

基于FKBP12 结构的药物发现: *L*-1,4-噻嗪-3-羧酸衍生物的设计、合成及其神经营养活性^{*}

聂爱华 肖军海 王莉莉 廖国超 刘洪英 任 珅 李 松^{**}

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 以神经亲免疫 FKBP12 为靶点, 基于 FKBP12, FK506 与 Calcineurin 的复合物晶体结构, 设计、合成和筛选能够特异地靶向 FKBP12 的只具有促神经生长作用的功能而不影响免疫系统的新结构神经退行性疾病治疗药物. 结果显示化合物 N308 作为一种促神经生长和保护的候选药物具进一步开发的前景.

关键词 FKBP12 *L*-1,4-噻嗪-3-羧酸衍生物 设计 合成 神经营养活性

神经退行性疾病防治药物的发现一直是一个重要的研究课题. 20 世纪 90 年代初期发现的神经亲免疫 FKBP12(FK506 结合蛋白家族)为这类药物的研究和开展展现出新的希望^[1,2]. 目前基于 FKBP12 结构的神经亲免疫配体药物 GPI-1485 作为治疗帕金森氏症的药物已完成了二期临床实验, 预计到 2009 年完成三期临床 (<http://www.guilfordpharm.com/licensing/out/NIL.pdf>). 本研究基于 FKBP12(FKBP12 家族成员之一)的结构, 设计、合成和筛选高亲和力特异性的小分子有机化合物, 研制具有新结构的神经退行性疾病治疗药物.

1 研究方法

1.1 化合物的设计

根据 FKBP12, FK506 与 Calcineurin 的复合物晶体

结构^[3,4], 应用计算机辅助药物设计的方法, 确定出 FKBP12 靶蛋白中与神经退行性疾病相关的结构部位, 并以此为结构基础构建小分子化合物虚拟库, 利用 DOCK 筛选的方法, 确定需要合成的定向分子库.

1.2 化合物的合成

利用液相多步合成的方法, 构建出目标分子的母核: *L*-1,4-噻嗪-3-羧酸; 再应用液相平行合成的方法合成目标分子库.

1.3 化合物的生物活性评价

应用分子水平的结合实验(生物质谱、复合物单晶 X 射线衍射实验)、PC12 细胞分化模型、鸡胚背根神经节(DRG)体外无血清培养模型、6-OHDA 毁损小鼠颌下腺交感神经末梢实验和免疫抑制作用实验对

收稿日期: 2006-04-21; 接受日期: 2006-05-10

^{*} 国家重点基础研究发展规划(批准号: G1998051107)和国家高科技计划(批准号: 2002AA233051)资助项目

^{**} 联系人, E-mail: lis@nic.bmi.ac.cn

所合成的化合物进行活性评价。

2 结果与讨论

2.1 化合物的设计与合成

图 1(a) 是 FKBP12, FK506, Calcineurin A 和 Calcineurin B 复合物的晶体结构^[3,4], 也是 FK506 发挥免疫抑制作用的关键环节。FK506 与 FKBP12 结合的部分为结合区, 与 Calcineurin B 结合的部分为效应区(图 1(b))。人们研究发现 FK506 具有神经保护和促神经再生的作用^[5-7], 同时也发现 FKBP12 与神经细胞再生过程相关, 并且其在神经系统中的浓度高于其在免疫系统中的浓度^[8], 由此奠定了 FKBP12 作为寻找神经退行性疾病防治药物的重要靶点之一的基础。显然, 由于 FK506 的免疫抑制作用, 此化合物不能作为治疗神经退行性疾病的有效药物; 但进一步研究表明 FK506 的神经营养活性只与其结合区的结构相关^[9-11]。本研究正是以此为基础, 基于 FK506 与 FKBP12 结合的结构特征, 设计出只具有神经营养活性而没有免疫抑制作用的小分子化合物并期望发展出可用于治疗神经退行性疾病的药物。

结构研究的结果表明 FKBP12 三维结构为: 一段短的 α 螺旋, 围绕 5 条反平行 β 带, 后者以右手螺旋形式缠绕于 α 螺旋周围。这 5 个带分别为残基 2~8,

21~30, 35~38 及 46~49, 71~76, 97~106, α 螺旋由残基 57~63 构成。FK506 与 FKBP12 结合时, 主要结合于 α 螺旋与 β 带之间的空腔中, 大约有 50% 的 FK506 分子表面积被埋于空腔中, 约为 $430 \text{ \AA}^2$ (图 2(c))。空腔的入口是由残基 39~46, 50~56, 82~95 围成的环, 这些残基大都含有芳香基团; 空腔的四壁由 Tyr26, Phe46, Phe99, Val55, Ile56 的侧链构成, Trp59 的吲哚环构成空腔的底部, 作为 FK506 被包埋最深的哌啶环的作用平台(图 2(d)); 哌啶环主要通过疏水及电荷相互作用结合于空腔中, 连接于哌啶环上且相互处于反式的酯基和邻二羧基部分则通过氢键和偶极相互作用与 FKBP12 结合(图 2(b), (c))。

基于上述对 FKBP12 与 FK506 结合特点的分析, 采用虚拟筛选的 DOCK 方法, 筛选出如下杂环为目标分子的母核(图 3(a)):

确定了母核后, 从 ACD 库中按分子量小于 300 选取小分子, 用 Project Library 进行虚拟合成, 以 DOCK 筛选(图 3(b)~(d)), 得到虚拟组合库。利用多步合成以及液相平行合成法对目标化合物进行合成。合成方案如下(图 4)。

为了确保目标分子的绝对构型与所设计的一致, 即 C-3 为 *R*-构型且 N-上的取代基与 C-3 上的取代基相互处于 *Trans*-的位置, 选取 *L*-Leucine 作为该合成的起始原料; 同时仔细地选择合成的条件以保证在

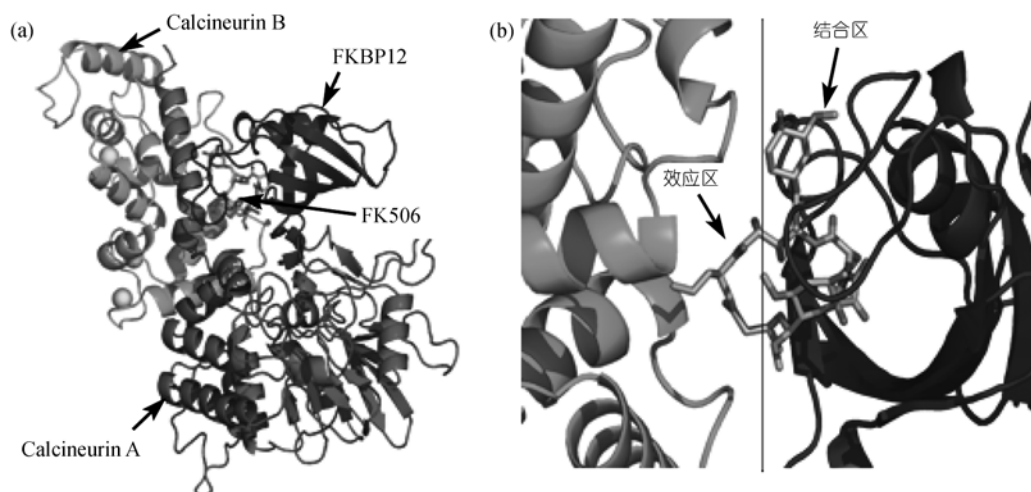


图 1

(a) FKBP12, FK506, Calcineurin A 和 Calcineurin B 复合物的晶体结构; (b) FKBP12, FK506 和 Calcineurin B 局部放大图

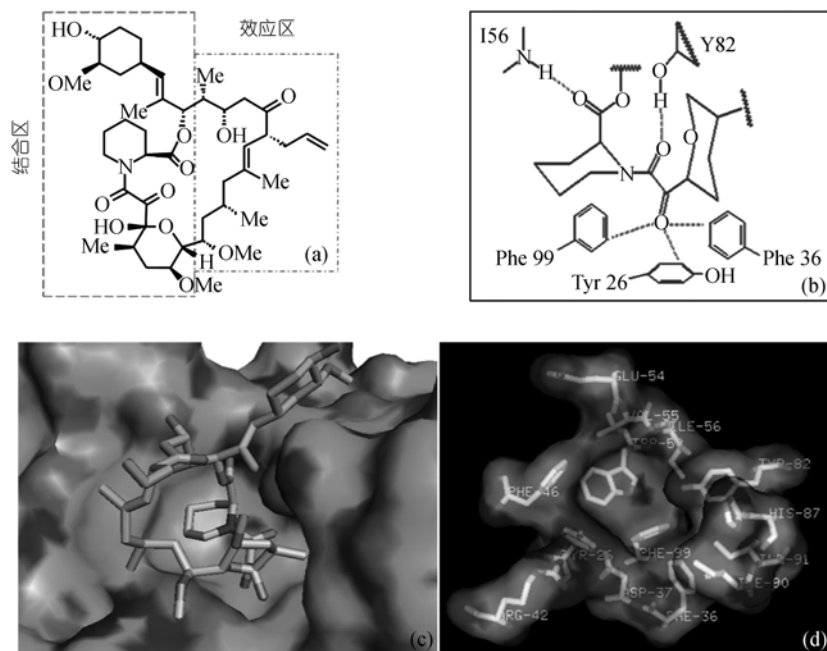


图 2

(a) FK506 的 2D 结构; (b) FK506 与 FKBP12 的关键相互作用; (c) FKBP12(表面图)与 FK506 相互作用局部放大图; (d) FKBP12 与 FK506 结合的活性位点表面图

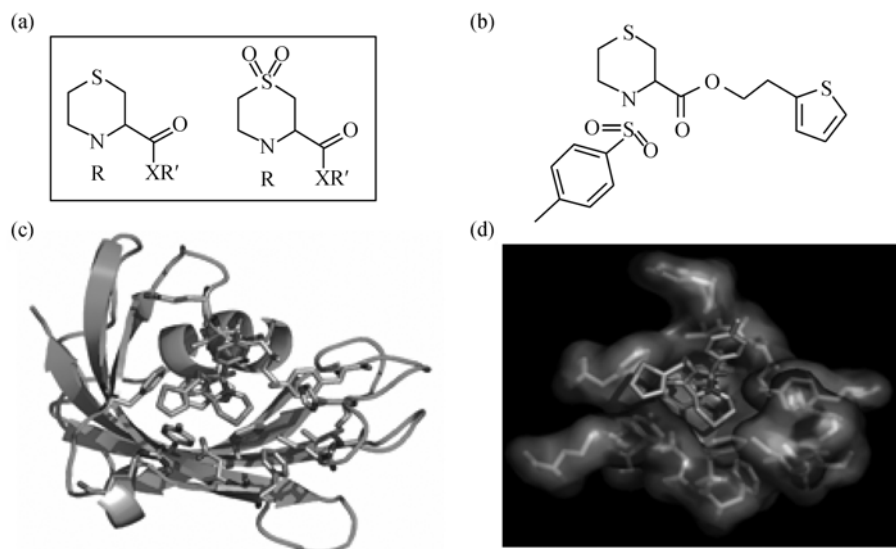


图 3

(a) 新设计的 FKBP12 小分子配体的母核结构; (b) 化合物库分子之一的 2D 结构; (c), (d): (b) 中所示结构的分子与 FKBP12 的 DOCK 结果

合成的过程中不发生外消旋化。X射线单晶衍射的结果^[12]证明了目标物构型的正确性。图 4 中R的结构见

实验部分, 合成的 27 个目标物(表 1)的结构都经MS, NMR, HRMS进行了确证。

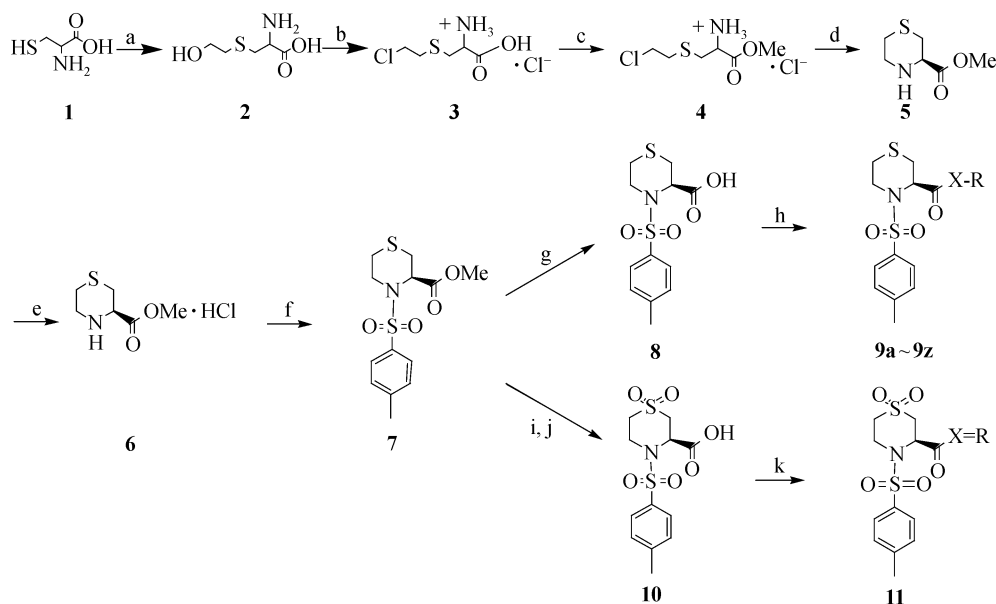


图4 L-1,4-噻嗪-3-羧酸衍生物的合成路线(X=O, NH)

a, C₂H₄O, 0℃; b, HCl(H₂O), 90℃~95℃; c, CH₃OH, 0℃; d, DMF, Et₃N, 90℃~95℃; e, HCl(EtOH), 0℃; f, *p*-toluenesulfonyl chloride, Et₃N, 0℃~5℃; g, i, LiOH(1 mol·L⁻¹), CH₃OH, HCl(1 mol·L⁻¹), pH=2; h, k, *D*(+)-camphorsulfonic acid, 4-dimethylaminopyridine, ROH 或 RNH₂, rt; j, *m*-chloroperoxybenzoic acid, CH₂Cl₂

表1 经由图4所示的合成路线产生的化合物

化合物	分子式	收率/(%) ^{a)}	HRMS ^{b)}	化合物	分子式	收率/(%) ^{a)}	HRMS ^{b)}
9a	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄ S ₂	80.4	449.0525	9o	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₄ S ₂	92.9	420.1179
9b	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄ S ₂	50.4	417.1067	9p	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₄ S ₂	73.6	435.1309
9c	C ₂₁ H ₃₁ NO ₄ S ₂	77.6	425.1754	9q	C ₂₈ H ₃₁ NO ₅ S ₂	38.1	525.1678
9d	C ₂₇ H ₂₉ NO ₄ S ₂	30.3	495.1565	9r	C ₂₇ H ₂₈ FNO ₄ S ₂	76.0	513.3334
9e	C ₂₁ H ₂₅ NO ₅ S ₂	89.7	435.1172	9s	C ₂₅ H ₂₇ NO ₄ S ₃	73.8	501.1100
9f	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄ S ₂	53.0	434.1320	9t	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄ S ₂	64.4	419.1156
9g	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄ S ₂	56.3	462.1608	9u	C ₂₁ H ₂₂ F ₃ NO ₄ S ₂	93.0	473.0860
9h	C ₂₉ H ₃₃ NO ₆ S ₂	90.1	556.1820	9v	C ₂₁ H ₂₂ F ₃ NO ₄ S ₂	45.8	473.0914
9i	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄ S ₃	68.1	411.0671	9w	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₆ S ₂	66.5	436.0759
9j	C ₂₆ H ₂₇ NO ₄ S ₂	83.2	481.1426	9x	C ₂₅ H ₂₅ NO ₄ S ₂	62.1	467.1224
9k	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₅ S ₂	74.3	539.1603	9y	C ₂₀ H ₂₃ NO ₅ S ₂	75.1	421.1080
9l	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅ S ₂	40.8	491.1662	9z	C ₂₂ H ₂₇ NO ₆ S ₂	68.1	465.1254
9m	C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₅ S ₂	90.2	505.1839	11	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₇ S ₂	84.4	473.3462
9n	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S ₂	81.4	443.1673				

a) 指通过分离得到的收率; b) 高分辨质谱

2.2 化合物的活性评价

2.2.1 分子水平的结合试验

应用生物质谱法对这些化合物进行了分子水平的筛选^[13]。结果发现化合物N308(表1中所示的化合物9n)能够与rhFKBP12形成非共价键复合物,其结

合强度虽低于FK506,但通过竞争实验发现其结合位点与FK506的相同。为了进一步了解化合物N308与rhFKBP12形成非共价键复合物的详细情况,通过共结晶的方法使化合物N308与rhFKBP12形成复合物单晶^[12],并对复合物单晶进行结构解析进一步证明了其结合位点与FK506-FKBP12非共价键复合物的

结合位点相同, 这些结果也与 DOCK 筛选的结果(图 5(a)~(e))一致.

2.2.2 PC12 细胞分化实验

PC12 细胞来源于大鼠肾上腺髓质瘤(嗜铬细胞瘤), 由于其能分泌多巴胺和少量的肾上腺素及在 NGF 作用下长出突起形成神经元样细胞, 被广泛用于神经系统疾病的体外研究. 本研究以 PC12 细胞为体外模型, 观察受试化合物是否能促进 NGF(2 ng/mL)诱导的 PC12 细胞分化. 从图 6, 7 中可以看出, 化合物 N308 与阳性对照药 FK506 一样, 具有促进 NGF(2 ng/mL)诱导的 PC12 细胞分化作用, 并有明显的剂量依赖关系.

2.2.3 鸡胚背根神经节(DRG)体外无血清培养模型

应用鸡胚背根神经节体外无血清培养模型对目标化合物的促神经生长作用进行筛选, 结果表明化合物 N308 在所示的浓度下有显著的促鸡胚背根神经

生长作用(见图 8).

2.2.4 6-OHDA 毁损小鼠颌下腺交感神经末梢实验

应用 6-OHDA 毁损小鼠颌下腺交感神经末梢实验筛选目标化合物的神经保护作用, 结果表明化合物 N308 在 5 mg/kg 剂量下, 能增加小鼠颌下腺 NE 释放量, 提示化合物 N308 对 6-OHDA 诱导的小鼠颌下腺交感神经末梢损伤具有保护作用(图 9).

2.2.5 化合物 N308 免疫抑制活性研究

体外试验(*in vitro*)观察了 N308 在 10 和 100 nmol·L⁻¹ 浓度下对 Balb/c 小鼠脾细胞存活和增殖的影响. 实验表明化合物 N308 在 10 和 100 nmol·L⁻¹ 浓度下均对小鼠脾细胞存活无明显影响(图 10(a)), 但可以促进 ConA 诱导的脾细胞增殖反应(图 10(b)); 阳性药物 FK506 在 10 和 100 nmol·L⁻¹ 浓度下对脾细胞增殖具有明显的抑制作用(图 10).

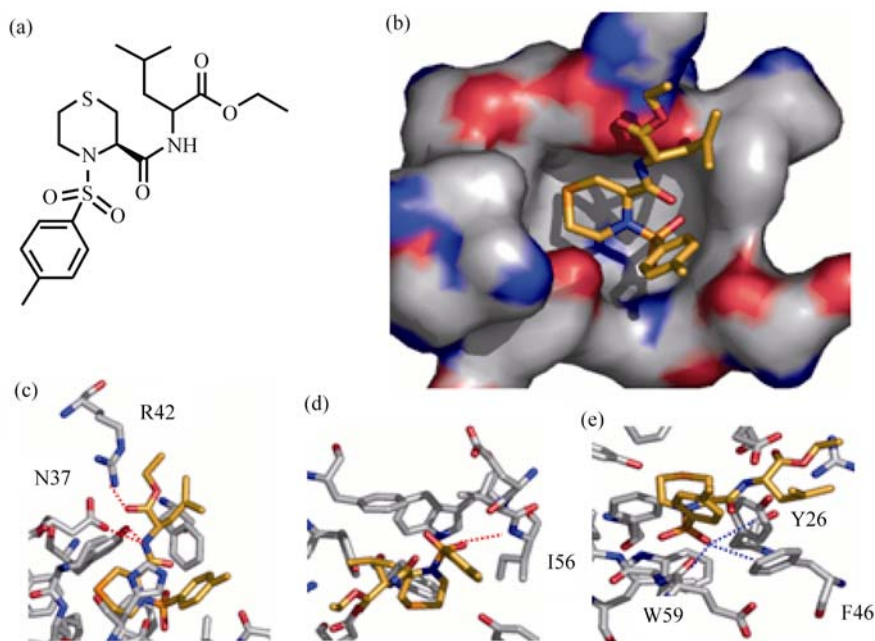


图 5

(a) N308 的 2D 结构; (b) N308 与 FKBP12(活性位点表面图)的 DOCK 结果; (c) N308 酰胺基中的氢原子与 Tyr 26 的羟基氧原子、Asp37 的羧基氧原子之间形成氢键(以红色虚线标出, 以下同); N308 酯基中羰基氧原子与 Arg 42 的胍基之间形成氢键; (d) N308 中磺酰基中的一个氧原子与 Ile56 中酰胺基中的氢原子之间形成氢键; (e) 显示出了 N308 中磺酰基中的另一个氧原子与 Trp 59, Tyr 26 和 Phe 46 中芳香环之间的偶极相互作用(以蓝色虚线标出)

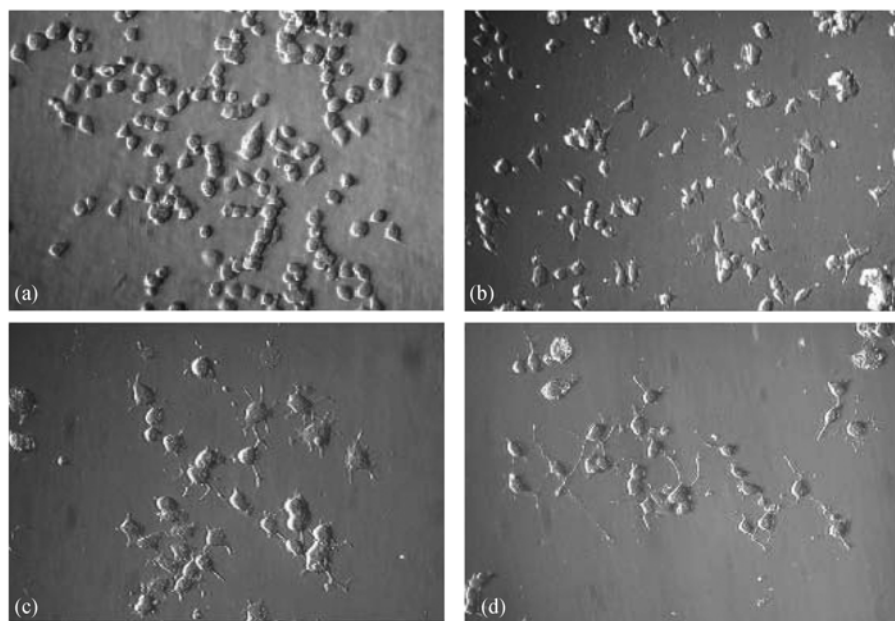


图6 化合物 N308 在浓度为 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下促 PC12 细胞的分化作用
(a) NGF (-); (b) NGF (2 ng/L); (c) NGF (2 ng/L)+FK506($10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$); (d) NGF (2 ng/L)+N308($10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

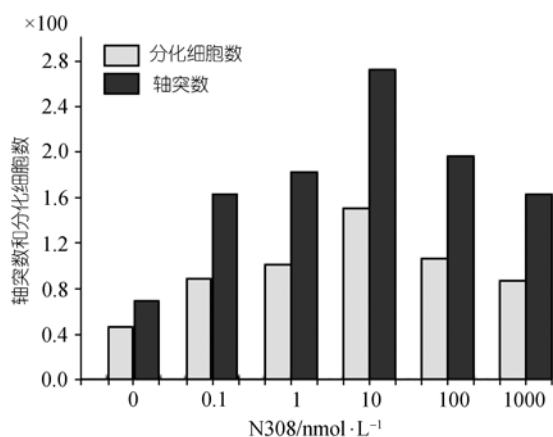


图7 化合物 N308 剂量依赖地促进 NGF(2 ng/mL)诱导的 PC12 细胞分化作用

3 合成实验

2-羟乙基半胱氨酸(2) 36.3 g (0.3 mol) 半胱氨酸溶于 300 mL 水中, 冰水浴冷却, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液(约 24 mL)调节 pH 值至 7, 缓慢滴入 30 mL 环氧乙烷(冷却至 10°C), 搅拌 1 h, 室温继续反应 1.5 h, 反应完毕, 用乙醚萃取三次以除去环氧乙烷,

水层蒸干得浅黄色固体, 用 95%乙醇重结晶, 得白色片状晶体 33.9 g, 收率 69.4%, mp $195^\circ\text{C} \sim 196^\circ\text{C}$ (分解). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 3.96 (dd, 1H, $J_1=4.3 \text{ Hz}$, $J_2=7.8 \text{ Hz}$), 3.81~3.77 (m, 2H), 3.18(dd, 1H, $J_1=4.3 \text{ Hz}$, $J_2=14.8 \text{ Hz}$), 3.08 (dd, 1H, $J_1=7.5 \text{ Hz}$, $J_2=14.8 \text{ Hz}$), 2.80 (t, 2H, $J=6.00 \text{ Hz}$).

2-氯乙基半胱氨酸盐酸盐(3) 在 1000 mL 三颈瓶中加入 33.9 g (0.2 mol) 2-羟乙基半胱氨酸和 800 mL 浓盐酸, 在 $90^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$ 搅拌反应 7 h. 反应完毕, 蒸去水得浅黄色固体, 用异丙醇重结晶, 得白色粉末状固体 34.2 g, 收率 75.4%, mp $185^\circ\text{C} \sim 186^\circ\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 4.30~4.27 (m, 1H), 3.82~3.78 (m, 2H), 3.26(dd, 1H, $J_1=4.4 \text{ Hz}$, $J_2=14.9 \text{ Hz}$), 3.19(dd, 1H, $J_1=7.4 \text{ Hz}$, $J_2=15.1 \text{ Hz}$), 3.04~3.01(m, 2H).

2-氯乙基半胱氨酸甲酯盐酸盐(4) 34.2 g (0.15 mol) 2-氯乙基半胱氨酸盐酸盐溶于 300 mL 无水甲醇(镁处理)中, 冰水浴下, 通入干燥的氯化氢气体直到饱和为止, 再在室温反应 12 h 后, 除去甲醇, 得白色固体 36.3 g(未纯化), 收率 100%, mp $128^\circ\text{C} \sim 129^\circ\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 4.45 (dd, 1H, $J_1=4.5 \text{ Hz}$, $J_2=7.5 \text{ Hz}$), 3.89729 (s, 3H), 3.82~3.78 (m, 2H), 3.34

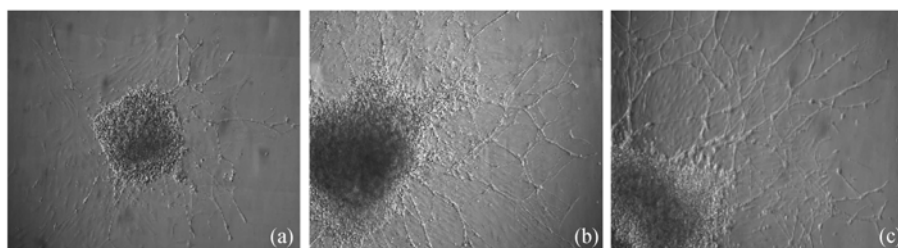


图 8 化合物 N308 促鸡胚背根神经的生长作用
(a) 对照; (b) FK506 ($100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$); (c) N308 ($100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

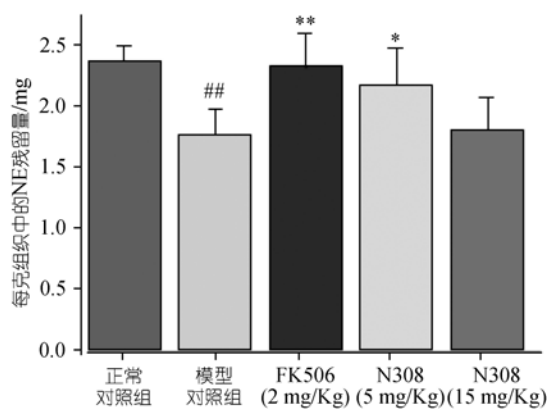


图 9 化合物 N308 对 6-OHDA 诱导的小鼠颌下腺交感神经末梢损伤中 NE 残留量的影响
##, $p < 0.01$ vs 正常对照组; **, $p < 0.01$ vs 模型对照组; *, $p < 0.05$ vs 模型对照组

(dd, 1H, $J_1=4.5 \text{ Hz}$, $J_2=15.0 \text{ Hz}$), 3.20(dd, 1H, $J_1=7.5 \text{ Hz}$, $J_2=15.0 \text{ Hz}$), 3.04~2.99 (m, 2H).

L-1,4-噻嗪-3-羧酸甲酯(5) 36.3 g(0.15 mol) 2-氯乙基半胱氨酸甲酯盐酸盐于 700 mLDMF 中, 搅拌下缓慢滴入 125 mL 三乙氨, 在 $90^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$ 下回流反应 8 h, 过滤除去白色固体, 母液浓缩得棕红色油状物, 用 150 mL 乙酸乙酯溶解, 依次用饱和氯化钠溶液、水洗, 无水硫酸钠干燥, 除去干燥剂, 蒸去乙酸乙酯, 得棕色油状物 10.9 g, 收率 43.6%.

L-1,4-噻嗪-3-羧酸甲酯盐酸盐(6) 10.9 g(0.07 mol) L-1,4-噻嗪-3-羧酸甲酯溶于 150 mL 无水乙醚, 冷却至 0°C , 缓慢滴入 14.5%盐酸乙醇(90 mL) 至 pH 为 2, 产生沉淀, 过滤, 无水乙醚洗涤, 干燥, 得棕黄色固体, 用无水甲醇和无水乙醚重结晶, 得白色固体 13.0 g, 收率 97.2%, mp $160^\circ\text{C} \sim 161^\circ\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (400

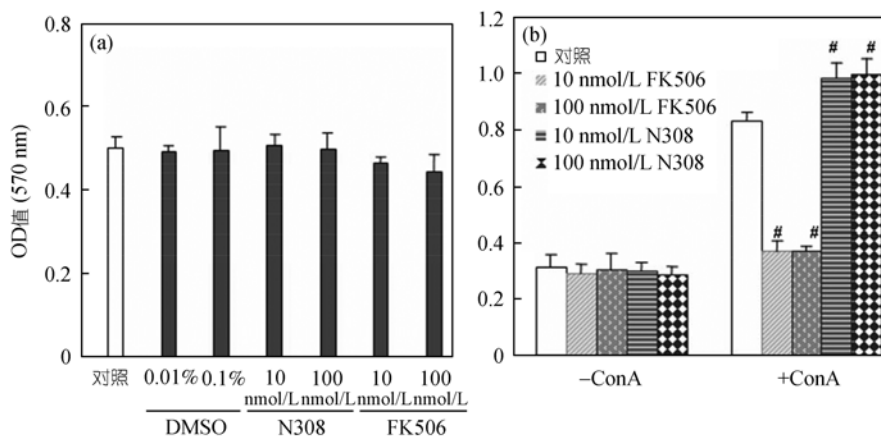


图 10 化合物 N308 对小鼠脾细胞存活(a)和 ConA 诱导的小鼠脾细胞增殖反应(b)的影响(*in vitro*)
(#, $p < 0.05$ vs 对照)

MHz, DMSO- d_6) δ : 10.09(brs, 2H), 4.42 (dd, 1H, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=8.6$ Hz), 3.78 (s, 3H), 3.50~3.48 (m, 1H), 3.22~3.06 (m, 3H), 2.99~2.96(m, 1H), 2.88~2.86 (m, 1H); MS (FAB) m/z : 162.0 (M-35.5) $^+$, 102.0, 74.0.

***L*-4-对甲苯磺酰-1,4-噻嗪-3-羧酸甲酯(7)** 13.0 g(0.065 mol) *L*-1,4-噻嗪-3-羧酸甲酯盐酸盐悬浮于120 mL 二氯甲烷中, 冷却至 0℃, 缓慢滴入 30 mL 三乙氨, 搅拌 1 h 后, 缓慢滴入 120 mL 溶有 13.5 g (0.071 mol) 对甲苯磺酰氯的二氯甲烷溶液, 室温反应 24 h, 过滤除去白色沉淀, 滤液依次用饱和碳酸氢钠溶液、水洗, 无水硫酸钠干燥, 除去干燥剂, 蒸馏出二氯甲烷得白色固体, 用乙酸乙酯和环己烷重结晶, 得白色晶体 19.4 g, 收率 93.5%, mp 87℃~88℃, 比旋光度 $[\alpha]_D^{24.5}=-78.1^\circ$ (c 2.00, CH₂Cl₂). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.67(d, 2H, $J=7.4$ Hz), 7.30(d, 2H, $J=8.0$ Hz), 5.07(t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.05~4.00(m, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.45~3.38 (m, 1H), 3.06~3.02 (m, 1H), 3.00~2.96(m, 1H), 2.82~2.75(m, 1H), 2.43(s, 3H), 2.40~2.37(1H).

***L*-4-对甲苯磺酰-1,4-噻嗪-3-羧酸(8)** 8.3 g (0.026 mol) *L*-4-对甲苯磺酰-1, 4-噻嗪-3-羧酸甲酯溶于 157 mL 甲醇中, 冷却至 0℃, 缓慢滴入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化锂溶液(52.5 mL), 反应 48 h, 乙酸乙酯提取, 冰水浴下, 向水层中加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸(100 mL), 调节 pH 值至 2, 产生白色沉淀, 过滤得白色固体 7.7 g, 收率 97.0%, mp 149℃~150℃. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.88(brs, 1H), 7.68~7.66 (m, 2H), 7.30 (d, 2H, $J=8.02$ Hz), 5.12(t, 1H, $J=3.5$ Hz), 4.04~3.99 (m, 1H), 3.47~3.40 (m, 1H), 3.06~2.96 (m, 2H), 2.80~2.73 (m, 1H), 2.43(s, 3H), 2.38 (s, 1H).

***L*-1,1-二氧化-4-对甲苯磺酰-1,4-噻嗪-3-羧酸甲酯** 11.1 g(0.035 mol) *L*-4-对甲苯磺酰-1, 4-噻嗪-3-羧酸甲酯溶于 70 mL 二氯甲烷, 冷却至 0℃, 缓慢滴入 170 mL 溶有 17.1 g 间氯过氧苯甲酸(含量 70%)的二氯甲烷溶液, 反应完毕后, 过滤除去白色沉淀, 依次以饱和碳酸氢钠溶液和水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 除去干燥剂, 蒸馏去溶剂得白色固体, 乙酸乙酯和环己烷重结晶, 得白色球状晶体 12.2 g, 收率 99.8%, mp 139℃~140℃.

***L*-1,1-二氧化-4-对甲苯磺酰-1,4-噻嗪-3-羧酸(10)**

2.50 g (0.008 mol) *L*-1,1-二氧化-4-对甲苯磺酰-1, 4-噻嗪-3-羧酸甲酯溶于 47 mL 甲醇, 冷至 0℃, 缓慢滴入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化锂溶液(15.8 mL), 搅拌 24 h. 反应完毕, 冰水浴下, 加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸(28.0 mL), 调节 pH 值到 2, 乙酸乙酯萃取三次, 合并有机层, 无水硫酸镁干燥. 除去干燥剂, 蒸馏去乙酸乙酯, 得浅黄色固体, 用乙酸乙酯和环己烷重结晶, 得白色固体 1.5 g, 收率 58.3%, mp 192℃~194℃. MS(EI) m/z : 331.9 (M-1) $^+$, 318.0, 301.0, 272.0, 196.0, 155.1.

目标分子合成的一般方法 A: 向 *L*-4-对甲苯磺酰-1,4-噻嗪-3-羧酸的二氯甲烷溶液中, 分别加入等摩尔量醇、DCC 和 DMAP, 室温反应 24 h. 过滤除去固体, 将收集到的母液旋转蒸发除去溶剂, 残留物以闪色谱柱分离得到产物.

目标分子合成的一般方法 B: 向 *L*-4-对甲苯磺酰-1,4-噻嗪-3-羧酸或 *L*-1,1-二氧化-4-对甲苯磺酰-1,4-噻嗪-3-羧酸的二氯甲烷溶液中, 分别加入等摩尔量的氨基酸酯盐酸盐, DCC, DMAP 和三乙胺, 室温反应 24 h. 过滤除去固体, 将收集到的母液旋转蒸发除去溶剂, 残留物以闪色谱柱分离得到产物.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(N-甲基-N-苄基)-乙酯(9a) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.66~7.64 (m, 2H), 7.35~7.25(m, 7H), 5.07(t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.27~4.24 (m, 2H), 4.0184~3.98 (m, 1H), 3.53~3.43 (m, 3H), 3.03~2.99 (m, 2H), 2.79~2.76 (m, 1H), 2.59 (brs, 2H), 2.41~2.36(m, 4H), 2.23 (s, 3H); MS(EI) m/z : 449.4(M $^+$), 292.9, 255.9, 154.9, 133.8, 90.9, 64.9.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(3-苄基)-烯丙酯(9b) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.67(d, 2H, $J=8.3$ Hz), 7.38~7.24(m, H), 6.59 (d, 1H, $J=15.9$ Hz), 6.15~6.11(m, 1H), 5.11 (t, 1H, $J=3.4\text{Hz}$), 4.77~4.72(m, 1H), 4.68~4.63 (m, 1H), 4.06~4.01 (m, 1H), 3.49~3.42 (m, 1H), 3.11~3.07 (m, 1H), 3.04~2.99 (m, 1H), 2.85~2.78(m, 1H), 2.42~2.37 (m, 4H); MS(EI) m/z : 417.0(M $^+$), 299.9, 255.9, 154.9, 134.0, 117.0, 108.0, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(3-环己基)-丙酯(9c) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.67 (d, 2H, $J=8.3$ Hz), 7.29(d, 2H, $J=8.4$

Hz), 5.05 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.06~3.97 (m, 3H), 3.47~3.40(m, 1H), 3.04~3.01(m, 2H), 2.81~2.80(m, 1H), 2.42~2.37 (m, 4H), 1.72~1.66(m, 5H), 1.55~1.51(m, 2H), 1.23~1.14(m, 6H), 0.87~0.84(m, 2H); MS(EI) m/z : 425.9(M^+), 301.8, 269.9, 255.8, 154.8, 102.9, 90.9, 69.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(1,3-二苯基)-丙酯(9d) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.50 (d, 2H, $J=8.32$ Hz), 7.38~7.06 (m, 12H), 5.72~5.68 (m, 1H), 5.06 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.01~3.98 (m, 1H), 3.48~3.41(m, 1H), 3.10~3.08(m, 2H), 2.86~2.79 (m, 1H), 2.66~2.54 (m, 2H), 2.43~2.39(m, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.23~2.20 (m, 1H), 2.06~2.03 (m, 1H); MS (EI) m/z : 495.8(M^+), 449.8, 391.8, 339.8, 299.7, 255.7, 193.8, 154.8, 138.8, 116.9, 90.8, 64.9.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(3-苯氧基)-丙酯(9e) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.66(d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.28~7.25 (m, 4H), 6.97~6.93 (m, 1H), 6.89~6.86 (m, 2H), 5.06 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.29~4.25(m,2H), 4.00~3.96 (m, 3H), 3.43~3.36 (m, 1H), 3.02~2.95 (m, 2H), 2.80~2.73 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.36~2.32 (m, 1H), 2.07~2.02 (m, 2H); MS(EI) m/z : 435.5(M^+), 342.4, 280.5, 256.4, 227.5, 186.4, 155.3, 139.3, 101.3, 77.2.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-[3-[2-(6-甲基)吡啶]]-丙酯(9f) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.67(d, 2H, $J=8.3$ Hz), 7.47 (t, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.27(d, 2H, $J=8.1$ Hz), 6.95(dd, 2H, $J=7.6$ Hz), 5.04 (t, 1H, $J=3.4$), 4.14~4.06(m, 2H), 4.04~4.00(m, 1H), 3.49~3.45 (m, 1H), 3.01~3.00 (m, 1H), 2.98~2.94 (m, 1H), 2.80~2.73(m, 3H), 2.52(s, 3H), 2.40~2.37(m, 4H), 2.00~1.96 (m, 2H); MS(EI) m/z : 435.1(M^+), 361.1, 280.1, 256.0, 206.1, 155.0, 134.0, 120.0, 107.1, 91.0, 77.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-[N-乙基-N-3-(3-甲基)苯基]-乙酯(9g) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.63 (d, 2H, $J=8.6$ Hz), 7.23(d, 2H, $J=8.7$ Hz), 7.11~7.07 (m, 1H), 6.52~6.48 (m, 3H), 5.02 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.23~4.19 (m, 1H), 4.15~4.11(m, 1H), 4.01~3.97m, 1H), 3.46~3.41(m, 3H), 3.38~3.30 (m, 2H), 2.94(d, 2H, $J=3.7$ Hz), 2.76~2.70 (m, 1H), 2.69 (s, 3H), 2.36~2.34 (m, 1H), 2.02(s, 3H), 1.12(t, 3H, $J=7.00$ Hz); MS(EI) m/z : 462.1(M^+), 447.0, 255.9, 162.1, 148.0,

134.0, 120.0, 101.0, 83.9, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(1,3-二苯甲氧基)-异丙酯(9h) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.64(d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.34~7.27(brs, 10H), 7.18 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 5.19~5.16 (m, 1H), 5.10(t, 1H, $J=3.2$ Hz), 4.53~4.46(m, 4H), 3.95~3.91 (m, 1H), 3.65~3.62(m, 1H), 3.59~3.55(m, 3H), 3.50~3.43 (m, 1H), 3.04~3.02 (m, 1H), 3.00~2.96(m, 1H), 2.81~2.74(m, 1H), 2.37(s, 3H), 2.31~2.28(m, 1H); MS(EI) m/z : 556.0(M^+), 467.7, 448.4, 398.6, 358.5, 293.0, 255.9, 192.3, 154.4, 90.6, 64.7.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(2-噻吩)-乙酯(9i) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.65 (d, 2H, $J=6.6$ Hz), 7.66~7.64(m, 2H), 7.16 (dd, 1H, $J_1=7.3$ Hz, $J_2=0.7$ Hz), 6.93 (dd, 1H, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=5.1$ Hz), 6.82~6.81 (m, 1H), 5.06(t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.33~4.21 (m, 2H), 4.01~3.96 (m, 1H), 3.40~3.33 (m, 1H), 3.08~2.98 (m, 4H), 2.78~2.75 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.37~2.33 (m, 1H); MS(EI) m/z : 411.1(M^+), 256.1, 155.1, 139.1, 110.1, 91.1, 77.1, 65.1.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-[1-苯基-1-(3-甲基)-甲酯(9j)] (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.57~7.55 (m, 2H), 7.36~7.30 (m, 5H), 7.30~7.24 (m, 4H), 7.15 ~7.10 (m, 2H), 6.78(d, 1H, $J=3.0$ Hz), 5.12 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 3.98(d, 1H, $J=13.6$ Hz), 3.45 ~3.43 (m, 1H), 3.14~3.09(m, 1H), 3.05~3.00 (m, 1H), 2.82~2.74 (m, 1H), 2.37~2.36(m, 4H), 2.32~2.31(m, 3H); MS(EI) m/z : 481.5(M^+), 300.4, 256.4, 181.3, 155.3, 139.3, 115.3, 91.2, 65.2.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-L-苯丙氨酸苄酯(9k) (方法 B) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.66~7.63 (m, 2H), 7.38~7.35(m, 4H), 7.30~7.28 (m, 4H), 7.26~7.19 (m, 2H), 7.09~7.07(m, 2H), 6.92 (d, 0.5H, $J=7.1$ Hz), 6.83 (d, 0.5H, $J=7.1$ Hz), 5.23 (d, 0.5H, $J=12.1$ Hz), 5.17(dd, 1H, $J_1=4.8$ Hz, $J_2=12.1$ Hz), 5.07 (d, 0.5H, $J=12.0$ Hz), 4.98~4.96 (m, 0.5H), 4.85~4.83 (m, 0.5H), 4.78~4.71 (m, 1H), 3.96~3.90(m, 1H), 3.30 (dd, 0.5H, $J_1=5.8$ Hz, $J_2=14.0$ Hz), 3.22~3.01 (m, 3H), 2.79~2.72(m, 0.5H), 2.55~2.50 (m, 0.5H), 2.46~2.40(m, 4H), 2.32 (brs, 0.5H), 2.056~1.94 (m, 1H); MS(EI) m/z : 539.1(M^+), 383.0, 283.9, 255.9, 190.0, 154.9, 120.0, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-L-缬氨酸苄酯(9l) (方法B) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.77~7.72 (m, 2H), 7.37~7.33(m, 7H), 7.00(d, 0.5H, $J=9.2$ Hz), 6.91 (d, 0.5H, $J=9.2$ Hz), 5.25~5.21 (m, 1H), 5.17(m, 1H), 4.79(brs, 1H), 4.66 (dd, 0.5H, $J_1=4.4$ Hz, $J_2=9.2$ Hz), 4.60(dd, 0.5H, $J_1=4.6$ Hz, $J_2=8.6$ Hz), 4.22 (d, 0.5H, $J=14.7$ Hz), 4.09 (d, 0.5H, $J=14.8$ Hz), 3.41~3.30(m, 1H), 3.14(d, 1H, $J=12.2$ Hz), 5.30~2.40 (m, 5H), 2.260~2.08 (m, 2H), 0.93 (dd, 3H, $J_1=6.8$ Hz, $J_2=17.5$ Hz), 0.83(dd, 3H, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=6.7$ Hz); MS(EI) m/z : 491.1(M^+), 355.0, 335.0, 255.9, 190.0, 154.9, 138.9, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-L-亮氨酸苄酯(9m) (方法B) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.72 (d, 2H, $J=8.2$ Hz), 7.39~7.34(m, 7H), 6.72 (d, 1H, $J=8.8$ Hz), 5.20 (d, 1H, $J=12.2$ Hz), 5.10(d, 1H, $J=12.2$ Hz), 4.78~4.73 (m, 2H), 4.12(d, 1H, $J=14.8$ Hz), 3.41~3.33 (m, 1H), 3.11(d, 1H, $J=13.6$ Hz), 2.52~2.37 (m, 5H), 2.05 (d, 1H, $J=13.4$ Hz), 1.70~1.45 (m, 3H), 0.92(d, 3H, $J=2.5$ Hz), 0.90 (d, 3H, $J=2.5$ Hz); MS(EI) m/z : 505.4(M^+), 368.8, 348.8, 283.9, 255.9, 190.0, 155.0, 112.0, 90.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-L-亮氨酸乙酯(9n) (方法B) $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.93^\circ$ (0.84, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.77~7.74 (m, 2H), 7.36 (d, 2H, $J=8.0$ Hz), 6.74 (d, 1H, $J=9.2$ Hz), 4.80~4.77 (m, 1H), 4.68~4.59(m, 1H), 4.28~4.16(m, 3H), 3.54~3.29(m, 1H), 3.13 (d, 1H, $J=13.7$), 2.57~2.42 (m, 5H), 2.25~2.21(m, 1H), 1.66~1.53 (m, 3H), 1.31~1.27 (m, 3H), 0.96~0.92(m, 6H); MS(EI) m/z : 443.1(M^+), 397.1, 369.1, 287.1, 256.0, 213.1, 155.0, 139.0, 112.0, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-[3-(3-吡啶基)]-丙酯(9o) (方法A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.47~8.44 (m, 2H), 7.67 (d, 2H, $J=8.2$ Hz), 7.50~7.49(m, 1H), 7.28~7.21 (m, 3H), 5.07 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.12~4.08 (m, 2H), 4.03~3.99(m, 1H), 3.47~3.40 (m, 1H), 3.02~2.96 (m, 2H), 2.81~2.74(m, 1H), 2.67~2.63 (m, 2H), 2.41~2.38 (m, 4H), 1.93~1.88(m, 2H); MS(EI) m/z : 421.8(M^+), 347.3, 265.4, 237.3, 192.3, 155.2, 119.9, 90.9, 64.9.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-[N-甲基-N-(2-吡啶基)]-乙酯(9p) (方法A) $^1\text{H-NMR}$ (400

MHz, CDCl_3) δ : 8.15~8.13 (m, 1H), 7.66~7.63 (m, 2H), 7.48~7.44 (m, 1H), 7.27~7.25 (m, 2H), 6.58(dd, 1H, $J_1=5.1$ Hz, $J_2=6.9$ Hz), 6.49 (d, 1H, $J=8.6$ Hz), 5.01(t, 1H, $J=3.3$ Hz), 4.32~4.22(m, 2H), 3.99~3.95 (m, 1H), 3.90~3.85(m, 1H), 3.78~3.78(m, 1H), 3.43~3.36(m, 1H), 3.03 (s, 3H), 2.91 (d, 2H, $J=3.6$ Hz), 2.78~2.71(m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.34~2.31(m, 1H); MS(EI) m/z : 435.0(M^+), 280.0, 256.0, 154.9, 135.0, 121.0, 107.0, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(1-对甲氧苯基-3-苯基)-丙酯(9q) (方法A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.53(d, 2H, $J=8.3$ Hz), 7.28~7.11(m, 9H), 6.89(d, 2H, $J=6.8$ Hz), 5.69~5.66(m, 1H), 5.03(t, 1H, $J=6.7$ Hz), 4.00~3.97(m, 1H), 3.84(s, 3H), 3.46~3.39(m, 1H), 3.08~3.02 (m, 2H), 2.84~2.78 (m, 1H), 2.64~2.60 (m, 1H), 2.54~2.52(m, 1H), 2.41~2.35 (m, 4H), 2.22~2.19 (m, 1H), 2.03~2.00 (m, 1H); MS(EI) m/z : 525.6(M^+), 392.5, 301.5, 255.6, 224.6, 192.7, 177.7, 155.1, 121.2, 90.8, 64.9.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(1-对氟苯基-3-苯基)-丙酯(9r) (方法A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.68~7.52(m, 2H), 7.26~7.05(m, 11H), 5.69~5.66 (m, 1H), 5.04 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.02~3.97 (m, 1H), 3.46~3.40(m, 1H), 3.08~3.05 (m, 2H), 2.81~2.77(m, 1H), 2.65~2.61 (m, 1H), 2.56~2.53 (m, 1H), 2.42~2.35 (m, 4H), 2.22~2.20 (m, 2H); MS(EI) m/z : 513.6(M^+), 468.5, 392.1, 358.4, 301.7, 255.6, 212.2, 180.8, 154.8, 109.1, 90.9, 64.9.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-[1-(2-噻吩基)-3-苯基]-丙酯(9s) (方法A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.65~7.57 (m, 2H), 7.32~7.14(m, 8H), 7.00~6.99(m, 2H), 6.04~6.00 (m, 1H), 5.04 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.03~3.98 (m, 1H), 3.47~3.40 (m, 1H), 3.08~2.98(m, 2H), 2.81~2.81(m, 1H), 2.60~2.58(m, 2H), 2.41~2.37 (m, 4H), 2.28~2.26(m, 1H), 2.15~2.13 (m, 1H); MS(EI) m/z : 501.0(M^+), 392.0, 346.0, 300.0, 256.0, 201.0, 185.0, 154.9, 138.9, 110.0, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-苯丙酯(9t) (方法A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.67 (d, 2H, $J=8.3$ Hz), 7.31~7.26 (m, 4H), 7.22~7.19(m, 1H), 7.17(m, 2H), 5.06 (t, 1H, $J=3.4$ Hz), 4.11~4.00 (m, 3H), 3.49~3.41 (m, 1H), 3.02~3.00 (m, 2H), 2.84~2.77(m, 1H), 2.63 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 2.42~2.38 (m,

4H), 1.91~1.84 (m, 2H); MS(EI) m/z : 419.5(M^+), 300.5, 255.4, 154.6, 138.7, 116.8, 90.8, 64.9.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(2-三氟甲基)-苯乙酯(9u) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.66~7.63 (m, 3H), 7.51~7.47 (m, 1H), 7.37~7.28 (m, 4H), 5.05(t, 1H, $J=3.4\text{ Hz}$), 4.34~4.21 (m, 2H), 4.03~4.00(m, 1H), 3.42~3.35(m, 1H), 3.07~3.04 (m, 2H), 2.98~2.97 (m, 2H), 2.80~2.73(m, 1H), 2.42(s, 3H), 2.36(d, 1H, $J=13.6\text{ Hz}$); MS(EI) m/z : 472.9(M^+), 399.9, 317.9, 255.8, 172.9, 154.9, 132.9, 117.9, 100.9, 64.9.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-[1-甲基-1-(3-三氟甲基苯基)]-甲酯(9v) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.61~7.55 (m, 3H), 7.52~7.45 (m, 3H), 7.16 (d, 2H, $J=8.0\text{ Hz}$), 5.87(dd, 1H, $J_1=13.2\text{ Hz}$, $J_2=6.6\text{ Hz}$), 5.07 (t, 1H, $J=3.4\text{ Hz}$), 4.04~3.99(m, 1H), 3.45~3.38 (m, 1H), 3.12~3.07 (m, 1H), 3.05~3.01(m, 1H), 2.84~2.71(m, 1H), 2.4092(s, 1H), 2.37(s, 3H), 1.49(d, 3H, $J=6.6\text{ Hz}$); MS(EI) m/z : 473.4(M^+), 318.4, 300.4, 256.4, 173.4, 155.3, 133.3, 91.3, 65.2.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-对硝基苯甲酯(9w) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.19(d, 2H, $J=8.7\text{ Hz}$), 7.65(d, 2H, $J=8.7\text{ Hz}$), 7.46(d, 2H, $J=8.4\text{ Hz}$), 7.25(d, 2H, $J=8.4\text{ Hz}$), 5.26~5.21(m, 2H), 5.17(t, 1H, $J=3.6\text{ Hz}$), 4.05~4.00(m, 1H), 3.47~3.39(m, 1H), 3.11~3.06 (m, 1H), 3.01~2.97(m, 1H), 2.78~2.71(m, 1H), 2.41~2.38(m, 4H); MS(EI) m/z : 437.0(M^+), 281.0, 256.1, 184.0, 154.9, 135.9, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-对苯基苯甲酯(9x) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.61(d, 2H, $J=8.3\text{ Hz}$), 7.43~7.34(m, 6H), 7.30~7.24(m, 3H), 7.17(d, 2H, $J=8.0\text{ Hz}$), 5.09~4.99 (m, 3H), 3.99~3.94(m, 1H), 3.42~3.35(m, 1H), 2.95(d, 2H, $J=3.4\text{ Hz}$), 2.79~2.72 (m, 1H), 2.35~2.32(m, 4H); MS(EI) m/z : 467.0(M^+), 422.0, 312.0, 255.9, 167.0, 115.0, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-邻甲氧基苯甲酯(9y) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.64~7.61 (m, 2H), 7.33~7.29(m, 1H), 7.21~7.18(m, 3H), 6.94~6.92(m, 1H), 6.86 (d, 1H, $J=8.2\text{ Hz}$), 5.18 (d, 1H, $J=24.1\text{ Hz}$), 5.11~5.05 (m, 2H), 4.01~3.96

(m, 1H), 3.80(s, 3H), 3.51~3.44 (m, 1H), 3.09~3.04 (m, 1H), 3.00~2.96(m, 1H), 2.82~2.75(m, 1H), 2.38~2.34 (m, 4H); MS(EI) m/z : 421.0(M^+), 300.0, 255.8, 241.0, 211.0, 154.9, 138.9, 121.0, 91.0, 65.0.

(3R)-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-(2-甲氧基-3-乙氧基)苯甲酯(9z) (方法 A) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.63 (d, 2H, $J=8.3\text{ Hz}$), 7.22 (d, 2H, $J=8.2\text{ Hz}$), 6.83~6.78 (m, 3H), 5.70~5.07(m, 2H), 4.98 (d, 1H, $J=24.0\text{ Hz}$), 4.09(dd, 2H, $J_1=7.0\text{ Hz}$, $J_2=14.0\text{ Hz}$), 4.00~3.96(m, 1H), 3.85(s, 3H), 3.46~3.39 (m, 1H), 3.07~3.03 (m, 1H), 2.97~2.93(m, 1H), 2.78~2.70 (m, 1H), 2.39~2.33 (m, 4H), 1.45 (t, 3H, $J=11.0\text{ Hz}$); MS(EI) m/z : 465.0(M^+), 256.0, 165.0, 137.0, 101.0, 91.0, 65.0.

(3R)-1, 1-二氧化-4-[(4-甲基苯磺酰基)]-1,4-噻嗪-3-羧酸-L-亮氨酸乙酯(11) (方法 B) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (dd, 2H, $J_1=8.3\text{ Hz}$, $J_2=12.4\text{ Hz}$), 7.40 (dd, 2H, $J_1=2.6\text{ Hz}$, $J_2=8.3\text{ Hz}$), 6.68 (d, 0.5H, $J=8.2\text{ Hz}$), 6.57 (d, 0.5H, $J=8.9\text{ Hz}$), 5.07~5.02 (m, 1H), 4.65~4.58 (m, 1H), 4.51~4.38 (m, 1H), 4.23~4.16(m, 2H), 4.06~3.97 (m, 1.5H), 3.80~3.73 (m, 0.5H), 3.01~2.86(m, 3H), 2.47 (s, 3H), 1.64~1.40 (m, 3H), 1.31~1.26(m, 3H), 0.95~0.88 (m, 6H); MS(EI) m/z : 473.3 (M^+), 381.2, 302.2, 254.2, 238.0, 192.1, 180.2, 169.9, 155.2, 90.5.

4 化合物的生物活性评价实验

4.1 结合实验(生物质谱、复合物单晶-X 射线衍射)

方法见参考文献[12]和[13].

4.2 PC12 细胞分化模型

取对数生长期 PC12 细胞, 用含 2 ng/mL NGF, 2%马血清, 1%胎牛血清的 PM1640 培养, 加入终浓度 $10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 待测化合物, 置 37°C , 9.5% CO_2 孵箱中培养 72 h, 显微镜下观察细胞的分化情况, 计数 400 个细胞中分化细胞数及轴突数.

4.3 鸡胚背根神经节(DRG)体外无血清培养模型

八天鸡胚, 解剖镜下取背根神经节, 接种于铺有大鼠尾胶原的培养瓶中, 加入含 0.15 ng/mL NGF 的 DMEM 培养基及不同浓度待评筛化合物. 置 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 倒置显微镜下观察背根

神经节周围突起伸出的程度。

4.4 6-OHDA 毁损小鼠颌下腺交感神经末梢实验

昆明小鼠♀, 体重 18~22 克, 随机分组($n > 10$), 包括正常对照组、模型对照组、阳性药物组 FK506(2 mg/kg)和受试化合物高、低剂量组(15, 5 mg/kg), ip 6-OHDA, 连续4天 sc. 受试化合物, 对照组 sc. 等量溶媒。两周后, 处死小鼠, 取两侧颌下腺称重, 匀浆, 离心取上清, HPLC-电化学检测器中测定 NE 含量。

4.5 免疫抑制作用实验对所合成的化合物进行活性评价

取 100 mL 无菌制备 5×10^6 /mL 含 20% 小牛血清的脾细胞悬液, 与等量 1640 和 ConA 液(终浓度为 5 μ g/mL)加入 96 孔板中, 5%CO₂ 37℃ 孵育 48 h, MMT 法测定增殖反应。

5 结论

通过基于结构的药物设计和虚拟筛选的方法, 得出了理论上有活性的化合物。应用多步合成构建了活性化合物的母核, 并利用液相平行合成的方法合成了这些目标化合物。经由分子水平的筛选、细胞水平的试验以及初步的动物实验, 结果显示化合物 N308 作为一种促神经生长和保护的候选药物具进一步开发的前景。

参 考 文 献

- 1 Maki N, Sekiguchi F, Nishimaki J, Miwa K, Hayano T, Takahashi N, Suzuki M. Complementary DNA encoding the human T-cell FK506-binding protein, a peptidylprolyl cis-trans isomerase distinct from cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(14): 5440—5443 [DOI]
- 2 Sharkey J, Butcher S P. Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischemia. *Nature*, 1994, 371(6495): 336—339 [DOI]
- 3 Kissinger C R, Parge H E, Knighton D R, Lewis C T, Pelletier L A, Tempczyk A, Kallsh V J, Tucker K D, Showalter R E, Moomaw E W, Gastinel L N, Habuka N, Chen X, Maldonado F, Barker J E, Bacquet R, Villafranca J E. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature*, 1995, 378(6557): 641—644 [DOI]
- 4 Griffith J P, Kim J L, Kim E E, Sintchak M D, Thomson J A, Fitzgibbon M J, Fleming M A, Caron P R, Hsiao K, Navia M A. X-Ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, 1995, 82(3): 507—522 [DOI]
- 5 Lyons, W E, George E B, Dawson T M, Steiner J P, Snyder S H. Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC-12 cells and sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(8): 3191—3195 [DOI]
- 6 Gold B G, Storm-Dickerson T, Austin D R. The immunosuppressant FK506 increases functional recovery and nerve regeneration following peripheral nerve injury. *Restor Neurol Neurosci*, 1994, 6(4): 287—296
- 7 Gold B G, Katoh K, Storm-Dickerson T. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci*, 1995, 15(11): 7509—7516
- 8 Steiner J P, Dawson T M, Fotuhi M, Glatt C E, Snowman A M, Cohen N, Snyder S H. High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature*, 1992, 358(6387): 584—587 [DOI]
- 9 Steiner J P, Connolly M A, Valentine H L, Hamilton G S, Dawson T M, Hester L, Snyder S H. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporine A. *Nature Med*, 1997, 3(4): 421—428 [DOI]
- 10 Hamilton G S, Huang W, Connolly M A, Ross D T, Guo H, Valentine H L, Suzdak P D, Steiner J P. FKBP12-binding domain analogues of FK506 are potent, nonimmunosuppressive neurotrophic agents *in vitro* and promote recovery in a mouse model of Parkinson's Disease. *Bioorg Med Chem Lett*, 1997, 7(13): 1785—1790 [DOI]
- 11 Hamilton G S, Steiner J P. Immunophilins: Beyond immunosuppression. *J Med Chem*, 1998, 41(26): 5119—5143 [DOI]
- 12 Li P Y, Wang L W, Ding Y, Wu B L, Shu C L, Nie A H, Li S, Shen B F, Rao Z H. Protein & peptide letters, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of FKBP12 complexed with a novel neurotrophic ligand. 2002, 9(5): 459—463
- 13 王红霞, 张学敏, 杨松成, 肖军海, 聂爱华, 赵丽琴, 李松. 重组人受体蛋白 FKBP12 与新型神经生长促进剂非共价键复合物的电喷雾质谱. *中国科学, C 辑*, 2002, 32(4): 355—360