



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00813705.6

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1137888C

[22] 申请日 2000.9.18 [21] 申请号 00813705.6
 [30] 优先权
 [32] 1999.9.17 [33] WO [31] PCT/KR99/00561
 [32] 1999.11.4 [33] KR [31] 1999/48608
 [86] 国际申请 PCT/KR00/01047 2000.9.18
 [87] 国际公布 WO01/21600 英 2001.3.29
 [85] 进入国家阶段日期 2002.4.1
 [71] 专利权人 株式会社 LGCI
 地址 韩国汉城
 [72] 发明人 金恩璟 朴美贞 李太熙 张惠卿
 朴泰教 姜昌律 金映明 文光律
 吴映林 闵昌熙 郑贤镐
 审查员 陈 真

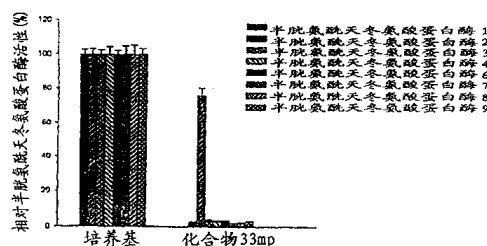
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
 标事务所
 代理人 唐晓峰

权利要求书 12 页 说明书 118 页 附图 16 页

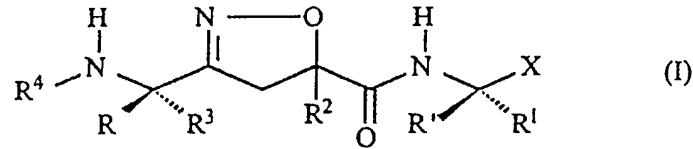
[54] 发明名称 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂

[57] 摘要

本发明涉及式(I)的异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯和立体化学异构体形式,以及该衍生物用于抑制半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性的用途。本发明还涉及用于预防炎症和细胞凋亡的药物组合物及其制备方法,该组合物含有异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯和立体化学异构体形式。本发明的衍生物可有效地用于治疗由于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶所引起的疾病,例如其中的细胞是异常死亡的疾病、痴呆、脑中风、AIDS、糖尿病、胃溃疡、由肝炎引起的肝细胞损害、败血症、器官移植排斥反应和抗炎反应。



1. 式(I)的异噁唑啉衍生物, 其可药用盐、酯和立体化学异构体形式



其中

R 和 R' 彼此独立地表示氢、低级烷基链 (-SAC)、低级环烷基 (-SCAC)、芳基 (-Ar) 或被芳基取代的低级烷基链 (-SAC-Ar);

R¹ 表示 -SAC、-SCAC、-Ar 或 -SAC-Ar, 或者表示氨基酸的侧链或 $-(\text{CH}_2)_n\text{COOZ}$ (其中 n 是 1 或 2, Z 是氢、-SAC、-Ar 或 -SCAC);

R³ 表示 -SAC、-SCAC、-Ar、-SAC-Ar 或氨基酸的侧链;

R² 表示 -H、-SAC、-SCAC、-Ar 或 -SAC-Ar, 或者表示氨基酸的侧链, 或表示 $-(\text{CH}_2)_n(\text{O})_m\text{R}^5$ (其中 R⁵ = -SAC、-SCAC、-Ar、-SAC-Ar; n = 0, 1 或 2; m = 0 或 1), 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{OC}(=\text{O})\text{R}^6$ (其中 R⁶ = -SAC、-SCAC、-Ar 或 -SAC-Ar; n = 1 或 2);

R⁴ 表示

a) 氨基酸残基, 其中①与氨基酸的手性碳相连的羧基与氨基结合形成酰胺键, ②氨基酸的手性碳具有 R 或 S 构型, ③与氨基酸的手性碳相连的氨基被甲酰基、乙酰基、丙基、环丙基羰基、丁基、甲磺酰基、乙磺酰基、丙磺酰基、丁磺酰基、甲氧羰基、乙氧羰基、丙氧羰基、丁氧羰基、甲基氨基甲酰基、乙基氨基甲酰基、丙基氨基甲酰基、丁基氨基甲酰基、二甲基氨基甲酰基、二乙基氨基甲酰基、二丙基氨基甲酰基、

基甲酰基、二丁基氨基甲酰基或环丙基氨基羰基保护，或者该氨基可被氢原子代替，④侧链中的羧基可以和-SAC或-SCAC形成酯基，

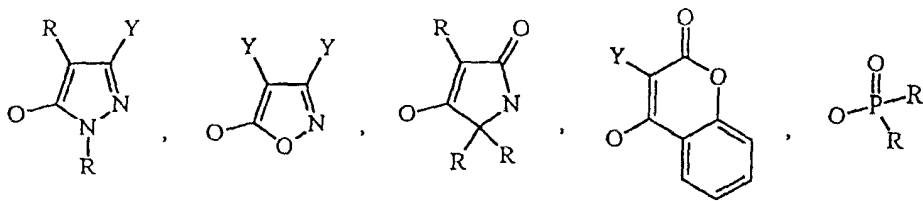
b) $-C(=O)R^7$ (其中 $R^7 = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 、 $-SAC-Ar$)、 $-CO_2R^8$ (其中 $R^8 =$ 氢或 R^7)、 $-C(=O)NR^8R^8$ 、 $-SOR^7$ 、 $-SO_2R^7$ 或 $-C(=O)CH=CH-Ar$ ，

c) $-(C=O)-L-CO_2R^8$ ，其中 L 表示选自下列的二价 (=能够双取代) 连接基： C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、咪喃、噻吩、二唑 (1, 2 或 1, 3)、三唑 (1, 2, 3 或 1, 3, 4)、四唑、噁唑、异噁唑、噻唑、异噻唑、二嗪 (1, 2 或 1, 3 或 1, 4)、三嗪、 $-Ph(-R^9)-$ (其中 $R^9 = H$ 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CHO 、 OH 、 OCH_3 、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $C(=O)Me$)、四氢咪喃、四氢噻吩、1, 4-二噁烷、 $-CH=C(R^{10})-$ (其中 $R^{10} = H$ 、甲基、乙基)、 $-CH=CHCH(R^{10})-$ 、 $-CH(OR^{10})CH_2-$ 、 $-CH_2C(=O)CH_2-$ 、 $-C(=O)CH_2CH_2-$ ，

当 R^1 和相邻的 R' ，和/或 R^3 和相邻的 R 相互连接形成环状化合物时， R^1-R' 或 R^3-R 合在一起表示 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-$ 或 $-(CH_2)_n-NR^{13}-(CH_2)_m-$ (其中 $n+m < 9$ ， $R^{13} = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 、 $-SAC-Ar$ 、 $-C(=O)-SAC$ 、 $-C(=O)-SCAC$ 、 $-C(=O)-Ar$ 或 $-C(=O)-SAC-Ar$)；

X 表示 $-CN$ 、 $-CHO$ 、 $-C(=O)R^{14}$ (其中 $R^{14} = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 、 $-SAC-Ar$ 或 $-CHN_2$)、 $-C(=O)OR^{15}$ (其中 $R^{15} = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SAC-Ar$)、 $-CONR^{16}R^{17}$ (其中 R^{16} 和 R^{17} 分别表示 $-H$ 、 $-SAC$ 、 $-O-SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SAC-Ar$)、 $-C(=O)CH_2O(C=O)Ar''$ (其中 $Ar'' =$ 被 F 、 Cl 、 Br 、 I 或 CH_3 2, 6-二取代的苯基)、 $-C(=O)CH_2OR^{18}$ (其中 R^{18} 表示 $-SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SAC-Ar$) 或 $-C(=O)CH_2OC(=O)R^{19}$ (其中 $R^{19} = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SAC-Ar$)，或者

X 表示 $-COCH_2-W$ ，其中 W 表示 $-N_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NR^{20}R^{21}$ 或 $-SR^{22}$ (其中 R^{20} 、 R^{21} 和 R^{22} 彼此独立地表示 $-SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SAC-Ar$ ，或者 R^{20} 和 R^{21} 连接形成环状化合物)；或者 W 表示



其中 Y 表示 $-\text{OH}$ 、 OR^{23} (其中 $\text{R}^{23} = -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{24}$ (其中 $\text{R}^{24} = -\text{H}$ 、 $-\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$)、 $-\text{F}$ 、 Cl 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NC}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{25}$ (其中 $\text{R}^{25} = -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^{26}$ (其中 $\text{R}^{26} = -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$) 和 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{27}\text{R}^{28}$ (其中 R^{27} 、 $\text{R}^{28} = -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$) 并且可以被单取代或被最大限度地多取代, 不考虑顺序和种类。

2. 权利要求 1 所述的式 (I) 化合物, 其中 R^4 表示 $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_p\text{COOZ}$ (其中 p 是 1 至 4, Z 是氢、 $-\text{SAC}$ 、 $-\text{Ar}$ 或 $-\text{SCAC}$)。

3. 权利要求 1 所述的式 (I) 化合物, 其中 R^1 表示 $-(\text{CH}_2)_n\text{COOZ}$ (其中 n 是 1 或 2, Z 是氢、 $-\text{SAC}$ 、 $-\text{Ar}$ 或 $-\text{SCAC}$)。

4. 权利要求 1 所述的式 (I) 化合物, 其中

a) R 和 R' 表示氢,

b) R^1 表示 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ 或 $\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$,

c) R^2 表示 $-(\text{CH}_2)_n(\text{O})_m\text{R}^5$ (其中 $\text{R}^5 = -\text{SAC}$ 、 $-\text{SCAC}$ 、 $-\text{Ar}$ 、 $-\text{SAC}-\text{Ar}$; $n=0$ 、1 或 2; $m=0$ 或 1)、 SAC 、 Ar 或氢,

d) R^3 表示 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$,

e) R^4 表示 $-\text{C}(=\text{O})(\text{O})_n\text{R}^{29}$ (其中 $n=0$ 、1; $\text{R}^{29} = -\text{Ar}$ 或 $-\text{SAC}-\text{Ar}$)、 $-\text{SO}_2\text{R}^{30}$ (其中 $\text{R}^{30} = -\text{Ar}$ 或 $-\text{SAC}-\text{Ar}$) 或 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^{31}$ (其中 $\text{R}^{31} = -\text{Ar}$ 或 $-\text{SAC}-\text{Ar}$), 或

f) X 表示 $-\text{C}(=\text{O})\text{CHN}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{OPh}$

或-C(=O)CH₂OC(=O)Ar'' (其中 Ar''= 2,6-二氯苯基、2,6-二氟苯基或2,6-二甲基苯基)。

5. 权利要求1所述的式(I)化合物, 该化合物选自:

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基-氨基}-4-酮基-戊酸;

(2S)-2-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基-氨基}-琥珀酸1-(N-甲基-N-甲氧基)-酰胺;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-1-羧基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲

基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸(LP和MP);

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸(LP和MP);

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(LP和MP);

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-3-羧基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-磺酰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(1-萘氧基)戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(2S)-2-乙酰氨基-琥珀酰氨基)-3-羧基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(非对映体混合物);

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基

基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸(非对映体混合物);

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸(非对映体混合物);

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(非对映体混合物);

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)甲基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)甲基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)甲基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(肉桂酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(肉桂酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(肉桂酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸 ;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-(1-咪唑基-甲基)-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(2-萘羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(琥珀酰氨基)-3-羧基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(1-吡啶基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-1-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰

氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-4-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯并呋喃-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二甲基苯甲酰氧基)-戊酸 [非对映体混合物];

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-8-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)戊酸 [非对映体混合物];

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(吡啶-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(吡啶-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯并呋喃-2-羰基氨基)-丙基]-5-

甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[3-羧基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(N-哌啶)-戊酸 [非对映体混合物];

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(N-吡咯烷)-戊酸 [非对映体混合物];

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丁基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸 [非对映体混合物];

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-羟基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸 [非对映体混合物];

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-

戊酸 [非对映体混合物];

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-正戊基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-乙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(戊二酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸; 和

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羧基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-戊酸甲酯。

6. 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂, 其含有权利要求 1 至 5 中任意一项所述的式 (I) 的异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯或立体化学异构体形式。

7. 用于治疗由于炎症或细胞凋亡所引起的疾病的药物组合物, 其含有治疗有效量的权利要求 1 至 5 中任意一项所述的式 (I) 的异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯或立体化学异构体形式作为活性成分并且含有可药用载体。

8. 权利要求 7 所述的组合物, 其中的疾病选自: 其中的细胞是异常死亡的疾病、痴呆、脑中风、AIDS 引起的脑损伤、糖尿病、胃溃疡、肝炎引起的脑损伤、暴发性肝功能衰竭 (FHF)、败血症、器官移植排斥反应、风湿性关节炎、由于局部缺血性心脏病引起的心脏细胞的细胞凋亡和抗炎反应。

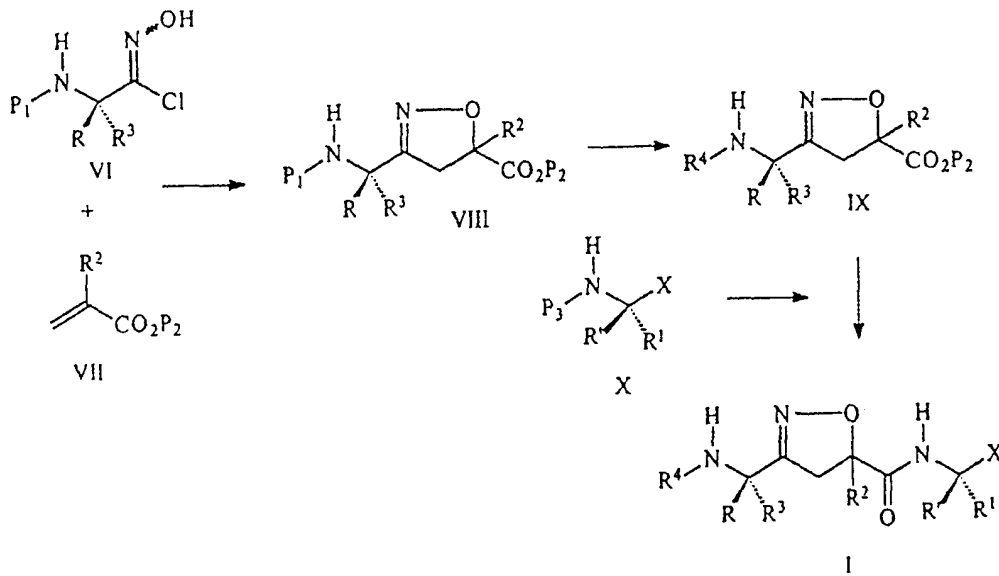
9. 权利要求 7 所述的组合物, 其中的疾病是人的暴发性肝功能衰竭。

10. 权利要求 7 所述的组合物, 其为用于口服、经皮或通过胃肠外注射给药的形式。

11. 对患有由于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶激活所引起的疾病的患者进行治疗的方法，该方法包括局部或全身给药治疗有效量的权利要求 1 至 5 中任意一项所述的式 (I) 的异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯或立体化学异构体形式或权利要求 7 至 10 中任意一项所述的药物组合物。

12. 制备权利要求 7 至 10 中任意一项所述的药物组合物的方法，其特征在于，将可药用载体与治疗有效量的权利要求 1 至 5 中任意一项所述的式 (I) 化合物紧密混合。

13. 制备式 (I) 的衍生物、其可药用盐、酯或立体化学异构体形式的方法，其特征在于，将异羟肟酰氯 (VI) 与丙烯酸酯衍生物 (VII) 反应得到异噁唑啉衍生物 (VIII)，然后将异噁唑啉衍生物 (VIII) 脱保护并向其中引入 R^4 得到式 (IX) 化合物，然后将式 (IX) 化合物与式 (X) 化合物反应，并且，如需要，将异噁唑啉衍生物 (VIII) 直接与化合物 (X) 反应得到式 (I) 化合物，然后，如需要，将带有保护基 P_1 的式 (I) 化合物转化成其它带有 R^4 的化合物，



其中的取代基如权利要求 1 中所定义。

半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂

技术领域

本发明涉及可以作为蛋白半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂的新的异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯和立体化学异构体形式，该衍生物的制备方法及其作为半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂的用途。本发明还涉及用于预防炎症和细胞凋亡的药物组合物及其制备方法，该组合物含有异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯和立体化学异构体形式。本发明的异噁唑啉衍生物可以有效地用于治疗由于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶所引起的疾病，例如其中的细胞是异常死亡的疾病、痴呆、脑中风、AIDS、糖尿病、胃溃疡、由肝炎引起的肝细胞损害、败血症、器官移植排斥反应和抗炎反应。

背景技术

自然界中的所有生物均会经历由发育、分化、生长和死亡组成的生命周期。最近，对细胞凋亡所涉及的机制进行了大量研究，因为细胞凋亡对于控制生命周期和疾病的暴发可能起着关键的作用。据报道，细胞凋亡可由多种因素引起，但主要是由三种细胞信号传递系统所引起的：第一种是通过蛋白-蛋白相互作用的信号传递系统(参见，Muzio M.等，Cell 85, 817, 1996; Humke E. W.等，JBC 273, 15702, 1998)，第二种是通过线粒体将细胞色素C掺入到细胞质内(参见，Liu X.等，Cell 86 : 147, 1996; Li P.等，Cell 91, 479, 1997)，第三种是通过 SAPK (应激活化蛋白激酶)激活促细胞分裂剂活化蛋白激酶(MAPK)的细胞信号传递途径。已知所有这些途径均可以活化半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶级联反应。对于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶，已在人类中识别出了约 10 种同功酶，在小鼠中识别出了 14 种(参见，

Thornberry N. A. 等, *Science* 28, 1312 1998; Green D. R. *Science* 28, 1309, 1998; Ahmad M. 等, *Cancer Res.* 15, 5201 1998)。该酶以没有酶活性的酶原的形式存在于细胞内并在细胞受到损伤或者接触到可以引起细胞坏死的物质时转化为活化的形式。活化的酶具有杂二聚体结构, 其中, 两种多肽, 即分子量约为 17-20 kDa 的较大的亚单位和分子量约为 10 kDa 的较小的亚单位结合在一起。

目前, 根据遗传学鉴定分析结果和生物化学特性将半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶分为 3 组: 第一组是负责处理细胞因子活化的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1、4 和 5, 第二组是实现细胞凋亡的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3、6 和 7, 第三组是在细胞凋亡信号传递系统的上游负责酶活化的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-8、9 和 10。

在这些半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶中, 最近报道了半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 和半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-8、9、10 等与细胞凋亡和疾病有关(参见, Thornberry N. A. 等, *Science*, 28, 1312, 1998)。

根据最近的研究结果, 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶通常在细胞凋亡开始时被活化, 虽然在组织和细胞之间有微小的差异。活化的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶随后活化细胞内的 CAD (半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活化的 DNA 酶), 其最终将会消化核内的 DNA 而引起细胞死亡(Sakahira H. 等, *Nature* 1 96, 1998; Enari M 等, *Nature* 1 43, 1998)。此外, 它们还可以通过分解底物例如细胞存活所必需的 PARP (聚-ADP 核糖聚合酶) 来促进细胞凋亡。

此外, 根据最近关于疾病的研究, 报道了痴呆患者脑内半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 活性的增加, 它可以促进从 β -淀粉样蛋白的前体蛋白产生 β -淀粉样蛋白(这被认为是痴呆的主要原因), 从而加速脑细胞的细胞凋亡(参见, Kuida K. 等, *Nature* 28, 368, 1996)。此外, 还报道了半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的活化可以是各种疾病的直接诱发因素, 例如败血症(参见, Haendeler J. 等, *Shock* 6, 405, 1996; Lenhoff R. J. 等, 29, 563, 1999)、类风湿性关节炎(Firestein G. S. 等, *J. Clin. Invest* 96 (3), 1631, 1995)、脑中风(参见, Hill I. E. 等,

Brain Res. 10, 398, 1995)、ALS 疾病(参见, Alexianu M. E. 等, J. Neurochem 63, 2365, 1994)、自身免疫疾病(参见, Rieux-Laucat F 等, Science 2, 1347, 1995)、糖尿病(参见, Juntti-Berggren 等, Science 2, 86, 1993)、肝炎(Haendeler J. 等, Shock 6, 405, 1996)、器官移植排斥反应(Koglin J. 等, Transplantation, 27, 904, 1999; Bergese S. D. 等, Transplantation 27, 904, 1999)、胃溃疡(参见, Slomiany B. L. 等, J. Physiol. Pharmacol. 96, 1631, 1995)等。

对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1 和半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 的三维结构、酶催化机制以及酶-底物特异性的研究(参见, Wilson, K. P 等, Nature 370, 270, 1994; Walker, N. P. C. 等, Cell 78, 343, 1994; Nature Struc. Biol. 3, 619, 1996)表明, 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1 对肽序列 (P4)-Val-X-Asp(P1) 具有水解酶-底物特异性, 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 对肽序列 (P4)Asp-X-X-Asp(P1) 具有水解酶-底物特异性。

模拟上述氨基酸序列的 Z-VAD-氟甲基酮和 Z-DEVD-氟甲基酮已被用于对抑制剂的研究, 并证实对于肝细胞通过半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的活化而发生的细胞凋亡(参见, Rodriguez I. 等, J. Exp. Med., 184, 2067, 1996; Rouquet N. 等, Curr Biol. 1, 1192, 1996; Kunstle G. 等, Immunol. Lett 55, 5, 1997)以及由脑局部缺血而引起的脑细胞的细胞凋亡具有抑制活性。但是, 由于这些肽衍生物缺乏用于临床应用的药物特性, 因此不能用作治疗剂。

暴发性肝功能衰竭(FHF)是一种由于大量肝细胞死亡或突发并且严重的肝功能损害所引起的临床综合征(参见: Trey, C. 等, 1970, Progress in liver disease, Popper, H. 和 F. Schaffner 编, Grune 和 stratton, New York, pp282-298)。FHF 的病因有许多种: 肝炎病毒感染、药物和毒素、酒精、局部缺血、代谢障碍、大量的恶性浸润、慢性自身免疫性肝炎等。但是, 这些机制并不完全清楚。由于 FHF 的预后非常差并且该疾病的发展非常迅速, 因此, 患者经常在该综合征开始发作后的 1-2 周内就陷入致命的状况(参见, Sherlock, S. 1993,

Adv. Intern. Med. 38 : 245-267)。因此在大部分情况下，总的死亡率非常高。但是，肝细胞损害是有可能逆转的，存活者通常可以完全恢复。

尝试用于治疗 FHF 的各种治疗方法包括抗生素、利尿剂、皮质类固醇、输血、活性炭血液输注和血浆置换。但是，在进行了控制的研究中，这些方法中没有一种被证实是有效的。近年来，普遍认为肝脏移植是确实改善该综合征的预后的唯一治疗方法。但是，由于免疫并发症、病毒或细菌感染以及移植物的可利用性，肝脏移植并不是 FHF 的理想疗法。因此，非常需要能够阻止急性期内肝细胞大量死亡的有效治疗剂。

细胞凋亡是一种以由专门的细胞结构所完成的一系列明显的形态学和生物化学改变为特征的细胞死亡。细胞凋亡是除去过多的、不需要的和有害的细胞并保持内环境的稳定所必需的，但是，不适当的细胞凋亡会引起多种人类疾病，例如神经变性疾病、局部缺血性损伤、自身免疫疾病以及多种癌症形式。最近证实，肝细胞的细胞凋亡是病毒性肝炎和酒精性肝炎的肝细胞损害以及暴发性肝炎的急性肝衰竭的主要原因。在接受到细胞凋亡信号的细胞内发生的多种改变反映了由一族称为半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的半胱氨酰蛋白酶所完成的复杂的生物化学事件。

半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶可以灭活能够阻止活细胞发生细胞凋亡的蛋白，例如 I^{CAD}/DFP45(负责 DNA 分裂的核酸酶的抑制剂)和 Bcl-2。同时，半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶不仅可以通过直接分解细胞结构来引起细胞凋亡，而且还可以通过裂解涉及细胞骨架调节的多种蛋白质而间接地改造细胞结构来引起细胞凋亡。由于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的活化与大部分形式的细胞凋亡的开始、传播和终止事件密切相关，因此该族的酶是治疗由于过度的细胞凋亡或细胞凋亡不足所引起疾病的有吸引力的潜在靶点。

已经发现了多种半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂。文献中记载了四种不同类型的病毒抑制剂：CrmA、p35、IAP (细胞凋亡的抑制剂)

和乙型肝炎病毒编码的 HBx 蛋白(参见, Gottlob, K. 等, 1998, J. Biol. Chem. 273: 33347-33353)。但是, 这些分子不适于作为治疗剂。肽类型的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂例如 z-VAD-fmk、z-DEVD-fmk 和 Ac-YVAD-cmk 曾广泛用于研究应用, 该抑制剂在细胞水平(参见: Sane, A. T. 等, 1998, Cancer Res. 58: 3066-3072)、在由 Fas 或 TNF α 引起的肝细胞损害啮齿类动物模型(参见: Kunstle, G. 等, 1997, Immunol. Lett. 55: 5-10)或肝脏移植后的局部缺血中(参见: Cursio, R. 等, 1999, FASEB J. 13 : 253-261)显示阻断细胞凋亡的活性。Petak 及其同事证实了双功能的抗癌剂 BCNU (1, 3-二(2-氯乙基)-1-亚硝基脲)具有半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制活性并且可以在体外抑制由药物引起的细胞凋亡(参见: Petak, I. 等, 1998, Cancer Res. 58: 614-618)。最近, 用环加氧酶-2 (COX-2) 抑制剂作为 FHF 治疗剂引起了人们的兴趣(参见, McCormick, P. A. 等, 1999, Lancet 353: 40-41)。但是, 这些物质的效力还没有得到临床上的验证。

同时, 新药物的开发主要依赖于适用于人类肝炎或肝细胞损害的适宜动物模型的获得。因此, 将适用于人类 FHF 的适宜动物模型用于测试候选治疗剂的效力是非常重要的。曾报道过两种实验型肝炎模型。一种是由细菌脂多糖和 D-半乳糖胺诱导的肝细胞损害(参见: Galanos, C. 等, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 5939; Lehman, V. 等, 1987, J. Exp. Med. 165-657), 另一种是最近开发的实验模型, Con A-诱导的肝炎(参见: Tiegs, G. 等, 1992, J. Clin. Invest. 90: 196-203; Mizuhara, H. 等, 1994, J. Exp. Med. 179: 1529-1537)。Con A-诱导的肝炎模型与人 FHF 在许多方面非常相似, 特别是 Fas 在发病机理中的作用。Fas 在肝细胞上大量表达, FasL 在活化的 T 细胞上表达并且具有细胞毒性淋巴细胞的效应物的作用。向成年小鼠注射拮抗性单克隆抗-Fas 抗体引发的迅速的肝衰竭表明, 异常活化的 Fas-FasL 系统可能在人暴发性肝炎(该疾病可由免疫系统例如细胞毒性 T 细胞的活化而引起)中起作用。有越来越多的数据与该假说相符, 例如, 特异

性 CTL 在 FHF 发病中的作用、初生肝细胞在体外对 Fas-介导的细胞凋亡的敏感度以及 Fas 在用人肝炎病毒转化的肝细胞中的过度表达等。在最近的研究中证实, Fas-FasL 系统的活化在由 Con A-介导的肝炎所引起的肝细胞损害中起重要作用(参见: Tagawa, Y. 等, 1998, Eur. J. Immunol. 28: 4105-4113)。注射 Con A 后很快在肝脏中出现的 FasL 主要在肝内 T 细胞上表达。这些结果表明, Fas-FasL 系统是 Con A-诱导的肝炎发展的决定性因素。同时, Con A-肝炎的诱导还伴随着各种细胞因子的产生, 例如 IL-2、TNF α 、IL-6、IL-4 和 IL-10。

本发明的公开

本发明人用多年时间进行了大量的研究, 以开发一种适于作为半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂的、具有独特结构的新型治疗剂。结果, 本发明人出人意料地发现了一种新的式(I)的异噁唑啉衍生物, 其结构不同于已知的抑制剂并且对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的底物具有极佳的抑制活性, 从而完成了本发明。

因此, 本发明的目的是提供一种可用作半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂的新的式(I)的异噁唑啉化合物、其可药用盐、酯和立体化学异构体形式。

本发明的另一个目的是提供制备式(I)化合物的方法。

本发明的另一个目的是提供一种半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂, 该抑制剂含有式(I)的异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯和立体化学异构体形式。

本发明的另一个目的是提供一种用于抑制半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性的药物组合物, 该组合物含有治疗有效量的式(I)的异噁唑啉衍生物作为活性成分并且含有可药用载体。

本发明的另一个目的是提供一种用于预防炎症和细胞凋亡的药物组合物及其制备方法, 该组合物含有异噁唑啉衍生物、其可药用盐、酯和立体化学异构体形式。

通过阅读本说明书的其它部分, 本发明的其它目的和优点将是显

而易见的。

以上简要描述了本发明的一些目的。这些目的应当仅仅看作是对本发明一些特点的举例说明。通过以不同的方式应用本文所公开的发明，或者通过在所公开的范围内对本发明进行修改，可以获得其它有益的效果。因此，通过阅读对优选实施方案的详细描述以及权利要求所定义的本发明的范围，可以更充分的理解本发明并发现本发明的其它目的。

附图概述

图 1 是显示本发明化合物对重组半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1、-2、-3、-4、-6、-7、-8 和-9 的抑制活性的图。

图 2 是显示本发明化合物在通过用 TNF_{α} 和放线菌素 D 处理引发了细胞凋亡的大鼠肝细胞中对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的抑制活性的图。

图 3 是显示本发明化合物在通过用 TNF_{α} 和放线菌素 D 处理引发了细胞凋亡的大鼠肝细胞中预防细胞凋亡的效果。

图 4 显示了本发明化合物在体内对抗由 ConA 升高的 AST 和 ALT 活性的剂量依赖性抑制活性，其中的横条表示各组的平均值，p 值通过学生 t 试验计算得到。

图 5 显示了在体内对抗由 ConA 升高的细胞因子的剂量依赖性抑制活性，其中的横条表示各组的平均值，p 值通过学生 t 试验计算得到。

图 6 是显示本发明化合物对于用 ConA 处理的小鼠肝脏中肝细胞的细胞凋亡性肝细胞损害和形态学、组织学改变的抑制活性的图。

图 7 是显示本发明化合物对于由 ConA 诱导的肝细胞细胞凋亡所引起的

PARP 裂解的抑制活性的电泳图象。每一泳道均代表每组 10 只小鼠。

图 8 是显示本发明化合物防止 IFN_{γ} 和抗-Fas 抗体诱导的细胞凋亡的肝保护作用的图示说明。

图 9 显示了本发明化合物防止抗-Fas 抗体诱导的细胞凋亡的肝保护作用。

图 10 是显示本发明化合物在抗-Fas 抗体处理的肝组织中对抗半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 样活性的抑制活性的图。

图 11 显示了本发明化合物防止抗-Fas 抗体诱导的小鼠死亡的保护作用。

图 12 是显示本发明化合物防止小鼠肝脏发生 TNF_{α} -诱导的细胞凋亡的图示说明。

图 13 是显示本发明化合物在 TNF_{α} 处理的肝脏中抑制半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 样活性的图示说明。

图 14 是显示本发明化合物防止小鼠发生 TNF_{α} -诱导的死亡的图示说明。

图 15 是显示本发明的化合物在原代培养的大鼠肝细胞中抑制 TNF_{α} /放线菌素 D-诱导的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活化和细胞凋亡的图示说明。

图 16 是显示本发明化合物预防由 TNF_{α} /放线菌素 D 预先诱导的肝细胞细胞凋亡的图示说明。

图 17 是显示本发明化合物预防由 $\text{TNF}_\alpha/\text{DaIN-}$ 引起的死亡的图示说明。

完成本发明的最佳方式

在对本发明进行详细描述之前，先对一些重要的术语进行如下定义：

a) 低级烷基链(以下称为“SAC”)是指 C_{1-8} 的烃，包括支链的异构体形式。

b) 低级环烷基链(以下称为“SCAC”)是指 C_{3-10} 的环状化合物。

c) 芳基(以下称为“Ar”)表示苯[1:2,3,4,5,6]、萘[1,2:1,2,3,4,5,6,7,8,]、吡啶[2,3,4:2,3,4,5,6]、咪唑[1,2,3,4,5,6,7:1,2,3,4,5,6,7]、喹啉[2,3,4,5,6,7,8:2,3,4,5,6,7,8]、异喹啉[1,3,4,5,6,7,8:1,3,4,5,6,7,8]、呋喃[2,3:2,3,4,5]、噻吩[2,3:2,3,4,5]、吡咯[1,2,3:1,2,3,4,5]、嘧啶[2,4,5,6:2,4,5,6]、咪唑[1,2,4,5:1,2,4,5]、苯并呋喃[2,3;2,3,4,5,6,7]等，其中，方括号中前面的数字表示相应的芳基与本发明的抑制剂连接的位置，冒号后的数字表示下文中所定义的取代基 Y 可以连接的位置。

d) 氨基酸的侧链表示与 20 种天然氨基酸的手性碳相连的侧基。

常用的术语用如下缩写表示：

N-氯代琥珀酰亚胺：NCS

N-甲基吗啉：NMM

N,N-二甲基甲酰胺：DMF

1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺：EDC

1-羟基苯并三唑水合物：HOBt

三氟乙酸：TFA

当与 R^1 或 R^3 相邻的位置成为可以产生立体化学的中心时, 两种立体异构体化合物均包括在本发明的范围内。同样, 两种形式的化合物共同存在的情况(非对映体化合物的混合物)也包括在本发明的范围内。此外, 当 R^1 或 R^3 是由氨基酸的侧链残基组成的羧酸或碱时, 它们的保护了的形式例如低级酯或可药用盐的形式也包括在本发明化合物的范围内。

R^2 表示 $-H$ 、 $-SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SAC-Ar$, 或者表示氨基酸的侧链, 或表示 $-(CH_2)_n(O)_mR^5$ (其中 $R^5 = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 、 $-SAC-Ar$; $n = 0, 1$ 或 2 ; $m = 0$ 或 1), 或 $-(CH_2)_nOC(=O)R^6$ (其中 $R^6 = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SAC-Ar$; $n = 1$ 或 2)。优选 R^2 表示 $(CH_2)_n(O)_mAr'$ (其中 $n = 0, 1$ 或 2 ; $m = 0$ 或 1 ; $Ar' =$ 取代的苯基或咪唑)、甲基或氢。

当相邻的位置由于 R^2 而成为可以产生立体化学的中心时, 两种立体异构体化合物均包括在本发明化合物的范围内。同样, 两种形式的化合物共同存在的情况(非对映体化合物的混合物)也包括在本发明化合物的范围内。此外, 当 R^2 是由氨基酸的侧链残基组成的羧酸或碱时, 它们的保护了的形式例如低级酯或可药用盐的形式也包括在本发明化合物的范围内。

R^4 表示

a) 氨基酸残基, 其中 ① 与氨基酸的手性碳相连的羧基与氨基结合形成酰胺键, ② 氨基酸的手性碳具有 R 或 S 构型, ③ 与氨基酸的手性碳相连的氨基被甲酰基、乙酰基、丙基、环丙基羰基、丁基、甲磺酰基、乙磺酰基、丙磺酰基、丁磺酰基、甲氧羰基、乙氧羰基、丙氧羰基、丁氧羰基、甲基氨基甲酰基、乙基氨基甲酰基、丙基氨基甲酰基、丁基氨基甲酰基、二甲基氨基甲酰基、二乙基氨基甲酰基、二丙基氨基甲酰基、二丁基氨基甲酰基或环丙基氨基羰基保护, 或者该氨基可被氢原子代替, ④ 侧链中的羧基可以和 $-SAC$ 或 $-SCAC$ 形成酯基,

b) $-C(=O)R^7$ (其中 $R^7 = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 、 $-SAC-Ar$)、 $-CO_2R^8$ (其中 $R^8 =$ 氢或 R^7)、 $-C(=O)NR^8R^8$ 、 $-SOR^7$ 、 $-SO_2R^7$ 或 $-C(=O)CH=CH-Ar$,

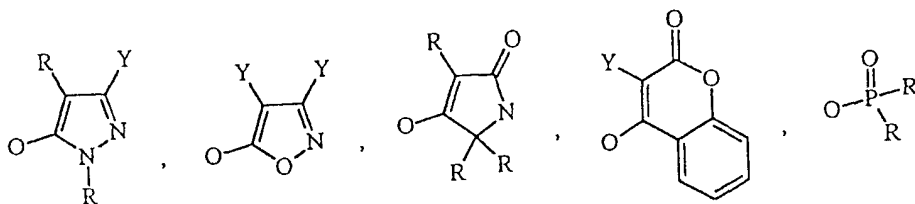
c) $-(C=O)-L-CO_2R^8$, 其中 L 表示选自下列的二价(=能够双取代)

连接基: C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、咪喃、噻吩、二唑(1, 2 或 1, 3)、三唑(1, 2, 3 或 1, 3, 4)、四唑、噁唑、异噁唑、噻唑、异噻唑、二嗪(1, 2 或 1, 3 或 1, 4)、三嗪、 $-\text{Ph}(-R^9)-$ (其中 $R^9 = \text{H}, \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{CHO}, \text{OH}, \text{OCH}_3, \text{CF}_3, \text{OCF}_3, \text{CN}, \text{C}(=\text{O})\text{Me}$)、四氢咪喃、四氢噻吩、1, 4-二噁烷、 $-\text{CH}=\text{C}(\text{R}^{10})-$ (其中 $\text{R}^{10} = \text{H}, \text{甲基}, \text{乙基}$)、 $-\text{CH}=\text{CHCH}(\text{R}^{10})-$ 、 $-\text{CH}(\text{OR}^{10})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 。

当 R^1 和相邻的 R' , 和/或 R^3 和相邻的 R 相互连接形成环状化合物时, $\text{R}^1-\text{R}'$ 或 R^3-R 合在一起表示 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-$ 或 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}^{13}-(\text{CH}_2)_m-$ (其中 $n+m < 9$, $\text{R}^{13} = -\text{SAC}, -\text{SCAC}, -\text{Ar}, -\text{SAC}-\text{Ar}, -\text{C}(=\text{O})-\text{SAC}, -\text{C}(=\text{O})-\text{SCAC}, -\text{C}(=\text{O})-\text{Ar}$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-\text{SAC}-\text{Ar}$);

X 表示 $-\text{CN}, -\text{CHO}, -\text{C}(=\text{O})\text{R}^{14}$ (其中 $\text{R}^{14} = -\text{SAC}, -\text{SCAC}, -\text{Ar}, -\text{SAC}-\text{Ar}$ 或 $-\text{CHN}_2$)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^{15}$ (其中 $\text{R}^{15} = -\text{SAC}, -\text{SCAC}, -\text{Ar}$ 或 $-\text{SAC}-\text{Ar}$)、 $-\text{CONR}^{16}\text{R}^{17}$ (其中 R^{16} 和 R^{17} 分别表示 $-\text{H}, -\text{SAC}, -\text{O}-\text{SAC}, -\text{SCAC}, -\text{Ar}$ 或 $-\text{SAC}-\text{Ar}$)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{Ar}''$ (其中 $\text{Ar}'' =$ 被 $\text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ 或 CH_3 2, 6-二取代的苯基)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{OR}^{18}$ (其中 R^{18} 表示 $-\text{SAC}, -\text{SCAC}, -\text{Ar}$ 或 $-\text{SAC}-\text{Ar}$) 或 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{19}$ (其中 $\text{R}^{19} = -\text{SAC}, -\text{SCAC}, -\text{Ar}$ 或 $-\text{SAC}-\text{Ar}$)、或者

X 表示 $-\text{COCH}_2-\text{W}$, 其中 W 表示 $-\text{N}_2, -\text{F}, -\text{Cl}, -\text{Br}, -\text{I}, -\text{NR}^{20}\text{R}^{21}$ 或 $-\text{SR}^{22}$ (其中 $\text{R}^{20}, \text{R}^{21}$ 和 R^{22} 彼此独立地表示 $-\text{SAC}, -\text{SCAC}, -\text{Ar}$ 或 $-\text{SAC}-\text{Ar}$, 或者 R^{20} 和 R^{21} 连接形成环状化合物); 或者 W 表示



其中 Y 表示 $-\text{OH}, \text{OR}^{23}$ (其中 $\text{R}^{23} = -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{24}$ (其中 $\text{R}^{24} = -\text{H}, -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$)、 $-\text{F}, \text{Cl}, -\text{Br}, -\text{I}, -\text{CN}, -\text{NC}, -\text{N}_3, -\text{CO}_2\text{H}, -\text{CF}_3, -\text{CO}_2\text{R}^{25}$ (其中 $\text{R}^{25} = -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^{26}$ (其中 $\text{R}^{26} = -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$) 和 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{27}\text{R}^{28}$ (其中 $\text{R}^{27}, \text{R}^{28} = -\text{SAC}$ 或 $-\text{SCAC}$) 并且可以被单取代或

被最大限度地多取代，不考虑顺序和种类。

在式(I)化合物中，优选其中 R^4 表示 $-C(=O)(CH_2)_pCOOZ$ (其中 p 是 1 至 4, Z 是氢、 $-SAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SCAC$) 的化合物。还优选其中 R^1 表示 $-(CH_2)_nCOOZ$ (其中 n 是 1 或 2, Z 是氢、 $-SAC$ 、 $-Ar$ 或 $-SCAC$) 的化合物。

在式(I)化合物中，更优选如下化合物，其中：

- a) R 和 R' 表示氢，
- b) R^1 表示 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COOCH_3$ 或 $CH_2COOCH_2CH_3$ ，
- c) R^2 表示 $-(CH_2)_n(O)_mR^5$ (其中 $R^5 = -SAC$ 、 $-SCAC$ 、 $-Ar$ 、 $-SAC-Ar$; $n=0$ 、1 或 2; $m=0$ 或 1)、 SAC 、 Ar 或氢，
- d) R^3 表示 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2COOH$ 、 $-(CH_2)_2CO_2H$ 、 $-CH_2C(O)NH_2$ 或 $-(CH_2)_2C(O)NH_2$ ，
- e) R^4 表示 $-C(=O)(O)_nR^{29}$ (其中 $n=0$ 、1; $R^{29} = -Ar$ 或 $-SAC-Ar$)、 $-SO_2R^{30}$ (其中 $R^{30} = -Ar$ 或 $-SAC-Ar$) 或 $-C(=O)NHR^{31}$ (其中 $R^{31} = -Ar$ 或 $-SAC-Ar$)，或
- f) X 表示 $-C(=O)CHN_2$ 、 $-C(=O)CH_2Br$ 、 $-C(=O)CH_2Cl$ 、 $-C(=O)CH_2OPh$ 或 $-C(=O)CH_2OC(=O)Ar''$ (其中 $Ar'' = 2,6$ -二氯苯基、 $2,6$ -二氟苯基或 $2,6$ -二甲基苯基)。

首选的化合物选自：

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸；

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-戊酸；

(2S)-2-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-琥珀酸 1-(N-甲基-N-甲氧基)-酰胺；

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸；

(3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸；

- (3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸(LP和MP);
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸(LP和MP);
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(LP和MP);
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-3-羧基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-磺酰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基

-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(1-萘氧基)戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(2S)-2-乙酰氨基-琥珀酰氨基]-3-羧基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(非对映体混合物);

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸(非对映体混合物);

- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸(非对映体混合物);
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(非对映体混合物);
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)乙基羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)乙基羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)乙基羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)甲基羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)甲基羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-((3-吡啶基)甲基羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(肉桂酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(肉桂酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(肉桂酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-重氮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-溴-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-(1-咪唑基-甲基)-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(2-萘羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸;

(3S)-3-{3-[(1S)-1-(琥珀酰氨基)-3-羧基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基

- 4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(1-哌啶基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-1-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-4-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯并咪唑-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二甲基苯甲酰氧基)-戊酸 [非对映体混合物];
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-8-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸 [非对映体混合物];
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(吡啶-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(吡啶-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
- (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯并咪唑-2-羰基氨基)-丙基]-5-甲基

-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
 (3S)-3-{3-[3-羰基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(N-吡啶)-戊酸 [非对映体混合物];
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(N-吡咯烷)-戊酸 [非对映体混合物];
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丁基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸;
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸 [非对映体混合物];
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-羟基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸 [非对映体混合物];
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸 [非对映体混合物];
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-正戊基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;
 (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-乙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸;

(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(戊二酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸; 和
(3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸甲酯。

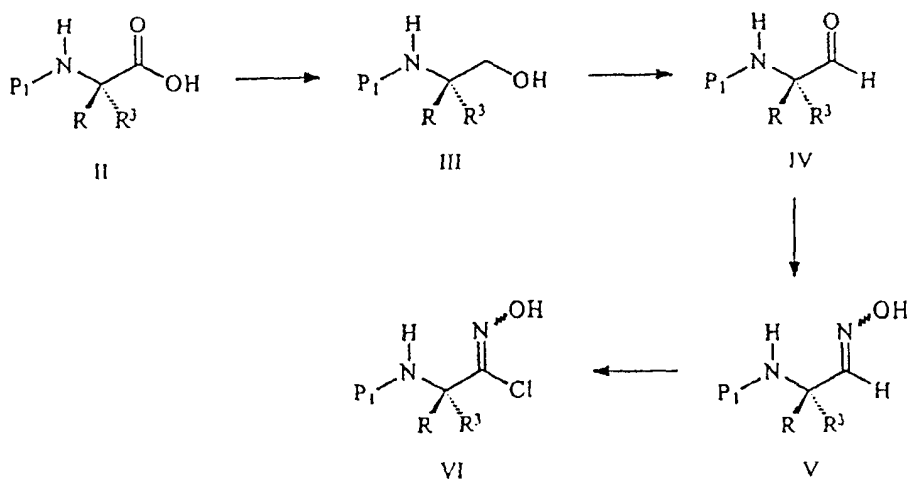
另一方面, 本发明提供了制备式(I)化合物的方法。

以下将参照反应方案1和2对本发明制备式(I)的异噁唑啉衍生物的方法进行解释。应当理解, 这些反应方案一般性地描述了本发明所用的具体方法, 可以对单元操作进行各种改变而不违背本发明的实质。因此, 本发明不限于以下优选的实施方案。

第一步中, 将氨基保护的氨基酸(II) (可从 Novabiochem 购买到) 还原得到 N-保护的氨基醇(III), 然后将其氧化得到 N-保护的氨基醛(IV)。

将 N-保护的氨基醛(IV) 与羟胺盐酸盐和碳酸钠在醇和水的混合溶液中反应得到肟(V) (顺式和反式的肟)。将得到的肟衍生物(V) 用 NCS (N-氯代琥珀酰亚胺) 在二甲基甲酰胺的水溶液中处理得到异羟肟酰氯(VI)。在合成异羟肟酰氯中所用的代表性的取代基的例子包括如下基团: P_1 表示 Cbz、t-Boc、Fmoc、Teoc (三甲基硅烷基-乙氧羰基) 等; R 表示 H, R^3 表示 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$ 、-异丙基、苯基甲基等。

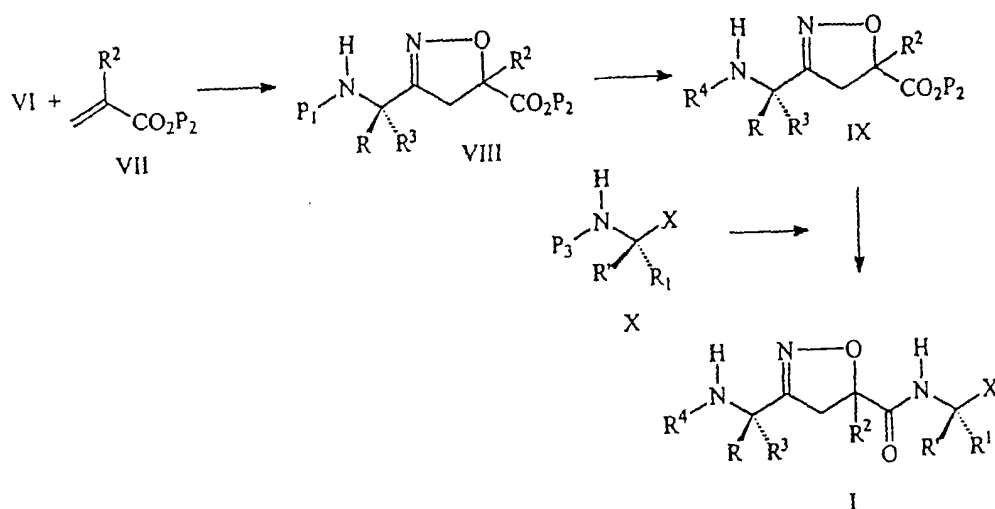
反应方案 1



在上述反应方案 1 中, 对于可购买到的化合物 (II) 至 (VI), 可以合成如下 a) 至 g) 的组合。

- a) $P_1 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$
- b) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$
- c) $P_1 = \text{Fmoc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$
- d) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$
- e) $P_1 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$
- f) $P_1 = \text{Fmoc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$
- g) $P_1 = \text{Boc}$ 或 Cbz , $R = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_2\text{Ph}$

反应方案 2



在第二步中, 将所得到的异羟肟酰氯 (VI) 与丙烯酸酯衍生物 (VII) 反应得到异噁唑啉衍生物 (VIII)。如需要, 可以直接从肟衍生物 (V) 合成异噁唑啉衍生物 (VIII)。

如果带有保护基 P_1 的化合物可以用作抑制剂 (例如, P_1 是 Cbz 基

团), 可将异噁唑啉衍生物 (VIII) 直接与化合物 (X) 反应得到式 (I) 化合物, 当需要将保护基 P_1 转化成其它取代基时, 可以除去 P_1 并向其中引入 R^4 。

在上述反应方案 2 中, 可以合成如下取代基的组合。

在化合物 (VIII) 中

- a) $P_1 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{H}$, $P_2 = \text{Et}$
- b) $P_1 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{H}$, $P_2 = \text{H}$
- c) $P_1 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{Et}$
- d) $P_1 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{H}$
- e) $P_1 = \text{Fmoc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $R^2 = \text{CH}_3$, $P_2 = \text{CH}_3$ (或 Et)
- f) $P_1 = \text{Teoc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $P_2 = \text{H}$
- g) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{PhCH}_2$, $P_2 = \text{Et}$
- h) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{PhOCH}_2$, $P_2 = \text{Et}$
- i) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = 1\text{-萘基}$, $P_2 = \text{Et}$
- j) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = 2\text{-萘基}$, $P_2 = \text{Et}$
- k) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{苯基}$, $P_2 = \text{Et}$
- l) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = 4\text{-溴苯基}$, $P_2 = \text{Et}$
- m) $P_1 = t\text{-Boc}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{AcOCH}_2$, $P_2 = \text{Et}$

在化合物 (IX) 中,

- a) $R^4 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{H}$, $P_2 = \text{Et}$
- b) $R^4 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{H}$, $P_2 = \text{H}$
- c) $R^4 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{Et}$
- d) $R^4 = \text{Cbz}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{H}$
- e) $R^4 = 1\text{-萘甲酰基}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{Et}$
- f) $R^4 = 1\text{-萘甲酰基}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{H}$
- g) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{Et}$
- h) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{H}$

- i) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = CH_2CH_2CO_2Bu(t)$, $R^2 = CH_3$, $P_2 = CH_3$
- j) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = CH_2CH_2CO_2Bu(t)$, $R^2 = CH_3$, $P_2 = H$
- k) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- l) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- m) $R^4 = 2\text{-萘磺酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $P_2 = Et$
- n) $R^4 = 2\text{-萘磺酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $P_2 = H$
- o) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $P_2 = Et$
- p) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $P_2 = H$
- q) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $P_2 = Et$
- r) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $P_2 = H$
- s) $R^4 = \text{氢化肉桂酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- t) $R^4 = \text{氢化肉桂酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- u) $R^4 = 1\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- v) $R^4 = 1\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- w) $R^4 = 1\text{-萘磺酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- x) $R^4 = 1\text{-萘磺酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- y) $R^4 = 3\text{-吡啶乙酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- z) $R^4 = 3\text{-吡啶乙酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- aa) $R^4 = 3\text{-吡啶丙酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- ab) $R^4 = 3\text{-吡啶丙酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- ac) $R^4 = \text{反式-肉桂酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- ad) $R^4 = \text{反式-肉桂酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- ae) $R^4 = \text{苯基-甲基磺酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- af) $R^4 = \text{苯基-甲基磺酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- ag) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $P_2 = Et$
- ah) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $P_2 = H$
- ai) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = Et$
- aj) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $P_2 = H$
- ak) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = 1\text{-咪唑基}$, $P_2 = Et$

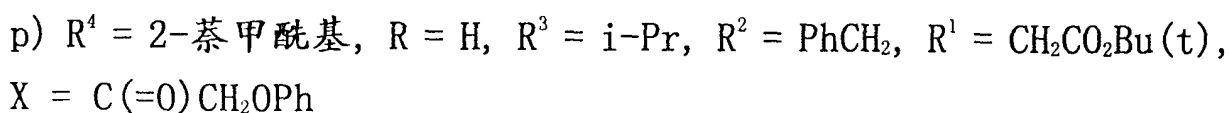
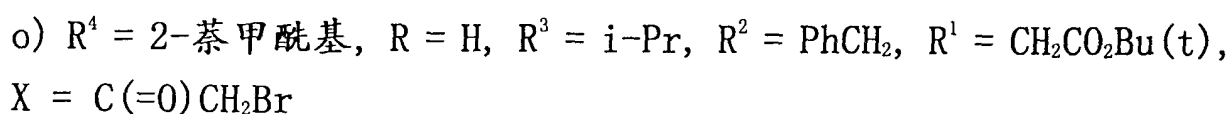
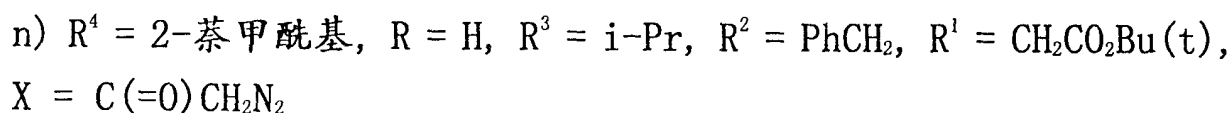
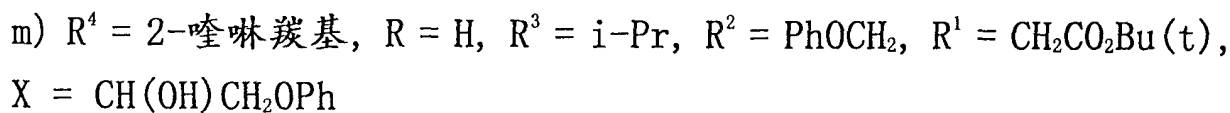
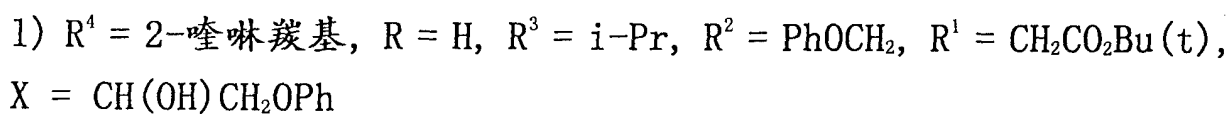
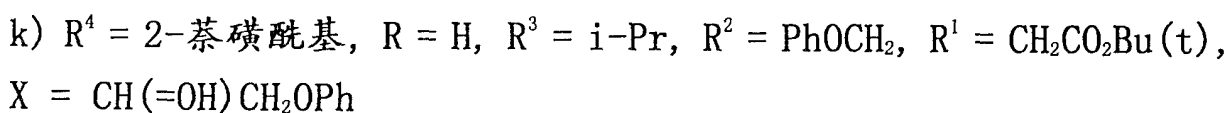
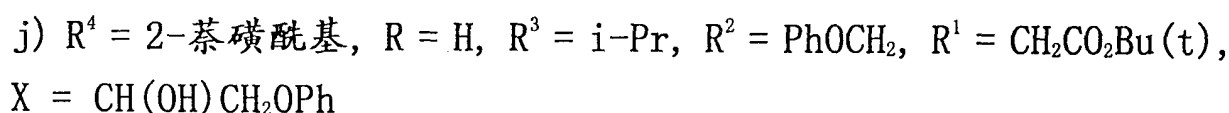
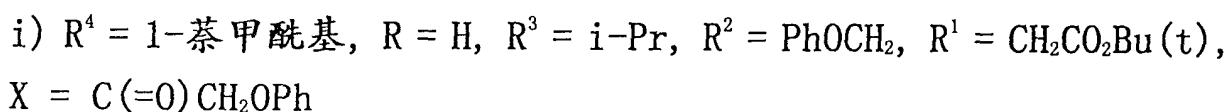
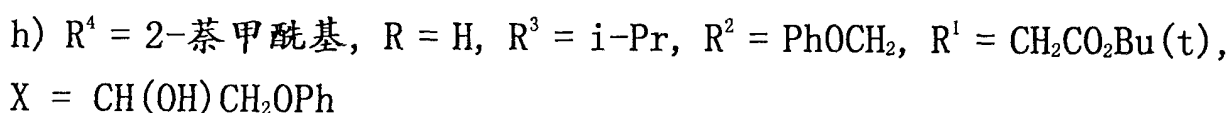
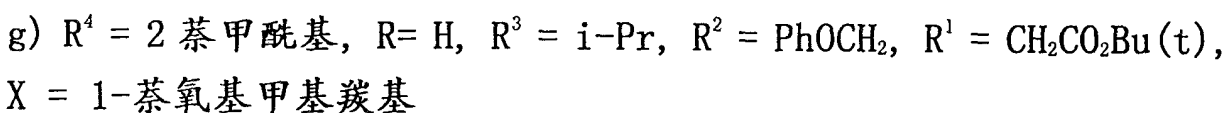
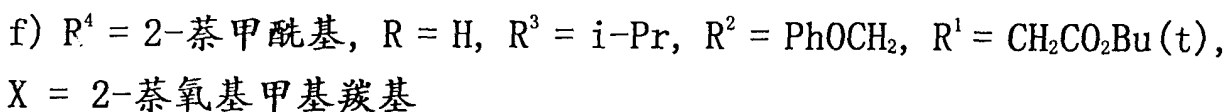
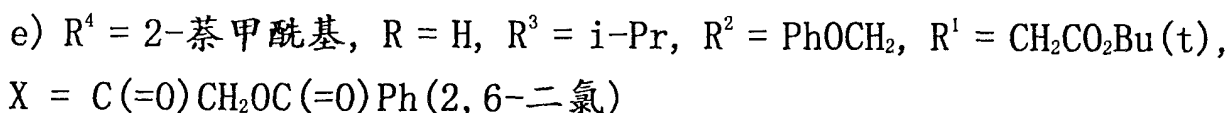
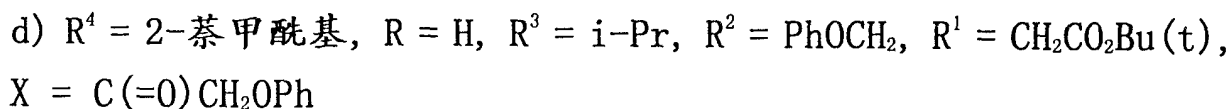
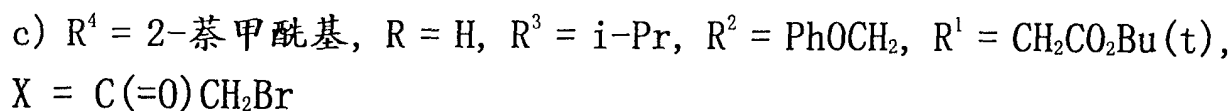
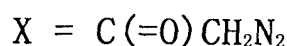
- a1) $R^4 = 1\text{-咪唑羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = 1\text{-咪唑基}$, $P_2 = H$
 am) $R^4 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $R = H$, $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $R^2 = \text{CH}_3$,
 $P_2 = \text{CH}_3$
 an) $R^4 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $R = H$, $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $R^2 = \text{CH}_3$, $P_2 = H$
 ao) $R^4 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $P_2 = \text{CH}_3$
 ap) $R^4 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $P_2 = H$

在化合物(X)中,

- a) $P_3 = \text{Cbz}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CO}_2\text{Me}$
 b) $P_3 = \text{HCl}+\text{H}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CO}_2\text{Me}$
 c) $P_3 = \text{Cbz}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{COCH}_2\text{N}_2$
 d) $P_3 = \text{Cbz}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{COCH}_2\text{Br}$
 e) $P_3 = \text{Cbz}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{COCH}_2\text{OPh}$
 f) $P_3 = \text{Cbz}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OPh}$
 g) $P_3 = H$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OPh}$
 h) $P_3 = \text{Cbz}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{Ph}(2,6\text{-二氯})$
 i) $P_3 = H$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{Ph}(2,6\text{-二氯})$
 j) $P_3 = \text{Cbz}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CONMe}(\text{OMe})$
 k) $P_3 = H$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CONMe}(\text{OMe})$
 l) $P_3 = \text{Cbz}$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-(1\text{-萘基})$
 m) $P_3 = H$, $R = H$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$, $X = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-(1\text{-萘基})$

在化合物(I)中,

- a) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{PhOCH}_2$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$,
 $X = \text{CO}_2\text{H}$
 b) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{PhOCH}_2$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$,



- q) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,
 $X = C(=O)CH_2OC(=O)-Ph-(2,6\text{-二氯})$
- r) $R^4 = N\text{-乙酰基-}\beta\text{-叔丁基天冬氨酸酰基}$, $R = H$, $R^3 = CH_2CH_2CO_2Bu(t)$,
 $R^2 = CH_3$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X = CH(OH)CH_2OPh$
- s) $R^4 = N\text{-乙酰基-}\beta\text{-叔丁基天冬氨酸酰基}$, $R = H$, $R^3 = CH_2CH_2CO_2Bu(t)$,
 $R^2 = CH_3$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X = C(=O)CH_2OPh$
- t) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X =$
 $C(=O)NMe(OMe)$
- u) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X = C(=O)CH_3$
- v) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X =$
 CO_2CH_3
- w) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X =$
 CO_2H
- 10x) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,
 $X = C(=O)CH_2N_2$
- y) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X =$
 $C(=O)CH_2Br$
- z) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X =$
 $C(=O)CH_2OC(=O)-Ph-2,6\text{-二氯}$
- aa) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X =$
 $C(=O)NMe(OMe)$
- ab) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhOCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X =$
 $C(=O)CH_3$
- ac) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X = CO_2CH_3$
- ad) $R^4 = Cbz$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$, $X =$
 $C(=O)CH_2OC(=O)Ph(2,6\text{-二氯})$
- ae) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,
 $X = C(=O)CH_2OPh$
- af) $R^4 = \text{氯化肉桂酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

ag) $R^4 = 1\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

ah) $R^4 = 1\text{-萘磺酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

ai) $R^4 = 3\text{-吡啶乙酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

aj) $R^4 = 3\text{-吡啶丙酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

ak) $R^4 = \text{反式-肉桂酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

al) $R^4 = \text{苯基-甲基磺酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 =$

$CH_2CO_2Bu(t)$, $X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

am) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

an) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OPh$

ao) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OC(=O)Ph$ (2, 6-二氯)

ap) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = PhCH_2$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OPh$

aq) $R^4 = 2\text{-喹啉羰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = 1\text{-咪唑基}$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_2OCPH$

ar) $R^4 = 2\text{-萘甲酰基}$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = H$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

$X = C(=O)CH_3$

as) $R^4 = COCH_2CH_2CO_2Bu(t)$, $R = H$, $R^3 = CH_2CH_2CO_2Bu(t)$, $R^2 = CH_3$, R^1

$= CH_2CO_2Bu(t)$, $X = C(=O)CH_2OPh$

at) $R^4 = COCH_2CH_2CO_2Bu(t)$, $R = H$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = CH_3$, $R^1 = CH_2CO_2Bu(t)$,

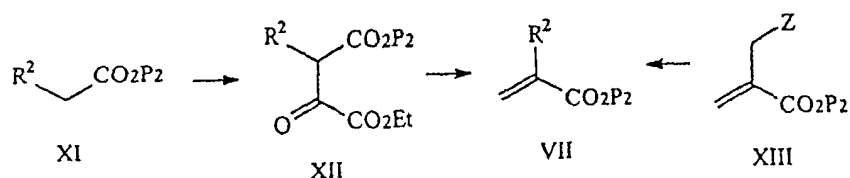
$X = C(=O)CH_2OPh$

au) $R^4 = 1\text{-萘甲酰基}$, $R = \text{H}$, $R^3 = i\text{-Pr}$, $R^2 = \text{PhCH}_2$, $R^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}(t)$,
 $X = \text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5$

在反应方案 2 中, 化合物 (X) 的功能基 X 可以在合成化合物 (VIII) 或 (IX) 的反应之后通过多个单元操作引入, 或者将已经带有所需取代基 X 的化合物 (VIII) 或 (IX) 进行随后的反应。

丙烯酸酯衍生物 (VII) 可以通过以下反应方案 3 中描述的一种方法进行合成。

反应方案 3



将酯衍生物 (XI) 与草酸二乙酯反应得到草酸酯衍生物 (XII), 然后在碱的存在下进行反应得到所需的丙烯酸酯衍生物 (VII)。或者, 可将其通过用已知化合物 (XIII) 作为原料的各种方法来合成。即, 很容易将已知化合物 (XIIIa) 转化成化合物 (XIIIb)、(VIIe)、(VIIf)、(VIIg) 等。

在化合物 (XI) 和 (XII) 中, 取代基的例子如下:

- $\text{P}_2 = \text{Et}$, $\text{R}^2 = \text{Ph}$
- $\text{P}_2 = \text{Et}$, $\text{R}^2 = 4\text{-溴苯基}$
- $\text{P}_2 = \text{Et}$, $\text{R}^2 = 1\text{-萘基}$
- $\text{P}_2 = \text{Et}$, $\text{R}^2 = 2\text{-萘基}$

在化合物 (VII) 和 (XIII) 中, 可以通过上述方法合成如下取代基的组合。

在化合物 (VII) 中,

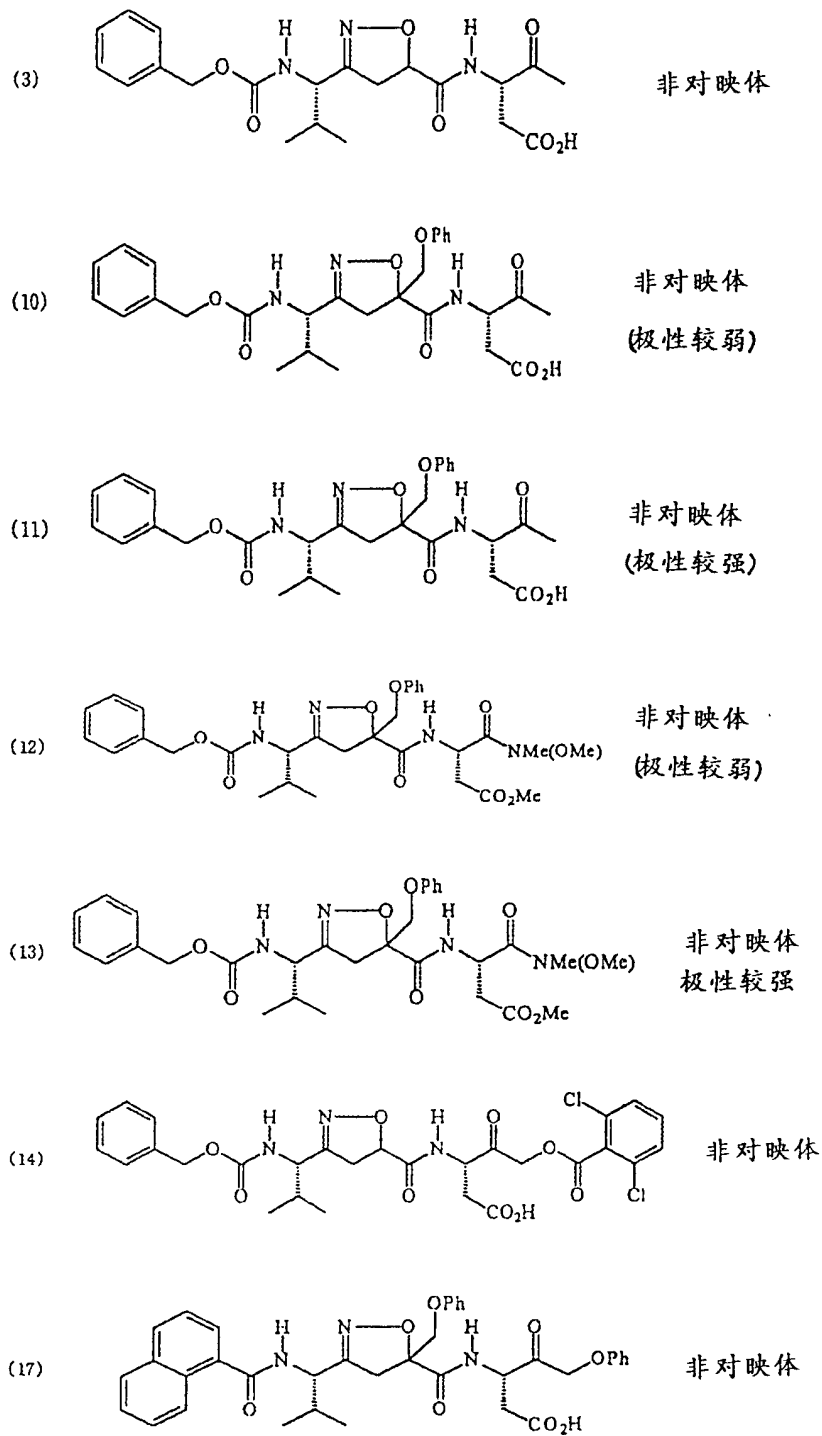
- $\text{R}^2 = \text{Ph}$, $\text{P}_2 = \text{Et}$
- $\text{R}^2 = 4\text{-溴苯基}$, $\text{P}_2 = \text{Et}$

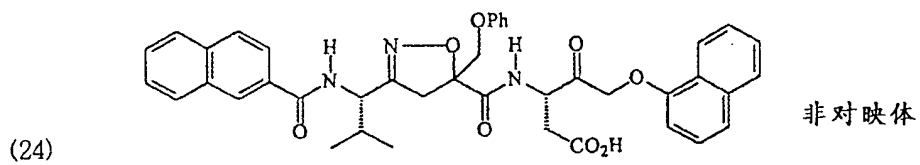
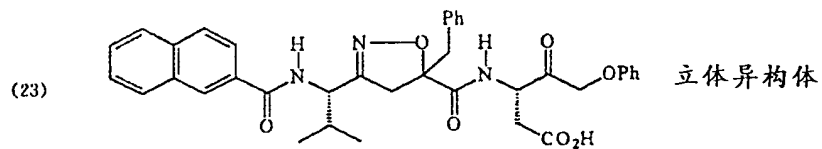
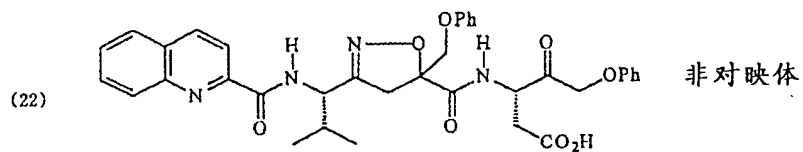
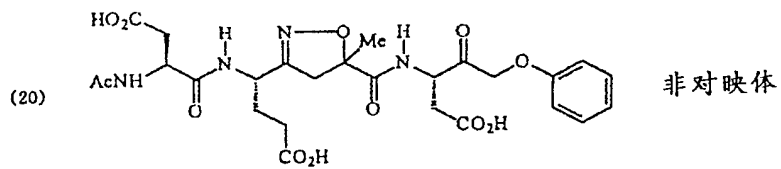
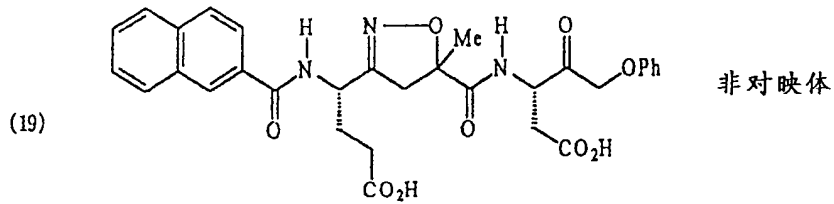
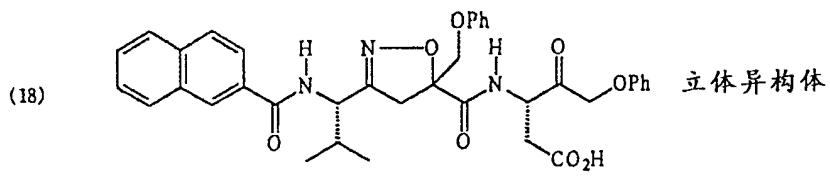
- c) $R^2 = 1\text{-萘基}$, $P_2 = \text{Et}$
- d) $R^2 = 2\text{-萘基}$, $P_2 = \text{Et}$
- e) $R^2 = \text{CH}_2\text{OAc}$, $P_2 = \text{Et}$
- f) $R^2 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $P_2 = \text{Et}$
- g) $R^2 = \text{CH}_2\text{OPh}$, $P_2 = \text{Et}$

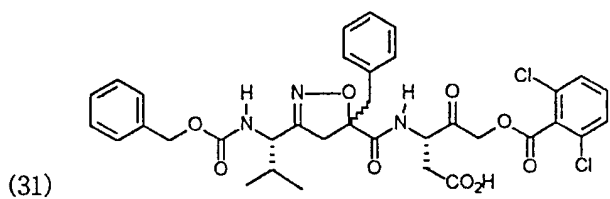
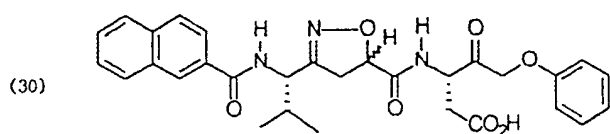
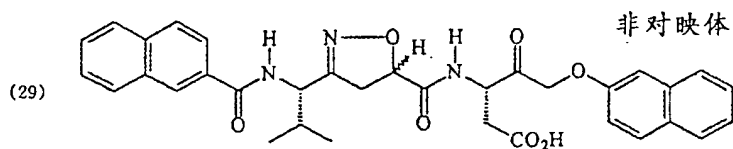
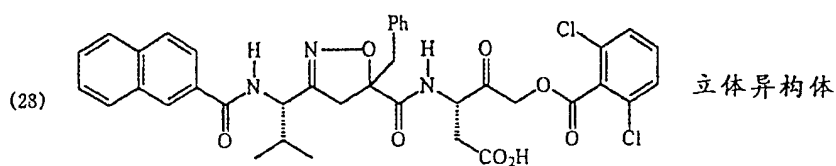
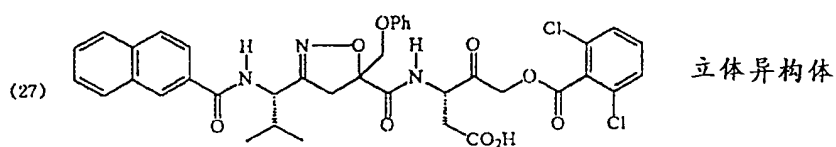
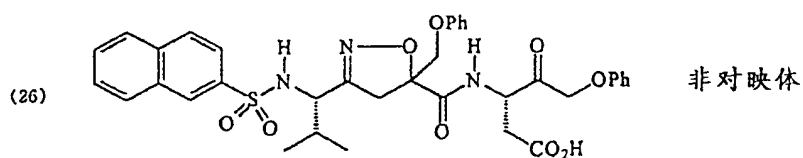
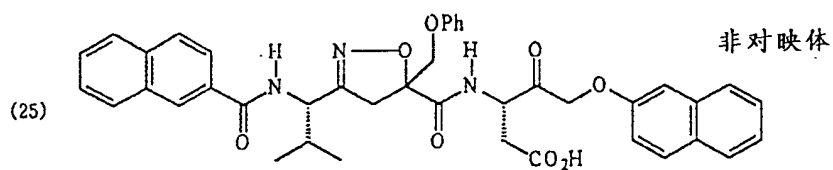
在化合物 (XIII) 中,

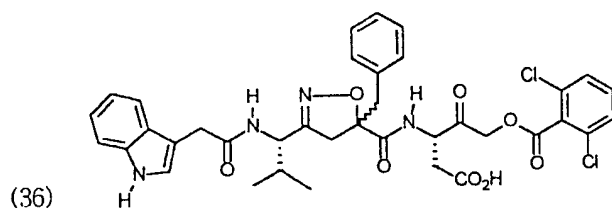
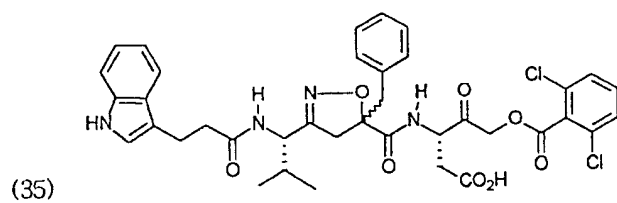
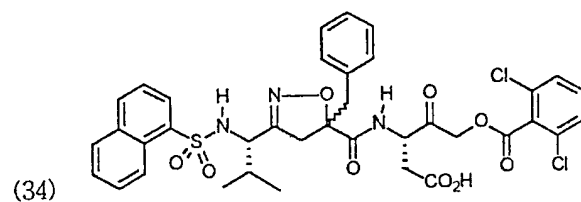
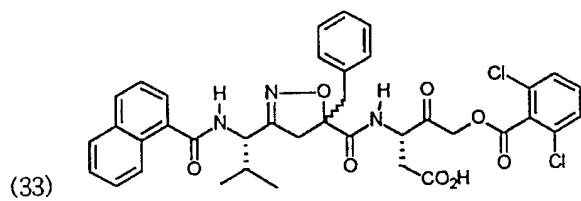
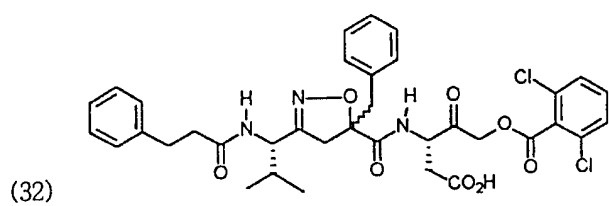
- a) $R^2 = \text{Et}$, $Z = \text{OH}$
- b) $R^2 = \text{Et}$, $Z = \text{Br}$

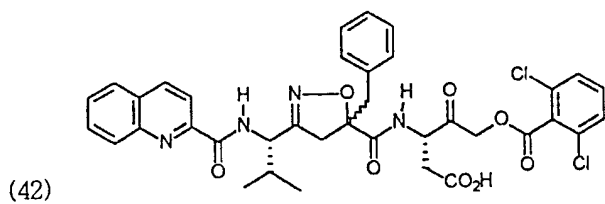
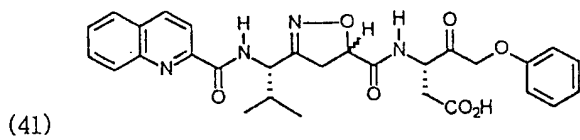
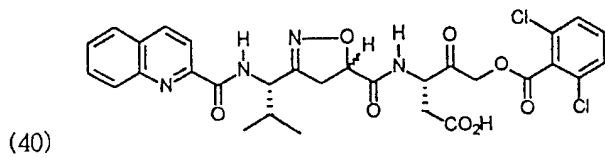
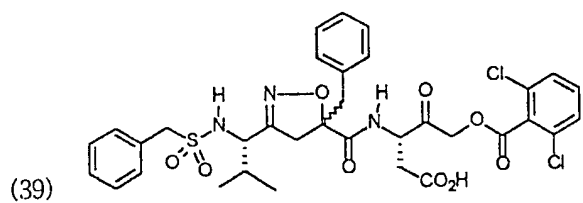
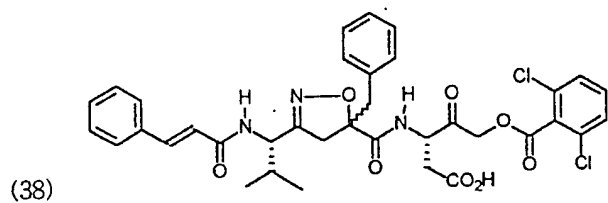
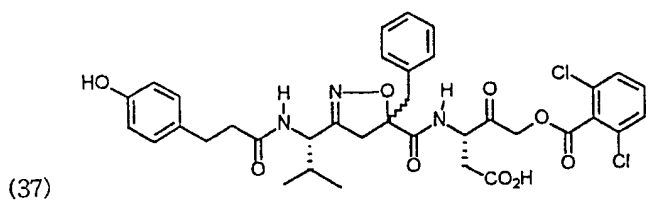
以下将列出通过本发明的方法合成的代表性化合物的结构式。为了方便起见, 发明人对本发明的代表性化合物进行了编号, 其中, MP 表示在脱保护步骤时在 HPLC 中的极性较强的馏份, 而 LP 表示 HPLC 中极性较弱的馏份。但是, 提供这些化合物的目的仅仅是为了说明本发明化合物的合成方法以及证实本发明的化合物可以通过上述方法合成这一事实, 但本发明并不受所列化合物的任何限制。

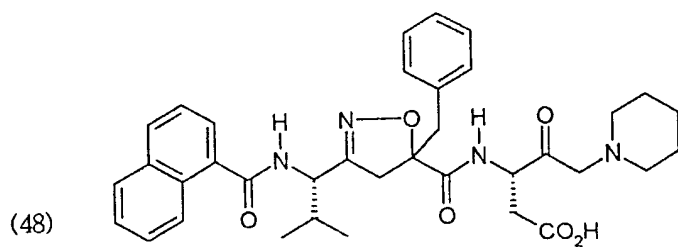
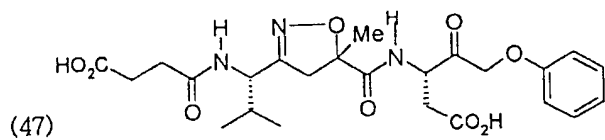
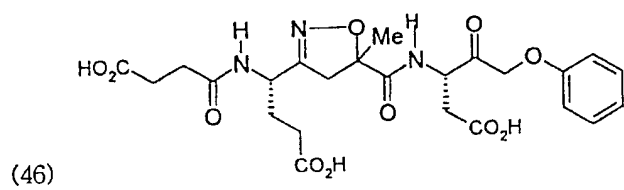
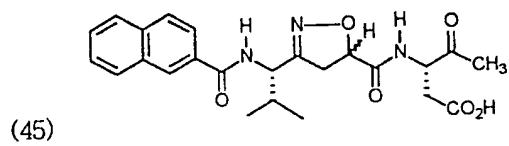
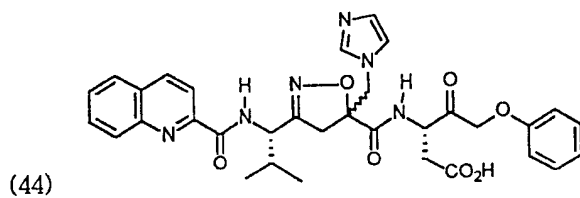
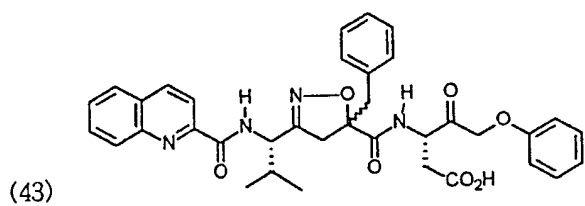


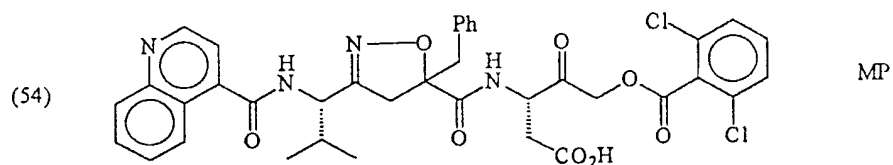
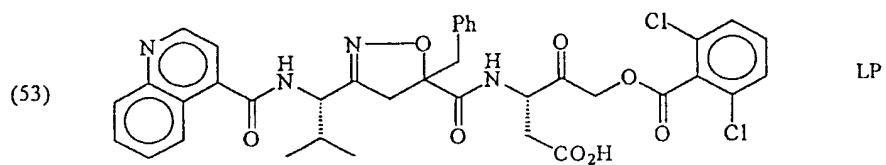
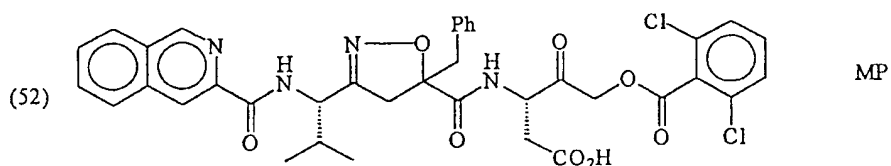
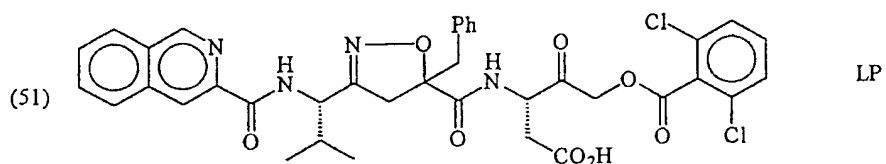
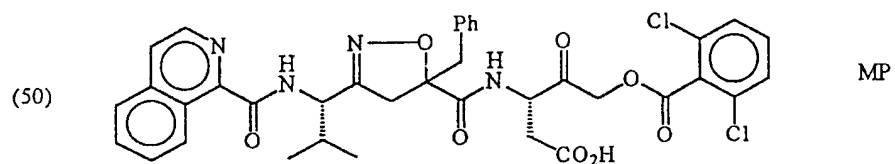
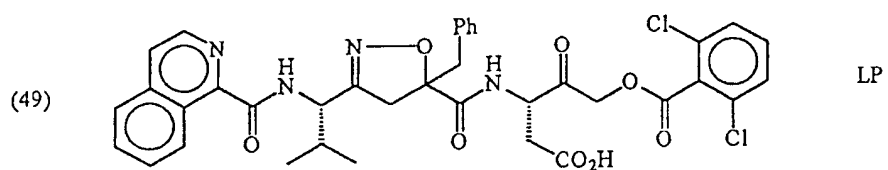


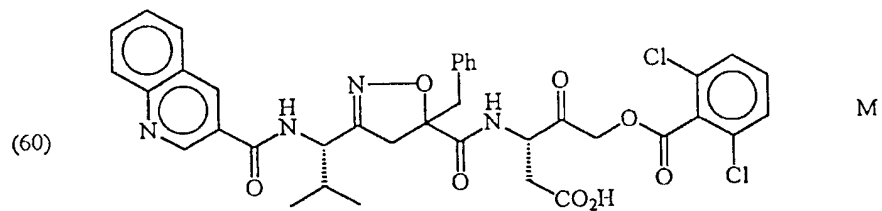
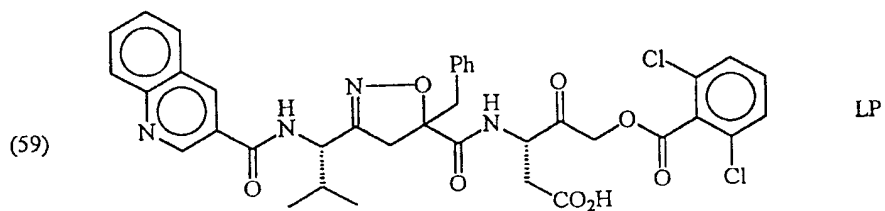
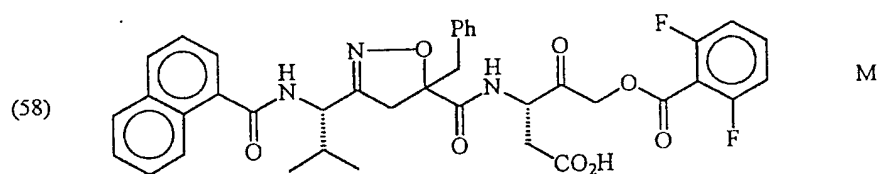
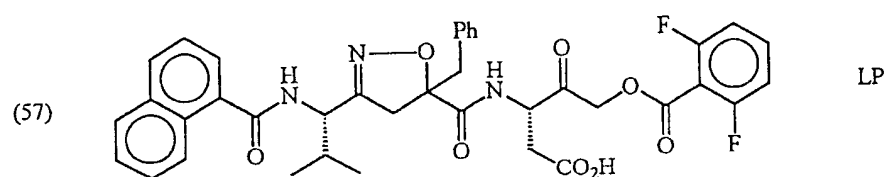
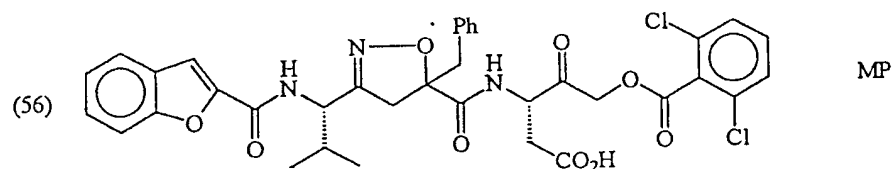
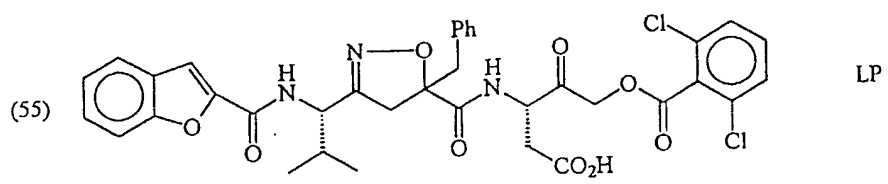


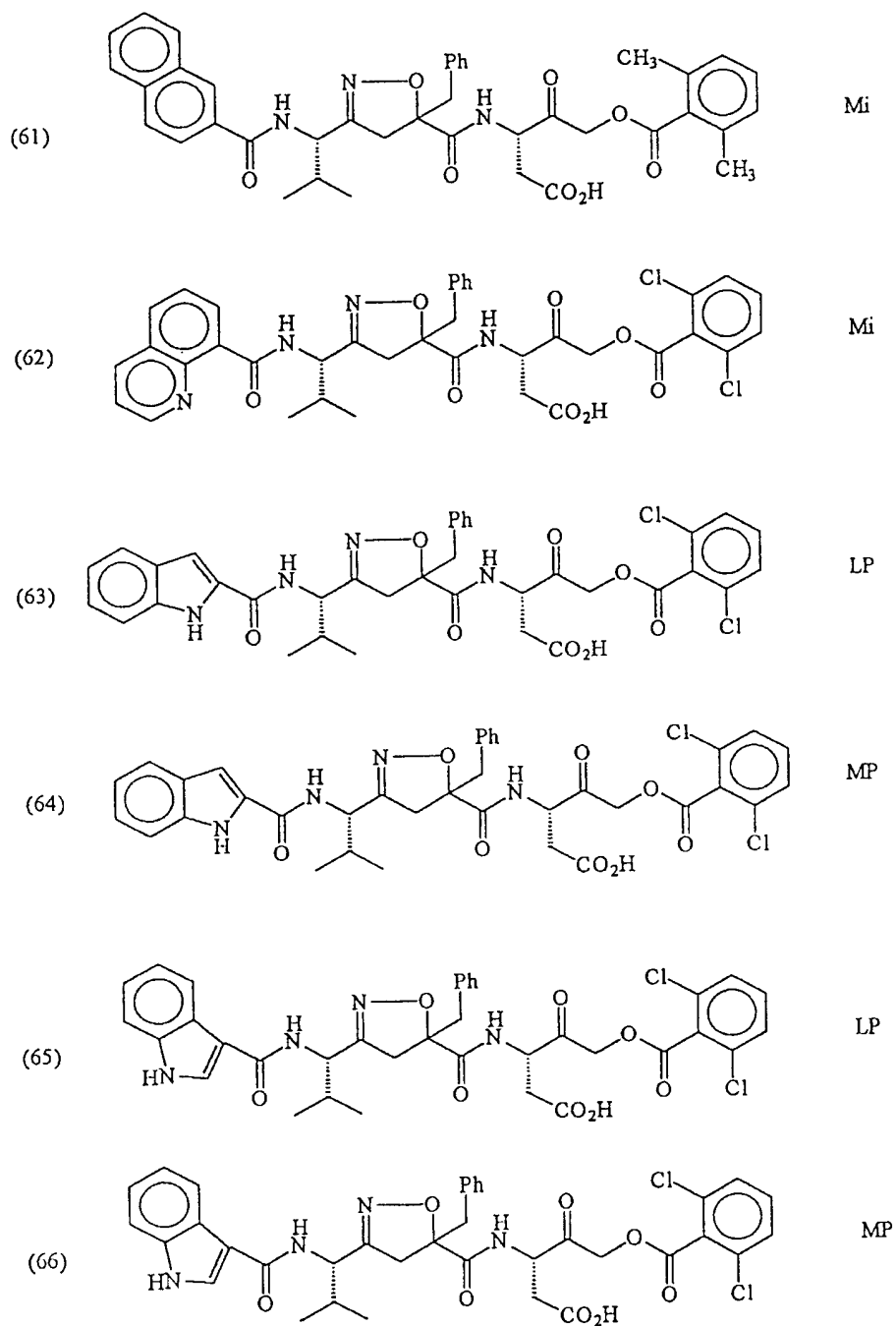


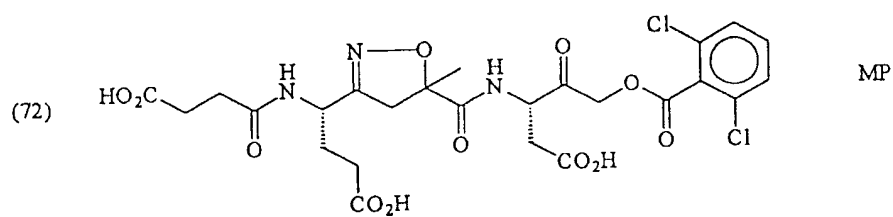
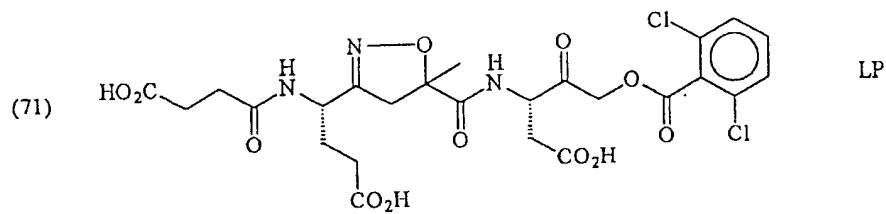
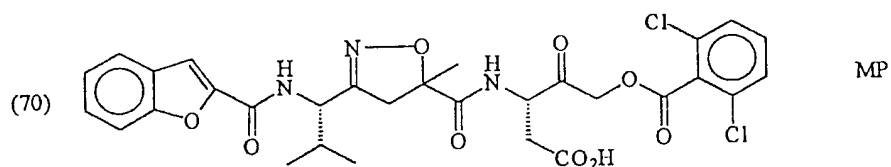
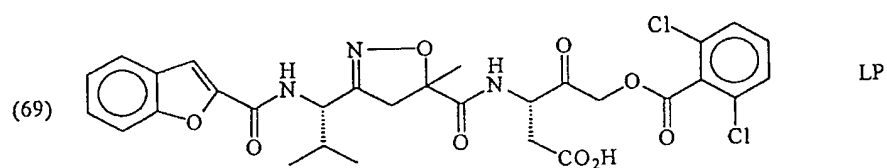
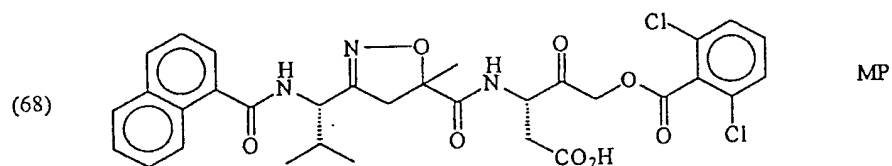
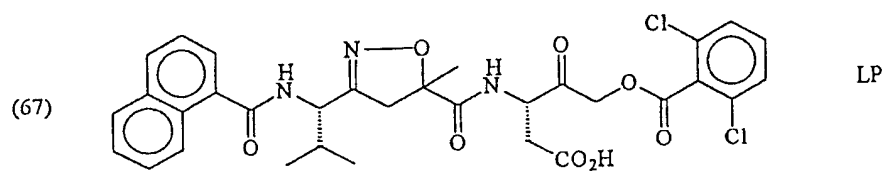


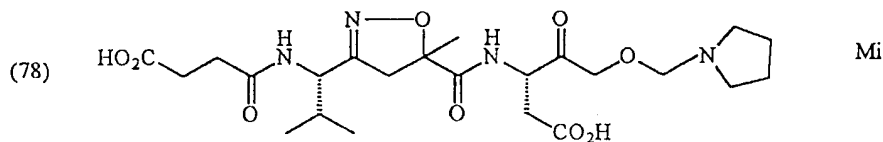
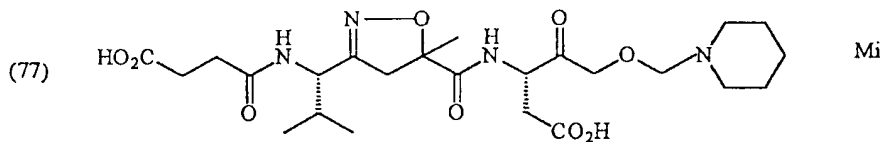
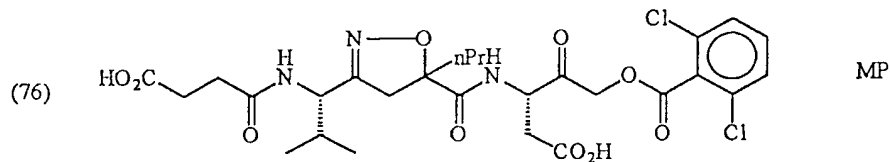
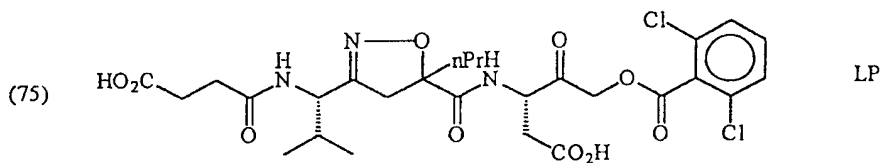
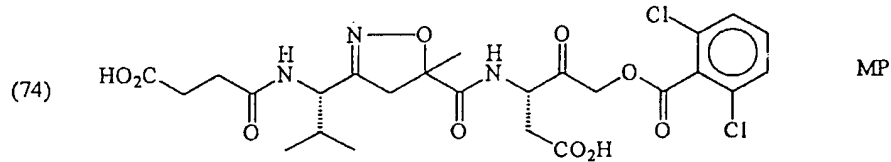
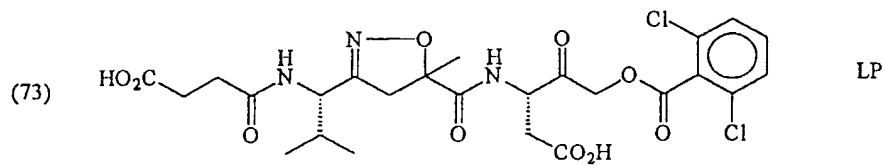


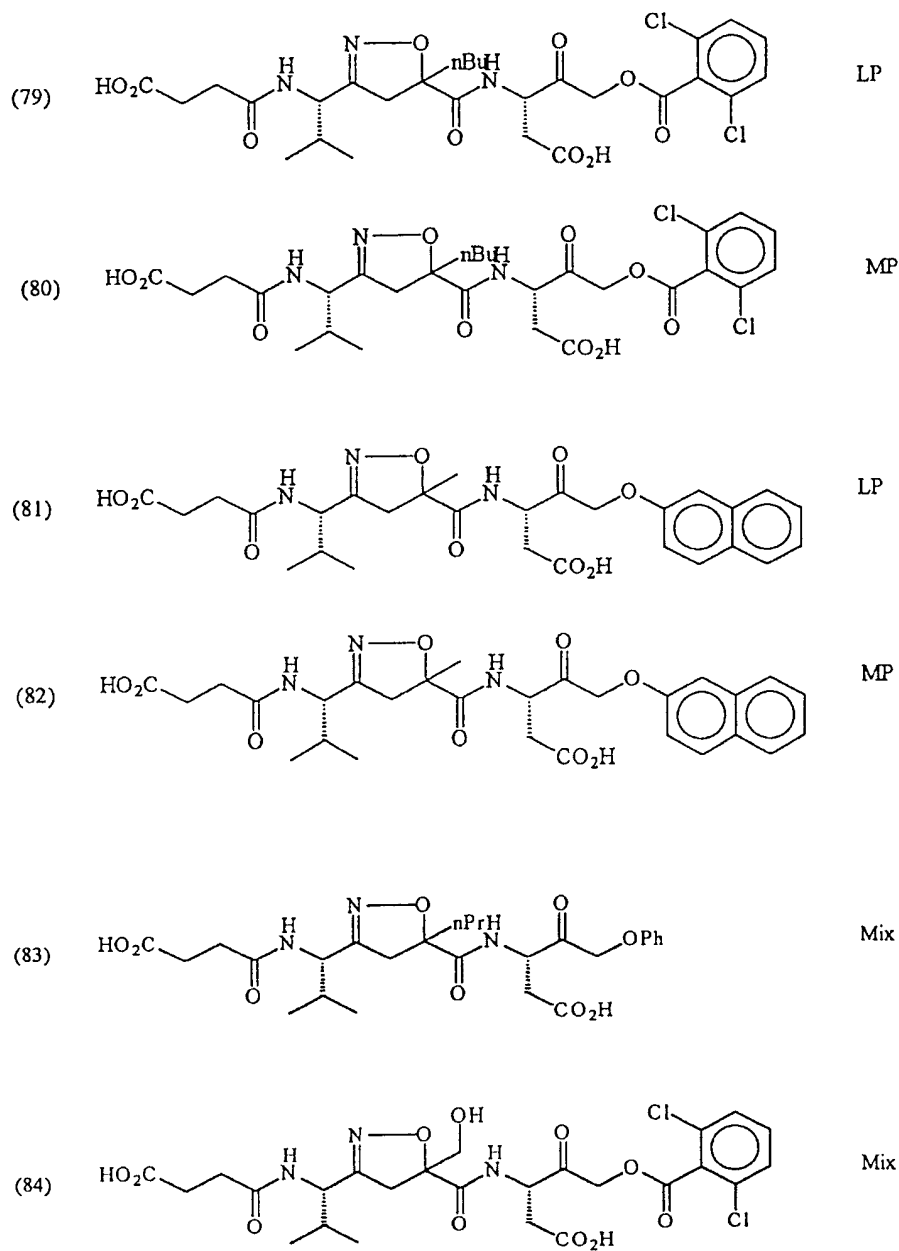


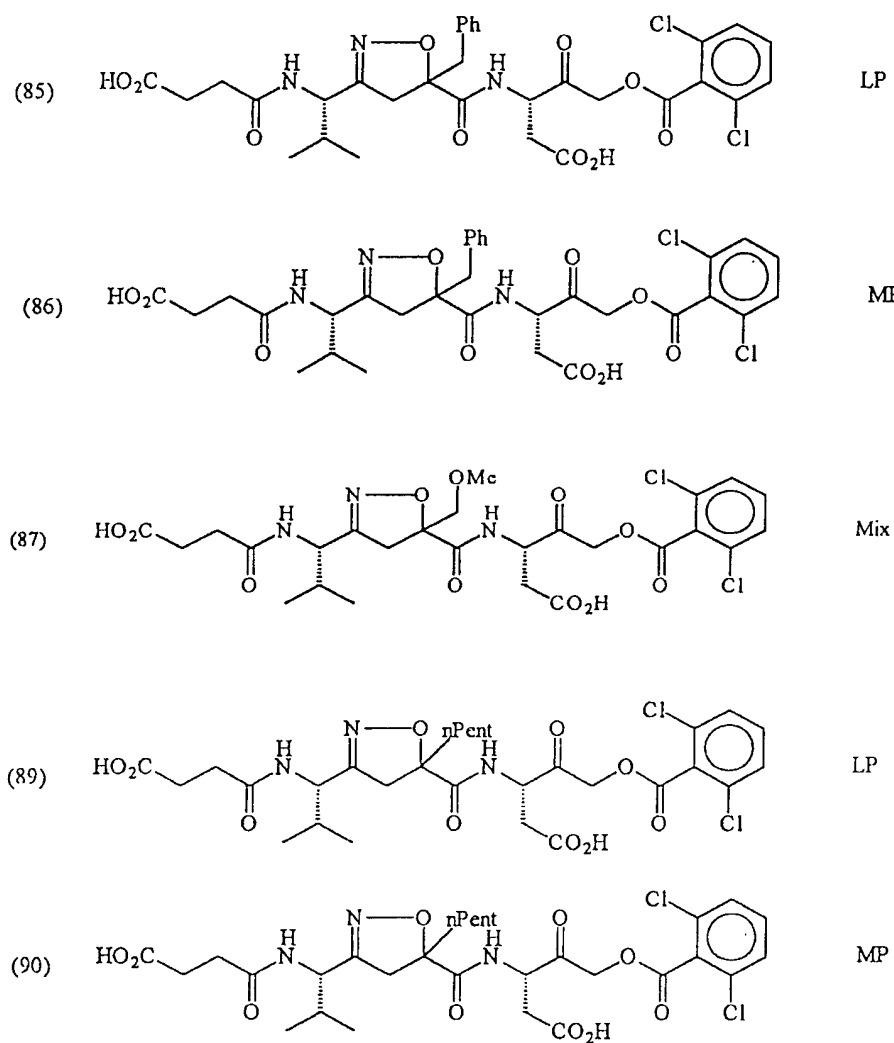


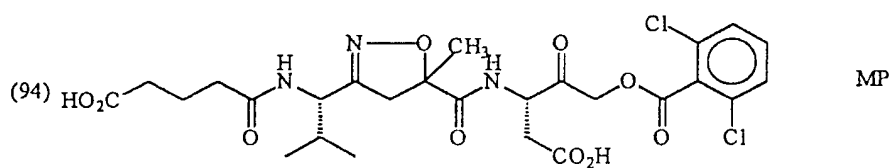
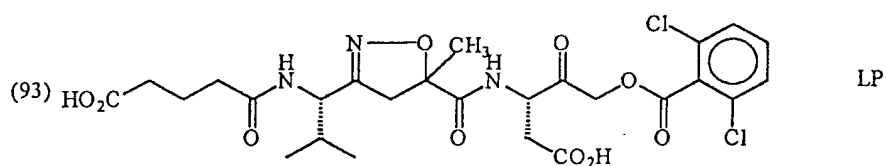
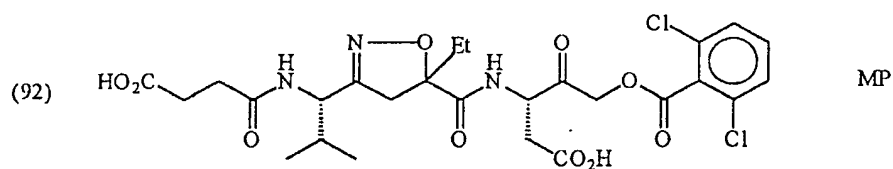
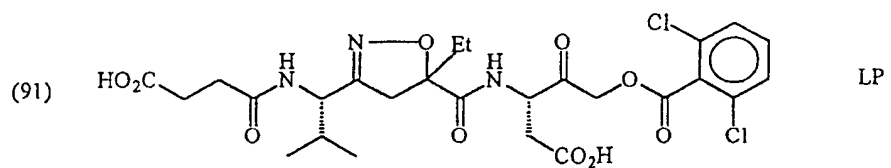












式(I)的异噁唑啉衍生物及其可药用盐、酯和异构体具有有用的药理学特性。例如,它们对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶具有抑制活性。由于它们的药理学活性,例如对抗炎反应的影响或对细胞凋亡的抑制作用,它们可有效地用作多种疾病的治疗剂,例如其中的细胞是异常死亡的疾病、痴呆、脑中风、AIDS引起的脑损伤、糖尿病、胃溃疡、由肝炎引起的脑损伤、暴发性肝功能衰竭(FHF)、败血症、器官移植排斥反应、风湿性关节炎、由于局部缺血性心脏病引起的心脏细胞的细胞凋亡以及抗炎反应。

具体地讲,本发明的组合物可用作暴发性肝功能衰竭的治疗剂。

正如以下将要详细描述,本发明人研究了式(I)化合物的体外和体内半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制活性、由 ConA 或 TNF_{α} /放线菌素 D 引起的肝病中的肝细胞的活力比、对肝炎的治疗效果、减少肝细胞的细胞凋亡以及抑制 PARP 裂解。

本发明人还研究了本发明的式(I)化合物对于由 IFN_{γ} 和抗-Fas 抗体引起的细胞凋亡的影响,并将其结果与现有的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Ac-DEVD-CHO 和/或 z-DEVD-cmk 进行了比较。简单地说,我们研究了式(I)的新型半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂抑制 Con A-诱导的小鼠急性肝功能衰竭的效力。结果发现,这种小分子的、非肽类型的抑制剂不仅在体外和体内显示对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性的抑制作用,而且还显示出对肝细胞的细胞凋亡性死亡的抑制作用。这些结果表明,本发明的式(I)化合物可以作为由于肝细胞的大量细胞凋亡性死亡所引起的人类 FHF 的治疗剂的候选药物。

本发明的化合物是小分子的、非肽类型的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂,具有广谱活性(参见图 1 和 2)。式(I)化合物与 BCNU 或 COX-2 抑制剂的不同之处在于该化合物最初是作为半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶家族的特异性抑制剂而设计的。值得注意的是,细胞凋亡过程是非常复杂的,半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶与该过程的许多步骤有关。此外,对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的调节了解的相对较少主要是因为许多已知的底物都是偶然发现的。因此,为了阻断在 FHF 急性期内肝细胞短

期的大量细胞凋亡，广谱的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂可能比特异性的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂更为有效。就此而言，式(I)化合物可能是理想的候选药物。

本发明人用 ConA-介导的肝炎模型测试了半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂式(I)化合物阻断细胞凋亡的效果。

有许多细胞因子与 Con A-诱导肝炎有关：IL-2、IFN γ 、TNF α 、IL-6、IL-4 和 IL-10。本发明人评估了式(I)化合物对于由 Con A 引起的血清 IL-1 β 、IL-2、IL-4 和 IFN γ 浓度升高的影响。结果发现，本发明的式(I)化合物由于具有半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1-抑制活性(如图 1 和 2 所示)而可以以剂量依赖型的方式显著抑制 IL-1 β 水平(参见图 5A)。但是，式(I)化合物并不显著影响 IL-2、IL-4 和 IFN γ 的水平(图 5B、C、D)。这些结果可以归因于式(I)化合物显示其半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂活性的细胞群主要是表达 Fas 的肝细胞。式(I)化合物可以阻止肝细胞发生与半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶有关的细胞凋亡，但并不直接抑制活化的 T 细胞。细胞中的一种半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 样蛋白酶的生物底物是 PARP (116 kDa)，其在发生细胞凋亡的细胞中会裂解为 85-和 31-kDa 的片段。因此，有人提出将 PARP 的 85 kDa-裂解产物的出现作为细胞凋亡的早期标志(参见，Lazebnik, Y. A. 等, 1994, Nature 371: 346-347; Kaufmann, S.H. 等, 1993, Cancer Res. 53: 3976-3985)。

式(I)化合物可以以剂量依赖型的方式抑制由 Con A 介导的肝细胞的细胞凋亡所引起的 PARP 裂解(参见图 7)。在蛋白质印迹分析中，85 kDa 裂解产物的量随着化合物 33 剂量的增加而逐渐减少，而完整的 116 kDa PARP 的量相对恒定。因此认为确实经历了细胞凋亡的肝细胞仅占整个肝脏的一小部分。该结果与组织学检查一致。如图 6 所示，Con A 引起了肝细胞严重的形态学和组织学的改变，并可以清楚地看到细胞凋亡性肝细胞损害。但是，大部分肝细胞仍保持存活，细胞凋亡的细胞仅占一部分。该现象解释了完整 116 kDa PARP 的量在 ConA/赋形剂处理的小鼠肝脏中相同的原因。

此外, 本发明人还通过用 IFN γ 和抗-Fas 抗体处理对 Fas 有响应的细胞来人工引起细胞凋亡, 并进行了实验以评估式 (I) 化合物防止细胞发生细胞凋亡的抑制活性。结果发现, 式 (I) 化合物的抑制作用比已知的 Ac-DEVD-CHO 或 z-DEVD-cmk 强 2 倍或更多 (在相同的浓度下, 细胞活力为 35.1% (Ac-DEVD-CHO)、47.3% (z-DEVD-cmk) 和 100% (化合物 33), 参见表 1 和图 8)。

从上述实验结果可以看出, 非肽类型的式 (I) 化合物具有多种半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制活性, 从而具有抗炎症和防止细胞凋亡的作用, 特别是可以有效地用作预防人类 FHF 中肝细胞大量细胞凋亡的治疗剂。

式 (I) 化合物是新的、非肽类型的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂。其广谱活性可以是作为阻断人类 FHF 中肝细胞大量细胞凋亡的治疗剂的有利性质。

因此, 本发明的化合物可以用作对抗上述疾病的药物。所述作为药物或治疗方法的应用包括向患者局部或全身给药有效量的用于治疗疾病的本发明化合物。

可将所述化合物配制成用于给药的各种药物形式。所述药物形式或组合物是新的, 因此构成了本发明的又一个方面。所述组合物的制备方法也构成了本发明的又一个方面。为了制备本发明的药物组合物, 可将有效量的作为活性成分的碱或盐形式的化合物与可药用载体以紧密混合物的形式混合, 所述可药用载体可以各种形式, 这取决于给药所需的剂型。这些药物组合物可以是适于口服、经皮或通过胃肠外注射给药的单位剂量形式。特别优选将上述药物组合物配制成单位剂量形式, 以便于给药并使剂量一致。例如, 在制备口服剂型的组合物时, 在口服液体制剂例如混悬剂、糖浆、酞剂和溶液剂的情况下, 可以使用任何常用的药物溶媒, 例如水、甘醇、油、醇等; 或者, 在散剂、丸剂、胶囊和片剂的情况下, 可以使用固体载体, 例如淀粉、糖、高岭土、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。片剂和胶囊是最适宜的口服剂量单位形式, 因其易于给药, 在该情况下, 使用的显然是固体药物载体。

优选片剂和填充物是肠溶包衣的。

对于胃肠外组合物，载体通常包括无菌水(至少占大部分)，但也可以含有其它例如促进溶解的成分。可注射溶液，例如无菌的含水注射混悬液或油混悬液，可以用适宜的分散剂、湿润剂或助悬剂制备。可用于该目的的溶剂包括水、Linger 溶液、等渗氯化钠溶液等。无菌的不挥发油也可用作溶剂或悬浮溶媒。任何无刺激性的不挥发油、包括甘油单酯、甘油二酯，均可用于该目的，脂肪酸例如油酸也可用于可注射制剂。

在适于经皮给药的制剂中，载体中选择性地含有渗透促进剂和/或适宜的湿润剂，并且选择性地含有少量适宜的各种性质的添加剂，其中的添加剂不会对皮肤产生明显的有害影响。所述添加剂可以促进向皮肤的给药和/或有助于所需组合物的制备。这些组合物可以以各种途径给药，例如，以经皮贴剂、spot-on 或软膏的形式给药。

在本说明书和权利要求书中所用的剂量单位是指适于作为单位剂量的物理上不连续的单位，每一单位含有计算出的用于产生所需治疗效果的预定量的活性成分和所需的药物载体。所述剂量单位形式的例子是片剂、胶囊、丸剂、散剂包、糯米纸囊剂、可注射溶液或混悬液、一茶匙的容量、一大汤匙的容量等，以及隔离开的多个这样的剂型。

鉴于本发明的化合物在治疗其中的细胞是异常死亡的疾病、痴呆、脑中风、AIDS、糖尿病、胃溃疡、肝炎引起的肝细胞损害、败血症、器官移植排斥反应和抗炎反应中的用途，本发明还提供了对患有这些疾病的患者进行治疗的方法，该方法包括，局部或全身性给药与药物载体混合的药物有效量的式(I)化合物或其可药用盐、酯或立体化学异构体形式。

治疗相关疾病的专业人士可以很容易地确定出向个体给药的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂、特别是式(I)化合物的有效量。通常，有效量的范围可以从 0.01mg/kg 至 100mg/kg 体重/天，可以以单位剂量或分开的剂量给药。但是，本领域技术人员可以理解，这一量的范围仅仅是指导性的，并不以任何方式限定本发明的范围或应用。对于具

体个体的具体剂量水平应取决于所采用的具体化合物、个体的体重、健康状况、给药方案、药物的给药时期、给药途径、排泄速率、药物的联用、疾病的严重程度等。

通过以下实施例对本发明进行更详细的描述。提供这些实施例的目的仅仅是为了进行说明，不应将其看作是对权利要求中所定义的本发明的限定。

实施例

(A) 异羟肟酰氯的合成(实施例 1 至 4)

实施例 1: N-叔丁氧羰基-(S)-缬氨酸(valinal)和 N-叔丁氧羰基-(S)-缬氨酸肟的合成

氮气氛下，向二甲亚砜(11.7ml, 3.0 当量)的干燥二氯甲烷(~200mL)溶液中于-60℃下缓慢加入草酰氯(5.78ml, 1.2 当量)。10 分钟后，缓慢加入 N-叔丁氧羰基-(S)-缬氨酸(11.23g, 55.2mmol)的二氯甲烷(30mL)溶液，并将烧瓶用 20ml 二氯甲烷冲洗。将形成的白色悬浮液于大约-50℃下搅拌 1 小时。将反应溶液用二异丙基乙基胺(28.8ml, 3.0 当量)处理并在-23℃下搅拌约 20 分钟，然后用己烷(400mL)稀释。将混合物用水(150mL)、1N-KHSO₄溶液(3 次，总共 1L)洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤然后浓缩。将得到的黄色液体不经进一步纯化直接用于下一步骤。

将粗品缬氨酸的乙醇(60mL)-水(30mL)溶液在水浴温度下用羟胺盐酸盐(5.76g, 1.5 当量)和碳酸钠(4.39g, 0.75 当量)处理。反应在 1 分钟内产生大量固体，于是用乙醇-水(1:1, 60mL)稀释并搅拌 1 稀释。将反应液倒入饱和氯化钠(100mL)中然后用乙酸乙酯萃取两次(300mL)。将有机萃取液用饱和碳酸氢钠洗涤(100mL x 2)，干燥(无水硫酸钠)，过滤然后浓缩得到白色粉末(11.34g, 肟的顺、反异构体)。

实施例 2: (2S)-2-(叔丁氧羰基)氨基-1-氯-3-甲基-丁烷-1-酮肟的合成

将 N-叔丁氧基-羰基-(S)-缬氨醛肟 (11.34g) 的 DMF (100mL) 溶液用 NCS (7.75g) 处理并在温水浴 (~40℃) 中搅拌 1 小时。蒸除 DMF 后, 将残余物用乙酸乙酯-己烷 (1:1, 150mL) 萃取, 用水洗涤 (100ml x 3), 干燥 (无水硫酸钠), 过滤然后浓缩得到 13.69g 标题化合物。

实施例 3: 4-(9-苄基甲氧羰基)氨基-(4S)-5-羟基-戊酸叔丁酯的合成

氮气氛围下, 向 N-(9-苄基甲氧羰基)- γ -叔丁基谷氨酸 (8.51g, 20.0mmol) 和 NMM (2.42mL, 1.1 当量) 的干燥 THF (110mL) 溶液于 0℃ 下加入氯甲酸异丁酯 (2.72mL, 1.05 当量)。20 分钟后, 将反应混合物过滤并在 -78℃ 及氮气氛围下加入到 NaBH₄ (1.5g) 的 THF (120mL)-MeOH (30mL) 溶液中并用干燥的 THF (20mL) 冲洗。于 -78℃ 搅拌 2.5 小时后, 用乙酸 (13mL) 终止反应。浓缩至约 50mL 后, 将残余物溶于乙酸乙酯-己烷 (200ml, 1:1), 用水洗涤 (150ml x 2)。将水层用乙酸乙酯萃取-己烷 (150ml, 1:1) 反萃取。将合并的萃取液用饱和碳酸氢钠洗涤 (150ml x 2), 干燥 (无水硫酸钠), 过滤然后浓缩得到 8.30g 玻璃样固体状标题化合物。将该粗品醇直接使用。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (2H, d, J= 7.3Hz), 7.66 (2H, d, J= 7.8Hz), 7.41 (2H, t, J= 7.3 Hz), 7.31 (2H, 假的 t, J= 7.8, 7.3 Hz), 5.18 (NH, d), 4.41 (2H, m), 4.22 (1H, m), 3.72-3.57 (3H, m), 2.33 (2H, m), 1.93-1.77 (2H, m), 1.45 (9H, s)。

实施例 4: 4-(9-苄基甲氧羰基)氨基-(4S)-5-氯-5-羟基亚氨基-戊酸叔丁酯的合成

氮气氛围下, 向 DMSO (3.0mL) 的干燥二氯甲烷 (100mL) 溶液于 -65℃ 下缓慢加入草酰氯 (2.10ml, 1.2 当量)。15 分钟后, 加入 4-(9-苄基甲氧羰基)氨基-(4S)-5-羟基戊酸叔丁酯 (8.30g, 20mmol) 的二氯甲烷 (50mL) 溶液并用干燥的二氯甲烷 (20mL) 冲洗。将所得溶液于 -40℃ 至约 -50℃ 搅拌 2 小时。向其中加入 EtN(i-Pr)₂ (10.45ml, 3.0 当量), 将反应液缓慢升温至 -10℃ 并用 TLC 进行检测 (向醛的转化相对缓慢,

约 1 小时)。将反应混合物用己烷(300mL)稀释,用水(150mL)、1N-KHSO₄(3次,总共 500mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤然后浓缩得到相应的醛。

将粗品醛的乙醇(60mL)-二氯甲烷(30mL)-水(10mL)溶液在 0℃下用 H₂NOH·HCl (2.08g, 1.5 当量)和碳酸钠(1.60g, 0.75 当量)处理。将反应液室温搅拌 30 分钟,然后加入水(10mL)并继续搅拌 1 小时。补加 H₂NOH·HCl (400mg)和碳酸钠(320mg)并将反应液继续搅拌 1 小时。真空蒸除大部分挥发性物质,将残余物加入乙酸乙酯(200ml)中,用水(100mL)、饱和碳酸氢钠(100mL)洗涤,干燥(无水硫酸钠),过滤然后浓缩得到白色粉末状所需的脘(8.30g, 顺+反)。

将粗品脘的 DMF (35mL)溶液用 NCS (2.67g, 20.0mmol)处理。将反应液在温水浴(40℃)中搅拌 1 小时。在高真空旋转蒸发器中蒸除 DMF 后,将残余物加入己烷-乙酸乙酯(1:1, 150mL)中,用水洗涤(100ml x 3),干燥(无水硫酸钠),过滤然后浓缩得到标题化合物(9.25g, 顺+反)。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.88 (1H, s), 7.75 (2H, d, J= 7.3Hz), 7.57 (2H, m), 7.39 (2H, t, J= 7.32Hz), 7.30 (2H, 假的 t, J= 7.8, 7.3Hz), 5.46 (1H, d, J= 9.3 Hz), 4.63 (1H, m), 4.43-4.38 (2H, m), 4.19 (1H, m), 2.3 (2H, m), 2.03 (2H, m), 1.43 (9H, s)。(报道的是主要异构体的 NMR 数据)

按照与以上实施例相同的方式制备如下化合物。

- 1-氯-3-甲基-(2S)-2-苯基甲氧羰基氨基-丁烷-1-酮脘,
 - 3-(叔丁氧羰基氨基)-(3S)-4-氯-4-羟基亚氨基-丁酸甲酯,
 - 3-(苯基甲氧羰基氨基)-(3S)-4-氯-4-羟基亚氨基-丁酸叔丁酯,
- 和
- 3-(9-苄基甲氧羰基氨基)-(3S)-4-氯-4-羟基亚氨基-丁酸叔丁酯。

(B) 丙烯酸酯衍生物的合成(实施例 5 至 8)

实施例 5: 2-乙酰氧基甲基丙烯酸乙酯的合成

将 2-羟基甲基丙烯酸乙酯(17.3g, 133mmol, 纯度~70%, 参考文献: Villieras, J. 和 Rambaud, M. Synthesis, 1982, 914)的干燥二氯甲烷(200mL)溶液在氮气氛及 0℃下用乙酸酐(18.8ml, 1.5 当量)和三乙胺(37ml, 2.0 当量)处理。室温搅拌过夜后, 将反应液用己烷(400mL)稀释, 用饱和碳酸氢钠洗涤(300ml x 2), 干燥(无水硫酸钠), 过滤然后浓缩。经简单地蒸馏得到 4.6g 澄清液体状标题化合物。NMR 分析显示约~70%的纯度。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.36 (1H, s), 5.84 (1H, s), 4.81 (2H, s), 4.25 (2H, q, J= 7.3 Hz), 2.11 (3H, s), 1.31 (3H, t, J= 7.3 Hz)

实施例 6: 2-苯氧基甲基丙烯酸乙酯的合成

氮气氛及 0℃下, 将 2-溴甲基丙烯酸乙酯(2.00g, 10.4mmol, 参考文献: Villieras, J. 和 Rambaud, M. Synthesis, 1982, 914)和苯酚(975mg, 1.0 当量)的干燥 THF (20mL)溶液用无水碳酸钾(1.43g, 1.0mol 当量)处理。1 小时内没有观察到反应。加入无水 DMF (20mL)并于 0℃下搅拌 2 小时, 然后室温搅拌 1 小时。蒸除 DMF 后, 加入水(100mL)并将反应液用乙酸乙酯萃取(100ml x 2)。将有机萃取液用盐水(100mL)洗涤, 干燥(无水硫酸钠), 过滤然后浓缩。经快速色谱(40% CH₂Cl₂/己烷)得到 1.712g (80%)标题化合物。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (2H, yt, J= 7.3 Hz), 6.99-6.96 (3H, m), 6.41 (1H, s), 6.01 (1H, s), 4.78 (2H, s), 4.27 (2H, q, J= 7.33 Hz)

实施例 7: 2-苄基丙烯酸乙酯的合成

氮气氛及-78℃下, 向溴苯(7.15g, 45.5mmol)的 THF (30mL)溶液中加入 n-BuLi (16.6mL, 2.5M 的己烷溶液, 41.4mmol)。将其搅拌 10 分钟。氮气氛及-78℃下, 通过套管向 CuCN (3.71g, 41.4mmol)的 THF (30mL)悬浮液中加入锂化苯的溶液。将反应混合物于-78℃下继续搅拌

10分钟然后加入2-溴甲基丙烯酸乙酯(4.00g, 20.7mmol)的THF溶液。将反应混合物缓慢升温至室温然后用2NHCl终止反应。滤出沉淀并将滤液用己烷(400mL)稀释,用饱和碳酸氢钠洗涤(300ml x 2),干燥(无水硫酸钠),过滤然后浓缩。经快速色谱(2%乙酸乙酯-己烷)得到3.04g (77%)标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.34-7.22 (5H, m), 6.26 (1H, s), 5.48 (1H, s), 4.22 (2H, q, $J=6.3\text{Hz}$), 3.66 (2H, s), 1.29 (3H, q, $J=6.3\text{Hz}$)。

实施例8: 2-(4-溴苯基)丙烯酸乙酯的合成

标题化合物按照已知的方法制备(Helvetica Chimica Acta 1986, 69 2048)。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (2H, d), 7.29 (2H, d), 6.37 (1H, s), 5.90 (1H, s), 4.29 (2H, q), 1.33 (3H, t)

按照类似的方法制备如下化合物。

• 2-(1-萘基)丙烯酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 7.44 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$), 7.48-7.43 (3H, m), 7.37 (1H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 6.70 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), 5.89 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), 4.22 (2H, q, $J=7.3\text{Hz}$), 1.21 (3H, t, $J=7.3\text{Hz}$),

• 2-(2-萘基)丙烯酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.95 (1H, s), 7.90-7.86 (3H, m), 7.59-7.52 (3H, m), 6.47 (1H, d, $J=1.0\text{Hz}$), 6.06 (1H, d, $J=1.0\text{Hz}$), 4.38 (2H, q, $J=6.8\text{Hz}$), 1.40 (3H, t, $J=6.8\text{Hz}$)。

• 2-丁基丙烯酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.11 (s, 1H), 5.49 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H),

4.19 (q, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.45-1.28 (m, 7H), 0.90 (t, $J=7.3$ Hz, 3H).

· 2-丙基丙烯酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.12 (d, $J=0.9$ Hz, 1H), 5.49 (d, $J=1.4$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.27 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.29 (t, $J=7.3$ Hz, 3H), 0.92 (t, $J=7.3$ Hz, 3H).

· 2-乙基丙烯酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.11 (d, $J=0.9$ Hz, 1H), 5.50 (s, 1H), 4.20 (q, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.32 (m, 2H), 1.29 (t, $J=6.9$ Hz, 3H), 1.07 (t, $J=7.4$ Hz, 3H).

· 2-戊基丙烯酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.12 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 4.21 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.51-1.13 (m, 9H), 0.89 (t, $J=6.8$ Hz, 3H).

(C) 合成异噁唑啉的一般方法(实施例 9 和 10)

实施例 9: 3-((1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基)-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯

将(2S)-2-苯基甲氧羰基氨基-1-氯-3-甲基-丁烷-1-酮肟(640mg, 2.25mmol)和 2-苯氧基甲基丙烯酸乙酯(464mg)的干燥乙醚(10mL)溶液在氮气氛围及 -78°C 下用三乙胺(627 μL , 2.0 当量)处理。将反应液搅拌过夜, 缓慢升温至室温。加水(100mL), 将反应液用乙酸乙酯萃取(100ml x 2), 用水洗涤(100mL), 干燥(无水硫酸钠), 过滤然后浓缩。经快速色谱(15%乙酸乙酯-己烷)得到 851mg (83%)标题化合物, 为非对映体的 1: 1 的混合物。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.34 (7H, m), 6.98 (1H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 6.89 (2H, d, $J=7.7\text{Hz}$), 5.61 (1H, d, $J=9.3\text{Hz}$), 5.15-5.08 (2H, m), 4.50 (1H, br s), 4.33-4.22 (4H, m), 3.60-3.54 (1H, m), 3.32-3.27 (1H, m), 2.10 (1H, m), 1.29 (3H, m), 1.02-0.94 (6H, m).

按照类似方法制备如下化合物:

• 3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.45-7.15 (m, 10H), 5.07 (m, 2.5H), 4.90 (d, 0.5H), 4.30-4.18 (m, 3H), 3.36-2.88 (m, 4H), 1.95-1.80 (m, 1H), 1.27 (m, 3H), 0.86-0.55 (m, 6H).

• 3-[(1S)-1-叔丁氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-(2-萘基)-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.97 (1H, s), 7.86-7.82 (3H, m), 7.52-7.48 (3H, m), 4.93 (1H, br), 4.37 (1H, m), 4.25-4.18 (2H, m), 4.10-4.05 (1H, 双二重峰, $J=17.1, 17.6\text{Hz}$), 3.28-3.22 (1H, 双二重峰, $J=17.1, 17.1\text{Hz}$), 2.05 (1H, m), 1.43 (1H, s), 1.24-1.20 (3H, m), 0.98-0.91 (6H, m).

• 3-[(1S)-1-叔丁氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(1:1非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (5H, m), 4.82 和 4.60 (1H, 双m), 4.25-4.15 (3H, m), 3.38-3.29 (2H, m), 3.10 (1H, m), 2.90 (1H, m), 1.43 和 1.42 (9H, 双s), 1.27 (3H, m), 0.90-0.80 (6H, m).

• 5-乙酰氧基甲基-3-[(1S)-1-叔丁氧基-羰基氨基-2-甲基-丙

基]-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.93 (1H, br), 4.44-4.26 (5H, m), 3.50 (1H, m), 3.10 (1H, m), 2.08 (4H, s + br 1H), 1.46 (9H, s), 1.32-1.30 (3H, m), 1.02-0.96 (6H, m).

• 3-[2-甲基-(1S)-1-(叔丁氧羰基氨基)-丙基]-5-丁基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.96 & 4.87 (双 br s, 1H), 4.34-4.18 (m, 3H), 3.42-3.36 (m, 1H), 2.90-2.83 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.91 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.37-1.26 (m, 7H), 0.98-0.87 (m, 9H).

• 3-[2-甲基-(1S)-1-(叔丁氧羰基氨基)-丙基]-5-丙基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.96-4.86 (m, 1H), 4.33-4.18 (m, 3H), 3.42-3.36 (m, 1H), 2.90-2.83 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.29 (m, 5H), 0.98-0.87 (m, 9H).

• 3-[2-甲基-(1S)-1-(叔丁氧羰基氨基)-丙基]-5-甲氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸甲酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.92 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 3.80 & 3.79 (双 s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.88-3.13 (m, 4H), 2.04 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 0.99-0.91 (m, 6H).

• 3-[2-甲基-(1S)-1-(叔丁氧羰基氨基)-丙基]-5-正戊基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.95 & 4.88 (双 br s, 1H), 4.30-4.17 (m, 3H), 3.42-3.36 (m, 1H), 2.89-2.83 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.28 (m, 9H), 0.98-0.85 (m, 9H).

· 3-[2-甲基-(1S)-1-(叔丁氧羰基氨基)-丙基]-5-乙基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.96 & 4.88 (双 br s, 1H), 4.31-4.18 (m, 3H), 3.42-3.36 (m, 1H), 2.89-2.80 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.94 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.29 (m, 3H), 0.97-0.86 (m, 9H).

实施例 10: 3-[(1S)-1-(9-苄基甲氧羰基氨基)-3-叔丁氧羰基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸甲酯的合成

将 4-(9-苄基甲氧羰基)氨基-(4S)-5-氯-5-羟基-亚氨基-戊酸叔丁酯(3.44g, 7.50mmol)和甲基丙烯酸甲酯(2.40mL, 3.0 当量)的干燥乙醚溶液在氮气氛围和 -78°C 下用 $\text{EtN}(\text{i-Pr})_2$ (1.96mL, 1.5 当量)处理。按照以上描述进行类似的处理然后用 25-30%乙酸乙酯/己烷进行快速色谱得到 3.46g (89%总收率)非对映体混合物形式的标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (2H, d, $J=7.3\text{Hz}$), 7.59 (2H, d, $J=7.3\text{Hz}$), 7.40 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 7.31 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 5.34 (1H, m), 4.58-4.38 (3H, m), 4.21 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.48 (1H, m), 2.90-2.81 (1H, m), 2.42-2.27 (2H, m), 2.18 (1H, m), 1.93 (1H, m), 1.63 (3H, s), 1.45 (9H, s)

(D) 异噁唑啉的转化(脱保护、P4 基团的引入、酯基团的水解)(实施例 11 和 12)

实施例 11: 3-{2-甲基-(1S)-1-(苄-2-羰基-氨基)-丙基}-5-苄氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯

将 3-{(1S)-1-(叔丁氧羰基氨基)-2-甲基-丙基}-5-苄氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(2.00g, 4.76mmol)的干燥二氯甲烷(10mL)溶液在 0°C 及氮气氛围下用 TFA (6mL)处理并搅拌 1.5 小时。蒸除挥发性物质后,将残余物加入乙酸乙酯(200mL)中,用饱和碳酸氢钠洗涤(100ml x 2),干燥(无水硫酸钠),过滤然后浓缩。向粗产物、

EDC(1.09g, 1.2 当量)、2-萘甲酸(983mg, 1.2 当量)和 HOBt (771mg, 1.2 当量)的 DMF (20mL)溶液中于 0℃下加入三乙胺(663 μ L, 1.0 当量)。将反应液室温搅拌过夜。真空蒸除挥发性物质后,将残余物加入乙酸乙酯(250mL)中,用水(100mL)、饱和碳酸氢钠(100ml x 2)洗涤,干燥(无水硫酸钠),过滤然后浓缩。用 25-33%乙酸乙酯/己烷进行快速色谱得到 2.04g (90%)标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (1H, s), 7.93-7.84 (4H, m), 7.58-7.52 (2H, m), 7.29-7.22 (2H, m), 7.00-6.81 (4H, m), 5.06-5.01 (1H, m), 4.36-4.24 (4H, m), 3.68-3.61 (1H, m), 3.43-3.39 (1H, m), 2.28 (1H, m), 1.31-1.26 (3H, m), 1.12-1.05 (6H, m)。

异噁唑啉 5-甲酸酯的水解: 将上述化合物(2.04g)在蒸馏过的 THF (40mL)中的溶液(不完全溶解)用 1N-NaOH (5.2ml, 1.2 当量)处理。4 小时后(约完成了 50%),补加 1N-NaOH (1.0mL)。搅拌过夜后,将反应液用浓的 1N-HCl 中和。将残余物加入二氯甲烷(>700mL)中,用水洗涤,干燥(无水硫酸钠),过滤然后浓缩得到 1.948g (103%)游离的羧酸,将其直接用于下一步骤。

按照类似方法制得如下化合物:

• 3-{2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羧基氨基)-丙基}-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 7.93-7.86 (2H, m), 7.66 (1H, m), 7.54-7.42 (3H, m), 7.29-7.25 (2H, m), 7.00-6.90 (3H, m), 6.49 (1H, m), 5.13-5.09 (1H, m), 4.40-4.26 (4H, m), 3.69-3.64 (1H, m), 3.44-3.41 (1H, m), 2.28 (1H, m), 1.32-1.01 (9H, m)。

• 3-{2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-丙基}-4,5-二氢-异噁唑-5-

甲酸乙酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (1H, s), 7.94-7.83 (4H, m), 7.59-7.53 (2H, m), 6.80-6.70 (NH, 双 d), 5.07-5.03 (2H, m), 4.28-4.21 (2H, m), 3.37-3.33 (2H, m), 2.28 (1H, m), 1.34-1.25 (3H, m), 1.12-1.02 (6H, m).

· 3-[(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.94-7.86 (m, 2H), 7.61-7.11 (m, 9H), 6.36 (d, $J=9.3$ Hz, 0.5H), 6.09 (d, $J=9.3$ Hz, 0.5H), 4.94-4.85 (m, 1H), 4.27-4.21 (m, 2H), 3.49-2.98 (m, 4H), 2.15 & 1.97 (双 m, 1H), 1.30-1.26 (m, 3H), 1.03-0.59 (m, 6H).

· 3-[(1S)-1-苯乙基羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.17 (m, 10H), 5.74 & 5.50 (双 d, $J=9.3$ Hz, NH), 4.58-4.52 (m, 1H), 4.24-4.20 (m, 2H), 3.34-3.25 (m, 2H), 3.11-2.82 (m, 4H), 2.52-2.45 (m, 2H), 1.93 & 1.75 (双 m, 1H), 1.29-1.25 (m, 3H), 0.79-0.41 (m, 6H).

· 3-[(1S)-1-(1-萘磺酰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.68-8.64 (m, 1H), 8.29-8.25 (m, 1H), 8.07 (m, 1H), 7.93 (m, 1H), 7.71-7.52 (m, 3H), 7.23-6.98 (m, 5H), 5.27 & 5.19 (双 m, 1H), 4.12-4.07 (m, 2H), 3.75 & 3.66 (双 m, 1H), 3.16-2.43 (m, 4H), 1.77-1.62 (m, 1H), 1.25-1.16 (m, 3H), 0.86-0.57 (m, 6H).

· 3-[(1S)-1-(吡啶-3-基-乙基羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.16-8.12 (m, 1H), 7.62-7.56 (m, 1H), 7.36-6.94 (m, 9H), 5.71 (d, $J=9.3$ Hz, 0.5H), 5.42 (d, $J=8.8$ Hz, 0.5H), 4.56-4.50 (m, 1H), 4.25-4.17 (m, 2H), 3.30-2.51 (m, 8H), 1.89-1.70 (m, 1H), 1.28-1.24 (m, 3H), 0.73-0.41 (m, 6H).

· 3-[(1S)-1-(吡啶-3-基-甲基羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.56 & 8.52 (双 br s, 1H), 7.55-7.05 (m, 10H), 5.98-5.91 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 4.22-4.15 (m, 2H), 3.73 (m, 2H), 3.28-2.79 (m, 4H), 1.87-1.68 (m, 1H), 1.27-1.20 (m, 3H), 0.75-0.34 (m, 6H).

· 3-[(1S)-1-(肉桂酰氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.61-7.23 (m, 11H), 6.40-6.34 (m, 1H), 6.06 (d, $J=8.8$ Hz, 0.5H), 5.81 (d, $J=9.3$ Hz, 0.5H), 4.76-4.69 (m, 1H), 4.26-4.19 (m, 2H), 3.42-2.94 (m, 4H), 2.06 & 1.88 (双 m, 1H), 1.28-1.24 (m, 3H), 0.93-0.57 (m, 6H).

· 3-[(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.35-7.16 (m, 10H), 4.66-4.61 (m, 1H), 4.25 (m, 2H), 4.11-3.84 (m, 3H), 3.71-2.82 (m, 4H), 1.80 & 1.70 (双 m, 1H), 1.28 (m, 3H), 0.85-0.58 (m, 6H).

· 3-[2-甲基-(1S)-1-(4-叔丁氧羰基丁酰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸甲酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.05-5.99 (双 d, 1H), 4.71 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.49-3.44 (m, 1H), 2.87-2.80 (m, 1H), 2.27 (m, 4H), 2.07 (m, 1H), 1.92 (m, 2H), \sim 1.6 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.29 (m, 3H), 0.99-0.86 (m, 6H).

• 3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-乙基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.20-6.15 (双 d, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.21 (m, 2H), 3.40-3.36 (m, 1H), 2.90-2.82 (m, 1H), 2.57 (m, 2H), 2.46 (m, 2H), 2.07 (m, 1H), 1.94 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.29 (m, 3H), 0.96-0.88 (m, 9H).

• 3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-正戊基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.18-6.13 (双 d, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.23 (m, 2H), 3.41-3.36 (m, 1H), 2.90-2.82 (m, 1H), 2.57 (m, 2H), 2.46 (m, 2H), 2.08 (m, 1H), 1.88 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.28 (m, 9H), 0.96-0.85 (m, 9H).

• 3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-甲氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸甲酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.17 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.72-3.65 (m, 2H), 3.39 (双 s, 3H), 3.39-3.34 (m, 1H), 3.17-3.12 (m, 1H), 2.57 (m, 2H), 2.46 (m, 2H), 2.08 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 0.97-0.88 (m, 6H).

• 3-[2-甲基-(1S)-1-氨基-丙基]-5-(2-萘基)-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(\sim 1.3: 1 非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (1H, s), 7.86-7.82 (3H, m),

7.53-7.49 (3H, m), 4.25-4.02 (3H, m), 3.55-3.48 (1H, 双 d, J=7.3, 6.8Hz), 3.35 (0.45H, d, J=17.1 Hz), 3.19 (0.55H, d, J=17.1Hz), 1.78 (1H, m), 1.22 (3H, t, J=7.3 Hz), 0.96-0.82 (6H, m)

实施例 12: 3-{(1S)-1-(2-萘甲酰基氨基)-3-叔丁氧羰基-丙基}-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸甲酯的合成

将 3-[(1S)-1-(9-苄基甲氧羰基氨基)-3-叔丁氧基-羰基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸甲酯(440mg, 0.842mmol)的 DMF (8.0mL)溶液在室温下用吡啶(2.5mL)处理 5 分钟。浓缩后,将残余物溶于 DMF (10mL)并用 2-萘甲酸(174mg, 1.2 当量)、EDC(210mg, 1.3 当量)、HOBt (148mg, 1.3 当量)和三乙胺(0.35ml, 3.0 当量)处理,然后搅拌过夜(0℃至室温)。进行常规的处理,然后进行色谱分离得到 133mg 标题化合物 260mg (~50%纯度)混合物。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (1H, s), 7.92-7.83 (4H, m), 7.58-7.48 (2H, m), 7.34 (1H, d, J=7.8Hz), 5.04 (1H, m), 3.78 和 3.74 (3H, 双 s), 3.62-3.53 (1H, 双 d, J=17.1, 17.6Hz), 3.00-2.96 (1H, 双 d, J=17.1, 17.6 Hz), 2.56-2.08 (4H, m), 1.63 和 1.59 (3H, 双 s), 1.41 和 1.40 (9H, 双 s)

(E) 天冬氨酸衍生物的合成(实施例 13 至 18)

实施例 13: N-苄基甲氧羰基-β-叔丁基天冬氨酸(N-甲氧基)甲基酰胺的合成

将 N-苄氧羰基-β-叔丁基天冬氨酸(2.0g, 6.2mmol)、N,O-二甲基羟胺盐酸盐(724mg, 1.2 当量)和 HOBt (1.00g, 1.2 当量)的 DMF (20mL)溶液在 0℃下用 EDC(1.42g, 1.2 当量)和三乙胺(1.29ml, 1.5 当量)处理。搅拌过夜后(0℃至室温),将反应液用水(100mL)稀释,用乙酸乙酯-己烷(1:1, 100ml x 2)萃取,用水洗涤(100mL),干燥(无水硫酸钠),过滤然后浓缩。用乙酸乙酯-己烷(3:7)进行快速色谱

得到 2.039g (90%) 标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.31 (5H, m), 5.70 (1H, br), 5.16-5.08 (3H, m), 3.80 (3H, s), 3.23 (3H, s), 2.74-2.71 (1H, m), 2.59-2.57 (1H, m), 1.43 (9H, s)。

实施例 14: β -叔丁基天冬氨酸 N, O-二甲基羧基-胺酰胺的合成

将 N-苄基甲氧羰基- β -叔丁基天冬氨酸(N-甲氧基)甲基酰胺进行常规的氢解(H_2 气囊, 10% Pd/C, EtOH)得到标题化合物(100%)。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.13 (1H, m), 3.77 (3H, s), 3.22 (3H, s), 2.71-2.67 (1H, m), 2.42-2.38 (1H, m), 1.46 (9H, s)

实施例 15: N-苄基甲氧羰基- β -叔丁基天冬氨酸甲酯的合成

将 N-苄氧羰基- β -叔丁基天冬氨酸用重氮甲烷/乙醚处理得到所需的甲酯(100%)。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.35-7.27 (5H, m), 5.75 (1H, d), 5.13 (2H, s), 4.60 (1H, m), 3.75 (3H, m), 2.90 (1H, m), 2.76 (1H, m), 1.42 (9H, s)。

实施例 16: β -叔丁基天冬氨酸甲酯盐酸盐的合成

将 N-苄基甲氧羰基- β -叔丁基天冬氨酸甲酯进行常规的氢解(H_2 气囊, 10% Pd/C, EtOH-HCl)得到盐酸盐形式的所需产物。

实施例 17: (3S)-3-苄基甲氧羰基氨基-4-羟基-5-苯氧基-戊酸叔丁酯的合成

将 N-苄基甲氧羰基- β -叔丁基-天冬氨酸(5.03g, 15.6mmol)、NMM(1.90ml, 17.1mmol)的干燥 THF (60mL)溶液在氮气氛及 -15°C 下用氯甲酸异丁酯(2.12ml, 16.3mmol)处理并将所得悬浮液搅拌 20 分钟。于 0°C 下向混合物中加入干燥的重氮甲烷/乙醚(从 2.0 当量 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基-胍合成, 60mL)并搅拌 30 分钟。当重氮酮合成结束时(TLC

分析), 于 0℃ 下向其中加入 30% HBr/AcOH (6.42ml, 2.0 当量) (搅拌 30-60 分钟)。将反应液用乙酸乙酯萃取, 用饱和碳酸氢钠(2 次)、盐水洗涤, 干燥(无水硫酸钠), 过滤然后浓缩得到溴甲基酮衍生物(6.4g)。

将溴甲基酮(4.36g)和苯酚(1.13g, 1.1 当量)的 DMF (18mL) 溶液在室温下用新近干燥的 KF (1.58g, 2.5 当量) 处理并搅拌 2 小时。经常规的萃取处理得到粗品苯氧基酮。将粗品苯氧基酮的甲醇(20mL) 溶液在 -78℃ 下用 NaBH₄ (412mg) 的 MeOH (40mL) 溶液处理 (-78℃ 至室温, 2h)。用乙酸终止反应。常规的萃取处理后进行快速色谱(乙酸乙酯-己烷= 1: 5) 得到 2.58g (57%) 非对映体混合物形式的标题化合物。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.26 (7H, m), 6.98-6.87 (3H, m), 5.71-5.53 (NH, 双 d), 5.10 (2H, s), 4.24-3.92 (4H, m), 2.70-2.63 (2H, m), 1.44 和 1.43 (9H, 双 s)。

按照类似的方法制得如下化合物:

• (3S)-3-苯基甲氧羰基氨基-4-羟基-5-(1-萘基)氧基-戊酸叔丁酯
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (1H, m), 7.80 (1H, m), 7.50-7.33 (9H, m), 6.80 (1H, m), 5.73 和 5.55 (1H, 双 d, J= 8.3 Hz), 5.10 (2H, s), 4.30-4.15 (4H, m), 2.76-2.69 (2H, m), 1.44 (9H, s)。

实施例 18: (3S)-3-氨基-4-羟基-5-苯氧基-戊酸叔丁酯的合成

将 (3S)-3-苯基甲氧羰基氨基-4-羟基-5-苯氧基-戊酸叔丁酯 (H₂ 气囊, Pd/C, EtOH) 进行常规的氢解得到所需产物 (100%)。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.29-7.26 (2H, m), 6.97-6.90 (3H, m), 4.08-3.82 (3H, m), 3.43 (1H, m), 2.63-2.37 (2H+NH₂+OH, m), 1.46 和 1.45 (9H, 双 s)。

按照类似方法制得如下化合物:

• (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(1-萘基)氧基-戊酸叔丁酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.22 (1H, m), 7.80 (1H, m), 7.50-7.34 (4H, m), 6.84 (1H, m), 4.26-4.20 (2H, m), 4.03-3.94 (1H, m), 3.51 (1H, m), 2.70-2.40 (2H, m), 1.47 和 1.46 (9H, 双 s)。

(F) 异噁唑啉衍生物和天冬氨酸衍生物的偶联及其进一步的转化(实施例 19 至 24)。

实施例 19: (2S)-2-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基-氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基-氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-(N-甲基-N-甲氧基)酰胺的合成

将 3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸乙酯(502mg, 1.10mmol)的 THF (6.6mL)溶液用 1N-NaOH (1.33mL)处理。室温搅拌 2.5 小时后,将反应液用 1N-HCl (1.33mL)处理,然后真空浓缩。将残余物和饱和氯化钠一起(50mL+ 2-3 mL 1N-HCl)用乙酸乙酯萃取(100ml x 2),干燥(无水硫酸钠),过滤然后浓缩得到 476mg (101%) 3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸。

将酸的粗品(320mg, 0.75mmol)和 β -叔丁基天冬氨酸 N-甲基-(N-甲氧基)酰胺(209mg, 1.2 当量)的 DMF (5mL)溶液在 0 $^\circ\text{C}$ 下用 HOBt (122mg, 1.2 当量)、EDC(172mg, 1.2 当量)和三乙胺(0.31ml, 3.0 当量)处理,然后搅拌 3 小时(0 $^\circ\text{C}$ 至室温)。浓缩,经常规处理后进行快速色谱得到极性较弱的异构体(160mg)和极性较强的异构体(213mg, 33%)。

极性较强的异构体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (1H, d), 7.35-7.24 (7H, m), 6.95 (1H, t, $J=7.3$ Hz), 6.88 (2H, d, $J=7.8$ Hz), 5.55 (1H, d), 5.18-5.08 (3H, m), 4.44 (1H, m), 4.32-4.25 (2H, m), 3.75 (3H, s), 3.32-3.25 (2H, m), 3.12 (3H, s), 2.77-2.71 (1H, m), 2.62-2.56 (1H, m), 2.12 (1H, m), 1.44 (9H, s), 1.03-0.91 (6H, m)。

极性较弱的异构体：¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.65 (1H, d, J= 8.3 Hz), 7.36-7.23 (7H, m), 6.95 (1H, t, J= 7.3 Hz), 6.88 (2H, d, J= 8.3 Hz), 5.19-5.11 (4H, m), 4.46 (1H, m), 4.33-4.22 (2H, ABq, J=10.3 Hz), 3.75 (3H, s), 3.33 (2H, s), 3.23 (3H, s), 2.73 (1H, m), 2.57 (1H, m), 2.07 (1H, m), 1.43 (9H, s), 1.03-0.92 (6H, m).

实施例 20: (3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基-氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-戊酸叔丁酯的合成

标题化合物通过用过量的 MeMgBr (3.0M 的乙醚溶液, > 3.0 当量) 在 0℃ 至室温下处理 (2S)-2-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-(N-甲基-N-甲氧基)酰胺的极性较弱的异构体 (110mg, 0.17mmol) 的 THF (5mL) 溶液 + LiCl 饱和的 THF (2mL) 制得 (44mg, 43%).

极性较弱的异构体：¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (1H, d, J= 9.3 Hz), 7.36-7.24 (7H, m), 6.96 (1H, t, J= 7.2 Hz), 6.87 (2H, d, J= 8.3 Hz), 5.26 (1H, d, J= 8.8 Hz), 5.12-5.09 (2H, m), 4.66 (1H, m), 4.43 (1H, d, J= 9.8 Hz), 4.21 (1H, d, J= 9.8 Hz), 3.37-3.19 (2H, ABq, J= 18.0 Hz), 2.88 (1H, m), 2.58 (1H, m), 2.25 (3H, s), 2.03 (1H, m), 1.42 (9H, s), 0.99-0.89 (6H, m).

按照类似的方式处理 (2S)-2-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-(N-甲基-N-甲氧基)酰胺的极性较强的异构体 (135mg) 得到 52mg (41%) 相应的甲基酮。

实施例 21: (2S)-2{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羰基-氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯

的合成

将 3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸(2.14g, 5.07mmol)、天冬氨酸 β -叔丁酯甲酯盐酸盐(1.46g, 1.2当量)、EDC(1.17g, 1.2当量)和 HOBt (822mg, 1.2当量)的 DMF (19mL)溶液用三乙胺(2.12ml, 3.0当量)处理然后搅拌过夜。经常规处理后进行快速色谱(40-50%乙酸乙酯-己烷),得到白色泡沫状标题化合物(2.94g, 94%)。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.30 和 8.25 (1H, 双 s), 7.96-7.79 (4H, m), 7.65-7.54 (3H, m), 7.31-7.18 (5H, m), 6.76 (0.5H, d, $J=9.3$ Hz), 6.43 (0.5H, d, $J=8.8$ Hz), 4.96-4.70 (2H, m), 3.71 和 3.60 (3H, 双 s), 3.45-3.14 (4H, m), 3.08-2.34 (2H, m), 2.15 (1H, m), 1.47 和 1.44 (9H, 双 s), 1.04-0.88 (6H, m)。

将上述化合物按照上述方法(1N-NaOH/THF)进行水解得到相应的羧酸(100%)。

按照类似方法制得如下的酯和游离羧酸。

• (2S)-2-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-丙基]-5-苯氧基-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基-氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.33 和 8.30 (1H, 双 s), 7.95-7.74 (5H, m), 7.59-7.53 (2H, m), 7.28-7.22 (2H, m), 6.99-6.89 (3.5H, m), 6.71 (0.5H, d, $J=8.8$ Hz), 5.08-5.01 (1H, m), 4.83-4.79 (1H, m), 4.39-4.29 (2H, m), 3.76 和 3.64 (3H, 双 s), 3.44 (2H, s), 2.97-2.93 (1H, m), 2.74-2.69 (1H, m), 2.34-2.23 (1H, m), 1.45 和 1.42 (9H, 双 s), 1.15-1.01 (6H, m)。

将上述化合物水解得到游离羧酸。

• (2S)-2-{3-[(1S)-1-(苯基甲氧羰基)-氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基-氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.59–7.49 (1H, m), 7.38–7.32 (5H, m), 5.25–4.95 (4H, m), 4.86 (1H, m), 4.48 (1H, m), 3.76 和 3.67 (3H, 双 s), 3.29 (2H, m), 2.92 (1H, m), 2.71–2.62 (1H, m), 2.04 (1H, m), 1.48 (9H, s), 1.01–0.85 (6H, m)

· (2S)-2-{3-[(1S)-1-苄乙基羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯 (非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (d, $J=8.3$ Hz, 0.5H), 7.47 (d, $J=9.3$ Hz, 0.5H), 7.28–7.18 (m, 10H), 5.83 & 5.44 (双 d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.70–4.52 (m, 2H), 3.68 & 3.65 (双 s, 3H), 3.33–2.28 (m, 10H), 1.89 (m, 1H), 1.43 & 1.42 (双 s, 9H), 0.79–0.63 (m, 6H).

· (2S)-2-{3-[(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯 (非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.27 (m, 1H), 7.92–7.85 (m, 2H), 7.61–7.15 (m, 10H), 6.45 & 6.05 (双 d, NH), 4.99–4.85 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 3.69 & 3.52 (双 s, 3H), 3.50–2.32 (m, 6H), 2.12 (m, 1H), 1.40 & 1.39 (双 s, 9H), 1.05–0.80 (m, 6H).

· (2S)-2-{3-[(1S)-1-(1-萘磺酰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯-1-甲酯 (非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.69–8.62 (m, 1H), 8.33–7.94 (m, 3H), 7.70–7.47 (m, 3H), 7.20–7.05 (m, 5H), 5.32 & 5.15 (双 m, 1H), 4.68 & 4.54 (双 m, 1H), 3.85 & 3.59 (双 m, 1H), 3.82 & 3.62 (双 s, 3H), 3.23–1.75 (m, 7H), 1.40 & 1.34 (双 s, 9H), 0.85–0.48

(m, 6H).

· (2S)-2-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯 (非对映体)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.53-7.49 (双 d, 1H), 7.35-7.25 (m, 10H), 5.09-5.07 (m, 2.5H), 4.88 (d, 0.5H), 4.69 (m, 1H), 4.34 & 4.23 (双 m, 1H), 3.68 & 3.63 (双 s, 3H), 3.36-2.23 (m, 6H), 1.89 & 1.70 (双 m, 1H), 1.42 & 1.40 (双 s, 9H), 0.88-0.73 (m, 6H).

· (2S)-2-{3-[(1S)-1-(吡啶-3-基-乙基羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯 (非对映体)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.54 & 8.38 (双 br s, 1H), 7.62-6.97 (m, 1H), 5.83 (d, J=8.8 Hz, 0.5H), 5.20 (d, J=9.3 Hz, 0.5H), 4.73-4.69 (m, 1H), 4.61 & 4.48 (双 m, 1H), 3.71 & 3.59 (双 s, 3H), 3.28-2.26 (m, 10H), 1.87-1.75 (m, 1H), 1.43 & 1.42 (双 s, 9H), 0.78-0.50 (m, 6H).

· (2S)-2-{3-[(1S)-1-(吡啶-3-基-甲基羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯 (非对映体)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 8.37 & 8.26 (双 br s, 1H), 7.54-7.12 (m, 11H), 5.95 (d, J=8.8 Hz, 0.5H), 5.76 (d, J=1.5 Hz, 0.5H), 4.68-4.51 (m, 2H), 3.78-3.68 (m, 2H), 3.66 & 3.62 (双 s, 3H), 3.28-2.21 (m, 6H), 1.80 (m, 1H), 1.41 & 1.37 (双 s, 9H), 0.75-0.46 (m, 6H).

· (2S)-2-{3-[(1S)-1-(肉桂酰氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯 (非对映体)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.63-7.25 (m, 12H), 6.43-6.32 (双 d, J= 15.6 Hz, 1H), 6.09 & 5.68 (双 d, J= 9.3 Hz, 1H), 4.78-4.70 (m, 1H), 3.69 & 3.68 (双 s, 3H), 3.35-2.31 (m, 6H), 2.03 (m, 1H), 1.43 & 1.40 (双 s, 9H), 0.92-0.76 (m, 6H).

· (2S)-2-{3-[(1S)-1-(苯基甲基磺酰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 1-甲酯 (非对映体)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.67 & 7.60 (双 d, J= 8.8 Hz, 1H), 7.40-7.17 (m, 10H), 3.71 & 3.55 (双 s, 3H), 3.37-2.23 (m, 6H), 1.70 (m, 1H), 1.42 & 1.47 (双 s, 9H), 0.91-0.65 (m, 6H).

实施例 22: (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羰基-氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸-叔丁酯的合成

将 (2S)-2-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-5-苯基甲基-异噁唑-5-羰基-氨基}-琥珀酸 4-叔丁酯 (2.86g, 4.75mmol) 和 NMM (0.57ml, 1.1 当量) 的干燥 THF (x mL) 溶液在氮气氛及 0℃ 下用氯甲酸异丁酯 (0.65ml, 1.05 当量) 处理并搅拌 20 分钟。于 0℃ 下向溶液中加入重氮甲烷并搅拌 30 分钟 (TLC 分析)。需要补加重氮甲烷以使反应完全 (1 小时)。在重氮酮的形成完成后, 于 0℃ 下加入 30% HBr/AcOH (4.0ml, 4.0 当量) 并将反应液搅拌 1 小时。将反应液用乙酸乙酯萃取 (2 次) 并将有机层用水、饱和碳酸氢钠和盐水洗涤, 干燥 (无水硫酸钠), 过滤然后浓缩得到 3.36g 黄色固体。将一半固体 (约 2.375mmol) 与无水 KF (345mg, 2.5 当量) 和 2,6-二氯苯甲酸 (545mg, 1.2 当量) 于氮气氛及室温下在 DMF (10mL) 中反应。经常规处

理和快速色谱后得到非对映体混合物形式的标题化合物(1.53g)。经制备型 HPLC(38% EtOAc/己烷)得到极性较弱的非对映体(585mg)和极性较强的非对映体(358mg)。

极性较弱的非对映体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (1H, s), 7.84-7.80 (4H, m), 7.55-7.46 (3H, m), 7.29-7.24 (8H, m), 6.87 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 5.05-4.93 (3H, m), 4.73 (1H, m), 3.54 (1H, d, $J=18.1$ Hz), 3.34 (1H, d, $J=13.7$ Hz), 3.19 (1H, d, $J=14.2$ Hz), 3.11 (1H, d, $J=17.6$ Hz), 2.74-2.70 (1H, m), 2.29-2.24 (2H, m), 1.39 (9H, s), 1.02 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.92 (3H, d, $J=6.8$ Hz)。

极性较强的非对映体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (1H, s), 7.97-7.75 (5H, m), 7.62-7.57 (2H, m), 7.37-7.22 (8H, m), 6.56 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 4.94 (1H, m), 4.78 (1H, m), 4.51-4.42 (2H, m), 3.51-3.43 (2H, m), 3.24-3.15 (2H, m), 2.99-2.95 (1H, m), 2.56-2.52 (1H, m), 2.18 (1H, m), 1.45 (9H, s), 1.02 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.97 (3H, d, $J=6.4$ Hz)。

按照类似方法制得如下化合物。

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基-氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸-叔丁酯

极性较弱的非对映体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (1H, s), 7.85-7.81 (5H, m), 7.54-7.46 (2H, m), 7.31-7.23 (5H, m), 6.98-6.87 (4H, m), 5.13-5.03 (3H, m), 4.90 (1H, m), 4.39-4.27 (2H, ABq, $J=9.3$ Hz), 3.51 (1H, d, $J=17.6$ Hz), 3.41 (1H, d, $J=17.6$ Hz), 2.94-2.78 (2H, m), 2.38 (1H, m), 1.41 (9H, s), 1.12-1.08 (6H, 双 d, $J=6.4$ Hz)。

极性较强的非对映体： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (1H, s), 8.11 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 7.93-7.83 (4H, m), 7.59-7.53 (2H, m), 7.33-7.22 (5H, m), 6.97-6.91 (3H, m), 6.77 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 5.37 (1H, d, $J=17.1$ Hz), 5.16 (1H, d, $J=17.1$ Hz), 5.01-4.95 (2H, m), 4.53 (1H, d, $J=9.8$ Hz), 4.25 (1H, d, $J=9.8$ Hz), 3.50 (1H, d, $J=7.6$ Hz), 3.32 (1H, d, $J=7.6$ Hz), 3.04-3.00 (1H, dd, $J=17.1, 4.9$ Hz), 2.73-2.68 (1H, dd, $J=17.1, 5.4$ Hz), 2.24 (1H, m), 1.47 (9H, s), 1.10-1.03 (6H, 双 d, $J=6.4$ Hz)。

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基甲氧羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸-叔丁酯(非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.72-7.60 (1H, m), 7.37-7.30 (8H, m), 5.40 (0.5H, d), 5.23-4.85 (6.5H, m), 4.40 (1H, m), 3.30 (2H, m), 2.92-2.65 (2H, m), 2.10-1.98 (1H, m), 1.44 (9H, s), 1.00-0.87 (6H, m)。

按照类似方法制得如下化合物：

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯

极性较强的异构体： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.59 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.22-7.15 (m, 4H), 6.96-6.81 (m, 6H), 4.99-4.81 (m, 4H), 4.40 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 4.21 (d, $J=10.0$ Hz, 1H), 3.44 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 3.24 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J=17.0, 4.6$ Hz, 1H), 2.76 (dd, $J=17.0, 5.5$ Hz, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.10 (m, 6H)

极性较弱的异构体： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.68 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.32-8.26 (m, 2H), 8.17 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.91 (m, 2H), 7.80 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.28 (m, 4H), 7.02-6.87 (m, 6H), 5.01-4.77 (m, 4H), 4.38-4.30 (m, 2H), 3.50-3.38 (ABq, $J=17.9$ Hz, 2H), 3.06-3.02 (m, 1H), 2.84-2.80 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.14 (m, 6H)

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸

极性较强的异构体： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.01 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.87 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.18-8.07 (m, 3H), 7.87 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.28-7.14 (m, 4H), 6.96-6.75 (m, 6H), 5.00-4.75 (m, 4H), 4.42 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 4.22 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.47-3.35 (ABq, $J=17.9$ Hz, 2H), 2.82 (dd, $J=17.0, 6.4$ Hz, 2.56 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 0.98 (m, 6H)。

极性较弱的异构体： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.06 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.88 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.57 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.22-8.07 (m, 3H), 7.87 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.17 (m, 4H), 6.91-6.78 (m, 6H), 4.98-4.90 (ABq, $J=17.9$ Hz, 2H), 4.77 (m, 2H), 4.35 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.47-3.35 (ABq, $J=18.3$ Hz, 2H), 2.89 (dd, $J=17.0, 6.4$ Hz, 2.61 (dd, $J=17.0, 6.4, 1\text{H}$), 2.31 (m, 1H), 0.98 (d, $J=6.9$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J=6.9$ Hz, 3H)。

· (S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯

极性较强的异构体： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (d, $J=8.3$ Hz), 7.94 (d, $J=8.3$ Hz), 7.88 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J=9.7$ Hz, 1H), 7.61-7.44 (m, 4H), 7.35-7.18 (m, 8H), 6.23 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.76 (m, 1H), 4.49-4.41 (ABq, $J=17.5$ Hz, 2H), 3.49-3.41 (m, 2H), 3.22-3.12 (m, 2H), 2.92 (dd, $J=17.0, 4.2$ Hz, 1H), 2.52 (dd, $J=17.0, 5.1$ Hz, 1H), 2.13 (m, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.04 (d, $J=6.9$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J=6.9$ Hz, 3H).

极性较弱的异构体： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.24 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.57-7.47 (m, 4H), 7.38-7.22 (m, 9H), 6.64 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.00-4.87 (m, 3H), 4.72 (m, 1H), 3.60 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 3.36 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 3.20 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 3.12 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.69 (dd, $J=17.0, 4.6$ Hz, 1H), 2.28-2.18 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.06 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J=6.9$ Hz, 3H).

• (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(肉桂酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯(极性较强的异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (d, 1H), 7.62 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.38-7.21 (m, 12H), 6.39 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 5.90 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 4.76 (m, 2H), 4.49-4.41 (ABq, $J=17.4$ Hz, 2H), 3.42-3.38 (m, 2H), 3.17 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 3.09 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.91 (dd, $J=17.4, 4.6$ Hz, 1H), 2.52 (dd, $J=17.4, 5.0$ Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 0.90 (m, 6H).

极性较弱的异构体： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.61 (d, 1H), 7.52 (d, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.28 (m, 12H), 6.64-6.41 (m, 2H), 5.09-4.99 (ABq, $J=17.4$ Hz, 2H), 4.81 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 3.50 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 3.34 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 3.17 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 3.04 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J=17.0,$

4.2 Hz, 1H), 2.22 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 0.97-0.88 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯

极性较强的异构体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 7.38-7.23 (m, 13H), 4.80-4.63 (m, 2H), 4.56-4.46 (ABq, $J=17.1$ Hz, 2H), 4.21-4.10 (m, 2H), 3.83 (m, 2H), 3.41-3.37 (m, 1H), 3.19 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 2.90-2.83 (m, 2H), 2.53 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 0.83 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.77 (d, $J=6.8$ Hz, 3H).

极性较弱的异构体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.36-7.26 (m, 13H), 5.05-4.95 (m, 3H), 4.74 (m, 1H), 4.17 (m, 2H), 3.96 (m, 1H), 3.41-2.99 (m, 4H), 2.70 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.39 (s, 9H), 0.86 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.77 (d, $J=6.8$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯

极性较强的异构体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.59 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.78-7.72 (m, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.33-7.27 (m, 3H), 5.20-5.05 (m, 3H), 4.92-4.89 (m, 2H), 3.47-3.34 (m, 2H), 2.95 (dd, $J=17.0, 4.6$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J=17.0, 5.1$ Hz, 1H), 2.28 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.07 (m, 6H).

极性较弱的异构体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.58 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.28-8.24 (m, 2H), 8.12 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=$

7.8 Hz, 1H), 7.75-7.59 (m, 3H), 7.31-7.25 (m, 3H), 5.12-4.89 (m, 5H), 3.46-3.41 (m, 2H), 2.92 (dd, J= 17.0, 5.1 Hz, 1H), 2.78 (dd, J= 17.0, 5.5 Hz, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.10 (m, 6H)

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯

极性较强的异构体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.32 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.26 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.12 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.88 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 7.80-7.63 (m, 3H), 7.36-7.18 (m, 8H), 4.82 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.47-4.37 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 3.47 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 3.41 (d, J= 13.8 Hz, 1H), 3.19 (d, J= 14.2 Hz, 1H), 3.14 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.94 (dd, J= 17.4, 4.1 Hz, 1H), 2.53 (dd, J= 17.0, 5.0 Hz, 1H), 2.18 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 0.98 (m, 6H).

极性较弱的异构体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.28-8.23 (m, 2H), 8.12 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.85 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.62-7.55 (m, 2H), 7.31-7.17 (m, 8H), 5.06-4.98 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 4.84 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 5.54 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 3.29 (d, J= 14.2 Hz, 1H), 3.16 (d, J= 14.2 Hz, 1H), 3.10 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.70 (dd, J= 17.0, 4.1 Hz, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.11 (dd, J= 17.0, 5.1 Hz, 1H), 1.38 (s, 9H), 0.98 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸叔丁酯

极性较强的异构体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.47 (d, J= 9.2 Hz,

1H), 8.32 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 8.25 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.13 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.89 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.69 (d, J= 8.8 Hz, 1H), 7.64 (t, J= 7.3 Hz, 1H), 7.29-7.17 (m, 4H), 7.06 (t, J= 7.4 Hz, 1H), 6.96 (t, J= 7.4 Hz, 1H), 6.78 (d, J= 8.3 Hz, 2H), 4.81-4.72 (m, 2H), 4.47-4.28 (ABq, J= 17.9 Hz, 2H), 3.42 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 3.34 (d, J= 14.2 Hz, 1H), 3.15 (d, J= 13.7 Hz, 1H), 3.10 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.94 (dd, J= 17.4, 4.1 Hz, 1H), 2.64 (dd, J= 17.4, 5.5 Hz, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 0.95 (m, 6H).

极性较弱的异构体:¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.50 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.24 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.18 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.10 (d, J= 8.2 Hz, 1H), 7.85 (d, J= 7.7 Hz, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.62-7.56 (m, 2H), 7.29-7.16 (m, 5H), 6.88 (t, J= 7.4 Hz, 1H), 6.78 (d, J= 7.8 Hz, 2H), 4.81-4.66 (m, 4H), 3.46 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 3.29 (d, J= 13.8 Hz, 1H), 3.15 (d, J= 13.8 Hz, 1H), 3.07 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.76 (dd, J= 17.0, 4.1 Hz, 1H), 2.21-2.09 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.93 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(2-萘羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸叔丁酯

非对映体混合物:¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (m, 1H), 7.96-7.50 (m, 7H), 6.85-6.73 (m, 1H), 5.10-4.97 (m, 2H), 4.66 (m, 1H), 3.40 (m, 2H), 2.94-2.60 (m, 2H), 2.32-2.14 (m, 1H), 2.22 & 2.10 (双 s, 3H), 1.43 & 1.42 (双 s, 9H), 1.10-0.95 (m, 6H).

实施例 23: (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羰基-氨基)-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸叔丁酯的合成

标题化合物通过将 3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-丙

基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸(1.00g, 2.24mmol)和(3S)-3-氨基-4-羟基-5-苯氧基-戊酸叔丁酯(630mg, 1.0 当量)、EDC(558mg, 1.3 当量)、HOBt(394mg, 1.3 当量)以及三乙胺(0.94ml, 3.0 当量)在DMF(5mL)中进行常规的EDC偶联制得。经常规处理后进行快速色谱得到1.44g偶联的产物。将偶联产物和Dess-Martin试剂(2.15g, 2.5 mol 当量)的干燥二氯甲烷(25mL)溶液在氮气氛围和室温下搅拌1小时,然后用异丙醇(3mL)终止反应。经常规的萃取步骤后进行快速色谱(36%乙酸乙酯-己烷)得到1.27g非对映体混合物形式的标题化合物。经制备型HPLC(36%乙酸乙酯-己烷, 10mL/min, 278nm UV检测)得到极性较弱(352mg)和极性较强(536mg)的对映体。

极性较弱的非对映体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (1H, s), 7.93-7.81 (5H, m), 7.58-7.51 (2H, m), 7.28-7.21 (4H, m), 6.99-6.76 (7H, m), 5.00-4.98 (2H, m), 4.79-4.66 (2H, ABq, $J=16.6$ Hz), 4.35-4.29 (2H, ABq, $J=10.3$ Hz), 3.40 (2H, s), 3.02-2.98 (1H, dd, $J=16.6, 4.9$ Hz), 2.84-2.79 (1H, dd, $J=16.6, 4.7$ Hz), 2.30 (1H, m), 1.41 (9H, s), 1.12-1.07 (6H, 双 d, $J=6.8$ Hz)。

极性较强的非对映体: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (1H, s), 7.99-7.82 (5H, m), 7.59-7.53 (2H, m), 7.26-7.18 (4H, m), 6.97-6.83 (6H, m), 6.68 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 5.01-4.95 (3H, m), 4.83 (1H, d, $J=17.1$ Hz), 4.42 (1H, d, $J=9.8$ Hz), 4.23 (1H, d, $J=9.8$ Hz), 3.49-3.32 (2H, ABq, $J=18.1$ Hz), 3.06-3.02 (1H, dd, $J=17.1, 4.4$ Hz), 2.76-2.72 (1H, dd, $J=17.1, 5.4$ Hz), 2.24 (1H, m), 1.45 (9H, s), 1.10-1.02 (6H, 双 d, $J=6.8$ Hz)。

按照类似方法制备如下化合物

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸叔丁酯

极性较弱的非对映体：¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (1H, s), 7.89 (8H, m), 7.56-7.26 (6H, m), 7.23-6.87 (5H, m), 6.74 (1H, d, J= 9.3 Hz), 5.04-4.95 (2H, m), 4.92-4.80 (2H, ABq, J= 16.6 Hz), 4.37-4.30 (2H, ABq, J= 23.4, 10.3 Hz), 3.43-3.38 (2H, ABq, J= 22.5, 17.8 Hz), 3.05-3.00 (1H, dd, J= 16.6, 4.9 Hz), 2.86-2.82 (1H, dd, J= 16.6, 4.9 Hz), 2.25 (1H, m), 1.42 (9H, s), 1.09-1.05 (6H, 双 d, J= 6.8, 6.7 Hz).

极性较强的非对映体：¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (1H, s), 8.02-7.55 (10H, m), 7.41-7.05 (6H, m), 6.89-6.66 (4H, m), 5.10-4.94 (4H, m), 4.41 (1H, d, J= 9.8 Hz), 4.23 (1H, d, J= 10.3 Hz), 3.50-3.34 (2H, ABq, J= 17.6 Hz), 3.09-3.05 (1H, dd, J= 17.1, 4.4 Hz), 2.79-2.74 (1H, dd, J= 17.1, 5.4 Hz), 2.25 (1H, m), 1.45 (9H, s), 1.10-1.02 (6H, 双 d, J= 6.8 Hz).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸叔丁酯

极性较强的异构体：¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.32-8.25 (m, 2H), 8.13 (d, J= 8.8 Hz, 1H), 7.88 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.79-7.62 (m, 3H), 7.27 (m, 2H), 6.97 (m, 1H), 6.88 (m, 2H), 5.04-4.72 (m, 5H), 3.48-3.34 (m, 2H), 3.00 (dd, J= 17.0, 4.6 Hz, 1H), 2.77 (dd, J= 17.0, 5.5 Hz, 1H), 2.27 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.06 (m, 6H).

极性较弱的异构体：¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.27 (d, J= 8.2 Hz, 1H), 8.21 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.13 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 7.86 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 7.78-7.59 (m, 3H), 7.22 (m, 2H), 6.92 (m, 1H), 6.82 (m, 2H), 5.04-4.88 (m, 3H), 4.82-4.69 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 3.45-3.33 (m, 2H), 2.99 (dd, J= 16.5, 4.6 Hz, 1H), 2.78 (dd, J= 16.5, 5.1 Hz, 1H), 2.26 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.06 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-正戊基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯; 极性较弱的异构体(化合物 89LP 的前体)
 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.32 (m, 3H), 6.42 (m, 1H), 5.20-5.05 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.90 (m, 1H) 4.67 (m, 1H), 3.38 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.92 (m, 2H), 2.78 (m, 1H), 2.53 (m, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.18 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.26 (m, 6H), 0.94 (m, 6H), 0.86 (t, $J=6.9$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-正戊基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯; 极性较强的异构体(化合物 90MP 的前体)
 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.31 (m, 3H), 6.17 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 5.17-5.07 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.87 (m, 1H) 4.65 (m, 1H), 3.30 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.96-2.90 (m, 2H), 2.69 (m, 1H), 2.56 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.81 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.26 (m, 6H), 0.94-0.86 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯; 极性较弱的异构体(化合物 85LP 的前体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.51 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.34-7.22 (m, 8H), 6.37 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.10-4.98 (ABq, $J=17.4$ Hz, 2H), 4.70 (m, 1H) 4.61 (m, 1H), 3.46 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 3.31 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 3.14 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 2.99 (d, $J=17.9$ Hz,

1H), 2.73 (m, 1H), 2.53 (m, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.18 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.39 (s, 9H), 0.90 (d, J= 6.9 Hz, 3H), 0.84 (d, J= 6.4 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-乙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯; 极性较弱的异构体(化合物 91LP 的前体)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.32 (m, 3H), 6.42 (d, J= 9.2, 1H), 5.21-5.05 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 4.91 (m, 1H) 4.67 (m, 1H), 3.37 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.94 (m, 2H), 2.79 (m, 1H), 2.53 (m, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.18 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 0.94 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯; 极性较弱的异构体(化合物 73LP 的前体)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.32 (m, 3H), 6.44 (d, J= 9.2, 1H), 5.20-5.04 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 4.88 (m, 1H) 4.67 (m, 1H), 3.46 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.94-2.76 (m, 3H), 2.53 (m, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.19 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 0.95 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯; 极性较强的异构体(化合物 74MP 的前体)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.33 (m, 3H), 6.18 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 5.18-5.05 (ABq, J= 16.5 Hz, 2H), 4.87 (m, 1H) 4.65 (m, 1H), 3.38 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.93-2.89 (m, 2H), 2.71 (m, 1H), 2.57 (m, 2H), 2.46 (m, 2H), 2.02 (m, 1H),

1.66 (s, 3H), 1.58 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 0.95-0.86 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(3-叔丁氧羰基丙酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸叔丁酯; 极性较强的异构体(化合物 86MP 的前体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.30 (m, 8H), 6.07 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 4.45-4.36 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 3.40-3.32 (m, 2H), 3.17 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 3.06 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.93 (m, 1H), 2.60-2.38 (m, 5H), 1.98 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 0.88-0.82 (m, 6H).

实施例 24: (3S)-3-{3-[(1S)-1-苄氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-戊酸的合成

将 (3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-戊酸叔丁酯(极性较弱的非对映体) (44mg) 的二氯甲烷(2mL) 溶液在 0°C 下用 TFA (1mL) 处理。将反应混合物搅拌 2 小时并同时缓慢升温至室温。浓缩得到标题化合物(化合物 10, 定量)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 7.35-6.90 (10H, m), 5.11 (2H, s), 4.53 (1H, m), 4.47 (1H, m), 4.23 (2H, dd), 2.86 (1H, dd), 2.54 (1H, dd), 2.24 (3H, s), 2.00 (1H, m), 1.00 和 0.97 (6H, 双 d); MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 562

按照类似方法从极性较弱的异构体制得如下化合物:

· (3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基-氨基}-4-酮基-戊酸(化合物 11)。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz,) δ 8.76 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 7.76 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 7.36-6.87 (10H, m), 5.06 (2H, m), 4.50 (1H, m), 4.32 (1H,

m), 4.16 (2H, m), 3.21 (2H, app s), 2.79 (1H, m), 2.06 (3H, s), 1.89 (1H, m), 0.91 (3H, d, J= 6.3 Hz), 0.80 (3H, d, J= 6.3 Hz).

将相应的叔丁酯按照类似方法用 TFA 脱保护制得如下最终化合物。

• (3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸(化合物 3, 非对映体混合物)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.49 (1H, m), 7.72 (1H, m), 7.35 (5H, m), 5.03 (3H, m), 4.40 (1H, m), 4.15 (1H, m), 3.24 (2H, m), 2.54 (2H, m), 2.04 和 1.95 (3H, 双 s), 1.88 (1H, m), 0.90-0.81 (6H, m): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 456

• (3S)-3-{3-[(1S)-1-苯基甲氧羰基氨基-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 14, 非对映体混合物)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.58 (1H, br s), 7.75 (1H, m), 7.61-7.30 (8H, m), 5.30-5.00 (5H, m), 4.70 (1H, m), 4.16 (1H, m), 2.66 (2H, m), 1.90 (1H, m), 0.95-0.79 (6H, m): MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 644

• (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(化合物 17, 非对映体混合物)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.92-8.55 (2H, m), 8.15-7.98 (3H, m), 7.63-7.55 (4H, m), 7.25-7.15 (4H, m), 6.95-6.74 (6H, m), 5.20-4.15 (6H, m), 2.80-2.55 (2H, m), 2.05 (1H, m), 1.05-0.89 (6H, m): MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 674.

· (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(化合物 18)

从极性较弱的叔丁酯制备: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) 8.93 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 8.79 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 8.48 (1H, s), 8.05-7.94 (4H, m), 7.64-7.58 (2H, m), 7.30-7.17 (4H, m), 6.94-6.83 (6H, m), 4.96 (2H, app s), 4.78 (1H, m), 4.73 (1H, m), 4.36 (1H, d, $J=10.2$ Hz), 4.22 (1H, d, $J=10.2$ Hz), 3.37 (2H, app s), 2.91 (1H, dd, $J=16.6, 6.4$ Hz), 2.62 (1H, dd, $J=16.6, 5.9$ Hz), 2.12 (1H, m), 1.00 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 0.87 (3H, d, $J=6.3$ Hz): MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 674

从极性较强的叔丁酯制备: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.88 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 8.79 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 8.43 (1H, s), 8.00-7.80 (4H, m), 7.61 (2H, m), 7.23-7.17 (4H, m), 6.93-6.77 (6H, m), 4.99 (1H, d, $J=17.6$ Hz), 4.86 (1H, d, $J=18.1$ Hz), 4.79 (1H, m), 4.72 (1H, m), 4.43 (1H, d, $J=10.7$ Hz), 4.20 (1H, d, $J=10.2$ Hz), 2.81 (1H, dd), 2.56 (1H, dd), 2.17 (1H, m), 1.01 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 0.99 (3H, d, $J=6.3$ Hz): MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 674

· (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 27)

从极性较弱的叔丁酯制备: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.08 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 8.87 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 8.55 (1H, s), 8.10-8.01 (4H, m), 7.68-7.58 (5H, m), 7.26 (2H, t, $J=7.8$ Hz), 6.98-6.92 (3H, m), 5.27 (2H, ABq, $J=16.6$ Hz), 4.82-4.78 (2H, m), 4.43 (1H, d, $J=10.7$ Hz), 4.29 (1H, d, $J=10.3$ Hz), 3.44 (2H, ABq, $J=18.1$ Hz), 3.01 (1H, dd, $J=17.1, 6.4$ Hz), 2.67 (1H, dd, $J=17.1, 6.3$ Hz), 2.21 (1H, m), 1.07 (3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.97 (3H,

d, $J=6.2$ Hz): MS $[M+Na]^+$ 770

从极性较强的叔丁酯制备: 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.97 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 8.85 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 8.50 (1H, s), 8.09–7.96 (4H, m), 7.67–7.60 (5H, m), 7.32 (2H, t, $J=6.3$ Hz), 7.00 (3H, m), 5.38 (1H, d, $J=17.1$ Hz), 5.13 (1H, d, $J=17.1$ Hz), 4.92 (1H, d, $J=6.3$ Hz), 4.79 (1H, t, $J=7.8$ Hz), 4.55 (1H, d, $J=9.7$ Hz), 4.28 (1H, d, $J=8.7$ Hz), 3.48 (1H, d, $J=18.1$ Hz), 3.38 (1H, d, $J=18.1$ Hz), 2.87 (1H, dd, $J=17.1, 4.9$ Hz), 2.60 (1H, dd, $J=17.1, 4.9$ Hz), 2.25 (1H, m), 1.07 (6H, m): MS $[M+Na]^+$ 770

· (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸(化合物 23, 非对映体)
 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.72–8.55 (2H, m), 8.38 (1H, s), 8.04–7.85 (4H, m), 7.62 (2H, m), 7.25–7.12 (7H, m), 6.91–6.70 (3H, m), 4.79–4.51 (4H, m), 3.40–3.05 (4H, m), 2.73–2.23 (2H, m), 2.01 (1H, m), 0.94–0.70 (6H, m) : MS $[M+Na]^+$ 658

· (3S)-2-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 28)

从极性较弱的叔丁酯制备: 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.68 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 8.59 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 8.40 (1H, s), 8.05–7.87 (4H, m), 7.63–7.54 (5H, m), 7.21–7.13 (5H, m), 5.98 (2H, ABq, $J=17.1$ Hz), 4.74 (1H, m), 4.64 (1H, m), 3.25–3.10 (4H, m), 2.62 (1H, dd, $J=17.1, 6.3$ Hz), 2.37 (1H, dd, $J=16.6, 5.4$ Hz), 2.06 (1H, m), 0.93 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.83 (3H, d, $J=6.2$ Hz): MS $[M+Na]^+$ 754

从极性较强的叔丁酯制备: 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.72 (1H,

d, $J=8.3$ Hz), 8.59 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 8.41 (1H, s), 8.01–7.87 (4H, m), 7.62–7.53 (5H, m), 7.29–7.21 (5H, m), 4.70–4.55 (4H, m), 3.44–3.10 (4H, m), 2.72–2.67 (1H, dd, $J=16.6, 7.3$ Hz), 2.38–2.34 (1H, dd, $J=16.6, 7.3$ Hz), 2.05 (1H, m), 0.97 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 0.79 (3H, d, $J=6.3$ Hz); MS $[M+Na]^+$ 754.

· (3S)-3-{3-[(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸(化合物 22, 非对映体混合物)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.06 (1H, m), 8.82 (1H, br), 8.57 (1H, m), 8.16–7.74 (5H, m), 7.26–7.12 (4H, m), 6.89–6.69 (6H, m), 5.10–4.70 (4H, m), 4.48–4.20 (2H, m), 2.87–2.53 (2H, m), 2.32 (1H, m), 0.98–0.85 (6H, m) : MS $[M+Na]^+$ 675, $[M+H]^+$ 653.

· (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羰基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸(化合物 25)

从极性较弱的叔丁酯制备: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.96 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 8.77 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 8.47 (1H, s), 8.03–7.57 (9H, m), 7.44 (1H, t, $J=6.8$ Hz), 7.34 (1H, t, $J=7.8$ Hz), 7.17–7.13 (4H, m), 6.88–6.82 (3H, m), 5.09 (2H, ABq), 4.84 (1H, m), 4.72 (1H, m), 4.38 (1H, d, $J=10.2$ Hz), 4.23 (1H, d, $J=10.7$ Hz), 2.94 (1H, dd, $J=17.1, 6.8$ Hz), 2.65 (1H, dd, $J=16.6, 5.9$ Hz), 2.12 (1H, m), 0.97 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 0.85 (3H, d, $J=6.3$ Hz): MS $[M+Na]^+$ 724

从极性较强的叔丁酯制备: ^1H NMR (50°C, 300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.72 (1H, d), 8.63 (1H, d), 8.41 (1H, s), 7.94–6.72 (19H, m), 5.03 (2H, ABq), 4.88 (1H, m), 4.74 (1H, m), 4.42 (1H, d), 4.19 (1H, m), 3.38 (2H, ABq), 2.88 (1H, dd), 2.65 (1H, dd), 2.19 (1H, m),

1.02 (6H, 双 d): MS $[M+Na]^+$ 724

^{13}C NMR (50°C, 300 MHz, DMSO- d_6) δ 202.1, 171.6, 170.7, 166.6, 159.3, 158.0, 155.6, 134.1, 133.9, 132.0, 131.6, 129.3, 129.1, 128.7, 127.7, 127.5, 127.3, 126.5, 126.2, 124.2, 123.6, 121.1, 118.1, 114.5, 107.4, 87.5, 70.2, 52.9, 34.4, 29.6, 19.4, 18.9.
极性较强的非对映体的甲酯: 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.29 (1H, s), 8.02-6.68 (20H, m), 5.09-4.95 (2H, ABq, $J=16.6$ Hz), 5.10 (1H, m), 5.01 (1H, m), 4.34 (2H, ABq, $J=10.3$ Hz), 3.70 (3H, s), 3.50-3.33 (2H, ABq, $J=17.6$ Hz), 3.13 (1H, dd, $J=17.1, 4.9$ Hz), 2.90 (1H, dd, $J=17.1, 5.9$ Hz), 2.23 (1H, m), 1.08 和 1.02 (6H, 双 d, $J=6.8$ Hz).

· (3S)-3-{3-[(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-2-甲基-丙基]-5-苯氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(1-萘氧基)-戊酸(化合物 24, 非对映体混合物)

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.02-8.18 (3H, m), 8.05-6.80 (18H, m), 5.15-4.15 (6H, m), 2.90-2.55 (2H, m), 2.14 (1H, m), 1.05-0.82 (6H, m).

· (3S)-2-{3-[(1S)-1-(萘-2-羧基氨基)-2-甲基-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸(化合物 29, 非对映体混合物)

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.95-8.46 (3H, m), 8.09-7.07 (13H, m), 5.21-4.75 (5H, m), 2.95-2.64 (2H, m), 2.19 (1H, m): MS $[M+H]^+$ 596

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(2-萘羧基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(化合物 30, 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.76–8.69 (m, 2H), 8.45 (m, 1H), 8.04–7.90 (m, 5H), 7.61 (m, 2H), 7.31–7.19 (m, 2H), 6.97–6.81 (m, 3H), 5.09–4.68 (m, 5H), \sim 3.3 (m, 2H), 2.82 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.00–0.84 (m, 6H): MS $[\text{M}+\text{Na}] = 568$

· (3S)-2-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基乙基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 32, 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.48 (br s, 1H), 8.00 (m, 1H), 7.61–7.54 (m, 3H), 7.30–7.15 (m, 11H), 4.93–4.32 (m, 4H), 3.34–2.90 (m, 4H), 2.78 (m, 1H), 1.78 (m, 1H), 0.90–0.60 (m, 6H): MS $[\text{M}+\text{Na}] = 732$

· (3S)-2-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 33)

从极性较强的叔丁酯制备: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.80 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.63 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.02 (m, 3H), 7.64–7.20 (m, 12H), 4.81–4.55 (m, 4H), 3.39 (m, 2H), 3.12 (m, 2H), 2.73 (m, 1H), 2.43 (m, 1H), 1.98 (m, 1H), 0.99 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H), 0.79 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H): MS $[\text{M}+\text{Na}] = 754$

从极性较弱的叔丁酯制备: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.08–7.97 (m, 4H), 7.61–7.21 (m, 12H), 5.00 (m, 2H), 4.77–4.67 (m, 2H), 3.39–3.27 (m, 2H), 3.15–3.11 (m, 2H), 2.64 (m, 1H), 2.40 (m, 1H), 1.99 (m, 1H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(肉桂酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-

戊酸(化合物 38)

从极性较强的叔丁酯制备： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.55 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.60-7.19 (m, 14H), 6.70 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 4.71-4.49 (m, 4H), \sim 3.3 (m, 2H), 3.08 (m, 2H), 2.71 (m, 1H), 2.40 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 0.86 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.74 (d, $J=6.4$ Hz, 3H): MS $[\text{M}+\text{H}]=708$

从极性较弱的叔丁酯制备： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.53 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.61-7.16 (m, 14H), 6.69 (d, $J=16.9$ Hz, 1H), 4.99-4.92 (ABq, $J=17.4$ Hz, 2H), 4.72 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 3.36 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 3.23 (d, $J=13.8$ Hz, 1H), 3.10-3.04 (m, 2H), 2.61 (dd, $J=17.0, 6.4$ Hz, 1H), 2.37 (dd, $J=17.0, 6.0$ Hz, 1H), 1.90 (m, 1H), 0.79 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯基-甲基磺酰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 39, 非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7.75 和 7.69 (m, 1H), 7.61-7.13 (m, 13H), 5.00 和 4.70 (m, 1H), 4.64 (m, 2H), 4.22-3.78 (m, 4H), 1.79 (m, 1H), 0.90 (m, 6H): MS $[\text{M}+\text{H}]=732$.

· (3S)-2-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 40)

从极性较强的异构体制备： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.94 (d, $J=9.7$ Hz, 1H), 8.75 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 8.18-8.05 (m, 3H), 7.85 (m, 1H), 7.55 (m, 3H), 5.22-5.06 (m, 3H), 4.83-4.70 (m, 2H), 3.35 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 2.31 (m, 1H), 0.95 (m, 6H): MS $[\text{M}+\text{H}]=643$

从极性较弱的异构体制备： $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.07 (d, $J=$

9.2 Hz, 1H), 8.76 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.56 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 8.20-8.07 (m, 3H), 7.87 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.62-7.54 (m, 3H), 5.21-5.06 (m, 3H), 4.84-4.70 (m, 2H), 3.44-3.27 (m, 2H), 2.85 (dd, J= 17.0, 6.0, 1H), 2.66 (dd, J= 17.0, 6.9 Hz, 1H), 2.29 (m, 1H), 0.98 (d, J= 6.9 Hz, 3H), 0.90 (d, J= 6.4 Hz, 6H)

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(化合物 41)

从极性较强的异构体制备: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.95 (d, 1H), 8.72 (d, 1H), 8.55 (d, 1H), 8.20-8.05 (m, 3H), 7.86 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.24-6.74 (m, 5H), 5.11-4.70 (m, 5H), 3.34 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 0.95 (m, 6H): MS $[\text{M}+\text{H}] = 547$

从极性较弱的异构体制备: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.03 (d, 1H), 8.74 (d, 1H), 8.56 (d, 1H), 8.20-8.07 (m, 3H), 7.87 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.23 (m, 2H), 6.88 (m, 3H), 5.09-4.71 (m, 5H), 3.34 (m, 2H), 2.85 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.27 (m, 1H), 0.96-0.87 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 42)

从极性较强的异构体制备: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.91 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.59-8.52 (m, 2H), 8.17-8.06 (m, 3H), 7.87 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.58-7.53 (m, 5H), 4.69-4.51 (m, 4H), 3.40 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.37 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 0.91-0.80 (m, 6H): MS $[\text{M}+\text{H}] = 733$

从极性较弱的异构体制备: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.92 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.56 (m, 2H), 8.19-8.07 (m, 3H), 7.87 (m, 1H), 7.73

(m, 1H), 7.60-7.54 (m, 3H), 7.22-7.07 (m, 5H), 5.01-4.93 (ABq, J= 16.5 Hz, 2H), 4.75-4.62 (m, 2H), 3.46 (d, J= 18.4 Hz, 1H), 3.23-3.07 (m, 3H), 2.62 (dd, J= 17.0, 6.9 Hz, 1H), 2.37 (dd, J= 17.0, 6.0 Hz, 1H), 2.21 (m, 1H), 0.86-0.83 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(化合物 43)

从极性较强的异构体制备：¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.91 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.62 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.52 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 8.15 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.07 (m, 2H), 7.86 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.26-7.09 (m, 7H), 6.86 (m, 1H), 6.69 (d, J= 8.3 Hz, 2H), 4.71-4.63 (m, 2H), 4.54-4.46 (ABq, J= 17.9 Hz, 2H), 3.42 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 3.29 (d, J= 13.8 Hz, 1H), 3.15 (d, J= 18.4 Hz, 1H), 3.09 (d, J= 14.3 Hz, 1H), 2.72 (dd, J= 17.0, 6.9 Hz, 1H), 2.36 (dd, J= 17.0, 6.0 Hz, 1H), 2.15 (m, 1H), 0.88 (d, J= 6.9 Hz, 3H), 0.75 (d, J= 6.9 Hz, 3H): MS [M+H]= 637

从极性较弱的异构体制备：¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.88 (d, J= 9.6 Hz, 1H), 8.54 (m, 2H), 8.18-8.06 (m, 3H), 7.87 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.28-6.78 (m, 10H), 4.78-4.63 (m, 4H), 3.45 (d, J= 18.3 Hz, 1H), 3.26-3.06 (m, 3H), 2.66-2.62 (dd, J= 17.0, 6.9 Hz, 1H), 2.44-2.39 (dd, J= 17.0, 5.5 Hz, 1H), 2.17 (m, 1H), 0.80 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-2-基-羰基氨基)-丙基]-5-(1-咪唑基甲基)-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(化合物 44, 非对映体混合物)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.09-6.60 (m, 16H), 4.92-4.62 (m, 6H), 3.50 (m, 2H), 2.85-2.20 (m, 3H), 0.93 (m, 6H): MS [M+H]= 627

• (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(2-萘羰基氨基)-丙基]-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-戊酸(化合物 45, 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.77 (m, 1H), 8.45 (m, 2H), 8.07-7.89 (m, 4H), 7.61 (m, 2H), 5.06 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.46 & 4.38 (双 m, 1H), \sim 3.3 (m, 异噁唑啉 CH_2), 2.62 (m, 1H), \sim 2.49 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.09 & 2.05 (双 s, 3H), 1.01-0.84 (m, 6H).

• (3S)-3-{3-[(1S)-1-(琥珀酰氨基)-3-羧基-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(化合物 46, 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.56-8.52 (m, 1H), 8.15 (m, 1H), 7.27 (m, 2H), 6.97-6.82 (m, 3H), 4.96-4.83 (m, 2H), 4.77 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 3.58-2.22 (m, 10H), 2.0-1.74 (m, 2H), 1.47 & 1.45 (双 s, 3H): MS $[\text{M}+\text{Na}] = 558$.

• (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-苯氧基-戊酸(化合物 47, 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.62-8.52 (m, 1H), 8.06 (m, 1H), 7.27 (m, 2H), 6.96-6.81 (m, 3H), 4.94-4.72 (m, 3H), 4.43-4.32 (m, 1H), 3.38-3.22 (m, 1H), 2.94-2.78 (m, 2H), 2.70-2.22 (m, 5H), 1.95-1.77 (m, 1H), 1.48 & 1.46 (双 s, 3H), 0.86-0.70 (m, 6H): MS $[\text{M}+\text{Na}] = 528$.

• (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(1-萘基羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(1-哌啶基)-戊酸(化合物 48, 非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.75 (m, 1H), 8.47 和 8.29 (m, 1H),

8.03-7.23 (m, 12H), 4.65 (m, 2H), 3.11-2.99 (m, 2H), 2.26-2.18 (m, 4H), 1.97 (m, 1H), 1.64-0.79 (m, 12H): MS [M+H] = 627.

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-1-羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 49LP)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.03 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.74 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.60-8.56 (m, 2H), 8.07-8.03 (m, 2H), 7.83 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.61-7.53 (m, 3H), 7.22-7.17 (m, 5H), 5.01-4.93 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 4.74-4.63 (m, 2H), 3.41 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 3.23 (d, J= 14.2 Hz, 1H), 3.13 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 3.09 (d, J= 14.2 Hz, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 0.91 (d, J= 6.9 Hz, 3H), 0.84 (d, J= 6.9 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-1-羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 50LP: 49LP 的立体异构体)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.04 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.65-8.60 (m, 2H), 8.53 (d, J= 6.0 Hz, 1H), 8.05-8.00 (m, 2H), 7.82 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.60-7.53 (m, 3H), 7.30-7.17 (m, 5H), 4.75-4.53 (m, 4H), 3.5-3.3 (m, 2H, 被溶剂峰掩盖), 3.13 (m, 2H), 2.68 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.04 (m, 1H), 0.95 (d, J= 6.4 Hz, 3H), 0.78 (d, J= 6.4 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-3-羧基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 51LP)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.40 (s, 1H), 8.99 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.56 (m, 2H), 8.26 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.17 (d, J= 7.8 Hz,

1H), 7.90-7.81 (m, 2H), 7.60-7.53 (m, 3H), 7.20-7.07 (m, 5H), 5.01-4.92 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 4.73-4.66 (m, 2H), ~3.4 (m, 1H, 被溶剂峰掩盖), 3.23-3.05 (m, 3H), 2.60 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 0.82 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 52MP: 化合物 51 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.39 (s, 1H), 8.97 (d, J= 9.6 Hz, 1H), 8.58 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.24 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.13 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.88-7.81 (m, 2H), 7.58-7.53 (m, 3H), 7.27-7.18 (m, 5H), 4.72-4.49 (m, 4H), 3.6-3.3 (m, 2H, 被溶剂峰掩盖), 3.19-3.08 (m, 2H), 2.67 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.18 (m, 1H), 0.87 (d, J= 6.9 Hz, 3H), 0.78 (d, J= 6.9 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-4-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 53 LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.02 (m, 2H), 8.63 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 8.10 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.01 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.83 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.61-7.53 (m, 3H), 7.44 (d, J= 4.2 Hz, 1H), 7.31-7.20 (m, 6H), 4.98 (m, 2H), 4.76-4.65 (m, 2H), 3.37 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 3.29 (d, J= 14.2 Hz, 1H), 3.15-3.11 (m, 2H), 2.63 (m, 1H), 2.39 (m, 1H), 1.99 (m, 1H), 0.93 (d, J= 6.9 Hz, 3H), 0.85 (d, J= 6.9 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(异喹啉-4-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 54 MP: 化合物 53 LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.05 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.96 (d, $J=4.1$ Hz, 1H), 8.64 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.69-7.48 (m, 5H), 7.31-7.20 (m, 5H), 4.80-4.55 (m, 4H), 3.6-3.3 (m, 2H, 被溶剂峰掩盖), 3.14-3.09 (m, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 0.96 (d, $J=6.9$ Hz, 3H), 0.78 (d, $J=6.9$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯并咪唑-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 55LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.83 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.61-7.33 (m, 6H), 7.20-7.04 (m, 5H), 5.00-4.92 (m, 2H), 4.73 (m, 1H), 4.56 (m, 1H), \sim 3.37 (m, 1H), 3.23-3.05 (m, 3H), 2.61 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 0.88-0.78 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯并咪唑-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 56: 化合物 55LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.83 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.58-7.43 (m, 5H), 7.33-7.18 (m, 6H), 4.69-4.55 (m, 4H), 3.43-3.30 (m, 2H), 3.12-3.07 (m, 2H), 2.69 (m, 1H), 2.37 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 0.90 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.74 (d, $J=6.4$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(茶-1-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 57LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.77 (d, $J=9.7$ Hz, 1H), 8.64 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.06–7.95 (m, 3H), 7.69–7.44 (m, 5H), 7.26 (m, 7H), 5.02–4.90 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.71 (m, 2H), 3.30–3.10 (m, 4H), 2.65 (m, 1H), 2.39 (m, 1H), 1.99 (m, 1H), 0.94 (d, $J=6.0$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J=6.0$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二甲基苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 61: 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.82–8.76 (m, 1H), 8.65 (m, 1H), 8.08–7.95 (m, 3H), 7.59–7.46 (m, 4H), 7.33–7.06 (m, 8H), 4.98–4.49 (m, 4H), 3.42–3.09 (m, 4H), 2.76–2.39 (m, 2H), 2.28 & 2.25 (双 s, 6H), 1.98 (m, 1H), 0.99–0.76 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(喹啉-8-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 62: 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 11.19–11.08 (m, 1H), 9.04 (m, 1H), 8.65–8.50 (m, 3H), 8.22 (m, 1H), 7.80–7.51 (m, 5H), 7.30–7.06 (m, 5H), 5.00–4.47 (m, 4H), 3.46–3.02 (m, 4H), 2.73–2.34 (m, 2H), 2.11 (m, 1H), 1.00–0.80 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(吡啶-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 63LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 11.58 (s, 1H), 8.56 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.64–7.53 (m, 4H), 7.43 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.24–7.03 (m, 8H), 5.00–4.92 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.74–4.56 (m, 2H), \sim 3.5 (m, 1H, 被溶剂峰掩盖), 3.23 (d, $J=13.8$

Hz, 1H), 3.15-3.06 (m, 2H), 2.60 (m, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 0.90 (d, J= 6.4 Hz, 3H), 0.81 (d, J= 6.9 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(吡啶-2-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 64MP: 化合物 63LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.56 (s, 1H), 8.54 (m, 2H), 7.60-7.02 (m, 13H) 4.71-4.51 (m, 4H), , 3.41-3.31 (m, 2H), 3.15-3.07 (m, 2H), 2.67 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 0.92 (d, J= 6.9 Hz, 3H), 0.77 (d, J= 6.9 Hz, 3H).

· (3S)-2-{3-[2-甲基-(1S)-1-(吡啶-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 65LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.61 (s, 1H), 8.56 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.08 (m, 2H), 7.91 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 7.62-7.54 (m, 3H), 7.43 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 7.22-7.00 (m, 7H), 4.95 (m, 2H), 4.72-4.61 (m, 2H), \sim 3.4 (m, 1H, 被溶剂峰掩盖), 3.23 (d, J= 13.8 Hz, 1H), 3.13-3.06 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 1.99 (m, 1H), 0.91 (d, J= 4 Hz, 3H), 0.81 (d, J= 6.4 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(吡啶-3-羰基氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 66MP: 化合物 65LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.60 (s, 1H), 8.54 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 8.11-8.06 (m, 2H), 7.91 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 7.60-7.05 (m, 11H), 4.71-4.47 (m, 4H), 3.33 (m, 2H), 3.09 (m, 2H), 2.68 (m, 2H), 2.39 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 0.93 (d, J= 6.4 Hz, 3H), 0.78 (d, J= 6.9 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 67LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.86 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 8.73 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.11-7.98 (m, 3H), 7.64-7.54 (m, 7H), 5.17-5.08 (ABq, $=17.0$ Hz, 2H), 4.81-4.70 (m, 2H), ~ 3.4 (m, 1H, 被溶剂峰掩盖), 3.05 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.55 (s, 3H), 1.00 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J=6.4$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(萘-1-羰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 68MP: 化合物 67LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.84 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.69 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.06-7.96 (m, 3H), 7.62-7.52 (m, 7H), 5.23-5.11 (ABq, $=17.0$ Hz, 2H), 4.82-4.67 (m, 2H), 3.6-3.4 (m, 1H, 被溶剂峰掩盖), 3.00 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.82 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 1.56 (s, 3H), 1.01-0.93 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯并呋喃-2-羰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 69LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.91 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.62-7.54 (m, 4H), 7.48 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 5.16-5.07 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.79 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 3.44 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 3.02 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J=17.0, 6.0$ Hz, 1H), 2.65 (dd, $J=17.0, 7.4$ Hz, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.50 (s,

3H), 0.94 (d, $J=6.9$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J=6.4$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(苯并咪唑-2-羰基氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)戊酸(化合物 70MP: 化合物 69LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.86 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.62 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.60-7.52 (m, 4H), 7.45 (m, 1H), 7.31 (m, 1H), 5.14-5.07 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.71 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 3.44 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 3.00 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.79 (dd, $J=17.0, 6.4$ Hz, 1H), 2.56 (dd, $J=17.0, 6.0$ Hz, 1H), 2.16 (m, 1H), 1.53 (s, 3H), 0.95-0.91 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[3-羧基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 71LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.60 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.61-7.54 (m, 3H), 5.16-5.08 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.78 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 3.31 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.90 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J=17.0, 6.0$ Hz, 1H), 2.64 (dd, $J=17.0, 6.9$ Hz, 1H), 2.44 (m, 2H), 2.33 (m, 2H), 2.24 (m, 2H), 1.90-1.76 (m, 2H), 1.46 (s, 3H).

· (3S)-3-{3-[3-羧基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 72MP: 化合物 71LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.55 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.62-7.55 (m, 3H), 5.21-5.09 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.76 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 3.23 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.95

(d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.83 (dd, $J=17.0, 6.5$ Hz, 1H), 2.62 (dd, $J=17.0, 6.4$ Hz, 1H), 2.44 (m, 2H), 2.33 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 1.96 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.50 (s, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 73LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.66 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.62-7.57 (m, 3H), 5.14-5.05 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.77 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.31 (d, $J=18.4$ Hz, 1H), 2.92 (d, $J=18.4$ Hz, 1H), 2.87-2.83 (m, 1H), 2.66-2.61 (m, 1H), 2.44 (m, 1H), 2.37 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.48 (s, 3H), 0.87 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.77 (d, $J=6.4$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 74MP: 化合物 73LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.56 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.62-7.57 (m, 3H), 5.19-5.08 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.30 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.93 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.82 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.44-2.31 (m, 4H), 1.92 (m, 1H), 1.51 (s, 3H), 0.86-0.84 (m, 6H).

· (3S)-2-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 75LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.64 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.60 (m, 3H), 5.17-5.04 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.83 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 3.25 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.95 (d,

J= 17.9 Hz, 1H), 2.85 (dd, J= 17.0, 5.5 Hz, 1H), 2.65 (dd, J= 16.5, 7.4 Hz, 1H), 2.46-2.35 (m, 4H), 1.84 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.36-1.15 (m, 2H), 0.88-0.76 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 76MP: 化合物 75LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) 8.59 (d, J= 6.4 Hz, 1H), 8.07 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 7.62-7.54 (m, 3H), 5.12 (m, 2H), 4.74 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.24 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.95 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.82 (dd, J = 17.0, 6.9 Hz, 1H), 2.59 (m, 1H), 2.44-2.30 (m, 4H), 1.92 (m, 2H), 1.71 (m, 1H), 1.38-1.20 (m, 2H), 0.85 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丁基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 79LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.63 (d, J= 8.2 Hz, 1H), 8.09 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 7.62-7.57 (m, 3H), 5.17-5.05 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 4.83 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 3.25 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.95 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.85 (dd, J= 17.0, 5.5 Hz, 1H), 2.65 (dd, J= 17.0, 7.3 Hz, 1H), 2.45-2.35 (m, 4H), 1.84 (m, 2H), 1.71 (m, 1H), 1.28-1.14 (m, 4H), 0.88-0.76 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丁基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 80MP: 化合物 79LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.58 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.07 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.61-7.54 (m, 3H), 5.18-5.08 (ABq, J= 17.0 Hz,

2H), 4.76 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.24 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.95 (d, J= 18.3 Hz, 1H), 2.83 (dd, J= 16.5, 6.4 Hz, 1H), 2.59 (dd, J= 17.0, 6.4 Hz, 1H), 2.44-2.30 (4H), 1.92 (m, 2H), 1.73 (m, 1H), 1.36-1.16 (m, 4H), 0.87-0.83 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-羧基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸(化合物 81LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.67 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.08 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.73 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.18 (m, 2H), 5.01 (m, 2H), 4.83 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 3.30 (d, J= 17.4 Hz, 1H), 2.93-2.87 (m, 2H), 2.67 (dd, J= 17.0, 6.4 Hz, 1H), 2.45-2.34 (m, 4H), 1.79 (m, 1H), 1.49 (s, 3H), 0.80 (d, J= 6.5 Hz, 3H), 0.68 (d, J= 6.9 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-羧基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2-萘氧基)-戊酸(化合物 82MP: 化合物 81LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.58 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.08 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.73 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.18 (m, 2H), 5.04 (m, 2H), 4.82 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.33 (d, J= 17.4 Hz, 1H), 2.95-2.82 (m, 2H), 2.65 (m, 1H), 2.44-2.27 (m, 4H), 1.91 (m, 1H), 1.51 (s, 3H), 0.86-0.83 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-丙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-萘氧基-戊酸(化合物 83: 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.57 (m, 1H), 8.06 (m, 1H), 7.26 (m,

2H), 6.94 (m, 1H), 6.83 (m, 2H), 4.92-4.71 (m, 3H), 4.41-4.34 (m, 1H), 3.26-3.21 (m, 1H), 2.96-2.78 (m, 2H), 2.67-2.56 (m, 1H), 2.44-2.25 (m, 4H), 1.92-1.66 (m, 3H), 1.40-1.16 (m, 2H), 0.88-0.70 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-羟基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 84: 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.57 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.59 (m, 3H), 5.24-5.09 (m, 2H), 4.80 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 3.16-3.03 (m, 2H), 2.79 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.44-2.33 (m, 4H), 1.90 (m, 1H), 0.86-0.76 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 85LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.51 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.59 (m, 3H), 7.25 (m, 5H), 4.92 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 3.34-3.20 (m, 2H), 3.07-3.02 (m, 2H), 2.58 (m, 1H), 2.44-2.30 (m, 5H), 1.82 (m, 1H), 0.81-0.73 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-苯基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 86MP: 化合物 85LP 的立体异构体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.49 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.60 (m, 3H), 7.28-7.19 (m, 5H), 4.70 (m, 1H), 4.60-4.51 (ABq, $J=17.4$ Hz, 2H), 4.36 (m, 1H), 3.32-3.26 (m,

2H), 3.07-3.02 (m, 2H), 2.73-2.68 (m, 1H), 2.42-2.28 (m, 5H), 1.82 (m, 1H), 0.83 (d, J= 6.9 Hz, 3H), 0.69 (d, J= 6.9 Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-甲氧基甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 87: 非对映体混合物)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.80 & 8.65 (双 m, 1H), 8.10 & 7.97 (双 m, 1H), 7.60 (m, 3H), 5.24-5.03 (m, 2H), 4.84 & 4.68 (双 m, 1H), 4.39 (m, 1H), 3.78-3.51 (m, 2H), \sim 3.35 (双 s, 3H), 3.20-2.99 (m, 2H), 2.91-2.50 (m, 2H), 2.44-2.34 (m, 4H), 1.85 (m, 1H), 0.87 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-正戊基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 89LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.64 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.10 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.60 (m, 3H), 5.16-5.05 (ABq, J= 16.5 Hz, 2H), 4.80 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.24 (d, J= 17.5 Hz, 1H), 2.94 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.85 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.45-2.36 (m, 4H), 1.84 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.23 (m, 6H), 0.86-0.76 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-正戊基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 90MP: 化合物 89LP 的非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.59 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.07 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.60 (m, 3H), 5.18-5.08 (ABq, J= 16.5 Hz, 2H), 4.76 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.24 (d, J= 18.3 Hz, 1H), 2.95 (d, J= 18.3 Hz, 1H), 2.82 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.44-2.30 (m, 4H), 1.92 (m, 2H), 1.72 (m, 1H), 1.23 (m, 6H), 0.85 (m, 6H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-乙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 91LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.66 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.62-7.56 (m, 3H), 5.17-5.05 (ABq, $J=16.5$ Hz, 2H), 4.84 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.25 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.95 (d, $J=17.9$ Hz, 1H), 2.85 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.45-2.35 (m, 4H), 1.91-1.71 (m, 3H), 0.88-0.74 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(琥珀酰氨基)-丙基]-5-乙基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 92MP: 化合物 91LP 的非对映体)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.59 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.62-7.54 (m, 3H), 5.17-5.09 (ABq, $J=17.0$ Hz, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.23 (d, $J=18.3$ Hz, 1H), 2.95 (d, $J=17.8$ Hz, 1H), 2.83 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 2.46-2.28 (m, 4H), 1.93 (m, 2H), 1.77 (m, 1H), 0.88-0.80 (m, 9H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(戊二酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羧基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 93LP)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.66 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.61-7.54 (m, 3H), 5.14-5.05 (ABq, $J=16.5$ Hz, 2H), 4.79 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.32 (d, $J=17.5$ Hz, 1H), 2.90-2.83 (m, 2H), 2.63 (m, 1H), 2.18 (m, 4H), 1.85 (m, 1H), 1.72 (m, 2H), 1.48 (s, 3H), 0.86 (d, $J=6.9$ Hz, 3H), 0.77 (d, $J=6.9$ Hz, 3H).

· (3S)-3-{3-[2-甲基-(1S)-1-(戊二酰氨基)-丙基]-5-甲基-4,5-二氢-异噁唑-5-羰基氨基}-4-酮基-5-(2,6-二氯苯甲酰氧基)-戊酸(化合物 94MP: 化合物 93LP 的非对映体)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.58 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.05 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 7.62-7.54 (m, 3H), 5.18-5.08 (ABq, J= 17.0 Hz, 2H), 4.76 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 3.31 (d, J= 17.4 Hz, 1H), 2.92 (d, J= 17.9 Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.16 (m, 4H), 1.91 (m, 1H), 1.70 (m, 2H), 1.51 (s, 3H), 0.85 (m, 6H).

药理学实验

通过如下实验评估了本发明化合物的药理学效力。Con A 购自 Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany)。半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的肽类底物 (Ac-YVAD-pNA 用于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1, Ac-VDVAD 用于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-2, Ac-DEVD-pNA 用于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3、7、8 和 9, Ac-LEVD-pNA 用于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-4, Ac-VEID-pNA 用于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-6) 和肽类的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (Ac-DEVD-fmk、z-VAD-CHO) 购自 Alexis Co. (San Diego, CA)。Ac-DEVD-CHO 和 z-DEVD-cmk 购自 Bachem; 抗 Fas 抗体购自 Oncor (Cat#A8050); WI38 细胞可以从 ATCC 获得; IFN- γ 购自 LG Pharmaceuticals (Korea)。所有的细胞培养基和添加物均购自 Gibco BRL (Tsuen Wan, Hong Kong), 除非另有说明。重组的人半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶(1-4、6-10)按照 Garcia-Calvo M 等, “人半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶家族成员的纯化和催化特性”, Cell Death Differ., 1999, Apr.; 6 (4): 362-9) 中描述的方法制备。半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3、-6、-7 和-8 可以购买到 (Pharmingen, San Diego, CA, USA, 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3: 66281T, 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-6: 66291T, 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-7: 66301T, 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-8: 66311T)。

实验 1: 对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制活性的筛选

在该实验中, 在将人半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶基因克隆到表达载体 pET 中后从转化的细菌中纯化重组的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶, 然后用于实验 (Thornberry, N. A. 等, Nature, 1992, 356, 768. Thornberry, N. A. Methods in Enzymology, 1994, 615.).

酶活性通过已知的方法测定 (Walker N. P. C. 等, Cell 1994, 78, 343). 简单地说, 将 10ng 重组蛋白与含有 $1 \sim 100 \mu\text{M}$ 酶底物 Ac-YVAD-AMC 或 Ac-DEVD-AMC 的 50mM Tris (pH 7.0), 1mM DTT, 0.5mM EDTA, 10% 甘油缓冲液混合, 然后于 37°C 下记录由分离出的 AMC 引起的改变。通过测定在 380 nm 激发和在 460 nm 放射的荧光的改变, 从早期的酶反应速率计算出对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的抑制活性 (范围; $K_i < 100\text{nM}$)。

实验 2: 筛选对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的细胞内抑制效力

通过筛选化合物对于用 LPS 刺激的外周淋巴细胞生产 IL- 1β 的影响来测定对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1 的抑制活性。简单地说, 将 500,000 细胞/ml 的人外周淋巴细胞用各种浓度的试验化合物处理 2 小时, 然后用 10ng/ml LPS 处理。将细胞保温 12 小时后, 通过免疫抗体分析法 (Amersham) 对培养基上清液的样品进行分析, 其中涂覆了 100ng/孔的人 IL- 1β 抗体 (范围: CIC_{50} : $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$)。

同时, 通过 MTT 分析定量研究了化合物对细胞凋亡的效力, 在该分析中, 在用可以引起细胞死亡的抗 FAS 抗体 CH11 处理的 Jurkat T 细胞中分析取决于化合物浓度的细胞的死亡和存活比 (有效范围; $1.0 \sim 10 \mu\text{M}$)。

[表 1]
不可逆抑制剂

化合物号	对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1的 $K_{obs}/[I]$ ($M^{-1} sec^{-1}$)	对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3的 $K_{obs}/[I]$ ($M^{-1} sec^{-1}$)	IC_{50} (IL-1 β 生产)	ED_{50} FAS引起的细胞死亡
32	130000	114	0.1-10 μ M	1-10 μ M
33mp	807000	500	"	"
36mp	294000	132	"	"
42mp	408000	160	"	"
58	577000	371	"	"
64	707000	1230	"	"
66	357000	1560	"	"
68	616000	2390	"	"
72	30800	176000	"	"
74	14500	40900		
76	14000	197000	"	"
80	14900	1140000	"	"
86	7560	28000		
87	3400	27400		
90		80100		

可逆抑制剂

化合物号	对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1的 K_i (nM)	对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3的 $K_{obs}/[I]$ (μ M)	IC_{50} (IL-1 β 生产)	ED_{50} FAS引起的细胞死亡
22mp	0.125	19.2	0.1-10 μ M	1-10 μ M
25mP	0.0721	24.9	"	"
29	0.324	65.9	"	"
30	19.1	44.8	"	"
43mp	4.0	70.7	"	"
46	29.1	0.0806	"	"
47	177	0.85	"	"
48	1.51	199	"	"
77	28900	19.3	"	"
78	63900	45.5		
81	26900	11.7	"	"
82	530	0.184	"	"
83	969	0.0277		

实验 3: 肝细胞的分离和培养

将雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (Hanlan Sprague-Dawley) 按照 MacMicking 等, 1995, Cell 81 : 641-650 描述的方法进行处理和繁殖并用作肝细胞源。按照 Stadler 等, Arch. Biochem. Biophys. 302: 4-11 描述的方法分离、纯化和培养大鼠肝细胞。将高度纯化的肝细胞 (纯度 >98% 并且活力 > 98%, 通过台盼蓝排除实验证实) 悬浮在含有 10% 胎牛血清并添加了 15mM HEPES (pH 7.4)、1 μ M 胰岛素、2mM L-谷酰胺、100 单位/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 Williams 培养液 E 中。将细胞以 2×10^5 细胞/孔的密度置于涂覆有胶原蛋白 12 孔平板中进行细胞活力测试, 或以 5×10^6 细胞/100ml 培养皿的密度用于酶分析。

实验 4: 在不含细胞的体系中抑制半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性的体外分析

通过测定各种酶对肽类型产色底物的蛋白水解裂解来测试半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性。将重组人半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶和 5mM DTT 一起在分析缓冲液 (100mM HEPES, pH 7.4, 含 20% (v/v) 甘油) 中在室温下预保温 20 分钟。将酶的等分液 (2 μ l, 所含的催化活性为 0.2 吸光度 (405nm)/h) 和 150 μ l 200 μ M 产色底物在含或不含 100 μ M 化合物 33 的条件下在 96 孔板中混合。将混合物于 37 $^{\circ}$ C 下保温。在 405nm 下在微量培养板读数器中断断地测定酶催化释放的 pNA 的吸光度 1 小时。从初始速率计算出半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性 (平均值 \pm SE) ($n=4$, 其中 n 表示重复实验的次数)。结果发现, 本发明的化合物几乎完全抑制所有测试的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性, 只有半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶 2 除外 (图 1)。该结果表明, 本发明化合物是广谱的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂。

实验 5: 在大鼠肝细胞中抑制半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性的体内分析

将新分离的大鼠肝细胞用 2,000 单位/ml 的 TNF $_{\alpha}$ 加 100ng/ml 放线

菌素 D 进行处理以诱导细胞凋亡。10 小时后收集细胞。通过冷冻/解冻 3 次使细胞溶解然后以 12,000 xg 在 4°C 下离心 20 分钟得到胞质溶液。将细胞溶胶 (~2 μ g 蛋白) 和 200 μ M 特异性的产色底物在含或不含 100 μ M 化合物 33 的条件下在含有 20%甘油和 5mM DTT 的 100mM HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 中混合并于 37°C 下保温。通过测定在 405nm 下吸光度的增加来分析半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶的活性。

用 Ac-DEVD-pNA (半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3、7、8 和 9)、Ac-LEVD pNA (半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-4) 和 Ac-VEEm-pNA (半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-6) 检测到了强的酶活性, 用 Ac-VDVAD (半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-2) 检测到了中等酶活性 (图 2)。本发明的化合物几乎完全抑制了这些放大的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性, 其活性与肽类型的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Ac-DEVD-fmk 和 z-VAD-CHO 相当 (图 2)。对于 Ac-YVAD-pNA (半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1), 检测到的酶活性相对较弱。但是, 本发明的化合物抑制了 74.1% 的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-1 类的活性。

实验 6: 在分离的大鼠肝细胞中增强细胞活力的体外分析

将细胞用 2,000 单位/ml TNF α 加 100ng/ml 放线菌素 D 在含或不含 100 μ M 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (化合物 33) 的条件下处理 12 小时。然后通过结晶紫染色法测定细胞活力 (n=4)。结果发现, 本发明的化合物阻止了大鼠肝细胞的死亡 (平均值 \pm SE) (图 3)。该实验结果表明, 本发明的化合物可以阻止由 TNF α 加放线菌素 D 引起的肝细胞的细胞凋亡。

实验 7: 对 Con A-诱导的小鼠急性肝炎的作用

步骤 1: 血样的制备

将 6 周大的雌性 Balb/c 小鼠 (Charles River Laboratory, Osaka, Japan) 在 22°C 和 55% 相对湿度下置于 12 小时白天/黑夜节律中, 使其可以随意地接近食物和水。将 Con A 以 2.5mg/ml 的浓度溶于无热原的

盐水中并以 20mg Con A /kg 的量通过尾静脉注射。在注射 Con A 前 1 小时和注射 4 小时后，用溶于由橄榄油和 10% DMSO 组成的载体中的化合物 33 或载体本身对动物腹膜内注射两次。在注射 Con A 24 小时后，通过颈部脱位处死动物以获得肝脏和血样。

步骤 2: 分析血浆氨基转移酶活性

在注射 Con A 24 小时后收集步骤 1 得到的血样。按照生产商的说明用 Autokit (Youngdong Pharmaceutical Co., Seoul, Korea) 测定血浆 AST 和 ALT 活性。

进行两次独立的实验以证实结果。在两次实验中，ConA 引起了血清 AST 和 ALT 活性的剧烈升高，而化合物 33 以剂量依赖性的方式抑制了升高的酶活性(图 4A、B)。在第二次实验中(图 4B)，各小鼠的酶活性显示出一些差异，但 ConA/载体组和 ConA/4mg/kg 化合物 33 组之间的差异没有达到统计学显著性的水平 (AST: $p=0.2972$, ALT: $p=0.1378$)。但是，在 20mg/kg 化合物 33 组，AST 和 ALT 活性与 ConA/载体组相比确实下降了 (AST: $p=0.0174$, ALT: $p=0.0011$)。在第一次实验中(图 4A)，化合物 33 本身略微增加了 AST 活性，但该增加没有达到统计学显著性的水平 ($p=0.1033$)。这些结果表明，式(I)化合物可以在体内抑制由 Con A 引起的 AST 和 ALT 活性的升高，但其本身不会产生显著的肝脏毒性。

步骤 3: 细胞因子分析

虽然肝脏疾病的大部分发病机理仍不清楚，但许多证据表明细胞因子可能直接或通过激活免疫系统而引起肝细胞损害，并且夹层 ELISA 也证实了在患有肝脏疾病的患者中细胞因子(包括 TNF_α 、IL-2、IL-4 和 IFN γ) 的增加(参见: Chisari, F. V., 1992, Mol. Genet. Med. 2: 67-104; Fukuda, R. 等, Clin. Exp. Immunolol. 100: 446-451; Yoshioka, K. 等, Hepatology 10: 769-773)。因此，本发明人分析了本发明化合物对于用 Con A 升高的血清细胞因子浓度的影响。

在步骤 1 中在 Con A 注射 6 小时后收集血样。通过 ELISA 试剂盒测定血浆中小鼠 IL-1 β (Endogen Inc. Boston, MA)、IL-2、IL-4、IFN γ (Pharmingen, San Diego, CA) 的量。该分析完全按照生产商的描述进行。每一样品测定两次。

结果表明, 本发明的化合物可以以剂量依赖性的方式抑制由 ConA 引起的 IL-1 β 的升高(参见图 5)。同时, 本发明化合物中等程度地减少 IL-4 浓度也显示出剂量依赖性的趋势, 但治疗组之间的差异没有达到统计学显著性的水平。另一方面, 本发明的化合物不显著影响 IL-2 和 IFN γ 的浓度。与单独使用载体相比, 本发明的化合物本身可以轻微减少所有四种细胞因子, 但这些差异没有达到统计学显著性的水平(对于所有 4 种细胞因子, $0.05 < p < 0.95$)。

实验 8: 组织学检查和细胞凋亡的检测

本发明人评估了在小鼠肝脏中细胞凋亡的传播以证实本发明化合物特异性地在肝细胞中阻断细胞凋亡的作用。将小鼠用 ConA 在含或不含各种剂量的化合物 33 的条件下处理[A 和 G: 用 ConA 和载体处理, B 和 H: 用 ConA 和 4mg/kg 的化合物 33 处理, C 和 I: 用 ConA 和 20mg/kg 的化合物 33 处理, D 和 J: 用 ConA 和 100mg/kg 的化合物 33 处理]以制备冷冻的肝脏切片。此外, 还将小鼠用 PBS 和载体(E 和 K)或 PBS 和 100mg/kg 的化合物 33 处理(F 和 L)以制备冷冻的肝脏切片。将新切除的小鼠肝脏立即在 25%蔗糖溶液于 4 $^{\circ}$ C 下浸泡过夜, 然后在液氮中冷冻并冷冻切片成 4 μ m 厚。

为了进行组织学检查, 将肝脏切片用 1%缓冲的低聚甲醛固定并用苏木精和曙红染色(图 6A 至 F)。为了检测肝脏内的发生细胞凋亡的细胞, 将冷冻的肝脏用 ApopTag 原位细胞凋亡过氧化物酶检测试剂盒(末端脱氧核酸转移酶介导的 dUTP 刻痕末端标记: TUNEL 分析) (Oncor, Gaithersburg, MD) 和 DAKO 液体 DAB (DAKO, Carpinteria, CA) 染色(图 6G 至 L)。按照生产商的说明进行染色。染色结束后, 将样品在光学显微镜下观察。各照片代表了从每组 10 只小鼠中获得的代表性的结

果。组织学检查表明 ConA 引起了肝细胞严重的形态学和组织学改变 (图 6 A), 在受影响的肝脏中可以清楚地看到细胞凋亡性肝细胞损害 (图 6g)。但是, 在用本发明化合物 (化合物 33) 治疗的小鼠肝脏中, 细胞凋亡性肝细胞损害以剂量依赖性的方式减少 (图 6B-D), 随着化合物 33 剂量的增加, 细胞组织学逐渐恢复 (图 6H-J)。这些结果表明, 本发明化合物可以保护肝细胞防止 ConA 产生的致命的引起细胞凋亡的作用。

实验 9: 蛋白质印迹

在该实验中, 通过在蛋白质印迹中分析从用 ConA 和各种剂量的式 (I) 化合物处理的小鼠获得的肝细胞溶解物中的 85kDa 裂解产物来确定 PARP 的裂解。

将新收集的用 ConA 或 PBS 以及各种剂量的化合物 33 处理的肝脏在冷的 PBS 中漂洗然后在每份重量 3 体积的含有 1% Nonidet P-40、0.1% SDS、1mM PMSF 和蛋白酶抑制剂合剂片 Complete™ (Boehringer Mannheim, 按照生产商的说明使用) 的冷的 PBS 中形成匀浆。将组织匀浆在冰上保温 30 分钟。然后将样品以 16,000 x g 在 4℃ 下离心 30 分钟。将上清液转移至新的试管中并继续离心 30 分钟。将收集的溶胞产物通过与蛋白 G-琼脂糖 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 一起在 4℃ 下保温并温和地振摇过夜进行预纯化 (precleared)。以 1000 x g 在 4℃ 下离心 30 秒收集上清液, 然后在 7% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离并转移至硝基纤维素膜上。在含有 5% 脱脂牛奶和 0.1% Tween 20 的 PBS 中在室温下温和地振摇 1 小时将印迹封闭。然后将膜和 1: 1000 稀释的单克隆抗-PARP 抗体 (Pharmingen) 一起在温和的振摇下保温过夜。用 PBS-Tween 洗涤 3 次后, 将印迹与山羊抗-小鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (1: 1000 稀释) 混合。用 PBS-Tween 洗涤 3 次后, 将信号用 ECL 蛋白质印迹试剂盒 (Amersham-Pharmacia Biotech, San Francisco, CA) 展开并通过放射自显影法进行显影。

根据组织学检查, 本发明的化合物可以抑制由 Con A-诱导的肝细

胞的细胞凋亡性死亡所引起的 PARP 裂解(图 7)。化合物阻断细胞凋亡的作用呈现剂量依赖性。

实验 10: 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂防止细胞凋亡的作用

为了测定本发明化合物防止细胞凋亡的效力,进行了如下实验。

使 WI38 细胞(人胚胎肺成纤维细胞)在含有 DMEM-10% FBS 的培养基中在 10cm 直径的培养皿中生长直至达到融合。将细胞在第 1 天接种在 24 孔板中然后保温过夜,使培养基的体积保持在 400 μ l。在第 2 天将细胞用 200 单位/ml 的 IFN γ 处理然后保温 12 小时以上。在第 3 天,将 10mM 的化合物储备液在 DMSO 中稀释然后将 100 μ l 试验化合物加入细胞中,分别达到 50、10、2 和 0.4 μ M 的最终浓度。将细胞保温 2 小时使化合物进入细胞内,然后用 40ng/孔的抗-Fas 抗体处理(在用抗体处理 2 小时后引起细胞凋亡,持续保温过夜)。对照不用 Fas 抗体处理。在第 4 天,将细胞用显微镜观察后,向各孔中加入 300 μ l 培养基然后向培养基中加入 150 μ l XTT 工作液并继续培养 2 小时。冷却后,将 100-200 μ l 上清液转移至 96 孔板中并用 ELISA 平板读数器读出在 490nm 的吸光度。对于空白,将 XTT 溶液加入到仅含培养基的孔中。通过与对照组比较进行绘图(未用 Fas 抗体处理时为 100%)。结果如下表 2 中所示。

[表 2]

Conc.(μ M)	IFN	IFN+Fas Ab	Ac-DEVD-CHO	z-DEVD-cmk	Comp 22	Comp 28	Comp 33
0	100	15.37					
0.4			12.16	15.13	14.44	14.67	15.51
2			14.75	16.27	18.32	17.33	64.44
10			19.16	27.38	35.37	82.40	92.68
50			35.14	47.32	78.29	90.39	100.21

从上表 2 可以看出, 当同时用 IFN γ 和抗-Fas 抗体进行处理时, 仅有 15%的细胞存活, 而用现有的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Ac-DEVD-CHO (可逆的抑制剂)或 z-DEVD-cmk (不可逆的抑制剂)处理 (50 μ M)分别产生了 35.1%和 47.3%的活力比。但是, 当用本发明的化合物 22、化合物 28 和化合物 33 以相同的浓度处理时, 活力比分别增加至了 78%、90%、100%。因此可以看出, 本发明的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂比现有的药物阻止细胞凋亡的能力更强(参见图 8)。

实验 11: 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂对抗-Fas 抗体诱导的肝细胞凋亡的影响

步骤 A: 动物处理

在静脉内注射 10 μ g 抗-Fas 抗体 (Jo2) 前 1 小时, 用溶于由橄榄油和 10% DMSO 组成的载体中的化合物 33MP 或载体本身对 3-4 周大的 C57BL/6 雌性小鼠 (18-20g) 进行腹膜内注射。静脉内注射 Jo2 抗体 4 小时后, 通过吸入异氟烷将动物麻醉以进行采血和肝脏分离。还对动物腹膜内注射 0.2 μ g/20g TNF α 和 12mg/20g D-半乳糖胺 (TNF α /GalN) 和化合物 33MP 或其盐 (化合物 33MP-Na)。8 小时后, 从麻醉的动物取血并分离出肝脏。将肝脏组织进行速冻并于 -80 $^{\circ}$ C 下保存直至使用。以 12,000 x g 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 分钟从血液中分离出血浆并于 -80 $^{\circ}$ C 下保存。在动物死亡率的某些实验中, 对小鼠腹膜内注射 TNF α /GalN 并在注射 TNF α /GalN 前 1 小时、同时、2 小时或 4 小时后注射半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂。

步骤 B: DNA 断裂

将整个组织 (0.5g) 在冰冷的溶解缓冲液 (5mM Tris, 20mM EDTA, 0.5% Triton-X 100, pH8.0) 中形成匀浆。将溶胞产物以 12,000 x g 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 20 分钟。将得到的上清液用苯酚和氯仿的混合物萃取两次。将十分之一体积的 3M 乙酸钠加入到溶液中, 然后通过加入等体积的异丙醇使 DNA 沉淀。于 -20 $^{\circ}$ C 下存放过夜后, 以 12,000 x g 在 4 $^{\circ}$ C

下离心 15 分钟得到 DNA 的沉积物并用 75%乙醇洗涤两次。将沉积物干燥然后重新悬浮在 100 μ l 20mM Tris-HCl, pH 8.0 中。用不含 DNA 酶的 RNA 酶(0.1mg/ml)于 37 $^{\circ}$ C 下将 RNA 消化 1 小时后,将样品(15mL)在 450mM Tris 硼酸盐+EDTA (TBE), pH 8.0 缓冲液中电泳通过 1.2% 琼脂糖凝胶。在用 UV 光显影下对 DNA 进行照相。

步骤 c: 酶分析

将肝脏组织在含有蛋白酶抑制剂(5 μ g/ml 抑肽酶、5 μ g/ml 胃酶抑制剂 A、10 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽和 0.5mM PMSF)的 10mM HEPES 缓冲液匀浆并通过冷冻/解冻循环 3 次使细胞溶解。通过以 12,000 x g 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 20 分钟得到细胞溶解级份。用 BCA 蛋白分析试剂(pierce, Rockford, IL)测定蛋白质的浓度。将含有 200 μ g 蛋白质的细胞溶胶在 96 孔板中与 200mM 合成底物 Ac-DEVD-pNA 在含有蛋白酶抑制剂的 150 μ l 100mM HEPES, pH 7.4 中混合,然后在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。通过测定在 405nm 下吸光度的增加来分析细胞溶胶中半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 的活性。通过分光光度法用各种酶分析试剂盒(Sigma)分析天冬氨酸氨基转移酶的血浆水平。

步骤 D: 肝细胞培养和处理

用胶原酶消化的方法从 Sprague-Dawley 大鼠分离和纯化初生大鼠肝细胞。将肝细胞在 30% Percoll 梯度上通过以 1,000 x g 在 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟进行纯化。将高度纯化的肝细胞(纯度>98%并且活力>98%,通过台盼蓝排除实验证实)悬浮在含有 10%胎牛血清、1 μ M 胰岛素、2mM L-谷酰胺、15mM HEPES (pH 7.4)、100 单位/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 Williams 培养液 E 中。将细胞以 2 x 10⁵ 细胞/孔的密度置于涂覆有胶原蛋白 12 孔平板中进行细胞活力测试,或以 5 x 10⁶ 细胞/100mm 培养皿的密度用于酶分析。预培养 18 小时后,将细胞用 2,000 单位/ml 的 TNF $_{\alpha}$ 和 0.2 μ g/ml 的放线菌素(ActD)处理。分别通过使用半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶底物 Ac-DEVD-pNA 的比色法和结晶紫染色方法

在 8 小时和 12 小时测定半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性和细胞活力。

从图 9 的结果可以看出, 当通过 DNA 断裂进行测定时, 在注射抗体前 1 小时用 0.4mg/20g、1mg/20g 化合物 33MP 或载体本身(橄榄油和 10% DMSO)进行注射的小鼠肝细胞凋亡在注射抗体 4 小时后在注射抗-Fas 抗体的动物中显著增加。用化合物 33MP 进行治疗以剂量依赖性的方式抑制了肝细胞凋亡。抑制作用高于公知的肽类半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Z-VAD-fmk。同样, 在用抗-Fas 抗体处理的动物中, 肝脏酶 AST 的释放也增加了。通过注射化合物 33MP 也显著抑制了酶的释放。该抑制作用高于 Z-VAD-fmk。这些结果表明, 化合物 33MP 可以保护肝脏防止抗-Fas 抗体诱导的肝细胞损害。由于半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 样蛋白酶的活化是细胞凋亡的完成期所必需的, 因此通过在 405nm 下测定胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 的底物 Ac-DEVD-pNA 的水解产物评估了注射抗-Fas 抗体后的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 的活性。在用抗体处理的肝脏组织中, 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性增加了约 25 倍(图 10)。通过用化合物 33MP 治疗消除了增加的活性。此外, 大部分用抗-Fas 抗体处理的动物(85%)在 24 小时内死亡, 而用化合物 33MP 治疗使死亡率减少了约 30%(图 11)。该抑制作用比 Z-VAD-fmk 更为有效。该结果表明, 化合物 33MP 对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性和/或活化的抑制作用足以保护小鼠防止抗-Fas 抗体诱导的细胞凋亡性死亡。

肝功能障碍和衰竭是内毒素血症和败血症中的常见问题。通常认为致炎细胞因子、特别是 TNF_α , 是肝细胞损害和死亡的主要原因。我们研究了化合物 33MP 对 TNF_α -介导的肝脏毒性的影响。用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理在肝脏组织中引起了 DNA 断裂, 通过给药化合物 33MP 显著降低了该毒性(图 12A)。通过用化合物 33MP 处理还抑制了用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理后所引起的 AST 释放(图 12B)。化合物 33MP 的保护作用高于 Z-VAD-fmk。 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ -介导的肝脏毒性伴随着半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 样活性的增加(图 13)。增加的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性受到了化合物 33MP 的抑制, 其显示的抑制作用高于 Z-VAD-fmk。这些数据

表明, 化合物 33MP 对致细胞凋亡的半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性的抑制作用与对伴有细胞凋亡性 DNA 断裂的肝细胞损害的抑制作用相关。由于暴发性肝细胞损害和破坏与动物的死亡率有关, 我们研究了本发明化合物对 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ -介导的小鼠死亡率的影响。当用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 和载体(橄榄油和 10% DMSO)进行注射时, 大部分小鼠($\sim 80\%$, 1/6 存活)在 24 小时内死亡, 而 80%用化合物 33MP 治疗的动物存活(图 14)。通过注射 Z-VAD-fmk 也观察到了类似的结果。因此, 我们的结果表明, 本发明的新型非肽类半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂可用于治疗暴发性肝细胞损害。

本发明人制备了化合物 33MP 的钠盐以增加其溶解度, 并研究了该化合物(化合物 33MP-Na)对半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶活性和用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理的初生大鼠肝细胞中细胞活力的影响。用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理 8 小时后, 在培养的肝细胞中半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶-3 样活性增加(图 15A)。通过加入 $100\mu\text{M}$ 化合物 33MP-Na 使该增加得到了抑制, 并且该抑制作用与化合物 33MP、Ac-DEVD-cho 或 Z-VAD-fmk 没有区别。用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理使培养的肝细胞活力减少了约 30%, 而所有半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制剂对 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ -诱导的肝细胞凋亡均显示类似的保护作用(图 15B)。这些结果表明, 化合物 33MP-Na 的细胞保护作用与其非盐的形式没有区别。

治疗药物在诊断了疾病症状后给药。我们研究了本发明化合物对预先诱导的肝细胞毒性的保护作用。将肝细胞首先用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理, 然后在不同的时间点加入 $100\mu\text{M}$ 化合物 33MP-Na。用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理 12 小时后, 通过结晶紫染色测定细胞活力。当在用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理后 0 至 6 小时之间加入化合物 33MP-Na 时, 细胞活力没有减少(图 16)。在用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理 6 小时后加入化合物 33MP-Na, 细胞活力以时间依赖性的方式减少。用化合物 33MP-Na 和 Z-VAD-fmk 得到的结果没有区别。将小鼠用 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 处理引起很高的死亡率(95%)。当在注射 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 前 1 小时、注射后 0 小时或 2 小时注射化合物 33MP-Na 时, 死亡率显著降低($\sim 80\%$) (图 17)。当在致死性的攻击 4 小时后给药时,

化合物 33MP-Na 仍能产生部分保护作用(50%)。此外,对于用化合物 33MP-Na 处理的未存活的动物,注射 $\text{TNF}_\alpha/\text{ActD}$ 的动物在 10-14 小时内出现的死亡明显延迟到了 24 小时(数据未示出)。

以上对抗-Fas 抗体和 TNF_α -诱导的肝细胞细胞凋亡的抑制作用的结果强烈地证实,半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶抑制药物的简单的盖伦制剂构成了一种新的富有前景的治疗涉及失控的细胞凋亡的急性肝脏疾病的方案。本发明的化合物及其盐形式均可用作治疗暴发性肝细胞损害和死亡的有希望的治疗药物。

图1

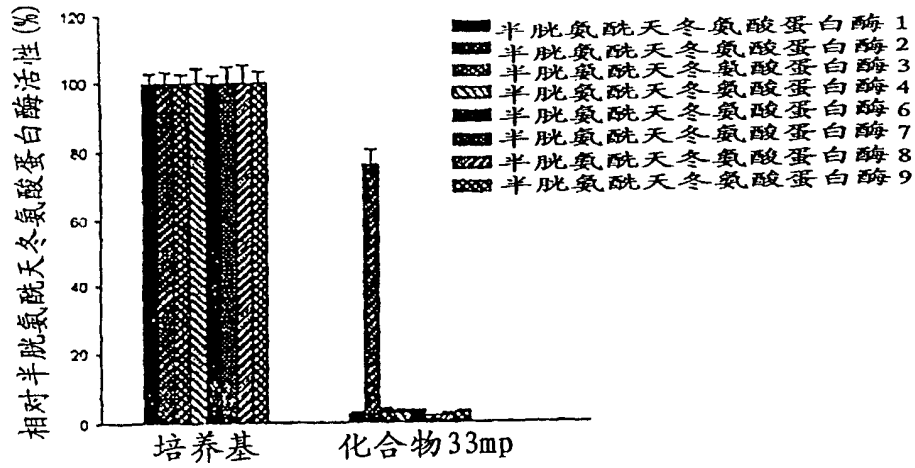


图2

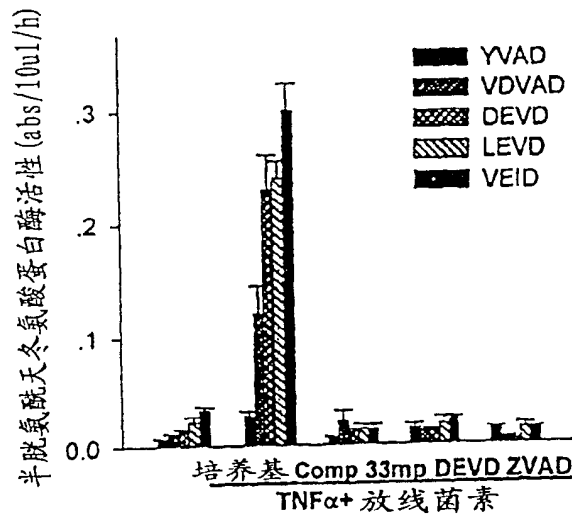


图3

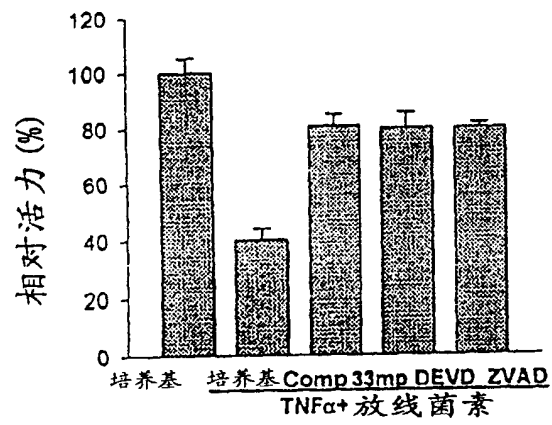


图 4

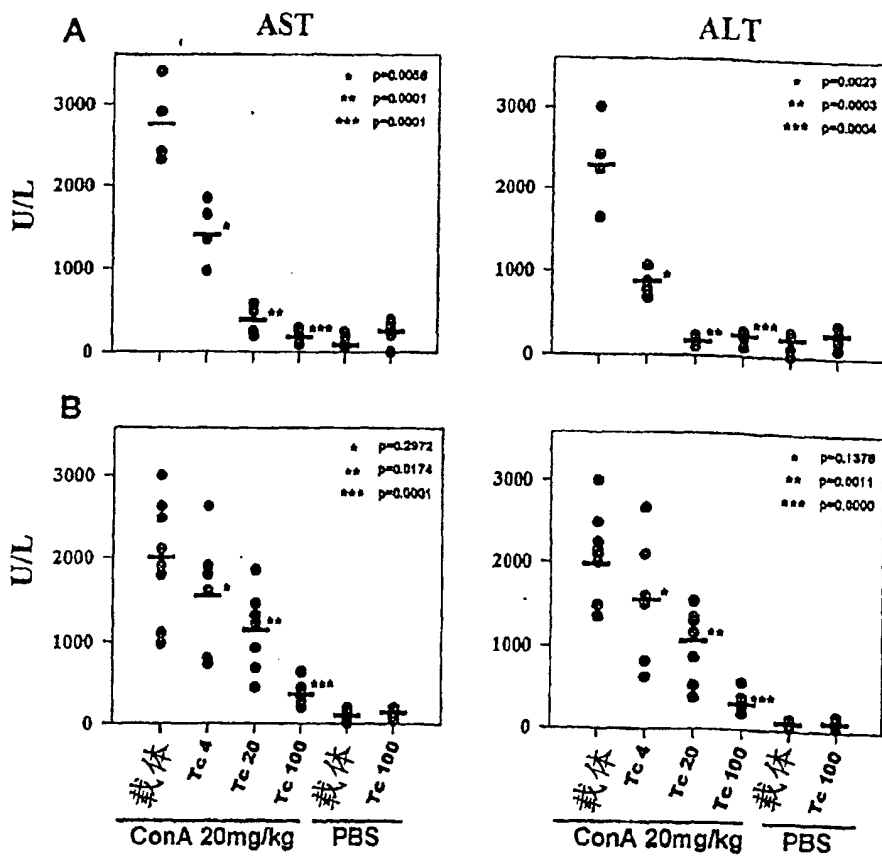


图5

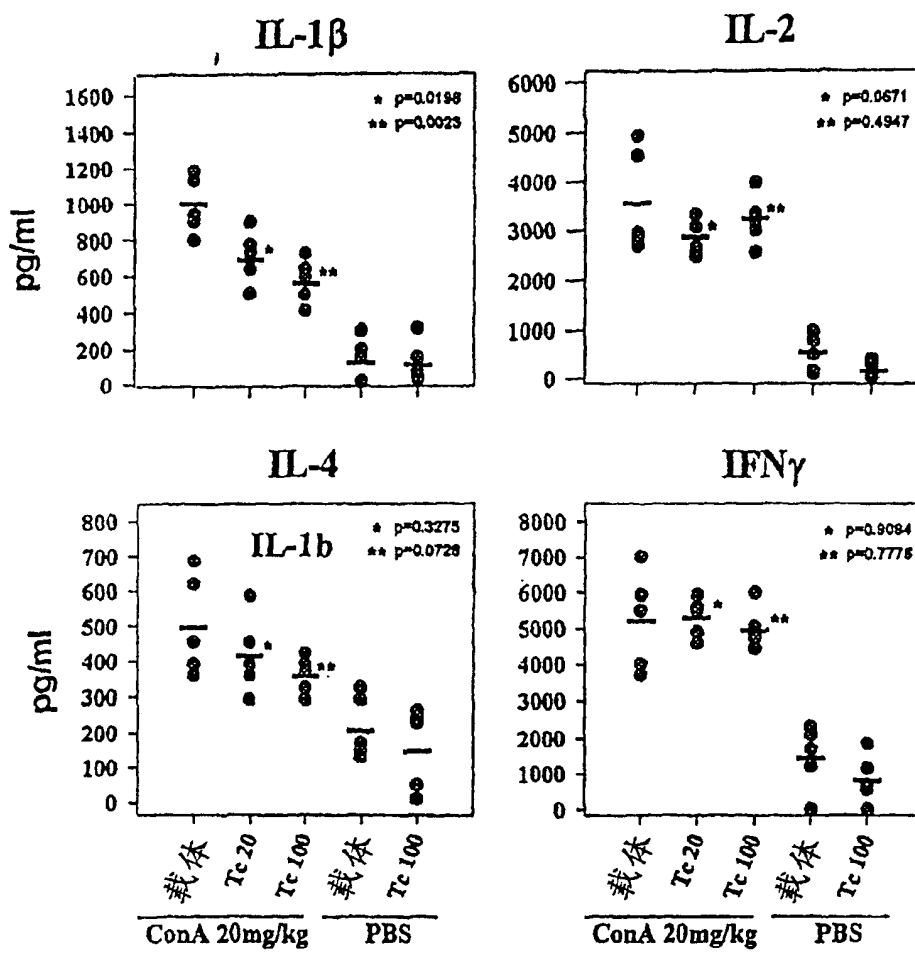


图 6a

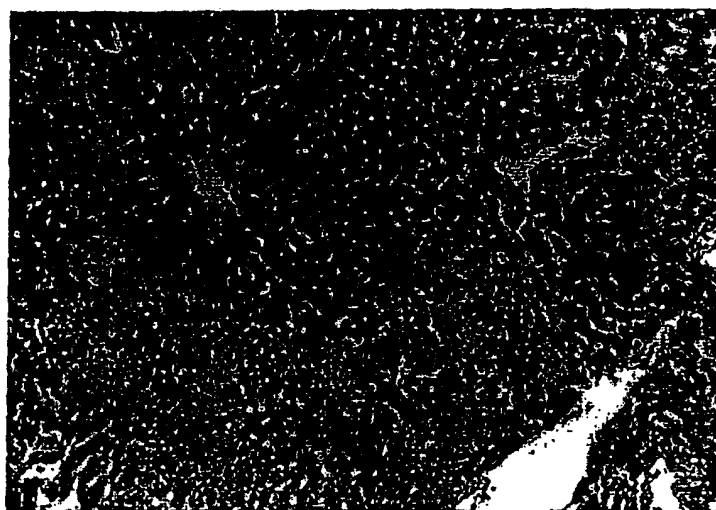


图 6b

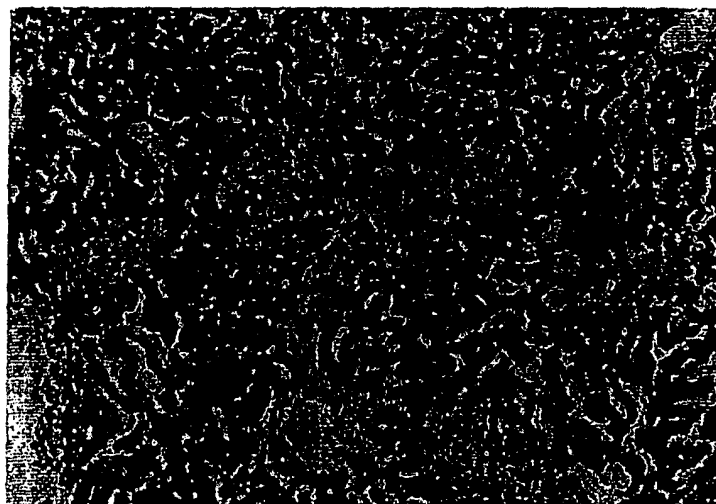


图 6c

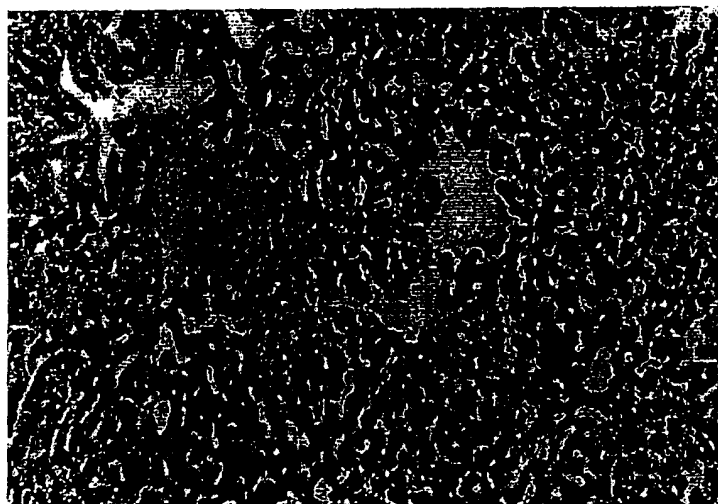


图 6d



图 6e

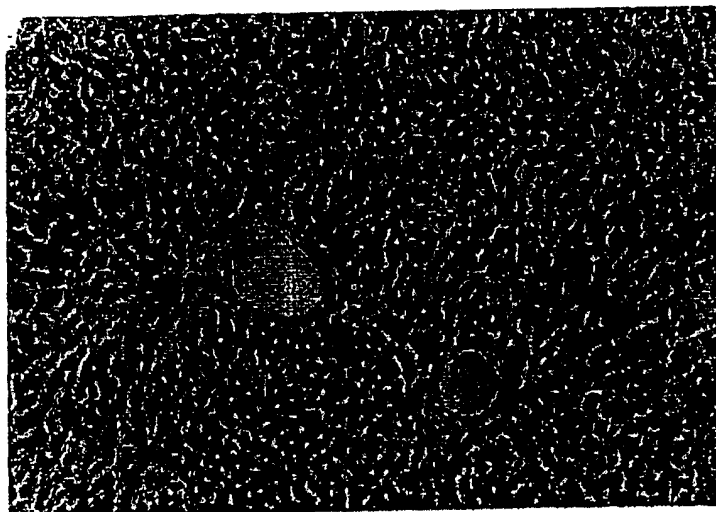


图 6f

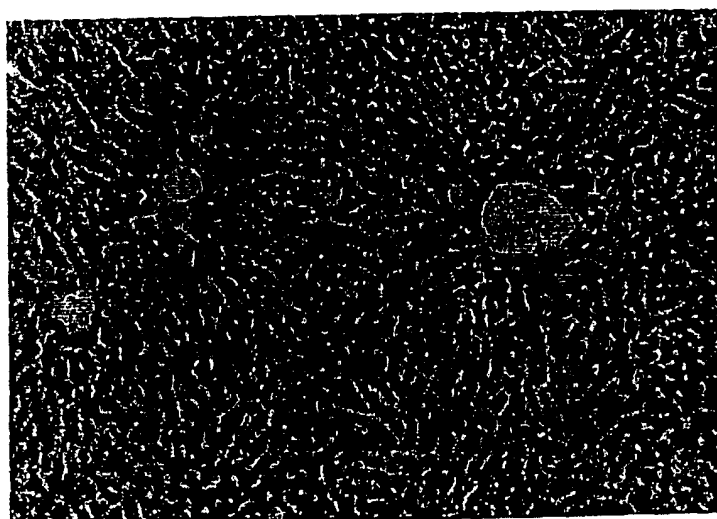


图 6g

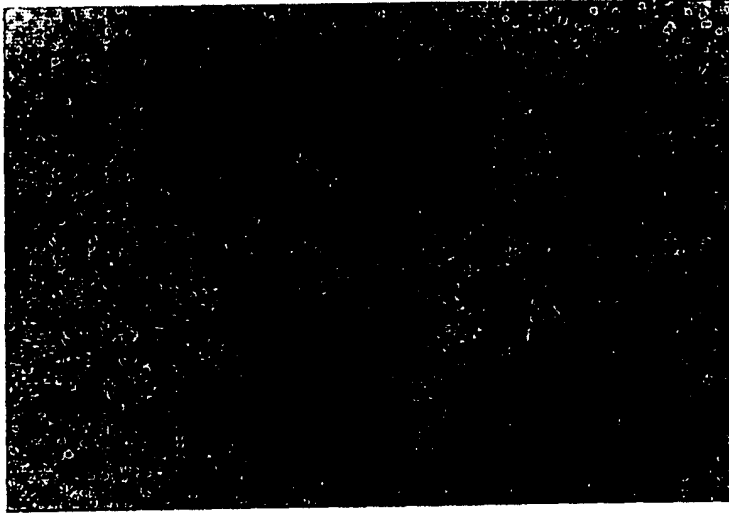


图 6h

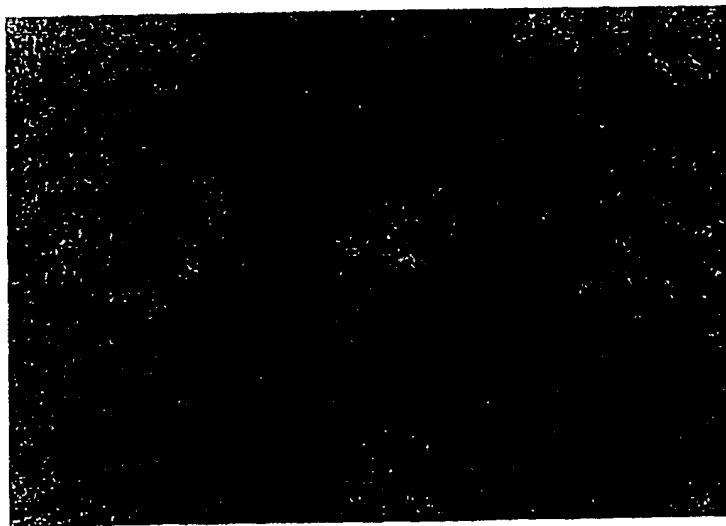


图6i

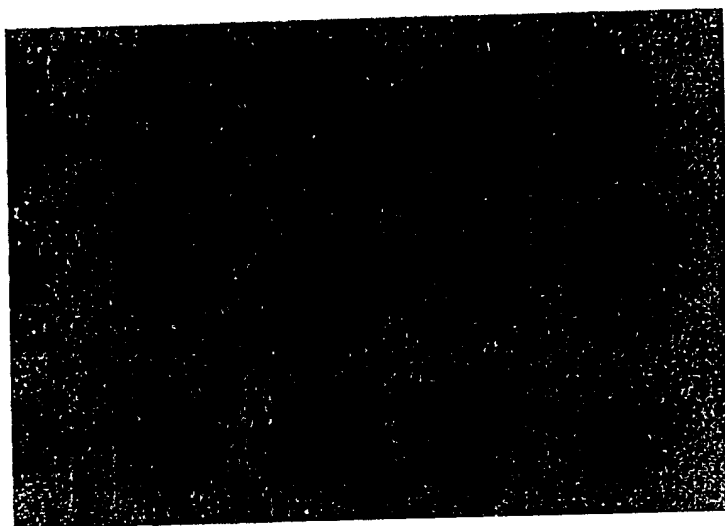


图6j

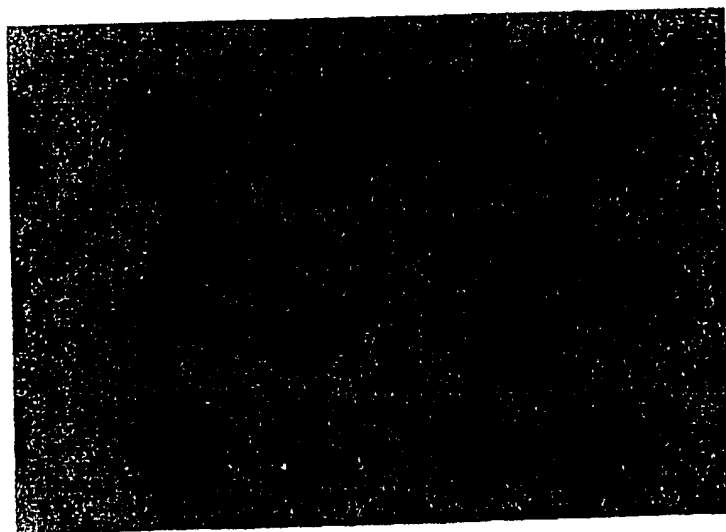


图6k

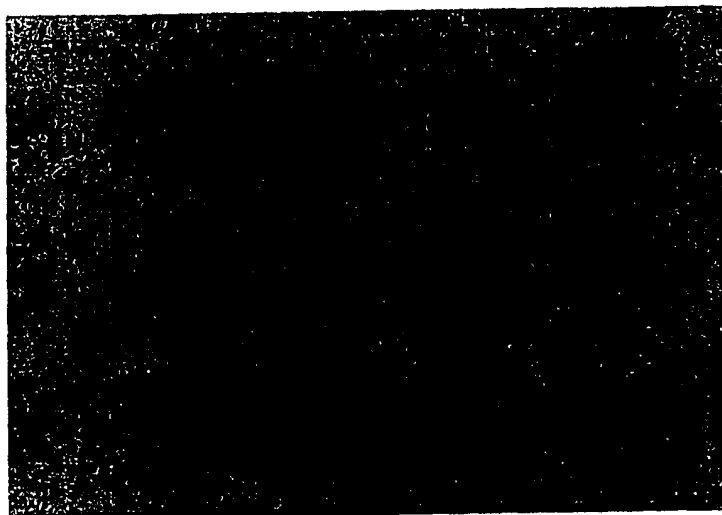


图6l

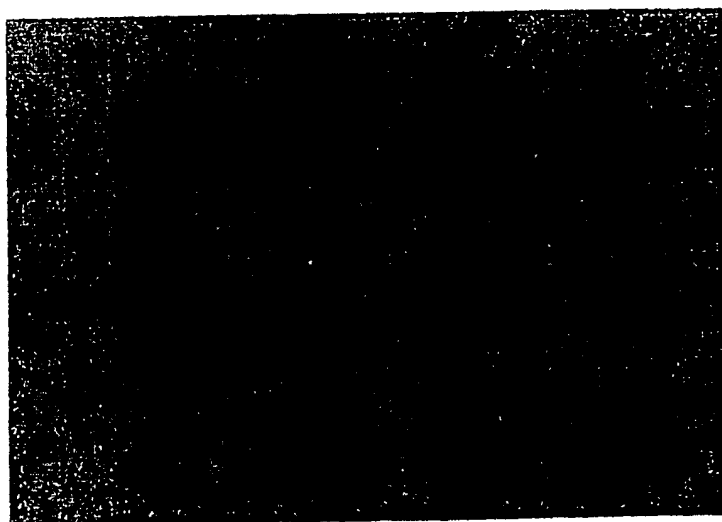


图7

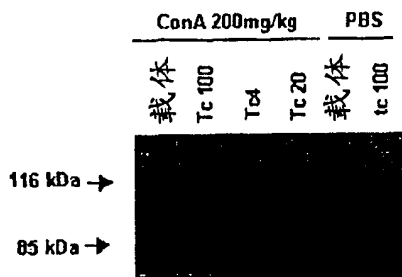
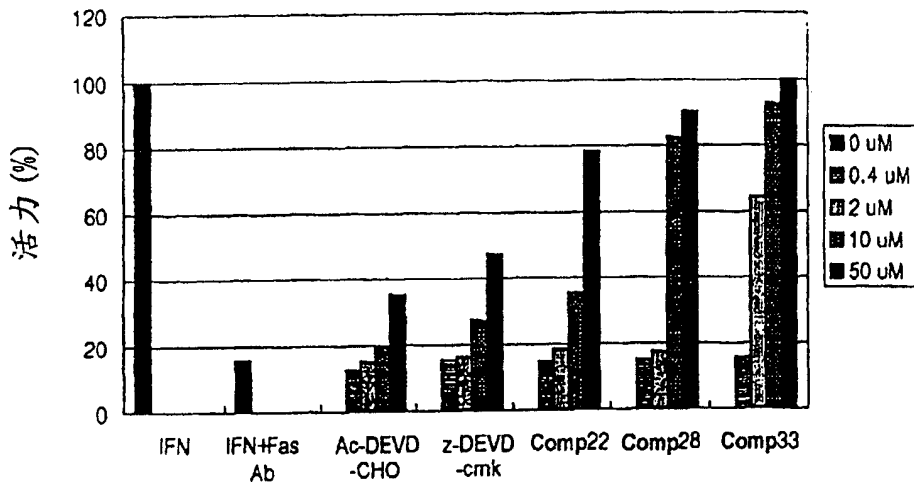


图8



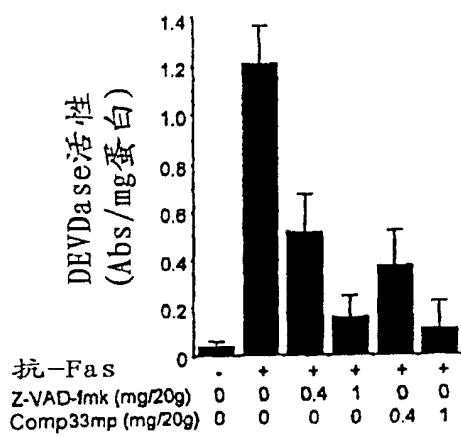
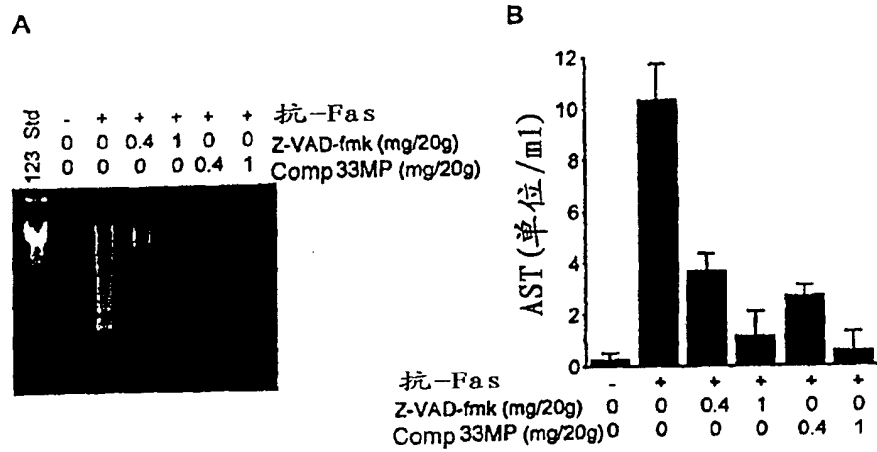


图 11

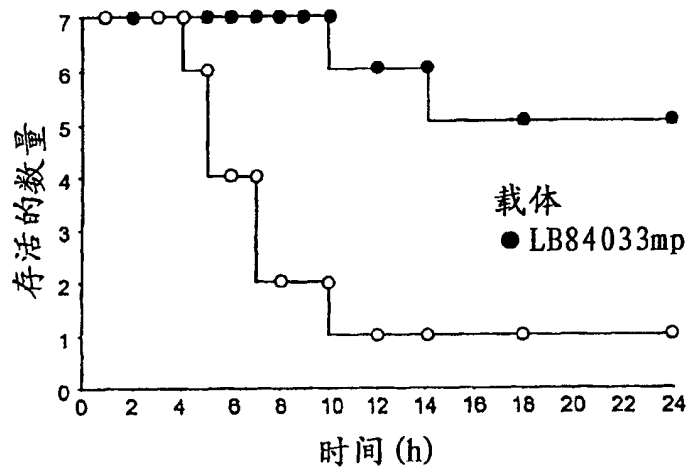
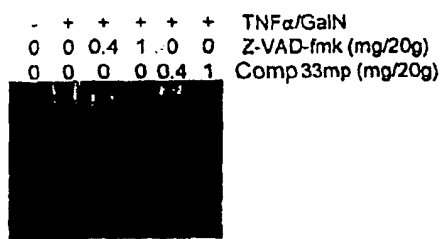


图 12

A



B

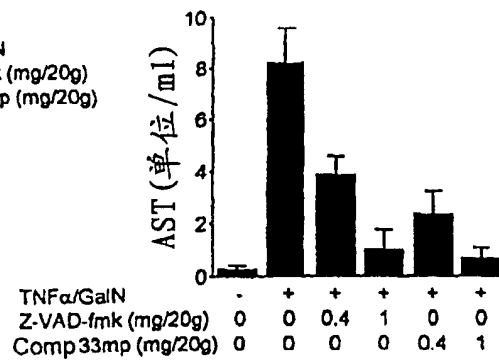


图13

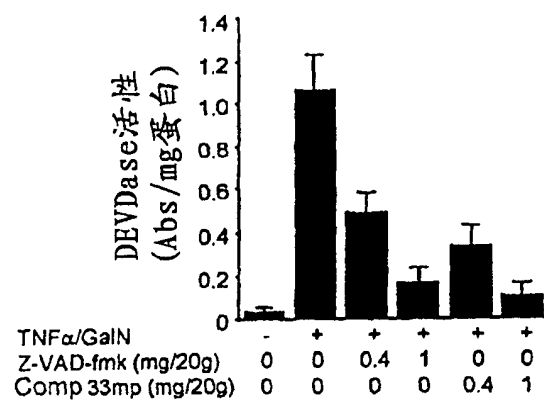


图14

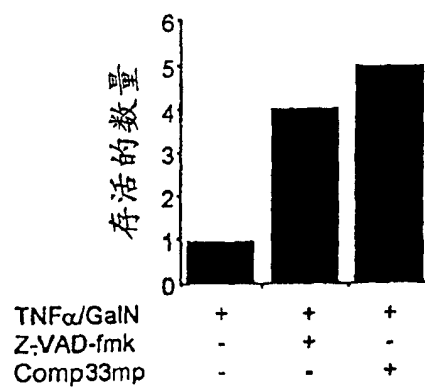


图15

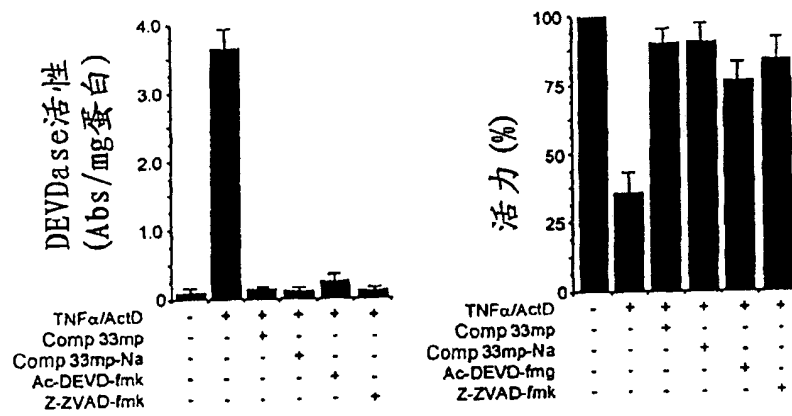


图16

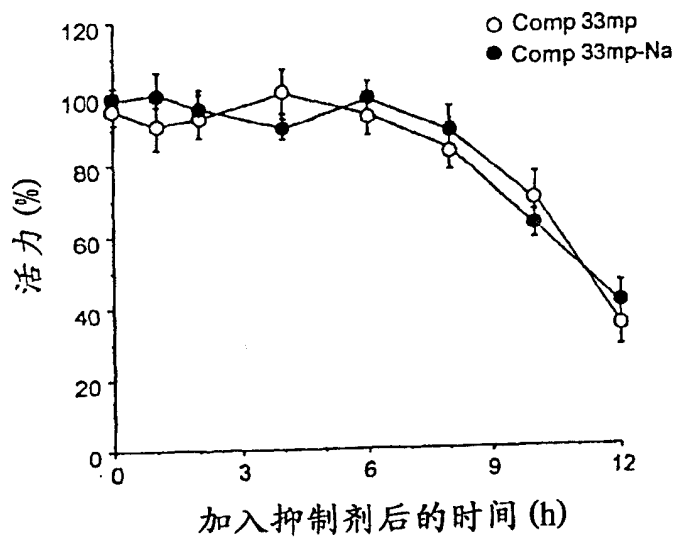


图17

