



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109843894 B

(45) 授权公告日 2022.02.08

(21) 申请号 201780060128.9

(22) 申请日 2017.09.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109843894 A

(43) 申请公布日 2019.06.04

(30) 优先权数据
62/401,022 2016.09.28 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.28(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2017/055973 2017.09.28(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/060926 EN 2018.04.05(73) 专利权人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔(72) 发明人 A·卡萨雷兹 M·富雷加蒂
G·科克 林晓东 F·奥索拉
F·雷克 R·L·西蒙斯 朱庆明(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 胡晨曦 黄革生

(51) Int.Cl.

C07D 519/06 (2006.01)

A61K 31/535 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C07D 471/18 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102827067 A, 2012.12.19

CN 103649088 A, 2014.03.19

WO 2015052682 A1, 2015.04.16

WO 2016116788 A1, 2016.07.28

Maria Elvira Tranquillini, et al.. Synthesis and Antimicrobial Activity of 4-Amino Trinems.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.1996, 第6卷 (第14期), 第1683-1688页.

杨阳、刘明亮. β -内酰胺酶抑制剂合剂的最新研究进展.《国外医药(抗生素分册)》.2016, 第37卷(第03期), 第109-114页.

审查员 王凌霄

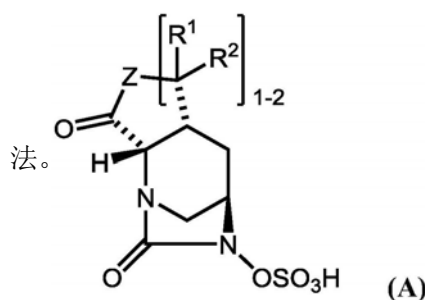
权利要求书5页 说明书74页
序列表7页 附图3页

(54) 发明名称

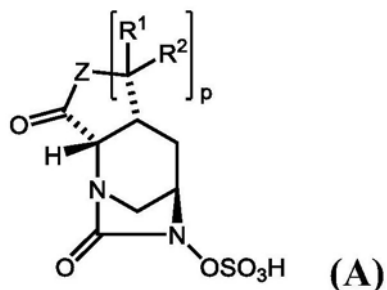
 β -内酰胺酶抑制剂

(57) 摘要

本发明一般性地涉及式(A)的化合物及其盐、晶型和制剂,如本文进一步描述的,其用作 β -内酰胺酶抑制剂。在某些方面,本发明涉及使用所述化合物与 β -内酰胺抗生素组合以治疗由革兰氏阴性细菌、包括耐药菌株引起的感染的方



1. 式 (A) 化合物或其盐或两性离子形式:



其中p是1或2;

R^1 和 R^2 独立地选自H和 C_1-C_4 烷基,该 C_1-C_4 烷基是未被取代的或被-OR取代;

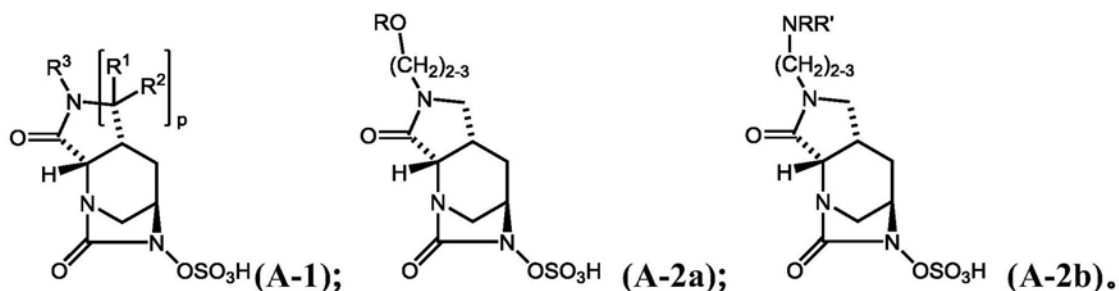
Z是 NR^3 ;

R^3 每次出现时都独立地选自H、Cy和 C_1-C_4 烷基,该 C_1-C_4 烷基是未被取代的或被-OR或-NRR'取代;

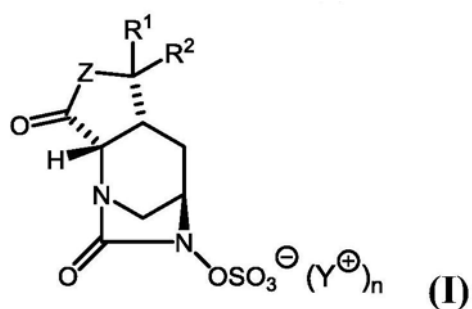
Cy是 C_3-C_6 环烷基环;且

R和R'独立地选自H和 C_1-C_4 烷基。

2. 如权利要求1所述的化合物,其为下式之一的化合物或其盐或两性离子形式:



3. 如权利要求1所述的化合物,其为式 (I) 化合物:



其中:

R^1 和 R^2 独立地选自H和 C_1-C_4 烷基,该 C_1-C_4 烷基是未被取代的或被-OR取代;

Z是 NR^3 ;

R^3 每次出现时都独立地选自H、Cy和 C_1-C_4 烷基,该 C_1-C_4 烷基是未被取代的或被-OR或-NRR'取代;

Cy是 C_3-C_6 环烷基环;且

R和R'独立地选自H和 C_1-C_4 烷基;

Y是阳离子基团;

n是0或1;且

当n是0时,式I化合物是以两性离子形式。

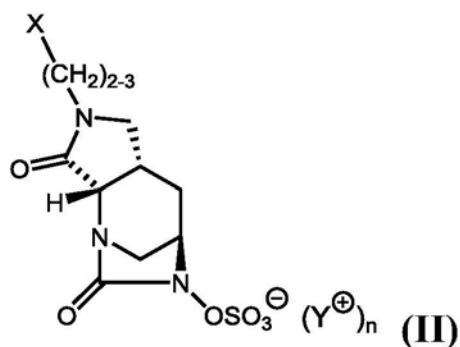
4.如权利要求1或3所述的化合物或其盐或两性离子形式,其中Z是 NR^3 ,且 R^3 是H或 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基,该 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基是未被取代的或被-OR或-NRR'取代。

5.如权利要求4所述的化合物或其盐或两性离子形式,其中 R^3 是 $\text{C}_1\text{-C}_2$ 烷基,其是未被取代的或被-OR或-NRR'取代。

6.如权利要求4所述的化合物或其盐或两性离子形式,其中 R^3 是H。

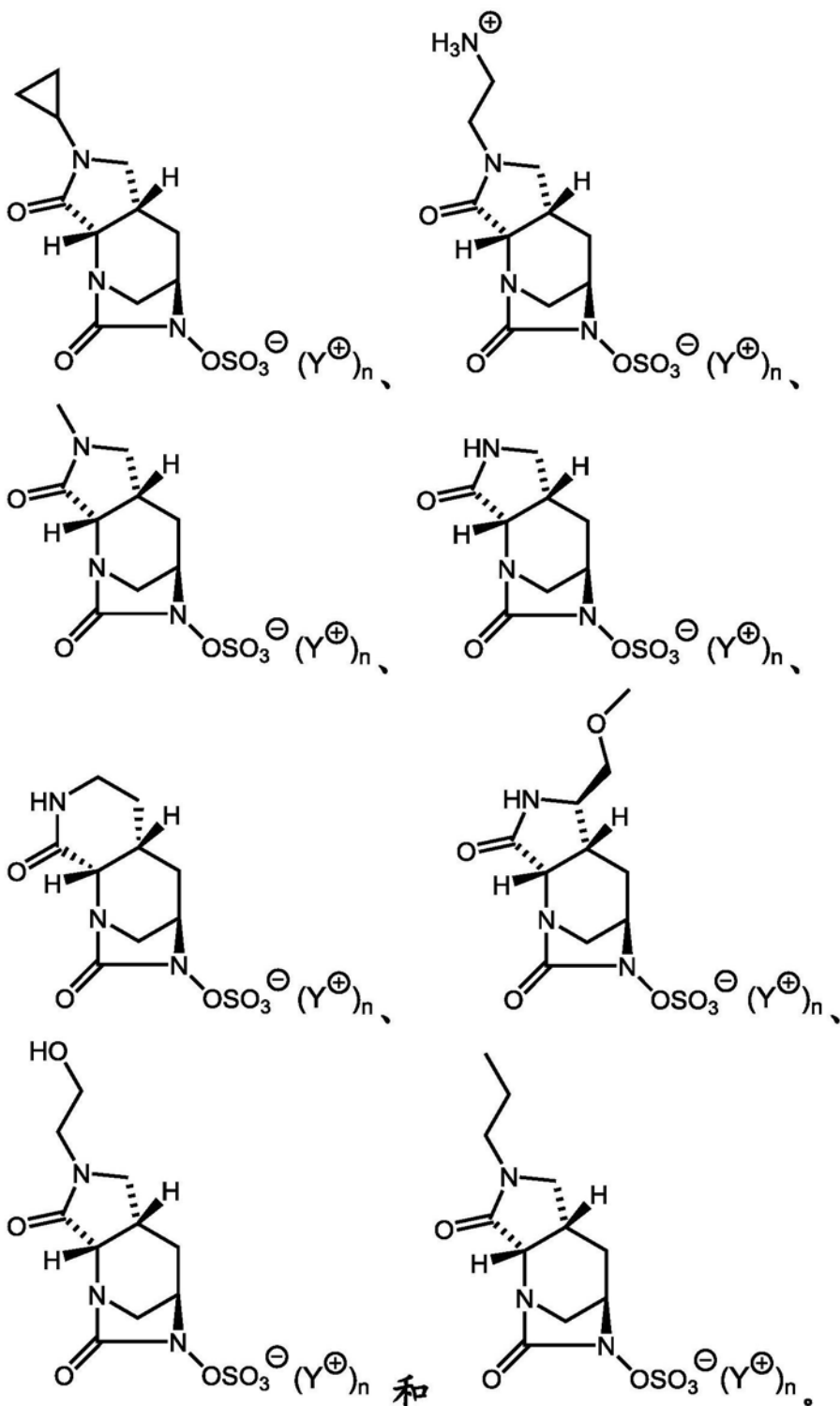
7.如权利要求1或3所述的化合物或其盐或两性离子形式,其中 R^1 和 R^2 都是H。

8.如权利要求1或3所述的化合物,以其盐或两性离子形式,其具有结构:



其中X是-OR或-NRR'。

9.如权利要求1或3所述的化合物,其选自:

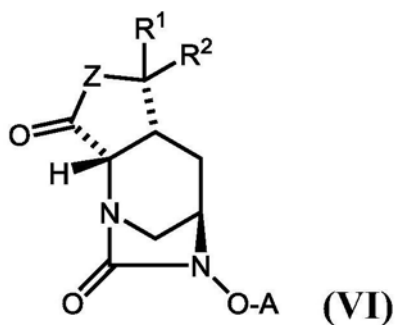


10. 如权利要求3所述的化合物,其中n是1且Y选自钠、钾和铵。

11. 如权利要求3所述的化合物,其中Y是钠。

12. 如权利要求1-3任一项所述的化合物,其是可药用的盐或两性离子形式。

13. 式 (VI) 化合物或其盐:



其中:

R¹和R²独立地选自H和C₁-C₄烷基,该C₁-C₄烷基是未被取代的或被-OR取代;

Z是NR³;

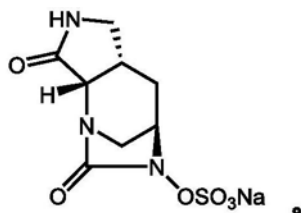
R³每次出现时都独立地选自H、Cy和C₁-C₄烷基,该C₁-C₄烷基是未被取代的或被-OR或-NRR'取代;

Cy是C₃-C₆环烷基环;且

R和R'独立地选自H和C₁-C₄烷基;

A是H或-CH₂-Ph,其中Ph代表苯基,其是未被取代的或被选自以下的一个或两个基团取代:卤素、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基。

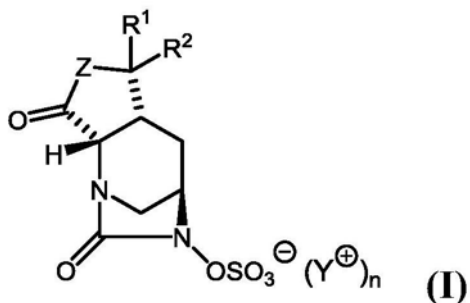
14. 式 (VII) 化合物:



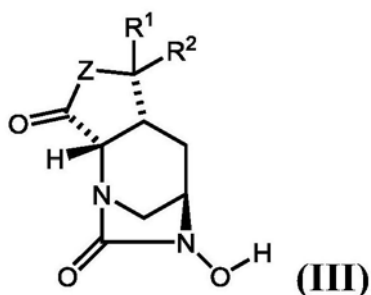
15. 权利要求14的化合物,其是结晶形式,其特征在于在衍射角(2θ)为8.3和16.6度处的XRPD峰,以及在衍射角(2θ)为25.1或31.3度的一个或多个另外的XRPD峰,以及在衍射角(2θ)为27.4或28.7度的一个或多个另外的XRPD峰,以及在衍射角(2θ)为19.5度或21.7度的另外的XRPD峰。

16. 权利要求15的化合物,其在差示扫描量热法中在283℃和350℃之间显示吸热。

17. 制备如权利要求3所述的式(I)化合物的方法,



其中该方法包括将式(III)化合物

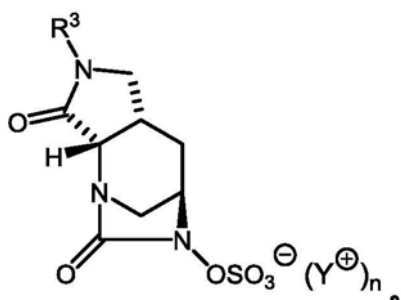


与磺酰化试剂在碱的存在下接触,

其中Z、R¹和R²和R³如权利要求3中所定义。

18. 权利要求17的方法, 其中Z是NR³, 且R³是H或者未取代的或被-OR或-NRR' 取代的C₁-C₂烷基。

19. 权利要求17或18的方法, 其中式(I) 化合物是下式



20. 权利要求18或19所述的方法, 其中R³是H。

21. 药物组合物, 其包含权利要求1或3所述的化合物和至少一种可药用赋形剂。

22. 权利要求1或3所述的化合物在制备用于治疗革兰氏阴性细菌感染的药物中的用途。

23. 权利要求22的用途, 其中所述细菌感染是由下述的物种引起: 伯克霍尔德菌属 (Burkholderia)、柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、克雷伯菌属 (Klebsiella)、摩根菌属 (Morganella)、莫拉菌属 (Moraxella)、普罗威登斯菌属 (Providencia)、假单胞菌属、变形菌属 (Proteus)、沙门氏菌属 (Salmonella)、沙雷氏菌属、不动杆菌属、拟杆菌属 (Bacteroides)、普雷沃氏菌属 (Prevotella)、弯曲杆菌属 (Campylobacter)、奈瑟氏球菌属 (Neisseria)、嗜血杆菌属 (Haemophilus) 或寡养单胞菌属的细菌。

24. 权利要求22或23的用途, 其中所述细菌感染是由肠杆菌科或假单胞菌属的物种引起的医院性肺炎、腹腔内感染或尿路感染。

25. 药物组合产品, 其包含权利要求1或3所述的化合物和β-内酰胺抗生素。

26. 权利要求25所述的药物组合产品在制备用于治疗革兰氏阴性细菌感染的药物中的用途。

β -内酰胺酶抑制剂

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2016年9月28日提交的美国临时申请号62/401,022的优先权,其内容引入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及抑制 β -内酰胺酶的化合物、制备这些化合物的方法和它们与 β -内酰胺类抗生素组合用于治疗细菌感染的用途。

背景技术

[0004] 在过去几十年中,抗微生物药的耐药性的频率和其与严重感染性疾病的关联已经以令人担忧的速度增加。医院病原体中越来越普遍的耐药性特别令人不安。在美国每年出现的超过两百万的医院感染中,50%-60%是由抗微生物药的耐药性菌株导致的。高比率的对常用的抗菌药的耐药性增加了与医院感染相关的发病率、死亡率和花费。在美国,医院感染被认为造成了或导致了每年超过77000人死亡,每年花费约50亿至100亿美元。

[0005] 目前可获得的最重要的抗生素是几类含有 β -内酰胺环的化合物,包括青霉素类、青霉烯类、碳青霉烯类、头孢菌素类、单环内酰胺类和硫内酰胺(sulfactam)类。这些 β -内酰胺抗生素通过与称为青霉素结合蛋白(PBP)的蛋白结合来抑制细胞壁生物合成,所述蛋白对于合成肽聚糖是必需的,所述肽聚糖是革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌的细胞壁的主要成分。虽然 β -内酰胺类抗生素在世界范围内仍然非常重要,但它们的广泛使用导致了一个巨大且日益严重的问题:细菌已经对 β -内酰胺类产生了抗性,正如它们对大多数其他可用的抗生素一样。事实上,世界卫生组织(WHO)表示抗生素耐药性是“严重的全球威胁……”。

[0006] 已经确认了对 β -内酰胺类抗生素的耐药性的一些不同机制:一些耐药菌株具有排泄抗生素的外排泵,而其他菌株发展出了突变的PBP,它们对抗生素的敏感性降低。耐药性的特别困难的形式是发展出与这些抗生素反应的细菌酶类,通过打开 β -内酰胺环而破坏抗生素。这些降解抗生素的酶被称为 β -内酰胺酶,由于它们能够赋予对许多不同的 β -内酰胺抗生素的抗性并且能够通过质粒在不同的细菌株系或物种之间转移,尤其造成了问题。在革兰氏阴性细菌中,有四类 β -内酰胺酶,即A、C、D类丝氨酸 β -内酰胺酶和金属 β -内酰胺酶(B类)。

[0007] 对 β -内酰胺抗生素耐药性的重要原因包括在肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和奇异变形菌(*Proteus mirabilis*)中的A类的超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)、丝氨酸碳青霉烯酶(例如KPC-2)和D类(例如OXA-48)的 β -内酰胺酶,在肠杆菌属(*Enterobacter*)物种和弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)中的由C类 β -内酰胺酶AmpC介导的对第三代头孢菌素类的高水平耐药性,以及假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)的多药耐药性菌株。抗菌药耐药性问题由于存在包含多种 β -内酰胺酶的细菌菌株而加强。例如,具有NDM-1金属- β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌常常在携带NDM-1的相同质粒上携带另外的丝氨酸

酸- β -内酰胺酶。

[0008] 由于 β -内酰胺抗生素是少数对革兰氏阴性细菌有效的类别,因此已经进行了许多努力以增强其控制抗性细菌菌株的能力,以避免失去这些极具价值的抗菌药物。例如,一些 β -内酰胺类在结构上进行了修饰,使它们对 β -内酰胺酶不太敏感,但这种方法很复杂,因为已经存在许多不同的 β -内酰胺酶,并且新的 β -内酰胺酶不断出现。另一种方法是通过使用小分子 β -内酰胺酶抑制剂(BLI)与 β -内酰胺抗生素组合来抑制降解这些抗生素的 β -内酰胺酶。这些BLI可以与批准的 β -内酰胺抗生素组合使用,以治疗感染细菌的患者,所述细菌由于 β -内酰胺酶活性而对单独的抗生素具有抗性。批准的BLI的实例包括克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦和阿维巴坦。据报道,其它(relebactam、vaborbactam(RPX7009)、zidebactam和nacubactam)正在开发中。

[0009] 在革兰氏阳性菌中,青霉素酶-型 β -内酰胺酶介导的青霉素抗性是金黄色葡萄球菌耐药(MSSA)的重要机制。 β -内酰胺酶介导的对青霉素的抗性也存在于厌氧菌中,如拟杆菌属。

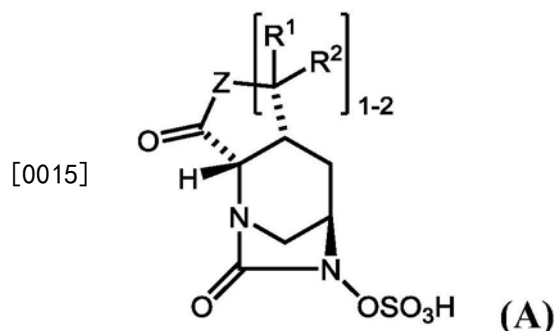
[0010] 三种最常用的丝氨酸 β -内酰胺酶抑制剂,克拉维酸、他唑巴坦和舒巴坦,仅对某些A类 β -内酰胺酶具有强效活性,不包括丝氨酸碳青霉烯酶。阿维巴坦(avibactam)是二氮杂双环辛烷(DBO)类 β -内酰胺酶抑制剂的成员,具有广谱的对A类(包括KPC)、C类和部分D类抑制作用。除了 β -内酰胺酶抑制外,阿维巴坦还通过抑制青霉素结合蛋白2(PBP-2)对一些临床菌株具有抗菌活性(Asli等人, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, No 2, 752, 2016)。具有这种作用机制抗菌化合物,包括DBO,在体外以非常高频选择抗性(Doumith等人, *J. Antimicrobial Chemotherapy* 2016, 71, 2810-2814)。因此,目前尚不清楚某些DBO β -内酰胺酶抑制剂的内在抗菌活性的任何潜在临床益处。阿维巴坦的弱抗菌活性可能不具有临床意义,因为阿维巴坦的临床剂量相当低,但是,它可能使体外药敏试验复杂化和/或促进抗性。阿维巴坦/ β -内酰胺组合对临床分离株的体外药敏试验通常使用高固定浓度的阿维巴坦(4 μ g/mL)进行,其可能不反映临床实现的水平。在这些人工体外测试条件下,阿维巴坦对抗菌活性的直接贡献可能影响预测阿维巴坦/ β -内酰胺酶组合的临床功效的准确性。缺乏显著抗菌活性的DBO β -内酰胺酶抑制剂不具有这种额外的混杂活性,体外测试方案仅测量临床分离株中 β -内酰胺酶介导的耐药性的逆转,从而能够基于体外易感性结果更准确地预测临床疗效。

[0011] 除了目前可用的BLI之外,在W02002/100860、US2003/0199541、US2004/0157826、W02008/039420和W02009/091856、US2010092443、W02010/126820、W02013/122888、W02013/038330、US2013/0225554、W02013149121、W02013149136、W02014141132和W02014/033560中公开了具有BLI活性的其他化合物。

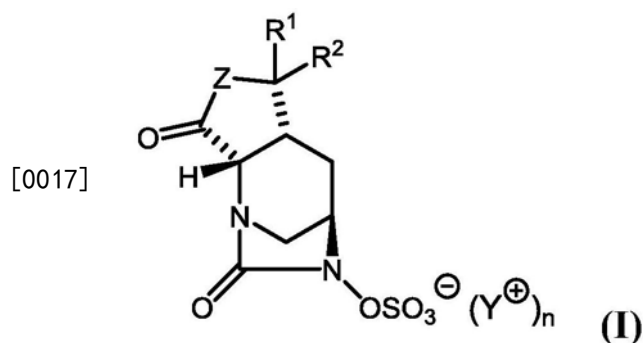
[0012] 先前描述的BLI的药代动力学和物理性质可能不适合与每种 β -内酰胺抗生素一起使用。此外,据报道已知的BLI随时间丧失有效性(K. Bush, *Int. J. Antimicrob. Agents* 46 (5), 483-93 (Nov 2015)),因为产生抗性细菌菌株,且新的 β -内酰胺酶不断出现。因此,仍然需要新的 β -内酰胺酶抑制剂来扩展有价值的 β -内酰胺抗生素的有用性;实际上,新型BLI还可以对抗对已知BLI的抗性以及对已知和未来开发的 β -内酰胺抗生素的抗性。本发明提供了新的 β -内酰胺酶抑制剂,其增强了多种 β -内酰胺抗生素的活性,同时它们本身几乎不表现出内在的(直接)抗生素活性。

[0013] 概述

[0014] 本发明包括新的BLI化合物、包含所述化合物的药物组合产品和药物制剂以及使用所述化合物和组合物治疗具有细菌感染的患者的方法。BLI与 β -内酰胺抗生素组合使用,所述抗生素例如青霉素衍生物、青霉烯、碳青霉烯、头孢菌素(头孢烯)、单环内酰胺或硫内酰胺类,主要用于治疗革兰氏阴性细菌感染,但也可用于治疗革兰氏阳性和厌氧菌感染,其中抗性是通过细菌产生 β -内酰胺酶介导。本发明包括式(A)的化合物及其变体,



[0016] 以及这些化合物的盐,包括式(I)化合物:



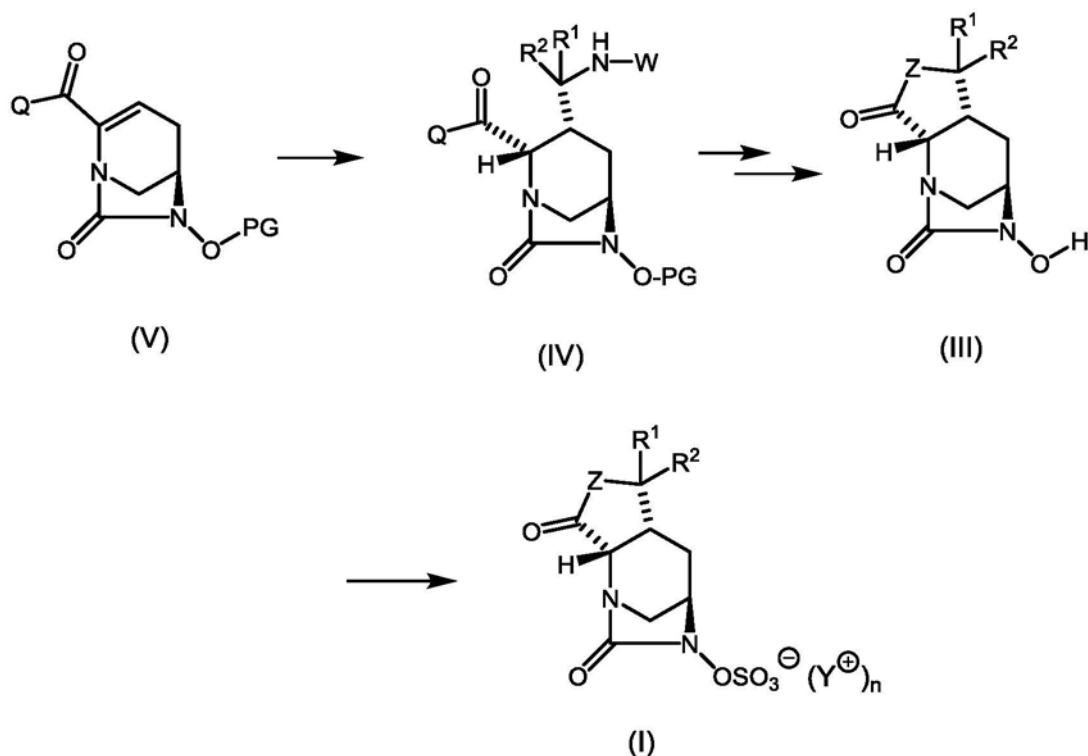
[0018] 其中式(I)化合物可以是盐形式或两性离子形式,如本文所进一步公开。

[0019] 本发明的BLI化合物用于与 β -内酰胺类抗生素(其实例在本文中公开)组合以治疗细菌感染,尤其是革兰氏阴性细菌感染。BLI和 β -内酰胺抗生素可以一起或分开施用,并且BLI增强 β -内酰胺抗生素至少对表现出对 β -内酰胺抗生素的抗性的细菌菌株的有效性,其中所述抗性由 β -内酰胺酶活性介导。 β -内酰胺类抗生素和式(A)的BLI的组合可用于治疗由以下细菌导致的感染:革兰氏阴性菌,包括肠杆菌科(Enterobacteriaceae),例如沙门氏菌属(Salmonella)、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌属(Proteus)、肠杆菌属(Enterobacter)、沙雷氏菌属(Serratia)、柠檬酸杆菌属(Citrobacter),非发酵菌,包括铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、不动杆菌属(Acinetobacter)、伯克霍尔德菌属(Burkholderia)、莫拉氏菌属(Moraxella)和寡养单胞菌属(Stenotrophomonas),革兰氏阳性菌,例如产生 β -内酰胺酶的金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus),以及厌氧细菌,例如脆弱拟杆菌(Bacteroides fragilis)或多形拟杆菌(Bacteroides thetaiotaomicron)。

[0020] 一方面,本发明提供新的式(A)和式(I)化合物,包括它们的盐或两性离子形式,它们可有效地作为一种或多种细菌 β -内酰胺酶的抑制剂。所述化合物可用于增强 β -内酰胺抗生素的抗菌活性。因此它们可以与 β -内酰胺抗生素组合使用。BLI和 β -内酰胺抗生素可以一起或分开施用;在一些实施方案中,式(A)或式(I)的BLI和 β -内酰胺抗生素组合在药物组合

物中,所述药物组合物通常还包含至少一种可药用载体。

[0021] 在一方面,本发明提供制备式(A)或式(I)化合物的方法和可用于制备如本文所述的式(A)或式(I)化合物的新前体。特别地,本发明提供了将式(V)化合物转化为式(IV)化合物的方法;和将式(III)化合物转化为式(I)化合物的方法。



[0023] 另一方面,本发明提供药物组合物,其包含与至少一种可药用载体或赋形剂混合的式(A)和式(I)化合物。在一些实施方案中,该组合物包含两种或更多种此类载体或赋形剂。任选地,该药物组合物还包含β-内酰胺抗生素,但BLI化合物可以与β-内酰胺抗生素分开配制和施用。

[0024] 另一方面,本发明提供用于治疗患有细菌感染的个体的方法,其包括向有此需要的个体施用抗菌有效量的β-内酰胺抗生素和有效量的式(A)或式(I)的BLI,包括盐和两性离子形式,任选与可药用载体组合。在某些实施方案中,个体是哺乳动物,并且在一些实施方案中,个体是人。该方面提供式(A)或式(I)的化合物,包括可药用盐或两性离子形式,用于治疗细菌感染,其中所述化合物与β-内酰胺抗生素组合使用。它还包括式(A)或式(I)化合物或其盐或两性离子形式在制备药物中的用途。优选地,所述药物是用于治疗革兰氏阴性细菌感染的药物,特别是具有足以赋予对β-内酰胺抗生素一定程度抗性的β-内酰胺酶活性的细菌,其中所述药物适于与例如本文所述的那些β-内酰胺抗生素组合使用。β-内酰胺抗生素和式(A)或式(I)的BLI化合物可以同时或分开并以任何顺序给药,条件是BLI与β-内酰胺抗生素同时存在于体内以增强β-内酰胺抗生素的有效性。

[0025] 革兰氏阴性菌可以是选自以下的属:柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、克雷伯菌属 (*Klebsiella*)、摩根菌属 (*Morganella*)、变形菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、沙雷氏菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)、弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、奈瑟氏球菌属 (*Neisseria*) 和寡养单胞菌属。特别是可通过本文所公开的方法治疗由柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、

克雷伯菌属、摩根菌属、变形菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、假单胞菌属或不动杆菌属的物种导致的细菌感染。对于所述治疗而言,具体细菌物种包括弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、柯氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter koseri*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*)、沙门氏菌属物种、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、铜绿假单胞菌和鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*),以及脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)、洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 和嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)。革兰氏阳性菌可以是例如粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 或肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)。

[0026] 另一方面,本发明提供抑制细菌生长或调节细菌感染毒力的方法,其中该方法包括给需要这种抑制的患者施用式 (A) 或式 (I) 化合物和 β -内酰胺抗生素。本文描述了用于这些方法的合适的 β -内酰胺抗生素。

[0027] 提供了本发明的药物组合物,其包含本文所述的任意一种化合物和可药用的载体。在一些实施方案中,所述组合物包含另外的治疗剂例如 β -内酰胺类抗生素。

[0028] 本发明的其它方面如本文所讨论。

[0029] 附图简述

[0030] 图1. 结晶的式 (VII) 化合物的SEM。

[0031] 图2. 结晶的式 (VII) 化合物的XRPD。

[0032] 图3. 结晶的式 (VII) 化合物的热重分析和差示扫描量热分析。

[0033] 发明详述

[0034] 为了解释本申请,应用下面的定义,另有规定或上下文清楚地有相反含义的除外。当适宜时,以单数形式使用的术语也包括复数,反之亦然。

[0035] 定义

[0036] 本申请中所用的术语具有下面的含义:

[0037] 本文所用的术语“个体”是指动物。在某些方面,所述动物是哺乳动物。个体还指例如灵长类动物(例如人)、牛、绵羊、山羊、马、犬、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼、鸟等。在某些实施方案中,所述个体是人。

[0038] 本文所用的术语“抑制作用”或“抑制”是指减轻或抑制给定病症、症状或障碍或疾病、或者显著降低生物学活性或过程的基线活性、或者降低菌群的生存力、数量或生长速度。

[0039] 本文所用的术语“治疗”任何疾病或病症或者任何疾病或病症的“治疗”在一个实施方案中是指改善所述疾病或病症(即,减慢或阻止或减少所述疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一个实施方案中,“治疗”是指减轻或改善至少一种机体参数,包括可能无法被患者辨别的那些机体参数。在另一个实施方案中,“治疗”是指在身体上(例如,稳定可辨别的症状)、生理学上(例如,稳定身体参数)或这两方面调节所述疾病或病症。在另一个实施方案中,“治疗”是指预防或延迟所述疾病或病症的发作或发生或进展。

[0040] 如文本所用的那样,本发明的上下文中(尤其是在权利要求的上下文中)所用的术语“一个”、“一种”、“该”和类似术语应理解为既涵盖单数,又涵盖复数,本文另有说明或者上下文显示含义相反的除外。

[0041] 除非本文另有说明或者上下文显示有相反含义,否则本文所述的所有方法可以以任意适合的顺序进行。本文所提供的所有实例和举例性语言(例如,“例如”、“如”)的使用仅仅旨在更好地举例说明本发明,不对在另外部分请求保护的本发明的范围构成限制。

[0042] 术语“抗菌剂”是指具有杀菌或抑菌活性的在实验室中合成或修饰的物质。在该上下文中“活性”物质或“活性”剂抑制铜绿假单胞菌和/或其它革兰氏阴性菌的生长。术语“抑制……的生长”表示特定细菌的菌群数量的增加速度被降低。因此,该术语包括其中菌群增加、但是以降低的速度增加的情况、以及其中菌群的生长停止的情况、以及其中菌群中的细菌数量减少或菌群甚至被消除的情况。

[0043] 术语“ β -内酰胺抗生素”是指具有抗菌活性的含有4-元内酰胺环(也称为 β -内酰胺)的抗菌剂。 β -内酰胺类抗生素包括青霉素类、头孢菌素类、单环 β -内酰胺类、碳青霉烯类、氧青霉烯类、头孢烯类、碳头孢烯类、氧头孢烯类、青霉烯类、青霉烷类、青霉烷砜类和棒烷类(clavams)。本文描述了适用于本发明方法和组合物的具体 β -内酰胺抗生素,包括氨曲南、哌拉西林、头孢他啶、美罗培南和 β -内酰胺5。

[0044] 本文所用的术语“ β -内酰胺酶”是指细菌具有或表现出的酶活性,其催化 β -内酰胺抗生素的降解或失活。通常,它催化单环或双环 β -内酰胺抗生素的 β -内酰胺环的水解,并且在革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌中表达,所述细菌可引起哺乳动物个体,尤其是人类的感染。感兴趣的 β -内酰胺酶包括A类(包括超广谱 β -内酰胺酶和丝氨酸碳青霉烯酶),以及C类和D类 β -内酰胺酶。

[0045] 本文所用的术语“ β -内酰胺酶抑制剂”或“BLI”是指抑制至少一种细菌 β -内酰胺酶的化合物。这意味着它抑制丝氨酸 β -内酰胺酶类中的至少一种,例如A、C或D类 β -内酰胺酶。通过降低 β -内酰胺酶活性,这些化合物增强了与BLI组合使用的 β -内酰胺抗生素的活性;这种作用在本文中称为增强作用,因为BLI本身不具有显著的抗菌活性、但是加大或增强抗生素在具有 β -内酰胺酶活性的细菌中的抗菌活性。增强作用是由于BLI允许 β -内酰胺类抗生素在细菌周围隔室内或细菌病原体附近体内保持更长时间,使抗生素更有效,或使其比没有式(A)的BLI的情况下所需剂量更低的剂量下有效。优选地,BLI在低于约100 μ g/mL(微克/mL),或低于约50 μ g/mL,或低于约25 μ g/mL的50%抑制浓度下有效。

[0046] 用于与本发明的BLI组合使用的合适的 β -内酰胺抗生素包括例如,氨曲南、亚胺培南、厄他培南、美罗培南、多利培南、比阿培南、哌拉西林、头孢曲松、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、头孢洛扎(ceftolozane)、头孢吡肟、帕尼培南、替卡西林、氨苄西林、阿莫西林、羧苄西林、阿洛西林、美洛西林、替卡西林、头孢哌酮、 β -内酰胺5(本文所示)等。

[0047] “任选被取代的”或“任选被……取代”意指所述基团可以在一个或多个位置上被其后列出的基团中的任意一个或任意组合取代。所述取代包括未被取代的基团的氢原子被另一种原子团替代;因此能被添加到任何未取代的基团上的取代基的数量等于所述的未被取代的基团上氢原子的数量。如果没有另外规定,‘任选被取代的’或‘任选被……取代’指可存在至多三个非氢取代基。

[0048] 本文所用的“卤代”或“卤素”可以是氟、氯、溴或碘。

[0049] 本文所用的“C₁-C₆烷基”或“C₁₋₆烷基”表示具有1-6个碳原子的直链或支链烷基。如果规定了不同数量的碳原子,例如C₈或C₃,则该定义作相应解释,例如“C₁-C₄烷基”包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

[0050] 本文所用的“C₁-C₆烷氧基”或“C₁₋₆烷氧基”表示具有1-6个碳原子的直链或支链烷氧基。如果规定了不同数量的碳原子,例如C₈或C₃,则该定义作相应解释,例如“C₁-C₄烷氧基”代表甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基和叔丁氧基。

[0051] 本文所用的“C₁-C₄-卤代烷基”或“C₁₋₄卤代烷基”表示其中至少一个氢已经被卤素代替的具有1-4个碳原子的直链或支链烷基。如果规定了不同数量的碳原子,例如C₆或C₃,则该定义作相应解释,因此“C₁-C₄-卤代烷基”代表具有至少一个被卤素替代的氢的甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基,例如在卤素是氟的情况下:CF₃CF₂-、(CF₃)₂CH-、CH₃-CF₂-、CF₃CF₂-、CF₃-CF₂H-、CF₃CF₂CHCF₃或CF₃CF₂CF₂CF₂-。

[0052] 本文所用的“C₃-C₈-环烷基”或“C₃₋₈环烷基”是指3-8个碳原子的饱和的单环烃环。这类基团的实例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。如果规定了不同数量的碳原子,例如C₃-C₆,则该定义作相应解释。

[0053] “4至8元杂环基”、“5至6元杂环基”、“3至10元杂环基”、“3至14元杂环基”、“4至14元杂环基”和“5至14元杂环基”分别指含有1-7个、1-5个或1-4个选自氮、氧和硫的杂原子的4至8元的、5至6元的、3至10元的、3至14元的、4至14元的和5至14元的杂环基环,其可以是饱和的或部分饱和的。“杂环”可以与“杂环基”互换使用。杂环基可以连接在杂原子或碳原子上。术语“杂环基”包括单环基团、稠环基团和桥环基团。所述杂环基的实例包括但不限于吡咯烷、哌啶、哌嗪、咪唑烷、吡咯烷酮、吗啉、四氢呋喃、四氢噻吩、四氢噻喃、四氢吡喃、1,4-二氧杂环己烷、1,4-氧杂硫杂环己烷、8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷、3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛烷、3-氧杂-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷、8-氧杂-3-氮杂-二环[3.2.1]辛烷、2-氧杂-5-氮杂-二环[2.2.1]庚烷、2,5-二氮杂-二环[2.2.1]庚烷、氮杂环丁烷、亚乙二氧基(ethylenedioxo)、氧杂环丁烷和噻唑烷。优选地,除非另有规定,否则杂环或杂环基是饱和的或部分饱和的单环基团,并且含有5-7个环原子,其中具有至多2个选自N、O和S的杂原子作为环成员。在一些实施方案中,杂环基团还包括含有1或2个杂原子例如N、O或S作为环成员的二环环系,其包含两个稠合的3、4、5或6元环,例如3-氮杂二环[3.1.0]己烷、8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷、3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛烷、3-氧杂-8-氮杂-二环[3.2.1]辛烷、8-氧杂-3-氮杂-二环[3.2.1]辛烷、2-氧杂-5-氮杂-二环[2.2.1]庚烷、2,5-二氮杂-二环[2.2.1]庚烷。

[0054] “杂芳基”是完全不饱和的(芳族的)环。术语“杂芳基”是指具有1-8个选自N、O和S的杂原子的5-14元的单环或二环或三环芳族环。典型地,所述杂芳基是5-10元的环系(例如,5-6元单环或8-10元二环)或5-6元的环系。除非另有规定,否则杂芳基优选是含有至多4个选自N、O和S的杂原子作为环成员的单独的5-6元环。典型的杂芳基包括呋喃、异噻唑、噻二唑、咪唑、吡唑、吡啶、喹啉、2-或3-噻吩基;2-或3-呋喃基;2-或3-吡咯基;1-、2-、4-或5-咪唑基;1、3-、4-或5-吡唑基;2-、4-或5-噻唑基、3-、4-或5-异噻唑基、2-、4-或5-咪唑基、3-、4-或5-异咪唑基、3-或5-(1,2,4-三唑基)、4-或5-(1,2,3-三唑基)、四唑基、三嗪、嘧啶、2-、3-或4-吡啶基、3-或4-哒嗪基、3-、4-或5-吡嗪基、2-吡嗪基和2-、4-或5-嘧啶基。

[0055] 术语“羟基”是指基团-OH,或者当作为基团名称例如羟基烷基的一部分被使用时,它是指被-OH取代的具有该名称的基团。

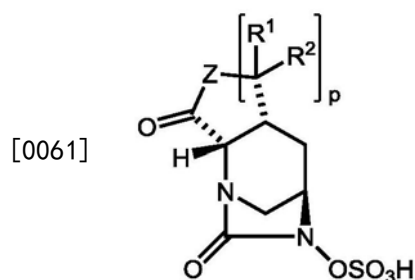
[0056] “两性离子”是具有带正电荷和带负电荷的基团但总电荷为零的分子,即+和-电荷在分子内平衡。为了将阴离子分子转化为中性分子,阴离子通常被中性基团替代,但是为了将阴离子分子转化为两性离子,则中性基团被阳离子基团替代。

[0057] 式(A)化合物以游离形式、盐或两性离子形式存在。在本说明书中,除非另有说明,否则诸如“式(A)化合物”的措辞应理解为包括任何形式的化合物,例如游离碱或酸加成或交换盐形式。还可包括盐,其可能不适于药用,但可用于例如分离或纯化游离的式(A)化合物,例如苦味酸盐或高氯酸盐。为了治疗用途,仅使用可药用的盐、两性离子或游离化合物(如果适用,以药物制剂的形式),因此是优选的。盐优选是生理学上可接受的盐,在适用时,通过加入酸或碱或通过离子交换形成。

[0058] 式(A)化合物可以以各种两性离子的形式存在。例如,式(A)化合物可显示质子化的氨基-基团和去质子化的硫酸根-基团。在本说明书中,游离形式的化合物的图也包括其它可能的两性离子。式(A)化合物的两性离子也包括在本发明中。

[0059] 式(A)化合物可以以光学活性形式或以光学异构体的混合物形式存在,例如,以外消旋混合物或非对映异构体混合物的形式。特别地,不对称碳原子可以存在于式(A)化合物及其盐中。本发明包括所有光学异构体及其混合物,包括外消旋混合物。本文描述了本发明的多种实施方案。应当理解,每个实施方案中所具体给出的特征可以与其它具体给出的特征组合,从而提供另外的实施方案。下面编号的实施方案是本发明的其他方面的代表。

[0060] 在一个实施方案中,本发明提供了式(A)化合物或其盐或两性离子形式:



[0062] 其中p是1或2;

[0063] R^1 和 R^2 独立地选自H和 C_1-C_4 烷基,该 C_1-C_4 烷基任选地被至多三个选自以下的基团取代:卤素、CN、-OR、氧代和-NRR';

[0064] Z是 NR^3 或 $N-OR^3$;

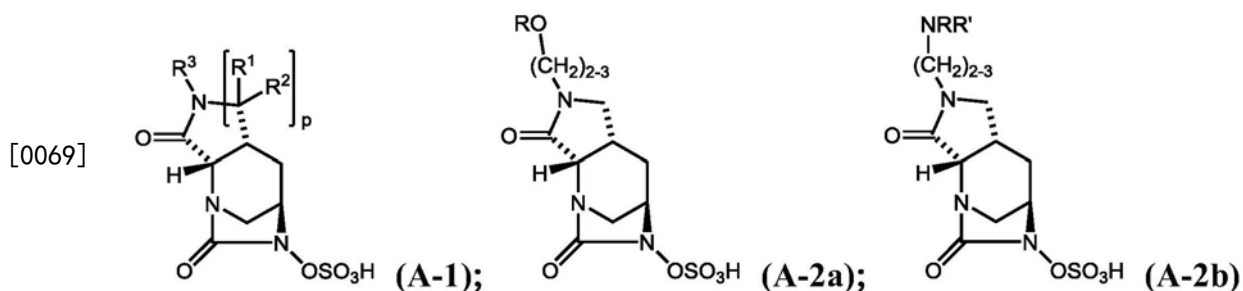
[0065] R^3 每次出现时都独立地选自H、Cy和 C_1-C_4 烷基,该 C_1-C_4 烷基任选地被至多三个选自以下的基团取代: Cy、卤素、CN、-OR和-NRR';

[0066] Cy是 C_3-C_6 环烷基环或包含一个或两个选自N、O和S的杂原子作为环成员的4-6元杂环基环,且Cy任选地被至多三个选自以下的基团取代:氧代、卤素、 C_1-C_2 烷基、CN、-OR和-NRR';且

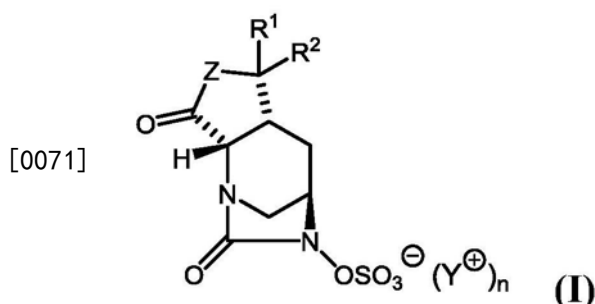
[0067] R和R'独立地选自H和 C_1-C_4 烷基,该 C_1-C_4 烷基任选地被一个或两个选自以下的基团取代:卤素、-OH、-CN、-O- (C_1-C_4 烷基)、氧代、-NH₂、-NH (C_1-C_4 烷基)和-N (C_1-C_4 烷基)₂,或R和R'与两者所连接的氮原子一起可以形成选自以下的环:哌啶、吗啉、吡咯烷和氮杂环丁烷,其中所述环任选地被一个或两个选自以下的基团取代:卤素、 C_1-C_2 烷基、-OH、-CN、-O-

(C₁-C₄烷基)、氧代、-NH₂、-NH(C₁-C₄烷基)和-N(C₁-C₄烷基)₂。

[0068] 这些化合物的具体实施方案包括下式的化合物或其盐或两性离子形式：



[0070] 特别感兴趣的实施方案是式(I)化合物：



[0072] 其中：

[0073] R¹和R²独立地选自H和C₁-C₄烷基，该C₁-C₄烷基任选地被至多三个选自以下的基团取代：卤素、CN、-OR、氧代和-NRR'；

[0074] Z是NR³或N-OR³；

[0075] R³每次出现时都独立地选自H、Cy和C₁-C₄烷基，该C₁-C₄烷基任选地被至多三个选自以下的基团取代：Cy、卤素、CN、-OR和-NRR'；

[0076] Cy是C₃-C₆环烷基环，或包含一个或两个选自N、O和S的杂原子作为环成员的4-6元杂环基环，且Cy任选地被至多三个选自以下的基团取代：氧代、卤素、C₁-C₂烷基、CN、-OR和-NRR'；且

[0077] R和R'独立地选自H和C₁-C₄烷基，该C₁-C₄烷基任选地被一个或两个选自以下的基团取代：卤素、-OH、-CN、-O-(C₁-C₄烷基)、氧代、-NH₂、-NH(C₁-C₄烷基)和-N(C₁-C₄烷基)₂，或R和R'与两者所连接的氮原子一起可以形成选自以下的环：哌啶、吗啉、吡咯烷和氮杂环丁烷，其中所述环任选地被一个或两个选自以下的基团取代：卤素、C₁-C₂烷基、-OH、-CN、-O-(C₁-C₄烷基)、氧代、-NH₂、-NH(C₁-C₄烷基)和-N(C₁-C₄烷基)₂；

[0078] Y是阳离子基团；

[0079] n是0或1；且

[0080] 当n是0时，式I化合物是以两性离子形式。

[0081] 本文实施例的每种化合物都是本发明的具体实施方案。

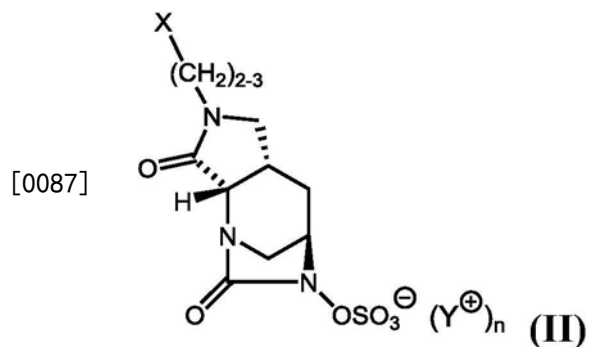
[0082] 如任何上述实施方案所述的化合物或其盐或两性离子形式，其中Z是NR³，且R³是H或C₁-C₄烷基，该C₁-C₄烷基任选地被-OR或-NRR'取代。

[0083] 如实施方案4所述的化合物或其盐或两性离子形式，其中R³是C₁-C₂烷基，其任选地被-OR或-NRR'取代。

[0084] 如实施方案4所述的化合物或其盐或两性离子形式，其中R³是H。

[0085] 如实施方案1-6中任一项所述的化合物或其盐或两性离子形式,其中 R^1 和 R^2 都是H。

[0086] 实施方案1所述的化合物,其具有结构:



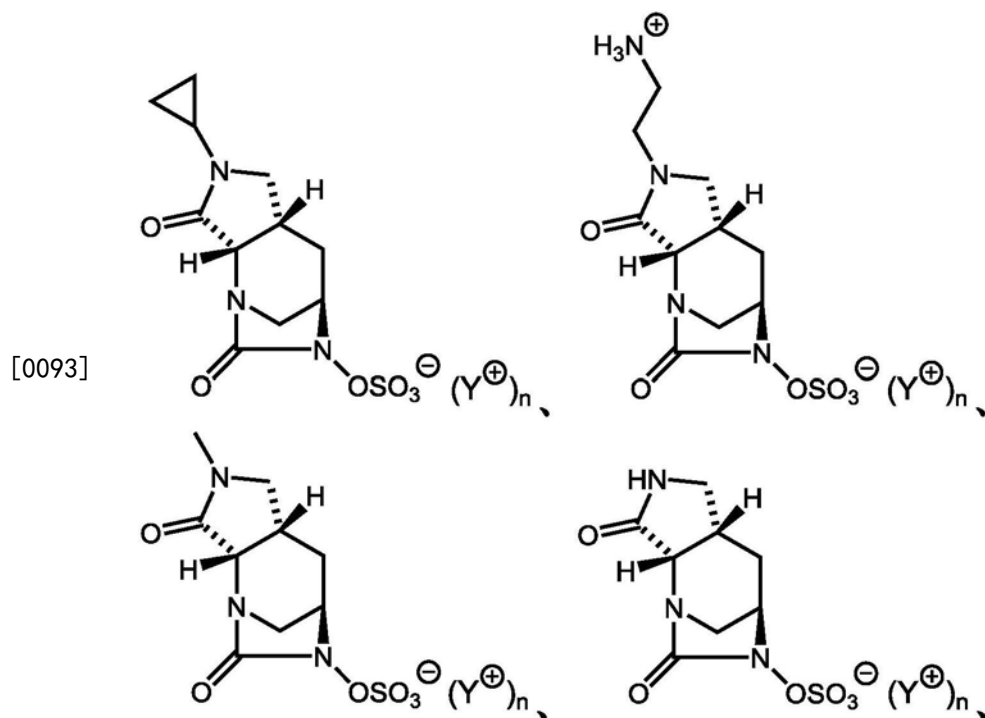
[0088] 其中X是-OR或-NRR' ;

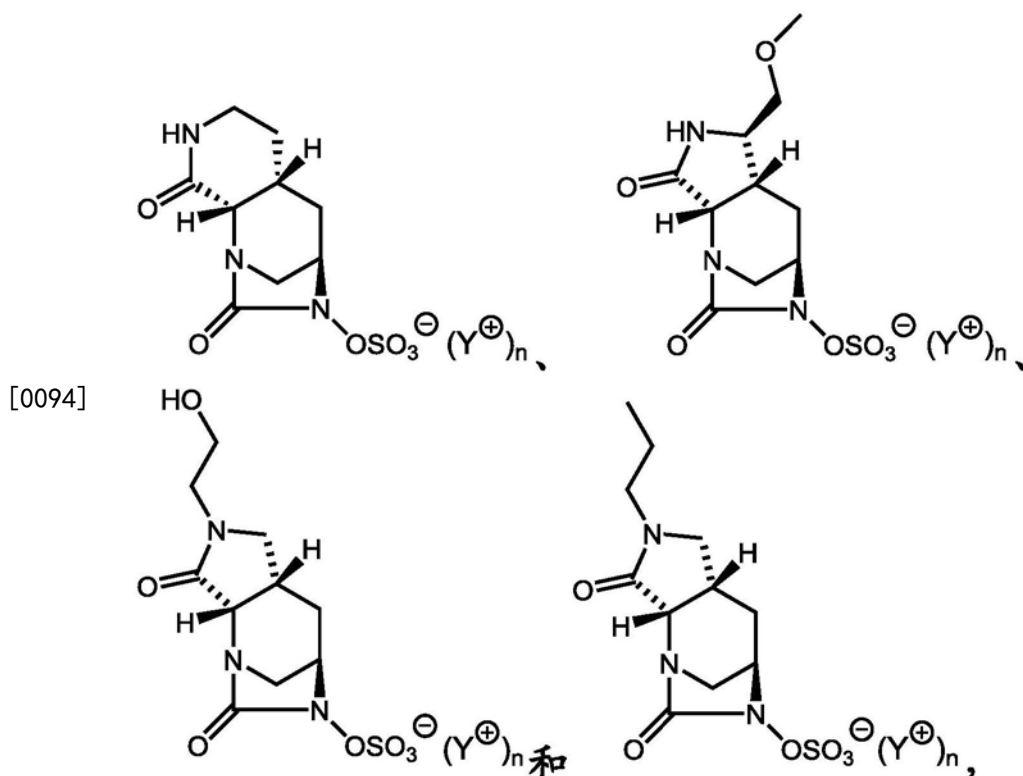
[0089] Y是阳离子基团;

[0090] n是0或1;且

[0091] 当n是0时,式II化合物是以两性离子形式。

[0092] 实施方案1所述的化合物,其选自:





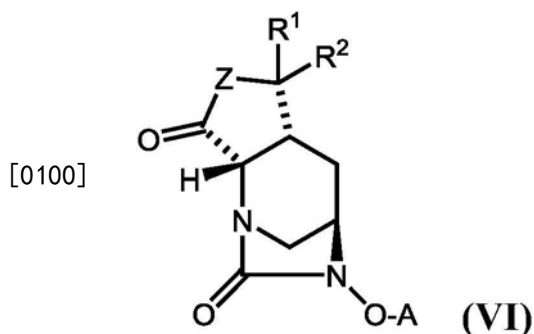
[0095] 以其盐或两性离子形式。

[0096] 如任何上述实施方案所述的化合物，其中n是1且Y是选自钠、钾、铵、钙、镁、铁、银、锌和铜。

[0097] 如任何上述实施方案所述的化合物，其中Y是钠。

[0098] 如任何上述实施方案所述的化合物，其是可药用盐或两性离子。

[0099] 特别感兴趣的实施方案是式(VI)化合物或其盐或两性离子形式：



[0101] 其中：

[0102] R^1 和 R^2 独立地选自H和 C_1-C_4 烷基，该 C_1-C_4 烷基任选地被至多三个选自以下的基团取代：卤素、CN、-OR、氧代和-NRR'；

[0103] Z是 NR^3 或 $N-OR^3$ ；

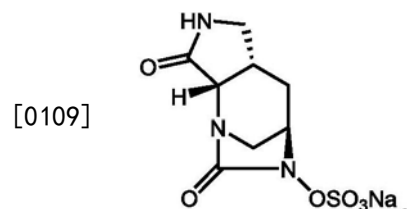
[0104] R^3 每次出现时都独立地选自H、Cy和 C_1-C_4 烷基，该 C_1-C_4 烷基任选地被至多三个选自以下的基团取代：Cy、卤素、CN、-OR和-NRR'；

[0105] Cy是 C_3-C_6 环烷基环或包含一个或两个选自N、O和S的杂原子作为环成员的4-6元杂环基环，且Cy任选地被至多三个选自以下的基团取代：氧代、卤素、 C_1-C_2 烷基、CN、-OR和-NRR'；且

[0106] R和R' 独立地选自H和C₁-C₄烷基,该C₁-C₄烷基任选地被一个或两个选自以下的基团取代:卤素、C₁-C₂烷基、-OH、-CN、-O- (C₁-C₄烷基)、氧代、-NH₂、-NH (C₁-C₄烷基) 和-N (C₁-C₄烷基)₂,或R和R' 与两者所连接的氮原子一起可以形成选自以下的环:哌啶、吗啉、吡咯烷和氮杂环丁烷,其中所述环任选地被一个或两个选自以下的基团取代:卤素、C₁-C₂烷基、-OH、-CN、-O- (C₁-C₄烷基)、氧代、-NH₂、-NH (C₁-C₄烷基) 和-N (C₁-C₄烷基)₂;

[0107] A是H或-CH₂-Ph,其中Ph代表苯基,其任选地被选自以下的一个或两个基团取代:卤素、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基。

[0108] 特别感兴趣的实施方案是式 (VII) 化合物:



[0110] 实施方案12的化合物,其是结晶形式。

[0111] 实施方案13的化合物,其在差示扫描量热法中在283℃和350℃之间显示吸热。

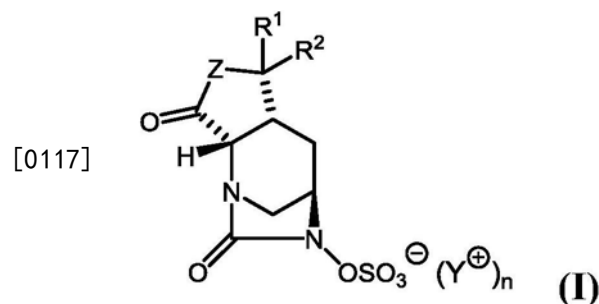
[0112] 实施方案13的化合物,其特征在于在衍射角 (2θ) 为8.3和16.6度处的XRPD峰。

[0113] 实施方案15的化合物,其进一步的特征在于在衍射角 (2θ) 为25.1或31.3度的一个或多个另外的XRPD峰。

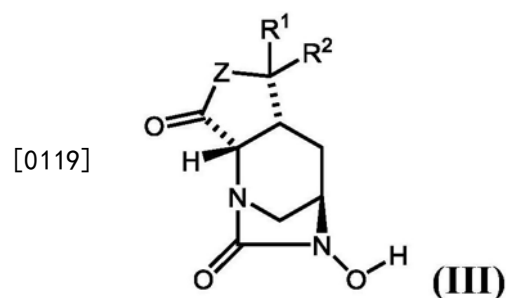
[0114] 实施方案16的化合物,其进一步的特征在于在衍射角 (2θ) 为27.4或28.7度的一个或多个另外的XRPD峰。

[0115] 实施方案17的化合物,其进一步的特征在于在衍射角 (2θ) 为19.5度或21.7度的另外的XRPD峰。

[0116] 制备如实施方案3所述的式 (I) 化合物 (以其盐或两性离子形式) 的方法,



[0118] 其中该方法包括将式 (III) 化合物

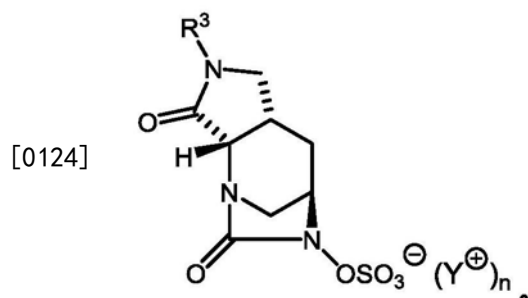


[0120] 其中Z、R¹和R²和R³如实施方案3中所定义,

[0121] 与磺酰化试剂在碱的存在下接触。

[0122] 实施方案19的方法,其中Z是 NR^3 ,且 R^3 是H或任选被-OR或-NRR'取代的 C_1 - C_2 烷基,或其可药用盐。

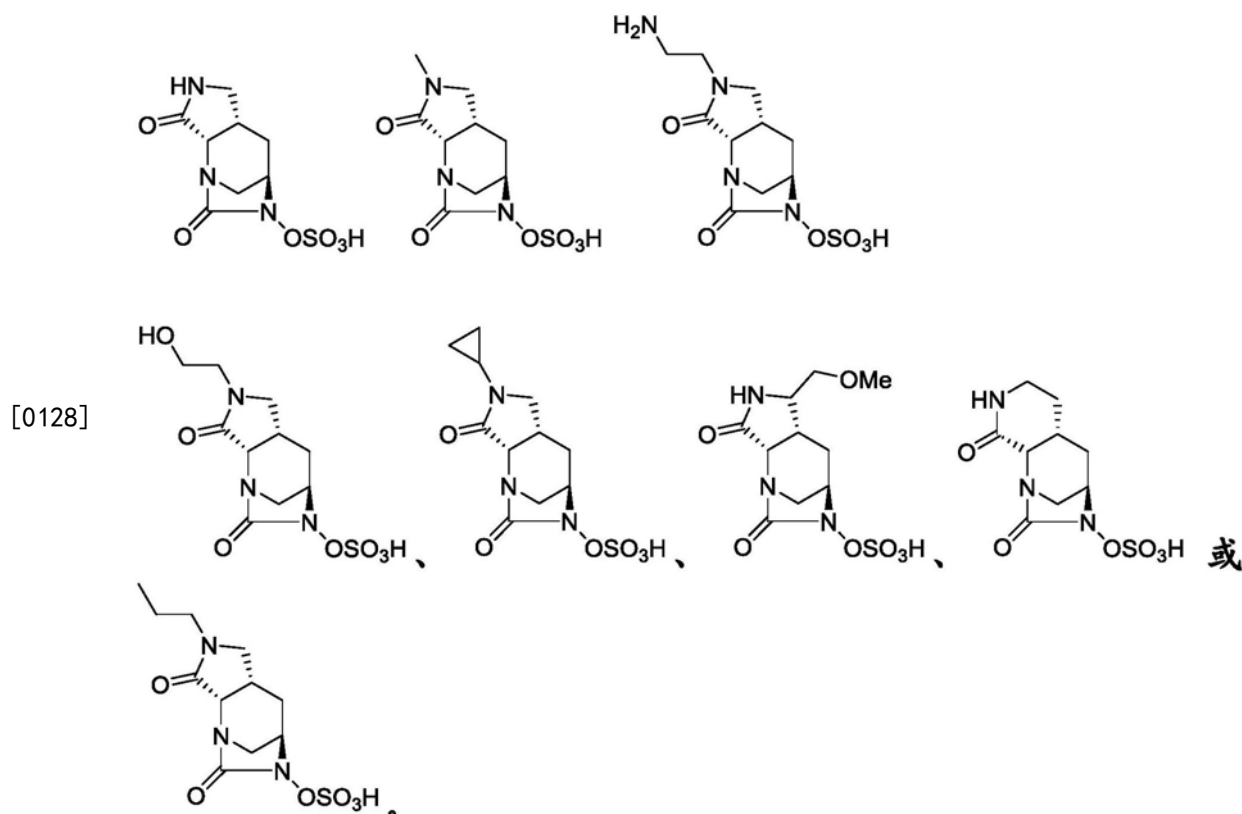
[0123] 实施方案19或20的方法,其中式(I)化合物或其盐或两性离子形式是下式



[0125] 实施方案19-21中任一项所述的方法,其中 R^3 是H。

[0126] 式(III)化合物可用于合成如实施方案3和其它上述实施方案中所述的式(I)化合物。

[0127] 具体的式(A)和式(I)化合物或其盐或两性离子包括:



[0129] 在其它方面,本发明提供了:

[0130] 药物组合产品,其包含(a)第一治疗剂,其是本发明的化合物,例如本文所述的式(A)或其任意子式的化合物,和(b)上文所述的第二治疗剂。第二治疗剂通常是 β -内酰胺类抗生素。

[0131] 上文所定义的方法,其包括共同施用、例如伴随或相继施用治疗有效量的本发明的化合物、例如本文所述的式(A)或其任意子式的化合物和上文所述的第二治疗剂。

[0132] 本文所用的术语“共同施用”或“组合使用”等包括给单个患者施用所选择的多种治疗剂,还包括其中各药物不必须通过相同施用途径或在相同时间施用的治疗方案。固定

组合产品也在本发明的范围内。与仅应用其药物活性成分之一的单一药物疗法相比,施用本发明的药物组合产品导致有益作用,例如协同治疗作用。

[0133] 本发明的组合的各组分可以分别、一起或以其任意组合方式施用。

[0134] 可以将本发明的化合物与任何另外的药物配制在分开的剂型中。或者,为了减少给患者施用的剂型的数量,可以将本发明的化合物与任何另外的药物以任意组合一起配制。例如,可以将本发明的抑制剂化合物配制在一个剂型中,并且可以将另外的药物一起配制在另外一个剂型中。任何分开的剂型可以在相同或不同的时间施用。

[0135] 或者,本发明的组合物包含本文所述的另外的药物。每种组份可以存在于各自的组合物、组合的组合物中或存在于单一组合物中。

[0136] 本发明的化合物可以通过下面的通用合成路线合成,在实施例更详细地描述了其具体实例。

[0137] 本发明的化合物和中间体也可以按照本领域技术人员广泛已知的方法相互转化。

[0138] 在本申请文本的范围内,除非上下文另有说明,否则只有不是本发明的化合物的具体所需终产物的组成部分的可容易除去的基团被称作“保护基团”。这类保护基团对官能团的保护、保护基团本身和它们的裂解反应例如在以下文献中描述:标准参考著作,例如 J.F.W.McOmie,“Protective Groups in Organic Chemistry”,Plenum Press,London and New York 1973,T.W.Greene和P.G.M.Wuts,“Protective Groups in Organic Synthesis”,第3版,Wiley,New York 1999,“The Peptides”;第3卷(编者:E.Gross和J.Meienhofer),Academic Press,London and New York 1981,“Methoden der organischen Chemie”(有机化学方法),Houben Weyl,第4版,第15卷/I,Georg Thieme Verlag,Stuttgart 1974,H.-D.Jakubke和H.Jeschkeit,“**aminosäuren**,Peptide,Proteine”(氨基酸,肽,蛋白质),Verlag Chemie,Weinheim,Deerfield Beach,and Basel 1982,和Jochen Lehmann,“Chemie der Kohlenhydrate:Monosaccharide und Derivate”(碳水化合物化学:单糖和衍生物),Georg Thieme Verlag,Stuttgart 1974。保护基团的特点在于它们能例如通过溶剂解、还原、光解或者在生理条件下(例如通过酶裂解)被容易地除去(即,没有不希望的副反应)。

[0139] 具有至少一个成盐基团的本发明的化合物的盐可以用本领域技术人员已知的方式来制备。例如,具有酸基团的本发明的化合物的盐可以例如通过用金属化合物如适合的有机羧酸的碱金属盐例如2-乙基己酸的钠盐处理所述化合物或所述化合物的盐如四丁基铵盐来形成,该处理在适宜的合适溶剂中进行,例如异丁醇/水混合物,其可帮助不需要的离子对沉淀(例如2-乙基己酸四丁基铵盐,如果使用四丁基铵盐的话)。优选地,本发明化合物的盐,例如铵盐,可以以其碱金属或碱土金属形式通过离子交换树脂,以促进抗衡离子的交换。本发明的化合物的酸加成盐或交换盐是用常规方式获得的,例如是通过用酸或适合的阴离子交换试剂处理所述化合物获得的。含有酸和碱性成盐基团例如游离硫酸根基和游离氨基的本发明的化合物的两性离子或内盐可以例如通过例如用弱碱将盐如酸加成盐中和至等电点或者通过用离子交换剂处理来形成。

[0140] 可以根据本领域技术人员已知的方法将盐转化成游离化合物。可以例如通过用适合的碱性试剂处理对盐酸盐进行转化。可以以本领域技术人员已知的方式将可根据本发明得到的异构体混合物分离成单个异构体;非对映异构体可以例如通过在多相溶剂混合物之

间分配、重结晶和/或色谱分离例如硅胶色谱分离或通过例如使用反相柱的中压液相色谱法来分离,外消旋物可以例如通过与光学纯的成盐试剂形成盐并分离(例如利用分步结晶分离)由此获得的非对映异构体混合物或者通过在旋光活性柱材料上进行色谱处理来分离。

[0141] 可以按照标准方法,例如使用色谱法、分配法、(重)结晶等对中间体和终产物进行后处理和/或纯化。

[0142] 下列内容一般性地适用于本文的上文和下文中所提到的所有方法。

[0143] 用于制备本发明化合物的所有方法步骤均可在本领域技术人员已知的反应条件(包括具体提及的那些反应条件)下,在不存在或者通常在存在溶剂或稀释剂(包括例如对所用的试剂而言是惰性的并且可溶解它们的溶剂或稀释剂)的情况下,在不存在或存在催化剂、缩合剂或中和剂(例如离子交换剂,如阳离子交换剂,例如H⁺形式的阳离子交换剂)的情况下,根据反应的性质和/或反应物的性质在降低的、正常的或升高的温度下、例如在约-100℃至约190℃(包括例如约-80℃至约150℃)的温度范围内、例如在-80至-60℃下、在室温下、在-20至40℃下或在回流温度下、在大气压下或在密闭的容器中、适宜时在压力下、和/或在惰性气氛中、例如在氩气或氮气气氛下进行。

[0144] 在反应的所有阶段,形成的异构体混合物可以被分离成单个异构体,例如非对映异构体或对映体,或者被分离成任意所需的异构体混合物,例如外消旋物或非对映异构体混合物。

[0145] 可以从中选择适合用于任意特定反应的那些溶剂包括具体提及的那些或者例如水、酯如低级烷基-低级链烷酸酯(例如乙酸乙酯)、醚如脂族醚(例如乙醚)或环状醚(例如四氢呋喃或二噁烷)、液体芳族烃如苯或甲苯、醇如甲醇、乙醇或1-或2-丙醇、腈如乙腈、卤化烃如二氯甲烷或氯仿、酰胺如二甲基甲酰胺或二甲基乙酰胺、碱如杂环氮碱(例如吡啶或N-甲基吡咯烷-2-酮)、羧酸酐如低级链烷酸酐(例如乙酸酐)、环状的、直链的或支链的烃如环己烷、己烷或异戊烷、甲基环己烷或这些溶剂的混合物例如水溶液,方法的描述中另有说明的除外。这类溶剂混合物也可以用在后处理、例如通过色谱法或分配进行的后处理中。

[0146] 本发明的化合物(包括它们的盐)也可以以水合物的形式被获得,或者它们的晶体可以例如包含结晶所用的溶剂。可以存在不同的晶形。

[0147] 用于合成本发明的化合物的所有起始材料、结构单元、试剂、酸、碱、脱水剂、溶剂和催化剂是可商购获得的或者可通过本领域普通技术人员已知的有机合成方法制备。

[0148] 术语“旋光异构体”或“立体异构体”是指本发明的给定化合物可以存在的各种立体异构构型中的任意一种且包括几何异构体。应当理解的是,取代基可以连接在碳原子的手性中心上。术语“手性”是指在它们的镜像伙伴上具有非叠加性的分子,而术语“非手性”是指在它们的镜像伙伴上是可叠加的分子。因此,本发明包括所述化合物的对映体、非对映体或外消旋物。“对映体”是互为不可叠加镜像的一对立体异构体。一对对映体的1:1混合物是“外消旋”混合物。在适宜的情况下,该术语用于指外消旋混合物。“非对映异构体”是具有至少两个不对称原子、但是不互为镜像的立体异构体。绝对立体化学是根据Cahn-Ingold-Prelog R-S系统来规定的。当一种化合物是纯对映体时,每个手性碳上的立体化学可以用R或S来说明。其绝对构型不明的拆分的化合物可以根据它们在钠D线波长下旋转平面偏振光的方向(右旋-或左旋-)而被指定为(+)或(-)。本文所述的某些化合物含有一个或多个不对

称中心或轴,因此可以产生对映体、非对映体和可以在绝对立体化学上被定义为(R)-或(S)-的其它立体异构形式。

[0149] 根据起始材料和操作的选择,所述化合物可以以可能的异构体之一的形式或以其混合物的形式、例如以纯旋光异构体的形式、或以异构体混合物例如外消旋物和非对映异构体混合物的形式存在,这取决于不对称碳原子的数量。本发明包括所有这类可能的立体异构体,包括外消旋混合物、非对映体混合物和旋光纯的形式。旋光活性的(R)-和(S)-异构体可以用手性合成子或手性试剂制备或者用常规技术进行拆分。如果化合物含有双键,则取代基可以是E或Z构型。如果化合物含有二取代的环烷基,则环烷基取代基可具有顺式-或反式-构型。还包括所有互变异构形式。

[0150] 任何所得的异构体混合物可以根据组分的理化差异被分离成纯的或基本上纯的几何异构体或旋光异构体、非对映体、外消旋物,例如通过色谱法和/或分步结晶来分离。

[0151] 任何所得的终产物或中间体的外消旋物可以用已知方法被拆分成旋光对映体,例如通过分离用旋光活性酸或碱获得的其非对映体盐并释放旋光活性的酸性或碱性化合物来拆分。特别地,因此碱性部分可被用于将本发明的化合物拆分成其旋光对映体,例如通过分步结晶用旋光活性的酸例如酒石酸、二苯甲酰基酒石酸、二乙酰基酒石酸、二-O,0'-对-甲苯酰酒石酸、扁桃酸、苹果酸或樟脑-10-磺酸形成的盐来拆分。外消旋产物也可以通过手性色谱法、例如使用手性吸附剂的高压液相色谱法(HPLC)来拆分。

[0152] 此外,包括它们的盐在内的本发明化合物也可以以它们的水合物形式获得或者包含它们结晶所用的其它溶剂。本发明的化合物可以固有地或经设计与可药用的溶剂(包括水)形成溶剂合物;因此,本发明既包括溶剂化的形式,也包括非溶剂化的形式。术语“溶剂合物”是指本发明的化合物(包括其盐或两性离子形式)与一个或多个溶剂分子的分子复合物。这类溶剂分子是药物领域中常用的那些,其已知对接受者是无害的,例如水、乙醇等。术语“水合物”是指其中所述溶剂分子是水的复合物。

[0153] 包括其盐、水合物和溶剂合物在内的本发明化合物可以固有地或经设计形成多晶型物。

[0154] 本文所用的术语“盐”是指本发明化合物的酸加成盐或碱加成盐。“盐”特别是包括“可药用盐”。术语“可药用盐”是指保留本发明化合物的生物学有效性和性质并且通常在生物学上或其它方面不具有不希望的性质的盐。在许多情况下,藉由氨基和/或硫酸根基或与其类似的基团的存在,本发明化合物能形成酸和/或碱盐。

[0155] 可药用的酸加成盐或交换盐可以用无机酸和有机酸形成,例如乙酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、溴化物/氢溴酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、樟脑磺酸盐、氯化物/盐酸盐、氯茶碱盐(chlorotheophyllonate)、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、马尿酸盐、氢碘酸盐/碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、萘甲酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、十八酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、磺基水杨酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和三氟乙酸盐。

[0156] 可以自其衍生得到盐的无机酸或可引入的“阴离子基团”包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。

[0157] 可以自其衍生得到盐的有机酸或可引入的“阴离子基团”包括例如乙酸、丙酸、乙醇酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、磺基水杨酸等。可药用的碱加成盐或交换盐可以用无机碱和有机碱形成。

[0158] 可以自其衍生得到盐的无机碱或可引入的“阳离子基团”包括例如铵盐和来自元素周期表I—XII族的金属。在某些实施方案中,盐衍生自阳离子基团钠、钾、铵、钙、镁、铁、银、锌和铜;特别适合的盐包括铵、钾、钠、钙和镁盐。

[0159] 可以自其衍生得到盐的有机碱或可引入的“阳离子基团”包括例如伯、仲和叔胺、被取代的胺、包括天然存在的被取代的胺、环状胺、碱性离子交换树脂等。某些有机胺包括异丙基胺、苄星盐 (benzathine)、胆碱酸盐 (choline)、二乙醇胺、二乙胺、赖氨酸、葡甲胺、哌嗪和氨丁三醇。

[0160] 本发明的盐可以通过常规的化学方法由碱性或酸性部分合成。一般而言,可以通过使这些化合物的游离酸形式与化学计量的适合的碱(例如Na、Ca、Mg或K的氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等)反应或通过使这些化合物的游离碱形式与化学计量的适合的酸反应来制备这类盐。优选地,本发明化合物的盐,例如铵盐,可以以其碱金属或碱土金属形式经离子交换树脂以促进抗衡离子交换。本发明化合物的酸加成或交换盐以常规方式获得,例如,通过用酸或合适的阴离子交换试剂处理化合物。含有酸和碱性成盐基团例如游离硫酸基和游离氨基的本发明化合物的两性离子或内盐,可以例如通过例如用弱碱或用离子交换剂处理将盐(例如酸加成盐)中和到等电点而形成。这类反应通常在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中进行。通常,如果切实可行,使用非水性介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是合乎需要的。另外的适合盐可在例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第20版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); 和 Stahl 和 Wermuth 的“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use” (Wiley-VCH, Weinheim, 德国, 2002) 中找到。

[0161] 本文给出的任意结构式还旨在表示本发明化合物的未标记的形式以及同位素标记的形式。同位素标记的化合物具有本文给出的结构式所描绘的结构,不同的是一个或多个原子被具有所选择的原子质量或质量数的原子代替。可掺入本发明化合物的同位素的实例包括:氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素,例如分别是 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{125}I 。本发明包括各种同位素标记的本发明化合物,例如其中存在放射性同位素如 ^3H 和 ^{14}C 的那些或者其中存在非放射性同位素例如 ^2H 和 ^{13}C 的那些。这类同位素标记的化合物可用于代谢研究(使用 ^{14}C)、反应动力学研究(例如使用 ^2H 或 ^3H)、检测或成像技术,例如正电子发射断层成像术(PET)或单光子发射计算机断层成像术(SPECT),包括药物或底物组织分布测定,或用于患者的放射性治疗。特别地,对于PET或SPECT研究, ^{18}F 标记的本发明化合物可能是特别合乎需要的。一般而言,可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与所附的实施例和制备例中所描述的那些类似的方法,用适宜的同位素标记的试剂替换之前使用的非标记的试剂来制备同位素标记的本发明化合物。

[0162] 此外,被更重的同位素、特别是氘(即 ^2H 或D)取代可因更高的代谢稳定性而提供某些治疗优势,例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求或治疗指数的改善。应当理解的是,在上下文中氘被视为本发明化合物的取代基。这类更重的同位素、特别是氘的浓度可以用同位素富集因子来定义。本文所用的术语“同位素富集因子”意指同位素丰度与具体给定的

同位素的天然丰度之比。如果本发明化合物中的取代基是所示的氘，则这种化合物对每个指定的氘原子而言具有至少3500(在每个指定的氘原子上52.5%氘掺入)、至少4000(60%氘掺入)、至少4500(67.5%氘掺入)、至少5000(75%氘掺入)、至少5500(82.5%氘掺入)、至少6000(90%氘掺入)、至少6333.3(95%氘掺入)、至少6466.7(97%氘掺入)、至少6600(99%氘掺入)或至少6633.3(99.5%氘掺入)的同位素富集因子。

[0163] 本发明的可药用的溶剂合物包括其中结晶的溶剂可以是同位素取代的、例如D₂O、d₆-丙酮、d₆-DMSO的那些。

[0164] 含有能作为氢键供体和/或受体的基团的本发明化合物能与适合的共晶形成剂一起形成共晶。可以通过已知的共晶形成操作由本发明化合物制备这些共晶。这类操作包括研磨、加热、共升华、共熔或在结晶条件下使本发明化合物在溶液中接触共晶形成剂并分离由此形成的共晶。适合的共晶形成剂包括W02004/078163中所述的那些。因此，本发明还提供了包含本发明化合物的共晶。

[0165] 除非本文另有说明或者上下文清楚地有相反含义，否则本文所述的所有方法可以以任意适合的顺序进行。本文提供的任意和所有实例或举例性语言(例如，“例如”、“如”)的使用仅仅旨在更好地举例说明本发明，不对在另外部分请求保护的本发明的范围构成限制。

[0166] 本发明提供了新的化合物、包含所述化合物的药物制剂和治疗革兰氏阴性菌感染的方法。特别地，所述化合物适合用于治疗由以下细菌导致的感染：伯克霍尔德菌属、柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、克雷伯菌属、摩根菌属、假单胞菌属、变形菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、不动杆菌属、拟杆菌属、弯曲杆菌属、奈瑟氏球菌属或寡养单胞菌属的细菌，包括本文给出名称的那些物种。

[0167] 被更重的同位素例如氘、即²H取代可因更高的代谢稳定性而提供某些治疗优势，例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求，因此在一些情况下是优选的。例如，在不可交换的键(例如C-H)上的氘取代可在体内阻碍差向异构化和/或代谢氧化。

[0168] 一般而言，可通过本领域技术人员已知的常规技术或通过所附的实施例和制备例部分中所描述的那些类似的方法，用适宜的同位素标记的试剂替换之前使用的未标记的试剂来制备同位素标记的本发明化合物、即式(I)的化合物。

[0169] 在另一个方面，本发明提供了治疗具有细菌感染的个体的方法，所述方法包括以下步骤：给需要其的个体施用抗细菌有效量的本发明化合物、例如式(A)的化合物或其盐和可药用的载体以及β-内酰胺类抗生素。用于这些方法的适合的β-内酰胺抗生素包括但不限于，青霉素类例如青霉素G、青霉素V、甲氧西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、萘夫西林、氨苄西林、阿莫西林、羧苄西林、替卡西林、美洛西林、哌拉西林、阿洛西林、替莫西林，头孢菌素类例如先锋霉素、头孢匹林、头孢拉定、头孢噻啶、头孢唑啉、头孢孟多、头孢呋辛、头孢氨苄、头孢丙烯、头孢克洛、洛拉卡比、头孢西丁、头孢奈唑(cefnetazole)、头孢噻肟、头孢唑肟、头孢曲松、头孢哌酮、头孢他啶、头孢克肟、头孢泊肟、头孢布坦、头孢地尼、头孢匹罗、头孢吡肟、头孢洛扎(ceftolozane)；碳青霉烯类如多利培南、亚胺培南、美罗培南、帕尼培南、比阿培南；以及单环β-内酰胺类例如氨曲南和本文公开的β-内酰胺5。

[0170] 本发明化合物的“有效量”是显著增强与本发明化合物组合使用的β-内酰胺抗生素活性的量，例如使抗生素对抗目标细菌的活性至少增加四倍的量，即，将目标细菌的最小

抑制浓度(或“最小抑菌浓度”、“MIC”)降低至少4倍,优选至少8倍的量。

[0171] 本文所用的BLI加 β -内酰胺抗生素组合的“有效量”是指有效治疗个体(通常是人个体)中细菌感染的量。有效量取决于感染细菌对所选抗生素的敏感性以及组合中使用的BLI提供的增强程度。技术人员可以基于待治疗的个体,感染细菌和待使用的组合的参数确定这种组合的有效量,其可以包括确定特定组合对目标细菌的MIC。通常,待治疗的细菌是对至少一些 β -内酰胺抗生素具有抗性的细菌,因为细菌表达 β -内酰胺酶活性。

[0172] 本发明化合物还可用于治疗患有或易于罹患由革兰氏阴性或革兰氏阳性病原体导致的皮肤感染、肺炎、脓毒症、囊性纤维化、伤口、并发的糖尿病足、腹内感染并发症或并发的泌尿道感染和性传播疾病的患者。本发明的化合物还可用于由柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、克雷伯菌属、摩根氏菌属、变形菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、拟杆菌属、伯克霍尔德菌属、弯曲杆菌属、奈瑟氏球菌属或寡养单胞菌属的物种导致的病症。特别地,由柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、克雷伯菌属、摩根氏菌属、变形菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、假单胞菌属或不动杆菌属的物种导致的细菌感染可用本文的方法治疗。用于这类治疗的具体的细菌物种包括弗氏柠檬酸杆菌、柯氏柠檬酸杆菌、阴沟肠杆菌、粪肠杆菌、屎肠杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、摩氏摩根氏菌、奇异变形菌、沙门氏菌属种类、粘质沙雷氏菌、铜绿假单胞菌和鲍氏不动杆菌,以及脆弱拟杆菌、洋葱伯克霍尔德菌、空肠弯曲杆菌、淋病奈瑟氏球菌和嗜麦芽寡养单胞菌。

[0173] 术语“组合”意指在一个剂量单位形式中的固定组合,或者药盒或用于组合使用的说明,其中本发明化合物和 β 内酰胺抗生素组合伙伴可以独立或同时在相同时间施用或在时间段内分开施用,其尤其使得各组合伙伴表现出合作的作用、例如协同作用,或其任意组合。

[0174] 本发明的一个实施方案提供了在具有 β 内酰胺抗生素和第三治疗剂的药物组合产品中的本发明化合物。在一些实施方案中,所述第三治疗剂是其它抗菌药,或其它 β -内酰胺酶抑制剂。在某些实施方案中,所述组合包括至少一种其它抗菌药,其可以是另一种 β -内酰胺抗生素或选自下述类别的另一种抗菌药。用在本发明的药物组合产品中的其它抗菌药的非限制性实例可以选自下面的组:

[0175] (1) 大环内酯类或酮内酯类,例如红霉素、阿奇霉素、克拉霉素和泰利霉素;

[0176] (2) β -内酰胺抗生素,包括青霉素类,例如青霉素G、青霉素V、甲氧西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、萘夫西林、氨苄西林、阿莫西林、羧苄西林、替卡西林、美洛西林、哌拉西林、阿洛西林、替莫西林,头孢菌素类,例如头孢噻吩、头孢匹林、头孢拉定、头孢噻啶、头孢唑林、头孢孟多、头孢呋辛、头孢氨苄、头孢丙烯、头孢克洛、氯碳头孢、头孢西丁、头孢美唑(cefmetazole)、头孢噻肟、头孢唑肟、头孢曲松、头孢哌酮、头孢他啶、头孢克肟、头孢泊肟、头孢布坦、头孢地尼、头孢匹罗、头孢吡肟、头孢洛扎,和碳青霉烯类抗生素,例如多利培南、亚胺培南、美罗培南、帕尼培南和单环 β -内酰胺类例如氨曲南和本文所述的 β -内酰胺5;

[0177] (3) 糖肽类,例如万古霉素和替考拉宁;

[0178] (4) 喹诺酮类,例如萘啶酸、奥索利酸、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、替马沙星、洛美沙星、氟罗沙星、格帕沙星、司帕沙星、曲伐沙星、克林沙星、加替沙星、莫西沙星、西他沙星、加内沙星(ganefloxacin)、吉米沙星、德拉沙星(delafloxacin)和帕珠沙星;

[0179] (5) 抗菌的磺胺类药和抗菌的氨苯磺胺类药 (sulphanilamides), 包括对-氨基苯甲酸、磺胺嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺甲唑和酞磺胺噻唑;

[0180] (6) 氨基糖苷类, 例如链霉素、新霉素、卡那霉素、巴龙霉素、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、奈替米星、大观霉素、西索米星、地贝卡星 (dibekalin)、plazomicin 和异帕米星;

[0181] (7) 四环素类, 例如四环素、金霉素、地美环素、米诺环素、土霉素、美他环素、多西环素、替吉环素和 eravacyclin;

[0182] (8) 利福霉素类, 例如利福霉素 (也称为利福平 (rifampin))、利福喷汀、利福布汀、苯并噁唑利福霉素和利福昔明;

[0183] (9) 林可酰胺类, 例如林可霉素和克林霉素;

[0184] (10) 链阳性菌素类, 例如奎奴普丁和达夫普丁 (daflopristin);

[0185] (11) 噁唑烷酮类, 例如利奈唑胺或泰地唑胺 (tedizolid);

[0186] (12) 多黏菌素、粘菌素 (colistin) 和粘菌素 (colymycin);

[0187] (13) 甲氧苄啶和杆菌肽; 和

[0188] (14) 流出泵抑制剂;

[0189] (15) β -内酰胺酶抑制剂, 例如金属 β -内酰胺酶抑制剂。

[0190] β -内酰胺或第二抗菌药可以与本发明化合物组合施用, 其中 β -内酰胺或第二抗菌药在本发明的一种或多种化合物之前、同时或之后施用。当需要同时施用本发明化合物与第二或第三药物且施用途径相同时, 则本发明化合物可以与第二或第三药物一起配制在相同的剂型中。含有本发明化合物和第二或第三药物的剂型的一个实例是静脉内施用。另一个实例是肌内施用包含本发明化合物和第二或第三药物的溶液。

[0191] 本文所述的化合物和组合物可以与 β -内酰胺和一种或多种用作免疫调节剂的治疗剂、例如共刺激分子的活化剂或免疫抑制分子的抑制剂或疫苗组合使用或施用。程序性死亡1 (PD-1) 蛋白是T细胞调节物的扩展的CD28/CTLA4家族的抑制性成员 (Okazaki 等人 (2002) Curr Opin Immunol 14:391779-82; Bennett 等人 (2003) J. Immunol. 170:711-8)。PD-1 在活化的B细胞、T细胞核和单核细胞上表达。PD-1 是负调节TCR信号的免疫抑制性蛋白 (Ishida, Y. 等人 (1992) EMBO J. 11:3887-3895; Blank, C. 等人 (Epub 2006年12月29日) Immunol. Immunother. 56 (5):739-745), 并且在慢性感染中被增量调节。PD-1 与PD-L1 之间的相互作用能作为免疫检查点起作用, 其能导致例如浸润淋巴细胞减少、T细胞受体介导的增殖减少和/或癌细胞或感染细胞的免疫逃逸 (Dong 等人 (2003) J. Mol. Med. 81:281-7; Blank 等人 (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314; Konishi 等人 (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100)。通过抑制PD-1 与PD-L1 或PD-L2 的局部相互作用能逆转免疫抑制; 当PD-1 与PD-L2 的相互作用也被阻断时该作用是相加性的 (Iwai 等人 (2002) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99:12293-7; Brown 等人 (2003) J. Immunol. 170:1257-66)。可通过与免疫抑制性蛋白 (例如PD-1) 结合或与调节抑制性蛋白的蛋白 (例如PD-L1、PD-L2) 结合来实现免疫调节。

[0192] 在一个实施方案中, 本发明的组合疗法包括作为免疫检查点分子的抑制性分子的抑制剂或拮抗剂的免疫调节剂。在另一个实施方案中, 所述免疫调节剂与天然抑制免疫抑制性检查点分子的蛋白结合。当与抗菌化合物组合使用时, 这些免疫调节剂能增强抗菌响

应,并因此与单独用抗菌化合物治疗相比增强功效。

[0193] 术语“免疫检查点”是指CD4和CD8T细胞表面上的一组分子。这些分子能有效地用作下调或抑制适应性免疫应答的“刹车”。免疫检查点分子包括但不限于程序性死亡1 (PD-1)、细胞毒性T-淋巴细胞抗原4 (CTLA-4)、B7H1、B7H4、OX-40、CD137、CD40和LAG3,它们直接抑制免疫细胞。可用在本发明的方法中的能用作免疫检查点抑制剂的免疫治疗剂包括但不限于PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFR β 的抑制剂。抑制性分子的抑制作用能通过DNA、RNA或蛋白水平上的抑制来实现。在一些实施方案中,抑制性核酸(例如,dsRNA、siRNA或shRNA)可用于抑制抑制性分子的表达。在另一些实施方案中,抑制性信号的抑制剂是多肽例如可溶性配体或者是抗体或其抗原结合片段,其与抑制性分子结合。

[0194] “与……组合”不表示所述疗法或所述治疗剂必须同时施用和/或必须被配制在一起用于递送,但是这些递送方法也在本文所述的范围内。所述免疫调节剂可以与一种或多种本发明化合物和 β -内酰胺组合伙伴以及任选的一种或多种另外的疗法或治疗剂同时施用、在其之前施用或在其之后施用。组合中的各治疗剂可以以任何顺序施用。一般而言,每种治疗剂可以以针对该治疗剂所确定的剂量和/或时间方案被施用。还应当理解的是,该组合中所用的多种治疗剂可以在单个组合物中一起施用,或者在不同的组合物中分开施用。一般而言,预计组合使用的治疗剂中的每一种以不超过它们各自使用时的水平被使用。在一些实施方案中,组合使用的水平低于各自使用的水平。

[0195] 在某些实施方案中,本文所述的 β -抑制剂与 β -内酰胺和作为PD-1、PD-L1和/或PD-L2的抑制剂的一种或多种免疫调节剂组合施用。每种这类抑制剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。这类免疫调节剂的实例在本领域中是已知的。

[0196] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是选自MDX-1106、Merck 3475或CT-011的抗-PD-1抗体。

[0197] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是免疫粘附素(例如,包含与恒定区(例如免疫球蛋白序列的Fc区域)融合的PD-L1或PD-L2的胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素。

[0198] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是PD-1抑制剂,例如AMP-224。

[0199] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是PD-L1抑制剂,例如抗-PD-L1抗体。

[0200] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MEDI-4736、MSB-0010718C或MDX-1105的抗-PD-L1结合拮抗剂。MDX-1105也称为BMS-936559,是W02007/005874中所述的抗-PD-L1抗体。抗体YW243.55.S70是W0 2010/077634中所述的抗-PD-L1。

[0201] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是尼鲁单抗(nivolumab)(CAS登记号:946414-94-4)。尼鲁单抗的其它名称包括MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538或BMS-936558。尼鲁单抗是一种全人IgG4单克隆抗体,其特异性地阻断PD-1。尼鲁单抗(克隆5C4)和特异性地结合PD-1的其它人单克隆抗体公开在US 8,008,449、EP2161336和W02006/121168中。

[0202] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗i-PD-1抗体派姆单抗(Pembrolizumab)。派姆单抗(也称为Lambrolizumab、MK-3475、MK03475、SCH-900475或**KEYTRUDA®**; Merck)是一种人源化IgG4单克隆抗体,其结合PD-1。派姆单抗和其它人源化抗-PD-1抗体公开在Hamid, O.等人(2013) New England Journal of Medicine 369(2):134-44、US8,354,

509、W02009/114335和W02013/079174中。

[0203] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是Pidilizumab(CT-011;Cure Tech)——一种结合PD1的人源化IgG1k单克隆抗体。Pidilizumab和其它人源化抗-PD-1单克隆抗体公开在W02009/101611中。

[0204] 可在本文所述的方法中用作免疫调节剂的其它抗-PD1抗体包括AMP514 (Amplimmune)和US 8,609,089、US 2010028330和/或US 20120114649中公开的抗-PD1抗体。在一些实施方案中,所述抗-PD-L1抗体是MSB0010718C。MSB0010718C(也称为A09-246-2;Merck Serono)是一种结合PD-L1的单克隆抗体。

[0205] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是MDPL3280A (Genentech/Roche),一种结合PD-L1的人Fc优化的IgG1单克隆抗体。MDPL3280A和PD-L1的其它人单克隆抗体公开在美国专利US7,943,743和美国公开US20120039906中。可作为免疫调节剂用于本发明的方法的其它抗-PD-L1结合剂包括YW243.55.S70(参见W02010/077634)、MDX-1105(也称为BMS-936559)和W02007/005874中公开的抗-PD-L1结合剂。

[0206] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是AMP-224 (B7-DCIg;Amplimmune;例如,公开在W02010/027827和W02011/066342中),是阻断PD1与B7-H1的相互作用的PD-L2Fc融合可溶性受体。

[0207] 在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗-LAG-3抗体,例如BMS-986016。BMS-986016(也称为BMS986016)是一种结合LAG-3的单克隆抗体。BMS-986016和其它人源化抗-LAG-3抗体公开在US2011/0150892、W02010/019570和W02014/008218中。

[0208] 在某些实施方案中,本文所公开的组合疗法包括共刺激分子或抑制性分子的调节剂,例如共-抑制性配体或受体。

[0209] 在一个实施方案中,所述的共刺激分子的共刺激调节剂例如激动剂选自OX40、CD2、CD27、CD28、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3或CD83配体的激动剂(例如,激动性抗体或其抗原结合片段,或可溶性融合)。

[0210] 在另一个实施方案中,本文所公开的组合疗法包括为共刺激分子的免疫调节剂,例如与正信号相关的激动剂,其包含CD28、CD27、ICOS和/或GITR的共刺激结构域。

[0211] 举例性的GITR激动剂包括例如GITR融合蛋白和抗-GITR抗体(例如,二价抗-GITR抗体),例如美国专利US6,111,090、欧洲专利EP090505B1、美国专利US8,586,023、PCT公开W0 2010/003118和2011/090754中所述的GITR融合蛋白,或例如美国专利US7,025,962、欧洲专利EP1947183B1、美国专利US7,812,135、美国专利US8,388,967、美国专利US8,591,886、欧洲专利EP1866339、PCT公开W0 2011/028683、PCT公开W0 2013/039954、PCT公开W02005/007190、PCT公开W0 2007/133822、PCT公开W02005/055808、PCT公开W0 99/40196、PCT公开W0 2001/03720、PCT公开W099/20758、PCT公开W02006/083289、PCT公开W0 2005/115451、美国专利US7,618,632和PCT公开W0 2011/051726中所述的抗-GITR抗体。

[0212] 在一个实施方案中,所用的免疫调节剂是可溶性配体(例如CTLA-4-Ig)或者抗体或抗体片段,其结合PD-L1、PD-L2或CTLA4。例如,抗-PD-1抗体分子可以例如与抗CTLA-4抗体例如伊匹木单抗组合施用。举例性的抗-CTLA4抗体包括曲美木单抗(Tremelimumab)(可从Pfizer获得的一种IgG2单克隆抗体,以前称为替西木单抗(ticilimumab),CP-675,206)

和伊匹木单抗 (CTLA-4抗体, 也称为MDX-010, CAS No.477202-00-9)。

[0213] 在一个实施方案中, 在用本文所述的本发明化合物治疗后施用抗-PD-1抗体分子。

[0214] 在另一个实施方案中, 抗-PD-1或PD-L1抗体分子与抗-LAG-3抗体或其抗原结合片段组合施用。在另一个实施方案中, 抗-PD-1或PD-L1抗体分子与抗-TIM-3抗体或其抗原结合片段组合施用。在另外一些其它的实施方案中, 抗-PD-1或PD-L1抗体分子与抗-LAG-3抗体和抗-TIM-3抗体或其抗原结合片段组合施用。本文所述的抗体的组合可以分开施用, 例如以分开的抗体的形式施用, 或者以连接的抗体施用, 例如以双特异性或三特异性抗体分子的形式施用。在一个实施方案中, 施用包含抗-PD-1或PD-L1抗体分子和抗-TIM-3或抗-LAG-3抗体或其抗原结合片段的双特异性抗体。在某些实施方案中, 本文所述的抗体的组合用于治疗癌症, 例如本文所述的癌症 (例如, 实体瘤)。可以在本领域已知的动物模型中测试上述组合的功效。例如, 测试抗-PD-1和抗-LAG-3的协同作用的动物模型例如在Woo等人 (2012) Cancer Res.72 (4):917-27) 中有描述。

[0215] 可以用在组合疗法中的举例性的免疫调节剂包括但不限于例如阿托珠单抗 (afutuzumab) (可从 **Roche®** 获得); 培非司亭 (**Neulasta®**); 来那度胺 (CC-5013, **Revlimid®**); 沙立度胺 (**Thalomid®**); actimid (CC4047); 和细胞因子, 例如IL-21或IRX-2 (包含白介素1、白介素2和干扰素 γ 的人细胞因子混合物, CAS 951209-71-5, 可从IRX Therapeutics获得)。

[0216] 可用于与本发明的抗菌化合物组合的所述免疫调节剂的举例性剂量包括约1-10mg/kg、例如3mg/kg的抗-PD-1抗体分子的剂量, 和约3mg/kg的抗-CTLA-4抗体、例如伊匹木单抗的剂量。

[0217] 使用本发明化合物与 β -内酰胺抗生素和免疫调节剂组合的方法的实施方案的实例包括以下这些:

[0218] i. 治疗个体的细菌感染的方法, 其包括给所述个体施用本文所述的式 (A) 的化合物和免疫调节剂。

[0219] ii. 实施方案i的方法, 其中所述免疫调节剂是共刺激分子的活化剂或免疫检查点分子的抑制剂。

[0220] iii. 实施方案i和ii之一的方法, 其中共刺激分子的活化剂是OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160、B7-H3和CD83配体中一个或多个的激动剂。

[0221] iv. 以上实施方案i-iii中任意一项的方法, 其中所述的免疫检查点分子的抑制剂选自PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR β 。

[0222] v. 实施方案i-iii中任意一项的方法, 其中所述的免疫检查点分子的抑制剂选自PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3或CTLA4的抑制剂或其任意组合。

[0223] vi. 实施方案i-v中任意一项的方法, 其中所述的免疫检查点分子的抑制剂是可溶性配体或者抗体或其抗原结合片段, 其结合免疫检查点分子。

[0224] vii. 实施方案i-vi中任意一项的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段来自IgG1或IgG4 (例如, 人IgG1或IgG4)。

[0225] viii. 实施方案i-vii中任意一项的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段是改变

的,例如是突变的,以增加或减少Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数量、效应细胞功能或补体功能中的一种或多种。

[0226] ix.实施方案i-viii中任意一项的方法,其中所述抗体分子是双特异性或多特异性抗体分子,其具有对PD-1或PD-L1的第一结合特异性和对TIM-3、LAG-3或PD-L2的第二结合特异性。

[0227] x.实施方案i-ix中任意一项的方法,其中所述免疫调节剂是选自尼鲁单抗、派姆单抗或Pidilizumab的抗-PD-1抗体。

[0228] xi.实施方案i-x中任意一项的方法,其中所述免疫调节剂是选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MEDI-4736、MSB-0010718C或MDX-1105的抗-PD-L1抗体。

[0229] xii.实施方案i-x中任意一项的方法,其中所述免疫调节剂是抗-LAG-3抗体分子。

[0230] xiii.实施方案xii的方法,其中所述抗-LAG-3抗体分子是BMS-986016。

[0231] xiv.实施方案i-x中任意一项的方法,其中所述免疫调节剂是抗-PD-1抗体分子,其通过注射(例如,皮下或静脉内)以约1-30mg/kg、例如约5-25mg/kg、约10-20mg/kg、约1-5mg/kg或约3mg/kg的剂量施用,例如每周施用一次至每2、3或4周施用一次。

[0232] xv.实施方案xiv的方法,其中所述抗-PD-1抗体分子以约10-20mg/kg的剂量每隔一周施用一次。

[0233] xvi.实施方案xv的方法,其中所述抗-PD-1抗体分子、例如尼鲁单抗以约1mg/kg至3mg/kg、例如约1mg/kg、2mg/kg或3mg/kg的剂量每两周静脉内施用一次。

[0234] xvii.实施方案xv的方法,其中所述抗-PD-1抗体分子、例如尼鲁单抗以约2mg/kg的剂量以3周的间期静脉内施用。

[0235] 措辞“有效量的”化合物是增强所用 β -内酰胺抗生素效能以治疗或预防细菌感染和/或本文所述的疾病或病症必需的或足够的量。在一个实例中,当与 β -内酰胺一起给药时,有效量的化合物是治疗个体的细菌感染足够的量。在另一个实例中,当与 β -内酰胺抗生素组合给药时,有效量的化合物是足以治疗细菌感染,例如治疗由(但不限于)肠杆菌科的菌种引发的个体的细菌感染足够的量。有效量可以根据诸如个体的大小和重量、疾病的类型、引起疾病的细菌病原体的特征(例如产生 β -内酰胺酶的类型和水平)或具体的本发明化合物,以及与本发明化合物一起使用的 β -内酰胺抗生素等因素而变化。例如,本发明化合物的选择能影响如何构成“有效量”。本领域的普通技术人员能研究本文所包含的因素并且无需过度实验即可确定本发明化合物的有效量。

[0236] 施用方案能影响如何构成有效量。本发明化合物可在细菌感染发作之前或之后施用于个体。典型地,将化合物施用给被诊断为具有细菌感染和需要治疗的个体。此外,多个分次剂量以及错开的剂量可以每6小时、每8小时、每12小时或每天或相继施用,或者所述剂量可以连续输注或可以推注。此外,本发明的一种或多种化合物的剂量可以根据治疗或预防的情况的紧急程度所提示地那样成比例地增加或减少。典型地,本发明化合物可以通过每天3或4次输注(每6或8小时)施用至少5天、更常见地至少7天或至少10天或至少14天的时间。

[0237] 本发明化合物可用于治疗本文所述的状态、病症或疾病,或者用于制备用于治疗这些疾病的药物组合物。本发明提供了在治疗这些疾病中使用本发明化合物的方法或者用于治疗这些疾病的包含本发明化合物的药物制剂。

[0238] 措辞“药物组合物”包括适合用于施用给哺乳动物例如人的制剂。当本发明化合物作为药物施用给哺乳动物例如人时，它们可以以本身形式或者以含有例如0.1-99.5%（更优选0.5-90%）活性成分以及可药用的载体的药物组合物的形式施用。

[0239] 短语“可药用的载体”是本领域公认的，包括适合用于将本发明化合物施用给哺乳动物的可药用的材料、组合物或介质。所述载体包括液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料，其参与将目的药物从一个器官或身体部分携带或运输到另一个器官或身体部分。每种载体都必须是“可药用的”，含义是与制剂中的其它成分是相容的，并且对患者无害。能用作可药用的载体的材料的一些实例包括：糖类，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉类，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；粉末状西黄蓍胶；麦芽；明胶；滑石粉；赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；油类，例如花生油、棉子油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油；二醇类，例如丙二醇；多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；酯类，油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原的水；等张盐水；林格氏液；乙醇；磷酸盐缓冲液；和药物制剂中使用的其它无毒的相容性物质。在一些实施方案中，可药用的载体在与本发明化合物混合之前被灭菌。

[0240] 在一些实施方案中，本发明的药物组合物包含编号的实施方案中任意一项的化合物和至少一种可药用的载体或赋形剂。在某些实施方案中，本发明的药物组合物包含编号的实施方案中任意一项的化合物和至少两种可药用的载体或赋形剂。

[0241] 所述组合物中还可以存在润湿剂、乳化剂和润滑剂，例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁，以及防腐剂和抗氧化剂。

[0242] 可药用的抗氧化剂的实例包括：水溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠；油溶性抗氧化剂，例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚（BHA）、丁羟甲苯（BHT）、卵磷脂、棕榈酸丙酯、 α -生育酚等；和金属螯合剂，例如柠檬酸、乙二胺四乙酸（EDTA）、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0243] 本发明的制剂包括适合用于口服、鼻、吸入、局部、透皮、口含、舌下、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些。典型地，本发明化合物以溶液形式被静脉内施用，所述溶液常是等张的，例如盐水或葡萄糖溶液。制剂可以常规地以单位剂型形式存在，并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。可以与载体材料合并来制备单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物的量。一般而言，按照百分比计算，该量为约1%至99%的活性成分，优选约5%至约70%、最优选约10%至约30%的活性成分。

[0244] 制备这些制剂或组合物的方法包括使本发明化合物与载体以及任选的一种或多种助剂联合的步骤。通常，所述制剂通过使本发明化合物与液体载体均匀且密切地混合来制备。

[0245] 适合用于肠胃外施用的本发明的药物组合物包含一种或多种本发明化合物以及一种或多种可药用的无菌的等张的水性或非水性溶液、分散液、混悬剂或乳剂、或可用于在使用前即刻重构成无菌注射溶液或分散物的无菌粉末，其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、制菌剂、使制剂与预期接受者的溶液等张的溶质或者助悬剂或增稠剂。

[0246] 可用在本发明的药物组合物中的适合的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）和其适合的混合物、植物油例如橄榄油和可注射的

有机酯例如油酸乙酯。可以例如通过使用包衣材料例如卵磷脂、在分散体系的情况下通过保持所需的粒度和通过使用表面活性剂可维持适合的流动性。

[0247] 这些组合物还可以含有辅助剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。防止微生物的作用可以通过包含各种抗菌剂或抗真菌剂例如尼泊金酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等来确保。在组合物中包含等张剂例如糖、氯化钠等可能也是符合需要的。另外,可以通过包含延迟吸收的物质例如单硬脂酸铝和明胶来产生可注射的药物形式的延长吸收。

[0248] 可注射的储库形式是通过在生物可降解的聚合物例如聚丙交酯-聚乙交酯中形成主题化合物的微囊基质来制备的。根据药物与聚合物的比例以及所使用的具体聚合物的性质,可以控制药物释放的速度。其它生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酐)。储库可注射制剂可以通过将药物包入与身体组织相容的脂质体或微乳中来制备。

[0249] 本发明的制剂可以口服、肠胃外、局部或直肠给予。它们当然通过适合各施用途径的形式给予。例如,它们以片剂或胶囊的形式、通过注射、吸入、洗眼液、软膏剂、栓剂等施用、通过注射、输注或吸入施用;通过洗剂或软膏剂局部施用;和通过栓剂直肠施用。优选静脉内施用。

[0250] 本文所用的措辞“肠胃外施用”意指不是肠内和局部施用的施用模式,通常是通过注射施用,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内(intracapsular)、眼眶内(intraorbital)、心内、真皮内、腹膜内、经气管(transtracheal)、皮下、表皮下、关节内、囊下(subcapsular)、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0251] 本文所用的措辞“全身施用”、“外周施用”意指不是直接施用至中枢神经系统中的化合物、药物或其它物质的施用,以至于其进入患者的系统并且因此经过代谢等过程,例如皮下施用。

[0252] 这些化合物可以通过任何适合的施用途径施用于人和其它动物以进行治疗,所述施用途径包括肌内注射、口服施用、鼻施用、吸入,例如通过喷雾剂鼻施用、直肠施用、阴道内施用、肠胃外施用和局部施用,例如通过散剂、软膏剂或滴剂局部施用,包括口含和舌下施用。在一些实施方案中,本发明化合物通过注射或输注给药,通常通过输注给药,并且可以与 β -内酰胺抗生素共同给药。 β -内酰胺抗生素可以通过任何适当的途径给药;在一些实施方案中, β -内酰胺抗生素口服给药,而在其他实施方案中, β -内酰胺抗生素通过注射或输注给药。当本发明化合物与 β -内酰胺抗生素共同给药并且两者都通过相同途径给药时,它们可以任选地通过注射或通过输注混合给药,或者它们可以单独给药,条件是 β -内酰胺酶抑制剂在治疗的个体中与 β -内酰胺抗生素一起全身存在,因此可以发生增强作用。

[0253] 无论所选择的施用途径如何,通过本领域技术人员已知的常规方法将可以以适合的水合形式使用的本发明化合物和/或本发明的药物组合物配制成可药用的剂型。

[0254] 本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以变化以便在对患者无毒性的情况下针对特定的患者、组合物和使用模式获得有效实现所需治疗响应的活性成分的量。

[0255] 选择的剂量水平取决于多种因素,包括所使用的本发明的具体化合物或其盐的活性、施用途径、施用时间、所使用的具体化合物的排泄速度、治疗时间、与所使用的具体化合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料、待治疗的患者的年龄、性别、体重、病症、总体健康状况和既往医疗史、引起感染的细菌病原菌的属、菌种和菌株以及医疗领域公知的其它

因素。

[0256] 概括而言,本发明化合物的适合的日剂量是为产生治疗作用有效剂量的量。所述有效剂量通常取决于上文所述的因素。当与 β -内酰胺组合用于所指出的抗菌作用时,用于患者的本发明化合物的静脉内和皮下剂量为约2至约100mg/千克体重/天,更优选为约5至约100mg/kg/天,还更优选约10至约50mg/kg/天。当与 β -内酰胺抗生素组合给药时,有效量是治疗细菌感染的量。

[0257] 如果需要,活性化合物的有效日剂量可以在一天中以2、3、4、5、6或更多个亚剂量的形式以适宜的时间间隔分开施用,任选地以单位剂型的形式或以连续输注的形式施用。

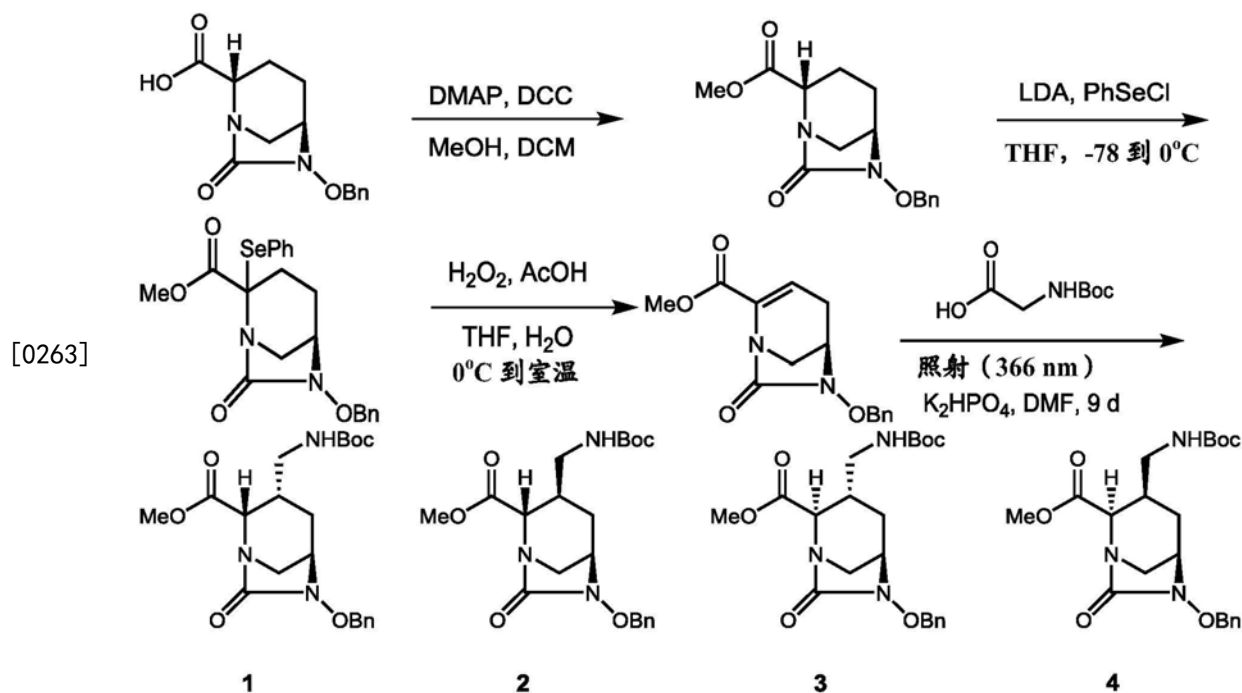
[0258] 尽管可以单独施用本发明化合物,但是更优选以药物组合物的形式施用化合物。

[0259] 实施方案中所定义的化合物可以通过下面的通用合成路线合成,在实施例更详细地描述了其具体实例。

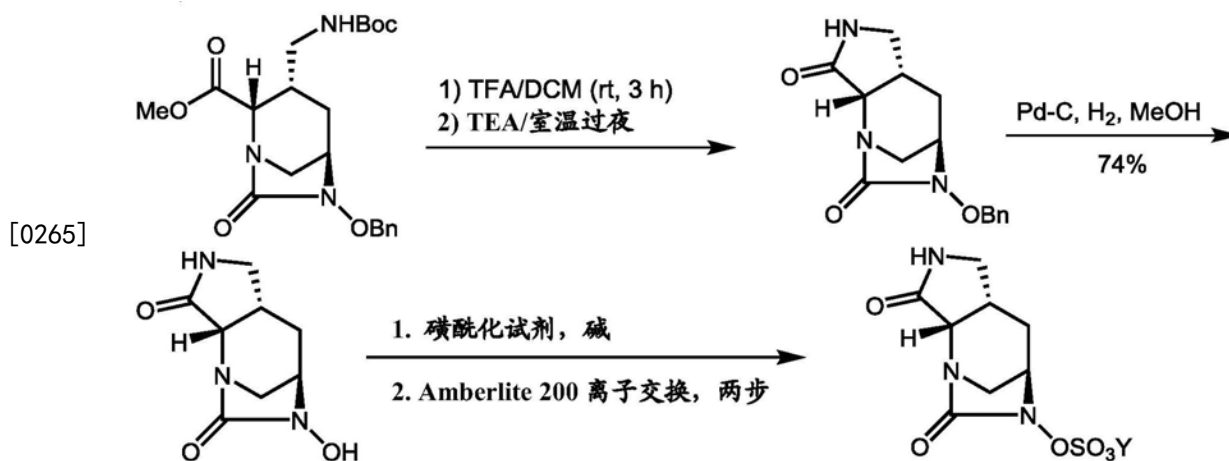
[0260] 通用合成流程

[0261] 式(I)化合物的一种合成方法如以下反应流程所示。流程A说明了以被保护形式的已知二氮杂双环辛烷骨架的官能化以引入氨基烷基基团,如工作实施例中所述。流程B说明了稠合内酰胺环的形成,其也由实施例说明。流程C说明了内酰胺如何能够容易被N-烷基化以引入任选取代的烷基。

[0262] 流程A



[0264] 流程B



[0266] 磺酰化试剂的实例包括但不限于三氧化硫吡啶络合物等。

[0267] 碱的实例包括但不限于吡啶等。

实施例

[0268] 通过以下实施例进一步说明本发明, 这些实施例不应解释为限制性的。接受所有实施例中所使用的测定法。在这些测定法中证实的功效可预测个体中的功效。

[0269] 通用条件

[0270] 使用以下配置的一系列仪器中的电喷雾、化学和电子碰撞电离方法在LC-MS、SFC-MS或GC-MS系统上获得质谱: Waters ACQUITY UPLC系统, 装配有ZQ 2000或SQD MS系统, 其中(M+1)是指化学物质的质子化分子离子, (M+)是指未质子化的季铵阳离子, (M-1)是指化学物质的去质子化分子离子。

[0271] 在TopSpin程序控制下, 使用ICON-NMR在Bruker BioSpin600MHz, Bruker AVANCE 500MHz或Varian 400MHz NMR光谱仪上进行NMR光谱。除非另有说明, 否则在298K下测量光谱, 并且相对于溶剂共振进行参考。

[0272] 仪器

[0273] MS方法:

[0274] 方法2m_酸性:

柱 Kinetex C18 50 x 2.1 mm, 2.6 μ m

柱温 50 $^{\circ}$ C

[0275] **洗脱剂** A: H₂O, B: 乙腈, 两者都包含 0.1% TFA

流速 1.2 mL/min

梯度 2%-88% B 下 1.30 min, 0.15 min 95% B

[0276] 方法2m_酸性_极性:

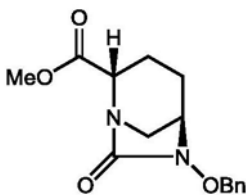
- | | | |
|--------|----------------------------------|--|
| | 柱 | Kinetex C18 50 x 2.1 mm, 2.6 μm |
| | 柱温 | 50 $^{\circ}$C |
| [0277] | 洗脱剂 | A: H₂O, B: 乙腈, 两者都包含 0.1% TFA |
| | 流速 | 1.2 mL/min |
| | 梯度 | 1%-30% B 下 1.30 min, 0.15 min 98% B |
| [0278] | 方法T3_3m_极性: | |
| | 柱 | T3 C18 50 x 2.1 mm, 2.6 μm |
| | 柱温 | 50 $^{\circ}$C |
| [0279] | 洗脱剂 | A: H₂O, B: 乙腈, 两者都包含 0.1% TFA |
| | 流速 | 1.2 mL/min |
| | 梯度 | 100% A 下 1.1 min, 30% B 下 1.20 min, 95% B 下 0.7 min |
| [0280] | 方法LCMS_2MIN_REACTION_MONITORING: | |
| | 柱 | Acquity UPLC HSS T3 50 x 2.1 mm, 1.8 μm |
| | 柱温 | 60 $^{\circ}$C |
| | 洗脱剂 | A: H₂O, B: 乙腈, 两者都包含 0.05% TFA |
| [0281] | 流速 | 1.0 mL/min |
| | 梯度 | 5%-98% B 下 1.4 min |
| | UV 检测 | TAC (210-450 nm) |
| [0282] | 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS: | |
| | 柱 | Acquity UPLC HSS T3 50 x 2.1 mm, 1.8 μm |
| | 柱温 | 60 $^{\circ}$C |
| | 洗脱剂 | A: H₂O (0.05% FA+3.75 mM AA, B: 乙腈(0.04% FA) |
| [0283] | 流速 | 1.0 mL/min |
| | 梯度 | 5%-98% B 下 1.4 min |
| | UV 检测 | TAC (210-450 nm) |
| [0284] | 方法LCMS_2_MIN_极性: | |

- [0285] **柱** Acquity UPLC HSS T3 50 x 2.1 mm, 1.8 μ m
柱温 60 °C
洗脱剂 A: H₂O (0.05% FA+3.75 mM AA, B: 乙腈(0.04% FA)
流速 1.0 mL/min
梯度 凹形函数 1%-98% B 下 1.4 min
UV 检测 TAC (210-450 nm)
- [0286] 方法HPLC_CHIRAL:
柱 Chiralpak IC KK025 250 x 4.6 mm, 5 μ m
柱温 室温
- [0287] **洗脱剂** 庚烷/EtOH/二乙胺 92:8:0.05
流速 1.0 mL/min
UV 检测 220 nm
- [0288] 缩写:
- [0289] AA 乙酸铵
- [0290] ACN 乙腈
- [0291] app 表观
- [0292] ATP 5'-三磷酸腺苷
- [0293] BINAP 外消旋2,2'-二(二苯基膦基)-1,1'-联萘基
- [0294] Boc 叔丁基氧羰基
- [0295] br 宽
- [0296] br s 宽单峰
- [0297] BSA 牛血清白蛋白
- [0298] d 双峰
- [0299] dd 双二重峰
- [0300] DCC 二环己基碳二亚胺
- [0301] DCE 1,2-二氯乙烷
- [0302] DCM 二氯甲烷
- [0303] DIAD 偶氮二甲酸二异丙酯
- [0304] DIPEA 二异丙基乙胺
- [0305] DMAP 4-(N,N-二甲基氨基)吡啶
- [0306] DME 1,4-二甲氧基乙烷
- [0307] DMF N,N-二甲基甲酰胺
- [0308] DMSO 二甲基亚砷
- [0309] EDTA 乙二胺四乙酸
- [0310] ESI 电喷射离子化

[0311]	EtOAc	乙酸乙酯
[0312]	FA	甲酸
[0313]	g	克
[0314]	h	小时
[0315]	HATU	1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐
[0316]	HBTU	1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-苯并三唑鎓六氟磷酸盐(1-)-3-氧化物
[0317]	HCl	盐酸
[0318]	HOBt	1-羟基苯并三唑
[0319]	HPLC	高效液相色谱
[0320]	LCMS	液相色谱和质谱
[0321]	LDA	二异丙基氨基锂
[0322]	MeOH	甲醇
[0323]	MS	质谱
[0324]	m	多重峰
[0325]	mg	毫克
[0326]	MIC	最小或最低抑制浓度
[0327]	min	分钟
[0328]	mL	毫升
[0329]	mmol	毫摩尔
[0330]	m/z	质荷比
[0331]	NMR	核磁共振
[0332]	o/n	过夜
[0333]	p	五重峰
[0334]	$\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$	1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷复合物
[0335]	ppm	百万分之一
[0336]	PyBOP	苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷子基磷六氟磷酸盐
[0337]	q	四重峰
[0338]	rac	外消旋
[0339]	rbf	圆底烧瓶
[0340]	rt	室温
[0341]	R_t	保留时间
[0342]	s	单峰
[0343]	t	三重峰
[0344]	TBME	甲基叔丁基醚
[0345]	TFA	三氟乙酸
[0346]	TFAA	三氟乙酸酐
[0347]	THF	四氢呋喃
[0348]	Tris • HCl	氨基三(羟甲基)甲烷盐酸盐

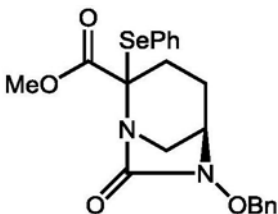
[0349] 中间体制备

[0350]



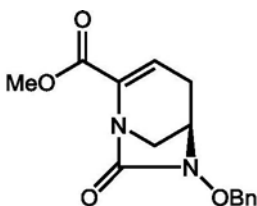
[0351] 中间体A: (2S,5R)-6-(苄氧基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯。0℃下向 (2S,5R)-6-(苄氧基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸 (5.0g, 18.1mmol)、MeOH (880μL, 21.7mmol) 和 DMAP (44mg, 0.36mmol) 在 DCM (50mL) 的溶液中加入 DCC (3.92g, 19.0mmol)。室温下2小时后将其用DCM稀释,并用水然后用盐水洗涤。将水层用DCM (2x) 萃取,并将合并的有机层用Na₂SO₄干燥,过滤,然后真空浓缩。将粗的残余物用乙醚研磨,过滤并真空浓缩。将粗的滤液经硅胶色谱纯化,得到标题化合物 (4.3g, 82%)。LCMS $R_t = 0.87\text{min}$, $m/z = 291.3 (M+1)$, 方法2MIN_REACTION_MONITORING。

[0352]



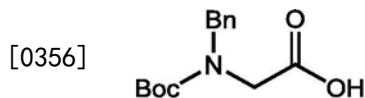
[0353] 中间体B: (5R)-6-(苄氧基)-7-氧代-2-(苄硒基)-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯。-70℃下向二异丙胺 (29.6ml, 210mmol) 在 THF (800mL) 的溶液中历经10分钟逐滴加入正丁基锂 (1.6M在己烷中的溶液, 108ml, 172mmol)。在-73℃下搅拌50分钟后,将 (2S,5R)-6-(苄氧基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯 (43.5g, 150mmol) 在 THF (350mL) 的溶液历经45分钟逐滴加入。在-78℃搅拌1.5小时后,历经45分钟将苄硒基氯 (57.4g, 300mmol) 在 THF (260mL) 中的溶液逐滴加入。在-78℃搅拌45分钟后,将其历经60分钟加温至-10℃,并再搅拌1小时,其后将其冷却至-30℃,用HCl (2M, 50mL) 猝灭,然后加入甲醇 (250mL)。将该混合物历经15分钟加温至室温,然后用TBME (1L) 稀释,并用盐水:水 (2:1, 2L) 洗涤。分离各相,将有机相用盐水 (2L) 洗涤。将水层用TBME (2x500mL) 萃取。将合并的有机相用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化,得到标题化合物 (23.70g, 36%, 3:1的非对映异构体混合物),为褐色油状物。LCMS $R_t = 1.12/1.16\text{min}$, $m/z = 447.3 (M+1)$, 方法2MIN_REACTION_MONITORING; ¹H NMR (600MHz, CDCl₃, 主要的非对映异构体) δ 7.59 (d, J=7.9Hz, 2H), 7.42-7.30 (m, 8H), 5.00 (d, J=11.5Hz, 1H), 4.88 (d, J=11.5Hz, 1H), 4.15 (d, J=11.7Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.35 (s, 1H), 3.18 (d, J=11.8Hz, 1H), 2.44 (ddd, J=17.4, 11.8, 6.6Hz, 1H), 2.07-2.01 (m, 1H), 1.91 (dd, J=16.6, 5.8Hz, 1H), 1.72 (td, J=12.9, 6.0Hz, 1H)。

[0354]

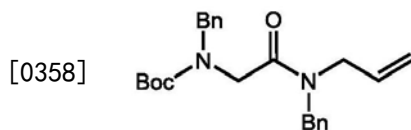


[0355] 中间体C: (5R)-6-(苄氧基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛-2-烯-2-甲酸甲

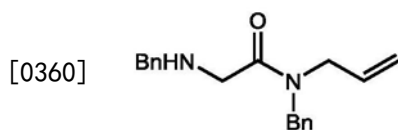
酯。0℃下向中间体B在THF:水(20:1, 22mL)的溶液中加入H₂O₂(30%水溶液, 0.8mL, 7.83mmol)和AcOH(0.55mL, 9.61mmol)。在0℃搅拌1小时后, 将其用EtOAc稀释, 并加入亚硫酸钾(5%水溶液)。破坏全部过氧化物(**KJ-stärke-test**)后, 分离各相, 并将有机层用盐水洗涤。将水层用EtOAc萃取, 并将合并的有机层用NaHCO₃(5%水溶液)、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥, 过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化, 得到标题化合物(419mg, 81%)。LCMS: R_t=0.88min, m/z=288.1 (M+1), 方法2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 7.45-7.41 (m, 2H), 7.40-7.33 (m, 3H), 6.88-6.86 (m, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.96 (br s, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.35-3.28 (m, 1H), 2.82 (d, J=11.0Hz, 1H), 2.58-2.52 (m, 1H), 2.38 (s, 1H), 2.34 (s, 1H)。



[0357] 中间体D:N-苄基-N-(叔丁氧基羰基)甘氨酸。向N-苄基甘氨酸(24.3g, 147mmol)在THF:水(1:1, 500mL)的混悬液中加入Boc-酸酐(33.7g, 154mmol)。6.5小时后, 将该混合物用TBME(250mL)稀释, 并加入柠檬酸(33g)直到pH=4。搅拌10分钟后, 分离各相, 并将有机相用盐水(250ml)洗涤。将水层用TBME(2x100ml)洗涤, 并将合并的有机相用Na₂SO₄干燥, 过滤, 然后真空浓缩(45℃), 得到标题化合物(40.70g), 为无色油状物, 其在放置后开始结晶。经UV检测, HPLC:99.7%, LCMS:R_t=0.94min, m/z=264.3 (M-H), 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 12.62 (br s, 1H), 7.44-7.09 (m, 5H), 4.41 (d, J=8.1Hz, 2H), 1.44-1.24 (m, 9H), 3.89-3.67 (m, 2H)。*为与0 (Boc)₂(约9%)的混合物。

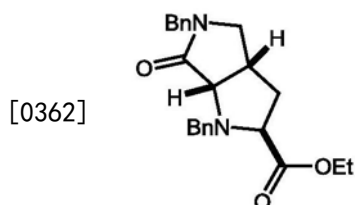


[0359] 中间体E:(2-(烯丙基(苄基)氨基)-2-氧代乙基)(苄基)氨基甲酸叔丁酯。向装配有机械搅拌器、内置温度计、冷凝管和氮气入口的1500mL 4-颈反应瓶中装入中间体D(31.6g, 107mmol), 然后加入EtOAc(500ml)。将反应混合物在冰浴(4℃)中冷却, 然后加入N-烯丙基苄基胺(16.44g, 107mmol)和丙基磷酸酐(T3P, 136g, 214mmol, 50%在乙酸乙酯中的溶液)。向该混合物中历经5分钟逐滴加入三乙胺(90ml, 643mmol)。将该褐色溶液在室温下搅拌20分钟, 然后倒入搅拌过的冰水混合物(500ml)中。分离各相并将有机相用HCl(0.5N, 500mL)、饱和NaHCO₃(500mL)和盐水(500mL)连续洗涤。将开始的水层用EtOAc(2x250mL)萃取, 并将合并的有机层用Na₂SO₄干燥, 过滤并真空浓缩(45℃), 得到标题化合物(43.94g), 为褐色油状物。LCMS:R_t=1.31, min m/z=395.5 (M+1), 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.53-6.99 (m, 10H), 5.94-5.55 (m, 1H), 5.24-4.97 (m, 2H), 4.55-4.25 (m, 4H), 4.16-3.68 (m, 4H), 1.42-1.28 (m, 9H)。

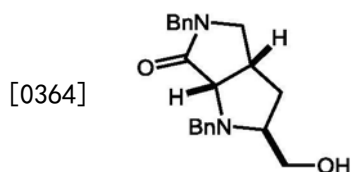


[0361] 中间体F:N-烯丙基-N-苄基-2-(苄基氨基)乙酰胺。向装配有机械搅拌器、内置温度计、冷凝管和氮气入口的750ml 4-颈反应瓶中装入中间体E(43.9g, 108mmol)在DCM

(400mL) 中的溶液。向该溶液中加入TFA (83ml, 1.079mol)。搅拌后, 将该黄色溶液缓慢倒入 (快速气体产生) 搅拌过的饱和NaHCO₃溶液 (水溶液, 1.5L) 和冰 (1kg) 的混合物中。搅拌10分钟后, 分离各相, 并将有机相用半饱和NaHCO₃ (水溶液, 0.5L), 然后用盐水 (0.5L) 洗涤。将水层用DCM (0.5L) 萃取, 并将合并的有机层用Na₂SO₄干燥, 过滤并真空浓缩 (45℃), 得到标题化合物 (31.30g), 为褐色油状物。LCMS: $R_t = 0.71\text{min}$ $m/z = 295.3$ (M+1), 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ ppm 7.49-7.04 (m, 10H), 5.90-5.55 (m, 1H), 5.19-4.92 (m, 2H), 4.64-4.37 (m, 2H), 3.98-3.76 (m, 2H), 3.73-3.61 (m, 2H), 3.44-3.32 (m, 2H), 2.44-2.28 (m, 1H)。

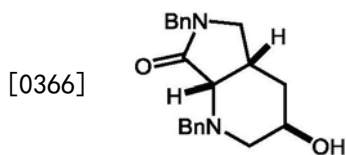


[0363] 中间体G: 外消旋 (2S*, 3aS*, 6aS*) -1,5-二苄基-6-氧代八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-2-甲酸乙酯。向用氮气惰化的装配有Huber恒温器390W、带有自动温控的Flexy ALR、投料控制和氮气入口的60L Buechi反应器CR60中加入中间体F (1.460kg, 4.81mol) 在甲苯 (20L) 中的溶液、硫酸镁 (2.32kg, 19.24mol) 和三乙胺 (0.872L, 6.25mol)。将该浅黄色混悬液在1小时内加热至回流。向该回流中的混合物中历经15小时经投料泵加入乙醛酸乙酯 (50%在甲苯中的溶液, 1.179kg, 5.77mol)。回流下再搅拌6小时后, 将该黄色混悬液冷却至15℃ (内部温度), 随后加入水 (20L) (放热)。搅拌15分钟后, 将该混合物转移至80L-分离容器, 并分离各相。将有机层用水 (15L), 然后用盐水 (15L) 连续萃取。将水层用TBME (2x10L) 洗涤。将第二次的TBME洗涤物经硅藻土 (含不溶物) 过滤, 用TBME洗脱。将合并的有机相在真空下部分浓缩 (45℃) 至6L体积, 用Na₂SO₄干燥, 过滤并真空浓缩 (50℃)。将该物质进一步干燥过夜 (50℃, 10mbar), 得到标题化合物 (1.970kg), 为褐色油状物, 其为5.2:1非对映异构体混合物。LCMS: $R_t = 1.21\text{min}$ (67.1%a) $m/z = 379.3$ (M+1); (12.9%a), $R_t = 1.16\text{min}$ $m/z = 379.3$ (M+1), 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS。

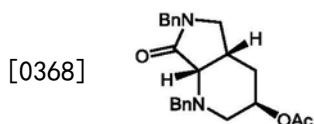


[0365] 中间体H: 外消旋 (2S*, 3aS*, 6aS*) -1,5-二苄基-2-(羟基甲基)-六氢吡咯并-[3,4-b]吡咯-6(1H)-酮。向装配有Huber恒温器1015W、Flexy ALR、自动温控和氮气入口的30L Büchi反应器CR30中的中间体G (1.967kg, 5.847mol) 在THF (20L) 的溶液中历经10分钟分批加入硼氢化锂 (0.238kg, 10.39mol) (轻微放热)。5天后, 室温下加入另外的硼氢化锂 (0.025kg, 1.143mol)。再过5天后, 室温下加入硼氢化锂 (0.017kg, 0.780mol)。再过6天后, 将该混合物冷却至-10℃, 然后经投料泵历经2小时逐滴加入HCl (2N, 8L), 得到pH=3 (注意: 产生非常强烈的气体和泡沫!)。剧烈搅拌后, 形成黄色混悬液, 将其在0℃搅拌30分钟。加入饱和NaHCO₃ (水溶液, 10L), 并将该混合物转移至80L-分离容器, 并在加入有助于相分离的水 (8L) 后用TBME (20L) 萃取。将有机相用盐水 (2x10L) 洗涤, 并将水层用TBME (2x7L) 萃取。将

合并的有机层真空浓缩 (45℃) 至8L体积, 然后用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩 (50℃)。将该残余物溶于甲苯 (3L), 真空浓缩, 并干燥3小时 (50℃, 10mbar), 得到标题化合物 (1.630kg), 为黄褐色油状物, 其是10.5:1的非对映异构体混合物。LCMS: $R_t = 0.77\text{min}$, $m/z = 337.3$ ($M+1$), 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS.*主要的非对映异构体。



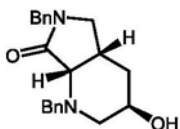
[0367] 中间体I: 外消旋 (3R*, 4aS*, 7aS*) -1,6-二苄基-3-羟基八氢-7H-吡咯并[3,4-b]吡啶-7-酮。-5℃下向在氮气惰化的装配有自动温控、Unistat 390W、回流冷凝器和氮气入口的30L三口夹套Amsi Glas反应器中的中间体H (1.627kg, 4.836mol)、分子筛 (4 Å, 2.5kg) 和THF (23L) 的混悬液中历经35分钟逐滴加入TFAA (0.820L, 5.81mol)。0℃下搅拌15分钟后, 历经10分钟加入三乙胺 (3.37L, 24.18mol), 然后将其加热至回流 (内部温度68℃) 6天, 达到产物与起始物质9:1的平衡比率。将该混合物转移至装有冰冷冷却的NaOH (1M, 24L) 的80L分离容器中, 并搅拌15分钟。向该褐色混悬液中加入硅藻土 (3kg), 将其搅拌15分钟, 然后经硅藻土垫过滤, 用TBME洗涤。将滤液用TBME (20L) 萃取。将有机相用饱和 NaHCO_3 (水溶液, 10L), 然后用盐水 (1x15L) 洗涤。将水层用TBME (2x7L) 再次萃取, 并将合并的有机层真空浓缩 (45℃) 至体积8L, 并用 Na_2SO_4 (2kg) 干燥。将该混悬液经硅胶 (1kg, 40-63μm) 过滤, 用EtOAc (4x2L) 洗涤。将洗脱液真空浓缩 (45℃), 并干燥3小时 (50℃, 15mbar), 得到标题化合物 (1.366kg), 为深褐色油状物。LCMS: $R_t = 0.84\text{min}$, $m/z = 337.3$ ($M+1$), 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS。 ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.40-7.15 (m, 10H), 4.69-4.57 (m, 1H), 4.65-4.56 (m, 1H), 4.43 (d, $J = 13.8\text{Hz}$, 1H), 4.29-4.21 (m, 1H), 3.62-3.49 (m, 1H), 3.46-3.39 (m, 1H), 3.18 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 2H), 2.86 (d, $J = 5.7\text{Hz}$, 1H), 2.70 (dd, $J = 10.7, 2.7\text{Hz}$, 1H), 2.66-2.56 (m, 1H), 1.83-1.67 (m, 2H), 1.39-1.29 (m, 1H)。



[0369] 中间体J: (3R, 4aS, 7aS) -1,6-二苄基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-3-基乙酸酯。将在氮气惰化的装有自动温控、Unistat 390W、冷凝器和氮气入口的30L的三口夹套反应器中的中间体I (1.364kg, 3.04mol)、乙酸乙烯酯 (4.20L, 45.6mol)、脂肪酶QLM (产碱杆菌属物种, Meito Sangyo, 活度: 101400U/g, 25g, 3.04mol) 和TBME (21L) 的混悬液在30℃ (内部温度) 下搅拌6天。将该混合物冷却至20℃, 经白色硅藻土 (hyflo) (500g) 过滤。将滤液真空浓缩 (35℃) 至体积3L, 然后加入甲苯 (1L), 随后进一步真空浓缩 (35℃, 然后50℃)。将粗产物溶于TBME: 庚烷 (2:1, 3L), 分几批经硅胶色谱纯化 (庚烷-EtOAc-甲醇), 得到标题化合物 (626g), 为褐色油状物。LCMS: $R_t = 1.16\text{min}$, $m/z = 379.3$ ($M+1$), 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS。HPLC: $R_t = 33.45\text{min}$, 98.2% ee (次要对映异构体: $R_t = 23.92\text{min}$) 方法HPLC_CHIRAL。 ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 7.41-7.22 (m, 10H), 4.74-4.65 (m, 1H), 4.56-4.51 (m, 1H), 4.36-4.26 (m, 2H), 3.75 (d, $J = 14.3\text{Hz}$, 1H), 3.30-3.21 (m, 2H), 3.00 (dd, $J = 9.5, 5.9\text{Hz}$, 1H), 2.75-2.68 (m, 1H), 2.62 (sxt, $J = 6.2\text{Hz}$, 1H), 2.23 (dd, $J = 11.6, 7.2\text{Hz}$, 1H),

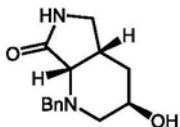
1.97 (s, 3H), 1.66 (t, J=6.05Hz, 2H)。

[0370]

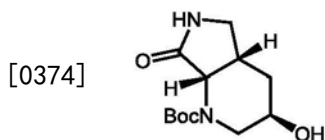


[0371] 中间体K: (3R, 4aS, 7aS)-1,6-二苄基-3-羟基八氢-7H-吡咯并[3,4-b]-吡啶-7-酮。将Büchi Rotavapor的20L圆底烧瓶中的中间体J (616g, 1221mmol)、THF (4L) 和NaOH (2N, 3.97L, 7.94mol) 的混合物在25℃下搅拌18小时, 并在40℃搅拌6小时, 然后将其冷却至25℃, 然后加入MeOH (2L), 并将其搅拌过夜。将该混合物用TBME (6L) 萃取, 并将有机相用盐水 (4L) 洗涤。将水层用TBME (3x3L) 萃取, 并将合并的有机相真空浓缩 (45℃) 至体积5L, 然后用无水硫酸钠干燥 (1kg), 过滤并真空浓缩 (45℃)。将残余物溶于甲苯 (3L), 并再次浓缩, 然后干燥2小时 (60℃, 20mbar), 得到标题化合物 (555g), 为褐色油状物。LCMS: $R_t = 0.84\text{min}$, $m/z = 337.3 (M+1)$, 方法LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.58-7.04 (m, 10H), 4.66-4.5 (m, 2H), 4.43 (d, J=13.9Hz, 1H), 4.25 (d, J=15.2Hz, 1H), 3.54 (tq, J=9.3, 4.5Hz, 1H), 3.47-3.39 (m, 1H), 3.18 (d, J=8.3Hz, 2H), 2.85 (d, J=5.9Hz, 1H), 2.70 (dd, J=11.0, 2.8Hz, 1H), 2.64-2.57 (m, 1H), 1.78-1.67 (m, 2H), 1.27-1.39 (m, 1H)。

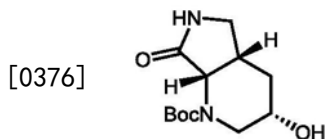
[0372]



[0373] 中间体L: (3R, 4aS, 7aS)-1-苄基-3-羟基八氢-7H-吡咯并[3,4-b]-吡啶-7-酮。向装配有Huber恒温器1015、带有自动温控的Flexy ALR、氩气和氨气入口的30L Büchi反应器CR30中用氩气惰化, 预冷却至-80℃, 装入液氨 (无水, 10.0kg, 587mol), 将入口与装有硫酸 (30%, 100L) 的气体洗涤器连接, 加入中间体K (543g, 1.614mol) 在THF (1.5L) 中的溶液, 然后加入乙醇 (无水, 236mL, 4.04mol)。向所得溶液中加入锂 (颗粒, 44.8g, 6.46mol), 历经15分钟分批加入 (温度从-72℃升至-63℃)。1小时后, 向该灰色混合物中加入锂 (22.4g, 3.23mol) 和乙醇 (无水, 94mL, 1.616mol), 同时保持在-60℃下搅拌。1小时后, 加入另外的锂 (11.2g, 1.615mol) 和乙醇 (无水, 47mL, 0.808mol)。45分钟后, 再加入更多的锂 (11.2g, 1.615mol)。15小时后, 将乙醇 (无水, 94mL, 1.616mol) 加入该深蓝色混合物。继续搅拌直到起始物质剩余<5%, 并将其通过历经10分钟分批加入氯化铵 (2.0kg, 37.4mol) 猝灭。将反应混合物在-28℃搅拌17小时, 并在2℃搅拌2小时, 直到氨全部蒸发。向该混合物中加入水 (15L) 和TBME (8L), 然后加入HCl (32%) 直到达到pH=9-10。分离各相, 并将有机层用盐水 (5L) 洗涤。将水层用DCM (3x2L) 萃取, 并将合并的有机层在45℃真空浓缩至体积3L, 然后用 Na_2SO_4 (1kg) 干燥, 过滤并真空浓缩 (45℃, 然后在65℃下2小时, 20mbar), 得到标题化合物 (373g), 为褐色油状物。LCMS: $R_t = 0.75$, $m/z = 247.2 (M+H)$, 方法LCMS_2_MIN_极性. ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.78 (s, 1H), 7.34-7.24 (m, 4H), 7.27-7.16 (m, 1H), 4.65-4.60 (m, 1H), 4.32 (d, J=13.9Hz, 1H), 3.64-3.54 (m, 1H), 3.44 (d, J=13.9Hz, 1H), 3.13 (d, J=8.1Hz, 2H), 2.69 (dd, J=10.82, 2.75Hz, 1H), 2.66-2.62 (m, 1H), 2.60-2.54 (m, 1H), 1.80-1.69 (m, 2H), 1.41-1.30 (m, 1H)。

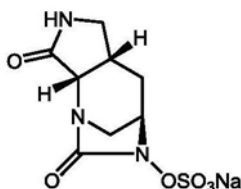


[0375] 中间体M: (3R,4aS,7aS)-3-羟基-7-氧代八氢-1H-吡咯并-[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯。向中间体L (372.0g, 1.51mol) 和Boc-酸酐 (346g, 1.59mol) 在THF (4.0L) 的溶液中加入Pd-C 10% (15g)。将该混合物在振摇duck器上在22-25℃下和0.1巴H₂下振摇89小时。吸收57%氢气后,再加入另外一部分的Pd-C 10% (15g)。将该混合物经硅藻土过滤,用THF洗涤,并真空浓缩,得到粗产物 (545g),为浅褐色固体。将残余物悬浮于EtOAc (1L),并在75℃搅拌1小时。75℃下向该混悬液中缓慢加入庚烷 (1.5L)。室温下搅拌2小时后,经过滤收集产物,将该固体用庚烷洗涤,然后真空干燥 (45℃),得到标题化合物 (278.5g),为白色晶体。LCMS: R_t=0.86min, m/z=257.3 (M+1), 方法LCMS_2_MIN_极性。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ7.83-7.65 (m, 1H), 4.80-4.49 (m, 2H), 3.93-3.67 (m, 2H), 3.43-3.37 (m, 1H), 2.72 (br d, J=9.5Hz, 1H), 2.60 (br d, J=12.5Hz, 1H), 2.48-2.39 (m, 1H), 1.82-1.70 (m, 1H), 1.40 (br d, J=6.8Hz, 9H) 1.36-1.27 (m, 1H)。



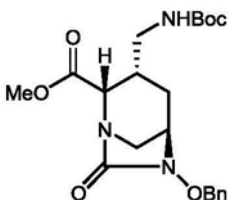
[0377] 中间体N: (3S,4aS,7aS)-3-羟基-7-氧代八氢-1H-吡咯并-[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯。向装在带有自动温控、Unistat 390W、冷凝器和氮气入口的氮气惰化的20L夹套反应器 (Amsi Glas) 中的中间体M (270g, 948mmol) 在THF (13L) 的溶液中加入-5℃ (内部温度) 下加入4-硝基苯甲酸 (323g, 1.90mol) 和三苯基膦 (524g, 1.90mol)。向所得溶液中历经30分钟逐滴加入DIAD (359ml, 1.85mol) 在THF (1.3L) 中的溶液,期间保持内部温度在-4至-10℃。将该混合物加温至室温,并搅拌过夜,然后真空浓缩 (45℃) 至获得粗物质 (1.64kg, 湿重),为褐色油状物。向该油状残余物在MeOH (15L) 的溶液中加入K₂CO₃ (393g, 2.844mol)。搅拌1小时后,将该混悬液真空浓缩 (40℃),得到橙色固体,向其中加入DCM (6L)。30分钟后将该混悬液过滤,用DCM洗涤,将滤液真空浓缩 (45℃)。残余物悬浮于DCM:MeOH (97:3, 4L) 中,并在室温下搅拌30分钟。将混悬液过滤,用DCM洗涤,并将滤液真空浓缩 (45℃) 至体积3L,然后以两部分经硅胶色谱纯化,得到产物 (189g),为固体。在45℃下向该溶于DCM:MeOH (95:5, 5L) 的物质中缓慢加入庚烷 (5L)。将该溶液部分浓缩 (45℃),除去部分DCM,使得产物在15分钟后结晶。室温下1小时后,将固体经过滤收集,用庚烷洗涤,并真空干燥 (45℃) 直到获得恒重,得到标题化合物 (167.7g),为晶体。LCMS: R_t=0.95min, m/z=257.3 (M+1), 方法LCMS_2_MIN_极性。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) *δ7.80 (d, J=20.2Hz, 1H), 4.97 (t, J=4.8Hz, 1H), 4.57 (dd, J=92.2, 7.0Hz, 1H), 3.89 (ddd, J=18.8, 9.3, 6.5Hz, 1H), 3.33-3.23 (m, 1H), 2.75 (ddd, J=9.7, 4.6, 2.0Hz, 1H), 2.43 (ddt, J=16.9, 11.8, 6.1Hz, 1H), 2.08 (ddd, J=86.6, 12.5, 10.7Hz, 1H), 1.94 (dd, J=12.2, 5.5Hz, 1H), 1.39 (d, J=22.6Hz, 9H), 1.04 (dq, J=15.2, 12.0Hz, 1H)。*报告观察到旋转异构体。

[0378]



[0379] 实施例1. (4R,5aS,8aS) -2,8-二氧化六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~革~~-3(4H)-基硫酸钠

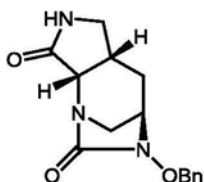
[0380]



[0381] 步骤1: (2S,3S,5R) -6-(苄氧基) -3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-甲基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯。将中间体C(0.82g,2.84mmol)、Boc-Gly-OH(1.00g,5.69mmol)和Ir[df(CF₃)ppy₂(dtbpy)]PF₆(32mg,0.028mmol)溶于DMF(20mL)中。向该溶液中加入精细研磨的磷酸二氢钾(0.59g,3.41mmol),并将所得混悬液在氩气(气球)中在500mL滴液漏斗(在底部用圆底烧瓶、在顶部用隔膜密封)中用8W UVA荧光管照射7天。将烧瓶水平放置在灯的顶部(空气冷却)以确保最大的照射。4天后,加入Ir[df(CF₃)ppy₂(dtbpy)]PF₆(32mg,0.028mmol)。

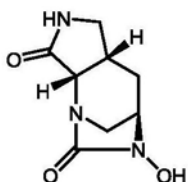
[0382] 向该混合物中加入水(100mL),然后加入饱和NaHCO₃(水溶液,100mL),将其用TBME萃取(4x80mL)。将合并的有机相依次用饱和NaHCO₃(水溶液,50mL)、水(50mL),随后用盐水(50mL)洗涤。将有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷,15-100%),得到标题化合物(108mg,9%),为油状物。LCMS:R_t=1.04min,方法2m_酸性。

[0383]



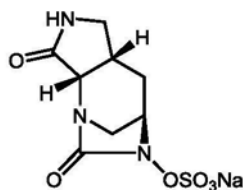
[0384] 步骤2: (4R,5aS,8aS) -3-(苄氧基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~革~~-2,8(3H)-二酮。室温下向(2S,3S,5R) -6-(苄氧基) -3-(((叔丁氧基羰基)氨基)-甲基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯(108mg,0.26mmol)在DCM(3mL)的溶液中逐滴加入TFA(1.0mL,13mmol)。将其在室温下搅拌3小时,然后真空浓缩。将粗的残余物溶于DCM(3mL),冷却至0℃,并加入三乙胺(0.31mL,2.3mmol)。1小时后,加入更多的三乙胺(0.11mL,0.75mmol)和DCM(5mL)。移去冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌过夜(o/n),然后将其用柠檬酸(10mL,约20%水溶液)洗涤。将水相用DCM萃取(3x8mL),并将合并的有机相用水(5mL)、盐水(2x10mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(DCM-MeOH,2-7%),得到标题化合物(47mg,61%),为浅褐色固体。LCMS:R_t=0.61min,m/z=288(M+1),方法2m_酸性。

[0385]



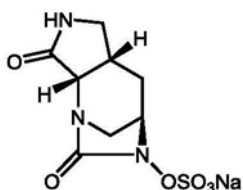
[0386] 步骤3: (4R,5aS,8aS)-3-羟基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-2,8(3H)-二酮。将(4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-2,8(3H)-二酮(80mg,0.278mmol)和Pd-C(10%Degussa 101型,50%水,34mg)在MeOH(1.8mL)中的浆体抽真空,并用H₂(3x)回充。2.5小时后将其经硅藻土柱过滤,用MeOH洗涤,并真空浓缩,得到标题化合物(40mg,74%)。LCMS:R_t=0.13min,m/z=198.1(M+1)方法2m_酸性。

[0387]



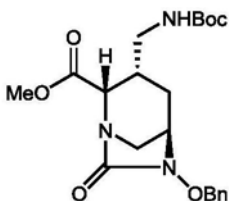
[0388] 步骤4: (4R,5aS,8aS)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-3(4H)-基硫酸钠。0℃下向粗的(4R,5aS,8aS)-3-羟基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-2,8(3H)-二酮(40.7mg,0.206mmol)在吡啶(2mL)的浆体中加入SO₃·Py复合物(335mg,2.064mmol)。将该浆体剧烈搅拌19小时后,过滤并真空浓缩。将该粗的残余物溶于THF:水(1:1,6mL),并加入Amberlite 200Na-交换树脂(1.5g)。将该混悬液搅拌2小时,然后过滤,部分真空浓缩,冷冻并冷冻干燥。将所得固体经硅胶色谱(水-乙腈,2-5%)纯化,得到标题化合物(12.3mg,16%,历经2个步骤),为无定形固体。LCMS:R_t=0.25min,m/z=278.0(M+1)方法T3_3m_极性;¹H NMR(500MHz,D₂O) δ4.24-4.18(m,2H),3.52(dd,J=10.7,6.2Hz,1H),3.33(d,J=12.3Hz,1H),3.10(d,J=10.7Hz,1H),2.95(d,J=12.3Hz,1H),2.81(p,J=8.5Hz,1H),2.54-2.46(m,1H),1.65(dd,J=14.7,9.2Hz,1H)。

[0389]



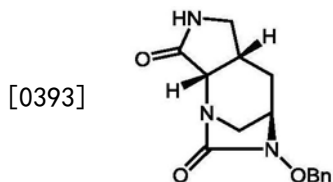
[0390] 实施例1.替代方法。(4R,5aS,8aS)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-3(4H)-基硫酸钠。

[0391]

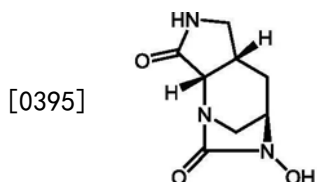


[0392] 步骤1: (2S,3S,5R)-6-(苄氧基)-3-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)-7-氧代-1,6-

二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯。将搅拌过的中间体C (3g, 10.41mmol)、2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙酸 (2.55g, 14.57mmol)、 $\text{Ir}[\text{df}(\text{CF}_3)\text{ppy}]_2(\text{dtbpy})\text{PF}_6$ (0.117g, 0.104mmol) 和磷酸二氢钾 (2.72g, 15.61mmol) 在DMF (30.6mL) 中的混合物通过 N_2 喷雾脱气15分钟, 并用Kessil H150-Blue LED (风扇冷却) 在 N_2 中照射92小时。加入2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙酸 (2.55g, 14.57mmol)、磷酸二氢钾 (2.72g, 15.61mmol) 和 $\text{Ir}[\text{df}(\text{CF}_3)\text{ppy}]_2(\text{dtbpy})\text{PF}_6$ (0.117g, 0.104mmol), 并将该混合物用Kessil H150-Blue LED (风扇冷却) 在 N_2 中再照射20小时。将该混合物用饱和 NaHCO_3 (水溶液) 稀释, 并用EtOAc (3x) 萃取。将合并的有机层用水、盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩。将粗物质经硅胶色谱纯化 (EtOAc-庚烷, 0-100%), 得到标题化合物 (352mg, 8%), 为黄色泡沫。LC/MS: $R_t = 0.87\text{min}$; $m/z = 420.2 (\text{M}+1)$ 方法2m_酸性; $^1\text{H NMR}$ (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.46-7.42 (m, 2H), 7.42-7.34 (m, 3H), 6.84 (br s, 1H), 4.93 (d, $J = 4.3\text{Hz}$, 2H), 3.88 (d, $J = 6.7\text{Hz}$, 1H), 3.76 (br s, 1H), 3.66-3.65 (m, 3H), 3.21 (d, $J = 12.0\text{Hz}$, 1H), 3.12-3.03 (m, 1H), 2.86-2.78 (m, 2H), 2.14 (br s, 1H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.51 (t, $J = 12.3\text{Hz}$, 1H), 1.34 (s, 9H)

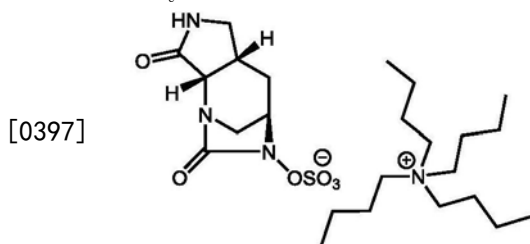


[0394] 步骤2: (4R, 5aS, 8aS) -3-(苄氧基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~草~~-2,8(8aH)-二酮。向 (2S, 3S, 5R) -6-(苄氧基)-3-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯 (352mg, 0.839mmol) 在DCM (4.19mL) 的溶液中逐滴加入TFA (1.61mL, 20.98mmol)。90分钟后, 将其真空浓缩, 溶于DCM并再次浓缩 (3x)。0℃下向溶于DCM (5mL) 的残余物中加入TEA (1.17mL, 8.39mmol), 然后移去冷却浴。室温下20小时后, 将该混合物用饱和 NaHCO_3 (水溶液) 稀释, 并用EtOAc (3x) 萃取。将合并的有机层用水、盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。将粗物质经硅胶色谱纯化 (MeOH-DCM, 0-20%), 得到标题化合物 (158mg, 66%, 2步), 为透明薄膜。LC/MS: $R_t = 0.65\text{min}$; $m/z = 288.0 (\text{M}+1)$ 方法2m_酸性; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.99 (s, 1H), 7.48-7.33 (m, 5H), 4.99-4.88 (m, 2H), 3.81 (d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 3.59 (br s, 1H), 3.32-3.22 (m, 1H), 2.89 (br d, $J = 11.9\text{Hz}$, 1H), 2.75 (d, $J = 9.8\text{Hz}$, 1H), 2.63 (d, $J = 11.9\text{Hz}$, 1H), 2.26-2.17 (m, 1H), 1.38 (ddd, $J = 14.3, 9.2, 1.9\text{Hz}$, 1H)

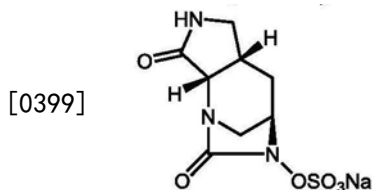


[0396] 步骤3: (4R, 5aS, 8aS) -3-羟基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~草~~-2,8(8aH)-二酮。将 (4R, 5aS, 8aS) -3-(苄氧基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~草~~-2,8(8aH)-二酮 (158mg, 0.550mmol) 和Pd-C (10% Degussa 101型, 50%水, 117mg, 0.055mmol) 在MeOH:DCM (3:1, 3.67mL) 中的浆体抽真空, 并用 H_2 回充。2小时后, 将该混合物

经硅藻土过滤,并真空浓缩(水浴温度<30℃),得到标题化合物(102mg,94%),为灰白色固体。LC/MS: $R_t=0.12\text{min}$; $m/z=198.0$ (M+1) 方法2m_酸性。



[0398] 步骤4: (4R,5aS,8aS) -2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -3(4H)-基硫酸四丁基铵。向粗的(4R,5aS,8aS) -3-羟基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -2,8(8aH)-二酮(102mg,0.517mmol)在吡啶(5.17mL)的溶液中加入 $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ (412mg,2.59mmol)。剧烈搅拌19小时后,将该混合物过滤并真空浓缩(水浴温度<30℃)。将所得物质溶于 NaH_2PO_4 (1M,10mL),然后加入四丁基铵硫酸氢盐(263mg,0.776mmol)。搅拌30分钟后,将其用IPA: CHCl_3 (1:4,3x)萃取。将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥,过滤并真空浓缩(水浴温度<30℃)。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM,0-30%),得到标题化合物(180mg,67%),为白色泡沫。LC/MS: $R_t=0.13\text{min}$; $m/z=278$ (M+1) 方法2m_酸性; ^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.97 (s, 1H), 3.98 (br s, 1H), 3.81 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 3.28 (dd, $J=6.1$, 9.9Hz, 1H), 3.19-3.13 (m, 8H), 2.98 (br d, $J=12.1\text{Hz}$, 1H), 2.78 (d, $J=9.9\text{Hz}$, 1H), 2.65 (d, $J=12.1\text{Hz}$, 1H), 2.49-2.44 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 1H), 1.63-1.51 (m, 8H), 1.40 (br dd, $J=9.3$, 12.7Hz, 1H), 1.31 (sxt, $J=7.4\text{Hz}$, 8H), 0.93 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 12H)



[0400] 步骤5: (4R,5aS,8aS) -2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -3(4H)-基硫酸钠。通过与NaOH (2N)一起搅拌3小时来调节DOWEX 50Wx8氢形式200-400目筛。将树脂装入柱上,并用水洗涤,直到pH为~6。然后将其用1:1水/丙酮洗涤。将(4R,5aS,8aS) -2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -3(4H)-基硫酸四丁基铵(180mg,0.347mmol)溶于1:1丙酮/水,并用1:1丙酮/水洗脱树脂。将样品部分真空浓缩(水浴温度<30℃),并冷冻干燥,得到标题化合物(75mg,68%),为白色固体。LC/MS: $R_t=0.25\text{min}$; $m/z=278.0$ (M+1) 方法T3_3m_极性; ^1H NMR (500MHz, D_2O) δ 4.24-4.18 (m, 2H), 3.51 (dd, $J=10.7$, 6.2Hz, 1H), 3.33 (br d, $J=12.3\text{Hz}$, 1H), 3.10 (d, $J=10.7\text{Hz}$, 1H), 2.95 (d, $J=12.3\text{Hz}$, 1H), 2.81 (p, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 2.54-2.46 (m, 1H), 1.65 (dd, $J=14.7$, 9.2Hz, 1H)。

[0401] 步骤5替代方法: (4R,5aS,8aS) -2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -3(4H)-基硫酸氢盐。40℃下向(4R,5aS,8aS) -2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚

甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~革~~-3(4H)-基硫酸四丁基铵(6.9g, 13.30mmol)在异丁醇(20.8mL)和水(1.35mL)的溶液中经微量注入泵以8mL/h加入2-乙基己酸钠(4.56g, 26.6mmol)在异丁醇(20.8mL)和水(1.35mL)的溶液。将该混合物在40℃搅拌1小时,然后冷却至室温,并搅拌过夜,然后将其经布氏漏斗用Whatman定性滤纸过滤。将滤饼用异丁醇(3x),然后用冰冷却的丙酮(3x)洗涤。在滤饼上用N₂流将漏斗抽真空3小时,然后冷冻干燥3天,其得到标题化合物(3.05g, 73%),为结晶状白色固体。LC/MS:R_t=0.25min;m/z=278.0 (M+1) 方法T3_3m_极性。

[0402] ¹H NMR (500MHz, D₂O) δ=4.20-4.12 (m, 2H), 3.48 (dd, J=6.2, 10.7Hz, 1H), 3.33-3.25 (m, 1H), 3.05 (d, J=10.7Hz, 1H), 2.90 (d, J=12.2Hz, 1H), 2.82-2.71 (m, 1H), 2.46 (tdd, J=2.8, 8.7, 14.7Hz, 1H), 1.66-1.56 (m, 1H)

[0403] 该钠盐的X-射线粉末衍射图谱如图1所示。

[0404] 仪器:X-射线衍射仪(Bruker, 模式D8)

[0405] 源-Cu kα

[0406] 步宽0.02°

[0407] 电压40kV

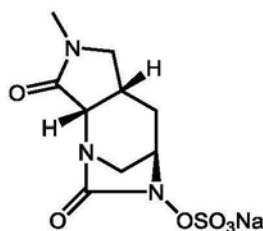
[0408] 电流40mA

[0409] 每步进时间120秒

[0410] 扫描范围3-39°

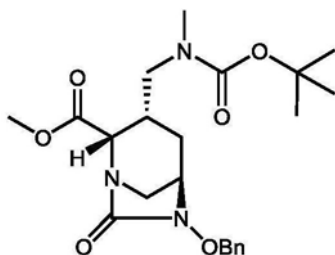
峰	20
1	8.31 ± 0.2)
2	11.66 ± 0.2)
3	14.45 ± 0.2)
4	16.63 ± 0.2)
5	17.64 (± 0.2)
6	18.12 ± 0.2)
7	18.64 ± 0.2)
8	19.51 ± 0.2)
9	21.68 ± 0.2)
10	23.54 ± 0.2)
[0411] 11	24.32 ± 0.2)
12	25.06 (± 0.2)
13	27.37 ± 0.2)
14	27.86 ± 0.2)
15	28.72 ± 0.2)
16	31.33 ± 0.2)
17	32.60 ± 0.2)
18	33.58 ± 0.2)
19	34.43 ± 0.2)
20	35.40 ± 0.2)
21	38.17 (± 0.2)

[0412]



[0413] 实施例2. (4R,5aS,8aS) -7-甲基-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~革~~-3(4H)-基硫酸钠

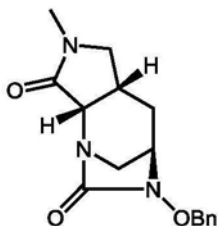
[0414]



[0415] 步骤1: (2S,3S,5R) -6-(苄氧基)-3-(((叔丁氧基羰基)(甲基)氨基)甲基)-7-氧

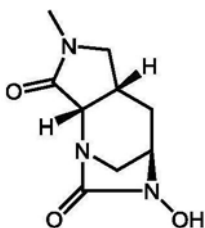
代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯。将搅拌的中间体C (3g, 10.41mmol)、2-((叔丁氧基羰基)(甲基)氨基)乙酸(2.56g, 13.53mmol)、Ir[df(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆(0.117g, 0.104mmol)和磷酸二氢钾(2.175g, 12.49mmol)在DMF(30mL)中的混合物通过将N₂鼓入该混悬液15分钟进行脱气,然后在N₂管线下放置,并用Kessil H150-蓝LED(风扇冷却)照射48小时。将反应物用饱和NaHCO₃稀释,并用EtOAc(3x)萃取。将合并的有机层用水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗物质经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷,0-100%),得到橙色泡沫(233mg)。将该物质经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷,0-70%),得到标题化合物(140mg, 3%),为黄色固体。LC/MS:R_t=0.92min;m/z=434.1(M+1)方法2m_酸性;¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ7.46-7.42(m, 2H), 7.41-7.33(m, 3H), 4.98-4.91(m, 2H), 3.88-3.81(m, 1H), 3.78(br s, 1H), 3.68(br s, 3H), 3.26-3.03(m, 2H), 2.84(br d, J=11.6Hz, 1H), 2.67(s, 3H), 1.97-1.88(m, 1H), 1.62(br t, J=12.6Hz, 1H), 1.34(br s, 9H)

[0416]



[0417] 步骤2: (2S,3S,5R)-6-(苄氧基)-3-((甲基氨基)甲基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯。向搅拌过的(2S,3S,5R)-6-(苄氧基)-3-(((叔丁氧基羰基)(甲基)氨基)甲基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯(140mg, 0.323mmol)在DCM(1.6mL)的溶液中,在室温下于N₂中逐滴加入TFA(0.622mL, 8.07mmol)。将反应物在室温下搅拌90分钟,然后浓缩,并与DCM(3x)共蒸发。将残余物溶于DCM(2mL),并冷却至0℃。加入TEA(0.450mL, 3.23mmol),移去冷却浴,并将反应物在室温下搅拌90分钟。将反应物用饱和NaHCO₃稀释,并用EtOAc(3x)萃取。将合并的有机层用水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗物质经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM,0-20%),得到标题化合物(86mg, 88%),为透明薄膜。LC/MS:R_t=0.46min;m/z=301.9(M+1)方法2m_酸性;¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ7.50-7.32(m, 5H), 5.03-4.86(m, 2H), 3.86(d, J=7.9Hz, 1H), 3.60(br s, 1H), 3.39-3.34(m, 1H), 2.93-2.83(m, 2H), 2.76(s, 3H), 2.57(d, J=11.9Hz, 1H), 2.49-2.42(m, 1H), 2.32-2.18(m, 1H), 1.38(ddd, J=14.3, 9.0, 1.9Hz, 1H)

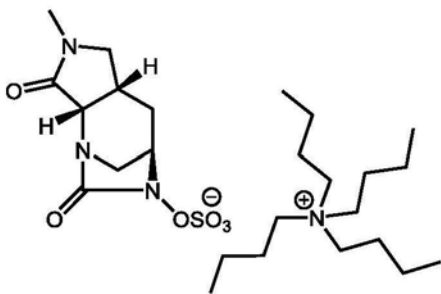
[0418]



[0419] 步骤3: (4R,5aS,8aS)-3-羟基-7-甲基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂革-2,8(8aH)-二酮。将(2S,3S,5R)-6-(苄氧基)-3-((甲基氨基)甲基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯(143mg, 0.475mmol)溶于甲醇(2.4mL),并加入Pd-C(10%, Degussa 101型, 50%水, 101mg, 0.047mmol)。将该混合物真空下抽真空,并用H₂回充。搅拌1小时后,将该混合物经硅藻土过滤,并真空浓缩(水浴温度<30℃),得到标题化合

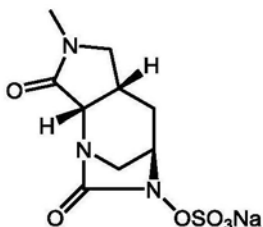
物 (63mg, 63%), 为白色固体。LC/MS: $R_t = 0.11\text{min}$; $m/z = 211.9$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0420]



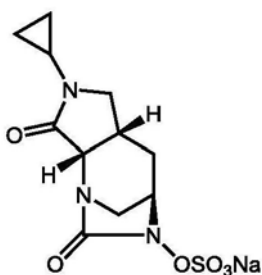
[0421] 步骤4: (4R, 5aS, 8aS) - 7-甲基-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-3(4H)-基硫酸四丁基铵。将 (4R, 5aS, 8aS) - 3-羟基-7-甲基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-2,8(8aH)-二酮 (63mg, 0.298mmol) 溶于吡啶 (2.9mL), 并加入 $\text{SO}_3 \cdot \text{吡啶}$ (237mg, 1.49mmol)。将反应物在室温下搅拌20小时。将反应物经一次性塑料过滤器过滤, 并减压浓缩 (水浴温度 $< 30^\circ\text{C}$)。将该物质溶于 NaH_2PO_4 (1M, 10mL), 并加入四丁基硫酸氢铵 (152mg, 0.447mmol)。室温下搅拌30分钟后, 将其用 EtOAc (4x) 萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。将水相进一步用 20% IPA 在 CHCl_3 中的溶液 (2x) 萃取, 用硫酸钠干燥, 并真空浓缩 (水浴温度 $< 30^\circ\text{C}$)。将合并的有机物经硅胶色谱纯化 (MeOH-DCM, 0-30%), 得到标题化合物 (62mg, 39%), 为透明薄膜状。LC/MS: $R_t = 0.13\text{min}$; $m/z = 291.9$ (M+1) 方法2m_酸性; ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) $\delta = 4.34$ (br s, 1H), 4.04 (br d, $J = 7.3\text{Hz}$, 1H), 3.44 (dd, $J = 10.0, 5.6\text{Hz}$, 1H), 3.34 (br d, $J = 2.6\text{Hz}$, 1H), 3.28 (br dd, $J = 10.3\text{Hz}, 5.1\text{Hz}$, 8H), 2.97-2.91 (m, 4H), 2.80 (d, $J = 12.0\text{Hz}$, 1H), 2.75-2.61 (m, 2H), 1.74-1.60 (m, 9H), 1.44 (sxt, $J = 7.4\text{Hz}$, 8H), 1.00 (t, $J = 7.3\text{Hz}$, 12H)。

[0422]



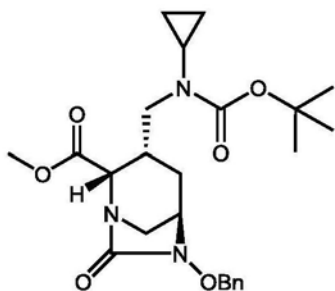
[0423] 步骤5: (4R, 5aS, 8aS) - 7-甲基-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-3(4H)-基硫酸钠。通过用 NaOH (2N) 搅拌3小时来调节 DOWEX 50Wx8 氢形式 200-400 目筛。将树脂装入玻璃柱上, 并用水洗涤, 直到 pH 为 ~ 6 。随后用水: 丙酮 (1:1) 洗涤。将 (4R, 5aS, 8aS) - 7-甲基-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-3(4H)-基硫酸四丁基铵 (62mg, 0.12mmol) 溶于 1:1 丙酮: 水, 并用丙酮: 水 (1:1) 通过该柱。将样品部分真空浓缩 (水浴温度 $< 30^\circ\text{C}$), 然后冷冻干燥, 得到标题化合物 (32mg, 83%), 为白色粉末。LC/MS: $R_t = 0.48\text{min}$; $m/z = 291.8$ (M+1) 方法T3_3m_极性; ^1H NMR (500MHz, D_2O) $\delta = 4.20$ -4.15 (m, 2H), 3.60 (dd, $J = 10.6, 6.4\text{Hz}$, 1H), 3.30 (dddd, $J = 12.3, 4.0, 2.7, 1.3\text{Hz}$, 1H), 3.13 (d, $J = 10.4\text{Hz}$, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.86 (d, $J = 12.1\text{Hz}$, 1H), 2.77-2.69 (m, 1H), 2.49 (tdd, $J = 14.8, 8.8, 3.0\text{Hz}$, 1H), 1.59 (ddd, $J = 14.8, 8.9, 2.0\text{Hz}$, 1H)。

[0424]



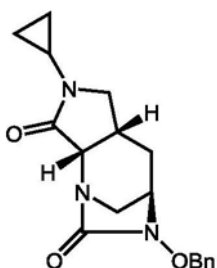
[0425] 实施例3. (4R,5aS,8aS)-7-环丙基-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-3(4H)-基硫酸钠

[0426]



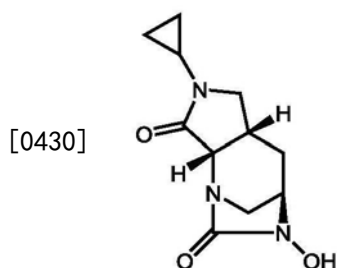
[0427] 步骤1: (2S,3S,5R)-6-(苄氧基)-3-(((叔丁氧基羰基)(环丙基)氨基)甲基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯。将搅拌的中间体C (4g, 13.87mmol)、2-(((叔丁氧基羰基)(环丙基)氨基)乙酸 (3.88g, 18.04mmol)、Ir[df(CF₃)ppy₂(dtbpy)]PF₆ (0.156g, 0.139mmol) 和磷酸二氢钾 (2.90g, 16.65mmol) 在DMF (40mL) 中的混合物经N₂喷射脱气15分钟。将该混合物在N₂中用Kessil H150-蓝LED(风扇冷却)照射42小时,然后将其用饱和NaHCO₃稀释,过滤,并用EtOAc (3x) 萃取。将合并的有机层用水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷, 0-100%)。将该物质经硅胶色谱再纯化2次(EtOAc-庚烷, 0-100%, 然后EtOAc-庚烷, 0-70%), 得到标题化合物 (190mg, 3%产率), 为透明薄膜状。LC/MS: R_t=0.99min; m/z=460.2 (M+1) 方法2m_酸性; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ=7.45-7.34 (m, 5H), 5.05 (d, J=11.5Hz, 1H), 4.89 (d, J=11.5Hz, 1H), 4.09 (d, J=6.5Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.37-3.25 (m, 2H), 3.17-3.07 (m, 1H), 2.92-2.83 (m, 1H), 2.64-2.52 (m, 1H), 2.44-2.35 (m, 1H), 2.09-1.98 (m, 1H), 1.68 (t, J=12.7Hz, 1H), 1.58-1.52 (m, 1H), 1.44-1.39 (m, 9H), 0.80-0.66 (m, 2H), 0.59-0.46 (m, 2H)

[0428]

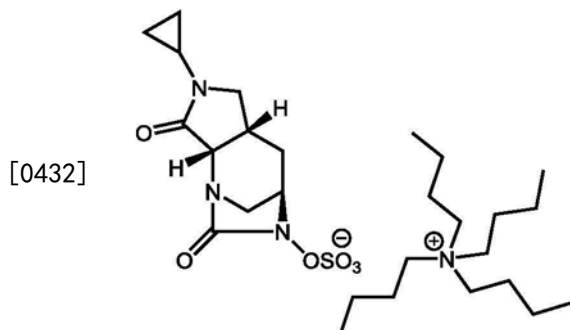


[0429] 步骤2: (4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-7-环丙基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-2,8(8aH)-二酮。室温下在N₂中向搅拌过的(2S,3S,5R)-6-(苄氧基)-3-(((叔丁氧基羰基)(环丙基)氨基)甲基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯 (190mg, 0.413mmol) 溶于DCM (4.1mL) 的溶液中逐滴加入TFA (0.796mL, 10.34mmol)。将该溶液在室温下搅拌90分钟,并随后真空浓缩,用DCM稀释,并再次浓缩 (3x)。将残余物溶于

DCM (2mL), 并冷却至0℃。加入TEA (0.576mL, 4.13mmol), 并将其在室温下搅拌18小时。将该溶液减压浓缩, 并将粗物质经硅胶色谱纯化 (MeOH-DCM, 0-20%), 得到标题化合物 (103mg, 76%), 为透明薄膜状。LC/MS: $R_t=0.69\text{min}$; $m/z=328.0$ (M+1) 方法2m_酸性; ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) $\delta=7.46-7.42$ (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 3H), 4.97-4.89 (m, 2H), 3.87 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 3.59 (br s, 1H), 3.31-3.27 (m, 1H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.76 (d, $J=9.8\text{Hz}$, 1H), 2.66 (tt, $J=7.5, 4.1\text{Hz}$, 1H), 2.56 (d, $J=11.9\text{Hz}$, 1H), 2.42 (dd, $J=8.5, 6.1\text{Hz}$, 1H), 2.19 (ddt, $J=14.3, 8.5, 3.0\text{Hz}$, 1H), 1.31 (ddd, $J=14.3, 9.2, 1.9\text{Hz}$, 1H), 0.78-0.68 (m, 2H), 0.66-0.55 (m, 2H)。

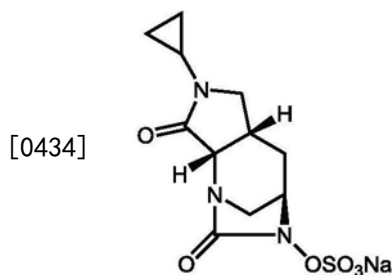


[0431] 步骤3: (4R,5aS,8aS)-7-环丙基-3-羟基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -2,8(8aH)-二酮。将(4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-7-环丙基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -2,8(8aH)-二酮 (103mg, 0.315mmol) 溶于MeOH (3.2mL), 并加入Pd-C (10% Degussa 101型, 50%水, 67.0mg, 0.031mmol)。将该混合物在真空中脱气, 并用 H_2 回充。搅拌40分钟后, 将其经硅藻土过滤, 并真空浓缩 (水浴温度 $<30^\circ\text{C}$), 得到标题化合物 (75mg, 100%), 为白色固体。LC/MS: $R_t=0.54\text{min}$; $m/z=238.0$ (M+1) 方法2m_酸性。

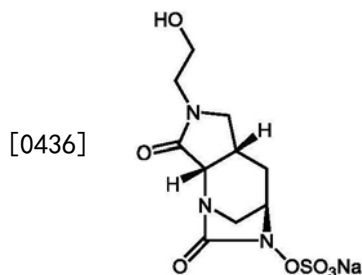


[0433] 步骤4: (4R,5aS,8aS)-7-环丙基-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -3(4H)-基硫酸四丁基铵。向(4R,5aS,8aS)-7-环丙基-3-羟基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -2,8(8aH)-二酮 (75mg, 0.316mmol) 在吡啶 (3.16mL) 的溶液中加入 $\text{SO}_3 \cdot \text{吡啶}$ (151mg, 0.948mmol)。搅拌20小时后, 将该浆体过滤并真空浓缩 (水浴温度 $<30^\circ\text{C}$)。将粗的残余物溶于饱和 NaH_2PO_4 (10mL), 并用EtOAc洗涤。向水层中加入四丁基铵硫酸氢盐 (161mg, 0.474mmol)。搅拌45min后, 将其用DCM萃取 (4x), 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩 (水浴温度 $<30^\circ\text{C}$)。将粗的残余物经硅胶色谱纯化 (丙酮-DCM, 0-100%) 得到121mg透明薄膜。LC/MS: $R_t=0.14\text{min}$; $m/z=318.0$ (M+1) 方法2m_酸性; ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) $\delta=3.93$ (br s, 1H), 3.87 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 3.34-3.29 (m, 1H), 3.19-3.13 (m, 8H), 2.99-2.94 (m, 1H), 2.78 (d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H), 2.68 (tt, $J=7.4, 4.2\text{Hz}$, 1H), 2.57 (d, $J=11.9\text{Hz}$, 1H),

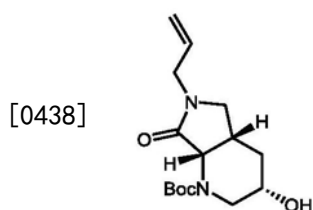
2.46-2.36 (m, 1H), 2.26-2.17 (m, 1H), 1.61-1.52 (m, 8H), 1.35-1.26 (m, 9H), 0.93 (t, J=7.3Hz, 12H), 0.78-0.69 (m, 2H), 0.66-0.57 (m, 2H)。



[0435] 步骤5: (4R,5aS,8aS)-7-环丙基-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -3(4H)-基硫酸钠。通过用NaOH(2N)搅拌3小时来调节DOWEX 50Wx8氢形式200-400目筛。将树脂装在于玻璃柱上,用水洗涤(直到pH $\approx$ 6),然后用水:丙酮(1:1)洗涤。将(4R,5aS,8aS)-7-环丙基-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -3(4H)-基硫酸四丁基铵(121mg,0.217mmol)在水:丙酮(1:1)中的溶液装入,并通过该柱,用水:丙酮(1:1)洗脱。将该样品真空浓缩(水浴温度 $<30^{\circ}\text{C}$),并冷冻干燥,得到标题化合物(51mg,66%产率),为白色粉末。LC/MS: $R_t=0.36\text{min}$; $m/z=318.0$ (M+1) 方法2m_酸性; ^1H NMR(500MHz, D_2O) δ 4.20-4.14 (m, 2H), 3.55 (dd, J=10.6, 6.1, Hz, 1H), 3.32-3.26 (m, 1H), 3.09 (d, J=10.6Hz, 1H), 2.83 (d, J=12.3Hz, 1H), 2.73-2.65 (m, 2H), 2.50-2.42 (m, 1H), 1.51 (dd, J=14.6, 9.1Hz, 1H), 0.90-0.74 (m, 3H), 0.71-0.63 (m, 1H)。



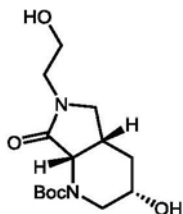
[0437] 实施例4. (4R,5aS,8aS)-7-(2-羟基乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 革 -3(4H)-基硫酸钠



[0439] 步骤1: (3S,4aS,7aS)-6-烯丙基-3-羟基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯。0 $^{\circ}\text{C}$ 下向(3S,4aS,7aS)-3-羟基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯(1.50g,5.62mmol)在DMF(56mL)的溶液中加入叔丁醇钾(1M THF溶液,5.6ml,5.6mmol)。5分钟后,移去冷却浴,将其在室温下搅拌30分钟,然后冷却至0 $^{\circ}\text{C}$,然后逐滴加入烯丙基溴(490 μL ,5.66mmol)。5分钟后移去冷却浴,并在室温下再放置2小时,将其真空浓缩,并经硅胶色谱直接纯化(乙酸乙酯-庚烷,0-100%),得到标题化合物(1.688g,81%),为白色固体。LC/MS: $R_t=0.70\text{min}$; $m/z=297.1$ (M+1) 方法2m_酸性; ^1H NMR(500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ

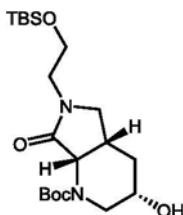
=5.72 (ddt, $J=16.4, 11.1, 5.9\text{Hz}$, 1H), 5.23-5.15 (m, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.77 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 0.5H), 4.62 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 0.5H), 3.97-3.85 (m, 1.5H), 3.85-3.75 (m, 1H), 3.71 (dd, $J=15.3, 6.3\text{Hz}$, 0.5H), 3.49-3.42 (m, 1H), 2.83-2.77 (m, 1H), 2.50-2.40 (m, 1H), 2.14 (t, $J=11.6\text{Hz}$, 0.5H), 2.03-1.91 (m, 1.5H), 1.42 (s, 4.5H), 1.38 (s, 4.5H), 0.96 (p, $J=12.1\text{Hz}$, 1H)。*报告为旋转异构体的混合物。

[0440]



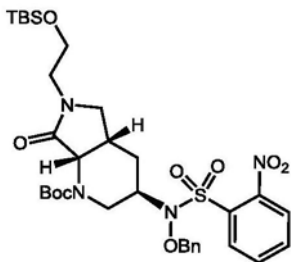
[0441] 步骤2: (3S, 4aS, 7aS)-3-羟基-6-(2-羟基乙基)-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯。-78℃下将(3S, 4aS, 7aS)-6-烯丙基-3-羟基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯(2.72g, 9.18mmol)在DCM(92ml)中的溶液用 O_3 喷洒30分钟。然后在-78℃下通过鼓入 O_2 再冲扫20分钟。向该澄清溶液中加入二甲基硫醚(6.74ml, 92mmol), 并将其加温至室温, 搅拌30分钟。将其冷却至0℃, 并加入MeOH(18mL), 然后加入硼氢化钠(694mg, 18.4mmol), 随后缓慢加温至室温。室温下14小时后, 将其冷却至0℃, 并加入饱和 NH_4Cl (水溶液, 10mL)。室温下20分钟后, 将其真空浓缩, 并随后加入MeOH, 并再次浓缩。将残余物溶于MeOH, 过滤并再次浓缩。加入甲苯, 并将该浆体超声处理, 然后再次浓缩。LCMS: $R_t=0.40\text{min}$; $m/z=301.4$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0442]



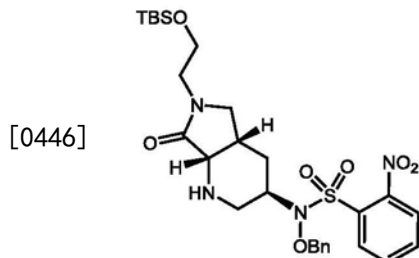
[0443] 步骤3: (3S, 4aS, 7aS)-6-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-3-羟基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁基。将(3S, 4aS, 7aS)-3-羟基-6-(2-羟基乙基)-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯(9.18mmol)在吡啶(18ml)中的溶液加入TBS-Cl(1.384g, 9.18mmol)中。室温下搅拌24小时后, 将其真空浓缩, 并溶于EtOAc, 用水洗涤。将水层用EtOAc(2x)萃取, 并将合并的有机层用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化, 得到标题化合物(2.433g, 64% 3步), 为白色固体。LCMS: $R_t=0.89\text{min}$; $m/z=415.4$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0444]

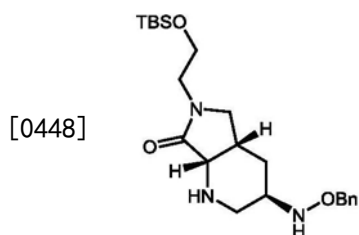


[0445] 步骤4: (3R, 4aS, 7aS)-3-((N-(苄氧基)-2-硝基苯基)磺酰氨基)-6-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯。向(3S,

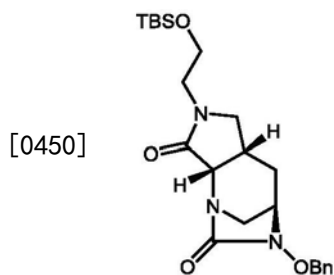
4aS,7aS)-6-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-3-羟基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯(2.411g,5.82mmol)、N-(苄氧基)-2-硝基苯磺酰胺(2.160g,7.01mmol)和三苯基膦(1.830g,6.98mmol)在THF(65mL)的溶液中于-17℃下逐滴加入DIAD(1.40mL,6.98mmol)在THF(10mL)中的溶液。将其缓慢加温至室温,并搅拌18小时,然后真空浓缩,并经硅胶色谱直接纯化,得到标题化合物(1.785g,44%产率),为白色固体。LCMS: $R_t=1.15\text{min}$; $m/z=705.4$ (M+1) 方法2m_酸性。



[0447] 步骤4:N-(苄氧基)-N-((3R,4aS,7aS)-6-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-3-基)-2-硝基苯磺酰胺。向在200℃干燥3小时的装有溴化锌(II)(1.21g,5.37mmol)的烧瓶中加入(3R,4aS,7aS)-3-((N-(苄氧基)-2-硝基苯基)磺酰氨基)-6-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯(1.79g,2.53mmol)在DCM(8.5mL)中的溶液。室温下搅拌18小时后,将其用DCM稀释,并用饱和 NaHCO_3 猝灭。停止冒气泡后,分离各层,将水层用DCM萃取(3x)。将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥,过滤并真空浓缩,得到白色泡沫。LCMS: $R_t=0.94\text{min}$; $m/z=605.3$ (M+1) 方法2m_酸性。

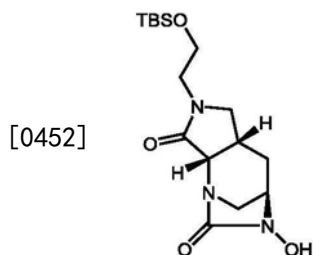


[0449] 步骤5:(3R,4aS,7aS)-3-((苄氧基)氨基)-6-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)八氢-7H-吡咯并[3,4-b]吡啶-7-酮。向N-(苄氧基)-N-((3R,4aS,7aS)-6-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-3-基)-2-硝基苯磺酰胺(1.53g,2.53mmol)和 K_2CO_3 (1.753g,12.68mmol)在ACN(25mL)的浆体中加入苯硫酚(1.343mL,12.65mmol)。22小时后,将其过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化,得到标题化合物(919mg,87%,2步),为灰白色泡沫。LCMS: $R_t=0.82\text{min}$; $m/z=420.4$ (M+1) 方法2m_酸性。

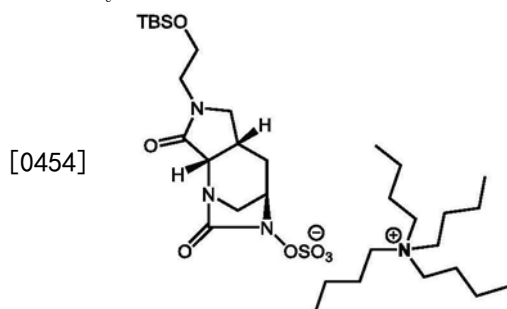


[0451] 步骤6:(4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-六

氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-2,8(3H)-二酮。0℃下向(3R,4aS,7aS)-3-((苄氧基)氨基)-6-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)八氢-7H-吡咯并[3,4-b]吡啶-7-酮(919mg,2.19mmol)和DIPEA(1.2mL,6.87mmol)在乙腈(68.4mL)的溶液中以8mL/h的速率加入光气(15-20%在甲苯中的溶液,1.60mL,2.24mmol)在乙腈(10mL)中的溶液。将其缓慢升温至室温。20小时后,将其真空浓缩,在EtOAc/HCl(水溶液,0.2M)之间分配,并分离各相。将水层用EtOAc萃取(2x),并将合并的有机层用盐水、饱和NaHCO₃洗涤,用Na₂SO₄/MgSO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化,得到标题化合物(549mg,56%),为白色泡沫。LCMS: $R_t=0.95\text{min}$; $m/z=446.4$ (M+1) 方法2m_酸性。

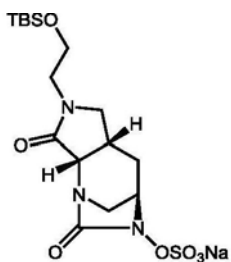


[0453] 步骤7: (4R,5aS,8aS)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-3-羟基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-2,8(3H)-二酮。将(4R,5aS,8aS)-3-((苄氧基)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-2,8(3H)-二酮(110mg,0.247mmol)和Pd-C(10%Degussa 101型,50%水,25mg,0.012mmol)在MeOH(2.5mL)中的浆体脱气,并用H₂回充(3x)。将该浆体剧烈搅拌3小时后用N₂冲扫,经硅藻土过滤,并真空浓缩。加入甲苯,将其超声处理,然后再次浓缩。假设定量产率。LCMS: $R_t=0.71\text{min}$; $m/z=356.4$ (M+1) 方法2m_酸性。



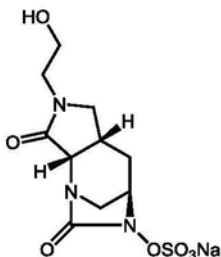
[0455] 步骤8: (4R,5aS,8aS)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸四丁基铵。向(4R,5aS,8aS)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-3-羟基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-2,8(3H)-二酮(0.247mmol)在吡啶(1.6mL)的溶液中加入SO₃·Py(197mg,1.24mmol)。室温下搅拌17小时后,将该混合物真空浓缩,并在DCM中浆化,然后过滤,并真空下重新浓缩。将所得固体溶于NaH₂PO₄(1M aq,20mL),然后加入四丁基铵硫酸氢盐(131mg,0.386mmol)。搅拌45分钟后,将其用DCM萃取(4x),并将合并的有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM,0-20%),得到标题化合物(56mg,34%,3步),为灰白色泡沫。LCMS: $R_t=0.81\text{min}$; $m/z=436.3$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0456]



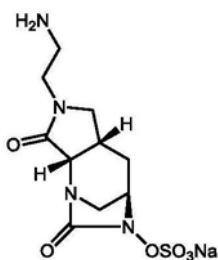
[0457] 步骤9: (4R,5aS,8aS)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸钠。通过与NaOH(2N)一起搅拌3小时来调节DOWEX 50Wx8氢形式200-400目筛。将树脂装入玻璃柱上,并用水洗涤(直到pH≈6)。然后将其用水/丙酮(1:1)洗涤。将(4R,5aS,8aS)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸四丁基铵盐(56mg,0.083mmol)在水:丙酮(1:1)中的溶液装入,并通过该柱,用水:丙酮(1:1)洗脱。将该样品真空浓缩(水浴温度<30℃),并冷冻干燥,得到标题化合物(36mg,95%产率),为白色粉末。LCMS: $R_t=0.84\text{min}$; $m/z=436.3$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0458]

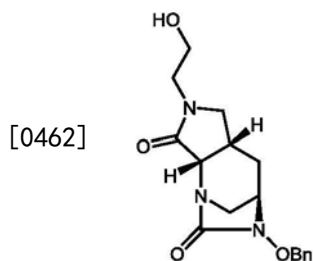


[0459] 步骤10: (4R,5aS,8aS)-7-(2-羟基乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸钠。向(4R,5aS,8aS)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸钠(36mg,0.079mmol)在乙腈(790μL)的浆体中逐滴加入三乙胺三氢氟酸盐(13.07μL,0.079mmol),并将所得溶液加热至45℃持续3小时。加入另外的三乙胺三氢氟酸盐(13.07μL,0.079mmol),并将其加热至45℃持续2小时,然后真空浓缩。将粗的残余物溶于磷酸盐缓冲液(pH=6)中,并经反相制备型HPLC纯化(T3,Atlantis柱,30x 100mm,5μm,C18柱;ACN-水,含有3.75mmol NH₄OAC缓冲液,20-60mL/min),得到标题化合物(13.9mg),为白色粉末。LCMS: $R_t=0.34\text{min}$; $m/z=322.2$ (M+1) 方法T3_3m_极性。¹H NMR(500MHz,D₂O) δ4.8(d,J=8.0Hz,1H),4.14(s,1H),3.69(t,J=5.4Hz,2H),3.61(dd,J=10.7,6.3Hz,1H),3.49-3.37(m,2H),3.29-3.22(m,1H),3.17-3.14(m,1H),2.84(d,J=12.2Hz,1H),2.75-2.67(m,1H),2.45(ddt,J=14.7,8.7,3.0Hz,1H),1.54(ddd,J=14.8,9.0,2.0Hz,1H)。

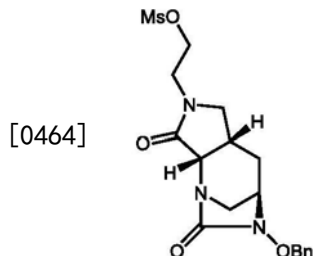
[0460]



[0461] 实施例5. (4R,5aS,8aS)-7-(2-氨基乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸氢盐

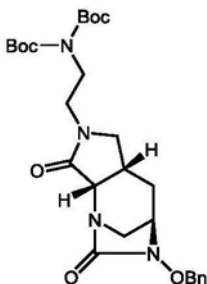


[0463] 步骤1: (4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-7-(2-羟基乙基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-2,8(3H)-二酮。0℃下向(4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-7-(2-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)乙基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-2,8(3H)-二酮(530mg,1.19mmol)在THF(12mL)的溶液中加入TBAF(1.2mL,1.20mmol)。1小时后,在0℃下将其真空浓缩,在EtOAc/水之间分配,并分离各相。将水层用EtOAc(2x)萃取,并将合并的有机层用盐水洗涤,用Na₂SO₄/MgSO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM,0-7%),得到标题化合物(268mg,68%),为白色固体。LCMS:R_t=0.55min;m/z=332.3(M+1)方法2m_酸性。¹H NMR(500MHz,CDCl₃-d) δ7.48-7.36(m,5H),5.09(d,J=11.3Hz,1H),4.93(d,J=11.2Hz,1H),4.18(d,J=7.8Hz,1H),3.87-3.75(m,2H),3.66-3.54(m,2H),3.42-3.35(m,1H),3.30(s,1H),3.10(d,J=12.2Hz,1H),3.03(d,J=10.1Hz,1H),2.81-2.72(m,2H),2.48-2.39(m,2H),1.38(dd,J=14.2,9.2Hz,1H)。



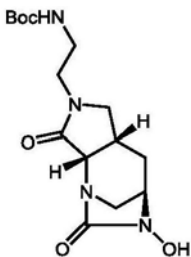
[0465] 步骤2:2-((4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-2,8-二氧代八氢-7H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-7-基)乙基甲磺酸酯。向(4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-7-(2-羟基乙基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-2,8(3H)-二酮(265.4mg,0.801mmol)和TEA(140μl,1.00mmol)在DCM(4.0mL)的溶液中加入MsCl(65.5μl,0.841mmol)。45分钟后,将其用水洗涤。将水层用DCM萃取(2x),并将合并的有机层用Na₂SO₄/MgSO₄干燥,过滤并真空浓缩,得到标题化合物(332mg),为白色固体。LCMS:R_t=0.55min;m/z=410.3(M+1)方法2m_酸性。

[0466]



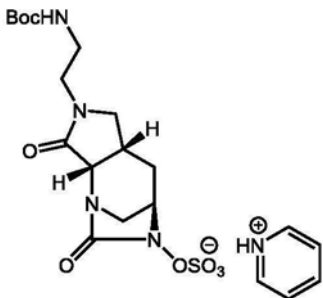
[0467] 步骤3: (2-((4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-2,8-二氧代八氢-7H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-7-基)乙基)亚氨基二甲酸二叔丁酯。向亚氨基二甲酸二叔丁基酯(153mg, 0.704mmol)在DMF(3.2mL)的溶液中加入叔丁醇钾(1M在THF中的溶液, 700μL, 0.700mmol)。室温下30分钟后, 加入2-((4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-2,8-二氧代八氢-7H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-7-基)乙基甲磺酸酯(262mg, 0.640mmol)在DMF(2mL, 2x500μL洗涤)中的溶液。将其在室温下搅拌10分钟, 加热至50℃持续100分钟, 然后在室温下搅拌12小时, 然后将其用EtOAc稀释, 并用盐水(半饱和)洗涤。将水层用EtOAc(2x)萃取, 将合并的有机层用Na₂SO₄/MgSO₄干燥, 过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷, 0-90%), 得到标题化合物(293mg, 86%), 为白色固体。LCMS: R_t=0.87min; m/z=431.4 (M-Boc+1) 方法2m_酸性。

[0468]



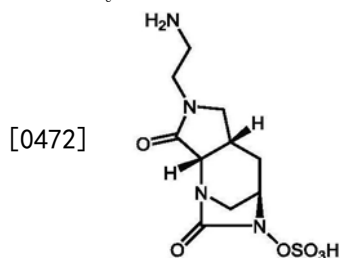
[0469] 步骤4: (2-((4R,5aS,8aS)-3-羟基-2,8-二氧代八氢-7H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-7-基)乙基)氨基甲酸叔丁酯。将(2-((4R,5aS,8aS)-3-(苄氧基)-2,8-二氧代八氢-7H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-7-基)乙基)亚氨基二甲酸二叔丁酯(226.8mg, 0.427mmol)和Pd-C(10% Degussa 101型, 50%水, 45.3mg, 0.021mmol)在MeOH(4.2mL)中的浆体脱气, 并用H₂(3x)回充。剧烈搅拌3小时后, 将该浆体用N₂冲扫, 经硅藻土过滤, 并真空浓缩。加入甲苯, 将其超声处理, 然后再次浓缩。假设定量产率。LCMS: R_t=0.65min; m/z=341.4 (M+1) 方法2m_酸性。

[0470]

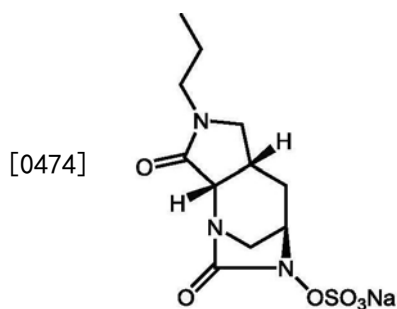


[0471] 步骤5: (4R,5aS,8aS)-7-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-

1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸吡啶-1-鎓盐。向(2-((4R,5aS,8aS)-3-羟基-2,8-二氧代八氢-7H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-7-基)乙基)氨基甲酸叔丁酯在吡啶(3mL)的溶液中加入SO₃·吡啶(335mg,2.10mmol)。室温下15小时后,将其真空浓缩,在DCM中浆化并过滤,得到标题化合物,为灰白色固体。假设定量产率。LCMS:R_t=0.59min;m/z=321.4 (M-Boc+1) 方法2m_酸性。

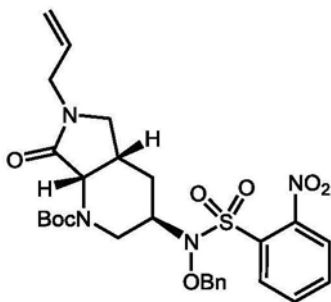


[0473] 步骤6: (4R,5aS,8aS)-7-(2-氨基乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸氢盐。0℃下向(4R,5aS,8aS)-7-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸吡啶-1-鎓盐(210mg,0.421mmol)在DCM(4.2mL)的浆体中加入TFA(973μl,12.63mmol)。0℃下2.5小时后,将其真空浓缩,在DCM中浆化,并再次浓缩。将粗的残余物溶于硫酸盐缓冲液(pH=6)中,过滤并经反相制备型HPLC纯化(T3,Atlantis柱,30x 100mm,5μm,C18柱;水,含有3.75mmol NH₄OAC缓冲液,20-60mL/min),得到标题化合物(155mg),为白色粉末。LCMS:R_t=0.22min;m/z=321.4 (M+1) 方法T3_3m_极性。¹H NMR(500MHz,D₂O) δ4.00(d,J=8.1Hz,1H),3.94(s,1H),3.61(dt,J=14.3,6.9Hz,1H),3.45(dd,J=10.5,6.4Hz,1H),3.28(dt,J=14.8,5.6Hz,1H),3.06(br d,J=12.4Hz,1H),2.96(t,J=6.2Hz,2H),2.92(d,J=10.5Hz,1H),2.68(d,J=12.3Hz,1H),2.55(p,J=8.3Hz,1H),2.31-2.21(m,1H),1.38(dd,J=14.9,9.1Hz,1H)。



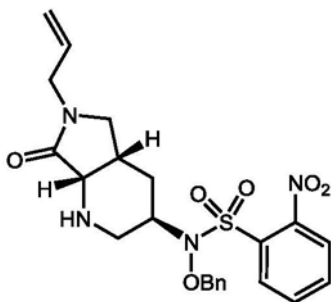
[0475] 实施例6. (4R,5aS,8aS)-2,8-二氧代-7-丙基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂^革-3(4H)-基硫酸钠

[0476]



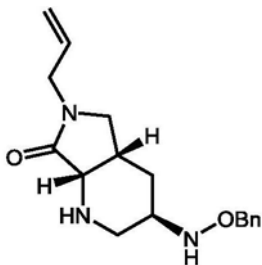
[0477] 步骤1: (3R,4aS,7aS)-6-烯丙基-3-((N-(苄氧基)-2-硝基苯基)磺酰胺基)-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯。在下午6:30向(3S,4aS,7aS)-6-烯丙基-3-羟基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯(786.4mg,2.65mmol)、N-(苄氧基)-2-硝基苯磺酰胺(900mg,2.92mmol)和三苯基膦(835mg,3.18mmol)在THF(29mL)的溶液中于-17℃下逐滴加入DIAD(0.640mL,3.18mmol)在THF(4.1mL)中的溶液。将其缓慢加温至室温,并搅拌22小时,然后真空浓缩,并经硅胶色谱直接纯化(EtOAc-庚烷,0-40%),得到标题化合物(846mg,54%),为灰白色固体。LCMS: $R_t=0.95\text{min}$; $m/z=587.3$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0478]



[0479] 步骤2:N-((3R,4aS,7aS)-6-烯丙基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-3-基)-N-(苄氧基)-2-硝基苯磺酰胺。向装有溴化锌(II)(681mg,3.02mmol,在200℃干燥4小时)和(3R,4aS,7aS)-6-烯丙基-3-((N-(苄氧基)-2-硝基苯基)磺酰胺基)-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-1-甲酸叔丁酯(845mg,1.44mmol)的烧瓶中在 N_2 下加入DCM(4.8mL)。室温下搅拌15小时后,将其用DCM稀释,并用饱和 $NaHCO_3$ 猝灭。停止冒气泡后,分离各层,并将水层用DCM萃取(3x)。将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥,并真空浓缩,得到白色泡沫。假设定量产率。LCMS: $R_t=0.70\text{min}$; $m/z=487.2$ (M+1) 方法2m_酸性。

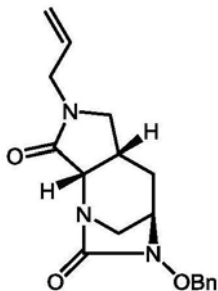
[0480]



[0481] 步骤3: (3R,4aS,7aS)-6-烯丙基-3-((苄氧基)氨基)八氢-7H-吡咯并[3,4-b]吡啶-7-酮。向N-((3R,4aS,7aS)-6-烯丙基-7-氧代八氢-1H-吡咯并[3,4-b]吡啶-3-基)-N-(苄氧基)-2-硝基苯磺酰胺(1.44mmol)和 K_2CO_3 (995mg,7.20mmol)在ACN(14.4mL)的浆体中加入苯硫酚(764μL,7.20mmol)。21小时后,将其过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM,0-8%),得到标题化合物(385mg,89%,2步),为灰白色泡沫。LCMS: $R_t=$

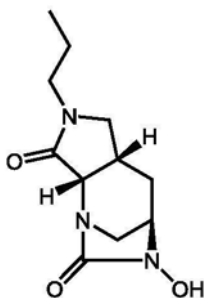
0.49min; $m/z=302.4$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0482]



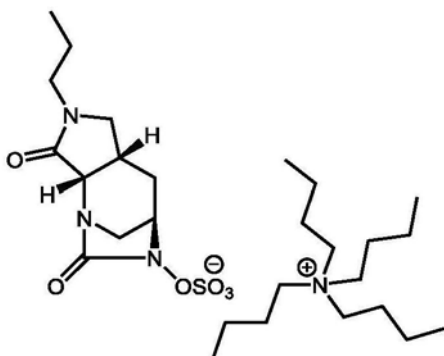
[0483] 步骤4: (4R,5aS,8aS)-7-烯丙基-3-(苄氧基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-2,8(3H)-二酮。0℃下向(3R,4aS,7aS)-6-烯丙基-3-((苄氧基)氨基)八氢-7H-吡咯并[3,4-b]吡啶-7-酮(385mg, 1.28mmol)和DIPEA(670μL, 3.83mmol)在ACN(40mL)的溶液中以6.5mL/h的速率加入光气(1.20mL, 1.66mmol)在ACN(5.7mL)中的溶液。将其缓慢升温至室温。20小时后,将其真空浓缩,在EtOAc/HCl(0.2N)之间分配,并分离各相。将水层用EtOAc萃取(3x),并将合并的有机层用盐水和饱和NaHCO₃洗涤。将盐水洗涤液与饱和NaHCO₃洗涤液合并,并将该溶液用10%MeOH/DCM萃取(2x)。将酸性水层用10%MeOH/DCM(2x)再次萃取,并将合并的有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM, 0-10%),得到标题化合物(369.2mg, 88%),为白色泡沫。LCMS: $R_t=0.60$ min; $m/z=328.4$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0484]



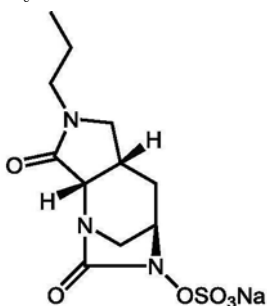
[0485] 步骤5: (4R,5aS,8aS)-3-羟基-7-丙基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-2,8(3H)-二酮。将(4R,5aS,8aS)-7-烯丙基-3-(苄氧基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂_革-2,8(3H)-二酮(209mg, 0.638mmol)和Pd-C(10%Degussa 101型, 50%水, 41mg, 0.019mmol)在MeOH(6.4mL)中的浆体脱气,并用H₂(3x)回充。剧烈搅拌5小时后,将该浆体用N₂冲扫,加入更多Pd-C(10%Degussa 101型, 50%水, 41mg, 0.019mmol),并将其脱气,用H₂(3x)回充。剧烈搅拌2小时后,将其用N₂冲扫,然后经硅藻土过滤,并真空浓缩。加入甲苯,并将其超声处理,然后再次浓缩。假设定量产率。LCMS: $R_t=0.27$ min; $m/z=240.3$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0486]



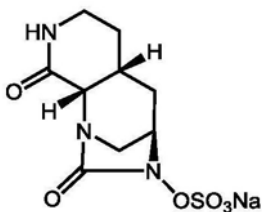
[0487] 步骤6: (4R,5aS,8aS)-2,8-二氧代-7-丙基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -3(4H)-基硫酸四丁基铵。向(4R,5aS,8aS)-3-羟基-7-丙基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -2,8(3H)-二酮(0.638mmol)在吡啶(6.4mL)的溶液中加入 $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ (508mg, 3.19mmol)。室温下搅拌13小时后,将该混合物过滤并真空浓缩。将所得固体溶于 NaH_2PO_4 (1M水溶液, 40mL), 然后加入四丁基铵硫酸氢盐(325mg, 0.957mmol)。搅拌1.5小时后, 将其用DCM(4x)萃取, 并将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM, 0-15%), 得到标题化合物(229mg, 64%, 3步), 为白色固体。LCMS: $R_t=0.81\text{min}$; $m/z=436.3$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0488]

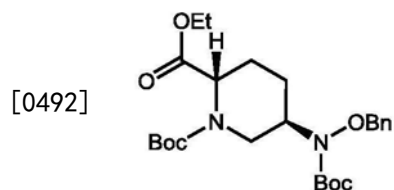


[0489] 步骤7: (4R,5aS,8aS)-2,8-二氧代-7-丙基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -3(4H)-基硫酸钠。通过用NaOH(2N)搅拌2小时来调节DOWEX 50Wx8氢形式200-400目筛。将树脂装在于玻璃柱上, 用水洗涤(直到 $\text{pH} \approx 6$), 然后用水: 丙酮(1:1)洗涤。将(4R,5aS,8aS)-2,8-二氧代-7-丙基六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -3(4H)-基硫酸四丁基铵(228mg, 0.408mmol)在水: 丙酮(1:1)中的溶液装入, 并通过该柱, 用水: 丙酮(1:1)洗脱。将该样品真空浓缩(水浴温度 $<30^\circ\text{C}$), 并冷冻干燥, 得到标题化合物(120mg, 85%), 为白色粉末。LCMS: $R_t=0.30\text{min}$; $m/z=320.3$ (M+1) 方法2m_酸性。 ^1H NMR (500MHz, D_2O) δ 4.18 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.54 (dd, $J=10.9, 6.3\text{Hz}$, 1H), 3.32-3.17 (m, 3H), 3.10 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 1H), 2.80 (d, $J=12.2\text{Hz}$, 1H), 2.69 (p, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 2.50-2.41 (m, 1H), 1.57-1.47 (m, 3H), 0.81 (t, $J=7.4$, 3H)。

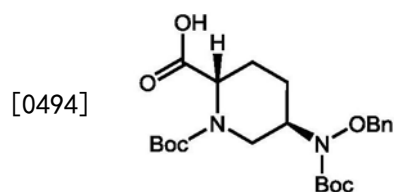
[0490]



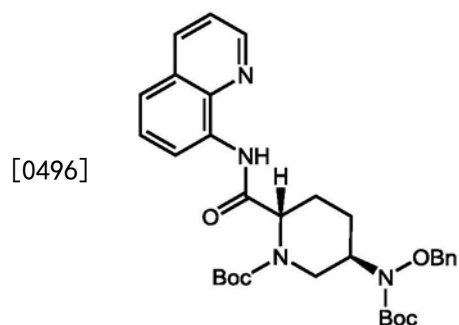
[0491] 实施例7. (4R,5aR,9aS)-2,9-二氧代八氢-1,4-亚甲基吡啶并[3,4-d][1,3]二氮杂~~革~~-3(2H)-基硫酸氢钠。



[0493] 步骤1: (2S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)哌啶-1,2-二甲酸1-(叔丁基)酯2-乙酯。向(2S,5R)-5-((苄氧基)氨基)哌啶-2-甲酸乙酯草酸盐(13.25g,36.0mmol)在EtOAc(200mL)的混悬液中加入 Na_2CO_3 (2.0M,80mL,160mmol)和氢氧化钠(1.0M,40mL,40mmol)。将该混合物在室温下搅拌30分钟。滤除形成的沉淀,并分离滤液的两层。将有机层用盐水(50mL)洗涤,用 Na_2SO_4 干燥,过滤并真空浓缩,得到粘稠油状物(10.0g)。向该油状物(10.0g,35.9mmol)在THF(100mL)的溶液中加入Boc-酸酐(23.5g,108mmol)、三乙胺(15.0mL,108mmol)和DMAP(4.38g,35.9mmol)。将反应混合物搅拌60小时,然后在50℃加热2天。真空除去溶剂,并溶于EtOAc/庚烷(300mL,1/1),用水(100mL)、HCl(0.1N,50mL)、盐水(50mL)洗涤,用 Na_2SO_4 干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷,0-40%),得到标题化合物(9.6g,55%),为油状物。LCMS: $R_t=1.19\text{min}$, $m/z=479.2$ (M+1),方法2m_酸性。

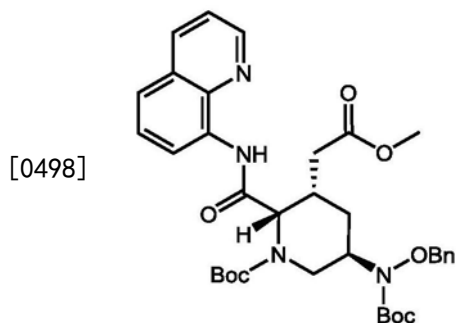


[0495] 步骤2: (2S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-1-(叔丁氧基羰基)哌啶-2-甲酸。0℃下向(2S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)哌啶-1,2-二甲酸1-(叔丁基)酯2-乙酯(9.60mg,20.06mmol)在THF:MeOH(3:1,80mL)的溶液中缓慢加入氢氧化钠(1N,40mL)溶液。室温下5小时后,缓慢加入HCl(1N,41mL),并将其用EtOAc(300mL)萃取。将有机层用 Na_2SO_4 干燥,过滤并真空浓缩,得到标题化合物(8.78g,97%),为软的固体。LCMS: $R_t=1.05\text{min}$, $m/z=451.2$ (M+1)方法2m_酸性。

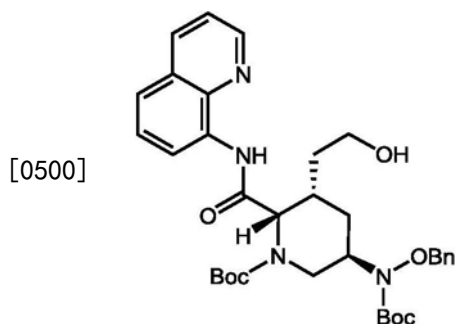


[0497] 步骤3: (2S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-2-(喹啉-8-基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯。向(2S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-1-(叔丁氧基羰基)哌啶-2-甲酸(6.010g,13.34mmol)在DCM(100mL)的溶液于0℃下加入喹啉-8-胺(2116mg,14.67mmol),然后加入DIPEA(4.66mL,26.7mmol)和HATU(6.087g,16.01mmol)。室温下在氩

气中搅拌2.5小时后,倒入水(150mL)中,并用DCM(100mL)萃取。将有机层用MgSO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷,10-40%),得到标题化合物(6.60g,86%),为软的固体。LCMS: $R_t=1.22\text{min}$, $m/z=577.3$ (M+1),方法2m_酸性。

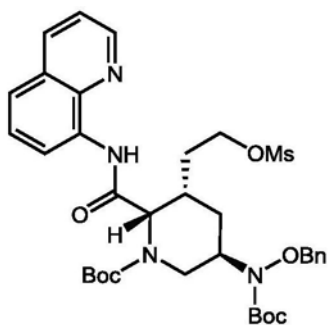


[0499] 步骤4: (2S,3S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-3-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2-(喹啉-8-基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯。向(2S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-2-(喹啉-8-基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(5.580g,9.68mmol)在2-甲基-2-丁醇(95mL)的溶液中加入二苄基磷酸氢盐(538mg,1.94mmol)、碳酸银(5.336g,19.35mmol)、Pd(II)乙酸盐(434mg,1.94mmol)和2-溴乙酸甲酯(2.83mL,29.0mmol)。将该混合物用氩气冲扫,密封,并加热至110℃持续20小时。加入另外的Pd(II)乙酸盐(217mg,0.97mmol)和2-溴乙酸甲酯(1.88mL,19.36mmol),并将反应混合物在110℃再搅拌20小时。将该混合物冷却至室温,用DCM(100mL)稀释,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷,0-35%),得到标题化合物(2.170g,35%),为粘稠油状物。LCMS: $R_t=1.26\text{min}$, $m/z=649.3$ (M+1),方法2m_酸性。



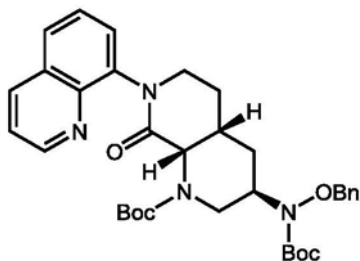
[0501] 步骤5: (2S,3S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-3-(2-羟基乙基)-2-(喹啉-8-基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯。0℃下向(2S,3S,5R)-5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-3-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2-(喹啉-8-基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(2.40g,3.70mmol)在THF(60mL)的溶液中加入超氢化物(1.0M在THF中的溶液,18.50mL,18.5mmol)。在0℃下搅拌5小时,加入AcOH(50%水溶液,10mL),然后加入饱和NH₄Cl(30mL)和EtOAc(150mL)。分离各层,并将有机层用盐水(50mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(EtOAc-庚烷,10-60%),得到标题化合物(680mg,30%)。LCMS: $R_t=1.16\text{min}$, $m/z=621.1$ (M+1),方法2m_酸性。

[0502]



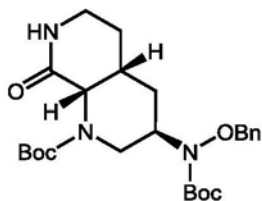
[0503] 步骤6: (2S,3S,5R) -5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-3-(2-((甲磺酰基)氧基)乙基)-2-(喹啉-8-基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯。0℃下向 (2S,3S,5R) -5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-3-(2-羟基乙基)-2-(喹啉-8-基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (680mg, 1.10mmol) 在二氯甲烷 (20mL) 的溶液中加入三乙胺 (0.30mL, 2.19mmol) 和甲磺酰氯 (0.17mL, 2.19mmol)。室温下搅拌20小时后,将该混合物用水 (20mL) 和EtOAc (100mL) 稀释,并再搅拌15分钟,然后分离各层。将有机层用NaH₂PO₄ (1.0M, 2x40mL)、盐水 (30mL) 洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩,得到标题化合物 (定量产率),为软的固体。LCMS: R_t = 1.22min, m/z = 699.4 (M+1), 方法2m_酸性。

[0504]



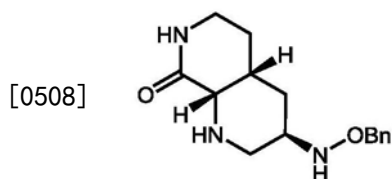
[0505] 步骤7: (3R,4aR,8aS) -3-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-8-氧代-7-(喹啉-8-基)八氢-1,7-萘啶-1(2H)-甲酸叔丁酯。0℃下向 (2S,3S,5R) -5-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-3-(2-((甲磺酰基)氧基)乙基)-2-(喹啉-8-基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (690mg, 0.99mmol) 在THF (16mL) 的溶液中加入LDA (1.0M在THF/己烷中的溶液, 1.97mL)。在0℃搅拌2.5小时后,将其加温至室温,并搅拌过夜。加入饱和NH₄Cl (20mL) 溶液,并将该混合物用EtOAc (80mL) 萃取。将有机层用盐水 (20mL) 洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化 (EtOAc-庚烷, 30-80%), 得到标题化合物 (680mg, 45%), 为软的固体。LCMS: R_t = 1.03min, m/z = 603.4 (M+1), 方法2m_酸性。

[0506]

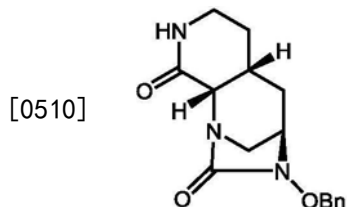


[0507] 步骤8: (3R,4aR,8aS) -3-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-8-氧代八氢-1,7-萘啶-1(2H)-甲酸叔丁酯。将 (3R,4aR,8aS) -3-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-8-氧代-7-(喹啉-8-基)八氢-1,7-萘啶-1(2H)-甲酸叔丁酯 (270mg, 0.448mmol) 在无水DCM (15mL) 中的溶液在-78℃下用O₃喷射,直到蓝色持续,然后移除喷射管线。在-78℃搅拌45分钟,蓝色消失,将其再次用O₃喷射,直到蓝色持续。搅拌15分钟后,将该系统用O₂喷射直到其无色。向该溶液中加入二甲基硫醚 (100μL, 1.36mmol)。室温下搅拌1小时后,将该混合物真空浓缩。将

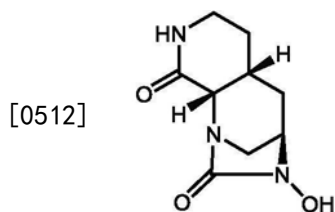
残余物再次溶于THF (5mL), 并加入 NH_4OH (25%水溶液, 5mL)。搅拌16小时后, 将该混合物用EtOAc (50mL) 稀释, 并将有机层用水 (20mL)、盐水 (20mL) 洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化 (EtOAc-庚烷, 70-100%), 得到标题化合物 (96mg, 45%), 为固体。LCMS: $R_t=1.00\text{min}$, $m/z=476.2$ (M+1), 方法2m_酸性。



[0509] 步骤9: (3R, 4aR, 8aS)-3-((苄氧基)氨基)八氢-1,7-萘啶-8(2H)-酮。0℃下向 (3R, 4aR, 8aS)-3-((苄氧基)(叔丁氧基羰基)氨基)-8-氧代八氢-1,7-萘啶-1(2H)-甲酸叔丁酯 (120mg, 0.252mmol) 在DCM (3mL) 的溶液中缓慢加入TFA (1.5mL)。在0℃下3小时后, 然后在室温下1小时, 将其真空浓缩 (水浴温度<30℃)。将残余物溶于DCM:EtOH (5:1, 30mL), 并加入 Na_2CO_3 (2M, 10mL)。分离各层, 并将水层用DCM:EtOH (5:1, 2x30mL) 萃取。将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化 (MeOH-DCM, 10-25%), 得到标题化合物 (60mg, 86%), 为固体。LCMS: $R_t=0.58\text{min}$, $m/z=276.1$ (M+1), 方法2m_酸性。

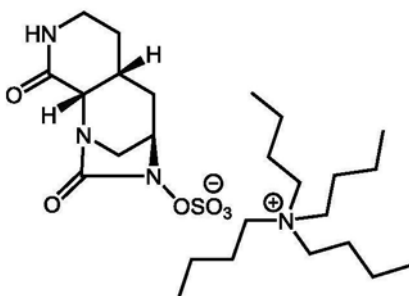


[0511] 步骤10: (4R, 5aR, 9aS)-3-((苄氧基)氨基)六氢-1,4-亚甲基吡啶并[3,4-d][1,3]二氮杂~~草~~-2,9(3H,6H)-二酮。0℃下向 (3R, 4aR, 8aS)-3-((苄氧基)氨基)八氢-1,7-萘啶-8(2H)-酮 (56mg, 0.20mmol) 在ACN (21mL) 的溶液中加入DIPEA (140μL, 0.81mmol)。将三光气 (24mg, 0.08mmol) 在ACN (3mL) 中的溶液通过注射泵加入 (0.1mL/min)。0℃下搅拌6小时后, 将其部分真空浓缩 (~10mL), 用DCM (40mL) 稀释, 用水 (20mL)、盐水 (20mL) 洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。粗的残余物经硅胶色谱纯化 (MeOH-DCM, 0-5%), 得到标题化合物 (50mg, 82%), 为灰白色固体。LCMS: $R_t=0.65\text{min}$, $m/z=302.0$ (M+1), 方法2m_酸性。



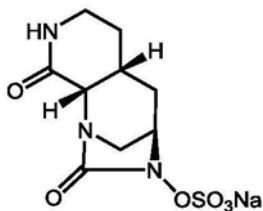
[0513] 步骤11: (4R, 5aR, 9aS)-3-羟基六氢-1,4-亚甲基吡啶并[3,4-d][1,3]二氮杂~~草~~-2,9(3H,6H)-二酮。将 (4R, 5aR, 9aS)-3-((苄氧基)氨基)六氢-1,4-亚甲基吡啶并[3,4-d][1,3]二氮杂~~草~~-2,9(3H,6H)-二酮 (50mg, 0.17mmol) 和Pd-C (10%Degussa 101型, 50%水, 27mg) 在MeOH:DCM (3:1, 4mL) 中的浆体抽真空, 并用 H_2 回充。剧烈搅拌2小时后, 将其经硅藻土柱过滤, 用MeOH洗涤, 真空浓缩。LCMS: $R_t=0.20\text{min}$, $m/z=212.0$ (M+1) 方法2m_酸性。

[0514]



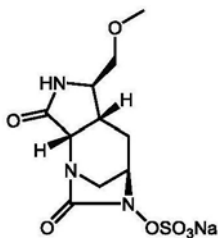
[0515] 步骤12: (4R,5aR,9aS)-2,9-二氧代八氢-1,4-亚甲基吡啶并[3,4-d][1,3]二氮杂**革**-3(2H)-基硫酸四丁基铵。在0℃下向粗的(4R,5aR,9aS)-3-羟基六氢-1,4-亚甲基吡啶并[3,4-d][1,3]二氮杂**革**-2,9(3H,6H)-二酮(35mg,0.17mmol)在吡啶(3ml)的浆体中加入SO₃·Py(132mg,0.83mmol)。室温下剧烈搅拌20小时后,将该浆体过滤,并将固体用冷却的DCM(5mL)洗涤。将滤液真空浓缩(水浴温度<30℃),并将粗的残余物溶于NaH₂PO₄(1M,10mL),然后加入四丁基铵硫酸氢盐(84mg,0.25mmol)。30分钟后,将其用CHCl₃:IPA(4:1,3x30mL)萃取。将合并的有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM,5-20%),得到标题化合物,为白色泡沫。LCMS:R_t=0.15min,m/z=292.0(M+1),方法2m_酸性。

[0516]



[0517] 步骤13: (4R,5aR,9aS)-2,9-二氧代八氢-1,4-亚甲基吡啶并[3,4-d][1,3]二氮杂**革**-3(2H)-基硫酸氢钠。通过与NaOH(2N)一起搅拌2小时来调节DOWEX 50Wx8氢形式200-400目筛。将树脂装入玻璃柱上,并用水洗涤(直到pH≈6)。然后将其用水/丙酮(1:1)洗涤。将(4R,5aR,9aS)-2,9-二氧代八氢-1,4-亚甲基吡啶并[3,4-d][1,3]二氮杂**革**-3(2H)-基硫酸四丁基铵盐(228mg,0.408mmol)在丙酮:水(1:1)中的溶液装入,并通过该柱,用水(20ml)、然后用丙酮:水(1:4,30ml)洗脱。将该样品冷冻干燥,得到标题化合物(28mg,52%产率),为白色固体。LCMS:R_t=0.29min,m/z=291.8(M+1)方法T3_3m_极性;¹H NMR(500MHz,D₂O)δ 4.31(m,1H),4.09(d,J=7.1Hz,1H),3.55(td,J=12.8,4.3Hz,1H),3.26-3.34(m,2H),2.87(d,J=12.3Hz,1H),2.55-2.64(m,1H),2.21-2.30(m,1H),1.99-2.09(m,1H),1.80-1.88(m,1H)1.72-1.79(m,1H)。

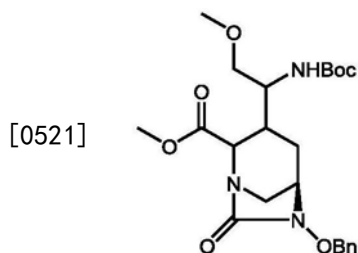
[0518]



[0519] 实施例8. (4R,5aS,6R,8aS)-6-(甲氧基甲基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡

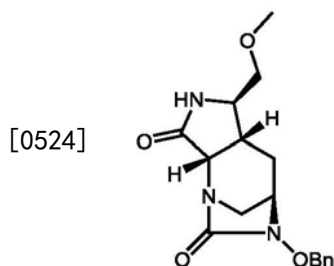
咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~草~~-3(4H)-基硫酸氢钠

[0520] 步骤1: (5R)-6-(苄氧基)-3-(1-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-甲氧基乙基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯(非对映异构体混合物)。



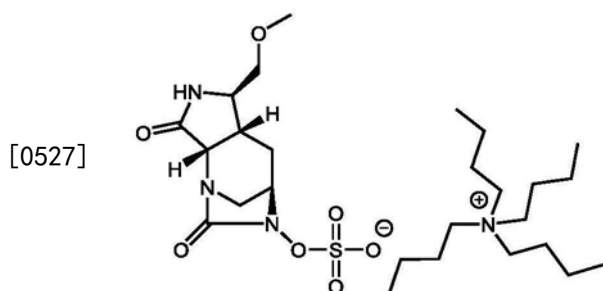
[0522] 将中间体C(1.10g, 3.82mmol)、Boc-L-Ser(OMe)-OH(1.04g, 4.58mmol)和Ir[df(CF₃)ppy₂(dtbpy)]PF₆(43mg, 0.04mmol)溶于DMF(16mL)。向该溶液中加入精细研磨的磷酸二氢钾(0.62g, 4.58mmol),并将所得混悬液搅拌,用Kessil H150-Blue灯照射12天,距离≤2cm。3天后和9天后,加入Ir[df(CF₃)ppy₂(dtbpy)]PF₆(43mg, 0.04mmol)(共3mol%催化剂)。向反应混合物中加入水(15mL),然后加入饱和NaHCO₃溶液(水溶液, 15mL),将其随后用TBME(3x60mL)萃取。将合并的有机相用盐水(10mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩,得到标题化合物(1.85g),为包含4种非对映异构体的黄色油状物(比率39:16:11:34)。LCMS:R_t=1.02min, 1.05min, 1.08min, 1.12min,全部具有m/z=464(M+1), LCMS_2MIN_REACTION_MONITORING。

[0523] 步骤2: (4R,5aS,6R,8aS)-3-(苄氧基)-6-(甲氧基甲基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂~~草~~-2,8(3H)-二酮。

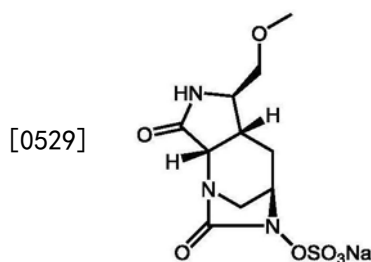


[0525] 0℃下向(5R)-6-(苄氧基)-3-(1-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-甲氧基乙基)-7-氧代-1,6-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-2-甲酸甲酯(1.85g, 4.0mmol)在DCM(60mL)的溶液中逐滴加入TFA(15.4mL, 200mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1.5小时,然后真空浓缩。将粗的残余物溶于DCM(60mL),然后逐滴加入三乙胺(11.1mL, 80mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后将其浓缩,得到红色油状物(6.8g)。加入水(20mL),并将该混合物用TBME(3x80mL)萃取。将合并的有机相用Na₂SO₄干燥,并真空浓缩,得到黄色油状物(1.13g)。将水相用NaCl(s)饱和,并进一步用DCM(3x80mL)萃取。将合并的有机相用Na₂SO₄干燥并真空浓缩,得到额外的粗产物(0.95g)。将合并的粗产物经HPLC色谱纯化(Sunfire-C18, 5μm, 50x250mm, 水/ACN+0.1%TFA, 100ml/min, 18-38%历经21min, 共35min),此时通过加入饱和NaHCO₃(水溶液)将流份的pH调至6.9,并冷冻干燥,得到浅褐色残余物(0.59g)。将该残余物溶于ACN/水,并经C18柱(ACN-水)纯化,然后将该物质冷冻干燥,得到标题化合物(62mg, 4.1%3步)。LCMS:R_t=0.70min, m/z=332(M+1), LCMS_2MIN_REACTION_MONITORING。

[0526] 步骤3: (4R,5aS,6R,8aS)-3-羟基-6-(甲氧基甲基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -2,8(8aH)-二酮。将(4R,5aS,6R,8aS)-3-(苄氧基)-6-(甲氧基甲基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -2,8(8aH)-二酮(59mg,0.178mmol)溶于MeOH:DCM(1:1,1.78mL)。将混合物用氮气冲扫,加入Pd-C(10%Degussa 101型,50%水,37.9mg,0.018mmol),然后在 H_2 气氛中放置90分钟。将该混合物经硅藻土过滤,用DCM:MeOH(1:1)洗脱,并真空浓缩,得到标题化合物(49mg,定量),为无色固体。LC/MS: $R_t=0.12\text{min}$; $m/z=242.0$ (M+1) 方法2m_酸性。



[0528] 步骤4: (4R,5aS,6R,8aS)-6-(甲氧基甲基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -3(4H)-基硫酸四丁基铵。向(4R,5aS,6R,8aS)-3-羟基-6-(甲氧基甲基)六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -2,8(8aH)-二酮(42mg,0.174mmol)在吡啶(1.85mL)的溶液中加入 $\text{SO}_3 \cdot \text{吡啶}$ (139mg,0.870mmol)。将该混合物搅拌18小时,然后经滤膜过滤并真空浓缩(水浴温度 $<30^\circ\text{C}$)。将粗的残余物溶于饱和 NaH_2PO_4 并用EtOAc洗涤。分离各层,并向水相中加入四丁基铵硫酸氢盐(89mg,0.261mmol)。将该混合物搅拌30分钟,然后用DCM萃取,用硫酸钠干燥,并真空浓缩。将粗的残余物经硅胶色谱纯化(MeOH-DCM,0-30%),得到标题化合物(57mg,58%),为无色薄膜。LC/MS: $R_t=0.12\text{min}$; $m/z=322.0$ (M+1) 方法2m_酸性。



[0530] 步骤5: (4R,5aS,6R,8aS)-6-(甲氧基甲基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -3(4H)-基硫酸氢钠。DOWEX 50Wx8氢形式200-400目筛用NaOH(2N)搅拌3小时,然后装到玻璃柱上,用水洗涤,直到洗脱液的pH为约6,然后用水:丙酮(1:1)洗涤。将(4R,5aS,6R,8aS)-6-(甲氧基甲基)-2,8-二氧代六氢-2H-1,4-亚甲基吡咯并[3,4-d][1,3]二氮杂 草 -3(4H)-基硫酸四丁基铵(57mg,0.101mmol)在丙酮:水(1:1)中的溶液装入,并通过该柱,用1:1丙酮/水洗脱。将流份真空浓缩并冷冻干燥,得到所需产物(27mg,70%),为无色粉末。LC/MS: $R_t=0.41\text{min}$; $m/z=321.9$ (M+1) 方法T3_3m_极性; $^1\text{H NMR}$ (500MHz, D_2O) $\delta=4.30$ (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 4.24 (br s, 1H), 3.60-3.56 (m, 1H), 3.56-3.45 (m,

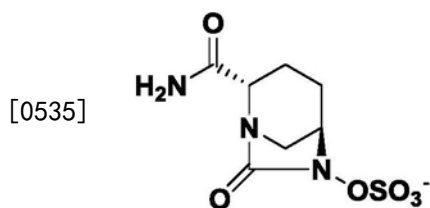
3H), 3.39 (s, 3H), 3.38-3.34 (m, 1H), 2.97 (d, J=12.3Hz, 1H), 2.67 (q, J=8.4Hz, 1H), 2.64-2.56 (m, 1H), 1.72 (dd, J=14.7, 8.4Hz, 1H)。

[0531] 易感性试验

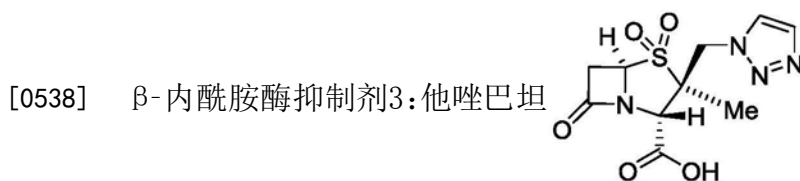
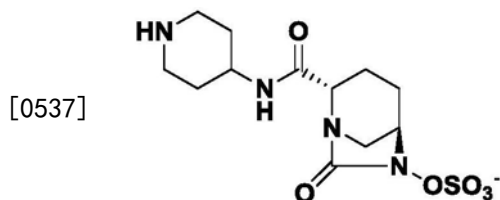
[0532] 按照临床和实验室协会 (CLSI) 指南, 通过培养物微量稀释方法测定MIC。简而言之, 将新鲜的过夜细菌培养物悬浮在无菌盐水中, 调节至0.5McFarland浊度标准。然后将细菌悬浮液在阳离子调节的Mueller-Hinton培养基 (MHB II; BBL) 中稀释, 得到约 5×10^5 菌落形成单位 (CFU) /mL的最终接种物。制备抗生素主板, 其浓度相当于在100%二甲基亚砜 (DMSO) 中最高所需最终浓度的100倍。然后用多通道移液管通过连续两倍稀释法稀释主抗生素板。将得到的化合物稀释系列用无菌水或制备的浓度相当于去离子水中11倍的所需最终浓度的 β -内酰胺酶抑制剂溶液1:10稀释, 得到10% DMSO终浓度。将10 μ L体积的药物稀释系列转移至96孔测定板。用90 μ L细菌悬浮液接种测定板, 并在35 $^{\circ}$ C下孵育20小时。使用微量滴定板读数器 (Molecular Devices) 在600nm处读取测定板以及通过用读取镜目视观察。阻止可见生长的化合物的最低浓度记录为MIC。通过针对根据CLSI指南的实验室质量控制菌株测试氨曲南来监测测试的性能。

[0533] 在下表中提到以下 β -内酰胺酶抑制剂和 β -内酰胺类抗生素:

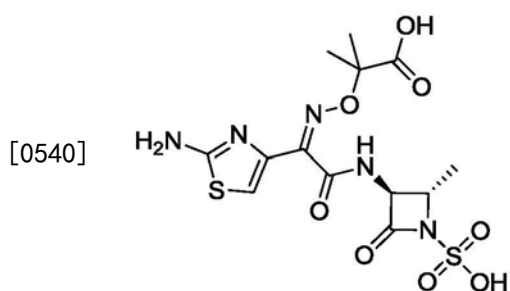
[0534] β -内酰胺酶抑制剂1:阿维巴坦



[0536] β -内酰胺酶抑制剂2:Relebactam

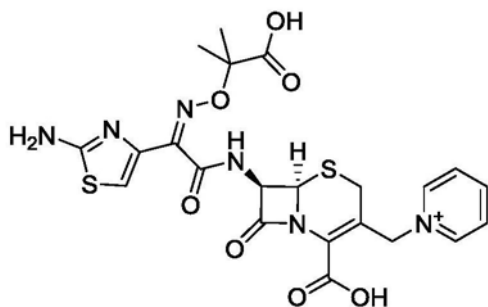


[0539] β -内酰胺1:氨曲南

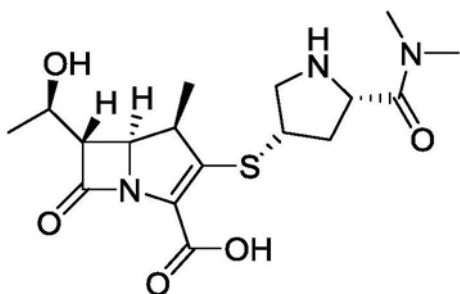


[0541] β -内酰胺2:头孢他啶

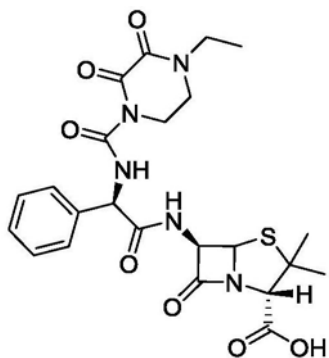
[0542]

[0543] β -内酰胺3:美罗培南

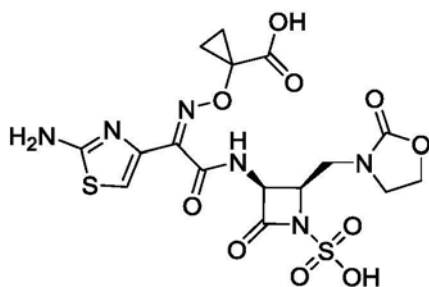
[0544]

[0545] β -内酰胺4:哌拉西林

[0546]

[0547] β -内酰胺5 (LYS228) :

[0548]

[0549] 通过抑制 β -内酰胺酶而与 β -内酰胺类形成协同

[0550] 针对各自表达独特的 β -内酰胺酶的大肠杆菌株系的同基因株组以及临床菌株,通过抑制 β -内酰胺酶来评价 β -内酰胺类抗生素的协同或增强作用。

[0551] 大肠杆菌菌株的同基因株NB27273-CDY0026 (亲本)、NB27273-CDY0033 (KPC-2)、NB27273-CDY0030 (SHV-12)、NB27273-CDY0034 (CTX-M-15) 和NB27273-CDY0036 (AmpC) 的构建。

[0552] 菌株NB27273 (BW25113 $\text{pspB}::\text{Km}^r$) 得自Keio转座子插入物收藏库。该菌株具有被卡那霉素抗性标记替换的 pspB 基因 (BW25113 $\text{pspB}::\text{Km}^r$)。将该菌株使用已公布的方法通过FLP重组酶在 pspB 中复原转座子。所得菌株BW25113 pspB 用作表达关键的 β -内酰胺酶的多拷

贝载体的宿主。如下构建引入组成性表达 β -内酰胺酶的多拷贝质粒:通过DNA2.0 (Palo Alto, CA) 制备编码大肠杆菌KPC-2、SHV-12和CTX-M-15 β -内酰胺酶的合成的密码子优化的基因。每个合成片段都在其末端设计含有NotI和NcoI限制性位点,以使其连接NotI/NcoI消化的用于蛋白质表达的pET28a (+) 衍生物。在这些载体中的插入物用作模板DNA,用于编码KPC-2、SHV-12和CTX-M-15的基因的PCR扩增,分别使用引物对:E225 (tcgcCTCGAGgcgactgcgctgacgaatttgg) (SEQ ID NO:1) 和E202 (aatcGAATTCttactgaccattaacgcccgaagc) (SEQ ID NO:2) 和E227 (tcgcCTCGAGgcgagccccgaaccgctgga) (SEQ ID NO:3) 和E204 (aatcGAATTCttaacgctgccagtgtcaatc) (SEQ ID NO:4) 和E226 (cgctCTCGAGagcggtcccgctgtacgcacaaacg) (SEQ ID NO:5) 和E203 (aatcGAATTCttacagaccgtcggtgacaatc) (SEQ ID NO:6)。密码子优化的核苷酸序列和相关引物识别信息如下所示:

[0553] KPC-2

ATGGGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCAGGGGCCCCGCGACTGCGCT
GA
CGAATTTGGTGGCCGAGCCGTTTCGCGAAATTGGAGCAAGATTTGGTGGTTCGATCGGTGTCTACGCG
AT
GGACACCGGTAGCGGTGCCACCGTGAGCTACCGTGCCGAAGAGCGTTTTCCGCTGTGTAGCTCTTTCA
AG
GGTTTTCTGGCCGAGCCGTTGCTGGCACGCAGCCAACAGCAAGCGGGCCTGCTGGACACCCCGATCCG
TT
ACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGAGCCCGATTAGCGAAAAGTACCTGACCACCGGCATGACGGTG
GC
GGAGTTGAGCGCTGCGGCGGTTTTCAGTATTCGATAACGCTGCGGCAAATCTGCTGCTGAAAGAACTGG
GC
GGTCCAGCGGTCTGACGGCTTTTCATGCGTTCTATTGGCGACACCACCTTTCGCTTGGACCGCTGGGA
GC
TGGAGCTGAACAGCGGATTCCGGGCGACGCACGTGATACGAGCAGCCCGCGTGCAGTGACCGAGAGC

[0554]

CT
GCAGAAGCTGACCCTGGGCAGCGCACTGGCCGCACCGCAGCGCCAACAGTTCGTCGATTGGCTGAAGG
GT
AACACCACCGGTAACCATCGTATTCGCGCAGCGGTCCCGGCTGATTGGGCAGTTGGTGACAAGACTGG
TA
CGTGCGGCGTTTATGGTACGGCGAATGACTACGCGGTTGTTTGGCCTACGGGTCTGCGCCGATCGTC
CT
GGCGGTGTATACCCGTGCTCCGAACAAAGACGATAAACTCCGAAGCGGTCATCGCCGAGCAGCGC
GT
CTGGCCCTGGAAGGCTTGGGCGTTAATGGTCAGTAACGCCGGCG (SEQ ID NO:7)

E225 TCGCCTCGAGGCGACTGCGCTGACGAATTTGG (SEQ ID NO:8)

E202 AATCGAATTCCTTACTGACCATTAAACGCCCAAGC (SEQ ID NO:9)

REV. COMP. E202 GCTTGGGCGTTAATGGTCAGTAAGAATTCGATT (SEQ ID

NO:10)

[0555] 下划线=编码BL的DNA

[0556] SHV-12

ATGGGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGGCCCGCGAG
CCCGCAACCGCTGGAGCAGATCAAGCAGTCTGAGAGCCAGCTGAGCGGCCGTGTGGGTATGATCGAGA
TGGATCTGGCTTCCGGCCGTACGCTGACGGCATGGCGTGCCGACGAACGTTTCCCGATGATGTGACC
TTTAAAGTTGTTCTGTGTGGTGCGGTCTTGGCACGTGTAGACGCGGGTGACGAACAACCTGGAGCGCAA
GATCCATTACCGCCAACAGGACTTGGTCTGACTACAGCCCGGTTAGCGAAAAGCACCTGGCGGATGGCA
TGACCGTGGGTGAATTGTGCGCCGCTGCGATTACCATGAGCGACAATAGCGCGGCTAATCTGCTGTTG
GCGACCGTTGGTGGCCAGCGGGCTTGACCGCATTCTGCGTCAAATCGGCGATAATGTTACGCGTCT
GGATCGCTGGGAAACGGAGCTGAACGAGGCACTGCCGGGTGATGCCCGTGATACCACGACTCCTGCTA
GCATGGCAGCGACCCTGCGTAACTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCACGTAGCCAACGCCAGCTG
CTGCAATGGATGGTGGATGACCGCGTGGCGGGTCCGCTGATCCGCTCCGTCTGCCAGCAGGCTGGTT
CATTGCGGACAAAACCTGGTGCCTCTAAGCGTGGTGCGCGTGGTATCGTCGCGCTGCTGGGTCCGAACA
ACAAAGCCGAACGTATTGTGGTTATCTATCTGCGCGACACCCCGCAAGCATGGCCGAGCGCAACCAG
CAAATTGCGGGCATTGGTGCGGCACTGATTGAGCACTGGCAGCGTTAACGCCGGCG (SEQ ID
NO:11)

E227 TCGCCTCGAGGCGAGCCCGCAACCGCTGGA (SEQ ID NO:12)

E204 AATCGAATTCTTAACGCTGCCAGTGCTCAATC (SEQ ID NO:13)

REV. COMP. E204 GATTGAGCACTGGCAGCGTTAAGAATTTCGATT (SEQ ID NO:14)

[0558] CTX-M-15

ATGGGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGGCCCGAGCGT
CCCGCTGTACGCACAAACGGCCGACGTGCAACAGAACTGGCGGAGTTGGAACGTCAGAGCGGTGGCC
GTTTGGGTGTAGCCCTGATCAATACCGCGGACAATAGCCAAATTCTGTATCGTGCGGACGAACGCTTC
GCGATGTGCAGCACGAGCAAGGTGATGGCCGCTGCGGCCGTTCTGAAGAAATCCGAGAGCGAGCCGAA
CTTGCTGAATCAGCGCGTTGAGATCAAGAAGTCGGATCTGGTGAACATAACCTATCGCGGAAAAAC
ATGTCAACGGCACCATGTCCCTGGCAGAGCTGAGCGCGGCTGCGTTGCAGTACTCTGATAACGTCGCA
ATGAATAAACTGATCGCACACGTCGGTGGCCCAGCAAGCGTGACCGCCTTTGCGCGTCAACTGGGCGA
TGAAACTTTTCGTCTGGATCGTACCGAACCGACCTGAATACGGCAATTCCGGGTGATCCGCGCGACA
CGACGAGCCCGCGTGCAATGGCACAGACCCTGCGCAACCTGACCCTGGGTAAAGCGCTGGGCGATAGC
CAACGTGCGCAGCTGGTTACGTGGATGAAGGGTAACACCACCGGTGCGGCCAGCATTCAAGCGGGCCT
GCCGGCCAGCTGGGTGTTGGTGATAAACTGGCTCCGGTGGTTATGGTACCACGAATGACATCGCGG
TTATTTGGCCGAAGGACCGTGCGCCGTTGATCCTGGTGACCTACTTCACCCAGCCGAGCCGAAAGCT
GAGTCTCGCCGTGACGTGCTGGCGAGCGCAGCTAAGATTGTCACCGACGGTCTGTAAACGCCGGCG

E226 cgctCTCGAGagcgctccgctgtacgcacaaacg (SEQ ID NO:15)

E203, aatcGAATTCttacagacgctcggtgacaatc (SEQ ID NO:16)

[0560] 使用引物对E252 (gccCTCGAGggcgagggcccgcgatcgc) (SEQ ID NO:17) 和E253 (tgaGAATTCtcagcgcttcagcggcacct) (SEQ ID NO:18), 从铜绿假单胞菌菌株PA01 (NB52019) (GenBank ID U5R279) 的基因组中PCR扩增编码AmpC的基因。

[0561] 然后用XhoI和EcoRI消化PCR产物,并连接到类似地消化的质粒pAH63-pstS (BlaP) 中。质粒pAH63-pstS (BlaP) 是质粒pAH63 (J Bacteriol.183 (21):6384-6393) 的衍生物,其是通过将质粒pBAD (J Bacteriol.1995Jul.177 (14):4121-30) 中的TEM-1 (bla) 启动子和信号肽编码区克隆到质粒pAH63中而制备。该片段使用引物对E192 (ttcaCTGCAGtgaacgttgcaagcaacggC) (SEQ ID NO:19) 和E194 (TCGAggatcctcgagagcaaaaacaggaaggcaaaatgccg) (SEQ ID NO:20) 从pBAD中PCR扩增,用PstI和BamHI消化,并插入到类似地消化的质粒pAH63中。因此,来自基于pAH63-pstS (BlaP) 的构建体的β-内酰胺酶的表达是组成型的,并且提供信号序列以将这些蛋白质引导至周质。基于质粒pAH63的载体用于以单拷贝形式插入基因组中,然而,为了提供更高的表达水平以允许更灵敏地检测化合物对所表达的β-内酰胺酶的易感性,将这些载体中包含的表达插入物移至复制性多拷贝载体pBAD-Kan (JBacteriol.1995年7月,177 (14):4121-30)。为了实现这一点,将包含具有结合的TEM启动子和信号序列的β-内酰胺酶基因的插入物从它们的相应载体进行PCR扩增,使用引物E268 (ccgTCTAGAcggatggcctttttgcgtttc) (SEQ ID NO:21) 和E202 (aatcGAATTCttactgaccattaacgcccgaagc) (SEQ ID NO:22) 用于KPC2构建体,引物E204 (aatcGAATTCttaacgctgcagtgctcaatc) (SEQ ID NO:23) 用于SHV-12构建体,引物E203 (aatcGAATTCttacagaccgtcgtgacaatc) (SEQ ID NO:24) 用于CTX-M-15构建体。接着将这些片段用XbaI和EcoRI消化,各自插入已经用相同的酶消化过的pBAD18-kan中,分别产生表达KPC-2、SHV-12和CTX-M-15的多拷贝的载体。将这些载体转化到BW25113pspB中,产生菌株NB27273-CDY0033 (表达KPC-2)、NB27273-CDY0030 (表达SHV-12)、NB27273-CDY0034 (表达CTX-M-15) 和NB27273-CDY0036 (表达AmpC)。pBAD18-kan载体也含有TEM启动子区域和信号序列(但缺少完整的β-内酰胺酶基因),并且使用标准规程转化到BW25113pspB中以产生对照菌株NB27273-CDY0026。β-内酰胺酶的表达通过验证对实施例的测试抗生素的降低的易感性来确认,所述抗生素是KPC-2、SHV-12、CTX-M-15或AmpC的已知底物。

[0562] 大肠杆菌同基因菌株NB27273-CDY0105 (OXA-18) 和NB27273-CDY0048 (TEM-10) 的构建。用于表达OXA-18的质粒载体构建如下:编码GIM-1 (GenBank ID Q704V1) 和 (OXA-18 (GenBank ID 007293) 的基因由Life Technologies使用侧翼序列5' - tgccttcctgtttttgctctcgag和gaattcgctagccccaaaaaacgg-3' (SEQ ID NO:25) 合成。用XhoI和EcoRI消化GIM-1编码片段,并插入上述用XhoI和EcoRI消化除去KPC-2编码基因的KPC-2表达构建体中。验证性核苷酸测序揭示载体骨架中的XhoI位点,然后使用引物对E396 (cgtcttgctccaggccgcgattaaattcc) (SEQ ID NO:26) 和E397 (tcgcggcctggagcaagacgtttc) (SEQ ID NO:27) 将其通过定点诱变除去。然后用XhoI和EcoRI消化编码OXA-18的基因并已经插入用XhoI和EcoRI除去GIM-1基因的该载体中。

[0563] 为了产生表达TEM-10的载体,将含有编码TEM-1的基因的质粒pBAD18 (J Bacteriol.1995Jul.177 (14):4121-30) 用作基于PCR的定点诱变的模板以便将编码TEM-1的基因转换为编码TEM-10的基因。从该模板DNA中,使用以下引物对通过PCR产生三个片段:

[0564] B124 (tcacgtagcgatagcgagg) (SEQ ID NO:28) 和E387 (tggagccggttaagcgtgggtctcgcggt) (SEQ ID NO:28),用于产生编码E237K取代的片段A

[0565] E389 (cgcgagaccacgcttaccggctccaga) (SEQ ID NO:29) 和E391 (ctcgccttgatagttgggaaccgga) (SEQ ID NO:30),用于产生编码E237K和R162S取代的片段B

[0566] E393 (cggttcccaactatcaaggcgagt) (SEQ ID NO:31) 和E289 (gacattgccgtcactgcgtct) SEQ ID NO:32), 用于产生片段C, 也引入R162S取代

[0567] 接着将片段A、B和C用作模板, 产生编码TEM-10的完整基因, 如下所述:

[0568] 将片段A和B用作PCR的模板, 使用引物B124 (tcacgtagcgatagcgag) (SEQ ID NO:33) 和E390 (gtaactcgccttgatagttgggaaccggagctgaatgaagc) (SEQ ID NO:34), 以便将片段A和B合并为片段D。

[0569] 将片段B和C用作PCR模板, 使用引物E290 (gcgggaccaaagccatgaca) (SEQ ID NO:35) 和E388 (accgcgagacccacgcttaccggctccagatttatcagcaataaacc) (SEQ ID NO:36), 以便将片段B和C合并为片段E。

[0570] 最后, 将片段D和E用作PCR的模板, 使用引物E395 (gtaaGAATTCttaccaatgcttaatc agtgaggc) (SEQ ID NO:37)、E268 (ccgTCTAGAcggatggcctttttgcgtttc) (SEQ ID NO:38), 以便将片段D和E合并为完整的编码TEM-10的产物。然后将该片段用XbaI和EcoRI消化并插入到也用相同的酶切割的pBAD-kan中。

[0571] 将这些用于表达OXA-18和TEM-10的最终载体转化到BW25113pspB中, 产生菌株NB27273-CDY0105 (表达OXA-18) 和NB27273-CDY0048 (表达TEM-10)。通过验证对实施例测试的已知为OXA-18或TEM-10的底物的抗生素的易感性减少来证实 β -内酰胺酶表达。

[0572] 表A: 最小抑菌浓度 (MIC), $\mu\text{g}/\text{mL}$ 所选择的BLI

BLI	大肠杆菌 ATCC 25922	肺炎克雷伯菌 (<i>K. pneumoniae</i>) ATCC 43816	铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>) ATCC 27853
阿维巴坦	16	32	>64
Relebactam	>64	>64	>64
实施例 1	>64	>64	>64
实施例 2	>64	>64	>64
实施例 3	>64	>64	>64
实施例 4	>64	>64	>64
实施例 5	>64	>64	>64
实施例 6	>64	>64	>64
实施例 7	>64	>64	>64
实施例 8	>64	>64	>64

[0575] 上表1表明, 虽然一些 β -内酰胺酶抑制剂如阿维巴坦表现出直接的抗菌活性, 但式(A)化合物几乎没有显示直接活性。

[0576] 以下数据证明了当与各种 β -内酰胺抗生素组合使用时, 实施例1的化合物所示例的本发明化合物的增效作用或协同活性。由于实施例1的化合物没有表现出很强的直接抗生素活性 (参见表1), 因此协同作用或增效作用被定义为与单独的 β -内酰胺抗生素相比, 由于式(A)化合物的存在引起的 β -内酰胺抗生素的MIC降低四倍或更多。优选地, 与单独的 β -内酰胺抗生素相比, 本发明的组合表现出MIC至少降低8倍。

[0577] 在表达各自的 β -内酰胺酶的大肠杆菌同基因菌株中通过 β -内酰胺酶抑制剂使氨

曲南的活性 (MIC, $\mu\text{g/mL}$) 增强。

[0578]	氨曲南 (AZ)	大肠杆菌 (KPC-2)	大肠杆菌 (TEM-10)	大肠杆菌 (SHV-12)	大肠杆菌 (CTX-M-15)	大肠杆菌 (AmpC)	大肠杆菌 (OXA-18)
	AZ 单独	64	64	>64	64	4	>64
	AZ+实施例 1 (2$\mu\text{g/mL}$)	0.125	0.125	0.25	≤ 0.06	0.125	1
	AZ+阿维巴坦 (2$\mu\text{g/mL}$)	0.125	0.25	1	0.125	≤ 0.06	1
	AZ+Relebactam (2$\mu\text{g/mL}$)	1	2	32	0.5	0.125	>64

[0579] 在表达各自的 β -内酰胺酶的大肠杆菌同基因菌株中通过 β -内酰胺酶抑制剂使头孢他啶的活性 (MIC, $\mu\text{g/mL}$) 增强。

[0580]	头孢他啶(Ceft)	大肠杆菌 (KPC-2)	大肠杆菌 (TEM-10)	大肠杆菌 (SHV-12)	大肠杆菌 (CTX-M-15)	大肠杆菌 (AmpC)	大肠杆菌 (OXA-18)
	头孢他啶单独	4	>64	>64	16	4	>64
[0581]	Ceft + 实施例 1 (2$\mu\text{g/mL}$)	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5
	Ceft + 阿维巴坦 (2$\mu\text{g/mL}$)	0.25	1	0.5	0.25	0.125	0.5
	Ceft + Relebactam (2$\mu\text{g/mL}$)	0.25	8	8	0.5	0.125	>64

[0582] 在表达各自的 β -内酰胺酶的大肠杆菌同基因菌株中通过 β -内酰胺酶抑制剂使美罗培南的活性 (MIC, $\mu\text{g/mL}$) 增强。

[0583]	美罗培南 (Mero)	大肠杆菌 (KPC-2)	大肠杆菌 (TEM-10)	大肠杆菌 (SHV-12)	大肠杆菌 (CTX-M-15)	大肠杆菌 (AmpC)	大肠杆菌 (OXA-18)
	美罗培南单独	1	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06
	Mero + 实施例 1 (2$\mu\text{g/mL}$)	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06
	Mero + 阿维巴坦 (2$\mu\text{g/mL}$)	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06
	Mero + Relebactam (2$\mu\text{g/mL}$)	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06

[0584] 在表达各自的 β -内酰胺酶的大肠杆菌同基因菌株中通过 β -内酰胺酶抑制剂使哌拉西林的活性 (MIC, $\mu\text{g/mL}$) 增强。

[0585]

哌拉西林 (Pip)	大肠杆菌 (KPC-2)	大肠杆菌 (TEM-10)	大肠杆菌 (SHV-12)	大肠杆菌 (CTX-M-15)	大肠杆菌 (AmpC)	大肠杆菌 (OXA-18)
哌拉西林单独	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Pip + 他唑巴坦 (4μg/mL)	>32	4	32	4	8	8
Pip + 阿维巴坦 (2μg/mL)	4	2	4	4	4	2
Pip + Relebactam (2μg/mL)	4	>32	>32	16	4	>32
Pip + 实施例 1 (2μg/mL)	4	2	2	2	8	2
Pip + 实施例 2 (2μg/mL)	2	4	4	4	8	4
Pip + 实施例 3 (2μg/mL)	2	4	2	4	8	4

[0586]

Pip + 实施例 4 (4μg/mL)	2	4	4	2	4	ND
Pip + 实施例 5 (4μg/mL)	1	2	2	2	16	ND
Pip + 实施例 6 (4μg/mL)	2	4	4	4	4	ND
Pip + 实施例 7 (2μg/mL)	2	2	4	4	8	8
Pip + 实施例 8 (4μg/mL)	4	4	4	2	4	ND

[0587] 在表达各自的β-内酰胺酶的大肠杆菌同基因菌株中通过β-内酰胺酶抑制剂使β-内酰胺5的活性(μg/mL)增强。

[0588]

β-内酰胺5 (5)	大肠杆菌 (KPC-2)	大肠杆菌 (TEM-10)	大肠杆菌 (SHV-12)	大肠杆菌 (CTX-M-15)	大肠杆菌 (AmpC)	大肠杆菌 (OXA-18)
β-内酰胺5单独	0.25	2	0.5	0.125	0.25	0.5
5 + 实施例 1 (2μg/mL)	0.25	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25
5 + 阿维巴坦 (2μg/mL)	0.125	0.125	0.125	0.25	0.125	0.125
5 + Relebactam (2μg/mL)	0.125	0.25	0.125	0.25	0.25	0.25

[0589] 在对β-内酰胺耐药的临床分离物中通过β-内酰胺酶抑制剂使氨曲南的活性(μg/mL)增强。

[0590]	氨曲南	肺炎克雷伯菌(<i>K. pneumoniae</i>) NB29323 (CTX-M-15, OXA-48, VEB-1)	阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>) NB25044 (CTX-M-12, ACT, KPC-2)
	氨曲南单独	>64	>64
	AZ + 实施例 1 (2μg/mL)	0.25	4
	AZ + 阿维巴坦 (2μg/mL)	2	8
	AZ + Relebactam (2μg/mL)	8	>64

[0591] 在对β-内酰胺耐药的临床分离物中通过β-内酰胺酶抑制剂使哌拉西林的活性(μg/mL)增强。

[0592]	哌拉西林	肺炎克雷伯菌(<i>K. pneumoniae</i>) NB29082 (KPC-2)	阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>) NB25055 (CMY-2)	金黄色葡萄球菌(<i>S. aureus</i>) NB01437(BLA+)
	哌拉西林	>64	>64	64
	Pip + 他唑巴坦 (4μg/mL)	>64	64	1
	Pip + 实施例 1 (2μg/mL)	8	4	1

[0593] 该数据表明,当与市售的β-内酰胺抗生素组合用于治疗由对某些已知的β-内酰胺类抗生素耐药的细菌引起的感染时,本发明化合物的增效作用与临床中使用的一些β-内酰胺酶抑制剂相似或更强。

[0594] 本领域技术人员将认识到或能够确定使用不超过常规实验的本文所述的具体实施方案和方法的许多等同方案。这些等同方案包含在以下权利要求的范围内。

序列表

[0001]	<110>	诺华股份有限公司	
	<120>	β -内酰胺酶抑制剂	
	<130>	PAT057369-WO-PCT	
	<140>	PCT/IB2017/055973	
	<141>	2017-09-28	
	<150>	62/401,022	
	<151>	2016-09-28	
	<160>	41	
	<170>	PatentIn 版本3.5	
	<210>	1	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	1	
		tcgcctcgag gcgactgcgc tgacgaattt gg	32
	<210>	2	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	2	
		aatcgaattc ttactgacca ttaacgccca agc	33
[0001]	<210>	3	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	3	
		tcgcctcgag gcgagccgc aaccgtgga	30
	<210>	4	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	4	
		aatcgaattc ttaacgctgc cagtgtcaa tc	32
	<210>	5	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	5	
		cgctctcgag agcgtccgc tgaacgaca aacg	34
	<210>	6	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	

<400> 6
aatcgaattc ttacagaccg tcggtgacaa tc 32

<210> 7
<211> 884
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /note="人工序列描述: 合成的
多核苷酸"

<400> 7
atgggccatc atcatcatca tcacagcagc ggccctggaag tctgttcca ggggcccgcg 60
actgcgctga cgaatttggg ggccgagccg ttgcgaaat tggagcaaga ttttgggtgt 120
tcgatcggtg tctacgcgat ggacaccggt agcgggtcca ccgtgagcta ccgtgccgaa 180
gagcgttttc cgcgtgttag ctctttcaag ggtttctgg ccgcagccgt gctggcacgc 240
agccaacagc aagcgggctt gctggacacc ccgatccgtt acggcaaaa tgcgtgtgtt 300
ccgtggagcc cgattagcga aaagtacctg accaccggca tgacgggtggc ggagttgagc 360
gctgcggcgg ttcatgtatc cgataacgct gcggcaaatc tgcgtctgaa agaactgggc 420
ggtccagcgg gtcgacgcgc ttcatgcgt tctattggcg acaccacctt tcgcttggac 480
cgctgggagc tggagctgaa cagcgcgatt ccggcgacg cactgatac gagcagcccg 540
cgtgcagtga ccgagagcct gcagaagctg accctgggca gcgactggc cgcaccgcag 600
cgccaacagt tcgtcgattg gctgaagggt aacaccaccg gtaaccatcg tattcgcgca 660
gcggtcccg cgtattgggc agttgtgac aagactggtc cgtgcggcgt ttatgttacg 720
gcgaatgact acgcggttgt ttggcctacg ggtcgtgcgc cgtcgtcct ggcggtgtat 780
acccgtgctc cgaacaaaga cgataaacac tccgaagcgg tcatcgccgc agcagcgcgt 840
ctggccctgg aagcgttggg cgttaatggt cagtaacgcc ggcg 884

[0002]

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /note="人工序列描述: 合成的
多核苷酸"

<400> 8
tcgcctcgag gcgactgcgc tgacgaattt gg 32

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /note="人工序列描述: 合成的
多核苷酸"

<400> 9
aatcgaattc ttactgacca ttaacgccca agc 33

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /note="人工序列描述: 合成的
多核苷酸"

<400> 10
gcttggcggt taatggtcag taagaattcg att 33

<210> 11
<211> 866
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0003]	<223> /note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400> 11	
	atgggccatc atcatcatca tcacagcagc gccctggaag tctgtttcca ggggcccgcg	60
	agcccgcaac cgctggagca gatcaagcag tctgagagcc agctgagcgg ccgtgtgggt	120
	atgatcaga tggatctggc ttccggccgt acgtgacgg catggcgtgc cgacgaacgt	180
	ttcccgatga tgtcgacctt taaagtgtt ctgtgtgggt cggtcttggc acgtgtagac	240
	gcgggtgacg aacaactgga gcgcaagatc cattaccgcc aacaggactt ggtcgactac	300
	agcccggtta gcgaaaagca cctggcggat ggcatgaccg tgggtgaatt gtgcgcgct	360
	gcgattacca tgagcgacaa tagcgcggct aatctgctgt tggcgaccgt tgggtggcca	420
	gcgggcttga ccgcatttct gcgtcaaacc ggcatgatac ttacgcgtct ggatcgctgg	480
	gaaacggagc tgaacgagc actgccgggt gatgccgtg ataccacgac tctgtctagc	540
	atggcagcga ccttcgctaa actgtgacc agccagcgtc tgagcgacg tagccaacgc	600
	cagctgtgc aatggatggt ggatgaccgc gtggcgggtc cgctgatccg ctccgtctcg	660
	ccagcaggct gggtcattgc ggacaaaact ggtgcctcta agcgtggtgc gcgtggtatc	720
	gtcgcgtgc tgggtccgaa caacaaagcc gaacgtattg tggttatcta tctgcgcgac	780
	accccgcaa gcattggcca gcgcaaccag caaattgcgg gcattggtgc ggcaactgatt	840
	gagcactggc agcgttaacg ccggcg	866
	<210> 12	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> /note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400> 12	
	tcgcctcgag gcgagccgc aaccgctgga	30
[0003]	<210> 13	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> /note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400> 13	
	aatcgaattc ttaacgtgc cagtgtcaa tc	32
	<210> 14	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> /note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400> 14	
	gattgagcac tggcagcgtt aagaattcga tt	32
	<210> 15	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> /note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400> 15	
	cgctctcgag agcgtccgc tgiacgaca aacg	34
	<210> 16	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

[0004]	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	16	
		aatcgaattc ttacagaccg tcggtgacaa tc	32
	<210>	17	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	17	
		gccctcgagg gcgaggcccc ggcggatcgc	30
	<210>	18	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	18	
		tgagaattct cagcgcttca gcggcacct	29
	<210>	19	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	19	
		ttcactgcag tgaacgttgc gaagcaacgg c	31
	<210>	20	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	20	
		tcgagatcc tcgagagcaa aaacagggaag gcaaaatgcc g	41
	<210>	21	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	21	
		ccgtctagac ggaatgcctt ttgcgtttc	30
	<210>	22	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	22	
		aatcgaattc ttactgacca ttaacgccca agc	33
	<210>	23	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

[0005]	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	23 aatcgaattc ttaacgtgc cagtgtcaa tc	32
	<210>	24	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	24 aatcgaattc ttacagaccg tcggtgacaa tc	32
	<210>	25	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	25 gaattcgcta gcccaaaaa acgg	24
	<210>	26	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	26 cgtcttgctc caggccgcga ttaaattcc	29
	<210>	27	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	27 tcggggcctg gagcaagacg tttc	24
	<210>	28	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	28 tcacgtagcg atagcggag	19
	<210>	29	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	29 cgcgagaccc acgcttacgg gctccaga	28
	<210>	30	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

[0006]	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	30	
		ctgccttga tagttggga ccgga	25
	<210>	31	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	31	
		cggttccaa ctatcaaggc gagt	24
	<210>	32	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	32	
		gacattgccg tcactgcgtc t	21
	<210>	33	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	33	
		tcacgtagcg atagcggag	19
	<210>	34	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	34	
		gtaactgcc ttgatagttg ggaaccggag ctgaatgaag c	41
	<210>	35	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	35	
		gcgggaccaa agccatgaca	20
	<210>	36	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	36	
		accgcgagac ccacgttac cggtccaga tttatcagca ataaacc	47
	<210>	37	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

[0007]	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	37	
		gtaagaattc ttaccaatgc ttaatcagtg aggc	34
	<210>	38	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	38	
		cogtctagac ggatggcett ttgctgttc	30
	<210>	39	
	<211>	875	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	39	
		atgggccatc atcatcatca tcacagcagc gccctgggaag ttctgttcca ggggccccagc	60
		gtcccgctgt acgcacaaac ggccgacgtg caacagaaac tggcggagtt ggaacgtcag	120
		agcgggtggcc gtttgggtgt agccctgate aataccgcgg acaatagcca aattctgtat	180
		cgtgcggacg aacgcttcgc gatgtgcagc acgagcaagg tgatggccgc tgcggccgtt	240
		cigaagaat cagagagcga gccgaacttg ctgaatcagc gcgttgagat caagaagtcg	300
		gatctggtga actataaccc tatcgcggaa aaacatgtca acggcaccat gtccctggca	360
		gagctgagcg cggtctcggtt gcagtactct gataacgtcg caatgaataa actgatcgca	420
		cacgtcgggtg gccagcaag cgtgaccgcc ttgctgcgtc aactgggcga tgaactttt	480
		cgtctggatc gtaccgaacc gacctgaat acggcaatc cgggtgatcc gcgcgacacg	540
		acgagcccgc gtgcaatggc acagaccctg cgcaacctga ccctgggtaa agcgtgggc	600
		gatagccaac gtgcgcagct ggttacgtgg atgaaggta acaccaccgg tgcggccagc	660
		attcaagcgg gcctgccgcg cagctgggtt gttgtgata aaactggctc cggtggttat	720
		ggtaccacga atgacatcgc ggtattttg ccgaaggacc gtgcgccgtt gatcctggtg	780
		acctacttca cccagccgca gccgaaagct gagtctcgcc gtgacgtgct ggcgagcgca	840
		gctaagattg tcaccgacgg tctgtaacgc cggcgc	875
	<210>	40	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	40	
		tgccttcctg tttttgctct cgag	24
	<210>	41	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	/note="人工序列描述: 合成的多核苷酸"	
	<400>	41	
		tggagccggt aagcgtgggt ctgcggt	28

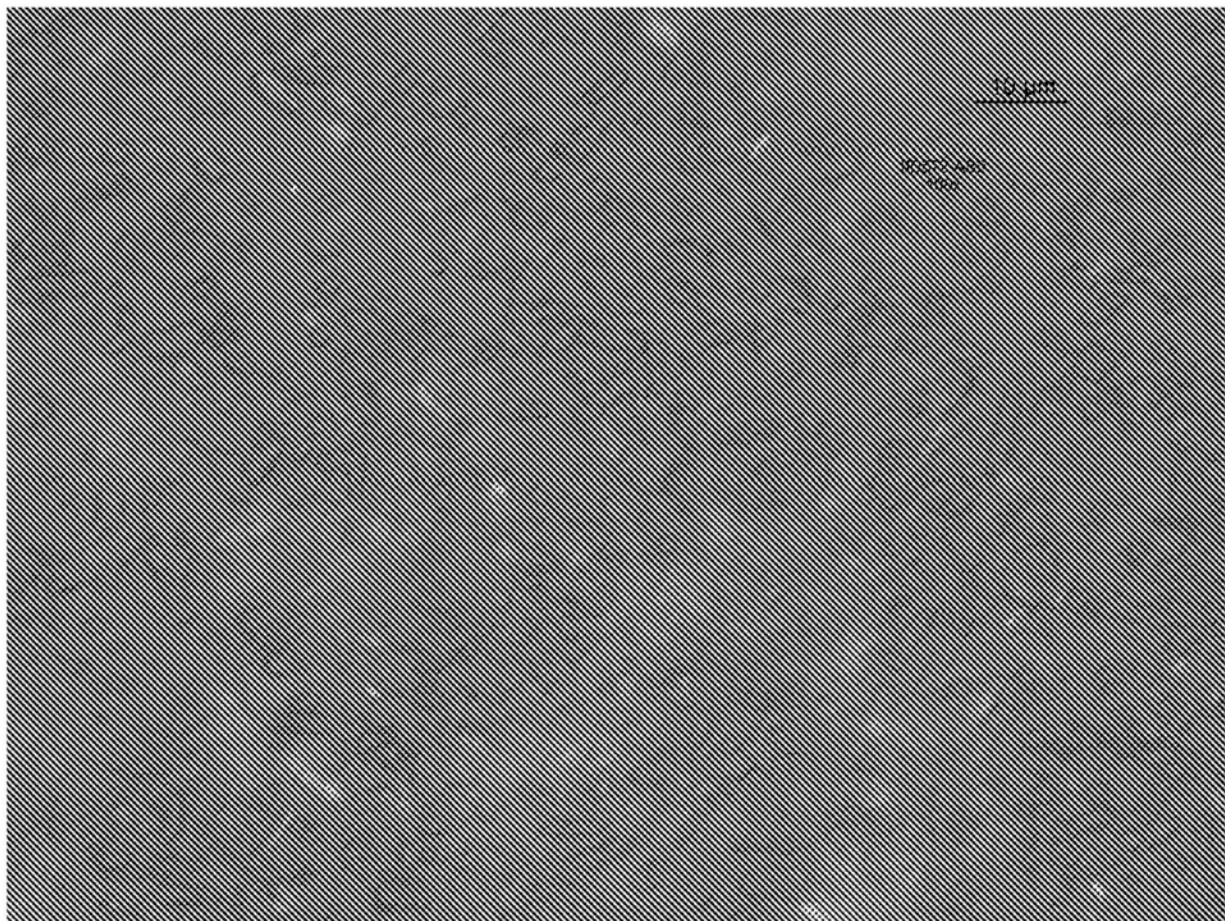


图1. 式 (VII) 化合物的结晶形式的扫描电子显微镜图像

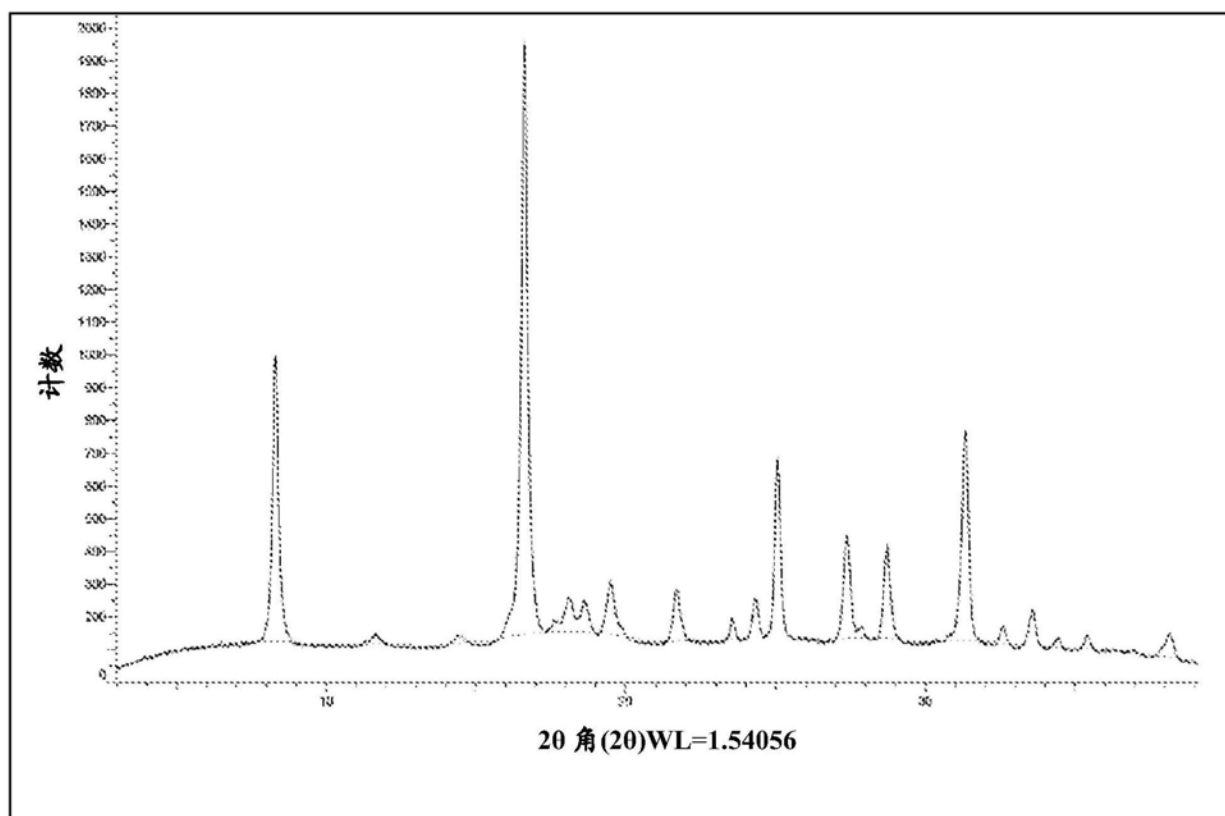
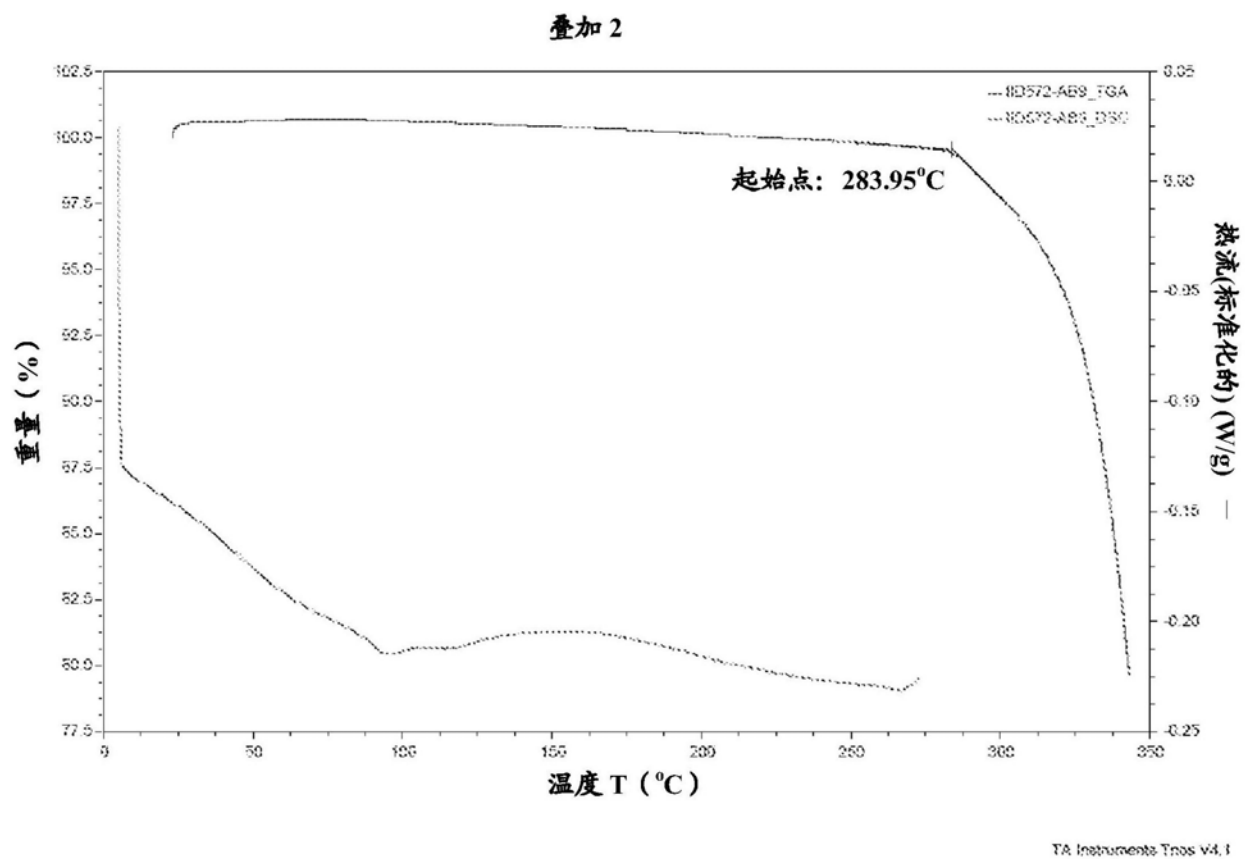


图2. 结晶的式 (VII) 化合物的XRPD图谱



DSC: 上部曲线

TGA: 下部曲线

图3. 结晶的式 (VII) 化合物的热重分析和DSC