



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103992329 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 17

(21) 申请号 201410205405. 9

(22) 申请日 2009. 09. 24

(30) 优先权数据

0817424. 5 2008. 09. 24 GB

(62) 分案原申请数据

200980148042. 7 2009. 09. 24

(73) 专利权人 美迪维尔公司

地址 瑞典胡丁厄

(72) 发明人 L. S. 奥登 M. 尼尔森 P. 坎伯格

B. 塞缪尔森 U. 格拉博斯卡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 万雪松

(51) Int. Cl.

C07D 491/048(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008007114 A1, 2008. 01. 17,

WO 2008007107 A1, 2008. 01. 17,

审查员 李莎莎

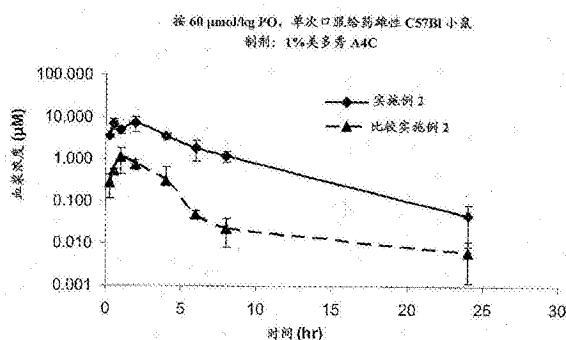
权利要求书1页 说明书45页 附图1页

(54) 发明名称

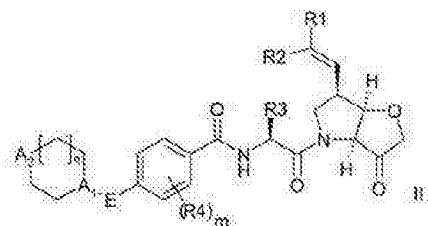
蛋白酶抑制剂

(57) 摘要

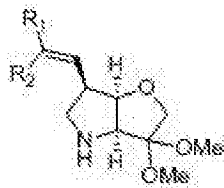
本发明为蛋白酶抑制剂。式 II 化合物或其药学上可接受的盐、N 氧化物或水合物: 其中 R^1 和 R^2 独立为 H、F 或 CH_3 ; 或 R^1 形成乙炔键, R^2 为 H 或任选被一个或两个取代基取代的 C_3-C_6 环烷基, 所述取代基独立选自甲基、 CF_3 、OMe 或卤素; R^3 为 C_1-C_3 烷基或 C_3-C_6 环烷基, 其中的任一个任选被一个或两个甲基和 / 或氟、三氟甲基或甲氧基取代, 当 R^3 为 C_3-C_6 环烷基时, 它也可被氟取代; R^4 为甲基或氟; m 为 0、1 或 2; E 为键或噻唑基, 所述噻唑基任选被甲基或氟取代; A_1 为 CH 或 N, A_2 为 CR^6R^7 或 NR^6 , 前提是 A_1 和 A_2 中至少一个含 N; R^6 为 H、 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 卤代烷基、 C_1-C_3 烷基- $O-C_1-C_3$ 烷基, 或当 A_2 为 C 时, R^6 也可作为 C_1-C_4 烷氧基或 F; R^7 为 H、 C_1-C_4 烷基或 F, 所述化合物具有治疗特征在于组织蛋白酶 K 不适当表达或活化的病症, 例如骨质疏松症、骨关节炎、类风湿性关节炎或骨转移。



移。



1. 下式的化合物：



其中 $-C=C(R^1)R^2$ 部分为乙炔，且N-官能团任选被N-保护基保护。

2. 根据权利要求1的化合物，其中该N-官能团被Boc、CBz或Fmoc基团保护。

3. 根据权利要求1的化合物，其中该N-官能团被Boc基团保护。

蛋白酶抑制剂

[0001] 本申请是申请号为2009801480427,申请日为2009年9月24日,发明名称为“蛋白酶抑制剂”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及半胱氨酸蛋白酶、尤其是木瓜蛋白酶超家族中那些蛋白酶的抑制剂。本发明提供新化合物,此类化合物可用于预防或治疗源自生理蛋白酶例如组织蛋白酶K失衡的病症。

背景技术

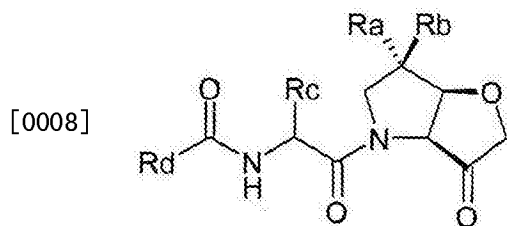
[0003] 半胱氨酸蛋白酶的木瓜蛋白酶超家族广泛分布在多种物种中,所述物种包括哺乳动物、无脊椎动物、原生动物、植物和细菌。包括组织蛋白酶B、F、H、K、L、O和S在内的多种哺乳动物组织蛋白酶归属于该超家族,它们活性的不适当调节与多种代谢病症有关,这些病症包括关节炎、肌肉萎缩症、炎症、肾小球肾炎和肿瘤侵袭(tumour invasion)。病原性组织蛋白酶样酶包括细菌牙龈蛋白酶(gingipain);疟疾性falcipain I、II、III以及下列等等和源自卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)、克鲁兹锥虫和步鲁斯锥虫(*Trypanosoma cruzi*和*brucei*)、肌束短膜虫(*Crithidia fusiculata*)、裂体吸虫(*Schistosoma* spp.)的半胱氨酸蛋白酶。

[0004] 组织蛋白酶K的不适当调节与多种病症有关,这些病症包括骨质疏松症;龈疾病例如龈炎和牙周炎;佩吉特病;恶性高钙血症和代谢性骨病。鉴于其在骨关节炎性滑膜的破软骨细胞中升高的水平,组织蛋白酶K与特征在于过量软骨或基质降解的疾病例如骨关节炎和类风湿性关节炎有关。

[0005] 通常对于处于或接近老年期的患者群体,骨和软骨病症例如骨关节炎和骨质疏松症的治疗很可能需要终生给予组织蛋白酶K抑制剂。这对意图用于此类病症的药物的给药便利性提出了异常高的要求。例如,正在进行将目前二膦酸盐类的骨质疏松症药物的剂量方案延长至每周一次或更长给药方案以有助于顺应性的尝试。然而,即使改善了给药,但二膦酸盐的其它副作用仍然存在。二膦酸盐阻断骨更新而不是如组织蛋白酶K抑制剂一样将其削弱。维持重建过程对于健康骨而言是重要的,然而二膦酸盐完全阻断该过程。另外,二膦酸盐在骨中的半衰期很长,所以即使作用例如颌的骨坏死自身表现出来,也不可能将二膦酸盐从骨中除去。相反,组织蛋白酶K抑制剂通常具有快速起效和中止的速率模式,这意味着如果发现问题,可停止给药且骨基质中不会存在抑制剂累积。

[0006] 因此,需要具有更佳药代动力学和/或药效学性质的备选骨质疏松症和骨关节炎药物。

[0007] 国际专利申请号W02008/007107中公开了下式的化合物:

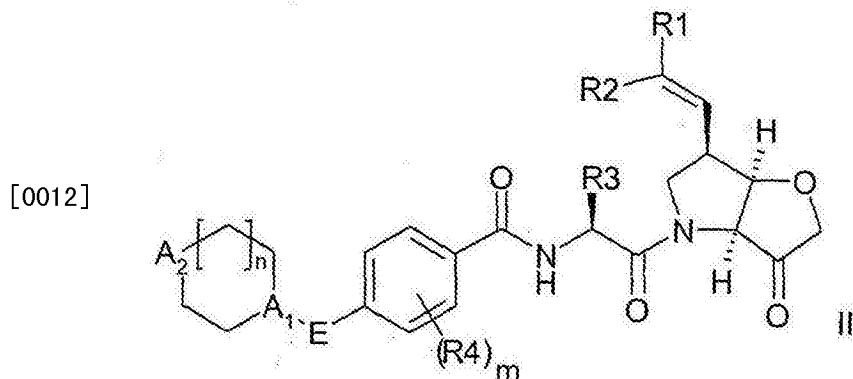


[0009] 其中Rd为取代的单环,Rc为支链烷基或环烷基,Ra和Rb为多种基团,包括H、甲基、乙基、醚、硫醚、胺、磷酸酯等。制备的仅有化合物在该位置上具有H或甲氧基。

[0010] 在本领域中,仍然需要有效的组织蛋白酶K抑制剂。显示对组织蛋白酶K的选择性超过其它组织蛋白酶(例如超过组织蛋白酶S和/或组织蛋白酶L的选择性)的组织蛋白酶K抑制剂尤其具有益处。可预计,显示性质例如高通透性和/或有利代谢特性的有效组织蛋白酶K抑制剂在临床环境中具有极大的价值。组织蛋白酶K相关适应症例如骨质疏松症或关节炎预示延长的给药期,因此需要具有毒性和或基因毒性最小的化合物。

发明内容

[0011] 本发明提供式II化合物或其药学上可接受的盐、N氧化物或水合物:



[0013] 其中

[0014] R^1 和 R^2 独立为H、F或 CH_3 ;或

[0015] R^1 形成乙炔键, R^2 为H或任选被1或2个取代基取代的 C_3 - C_6 环烷基, 所述取代基独立选自甲基、 CF_3 、OMe或卤素;

[0016] R³为C₁-C₃烷基或C₃-C₆环烷基,它们中的任一个任选被1或2个甲基和/或氟、三氟甲基或甲氧基取代,当R³为C₃-C₆环烷基时,它也可被氟偕取代;

[0017] R^4 为甲基或氟;m为0、1或2;

[0018] E为噻唑基,其任选被甲基或氟取代;

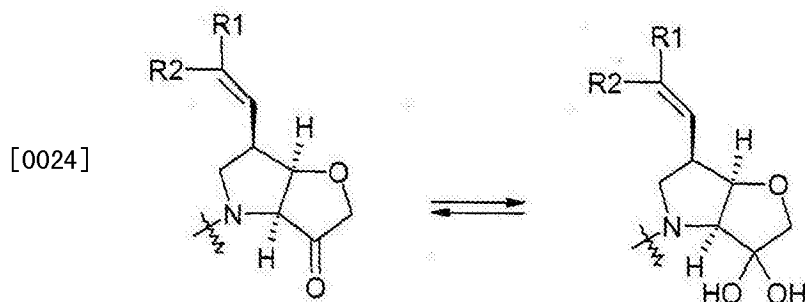
[0019] A₁为CH或N,

[0020] A_2 为 CR^6R^7 或 NR^6 ,前提是 A_1 和 A_2 中的至少一个含N;

[0021] R⁶为H、C₁-C₄烷基、C₁-C₄卤代烷基、C₁-C₃烷基-O-C₁-C₃烷基,或当A₂为C时,R⁶也可C₁-C₄烷氧基或F;

[0022] R^7 为H、C₁-C₄烷基或F。

[0023] 理解的是,本发明化合物可作为水合物例如以下部分式的水合物存在:



[0025] 并且本发明延伸至所有此类备选形式。

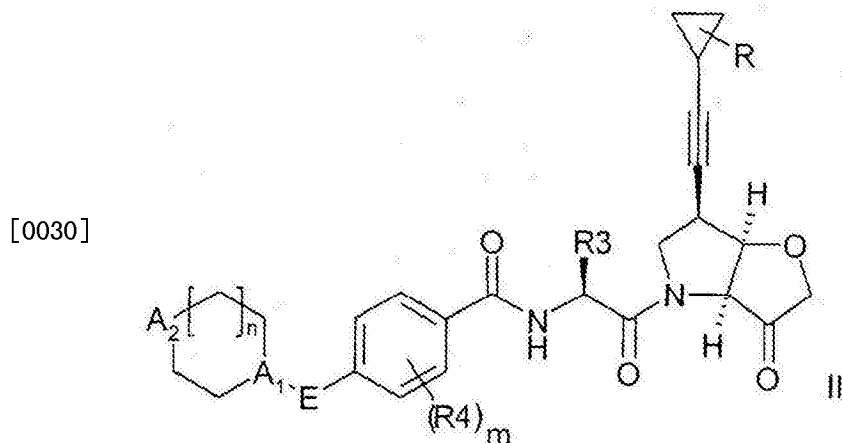
具体实施方式

[0026] 在本发明的一些实施方案中, R^1 和 R^2 均为 H, 均为甲基, 或更优选均为 F。

[0027] 在本发明的其它实施方案中, R^1 与式 II 中所示烯烃一起定义乙炔键, 例如当 R^2 为 H 时, 为乙炔。

[0028] 在本发明的其它实施方案中, R^1 与式 II 中所示烯烃一起定义乙炔键, R^2 为环烷基部分, 例如环戊基, 更优选环丁基, 最优选环丙基。环烷基任选在其中化合价允许被 2 个取代基取代的任何位置 (包括 1 位) 被 1 个取代基取代, 所述取代基选自甲基、OMe、卤素 (例如氟) 或 CF_3 。

[0029] 因此, 本发明一个实施方案定义下式化合物:



[0031] 其中 A_2 、 n 、 A_1 、 E 、 R^4 、 m 和 R^3 定义同上或以下定义的任何优先基团 (preferment), 和 R 为 H、甲基、 CF_3 、OMe 或卤素例如氟, 其位于 1、2 或 3 位中任何位置。

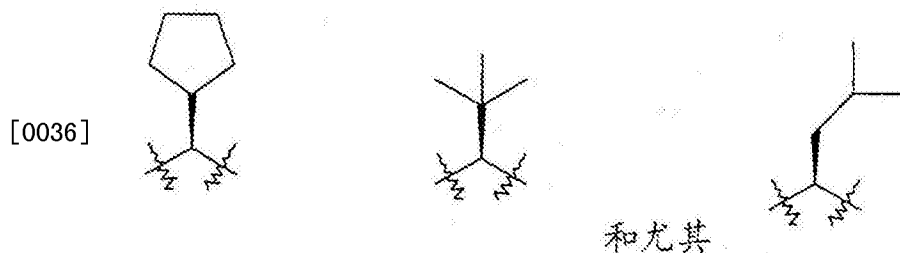
[0032] 合适的 R^3 为 C_1 - C_3 烷基或 C_3 - C_6 环烷基, 它们中的任一个任选被 1 或 2 个甲基和/或氟、三氟甲基或甲氧基取代。

[0033] R^3 环烷基的代表性含义包括环丙基、环丁基和尤其是环戊基或环己基, 它们中的任一个被氟或偕氟取代。环丙基的 2 位、环丁基或环戊基的 3 位或环丙基的 4 位上的偕氟通常合适。环己基的 4 位上的偕氟通常也合适。

[0034] 在本发明的一个实施方案中, R^3 表示亮氨酸的侧链。在本发明的第二个实施方案中, R^3 表示异亮氨酸的侧链。在本发明的第三个实施方案中, R^3 表示环己基甘氨酸的侧链。在本发明的第四个实施方案中, R^3 表示环戊基甘氨酸的侧链。在本发明的第五个实施方案中, R^3 表示 O-甲基苏氨酸的侧链。在本发明的第五个实施方案中, R^3 表示 4-氟亮氨酸的侧链。在

本发明的第六个实施方案中, R^3 表示3-甲氧基缬氨酸的侧链。

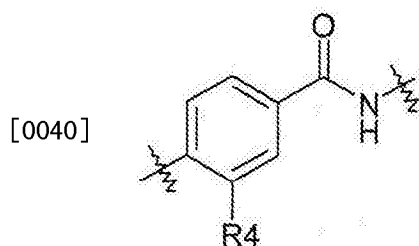
[0035] 目前优选的 R^3 的含义包括由以下部分结构包括的那些含义:



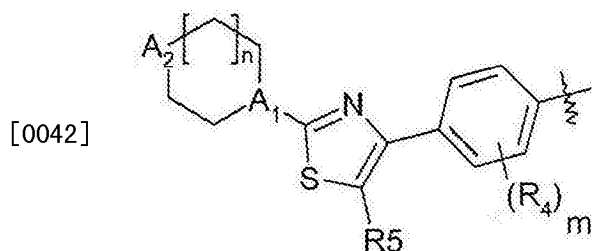
[0037] 在本发明的一个实施方案中, m 表示2。尤其关注的是其中 m 表示1的化合物。在本发明的另外实施方案中, m 为0, 尤其是当邻位噻唑基被Me或优选F取代时。

[0038] R^4 适合表示甲基或氟, 尤其是氟。如果 m 为2, 目前优选各个 R^4 都相同。

[0039] 当 m 表示1时, R^4 适合位于以下部分结构所示的位置:



[0041] 如上定义, E 为噻唑基, 该基团任选被甲基或更优选氟取代。优选的噻唑环取向为:

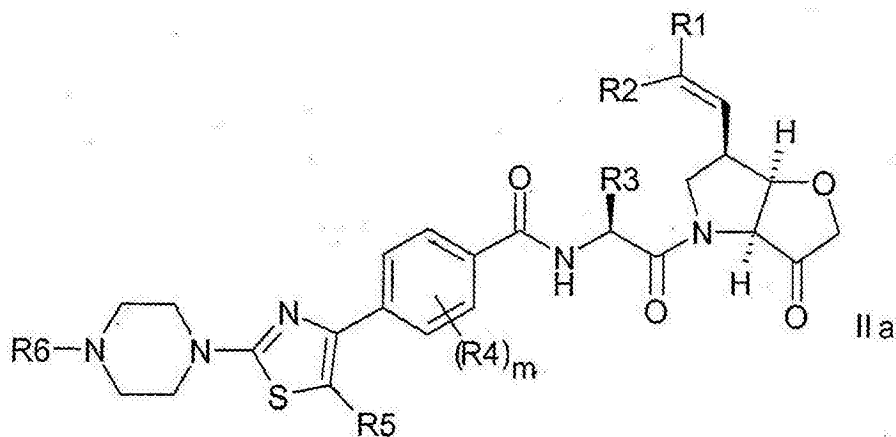


[0043] 其中 R^5 为H、甲基或氟。

[0044] 含 A_1 和 A_2 的环为饱和的5元或6元含氮环。因此, 代表性的环包括吡咯烷-1-基、吡咯烷-3-基、哌嗪-1-基、哌啶-4-基和哌啶-1-基。环容易例如被烷基或卤代烷基、通常甲基或丙基或三氟甲基取代。或者, 环被醚例如甲氧基甲基-或甲氧基乙基-取代。当 A_2 为碳时, 环也可被烷氧基例如甲氧基或氟、尤其是偕氟取代。

[0045] 本发明的优选实施方案具有式IIa或其药学上可接受的盐、N氧化物或水合物(在本文中统称为本发明化合物):

[0046]



[0047] 其中

[0048] R^1 和 R^2 独立为H、F或 CH_3 ;或[0049] R^1 形成乙炔键,和 R^2 为H、 C_3 - C_6 环烷基,其任选被1或2个取代基取代,所述取代基选自Me、 CF_3 、OMe或卤素(例如氟);[0050] R^3 为支链 C_2 - C_6 烷基或 C_3 - C_6 环烷基,它们中的任一个被卤素或三氟甲基取代;[0051] R^4 为甲基或氟; m 为0或1或2;[0052] R^5 为H、甲基或氟;[0053] R^6 为 C_1 - C_4 烷基。[0054] R^5 优选为氟,尤其是当 m 为0时。其余优先基团如式II相关上文所定义。对以下式II的描述应理解为包括式IIa的相应实施方案。[0055] 其中 $-C=CR^1R^2$ 部分为乙炔的式II的代表性实施方案包括:

[0056] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0057] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0058] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0059] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0060] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0061] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0062] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0063] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0064] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

- [0065] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0066] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺
- [0067] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0068] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0069] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0070] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0071] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺,
- [0072] 及其药学上可接受的盐、N氧化物和水合物。
- [0073] 其中R¹和R²为甲基的式II的另外代表性实施方案包括:
- [0074] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0075] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0076] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0077] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0078] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0079] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0080] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0081] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0082] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0083] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;
- [0084] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺
- [0085] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-

丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0086] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0087] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0088] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0089] N-[1-(6-(二甲基乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0090] 及其药学上可接受的盐、N氧化物和水合物。

[0091] 其中R¹和R²为F的式II的另外优选实施方案包括

[0092] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0093] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0094] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0095] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0096] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0097] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0098] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0099] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0100] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0101] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0102] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺

[0103] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0104] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0105] N-[1-(6-(二氟乙烯基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0106] N-[1-(6-(二氟乙基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0107] N-[1-(6-(二氟乙基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺

[0108] 及其药学上可接受的盐、N氧化物和水合物。

[0109] 其中R¹为乙炔键且R²为环丙基的式II的另外优选实施方案包括:

[0110] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0111] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0112] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0113] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0114] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0115] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0116] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0117] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0118] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0119] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0120] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0121] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0122] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环己基-2-氧代-乙基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0123] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺;

[0124] N-[1-(6-(环丙基乙炔基)-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-2-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺

[0125] 及其药学上可接受的盐、N氧化物和水合物。

[0126] R^6 或 R^7 的 C_1 - C_n 烷基定义意在包括含总数1-n个碳原子的支链和直链烷基部分。此类 R^6 基团或 R^7 的实例为甲基、乙基、丙基(正丙基和异丙基)、丁基(正丁基、异丁基、叔丁基和仲丁基)。尤其感兴趣的一个 R^6 基团为甲基。尤其感兴趣的第二个 R^6 基团为丙基(尤其是正丙基)。由于 R^3 任选被1或2个甲基取代,所以该部分也可定义最多5个C原子的支链烷基链。

[0127] 在本发明某些实施方案中, A_1 为N。

[0128] 本发明的另一些方面包括药用组合物,其包含以上定义的化合物和其药学上可接受的载体或稀释剂。

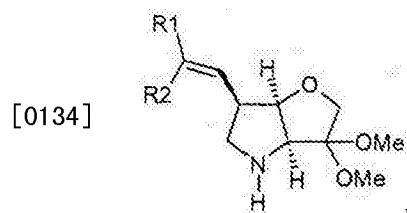
[0129] 本发明的再一方面为以上定义的化合物在制备用于治疗由组织蛋白酶K介导的病症的药物中的用途,此类病症例如:骨质疏松症、龈疾病(例如龈炎和牙周炎)、佩吉特病、恶性高钙血症、代谢性骨病、特征在于过量软骨或基质降解的疾病(例如骨关节炎和类风湿性关节炎)、包括瘤形成在内的骨癌、疼痛(尤其是慢性疼痛)。

[0130] 还提供用于治疗或预防由组织蛋白酶K介导的病症的方法,该方法包括给予安全和有效量的本发明化合物,用于治疗或预防由组织蛋白酶K介导的所述病症的目的。

[0131] 还提供用于治疗或预防由组织蛋白酶K介导的病症的本发明化合物。

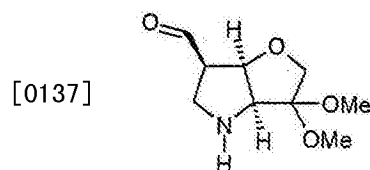
[0132] 另外,作为本发明的一个方面提供新中间体(如本文中所述),它们可用于制备本发明化合物。

[0133] 具体而言,提供下式化合物或其N-保护的衍生物(例如Boc、CBz或Fmoc-保护的衍生物):



[0135] 本发明还提供其相应的1,3-二氧戊环保护的类似物和N-保护的衍生物(例如Boc-CBz或Fmoc保护的衍生物)。该结构单元的尤其优选实施方案具有均为氟或甲基的 R^1 和 R^2 ,或 $-C=C(R^1)R^2$ 部分为乙炔或环丙基乙烯。

[0136] 本发明的另一种新中间体具有下式:



[0138] 或相应的1,3-二氧戊环保护的类似物,在各种情况下,其中N官能团任选被常规保护基团例如Boc、CBz或Fmoc保护。

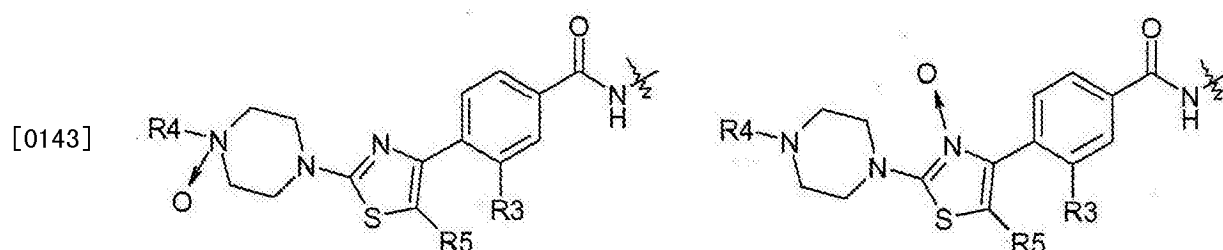
[0139] 本发明化合物可形成盐,该盐形成本发明的又一方面。式II化合物的合适药学上可接受的盐包括有机酸、尤其是羧酸的盐,所述羧酸盐包括但不限于乙酸盐、三氟乙酸盐、乳酸盐、葡糖酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、泛酸盐、羟乙磺酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、丁酸盐、二葡糖酸盐(digluconate)、环戊烷酸盐(cyclopentamate)、葡庚糖酸盐(glucoheptanate)、甘油磷酸盐、草酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、烟酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐

(propionate)、酒石酸盐、乳糖酸盐、新戊酸盐(pivate)、樟脑酸盐、十一酸盐和琥珀酸盐；有机磺酸的盐例如甲磺酸盐、乙磺酸盐、2-羟基乙磺酸盐、樟脑磺酸盐、2-萘磺酸盐、苯磺酸盐、对-氯苯磺酸盐和对-甲苯磺酸盐；和无机酸的盐例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、半硫酸盐、硫氰酸盐、过硫酸盐、磷酸和磺酸的盐。

[0140] 在某些情况下，可作为水合物分离本发明化合物。通常，用有机溶剂例如二噁英、四氢呋喃或甲醇，通过从水/有机溶剂混合物中重结晶来制备水合物。也可通过给予患者相应的酮原位生成水合物。

[0141] 可通过本领域普通技术人员已知方法制备本发明化合物的N氧化物。例如，可在合适的惰性有机溶剂(例如卤代烃例如二氯甲烷)中，在约0°C下，通过将本发明化合物的非氧化形式用氧化剂(例如三氟过乙酸、过马来酸、过苯甲酸、过乙酸、间-氯过苯甲酸等)处理，来制备N氧化物。或者，可由合适原料的N氧化物制备本发明化合物的N氧化物。

[0142] 本发明N氧化物的实例包括具有以下部分结构的那些N氧化物：



[0144] 可通过在合适的惰性有机溶剂(例如乙腈、乙醇、二噁英水溶液等)中，在0-80°C下，用还原剂(例如硫、二氧化硫、三苯膦、氢硼化锂、氢硼化钠、二氯化磷(phosphorus bichloride)、三溴化物等)处理，由本发明的相应化合物的N氧化物制备非氧化形式的本发明化合物。

[0145] 应注意，只要化学上稳定，定义中所用的任何分子部分上的基团位置可在这种部分上的任何地方。

[0146] 除另有说明外，变量的定义中所用的基团包括所有可能的异构体。例如，丁基包括叔丁基、异丁基、正丁基等。

[0147] 当任何变量在任何成分中出现大于一次时，各定义独立。

[0148] 除另外指出或说明外，化合物的化学名称包括所述化合物可具有的所有可能的立体化学异构形式的混合物。所述混合物可含所述化合物的基本分子结构的所有非对映体和/或对映体。纯形式或互相混合的本发明化合物的所有立体化学异构形式都意在包括在本发明范围内。

[0149] 将本文中所述化合物和中间体的纯立体异构形式定义为以下异构体，其基本上不含所述化合物或中间体的同一基本分子结构的其它对映体或非对映体形式。具体而言，术语“立体异构纯”涉及具有至少80%立体异构过量(即最小90%的一种异构体和最大10%的其它可能的异构体)至最多100%立体异构过量(即100%的一种异构体和不存在其它异构体)的化合物或中间体，更尤其是具有90%至最多100%立体异构过量、甚至更尤其是具有94%至最多100%立体异构过量和最尤其是具有97%至最多100%立体异构过量的化合物或中间体立体。术语“对映体纯”和“非对映体纯”应按相似方式理解，但是分别针对所述混合物的对映体过量和非对映体过量，。

[0150] 可如下将本发明化合物制备成其单独立体异构体:通过使所述化合物的外消旋混合物与旋光拆分剂反应以形成非对映异构化合物对,分离非对映体,和回收旋光纯对映体。虽然可用式II化合物的共价非对映体衍生物来进行对映体的拆分,但优选可离解的络合物(例如晶体;非对映体的盐)。非对映体具有不同的物理性质(例如熔点、沸点、溶解度、反应性等),并可通过利用这些差异容易地分离。可通过色谱法例如HPLC或优选通过基于溶解度差异的分离/拆分技术将非对映体分离。然后通过不会导致外消旋化的任何实用方法回收旋光纯对映体和拆分剂。适用于将化合物的立体异构体从它们的外消旋混合物中拆分的技术的更详细的描述可参见Jean Jacques Andre Collet, Samuel H. Wilen, *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, John Wiley and Sons, Inc. (1981)。

[0151] 本文中定义的式II化合物或式II的任何亚类包括放射性同位素或放射性标记的化合物,其中一个或多个原子被该原子的同位素置换,原子的同位素即与自然界通常存在的原子的原子数相同但原子质量不同的原子。可掺入式I化合物或式I的任何亚类的同位素的实例包括但不限于氢的同位素,例如 ^2H 和 ^3H (又分别用D代表氘,T代表氚);碳的同位素,例如 ^{11}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C ;氮的同位素,例如 ^{13}N 和 ^{15}N ;氧的同位素,例如 ^{15}O 、 ^{17}O 和 ^{18}O ;磷的同位素,例如 ^{31}P 和 ^{32}P ;硫的同位素,例如 ^{35}S ;氟的同位素,例如 ^{18}F ;氯的同位素,例如 ^{36}Cl ;溴的同位素,例如 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 和 ^{82}Br ;和碘的同位素,例如 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 和 ^{131}I 。

[0152] 选择包含在同位素标记化合物中的同位素取决于该化合物的具体应用。例如,对于药物或底物组织分布测定,其中掺入放射性同位素例如 ^3H 或 ^{14}C 的化合物通常最有用。对于放射成像应用,例如正电子成像术(PET),发射正电子的同位素例如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{13}N 或 ^{15}O 有用。掺入较重同位素例如氘即 ^2H 可为式I化合物或式I的任何亚类提供较大代谢稳定性,这可导致例如化合物的体内半衰期增加或剂量需求减少。

[0153] 为便于合成,通常优选式II化合物呈天然同位素状态。

[0154] 可通过类似于下文流程和/或实施例中描述的那些方法,通过用合适的同位素标记试剂或原料代替相应的非同位素标记试剂或原料,或通过本领域技术人员已知的常规技术,来制备同位素标记的式I化合物或式II的任何亚类。

[0155] 理解的是,本发明延伸至在体内释放本发明化合物的前药、溶剂合物、络合物和其它形式。

[0156] 虽然可以单独给予活性剂,但优选将其作为药用制剂的一部分给予。这种制剂含以上定义的活性剂和一种或多种可接受的载体/赋性剂和任选其它治疗成分。在与制剂的其它成分相容的意义上,载体必须可接受且对受体无害。

[0157] 制剂包括适合直肠、鼻部、局部(包括含服和舌下)、阴道或胃肠外(包括皮下、肌肉、静脉内和皮内)给药的那些制剂,但优选制剂为经口给予的制剂。制剂可适宜地以单位剂型例如片剂和缓释胶囊存在,并可通过药剂领域中熟知的任何方法制备。

[0158] 此类方法包括使以上定义的活性剂与载体结合的步骤。一般而言,如下制备制剂:通过使活性剂与液体载体或细碎的固体载体或二者均匀和紧密地结合在一起,然后视需要使产物成形。本发明延伸至制备药物组合物的方法,该方法包括使式II化合物或其药学上可接受的盐与药学上可接受的载体或溶媒联合或结合在一起。如果药物制剂的制备涉及将药物赋性剂和盐形式的活性成分紧密混合,则通常优选使用性质上为非碱性即酸性或中性的赋性剂。

[0159] 在本发明中,口服给药制剂可存在为离散单元例如各自含预定量的活性剂的胶囊剂、扁囊剂或片剂;散剂或颗粒剂;活性剂在水成液或非水水成液中的溶液剂或混悬剂;或水包油液体乳剂或油包水液体乳剂和大丸剂等。

[0160] 对于口服给药组合物(例如片剂和胶囊剂),术语合适的载体包括溶媒例如常用赋性剂,例如粘合剂,例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨醇、西黄蓍胶、聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮)、甲基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基-甲基纤维素、蔗糖和淀粉;填充剂和载体,例如玉米淀粉、明胶、乳糖、蔗糖、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、磷酸二钙、氯化钠和藻酸;和润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸钠和其它金属硬脂酸盐、硬脂酸甘油酯、硬脂酸、硅油、滑石、蜡、油和胶态氧化硅。也可使用矫味剂,例如薄荷油、冬青油、樱桃香精等。可能需要加入着色剂以使剂型容易识别。也可通过本领域中熟知的方法将片剂包衣。

[0161] 可任选用一种或多种助剂通过压缩或塑模,来制备片剂。可通过在合适的机器中,压制任选与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂混合的自由流动形式的活性剂例如粉末或颗粒,来制备压制片剂。可通过在合适的机器中对用惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物混合物进行模塑,来制备模制片剂。可任选将片剂包衣或刻痕,并可将片剂配制以提供活性剂的缓释或控释。

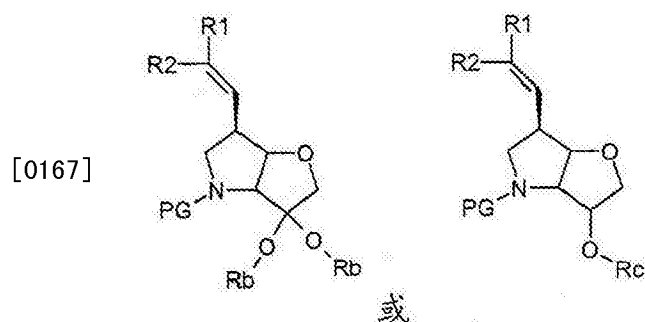
[0162] 适合口服给药的其它制剂包括在矫味基质(通常为蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶)中含有活性剂的锭剂;在惰性基质例如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶中含有活性剂的软锭剂;和在合适的液体载体中含有活性剂的漱口剂。

[0163] 本发明化合物或制剂的合适剂量取决于适应症和患者,并通过常规动物试验容易确定。通常需要和实现提供0.01-100 μ M,更优选0.01-10 μ M例如0.1-25 μ M数量级细胞内浓度的剂量(用于抑制木瓜蛋白酶超家族的生理蛋白酶)。

[0164] 通过多种溶液和固相化学法来制备本发明化合物。

[0165] 通常,将化合物制备为对应于终产物抑制剂的P1、P2和P3部分的结构单元。在不愿以任何方式囿于理论或对特定变量的假定结合模式的描述的情况下,本文中使用的表意概念P1、P2和P3仅因方便而提供,并且基本上具有它们的常规Schlechter&Berger含义,和表示据信分别填充酶的S1、S2和S3亚位点的抑制剂的那些部分,其中S1与切割位点相邻,S3远离切割位点。与结合模式无关,由式II定义的化合物意在包括在本发明范围内。

[0166] 一般而言,P1结构单元具有下式:



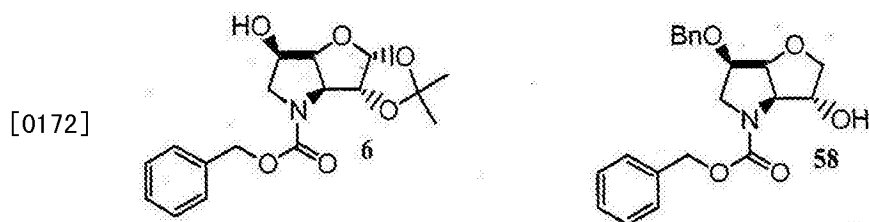
[0168] 其中

[0169] R^1 和 R^2 定义同上,两个Rb基团定义缩酮例如二甲缩酮(bis methyl ketal),或一起定义环缩酮例如1,3-二氧戊环;

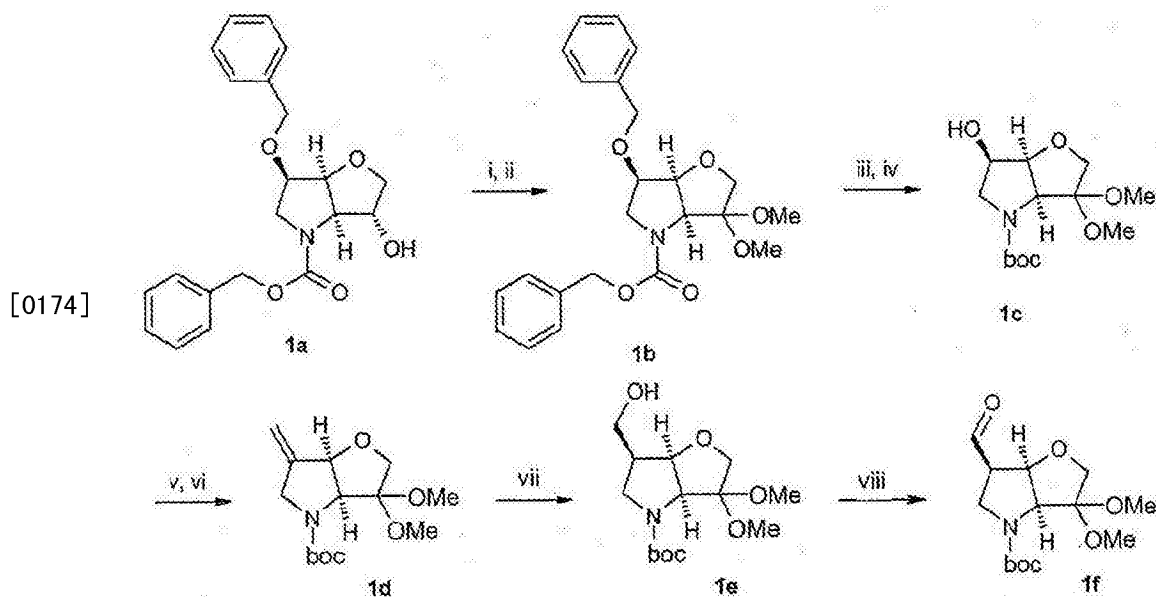
[0170] 和Rc为羟基保护基。较不常见的是,Rc为H,或在其中作为酮的P1结构单元被P2和

P3拉长的情况下,表示终产物抑制剂的酮官能团。

[0171] W005/066180描述了用于以上P1结构单元的中间体的制备,该中间体包括:



[0173] 本发明化合物合成的第一阶段通常为在溶液中制备官能化P1结构单元。流程1说明制备适当的6-醛中间体的途径。

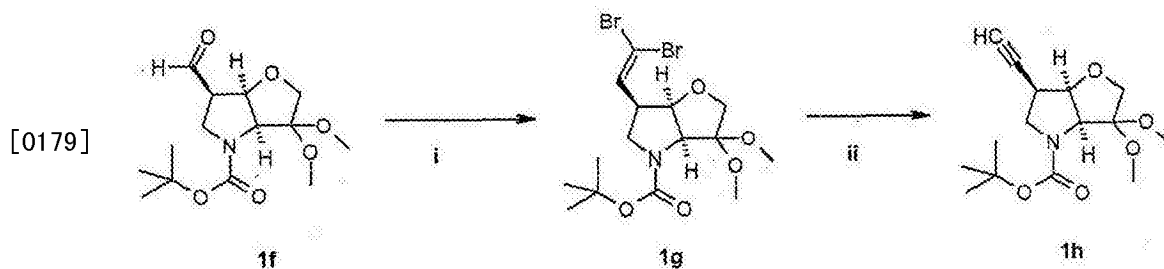


[0175] i)戴斯-马丁氧化剂(Dess-Martin Periodinane),DCM;ii)原甲酸三甲酯,pTs, MeOH;iii)Pd(OH)₂,H₂,MeOH;iv)Boc₂O,10%Na₂CO₃,v)戴斯-马丁氧化剂,DCM;vi)1) CH₃PPh₃Br,KOtBu,THF;vii)1)9-BBN-H,THF,2)NaBO₃,H₂O,THF;viii)戴斯-马丁氧化剂, DCM。

[0176] 流程1

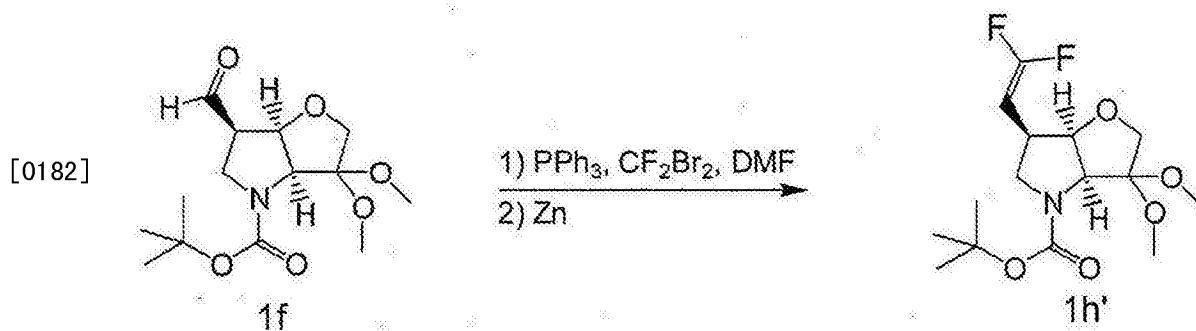
[0177] 可按W005/066180中所述制备起始双环醇(1a)。例如用戴斯-马丁氧化剂将羟基官能团氧化,然后通过在对-甲苯磺酸的存在下通过用原甲酸三甲酯处理,将得到的酮官能团转化为二甲缩酮,得到缩酮(1b)。例如通过用催化剂如Pd(OH)₂等氢解来实现将Cbz和苄基保护基除去,然后将得到的游离胺用boc保护,得到醇(1c)。将得到的游离醇用例如含戴斯-马丁氧化剂的溶剂如二氯甲烷氧化,然后在KOt.Bu等的存在下用溴化甲基三苯基磷进行维蒂希(Wittig)反应,得到烯烃(1d)。例如通过用9-BBN-H处理来实现将双键羟基化,得到伯醇(1e),然后可用任何合适的氧化方法例如用戴斯-马丁氧化剂等处理,将所述伯醇氧化为相应的醛(1f)。

[0178] 流程2说明以流程1的6-醛中间体为原料制备6-乙炔P1结构单位的典型方法。

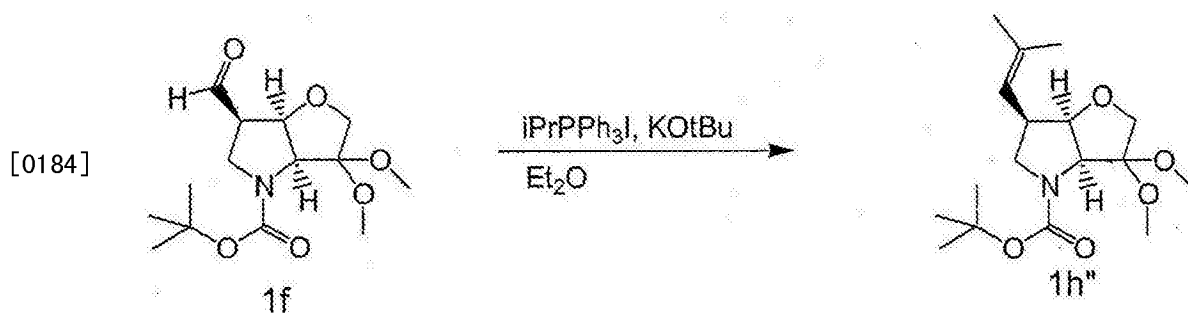


[0180] i) CBr_4 , PPh_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , ii) $n\text{BuLi}$, THF, -78°C

[0181] 按流程2中所示制备C-6乙炔结构单元1h。基本上,通过两步Corey-Fuchs法,通过相应的1,1-二溴烯烃1g,容易由醛前体1f制备乙炔1h。将醛1f在 0°C 下用例如由 PPh_3 和 CBr_4 产生的三苯基膦二溴化碳处理,得到二溴烯烃1g。然后在低温,通常 -78°C 下,将溶于有机溶剂例如THF的该二溴化物用正丁基锂处理,经后处理,得到乙炔1h,通常收率高。可用多种常规N保护基代替在此所示Boc基团。另外,可通过包括环缩酮在内的多种标准酮保护基代替二甲缩酮,或较不常见的是,在偶联前,可用活性酮官能团原地构建结构单元。

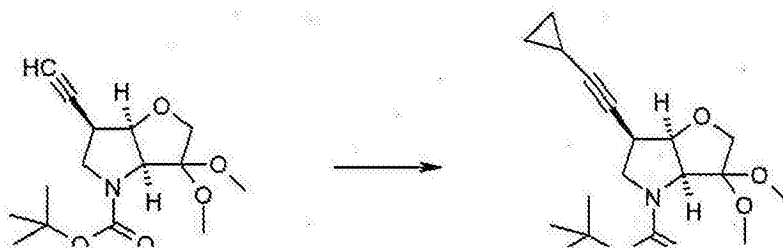


[0183] 例如在 0°C 下,在惰性气氛下,通过将氟甲基卤例如二溴二氟甲烷加入溶于有机溶剂例如DMF的三苯基膦溶液,来制备式II化合物,其中 R^1 和/或 R^2 定义氟乙炔基取代基。将溶液搅拌短时间(例如0.5小时),然后缓慢加入醛1f和锌粉。在室温下保持1小时后,通过加入 NaHCO_3 水溶液将反应淬灭,得到保护的P1结构单元1h'(由以上N-Boc和二甲缩醛代表,但也可考虑其它常规保护基)。



[0185] 可通过维蒂希反应制备式II化合物,其中 R^1 和/或 R^2 定义甲基化乙烯基取代基。例如,将叔丁醇钾加入含活化烷基例如碘化异丙基三苯基膦的二乙醚悬浮液。约2小时后,将溶于溶剂例如二乙醚的醛1f加入溶液。搅拌(例如1小时)后,可将反应用氯化铵水溶液淬灭,得到乙烯基结构单元1h''(同以上二甲基乙烯基中所述)。尽管用N-Boc和二甲缩醛保护基描绘流程,但显而易见的是,也可考虑其它常规保护基。

[0186]



[0187] 可通过将相应的乙炔基结构单元烷基化来制备式II化合物,其中R²为任选取代的环烷基。在以上实例中,将1h用强碱例如氨基化钠处理,得到炔化物,然后使该炔化物与合适的环烷基卤反应,得到结构单元1h' (在以上环丙基氯的实例中,但其它活化环烷基也有效)。或者,可如下延伸乙炔官能团:通过与ClCH₂CH₂Br反应,然后用碱处理,形成环丙基环。尽管用N-Boc和二甲缩醛保护基描绘流程,但显而易见,也可考虑其它常规保护基。

[0188] 通常为得到最终化合物,将合适的P1结构单元例如1h、1h'、1h''或1h'''按常规方式使N-脱保护,例如用乙酰氯的甲醇溶液处理以除去N-Boc保护基。在随后的游离胺中,用标准偶联条件例如HATU、DIPEA的DMF溶液,将P2残基例如通过BocP2-OH引入。将端基Boc保护用乙酰氯的甲醇溶液再次除去,并用标准偶联条件例如HATU、DIPEA的DMF溶液通过P3-OH引入P3残基。最后,将二甲缩醛保护用TFA除去,得到需要的终化合物。

[0189] 通常,在合适的偶联剂例如苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷磷鎓六氟磷酸盐(PyBOP)、O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-脒鎓六氟磷酸盐(HBTU)、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基-脒鎓六氟磷酸盐(HATU)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)或在1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)的存在下,任选在1-羟基苯并三唑(HOBT)和碱例如N,N-二异丙基乙胺、三乙胺、N-甲基吗啉等的存在下,进行延伸。通常,反应在20-30°C,优选在约25°C下进行,并需要2-24h来完成。合适的反应溶剂为惰性有机溶剂,例如卤化有机溶剂(例如二氯甲烷、氯仿等)、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、醚溶剂例如四氢呋喃、二噁烷等。

[0190] 或者,可通过先将P3/P2结构单元转化为活性酸衍生物例如琥珀酰亚胺酯,然后使其与P1胺反应,来进行以上延伸偶联步骤。反应通常需要2-3h来完成。用于该反应的条件取决于活性酸衍生物的性质。例如,如果其为酰基氯衍生物,则反应在合适的碱(例如三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶等)的存在下进行。合适的反应溶剂为极性有机溶剂,例如乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、二氯甲烷或其任何合适的混合物。

[0191] P2结构单元通常为N-保护的氨基酸,例如L-亮氨酸、L-异亮氨酸、O-甲基-L-苏氨酸、L-3-羟基缬氨酸、4-氟亮氨酸、L-环戊基甘氨酸或L-环己基甘氨酸,P3通常含封端基团例如苯甲酸衍生物,该衍生物具有例如在其对位用其合成子引入或提供的N-烷基-哌嗪基-E部分或提供。

[0192] 可先制备适当保护的单个结构单元,然后优选按以下顺序将它们偶联在一起以在P2处的外消旋化最小:首先P2+P1→P2-P1,然后N-烷基哌嗪基-E-苯甲酸*+P2-P1→N-烷基哌嗪基-E-苯甲酸酯-P2-P1,其中*表示活化形式。

[0193] 可用标准偶联方法进行两个氨基酸、氨基酸与肽、或两个肽片段之间的偶联,所述方法为例如叠氮化物法、混合碳酸-羧酸酐(氯甲酸异丁酯)法、碳二亚胺(二环己基碳二亚胺、二异丙基碳二亚胺或水溶性碳二亚胺)法、活性酯(对-硝基苯基酯、N-羟基琥珀酰亚胺

酯)法、伍德沃德试剂K-法、羰基二咪唑法、磷试剂或氧化-还原法。可通过加入1-羟基苯并三唑或4-DMAP来加强这些方法中的一些(尤其是碳二亚胺法)。这些偶联反应可在溶液(液相)或固相中进行。

[0194] 更具体地说,偶联步骤涉及在偶联剂的存在下使一个反应物的游离羧基与另一个反应物的游离氨基脱水偶联,形成连接的酰胺键。关于此类偶联剂的描述参见普通肽化学教科书例如M.Bodanszky, "Peptide Chemistry", 第2修订版, Springer-Verlag, Berlin, Germany, (1993), 下文中简称为Bodanszky, 其内容通过引用结合到本文中。合适的偶联剂的实例为N,N'-二环己基碳二亚胺、1-羟基苯并三唑与N,N'-二环己基碳二亚胺或N-乙基-N'-[(3-二甲基氨基)丙基]碳二亚胺的混合物。一种实用而有效的偶联剂为单独的市售(苯并三唑-1-基氧)三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐, 或其和1-羟基苯并三唑或4-DMAP的混合物。另一种实用而有效的偶联剂为市售2-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐。又另一种实用而有效的偶联剂为市售O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐。

[0195] 偶联反应在惰性溶剂例如二氯甲烷、乙腈或二甲基甲酰胺中进行。加入过量叔胺例如二异丙基乙胺、N-甲基吗啉、N-甲基吡咯烷或4-DMAP, 以将反应混合物的pH维持在8左右。反应温度通常为0°C-50°C, 反应时间通常为15分钟-24h。

[0196] 在偶联反应期间, 通常必须保护组成型非天然氨基酸的官能团, 以避免形成不需要的键。可使用的保护基在Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, New York (1981) 和 "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", 第3卷, Academic Press, New York (1981) (下文简称为Greene) 中列出, 其公开内容通过引用结合到本文中。

[0197] 通常, 将C-端残基的 α -羧基保护为酯, 可将该酯裂解以得到羧酸。可使用的保护基包括1) 烷基酯例如甲基、三甲基甲硅烷基和叔丁基, 2) 芳烷基酯例如苄基和取代的苄基, 或3) 可通过弱碱或弱还原途径裂解的酯, 例如三氯乙基酯和苯甲酰甲基酯。

[0198] 通常, 将待偶联的各个氨基酸的 α -氨基经N-保护。可使用本领域中已知的任何保护基。此类基团的实例包括: 1) 酰基例如甲酰基、三氟乙酰基、邻苯二甲酰基和对-甲苯磺酰基; 2) 芳族氨基甲酸酯基团例如苄氧基羰基(Cbz或Z)和取代的苄氧基羰基, 和9-芴基甲氧基羰基(Fmoc); 3) 脂族氨基甲酸酯基团例如叔丁氧基羰基(Boc)、乙氧基羰基、二异丙基甲氧基-羰基和烯丙氧基羰基; 4) 环烷基氨基甲酸酯基团例如环戊氧基羰基和金刚烷基氧基羰基; 5) 烷基例如三苯基甲基和苄基; 6) 三烷基甲硅烷基例如三甲基甲硅烷基; 和7) 含硫醇的基团例如苯硫基羰基和二硫杂琥珀酰基。优选的 α -氨基保护基为Boc或Fmoc。用于肽合成的经适当保护的多种氨基酸衍生物有市售。

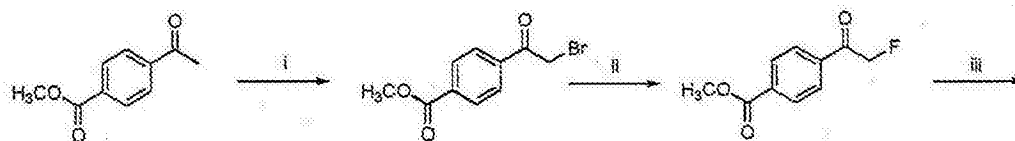
[0199] 通常, 在下一个偶联步骤前, 将 α -氨基保护基裂解。当使用Boc基团时, 选择的方法为纯净或在二氯甲烷中的三氟乙酸, 或含HCl的二噁烷或乙酸乙酯。然后在偶联之前或原位用碱性溶液例如水性缓冲剂或含叔胺的二氯甲烷或乙腈或二甲基甲酰胺, 将得到的铵盐中和。当使用Fmoc基团时, 选择的试剂为含哌啶或取代哌啶的二甲基甲酰胺, 但可使用任何仲胺。在0°C至室温、通常20-22°C的温度下进行脱保护。

[0200] 一旦完成抑制剂序列, 将任何剩余的保护基以由选择的保护基决定的任何方式除去。本领域技术人员熟知这些方法。

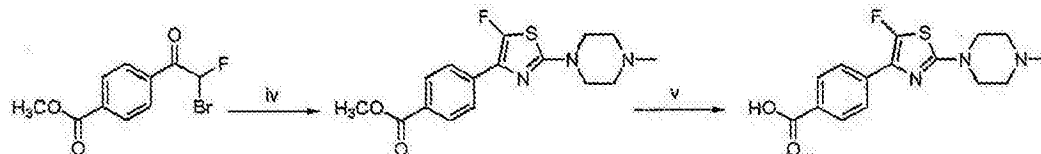
[0201] N-保护的L-氨基酸形式的P2结构单元容易购得,例如具有多种保护基变体例如CBz、Boc或Fmoc的L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-环己基甘氨酸、O-甲基-L-苏氨酸和其它有市售。容易由市售原料制备R³的其它变体。例如可通过使CBz保护的(S)-(+)-2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸与3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并(3,2b)吡咯反应,形成需要的P2-P1单元,来制备其中R²为-C(CH₃)₂OCH₃的化合物。现可在常规氢化钠、咪唑、THF条件下,用甲基碘将P2侧链醇甲基化,以在α中心基本上无外消旋化的情况下得到需要的P2。现可使该P2-P1部分经过本文中所述的合成,即将CBz除去和偶联。

[0202] W005/565299描述了γ-氟亮氨酸P2结构单元的制备。Truong等在Syn.Lett.2005第8期1278-1280中给出Fmoc和N-Boc-γ-氟亮氨酸结构单元的备选合成法。

[0203] 在W005/066180、W008/007114中描述了P3结构单元的制备,或通过类似方法容易制备。例如,以下流程E显示其中E为氟取代噻唑基的P3结构单元的制备:



[0204]



[0205] i. HOAc, Br₂, RT, 2h, 55% 收率; ii. KF, 18-冠-6, CH₃CN, 90℃, 16h, 31% 收率; iii. HOAc, Br₂, 45℃, 4h, 100% 收率; iv. 4-甲基哌嗪-1-硫代甲酰胺, 乙醇, 70℃, 2h, 74% 收率, v. LiOH, THF, H₂O, RT, 16h, 79% 收率。

[0206] 流程E

[0207] 4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酸的合成

[0208] 4-乙酰基苯甲酸甲酯原料有市售。用含溴的乙酸实现在酮的α位的溴化,得到需要的4-(2-溴-乙酰基)-苯甲酸甲酯。然后在18-冠-6的存在下,在90℃下,将4-(2-溴-乙酰基)-苯甲酸甲酯用氟化钾处理,然后通过柱层析,得到4-(2-氟-乙酰基)-苯甲酸甲酯。重复用含溴的乙酸实现在该酮的α位的溴化,得到需要的4-(2-溴-2-氟-乙酰基)-苯甲酸甲酯。通常通过将4-(2-溴-2-氟-乙酰基)-苯甲酸甲酯和4-甲基哌嗪-1-硫代甲酰胺在70℃下加热2小时形成噻唑。冷却过程中,所需的4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酸甲酯沉淀出。将该甲酯用氢氧化锂溶液脱保护,并在用盐酸后处理后,通常以高收率得到作为二盐酸盐的所需酸4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酸。

[0209] 本文中使用的术语“N-保护基”或“N-保护的”是指用于保护氨基酸或肽的N-端或阻止合成期间氨基发生不需要的反应的基团。常用的N-保护基公开于Greene, “Protective Groups in Organic Synthesis” (John Wiley & Sons, New York, 1981), 其通过引用结合到本文中。N保护基包括酰基,例如甲酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻-硝基苯氧基乙酰基、α-氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基等;磺酰基例如苯磺酰基、对-甲苯磺酰基等;氨基甲酸酯形成基团例如苄氧基羰基、对-氯苄氧基羰基、对-甲氧基苄

氧基羰基、对-硝基苄氧基羰基、2-硝基苄氧基羰基、对-溴苄氧基羰基、3,4-二甲氧基苄氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、2-硝基-4,5-二甲氧基苄氧基羰基、3,4,5-三甲氧基苄氧基羰基、1-(对-联苯基)-1-甲基乙氧基羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧基羰基、二苯甲基氧基羰基、叔-丁氧基羰基、二异丙基甲氧基羰基、异丙氧基羰基、乙氧基羰基、甲氧基羰基、烯丙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、苯氧基羰基、4-硝基苯氧基羰基、苄基-9-甲氧基羰基、环戊基氧基羰基、金刚烷基氧基羰基、环己基氧基羰基、苯硫基羰基等；烷基例如苄基、三苯基甲基、苄氧基甲基等；和甲硅烷基例如三甲基甲硅烷基等。优选的N保护基包括甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、新戊酰基、叔-丁基乙酰基、苯基磺酰基、苄基(bz)、叔-丁氧基羰基(BOC)和苄氧基羰基(Cbz)。

[0210] 羟基和/或羧基保护基也在以上Greene中进行了广泛综述,并包括醚例如甲基醚、取代的甲基醚例如甲氧基甲基、甲硫基甲基、苄氧基甲基、叔-丁氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基等；甲硅烷基醚例如三甲基甲硅烷基(TMS)、叔-丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、三苄基甲硅烷基、三苯基甲硅烷基、叔-丁基二苯基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基等；取代的乙醚例如1-乙氧基甲基、1-甲基-1-甲氧基乙基、叔-丁基、烯丙基、苄基、对-甲氧基苄基、二苯基甲基、三苯基甲基等；芳烷基例如三苯甲基,和pixyl(9-羟基-9-苯基咕吨衍生物,尤其是氯化物)。酯羟基保护基包括酯,例如甲酸酯、甲酸苄酯、氯代乙酸酯、甲氧基乙酸酯、苯氧基乙酸酯、新戊酸酯(pivaloate)、金刚烷酸酯、~~苯~~酮酸酯(mesitoate)、苯甲酸酯等。碳酸酯羟基保护基包括甲基乙烯基、烯丙基、肉桂基、苄基等。

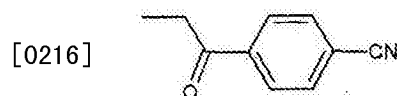
[0211] 实施方案详述

[0212] 现参考以下实施例和图1仅作为说明地描述本发明各种实施方案,图1描绘经口给予本发明化合物或现有技术化合物的雄性C57B1小鼠的血浆浓度对时间的关系曲线。

[0213] 参考实施例1

[0214] P3结构单元

[0215] 步骤a)4-氰基苯丙酮

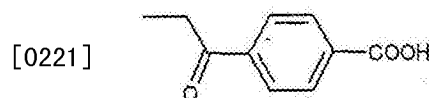


[0217] 按对制备4-氰基乙酰苯的所述方法(Synth.Communi994,887-890),在80°C下,将4-溴苯丙酮(5.65g,26.4mmol)、Zn(CN)₂(1.80g,15.3mmol)和Pd(PPh₃)₄(2.95g,2.6mmol)的混合物在脱氧DMF(35ml,在4Å分子筛上贮存,临用前用Ar鼓泡)中回流18h。将混合物在甲苯(100ml)和2N NH₄OH(100ml)之间分配。将有机相用2NNH₄OH(100ml)萃取,用饱和NaCl水溶液(2×100ml)洗涤,干燥并蒸发。按类似方法进行10mmol规模反应,将粗产物合并。经快速层析(330g二氧化硅,6/1石油醚-EtOAc)纯化,得到白色固体(5.17g,89%)。

[0218] ¹H NMR(CDCl₃) δ ppm:1.22(t,3H,J=7.2Hz),3.00(q,2H,J=7.3Hz),7.75(d,2H,J=8.8Hz),8.03(d,2H,J=8.4Hz)

[0219] ¹³C NMR(CDCl₃) δ ppm:7.8,32.1,116.1,117.9,128.3,132.4,139.7,199.2

[0220] 步骤b)4-丙酰基苯甲酸

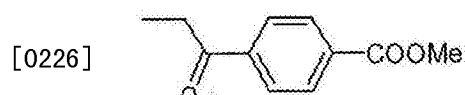


[0222] 将4-氰基苯丙酮(4.67g, 29.3mmol)与2N NaOH(90mL, 180mmol)和二噁烷(90ml)在95℃下回流过夜。将混合物用水(150ml)稀释, 用醚(75ml)洗涤, 用浓HCl酸化至pH2, 用醚(3×75ml)萃取。将有机相用饱和NaCl水溶液(3×75ml)洗涤, 干燥, 蒸发, 得到黄色固体(5.12g, 98%)。

[0223] ^1H NMR($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) δ ppm: 1.18(t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$), 2.99, (q, 2H, $J=7.1\text{Hz}$), 7.95(d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 8.08(d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$)

[0224] ^{13}C NMR(CDCl_3) δ ppm: 7.9, 32.1, 127.7, 130.0, 134.0, 140.0, 168.0, 200.8

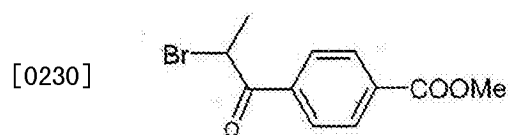
[0225] 步骤c) 4-丙酰基苯甲酸甲酯



[0227] 将以上苯甲酸(890mg, 5mmol)、 NaHCO_3 (1.26g, 15mmol)和碘代甲烷(935 μl , 15mmol)的DMF(10ml)溶液在室温下搅拌过夜。将混合物用饱和NaCl水溶液(50mL)稀释, 用醚(3×50ml)萃取。将有机相用水(50ml)洗涤, 干燥, 蒸发。经快速层析(90g二氧化硅, 2/1石油醚-EtOAc)纯化, 得到白色固体(744mg, 77%)。

[0228] ^1H NMR(CDCl_3) δ ppm: 1.24(t, 3H, $J=7\text{Hz}$), 3.03(q, 2H, $J=7\text{Hz}$), 3.95(s, 3H), 8.0和8.12(ABq, 4H)

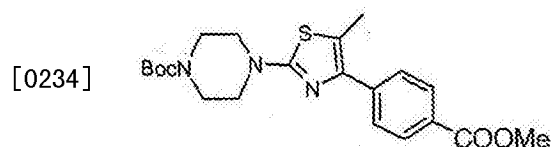
[0229] 步骤d) 4-(2-溴丙酰基)苯甲酸甲酯



[0231] 在氮气下, 将4-丙酰基苯甲酸甲酯(744mg, 3.87mmol)、吡咯烷酮三溴化氢盐(pyrrolidone hydrotribromide)(1.98g)和2-吡咯烷酮(380mg, 4.5mmol)的THF(38ml)溶液在50℃下加热3h。将混合物冷却, 过滤, 浓缩, 然后复溶于醚(50ml)。将醚溶液依次用水(20ml)、饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 水溶液(20ml)、饱和NaCl水溶液(20ml)和水(20mL)洗涤, 干燥, 蒸发, 得到黄色油状物(1.025g), 该油状物直接用于Hantzsch偶联。通过 ^1H NMR测定该物质含91%所需溴酮、5%原料酮和4%4-溴-1-丁醇。

[0232] ^1H NMR(CDCl_3) δ ppm: 1.92(d, 3H, $J=7\text{Hz}$), 3.96(s, 3H), 5.28(q, 1H, $J=7\text{Hz}$), 8.07和8.14(ABq, 4H)

[0233] 步骤e) 4-[2-(4-叔-丁氧基羰基哌嗪-1-基)-5-甲基噻唑-4-基]苯甲酸甲酯

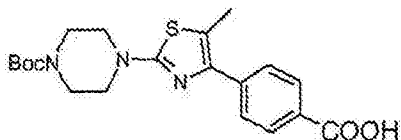


[0235] 在 N_2 下, 在70℃下, 将所有以上 α -溴酮和4-硫代羰基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(J. Med. Chem., 1998, 5037-5054, 917mg, 3.73mmol)在36ml THF中回流2h。将沉淀过滤, 然后将滤液蒸发, 得到黄色固体。经快速柱层析(二氧化硅, 5/1石油醚-EtOAc)纯化, 得到624mg浅黄色固体。沉淀经层析(二氧化硅, 2/1石油醚-EtOAc)纯化, 又得到32mg化合物。总收率为44%。

[0236] ^1H NMR(CDCl_3) δ ppm: 1.46(s, 9H), 2.43(s, 3H), 3.42, (m, 4H), 3.54(m, 4H), 3.90(s, 3H), 7.68和8.04(ABq, 4H).

[0237] 步骤f) 4-[2-(4-叔-丁氧基羰基哌嗪-1-基)-5-甲基噻唑-4-基]苯甲酸

[0238]



[0239] 将以上甲酯(564mg, 1.35mmol)与1.35ml 2N NaOH、5ml THF和3.65ml水在60°C下加热4h。将反应混合物蒸发, 倾入20ml饱和NaCl水溶液和20ml CH₂Cl₂, 然后在冰浴中用5%柠檬酸酸化至pH3。将各层分离, 然后将有机相再用2×10ml CH₂Cl₂萃取。将有机相合并, 用水(10ml)洗涤, 干燥, 蒸发, 得到浅黄色固体(537mg, 98%)。

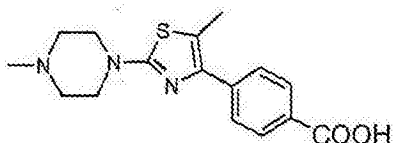
[0240] ¹H NMR(CDCl₃) δppm: 1.48(s, 9H), 2.47(s, 3H), 3.47(m, 4H), 3.57(m, 4H), 7.74和8.12(ABq, 4H)。

[0241] ¹³C NMR(CDCl₃) δppm: 12.6, 28.3, 42.8, 48.1, 80.3, 119.1, 127.8, 128.2, 130.1, 140.5, 145.6, 154.6, 167.2, 171.4。

[0242] LCMS: (M+H)⁺ 404, (M-H)⁻ 402。

[0243] 步骤g) 4-[5-甲基-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]苯甲酸

[0244]



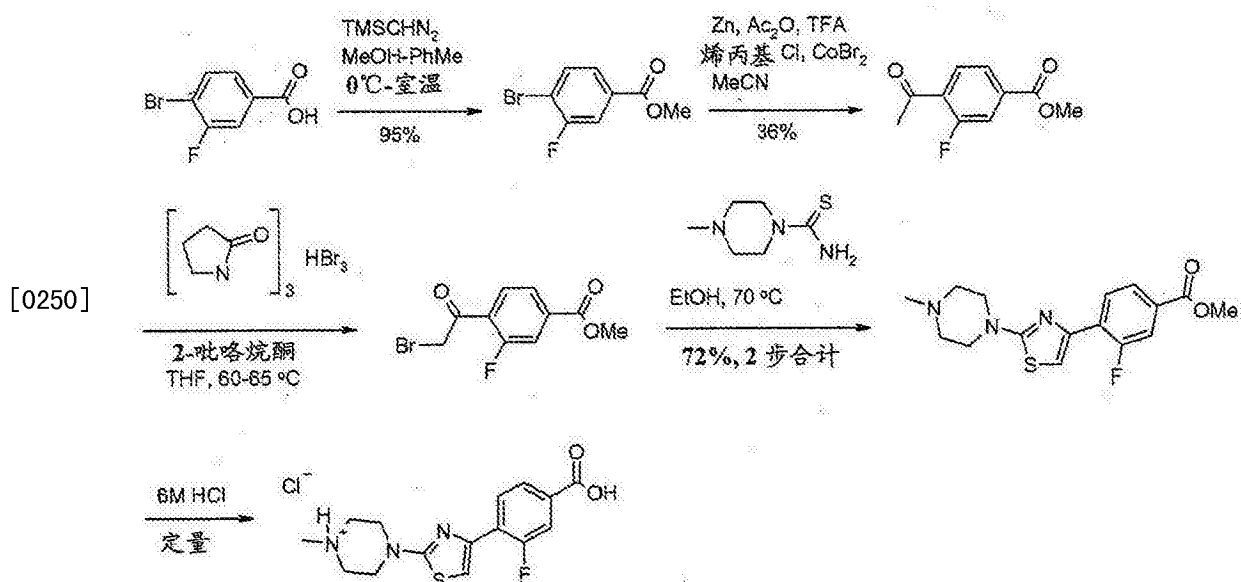
[0245] 将4-[4-(4-羧基-苯基)-5-甲基-噻唑-2-基]-哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.421mmol)溶于含4M HCl的1,4-二噁烷溶液, 在室温下搅拌1h。然后将溶剂在真空下除去, 将剩余物4-(5-甲基-2-哌嗪-1-基-噻唑-4-基)-苯甲酸悬浮于甲醇(10ml), 然后用AcOH/AcONa缓冲液(pH约5.5, 5ml)和甲醛(0.547mmol)处理。将反应混合物在室温下搅拌1h, 然后用NaCNBH₃(0.547mmol)处理, 并在室温下搅拌过夜。然后将溶剂在真空下除去, 并将剩余物经柱层析纯化, 得到标题化合物(0.403mmol, 95%)。

[0246] MS(ES)_{m/z} 318(100%, [M+H]⁺)。

[0247] 参考实施例2

[0248] 备选的P3结构单元

[0249] 3-氟-4-[2-(4-甲基哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]苯甲酸HCl盐



[0251] 步骤a)4-溴-3-氟苯甲酸甲酯

[0252] 将4-溴-3-氟苯甲酸(2.46g, 11.2mmol)溶于MeOH(9ml)和甲苯(4ml),并在冰浴中冷却。滴加(三甲基甲硅烷基)重氮甲烷(11ml, 2.0M, 在己烷中, 22mmol)至黄色保持不变。将溶液在室温下搅拌40分钟,然后真空浓缩。将第二批羧酸(2.43g)按相似方式处理。将两批粗产物合并,经快速层析(二氧化硅, 5/1戊烷-EtOAc)纯化,得到甲酯,为白色固体(4.92g, 95%收率)。

[0253] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ ppm 7.77(m, 1H), 7.71(m, 1H), 7.64(m, 1H), 3.93(s, 3H)。

[0254] 步骤b)4-乙酰氧基-3-氟苯甲酸甲酯

[0255] 在惰性气体下,将烯丙基氯(105 μ l, 1.28mmol)和TFA(20 μ l, 0.26mmol)加入锌粉(480mg, 7.34mmol)和无水溴化钴(II)(96.6mg, 0.44mmol)的MeCN(4ml)悬浮液中。在室温下搅拌10分钟后,依次加入来自(a)的芳基溴(1.003g, 4.30mmol溶于5ml MeCN)、乙酸酐(0.45ml, 4.79mmol)和更多的MeCN(1ml)。将混合物搅拌过夜,用1M HCl(20ml)淬灭,然后用EtOAc(3 $\times$ 20ml)萃取。将有机相依次用饱和 NaHCO_3 水溶液(20ml)和饱和NaCl(2 $\times$ 20ml)洗涤,干燥(Na_2SO_4),并浓缩。经快速层析(二氧化硅, 6/1-4/1石油醚-EtOAc)纯化,得到回收的溴化物(161.1mg, 16%)和需要的酮(白色固体, 305.5mg, 36%)。

[0256] NMR(CDCl_3) δ ppm: ^1H (400MHz) 7.94-7.86(m, 2H), 7.80(dd, 1H, $J=11.2, 1.6\text{Hz}$), 3.95(s, 3H), 2.67(d, 3H, $J=4.4\text{Hz}$); ^{19}F (376MHz) -109.2(m); ^{13}C (100MHz) 195.4(d, $J=3.7\text{Hz}$), 165.1(d, $J=2.2\text{Hz}$), 161.6(d, $J=255\text{Hz}$), 135.8(d, $J=8.1\text{Hz}$), 130.7(d, $J=2.9\text{Hz}$), 129.0(d, $J=14\text{Hz}$), 125.2(d, $J=3.6\text{Hz}$), 117.9(d, $J=26\text{Hz}$), 52.7(s), 31.4(d, $J=7.3\text{Hz}$)。

[0257] 步骤c)4-(2-溴乙酰氧基)-3-氟苯甲酸甲酯

[0258] 将THF(10ml)和2-吡咯烷酮(91 μ l, 1.20mmol)加入来自b)的酮(198mg, 1.01mmol)和吡咯烷酮三溴化氢盐(532mg, 1.07mmol)的混合物中。在60-65 $^\circ\text{C}$ 下加热2h后,将混合物真空浓缩,然后在EtOAc(20ml)和饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10ml)之间分配。将水相用EtOAc(10ml)萃取。将有机相合并,用饱和NaCl(2 $\times$ 10ml)洗涤,干燥(Na_2SO_4),并浓缩。经快速层析(二氧化硅, 7/1石油醚-EtOAc)纯化,得到白色固体(0.2634g),该固体含84%需要的溴化物(通过将 ^{19}F

NMR峰积分测得)。NMR(CDC1₃) δ ppm: ¹H(400MHz)7.93(m,1H),7.88(m,1H),7.79(dd,1H,J=11.2,1.6Hz),4.50(d,2H,J=2.4Hz),3.94(s,3H);¹⁹F(376MHz)-108.4(m).

[0259] 步骤d)3-氟-4-[2-(4-甲基哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]苯甲酸甲酯

[0260] 将EtOH(5.0ml)加入以上溴酮(193mg,0.70mmol)和4-甲基-哌嗪-1-硫代甲酰胺(carbothioic acid amide)(113mg,0.71mmol)中,然后将混合物在70℃下加热2小时15分钟。将沉淀过滤,用冷EtOH洗涤,并真空干燥和表征。用1.75g溴酮(6.36mmol)大规模地重复该过程。NMR(1/1CDC1₃-CD₃OD) δ ppm: ¹H(400MHz)8.20(m,1H),7.86(dd,1H,J=8.4,1.6Hz),7.76(dd,1H,J=11.4,1.8Hz),7.38(d,1H,J=2.4Hz),4.23(br,2H),3.95,(s,3H),3.65(br,4H),3.32(br,2H),2.98(s,3H);¹⁹F(376MHz)-114.0(m).LCMS[M+H]⁺=336.

[0261] 将两次制备的沉淀物合并,并悬浮于饱和NaHCO₃(50ml)。将混合物用EtOAc萃取。将有机相用水洗涤,干燥(Na₂SO₄),蒸发,得到标题化合物,为膏状固体(1.76g)。

[0262] 步骤e)3-氟-4-[2-(4-甲基哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]苯甲酸HCl盐

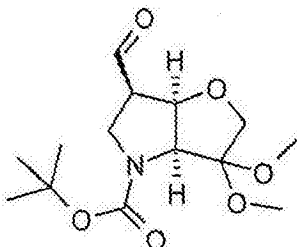
[0263] 将来自(d)的甲酯(1.76g,5.25mmol)与6M HCl(40ml)在80℃下加热5.5h。加入更多的6M HCl(10ml),将混合物在90℃下加热1小时15分钟。冷却后,然后将混合物真空蒸发,从水中冻干,以定量收率得到终产物,其为膏状固体。

[0264] NMR(DMSO-d₆) δ ppm: ¹H(400MHz)11.60(br,1H),8.18(t,1H,J=8.0Hz),7.82(dd,1H,J=8.4,1.6Hz),7.72(dd,1H,J=12.0,1.6Hz),7.48(d,1H,J=2.8Hz),4.11(m,2H),3.58(m,2H),3.49(m,2H),3.19(m,2H),2.80(d,3H,J=4.4Hz);¹⁹F(376MHz)-113.5(m);¹³C(100MHz)168.9,166.0,159.0(d,J=250Hz),143.4,131.4(d,J=8Hz),129.8,125.8(d,J=11Hz),125.6,116.6(d,J=24Hz),111.1(J=15Hz),51.1,45.0,41.9.LCMS[M+H]⁺=322.

[0265] 参考实施例3

[0266] 6-醛-中间体

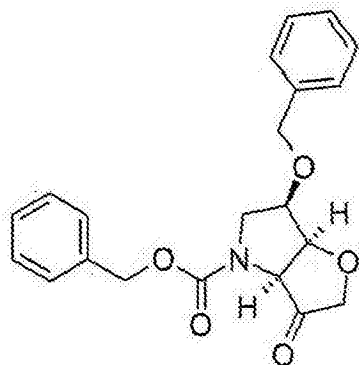
[0267]



[0268] 6-甲酰基-3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸叔丁酯

[0269] 步骤a

[0270]

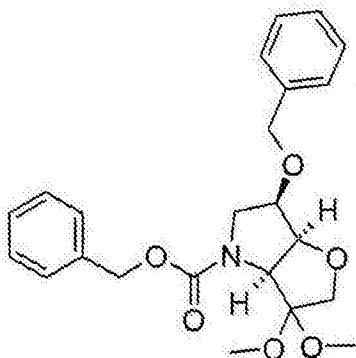


[0271] (3as,6aS)-6R-苄氧基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸苄酯(1a)

[0272] 将戴斯-马丁试剂(12.5g, 30mmol)溶于DCM(250ml)中。在室温和氮气氛下, 于45分钟内, 将含6-苄氧基-3-羟基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸苄酯(按W005/066180中所述制备)(7.4g, 20mmol)的DCM(50ml)溶液加入经搅拌的氧化剂溶液中。再搅拌90分钟后, 通过TLC确认反应完成。加入10% Na₂S₂O₃水溶液(200mL), 将混合物在室温下再搅拌15分钟。将两相系统移至分液漏斗, 用EtOAc(分别为200mL、100mL)萃取两次。将合并的有机相用饱和NaHCO₃水溶液(100mL)和盐水(100mL)洗涤一次, 经Na₂SO₄干燥, 过滤, 然后将溶剂真空除去, 得到粗产物标题化合物, 为透明油状物(7.69g,); ESI+, m/z: 368(M++1)。

[0273] 步骤b

[0274]

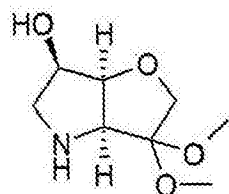


[0275] (3aS,6aS)-6R-苄氧基-3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸苄酯(1b)

[0276] 将酮衍生物(1a)(7.6g)溶于无水甲醇(100ml)。在室温和氮气氛下, 加入原甲酸三甲酯(30mL)和pTsOH(0.2g)。将混合物在60℃下加热8小时。当按TLC确认反应完成后, 将反应物冷却至室温, 并真空浓缩。将粗产物经在硅胶上用乙酸乙酯-庚烷(1:4)洗脱的柱层析纯化, 得到标题化合物, 其为透明油状物(5.9g, 2步合计71%); ESI+, m/z: 382(M+-OMe)。

[0277] 步骤c

[0278]

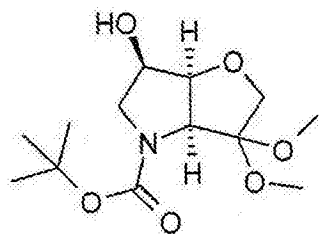


[0279] (3aS,6aS)-3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-6R-醇(1c)

[0280] 在H₂气氛下, 将化合物(1b)(2.5g, 6.4mmol)在甲醇(60mL)和Pd(OH)₂(0.7g)中的溶液在室温下搅拌48小时。当按TLC确认反应完成时, 将混合物过滤并真空浓缩, 得到粗标题化合物, 其为棕色油状物(1.15g); ESI+, m/z: 190(M++1)。

[0281] 步骤d

[0282]

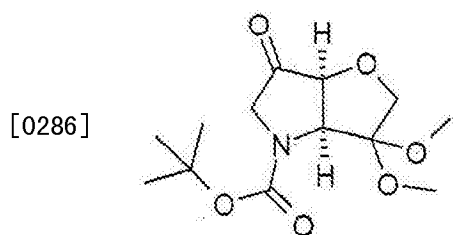


[0283] (3aS,6aS)-6R-羟基-3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸叔丁酯(1d)

[0284] 将3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-6-醇(1c)(2.80g, 14.8mmol)溶于

75mL二噁烷/水(2:1)混合物中。滴加10%Na₂CO₃溶液(25ml)至pH9-9.5。将混合物在冰-水浴中冷却至0℃,然后一次性加入Boc酐。将反应物在室温下搅拌过夜,并视需要通过加入更多的10%Na₂CO₃溶液将混合物的pH保持在9-9.5。通过TLC(50:50乙酸乙酯:异己烷)监测反应。一旦完成,将混合物过滤以将形成的盐除去,然后将溶剂真空蒸发。将混合物水溶液用3×100mL EtOAc萃取,将合并的有机相用100mL水和100mL盐水洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤,然后将溶剂真空蒸发,得到3.79g标题氨基甲酸酯,其为透明油状物(89%),94%纯(HPLC),ESI⁺,m/z:312(M⁺+Na)。

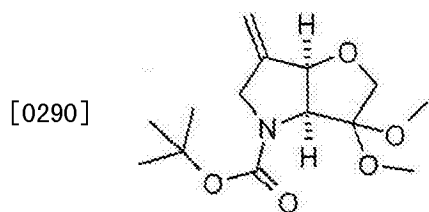
[0285] 步骤e



[0287] 3,3-二甲氢基-6-氢代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸叔丁酯(1e)

[0288] 向溶于DCM(80mL)的醇(1e)(3.674g,12.70mmol)中加入戴斯-马丁氧化剂(7.00g,16.5mmol),然后将溶液在室温下搅拌3h。然后加入10%Na₂S₂O₃(水溶液)(150mL)将反应淬灭,将得到的浆液搅拌15分钟。将混合物移至分液漏斗,并将各相分离。将水相用DCM萃取两次,然后将合并的有机相用饱和NaHCO₃溶液洗涤两次,干燥,过滤并浓缩。粗物质经快速柱层析(甲苯/乙酸乙酯3:1)纯化,由此得到标题化合物(2.882g,79%)。

[0289] 步骤f

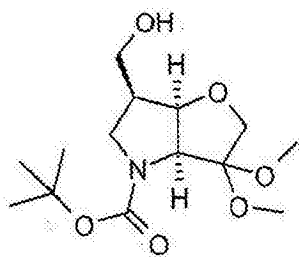


[0291] 3,3-二甲氧基-6-亚甲基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸叔丁酯(1f)

[0292] 将酮化合物1e(1.10g,3.83mmol)溶于无水THF(30mL),将溶液冷却至0℃。将溴化甲基三苯基磷鎓(4.0g,11.2mmol)和KOtBu(1.17g,10.5mmol)的无水THF(40mL)溶液分为3等份,以2小时时间间隔分别加入。6小时后,将溶液倾入含二乙醚(70mL)的分液漏斗,用10%柠檬酸(水溶液)(2×40mL)萃取。将有机相用饱和NaHCO₃水溶液(40mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤,并将溶剂真空蒸发。粗产物经快速层析(庚烷:乙酸乙酯4:1)纯化,由此得到标题化合物(524mg,48%)¹H NMR(CDCl₃,400MHz)δ1.48(s,9H),3.27(s,3H),3.40(d,3H,J=16.6),3.57-3.64(m,1H),3.84(d,1H,J=9.5),3.92(d,1H,J=16.3),4.07-4.25(m,1H),4.35-4.49(m,1H),4.98(bs,1H),5.22(d,1H,J=16.4),5.34(s,1H)。

[0293] 步骤g

[0294]

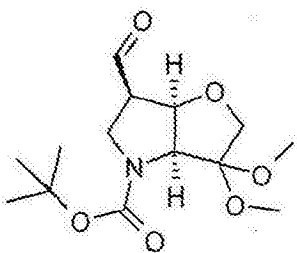
[0295] 6-羟甲基-3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸叔丁酯(1g)

[0296] 将烯炔1e(524mg, 1.84mmol)溶于无水THF(70mL)。加入9-BBN-H(0.5M, 在THF中)(7.34mL, 3.67mmol), 将溶液搅拌过夜。将溶剂通过旋转蒸发除去, 然后复溶于THF(20mL)。将MeOH(10mL)缓慢加入溶液中, 当气体逸出停止时, 将H₂O(20mL)加入溶液中, 然后加入NaBO₃。搅拌18小时后, 将溶液过滤, 然后将滤液用EtOAc(70mL)稀释, 用盐水(2*50mL)洗涤。将有机相用Na₂SO₄干燥, 过滤, 然后将溶剂真空蒸发。粗产物经快速层析(庚烷:乙酸乙酯2:1)纯化, 由此得到标题化合物(477mg, 86%)。

[0297] ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) δ1.47(s, 9H), 2.09-2.25(m, 2H), 3.02-3.20(m, 1H), 3.29(s, 3H), 3.39(s, 3H), 3.65-3.93(m, 4H), 4.44(d, 1H, J=5.7), 4.70-4.84(m, 1H)。

[0298] 步骤h

[0299]

[0300] 6-乙酰基-3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-甲酸叔丁酯(1h)

[0301] 向溶于无水DCM(10mL)的醇1g(370mg, 1.22mmol)溶液中加入戴斯-马丁氧化剂(673mg, 1.59mmol)。将反应物搅拌40分钟, 然后加入10mL 10% Na₂S₂O₃:NaHCO₃(饱和)1:1将反应淬灭。将溶液用DCM(50mL)稀释, 用1:1的10% Na₂S₂O₃:NaHCO₃(饱和)混合物(50mL)萃取。将有机相用Na₂SO₄干燥, 过滤, 蒸发。粗产物经快速层析(庚烷:乙酸乙酯(2:1)纯化, 由此得到标题化合物(290mg, 79%)。

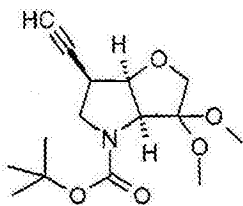
[0302] ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) δ1.47(s, 9H), 2.90-3.06(m, 1H), 3.29(s, 3H), 3.38(s, 3H), 3.67-3.85(m, 2H), 3.88-4.55(m, 3H), 4.93-5.19(m, 1H), 9.64*和9.80*(s, 1H)。

[0303] *因旋转异构体产生两个峰

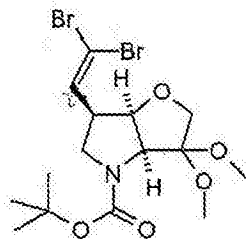
[0304] 参考实施例4

[0305] 6-乙炔P1结构单元

[0306]

[0307] 6-乙炔基-3,3-二甲氧基-六氢-呋喃并(3,2-b)吡咯-4-甲酸叔丁酯[0308] 步骤a)

[0309]

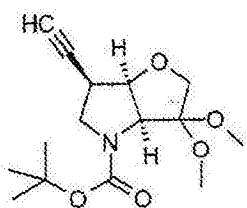


[0310] 在冰浴冷却下,将含参考实施例3的醛(318.3mg,1.06mmol)的6mL二氯甲烷(DCM)溶液滴加在含 CBr_4 (700mg,2.11mmol)和 PPh_3 (1.10g,4.19mmol)的10mL DCM溶液中。在 0°C 下搅拌2h后,将混合物用30mL异己烷稀释,然后通过短硅藻土柱过滤。将柱依次用20mL异己烷、3/1异己烷-DCM洗涤。将滤液蒸发,得到浅黄色固体。经快速层析(二氧化硅,3/1异己烷-EtOAc)纯化,得到化合物2(339.5mg,70%收率)。

[0311] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 6.55(d,1H, $J=8.8\text{Hz}$, $\text{HC}=\text{CBr}_2$),4.64(br s,1H),4.42(d,1H, $J=5.2\text{Hz}$),4.10-3.90(br m,1H),3.85-3.65(m,2H),3.37(s,3H,OMe),3.29(s,3H,OMe),3.00(m,1H),2.84(br s,1H)。

[0312] 步骤b)

[0313]



[0314] 在 -78°C 下,将丁基锂溶液(1.6M,在己烷中,1.50mL)滴加到含步骤a的二溴烯烃(327.5mg,0.72mmol)的13mL THF溶液。在 -78°C 下搅拌1.75h后,将反应用饱和 NH_4Cl 水溶液淬灭。将反应混合物浓缩,然后在30mL饱和NaCl水溶液和30mL EtOAc之间分配。将水相用 $2 \times 30\text{mL}$ EtOAc萃取。将有机相合并,干燥(Na_2SO_4)并蒸发,得到黄色油状物。经快速层析(二氧化硅,3/1异己烷-EtOAc)纯化,得到标题化合物,其为白色固体(161.7mg,67%收率)。

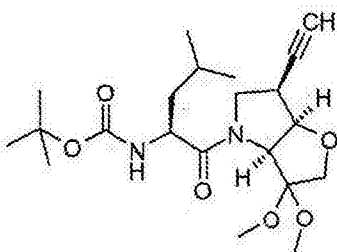
[0315] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 4.67(br s,1H),4.40(br s,1H),4.16-4.0(br m,1H),3.88-3.74(m,2H),3.37(s,3H,OMe),3.29(s,3H,OMe),3.16(br s,1H),2.81(br s,1H, $\text{HC}\equiv\text{CH}$),2.20(d,1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$),1.47(s,9H,tBu)。

[0316] 参考实施例5

[0317] 典型的P1/P2偶联和脱保护

[0318] 步骤a)

[0319]



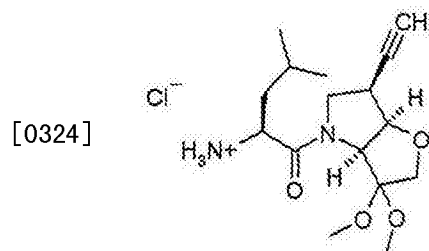
[0320] 在冰浴冷却下,将乙酰氯(0.51mL)滴加到含参考实施例4的最终产物炔(153mg,0.514mmol)的MeOH(4.6mL)溶液中。将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后蒸发。加入Boc-Leu-OH- H_2O (145mg,0.58mmol),将混合物从DMF中共蒸发,然后复溶于5mL DMF,在冰浴中冷

却。依次加入DIEA(0.36mL, 2.1mmol)、HATU(220mg, 0.578mmol)。在0℃下搅拌15分钟后,将混合物在室温下搅拌3h,然后浓缩。将混合物溶于20mLEtOAc,依次用饱和NaHCO₃水溶液(10mL)和饱和NaCl水溶液(2×10mL)洗涤,干燥(Na₂SO₄),蒸发,得到黄褐色油状物。经快速层析(二氧化硅,1/1异己烷-EtOAc)纯化,得到标题化合物(213mg, 定量)。

[0321] HPLC-MS:单峰,质量411[M+H]⁺, R_t=3.15分钟(梯度5-99%B洗脱3分钟,然后100%B洗脱1.5分钟)

[0322] 方法-流速:0.8mL/min, UV=210-400nm, ACE C83×50mm;流动相A:含10mM NH₄Ac的90%H₂O, B:含10mM NH₄Ac的90%MeCN

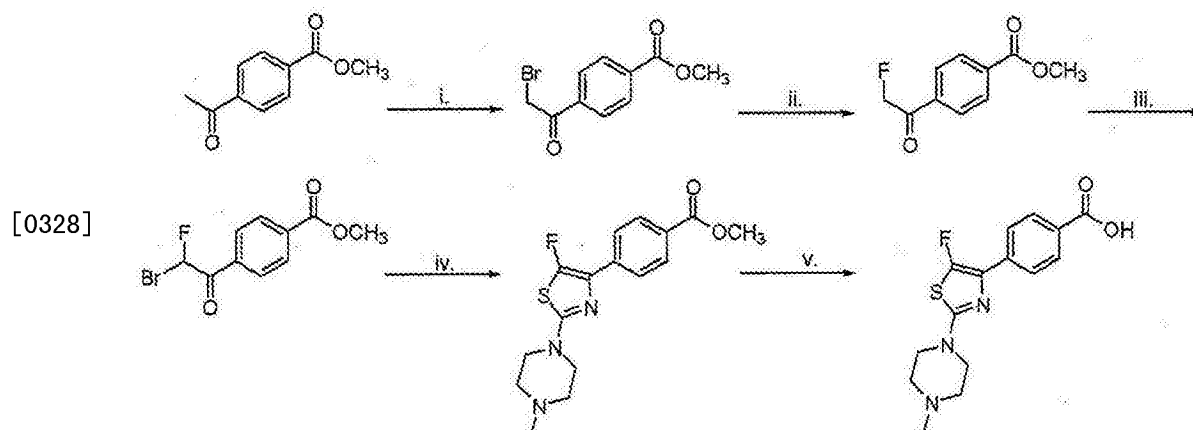
[0323] 步骤b)



[0325] 按以上参考实施例4方法,将步骤a)化合物(0.514mmol)的Boc脱去,得到标题HCl盐。将该盐溶于CH₂Cl₂,然后将得到的溶液分为三部分,分别蒸发,每份样品得到0.17mmol。

[0326] 参考实施例6

[0327] 备选P3结构单元

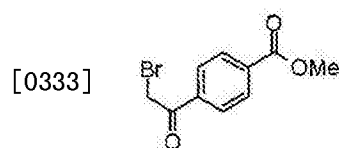


[0329] i. AcOH, 溴, RT, 2h, 55%收率; ii. KF, 乙腈, 18-冠-6, 90℃, 16h; 31%收率; iii. AcOH, 溴, 45℃, 4h, 100%收率; iv. 4-甲基-哌嗪-1-硫代甲酰胺, Δ, 2h, 74%收率; LiOH, RT, 16h, 100%收率

[0330] 原料来源-

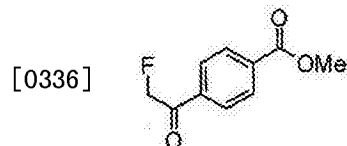
[0331] 4-乙酰基苯甲酸甲酯可从Aldrich得到;在SciFinder中找到4-甲基-哌嗪-1-硫代甲酰胺-11个供应商(德国的Chem Pur Products Ltd可能最方便)

[0332] 步骤a)4-(2-溴-乙酰基)-苯甲酸甲酯



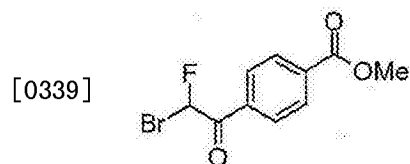
[0334] 向含4-乙酰基-苯甲酸甲酯(8.4mmol)的乙酸(20mL)溶液中加入溴(8.4mmol)。将反应物在室温下搅拌2h,在此期间,红色消失,形成灰白色沉淀。将产物通过过滤收集,并用冷甲醇/水(200mL1:1)洗涤,得到白色粉末(55%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) 3.98(3H, s), 4.20(2H, s), 8.02(2H, d, J=8Hz), 8.18(2H, d, J=8Hz)。

[0335] 步骤b) 4-(2-氟-乙酰基)-苯甲酸甲酯



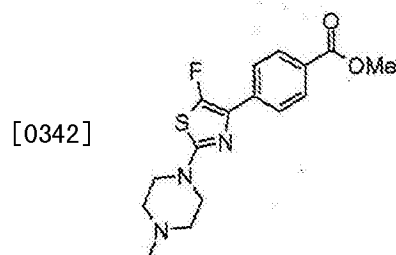
[0337] 向含氟化钾(3.11mmol)的乙腈(1mL)悬浮液中加入18-冠-6(0.1mmol),将反应物在90℃下加热30分钟。加入4-(2-溴-乙酰基)-苯甲酸(1.56mmol),将反应物在90℃下加热16h。将反应物用水(10mL)稀释,用乙酸乙酯(3×20mL)萃取。将产物在二氧化硅上用5-15%乙酸乙酯/异己烷洗脱来纯化,将需要的流分真空浓缩,得到标题产物,为白色固体(31%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) 3.98(3H, s), 5.55(2H, d, J=50Hz), 7.95(2H, d, J=8Hz), 8.18(2H, d, J=8Hz)。

[0338] 步骤c) 4-(2-溴-2-氟-乙酰基)-苯甲酸甲酯



[0340] 向含4-(2-氟-乙酰基)-苯甲酸(1.19mmol)的乙酸(5mL)悬浮液中加入溴(1.19mmol)。将反应物在45℃下加热4h,在此期间形成绿色溶液。将反应物真空浓缩,与甲苯共沸蒸馏两次,得到标题化合物,为绿色固体(100%)。将该粗产物用于下一步。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) 3.98(3H, s), 7.04(1H, s), 8.05-8.10(4H, m)。

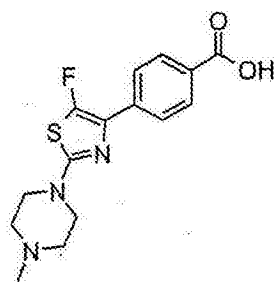
[0341] 步骤d) 4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酸甲酯



[0343] 将4-(2-溴-2-氟-乙酰基)-苯甲酸甲酯(1.18mmol)和4-甲基-哌嗪-1-硫代甲酰胺(1.18mmol)溶于乙醇(10mL)。将反应物加热回流2h。将反应物冷却至室温,造成产物沉淀。将产物通过过滤收集,并用冷乙醇洗涤。使产物经碳酸氢钠水溶液后处理,得到标题化合物,为无色油状物(74%)。MS(ES⁺) 337(M+H, 100%)。

[0344] 步骤f) 4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酸二盐酸盐

[0345]

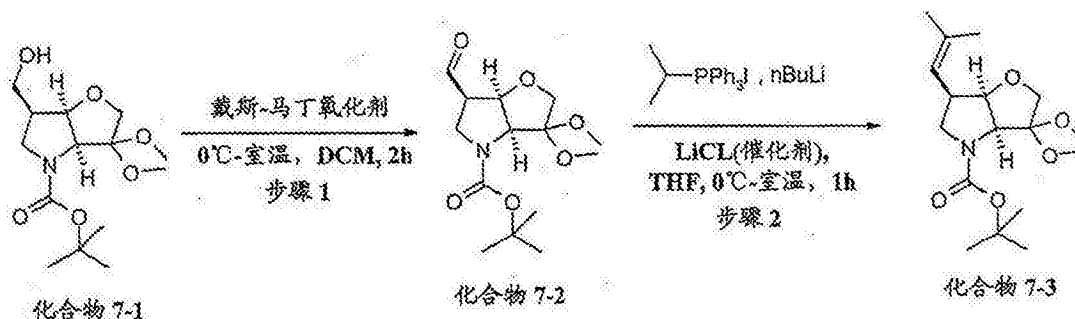


[0346] 向含4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酸甲酯(0.43mmol)的四氢呋喃/水(2.5ml, 4:1)溶液中加入氢氧化锂(0.5mmol)。将反应物在室温下搅拌16h。将反应物真空浓缩,加入盐酸(2N, 3ml),造成产物沉淀,其为白色固体。将产物通过过滤收集,得到标题产物,为白色固体(79%)。MS(ES⁺)322(M+H, 100%)。

[0347] 参考实施例7

[0348] 备选P1结构单元

[0349]



[0350] 步骤a)醇7-1的氧化

[0351] 向含化合物7-1(0.85g, 2.8mmol)(参见参考实施例3步骤g)的无水CH₂Cl₂(15ml)溶液吹扫氩气30分钟。在0℃下加入戴斯-马丁氧化剂(1.78g, 4.2mmol),然后将反应混合物在室温下搅拌2小时。当确认反应完成后,将反应用10%Na₂S₂O₃溶液淬灭。将反应混合物用CH₂Cl₂(30ml)稀释,然后依次用饱和Na₂S₂O₃溶液(2×50ml)、饱和碳酸氢钠溶液(2×50ml)洗涤。然后将有机层经无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液在室温下真空干燥。粗产物醛7-2(0.75g, 粗品)用于下一步,无需进一步纯化。

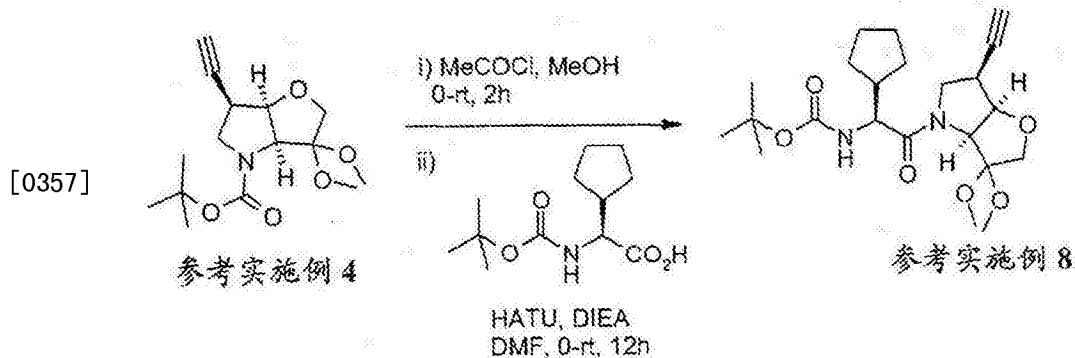
[0352] TLC:EtOAc:石油醚1:1R_f=0.5。

[0353] 步骤b)与化合物7-2的维蒂希反应

[0354] 在-10℃和氮气氛下,向含碘化异丙基三苯基磷盐(6.48g, 0.015mol)(在反应开始前与无水甲苯共蒸发)的无水THF(20mL)的经搅拌溶液中加入n-BuLi溶液(10.7mL, 0.0172mol, 1.6M, 在己烷中),然后在0℃下再搅拌1小时。反应混合物的颜色缓慢变为暗橙色。在0℃和氮气氛下,将含化合物2(0.75g, 0.0025mol)和无水氯化锂(约1.5mg)的无水THF(20mL)溶液缓慢加入反应混合物中。在保持在所述温度下,将反应混合物再搅拌30分钟,然后缓慢升温至室温,再搅拌30分钟。然后将反应混合物用饱和氯化铵溶液(20mL)淬灭。将粗产物用EtOAc(2×30mL)萃取,将有机层用盐水(50mL)洗涤,并经无水硫酸钠干燥。将溶剂真空除去,粗产物经柱层析(中性氧化铝, 1%EtOAc/石油醚洗脱液)纯化,得到纯化合物7.3(0.19g, 两步合计收率21%)。

[0355] 参考实施例8

[0356] 备选P1-P2结构单元

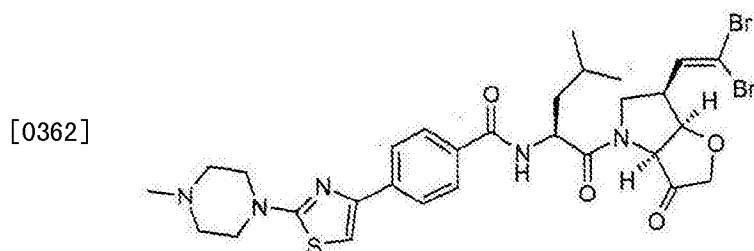


[0358] 按与参考实施例5中所述相似方法进行初始反应,但用含4(0.2g,0.67mmol)的无水MeOH(15mL)和乙酰氯(0.66mL)代替,得到脱去Boc的胺化合物,然后用含Boc-环戊基甘氨酸(0.17g,0.7mmol)、HATU(0.27g,0.7mmol)和DIEA(0.45mL,.2.6mmol)的无水DMF(7mL)溶液处理,得到纯的标题化合物[0.195g,收率68%]。

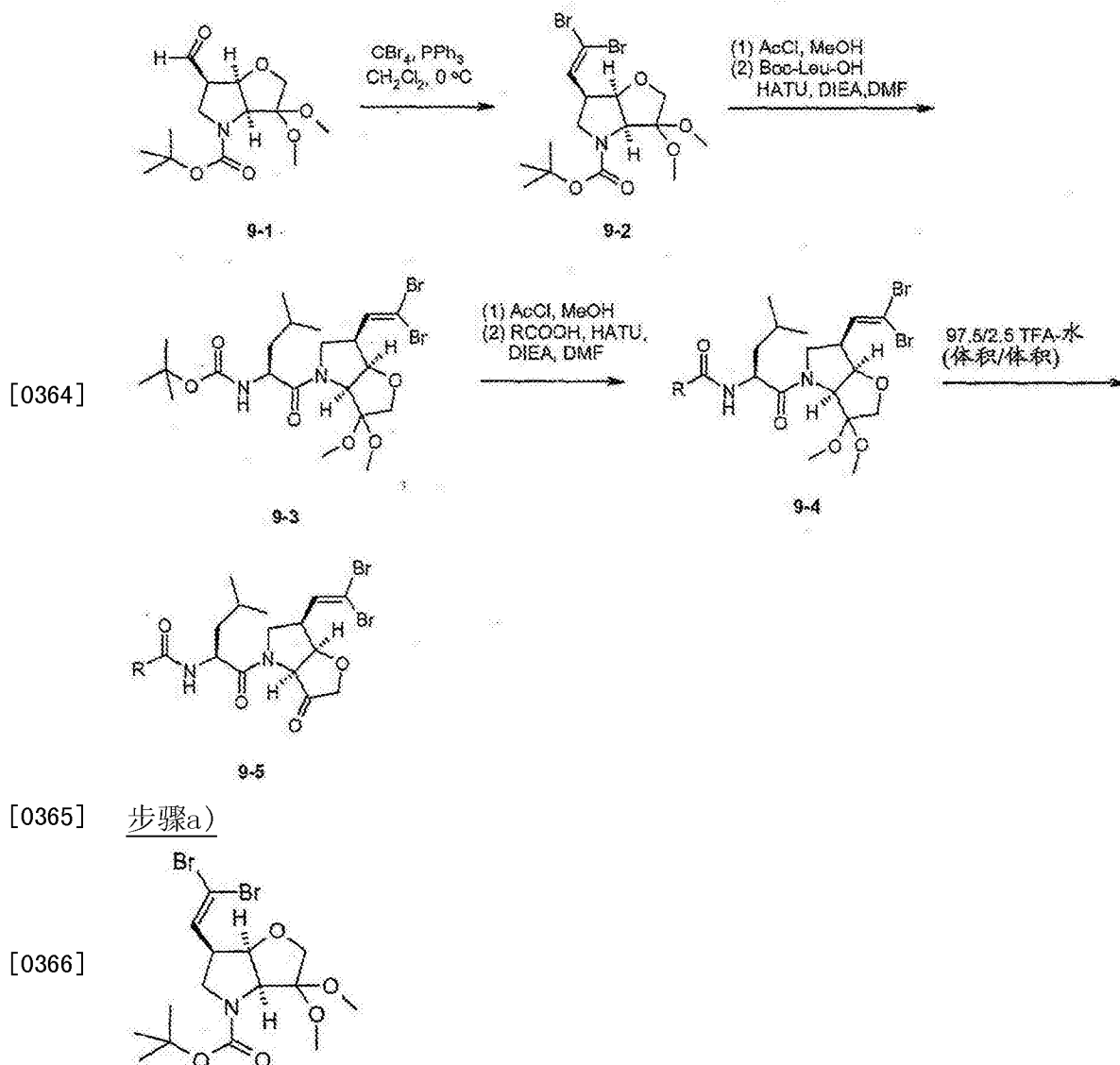
[0359] TLC系统:EtOAc:石油醚1:1体积/体积, $R_f=0.4$

[0360] 参考实施例9

[0361] 用于二卤代乙烯基P1可行性的探测化合物



[0363] 该化合物测试二卤代乙烯基P1终产物的合成可行性和生物学可行性。理解的是,通过参考实施例3的相应维蒂希反应引入6-二氟乙烯基意义不大,以及生物活性终产物的制备对以下提供确认:要求保护的二氟乙烯基化合物在合成上也是稳定的并且具有活性。



[0367] 在冰浴冷却下,将含醛9-1(318.3mg,1.06mmol)(参见参考实施例3)的6mL二氯甲烷(DCM)溶液滴加到含 CBr_4 (700mg,2.11mmol)和 PPh_3 (1.10g,4.19mmol)的10mL DCM溶液中。在 0°C 下搅拌2h后,将混合物用30mL异己烷稀释,然后通过短硅藻土柱过滤。将柱依次用20mL异己烷、3/1异己烷-DCM洗涤。将滤液真空浓缩,得到浅黄色固体。经快速层析(二氧化硅,3/1异己烷-EtOAc)纯化,得到化合物9-2(339.5mg,70%收率)。

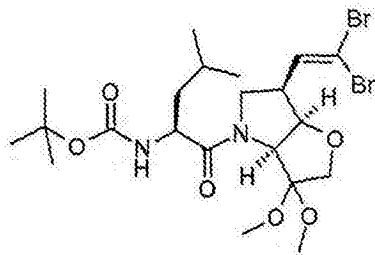
[0368] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 6.55(d,1H, $J=8.8\text{Hz}$, $\text{HC}=\text{CBr}_2$),4.64(brs,1H),4.42(d,1H, $J=5.2\text{Hz}$),4.10-3.90(br m,1H),3.85-3.65(m,2H),3.37(s,3H,OMe),3.29(s,3H,OMe),3.00(m,1H),2.84(br s,1H)。

[0369] R_f (TLC1/1异己烷-EtOAc)0.79。

[0370] HPLC-MS:离子束 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 478(8%),480(15%),482(7%), $R_t=3.56$ 分钟(梯度5-99%B洗脱3min,然后100%B洗脱1.5min)

[0371] 步骤b)

[0372]



[0373] 在冰浴冷却下,将乙酰氯(0.18mL)滴加到含二溴烯9-2(81.7mg,0.179mmol)的MeOH(1.62mL)溶液中。将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后蒸发。加入Boc-Leu-OH-H₂O(50mg,0.20mmol)、HATU(75mg,0.20mmol)、1.8mL DMF,最后加入DIEA(125μL,0.72mmol)。在室温下搅拌5.5h后,将混合物真空浓缩,然后在EtOAc和饱和NaHCO₃水溶液之间分配。将有机相用饱和NaCl水溶液洗涤两次,干燥(Na₂SO₄),真空浓缩。经快速层析(二氧化硅,3/1异己烷-EtOAc)纯化,得到化合物9-3,为白色固体(86.3mg,85%收率)。

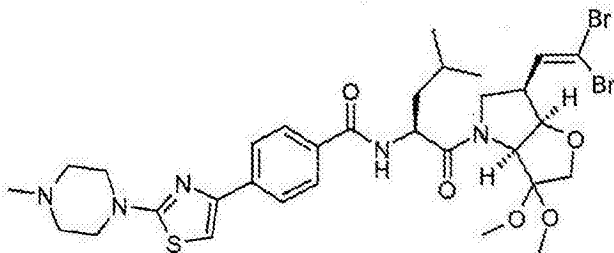
[0374] R_f(TLC1/1异己烷-EtOAc)0.54。

[0375] HPLC-MS: 质量571[M+H]⁺; R_t=3.75分钟96%(梯度5-99%B洗脱3min,然后100%B洗脱1.5min)

[0376] 方法-流速:0.8mL/min,UV=210-400nm,ACE C83×50mm;流动相A:含10mM NH₄Ac的90%H₂O,B:含10mMNH₄Ac的90%MeCN

[0377] 步骤c)

[0378]

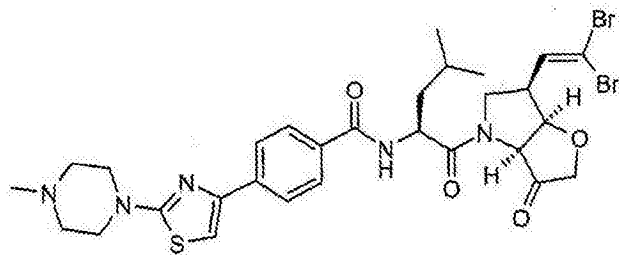


[0379] 按用于以上9-2的方法,将化合物9-3(86.3mg,0.15mmol)脱去Boc,得到胺HCl盐。在冰浴冷却下,将DMF(1.5mL)加入胺盐4-[2-(4-甲基-1-哌嗪基)-4-噻唑基]-苯甲酸氢溴酸盐(65mg,0.17mmol)和HATU(65mg,0.17mmol)的混合物中。加入DIEA(120μL,0.69mmol)。在室温下搅拌3h后,加入20mL EtOAc,然后将混合物依次用1MNaHCO₃(10mL)、饱和NaCl水溶液洗涤。将有机相干燥(Na₂SO₄)并真空浓缩,得到粗产物。经快速层析(二氧化硅,CH₂Cl₂-MeOH100/1-100/4)纯化,得到需要的产物,为浅黄色固体(65.7mg,58%收率)。

[0380] 用)LC-MS: 质量756[M+H]⁺; R_t=3.83min(5-99%B洗脱3min,然后100%B洗脱1.5min),和R_t=4.07min(30-80%B洗脱3min,然后100%B洗脱1.5min),在两种梯度中为96%纯。

[0381] 步骤d)

[0382]



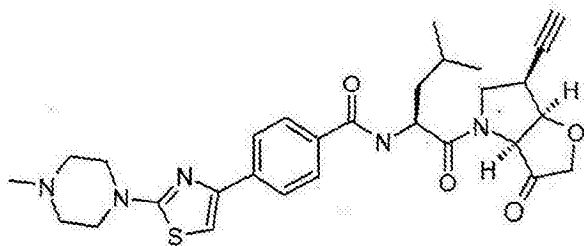
[0383] 将缩酮9-4(65.7mg, 0.087mmol)与1.0mL 97.5/2.5(体积/体积)TFA-H₂O搅拌4小时20分钟,然后用NaHCO₃水性悬浮液淬灭。将混合物用EtOAc萃取。将有机相用饱和NaCl水溶液洗涤,干燥(Na₂SO₄),并真空浓缩。经制备HPLC纯化,得到酮9-5,为白色固体(12mg)。

[0384] ¹H NMR(500MHz, CDCl₃) 2个旋转异构体,主要的: δ7.90和7.81(ABq, 4H, 苯基), 6.91-6.87(2H 噻唑和NH), 6.67(d, 1H, HC=CBr₂), 5.05(td, 1H, LeuCHa), 4.85(m, 1H, 双环桥HCO), 4.74(d, 1H, 双环桥HCN), 4.32和3.42(各为1H, 双环NCH₂), 4.18和4.00(ABq, 2H, OCH₂), 3.59(4H, 哌嗪CH₂N-噻唑), 3.25(1H, Br₂C=CH-CH), 2.56(4N, 哌嗪CH₂NMe), 2.37(s, 3H, NMe), 1.80-1.54(d, 3H, CH₂CHMe₂), 1.04(d, 3H, CHMe₂), 0.94(d, 3H, CHMe₂),

[0385] LC-UV/MS: 单种同位素分子质量709.1Da, >94%纯度(柱: ACE C₈50×3.0mm, 3μm颗粒; 流动相A: 10mMNH₄Ac, B: 含10mMNH₄Ac的90%MeCN; 梯度: 30-70%B洗脱10min, 然后用100%B洗脱2min; 流速: 0.8mL/min, 检测: UV210-400nm和ESI-MS)

[0386] 实施例1

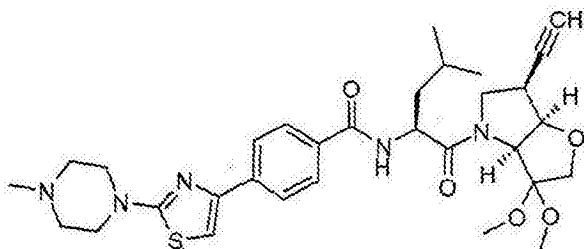
[0387]



[0388] N-[1-6-(乙炔基-3-氧代-六氢-咪喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)噻唑-4-基]-苯甲酰胺

[0389] 步骤a)

[0390]



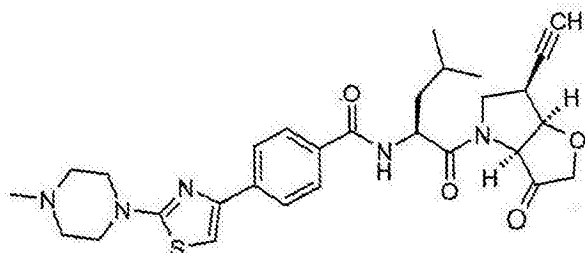
[0391] 在冰浴冷却下,将DMF(2ml)加入4-[2-(4-甲基-1-哌嗪基)-4-噻唑基]-苯甲酸氢溴酸盐(73.9mg, 0.19mmol)、参考实施例5的化合物(0.17mmol)和HATU(73.4mg, 0.19mmol)的混合物中。加入DIEA(0.12ml, 0.69mmol)。在室温下搅拌2.5h后,将混合物浓缩,复溶于20ml EtOAc,然后用10ml饱和NaHCO₃水溶液洗涤。将水相用10ml EtOAc萃取。将有机相合并,用饱和NaCl水溶液(2×15ml)洗涤,干燥(Na₂SO₄),并蒸发,得到粗产物。经初始快速层析(二氧化硅40-63μm, 含5-8%MeOH的EtOAc)纯化,得到纯化物,然后使其经历第二次层析(YMC硅胶6nmS-50μm, 含1-5%MeOH的CH₂Cl₂)纯化,得到标题化合物,为浅黄色固体(50.1mg, 49%收

率)。

[0392] HPLC-MS: 质量596[M+H]⁺, 单峰, R^t=3.18min(梯度5-99%B洗脱3min, 然后100%B洗脱1.5min)

[0393] 步骤b)

[0394]

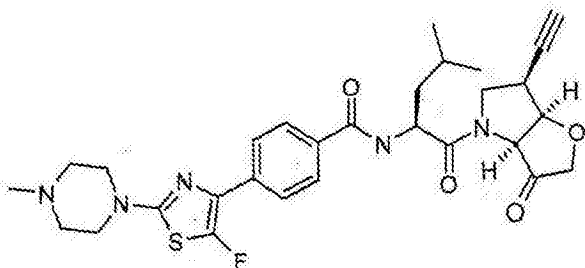


[0395] 将步骤a)的化合物(50mg, 0.0839mmol)溶于10mL TFA:H₂O(97.5:2.5), 搅拌4小时。将溶剂倾入分液漏斗, 用EtOAc萃取, 用饱和NaHCO₃水溶液洗涤。将有机相用Na₂SO₄干燥, 过滤, 蒸发。将粗产物通过半制备HPLC在XBridgPhenyl15μm柱上, 用流动相A(90:10H₂O:乙腈, 10mM NH₄Ac)和25-60%B(10:90H₂O:乙腈, 10mMNH₄Ac)洗脱来纯化。得到作为白色固体的产物, 62%收率(29mg)。LRMS(M+H)550。

[0396] ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 0.95(d, J=6.4, 3H), 1.03(d, J=6.4, 3H), 1.57-2.10(m, 4H), 2.37(s, 3H), 2.60-2.54(m, 4H), 3.17-3.26(m, 1H), 3.55-3.64(m, 5H), 4.07(d, J=17.1, 1H), 4.27(d, J=17.2, 1H), 4.50(dd, J=7.8, 9.9, 1H), 4.77(d, J=5.1, 1H), 4.91(dd, J=4.6, 4.6, 1H), 4.97-5.06(m, 1H), 6.85-6.91(m, 2H), 7.79(d, J=8.3, 2H), 7.89(d, J=8.4, 3H)。

[0397] 实施例2

[0398]

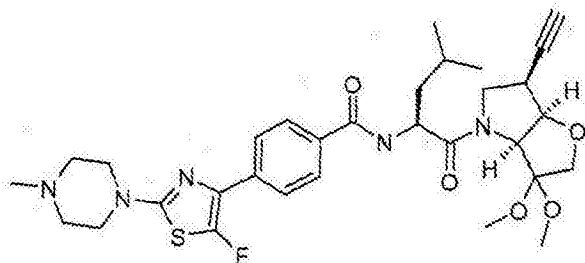


[0399] N-[1-6-(乙炔基-3-氧代-六氢-咪喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁

[0400] 基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)噻唑-4-基]-苯甲酰胺

[0401] 步骤a)

[0402]



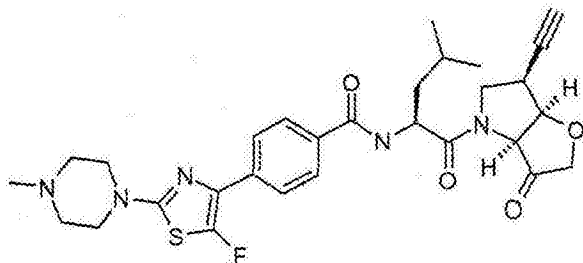
[0403] 在冰浴冷却下, 将DMF(1.7ml)加入4-[5-氟-2-(4-甲基-1-哌嗪基)-4-噻唑基]-苯甲酸盐酸盐(68.0mg, 0.19mmol)、参考实施例5的化合物(0.17mmol)和HATU(73.8mg, 0.19mmol)的混合物中。加入DIEA(0.12ml, 0.69mmol)。在室温下搅拌2.75h后, 按实施例1方

法处理混合物,得到粗氟噻唑类似物。经快速层析(YMC硅胶,含1-3%MeOH的CH₂Cl₂)纯化,得到标题化合物,为浅黄色固体(62.8mg,60%收率)。

[0404] HPLC-MS:质量614[M+H]⁺,在UV上为单峰,R_t=3.39min(梯度5-99%B洗脱3min,然后100%B洗脱1.5min)

[0405] 步骤b)

[0406]

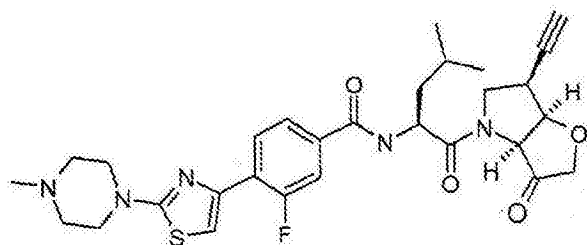


[0407] 将步骤a)的化合物(63mg,0.102mmol)溶于10ml TFA:H₂O(97.5:2.5),并搅拌4小时。将溶剂倾入分液漏斗,用EtOAc萃取,然后用饱和NaHCO₃(水溶液)洗涤。将有机相用Na₂SO₄干燥,过滤,蒸发。粗产物经半制备HPLC,在XBridge Phenyl5μm柱上,用流动相A(90:10H₂O:乙腈,10mM NH₄Ac)和25-60%B(10:90H₂O:乙腈,10mM NH₄Ac)洗脱来纯化。得到作为白色固体的产物,收率46%(26mg)。LRMS(M+H)568。

[0408] ¹H NMR(CDCl₃,400MHz):0.95(d,J=6.4,3H),1.03(d,J=6.4,3H),1.58-2.15(m,4H),2.37(s,3H),2.61-2.48(m,4H),3.18-3.25(m,1H),3.53-3.42(m,4H),3.60(t,J=10.5,1H),4.07(d,J=17.1,1H),4.27(d,J=17.2,1H),4.56-4.46(m,1H),4.91(t,J=4.5,1H),4.96-5.06(m,1H),6.87(d,J=8.2,1H),7.81(d,J=8.4,2H),7.90(t,J=9.4,2H)。

[0409] 实施例3

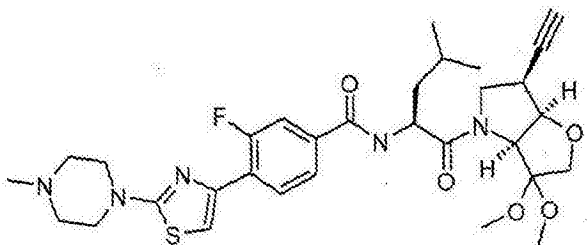
[0410]



[0411] N-[1-6-(乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-3-氟-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)噻唑-4-基]-苯甲酰胺

[0412] 步骤a)

[0413]



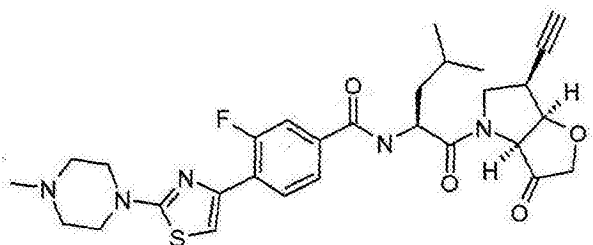
[0414] 在冰浴冷却下,将DMF(1.7ml)加入3-氟-4-[2-(4-甲基-1-哌嗪基)-4-噻唑基]-苯甲酸盐酸盐(68.9mg,0.19mmol)、参考实施例5的化合物(0.17mmol)和HATU(80mg,0.21mmol)的混合物中。加入DIEA(0.12ml,0.69mmol)。在室温下搅拌3h后,将混合物浓缩,

复溶于30ml EtOAc中,依次用15ml饱和NaHCO₃水溶液、30ml饱和NaCl水溶液洗涤。将有机相干燥(Na₂SO₄),然后蒸发。经快速层析(YMC硅胶,含1-3%MeOH的CH₂Cl₂)纯化,得到标题化合物,为灰白色固体(724mg,70%收率)。

[0415] HPLC-MS:质量614[M+H]⁺,R_t=3.46min(梯度5-99%B洗脱3min,然后100%B洗脱1.5min)

[0416] 步骤b)

[0417]



[0418] 将步骤a)的缩酮(67mg,0.11mmol)与1.10mL97.5/2.5(体积/体积)TFA-H₂O一起搅拌2h,然后浓缩。将混合物用EtOAc(10mL)稀释,依次用饱和NaHCO₃水溶液(5mL)、饱和NaCl水溶液(2×5mL)洗涤,干燥(Na₂SO₄),蒸发。将粗产物溶于2mL MeCN和1mL H₂O中,将0.9mL该溶液经制备HPLC纯化,得到标题化合物酮,为白色固体(8.2mg)。

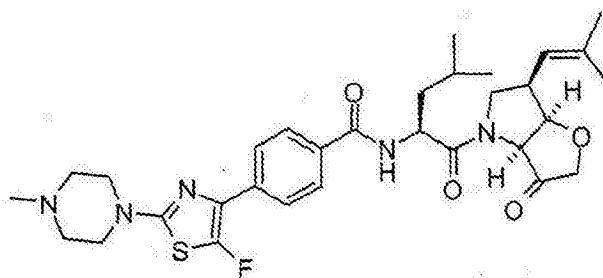
[0419] ¹H NMR(500MHz,CDCl₃)2个旋转异构体δ8.22(m,1H,Ph),7.63-7.55(m,2H,Ph),7.21(m,1H,噻唑),主要的6.91和次要的6.87(d,1H,J=8.0和7.5Hz,NHC=O),次要的5.05和主要的5.00(m,1H),4.93(m,1H),4.79(d,1H,J=5.0Hz),4.48(dd,1H,J=10.2,7.7Hz),4.28和4.09(ABq,各为1H),3.64-3.59(m,5H),3.23(m,1H,HC-C≡CH),2.58(m,4H),2.38(s,3H,NMe),2.35(d,1H,J=2.0Hz,C≡CH),1.78-1.59(m,3H),1.04(d,3H,J=6.0Hz),0.96(d,3H,J=6.5Hz)。

[0420] LC-UV/MS:单种同位素分子质量567.2Da,97.6%纯度(柱:ACE C₈50×3.0mm,3μm颗粒;流动相A:10mM NH₄Ac,B:含10mM NH₄Ac的90%MeCN;梯度:20-100%B洗脱10min,然后用100%B洗脱2min;流速:0.8mL/min,检测:UV210-400nm和FSI-MS)

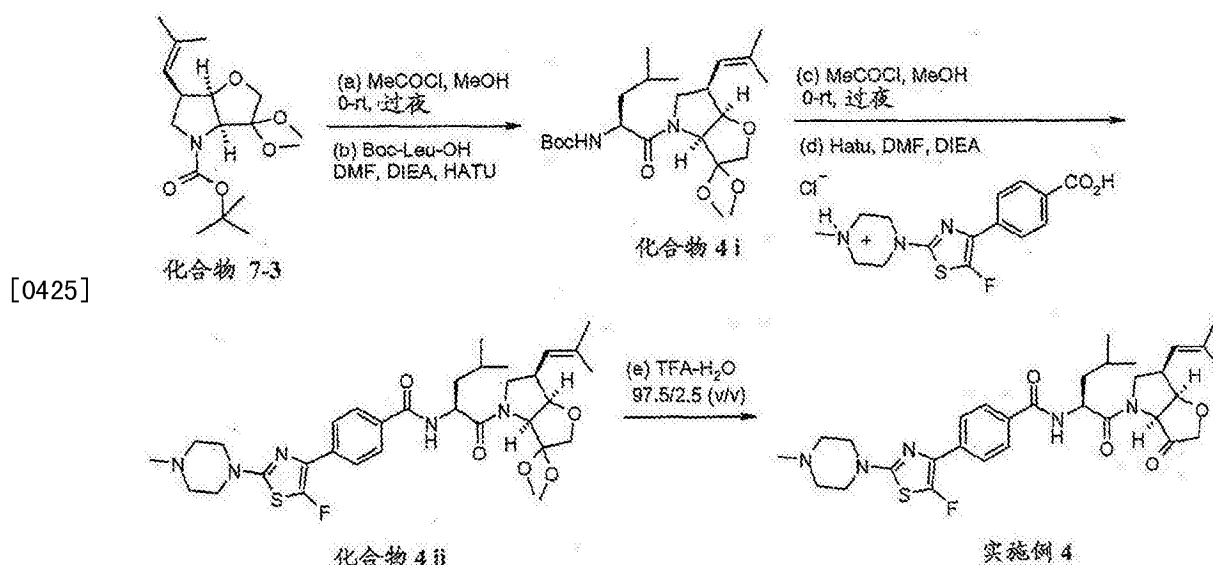
[0421] 实施例4

[0422] N-[1-6-(二甲基乙烯基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-羰基)-3-甲基-丁基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)噻唑-4-基]-苯甲酰胺

[0423]



[0424] 反应流程:



[0426] 将乙酰氯(0.3mL)滴加到含化合物7-3(103.4mg, 0.316mmol)(参见参考实施例7)的甲醇(2.9mL)冰冷溶液中。将溶液在室温下搅拌过夜,然后真空浓缩,用CH₂Cl₂共蒸发两次,然后真空干燥。加入Boc-L-亮氨酸-H₂O(96.2mg, 0.386mmol)和HATU(143mg, 0.376mmol),然后将混合物在冰浴中冷却。依次加入DMF(3.2mL)、DIEA(220μL, 1.26mmol)。将得到的溶液在室温下搅拌6h。将反应混合物真空浓缩,再溶于EtOAc(15mL),然后依次用饱和NaHCO₃水溶液(10mL)和饱和NaCl水溶液(10mL)洗涤。将有机相干燥(Na₂SO₄),然后真空浓缩,得到粗物质。经快速柱层析(二氧化硅, 2/1异己烷-EtOAc)纯化,得到化合物4-i,为白色固体(127.8mg, 92%收率)。

[0427] TLC R_f=0.56(1/1异己烷-EtOAc)

[0428] LC-UV/MS Rt=1.98min(单峰),质量441[M+H]⁺(梯度70-99%B洗脱3min,然后100%B洗脱1.5min(方法-流速0.8mL/min,UV=210-400nm,Phenomenex Gemini-NX3μmC18110Å50×3.0mm,流动相A:含10mM NH₄Ac的H₂O,B:含10mM NH₄Ac的90/10MeCN-H₂O))

[0429] 按以上方法,用MeOH(2.7mL)和乙酰氯(0.30mL)将化合物4-i(127.8mg, 0.290mmol)脱保护。按类似于Boc-Leu-OH的偶联步骤,在含HATU(69mg, 0.18mmol)和DIEA(115μL, 0.66mmol)的DMF(2.0mL)中持续3.5h,实现得到的胺HCl盐(一半物质, 0.145mmol)与4-[5-氟-2-(4-甲基-1-哌嗪基)-4-噻唑基]-苯甲酸盐(674mg, 0.19mmol)的偶联。粗产物经快速柱层析(二氧化硅, 含2-5%MeOH的CH₂Cl₂)纯化,得到化合物4-ii,为浅黄色固体(48.3mg, 52%收率)。

[0430] TLC R_f=0.5(9/1CH₂Cl₂-MeOH)

[0431] LC-UV/MS Rt=2.41min, 95q%纯,质量644[M+H]⁺(梯度70-99%B洗脱3min,然后100%B洗脱1.5min)

[0432] 向含缩酮4-ii(41.3mg, 0.064mmol)的CH₂Cl₂(0.3mL)冰冷溶液中滴加0.65mL TFA-水(97.5/2.5体积/体积)溶液。将反应混合物在室温下搅拌30分钟,然后换入冰浴中,并用饱和NaHCO₃水溶液(10mL)淬灭。将混合物用EtOAc(20mL, 10mL)萃取两次。将有机相合并,用饱和NaCl水溶液(10mL)洗涤,干燥(Na₂SO₄),真空浓缩。经制备HPLC纯化,得到终标题化合物。

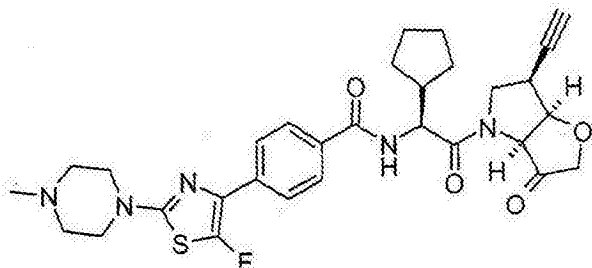
[0433] LC-UV/MS Rt=6.5和7.5min(水合物和酮), 98%纯,单种同位素分子质量597.3Da

(方法-流速0.8mL/min;UV=210-400nm,和ESI-MS;Phenomenex Gemini-NX C1850×3.0mm, 3μm颗粒;流动相A:含5mM NH₄Ac的H₂O,B:含5mM NH₄Ac的MeCN,梯度20-99%B洗脱10min,然后用100%B洗脱2min)

[0434] 实施例5

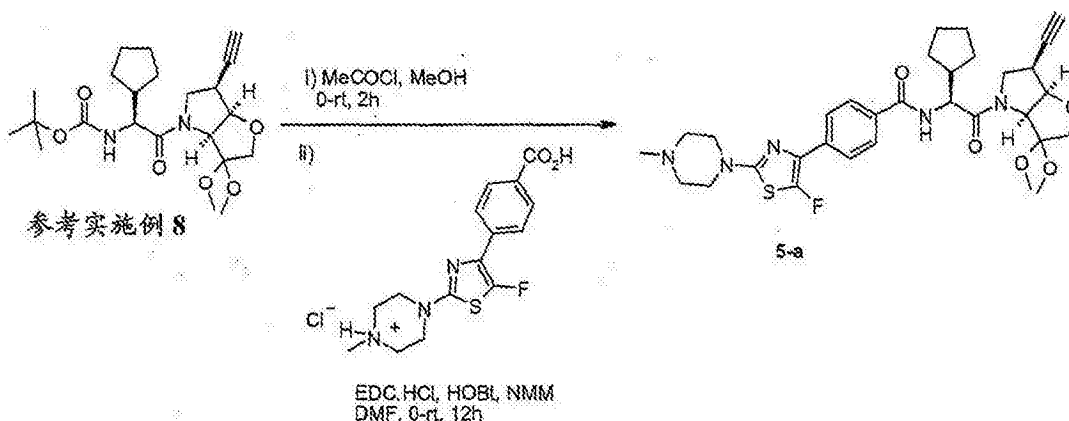
[0435] N-[1-(6-乙炔基-3-氧代-六氢-呋喃并[3,2-b]吡咯-4-基)-1-环戊基-2-氧代-乙基]-4-[5-氟-2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑-4-基]-苯甲酰胺

[0436]



[0437] 步骤a)

[0438]

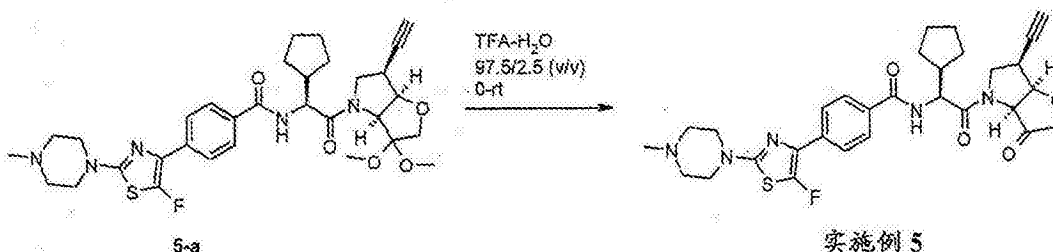


[0439] 按类似于实施例3中所述方法进行反应,但使用含参考实施例8的P1-P2结构单元(0.14g,0.33mmol)的无水MeOH(15ml)溶液,并用乙酰氯(0.5ml)得到脱去Boc的胺,将该胺进一步用含HCl盐(0.132g,0.33mmol)、HOBT(0.04g,0.3mmol)、EDC·HCl(0.117g,0.61mmol)和NMM(0.11ml,1.0mmol)的无水DMF(10ml)溶液处理,得到纯化合物5-a[0.05g,收率26%]。

[0440] TLC系统:CHCl₃:MeOH9.5:0.5体积/体积,R_f=0.25.

[0441] 步骤b)

[0442]



[0443] 按化合物3中所述方法,用0.65ml TFA-水溶液,在室温下反应2小时15分钟,将缩酮5-a(40.5mg,0.065mmol)脱保护,得到标题酮。经制备HPLC纯化,得到11,为浅黄色固体(14.75mg)。

[0444] LC-UV/MS R_t=5.3和6.0min,(水合物和酮),96.7%纯,单种同位素分子质量

579.2Da(方法-流速0.8mL/min;UV=210-400nm和ESI-MS;Phenomenex Gemini-NX C1850×3.0mm,3μm颗粒;流动相A:5mM NH₄Ac,B:含5mM NH₄Ac的MeCN,梯度20-99%B洗脱10min,然后用100%B洗脱2min)

[0445] 生物学实施例

[0446] 组织蛋白酶K的蛋白水解催化活性的测定

[0447] 用人重组酶例如PDB中所述的酶进行组织蛋白酶K的适宜测定。

[0448] IDBC016058标准品;mRNA;HUM;1699BP

[0449] DE人组织蛋白酶K(致密性骨发育不全(pycnodysostosis)),mRNA(cDNA克隆MGC:23107

[0450] RX MFDLINE;.RX PUBMED;12477932

[0451] DR RZPD;IRALp962G1234

[0452] DR SWISS-PROT;P43235;

[0453] 可在多种市售表达系统中表达重组组织蛋白酶K,此类表达系统包括大肠杆菌(E coli)、毕赤酵母属(Pichia)和杆状病毒系统。通过常规方法将前序列(prosequence)除去,从而活化经纯化的酶。

[0454] 测定动力学常数的标准测定条件使用荧光肽底物,通常为H-D-Ala-Leu-Lys-AMC,并且在以下溶液中测定:在含1mM EDTA和10mM2-巯基乙醇的100mM Mes/Tris,pH7.0,或100mM磷酸Na,imMEDTA,0.1%PEG4000pH6.5,或含5mM EDTA和20mM半胱氨酸的100mM乙酸Na,pH5.5,在每一种情况中任选用1M DTT作为稳定剂。使用的酶浓度为5nM。在DMSO中,制备10mM底物储液。在60μM固定底物浓度下进行筛选,用从250μM开始二倍稀释的底物进行详细的动力学研究。在测定中,将总DMSO浓度保持在3%以下。所有测定均在环境温度下进行。用Labsystems Fluoreskan Ascent荧光读板器监测产物荧光(在390nm激发,在460nm发射)。AMC产物产生后,于15分钟内生成产物发展曲线。

[0455] 组织蛋白酶S的K_i测定

[0456] 该测定使用购自Bachem的以384孔板形式的杆状病毒表达的人组织蛋白酶S和 boc-Val-Leu-Lys-AMC荧光底物,其中7个试验化合物可与含已知组织蛋白酶S抑制剂对照(comparator)的阳性对照平行测试。

[0457] 底物稀释

[0458] 按280μl/孔,将12.5%DMSO加入96深孔聚丙烯板的两列中的B-H排。按70μl/孔,将底物加入A排。按2×250μl/孔,将测定缓冲液(100mM磷酸Na,100mM NaCl,pH6.5)加入A排,混合,然后沿着板向下二倍稀释至H排。

[0459] 抑制剂稀释

[0460] 将100μl/孔测定缓冲液加入96孔V形底聚丙烯板的4排的第2-5列和第7-12列。按200μl/孔,将测定缓冲液加入第1-6列。

[0461] 将在DMSO中制备的第一种试验化合物加入顶排的第1列,加入的体积通常为提供初期测定的粗略K_i的10-30倍的体积。根据预试运行计算粗略K_i,其中按10μl/孔将1mM boc-VLK-AMC(在DMSO中将10mM储液按1/10稀释度稀释为测定缓冲液)分配到96孔Microfluor™板的B-H排,并按20μl/孔分配到A排。将2μl各10mM的试验化合物加入A排第1-10列的各孔中。将90μl含1mM DTT和2nM组织蛋白酶S的测定缓冲液加入B-H排的各孔,并将180μl加入A

排。用多道移液管(multichannel pipette)将A排混合,二倍稀释至G排。将H排混合,在荧光分光光度计中读数。读数为拟合到竞争抑制方程的Prism数据,设 $S=100\mu\text{M}$ 和 $K_M=100\mu\text{M}$ 以得到 K_i 的估值,高达最大 $100\mu\text{M}$ 。

[0462] 将第二种试验化合物加入顶排的第6列、将第三种试验化合物加入第二排的第1列等。将 $1\mu\text{l}$ 对照加入底排的第6列。将第1列混合,然后二倍稀释移至第5列。将第6列混合,然后二倍稀释至第10列。

[0463] 用设为 $5\times 10\mu\text{l}$ 的8-道自动平滑(multisteping)移液管,按 $10\mu\text{l}$ /孔,将底物分配到384孔测定板。从A排开始,将底物稀释板的第一列分配到测定板的所有列中。多道移液管的尖端间距会恰当地隔排越过。将第二列分配到从B排起始的所有列。

[0464] 用设为 $4\times 10\mu\text{l}$ 的12-道自动平滑移液管,按 $10\mu\text{l}$ /孔,将抑制剂分配到384孔测定板。将抑制剂稀释板的第一排分配到测定板从A1开始的各个隔排中。多道移液管的管尖间距会恰当地隔列越过。同样,将第2、第3和第4排分别分配到从A2、B1和B2开始的各个隔排和列中。

[0465] 将20ml测定缓冲液和 $20\mu\text{l}$ 1M DTT混合。加入足够组织蛋白酶S,得到2nM终浓度。

[0466] 用分配器例如Multidrop384,按 $30\mu\text{l}$ /孔,加入测定板的所有孔中,在荧光分光光度计例如Ascent中读数。

[0467] 虽然存在抑制剂,但反映荧光底物酶切程度的荧光读数(使用带通滤波器将激发波长和发射波长分别设置为390nm和460nm)为对各孔拟合的线性速率。

[0468] 用SigmaPlot2000,将对各种抑制剂的所用孔拟合的速率拟合进竞争抑制方程中,以确定 V 、 K_M 和 K_i 值。

[0469] 组织蛋白酶L的 K_i

[0470] 用带以下修正的以上方法来测定组织蛋白酶L的 K_i 。

[0471] 酶为市售人组织蛋白酶L(例如Calbiochem)。底物为得自Bahcem的H-D-Val-Leu-Lys-AMC。测定缓冲液为100mM乙酸钠1mM EDTA,pH5.5)。将DMSO储液(10mM,在100%DMSO中)在测定缓冲液中稀释至10%。临用前,在测定缓冲液和1mM二硫苏糖醇中制备5nM浓度的酶。将 $2\mu\text{l}$ 在100%DMSO中制备的10mM抑制剂分配到A排。 $10\mu\text{l}$ 50 μM 底物(=1/200稀释度的在DMSO中的10mM储液,在测定缓冲液中稀释)

[0472] 抑制研究

[0473] 用以上测定法,在各种浓度的试验化合物中筛选潜在抑制剂。通过将酶加入底物和抑制剂的缓冲液中开始反应。按方程1计算 K_i 值。

$$[0474] \quad v_0 = \frac{VS}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S} \quad (1)$$

[0475] 其中 v_0 为反应速度, V 为最大速度, S 为底物浓度, K_M 为Michaelis常数, I 为抑制剂浓度。

[0476] 按以下表示结果:

[0477] A: 小于50纳摩尔

[0478] B: 50-500纳摩尔

[0479] C: 501-1000纳摩尔

[0480] D:1001-5000纳摩尔

[0481] E:5001-10000纳摩尔

[0482] F:大于10000纳摩尔

[0483] 表1

[0484]

实施例	试验编号	K _i 组织蛋白酶 K	K _i 组织蛋白酶 S	K _i 组织蛋白酶 L
1	试验 1	A	F	D
2	试验 1	A	F	D
3	试验 1	A	F	C

[0485]

1	试验 2	1.6 nM	25 000 nM	2000 nM
2	试验 2	1.1 nM	21 000 nM	1700 nM
3	试验 2	4 nM	22 000 nm	1400 nM
4	-	2.7 nM	14 500nM	300 nM
5	-	0.6 nM	2 900 nM	1 170 nm
参考实施例 9	-	2.6 nM	6 100 nM	NA

[0486] 因此,式II化合物为组织蛋白酶K的有效抑制剂,但对组织蛋白酶K的选择性超对密切相关的组织蛋白酶S和L。参考实施例9的化合物提供对以下的确认:相应的二氟乙烯基化合物也有活性和选择性。

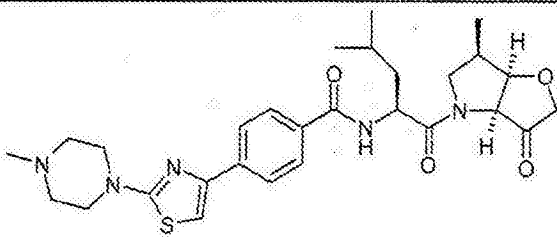
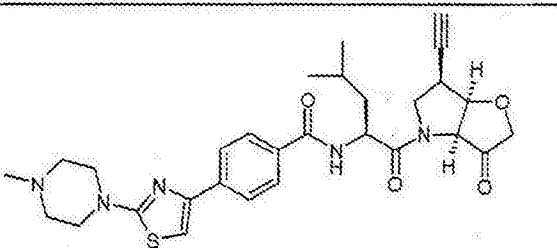
[0487] 代谢稳定性

[0488] 通过细胞溶胶测定测试本发明化合物和所述比较实施例的化合物的代谢稳定性,其中将化合物与市售人肝细胞溶胶组分一起温育,并通过HPLC或LC/MS监测化合物的消失。与全血不同,合并的人肝细胞溶胶组分代表单一个体的血液比代表异常值个体的可能性大,并可冷冻贮存。因此,细胞溶胶测定提供稳定的测定试验台作为化合物在体内环境中例如当暴露于全血时的稳定性指标。

[0489] 简而言之,在37℃下,于1小时内,将试验化合物(2μM)在合并的人肝细胞溶胶(Xenotech LLC Lenexa US,含1mg/mL蛋白的0.1M磷酸盐缓冲液,pH7.4)中温育。通过加入1mM NADPH辅因子启动温育。在0、20、40和60分钟时,抽取定时小例样,通过加入3体积冰冷乙腈进行“快速沉淀”。将样品在低温下离心,将上清液分离并通过LC-MS-MS分析。

[0490] 或者,在人或猴全血和/或市售肝微粒体例如XEN025中进行类似的稳定性测定。

[0491] 表2

实施例	结构	CLint 全血 ul/min/mg	CLint HLM ul/min/mg
比较实施例		9	49
实施例 1		3	16

[0493] 比较实施例1代表在以上引用的w02008/007107范围内的在6位具有碳-碳键的化合物。按易捷方式,将其由化合物1d制备(流程1)。因此,得到环外烯1d后,在氢气氛下,用含亚当斯催化剂(二氧化铂)的乙酸乙酯对该烯的立体有择氢化与氢顺式加成一起进行。该氢化以高收率得到基本上一种产物,即具有R-立体化学的C-6甲基异构体(实测LCMS[M+H]=288)。在此看到的氢化步骤的面式选择性与先前有关紧密相关的双环结构的文献(Srinivas等,Synlett,1999,555-556)中报道的相似。将由此制备的结构单元脱保护、延伸和氧化为以上例示的本发明化合物的活性酮形式。

[0494] 根据比较实施例1,6位上的甲基提供具有全血CLint值为9微克/分钟/mg的化合物是显而易见的,该CLint值表示估计的全血半衰期稍大于1小时。相反,乙炔提供CLint值3,该值表示理论全血半衰期接近4小时。还注意到,对6-甲基化合物的HLM微粒体清除(表示肝脏对各化合物代谢的贡献)显著高于对本发明化合物的清除,这进一步突出本发明化合物的较好稳定性。无论QD还是BD给药,体内稳定性提高允许化合物在全天中在身体内更好分布。这对于其中日间变动显著的适应症例如骨质疏松症尤其重要。

[0495] 渗透性

[0496] 该实验测量通过人胃肠道细胞转运的抑制剂。该测定使用熟知的传代数40-60的Caco-2细胞。

[0497] 由顶端向基底外侧转运

[0498] 通常,在2-4个孔中测试每一种化合物。基底外侧和顶端孔分别含1.5ml和0.4ml转运缓冲液(TB),试验物的标准浓度为10 μ M。另外,所有试验溶液和缓冲液含1%DMSO。实验前,将转运板用含10%血清的培养基预包被30分钟,以避免与塑料物质的非特异性结合。在过滤器支持体上的培养基培养21-28天后,细胞即可用于渗透性实验。

[0499] 1号转运板包含3排,每排4孔。第1排标记为洗涤,第2排为“30分钟”,第3排为“60分

钟”。2号转运板包含3排,每排4孔,将第4排标记为“90分钟”,第5排为“120分钟”,而其余排未标记。

[0500] 将顶端孔中的培养基除去,将插入物转移到无插入物的2个板中的转运板(1号板)中洗涤排(1号),插入物已用第1-5排中的1.5ml转运缓冲液(HBSS,25mM HEPES,pH7.4)制备。在A→B筛选中,基底外侧孔中的TB也含1%牛血清白蛋白。

[0501] 将0.5ml转运缓冲液(HBSS,25mM MES,pH6.5)加入插入物中,然后在37℃下,在polymix摇床中,将细胞单层在转运缓冲系统中平衡30分钟。在缓冲系统中平衡后,通过EVOM筷子(chop stick)仪测量各孔中的跨表皮电阻值(TEER)。TEER值通常为400-1000 Ω /孔(取决于使用的传代数)。

[0502] 将转运缓冲液(TB,pH6.5)从顶侧除去,将插入物转移到30分钟排(2号),然后将包含试验物的新制425 μ l TB(pH6.5)加入顶端(供体)孔。在37℃下,在约150-300rpm低振摇速度下,将板在polymix摇床中温育。

[0503] 在第2排中温育30分钟后,每隔30分钟,将插入物移至新的预热基底外侧(受体)孔;在第3排(60分钟),第4排(90分钟)和在第5排(120分钟)。

[0504] 约2分钟后和在实验结束时,从顶端溶液中吸取25 μ l样品。这些样品代表实验开始和结束时的供体样品。

[0505] 在各预定时间点,从基底外侧(受体)孔中吸取300 μ l,在实验结束时测量TEER的标称值(post value)。向所有收集的样品中加入乙腈达样品中终浓度50%。将收集的样品储存于-20℃直至HPLC或LC-MS分析。

[0506] 由基底外侧向顶端转运

[0507] 通常,在2-4个孔中测试每一种化合物。基底外侧和顶端孔分别含1.55ml和0.4ml TB,试验物的标准浓度为10 μ M。另外,所有试验溶液和缓冲液均含1%DMSO。实验前,将转运板用含10%血清的培养基预包被30分钟,以避免与塑料物质非特异性结合。

[0508] 在过滤器支持体上的培养基中培养21-28天后,上的细胞即可用于渗透性实验。将顶端孔中的培养基除去,将插入物转移到无插入物的新板(转运板)中洗涤排(1号),

[0509] 转运板包含3排,每排4孔。第1排标记为“洗涤”,第3排为“实验排”。转运板先前已用1号洗涤排中的1.5ml TB(pH7.4)和3号实验排(供体方)中包含试验物的1.55ml TB(pH7.4)准备。

[0510] 将0.5ml转运缓冲液(HBSS,25mM MES,pH6.5)加至1号排中的插入物,然后在37℃下,在polymix摇床中,将细胞单层在转运缓冲系统中平衡30分钟。在缓冲系统中平衡后,通过EVOM筷子仪测量各孔中的TEER值。

[0511] 将转运缓冲液(TB,pH6.5)从顶侧除去,将插入物转移到第3排,并将新制400 μ l TB,pH6.5加入插入物中。30分钟后,从顶端(受体)孔吸出250 μ l并用新制转运缓冲液代替。然后,每隔30分钟吸出250 μ l样品并用新制转运缓冲液代替直至在120分钟时实验结束,最后,在实验结束时测量TEER的标称值。约2分钟后和在实验结束时,从基底外侧(供体)室中吸取25 μ l样品。这些样品表示来自实验开始和结束的供体样品。

[0512] 向所有收集的样品中加入乙腈至在样品中达到样品中终浓度50%。将收集的样品在-20℃下储存,直至HPLC或LC-MS分析。

[0513] 计算

[0514] 确定相对于时间的累积组分吸收 FA_{cum} 。根据下式计算 FA_{cum} ：

$$[0515] \quad FA_{cum} = \sum \frac{C_{Ri}}{C_{Di}}$$

[0516] 其中 C_{Ri} 为在间隔 i 末端时的受体浓度， C_{Di} 为在间隔 i 开始时的供体浓度。应得到线性关系。

[0517] 根据下式计算，来确定渗透系数(P_{app} , cm/s)：

$$[0518] \quad P_{app} = \frac{(k \cdot V_R)}{(A \cdot 60)}$$

[0519] 其中 k 为转运率(min^{-1})，其定义为通过将作为时间(min)函数的累积组分吸收(FA_{cum})线性回归而得到的斜率， V_R 为受体室的体积(mL)，而 A 为滤器的面积(cm^2)。

[0520] 参比化合物

[0521]

在人中吸收的类别	标记物	在人中吸收%
被动转运		
低(0-20%)	甘露醇	16
	甲氨蝶呤	20

[0522]

中等(21-75%)	阿昔洛韦	30
高(76-100%)	普萘洛尔	90
	咖啡因	100
主动转运		
氨基酸转运蛋白	L-苯丙氨酸	100
主动流出		
PGP-MDR1	地高辛	30

[0523] 通过胃肠组织的较大渗透性的优势在于其允许使用较小剂量达到与暴露于以较高剂量给予的渗透性较差的化合物相似的水平。低剂量的优势在于使用于日剂量的物质成本最低化，该成本在长期给予的药物中是重要的参数。

[0524] 在Caco-2测定中，实施例2化合物显示 P_{app} 值为 9.1×10^{-6} cm/秒，而在平行测定中，W02008007107实施例2的现有技术化合物显示 P_{app} 值为 2.7×10^{-6} cm/秒。在该测定系统中，争议性的现有技术化合物N-((S)-1-((3aS,6R,6aS)-6-甲氧基-氧代二氢-2H-呋喃并[3,2-b]吡咯-4(5H,6H,6aH)-基)-4-甲基-氧代戊-2-基)-4-(2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-4-基)苯甲酰胺显示 P_{app} 值为 0.9×10^{-6} cm/秒，该化合物引用自W02008/007107中第33页(但其制备方法未公开)。

[0525] 作为经验法则， P_{app} 值约为2表示体内吸收仅10-30%，而 P_{app} 值接近10通常表示完全吸收。

[0526] 如图1所示，实施例2与上述现有技术W02008007107的实施例2的 P_{app} 值间的显著差异与体内小鼠PK实验良好相关。各化合物经口给予(含 $60 \mu\text{mol/kg}$ 的常规1%美多秀

(Methocel)A4C溶媒。如图1中明确所示,本发明化合物的体内暴露(无论按C_{max}还是AUC测量)远大于现有技术化合物(WO2008007107的实施例2)。注意到该图具有对数标度。

[0527] 致突变性

[0528] 化合物的潜在致突变性适宜在埃姆斯试验中测试,通常在含或不合肝脏S9组分的多种细菌菌株例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)TA100、TA102、TA1535、TA1537中,在例如30、300和3000 μ g/板浓度下进行。

[0529] 埃姆斯试验可容易在全球很多CRO中得到。

[0530] 缩写

DMF	二甲基甲酰胺	DCM	二氯甲烷
TBDMS	叔-丁基二甲基甲硅烷基	RT	室温
[0531] THF	四氢呋喃	Ac	乙酰基
TLC	薄层层析	DMAP	二甲氨基吡啶
EtOAc	乙酸乙酯	μ M	微摩尔

[0532] 本申请中引用的包括专利和专利申请在内的所有参考文献都通过引用以最可能大的程度结合到本文中。

[0533] 除上下文另有需要外,在本发明说明书和随附权利要求全文中,措词“包含”及其衍生形式(例如“包含”、“含有”)应理解为表示包括所述整数、步骤、整数组或步骤组,但不排除任何其它整数、步骤、整数组或步骤组。

按 60 $\mu\text{mol/kg}$ PO, 单次口服给药雄性 C57Bl 小鼠
制剂: 1% 美多秀 A4C

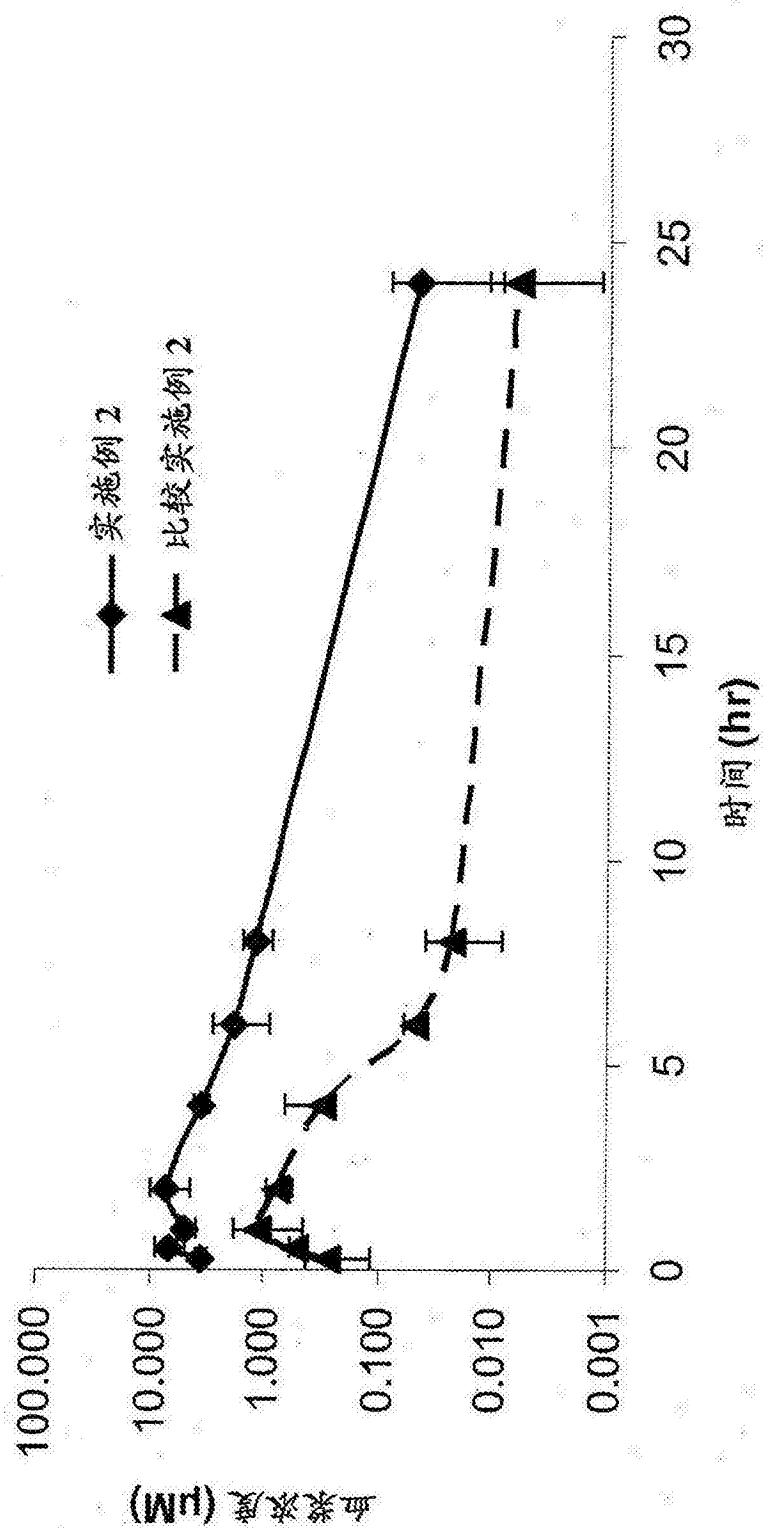


图1