

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98813475.6

[51] Int. Cl.

C07D 207/16 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100379722C

[22] 申请日 1998.12.1 [21] 申请号 98813475.6
[30] 优先权
[32] 1997.12.5 [33] SE [31] 9704543-9
[86] 国际申请 PCT/SE1998/002187 1998.12.1
[87] 国际公布 WO1999/029664 英 1999.6.17
[85] 进入国家阶段日期 2000.8.4
[73] 专利权人 阿斯特拉曾尼卡有限公司
地址 瑞典南泰利耶
[72] 发明人 O·卡尔松 M·林肖滕
J·-E·尼斯特伦
[56] 参考文献
EP0669317A 1995.8.30
WO97/02284A1 1997.1.23
审查员 刘桂明

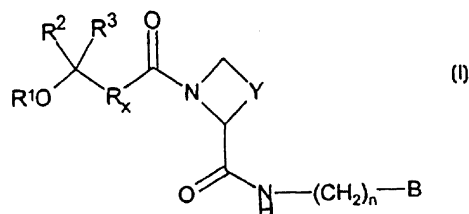
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 马崇德 周慧敏

权利要求书 6 页 说明书 31 页

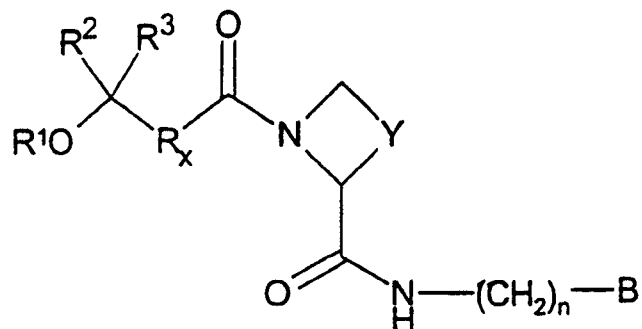
[54] 发明名称
新化合物

[57] 摘要

本发明提供了式(I)化合物, 其中 R^1 , R^2 , R^3 , R^x , Y, n 和 B 的含义如说明书中所述, 该化合物可用作胰蛋白酶类蛋白酶如凝血酶的竞争性抑制剂, 特别是用于治疗需要抑制凝血酶的病症(如血栓形成)或用作抗凝剂。



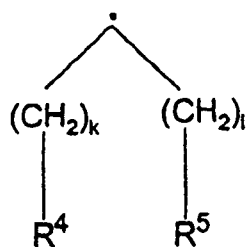
1. 式 I 化合物或其可药用盐,



其中

R^1 、 R^2 和 R^3 代表 H;

R_x 代表式 IIa 结构片段;



IIa

其中

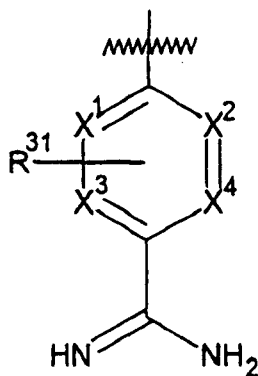
k 和 l 代表 0;

R^4 和 R^5 分别代表 H 或苯基, 该苯基任选被一个或多个 C_{1-4} 烷氧基取代;

Y 代表 CH_2 或 $(CH_2)_2$;

n 代表 0, 1, 2, 3 或 4; 和

B 代表式 IVa 结构片段,



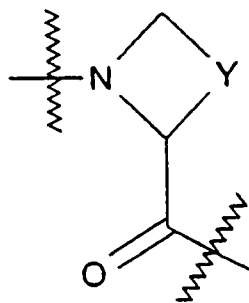
IVa

其中

X^1 , X^2 , X^3 和 X^4 代表 CH;

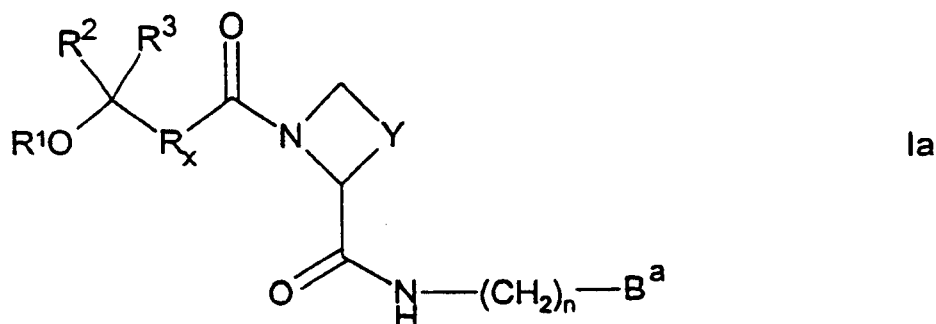
R^{31} 代表一个或多个选自卤素和 C_{1-4} 烷基的取代基。

2. 如权利要求 1 定义的式 I 化合物, 其中片段

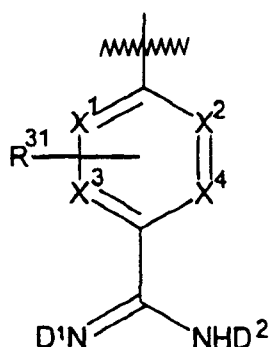


是 S 构型。

3. 式 Ia 化合物及其可药用盐,



其中 B^a 代表式 IVe 结构片段,



IVe

其中 D¹ 是 OH 和 D² 是 H, 及 R¹, R², R³, R_x, Y, n, X¹, X², X³, X⁴ 和 R³¹ 定义如权利要求 1 所限定。

4. 药物制剂, 它含有与可药用辅剂、稀释剂或载体混合的上述任一权利要求定义的化合物或其可药用盐。

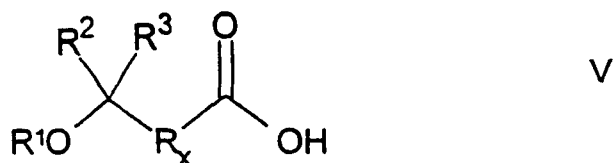
5. 权利要求 1-3 之一定义的化合物或其可药用盐作为活性成分在制备治疗需要或想要抑制凝血酶的病症的药物中的用途。

6. 如权利要求 5 要求的用途, 其中病症指血栓形成。

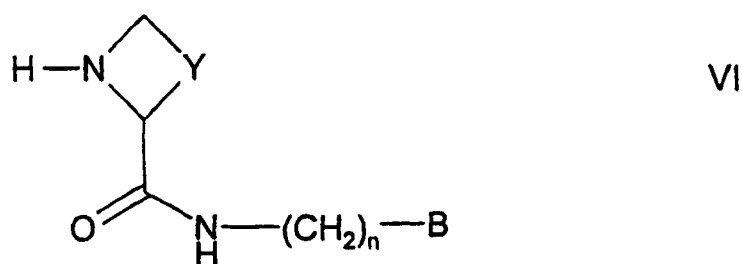
7. 权利要求 1-3 之一定义的化合物或其可药用盐作为活性成分在制备抗凝血剂中的用途。

8. 如权利要求 1 定义的式 I 化合物的制备方法, 包括:

(a) 将式 V 化合物

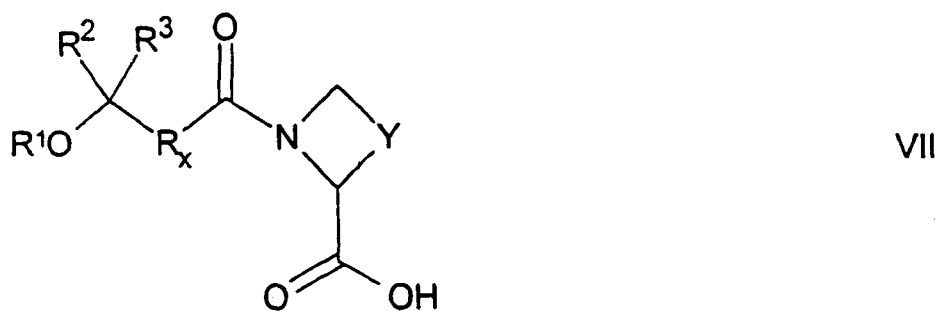


其中 R^1 , R^2 , R^3 和 R_x 定义如权利要求 1 所限定,
与式 VI 化合物偶合,



其中 Y, n 和 B 定义如权利要求 1 所限定;

(b) 将式 VII 化合物

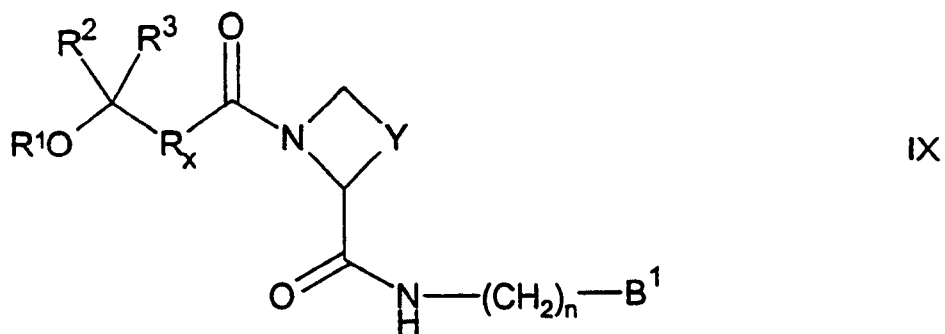


其中 R^1 , R^2 , R^3 , R_x 和 Y 定义如权利要求 1 所限定,
与式 VIII 化合物偶合,

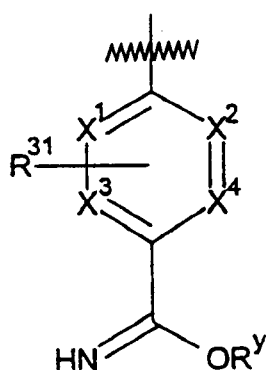


其中 n 和 B 定义如权利要求 1 所限定;

(c) 为了得到其中 B 是式 IVa 结构片段的式 I 化合物, 将式 IX 化合物
与氨气反应,



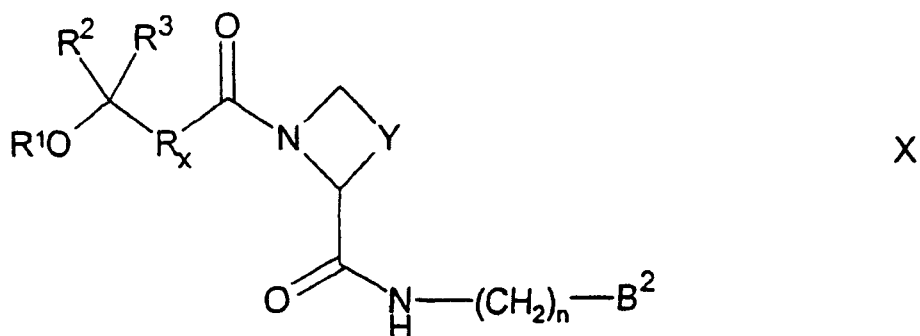
其中 B^1 代表式 IVa^1 结构片段,



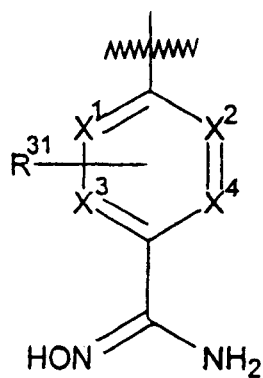
IVa^1

其中 R^y 代表 C_{1-4} 烷基, R^1 , R^2 , R^3 , R_x , Y , n , X^1 , X^2 , X^3 , X^4 和 R^{31} 定义如权利要求 1 所限定;

(d) 为了得到其中 B 是式 IVa 结构片段的式 I 化合物, 将式 X 化合物还原,



其中 B^2 代表式 IVa^2 结构片段,

IVa²

其中 R¹, R², R³, R_x, Y, n, X¹, X², X³, X⁴ 和 R³¹ 定义如权利要求 1 所限定。

新化合物

发明领域

本发明涉及新的可药用化合物，特别是胰蛋白酶类丝氨酸蛋白酶，尤其是凝血酶的竞争性抑制剂，涉及它们作为药物的用途，含有它们的药物组合物，以及它们的合成方法。

发明背景

血凝作用是涉及到血液停滞（即预防由于血管破损造成的血液流失）和血栓形成（即血管中形成血凝块，有时会导致血管阻塞）的关键过程。

凝结作用是一系列复杂的酶反应的结果。这一系列反应的最终步骤之一是前酶即前凝血酶向活性酶凝血酶的转变。

已知凝血酶在凝结作用中起着核心作用。它活化血小板，致使血小板聚集，将纤维蛋白原转变成纤维蛋白单体，同时聚合成纤维蛋白聚合物，并且活化因子 XIII，然后该因子与聚合物交联，形成不溶性纤维蛋白。而且，凝血酶活化因子 V 和 VII，导致凝血酶从前凝血酶开始“正反馈”繁衍。

由于有效的凝血酶抑制剂能抑制血小板聚集和纤维蛋白的形成和交联，所以人们希望它能表现出抗凝血活性。此外，人们希望依靠有效的正反馈抑制机理能提高抗凝血活性。

现有技术

低分子量凝血酶抑制剂的早期开发已经由 Claesson 在《血凝纤维蛋白学》(Blood Coagul. Fibrinol.), 5: 411 (1994)中描述过。

Blomback 等人在《临床实验室研究杂志》(J. Clin. Lab. Invest.), 24, 增刊 107, 59 (1969)中报道了基于位于纤维蛋白原 A α 链的裂解位置周围的氨基酸序列的凝血酶抑制剂。基于对氨基酸序列的讨论，这些作者认为三肽序列 Phe-Val-Arg (P9-P2-P1, 以下称 P3-P2-P1 序列) 将是最有效的抑制剂。

人们已经从美国专利 4,346,078 和国际专利申请 WO 93/11152 中得知了基于 P1 位 α, ω -氨基烷基胍的二肽基衍生物的凝血酶抑制剂。类似的结构相关的二肽基衍生物也有报道。例如，国际专利申请

WO 94/29336 公开了例如在 P1 位有氨基甲基苄脒，环状氨基烷基脒和环状氨基烷基胍的化合物；欧洲专利申请 0 648 780 公开了例如在 P1 位有环状氨基烷基胍的化合物。

人们可以从欧洲专利申请 0 468 231, 0 559 046 和 0 641 779 了解基于 P1 位环状氨基烷基胍（例如，3- 或 4- 氨基甲基-1- 脒基哌啶）的肽衍生物的凝血酶抑制剂。

基于 P1 位精氨酸醛的三肽基衍生物的凝血酶抑制剂首先公开于欧洲专利申请 0 185 390。

最近，已经报道在 P3 位修饰的精氨酸醛基的肽基衍生物。例如，国际专利申请 WO 93/18060 公开了 P3 位的羧基酸；欧洲专利申请 0 526 877 公开了 P3 位的脱氨基酸；及欧洲专利申请 0 542 525 公开了 P3 位的 O- 甲基扁桃酸。

基于 P1 位亲电性酮的丝氨酸蛋白酶（如凝血酶）的抑制剂也是已知的。例如，欧洲专利申请 0 195 212 公开了 P1 位精氨酸的肽基 α - 酮酯和酰胺类；欧洲专利申请 0 362 002 公开了 P1 位精氨酸的氯代烷基酰胺酮类；欧洲专利申请 0 364 344 公开了 P1 位精氨酸的 α, β, δ - 三酮化合物；及欧洲专利申请 0 530 167 公开了 P1 位精氨酸的 α - 烷氧基酮衍生物。

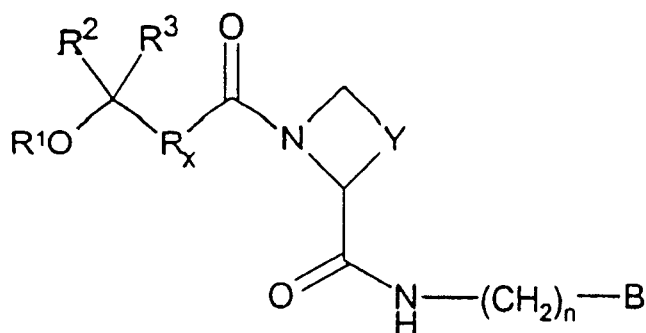
人们还从欧洲专利申请 0 293 881 中了解了其它结构不同的基于精氨酸 C 端硼酸衍生物及其异硫脲鎓(isothiuronium)类似物的胰蛋白酶类丝氨酸蛋白酶的抑制剂。

最近，基于肽基和氨基酸的衍生物的凝血酶抑制剂已经公开于欧洲专利申请 0 669 317 和国际专利申请 WO 95/35309, WO 95/23609, WO 94/29336, WO 97/02284, WO 97/46577, WO 98/06740 和 WO 98/06741。

但是，人们仍然需要有效的胰蛋白酶类丝氨酸蛋白酶如凝血酶的抑制剂。人们尤其需要既有口服生物利用度又能选择性抑制凝血酶而非其它丝氨酸蛋白酶的化合物。人们希望这些对凝血酶表现出竞争性抑制活性的化合物特别适宜用作抗凝血剂，进而用于治疗血栓形成病及相关疾病。

发明公开

本发明提供了式 I 化合物或其可药用盐，



其中

R^1 代表 H, $C(O)R^{11}$, $SiR^{12}R^{13}R^{14}$ 或 C_{1-6} 烷基 (该烷基任选被一个或多个取代基 OR^{15} 或 $(CH_2)_qR^{16}$ 取代或作末端基), 其中

R^{12} , R^{13} 和 R^{14} 分别代表 H, 苯基或 C_{1-6} 烷基;

R^{16} 代表 C_{1-4} 烷基, 苯基, OH, $C(O)OR^{17}$ 或 $C(O)N(H)R^{18}$, 其中

R^{18} 代表 H, C_{1-4} 烷基或 $CH_2C(O)OR^{19}$;

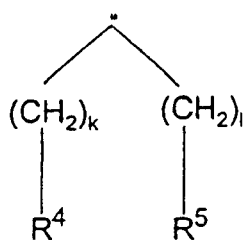
R^{15} 和 R^{17} 分别代表 H, C_{1-6} 烷基或 C_{7-9} 烷基苯基;

R^{11} 和 R^{19} 分别代表 H 或 C_{1-4} 烷基; 及

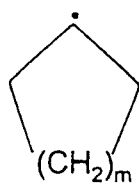
q 代表 0, 1 或 2;

R^2 和 R^3 分别代表 H, C_{1-4} 烷基, 环己基或苯基;

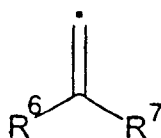
R_X 代表式 IIa, IIb 或 IIc 结构片段,



IIa



IIb



IIc

其中

k , l 和 m 分别代表 0, 1, 2, 3 或 4;

R^4 和 R^5 分别代表 H, $Si(Me)_3$, 1- 或 2- 萘基, 多环烷基, $CHR^{41}R^{42}$ 或 C_{1-4} 烷基 (该烷基任选被一个或多个卤素取代基取代), 或 C_{3-8} 环烷

基, 苯基, 亚甲基二氧基苯基, 苯并二噁基, 苯并呋喃基, 二氢苯并呋喃基, 苯并噻唑基, 苯并噁唑基, 苯并咪唑基, 苯并二氢呋喃-3-酮基, 香豆素基或二氢香豆素基[这十二个基团任选被一个或多个 C_{1-4} 烷基(该烷基任选被一个或多个卤素取代基取代), C_{1-4} 烷氧基, 卤素, 羟基, 氰基, 硝基, SO_2NH_2 , $C(O)OH$ 或 $N(H)R^{43}$ 取代], 其中

R^{41} 和 R^{42} 分别代表环己基或苯基;

R^6 和 R^7 分别代表 H, C_{1-4} 烷基, C_{3-8} 环烷基, 苯基[该苯基任选被一个或多个 C_{1-4} 烷基(该烷基任选被一个或多个卤素取代基取代), C_{1-4} 烷氧基, 卤素, 羟基, 氰基, 硝基, SO_2NH_2 , $C(O)OH$ 或 $N(H)R^{44}$ 取代], 或与它们相连的碳原子一起形成 C_{3-8} 环烷基环, 其中

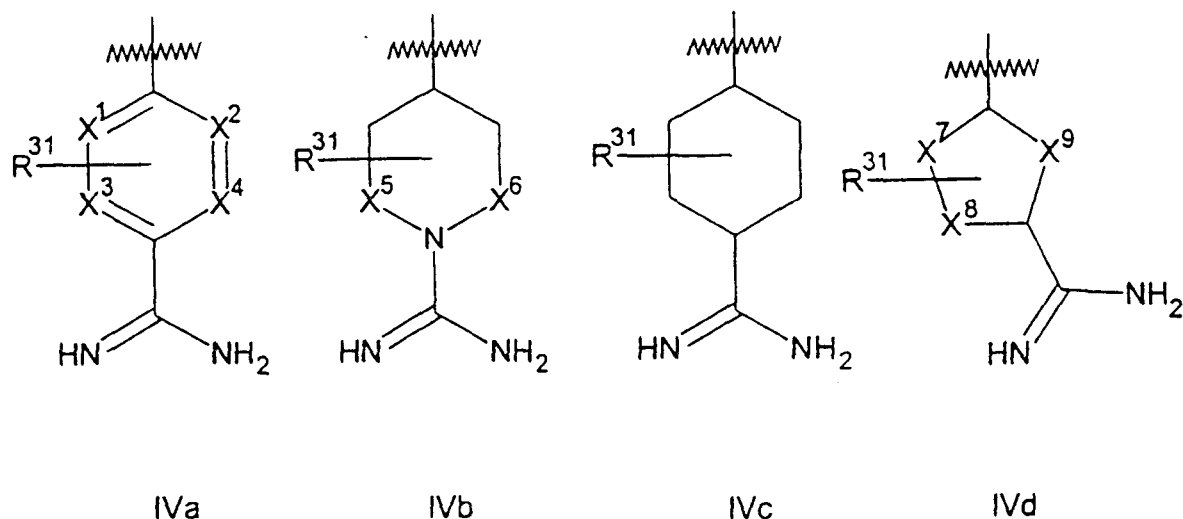
R^{43} 和 R^{44} 分别代表 H 或 $C(O)R^{45}$, 其中

R^{45} 代表 H, C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基;

Y 代表 CH_2 , $(CH_2)_2$, $CH=CH$, $(CH_2)_3$, $CH_2CH=CH$ 或 $CH=CHCH_2$ (后三个基团任选被 C_{1-4} 烷基, 亚甲基, 氧或羟基取代);

n 代表 0, 1, 2, 3 或 4;

B 代表式 IVa, IVb, IVc 或 IVd 结构片段,



其中

X^1 , X^2 , X^3 和 X^4 分别代表 CH, N 或 N-O;

X^5 和 X^6 分别代表单键或 CH_2 ;

X^7 , X^8 和 X^9 之一代表 S, O 或 NH, 其余两个分别代表 $-CH=$, $=CH-$, $-N=$, $=N-$, $-N(O)=$ 或 $=N(O)-$;

在所有情况下 R^{31} 代表一个或多个下列任选取代基：卤素， C_{1-4} 烷基， C_{1-4} 烷氧基或 $-O-(CH_2)_p-C(O)N(R^{32})(R^{33})$ ，其中

p 代表 0, 1, 2, 3 或 4; 及

R^{32} 和 R^{33} 分别代表 H, C_{1-6} 烷基或 C_{3-7} 环烷基。

式 I 化合物还表现出互变异构现象。所有互变异构形式及其混合物都包括在本发明范围内。

式 I 化合物也可以含有一个或多个不对称碳原子，因此，它可表现出光学和/或非对映异构现象。所有非对映体都可以用常规技术分离，例如色谱法或分级结晶法。可以采用常规方法如分级结晶法或 HPLC，通过分离化合物的外消旋或其它混合物，分离各种立体异构体。或者，在不引起外消旋作用或差向异构作用的条件下，通过合适的有旋光活性的起始原料，例如，与纯手性酸的反应或衍化作用，然后用常规方法（如 HPLC，硅胶色谱）分离非对映体衍生物，制成所需的光学异构体。所有立体异构体都包括在本发明范围内。

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^{11}, R^{12}, R^{13}, R^{14}, R^{15}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{31}, R^{32}, R^{33}$ 和 R^{45} 代表的烷基，以及可以取代 R^4, R^5, R^6, R^7 和 Y 的烷基； R^{31} 和 R^{45} 代表的烷氧基，以及可以取代 R^4, R^5, R^6 和 R^7 的烷氧基； $R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^{32}, R^{33}, R^{41}$ 和 R^{42} 代表的环烷基；及 R^{15} 和 R^{17} 代表的烷基苯基，都可以是直链或支链的饱和或不饱和的。式 I 化合物中 $-(CH_2)_k-$, $-(CH_2)_1-$, $-(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_p-$ 和 $-(CH_2)_q-$ 代表的亚烃基也可以是直链或支链的饱和或不饱和的。

R^{31} 代表的卤素，可以取代 R^4, R^5, R^6 和 R^7 的卤素，以及可以取代 R^4, R^5, R^6 和 R^7 的取代基的卤素包括氟，氯，溴和碘。

在式 IIa, IIb 和 IIc 的结构片段中，点“·”表示式 I 化合物中连接 $-C(O)-$ 基团和连接带有 $-OR^1, R^2$ 和 R^3 的碳原子的碳原子（为了避免疑问，再没有其它 H 原子连到所说的碳原子）。

片段 IVa, IVb, IVc 和 IVd 中键上的波浪线表示该结构中键的位置。为了避免疑问，当一个或多个取代基 R^{31} 存在时，它将代替适当环上 CH, CH_2 和/或 NH 中的一个或多个 H 原子。

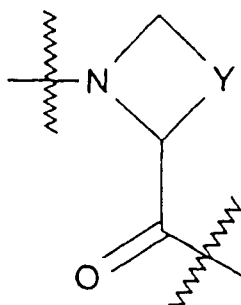
技术人员都应理解，在结构片段 IVd 中，两个双键必须存在于 5 员环中，双键的位置取决于 X^7, X^8 和 X^9 中哪个代表 S, O 或 NH。

缩写表列于本说明书的结尾。

本发明优选化合物包括其中 B 代表式 IVa 的结构片段（其中 X^1 , X^2 , X^3 和 X^4 都代表 CH），式或 IVb 的结构片段，或式或 IVc 的结构片段，及 R^{31} 代表一个或多个下列取代基的那些化合物：卤素， C_{1-4} 烷基， C_{1-4} 烷氧基和 $-O-(CH_2)_p-C(O)N(R^{32})(R^{33})$ （即取代基不是任选的）。

本发明优选化合物包括其中 B 代表结构片段式 IVa 的那些化合物。

其中片段



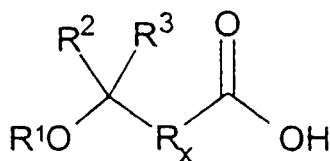
是 S 构型的式 I 化合物是优选的。上述片段中氮原子和碳原子上的波浪线表示片段的键的位置。

优选的式 I 化合物包括实施例 1 和 2 所描述的化合物。

制备方法

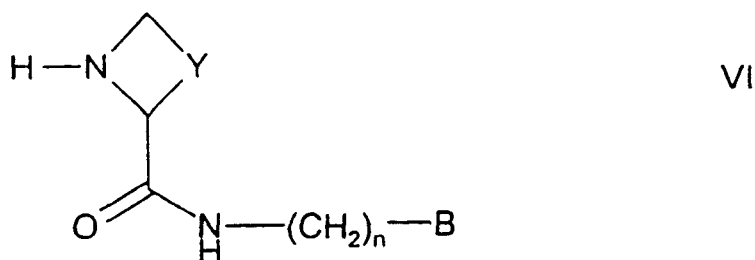
本发明还提供了制备式 I 化合物的方法，包括：

(a) 式 V 化合物



V

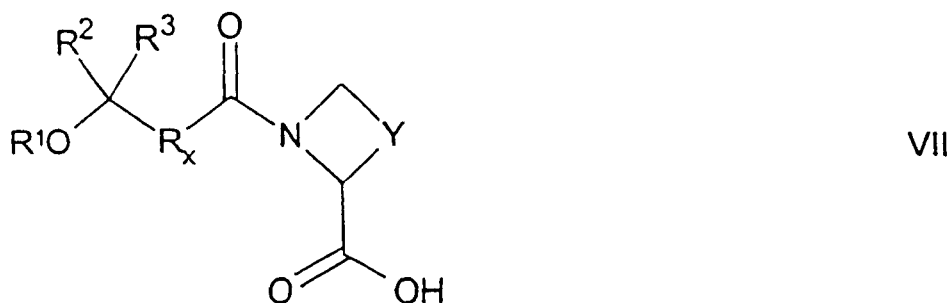
其中 R^1 , R^2 , R^3 和 R_X 定义如上，
与式 VI 化合物



其中 Y, n 和 B 定义如上,

例如, 在偶合剂体系 (如在 DMF, EDC, DCC, HBTU 或 TBTU 中的草酰氯), 适当的碱 (如吡啶, DMAP, TEA 或 DIPEA) 和合适的有机溶剂 (如二氯甲烷, 乙腈或 DMF) 存在下进行偶合;

(b) 式 VII 化合物



其中 R¹, R², R³, R_x 和 Y 定义如上,

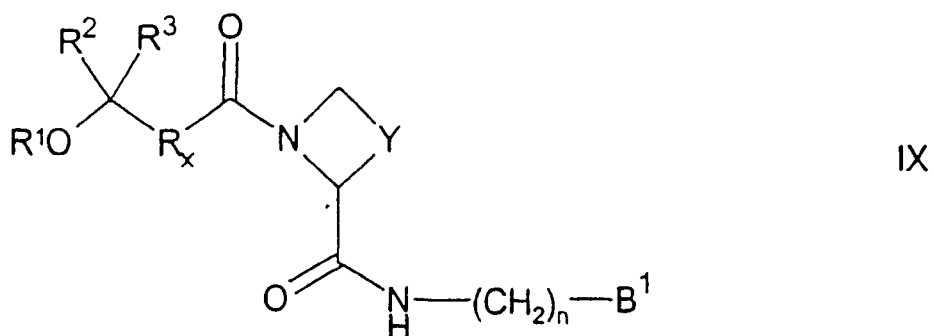
与式 VIII 化合物



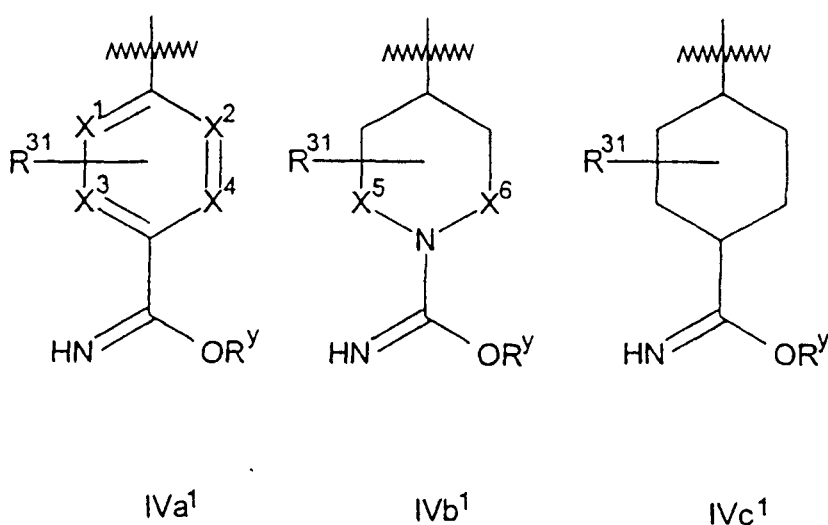
其中 n 和 B 定义如上,

例如, 在偶合剂系统 (如在 DMF, EDC, DCC, HBTU 或 TBTU 中的草酰氯), 适当的碱 (如吡啶, DMAP, TEA 或 DIPEA) 和合适的有机溶剂 (如二氯甲烷, 乙腈或 DMF) 存在下进行偶合;

(c) 为了得到其中 B 是式 IVa, IVb 或 IVc 结构片段的式 I 化合物, 式 IX 化合物



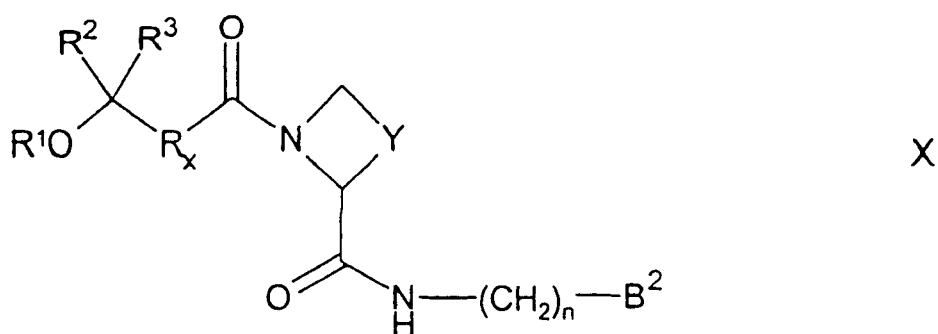
其中 B¹ 代表式 IVa¹, IVb¹ 或 IVc¹ 结构片段,



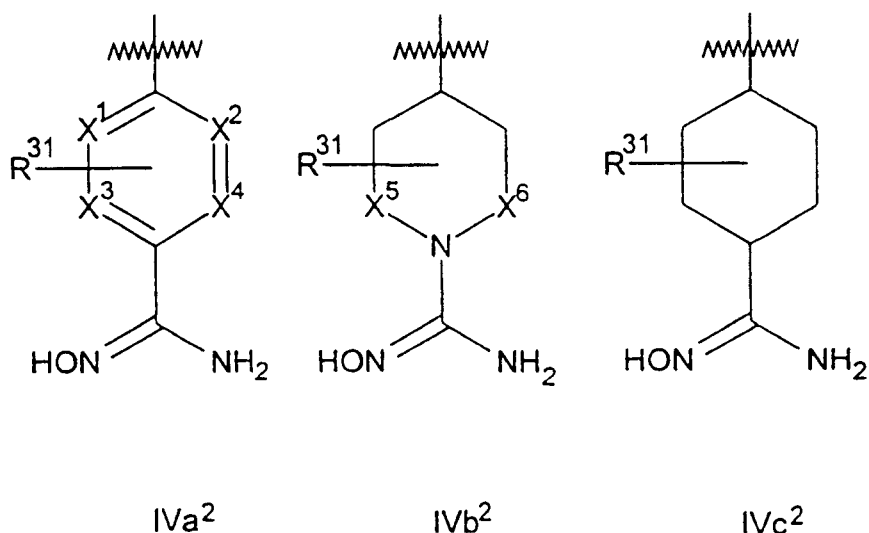
其中 Rʸ 代表 C₁₋₄ 烷基, R¹, R², R³, Rₓ, Y, n, X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶ 和 R³¹ 定义如上,

与氨气, 例如, 在室温下和合适的有机溶剂 (如甲醇或乙醇) 存在下反应;

(d) 为了得到其中 B 是式 IVa, IVb 或 IVc 结构片段的式 I 化合物, 将式 X 化合物



其中 B² 代表式 IVa², IVb² 或 IVc² 结构片段,

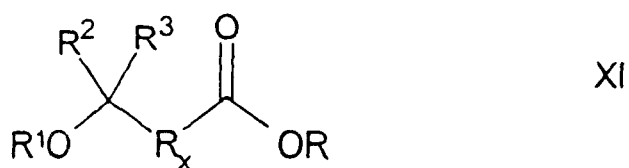


其中 R¹, R², R³, R_x, Y, n, X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶ 和 R³¹ 定义如上, 在合适的还原剂 (如通过 Pd/C 或 TiCl₃ 存在下的催化氢化反应) 和合适的有机溶剂 (如乙醇) 存在下进行还原反应; 或

(e) 为了得到其中 X¹, X², X³, X⁴, X⁷, X⁸ 和/或 X⁹ 代表 N-O 的式 I 化合物, 将相应的其中 X¹, X², X³, X⁴, X⁷, X⁸ 和/或 X⁹ (如果适当) 代表 N 的式 I 化合物, 例如, 在本领域技术人员已知的条件下进行氧化反应。

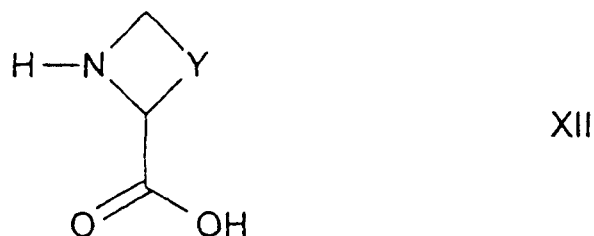
其中 B 代表式 IVd 结构片段的式 I 化合物可以用类似本文所述方法或国际专利申请 WO 95/23609 和 WO 98/06741 所述方法制备。

式 V 化合物是商品, 而且可以在文献中查到, 或者用已知技术制备。例如, 式 V 化合物可以通过式 XI 化合物



其中 R 是 C₁₋₆ 烷基或 C₁₋₃ 烷基苯基, R¹, R², R³ 和 R_x 定义如上, 例如, 在室温及适当碱 (如氢氧化锂) 和适当溶剂 (如 THF 和/或水) 存在下的水解进行制备。

式 VI 化合物可以通过式 XII 化合物

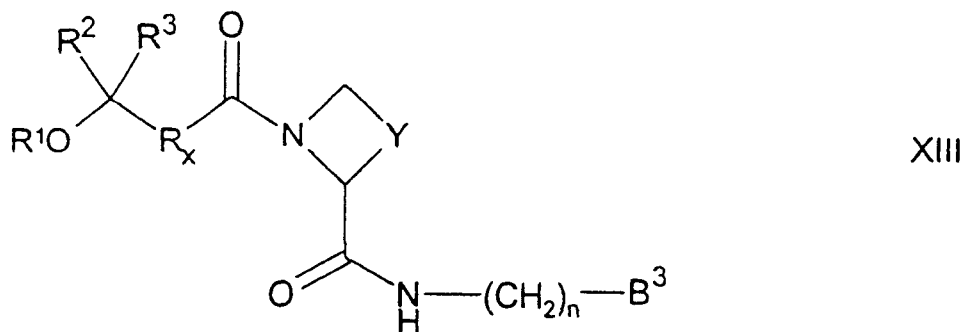


其中 Y 定义如上,

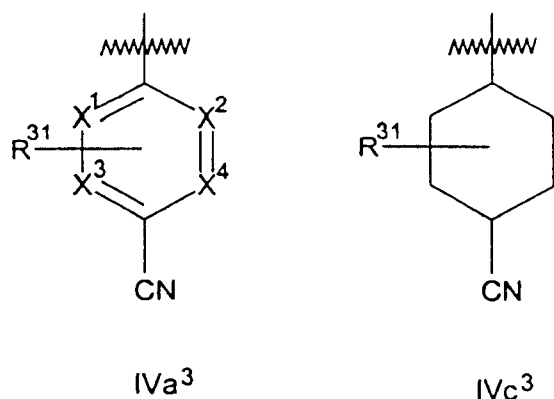
与上述式 VIII 化合物, 例如, 在上述合成式 I 化合物的条件下 (步骤 (a) 和 (b)) 反应进行制备。

式 VII 化合物可以很容易地用已知技术制得。例如, 式 VII 化合物可以通过上述式 V 化合物与上述式 XII 化合物, 例如, 在上述合成式 I 化合物的条件下 (步骤 (a) 和 (b)) 反应进行制备。

式 IX 化合物可以用已知技术制备。例如, 其中 B¹ 代表式 IVa¹ 或 IVc¹ 结构片段的式 IX 化合物可以通过式 XIII 化合物



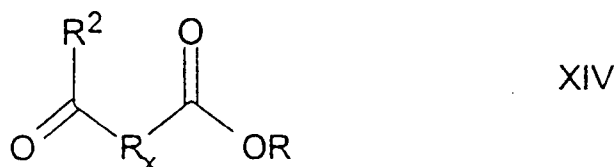
其中 B³ 代表式 IVa³ 或 IVc³ 结构片段,



及 R^1 , R^2 , R^3 , R_x , Y , n , X^1 , X^2 , X^3 , X^4 和 R^{31} 定义如上,
与 HCl (g) 和 C_{1-4} 烷基醇, 例如, 在室温或室温以下反应进行制备。

式 X 化合物可以用已知技术制备。例如, 其中 B^2 代表式 IVa^2 或 IVc^2 结构片段的式 X 化合物可以通过上述式 XIII 化合物与 HCl (g) 和甲醇, 例如, 在室温或室温以下反应, 然后, 例如, 在室温左右及适当碱 (如 TEA) 和溶剂 (如 MeOH) 存在下与羟胺或其氢卤化物盐反应进行制备。

其中 R^1 和 R^3 均代表 H 的式 XI 化合物可以通过式 XIV 化合物



其中 R , R_x 和 R^2 定义如上,
例如, 在室温以下 (如 $-70 - -5^\circ C$), 在适当还原剂 (如硼氢化钠) 和适当有机溶剂 (如 MeOH 或 EtOH) 存在下进行还原反应来制备。

其中 R^1 代表 H, R^3 代表 C_{1-4} 烷基, 环烷基或苯基的式 XI 化合物可以通过上述式 XIV 化合物与式 XV 有机金属化剂



其中 R^{3a} 代表 C_{1-4} 烷基, 环己基或苯基, M 代表 Li 或 $MgHal$, Hal 是 Cl, Br 或 I,

在本领域技术人员熟知的条件下, 在适当有机溶剂 (如 THF) 存在下反应进行制备。

其中 R^1 代表 H 的式 XI 化合物可以通过式 XVI 化合物



其中 R 和 R_x 定义如上,

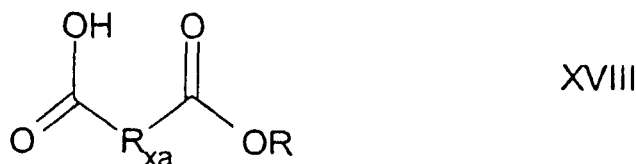
在本领域技术人员熟知的条件下, 与式 XVII 化合物



其中 R^2 和 R^3 定义如上,

反应进行制备。

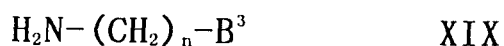
其中 R^1 , R^2 和 R^3 均代表 H, R_x 代表上述式 IIa 结构片段, 其中 k 和 l 均不代表 0, 的式 XI 化合物可以通过式 XVIII 化合物



其中 R_{xa} 代表上述式 IIa 结构片段, 其中 k 和 l 均不代表 0, 且 R 定义如上,

在适当还原剂 (如甲硼烷) 和有机溶剂 (如 THF) 存在下进行还原反应来制备。

式 XIII 化合物可以通过上述式 VII 化合物, 例如, 在上述合成式 I 化合物的条件下 (步骤 (a) 和 (b)), 与式 XIX 化合物



其中 n 和 B^3 定义如上,

进行偶合反应来制备。

式 XIV 化合物既是已知的, 也可以用类似《有机化学杂志》(J. Org. Chem.), 54: 3831 (1989) 所述方法制备。

式 XVIII 化合物是可从文献中获知的或用已知技术制备的, 例如, 通过适当丙二酸衍生物与式 XX 烷基化剂



其中 L 是离去基团 (如卤素 Cl, Br, I 或甲苯磺酰基), 而 R_{xa} 定义如上,

例如, 在适当碱 (如氢氧化钠或乙醇钠) 和适当有机溶剂存在下反应进行制备。

式 VIII, XII, XV, XVI, XVII, XIX 和 XX 化合物及其衍生物既是商品, 又可以从文献上获知, 或用类似本文所述方法或常规合成方法, 根据标准工艺, 由可以买到的起始原料, 在适当反应条件下用适当试剂获得。

式 I, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XIII, XIV, XVI, XVIII, XIX 和 XX 化合物中所含基团, 尤其是苯基上的取代基可以用标准工艺进行内部转换。

式 I 化合物可以用常规技术从它们的反应混合物分离制得。

本领域技术人员应该理解, 在上述方法中中间体化合物的官能团需要用保护基保护。

需要保护的官能团包括羟基, 氨基和羧酸。适合于羟基的保护基包括三烷基甲硅烷基或二芳基烷基甲硅烷基(如叔丁基二甲基甲硅烷基, 叔丁基二苯基甲硅烷基或三甲基甲硅烷基)和四氢吡喃基。适合于羧酸的保护基包括 C_{1-6} 烷基或苄基酯。适于氨基, 胍基和脒基的保护基包括叔丁氧羰基或苄氧羰基。胍基-和脒基氮既可以被单保护也可以被双保护。

官能团的保护和脱保护反应可以在偶合反应之前或之后进行。

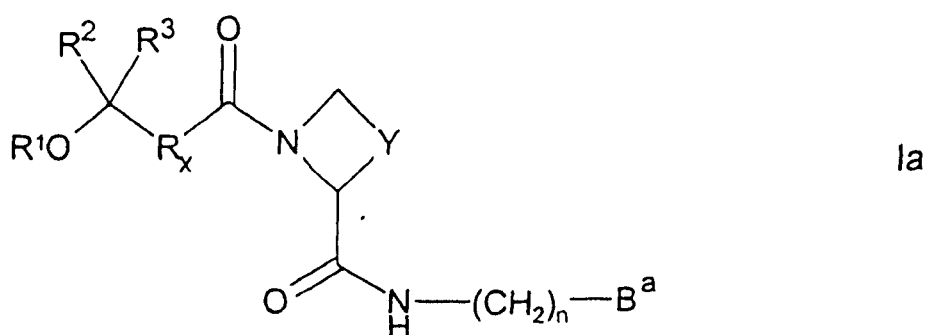
例如, 式 I 化合物可以通过 N-酰基化氨基酸或 N-保护的氨基酸的偶合反应来制备。如果使用 N-保护的氨基酸, 则可以在偶合反应之后加入酰基, 然后用标准方法进行氮原子的脱保护反应。

可以根据本领域技术人员已知的技术和本文所述方法脱去保护基。

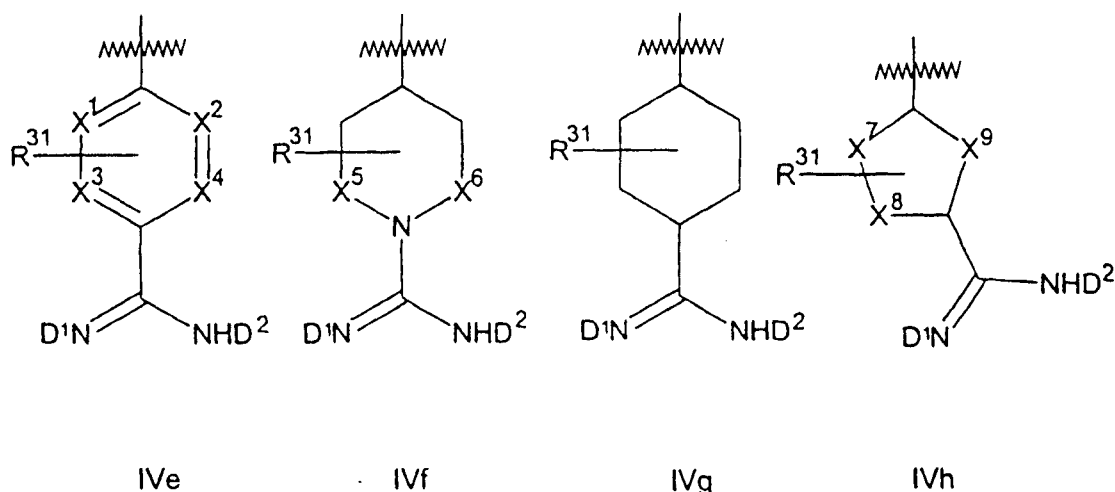
保护基的用途在下列文献中有详细描述: 《有机化学中的保护基》(Protective Groups in Organic Chemistry), J.W.F. McOmie 编辑, Plenum 出版社(1973); 及《有机合成中的保护基》(Protective Groups in Organic Synthesis), 第二版, T.W. Greene & P.G.M. Wutz, Wiley-Interscience (1991)。

式 I 化合物某些保护的衍生物是新的, 它们可在形成式 I 化合物的最后脱保护阶段之前形成。

本发明另一方面还提供了式 Ia 化合物及其可药用盐,



其中 B^a代表式 IVe, IVf, IVg 或 IVh 结构片段,



其中 D¹和 D²在各种情况下分别代表 H, OH, OR^a, OC(O)R^b, OC(O)OR^c, C(O)OR^d, C(O)R^e, 其中 R^a, R^b, R^c, R^d和 R^e分别代表 C₁₋₁₂烷基(该烷基可以任意被氧间断和/或被卤素取代), 苯基, 萘基, C₁₋₃烷基苯基(这3种基团可以任意被 C₁₋₄烷基, C₁₋₄烷氧基, 硝基或卤素取代), 或-(C(R^f)(R^g))₂OC(O)C(R^h), 其中 R^f, R^g和 R^h分别代表 H 或 C₁₋₄烷基, 及 R¹, R², R³, R_x, Y, n, X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸, X⁹和 R³¹定义如上, 条件是 D¹和 D²不同时代表 H。

R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, R^f, R^g和 R^h代表的烷基及可以取代 R^a, R^b, R^c, R^d和 R^e的烷基可以是直链或支链的、饱和或不饱和的, 也可以是环状或开链或部分环状/开链的烷基。可以取代 R^a, R^b, R^c, R^d和 R^e的烷氧基可以是直链或支链的、饱和或不饱和的, 也可以是环状或开链或部分环状/开链的烷氧基。R^a, R^b, R^c, R^d和 R^e代表的烷基苯基中

的烷基部分可以是直链或支链的、饱和或不饱和的烷基。

可以取代 R^a , R^b , R^c , R^d 和 R^e 的卤素包括氟, 氯, 溴和碘。

片段 IVe, IVf, IVg 和 IVh 中键上的波浪线表示片段中键的位置。

优选的式 Ia 化合物包括其中 D^2 代表 H, D^1 代表 OH, OCH_3 , $OC(O)R^b$ 或 $C(O)OR^d$, 其中 R^b 和 R^d 定义如上的化合物。

上述优选的式 I 化合物结构同样适用于式 Ia 化合物。

式 Ia 化合物也可以根据本领域技术人员已知的技术直接从式 I 化合物制备。例如, 其中 B^a 代表式 Ive, Ivf 或 IVg 结构片段, 及 D^1 或 D^2 代表 OH 的式 Ia 化合物可以用本文所述制备式 X 化合物的方法或类似的方法制备。

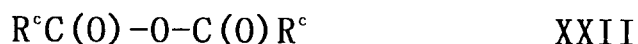
或者, 通过上述式 XIII 化合物与式 XXI 化合物



其中 R^{a1} 代表 H 或 R^a , 其中 R^a 定义如上,

例如, 在 $40-60^\circ\text{C}$, 在合适的碱 (如 TEA) 和适当有机溶剂 (如 THF, CH_3CN , DMF 或 DMSO) 存在下反应, 制备其中 B^a 代表式 IVe, IVf 或 IVg 结构片段, 及 D^1 或 D^2 代表 OH 或 OR^a 的式 Ia 化合物, 其中 R^a 定义如上。

或者, 根据本领域技术人员已知的技术, 经过式 Ia 化合物其它保护的衍生物制备式 Ia 化合物。例如, 通过相应的其中 D^1 或 D^2 (如果需要) 代表 OH 的式 Ia 化合物与式 XXII 化合物



其中 R^c 定义如上,

例如, 在室温及在合适的碱 (如 TEA, 吡啶或 DMAP) 和适当有机溶剂存在下反应, 制备其中 D^1 或 D^2 代表 $OC(O)OR^c$ 的式 Ia 化合物, 其中 R^c 定义如上。而且, 其中 D^1 或 D^2 代表 OH 的式 Ia 化合物可以通过相应的其中 D^1 或 D^2 (如果需要) 代表 $COOR^d$ 的式 Ia 化合物, 其中 R^c 定义如上, 与羟胺 (或其氢卤化物盐), 例如, 在 40°C 及在合适的碱 (如 TEA) 和适当有机溶剂 (如 THF) 存在下反应来制备。

式 XXI 和 XXII 化合物既是商品, 又可以从文献上获知, 或用已知技术制得。

本领域技术人员应该理解, 尽管这些式 I 化合物的保护的衍生物

(如式 Ia 化合物)可能不象式 I 化合物那样具有药物活性,但它们一样可以胃肠外或口服给药,然后它们在体内经过代谢可以形成具有药物活性的本发明化合物。因此,这种衍生物被称为“前药”。所有式 I 化合物的前药也属于本发明范围。

特别适合用作前药的式 I 化合物的保护的衍生物包括式 Ia 化合物。

而且,某些式 I 化合物可以作为另外一些式 I 化合物的前药。

式 I 化合物,其可药用盐,其互变异构体和立体异构体,及其前药(包括是式 I 化合物前药的式 Ia 化合物)今后统称为“本发明化合物”。

本领域技术人员应该理解,为了以其它的、偶然的、更方便的方式得到本发明化合物,上述各反应步骤可以不同的顺序进行,和/或各反应可在整个制备过程的不同阶段进行(即,取代基可以被加到,和/或所进行的化学转变过程依赖于,与具体反应相关的那些化合物的不同的中间体)。采用何种方案尤其取决于以下因素:具体底物中存在的其它官能团的性质,关键中间体的可利用性和将要采用的保护基策略(如果需要)。显然,所涉及的化学类型将影响要用于所说合成步骤的试剂的选择,所用保护基的取舍和类型,以及合成反应所要达到的结果。

医药用途

本发明化合物是有用的,因为它们具有药物活性,因此也就被称为药物。

根据本发明另一方面,本发明提供了将本发明化合物用作药物的用途。

特别是,本发明化合物是胰蛋白酶类蛋白酶,尤其是凝血酶的有力的抑制剂。不论是其本身还是作为前药,在给哺乳动物(包括人)给药之后,例如在下述试验中给药后,它们都是有力的抑制剂。

因此,人们预期能将本发明化合物用于需要抑制凝血酶的病症。

因此,预料本发明化合物可用于治疗或预防动物(包括人)血液和组织中的血栓形成和凝固性过高。

已知凝固性过高可以导致血栓栓塞疾病。与上述凝固性过高和血栓栓塞有关的病症包括活化蛋白质 C 抗性,如因子 V 突变(因子 V

Leiden), 以及在抗凝血 III, 蛋白质 C, 蛋白质 S 和肝素余因子 II 方面的遗传性或获得性缺陷。其它已知的与凝固性过高和血栓栓塞有关的病症包括循环式抗磷脂抗体 (Lupus 抗凝血剂), 高半胱氨酸 (homocysteinemi), 肝素引起的血小板减少和纤维蛋白溶解中的缺陷。因此, 预料本发明化合物既可以治疗也可以预防这些病症。

本发明化合物还预示它能治疗没有凝固性过高征兆的凝血酶不良性过高的病症, 例如, 神经变性类疾病如阿尔茨海默病。

具体的上述疾病状态包括想要治疗或预防的静脉血栓形成和肺栓塞, 动脉血栓形成 (如心肌梗塞, 不稳定性心绞痛, 血栓形成引起的中风和末梢动脉血栓形成) 和全身性栓塞, 通常源于动脉纤维性颤动期间的 (前) 心房或源于透壁性心肌梗塞之后的左心室。

而且, 本发明化合物预计可以用来预防血栓形成, 经皮透照血管成形术 (PTA) 和冠状旁路手术之后的再闭合 (即血栓形成); 防止通常情况下显微手术和血管手术之后再次形成血栓。

其它作用包括治疗和/或预防细菌, 多处创伤, 中毒或任何其它机理引起的播散性血管内凝结; 当血液与身体的外来物表面接触时, 如与血管移植物, 血管斯滕特氏印模, 血管导管, 机械和生物修复阀或其它任何医疗设备接触时所作的抗凝结处理; 当血液与身外医疗设备表面接触时, 如在用心肺机进行心血管手术期间或在进行血液透析时所作的抗凝结处理。

除了对凝结过程起作用之外, 凝血酶对大量细胞 (如中性细胞, 成纤维细胞, 内皮细胞和平滑肌细胞) 的活化作用也是已知的。因此, 本发明化合物也可用于治疗 and/或预防自发性和成人呼吸窘迫综合征, 放射性治疗或化疗之后的肺纤维化, 脓毒性休克, 败血症, 炎症反应, 例如包括, 但不限于, 水肿, 急性或慢性动脉粥样硬化如冠状动脉疾病, 脑动脉疾病, 末梢动脉疾病, 再灌注损伤, 及经皮透照血管成形术 (PTA) 之后的再狭窄。

抑制胰蛋白酶和/或凝血酶的本发明化合物也可以用于治疗胰腺炎。

根据本发明另一方面, 本发明还提供了需要或想要抑制凝血酶的病症的治疗方法, 该方法包括给患有或怀疑患有这种病症的患者使用有效量的本发明化合物或其可药用盐。

本发明化合物通常可以用含有游离碱形式或可药用无毒有机或无机酸加成盐形式的活性化合物，并为可药用剂型的药物制剂经口服，静脉内，皮下，向颊，直肠，皮肤，鼻，气管，支气管，或任何其它胃肠外途径或经过吸入进行给药。取决于所要治疗的疾病和患者以及给药途径，本组合物可以多种剂量给药。

本发明化合物还可以与任何有不同作用机理的抗血栓形成剂结合和/或联合给药，如抗血小板剂乙酰基水杨酸，氯吡格雷，clopidogrel，血栓烷受体和/或合成酶抑制剂，纤维蛋白原受体拮抗剂，前列腺环素拟态和磷酸二酯酶受体拮抗剂，及ADP受体(P₂T)拮抗剂。

本发明化合物还可以与溶解血栓剂结合和/或联合给药，如组织纤溶酶原活化剂（天然的，重组的或改性的），链激酶，尿激酶，前尿激酶，茴香酰基化纤溶酶原-链激酶活化剂络合物（APSAC），动物涎腺纤溶酶原活化剂等，治疗血栓形成疾病，尤其是心肌梗塞。

根据本发明另一方面，本发明还提供了药物制剂，其中含有本发明化合物，以及与其混合的可药用辅剂，稀释剂或载体。

在进行人类患者的治疗时，本发明化合物口服给药合适的日剂量约为0.001-100mg/kg（体重），胃肠外给药合适的日剂量约为0.001-50mg/kg（体重）。

本发明化合物具有比现有技术中已知的化合物更有效，更低毒，更长效，更宽活性范围，更有效力，副作用更少，更容易被吸收的优点，以及其它有用的药物性质。

生物试验

试验 A

凝血酶凝结时间（TT）的测定

将人凝血酶（T6769，Sigma Chem. Co.）在100μL pH 7.4的缓冲液和100μL抑制剂溶液中培养1分钟。加入100μL混合的正常人柠檬酸钠血浆，然后在自动仪器（KC 10，Amelung）中测量凝结时间。

画出凝结时间（以秒为单位）与抑制剂浓度的关系曲线，并用内插法测定IC₅₀TT。

IC₅₀TT是试验中使人血浆凝血酶凝结时间加倍的抑制剂浓度。

试验 B

机器人测定：用显色法测定凝血酶抑制情况

凝血酶抑制剂的效力是用底物显色法在 Plato3300 机器人微(滴定)板处理器 (Rosys AG, CH-8634 Hombrechtikon, Switzerland) 中测量的,使用的是 96 孔半容积微滴定板 (Costar, Cambridge, MA, USA; Cat. No. 3690)。试验底物在 DMSO 中制成的存储液 (72 μ L; 1 mmol/L) 用 DMSO 以 1: 3 (24 + 48 μ L) 比例进行稀释, 得到 10 个不同浓度的样品, 它们将被用于测定。将 2 μ L 试验样品用 124 μ L 测定缓冲液, 在测定缓冲液中加入 12 μ L 显色底物溶液 (S-2366, Chromogenix, Molndal, Sweden) 和 12 μ L α -凝血酶溶液 (人 α -凝血酶, Sigma Chem. Co.), 然后将样品混合。最后, 测定浓度为: 试验底物 0.00068 - 13.3 μ mol/L, S-2366 0.30 mmol/L, α -凝血酶 0.020 NIHU/mL。在 37 $^{\circ}$ C 培养 40 分钟期间吸收的线性递增被用来计算抑制试验样品的百分比, 与没有抑制剂的空白样品进行比较。对应抑制 50% 凝血酶活性的抑制剂浓度记为 IC₅₀-机器人值, 由“对数剂量-抑制 %”曲线计算。

试验 C

人凝血酶抑制常数 K_i 的测定

K_i 的测定是用底物显色法在 37 $^{\circ}$ C 及在 Cobas Bio 离心分析仪 (Roche, Basel, Switzerland) 上进行的。用各种浓度的试验化合物对人 α -凝血酶培养后剩下的酶活性可以 3 个不同的底物浓度进行测定, 而且测量在 405nm 处的光吸收变化。

将试验化合物溶液 (100 μ L; 通常在缓冲液或含有 10g/L BSA 的盐水中) 与 200 μ L 含有人 α -凝血酶 (Sigma Chem. Co.) 和 BSA (10g/L) 的测定缓冲液 (0.05mol/L Tris-HCl pH7.4, 用 NaCl 将离子强度调节到 0.15) 混合, 然后作为样品在 Cobas Bio 离心分析仪中进行分析。将 60 μ L 样品与 20 μ L 水一起加到 320 μ L 含有底物 S-2238 (Chromogenix AB, Molndal, Sweden) 的测定缓冲液中, 并监测吸收变化 ($\Delta A/\text{min.}$)。S-2238 的最终浓度为 16, 24 和 50 μ mol/L, 凝血酶的最终浓度为 0.125 NIH U/mL。

稳定态反应速率被用于构成 Dixon 曲线图, 即抑制剂 - $1/(\Delta A/\text{min.})$ 图。由于是可逆的竞争性抑制剂, 所以, 不同底物浓度的数据点一般都形成直线, 在 x 轴的截距即为 $-K_i$ 。

试验 D

活化部分凝血激酶时间 (APTT) 的测定

在混合的正常人柠檬酸钠血浆中用 Stago 制造的试剂 PTT Automated 5 测定 APTT。将抑制剂加到血浆中 (10 μ L 抑制剂溶液比 90 μ L 血浆)，然后加入上述试剂和氯化钙溶液，并在试剂厂商的指导下用凝结分析仪 KC10 (Amelung) 测定混合物的 APTT。画出凝结时间 (秒) 与血浆中抑制剂浓度的关系曲线，并用内插法测定 IC₅₀TT。

IC₅₀TT 被定义为使活化的部分凝血激酶时间加倍的人血浆中抑制剂的浓度。

试验 E

体外 (ex vivo) 凝血酶时间的测定

将溶解于乙醇: Solutol™: 水 (5: 5: 90) 的式 I 和 Ia 化合物给小鼠口服或胃肠外给药后，在实验前一或两天通过在小鼠身上装的导管从颈动脉获取的血样检查凝血酶的抑制情况。在实验那天，在将试验化合物加到盛有 1 份柠檬酸钠溶液 (0.13mol/L) 和 9 份血液的弹性试管中之后以固定的时间抽取血样。将试管离心以得到血小板稀少的血浆。用下面所述方法测定该血浆的凝血酶时间。

将 25 μ L 小鼠柠檬酸钠血浆用 25 μ L 0.9% 盐水溶液稀释，通过加入 25 μ L 含人凝血酶 (T6769, Sigma Chem. Co., USA) 的缓冲液 (pH 7.4) 使血浆凝结。在自动仪器 (KC10A-micro, Amelung, 德国) 中测量凝结时间。

如果用式 Ia 化合物给药，则用与混合的小鼠柠檬酸钠血浆中的凝血酶时间有关的标准曲线估算小鼠血浆中相应的式 I 活性凝血酶抑制剂的浓度，从而知道溶解在盐水中对应的“活性”凝血酶抑制剂的浓度。

根据估算的式 I 活性凝血酶抑制剂 (其中假设凝血酶时间的延长是由上述化合物引起的) 在小鼠身上的血浆浓度，口服和/或胃肠外给药相应的式 Ia 化合物后血浆浓度-时间曲线下方的面积将用梯形法则和向无穷大的数据外推来计算。

式 Ia 化合物口服或胃肠外给药后式 I 活性凝血酶抑制剂的生物利用度用下式计算：

$$(\text{AUC}_{\text{pd}}/\text{剂量}) / (\text{AUC}_{\text{活性, 胃肠外}}/\text{剂量}) \times 100$$

其中 AUC_{活性, 胃肠外} 代表给上述有知觉的小鼠进行相应的式 I 活性凝血酶抑制剂胃肠外给药后得到的 AUC。

试验 F

体外尿中凝血酶时间的测定

将口服或胃肠外给药本发明化合物后随尿排出的一定量的式 I 活性凝血酶抑制剂溶解于乙醇: Solutol™: 水 (5: 5: 90), 然后通过测定体外尿中的凝血酶时间来估算式 I 活性凝血酶抑制剂的量 (其中假设凝血酶时间的延长是由上述化合物引起的)。

将有知觉的小鼠放在代谢笼中, 口服本发明化合物 24 小时后分开收集尿和粪便。用上述收集的尿测定凝血酶时间。

将 100 μ L 混合的正常人柠檬酸钠血浆与浓缩的鼠尿或其盐水稀释液一起培养 1 分钟。加入 100 μ L 含人凝血酶 (T6769, Sigma Chem. Co.) 的缓冲液 (pH 7.4) 使血浆开始凝结。在自动仪器 (KC 10; Amelung) 中测量凝结时间。

用与混合的正常人柠檬酸钠血浆中的凝血酶时间有关的标准曲线估算鼠尿中式 I 活性凝血酶抑制剂的浓度, 从而知道溶解在浓鼠尿 (或其盐水稀释液) 中上述活性凝血酶抑制剂的浓度。将 24 小时内鼠尿总量乘以估算的尿中上述活性抑制剂的平均浓度, 可以计算出随尿排出的活性抑制剂的量 (AMOUNT_{pd})。

口服或胃肠外给药前药后式 I 活性凝血酶抑制剂的生物利用度用下式计算:

$$(\text{AMOUNT}_{\text{pd}}/\text{剂量}) / (\text{AMOUNT}_{\text{活性, 胃肠外}}/\text{剂量}) \times 100$$

其中 AMOUNT_{活性, 胃肠外} 代表给上述有知觉的小鼠进行相应的式 I 活性凝血酶抑制剂胃肠外给药后尿中排出的量。

本发明将以实施例方式加以说明。

实施例

一般实验方法

质谱数据记录在装有电喷接口 (FAB-MS) 的 Finnigan MAT TSQ 700 三倍四极质谱仪和装有电喷接口 (LC-MS) 的 VG Platform II 质谱仪上。¹H NMR 和 ¹³C NMR 测量分别在 BRUKER ACP 300 和 Varian UNITY+ 400, 500 和 600 谱仪上进行, 对于 ¹H, 操作频率为 300.13, 399.96, 499.82 和 599.94 MHz; 对于 ¹³C, 操作频率为 75.46, 100.58,

125.69 和 150.88 MHz. 制备性 HPLC 用反相柱 (250mm, 20 或 50mm; 5-7 μ M 相 Chromasil C8) 进行, 流量为 10-50mL/min., 用 UV 探测器测量 (240-290nm)。

实施例 1

(2,5-diMeO)Ph-(S)-或(R)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-Pab(2-Cl) × HOAc

(i) 4-叠氮基甲基-3-氯苄腈

将 8.0g (0.035mol) 4-溴甲基-3-氯苄腈 (《药物科学杂志》(J. Pharm. Sci.), 75: 410 (1986)), 2.7g (0.042mol) 叠氮化钠, 1.2g (3.4mmol) 四丁基硫酸氢铵, 0.30g (3.4mmol) 碳酸氢钠, 7ml 水和 20ml 甲苯的混合物剧烈搅拌 3 天。分离各相, 水相用醚萃取三次。合并的有机相用水洗涤, 硫酸钠干燥, 然后蒸发, 得到 6.7g (100%) 小标题化合物。

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃): δ 4.60 (s, 2H), 7.57 (d, 1H), 7.61 (m, 1H), 7.70 (d, 1H)

(ii) 4-氨基甲基-3-氯苄腈

将 4-叠氮基甲基-3-氯苄腈 (1.0g, 5.2mmol; 上面步骤(i)所得) 溶解于 9ml 水和 1ml 乙醇中。加入三苯膦(1.5g), 将混合物搅拌过夜。蒸发除去乙醇, 剩余物在 1M HCl 和苯之间分配。水相用苯萃取多次, 然后冻干。该胺盐酸盐的产量为 0.54g (51%)。

¹H-NMR (400 MHz; D₂O) HCl salt: δ 4.42 (s, 2H), 7.69 (d, 1H), 7.81 (dd, 1H), 7.98 (d, 1H)

(iii) (R,S)-3-羟基-2-(2,5-二甲氧基苯基)丙酸乙酯

在-15℃向 3-氧基-2-(2,5-二甲氧基苯基)丙酸乙酯(7.6g, 30mmol; 根据《有机化学杂志》(J. Org. Chem.), 54: 3831 (1989) 所述方法制备) 的乙醇溶液中加入 NaBH₄ (2 当量)。在-15℃搅拌 2 小时后在-5℃再搅拌 4 小时。加水, 浓缩反应混合物, 剩余物用乙酸乙酯萃取。用盐水洗涤有机相, 干燥(MgSO₄), 然后浓缩, 得到 7.7g (100%) 小标题化合物。

(iv) (2, 5-diMeO)Ph-(R, S)-CH(CH₂OH)-COOH

将上面步骤(iii)所得乙酯(7.4g, 29mmol)溶解于 THF: 水 (1: 1)。加入 LiOH×H₂O (2 当量), 然后将反应混合物在室温搅拌 2 小时。浓缩反应混合物, 并用 CH₂Cl₂ 萃取。水相用 HCl (2M) 酸化至 pH 2, 然后用 CH₂Cl₂ 萃取三次。合并有机相, 干燥 (Na₂SO₄), 然后浓缩, 得到 5.4g (82%) 小标题化合物。

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 6.89 (d, 1H); 6.85 (d, 1H); 6.78 (dd, 1H); 4.86 (broad, 2H); 4.14 (dd, 1H); 3.98 (dd, 1H); 3.78 (s, 3H); 3.72 (s, 3H); 3.67 (dd, 1H)

(v) (2, 5-diMeO)Ph-(R, S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-OBn

将 1.8ml (9.6mmol) 二异丙基乙胺加到冰冷却的 0.50g (2.2mmol) (2, 5-diMeO)Ph-(R, S)-CH(CH₂OH)-COOH(上面步骤(iv)所得), 0.58g (2.4mmol) H-Pro-OBn 和 0.77g (2.4mmol) TBTU 的 10ml DMF 的混合物中。将反应混合物在室温搅拌过夜, 然后将其倒入 1M HCl 中, 并用乙酸乙酯: 甲苯 (1: 1) 萃取两次。合并的有机相用 NaHCO₃ (水溶液) 和水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄) 并蒸发。产物是纯的, 可直接用于下一步反应。产率: 0.91g (100%)。

¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃) 非对映体混合物: δ 1.8-2.3 (m, 4H), 3.0-3.1 (m, 1H), 3.18 (m, 1H, 非对映体), 3.34 (m, 1H, 非对映体), 3.46 (m, 1H, 非对映体), 3.65-3.7 (m, 1H), 3.75-3.9 (m, 7H, 有 4 个单峰在 3.77, 3.80, 3.85 和 3.87 ppm), 3.95-4.05 (m, 1H), 4.39 (m, 1H, 非对映体), 4.46 (m, 1H, 非对映体), 4.58 (m, 1H, 非对映体), 4.63 (m, 1H, 非对映体), 5.18 (d, 1H, 非对映体), 5.26 (s, 1H, 非对映体), 5.32 (d, 1H, 非对映体), 5.37 (s, 1H, 非对映体), 6.8-7.0 (m, 3H), 7.2-7.5 (m, 5H)

(vi) (2, 5-diMeO)Ph-(R, S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-OH

将 (2, 5-diMeO)Ph-(R, S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-OBn (0.91g,

2.2mmol; 上面步骤(v)所得) 在大气压下及 50mg 10% Pd/C 存在下在 25ml 乙醇中氢化 2 小时。混合物经硅藻土过滤, 然后蒸发, 得到 0.71g (100%) 小标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; CDCl_3) 非对映体混合物: δ 1.8-2.3 (m, 4H), 3.02 (m, 1H, 非对映体), 3.15 (m, 1H, 非对映体), 3.47 (m, 1H, 非对映体), 3.7-3.8 (m, 5H, 对应于 3.47 的其他非对映体及二个单峰 3.74 和 3.76 ppm), 3.83-3.85 (m, 3H), 4.0-4.1 (m, 1H), 4.38 (m, 1H, 非对映体), 4.50 (m, 1H, 非对映体), 4.56 (m, 1H, 非对映体), 4.63 (m, 1H, 非对映体), 6.8-6.9 (m, 3H)

(vii) (2, 5-diMeO)Ph-(R 及 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-NHCH₂-Ph(2-Cl, 4-CN)

将 0.76ml (4.4mmol) 二异丙基乙胺加到冰冷却的 0.35g (1.1mmol) (2, 5-diMeO)Ph-(R, S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-OH (上面步骤(vi)所得), 0.22g (1.1mmol) 4-氨基甲基-3-氯苄腈(上面步骤(ii)所得) 和 0.35g (1.1mmol) TBTU 的 10ml DMF 的混合物中。将反应混合物在室温搅拌 2 天, 然后将其倒入 1M HCl 中, 并用乙酸乙酯: 甲苯 (1: 1) 萃取两次。合并的有机相用 NaHCO_3 (水溶液) 和水洗涤, 干燥(Na_2SO_4) 并蒸发。粗产物在硅胶上进行快速色谱纯化, 用 EtOAc:MeOH (99:1) 洗脱。分离各非对映体。总产率: 0.48g (94%)。初次分离得到 0.22g 非对映体 A。

非对映体 A

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): δ 1.7-2.1 (m, 3H), 2.34 (m, 1H), 2.90 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 3.73-3.8 (m, 4H, 单峰 : 3.75), 3.82 (s, 3H), 4.01 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.56 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 6.75-6.85 (m, 3H), 7.53 (d, 1H), 7.56 (dd, 1 H), 7.65 (d, 1H), 7.68 (m, 1H)

(viii) (2, 5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-NHCH₂-Ph(2-Cl, 4-C(NH)OMe)

将 (2, 5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-NHCH₂-Ph(2-Cl, 4-CN) (0.22g, 0.47mmol; 上面步骤(vii)所得非对映体 A) 溶解于用氯化氢气体饱和的 25ml 甲醇中, 然后在冰箱中放置 2 天。蒸发后得到无需进一步纯化即可用于下步反应的粗产物。MS(M+1)⁺ 504.

(ix) (2, 5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-Pab(2-Cl) × HOAc

将上面步骤(viii)所得粗产物的一半溶解于用氨气饱和的 25ml 甲醇中, 然后在室温下放置 5 天。蒸发除去溶剂, 剩余物用制备性 HPLC 纯化, CH₃CN: 0.1M NH₄OAc (30: 70) 洗脱。从水中冻干, 得到 9mg (7%) 所要产物。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; D_2O) 旋转异构体: δ 1.8-2.4 (m, 7H, 单峰 :

at 1.93 ppm), 3.35 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.7-3.9 (m, 8H,

单峰 3.80, 3.81 和 3.86 ppm (旋转异构体)), 4.05 (m, 1H), 4.4-4.65

(m, 3H), 6.82 (d, 1H, 主旋转异构体), 6.86 (d, 1H, 次旋转异构体), 6.95-

7.05 (m, 1H), 7.08 (d, 1H, 主旋转异构体), 7.23 (d, 1H, 次旋转异构体),

7.59 (d, 1H), 7.63 (dd, 1H, 次旋转异构体), 7.73 (dd, 1H, 主旋转

异构体), 7.82 (d, 1H, 次旋转异构体), 7.98 (d, 1H, 主旋转异构体)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz; D_2O) 羰基和脒碳: δ 176.2,

174.6, 166.7

实施例 2(2,5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-Pab(2-Me) × HOAc(i) 3-甲基-4-乙烯基苄腈

氩气中将 0.75g (0.65mmol) 四(三苯膦)钯(0) 加到 5.1g (0.026mol) 4-溴-3-甲基苄腈和 8.3g (0.026mol) 乙烯基三丁基锡的 250ml 甲苯溶液中, 然后加热回流过夜。用一层硅藻土过滤混合物并蒸发。剩余物在硅胶上进行快速色谱分离, 庚烷: EtOAc (1: 1) 洗脱。产率: 4.0g (100%)。

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃): δ 2.36 (s, 3H), 5.46 (d, 1H), 5.73 (d, 1H), 6.90 (dd, 1H), 7.4-7.5 (m, 2H), 7.52 (d, 1H)

(ii) 4-羟基甲基-3-甲基苄腈

将 3-甲基-4-乙烯基苄腈 (0.40g, 2.8mmol; 上面步骤(i)所得) 溶解于 50ml 甲醇中, 并将溶液冷却到 -70℃。鼓入臭氧 (2 当量), 然后加入 0.20g (5.3mmol) 硼氢化钠和 5ml 水, 并撤掉冷却浴。4 小时后蒸发除去甲醇, 剩余物在 1M HCl 和乙醚之间分配。水相用乙醚萃取两次。合并的有机相用水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 然后蒸发, 得到 0.37g (90%) 所要产物, 无需进一步纯化即可用于下步反应。

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 2.29 (s, 3H), 3.07 (broad, 1H), 4.69 (s, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.53 (d, 1H)

(iii) 4-甲磺酰氧基-3-甲基苄腈

在 0℃ 将 1.2g (0.010mol) 甲磺酰氯滴加到 1.5g (0.010 mol) 4-羟基甲基-3-甲基苄腈 (得自上面步骤(ii)) 和 1.0g (0.010mol) 三乙胺的 50ml 二氯甲烷溶液中。将反应混合物在室温搅拌 3 小时, 然后依次用 1M HCl 和水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄) 及蒸发。产率: 2.1g (91%)。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3): δ 2.41 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 5.28 (s, 2H), 7.4-7.6 (m, 3H)

(iv) 4-叠氮基甲基-3-甲基苄腈

将 1.0g (0.015mol) 叠氮化钠和 10ml 水加到 2.1g (9.3mmol) 4-甲磺酰氧基-3-甲基苄腈(得自上面步骤(iii))的 20ml DMF 溶液中。将反应混合物在室温搅拌 1.5 小时, 然后倒入 200ml 水中, 用乙醚萃取三次。合并的有机相用水洗涤多次, 干燥(Na_2SO_4)及蒸发。产率: 1.4g (87%)。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3): δ 2.39 (s, 3H), 4.40 (s, 2H), 7.40 (d, 1H), 7.45-7.55 (m, 2H)

(v) 4-氨基甲基-3-甲基苄腈

根据上面实施例 1(ii)所述方法, 由在 18ml 乙醇和 2ml 水中的 1.4g (8.1mmol) 4-叠氮基甲基-3-甲基苄腈(得自上面步骤(iv))和 2.3g (9.0mmol) 三苯膦制备小标题化合物。产率: 0.60g (其中含有三苯膦氧化物杂质; 估计实际产率为 0.36g (28%))。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3): δ 2.38 (s, 3H), 3.90 (bs, 2H), 7.3-7.4 (m, 3H) 隐藏有三苯膦氧化物

(vi) (2,5-diMeO)Ph-(R 及 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-NHCH₂-Ph(2-Me, 4-CN)

根据上面实施例 1(vii)所述方法, 由 0.37g (1.2mmol) (2,5-diMeO)Ph-(R, S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-OH (见上面实施例 1(vi)), 0.42g 4-氨基甲基-3-甲基苄腈(得自上面步骤(v)), 估计纯原料的含量为 0.25g (1.7mmol), 0.38g (1.2mmol) TBTU 和 0.62g (4.8mmol) 二异丙基乙胺的 10ml DMF 溶液制备小标题化合物。将粗产物在硅胶上用快速色谱分离, 用 EtOAc: 丙酮 (9:1) 洗脱。分离两个非对映体。总产量 0.58g, 其中含有三苯膦氧化物杂质; 估计实际产

率为 0.45g (87%)。分离出的第一个要洗脱的非对映体记为非对映体 A。

非对映体 A (产量: 0.30g; 其中含有三苯膦氧化物杂质; 估计实际产量为 0.20g)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz; CDCl_3): δ 1.7-2.1 (m, 3H), 2.3-2.35 (m, 4H, 有一个单峰在 2.32 ppm), 3.1-3.2 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.7-3.8 (m, 4H, 有一个单峰在 3.73 ppm), 3.80 (s, 3H), 3.98 (m, 1H), 4.4-4.5 (m, 3H), 4.65 (m, 1H), 6.7-6.9 (m, 3H), 7.37 (d, 1H), 7.41 (s, 1H), 剩下的芳香信号被三苯膦掩盖

(vii) (2, 5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-NHCH₂-Ph(2-Me, 4-C(NH)OMe)

将 (2, 5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-NHCH₂-Ph(2-Me, 4-CN) (0.30g; 估计纯原料的实际含量为 0.20g (0.44mmol)); 上面步骤(vi)所得非对映体 A) 溶解于用氯化氢气体饱和的 25ml 甲醇中, 然后在室温下放置过夜。蒸发后得到无需进一步纯化即可使用的粗产物。TLC (EtOAc: 丙酮 (9:1)) 测量结果表明, 已无起始原料存在。

(viii) (2, 5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-Pab(2-Me)(OH)

将上面步骤(vii)所得粗产物溶解于 10ml 甲醇, 并加入 0.14g (2.0mmol) 羟胺盐酸盐和 0.40g (4.0mmol) 三乙胺。允许将混合物在室温下放置 2 天。蒸发及快速色谱 (硅胶, CH_2Cl_2 :MeOH (9:1) 洗脱) 分离, 得到 0.13g (60%) 所要化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz; CDCl_3): δ 1.80 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.27 (m, 1H), 3.22 (m, 1H), 3.65-3.8 (m, 5H, 有一个单峰 3.74 ppm), 3.80 (s, 3H), 4.06 (m, 1H), 4.32 (dd, 1H), 4.38 (dd, 1H), 4.51 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.93 (宽峰, 2H), 6.78 (dd, 1H), 6.81 (d, 1H), 6.85 (d, 1H), 7.08 (d, 1H), 7.16 (d, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.81 (bt, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz; CDCl_3) 羰基和脘碳: δ 174.7, 172.8, 154.9

(ix) (2, 5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-Pab(2-Me)

将 (2, 5-diMeO)Ph-(R 或 S)-CH(CH₂OH)-CO-Pro-Pab(2-Me) (OH) (65mg, 0.13mmol; 得自上面步骤(viii)) 溶解于 5ml 乙醇。加入 HOAc (用 Pasteur 滴管滴 8 滴) 和 40mg 10% Pd/C。将反应混合物在大气压下氢化 2 天。反应混合物通过硅藻土过滤, 然后蒸发。将剩余物溶解于水, 用乙酸乙酯洗涤, 然后冻干。产率: 46mg (65%)。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; D_2O) 旋转对映体: δ 1.8-2.1 (m, 6H, 一个单峰: at 1.92 ppm), 2.2-2.4 (m, 4H, 两个单峰: 在 2.24 (次要旋转对映体) 和 2.38 (主要旋转对映体)), 3.35 (m, 1H, 次要旋转对映体), 3.6-3.7 (m, 1H), 3.75-3.85 (m, 7H, 有三个单峰: 3.77, 3.79 和 3.84 ppm (旋转对映体)), 4.0-4.1 (m, 1H), 4.4-4.5 (m, 3H), 4.8 (m, 1H

部分被 HDO 峰掩盖), 6.80 (d, 1H, 主要旋转对映体), 6.85 (d, 1H, 主要旋转对映体), 6.9-7.1 (m, 2H), 7.45 (d, 1H, 主要旋转对映体), 7.51 (d, 1H, 主要旋转对映体), 7.55-7.65 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; D_2O) 羰基和脘碳: δ 175.4, 174.5 (次要), 174.2 (次要), 174.1, 167.1

实施例 3

将实施例 1 和 2 的标题化合物在上述试验 A 中进行测试, 结果表明, 二者表现出的 IC₅₀TT 值均小于 0.3 μM 。

缩写

aq	=	水溶液
Bn	=	苄基
DCC	=	二环己基碳化二亚胺
DIPEA	=	二异丙基乙胺
DMAP	=	N,N-二甲氨基吡啶
DMF	=	二甲基甲酰胺
DMSO	=	二甲亚砷
EDC	=	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二 亚胺盐酸盐
Et	=	乙基
EtOAc	=	乙酸乙酯
EtOH	=	乙醇
h	=	小时
HBTU	=	[N,N,N',N'-四甲基-0-(苯并三唑-1- 基)六氟磷酸脲鎓]
HOAc	=	乙酸
H-Pab	=	4-脒基苄胺
H-Pab(Z)	=	4-(N-苄氧羰基脒基)苄胺
H-Pab(2-Cl)	=	4-脒基-2-氯-苄胺
H-Pab(2-Me)	=	4-脒基-2-甲基-苄胺
HPLC	=	高效液相色谱
Me	=	甲基
MeOH	=	甲醇
Ph	=	苯基
Pr	=	丙基
i-PrOH	=	异丙醇
TBTU	=	[N,N,N',N'-四甲基-0-(苯并三唑-1- 基)四氟硼酸脲鎓]
TEA	=	三乙胺
THF	=	四氢呋喃
Z	=	苄氧羰基

前缀 n, s, i 和 t 通常的涵义分别是：正，异，仲和叔。如果没有特别说明，氨基酸的立体化学结构默认为 (S)。