



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102361855 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201080012602. 9

(22) 申请日 2010. 03. 19

(30) 优先权数据

61/162, 148 2009. 03. 20 US

61/246, 303 2009. 09. 28 US

61/248, 565 2009. 10. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 09. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/028069 2010. 03. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/108162 EN 2010. 09. 23

(73) 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 J·德马堤 A·R·鲁克

B·纽伯特-兰吉尔 M·特鲁多

S·罗伊珀 M·P·瑞恩

D·M·L·亚普 B·R·克鲁格

P·D·J·格鲁滕休斯

F·F·范格尔 M·C·伯特菲尔德

G·佐罗卡尔尼克

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 王贵杰

(51) Int. Cl.

C07D 215/233(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007134279 A2, 2007. 11. 22, 第 17-21 页.

WO 2007106537 A2, 2007. 09. 20, 第 110 页 Scheme 5.

WO 2006002421 A2, 2006. 01. 05, 第 229-240 页.

WO 2006002421 A2, 2006. 01. 05, 第 229-240 页.

Takuo Hama, 等. Palladium-Catalyzed *r*-Arylation of Esters and Amides under More Neutral Conditions. 《J. Am. Chem. Soc.》. 2003, 第 125 卷 (第 37 期), 第 11176 - 11177 页.

Takuo Hama, 等. Palladium-Catalyzed *r*-Arylation of Esters and Amides under More Neutral Conditions. 《J. Am. Chem. Soc.》. 2003, 第 125 卷 (第 37 期), 第 11176 - 11177 页.

Mark P. Wentland, 等. Mammalian Topoisomerase II Inhibitory Activity of 1-Cyclopropyl-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-7-(2, 6-dimethyl-4-pyridinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic Acid and Related Derivatives. 《J. Med. Chem.》. 1993, 第 36 卷 (第 19 期), 第 2802 页 Scheme I.

审查员 陈昊

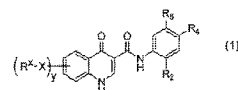
权利要求书4页 说明书72页

(54) 发明名称

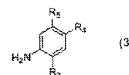
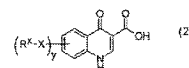
囊性纤维化跨膜传导调节因子的调节剂的制备方法

(57) 摘要

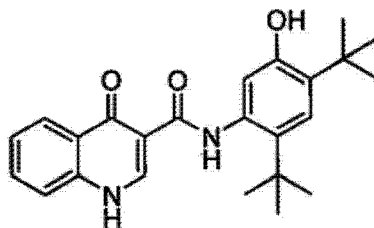
本发明提供了式 1 化合物的制备方法, 所述方法包括使式 2 的羧酸与式 3 的苯胺在偶合剂的



存在下偶合。



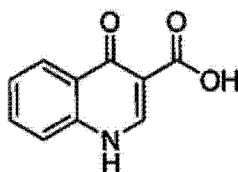
1. 化合物 34 的制备方法，



化合物 34

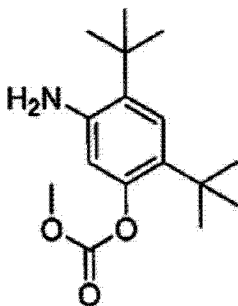
包括：

(a) 使化合物 26



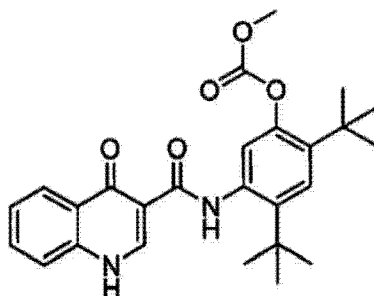
化合物 26

与化合物 32



化合物 32

在 **T3P®** 和吡啶的存在下使用 2- 甲基四氢呋喃作为溶剂反应，其中将反应温度维持在 42℃ -53℃，且其中使反应进行至少 2 小时，得到化合物 33



化合物 33;

(b) 用 NaOMe/MeOH 在 2- 甲基四氢呋喃中处理化合物 33 ;和

(c) 在乙腈和水的混合物中形成化合物 34 的淤浆。

2. 权利要求 1 的方法，其中使反应进行至少 6 小时。

3. 权利要求 1 的方法，其中乙腈与水之比为 9:1。

4. 权利要求 1 的方法，该方法进一步包括将淤浆加热至 73℃ -83℃ 的温度。

5. 权利要求 1 的方法, 其中化合物 34 在淤浆中至少 3 小时。

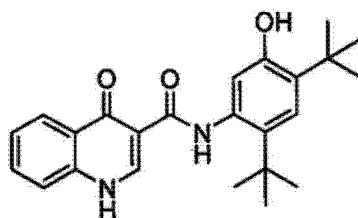
6. 权利要求 1 的方法, 该方法进一步包括在乙酸异丙酯中形成化合物 34 的淤浆。

7. 权利要求 5 或 6 的方法, 该方法进一步包括将淤浆加热至回流温度。

8. 权利要求 1 的方法, 该方法进一步包括将化合物 34 溶于 2- 甲基四氢呋喃和 0.1N HCl 的双相溶液; 搅拌该双相溶液; 从该双相溶液中分离有机相; 过滤并且从所述有机相中除去固体物质; 使用蒸馏将所述有机相的体积减少 50%; 进行三次如下操作: 将 MeOAc、EtOAc、IPAc、t-BuOAc、四氢呋喃、Et₂O 或甲基 - 叔丁基醚加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100% 并且使用蒸馏将有机相的体积减少 50%; 将 MeOAc、EtOAc、IPAc、t-BuOAc、四氢呋喃、Et₂O 或甲基 - 叔丁基醚加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100%; 将有机相加热至回流温度并且将该回流温度维持至少 5 小时时间; 并且在 4.5 小时 - 5.5 小时时间期限内将有机相冷却至 -5°C 至 5°C 的温度。

9. 权利要求 1 的方法, 该方法进一步包括用 1.2N HCl 使反应混合物猝灭; 由此生成双相混合物; 搅拌该双相混合物; 从所述双相混合物中分离有机相; 将 0.1N HCl 加入到有机层中, 由此生成双相混合物; 搅拌该双相混合物; 分离有机相; 过滤并且从所述有机相中除去固体物质; 使用蒸馏将有机相的体积减少 50%; 进行三次如下步骤: 将乙腈加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100% 并且将有机相的体积减少 50%; 通过加入乙腈、然后加入水将有机相的体积增加 100%, 形成淤浆, 其中最终溶剂比为 9:1 乙腈 / 水; 将该淤浆加热至 73°C - 83°C 的温度; 将该淤浆搅拌至少 5 小时; 并且将所述淤浆冷却至 20°C - 25°C 的温度; 过滤并且从该淤浆中除去固体物质; 用具有 20°C - 25°C 的温度的乙腈将该固体物质洗涤 4 次; 并且在 45°C - 55°C 的温度在真空下干燥该固体物质。

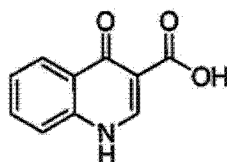
10. 化合物 34 的制备方法,



化合物 34

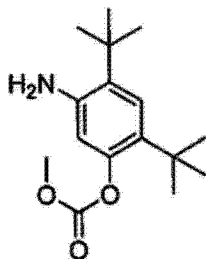
包括步骤:

(a) 使化合物 26



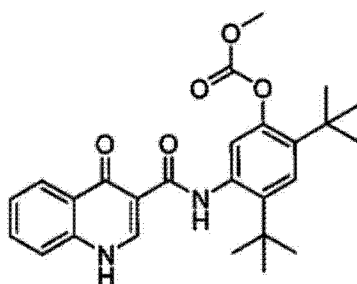
化合物 26

与化合物 32



化合物 32

在 **T3P®** 和吡啶的存在下使用 2- 甲基四氢呋喃作为溶剂反应, 其中将反应温度维持在 42°C -53°C, 且其中使反应进行至少 6 小时, 得到化合物 33

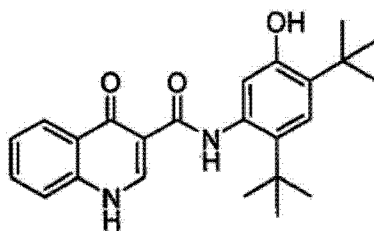


化合物 33;

- (b) 用 NaOMe/MeOH 在 2- 甲基四氢呋喃中处理化合物 33 ;
- (c) 将 1. 2N HCl 溶液加入到反应混合物中, 由此形成第一双相混合物 ;
- (d) 从所述第一双相混合物中分离有机层 ;
- (e) 将 0. 1N HCl 溶液加入到所述第一双相混合物的有机层中, 由此形成第二双相混合物 ;
- (f) 从所述第二双相混合物中分离有机层 ;
- (g) 通过使用蒸馏将第二双相混合物的有机层中的溶剂的量减少 50% ;
- (h) 通过添加乙腈, 将所述第二双相混合物的有机层的体积增加 100% ;
- (i) 将步骤 (g) 至步骤 (h) 进行额外两次 ;
- (j) 将水加入到所述第二双相混合物的有机层中形成化合物 34 在乙腈和水中的淤浆, 其中所述淤浆具有的乙腈 / 水之比为 9:1 ;
- (k) 将该淤浆加热至 73°C -83°C 的温度至少 3 小时 ;
- (l) 将所述淤浆冷却至 20°C -25°C 的温度 ; 和
- (m) 过滤并且从该淤浆中除去固体物质。

11. 权利要求 10 的方法, 该方法进一步包括将化合物 34 溶于 2- 甲基四氢呋喃和 0. 1N HCl 的双相溶液 ; 搅拌该双相溶液 ; 从所述双相溶液中分离有机相 ; 过滤并且从所述有机相中除去固体物质 ; 使用蒸馏将所述有机相的体积减少 50% ; 进行三次如下操作 : 将 MeOAc、EtOAc、IPAc、t-BuOAc、四氢呋喃、Et₂O 或甲基 - 叔丁基醚加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100% 并且使用蒸馏将有机相的体积减少 50% ; 将 MeOAc、EtOAc、IPAc、t-BuOAc、四氢呋喃、Et₂O 或甲基 - 叔丁基醚加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100% ; 将有机相加热至回流温度并且将该回流温度维持至少 5 小时时间 ; 并且在 4. 5 小时 -5. 5 小时时间期限内将有机相冷却至 -5°C 至 5°C 的温度。

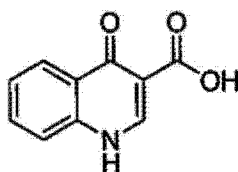
12. 化合物 34 的制备方法，



化合物 34

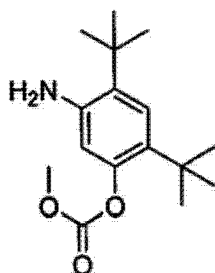
包括步骤：

(a) 使化合物 26



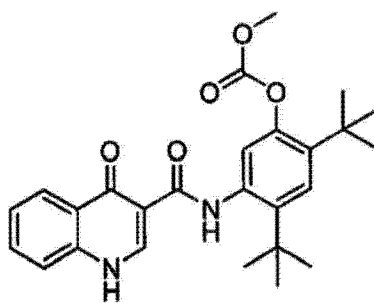
化合物 26

与化合物 32



化合物 32

在 **T3P®** 和吡啶的存在下使用 2- 甲基四氢呋喃作为溶剂反应，其中将反应温度维持在 42℃ -53℃，且其中使反应进行至少 2 小时，得到化合物 33



化合物 33;

(b) 通过用 NaOMe/MeOH 在 2- 甲基四氢呋喃中处理化合物 33，从化合物 33 的酚氧原子上水解甲氧基羰基保护基，以提供化合物 34；和

(c) 形成化合物 34 在乙腈和水中的淤浆，提供纯形式的化合物 34。

囊性纤维化跨膜传导调节因子的调节剂的制备方法

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求 2009 年 3 月 20 日提交的美国临时申请顺序号 US61/162,148、2009 年 9 月 28 日提交的美国临时申请顺序号 US61/246,303 和 2009 年 10 月 5 日提交的美国临时申请顺序号 US61/248,565 的优先权。将前述临时申请各自完整引入本文参考。

[0003] 本发明技术领域

[0004] 本发明涉及囊性纤维化跨膜传导调节因子（“CFTR”）的制备方法。

[0005] 发明背景

[0006] 囊性纤维化（CF）在美国是一种影响约 30,000 儿童和成年人并且在欧洲影响约 30,000 儿童和成年人的隐性遗传疾病。尽管在治疗 CF 方面已经取得了进展，但是无法治愈。

[0007] CF 因编码负责有助于调节各种组织中盐和水吸收和分泌的上皮氯离子通道的囊性纤维化跨膜传导调节因子（CFTR）基因中的突变导致。称作增加 CFTR 通道开放可能性的增强剂的小分子药物代表治疗 CF 的一种潜在治疗策略。

[0008] 特别地，CFTR 是在多种细胞类型（包括吸收和分泌上皮细胞）中表达的 cAMP/ATP- 介导的阴离子通道，其中它调节跨膜的阴离子流通，并调节其它离子通道和蛋白质的活性。在上皮细胞中，CFTR 的正常功能对于维持包括呼吸和消化组织在内的整个身体的电解质转运是非常关键的。CFTR 是由约 1480 个氨基酸构成的，这些氨基酸编码由跨膜区的串联重复体构成的蛋白质，每个重复体包含 6 个跨膜螺旋和 1 个核苷酸结合域。2 个跨膜区通过一个具有多个磷酸化位点的大的、极性的、调节性（R）- 域相连，所述磷酸化位点调节通道活性和细胞运输。

[0009] 已经鉴定出了编码 CFTR 的基因并测定了其序列（参见 Gregory, R. J. 等人，(1990)Nature 347 :382-386 ;Rich, D. P. 等人，(1990)Nature 347 :358-362），(Riordan, J. R. 等人，(1989)Science 245 :1066-1073)。这个基因的缺陷引起 CFTR 突变，导致囊性纤维化（“CF”），是人体最常致命的遗传性疾病。在美国，囊性纤维化影响约 2,500 分之一的婴儿。在一般的美国人口中，高达 1 千万的人携带单独 1 个这样的缺陷基因，但没有明显的不良效果。与此不同的是，携带 2 个与 CF 有关的基因的个体会发生 CF 的致虚弱和致命作用，包括慢性肺病。

[0010] 在患囊性纤维化的患者中，在呼吸上皮中内源性表达的 CFTR 突变导致顶膜的阴离子分泌减少，使离子和液体转运失衡。所导致的阴离子转运的减少使得 CF 患者的肺粘液蓄积增加并伴随最终导致死亡的微生物感染。除了呼吸性疾病，CF 患者典型地具有胃肠方面的问题和胰功能不全，如果不治疗的话，会导致死亡。此外，大部分患有囊性纤维化的男性都不能生育，而患囊性纤维化的女性则生育力降低。与 2 个和 CF 有关的基因所带来的严重后果不同的是，携带有 1 个与 CF 有关的基因的个体显示出对霍乱和腹泻导致的脱水的抵抗力增强——可能解释了 CF 基因在这个人群中的相对高频率出现。

[0011] CF 染色体的 CFTR 基因的序列分析显示了很多导致疾病的突变。(Cutting, G. R. 等人，(1990)Nature 346 :366-369 ;Dean, M. 等人，(1990)Cell 61 :863 :870 ; 和 Kerem,

B-S. 等人, (1989)Science245 :1073-1080 ;Kerem, B-S 等人, (1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA87 :8447-8451)。迄今为止,已经鉴定出了 1000 种以上的引起疾病的 CF 基因突变 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>)。最常见的突变是在 CFTR 氨基酸序列的 508 位上苯丙氨酸的缺失,一般称作 $\Delta F508$ -CFTR。这种突变在约 70% 的囊性纤维化病例中都会发生,与严重的疾病有关。

[0012] $\Delta F508$ -CFTR 中第 508 位残基的缺失妨碍了初生蛋白的正确折叠。这导致该突变蛋白不能退出 ER,和通过质膜。结果,膜中存在的通道数量远小于表达野生型 CFTR 的细胞中所观察到的数量。除了运输受损,该突变导致通道门控缺陷。这样加起来,膜中通道数量减少和门控缺陷导致通过上皮的阴离子转运减少,导致离子和液体转运出现缺陷。(Quinton,P. M. (1990),FASEB J. 4 :2709-2727)。但是,研究已经显示出,尽管比野生型 CFTR 少,膜中 $\Delta F508$ -CFTR 的数量减少是有用的。(Dalemans 等人, (1991), Nature Lond. 354 :526-528 ;Denning 等人, 出处同前 ;Pasyk 和 Foskett(1995), J. Cell. Biochem. 270 :12347-50)。除了 $\Delta F508$ -CFTR,导致运输、合成和 / 或通道门控缺陷的其它的引起疾病的 CFTR 突变可以被向上或向下调节,以改变阴离子分泌并改变疾病进程和 / 或严重性。

[0013] 尽管除了阴离子外 CFTR 还转运多种分子,但是显然,这种作用(转运阴离子)代表了跨上皮细胞转运离子和水的重要机制中的一个要素。其它要素包括上皮 Na^+ 通道、ENaC、 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共转运体、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和基底外侧膜 K^+ 通道,它们负责将氯离子吸收到细胞中。

[0014] 这些要素一起运作,以通过它们在细胞中的选择性表达和定位实现跨上皮细胞的定向转运。通过存在于顶膜上的 ENaC 和 CFTR 与在细胞的基底外侧表面上表达的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和 Cl^- 通道之间的协调性活性,发生了氯离子的吸收。氯离子从腔侧的继发性主动转运导致细胞内的氯离子蓄积,接着被动地通过 Cl^- 通道离开细胞,导致矢量转运。基底外侧表面上的 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共转运体、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和基底外侧膜 K^+ 通道和腔侧上的 CFTR 的排列,通过腔侧上的 CFTR 来协调氯离子的分泌。由于水可能从不自己主动转运,因此它依靠钠和氯离子的总体流量产生的微小的跨上皮渗透梯度流过上皮。

[0015] 如上讨论,据认为, $\Delta F508$ -CFTR 中 508 残基的缺失会妨碍初生蛋白正确折叠,导致该突变蛋白不能退出 ER,并通过质膜。结果,质膜中存在的成熟蛋白量不足,上皮组织内的氯离子转运显著减少。事实上,经由 ER 机制加工 ABC 转运体的 ER 缺陷的这种细胞现象已经显示出,其不仅是 CF 疾病的潜在基础,也是范围广泛的其它独立和遗传疾病的潜在基础。

[0016] 因此,需要 CFTR 活性的调节剂及其组合物,其可以用于调节哺乳动物的细胞膜中的 CFTR 的活性。

[0017] 需要使用这种 CFTR 活性调节剂治疗 CFTR 中突变导致的疾病的方法。

[0018] 需要在哺乳动物的离体细胞膜中调节 CFTR 活性的方法。

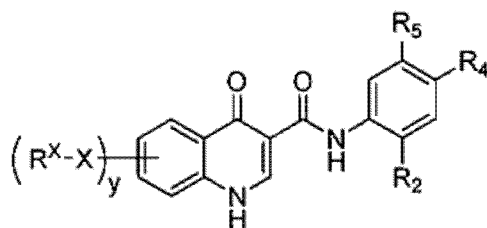
[0019] 还需要调节 CFTR 活性的化合物的制备方法。

[0020] 发明概述

[0021] 一般而言,本发明提供了用作 CFTR 调节剂的化合物的制备方法。

[0022] 在一个方面中,本发明提供了式 1 化合物的制备方法,

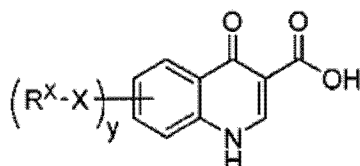
[0023]



[0024] 式 1

[0025] 该方法包括使式 2 的羧酸

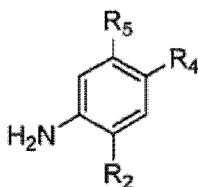
[0026]



[0027] 式 2

[0028] 与式 3 的苯胺

[0029]



[0030] 式 3

[0031] 在偶合剂的存在下偶合,所述偶合剂选自 2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**。

[0032] R_2 和 R_4 各自独立地选自氢、CN、 CF_3 、卤素、 C_{1-6} 直链或支链烷基、3-12 元脂环族基团、苯基、 C_{5-10} 杂芳基或 C_{3-7} 杂环基,其中所述杂芳基或杂环基具有至多 3 个选自 O、S 或 N 的杂原子,且 C_{1-6} 直链或支链烷基、3-12 元脂环族基团、苯基、 C_{5-10} 杂芳基或 C_{3-7} 杂环基各自独立和任选地被至多 3 个取代基取代,所述取代基选自 $-OR'$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 SR' 、 $S(O)R'$ 、 SO_2R' 、 $-SCF_3$ 、卤素、CN、 $-COOR'$ 、 $-COR-$ 、 $-O(CH_2)_2N(R')(R')$ 、 $-O(CH_2)N(R')(R')$ 、 $-CON(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2OR'$ 、 $-(CH_2)OR'$ 、 CH_2CN 、任选取代的苯基或苯氧基、 $-N(R')(R')$ 、 $-NR'C(O)OR'$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-(CH_2)_2N(R')(R')$,或 $-(CH_2)N(R')(R')$ 。

[0033] R_5 各自独立地选自氢、 $-OH$ 、 NH_2 、CN、 CHF_2 、 NHR' 、 $N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $NHC(O)OR'$ 、 $NHSO_2R'$ 、 $-OR'$ 、 $OC(O)OR'$ 、 $OC(O)NHR'$ 、 $OC(O)NR'_2$ 、 CH_2OH 、 $CH_2N(R')_2$ 、 $C(O)OR'$ 、 SO_2NHR' 、 $SO_2N(R')_2$ 或 $CH_2NHC(O)OR'$ 。

[0034] 或 R_4 和 R_5 一起形成包含 0-3 个选自 N、O 或 S 的杂原子的 5-7 元环,其中所述环任选地被至多 3 个 R_3 取代基取代。

[0035] X 各自独立地是键或任选取代的 C_{1-6} 亚烷基链,其中 X 的至多 2 个亚甲基单元任选和独立地被 $-CO-$ 、 $-CS-$ 、 $-COCO-$ 、 $-CONR'-$ 、 $-CONR'NR'-$ 、 $-CO_2-$ 、 $-OCO-$ 、 $-NR'CO_2-$ 、 $-O-$ 、 $-NR'CONR'-$ 、 $-OCONR'-$ 、 $-NR'NR'-$ 、 $-NR'NR'CO-$ 、 $-NR'CO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR'-$ 、 $-SO_2NR'-$ 、 $NR'SO_2-$ 或 $-NR'SO_2NR'-$ 替代。

[0036] R^X 各自独立地是 R' 、卤素、 NO_2 、CN、 CF_3 或 OCF_3 。

[0037] y 是 0-4 的整数。

[0038] R' 各自独立地选自氢或任选取代的基团,所述基团选自 C₁₋₈脂族基团、具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或具有 0-5 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 8-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的双环环系;或两次出现的 R' 与它们所连接的原子一起形成具有 0-4 个独立地选自 N、O 或 S 的杂原子的任选取代的 3-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或双环。

[0039] R₃各自独立地是 -C₁-C₃烷基、C₁-C₃全卤代烷基、-O(C₁-C₃烷基)、-CF₃、-OCF₃、-SCF₃、-F、-Cl、-Br、-COOR'、-COR'、-O(CH₂)₂N(R')(R')、-O(CH₂)N(R')(R')、-CON(R')(R')、-(CH₂)₂OR'、-(CH₂)OR'、任选取代的单环或双环芳族环、任选取代的芳基砜、任选取代的 5- 元杂芳基环、-N(R')(R')、-(CH₂)₂N(R')(R')或 -(CH₂)N(R')(R')。

[0040] 该方面的实施方案包括一个或多个如下特征。R₅独立地是 -OC(O)OR'、-OC(O)NHR' 或 -OC(O)N(R')₂, 且 R' 不是氢;R₄或 R₂的至少一个是被 -COOR' 或 -CON(R')(R') 取代的 C₁₋₆直链或支链烷基,且 R' 不是氢。该方法进一步包括裂解 -OC(O)OR'、-OC(O)NHR' 或 -OC(O)N(R')₂基团,形成 -OH。该方法进一步包括水解各 -COOR' 或 -CON(R')₂基团,形成 -COOH。通过用醇溶剂在碱例如 NaOH、KOH 或甲醇钠的存在下处理式 1 化合物进行水解。用于水解的醇溶剂是甲醇。式 2 化合物与式 3 化合物偶合产生式 1 化合物在碱例如 K₂CO₃、Et₃N、NMM、吡啶或 DIEA 的存在下进行。式 2 化合物与式 3 化合物偶合产生式 1 化合物在溶剂例如 EtOAc、IPAc、THF、MEK、NMP、乙腈、DMF 或 2- 甲基四氢呋喃的存在下进行。式 2 化合物与式 3 化合物偶合产生式 1 化合物在维持在约 10℃ -78℃、例如约 20℃ -30℃、约 40℃ -50℃和约 42℃ -53℃的反应温度下进行。将偶合反应搅拌至少 2 小时,例如至少 70 小时或至少 3 天。

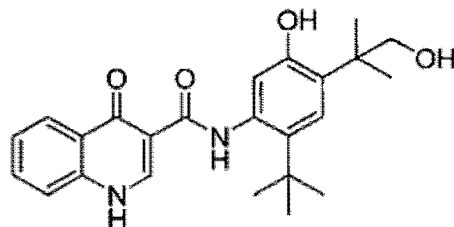
[0041] 在一些实施方案中,R₅独立地是 -OC(O)OR'、-OC(O)NHR' 或 -OC(O)N(R')₂, 且 R' 不是氢;并且 R₂和 R₄各自独立地选自氢、CF₃、C₁-C₆直链或支链烷基、3-12 元脂环族基团或苯基。

[0042] 在一些进一步的实施方案中,R₅独立地是 -OC(O)OR', 且 R' 不是氢;并且 R₂和 R₄各自独立地是 C₁-C₆直链或支链烷基或 3-12 元脂环族基团。

[0043] 在一些实施方案中,R₂和 R₄是叔丁基。

[0044] 在另一个方面中,本发明提供了化合物 27 的制备方法,

[0045]

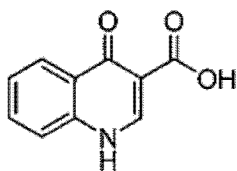


[0046] 化合物 27

[0047] 包括:

[0048] 使化合物 26

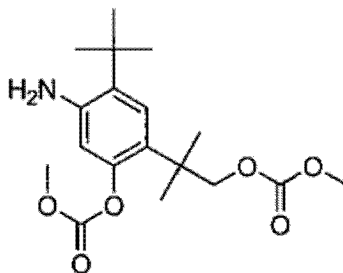
[0049]



[0050] 化合物 26

[0051] 与化合物 13

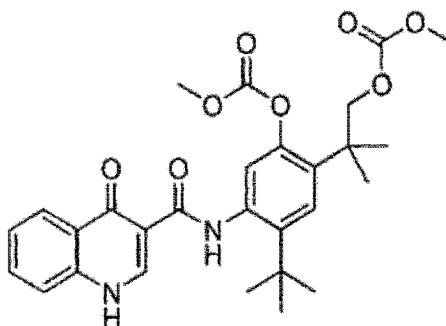
[0052]



[0053] 化合物 13

[0054] 在 EDCI、HOBT 和 DIEA 的存在下使用 DMF 作为溶剂偶合, 其中将反应温度维持在约 20°C -30°C, 并且使反应进行至少 70 小时, 得到化合物 14

[0055]

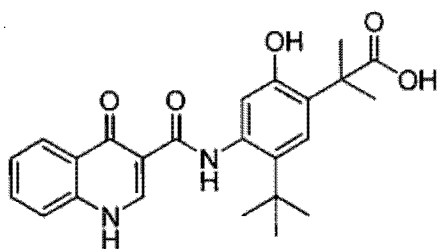


[0056] 化合物 14 ;和

[0057] 用 KOH 在甲醇中处理化合物 14。

[0058] 在另一个方面中, 本发明提供了化合物 28 的制备方法,

[0059]

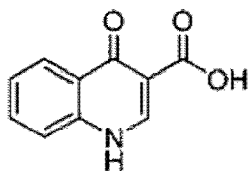


[0060] 化合物 28

[0061] 包括 :

[0062] 使化合物 26

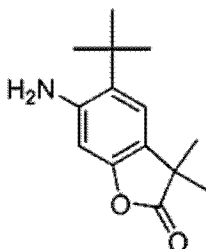
[0063]



[0064] 化合物 26

[0065] 与化合物 20

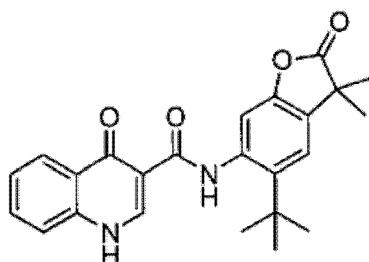
[0066]



[0067] 化合物 20

[0068] 在 HATU 和 DIEA 的存在下使用乙腈作为溶剂偶合, 其中将反应温度维持在约 40°C -50°C, 并且其中使反应进行至少 3 天, 得到化合物 21

[0069]

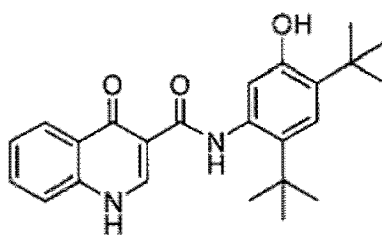


[0070] 化合物 21 ;和

[0071] 用 NaOH 在甲醇中处理化合物 21。

[0072] 在另一个方面中, 本发明提供了化合物 34 的制备方法,

[0073]

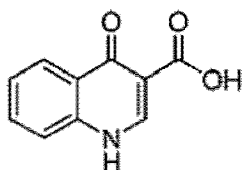


[0074] 化合物 34

[0075] 包括 :

[0076] 使化合物 26

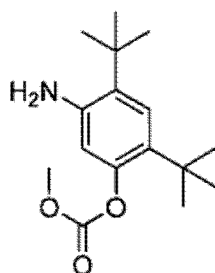
[0077]



[0078] 化合物 26

[0079] 与化合物 32

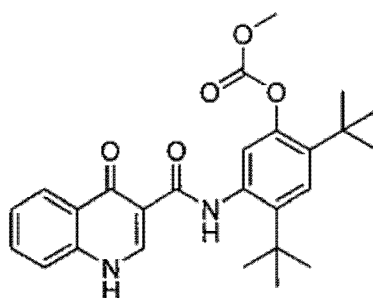
[0080]



[0081] 化合物 32

[0082] 在**T3P®**和吡啶的存在下使用 2-甲基四氢呋喃作为溶剂偶合,其中将反应温度维持在约 42℃ -53℃,并且其中使反应进行至少 2 小时,得到化合物 33

[0083]



[0084] 化合物 33 ;

[0085] 用 NaOMe/MeOH 在 2-甲基四氢呋喃中处理化合物 33。

[0086] 在一个实施方案中,该方法进一步包括在乙腈和水的混合物中形成化合物 34 的淤浆的步骤,其中化合物 34 的固体形式转化成化合物 34。

[0087] 上述方面的实施方案包括一个或多个如下特征。该方法进一步包括将化合物 34 溶于 2-甲基四氢呋喃和 0.1N HCl 的双相溶液,搅拌该双相溶液。该方法进一步包括从所述双相溶液中分离有机相。该方法进一步包括过滤并且从所述有机相中除去固体物质。该方法进一步包括使用蒸馏将所述有机相的体积减少约 50%。该方法进一步包括进行三次如下操作:将 MeOAc、EtOAc、IPAc、t-BuOAc、四氢呋喃 (THF)、Et₂O 或甲基-叔丁基醚 (MTBE) 加入到有机相中,直到所述有机相的体积增加 100% 并且使用蒸馏将有机相的体积减少 50%。该方法进一步包括将 MeOAc、EtOAc、IPAc、t-BuOAc、四氢呋喃 (THF)、Et₂O 或甲基-叔丁基醚 (MTBE) 加入到有机相中,直到所述有机相的体积增加 100%。该方法进一步包括将有机相加热至回流温度并且将该回流温度维持至少约 5 小时时间。该方法进一步包括在 4.5 小时 -5.5 小时时间期限内将有机相冷却至 -5℃ 至 5℃ 的温度。

[0088] 在另一个方面中,本发明提供了通过本文所述任意方法生产的化合物。

[0089] 在进一步的方面中,本发明提供了药物组合物,其包含通过本文所述任意方法生产的化合物。

[0090] 在更进一步的方面中,本发明提供了调节生物样品中 CFTR 活性的方法,所述方法包括使该生物样品与通过本文所述任意方法生产的化合物接触的步骤。

[0091] 在另一个方面中,本发明还提供了治疗患者疾病或减轻其严重性的方法,所述方法包括对该患者给予如本文所定义的组合物中的一种,且所述疾病选自囊性纤维化、哮喘、

吸烟诱发的 COPD、慢性支气管炎、鼻窦炎、便秘、胰腺炎、胰功能不全、先天性双侧输精管缺失 (CBAVD) 导致的男性不育症、轻度肺病、特发性胰腺炎、变应性支气管肺曲菌病 (ABPA)、肝病、遗传性肺气肿、遗传性血色病、凝血 - 纤溶缺陷, 例如蛋白质 C 缺乏症、1 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷, 例如家族性高胆固醇血症、1 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积症, 例如 I- 细胞病 / 假性胡尔勒综合征、粘多糖症、桑德霍夫 / 泰 - 萨克斯病、克 - 纳综合征 II 型、多内分泌腺病 / 高胰岛素血症、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺功能减退、黑素瘤、聚糖病 CDG 1 型、先天性甲状腺功能亢进症、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 缺乏症、尿崩症 (DI)、神经生长性 DI (neurophyseal DI)、肾性 DI、夏 - 马 - 图综合征、佩 - 梅病、神经变性疾病, 例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、匹克病、若干聚谷氨酰胺神经性障碍, 例如亨廷顿病、I 型脊髓小脑性共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩和肌强直性营养不良、以及海绵状脑病, 例如遗传性克 - 雅病 (由朊病毒蛋白加工缺陷导致)、法布里病、格 - 斯 - 施综合征、COPD、干眼病或斯耶格伦病、骨质疏松症、骨质减少、骨愈合和骨生长 (包括骨修复、骨再生、减少骨质吸收和增加骨沉积)、戈勒姆综合征、氯化物通道病变, 例如先天性肌强直 (Thomson 和 Becker 形式)、III 型巴特综合征、登特病、惊跳病 (hyperreflexia)、癫痫症、惊跳病、溶酶体贮存病、安格曼综合征和原发性纤毛运动障碍 (PCD), 即纤毛结构和 / 或功能遗传障碍的术语, 包括具有左右转位的 PCD (也称作卡特金纳综合征)、不具有左右转位的 PCD 和纤毛发育不良。

[0092] 在一些实施方案中, 所述疾病是囊性纤维化。

[0093] 在另一个方面中, 本发明提供用于在体外或体内测定生物样品中 CFTR 或其片段的活性的试剂盒, 所述试剂盒包括:

[0094] 包含通过本文所述任意方法生产的化合物的组合物; 和

[0095] 用于如下内容的说明书:

[0096] 将该组合物与生物样品接触; 和

[0097] 测定所述 CFTR 或其片段的活性。

[0098] 在一些实施方案中, 所述试剂盒进一步包括用于下列内容的说明书:

[0099] 将另外的组合物与该生物样品接触;

[0100] 在所述另外的化合物存在下测定所述 CFTR 或其片段的活性; 和

[0101] 将在另外的化合物存在下的 CFTR 或其片段的活性与在式 1 的组合物存在下的 CFTR 或其片段的密度进行比较。

[0102] 有利地, 本发明相对于已知方法提供了以更高的收率和更高的纯度合成用作 CFTR 调节剂的化合物的方法。

[0103] 详细描述

[0104] I. 定义

[0105] 除非另有指示, 否则如下定义应适用。

[0106] 本文使用的术语“ABC- 转运体”是指 ABC- 转运蛋白或其包含至少一个结合域的片段, 其中所述蛋白或其片段存在于体内或体外。本文使用的术语“结合域”是指可以与调节剂结合的 ABC- 转运体上的一个区域。参见, 例如 Hwang, T. C. 等人, J. Gen. Physiol. (1998): 111 (3), 477-90。

[0107] 本文使用的术语“CFTR”是指囊性纤维化跨膜传导调节因子或其具有调节活性的突变体,包括但不限于 $\Delta F508$ CFTR 和 G551D CFTR(参见,例如, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, CFTR 突变体)。

[0108] 本文使用的术语“调节”是指以可测定量增加或减少。

[0109] 为了本发明的目的,根据元素周期表, CAS 版, Handbook of Chemistry and Physics, 第 75 版, 来鉴定化学元素。此外,在“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito:1999, 以及“March's Advanced Organic Chemistry”, 第 5 版, Ed.:Smith, M. B. 和 March, J., John Wiley&Sons, New York:2001 中描述了有机化学的一般原理,将其全部内容通过参考引入本文。

[0110] 如本文所述,本发明的化合物可以任选地被一个或多个取代基取代,例如一般上文示例的或以本发明的类型、亚类和种类为典型。应当理解,措辞“任选取代的”与措辞“取代或未取代的”是可互换使用的。一般而言,术语“取代”无论前面有无术语“任选”,都表示给定结构中的氢原子团被指定取代基的原子团所代替。

[0111] 除非另有指示,任选取代的基团可以在该基团每一可取代的位置上具有取代基,若任意给定结构中一个以上位置可以被一个以上选自指定组的取代基所取代,则取代基可以在每个位置上是相同或不同的。本发明所关注的取代基组合优选地是能形成稳定的或化学上可行的化合物的那些。

[0112] 本文中使用的短语“稳定的或化学上可行的”是指当出于本文所述的一种或多种目的而受到允许它们的生产、检测、优选回收、纯化、以及使用的条件处理时,基本上没有改变的化合物。在一些实施方案中,稳定的化合物或化学上可行的化合物是在没有水分或没有其它化学反应性条件的存在下,在 40℃或更低的温度保持至少一周时,基本上没有改变的化合物。

[0113] 本文所用的术语“脂族基”或“脂族基团”意指直链(即无支链)或支链、取代或未取代的烃链,其是完全饱和的或包含一个或多个不饱和单元;或是单环或双环烃,其是完全饱和的或包含一个或多个不饱和单元,但不是芳族的(本文也称作“碳环”、“脂环族基团”或“环烷基”),它具有单一的与分子其余部分连接的点。除非另有指定,否则脂族基团包含 1-20 脂族碳原子。在一些实施方案中,脂族基团包含 1-10 脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基团包含 1-8 脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基团包含 1-6 脂族碳原子,在其他实施方案中,脂族基团包含 1-4 脂族碳原子。在一些实施方案中,“脂环族基团”(或“碳环”或“环烷基”)意指单环 C_{3-8} 烃或双环或三环 C_{8-14} 烃,其是完全饱和的或包含一个或多个不饱和单元,但不是芳族的,具有单一的与分子其余部分连接的点,其中所述双环环系上的任意各环具有 3-7 个成员。适合的脂族基团包括但不限于直链或支链、取代或未取代的烷基、烯基、炔基及其混合物例如(环烷基)烷基、(环烯基)烷基或(环烷基)烯基。适合的环脂族基团包括环烷基、双环环烷基(例如十氢化萘)、桥连双环烷基例如降冰片基或 [2.2.2] 二环-辛基或桥连三环例如金刚烷基。

[0114] 本文所用的术语“杂脂族基团”意指脂族基团,其中一个或两个碳原子独立地被一个或多个氧、硫、氮、磷或硅替代。杂脂族基团可以是取代或未取代的、支链或无支链的、环状或无环的并且包括“杂环”、“杂环基”、“杂脂环族基团”或“杂环”基团。

[0115] 本文所用的术语“杂环”、“杂环基”、“杂脂环族基团”或“杂环化合物”意指非芳族

的单环、双环或三环环系,其中一个或多个环成员中的一个或多个环原子是独立选择的杂原子。杂环可以是饱和的或可以包含一个或多个不饱和键。在一些实施方案中,“杂环”、“杂环基”、“杂脂环族基团”或“杂环化合物”基团具有 3-14 个环成员,其中一个或多个环成员是独立地选自氧、硫、氮或磷的杂原子且环系中的各环包含 3-7 个环成员。

[0116] 术语“杂原子”意指氧、硫、氮、磷或硅(包括氮、硫、磷或硅的任意氧化形式;任意碱性氮的季铵化形式;或杂环的可取代氮例如 N(如在 3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或 NR^+ (如在 N-取代的吡咯烷基中))。

[0117] 本文所用的术语“不饱和的”意指结构部分具有一个或多个不饱和单元。

[0118] 本文所用的术语“烷氧基”或“烷硫基”意指如上述所定义的通过氧(“烷氧基”)或硫(“烷硫基”)原子与主碳链连接的烷基。

[0119] 本文所用的术语“卤代脂族基团”和“卤代烷氧基”意指脂族基团或烷氧基,视情况而定,可以被一个或多个卤原子取代。术语“卤素”或“卤代”意指 F、Cl、Br 或 I。卤代脂族基团的实例包括 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2-$ 或全卤代烷基例如 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 。

[0120] 单独或者作为更大结构部分“芳烷基”、“芳烷氧基”或“芳氧基烷基”的一部分使用的术语“芳基”意指单环、双环和三环环系,其总计具有 5-14 个环碳原子,其中系统中至少一个环是芳族的且其中系统中的各环包含 3-7 个环碳原子。术语“芳基”可以与术语“芳基环”互换使用。术语“芳基”还意指如下文定义的杂芳基环系。

[0121] 单独或者作为更大结构部分“杂芳烷基”或“杂芳烷氧基”的一部分使用的术语“杂芳基”意指单环、双环和三环环系,其总计具有 5-14 个环成员,其中系统中至少一个环是芳族的、系统中至少一个环包含一个或多个杂原子且其中系统中的各环包含 3-7 个环成员。术语“杂芳基”可以与术语“杂芳基环”或术语“杂芳族化合物”互换使用。

[0122] 芳基(包括芳烷基、芳烷氧基、芳氧基烷基等)或杂芳基(包括杂芳烷基和杂芳氧基等)可以包含一个或多个取代基。芳基或杂芳基的不饱和碳原子上的适宜取代基选自卤素; $-\text{R}^\circ$; $-\text{OR}^\circ$; $-\text{SR}^\circ$; 1,2-亚甲二氧基; 1,2-亚乙二氧基; 任选地被 R° 取代的苯基(Ph); 任选地被 R° 取代的 $-\text{O}(\text{Ph})$; 任选地被 R° 取代的 $-(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{Ph})$; 任选地被 R° 取代的 $-\text{CH}=\text{CH}(\text{Ph})$; $-\text{NO}_2$; $-\text{CN}$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{S}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{SO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{C}(=\text{NH})-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; 或 $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NHC}(\text{O})\text{R}^\circ$, 其中各独立出现的 R° 选自氢、任选取代的 C_{1-6} 脂族基、未取代的 5-6 元杂芳基或杂环、苯基、 $-\text{O}(\text{Ph})$ 或 $-\text{CH}_2(\text{Ph})$, 或尽管上述定义,但相同取代基或不同取代基上两个独立出现的 R° 与各 R° 基团所键合的原子一起形成具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。 R° 的脂族基团上的任选取代基选自 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基团)、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基团) $_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族基团、 OH 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基团)、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}$ 脂族基团)、 $\text{O}(\text{卤代 } \text{C}_{1-4} \text{ 脂族基})$ 或卤代 C_{1-4} 脂族基团,其中 R° 的各上述 C_{1-4} 脂族基团未被取代。

[0123] 脂族基团或杂脂族基团或非芳族杂环可以包含一个或多个取代基。脂族基团或杂脂族基团或非芳族杂环的饱和碳上的适宜取代基选自上述芳基或杂芳基不饱和碳所举出那些取代基并且进一步包括如下取代基: $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 、 $=\text{NNHR}^*$ 、 $=\text{NN}(\text{R}^*)_2$ 、 $=\text{NNHC}(\text{O})\text{R}^*$ 、 $=\text{NNHCO}_2(\text{烷基})$ 、 $=\text{NNHSO}_2(\text{烷基})$ 或 $=\text{NR}^*$, 其中各 R^* 独立地选自氢或任选取代的 C_{1-6} 脂族

基团。R*的脂族基团上的任选取代基选自 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{脂族基})$ 、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{脂族基})_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族基、 OH 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4}\text{脂族基})$ 、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}\text{脂族基})$ 、 $\text{O}(\text{卤代C}_{1-4}\text{脂族基})$ 或卤代($\text{C}_{1-4}\text{脂族基}$)，其中R*的各上述 C_{1-4} 脂族基团未被取代。

[0124] 非芳族杂环氮上的任选取代基选自 $-\text{R}^+$ 、 $-\text{N}(\text{R}^+)_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^+$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^+$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^+$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^+$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^+$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^+)_2$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^+)_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{N}(\text{R}^+)_2$ 或 $-\text{NR}^+\text{SO}_2\text{R}^+$ ；其中 R^+ 是氢、任选取代的 C_{1-6} 脂族基、任选取代的苯基、任选取代的 $-\text{O}(\text{Ph})$ 、任选取代的 $-\text{CH}_2(\text{Ph})$ 、任选取代的 $-(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{Ph})$ ；任选取代的 $-\text{CH}=\text{CH}(\text{Ph})$ ；或具有1-4个独立地选自氧、氮或硫的杂原子的未取代的5-6元杂芳基或杂环，或尽管上述定义，但在相同取代基或不同取代基上的两个独立出现的 R^+ 与各 R^+ 基团所键合的原子一起形成具有0-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的3-8元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。 R^+ 的脂族基团或苯基环上的任选取代基选自 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{脂族基})$ 、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{脂族基})_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族基、 OH 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4}\text{脂族基})$ 、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}\text{脂族基})$ 、 $\text{O}(\text{卤代C}_{1-4}\text{脂族基})$ 或卤代($\text{C}_{1-4}\text{脂族基}$)，其中 R^+ 的各上述 C_{1-4} 脂族基团未被取代。

[0125] 术语“亚烷基链”意指直链或支链碳链，其可以是完全饱和的或具有一个或多个不饱和单元并且具有两个与分子其余部分的连接点。术语“螺环亚烷基”意指碳环，其可以是完全饱和的或具有一个或多个不饱和单元并且具有两个来自同一环碳原子与分子其余部分的连接点。

[0126] 将本文所用的术语“淤浆”定义为包含固体和液体的混合物，其中固体至多部分溶于液体。将本文所用的术语“淤浆化”或“使成为淤浆”（例如“将固体产物淤浆化24小时”）定义为生成淤浆和将所述淤浆搅拌一定时间期限的作用。

[0127] 本文所用的术语“保护基”表示指定防止官能团在合成操作过程中发生不期望的的那些基团，例如醇、胺、羧基、羰基等。常用保护基公开在Greene和Wuts的Protective Groups in Organic Synthesis,第3版(John Wiley&Sons, New York, 1999)中，将该文献引入本文参考。氮保护基的实例包括酰基、芳酰基或氨基甲酰基例如甲酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻-硝基苯氧基乙酰基、 α -氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基和手性助剂例如被保护或未保护的D,L或D,L-氨基酸例如丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等；磺酰基例如苯磺酰基、对-甲苯磺酰基等；氨基甲酸酯基例如苄氧羰基、对-氯苄氧羰基、对-甲氧基苄氧羰基、对-硝基苄氧羰基、2-硝基苄氧羰基、对-溴苄氧羰基、3,4-二甲氧基苄氧羰基、3,5-二甲氧基苄氧羰基、2,4-二甲氧基苄氧羰基、4-甲氧基苄氧羰基、2-硝基-4,5-二甲氧基苄氧羰基、3,4,5-三甲氧基苄氧羰基、1-(对-联苯基)-1-甲基乙氧羰基、 α , α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧羰基、二苯甲氧基羰基、叔丁氧羰基、二异丙基甲氧羰基、异丙氧羰基、乙氧羰基、甲氧羰基、烯丙氧羰基、2,2,2-三氯乙氧羰基、苄氧羰基、4-硝基苄氧羰基、苄基-9-甲氧羰基、环戊氧羰基、金刚烷氧羰基、环己氧羰基、苄基硫羰基等、芳基烷基例如苄基、三苯基甲基、苄氧基甲基等和甲硅烷基例如三甲基甲硅烷基等。另一个典型的N-保护基是叔丁氧羰基(Boc)。

[0128] 有用的酸保护基的实例是取代的烷基酯类，例如9-苄基甲基、甲氧基甲基、甲硫基甲基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、甲氧基乙氧基甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基、苄氧基甲基、新戊酰氧基甲基、苄基乙酰氧基甲基、三异丙基甲硅烷基

(triisopropylsilyl) 甲基、氰基甲基、丙酮醇、苯酰基、取代的苯酰基酯类、2,2,2-三氯乙基、2-卤代乙基、 ω -氯烷基、2-(三甲基甲硅烷基)乙基、2-甲硫基乙基、叔丁基、3-甲基-3-戊基、二环丙基甲基、环戊基、环己基、烯丙基、甲代烯丙基、肉桂基 (cinnamyl)、苯基。甲硅烷基酯类、苄基和取代的苄基酯类、2,6-二烷基苯基酯类例如五氟苯基、2,6-二烷基苯基 (pyhenyl)。其他酸保护基是甲基或乙基酯类。

[0129] 添加 (一般称作“保护”的方法) 和除去 (一般称作“脱保护”的方法) 这样的胺和酸保护基的方法是本领域众所周知的且可以从 P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme, 1994 (将该文献完整引入本文参考) 和 Greene 和 Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 3 版 (John Wiley & Sons, New York, 1999) 中得到。

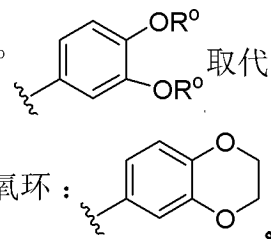
[0130] 可以用于本发明的适合的溶剂的实例是但不限于水、甲醇、二氯甲烷 (DCM)、乙腈、二甲基甲酰胺 (DMF)、乙酸甲酯 (MeOAc)、乙酸乙酯 (EtOAc)、乙酸异丙酯 (IPAc)、乙酸叔丁酯 (t-BuOAc)、异丙醇 (IPA)、四氢呋喃 (THF)、甲基乙基酮 (MEK)、叔丁醇、乙醚 (Et₂O)、甲基-叔丁基醚 (MTBE)、1,4-二噁烷和 N-甲基吡咯烷酮 (NMP)。

[0131] 可以用于本发明的适合的偶合剂的实例是但不限于 1-(3-(二甲氨基)丙基)-3-乙基-碳二亚胺盐酸盐 (EDCI)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU)、1-羟基苯并三唑 (HOBT)、2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐 (HATU)、2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、1-H-苯并三唑鎓-1-[双(二甲氨基)亚甲基]-5-氯六氟磷酸盐 (HCTU)、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪和 2-丙膦酸酐(**T3P**®)。

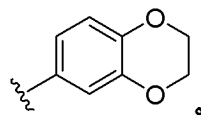
[0132] 可以用于本发明的适合的碱的实例是但不限于碳酸钾 (K₂CO₃)、N-甲基吗啉 (NMM)、三乙胺 (Et₃N; TEA)、二异丙基-乙胺 (i-Pr₂EtN; DIEA)、吡啶、氢氧化钾 (KOH)、氢氧化钠 (NaOH) 和甲醇钠 (NaOMe; NaOCH₃)。

[0133] 在一些实施方案中,如下文结构中所示的两个独立出现的 R^o与各变量所键合的原子一起形成具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。两个出现的 R^o与各变量所键合的原子一起形成的典型环包括但不限于如下:a) 与同一原子键合并且与该原子一起形成环的两个出现的 R^o例如 N(R^o)₂, 其中两个出现的 R^o与氮原子一起形成哌啶-1-基、哌嗪-1-基或吗啉-4-基;和 b) 与不同原子键合并且与这样的

原子一起形成环的两个独立出现的 R^o, 例如苯基被两个出现的 OR^o 取代,



[0134] 这两个出现的 R^o与所键合的氧原子一起形成耦合 6-元含氧环:



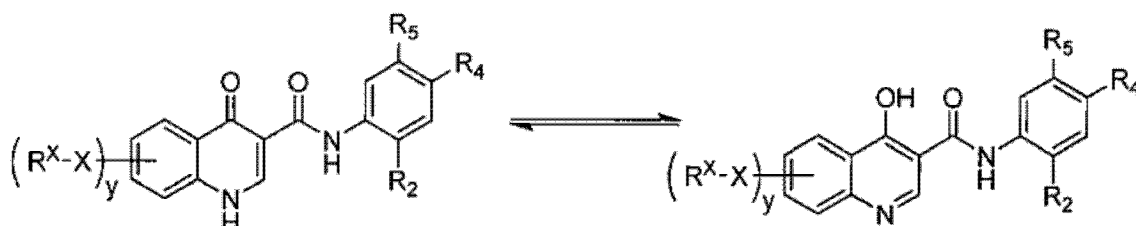
[0135] 将要被理解的是两个独立出现的 R^o与各变量所键合的原子形成各种其他环并且上文详细描述实例并非起限定作用。

[0136] 例如,单和多芳基、脂族、杂脂族环系上的环取代基可以连接在化学上切实可行连接取代基的任意环位置上。

[0137] 除非另有规定,否则本文所描绘的结构也意味着包括该结构的所有异构(例如对映异构、非对映异构和几何异构(或构象异构))形式;例如每一不对称中心的 R 与 S 构型、(Z) 与 (E) 双键异构体和 (Z) 与 (E) 构象异构体。因此,本发明化合物的单一立体化学异构

体以及对映异构、非对映异构和几何异构（或构象异构）混合物都属于本发明的范围。除非另作陈述，否则本发明化合物的所有互变体形式属于本发明的范围。即当式 1 化合物上的 R^x-X 是氢时，所述式 1 化合物可以作为互变体存在：

[0138]



[0139] 式 1 的互变体

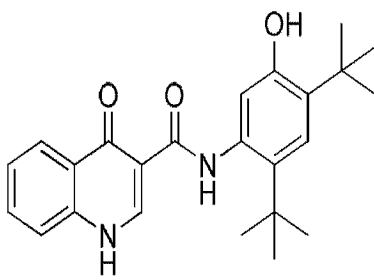
[0140] 另外，除非另作陈述，否则本文所述的结构也意指包括仅在一个或多个富含同位素的原子的存在下不同的化合物。例如，具有本结构的化合物，其中氢被氘或氚替代或碳原子被富含 ^{13}C - 或 ^{14}C - 的碳替代，属于本发明的范围。这种化合物例如用作分析工具、生物试验中的探针或用作治疗剂。

[0141] II. 本发明的方法

[0142] 一般而言，本发明提供了用作 CFTR 调节剂的化合物的合成方法。

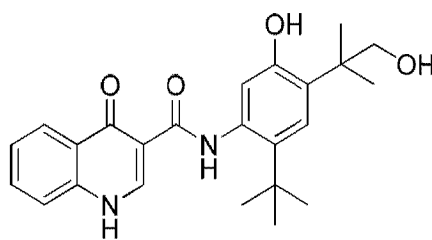
[0143] 在一些实施方案中，本发明提供了具有如下结构的化合物的制备方法：

[0144]



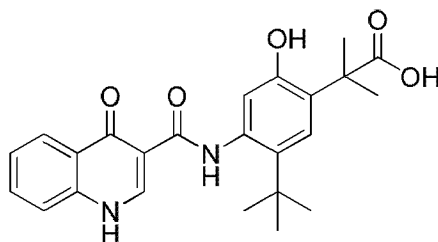
[0145] 在一些实施方案中，本发明提供了具有如下结构的化合物的制备方法：

[0146]



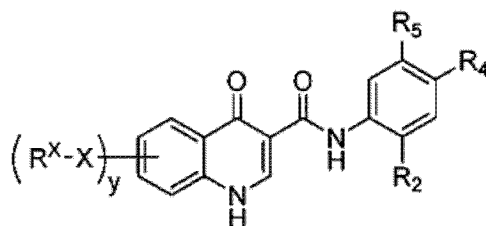
[0147] 在一些实施方案中，本发明提供了具有如下结构的化合物的制备方法：

[0148]



[0149] 在一个方面中，本发明提供了式 1 化合物的制备方法，

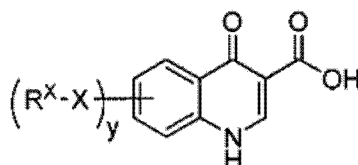
[0150]



[0151] 式 1

[0152] 该方法包括使式 2 的羧酸

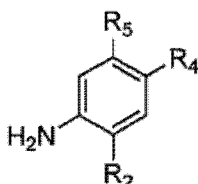
[0153]



[0154] 式 2

[0155] 与式 3 的苯胺

[0156]



[0157] 式 3

[0158] 在偶合剂的存在下偶合,所述偶合剂选自 2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**。

[0159] R_2 和 R_4 各自独立地选自氢、CN、 CF_3 、卤素、 C_{1-6} 直链或支链烷基、3-12 元脂环族基团、苯基、 C_{5-10} 杂芳基或 C_{3-7} 杂环基,其中所述杂芳基或杂环基具有至多 3 个选自 O、S 或 N 的杂原子,且 C_{1-6} 直链或支链烷基、3-12 元脂环族基团、苯基、 C_{5-10} 杂芳基或 C_{3-7} 杂环基各自独立和任选地被至多 3 个取代基取代,所述取代基选自 $-OR'$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 SR' 、 $S(O)R'$ 、 SO_2R' 、 $-SCF_3$ 、卤素、CN、 $-COOR'$ 、 $-COR-$ 、 $-O(CH_2)_2N(R')(R')$ 、 $-O(CH_2)N(R')(R')$ 、 $-CON(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2OR'$ 、 $-(CH_2)OR'$ 、 CH_2CN 、任选取代的苯基或苯氧基、 $-N(R')(R')$ 、 $-NR' C(O)OR'$ 、 $-NR' C(O)R'$ 、 $-(CH_2)_2N(R')(R')$ 或 $-(CH_2)N(R')(R')$ 。

[0160] R_5 各自独立地选自氢、 $-OH$ 、 NH_2 、CN、 CHF_2 、 NHR' 、 $N(R')(R')$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $NHC(O)OR'$ 、 $NHSO_2R'$ 、 $-OR'$ 、 $OC(O)OR'$ 、 $OC(O)NHR'$ 、 $OC(O)NR'_2$ 、 CH_2OH 、 $CH_2N(R')(R')$ 、 $C(O)OR'$ 、 SO_2NHR' 、 $SO_2N(R')(R')$ 或 $CH_2NHC(O)OR'$ 。

[0161] 或 R_4 和 R_5 一起形成包含 0-3 个选自 N、O 或 S 的杂原子的 5-7 元环,其中所述环任选地被至多 3 个 R_3 取代基取代。

[0162] X 各自独立地是键或任选取代的 C_{1-6} 亚烷基链,其中 X 的至多 2 个亚甲基单元任选和独立地被 $-CO-$ 、 $-CS-$ 、 $-COCO-$ 、 $-CONR'-$ 、 $-CONR'NR'-$ 、 $-CO_2-$ 、 $-OCO-$ 、 $-NR'CO_2-$ 、 $-O-$ 、 $-NR'CONR'-$ 、 $-OCONR'-$ 、 $-NR'NR'-$ 、 $-NR'NR'CO-$ 、 $-NR'CO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR'-$ 、 $-SO_2NR'-$ 、 $NR'SO_2-$ 或 $-NR'SO_2NR'-$ 替代。

[0163] R^x 各自独立地是 R' 、卤素、 NO_2 、 CN 、 CF_3 或 OCF_3 。

[0164] y 是 0-4 的整数。

[0165] R' 各自独立地选自氢或任选取代的基团,所述基团选自 C_{1-8} 脂族基团、具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或具有 0-5 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 8-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的双环环系;或两次出现的 R' 与它们所连接的原子一起形成具有 0-4 个独立地选自 N、O 或 S 的杂原子的任选取代的 3-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或双环。

[0166] R_3 各自独立地是 $-C_{1-3}$ 烷基、 C_{1-3} 全卤代烷基、 $-O(C_{1-3}$ 烷基)、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-SCF_3$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-COOR'$ 、 $-COR'$ 、 $-O(CH_2)_2N(R')(R')$ 、 $-O(CH_2)N(R')(R')$ 、 $-CON(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2OR'$ 、 $-(CH_2)OR'$ 、任选取代的单环或双环芳族环、任选取代的芳基砜、任选取代的 5- 元杂芳基环、 $-N(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2N(R')(R')$ 或 $-(CH_2)N(R')(R')$ 。

[0167] 在一个实施方案中, R_5 独立地是 $-OC(O)OR'$ 、 $-OC(O)NHR'$ 或 $-OC(O)N(R')_2$,且 R' 不是氢。在一些情况中, R_5 是 $-OC(O)OR'$,且 R' 不是氢。在其他情况中, R_5 是 $-OC(O)NHR'$,且 R' 不是氢。在其他情况中, R_5 是 $-OC(O)N(R')_2$,且 R' 不是氢。

[0168] 在一个实施方案中,该方法进一步包括裂解 $-OC(O)OR'$ 、 $-OC(O)NHR'$ 或 $-OC(O)N(R')_2R_5$ 基团,形成 $-OH$ 。通过用醇溶剂在碱例如 $NaOH$ 、 KOH 或甲醇钠的存在下处理包含 $-OC(O)OR'$ 、 $-OC(O)NHR'$ 或 $-OC(O)N(R')_2R_5$ 基团的式 1 化合物来进行裂解。用于裂解反应的醇溶剂是甲醇、乙醇、异丙醇或叔丁醇。

[0169] 在另一个实施方案中, R_4 或 R_2 的至少一个独立地是被 $-COOR'$ 或 $-CON(R')_2$ 取代的 C_1-C_6 直链或支链烷基,且 R' 不是氢。在一些情况中, R_4 或 R_2 之一是 $-COOR'$,且 R' 不是氢。在其他情况中, R_4 或 R_2 之一是 $-CON(R')_2$,且 R' 不是氢。

[0170] 在一个实施方案中,该方法进一步包括水解至少一个 R_4 和 R_2 上的 $-COOR'$ 或 $-CON(R')_2$ 。通过用醇溶剂在碱例如 $NaOH$ 、 KOH 或甲醇钠的存在下处理 R_4 和 R_2 的至少一个上包含 $-COOR'$ 或 $-CON(R')_2$ 基团的式 1 化合物进行水解。用于水解反应的醇溶剂是甲醇、乙醇、异丙醇或叔丁醇。

[0171] 在另一个实施方案中, R_4 或 R_2 的至少一个独立地是被 $-COOR'$ 或 $-CON(R')_2$ 取代的 C_{1-6} 直链或支链烷基,且 R_5 独立地是 $-OC(O)OR'$ 、 $-OC(O)NHR'$ 或 $-OC(O)N(R')_2$,且 R' 各自不是氢。

[0172] 在一个实施方案中,该方法进一步包括水解 R_4 和 R_2 的至少一个上的 $-COOR'$ 或 $-CON(R')_2$ 并且裂解 $-OC(O)OR'$ 、 $-OC(O)NHR'$ 或 $-OC(O)N(R')_2R_5$ 基团。通过用醇溶剂在碱例如 $NaOH$ 、 KOH 或甲醇钠的存在下处理 R_4 和 R_2 的至少一个上包含 $-COOR'$ 或 $-CON(R')_2$ 基团和 $-OC(O)OR'$ 、 $-OC(O)NHR'$ 或 $-OC(O)N(R')_2R_5$ 基团的式 1 化合物进行水解/裂解反应。用于水解/裂解反应的醇溶剂是甲醇、乙醇、异丙醇或叔丁醇。

[0173] 在另一个实施方案中,式 2 的羧酸与式 3 的苯胺的偶合在碱例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、 N - 甲基吗啉 (NMM)、吡啶或 DIEA 的存在下进行。

[0174] 在另一个实施方案中,式 2 的羧酸与式 3 的苯胺的偶合在吡啶或 DIEA 的存在下进行。

[0175] 在另一个实施方案中,式 2 的羧酸与式 3 的苯胺的偶合在溶剂例如 $EtOAc$ 、 $IPAc$ 、 THF 、 MEK 、 NMP 、乙腈、 DMF 或 2- 甲基四氢呋喃的存在下进行。

[0176] 在进一步的实施方案中,式 2 的羧酸与式 3 的苯胺的偶合在维持在 10℃ -78℃、例如约 20℃ -30℃、约 40℃ -50℃和约 42℃ -53℃的反应温度下进行。

[0177] 在更进一步的实施方案中,将偶合反应搅拌至少 2 小时,例如至少 8 小时、至少 70 小时或至少 3 天。

[0178] 在另一个实施方案中,y 是 0。

[0179] 在其他实施方案中, R_2 是叔丁基。

[0180] 在一些实施方案中, R_5 独立地是 $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NHR}'$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$,且 R' 不是氢;且 R_2 和 R_4 各自独立地选自氢、 CF_3 、 C_1 - C_6 直链或支链烷基、3-12 元脂环族基团或苯基。

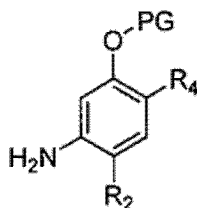
[0181] 在一些实施方案中, R_5 独立地是 $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NHR}'$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$,且 R' 不是氢;且 R_2 和 R_4 各自独立地选自 C_1 - C_6 直链或支链烷基。

[0182] 在一些实施方案中, R_5 独立地是 $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NHR}'$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$,且 R' 不是氢;且 R_2 和 R_4 各自独立地选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基或正己基。

[0183] 在一些实施方案中, R_2 和 R_4 是叔丁基。

[0184] 在一个实施方案中,本发明提供了式 5 化合物的制备方法,通过下列步骤进行:

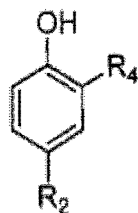
[0185]



[0186] 式 5

[0187] 使式 6 化合物

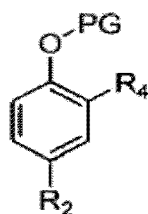
[0188]



[0189] 式 6

[0190] 与能够导致保护基连接在式 6 化合物的酚氧上的保护基在溶剂的存在下反应,由此得到式 7 化合物,

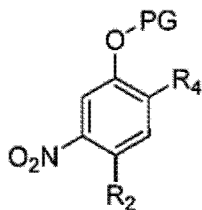
[0191]



[0192] 式 7

[0193] 将式 7 化合物硝化,形成式 8 化合物

[0194]



[0195] 式 8

[0196] 然后将式 8 化合物还原,得到式 5 化合物,其中 PG 是保护基,且 R_4 和 R_5 如上述所定义。

[0197] 在一个实施方案中,用于将式 6 化合物转化成式 7 化合物的溶剂是乙醚或二氯甲烷。

[0198] 在另一个实施方案中,用于保护反应的溶剂是二氯甲烷。

[0199] 在进一步的实施方案中,PG 是丙氧基甲酰基、甲磺酰基、4-硝基-苯甲酰基、乙氧基甲酰基、丁氧基甲酰基、叔丁氧基甲酰基、异丙氧基甲酰基或甲氧基甲酰基。

[0200] 在另一个实施方案中,PG 是甲氧基甲酰基。

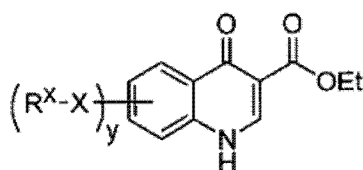
[0201] 在另一个实施方案中,使用硫酸、硝酸和二氯甲烷的混合物硝化式 7 化合物。

[0202] 在一个实施方案中,通过结晶纯化式 8 的硝基化合物。

[0203] 在进一步的实施方案中,通过使用己烷结晶纯化式 8 的硝基化合物。

[0204] 在另一个实施方案中,该方法进一步包括使式 4 化合物

[0205]

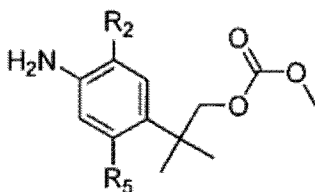


[0206] 式 4

[0207] 与含水酸接触的步骤,得到式 2 化合物。

[0208] 在一个实施方案中,式 3 化合物是式 40 化合物

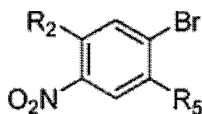
[0209]



[0210] 式 40。

[0211] 在另一个实施方案中,该方法进一步包括使式 41 化合物

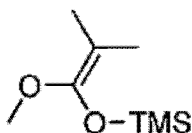
[0212]



[0213] 式 41

[0214] 与甲基三甲基甲硅烷基二甲基乙烯酮缩醛 (dimethylketene acetal) (MTDA) 接触的步骤,

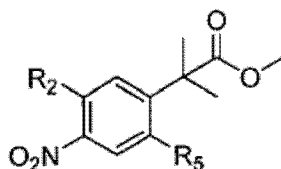
[0215]



MTDA

[0216] 得到式 42 化合物

[0217]

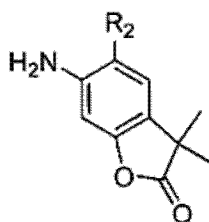


[0218] 式 42。

[0219] 在进一步的实施方案中,该方法包括将式 42 化合物还原的步骤,得到式 40 化合物。

[0220] 在一个实施方案中,式 3 化合物是式 43 化合物

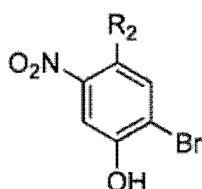
[0221]



[0222] 式 43。

[0223] 在进一步的实施方案中,该方法包括使式 44 化合物

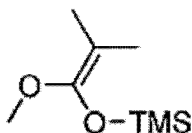
[0224]



[0225] 式 44

[0226] 与甲基三甲基甲硅烷基二甲基乙烯酮缩醛 (MTDA) 接触的步骤,

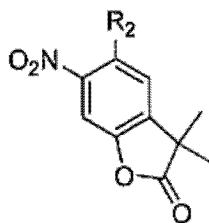
[0227]



MTDA

[0228] 得到式 45 化合物

[0229]

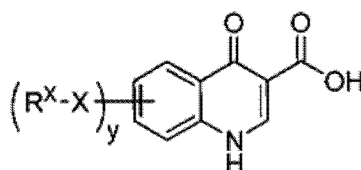


[0230] 式 45。

[0231] 在进一步的实施方案中,该方法包括将式 45 化合物还原的步骤,得到式 43 化合物。

[0232] 在另一个方面中,本发明提供了式 2 化合物的制备方法,

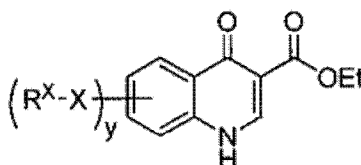
[0233]



[0234] 式 2

[0235] 包括使式 4 化合物

[0236]



[0237] 式 4

[0238] 与含水酸接触的步骤,其中:

[0239] X 各自独立地是键或任选取代的 C_{1-6} 亚烷基链,其中 X 的至多 2 个亚甲基单元任选和独立地被 $-CO-$ 、 $-CS-$ 、 $-COCO-$ 、 $-CONR'$ 、 $-CONR'NR'$ 、 $-CO_2-$ 、 $-OCO-$ 、 $-NR'CO_2-$ 、 $-O-$ 、 $-NR'CONR'$ 、 $-OCONR'$ 、 $-NR'NR'$ 、 $-NR'NR'CO-$ 、 $-NR'CO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR'SO_2-$ 、 $-SO_2NR'$ 、 $-NR'SO_2-$ 或 $-NR'SO_2NR'$ 替代;

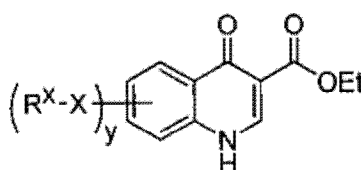
[0240] R^X 各自独立地是 R' 、卤素、 NO_2 、 CN 、 CF_3 或 OCF_3 ;

[0241] y 是 0-4 的整数;且

[0242] R' 各自独立地选自氢或任选取代的基团,所述基团选自 C_{1-8} 脂族基团、具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或具有 0-5 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 8-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的双环体系;或两次出现的 R' 与它们所连接的原子一起形成具有 0-4 个独立地选自 N、O 或 S 的杂原子的任选取代的 3-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或双环。

[0243] 在该方面的一个实施方案中,通过下列步骤制备式 4 化合物:

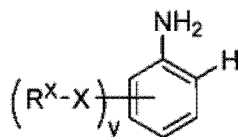
[0244]



[0245] 式 4

[0246] 使式 50 化合物

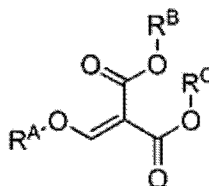
[0247]



[0248] 式 50

[0249] 与式 51 化合物接触

[0250]



[0251] 式 51,

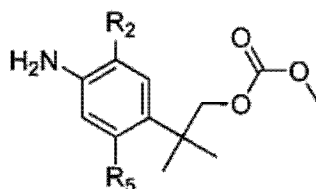
[0252] 其中 R^A 、 R^B 和 R^C 可以是 C_{1-6} 烷基。

[0253] 在该方面的一个实施方案中,式 50 化合物和式 50 化合物在约 100°C – 约 300°C 的温度反应。在另一个实施方案中,式 50 化合物和式 50 化合物在约 100°C 的温度反应。在另一个实施方案中,式 50 化合物和式 50 化合物在约 250°C 的温度反应。在进一步的实施方案中,式 50 化合物和式 50 化合物在约 100°C 的温度、然后在约 250°C 的温度反应。

[0254] 在该方面的进一步的实施方案中, y 是 0。

[0255] 在另一个方面中,本发明提供了式 40 化合物的制备方法,

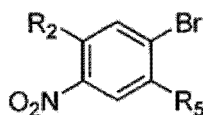
[0256]



[0257] 式 40

[0258] 包括使式 41 化合物

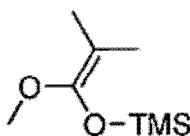
[0259]



[0260] 式 41

[0261] 与甲基三甲基硅烷基二甲基乙烯酮缩醛 (MTDA) 接触的步骤,

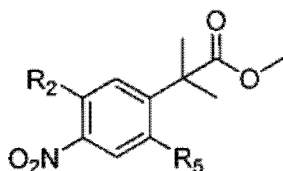
[0262]



MTDA

[0263] 得到式 42 化合物

[0264]



[0265] 式 42,

[0266] 其中

[0267] R_2 各自独立地选自氢、CN、 CF_3 、卤素、 C_{1-6} 直链或支链烷基、3-12元脂环族基团、苯基、 C_{5-10} 杂芳基或 C_{3-7} 杂环基,其中所述杂芳基或杂环基具有至多3个选自O、S或N的杂原子,且 C_{1-6} 直链或支链烷基、3-12元脂环族基团、苯基、 C_{5-10} 杂芳基或 C_{3-7} 杂环基各自独立和任选地被至多3个取代基取代,所述取代基选自 $-OR'$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 SR' 、 $S(O)R'$ 、 SO_2R' 、 $-SCF_3$ 、卤素、CN、 $-COOR'$ 、 $-COR-$ 、 $-O(CH_2)_2N(R')(R')$ 、 $-O(CH_2)N(R')(R')$ 、 $-CON(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2OR'$ 、 $-(CH_2)OR'$ 、 CH_2CN 、任选取代的苯基或苯氧基、 $-N(R')(R')$ 、 $-NR'C(O)OR'$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-(CH_2)_2N(R')(R')$ 或 $-(CH_2)N(R')(R')$;

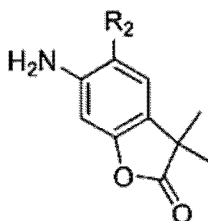
[0268] R_5 各自独立地选自氢、 $-OH$ 、 NH_2 、CN、 CHF_2 、 NHR' 、 $N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $NHC(O)OR'$ 、 $NHSO_2R'$ 、 $-OR'$ 、 $OC(O)OR'$ 、 $OC(O)NHR'$ 、 $OC(O)NR'_2$ 、 CH_2OH 、 $CH_2N(R')_2$ 、 $C(O)OR'$ 、 SO_2NHR' 、 $SO_2N(R')_2$ 或 $CH_2NHC(O)OR'$;且

[0269] R' 各自独立地选自氢或任选取代的基团,所述基团选自 C_{1-8} 脂族基团、具有0-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的3-8元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或具有0-5个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的8-12元饱和、部分不饱和或完全不饱和的双环环系;或两次出现的 R' 与它们所连接的原子一起形成具有0-4个独立地选自N、O或S的杂原子的任选取代的3-12元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或双环。

[0270] 在该方面的一个实施方案中,该方法包括将式42化合物还原的步骤,得到式40化合物。

[0271] 在另一个方面中,本发明提供了式43化合物的制备方法,

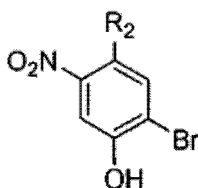
[0272]



[0273] 式 43

[0274] 包括使具有式 44 的化合物

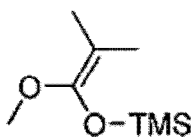
[0275]



[0276] 式 44

[0277] 与甲基三甲基甲硅烷基二甲基乙烯酮缩醛 (MTDA) 接触的步骤,

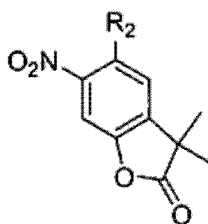
[0278]



MTDA

[0279] 得到式 45 化合物

[0280]



[0281] 式 45,

[0282] 其中

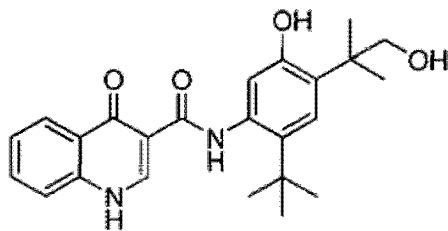
[0283] R_2 各自独立地选自氢、CN、 CF_3 、卤素、 C_{1-6} 直链或支链烷基、3-12 元脂环族基团、苯基、 C_{5-10} 杂芳基或 C_{3-7} 杂环基,其中所述杂芳基或杂环基具有至多 3 个选自 O、S 或 N 的杂原子,且 C_{1-6} 直链或支链烷基、3-12 元脂环族基团、苯基、 C_{5-10} 杂芳基或 C_{3-7} 杂环基各自独立和任选地被至多 3 个取代基取代,所述取代基选自 $-OR'$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 SR' 、 $S(O)R'$ 、 SO_2R' 、 $-SCF_3$ 、卤素、CN、 $-COOR'$ 、 $-COR-$ 、 $-O(CH_2)_2N(R')(R')$ 、 $-O(CH_2)N(R')(R')$ 、 $-CON(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2OR'$ 、 $-(CH_2)OR'$ 、 CH_2CN 、任选取代的苯基或苯氧基、 $-N(R')(R')$ 、 $-NR' C(O)OR'$ 、 $-NR' C(O)R'$ 、 $-(CH_2)_2N(R')(R')$ 或 $-(CH_2)N(R')(R')$;且

[0284] R' 各自独立地选自氢或任选取代的基团,所述基团选自 C_{1-8} 脂族基团、具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或具有 0-5 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 8-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的双环体系;或两次出现的 R' 与它们所连接的原子一起形成具有 0-4 个独立地选自 N、O 或 S 的杂原子的任选取代的 3-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或双环。

[0285] 在该方面的一个实施方案中,该方法包括将式 45 化合物还原的步骤,得到式 43 化合物。

[0286] 在一些具体的实施方案中,化合物 27 的制备方法

[0287]

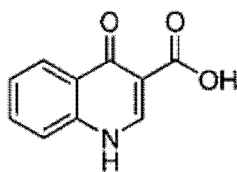


[0288] 化合物 27

[0289] 包括:

[0290] 使化合物 26

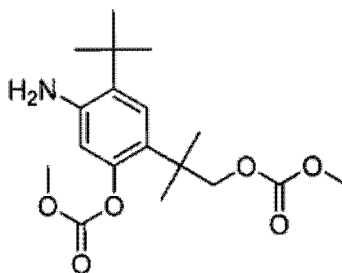
[0291]



[0292] 化合物 26

[0293] 与化合物 13

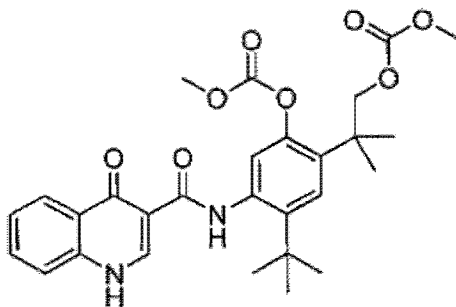
[0294]



[0295] 化合物 13

[0296] 在 EDCI、HOBT 和 DIEA 的存在下使用 DMF 作为溶剂反应, 其中将反应温度维持在约 20℃ -30℃ 的温度, 并且使反应进行至少 70 小时, 得到化合物 14

[0297]

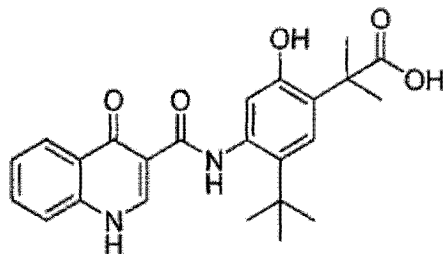


[0298] 化合物 14 ;和

[0299] 用 KOH 在甲醇中处理化合物 14。

[0300] 在一些具体的实施方案中, 化合物 28 的制备方法

[0301]

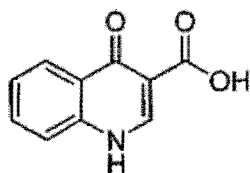


[0302] 化合物 28

[0303] 包括 :

[0304] 使化合物 26

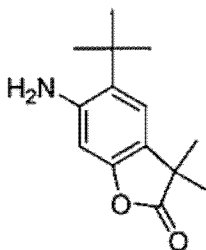
[0305]



[0306] 化合物 26

[0307] 与化合物 20

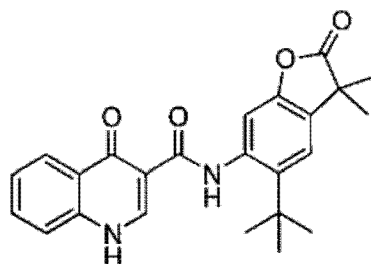
[0308]



[0309] 化合物 20

[0310] 在 HATU 和 DIEA 的存在下使用乙腈作为溶剂反应, 其中将反应温度维持在约 40°C -50°C 的温度, 且其中使反应进行至少 3 天, 得到化合物 21

[0311]

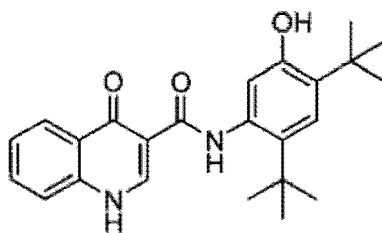


[0312] 化合物 21 ;和

[0313] 用 NaOH 在甲醇中处理化合物 21。

[0314] 在另一个具体的实施方案中, 化合物 34 的制备方法

[0315]

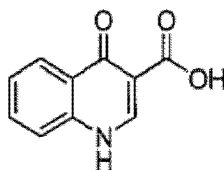


[0316] 化合物 34

[0317] 包括 :

[0318] 使化合物 26

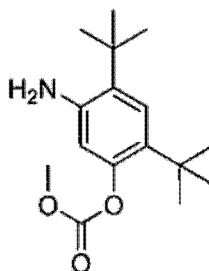
[0319]



[0320] 化合物 26

[0321] 与化合物 32

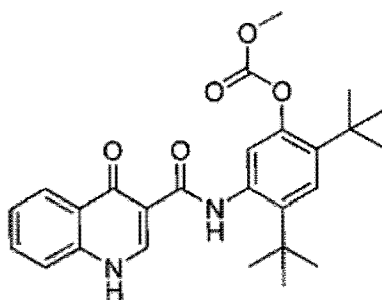
[0322]



[0323] 化合物 32

[0324] 在**T3P®**和吡啶的存在下使用 2- 甲基四氢呋喃作为溶剂反应, 其中将反应温度维持在约 42℃ - 约 3℃ 的温度, 且其中使反应进行至少 2 小时, 得到化合物 33

[0325]



[0326] 化合物 33 ; 和

[0327] 用 NaOMe/MeOH 在 2- 甲基四氢呋喃中处理化合物 33。

[0328] 在另一个实施方案中, 该方法还包括在乙腈和水的混合物中形成化合物 34 的淤浆的步骤, 其中化合物 34 的固体形式转化成化合物 34。

[0329] 在一个实施方案中, 乙腈与水之比在淤浆中为约 9 : 1。

[0330] 在另一个实施方案中, 将淤浆加热至约 73℃ -83℃ 的温度。

[0331] 在另一个实施方案中, 化合物 34 在淤浆中至少约 3 小时。

[0332] 在进一步的实施方案中, 该方法包括用 1N HCl 使反应混合物猝灭 ; 将 0. 1N HCl 加入到该混合物中, 由此生成双相混合物 ; 搅拌该双相混合物 ; 从所述双相混合物中分离有机相 ; 过滤并且从所述有机相中除去固体物质 ; 使用蒸馏将有机相的体积减少约 50 % ; 进行三次如下步骤 : 将乙腈加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100 % 并且将有机相的体积减少约 50 % ; 通过加入乙腈、然后加入水将有机相的体积增加约 100 %, 形成淤浆, 其中最终溶剂比为 9 : 1 乙腈 / 水 ; 将该淤浆加热至约 73℃ -83℃ 的温度 ; 将该淤浆搅拌至少 5 小时 ; 并且将所述淤浆冷却至约 -5℃ 至 5℃ 的温度。

[0333] 在一个可替代选择的实施方案中, 该方法包括用 1. 2N HCl 使反应混合物猝灭 ; 由此生成双相混合物 ; 搅拌该双相混合物 ; 从所述双相混合物中分离有机相 ; 将 0. 1N HCl 加入到有机层中, 由此生成双相混合物 ; 搅拌该双相混合物 ; 分离有机相 ; 过滤并且从所述有机相中除去固体物质 ; 使用蒸馏将有机相的体积减少约 50 % ; 进行三次如下步骤 : 将乙腈加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100 % 并且将有机相的体积减少约 50 % ; 通过加入乙腈、然后加入水将有机相的体积增加约 100 %, 形成淤浆, 其中最终溶剂比为 9 : 1 乙腈 / 水 ; 将该淤浆加热至约 73℃ -83℃ 的温度 ; 将该淤浆搅拌至少 5 小时 ; 并且将所述淤

浆冷却至约 20℃ -25℃ 的温度 ; 过滤并且从该淤浆中除去固体物质 ; 用具有约 20℃ -25℃ 的温度的乙腈将该固体物质洗涤 4 次 ; 并且在 45℃ - 约 55℃ 的温度在真空下干燥该固体物质。

[0334] 在一个实施方案中, 用于使反应猝灭的 1N HCl 的体积等于原始反应混合物总体积的 25%; 加入到反应混合物中的 0.1N HCl 的体积等于原始反应混合物总体积的 25%; 在减压下进行蒸馏步骤, 其中反应容器外部的温度低于约 45℃, 并且反应混合物的温度高于约 0℃。

[0335] 在进一步的实施方案中, 该方法包括在乙酸异丙酯中形成化合物 34 的淤浆。

[0336] 在一个实施方案中, 将淤浆加热至回流温度。

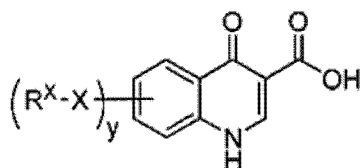
[0337] 在另一个实施方案中, 化合物 34 在淤浆中至少约 3 小时。

[0338] 在一些实施方案中, 化合物 34 的制备方法进一步包括将化合物 34 溶于 2- 甲基四氢呋喃 ; 向该溶液中加入 0.1N HCl, 生成双相溶液, 搅拌该双相溶液。在另一个实施方案中, 该方法进一步包括从所述双相溶液中分离有机相。在另一个实施方案中, 该方法进一步包括过滤并且从所述有机相中除去固体物质。在另一个实施方案中, 该方法进一步包括使用蒸馏将所述有机相的体积减少约 50%。在另一个实施方案中, 该方法进一步包括进行三次如下操作 : 将 MeOAc、EtOAc、IPAc、t-BuOAc、四氢呋喃 (THF)、Et₂O 或甲基 - 叔丁基醚 (MTBE) 加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100% 并且使用蒸馏将有机相的体积减少 50%。在另一个实施方案中, 该方法进一步包括将 MeOAc、EtOAc、IPAc、t-BuOAc、四氢呋喃 (THF)、Et₂O 或甲基 - 叔丁基醚 (MTBE) 加入到有机相中, 直到所述有机相的体积增加 100%。在另一个实施方案中, 该方法进一步包括将有机相加热至回流温度并且将该回流温度维持至少约 5 小时时间。在另一个实施方案中, 该方法进一步包括在约 4.5 小时 -5.5 小时时间期限内将有机相冷却至约 -5℃ 至约 5℃ 的温度。

[0339] 在另一个实施方案中, 化合物 34 的制备方法进一步包括结晶化合物 34, 包括给溶液中包含化合物 34 的饱和反应混合物接种至少一种基本上纯的化合物 34 的晶体。

[0340] 在另一个实施方案中, 本发明提供了式 2 化合物的制备方法,

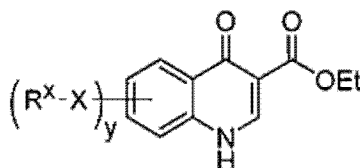
[0341]



[0342] 式 2

[0343] 包括水解式 4 化合物

[0344]



[0345] 式 4。

[0346] 在进一步的实施方案中, 使用水解剂在溶剂的存在下水解式 4 化合物。

[0347] 在一些进一步的实施方案中, 水解剂是 HCl、H₂SO₄、H₃PO₄、Na₂CO₃、LiOH、KOH 或 NaOH。

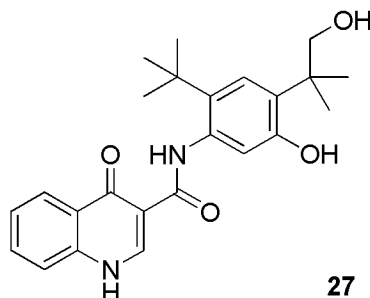
[0348] 在一些实施方案中,用于水解的溶剂是 H₂O、甲醇、乙醇、异丙醇或叔丁醇。

[0349] 在其他实施方案中,本发明提供了通过本文所述的任意方法生产的化合物。

[0350] 在进一步的实施方案中,本发明提供了包含通过本文所述任意方法生产的化合物的药物组合物。

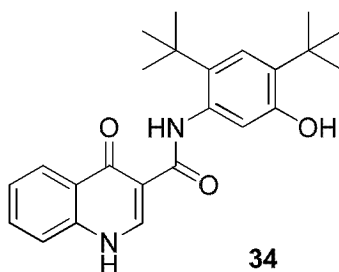
[0351] 在一个方面中,本发明提供了化合物 27 的制备方法,

[0352]



[0353] 包括使化合物 34

[0354]



[0355] 与生物组合物接触。

[0356] 在该方面的一个实施方案中,生物组合物包括选自真菌、细菌和古细菌 (archaea) 的生物微生物。

[0357] 在一个实施方案中,生物组合物是真菌。在进一步的实施方案中,真菌是单细胞真菌。在另一个实施方案中,真菌是多细胞真菌。

[0358] 在进一步的实施方案中,真菌是选自犁头霉属 (*Absidia*)、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、白僵菌属 (*Beauveria*)、葡萄孢属 (*Botrytis*)、小克银汉霉属 (*Cunninghamella*)、黑蛋巢菌属 (*Cyathus*)、胶霉属 (*Gliocladium*)、被孢霉属 (*Mortierella*)、毛霉菌属 (*Mucor*)、白腐真菌 (*Phanerochaete*)、匍柄霉属 (*Stemphylium*)、共头霉属 (*Syncephalastrum*) 和轮枝孢属 (*Verticillium*) 的多细胞真菌。

[0359] 在进一步的实施方案中,真菌是选自假柱孢犁头霉 (*Absidia pseudocylindrospora*)、洋葱曲霉 (*Aspergillus alliaceus*)、赭曲霉属 (*Aspergillus ochraceus*)、巴西安白僵菌 (*Beauveria bassiana*)、短刺小克银汉霉 (*Cunninghamella blakesleeana*)、刺孢小克银汉霉 (*Cunninghamella echinulata*)、深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*)、密丛毛霉 (*Mucor plumbeus*)、*Phanerochaete chrysosporium*、总状共头霉 (*Syncephalastrum racemosum*) 和可可轮枝孢 (*Verticillium theobromae*) 的多细胞真菌。

[0360] 在另一个实施方案中,真菌是选自假丝酵母属 (*Candida*)、德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*)、地丝菌属 (*Geotrichum*)、毕赤氏酵母属 (*Pichia*)、红酵母属

(*Rhodotorula*)、酵母菌属 (*Saccharomyces*)、掷孢酵母属 (*Sporobolomyces*)、拟威尔酵母属 (*Williopsis*) 和子囊菌酵母属 (*Yarrowia*) 的单细胞真菌。

[0361] 在进一步的实施方案中,真菌是选自近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*)、汉逊氏德巴利氏酵母 (*Debaryomyces hansenii*)、白地霉 (*Geotrichum candidum*)、*Pichia methanolica*、*Pichia subpelliculosa*、胶粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)、粘性红酵母 (*Rhodotorula mucaliginosa*)、啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、赭色掷孢酵母 (*Sporobolomyces salmonicolor*)、土星形威尔氏酵母 (*Williopsis saturnis*) 和 *Yarrowia lipolytica* 的多细胞真菌。

[0362] 在另一个实施方案中,生物微生物是古细菌。在进一步的实施方案中,古细菌是火球菌属 (*Pyrococcus*)。在更进一步的实施方案中,古细菌是激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*)。

[0363] 在另一个实施方案中,生物微生物是细菌。

[0364] 在进一步的实施方案中,细菌选自乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、红球菌属 (*Rhodococcus*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。

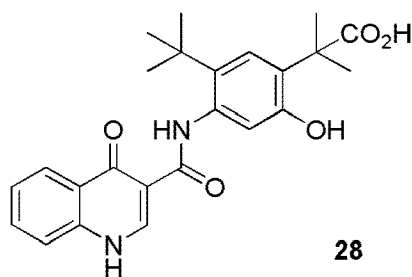
[0365] 在进一步的实施方案中,细菌选自路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuterii*)、甲烷假单胞菌 (*Pseudomonas methanolica*)、红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*)、灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*)、浅灰链霉菌 (*Streptomyces griseolus*)、普拉特链霉菌 (*Streptomyces platensis*) 和龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*)。

[0366] 在更进一步的实施方案中,生物组合物包括龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*) 或其片段。

[0367] 在该方面的一个实施方案中,生物组合物包括溶剂。在进一步的实施方案中,溶剂包括水。在更进一步的实施方案中,溶剂是缓冲液。在更进一步的实施方案中,溶剂是具有约 7 的 pH 的磷酸钾缓冲液。

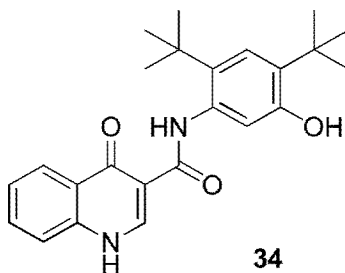
[0368] 在一个方面中,本发明提供了化合物 28 的制备方法。

[0369]



[0370] 包括使化合物 34

[0371]



[0372] 与生物组合物反应。

[0373] 在该方面的一个实施方案中,生物组合物包括选自真菌、细菌和古细菌的生物微生物。

[0374] 在一个实施方案中,生物组合物是真菌。在进一步的实施方案中,真菌是单细胞真菌。在另一个实施方案中,真菌是多细胞真菌。

[0375] 在进一步的实施方案中,真菌是选自犁头霉属 (*Absidia*)、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、白僵菌属 (*Beauveria*)、葡萄孢属 (*Botrytis*)、小克银汉霉属 (*Cunninghamella*)、黑蛋巢菌属 (*Cyathus*)、胶霉属 (*Gliocladium*)、被孢霉属 (*Mortierella*)、毛霉菌属 (*Mucor*)、白腐真菌 (*Phanerochaete*)、匍柄霉属 (*Stemphylium*)、共头霉属 (*Syncephalastrum*) 和轮枝孢属 (*Verticillium*) 的多细胞真菌。

[0376] 在进一步的实施方案中,真菌是选自假柱孢犁头霉 (*Absidia pseudocylindrospora*)、洋葱曲霉 (*Aspergillus alliaceus*)、赭曲霉属 (*Aspergillus ochraceus*)、巴西安白僵菌 (*Beauveria bassiana*)、短刺小克银汉霉 (*Cunninghamella blakesleeana*)、刺孢小克银汉霉 (*Cunninghamella echinulata*)、深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*)、密丛毛霉 (*Mucor plumbeus*)、*Phanerochaete chrysosporium*、总状共头霉 (*Syncephalastrum racemosum*) 和可可轮枝孢 (*Verticillium theobromae*) 的多细胞真菌。

[0377] 在另一个实施方案中在另一个实施方案中,真菌是选自假丝酵母属 (*Candida*)、德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*)、地丝菌属 (*Geotrichum*)、毕赤氏酵母属 (*Pichia*)、红酵母属 (*Rhodotorula*)、酵母菌属 (*Saccharomyces*)、掷孢酵母属 (*Sporobolomyces*)、拟威尔酵母属 (*Williopsis*) 和子囊菌酵母属 (*Yarrowia*) 的单细胞真菌。

[0378] 在进一步的实施方案中,真菌是选自近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*)、汉逊氏德巴利氏酵母 (*Debaryomyces hansenii*)、白地霉 (*Geotrichum candidum*)、*Pichia methanolica*、*Pichia subpelliculosa*、胶粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)、粘性红酵母 (*Rhodotorula mucaliginosa*)、啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、赭色掷孢酵母 (*Sporobolomyces salmonicolor*)、土星形威尔氏酵母 (*Williopsis saturnis*) 和 *Yarrowia lipolytica* 的多细胞真菌。

[0379] 在另一个实施方案中,生物微生物是古细菌。在进一步的实施方案中,古细菌是火球菌属 (*Pyrococcus*)。在更进一步的实施方案中,古细菌是激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*)。

[0380] 在另一个实施方案中,生物微生物是细菌。

[0381] 在进一步的实施方案中,细菌选自乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、红球菌属 (*Rhodococcus*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。

[0382] 在进一步的实施方案中,细菌选自路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuterii*)、甲烷假单胞菌 (*Pseudomonas methanolica*)、红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*)、灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*)、浅灰链霉菌 (*Streptomyces griseolus*)、普拉特链霉菌 (*Streptomyces platensis*) 和龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*)。

[0383] 在该方面的一个实施方案中,生物组合物包括龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*) 或其片段。

[0384] 在该方面的一个实施方案中,生物组合物包括溶剂。在进一步的实施方案中,溶剂

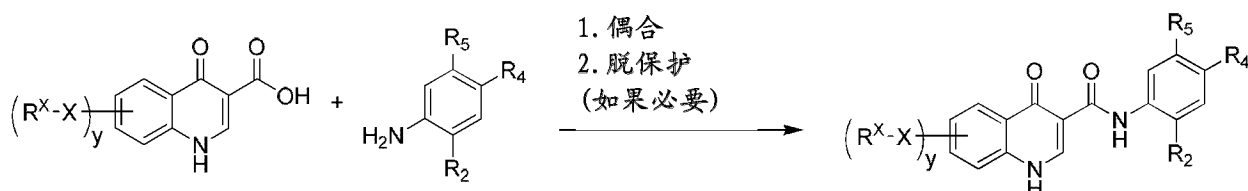
包括水。在更进一步的实施方案中,溶剂是缓冲液。在更进一步的实施方案中,溶剂是具有约 7 的 pH 的磷酸钾缓冲液。

[0385] III. 一般合成

[0386] 可以根据合成路线 1 合成式 1 化合物。

[0387] 合成路线 1

[0388]



[0389] 式 2

式 3

式 1

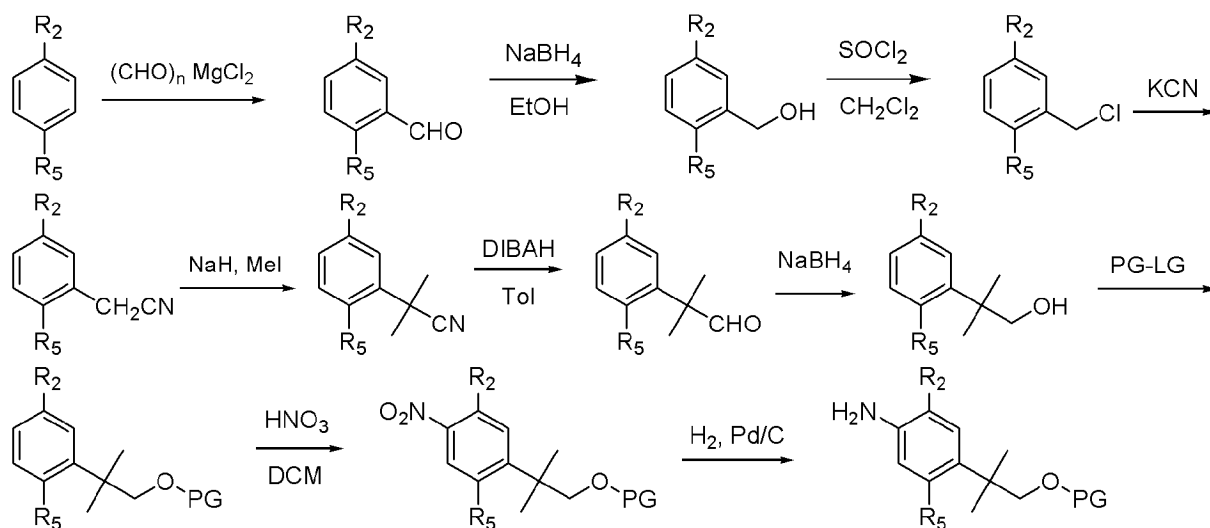
[0390] 在合成路线 1 中,使式 3 的苯胺类,其中 R_2 、 R_4 和 R_5 任选和独立地被上述定义的官能团取代,且其中那些官能团任选和独立地在其上带有保护基,与式 2 的羧酸中间体在偶合条件下反应。然后可以使带有一个或多个保护基的式 1 的衍生物脱保护,得到脱保护的式 1 的衍生物。

[0391] 可以通过将反应剂溶于适合的溶剂、用适合的偶合试剂任选地在适合的碱的存在下处理得到的溶液进行合成路线 1 中所述的偶合反应。

[0392] 可以根据合成路线 2 合成式 3 的苯胺类,其中 R_4 是被保护的 1-羟基-2-甲基丙-2-基。

[0393] 合成路线 2

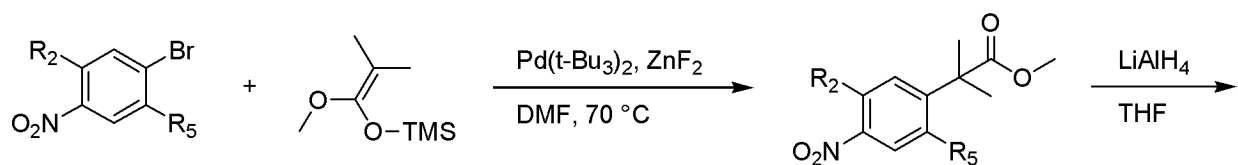
[0394]



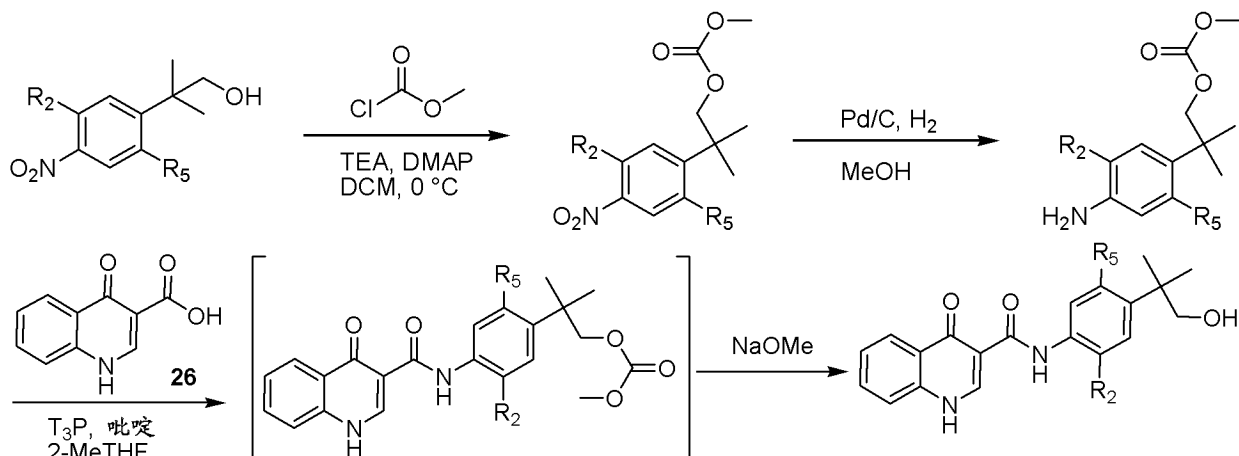
[0395] 或者,可以根据合成路线 3 合成式 3 的苯胺类,其中 R_4 是被保护的 1-羟基-2-甲基丙-2-基。

[0396] 合成路线 3

[0397]



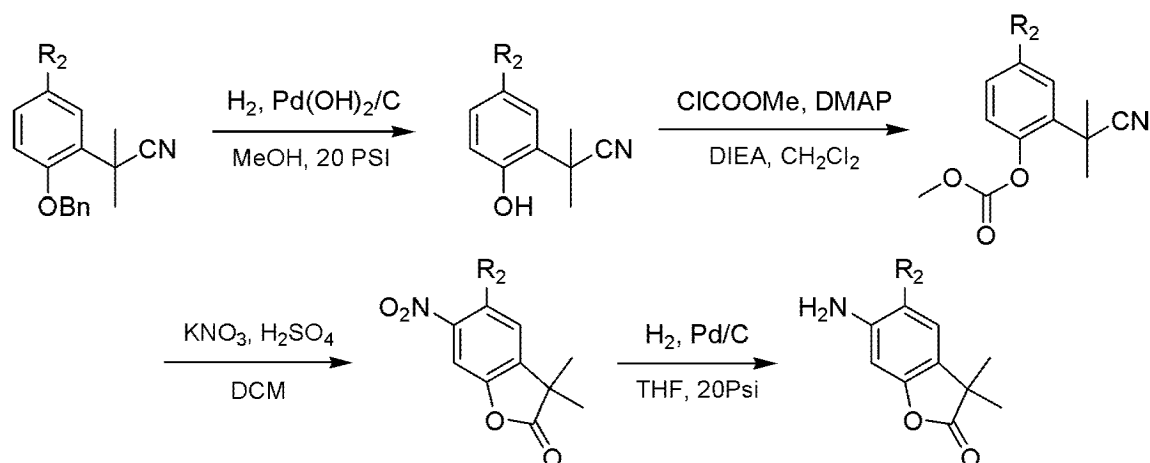
[0398]



[0399] 可以根据合成路线 4 合成式 3 的苯胺类, 其中 R_4 和 R_5 与所连接的苯环一起形成 3, 3-二甲基苯并呋喃-2(3H)-酮。

[0400] 合成路线 4

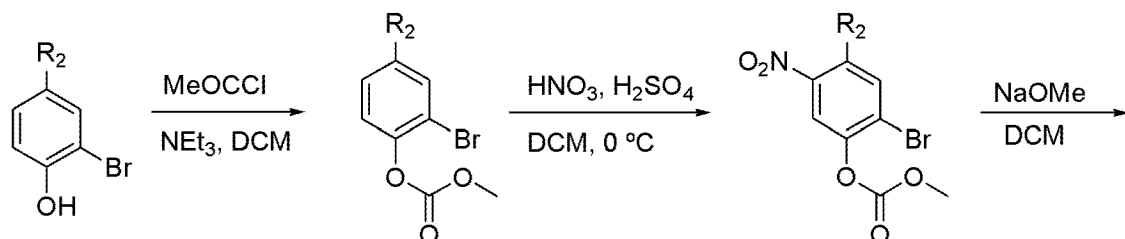
[0401]



[0402] 或者, 可以根据合成路线 5 合成式 3 的苯胺类, 其中 R_4 和 R_5 与所连接的苯环一起形成 3, 3-二甲基苯并呋喃-2(3H)-酮。

[0403] 合成路线 5

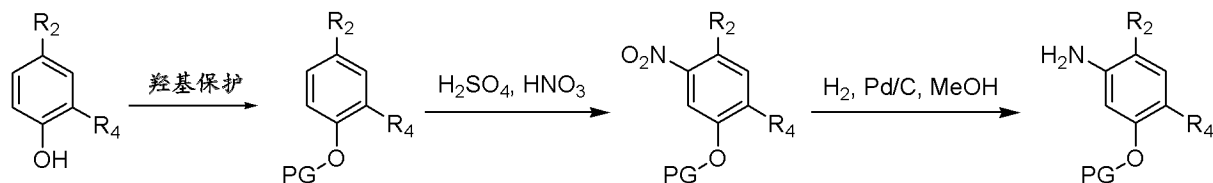
[0404]



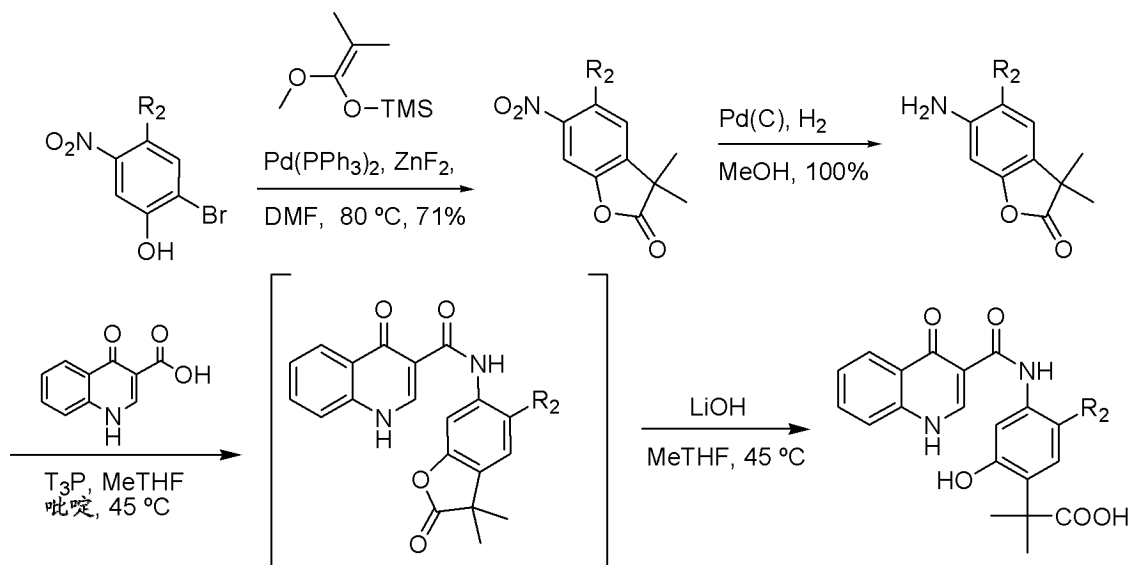
[0405] 可以根据合成路线 6 合成式 3 的苯胺类, 其中 R_5 是被保护的羟基。

[0406] 合成路线 6

[0407]



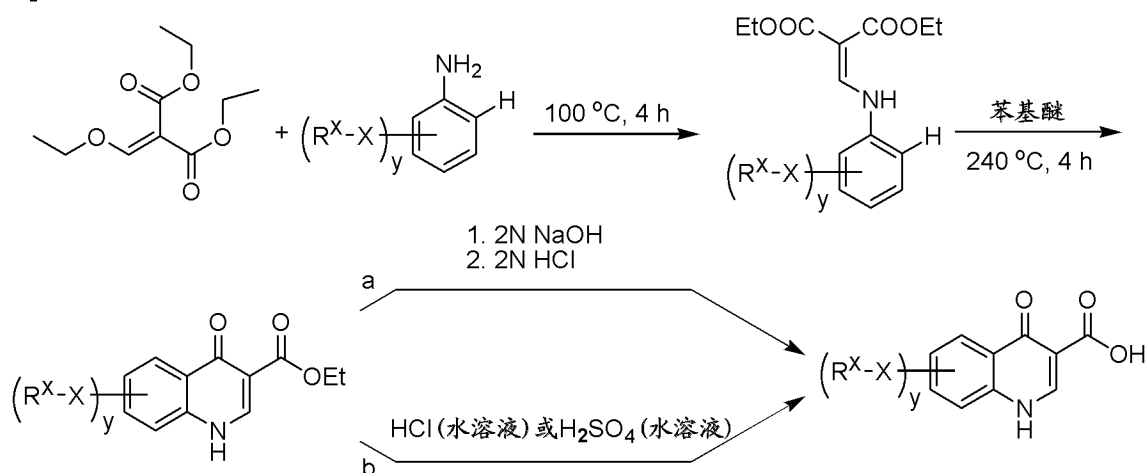
[0408]



[0409] 可以根据合成路线 7 合成式 2 的二氢喹啉羧酸, 其中苯胺衍生物进行与 $\text{EtOCH}=\text{C}(\text{COOEt})_2$ 的共轭加成, 然后进行热重排和水解。

[0410] 合成路线 7

[0411]



[0412] IV. 应用和使用方法

[0413] 药学上可接受的组合物

[0414] 在本发明的一个方面, 提供药学上可接受的组合物, 其中这些组合物包含如本文所述的任意化合物、和任选地包含药学上可接受的载体、辅助剂或赋形剂。在一些实施方案中, 这些组合物任选地进一步包含一种或多种另外的治疗剂。

[0415] 也应认识到, 本发明的某些化合物可以以游离形式存在用于治疗, 或者如果适当可以以其药学上可接受的衍生物或前药的形式存在。根据本发明, 药学上可接受的衍生物

或前药包括但不限于,药学上可接受的盐、酯、这些酯的盐或者在给予于有此需要的患者时能直接或间接提供本文所述的化合物或其代谢产物或残留物的任何另外的加合物或衍生物。

[0416] 本文使用的术语“药学上可接受的盐”是指在合理的医学判断的范围内,适用于与人和低级动物的组织接触而没有异常毒性、刺激性、过敏反应等的那些盐,而且具有合理的收益/风险比。“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的任何无毒性的盐或酯盐,当给予于接受者时,能够直接或间接提供本发明的化合物或其具有抑制活性的代谢产物或残留物。

[0417] 药学上可接受的盐是本领域公知的。例如 S. M. Berge 等人在 J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19 中详细描述了药学上可接受的盐,将其引入本文作参考。本发明化合物的药学上可接受的盐包括由适当的无机和有机的酸和碱产生的盐。药学上可接受的无毒性的酸加成盐的例子是与无机酸例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸形成的氨基盐,或是与有机酸例如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸形成的氨基盐,或通过使用本领域使用的其它方法例如离子交换法而形成的氨基盐。其它药学上可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。由碱衍生的适当的盐包括碱金属、碱土金属、铵和 $N^+(C_{1-4}\text{烷基})_4$ 盐。本发明也包括本文所述的化合物的任何碱性含氮基团的季化形式。通过这种季化可以获得水或油溶性或可分散于水或油中的产物。代表性的碱或碱土金属盐类包括钠、锂、钾、钙、镁盐等。在适当时,进一步的药学上可接受的盐包括无毒的铵盐、季铵盐,以及使用抗衡离子,例如卤化物、氢氧化物、羧酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、低级烷基磺酸盐和芳基磺酸盐形成的胺阳离子盐。

[0418] 如上所述,本发明的药学上可接受的组合物进一步包括药学上可接受的载体、辅助剂或赋形剂,其在本文中使用,包括任何和所有的溶剂、稀释剂或其它液体赋形剂、助分散剂或助悬剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,其适合所需的特定剂型。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 描述了在配制药学上可接受的组合物中使用的各种载体和已知的制备技术。除了例如由于产生任何不希望的生物学效应或以有害的方式干扰该药学上可接受的组合物的任何其它组分而与本发明化合物不相容的任何常规的载体介质以外,其使用也涵盖在本发明的范围内。可以用作药学上可接受的载体的物质的一些例子包括但不限于,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白例如人血清白蛋白、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸或山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质,例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段共聚物、羊毛脂、糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉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、乙基纤维素和醋酸纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;赋形

剂,例如可可脂和栓剂用蜡;油,例如花生油、棉籽油;红花油;芝麻油;橄榄油;玉米油和豆油;二醇类;例如丙二醇或聚乙二醇;酯类例如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;等渗盐水;林格液;乙醇,和磷酸盐缓冲溶液,以及其它无毒性的相容性润滑剂,例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,此外根据配制者的判断,该组合物中也可以存在着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0419] 化合物和药学上可接受的组合物的应用

[0420] 在另一个方面,本发明提供治疗与 CFTR 突变有关的病症、疾病或障碍或减轻其严重性的方法。在一些实施方案中,本发明提供治疗与 CFTR 活性不足有关的病症、疾病或障碍的方法,该方法包括给有此需要的受试者,优选哺乳动物给予包含式 1 化合物的组合物。

[0421] 在另一个方面中,本发明还提供了治疗患者疾病或减轻其严重性的方法,所述方法包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一,且上述疾病选自囊性纤维化、哮喘、吸烟诱发的 COPD、慢性支气管炎、鼻窦炎、便秘、胰腺炎、胰功能不全、先天性双侧输精管缺失 (CBAVD) 导致的男性不育症、轻度肺病、特发性胰腺炎、变应性支气管肺曲菌病 (ABPA)、肝病、遗传性肺气肿、遗传性血色病、凝血-纤溶缺陷,例如蛋白质 C 缺乏症、1 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷,例如家族性高胆固醇血症、1 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积症,例如 I-细胞病/假性胡尔勒综合征、粘多糖症、桑德霍夫/泰-萨克斯病、克-纳综合征 II 型、多内分泌腺病/高胰岛素血症、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺功能减退、黑素瘤、聚糖病 CDG 1 型、先天性甲状腺功能亢进症、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 缺乏症、尿崩症 (DI)、神经生长性 DI、肾性 DI、夏-马-图综合征、佩-梅病、神经变性疾病,例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、匹克病、若干聚谷氨酰胺神经性障碍,例如亨廷顿病、I 型脊髓小脑性共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩和肌强直性营养不良、以及海绵状脑病,例如遗传性克-雅病(由朊病毒蛋白加工缺陷导致)、法布里病、格-斯-施综合征、COPD、干眼病或斯耶格伦病、骨质疏松症、骨质减少、骨愈合和骨生长(包括骨修复、骨再生、减少骨质吸收和增加骨沉积)、戈勒姆综合征、氯化物通道病变,例如先天性肌强直 (Thomson 和 Becker 形式)、III 型巴特综合征、登特病、惊跳病、癫痫症、惊跳病、溶酶体贮存病、安格曼综合征和原发性纤毛运动障碍 (PCD),即纤毛结构和/或功能遗传障碍的术语,包括具有左右转位的 PCD(也称作卡特金纳综合征)、不具有左右转位的 PCD 和纤毛发育不良。

[0422] 在一些实施方案中,该方法包括治疗患者囊性纤维化或减轻其严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一些实施方案中,所述患者具有人 CFTR 的突变形式。在其他实施方案中,所述患者具有一种或多种人 CFTR 的如下突变: Δ F508、R117H 和 G551D。在一个实施方案中,该方法包括治疗具有人 CFTR 的 Δ F508 突变患者的囊性纤维化或减轻其严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括治疗具有人 CFTR 的 G551D 突变患者的囊性纤维化或减轻其严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括治疗在至少一个等位基因上具有人 CFTR 的 Δ F508 突变患者的囊性纤维化或减轻其严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括治疗在两个等位基因上具有人

CFTR 的 $\Delta F508$ 突变患者的囊性纤维化或减轻其严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括治疗在至少一个等位基因上具有人 CFTR 的 G551D 突变患者的囊性纤维化或减轻其严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括治疗在两个等位基因上具有人 CFTR 的 G551D 突变患者囊性纤维化或减轻其严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。

[0423] 在一些实施方案中,该方法包括减轻患者囊性纤维化的严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一些实施方案中,所述患者具有人 CFTR 的突变形式。在其他实施方案中,所述患者具有一种或多种人 CFTR 的如下突变: $\Delta F508$ 、R117H 和 G551D。在一个实施方案中,该方法包括减轻具有人 CFTR 的 $\Delta F508$ 突变的患者囊性纤维化的严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括减轻具有人 CFTR 的 G551D 突变的患者囊性纤维化的严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括减轻在至少一个等位基因上具有人 CFTR 的 $\Delta F508$ 突变的患者囊性纤维化的严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括减轻在两个等位基因上具有人 CFTR 的 $\Delta F508$ 突变的患者囊性纤维化的严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括减轻在至少一个等位基因上具有人 CFTR 的 G551D 突变的患者囊性纤维化的严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。在一个实施方案中,该方法包括减轻在两个等位基因上具有人 CFTR 的 G551D 突变的患者囊性纤维化的严重性,包括对该患者给予如本文所定义的组合物之一。

[0424] 在一些方面中,本发明提供了治疗患者骨质疏松症或减轻其严重性的方法,所述方法包括对该患者给予式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0425] 在一些实施方案中,治疗患者骨质疏松症或减轻其严重性的方法包括对该患者给予基本上非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0426] 在其他实施方案中,治疗患者骨质疏松症或减轻其严重性的方法包括对该患者给予非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0427] 在一些实施方案中,治疗患者骨质疏松症或减轻其严重性的方法包括对该患者给予如本文所述的药物组合物。

[0428] 在一些方面中,本发明提供了治疗患者骨质减少或减轻其严重性的方法,所述方法包括对该患者给予式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0429] 在一些实施方案中,治疗患者骨质减少或减轻其严重性的方法包括对该患者给予基本上非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0430] 在其他实施方案中,治疗患者骨质减少或减轻其严重性的方法包括对该患者给予非晶形的式 1 化合物。

[0431] 在一些实施方案中,治疗患者骨质减少或减轻其严重性的方法包括对该患者给予如本文所述的药物组合物。

[0432] 在一些方面中,本发明提供了患者骨愈合和 / 或骨修复的方法,所述方法包括对该患者给予式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0433] 在一些实施方案中,患者骨愈合和 / 或骨修复的方法包括对该患者给予基本上非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0434] 在其他实施方案中,患者骨愈合和 / 或骨修复的方法包括对该患者给予非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0435] 在一些实施方案中,患者骨愈合和 / 或骨修复的方法包括对该患者给予如本文所述的药物组合物。

[0436] 在一些方面中,本发明提供了减少患者骨质吸收的方法,所述方法包括对该患者给予式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0437] 在一些实施方案中,减少患者骨质吸收的方法包括对该患者给予基本上非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0438] 在其他实施方案中,减少患者骨质吸收的方法包括对该患者给予非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0439] 在一些方面中,本发明提供了增加患者骨沉积的方法,所述方法包括对该患者给予式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0440] 在一些实施方案中,增加患者骨沉积的方法包括对该患者给予基本上非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0441] 在其他实施方案中,增加患者骨沉积的方法包括对该患者给予非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0442] 在一些实施方案中,增加患者骨沉积的方法包括对该患者给予如本文所述的药物组合物。

[0443] 在一些方面中,本发明提供了治疗患者 COPD 或减轻其严重性的方法,所述方法包括对该患者给予式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0444] 在一些实施方案中,治疗患者 COPD 或减轻其严重性的方法包括对该患者给予基本上非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0445] 在其他实施方案中,治疗患者 COPD 或减轻其严重性的方法包括对该患者给予非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0446] 在一些实施方案中,治疗患者 COPD 或减轻其严重性的方法包括对该患者给予如本文所述的药物组合物。

[0447] 在一些方面中,本发明提供了治疗患者吸烟诱发的 COPD 或减轻其严重性的方法,所述方法包括对该患者给予式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0448] 在一些实施方案中,治疗患者吸烟诱发的 COPD 或减轻其严重性的方法包括对该患者给予基本上非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0449] 在其他实施方案中,治疗患者吸烟诱发的 COPD 或减轻其严重性的方法包括对该患者给予非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0450] 在一些实施方案中,治疗患者吸烟诱发的 COPD 或减轻其严重性的方法包括对该患者给予如本文所述的药物组合物。

[0451] 在一些方面中,本发明提供了治疗患者慢性支气管炎或减轻其严重性的方法,所述方法包括对该患者给予式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0452] 在一些实施方案中,治疗患者慢性支气管炎或减轻其严重性的方法包括对该患者给予基本上非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0453] 在其他实施方案中,治疗患者慢性支气管炎或减轻其严重性的方法包括对该患者

给予非晶形的式 1 化合物或其药学上可接受的盐。

[0454] 在一些实施方案中,治疗患者慢性支气管炎或减轻其严重性的方法包括对该患者给予如本文所述的药物组合物。

[0455] 根据一个可替代的实施方案,本发明提供一种治疗囊性纤维化的方法,所述方法包括对所述哺乳动物给予有效量的组合物的步骤,该组合物包含本发明化合物。

[0456] 根据本发明,化合物或药学上可接受的组合物的“有效量”是有效治疗如上所述一种或多种疾病、障碍或病症或减轻其严重性的用量。

[0457] 本发明的另一个方面提供给予药物组合物的方法,通过对患者每天至少一次口服给予包含式 1 化合物的药物组合物来进行。在一个实施方案中,该方法包括每隔 24 小时给予一次包含式 1 化合物的药物组合物。在另一个实施方案中,该方法包括每隔 12 小时给予一次包含式 1 化合物的药物组合物。在进一步的实施方案中,该方法包括每天给予三次包含式 1 化合物的药物组合物。在更进一步的实施方案中,该方法包括每隔 4 小时给予一次包含式 1 化合物的药物组合物。

[0458] 根据本发明的方法,化合物和组合物可以使用能有效治疗如上所述的一种或多种疾病或减轻其严重性的任何用量和任何给药途径来给予。

[0459] 在一些实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用于治疗患者的囊性纤维化或减轻其严重性,该患者的呼吸或非呼吸上皮细胞的顶膜中显示残留的 CFTR 活性。使用本领域已知的方法,例如标准的电生理学、生物化学或组织化学技术可以容易地检测上皮细胞表面残留的 CFTR 活性的存在。这些方法使用体内或离体的电生理技术、汗液或唾液的 Cl⁻ 浓度测定或者离体生物化学或组织化学技术来监测细胞表面密度,以鉴定 CFTR 活性。使用这些方法,可以容易地在各种不同突变体的杂合或纯合的患者,包括最常见的突变体 $\Delta F508$ 的杂合或纯合的患者中检测残留的 CFTR 活性。

[0460] 在另一个实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用于治疗患者的囊性纤维化或减轻其严重性,该患者具有用药理学方法或基因疗法诱导或增强的残留 CFTR 活性。这些方法增加细胞表面上存在的 CFTR 的量,因此在患者中诱导迄今不存在的 CFTR 活性或在患者中提高残留 CFTR 活性的现存水平。

[0461] 在一个实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用于治疗患者的囊性纤维化或减轻其严重性,该患者具有某些显示残留 CFTR 活性的基因型,例如,III 类突变(调节或门控受损)、IV 类突变(传导改变)或 V 类突变(合成减少)(Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521-529, 2000)。显示残留 CFTR 活性的其他患者基因型包括这些类型之一的纯合或任何其他类型突变体的杂合的患者,所述其他类型的突变包括 I 类突变、II 类突变或无分类的突变。

[0462] 在一个实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用于治疗患者的囊性纤维化或减轻其严重性,该患者具有某些临床显型,例如,典型地与上皮细胞顶膜上的残留 CFTR 活性的量相关的轻度至中度临床显型。这些显型包括显示胰功能不全的患者或者诊断为特发性胰腺炎和先天性双侧输精管缺失或者轻度肺病的患者。

[0463] 所需的确切的量对于不同的受治疗者而言是不同的,这取决于受治疗者的种类、

年龄和一般状况、感染的严重度、具体的药物、其给药方式等。本发明的化合物优选配制成易于给药和剂量均匀的剂量单位形式。本文使用的表述“剂量单位形式”是指适合所要治疗的患者的药物的物理上分离的单位。但是,应当理解,本发明的化合物和组合物的每日总使用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何具体的患者或生物体的具体有效剂量水平将取决于多种因素,包括所要治疗的疾病和该疾病的严重性;所使用的具体化合物的活性;所使用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给药时间、给药途径和所使用的具体化合物的排泄率;治疗的持续时间;与所使用的具体化合物联合或同时使用的药物等,以及医学领域公知的其它因素。本文使用的术语“患者”是指动物,优选哺乳动物,最优选人。

[0464] 本发明的药学上可接受的组合物可以通过口服、直肠、胃肠外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉剂、软膏、滴剂或贴剂)、经颊以及作为口腔或鼻喷雾剂等方式给予于人和其它动物,这取决于所要治疗的感染的严重性。在一些实施方案中,本发明的化合物可以以每日约 0.01mg/kg 至约 50mg/kg,优选约 0.5mg/kg 至约 25mg/kg 患者体重的剂量水平经口服或胃肠外给予,每日一次或多次,以获得所需的治疗效果。

[0465] 用于口服的液体剂型包括但不限于,药学上可接受的乳剂、微乳、溶液、混悬液、糖浆和酏剂。除了活性化合物以外,该液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是,棉籽油、花生油、玉米油、胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯,以及它们的混合物。除了惰性稀释剂,该口服组合物也可以包含辅助剂,例如湿润剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0466] 可以根据已知的技术,使用适当的分散或湿润剂和助悬剂配制可注射制剂,例如无菌注射用水或油性混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒性的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液、混悬液或乳剂,例如在 1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的载体或溶剂是水、林格液, U. S. P. 和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发性油一般也用作溶剂或助悬介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸例如油酸可以用于注射制剂中。

[0467] 注射制剂可以通过例如细菌截留性过滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,其中所述无菌固体组合物可以在临用前溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中。

[0468] 为了延长本发明化合物的效果,经常需要缓慢地吸收皮下或肌肉注射的化合物。这可以通过使用水溶性差的晶体或无定形物质的液体混悬液来实现。那么,化合物的吸收速率将取决于其溶出速度,溶出速度又可能取决于晶体大小和晶型。可替代地,延迟胃肠外给药的化合物形式的吸收可以通过将该化合物溶解或混悬于油性载体中来实现。制备可注射的储库型(长效型)剂型,包括在生物可降解的聚合物例如聚乳酸-聚乙醇酸交酯中形成化合物的微囊基质。根据化合物与聚合物的比例和所使用的具体聚合物的性质,可以控制化合物的释放速率。其它生物可降解的聚合物的例子包括聚(正酯)和聚(酸酐)。储库型注射剂也可以通过将化合物包埋在与机体组织相容的脂质体或微乳中来制备。

[0469] 直肠或阴道给予的组合物优选是栓剂,其可以通过将本发明的化合物与适当的非

刺激性赋形剂或载体例如可可脂、聚乙二醇或栓剂用蜡混合来制备,其中所述赋形剂或载体在环境温度下是固体,但在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中融化并释放出活性化合物。

[0470] 口服给药的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,活性化合物与至少一种惰性的、药学上可接受的赋形剂或载体混合,所述赋形剂或载体例如为柠檬酸钠或磷酸二钙、和 / 或 a) 填充剂或增充剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,b) 粘合剂,例如,羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,c) 保湿剂,例如甘油,d) 崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠,e) 溶解阻滞剂,例如石蜡,f) 吸收促进剂,例如季铵类化合物,g) 湿润剂,例如十六醇和单硬脂酸甘油酯,h) 吸收剂,例如高岭土和膨润土,和 i) 润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,及它们的混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,该剂型也可以包含缓冲剂。

[0471] 相似类型的固体组合物也可以在软和硬的填充性明胶胶囊中用作填充剂,胶囊使用例如乳糖或奶糖,以及高分子聚乙二醇等赋形剂。可以用包衣和壳例如肠溶衣和药物配制领域公知的其它包衣材料来制备片剂、锭剂、胶囊、丸剂和颗粒剂等固体剂型。它们任选可以包含遮光剂,也可以是这样一种组合物:它们只在或优选在肠道的某一部分(任选地以延迟方式)释放一种或多种活性成分。可以使用的包埋组合物的例子包括聚合物和蜡。相似类型的固体组合物也可以在软和硬的填充性明胶胶囊中用作填充剂,胶囊所用赋形剂例如为乳糖或奶糖,以及高分子量聚乙二醇等。

[0472] 活性化合物也可以存在于具有一种或多种上述赋形剂的微囊中。可以用包衣和壳例如药物配制领域公知的肠溶衣和其它包衣材料来制备片剂、糖衣片、胶囊、丸剂和颗粒等固体剂型。在这些固体剂型中,活性化合物可以与至少一种惰性稀释剂,例如蔗糖、乳糖或淀粉混合。这些剂型也可以例如如一般实践,包含惰性稀释剂以外的其它物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂,例如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况中,该剂型也可以包含缓冲剂。它们任选可以包含遮光剂,也可以是这样一种组合物:它们只在或优选在肠道的某一部分任选地以延迟方式释放一种或多种活性成分。可以使用的包埋组合物的例子包括聚合物和蜡。

[0473] 本发明化合物的局部或经皮给药的剂型包括软膏、糊剂、乳剂、洗剂、凝胶剂、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。活性组分在无菌条件下与药学上可接受的载体和任何需要的防腐剂或可能需要的缓冲剂混合。眼用制剂、滴耳剂和滴眼剂也涵盖在本发明的范围内。此外,本发明涵盖透皮贴剂的使用,它的附加优点在于向机体可控地递送化合物。这类剂型可以通过将化合物溶解或分散于适当的介质中来制备。也可以使用吸收增强剂来增加化合物通过皮肤的流量。可以通过提供速率控制膜或通过将化合物分散于聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0474] 在本发明中用作 CFTR 调节剂的化合物的活性可以根据本领域一般所述的方法和在本文实施例中所述的方法来测定。

[0475] 同时应当认识到,本发明的化合物和药学上可接受的组合物可以用在联合治疗中,也就是说,本发明的化合物和药学上可接受的组合物可以在一种或多种另外的所需治疗或医学操作的同时、之前或之后给予。在联合治疗方案中使用的治疗(治疗或操作)的

具体组合将考虑所需的治疗和 / 或操作与所要实现的所需治疗效果之间的相容性。也应当认识到,所使用的治疗可以对相同的疾病达到期望的效果(例如,本发明的化合物可以与另一种用于治疗相同疾病的药物同时给予),或者它们可以实现不同的效果(例如,控制任何不良反应)。本文所用的通过正常给药来治疗或预防特定疾病或病症的另外的治疗剂被称作“适合所要治疗的疾病或病症”。

[0476] 在一个实施方案中,另外的治疗剂选自溶粘蛋白剂、支气管扩张剂、抗生素、抗感染剂、抗炎剂、本发明化合物以外的 CFTR 调节剂或营养剂。

[0477] 在一个实施方案中,另外的活性剂是抗生素。本文有用的典型抗生素包括妥布霉素,包括妥布霉素吸入粉末(TIP);阿奇霉素;氨曲南,包括氨曲南的气雾剂形式;阿米卡星,包括其脂质体制剂;环丙沙星,包括其适合于通过吸入给药的制剂;左氧氟沙星,包括其气雾剂形式;和两种抗生素的组合,例如磷霉素和妥布霉素。

[0478] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是溶粘蛋白剂。本文有用的典型溶粘蛋白剂包括 **Pulmozyme®**。

[0479] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是支气管扩张剂。典型的支气管扩张剂包括沙丁胺醇、硫酸奥西那林(metaprotenerol sulfate)、醋酸吡布特罗、沙美特罗或硫酸 tetrabuline。

[0480] 在另一个实施方案中,另外的活性剂有效恢复肺气道表面液体。这种活性剂改善细胞内和外部盐的运动,使得肺气道中的粘液更多地被水化,且由此更易于清除。典型的这种活性剂包括高张生理盐水、地纽福索钠([[(3S,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1-基)-3-羟基氧戊环-2-基]甲氧基-羟基磷酰基][[(2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-二氧代嘧啶-1-基)-3,4-二羟基氧戊环-2-基]甲氧基-羟基磷酰基]氧基-羟基磷酰氯]磷酸氢盐)或 bronchitol(甘露醇吸入制剂)。

[0481] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是抗炎剂,即可以减轻肺中炎症的活性剂。本文有用的典型的这种活性剂包括布洛芬、二十二碳六烯酸(DHA)、西地那非、可吸入谷胱甘肽、吡格列酮、羟氯喹或斯伐他汀。

[0482] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是非化合物 1 的 CFTR 调节剂,即具有调节 CFTR 活性的效果的活性剂。典型的这种活性剂包括阿他卢仑(“**PTC124®**”; 3-[5-(2-氟苯基)-1,2,4-噁二唑-3-基]苯甲酸)、西那普肽、杜拉霉素、地来司他(人重组中性白细胞弹性蛋白酶抑制剂)、考前列酮(7-{(2R,4aR,5R,7aR)-2-[(3S)-1,1-二氟-3-甲基戊基]-2-羟基-6-氧代八氢环戊[b]吡喃-5-基}庚酸)或(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸。在另一个实施方案中,另外的活性剂是(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸。

[0483] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是营养剂。典型的这种活性剂包括胰脂肪酶(胰腺酶替代物),包括 **Pancrease®**、**Pancreacarb®**、**Ultrase®** 或 **Creon®**、**Liprotomase®**(在先的 **Trizyte®**)、**Aquadeks®** 或谷胱甘肽吸入物。在一个实施方案中,另一种营养剂是胰脂肪酶。

[0484] 其他治疗剂在本发明组合物中的含量将不超过在包含该治疗剂作为唯一活性剂的组合物中通常的给药量。优选地,其他治疗剂在目前所公开的组合物中的量将是通常的

包含该药物作为唯一治疗活性剂的组合物中的含量的约 50% -100%。

[0485] 本发明化合物或其药学上可接受的组合物也可以引入到涂覆可植入医药装置的组合物中,如假肢、人工瓣膜、脉管移植物、斯坦特印模和导管。因此,在另一个方面中,本发明的包括用于涂覆可植入装置的组合物,其包含一般如上所述和本文的类型和亚类中的本发明化合物和适合于涂覆所述可植入装置的载体。在另一个方面中,本发明包括可植入装置,其上涂覆了一般如上所述和本文的类型和亚类中的本发明化合物和适合于涂覆所述可植入装置的载体。适合的涂料和涂覆可植入装置的一般制备方法描述在美国专利 US 6,099,562、5,886,026 和 5,304,121 中。涂料典型地是生物可相容的聚合材料,如水凝胶聚合物、聚甲基二硅氧烷、聚己内酯、聚乙二醇、聚乳酸、乙烯乙酸乙烯酯共聚物和它们的混合物。涂料可以任选地进一步被适合的氟硅酮、多糖、聚乙二醇、磷脂或其组合的表层所覆盖,以赋予组合物的控释特征。

[0486] 本发明的另一个方面涉及在生物样品或患者中调节 CFTR 活性的方法(例如体外或体内),该方法包括对所述患者给予或使所述生物样品接触式 1 化合物或包含所述化合物的组合物。本文所用的术语“生物样品”包括但不限于细胞培养物或其提取物;从哺乳动物或其提取物获得的活组织检查材料;和血液、唾液、尿、粪便、精液、泪液或其他体液或者其提取物。

[0487] 调节生物样品中的 CFTR 用于本领域技术人员公知的不同目的。这种目的的实例包括但不限于研究生物学和病理学现象中的 CFTR;和新 CFTR 调节剂的对比评价。

[0488] 在另一个实施方案中,提供了在体外或体内调节阴离子通道活性的方法,所述方法包括使所述通道与式 1 化合物接触的步骤。在优选的实施方案中,阴离子通道是氯离子通道或碳酸氢根离子通道。在其他优选的实施方案中,阴离子通道是氯离子通道。

[0489] 根据可替代选择的实施方案,本发明提供了增加细胞膜中功能性 CFTR 数量的方法,所述方法包括使所述细胞与式 1 化合物接触的步骤。

[0490] 根据另一个实施方案,通过测定跨膜电位来确定 CFTR 活性。用于测定生物样品中跨膜电位的方式可以使用任意本领域公知的方法,例如光学膜电位测定法或其他电生理学方法。

[0491] 光学膜电位测定法使用 Gonzalez 和 Tsien 所述的电压-敏感性 FRET 传感器(参见 Gonzalez, J.E. 和 R.Y.Tsien(1995) “Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells.” *Biophys J* 69(4):1272-80, 和 Gonzalez, J.E. 和 R.Y.Tsien(1997); “Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer” *Chem Biol* 4(4):269-77) 以及用于测定荧光改变的仪器例如电压/离子探针读取器 (Voltage/Ion Probe Reader) (VIPR) (参见 Gonzalez, J.E., K.Oades 等人, (1999) “Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets” *Drug Discov Today* 4(9):431-439)。

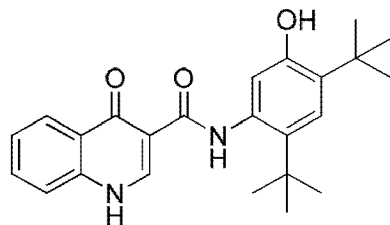
[0492] 这些电压敏感性测定法基于膜-可溶性、电压敏感性染料 DiSBAC₂(3) 与附着于质膜外叶并且作为 FRET 供体起作用的荧光磷脂 CC2-DMPE 之间的荧光共振能量转移 (FRET) 改变。膜电位 (V_m) 改变导致带负电荷的 DiSBAC₂(3) 重新分布通过质膜且能量由此因 CC2-DMPE 改变而转移。可以使用 VIPRTM II 监测荧光发射改变,所述 VIPRTM II 是集成的液体处理机和荧光检测器,设计它是为了进行基于细胞的 96- 或 384- 孔微量滴定板上的筛

选。

[0493] 在一个实施方案中,本发明提供了调节生物样品中 CFTR 活性的方法,所述方法包括使所述生物样品与式 1 化合物或其药学上可接受的盐接触的步骤,其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 Y 如上述所定义。

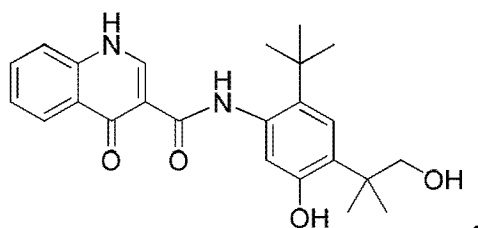
[0494] 在一个实施方案中,本发明提供了调节生物样品中 CFTR 活性的方法,所述方法包括使所述生物样品与如下结构的化合物或其药学上可接受的盐接触的步骤:

[0495]



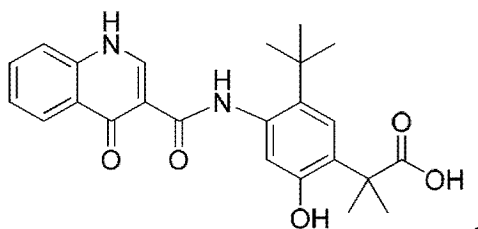
[0496] 在一个实施方案中,本发明提供了调节生物样品中 CFTR 活性的方法,所述方法包括使所述生物样品与如下结构的通过本文所述方法生产的化合物或其药学上可接受的盐接触的步骤:

[0497]



[0498] 在一个实施方案中,本发明提供了调节生物样品中 CFTR 活性的方法,所述方法包括使所述生物样品与如下结构的通过本文所述方法生产的化合物或其药学上可接受的盐接触的步骤:

[0499]

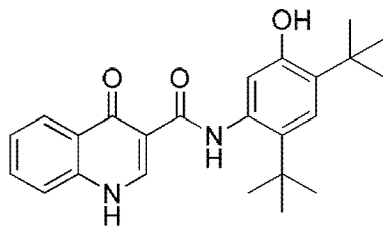


[0500] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗患者疾病或减轻其严重性的方法,所述方法包括对该患者给予有效量的式 I 化合物或其药学上可接受的盐,其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 Y 如上述所定义,且所述疾病选自囊性纤维化、哮喘、吸烟诱发的 COPD、慢性支气管炎、鼻窦炎、便秘、胰腺炎、胰功能不全、先天性双侧输精管缺失 (CBAVD) 导致的男性不育症、轻度肺病、特发性胰腺炎、变应性支气管肺曲菌病 (ABPA)、肝病、遗传性肺气肿、遗传性血色病、凝血-纤溶缺陷,例如蛋白质 C 缺乏症、1 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷,例如家族性高胆固醇血症、1 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积症,例如 I- 细胞病 / 假性胡尔勒综合征、粘多糖症、桑德霍夫 / 泰-萨克斯病、克-纳综合征 II 型、多内分泌腺病 / 高胰岛素血症、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺功能减退、黑素瘤、聚糖病 CDG 1 型、先天性甲状腺功能亢进症、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 缺乏

症、尿崩症 (DI)、神经生长性 DI、肾性 DI、夏 - 马 - 图综合征、佩 - 梅病、神经变性疾病,例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、匹克病、若干聚谷氨酰胺神经性障碍,例如亨廷顿病、I 型脊髓小脑性共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩和肌强直性营养不良、以及海绵状脑病,例如遗传性克 - 雅病 (由朊病毒蛋白加工缺陷导致)、法布里病、格 - 斯 - 施综合征、COPD、干眼病或斯耶格伦病。

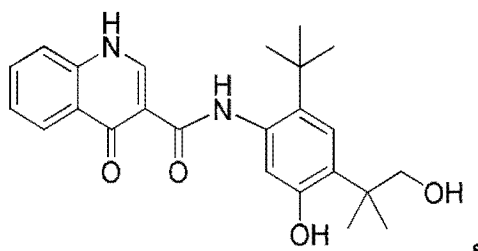
[0501] 在一个实施方案中,该方法包括治疗患者疾病或减轻其严重性,通过对该患者给予有效量的具有如下结构的通过本文所述方法生产的化合物或其药学上可接受的盐来进行:

[0502]



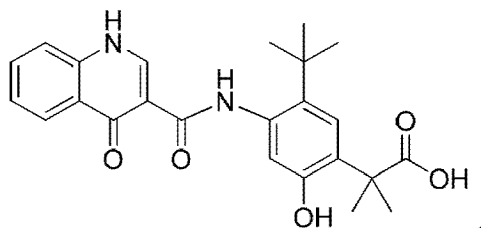
[0503] 在另一个实施方案中,该方法包括治疗患者疾病或减轻其严重性,通过对该患者给予有效量的具有如下结构的通过本文所述方法生产的化合物或其药学上可接受的盐来进行:

[0504]



[0505] 在另一个实施方案中,该方法包括治疗患者疾病或减轻其严重性,通过对该患者给予有效量的具有如下结构的通过本文所述方法生产的化合物或其药学上可接受的盐来进行:

[0506]



[0507] 在另一个方面中,本发明提供了用于在体外或体内测定生物样品中 CFTR 或其片段活性的试剂盒,所述试剂盒包括 (i) 包含式 1 化合物或任意上述实施方案的组合物;和 (ii) 用于如下内容的说明书:a) 将该组合物与生物样品接触;和 b) 测定所述 CFTR 或其片段的活性。

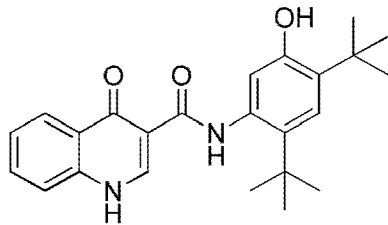
[0508] 在一个实施方案中,试剂盒进一步包括下列用于下列内容的说明书:a) 将另外的组合物与该生物样品接触;b) 在所述另外的化合物存在下测定所述 CFTR 或其片段的活性;和 c) 将在另外的化合物存在下的 CFTR 或其片段的活性与在式 1 的组合物存在下的 CFTR

的密度进行比较。

[0509] 在实施方案中,试剂盒用于测定 CFTR 密度。

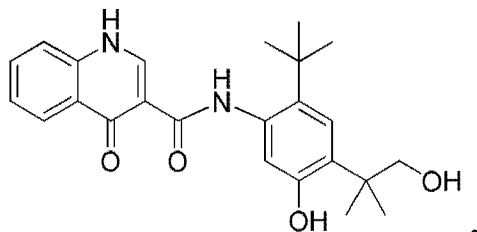
[0510] 在一个实施方案中,试剂盒包括包含具有如下结构的通过本文所述方法生产的化合物或其药学上可接受的盐的组合物:

[0511]



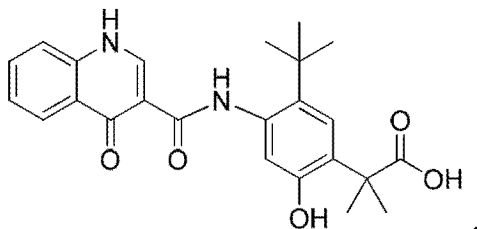
[0512] 在一个实施方案中,试剂盒包括包含具有如下结构的通过本文所述方法生产的化合物或其药学上可接受的盐的组合物:

[0513]



[0514] 在一些实施方案中,试剂盒包括包含具有如下结构的通过本文所述方法生产的化合物或其药学上可接受的盐的组合物:

[0515]

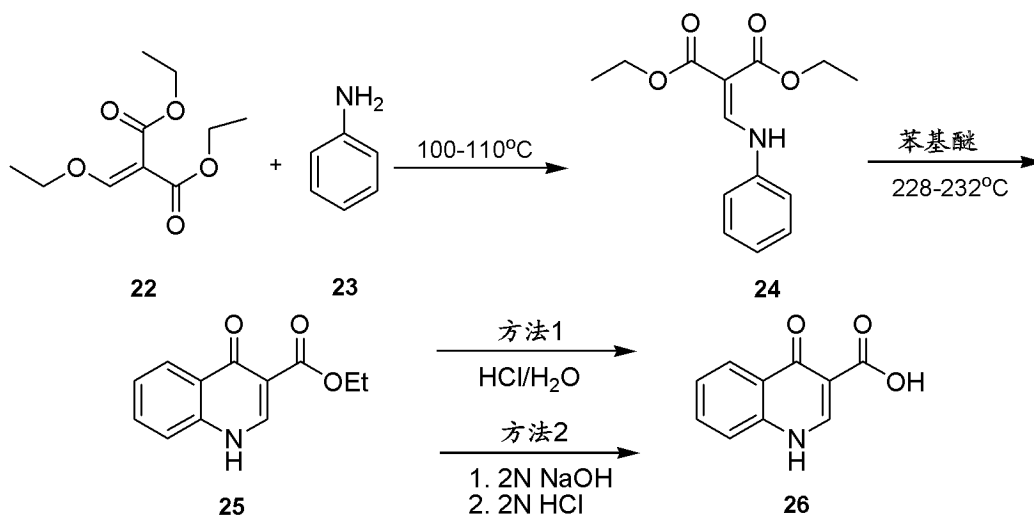


[0516] 为了更完整地理解本文所述的本发明,举出下列实施例。应理解这些实施例仅用于示例目的,而不用来以任何方式限定本发明。

[0517] V. 实施例

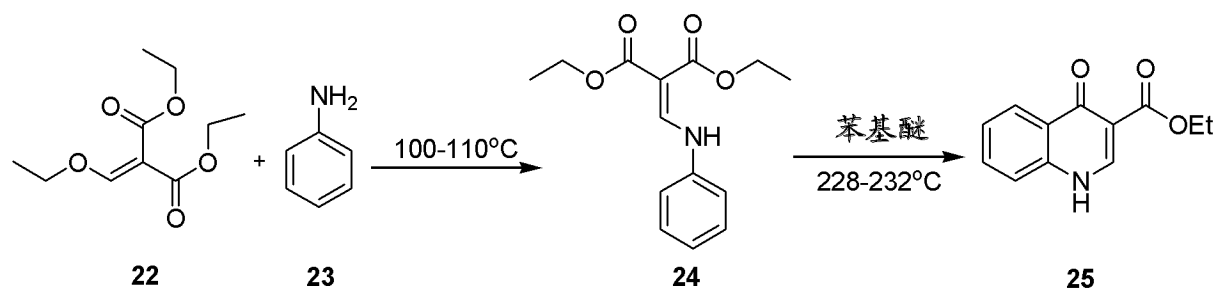
[0518] 制备 1 :4- 氧代 -1,4- 二氢喹啉 -3- 羧酸 (26) 的全合成

[0519]



[0520] 4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸乙酯 (25) 的制备方法苯基醚

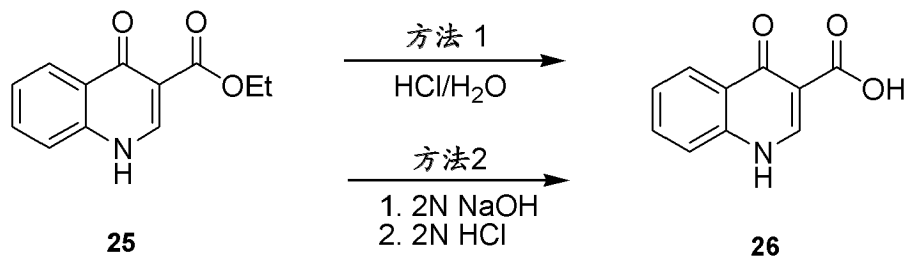
[0521]



[0522] 将化合物 23 (4.77g, 47.7mmol) 滴加到 N₂ 气流界面下的化合物 22 (10g, 46.3mmol) 中, 以使乙醇在低于 30°C 挥发 0.5 小时。然后将该溶液加热至 100-110°C, 搅拌 2.5 小时。在将该混合物冷却至低于 60°C 后, 加入二苯基醚。将得到的溶液滴加到已经在 N₂ 气流界面下加热至 228-232°C 1.5 小时的二苯基醚中, 以使乙醇挥发。将该混合物在 228-232°C 再搅拌 2 小时, 冷却至 100°C 以下, 然后加入庚烷以沉淀产物。将得到的淤浆在 30°C 搅拌 0.5 小时。然后过滤固体, 用庚烷洗涤滤饼, 真空干燥, 得到化合物 25, 为棕色固体。¹H NMR (DMSO-d₆; 400MHz) δ 12.25 (s), δ 8.49 (d), δ 8.10 (m), δ 7.64 (m), δ 7.55 (m), δ 7.34 (m), δ 4.16 (q), δ 1.23 (t)。

[0523] 4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸 (26) 的制备方法

[0524]



[0525] 方法 1

[0526] 将化合物 25 (1.0eq) 混悬于 HCl (10.0eq) 和 H₂O (11.6vol) 溶液。将该淤浆加热至 85-90°C, 不过, 可替代选择的温度也适合于这种水解步骤。例如, 可以在约 75-约 100°C 的温度进行水解。在一些情况中, 在约 80-约 95°C 的温度进行水解。在其他情况中, 在约 82-约 93°C (例如约 82.5-约 92.5°C 或约 86-约 89°C) 进行水解步骤。在约 85-90°C 搅拌

约 6.5 小时后,采样反应体系用于反应完成。在任意适合于水解的温度下进行搅拌。然后将该溶液冷却至 20-25℃,过滤。用 H₂O(2vol×2) 冲洗反应器 / 滤饼。然后用 2vol H₂O 将滤饼洗涤至 pH ≥ 3.0。然后在 60℃ 真空干燥滤饼,得到化合物 26。

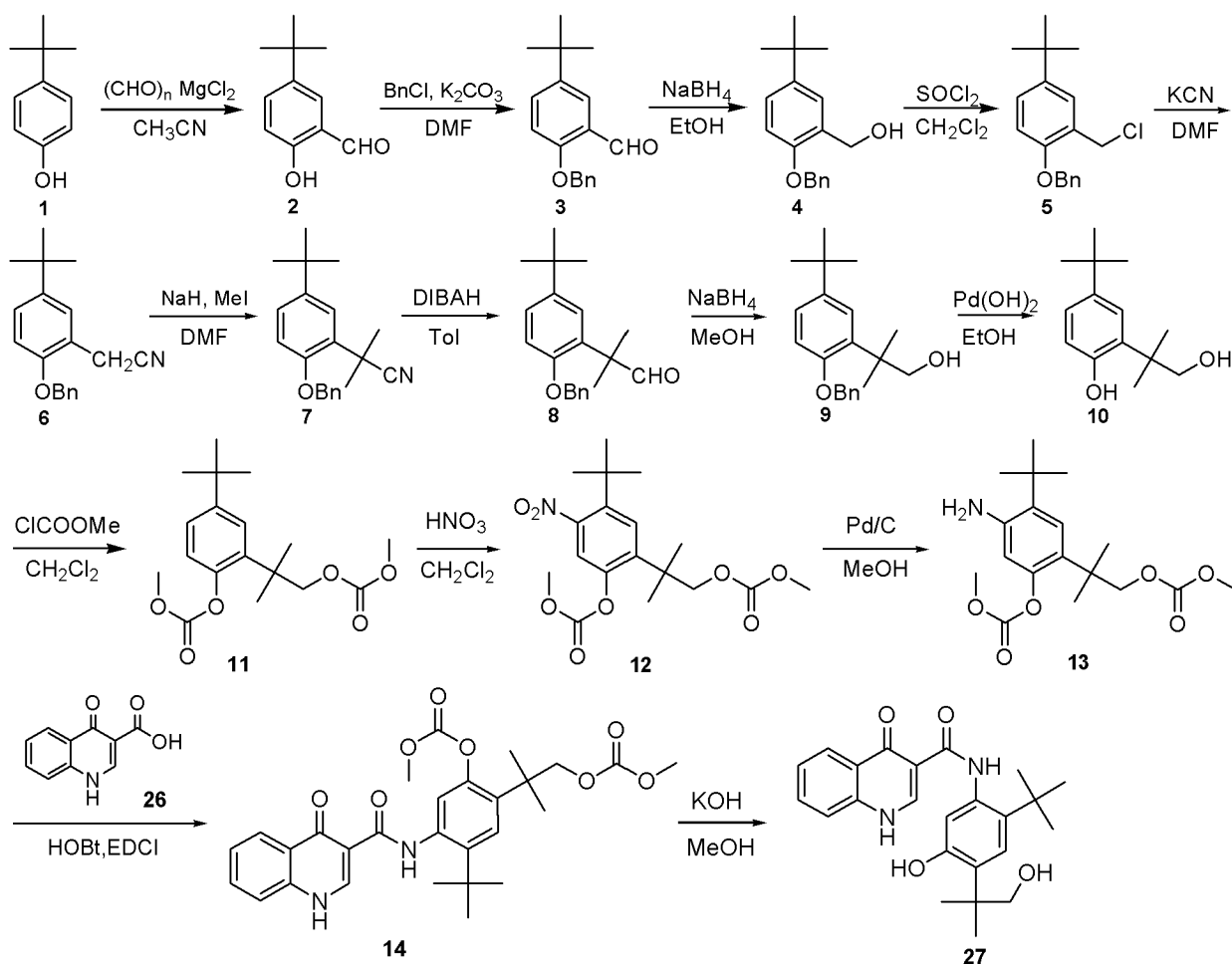
[0527] 方法 2

[0528] 将化合物 25(11.3g, 52mmol) 加入到 10% NaOH(水溶液)(10mL) 和乙醇(100mL) 混合物中。将该溶液加热至回流 16 小时,冷却至 20-25℃,然后用 8% HCl 将 pH 调节至 2-3。然后将该混合物搅拌 0.5 小时,过滤。用水(50mL) 洗涤滤饼,然后真空干燥,得到化合物 26,为棕色固体。¹H NMR(DMSO-d₆;400MHz) δ 15.33(s), δ 13.39(s), δ 8.87(s), δ 8.26(m), δ 7.87(m), δ 7.80(m), δ 7.56(m)。

[0529] 实施例 1:N-(2-叔丁基-5-羟基-4-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺(27)的全合成

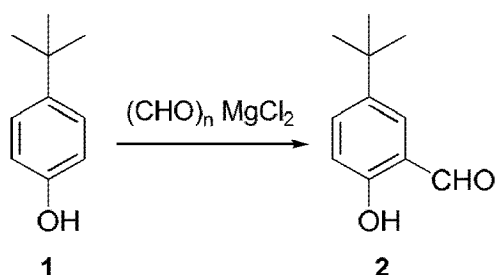
[0530] 化合物 27 合成的总体合成路线如下所示,然后进行每一合成中间体的合成操作。

[0531]



[0532] 2-羟基-5-叔丁基苯甲醛(2)的制备方法

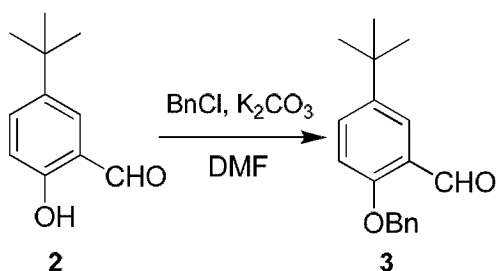
[0533]



[0534] 在 N_2 气氛中向搅拌的化合物 1 (700g, 4.66mol) 在 CH_3CN (7.0L) 中的溶液中加入 $MgCl_2$ (887g, 9.32mol)、多聚甲醛 (1190g) 和 TEA (2.5L, 17.9mol)。将该混合物加热至回流 5 小时。冷却至室温后, 向该混合物中加入 2L 冰水, 然后加入 6L 3M HCl (水溶液)。将该混悬液保持搅拌至溶液变澄清。分离有机层, 用 MTBE (3L $\times$ 3) 萃取水层。合并有机层, 浓缩至干。将残余物溶于 MTBE (4000mL), 用水 (1000mL $\times$ 2) 和盐水 (1000mL) 洗涤, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 然后浓缩至得到化合物 2, 为淡黄色固体, 将其不经进一步干燥或纯化用于下一步反应。 1H NMR ($CDCl_3$; 400MHz) δ 10.86 (s), δ 9.89 (s), δ 7.59 (m), δ 7.51 (d), δ 6.94 (d), δ 10.61 (s)。

[0535] 2-(苄氧基)-5-叔丁基苯甲醛 (3) 的制备方法

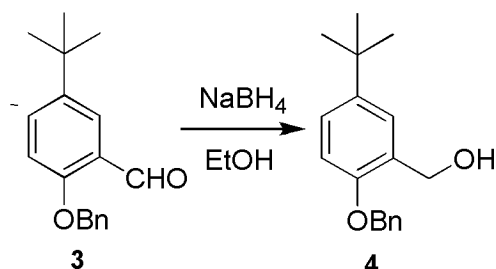
[0536]



[0537] 向搅拌的化合物 2 (614.5g, 3.33mol) 在 DMF (3.5L) 中的溶液中加入 K_2CO_3 (953g, 6.90mol) 和苄基氯 (480g, 3.80mol)。将该混合物加热至 90 $^{\circ}C$, 保持搅拌 3 小时。将该混悬液冷却至室温, 然后加入 MTBE (2L), 然后加入水 (12L)。然后将该混合物搅拌 10 分钟, 分离水层, 用 MTBE (2L $\times$ 3) 萃取。合并有机层, 用水 (2L $\times$ 2) 和盐水 (1.5L $\times$ 1) 洗涤, 浓缩至得到化合物 3, 为淡黄色固体。 1H NMR ($DMSO-d_6$; 400MHz) δ 10.42 (s), δ 7.71 (m), δ 7.51 (m), δ 7.43 (m), δ 7.35 (m), δ 7.24 (m), δ 5.27 (s), δ 1.26 (s)。

[0538] 2-(苄氧基)-5-叔丁基苯醇 (4) 的制备方法

[0539]

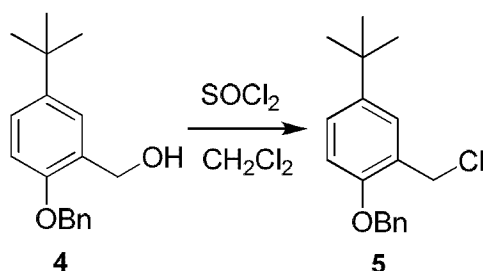


[0540] 在 0-20 $^{\circ}C$ 向搅拌的化合物 3 (974g, 3.63mol) 在 MeOH (4000mL) 中的混悬液中缓慢加入 $NaBH_4$ (121g, 3.20mol)。将该溶液在 15 $^{\circ}C$ 保持搅拌 3 小时, 然后冷却至 0 $^{\circ}C$ 。在低于 20 $^{\circ}C$ 滴加 2N HCl (水溶液) (1300mL)。然后过滤该溶液, 蒸发至干, 将残余物溶于 MTBE (5L)。然后用水 (2L $\times$ 2) 和盐水 (1.5L $\times$ 1) 洗涤该溶液。蒸发溶剂, 得到化合物 4, 为淡黄色固体,

将其不经进一步纯化用于下一步反应。 ^1H NMR(DMSO- d_6 ;400MHz) δ 7.40(m), δ 7.32(m), δ 7.17(m), δ 6.91(m), δ 5.09(s), δ 5.00(t), δ 4.56(d), δ 1.26(s)。

[0541] 2-(苄氧基)-5-叔丁基苄基氯 (5) 的制备方法

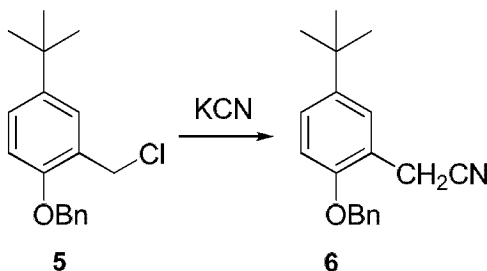
[0542]



[0543] 在 0℃向搅拌的化合物 4(963g,3.56mol) 在无水 DCM(2000mL) 中的溶液中缓慢加入 SOCl_2 (535g,4.5mol)。将该混合物在 20℃保持搅拌 2 小时,然后真空浓缩,得到化合物 5,为油状物,将其不经进一步干燥或纯化用于下一步反应。

[0544] 2-(苄氧基)-5-叔丁基苄腈 (6) 的制备方法

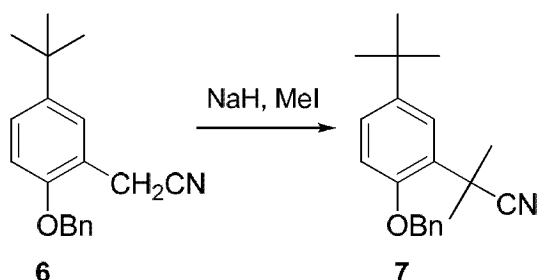
[0545]



[0546] 向搅拌的化合物 5(1045g,3.54mol) 在无水 DMF(1000mL) 中的溶液中加入 KCN(733g,11.3mol)。将该混合物在 35℃搅拌 24 小时,然后倾入水 (10L)。加入乙酸乙酯 (4L),将该混合物搅拌 30 分钟。然后分离有机层,用乙酸乙酯 (3000mL×2) 萃取水层。合并有机层,用水 (4L×2) 和盐水 (3L×1) 洗涤,然后真空浓缩,得到化合物 6,为黄色固体。 ^1H NMR(DMSO- d_6 ;400MHz) δ 7.51(m), δ 7.37(m), 7.02(d), δ 5.17(s), δ 3.88(s), 1.26(s)。

[0547] 2-(2-(苄氧基)-5-叔丁基苄基)-2-甲基丙腈 (7) 的制备方法

[0548]

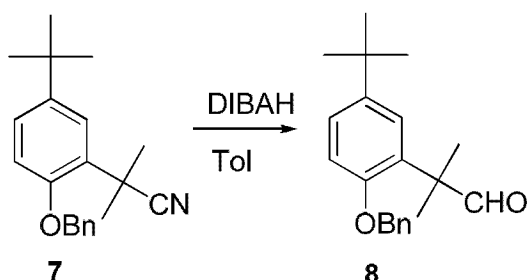


[0549] 在 20℃向搅拌的 NaH(86g,2.15mol,60%的矿物油溶液) 在 DMF(1000mL) 中的混悬液中滴加化合物 6(100.0g,0.358mol) 在 DMF(500mL) 中的溶液。搅拌 30 分钟后,在低于 30℃在 2 小时期限过程中滴加 MeI(205g,1.44mol) 的 DMF(500mL) 溶液。将该混悬液在 25-30℃搅拌 1.5 小时,然后缓慢加入冰 (100g),直到无气体生产为止。通过缓慢添加 2N HCl 将 pH 调节至约 7。用水 (4L) 和 MTBE (2L) 稀释该混合物。分离有机层,用 MTBE (500mL×2) 萃取水层。用水和盐水洗涤合并的有机层,用 Na_2SO_4 干燥,过滤,然后真空浓缩,得到化合物

7, 为白色固体。 ^1H NMR(DMSO- d_6 ;400MHz) δ 7.56(m), δ 7.40(m), δ 7.34(m), δ 7.10(d), δ 5.21(s), δ 1.73(s), δ 1.27(s)。

[0550] 2-(2-(苄氧基)-5-叔丁基苯基)-2-甲基丙醛(8)的制备方法

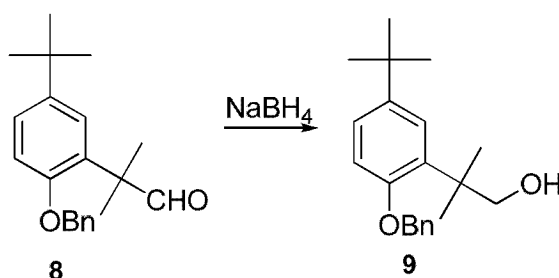
[0551]



[0552] 在约 -60 至 -50°C 向搅拌的化合物 7 (20g, 0.065mol) 在甲苯 (300mL) 中的溶液中滴加 DIBALH (80mL, 1M 的甲苯溶液)。在搅拌 2 小时后, 将 6N HCl (300mL) 加入到反应混合物中, 持续搅拌 30 分钟。然后分离有机层, 用 2N HCl、然后用 NaHCO_3 溶液、然后还用盐水溶液洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩, 得到化合物 8, 为油状物。将产物不经进一步纯化用于下一步反应。 ^1H NMR(CDCl_3 ;400MHz) δ 9.61(s), δ 7.36(m), δ 7.25(m), δ 6.87(m), δ 5.06(m), δ 1.43(s), δ 1.33(s)。

[0553] 2-(2-(苄氧基)-5-叔丁基苯基)-2-甲基丙-1-醇(9)的制备方法

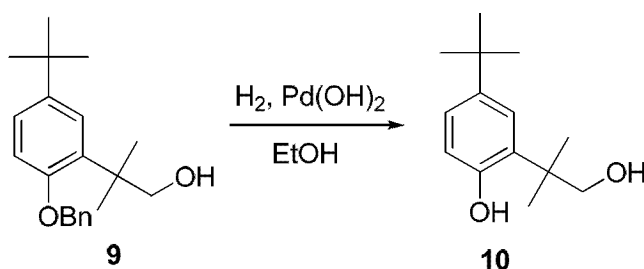
[0554]



[0555] 在 0°C 向搅拌的化合物 8 (9.21g, 0.030mol) 在 MeOH (150mL) 中的溶液中缓慢加入 NaBH_4 (2.3g, 0.061mol)。在 20°C 将该混合物搅拌 3 小时后, 加入 12mL 6N HCl, 将该混合物再搅拌 30 分钟。然后将该溶液浓缩至约原体积的四分之一, 用 EtOAc 萃取。分离有机层, 用水和盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 然后真空浓缩, 得到化合物 9, 为白色固体。 ^1H NMR(DMSO- d_6 ;400MHz) δ 7.47(m), δ 7.42(m), δ 7.34(m), δ 7.28(m), δ 7.16(m), δ 6.94(m), δ 5.08(s), δ 4.45(t), δ 3.64(d), δ 1.28(s), δ 1.25(s)。

[0556] 2-(2-羟基-5-叔丁基苯基)-2-甲基丙-1-醇(10)的制备方法

[0557]

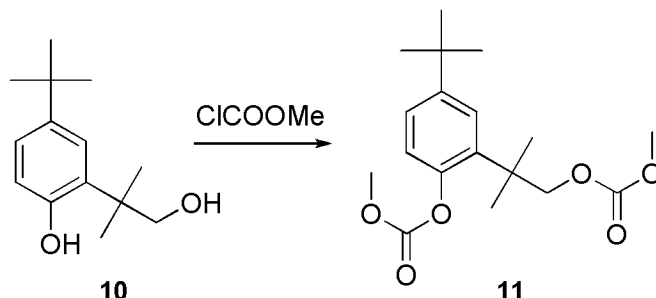


[0558] 将 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (1g) 和化合物 9 (9.26g, 0.030mol) 的 MeOH (200mL) 溶液在 20-30psi 压力下、在氢气气氛中搅拌 16-18 小时。然后通过 C 盐®(Celite®) 过滤该混合物, 浓

缩滤液,得到化合物 10,为白色固体。¹H NMR(DMSO-d₆;400MHz) δ 9.16(s), δ 7.16(d), δ 7.00(m), δ 6.65(m), δ 4.71(t), δ 3.62(d), δ 1.27(s), δ 1.22(s)。

[0559] 1-((甲氧羰基)氧基)-2-(1-((甲氧羰基)氧基)-2-甲基丙-2-基)-4-叔丁基苯(11)的制备方法

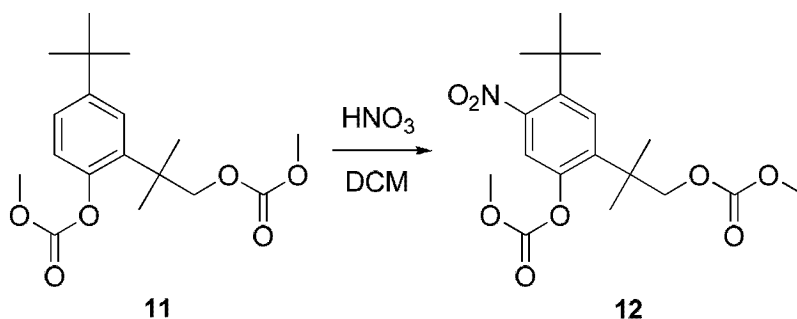
[0560]



[0561] 在 0℃向搅拌的化合物 10(23.2g,0.10mol)、DMAP(1.44g)和 DIEA(72.8g,0.56mol)在无水 DCM(720mL)中的溶液中滴加氯甲酸甲酯(43.5g,0.46mol)的 DCM(160mL)溶液。在将该混合物在 20℃搅拌 16 小时后,用水、1N HCl 和盐水洗涤,用 MgSO₄干燥,真空浓缩。使用硅胶柱色谱法(1 : 20EtOAc : 石油醚)纯化残余物,得到化合物 11,为白色固体。¹H NMR(DMSO-d₆;400MHz) δ 7.32(m), δ 7.10(d), δ 4.26(s), δ 3.84(s), δ 3.64(s), δ 1.31(s), δ 1.28(s)。

[0562] 1-((甲氧羰基)氧基)-2-(1-((甲氧羰基)氧基)-2-甲基丙-2-基)-4-叔丁基-5-硝基苯(12)的制备方法

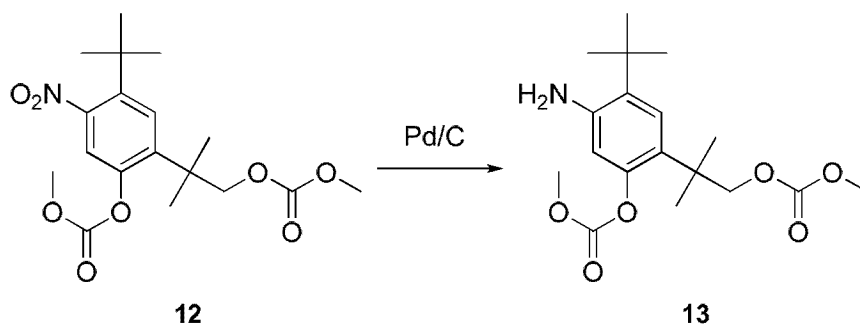
[0563]



[0564] 在 0℃向搅拌的化合物 11(32g,0.095mol)在 DCM(550mL)中的溶液中滴加 98% H₂SO₄(43g,0.43mol)。在 0℃搅拌 20 分钟后,在 0℃向该混合物中加入 65% HNO₃(16.2g,0.17mol)。然后将该混合物在 1-10℃搅拌 4 小时,然后加入冰水(200mL)。分离有机层,用 DCM(200mL×3)萃取,用水(水溶液)、NaHCO₃和盐水洗涤合并的有机层,然后用 MgSO₄干燥,真空浓缩。使用硅胶柱色谱法(1 : 20EtOAc : 石油醚)纯化残余物,得到化合物 12,为油状物。

[0565] 2-叔丁基-5-((甲氧羰基)氧基)-4-(1-((甲氧羰基)氧基)-2-甲基丙-2-基)苯胺(13)的制备方法

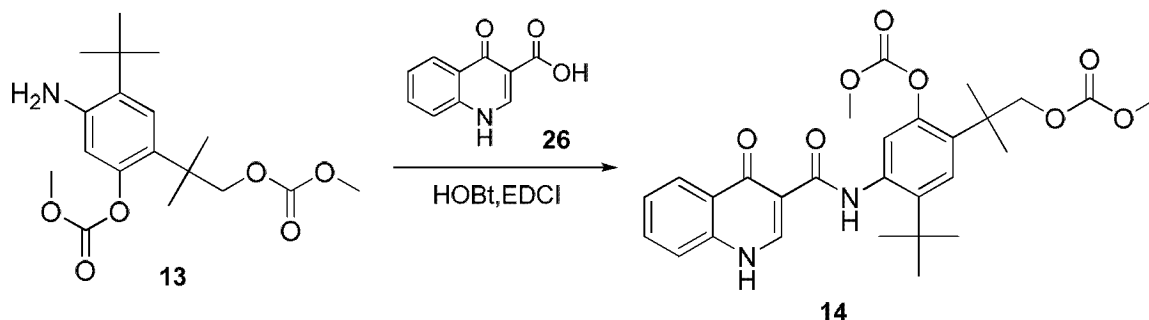
[0566]



[0567] 在室温在氢气气氛中在 20-30psi 压力下将 Pd/C(2.6g) 和化合物 12(14g, 粗品) 在 MeOH(420mL) 中搅拌 16-18 小时。然后用硅藻土®(**kieselguhr®**)过滤该混合物, 真空浓缩滤液。通过硅胶柱色谱法纯化残余物 (1 : 10EtOAc : 石油醚), 得到化合物 13, 为灰色固体。¹H NMR(CDCl₃;400MHz) δ 7.26(s), δ 7.19(s), δ 4.26(s), δ 3.89(s), δ 3.74(s), δ 1.40(s), δ 1.35(s)。

[0568] N-(2-叔丁基-5-((甲氧羰基)氧基)-4-(1-((甲氧羰基)氧基)-2-甲基丙-2-基)苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (14) 的制备方法

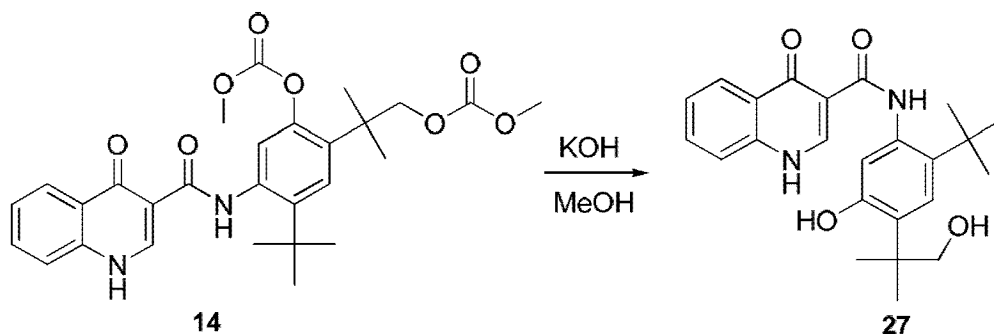
[0569]



[0570] 在 0℃ 向搅拌的化合物 26(5.0g, 0.026mol) 在无水 DMF(120mL) 中的溶液中加入 EDCI(5.6g, 0.029mol)、HOBT(3.8g, 0.028mol) 和 DIEA(6.6g, 0.051mol)。搅拌 1 小时后, 在 0℃ 将该混合物滴加入化合物 13(3.0g, 0.008mol) 在 DCM(30ml) 中的溶液。将该混合物在 25℃ 搅拌 72 小时, 然后真空浓缩。将残余物溶于 EtOAc(225mL), 用水 (120mL×1)、1N HCl(120mL) 和盐水洗涤, 用 Na₂SO₄干燥, 真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物 (1 : 1EtOAc : 石油醚), 得到化合物 14, 为白色固体。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 12.34(s, 1H), 11.58(s, 1H), 9.07(s, 1H), 8.42(d, 1H), 7.66(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.47(s, 1H), 7.39(s, 1H), 6.72(s, 1H), 4.34(s, 2H), 3.82(s, 3H), 3.74(s, 3H), 1.41(s, 9H), 1.40(s, 6H)。

[0571] N-(2-叔丁基-5-羟基-4-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (27) 的制备方法

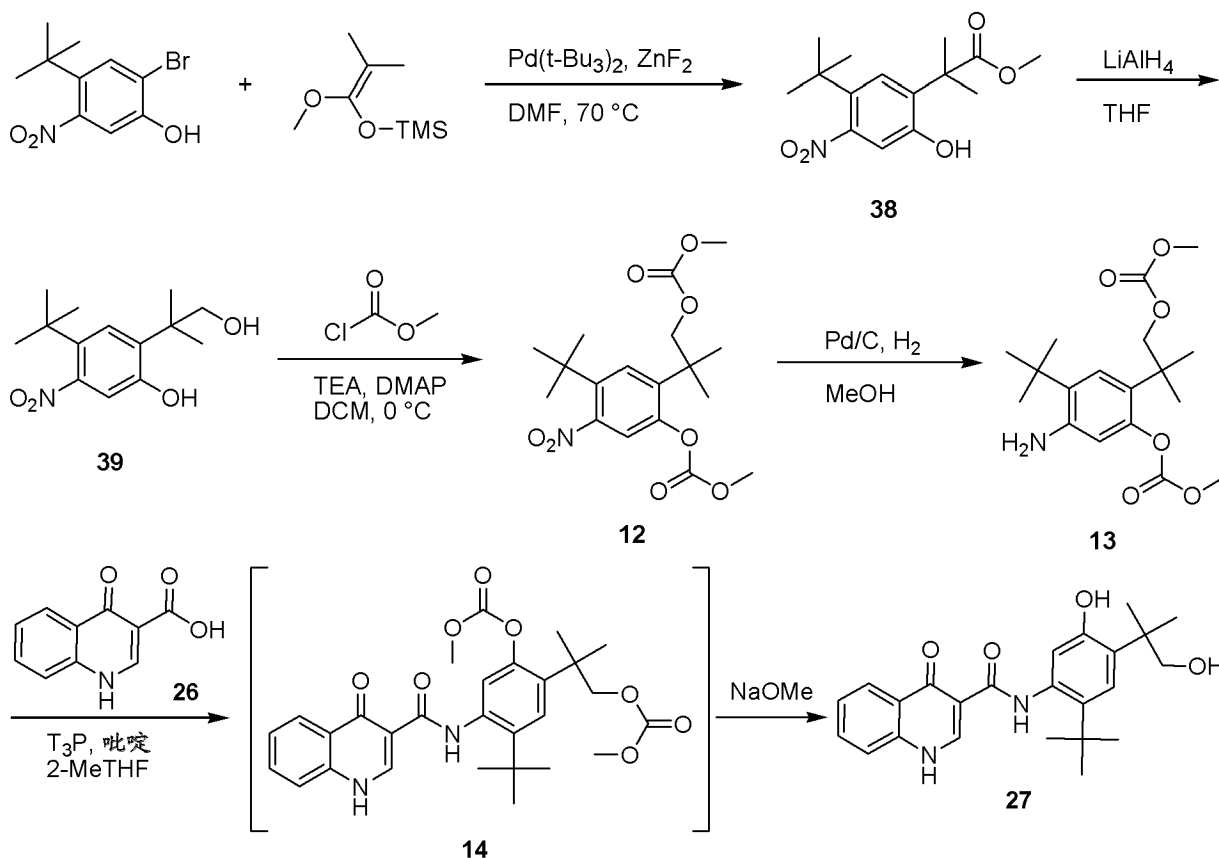
[0572]



[0573] 在 0℃ 向搅拌的 KOH(1.2g, 0.02mol) 在 MeOH(80mL) 中的溶液中加入化合物 14(1.9g, 0.0036mol)。在 5-15℃ 搅拌 2-3 小时后, 将该混合物浓缩至干。然后将残余物与水(10mL)一起研磨, 过滤, 用 DCM 洗涤, 真空干燥 24 小时, 得到化合物 27, 为白色固体。¹H NMR(DMSO-d₆; 400MHz) δ 12.77(s), δ 8.86(s), δ 8.20(d), δ 7.55(d), δ 7.42(t), δ 7.16(q), δ 7.02(s), δ 6.85(m), δ 3.55(s), δ 1.55(s), δ 1.35(s), δ 1.27(s)。MS 测定值 (M+H) 409.2。

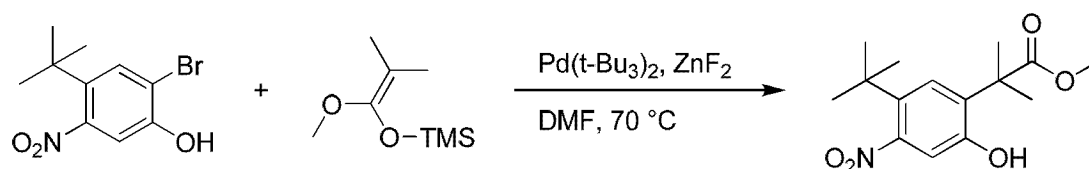
[0574] 实施例 2: N-(2-叔丁基-5-羟基-4-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (27) 可替代选择的全合成

[0575]



[0576] 2-(5-叔丁基-2-羟基-4-硝基苯基)-2-甲基丙酸甲酯 (38) 的制备方法:

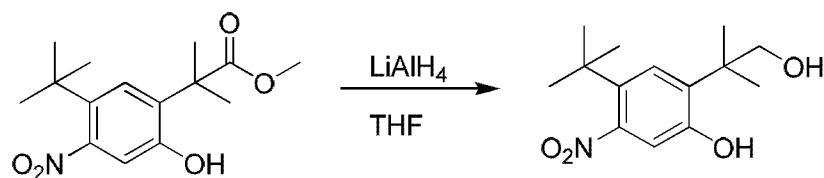
[0577]

**38**

[0578] 将 2-溴-4-叔丁基-5-硝基苯酚 (15.00g, 54.72mmol)、双(三-叔丁膦)钯 (0) (1.422g, 2.783mmol)、氟化锌 (2.82g, 27.27mmol)、甲基三甲基甲硅烷基二甲基乙烯酮缩醛 (MTDA) (19.35g, 111.0mmol) 和二甲基甲酰胺 (150mL) 的混合物在 70℃ 加热 18h。将该混合物冷却至室温, 用水稀释。搅拌 1 小时后, 用 MTBE 萃取水相。真空干燥有机相, 得到粗产物, 为棕色固体。通过在正庚烷中研磨纯化产物。¹H-NMR (400MHZ, DMSO-d₆) δ 10.38 (s, 1H); 7.37 (s, 1H); 6.79 (s, 1H); 3.54 (s, 3H); 1.45 (s, 6H); 1.32 (s, 9H)。

[0579] 4-叔丁基-2-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)-5-硝基苯酚 (39) 的制备方法:

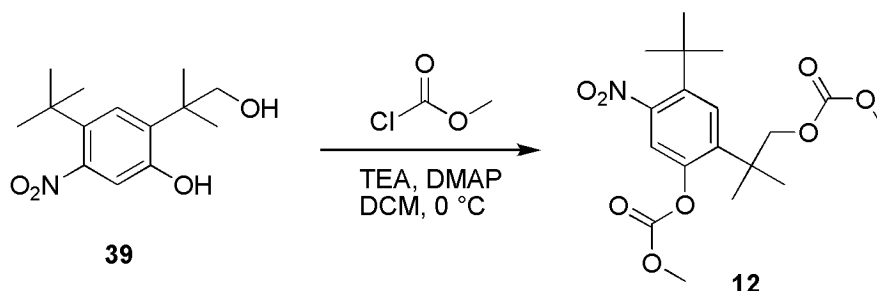
[0580]

**38****39**

[0581] 将 1M 氢化铝锂的 THF 溶液 (11.80mL, 11.80mmol) 加入到 2-(5-叔丁基-2-羟基-4-硝基苯基)-2-甲基丙酸甲酯 (5.36g, 18.15mmol) 在 THF (50mL) 中的溶液中。将该混合物在环境温度搅拌 3h, 然后用甲醇稀释。用 1N HCl 酸化该混合物 (pH 1-2), 用 MTBE 萃取水相。真空干燥有机相, 得到 4-叔丁基-2-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)-5-硝基苯酚, 将其不经进一步纯化用于下一步。¹H-NMR (400MHZ, DMSO-d₆) δ 10.12 (s, 1H); 7.37 (s, 1H); 6.80 (s, 1H); 4.77 (s, 1H); 3.69-3.65 (m, 2H); 1.30 (s, 9H); 1.29 (s, 6H)。

[0582] 碳酸 4-叔丁基-2-(2-甲氧羰基氧基-1,1-二甲基-乙基)-5-硝基-苯基] 甲基酯 (12) 的制备方法

[0583]

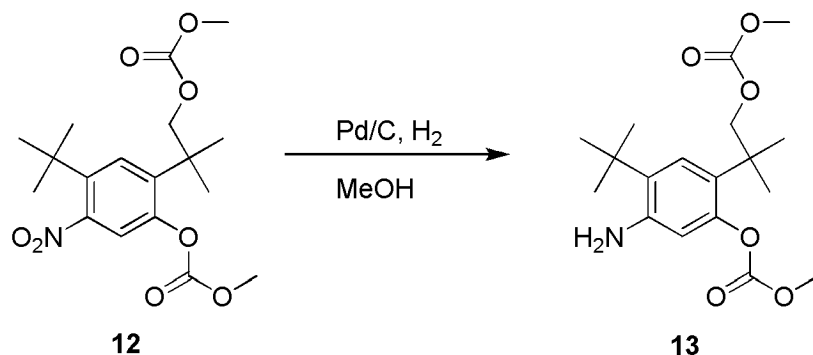
**39****12**

[0584] 在 0℃ 向 4-叔丁基-2-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)-5-硝基苯酚 (1.92g, 7.18mmol)、三乙胺 (1.745g, 17.24mmol) 和二氨基吡啶 (87.74mg, 0.718mmol) 在二氯甲烷 (30mL) 中的溶液缓慢加入氯甲酸甲酯 (2.376g, 25.14mmol), 保持温度低于 5℃。添加后, 将该混合物温至环境温度, 搅拌至 HPLC 显示原料完全转化 (2-8h)。用水稀释该反应混合物, 用 1N HCl (pH 1-2) 酸化。用 DCM 萃取水相, 真空干燥合并的有机相。使粗琥珀色半固体从甲醇和二氯甲烷中重结晶, 得到标题化合物, 为黄色结晶固体。¹H-NMR (400MHZ, DMSO-d₆)

δ 7.67 (s, 1H) ; 7.52 (s, 1H) ; 4.30 (s, 2H) ; 3.86 (s, 3H) ; 3.64 (s, 3H) ; 1.35 (s, 9H) ; 1.35 (s, 6H)。

[0585] 碳酸 5-氨基-4-叔丁基-2-(2-甲氧羰基氧基-1,1-二甲基-乙基)苯基]甲基酯 (13) 的制备方法:

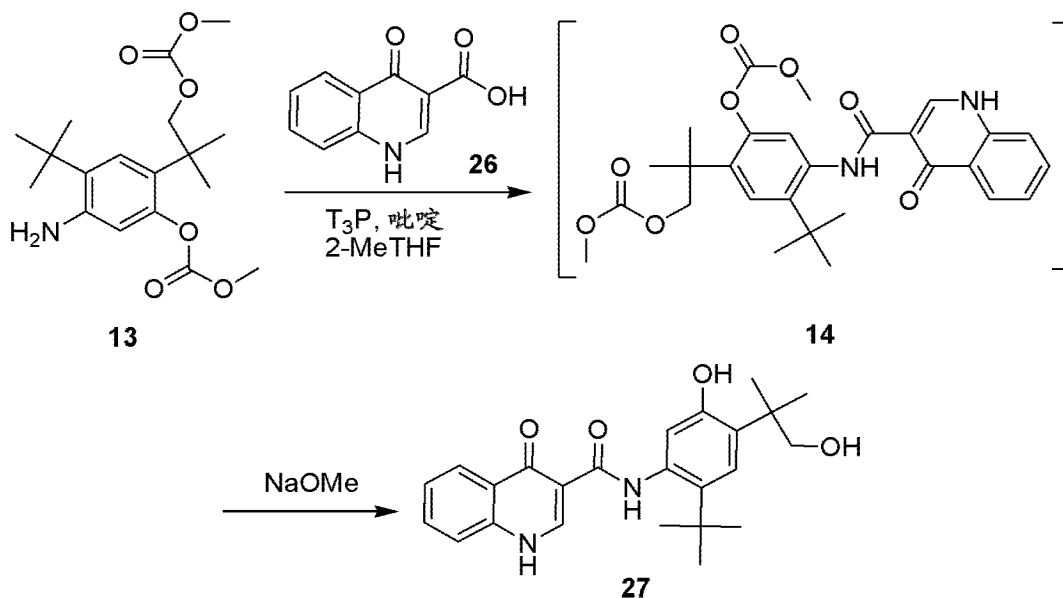
[0586]



[0587] 用氮气净化碳酸 [4-叔丁基-2-(2-甲氧羰基氧基-1,1-二甲基-乙基)-5-硝基-苯基] 甲基酯 (1.27g, 3.313mmol) 和 Pd/C (75mg, 0.035mmol) 在甲醇 (50mL) 中的混合物。用氢气净化烧瓶后, 在环境温度和压力下将该混合物氢化 18 小时。通过 C 盐®过滤该溶液, 真空干燥, 得到产物, 为固体。¹H-NMR (400MHZ, DMSO-d₆) δ 6.99 (s, 1H) ; 6.39 (s, 1H) ; 4.92 (s, 2H) ; 4.13 (s, 2H) ; 3.82 (s, 3H) ; 3.65 (s, 3H) ; 1.32 (s, 9H) ; 1.23 (s, 6H)。

[0588] N-(2-叔丁基-5-羟基-4-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (27) 的制备方法

[0589]

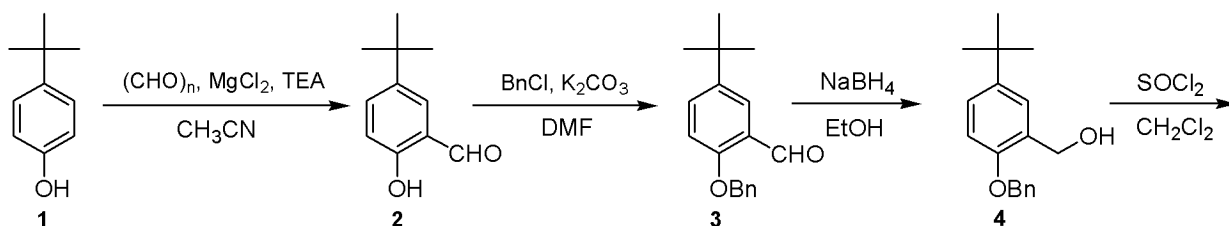


[0590] 向碳酸 [5-氨基-4-叔丁基-2-(2-甲氧羰基氧基-1,1-二甲基-乙基)苯基] 甲基酯 (103mg, 0.29mmol)、4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸 (50mg, 0.26mmol) 和吡啶 (42mg, 0.53mmol) 在 2-MeTHF (3.0mL) 中的混合物中加入作为 50wt% 的 2-MeTHF 溶液的 T3P (286mg, 0.45mmol)。将该混合物加热至 50℃ 18h。冷却至环境温度后, 用水稀释该混合物。分离水相, 再用水洗涤。向有机相中加入甲醇钠 (39mg, 0.72mmol), 将该溶液搅拌 2 小时。用 1N HCl 猝灭, 分离各相后, 用 0.1N HCl 洗涤有机相。然后真空干燥有机相, 得到化

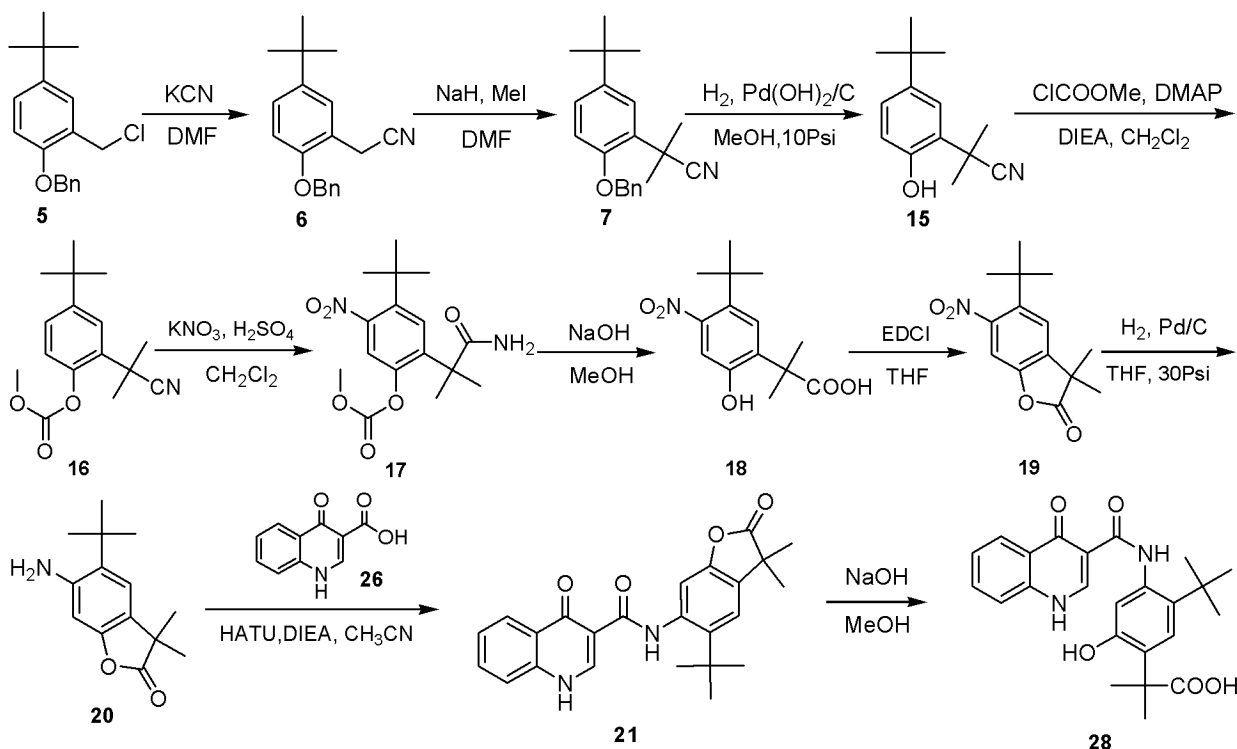
合物 27, 为固体。¹H-NMR 光谱与上述不报道的一致。

[0591] 实施例 3 : 2-(5-叔丁基-2-羟基-4-(4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰氨基)苯基)-2-甲基丙酸 (28) 的全合成

[0592]

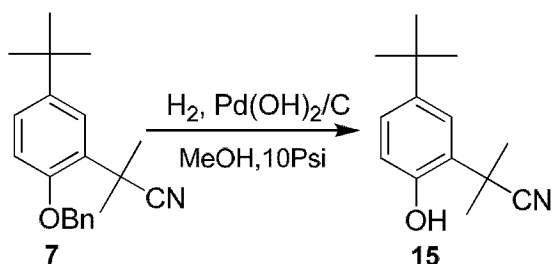


[0593]



[0594] 2-(5-叔丁基-2-羟基苯基)-2-甲基丙腈 (15) 的制备方法

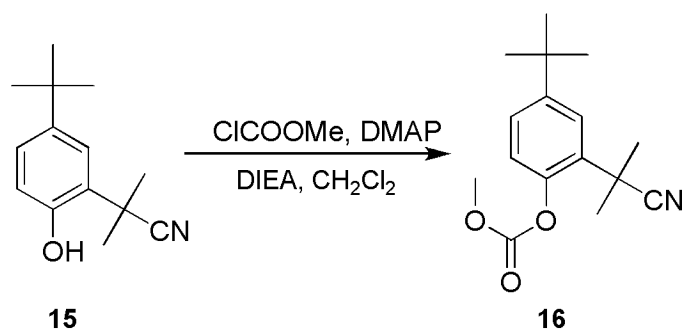
[0595]



[0596] 将 Pd(OH)₂/C (2.0g) 和化合物 7 (20.0g, 0.104mol) 在 MeOH (150mL) 中在室温下在氢气气氛中在 10psi 压力下搅拌 16-18 小时。然后通过 C 盐®垫过滤该混合物, 浓缩滤液, 得到化合物 15, 将其不经进一步纯化用于下一步反应。¹H NMR (DMSO-d₆; 400MHz) δ 9.83(s), δ 7.24(s), δ 7.18(m), δ 6.80(m), δ 1.71(s), δ 1.24(s)。

[0597] 碳酸 4-叔丁基-2-(2-氰基丙-2-基)苯基甲基酯 (16) 的制备方法

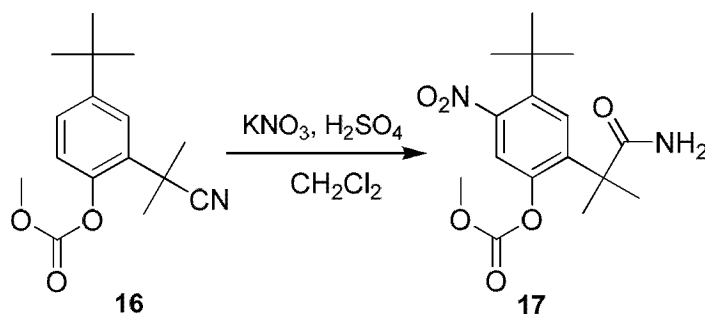
[0598]



[0599] 在 0℃、在 2 小时内向搅拌的化合物 15(126.6g, 0.564mol)、DMAP(6.0g) 和 DIEA(188g, 1.46mol) 在无水 DCM(1500mL) 中的混合物中滴加氯甲酸甲酯(110g, 1.17mol) 的无水 DCM(300mL) 溶液。在 0℃ 搅拌 12 小时后, 加入冰水(1.5L), 将该混合物在 0℃ 搅拌 30 分钟。分离有机层, 用 1N HCl、水和盐水洗涤。用 MgSO_4 干燥 DCM 溶液, 真空浓缩, 得到化合物 16, 为黄色固体。 ^1H NMR($\text{DMSO}-d_6$; 400MHz) δ 7.47(m), δ 7.39(d), δ 7.24(d), δ 3.84(s), δ 1.71(s), δ 1.30(s)。

[0600] 碳酸 2-(1-氨基-2-甲基-1-氧代丙-2-基)-4-叔丁基-5-硝基苯基甲基酯 (17) 的制备方法

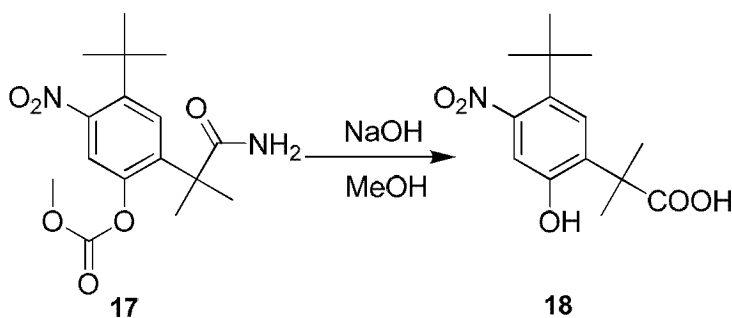
[0601]



[0602] 在 0℃ 向搅拌的化合物 16(10.0g, 36.3mmol) 和 KNO_3 (5.51g, 54.5mmol) 在 DCM(1000mL) 中的混合物中滴加 98% H_2SO_4 (145.4g, 1.45mol)。将该混合物在 30℃ 搅拌 4 天。然后分离 H_2SO_4 层, 倾入冰水(50g), 然后用 DCM(100mL×3) 萃取。用水、 NaHCO_3 水溶液和盐水洗涤合并的有机层, 然后用 MgSO_4 干燥, 真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物(石油醚/EtOAc 20:1 → 10:1 → 5:1 → 3:1), 得到化合物 17, 为黄色固体。 ^1H NMR(CDCl_3 ; 400MHz) δ 8.05(s), δ 7.74(s), δ 7.61(s), δ 7.32(s), δ 5.32(s), δ 3.91(s), δ 3.92(s), δ 1.62(s), δ 1.59(s), δ 1.42(s), δ 1.38(s)。

[0603] 2-(5-叔丁基-2-羟基-4-硝基苯基)-2-甲基丙酸 (18) 的制备方法

[0604]

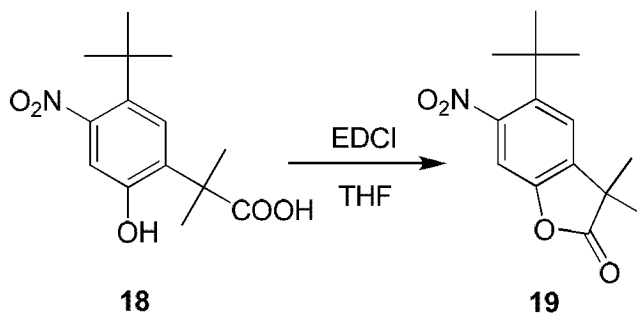


[0605] 向化合物 17(7.3g, 21.6mmol) 在甲醇(180mL) 中的混合物中加入水(18mL) 和

NaOH(8.64g, 216mmol)。加热该溶液, 维持在回流 3 天。真空蒸发溶剂, 将残余物溶于 140mL 水。然后通过添加 2N HCl 将该溶液酸化至 pH 2。用乙酸乙酯 (100mL×3) 萃取水相, 用水和盐水洗涤合并的有机相, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 然后浓缩, 得到化合物 18, 为黄色固体, 将其不经进一步纯化用于下一步反应。

[0606] 5-叔丁基-3,3-二甲基-6-硝基苯并呋喃-2(3H)-酮 (19) 的制备方法

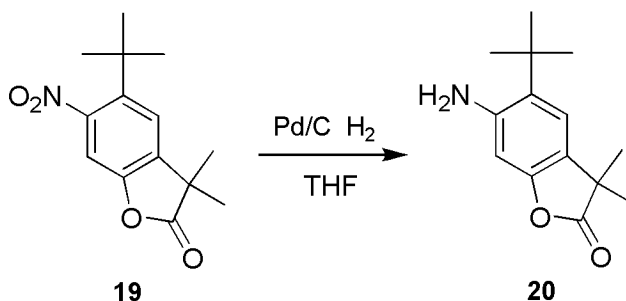
[0607]



[0608] 向化合物 18(7.10g, 25.2mmol) 在 710mL 无水 THF 中的溶液中加入 EDCI(14.5g, 75.6mmol)。将得到的混悬液保持在 30℃ 搅拌过夜。过滤沉淀, 用 DCM 充分洗涤。浓缩滤液至干, 将残余物溶于 DCM(100mL)。用水 (50mL×2) 和盐水 (50mL×1) 洗涤该溶液。然后用无水 Na₂SO₄ 干燥 DCM 层, 浓缩, 得到粗产物, 通过硅胶柱色谱法纯化 (石油醚 / EtOAc 200 : 1 → 100 : 1 → 50 : 1), 得到化合物 19, 为白色固体。¹H NMR(CDCl₃; 400MHz) δ 7.36(s), δ 7.10(s), δ 1.53(s), δ 1.41(s)。

[0609] 6-氨基-5-叔丁基-3,3-二甲基苯并呋喃-2(3H)-酮 (20) 的制备方法

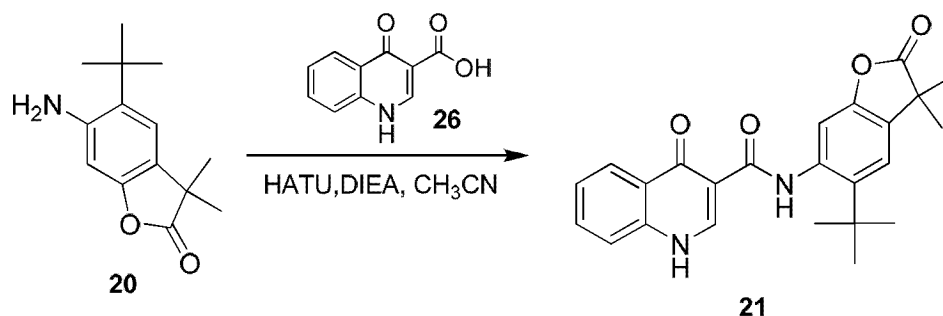
[0610]



[0611] 在 25℃、在氢气气氛中在 30psi 将 Pd/C(1.50g) 和化合物 19(3.00g, 1.14mmol) 混悬于 THF(1500mL) 4 小时。然后通过 C 盐® 过滤该混合物, 真空浓缩滤液, 得到化合物 20, 为白色固体。¹H NMR(DMSO-d₆; 400MHz) δ 7.05(s), δ 6.49(s), δ 5.01(s), δ 1.35(s), δ 1.33(s)。

[0612] N-(5-叔丁基-3,3-二甲基-2-氧代-2,3-二氢苯并呋喃-6-基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (21) 的制备方法

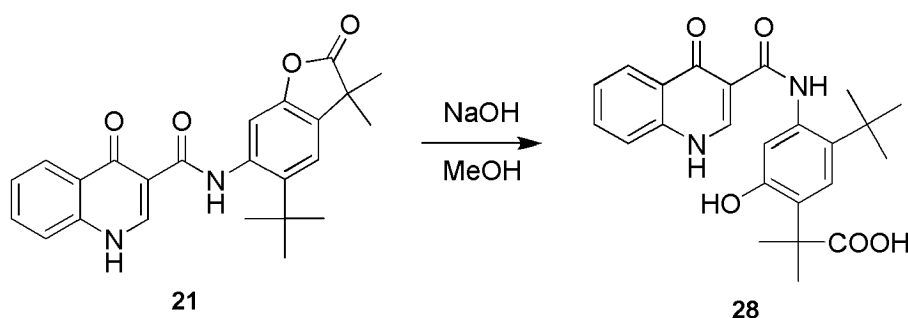
[0613]



[0614] 将 HATU (17.6g, 46.3mmol) 和化合物 26 (8.36g, 44.2mmol) 在无水乙腈 (1L) 中的混悬液在室温搅拌 1 小时。将化合物 20 (3.40g, 14.6mmol) 加入到该混悬液中, 然后滴加 DIEA (11.5g, 89.0mmol)。将该混合物在 45℃ 搅拌 4 天。过滤得到的沉淀, 用 DCM 充分洗涤。浓缩滤液至干, 将残余物溶于 DCM (200mL), 用 1N HCl (200mL×2)、然后用 5% NaHCO₃ 水溶液 (200mL×3)、然后用盐水 (200mL×1) 洗涤。然后用 Na₂SO₄ 干燥该混合物, 真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物 (CH₂Cl₂/MeOH 100 : 1 → 50 : 1), 得到化合物 21, 为淡黄色固体。¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 12.96 (d, J 6.4Hz, 1H); 12.1 (s, 1H); 8.9 (d, J 6.4Hz, 1H); 8.33 (d, J 8Hz, 1H); 7.84-7.75 (m, 2H); 7.55-7.48 (m, 3H); 1.47 (s, 6H); 1.45 (s, 9H)。

[0615] 2-(5-叔丁基-2-羟基-4-(4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰氨基)苯基)-2-甲基丙酸 (28) 的制备方法

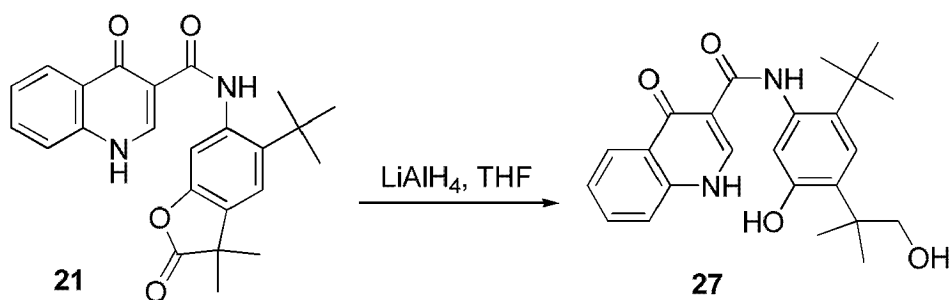
[0616]



[0617] 在 0℃ 向搅拌的化合物 21 (0.9g, 2.45mmol) 在 MeOH (50mL) 中的溶液中加入 NaOH (1.5g, 37.5mmol)。在 40℃ 搅拌 16 小时后, 真空蒸发溶剂, 然后将残余物溶于 H₂O (50mL)。过滤沉淀, 用 DCM (100mL×1) 和乙酸乙酯 (100mL×1) 洗涤滤液。用 2N HCl 将水层酸化至 pH 1-2。过滤沉淀, 用 H₂O (80mL) 和庚烷 (50mL) 洗涤。真空干燥, 得到化合物 28, 为白色固体。¹H NMR (DMSO-d₆; 400MHz) δ 12.85 (s), δ 11.84 (s), δ 11.77 (s), δ 9.39 (s), δ 8.86 (s), δ 8.33 (s), δ 7.79 (m), δ 7.52 (m), δ 7.18 (s), δ 7.09 (s), δ 1.44 (s), δ 1.40 (s)。MS 测定值 (M+H) 423.08。

[0618] 实施例 4: N-(2-叔丁基-5-羟基-4-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (27) 的第二种可替代选择合成

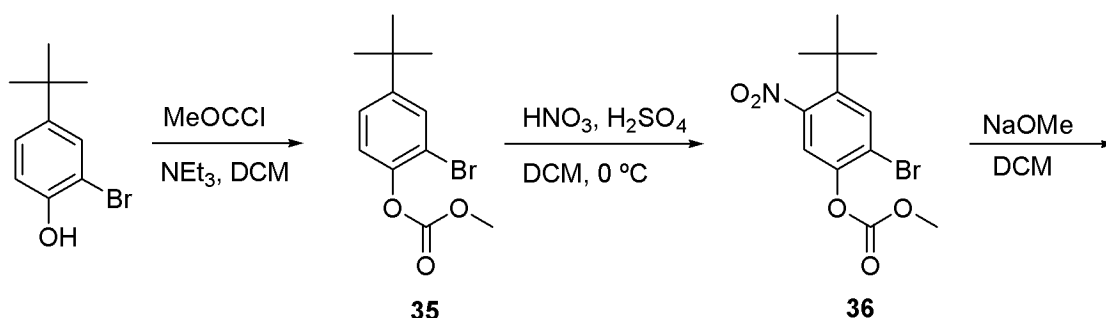
[0619]



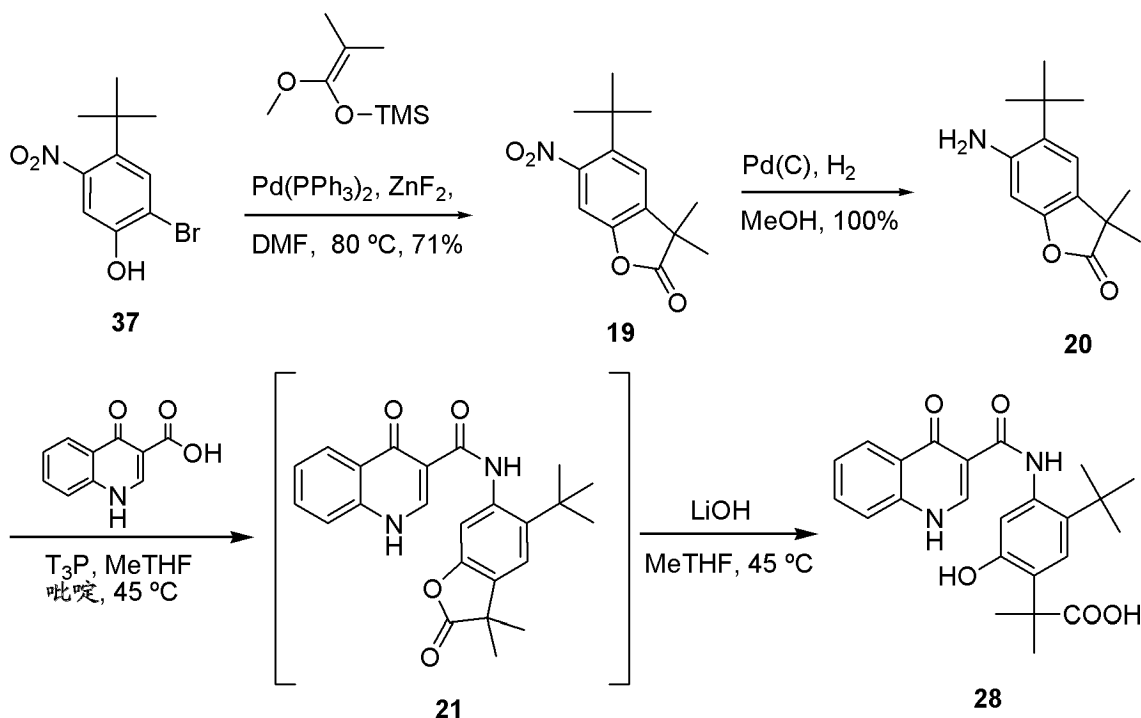
[0620] 给 3-颈 50mL 圆底烧瓶安装磁力搅拌器、氮气起泡器和热电偶。向烧瓶中加入化合物 21 (514mg, 1.27mmol) 和 2-MeTHF (4mL)。在室温搅拌该反应混合物, 加入作为固体的氢化铝锂 (204mg, 6.6mmol), 直到使用 HPLC 监测得到 100% 转化率。向该反应混合物中加入四水合 2,3-二羟基丁二酸钠钾 (Potassium sodium 2,3-dihydroxybutanedioate) (50mL 的 400g/L 溶液) 和 MTBE (50mL)。将得到的溶液搅拌 15 分钟, 然后保持静置 15min。分离有机层, 通过添加酒石酸将水层的 pH 调节至 pH 约 6-7。用 MTBE 萃取水层。浓缩有机层, 在高真空下干燥, 得到标题化合物, 为黄白色粉末。¹H-NMR 光谱与上述报道的一致。

[0621] 实施例 5 : 2-(5-叔丁基-2-羟基-4-(4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰氨基)苯基)-2-甲基丙酸 (28) 可替代选择的全合成

[0622]

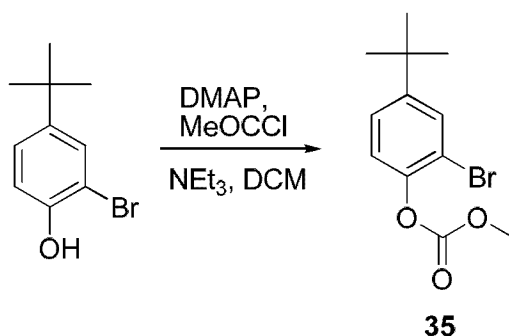


[0623]



[0624] 碳酸 2- 溴-4- 叔丁基苯基酯甲基酯 (35) 的制备方法

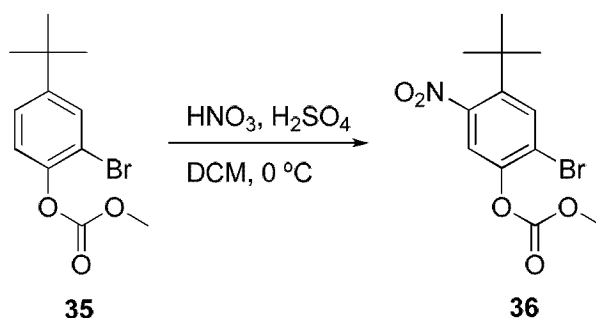
[0625]



[0626] 给 3- 颈 2L 圆底烧瓶安装磁力搅拌器、氮气起泡器和热电偶。加入 2- 溴-4- 叔丁基苯酚 (50g, 211.7mmol), 然后加入 DCM (1.75L)、DMAP (1.29g, 10.58mmol) 和 Et₃N (44.3mL, 317.6mmol)。将该反应混合物冷却至 0℃。向该反应混合物中滴加氯甲酸甲酯 (19.62mL, 254mmol)。将该混合物温至室温, 同时搅拌过夜。当反应完成时, 通过烧结漏斗过滤该混合物。将滤液转入 1L 分液漏斗。为了猝灭, 将 1N HCl (300mL) 加入滤液, 分离有机层。然后用 291mL 饱和 NaHCO₃ 和 100mL 水的混合物洗涤有机层。分离各层, 测定水层的 pH 为约 8。浓缩有机层, 在高真空下干燥约 16 小时, 得到标题化合物, 为澄清黄色油状物, 将其不经进一步纯化用于下一步。¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) 7.66 (d, J 2.0Hz, 1H), 7.46 (dd, J 8.4, 2.0Hz, 1H), 7.32 (d, J 8.4Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 1.28 (s, 9H)

[0627] 碳酸 (2- 溴-4- 叔丁基-5- 硝基- 苯基) 甲基酯 (36) 的制备方法

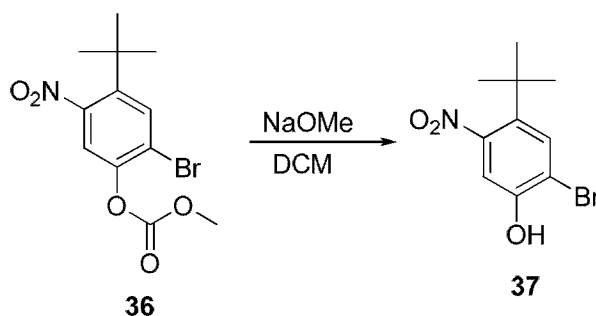
[0628]



[0629] 给 3- 颈 2L 圆底烧瓶安装磁力搅拌器、氮气起泡器和热电偶。向烧瓶中加入化合物 35 (176g, 612.9mmol) 和浓硫酸 (264mL)。将该反应混合物冷却至 -5℃ 至 0℃。滴加硝酸 (28.6mL, 612.9mmol)。将该反应混合物在 0℃ 搅拌 2 小时。完成时, 加入水 (264mL), 然后加入 MTBE (264mL)。将该溶液搅拌 15 分钟, 然后静置 15 分钟。分离有机层, 浓缩, 在高真空下干燥, 得到标题化合物, 为深棕色油状物, 将其不经进一步纯化用于下一步。¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) 7.96 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 1.34 (s, 9H)

[0630] 2- 溴-4- 叔丁基-5- 硝基- 苯酚 (37) 的制备方法

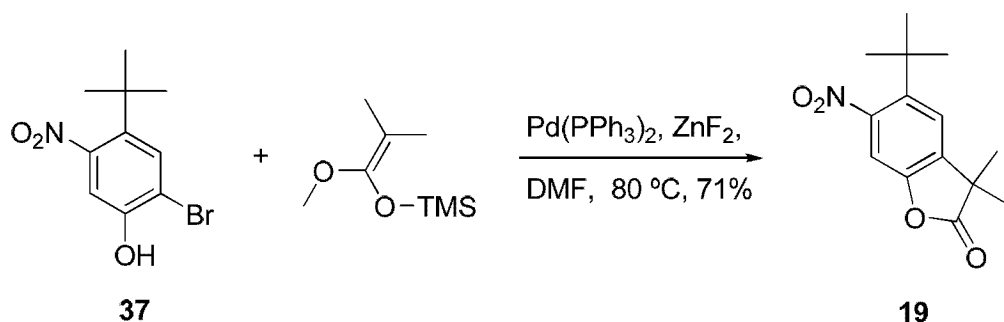
[0631]



[0632] 将碳酸(2-溴-4-叔丁基-5-硝基-苯基)甲基酯(72.9g, 219.5mmol)加入到反应器中,加入 DCM(291.6mL)。使用冰浴将黄色溶液冷却。在 2.2-6.9℃逐步加入甲醇钠(67.04g, 69.11mL, 5.4M, 373.2mmol)。完成添加后,将该反应体系缓慢温至环境温度。完成时,将该反应体系冷却至 0℃,用 1M HCl(373.2mL, 373.2mmol)猝灭。将双相混合物搅拌 20min,转入分液漏斗。分离有机层,用水(300mL),然后用盐水(300mL)洗涤。浓缩有机层,在高真空下干燥粗产物。再使用应用 Berger MultiGram III(Mettler Toledo AutoChem, Newark DE)的超临界流体色谱法(SFC)分离纯化产物。方法条件是使用来自 Princeton Chromatography 的 PPU 柱(30*150),20% 甲醇,在 250mL/min,100 巴,35℃,220nm。注射 3.5mL 的 55-70mg/mL 溶液。使用 SFC ProNTo 软件采集数据。从 SFC 纯化中回收的纯化产物是甲醇溶剂合物。为了除去甲醇,进行共沸蒸馏。将深黄色固体 2-溴-4-叔丁基-5-硝基苯酚甲醇溶剂合物(111.3g, 59.9mmol)加入到 1L 圆底烧瓶中,然后加入庚烷(500mL)。将该淤浆加热至 64℃,得到澄清溶液。减压(649mbar)蒸馏溶剂 30 分钟,然后反萃取至干。将该过程重复三次,直到通过 ¹H-NMR 未检测到 MeOH。在高真空下干燥产物 16 小时,得到产物,为深黄色半固体。¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 11.2(b s, OH), 7.69(s, 1H); 7.03(s, 1H); 1.30(s, 9H)。

[0633] 5-叔丁基-3,3-二甲基-6-硝基苯并呋喃-2(3H)-酮(19)的制备方法

[0634]

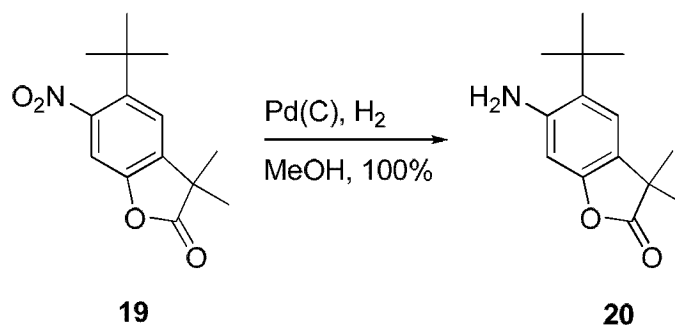


[0635] 将二氟锌(6.093g, 58.92mmol)加入到充氮气的圆底烧瓶中。然后在氮气流中加入 Pd(tBu₃P)₂(2g, 3.835mmol)。然后向烧瓶中加入溶于 DMF(80.75mL)的 2-溴-4-叔丁基-5-硝基-苯酚(16.15g, 58.92mmol)。该反应混合物是橙色混悬液。向该混合物中加入(1-甲氧基-2-甲基-丙-1-烯氧基)三甲基硅烷(21.61g, 25.13mL, 117.8mmol),将得到的混合物加热至 80℃,搅拌 16h。完成时,将该反应混合物冷却至环境温度,通过 C 盐®过滤。用 MTBE(536.0mL)洗涤滤饼,向滤液中加入水(893.3mL)。将该混合物搅拌 15min,再沉降 15min。分离各层,将 0.5M HCl(500mL, 250.0mmol)加入到有机相中。分离各层,用水(500mL)洗涤有机层。分离各层,用 NaCl(500mL; 8wt%)洗涤有机层。分离有机层,真空除去溶剂。得到粗产物,为棕色结晶固体,然后通过硅胶垫使用己烷: MTBE 20 : 1-10 : 1 作为洗脱剂

纯化。合并包含产物的级分,真空除去溶剂,得到纯产物,为白色结晶固体。 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.80 (s, 1H) ; 7.62 (s, 1H) ; 1.49 (s, 6H) ; 1.34 (s, 9H)。

[0636] 6-氨基-5-叔丁基-3,3-二甲基苯并呋喃-2(3H)-酮 (20) 的制备方法

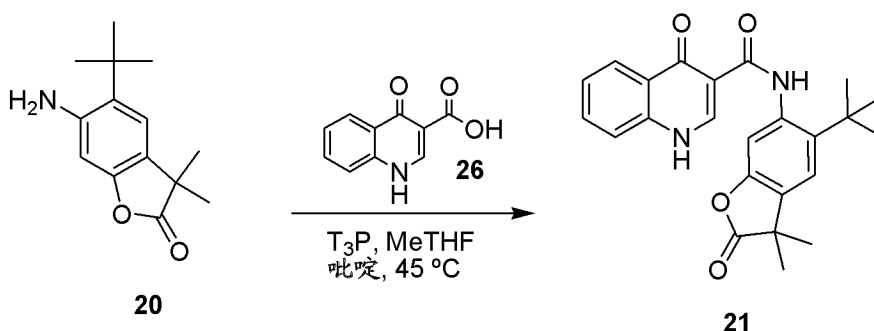
[0637]



[0638] 在氮气流中将钯 / 碳 (湿; 5wt%) 放入圆底烧瓶。然后向容器中加入 5-叔丁基-3,3-二甲基-6-硝基-苯并呋喃-2-酮 (4.7g, 17.85mmol)。然后在氮气气氛中向容器中谨慎加入甲醇 (120mL)。然后用 N_2 净化容器, 抽真空, 然后加入氢气。给容器抽真空, 再加入氢气, 然后连续导入氢气流。完成后, 通过 C 盐® 过滤该反应体系, 用 MeOH (300ml) 洗涤滤饼。真空除去溶剂, 在高真空下干燥产物, 得到白色结晶固体。 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.05 (s, 1H) ; 6.48 (s, 1H) ; 5.02 (s, 2H, NH_2) ; 1.34 (s, 6H) ; 1.30 (s, 9H)。

[0639] N-(5-叔丁基-3,3-二甲基-2-氧代-2,3-二氢苯并呋喃-6-基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (21) 的制备方法

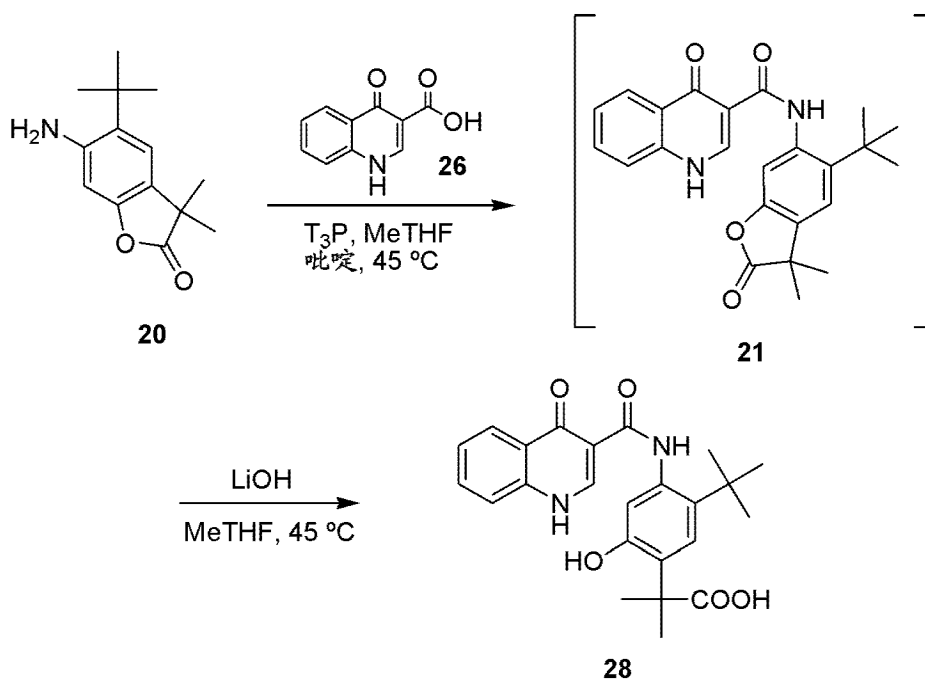
[0640]



[0641] 向反应容器中加入化合物 26 (2.926g, 15.43mmol)、化合物 20 (4.32g, 18.52mmol)、2-MeTHF (35.99mL), 然后加入 50% T_3P 的 2-MeTHF 溶液 (13.36g, 21.00mmol)。加入吡啶 (2.441g, 2.496mL, 30.86mmol), 将该混悬液在 $47.5^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 加热 18h。完成后, 将该反应体系冷却至环境温度, 加入 2-MeTHF (36) 和水 (30ml)。分离各层, 用 10wt% 柠檬酸溶液 (30ml)、水 (30ml) 洗涤有机层, 用 NaHCO_3 (20ml) 洗涤两次。用盐水 (50ml) 洗涤有机层, 分离, 真空除去溶剂。将粗产物溶于 MTBE (100ml), 加入作为抗溶剂的庚烷 (200ml)。固体沉淀, 将得到的淤浆搅拌 2 小时。通过抽滤收集固体, 用己烷洗涤滤饼。在 55°C 在真空烘箱内在氮气气氛中干燥得到的产物, 得到标题化合物, 为浅褐色固体。 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 12.96 (d, J 6.4Hz, 1H) ; 12.1 (s, 1H) ; 8.9 (d, J 6.4Hz, 1H) ; 8.33 (d, J 8Hz, 1H) ; 7.84-7.75 (m, 2H) ; 7.55-7.48 (m, 3H) ; 1.47 (s, 6H) ; 1.45 (s, 9H)。

[0642] 2-(5-叔丁基-2-羟基-4-(4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰氨基)苯基)-2-甲基丙酸 (28) 的制备方法

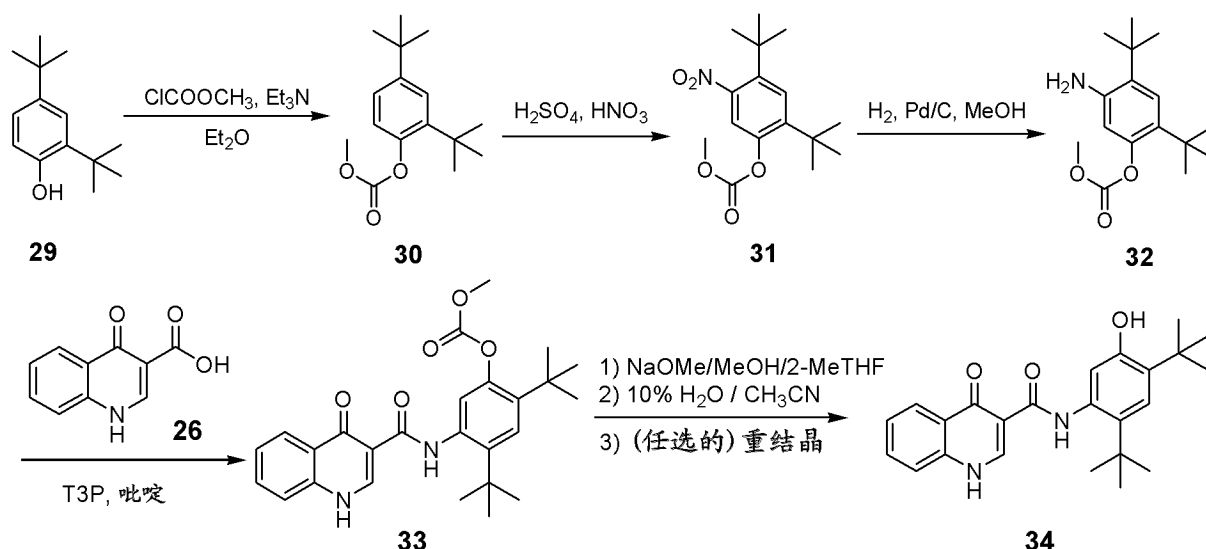
[0643]



[0644] 将化合物 26 (81.30mg, 0.4288mmol) 和化合物 20 (110mg, 0.4715mmol) 加入到圆底烧瓶中, 然后加入 2-MeTHF (1mL), 然后加入 50% T_3P 的 2-MeTHF 溶液 (371.4mg, 0.5836mmol) 和吡啶 (67.84mg, 69.37 μL , 0.8576mmol) 的 2-MeTHF 溶液。将该混悬液在 $47.5^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 加热过夜。完成后, 将该反应体系冷却至环境温度。加入 2-MeTHF (1.014mL) 和水 (811.2 μL)。分离各层, 用 (811.2 μL) 水洗涤有机层, 用 NaHCO_3 (2mL) 洗涤两次。将有机层转入圆底烧瓶。加入溶于水 (2mL) 的 LiOH (38.6mg, 0.9mmol), 将该反应体系加热至 45°C 。完成后, 分离各层, 弃去有机层。用冰浴冷却水层, 向溶液中加入盐酸 (10.72mL, 1.0M, 10.72mmol), 直到 pH 达到 pH 为约 3-4。用 2-MeTHF (5mL) 将水层萃取两次, 合并有机层, 用盐水 (5mL) 洗涤。分离有机层, 真空除去溶剂。在 50°C 、在氮气气氛中用真空烘箱干燥得到的固体, 得到标题化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ 12.89 (d, J 6.8Hz, 1H) ; 11.84 (s, 1H) ; 11.74 (s, 1H) ; 9.36 (s, 1H) ; 8.87-8.61 (d, J 6.4Hz, 1H) ; 8.34-8.32 (d, J 9.1Hz, 1H) ; 7.83-7.745 (m, 2H) ; 7.17-7.09 (m, 1H) ; 7.17 (s, 1H) ; 7.09 (s, 1H) ; 1.43 (s, 6H) ; 1.40 (s, 9H)。

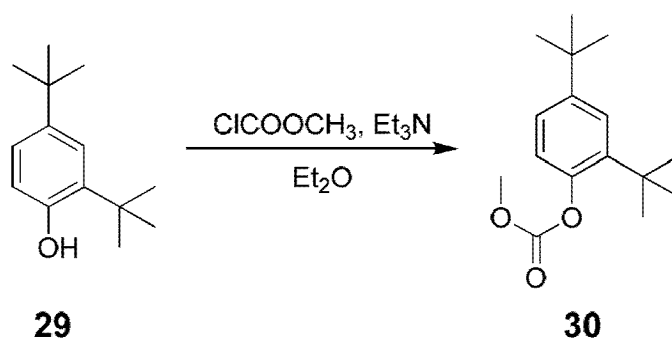
[0645] 实施例 6 : N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (34) 的全合成

[0646]



[0647] 碳酸 2,4-二叔丁基苯基甲基酯 (30) 的制备方法

[0648]



[0649] 方法 1

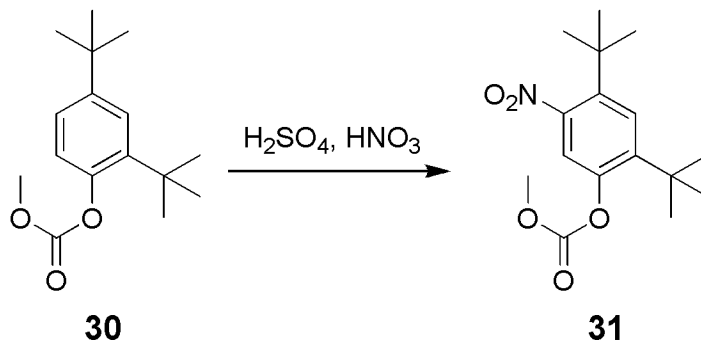
[0650] 在 0℃ 向 2,4-二叔丁基苯酚 29 (10g, 48.5mmol) 在乙醚 (100mL) 和三乙胺 (10.1mL, 72.8mmol) 中的溶液中加入氯甲酸甲酯 (7.46mL, 97mmol)。然后将该混合物温至室温, 再搅拌 2 小时。然后再加入 5mL 三乙胺和 3.7mL 氯甲酸甲酯, 将该反应体系搅拌过夜。然后过滤该反应体系, 将滤液冷却至 0℃, 然后再加入 5mL 三乙胺和 3.7mL 氯甲酸甲酯, 将该反应体系温至室温, 然后再搅拌 1 小时。在该步骤, 反应基本上完成, 通过过滤、然后用水 (2×)、随后用盐水洗涤进行后处理。然后浓缩该溶液, 得到黄色油状物, 使用柱色谱法纯化, 得到化合物 30。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.35 (d, J = 2.4Hz, 1H), 7.29 (dd, J = 8.4, 2.4Hz, 1H), 7.06 (d, J = 8.4Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 1.30 (s, 9H), 1.29 (s, 9H)。

[0651] 方法 2

[0652] 向反应容器中加入 4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 3.16g, 25.7mmol) 和 2,4-二叔丁基苯酚 (化合物 29, 103.5g, 501.6mmol), 加入二氯甲烷 (415g, 313mL), 将该溶液搅拌至全部固体溶解。然后加入三乙胺 (76g, 751mmol), 将该溶液冷却至 0-5℃。然后在 2.5-4 小时内滴加氯甲酸甲酯 (52g, 550.3mmol), 同时保持溶液温度在 0-5℃。然后将该反应混合物缓慢加热至 23-28℃, 搅拌 20 小时。然后将该反应体系冷却至 10-15℃, 加入 150mL 水。将该混合物在 15-20℃ 搅拌 35-45 分钟, 然后分离水层, 用 150mL 二氯甲烷萃取。合并有机层, 在 5-20℃ 的温度用 2.5% HCl (水溶液) 中和, 得到最终 pH 为 5-6。然后用水洗涤有机层, 在真空下低于 20℃ 的温度浓缩至 150mL, 得到在二氯甲烷中的化合物 30。

[0653] 碳酸 5-硝基-2,4-二叔丁基苯基甲基酯 (31) 的制备方法

[0654]



[0655] 方法 1

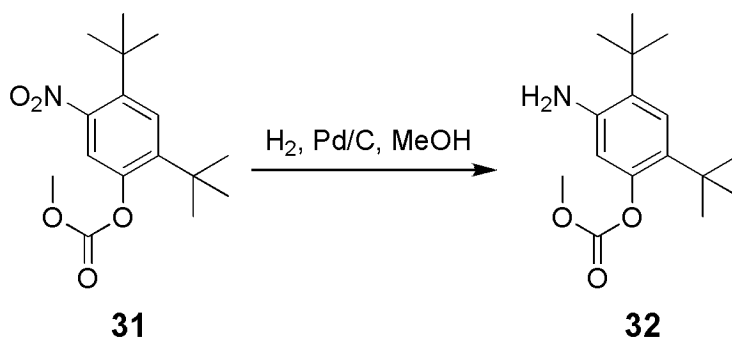
[0656] 在 0℃ 向搅拌的化合物 30 的溶液 (6.77g, 25.6mmol) 中滴加 6mL 1 : 1 硫酸和硝酸的混合物。将该混合物温至室温, 搅拌 1 小时。使用液相色谱法纯化产物 (ISCO, 120g, 0-7% EtOAc/ 己烷, 38min), 得到约 8 : 1-10 : 1 化合物 31 的区域异构体混合物, 为白色固体。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.63 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.32 (s, 9H)。HPLC 保留时间 3.92min 10-99% CH₃CN, 5min 运行; ESI-MS 310m/z (MH)⁺。

[0657] 方法 2

[0658] 向化合物 30 (100g, 378mmol) 中加入 DCM (540g, 408mL)。将该混合物搅拌至全部固体溶解, 然后冷却至 -5 至 0℃。然后滴加浓硫酸 (163g), 同时维持反应体系内部温度, 将该混合物搅拌 4.5 小时。然后在 2-4 小时内滴加硝酸 (62g), 同时维持反应体系内部温度, 然后在该温度下再搅拌 4.5 小时。然后将该反应混合物缓慢加入到冷水中, 维持温度低于 5℃。然后将冷却的反应体系加热至 25℃, 除去水层, 用二氯甲烷萃取。用水洗涤合并的有机层, 用 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩至 124-155mL。加入己烷 (48g), 将得到的混合物再浓缩至 124-155mL。然后向该混合物中再加入己烷 (160g)。然后将该混合物在 23-27℃ 搅拌 15.5 小时, 然后过滤。向滤饼中加入己烷 (115g), 将得到的混合物加热至回流, 搅拌 2-2.5 小时。然后将该混合物冷却至 3-7℃, 再搅拌 1-1.5 小时, 过滤, 得到化合物 31, 为淡黄色固体。

[0659] 碳酸 5-氨基-2,4-二叔丁基苯基甲基酯 (32) 的制备方法

[0660]



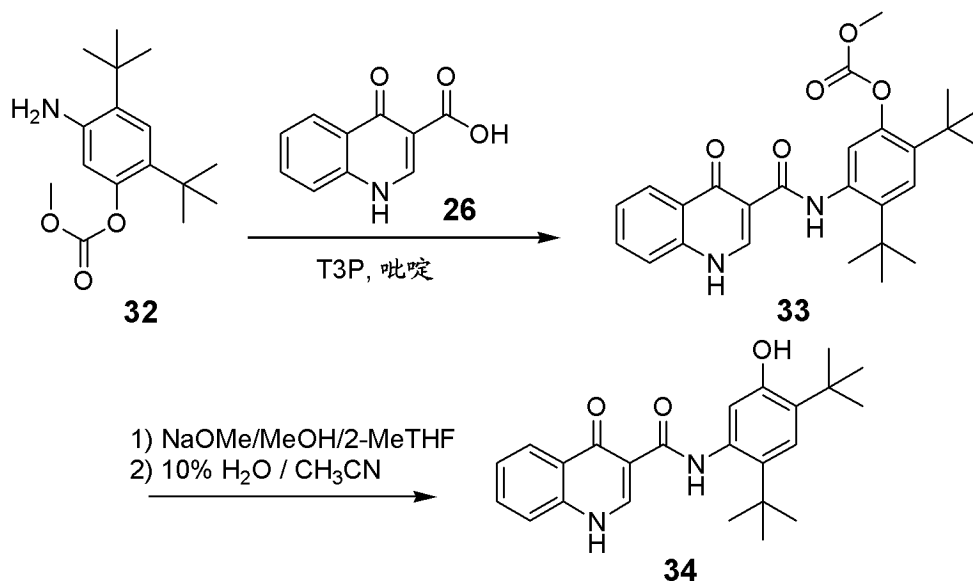
[0661] 将酸酯 2,4-二叔丁基-5-硝基苯基甲基碳 (1.00eq) 加入到适合的氢化反应器中然后加入 5% Pd/C (基于干重 2.50wt%, Johnson-Matthey Type 37)。向反应器中加入 MeOH (15.0vol), 封闭该系统。用 N₂(g) 净化该系统, 然后用 H₂(g) 加压至 2.0 巴。在 25℃ +/- 5℃ 反应温度进行反应。完成时, 过滤该反应体系, 用 MeOH (4.00vol) 洗涤反应器 / 滤饼。在不超过 50℃ 将得到的滤液真空蒸馏至得到 8.00vol。在 45℃ +/- 5℃ 加入水 (2.00vol)。将得到的淤浆冷却至 0℃ +/- 5, 将该淤浆保持在 0℃ +/- 5℃ 不少于 1 小时, 过

滤。用 $0^{\circ}\text{C} +/ -5^{\circ}\text{C}$ MeOH/ H_2O (8 : 2) (2.00vol) 将滤饼洗涤一次。在 $35^{\circ}\text{C} -40^{\circ}\text{C}$ 真空干燥滤饼 (-0.90 巴和 -0.86 巴), 得到化合物 32。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.05 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.33 (s, 9H), 1.23 (s, 9H)。

[0662] 一旦反应完成, 则用约 5-10 个体积的 MeOH (例如约 6-约 9 个体积的 MeOH、约 7-约 8.5 个体积的 MeOH、约 7.5-约 8 个体积的 MeOH 或约 7.7 个体积的 MeOH) 稀释得到的混合物, 加热至约 $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 的温度, 如上所述过滤, 洗涤, 干燥。

[0663] N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (34) 的制备

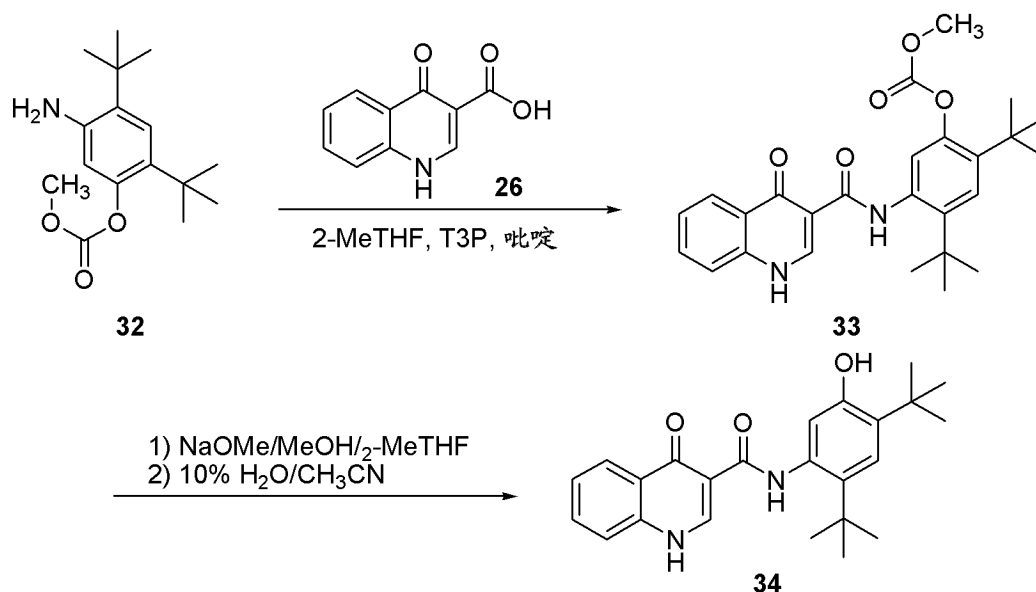
[0664]



[0665] 将 4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸 26 (1.0eq) 和碳酸 5-氨基-2,4-二叔丁基苯基甲基酯 32 (1.1eq) 加入到反应器中。加入 2-MeTHF (4.0vol, 相对于酸), 然后加入 **T3P**[®] 50% 的 2-MeTHF 溶液 (1.7eq)。用 2-MeTHF (0.6vol) 洗涤加入 T3P 的容器。然后加入吡啶 (2.0eq), 将得到的混悬液加热至 $47.5 \pm 5.0^{\circ}\text{C}$, 保持在该温度 8 小时。采样, 通过 HPLC 检查完成。一旦完成, 则将得到的混合物冷却至 $25.0^{\circ}\text{C} +/ -2.5^{\circ}\text{C}$ 。加入 2-MeTHF (12.5vol) 以稀释该混合物。用水 (10.0vol) 将该反应混合物洗涤 2 次。加入 2-MeTHF 以使反应总体积达到 40.0vol (加入 $\sim 16.5\text{vol}$)。向该溶液中加入 NaOMe/MeOH (1.7 当量) 以进行甲醇分解。将该反应体系搅拌不少于 1.0 小时, 通过 HPLC 检查完成。一旦完成, 用 1N HCl (10.0vol) 猝灭, 用 0.1N HCl (10.0vol) 洗涤。精滤有机溶液, 以除去任何颗粒, 放入第二个反应器。在不超过 35°C (夹套温度) 和不高于 8.0°C (内部反应温度) 减压浓缩过滤的溶液至 20vol。加入 CH_3CN 至 40vol, 在不超过 35°C (夹套温度) 和不高于 8.0°C (内部反应温度) 浓缩该溶液至 20vol。添加 CH_3CN 和浓缩循环重复 2 次以上, 总计 3 次添加 CH_3CN 和 4 次浓缩至 20vol。最终浓缩至 20vol 后, 加入 16.0vol CH_3CN , 然后加入 4.0vol H_2O , 使终浓度相对于原料酸为 40vol 10% $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 。将该淤浆加热至 $78.0^{\circ}\text{C} +/ -5.0^{\circ}\text{C}$ (回流)。然后将该淤浆搅拌不少于 5 小时。将该淤浆在 5 小时内冷却至 $0.0^{\circ}\text{C} +/ -5.0^{\circ}\text{C}$, 过滤。用 $0.0^{\circ}\text{C} +/ -5.0^{\circ}\text{C}$ CH_3CN (5vol) 将滤饼洗涤 4 次。在 $50.0^{\circ}\text{C} +/ -5.0^{\circ}\text{C}$ 真空烘箱内干燥得到的固体 (化合物 34)。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.8 (s, 1H), 11.8 (s, 1H), 9.2 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.9 (t, 1H), 7.8 (d, 1H), 7.5 (t, 1H), 7.1 (s, 1H), 1.4 (s, 9H), 1.4 (s, 9H)。

[0666] N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (34) 的可替代选择制备

[0667]

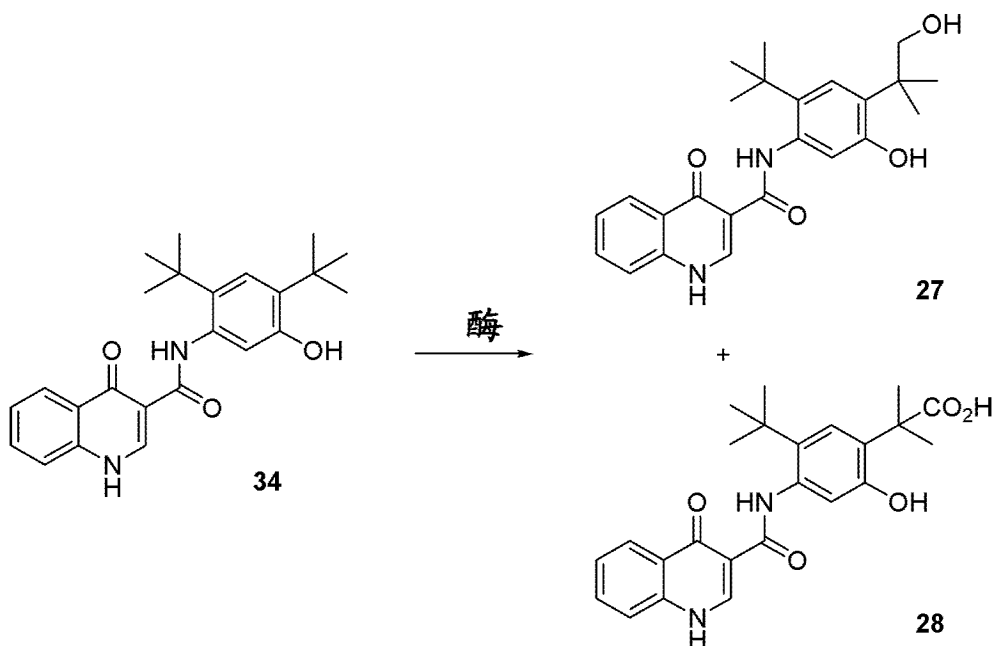


[0668] 将 4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-羧酸 26 (1.0eq) 和碳酸 5-氨基-2,4-二叔丁基苯基甲基酯 32 (1.1eq) 加入到反应器中。加入 2-MeTHF (4.0vol, 相对于酸), 然后加入 **T3P**[®] 50% 的 2-MeTHF 溶液 (1.7eq)。用 2-MeTHF (0.6vol) 洗涤加入 T3P 的容器。然后加入吡啶 (2.0eq), 将得到的混悬液加热至 47.5 $\pm$ 5.0 $^{\circ}$ C, 保持在该温度 8 小时。采样, 通过 HPLC 检查完成。一旦完成, 则将得到的混合物冷却至 20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C。加入 2-MeTHF (12.5vol) 以稀释该混合物。用水 (10.0vol) 将该反应混合物洗涤 2 次。加入 2-MeTHF (16.5vol) 至反应器中。向该溶液中加入 30% w/w NaOMe/MeOH (1.7 当量) 以进行甲醇分解。将该反应体系在 25.0 $^{\circ}$ C $\pm$ 5.0 $^{\circ}$ C 搅拌不少于 1.0 小时, 通过 HPLC 检查完成。一旦完成, 用 1.2N HCl/H₂O (10.0vol) 猝灭, 用 0.1N HCl/H₂O (10.0vol) 洗涤。精滤有机溶液, 以除去任何颗粒, 放入第二个反应器。

[0669] 在不超过 35 $^{\circ}$ C (夹套温度) 和不低于 8.0 $^{\circ}$ C (内部反应温度) 减压浓缩过滤的溶液至 20vol。加入 CH₃CN 至 40vol, 在不超过 35 $^{\circ}$ C (夹套温度) 和不低于 8.0 $^{\circ}$ C (内部反应温度) 浓缩该溶液至 20vol。添加 CH₃CN 和浓缩循环重复 2 次以上, 总计 3 次添加 CH₃CN 和 4 次浓缩至 20vol。最终浓缩至 20vol 后, 加入 16.0vol CH₃CN, 然后加入 4.0vol H₂O, 使终浓度相对于原料酸为 40vol 10% H₂O/CH₃CN。将该淤浆加热至 78.0 $^{\circ}$ C $\pm$ 5.0 $^{\circ}$ C (回流)。然后将该淤浆搅拌不少于 5 小时。将该淤浆在 5 小时内冷却至 20-25 $^{\circ}$ C, 过滤。用 CH₃CN (5vol) 洗涤滤饼, 加热至 20-25 $^{\circ}$ C 4 次。在 50.0 $^{\circ}$ C $\pm$ 5.0 $^{\circ}$ C 真空烘箱内干燥得到的固体 (化合物 34)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 12.8 (s, 1H), 11.8 (s, 1H), 9.2 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.9 (t, 1H), 7.8 (d, 1H), 7.5 (t, 1H), 7.1 (s, 1H), 1.4 (s, 9H), 1.4 (s, 9H)。

[0670] 实施例 7: N-(2-叔丁基-5-羟基-4-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (27) 和 2-(5-叔丁基-2-羟基-4-(4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰氨基)苯基)-2-甲基丙酸 (28) 的生物合成方法

[0671]



[0672] 龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*) (DSM 40260) 作为冷冻培养物购自 DSMZ。该培养物用于接种维持并且贮存在 4℃ 的琼脂斜面。制备包含酵母提取物 (4g/L)、麦芽提取物 (10g/L) 和大豆粉 (5g/L) 的酵母提取物-麦芽提取物-胨 (YMP)，在 130℃ 灭菌 60 分钟。给包含 1L YMP 培养基的 5 个烧瓶直接接种来自琼脂斜面的龟裂链霉菌。使培养物在 30℃ 与约 100rpm 的适度搅拌下生长 2-3 天。在这些条件下，观察到两种生长类型，即混浊溶液或在烧瓶底部上聚集的球形颗粒。后面的生长类型显示向化合物 27 的更高的转化率。然后旋降细胞，收集，重新混悬于包含 1L 0.1M 磷酸钾缓冲液 pH 7.0 的两个烧瓶。向烧瓶中加入 5.0g 在 50mL N,N 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的化合物 34。使反应在 30℃ 与约 100rpm 的适度搅拌下进行 24 小时，此时通过 HPLC 显示化合物 27 的转化率为 7.59% 且化合物 28 的转化率为 1.17%。

[0673] 合并两烧瓶，以 3500rpm 离心 10 分钟，重新混悬于 500mL 甲醇。将该混悬液剧烈搅拌 30 分钟，然后以 6000rpm 旋降 10 分钟。收集有机层，将该过程重复两次。真空浓缩甲醇萃取物，分别得到 2.50g、1.57g 和 1.11g 固体物质。来自这些萃取物的固体显示包含 74.78-91.96% 化合物 34、7.66-19.73% 化合物 27 和 0.39-5.49% 化合物 28。在从生物氧化产物中采集部分化合物 34 的尝试中，合并来自两次萃取的固体，混悬于 250mL 甲醇，剧烈搅拌 1 小时，真空过滤。尽管滤液中富含化合物 27 和 28 (分别为 22.09 和 6.14%)，但是固体仍然包含化合物 27 (8.96%) 和化合物 28 (0.50%)。

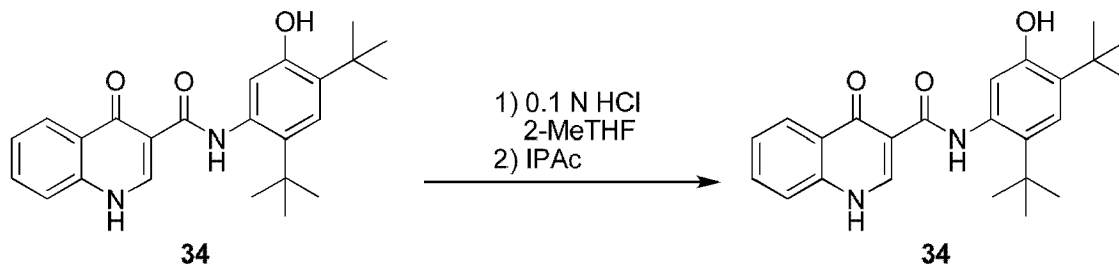
[0674] 使包含约 2.2g 溶解的固体的甲醇滤液吸附在 4.5g 二氧化硅上，通过使用 100% 二氯甲烷-88 : 12 二氯甲烷 / 甲醇梯度的快速色谱法纯化。真空浓缩包含化合物 27 的级分，通过冷冻干燥进一步干燥，得到 130mg 化合物 27 (通过 HPLC 证实纯度为 98.5%)。还真空浓缩包含不纯化合物 28 的级分，得到少于 10mg 的固体。

[0675] 将细胞沉淀 (pellet) 重新混悬于 500mL 甲醇，在 BeadBeater 中匀化，以破碎细胞，回收任何遗留的产物。通过以 6000rpm 将匀化混悬液离心 10 分钟得到有机层。将其加入从第三次萃取中得到的固体和从前两次萃取的淤浆富集中过滤的固体中，在回流状态搅拌成淤浆过夜。然后冷却该淤浆，抽滤，得到 1.99g 固体。将该固体重新溶于 300mL 甲醇，

然后使其吸附在约 5g 二氧化硅上,通过使用 100%二氯甲烷-94 : 6 二氯甲烷 / 甲醇梯度的快速色谱法纯化,得到 820mg 固体,其包含化合物 34 和化合物 27 和其他杂质。将其使用更渐进的溶剂梯度 (100% DCM-6% MeOH/94% DCM 混合物) 再上柱,又得到 89mg 化合物 27。¹H-NMR 光谱与上述报道的一致。

[0676] 实施例 8 :N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (34) 的重结晶方法

[0677]



[0678] 将化合物 34 (1.0eq) 加入到反应器中。加入 2-MeTHF (20.0vol), 然后加入 0.1N HCl (5.0vol)。搅拌双相溶液, 分离, 用 0.1N HCl (5.0vol) 将上部有机相洗涤两次。精滤有机溶液, 以除去任何颗粒, 并置于第二个反应器中。在不超过 35°C (夹套温度) 和不超过 8.0°C (内部反应温度) 减压浓缩过滤的溶液至 10vol。加入乙酸异丙酯 (IPAc) (10vol), 在不超过 35°C (夹套温度) 和不超过 8.0°C (内部反应温度) 减压浓缩溶液至 10vol。将添加 IPAc 和浓缩重复 2 次以上, 总计 3 次添加 IPAc 和 4 次浓缩至 10vol、最终浓缩后, 加入 10vol IPAc, 将淤浆加热至回流, 维持在该温度 5 小时。在 5 小时内将淤浆冷却至 0.0°C +/-5.0°C, 过滤。用 IPAc (5vol) 将滤饼洗涤一次。在 50.0°C +/-5.0°C 在真空烘箱内干燥得到的固体。

[0679] 实施例 9 : 在 pH 7.4 下测试溶解度的一般方法

[0680] 高通量摇瓶测定法用于测定化合物在 pH 7.4 缓冲液中的溶解度。为了计算化合物在溶液中的浓度, 每种化合物运行两种条件: 300uM 的 100% DMSO 溶液和 200uM 的包含 2% DMSO 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液溶液。将每一样品保持振摇过夜, 然后注射在 HPLC-UV 上, 以使用下列条件测定峰面积: Phenomenex 00A-4251-B0-30x2.00mm Luna 3u C18(2) 100A 柱; 0.8mL/min 流速; 20uL 注射体积; 含有 0.1% 甲酸的 HPLC 级水和含有 0.1% 甲酸的 HPLC 级乙腈流动相; 在 254nm 测定峰面积。使用下列方程计算以 uM 计的溶解度: 浓度 = (峰面积 pH 7.4) / (峰面积 300uM DMSO 标准条件) * 300uM 标准条件浓度。基于在 300uM DMSO 标准条件下的最大面积峰的保留时间 (RT) 的缓冲液条件鉴定所关注的峰。

[0681] VI. 活性测定

[0682] 实施例 10 : 一般活性测定方法

[0683] 用于检测和测量化合物的 $\Delta F508$ -CFTR 增强作用的分析

[0684] 用于测定化合物的 $\Delta F508$ -CFTR 调节性质的跨膜电位光学方法

[0685] 该测定法使用荧光电压传感染料以使用荧光板读出器测定跨膜电位改变 (例如 FLIPR III, Molecular Devices, Inc.) 作为 NIH 3T3 细胞中功能性 $\Delta F508$ -CFTR 增加的读出值。对该响应的驱动力在于在预先用化合物处理细胞、然后加载电压传感染料后, 通过单一液体添加步骤生成与通道活化相关的氯离子梯度。

[0686] 增强剂化合物的鉴定

[0687] 为了鉴别 $\Delta F508$ -CFTR 增强剂, 研发了双重-添加 HTS 测定方式。该 HTS 分析使

用荧光电压传感染料以测定 FLIPR III 上跨膜电位改变作为温度校准的 $\Delta F508$ CFTR NIH 3T3 细胞中 $\Delta F508$ CFTR 门控增加的测量值（电导）。对该响应的驱动力在于在预先用增强剂化合物（或 DMSO 媒介物对照品）处理细胞、然后加载再分布染料后，与使用荧光板读出器例如 FLIPR III 进行通道活化相关的 Cl^- 离子梯度。

[0688] 溶液

[0689] 浴溶液 #1 : (以 mM 计) NaCl 160, KCl 4.5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, pH 7.4 与 NaOH。

[0690] 不含氯化物的浴溶液 : 浴溶液 #1 中的氯化物盐被葡萄糖酸盐取代。

[0691] 细胞培养将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于膜电位的光学测定。将细胞维持在 $37^\circ C$ 、在 5% CO_2 和 90% 湿度中的在 $175cm^2$ 培养烧瓶中的改进的 Eagle 培养基中，该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X 青霉素 / 氯霉素和 25mM HEPES。就所有光学测定而言，以 $\sim 20,000$ / 孔将细胞接种在 384-孔基质胶包被的培养板上并且在 $37^\circ C$ 培养 2hrs，然后在 $27^\circ C$ 培养 24 小时，以用于增强剂测定。就纠正测定而言，将细胞在 $27^\circ C$ 或 $37^\circ C$ 与和与不化合物一起培养 16-24 小时。测定化合物 $\Delta F508$ -CFTR 调节特性的电生理试验。

[0692] 1. Ussing 室测定

[0693] 对表达 $\Delta F508$ -CFTR 的极化气道上皮细胞进行 Ussing 室实验，以进一步表征在光学测定法中鉴别的 $\Delta F508$ -CFTR 调节剂。从支气管组织中分离非-CF 和 CF 气道上皮，如上所述培养 (Galiotta, L. J. V., Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, G. A., & Zegarria-Moran, O. (1998) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34, 478-481)，在用 NIH3T3-条件培养基预包被的 **Costar**® Snapwell™ 过滤器上铺板。4 天后，除去顶部培养基，使细胞在空气液体界面上生长 ≥ 14 天，然后使用。这产生单层完全分化的柱状细胞，它们具纤毛、特征在于气道上皮特征。从没有已知任何肺病的不吸烟者中分离非-CFHBE。从对 $\Delta F508$ -CFTR 而言纯合的患者中分离 CF-HBE。

[0694] 将生长在 **Costar**® Snapwell™ 细胞培养插入物上的 HBE 固定在 Ussing 室 (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA) 上，使用电压钳系统 (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA) 测定在基底外侧到顶端 Cl^- 梯度 (I_{sc}) 的存在下的经上皮电阻和短路电流。简言之，在电压钳记录条件下 ($V_{保持} = 0mV$)、在 $37^\circ C$ 检验 HBE。基底外侧溶液包含 (以 mM 计) 145NaCl、0.83 K_2HPO_4 、3.3 KH_2PO_4 、1.2 $MgCl_2$ 、1.2 $CaCl_2$ 、10 葡萄糖、10HEPES (用 NaOH 将 pH 调节至 7.35)，顶端溶液包含 (以 mM 计) 145 葡萄糖酸钠、1.2 $MgCl_2$ 、1.2 $CaCl_2$ 、10 葡萄糖、10HEPES (用 NaOH 将 pH 调节至 7.35)。

[0695] 增强剂化合物的鉴定

[0696] 典型的方案使用基底外侧至顶端膜的 Cl^- 浓度梯度。为了产生该梯度，对基底外侧膜使用正常的林格液 (ringer)，同时用等摩尔的葡萄糖酸钠 (用 NaOH 滴定至 pH 7.4) 代替顶膜的 NaCl，以得到跨上皮的大幅的 Cl^- 浓度梯度。将福斯柯林 (10 μM) 和所有受试化合物加入到细胞培养嵌入物的两侧。比较推测的 $\Delta F508$ -CFTR 增强剂与已知增强剂染料木黄酮的效果。

[0697] 2. 膜片钳记录

[0698] 如上所述使用穿孔的膜片记录监测 $\Delta F508$ -NIH3T3 细胞中的总 Cl^- 电流 (Rae,

J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) *J. Neurosci. Methods* 37, 15-26)。使用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) 在 22℃ 进行电压钳记录。移取管溶液包含 (以 mM 计) 150N- 甲基-D- 葡萄糖胺 (NMDG)-Cl、2MgCl₂、2CaCl₂、10EGTA、10HEPES 和 240 μg/ml 两性霉素-B (用 HCl 将 pH 调节至 7.35)。胞外培养基包含 (以 mM 计) 150NMDG-Cl、2MgCl₂、2CaCl₂、10HEPES (用 HCl 将 pH 调节至 7.35)。使用安装了 Digidata1320A/D 界面与 Clampex 8 (Axon Instruments Inc.) 的 PC 进行脉冲发生、数据采集和分析。为了活化 ΔF508-CFTR, 向浴中加入 10 μM 福司柯林和 20 μM 染料木黄酮, 每隔 30 秒监测一次电流-电压相关性。

[0699] 增强剂化合物的鉴定

[0700] 还用穿孔膜片记录技术研究了 ΔF508-CFTR 强化剂增加稳定表达 ΔF508-CFTR 的 NIH3T3 细胞中宏观 ΔF508-CFTR Cl⁻ 电流 ($I_{\Delta F508}$) 的能力。从光学测定法中鉴别的强化剂引起与在光学测定法中观察到的类似效力和功效的 $I_{\Delta F508}$ 剂量依赖性增加。在所有检验的细胞中, 施加强化剂前和过程中的逆转电位为约 -30mV, 它是计算的 E_{Cl} (-28mV)。

[0701] 细胞培养

[0702] 将稳定表达 ΔF508-CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于全细胞记录。将细胞维持在 37℃、在 5% CO₂ 和 90% 湿度中的在 175cm² 培养烧瓶中的改进的 Eagle 培养基中, 该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、β-ME、1X 青霉素/氯霉素和 25mM HEPES。就全细胞记录而言, 将 2,500-5,000 细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上并且在 27℃ 培养 24-48hrs, 然后用于测试增强剂活性, 并且将细胞在 37℃ 与和与纠正化合物一起温育以测定纠正剂活性。

[0703] 3. 单通道记录

[0704] 使用如上所述切下的膜内侧翻外膜片 (Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R. G., Pavirani, A., Lecocq, J-P., Lazdunski, M. (1991) *Nature* 354, 526-528)、应用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc.) 观察 NIH3T3 细胞中表达的 wt-CFTR 和温度校准的 ΔF508-CFTR 的门控活性。移取管包含 (以 mM 计): 150NMDG、150 天冬氨酸、5CaCl₂、2MgCl₂ 和 10HEPES (用 Tris 碱将 pH 调节至 7.35)。浴包含 (以 mM 计): 150NMDG-Cl、2MgCl₂、5EGTA、10TES 和 14Tris 碱 (用 HCl 将 pH 调节至 7.35)。在切下后通过添加 1mM Mg-ATP、75nM 的 cAMP- 依赖性蛋白激酶催化亚单位 (PKA; Promega Corp. Madison, WI) 和 10mM NaF 活化 wt- 和 ΔF508-CFTR, 以抑制蛋白磷酸酶, 从而防止电流衰减。在通道活性稳定后, 使用重力驱动微量灌注系统灌注膜片。将移取管电位维持在 80mV。分析来自包含 ≤ 2 活性通道的膜片中通道活性。同时开放的最大值确定了实验过程中活性通道的数量。为了测定单通道电流振幅, 在 100Hz “离线”过滤从 120 秒 ΔF508-CFTR 活性记录的数据, 然后用于构建所有点的振幅直方图, 使用 Bio-Patch Analysis 软件 (Bio-Logic Comp. France) 与多高斯函数拟合。根据 120 秒的通道活性确定总微型电流和开放概率 (P_o)。使用 Bio-Patch 软件或根据相关性 $P_o = I/i(N)$ 测定 P_o , 其中 I = 平均电流, i = 单通道电流振幅, 且 N = 膜片中活性通道的数量。

[0705] 细胞培养

[0706] 将稳定表达 ΔF508-CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于切下膜的膜片钳记录。将细胞维持在 37℃、在 5% CO₂ 和 90% 湿度中的在 175cm² 培养烧瓶中的改进的 Eagle 培养

基中,该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X 青霉素 / 氯霉素和 25mM HEPES。就单通道而言,将 2,500-5,000 细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上并且在 27°C 培养 24-48hrs,然后使用。

[0707] 式 1 化合物用作 ATP 结合盒转运体的调节剂。

[0708] 其他实施方案

[0709] 将本说明书中涉及的全部公开文献和专利引入本文参考,就如同将每篇公开文献或专利申请各自特别和分别引入作为参考的情况一样。如果在作为参考引入的任意专利或公开文献中的术语的含义与本说明书中使用的术语含义发生矛盾,则指定本说明书中的术语含义为准。此外,上述讨论仅公开并且描述本发明的典型实施方案。本领域技术人员从这种讨论和附图和权利要求中易于认可可以在不脱离如下面的权利要求所定义的本发明精神和范围的情况下对其中进行各种改变、变型和修改。