

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480020758.6

[51] Int. Cl.

C07C 43/205 (2006.01)

C07C 205/37 (2006.01)

C07C 217/84 (2006.01)

C07F 9/09 (2006.01)

A61K 31/09 (2006.01)

A61K 31/136 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月30日

[11] 公开号 CN 1826308A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/661 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2004.7.6

[21] 申请号 200480020758.6

[30] 优先权

[32] 2003.7.18 [33] GB [31] 0316910.9

[86] 国际申请 PCT/IT2004/000375 2004.7.6

[87] 国际公布 WO2005/007603 英 2005.1.27

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.18

[71] 申请人 希格马托制药工业公司

地址 意大利罗马

[72] 发明人 G·吉安尼尼 M·玛兹

D·欧络艾缇 M·O·廷缇

T·里茨欧尼 M·玛赛里尼

[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

代理人 陈轶兰

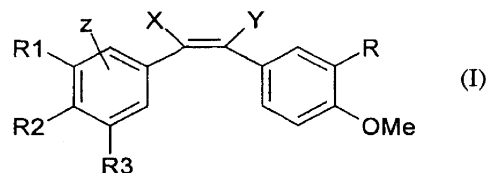
权利要求书4页 说明书21页 附图6页

[54] 发明名称

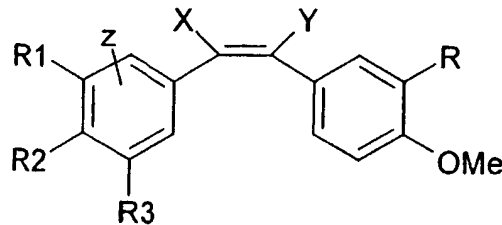
氟考布他汀及其衍生物

[57] 摘要

本发明涉及通过全合成得到的式(I)的新的考布他汀衍生物。对每种化合物开发的策略为：i)用卤素(即氟原子)替换烯键上的氢；ii)用氨基-芳环替换天然产物中的芳环。该化合物识别和结合微管蛋白位点：用于治疗细胞增殖导致或加剧的病理状态-作为哺乳动物的抗癌剂和/或具有抗血管生成活性-涉及包含这些化合物的药物组合物。



1. 式(I)的化合物、它们的药学上可接受的盐、外消旋物和单一对映异构体



其中:

$R_1$ 、 $R_2$ 和 $R_3$ 可以相同或不同, 为H、OMe、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NHR}'$ ;

X和Y, 彼此不同, 为卤素或H;

Z=H或卤素

$R=\text{OH}$ 、 $\text{OPO}_3\text{Na}_2$ 、 $\text{OCH}_2\text{OPO}_3\text{Na}_2$ 、 $\text{OR}'$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NHR}'$ ;

$R'=\text{H}$ 、烷基( $\text{C}_1\text{-C}_6$ )、 $(\text{COCHR}''\text{NH})_n\text{-H}$ ;

$R''=\text{H}$ 、氨基酸侧链、Ph;

n为1-3的整数。

2. 根据权利要求1的化合物, 选自:

X和Y中至少一个为卤素,  $R_1\text{-}R_3$ 为甲氧基, 而R为羟基的化合物;

X和Y中至少一个为卤素,  $R_1\text{-}R_3$ 为甲氧基, R为氨基或取代的氨基的化合物;

X和Y中至少一个为卤素,  $R_1\text{-}R_3$ 不同于甲氧基, R为羟基的化合物;

R为 $\text{OPO}_3\text{Na}_2$ 的化合物, 和

$R'$ 为 $(\text{COCHR}''\text{NH})_n\text{-H}$ 的化合物。

3. 根据权利要求1或2的化合物, 其中 $R''$ 为天然氨基酸的侧链。

4. 根据权利要求1的化合物, 选自:

$X=Y=\text{F}$ ;  $R=\text{OPO}_3\text{Na}_2$ : 二氟考布他汀;

X=Y=F; R=NH<sub>2</sub>: 二氟氨基考布他汀;

X=H; Y=F; R=OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>: 一氟考布他汀;

X=F; Y=H; R=OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>: 一氟考布他汀;

X=H; Y=F; R=NH<sub>2</sub>: 一氟氨基考布他汀;

X=F; Y=H; R=NH<sub>2</sub>: 一氟氨基考布他汀。

X= Br; Y=F; R=OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>: 溴氟考布他汀。

5. 制备 X 和 Y 均为 F 的权利要求 1 的化合物的方法, 包括以下步骤:

- a) 使 1-溴-1, 2-二氟-2-(4-甲氧基-3-(受保护的 OH)-苯基) 乙烯与 3-R<sub>1</sub>-4-R<sub>2</sub>-5-R<sub>3</sub>-苯基硼酸反应, 和
- b) 恢复 3-(受保护的 OH) 基团。

6. 制备 X 和 Y 之一为 F 而另一个为 H 的权利要求 1 的化合物的方法, 包括以下步骤:

- c) 使 X 和 Y 为 H 的式 (I) 的化合物溴氟化, 和
- d) 进行碱促进的 HBr 消除。

7. 制备 X 和 Y 之一为 F 的权利要求 1 的化合物的方法, 包括以下步骤:

- c) 将 X 和 Y 为 H 的式 (I) 的化合物转化成各溴醇, 和
- d) 进行碱促进的 HBr 消除。

8. 制备 X 和 Y 之一为 F 的权利要求 1 的化合物的方法, 包括以下步骤:

- a) 将 X 和 Y 为 H 的式 (I) 的化合物转化成各环氧化物;
- b) 打开环氧化物得到各溴醇, 和
- c) 进行碱促进的 HBr 消除, 或者可选择地,
- d) 打开环氧化物得到各氟醇, 和

e) 除去合适的羟基衍生物。

9. 制备 X 和 Y 之一为 F 而另一个为 Br 的权利要求 1 的化合物的方法，包括以下步骤：

a) 将 X 和 Y 为 H 的式 (I) 的化合物转化成各溴醇，和

b) 进行碱促进的 HBr 消除。

10. 权利要求 1-4 之任一项的化合物用于识别和结合微管蛋白位点的应用。

11. 权利要求 1-4 之任一项的化合物作为药物的应用。

12. 权利要求 1-4 之任一项的化合物用于制备治疗病理状态的药物的应用。

13. 根据权利要求 12 的应用，其中该病理状态为肿瘤。

14. 根据权利要求 13 的应用，其中该肿瘤选自肉瘤、癌、类癌、骨肿瘤、神经内分泌肿瘤、淋巴白血病、急性早幼粒细胞白血病、髓细胞白血病、单核细胞白血病、成巨核细胞白血病和非何杰金病、血管瘤和多发性骨髓瘤、间变性甲状腺癌。

15. 根据权利要求 5 的化合物作为抗转移剂的应用。

16. 根据权利要求 12 的应用，其中该病理状态由异常血管生成导致。

17. 根据权利要求 16 的应用，其中由异常血管生成导致的该病理状态选自肿瘤转移、关节炎病、糖尿病性视网膜病、黄斑变性、牛皮

癣、慢性炎性疾病或动脉硬化。

18. 根据权利要求 12 的应用，其中该病理状态为非肿瘤性疾病。

19. 药物组合物，包含至少一种权利要求 1-4 之任一项的化合物和至少一种药学上可接受的载体和/或赋形剂的混合物。

## 氟考布他汀及其衍生物

### 发明背景

肿瘤性疾病，其特征是不受正常细胞增殖控制的细胞增殖，是人和其它哺乳动物的主要死亡原因。癌症的化学治疗已提供新的和更有效的药物用于治疗这些疾病，并也已表明破坏微管合成的药物有效地抑制肿瘤细胞的增殖。

微管在细胞结构、代谢和分裂的调节中起关键作用。真核细胞的微管系统包括动态装配和解装配基质，其中微管蛋白的杂二聚体在正常和肿瘤细胞中聚合形成微管。在肿瘤细胞内，微管蛋白聚合成为形成有丝分裂纺锤体的微管。然后在有丝分裂纺锤体实现其应用时该微管解聚。破坏肿瘤细胞内的微管聚合或解聚，从而抑制这些细胞增殖的药剂包括某些最有效的正被使用的癌症化学治疗剂。

从非洲灌木柳树-矮生柳树 (*Combretum caffrum*) (使君子科) 中分离的考布他汀 A-4 (CA-4) (Pettit, G. R. 等人, : *Experientia*, 1989, 45, 209) 表现出作为与秋水仙碱结合部位共享或接近的部位与微管蛋白强烈结合的抗癌剂的令人兴奋的潜能 (Lin, C. N 等人, *Biochemistry*, 1989, 28, 6984)。与微管蛋白的结合防止它聚合成微管，其具有抗有丝分裂作用。CA-4 在低至毫微摩尔浓度下也抑制细胞生长，并与其它微管蛋白结合剂，例如秋水仙碱和鬼臼毒素共享许多结构特征。

磷酸盐 [CA-4P] (Pettit, G. R. 等人; *Anti-cancer Drug Des.* 1995, 10, 299)，具有比 CA-4 更好的水溶性，已进入 II 期临床试验。

考布他汀能够破坏肿瘤脉管系统，从而有效地使肿瘤得不到营养物质，这它们成为令人感兴趣的分子。

目前许多研究已表明，许多抗血管生成剂，例如 CA-4P，在良好表征的局部缺血诱导的增殖性视网膜病的鼠模型中可以抑制视网膜新

血管形成。

这些研究表明，CA-4P 或新的衍生物和其它抗血管生成剂，都可以用于治疗非肿瘤性疾病，例如局部缺血诱导的增殖性视网膜病 (Griggs, J. 等人, *Am. J. Pathol.*, 2002, 160(3), 1097-103)。

考布他汀、秋水仙碱和类似药物的两个芳环之间的空间关系是决定它们与微管蛋白结合的能力的一个重要结构特征 (McGown, A. T. 等人, a) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1988, 8(9), 1051-6; b) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11(1), 51-4)。

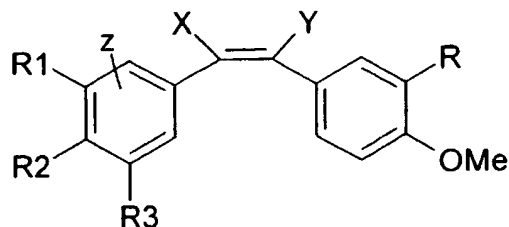
自从 80 年代以来，研究者已发现选择性地将氟引入生物活性分子对活性施加影响。因此，已描述了在药物设计中的重要努力，并已报道了许多掺入氟作为氢的生物等排替换的化合物 (Giannini, G., *Current Medicinal Chemistry*, 2002, 9, 687-712)。

### 发明概述

目前已发现，在不对顺式-茛菪基元进行任何修饰的情况下在烯键中引入强吸电子氟原子导致生物活性增加，或者在相同活性的情况下影响药效学活性。

已合成氟和溴氟茛。

因此，本发明的一个目的是式 (I) 的化合物、它们的药学上可接受的盐、外消旋物和单一对映异构体



其中：

$R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  可以相同或不同，为 H、OMe、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NHR}'$ ；

Z=H 或卤素；

X 和 Y，彼此不同，为卤素或 H；

$R=\text{OH}$ 、 $\text{OPO}_3\text{Na}_2$ 、 $\text{OCH}_2\text{OPO}_3\text{Na}_2$ 、 $\text{OR}'$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NHR}'$ ；

$R' = \text{H}$ 、烷基 ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ )、 $(\text{COCHR}''\text{NH})_n\text{-H}$ ;

$R'' = \text{H}$ 、氨基酸侧链、Ph;

$n$  为 1-3 的整数。

本发明的其它目的是用于制备上式 (I) 的化合物的方法。

本发明的另一目的是式 (I) 的化合物作为微管聚合生物试验中的受试化合物的应用。

式 (I) 的化合物具有至少相当于 CA-4 的抗微管蛋白活性 (J. Med. Chem, 2002, 45: 1697-1711)。

本发明的另一目的是式 (I) 的化合物作为药物, 特别是用于制备治疗由细胞增殖导致或加剧的病理状态的药物的应用。

本发明的另一目的是包含作为活性成分的至少一种式 (I) 的化合物和至少一种药学上可接受的载体和/或赋形剂的混合物的药物组合物。

还通过实施例和附图详细地例示本发明的这些和其它目的, 其中在后者中:

图 1: 合成二氟考布他汀;

图 2: 合成二氟硝基-和二氟氨基-考布他汀;

图 3: 合成一氟考布他汀;

图 4: 合成二氟考布他汀二钠-磷酸盐;

图 5: 合成一-二氟考布他汀二钠-氧甲基 (oxymetil) -磷酸盐;

图 6: 合成一-二氟氨基考布他汀氨基酸酰胺衍生物。

图 7: 合成溴氟考布他汀

本领域技术人员应该理解, 在图 1-7 中提供了用于本发明的优选化合物的合成方案, 但精通本领域技术的阅读者应该理解这些方案适用于本发明的整个范围, 只是要根据式 (I) 的含义选择适宜的原料, 并采用公知常识对反应条件和反应物进行显而易见的改变。

## 发明详述



根据本发明，卤素意指氟、氯和溴。

根据本发明，R"优选为天然氨基酸的侧链，特别是 Ala、Asn、Asp、Cys、Gly、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Tyr、Try、Val。

特别优选的化合物为式(I)的化合物，其中：

X和Y中至少一个为卤素，R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>为甲氧基，而R为羟基；

X和Y中至少一个为卤素，R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>为甲氧基，R为氨基或取代的氨基；

X和Y中至少一个为卤素，R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>不同于甲氧基，R为羟基

Z为氢或卤素；

R为OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>或OCH<sub>2</sub>OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>；

R'为(COCHR"NH)<sub>n</sub>-H。

特别优选的化合物是这样的化合物，其中

X=Y=F；R=OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>：二氟考布他汀；

X=Y=F；R=NH<sub>2</sub>：二氟氨基考布他汀；

X=H；Y=F；R=OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>：一氟考布他汀；

X=F；Y=H；R=OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>：一氟考布他汀；

X=H；Y=F；R=NH<sub>2</sub>：一氟氨基考布他汀；

X=F；Y=H；R=NH<sub>2</sub>：一氟氨基考布他汀。

X= Br；Y=F；R=OPO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>：溴氟考布他汀。

通过参考图中所附的合成方案详细描述本发明的化合物的制备方法。

本发明的化合物可以通过常规合成方法制备，但在本发明的某些优选的实施方案中，起始化合物是X和Y都为氢的式(I)的化合物。

X和Y都为F的式(I)的化合物的制备方法包括以下步骤：

a)使1-溴-1,2-二氟-2-(4-甲氧基-3-(受保护的OH)-苯基)乙烯与3-R<sub>1</sub>-4-R<sub>2</sub>-5-R<sub>3</sub>-苯基硼酸反应，和

b)恢复3-(受保护的OH)基团。

对于步骤 a)，可以通过现有技术中可获得的合成方法得到 1-溴-1,2-二氟-2-(4-甲氧基-3-(受保护的 OH)-苯基) 乙烯。例如，将 OH 被适宜保护的异香草醛转化成 1-溴-1,2-二氟-2-(4-甲氧基-3-(受保护的 OH)-苯基) 乙烯。

异香草醛是一种可商购得到的产品，3,4,5-三取代的-苯基-硼酸也可商购得到，或者可以通过常规方法得到。同样许多其它一、二和三取代的-苯基-硼酸也可商购得到。但是，可以通过常规方法得到原料。

步骤 a) 的反应在适宜的反应介质，例如有机溶剂或者水与溶剂的混合物中，在含水碱，例如碱金属碳酸盐存在下完成。使用催化剂是明智的，且优选的实例为  $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ 。反应温度根据所用的原料、溶剂和催化剂来选择。优选反应温度在反应介质的回流温度。

从羟基上除去保护部分是绝对常规的，并由本领域技术人员常规地完成。优选的保护基在可商购得到的有机甲硅烷氧基衍生物中可找到，例如叔丁基-二甲基-甲硅烷氧基苯基。用常规方法除去这些基团。

X 和 Y 之一为 F 而另一个为 H 的式 (I) 的化合物的制备方法包括以下步骤：

- a) 使 X 和 Y 为 H 的式 (I) 的化合物溴氟化，和
- b) 进行碱促进的 HBr 消除。

此方法公开在 Giannini, G., Gazz. Chim. It., 1997, 127, 545; Thakker D. R. 等人, J. Org. Chem., 1989, 54, 3091 中。

X 和 Y 之一为 F 的式 (I) 的化合物的也可以通过包括以下步骤的方法制备：

- a) 将 X 和 Y 为 H 的式 (I) 的化合物转化成各溴醇 (bromohydrin)，和
- b) 进行碱促进的 HBr 消除。

此方法公开在 Giannini, G., Gazz. Chim. It., 1997, 127, 545, Thakker D. R. 等人, J. Org. Chem., 1989, 54, 3091。

作为可替代的选择，X 和 Y 之一为 F 的式 (I) 的化合物可以通过包

括以下步骤的方法制备:

- a) 将 X 和 Y 为 H 的式 (I) 的化合物转化成各环氧化物;
- b) 打开环氧化物得到各溴醇, 和
- c) 进行碱促进的 HBr 消除, 或者可替选择地,
- d) 打开环氧化物得到各氟醇, 和
- e) 除去合适的 (opportune) 羟基衍生物。

此方法公开在 Giannini, G., Gazz. Chim. It., 1997, 127, 545; Thakker D. R. 等人, J. Org. Chem., 1989, 54, 3091 中。

X 和 Y 之一为 F 而另一个为 Br 的式 (I) 的化合物可以通过包括以下步骤的方法制备:

- a) 将 X 和 Y 为 H 的式 (I) 的化合物转化成各溴醇, 和
- b) 进行碱促进的 HBr 消除。

此方法公开在 Giannini, G., Gazz. Chim. It., 1997, 127, 545; Thakker D. R. 等人, J. Org. Chem., 1989, 54, 3091 中。

在一个优选的实施方案中, 原料化合物为考布他汀 A (式 I, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>=OMe, X 和 Y=H, R=OH)。

作为可替代的选择, X 或 Y 之一为 F 的一氟考布他汀衍生物可以通过全合成制备。

X 为 Br 和 Y 为 F 的式 (I) 的化合物的制备方法公开在方案 7 中。

药学上可接受的盐用文献中报道的常规方法得到, 且不需要任何进一步的描述。

如上述, 本发明的化合物用作药物, 并且由于它们对微管蛋白部位的活性它们可以用于制备治疗细胞增殖导致或加剧的病理状态的药物。

该病理状态的一个实例为肿瘤, 且其中实体或血液系统肿瘤都可以治疗, 例如肉瘤、癌、类癌、骨肿瘤、神经内分泌肿瘤、淋巴白血病、急性早幼粒细胞白血病、髓细胞白血病、单核细胞白血病、成巨核细胞白血病和何杰金病。

在本发明的另一方面, 该药物用于治疗由异常血管生成导致的病

理状态，例如肿瘤转移、关节炎病、糖尿病性视网膜病、牛皮癣、慢性炎性疾病或动脉硬化。

在本发明的进一步的实施方案中，该药物用于治疗非肿瘤性疾病，例如局部缺血诱导的增殖性视网膜病。

药物组合物包含至少一种式(I)的化合物作为活性成分，其量为产生明显治疗效果的量。本发明涵盖的组合物完全是常规的，并使用在制药工业中常规实施的方法获得，所述方法例如在 Remington's Pharmaceutical Science Handbook, Mack Pub. N. Y.-最新版中作了说明。根据选择的给药途径，组合物可以是固体或液体剂型，适于口、肠胃外或静脉内给药。根据本发明的组合物包含活性成分和至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。它们可以具体为制剂中的有用助剂，例如增溶剂、分散剂、助悬剂和乳化剂。

现有通过实施进一步例示本发明。

一般说明：在  $\text{CDCl}_3$  溶液中按照指示分别在 200 或 300 MHz 处记录  $^1\text{H}$ -和  $^{13}\text{C}$ -NMR 光谱。化学位移值以 ppm 为单位给出，而偶合常数以 Hz 为单位。用 Perkin-Elmer 241 型旋光仪得到旋光数据。用 Merck 预涂的硅胶 F-254 平板完成薄层色谱处理(TLC)。用 Macherey-Nagel 硅胶 60, 230-400 目完成快速色谱处理。根据标准方法干燥溶剂，并在氮气气氛下完成需要无水条件的反应。用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥包含最终产物的溶液，过滤，并在减压下用旋转蒸发器浓缩。

相同的缩写用于实验部分：TBDMSiCl (叔丁基二甲基氯硅烷)；Hex (己烷)；DAST (三氟化二乙基氨基硫)；DIPEA (二异丙基乙基胺)；PyBroP (溴-三吡咯烷基-磷鎓-六氟-磷酸盐)；TAEA (三(2-氨基乙基)胺)。

### 实施例 1

#### 合成二氟考布他汀(方案 1)

### 合成叔丁基-二甲基-甲硅烷基异香草醛(1)

往在 50 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中的 6.09 g (40 mmol) 异香草醛的溶液加入 6.64 g 的  $\text{TBDMSiCl}$  (44 mmol, 1.1 当量) 和 2.95 g (44 mmol, 1.1 当量) 的咪唑。将溶液于室温下搅拌 3 小时, 然后用 0.5 M  $\text{HCl}$  洗涤。在硅胶柱上使用己烷/乙酸乙酯 9:1 纯化粗产物, 得到 9g (33 mmol, 83%) 无色油。 $R_f=0.27$  (Hex. / 乙酸乙酯 95: 5)

MS (IS):  $[\text{MH}]^+=267.2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+=289.2$  (主峰)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0.2 (s, 6H,  $2\times\text{CH}_3$ ), 1.0 (s, 9H, tBu), 3.9 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.9–6.95 (d, 1H, CH), 7.4 (s, 1H, CH), 7.45–7.5 (d, 1H, CH), 9.8 (s, 1H, CHO)。

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): -4.4; 18.6; 25.9; 55.6; 111.9; 120.0; 126.5; 130.0; 146.0; 157.1; 191.0。

### 合成 2,2-二溴-2-氟-1-(4-甲氧基-3-叔丁基-二甲基-甲硅烷氧基苯基)乙醇(2)

使在 80 mL  $\text{Et}_2\text{O}/\text{THF}$  (1:1) 中的 2.66 g (10 mmol)  $\text{TBDMS}$ -异香草醛和 2.98 g (11 mmol, 1.1 当量)  $\text{CFBr}_3$  的混合物变为  $T=-130^\circ\text{C}$ ; 10 分钟内将在己烷中的 4.4 mL (11mmol, 1.1 当量) 2.5 M  $\text{BuLi}$  溶液加到该混合物。于  $T=-70^\circ\text{C}$  下 2 小时后需要加入 1.3 mL  $\text{BuLi}$  溶液和 0.3 mL  $\text{CFBr}_3$ , 以驱使反应完成。

用 60 mL  $\text{NH}_4\text{Cl}$  饱和溶液终止反应, 并用 20 mL 二乙醚稀释。用  $2\times 20$  mL 二乙醚反萃取水相, 收集有机级分, 并用无水硫酸钠干燥, 然后在硅胶柱上用己烷/乙酸乙酯 95:5 纯化得到 3.1 g (6.8 mmol, 68%) 蜡状固体。 $R_f=0.5$  (Hex. /  $\text{AcOEt}$  85:15)。

MS (IS):  $[\text{M}+\text{Na}]^+=479.1$ ; 481.1; 483.1 (1: 2: 1)

$[\text{M}-1]^- = 457.2$

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0.2 (s, 6H,  $2\times\text{CH}_3$ ), 1.0 (s, 9H, tBu), 3.8 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.0 (d, 1H, CH,  $3\text{JHF}=10\text{Hz}$ ), 6.8–6.9 (d, 1H, CHar), 7.0–7.1 (t, 2H,  $2\times\text{CH}$ )。

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 4.4; 18.6; 25.9; 55.6; 82.7; 83.0; 101.3; 105.6; 111.5; 121.3; 122.2; 127.5; 144.9; 152.2.

合成 1,1-二溴-1,2-二氟-2-(4-甲氧基-3-叔丁基-二甲基-甲硅烷氧基苯基)乙烷 (3)

-78 $^{\circ}\text{C}$ 下将在 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中的三氟化(二乙基氨基)硫 1.5 mL (11.2 mmol; 1.8 当量)加到在 14 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中的 2.84 g (6.2 mmol) 醇 DA 59 的溶液。在 2 小时内将反应混合物升温至 0 $^{\circ}\text{C}$ ，用 25 mL  $\text{NaHCO}_3$  饱和溶液终止反应，并用 20 mL 二乙醚稀释。用无水硫酸钠干燥有机相，并用制备 TLC 法，使用己烷/乙酸乙酯 98:2 纯化得到 1.8 g (4 mmol; 64.5%) 黄色油。 $R_f=0.43$  (Hex. /AcOEt 97:3)。

MS (IS):  $[\text{M}+\text{Na}]^+=483.1; 485.1; 487.1$  (1: 2: 1)

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0.2 (s, 6H, 2x $\text{CH}_3$ ), 1.0 (s, 9H, tBu), 3.8 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.6 (dd, 1H, CH, 3JHF=10Hz, 2JHF=44Hz), 6.8-6.9 (d, 1H, CHar), 7.0-7.1 (t, 2H, 2xCH)。

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): -4.4; 18.6; 25.9; 55.7; 96; 82.5; 82.8; 95.8; 96.1; 98.3; 98.7; 111.5; 121.1; 121.2; 122.4; 122.5; 124.4; 144.9; 152.8。

合成 1-溴-1,2-二氟-2-(4-甲氧基-3-叔丁基-二甲基-甲硅烷氧基苯基)乙烯 (4)

步骤 1. 制备四甲基哌啶溶液。将 1.9 mL (11.7 mmol; 3 当量) 2,2,6,6-四甲基哌啶溶于 4 mL 无水 THF; 将该溶液冷却至 -80 $^{\circ}\text{C}$ ，然后加入 3.9 mL (9.8 mmol; 2.5 当量) 在己烷中的 2.5 M BuLi 溶液。将该混合物于 0 $^{\circ}\text{C}$  下搅拌 2 小时。

步骤 2. 脱去溴化氢。将在 5 mL 无水 THF 中的 1.8 g (3.9 mmol) DA 62 的溶液加到先前冷却至 -100 $^{\circ}\text{C}$  的四甲基哌啶溶液。1 小时后用 10 mL HCl 0.1 N 洗涤反应物，并用 2x10 mL  $\text{Et}_2\text{O}$  反萃取水相。收集有机萃取物，并用无水硫酸钠干燥，然后在制备硅胶板上用正己烷/乙酸乙酯

97:3 纯化得到 857 mg (2.3 mmol; 59%) 产物。R<sub>f</sub>=0.8, 在 Hex./丙酮 8:2 中。

MS (IS): [M+Na]<sup>+</sup>=401.4; 403.4 (1:1)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0.2 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 1.0 (s, 9H, tBu), 3.8 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.8-6.9 (d, 1H, CH), 7.1-7.15 (d, 1H, CH), 7.2-7.3 (dd, 1H, CH)。

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): -4; 4; 18.6; 25.9; 55.7; 111.7; 120.5; 121.9; 122.0; 122.1; 124.3; 144.7; 151.9。

合成 (Z)-1,2-二氟-1-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-(4-甲氧基-3-叔丁基-二甲基-甲硅烷氧基苯基) 乙烯 (5)

将在 20 mL 甲苯中的 750 mg (1.98 mmol; 1 当量) DA 63、1.260 g (5.94 mmol; 3 当量) 3,4,5-三甲氧基苯基-硼酸、4mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M 溶液和 104 mg (0.09 mmol; 0.05 当量) Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> 的混合物回流过夜。然后将该溶液冷却至室温, 用无水硫酸钠干燥, 并使粗混合物通过短硅胶柱以除去催化剂。在硅胶板上用己烷/丙酮 8:2 色谱纯化粗产物, 得到 740 mg (1.6 mmol; 81%) 的油。R<sub>f</sub>=0.36, 在 Hex./丙酮 8:2 中。

MS (IS): [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>=484.1; [2M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>=950.1

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0.5 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 1.0 (s, 9H, tBu), 3.65 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 3.8 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.9 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.5-6.7 (t, 2H, 2xCH), 6.75-7.0 (dq, 3H, 3xCH)。

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): -4.6; 1; 18.6; 25.8; 25.9; 55.7; 56.2; 56.3; 56.4; 61.0; 61.1; 103.4; 105.5; 111.9; 121.0; 122.5; 122.6; 123.8; 145.1; 153.3; 153.8。

合成 (Z)-1,2-二氟-1-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基) 乙烯 (ST2303)

在 0°C 和惰性气氛下将在 THF 中的 1M 氟化四丁基铵的溶液 (9.4 mmol; 2 当量) 滴加到在 10 mL 无水 THF 中的 2.2 g (4.7 mmol) 苾 DA 64

的溶液(保存在分子筛上)。将反应混合物升温至室温,4小时后反应完全。将混合物倾入冰,并用 Et<sub>2</sub>O (3x20 mL) 萃取水相;收集有机萃取物,并用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。

在硅胶上用正己烷/丙酮 8:2 色谱纯化粗混合物得到 1.361 g (3.9 mmol; 83%)。

M. p. =135 °C

MS (IS): [M+H]<sup>+</sup>=353.0

[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>=370.0

[M+Na]<sup>+</sup>=375.0

[M-1]<sup>-</sup> 351.0

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 3.75 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 3.8 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.9 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.6 (宽, 1H, OH), 6.6 (s, 2H, 2xCH), 6.75-6.8 (d, 1H, CH), 6.85-6.9 (dd, 1H, CH), 7.0 (dd, 1H, CH)。

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 56.2; 61.1; 105.3; 105.4; 110.4; 114.5; 114.6; 121.1; 123.1; 123.6; 125.1; 125.6; 142.1; 145.6; 147.3; 147.5; 147.6; 153.1。

<sup>19</sup>F NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): -126.2 (d, J<sub>FF</sub>=14.8Hz), -130.3 (d, J<sub>FF</sub>=14.8Hz)。

## 实施例 2

### 合成二氟硝基-和二氟氨基考布他汀(方案 2)

#### 合成 2,2-二溴-2-氟-1-(3-硝基-4-甲氧基-苯基)乙醇(7)

使在 40 mL Et<sub>2</sub>O/THF (1:1) 中的 978 mg (5.4 mmol) 3-硝基-4-甲氧基-苯甲醛(6)和 1.6 g (5.9 mmol, 1.1 当量) CFBr<sub>3</sub> 的混合物变成 T = -130 °C; 10 分钟内将 3.7 mL (5.9 mmol, 1.1 当量) 在己烷中的 1.6 M BuLi 溶液加到混合物。

用 25 mL NH<sub>4</sub>Cl 饱和溶液终止反应,并用 20 mL 二乙醚稀释。用



2x20 mL 二乙醚反萃取水相，收集有机级分，并用无水硫酸钠干燥，然后在硅胶柱上用己烷/乙酸乙酯 95: 5 纯化得到 1.146 g (3.1 mmol, 57.4 %) 黄色油。R<sub>f</sub>=0.53 (Hex./AcOEt 6: 4)。

MS (IS): [M-1]<sup>-</sup> = 371.8

[M+AcO]<sup>-</sup> = 431.7

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 3.2 (bs, 1H, OH), 4.0 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.1-5.2 (m, 1H, CH), 7.05-7.15 (d, 1H, CH<sub>ar</sub>) 7.7-7.8 (d, 1H, CH<sub>ar</sub>), 8.05 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>)。

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 56.9; 81.5; 81.8; 98.9; 100.3; 104.6; 113.3; 126.3; 127.3; 134.3; 153.8。

#### 合成 1,1-二溴-1,2-二氟-2-(3-硝基-4-甲氧基-苯基)乙烷 (8)

-78 °C 下将在 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中的 (DAST 730 μL (5.58 mmol; 1.8 当量) 加到在 7 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中的 1.146 g (3.1 mmol) 的醇 (7) 的溶液。2 小时内将该反应混合物升温至 0 °C，用 15 mL NaHCO<sub>3</sub> 饱和溶液终止反应，并用 20 mL 二乙醚稀释。用无水硫酸钠干燥有机相，并在 SiO<sub>2</sub> 上用己烷/乙酸乙酯 7:3 进行色谱纯化，得到 960 mg (2.6 mmol; 84 %) 黄色油。R<sub>f</sub>=0.493 (Hex./AcOEt 7:3)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 4.0 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.55-5.80 (dd, 1H, CH, ), 7.1-7.2 (d, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7.7-7.8 (d, 1H, CH<sub>ar</sub>), 8.1 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>)。

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 29.9; 56.9; 94.4; 94.8; 97.0; 97.2; 97.4; 113.6; 124.1; 124.4; 126.2, 134.0, 139.4; 154.5。

#### 合成 (E)-1-溴-1,2-二氟-2-(3-硝基-4-甲氧基-苯基)-乙烯 (9)

步骤 1 制备四甲基-哌啶溶液。 将 1.3 mL (7.8 mmol; 3 当量) 2,2,6,6-四甲基-哌啶溶于 3 mL 无水 THF; 将该溶液冷却至 -80 °C, 然后加入 3.9 mL (9.8 mmol; 2.5 当量) 在己烷中的 2.5 M BuLi 溶液。将该混合物于 0 °C 下搅拌 2 小时。

步骤 2 脱去溴氢化。将在 5 mL 无水 THF 中的 960 mg (2.6 mmol) (8) 的溶液加到先前冷却至  $-100^{\circ}\text{C}$  的四甲基哌啶溶液。1 小时后用 10 mL HCl 0.1 N 洗涤反应物，用  $2 \times 10$  mL Et<sub>2</sub>O 反萃取水相。收集有机萃取物，并用无水硫酸钠干燥，然后在硅胶上用正己烷/乙酸乙酯 8:2 纯化得到 100 mg (0.34 mmol; 13%) 产物。

$R_f=0.36$ ，在 Hex./丙酮 8:2 中。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 4.0 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.1–7.2 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.8–7.9 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.2 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ )。

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 57.0; 113.6; 113.8; 120.5; 120.9; 124.6; 125.1; 125.4; 126.2; 126.3; 128.8; 129.3; 133.3; 134.0; 141.1; 141.3; 144.4; 144.6; 154.0。

### 合成 (Z)-1,2-二氟-1-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-(3-硝基-4-甲氧基-苯基) 乙烯 (10)

将在 4 mL 甲苯中的 90 mg (0.31 mmol; 1 当量) (9)、198 mg (0.93 mmol; 3 当量) 的 3,4,5-三甲氧基苯基-硼酸、0.6 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2M 水溶液和 19 mg (0.0016 mmol; 0.05 当量)  $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$  的混合物回流 2.5 小时。然后将该溶液冷却至室温，用无水硫酸钠干燥，并使该粗混合物通过短硅胶柱以除去催化剂。在硅胶上使用己烷/丙酮 8:2 色谱纯化粗产物得到 57 mg (0.15 mmol; 48 %) 黄色油。 $R_f=0.17$ ，在 Hex./丙酮 8:2 中。

MS (IS):  $[\text{M}+\text{H}]^+=382.4$ ;  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+=399.3$ 。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3.75 (s, 6H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ), 3.85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.0 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.6 (s, 2H,  $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.95–7.05 (dq, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.4–7.5 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.9 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ )。

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 29.9; 56.4; 56.9; 61.2; 105.9; 113.6; 125.1; 133.3; 153.7。

### 合成 (Z)-1,2-二氟-1-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-(3-氨基-4-甲氧基

### 基苯基) 乙烯 (ST2578)

往在 AcOH (5 mL) 中的 40 mg (0.105 mmol) 硝基-芪 (10) 的溶液加入锌粉 75 mg (1.15 mmol; 11 当量); 将混合物于室温下搅拌 1.5 小时。使该反应混合物通过 C 盐过滤, 并将该滤液蒸发至干。

在硅胶上用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  色谱纯化粗产物, 然后在制备 HPLC 上纯化得到 32 mg (0.091 mmol; 87 %) 白色固体。 $R_f = 0.31$ , 在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中。

使小部分 (4 mg) 得自制备 HPLC 的三氟乙酸盐通过离子交换柱 IRA402\* $\text{Cl}^-$ , 得到 3 mg 对应的 HCl 盐 (ST2578)。

MS (IS):  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 352.3$ ;  $[2\text{M}+\text{H}]^+ = 703.1$ 。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3.7 (s, 6H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ), 3.85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.0 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.6 (s, 2H,  $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.7–6.8 (t, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.85–6.90 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.95 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ )。

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 29.9; 55.9; 56.3; 56.5; 61.1; 105.0; 105.4; 110.5; 116.6; 121.6; 122.8; 123.1; 125.5; 125.9; 133.0; 143.1; 143.9; 146.6; 149.5; 153.3; 153.7。

### 实施例 3

#### 合成一氟考布他汀 (方案 3)

从天然 CA-4 开始合成两种区域异构 (regioisomeric) 一氟考布他汀的方便方法如下:

A) 溴氟化 CA-4, 然后进行碱促进的 HBr 消除 (Giannini, G., Gazz. Chim. It., 1997, 127, 545; Thakker D.R. 等人, J. Org. Chem., 1989, 54, 3091)。

B) 用 DAST 氟化得自 CA-4 的溴醇 (bromohydrin), 然后进行碱促进的 HBr 消除。

C) 由 CA-4 合成环氧化物, 打开环氧化物得到:

- 溴醇, 并如 B) 点继续, 或者
- 氟醇 (fluorohydrin), 然后除去适宜的羟基衍生物。

作为可替代的选择,可以根据方案 3a 通过全合成得到一氟考布他汀。

用于此方法的关键中间产物可以如以下关于 3,4,5-三甲氧基苯甲醛所例示的那样制备。

#### 合成 (E/Z)-1-氟-2-(3,4,5-三甲氧基苯基) 乙烯

将 1.63 g (6 mmol, 1.2 当量)  $\text{CFBr}_3$  加到在冰浴中保存的在 30 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中的 2.9 g (11 mmol, 2.2 当量)  $\text{Ph}_3\text{P}$  的溶液。此温度下 30 分钟后, 将 980 mg 3,4,5-三甲氧基苯甲醛加到该混合物, 在 2 小时内将该反应物升温至室温。用 50 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  稀释该混合物, 并用盐水洗涤。通过硅胶色谱法, 用己烷/ $\text{EtOAc}$  9:1 纯化粗产物得到 758 mg (2.6 mmol; 52%) 53:47 Z/E 的目标产物混合物, 为一种无色油。 $R_f=0.23$ , 在 Hex/ $\text{EtOAc}$  9:1 中。

MS (IS):  $[\text{M}+\text{H}]^+=291.0/293.0$

(Z)-异构体 (通过制备 HPLC 得到)

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3.88 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.89 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 6.66 (d,  $J=15.4$  Hz, 1H, CH), 6.75 (s, 2H,  $2\times\text{CH}_{\text{ar}}$ )。

(E)-异构体 (通过制备 HPLC 得到)

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3.87 (s, 9H,  $3\times\text{OCH}_3$ ), 5.93 (d,  $J=32.2$  Hz, 1H, CH), 6.65 (s, 2H,  $2\times\text{CH}_{\text{ar}}$ )。

此中间产物可以与适宜的硼酸进行典型的 Suzuki 样偶合。(参见方案 3a)。

#### 实施例 4

##### 合成二氟考布他汀的磷酸二钠前药 (方案 4)

用于合成二钠-磷酸盐前药的典型方法在文献中是已知的 (Pettit,

G. R. 等人, *Anti-Cancer Drug Design* 1998, 13, 183-191), 并被意图通用于具有游离酚部分的本文所述的所有化合物。作为举例, 本文报道了化合物 (6) 的二钠-磷酸盐前药的合成。

合成 (Z)-1, 2-二氟-1-(3, 4, 5-三甲氧基苯基)-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基) 乙烯 o-二苄基-磷酸盐 (11)

往冷却至  $-25^{\circ}\text{C}$  的在 1 mL 无水  $\text{CH}_3\text{CN}$  中的 30 mg (6) (0.09 mmol) 的溶液加入  $44\mu\text{L}$  (0.45 mmol; 5 当量)  $\text{CCl}_4$ 。混合 5 分钟后将  $33\mu\text{L}$  (0.19 mmol; 2.1 当量) 二异丙基-乙基胺、1 mg (0.009; 0.1 当量) DMAP 和  $29\mu\text{L}$  二苄基亚磷酸酯加到该溶液, 并将反应混合物于  $-10^{\circ}\text{C}$  下搅拌 1.5 小时。

通过倾入 5 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 M 终止反应; 用  $\text{AcOEt}$  (3x10mL) 洗涤水相, 并用 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  反萃取有机相, 然后用 10 mL  $\text{NaCl}$  饱和溶液萃取。用硅胶色谱法, 使用己烷/ $\text{AcOEt}$  6:4 纯化粗混合物得到 55 mg 无色油 (0.088; 98%)。  $R_f=0.32$ , 在  $\text{Hex.}/\text{AcOEt}$  6:4 中。

MS (IS):  $[\text{M}+\text{H}]^+=613.4$ ;  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+=630.2$ ;  $[\text{M}+\text{Na}]^+=635.0$ 。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3.70 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ); 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5.65 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 5.70 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 6.55 (s, 2H,  $2\times\text{CHar.}$ ); 6.80-6.85 (d, 1H,  $\text{CHar.}$ ); 7.10-7.15 (dd, 1H,  $\text{CHar.}$ ); 7.25 (s, 1H,  $\text{CHar.}$ ); 7.35-7.45 (m, 10H,  $\text{CHar.}$ )。

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 29.6; 29.9; 56.1; 56.3; 56.4; 61.1; 70.1; 70.3; 104.3; 105.4; 106.4; 109.1; 112.6; 115.1; 121.7; 125.0; 126.6; 128.1; 128.2; 128.8; 128.9; 129.2; 130.9; 132.3; 135.7; 145.5; 153.2; 153.4。

合成 (Z)-1, 2-二氟-1-(3, 4, 5-三甲氧基苯基)-2-(3-羟基-4-甲氧基苯基) 乙烯 o-二钠磷酸盐 [ST2493]

在三颈圆底烧瓶中, 并在  $\text{Ar}$  气氛下, 往在 1.5 mL 无水  $\text{CH}_3\text{CN}$  中的 50 mg (0.08 mmol) 的 (11) 的溶液加入 24 mg (0.16 mmol; 2 当量)  $\text{NaI}$ 。

将该混合物于室温下搅拌 10 分钟，然后滴入在 1 mL CH<sub>3</sub>CN 中的 20 μL (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl (0.16 mmol; 2 当量) 的溶液。

1.5 小时后加入 1 当量的 NaI 和 1 当量的 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl 以完成反应。加入水 (正好足以溶解盐)，并通过加入 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 水溶液 (1 mL) 除去浅黄色。分离有机相，并用 AcOEt (4x4mL) 萃取水相。将合并的有机萃取物浓缩得到黄色蜡状固体。

将该固体溶于 1.5 mL 无水 MeOH (保存在分子筛上)，加入 9 mg (0.16 mmol; 2 当量) 甲醇钠，并将该溶液于室温下搅拌 12 小时。在真空下除去甲醇，并用水-丙酮和甲醇-丙酮重结晶固体得到 35mg (0.073 mmol; 91%) 化合物 (ST2493)，为一种白色固体。

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 3.60 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>); 2.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.8 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.70 (bs, 2H, 2xCHar.); 6.85 (bs, 2H, 2xCHar.); 7.55 (s, 1H, CHar.)。

### 实施例 5

#### 合成一二氟考布他汀-4-0-甲氧基磷酸二钠 [12]

通过方案 5 所述的途经制备前药 12。首先用典型的甲氧基-磷酸化方法，使用氢化钠处理酚残基，然后用如已描述的方法 [Mantyla A. 等人, Tetrahedron Lett. 2002, 43, 3793-4] 制备的受保护的磷酸氯甲酯处理。使用饱和 EtOAc/HCl 溶液除去保护基，然后在 NaOH/H<sub>2</sub>O 溶液中进行二钠盐制备。

### 实施例 6

#### 合成一二氟氨基考布他汀氨基酸酰胺衍生物 [13]

根据方案 6，从氨基芪衍生物开始，通过 Fmoc 路线与氨基酸偶合，然后裂解 α-氨基保护基 [G. R. Pettit 等人, J. Med. Chem 2002, 46, 525-31]。

### 实施例 7

### 合成溴氟氨基考布他汀 [14]

根据方案 7 的方法, 用快速色谱分离后分离出溴氟考布他汀的两种异构体 (E 和 Z)。

### 细胞培养和细胞毒性试验

如 Folkman (Folkman J., Haudenschild C.C., Zetter B.R. Long-term culture of capillary endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1979 Oct; 76 (10): 5217-21) 所述从牛肾上腺得到牛微血管内皮细胞 (BMEC) 的原代培养物。将 BMEC 维持在补充 20% 胎牛血清 (FCS)、50 单位/ml 肝素 (Sigma, St. Louis, MO)、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  牛脑提取物、100 单位/ml 庆大霉素的 DMEM 中。HUVEC (人脐静脉内皮细胞) 购自 BioWhittaker (Walkersville, MD), 并在 EGM-2 (BioWhittaker) 中生长。EA-hy 926 细胞系, 一种 HUVEC-腺癌永生细胞杂交体, 获自 Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana (Università di Bari, Italy), 并在补充 10% 血清和 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  硫酸庆大霉素的 DMEM 中培养。

以下细胞系购自 ATCC, 并根据制造商指示培养: NCIH460 人肺癌、MeWo 人黑素瘤、MES-SA 人子宫肉瘤和 HCT116 人结肠直肠癌。HT-29 人结肠腺癌细胞和 A2780 人卵巢癌获自 Istituto Nazionale Tumori (Milan, Italy), 在含有 10% 胎牛血清 (GIBCO) 和 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  硫酸庆大霉素的 RPMI 1640 (GIBCO) 中生长。

为测试 ST2303 对生长的影响, 以大约 10% 融合将细胞接种于 96 孔组织培养平板 (Corning), 并使其贴壁和恢复至少 24 小时。然后将不同浓度的化合物加到每孔。将该平板温育 24 小时, 然后洗涤, 接着再将它们温育 48 小时。随后如 Skehan 等人 (1990) 所述, 通过用硫代若丹明 (sulforhodamine) B 染色来测定存活细胞数。通过 "ALLFIT" 计算机程序评价 ST2303 对不同细胞系的抑制浓度  $50 (\text{IC}_{50}) \pm \text{SD}$ , 显示在表 1 中。

表 1 (ST2303)

细胞系	IC <sub>50</sub> ±SE (nM)
BMEC	1±0.5
HUVEC	1±0.3
EAHY.926	5±0.5
NCI-H460	3±0.005
HT29	>200
MeWo	3.6±0.0003
A2780	3±0.001
MES-SA	<1
HCT 116	2.2±0.05

### 肿瘤生长评价

将来自体外细胞培养物的 NCI-H460 人肺癌皮下注射 ( $3 \times 10^6$  细胞/100 $\mu$ l/小鼠) 至 CD-1 裸鼠的右肋。在肿瘤植入后 4 天, 开始根据以下方案用剂量为 50 mg/kg 的 ST2493 腹膜内治疗小鼠: qdx5/w/3wks。使用相同剂量的 CA-4P (考布他汀 A-4 P) 作为阳性对照。

在整个治疗期间将所有动物称重, 以调节给药体积, 并记录由疗程导致的体重减轻百分率。

在用相同动物模型进行的以下实验中, 根据 q2dx6 方案静脉内施用剂量为 25 和 50 mg/kg 的 ST2493 (ST2303 的前药)。

通过每周二次用游标卡尺测量各个肿瘤的最短的直径 (宽度) 和最长的直径 (长度) 来评价肿瘤生长, 并根据肿瘤生长抑制百分率评价抗肿瘤活性。根据下式, 使用测径法计算肿瘤体积 (或肿瘤重量\*): 肿瘤体积或 TV ( $\text{mm}^3$ ) = [长度 (mm) x 宽度 (mm)<sup>2</sup>] / 2。

根据以下方程计算肿瘤体积抑制百分率 (% TVI):  $100 - [(\text{治疗组的平均肿瘤体积} / \text{对照组的平均肿瘤体积}) \times 100]$ 。P $\leq$ 0.05 的值被认为在统计学上是显著的。



结果在表 2 中报道, 表明与载体相比腹膜内和静脉内施用 ST2493 都产生明显的 TVI。在腹膜内治疗中, ST2493 与相同剂量的 CA-4P 的比较表明在这两种化合物之间有显著差异(在第 11 天  $p=0.0095$ , 在第 28 天  $p=0.0180$ , Mann Whitney's 检验)。

表 2

治疗	n	% BWL	死亡率	%TVI	
				11	28
载体 (盐水)	8	0	0/8	/	/
ST2493 i. p. 50mg/kg	8	8	0/8	68**	73***
CA-4P i. p. 50mg/kg	8	3	0/8	47**	61***
ST2493 i. v. 25mg/kg	8	8	0/8	63**	64***
ST2493 i. v. 50mg/kg	8	8	0/8	73**	73**

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  相对于载体 (Mann Whitney's 检验)

### 微管蛋白聚合抑制试验

用 CytoDINAMIX Screen™ 进行微管蛋白聚合试验。用来自 Wallac 的 Victor2 测定微管蛋白聚合导致的浊度。用含有加了 5%甘油的 1mM GTP (GPEM) 的缓冲液 PEM [100mM PIPES (pH 6.9)、1mM EGTA 和 1mM  $MgCl_2$ ] 将 HTS-微管蛋白稀释至 3mg/ml, 并在冰上保持。然后将等分试样的此溶液于 37°C 下在紫杉醇 (3 $\mu$ M) 或秋水仙酰胺 (3 $\mu$ M) 或考布他汀 (ST1986) 或待检化合物存在下放置, 并在 340nm 处测定吸光度。用 "Prism GraphPad" 软件进行非线性回归分析来测定  $IC_{50}$  值。

表 3 所示的值为 3 次独立测定的平均值。

表 3

化合物	IC <sub>50</sub> ±SE (μM)
ST2303	7.7±0.12
ST1986	14.4±5.8

图1

方案1: 二氟考布他汀的合成

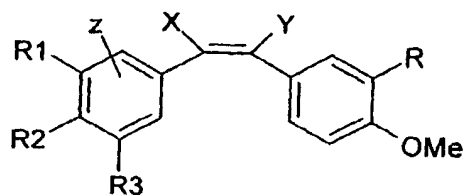
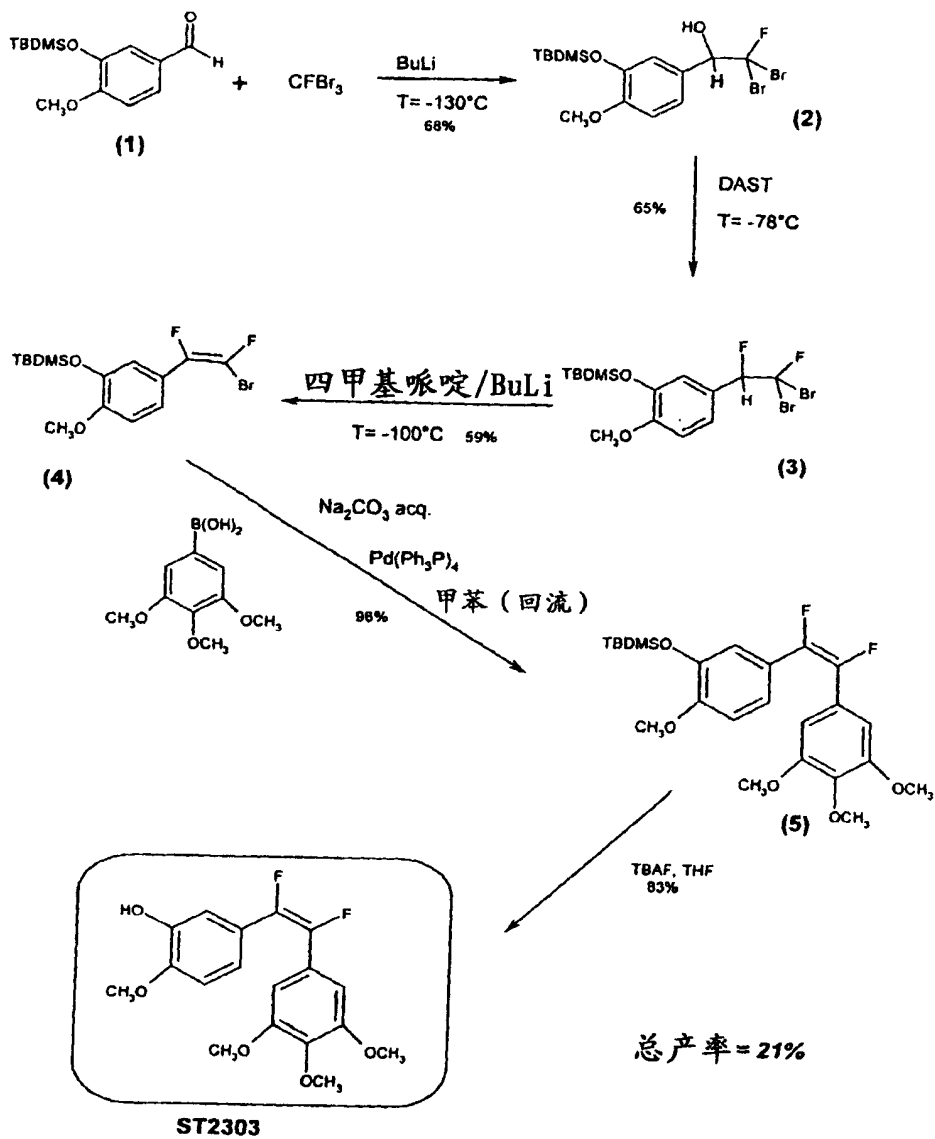


图2

方案2: 二氟-硝基-和二氟-氨基-考布他汀的合成

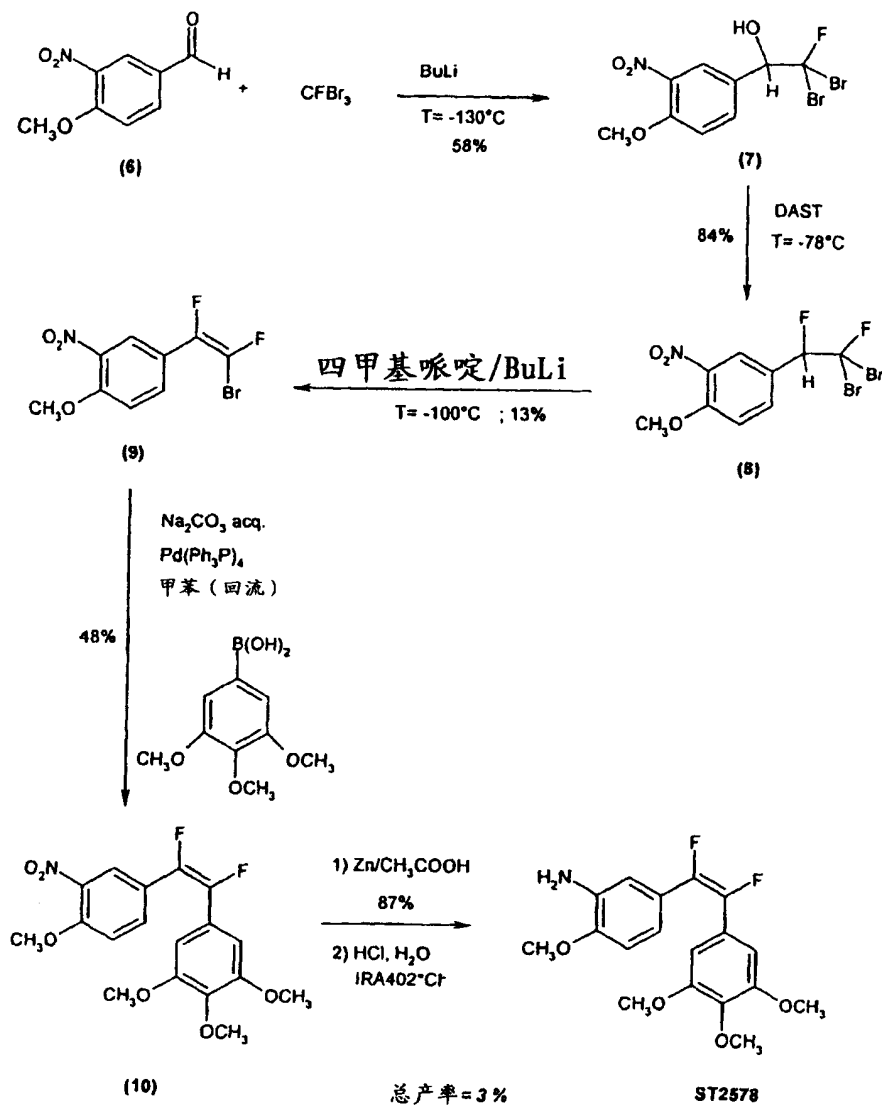
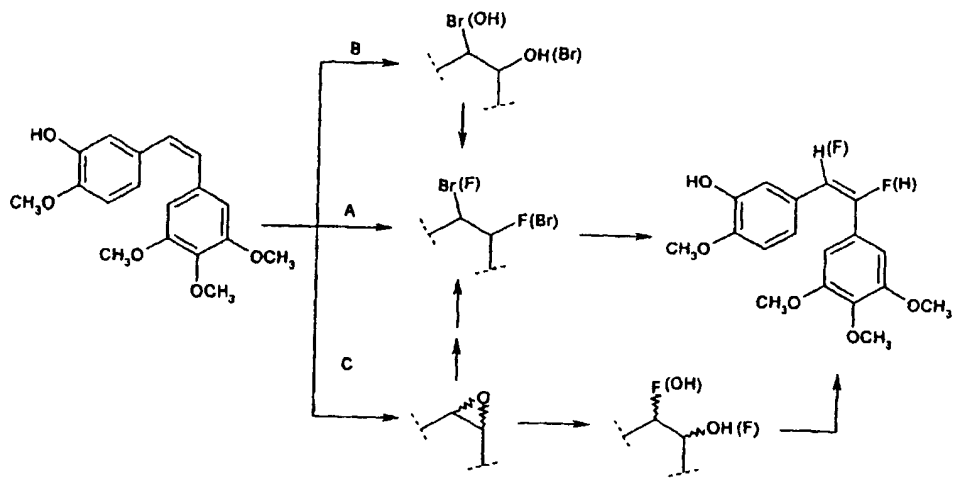


图 3

## 方案3: 一氟考布他汀的合成



## 方案3a: 一氟考布他汀的总合成途径

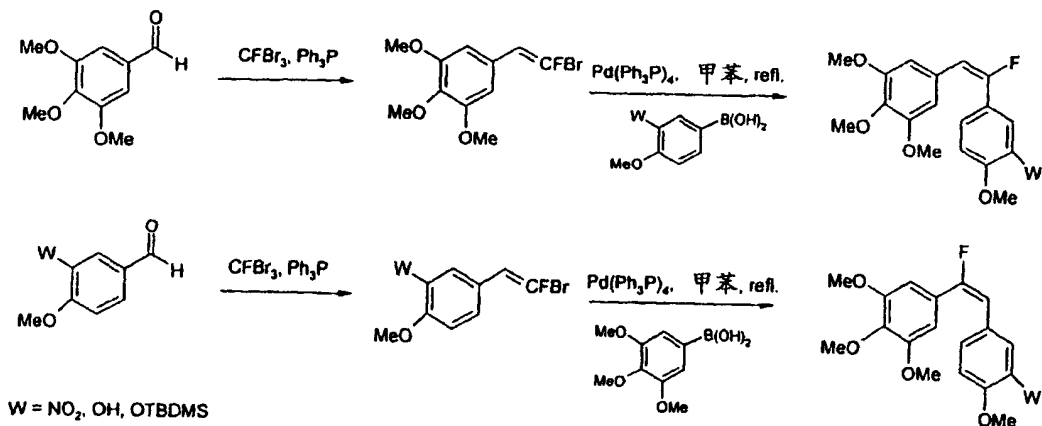


图4

方案4: 磷酸二钠前药二氟考布他汀 (ST2493) 的合成

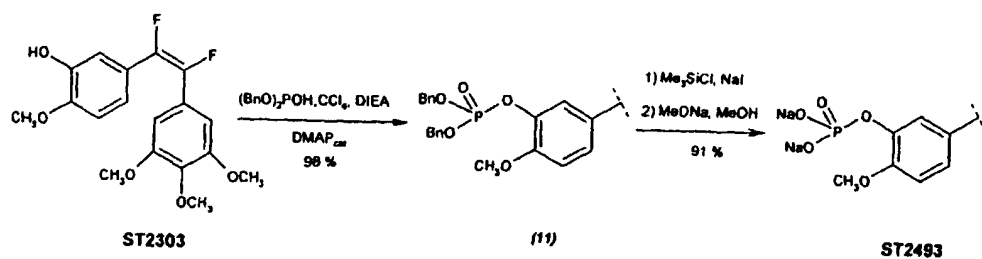


图5

方案5: 二氟考布他汀-4-O-甲氧基磷酸二钠的合成

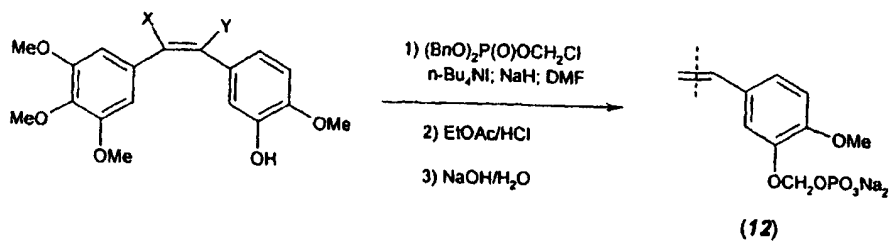


图6

方案6: 获得酰胺衍生物 [13] 的通用程序

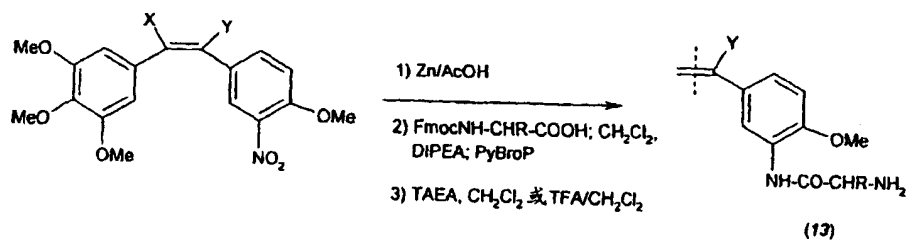


图7

## 方案7: 溴氟考布他汀的合成

