(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113121443 B
(45)授权公告日 2024.07.09

(21)申请号 202011454931.0

(22)申请日 2020.12.10

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113121443 A

(43)申请公布日 2021.07.16

(30)优先权数据
62/955,683 2019.12.31 US

(73)专利权人 财团法人工业技术研究院
地址 中国台湾新竹县

(72)发明人 傅志伟 刘志鹏 陈翊勋 杜佳穆 洪秋莲

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 秦剑

(51)Int.Cl.
C07D 231/12(2006.01)
C07D 403/12(2006.01)
C07D 231/18(2006.01)
A61K 31/415(2006.01)
A61K 31/4192(2006.01)
A61K 31/655(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 27/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
Registry.1787986-75-7等.《STN》.2015,第2-3页.

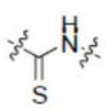
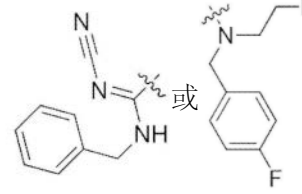
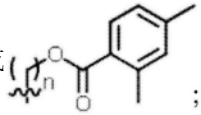
审查员 史博颖

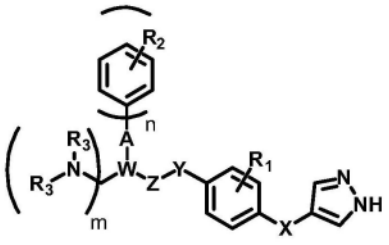
权利要求书18页 说明书47页 附图8页

(54)发明名称

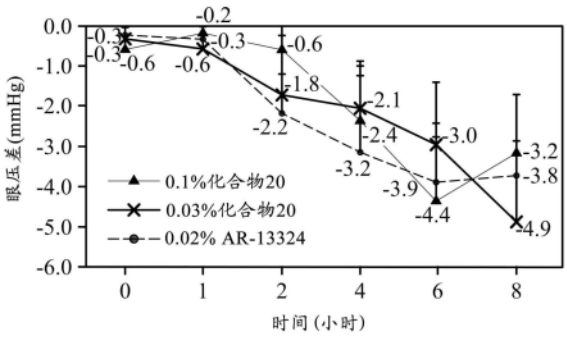
β-氨基酸衍生物、含其之激酶抑制剂与医药组合物以及其用途

(57)摘要

提供一种式(I)所示之化合物或其药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,该式(I)所示之化合物为一β氨基酸衍生物,又于该式(I)中:X为单键或O;Y为NH或C=O;Z为C=O、C=S、NH、、或;W为C或N;A为单键、O、OH、OCH_2、杂环或N_3;R_1为H或F;R_2为H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO或;R_3为H;n为0或1;且m为0或1。

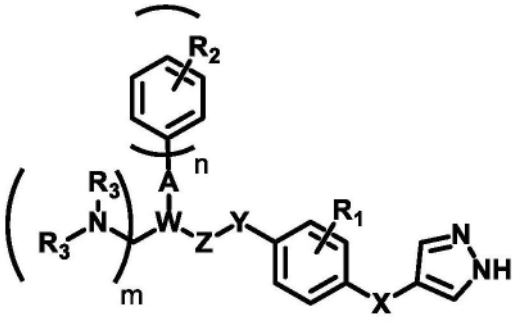


式(I)。

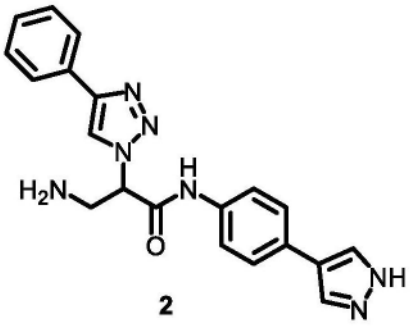


CN 113121443 B

1.一种式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,或其药学上可接受之盐:

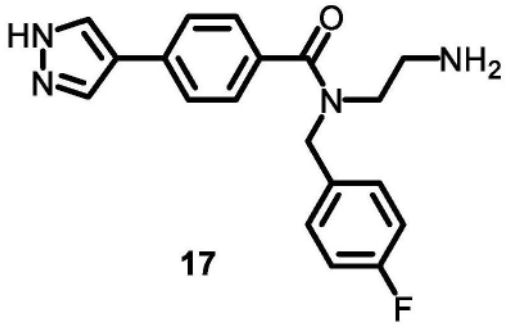


式(I),



2

化合物2;



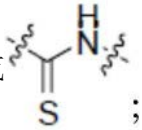
17

化合物17,

其中,该式(I)所示之化合物、化合物2与化合物17为β氨基酸衍生物,又于该式(I)中:

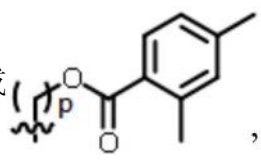
X为单键;

Y为NH;

Z为C=O、C=S或;

W为CH;

R_1为H或F;

R_2为H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO或,其中p为0或1;

R_3为H;

n为0或1;且

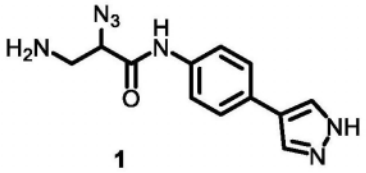
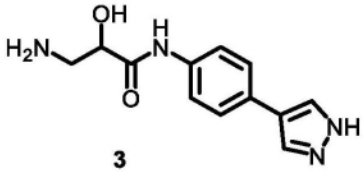
m为1,

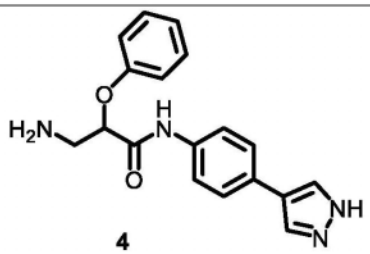
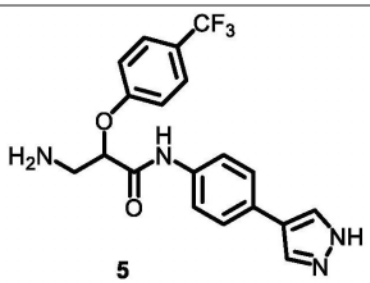
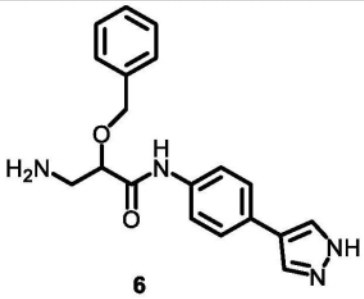
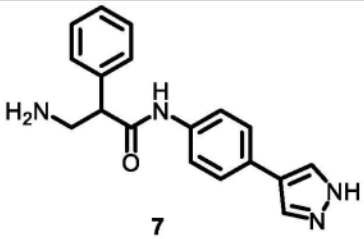
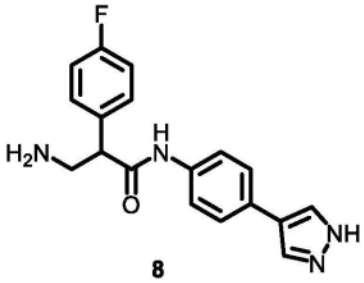
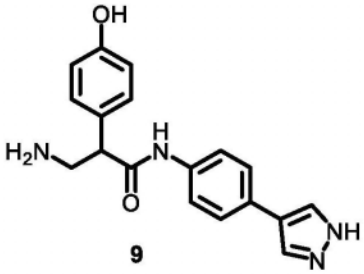
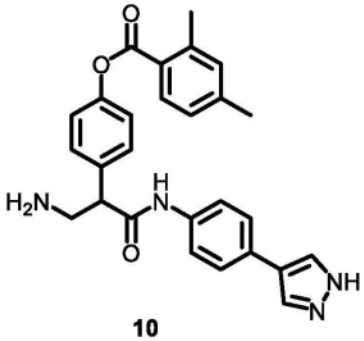
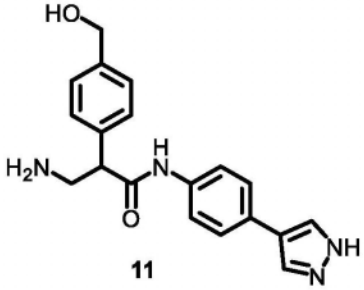
其中

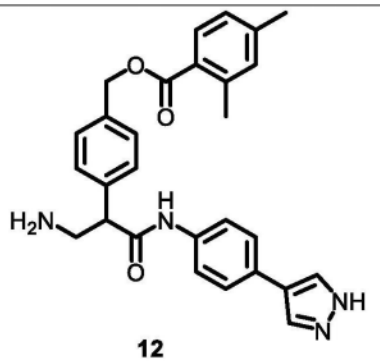
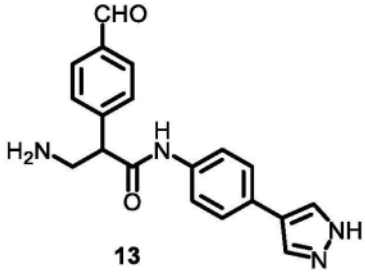
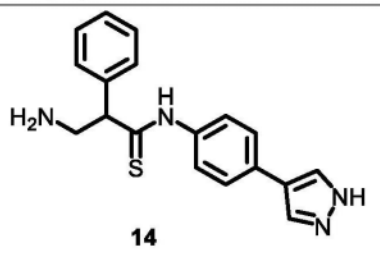
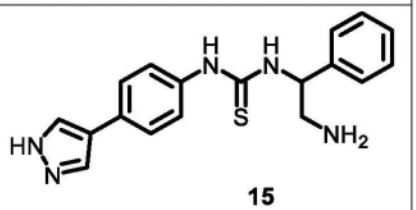
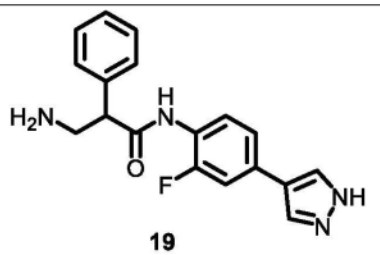
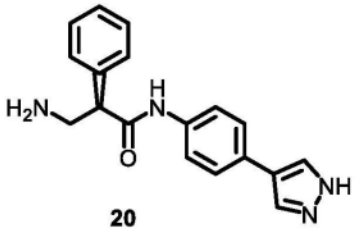
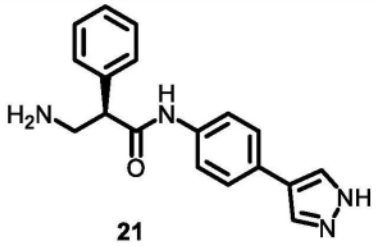
当n为0时,A为OH或N_3,且

当n为1时,A为单键、O或OCH_2。

2.如权利要求1之式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,或其药学上可接受之盐,其中该式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,系以个别光学异构物、个别手性异构物之混合物或消旋化合物之形式存在,且该式(I)所示之化合物择自由以下所示之化合物1、化合物3至化合物15与化合物19至化合物21所组成的群组:

化合物编号	化合物1	化合物3
结构式	 1	 3
化合物编号	化合物4	化合物5

结构式	 4	 5
化合物编号	化合物6	化合物7
结构式	 6	 7
化合物编号	化合物8	化合物9
结构式	 8	 9
化合物编号	化合物10	化合物11
结构式	 10	 11
化合物编号	化合物12	化合物13

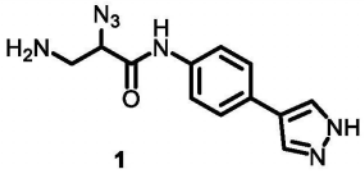
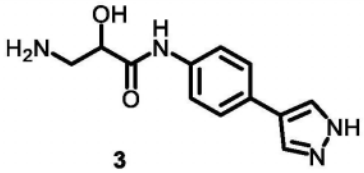
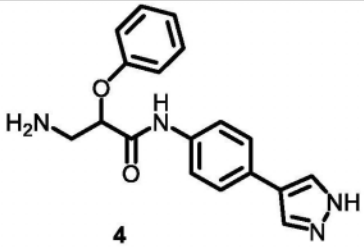
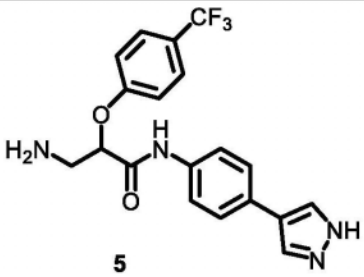
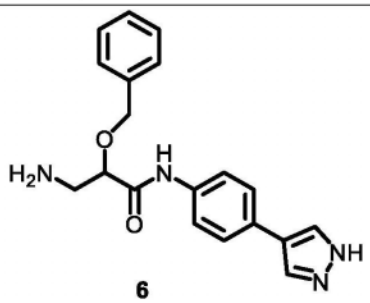
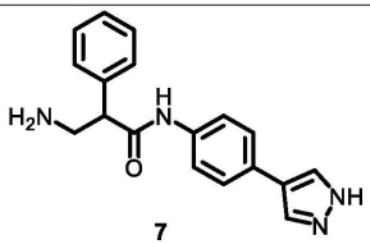
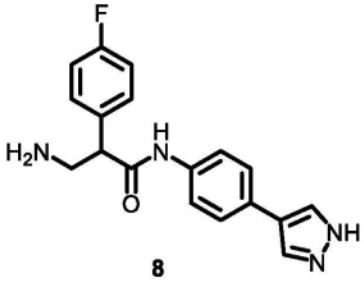
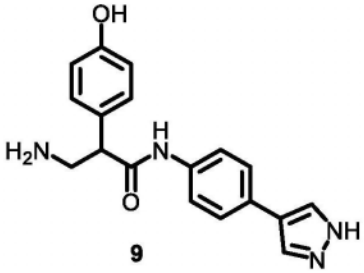
结构式	 12	 13
化合物编号	化合物14	化合物15
结构式	 14	 15
化合物编号	化合物19	化合物20
结构式	 19	 20
化合物编号	化合物21	
结构式	 21	

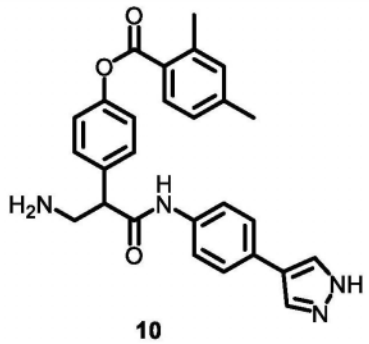
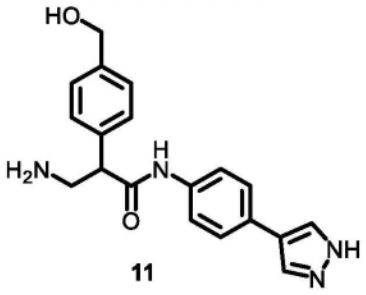
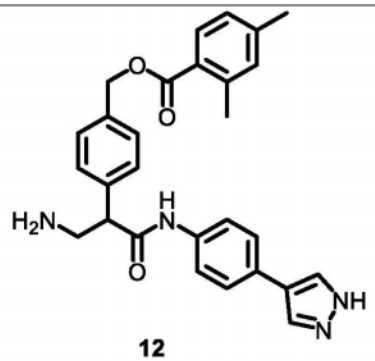
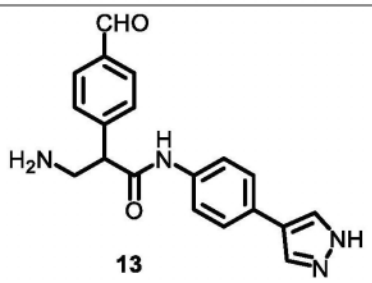
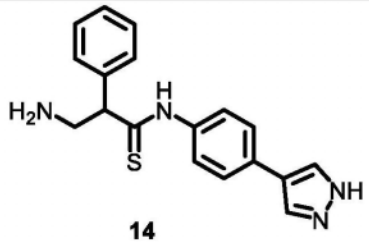
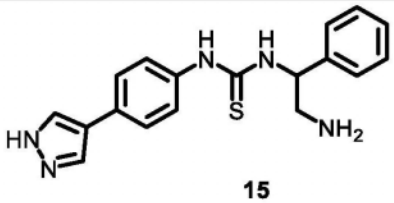
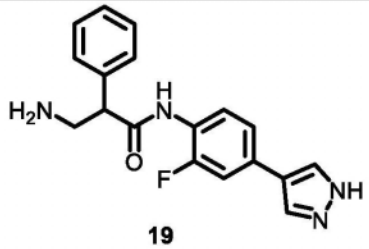
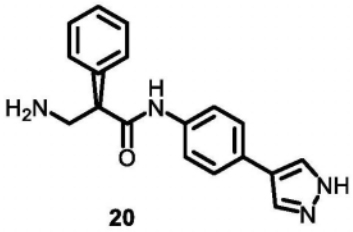
3.如权利要求2之式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,或其药学上可接受之盐,其中该式(I)所示之化合物为该化合物7或该化合物20。

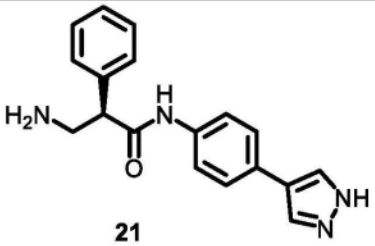
4.一种激酶抑制剂,包括:

如权利要求1之式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,或其药学上可接受之盐。

5.如权利要求4之激酶抑制剂,其中该式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,系以个别光学异构物、个别手性异构物之混合物或消旋化合物之形式存在,且该式(I)所示之化合物包括一化合物,其择自由以下所示之化合物1、化合物3至化合物15与化合物19至化合物21所组成的群组:

化合物编号	化合物1	化合物3
结构式	 1	 3
化合物编号	化合物4	化合物5
结构式	 4	 5
化合物编号	化合物6	化合物7
结构式	 6	 7
化合物编号	化合物8	化合物9
结构式	 8	 9
化合物编号	化合物10	化合物11

结构式	 10	 11
化合物编号	化合物12	化合物13
结构式	 12	 13
化合物编号	化合物14	化合物15
结构式	 14	 15
化合物编号	化合物19	化合物20
结构式	 19	 20
化合物编号	化合物21	

结构式	 21	

6.如权利要求5之激酶抑制剂,其中该式(I)所示之化合物为该化合物7或该化合物20。

7.如权利要求4之激酶抑制剂,其中该式(I)所示之化合物具有抑制肌凝蛋白轻链激

酶-4及/或有丝分裂原活化蛋白激酶-19之能力。

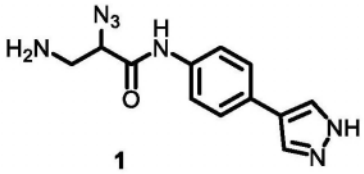
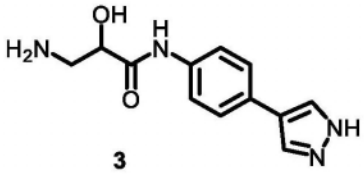
8.如权利要求7之激酶抑制剂,其中该式(I)所示之化合物进一步具有抑制Rho相关的蛋白激酶之能力。

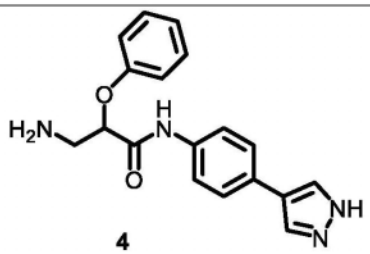
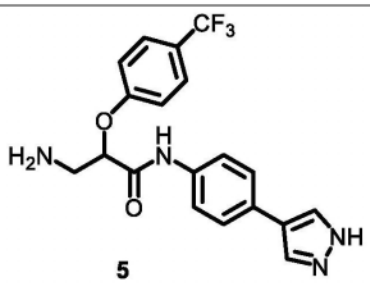
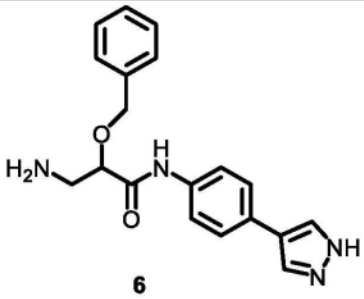
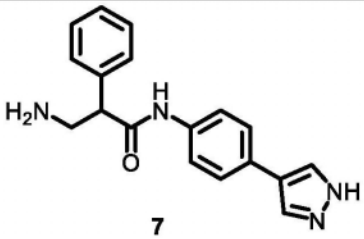
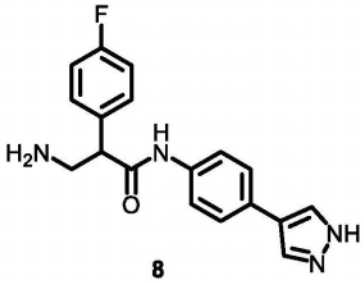
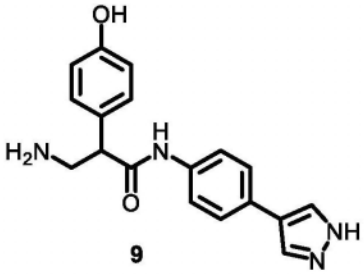
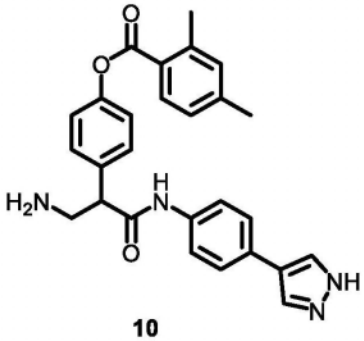
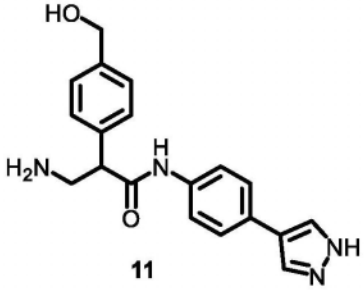
9.如权利要求8之激酶抑制剂,其中该Rho相关的蛋白激酶包括Rho相关的蛋白激酶-1。

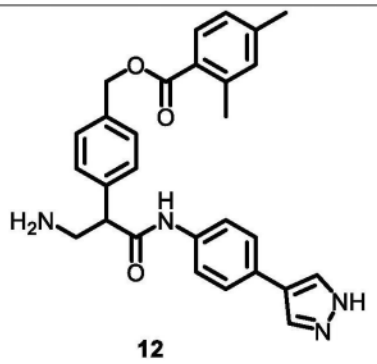
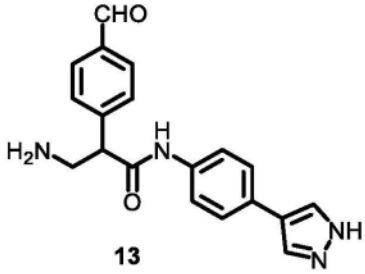
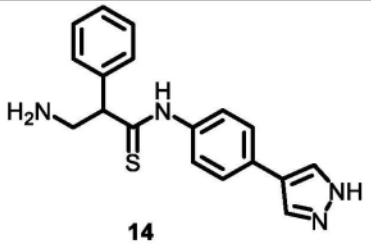
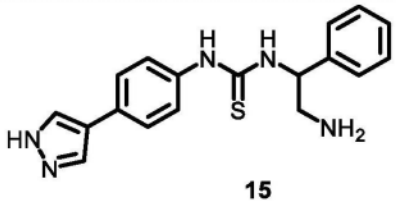
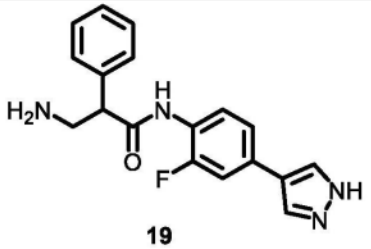
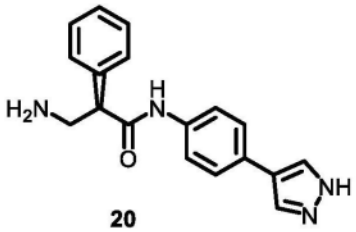
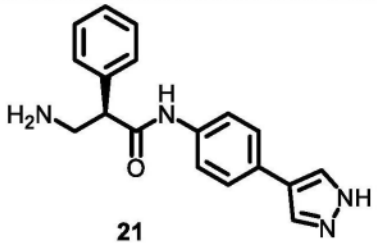
10.一种医药组合物,包括;

有效量之如权利要求1之式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,或其药学上可接受之盐。

11.如权利要求10之医药组合物,其中该式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,系以个别光学异构物、个别手性异构物之混合物或消旋化合物之形式存在,且该式(I)所示之化合物择自由以下所示之化合物1、化合物3至化合物15与化合物19至化合物21所组成的群组:

化合物编号	化合物1	化合物3
结构式	 **1**	 **3**
化合物编号	化合物4	化合物5

结构式	 4	 5
化合物编号	化合物6	化合物7
结构式	 6	 7
化合物编号	化合物8	化合物9
结构式	 8	 9
化合物编号	化合物10	化合物11
结构式	 10	 11
化合物编号	化合物12	化合物13

结构式	 12	 13
化合物编号	化合物14	化合物15
结构式	 14	 15
化合物编号	化合物19	化合物20
结构式	 19	 20
化合物编号	化合物21	
结构式	 21	

12.如权利要求11之医药组合物,其中该式(I)所示之化合物为该化合物7或该化合物20。

13.如权利要求10之医药组合物,更包括药学上可接受之载体或盐类。

14.如权利要求10或11之医药组合物,其中该医药组合物系用于受益于激酶之抑制的体内相关应用,且该激酶系则自由以下所组成之群组的至少一个:

肌凝蛋白轻链激酶-4;

有丝分裂原活化蛋白激酶-19;与

Rho相关的蛋白激酶。

15.如权利要求14之医药组合物,其中该体内相关应用包括眼科相关应用,其中该眼科相关应用包括视神经的保护,及/或高眼压、青光眼、眼中风、黄斑部病变、黄斑部水肿、糖尿病视网膜病变、角膜内皮细胞损伤及/或角膜纤维化的预防及/或治疗。

16.如权利要求10或11之医药组合物,其中该医药组合物系用于降低眼压。

17.如权利要求10或11之医药组合物,其中该医药组合物系用于高眼压症或具有高眼压症之疾病的治疗及/或预防。

18.如权利要求17之医药组合物,其中该高眼压症系为具有25mmHg以上之眼压的高眼压症。

19.如权利要求10或11之医药组合物,其中该医药组合物系用于青光眼的治疗及/或预防。

20.如权利要求19之医药组合物,其中该青光眼包括剥脱性青光眼。

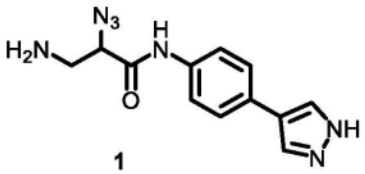
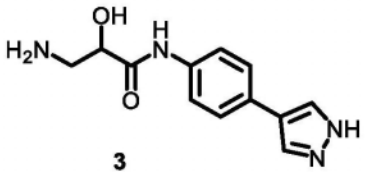
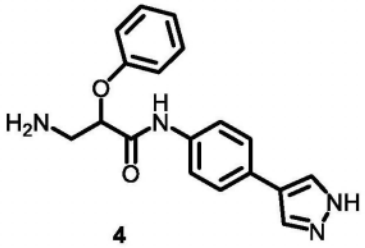
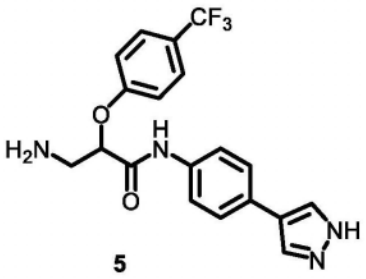
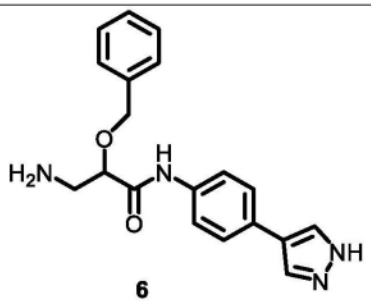
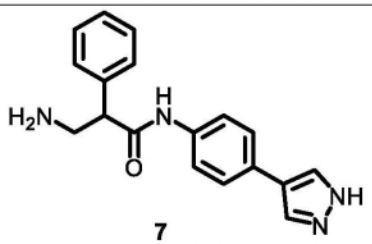
21.如权利要求10或11之医药组合物,其中该医药组合物系被调制成眼用制剂。

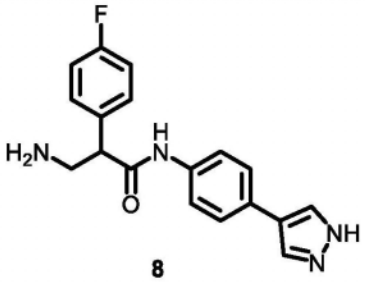
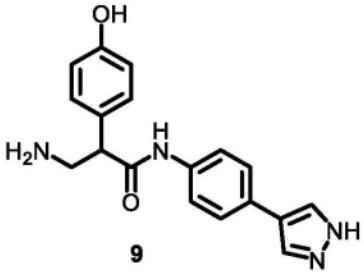
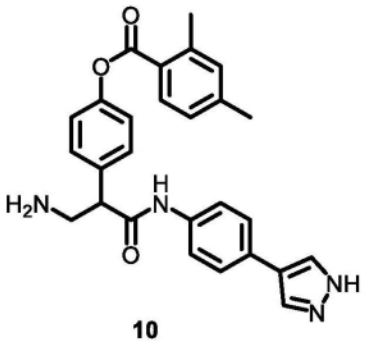
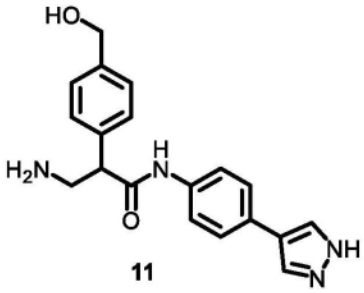
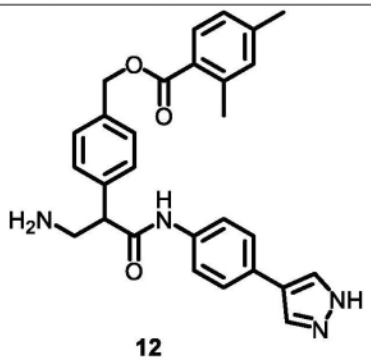
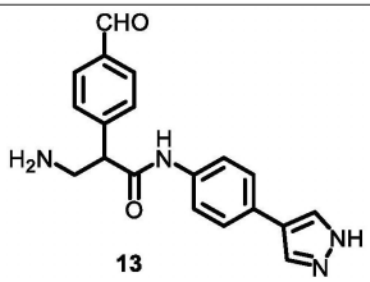
22.如权利要求21之医药组合物,其中该眼用制剂包括眼用滴剂、眼用软膏、眼用凝胶或眼内注射剂。

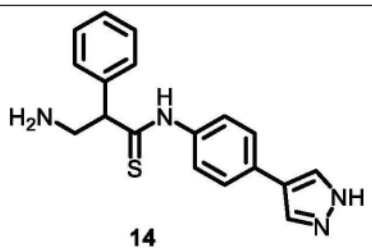
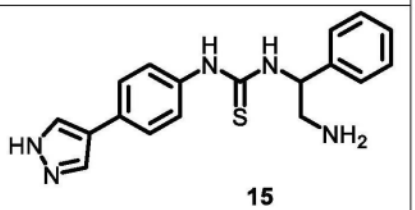
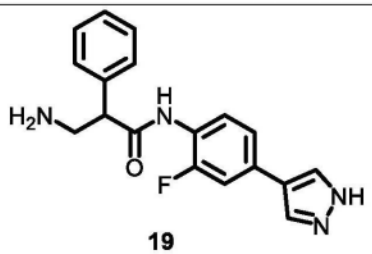
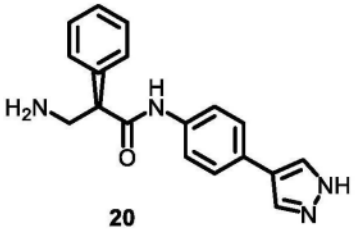
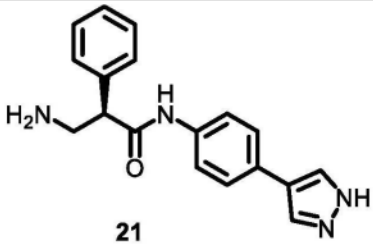
23.一种如权利要求1之式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,或其药学上可接受之盐用于制备激酶抑制剂之用途,

其中该激酶抑制剂为肌凝蛋白轻链激酶-4、有丝分裂原活化蛋白激酶-19及/或Rho相关的蛋白激酶抑制剂。

24.如权利要求23之用途,其中该式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,系以个别光学异构物、个别手性异构物之混合物或消旋化合物之形式存在,且该式(I)所示之化合物择自由以下所示之化合物1、化合物3至化合物15与化合物19至化合物21所组成的群组:

化合物编号		化合物1	化合物3
结构式		 1	 3
化合物编号		化合物4	化合物5
结构式		 4	 5
化合物编号		化合物6	化合物7
结构式		 6	 7
化合物编		化合物8	化合物9

号			
结构式		 8	 9
化合物编号		化合物10	化合物11
结构式		 10	 11
化合物编号		化合物12	化合物13
结构式		 12	 13
化合		化合物14	化合物15

物编号			
结构式		 14	 15
化合物编号		化合物19	化合物20
结构式		 19	 20
化合物编号		化合物21	
结构式		 21	

25.如权利要求24之用途,其中该式(I)所示之化合物为该化合物7或该化合物20。

26.如权利要求23之用途,其中该Rho相关的蛋白激酶包括Rho相关的蛋白激酶-1。

27.一种如权利要求1之式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,或其药学上可接受之盐用于制备药物之用途,其中该药物系用于受益于激酶之抑制的体内相关应用,且该激酶系择自由以下所组成之群组的至少一个:

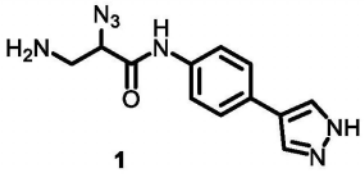
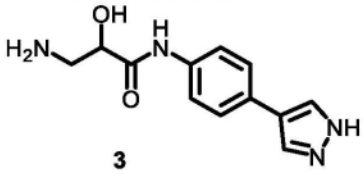
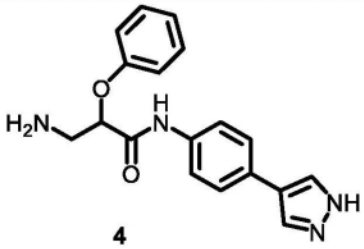
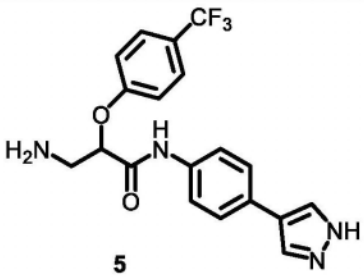
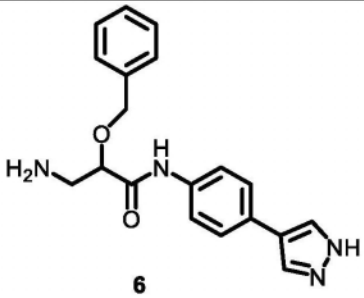
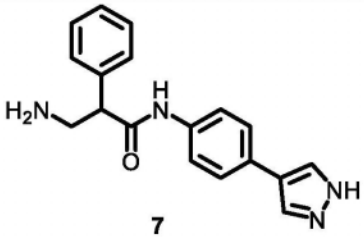
肌凝蛋白轻链激酶-4;

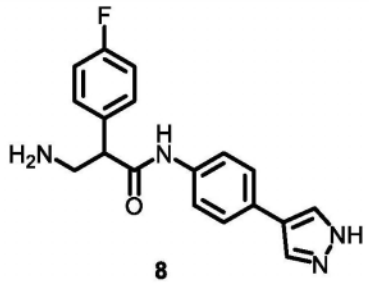
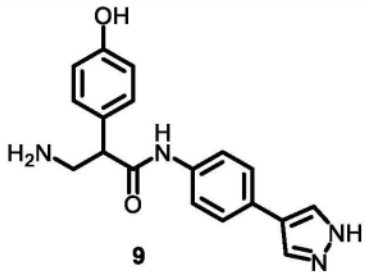
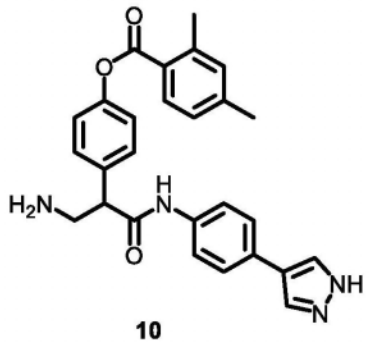
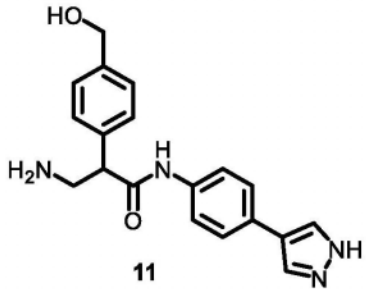
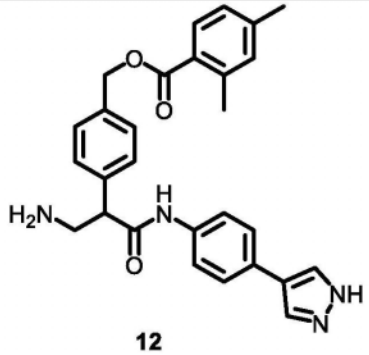
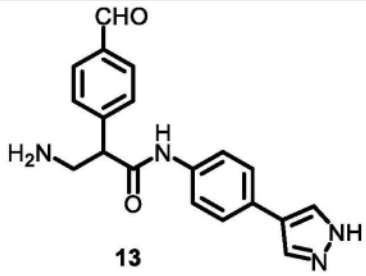
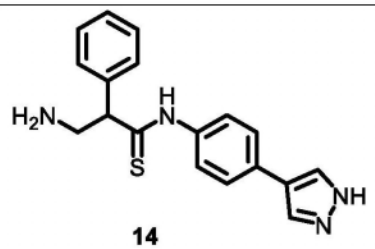
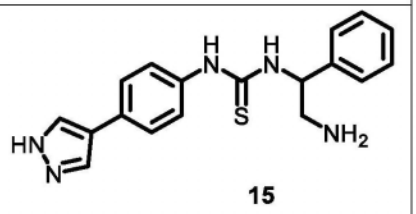
有丝分裂原活化蛋白激酶-19;与

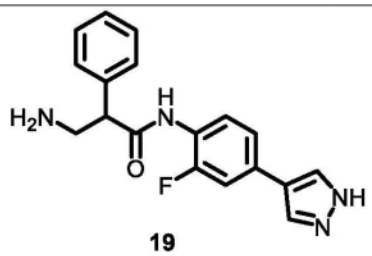
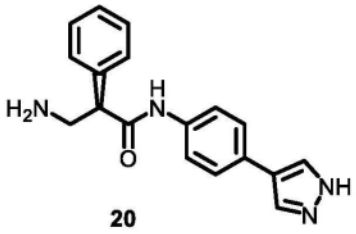
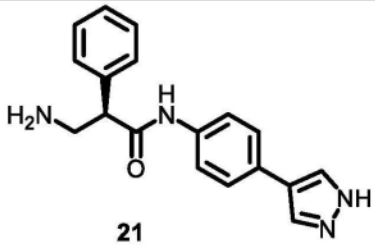
Rho相关的蛋白激酶。

28.如权利要求27之用途,其中该式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,系以个别

光学异构物、个别手性异构物之混合物或消旋化合物之形式存在,且该式(I)所示之化合物择自由以下所示之化合物1、化合物3至化合物15与化合物19至化合物21所组成的群组:

化合物编号	化合物1	化合物3
结构式	 1	 3
化合物编号	化合物4	化合物5
结构式	 4	 5
化合物编号	化合物6	化合物7
结构式	 6	 7
化合物编号	化合物8	化合物9

结构式	 8	 9
化合物编号	化合物10	化合物11
结构式	 10	 11
化合物编号	化合物12	化合物13
结构式	 12	 13
化合物编号	化合物14	化合物15
结构式	 14	 15
化合物编号	化合物19	化合物20

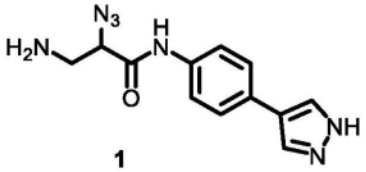
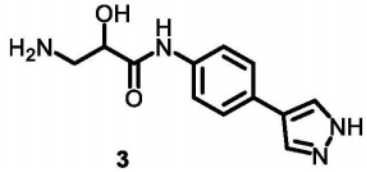
结构式	 19	 20
化合物编号	化合物21	
结构式	 21	

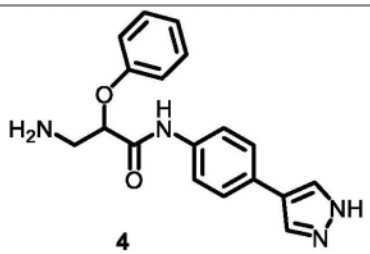
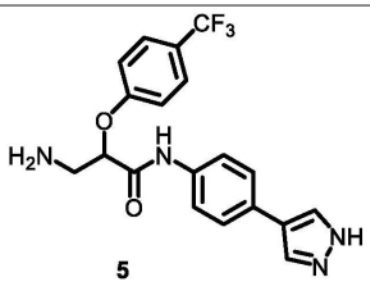
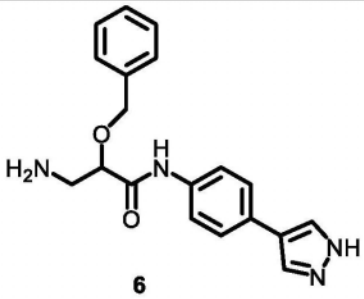
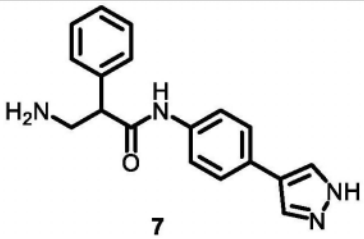
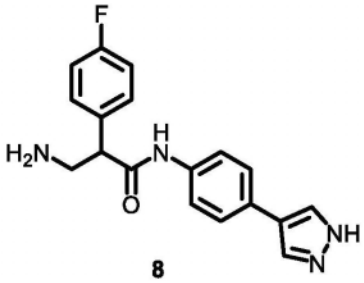
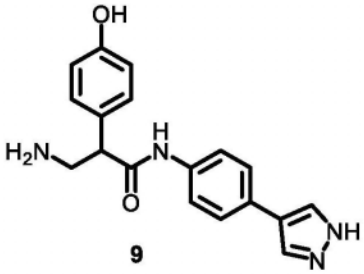
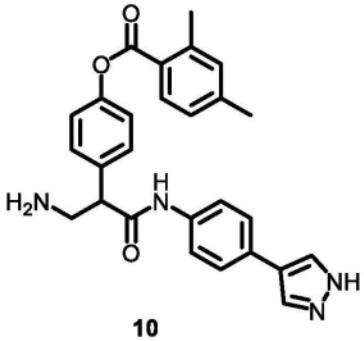
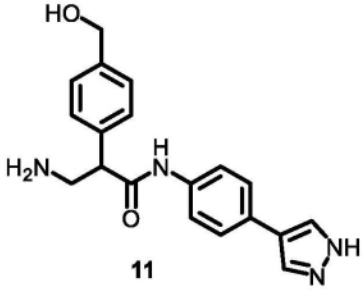
29.如权利要求28之用途,其中该式(I)所示之化合物为该化合物7或该化合物20。

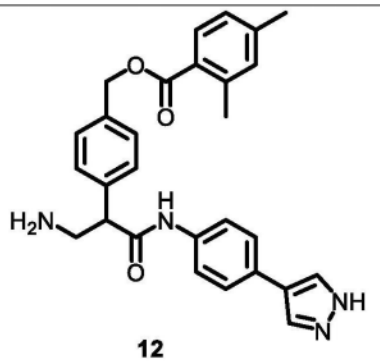
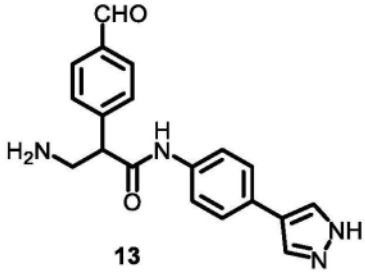
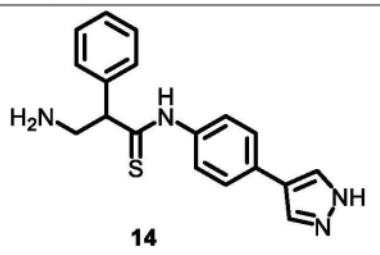
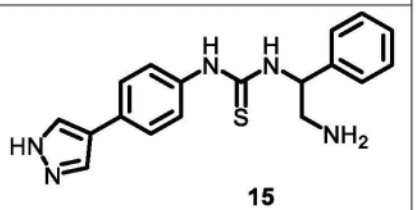
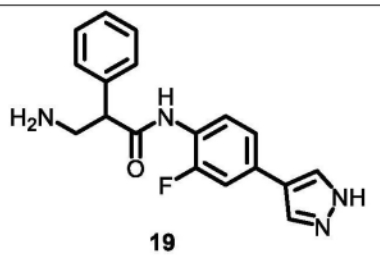
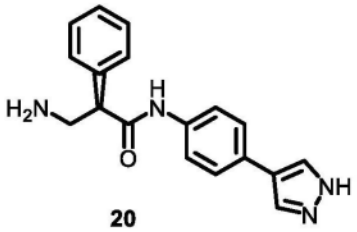
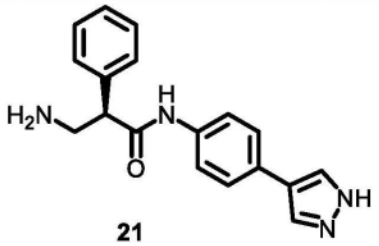
30.如权利要求27或28之用途,其中该体内相关应用包括眼科相关应用,其中该眼科应用包括视神经的保护,及/或高眼压、青光眼、眼中风、黄斑部病变、黄斑部水肿、糖尿病视网膜病变、角膜内皮细胞损伤及/或角膜纤维化的预防及/或治疗。

31.一种如权利要求1之式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,或其药学上可接受之盐之用途,其系用于制备降低眼压之药物。

32.如权利要求31之用途,其中该式(I)所示之化合物、化合物2或化合物17,系以个别光学异构物、个别手性异构物之混合物或消旋化合物之形式存在,且该式(I)所示之化合物择自由以下所示之化合物1、化合物3至化合物15与化合物19至化合物21所组成的群组:

化合物编号	化合物1	化合物3
结构式	 1	 3
化合物编号	化合物4	化合物5

结构式	 4	 5
化合物编号	化合物6	化合物7
结构式	 6	 7
化合物编号	化合物8	化合物9
结构式	 8	 9
化合物编号	化合物10	化合物11
结构式	 10	 11
化合物编号	化合物12	化合物13

结构式	 12	 13
化合物编号	化合物14	化合物15
结构式	 14	 15
化合物编号	化合物19	化合物20
结构式	 19	 20
化合物编号	化合物21	
结构式	 21	

。

33.如权利要求32之用途,其中该式(I)所示之化合物为该化合物7或该化合物20。

34.如权利要求31或32之用途,其中该降低眼压之药物系用于高眼压症或具有高眼压症之疾病的治疗及/或预防。

35.如权利要求34之用途,其中该高眼压症系为具有约21mmHg以上之眼压的高眼压症。

36.如权利要求34之用途,其中该高眼压症系为具有25mmHg以上之眼压的高眼压症。

37.如权利要求31或32之用途,其中该降低眼压之药物为青光眼之治疗药物。

38.如权利要求37之用途,其中该青光眼包括剥脱性青光眼。

39.如权利要求31或32之用途,其中该药物为眼用制剂。

40.如权利要求39之用途,其中该眼用制剂包括眼用滴剂、眼用软膏、眼用凝胶或眼内注射剂。

β-氨基酸衍生物、含其之激酶抑制剂与医药组合物以及其用途

技术领域

[0001] 本揭露系关于一种新颖之化合物,且特别是关于一种新颖之β-氨基酸衍生物、含其之激酶抑制剂与医药组合物以及其用途。

背景技术

[0002] 为了将眼球维持在一定的形状,以保持眼睛光学功能及新陈代谢,睫状体会分泌房水来执行这个工作。当房水排出的通路受阻、蓄积,就会造成眼压的升高,而眼压是青光眼最重要的风险因素。

[0003] 目前已知房水引流主要通过以下三种途径:(1)Schlemm管路径(最主要(conventional pathway));(2)葡萄膜-巩膜路径(少量),约10%-20%;(3)虹膜表面吸收(微量)。而目前常用青光眼药物的降眼压机制为:(a)减少房水生成,如β受体阻滞剂、碳酸酐酶抑制剂、α受体激动剂等;(b)增加房水排出(葡萄膜巩膜途径),如摄护腺素类似物、α受体激动剂等。

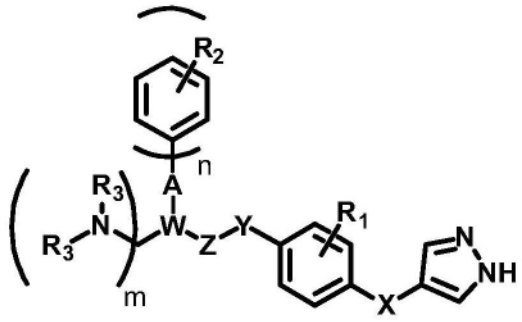
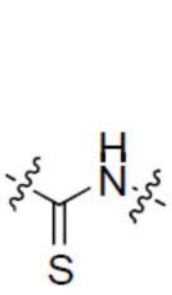
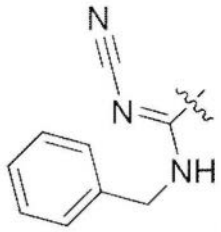
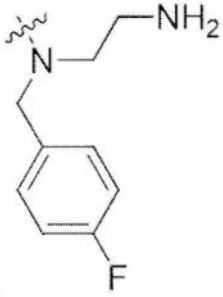
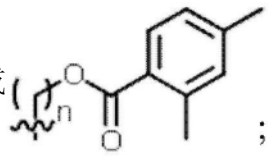
[0004] Rho/ROCK途径在细胞骨架的调节方面扮演重要角色。Rho/ROCK抑制剂可以通过调节小梁网组织中肌动蛋白细胞骨架、细胞外基质以及Schlemm's管内皮细胞的功能,进而达成降低眼压之目的。

[0005] 当前,一些医药公司已开始探索ROCK抑制剂对人体中降眼压的影响,并相继研发新药物。在评估人体临床安全性与有效性后,目前市售ROCK抑制剂之降眼压药物包括Ripasudil(K-115)与Netarsudil(AR-13324)等。在Ripasudil III期临床试验中发现,轻度结膜充血为最常见的不良反应,其发生率高达75%,且结膜炎、点状角膜炎等也有发生。Netarsudil(AR-13324)为ROCK/去甲肾上腺素转运蛋白(norepinephrine transporter,NET)抑制剂化合物,除了作为ROCK抑制剂的作用外,还有抑制去甲肾上腺素的作用,具有持续降眼压的作用,并且局部耐受性好,但其仍有结膜充血反应。此外,Netarsudil(AR-13324)在临床三期试验ROCKET1、ROCKET2(总计1,167位病患)对眼压>25mmHg的青光眼病患之药效不如青光眼常规治疗药物Timolol,在<25mmHg的病患则是药效与Timolol相当。

[0006] 基于目前已知ROCK抑制剂在应用于降低眼压仍存在各种不同的副作用,以及长期使用单一机制药物可能衍生药效降低问题,使得病人无法长期使用单一种药物,因此目前仍亟需开发具有新标靶或多标靶之新颖降眼压药物,以达成有效降低眼压并减少副作用之效果。

发明内容

[0007] 本揭露提供一种式(I)所示之化合物或其药学上可接受之盐或酯(ester)、水合物(hydrate)、溶剂合物(solvate)或结晶物(crystalline form):

[0008]  该式(I)所示之化合物为一β氨基酸衍生物,又于该式(I)中:X为单键或O;Y为NH或C=O;Z为C=O、C=S、NH、、或;W为C或N;A为单键、O、OH、OCH_2、杂环或N_3;R_1为H或F;R_2为H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO或;R_3为H;n为0或1;且m为0或1。

[0009] 本揭露也提供一种激酶抑制剂,包括上述式(I)所示之化合物或其药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物。

[0010] 本揭露还提供一种医药组合物,包括一有效量之上述式(I)所示之化合物或其药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物。

[0011] 又,本揭露提供一种上述式(I)所示之化合物或其药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物作为激酶抑制剂之用途。

[0012] 本揭露也提供一种上述式(I)所示之化合物或其药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物用于制备一药物之用途,其中该药物系用于受益于一激酶之抑制的一体内相关应用,且该激酶系择自由以下所组成之群组的至少一个:Rho相关的蛋白激酶(Rho-associated protein kinase,ROCK)、肌凝蛋白轻链激酶-4(myosin light chain kinase 4,MYLK-4)、与有丝分裂原活化蛋白激酶-19(mitogen-activated protein kinase 19,MAPK19,YSK-4)。

[0013] 此外,本揭露更提供一种上述式(I)所示之化合物或其药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物之用途,其系用于制备降低眼压之药物。

[0014] 为了让本发明之上述和其他目的、特征、和优点能更明显易懂,下文特举较佳实施例,并配合所附图示,作详细说明如下:

附图说明

[0015] 第1A图显示,在正常眼压兔眼中,不同浓度之本揭露之化合物于第1天投药之眼压测定结果。

[0016] 第1B图显示,在正常眼压兔眼中,不同浓度之本揭露之化合物于第3天投药之眼压测定结果。

[0017] 第2图显示,在正常眼压兔眼中,本揭露之化合物与市售药物的降眼压功效。

[0018] 第3A图显示,本揭露之化合物与市售药物之眼刺激评估的分数。

[0019] 第3B图显示,于眼刺激评估中,以本揭露之化合物与市售药物处理之兔眼的照片。

[0020] 第3C图显示,于眼刺激评估中,以本揭露之化合物连续投药7天之兔眼,角膜无呈现混浊受损的照片。

[0021] 第4图显示,在正常眼压兔眼中,本揭露之化合物之药物浓度在标的组织8小时内均达到标靶作用药效IC_{90}以上测试的结果。针对虹膜与睫状体,化合物20之浓度系以单位ng/g进行测定;针对房水,化合物20之浓度系以单位ng/mL进行测定。

[0022] 第5图显示,在正常眼压兔眼中,本揭露之化合物之安全边际(safety margin)测试的结果。

[0023] 第6图显示,在正常眼压猕猴中,本揭露之化合物与市售药物的降眼压功效。

[0024] 第7图显示,在高渗透压食盐水诱导高眼压兔眼中,本揭露之化合物与市售药物的降眼压功效。*:t-test,p-value<0.05(相较于生理食盐水);#:t-test,p-value<0.05(相较于载剂);φ:t-test,p-value<0.05(相较于市售药物(AR-13324))。

[0025] 第8图显示,在磁珠诱导高眼压兔眼中,本揭露之化合物与市售药物的降眼压功效。

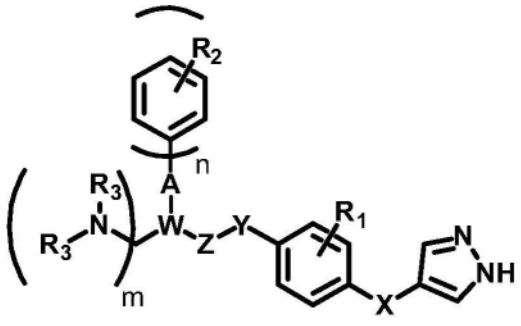
[0026] 第9图显示,在磁珠诱导高眼压兔眼中,肌凝蛋白轻链激酶-4(myosin light chain kinase 4,MYLK-4)之表现。

[0027] 第10图显示,磁珠诱导高眼压兔眼之组织切片的免疫组织化学染色。

实施方式

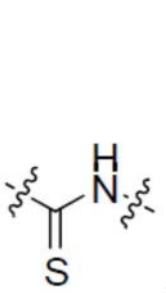
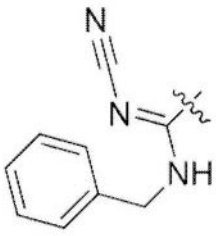
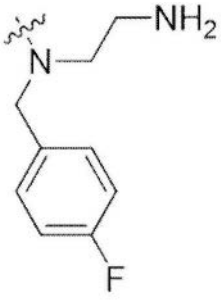
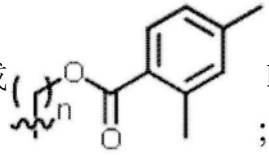
[0028] 本揭露提供一种新颖之β氨基酸衍生物,并同时提供此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物。

[0029] 上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物,可包括以下式(I)所示之化合物,但不限于此:

[0030] 

式(I)。

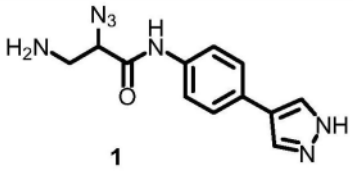
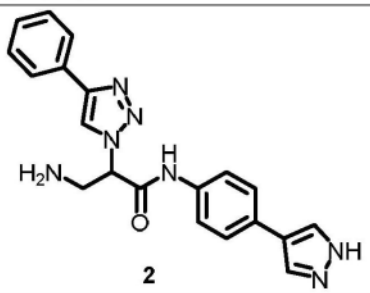
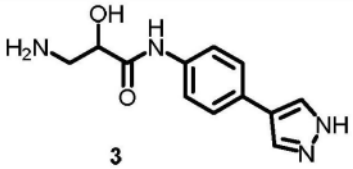
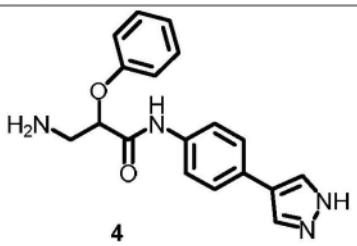
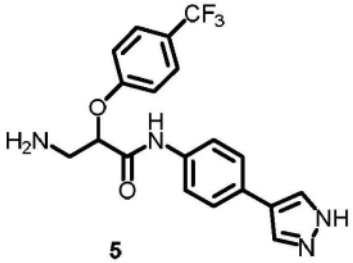
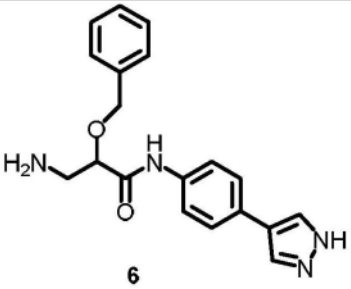
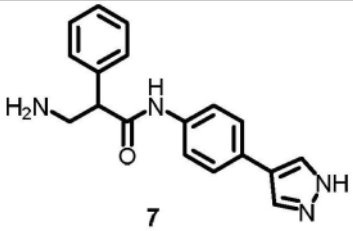
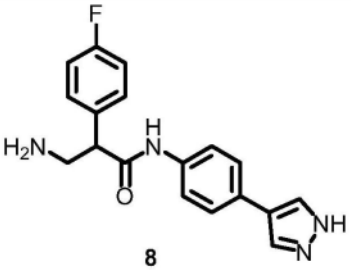
[0031] 于上方所示之式(I)中,X可为单键或O;Y可为NH或C=O;Z可为C=O、C=S、NH、


、或；W可为C或N；A可为单键、O、OH、OCH_2、杂环或N_3；R_1可为H或F；R_2可为H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO或；R_3可为H；n可为0或1；且m可为0或1。

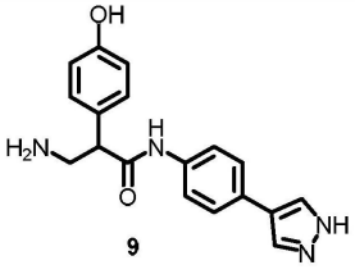
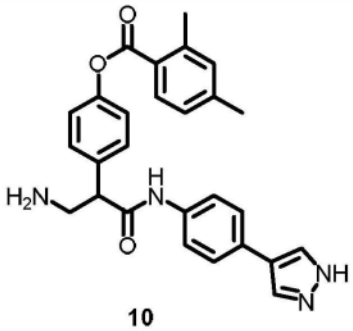
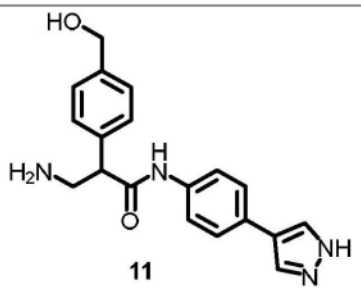
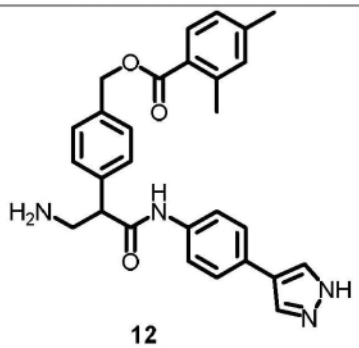
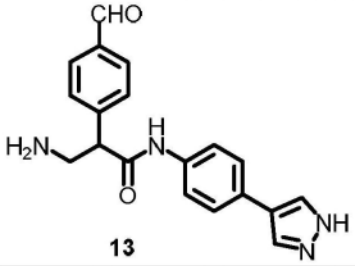
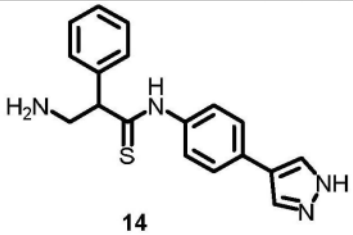
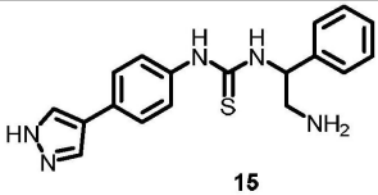
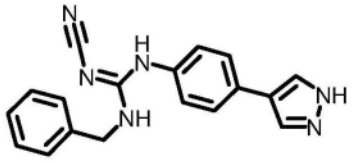
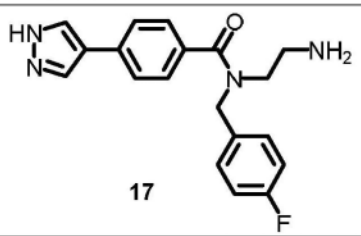
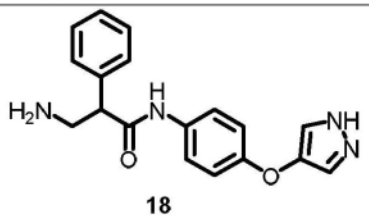
[0032] 于本揭露中，上述式(I)所示之化合物可以个别光学异构物、个别手性异构物之混合物或消旋化合物之形式存在，且可包括，但不限于，下方表1中所示之化合物。

[0033] 表1、式(I)所示之化合物的例子

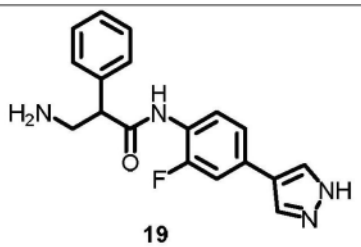
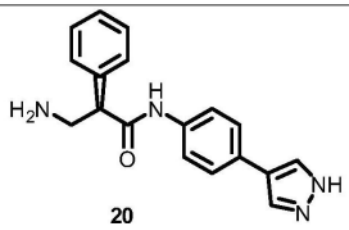
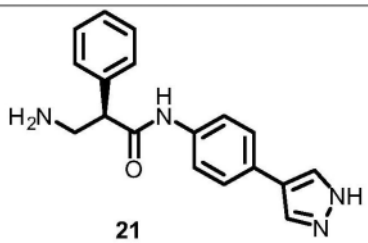
[0034]

化合物编号	化合物1	化合物2
结构式		
化合物编号	化合物3	化合物4
结构式		
化合物编号	化合物5	化合物6
结构式		
化合物编号	化合物7	化合物8
结构式		
化合物编号	化合物9	化合物10

[0035]

结构式	 9	 10
化合物编号	化合物11	化合物12
结构式	 11	 12
化合物编号	化合物13	化合物14
结构式	 13	 14
化合物编号	化合物15	化合物16
结构式	 15	 16
化合物编号	化合物17	化合物18
结构式	 17	 18
化合物编号	化合物19	化合物20

[0036]

结构式	 19	 20
化合物编号	化合物21	
结构式	 21	

[0037] 在一实施例中,本揭露之式(I)所示之化合物可为上述之化合物7,其为一消旋化合物(racemic compound)。在另一实施例中,本揭露之式(I)所示之化合物可为上述之化合物20,其为一S型化合物,进一步言之,为一S型镜像异构物(S-Enantiomer)。

[0038] 在一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有抑制一激酶的功效,但不限于此。上述激酶的例子可包括,但不限于,肌凝蛋白轻链激酶-4(myosin light chain kinase 4,MYLK-4)、有丝分裂原活化蛋白激酶-19(mitogen-activated protein kinase 19,MAPK19,YSK-4)、Rho相关的蛋白激酶(Rho-associated protein kinase,ROCK)或上述之任意组合。Rho相关的蛋白激酶则可包括,但不限于,Rho相关的蛋白激酶-1(Rho-associated protein kinase-1,ROCK-1)。

[0039] 在一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有抑制肌凝蛋白轻链激酶-4的功效。

[0040] 又,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物也可具有加成性标靶抑制作用。因此,在另一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有抑制有丝分裂原活化蛋白激酶-19的功效。

[0041] 又,在另一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有同时抑制肌凝蛋白轻链激酶-4与Rho相关的蛋白激酶的功效。

[0042] 又,在另一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有同时抑制有丝分裂原活化蛋白激酶-19与Rho相关的蛋白激酶的功效。

[0043] 此外,在另一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有同时抑制肌凝蛋白轻链激酶-4、有丝分裂原活化蛋白激酶-19与Rho相关的蛋白激酶的功效。

[0044] 在另一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物

之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有降低眼压之功效。在一特定实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物可经由肌凝蛋白轻链激酶-4、有丝分裂原活化蛋白激酶-19、Rho相关的蛋白激酶或上述之任意组合而达成降低眼压之功效。

[0045] 由于上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有降低眼压之功效,因此其可应用于一高眼压症(ocular hypertension)或一具有高眼压症之疾病的治疗及/或预防。上述高眼压症系指眼压大于正常范围的症状。例如,人类正常眼压为约10-21mmHg,高眼压症为眼压大于约21mmHg的症状,如大于约22mmHg、大于约25mmHg、大于约30mmHg等,但不限于此。

[0046] 在一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可应用于眼压大于约25mmHg,如大于约30mmHg之高眼压症的治疗及/或预防。

[0047] 基于前述,本揭露也提供一种激酶抑制剂,其可包括任何上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,但不限于此。

[0048] 于本揭露之激酶抑制剂中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有抑制一激酶的功效,而于此所述之激酶可包括,但不限于,肌凝蛋白轻链激酶-4、有丝分裂原活化蛋白激酶-19、Rho相关的蛋白激酶或上述之任意组合。Rho相关的蛋白激酶则可包括,但不限于,Rho相关的蛋白激酶-1。

[0049] 于本揭露之激酶抑制剂中,在一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,可具有抑制肌凝蛋白轻链激酶-4及/或有丝分裂原活化蛋白激酶-19之功效。于本揭露之激酶抑制剂中,在另一实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物,除了抑制肌凝蛋白轻链激酶-4及/或有丝分裂原活化蛋白激酶-19之功效外,还可具有抑制Rho相关的蛋白激酶的功效。

[0050] 在一实施例中,本揭露之激酶抑制剂可包括上述化合物7(其为一消旋化合物)或化合物20(其为一S型化合物)。于此特定实施例中,本揭露之激酶抑制剂可具有同时抑制肌凝蛋白轻链激酶-4、有丝分裂原活化蛋白激酶-19与Rho相关的蛋白激酶的功效。

[0051] 此外,基于前述,本揭露也可提供一种任何上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物作为激酶抑制剂之用途。

[0052] 而于本揭露之此用途中,关于上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物的激酶抑制功效相关说明同前方所述,因此不于此赘述。

[0053] 于本揭露之此用途中,在一特定实施例中,上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物,可为上述化合物7(其为一消旋化合物)或化合物20(其为一S型化合物)。于此特定实施例中,前述激酶抑制剂可具有同时抑制肌凝蛋白轻链激酶-4、有丝分裂原活化蛋白激酶-19与Rho相关的蛋白激酶的功效。

[0054] 此外,本揭露还提供一种医药组合物,其可包括,但不限于,任何上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物。

[0055] 而于本揭露之医药组合物中,关于上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物的所有相关叙述同前方所述,因此不于此赘述。

[0056] 在一实施例中,本揭露之医药组合物可包括上述化合物7,其为一消旋化合物。在另一实施例中,本揭露之医药组合物可包括上述化合物20,其为一S型化合物。

[0057] 又,在一实施例中,上述本揭露之医药组合物,还可包括一药学上可接受之载体或盐类,但不限于此。

[0058] 上述药学上可接受之载体可包括,但不限于溶剂、分散媒(dispersion medium)、套膜(coating)、抗菌与抗真菌试剂与一等渗透压与吸收延迟(absorption delaying)试剂等与药学投予相容者。对于不同的给药方式,可利用一般方法将药学组合物配制成剂型(dosage form)。

[0059] 又,上述药学上可接受之盐类可包括,但不限于盐类包括无机阳离子,例如,碱金属盐类,如钠、钾或胺盐,碱土金族盐类,如镁、钙盐,含二价或四价阳离子之盐类,如锌、铝或锆盐。此外,也可是为有机盐类,如二环己胺盐类、甲基-D-葡糖胺,氨基酸盐类,如精胺酸、离胺酸、组织胺酸、麸胺酸酰胺。

[0060] 再者,本揭露之医药组合物可被投予至一需要此医药组合物之一个体,但不限于此。而本揭露之医药组合物的给药途径可包括非口服、口服、经由吸入喷雾(inhalation spray)或藉由植入贮存器(implanted reservoir)的方式,但不限于此。非口服可包括,但不限于,涂擦患部、皮下(subcutaneous)、皮内(intracutaneous)、静脉内(intravenous)、肌肉内(intramuscular)、关节内(intraarticular)动脉(intraarterial)、滑囊(腔)内(intrasynovial)、胸骨内(intrasternal)、蜘蛛膜下腔(intrathecal)、疾病部位内(intralesional)注射、眼部外用(external ophthalmic use)、眼内注射(intraocular)以及灌注技术等。

[0061] 而涂擦之局部使用的形式可包括软膏、乳剂、液剂、凝胶等,但不限于此。又,眼部外用之使用的形式可包括,但不限于,眼用滴剂、眼用软膏、眼用凝胶等。

[0062] 此外,上述需要被投予此医药组合物之个体可包括,但不限于,一脊椎动物。又,上述脊椎动物可包括鱼类、两栖类、爬虫类、鸟类或哺乳类,但不限于此。哺乳类的例子可包括,但不限于,人类、猩猩、猴子、马、驴、狗、猫、兔子、天竺鼠、大鼠与小鼠。在一实施例中,上述个体可为人类。

[0063] 在一实施例中,上述本揭露之医药组合物可用于受益于任一激酶抑制任一体内(in vivo)相关应用,例如受益于任一激酶之抑制任一疾病或病征的治疗及/或预防,而于此所述之激酶的例子,可包括,但不限于,肌凝蛋白轻链激酶-4、有丝分裂原活化蛋白激酶-19、Rho相关的蛋白激酶或上述之任意组合。

[0064] 又,上述体内相关应用可包括,但不限于,一眼科相关应用及/或肺部相关应用等。眼科相关应用的例子可包括,视神经的保护,及/或高眼压、青光眼、眼中风、黄斑部病变、黄斑部水肿、糖尿病视网膜病变、角膜内皮细胞损伤、角膜纤维化或上述之任意组合的预防

及/或治疗等,但不限于此。其中青光眼可包括剥脱性青光眼(exfoliation glaucoma,XFG)、隅角开放性青光眼(open angle glaucoma)、隅角闭锁性青光眼(angle-closure glaucoma)、继发型青光眼(secondary glaucoma)、先天型青光眼(congenital glaucoma)等,但不限于此。又,上述肺部相关应用的例子可包括,但不限于,肺动脉高压、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)、病因不明性肺纤维化、肺气肿、肺癌或上述之任意组合等的预防及/或治疗。

[0065] 此外,本揭露之医药组合物可被调制成一医药制剂,但不限于此。在一实施例中,本揭露之医药组合物可被调制成一眼用制剂,但不限于此。上述眼用制剂的例子可包括,但不限于,眼用滴剂、眼用软膏、眼用凝胶、眼内注射剂等。在一特定实施例中,本揭露之医药组合物可被调制成一眼用滴剂。

[0066] 此外,本揭露也可提供一种任何上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物用于制备一药物之用途,其中上述药物系用于受益于一激酶之抑制的一体内相关应用。上方所述激酶的例子可包括,但不限于,肌凝蛋白轻链激酶-4、有丝分裂原活化蛋白激酶-19、Rho相关的蛋白激酶或上述之任意组合。

[0067] 在一实施例中,于本揭露之上述用途中,所采用为化合物7,其为一消旋化合物。在一实施例中,于本揭露之上述用途中,所采用为化合物20,其为一S型化合物。

[0068] 又于本揭露之上述用途中,上述体内相关应用可包括,但不限于,一眼科相关应用及/或肺部相关应用等。眼科相关应用的例子可包括,视神经的保护,及/或高眼压、青光眼、眼中风、黄斑部病变、黄斑部水肿、糖尿病视网膜病变、角膜内皮细胞损伤、角膜纤维化或上述之任意组合的预防及/或治疗等,但不限于此。其中青光眼可包括剥脱性青光眼、隅角开放性青光眼、隅角闭锁性青光眼、继发型青光眼、先天型青光眼等,但不限于此。又,上述肺部相关应用的例子可包括,但不限于,肺动脉高压、慢性阻塞性肺病、病因不明性肺纤维化、肺气肿、肺癌或上述之任意组合等的预防及/或治疗。

[0069] 在一实施例中,于本揭露之上述用途中,上方所述之体内相关应用可为青光眼的预防及/或治疗。

[0070] 于本揭露之上述用途中,在另一实施例中,一药学上可接受之载体或盐类,可与任何上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物一起制备上述药物。

[0071] 关于所述之药学上可接受之载体或盐类,可参见前方本揭露之医药组合物中之药学上可接受之载体或盐类的相关说明,因此不于此赘述。

[0072] 另外,本揭露也提供一种任何上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物用于制备降低眼压的药物的用途。

[0073] 在一实施例中,于本揭露之上述用途中,所采用为化合物7,其为一消旋化合物。在一实施例中,于本揭露之上述用途中,所采用为化合物20,其为一S型化合物。

[0074] 又,在一实施例中,于上述本揭露之用途中,上述降低眼压之药物可用于一高眼压症或一具有高眼压症之疾病的治疗及/或预防。而关于所述高眼压症或具有高眼压症之疾病的相关说明与叙述,可参见前方所述,因此不于此赘述。

[0075] 在一实施例中,于上述本揭露之用途中,上述降低眼压之药物可为一青光眼之治疗药物。而上述青光眼可包括,但不限于,剥脱性青光眼、隅角开放性青光眼、隅角闭锁性青光眼、继发型青光眼、先天型青光眼等。

[0076] 又,在一实施例中,于上述本揭露之用途中,上述降低眼压之药物可为一眼用制剂。而眼用制剂可包括,但不限于,眼用滴剂、眼用软膏、眼用凝胶、眼内注射剂等。在一特定实施例中,上述降低眼压之药物可为一眼用滴剂。

[0077] 于本揭露之上述用途中,在另一实施例中,一药学上可接受之载体或盐类,可与任何上述本揭露之新颖之β氨基酸衍生物或此新颖之β氨基酸衍生物之药学上可接受之盐或酯、水合物、溶剂合物或结晶物一起制备上述降低眼压之药物。

[0078] 关于所述之药学上可接受之载体或盐类,可参见前方本揭露之医药组合物中之药学上可接受之载体或盐类的相关说明,因此不于此赘述。

实施例

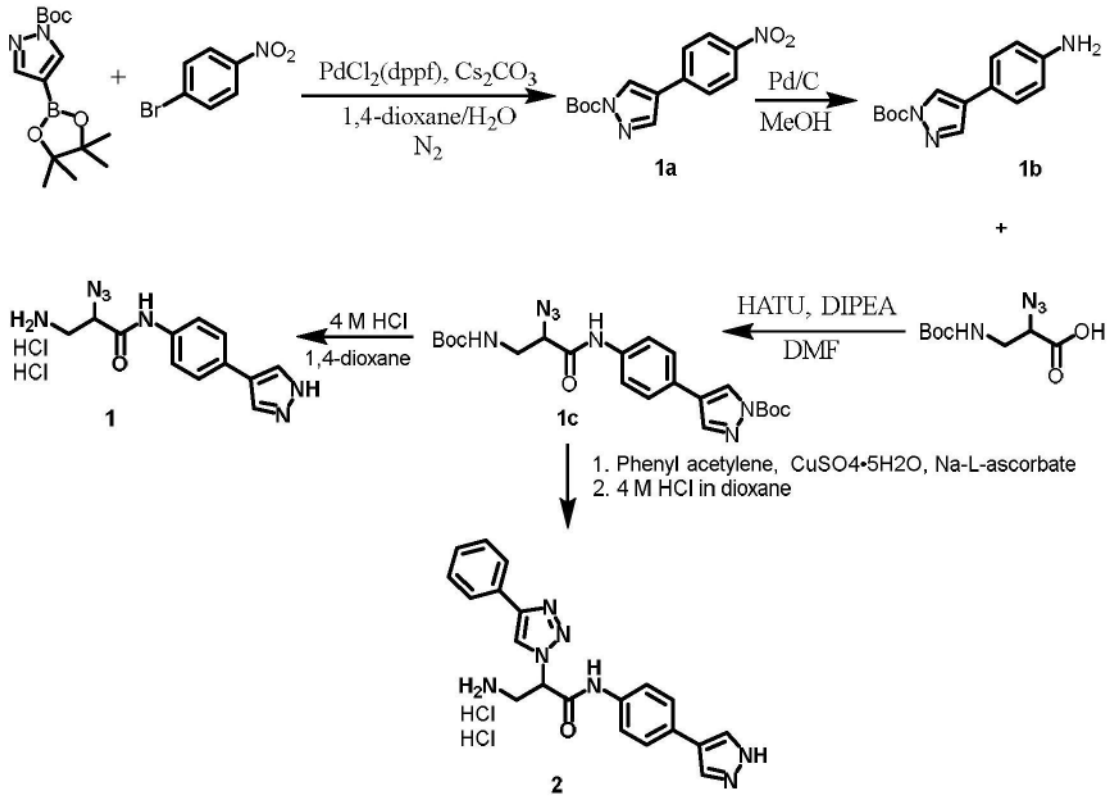
[0079] 实施例1

[0080] β氨基酸衍生物之合成

[0081] 1.化合物1与化合物2之合成

[0082] 化合物1与化合物2之合成方案如以下方案1所示。

[0083] 方案1

[0084] 

[0085] (1)合成例1

[0086] 在氩气下,对密封管中之1-溴-4-硝基苯(1-bromo-4-nitrobenzene)(210mg,1.04mmol)、1-Boc-4-吡唑硼酸频哪醇酯(1-Boc-4-pyrazoleboronic acid pinacol ester)(305mg,1.04mmol)、$PdCl_2$(dppf)(76mg,103.76μmol)与Cs_2CO_3(676mg,2.08mmol)的

混合物注入混合溶剂(二噁烷(dioxane)/H_2O=10/1,6mL),之后将前述之混合物在90℃下搅拌6小时。冷却至室温后,经由旋转蒸发去除溶剂,且对残留物加水,并以EtOAc(15mL×3)进行萃取。将经合并之有机层以盐水清洗、以无水Na_2SO_4干燥并过滤。将滤液浓缩且将残留物藉由急速层析法(flash chromatography)(EtOAc/Hex=15%)以硅胶进行纯化,以获得叔丁基4-(3-(2-(二甲基氨基)乙氧基)-4-硝基苯基)-1H-吡唑(tert-butyl 4-(3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-4-nitrophenyl)-1H-pyrazole)(1a),其为白色固体(249mg,64%)。

[0087] 对叔丁基4-(3-(2-(二甲基氨基)乙氧基)-4-硝基苯基)-1H-吡唑(1a)(360mg)在MeOH(8mL)中的溶液添加10%Pd/C,并将前述反应之混合物于H_2气环境(H_2 balloon atmosphere)之室温下搅拌1小时。将混合物过滤,并将滤液藉由旋转蒸发以获得叔丁基-(4-氨基-3-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)-1H-吡唑(tert-butyl-(4-amino-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-1H-pyrazole)(1b)为棕色固体(320mg,97%)。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:8.44(s,1H),8.27(d,J=9.0Hz,2H),8.06(s,1H),7.69-7.68(m,4H),1.68(s,9H),1.59(s,9H)。

[0088] 将2-叠氮基-3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸(2-azido-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid)(1.2eq)、HATU(1.5eq)与DIPEA(2eq)溶解于DMF(0.1M)中,且加入叔丁基-(4-氨基-3-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)-1H-吡唑(1b)(1.0eq),以形成一混合物并于室温搅拌1小时。以水激发反应,并以EtOAc萃取。收集有机层并以Na_2SO_4干燥,且将萃取液在减压下进行浓缩。将残留物以硅胶(EtOAc/Hex=20%)纯化,并获得所需之化合物叔丁基4-(4-(2-(2-叠氮基-3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(2-azido-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(1c)。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:8.41(s,1H),8.25(s,1H),7.94(s,1H),7.58(d,J=9.0Hz,2H),7.47(d,J=9.0Hz,2H),5.07(s,1H),4.27(m,1H),3.72(m,1H),3.60(m,1H),1.65(s,9H),1.43(s,9H)。

[0089] 将1,4-二噁烷中之4M HCl(20eq)与4-(4-(2-(2-叠氮基-3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-甲酸叔丁酯(1c)(1eq)于室温下搅拌1小时。经由过滤收集白色固体,并将其以1,4-二噁烷与DCM清洗。将白色固体真空干燥以获得N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-叠氮基丙酰胺二盐酸盐)(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-azidopropanamide dihydrochloride)(1)。^{1}H-NMR(500MHz,D2O)δ:8.30(s,2H),7.67(m,2H),7.55(m,2H),4.76(m,1H),3.57(dd,J=13.5,4.5Hz,1H),3.44(dd,J=13.5,7.5Hz,1H),3.60(m,1H)。

[0090] (2)合成例2

[0091] 将叔丁基4-(4-(2-(2-叠氮基-3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(1c)(1eq)、苯基乙炔(phenyl acetylene)(1.1eq)、硫酸铜(II)(0.2eq)与(+)-Na-L-抗坏血酸盐((+)-Na-L-ascorbate)(0.2eq)于THF与2-3滴H_2O中搅拌。将前述之混合物于室温下隔夜搅拌,之后移除溶剂。将残留物以硅胶(EtOAc/Hex=20%)进行纯化,获得所需之化合物叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-

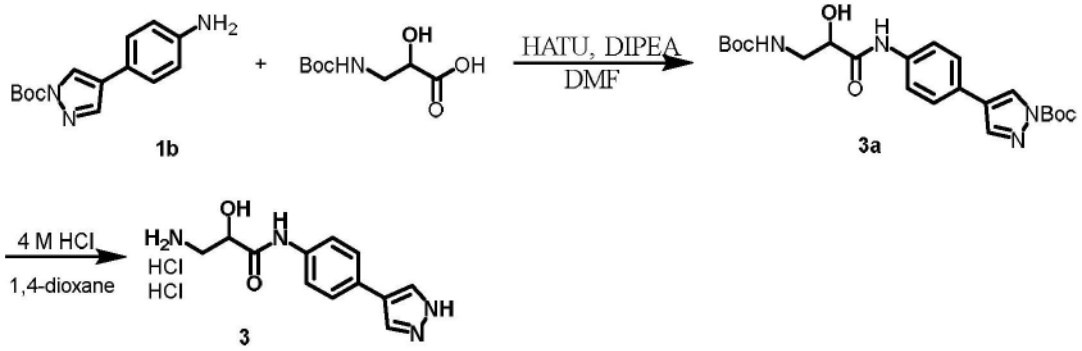
carboxylate)。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:8.98(s,1H),8.24(s,1H),8.11(s,1H),7.94(s,1H),7.83(d,J=7.5Hz,2H),7.58(d,J=8.5Hz,2H),7.46(d,J=8.5Hz,2H),7.42(t,J=7.0Hz,2H),7.34(t,J=7.0Hz,1H),5.61(s,1H),5.15(s,1H),4.10-4.06(m,1H),3.96-3.95(m,1H),1.65(s,9H),1.40(s,9H)。

[0092] 化合物2的制备方法与化合物1的制备方法相似。区别在于,化合物叔丁基4-(4-(2-(2-叠氮基-3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯被置换为化合物叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯,以获得产物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-(4-苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基)丙烯酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propenamide dihydrochloride)(2)。^{1}H-NMR(500MHz,CD_3OD)δ:8.63(s,1H),8.61(s,1H),7.88(d,J=7.5Hz,2H),7.74(d,J=8.5Hz,2H),7.67(d,J=8.5Hz,2H),7.45(t,J=8.5Hz,2H),7.37(t,J=8.5Hz,1H),5.97(t,J=6.0Hz,1H),5.54(s,1H),3.92(d,J=6.0Hz,2H),3.34(s,2H)。

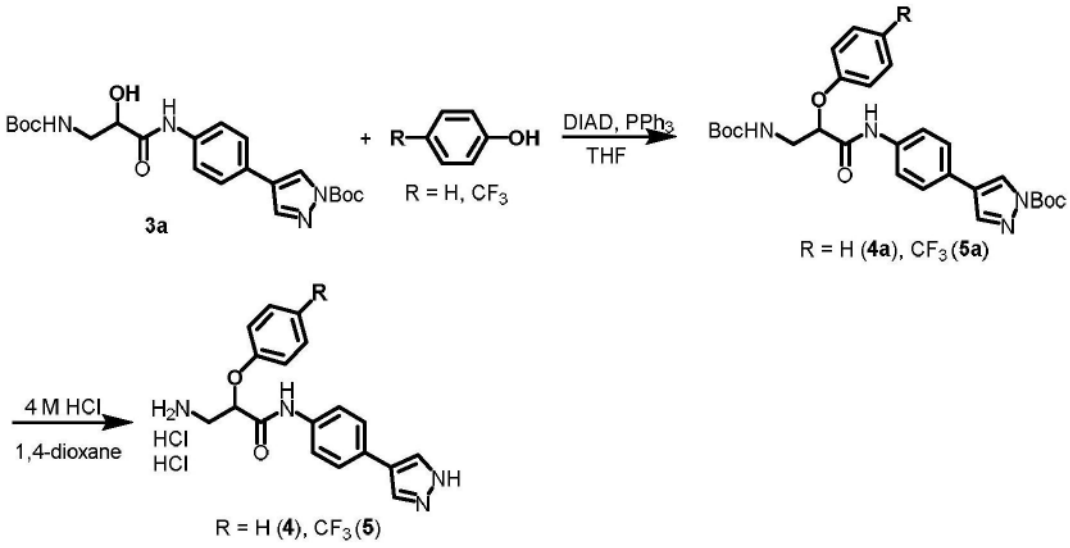
[0093] 2.化合物3至化合物5之合成

[0094] 化合物3至化合物5之合成方案如以下方案2所示。

[0095] 方案2



[0096]



[0097] (3)合成例3

[0098] 化合物3a的制备方法与化合物1c的制备方法相似。区别在于,化合物2-叠氮基-3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸被置换为化合物叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-羟基丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)

amino)-2-hydroxypropanamido)phenyl)-1H-pyrazo le-1-carboxylate)(3a)。最终产物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-羟基丙酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-hydroxypropanamide dihydrochloride)(3)的合成方法与化合物1相似。^{1}H-NMR(500MHz,D_2O)δ:8.20(s,2H),7.70(d,J=8.0,2H),7.56(d,J=8.0,2H),4.64(dd,J=8.5,4.5Hz,1H),3.51(dd,J=13.5,4.5Hz,1H),3.36-3.31(m,1H)。

[0099] (4)合成例4

[0100] 对10mL THF中之化合物3a(1eq)、苯酚(1eq)与PPh_3(2eq)的零度溶液,逐滴加入DIAD(1.5eq)。将前述之混合物于室温下搅拌2小时。经由减压移除溶剂,并以管柱层析(column chromatography)(EtOAc/Hex=10%)纯化粗产物,以获得叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯氧基丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-buty14-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenoxypropanamido)phenyl)-1H-pyraz ole-1-carboxylate)(4a),其为油状物。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCI_3$)δ:8.26(s,2H),7.96(s,1H),7.58(d,J=9.0Hz,2H),7.48(d,J=9.0Hz,2H),7.35(t,J=8.0Hz,2H),7.09-6.99(m,3H),5.03(brs,1H),4.76(t,J=5.0Hz,1H),3.81-3.78(m,1H),3.73-3.70(m,1H),1.68(s,9H),1.45(s,9H)。最终产物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯氧基丙酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenoxypropanamide dihydrochloride)(4)的合成方法与化合物1相似。^{1}H-NMR(500MHz,CD_3OD)δ:8.30(s,2H),7.66(d,J=9.0Hz,2H),7.59(d,J=9.0Hz,2H),7.36(d,J=8.5Hz,2H),7.12(d,J=8.5Hz,1H),7.07(t,J=7.0Hz,1H),7.01-6.98(m,1H),3.75-3.66(m,1H),3.60-3.50(m,2H)。

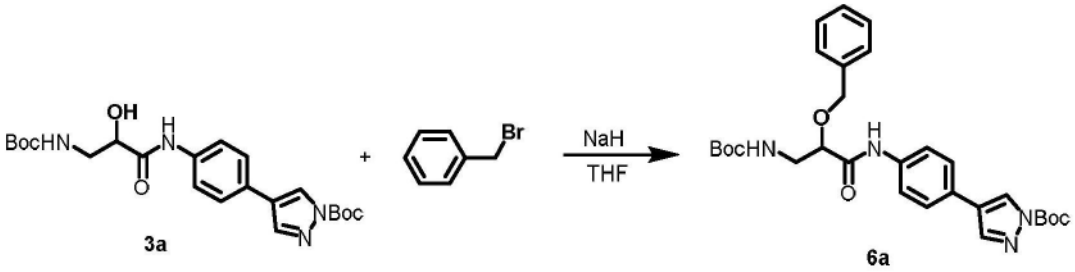
[0101] (5)合成例5

[0102] 化合物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-(4-(三氟甲基)苯氧基)丙烯酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-(trifluoromethyl)phenoxy)propenamide dihydrochloride)(5)的合成方法与化合物4相似。^{1}H-NMR(500MHz,CD_3OD)δ:8.14(br,2H),7.68(d,J=9.0,2H),7.63(d,J=6.5,2H),7.58(d,J=6.5,2H),7.26(d,J=9.0,2H),5.21(m,1H),3.60-3.58(m,2H)。

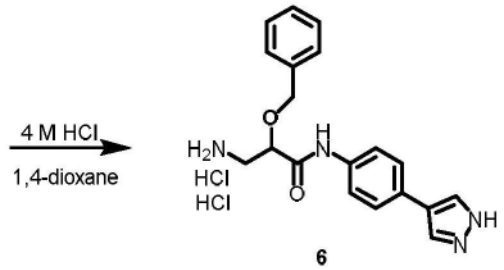
[0103] 3.化合物6之合成

[0104] 化合物6之合成方案如以下方案3所示。

[0105] 方案3



[0106]



[0107] (6)合成例6

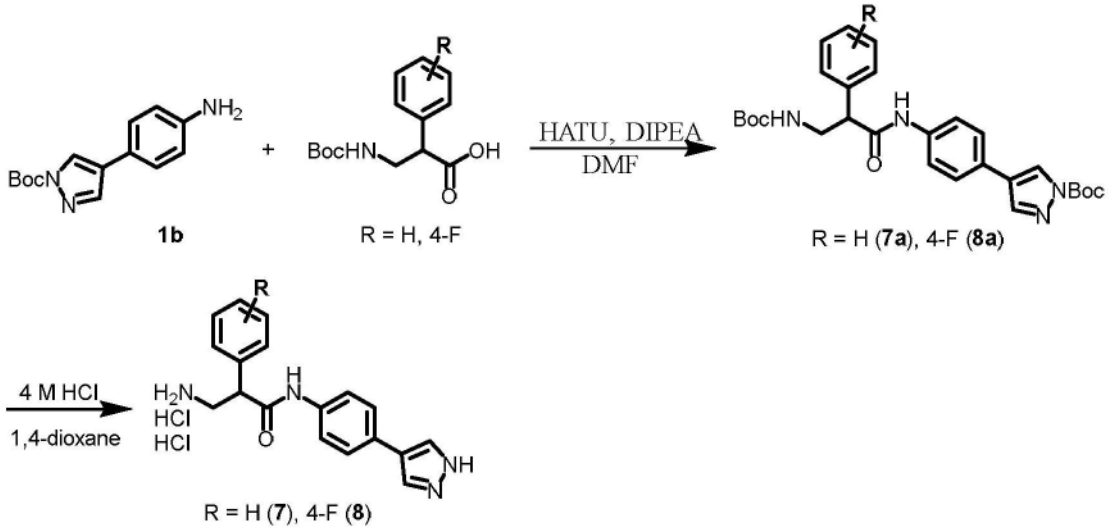
[0108] 对化合物3a(1eq)在10mL THF中之零度溶液添加NaH(1.5eq)。将前述混合物于零度下搅拌1小时,之后逐滴加入BnBr(1.5eq)。将前述反应混合物于室温下搅拌6小时。将反应以水激发并以EtOAc进行萃取。收集有机层并以Na_2SO_4干燥,之后于减压下移除溶剂。将残留物以硅胶(EtOAc/Hex＝5％至15％)进行纯化,以获得所需之化合物叔丁基4-(4-(2-(苄氧基)-3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酰胺基)苯基)叔丁基-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(2-(benzyloxy)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(6a)。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:8.44(s,1H),8.27(s,1H),7.97(s,1H),7.56(d,J＝8.5Hz,2H),7.48(d,J＝8.5Hz,2H),7.41-7.35(m,5H),4.93(brs,1H),4.82(d,J＝8.5Hz,1H),4.66(d,J＝11.0Hz,1H),4.06(t,J＝5.0Hz,1H),3.65-3.61(m,2H),1.68(s,9H),1.44(s,9H)。

[0109] 最终产物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-(苄氧基)丙酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(benzyloxy)propanamidedihydrochloride)(6)的合成方法与化合物1相似。^{1}H-NMR(500MHz,CD_3OD)δ:8.46(s,2H),7.69-7.66(m,4H),7.49(d,J＝7.5Hz,2H),7.38(t,J＝7.5Hz,2H),7.34-7.31(m,1H),4.78(d,J＝11.5Hz,1H),4.75(d,J＝11.5Hz,1H),4.36-4.34(m,1H),3.36-3.31(m,2H)。

[0110] 4.化合物7与化合物8之合成

[0111] 化合物7之合成方案如以下方案4所示。

[0112] 方案4

[0113] 

[0114] (7)合成例7

[0115] 中间化合物7a与8a的制备方法与化合物1c的制备方法相似。

[0116] 中间化合物叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(7a)为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:8.22(s,1H),7.92(s,1H),7.49(d,J=8.5Hz,2H),7.42(d,J=8.5Hz,2H),5.14(s,1H),3.90(m,1H),3.65(m,1H),3.55(m,1H),1.64(s,9H),1.40(s,9H)。

[0117] 中间化合物叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-氟苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-fluorophenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(8a)为白色粉末。^{1}H-NMR($CDCl_3$,500MHz)8.25(s,1H),7.94(s,1H),7.53-7.51(m,3H),7.45(d,J=8.5Hz,2H),7.34(t,J=8.5Hz,2H),7.05(t,J=8.5Hz,2H),5.13(brs,NH,1H),3.92(s,1H),3.65-3.64(m,1H),3.54-3.51(m,1H),1.67(s,9H),1.47(s,9H)。

[0118] 最终化合物7与8的制备方法与化合物1的制备方法相似。

[0119] 最终化合物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanamidedihydrochloride)(7)为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,CD_3OD)δ:8.55(br,2H),7.69(d,J=8.5,2H),7.63(d,J=8.5,2H),7.47-7.34(m,5H),4.15-4.17(m,1H),3.61(dd,J=12.5,9.5Hz,1H),3.25(dd,J=12.5,5.5Hz,1H),3.60(m,1H)。

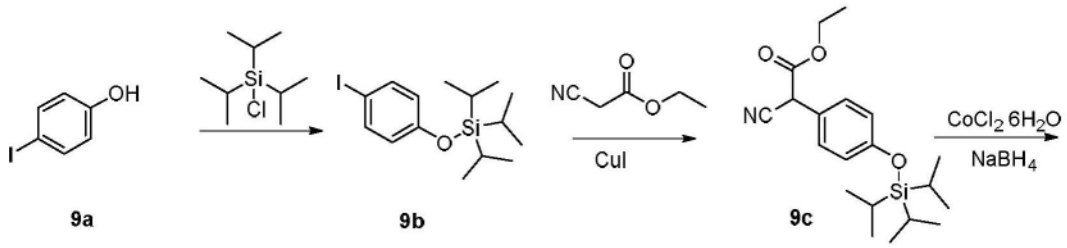
[0120] 最终化合物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-(4-氟苯基)丙酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-fluorophenyl)propanamide dihydrochloride)(8)为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,D_2O)δ:8.07(s,2H),7.42(d,J=8.5Hz,2H),7.34(dd,J=5.5,8.5Hz,2H),7.26(d,J=8.5Hz,2H),7.08(t,J=8.5Hz,2H),4.06(t,J=7.5Hz,1H),3.52(dd,J=7.5,13.0Hz,1H),3.33(dd,J=7.5,13.0Hz,1H)。

[0121] 5.化合物9之合成

[0122] (8)合成例8

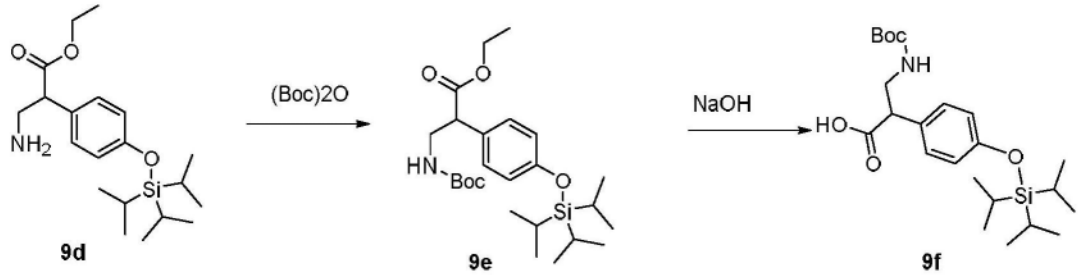
[0123] 化合物9f之合成方案如以下方案5所示。

[0124] 方案5



9a 9b 9c

[0125]



9d 9e 9f

[0126] 对碘酚(9a)(100g,454.5mmol)在DCM(1000mL)中的溶液添加咪唑(imidazole)(68g,999.9mmol),然后逐滴加入TIPSCl(87.3g,454.5mmol)。将前述混合物搅拌16小时,然后倒入冰/水中,以DCM进行萃取。以盐水清洗有机层,且将其以Na_2SO_4干燥并浓缩。将残留物藉由硅胶管柱层析法纯化(洗提剂:乙酸乙酯/石油醚=1/50),获得化合物9b(170g,99.1%),其为无色油。^{1}H-NMR($CDCl_3$,400MHz):δ:1.05-1.08(d,18H),1.20-1.28(m,3H),6.64-6.66(m,2H),7.47-7.49(m,2H)。

[0127] 对化合物9b(140g,372.3mmol)在二噁烷(1500mL)中的溶液添加2-氰基乙酸乙酯(ethyl 2-cyanoacetate)(63.1g,558.8mmol)、吡啶甲酸(picolinicacid)(13.8g,111.7mmol)、Cs_2CO_3(242g,744.6mmol)与CuI(21.2g,111.7mmol)。将前述混合物于90℃搅拌2小时并过滤。将有机层浓缩并藉由硅胶管柱层析进行纯化(洗提溶剂:乙酸乙酯/石油醚=1/20),以获得化合物9c(44g,32.7%),其为白色固体。

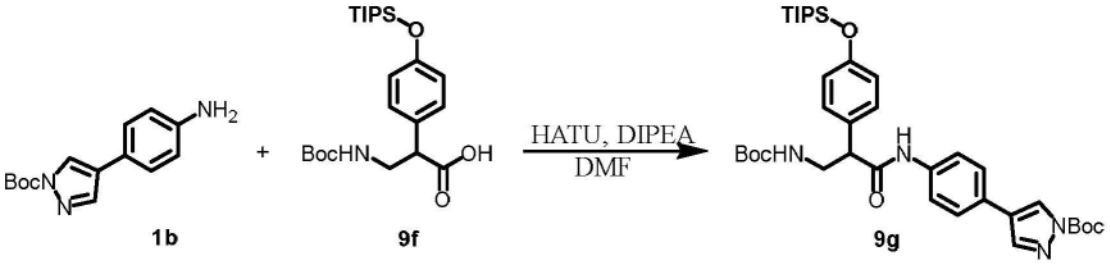
[0128] 对化合物9c(22g,60.9mmol)在MeOH/THF(2:1,660mL)中的溶液于-20℃添加$CoCl_{26}H_2O$(44g,184.9mmol)与$NaBH_4$(33g,868.4mmol)。将前述混合物搅拌30分钟并过滤以获得滤液。再将前述滤液加入有机物$(Boc)_2O$(40g,183.5mmol),并在室温搅拌0.5小时。接着将前述混合物倒入冰/水中,并以EtOAc进行萃取。以盐水清洗有机层,且将其以Na_2SO_4干燥并浓缩。将残留物以硅胶管柱层析进行纯化(洗提溶剂:乙酸乙酯/石油醚=1/30),以获得化合物9e(10.5g,35.9%),其为黄色油。^{1}H-NMR($CDCl_3$,400MHz):δ:1.53-1.09(t,18H),1.17-1.28(m,6H),1.42(s,9H),3.46-3.56(m,2H),3.77-3.80(t,1H),4.11-4.18(m,2H),4.82(s,1H),6.81-6.83(d,2H),7.09-7.11(d,2H)。

[0129] 对化合物9e(10g,21.5mmol)在EtOH/H_2O(10:1,220mL)的溶液添加NaOH(2g,49.5mmol),并在室温下搅拌1小时。将前述混合物以1N HCl中和并以EtOAc进行萃取。以盐水清洗有机层,且将其以Na_2SO_4干燥并浓缩。将残留物以硅胶管柱层析进行纯化(洗提溶剂:乙酸乙酯/石油醚=1/10),以获得化合物9f(2.5g,26.6%),其为白色固体。^{1}H-NMR(DMSO-d6,400MHz):δ:1.08-1.10(d,18H),1.22-1.32(m,3H),1.37(s,9H),3.23-3.28(m,1H),3.42-3.46(t,1H),3.69-3.73(t,1H),6.85-6.87(d,3H),7.16-7.18(d,2H)。

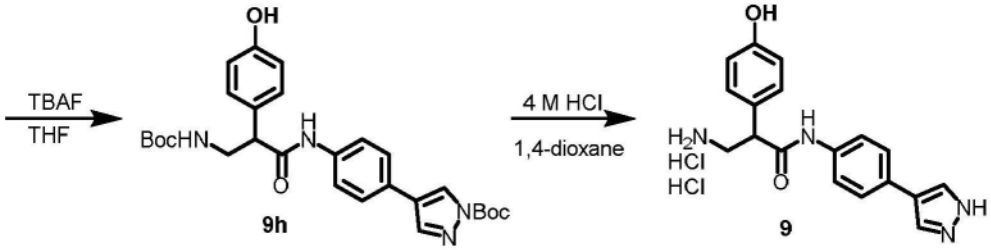
[0130] (9)合成例9

[0131] 化合物9之合成方案如以下方案6所示。

[0132] 方案6



[0133]



[0134] 中间化合物9g的制备方法与化合物1c的制备方法相似。

[0135] 中间化合物叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-((三异丙基甲硅烷基)氧基)苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(9g)为白色粉末。^{1}H-NMR($CDCl_3$,500MHz)8.25(s,1H),7.94(s,1H),7.49(d,J=8.5Hz,2H),7.44(d,J=8.5Hz,2H),7.30(brs,NH,1H),7.19(d,J=8.5Hz,2H),6.87(d,J=8.5Hz,2H),5.17(brs,NH,1H),3.82(s,1H),3.64-3.62(m,1H),3.56-3.53(m,1H),1.67(s,9H),1.43(s,9H),1.30-1.20(m,3H),1.09(d,J=7.0Hz,18H)。

[0136] 对叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-((三异丙基甲硅烷基)氧基)苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(9g)(1030mg,1.52mmol)在THF(10mL)中且经搅拌的溶液添加在THF溶液中之1M TBAF(3.03mL,3.03mmol)。将所产生之混合物在室温下搅拌1小时。以水激活反应并以EtOAc进行萃取。收集有机层并以Na_2SO_4干燥,且将萃取物在减压下浓缩。将残留物以制备逆相高效液相色层分析(preparative reverse HPLC)(80%ACN,20%H_2O)进行纯化,之后冷冻干燥以获得叔丁4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-羟苯基)丙酰胺基)苯基)叔丁基-1-H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-hydroxyphenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(9h)(600mg,76%),其为白色粉末。^{1}H-NMR($CDCl_3$,500MHz)8.25(s,1H),7.94(s,1H),7.50(d,J=8.5Hz,2H),7.45-7.43(m,3H),7.15(d,J=8.5Hz,2H),6.81(d,J=8.5Hz,2H),5.26(brs,NH,1H),3.80(s,1H),3.62(s,1H),3.55-3.53(m,1H),1.67(s,9H),1.62(brs,OH,1H),1.43(s,9H)。

[0137] 最终化合物9的制备方法与化合物1的制备方法相似。

[0138] 最终化合物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-(4-羟基苯基)丙酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-hydroxyphenyl)propanamide dihydrochloride)(9)为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,D_2O)δ:8.06(s,2H),7.39(d,J=8.5Hz,

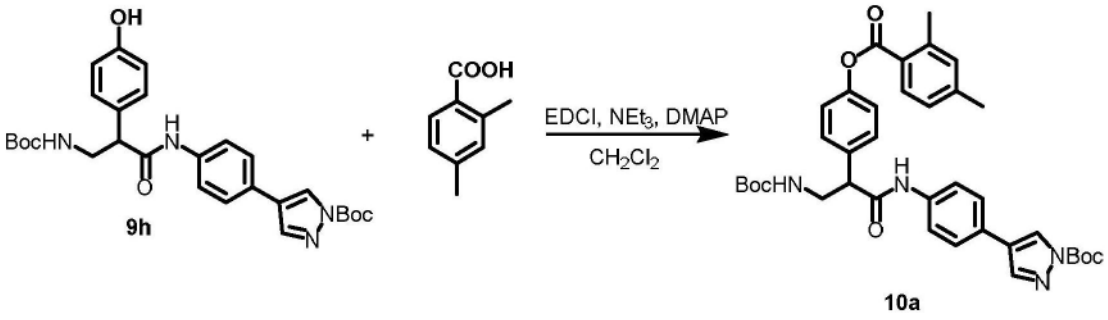
2H),7.24(d,J＝8.5Hz,2H),7.20(d,J＝8.5Hz,2H),6.82(d,J＝8.5Hz,2H),3.97(t,J＝7.5Hz,1H),3.49(dd,J＝7.5,13.0Hz,1H),3.30(dd,J＝7.5,13.0Hz,1H)。

[0139] 6.化合物10之合成

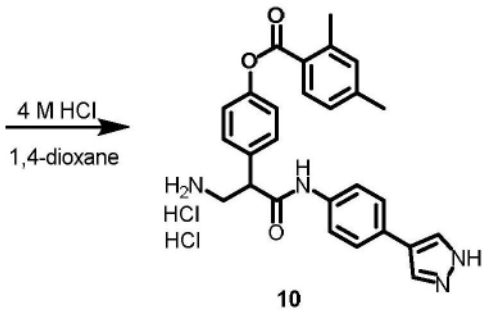
[0140] (10)合成例10

[0141] 化合物10之合成方案如以下方案7所示。

[0142] 方案7



[0143]



[0144] 对叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-羟苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-hydroxyphenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(9h)(356mg,0.68mmol)、2,4-二甲基苯甲酸(2,4-dimethylbenzoic acid)(103mg,0.68mmol)与NEt_3(143μL,1.02mmol)在CH_2Cl_2(20mL)中且经搅拌的溶液添加EDCI(196mg,1.02mmol)与DMAP(25mg,0.21mmol)。将所产生的混合物搅拌16小时。以饱和柠檬酸激活反应,并以EtOAc进行萃取。收集有机层并以Na_2SO_4干燥,且在减压下移除溶剂。将残留物以制备逆相高效液相色层分析(100％ACN)进行纯化,之后冷冻干燥以获得叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-(((2,4-二甲基苯甲酰基)氧基)苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-((2,4-dimethylbenzoyl)oxy)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(10a)(355mg,80％)为白色粉末。^{1}H-NMR($CDCl_3$,500MHz)8.26(s,1H),8.06(d,J＝8.0Hz,1H),7.96(s,1H),7.53(d,J＝8.5Hz,2H),7.52-7.42(m,5H),7.21(d,J＝8.5Hz,2H),5.15(brs,NH,1H),3.95(s,1H),3.68-3.67(m,1H),3.58-3.55(m,1H),2.63(s,3H),2.40(s,3H),1.67(s,9H),1.44(s,9H)。

[0145] 于20mL小瓶中装入叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-((2,4-二甲基苯甲酰基)氧基)苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-((2,4-dimethylbenzoyl)oxy)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(10a)(350mg,0.54mmol)与在二噁烷中之4M HCl溶液(2.7mL)。将所产生之混合物在室温下搅拌1小时。在减压下移除溶剂以获得所需的化合

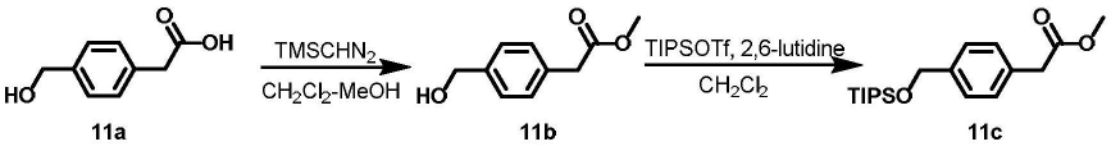
物4-(1-((4-(1H-吡唑-4-基)苯基)氨基)-3-氨基-1-氧丙烷-2-基)苯基2,4-二甲基苯甲酸酯二盐酸盐(4-(1-((4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)amino)-3-amino-1-oxopropan-2-yl)phenyl2,4-dimethylbenzoate dihydrochloride)(10),其为白色粉末(271mg,96%)。^{1}H-NMR(500MHz,DMSO)δ:10.47(s,1H),8.08(brs,3H),8.02(s,2H),7.94(d,J=8.5Hz,1H),7.61(d,J=9.0Hz,2H),7.53(d,J=8.5Hz,2H),7.50(d,J=8.5Hz,2H),7.28(d,J=8.5Hz,2H),7.19(d,J=9.0Hz,2H),4.18(dd,J=5.5,8.5Hz,1H),3.15-3.06(m,1H),2.52(s,3H),2.34(s,3H)。

[0146] 7.化合物11之合成

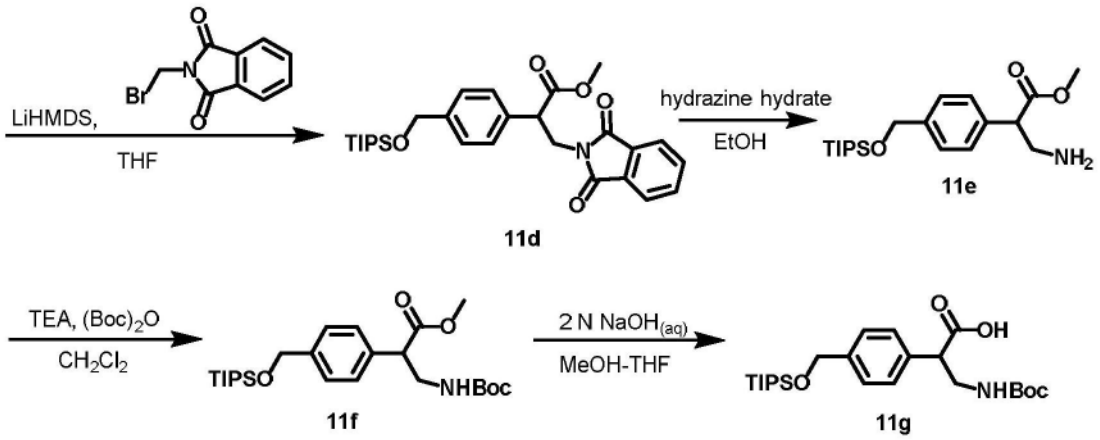
[0147] (11)合成例11

[0148] 化合物11g之合成方案如以下方案8所示。

[0149] 方案8



[0150]



[0151] 对2-(4-(羟甲基)苯基)乙酸(2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)acetic acid)(5233mg,31.49mmol)在CH_2Cl_2(25mL)与MeOH(6mL)中的零度溶液逐滴添加TMS重氮甲烷(diazomethane)(23.6mL之于己烷中之2M溶液,47.23mmol)。于15分钟后,藉由添加HOAc(1mL)以使反应淬灭(quenched)。将前述之反应混合物以EtOAc(100mL)稀释,并以饱和$NaHCO_3$(2×25mL)与盐水(25mL)清洗。将有机层干燥(Na_2SO_4)、过滤与浓缩。藉由急速层析法(0至33百分比EtOAc/己烷)纯化残留物,以获得甲基2-(4-(羟甲基)苯基)乙酸盐(methyl2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)acetate)(11b)。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ:7.33(d,J=7.5Hz,2H),7.27(d,J=7.5Hz,2H),4.68(s,2H),3.69(s,3H),3.63(s,2H)。

[0152] 对甲基2-(4-(羟甲基)苯基)乙酸盐(11b)(5674mg,31.49mmol)在CH_2Cl_2(50mL)中的零度溶液,添加2,6-二甲基吡啶(2,6-lutidine)(5.47mL,47.23mmol)与TIPS-OTf(14.48g,47.23mmol)。移除冰浴,使溶液回温至室温并搅拌。于2小时之后,藉由添加$NH_4Cl_{(aq)}$(50mL)以使反应淬灭。将前述之反应混合物以CH_2Cl_2(100mL)稀释,并以H_2O(2x50mL)与盐水(50mL)清洗。将有机层干燥(Na_2SO_4)、过滤与浓缩。藉由急速层析法(0至5百分比EtOAc/己烷)纯化残留物,以获得甲基2-(4-(((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)

乙酸盐(methyl2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)acetate)(11c)。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.31(d,J=8.0Hz,2H),7.24(d,J=8.0Hz,2H),4.82(s,2H),3.69(s,3H),3.62(s,2H),1.21-1.15(m,3H),1.10-1.06(m,18H)。

[0153] 对甲基2-(4-(((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)乙酸盐(11c)(10.60g,31.49mmol)在THF(50mL)中之-78℃溶液,逐滴添加LiHMDS(47.30mL,47.23mmol)。于30分钟后,于相同温度逐滴添加在THF(50mL)中之溴甲基邻苯二甲酰亚胺(bromo-methyl phthalimide)(11.34g,47.23mmol)。移除-78℃冰浴,将溶液回温至室温并搅拌。2小时后,藉由加入$NH_4Cl_{(aq)}$(40mL)以使反应淬灭,并以EtOAc(100mL)进行萃取。将有机层进行干燥(Na_2SO_4)、过滤并浓缩。藉由急速层析法(0至10百分比EtOAc/己烷)纯化残留物,以获得甲基3-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)-2-(4-((((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)丙酸酯(methyl3-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanoate)(11d)。^{1}H-NMR(500MHz,CDCl3):δ7.79-7.76(m,2H),7.69-7.67(m,2H),7.30-7.28(m,4H),4.77(s,2H),4.31(t,J=7.5Hz,1H),4.26-4.15(m,2H),3.66(s,3H),1.17-1.06(m,3H),1.05-1.02(m,18H)。

[0154] 对甲基3-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)-2-(4-((((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)丙酸酯(11d)(4.39g,8.86mmol)在MeOH(30mL)与EtOH(50mL)的搅拌溶液中加入水合肼(hydrazine hydrate)(2.22g,44.29mmol),并将溶液回流2小时。过滤固体,并蒸发溶剂。藉由急速层析法(0至50百分比EtOAc/己烷)纯化残留物,以获得甲基3-氨基-2-(4-((((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)丙酸酯(methyl3-amino-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanoate)(11e)。

[0155] 对甲基3-氨基-2-(4-((((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)丙酸酯(11e)(3.19g,8.74mmol)在CH_2Cl_2(50mL)中且经搅拌的溶液中加入TEA(2.44mL,17.47mmol)与$(Boc)_2O$(17.47mmol)。将此溶液在室温下搅拌4小时,然后倒入CH_2Cl_2/$NaHCO_{3(aq)}$中。将水层以CH_2Cl_2进一步萃取、干燥(Na_2SO_4)、过滤并蒸发。藉由急速层析法(0至4百分比EtOAc/己烷)纯化残留物,以获得甲基3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-(((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)丙酸酯(methyl3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanoate)(11f)。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.32(d,J=7.5Hz,2H),7.22(d,J=7.5Hz,2H),4.86-4.82(m,1H),4.77(s,2H),3.88-3.83(m,1H),3.68(s,3H),3.63-3.57(m,1H),3.51-3.48(m,1H),1.42(s,9H),1.21-1.14(m,3H),1.10-1.08(m,18H)。

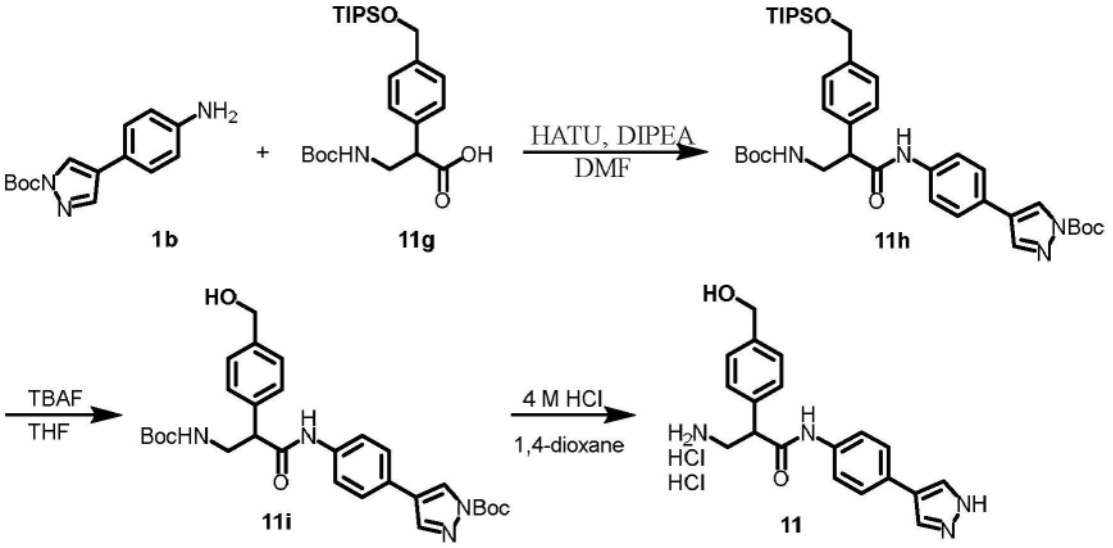
[0156] 对甲基3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-(((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)丙酸酯(11f)(2.07g,4.44mmol)在THF/MeOH(1:1,40mL)中的溶液加入NaOH(8.88mL,17.76mmol),并在室温下搅拌2小时。将混合物以1N HCl中和并以EtOAc萃取。将有机层以盐水清洗,以Na_2SO_4干燥并浓缩。将残留物以硅胶管柱层析进行纯化(洗提溶剂:EtOAc/己烷=1/3)以获得化合物3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-((((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)丙酸(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanoic acid)(11g)(1.84g,92%),其为白色固体。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.35(d,J=7.5Hz,2H),7.28(d,J=7.5Hz,2H),6.77(brs,0.5H),4.92(brs,0.5H),4.82(s,2H),3.91-3.80(m,1H),3.59-3.50(m,2H),1.46-1.42(m,9H),1.21-1.14(m,3H),1.10-1.08

(m,18H)。

[0157] (12)合成例12

[0158] 化合物11之合成方案如以下方案9所示。

[0159] 方案9

[0160] 

[0161] 最终化合物11的合成方法与化合物9相似。

[0162] 化合物叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-(((三异丙基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(11h)为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ8.25(s,1H),7.95(s,1H),7.50(d,J=7.5Hz,2H),7.45(d,J=7.5Hz,2H),7.37(d,J=7.5Hz,2H),7.33-7.31(m,3H),5.15(brs,1H),4.83(s,2H),3.90(brs,1H),3.68(brs,1H),3.58-3.55(m,1H),1.67(s,9H),1.43(s,9H),1.26-1.14(m,3H),1.10-1.08(m,18H)。

[0163] 化合物叔丁基4-(4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-(羟甲基)苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(11i)为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ8.25(s,1H),7.94(s,1H),7.51(d,J=8.0Hz,2H),7.46-7.44(m,3H),7.39-7.37(m,4H),5.15(brs,1H),3.92(brs,1H),3.67-3.66(m,1H),3.56-3.54(m,1H),1.67-1.64(m,10H),1.43(s,9H)。

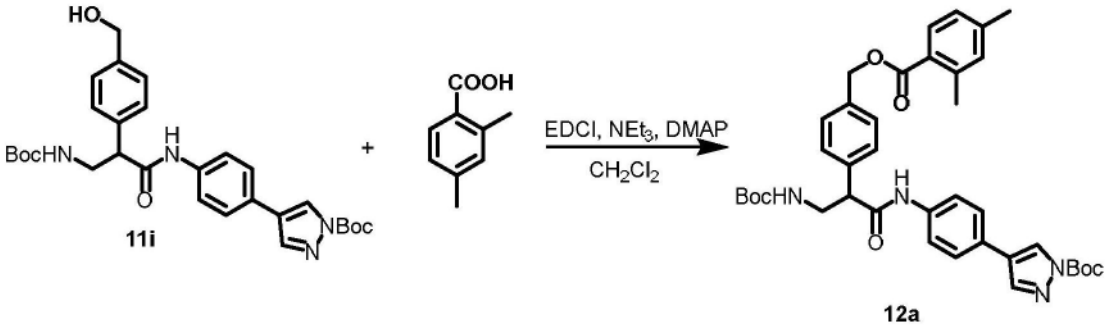
[0164] 最终化合物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-(4-(羟甲基)苯基)丙烯酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)propenamide dihydrochloride)(11)为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,D_2O)δ:8.05(s,2H),7.44(d,J=9.0Hz,2H),7.35(s,4H),7.27(d,J=9.0Hz,2H),4.53(s,2H),4.08(t,J=6.5Hz,1H),3.56(dd,J=6.5,13.0Hz,1H),3.36(dd,J=6.5,13.0Hz,1H)。

[0165] 8.化合物12之合成

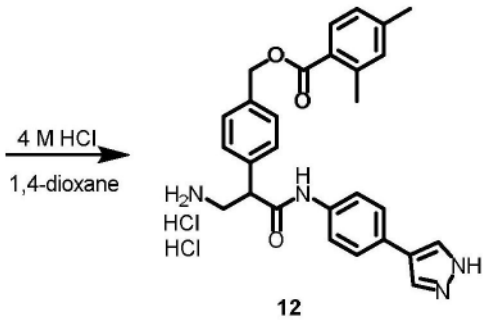
[0166] (13)合成例13

[0167] 化合物12之合成方案如以下方案10所示。

[0168] 方案10



[0169]



[0170] 最终化合物12的合成方法与化合物10相似。

[0171] 化合物叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-((((2,4-二甲基苯甲酰基)氧基)甲基)苯基)丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((2,4-dimethylbenzoyl)oxy)methyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(12a)为白色粉末。^{1}H-NMR($CDCl_3$,500MHz)8.25(s,1H),7.94(s,1H),7.86(d,J=7.5Hz,1H),7.52(d,J=8.0Hz,2H),7.46-7.44(m,4H),7.41-7.37(m,3H),7.06-7.03(m,3H),5.31(s,2H),5.14(brs,1H),3.93(brs,1H),3.68-3.67(m,1H),3.59-3.55(m,1H),2.60(s,3H),2.37(s,3H),1.67(s,9H),1.43(s,9H)。

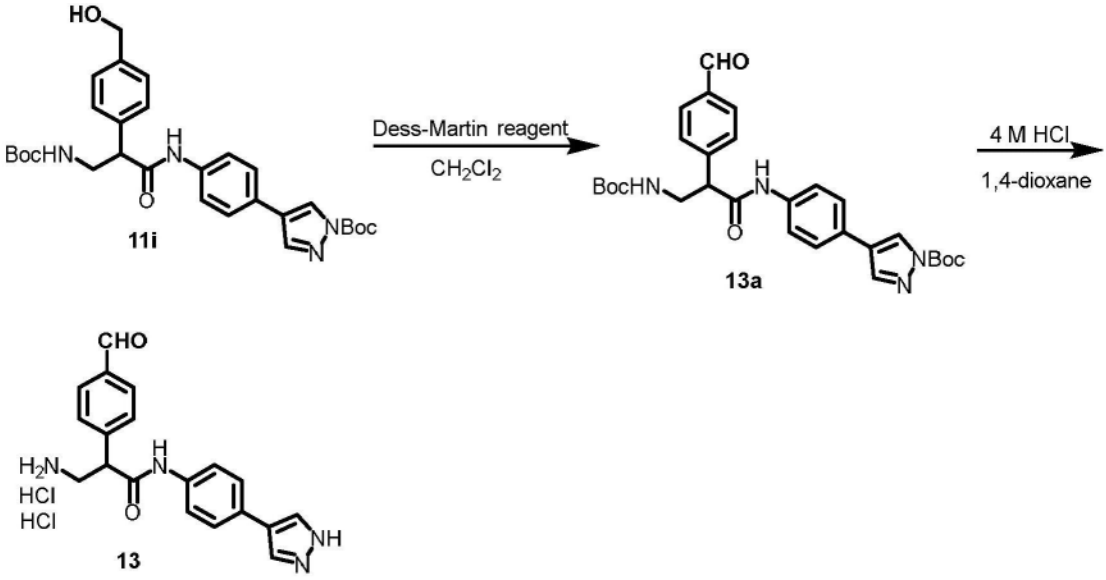
[0172] 化合物2-(4-(1-((4-(1H-吡唑-4-基)苯基)氨基)-3-氨基-1-氧丙烷-2-基)苄基2,4-二甲基苯甲酸酯二盐酸盐(4-(1-((4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)amino)-3-amino-1-oxopropan-2-yl)benzyl2,4-dimethylbenzoate dihydrochloride)(12)为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,DMSO)δ:10.40(s,NH,1H),8.03(brs,NH,3H),8.00(s,2H),7.75(d,J=8.0Hz,1H),7.58(d,J=9.0Hz,2H),7.51(d,J=9.0Hz,2H),7.47-7.44(m,4H),7.12(s,1H),7.09(d,J=8.0Hz,1H),5.26(s,2H),4.13(dd,J=5.5,9.0Hz,1H),3.07-3.02(m,1H),2.47(s,3H),2.29(s,3H)。

[0173] 9.化合物13之合成

[0174] (14)合成例14

[0175] 化合物13之合成方案如以下方案11所示。

[0176] 方案11

[0177] 

[0178] 对叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-(羟甲基)苯基)丙酰胺基)苯基)-1-H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(11i)(100mg,0.19mmol)在CH_2Cl_2(10mL)中且经搅拌的溶液加入Dess-Martin试剂(166mg,0.37mmol)。将所得溶液在室温下搅拌1小时。在减压下蒸发溶剂,并以管柱层析(EtOAc/己烷=25%至50%)纯化粗产物,以获得叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-甲酰基苯基)丙酰胺基)苯基)叔丁基-1-H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-formylphenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(13a),其为白色粉末。^{1}H-NMR($CDCl_3$,500MHz)10.01(s,CHO,1H),8.26(s,1H),7.95(s,1H),7.88(d,J=8.0Hz,2H),7.62(brs,1H),7.58-7.53(m,4H),7.46(d,J=8.0Hz,2H),5.12(brs,1H),4.13-4.05(m,1H),3.74-3.70(m,1H),3.60-3.56(m,1H),1.66(s,9H),1.43(s,9H)。

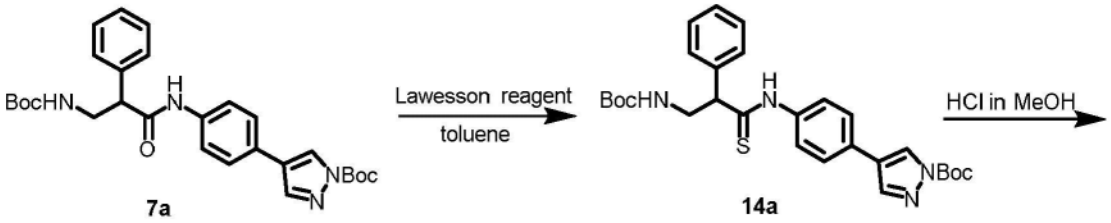
[0179] 在4mL小瓶中装入叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(4-甲酰基苯基)丙酰胺基)苯基)叔丁基-1-H-吡唑-1-羧酸酯(13a)(52mg,0.10mmol)与在二噁烷(1.0mL)中之4M HCl。将所得混合物在室温下搅拌1小时。于减压下移除溶剂,以获得所需化合物N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-(4-甲酰基苯基)丙酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-formylphenyl)propanamide dihydrochloride)(13)(44mg,90%)。^{1}H-NMR(500MHz,D_2O)δ:9.79(s,CHO,1H),7.94(s,2H),7.84(d,J=8.5Hz,2H),7.53(d,J=8.5Hz,2H),7.39(d,J=8.5Hz,2H),7.25(d,J=8.5Hz,2H),4.19(t,J=7.0Hz,1H),3.60(dd,J=7.0,12.5Hz,1H),3.38(dd,J=7.0,12.5Hz,1H)。

[0180] 10.化合物14之合成

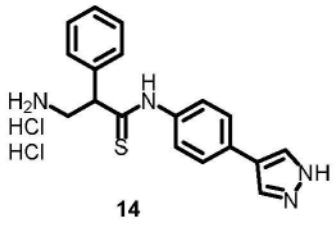
[0181] (15)合成例15

[0182] 化合物14之合成方案如以下方案12所示。

[0183] 方案12



[0184]



[0185] 将叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(7a)(506mg,1.0mmol,1.0eq)与Lawesson试剂(808mg,2.0mmol,2.0eq)在甲苯(5mL)中的混合物于N_2气环境(N_2 atmosphere)下加热至120℃持续16小时。将前述反应混合物冷却并浓缩,以获得粗化合物叔丁基4-(4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙烷硫代酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanethioamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(14a)(520mg,产率:100%),其无需进一步纯化即可用于下一步骤。LCMS(ES,m/z):[M+H]+=523.3。

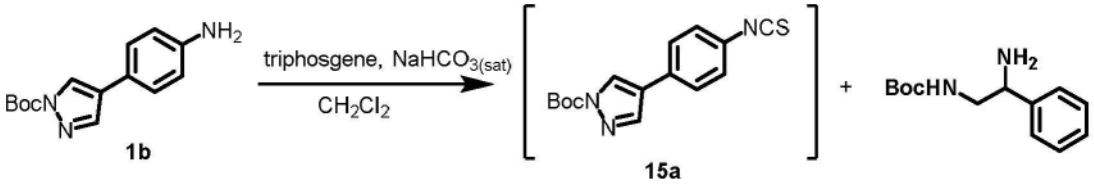
[0186] 将叔丁基4-(4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙烷硫代酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(14a)(520mg,1.0mmol,1.0eq)溶于1mL MeOH,加入HCl/MeOH(3M,5mL)于室温搅拌3小时。将前述反应混合物浓缩。将残留物藉由快速层析法(DCM/MeOH从100%至10%)纯化,以获得粗产物(110mg),又将其以DCM和MeOH结晶,并以1N HCl调整pH值至5.0,以获得N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙硫酰胺二盐酸盐(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanethioamide dihydrochloride)(化合物14)(75mg,产率:两步骤23%),其为黄色固体。LCMS(ES,m/z):$[M+H]^+$=323.2。^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d_6):12.08(s,1H),8.06-7.99(m,5H),7.77(d,J=8.4Hz,2H),7.63-7.59(m,4H),7.41-7.31(m,3H),4.54-4.50(m,1H),3.88-3.78(m,1H),3.31-3.24(m,1H)。

[0187] 11.化合物15之合成

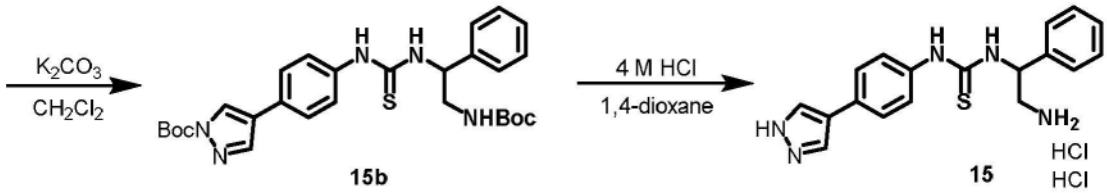
[0188] (16)合成例16

[0189] 化合物15之合成方案如以下方案13所示。

[0190] 方案13



[0191]



[0192] 对叔丁基-(4-氨基-3-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)-1H-吡唑(tert-butyl-(4-amino-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-1H-pyrazole)(200mg,0.85mmol,1.0eq)在CH_2Cl_2(4mL)之溶液加入$NaHCO_3$饱和溶液(2mL,0.4M)。接着缓慢加入硫光气(thiophosgene)(97mg,0.85mmol,1.0eq),并搅拌3小时。将有机层以无水硫酸钠干燥,并于减压下移除溶剂,以获得粗产物15a。于残留物15a中加入在CH_2Cl_2(4.0mL)中之叔丁基(2-氨基-2-苯基乙基)氨基甲酸酯(tert-butyl(2-amino-2-phenylethyl)carbamate)(220mg,0.85mmol,1.0eq)与K_2CO_3(235mg,1.70mmol,2.0eq)。以水激活反应,并以CH_2Cl_2萃取。收集有机层并以Na_2SO_4干燥,且将萃取液在减压下浓缩。将残留物以硅胶纯化(EtOAc/Hex=20%),以获得化合物叔丁基4-(4-(3-(2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)-1-苯基乙基)硫脲基)苯基)叔丁基-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-1-phenylethyl)thioureido)phenyl)-1H-py razole-1-carboxylate)(15b)(353mg,85%),其为淡黄色固体。^{1}H-NMR(500MHz,CDCl3)δ:8.30(s,1H),8.02(s,1H),7.98(s,1H),7.63(s,1H),7.57(d,J=8.0Hz,2H),7.38-7.34(m,4H),7.30-7.24(m,3H),5.63(s,1H),4.85(s,1H),3.55-3.44(m,2H),1.68(s,9H),1.31(s,9H)。

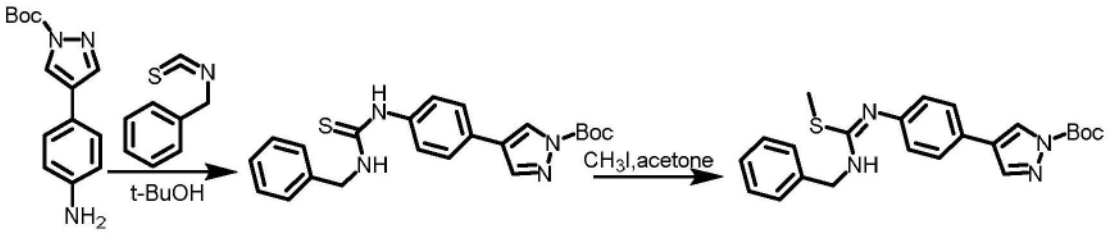
[0193] 在20mL小瓶中装入化合物叔丁基4-(4-(3-(2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)-1-苯基乙基)硫脲基)苯基)叔丁基-1H-吡唑-1-羧酸酯(15b)(353mg,0.66mmol)与4M HCl于二噁烷(3.3mL)中。将所得混合物在室温下搅拌1小时。于减压下除去溶剂,以获得化合物1-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-(2-氨基-1-苯基乙基)硫脲二盐酸盐(1-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-(2-amino-1-phenylethyl)thiourea dihydrochloride)(15)(244mg,90%),其呈淡黄色粉末状。^{1}H-NMR(500MHz,CD_3OD)δ:8.56(brs,2H),7.65(d,J=8.0,2H),7.60-7.58(m,2H),7.48-7.39(m,4H),7.38-7.37(m,1H),6.08(dd,J=9.0,5.0Hz,1H),3.49(dd,J=13.0,9.0Hz,1H),3.36(dd,J=13.0,5.0Hz,1H)。

[0194] 12.化合物16之合成

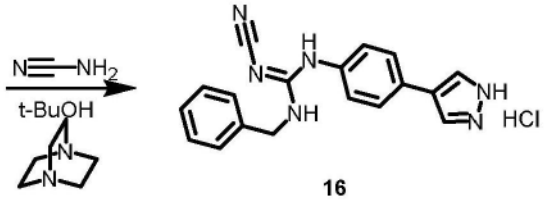
[0195] (17)合成例17

[0196] 化合物16之合成方案如以下方案14所示。

[0197] 方案14

[0198] 

1b 16a 16b



16

[0199] 将叔丁基-(4-氨基-3-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)-1H-吡唑(1b)(400mg,1.54mmol,1.0equiv)与(异硫氰酸根合甲基)苯((isothiocyanatomethyl)benzene)(276mg,1.85mmol,1.2eq)于叔丁醇(t-BuOH)(10mL)中的混合物在N_2环境下于85℃搅拌隔夜。将前述之反应混合物冷却并浓缩。将残留物以硅胶管柱纯化,并以乙酸乙酯/石油醚(1:1)活化,以获得叔丁基4-(4-(3-苄硫脲基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-benzylthioureido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(16a)(410mg,产率:65%),其为黄色固体。LCMS(ES,m/z):$[M+H]^+$=409.3。

[0200] 将叔丁基4-(4-(3-苄硫脲基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(16a)(410mg,1.00mmol,1.0eq)与CH_3I(214mg,1.51mmol,1.5eq)于丙酮(15mL)中的混合物在N_2环境下于30℃搅拌3小时。将前述之反应混合物过滤。收集滤饼(filter cake),以获得叔丁基4-(4-((((苄基氨基)(甲硫基)亚甲基)氨基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(((benzylamino)(methylthio)methylene)amino)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(16b)(370mg,产率:87%),其为白色固体。LCMS(ES,m/z):$[M+H]^+$=423.3。

[0201] 将叔丁基4-(4-((((苄基氨基)(甲硫基)亚甲基)氨基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(16b)(370mg,0.88mmol,1.0eq)、氰胺(cyanamide)(110mg,2.63mmol,3.0eq)与1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷(1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)(98mg,0.88mmol,1.0eq)于叔丁醇(10mL)中之混合物于在N_2环境下于90℃隔夜搅拌,之后于130℃搅拌3小时。将前述之反应混合物冷却并浓缩。将残留物以二氯甲烷(10mL)处理并过滤。藉由Prep-HPLC(H_2O:CH_3CN=7:3)将滤饼纯化,以获得1-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-苄基-2-氰基胍盐酸盐(1-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-benzyl-2-cyanoguanidine hydrochloride)(16)(53mg,产率:19%),其为白色固体。LCMS(ES,m/z):$[M+H]^+$=317.2。^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d_6):9.08(s,1H),8.03(s,2H),7.64-7.62(m,1H),7.57(d,J=8.4Hz,2H),7.32(t,J=7.4Hz,2H),7.28-7.23(m,3H),7.17(d,J=8.8Hz,2H),4.36(d,J=5.6Hz,2H)。

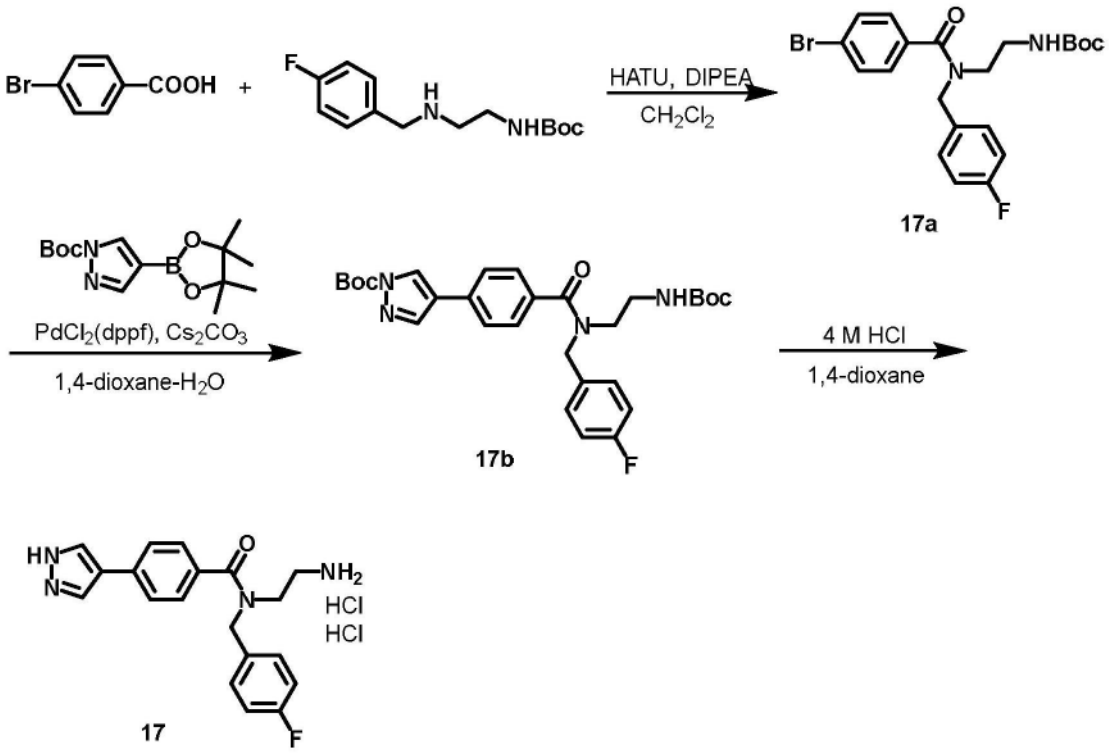
[0202] 13.化合物17之合成

[0203] (18)合成例18

[0204] 化合物17之合成方案如以下方案15所示。

[0205] 方案15

[0206]



[0207] 对4-溴苯甲酸(4-bromobenzoic acid)(322mg,1.60mmol)与叔丁基(2-((4-氟苄基)氨基)乙基)氨基甲酸酯(tert-butyl(2-((4-fluorobenzyl)amino)ethyl)carbamate)(430mg,1.60mmol)在CH_2Cl_2(5mL)中且经搅拌的溶液加入DIPEA(698μL,4.01mmol)与HATU(732mg,1.92mmol)。将前述之反应混合物在室温下搅拌2小时。藉由减压移除溶剂,藉由管柱层析将残留物纯化,以获得叔丁基(2-(4-溴-N-(4-氟苄基)苯甲酰胺基)乙基)氨基甲酸酯(tert-butyl(2-(4-bromo-N-(4-fluorobenzyl)benzamido)ethyl)carbamate)(17a)(537mg,75%)为一种油。^{1}H-NMR($CDCl_3$,500MHz)7.53(s,1H),7.31-7.29(m,2H),7.10-7.04(m,4H),5.01-4.75(m,1H),4.53(s,2H),3.58-3.19(m,4H),1.44(s,9H)。

[0208] 将叔丁基(2-(4-溴-N-(4-氟苄基)苯甲酰胺基)乙基)氨基甲酸酯(17a)(537mg,1.19mmol)、叔丁基4-(4,4 1,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(350mg,1.19mmol)、$PdCl_2$(dppf)(87mg,0.12mmol)与Cs_2CO_3(775mg,2.38mmol)的混合物装入一密封试管,然后在氩气下注入混合溶剂(二噁烷/H_2O=10/1,6mL),并将混合物在90℃下搅拌2小时。冷却至室温后,藉由旋转蒸发移除溶剂,并对残留物加水,且以EtOAc(15mL×3)萃取。将合并的有机层以盐水清洗,以无水Na_2SO_4干燥并且过滤。将滤液浓缩并藉由急速层析法(EtOAc/Hex=25%至67%)于硅胶纯化残留物,以获得叔丁基4-(4-((2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙基)(4-氟苄基氨基甲酰基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)(4-fluorobenzyl)carbamoyl)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(17b),其为白粉末状(385mg,60%)。^{1}H-NMR(CDCl3,500MHz)8.32(s,1H),7.59(s,1H),7.53(s,1H),7.47(s,2H),7.14-7.04(m,4H),5.07-4.78(m,1H),4.58(s,2H),3.60-3.33(m,4H),1.68(s,9H),1.45(s,9H)。

[0209] 对叔丁基4-(4-((2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙基)(4-氟苄基氨基甲酰基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(17b)(300mg,0.56mmol)与1,4-二噁烷(1mL)的混合物加入在1,4-二噁

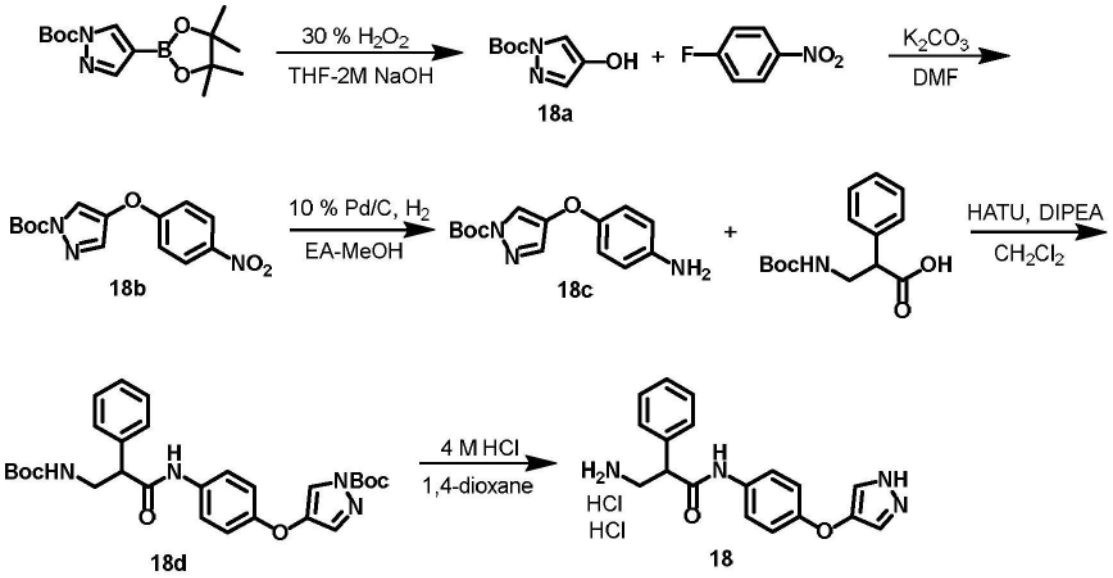
烷(2.78mL)中之4M HCl。将前述之反应混合物在室温下搅拌1小时。将反应混合物浓缩。将残留物以DCM(6mL)处理并过滤。收集滤饼,以获得N-(2-氨基乙基)-N-(4-氟苄基)-4-(1H-吡唑-4-基)苯甲酰胺二盐酸盐(N-(2-aminoethyl)-N-(4-fluorobenzyl)-4-(1H-pyrazol-4-yl)benzamide dihydrochloride)(17,200mg,87%),其为浅黄色固体。^{1}H-NMR(500MHz,D_2O)δ:7.99(s,2H),7.40-7.32(m,4H),7.04-6.97(m,4H),4.41(s,2H),3.64(s,2H),3.06(s,2H)。

[0210] 14.化合物18之合成

[0211] (19)合成例19

[0212] 化合物18之合成方案如以下方案16所示。

[0213] 方案16

[0214] 

[0215] 对4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-甲酸叔丁酯(tert-butyl4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(1540mg,5.24mmol)在THF(15mL)于0℃且经搅拌的溶液加入2M $NaOH_{(eq)}$(5.24mL,10.47mmol),接着加入30%过氧化氢(1.19mL,10.47mmol),并将前述之反应混合物先于0℃搅拌30分钟再于室温下搅拌1小时。将反应混合物冷却至0℃,并以DCM稀释,且加入2M $HCl_{(eq)}$直至达到pH值为2。收集有机层,干燥并于减压下去除溶剂,以获得叔丁基4-羟基-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-hydroxy-1H-pyrazole-1-carboxylate)(18a)(965mg,100%),其为黄色固体。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:9.28(s,OH,1H),7.51(s,1H),7.45(s,1H),1.52(s,9H)。

[0216] 对叔丁基4-羟基-1H-吡唑-1-羧酸酯(18a)(965mg,5.24mmol)与1-氟-4-硝基苯(1-fluoro-4-nitrobenzene)(739mg,5.24)在DMF(10mL)中且经搅拌的溶液加入K_2CO_3(1447mg,10.47mmol)。将前述之反应混合物在90℃下搅拌12小时。在减压下移除溶剂,藉由管柱层析(EtOAc/已烷=10%)将残留物纯化,以获得叔丁基4-(4-硝基苯氧基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-nitrophenoxy)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(18b)(479mg,30%),其为黄色固体。^{1}H-NMR(500MHz,CDCl3)δ:8.22(d,J=8.0Hz,2H),8.01(s,1H),7.65(s,1H),7.10(d,J=8.0Hz,2H),1.67(s,9H)。

[0217] 对叔丁基4-(4-硝基苯氧基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(18b)(140mg,0.46mmol)于MeOH(5mL)与EtOAc(5mL)中的溶液中加入10％Pd/C(49mg,0.046mmol)。将前述之反应混合物于H_2气环境之室温下搅拌2小时。将混合物过滤,并藉由旋转蒸发滤液,以获得叔丁基4-(4-氨基苯氧基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl 4-(4-aminophenoxy)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(18c)(118mg,93％),其为棕色固体。

[0218] 对3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酸(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanoic acid)(114mg,0.43mmol)与叔丁基4-(4-氨基苯氧基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(118mg,0.43mmol)在CH_2Cl_2(25mL)中且经搅拌的溶液,加入DIPEA(187μL,1.07mmol)与HATU(196mg,0.51mmol)。将前述之反应混合物在室温下搅拌2小时。藉由减压移除溶剂,然后将残留物以制备逆相高效液相色层分析(80％ACN,20％H_2O)纯化,之后冷冻干燥,以获得叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酰胺基)苯氧基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)phenoxy)-1H-pyraz ole-1-carboxylate)(18d)(110mg,49％),其为白色粉末。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:7.79(s,1H),7.56(s,1H),7.42(d,=8.0Hz,2H),7.39-7.29(m,5H),6.98(d,J=8.0Hz,2H),5.15(brs,1H),3.89(t,J=5.0Hz,1H),3.70-3.58(m,1H),3.56-3.54(m,1H),1.64(s,9H),1.51(s,9H)。

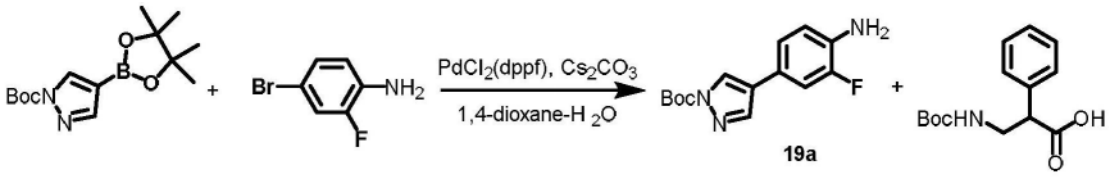
[0219] 对叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酰胺基)苯氧基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(18d)(110mg,0.21mmol)与1,4-二噁烷(1mL)的混合物,加入在1,4-二噁烷(1.05mL)中之4M HCl。将前述之反应混合物在室温下搅拌1小时。将反应混合物浓缩。将残留物以DCM(5mL)处理并过滤。收集滤饼,以获得N-(4-(((1H-吡唑-4-基)氧基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺二盐酸盐(N-(4-((1H-pyrazol-4-yl)oxy)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanamide dihydrochloride)(18)(82mg,22％),其为白色固体。^{1}H-NMR(500MHz,CD_3OD)δ:7.84(s,2H),7.54(d,J=8.5Hz,2H),7.53-7.40(m,4H),7.37-7.34(m,1H),7.02(d,J=8.5Hz,2H),4.13-4.10(m,1H),3.62-3.57(m,1H),3.24(dd,J=5.5,12.5Hz,1H)。

[0220] 15.化合物19之合成

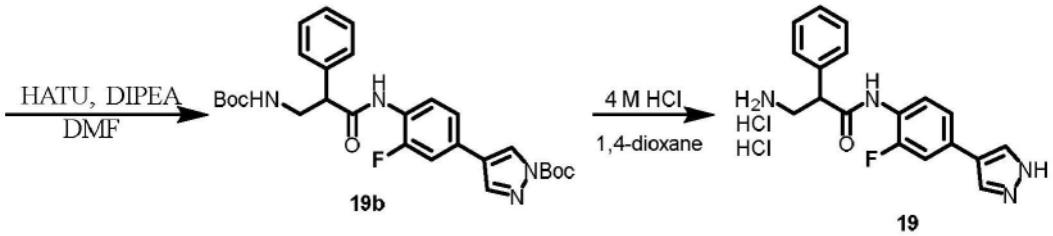
[0221] (20)合成例20

[0222] 化合物19之合成方案如以下方案17所示。

[0223] 方案17



[0224]



[0225] 对在密封管中之4-溴-2-氟苯胺(4-bromo-2-fluoroaniline)(1211mg,

6.37mmol)、1-Boc-4-吡唑硼酸频哪醇酯(1-Boc-4-pyrazoleboronic acid pinacol ester)(1875mg,6.37mmol)、$PdCl_2$(dppf)(467mg,0.64mmol)与Cs_2CO_3(4153mg,12.75mmol)的混合物,在氩气下注入混合溶剂(二噁烷/H_2O=9/1,36mL),之后将混合物在80℃下搅拌2小时。于冷却至室温后,经由旋转蒸发去除溶剂,且对残留物加水,并以EtOAc(30mL×3)进行萃取。将经合并之有机层以盐水清洗、以无水Na_2SO_4干燥并过滤。将滤液浓缩且将残留物藉由急速层析法(EtOAc/Hex=15%至17%)于硅胶进行纯化以获得叔丁基4-(4-氨基-3-氟苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl4-(4-amino-3-fluorophenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(19a)(1362mg,77%),其为油。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:8.17(s,1H),7.89(s,1H),7.15(dd,J=2.0,12.0Hz,1H),7.11(d,J=8.0Hz,1H),6.80(t,J=8.0Hz,1H),1.67(s,9H)。

[0226] 对3-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酸(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanoic acid)(346mg,1.31mmol)与叔丁基4-(4-氨基-3-氟苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(19a)(362mg,1.31mmol)在DMF(2mL)中且经搅拌的溶液,加入DIPEA(569μL,3.26mmol)与HATU(596mg,1.57mmol)。将前述之反应混合物在室温下搅拌2小时。藉由减压移除溶剂,接着将残留物以制备逆相高效液相色层分析(80%ACN,20%H_2O)纯化,之后冷冻干燥,以获得叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酰胺基)-3-氟苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)-3-fluorophenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(19b)(321mg,47%),其为白色粉末状。^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:8.32(t,J=8.5Hz,1H),8.25(s,1H),7.92(s,1H),7.42-7.33(m,5H),7.29-7.26(m,1H),7.19(d,J=11.5Hz,1H),5.12(brs,1H),3.96(s,1H),3.71-3.68(m,1H),3.60-3.58(m,1H),1.67(s,9H),1.43(s,9H)。

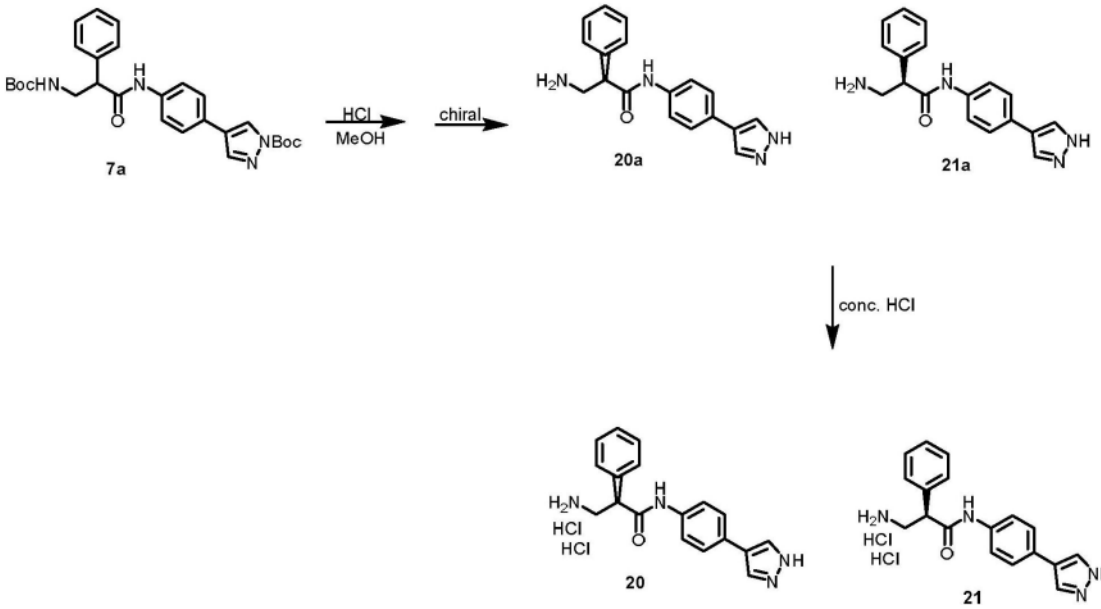
[0227] 对溶于1,4-二噁烷(1mL)之叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酰胺基)-3-氟苯基)-1H-吡唑-1-羧酸酯(19b)(315mg,0.60mmol),加入在1,4-二噁烷(4.0mL)中之4M HCl。将前述之反应混合物在室温下超音波处理30分钟。藉由过滤收集白色粉末、以DCM洗涤并干燥,以获得3-氨基-N-(2-氟-4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-2-苯基丙酰胺二盐酸盐(3-amino-N-(2-fluoro-4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-2-phenylpropanamide dihydrochloride)(19)(230mg,96%)。^{1}H-NMR(500MHz,D_2O)δ:8.05(s,2H),7.42-7.38(m,6H),7.28(t,J=8.0Hz,2H),4.18(t,J=7.0Hz,1H),3.58(dd,J=7.0,13.0Hz,1H),3.39(dd,J=7.0,13.0Hz,1H)。LCMS(ES,m/z):$[M-2HCl+H]^+$=326.1,$[M-2HCl+Na]^+$=348.1。

[0228] 16.化合物20与化合物21之合成

[0229] (21)合成例21

[0230] 化合物20与21之合成方案如以下方案18所示。

[0231] 方案18



[0232]

[0233] 对4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-苯基丙酰胺基)苯基)-1H-吡唑-1-甲酸叔丁酯(tert-butyl4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(15g,29.6mmol,1.0eq)在MeOH(150mL)中的溶液加入HCl/MeOH(150mL)。将前述混合物于室温隔夜搅拌。将混合物浓缩并将残留物溶于H_2O(50mL)中,以$NaHCO_3$水溶液调整pH值至9。将混合物过滤,将滤饼真空干燥,以获得N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanamide)(10g,100%),其为白色固体。藉由手性拆分(chiral resolution)纯化固体,以获得(S)-N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺(20a)与(R)-N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺(21a)

[0234] 分离条件:

[0235] 管柱:ChiralPak AD-H Daicel chemical Industries,Ltd,250*30mm I.D.,10μm

[0236] 移动相A:Supercritical CO_2,移动相B:MeOH(0.1%NH_3H_2O)

[0237] A:B=60:40于50mL/分钟

[0238] 管柱温度:38℃

[0239] 喷嘴压力:100Bar;喷嘴温度:60℃;蒸发温度:20℃;微调温度(Trimmer Temp):25℃;波长:220nm

[0240] 对H_2O溶液(10mL)中之(S)-N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺的加入浓HCl(2mL),并浓缩以获得(S)-N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺二盐酸盐((S)-N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanamide dihydrochloride)(20)(2.1g)。^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d_6):10.55(s,1H),8.20(s,3H),8.13(s,2H),7.65-7.29(m,9H),4.22-4.19(m,1H),3.51(s,1H),3.04-3.01(m,1H)。LCMS:$[M+H]^+$=307.1。

[0241] 对H_2O溶液(10mL)中之(R)-N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺的加入浓HCl(2mL),并浓缩以获得(R)-N-(4-(1H-吡唑-4-基)苯基)-3-氨基-2-苯基丙酰胺二盐酸盐(21)(2.1g)。^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d6):10.50(s,1H),8.16(s,3H),8.11(s,2H),7.64-7.29(m,9H),4.20-4.16(m,1H),3.53-3.48(m,1H),3.06-3.00(m,1H)。LCMS:$[M+H]^+$=

307.1。

[0242] 实施例2

[0243] 体外功效测试

[0244] A.对Rho相关的蛋白激酶(Rho-associated protein kinase,ROCK)之抑制功效测试

[0245] 测试上方所合成之各化合物对于ROCK的抑制效果

[0246] A-1.方法

[0247] 1.以DMSO将10mM之测试化合物稀释为1mM,接着再稀释为300nM。Netarsudil(AR-13324)为市售降眼压药物,AR-13503为AR-13324之活性代谢物。

[0248] 2.将上述300nM之测试化合物进行系列稀释,以分别获得浓度为100nM、33nM、11nM、3.7nM、1.2nM以及0.4nM的测试化合物。

[0249] 3.将1μL之上述经系列稀释的测试化合物加入49μL之经调整之ROCK反应缓冲溶液(Modified ROCK reaction buffer)(含0.1M KCl、0.01M $MgCl_2$、0.1mM EGTA与2.25μg/mL ROCK1之0.05M Trizma®hydrochloride buffer(pH 7.5))以获得实验组样本。取1μL DMSO加入49μL之经调整之ROCK反应缓冲溶液以获得正控制组样本(最大值=100%)。取1μL DMSO加入49μL之缓冲溶液(含0.1M KCl,0.01M $MgCl_2$与0.1mM EGTA之0.05M Trizma® hydrochloride buffer(pH 7.5))以获得载剂控制组样本(最小值=0%)。

[0250] 4.将20μL之上述配制样本加入平底之96孔盘,并于每孔中加入20μL ROCK ATP缓冲溶液。

[0251] 5.将上述96孔盘放置于回旋式震荡器上,于室温下反应90分钟。

[0252] 6.接着,将40μL Kinase-Glo luminescent kinase assay solution(Promega,RV6712)加入上述96孔盘,并将96孔盘置于回旋式震荡器上,于室温下反应10分钟。

[0253] 7.以SpectraMax M5 microplate reader测定96孔盘之各孔的冷光数值,并以下方公式计算ROCK抑制率(%)。

[0254] 最大值=在无任何测试化合物存在下,利用上述方法所测得之值(酵素与基质完全反应的状况下所测得之值为最大值)

[0255] 最小值=在无酵素存在下,利用上述方法所测得之值(无酵素与基质反应所测得之值为最小值)

[0256] 抑制率(%)=(实验组(添加测试化合物之组所测得的值)-最小值)/(最大值-最小值)*100%

[0257] A-2.结果

[0258] 结果如表2所示。

[0259] 表2

[0260]

化合物	ROCK1 IC_{50}(nM)
AR-13324	+++++
AR-13503(AR-13324之活性代谢物)	++++++
化合物1	+++
化合物2	++++

化合物3	+++
化合物4	+++++
化合物5	+++++
化合物6	++++
化合物7	+++++
化合物8	+++++
化合物9	+++++
化合物10	+++
化合物11	+++++
化合物12	++++
化合物13	++++++
化合物14	+++++
化合物15	+++
化合物16	+
化合物17	+++
化合物18	+
化合物19	++++
化合物20	+++++
化合物21	+++

[0261] 注:++++++代表IC_{50}<1nM;+++++代表IC_{50}=1-10nM;++++代表IC_{50}=10~100nM;+++代表IC_{50}=100-1000nM;++代表IC_{50}>1,000nM;+代表IC_{50}>10,000nM

[0262] B.对肌凝蛋白轻链激酶-4(myosin light chain kinase 4,MYLK-4)之抑制功效测试

[0263] 实验流程系参考ThermoFisher Scientific所提供之LanthaScreen Eu Kinase Binding Assay Screening Protocol and Assay Conditions。

[0264] B-1.材料制备

[0265] 将配制于100%DMSO中之测试化合物储存溶液(1mM),进行3倍系列稀释10次,以备测定其对MYLK-4的IC_{50}。

[0266] 激酶/抗体混合物(Kinase/Antibody Mixture),预先以激酶缓冲液(Kinase Buffer)稀释为2X工作浓度。

[0267] B-2.分析方法

[0268] 1.于白色384微孔平盘(Greiner,Cat.NO.784207)中加入激酶缓冲液3.84μL,接着加入上述激酶/抗体混合物8.0μL,再加入追踪剂(AlexaFluor labeled Tracer)4.0μL,之后加入上述经稀释之适当浓度测试化合物160nL,并使培养盘震荡30秒。

[0269] 2.接着将培养盘放置在室温下培养60分钟,再以萤光盘分析器(fluorescence plate reader)读取并分析数据。并以下公式计算各孔洞中之反应液的发射比。

[0270] 发射比(emission eatio,ER)=AF647发射(665nm)/铕发射(europium emission)(615nm)

[0271] 此外,于上述分析中同时设置有LanthaScreen Eu激酶之结合分析的对照组:抑制

0％对照组(0％displacement control),反应中不含已知抑制剂,作为最大发射比(maximum emission ratio);抑制100％对照组(100％displacement control),包含最高浓度之已知抑制剂,作为最小发射比(minimum emission ratio);其中,已知抑制剂为Sunitinib。

[0272] LanthaScreen Eu Kinase之结合分析的反应成份如表3所示。已知抑制剂Sunitinib之IC_{50}为19.0nM,符合预期IC_{50}范围。

[0273] 表3、LanthaScreen Eu激酶之结合分析的反应成份

[0274]

反应成份	浓度(nM)/IC_{50} (nM)
激酶(MYLK4)	5
抗体(Eu-anti-GST)	2
追踪剂(Tracer 222)	100 (Kd为173 nM)
缓冲溶液A (包括HEPES、BRIJ-35、$MgCl_2$及EGTA)	50 mM HEPES (pH 7.5)、0.01% BRIJ-35、10 mM $MgCl_2$及1 mM EGTA

[0275] 3.测试化合物于不同浓度对MYLK-4的抑制率可依据以下公式获得:

[0276] 抑制％＝[($ER_{抑制0\%对照组}$-$ER_{样本}$)/($ER_{抑制0\%对照组}$-$ER_{抑制100\%对照组}$)]*100

[0277] 4.根据上方所得测试化合物于不同浓度对MYLK-4的抑制率,计算出测试化合物于MYLK-4的IC_{50}。

[0278] B-3.结果

[0279] 结果如表4所示。

[0280] 表4、测试化合物之MYLK-4IC_{50}

[0281]

化合物	MYLK4 IC_{50}(nM)
AR-13324	++
AR-13503	+++
化合物1	+++
化合物2	+++
化合物5	+++
化合物6	+++
化合物7	++++
化合物8	++++
化合物10	++
化合物11	+++
化合物12	+++
化合物13	+++
化合物14	+++
化合物15	+++
化合物16	+
化合物17	+
化合物19	+++

化合物20	++++
化合物21	+++

[0282] 注:++++++代表IC_{50}<1nM;+++++代表IC_{50}=1-10nM;++++代表IC_{50}=10-100nM;+++代表IC_{50}=100-1000nM;++代表IC_{50}>1,000nM;+代表IC_{50}>10,000nM

[0283] C.对YSK-4之抑制功效测试

[0284] 实验流程系参考ThermoFisher Scientific所提供之Z'-LYTE Screening Protocol and Assay Conditions。

[0285] C-1.材料制备

[0286] 将配制于100%DMSO中之测试化合物储存溶液(1mM),进行3倍系列稀释10次,以用于测定测试化合物对YSK-4的IC_{50}。

[0287] 胜肽/激酶抗体混合物(Peptide/Kinase Mixture),预先以激酶缓冲液(Kinase Buffer)稀释为2X工作浓度。

[0288] ATP溶液,预先以激酶缓冲液(50mM HEPES pH 7.5,0.01%BRIJ-35,10mM $MgCl_2$,1mM EGTA)稀释为4X工作浓度。

[0289] 显影剂溶液为新颖PKC脂质混合物(Novel PKC Lipid Mix),其含有2mg/mL Phosphatidyl Serine、0.2mg/mL DAG于20mM HEPES,pH 7.4与0.3%CHAPS,预先以显影缓冲液稀释10倍。

[0290] C-2.分析方法

[0291] 1.于黑色384孔盘(Corning,Cat.NO.4514)中加入上述经稀释之适当浓度测试化合物100nL、激酶缓冲液2.4μL,接着加入上述胜肽/激酶混合物5μL,再加入ATP溶液2.5μL,并使培养盘震荡30秒。

[0292] 2.接着将培养盘放置在室温下培养60分钟。

[0293] 3.之后加入显影剂溶液5μL,并于黑暗中使培养盘震荡30秒,再以萤光盘分析器(fluorescence plate reader)读取并分析数据。

[0294] 此外,针对激酶制作以下对照组,并将其与激酶置于于同一培养盘上:

[0295] (1)0%磷酸化对照组(100%抑制对照组)

[0296] 最大发射比由0%磷酸化对照组(100%抑制对照组)所建立,其不包含ATP,且因此不显示激酶活性。该对照组在显影反应中产生100%经裂解的胜肽。

[0297] (2)100%磷酸化对照组

[0298] 由与胜肽基质序列相同的合成磷酸化胜肽作为100%磷酸化对照组。此对照组在显影反应中产生非常低百分比的裂解胜肽。

[0299] 依据0%磷酸化对照组与100%磷酸化对照组计算在特定反应孔(实验组)中达到的磷酸化百分比。

[0300] Z'-LYTE Screening Kinase之结合分析反应所使用的Z'-LYTE substrate种类为Ser/Thr 07胜肽,ATP反应浓度为5μM(YSK4的Km)。本分析中作为对照用的已知抑制剂为Staurosporine。于系统中IC_{50}为12.7nM,符合预期IC_{50}范围。将各孔洞所测得之数值,依据下方公式计算出测试化合物于不同浓度对YSK-4的抑制率,并依此计算出测试化合物于YSK-4的IC_{50}。

[0301] 对背景萤光的校正=萤光强度$_{样本}$-萤光强度$_{TCF1控制组}$

[0302] 发射比＝香豆素(Coumarin)发射(445nm)/萤光素发射(520nm)(使用针对背景萤光之校正值)

[0303] %磷酸化＝1-(发射比x $F_{100\%}$-$C_{100\%}$)/{($C_{0\%}$-$C_{100\%}$)+[发射比x($F_{100\%}$-$F_{0\%}$)]}*100

[0304] %抑制＝(1-%磷酸化$_{样本}$/%磷酸化$_{0\%抑制对照组}$)*100

[0305] C100%:100%磷酸化对照组之平均香豆素发射讯号

[0306] C0%:0%磷酸化对照组之平均香豆素发射讯号

[0307] F100%:100%磷酸化对照组之平均萤光素发射讯号

[0308] F0%:0%磷酸化对照组之平均萤光素发射讯号

[0309] DRI:显应反应干扰(Development Reaction Interference)

[0310] TCFI:测试化合物的萤光干扰(Test Compound Fluorescence Interference)

[0311] C-3.结果

[0312] 结果如表5所述。

[0313] 表5、测试化合物之YSK4 IC_{50}

[0314]

化合物	YSK4 IC_{50}(nM)
AR-13324	n.a.
AR-13503	n.a.
化合物1	+
化合物2	+
化合物5	+
化合物6	+
化合物7	++
化合物8	++
化合物10	+
化合物11	++
化合物12	++
化合物13	++
化合物14	++
化合物15	+
化合物16	+
化合物17	+
化合物19	++

[0315] 注:++++++代表IC_{50}<1nM;+++++代表IC_{50}＝1-10nM;++++代表IC_{50}＝10-100nM;+++代表IC_{50}＝100-1000nM;++代表IC_{50}>1,000nM;+代表IC_{50}>10,000nM

[0316] 整合前述结果可知,本揭露上述合成之化合物对于ROCK、MYLK-4与YSK4,均具有抑制功效,且具有加成性标靶抑制作用,特别是化合物7与化合物20。

[0317] 又,由于目前已知经由抑制之ROCK表现可达成保护视神经(参见,如Rothschild et al.,ROCK-1mediates diabetesinduced retinal pigment epithelial and endothelial cell blebbing:Contribution to diabetic retinopathy.Scientific Reports.(2017)7:8834.与Tanna et al.,Rho Kinase Inhibitors as a Novel

Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension.Ophthalmology.(2018)125:1741-1756.)与减缓或治疗高眼压(参见,如Tanna et al.,Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension.Ophthalmology.(2018)125:1741-1756)、青光眼压(参见,如Tanna et al.,Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension.Ophthalmology.(2018)125:1741-1756)、眼中风(参见,如Yi et al.,Protective Effects of Intravitreal Injection of the Rho-Kinase Inhibitor Y-27632in a Rodent Model of Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy(rAION).J Ophthalmol.(2020)2020:1485425.与Nourinia R,et al.ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases.Br J Ophthalmol 2018;102:1-5.)、黄斑部病变(参见,如Sadiq et al.Pharmacological agents in development for diabetic macular edema Int J Retin Vitr(2020)6:29.)、黄斑部水肿(参见,如Sadiq et al.Pharmacological agents in development for diabetic macular edema Int J Retin Vitr(2020)6:29.)、糖尿病视网膜病变(参见,如Nourinia R,et al.ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases.Br J Ophthalmol 2018;102:1-5)、角膜内皮细胞损伤(Fuchs endothelial corneal dystrophy,FECD)(参见,如Okumura et al.The ROCK Inhibitor Eye Drop Accelerates Corneal Endothelium Wound Healing Invest Ophthalmol Vis Sci.(2013)54:2439-2502.)、角膜纤维化(参见,如Słoniecka et al.,Substance P induces fibrotic changes through activation of the RhoA/ROCK pathway in an in vitro human corneal fibrosis model.J Mol Med (Berl).2019;97(10):1477-1489)等之功效,因此具有抑制ROCK之功效的本揭露上述合成之化合物,也可应用于眼科相关应用,如视神经的保护,及/或高眼压、青光眼、眼中风、黄斑部病变、黄斑部水肿、糖尿病视网膜病变、角膜内皮细胞损伤及/或角膜纤维化的预防及/或治疗等。

[0318] 此外,目前也已知经由抑制之ROCK表现可达成减缓或治疗肺动脉高压(参见,如Zhang et al.,Effects of Fasudil on Patients with Pulmonary Hypertension Associated with Left Ventricular Heart Failure with Preserved Ejection Fraction:A Prospective Intervention Study.Can Respir J.(2018)2018:314825)、慢性阻塞性肺病(COPD)(参见,如Liu et al.,Influence of Rho kinase inhibitor Fasudil on late endothelial progenitor cells in peripheral blood of COPD patients with pulmonary artery hypertension.Bosn J Basic Med Sci.(2014)14(1):40-4)、病因不明性肺纤维化(参见,如Knipe et al.,The Rho Kinase Isoforms ROCK1 and ROCK2 Each Contribute to the Development of Experimental Pulmonary Fibrosis.Am J Respir Cell Mol Biol.(2018)58(4):471-481.)、肺气肿(参见,如Bewley et al.,Differential Effects of p38,MAPK,PI3K or Rho Kinase Inhibitors on Bacterial Phagocytosis and Efferocytosis by Macrophages in COPD.PLoS One.(2016)11(9):e0163139.)、肺癌(参见,如Vigil et al.,ROCK1 and ROCK2 are Required for Non-Small Cell Lung Cancer Anchorage-Independent Growth and Invasion.Cancer Res.(2012)15:72(20).)等之功效,因此具有抑制ROCK之功效的本揭露上述合成之化合物,也可应用于肺部相关疾病与症状,如肺动脉高压、慢性阻塞性肺病、病

因不明性肺纤维化、肺气肿及/或肺癌的预防及/或治疗等。

[0319] 实施例3

[0320] 于正常兔之降眼压模型之最大效应(maximal effect,Emax)剂量评估

[0321] A.化合物20

[0322] 1.方法

[0323] 动物:雄性纽西兰白兔(n=7/每组);

[0324] 测试化合物配方:0.01%化合物20;0.03%化合物20;0.1%化合物20;

[0325] 投药:对每只实验动物于右眼(投药眼)滴入50μL测试化合物并于左眼(对照眼)滴入50μL载剂(vehicle)(不含测试化合物)。将上述3种配方每天投药一次,连续3天。

[0326] 在第1天与第3天投药前(0小时)以及投药后2、4、6与8小时以Tono-Vet(iCare)测量每只动物之眼压。

[0327] 2.结果

[0328] 结果如第1A图与第1B图,以及表6与表7所示。

[0329] 表6、第1天投药之眼压测定结果

[0330]

化合物20浓度	降眼压幅度(ΔIOP) (mmHg)	最大眼压下降幅度	T_{max} (小时)
0.10%	-5.3±0.6	32.2%	8
0.03%	-4.3±1.2	28.3%	8
0.01%	-2.9±1.1	18.7%	6

[0331] 最大眼压下降幅度%=(对照眼之眼压-投药眼之眼压)/对照眼之眼压*100

[0332] 表7、第3天投药之眼压测定结果

[0333]

化合物20浓度	降眼压幅度(ΔIOP) (mmHg)	最大眼压下降幅度	Tmax (小时)
0.10%	-5.2±1.3	32.6%	6
0.03%	-5.1±1.2	30.5%	8
0.01%	-2.7±0.8	15.4%	6

[0334] 最大眼压下降幅度%=(对照眼之眼压-投药眼之眼压)/对照眼之眼压*100

[0335] 第1A图与表6显示于第1天投药之眼压测定结果。第1B图与表7显示于第3天投药之眼压测定结果。

[0336] 结果显示,化合物20在降眼压效果方面呈现剂量依赖作用(dose dependent effect),其中投予0.03%化合物20之组与投予0.1%化合物20之组的降眼压幅度与趋势相近。

[0337] 又,连续给药3天,投予0.03%化合物20之组有些许药效累积的现象(第3天比第1天之降眼压幅度平均增加近1mmHg)(参见表6与表7),但投予0.03%化合物20之组的降眼压幅度与投予0.1%化合物20之组的降眼压幅度相近(参见表7)。此结果显示,化合物20于浓度0.03%应已接近此模型之眼压测试极限,因此其所显示之药效(Emax)累积差异不大。

[0338] 本实验所呈现之数据,系已去除不合格之数据(已去除第1天两眼之眼压差≥2mmHg(n=1)与第3天给药前两眼之眼压差>5mmHg之白兔(n=1)),并去除反弹性高眼压之数据(n=3)。每组n值≥3;另外投予0.01%化合物20之组的n值为6。

[0339] 由上述结果可知,浓度0.03%应已为化合物20于正常眼压兔之模型中的最大效应

(maximal effect,Emax)剂量。

[0340] B.化合物4、5、7、8、11、12与14

[0341] 以与对于化合物20之类似方法,确认化合物4、5、7、8、11、12与14于正常眼压兔之模型中的最大效应剂量。

[0342] 结果显示化合物4、5、7与8之最大效应剂量皆为1%,而化合物11、12与14之最大效应剂量分别为0.5%、0.25%与0.5%。

[0343] 实施例4

[0344] 于正常眼压兔之模型中之降眼压功效评估

[0345] A.化合物20

[0346] 1.材料与方法

[0347] 实验动物:纽西兰大白兔,雄性,体重大于2公斤。纽西兰大白兔系购自惠钧养殖场。经过一周检疫期后,以温度16-22℃及30-70%相对湿度(Relative Humidity,RH)、8小时白天/16小时黑夜之环境条件,饲养于瑞德生物科技有限公司。

[0348] 实验方法:

[0349] (1)降眼压功效评估

[0350] 于将12只纽西兰大白兔(2.0-4.0kg)秤重并分组后(每组n=3-6),将大白兔以包巾固定。待大白兔呈现稳定状态后,拉开其右眼下眼睑,将50μL的测试样本(含0.1%或0.03%化合物20之眼滴剂),滴入大白兔右眼的结膜囊内,阖上眼睑,维持大白兔安定状态至少2分钟,并避免大白兔甩头导致眼药流出眼部;左眼给予载剂(不含测试化合物),作为对照组。以0.02%AR-13324作为比较基准(benchmark),以评估测试化合物的药效竞争性。眼压侦测时间点为给药前(0小时)及给药后1、2、4、6与8小时。

[0351] (2)刺激性评估

[0352] 眼压测量完毕后即进行兔眼外观拍照,并依据经济合作暨发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development,OECD)所规定之眼刺激性试验准则(OECD/OCDE 405)评估测试物质对大白兔眼睛角膜、虹膜或结膜造成的刺激状态(adverse event)。

[0353] OECD/OCDE 405对于角膜、虹膜或结膜之评分方式如表8所示。

[0354] 表8、眼刺激等级

[0355]

不透明度	密度分数（应从最稠密的区域中读取读数）*
无溃疡或浑浊	0
散乱或分散的不透明区域(正常光泽略微变暗)； 虹膜之细节清晰可见	1
容易辨认的半透明区域; 虹膜的细节稍微模糊	2
纳克洛斯区(Nacrous Area)（角膜呈现珠光白)；没有可见的虹膜细节; 瞳孔大小几乎无法识别	3
不透明角膜; 虹膜无法通过不透明辨别	4

[0356] 可能的最大值:4

[0357] *应注意角膜混浊区域

[0358] (3)角膜观察

[0359] 以0.1％化合物20之眼滴剂为测试样本,实验方法与上方「(1)降眼压功效评估」中所记载之实验方法相同。进行7日连续投药(每日一次),之后以裂隙灯观察角膜状态。

[0360] (4)候选药物于投药后存在于房水(aqueous humor,AH)之含量分析将正常兔投予化合物20,并于不同时间点确认化合物于房水中之含量。

[0361] 2.结果

[0362] 降眼压功效评估之结果如第2图所示。

[0363] 依据第2图可知,含0.1％化合物20之眼滴剂与含0.03％化合物20之眼滴剂的最大效应(Emax)显示于投药后6-8小时,而其最大降眼压幅度为约4.4-4.9mmHg,且眼刺激性轻微。

[0364] 又,此结果也显示,于正常眼压兔之模型中含0.03％化合物20之眼滴剂已达最大降眼压作用。

[0365] 眼刺激性评估结果如第3A图、第3B图与第3C图所示。

[0366] 由第3A图与第3B图可知,化合物20在最大效应剂量(0.1％)下之眼刺激性仍低于AR-13324(0.02％)。

[0367] 此外,第3C图显示,连续给药7天,角膜仍无破损与混浊。

[0368] 化合物20于投药后存在于虹膜与睫状体及房水之含量分析结果如第4图所示。针对虹膜与睫状体,化合物20之浓度系以单位ng/g进行测定;针对房水,化合物20之浓度系以单位ng/mL进行测定。

[0369] 依据第4图可知,于投药后化合物20在房水中之含量可达ROCK抑制需求。

[0370] B.化合物4、5、7、8、11、12与14

[0371] 1.方法

[0372] (1)降眼压功效评估

[0373] 以与对于化合物20之类似方法,确认化合物4、5、7、8、11、12、14、20与21(使用最大

效应剂量)于正常眼压兔之模型中的降眼压功效。

[0374] (2)安全边际(safety margin)测试

[0375] 以化合物7为代表,将含2%化合物7之眼滴剂投予兔眼(一天3剂,每次间隔3小时,并于给药前以及每次给药后1小时观察)。另含0.04%化合物7之眼滴剂投予兔眼(一天1剂,并于给药前以及给药后1小时与6小时观察)。依据上述经济合作暨发展组织所规定之眼刺激性试验准则OECD/OCDE 405,对化合物7之眼刺激性进行评估。

[0376] 2.结果

[0377] 降眼压功效评估之结果如表9所示。

[0378] 表9、降眼压功效评估结果

[0379]

化合物	眼压差(mmHg)/剂量/达最大效应之时间点
AR-13324	4.5/1%/6小时
化合物4	4.2/1%/2小时
化合物5	1.5/1%/6小时
化合物7	5.1/1%/4小时
化合物8	5.2/1%/6小时
化合物11	2.0/0.5%/1小时
化合物12	2.0/0.25%/6小时
化合物14	2.5/0.5%/6小时
化合物20	4.9/0.03%/8小时
化合物21	1.3/0.03%/8小时

[0380] 安全边际(safety margin)测试结果如第5图与表10所示。

[0381] 表10、安全边际测试结果

[0382]

安全边际	AR-13324	化合物7
治疗指数(therapeutic index, TI)	2	3
OECD分数		
	AR-13324(治疗指数:2)	化合物7(治疗指数:3)
红眼	1	1
结膜水肿	1	0
过度分泌(Discharge)	2	1
整体	4	2

[0383] 由第5图与表10可知,AR-133247于治疗指数为2时,OECD405整体分数为4,而化合物7于治疗指数为3时,OECD405整体分数为2,因此化合物7之安全边际优于AR-13324。

[0384] 实施例5

[0385] 猕猴动物模式

[0386] 1.材料与方法

[0387] 将含0.1%或0.03%化合物20之眼滴剂投予正常猕猴。以0.02%AR-13324作为基

准,以评估测试化合物的药效竞争性。以气动式眼压测定仪(Model 30™ Pneumatonometer)测定动物眼压。眼压测定前需要先进行动物麻醉。分别在局部(topical)给药后(一天一次)于所设定之时间点测定动物眼压。

[0388] 2.结果

[0389] 结果如第6图所示。

[0390] 依据第6图可知,化合物20可在正常眼压弥猴达到与AR-13324相当或更优之降眼压作用,且无明显红眼症等副作用。

[0391] 实施例6

[0392] 于高渗透压食盐水(hypertonic saline)所诱导之高眼压兔模型(急性高眼压模型)中的降眼压功效评估

[0393] 1.材料与方法

[0394] 实验动物:纽西兰大白兔,雄性,体重2.0-3.0kg。纽西兰大白兔于试验前购自合格之实验动物兔场,饲养于交通大学动物中心。

[0395] 测试样本:含0.1%化合物20之眼滴剂

[0396] 负对照组(negative control)1:生理食盐水

[0397] 负对照组2:不含测试物质的载剂(含有5%甘露醇(mannitol)、20mM硼酸(boric acid)与0.125%壬苯醇醚-9(nonoxynol-9))

[0398] 实验方法:将雄性纽西兰大白兔于秤重与分组后进行麻醉。将160μL高渗透压食盐水(5%NaCl)注入于麻醉状况下的大白兔左右眼玻璃体内,以使兔眼成为高眼压状态。接着,将50μL生理盐水(0.9%NaCl)、含0.1%化合物20之眼滴剂、用于制备化合物20之眼滴剂的载剂(不含化合物20)与含0.02%AR-13324之眼滴剂,分别滴入各组别的兔左右眼内。眼压侦测(IOP)时间点为麻醉前(0小时)以及投药后0.5、1、1.5、3与5小时。以生理食盐水与不含测试物质之载剂作为负对照组,以含0.02%AR-13324之眼滴剂作为基准(benchmark),以评估化合物20于高渗透压食盐水诱导高眼压兔之模型中的降眼压功效。

[0399] 2.结果

[0400] 结果如第7图与表11所示。

[0401] 表11、于高眼压兔模型中之降眼压测试结果

[0402]

短暂性高眼压兔				
	剂量	最大眼压差(mm Hg)	最大眼压差(%)	AUC
生理食盐水	-	-	-	139.7
AR-13324	0.02%	-7.7±4.2	-20.8%	132.9
用于制备化合物20之眼滴剂的载剂	-	+7.2±5.2	+16.2%	NA
化合物20	0.1%	-18.0±6.8	-40.4%	99.1

[0403] 最大眼压差:于记录到最大反应之时间点,个体之眼压读数与负对照组1(生理食盐水)之平均眼压读数之差异(J Ocul Pharmacol Ther.2010 Apr;26(2):125-132)

[0404] 结果显示,于高渗透压食盐水诱导高眼压兔之模型中,含0.1%化合物20之眼滴剂可降低眼压约18.0±6.8mmHg,而含0.02%AR-13324之眼滴剂降低眼压约7.7±4.2mmHg。显

示化合物20的降眼压功效相较于AR-13324明显较佳(t-test,p<0.05)。而载剂相较于生理食盐水于统计上(t-test)并无明显差异。AR-13324相较于生理食盐水或载剂,在统计上(t-test)也无显著差异。

[0405] 实施例7

[0406] 于磁珠诱导高眼压兔之模型(眼压>30mmHg的高眼压模型)中的降眼压功效评估

[0407] 剥脱性青光眼(exfoliation glaucoma,XFG)被认为比原发性隅角开放性青光眼(primary open angle glaucoma)更严重。剥脱性青光眼与原发性隅角开放性青光眼之最大眼压(38.2 vs 26.9mmHg)、最小眼压(24.7 vs 18.4mmHg)与平均眼压变化(13.5 vs 8.5mmHg)在统计学上具显著差异。又,目前并无已知的饮食疗法、药物或其他干预措施可以防止剥脱性综合征(exfoliation syndrome)的发生或减慢其发展(Progress in Retinal and Eye Research Vol.19,No.3,pp.345 to 368,2000)。由上述可知,剥脱性青光眼之眼压可以达到>30mmHg,且目前对其并无有效药物,因此,于此提供眼压>30mmHg的高眼压模型以评估本揭露之化合物应用于剥脱性青光眼与眼压>30mmHg的高眼压之治疗的可行性。

[0408] A.化合物20

[0409] 1.材料与方法

[0410] 实验动物:纽西兰大白兔,雄性,体重2.0-3.0kg。纽西兰大白兔于试验前购自惠钧养殖场,饲养于交通大学动物中心。

[0411] 测试样本:含0.03%或0.1%化合物20之眼滴剂

[0412] 负对照组1:不含测试化合物20的载剂(含有5%甘露醇、20mM硼酸与0.125%壬苯醇醚-9)

[0413] 负对照组2:不含测试化合物AR-13324的载剂(含有4.7%D-甘露醇与0.05%硼酸)

[0414] 实验方法:将雄性纽西兰大白兔于秤重与分组后以Zoletil 50 0.2mL/kg进行麻醉纽西兰大白兔。将50μL磁珠溶液(50mg/mL,磁珠粒径10μm)注入于麻醉状况下的大白兔左右眼前眼房内,以使兔眼成为高眼压状态。眼前房注射结束后,立即在眼周套入强力钕铁磁铁环处理10-20分钟,以使磁珠完全堵住眼房水排水组织。以抗生素消毒眼球后,提供保湿眼膏进行眼球恢复,并待眼压升高。约3天后,眼压可以达到>30mmHg的高眼压,并可以持续至少10天。在眼压达到目标眼压>30mmHg的高眼压后,将含0.03%或0.1%化合物20之眼滴剂(右眼)、用于制备化合物20之眼滴剂的载剂(不含化合物20)(左眼)、含0.02%AR-13324之眼滴剂(右眼)与用于制备AR-13324眼滴剂的载剂(不含AR-13324)(左眼),分别滴入一滴(约35μL)于各组别的兔左右眼内。眼压侦测(IOP)时间点为给药前(0小时)以及给药后2、4、6与8小时,实验连续进行2天。以含0.02%AR-13324之眼滴剂作为基准,以评估化合物20于磁珠诱导高眼压兔之模型(眼压>30mmHg的高眼压模型)中的降眼压功效。

[0415] 2.结果

[0416] 结果如表12与第8图所示。

[0417] 表12、化合物20于磁珠诱导高眼压兔之模型中的降眼压测试结果

[0418]

化合物	剂量	最大眼压差(mmHg)
AR-13324	0.02%	4.3±1.4
化合物 20	0.03%	5.7±0.6
	0.1%	12.1±1.4

[0419] 结果显示,于磁珠诱导高眼压兔之模型(眼压>30mmHg的高眼压模型)中,含0.03%化合物20之眼滴剂可降低眼压约5.7±0.6mmHg(降低约15.3%),而含0.1%化合物20之眼滴剂可降低眼压约12.1±1.4mmHg(降低约28.8%)。亦即含0.03%化合物20之眼滴剂与含0.1%化合物20之眼滴剂的降眼压功效均优于含0.02%AR-13324之眼滴剂(降低眼压约4.3±1.4mmHg(降低约11.0%)),且含0.1%化合物20之眼滴剂的降眼压功效甚至可为含0.02%AR-13324之眼滴剂的2倍以上。

[0420] B.化合物7

[0421] 以与对于化合物20之类似方法,确认化合物7(使用最大效应剂量0.5%与1%)于正常眼压兔之模型中的降眼压功效。

[0422] 结果如表13所示。

[0423] 表13、化合物7于磁珠诱导高眼压兔之模型中的降眼压测试结果

[0424]

化合物	剂量	最大眼压差(mmHg)
AR-13324	0.02%	3.6±2.1
化合物 7	0.5%	6.7±1.6
	1%	11.8±0.8

[0425] 依据表12可知,于磁珠诱导高眼压兔之模型(眼压>30mmHg的高眼压模型)中,含0.5%化合物7之眼滴剂与含1%化合物7之眼滴剂的降眼压功效也均优于含0.02%AR-13324之眼滴剂,其中含1%化合物7之眼滴剂的降眼压功效甚至可为含0.02%AR-13324之眼滴剂的3倍以上。

[0426] 实施例8

[0427] 1.MYLK-4于细胞之表现

[0428] (1)方法

[0429] 人小梁网(Human Trabecular Meshwork,HTM)细胞(Cat.NO.6590)获自ScienCell Research Laboratories。将HTM细胞维持于小梁网细胞培养基(Trabecular Meshwork Cell Medium,TMCM)(Cat.NO.6591)中。TMCM是由500mL基础培养基、10mL FBS(Cat.NO.0010)、5mL小梁网细胞生长补充剂(TMCGS,Cat.NO.6592)与5mL青霉素/链霉素溶液(P/S,Cat.NO.503)所调配而成。当细胞生长达到70-80%饱合后,以50μg/mL地塞米松(dexamethasone)(Cat.NO.4902,Sigma)对HTM细胞进行隔夜处理。

[0430] 通过西方墨点法分析细胞裂解物中之MYLK4与GAPDH的表现。首先收集细胞,并以1x RIPA(50mM Tris-HCl,pH 7.4、150mM NaCl、0.25%脱氧胆酸、0.1%NP-40、1mM EDTA,磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂混合物)冲洗。接着,以SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离细胞裂解物,并转移到PVDF membtane(iBlot™ 2 Transfer Stacks,聚偏二氟乙烯膜,Invitrogen)。将薄膜以一级抗体(小鼠抗MYLK4抗体(1:1,000,Cat.NO.SAB1412951)与小鼠抗GAPDH抗体(1:1,000,Cat.NO.G8795))进行免疫墨渍。其中以GAPDH作为装载对照组(loading control)。之后将薄膜以1X TBST清洗3次。接着,将薄膜与二级抗体(Cat.NO.111-0350003,Cat.NO.111-035-164)在室温下培养1小时。藉由增强的化学发光(WBKLS0500,Millipore)检测系统(Fisher Scientific,US)使薄膜可视化。

[0431] (2)结果

[0432] 结果如第9图所示。

[0433] 依据第9图可知,经地塞米松处理之HTM细胞(疾病状态细胞)之MYLK-4表现量较正常HTM细胞高。

[0434] 2.MYLK-4于磁珠诱导的疾病标的组织表现

[0435] (1)方法

[0436] 将50μL磁珠溶液(50mg/mL,磁珠粒径10μm)注入于麻醉状况下的大白兔左右眼之眼前房内,以使兔眼成为高眼压状态。以未经磁珠溶液处理之大白兔作为对照组。之后将兔子牺牲,取出眼球,并进行组织病理分析。

[0437] 组织病理判读方法:

[0438] 显微镜:MoticEasyScan

[0439] 显微摄影系统:MoticEasyScan

[0440] 判读方法:

[0441] 委托远见生物科技股份有限公司进行兔眼球石蜡组织切片之免疫组织化学染色(immunohistochemical,IHC staining),除针对眼球小梁网(trabecular meshwork)进行结果判读外,并提供判读结果评分表及各不同倍率的显微摄影照片。

[0442] 取下之眼球组织经福马林固定后,脱水并进行石蜡包埋,再制成3μm厚的石蜡组织切片。IHC染色之生物标记为MYLK-4及MLC-2。

[0443] 根据检体所制成之组织病理切片,分别在20倍、40倍、100倍、200倍及400倍显微镜下进行组织病灶观察及记录。根据病灶严重度、分布范围及所占组织的百分比例,参照INHAND(International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria)建议之5级分制评级法进行病灶评分:0级分代表无明显病理变化、病灶占总体组织1%以下;1级分代表病症极微(minimal,1-5%);2级分代表病症轻微(mild,6-25%);3级分代表病症中度(moderate,26-50%);4级分代表病症中高度(moderately severe,51-75%);5级分代表病症严重(severe/high,>76%)。

[0444] (2)结果

[0445] 免疫组织化学染色结果如第10图所示,而评分结果如表14所示。

[0446] 表14、免疫组织化学染色之评分结果

[0447]

组别	分数
对照组	0
高眼压组	3.3±0.6

[0448] 依据图10及表14可知,无论是疾病状态细胞(经地塞米松处理之HTM细胞),或者是疾病动物标的组织(经磁珠诱导之兔眼),MYLK-4的表现量均高于正常细胞与组织,因此推定具MYLK-4抑制功效之本揭露化合物除了经由ROCK抑制作用,还可藉由抑制MYLK-4而有效降低眼压。

[0449] 整合前述实验结果可知,相较于AR-13324仅以ROCK为标靶,本揭露之化合物20可同时以ROCK、MYLK-4与YSK-4为标靶。又,于高渗透压食盐水诱导高眼压兔之模型(急性高眼压模型)与磁珠诱导高眼压兔之模型(眼压>30mmHg的高眼压模型)中,本揭露之化合物20的降眼压功效皆优于AR-13324。此外,本揭露之化合物20在最大效应剂量下,相较于AR-13324具有较低之刺激性。

[0450] 虽然本发明已以较佳实施例揭露如上,然其并非用以限定本发明,任何熟习此技艺者,在不脱离本发明之精神和范围内,当可作些许之更动与润饰,因此本发明之保护范围当视后附之权利要求所界定者为准。

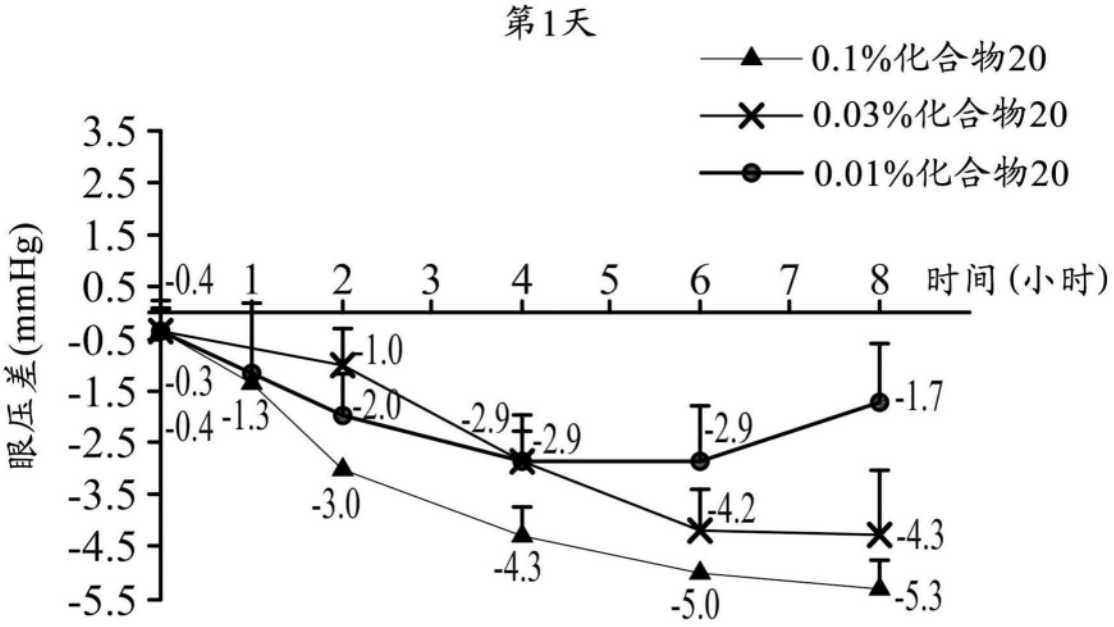

第1天
0.1%化合物20
0.03%化合物20
0.01%化合物20
眼压差(mmHg)
时间(小时)
3.5
2.5
1.5
0.5
-0.5
-1.5
-2.5
-3.5
-4.5
-5.5
-0.4
1
2
3
4
5
6
7
8
-0.3
-0.4
-1.3
1.0
-2.0
-3.0
-2.9
-2.9
-4.3
-2.9
-4.2
-5.0
-1.7
-4.3
-5.3

图1A

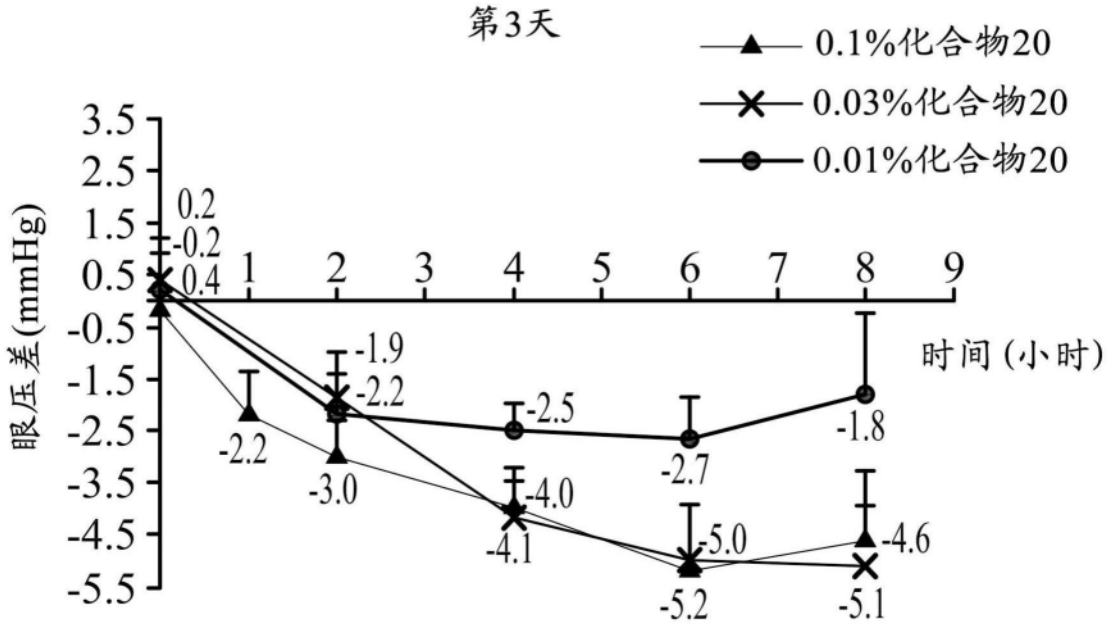

第3天
0.1%化合物20
0.03%化合物20
0.01%化合物20
眼压差(mmHg)
时间(小时)
3.5
2.5
1.5
0.5
-0.5
-1.5
-2.5
-3.5
-4.5
-5.5
0.2
-0.2
0.4
1
2
3
4
5
6
7
8
9
-2.2
-1.9
-2.2
-3.0
-2.5
-4.0
-4.1
-2.7
-5.0
-5.2
-1.8
-4.6
-5.1

图1B

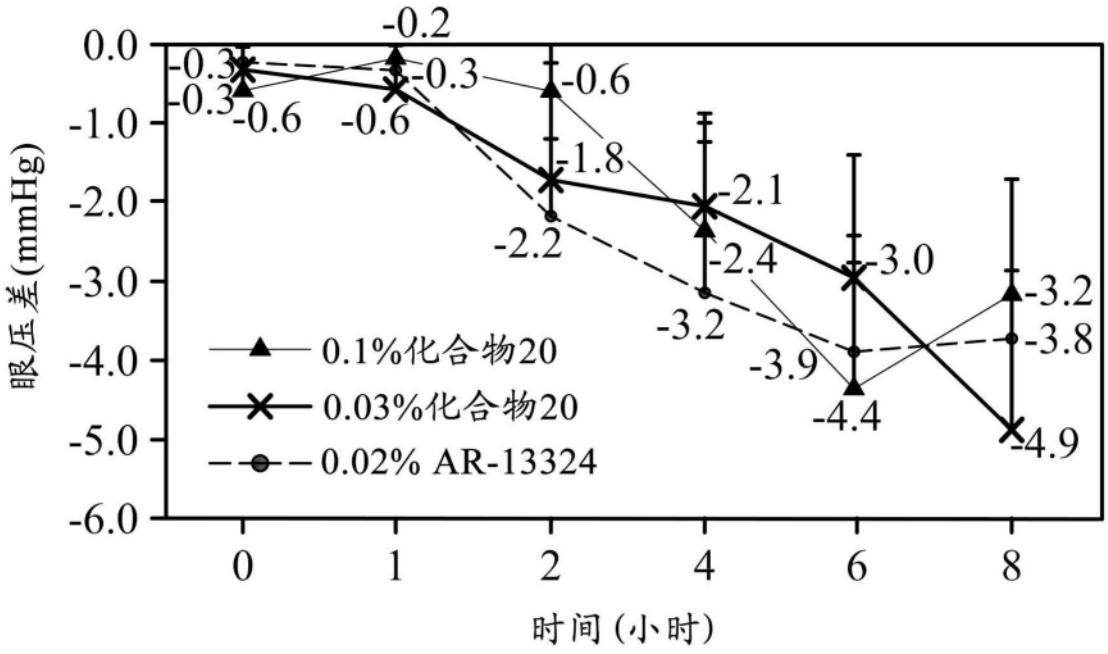

眼压差(mmHg)
0.0
-1.0
-2.0
-3.0
-4.0
-5.0
-6.0
0
1
2
4
6
8
时间(小时)
0.1%化合物20
0.03%化合物20
0.02% AR-13324
-0.2
-0.3
-0.3
-0.3
-0.6
-0.6
-0.6
-1.8
-2.2
-2.1
-2.4
-3.2
-3.0
-3.9
-4.4
-3.2
-3.8
-4.9

图2

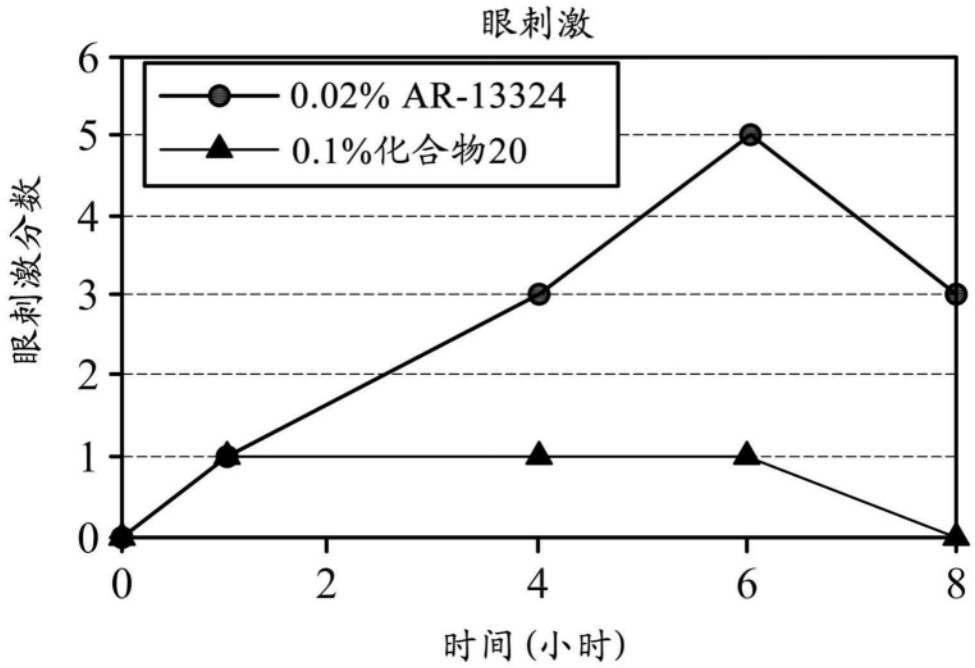

眼刺激
眼刺激分数
6
5
4
3
2
1
0
0
2
4
6
8
时间(小时)
0.02% AR-13324
0.1%化合物20

图3A

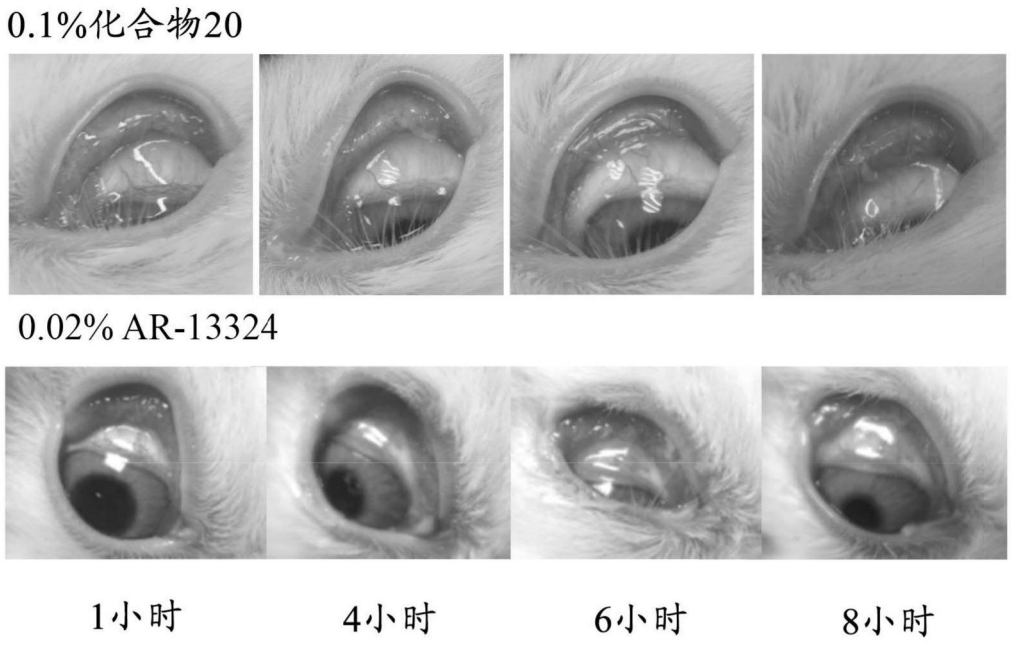


图3B

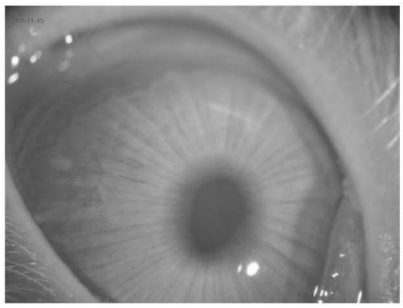


图3C

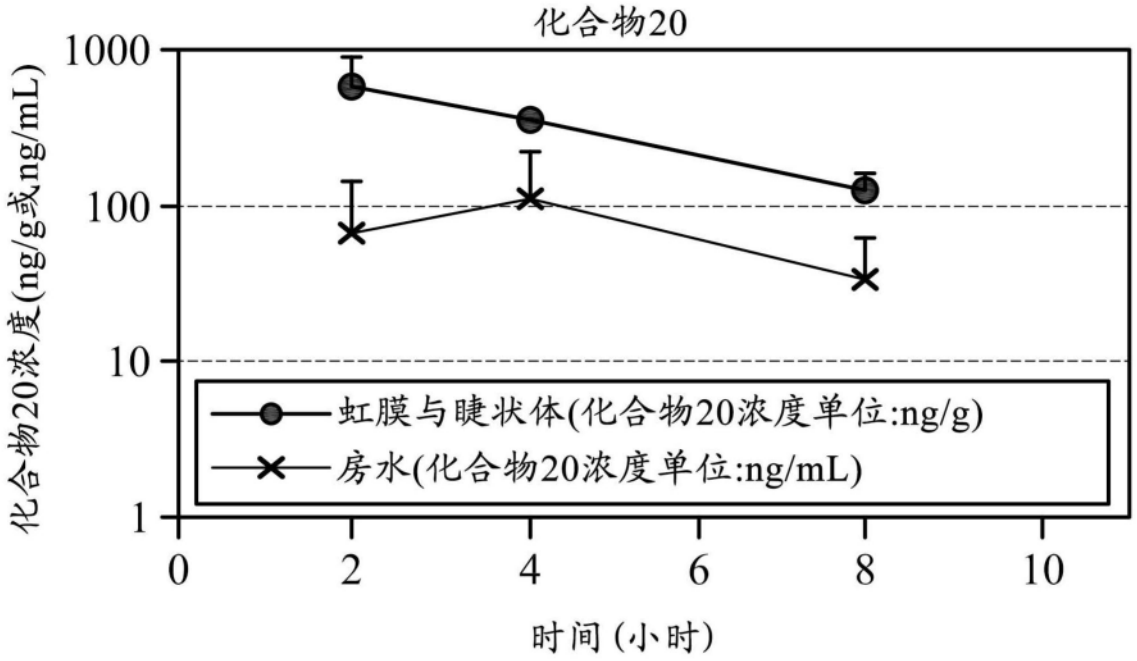

化合物20
1000
100
10
1
化合物20浓度(ng/g或ng/mL)
虹膜与睫状体(化合物20浓度单位:ng/g)
房水(化合物20浓度单位:ng/mL)
0
2
4
6
8
10
时间(小时)

图4

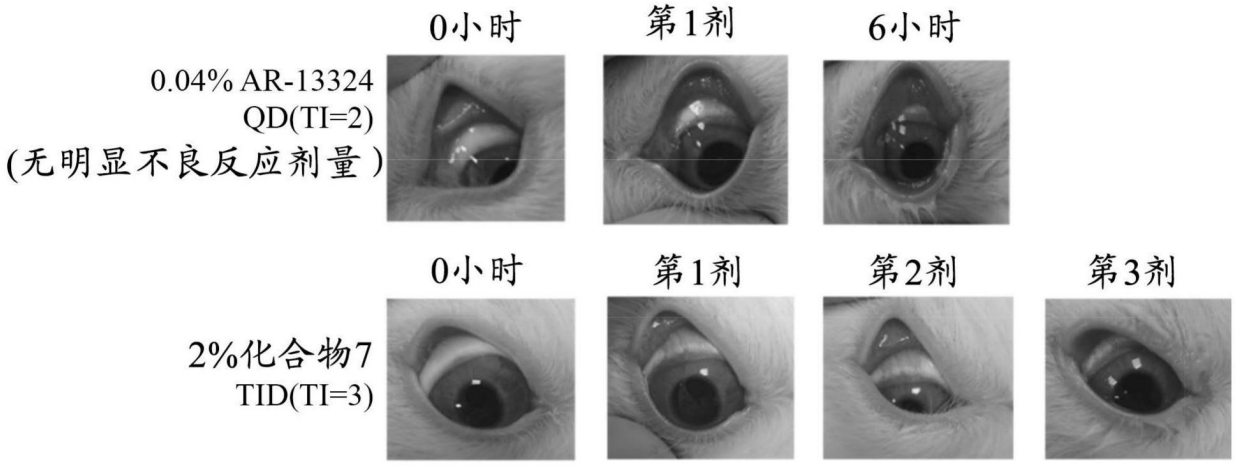

0小时
第1剂
6小时
0.04% AR-13324
QD(TI=2)
(无明显不良反应剂量)
0小时
第1剂
第2剂
第3剂
2%化合物7
TID(TI=3)

图5

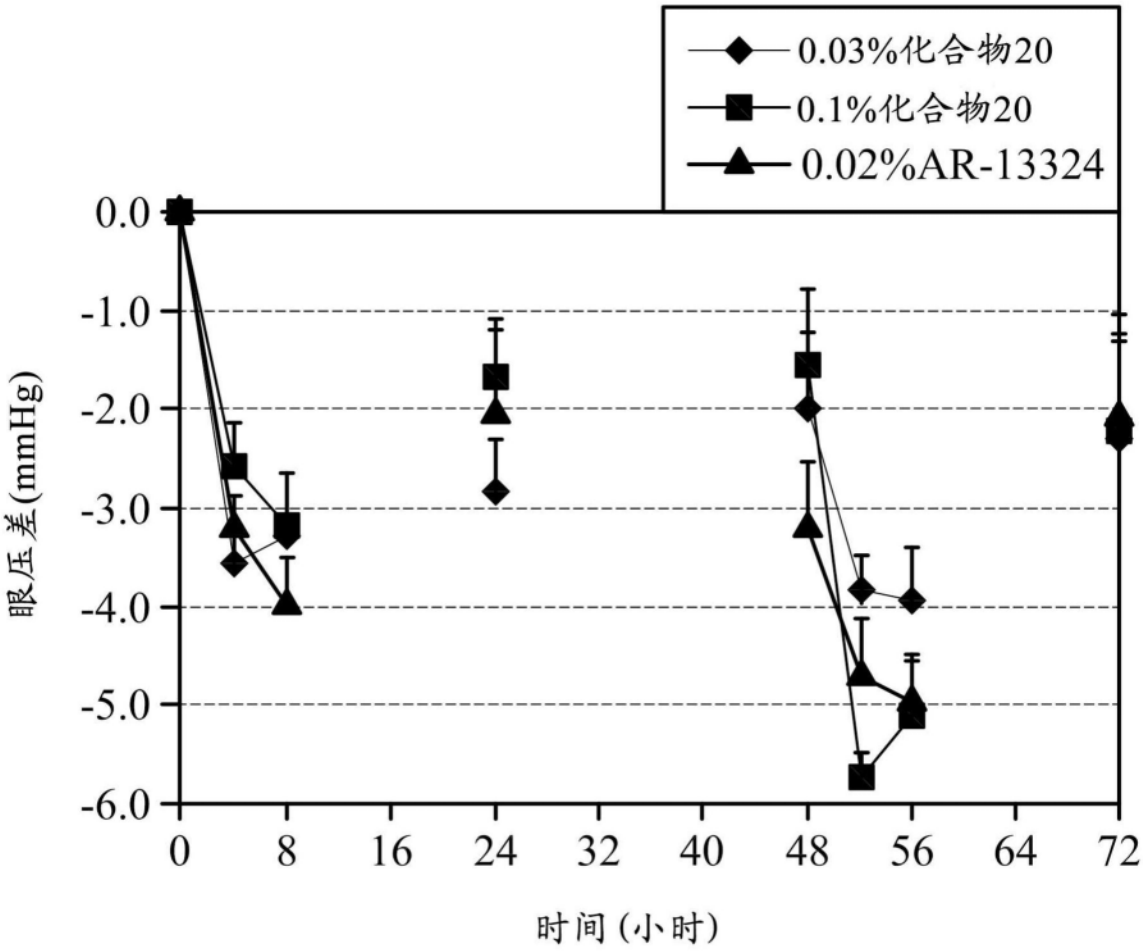

0.03%化合物20
0.1%化合物20
0.02%AR-13324
0.0
-1.0
-2.0
-3.0
-4.0
-5.0
-6.0
眼压差(mmHg)
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72
时间(小时)

图6

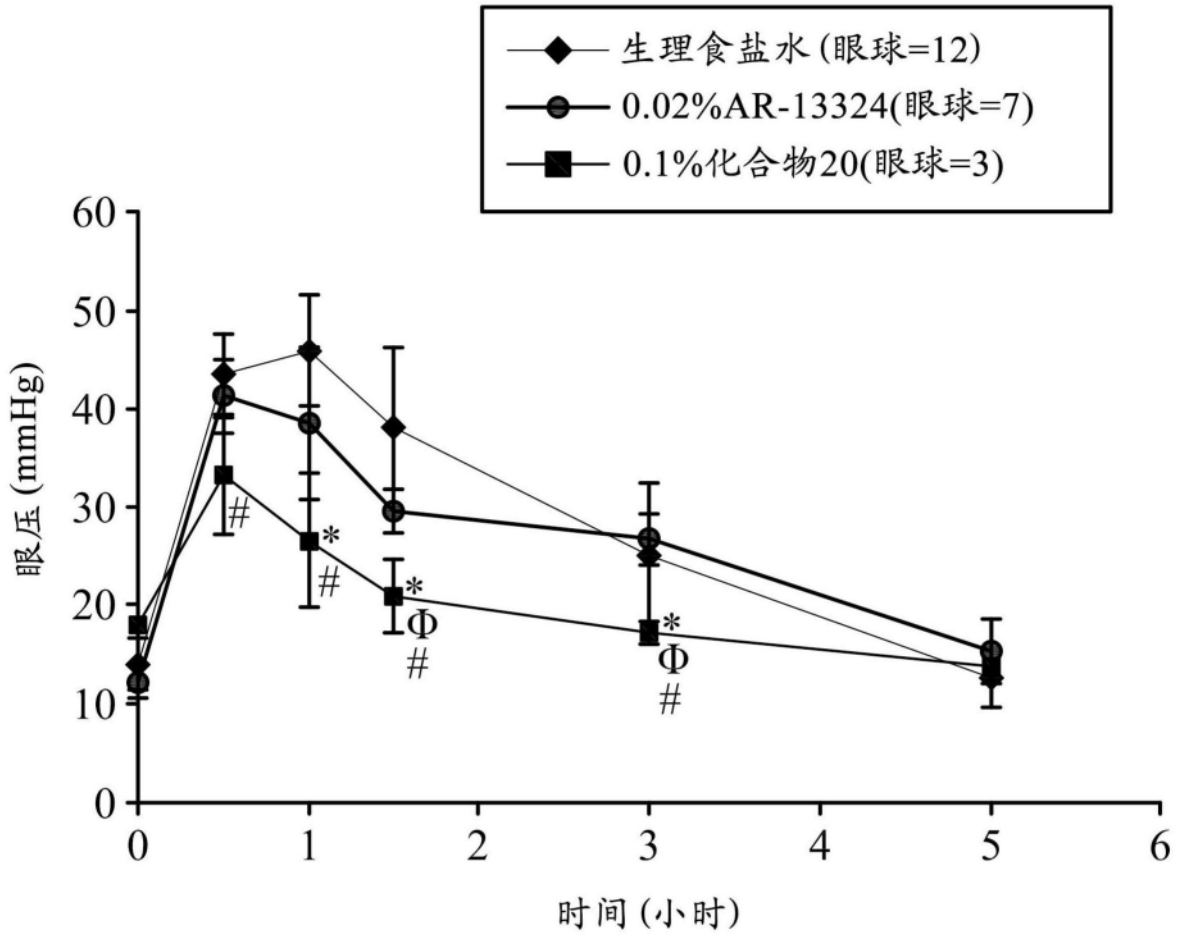

生理食盐水(眼球=12)
0.02%AR-13324(眼球=7)
0.1%化合物20(眼球=3)
眼压(mmHg)
时间(小时)
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
#
*
#
*
Φ
#
*
Φ
#

图7

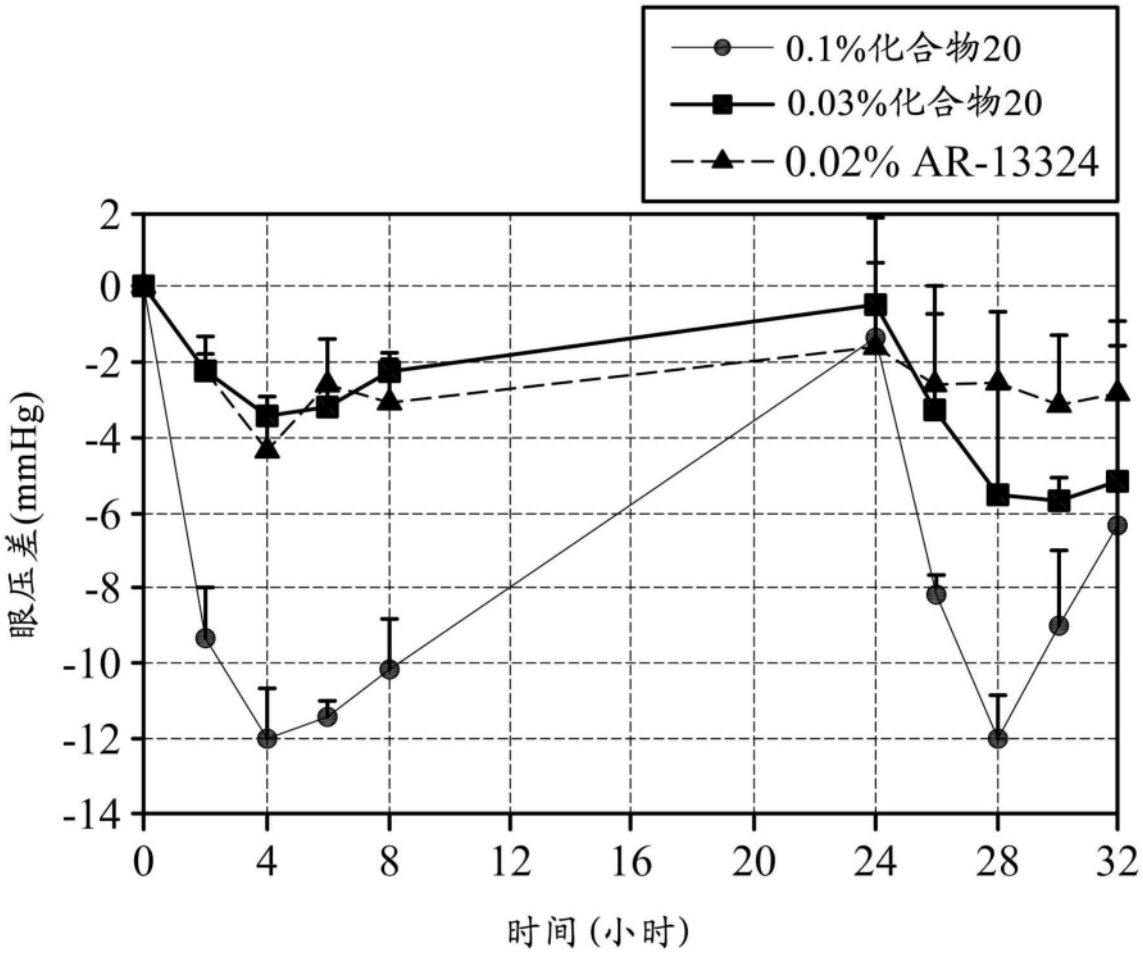

0.1%化合物20
0.03%化合物20
0.02% AR-13324
眼压差(mmHg)
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
0
4
8
12
16
20
24
28
32
时间(小时)

图8

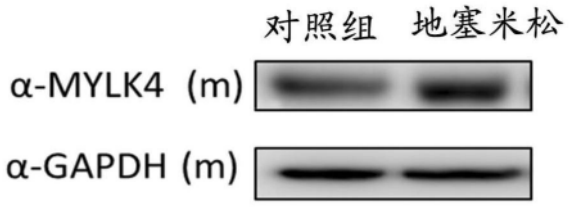

对照组
地塞米松
α-MYLK4 (m)
α-GAPDH (m)

图9

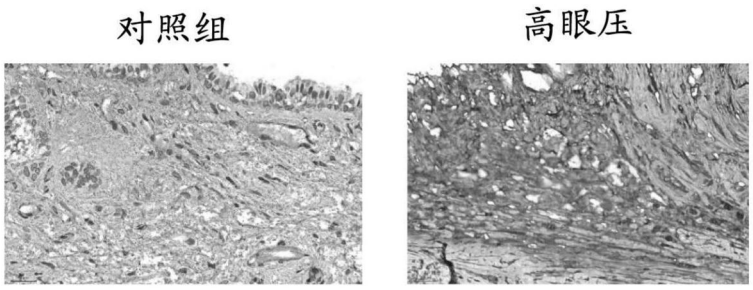


图10