



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117466958 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202311295323.3  
(22) 申请日 2018.03.15  
(30) 优先权数据  
201721008996 2017.03.15 IN  
(62) 分案原申请数据  
201880032661.9 2018.03.15  
(71) 申请人 ELOXX制药有限公司  
地址 以色列雷霍沃特市  
(72) 发明人 迈克尔·米吉瑞斯齐  
马尼·布珊·科塔拉  
拉文德尔·帕拉迪  
(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11400  
专利代理师 郭玥 方挺

(51) Int.Cl.  
C07H 5/06 (2006.01)  
C07H 15/224 (2006.01)  
A61K 31/7036 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)

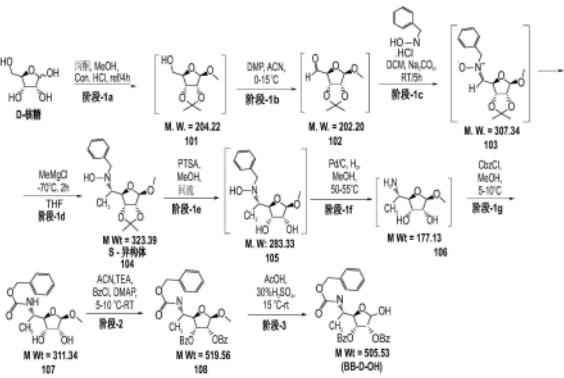
权利要求书5页 说明书46页 附图7页

(54) 发明名称

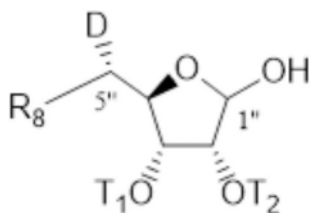
假三糖氨基糖苷及其中间体的大规模制备

(57) 摘要

本发明提供了制备由本说明书定义的式I或式Ia表示的假三糖氨基糖苷化合物的合成途径以及用于制备此类化合物的供体和受体化合物。本发明也提供了一种立体选择性地制备由本说明书定义的式III表示的化合物的方法,同时避免了立体异构体的色谱分离。本发明还提供了通过所述方法制备的化合物及其用途。



1. 一种制备由式III表示的化合物的方法:



式III

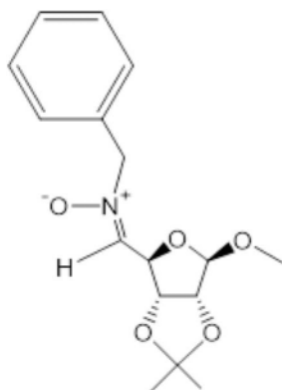
其中:OT<sub>1</sub>和OT<sub>2</sub>各自独立地是供体被保护羟基;

R<sub>8</sub>是烷基;以及

D是被保护氨基,

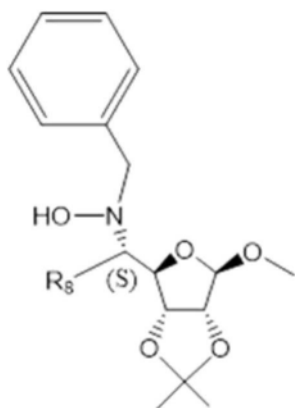
所述方法包括:

使由式IIIa表示的化合物:



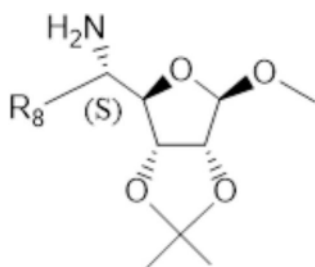
式IIIa

与由式R<sub>8</sub>MgX表示的格氏试剂反应,其中X是卤化物,从而立体选择性地获得由式IIIb表示的化合物:



式IIIb;

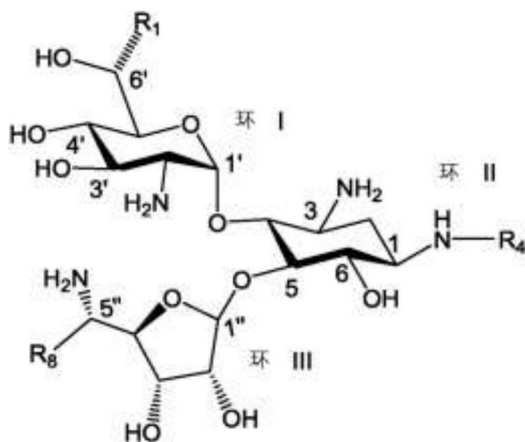
将所述由式IIIb表示的化合物转化为由式IIIc表示的化合物:



式IIIc;

使所述由式IIIc表示的化合物与氨基保护基团反应以生成所述D;以及  
使所述由式IIIc表示的化合物与羟基保护基团反应以生成所述OT<sub>1</sub>和OT<sub>2</sub>,  
从而制备由式III表示的化合物。

2.一种制备由式I表示的假三糖氨基糖苷化合物:



式I

或其药学上可接受的盐的方法,其中:

矩形虚线表示6' 位的S-构型或R-构型;

R<sub>1</sub>选自氢,烷基,环烷基,或芳基;

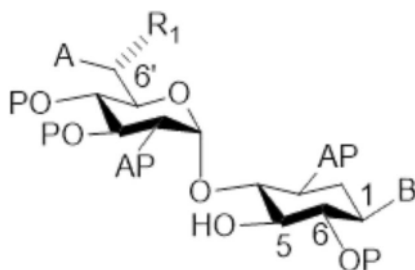
R<sub>4</sub>选自氢,酰基,和氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基;以及

R<sub>8</sub>是烷基,

所述方法包括:

根据权利要求1-6中的任一方法制备由式III表示的化合物;以及

将所述由式III表示的化合物与由式II表示的化合物偶联:



式II

其中:

矩形虚线表示6'位的S-构型或R-构型；

OP是受体被保护羟基；

AP是受体被保护氨基；

A是受体被保护羟基(OP)；以及

如果式I中R<sub>4</sub>是氢,则B是受体被保护氨基,或者当R<sub>4</sub>不是氢时,B是定义R<sub>4</sub>的基团的被保护或未被保护形式；

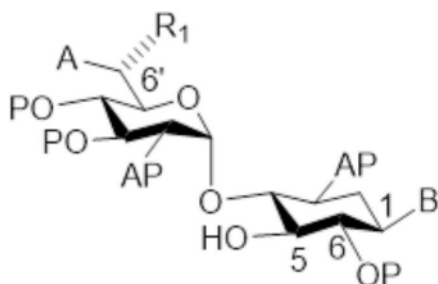
对所述受体被保护和供体被保护羟基进行去保护；

对所述受体被保护和供体被保护氨基进行去保护；以及

如果存在,对所述定义R<sub>4</sub>的基团的被保护形式进行去保护,

从而制备由式I表示的化合物。

3.一种制备由式II表示的化合物的方法：



式II

其中：

矩形虚线表示6'位的S-构型或R-构型；

R<sub>1</sub>是氢,烷基,环烷基,或芳基；

OP是受体被保护羟基；

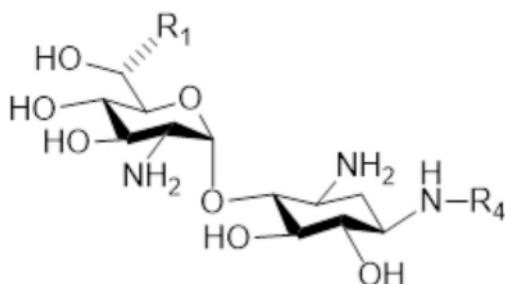
AP是受体被保护氨基；

A是受体被保护羟基(OP)；以及

B是受体被保护氨基,酰基,或者被保护或未被保护氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基,

所述方法包括：

提供由式IIa表示的化合物：



式IIa

或其药学上可接受的盐,其中：

R<sub>4</sub>是氢,酰基,或氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基；

将每个所述氨基转化为所述受体被保护氨基；并且将每个所述羟基转化为所述受体被保护羟基。

4. 由式I表示的假三糖化合物或其药学上可接受的盐,通过权利要求2所述的方法制备。

5. 一种药物组合物,包括权利要求4的化合物和药学上可接受的盐。

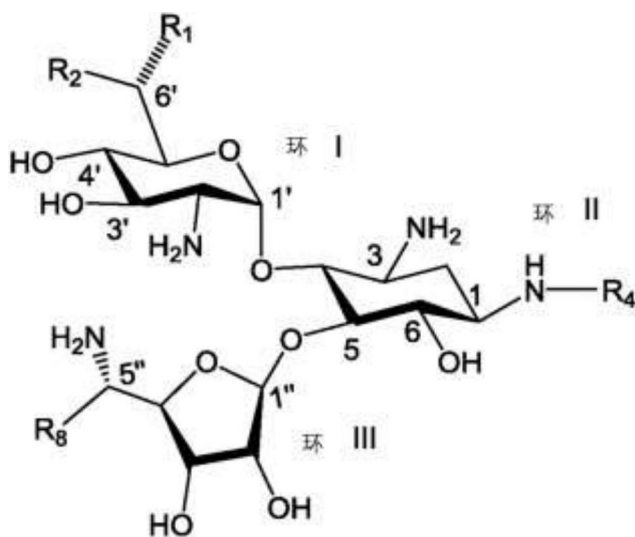
6. 一种由式III表示的化合物,通过权利要求1所述的方法制备。

7. 一种由式IIIa表示的化合物。

8. 一种由式IIIb表示的化合物。

9. 一种由式IIIc表示的化合物。

10. 一种制备由式Ia表示的假三糖氨基糖苷化合物:



式 Ia

或其药学上可接受的盐的方法,其中:

矩形虚线表示6' 位的S-构型或R-构型;

R<sub>1</sub>选自氢,烷基,环烷基,或芳基;

R<sub>2</sub>选自取代或未取代的烷基,OR' 和NR' R'',其中每个R' 和R''各自独立地选自氢,取代或未取代的烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的芳基,取代或未取代的杂芳基,取代或未取代的烷芳基,和酰基;

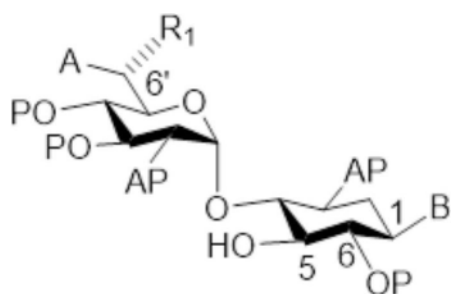
R<sub>4</sub>选自氢,酰基,氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基,取代或未取代的烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的芳基,取代或未取代的烷芳基,和可渗透细胞的基团;以及

R<sub>8</sub>是烷基,

所述方法包括:

根据权利要求1-6中任一项来制备由式III表示的化合物;并且

将所述由式III表示的化合物与由式IIb表示的化合物偶联:



式IIb

其中：

矩形虚线表示6' 位的S-构型或R-构型；

OP是受体被保护羟基；

AP是受体被保护氨基；

当式Ia中 $R_2$ 是 $OR'$  并且 $R'$  是氢时,A是受体被保护羟基(OP) ;当式Ia中 $R_2$ 是 $NR'R''$  并且 $R'$  和 $R''$  中至少一个是氢时,A是受体被保护氨基(AP) ;或者当 $R_2$ 不是OH, $NH_2$ , $NHR'$  ,或 $NHR''$  时,A是定义 $R_2$ 的基团的被保护或未被保护形式；

当式Ia中 $R_4$ 是氢时,B是受体被保护氨基(AP) ,或者当 $R_4$ 不是氢时,B是定义 $R_4$ 的基团的被保护或未被保护形式；

对所述受体被保护和供体被保护羟基进行去保护；

对所述受体被保护和供体被保护氨基进行去保护；以及

如果存在,对所述定义 $R_2$ 的基团的被保护形式和/或所述定义 $R_4$ 的基团的被保护形式进行去保护,

从而制备由式Ia表示的化合物。

## 假三糖氨基糖苷及其中间体的大规模制备

[0001] 本申请是2018年3月15日提交的申请号为201880032661.9,名称为“假三糖氨基糖苷及其中间体的大规模制备”的中国国家阶段专利申请的分案申请。

[0002] 发明领域和发明背景

[0003] 本发明在其一些实施方式中涉及氨基糖苷的合成,并且更具体地但非排他地涉及制备表现出读出(read-through)活性和降低的毒性的假三糖氨基糖苷的新方法,可用于大规模生产此类氨基糖苷以及可用于制备此类氨基糖苷的受体和供体中间体化合物。

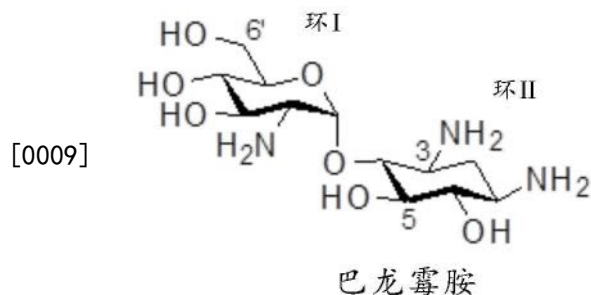
[0004] 许多人类遗传紊乱(disorder)是由无义突变引起的,其中三个终止密码子(UAA, UAG,或UGA)之一取代氨基酸编码密码子,导致转译的提前终止,并且最终成为截短的失活蛋白质。目前,已知数百种此类无义突变,并且有数个被证明为某些致命疾病的病例的原因,包括例如囊性纤维化(CF),杜兴氏肌肉营养不良症(DMD),共济失调-毛细血管扩张,Hurler综合征,A型血友病,B型血友病,Tay-Sachs等。对于许多这些疾病,目前尚无有效的治疗方法。

[0005] 氨基糖苷是高效力的广谱抗生素,通常用于危及生命的感染的治疗。一些氨基糖苷化合物已被证明为在多个遗传疾病的治疗中具有治疗价值,因为它们能够诱导核糖体读出终止密码子突变,从mRNA分子的一部分产生全长蛋白质。

[0006] 然而,大多数对人体细胞的细胞质核糖体表现出显著影响的氨基糖苷化合物,也对哺乳动物细胞表现出抗菌活性和/或其他毒性。如同任何抗生素的非必要使用一样,读出药物的抗菌活性是不被期望的,特别是对于胃肠道(GI)生物群,因为它会扰乱GI生物群平衡以及形成耐药性,从而产生不利影响。

[0007] 已进行了广泛的研究来揭示氨基糖苷化合物,其通过表现出高的提前终止密码子突变读出活性,在哺乳动物细胞中的低毒性和低抗菌活性,以及改进的生物利用度和/或细胞渗透性,可有益地用于遗传疾病的治疗。

[0008] WO 2007/113841,通过引用并入本文并如同在本文充分阐述,启示了一类巴龙霉素衍生的氨基糖苷,其被设计为特异性地表现出高终止密码子突变的读出活性,同时在哺乳动物细胞中发挥低细胞毒性和低抗菌活性,因此可以用于遗传疾病的治疗。这类巴龙霉素衍生的氨基糖苷的设计是通过对巴龙霉胺的核心引入某些处理(manipulation)而实现的,可以增强读出活性并且降低毒性和抗菌活性。该处理在巴龙霉胺的核心的数个位置上进行。



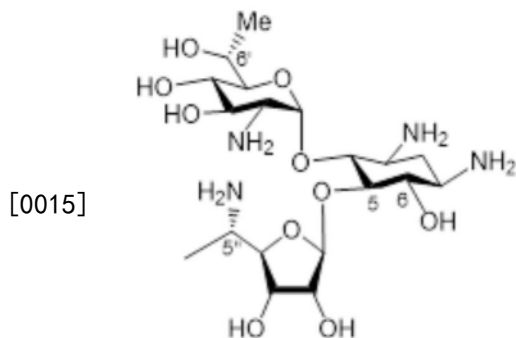
[0010] 已在WO 2007/113841中描述的对巴龙霉胺核心的一种此类处理是测定氨基糖苷核心的6'位羟基的有益作用。

[0011] 已在W0 2007/113841中定义和证实的对巴龙霉素核心的另一处理是在氨基糖苷核心的3',5,和/或6位引入一个或多个单糖部分(moieties)或一寡糖部分。

[0012] 已在W0 2007/113841中定义和证实的对巴龙霉素核心的另一附加处理是在巴龙霉素核心的1位引入(S)-4-氨基-2-羟基丁酰基(AHB)部分。

[0013] 已经在W0 2007/113841中描述的对巴龙霉素核心的另一附加处理是6'位上的氢被烷基取代,例如甲基取代基。

[0014] W0 2012/066546,通过引用并入本文并如同在本文充分阐述,公开了另一类假三糖氨基糖苷,其表现出有效的终止密码子突变读出活性,低细胞毒性和对真核转译系统的高选择性。这些假三糖氨基糖苷以5"位的烷基为特征,如化合物NB124例示。



NB124

[0016] W0 2012/066546进一步公开了以5"位的S-构型为特征的立体异构体的改进性能。

[0017] W0 2007/113841和W0 2012/066546中公开的假三糖氨基糖苷化合物的合成是基于将供体单糖部分(形成氨基糖苷化合物的环III)偶联到假二糖受体。根据W0 2007/113841和W0 2012/066546的启示,可以通过巴龙霉素的裂解来获得假二糖受体,从而获得巴龙霉素的二糖核心,根据需要进一步处理。合成途径涉及在合成的多个阶段使用氨基保护基团,通常为叠氮化物,使用羟基保护基团,以及立体异构体的色谱分离。

[0018] 额外的背景技术包括Nudelman,I.等人,生物有机与药物化学快报(Bioorg Med Chem Lett),2006.16(24):页数6310-5;Nudelman,I.等人,生物有机与药物化学(Bioorg Med Chem),2010.18(11):页数3735-46;W0 2017/037717和W0 2017/037718。

#### [0019] 发明概述

[0020] 本发明者现已设计并成功实施了一种用于生产假三糖氨基糖苷的新的合成途径,例如W0 2012/066546和W0 2017/037718中所述,该方法适合于此类氨基糖苷化合物的大规模生产。如前所述,新设计的方法虽然基于将单糖供体与假二糖受体偶联,但有益地使用了G-418作为制备受体的原料,并且重要的是,使用所需的供体立体异构体的立体选择性合成,从而避免了使用立体异构体的色谱分离的需要。新设计的方法的优点还在于减少的步骤数量,大幅减少的色谱分离次数,减少的或避免的危险试剂的使用,更高的产率和提高的成本效益。

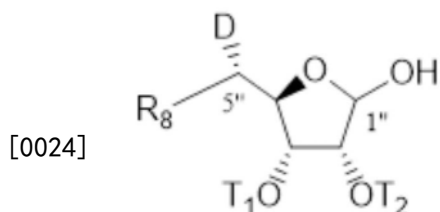
[0021] 因此,本发明的一些实施方式涉及制备所需的供体糖基化合物的立体异构体的新方法,涉及将此种供体与合适的受体偶联而获得假三糖氨基糖苷化合物的新方法,例如W0 2012/066546和W0 2017/037718中所述,涉及制备本文所述的假二糖受体的新方法,以及涉及本文所述的将供体与受体偶联并由此产生最终的假三糖氨基糖苷的新方法。本发明的一



些实施方式涉及本文所述的供体糖基化合物(例如,由式III表示的化合物)的立体异构体的大规模生产。本发明的一些实施方式涉及例如WO 2012/066546和WO 2017/037718中所述的假三糖氨基糖苷化合物(例如,由式I或Ia表示的化合物)的大规模生产。

[0022] 本发明的一些实施方式涉及通过本文所述的方法制备的供体化合物,受体化合物,假三糖氨基糖苷和其他中间体化合物。

[0023] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了一种制备由式III表示的化合物的方法:



式III

[0025] 其中:

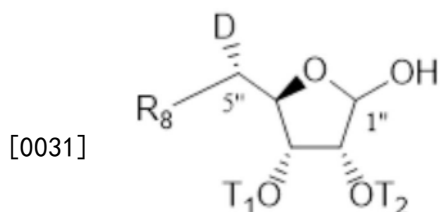
[0026] OT<sub>1</sub>和OT<sub>2</sub>各自独立地是供体被保护羟基;

[0027] R<sub>8</sub>是烷基,优选是甲基;以及

[0028] D是被保护氨基,

[0029] 所述方法用于大规模制备本文所述的式III化合物,或本文所述的由式I或式Ia表示的化合物的大规模制备(如本文所定义的大规模生产或制造)。

[0030] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了一种制备由式III表示的化合物的方法:



式III

[0032] 其中:

[0033] OT<sub>1</sub>和OT<sub>2</sub>各自独立地是供体被保护羟基;

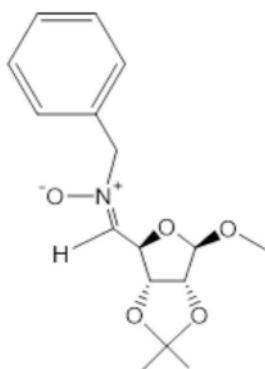
[0034] R<sub>8</sub>是烷基,优选是甲基;以及

[0035] D是被保护氨基,

[0036] 所述方法包括:

[0037] 使由式IIIa表示的化合物:

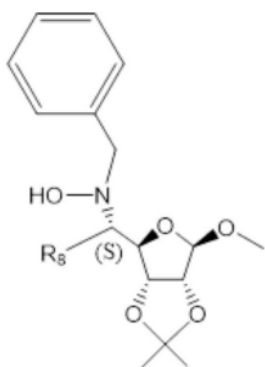
[0038]



式IIIa

[0039] 与由 $R_8MgX$ 表示的格氏试剂反应,其中X是卤化物,从而立体选择性

[0040]

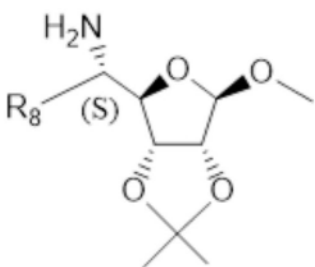


[0041] 地获得由式IIIb表示的化合物,以如下所示的S-构型为特征:

[0042] 式IIIb;

[0043] 将所述由式IIIb表示的化合物转化为由式IIIc表示的化合物:

[0044]



式IIIc;

[0045] 使所述由式IIIc表示的化合物与氨基保护基团反应以生成所述D;以及使所述由式IIIc表示的化合物与羟基保护基团反应以生成所述OT<sub>1</sub>和OT<sub>2</sub>,从而制备由式III表示的化合物。

[0046] 根据本文描述的任何实施方式中的一些实施方式,所述氨基保护基团是N-苄氧羰基。

[0047] 根据本文描述的任何实施方式中的一些实施方式,每个所述羟基保护基团均为苯甲酰基。

[0048] 根据本文描述的任何实施方式中的一些实施方式,所述由式IIIa表示的化合物由以下步骤制备:

[0049] 将D-核糖转化为被二氧戊环保护的D-核糖;

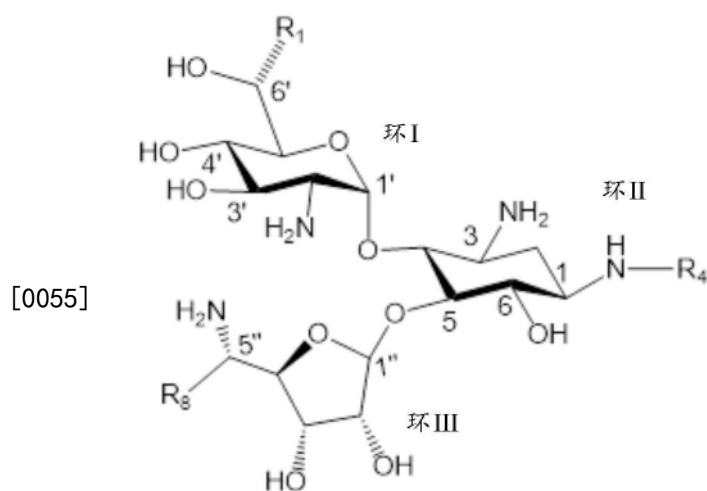
[0050] 将5'位的羟基氧化成相应的醛;以及

[0051] 将所述醛与N-苄基羟基胺盐酸盐反应。

[0052] 根据本文描述的任何实施方式中的一些实施方式,D是被N-苄氧羰基(CBz)保护的氨基, $R_8$ 是甲基,且每个 $T_1$ 和 $T_2$ 均为苯甲酰基,所述方法基本上如本文所述并如图1所示。

[0053] 根据本文描述的任何实施方式中的一些实施方式,以“一锅式反应(one pot reaction)”的方式来进行:从D-核糖制备所述由式IIIa表示的化合物,使所述由式IIIa表示的化合物与所述格氏试剂反应,将所述由式IIIb表示的化合物转化为所述由式IIIc表示的化合物,以及使所述由式IIIc表示的化合物与氨基保护基团反应以形成所述D。

[0054] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了一种制备由式I表示的假三糖氨基糖苷化合物:



式 I

[0056] 或其药学上可接受的盐的方法,其中:

[0057] (矩形)虚线表示6'位的S-构型或R-构型;

[0058]  $R_1$ 选自氢,烷基,环烷基,或芳基;

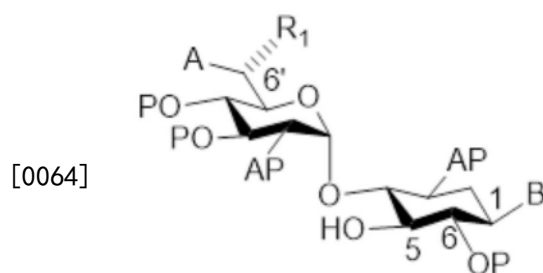
[0059]  $R_4$ 选自氢,酰基,和氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基;以及

[0060]  $R_8$ 是烷基,优选是甲基,

[0061] 所述方法包括:

[0062] 根据相应(respective)实施方式中的任意一个及其任意组合制备由式III表示的化合物;以及

[0063] 将所述由式III表示的化合物与由式II表示的化合物偶联:

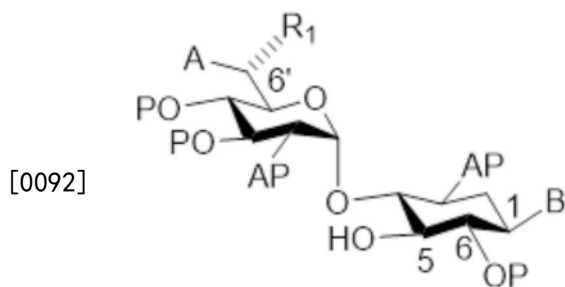


式 II

- [0065] 其中：
- [0066] (矩形)虚线表示6'位的S-构型或R-构型；
- [0067] OP是受体被保护羟基(acceptor-protected hydroxyl group)；
- [0068] AP是受体被保护氨基；
- [0069] A是受体被保护羟基(OP)；以及
- [0070] 如果式I中 $R_4$ 是氢,则B是受体被保护氨基,或者当 $R_4$ 不是氢时,B是定义 $R_4$ 的基团的被保护或未被保护形式；
- [0071] 对所述受体被保护和供体被保护羟基进行去保护；
- [0072] 对所述受体被保护和供体被保护氨基进行去保护；以及
- [0073] 如果存在,对所述定义 $R_4$ 的基团的被保护形式进行去保护,
- [0074] 从而制备由式I表示的化合物。
- [0075] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,在 $BF_3$ -乙醚的存在下实现所述偶联。
- [0076] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,所述式III化合物在所述偶联之前被转化为其活化形式。
- [0077] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,所述将所述式III化合物转化为所述活化形式于原位进行且不分离所述活化形式。根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 是甲基, $R_4$ 是氢,并且所述由式II表示的化合物通过以下步骤制备：
- [0078] 将G418硫酸盐转化为6-甲基巴龙霉胺；
- [0079] 将羟基转化为所述受体被保护羟基；以及
- [0080] 将氨基转化为所述受体被保护氨基。
- [0081] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,将G418硫酸盐转化为6-甲基巴龙霉胺包括使G418以其游离碱的形式与HCl甲醇溶液接触。
- [0082] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个所述受体被保护羟基均为O-乙酰基。
- [0083] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,在甲醇氨溶液中实现对所述受体被保护羟基的去保护。
- [0084] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个所述受体被保护氨基均为被N-苄氧羰基(CBz)保护的氨基。
- [0085] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,对所述受体被保护氨基的去保护通过Pd/C-催化加氢而实现。
- [0086] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,6'位的立体构型是R-构型。
- [0087] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,式I化合物是硫酸盐,所述方法还包括将由式I表示的化合物以其游离碱的形式转化为所述硫酸盐。
- [0088] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,通过使由式I表示的化合物以其游离碱的形式与 $H_2SO_4$ 的甲醇溶液接触来进行所述转化。
- [0089] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 是甲基,6'位的构型是R-构型, $R_4$ 是氢,以及 $R_8$ 是甲基。示例性的此种方法基本上如本文所述并如图1-3所示。
- [0090] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,如相应实施方式中的任意一个

及其任意组合所述来制备所述由式II表示的化合物。

[0091] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了一种制备由式II表示的化合物的方法:



式II

[0093] 其中:

[0094] (矩形)虚线表示6'位的S-构型或R-构型;

[0095]  $R_1$ 是氢,烷基,环烷基,或芳基;

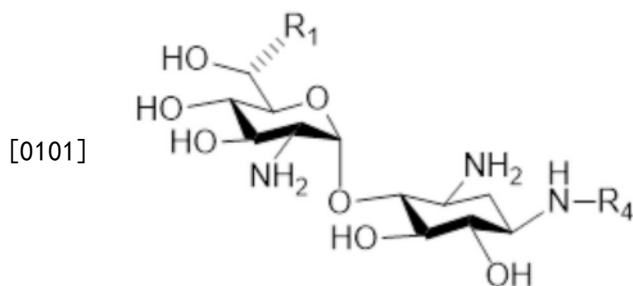
[0096] OP是受体被保护羟基;

[0097] AP是受体被保护氨基;

[0098] A是受体被保护羟基(OP);以及

[0099] B是受体被保护氨基,酰基,或者被保护或未被保护氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基,

[0100] 所述方法包括:



[0102] 提供由式IIa表示的化合物:

[0103] 式IIa

[0104] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0105]  $R_4$ 是氢,酰基,或氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基;

[0106] 将每个所述氨基转化为所述受体被保护氨基;并且将每个所述羟基转化为所述受体被保护羟基。

[0107] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个所述受体被保护基均为O-乙酰基。

[0108] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个所述受体被保护基均为被N-苄氧羰基(CBz)保护的氨基。

[0109] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 是甲基,6'位的构型是R-构型,并且提供所述式IIa化合物包括将G418转化为所述由式IIa表示的化合物。

[0110] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,所述转化包括使G418以其游离碱的形式与HCl甲醇溶液接触。

[0111] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,  $R_4$  是氢, 所述方法基本上如本文所述并如图2所示。

[0112] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了一种基本上如本文所述的立体选择性地制备由式 IIIa 表示的化合物的方法。

[0113] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了一种基本上如本文所述的制备由式 IIIb 表示的化合物的方法。

[0114] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了一种基本上如本文所述的制备由式 IIIc 表示的化合物的方法。

[0115] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了由式 I 表示的假三糖化合物或其药学上可接受的盐, 通过如本文所述的相应实施方式中的任意一种方法制备或可获得。

[0116] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了一种药物组合物, 其包含如本文所述和要求保护的由式 I 表示的假三糖化合物和药学上可接受的盐。

[0117] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了如本文所述和要求保护的由式 I 代表的假三糖化合物或包含如本文所述的假三糖化合物的组合物, 用于治疗遗传紊乱。

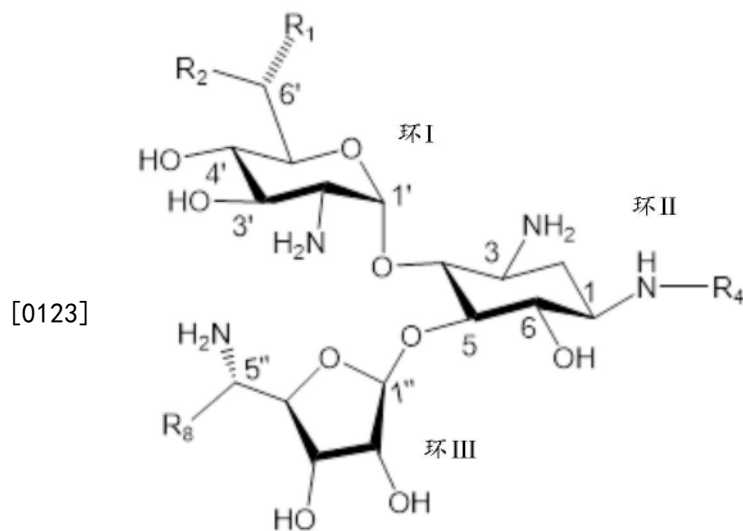
[0118] 根据本发明一些实施方式的一个方面, 提供了一种由式 III 表示的化合物, 通过本文描述的相应实施方式中的任意方法制备。

[0119] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了一种由式 IIIa 表示的化合物。

[0120] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了一种由式 IIIb 表示的化合物。

[0121] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了一种由式 IIIc 表示的化合物。

[0122] 根据本发明的一些实施方式的一个方面, 提供了一种制备由式 Ia 表示的假三糖氨基糖苷化合物:



式 Ia

[0124] 或其药学上可接受的盐的方法, 其中:

[0125] 矩形虚线表示6' 位的S-构型或R-构型;

[0126]  $R_1$  选自氢, 烷基, 环烷基, 或芳基;

[0127]  $R_2$  选自取代或未取代的烷基,  $OR'$ , 和  $NR'R''$ , 其中每个  $R'$  和  $R''$  各自独立地选自氢, 取代或未取代的烷基, 取代或未取代的环烷基, 取代或未取代的芳基, 取代或未取代的杂芳

基,取代或未取代的烷芳基,和酰基;

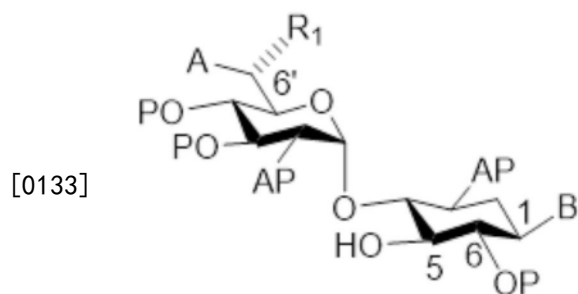
[0128]  $R_4$ 选自氢,酰基,氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基,取代或未取代的烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的芳基,取代或未取代的烷芳基,和可渗透细胞的基团;以及

[0129]  $R_8$ 是烷基,

[0130] 所述方法包括:

[0131] 根据本文所述的相应实施方式中的相应方法及其任意组合制备由式III表示的化合物;并且

[0132] 将所述由式III表示的化合物与由式IIb表示的化合物偶联:



式IIb

[0134] 其中:

[0135] 矩形虚线表示6'位的S-构型或R-构型;

[0136] OP是受体被保护羟基;

[0137] AP是受体被保护氨基;

[0138] 当式Ia中 $R_2$ 是 $OR'$ 并且 $R'$ 是氢时,A是受体被保护羟基(OP);当式Ia中 $R_2$ 是 $NR'R''$ 并且 $R'$ 和 $R''$ 中至少一个是氢时,A是受体被保护氨基(AP);或者当 $R_2$ 不是OH, $NH_2$ , $NHR'$ ,或 $NHR''$ 时,A是定义 $R_2$ 的基团的被保护或未被保护形式;

[0139] 当式Ia中 $R_4$ 是氢时,B是受体被保护氨基(AP),或者当 $R_4$ 不是氢时,B是定义 $R_4$ 的基团的被保护或未被保护形式;

[0140] 对所述受体被保护和供体被保护羟基进行去保护;

[0141] 对所述受体被保护和供体被保护氨基进行去保护;以及

[0142] 如果存在,对所述定义 $R_2$ 的基团的被保护形式和/或所述定义 $R_4$ 的基团的被保护形式进行去保护,

[0143] 从而制备由式Ia表示的化合物。

[0144] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,在 $BF_3$ -乙醚存在下实现所述偶联。

[0145] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,所述式III化合物在所述偶联之前被转化为其活化形式。

[0146] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,所述将所述式III化合物转化为所述活化形式于原位进行且不分离所述活化形式。

[0147] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个所述受体被保护羟基均为O-乙酰基。

[0148] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,在甲醇氨溶液中实现对所述受

体被保护羟基的去保护。

[0149] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个所述受体被保护氨基均为被N-苄氧羰基(CBz)保护的氨基。

[0150] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,对所述受体被保护氨基的去保护通过Pd/C-催化加氢而实现。

[0151] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,6'位的立体构型是R-构型。

[0152] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,式Ia化合物是硫酸盐,所述方法还包括将由式Ia表示的化合物以其游离碱的形式转化为所述硫酸盐。

[0153] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,通过使由式Ia表示的化合物以其游离碱的形式与H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的甲醇溶液接触来进行所述转化。

[0154] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了由式Ia表示的假三糖化合物或其药学上可接受的盐,根据任意相应实施方式及其任意组合所述的方法制备。

[0155] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所述的式Ia的化合物和药学上可接受的盐。

[0156] 除非另有定义,否则本文所使用的所有技术术语和/或科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实施方式的实施或测试中,但是下面描述了示例性的方法和/或材料。在冲突的情况下,则以本专利说明书包括定义为准。另外,材料,方法,和实施例仅是说明性的,并且不必然用以限制。

[0157] 附图的几个视图的简要说明

[0158] 本发明的一些实施方式通过仅示例的方式并参考附图在此描述。现在详细地具体参考附图,应当强调所示细节是作为示例并且出于对本发明的实施方式的说明性讨论的目的。基于此点,结合附图进行的描述使得本领域技术人员能够明确如何实施本发明的实施方式。

[0159] 在附图中:

[0160] 图1示出了根据本发明的一些实施方式制备单糖供体BB-D-OH的合成途径的示意图;

[0161] 图2示出了根据本发明的一些实施方式制备假二糖受体BB-A的合成途径的示意图;

[0162] 图3示出了根据本发明的一些实施方式将BB-A与BB-D偶联并藉此制备假三糖ELX-02(硫酸盐)的合成途径的示意图;

[0163] 图4示出了通过图3所示的方法制备的ELX-02(硫酸盐)的<sup>1</sup>H-NMR谱图;

[0164] 图5示出了通过图3所示的方法制备的ELX-02(硫酸盐)的质谱分析;以及

[0165] 图6A-B示出了在0-12μM的浓度范围内针对ELX-02进行的Rett综合征R270X无义突变抑制的剂量-反应的无细胞实验的结果,其中图6A显示了在突变序列的下游发现的萤火虫荧光素酶的表达水平,作为对照实验(未添加化合物)中显出的表达水平的一部分,以及图6B显示了在突变序列的下游和上游的萤火虫/海肾表达比率,作为对照实验中表达水平的一部分;

[0166] 本发明具体实施方式的描述



[0167] 本发明在其一些实施方式中涉及氨基糖苷的合成,并且更特别地但非排他地涉及制备表现出读出活性和降低的毒性的假三糖氨基糖苷的新方法,可用于大规模生产此类氨基糖苷以及可用于制备此类氨基糖苷的受体和供体中间体化合物。

[0168] 在对本发明的至少一个实施方式进行详细解释之前,应当理解本发明的应用不一定限于如下文描述或由实施例例示的细节。本发明可以有其它实施方式或者以多种方式被实施或执行。

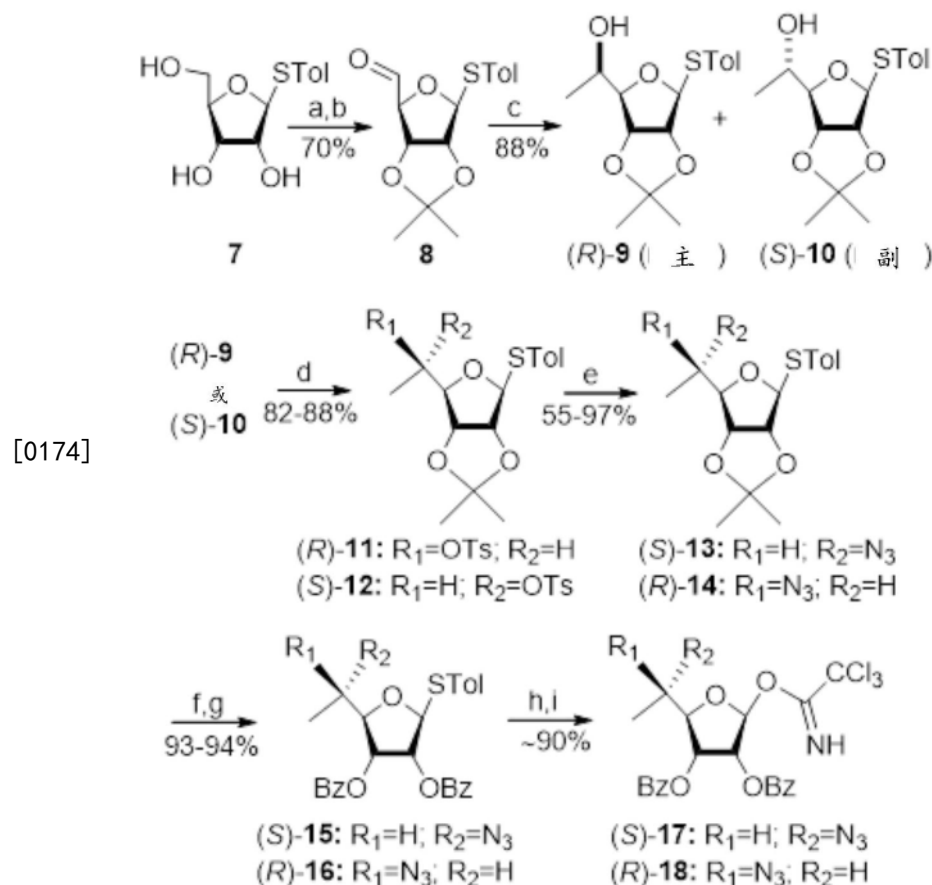
[0169] 本发明者已设计并成功实施了一种非常适合于假三糖氨基糖苷的大规模生产的新方法,例如W0 2012/066546中所述。

[0170] W0 2012/066546描述了假三糖氨基糖苷化合物,其表现出读出活性,对哺乳动物细胞的降低的毒性,以及降低的甚至没有(nullified)的抗菌活性。

[0171] W0 2012/066546中公开的假三糖氨基糖苷化合物通过糖基化反应将供体单糖化合物与衍生自巴龙霉素的假二糖受体偶联来制备。

[0172] 根据W0 2012/066546的启示,如背景技术方案1所示,使用硫苷化合物7作为原料制备供体化合物:

[0173] 方案1(背景技术)



[0175] 其中“a”代表1,1-二甲氧基丙烷,CSA,丙酮,室温;“b”代表戴斯-马丁(Dess-Martin)过碘烷(DMP),DCM,室温;“c”代表MeMgBr,THF,-30℃;“d”代表TsCl,Py,4-DMAP,室温;“e”代表NaN<sub>3</sub>,HMPA,DMF,70℃;“f”代表乙酸/水(8:2),回流;“g”代表BzCl,Py,4-DMAP,室温;“h”代表NBS,丙酮/水(8:2),-30℃;“i”代表CCl<sub>3</sub>CN,DBU,DCM,0℃)。

[0176] 通常,根据W0 2012/066546中公开的合成途径,通过异亚丙基(isopropylidene)

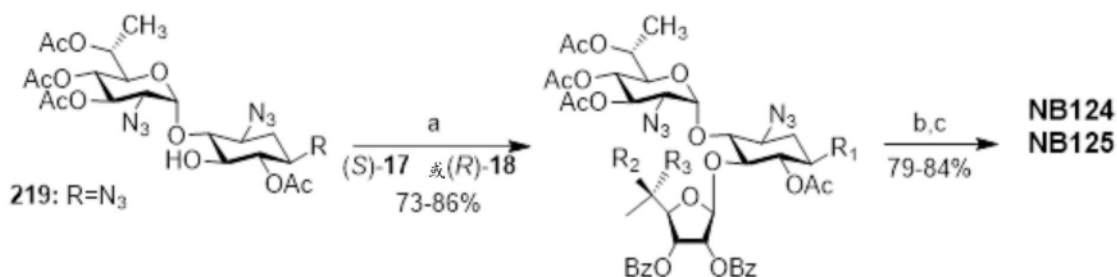
(2,2-二甲氧基丙烷/丙酮,CSA)对C2-和C3-羟基进行选择保护,然后使用Dess-Martin过碘烷(DMP,二氯甲烷)氧化剩余的伯醇,以两步70%的分离产率得到醛化合物8。用MeMgBr处理化合物8得到相应的仲醇,其为C5-非对映异构体的混合物(比率为4:1),分离产率为88%。主非对映异构体和副非对映异构体分别表现出(R)-构型和(S)-构型(化合物(R)-9和(S)-10)。

[0177] 通过快速柱色谱分离该混合物。

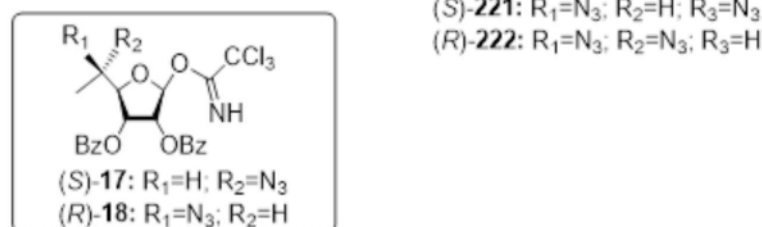
[0178] 对每个非对映异构体分别进行了背景技术方案1中的以下步骤。仲醇的甲苯磺酰化(TsCl,吡啶,4-DMAP),然后用NaN<sub>3</sub>(DMF,HMPA)S<sub>N</sub>2取代相应的对甲苯磺酸酯(化合物(R)-11和(S)-12)以得到具有翻转构型的叠氮化物化合物(S)-13和(R)-14。用乙酸水溶液水解异亚丙基缩酮,然后将所得的仲醇苯甲酰化,得到苯甲酸酯化合物(S)-15和(R)-16。在两个连续的步骤中,将硫苷化合物(S)-15和(R)-16转化为相应的三氯乙酰亚胺酯化合物(S)-17和(R)-18;在丙酮水溶液中用NBS水解,并在DBU存在下用CCl<sub>3</sub>CN处理所得的半缩醛。供体化合物(S)-17和(R)-18无需进一步纯化即可用于糖基化反应。

[0179] 根据W0 2012/066546中公开的合成途径,化合物(S)-17可与受体219偶联,从而生成假三糖氨基糖苷化合物,如以下背景技术方案2(对应于W0 2012/066546的方案4)所示。

[0180] 方案2(背景技术)



[0181]



[0182] 其中“a”代表BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O,DCM,4ÅMS,-20℃;“b”代表MeNH<sub>2</sub>-EtOH,室温;“c”代表PMe<sub>3</sub>,NaOH,THF,室温。

[0183] 受体219的制备描述于例如Nudelman等人,2010(同上)。通常,将G418水解以获得假二糖6-甲基巴龙霉胺的核心,然后使其与TfN<sub>3</sub>和乙酸酐反应。

[0184] 如W0 2012/066546中进一步公开的,“S”非对映异构体NB124优于“R”对映异构体NB125。

[0185] 鉴于在本文中也可互换地称为ELX-02或ELOXX-02的化合物NB124的有希望的治疗活性,已经进行了广泛的努力以改进其合成,目的是设计一种适合此化合物大规模生产的方法。

[0186] 在放大ELX-02生产的初步研究中,保留了涉及将供体(S)-17与受体219偶联的一般合成途径(参见背景技术方案2),以及如前所述的制备供体和受体的合成途径。制备ELX-

02的各个步骤导致了17步的合成,并且涉及许多色谱分离,尽管一些色谱分离已被结晶过程所取代,并且供体的量大幅减少(例如,从4摩尔当量降至2摩尔当量)。值得注意的是,尽管遵循W0 2012/066546中公开的用于制备供体分子的合成途径,但需要色谱分离(R)和(S)立体异构体(参见背景技术方案1)。

[0187] 为了寻求进一步改进的合成途径,本发明者已经设计了一种用于制备供体分子的所需S-立体异构体的新方法,其在本文中称为化合物(S)-17,并且可互换地称为BB-D-OH。该新设计的方法涉及供体的所需立体异构体的立体选择性合成,从而避免了对立体异构体进行费力,昂贵且低效的色谱分离的需要。

[0188] BB-D-OH的合成将在随后的实施例部分中进行详细描述,并如图1所示,使用D-核糖为原料。通常,在甲醇中用丙酮保护D-核糖以得到1-甲氧基丙酮化合物(1-methoxy acetonide),其被氧化成相应的醛。该醛与苄基羟胺的反应导致形成硝酮,然后将其与格氏试剂(例如甲基氯化镁)立体选择性地反应,从而得到作为单个所需(S)立体异构体的被保护中间体。对保护基团进行的去保护得到5-氨基-5,6-二脱氧-2,3-二羟基-1-甲氧基- $\alpha$ -L-塔罗呋喃糖苷(talofuranoside),然后用CBz氯化物对其进行重新保护以形成N-CBz衍生物,其是一种通过结晶进行分离和纯化的固体化合物。该7步合成无需分离和纯化中间体即可作为“一锅式”合成进行,总产率为26-28%(每步产率为85-90%),因此对于工业过程而言代表了实际的一步合成。然后用苯甲酰氯保护所获得的2,3-二羟基中间体(77-78%产率),接着对甲氧基进行去保护(53-57%产率)。将所得的1-羟基化合物以几乎定量的产率转化为BB-D-OH。

[0189] 制备BB-D-OH的这种合成途径代表了实际的4步工业合成,并且涉及单色谱纯化程序(single chromatographic purification procedure)。

[0190] 与W0 2012/066546中描述的合成途径相比,除了避免了立体异构体的颜色(chromatic)分离之外,合成步骤的总数量以及,重要的是色谱纯化程序的总数量也大幅减少,使该方法非常适合于大规模生产供体化合物和通过将供体化合物与合适的受体分子偶联而制备最终的假三糖化合物。

[0191] 为了进一步改进ELX-02和例如W0 2012/066546中所述的类似的假三糖氨基糖苷的生产,本发明者已经设计并成功实施了一种用于制备受体219,在本文中也可互换地称为BB-A的新的合成途径(参见背景技术方案2),用于将供体BB-D-OH或其在本文中为BB-D的活化形式,与受体BB-A偶联,并且用于最终产物ELX-02盐形成而作为硫酸盐。

[0192] BB-A的合成,将在随后的实施例部分中进一步详细描述,并如图2所示,使用G418硫酸盐(在本文和本领域中也简称为G418)作为原料。G418在甲醇中使用氯化氢溶液水解。这种新使用的试剂可提供所需6-甲基巴龙霉胺的更好的转化和产率。

[0193] 使用CBz基团代替先前描述的使用三氟甲烷磺酸酐和有害的叠氮化钠获得的叠氮化物基团,对巴龙霉胺核心的氨基进行保护。制备了被CBz保护的6-甲基巴龙霉胺,无需色谱纯化即可用于下一步。在下一步中,羟基通过乙酰化得到保护,使用乙酰氯并使用吡啶作为碱,因此与使用吡啶作为溶剂的先前合成途径相比,羟基的含量大幅降低。该改变(modification)进一步导致该步骤的产率增加,从先前报道的60%增加至73-78%。

[0194] 由于CBz和Ac基团与BB-D中的保护基团(CBz,Bz)相容,因此被选作保护基团。

[0195] 供体BB-D或BB-D-OH与受体BB-A之间的偶联反应将在随后的实施例部分中进一步

详细描述,并如图3所示使用大幅减少量的BB-D(1.5摩尔当量的BB-D到1摩尔的BB-A)进行。随后的脱乙酰反应使用甲醇中的氨溶液代替以前使用的昂贵的乙醇中使用的甲胺进行。利用氢化作用进行对CBz-基团的去保护,而不是利用叠氮化物基团的危险且昂贵的三甲基膦来去保护。

[0196] 总体而言,本文所述的新设计的受体,其制备方法和偶联方法利用了保护基团,其允许以良好的产率进行偶联和去保护反应,同时避免使用危险和/或昂贵的化学试剂。

[0197] 如WO 2012/066546中所述,NB124以其硫酸盐形式使用,并使用硫酸水溶液将其转化为该盐。在本文所述的方法中,使用了甲醇-硫酸溶液(methanolic sulfuric acid),使盐的形成和沉淀明显更有效。

[0198] 因此,本发明的一些实施方式涉及制备BB-D-OH的新方法,涉及将BB-D-OH,任选地以其活化形式BB-D,与合适的受体偶联从而获得假三糖氨基糖苷化合物的新方法,例如在WO 2012/066546中所述,涉及用于制备本文所述的受体BB-A的新方法,以及涉及用于将BB-A和BB-D-OH(或BB-D)偶联并由此生成最终的假三糖氨基糖苷化合物的新方法。

[0199] 本文所述的供体为BB-D-OH,其制备方法可与其他单糖,二糖,和三糖或假糖受体偶联,因此可用于制备假二糖,假三糖,假四糖氨基糖苷的方法中。在本发明的一些实施方式中,本文所述的供体用于制备假三糖氨基糖苷化合物,例如WO 2017/037718中所述。

[0200] 在本发明的一些实施方式中,本文所述的用于制备受体分子(例如BB-A)的合成途径,用于将供体与受体偶联的合成途径,以及用于最终产物的盐形成而作为硫酸盐的合成途径被用于制备假三糖氨基糖苷化合物的方法中,例如WO 2017/037718中所述。此处,术语“立体异构体”包括对映异构体和非对映异构体。

[0201] 如本文所用,“对映异构体”是指仅通过彼此的完全翻转/反射(镜像)而与其对应物是可重合的化合物的立体异构体。将对映异构体称为具有“手性”,因为它们像右手和左手一样互相对应。对映异构体具有相同的化学和物理特性,除非当存在于本身具有手性的环境(例如所有生物系统(all living system))中时。除非另有说明,否则在本实施方式的上下文中,一化合物可表现出一个或多个手性中心,每个手性中心表现出R-构型或S-构型以及任意组合,并且根据本发明一些实施方式的多个化合物,可以具有它们表现出R-构型或S-构型的手性中心中的任意一个。

[0202] 如本文所用,术语“非对映异构体”是指彼此不是对映异构体的立体异构体。当一化合物的两个或多个立体异构体在一个或多个但不是所有的等同(相关)立体中心处具有不同构型并且彼此互不为镜像时,会发生非对映异构。当两个非对映异构体仅在一个立体中心处彼此不同时,它们就是差向异构体。每个立体中心(手性中心)产生两种不同的构型,因此产生两种不同的立体异构体。在本发明的上下文中,本发明的一些实施方式包括具有多个手性中心的化合物,其以立体构型的任意组合,即任意非对映异构体出现。除非另有说明,否则本发明的一些实施方式涉及具有多个手性中心的化合物,每个手性中心均表现出如本文所述和所示的R-构型或S-构型。

[0203] 在本文全文给出的结构式中,每当手性碳具有确定的(defined)R-构型或S-构型时,其手性由三角形虚线或粗体线表示,如本领域所接受的,这取决于所示的立体构型,并无指定。每当手性碳具有可为R-构型或S-构型的构型时,其由矩形虚线表示并如此描述。本文中可以通过简单的线条或弯曲的(波浪形)线条表示可以采用R-构型或S-构型的手性碳

原子或其外消旋混合物。

[0204] 本文使用术语“受体”以描述衍生自巴龙霉胺的骨架结构,其在C5位具有可用的(未保护的)羟基,所述羟基在糖基化反应期间具有反应性,并且可以接受一糖基。

[0205] 本文使用术语“供体”以描述与受体反应而形成最终的假三糖化合物的糖基。

[0206] 如本文所用,术语“糖基”是指通过从单糖的半缩醛官能团中除去羟基而获得的化学基团。

[0207] 如本文所用,术语“单糖”在本领域中是熟知的,是指由单一糖分子组成的糖的简单形式,所述糖分子不能通过水解进一步被分解。根据本发明的实施方式的单糖是核糖。当根据碳水化合物的碳原子数分类时,单糖是具有5个碳原子的戊糖。

[0208] 根据本发明的一些实施方式,供体和受体被设计为形成所需的假三糖氨基糖苷化合物。

[0209] 根据本发明的一些实施方式的化合物的合成,通常包括(i)通过选择性保护存在于巴龙霉胺支架上的选定位置处的一个或多个羟基和胺来制备受体化合物,使选定位置(C5)不受保护并因此能够自由地接受本文所定义的供体(糖基)化合物;(ii)除其他外,特别是通过选择性保护存在于糖基上的选定位置处的一个或多个羟基和胺来制备供体化合物所需的立体异构体,使一个位置不受保护并因此能够自由地与本文所定义的受体化合物偶联;(iii)使供体和受体进行偶联反应;以及(iii)去除保护基团从而得到所需化合物。

[0210] 如本文所用,短语“被保护基团”是指被取代或被修饰以阻断其官能性(functionality)并且保护其在反应条件下(例如,如本文所述的偶联反应)不与其它基团发生反应的基团。被保护基团通过去除取代基或通过再修饰而重新生成。

[0211] 当使用“氨基被保护基团(amino-protected group)”或“羟基被保护基团(hydroxyl-protected group)”时,它是指保护基团被连接或用于修饰相应的胺或羟基以生成所示被保护基团。

[0212] 如本文所用,短语“保护基团(protecting group)”是指取代基或修饰,所述取代基或修饰通常被用于在化合物上的其它官能团反应时阻断或保护特定的官能团(functionality)。保护基团被选定以释放取代基或被重新修饰,从而生成所需的未被保护基团。

[0213] 例如,“氨基保护基团(amino-protecting group)”或“胺保护基团(amine-protecting group)”是连接到氨基上的取代基,或氨基的修饰,其阻断或保护化合物中氨基官能团,并且阻止它参与化学反应。

[0214] 所述氨基保护基团通过取代基的去除或通过重新生成胺基(amine group)的修饰来去除。

[0215] 根据本发明的一些实施方式可用的示例性氨基保护基团是N-苄氧羰基(CBz)。

[0216] “羟基保护基团(hydroxyl-protecting group)”或“羟基保护基团(hydroxy-protecting group)”是指羟基(hydroxyl)(羟基(hydroxy))的取代基或修饰,所述取代基或修饰阻断或保护羟基官能团,并且阻止所述羟基官能团参与化学反应。羟基保护基团通过取代基的去除或通过重新生成羟基的修饰而去除。

[0217] 合适的羟基保护基团包括异亚丙基缩酮和环己酮二甲基缩酮(形成带有两个相邻羟基的1,3-二恶烷),4-甲氧基-1-甲基苯(形成带有两个相邻羟基的1,3-二恶烷),0-乙酰

基,0-氯乙酰基,0-苯甲酰基,和0-甲硅烷基。

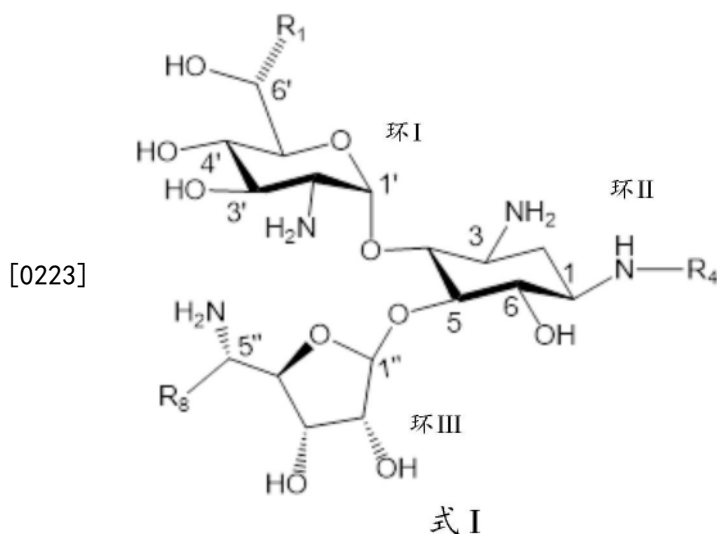
[0218] 有关保护基团及其使用的一般说明,参见T.W.Greene,有机合成中的保护基团(Protective Groups in Organic Synthesis),John Wiley&Sons,纽约,1991。

[0219] 根据一些实施方式,示例性羟基保护基团包括0-乙酰基(AcO-)和0-苯甲酰基。

[0220] 本文中应当注意,当应用时,“被保护基团”是指残基,在所述残基中,保护化合物上一个反应性官能团或同时保护多于一个的官能团,例如在两个相邻官能团的情况下,例如,在可通过形成缩酮(例如异亚丙基缩酮)而一次性被保护的两个羟基的情况下。

[0221] 假三糖氨基糖苷化合物:

[0222] 本文所述的方法可用于例如由式I表示的假三糖氨基糖苷化合物的大规模生产(例如,如本文所述):



[0224] 其中:

[0225] (矩形虚线)表示6'位的S-构型或R-构型,优选为R-构型;

[0226] R<sub>1</sub>选自氢,烷基,环烷基,或芳基,且优选烷基,更优选甲基;

[0227] R<sub>4</sub>选自氢,酰基,和氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基,且优选氢;以及

[0228] R<sub>8</sub>选自烷基,环烷基,或芳基,且优选烷基,更优选甲基。

[0229] 在W0 2012/066546中描述了代表性化合物。

[0230] 由式I表示的化合物可以是游离碱形式或其盐形式,优选其药学上可接受的盐形式。

[0231] 如本文所用,短语“药学上可接受的盐”是指母体化合物及其反离子的带电物质(charged species),通常用于修饰母体化合物的溶解特性和/或减少母体化合物对生物体的任何明显刺激,而不会消除施用化合物(administered compound)的生物学活性和特性。或者,可在化合物的合成期间,例如在从反应混合物中分离化合物或使化合物重结晶的过程中,形成如本文所述的化合物的药学上可接受的盐。

[0232] 在一些本实施方式的上下文中,本文所述的化合物的药学上可接受的盐可以任选地是酸加成盐,所述酸加成盐包括化合物的至少一个碱性(例如,胺和/或胍)基团,所述碱性基团是在带正电荷的形式(例如,其中所述碱性基团被质子化),与至少一种衍生自被选定的碱的反离子组合,从而形成药学上可接受的盐。

[0233] 因此本文所述的化合物的酸加成盐可以是在化合物的一个或多个碱性基团与一或多当量的酸之间形成的复合物。

[0234] 取决于化合物中带电基团与盐中反离子之间的化学计量比例,酸加成盐可以是单加成盐或多加成盐。

[0235] 如本文所用,短语“单加成盐(mono-addition salt)”是指其中化合物的反离子与带电形式之间的化学计量比为1:1的盐,使得对于每1摩尔当量的化合物,所述加成盐包含1摩尔当量的反离子。

[0236] 如本文所用,短语“多加成盐(poly-addition salt)”是指其中化合物的反离子与带电形式之间的化学计量比大于1:1,并且例如2:1,3:1,4:1等,使得对于每1摩尔当量的化合物,所述加成盐包含2摩尔当量或更多摩尔当量的反离子。

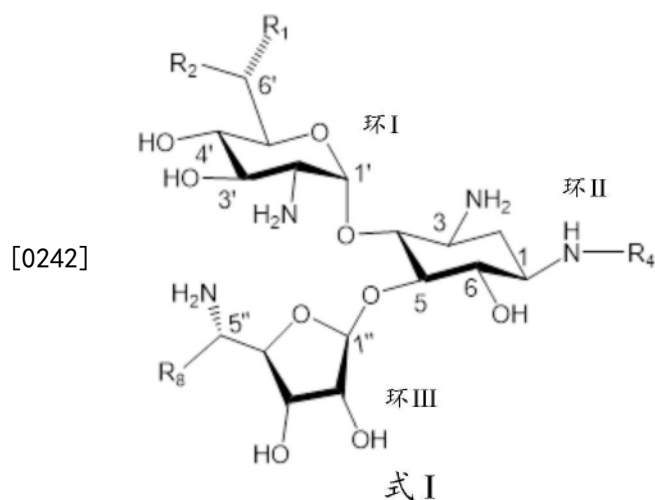
[0237] 药学上可接受的盐的非限制性实例为铵阳离子及其酸加成盐。

[0238] 酸加成盐可包括多种有机和无机酸,例如但不限于提供盐酸加成盐的盐酸,提供氢溴酸加成盐的氢溴酸,提供乙酸加成盐的乙酸,提供抗坏血酸加成盐的抗坏血酸,提供苯磺酸盐加成盐的苯磺酸,提供樟脑磺酸加成盐的樟脑磺酸,提供柠檬酸加成盐的柠檬酸,提供马来酸加成盐的马来酸,提供苹果酸加成盐的苹果酸,提供甲磺酸(甲磺酸酯)加成盐的甲磺酸,提供萘磺酸加成盐的萘磺酸,提供草酸加成盐的草酸,提供磷酸加成盐的磷酸,提供对甲苯磺酸加成盐的甲苯磺酸,提供琥珀酸加成盐的琥珀酸,提供硫酸加成盐的硫酸,提供酒石酸加成盐的酒石酸和提供三氟乙酸加成盐的三氟乙酸。这些酸加成盐中的每一种均可以是如本文所定义的单加成盐或多加成盐。

[0239] 本实施方式还包括本文所述化合物的任何前药,溶剂化物,和/或水合物。

[0240] 根据本发明的一些实施方式的由式I表示的示例性化合物是在本文中也称为ELX-02的NB124,或其药学上可接受的盐,例如其硫酸加成盐(例如,二加成盐)。

[0241] 本文所述的方法可用于如本文所述的例如由式Ia表示的假三糖氨基糖苷化合物或其药学上可接受的盐的大规模生产(例如,如本文所述):



[0243] 其中:

[0244] 矩形虚线表示6'位的立体构型是R-构型或S-构型;

[0245] R<sub>1</sub>选自氢,烷基,环烷基,或芳基;

[0246] R<sub>2</sub>选自取代或未取代的烷基,OR',和NR'R'',其中R'和R''各自独立地选自氢,取代

或未取代的烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的芳基,取代或未取代的杂芳基,取代或未取代的烷芳基,和酰基;

[0247]  $R_4$ 选自氢,酰基,氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基,取代或未取代的烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的芳基,取代或未取代的烷芳基,和可渗透细胞的基团,如本文所述;以及

[0248]  $R_8$ 是烷基,如本文所述。

[0249] 根据本发明的一些实施方式,氨基糖苷结构1位的胺取代基被修饰,使得 $R_4$ 不是氢;

[0250] 在本文中,带有氢以外的取代基的胺在本文称为“改性胺取代基”或简称为“改性胺”。

[0251] 根据本发明的一些实施方式,对氨基糖苷结构1位上的胺取代基进行修饰以包括疏水性部分,例如烷基,环烷基,烷芳基,和/或芳基,或包括在生理pH下带正电荷并且可以增加化合物的细胞渗透性的基团(在本文中也可互换地称为“可渗透细胞的基团(cell-permealizable group)”或“细胞可渗透性基团(cell-permealizing group)”),例如本文定义的鸟嘌呤或胍,或者胍,酰胍,硫酰胍,尿素,和硫脲。

[0252] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 是烷基,并且在一些实施方式中,它是具有1-4个碳原子的低级烷基,包括但不限于甲基,乙基,丙基,丁基,异丙基,和异丁基。

[0253] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 是非取代的(未取代的)烷基。

[0254] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 是甲基。

[0255] 或者,根据本文描述的任何实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 为环烷基,包括但不限于环丙基,环丁基,环戊基,和环己基。

[0256] 又或者,根据本文描述的任何实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 是芳基,例如取代或未取代的苯基。非限制性实例包括未取代的苯基和甲苯。

[0257] 又或者,根据本文描述的任何实施方式中的一些实施方式, $R_1$ 是烷芳基,例如取代或未取代的苄基。

[0258] 在本文描述的任何实施方式中的一些实施方式中, $R_1$ 是烷基。在一些实施方式中, $R_1$ 是甲基。

[0259] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, $R_2$ 是 $OR'$ 。

[0260] 在这些实施方式中的一些中, $R'$ 是氢,并且 $R_2$ 是羟基。

[0261] 在其他实施方式中, $R_2$ 是 $OR'$ 且 $R'$ 不是氢。

[0262] 在这些实施方式中的一些中, $R'$ 是如本文所定义的取代或未取代的烷基,或如本文所定义的取代或未取代的环烷基,并且 $R_2$ 是烷氧基。

[0263] 在这些实施方式的一些中, $R'$ 是如本文所定义的取代或未取代的芳基,并且 $R_2$ 是芳氧基。

[0264] 在这些实施方式的一些中, $R'$ 是如本文所定义的酰基,并且 $R_2$ 是如本文所定义的羧酸盐。

[0265] 替代地, $R_2$ 是 $NR'R''$ 。



[0266] 在这些实施方式的一些中, R' 和 R'' 都是氢。

[0267] 在这些实施方式的一些中, R' 和 R'' 之一或两者都不是氢。

[0268] 当 R<sub>2</sub> 是 NR' R'' 时, 可由式 Ia 中的变量 R<sub>2</sub> 表示的示例性化学基团包括但不限于其中 R' 是氢且 R'' 是烷基氨基的化合物, 例如 NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, 其中 n 为例如 1 至 6; 其中 R' 是氢且 R'' 是 NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH 的化合物, 其中 n 为例如 1 至 6; 其中 R' 是氢且 R'' 是 NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(=O)R''' 的化合物, 其中 n 为例如 1 至 6, 并且 R''' 是氢或烷基或环烷基或芳基; 其中 R' 是氢且 R'' 是 NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH(OR''')<sub>2</sub> 的化合物, 其中 n 为例如 1 至 6, 且 R''' 是氢或烷基或环烷基或芳基; 以及其中 R' 是氢且 R'' 是 NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R''' 的化合物, 其中 n 为例如 1 至 6, 并且 R''' 是氢或烷基或环烷基或芳基或杂芳基或杂脂环族(heteroalicyclic)。

[0269] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, R<sub>2</sub> 是烷基, 并且在这些实施方式的一些中, R<sub>2</sub> 是取代的烷基, 例如, 被一个或多个胺基取代的烷基(氨基烷基)。

[0270] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式及其任意组合, 式 Ia 中 1 位(环 II) 上的胺取代基是本文所述的改性胺, 从而 R<sub>4</sub> 不是氢。

[0271] 在这些实施方式的一些中, R<sub>4</sub> 可以是如本文所定义的烷基, 烷芳基, 环烷基, 芳基, 酰基, 或氨基取代的 α-羟基酰基, 例如, (S)-4-氨基-2-羟基丁酰基(AHB), 或 (S)-4-氨基-2-羟基丙酰基(AHP)。

[0272] 在一些实施方式中, 其中 R<sub>4</sub> 是烷基, 所述烷基可以是例如 1-4 个碳原子的低级烷基, 例如但不限于甲基, 乙基, 丙基, 丁基, 异丙基, 和异丁基, 每个被任选地取代, 如本文所述。

[0273] 在这些实施方式的一些中, 烷基独立地是非取代的烷基, 例如但不限于乙基, 丙基, 和异丙基。

[0274] 在这些实施方式的一些中, 烷基独立地是取代的甲基, 例如但不限于烷芳基, 例如苄基。

[0275] 或者, R<sub>4</sub> 是环烷基, 并且所述环烷基可以是例如环丙基, 环丁基, 环戊基, 和环己基。

[0276] 进一步可替代地, R<sub>4</sub> 是芳基, 并且所述芳基可以是例如取代或未取代的苯基。非限制性实例包括未取代的苯基和甲苯。

[0277] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, R<sub>4</sub> 是如本文所述的烷基, 环烷基, 或芳基。

[0278] 在这些实施方式的一些中, R<sub>1</sub> 是烷基, 环烷基, 或芳基, 并且优选为如本文所定义的烷基。

[0279] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式, R<sub>4</sub> 是烷基, 并且在一些实施方式中, 其是 1-4 个碳原子的低级烷基。

[0280] 在一些实施方式中, R<sub>4</sub> 是烷基, 例如乙基, 丙基, 丁基, 异丙基, 异丁基, 叔丁基, 每个被任选地取代。

[0281] 在一些实施方式中, R<sub>4</sub> 是甲基或乙基, 并且优选为取代的甲基或乙基。在这些实施方式的一些中, 甲基或乙基被例如环烷基或芳基取代。这些取代基在本领域中也分别称为烷基环烷基和烷芳基。示例性的烷芳基是苄基(-CH<sub>2</sub>-苯基)。

[0282] 在一些实施方式中, R<sub>4</sub> 是丙基或异丙基。

[0283] 在一些实施方式中,  $R_4$  是苄基。

[0284] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,  $R_4$  是如本文所定义的可渗透细胞的基团, 并且在一些实施方式中,  $R_4$  是胍基。

[0285] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,  $R_1$  是烷基, 环烷基, 或芳基, 并且优选是如本文所定义的烷基, 并且  $R_4$  是如本文所定义的烷基, 优选是乙基, 丙基, 异丙基, 或苄基。

[0286] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,  $R_1$  是烷基, 环烷基, 或芳基, 并且优选是如本文所定义的烷基; 并且  $R_4$  是如本文所定义的细胞可渗透性基团, 优选是胍或鸟嘌呤。

[0287] 细胞可渗透细胞的基团在本文中也可互换地称为“细胞可渗透性基团 (cell-permeabilizing group)”, 包括通常在生理 pH 下带正电荷并且可以增加化合物的细胞渗透性的基团。实例包括但不限于如本文所定义的鸟嘌呤或胍基, 或可替代地包括如本文所定义的胍, 酰胍, 硫酰胍, 尿素, 和硫脲。

[0288] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,  $R_1$  是烷基, 环烷基, 或芳基, 并且优选是如本文所定义的烷基; 并且  $R_4$  是如本文所定义的细胞可渗透性基团, 优选胍或鸟嘌呤, 更优选胍。

[0289] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,  $R_4$  是氢或例如 (S) -4-氨基-2-羟基丁酰基 (AHB), 或 (S) -4-氨基-2-羟基丙酰基 (AHP) 的部分。

[0290] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,  $R_1$  是烷基, 环烷基, 或芳基, 并且优选是如本文所定义的烷基;  $R_4$  是如本文所定义的氢或氨基取代的  $\alpha$ -羟基-酰基; 以及  $R_5$  是胍基 (胍基 (guanidiny))。

[0291] 根据本文描述的式 Ia 的任意实施方式中的一些实施方式及其任意组合, 6' 位的构型是 R-立体构型。

[0292] 根据本文描述的式 Ia 的任意实施方式中的一些实施方式及其任意组合, 5' 位的构型是 S-立体构型。

[0293] 在本文中, 术语“酰基”描述  $-C(=O)-R$  基团, R 是取代或未取代的烷基, 环烷基, 芳基, 烷芳基, 或氢。

[0294] 在示例性实施方式中, 酰基使得 R 是烷基或烷芳基或芳基, 每一个任选地被一个或多个胺取代基取代。

[0295] 在一些实施方式中, R 是取代的烷基, 并且在一些实施方式中, R 在相对于羰基的  $\alpha$  位被羟基取代, 使得酰基是  $\alpha$ -羟基-酰基。

[0296] 在一些实施方式中,  $\alpha$ -羟基-酰基进一步被一个或多个胺基取代, 并且是氨基取代的  $\alpha$ -羟基-酰基。

[0297] 在如本文所述的酰基的一些实施方式中, 胺取代基可例如位于相对于酰基的 R 部分的一个或多个位置  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , 和/或  $\omega$  上。

[0298] 示例性的氨基取代的  $\alpha$ -羟基-酰基包括但不限于残基 (S) -4-氨基-2-羟基丁酰基, 在本文中也称为 AHB。根据本发明的一些实施方式, AHB 残基的替代物可以是  $\alpha$ -羟基- $\beta$ -氨基丙酰基 (AHP) 残基。其他示例性的氨基取代的  $\alpha$ -羟基-酰基包括但不限于 L-(-)- $\gamma$ -氨基- $\alpha$ -羟基丁酰基, L-(-)- $\delta$ -氨基- $\alpha$ -羟基戊酰基, L-(-)- $\beta$ -苄氧羰基氨基- $\alpha$ -羟基丙酰基, L-(-)-

$\delta$ -苄氧羰基氨基- $\alpha$ -羟基戊酰基。

[0299] 在本文中应注意,根据本发明的一些实施方式,涉及羰基,羟基,和氨基的组合的其他部分以及表现出任意立体化学的低级烷基被考虑为代替AHB和/或AHP的任选的取代基,包括例如2-氨基-3-羟基丁酰基,3-氨基-2-羟基戊酰基,5-氨基-3-羟基己酰基等。

[0300] 在W0 2017/037718中描述了代表性化合物。

[0301] 方法:

[0302] 根据本实施方式,本文所述的至少一些方法可用于大规模生产,制备或制造氨基糖苷化合物或其中间体。

[0303] 在本文中,在生产如本文所述的任意化合物的上下文中,“大规模”是指一种生产方法,其中至少一种化合物,无论是原料,中间体,和/或最终产物,以至少1摩尔,或至少2摩尔,或至少3摩尔,或至少5摩尔量,例如6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,25,30,35,40,45,50摩尔,或更多的量,包括它们之间的任意中间值的量被使用或生产。

[0304] 或者或另外地,“大规模”方法由一种或多种原料,中间体,和/或最终产物的重量定义,使得一种或多种这些材料以至少1kg,或至少2Kg,或至少3Kg,或至少5Kg,例如6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,25,30,35,40,45,50,60,70,80,90,100Kg,或更多的量,包括它们之间的任意中间值的量被使用或生产。

[0305] 或者或另外地,“大规模”方法由该方法中使用的反应器的体积定义,包括至少一个生产步骤,该生产步骤在具有至少10升,或至少15升,或至少20升,或至少30升,或至少40,50,60,70,80,90,100升,或更大的体积,包括它们之间的任意中间值的体积的反应器中进行。

[0306] 制备假三糖氨基糖苷化合物的方法:

[0307] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了制备如本文所述的由式I表示的假三糖氨基糖苷化合物的方法。根据本发明的一些实施方式,该方法可用于本文所定义的氨基糖苷化合物的大规模生产。

[0308] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了制备如本文所述的由式Ia表示的假三糖氨基糖苷化合物的方法。根据本发明的一些实施方式,该方法可用于本文所定义的氨基糖苷化合物的大规模生产。

[0309] 根据本发明的实施方式,提供了一种制备如本文所述的由式I或Ia表示的化合物的方法,该方法尤其可用于此类化合物的大规模生产,该方法包括:

[0310] 根据如本文所述的相应实施方式及其任意组合,制备如本文所述的由式III表示的供体化合物;

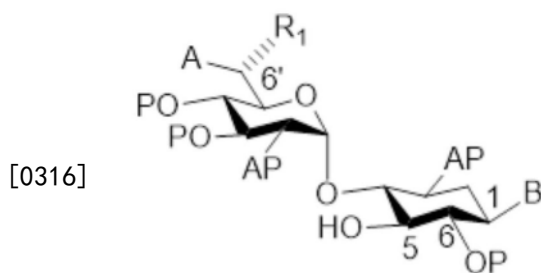
[0311] 将供体化合物与相应的受体偶联,例如,与相应的实施方式(例如,式II,IIa,IIb,或IIc)中的任意一个如本文所定义的受体偶联;以及

[0312] 对所有被保护基团进行去保护以获得所需的假三糖氨基糖苷。

[0313] 根据本发明的实施方式,提供了一种制备如本文所述的由式I表示的化合物的方法,该方法尤其可用于此类化合物的大规模生产,其包括:

[0314] 根据如本文所述的相应实施方式及其任意组合,制备如本文所述的由式III表示的供体化合物;

[0315] 将由式III表示的供体化合物与由式II表示的受体化合物偶联:



式II

[0317] 其中：

[0318] 如本文所述，(矩形)虚线表示6'位的S-构型或R-构型；

[0319] 如本文所述，OP是受体被保护羟基；

[0320] 如本文所述，AP是受体被保护氨基；

[0321] 如本文所述，A是受体被保护羟基(OP)；以及

[0322] 如果式I中 $R_4$ 是氢，则B是如本文所述的受体被保护氨基，和/或当 $R_4$ 不是氢时，B是定义 $R_4$ 的基团的被保护或未被保护形式；

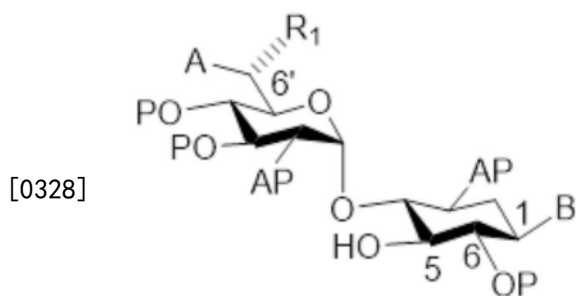
[0323] 对所述被保护羟基进行去保护(当存在被保护的受体羟基和被保护的供体羟基时)；

[0324] 对所述被保护氨基进行去保护(当存在被保护的受体氨基和被保护的供体氨基时)；以及

[0325] 任选地，如果存在，对任意以被保护形式存在的其他基团进行去保护，例如，如果存在，定义 $R_4$ 的基团的被保护形式。根据本发明的实施方式，提供了一种制备如本文所述的由式Ia表示的化合物的方法，该方法尤其可用于此类化合物的大规模生产，该方法包括：

[0326] 根据如本文所述的相应实施方式及其任意组合，制备如本文所述的由式III表示的供体化合物；

[0327] 将由式III表示的供体化合物与由式IIb表示的受体化合物偶联：



式IIb

[0329] 其中：

[0330] 矩形虚线表示6'位的S-构型或R-构型；

[0331] OP是受体被保护羟基；

[0332] AP是受体被保护氨基；

[0333] 当式Ia中 $R_2$ 是 $OR'$ 并且 $R'$ 是氢时，A是受体被保护羟基(OP)；当式Ia中 $R_2$ 是 $NR'R''$ 并且 $R'$ 和 $R''$ 中至少一个是氢时，A是受体被保护氨基(AP)；或者当 $R_2$ 不是OH，或不是 $NHR'$ 或 $NH_2$ 时，A是定义 $R_2$ 的基团的被保护或未被保护形式；

[0334] 当式Ia中 $R_4$ 是氢时,B是受体被保护氨基(AP),或者当 $R_4$ 不是氢时,B是定义 $R_4$ 的基团的被保护或未被保护形式;

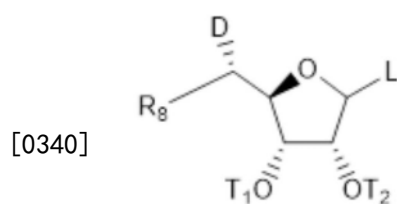
[0335] 对所述受体被保护和供体被保护羟基进行去保护;

[0336] 对所述受体被保护和供体被保护氨基进行去保护;以及

[0337] 如果存在,对所述定义 $R_2$ 的基团的被保护形式和/或所述定义 $R_4$ 的基团的被保护形式进行去保护。

[0338] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,在 $BF_3$ -乙醚存在下实现所述偶联,尽管可以考虑任意其他偶联剂。

[0339] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,在如本文所述的式II或IIb化合物与式III\*化合物之间实现所述偶联:



式III\*

[0341] 其中在任意的相应实施方式中D, $R_8$ , $OT_1$ ,和 $OT_2$ 如本文所定义,且L为如本文所定义的离去基团(leaving group)。

[0342] 如本文所用,短语“离去基团”描述了在化学反应期间容易从有机分子上脱离的不稳定的原子,基团,或化学部分,而脱离通常通过其上的离去原子,基团或残基的相对稳定性来促进。通常,作为强酸的共轭碱的任意基团都可以充当离去基团。在一些实施方式中,离去基团促进供体和受体之间的偶联反应。根据一些本实施方式的合适的离去基团的代表性实例包括但不限于亚氨酸酯(例如,乙亚氨酸酯(acetimidate),例如三氯乙酰亚氨酸酯),乙酸酯,甲苯磺酸酯,三氟甲磺酸酯,磺酸酯,叠氮化物,卤化物,硫代羟基,烷氧基,氰酸酯,硫氰酸酯,硝基,和氰基。

[0343] 在一些实施方式中,包含离去基团表示式III化合物的活化形式。

[0344] 在一些实施方式中,式III化合物在偶联之前被转化为其活化形式。

[0345] 在一些实施方式中,转化为活化形式于原位进行,使得式III化合物在与式II或IIb化合物和/或偶联剂接触之前或期间在反应釜中转化为其活化形式(例如,式III\*)。

[0346] 在一些实施方式中,在进行偶联之前,即在与本文所述的偶联剂和/或受体接触之前,将式III化合物转化为其活化形式。

[0347] 式II或IIb的受体的多个位置上的受体羟基被保护基团和受体氨基被保护基团在每个位置上可以相同或不同。

[0348] 在一些实施方式中,例如,如果式I或Ia中的 $R_4$ 不是H,在与供体反应之前,通过生成部分B来制备式II或IIb的受体。

[0349] 在一些实施方式中,式II或IIb中的B包含被保护胺基,并且在 $R_4$ 不是氢的情况下还包括定义 $R_4$ 的基团的被保护形式。例如,当 $R_4$ 是包含胺的基团时,如本文所述,胺为氨基被保护基团的形式。当 $R_4$ 是包含鸟嘌呤或胍的基团时,鸟嘌呤或胍呈被保护形式。当 $R_4$ 是包含羟基的基团时,如本文所述,羟基为羟基被保护基团的形式。定义除氢以外的 $R_4$ 的基团的被

保护形式是本领域技术人员熟知的,并且全部被本实施方式所涵盖。

[0350] 在一些实施方式中,当 $R_2$ 为 $OR'$ 且 $R'$ 为氢时,式IIb中的A包含被保护羟基。

[0351] 在一些实施方式中,当 $R_2$ 为 $NR'R''$ 且 $R'$ 和 $R''$ 之一或两者为氢时,式IIb中的A包含被保护胺基。当 $R'$ 和 $R''$ 之一或两者都不是氢但包含胺时,如本文所述,胺为氨基被保护基团的形式。当 $R'$ 和 $R''$ 之一或两者是包含羟基的基团时,如本文所述,羟基为羟基被保护基团的形式。定义除氢以外的 $R'$ 和 $R''$ 的基团的被保护形式是本领域技术人员熟知的,并且全部被本实施方式所涵盖。

[0352] 根据本发明的一些实施方式,(式II或IIb的)受体化合物的结构分别设定了由式I或Ia表示的所得化合物中环I和环II的绝对结构。

[0353] 根据本发明的一些实施方式,供体化合物的结构设定了由式I或Ia表示的所得化合物中环III的绝对结构,即式I或Ia中5"位的立体构型和 $R_8$ 的类型。

[0354] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个受体羟基被保护基团均为O-乙酰基。

[0355] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,如在后文实施例部分中所描述和例示的,在甲醇氨溶液中对O-乙酰基羟基被保护基团进行去保护。

[0356] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个受体氨基保护基团均为苄氧羰基(CBz)基团。

[0357] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个供体氨基保护基团均为苄氧羰基(CBz)基团。

[0358] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,每个供体羟基被保护基团均为O-苯甲酰基基团。

[0359] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,如在后文实施例部分中所描述和例示的,通过Pd/C催化加氢化有利地实现对氨基的去保护。

[0360] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,式I或Ia化合物是硫酸盐,该方法还包括将由式I或Ia表示的作为游离碱形成的化合物转化为硫酸盐。

[0361] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,通过使由式I或Ia表示的化合物以其游离碱的形式与 $H_2SO_4$ 的甲醇溶液接触来转化为硫酸盐,所述游离碱的形式通过将供体与受体偶联而获得,如在后文实施例部分中所描述和例示的。

[0362] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,由式II或IIb表示的受体化合物如本文在任意相应实施方式及其任意组合中所述而制备。

[0363] 制备式I化合物的示例性方法,如在后文实施例部分中所描述并如图1-3所示,其中 $R_1$ 是甲基,6'位的构型是R-构型, $R_4$ 是氢,以及 $R_8$ 是甲基。根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,由式I或Ia表示的化合物,包括其盐,通过将如本文所述的任意受体化合物与例如WO 2012/066546和/或WO 2017/037718中描述的供体化合物偶联而制备。

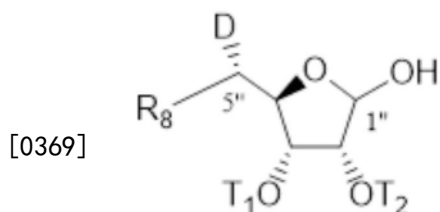
[0364] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,由式I或Ia表示的化合物,包括其盐,通过将如本文在任意相应实施方式中所述的供体化合物与例如WO 2012/066546和/或WO 2017/037718中描述的受体化合物偶联而制备。

[0365] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,由式I或Ia表示的化合物,包括其盐,通过将如本文所述的任意受体化合物与如本文所述的任意供体化合物偶联而制备。

[0366] 在这些实施方式的一些中,如本文在任意相应实施方式及其任意组合中所述进行偶联和/或保护基团及其相应的去保护和/或向硫酸盐的转化。

[0367] 供体化合物的制备:

[0368] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了一种制备由式III表示的供体化合物的方法:



式III

[0370] 其中:

[0371] OT<sub>1</sub>和OT<sub>2</sub>各自独立地是供体被保护羟基;

[0372] R<sub>8</sub>如本文对式I或Ia的定义,并且优选是烷基,更优选是甲基;以及

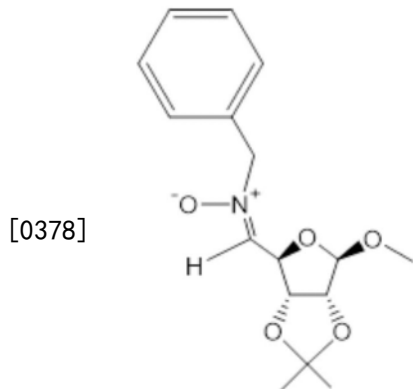
[0373] D是供体被保护氨基,

[0374] 根据本文描述的任意实施方式中的一些实施方式,本文所述的方法可用于式III化合物的大规模生产。

[0375] 根据本发明的一些实施方式,每个供体羟基保护基团均为O-苯甲酰基。

[0376] 根据一些实施方式,该方法通过以下步骤实现:

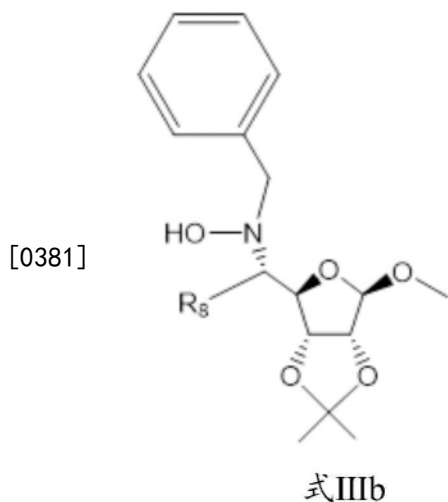
[0377] 使由式IIIa表示的化合物:



式IIIa

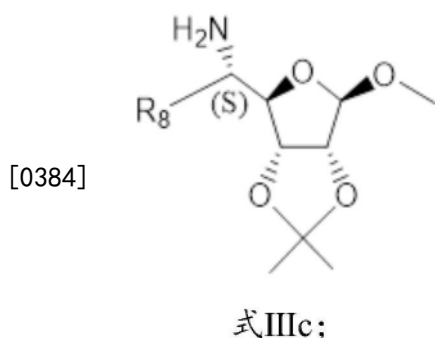
[0379] 与由式R<sub>8</sub>MgX表示的格氏试剂反应,其中X是卤化物,

[0380] 从而立体选择性地获得由式IIIb表示的化合物:



[0382] “立体选择性地”是指以至少60%，或至少70%，或至少80%，或至少90%，或至少95%，或至少98%，或至少99%，或甚至更高的光学纯度(对映体纯度)获得所示的立体异构体。这意味着，以摩尔计，至少60%，或至少70%，或至少80%，或至少90%，或至少95%，或至少98%，或至少99%的所得的式IIIb化合物在式IIIb中5”对应位具有S-构型。

[0383] 通过将由式IIIb表示的化合物转化为由式IIIc表示的化合物而继续进行该方法：



[0385] 使由式IIIc表示的化合物与氨基保护基团反应以形成D-氨基被保护基团；以及

[0386] 使由式IIIc表示的化合物与羟基保护基团反应以形成OT<sub>1</sub>和OT<sub>2</sub>羟基被保护基团。

[0387] 该方法还可包括在1”位生成羟基。

[0388] 通过保持5”位的立体构型，将由式IIIb表示的化合物转化为由式IIIc表示的化合物，并使由式IIIc表示的化合物进一步反应以获得由式III表示的供体化合物。

[0389] “保持立体构型”是指式IIIc和式III的化合物的光学纯度与本文对式IIIb化合物所描述的光学纯度基本相同。“基本上相同”是指其与式IIIb化合物的光学纯度相差不超过10%，优选不超过5%，或不超过4%，或不超过3%，或不超过2%，或不超过1%，或不超过0.5%，或不超过0.1%。

[0390] 在一些实施方式中，式IIIc和式III的化合物的光学纯度与本文对式IIIb的化合物所描述的光学纯度基本相同。

[0391] 根据一些本文所述的任意实施方式，所述氨基保护基为N-苄氧羰基。

[0392] 根据一些本文所述的任意实施方式，每个羟基保护基团是苯甲酰基。

[0393] 根据一些本文所述的任意实施方式，通过以下步骤制备由式IIIa表示的化合物来实现该方法：

[0394] 将D-核糖转化为二氧戊环被保护D-核糖；



[0395] 将5”位的羟基氧化成相应的醛;以及

[0396] 将所述醛与N-苄基羟基胺盐酸盐反应。

[0397] 在示例性实施方式中,由式IIIa表示的化合物如后文针对化合物103的实施例部分中所述而制备。

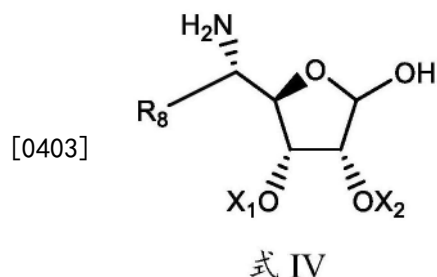
[0398] 在示例性实施方式中,D是N-苄氧羰基(CBz)保护的氨基, $R_8$ 是甲基,且每个 $T_1$ 和 $T_2$ 均为苯甲酰基。制备这种在本文中也称为BB-D的供体化合物的示例性方法在后文实施例部分详细描述并在图1中概要性示出。当L为OH,供体化合物在本文中也称为BB-D-OH。

[0399] 在一些实施方式中,从D-核糖制备所述由式IIIa表示的化合物,使所述由式IIIa表示的化合物与所述格氏试剂反应,将所述由式IIIb表示的化合物转化为所述由式IIIc表示的化合物,以及使所述由式IIIc表示的化合物与氨基保护基团反应以形成所述D,以“一锅式反应”的方式来进行,即,使这些反应的每步中获得的中间体连续反应以提供后续的中间体,以及分离中间体/或无需分离中间体。

[0400] 要注意的是,对于本文所述的任意实施方式,式IIIa,IIIb,和IIIc的任意化合物中的1”位上的甲氧基可被本文所定义的任意其他羟基保护基团取代。

[0401] 要进一步注意的是,对于本文所述的任意实施方式,保护位置2”和3”的羟基的二氧戊环可被本文定义的任意其他羟基保护基团取代,可与本文描述的 $OT_1$ 和 $OT_2$ 相同或不同。

[0402] 根据本发明的一些实施方式,如本文所述的用于制备式III化合物的方法可以用于制备式IV化合物:



[0404] 其中:

[0405]  $R_8$ 如本文定义;以及

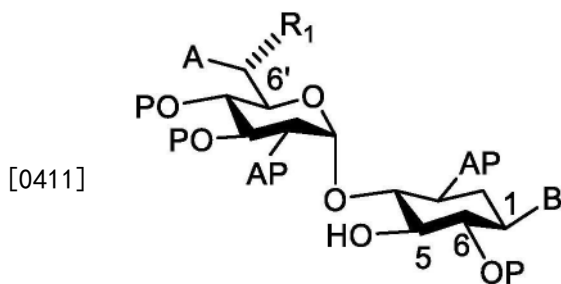
[0406]  $X_1$ 和 $X_2$ 各自独立地为氢或本文定义的羟基保护基团。

[0407] 所述方法通过以下来实现:提供式IIIc化合物,如本文在任意各个实施方式中所述;使用本领域熟知的步骤分别产生 $OX_1$ 和 $OX_2$ (在它们与式IIIc化合物中的羟基保护基不同时);以及在位置1”产生羟基。

[0408] 在一些实施方式中,通过将位置1”的羟基转化为各自的离去基团,如本文定义,式IV化合物可用于制备本文描述的式III\*化合物。

[0409] 制备受体化合物的方法:

[0410] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供由式II表示的受体化合物的制备方法:



式 II

[0412] 其中:

[0413] (矩形) 虚线表示6' 位的S-构型或R-构型, 优选为R-构型;

[0414]  $R_1$  是氢, 烷基, 环烷基, 或芳基, 优选为烷基, 更优选为甲基;

[0415] OP是受体被保护羟基;

[0416] AP是受体被保护氨基;

[0417] A是受体被保护羟基 (OP); 以及

[0418] B是受体被保护胺基, 酰基, 或者被保护或未被保护氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基, 优选是受体被保护氨基。

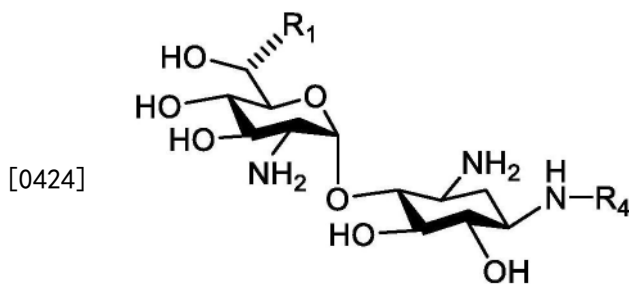
[0419] 在受体多种位置处的受体羟基被保护基团和受体氨基被保护基团在各个位置可相同或不同。

[0420] 根据本发明的一些实施方式, 受体化合物的结构设定所得式I化合物中的环I和环II的绝对结构。

[0421] 根据本文描述的任意实施方式中的一些, 提供制备本文描述的式II受体的方法, 其可用于受体的大规模生产或式I化合物的大规模生产。

[0422] 根据本文描述的任意实施方式中的一些, 提供用于制备式II受体的方法, 其尤其可用于受体的大规模生产或式I化合物的大规模生产, 其包括:

[0423] 提供由式IIa表示的化合物:



式 IIa

[0425] 或其药学上可接受的盐,

[0426] 其中:

[0427] 虚线表示本文描述的6' 位的立体构型, 且

[0428]  $R_4$  是氢, 酰基, 或氨基取代的 $\alpha$ -羟基酰基, 且优选为氢;

[0429] 将每个氨基转化为氨基被保护基团; 以及

[0430] 将每个羟基转化为羟基被保护基团。

[0431] 根据本文描述的任意实施方式中的一些, 每个羟基被保护基团是O-乙酰基。

[0432] 根据本文描述的任意实施方式中的一些,每个氨基被保护基团是苄氧羰基(CBz)被保护氨基。

[0433] 如本文所探讨,这种氨基被保护基团的有害性显著低于以前描述的叠氮化物基团,并且还有利地能够通过氢化对氨基进行去保护。

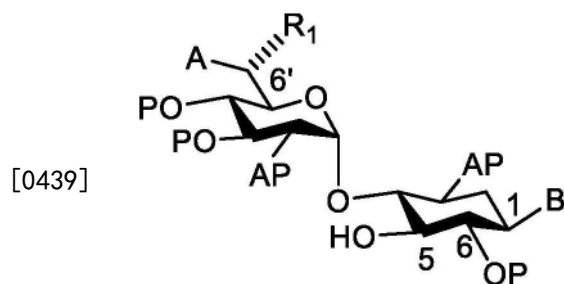
[0434] 根据本发明的一些实施方式, $R_1$ 是甲基,6'位的构型为R-构型,并且提供式IIa化合物包括将G-418硫酸盐转化为由式IIa表示的化合物。

[0435] 根据本发明的一些实施方式,该转化包括将G-418转化成其游离碱形式(例如施用本领域已知的方法)并使G-418以其游离碱形式与HCl的甲醇溶液接触。

[0436] 制备在本文也称作BB-A的式II受体的示例性方法在实施例部分详细描述并在图2中示出。

[0437] 在根据本实施方式的一个示例性方法中,本文描述的方法可用于在本文也称作NB124或ELX-02的假三糖氨基糖苷化合物的大规模生产,并且通过以下步骤来实现:制备如本文描述的供体化合物BB-D-OH和本文描述的受体化合物BB-A,并且将BB-D-OH(任选地在将其转化为诸如BB-D的活化形式时)和BB-A偶联以获得所需的产物,可以是其盐(例如硫酸盐)。这种方法在图3中描述。

[0438] 根据本发明的一些实施方式中的一个方面,提供用于制备由式IIb表示的受体化合物的方法:



式 IIb

[0440] 其中,(矩形)虚线表示6'位的S-构型或R-构型,优选为R-构型;

[0441]  $R_1$ 为氢,烷基,环烷基,或芳基,优选为烷基,更优选为甲基;

[0442] OP是受体被保护羟基;

[0443] AP是受体被保护氨基;

[0444] A和B如本文针对式IIb限定。

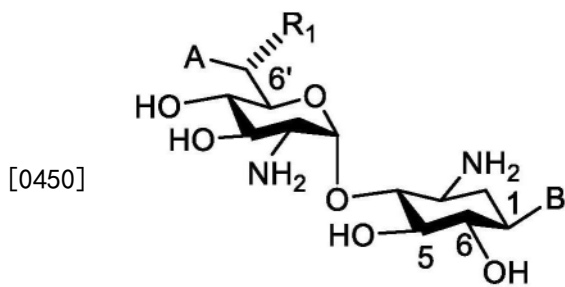
[0445] 在受体各种位置处的受体羟基被保护基团和受体氨基被保护基团在各个位置可相同或不同。

[0446] 根据本发明的一些实施方式,式IIb受体化合物的结构设定所得式Ia化合物中的环I和环II的绝对结构。

[0447] 根据本文描述的任意实施方式中的一些,提供制备本文描述的式IIb受体的方法,其可用于受体的大规模生产或式Ia化合物的大规模生产。

[0448] 根据本文描述的任意实施方式中的一些,提供用于制备式IIb受体的方法,其尤其可用于受体的大规模生产或式Ia化合物的大规模生产,其包括:

[0449] 提供由式IIc表示的化合物:



式 IIc

[0451] 其中:

[0452] 矩形虚线表示6' 位的S-构型或R-构型;

[0453] 当式Ia中 $R_2$ 是 $OR'$  并且 $R'$  是氢时,A是OH;当式Ia中 $R_2$ 是 $NR'R''$  并且每个 $R'$  和 $R''$  均为氢时,A是 $NH_2$ ;当式Ia中 $R_2$ 为 $NR'R''$  且 $R'$  和 $R''$  之一为氢时,A是 $NHR'$  或 $NHR''$ ;或者是定义式Ia中 $R_2$ 的取代或未取代的烷基;

[0454] 当式Ia中 $R_4$ 是氢时,B是胺,或者当 $R_4$ 不是氢时,B是定义 $R_4$ 的基团的未被保护形式,如本文定义;

[0455] 将每个氨基转化为氨基被保护基团;并且将每个羟基转化为羟基被保护基团。

[0456] 根据本文描述的任意实施方式中的一些,每个羟基被保护基团为O-乙酰基。

[0457] 根据本文描述的任意实施方式中的一些,每个氨基被保护基团是苄氧羰基(CBz)被保护氨基。

[0458] 本发明的实施方式还涉及制备本文描述的由式IIIa,IIIb,和IIIc表示的中间体化合物的方法,以及制备本文描述的由式IIIa,IIIb,和IIIc表示的化合物的方法(例如本文限定的大规模方法)。

[0459] 治疗用途:

[0460] 设计本文提出的化合物以使其具有截短突变抑制活性,即诱导提前终止密码子突变的读出的能力。这种活性使得这些化合物适合用作治疗遗传紊乱的治疗活性剂,尤其是以截短突变为特征的这类紊乱。

[0461] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,由通式I或Ia统一表示以及由本文描述的方法制备的任意化合物用于遗传紊乱的治疗中的用途,或用于制造用于治疗遗传紊乱的药物。

[0462] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供一种治疗遗传紊乱的方法。根据本发明的该方面的方法通过向有此需要的受试者施用治疗有效量的一种或多种本文提出的具有通式I或Ia的化合物而实现,该化合物由本文描述的方法制备,包括化合物的任意相应实施方式及其任意组合。

[0463] 如本文所用,术语“治疗”包括消除,基本上抑制,减慢,或逆转病情的进展,基本上改善病情的临床或美学症状(aesthetical symptoms),或基本上防止病情的临床或美学症状的出现。

[0464] 如本文所用,短语“治疗有效量”描述将在某种程度上减轻待治疗病症的一种或多种症状的聚合物的施用量。

[0465] 如本文所用,短语“遗传紊乱(genetic disorder)”是指由一种或多种经常从双亲

遗传的缺陷基因引起的慢性紊乱,并且当缺陷性隐性基因的两个健康携带者繁殖时或当缺陷基因占优势时会意外发生。遗传紊乱可以不同的遗传模式发生,包括常染色体显性遗传模式,其中只需要一个基因的突变复制体即可影响后代;以及常染色体隐性遗传模式,其中必须在基因的两个复制体发生突变才能影响后代。

[0466] 本文所用短语“遗传紊乱 (genetic disorder)”涵盖遗传紊乱 (genetic disorder),遗传病 (genetic disease),遗传病症 (genetic condition),或遗传综合征 (genetic syndrome)。

[0467] 根据本发明的任意实施方式中的一些,遗传疾病,遗传病,遗传病症,或遗传综合征涉及具有导致其不当转译的提前终止密码子突变,或截短突变(无义突变)的基因。不当转译会产生功能失调的必需蛋白,或导致必需蛋白合成的减少或取消。在本发明的一些实施方式的上下文中,在本实施方式的范围内考虑的遗传紊乱被称为与提前终止密码子突变和/或蛋白质截短表型相关的遗传紊乱。

[0468] 根据本发明任意实施方式中的一些,与提前终止密码子突变和/或蛋白质截短的表型相关的遗传紊乱可通过促进完整转录的读出而治疗(mRNA),或换句话说,通过促进对无义突变(提前终止密码子突变和/或截短突变)的抑制而治疗。因此,遗传紊乱可以是可由读出诱导的化合物治疗的紊乱。

[0469] 与提前终止密码子突变和/或蛋白质截短表型相关的遗传紊乱的鉴别方法是本领域所熟知的,并且包括全部或部分基因组阐明,遗传生物标志物检测,表型分类和遗传信息分析。

[0470] 这样的方法通常导致成对的突变/野生型(WT)序列,并且这些对可以用于已知方法中以鉴别遗传紊乱是否与提前终止密码子突变和/或蛋白质截短表型相关。

[0471] 用于治疗这种遗传紊乱的化合物的读出诱导活性可通过本领域熟知的方法来建立。

[0472] 例如,在全细胞或无细胞体系中,将包含两个被突变基因(引起遗传紊乱的基因)序列打断的报告基因(reporter gene)的质粒横切(transected)成蛋白质表达平台,通常在一系列浓度和复制(duplication)下,测定存在被测化合物的情况下两个基因的表达水平之间的比例,并将其与野生型的基因表达水平比例和/或与不含被测化合物的对照样品中测得的表达水平比例进行比较。

[0473] 值得注意的是,用于读出活性的实验模型,即含有提前终止密码子突变的基因的核苷酸序列,是一种鉴别与提前终止密码子突变和/或蛋白质截短表型相关联的遗传紊乱的过程的副产物,还需注意的是,随着基因组数据获取的巨大进步,该过程现已完全在本领域技术人员的技能范围内,并且一旦建立了候选药物的作用机理,例如已证实与提前终止密码子突变和/或蛋白质截短表型有关的遗传紊乱的情况下,鉴别,表征和评估本文提出的读出诱导的化合物的任意一种的功效,选择性和安全性均在本领域技术人员的技术范围内。进一步在药物开发的整个常规过程中采用本文提出的读出诱导的化合物也在本领域技术人员的技术范围内。

[0474] 测试在本文中称为读出活性的提前终止密码子突变和/或截短突变的读出的方法在本领域中是已知的,并在后文实施例部分中提供了若干示例性的实验方法,借此能够表征根据本发明的一些实施方式的读出诱导的化合物。应理解的是,其他方法可用于表征读

出诱导的化合物,并且这些方法在本发明的范围内也可考虑。本文提供的方法也可适用于高通量筛选技术,该技术可以在相对较短的时间内评估数以千计的化合物。

[0475] 本领域技术人员将理解,许多体外方法可用于表征本文提供的读出诱导化合物在用作药物时的安全性,并且评估候选药物的相对于其效用的细胞毒性。所述技术人员也将理解,许多体外方法可用于表征本文提供的读出诱导的化合物对真核与原核的选择性,并且这种方法也可适合用于高通量筛选技术,该技术可在相对较短的时间评估数以千计的化合物。

[0476] 与至少一种提前终止密码子或其他无义突变的出现有关的示例性遗传紊乱,病,病症,和综合征包括但不限于Rett综合征,囊性纤维化(CF),贝克尔肌营养不良症(BMD),先天性肌营养不良(CMD),杜兴氏肌营养不良(DMD),VII因子缺乏症,家族性心房颤动,Hailey-Hailey病,A型血友病,B型血友病,Hurler综合征,Louis-Bar综合征(共济失调-毛细血管扩张症,AT),McArdle病,黏多糖贮积症,肾病性胱氨酸病,多囊肾病,脊髓性肌萎缩症(SMA),Tay-Sachs,Usher综合征,X连锁性肾病性尿崩症(XNDI),和X连锁性色素性视网膜炎。

[0477] 在本文描述的任意实施方式的一些中,遗传紊乱是Rett综合征。

[0478] 在本文描述的任意方法和用途中,本文描述的化合物可使用其本身或形成药物组合物的一部分,该药物组合物还包含本文定义的药学上可接受的载体。

[0479] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供一种药物组合物,其包含作为活性成分的本文所述的任意化合物和药学上可接受的载体。

[0480] 如本文所用,“药物组合物”是指本文提出的化合物与其他化学组分(例如药学上可接受的和合适的载体和赋形剂)的制剂。药物组合物的目的在于促进向生物体施用化合物。

[0481] 在下文中,术语“药学上可接受的载体”是指不会对生物体造成明显刺激并且不会消除所施用化合物的生物学活性和特性的载体或稀释剂。载体的实例包括但不限于:丙二醇,盐水,有机溶剂与水的乳液和混合物,以及固体(例如粉末状)和气态载体。

[0482] 本文中的术语“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步促进化合物的施用的惰性物质。赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙,磷酸钙,各种糖和各种类型的淀粉,纤维素衍生物,明胶,植物油,和聚乙二醇。

[0483] 药物的配制和施用技术可以在最新版的“雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)”麦克出版公司(Mack Publishing Co.),Easton,PA中找到,其通过引用并入本文。

[0484] 本发明的药物组合物可以通过本领域公知的方法来制造,例如,通过常规的混合,溶解,制粒,糖衣丸制作,浸出,乳化,包囊,包埋,或冻干方法。

[0485] 因此,根据本发明所使用的药物组合物可以使用一种或多种包含赋形剂和助剂的药学上可接受的载体以常规方式配制,所述赋形剂和助剂有利于将本文提出的化合物加工成可药用的制剂。合适的制剂取决于所选的给药途径。

[0486] 根据一些实施方式,该施用通过口服完成。对于口服施用,可以通过将化合物与本领域公知的药学上可接受的载体混合来容易地配制本文提供的化合物。这种载体使得本文提出的化合物能够被配制成片剂,丸剂,糖衣丸,胶囊,液体,凝胶,糖浆,浆液,悬浮液等,以

供患者口服摄取。可使用固体赋形剂,任选地研磨所得混合物,并在需要时加入合适的助剂后加工颗粒混合物,以制备片剂或糖衣丸芯,从而制成用于口服的药物制剂。合适的赋形剂尤其是填充剂,例如糖,包括乳糖,蔗糖,甘露糖醇,或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉,小麦淀粉,大米淀粉,马铃薯淀粉,明胶,黄芪胶,甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羧甲基纤维素钠;和/或生理上可接受的聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可以加入崩解剂,例如交联的聚乙烯吡咯烷酮,琼脂,或海藻酸或其盐,例如海藻酸钠。

[0487] 可以口服使用的药物组合物包括由明胶制成的推入配合(push-fit)胶囊以及由明胶和增塑剂(如甘油或山梨糖醇)制成的密封的软胶囊。推入配合胶囊可包含与填充剂(如乳糖),粘合剂(如淀粉),润滑剂(如滑石粉或硬脂酸镁)以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,本文提出的化合物可溶解或悬浮在合适的液体中,例如脂肪油,液体石蜡,或液体聚乙二醇。另外,可以添加稳定剂。所有用于口服施用的制剂的剂量应适合所选的施用途径。

[0488] 对于注射,本文提出的化合物可以在水溶液中,优选在生理相容的缓冲液(例如汉克氏溶液,林格氏溶液,或生理盐水缓冲液)中配制,所述缓冲液含有或不含有有机溶剂(例如丙二醇,聚乙二醇)。

[0489] 对于透黏膜施用,在制剂中使用渗透剂。这种渗透剂是本领域公知的。

[0490] 糖衣丸芯具有合适的涂层。为此,可使用浓缩的糖溶液,其可任选地包含阿拉伯胶,滑石,聚乙烯吡咯烷酮,卡波姆凝胶,聚乙二醇,二氧化钛,漆(lacquer)溶液,和合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或颜料可添加至片剂或糖衣丸包衣以鉴别或表征活性氨基糖苷化合物剂量的不同组合。

[0491] 对于口腔施用,组合物可采取以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0492] 对于吸入施用,使用合适的推进剂(例如二氯二氟甲烷,三氯氟甲烷,二氯四氟乙烷,或二氧化碳)从加压包装或喷雾器中以气溶胶喷雾递送(通常包括粉状,液状,和/或气态载体)的形式方便地递送本文提出的化合物。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可通过提供阀门来递送计量的量而确定。可以配制例如用于吸入器或吹入器中的明胶的胶囊和药筒,其包含本文提出的化合物和合适的粉末基质(例如但不限于乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0493] 本文提出的化合物可经配制以用于肠胃外给药,例如通过推注或连续输注。注射用制剂可以单位剂型存在,例如在安瓿中或在多剂量容器中,任选地添加防腐剂。所述组合物可以是在油性或水性媒介物中的悬浮液,溶液,或乳液,并且可以包含配制剂,例如悬浮剂,稳定剂,和/或分散剂。

[0494] 用于肠胃外给药的药物组合物包括水溶性形式的化合物制剂的水溶液。另外,本文提出的化合物的悬浮液可制备成适当的油性注射悬浮液和乳液(例如,油包水,水包油,或油乳液中的油包水)。合适的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油,例如芝麻油,或合成脂肪酸酯,例如油酸乙酯,甘油三酯,或脂质体。水性注射悬浮液可包含增加悬浮液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠,山梨糖醇,或葡聚糖。任选地,悬浮液还可包含合适的稳定剂或试剂,其增加本文提出的化合物的溶解度以允许制备高浓度的溶液。

[0495] 或者,本文提出的化合物可以是粉末形式,以便在使用前与合适的媒介物(例如无菌,无热原的水)混合。

[0496] 本文提出的化合物也可使用例如常规的栓剂基质(例如可可脂或其他甘油酯)被配制成直肠组合物,例如栓剂或保留灌肠剂。

[0497] 本文描述的药物组合物也可包含凝胶相载体或赋形剂的合适固体。这种载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙,磷酸钙,各种糖,淀粉,纤维素衍生物,明胶,和聚合物,例如聚乙二醇。

[0498] 适用于本发明的上下文的药物组合物包括组合物,该组合物中以能够有效达到预期目的的量包含活性成分。更具体地,治疗有效量是指本文提出的化合物有效预防,减轻或改善紊乱症状,或延长所治疗受试者的存活量。

[0499] 治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其是根据本文提供的详细公开内容。

[0500] 对于在本实施方式的方法中使用的本文提出的任意化合物,治疗有效量或剂量可首先从动物的活性测定中预估。例如,可在动物模型中配制剂量以达到包括通过活性测定法确定的突变抑制水平的循环浓度范围(例如,实现对截短突变的基本读出的测试化合物的浓度)。此类信息可用于更准确地确定对人有用的剂量。

[0501] 可以通过实验动物中的标准药理学程序,例如通过确定 $EC_{50}$ (观察到其最大作用的50%时的化合物的浓度)和 $LD_{50}$ (致死剂量,导致50%的测试动物死亡),确定本文提出的化合物的毒性和治疗功效。从这些活性测定和动物研究中获得的数据可用于配制用于人的剂量范围。

[0502] 剂量可根据所采用的剂型和所采用的施用途径而变化。具体的制剂,施用途径,和剂量可由医师个人根据患者的状况来选择。(参见,例如,Fingl等,1975,“The Pharmacological Basis of Therapeutics(治疗学的药理学基础)”,第1章,第1页)。

[0503] 剂量和间隔可单独调节来提供足以维持所需效果的本文提出的化合物的血浆水平,称为最小有效浓度(MEC)。每种制剂的MEC会有所不同,但可根据体外数据进行估算;例如,实现具有截断突变(即突变密码子的读出)的整个基因的10-90%表达所必需的化合物的浓度。达到MEC所需的剂量将取决于个体特征和施用途径。HPLC测定法或生物测定法可用于确定血浆浓度。

[0504] 剂量间隔也可使用MEC值确定。制剂应使用一种方案而施用,该方案可在10-90%的时间内将血浆水平维持在高于MEC的水平,优选在30-90%的时间内,最优选在50-90%的时间内。

[0505] 取决于待治疗的慢性疾病的严重程度和反应性,给药也可以是上述缓释组合物的单次周期性施用,其中周期性治疗的过程持续数天至数周,或直到在周期性治疗期间实现足够的改善,或直到可在周期性治疗中实现紊乱状态的显著减少。

[0506] 当然,待施用的组合物的量取决于所治疗的受试者,患病的严重程度,施用的方式,处方医生的判断等。本发明的组合物如果需要则可以包装或分配器装置(例如FDA(美国食品和药物管理局)批准的试剂盒)的形式提供,其可包含一种或多种含有活性成分的单位剂型。包装或分配器装置可随附施用说明。包装或分配器还可伴有与容器相关联的提醒,该提醒是由规范药品生产,使用或销售的政府机构规定的形式,该通知反映了该机构对人用或兽用组合物的形式的批准。例如,此类通知可以是美国食品和药物管理局批准的处方药标签,也可以是批准的产品插页。如上文所详述,包含在相容的药物载体中配制的根据本实



施方式的化合物的组合物可以被制备并放置在合适的容器中,并针对所指定的病症或诊断的治疗进行标注。

[0507] 因此,在一些实施方式中,将药物组合物包装在包装材料中,并在包装材料中或包装材料上以印刷形式进行标识,以用于治疗本文定义的遗传紊乱。

[0508] 在本文描述的任意组合物,方法,和用途中,化合物可与可用于治疗遗传紊乱的其他试剂联合使用。

[0509] 本发明提出的化合物或包含该化合物的药物组合物主要针对定义为慢性病的遗传紊乱的治疗,预期其将在被治疗的受试者的整个生命周期内施用。因此,含有该化合物的药物组合物的施用方式应使施用容易且舒适,优选自我施用,从而对患者的健康和生命周期造成的损失最小。

[0510] 本文提出的化合物或含有该化合物的药物组合物的重复和周期施用例如可基于每日完成,即每天一次,更优选该施用基于每周完成,即每周一次,更优选该施用基于每月完成,即每月一次,最优选每几个月施用一次(例如,每1.5个月,2个月,3个月,4个月,5个月,或甚至6个月一次)。

[0511] 如上文探讨,一些针对使用目前已知的氨基糖苷作为截短突变读出药物的限制与它们主要抗菌(用作抗生素)的事实相关联。长期使用任意抗菌剂难以保证安全并且甚至会危及生命,因为它会改变肠道微生物菌群,这可能会导致或加重其他医学病症,例如发炎性肠病的爆发,并可能导致某些病理性微生物菌株产生抗性。

[0512] 在一些实施方式中,本文提出的化合物基本上没有抗菌活性。“无抗菌活性”是指其对特定菌株的最小抑制浓度(MIC)远高于被认为对该菌株具有抗生素作用的化合物的浓度。此外,这些化合物的MIC显著高于发挥截短突变抑制活性所需的浓度。

[0513] 本文提出的化合物基本上是非杀菌的,不会产生上述不利影响,因此可以通过可能包含非靶标的良性和/或有益微生物的吸收途径施用,因此甚至可能需要对其进行保留。本文提出的化合物的这一重要特性使这些化合物特别有效地对抗慢性病,因为它们可以重复并在生命周期内施用,而不会引起任何与抗菌有关的不良累积作用,并且可以进一步口服或直肠施用,即通过胃肠道(GI tract),对治疗慢性紊乱的药物是非常有用和重要的特性。

[0514] 根据一些实施方式,本文提出的化合物被选择和/或设计成相对于真核细胞转译系统对原核细胞转译系统具有选择性,即与原核细胞(例如细菌)中的活性相比,该化合物在真核细胞(例如在哺乳动物(人))中表现出更高的活性。不受任何特定理论的束缚,认为已知本文提出的化合物通过与16S核糖体RNA的A位点结合而发挥作用,而核糖体参与对基因的转译,从而本发明提出的化合物对真核生物核糖体A位具有更高的亲和力,或相对于原核生物核糖体A位点以及类似于其原核生物对应物的线粒体核糖体A位点对真核生物A位点具有选择性。

[0515] 本文所用的术语“约”是指 $\pm 5\%$ 或 $\pm 10\%$ 。

[0516] 术语“包括(comprises)”,“包括(comprising)”,“包括(includes)”,“包括(including)”,“具有(having)”及其词形变化是指“包括但不限于”。

[0517] 术语“由...构成(consisting of)”表示“包括且限于”。

[0518] 术语“基本上由.....构成”是指组合物,方法,或结构可包括另外的成分,步骤,

和/或部分,但仅限于另外的成分,步骤,和/或部分不实质上改变所要求保护的组合物,方法,或结构的基本特征和新颖特征。

[0519] 如本文所用,单数形式“一(a)”,“一(an)”,和“该(the)”包括复数指代,除非上下文另外明确指出。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括其混合物。

[0520] 在整个申请中,本发明的多种实施方式可以范围格式呈现。应理解,范围格式的描述仅出于方便和简洁,且不应被解释为对本发明范围的不灵活的限制。因此,应该认为范围的描述已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,对从1到6的范围的描述应视为已明确公开了子范围,例如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3到6等,以及该范围内的单个数字,例如1,2,3,4,5,和6。这与范围的广度无关。

[0521] 当在此指出数值范围时,其意图在于包括所指示的范围内的任何引用的数字(分数或整数)。短语在第一指示数字和第二指示数字“之间的范围/范围”和从第一指示数字“到”第二指示数字的“范围/范围”在本文中可互换使用,并且意在包括第一和第二指示数字以及它们之间的所有分数和整数。

[0522] 如本文所用,术语“方法”是指用于完成给定任务的方式,手段,技术,和步骤,包括但不限于化学,药理,生物,生化,和医学领域的从业人员知晓的或容易从已知的方式,手段,技术,和步骤发展出的那些方式,手段,技术,和步骤。

[0523] 如本文所用,术语“治疗”包括消除,基本上抑制,减慢,或逆转病情的进展,基本上改善病情的临床或美学症状或基本上防止病情的临床或美学症状的出现。

[0524] 本文描述的任意化合物可以是其前药,水合物,或溶剂化物,或以其前药,水合物,或溶剂化物的形式使用。

[0525] 本文所用的术语“前药”是指在体内转化为活性化合物(活性母药)的试剂。前药通常可用于促进母药的使用。例如,前药通过口服给药可具有生物利用性,而母药则不能。与母药相比,前药在药物组合物中的溶解度也可提高。前药也经常用于在体内实现活性化合物的持续释放。前药的一个例子是但不限于,具有一个或多个羧酸部分的本发明化合物,其以酯(“前药”)的形式施用。这种前药在体内被水解,从而提供游离化合物(母药)。所选择的酯可影响前药的溶解度特征和水解速率。

[0526] 术语“溶剂化物”是指由溶质(本发明的化合物)和溶剂形成的具有可变化学计量(例如,二,三,四,五,六等)的络合物,其中溶剂不会干扰溶质的生物活性。合适的溶剂包括例如乙醇,乙酸等。

[0527] 术语“水合物”是指如上定义的溶剂化物,其中溶剂是水。

[0528] 本文所用的术语“羟基(hydroxyl)”或“羟基(hydroxy)”是指-OH基团。

[0529] 本文所用的术语“胺”描述-NR'R"基团,其中每个R'和R"均在本文独立描述,并且例如是氢,烷基,环烷基,杂脂环族,芳基,或杂芳基,如这些术语在本文中的定义。R'和R"之一不为氢的胺在本文称作“改性胺”。

[0530] 如本文所用,术语“烷基”描述包括直链和支链基团的脂族烃。烷基可具有1至20个碳原子,或1至10个碳原子,并且可以是支链或非支链的。根据本发明的一些实施方式,烷基是具有1至6或1至4个碳原子的低级(或更低级)烷基(即,甲基,乙基,丙基,和丁基)。

[0531] 在本文陈述数值范围时,例如“1-10”表示该基团,在这种情况下为烷基,可包含1

个碳原子,2个碳原子,3个碳原子等,最多至包括10个碳原子。在一些实施方式中,烷基为更低级烷基,包括1-6或1-4个碳原子。

[0532] 烷基可以是取代的或未取代的。当被取代时,取代基可以是例如烷基(形成支链烷基),烯基,炔基,环烷基,芳基,杂芳基,杂脂环族,卤素,三卤代烷基,羟基,烷氧基,和羟烷基中的一个或多个,如同这些术语在下文中的定义。被芳基取代的烷基在本文也称为“烷芳基”,其实例为苄基。

[0533] 当描述“烷基”时,它也可以被烯基或炔基代替。本文所用的术语“烷基”还涵盖饱和或不饱和烃,因此该术语还涵盖烯基和炔基。

[0534] 术语“烯基”描述具有至少两个碳原子和至少一个碳-碳双键的如本文定义的不饱和烷基,例如烯丙基,乙烯基,3-丁烯基,2-丁烯基,2-己烯基,和异丙烯基。如上所述,烯基可以被一个或多个取代基取代或未被取代。

[0535] 本文定义的术语“炔基”是具有至少两个碳原子和至少一个碳-碳三键的不饱和烷基。如上所述,炔基可被一个或多个取代基取代或未被取代。

[0536] 术语“环烷基”是指全碳单环或稠环(即,共享一对相邻碳原子的环),含有3个或更多个碳原子的支链或非支链基团,其中一个或多个环不具有完全共轭的 $\pi$ 电子体系,并且可进一步被取代或未被取代。示例性的环烷基基团包括,例如,环丙基,环丁基,环戊基,环己基,或环十二烷基。环烷基可被取代或未被取代。当被取代时,取代基可以是例如烷基,烯基,炔基,环烷基,芳基,杂芳基,杂脂环族,卤素,三卤代烷基,羟基,烷氧基,和羟烷基中的一个或多个,如这些术语在下文中的定义。

[0537] 术语“芳基”描述具有完全共轭的 $\pi$ 电子体系的全碳单环或稠环多环(即,共享相邻碳原子对的环)基团。芳基可未被取代或被一个或多个取代基取代。当被取代时,取代基可以是例如烷基,烯基,炔基,环烷基,芳基,杂芳基,杂脂环族,卤素,三卤代烷基,羟基,烷氧基,和羟烷基中的一个或多个,如这些术语在下文中的定义。

[0538] 术语“杂芳基”描述在环中具有一个或多个原子(例如氮,氧,和硫)且具有完全共轭的 $\pi$ 电子体系的单环或稠环(即,共享一对相邻原子的环)。杂芳基的实例包括但不限于吡咯,呋喃,噻吩,咪唑,恶唑,噻唑,吡唑,吡啶,嘧啶,喹啉,异喹啉,和嘌呤。代表性的示例是噻二唑,吡啶,吡咯,恶唑,吡啶,嘌呤等。杂芳基可未被取代或被一个或多个取代基取代。当被取代时,取代基可以是例如烷基,烯基,炔基,环烷基,芳基,杂芳基,杂脂环族,卤素,三卤代烷基,羟基,烷氧基,和羟烷基中的一个或多个,如这些术语在下文中的定义。

[0539] 本文所用术语“杂脂环族”描述在环中具有一个或多个原子(例如氮,氧,和硫)的单环或稠环基团。环也可具有一个或多个双键。然而,环不具有完全共轭的 $\pi$ 电子体系。代表性实例是吗啉,哌啶,哌嗪,四氢呋喃,四氢吡喃等。杂脂环族可以是取代的或未取代的。当被取代时,取代基可以是例如烷基,烯基,炔基,环烷基,芳基,杂芳基,杂脂环族,卤素,三卤代烷基,羟基,烷氧基,和羟烷基中的一个或多个,如这些术语在下文中的定义。

[0540] 本文所用术语“卤化物”是指卤原子的阴离子,即 $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ , 和  $I^-$ 。

[0541] 术语“卤代”是指F, Cl, Br, 和I原子作为取代基。

[0542] 术语“醇盐”是指 $Ra-O^-$ 阴离子,其中Ra为烷基,环烷基,芳基,杂芳基,或杂脂环族。

[0543] 术语“烷氧基”是指 $ORa$ 基团,其中Ra如本文所定义,但不是氢。

[0544] 本文所用术语“羟烷基”是指烷基,如本文定义,被一个或多个羟基基团取代,例如

羟甲基, 2-羟乙基, 和4-羟戊基。

[0545] 本文所用术语“氨基烷基”是指烷基, 如本文所定义, 被一个或多个氨基取代。

[0546] 本文所用术语“烷氧基烷基”是指被一个烷氧基取代的烷基, 例如甲氧基甲基, 2-甲氧基乙基, 4-乙氧基丁基, 正丙氧基乙基, 和叔丁基乙基。

[0547] 术语“三卤代烷基”是指- $\text{CX}_3$ , 其中X是卤素, 如本文所定义。示例性的卤代烷基是 $\text{CF}_3$ 。

[0548] “胍基(guanidino)”或“胍(guanidine)”或“胍(guanidiny1)”是指-- $\text{RaNC}(=\text{NRd})-\text{NRbRc}$ 基团, 其中每个Ra, Rb, Rc, 和Rd可如本文对R' 和R”的定义。

[0549] “鸟苷基(guany1)”或“鸟嘌呤”基团是指 $\text{RaRbNC}(=\text{NRd})-$ 基团, 其中Ra, Rb, 和Rd如本文所定义。

[0550] 在本文描述的任意实施方式的一些中, 胍是 $\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 。

[0551] 在本文描述的任意实施方式的一些中, 胍基为 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{NH})-$ 基团。

[0552] 本文描述的胺(包括被修饰的胺), 胍基, 和鸟嘌呤基团中的任一种均以其游离碱形式存在, 但意在涵盖其在生理pH下和/或在其盐内的离子化形式, 例如, 其药学上可接受的盐, 如本文所述。

[0553] 对于本文描述的烷基, 环烷基, 芳基, 烷芳基, 杂芳基, 杂脂环族, 和酰基中的任一个, 替代性的取代基包括但不限于磺酸盐, 亚砷, 硫代硫酸盐, 硫酸盐, 亚硫酸盐, 硫代亚硫酸盐, 膦酸盐, 硫代羟基, 硫代烷氧基, 硫代芳氧基, 氰基, 硝基, 偶氮, 磺酰, 羰基, 硫代羰基, C-羧酸盐, O-羧酸盐, N-硫代氨基甲酸酯, O-硫代氨基甲酸酯, 氧代, 硫代羰基, 脞, 酰基, 酰卤, 偶氮, 叠氮化物, 脲, 硫脲, N-氨基甲酸酯, O-氨基甲酸酯, C-酰胺, N-酰胺, 胍, 和酰胍, 如这些术语在本文中的定义。

[0554] 术语“氰基”描述- $\text{C}\equiv\text{N}$ 基团。

[0555] 术语“硝基”描述- $\text{NO}_2$ 基团。

[0556] 术语“硫酸盐”描述- $\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{ORa}$ 端基, 如该术语的上文定义, 或- $\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{O}-$ 连接基, 如这些短语的上文定义, 其中R' 如上文所定义。

[0557] 术语“硫代硫酸盐”描述- $\text{O}-\text{S}(=\text{S})(=\text{O})-\text{ORa}$ 端基或- $\text{O}-\text{S}(=\text{S})(=\text{O})-\text{O}-$ 连接基, 如这些短语在上文中的定义, 其中Ra如上文所定义。

[0558] 术语“亚硫酸盐”描述- $\text{O}-\text{S}(=\text{O})-\text{O}-\text{Ra}$ 端基或- $\text{O}-\text{S}(=\text{O})-\text{O}-$ 基团连接基, 如这些短语的在上文中的定义, 其中R' 如上文所定义。

[0559] 术语“硫代亚硫酸盐”描述- $\text{O}-\text{S}(=\text{S})-\text{O}-\text{Ra}$ 端基或- $\text{O}-\text{S}(=\text{S})-\text{O}-$ 基团连接基, 如这些短语在上文中的定义, 其中Ra如上文所定义。

[0560] 术语“亚磺酸盐”描述- $\text{S}(=\text{O})-\text{ORa}$ 端基或- $\text{S}(=\text{O})-\text{O}-$ 基团连接基, 如这些短语在上文中的定义, 其中Ra如上文所定义。

[0561] 术语“亚砷”或“亚磺酰基”描述- $\text{S}(=\text{O})\text{Ra}$ 端基或- $\text{S}(=\text{O})-$ 连接基, 如这些短语在上文中的定义, 其中Ra如上文所定义。

[0562] 术语“磺酸酯”描述- $\text{S}(=\text{O})_2-\text{Ra}$ 端基或- $\text{S}(=\text{O})_2-$ 连接基, 如这些短语在上文中的定义, 其中R' 如本文所定义。

[0563] 术语“S-磺酰胺”描述- $\text{S}(=\text{O})_2-\text{NRaRb}$ 端基或- $\text{S}(=\text{O})_2-\text{NR}'$ -连接基, 如这些短语在上文中的定义, 其中Ra如本文所定义, Rb独立地如本文对于Ra的定义。

[0564] 术语“N-磺酰胺”描述 $\text{RaS}(=\text{O})_2\text{-NRb}$ -端基或 $\text{-S}(=\text{O})_2\text{-NRa}$ -连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0565] 本文所用术语“羰基”或“碳酸盐(carbonate)”描述 $\text{-C}(=\text{O})\text{-Ra}$ 端基或 $\text{-C}(=\text{O})\text{-}$ 连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra如本文所定义。

[0566] 本文所用术语“硫代羰基”描述 $\text{-C}(=\text{S})\text{-Ra}$ 端基或 $\text{-C}(=\text{S})\text{-}$ 连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra如本文所定义。

[0567] 本文所用术语“氧代”描述 $(=\text{O})$ 基团,其中氧原子通过双键在指示位置处与原子(例如,碳原子)连接。

[0568] 本文所用术语“硫代羰基(thiooxo)”描述 $(=\text{S})$ 基团,其中硫原子通过双键在指示位置处与原子(例如,碳原子)连接。

[0569] 术语“肟”描述 $\text{=N-OH}$ 端基或 $\text{=N-O-}$ 连接基团,如这些短语在上文中的定义。

[0570] 术语“酰卤”描述 $\text{-C}(=\text{O})\text{Rd}$ 基团,其中Rd是如上文所定义的卤化物。

[0571] 术语“偶氮”或“重氮”描述 $\text{-N=NRa}$ 端基或 $\text{-N=N-}$ 连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra如上文所定义。

[0572] 术语“叠氮化物”描述 $\text{-N}_3$ 端基。

[0573] 本文所用术语“羧酸酯(carboxylate)”涵盖C-羧酸酯和O-羧酸酯。

[0574] 术语“C-羧酸酯”描述 $\text{-C}(=\text{O})\text{-ORa}$ 端基或 $\text{-C}(=\text{O})\text{-O-}$ 连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra如本文所定义。

[0575] 术语“O-羧酸酯”描述 $\text{-OC}(=\text{O})\text{Ra}$ 端基或 $\text{-OC}(=\text{O})\text{-}$ 连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra如本文所定义。

[0576] 羧酸酯可以是线性或环状的。当为环状时,Ra和碳原子在C-羧酸酯中连接在一起形成环,该基团也称为内酯。或者,Ra和O连接在一起以在O-羧酸酯中形成环。环状羧酸酯可以用作连接基,例如,当形成的环中的一个原子与另一基团连接时。

[0577] 本文所用术语“硫代羧酸酯”涵盖C-硫代羧酸酯和O-硫代羧酸酯。

[0578] 术语“C-硫代羧酸酯”描述 $\text{-C}(=\text{S})\text{-ORa}$ 端基或 $\text{-C}(=\text{S})\text{-O-}$ 连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra如本文所定义。

[0579] 术语“O-硫代羧酸酯”描述 $\text{-OC}(=\text{S})\text{Ra}$ 端基或 $\text{-OC}(=\text{S})\text{-}$ 连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra如本文所定义。

[0580] 硫代羧酸酯可以是直链或环状的。当为环状时,Ra和碳原子在C-硫代羧酸酯中连接在一起形成环,该基团也称为硫代内酯。或者,Ra和O连接在一起以在O-硫代羧酸酯中形成环。环状硫代羧酸酯可以用作连接基,例如,当形成的环中的一个原子与另一基团连接时。

[0581] 本文所用术语“氨基甲酸酯(carbamate)”涵盖N-氨基甲酸酯和O-氨基甲酸酯。

[0582] 术语“N-氨基甲酸酯”描述一种 $\text{RbOC}(=\text{O})\text{-NRa}$ -端基或 $\text{-OC}(=\text{O})\text{-NRa}$ -连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0583] 术语“O-氨基甲酸酯”描述 $\text{-OC}(=\text{O})\text{-NRaRb}$ 端基或 $\text{-OC}(=\text{O})\text{-NRa}$ -连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0584] 氨基甲酸酯可以是线性或环状的。当为环状时,Ra和碳原子在O-氨基甲酸酯中连接在一起形成环。或者,Ra和O连接在一起以在N-氨基甲酸酯中形成环。环状氨基甲酸酯可

以用作连接基,例如,当形成的环中的一个原子与另一基团连接时。

[0585] 本文所用术语“氨基甲酸酯”涵盖N-氨基甲酸酯和O-氨基甲酸酯。

[0586] 本文所用术语“硫代氨基甲酸酯”涵盖N-硫代氨基甲酸酯和O-硫代氨基甲酸酯。

[0587] 术语“O-硫代氨基甲酸酯”描述-OC(=S)-NRaRb端基或-OC(=S)-NRa-连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0588] 术语“N-硫代氨基甲酸酯”描述RbOC(=S)NRa-端基或-OC(=S)NRa-连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0589] 硫代氨基甲酸酯可以是线性或环状的,如本文对氨基甲酸酯的描述。

[0590] 本文所用术语“二硫代氨基甲酸酯”涵盖S-二硫代氨基甲酸酯和N-二硫代氨基甲酸酯。

[0591] 术语“S-二硫代氨基甲酸酯”描述-SC(=S)-NRaRb端基或-SC(=S)NR'-连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0592] 术语“N-二硫代氨基甲酸酯”描述RbSC(=S)NRa-端基或-SC(=S)NRa-连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0593] 术语“尿素”,在本文中也称为“脲基(ureido)”,描述-NRaC(=O)-NRbRc端基或-NRaC(=O)-NRb-连接基团,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义且Rc独立地如本文对Ra和Rb的定义。

[0594] 术语“硫脲”,在本文中也称为“硫脲基(thioureido)”,描述-NRa-C(=S)-NRbRc端基或-NRa-C(=S)-NRb-连接基团,其中Ra,Rb,和Rc如本文所定义。

[0595] 如本文所用,术语“酰胺”涵盖C-酰胺和N-酰胺。

[0596] 术语“C-酰胺”描述-C(=O)-NRaRb端基团或-C(=O)-NRa-连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0597] 术语“N-酰胺”描述RaC(=O)-NRb-端基团或RaC(=O)-N-连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0598] 术语“胍”描述-NRa-NRbRc端基或-NRa-NRb-连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra,Rb,和Rc如本文所定义。

[0599] 本文所用术语“酰胍”描述-C(=O)-NRa-NRbRc端基或-C(=O)-NRa-NRb-连接基,如这些短语在上文中的定义,其中Ra,Rb,和Rc如本文所定义。

[0600] 本文所用术语“硫代酰胍”描述-C(=S)-NRa-NRbRc端基或-C(=S)-NRa-NRb-连接基团,如这些短语在上文中的定义,其中Ra,Rb,和Rc如本文所定义。

[0601] 本文所用术语“酰亚胺酯(imidate)”描述-O-C(=NRa)-Rb-端基或-O-C(=NRa)-连接基,其中Ra和Rb如本文所定义。

[0602] 应理解,为清楚起见在单独的実施方式的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方式中组合提供。相反,为简洁起见,在单个實施方式的上下文中描述的本发明的各种特征,也可单独地或以任何合适的子组合或在本发明的任意其他所述的实施方式中合适地提供。在各种實施方式的上下文中描述的某些特征不应被认为是那些實施方式的必要特征,除非该实施方式没有那些要素就无法工作。

[0603] 如上文以及下文权利要求部分所描述的本发明的各种實施方式和方面在下文實施例中得到实验支持。

## 实施例

[0604] 现在参考以下实施例,这些实施例与上文描述共同以非限制性方式说明本发明的一些实施方式。

[0605] 实施例1

[0606] BB-D-OH的制备

[0607] 大规模生产BB-D-OH的一般合成途径如图1所示。

[0608] 通常,下文的“当量”是指重量单位。

[0609] 术语“vol.”,“vol”,或“Vol.”是指相对于一个体积当量的体积比(v/v)。例如,当使用10Vol.和1当量时,是指对于1克的化合物,溶剂,或任意其他试剂的指示体积是1克该化合物的体积的10倍。

[0610] 术语“w/w”或“%w/w”描述指示的化合物在其所加入的试剂的反应混合物的总重量中的重量百分比。

[0611] 术语“v/w”描述体积与重量之比,以ml/克为单位。

[0612] 短语“浓缩至不高于(concentrated up to)v/w”或“浓缩至不高于v/v”描述除去溶剂直至达到溶剂和试剂/产物/中间体的所指示的v/w或v/v。

[0613] 化合物107的制备(图1,阶段1a-g)

[0614] 中间体化合物101的制备(图1,阶段1a):于25(±5)°C将甲醇(10vol.)和D-核糖(1mol当量)的混合物搅拌5-10分钟。然后添加丙酮(12vol.)并于25(±5)°C将混合物搅拌5-10分钟。之后添加浓(Con.)HCl(0.1vol.)并在低于30°C的温度下将混合物搅拌5-10分钟。然后升温至55(±5)°C(回流)并保持2小时。通过TLC监测反应。一旦反应完成,则将反应混合物冷却至15(±5)°C,并在低于30°C的温度下添加饱和碳酸氢钠溶液(2.5vol.),并于25(±5)°C将混合物搅拌30分钟。之后,在真空且低于50°C的温度下将反应混合物浓缩至不高于3-4v/w,冷却至25(±5)°C,用水(10vol.)和二氯甲烷(DCM;10vol.)稀释并于25(±5)°C搅拌10-15分钟。进行相分离并用DCM(5vol.)萃取水性层。组合的有机层(DCM)用水(2x5Vol.)和盐水溶液(5vol.)洗涤,经无水硫酸钠(1w/w;1%重量)干燥,过滤,并在减压和低于40°C的温度下将滤液浓缩至最小体积。所得中间体的样品在低于40°C的温度下于真空脱气1小时,并送至品质检查QC以检查GC纯度。含有中间体化合物101的浓缩溶液与乙腈(2vol.)在真空和低于45°C的温度下进行共蒸馏,所得反应混合物冷却至25(±5)°C,并在低于25(±5)°C的温度下添加乙腈(1.5vol.)。将所得混合物于25(±5)°C卸载至洁净的容器。用乙腈(0.5vol.)清洗反应器并卸载至上述容器中。

[0615] 中间体化合物102的制备(图1,阶段1b):乙腈(8vol.)和戴斯-马丁过碘烷(Dess-Martin periodinane,DMP)(1.3mol当量)于25(±5)°C在氮气气氛下加入反应器,将混合物冷却至5(±5)°C并搅拌10-15分钟,将溶解在乙腈中的化合物101(阶段-1a化合物)于5(±5)°C用2-3小时缓慢添加至反应混合物。然后升温至15(±3)°C并将反应混合物额外搅拌2小时。通过GC监测反应。一旦反应完成,则于15(±3)°C添加乙酸乙酯(10Vol.),将所得反应混合物冷却至5(±5)°C,并添加溶解在饱和碳酸氢盐溶液中的硫代硫酸钠的溶液。于25(±5)°C将混合物搅拌1小时,添加氯化钠(4w/w;4%重量),于25(±5)°C将所得混合物搅拌15-20分钟,然后过滤。之后进行层分离,用乙酸乙酯(5vol.)萃取水性层,并将混合的(combined)有机层用饱和碳酸氢盐溶液以及随后的盐水溶液洗去,并经硫酸钠(1w/w;1%重量)干燥。

过滤所述混合物并在减压和低于40℃的温度下将滤液浓缩至最小体积。所得残留物与DCM (2vol.) 在真空和低于40℃的温度下进行数 (2-3) 次共蒸馏。DCM (10v/w) 之后为25 (±) 5℃ 的温度, 并将混合物搅拌5分钟。所得混合物的样品送至QC以进行GC分析。

[0616] 化合物103的制备 (图1, 阶段1c): 将硫酸镁 (0.5% w/w) 于25 (±) 5℃添加至阶段1b) 所得的反应混合物并将所得反应混合物搅拌5分钟。然后添加N-苄基羟胺盐酸盐 (0.65mol当量) 并于25 (±) 5℃将反应混合物搅拌5-10分钟, 之后冷却至10 (±) 5℃并以5-10分钟的间隔在相同温度下缓慢且逐步地添加碳酸钠 (0.25mol当量x 4)。升温至25 (±) 5℃并将混合物搅拌2小时。所得混合物的样品送至QC以进行GC分析。过滤反应混合物并用DCM (1.5v/w) 对所得的湿饼进行浆洗 (slurry washed)。过滤后, 用水 (5v/w) 以及随后的盐水溶液洗涤混合的滤液。有机层经硫酸钠 (1% w/w) 干燥, 过滤并在减压和低于40℃的温度下浓缩至最小体积。将THF (2Vol.) 添加至所得残留物并在真空和低于45℃的温度下对混合物进行共蒸馏。之后添加THF (10v/w) 并将所得产物的样品送至QC以检查MC&HPLC纯度。

[0617] 化合物104的制备 (图1, 阶段1d): 阶段1c所得的反应混合物冷却至-70 (±) 5℃, 并在2-3小时的期间内于-70 (±) 5℃将氯化甲基镁 (Methyl Magnesium chloride) 在THF (2.5v/w) 中的溶液添加至其中。于-70 (±) 5℃将反应混合物搅拌2小时, 然后于0 (±) 5℃搅拌1小时。将样品送至QC以进行HPLC分析。在氮气气氛下于0 (±) 10℃将反应混合物缓慢倒入氯化铵溶液, 在其中添加乙酸乙酯 (10v/w) 并于25 (±) 5℃将所得混合物搅拌10分钟。然后进行相分离, 并用乙酸乙酯 (5v/w) 萃取水性层。混合的有机层用水 (5v/w) 以及盐水溶液洗涤, 经无水硫酸钠 (1% w/w) 干燥, 过滤并在低于40℃的温度和真空下浓缩至不高于1-2体积 (v/v)。然后将反应混合物冷却至25 (±) 5℃, 于25 (±) 5℃添加甲醇 (5v/w), 并在低于40℃的温度和真空下将所得混合物共蒸馏至不高于2-3体积 (v/v)。反应混合物冷却至25 (±) 5℃, 于25 (±) 5℃搅拌1小时, 然后于-40 (±) 5℃搅拌2小时。然后将所得固体滤出, 用冷冻甲醇 (-30 (±) 5℃) (1v/w) 洗涤, 并在真空下于35 (±) 5℃干燥6小时。所得产物的样品送至QC以检查LOD。

[0618] 化合物105的制备 (图1, 阶段1e): 将甲醇 (10vol.) 添加至阶段1d所得的化合物104 (1mol当量), 并将混合物于25 (±) 5℃搅拌5-10分钟。添加对甲苯磺酸 (PTSA) (1.4mol当量) 并于25 (±) 5℃搅拌5-10分钟。升温至64 (±) 3℃ (回流) 并保持2小时。将样品送至QC以监测HPLC。在真空和低于45 (±) 3℃的温度下浓缩反应混合物直至达到3-4v/w, 然后冷却至25 (±) 5℃, 用水 (10v/w) 于25 (±) 5℃稀释, 并搅拌10-15分钟。然后在低于25 (±) 5℃的温度下将反应混合物缓慢添加至饱和碳酸氢钠溶液, 搅拌30-60分钟, 并用乙酸乙酯萃取。混合的有机层经硫酸钠 (1% w/w) 干燥, 过滤并在减压和低于40 (±) 5℃的温度下浓缩至最小体积。然后在低于45 (±) 5℃的温度下将所得产物与甲醇 (3vol.) 共蒸馏并冷却至25 (±) 5℃。添加了甲醇 (3vol.)。所得混合物的样品送至QC以检查HPLC。

[0619] 化合物106的制备 (图1, 阶段1f):

[0620] 将阶段1e所得的化合物105的混合物放入高压釜, 于25 (±) 5℃将反应混合物和甲醇 (8vol.) 共蒸馏, 并用氮气将所得的混合物脱气5-10分钟。添加10% 钨碳 (50% 湿润, 0.1% w/w) 并于25 (±) 5℃用氮气对反应混合物进行两次吹扫 (每次含3kg的H<sub>2</sub>)。然后施加4-5kg的氢气压力并将反应混合物加热至50 (±) 5℃并保持4-5小时。反应通过TLC监测。一旦反应完成, 则将反应混合物冷却至25 (±) 5℃, 在氮气气氛下通过硅藻土床过滤并用甲醇



洗涤硅藻土床。混合的滤液通过0.5微米过滤器过滤并在真空下过滤至不高于10体积剩余。所得产物的样品送至QC以检查GC纯度。

[0621] 化合物107的制备 (图1,阶段1g):将含有阶段1f所得的化合物106的混合物冷却至10(±)5℃并添加碳酸钠(3.0mol当量)。将反应混合物搅拌15-20分钟并向其添加50%CBz氯化物在甲苯中的溶液(1.0mol当量),同时将10(±)5℃的温度保持2小时。反应通过TLC监测。一旦反应完成,将反应混合物过滤并用甲醇(3vol.)于25(±)5℃洗涤。在真空和低于40(±)5℃的温度下将溶剂馏去至不高于1-2体积剩余,并将所得混合物冷却至25(±)5℃并用乙酸乙酯(3vol.)稀释。进行相分离并用饱和碳酸氢钠溶液(1.5vol.)和水(1vol.)洗涤有机相,经硫酸钠(1%w/w)干燥并过滤。

[0622] 有机溶剂在真空和低于40(±)5℃的温度下被完全馏去,藉此获得分离的化合物107。

[0623] 放大批次(Scale up batch)以60Kg规模完成,分离后的S-异构体化合物(99.5%光学纯度)的产量为33.9Kg(27%的整体产率)。

[0624] 化合物108的制备 (图1,阶段2):

[0625] 为制备化合物108,在过滤硫酸钠后,将含有化合物107的溶液蒸馏至最小体积,用乙腈(2vol.)稀释残留物,并在真空中于40(±)5℃共蒸馏所得混合物。然后将混合物冷却至25(±)5℃,加入乙腈(2vol.)并将混合物转移至下一步骤。

[0626] 于25(±)5℃添加乙腈(8vol.),接着加入三乙胺(3.2mol当量)和4-N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP,0.1mol当量),将反应混合物冷却至5(±)5℃并添加苯甲酰氯(59mL;1.2mol当量)。于5(±)5℃将反应混合物搅拌2小时。将样品送至QC进行HPLC监测。一旦反应完成,于25(±)5℃添加饱和碳酸氢钠(3vol.),并将所得混合物搅拌1-2小时。然后用乙酸乙酯(5vol.)萃取混合物,进行相分离且有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并在低于40(±)5℃的温度和真空中使溶剂完全蒸发,以得到作为黏性液体的化合物108。

[0627] 放大批次以30Kg规模完成,分离后的化合物108的产量为37.14Kg(75%)。

[0628] BB-D-OH的制备:

[0629] 为了制备BB-D-OH,在硫酸钠过滤后,将含有化合物108的溶液蒸馏至最小体积并加入乙酸。将溶剂共蒸发。将乙酸添加至所得残留物并将混合物转移至下一步骤。

[0630] 在1-2小时的期间内于25(±)5℃缓慢添加30%硫酸溶液,然后将反应混合物加热至28(±)5℃并于该温度搅拌36小时。将样品送至QC以通过HPLC检查SM含量。一旦反应完成,则将反应混合物冷却至25(±)5℃,用二氯甲烷(10vol.)稀释并搅拌30分钟。然后使反应混合物沉降1小时并使底部有机层和上部水性层分离。用水(5vol.x 3),饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤DCM层,经硫酸钠干燥并过滤。在真空和低于30(±)5℃的温度下浓缩滤液以得到呈浓浆状的粗产物。

[0631] BB-D-OH的纯化:

[0632] 将所得粗产物溶解于二氯甲烷,于25(±)5℃吸附至硅胶(100-200目),(3%w/w)并干燥。

[0633] 于25(±)5℃将二氯甲烷(20vol.)添加至硅胶(100-200目;12v/w;1.2kg)并于25(±)5℃将混合物倒入柱中。该柱用10vol.的二氯甲烷于25(±)5℃运行以形成合适的床。硅胶吸附的阶段-3粗产物装填至柱的顶部,并用二氯甲烷(10vol.)进行初步洗脱,然后用

二氯甲烷 (20vol.) 中的1%乙酸乙酯洗脱非极性杂质。接着使用二氯甲烷 (150vol.) 中的2.5%乙酸乙酯作为洗脱剂以回收化合物108的残留物。化合物108的洗脱完成后,用二氯甲烷中的15%乙酸乙酯对柱进行洗脱,直至所有BB-D-OH产物被洗脱。收集纯的级分并将样品送至QC以检查纯度。将所有被接收的级分混合并在低于30(±)5℃的温度下浓缩至最小体积并作为DCM溶液储存。将样品提交至QC以进行完整分析。

[0634] 一个放大批次以37.1Kg规模完成,以在柱纯化后提供20.6Kg的BB-D (57%产率),纯度为92% (通过HPLC测定)。

[0635] 另一放大批次以38.7Kg规模完成,以在柱纯化后提供19.8Kg (53%产率),纯度为95% (通过HPLC测定)。

[0636] 实施例2

[0637] BB-A的制备

[0638] 大规模生产BB-A的一般合成途径如图2所示。

[0639] 使用本领域已知的方法,将G418硫酸盐转化为G418的游离碱形式 (化合物111)。

[0640] 6-甲基巴龙霉胺的制备 (化合物112,图2,阶段-2):

[0641] 将纯化的G-418 (作为游离碱;1.0mol当量) 和HCl甲醇溶液 (MeOH HCl;10vol.) 的混合物加热至70(±)5℃保持24小时。通过HPLC监测反应进程,显示在24小时后,G-418约为4%。然后在真空下于70(±)5℃馏去甲醇 (2/3体积)。将反应混合物冷却至30(±)5℃并向其中加入MeOH HCl (10vol)。将所得混合物加热至70(±)5℃保持24小时。通过HPLC监测反应进程,显示在48小时后,G-418约为0.5%。然后将反应混合物冷却至5-10℃并搅拌1-2小时,然后过滤并在过滤器上干燥20-30分钟。将所得固体转移至含有乙醇的反应器中。将混合物冷却至0-10℃并在5-10℃下搅拌1-2小时,然后过滤,用冷乙醇洗涤并于50(±)50℃真空干燥5-6小时。

[0642] G-418放大反应的酸裂解以16.4Kg规模完成,分离后得到产量为12.7Kg (85%) 的6-甲基巴龙霉胺,含有0.47%的G-418。

[0643] 化合物113的制备 (6-甲基巴龙霉胺的CBz保护,图2,阶段-3):

[0644] 将6-甲基巴龙霉胺 (化合物112,1mol当量) 和二异丙基乙胺 (DIPEA) (10mol当量) 溶解在丙酮 (15vol) 和水 (15vol) 中。于30(±)5℃添加CBzCl (4mol当量) (作为甲苯中的50%溶液),并将反应混合物搅拌24小时。之后,将混合物用水 (10vol) 稀释,搅拌15-20分钟,然后过滤。于30(±)5℃将所得固体在丙酮 (20vol) 中搅拌1-2小时,在真空下过滤,并将所得浆料用丙酮 (5vol) 洗涤。于50-60℃将所得产物真空干燥3-4小时以得到作为白色固体的粗化合物113。

[0645] CBz保护反应以12.5kg规模完成,分离后得到产量为15.8Kg的三(tris)-CBz-6-甲基巴龙霉胺 (82%产率;HPLC测得的纯度为93%)。

[0646] BB-A的制备 (三-CBz-6-甲基巴龙霉胺的乙酰基保护;图2):

[0647] 将三-CBz-6-甲基巴龙霉胺 (化合物113,1.0mol当量) 溶解于吡啶 (2vol) 和DMF (3vol) 中,添加DMAP (0.1mol当量) 并将所得反应混合物于30(±)5℃搅拌10-15分钟。于30(±)5℃将乙酸酐缓慢分批 (1+1+1+1+0.5mol当量) 添加至反应混合物。通过HPLC监测反应进程。一旦反应完成,则将反应混合物用水 (10vol) 和乙酸乙酯 (10vol) 稀释并搅拌10-15分钟。此后分离有机层,水性层用乙酸乙酯 (5vol) 萃取。将混合的有机层用20% HCl水溶液

(10vol), 水 (10vol), 和盐水溶液 (10vol) 洗涤, 经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并在减压下浓缩以得到粗产物。

[0648] 粗产物在硅胶 (100目-200目) (20w/w) 柱上纯化, 使用乙酸乙酯和DCM (15-40%) 作为洗脱剂。收集含有产物的三个主要级分, 并在真空下浓缩。

[0649] 以15.5Kg规模完成放大反应, 分离后得到产量为16.5Kg (86%) 的BB-A。

[0650] 实施例3

[0651] ELX-02的制备

[0652] 大规模生产ELX-02的一般合成途径如图3所示。

[0653] BB-D的制备 (原位) :

[0654] 于 $25 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 向化合物BB-D-OH (图1) 在DCM (1.5mol 当量) 中的溶液里加入DCM (8vol.), 并将混合物搅拌10-20分钟。然后将溶液冷却至 $-5 (\pm) 5^\circ\text{C}$ , 于 $-5 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 向其中加入三氯乙腈 (3mol 当量), 并将所得混合物搅拌5-10分钟。将DCM (0.5vol.) 中的DBU (0.15mol 当量) 溶液缓慢添加至反应混合物中, 同时保持温度在 $-5 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 并将混合物搅拌2小时。通过HPLC监测反应进程。一旦反应完成, 则于 $10 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 将20%氯化铵溶液 (10vol.) 缓慢添加至反应混合物中。进行层分离, 有机层于 $5 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 用20%氯化钠溶液 (10vol.) 洗涤, 经无水硫酸钠 (1% w/w) 干燥。

[0655] 化合物121的制备 (BB-A和BB-D的偶联, 图3) :

[0656] 将含有原位制备的BB-D和BB-A (1mol 当量) 的有机层于 $10 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 混合在一起并搅拌10-15分钟。加入分子筛 (0.5% w/w) 并将混合物搅拌10-15分钟, 然后冷却至 $-15 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 。在保持温度为 $-15 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 的同时, 向反应混合物缓慢添加三氟化硼乙醚 ( $\text{BF}_3$ -Etherate, 0.1mol 当量) 在DCM (0.5vol.) 中的溶液, 并将所得混合物于该温度搅拌1小时。通过HPLC监测反应进程。一旦反应完成, 则将温度升至 $5 (\pm) 5^\circ\text{C}$ , 并缓慢添加饱和碳酸氢钠水溶液 (10vol.)。使所得混合物通过硅藻土床过滤, 并用DCM (5vol.) 洗涤硅藻土床。分离有机层, 并用DCM (5vol.) 萃取水性层。用氯化钠溶液 (5vol.) 洗涤混合的有机层, 并在大气压于 $45 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 浓缩。向残留物中添加甲醇 (2vol.), 然后于 $45 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 真空馏去。

[0657] 化合物122的制备 (图2; 乙酰基去保护) :

[0658] 将含有化合物121的前步骤的产物冷却至 $10 (\pm) 5^\circ\text{C}$ , 并加入甲醇氨 (25v/w)。于 $30 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 将反应混合物搅拌24小时, 并通过HPLC监测反应进程。一旦反应完成, 则将反应混合物于 $40 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 真空浓缩。将乙酸乙酯 (2vol.) 添加至残余物, 并于 $40 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 在真空下对溶剂进行共蒸馏。将所得混合物冷却至 $30 (\pm) 5^\circ\text{C}$ , 添加乙酸乙酯 (10vol.) 并将混合物搅拌30-40分钟, 过滤, 用水 ( $2 \times 10\text{vol.}$ ) 和盐水溶液 (10vol.) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并减压浓缩。将所得残留物与MTBE (2v/w) 于 $40 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 共蒸馏, 并将混合物冷却至 $30 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 。添加MTBE (20v/w), 并将混合物于 $30 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 搅拌2小时。将产物过滤并用MTBE (2vol.) 洗涤, 得到化合物122 (85% 产率; HPLC测得的纯度为98.2%)。

[0659] 化合物123的制备 (ELX-02游离碱; 图2; CBz去保护) :

[0660] 于 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 将化合物122 (1mol 当量) 和MeOH (10vol.) 混合, 添加水 (1vol.), 并将所得混合物搅拌10-15分钟。添加10% Pd/C (0.25% w/w) 并将所得混合物在氢气压力下于 $25 (\pm) 5^\circ\text{C}$ 搅拌24-36小时。通过TLC监测反应进程。一旦反应完成, 则将反应混合物通过硅藻土床过滤, 并用MeOH洗涤硅藻土床。于 $45 \pm 5^\circ\text{C}$ 将滤液真空浓缩。通过柱色谱法纯化粗产物

(纯度95.8%)。

[0661] ELX-02的制备(图2,成盐):

[0662] 将ELX-02游离碱(化合物123,1mol当量)在MeOH(10vol.)中的混合物搅拌10-15分钟然后冷却至0-10℃。将预冷的甲醇H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(2.0mol当量)溶液于0±5℃缓慢添加至混合物中,并将反应混合物于0-10℃搅拌20-30分钟,然后于30±5℃搅拌1-2小时,之后于45±5℃真空浓缩。添加丙酮(15vol.),并将所得混合物于25±5℃搅拌30分钟,过滤,并用丙酮(5vol.)洗涤滤饼,继而于40±5℃真空干燥6小时。得到作为硫酸盐的ELX-02,用HPLC测得的纯度为95.78%(产物:76.36%,硫酸盐峰:19.42%)。

[0663] 分别通过图4和5所示的H-NMR和质谱证实了所得产物的结构。

[0664] 实施例4

[0665] 无细胞实验中的读出活性

[0666] 试验方法:

[0667] 质粒在体外转录并使用兔网织红细胞(TNT混合物)转译,然后测试萤火虫和海肾荧光素酶的表达水平。WT质粒表达了萤火虫和海肾荧光素酶这两者,而突变质粒由于插入序列中的终止密码子而仅表达海肾荧光素酶。通过将化合物添加至体外转录/转译反应混合物中,对被测化合物和对照进行读出实验。在化合物抑制提前无义/终止密码子突变的情况下,萤火虫荧光素酶被表达并且观察到其表达的倍数变化。

[0668] 结果:

[0669] 使用实施例1和2中制造的ELX-02测试Rett综合征突变R270X的读出活性,基于萤火虫/海肾表达比值来计算突变抑制,并相对于WT和对照样品(无被测化合物)的表达水平进行标准化。

[0670] 图6A-B显示根据本发明的实施方式的针对ELX-02进行的Rett综合征突变R270X无义突变抑制剂剂量响应无细胞实验的结果,浓度范围为0-12μM。

[0671] 图6A显示终止密码子突变读出点图,其示出读出百分比作为具有ELX-02的WT的浓度的函数(读出至50%海肾),比较突变R270X的读出。以及图6B显示终止密码子突变读出点图,其示出暴露至来自未处理的对照的ELX-02后的读出倍数增加,作为ELX-02浓度的函数,比较突变R270X的读出。ELX-02在Rett综合征突变R270X的读出中显示剂量依赖性增加。

[0672] 尽管已结合本发明的特定实施方式描述了本发明,但是显然对于本领域技术人员而言,许多替代,修改,和变化将是显而易见的。因此,旨在涵盖落入所附权利要求书的精神和广泛范围内的所有这种替代,修改,和变化。

[0673] 本说明书中提及的所有公开,专利,和专利申请都通过引用整体并入本说明书,其程度如同每个单独的公开,专利,或专利申请被具体和单独地指示通过引用并入本文。此外,在本申请中对任何参考文献的引用或标识均不应解释为承认该参考文献可作为本发明的现有技术。对于章节标题的使用程度,不应将其解释为必然的限制。

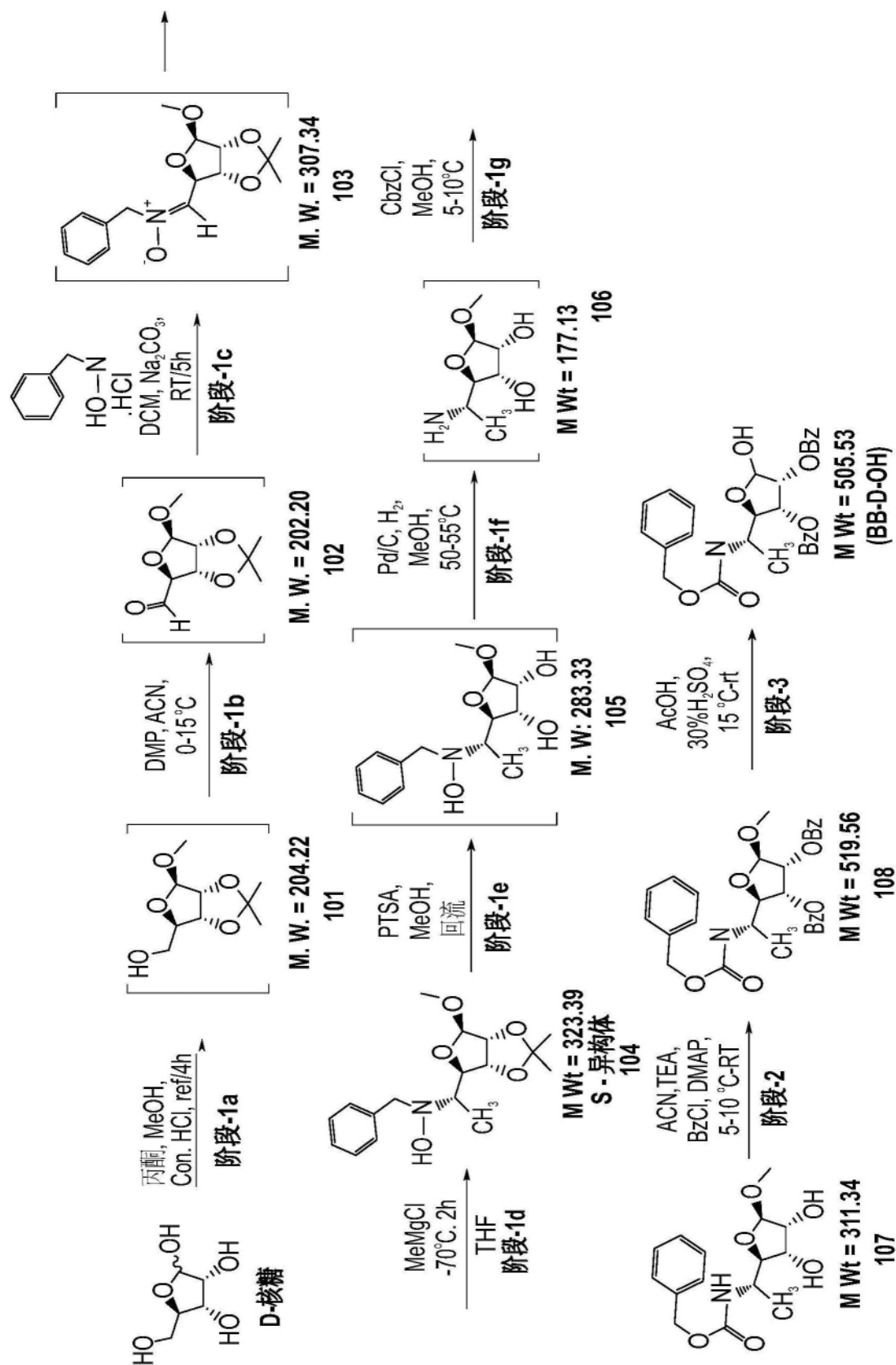


图1

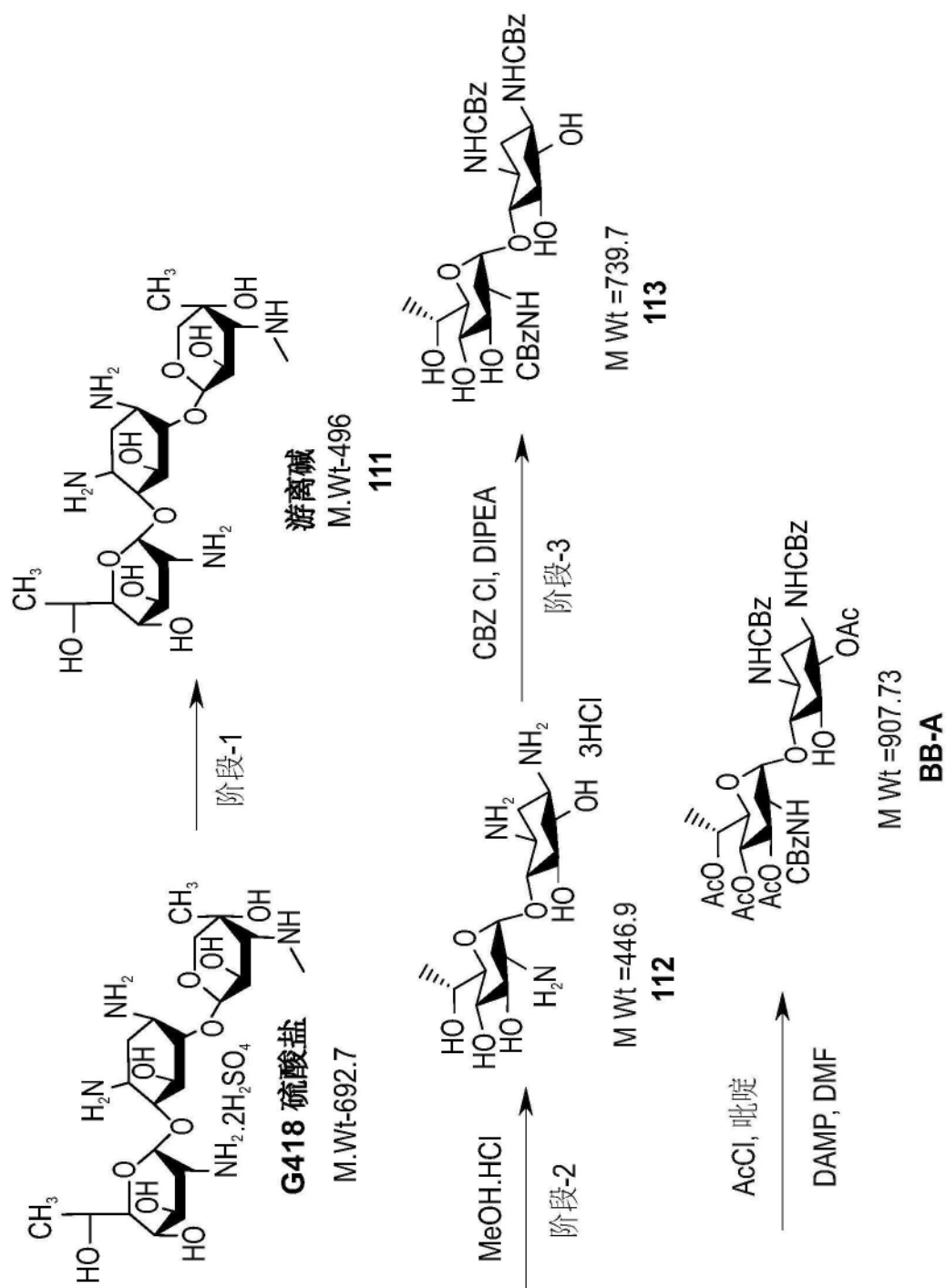


图2

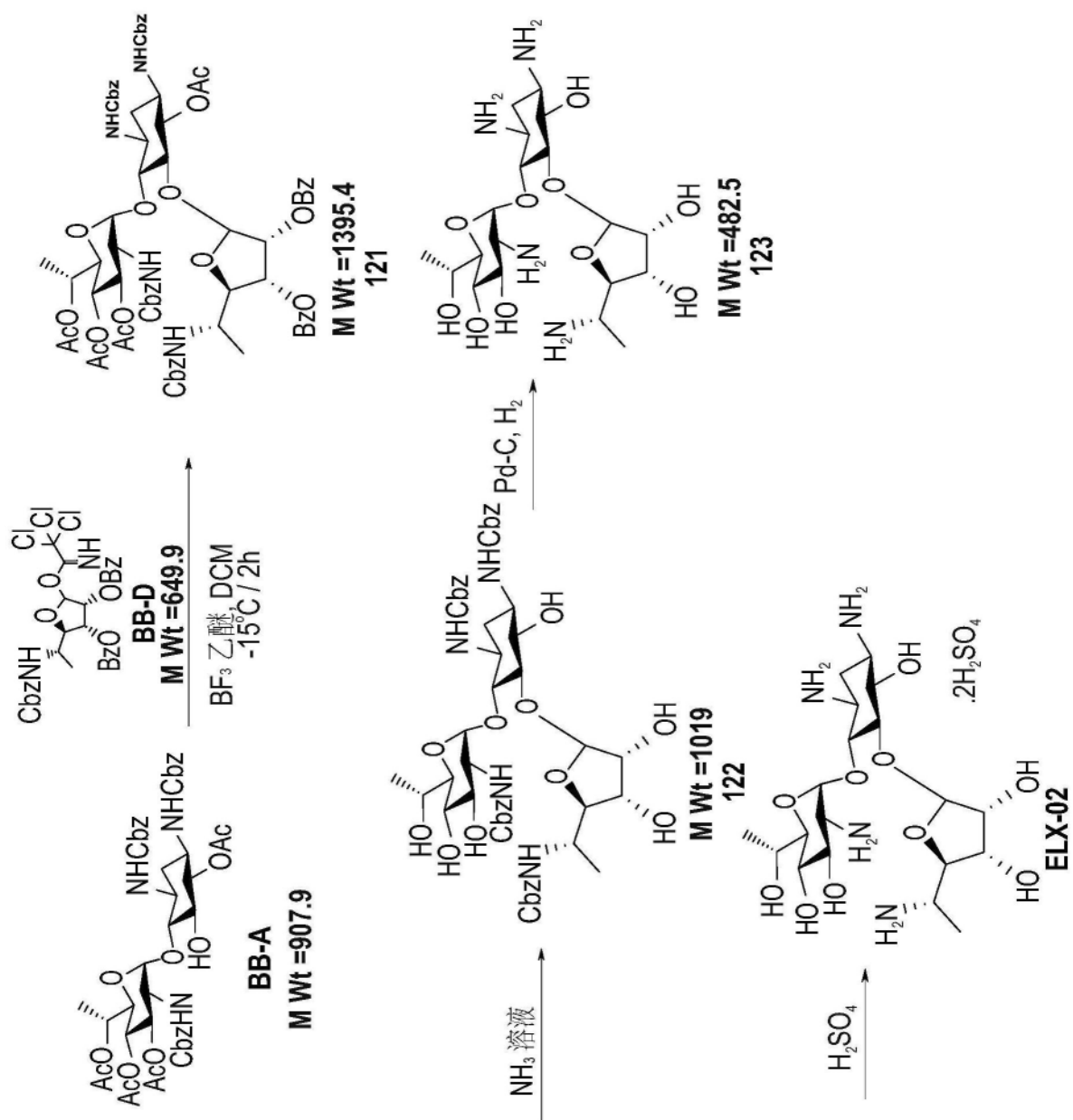


图3

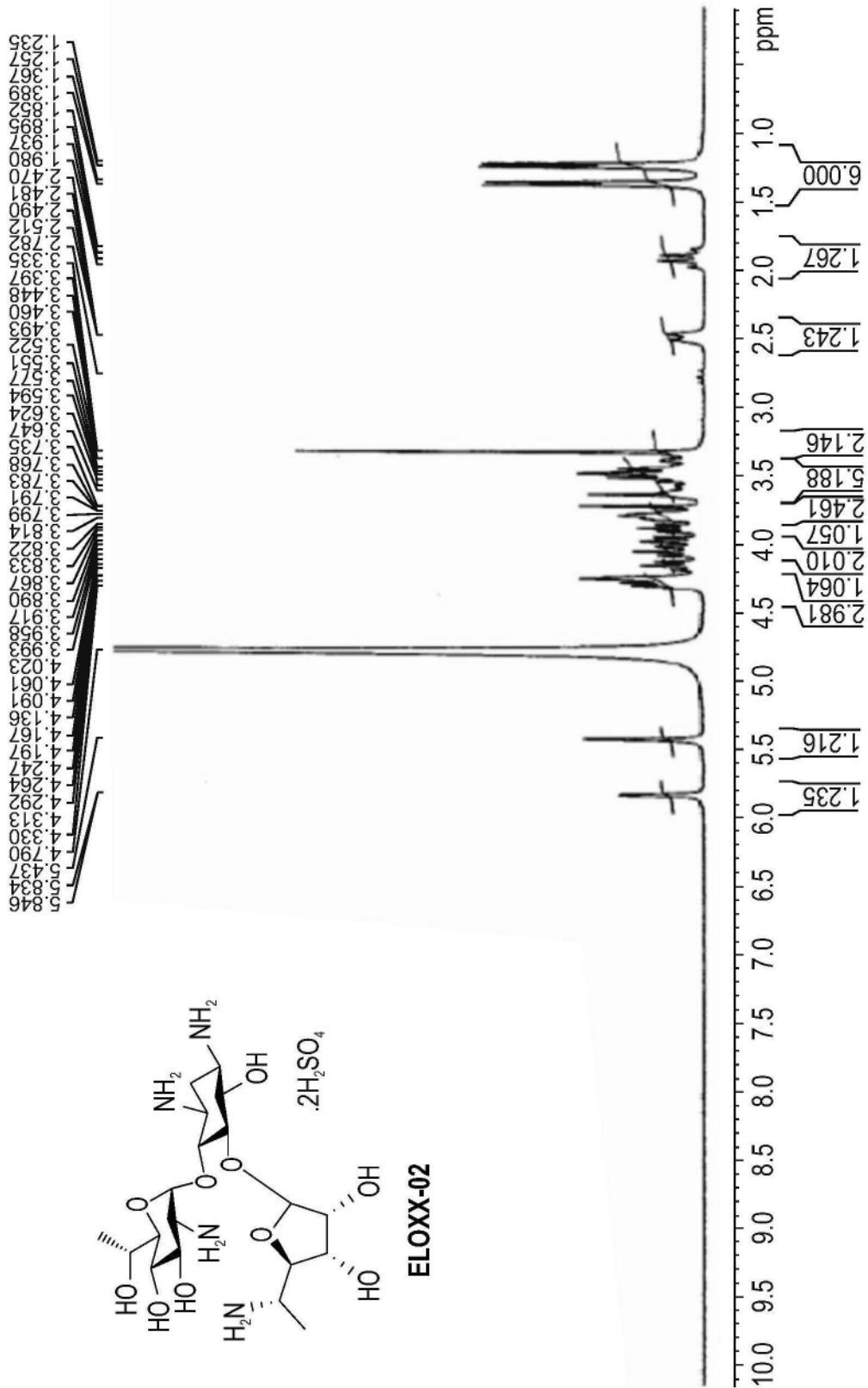


图4



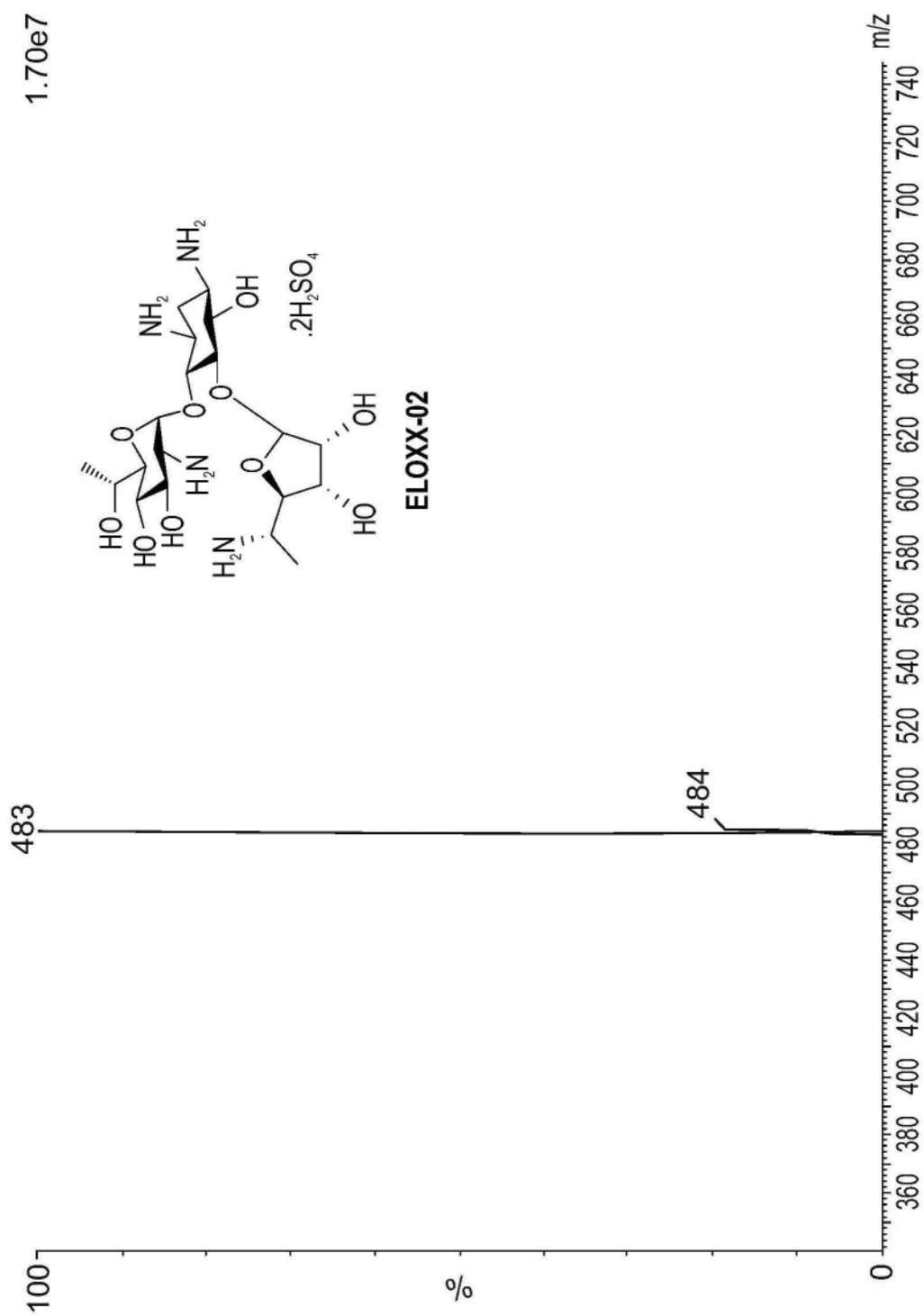


图5

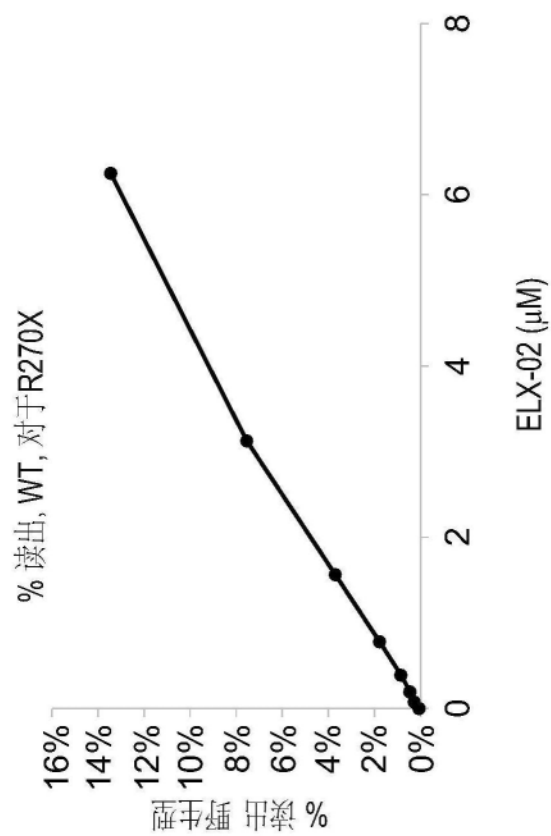


图6A

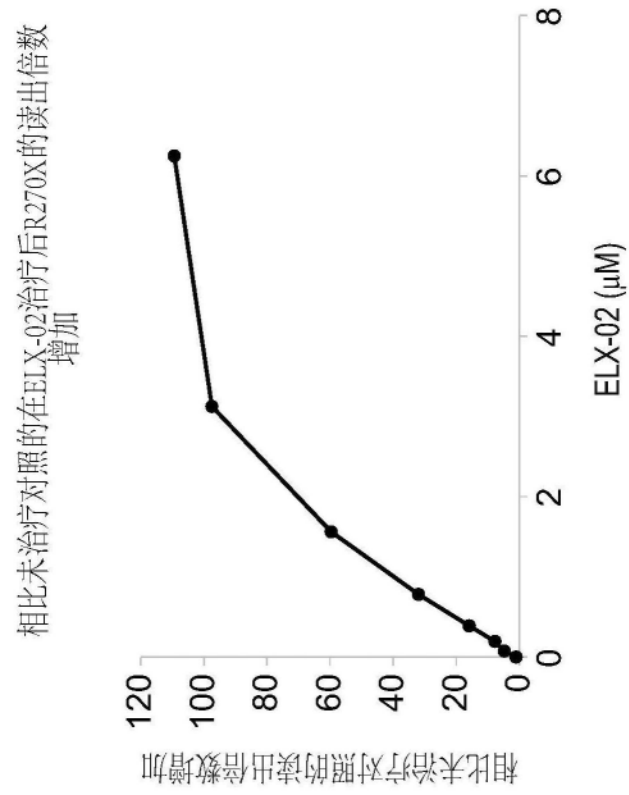


图6B