[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07D261/18
C07C255/30 A61K 31/42
A61K 31/275 G01N 33/50

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98103677.5

[45] 授权公告日 2003 年 9 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1120160C

[22] 申请日 1998.1.26 [21] 申请号 98103677.5

[30] 优先权

[32] 1997. 1.28 [33] DE [31] 19702988.4

[71] 专利权人 阿文蒂斯药物德国有限公司

地址 联邦德国法兰克福

[72] 发明人 S·马勒纳 B·柯什博姆
W·施瓦伯

[56] 参考文献

CN – A – 1056684	1991.12.04	C07C255/29
US – A – 4284786	1981.08.18	C07D261/12
US – A – 4965276	1990.10.23	A61K31/42
US – A – 5268382	1993.11.07	A61K31/42
US – A – 5459163	1995.10.17	A61K31/42
WO – A – 9424095	1994.10.27	C07C255/15
WO – A – 9632965	1996.10.24	A61K39/395

审查员 姚 云

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 杨宏军

权利要求书 2 页 说明书 22 页

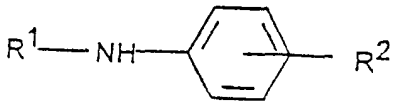
[54] 发明名称 异噁唑与巴豆酰胺衍生物及其在药学和诊断学中的用途

[57] 摘要

本发明涉及新的异噁唑与巴豆酰胺衍生物、它们的制备和作为药物的用途，以及它们作为抗原在制备抗体中的用途和它们在诊断及精制方法中的用途。

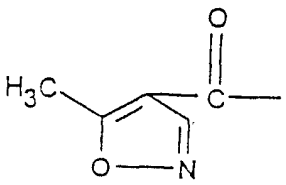
ISSN1008-4274

1. 式 I 化合物和/或式 I 化合物生理学上可允许的盐，可选地和/或式 I 化合物的立体异构体，



(I),

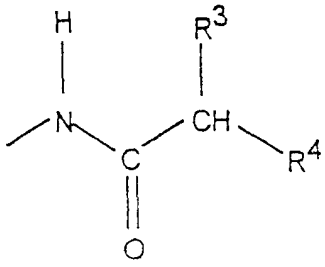
其中 R^1 为式 II 基团



(II)

R^2 为 a)-O-$(CH_2)_n$-CH=CH_2，其中 n 为 1、2 或 3 的整数，

b)式 V 基团



(V)

其中

R^3 为 1）卤素或

2）$-NH_2$，

R^4 为 1）氢原子或

2）氨基酸残基。

2. 如权利要求 1 的式 I 化合物，其中

R^1 为式 II 基团，

R^2 为

a)-O-CH_2-CH=CH_2，或

b)-NH-C(O)-CH(R^3)(R^4)，

其中 R^3 为溴、-NH_2 或氯，R^4 为氢原子。

3. 如权利要求 1 或 2 的式 I 化合物，其中式 I 的 R^2 基团位于苯环上“NH”

基的对位。

4. 如权利要求 1 的式 I 化合物，是

盐酸 5- 甲基异噁唑 -4- 羧酸（4-（2- 氨基乙酰氨基）苯基）酰胺，或 5- 甲基异噁唑 -4- 羧酸（4-（2- 溴乙酰氨基）苯基）酰胺。

5. 一种药物组合物，该药物组合物含有如权利要求 1 的式 I 化合物与一种药学上可允许的赋形剂。

6. 如权利要求 1 的式 I 化合物的用途，用于制备治疗癌症、炎症或自体免疫性疾病的药物组合物。

异噁唑与巴豆酰胺衍生物及其在药学和诊断学中的用途

本发明涉及新的异噁唑与巴豆酰胺衍生物、它们的制备和作为药物的用途，以及它们作为抗原在制备抗体中的用途和它们在诊断及精制方法中的用途。

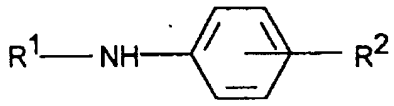
异噁唑与巴豆酰胺衍生物已被公开具有抗炎、免疫抑制或抗增生作用(EP0013376; EP0217206;EP0527736)。借助常规的色谱法，能对动物和人血清中的这些化合物进行分析检测。这些色谱法的缺点是仪器的成本高、样品制备步骤复杂和样品处理量低。

免疫检测与分析法快速、可靠，是色谱法的替代方法。使用这些替代方法的关键在于制备出适当的抗体。

本发明通过对异噁唑与巴豆酰胺进行改性处理，目的是使该适于制备抗体的化合物能与聚合物偶合，且能被用作放射免疫测定法的示踪剂。

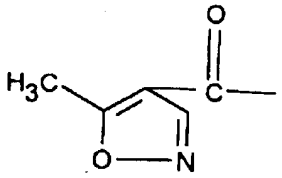
已发现式 I 化合物可实现该目的，其中在苯胺部分的芳环上，有一个或多个官能团，该官能团能与聚合物进行共价偶合，或者通过一个间隔基偶合。

因此本发明涉及式 I 化合物和/或式 I 化合物生理学上可允许的盐，可选地和/或式 I 化合物的立体异构体，

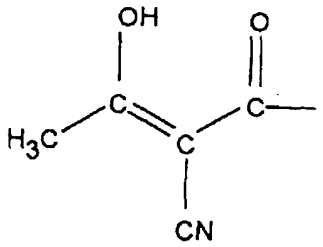


(I),

其中 R' 为式 II 或式 III 基团



(II)

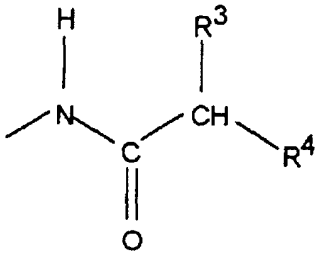


(III)

R^2为a)-O-$(CH_2)_n$-CH=CH_2，其中n为1、2或3的整数，

b)-O-$(CH_2)_m$-CH_2-卤素，其中m为1、2或3的整数，卤素为氟、氯、溴或碘，

c)式V基团



(V)

其中

R^3为1)卤素或

2)-NH_2，

R^4为1)氢原子或

2)氨基酸残基，或

d)-NH_2。

在优选的式I化合物中，

R^1为式II或式III基团，

R^2为a)-O-$(CH_2)_m$-CH_2-卤素，其中m为整数2，卤素为溴或碘，

b)-O-CH_2-CH=CH_2，或

c)-NH-C(O)-CH(R^3)(R^4)，

其中R^3为溴、-NH_2或氯，R^4为氢原子。

尤其优选的式 I 化合物例如

2 - 氰基 - 3 - 羟基丁 - 2 - 烯羧酸（4 - 烯丙氧基苯基）酰胺，

2 - 氰基 - 3 - 羟基丁 - 2 - 烯羧酸（4 -（3 - 碘代丙氧基）苯基）酰胺，

2 - 氰基 - 3 - 羟基丁 - 2 - 烯羧酸（4 -（2 - 氨基乙酰氨基）苯基）酰胺，

5 - 甲基异噁唑 - 4 - 羧酸（4 -（2 - 氨基乙酰氨基）苯基）酰胺，

2 - 氰基 - 3 - 羟基丁 - 2 - 烯羧酸（4 -（2 - 溴乙酰氨基）苯基）酰胺，

或 5 - 甲基异噁唑 - 4 - 羧酸（4 -（2 - 溴乙酰氨基）苯基）酰胺。

式 I 中 R^2 基团位于苯环上“NH”基的间位、邻位或对位，优选为对位。

式 I 化合物可选以光学异构体、非对映体、外消旋物或其混合物的形式存在。对“氨基酸”一词的理解是其含义包括下列化合物的立体异构体，如 D 型与 L 型：

天冬酰胺、缬氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、色氨酸、β - 丙氨酸、赖氨酸、脯氨酸、甘氨酸、γ - 氨基丁酸、Nε - 乙酰赖氨酸、Nδ - 乙酰鸟氨酸、Nγ - 乙酰二氨基丁酸、Nα - 乙酰二氨基丁酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、丙氨酸和酪氨酸。

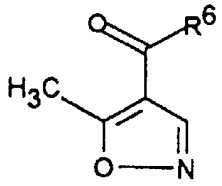
优选 L - 氨基酸。尤其优选为氨基酸残基 Gly 。

氨基酸残基由相应氨基酸衍生而来。可按照一般习惯使用氨基酸的简记符号。R^4 基团代表氨基酸各自的侧链。

式 I 化合物适当的生理学上可允许的盐例如碱金属盐、碱土金属盐和铵盐，包括有机铵碱的盐和质子化的氨基酸残基的盐。

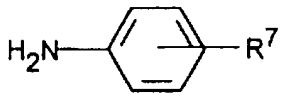
本发明也涉及式 I 化合物的制备方法和/或式 I 化合物生理学上可允许的盐，可选地和/或式 I 化合物的立体异构体，该制备方法包括

a) 将式 VI 化合物



(VI)

其中 R^6 为 OH、 Cl 或 Br，与式 VII 化合物



(VII)

其中 R^7 为 1) NH_2,

2) -NH-C(O)-CH_2-NH-保护基，其中保护基是一种胺保护基，如 Boc,

3) -NH-C(O)-CH_2-卤素，或

4) -OH，

进行反应得到式 I 化合物，其中 R^1 为式 II 基团， R^2 为-NH_2、-NH-C(O)-CH_2-NH-保护基、-OH 或-NH-C(O)-CH_2-卤素，或

b)将由方法 a)制得的化合物、其中的 R^7 为-OH，与一种烷基卤或一种二卤代链烷烃、其中的烷基部分具有 2 、 3 或 4 个碳原子，进行反应得到相应的式 I 化合物，或

c)将由方法 a)制得的化合物、其中的 R^7 为-OH，与一种不饱和烷基卤、其中的烷基部分具有 3 、 4 或 5 个碳原子，进行反应得到相应的式 I 化合物，或

d)将由方法 a)制得的化合物、其中的 R^7 为-NH_2，与一种诸如溴乙酰溴的羧酸卤进行反应得到式 I 化合物，其中的 R^2 为式 V 基团， R^3 为卤素， R^4 为氢原子，或

e)将一种诸如对苯二胺的芳族二胺与一种氨基被保护起来的氨基酸进行反应得到式 VII 化合物，其中的 R^7 为式 V 基团， R^3 为-NH_2， R^4 为被保护的氨基酸，然后按照方法 a)进行反应得到相应的式 I 化合物，或

f)除去由方法 a)或 e)制得的式 I 化合物的保护基，或

g)使由方法 a) - f)制得的化合物、其中的 R^1 为式 II 基团，转化为式 I 化合物，其中的 R^1 为式 III 基团，或

h)将由方法 a) - g)制得的式 I 化合物进行分离得到其游离形式，或者

可选地在酸根或碱性基的存在下，将其转化为生理学上可允许的盐.

在按照a)的方法步骤中，例如根据文献中已知的方法，可将异噁唑－4－羧酸（R^6为-OH）转化为一种酰基氯。例如在一种非质子传递溶剂（如甲苯、四氢呋喃(THF)或氯代烃）中将前者转化为亚硫酰氯或磷酰氯，然后在一种诸如THF或氯代烃的偶极性非质子传递溶剂中，使其与一种可选以适当方式被取代的芳胺外加一种诸如叔胺（如三乙胺或N－乙基吗啉）的有机碱进行反应。另一种方法是，添加一种肽化学中已知的缩合剂、如二环己基碳二亚胺从羧酸直接生成酰胺。第二种方法特别适用于进一步含有氨基或醇羟基的芳胺。

在b)或c)的方法步骤中进一步通过苯胺部分引入羟基的作用是

1)与一种烷基卤或诸如1,3－二碘代丙烷的二卤代链烷烃外加一种有机碱或诸如碳酸钾的无机碱反应，得到相应取代的araliphatic醚，其中在后一种情况下，通过使用适当过量的烷基化试剂或将烷基化试剂用作溶剂，可以避免二聚作用的产生，以使产物中烷基卤还保留有进一步使产物与固定相偶合的作用，或

2)在类似条件下，在一种诸如四氢呋喃(THF)、丙酮或氯代烃的偶极性非质子传递溶剂中与一种不饱和烷基卤反应，如烯丙基卤或炔丙基卤，优选为烯丙基溴，反应得到烯丙基醚或炔丙基醚，其中若将丙酮用作溶剂、碳酸钾用作碱，反应同时伴有如g)所述的异噁唑部分（式II基团）的开环反应。

在步骤d)中，在一种诸如THF或氯代烃的偶极性非质子传递溶剂中，使氨基与一种诸如溴乙酰溴的羧酸卤外加一种诸如叔芳胺（如三乙胺或N－乙基吗啉）的有机碱反应。

在步骤e)中，使用一种诸如二环己基碳二亚胺的缩合剂将诸如对苯二胺的芳族二胺转化为单酰胺，转化的方法是使用一种氨基被保护的氨基酸、如N－Boc－甘氨酸，然后如步骤a)所述生成N－某酰苯胺，最终在肽化学已知的标准条件下除去一直存在的胺保护基（步骤f））。

在步骤g)中，使由a)－f)制得的化合物发生碱诱导的异噁唑部分的开环反应，反应优选在一种水/有机溶剂混合物中进行，如THF/水或乙醇/水，并使用过量的有机或无机碱。如NaOH、氨水溶液或碳酸钾。

所提供的通式Ⅰ化合物呈非对映异构体或对映体的形式，在所选择的合成方法中得到的是其混合物，纯立体异构体是在可选地手性材料上通过色谱法进行分离得到的，或者，只要式Ⅰ的外消旋化合物能够成盐，通过使其与一种光学活性的碱或酸助剂生成非对映体的盐，然后对盐进行分步结晶，也能分离得到纯立体异构体。另一种方法与之原理相同，使用光学活性的酸，如（＋）－樟脑－10－磺酸、D－及L－酒石酸、D－及L－乳酸或（＋）－及（－）－扁桃酸，可将含有诸如氨基的碱基的式Ⅰ外消旋化合物转化为纯对映体。

本发明也涉及药物，该药物含有有效量的至少一种式Ⅰ化合物和/或式Ⅰ化合物的立体异构体和/或式Ⅰ化合物的生理学上可允许的盐，此外还含有药学上适用且生理学上可允许的赋形剂、添加剂和/或活性化合物及助剂。按照本发明的药物可经静脉内、胃肠外、局部、直肠或口服给药。

按照本发明的药物优选适用于癌症、炎症和自体免疫疾病的预防和/或治疗。

这些疾病例如包括风湿病、急性及慢性的肌肉、关节或胃肠道炎症、过敏性气管疾病、牛皮癣或自体免疫疾病，如系统性红斑狼疮(SLE)、Ⅱ型糖尿病、重症肌无力、斯耶格伦综合征、皮肤肌炎、硬化性皮炎或多发性硬化(MS)。癌症例如包括肺癌、白血病、淋巴结癌、脑瘤、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌或皮肤癌。

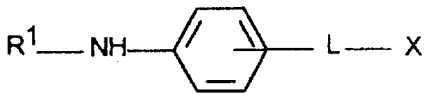
本发明也涉及本发明的药物的制备方法，该方法包括使用一种药学上适用且生理学上可允许的赋形剂，如果合适的话，进一步使用适当的活性化合物、添加剂或助剂，将至少一种式Ⅰ化合物制成适当的给药方式。

适当的固体或液体药物剂型例如包括颗粒、粉末、包衣片、片剂、（微）胶囊、栓剂、糖浆、药汁、悬浮液、乳液、滴剂或注射溶液，以及可持续释放活性化合物的制剂，在这些制剂中加入常规的助剂，如赋形剂、崩解剂、粘合剂、包衣剂、溶涨剂、滑动剂或润滑剂、矫味剂、甜味剂及增溶剂。经常被提到的助剂例如滑石，淀粉，碳酸镁，二氧化钛，乳糖，甘露糖醇及其它糖类，乳蛋白，明胶，纤维素及其衍生物，动物油及植物油，如鳕鱼肝油、葵花油、花生油或芝麻油，聚乙二醇，和溶剂，如灭菌水和单醇或多元醇、如甘油。

药物制剂优选以剂量单元的方式制备和给药，每个单元含有一定剂量按照本发明的式 I 化合物作为活性成分。在诸如片剂、胶囊、包衣片或栓剂的固体剂量单元的情况下，剂量可高达约 1000mg ，不过优选约为 50 至 300mg，在安瓿注射溶液的情况下，剂量可高达约 300mg，不过优选约为 10 至 100mg。在人和动物的前提下，若要治疗体重约 70kg 的成年病人，根据式 I 化合物的功效不同，口服每日剂量约为 50 至 3000mg 活性化合物，优选约为 150 至 1000mg，静脉内给药的每日剂量约为 50 至 1000mg，优选约为 100 至 300mg 。不过在某些情况下，每日剂量稍高或稍低也是可以的。每日剂量的服用可通过以单个剂量单元或若干小剂量单元进行单次给药来完成，或者通过细分的剂量以特定时间间隔进行多次给药来完成。

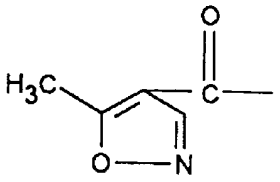
本发明进一步涉及的式 I 化合物可选地通过桥连原子与聚合物或固体偶合。

它们是式 IV 化合物

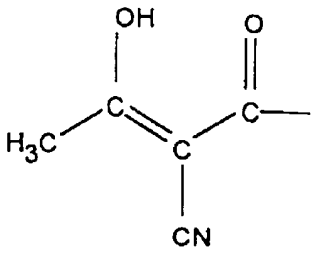


(IV),

其中 R^1 为式 II 或式 III 基团



(II)



(III)

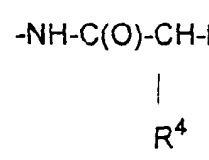
L 为桥连原子，来自

a)-O-,

b)$-NR^5-$，其中R^5为氢原子，

c)$-O-(CH_2)_n-CH_2-$，其中n为1、2或3的整数，

d)



其中R^3为a)共价键或

b)$-NH-$，

R^4为a)氢原子或

b)氨基酸残基，或

e)定义同a)至d)的桥连原子L，且具有一个间隔基，其中的间隔基为

1)$-NH-(CH_2)_m-S-$，其中m为1至12的整数，X为聚合物或固体。

式IV中“L-X”基团可以位于苯环上“NH”基的间位、邻位或对位，优选在对位。对“聚合物”一词的理解是其含义为合成或天然聚合物，例如聚苯乙烯、聚丙烯、聚氯乙烯、胶乳、多糖、琼脂糖、蛋白质、脂类、硅酸盐或核酸。聚合物可选地具有一个或多个选自-OH、-COOH、$-NH_2$及-CO-的官能团，以便该聚合物能与式I化合物进行偶合。式I化合物与固体偶合的一般方法例如BI申请手册，Ed.1994，图4.1(Merk AB, Uppsala, Sweden)所述。“固体”一词代表不溶物，它可被粒子化，或可形成诸如管状、珠状或微量滴定盘的几何形状。

优选的式IV化合物是式I化合物与固体或聚合物偶合后所形成的化合物。式IV化合物尤其优选为诸如5-甲基异噁唑-4-羧酸(4-(2-溴乙酰氨基)苯基)酰胺或2-氰基-3-羟基丁-2-烯羧酸(4-(2-溴乙酰氨基)苯基)酰胺的式I化合物与固体或聚合物偶合后所形成的化合物。

式IV化合物也适用于从细胞提取物、血清、血液或滑液中发现特殊结合蛋白质，适用于蛋白质的精制、微量滴定盘的校准或色谱原料的制备，尤其适用于亲和色谱法原料的制备。用于精制的蛋白质直接与结合在聚合物或固体上的式I化合物发生相互作用。化合物也适用于诊断学领域。

一个特别恰当的式IV化合物固体是®BIA Core CM5片或固定相，供色谱研究或分离及微量滴定盘之用。

例 1

5－甲基异噁唑－4－羧酸（4－（2－溴乙酰氨基）苯基）酰胺

步骤 a) 5 －甲基异噁唑－ 4 －羧酸（ 4 －氨基苯基）酰胺

将 10.1g (0.08mol) 5 －甲基异噁唑－ 4 －羧酸与 8.65g (0.08mol) 对苯二胺溶于 300ml 四氢呋喃，并加入 18.05g (0.088mol) 二环己基碳二亚胺。 5 小时 (h) 后，用空吸法滤除所沉淀出来的沉淀物，有机相浓缩，产物经硅胶色谱，用乙酸乙酯/石油醚外加 1 % 冰醋酸洗脱，然后从乙酸乙酯/石油醚中结晶。产出： 6.8g 乙酸盐，熔点 123 ℃至 128 ℃。

步骤 b) 5 －甲基异噁唑－ 4 －羧酸（ 4 －（ 2 －溴乙酰溴）苯基）酰胺

首先将 2.17g (0.01mol) 来自步骤 a) 的产物与 1.9g (0.016mol) N －乙基吗啉导入 50ml 四氢呋喃中，在冰水浴中，再滴加 2.4g (0.012mol) 溴乙酰溴溶液，然后在室温下将混合物搅拌 5h 。加入 5ml 水后，用 1N 的 HCl 酸化至 pH2 ，产物用乙酸乙酯萃取，有机相用水洗涤，干燥并浓缩。产物从乙酸乙酯/石油醚中结晶。产出： 2.0g ，熔点 179 ℃。

^{1}H-NMR: (DMSO-d_6) 2.7 (s, 3H), 4.05 (s, 2H), 7.5-7.75 (m, 4H), 9.1 (s, 1H), 10.1 与 10.45 (每个均为 sb, 1H)

例 2

2－氰基－3－羟基丁－2－烯羧酸（4－（2－溴乙酰氨基）苯基）酰胺

将 0.5g (0.0015mol) 例 1 产物溶于 10ml 四氢呋喃，在冰冷却下加入 2ml 1N 的 NaOH 水溶液。反应在 TLC 的监视下进行，反应完成后（大约 60 － 90min 后），用 2.25ml 1N 盐酸水溶液酸化并加入 100ml 水，使产物沉淀出来，过滤、用水洗涤，然后边搅拌边用少量乙酸乙酯洗涤，再减压干燥。产出： 0.28g ，熔点大于 210 ℃。

^{1}H-NMR: (DMSO-d_6) 2.28 (s, 3H), 4.04 (s, 2H), 7.4-7.7 (m, 4H), 8.5-10 (sb, 1H), 10.4 (sb, 2H)

例 3

盐酸 5－甲基异噁唑－4－羧酸（4－（2－溴乙酰氨基）苯基）酰胺

步骤 a) 2 －叔丁氧基羰基氨基乙酰氨基－对苯二胺

将 8.65g (0.08mol) 对苯二胺与 15.3g (0.088mol) N － Boc －甘氨酸溶于

300ml 无水四氢呋喃(THF)，再分次加入 18.05g(0.088mol)二环己基碳二亚胺。 5h 后，用空吸法滤除所沉淀出来的沉淀物，滤液浓缩，产物经硅胶色谱法精制，用乙酸乙酯/甲醇/乙酸洗脱，然后从乙酸乙酯/石油醚中结晶。

产出： 13.5g，熔点 144 ℃。

步骤 b) 5 - 甲基异噁唑 - 4 - 碳酰氯

首先将 127.1g(1.0mol) 5 - 甲基异噁唑 - 4 - 羧酸导入 11 甲苯中，再滴加 129.8g(1.1mol) 亚硫酰氯，然后将混合物加热至 80 ℃达 6h 。减压浓缩至约一半体积，所得甲苯溶液直接用于下面的反应。

步骤 c) 5 - 甲基异噁唑 - 4 - 羧酸（4 -（2 - 叔丁氧基羰基氨基乙酰氨基）苯基）酰胺

首先将 13.5g(0.05mol) 的步骤 a) 产物与 7.6ml(0.06mol) N - 乙基吗啉导入 100mlTHF 中，再在 0 ℃下滴加 30ml 来自步骤 b) 的溶液（相应为 0.06mol ）。混合物进一步在室温下搅拌 5h ，用柠檬酸水溶液进行水解，产物用乙酸乙酯萃取，用水洗涤，用硫酸钠干燥并减压浓缩。产出： 12g ，熔点 139 ℃。

步骤 d) 盐酸 5 - 甲基异噁唑 - 4 - 羧酸（4 -（2 - 氨基乙酰氨基）苯基）酰胺

将 6g(0.017mol) 的步骤 c) 产物溶于 180ml 二氯甲烷，并加入 18ml 三氟乙酸。混合物在室温下搅拌 1h ，浓缩，溶于乙醇后加入过量乙醇 HCl 并浓缩，边搅拌边用乙酸乙酯洗涤残余物，使产物转化为盐酸盐。产出： 2.5g ，熔点 210 ℃。

^{1}H-NMR: (DMSO-d_6) 2.7(s,3H)， 3.7-3.9(m,2H)， 7.6 与 7.72(每个均为 2H， AA′BB′)， 8.25(sb,2H)， 9.3,10.2 与 10.75(每个均为 s,1H)

例 4

三氟乙酸 2 - 氰基 - 3 - 羟基丁 - 2 - 烯羧酸（4 -（2 - 氨基乙酰氨基）苯基）酰胺

将 6g(0.017mol) 的例 3 步骤 c) 产物溶于 20ml1N 氢氧化钠溶液/2ml 乙醇，混合物在室温下搅拌，直至完成开环反应（大约 3h ）。用柠檬酸酸化后，得到固态 Boc-被保护的产物，在空吸滤器上过滤并干燥（熔点 189 ℃，产出 5.5g ）。将 5g 该中间产物在二氯甲烷中用三氟乙酸处理，方法与例

3d)相似，借助于乙酸乙酯与石油醚使所得产物从乙醇中以三氟乙酸盐的形式结晶析出。产出： 5.0g，熔点209 ℃。

^{1}H-NMR: (DMSO-d_6) 2.15(s, 3H)， 3.7-3.85(m, 2H)， 7.49(s, 4H)，8.1(sb, 3H)， 10.3与11.2(每个均为sb, 1H)

例5

2 －氰基－ 3 －羟基丁－ 2 －烯羧酸（ 4 －（ 3 －碘代丙氧基）苯基）酰胺

步骤a)5 －甲基异噁唑－ 4 －羧酸（ 4 －（ 3 －碘代丙氧基）苯基）酰胺

将6.5g(0.03mol)5 －甲基异噁唑－ 4 －羧酸（ 4 －羟苯基）酰胺溶于57ml(0.5mol)1,3 －二碘代丙烷，在剧烈搅拌下加入 26.2g(0.19mol)精细研磨过的碳酸钾。大约4h后反应完全。通过过滤、浓缩和借助于乙酸乙酯/石油醚1:1外加1 %冰醋酸而进行的硅胶色谱完成操作。产出： 6.7g。

步骤b)2 －氰基－ 3 －羟基丁－ 2 －烯羧酸（ 4 －（ 3 －碘代丙氧基）苯基）酰胺

将5.5g的步骤a)产物在200ml约1N的甲醇铵溶液中处理，直至完成开环反应，混合物浓缩，将残余物溶于稀乙酸，借助于乙酸乙酯/石油醚外加1 %冰醋酸进行色谱分离，然后使产物从乙酸乙酯/石油醚中结晶析出。产出： 2.3g，熔点149 ℃。

^{1}H-NMR: (DMSO-d_6)2.1-2.4(m, 2H 与 s, 3H, 2.3ppm)， 3.4 与 4.02(每个均为t, 2H)， 6.92 与 7.42(每个均为 2H, AA′BB′)， 7.2-8.5(ssb, 1H)，10.2(s, 1H)

例6

2 －氰基－ 3 －羟基丁－ 2 －烯羧酸（ 4 －烯丙氧基苯基）酰胺

将1.5g(0.0068mol)5 －甲基异噁唑－ 4 －羧酸（ 4 －羟苯基)酰胺溶于丙酮，加入5.8ml(0.068mol)烯丙基溴并在剧烈搅拌下加入9.3g(0.068mol)精细研磨的碳酸钾，然后混合物在室温下搅拌过夜。过滤后的滤液浓缩，将残余物溶于水，从乙酸乙酯/石油醚中重结晶。产出： 0.8g，熔点 162 ℃至164 ℃。

^{1}H-NMR: (DMSO-d_6)2.3(s, 3H)， 4.45-4.63(m, 2H)， 5.15-5.38(m, 2H)， 5.9-

6.2 (m,1H), 6.95 与 7.42(每个均为 2H,AA′BB′), 10.0(sb, 1H), 12.5-14.5(ssb,1H)

药理实验

用体外增生试验细胞培养物测定式 I 化合物的活性。

例 7

增生试验

将 10l 含有 L - 谷氨酰胺、不含 $NaHCO_3$ 的粉末型 Clicks/RPMI 1640 培养基(50:50) (Seromed, Biochrom, Berlin, FRG)溶于 91 重蒸馏水，无菌过滤后灌瓶，每瓶装 900ml 。

洗涤培养基

将900ml 基本培养基用 9.5ml7.5 % 增强型碳酸氢钠溶液和 5mlHEPES (N - 2 - 羟乙基哌嗪 - N - 2 - 乙烷磺酸) (Gibco, Eggenstein, FRG)进行缓冲处理。

实用培养基

向 900ml 基本培养基中加入 19ml$NaHCO_3$溶液 (7.5 %; 10mlHEPES 溶液和 10mlL - 谷氨酰胺溶液(200mM)) 。

该用于促细胞分裂剂诱导的淋巴细胞增殖的培养基是实用培养基，该培养基用 1 % 热灭活的 (30min, 56 ℃) 胎牛血清 (FCS) 增菌。

肿瘤细胞培养基

为维持肿瘤细胞和杂交瘤的生长，制得含有 5 % FCS 的实用培养基。

细胞系培养基

为维持细胞系的生长,将 900ml 含有 10 % FCS 的实用培养基、 10ml NEA (非必需氨基酸) 溶液(Gibco)、 10ml 丙酮酸钠溶液(100mM, Gibco)和 5ml10^{-2}M 巯基乙醇混合。

用于促细胞分裂剂诱导的淋巴细胞增生的脾细胞的获得和处理

将小鼠用颈脱位法处死，在无菌条件下取出脾。脾在 80 目无菌筛上切碎，再用塑料注射器(10ml)的活塞小心地将其滤入含有实用培养基的佩特里细菌培养皿中。为除去脾细胞悬浮液中的红细胞，将混合物在室温下恒温约 1min，同时在低渗的 0.17M 氯化铵溶液中不时振摇。红细胞在此过程中被溶解了，而淋巴细胞的存活性与反应性均不受影响。离心(7min/340g)

后，弃去溶解物，将细胞洗涤两次，再溶于各自的试验培养基中。

促细胞分裂剂诱导的淋巴细胞增生

将来自雌性NMRI小鼠的5 × 10^5个处理过的脾细胞与各种促细胞分裂剂和制剂（式 I 化合物）一起用移液管移入平底微量滴定盘每个小穴的 200 μ l 试验培养基中。使用下列浓度的促细胞分裂剂和制剂:

伴刀豆球蛋白A(Serva): 0.5-0.25-0.12 μ g/ml

脂多糖(Calbiochem): 1.0-0.5-0.1 μ g/ml

植物血凝素(Gibco): 0.5-0.25-0.12 % 储备溶液

美洲商陆促细胞分裂剂(Gibco)化合物1或2:

50, 25, 10, 7.5, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 μ mol

加入促细胞分裂剂而不含制剂的组定义为阳性对照。阴性对照是含有制剂而没有促细胞分裂剂加入的培养基细胞。对于所有浓度的制剂，每个浓度的促细胞分裂剂均试验四次。以37 ℃/5 % CO2恒温48h后，向细胞中加入具有 0.25 μ Ci/穴(9.25 × 10^3Bq)活性的 25 μ l/穴氚－胸苷(Amersham)。然后在同样条件下进一步恒温16h。为对一批试验进行评价，用细胞收集器（Flow实验室）将细胞收集在滤纸上，将没有结合进来的胸苷单独收集在一个废瓶中。滤纸干燥、穿孔，再与2ml闪烁剂(Rotiszint 22, Roth)一起加入到闪烁剂容器中，然后将该容器在4 ℃下进一步冷却2h。用β－计数器(Packard, Tricarb-460c)定量测量细胞所具有的放射性。

肿瘤细胞的制备与增生试验所用的细胞系

试验所用肿瘤细胞或细胞系取自处于对数生长期的储备溶液，用洗涤介质洗涤两次，并使其悬浮在适当的介质中。

增生试验的进行与评价

在圆底微量滴定盘中进行增生试验。将式I化合物与白细胞间介素分别溶于50 μ l/穴的适当介质中，用100 μ l/穴调整细胞数量(5 × 10^5)，使最终体积为200 μ l/穴。在全部试验中，各试验数据均测定四次。不含制剂也不含生长因子的细胞定义为阴性对照，不含制剂而含有生长因子的细胞作为阳性对照。从所有测定值中减去阴性对照值，并将阳性对照与阴性对照之差设为100 %。

将微量滴定盘以37 ℃/5 % CO2恒温72h，测定相应的促细胞分裂剂诱

导的淋巴细胞增生的增生率。细胞系由美国典型培养物保藏中心（ ATCC ）获得。

表 1 为达到 50 % 抑制时的浓度:

根据实施例的式 I 化合物	细胞系		
	A20.2.J(μ M)	EL4(μ M)	K562(μ M)
1	0.8	0.8	50
2	15.0	6.0	20
5	50.0	25.0	未检测到

例 8

将例 2 化合物结合在®BIA core CM5 基质上的方法

原料是来自 Pharmacia Biosensor 公司的 CM5 片，它具有一个羧甲基葡聚糖表面（ BI 申请手册， Ed. 1994, Merk AB, Uppsala, Sweden ）。偶合步骤均在 5 μ l/min 的流速下进行。所有步骤均在 25 ℃下进行，并使用 pH7.4 的 Hepes 缓冲盐水(HBS)作为操作缓冲液。

第 1 步: 用 35 μ l 0.05M 的 NHS （ N - 羟基琥珀酰亚胺）与 0.2M 的 EDC （ N - 乙基 - N′ - （二甲氨基丙基）碳二亚胺）的 1:1 混合物活化基质片的表面。

第 2 步: 35 μ l 40mM 二盐酸胱胺溶液用 0.1M 硼酸钠缓冲至 pH8.5 。

第 3 步: 用 35 μ l pH8.5 的盐酸乙醇胺饱和基质结构中未被占用的部分。

第 4 步: 35 μ l 0.1M 二硫苏糖醇用 0.1M 硼酸钠缓冲至 pH8.5 。

第 5 步: 35 μ l 含有例 2 化合物的溶液(10mg/ml)用 0.1M 硼酸钠缓冲至 pH7.5 。

例 9

用于分析的®BIA core 法

基本上按照《 Current Biology 》（ 3 卷 12 期， 1993， 913 - 915 页）所述方法进行分析。

系统: ®BIA core 2000 及相应软件， Pharmacia Biosensor AB, Uppsala,

Sweden

片 ： CM5 传感片， Pharmacia Biosensor AB

覆盖： 同例 8

操作缓冲液： HBS 缓冲液，由 BIA 认证， Pharmacia Biosensor AB

流速： 10 μ l/min

注射： 每 50 μ l 供分析的样品有 5min 的缔合期

冲洗时间： 180sec 3min 离解期

再生： 2 × 15sec，用 0.05 % 十二烷基硫酸钠

A) 不同血清白蛋白的结合

类型	共振单元
牛	50
人	294
大鼠	1061
小鼠	151
雏鸡	8
猴	480
绵羊	331

“共振单元”一词指的是与蛋白质结合数量成比例的量化单元数。

B) 不同脱氢酶的结合

酶	共振单元
磷酸甘油醛 DH (25nM)	69
磷酸甘油醛 DH (50nM)	148
磷酸甘油醛 DH (100nM)	297
磷酸甘油醛 DH (250nM)	603
二氢乳清酸 DH (50nM)	203
二氢乳清酸 DH (100nM)	425
二氢乳清酸 DH (250nM)	1064
丙酮酸激酶 (50nM)	85
丙酮酸激酶 (100nM)	189
丙酮酸激酶 (250nM)	505

DH 代表由酶决定的脱氢酶。

在指定的蛋白质浓度下，将所研究的脱氢酶成键强度彼此之间进行了比较。蛋白质浓度为 1 μ M 时，二氢乳清酸 DH 成键能力最强，其后是乳酸 DH、磷酸甘油醛 DH 和丙酮酸激酶。

例 10

亲和色谱法

例 1 化合物通过其中的可反应性的溴与载体基质偶合。所用载体基质为 Fractogel® EMD-SH (Merk KGaA, Darmstadt)。按照 DE4310964 中所说明的标准条件形成共价键。将所得到的凝胶装入 Superformance® (1cm × 5cm) 柱 (Merk KGaA)，再连接在高效液相色谱 (HPLC) 上。

可溶性细胞蛋白质的获得

将 RAW264.7 株 (ATCC 菌种保藏中心) 培养 48 小时 (h)，直至出现细胞融合时为止，用冷的 4 ℃ PBS 缓冲液洗涤三次，洗去培养基，再将细胞移至 PBS 缓冲液中，以 200g 离心 10min。在 4 ℃下进行细胞处理。再将细胞团悬浮在缓冲液 A 中，缓冲液 A 由 20mM 的 tris 碱、2mM 的 $MgCl_2 \times 6H_2O$ 与 1mM 二硫苏糖醇 (DTT) 组成。加入各种蛋白酶抑制剂，以防止发生由细胞内源性蛋白酶引起的质子迁移作用。然后将混合物在玻璃罐中搅匀。然后将

悬浮液在4℃下以22000g离心30min，得到可溶性蛋白质。

立即将上清液用于亲和色谱法分析。将上清液等分两份，一份留作参照，另一份泵入亲合柱。

HPLC

亲和色谱法使用意大利米兰Kontron仪器公司的设备。系统的组成为自动进样器465、HPLC泵422与422S、高压混合阀M800、Besta马达阀和二极管矩阵检测器440。数据的记录和分析由数据系统450－MT2/DAD系列完成。细胞上清液用水稀释至体积为30ml，以1ml/min的流速注入。收集流出液，在4℃下贮藏，作为馏分直至色谱完成。

下列缓冲液用于蛋白质的梯度洗脱:

PBS缓冲液的组成:

NaCl	8.00g/l
KCl	0.20g/l
KH_2PO_4	0.20g/l
$NH_2HPO_4 \times 7H_2O$	2.16g/l

表2中所用缓冲液的组成:

缓冲液	组成
1	PBS
2	PBS+0.5M NaCl
3	PBS+150mM A771726b（N－（4－三氟甲苯基）－2－氧基－3－羟基巴豆酰胺的钠盐）
4	H_2O
5	6M尿素
6	60％乙腈+0.1％三氟乙酸(TFA)

注入蛋白质溶液后，以3ml/min的流速开始如表2所示的梯度洗脱。

表 2：

时间(min)	梯度	馏分
0 - 10	H_2O (4)	1
10 - 15	梯度至 PBS (1)	2
15 - 20	PBS (1)	
20 - 35	梯度至 PBS+0.5M NaCl (2)	3
35 - 40	PBS+0.5M NaCl (2)	
40 - 50	梯度至 PBS (2)	
50 - 55	PBS (1)	4
55 - 70	梯度至 PBS+制剂 (3)	5
70 - 75	PBS+制剂 (3)	
75 - 90	H_2O (4)	6
90 - 100	尿素 (5)	7
100 - 110	H_2O (4)	8
110 - 120	乙腈 (6)	9

各栏中的数字与所用缓冲液有关。

收集馏分，在 4 ℃下以水渗析 48h （不受所用 6000 - 8000Da 渗析膜的限制）（与乙腈馏分无关），然后冷冻干燥。

蛋白质测定

冷冻干燥后，将蛋白质溶于 1ml 1 %十二烷基硫酸钠(SDS)并用水稀释至 SDS 浓度为 0.5 %。取该溶液的等分试样用于蛋白质测定，测定时使用 BCA 试验(Pierce)。将蛋白质蒸干(UNIVASPO 150H, UniEquip Power Heater, Martinsried, Germany)，然后溶于适当体积的样品缓冲液，该缓冲液由 10g 蔗糖、 9ml 0.25M tris/1M 甘氨酸溶液、 7.8ml 10 % SDS 、 2.5ml 溴酚蓝 (0.1 %)、 4ml β - 巯基乙醇和 1.7ml 水组成。

SDS - PAGE

为制备具有 10 - 17 %聚丙烯酰胺梯度的 SDS 凝胶，制得下列溶液。

A：		B：	
5ml	丙烯酰胺(30 %, 0.5 %)	8.5ml	丙烯酰胺(30 %, 0.5 %)

3.75ml tris(3M,pH8.8)	3.75ml tris(3M,pH8.8)
6.12ml 水	3.275ml 甘油
0.15ml SDS	0.15ml SDS

加入100μl 10%APS与12.5μl TEMED后即开始进行聚合反应。由3ml丙烯酰胺(10%,0.5%)、1.36ml水、1.45ml 0.5M tris(pH6.8)、60μl 10% SDS、106μl 10% APS与9μl TEMED制得收集用凝胶。

为制备分析凝胶，每道(track)装入10μg蛋白质，得100μg制备凝胶。

通过与标准蛋白质混合物进行对比，测定分子量。

序列

蛋白质馏分在分析凝胶中表现为浓缩的蛋白质带，以制备级水平进行分离，分离后的蛋白质吸留在PVDF膜(Millipore)上固定。蛋白质用考马斯染料(Coomassie)染色，使其显色，然后直接进行埃德曼(Edman)降解反应。在考马斯染色过的凝胶上进行电泳，之后小心地切断被保护的N-末端，再用水洗至中性。用两片孔径分别为100μm和32μm的钢筛彼此叠在一起，将凝胶压成小片状，使其均化。将该软膏样物质在UNIVAPO 150H(UniEquip Power Heater, Martinsried, Germany)中干燥至较少水分残留。在一种由pH8.5的25mM HCl tris与1mM EDTA组成的缓冲液中，将如此得到的蛋白质与LysdC内蛋白酶(Boehringer Mannheim)（酶与蛋白质的比例约为1:10）在37℃下恒温7h，使蛋白质断裂为肽。

所得肽用1ml 60%乙腈和1ml 0.1% TFA在37℃下洗脱两次，时间为4h。合并洗脱液，在UNIVAPO中蒸干，所得肽用反相色谱法分离。色谱分离用LiChroCART®125-2 Superspher®60柱，所用线性梯度(1%/min)为A: 0.1% TFA水溶液至B: 0.1% TFA乙腈溶液，时间为70min。

精制过的肽的氨基酸序列按照埃德曼降解反应原理用477A气相序列分析仪(Applied Biosystems)进行分析。PTH-AA用120A苯硫乙内酰脲氨基酸分析仪(Applied Biosystems)在269nm下进行鉴别。

Western斑点分析

将蛋白质从SDS凝胶转移至PVDF膜(Millipore)上后，使未被覆盖的区域与5升、pH7.4的2.5%鸡白蛋白(Sigma)的TBS溶液恒温2h，将该区

域保护起来，TBS 由 45g NaCl 、 30.3g tris 碱组成。

第一种抗体用保护缓冲液稀释至适当比例，恒温 1h 。然后用 TBS 与 0.1 % 吐温 20 洗涤斑点三次，时间为 5min ，再与 POD 标记的第二种抗体恒温 1h 。重复洗涤过程，借助于 60mg 4 - 氯 - 1 - 萘酚、 20ml 甲醇、 100ml TBS 与 200 μ l 过氧化氢(30 %)的溶液使结合抗体显色。

借助于 7 至 14 氨基酸长度的肽可对 NaCl (3) 与 A771726b(5) 馏分中所得到的蛋白质进行鉴别（见表 2 ）。若蛋白质为 22kDa ，所测氨基酸序列可能被确定为两种蛋白质， MSP23 与 NKEF-A 。其原因在于这两种蛋白质序列的高度同源性，为 93 % 。亲和色谱法的序列结果总结在表 3 中。

表 3：

馏分	蛋白质	氨基酸序列	MW(Da)
NaCl (3)	乳酸 DH M 链(LDH-A)	SADTLWGIQK	36498
	环啡林 A	TAENFRALSTGEK	17971
A77 1726B(5)	HSP90-β (HSP84)	EQVANSAFVERVRK	83185
	HSP70(HSC73)	EIAEAYLGK	70871
	丙酮酸激酶 M_2	GPEIRTGLIK	57755
	EF1-α	STTTGHLIYK	50164
	肌动蛋白(γ-链)	EITALAPSTMKRGILTLK	41876
	GAPDH	VIPELNGK	35679
	苹果酸 DH	ITPFEEKVVE--FV	35596
	乳酸 DH	NLRRVHP	36367
	磷酸甘油酸变位酶	PMQFLGDEETVRK	28635
	MSP23/NKEF-A	ATAVMPDGQFK	22176

根据表 2 ，馏分编号以柱的馏分进行划分。

对鉴别出来的蛋白质的说明

浓缩馏分(3) 中的 18kDa 蛋白质经鉴别为环啡林 A 。环啡林 A 属于一大类肽基丙基顺式/反式异构酶，该类酶与很多免疫抑制剂的作用机理有关，如环孢菌素 A 。

在馏分(3)中还鉴别出了乳酸脱氢酶，它是一种厌氧的糖原酵解酶，该种酶催化丙酮酸转化为乳酸反应的进行。乳酸脱氢酶在动物组织中至少具有五种同功酶的形式。骨骼肌中的同功酶一般含有四个 A 链，而心脏中的同功酶主要含有四个 B 链。本试验中鉴定出来的是一种来自乳酸脱氢酶 A 链的肽。

在馏分(5)中鉴别出来的两种蛋白质属于热激蛋白质。热激蛋白质 HSP70 主要存在于真核生物中，是多基因类蛋白质的一种。

热激蛋白质 HSP90 是一种即使在正常条件下也被表达的胞液蛋白质。它由两个分离的基因成分组成， HSP84 与 HSP86 ，二者彼此的序列同源性为 86 %。已知 HSP90 与固醇类激素受体形成配合物，并以此方式干预某些基因的转录。

在馏分(5)中另外还发现了三种糖原酵解的蛋白质，它们是甘油醛－ 3 －磷酸脱氢酶(GAPDH)、丙酮酸激酶 M_2 和磷酸甘油酸变位酶。这三种酶来自糖原酵解初期，在天然条件下存在于多酶配合物中。

在馏分(5)中还有一条非常明显的浓缩带，经鉴别为延伸因子(EF-1 α)。 EF-1 α是一种真核生物重要的转译因子。其作用与原核生物延伸因子 EF-Tu 相当，在 GTP 依赖的蛋白质生物合成过程中将氨酰基－ tRNA 从胞液中转运至其在核糖体上的受体部位。

另外在馏分(5)中还可能检测到肌动蛋白。肌动蛋白是一种大量存在于真核生物中几乎各处的蛋白质。它是肌肉组织和细胞骨架的主要成分。肌动蛋白多基因类代码有至少四种肌肉肌动蛋白形式和两种细胞质肌动蛋白形式（ β －与 γ －肌动蛋白）。此处的肌动蛋白为细胞质肌动蛋白形式的 γ 链。

还鉴别出柠檬酸循环酶、苹果酸－天冬氨酸往复酶和苹果酸脱氢酶。苹果酸脱氢酶存在于动物组织胞液与线粒体的异构重整方式中。苹果酸－天冬氨酸在胞液与线粒体之间往复，在此过程中这两种同功酶与天冬氨酸转氨酶起到重要作用。

馏分(5)中 22kDa 蛋白质根据肽片段的序列被确认为两种蛋白质：巨噬细胞 23kDa 应激蛋白(MSP23)，也被称为成骨细胞特异因子 3(OSF-3)，和“自然杀伤细胞促进因子－ A ”(NKEF-A)。巨噬细胞被激活后产生反应性氧化

合物，如 H_2O_2 和 O_2。由于它们本身耐受该氧化应激反应，它们必须具有保护系统的作用，以保护它们不受这些反应性化合物的影响。NKEF 是一种来自人红细胞的胞液蛋白质，能提高自然杀伤细胞的活性。作为淋巴细胞，在细胞激动素的刺激下，能够识别大量肿瘤细胞并进行破坏。“自然杀伤细胞促进因子”的分子量为 44kDa，由两种同等大小的亚单元组成(NKEF-A 与 NKEF-B)，二者的相互序列同源性较好，为 88 %。

例 11

没有刺激物作用的、用 LPS 刺激的、和用 LPS 刺激并用来氟米物（leflunomide）处理的 RAW264.7 胞液提取物的亲和色谱法比较

用脂多糖刺激 RAW264.7 巨噬细胞系，作为体外炎症模型。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌外膜结构的必要组成成分，几乎所有的免疫细胞都能识别它。尤其是巨噬细胞在被 LPS 刺激作用激活后，合成大量细胞激动素，如 TNF－α、IL－1 和 IL－6。在使用脂多糖的同时给以免疫调节剂来氟米物，可以防止刺激作用可能引起的蛋白质类型的变化。

RAW264.7 细胞用 10ng LPS/ml 培养基恒温 24 小时。对于用 LPS 刺激并用来氟米物处理的细胞，同时用 60 μM A771726B 恒温 24 小时。细胞经处理得到的胞液提取物用于亲和色谱法研究，按照例 10 借助于 Fractogel® 柱进行色谱分析。这三批试验制得的馏分上样到分析梯度凝胶中，彼此进行比较。

在 35kDa 附近的带特别增强了，经序列分析鉴别为苹果酸脱氢酶。与另一条蛋白质的带相比，这些带的强度显著提高了，而用 LPS 与 A771726B 恒温的另一条带强度较弱。