



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101910141 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 19

(21) 申请号 200880124010. 9

A61P 25/28 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 10. 14

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/984118 2007. 10. 31 US

W0 03/053912 A1, 2003. 07. 03, 权利要求  
1-25.

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 郝鹏

2010. 06. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/079798 2008. 10. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02009/058552 EN 2009. 05. 07

(73) 专利权人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J·E·小斯塔雷特 K·W·吉尔曼

R·E·奥尔森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
司 72001

代理人 梁谋 林森

(51) Int. Cl.

C07D 271/06 (2006. 01)

A61K 31/4245 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 33 页

(54) 发明名称

作为  $\beta$  淀粉样肽产生的抑制剂的  $\alpha$ -(N-磺  
酰氨基)乙酰胺化合物

(57) 摘要

本发明提供一种新型  $\alpha$ -(N-磺酰氨基)乙  
酰胺化合物、其药物组合物、其工艺以及治疗阿尔  
茨海默病和其它与  $\beta$ -淀粉样肽相关的病症的方法。

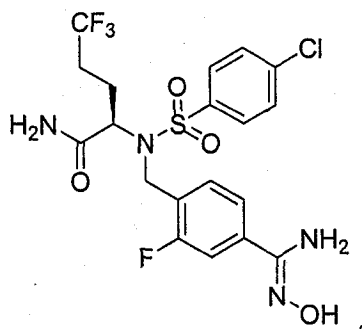
1. 一种化合物,所述化合物为 (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基 ] [2- 氟 -4-(1,2,4- 噁二唑 -3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺。

2. 一种药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的 (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基 ] [2- 氟 -4-(1,2,4- 噁二唑 -3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺以及药学上可接受的载体或稀释剂。

3. (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基 ] [2- 氟 -4-(1,2,4- 噁二唑 -3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺在制备用于治疗或延迟阿尔茨海默病、淀粉样脑血管病、轻度认知障碍和 / 或唐氏综合症发生的药物中的用途。

4. 权利要求 3 的用途,所述药物用于治疗阿尔茨海默病。

5. 一种化合物,所述化合物为



## 作为 $\beta$ 淀粉样肽产生的抑制剂的 $\alpha$ -(N-磺酰氨基)乙酰胺化合物

[0001] 相关申请的参考

[0002] 本申请要求保护 2007 年 10 月 31 日申请的美国临时申请序号 60/984,118 的权益。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及具有药物和生物影响特性的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基)磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺、其药物组合物、其工艺和使用方法。所述新型化合物具有独特的 A $\beta$  肽生产抑制作用,因此可用于预防 A $\beta$  肽和/或淀粉样蛋白沉积物在脑中的累积,并可用于治疗或延迟阿尔茨海默病 (AD)、唐氏综合症、轻度认知障碍和其它与  $\beta$ -淀粉样肽相关的病症的发生。

[0004] 发明背景

[0005] 阿尔茨海默病 (AD) 是一种渐进性神经退化性疾病,其以记忆丧失开始,发展至包括严重认知障碍、行为改变和运动机能降低 (Grundman, M. 等人, Arch Neurol. (2004) 61 : 59-66 ;Walsh, D. M. 等人, Neuron (2004) 44 : 181-193)。阿尔茨海默病是最常见的痴呆形式,并成为继心血管病和癌症之后的第三大死因。AD 耗费巨大,给患者本人和家庭带来巨大损失,使患者丧失劳动力并需要他人护理。目前还没有能有效预防 AD 或逆转临床症状和基础性病理生理学的治疗。

[0006] 对痴呆患者的明确 AD 诊断需要尸检时对神经炎斑和神经原纤维缠结的数量和位置进行组织病理学评价 (Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease (对阿尔茨海默病的死后诊断的一致推荐)。Neurobiol Aging (1997) 18 : D1-2)。在患有 21 三体症 (唐氏综合症) 的患者中观察到相似的改变。斑块主要由  $\beta$ -淀粉样 (A $\beta$ ) 肽组成,所述  $\beta$ -淀粉样 (A $\beta$ ) 肽由  $\beta$ -位点 APP-切割酶 (BACE) (以产生 N-末端) 和  $\gamma$ -分泌酶 (以产生 C-末端) 分步蛋白水解淀粉样前体蛋白 (APP) 形成 (Selkoe, D. J., Physiol Rev. (2001) 81 : 741-766)。 $\gamma$ -分泌酶是一种跨膜蛋白复合物,其包含 Nicastrin、Aph-1、PEN-2 以及衰老蛋白-1 (PS-1) 或衰老蛋白-2 (PS-2) 中的一种 (Wolfe, M. S. 等人, Science (2004) 305 : 1119-1123)。PS-1 和 PS-2 被认为包含  $\gamma$ -分泌酶的催化位点。

[0007] A $\beta$  40 是合成的最丰富的 A $\beta$  形式 (80-90%),而 A $\beta$  42 与 AD 发病机理最紧密关联。具体地说,导致罕见的 AD 家族形式的 APP、PS-1 和 PS-2 基因突变暗示 A $\beta$  42 聚集体为主要的毒性物质 (Selkoe, D. J., Physiol Rev., (2001) 81 : 741-766)。目前,有证据显示,寡聚型、原纤维型和胞内 A $\beta$  42 在疾病过程中起显著作用 (Cleary, J. P. 等人, Nat Neurosci. (2005) 8 : 79-84)。针对形成 A $\beta$  42 的酶 (如  $\gamma$ -分泌酶) 的抑制剂,代表了治疗 AD 的潜在疾病调修治疗剂。

[0008] 除 APP 之外, $\gamma$ -分泌酶还切割多种 I 型跨膜蛋白 (Pollack, S. J. 等人, Curr Opin Investig Drugs (2005) 6 : 35-47)。尽管大部分这些切割事件的生理意义是未知的,但遗传

证据表明, Notch 信号转导需要 Notch 的  $\gamma$ -分泌酶切割 (Artavanis-Tsakonas, S. 等人, *Science*(1999) 284(5415) :770-6 ;Kadesch, T. ;*Exp Cell Res.* (2000) 260(1) :1-8)。在以  $\gamma$ -分泌酶抑制剂给药的啮齿动物中, 已鉴别出胃肠 (GI) 道、胸腺和脾脏中的药物相关毒性 (Dearfoss, G. H. ;Jordan 等人, *J Biol Chem.* (2003) 278 :46107-46116 ;Wong, G. T. 等人, *J Biol Chem.* (2004) 279 :12876-12882 ;Milano, J. 等人, *Toxicol Sci.* (2004) 82 :341-358)。这些毒性可能与 Notch 信号转导的抑制相关联 (Jensen, J. 等人, *Nat Genet.* (2000) 24 :36-44)。

[0009] 机理性毒性的鉴定提出了是否可以用  $\gamma$ -分泌酶抑制剂实现可接受的治疗指数的问题。在 Notch 加工、药代动力学、药物处置和 / 或组织特异性药效学当中选择性抑制 A $\beta$  形成可能影响治疗范围 (therapeutic margin)。

[0010] 证据表明, 通过抑制  $\gamma$ -分泌酶降低脑 A $\beta$  水平可以防止 AD 的发生和发展 (Selkoe, D. *Physiol. Rev.* (2001) 81 :741-766 ;Wolfe, M. , *J. Med. Chem.* (2001) 44 :2039-2060)。有新的证据表明 A $\beta$  在其它疾病中也起作用, 所述疾病包括轻度认知障碍 (MCI)、唐氏综合症、淀粉样脑血管病 (CAA)、Lewy 小体痴呆 (DLB)、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS-D)、包涵体肌炎 (IBM) 和年龄相关性黄斑退化。有利的是, 抑制  $\gamma$ -分泌酶并减少 A $\beta$  产生的化合物可用于治疗这些或其它 A $\beta$  依赖性疾病。

[0011] A $\beta$  的过量生产和 / 或减慢清除引起 CAA (Thal, D. 等人, *J. Neuropath. Exp. Neuro.* (2002) 61 :282-293)。在这些患者中, 血管淀粉体沉积引起血管壁退化和可能与 10-15% 的老年患者出血性中风有关的动脉瘤。与 AD 一样, 编码 A $\beta$  的基因突变导致早期发病形式的 CAA, 称为带有 Dutch 型淀粉样变性的脑出血, 表达该突变蛋白的小鼠发展出类似于患者的 CAA。特异性靶向  $\gamma$ -分泌酶的化合物可以降低或预防 CAA。

[0012] DLB 表现为视幻觉、错觉和帕金森病。令人感兴趣的是, 引起 A $\beta$  沉积的家族 AD 突变也可以引起 Lewy 小体和 DLB 症状 (Yokota, O. 等人, *Acta Neuropathol (Berl)* (2002) 104 :637-648)。此外, 散发性 DLB 患者具有与 AD 类似的 A $\beta$  沉积物 (Deramecourt, V. 等人, *J Neuropathol Exp Neurol* (2006) 65 :278-288)。基于该数据, A $\beta$  可能驱动 DLB 中的 Lewy 小体病理学, 因此  $\gamma$ -分泌酶抑制剂可能减轻或预防 DLB。

[0013] 约 25 % 的 ALS 患者具有显著的痴呆或失语症 (Hamilton, R. L. 等人, *Acta Neuropathol (Berl)* (2004) 107 :515-522)。这些患者大部分 (约 60 %) 称为 ALS-D, 包含主要由 TDP-43 蛋白组成的遍在蛋白阳性包涵体 (Neumann, M. 等人, *Science* (2006) 314 :130-133)。约 30 % 的 ALS-D 患者具有淀粉体斑, 它们与引起他们痴呆的 A $\beta$  一致 (Hamilton, R. L. 等人, *Acta Neuropathol (Berl)* (2004) 107 :515-522)。这些患者应当用淀粉体成像剂鉴别, 并有可能用  $\gamma$ -分泌酶抑制剂治疗。

[0014] IBM 是一种罕见的年龄相关性骨骼肌变性疾病。A $\beta$  沉积物在 IBM 肌肉中的出现以及通过将 APP 过表达引导至转基因小鼠的肌肉 再现该疾病的几方面, 都表明 A $\beta$  在 IBM 中的作用 (综述于 Murphy, M. P. 等人, *Neurology* (2006) 66 :S65-68)。特异性靶向  $\gamma$ -分泌酶的化合物可以减轻或预防 IBM。

[0015] 在年龄相关性黄斑变性中, A $\beta$  被鉴定为玻璃疣的几种组分之一, 玻璃疣是视网膜色素上皮 (RPE) 之下的胞外沉积物 (Anderson, D. H. 等人, *Exp Eye Res* (2004) 78 :243-256)。近来的研究已表明了小鼠中 A $\beta$  和黄斑变性之间的潜在关联 (Yoshida, T. 等

人, J Clin Invest(2005) 115 :2793-2800)。已在 AD 患者中发现了 A $\beta$  沉积和核上性内障 (supranuclear cataracts) 的增加 (Goldstein, L. E. 等人, Lancet(2003) 361 :1258-1265)。特异性靶向  $\gamma$ -分泌酶的化合物可以减轻或预防年龄相关性黄斑变性。

[0016] 基于 Notch 信号转导在肿瘤生成中的作用, 抑制  $\gamma$ -分泌酶的化合物也可以用作治疗癌症的治疗剂 (Shih, I.-M. 等人, Cancer Research(2007) 67 :1879-1882)。

[0017] Smith 等人在 2000 年 8 月 31 日公布的国际申请 W000/50391 中公开了一系列磺酰胺化合物, 这些磺酰胺化合物可用于调节淀粉体  $\beta$  蛋白的产生, 其作为治疗多种疾病的手段, 尤其是阿尔茨海默病和其它与淀粉体沉积相关的疾病。

[0018] 于 1999 年 12 月 14 日公布的日本专利号 11343279 公开了一系列磺酰胺衍生物, 其为可用于治疗自身免疫病的 TNF- $\alpha$  抑制剂。

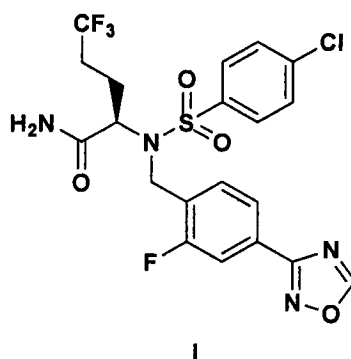
[0019] Parker 等人在于 2003 年 7 月 3 日公布的国际申请 W003/053912 中公开了一系列为  $\beta$ -淀粉体抑制剂的  $\alpha$ -(N-磺酰氨基)乙酰胺衍生物, 其可用于治疗阿尔茨海默病和与  $\beta$ -淀粉样肽相关的其它病症。

[0020] 本发明新型化合物不属于 Parker 等人在 W003/053912 中公开或描述的化学式定义。令人惊奇的是, 业已发现, (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺具有独特的特性, 使其可用于治疗阿尔茨海默病和其它与  $\beta$ -淀粉样肽相关的病症。

[0021] 发明详述

[0022] 本发明涉及具有下式 I 的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺、其药物制剂及其在罹患或易患阿尔茨海默病 (AD) 或其它与  $\beta$ -淀粉样肽相关的疾病的患者中抑制 A $\beta$  产生的用途。

[0023]



[0024] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种药物组合物, 其包含治疗有效量的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺和药学上可接受的佐剂、载体或稀释剂。

[0025] 在又一个实施方案中, 本发明提供一种治疗、缓解或延迟与  $\beta$ -淀粉样肽相关的病症 (尤其是阿尔茨海默病、淀粉样脑血管病、轻度认知障碍和唐氏综合症) 发生的方法, 其包括与常规佐剂、载体或稀释剂一起给予治疗有效量的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺或其溶剂化物或水合物。

[0026] 另一方面, 本发明提供一种制备 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺的方法, 其包括在碱 (优选无机

碱,如碳酸铯)存在下使(R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺与在惰性有机溶剂中的3-(4-(溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑反应的步骤。

[0027] 再一方面,本发明提供制备(2R)-2-[[[(4-氯苯基)磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺的方法,其包括以下步骤:

[0028] (a) 使(R)-2-(4-氯-N-(4-氰基-2-氟苄基)苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺与羟胺反应,和

[0029] (b) 在酸性催化剂存在下,用在惰性有机溶剂中的原甲酸三乙酯处理所获的(R)-2-(4-氯-N-(2-氟-4-(N'-羟基甲脒基(carbamimidoyl))苄基)苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺。

[0030] 由于本发明的化合物具有不对称的碳原子,所以本发明包括外消旋物以及式I化合物的各个对映异构体形式,还包括如本文所述的手性和外消旋中间体。使用单个标记如(R)或(S)指包括主要的一种立体异构体。可以按照已知方法,例如分级结晶、吸附层析或其它合适的分离方法,将异构体的混合物分离为单个异构体。可以在引入合适的盐形成基团之后,例如通过形成非对映异构体盐与光学活性的成盐剂的混合物,将所述混合物分离为非对映体盐,并将分离的盐转变为游离化合物,以通常的方式将所获外消旋物分离为相反的物质。对映异构体形式还可以通过手性高压液相层析柱通过分级来分离。

[0031] 在本发明的方法中,术语“治疗有效量”是指方法中的每一活性组分足以显示出有意义的患者利益的总量,所述利益即与 $\beta$ -淀粉样肽相关的病症的康复。当应用于单独给予的单一活性成分时,该术语是指该单独的成分。当应用于组合时,该术语是指产生疗效的活性成分的组合量,无论是组合给药、连续给药还是同时给药。本文和权利要求书使用的术语“治疗、处理、疗法”是指预防、延迟、抑制或改善与 $\beta$ -淀粉样肽相关的疾病。

[0032] 在本发明的再一个实施方案中,式I的化合物可以与其它药物组合使用,所述其它药物用于治疗/预防/抑制或改善式I的化合物对其有效的疾病或病症。这样的其它药物可以通过某一途径并以常用于该途径的量与本发明的化合物同时或序贯给予。当式I的化合物与一种或多种其它药物同时使用时,优选含有这些药物外加式I化合物的药物组合物。因此,除式I化合物以外,本发明的药物组合物还包括那些含有一种或多种其它活性成分的药物组合物。可以单独地或在一同一药物组合物中与(2R)-2-[[[(4-氯苯基)磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺组合给予以治疗阿尔茨海默病的其它活性成分的实例,包括但不限于:为胆碱酯酶抑制剂的药物类型,例如多奈哌齐(Aricept®)、利斯的明(Exelon®)、加兰他敏(Reminyl®,现在为Razadyne®);为NMDA拮抗剂如美金胺(Namenda®)和PDE4抑制剂如西洛司特(Ariflo®)的其它药物;NSAID类,例如R-氟比洛芬(Flurizan®);降低胆固醇的他汀类药物,例如普伐他汀、辛伐他汀和阿托伐他汀;抗淀粉体和抗 $A\beta$ 免疫治疗;抑制 $A\beta$ 聚集的化合物,例如鲨肌醇和氯碘羟喹;抑制或修改 $A\beta$ 生产或加工的其它化合物,例如 $\gamma$ -分泌酶抑制剂、 $\beta$ -分泌酶抑制剂、 $\gamma$ -分泌酶调节剂、 $A\beta$ 调节剂和GSK-3抑制剂;调节 $A\beta$ 周转的化合物,例如PAI-1抑制剂;调节tau磷酸化的化合物,例如GSK-3和CDK-5抑制剂;PPAR $\gamma$ 激动剂,例如罗格列酮;调节tau或磷-tau周转或者寡聚化的化合物,例如HSP90抑制剂、HDAC抑制剂和抗-tau免疫疗法;和稳定或结合微管的化合物,例如紫杉烷衍生物和

埃坡霉素衍生物 ; 和调节线粒体功能的化合物, 例如 Dimebon。

[0033] 在癌症治疗中, 本发明的化合物可以与已知的抗癌剂或治疗一起使用。这样的药物和治疗包括细胞毒性剂 / 细胞抑制剂、雄激素受体调节剂、雌激素受体调节剂、类视黄醇受体调节剂、异戊二烯基 - 蛋白转移酶抑制剂、血管生成抑制剂、干扰细胞周期关卡的药物和放疗。另外, 本发明的化合物可用于治疗免疫病症如狼疮。

[0034] 以上的治疗剂在与本发明的化合物组合使用时, 在适用的情况下或者由本领域一般技术人员确定时, 例如可以以医师临床指引 (Physician's Desk Reference) (PDR) 中指示的量使用。

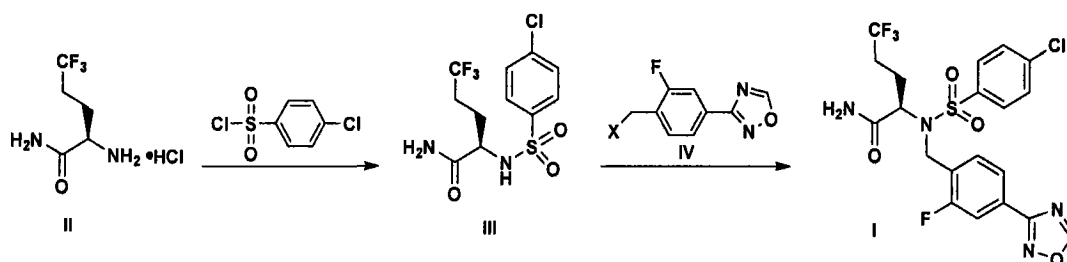
[0035] 然而, 要理解的是, 实际给予的化合物的量将由医师根据相关的情况确定, 包括要治疗的病症、选择给予的化合物、选定的给予途径、个体患者的年龄、体重、反应以及患者症状的严重性。

[0036] 通用反应流程

[0037] 本发明的化合物可以有有机合成领域技术人员众所周知的许多不同方法制备。式 I 的化合物可通过以下反应流程 1-5 中描述的方法制备。所述程序的合理变化, 以及本领域技术人员应显而易见的合成方法, 属于本发明的范围。

[0038] 反应流程 1

[0039]

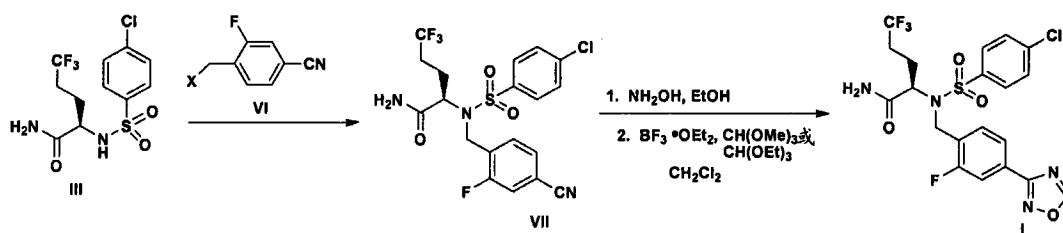


[0040] 在反应流程 1 中所示的一种制备方法中, 以基本上对映异构体纯形式使用的式 II 的起始 ( $\alpha$ -氨基) 乙酰胺可以通过众所周知的文献程序制备, 例如使用在反应流程 3 中描述的不对称 Strecker 合成法, 将三氟丁醛转变为式 II 的 ( $\alpha$ -氨基) 乙酰胺, 或者由 (R)-5, 5, 5- 三氟正缬氨酸制备 (参见 :I. Ojima, J. Org. Chem. (1989) 54 :4511-4522) ; 以及使用反应流程 4 中所述的方法, 然后使用制备酰胺的通用程序 :R. C. Larock "Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, New York, 1989, 972-976 页。式 II 的 ( $\alpha$ -氨基) 乙酰胺用适宜的碱处理, 并用在适宜的非质子溶剂如  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中的对氯磺酰氯于约室温磺酰化, 以获得式 III 的 ( $\alpha$ -磺酰氨基) 乙酰胺。适宜的碱包括三乙胺、二异丙胺、吡啶等。

[0041] 在碱存在下, 通过使式 III 的 ( $\alpha$ -磺酰氨基) 乙酰胺与在适宜的非质子化溶剂中的式 IV 的噁二唑氟苄基烷基化剂在加热或没有加热的情况下反应, 进行式 III 的化合物向式 I 的磺酰胺的转变。式 IV 的氟苄基噁二唑可易于通过本领域众所周知的方法制备, 其中 X 为离去基团, 和通过反应流程 6 中所述的方法制备。用于该烷基化的适宜的碱包括无机碱, 例如碳酸钾和碳酸铯。优选的溶剂包括 DMF 和乙腈。反应的温度范围通常为  $20^\circ\text{C}$  -  $100^\circ\text{C}$ 。

[0042] 反应流程 2

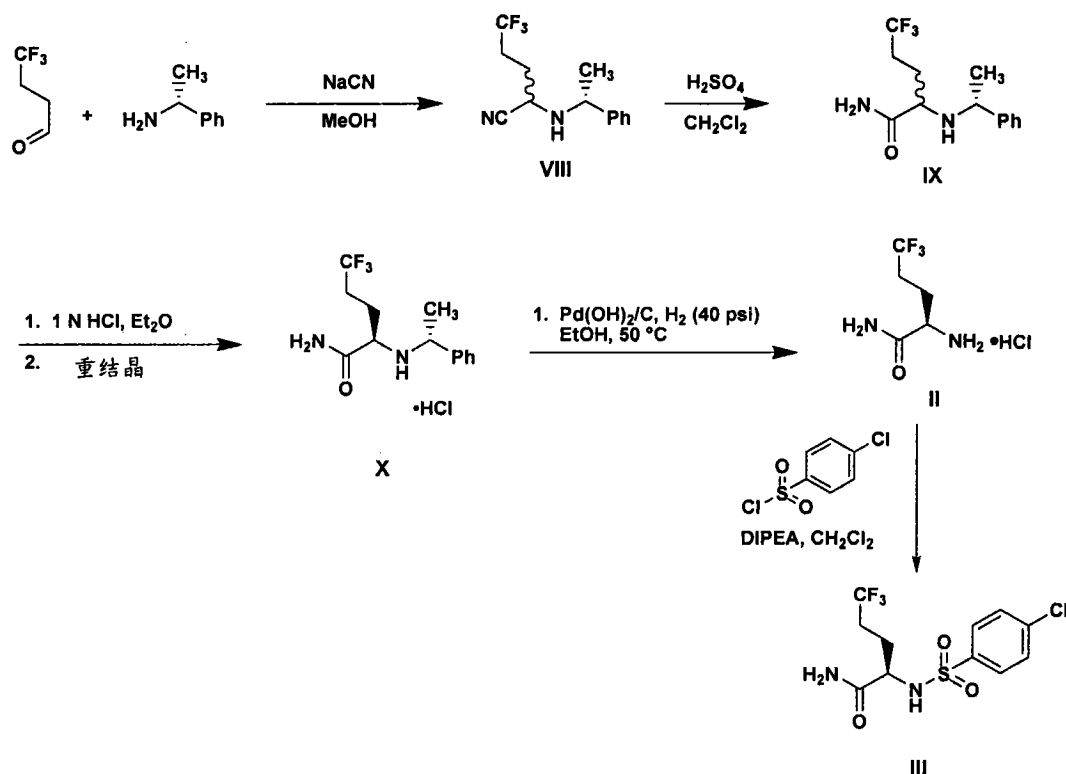
[0043]



[0044] 在反应流程 2 中所示的另一种制备方法中,在碱存在下在适宜的溶剂中通过用式 VI 的 2-氰基-4-氟苄基衍生物烷基化式 III 的化合物,制备式 I 的 1,2,4-噁二唑化合物,其中 X 为离去基团,以产生式 VII 的腈。然后使用本领域技术人员众所周知的方法由式 VII 的腈化合物制备式 I 的目标化合物(参考:Joule, J. A, 等人, *Heterocyclic Chemistry*, 第 3 版, Chapman&Hall, London(1995) 452-456 和其中提及的参考文献)。例如,式 VII 的腈与在醇溶剂如甲醇或乙醇中的羟胺于至回流的温度反应产生中间体酰胺腈,其随后在酸源(如三氟乙酸或三氟硼醚合物)存在下用在惰性有机溶剂如  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、乙腈、四氢呋喃等中的原甲酸酯(例如原甲酸三乙酯或原甲酸三甲酯)处理,以提供式 I 的 1,2,4-噁二唑。

[0045] 反应流程 3

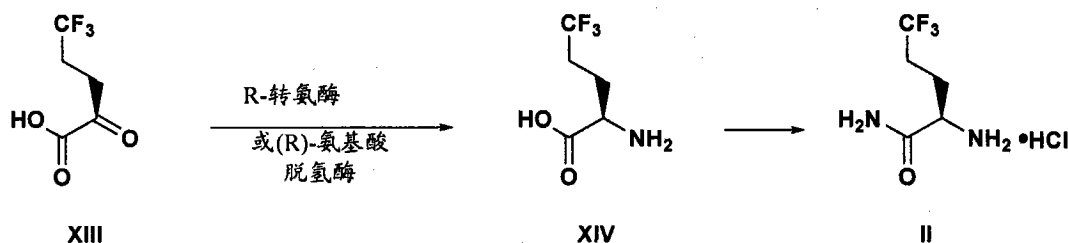
[0046]



[0047] 反应流程 3 描述了式 II 的 ( $\alpha$ -氨基)乙酰胺的制备,以市售可得的三氟丁醛和 (R)- $\alpha$ -甲基苄胺开始,在 Strecker 条件下与在适宜的溶剂如甲醇中的乙酸和氰化物源(例如氰化钠、氰化钾或三甲基氰硅烷)反应,得到为非对映体混合物的式 VIII 的氨基腈。起始的三氟丁醛还可以通过氧化三氟丁醇制备。用硫酸将式 VIII 的腈水解为相应的式 IX 的酰胺,并中和反应物,之后酸化,并由适宜的溶剂如甲醇、异丙醇、乙酸乙酯、叔丁基甲酯或其混合物重结晶,以得到 > 99% 非对映体过量的式 X 的酰胺。然后可以通过在适宜的催化剂如氢氧化钯或披钯碳存在下氢化,除去苄基,以得到式 II 的氨基酰胺,其可以用对氯磺酰氯磺酰化,以得到式 III 的磺酰胺。

[0048] 反应流程 4

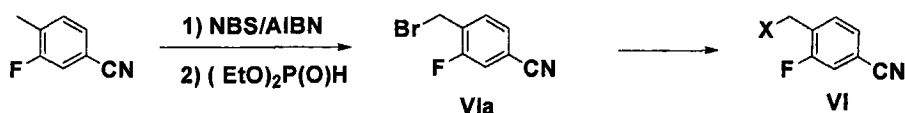
[0049]



[0050] 在另一种制备方法中,如反应流程 4 所示,可以 5,5,5-三氟-2-氧代戊酸开始,使用酶促方法立体选择性产生式 II 的( $\alpha$ -氨基)乙酰胺。可以使用市售可得的(R)-氨基转移酶,通过本领域技术人员众所周知的方法,由式 XIII 的化合物制备基本对映异构体纯形式的式 XIV 的(R)-5,5,5-三氟正缬氨酸。在替代方法中,可以使用市售可得的(R)-氨基酸脱氢酶实施酶促方法。使用下述方法和本领域技术人员众所周知的方法实施酶促方法。可以使用本领域众所周知的用于酰胺制备的通用程序实施式 XIV 的(R)-5,5,5-三氟正缬氨酸向式 II 化合物的转变。

[0051] 反应流程 5

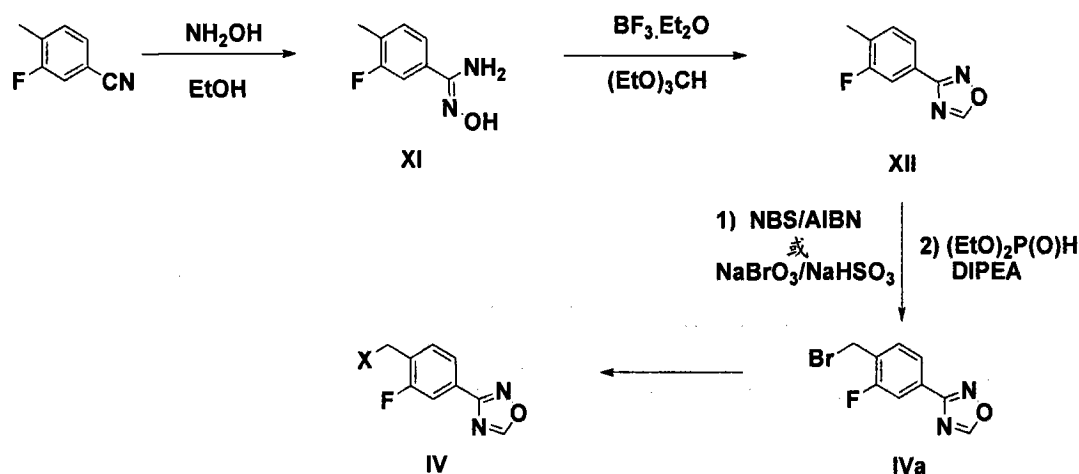
[0052]



[0053] 可如反应流程 5 所示使用引发剂如 AIBN,在适宜的溶剂如二氯甲烷、二氯乙烷或四氯化碳中通过用 N-溴琥珀酰亚胺溴化市售可得的 2-氟-4-氰基甲苯,制备式 VIa 的苄基溴。溴化以高收率进行,如果需要,可通过本领域技术人员众所周知的方法,容易地将式 VIa 的化合物转变为式 VI 的化合物,其中 X 为离去基团。

[0054] 反应流程 6

[0055]



[0056] 作为对以上反应流程 2 所述式 I 的磺酰氨基噁二唑的线性顺序中使用的式 VI 化合物的替代,用于反应流程 1 所示的汇集途径的式 IV 化合物的制备示于反应流程 6。在醇类溶剂中于室温用羟胺处理市售可得的 2-氟-4-氰基甲苯,得到式 XI 的粗酰胺肟,其可以直接用于随后的反应。通过用醚合三氟化硼和原甲酸三乙酯处理环化式 XI 的酰胺肟,以两

步超过 90% 的收率得到式 XII 的噁二唑。作为使用三氟化硼的替代,还可以通过使用三氟乙酸作为酸源彻底完成环化。在适宜的溶剂如二氯甲烷、二氯乙烷或四氯化碳中使用引发剂如 AIBN 用 N- 溴代琥珀酰亚胺溴化,得到式 IVa 的一溴噁二唑化合物。如果需要避免可能的一溴化物和二溴化物的混合物,则可以用 N- 溴代琥珀酰亚胺和 AIBN 有意地过度溴化式 XI 化合物的甲苯甲酰基官能团,以得到相应的二溴化物,然后其可以用亚磷酸二乙酯还原,以超过 90% 的收率得到式 VIa 的一溴化物。二溴化和还原可以以超过 90% 的总收率一锅完成,不用分离二溴化物。或者,还可以在适宜的两相溶剂体系如乙酸乙酯 / 水、二氯甲烷 / 水、乙酸丁酯 / 水、三氟甲苯 / 水等中用过量的溴酸钠和亚硫酸氢钠由式 XII 的化合物制备式 IVa 的化合物,以提供一溴化物和二溴化物中间体的混合物,该混合物用磷酸二乙酯 / 二异丙胺原位还原,得到式 IVa 的一溴化物。如果需要,可以通过本领域技术人员众所周知的方法,容易地将式 IVa 的化合物转变为式 IV 的化合物,其中 X 为离去基团。

[0057] 在另一个实施方案中,本发明包括药物组合物,其含有式 I 的化合物和药物佐剂、载体或稀释剂。

[0058] 在又一个实施方案中,本发明涉及需要治疗的哺乳动物响应于  $\beta$ - 淀粉样肽抑制的疾病的方法,其包括给予所述哺乳动物治疗有效量的式 I 化合物或其溶剂化物或水合物。

[0059] 在又一个实施方案中,本发明涉及在其需要的患者中治疗、缓解或延迟阿尔茨海默病、淀粉样脑血管病、系统性淀粉样变病、带有 Dutch 型淀粉样变性的遗传性脑出血、多发脑梗死性痴呆、轻度认知障碍和唐氏综合症的发生的方法,其包括给予所述患者治疗有效量的式 I 化合物或其溶剂化物或水合物。

[0060] 对于治疗用途,式 I 的药物活性化合物通常作为药物组合物使用标准技术和常规技术给予,所述药物组合物包含作为必需活性成分的至少一种这样的化合物连同药学上可接受的固体或液体载体,以及任选的药学上可接受的佐剂和赋形剂。

[0061] 所述药物组合物包括适于口服、胃肠外(包括皮下、肌肉、真皮内和静脉内)、透皮、舌下、支气管或鼻内给药的剂型。因此,如果使用固体载体,则制剂可制片,以粉末或丸剂形式置于硬胶囊中,或者是锭剂或糖锭(troche or lozenge)形式。固体载体可以含有常规的赋形剂,如粘合剂、填充剂、成片润滑剂、崩解剂、润湿剂等。如有需要,片剂可以通过常规技术包衣。口服制剂包括由明胶制备的压入配合(push-fit)胶囊,以及由明胶和包衣如甘油或山梨糖醇制备的软密封胶囊。压入配合胶囊可包含与下列各项混合的活性成分:填充剂或粘合剂如乳糖或淀粉,润滑剂如滑石或硬脂酸镁,和任选的稳定剂。在软胶囊中,所述活性化合物可被溶解或悬浮在合适的液体如脂肪油、液体或液体聚乙二醇中,有或没有稳定剂。如果使用液体载体,则制剂可以为糖浆、乳液、软明胶胶囊、无菌注射溶媒、水性或非水性液体悬浮液形式,或者可以是干燥制品,使用前用水或其它合适的溶媒重构。液体制剂可以含有常规的添加剂,如悬浮剂、乳化剂、润湿剂、非水性溶媒(包括食用油)、防腐剂以及调味剂和/或着色剂。对于胃肠外给药,溶媒通常(至少大部分)包括无菌水,不过可以使用盐水溶液、葡萄糖溶液等。也可以使用注射悬浮液,在此情况下可以使用常规悬浮剂。常规的防腐剂、缓冲剂等也可以加入到胃肠外剂型中。对于局部或鼻内给药,可在制剂中使用适于穿透特定屏障的渗透剂或透过剂。这样的渗透剂一般是本领域已知的。所述药物组合物通过对含有适量活性成分(即本发明的式 I 化合物)的所需制剂适合的常规技

术制备。参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, 第 17 版, 1985。

[0062] 达到疗效的式 I 化合物的剂量不仅取决于诸如患者的年龄、体重 和性别以及给药方式等因素, 还取决于所需的 A $\beta$  抑制的程度和式 I 化合物对所涉及的具体病症或疾病的效力。还设想式 I 化合物的治疗和剂量可以以单位剂量形式给药, 因此单位剂量形式应由本领域技术人员调整, 以反映相对活性水平。决定所用的具体剂量 (和每天的给药次数) 属于医师决定的范围, 并且可以根据本发明的具体情况通过剂量滴定改变, 以产生所需的疗效。

[0063] 对于罹患或可能罹患如本文所述的与 A $\beta$  肽产生有关的任何疾病的哺乳动物 (包括人), 式 I 化合物或其药物组合物的适宜剂量, 在胃肠外给药时, 日剂量一般为约 0.01mg/kg 至约 10mg/kg, 优选为约 0.1mg/kg 至 2mg/kg。对于口服给药, 剂量范围可为约 0.01mg/kg 至约 20mg/kg, 优选 0.1-10mg/kg 体重。活性成分优选以相同剂量给药, 每天 1-4 次。但是通常以小剂量给药, 剂量逐渐增加, 直到确定对所治疗的宿主最佳的剂量。根据良好的临床实践, 优选以产生有效抗淀粉体效果而不引起任何有害的或不希望的副反应的浓度水平给予本发明的化合物。但是, 应该理解, 实际给予的化合物的量由医师根据相关情况决定, 包括所治疗的疾病、所给予的化合物的选择、选定的给药途径、个体患者的年龄、体重和反应以及患者病症的严重程度。

[0064] 生物学数据

[0065] PXR 转移活化

[0066] 孕烷 X 受体 (PXR) 是主要负责诱导细胞色素 P450 (CYP) 3A4 的核激素受体, 其在代谢许多临床处方药物方面起重要作用。众所周知诱导 CYP3A4 可以通过增加共给予的 CYP3A4 底物的代谢清除引起药物-药物相互作用 (Bertilsson, G. 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1998) 95 : 12208-12213 ; Lehmann, J. M. 等人, J. Clin. Invest. (1998) 102 : 1016-1023), 或者可以引起归因于自诱导的药物暴露损失。表征发现或开发的药物候选物的诱导潜力已变成整个医药产业的重要药物筛选方法。PXR 转移活化测定用于评价 CYP3A4 的诱导潜力, HepG2 细胞的细胞毒性测定用于监测归因于细胞毒性的测定干扰。

[0067] 使用的细胞培养基是 DMEM。脂转染胺 2000、PBS、胰蛋白酶-EDTA (0.25%) 和青霉素-链霉素购自 GIBCO/Invitrogen (Carlsbad, CA)。热失活的胎牛血清 (FBS) 购自 Sigma (St. Louis, MO)。活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone (Logan, UT)。HepG2 细胞得自 ATCC (Manassas, VA)。人 PXR-pcDNA3 和包含 CYP3A4 启动子的萤光素酶报告体 CYP3A-Luc 在 Bristol-Myers Squibb 产生。黑色标准 384 孔板购自 BD Biosciences (Lexington, KY)。萤光素酶底物 (Steady-Glo) 购自 Promega (Madison, WI)。对照化合物利福平购自 Sigma (St. Louis, MO)。

[0068] HepG2 细胞的培养在 T175 瓶中使用含 10% FBS 的 DMEM 进行。转染混合物包含 1  $\mu$ g/mL PXR-pcDNA3 质粒 DNA、20  $\mu$ g/mL Cyp3A-Luc 质粒 DNA、90  $\mu$ L/mL 脂转染胺 2000 和无血清培养基。在室温温育 20 分钟后, 将转染混合物 (1mL/瓶) 加至新鲜培养基中的细胞 (20mL/瓶), 将瓶于 37°C (5% CO<sub>2</sub>) 过夜温育。

[0069] 将每个瓶中的细胞用 PBS 洗涤, 加入 4mL 胰蛋白酶-EDTA (0.25%), 并于室温温育 1 分钟。然后吸出胰蛋白酶, 将瓶于室温再温育 5 分钟。然后剧烈敲击瓶, 以散开细胞聚集

物。在加入含 5% 活性炭 / 葡聚糖处理的 FBS 的 10mL DMEM 之后, 将整个混合物转移至圆锥管。再通过 1mL 细管尖吸打解聚悬浮液中的细胞团。然后计数细胞, 并以培养基稀释至  $3.0 \times 10^5$  个细胞 / mL。将 50  $\mu$ L 细胞混合物加至含有溶解在 100% DMSO 中的 0.25  $\mu$ L 测试化合物的黑色标准 384 孔板的每个孔。将所述板于 37°C (5% CO<sub>2</sub>) 过夜温育, 然后将 25  $\mu$ L 萤光素酶底物 (Steady-Glo, Promega) 加至每个孔。在 15 分钟后, 以 Viewlux (Perkin-Elmer) 读板器读取板。

[0070] 利福平 (10  $\mu$ M) 是一种众所周知的 PXR 激动剂, 纳入每块板中作为内标和阳性对照。然后将数据表示为活化百分率 (% Act), 其中总信号为得自 10  $\mu$ M 利福平的信号, 空白信号为得自 DMSO 溶媒的信号。

[0071]

$$\% \text{Act} = \frac{\text{化合物信号} - \text{空白信号}}{\text{总信号} - \text{空白信号}} \times 100\%$$

[0072] 以 10 个浓度 (50  $\mu$ M-2.5nM, 1 : 3 连续稀释) 测试化合物, XL-Fit (IDBS, Inc.) 用于曲线拟合。报告发生 20% 和 60% 活化 (分别为 EC<sub>20A</sub> 和 EC<sub>60A</sub>) 的化合物浓度。

[0073] 人孕烷-X 受体主要负责诱导 CYP3A4 以及 CYP2B6、CYP2C8/9、2 期酶如 UGT, 以及几种转运体, 例如 P-gp、MRP2 和 OATP2。以上的测试表明, 在 hPXR 转移活化测定中, (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺具有 6.9  $\mu$ M 的 EC<sub>20A</sub> (20% 的 10  $\mu$ M 利福平反应) 和大于 16.7  $\mu$ M 的 EC<sub>60A</sub> (60% 的 10  $\mu$ M 利福平反应)。这些结果提示, (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺可以通过活化 hPXR 具有为人 CYP3A4 诱导物的潜力。

[0074] Fa2N-4 细胞中细胞色素 P450 的诱导

[0075] 在体外使用 Fa2N-4 细胞系评价 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺诱导 CYP3A4 mRNA 的能力。Fa2N-4 细胞是永生化的肝细胞系, 其使用猿猴病毒 40 (SV40) T 抗原作为永生化的基因产生, 同时保留几种 CYP 同种型 (包括 CYP3A4) 的基础表达和诱导力。Fa2N-4 细胞和 MFE 支持培养基 F 由 XenoTech, LLC (Lenexa, Kansas) 提供。

[0076] Fa2N-4 细胞以  $0.67 \times 10^6$  个细胞 / 孔的接种密度在 12 孔胶原蛋白包被的板上提供。在接入细胞时, 更换培养基, 将细胞过夜保持在湿润的、供应 CO<sub>2</sub> 的培养箱中。在该适应期之后, 在光学显微镜下检查细胞, 并确定细胞是否形态正常和适于使用。在处理期当中, 每天目测检查细胞; 根据需要以文件记录由于测试物产生的细胞形态、汇合和毒性迹象。用 4 种浓度 (最终温育时 0.5  $\mu$ M、2  $\mu$ M、8  $\mu$ M 和 20  $\mu$ M) 的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺和溶剂溶媒对照 (0.1% DMSO) 平行三份处理细胞培养物。利福平 (10  $\mu$ M) 是一种原型的 CYP3A4 诱导物, 用作阳性对照。Fa2N-4 细胞接触测试物总共 3 天。用含有测试物的新鲜培养基每日更换培养基。在总共约 72 小时的接触后, 吸出培养基, 用热磷酸缓冲盐水溶液洗涤细胞 1 次, 之后加入细胞裂解缓冲液 (Qiagen, Valencia, CA)。

[0077] 以 Fa2N-4 永生化的肝细胞检验 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺诱导 CYP3A4 mRNA 表达的能力。

用利福平 (10  $\mu$  M) 处理 Fa2N-4 肝细胞 3 天引起细胞 CYP3A4 mRNA 表达显著 (12 倍) 增加, 表明细胞正确地发挥机能。用 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺诱导肝细胞 3 天导致 CYP3A4 mRNA 表达浓度依赖性增加, 于最高测试浓度 (20  $\mu$  M) 达到溶媒对照的 2.6 倍。该诱导程度等于由利福平引起的诱导响应的 22%, 提示 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺于高于 20  $\mu$  M 的浓度时可以中度诱导 CYP3A4。于较低的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺浓度 ( $\leq 8.0 \mu$  M) 时, 观察到相对较小的 CYP3A4 诱导 ( $\leq 2.0$  倍)。

[0078] 在肝脏微粒体中的代谢稳定性

[0079] 小鼠、大鼠、狗、人和猕猴肝脏微粒体得自 BD Gentest (Woburn, MA)。批次为 13 (小鼠)、8 (大鼠)、8 (狗)、19 和 26 (人) 以及 3 (猕猴)。在三组条件下研究了肝脏微粒体中 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺的氧化代谢作用。人和狗的温育混合物 (总体积 3 mL, 有机溶剂含量 0.3%) 包含 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺 (1  $\mu$  M)、微粒体蛋白 (1mg/mL)、NADPH (1mM)、Tris 氯化物缓冲液 (100mM, pH7.4) 和氯化镁 (3.3mM)。反应以平行三份进行, 通过加入 NADPH 开始, 之后于 37°C 温育 50 分钟。于 0、5、10、20、30、40 和 50 分钟取等份的样品 (0.25mL), 通过加入 3 体积乙腈猝灭反应。猕猴和大鼠的温育混合物 (总体积 3mL, 有机溶剂含量 0.3%) 包含 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺 (1  $\mu$  M)、微粒体蛋白 (0.1mg/mL)、NADPH (1mM)、Tris 氯化物缓冲液 (100mM, pH7.4) 和氯化镁 (3.3mM)。反应以平行三份进行, 通过加入 NADPH 开始, 之后于 37°C 温育 50 分钟。于 0、5、10、20、30、40 和 50 分钟取等份的样品 (0.25mL), 通过加入 3 体积乙腈猝灭反应。小鼠和猕猴的温育混合物 (总体积 3 mL, 有机溶剂含量 0.3%) 包含 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺 (1  $\mu$  M)、微粒体蛋白 (0.1mg/mL)、NADPH (1mM)、Tris 氯化物缓冲液 (100mM, pH7.4) 和氯化镁 (3.3 mM)。反应以平行两份进行, 通过加入 NADPH 开始, 之后于 37°C 温育 40 分钟。于 0、5、10、15、20、30 和 40 分钟取等份的样品 (0.25mL), 通过加入 3 体积乙腈猝灭反应。对于所有的研究, 都立即通过 LC/MS 方法分析样品。由每个时间点的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺的峰面积比率计算母体消失速率。

[0080] 使用 Houston JB., Biochem Pharmacol 1994;47:1469-1479; Iwatsubo 等人, Pharmacol Ther (1997) 73:147-171; 和 Obach 等人, JPharmacol Exp Ther (1997) 283:46-58 描述的方法, 由肝脏微粒体数据评价多个物种中的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺的肝清除率 (CL<sub>h</sub>, int, mL/min/kg)。

[0081] 在多个物种的 NADPH 加强的肝脏微粒体存在下, 测定 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺的体外代谢速率。本发明的化合物 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)

苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺(1 μM)分别以690、630、40、495和32pmol/min/mg小鼠、大鼠、狗、猕猴和人微粒体中存在的蛋白的速率代谢。当(2R)-2-[[[(4-氯苯基)磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺消耗速率放大至体内清除时,预测的(2R)-2-[[[(4-氯苯基)磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺体内(血清)清除值在小鼠、大鼠、狗、猕猴和人中分别为87、52、14、39和8mL/min/kg。这些数据提示,(2R)-2-[[[(4-氯苯基)磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺预期在人中为低清除化合物。

[0082] 体外药理学

[0083] 衰老蛋白结合测定

[0084] 使用以前描述的用于<sup>[3]H</sup>(2R,3S)-2-异丁基-N1-((S)-2-氧代-1-(3-苯氧基苄基)氮杂 萘-3-基)-3-丙基琥珀酰亚胺(RE987,化合物A[Seiffert D等人, Presenilin-1 and-2 are molecular targets for γ-secretase inhibitors. J. Biol. Chem. (2000) 275(44):34086-34091])的方法,采用<sup>[3]H</sup>(R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺进行放射性配体置换测定。进行几个实验来证实<sup>[3]H</sup>(R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺结合γ-分泌酶。首先,<sup>[3]H</sup>(R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺与野生型和PS-1/PS-2敲除成纤维细胞的膜的特异性结合表明,<sup>[3]H</sup>(R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺特异性结合野生型成纤维细胞的膜,但不结合敲除成纤维细胞的膜,且特异性信号被结构上不同的γ-分泌酶抑制剂竞争。其次,用几种γ-分泌酶抑制剂研究<sup>[3]H</sup>(R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺结合的药理学。这些结果表明,置换结合THP-1膜的<sup>[3]H</sup>(R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺与使用先前的放射性配体结合测定检测的γ-分泌酶效力和培养细胞中的Aβ形成抑制均良好关联。

[0085] 在含有L-谷氨酰胺(Life Technologies Inc.)和10 μM β-巯基乙醇的RPMI1640中,以旋动培养将THP-1细胞培养至5×10<sup>5</sup>个/mL的细胞密度。通过离心收获细胞,将含有2×10<sup>8</sup>个细胞的沉淀在干冰/乙醇中快速冷冻,并在使用前储存于-70℃。在测定当天,以2×10<sup>8</sup>个细胞/10mL匀浆缓冲液于4℃融化细胞,所述匀浆缓冲液由50mM HEPES pH7.0组成,含有104 μM 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐、80nM 抑肽酶、2 μM 亮抑酶肽、4 μM 贝他定、1.5 μM 抑肽素A和1.4 μM ME-64(0.1%蛋白酶抑制剂混合物P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的蛋白酶抑制剂混合物。使用Polytron(Brinkman, Westbury, NY)以18,000rpm匀化细胞15秒,然后用Sorval RC5B离心机以18,000rpm于4℃离心15分钟。将获得的沉淀重悬浮在4℃缓冲液中,以产生5mg/mL的总蛋白浓度。为用于结合测定,以测定缓冲液将细胞匀浆稀释至300 μg/mL的浓度,所述测定缓冲液由50mM HEPES pH7.0、0.1% CHAPS组成。通过加入200 μL细胞匀浆物至含有0.75nM放射性配体(<sup>[3]H</sup>(R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲

基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺,110Ci/mmol)和多种浓度的未标记化合物的50 μL测定缓冲液在聚丙烯96孔板(Costar, Cambridge, MA)中开始测定,并于37℃温育1小时。最终的DMSO浓度为1%。使用Innotech细胞收集器经由GFF玻璃纤维滤器(Innotech Biosystems International, Lansing, MI)过滤分离结合的放射性配体与游离的放射性配体。滤器用0.3ml/孔的磷酸缓冲盐水pH 7.0于4℃洗涤3次,并使用Wallac 1450 Microbeta液体闪烁计数器(PerkinElmer, Boston, MA)检测放射性活性。竞争化合物的 $K_i$ 值通过Cheng-Prusoff校正使用XLfit(IDBS, Guildford, UK)计算的 $IC_{50}$ 值导出。

[0086] 以上的放射性配体结合测定用于检测化合物对 $\gamma$ -分泌酶复合物的衰老蛋白靶向位点的亲和力。(2R)-2-[[[4-氯苯基]磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺对 $[^3H]$ (R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺结合THP-1膜中的衰老蛋白产生剂量依赖性抑制。多个实验的分析产生 $K_i = 0.48 \text{ nM} \pm 0.24 \text{ nM}$ (平均值 $\pm$ SD,  $n = 8$ )。

[0087] 培养细胞的A $\beta$ 形成抑制

[0088] 使用在Bristol-Myers Squibb开发的H4 APP751 SWE克隆8.20(稳定表达APP751的Swedish突变体的H4神经胶质瘤细胞系)测定化合物在细胞中的A $\beta$ 40抑制或A $\beta$ 42抑制。通过每周两次的传代以1:20的稀释度将细胞保持在对数期。对于 $IC_{50}$ 测定,将在含有0.0125% BSA(Sigma A8412)的DMEM培养基中的30 μL细胞( $1.5 \times 10^4$ 个细胞/孔)直接铺板于含有0.1 μL连续稀释的化合物的DMSO溶液的384孔化合物板(Costar 3709)上。在5% CO<sub>2</sub>中于37℃温育19小时后,短暂离心板(1000rpm, 5分钟)。将每孔的10 μL等份试样转移至第二块测定板(Costar 3709),用于A $\beta$ 40检测。通过稀释至含0.2% BSA的40 mM Tris-HCl(pH 7.4)新鲜制备抗体混合物,并加至测定板。对于A $\beta$ 42检测,混合对A $\beta$ 42新表位(565,在Bristol-Myers Squibb开发;缀合至Wallac试剂(Perkin Elmer))特异性的抗体和A $\beta$ 肽(26D6,在SIBIA/Bristol-Myers Squibb开发;缀合至APC(Perkin Elmer))的N-末端序列,将20 μL混合物加至温育细胞板的每个孔,产生0.8ng/孔565和75ng/孔26D6的终浓度。对于A $\beta$ 40检测,混合如上所述对A $\beta$ 40新表位(TSD,在Bristol-Myers Squibb开发;缀合至Wallac试剂(Perkin Elmer))和26D6特异性的抗体,将20 μL混合物加至预先已由细胞板取出的10 μL等份试样,产生1.6ng/孔TSD和17.5ng/孔26D6的终浓度。用铝箔密封含有抗体的测定板,并于4℃过夜温育。使用Viewlux计数器(Perkin Elmer)测定信号,并使用以CurveMaster(基于Excel Fit)拟合的曲线测定 $IC_{50}$ 值。

[0089] (2R)-2-[[[4-氯苯基]磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺有效抑制H4-8Sw细胞中的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42形成。多个实验的分析产生的A $\beta$ 40抑制的 $IC_{50} = 0.30 \pm 0.15 \text{ nM}$ (平均值 $\pm$ SD,  $n = 50$ ),产生的A $\beta$ 42抑制的 $IC_{50} = 0.27 \pm 0.12 \text{ nM}$ (平均值 $\pm$ SD,  $n = 45$ )。

[0090] 对培养细胞中的Notch信号转导的抑制

[0091] 通过跨膜受体的Notch家族进行信号转导需要 $\gamma$ -分泌酶活性。因为抑制Notch信号转导引起不需要的机理性副作用,所以使用针对Notch1- $\Delta E$ 信号转导的细胞测定反筛选 $\gamma$ -分泌酶抑制剂。

[0092] 使用标准分子生物学技术通过PCR产生小鼠Notch1表达构建体,并通过测序确

认。该构建体在 pCDNA3.1+Hyg 载体 (Invitrogen) 中产生,所述载体被修饰为包含 N- 末端 20 个氨基酸的信号序列和 C- 末端 7Xmyc 标记。信号序列来源于小鼠 Notch1;7Xmyc- 标记通过使用重叠引物产生,并亚克隆入 pCDNA3.1+Hyg 载体的 HindIII/XhoI 位点中。

[0093] 小鼠 Notch1-ΔE 构建体包含小鼠 Notch1 信号序列和跨膜结构域中的 M1727V 突变,以抑制内部翻译起始。由氨基酸 1704 至 2193 的小鼠 Notch1-ΔE 编码序列分离自小鼠脾脏 Quick Clone cDNA 文库 (Clontech),并以 XbaI/HindII 片段亚克隆入含有 7X myc- 标记和信号序列的修饰载体中。

[0094] HeLa 细胞保持在含有 10% FBS (GibcoBRL)、青霉素 / 链霉素 (GibcoBRL) 和 2 mM L- 谷氨酰胺 (GibcoBRL) 的 DMEM (GibcoBRL) 中。使用 TransIT-HeLaMONSTER (Mirus) 按照生产商的指引瞬时转染细胞。在转染前 16 小时将 HeLa 细胞 (ATCC) 以  $4 \times 10^6$  个细胞 / T175 瓶的密度铺板在 HeLa 生长培养基 (DMEM (高葡萄糖,含 HEPES),含谷氨酰胺、青霉素、链霉素和 10% 胎牛血清) 中。使用 HeLaMonster 转染试剂 (Mirus) 用以下各项转染生长培养基中的细胞:  $6 \mu\text{g}$  小鼠 Notch1-ΔE 质粒、 $15.6 \mu\text{g}$  载体质粒 (pCDNA3.1+hyg)、 $14.4 \mu\text{g}$  gCBF1 质粒 (萤光素酶报告体)。CBF1- 萤光素酶报告构建体由 SV40 启动子 (pGL3- 启动子, Promega) 上游的 4X 拷贝的 CBF1 结合元件组成。使用重叠引物产生 CBF1- 萤光素酶报告体,以产生 4XCBF1 结合区。将该片段亚克隆入 pGL3- 启动子构建体的 NheI/BglIII 位点。该构建体的完整性通过测序证实。以 TE 缓冲液 (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) 稀释 DNA 母液用于转染。在 DNA 加入后 5-6 小时,由含胰蛋白酶-EDTA 的瓶中取出细胞,并以  $5 \times 10^4$  个细胞 / mL 的浓度重悬浮在限定培养基 (DMEM (高葡萄糖,含 HEPES),含谷氨酰胺、青霉素、链霉素、0.0125% 牛血清白蛋白和非必需氨基酸) 中。以  $200 \mu\text{L}$  / 孔 ( $1 \times 10^4$  个细胞) 的体积将细胞铺板入 96 孔黑色 Clearview 板 (Packard) 中,并于  $37^\circ\text{C}$  温育 1.5 小时,以允许细胞粘附至所述板。初始以 100% DMSO 将测试化合物稀释入 96 孔聚丙烯板中。然后通过转移入含限定培养基的板中将 DMSO 化合物母液稀释 47.6 倍,得到 2.1% DMSO 浓度。将稀释的化合物溶液 ( $10 \mu\text{L}$ ) 加至细胞板,产生最终 0.1% DMSO 浓度。含有化合物的细胞板于  $37^\circ\text{C}$  过夜温育。在此过夜温育后,轻缓去除培养基,并向每个孔加入  $25 \mu\text{L}$  磷酸缓冲盐水 (含钙和镁)。以等比例混合 Luc-Screen (Applied Biosystems) 试剂 A 和 B,并将  $50 \mu\text{L}$  混合物加至每个孔。将所述板于室温温育 10 分钟,之后将黑色背衬贴附至板的底部,以 TopCount (Packard) 读取信号。然后使用非线性回归拟合浓度响应曲线,以确定  $\text{IC}_{50}$  值。

[0095] 通过跨膜受体的 Notch 家族进行信号转导需要  $\gamma$ - 分泌酶活性。因为 Notch 信号转导的抑制会引起不需要的机理性副作用,所以使用上述针对 Notch1-ΔE 信号转导的细胞测定反筛选  $\gamma$ - 分泌酶抑制剂。多个实验分析 (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基] [[2- 氟-4-(1,2,4- 噁二唑-3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺对 Notch1-ΔE 信号转导的抑制产生的  $\text{IC}_{50} = 58 \pm 23 \text{ nM}$  (平均值  $\pm$  SD,  $n = 58$ )。

[0096] 基于抑制 A $\beta$  40 (0.3nM) 和 Notch (58nM) 的细胞效力,针对 (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基] [[2- 氟-4-(1,2,4- 噁二唑-3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺的 Notch/APP 选择性为 193X (95% CI = 163-232)。

[0097] 体内药理学

[0098] A $\beta$  ELISA

[0099] 使用夹心 ELISA 测定检测动物的 A $\beta$  种类。本文包括这些测定的简短论述,因为

各种抗体的表位细节决定了要检测的 Aβ 种类。小鼠和大鼠 Aβ 共有相同的 Aβ 序列,该序列与人 Aβ 不同。由于这些序列差异,识别人 Aβ 的 N-末端区的抗体如 26D6 弱结合啮齿动物 Aβ。同样,紧密结合啮齿动物 Aβ 的抗体如 252 弱结合人 Aβ。开发两种测定来检测啮齿动物 Aβ 40:252-TSD 和 4G8-TSD。TSD-4G8 测定不仅可以检测 Aβ 40,而且可以检测其它 BACE-γ-分泌酶切割产物(Aβ 11-40)和 α-分泌酶-γ-分泌酶切割产物(P3)。表 1 概述了在本申请中提出的测定及其用途。

[0100] 表 1:用于体内样品测定的抗体对的概述

[0101]

| 抗体对     | 分析的组织     | 检测的 Aβ 种类           |
|---------|-----------|---------------------|
| 252-TSD | 大鼠脑       | Aβx-40 <sup>a</sup> |
| 4G8-TSD | 大鼠血浆, CSF | Aβx-40 和 P3         |

[0102] <sup>a</sup> “x”的确切位置是未知的。尽管 252 识别 Aβ 的 N-末端区,但不知道 Aβ 的氨基末端截短是否影响 252 结合。这种不确定性在大鼠中不可能是问题,因为 N-末端截短是罕见的。

[0103] 这些测定的每一种都使用几种方法验证。首先,将不同量的合成 Aβ 改变加入到生物基质,并将信号增加与用合成 Aβ 在缓冲溶液中获得信号增加相比较。其次,用抗 Aβ 抗体耗尽生物样品中的 Aβ。第三,测定用高剂量 γ-分泌酶抑制剂治疗的动物的样品。已验证的测定有效检测到外源加入的 Aβ (回收率>80%),在 Aβ 免疫耗竭后信号极大降低(相比于非特异性对照降低>80%),且信号降低至与使用高剂量 γ-分泌酶抑制剂治疗的动物的样品的测定基底 (assay floor) 接近或重叠的值。最佳的和经验证的 Aβ 测定仍含有少量信号(5-20%的溶媒对照),其不能被抗 Aβ 抗体或用 γ-分泌酶抑制剂治疗耗竭。该信号不可能为 Aβ,因此被称为测定基底。测定基底不用于校正任何 Aβ 测量值,因此报告的值可能低估了 Aβ 抑制的实际量。

[0104] Aβ 40 在体内用作 Aβ 42 的替代品。生物样品中的 Aβ 40 丰度约为 Aβ 42 的 10 倍。基于培养细胞中的实验,Aβ 40 是 Aβ 42 的良好替代品,其中 Aβ 40 和 Aβ 42 类似地受(2R)-2-[[4-氯苯基]磺酰基][[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苯基]甲基]氨基]-5,5-三氟戊酰胺和其它 γ-分泌酶抑制剂抑制。

[0105] 大鼠研究

[0106] 在活体中

[0107] 每日早晨以 4mL/kg 经口管饲将 99% PEG-400、1% Tween-80 的给药溶媒给予雌性 Harlan Sprague-Dawley 大鼠(约 200-250g)。给药溶液在研究开始时一次制备。于 56℃ 加热和超声用于溶解给药溶液中的化合物。所有的程序都按照 ACUC 指引进行。终端血样在 CO<sub>2</sub> 安乐死之后通过心脏穿刺获得,并收集在 EDTA 管中。在离心后获得血浆。解剖脑组织,称重,并在干冰上冷却,直至分析。离心 CSF 样品,以除去细胞或碎片,然后用 4% BSA 以 1:2 稀释,并冷冻,用于随后的分析。在处理前将组织病理学样品置于中性缓冲福尔马林中。将收集用于占据的样品在包埋基质中包被,并于 -25℃ 至 -30℃ 在 2-甲基丁烷浴中冷

冻,之后在干冰中冷冻。使用眼球后取血获得活体血浆样品。

#### [0108] 脑 A $\beta$ 40 测定

[0109] 使用 polytron 以 4mL/g 在 PBS, pH7.8、2% CHAPS、完全蛋白酶抑制剂 (Roche) 中匀化大鼠脑 (半球的一半)。通过以 20,800xg 离心 30 分钟去除大碎片,用 PBS、2.5% BSA 以 1 : 2 稀释获得的上清液。将含 50  $\mu$ g/mL TSD9S3.2 抗体的 PBS 溶液的 White Microlite II ELISA 板 (Thermo Electron) 于 37°C 温育 1 小时。在板振荡器上用 200  $\mu$ L 5% 牛血清白蛋白 (BSA; 重量 / 体积, 以 PBS 制备) 于室温封闭板 2 小时,然后用 500  $\mu$ L / 孔 PBS、0.05% Tween-20 洗涤板 5 次。将澄清的脑匀浆物以 50  $\mu$ L / 孔的 6 份复制品加样,并于室温温育 1 小时。如前洗涤板,然后与用 PBS、0.05% Tween、0.1% BSA 以 1 : 2000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP)-缀合的 252 抗体 (Biosource) 温育 1 小时。3 份复制品仅含有 252-HRP 抗体,而 3 份复制品含有 252-HRP 抗体和特异性竞争结合抗体的 1  $\mu$ g/mL 大鼠 A $\beta$  1-14 (Anaspec); 将该背景信号由总信号中扣除,以产生特异性信号。使用 Pierce Supersignal Pico 化学发光底物检测结合的 252-HRP 抗体 10 分钟,并以 Packard TopCount 定量。将样品对置于每块板上的脑匀浆参比标准化。基于 A $\beta$  40 标准曲线,LLQ 为 10pg/mL 组织,LLD 为 20pg/g 组织。

#### [0110] 血浆 A $\beta$ 40 测定

[0111] 用 TSD 抗体包被板,并如对脑 A $\beta$  40 测定一样洗涤。用 PBS 缓冲液, pH7.8、0.25% 诺乃洗涤剂 P40、2.5% BSA 以 1 : 3 稀释血浆样品。将样品以 50  $\mu$ L / 孔的 6 份复制品加样,并于室温温育 1-2 小时。使用以 PBS、0.05% Tween、0.1% BSA 1 : 8000 稀释的 4G8-生物素 (Signet) 检测样品 1 小时。3 份复制品仅具有 4G8-生物素抗体,3 份复制品具有 4G8-生物素抗体和竞争特异性信号的 1  $\mu$ g/mL A $\beta$  17-24,由此建立每个样品的背景值。在如上洗涤后,将板与以 PBS、0.05% Tween、0.1% BSA 1 : 50,000 稀释的链酶抗生物素蛋白-HRP (Zymed) 温育 10 分钟。如对脑 A $\beta$  40 测定一样检测和定量。将样品对置于每块板上的血浆参比标准化。基于 A $\beta$  40 标准曲线,LLQ 为 7.5pg/mL 血浆,LLD 为 23pg/mL 血浆。

#### [0112] CSF A $\beta$ 40 测定

[0113] 用 TSD 抗体包被板,并如脑 A $\beta$  40 测定一样洗涤。用 PBS, pH 7.8、0.1% Tween-20 以 1 : 10 稀释 CSF 样品。在收集时,预先用 4% BSA 的水溶液以 1 : 2 稀释 CSF。将样品以 50  $\mu$ L / 孔的 3 份复制品加样,并于室温温育 1-2 小时。使用 PBS、0.05% Tween、0.1% BSA 1 : 8000 稀释的 4G8-生物素 (Signet) 检测样品 1 小时。因为背景低,所以不需要针对该测定运行复制样品和竞争肽。检测结合的 4G8-HRP,并如血浆 A $\beta$  40 测定一样定量。将样品对置于每块板上的 CSF 参比标准化。基于 A $\beta$  40 标准曲线,LLQ 为 20pg/mL CSF,LLD 为 400pg/mL CSF。

#### [0114] $\gamma$ -分泌酶位点占据

[0115] 用低温恒温器以 20  $\mu$ m 厚度切冠状脑切片,并融化封装在 Superfrost Plus 载玻片上。将切片保存在吻侧海马 (rostral hippocampus) 平面处,每个载玻片的 3 个切片,间隔约 120  $\mu$ m,并于 -20°C 冷冻备用。对于占据研究,将脑切片温至室温,干燥,在 50mM HEPES 缓冲液, pH7.4 中温育 10 分钟,然后转移至含有 1.5nM [ $^3$ H] IN973 (Goldstein, M. E. 等人, J. Pharmacol. Exp. Ther (2007) 323 : 102-108) 或 [ $^3$ H] (R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺的相同缓冲液

中,并于室温温育 10 分钟。为确定非特异性结合,将邻接的切片在含有 [<sup>3</sup>H] IN973 或 [<sup>3</sup>H] (R)-4-((N-(1-氨基-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)-4-氯苯基磺酰氨基)甲基)-N-(2-甲氧基乙基)苯甲酰胺但含有 0.5- 未标记的  $\gamma$ -分泌酶抑制剂的缓冲液中温育。在温育后,用冰冷的 PBS, pH7.2 将载玻片洗涤 3 次,每次 2 分钟,将载玻片浸入冰冷的蒸馏水中,并用鼓风的冷空气干燥。将载玻片置于氟-敏感性储磷屏 (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) 下,并在黑暗中曝光 7 天。使用 Cyclone 磷扫描仪 (Packard, Meriden, CT) 以及 OptiQuant 获取和分析软件 (Packard) 由储磷屏获取图像。检测目标区域内的光密度 (表示为数字光度单位 / 平方毫米),并表示为溶媒对照的百分率。

#### [0116] 组织病理学方法

[0117] 在通过 CO<sub>2</sub> 窒息安乐死后,由腹部取出近十二指肠的约 3cm 长段,用冰冷的磷酸缓冲盐水淋洗,并置于 10% 缓冲福尔马林中,之后制作切片。将十二指肠的组织切片包埋在液体石蜡中,封装成块,并切为 3 份径向 (横过管腔) 环状切片,使用高碘酸席夫碱法染色,之后进行显微镜评价。所有的动物直至进行预定尸检时仍存活。

#### [0118] 急性大鼠研究

[0119] 30mg/kg 的单剂 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺分别将血浆 A $\beta$  40 和脑 A $\beta$  40 显著降低至溶媒对照的 2% 和 16% 的水平。为进一步研究大鼠中 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺的作用,以 1mg/kg、10mg/kg 和 100mg/kg 给予单剂 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺,在 2、5、8、12 和 24 小时后收集组织,用于血浆 A $\beta$  40、脑 A $\beta$  40 和  $\gamma$ -分泌酶位点占据检测。这些检测表明,给药后 2-24 小时,10mg/kg 和 100mg/kg 降低的血浆 A $\beta$  40 和脑 A $\beta$  40 低于基线 A $\beta$  40 值的 25%。相比之下,1mg/kg 没有引起脑 A $\beta$  40 统计学显著的变化,但引起血浆 A $\beta$  40 短暂升高。具体地说,血浆 A $\beta$  40 至 8 小时时增加至起始值的 250%,之后至 24 小时时回到基线值。 $\gamma$ -分泌酶位点占据表明,在 100mg/kg 剂量之后的整个给药间隔中,脑中大于 94% 的  $\gamma$ -分泌酶抑制剂结合位点被占据,在 10mg/kg 剂量之后在除 24 小时时间点之外的所有时间点被占据 (88%)。相比之下,在 1mg/kg 剂量之后 2 小时仅 75% 的脑  $\gamma$ -分泌酶结合位点被占据,至 24 小时时位点占据逐渐回到基线水平。

[0120] 急性大鼠研究的结果表明,(2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺降低血浆 A $\beta$  40、脑 A $\beta$  40 和 CSF A $\beta$  40, ED<sub>50</sub> 在 1mg/kg 至 10mg/kg 之间。

#### [0121] 亚慢性大鼠研究

[0122] 基于先前章节中描述的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [[2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺对大鼠脑 A $\beta$  40 的作用,每日给予大鼠 3、10、30 或 100mg/kg/ 天的剂量。在第 3 剂之后 12 小时或 24 小时或者第 4 剂之后 5 小时使动物安乐死。在给药后 5、12 或 24 小时通过线性外推由表 2 所示的相同剂量组中的动物获得的值评估脑 A $\beta$  40 AUC 的降低。基于该分析,于 3mg/kg/ 天时,A $\beta$  40 AUC 降低平均为 53%,于 10mg/kg/ 天或更高的剂量时,增加至超过 85%。检测化合物在数个时间点的水平,以评价化合物在实验开始和结束时的 AUC(0-24 小时) 值。这些值表明,3 剂后的化合物暴

露不超过初始剂量后暴露的 2 倍。这些大鼠的十二指肠组织的组织学评价表明,以 100mg/kg/ 天给药的大鼠中 1/3 具有轻微病变。

[0123] 表 2 :4 天大鼠研究结果的概述

[0124]

| 研究              | 给药<br>(mg/kg<br>/天) | 化合物 PK AUC<br>(uM•h)<br>(ng•h/mL)血浆 |                 | 终点脑 Aβ 40<br>(%Veh) <sup>a</sup> |          |          | 脑 <sup>b</sup><br>% Aβ<br>AUC 降低 | GI 毒性          |
|-----------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------|----------------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------------|
|                 |                     | 天 1 <sup>c</sup>                    | 结束 <sup>d</sup> | 5 小<br>时                         | 12<br>小时 | 24<br>小时 |                                  |                |
| 1#<br><br>(N=3) | 3                   | 10<br>5200                          | 12<br>6240      | 39%                              | 35%      | 92%      | 49%                              | NAD            |
|                 | 10                  | 60<br>31200                         | 48<br>24960     | 12%                              | 9%       | 28%      | 85%                              | NAD            |
|                 | 30                  | 169<br>87880                        | 93<br>48360     | 8%                               | 9%       | 13%      | 90%                              | NAD            |
| 2#<br><br>(N=3) | 3                   | 10<br>5200                          | 13<br>6760      | 16%                              | 34%      | 94%      | 57%                              | NAD            |
|                 | 10                  | 65<br>33800                         | 55<br>28600     | 6%                               | 4%       | 23%      | 91%                              | NAD            |
|                 | 30                  | 191<br>99320                        | 116<br>60320    | 6%                               | 4%       | 15%      | 93%                              | NAD            |
|                 | 100                 | 328<br>170560                       | 199<br>103480   | 3%                               | 3%       | 7%       | 96%                              | + <sup>e</sup> |

[0125] <sup>a</sup> 值代表相对于溶媒对照组的平均值表示的 n = 3 只动物的平均脑 Aβ 40 水平

[0126] <sup>b</sup> 通过线性外推相同剂量组中于给药后 5、12 或 24 小时由动物获得的值估计脑 Aβ 40 AUC 降低。

[0127] <sup>c</sup> 值代表 n = 3 只动物的平均 AUC(uM•h 或 ng•h/mL)。由第 1 剂后 5、12 和 24 小时取得的样品 (研究 1) 或第 1 剂后 5、12、17 和 24 小时取得的样品 (研究 2) 评估 AUC。

[0128] <sup>d</sup> 值代表 n = 3 只动物的平均 AUC(uM•h 或 ng•h/mL)。由第 3 剂后 12 和 24 小时以及第 4 剂后 5 小时取得的样品 (研究 1) 或者第 3 剂后 12、17、24 小时和第 4 剂后 5 小时取得的样品 (研究 2) 评估 AUC。

[0129] <sup>e</sup> 在 3 只动物中的 1 只中观察到杯状细胞化生

[0130] NAD = 未检测到异常

[0131] 亚慢性大鼠研究的结果表明, (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺降低了脑 Aβ 40, 无 GI 毒性。具体地说, 相比于诱发 GI 毒性需要的 100mg/kg/ 天的剂量, 3mg/kg/ 天的剂量引起约 50% 的

脑 A $\beta$  40 AUC 降低。

[0132] 对高剂量组的一只动物（以该剂量水平评价的 3 只动物中的 1 只），每天 1 次给予 100mg/kg/ 天 (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基 ] [[2- 氟 -4-(1,2,4- 噁二唑 -3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺，共给予 4 天，对其近十二指肠的显微镜评价显示，在该动物中具有轻微的杯状细胞化生。在以  $\leq 30$ mg/kg 给予 (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基 ] [[2- 氟 -4-(1,2,4- 噁二唑 -3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺的大鼠中没有观察到与药物相关的十二指肠改变。

[0133] 在另一个实验中，每天一次以 30mg/kg/ 天或 300mg/kg/ 天对大鼠给药 4 天或 7 天（表 3）。终点（给药后 5 小时）的脑 A $\beta$  40 水平为溶媒对照的 13%，因此类似于先前采用 (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基 ] [[2- 氟 -4-(1,2,4- 噁二唑 -3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺的大鼠研究。第一次和第四次给药后 5 小时的化合物血浆水平相似。300mg/kg/ 天剂量组中的某些大鼠（5 只中的 4 只）在给药 4 天后出现了 GI 毒性，但其它治疗组没有大鼠具有可检测的 GI 毒性，包括给药 7 天的动物。

[0134] 表 3：大鼠研究 3 的结果概述

[0135]

| 剂量 <sup>a</sup><br>(mg/kg/<br>天) | 给药后 5 小时<br>的血浆浓度<br>( $\mu$ M) |       | 第 4 天          | 给药后 5 小时<br>的血浆浓度<br>( $\mu$ M) |       | 第 7 天                           |           |
|----------------------------------|---------------------------------|-------|----------------|---------------------------------|-------|---------------------------------|-----------|
|                                  | 第 1 天                           | 第 4 天 | GI 毒性          | 第 1 天                           | 第 7 天 | 5 小时脑<br>A $\beta$ 40 (%<br>溶媒) | GI 毒<br>性 |
| 30                               | 5.9                             | 5.6   | NAD            | 7.2                             | 6.2   | 13%                             | NAD       |
| 300                              | 12                              | 10    | + <sup>b</sup> | 14                              | 11    | 13%                             | NAD       |

[0136] <sup>a</sup>N = 测试 5 只动物 / 剂量组 / 终点时间点（第 4 天或第 7 天）

[0137] <sup>b</sup>5 只动物中的 4 只观察到杯状细胞化生

[0138] NAD = 未检测到异常

[0139] 以上结果证实，(2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基 ] [[2- 氟 -4-(1,2,4- 噁二唑 -3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺是有效的选择性  $\gamma$ - 分泌酶抑制剂。这些结果支持将 (2R)-2-[[ (4- 氯苯基) 磺酰基 ] [[2- 氟 -4-(1,2,4- 噁二唑 -3- 基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5- 三氟戊酰胺作为阿尔茨海默病和其它与  $\beta$ - 淀粉样肽相关的疾病的治疗性治疗药物的用途。

[0140] 给出以下的实施例是为了阐述，不能被视为以任何方式限制本发明，因为本发明的变化在本发明合理的精神范围内。

[0141] 本申请的化合物可以以有机合成领域技术人员众所周知的众多方法制备。本申请的化合物可以使用下述方法以及合成有机化学领域已知的合成方法或本领域技术人员知晓的其变体方法合成。优选的方法包括但不限于下述的那些方法。本文提及的所有参考文献都通过引用整体结合到本文中。

[0142] 可以使用本章节中描述的反应和技术制备所述化合物。所述反应在适于所用试剂和材料的溶剂中进行,并适于要实施的转化。另外,在下述的合成方法的描述中,要理解的是,所有提出的反应条件,包括溶剂的选择、反应气氛、反应温度、实验过程和后处理程序,都选择该反应的标准条件,其应当是本领域技术人员容易知晓的。有机合成领域的技术人员理解,分子的不同部分上存在的官能团必须与所提出的试剂和反应相适。与所述反应条件相适的取代基的这类限制对于本领域技术人员是显而易见的,因而必须使用替代方法。

[0143] 具体实施方案的描述

[0144] 在以下的实施例中,所有的温度都以摄氏度给出。熔点以 ThomasScientific Unimelt 毛细管熔点装置记录,且未修正。核磁共振 ( $^1\text{H}$  NMR) 光谱以 Bruker Avance 300、Bruker Avance 400 或 Bruker Avance 500 光谱仪记录。所有的光谱都在所示溶剂中确定,并以在内标四甲基硅烷 (TMS) 之前的  $\delta$  单位报告化学位移,质子间耦合常数以赫兹 (Hz) 报告。多重谱如下指示:s,单峰;d,双峰;t,三重峰;q,四重峰;m,多重峰;br,宽峰;dd,双组双重峰;brd,宽双重峰;dt,双组三重峰;brs,宽单峰;dq,双组四重峰。使用溴化钾 (KBr) 或氯化钠膜的红外 (IR) 光谱以 Jasco FT/IR-410 或 Perkin Elmer 2000 FT-IR 光谱仪由  $4000\text{cm}^{-1}$  至  $400\text{cm}^{-1}$  测定,对聚苯乙烯膜  $1601\text{cm}^{-1}$  的吸光度校准,并以厘米倒数报告 ( $\text{cm}^{-1}$ )。旋光度  $[\alpha]_D$  以 Rudolph Scientific Autopol IV 旋光计在所示溶剂中测定;浓度以  $\text{mg/mL}$  给出。低分辨率质谱 (MS) 和表观分子量 ( $M^+$ ) 或  $(M-H)^+$  以 Finnegan SSQ7000 测定。高分辨率质谱以 Finnegan MAT900 测定。液相色谱 (LC)/质谱以偶联 WaterMicromass ZQ 的 Shimadzu LC 进行。

[0145] 使用以下的缩写:DMF(二甲基甲酰胺);THF(四氢呋喃);DMSO(二甲基亚砜);Leu(亮氨酸);TFA(三氟乙酸);MTBE(甲基叔丁醚);DAST[(二乙基氨基)三氟化硫];HPLC(高效液相层析);rt(室温);aq.(水性);AP(面积百分率)。

[0146] 制备 A

[0147] (R)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酰胺盐酸盐

[0148] 步骤 A. 4,4,4-三氟丁醛

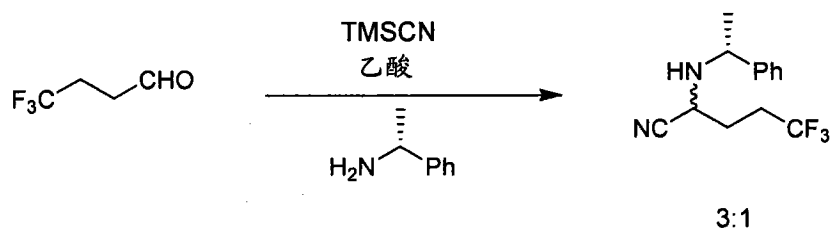
[0149]



[0150] 将二氯甲烷 (4.2L) 加至配有机械搅拌和冷水浴的 20 L 四颈圆底烧瓶中。开始搅拌,将反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  至  $-2^\circ\text{C}$ 。加入 4,4,4-三氟丁醇 (750.0g),将反应混合物进一步冷却至  $-5^\circ\text{C}$  至  $-8^\circ\text{C}$ 。加入 TEMPO(2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基,游离基) (9.15 g),同时将温度保持在  $-5^\circ\text{C}$  至  $-8^\circ\text{C}$ 。将溴化钾水溶液 (60g,在 1.17L 水中) 加至以上溶液,将温度保持于  $-5^\circ\text{C}$  至  $-8^\circ\text{C}$ 。将 NaOCl 水溶液 (8.8L,6-7% 重量,使用碳酸氢钠缓冲至  $\text{pH} = 8.5$ ) 加至反应混合物 (小心:放热反应),同时将反应混合物的温度保持在  $-5^\circ\text{C}$ 。类似地,高碘酸钠 ( $\text{NaIO}_4$ ) 可以替代 NaOCl 作为氧化剂。在完全加入后,分离二氯甲烷层,用二氯甲烷 ( $1 \times 750\text{mL}$ ) 洗涤水层。组合二氯甲烷层,并使用无水硫酸钠干燥。过滤干燥剂,通过 NMR 测定 4,4,4-三氟丁醛溶液的浓度。含有标题化合物的溶液直接用于下一步,无需额外加工。 $^1\text{H}$ NMR( $\text{CDCl}_3$ ) (400MHz)  $\delta$  2.30-2.50 (m, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CF}_3$ ), 2.70-2.80 (m, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CHO}$ ), 9.8 (s, 1H, CHO)。

[0151] 步骤 B. 5,5,5-三氟-2-(1-苯乙基氨基)戊腈(非对映体的混合物)

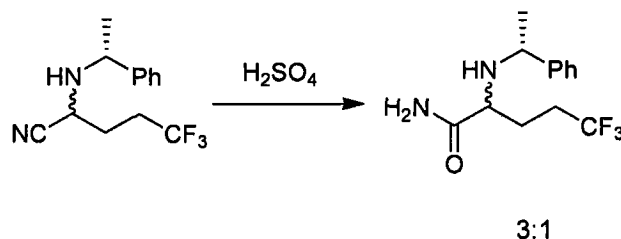
[0152]



[0153] 将 R- $\alpha$ -甲基苄胺 (528.5g) 加至配备机械搅拌、冷水浴的合适容器中,并保持在氮气层之下。加入 4,4,4-三氟丁醛溶液(来自步骤 A, 550g),接着加入甲醇 (3.3L)。然后将反应混合物冷却至约 0℃至 -3℃。滴加乙酸(冰的, 260mL),将温度保持在约 0℃,之后在 15 分钟内加入三甲基氰硅烷 (581mL)。类似地,氰化钠 (NaCN) 或氰化钾可用作氰化物源。将反应混合物温至 25℃-27℃,并过夜搅拌。通过 TLC 测定反应的完成情况。将冷水 (10.0L) 加至反应混合物中,用二氯甲烷 (1×10.0L) 萃取反应混合物。用水 (2×10.0L) 洗涤二氯甲烷层,接着用盐水 (1×5.0L) 洗涤。二氯甲烷层经无水硫酸钠干燥,并减压浓缩,产生为粘性液体的标题氨基腈(非对映体的混合物),平均收率 90%。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>) (400MHz)  $\delta$  1.42(d&m, 5H), 2.15&2.35(两个 m, 各 1H), 3.10-3.20(m, 1H), 4.10-4.15(m, 1H), 7.10-7.35(m, 6H)。

[0154] 步骤 C. 5,5,5-三氟-2-(1-苯乙基氨基)戊酰胺(非对映体的混合物)

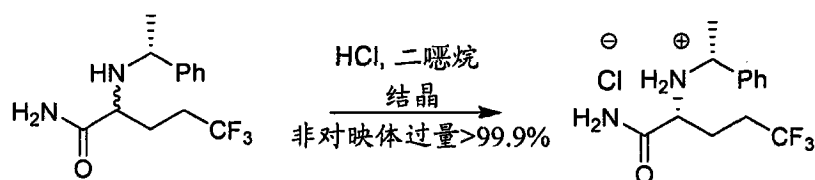
[0155]



[0156] 将 5,5,5-三氟-2-(1-苯乙基氨基)戊腈(来自步骤 B 的非对映体的粗混合物, 1.10kg) 溶解在适宜容器中的二氯甲烷 (5.5L) 中,所述容器配备机械搅拌、用于冷却的冰浴,并保持在氮气层下。开始搅拌,将反应混合物冷却至 0℃至 -5℃。在 1 小时内将浓硫酸 (1.75L) 滴加入以上混合物中,将温度保持在 0℃以下;在完成加入后获得澄清溶液。将反应混合物的温度升至 25℃至 27℃,并过夜搅拌 (12-14 小时)。通过 HPLC 测定反应的完成情况。将反应混合物缓慢倾至碎冰(约 15.0kg)上,并用氨水(约 25%, 体积)中和。分离水层,用二氯甲烷 (2×3.0L) 萃取。用水 (1×12.0L) 洗涤混合的二氯甲烷,接着用盐水 (1×3.0L) 洗涤。富含产物的有机层经硫酸钠干燥,并减压浓缩,产生 0.85kg (72.0%) 粗标题化合物。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>) (400MHz) (非对映体的混合物)  $\delta$  1.36(d&m, 4H, CH<sub>3</sub>(J = 8.0Hz&1H, CH<sub>2</sub>), 1.90(m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.15&2.35(两个 m, 1H, 每个 CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>), 2.80-2.90(m, 1H, CH-Ph), 3.60-3.70(m, 1H, -(CONH<sub>2</sub>)CH(NH)), 5.90&6.45(1H, 每个 CONH<sub>2</sub>, 具有其它非对映体的小峰), 7.20-7.40(m, 6H, Ar+NH)。

[0157] 步骤 D. (R)-5,5,5-三氟-2-((R)-1-苯乙基氨基)戊酰胺盐酸盐

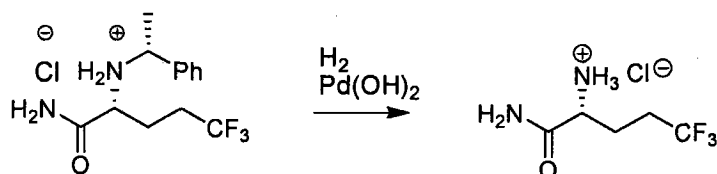
[0158]



[0159] 将 5,5,5-三氟-2-(1-苯乙基氨基)戊酰胺(非对映体的混合物)(850g)加至配有机械搅拌和冷水浴的合适容器中。加入甲醇(2.55 L)、乙酸乙酯(1.7L)和水(1.06L),将反应混合物冷却至 0℃至 5℃。在 30-45 分钟内滴加二噁烷的 HCl 溶液(4.5M, 1.72L)。类似地,异丙醇和叔丁基甲酯的混合物可以用作溶剂,HCl 水溶液或浓 HCl 可以用作 HCl 源。然后将反应混合物的温度升至 25℃至 27℃,并搅拌 2 小时。通过 TLC 确定反应的完成情况。过滤沉淀的固体,用适宜的溶剂如乙酸乙酯(1.8L)洗涤滤饼,接着用石油醚(2.5L)或异丙醇和叔丁基甲酯的混合物洗涤。使固体于室温在敞口碟中干燥,得到标题 R-氨基酰胺(480g, 50%收率,非对映体过量=99.9%)。<sup>1</sup>HNMR(CDC1<sub>3</sub>)(400MHz) δ 1.73(d, 3H, CH<sub>3</sub>, J = 8.0Hz), 2.08-2.09(m, CH<sub>2</sub>的 2H), 2.20-2.40(m, 2H, CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>), 3.50-3.55 (m, 1H, CH-Ph), 4.40-4.41(m, 1H, -(CONH<sub>2</sub>)CH(NH)), 7.48-7.53(brs, 5H, Ar)。

[0160] 步骤 E. (R)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酰胺盐酸盐

[0161]



[0162] 向适合的压力容器中加入 (R)-5,5,5-三氟-2-((R)-1-苯乙基氨基)-戊酰胺盐酸盐(1.50kg)连同甲醇(15.0L)。这之后加入水(701.0mL),之后加入 20%披氢氧化钯的碳(225 g)。类似地,披钯碳(Pd/C)可以用作氢化催化剂。用氮气冲洗容器 3 次,然后于 60℃将氢气压入容器(3-4kg/cm<sup>2</sup>)中。通过 HPLC 监测反应的完成情况。在完成时,使反应混合物冷却至 30-35℃,通过寅式盐垫过滤,然后用甲醇洗涤。然后减压浓缩滤过物。在完成浓缩后,用二氯甲烷(2.5L/洗涤)处理余下的反应混合物,过滤,并于 45℃干燥 12 小时,产生标题化合物(915g, 91.0%;纯度=97%)。<sup>1</sup>HNMR(DMSO-d<sub>6</sub>)(400MHz) δ 2.00(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.30-2.40(m, 2H, CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>), 3.85-3.88(m, 1H, -(CONH<sub>2</sub>)CH(NH)), 7.64&8.11(brs, 1H, 每个 CONH<sub>2</sub>), 8.44(brs, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)。 <sup>13</sup>CNMR(DMSO-d<sub>6</sub>)(100.0 MHz) δ 169.57, 131.20, 128.45, 125.71, 122.97, 50.91, 29.46, 29.18, 28.89, 28.61, 23.56, 23.53。

[0163] 制备 B

[0164] (R)-5,5,5-三氟正缬氨酸

[0165] 方法 A. R-转氨酶(Biocatalytics 和 BMS 转氨酶)

[0166] 将含有 5,5,5-三氟-2-氧代戊酸(100mg, 0.588mmol)、R, S-丙氨酸(200mg, 2.244mmol)和 0.02mM 吡哆醛磷酸盐的 0.1M 磷酸钾缓冲液 pH7.5 的溶液与得自 Biocatalytics 的 R-转氨酶 AT-103(5mg, 44 单位)或得自苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)SC16569 的克隆的 R-转氨酶(0.5mL, 10 单位, BMS 转氨酶)以总体积 5mL 在 15mL 管中于 30℃温育 44 小时。用 AT-103 和 BMS 转氨酶获得的 (R)-5,5,5-三氟-2-氨基戊酸的反应收率分别为 49%和 48%。对映体过量在两种情况下均为 100%。

[0167] 通过加入辅助酶增加收率,以将丙酮酸盐还原为乳酸盐。乳酸盐脱氢酶需要 NADH 作为辅因子。使用甲酸脱氢酶再生 NADH。将含有 5,5,5-三氟-2-氧代戊酸 (100mg, 0.588mmol)、D, L-丙氨酸 (200mg, 2.244mmol)、0.02mM 吡哆醛磷酸盐、甲酸钠 (68mg, 1mmol)、NAD (3.31mg, 5  $\mu$ mol)、由兔肌肉克隆的 L-乳酸脱氢酶 (BiocatalyticsLDH-103, 0.107mg, 15 单位) 和甲酸脱氢酶 (0.5mL, 15 单位, 由巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 克隆, 并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达) 的 0.1M 磷酸钾缓冲液, pH7.5 的溶液, 与得自 Biocatalytics 的 R-转氨酶 AT-103 (5mg, 44 单位) 或得自苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) SC16569 的克隆的 R-转氨酶 (0.5mL, 10 单位) 以总体积 5mL 在 15mL 管中于 30°C 温育。用 AT-103 和 BMS 转氨酶获得的 (R)-5,5,5-三氟-2-氨基戊酸的反应收率分别为 94% 和 91%。对映体过量在两种情况下均为 100%。

[0168] 方法 B. (R)-氨基酸脱氢酶 (Biocatalytics 和 BMS)

[0169] 程序 1: 将 5,5,5-三氟-2-氧代戊酸 (60.00g, 0.353mol)、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  (64.19g, 1.2mol)、葡萄糖 (86.4g, 0.479mol) 和水 (975mL) 加至 2-L 夹套反应器。加入 NaOH (36mL, 10N), 于 30°C 用磁铁搅拌混合物, 以溶解固体。pH 约为 7。加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (12.72g, 0.12mol), 其使 pH 达到约 8.5。然后将 NADP (458mg, 0.60mmol)、葡萄糖脱氢酶 (33.7mg, 5277 单位, 得自 Amano Enzyme Company) 和 R-氨基酸脱氢酶 (600mg D-AADH-102, 得自 Biocatalytics) 以该顺序加入。通过滴加 10N NaOH 使反应混合物达到 pH9。于 30°C 搅拌反应混合物, 并通过由恒 pH 滴定 (pHstat) 加入 5N NaOH 保持在 pH9.00。在 21 小时后, (R)-5,5,5-三氟-2-氨基戊酸的溶液收率为 51.1g, 84.7% 收率, 100% 对映体过量。

[0170] 程序 2: 将 5,5,5-三氟-2-氧代戊酸 (60.00g, 0.353mol)、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  (64.19g, 1.2mol)、葡萄糖 (86.4g, 0.479mol) 和水 (975mL) 加入 2-L 夹套反应器。加入 NaOH (36mL, 10N), 用磁铁于 30°C 搅拌混合物, 以溶解固体。pH 约为 7。加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (12.72g, 0.12mol), 其使 pH 达到约 8.5。然后将 NADP (458mg, 0.60mmol)、葡萄糖脱氢酶 (33.7mg, 5277 单位, 得自 Amano Enzyme Company) 和 D-氨基酸脱氢酶 (50mL 提取物, 含 1500 单位, BMS 酶) 以该顺序加入。通过滴加 10N NaOH 使反应混合物达到 pH9。于 30°C 搅拌反应混合物, 并通过由恒 pH 滴定 (pHstat) 加入 5N NaOH 保持在 pH9.00。在 15 小时后, (R)-5,5,5-三氟-2-氨基戊酸的溶液收率为 51.04g, 84.6% 收率, 99.1% 对映体过量。

[0171] 制备 C

[0172] 4-(溴甲基)-3-氟苯甲腈

[0173]



[0174] 方法 A. NBS/AIBN 溴化

[0175] 将 1,2-二氯乙烷 (151kg) 连同 4-氰基-2-氟代甲苯 (24kg) 和 AIBN (2kg) 加至合适的容器中。将混合物加热至 70 ~ 74°C。一旦料温达到 70°C, 则以 12kg/小时的速率分份加入 N-溴代琥珀酰亚胺 (47.4kg), 将温度保持于 70 ~ 74°C (重要的是控制加入速率, 以避免放热反应)。在加入 24kg N-溴代琥珀酰亚胺之后经 GC 检测取样混合物, 将反应物加

热至 70–74℃,直至观察到完全反应。将混合物冷却至 0–5℃,并使其再静置 2 小时。过滤混合物,用 MTBE (24kg) 洗涤滤饼。滤过物用水 (3×65kg) 洗涤。有机层用硫酸钠 (10.3kg) 干燥 6 小时,过滤,用 MTBE (24kg) 洗涤滤饼。减压蒸发溶液,加入乙醇 (12kg),将混合物加热至 40–45℃,然后在搅拌的同时缓慢冷却至 0–5℃,以结晶。过滤混合物,并用冷乙醇 (5kg) 洗涤滤饼。由石油醚重结晶粗固体,过滤,并用石油醚 (10kg) 洗涤,得到为乳白色固体的标题化合物 4-(溴甲基)-3-氟苯甲腈 (21kg, 55% 收率)。<sup>1</sup>HNMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 4.46–4.50 (m, 2H) 7.36 (dd, J = 8.85, 1.32Hz, 1H) 7.44 (dd, J = 7.91, 1.32Hz, 1H) 7.52 (dd, J = 7.91, 7.16Hz, 1H)。<sup>13</sup>CNMR (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 23.65 (d, J = 4.60Hz, 1C) 113.76 (d, J = 9.77Hz, 1C) 117.09 (d, J = 2.87Hz, 1C) 119.44 (d, J = 24.71Hz, 1C) 128.44 (d, J = 4.02Hz, 1C) 130.66–130.81 (s, 1C) 130.81–131.06 (s, 1C) 132.18 (d, J = 3.45Hz, 1C) 159.86 (d, J = 254.03Hz, 1C)。IR: (KBr) 3088, 3077, 3040, 2982, 2250, 1571, 1508, 1439, 1248cm<sup>-1</sup>。

[0176] C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>BrFN 的理论分析值:理论值 C, 44.89; H, 2.35; N, 6.54; F, 8.88; 实测值: C, 44.94; H, 2.73; N, 6.56; F, 8.73。

[0177] 方法 B. 溴酸钠溴化

[0178] 向适合的反应器中加入二氯甲烷 (40L) 和 3-氟-4-甲基苯甲腈 (4kg, 18.7mol), 之后加入溴酸钠的水溶液 (13.45kg, 89.1mol, 溶解在 53.6L 水中)。将反应混合物冷却至 0–5℃。在 2–3 小时内加入亚硫酸氢钠 (9.25kg, 溶解在 42L 水中) 溶液,同时保持 10–20℃ 的料温 (反应是放热的)。在结束加入后, 200W 灯照射反应器, 将料温增加至 25–30℃。保持光照射和温度, 直至依据 HPLC 产物为 70–75%。去除照射, 终止搅拌, 使反应物沉降 15 分钟。除去有机层, 剩下的水层用二氯甲烷萃取两次。合并有机层, 用 10% 硫代硫酸钠溶液洗涤 4 次。然后用盐水 (10L) 洗涤有机层, 并用硫酸钠干燥。浓缩有机层, 然后加入石油醚, 并两次蒸馏至干燥, 以除去所有的二氯甲烷。加入石油醚 (3L), 冷却淤浆至 5–10℃ 达 1 小时。过滤淤浆, 并用冷石油醚洗涤。在真空烘箱内于 40–45℃ 干燥产物, 得到为乳白色固体的标题化合物 (3.2kg, 50.4% 收率)。

[0179] 由母液回收标题化合物的代表性程序: 由浓缩母液 (300g) 得到粗物质 (约 36% 4-(溴甲基)-3-氟苯甲腈和约 59% 偕二溴化物), 并将 2 当量的二异丙基乙胺 (基于偕二溴化物) 溶解在乙腈 (3L) 和水 (50mL) 中。将反应物冷却至 0–5℃, 并在 30 分钟内加入亚磷酸二乙酯 (169g, 1.22mol) (加入是放热的)。于 0–5℃ 搅拌反应物 60–90 分钟, 并通过 TLC 监测。当依据 TLC 不再存在二溴化物时, 加入水 (3.3L), 并过滤所获的淤浆。滤饼用水洗涤, 并在真空烘箱中干燥 (直至水分含量 < 1%), 以产生 202g (依据 HPLC 为 98AP) 额外的标题化合物。

[0180] 制备 D

[0181] 3-氟-N'-羟基-4-甲基苯甲腈 (benzimidamide) 的制备

[0182] 在 N<sub>2</sub> 气氛下向配有机械搅拌的合适容器中加入 202.0g 3-氟-4-甲基苯甲腈, 接着加入 1.0L 乙醇。在 20 分钟内经加液漏斗加入羟胺 (144mL 的 50% 水溶液)。于环境温度搅拌混合物, 直至 HPLC 分析表明反应完成 (没有剩下起始物质)。在 1 小时内向浅黄色溶液滴加水 (3.0L), 以产生稠淤浆。在冰水浴中将淤浆冷却至 2℃ 达 1.5 小时, 过滤, 并于 35℃ 真空干燥 22 小时, 产生为白色固体的标题化合物 (230.3g, 91.6%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 7.30 (m, 2H), 7.19 (m, 1H), 4.87 (s, 2H), 2.28 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 162.15,

160.19, 151.58, 131.82, 131.76, 131.66, 131.62, 127.01, 126.87, 121.06, 112.69, 112.51, 14.48;  $^{19}\text{F}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz)  $\delta$  -116.35, -116.37, -116.39。LC-MSM+H169.19。

[0183] 制备 E

[0184] 3-(3-氟-4-甲基苯基)-1,2,4-噁二唑的制备

[0185] 方法 A. 三氟化硼

[0186] 将粗酰胺脒 3-氟-N'-羟基-4-甲基苯甲脒 (118.6g) 和原甲酸三乙酯 (292mL, 260g, 1.76mol) 在二氯甲烷 (800mL) 中淤化, 并于室温加入三氟化硼乙醚 (14.8mL, 16.6g, 0.12mol)。将获得的黄色溶液加热至 45℃ 达 1 小时, 并于室温保持 16 小时, 依据 HPLC 其提供了 60% 转变。将该溶液加热至 45℃ 达 2.5 小时, 使残留的起始物质变为约 1%。在冷却至室温后, 将 1N HCl (600mL) 加入混合物。分离各相, 水层用二氯甲烷 (200mL) 萃取。合并的有机层经硫酸钠干燥, 并于 25℃ 减压浓缩, 以得到白色固体。在高真空下干燥 16 小时, 得到标题化合物 (102.3g, 经两步为 98% 收率)。

[0187] 方法 B. 三氟乙酸

[0188] 在  $\text{N}_2$  气氛下将 3-氟-N'-羟基-4-甲基苯甲脒 (302.52g, 1.79mol)、原甲酸三乙酯 (382.5mL, 341.1g, 2.3mol) 和乙腈 (1512mL) 加入配有机械搅拌的合适容器。将反应混合物加热至 45℃, 并于该温度加入三氟乙酸 (6.72mL, 10.08g, 87.6mmol)。将反应混合物于 60℃ 再加热 90 分钟, 然后冷却至室温。在 60 分钟内滴加水 (3L)。将淤浆冷却至 4℃, 并于该温度搅拌 30 分钟。过滤固体, 并于 50℃ 真空干燥 12 小时, 以产生为白色固体的 3-(3-氟-4-甲基苯基)-1,2,4-噁二唑 (306g, 95.6%)。HPLC 表明 99.8% 的化学纯度。 $^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  8.67(s, 1H), 7.71(m, 2H), 7.23(t,  $J = 8\text{Hz}$ , 1H), 2.28(s, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  166.9447, 164.7258, 162.5473, 160.1066, 132.0480, 132.0077, 128.5987, 122.9910, 122.9507, 114.2568, 114.0147, 14.6902。  $^{19}\text{F}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  -115.94, -115.96。

[0189]  $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_2\text{O}$  的理论计算值: C, 60.67; H, 3.96; N, 15.72。实测值: C, 60.54; H, 3.78; N, 15.69。

[0190] 制备 F

[0191] 3-(4-(溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑的制备

[0192] 方法 A. 分步溴化

[0193] 向 3-(3-氟-4-甲基苯基)-1,2,4-噁二唑 (5.34g, 30mmol)、 $\text{CCl}_4$  (50mL) 和 NBS (11.7g, 66mmol) 的搅拌混合物加入 AIBN (246mg, 1.5mmol)。在氮气下将反应混合物加热至 80℃ 达 3 小时, 冷却至室温, 并加入 50mL 饱和碳酸氢钠溶液。分离有机层, 并用二氯甲烷 (50mL) 萃取水层。有机层经硫酸钠干燥, 过滤, 用 rotovap 浓缩, 得到为白色固体的 3-(4-(二溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑 (9.34g, 93%), 其用于下一步, 无需进一步纯化。将 3-(4-(二溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑 (8.37g, 25mmol) 和 THF (60mL) 加入 200mL 圆底烧瓶。将混合物冷却至 0℃, 并在 15 分钟内滴加二异丙基乙胺 (3.48g, 27mmol), 接着滴加亚磷酸二乙酯 (3.7g, 26.8mmol)。于室温搅拌混合物 60 分钟, 并用 40mL 水猝灭。水层用乙醚 (2×80mL) 萃取。合并的有机层用 20mL 饱和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液和 20mL 饱和氯化钠溶液洗涤。有机层经硫酸钠干燥, 过滤, 并用 rotovap 浓缩, 得到粗固体, 其通过短硅胶柱 (pad) 纯化, 得到 3-(4-(溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑 (6.03g, 94%)。

熔点 87.3 °C。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ 8.80(s, 1H), 7.94(dd, 1H), 7.87(dd, 1H), 7.58(t, 1H), 4.57(s, 2H); <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ 166.97, 166.95, 165.45, 162.29, 159.73, 132.34, 132.30, 128.99, 128.90, 128.81, 124.04, 124.01, 115.56, 115.32, 25.22, 25.18; <sup>19</sup>F-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ -115.81, -115.84, -115.86。C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>BrFN<sub>2</sub>O 的理论计算值 :C, 42.05; H, 2.35; N, 10.90。实测值 :C, 42.17; H, 2.17; N, 10.63。

[0194] 方法 B. 替代的一锅溴化

[0195] 将 3-(3-氟-4-甲基苯基)-1,2,4-噁二唑 (101.8g, 0.57mol) 和 N-溴代琥珀酰亚胺 (206g, 1.16mol) 溶解在乙腈 (约 1L) 中, 并于室温加入偶氮二异丁腈 (4.2g, 26mmol)。将混合物加热至 70°C 达 2 小时, 在该时间点 HPLC 显示起始物质完全转变为一溴化物和二溴化物的混合物。将混合物冷却至 0°C, 并加入二异丙基乙胺 (73mL, 54.2g, 0.42mol), 同时保持反应温度在 5 °C 以下。缓慢加入亚磷酸二乙酯 (54.7mL, 58.6g, 0.42mol), 将反应混合物温至室温。在 2 小时后, HPLC 表明二溴化物完全转变为一溴化物。加入水 (1.2L), 过滤所获的沉淀。用水 (2×200mL) 洗涤, 并干燥, 得到 3-(4-(溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑 (135g, 92% 收率)。

[0196] 方法 C : 溴酸钠溴化 (直接分离)

[0197] 将溴酸钠 (2.54g) 溶解在水 (8.4mL) 中。于室温向该溶液加入 3-(3-氟-4-甲基苯基)-1,2,4-噁二唑 (1.0g) 的 EtOAc (12mL) 溶液。滴加 NaHSO<sub>3</sub> (1.75g) 的水 (17mL) 溶液 (注意 : 放热)。于室温搅拌混合物 2 小时, 然后保持在冷室中过夜。分离有机层, 用 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和水洗涤, 然后浓缩。将所获固体溶解在 EtOAc (约 6mL) 中。缓慢加入庚烷 (约 30mL)。于室温搅拌淤浆 3 小时, 然后过滤。用庚烷 (15mL) 洗涤固体, 然后干燥, 得到 0.74g (51%) 标题化合物 : HPLC : 99.42AP。第二遍回收 : 将滤过液浓缩至约 30mL 体积, 过滤所获淤浆, 得到为白色固体的标题化合物 0.23 (16%), HPLC 为 97.09AP。

[0198] 方法 D : 溴酸钠溴化 (使用二溴化物还原的两步程序)

[0199] 于室温将 3-(3-氟-4-甲基苯基)-1,2,4-噁二唑 (20.0g, 112.2mmol) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液加入 NaBrO<sub>3</sub> (50.8g, 336.7mmol) 的水 (200mL) 溶液。将所获两相混合物冷却至 0°C。滴加 NaHSO<sub>3</sub> (35.7g, 336.7mmol) 的水 (160mL) 溶液, 以将料温保持在 20°C 以下 (约 1 小时)。于室温搅拌所获的红色溶液, 直至依据 HPLC 3-(3-氟-4-甲基苯基)-1,2,4-噁二唑低于 1.0AP (约 2 小时)。分离有机层 (底层), 并用二氯甲烷 (200mL) 萃取水层。用 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 水溶液 (200mL)、水 (200mL) 和 15% 盐水 (200mL) 洗涤合并的二氯甲烷溶液。在真空浓缩后获得白色固体 (一溴化物和二溴化物的混合物)。将该固体溶解在湿 MeCN (200mL, KF : 1.5-4%) 中, 并将溶液冷却至 -5°C 至 0°C。加入 N, N-二异丙基乙胺 (6.0g, 8.1mL, 46.4mmol), 接着在 15 分钟内滴加亚磷酸二乙酯 (6.0g, 46.1mmol)。于 -5°C 至 0°C 搅拌混合物, 直至 3-(4-(二溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑 < 0.5AP (1.5-2 小时)。在 30 分钟内加入水 (500mL), 产生白色淤浆。于室温搅拌该淤浆 1-3 小时, 然后过滤。滤饼用水 (2×200mL) 洗涤, 然后于 45°C 真空干燥 20 小时。

[0200] C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>BrFN<sub>2</sub>O 的理论计算值 : 理论值, C, 42.05; H, 2.35; N, 10.89; Br, 31.08; F, 7.39。实测值 : C, 42.10; H, 2.24; N, 10.90; Br, 31.18; F, 7.00。

[0201] 实施例 1

[0202] (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [ [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基 ] 甲基 ]

氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺

[0203] 步骤 A. 5,5,5-三氟-2-(1-苯乙基氨基)戊腈

[0204] 向(R)-苯乙胺(9.60g,79.4mmol)和乙酸(5.08g,79.6mmol)的MeOH(150mL)溶液加入NaCN(3.88g,79.6mmol)。将反应物冷却至0℃,并加入4,4,4-三氟丁醛(10.0g,79.6mmol)的MeOH(50mL)溶液。将反应物温至室温,并搅拌20小时。用水(400mL)稀释反应物,并用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3×300mL)萃取。合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,并真空浓缩,以得到为浅黄色油状物的氨基腈标题化合物(18.1g,89%,为非对映体的4:1混合物):<sup>1</sup>HNMR(300MHz,CD<sub>3</sub>OD) δ 7.38-7.27(m,5H),4.15-4.02(m,1H),3.69(t,J=7.5Hz,0.22H),3.18(t,J=7.5Hz,0.78H),2.48-2.26(m,1H),2.25-2.03(m,1H),2.01-1.86(m,2H),1.39(d,J=6.5Hz,2.34H),1.36(d,J=6.5Hz,0.66H);ESIMS/z 257[C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>+H]。

[0205] 步骤 B. (R)-5,5,5-三氟-2-((R)-1-苯乙基氨基)戊酰胺盐酸盐

[0206] 向5,5,5-三氟-2-(1-苯乙基氨基)戊腈(18.0g,70.31mmol,非对映体的4:1混合物)的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL)溶液加入H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(100mL)。反应物于室温搅拌22小时,倾至碎冰上,并用NH<sub>4</sub>OH中和。混合物用EtOAc(3×500mL)萃取。合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,并真空浓缩,以得到为橙色油状物的非对映体混合物(18.94g,98%)的标题化合物的游离碱:<sup>1</sup>HNMR(300MHz,CDC<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>) δ 7.40-7.18(m,5H),6.78(brs,0.23H),6.50(brs,0.77H),6.00(brs,0.77H),5.81(brs,0.23H),3.82(q,J=6.5Hz,0.23H),3.70(q,J=6.5Hz,0.77H),3.14(t,J=6.0Hz,0.23H),2.86(t,J=7.0Hz,0.77H),2.35-1.86(m,2H),1.84-1.64(m,2H),1.39(d,J=6.5Hz,0.69H),1.35(d,J=6.5Hz,2.31H);ESIMS/z 275[C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O+H]。

[0207] 盐酸盐

[0208] 向为非对映体混合物(11.9g,43.4mmol)的标题化合物的游离碱的Et<sub>2</sub>O/MeOH(7:1,40mL)溶液加入1N HCl的Et<sub>2</sub>O(70mL)溶液。通过加热混合物并加入MeOH(至4:1Et<sub>2</sub>O/MeOH的最终比率)再溶解形成的白色沉淀。使溶液冷却至室温,并使其过夜静置。分离标题化合物的氨基酰胺盐酸盐,其为白色固体的单一非对映体(3.11g,23%):<sup>1</sup>HNMR(300MHz,CD<sub>3</sub>OD) δ 7.93(brs,1H),7.69(brs,1H),7.54-7.44(m,5H),4.39(q,J=7.0Hz,1H),3.50(t,J=6.5Hz,1H),2.29-2.20(m,2H),2.10-2.01(m,2H),2.07(d,J=7.0Hz,3H);ESI MS/z 275[C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O+H]。

[0209] 步骤 C. (R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺

[0210] 向(R)-5,5,5-三氟-2-((R)-1-苯乙基氨基)戊酰胺盐酸盐(3.10g,10.0mmol)的EtOH(100mL)溶液加入Pd(OH)<sub>2</sub>(350mg)和水(10mL)。于50℃氢化(40psi)反应混合物4小时。通过寅氏盐过滤反应物,真空浓缩滤过液,得到为白色固体的中间体胺盐酸盐。向所述胺的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL)悬浮液加入N,N-二异丙基乙胺(5.25mL,30.0mmol)和4-氯苯磺酰氯(2.53g,12.0mmol)。反应物于室温搅拌18小时,并用EtOAc(200mL)稀释,用NaHCO<sub>3</sub>(250mL)和盐水(250mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,并真空浓缩。通过用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/己烷(2:1)研磨残余物获得为白色固体的标题化合物(2.91g,84%):<sup>1</sup>HNMR(300MHz,CD<sub>3</sub>OD) δ 7.84(dt,J=8.5,2.0Hz,2H),7.55(dt,J=8.5,2.0Hz,2H),3.85(dd,J=8.5,5.0Hz,1H),2.34-2.05(m,2H),1.97-1.68(m,2H);ESI MS/z 345[C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S+H]。

[0211] 步骤 D. (R)-2-(4-氯-N-(2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苄基)苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺

[0212] 向磺酰氨基 (R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 (130mg, 0.37mmol) 的 DMF (2mL) 溶液加入  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (241mg, 0.74mmol) 和 3-(4-溴甲基-3-氟-苄基)-1,2,4-噁二唑 (257mg, 0.48mmol)。将反应物于室温搅拌 2 小时, 用水 (50mL) 稀释, 并用 EtOAc (2×50mL) 萃取。合并的有机萃取物用水 (2×50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤, 并真空浓缩。残余物通过柱色谱纯化 (硅胶, 0-55% EtOAc/己烷), 以得到为白色固体的标题噁二唑化合物 (92mg, 45%); 熔点 66-68°C;  $^1\text{H NMR}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.77 (s, 1H), 7.90 (dd,  $J$  = 8.0, 1.5Hz, 1H), 7.77-7.71 (m, 3H), 7.64 (dd,  $J$  = 7.5, 7.5Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$  = 8.5Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.66 (d,  $J$  = 15.6Hz, 1H), 4.51 (d,  $J$  = 15.6Hz, 1H), 4.39 (dd,  $J$  = 8.9, 6.3Hz, 1H), 2.25-1.82 (m, 3H), 1.54-1.47 (m, 1H); ESIMS  $m/z$  521  $[\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClF}_4\text{N}_4\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$ ; HPLC 98.9% (AUC),  $t_R$  = 19.4 分钟。

#### [0213] 实施例 2

[0214] (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [ [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苄基 ] 甲基 ] 氨基 ]-5,5,5-三氟戊酰胺

#### [0215] 步骤 A. 4-(溴甲基)-3-氟苄甲腈

[0216] 向 3-氟-4-甲基苄甲腈 (5.0g, 0.23mol) 的 100mL 四氯化碳溶液加入 N-溴代琥珀酰亚胺 (4.97g, 0.28mol) 和 AIBN (100mg, 0.61mmol), 使混合物回流 6 小时。冷却反应物, 并过滤。滤过物用水洗涤, 经硫酸镁干燥, 过滤, 真空去除溶剂, 得到为乳白色固体的 5.44g 标题化合物。 $^1\text{H NMR}$  表明存在 20% 起始物质。标题化合物的  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.54-7.30 (m, 3H), 4.83 (s, 2H)。

[0217] 步骤 B. (R)-2-(4-氯-N-(4-氰基-2-氟苄基) 苄基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺

[0218] 向 (R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 (6.88g, 20.0mmol) 和 4-(溴甲基)-3-氟苄甲腈 (6.43g, 30mmol) 的 DMF (35mL) 溶液加入无水  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (19.56g, 60mmol)。所获混合物于室温搅拌 45 分钟, 然后用 EtOAc (200mL) 稀释, 用水 (100mL×4) 洗涤, 并经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。产物通过 Biotage (40+M 柱, 3% -80% EtOAc 的己烷溶液, 651mL) 纯化。获得为白色固体的标题化合物 (6.50g, 68.1% 收率)。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400MHz)  $\delta$  7.80-7.88 (m, 3H), 7.70-7.75 (m, 2H), 7.67 (d, 2H,  $J$  = 8), 7.60 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 4.99 (d, 1H,  $J$  = 16), 4.68 (d, 1H,  $J$  = 16), 4.14 (t, 1H,  $J$  = 8), 1.99-2.17 (m, 2H), 1.80-1.94 (m, 1H), 1.40-1.56 (m, 1H). LC/MSM+H478.14, 94%。

[0219] 步骤 C. (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [ [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苄基 ] 甲基 ] 氨基 ]-5,5,5-三氟戊酰胺

[0220] 向 (R)-2-(4-氯-N-(4-氰基-2-氟苄基) 苄基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 (6.5g, 13.6mmol) 的 EtOH (70mL) 溶液加入  $\text{NH}_2\text{OH}$  (50% 的  $\text{H}_2\text{O}$  溶液, 2.6mL 40.8mmol)。所获混合物在氮气下于 80°C 搅拌 1 小时, 然后冷却至室温。减压蒸发溶剂。将残余物溶解在 EtOAc 中, 并用水洗涤, 经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。溶剂蒸发产生白色固体, 其由 EtOAc 和己烷重结晶, 得到为白色固体的中间体酰胺肟 (6.93g, 定量收率)。向中间体 (R)-2-(4-氯-N-(2-氟-4-(N'-羟基甲脒基) 苄基) 苄基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 (6.93g, 13.6mmol) 和原甲酸三乙酯 (6.77mL, 40.8mmol) 在二氯乙烷 (30mL) 中的混合物加入  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (0.17mL, 1.36mmol)。所获混合物于 70°C 搅拌 1 小时, 然后冷却至室温。色

谱(硅胶, biotage, 40+M 柱, 3% -80% EtOAc 的己烷溶液, 651mL) 得到为白色固体的标题化合物(4.9g, 69.3% 收率)。

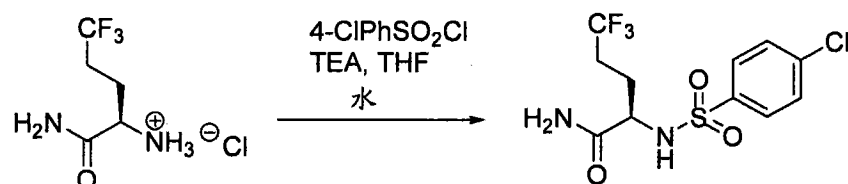
[0221] 将以上的 4.9g 产物与第二批 9.8g (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺(通过实施例 1 所述的程序制备) 混合。向混合批(14.7g) 加入异丙醇(75mL)。回流混合物, 直至几乎全部分散, 然后过滤。于室温搅拌滤过液 16 小时, 并过滤。在干燥至恒定质量后获得白色精细晶体白色固体, 得到 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺(13.7g)。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 8.77(s, 1H), 7.90(dd, J = 8.0, 1.5Hz, 1H), 7.77-7.71(m, 3H), 7.64(dd, J = 7.5, 7.5Hz, 1H), 7.51(d, J = 8.5Hz, 2H), 6.34(s, 1H), 5.28(s, 1H), 4.66(d, J = 15.6Hz, 1H), 4.51(d, J = 15.6Hz, 1H), 4.39(dd, J = 8.9, 6.3Hz, 1H), 2.25-1.82(m, 3H), 1.54-1.47(m, 1H); ESIMS m/z 521 [C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>ClF<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S+H]<sup>+</sup>。

[0222] 实施例 3

[0223] (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺

[0224] 步骤 A. (R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺

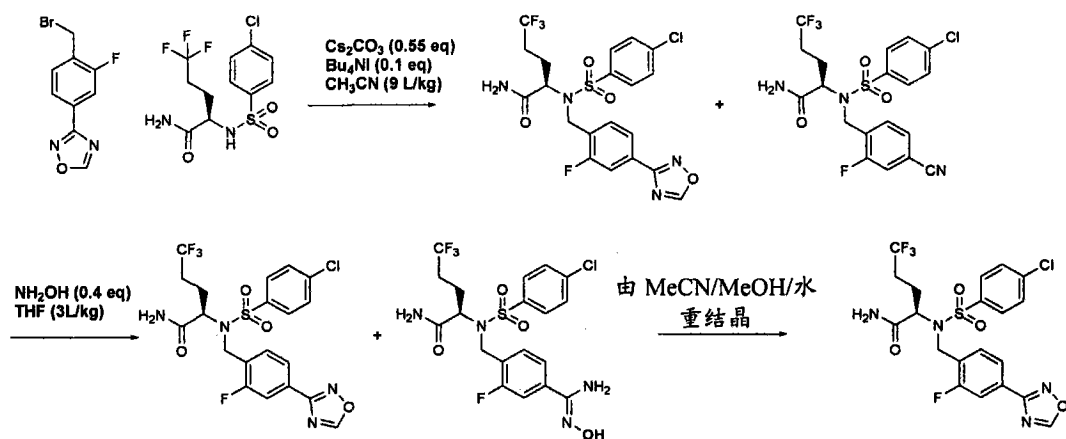
[0225]



[0226] 于室温向适合的干燥容器加入 (R)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酰胺盐酸盐(199.52g 0.966mol, 1.0 当量), 接着加入 4-氯苯磺酰氯(215.22g 0.989mol, 1.02 当量, 97% 重量/重量%) 和 1.6L THF。在 20 分钟内加入 三乙胺(206.5g, 2.04mol, 2.1 当量), 将罐温保持于 15-25℃, 所获白色淤浆于 15-25℃ 搅拌 30 分钟。于 20-25℃ 将水(1.4L, 7 体积) 加入反应混合物, 然后通过真空蒸馏除去 THF(1.4L, 7 体积)(在蒸馏过程中在 250-400mmHg 下将罐温保持在 40-60℃)。在蒸馏过程结束时, 在 30 分钟内加入 1.4L(7 体积) 水, 同时保持罐温于 50-60℃, 所获淤浆于 50-60℃ 搅拌 30 分钟, 然后冷却至 10℃。搅拌淤浆至少 1 小时, 过滤产物。用水(每次洗涤 600mL) 洗涤滤饼, 直至检测的滤饼洗涤液 pH ≥ 5。于不超过 70℃(夹套温度) 真空干燥滤饼, 直至干燥失重 < 0.5 重量/重量%, 得到为白色固体的标题化合物(300g, 91% 收率)。<sup>1</sup>HNMR(DMSO-d<sub>6</sub>) (400MHz) δ 160-1.90(两个 m, 1H, 每个 CH<sub>2</sub>), 2.10-2.35(m, 2HCH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>), 3.85-3.88(m, 1H, -(CONH<sub>2</sub>)CH(NH), 7.13&7.37(brs, 1H, 每个 CONH<sub>2</sub>), 7.61(m, 2H, Ar-H<sub>a</sub>), 7.64(m, 2H, Ar-H<sub>b</sub>), 8.18(d, 1H, J = 8.0Hz, NH-SO<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>CNMR(DMSO-d<sub>6</sub>) (100.0MHz) δ 171.75, 140.27, 137.77, 131.71, 129.56, 128.95, 126.22, 55.12, 30.1, 29.82, 29.53, 29.25, 25.82, 25.79。

[0227] 步骤 B. (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺

[0228]



## [0229] 步骤B, 程序 1

[0230] 将 3-(4-(溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑 (492.14g, 1.10 当量, 1.914mol)、(R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 (600g, 1.00 当量; 1.74mol)、碳酸铯 (312.22g, 0.55 当量; 0.98mol)、四正丁基碘化铵 (64.29g, 0.10 当量; 0.17mmol) 和乙腈 (9mL/g; 5.4L) 加入合适的容器。将夹套加热至 40℃ (内部 38℃)。通过 HPLC 监测反应物, 直至 (R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 < 5AP。将容器冷却至内部温度为 20℃, 并加入水 (5.4L)。分离各相, 富含产物的层在顶部。废弃底层。在 18 分钟内加入水 (3.7L), 将反应物在 20℃ 保持 20 小时, 然后过滤。将水 (6L) 加入容器, 并搅拌, 以便将粘附至搅拌桨和容器壁的固体转移。以用于冲洗反应器的水洗涤粗滤饼 1 次。粗滤饼于 50℃ 在真空下于盘子中干燥。干燥的粗滤饼称重为 699g。将滤饼转移至 10L 反应器, 并加入 THF (2.025L), 之后加入羟胺溶液 (50% 的水溶液) (42.97mL, 0.40 当量, 0.696mol)。将反应器夹套加热至 40℃。通过 HPLC 监测反应, 直至 (R)-2-(4-氯-N-(4-氰基-2-氟苄基)苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 < 0.4AP。将反应物冷却至 20℃, 加入水 (2L), 将反应物于 20℃ 搅拌 30 分钟。分离各相, 在搅拌的同时用庚烷 (8L) 处理有机相, 反应物变成油状, 然后沉淀。使淤浆于 20℃ 静置 2 小时, 过滤反应物, 用庚烷 (2L) 洗涤滤饼。粗滤饼在真空下于 40-50℃ 托盘干燥, 在干燥至 < 1% 干燥失重后称重为 613g。将粗产物连同 MeOH (3.678L) 和 MeCN (1.226L) 一起转移回容器。将夹套加热至 60℃ (内部 52℃), 以实现完全溶解, 于该温度缓慢加入水 (2.023L), 保持内部温度 > 50℃。当水加入完成时, 在 4 小时内将溶液冷却至 15℃ 的内部温度, 同时发生结晶。将另外的水加入反应器 (400mL), 过滤反应物, 将母液返回容器。搅拌母液 2 分钟, 以游离容器中的任何粘附产物。用母液洗涤粗滤饼, 接着用庚烷 (1.500L) 洗涤。产物在真空下于 40-50℃ 托盘干燥, 直至干燥失重 < 0.5%, 以得到为发亮的乳白色固体的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基] 甲基] 氨基]-5,5,5-三氟戊酰胺 (577.6g, 63.76% 收率)。

## [0231] 步骤B, 程序 2

[0232] 将 (R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 (2.68kg, 7.77mol, 1 当量)、3-(4-(溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑 (2.00kg, 7.78mol, 1 当量)、碳酸铯 (1.65kg, 5.06mol, 0.65 当量)、四丁基碘化铵 (0.29kg, 0.78mol, 0.1 当量) 和乙腈 (12.0L/4.5L/kg) 加入合适的容器。将反应物加热至 35℃, 直至通过 HPLC 监测完成 (依据 HPLC, 3-(4-(溴甲基)-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑 < 0.5 相对 AP)。将反应物冷却至 15℃, 并在搅拌下加入水 (10.72L, 4L/kg), 之后加入冰乙酸 (0.22kg), 以使反应物的 pH < 6.5。终止搅拌, 分

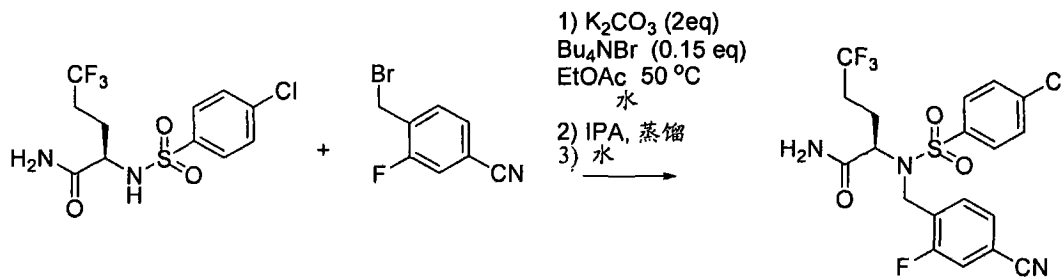
离各相（顶层包含产物）。向富含产物的层加入甲苯（26.8kg, 31L, 10kg/kg），之后加入盐水溶液（20%重量/重量, 6.39kg, 2L/kg），分离各层（顶层包含产物）。将混合物在真空（200mbar）下于约 50℃蒸馏，直至除去乙腈。如有需要在蒸馏后再用甲苯调整浓度，以确保反应器中的总体积为约 10L/kg。加入异丙醇（0.48kg, 0.2L/kg），将批料冷却至 15℃，以开始结晶。过滤所获淤浆，并用冷甲苯（18.65kg, 21.56L, 8L/kg）洗涤。粗滤饼于 50℃在真空下托盘干燥，直至干燥失重 < 1.0%。将干滤饼连同异丙醇（27.34kg, 34.8L, 13L/kg）和羟胺（50%水溶液, 0.05kg, 1.51mol, 0.2 当量）一起加入 100L 反应器。将混合物加热至 65℃，并通过 HPLC 监测，直至 (R)-2-(4-氯-N-(4-氰基-2-氟苄基)苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺 < 0.4AP。然后蒸馏反应物（罐温约 50℃，真空 300mbar），直至反应体积为原来的约 60%。加入乙腈（5.36kg, 2L/kg），将反应温度增加至 70℃，以达到完全溶解。缓慢加入水（11.26L, 4.2L/kg），同时保持反应温度 > 65℃。在 2 小时内将反应物冷却至 15℃，并发生结晶。过滤淤浆，用冷异丙醇水溶液（2 : 1IPA : 水，体积）洗涤。在真空烘箱中干燥滤饼，直至干燥失重 < 1%。然后通过溶解在乙腈（2L/kg，基于输入的干滤饼的重量）和甲醇（6L/kg）中重结晶产物，然后加热至 50℃。缓慢加入水（4L/kg），保持反应温度 > 50℃。在 2 小时内将反应物冷却至 15℃。过滤所获淤浆，并用甲醇：乙腈：水（6 : 2 : 4, 5L/kg）溶液洗涤，以产生为白色固体的 (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [ [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基 ] 甲基 ] 氨基 ]-5,5,5-三氟戊酰胺（2.02 kg, 50% 收率）。

[0233] 实施例 4

[0234] (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [ [2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基) 苯基 ] 甲基 ] 氨基 ]-5,5,5-三氟戊酰胺

[0235] 步骤 A. (2R)-2-[[ (4-氯苯基) 磺酰基 ] [ (4-氰基-2-氟苄基) 甲基 ] 氨基 ]-5,5,5-三氟戊酰胺

[0236]



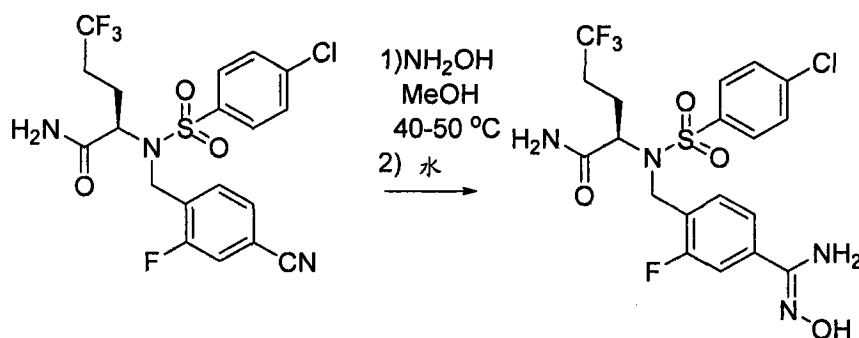
[0237] 将 (R)-2-(4-氯苯基磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺（3.444kg）、碳酸钾（2.774kg）、四丁基溴化铵（0.484kg）和 4-(溴甲基)-3-氟苯甲腈（2.092kg）加入反应器。然后加入乙酸乙酯（17.2L）和水（3.44L），将批料加热至 50℃，直至依据 HPLC 完成（< 1, 相对 AP 起始物质）。反应通常在约 15 小时内完成。将批料冷却至 15-20℃，并加入水（6.88L），分离底层水相。加入磷酸二氢钠溶液（0.2M 水溶液, 20.66L），分离底层水相，测试 pH，以确保其 < 6.5。（注意：如果 pH > 6.5，则可以再加入 20.66L 的 0.2M 磷酸二氢钠溶液，并重复萃取和 pH 检测）。然后通过恒体积真空蒸馏更换溶剂。将反应器置于真空（270mmHg）下，将夹套加热至 75-80℃。一旦开始乙酸乙酯的蒸馏，则以相同的蒸馏收集速率加入异丙醇（41.34L），并以恒定水平维持总批料体积。一旦加入所有的异丙醇，则释放真空，并加入水（13.76L）。在水加入过程中将料温保持于约 50℃。然后将批料冷却

至 15-20℃, 并过滤。用 50% (体积 / 体积) 异丙醇水溶液 (4×21.6kg) 洗涤湿滤饼, 然后于 50℃ 真空干燥, 得到为乳白色固体的标题化合物 (3.648kg, 78% 收率)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1.42-1.55 (m, 1H) 1.80-1.93 (m, 1H) 2.00-2.15 (m, 2H) 4.44 (dd, J = 7.91, 1.13Hz, 1H) 4.68 (d, J = 17.71Hz, 1H) 4.99 (d, J = 17.71Hz, 1H) 7.26 (s, 1H) 7.50 (s, 1H) 7.63-7.73 (m, 4H) 7.78-7.87 (m, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm 22.58-22.97 (m, 1C) 29.96 (d, J = 29.09Hz, 1C) 41.46 (d, J = 5.49Hz, 1C), 57.86, 110.97, 111.45 (d, J = 10.43Hz, 1C), 117.58, 119.11 (d, J = 25.80Hz, 1C), 124.89, 128.53, 128.56, 129.21, 131.17, 131.98, 137.44, 138.32, 158.99 (d, J = 247.54Hz, 2C), 170.25。<sup>19</sup>F NMR, (CDCl<sub>3</sub>, 282MHz) δ : -116.5, -65.9。IR (KBr) : 3443, 3342, 3210, 2955, 2245, 1699, 1577, 1476, 1163cm<sup>-1</sup>。

[0238] C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClF<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S 的理论计算值: 理论值 C, 47.75; H, 3.37; N, 8.79; S, 6.71; F, 15.90; Cl, 7.41。实测值: C, 47.95; H, 3.31; N, 8.67; S, 6.72; F, 15.59; Cl, 7.49。

[0239] 步骤 B. (R)-2-(4-氯-N-(2-氟-4-(N'-羟基甲脒基) 苄基) 苄基磺酰氨基)-5, 5, 5-三氟戊酰胺

[0240]

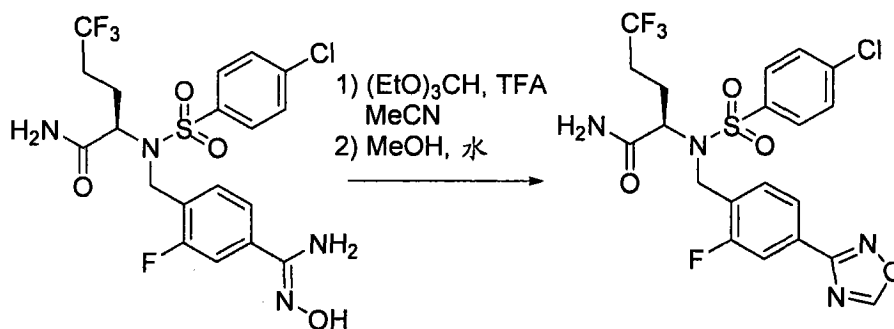


[0241] 将 (2R)-2-[[4-氯苄基]磺酰基][4-氰基-2-氟苄基]氨基]-5, 5, 5-三氟戊酰胺 (399g) 和甲醇 (1.6L) 加入反应器, 接着加入羟胺 (50% 的水溶液, 93mL, 1.8 当量)。将混合物加热至 45-50℃, 直至依据 HPLC 完成反应 (< 0.15, 相对 AP 起始物质)。缓慢加入水 (0.5L), 将料温保持于 30-50℃。使料液静置, 直至开始结晶, 然后加入水 (2.7L)。将料液冷却至 15-20℃, 并过滤。用 2 : 1MeOH : 水 (2L) 洗涤滤饼, 然后于 50℃ 真空干燥, 得到为白色固体的标题化合物 (415g, 96% 收率)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1.43-1.64 (m, 1H) 1.77-1.93 (m, 1H) 1.93-2.17 (m, 2H) 4.41 (dd, J = 8.48, 6.03Hz, 1H) 4.60 (d, J = 17.14Hz, 1H) 4.94 (d, J = 16.77Hz, 1H) 5.81-5.98 (m, 2H) 7.19-7.27 (m, 1H) 7.37-7.47 (m, 2H) 7.52 (d, J = 4.14Hz, 2H) 7.64 (d, J = 8.67, Hz, 2H) 7.85 (d, J = 8.85Hz, 2H) 9.71-9.83 (m, 1H)。IR (KBr) : 3491, 3379, 1680, 1651, 1592, 1433, 1343。

[0242] C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>ClF<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S 的理论计算值: 理论值, C, 44.66; H, 3.74; N, 10.96; S, 6.27; F, 14.87; Cl, 6.94。实测值: C, 44.90; H, 3.91; N, 10.91; S, 6.41; F, 15.21; Cl, 6.95。

[0243] 步骤 C. (2R)-2-[[4-氯苄基]磺酰基][2-氟-4-(1,2,4-噁二唑-3-基)苄基]氨基]-5, 5, 5-三氟戊酰胺

[0244]



[0245] 将(R)-2-(4-氯-N-(2-氟-4-(N'-羟基甲脒基)苄基)-苯基磺酰氨基)-5,5-三氟戊酰胺(246g)加入反应器,之后加入无水乙腈(509mL)、原甲酸三乙酯(120mL)和三氟乙酸(7mL)。将溶液加热至40-50℃,直至依据HPLC完成反应(<0.15,相对AP起始物质)。一次加入甲醇(1.48L),接着加入水(1.034L),将批料保持于45-50℃。然后将批料冷却至15-20℃,并过滤。用2:6:5MeCN:MeOH:水洗滤饼,于50-60℃在真空下托盘干燥,得到为白色固体的标题化合物(228g,90%收率)。 $^1\text{H}$ NMR, ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$ : 1.40-1.58(m, 1H) 1.75-1.90(m, 1H) 1.92-2.07(m, 1H) 2.10-2.26(m, 1H) 4.37(dd,  $J$  = 8.67, 6.22Hz, 1H) 4.48(d,  $J$  = 15.64Hz, 1H) 4.64(d,  $J$  = 15.82Hz, 1H) 5.54(s, 1H) 6.33(s, 1H) 7.44-7.54(m, 2H) 7.62(t,  $J$  = 7.72Hz, 1H) 7.68-7.76(m, 3H) 7.85(dd,  $J$  = 7.91, 1.51Hz, 1H) 8.76(s, 1H)。  $^{13}\text{C}$ NMR, ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75MHz)  $\delta$ : 170.34, 167.75, 165.80, 159.64(d,  $J$  = 244.5Hz, 1C), 138.19, 137.64, 131.25(d,  $J$  = 3.75Hz, 1C), 129.31, 129.23, 129.05(d,  $J$  = 14.25Hz, 1C), 126.74(q,  $J$  = 274.5Hz, 1C), 126.91, 126.80, 123.12(d,  $J$  = 3.75Hz, 1C), 113.7(d,  $J$  = 24.0Hz, 1C), 57.92, 41.38(d,  $J$  = 4.5Hz, 1C), 30.04(d,  $J$  = 30.0Hz, 1C), 22.90。  $^{19}\text{F}$ NMR, ( $\text{CDCl}_3$ , 282MHz)  $\delta$ : -116.3, -66.5。 IR(KBr): 3454, 334, 3286, 2952, 1705, 1432, 1325, 1260, 1167, 1084, 828 $\text{cm}^{-1}$ 。

[0246]  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClF}_4\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$  的理论计算值: 理论值, C, 46.11; H, 3.29; N, 10.71; S, 6.15; F, 14.58; Cl, 6.80。实测值: C, 46.06; H, 3.24; N, 10.71; S, 6.25; F, 14.60; Cl, 6.88。