



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101928329 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 17

(21) 申请号 200910147292. 0

(22) 申请日 2009. 06. 19

(73) 专利权人 北京大学

地址 100191 北京市海淀区学院路 38 号

(72) 发明人 李润涛 崔景荣 朱永强 姚书扬

葛泽梅 程铁明

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

代理人 薛俊英 王维玉

(56) 对比文件

US 5693617 A, 1997. 12. 02, 全文.

US 5780454 A, 1998. 07. 14, 全文.

WO 02059131 A1, 2002. 08. 01, 全文.

CN 100447151 C, 2008. 12. 31, 全文.

审查员 李谦

(51) Int. Cl.

C07K 5/097(2006. 01)

A61K 38/06(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/02(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

A61P 25/16(2006. 01)

A61P 25/14(2006. 01)

A61P 21/00(2006. 01)

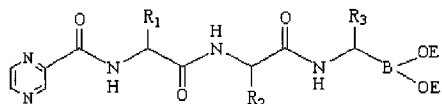
权利要求书3页 说明书27页

(54) 发明名称

三肽硼酸(酯)类化合物、其制备方法和应用

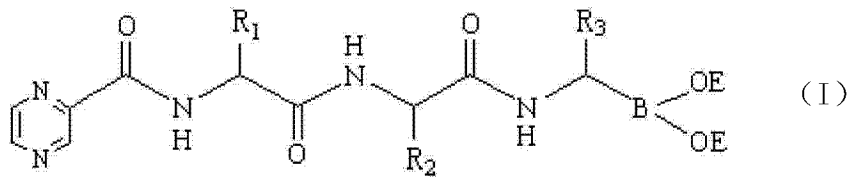
(57) 摘要

本发明涉及药品生产领域,具体的,本发明公开了具有通式(I)结构的一系列三肽硼酸(酯)类蛋白酶体抑制剂、其制备方法和应用,通过合成和初步生物活性评价,发现本发明化合物具有很好的蛋白酶体抑制活性,可作为蛋白酶体抑制剂,用于各种基因疾病如恶性肿瘤、多种神经系统变性疾病、肌肉恶病质或糖尿病等疾病的治疗。



CN 101928329 B

1. 一种具有下述通式(I)结构的三肽硼酸类化合物：



其中, E 为 H 或 2, 3- 蒎烷二醇酯基；

所述的 R_1 和 R_2 各自独立的为苯甲基、对羟基苯甲基、异丁基或 2- 萘基甲基, 并且 R_1 和 R_2 不同时为异丁基；

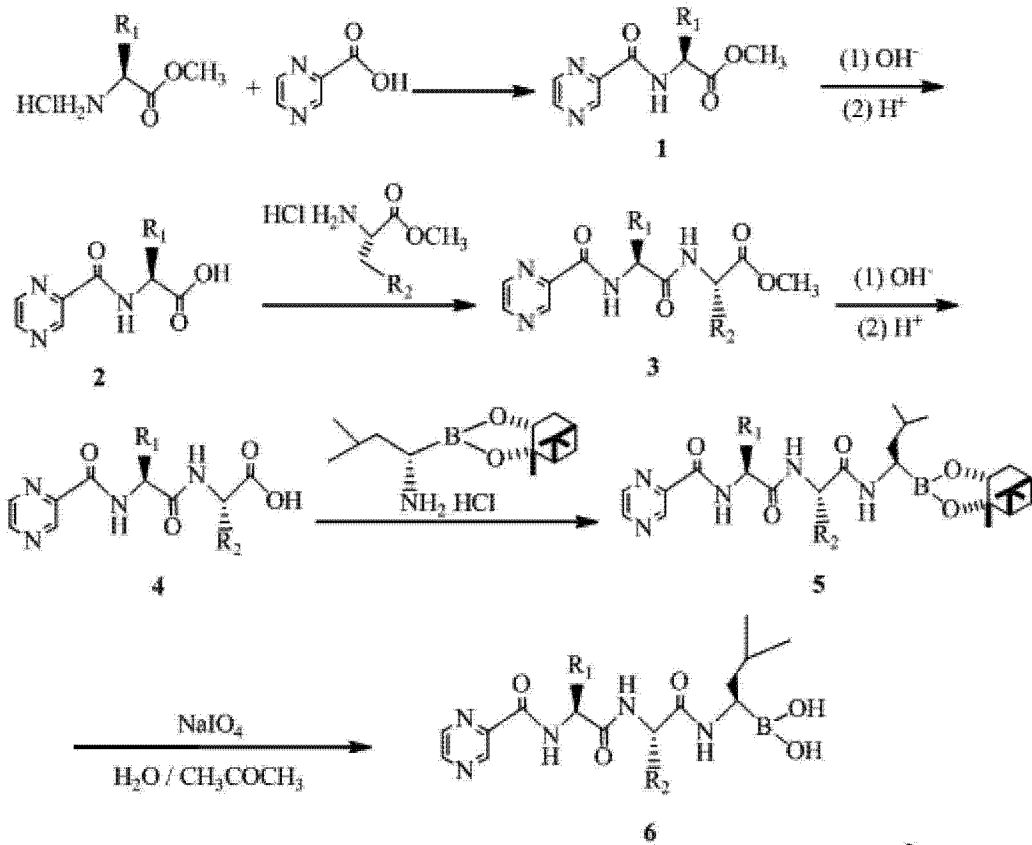
所述的 R_3 基团是异丁基。

2. 根据权利要求 1 所述化合物, 其中所述的化合物是：

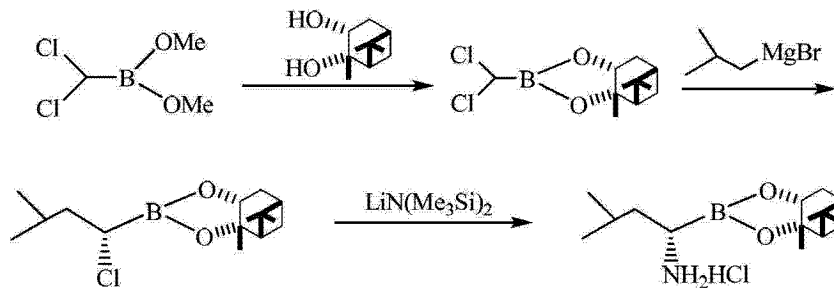
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酰 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 萘丙氨酰 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酰 -L- 酪氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 酪氨酰 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 亮氨酰 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 亮氨酰 -L- 萘丙氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酰 -L- 萘丙氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 萘丙氨酰 -L- 萘丙氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 萘丙氨酰 -L- 亮氨酰 -L- 亮氨硼酸蒎烷二醇酯；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酰 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨硼酸；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 萘丙氨酰 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨硼酸；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酰 -L- 酪氨酰 -L- 亮氨硼酸；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 酪氨酰 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨硼酸；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 亮氨酰 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨硼酸；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 亮氨酰 -L- 萘丙氨酰 -L- 亮氨硼酸；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酰 -L- 萘丙氨酰 -L- 亮氨硼酸；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 萘丙氨酰 -L- 萘丙氨酰 -L- 亮氨硼酸；
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酰 -L- 亮氨酰 -L- 亮氨硼酸；和
- N- 吡嗪甲酰基 -L- 萘丙氨酰 -L- 亮氨酰 -L- 亮氨硼酸。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述化合物的制备方法, 该方法包括以吡嗪甲酸为起始原料, 依次引入二种所需的氨基酸, 然后引入所需第三个氨基酸的硼酸酯, 可得到上述通式(I)的硼酸酯类化合物；如果需要制备相应的硼酸化合物, 可将上述硼酸酯化合物水解。

4. 根据权利要求 3 所述化合物的制备方法, 当其中所述的 R_3 基团是异丁基时, 所述的通式化合物按下述合成路线制备：



5. 根据权利要求4所述化合物的制备方法,其中所用的原料L-亮氨酸硼酸酯按下述合成路线制备:



6. 药物组合物,其中含有权利要求1或2所述的三肽硼酸类化合物作为活性成分,和任选的含有一种或多种药用载体。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中活性成分的含量是0.5% -99%,药用载体的含量是1% -99.5%。

8. 根据权利要求6或7所述的药物组合物,其中所述的组合物被制成口服或肠胃外给药的形式,所述肠胃外给药的形式包括注射给药、局部给药、吸入给药、直肠给药或植入给药的形式。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中口服给药的剂型是片剂、胶囊、颗粒剂或适于口服的液体制剂形式,或所述的口服制剂是缓释或定量释放的形式。

10. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述注射给药的药物组合物是注射剂、冻干粉针制剂或适于输液的剂型。

11. 权利要求1或2所述的化合物或权利要求6-10任意一项所述的药物组合物在制备

蛋白酶体抑制剂中的应用。

12. 根据权利要求 11 所述的应用,其中所述的蛋白酶体抑制剂是恶性肿瘤的治疗剂。

13. 根据权利要求 12 所述的应用,其中所述的恶性肿瘤是白血病、胃癌、肝癌或鼻咽癌。

三肽硼酸（酯）类化合物、其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药品生产领域，具体的，本发明涉及一类新的三肽硼酸（酯）类化合物、其制备方法和应用，所述的三肽硼酸（酯）类化合物具有很好的蛋白酶体抑制活性，可用于各种基因疾病，如恶性肿瘤、多种神经系统变性疾病、肌肉恶病质、糖尿病等疾病的治疗。

背景技术

[0002] 2004年10月6日，瑞典皇家科学院宣布，将本年度的诺贝尔化学奖授予以色列科学家 Aaron Ciechanover, Avram Hershko 和美国科学家 Irwin Rose，因为他们共同发现了泛素 (ubiquitin) - 蛋白酶体 (proteasome) (以下简称 UPP) 调节的蛋白降解过程。这说明泛素 - 蛋白酶体降解蛋白质这一途径在生命领域具有非凡的意义。

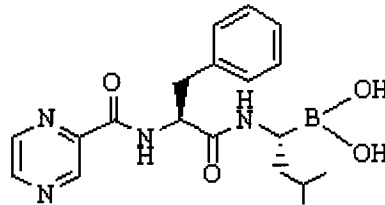
[0003] 泛素 (简称 Ub) 是一个由 76 个氨基酸组成的高度保守的多肽链，分子量约为 8.5kD。很多分子、生物化学、细胞、遗传和临床研究表明，泛素 - 蛋白酶体降解蛋白质这一过程对很多生理过程的调控以及人类许多重要疾病的发展过程都起到非常重要的作用。近期发现，这一过程还对神经退行性疾病、肌萎缩侧索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease, HD)、皮质 - 纹状体 - 脊髓变性病 (Creutzfeldt-Jacob disease, CJD) 以及糖尿病的发病都有很大的影响。

[0004] 已经知道，蛋白酶体能调控参与细胞周期控制的蛋白质的水平，如作用于 G1 期和有丝分裂期的周期素、cdk 抑制剂、肿瘤抑制因子蛋白及其它调控蛋白。目前已证实 UPP 依赖的蛋白降解途径在控制细胞繁殖和细胞死亡方面起着重要的作用，而且这一途径还对神经系统退行性疾病如 PD、AD 等有重大的影响。使用新的抑制剂将会揭示泛素蛋白酶体更多新的未知功能。

[0005] 目前已发现的蛋白酶体抑制剂可分为肽类和非肽类两类。肽类抑制剂通常是由短肽及其 C 末端连接的各种药效团构成。其中，药效团与蛋白酶体上起催化作用的氨基酸残基 (主要是 N 端苏氨酸上的羟基) 反应生成可逆或不可逆的共价复合物，而肽链的其它部分则选择性地与亚基活性部位的其余残基结合。目前，主要的药效团有醛基 (肽醛类)、乙烯基砜、硼酸 (肽硼酸类) 以及 α' , β' - 环氧化酮等。

[0006] 与肽醛类抑制剂相比，肽硼酸类抑制剂更具有成药性，因为这类化合物的药效团硼酸基或硼酸酯基的稳定性和选择性比醛基好，而且硼类物质的毒性非常低，它们可以最终降解为环境友好的硼酸。例如，PS341，英文名 Bortezomib 或 VELCADE，中文名硼替佐米，又称为万珂，其结构为：

[0007]



[0008] 是一种二肽硼酸类抑制剂,由美国千年制药公司 (MillenniumPharmaceuticals) 开发的新型抗肿瘤药物,已在美国、欧盟和我国上市,主要用于治疗至少接受过二种以上疗法的多发性骨髓瘤 (multiplemyeloma, MM)。该药是目前全球唯一批准用于临床治疗的蛋白酶体抑制剂,它能克服传统抗癌药物的耐受性,为多发性骨髓瘤的治疗带来希望。

[0009] USP5, 780, 454 公开了新的硼酸酯类化合物 $P-AA^1-AA^2-AA^3-B(Z^1)(Z^2)$, 其中包括三肽硼酸酯类化合物,但仅公开了少量三肽类化合物,而且所述三肽的结构只有两类: L-Leu-L-Leu-L-Leu 或 L-Leu-L-Nal-L-Leu; 该专利提供的数据表明,其中二肽类化合物的活性优于三肽类化合物。

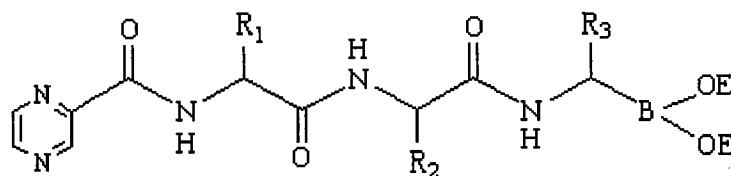
[0010] 另据美国专利 (5, 693, 617) 报道,三肽醛类化合物是一类活性很好的蛋白酶体抑制剂。但是这类抑制剂由于其药效团为醛基,使得它们的选择性和稳定性都非常差。

[0011] 在此基础上,本发明人通过研究发现一类新的三肽的硼酸(酯)类化合物具有更好的蛋白酶体抑制活性。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供一种新的、具有下述通式 (I) 结构的三肽硼酸(酯)类化合物:

[0013]



(I)

[0014] 其中, R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立的为 L-氨基酸侧链, E 为 H 或 2,3- 丙烷二醇酯基。其中所述的氨基酸为 α -氨基酸,优选所述的氨基酸是天然氨基酸。

[0015] 优选的, R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立的为 C_{1-6} 的直链或支链烷基、芳基甲基或芳杂环基甲基,其中在芳基甲基或芳杂环基甲基的芳环上可任意的被选自 C_{1-4} 的直链或支链烷基、羟基、氨基或卤素的基团所取代。

[0016] 在本发明化合物定义中,所用的术语“ C_{1-6} 的直链或支链烷基”是指含有 1-6 个碳原子的、直链或支链的饱和烃基;优选具有 3-4 个碳原子的直链或支链烷基,例如丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基等,更优选异丙基、异丁基或叔丁基;最优选异丁基。类似地,所用的术语“ C_{1-4} 的直链或支链烷基”是指含有 1-4 个碳原子直链或支链的饱和烃基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、异丁基或叔丁基等,优选甲基。

[0017] 所用的术语“芳基”是指具有 6-10 个碳原子的芳香族基团,优选苯基或萘基。

[0018] 所用的术语“芳杂环基”是指含有选自 N、O、S 的杂原子的五员或六员环,且所述的五员或六员环还可与苯环稠合;例如吡咯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、苯并噻吩基、

喹啉基或异喹啉基等,更优选的芳杂环基为吡啶基。

[0019] 上述定义中,在芳基甲基或芳杂环基甲基的芳环上可任选的被选自 C_{1-4} 的直链或支链烷基、羟基、氨基或卤素的基团所取代,其中所使用的术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘原子,优选为氟、氯或碘原子;所述芳环上的取代基优选是甲基、羟基、氟或氯原子。

[0020] 优选的,其中所述的 R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立的为苯甲基、对羟基苯甲基、 β -吡啶基甲基、异丁基或 2-萘基甲基等 L-氨基酸侧链,更优选所述的 R_3 基团是异丁基。

[0021] 根据上述定义,本发明化合物结构中的三肽结构部分的三个氨基酸优选的是下述 L-氨基酸的任意组合:亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和 2-萘基丙氨酸;更优选的,其中所述的 R_3 基团是异丁基,即最靠近硼酸(酯)一端的氨基酸是亮氨酸。

[0022] 优选的,本发明提供了下述化合物:

[0023] 1、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5a),

[0024] 2、N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5b),

[0025] 3、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-酪氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5c),

[0026] 4、N-吡嗪甲酰基-L-酪氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5d),

[0027] 5、N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5e),

[0028] 6、N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酰-L-萘丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5f),

[0029] 7、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-萘丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5g),

[0030] 8、N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-萘丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5h),

[0031] 9、N-吡嗪甲酰基-L-色氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5i),

[0032] 10、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-色氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5j),

[0033] 11、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5k),

[0034] 12、N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酰-L-亮丙氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5l),

[0035] 13、N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-亮氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5m),

[0036] 14、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6a),

[0037] 15、N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6b),

[0038] 16、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-酪氨酰-L-亮氨酸硼酸(6c),

[0039] 17、N-吡嗪甲酰基-L-酪氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6d),

[0040] 18、N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6e),

[0041] 19、N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酰-L-萘丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6f),

[0042] 20、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-萘丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6g),

[0043] 21、N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-萘丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6h),

[0044] 22、N-吡嗪甲酰基-L-色氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6i),

[0045] 23、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-色氨酰-L-亮氨酸硼酸(6j),

[0046] 24、N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酰-L-亮氨酸硼酸(6k),

[0047] 25、N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酰-L-亮丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6l),和

[0048] 26、N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-亮氨酰-L-亮氨酸硼酸(6m)。

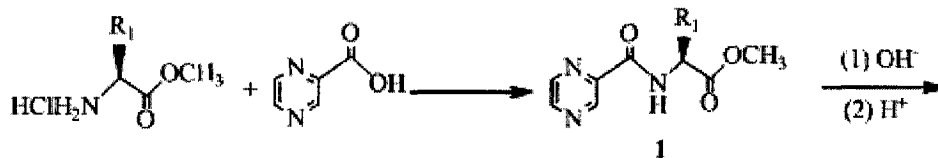
[0049] 其中括号中的编号为该化合物在本发明的描述中所使用的编号。

[0050] 本发明的另一目的是提供了一种上述通式化合物的制备方法,该方法包括以吡嗪甲酸为起始原料,依次引入二种所需的氨基酸,然后引入所需第三个氨基酸的硼酸酯,可得

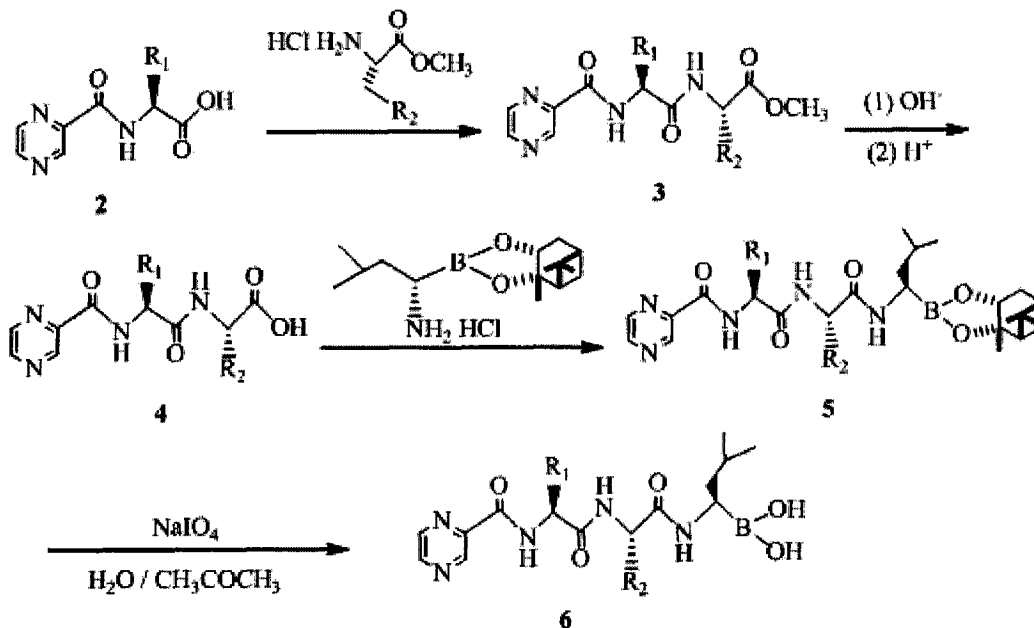
到本发明上述通式的硼酸酯类化合物；如果需要制备相应的硼酸化合物，可将上述硼酸酯类化合物水解。

[0051] 其中所述的 R_3 基团是异丁基，即最靠近硼酸（酯）一端的氨基酸是亮氨酸的通式化合物可以吡嗪甲酸为起始原料，按照下述合成路线制备：

[0052]



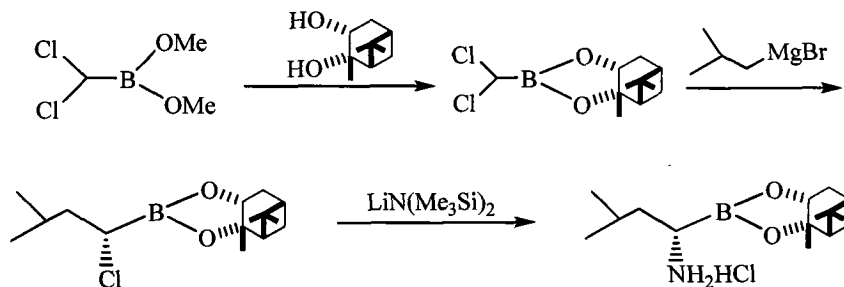
[0053]



[0054] 在上述方法中主要包括逐个引入氨基酸的步骤，而每一引入氨基酸的步骤包括首先与所述氨基酸的甲酯反应，然后再水解得到相应的氨基酸化合物，上述引入氨基酸的过程可按照肽合成反应中常规的方法进行。

[0055] 其中所用的原料亮氨酸硼酸酯（在本文中简称为 LeuBdiol- NH_2 ）可按照文献中公开的方法 (Hall, D. G., Structure, properties, and preparation of boronic acid derivatives, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim. 2005, p8) 制备；也可按照下述合成路线制备：

[0056]



[0057] 其中所使用的原料顺式手性蒎烷二醇 ((1S,2S,3R,5S)-2,6,6-三甲基二环[3.1.1]庚烷-2,3-二醇)是一种立体位阻较大的、非常有效的手性试剂。该试剂可在市场上买到，也可以用现有技术已知的方法合成。

[0058] 本发明的另一目的是提供了一种药物组合物,该药物组合物是一种蛋白酶体抑制剂,可用于治疗由蛋白酶体介导的疾病,例如可用于治疗恶性肿瘤、多种神经系统变性疾病、肌肉恶病质或糖尿病等。该组合物以本发明的通式(I)的三肽硼酸(酯)类化合物为活性成分,其中还可以任意地含有药用载体。

[0059] 具体的,该组合物含有治疗有效量的本发明通式(I)化合物,以及一种或多种药学上可接受的载体。优选的,本发明组合物中活性成分的含量是0.5% -99%,药用载体的含量是1% -99.5%。

[0060] 本发明的组合物可以制成各种常规的药用剂型,例如制成口服、肠胃外给药的形式,所述肠胃外给药的形式例如是各种注射给药、局部给药、吸入给药、直肠给药或植入给药的形式。优选注射给药形式,例如注射剂、冻干粉针制剂或输液剂型;或口服给药形式,例如是片剂、胶囊、颗粒剂或其它适于口服的液体制剂形式如溶液、乳液、悬浮剂等。优选的口服制剂是片剂,所述片剂可以制成包衣或肠溶形式,优选所述的口服制剂被制成缓释或定量释放的形式。

[0061] 为了制备适用的剂型,可根据需要在活性成分中添加一种或多种药用载体,所述的药用载体包括各种常规的药用辅料,例如赋形剂、填充剂、稀释剂、崩解剂、表面活性剂、湿润剂、防腐剂、甜味剂、色素等。

[0062] 根据疾病的类型、严重的程度以及患者的状况,例如性别、年龄、体重等选用合适的剂型和施用剂量,通常成人施用剂量在1-200mg/kg 体重/天,优选为1-50mg/kg 体重/天之间。

[0063] 本发明的药用组合物和该组合物的各种制剂可按照制药领域已知的常规方法、使用常规的药用载体制备。

[0064] 本发明的三肽硼酸(酯)类化合物对蛋白酶体具有良好的抑制活性,可作为一种新的蛋白酶体抑制剂使用,用于治疗恶性肿瘤、多种神经系统变性疾病、肌肉恶病质或糖尿病等疾病。

[0065] 本发明的另一目的是提供了通式(I)化合物和含有所述化合物的药物组合物的药用用途。即本发明提供了通式(I)化合物以及含有上述化合物的药物组合物在制备蛋白酶体抑制剂中的应用,特别是该化合物或药物组合物在制备治疗恶性肿瘤、多种神经系统变性疾病、肌肉恶病质或糖尿病等疾病的药物中的应用。所述的疾病包括各种恶性肿瘤、神经退行性疾病、肌萎缩侧索硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、皮质-纹状体-脊髓变性病以及糖尿病;其中所述的恶性肿瘤是白血病、胃癌、肝癌或鼻咽癌。

[0066] 本发明的另一目的是提供了一种治疗各种恶性肿瘤、神经退行性疾病、肌萎缩侧索硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、皮质-纹状体-脊髓变性病或糖尿病的方法,该方法包括将治疗有效量的通式(I)化合物施用于需要这种治疗的患者;其中所述的恶性肿瘤是白血病、胃癌、肝癌或鼻咽癌等。

[0067] 试验证明,本发明的三肽硼酸(酯)对蛋白酶体抑制作用具有很好的活性,其抗肿瘤活性高于已知药物硼替佐米,可用于替代硼替佐米治疗恶性肿瘤,特别是用于治疗多发性骨髓瘤。在对HL-60人白血病、BGC-823人胃癌、Be1-7402人肝癌和KB人鼻咽癌的测试模型实验中,本发明化合物也显示出良好的活性。

具体实施方式

[0068] 下面通过具体的实施方式对本发明的技术方案作进一步的说明,其中例举的实施例仅是对本发明的说明,而不以任何方式限制本发明的保护范围。

[0069] 制备实施例 1 L- 苯丙氨酸甲酯盐酸盐

[0070] 在 100mL 反应瓶中加入 25mL 无水甲醇,冰盐浴冷却到 -10°C 以下,搅拌下缓慢滴加 SOCl_2 (7mL, 96mmol), 然后于 -10°C 以下反应 10min, 再加入 L- 苯丙氨酸 (1.65g, 10mmol), 低温反应 40min, 撤去冰盐浴, 于室温反应 48h, 减压浓缩, 再加入 15mL 甲醇, 反复减压浓缩两次。加入 50mL 乙醚, 放置, 析出针状结晶, 过滤干燥, 粗产品再用甲醇-乙醚重结晶, 得白色晶体 L- 苯丙氨酸甲酯盐酸盐 2.0g, 收率 95%, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +37.2^{\circ}$ ($c = 1, \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), m. p. : 155-158 $^{\circ}\text{C}$

[0071] 制备实施例 2 N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酸甲酯

[0072] 将制备实施例 1 的产物 L- 苯丙氨酸甲酯盐酸盐 (1.12g, 5.2mmol) 溶于 20mL THF 中, 用 N- 甲基吗啉 (NMM) (0.7mL, 6.2mmol) 中和, 于冰浴下冷却备用。在另一反应瓶中加入吡嗪甲酸 (0.65g, 5.2mmol), 用 THF 20mL 溶解, 冰水浴冷却, 于 0°C 加入二环己基碳二亚胺 (DCC) (1.07g, 5.2mmol), HOBt (0.84g, 6.2mmol), 于 0°C 反应 40min, 然后加入已制备并冷却好的中和完毕的 L- 苯丙氨酸甲酯盐酸盐的 THF 溶液, TLC 检测反应, 2h 后反应完毕, 过滤除去不溶物 N, N'- 二环己基脲 (DCU), 滤液加入乙酸乙酯 150mL, 分别用 5% NaHCO_3 溶液、10% 的柠檬酸溶液、5% NaHCO_3 溶液、饱和食盐水溶液洗涤 ($2 \times 20\text{mL}$)。乙酸乙酯层用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 得化合物 1.37g, 产物为白色固体, 收率 98%, m. p. : 152-155 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) : δ 3.26 ($-\text{CH}_2$, m, 2H), 3.75 ($-\text{CH}_3$, s, 3H), 5.09 ($-\text{CH}$, m, 1H), 7.15 ~ 7.32 ($-\text{Ph}$, m, 5H), 8.23 ($-\text{CONH}$, d, 1H), 8.52 ($-\text{Pyz}$, d, 1H), 8.74 ($-\text{Pyz}$, d, 1H), 9.37 ($-\text{Pyz}$, s, 1H)。

[0073] 制备实施例 3 N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酸

[0074] 将制备实施例 2 的产物 N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酸甲酯 (1.0g, 3.51mmol) 用 10mL 丙酮溶解, 冰水浴下慢慢滴加 2N NaOH 至 pH 值为 12 ~ 13, 继续保持冰水浴中反应, TLC 检测, 2h 后反应完毕。冰水浴下滴加盐酸至 pH 值为 2 ~ 3, 产生大量白色固体, 过滤产生的沉淀, 用水、乙醚洗涤后晾干, 得白色产品 0.89g, 收率 93.6%, m. p. : 166-169 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 300MHz) : δ 3.23 ($-\text{CH}_2$, m, 2H), 4.74 ($-\text{CH}$, m, 1H), 7.16 ~ 7.25 ($-\text{Ph}$, m, 5H), 8.74 ($-\text{CONH}$, t, 1H), 8.86 ~ 8.89 ($-\text{Pyz}$, t, 2H), 9.14 ($-\text{Pyz}$, d, 1H), 13.06 ($-\text{COOH}$, s, 1H)。

[0075] 制备实施例 4 N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酸 -L- 苯丙氨酸甲酯

[0076] 将 L- 苯丙氨酸甲酯盐酸盐 (0.8g, 3.69mmol) 用 20mL THF 溶解, 用 NMM (0.49mL, 4.43mmol) 中和盐酸, 于冰浴下冷却备用。在另一反应瓶中加入制备实施例 3 的产物 N- 吡嗪甲酰基 -L- 苯丙氨酸 (1.0g, 3.69mmol), 用 20mL THF 溶解, 冰水浴冷却, 于 0°C 加入二环己基碳二亚胺 (DCC) (0.76g, 3.69mmol), HOBt (0.60g, 4.42mmol) 于 0°C 反应 40min, 然后加入已制备并冷却好的中和完毕的 L- 苯丙氨酸甲酯盐酸盐的 THF 溶液, TLC 检测反应, 2h 后反应完毕, 过滤除去不溶物 DCU, 滤液加入乙酸乙酯 80mL, 分别用 5% NaHCO_3 溶液、10% 的柠檬酸溶液、5% NaHCO_3 溶液、饱和食盐水溶液洗涤 ($2 \times 20\text{mL}$)。乙酸乙酯层用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 得化合物 1.52g, 产物为白色固体, 收率 95.6%, m. p. : 111 ~ 113 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) : δ 3.04 ($-\text{CH}_2$, m, 2H), 3.18 ($-\text{CH}_2$, d, 2H), 3.69 ($-\text{CH}_3$, s,

3H), 4.82(-CH, m, 2H), 6.36(-CONH, d, 1H), 6.92 ~ 7.30(-Ph, m, 10H), 8.26(-CONH, d, 1H), 8.54(-Pyr, d, 1H), 8.76(-Pyr, d, 1H), 9.33(-Pyr, s, 1H)。

[0077] 制备实施例 5 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-苯丙氨酸

[0078] 将制备实施例 4 的产物 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-苯丙氨酸甲酯 (1.52g, 3.52mmol) 用 10mL 丙酮溶解, 冰水浴下慢慢滴加 2N NaOH 至 pH 值为 12 ~ 13, 继续保持冰水浴中反应, TLC 检测, 2h 后反应完毕。冰水浴下滴加盐酸至 pH 值为 2 ~ 3, 产生大量白色固体, 过滤产生的沉淀, 用乙醚洗涤后晾干得白色产品 1.33g, 收率 90.5%, 白色固体熔点: 194-196 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 12.88(s, 1H), 9.10(s, 1H), 8.90-8.87(m, 1H), 8.77-8.73(m, 1H), 8.75-8.65(m, 2H), 7.24-7.14(m, 10H), 4.84-4.80(m, 1H), 4.53-4.50(m, 1H), 3.14-2.89(m, 4H)。

[0079] 制备实施例 6 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酸

[0080] 以萘丙氨酸甲酯烟酸盐为原料, 合成及后处理同制备实施例 3。得红褐色粘稠固体 2.96g, 收率 97.4%。¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 4.78(-CH, s, 1H), 6.92 ~ 7.54(=CH, m, 5H), 8.74(-CONH, -Pyr, d, 2H), 8.87(-Pyr, s, 1H), 9.15(-Pyr, s, 1H), 10.86(-NH, s, 1H), 13.04(-COOH, s, 1H)。

[0081] 制备实施例 7 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-苯丙氨酸甲酯

[0082] 以上一制备实施例 6 的产物 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酸为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠状物 1.89g, 收率 94.2%。产品直接用于下步皂化。

[0083] 制备实施例 8 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-苯丙氨酸

[0084] 以制备实施例 7 的产物 2b 为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 5。收率 77%, 白色固体, 熔点: 196-197 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 9.07(s, 1H), 8.86(d, J = 2.7Hz, 1H), 8.70(d, J = 1.2Hz, 1H), 8.68-8.62(m, 2H), 7.83-7.72(m, 4H), 7.45-7.37(m, 3H), 7.24-7.17(m, 5H), 4.93-4.91(m, 1H), 4.53-4.50(m, 1H), 3.24-2.98(m, 4H)。

[0085] 制备实施例 9 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-酪氨酸甲酯

[0086] 以酪氨酸甲酯盐酸盐及制备实施例 3 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠状物, 收率 92%。产品直接用于下步皂化。

[0087] 制备实施例 10 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-酪氨酸

[0088] 以制备实施例 9 产物 2c 为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 5。得泡沫状固体, 收率 83%。直接用于下一步反应。

[0089] 制备实施例 11 N-吡嗪甲酰基-L-酪氨酸

[0090] 以 N-吡嗪甲酸和酪氨酸甲酯盐酸盐为原料, 合成方法同制备实施例 3, 得乳白色粘稠状固体, 收率 89%, 产品直接用于下步反应。

[0091] 制备实施例 12 N-吡嗪甲酰基-L-酪氨酰-L-苯丙氨酸甲酯

[0092] 以制备实施例 11 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠状物 2.26g, 收率 95.5%。产品直接用于下步皂化。

[0093] 制备实施例 13 N-吡嗪甲酰基-L-酪氨酰-L-苯丙氨酸

[0094] 以制备实施例 12 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 5。得泡沫状固体, 收率 86%。直接用于下一步反应。

[0095] 制备实施例 14 L-亮氨酸甲酯盐酸盐

[0096] 以 L-亮氨酸为原料,合成方法及后处理同制备实施例 1。得白色晶体 1.7g,收率 94%, $[\alpha]_D^{25} = +20.2^\circ$ ($c = 1, \text{CH}_3\text{OH}$), m. p. :149-150°C。

[0097] 制备实施例 15 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸甲酯

[0098] 以制备实施例 14 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 2。得红色粘稠液体 2.47g,收率 98%。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$: δ 0.97 ~ 0.99(-CH₃, m, 6H), 1.69 ~ 1.83(-CH₂, -CH, m, 3H), 3.78(-CH₃, s, 3H), 4.82 ~ 4.90(-CH, m, 1H), 8.15(-CONH, d, 1H), 8.57(-Pyz, q, 1H), 8.78(-Pyz, d, 1H), 9.40(-Pyz, s, 1H)。

[0099] 制备实施例 16 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸

[0100] 以制备实施例 15 的产物 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸甲酯为原料,合成方法及后处理同制备实施例 3。得白色固体 2.22g,收率为 95%, m. p. :36-38°C。 $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6, 300\text{MHz})$: δ 0.88 ~ 0.91(-CH₃, t, 6H), 1.57 ~ 1.64(-CH₂, m, 2H), 1.81 ~ 1.91(-CH, m, 1H), 4.48 ~ 4.55(-CH, m, 1H), 8.77(-CONH, q, 1H), 8.90 ~ 8.95(-Pyz, dd, 2H), 9.19(-Pyz, d, 1H), 12.81(-COOH, s, 1H)。

[0101] 制备实施例 17 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-苯丙氨酸甲酯

[0102] 以制备实施例 16 产物 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸为原料,合成方法及后处理同制备实施例 4。产物为黄色粘稠状物,收率 93%。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$: δ 0.92 ~ 0.96(-CH₃, dd, 6H), 1.64 ~ 1.79(-CH₂, -CH, m, 3H), 3.02 ~ 3.20(-CH₂, m, 2H), 3.74(-CH₃, s, 3H), 4.64(-CH, m, 1H), 4.88(-CH, dd, 1H), 6.64(-CONH, d, 1H), 7.03 ~ 7.10(-Ph, m, 5H), 8.03(-CONH, d, 1H), 8.55(-Pyz, q, 1H), 8.79(-Pyz, d, 1H), 9.36(-Pyz, d, 1H)。

[0103] 制备实施例 18 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-苯丙氨酸

[0104] 以制备实施例 17 产物 2e 为原料,合成方法及后处理同制备实施例 18。得粘稠状固体,收率 95.6%; $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6, 300\text{MHz})$: δ 12.61(s, 1H), 9.20(s, 1H), 8.98-8.91(m, 1H), 8.77(s, 1H), 8.66-8.62(m, 1H), 8.46-8.44(m, 1H), 7.22-7.15(m, 5H), 4.61(s, 1H), 4.48-4.46(m, 1H), 3.10-2.87(m, 2H), 1.98-1.92(m, 1H), 1.62-1.59(m, 2H), 0.92-0.88(m, 6H)。

[0105] 制备实施例 19 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-萘丙氨酸甲酯

[0106] 以制备实施例 16 产物 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸为原料,合成及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠状物 2.1g,收率 93%。产品直接用于下步皂化。

[0107] 制备实施例 20 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-萘丙氨酸

[0108] 以制备实施例 19 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 5。得白色固体,收率 83%, m. p. :99-100°C; $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6, 300\text{MHz})$: δ 9.16(s, 1H), 8.89(d, J = 2.4Hz, 1H), 8.70(d, J = 1.5Hz, 1H), 8.58(d, J = 9.0Hz, 1H), 8.46(d, J = 7.8Hz, 1H), 7.79-7.73(m, 4H), 4.60-4.57(m, 1H), 4.55-4.53(m, 1H), 1.54-1.45(m, 3H), 0.83-0.79(m, 6H)。

[0109] 制备实施例 21 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酸-L-萘丙氨酸甲酯

[0110] 以制备实施例 3 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠状物 2.3g,收率 93.5%。产品直接用于下步反应。

[0111] 制备实施例 22 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酸-L-萘丙氨酸

[0112] 以制备实施例 21 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 5。得白色固体,收率 79%, m. p. :191-193°C; $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6, 300\text{MHz})$: δ 9.07(d, J = 1.2Hz, 1H), 8.86(d, J

= 2.7Hz, 1H), 8.68(d, J = 1.5Hz, 1H), 8.64-8.56(m, 2H), 7.81-7.72(m, 4H), 7.42-7.40(m, 3H), 7.17-7.11(m, 5H), 4.83-4.79(m, 1H), 4.59-4.55(m, 1H), 3.26-3.02(m, 4H).

[0113] 制备实施例 23 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-苯丙氨酸甲酯

[0114] 以制备实施例 6 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠状物 1.89g, 收率 94.2%。产品直接用于下步皂化。

[0115] 制备实施例 24 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-萘丙氨酸

[0116] 以制备实施例 23 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 5。得淡黄色固体, 收率 72%, 熔点: 208-209 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 9.04(s, 1H), 8.84(d, J = 2.4Hz, 1H), 8.73-8.69(m, 1H), 8.67-8.66(m, 2H), 7.82-7.69(m, 8H), 7.74-7.69(m, 6H), 7.44-7.35(m, 6H), 4.95-4.91(m, 1H), 4.64-4.60(m, 1H), 3.28-3.08(m, H)。

[0117] 制备实施例 25 L-色氨酸甲酯盐酸盐

[0118] 以 L-色氨酸为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 1。得白色晶体 3.02g, 收率 93%, [α]_D²⁵ = +16.5° (c = 1, CH₃OH), m. p.: 206-208 °C。

[0119] 制备实施例 26 N-吡嗪甲酰基-L-色氨酸甲酯

[0120] 以 N-吡嗪甲酸和制备实施例 25 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 2。得红褐色粘稠状物 3.18g, 收率 96%, 直接用于下步反应。

[0121] 制备实施例 27 N-吡嗪甲酰基-L-色氨酸

[0122] 以制备实施例 26 为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 3。得红褐色粘稠固体 2.96g, 收率 97.4%。¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 4.78(-CH, s, 1H), 6.92 ~ 7.54(= CH, m, 5H), 8.74(-CONH, -Pyr, d, 2H), 8.87(-Pyr, s, 1H), 9.15(-Pyr, s, 1H), 10.86(-NH, s, 1H), 13.04(-COOH, s, 1H)。

[0123] 制备实施例 28 N-吡嗪甲酰基-L-色氨酸-L-苯丙氨酸甲酯

[0124] 以制备实施例 27 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠物 2.13g, 收率 96.8%, 未经分离, 直接用于皂化。

[0125] 制备实施例 29 N-吡嗪甲酰基-L-色氨酸-L-苯丙氨酸

[0126] 以制备实施例 28 为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 3。收率 96.4%, 白色固体, 熔点: 74-76 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.79(s, 1H), 9.13(s, 1H), 8.86(s, 1H), 8.68(s, 1H), 8.62-8.59(m, 2H), 7.54-6.84(m, 10H), 4.84(s, 1H), 4.58-4.50(m, 2H), 3.20-3.09(m, 4H)。

[0127] 制备实施例 30 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-色氨酸甲酯

[0128] 以制备实施例 3 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 4。得淡黄色油状液体 1.65g, 收率 94.8%。¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz): δ 3.13 ~ 3.24(-CH₂, m, 4H), 3.68(-CH₃, s, 3H), 4.90(-CH, q, 1H), 5.06(-CH, m, 1H), 6.79(-NH, s, 1H), 6.91 ~ 7.34(-Ph, = CH, m, 10H), 8.26 ~ 8.33(-CONH, t, 2H), 8.43(-Pyr, d, 1H), 8.63(-Pyr, d, 1H), 9.14(-Pyr, s, 1H)。

[0129] 制备实施例 31 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-色氨酸

[0130] 以制备实施例 30 产物为原料, 合成方法及后处理同制备实施例 5。得淡黄色固体, 收率 93.7%, m. p.: 106-108 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 12.59(s, 1H), 10.87(s, 1H), 9.16-9.12(m, 1H), 8.89-8.87(m, 1H), 8.75-8.72(m, 1H), 8.66-8.59(m, 2H), 7.56-6.96(m, 10H), 4.88-4.85(m, 1H), 4.59-4.56(m, 1H), 3.22-3.05(m, 4H)。

[0131] 制备实施例 32 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸甲酯

[0132] 以制备实施例 3 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 4。得白色粘稠固体 1.20g,收率 94.5%,直接用于下一步皂化。

[0133] 制备实施例 33 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸

[0134] 以制备实施例 32 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 5。收率 93.9%,淡黄色固体,熔点:142-144°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300MHz): δ 12.70 (s, 1H), 9.15-9.12 (m, 1H), 8.90-8.88 (m, 1H), 8.79-8.74 (m, 1H), 8.68-8.65 (m, 1H), 8.57-8.53 (m, 1H), 7.27-7.15 (m, 5H), 4.90-4.82 (m, 1H), 4.32-4.25 (m, 1H), 3.21-3.04 (m, 2H), 1.68-1.54 (m, 3H), 0.94-0.91 (m, 3H), 0.87-0.85 (m, 3H)。

[0135] 制备实施例 34 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-亮氨酸甲酯

[0136] 以制备实施例 16 产物 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸为原料,合成方法及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠状物 1.69g,收率 91.8%。产品直接用于下步皂化。

[0137] 制备实施例 35 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-亮氨酸

[0138] 以制备实施例 34 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 5。得粘稠固体,收率 83%.,直接用于下一步反应。

[0139] 制备实施例 36 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸甲酯

[0140] 以制备实施例 6 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 4。得黄色粘稠状物 1.8g,收率 92.5%。产品直接用于下步皂化。

[0141] 制备实施例 37 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸

[0142] 以制备实施例 36 产物为原料,合成方法及后处理同制备实施例 5。得白色固体,收率 78%,熔点:98-100°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300MHz): δ 9.09 (d, J = 1.2Hz, 1H), 8.86 (d, J = 2.7, 1H), 8.71-8.70 (m, 2H), 8.57 (d, J = 7.8Hz, 1H), 7.84-7.45 (m, 4H), 7.43-7.42 (m, 3H), 5.02-4.96 (m, 1H), 4.32-4.28 (m, 1H), 1.66-1.58 (m, 3H), 0.89 (d, J = 6.6Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.3Hz, 3H)。

[0143] 制备实施例 38 (1S, 2S, 3R, 5S)-2,6,6-三甲基二环 [3.1.1] 庚烷-2,3-二醇

[0144] 将 $\text{Me}_3\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11.3g, 102mmol) 用 16mL 水溶解,搅拌下再加入 α -蒎烯 (13.2g, 96.9mmol)、74mL 叔丁醇、7.4mL 吡啶和四氧化钨 (60mg, 0.236mmol)。然后通氮气,10 分钟后,加热至回流。TLC 检测,15 小时反应完毕。自然降至室温,加入 NaHSO_3 (1.2g, 11.5mmol), 适量 NaCl 饱和水溶液。分出有机相,水层用乙醚提取 (3 \times 20mL),合并有机相,无水硫酸钠干燥。浓缩后柱层析分离 (乙酸乙酯:石油醚=1:30),得白色固体 15.33g,收率 92.9%, $[\alpha]_D^{20} = -10.79^\circ$ (c = 5.5, 甲苯), m. p. :52-54°C。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 0.94 (- CH_3 , s, 3H), 1.28 (- CH_3 , s, 3H), 1.32 (- CH_3 , s, 3H), 1.34 ~ 1.38 (- CH_2 , d, 1H), 1.66 (- CH_2 , m, 1H), 1.93 (-CH, m, 1H), 2.01 (- CH_2 , t, 1H), 2.20 (-CH, m, 1H), 2.33 (H_2O , s, 2H), 2.49 (- CH_2 , m, 1H), 4.00 (-CH, q, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 24.11, 27.80, 28.00, 29.54, 38.21, 8.99, 40.51, 53.98, 69.26, 73.88; 元素分析 $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ 计算值 :C, 70.55 ;H, 10.66 ;实测值 :C, 70.55 ;H, 10.67。

[0145] 制备实施例 39 二氯甲基硼酸二甲酯

[0146] 于 250mL 瓶中加入无水二氯甲烷 (4.26mL, 66mmol) 和 120mL 无水四氢呋喃,通入氮气,降温至 -110°C,然后慢慢滴加正丁基锂的环己烷溶液 (25.2mL, 60mmol),滴加完

毕后低温继续搅拌 1 小时,再加入硼酸三甲酯 (7.5mL,66mmol),继续低温搅拌 1 小时后加入 5N HCl 溶液 12mL,自然升至室温。反应液转入分液漏斗,分出有机相,水层用乙醚提取 (2×10mL),合并有机相,无水硫酸钠干燥。蒸除溶剂得白色粘稠状固体 9.3g,收率 99.4%。产品未经纯化直接用于下步反应。

[0147] 制备实施例 40 二氯甲基硼酸- α -蒎烷二醇酯

[0148] 于 25mL 瓶中加入制备实施例 38 产物 α -蒎烷二醇 (3.23g,0.019mmol) 和制备实施例 38 产物二氯甲基硼酸二甲酯 (5.38g,0.035mmol),5mL THF 溶解,室温下搅拌。TLC 检测,18h 后反应完毕。柱层析分离 (乙酸乙酯:石油醚=1:20) 得无色液体 4.92g,收率 98.5%。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz): δ 0.85(-CH₃,s,3H),1.21(-CH₂,t,1H),1.31(-CH₃,s,3H),1.47(-CH₃,s,3H),1.92~1.97(-CH₂,CH,m,2H),2.15(-CH,t,1H),2.25~2.43(-CH₂,m,2H),4.47(-CH,q,1H),5.40(-CH,s,1H);¹³C-NMR(CDCl₃,75MHz): δ 23.92,26.18,26.93,28.18,34.98,38.31,39.16,51.09,79.41,88.08。MS(EI):m/z 262.0(M⁺),计算值:m/z 262.0。

[0149] 制备实施例 41 2-甲基-4-氯-丁基硼酸- α -蒎烷二醇酯

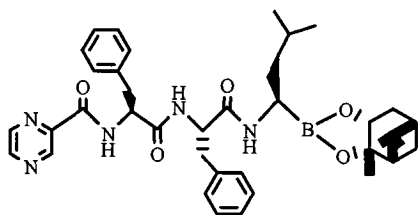
[0150] 将制备实施例 40 产物二氯甲基硼酸- α -蒎烷二醇酯 (1.18g,4.49mmol) 用 12mL 乙醚溶解,室温下搅拌。通入氮气,并降温至 -78°C,然后慢慢滴加新制的叔丁基格式试剂的乙醚溶液 (6mL,4.50mmol),滴加完毕后,加入干燥好的 ZnCl₂ 粉末 (0.44g,3.25mmol)。自然升至室温,继续室温下搅拌。TLC 检测,18h 后反应完毕。过滤除去 ZnCl₂ 及反应生成的 MgBr₂,浓缩后柱层析分离 (乙酸乙酯:石油醚=1:200) 得无色液体 1.13g,收率 88.5%。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz): δ 0.85-0.94(-CH₃,m,9H),1.19(-CH,q,1H),1.30(-CH₃,s,3H),1.42(-CH₃,s,3H),1.62(CH,m,1H),1.75-1.95(-CH₂,m,4H),2.10(-CH,t,1H),2.21-2.40(-CH₂,m,2H),3.54(-CH,m,1H),4.37(-CH,q,1H)。¹³C-NMR(CDCl₃,75MHz): δ 21.18,22.84,23.93,25.54,26.27,26.97,28.37,35.24,38.18,39.27,42.72,51.11,86.63;MS(EI):m/z 284.2(M⁺),计算值:m/z 284.6。

[0151] 制备实施例 42 2-甲基-4-氨基-丁基硼酸- α -蒎烷二醇酯盐酸盐 (LeuBdiol-NH₂)

[0152] 于 150mL 茄形瓶中加入 LiN(SiMe₃)₂ (9.5mL,17.98mmol),通入氮气,并降温至 -78°C,然后用注射器慢慢加入含有制备实施例 41 产物 2-甲基-4-氯-丁基硼酸- α -蒎烷二醇酯 (4.7g,16.54mmol) 的 THF 溶液,滴加完毕后,自然升至室温,继续室温下搅拌。TLC 检测,20h 后反应完毕。减压蒸除溶剂,并用乙醚带两次,加 50mL 石油醚溶解,过滤除去不溶物。将滤液降温至 -78°C,加入 65mL 氯化氢的乙醚溶液,然后自然慢慢升至室温,出现大量乳白色固体。冷冻使完全析出结晶,过滤,乙醚洗涤产品得乳白色固体 2.8g,收率 56.2%。产品未经纯化,直接用于下步反应。

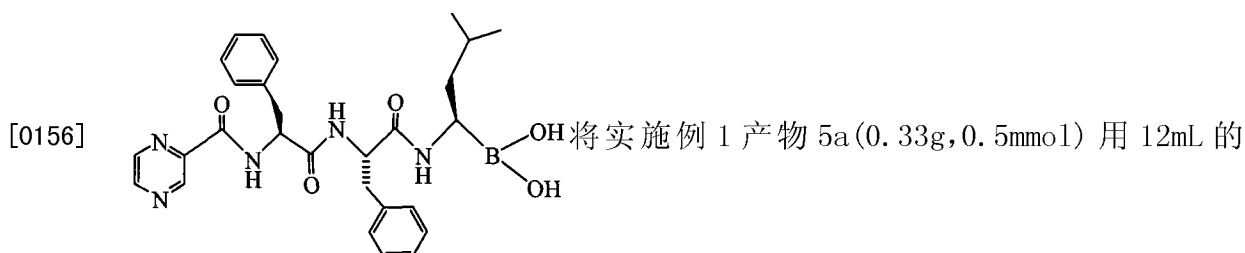
[0153] 实施例 1 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨硼酸蒎烷二醇酯 (5a)

[0154] 将 0.42g(1mmol) 制备实施例 5 的 N-吡嗪甲酰



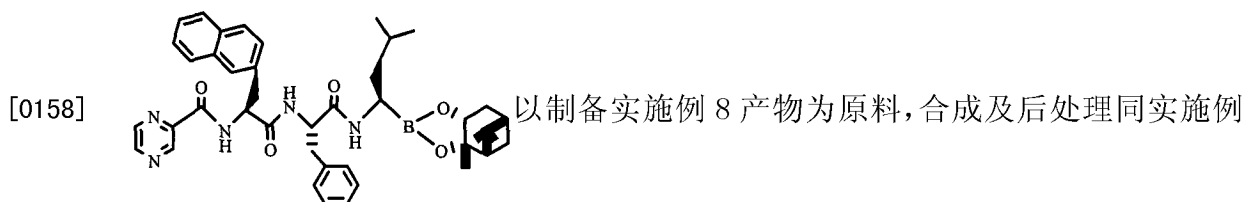
基-L-苯丙氨酰-L-苯丙氨酸溶于7ml四氢呋喃,在-20℃下加入HOBt 0.16g(1.2mmol)和1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐0.29g(1.5mmol),反应30分钟后,加入0.3g(1mmol)制备实施例42得到的LeuBdiol-NH₂和N,N-二异丙基乙胺0.26g(2mmol),在-20℃下搅拌过夜。TLC检测反应完毕,过滤除去不溶物,减压蒸除溶剂,用20mL乙酸乙酯溶解,分别用10%的柠檬酸溶液、5% NaHCO₃溶液、饱和食盐水溶液洗涤(3×15mL)。乙酸乙酯层用无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩后柱层析分离得0.54g化合物4a,为白色固体,收率82%。熔点78-80℃;¹H-NMR(CDCl₃,500MHz):δ 9.31-9.26(m,1H),8.82-8.77(m,1H),8.58-8.54(m,1H),8.23-8.19(m,1H),7.32-6.99(m,10H),6.48-6.42(m,1H),5.72-5.67(m,1H),4.80-4.77(m,1H),4.59-4.55(m,1H),4.36-4.33(m,1H),3.19-3.09(m,4H),2.90-2.88(m,1H),2.36-2.22(m,2H),2.08-2.03(m,1H),1.94-1.86(m,2H),1.47-1.39(m,3H),1.30-1.28(m,3H),1.29-1.21(m,3H),0.90-0.83(m,9H);¹³C-NMR(CDCl₃,125MHz):169.86,169.77,163.21,147.63,144.33,143.52,142.69,136.25,135.94,129.22,129.13,128.81,128.45,127.28,126.72,84.72,54.73,54.27,51.50,39.41,39.37,38.37,38.03,37.84,37.64,35.68,28.53,28.44,27.05,26.36,26.32,25.58,23.96,22.36;MS(EI):m/z 665.6(M)⁺。

[0155] 实施例2 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸(6a)



丙酮溶解,加入NH₄OAc溶液(0.1N,11.6mL),最后加入NaIO₄(0.32g,1.5mmol),室温搅拌反应。TLC检测显示,10h后反应完全。向反应溶液中加入NaOH溶液(2N,0.5mL),CH₂Cl₂萃取。用浓盐酸调节溶液pH值约为3。用CH₂Cl₂萃取(3×15mL),合并有机相,无水Na₂SO₄干燥,过滤,蒸干得到淡黄色固体5a 0.19g,收率72.1%。m.p.:112-114℃。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz):δ 0.88(-CH₃,d,3H),0.90(-CH₃,d,3H),1.25~2.17(-CH₂,-CH,-B(OH)₂,m,5H),2.96~3.17(-CH,m,5H),4.65~4.77(-CH,m,2H),6.38~6.42(-CONH,m,1H),6.84~7.07(-Ph,-CONH,m,6H),7.24~7.29(-Ph,m,5H),8.18(-CONH,s,1H),8.53(-Pyz,s,1H),8.77(-Pyz,s,1H),9.15~9.26(-Pyz,m,1H);¹³C-NMR(CDCl₃,75MHz):δ 22.51,23.17,25.66,37.30,37.54,51.70,53.64,54.96,126.75,127.41,128.41,128.54,128.88,129.20,135.66,135.89,142.72,143.32,144.28,147.75,163.32,163.58,169.74,170.01;MS(ESI):m/z 530.4907(M-H);FT-MS:m/z 532.27179(M+H),计算值:532.27258。

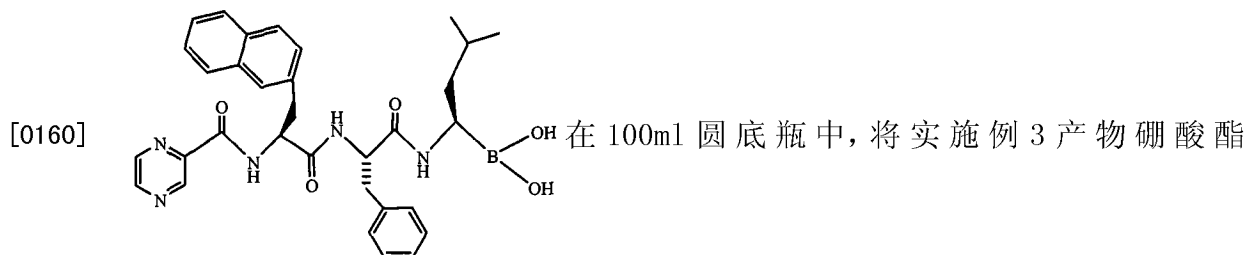
[0157] 实施例3 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸二丙醇酯(5b)



1,得白色固体,87%收率,熔点:98-100℃。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz):δ 9.13(s,1H),8.74(d,

J = 2.4Hz, 1H), 8.48(d, J = 2.1Hz, 1H), 8.23-8.20(d, J = 7.5Hz, 1H), 7.80-7.69(m, 4H), 7.46-7.43(m, 2H), 7.35(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.02-6.95(m, 5H), 6.53-6.45(m, 1H), 4.65-4.57(m, 1H), 4.29-4.27(m, 1H), 3.40-3.26(m, 2H), 3.13-3.02(m, 1H), 2.95-2.84(m, 1H), 2.35-2.27(m, 1H), 2.20-2.15(m, 1H), 2.04-1.99(m, 1H), 1.89-1.80(m, 1H), 1.39-1.23(m, 12H), 0.87-0.83(m, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz): 170.39, 169.85, 163.19, 147.57, 144.32, 143.59, 142.71, 136.13, 133.51, 133.46, 132.47, 129.22, 128.56, 128.35, 128.01, 127.66, 127.57, 127.51, 126.65, 126.24, 125.84, 54.55, 54.42, 53.64, 51.35, 39.70, 39.55, 38.19, 37.85, 37.74, 35.50, 28.61, 27.08, 26.24, 25.36, 25.21, 24.03, 22.97, 22.01; HRMS 计算值 $\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{BN}_5\text{O}_5$ (M+1) $^+$ 716.3978, 实测值 716.3986.

[0159] 实施例 4 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨酸硼酸(6b)



5b(0.357g 0.5mmol) 溶于无水二氯甲烷中, 滴加 1N 的三溴化硼二氯甲烷溶液 2.5ml, 冰浴下搅拌, 2 小时后, TLC 检测反应结束, 滴加 50ml 水扑灭反应, 二氯甲烷萃取 (15ml \times 4 次), 合并有机相, 饱和食盐水洗 (15ml \times 4 次), 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩, 乙醚二氯甲烷重结晶得乳白色固体 0.18g. 产率 63.5%. 熔点: 134-135 $^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 9.15(s, 1H), 8.73(d, J = 2.4Hz, 1H), 8.46(d, J = 2.1Hz, 1H), 8.24-8.17(m, 1H), 7.76-7.66(m, 4H), 7.44-7.40(m, 3H), 7.32-7.25(m, 1H), 6.90-6.86(m, 5H), 6.52-6.46(m, 2H), 4.81-4.67(m, 2H), 3.31-3.26(m, 1H), 3.11(d, J = 6.9Hz, 2H), 2.93-2.89(m, 1H), 1.92(s, br, 2H), 1.55-1.21(m, 3H), 0.85-0.82(m, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz): 172.96, 169.99, 163.61, 147.70, 144.24, 143.30, 142.70, 137.28, 135.61, 133.47, 133.19, 132.49, 129.13, 128.64, 128.35, 128.07, 127.64, 127.55, 127.11, 126.71, 126.39, 125.92, 54.88, 51.86, 39.85, 39.34, 37.43, 37.23, 36.88, 25.68, 23.12, 22.46. HRMS 计算值 $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{BN}_5\text{O}_5$ (M-1) $^-$ 580.2727, 实测值 580.2736.

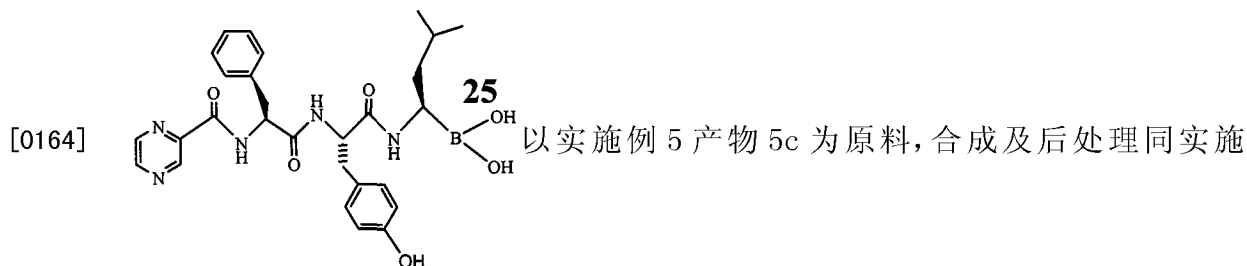
[0161] 实施例 5 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-酪氨酰-L-亮氨酸硼酸蕈烷二醇酯(5c)



施例 1 制备, 得淡黄色固体, 收率 81%. 熔点: 119-120 $^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300MHz): δ 9.18(s, 1H), 8.68(d, J = 10.2Hz, 1H), 8.48(s, 1H), 8.26(d, J = 7.5Hz, 1H), 7.82-7.74(m, 1H), 7.27-7.18(m, 5H), 6.80-6.76(m, 3H), 6.49-6.40(m, 2H), 4.82-4.61(m, 2H), 4.29-4.27(d, J = 8.1Hz, 1H), 3.13-3.06(m, 2H), 2.95-2.84(m, 3H), 2.35-2.27(m, 2H), 2.04-2.02(m, 1H), 1.85-1.80(m, 2H), 1.43-1.26(m, 9H), 0.88-0.83(m, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75MHz): 170.17,

163.36, 155.62, 147.61, 143.96, 143.44, 142.83, 135.95, 130.37, 129.21, 128.78, 127.47, 127.23, 126.61, 126.44, 115.34, 85.30, 54.86, 54.74, 52.91, 51.54, 40.16, 39.82, 39.64, 38.10, 37.57, 36.97, 35.80, 35.69, 28.73, 27.10, 26.28, 25.41, 24.04, 23.06, 22.97, 22.03, 21.95; HRMS 计算值 $C_{38}H_{49}BN_5O_6 (M+1)^+$ 682.3770, 实测值 682.3767。

[0163] 实施例 6 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-酪氨酰-L-亮氨硼酸 (6c)



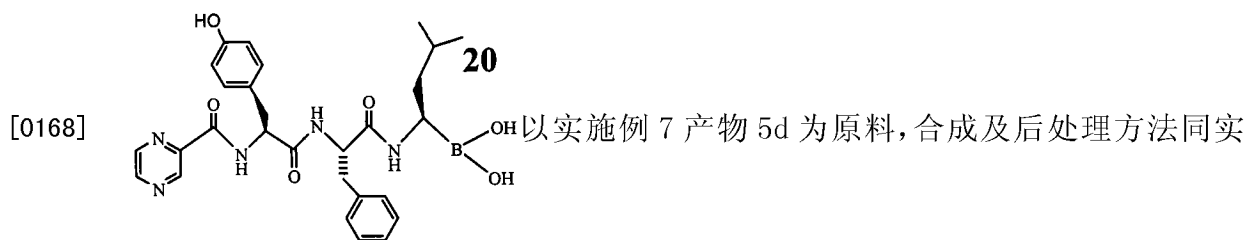
例 4, 得黄色固体, 产率 56.3%。熔点: 298-300 °C。 1H -NMR (CD_3OD , 300MHz): δ 9.13 (s, 1H), 8.78 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.67-8.66 (dd, $J = 1.2, 2.4$ Hz, 1H), 7.23-7.16 (m, 5H), 7.16-7.01 (m, 2H), 6.66-6.18 (m, 2H), 4.80-4.73 (m, 2H), 3.20-3.18 (m, 1H), 3.08-3.02 (m, 3H), 2.68-2.56 (m, 1H), 1.62-1.54 (m, 2H), 1.33-1.26 (m, 2H), 1.14-1.04 (m, 2H), 0.89-0.83 (m, 6H); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 300M): 177.69, 173.05, 165.13, 164.95, 157.77, 157.68, 148.79, 145.59, 144.96, 144.79, 144.49, 137.82, 131.47, 131.35, 130.34, 129.56, 127.97, 127.40, 127.16, 116.41, 56.11, 55.90, 52.87, 52.67, 40.70, 38.82, 38.49, 37.65, 37.30, 26.83, 26.61, 23.89, 23.69, 22.31, 21.83. HRMS 计算值 $C_{28}H_{34}BN_5O_6 (M-1)^-$ 546.2529, 实测值 546.2527。

[0165] 实施例 7 N-吡嗪甲酰基-L-酪氨酰-L-苯氨酰-L-亮氨硼酸蕈烷二醇酯 (5d)



方法制备, 得淡黄色固体, 收率 80%。熔点: 90-92 °C。 1H -NMR (CD_3OD , 300MHz): δ 9.29 (s, 1H), 8.74 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.50 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 7.8$, 1H), 7.11-6.99 (m, 8H), 6.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.74-6.71 (m, 1H), 6.50-6.42 (m, 1H), 4.70-4.26 (m, 1H), 4.51-4.27 (m, 1H), 4.29-4.17 (m, 2H), 3.07-2.93 (m, 5H), 2.37-2.31 (m, 1H), 2.21-2.16 (m, 1H), 2.06-2.03 (m, 1H), 1.90-1.80 (m, 2H), 1.40-1.26 (m, 6H), 0.90-0.79 (m, 12H); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 75MHz): 171.36, 170.18, 163.03, 155.47, 147.50, 144.29, 143.74, 142.73, 135.95, 130.29, 130.15, 129.31, 128.50, 127.51, 126.83, 116.47, 116.64, 85.33, 55.08, 53.19, 51.55, 39.73, 39.64, 39.40, 38.23, 38.16, 37.44, 37.14, 35.67, 28.73, 28.54, 27.14, 26.30, 25.44, 24.07, 22.98, 22.02; HRMS 计算值 $C_{38}H_{49}BN_5O_6 (M+1)^+$ 682.3770, 实测值 682.3795。

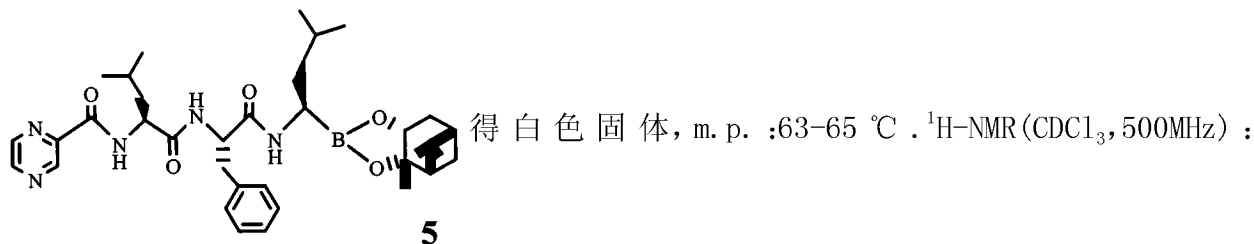
[0167] 实施例 8 N-吡嗪甲酰基-L-酪氨酰-L-苯丙氨酰-L-亮氨硼酸 (6d)



施例 4,得黄色固体,产率 71.5%。熔点:219-221 °C。¹H-NMR(CD₃OD,300MHz): δ 9.15(s, 1H), 8.78(d, J = 2.4Hz, 1H), 8.66(d, J = 2.1Hz, 1H), 7.24-7.19(m, 5H), 7.13-7.00(m, 2H), 6.97-6.62(m, 2H), 4.80-4.71(m, 2H), 3.11-3.06(m, 3H), 2.93-2.87(m, 1H), 2.64-2.54(m, 1H), 1.62-1.54(m, 2H), 1.40-1.29(m, 2H), 1.16-1.11(m, 2H), 0.92-0.81(m, 6H); ¹³C-NMR(CD₃OD,75MHz): 177.20, 173.18, 164.92, 157.51, 148.68, 145.62, 144.93, 144.73, 137.17, 136.96, 131.36, 130.46, 130.33, 129.69, 129.62, 128.25, 128.19, 116.32, 56.34, 56.17, 52.61, 40.77, 38.46, 38.11, 37.82, 26.62, 23.86, 21.91. ESI:MS(ESI) 实测值:(M+Na/z)+570.2168,计算值:570.2500(M+Na)。

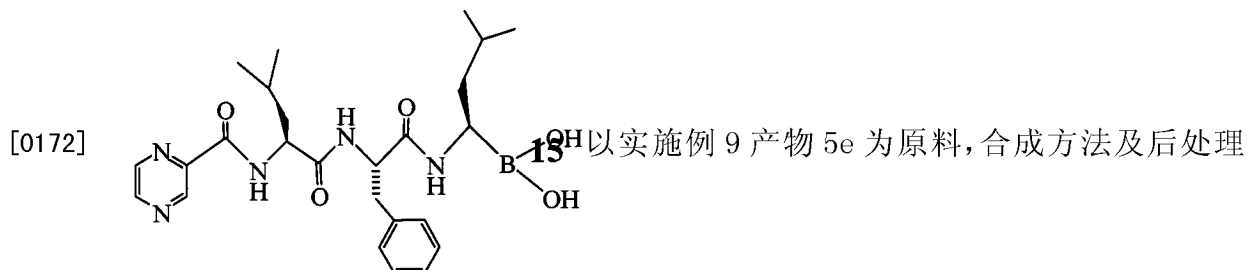
[0169] 实施例 9 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸二酯(5e)

[0170] 以制备实施例 18 产物为原料,按照实施例 1 的合成方法制备,收率 87%。



δ 9.32(s, 1H), 8.78-8.67(m, 1H), 8.55-8.21(m, 1H), 8.10-7.95(m, 1H), 7.15-6.99(m, 6H), 6.04-5.96(m, 1H), 4.65-4.34(m, 2H), 4.30-4.15(m, 1H), 3.22-3.01(m, 2H), 2.37-2.22(m, 2H), 2.12-2.04(m, 1H), 1.93-1.90(m, 2H), 1.76-1.63(m, 3H), 1.48-1.39(m, 1H), 1.28(s, 3H), 1.29-1.22(m, 3H), 0.94-0.90(m, 6H), 0.86-0.83(m, 9H); ¹³C-NMR(CDCl₃,125MHz): 171.35, 170.30, 163.15, 147.47, 144.38, 143.72, 142.63, 136.45, 129.10, 128.37, 126.66, 84.55, 54.50, 52.02, 51.45, 40.73, 38.31, 38.03, 37.95, 37.77, 35.63, 28.48, 27.00, 26.26, 25.52, 24.78, 23.91, 22.89, 22.29, 21.78;MS(EI):m/z 631.6(M)⁺。

[0171] 实施例 10 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸(6e)



同实施例 2。蒸干得到黄色固体 19.7mg,收率 68.4%。m. p.: 113-116 °C。¹H-NMR(CDCl₃,300MHz): δ 0.78 ~ 0.82(-CH₃, m, 13H), 1.19 ~ 1.57(-CH₂, -CH, -B(OH)₂, m, 7H), 1.95(-CH, d, 1H), 2.89 ~ 3.09(-CH, -CH₂, m, 3H), 4.28 ~ 4.41(-CH, m, 1H), 4.61 ~ 4.76(-CH, m, 1H), 6.92 ~ 7.02(-Ph, -CONH, m, 6H), 7.19 ~ 7.25(-CONH, m, 1H), 7.96 ~ 8.02(-CONH, m, 1H), 8.47(-Pyz, s, 1H), 8.72(-Pyz, s, 1H), 9.16 ~ 9.25(-Pyz, m, 1H);MS(ESI) 实测值:m/

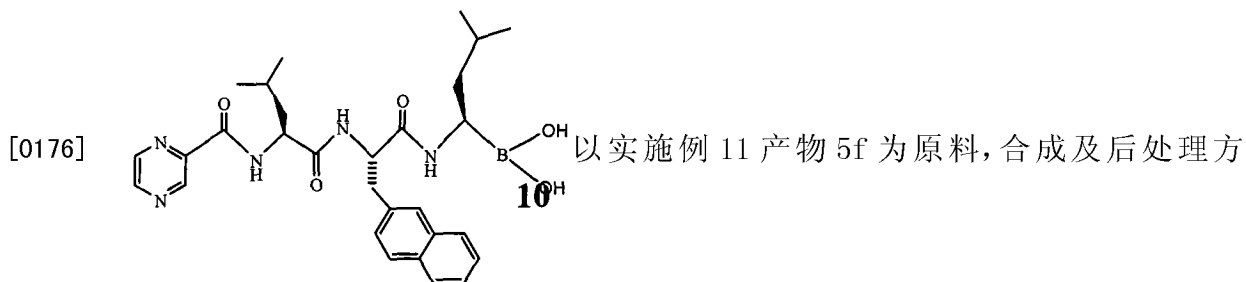
z496. 3710(M-H), 计算值 :497. 2809。

[0173] 实施例 11 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-萘氨酸-L-亮氨酸硼酸酐二醇酯 (5f)



同实施例 1, 收率 85%, 白色固体, 熔点 :140-142 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) : δ 9.195(d, $J = 1.5\text{Hz}$, 1H), 8.71(d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 8.40(t, $J = 1.2\text{Hz}$, 1H), 7.93(d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H), 7.66-7.61(m, 4H), 7.36-7.32(m, 3H), 6.75(d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 6.00(d, $J = 4.8$, 1H), 4.78-4.71(m, 1H), 4.59-4.53(m, 1H), 4.27(dd, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 3.23(d, $J = 6.6\text{Hz}$, 2H), 3.14-3.10(m, 1H), 2.28-2.20(m, 1H), 2.17-2.08(m, 1H), 2.00-2.05(m, 1H), 1.87-1.57(m, 6H), 1.41-1.27(m, 9H), 0.92-0.90(m, 6H), 0.83-0.77(m, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) : 171.05, 170.61, 163.13, 147.52, 144.24, 143.45, 142.59, 142.47, 133.933, 133.25, 132.22, 128.13, 127.99, 127.48, 127.26, 125.95, 125.52, 85.83, 53.06, 51.98, 51.88, 51.32, 40.63, 39.68, 39.56, 38.19, 35.48, 28.56, 27.10, 26.23, 25.33, 25.22, 24.78, 24.04, 22.89, 21.80; HRMS 计算值 $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{BN}_5\text{O}_5$ (M+1) $^+$ 682.4134, 实测值 682.4155。

[0175] 实施例 12 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-萘氨酸-L-亮氨酸硼酸 (6f)



法同实施例 4, 得乳白色固体, 产率 56.3%, 熔点 :157-159 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) : δ 9.13-9.10(m, 1H), 8.67(s, 1H), 8.36(s, 1H), 7.98-7.94(m, 2H), 7.59-7.29(m, 7H), 7.22-7.19(m, 2H), 4.98-4.84(m, 1H), 4.41-4.37(m, 1H), 3.46-3.35(m, 2H), 3.24-3.10(m, 1H), 1.71-1.25(m, 8H), 0.88-0.78(m, 12H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) : 171.48, 163.92, 147.65, 144.15, 143.31, 143.07, 142.56, 133.56, 133.22, 132.25, 129.16, 128.69, 128.24, 127.51, 127.10, 125.98, 125.58, 52.95, 52.77, 51.91, 41.12, 40.23, 36.76, 25.68, 24.72, 23.12, 22.83, 22.44, 21.69. HRMS 计算值 $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{BN}_5\text{O}_5$ (M-1) $^-$ 546.2893, 实测值 546.2906。

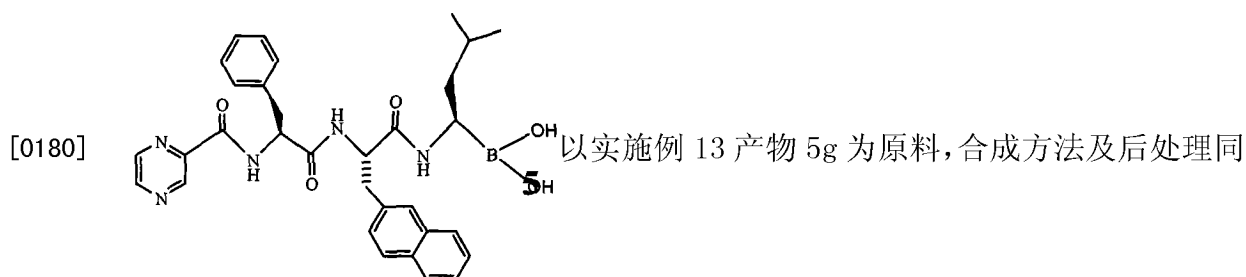
[0177] 实施例 13 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酸-L-萘氨酸-L-亮氨酸硼酸酐二醇酯 (5g)



处理方法同实施例 1, 得白色固体, 收率 86%, 熔点 :97-98 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) :

δ 9.13-9.09 (m, 1H), 8.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.34 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.62-7.46 (m, 3H), 7.41-7.21 (m, 9H), 6.53-6.45 (m, 1H), 5.99-5.78 (m, 1H), 4.76-4.72 (m, 1H), 4.25 (dd, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.29-3.22 (m, 1H), 3.16-3.14 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.11-3.04 (m, 1H), 2.29-2.26 (m, 1H), 2.17-2.12 (m, 1H), 2.02-1.98 (m, 1H), 1.86-1.67 (m, 2H), 1.38-1.25 (m, 12H), 0.87-0.81 (m, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz): 170.53, 169.85, 163.19, 147.50, 144.04, 143.28, 143.15, 142.63, 135.96, 135.89, 133.66, 133.54, 133.20, 132.19, 129.20, 128.78, 128.14, 127.96, 127.48, 127.28, 127.21, 125.92, 125.53, 54.56, 53.36, 53.01, 51.34, 39.88, 39.70, 39.57, 38.05, 37.60, 35.57, 28.57, 27.09, 26.22, 25.32, 25.16, 24.03, 22.91, 22.01, 21.92; HRMS 计算值 $\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{BN}_5\text{O}_5$ ($M+1$) $^+$ 716.3978, 实测值 716.3996。

[0179] 实施例 14 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-萘丙氨酰-L-亮氨硼酸 (6g)



实施例 4, 得乳白色固体, 产率 53%, 熔点: 137-138 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 9.90 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.09-7.98 (m, 1H), 7.50-7.23 (m, 12H), 7.19-7.07 (m, 1H), 6.73-6.56 (m, 2H), 4.88-4.76 (m, 1H), 4.72-4.67 (m, 1H), 3.33-3.28 (m, 1H), 3.14-3.12 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.02-2.97 (m, 1H), 2.04 (s, br, 2H), 1.51-1.42 (m, 3H), 0.87-0.80 (m, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz): 173.10, 170.06, 163.51, 147.59, 143.90, 142.95, 142.86, 142.64, 142.52, 135.90, 135.70, 133.45, 133.23, 133.07, 132.14, 129.29, 128.88, 128.24, 127.94, 127.46, 127.14, 125.90, 125.53, 54.94, 51.96, 42.92, 39.98, 37.26, 36.92, 25.69, 23.14, 22.56; HRMS 计算值 $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{BN}_5\text{O}_5$ ($M-1$) $^-$ 580.2736, 实测值 580.2729。

[0181] 实施例 15 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-萘氨酰-L-亮氨硼酸癸烷二醇酯 (5h)

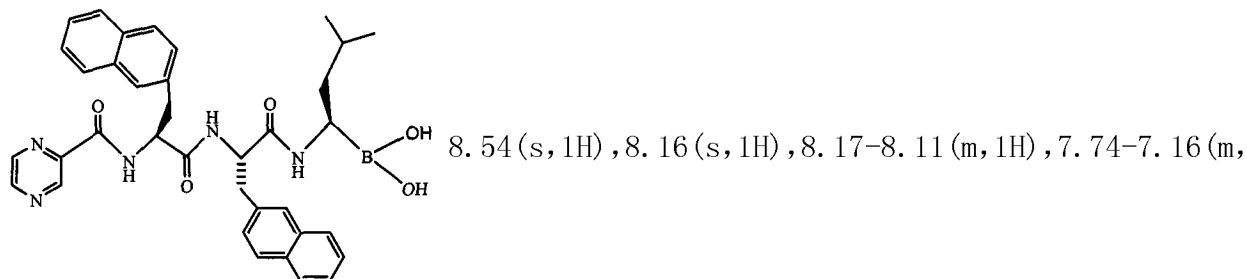


处理同实施例 1, 得白色固体, 收率 82%, 熔点: 136-137 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300MHz): δ 9.10 (s, 1H), 8.63 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.12-8.02 (m, 1H), 7.81-7.57 (m, 6H), 7.53-7.32 (m, 8H), 7.20-7.17 (dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz, 2H), 6.51-6.49 (m, 1H), 6.00 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.87-4.72 (m, 2H), 4.28-4.24 (dd, $J = 1.5, 8.7$ Hz, 1H), 3.33-3.31 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.24-3.22 (m, 1H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.33-2.25 (m, 1H), 2.18-2.13 (m, 1H), 2.04-2.00 (m, 1H), 1.87-1.67 (m, 2H), 1.36-1.25 (m, 8H), 0.87-0.74 (m, 12H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75MHz): 170.46, 169.85, 163.22, 147.46, 144.00, 143.16, 142.61,

142.49, 133.58, 133.45, 133.34, 132.50, 132.13, 128.58, 127.97, 127.71, 127.57, 127.44, 126.31, 125.90, 125.52, 85.76, 54.41, 53.30, 51.35, 39.58, 38.19, 37.98, 37.59, 35.50, 28.59, 27.10, 26.24, 25.33, 25.18, 24.04, 21.96; HRMS 计算值 $C_{46}H_{53}N_5O_5 (M+1)^+$ 766.4134, 实测值 766.4148。

[0183] 实施例 16 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-萘丙氨酰-L-亮氨酸硼酸 (6h)

[0184] 以实施例 15 产物 5h 为原料, 合成方法及后处理同实施例 4, 得乳白色固体, 产率 72.1%, 熔点: 145-146 °C。 1H -NMR($CDCl_3$, 300MHz): δ 8.95(s, 1H),



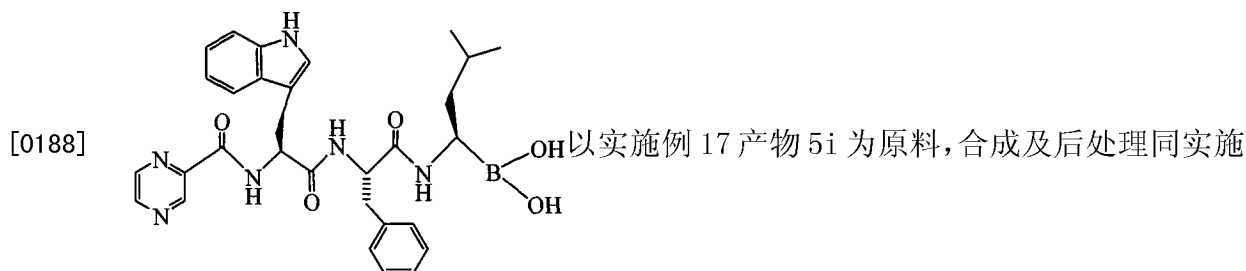
14H), 7.08-6.95(m, 2H), 6.87-6.50(m, 2H), 4.95-4.87(m, 1H), 4.79-4.68(m, 1H), 3.28-3.26(m, 2H), 3.00-2.86(m, 1H), 2.33(s, br, 2H), 1.38-1.35(m, 3H), 0.81-0.79(m, 6H); ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 75MHz): 170.18, 169.61, 163.56, 147.51, 143.79, 141.90, 142.55, 133.42, 133.126, 133.01, 132.46, 132.07, 128.58, 128.09, 127.39, 127.14, 127.01, 126.32, 125.94, 125.83, 125.49, 54.79, 51.52, 39.78, 37.49, 37.30, 36.95, 25.64, 23.09, 22.39, 22.19; HRMS 计算值 $C_{36}H_{37}BN_5O_5 (M-1)^-$ 630.2893, 实测值 630.2895。

[0185] 实施例 17 N-吡嗪甲酰基-L-色氨酸-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸二酯 (5i)



施例 1, 得白色固体, 收率 78%, 熔点: 127-129 °C。 1H -NMR($CDCl_3$, 300MHz): δ 9.24(s, 1H), 8.76(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.51(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.50-8.46(m, 1H), 8.22-8.14(m, 1H), 7.40-7.38(m, 5H), 7.01-6.88(m, 4H), 6.78-6.58(m, 1H), 6.09-5.97(m, 1H), 5.75-5.71(m, 2H), 4.82-4.75(m, 2H), 3.51-3.45(m, 1H), 3.31-3.01(m, 4H), 1.25-1.23(m, 10H), 0.99-0.89(m, 8H), 0.88-0.85(m, 6H); MS(EI) m/z 703.6 ($M-1$) $^-$ 。

[0187] 实施例 18 N-吡嗪甲酰基-L-色氨酸-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸 (6i)

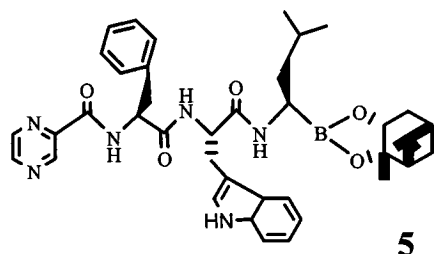


例 2, 蒸干得到黄色粘稠固体 11.4mg, 收率 49.2%。 1H -NMR($CDCl_3$, 300MHz): δ 0.79(- CH_3 , d, 6H), 1.40 ~ 1.60(- CH_2 , -CH, m, 3H), 1.97 ~ 2.13(- CH_2 , -B(OH) $_2$, m, 10H), 3.15 ~ 3.19(-CH,

m, 1H), 3.53 ~ 3.58 (-CH, m, 1H), 3.75 ~ 3.98 (-CH, m, 1H), 4.87 ~ 4.98 (-CH, m, 1H), 5.05 (-CH, s, 1H), 6.89 (-CONH, m, 1H), 7.16 ~ 7.19 (-Ph, 吡啶, m, 9H), 8.06 (-CONH, d, 1H), 8.64 (-Pyr, d, 1H), 9.17 (-Pyr, s, 1H), 9.28 (-Pyr, d, 1H), 9.72 (-NH, s, 1H)。

[0189] 实施例 19 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-色氨酰-L-亮氨硼酸蕈烷二醇酯 (5j)

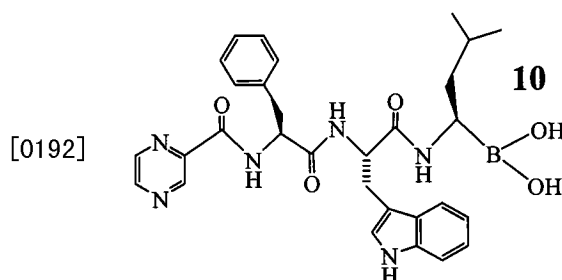
[0190] 以制备实施例 30 产物为原料, 合成及后处理同实施例 1, 得淡黄色固



体, 收率 79%, 熔点: 153-155 °C。¹H-NMR (CDCl₃,

300MHz): δ 9.08 (s, 1H), 8.73-8.69 (m, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.11-7.94 (m, 1H), 7.32-7.21 (m, 5H), 7.08-6.88 (m, 4H), 6.62-6.42 (m, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.65-5.58 (m, 2H), 4.38-4.29 (m, 2H), 3.20-3.01 (m, 4H), 1.40-1.24 (m, 10H), 0.99-0.89 (m, 8H), 0.83-0.80 (m, 6H); MS (EI) m/z 704.7 (M⁺)。

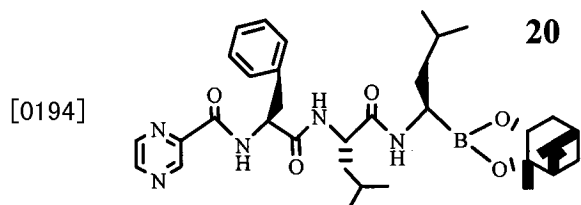
[0191] 实施例 20 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-色氨酰-L-亮氨硼酸 (6j)



[0192] 以实施例 19 产物 5j 为原料, 合成方法及后处

理同实施例 2, 蒸干得到黄色粘稠固体 49.3mg, 收率 42.4%。¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz): δ 0.81 (-CH₃, m, 6H), 1.23 ~ 1.45 (-CH₂, -CH, m, 3H), 1.89 ~ 2.07 (-CH₂, -B(OH)₂, m, 10H), 3.05 ~ 3.11 (-CH, m, 1H), 3.33 ~ 3.48 (-CH, m, 1H), 3.45 ~ 3.78 (-CH, m, 1H), 4.64 ~ 4.81 (-CH, m, 1H), 5.25 (-CH, d, 1H), 6.76 (-CONH, m, 1H), 7.08 ~ 7.16 (-Ph, 吡啶, m, 9H), 8.12 (-CONH, d, 1H), 8.57 (-Pyr, d, 1H), 9.07 (-Pyr, d, 1H), 9.21 (-Pyr, d, 1H), 9.28 (-NH, d, 1H)。

[0193] 实施例 21 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酰-L-亮氨硼酸蕈烷二醇酯 (5k)

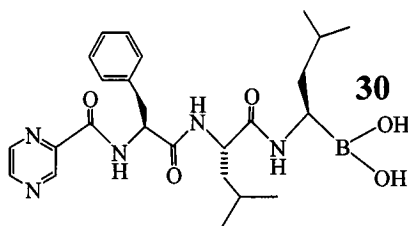


[0194] 以制备实施例 32 产物为原料, 合成及后处理同

实施例 1, 得白色固体, 收率 81%。熔点: 68-70 °C。¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz): δ 9.33 (s, 1H), 8.76-8.73 (d, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.29-8.10 (m, 1H), 7.29-7.25 (m, 5H), 6.39-6.31 (m, 2H), 4.82-4.79 (m, 1H), 4.44-4.41 (m, 1H), 4.30-4.27 (m, 1H), 3.22-3.19 (m, 3H), 2.32-2.17 (m, 3H), 2.05-2.02 (m, 1H), 1.89-1.27 (m, 14H), 0.96-0.83 (m, 15H); MS (EI) m/z 631.6 (M⁺)。

[0195] 实施例 22 N-吡嗪甲酰基-L-苯丙氨酰-L-亮氨酰-L-亮氨硼酸 (6k)

[0196]

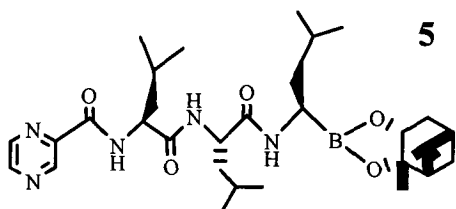
**30**

以实施例 21 产物 5k 为原料, 合成方法及后处理

同实施例 2, 蒸干得到黄色固体 16.7mg, 收率 73.2%, 熔点: 116-118°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 9.30-9.21 (m, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.33-8.29 (m, 1H), 7.32-7.22 (m, 6H), 6.99-6.91 (m, 1H), 4.93-4.57 (m, 2H), 3.21 (s, 2H), 2.85-2.58 (m, 1H), 2.18-1.25 (m, 8H), 0.96-0.82 (m, 12H); MS (ESI) 实测值: m/z 496.3977 (M-H), 计算值: 497.2809.

[0197] 实施例 23 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-亮氨酸-L-亮氨酸硼酸茚烷二醇酯 (51)

[0198]

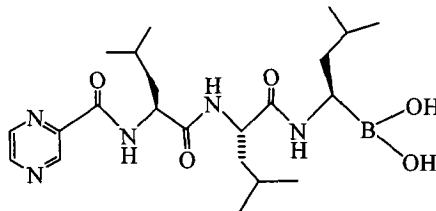
**5**

以制备实施例 34 产物为原料, 合成方法及

后处理同实施例 1, 得粘稠状固体, 收率 87%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 9.41 (s, 1H), 8.76-8.65 (m, 1H), 8.56-8.45 (m, 1H), 8.18-8.10 (m, 1H), 5.43-5.38 (m, 1H), 4.71-4.50 (m, 1H), 4.38-4.32 (m, 1H), 4.07-3.97 (m, 2H), 3.86-3.84 (m, 1H), 2.52-2.08 (m, 3H), 2.04-1.90 (m, 6H), 1.67-1.60 (m, 2H), 1.41-1.25 (m, 10H), 0.99-0.83 (m, 21H); MS (EI) m/z 597.5 (M) $^+$.

[0199] 实施例 24 N-吡嗪甲酰基-L-亮氨酸-L-亮氨酸-L-亮氨酸硼酸 (61)

[0200]

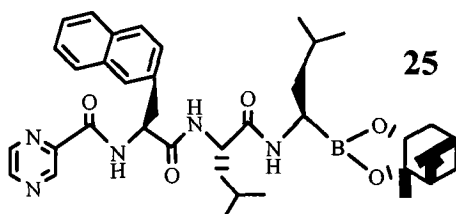
**30**

以实施例 23 产物 51 为原料, 合成方法及后处理

同实施例 2, 得到黄色粘稠固体 14.4mg, 收率 62.8%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 0.81 ~ 0.97 (-CH₃, m, 18H), 1.19 ~ 2.82 (-CH₂, -CH, -B(OH)₂, m, 11H), 2.85 ~ 2.91 (-CH, m, 1H), 4.53 (-CH, s, 1H), 4.69 ~ 4.86 (-CH, m, 1H), 6.99 (-CONH, d, 1H), 7.16 (-CONH, d, 1H), 8.06 ~ 8.28 (-CONH, m, 1H), 8.50 (-Pyz, s, 1H), 8.71 (-Pyz, s, 1H), 9.30 (-Pyz, s, 1H); MS (ESI) 实测值: m/z 462.3825 (M-H), 计算值: 463.2966.

[0201] 实施例 25 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酸-L-亮氨酸-L-亮氨酸硼酸茚烷二醇酯 (5m)

[0202]

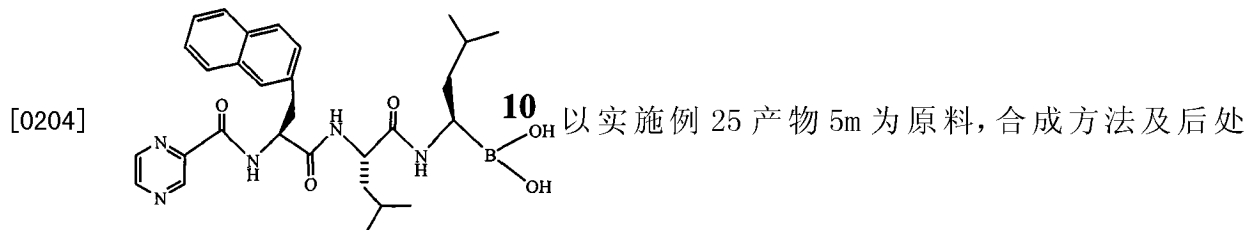
**25**

以制备实施例 36 产物为原料, 合成及后处理方

法同实施例 1, 得白色固体, 收率 81%. 熔点: 99-100°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 9.31 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.49 (d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 8.33 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.66-7.58 (m, 4H), 7.44-7.38 (m, 3H), 6.48-6.36 (m, 2H), 4.94-4.85 (m, 1H), 4.42-4.30 (m, 1H), 4.25-4.16 (m,

1H), 3.39-3.37 (d, $J = 6.3\text{Hz}$, 2H), 3.19-3.11 (m, 1H), 2.35-2.27 (m, 1H), 2.20-2.15 (m, 1H), 1.89-1.84 (m, 2H), 1.68-1.61 (m, 2H), 1.37-1.36 (m, 3H), 1.53-1.43 (m, 4H), 1.28-1.21 (m, 3H), 0.94-0.89 (m, 6H), 0.83-0.79 (m, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz): 171.81, 170.10, 163.298, 147.59, 144.34, 143.72, 142.77, 133.46, 132.47, 128.56, 128.12, 127.62, 127.16, 126.18, 125.80, 85.60, 54.70, 54.53, 51.40, 51.20, 50.96, 40.89, 40.08, 39.85, 39.56, 38.18, 38.09, 35.58, 28.59, 27.08, 26.25, 25.26, 25.46, 24.51, 24.03, 23.00, 22.71, 22.15, 21.94; HRMS 计算值 $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{BN}_5\text{O}_5$ ($\text{M}+1$)⁺ 682.4134, 实测值 682.4152.

[0203] 实施例 26 N-吡嗪甲酰基-L-萘丙氨酰-L-亮氨酰-L-亮氨硼酸 (6m)



理同实施例 4 得乳白色固体, 产率 66%。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300M): δ 9.29 (s, 1H), 8.70 (d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H), 8.45 (d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 8.40 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.74-7.66 (m, 4H), 7.45-7.42 (m, 3H), 7.37 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 5.05-4.93 (m, 1H), 4.53-4.45 (m, 1H), 3.38 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 2.98-2.83 (m, 1H), 1.99 (s, br, 2H), 1.80-1.51 (m, 1H), 1.50-1.29 (m, 6H), 0.86-0.74 (m, 12H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz): 170.59, 170.45, 163.83, 147.74, 144.27, 143.61, 142.77, 133.46, 133.27, 132.47, 128.59, 128.12, 127.63, 127.05, 126.24, 125.84, 54.76, 39.88, 37.74, 25.78, 24.61, 24.48, 23.03, 22.82, 22.63, 21.60, 21.45. MS (ESI) 实测值: m/z 462.3825 (M-H), 计算值: 463.2966.

[0205] 试验实施例 1 三肽硼酸 (酯) 化合物的蛋白酶体抑制作用

[0206] 采用荧光肽的方法测定蛋白酶体的活性, 用 Suc-leu-leu-Val-Tyr-AMC (Suc 代表琥珀酰, AMC 代表 7-氨基-4-甲基香豆素, 从 SIGMA 购买) 测定糜蛋白酶样活性 (ChT-L); 用 Z-Ala-Arg-Arg-AMC (Z 代表苄氧羰基, 从 Calbiochem 购买) 测定胰蛋白酶样活性 (T-L); 用 Z-leu-leu-Glu- β NA (β NA 代表 β 萘酰胺, 从 SIGMA 购买) 测定多肽-谷氨酰-多肽水解酶活性 (PGPH)。

[0207] 所述的活性测定方法是: 37°C 下将 $1\ \mu\text{g}$ 从大鼠肝脏中提取 20S 蛋白酶体用含有不同浓度的化合物、 $50\ \mu\text{M}$ 的荧光肽和 20mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐的 $100\ \mu\text{L}$ 溶液分别培养一小时, 在 $380/440\text{nm}$ 和 $335/410\text{nm}$ 的激发/发射波长下分别用 Fluostar OPTIMA 和 BMG Germany 光谱荧光剂测定 AMC 及 β NA 物质的释放的荧光, 用 0.1% DMSO 作为溶剂空白。比较溶剂空白的荧光来计算抑制率。所述的试验以抗肿瘤药物硼替佐米 (bortezomib) (白血病治疗药), 即 PS341 作为阳性对照的比较化合物。试验结果见下表 1。

[0208] 表 1 本发明化合物的蛋白酶体抑制作用

[0209]

化合物 编号	CT-L (IC_{50} , nM)	T-L (IC_{50} , nM)	PGPH (IC_{50} , nM)
PS341	0.161 ± 0.024	> 20	

5a	0.402 ± 0.024	> 20	8.330 ± 2.493
6a	0.546 ± 0.077	> 20	10.907 ± 3.206
5b	0.220 ± 0.106	> 20	> 20
6b	0.417 ± 0.070	> 20	4.428 ± 1.407
5c	0.335 ± 0.031	> 20	5.390 ± 0.368
6c	0.395 ± 0.035	> 20	4.013 ± 1.472
5d	0.295 ± 0.049	> 20	4.763 ± 1.308
6d	0.263 ± 0.081	> 20	2.500 ± 1.485
5e	0.431 ± 0.086	> 20	3.405 ± 0.021
6e	0.190 ± 0.017	> 20	5.143 ± 2.166
5f	0.370 ± 0.141	> 20	3.910 ± 1.718
6f	0.079 ± 0.011	> 20	3.630 ± 1.669
5g	0.443 ± 0.081	> 20	
6g	0.111 ± 0.050	> 20	3.797 ± 0.983
5h	0.495 ± 0.092	> 20	
6h	0.335 ± 0.078	> 20	
5i	> 20	> 20	> 20
6i	> 20	> 20	> 20
5j	> 20	> 20	> 20
6j	> 20	> 20	> 20
5k	0.287 ± 0.019	> 20	2.725 ± 1.039
6k	0.173 ± 0.033	> 20	5.663 ± 0.839
5l	> 20	> 20	> 20
6l	> 20	> 20	> 20

5m	0.345±0.106	> 20	
6m	0.220±0.070	> 20	8.330±2.493

[0210] 试验实施例 2 体外抗肿瘤活性初筛试验

[0211] 本实施例所采用的试验方法是药学领域常规的抗肿瘤活性试验方法,例如可参见下述文献:(J. Immunol Method, 1983, 65, 55)。

[0212] 测试模型:A:MTT法(HL-60人白血病);B:SRB法(BGC-823人胃癌);C:SRB法(Be1-7402人肝癌);D:SRB法(KB人鼻咽癌)。

[0213] 用本发明的实施例 1-26 的化合物进行上述试验,试验结果分别列于表 2-5。其中试验结果的表示方法是:“+++”表示 3 个剂量的抑制率均大于 50%;“++”表示 2 个剂量的抑制率大于 50%;“+”表示 1 个剂量的抑制率大于 50%。

[0214] 表 2 对 HL-60 人白血病细胞生长的抑制活性(MTT法)

化合物 编号	不同剂量下的测试效应(抑制率%)			结果
	0.05μM	0.5μM	5μM	
5b	21.15	88.14	88.10	++
6b	3.58	87.34	88.89	++
5c	-10.46	1.94	98.97	+
6c	-16.15	-8.48	64.97	+
5d	-11.79	35.94	88.92	+
6d	-21.09	-5.04	87.91	+
5f	-19.90	81.94	88.57	++
6f	1.26	87.39	88.63	++
5g	-5.06	87.48	88.32	++
6g	5.68	87.79	88.60	++
5h	11.38	85.54	88.26	++
6h	13.58	85.65	88.32	++
5m	11.22	82.73	87.93	++
6m	4.61	85.20	87.79	++

[0215] [0216] 表 3 对 BGC-823 人胃癌细胞生长的抑制活性(SRB法)

[0217]

化合物 编号	不同剂量下的测试效应(抑制率%)			结果
	0.05 μ M	0.5 μ M	5 μ M	
5b	68.59	94.76	96.54	+++
6b	56.35	93.69	96.69	+++
5c	3.19	55.99	96.09	++
6c	2.64	25.10	97.70	+
5d	23.64	93.63	97.85	++
6d	4.33	46.66	97.55	+
5f	38.27	89.15	83.02	++
6f	80.30	95.52	96.79	+++
5g	77.62	95.43	95.89	+++
6g	76.86	95.55	97.09	+++
5h	55.00	88.97	95.40	+++
6h	44.94	88.06	97.58	++
5m	45.97	84.53	97.18	++
6m	60.31	81.93	96.99	+++

[0218] 表 4 对 Be1-7402 人肝癌细胞生长的抑制活性 (SRB 法)

[0219]

化合物 编号	不同剂量下的测试效应(抑制率%)			结果
	0.05 μ M	0.5 μ M	5 μ M	
5b	35.88	66.68	91.05	++
6b	22.91	56.08	91.61	+
5c	4.18	16.63	91.12	+
6c	-2.64	-4.84	71.23	+
5d	5.52	51.96	93.13	++
6d	1.70	8.79	90.00	+
5f	3.18	83.87	92.31	++
6f	39.40	90.64	93.67	++
5g	46.67	77.65	94.73	++
6g	37.88	72.16	93.36	++
5h	13.09	51.67	90.97	++
6h	6.61	49.76	94.80	+
5m	6.49	52.60	95.73	++
6m	30.30	57.72	95.23	++

[0220] 表 5 对 KB 人鼻咽癌细胞的生长抑制活性 (SRB 法)

[0221]

化合物 编号	不同剂量下的测试效应(抑制率%)			结果
	0.05 μ M	0.5 μ M	5 μ M	
5b	40.35	95.06	95.78	++
6b	23.33	91.47	96.64	++
5c	1.84	29.83	91.36	+
6c	-13.57	-5.16	95.40	+
5d	0.83	73.23	94.76	++
6d	3.23	17.34	96.20	+
5f	3.74	93.41	95.26	++
6f	32.11	95.69	97.80	++
5g	62.79	95.50	96.51	+++
6g	59.43	95.97	96.66	+++
5h	20.83	91.25	94.62	++
6h	14.25	91.77	97.40	++
5m	8.59	85.61	96.17	++
6m	40.84	86.42	94.69	++

[0222] 以上试验数据表明:(1)本发明的三肽硼酸(酯)具有很好的体外抗肿瘤活性。多数化合物在5 μ M浓度下可达到>90%的抑制率,甚至在0.05 μ M浓度下个别化合物仍能达到>50.0%的抑制率;(2)保护基蕨烷二醇的脱除与否,对活性影响很小。

[0223] 试验实施例3 体外抗肿瘤活性(IC₅₀)

[0224] 根据上述抗肿瘤细胞活性初步筛选试验结果,选择其中活性较好的化合物在HL-60(早幼粒细胞白血病细胞株)、BXPC-3(人胰腺癌细胞株)、U266(多发性骨髓瘤细胞株)及BGC-823(人胃癌细胞株)四种肿瘤细胞株上测定了它们的IC₅₀值。其中前三种肿瘤细胞株由American Type Culture(Manassas, VA)获得,BGC-823(人胃癌细胞株)从中国药科大学获得。

[0225] 试验方法:HL-60细胞于含有20%胎牛血清的IMDM培养基上培养,培养温度37 $^{\circ}$ C,培养环境含5%CO₂;BGC-823细胞及BXPC-3细胞在含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基上培养,培养温度37 $^{\circ}$ C,培养环境含5%CO₂;U266细胞在含有15%胎牛血清的RPMI1640培养基上培养,培养温度37 $^{\circ}$ C,培养环境含5%CO₂。

[0226] 采用标准的MTT法测定细胞的生长。在96孔板的每个孔中加入150 μ L(含3000个细胞)的分散液并使其生长,24小时后,将10个50 μ L含不同浓度药物的介质加入相应的孔中,继续培养72小时。然后在37 $^{\circ}$ C下将20 μ L含有5mg/ml MTT的溶液加入到每个孔中培养4小时。在4 $^{\circ}$ C下1000转/分离心5分钟,将上层介质小心弃去。将沉淀物溶于100 μ L的DMSO中,在540nm波长下用Infinite M200(Tecan, Austria)酶标仪测定吸光度。结果用IC₅₀值来表示,取三次独立测定的平均值。结果见表6。

[0227] 表6部分化合物的IC₅₀值

[0228]

化合物 编号	BGC-823 (μ M)	BXPC-3 (nM)	HL-60 (nM)	U266 (nM)
PS341	2.89	11.8	6.9	12.2
6b	2.81	31.8	10	53.0
6c	5.14	445.0	552.5	250.0
6d	2.46	256.7	444.7	66.2
6f	0.60	21.2	4.6	9.9
6g	1.04	28.7	7.4	15.8
6h	2.45	33.3	19.6	195.0
6m	1.72	43.5	15.0	120.0

[0229] 结果显示,多数化合物显示出比 PS341 更好的选择性,而且在一些肿瘤株上的活性明显高于 PS341。如除 6c 外,其它化合物对 BGC-823 细胞的生长抑制率均高于 PS341 ;6f 对 3 种细胞的生长抑制率均高于 PS341。

[0230] 试验实施例 4 体内抗肿瘤活性

[0231] 动物:ICR 小鼠,雌雄各半(18-22 克),由北京医科大学动物部提供。

[0232] 肿瘤细胞株:小鼠 H22 由天然药物及仿生药物国家重点实验室药理组细胞库提供。

[0233] 方法:取小鼠肿瘤细胞,经处理后将细胞稀释为 5×10^6 /ml。在无菌条件下,按 0.2ml/只,接种于小鼠左前肢腋下。接种 24h 后,分组给药,每天口服给药一次,连续 10 天。第 12 天剥瘤称重,计算每组平均瘤重、标准差及 P 值。

[0234] 表 7 化合物 6f 和 6m 的体内抗肿瘤活性

组别	剂量 (mg/kg)	动物数(只) 开始/结束	体重(g) ($\bar{X} \pm SD$)	瘤重(g) ($\bar{X} \pm SD$)	抑制率 (%)
NS	/	8/8	6.52 \pm 3.06	1.25 \pm 0.32	/
PS341	1	8/4	0.65 \pm 2.07	0.47 \pm 0.20***	62.05
6f	1	8/6	1.49 \pm 1.07	0.60 \pm 0.16***	51.67
	2	8/5	0.04 \pm 4.29	0.56 \pm 0.17***	55.34
6g	1	8/8	-1.28 \pm 2.83	0.82 \pm 0.36*	34.24
	2	8/8	-0.53 \pm 2.58	0.54 \pm 0.28***	56.33

[0236] NS:空白组;***P < 0.001 ;*P < 0.05

[0237] 以上体内抗肿瘤活性试验结果表明,本发明三肽硼酸化合物的活性与硼替佐米(PS341)相当,但毒性明显降低,尤其是化合物 6g 毒性更低,有望研发成为效果更好、毒副

作用更低的蛋白酶体抑制剂。

[0238] 以上已经详细描述了本发明的实施方案,对本领域技术人员来说很明显可以做很多改进和变化而不会背离本发明的基本精神。所有这些变化和进步都认为是在本发明的范围之内。