



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103764667 B

(45)授权公告日 2017.06.20

(21)申请号 201280019732.4

(22)申请日 2012.03.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103764667 A

(43)申请公布日 2014.04.30

(30)优先权数据

11158481.9 2011.03.16 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.10.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/054294 2012.03.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/123423 DE 2012.09.20

(73)专利权人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 H-G·莱尔臣 S·埃尔 谢赫

B·斯泰尔特-路德维希

J·舒马赫 M·格诺特

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 马彦

(51)Int.Cl.

C07K 5/02(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

W0 02088172 A2,2002.11.07,

W0 2005081711 A2,2005.09.09,

W0 03008378 A1,2003.01.30,

审查员 徐莉

权利要求书7页 说明书50页

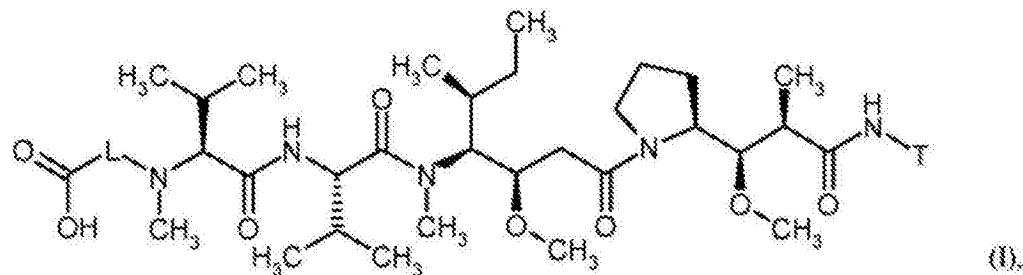
(54)发明名称

N-羧烷基耳他汀类及其应用

(57)摘要

本申请涉及N末端被羧基烷基取代的新型单甲基耳他汀E和单甲基耳他汀F衍生物、制备这些衍生物的方法、这些衍生物用于治疗 and/或预防疾病的用途,还涉及这些衍生物用于制备治疗和/或预防疾病的药物的用途,所述疾病更具体地是过度增殖性疾病和/或血管生成疾病,例如癌症。这种治疗可以采用单一疗法的形式或者与其它药物或其它治疗性措施相结合。

1. 一种式 (I) 的化合物或其盐,

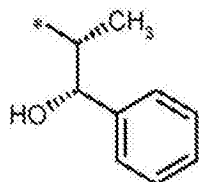


其中

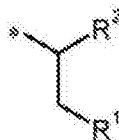
L表示直链 (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷二基, 所述直链 (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷二基最多可被甲基取代四次, 并且在所述直链 (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷二基中 (a) 两个碳原子可以以1,2位、1,3位或1,4位的形式彼此桥连, 从而任选地在这两个碳原子之间形成 (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-环烷基环或苯环, 或者 (b) 最多三个彼此不相邻的CH<sub>2</sub>基团可被-O-代替,

并且

T代表下式的基团,



或



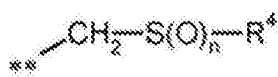
式中

\*表示与氮原子的连接位点,

R<sup>1</sup>表示苯基或1H-吡啶-3-基,

并且

R<sup>2</sup>表示氢或下式的基团



或



式中

\*\*表示与各自的T基团的各自连接位点,

A表示直链 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷二基或直链 (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-烯二基

R<sup>3</sup>表示可被 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧羰基或羧基取代的苯基,

n表示0,1或2的数字,

R<sup>4</sup>表示苯基、苄基或2-苯基乙基, 这些基团可被 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧羰基或羧基取代,

Het表示最多含有三个选自N,O和/或S的环杂原子的二价5元杂芳环,

并且

R<sup>5</sup>表示可被苯基取代的 (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-环烷基、苯基或 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基,

其中上述苯基可相应地被 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧羰基或羧基取代。

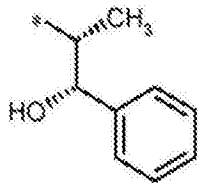
2. 如权利要求1所述的式 (I) 的化合物或其盐, 其特征在于,

L表示直链 (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-烷二基, 其中 (a) 两个碳原子可以通过与位于所述两个碳原子之间的一个或两个碳原子一起形成苯基环而以1,3位或1,4位的形式彼此桥连, 或者 (b) 最多两

个彼此不相邻的CH<sub>2</sub>基团可被-O代替，

并且

T代表下式的基团，



或



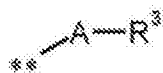
式中

\*表示与氮原子的连接位点，

R<sup>1</sup>表示苯基或1H-吡啶-3-基，

并且

R<sup>2</sup>代表氢或下式的基团



或



式中

\*\*表示与相应的T基团的连接位点，

A表示乙烯-1,2-二基或丙烯-1,3-二基，

R<sup>3</sup>表示可被(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧羰基或羧基取代的苯基，

Het是选自吡唑基、咪唑基、1,3-噁唑基、1,3-噻唑基、1,2,4-噁二唑基和1,3,4-噁二唑基的二价5元杂芳环，

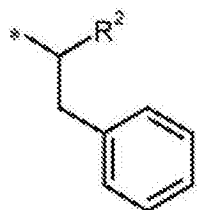
并且

R<sup>5</sup>表示可被(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧羰基或羧基取代的苯基。

3. 如权利要求1所述的式(I)的化合物或其盐，其特征在于，

L表示直链(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-烷二基，

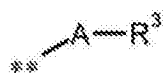
T代表下式的基团，



式中

\*表示与氮原子的连接位点，

R<sup>2</sup>表示氢或下式基团



或



式中

\*\*表示与相应T基团的连接位点，

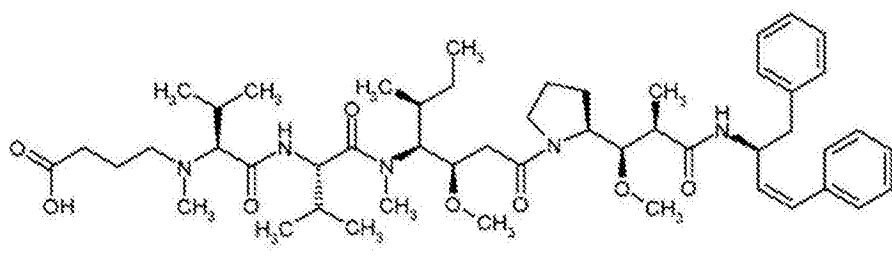
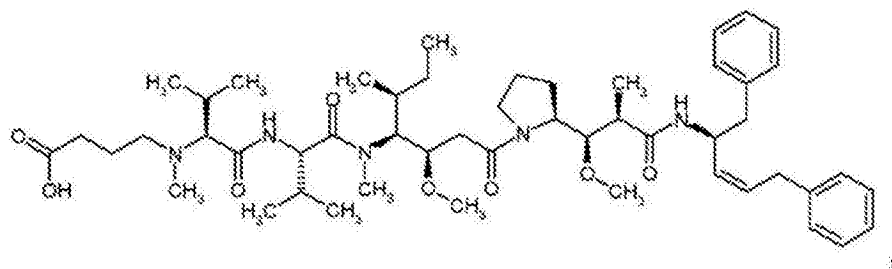
A表示乙烯-1,2-二基，

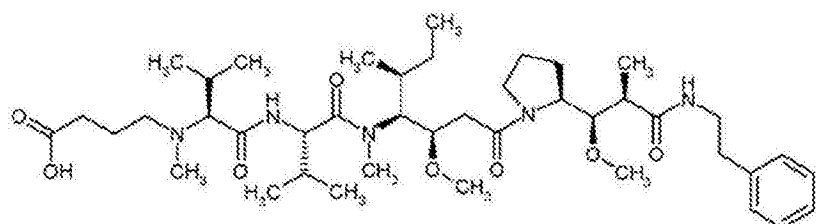
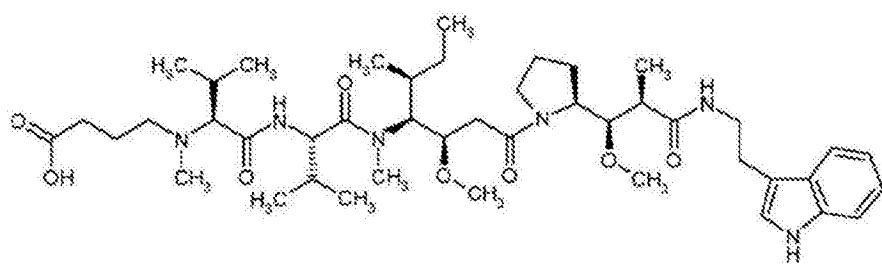
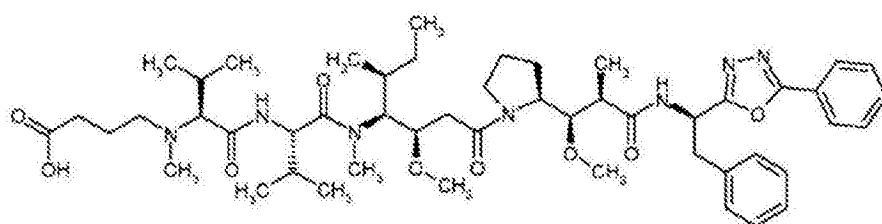
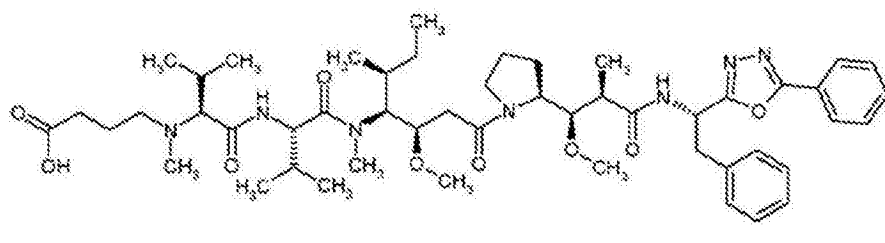
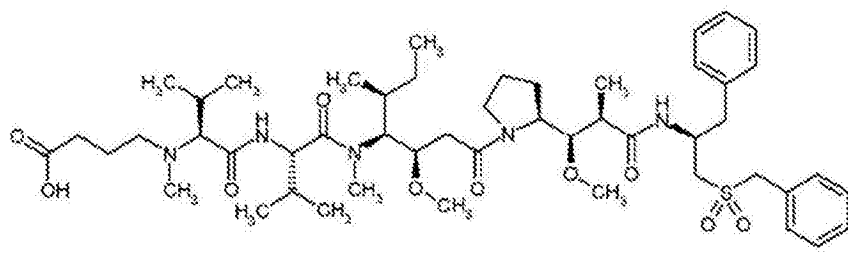
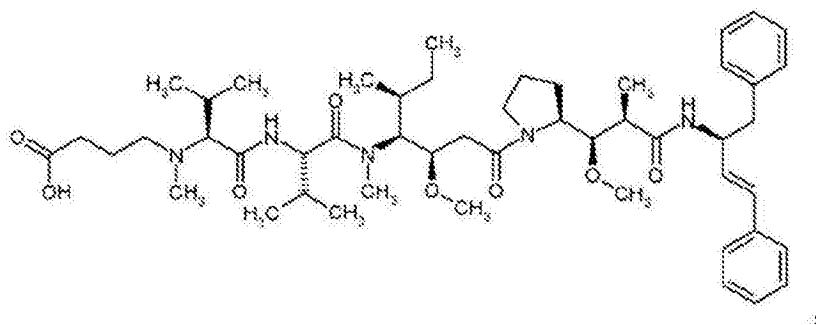
R<sup>3</sup>表示可被甲氧羰基或羧基取代的苯基，

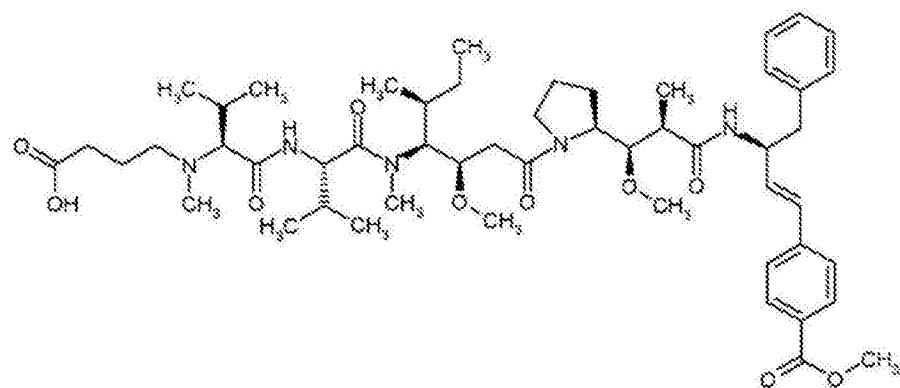
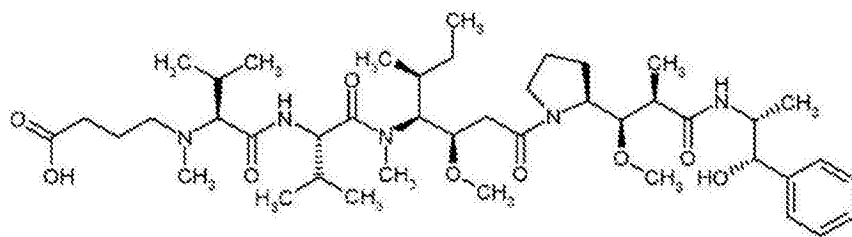
Het是1,3,4-噁二唑-2,5-基,

R<sup>5</sup>是可被甲氧羰基或羧基取代的苯基。

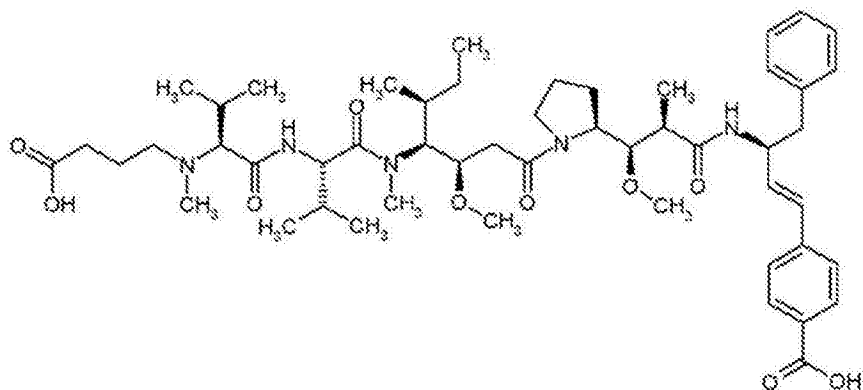
4.如权利要求1所述的化合物或其盐,其特征在于,所述化合物选自:







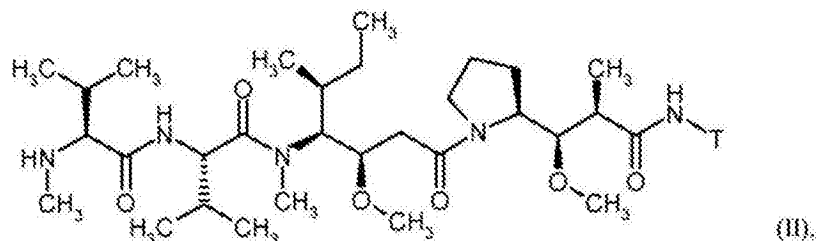
,和



。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的化合物或其盐,所述化合物或其盐是用于治疗 and/或预防疾病。

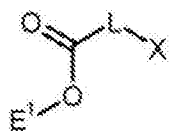
6. 如权利要求1至3中任一项所述的式(I)的化合物或其盐的制备方法,其特征在于,式(II)的化合物在惰性溶剂中通过下述方式发生反应:



(III).

式(II)中,T如权利要求1中定义,

[A] 与式(III)的化合物发生碱引起的烷基化,

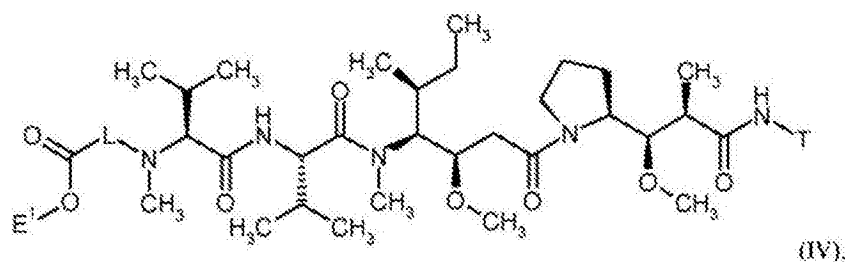


(III).

式(III)中L具有权利要求1中所给出的含义,

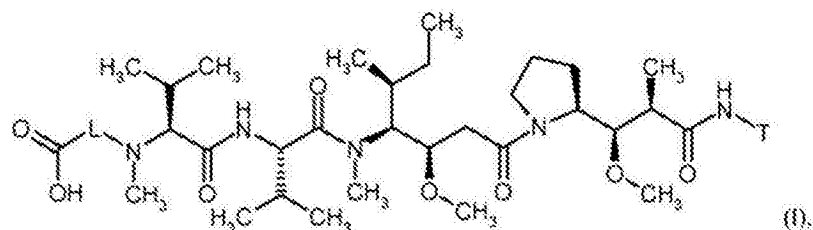
$E^1$ 代表氢、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基或苄基,

X表示离去基团,选自氯、溴、碘、甲磺酸根、三氟甲磺酸根或甲苯磺酸根,而形成式(IV)的化合物,



式(IV)中, $E^1$ 代表氢、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基或苄基L和T如权利要求1定义,

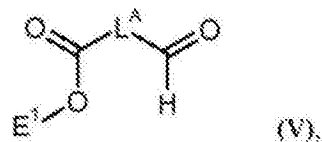
然后,在 $E^1$ 代表(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基或苄基的情况下,通过常规方法分离除去此酯基,因而正如式(III)中的 $E^1$ 代表氢的情况,得到式(I)的羧酸



式中,L和T如权利要求1定义,

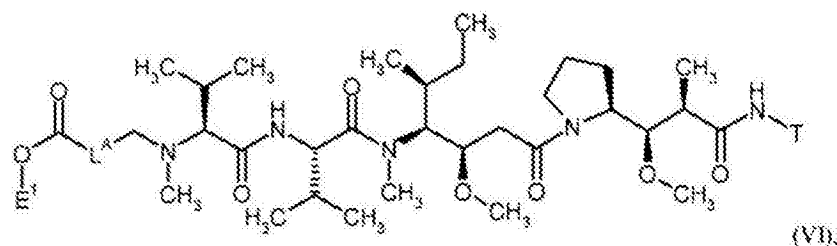
或者

[B]在合适的还原剂存在下,与式(V)的化合物发生反应



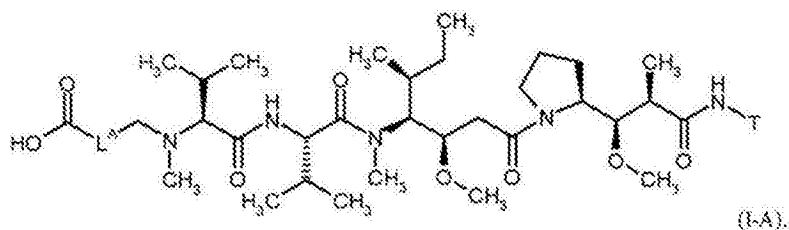
$E^1$ 代表氢、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基或苄基,

$L^A$ 具有权利要求1中给出的L的含义,但烷基链长中少了一个CH<sub>2</sub>单元,由此转化为式(VI)的化合物,



式(VI)中, $E^1$ 代表代表氢、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基或苄基, $L^A$ 和T如权利要求1中定义,

然后,在 $E^1$ 代表(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基或苄基的情况下,通过常规方法分离除去所述酯基,因而正如式(V)中的 $E^1$ 代表氢的情况,得到式(I-A)的羧酸,



式 (I-A) 中,  $L^A$  和 T 如权利要求 1 定义,

并且, 任选地将所得式 (I) 和/或 (I-A) 的化合物分离成其对映异构体和/或非对映体并且/或者与相应的 (i) 溶剂和/或 (ii) 碱或酸发生反应而形成它们的盐。

7. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述化合物或其盐在制备治疗和/或预防肿瘤疾病的药物中的用途。

8. 一种含有如权利要求 1 至 4 中任一项所述的化合物或其盐连同一种或更多种惰性、无毒、药学上合适的赋形剂的药物。

9. 一种含有如权利要求 1 至 4 中任一项所述的化合物或其盐连同一种或更多种其它活性成分的药物。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的药物, 所述药物是用于治疗 and/或预防肿瘤疾病的药物。

11. 如权利要求 8 或 9 所述的药物, 其特征在于, 所述药物是用于治疗 and/或预防癌症。

12. 有效量的至少一种如权利要求 1 至 4 中任一项所述的化合物或其盐或者如权利要求 8 至 9 中任一项所述的药物的用途, 用于制备治疗和/或预防人和动物的肿瘤疾病的药物。

13. 如权利要求 7 或 12 所述的用途, 其特征在于, 所述药物是用于治疗 and/或预防癌症。

## N-羧烷基耳他汀类及其应用

### 技术领域

[0001] 本专利申请涉及N末端被羧烷基取代的单甲基耳他汀

[0002] E (monomethylauristatin E) 和单甲基耳他汀F (monomethylauristatin F) 的新型衍生物、合成这些衍生物的方法、这些衍生物用于治疗 and/或预防疾病的用途、以及将这些衍生物用于制备治疗和/或预防疾病 (例如, 特别是过度增殖性疾病和/或血管生成疾病, 如各种形式的癌症) 的药物的用途。这种治疗可采用单一疗法的形式或者结合其它药物或其它治疗措施。

### 背景技术

[0003] 癌症是多种组织中不受控制的细胞生长的结果。在很多情况下, 新细胞长入现有组织中 (侵袭性生长) 或者转移至远端器官。癌症发生于多种器官中并且病变通常具有组织特异性过程。因此术语“癌症”是描述各种器官、组织和细胞类型的一大群特定疾病的通称。

[0004] 在一些情况下, 早期肿瘤可通过手术和放疗措施加以去除。转移性肿瘤通常可以仅用化疗剂进行姑息治疗。本文的目标是寻找延长生命与改善生活质量的最佳组合。

[0005] 目前大多数肠道外给药的化疗剂并非以靶向的方式被分布到肿瘤组织或肿瘤细胞, 而是经全身给药被非特异性分布到患者全身, 即与药物接触的部位常常是不需要药物的部位, 例如健康的细胞、组织和器官。这会导致不良反应或者甚至导致严重的全身毒性作用, 然后常常严重限制治疗上可使用的药物剂量范围或者必须完全停用药物。

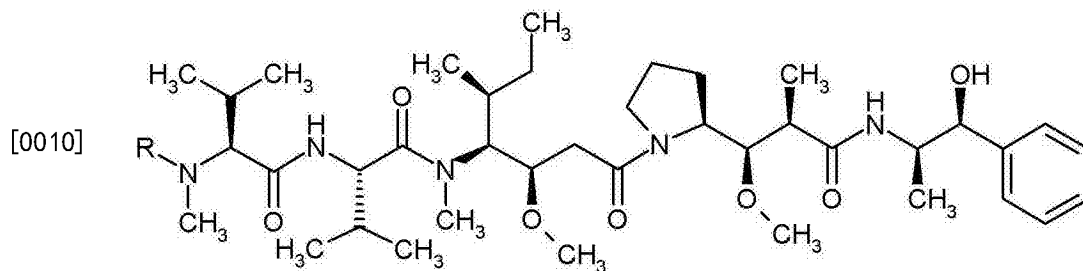
[0006] 因此多年来开发新化疗药物的工作重点是, 一方面在肿瘤细胞或其外周组织中改进并选择性利用这些化疗剂以及作用的提高相关, 另一方面使毒性副作用最小化。迄今为止人们已作出很多努力来开发把药物引导入靶细胞的有效方法。然而, 优化药物与胞内靶标的结合并且优化药物在细胞 (如相邻细胞) 内分布仍然是困难的任务。

[0007] 例如, 单克隆抗体适用于对肿瘤组织和肿瘤细胞的靶向定位。近年来, 基于这种药物的活性, 用于癌症临床治疗的这种抗体的重要性显著提升, 所述药物例如是曲妥珠单抗 (贺赛汀)、利妥昔单抗 (美罗华)、西妥昔单抗 (爱必妥) 和贝伐单抗 (阿瓦斯丁), 这些药物已被同时批准用于治疗单独的特定肿瘤疾病 (参见例如 G.P. Adams 和 L.M. Weiner, Nat. Biotechnol. 23, 1147-1157 (2005))。因此, 大幅提高了人们对所谓“免疫偶联物”的兴趣, 在免疫偶联物中针对肿瘤相关抗原的内化抗体通过连接单元 (“接头”) 与细胞毒剂共价连接。在把将偶联物导入肿瘤细胞之后将抗体分离除去, 细胞毒剂被释放到肿瘤细胞中, 在其中细胞毒剂直接地和选择性地展现其作用。这样, 对正常组织的损伤可保持在明显小于癌症常规化疗的范围内 (例如, 参见 J.M. Lambert, Curr. Opin. Pharmacol. 5, 543-549 (2005); A.M. Wu 和 P.D. Senter, Nat. Biotechnol. 23, 1137-1146 (2005); P.D. Senter, Curr. Opin. Chem. Biol. 13, 235-244 (2009); L. Ducry 和 B. Stump, Bioconjugate Chem. 21, 5-13 (2010))。

[0008] 除了抗体, 还可以将小分子药物领域的粘合子 (binder) 用作选择性结合特异性靶标 (例如受体的) 接头 (例如, 参见 E. Ruoslahti 等人, Science 279, 377-380 (1998); D. Karkan

等人, PLoS ONE 3 (6), e2469 (2008年6月25日))。同样了解到细胞毒药物与定位配体的偶联物在配体和药物之间具有用于释放药物的限制性裂解位点。例如, 这种“预定的断裂点”可由肽链组成, 该肽链可在某个特定位置通过位于反应位点的特异性酶被选择性地裂解 (参见例如, R.A.Firestone和L.A.Telan的美国专利申请US2002/0147138)。

[0009] 耳他汀E (AE) 和一甲基耳他汀E (MMAE) 是海兔毒素的合成类似物, 海兔毒素是一组特别的线性类肽, 最初是从海洋来源中分离, 其中的一些对肿瘤细胞具有非常强的细胞毒活性 (例如参见综述G.R.Pettit, Prog.Chem.Org.Nat.Prod. 70, 1-79 (1997); G.R.Pettit等人的《抗癌药物设计》(Anti-Cancer Drug Design) 10, 529-544 (1995); G.R.Pettit等人的《抗癌药物设计》(Anti-Cancer Drug Design) 13, 243-277 (1998))。

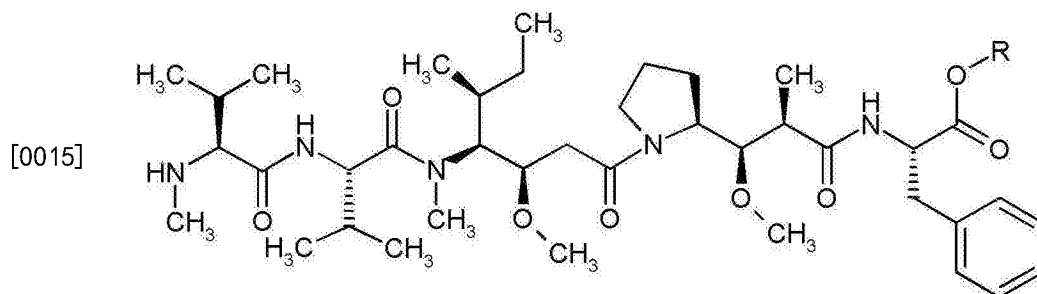


[0011] 耳他汀E (AE) : R=CH<sub>3</sub>

[0012] 单甲基耳他汀E (MMAE) : R=H

[0013] 然而, MMAE具有全身毒性相对较高的缺点。另外, 当以抗体-药物偶联物 (免疫偶联物) 的形式使用时, 该化合物与抗体和活性成分/药物之间的这种连接单元 (接头) 不相容, 该连接单元不具有酶可切割的预定断裂点 (S.O.Doronina等人, Bioconjugate Chem. 17, 114-124 (2006))。

[0014] 一甲基奥他汀F (MMAF) 是具有C-末端苯丙氨酸单元的耳他汀衍生物, 与MMAE相比其仅具有中等抗增殖作用。这很可能归因于游离的羧基, 该羧基由于其极性和电荷而使该化合物对细胞活力产生负面影响。在本文的上下文中, MMAF的甲基酯 (MMAF-OMe) 已被描述成具有中性电荷且能够穿过细胞膜的前药衍生物; 其对多种癌细胞系的体外细胞毒性比MMAF高出几个数量级 (S.O.Doronina等人, Bioconjugate Chem. 17, 114-124 (2006))。可认为该作用是由MMAF自身所引起, MMAF在前药被引入细胞后通过细胞内酯水解而被快速释放。



[0016] 单甲基耳他汀F (MMAF) : R=H

[0017] 单甲基耳他汀F-甲基酯 (MMAF-OMe) : R=CH<sub>3</sub>

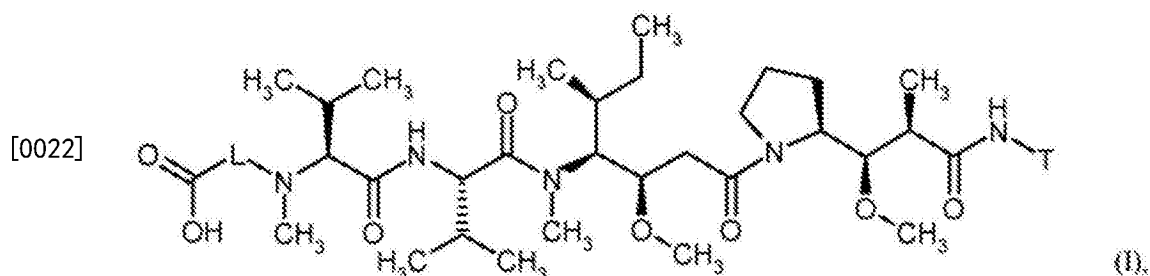
[0018] 然而, 基于简单酯衍生物的药物化合物通常具有由于非特异性酯水解所引起的化学不稳定性风险, 例如由于血浆中的酯酶引起的独立于预定作用位点的酯水解。这会大大

限制这种化合物在治疗中的适用性。此外,耳他汀衍生物例如MMAE和MMAF还是由肿瘤细胞表达的转运蛋白的底物,这会导致形成对这些活性成分药物的耐药性。

[0019] 因此,本发明的目的是鉴定新型耳他汀化合物以及提供它们在癌症中的治疗用途,使得这些耳他汀化合物在全细胞试验中比只具有中等效力的单甲基耳他汀F (MMAF) 具有更强的细胞毒性活性、并且/或者具有更低的转运蛋白的底物特性。这种物质也可以特别适用作用于与蛋白质(例如,特别是抗体)连接或者与低分子量配体连接从而形成具有抗增殖作用的(免疫)偶联物的毒簇。

[0020] W02005/081711A2中公开了单甲基耳他汀F (MMAF) 及其各种酯衍生物和酰胺衍生物。W001/18032A2中描述了其它具有C-末端酰胺取代的苯丙氨酸单元的其它耳他汀类似物。W002/088172A2和W02007/008603A1对包含苯丙氨酸侧链修饰的MMAF类似物的申请了专利保护,W02007/008848A2描述了苯丙氨酸的羧基被修饰的化合物。W02009/117531A1中描述了通过N-或C-末端连接的其它耳他汀偶联物(还参见S.O.Doronina等人,Bioconjugate Chem. 19,1960-1963 (2008))。

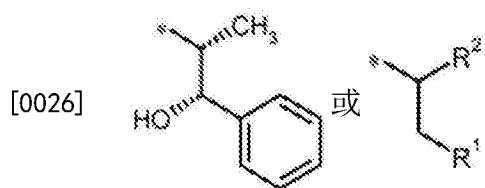
[0021] 本发明的主题是通式(I)的化合物以及它们的盐和溶剂合物及这些盐的溶剂合物



[0023] 式中:

[0024] L表示直链(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷二基,该直链(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷二基最多可被甲基取代四次,并且在该直链(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷二基中,(a)两个碳原子可以以1,2位、1,3位或1,4位的关系彼此桥连,从而与位于这两个碳原子之间的碳原子形成(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-环烷基环或苯环,或者(b)多达3个的彼此不相邻的CH<sub>2</sub>基团可被-O-代替,

[0025] T代表下式的基团

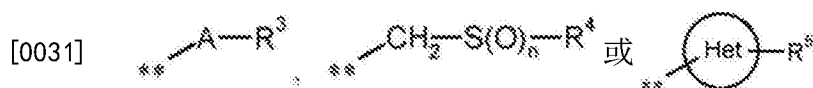


[0027] 式中

[0028] \*表示与氮原子的连接位点,

[0029] R<sup>1</sup>表示苯基或1H-吡啶-3-基,

[0030] R<sup>2</sup>代表氢或下式基团



[0032] 式中

[0033] \*\*表示与相应T基团的相应连接位点,

[0034] A代表直链(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷二基或直链(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-烯二基,

[0035] R<sup>3</sup>表示可被(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧基羰基或羧基取代的苯基,

[0036] n表示0、1或2的数字,

[0037] R<sup>4</sup>表示苯基中的氢可被(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧基羰基或羧基取代的苯基、苄基或2-苯乙基,

[0038] Het表示最多含有3个选自N、O和/或S的环杂原子的二价5元杂芳环,

[0039] R<sup>5</sup>表示可被苯基取代的(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-环烷基、苯基或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基,

[0040] 其中上述苯基可以相应地被(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧基羰基或羧基取代。

[0041] 根据本发明的化合物包括式(I)的化合物以及它们的盐和溶剂合物及这些盐的溶剂合物、下面所给出的由式(I)所包括的化合物以及它们的盐和溶剂合物及这些盐的溶剂合物、由式(I)所包括且在下面被称为示例性实施方式的化合物以及它们的盐和溶剂合物及这些盐的溶剂合物,只要是由式(I)所包括且下面所列出的化合物还不是盐和溶剂合物以及这些盐的溶剂合物。

[0042] 根据本发明的化合物可基于其结构以不同的立体异构体形式而存在,即以构型异构体或者任选地作为构象异构体(对映异构体和/或非对映异构体,包括阻转异构体的情况中的异构体)的形式而存在。因此,本发明包括对映异构体和非对映体以及它们各自的混合物。可通过已知方法从这种对映异构体和/或非对映异构体的混合物中分离出立体异构相同的组分。为了此分离目的,优选使用色谱法,特别优选在手性或非手性相上的HPLC色谱法。

[0043] 如果根据本发明的化合物可以互变异构体的形式存在时,那么本发明也包括所有的互变异构体形式。

[0044] 在本发明的范围内,优选的盐是根据本发明的化合物的生理学上安全的盐。本发明还包括这样的盐:尽管本身不适合于药学应用但可用于(例如)分离或纯化根据本发明的化合物。

[0045] 根据本发明的化合物的生理学上安全的盐包括无机酸、羧酸和磺酸的酸加成盐,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、萘二磺酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸、马来酸和苯甲酸的盐。

[0046] 根据本发明的化合物的生理学上安全的盐还包括常用碱的盐,例如优选碱金属盐(例如钠盐和钾盐)、碱土金属盐(例如钙盐和镁盐)以及衍生自氨或具有1-16个碳原子的有机胺的铵盐,所述有机胺优选的是例如乙胺、二乙胺、三乙胺、N,N-二异丙基乙胺、一乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二甲氨基乙醇、二乙氨基乙醇、普鲁卡因、二环己基胺、二苄基胺、N-甲基哌啶、N-甲基吗啉、精氨酸、赖氨酸和1,2-乙二胺。

[0047] 在本发明的范围内,“溶剂合物”是指本发明化合物通过与溶剂分子的配位而形成固体状态或液体状态的络合物的本发明化合物的形态。水合物是其中分子与水发生配位的溶剂合物的一种特殊形态。在本发明的范围内,水合物是优选的溶剂合物。

[0048] 另外,本发明还包括根据本发明的化合物的前药。本文中的术语“前药”是指如下的化合物:可以是有生物活性或无生物活性的但在体内停留时间期间转化(例如通过代谢或水解)成根据本发明的化合物。

[0049] 除非另有说明,在本发明的范围内,取代基具有以下含义,

[0050] 在本发明的范围内,“(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基”表示具有1-4个碳原子的直链或支链烷基。优

选的是例如：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

[0051] 在本发明的范围内，“(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷二基、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-烷二基和(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-烷二基”表示具有1至12、1至8或1至6个碳原子的直链 $\alpha, \omega$ -二价烷基。优选的是具有1至8个碳原子、尤其优选1至6个碳原子的直链烷二基。优选的是例如：亚甲基、乙烷-1,2-二基(1,2-亚乙基)、丙烷-1,3-二基(1,3-亚丙基)、丁烷-1,4-二基(1,4-亚丁基)、戊烷-1,5-二基(1,5-亚戊基)、己烷-1,6-二基(1,6-亚己基)、庚烷-1,7-二基(1,7-亚庚基)、辛烷-1,8-二基(1,8-亚辛基)、壬烷-1,9-二基(1,9-亚壬基)、癸烷-1,10-二基(1,10-亚癸基)、十一烷-1,11-二基(1,11-亚十一烷基)和十二烷-1,12-二基(1,12-亚十二烷基)。

[0052] 在本发明的范围内，“(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷二基”表示具有1-4个碳原子的直链 $\alpha, \omega$ -二价烷基。优选的例子包括：亚甲基、乙烷-1,2-二基(1,2-亚乙基)、丙烷-1,3-二基(1,3-亚丙基)和丁烷-1,4-二基(1,4-亚丁基)。

[0053] 在本发明的范围内，“(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-烯二基”表示具有2-4个碳原子和一个双键的直链 $\alpha, \omega$ -二价烯基。优选的例子包括：乙烯-1,2-二基、丙烯-1,3-二基、丁-1-烯-1,4-二基和丁-2-烯-1,4-二基。这里双键可以是顺式或反式构型。

[0054] 在本发明的范围内，“(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷氧基”表示具有1-4个碳原子的直链或支链烷氧基。优选的例子包括：甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基和叔丁氧基。

[0055] 在本发明的范围内，“(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧羰基”表示经由氧原子连接到羰基[-C(=O)-]的、具有1-4个碳原子的直链或支链烷氧基。优选的例子包括：甲氧基羰基、乙氧基羰基、正丙氧基羰基、异丙氧基羰基、正丁氧基羰基和叔丁氧基羰基。

[0056] 在本发明的范围内，“(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-环烷基”表示具有3-6个碳原子的单环饱和环烷基团。优选的例子包括：环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

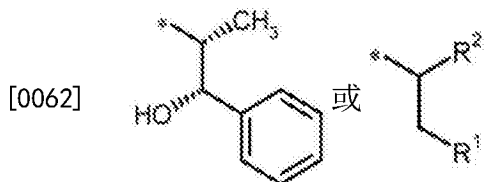
[0057] 5元杂芳基在环Het中的定义表示二价芳杂环(杂芳环)，该芳杂环总共具有5个环原子，含有多达3个选自N、O和/或S的可以相同或者可以不同的环杂原子，并且经由两个环碳原子或者任选地一个环氮原子和一个环碳原子而相连。例子包括：呋喃基、吡咯基、噻吩基、吡唑基、咪唑基、1,2-噁唑基、1,3-噁唑基、1,2-噻唑基、1,3-噻唑基、1,2,3-噻唑基、1,2,4-噻唑基、1,2,4-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、1,2,4-噻二唑基和1,3,4-噻二唑基。具有2个或3个选自N、O和/或S的相同或不同的杂原子的5元杂芳基例如特别是：吡唑基、咪唑基、1,3-噁唑基、1,3-噻唑基、1,2,4-噻唑基、1,2,4-噁二唑基和1,3,4-噁二唑基。

[0058] 本发明的范围内，所有多次出现的基团的含义确实是相互独立的。如果根据本发明的化合物中的基团是被取代的，那么这些基团可被一次或多次取代，除非另有说明。优选的是用一个或两个相同或不同的取代基取代。特别优选的是用一种取代基取代。

[0059] 在本发明的范围内，优选的是式(I)化合物以及其盐和溶剂合物及这些盐的溶剂合物，式中：

[0060] L表示直链(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-烷二基，其中(a)两个碳原子可以以1,3位或1,4位的关系彼此桥连，与位于所述两个碳原子之间的一个或两个碳原子形成苯基环，或者(b)多达2个彼此不相邻的CH<sub>2</sub>基团可被-O-取代，

[0061] T代表下式的基团

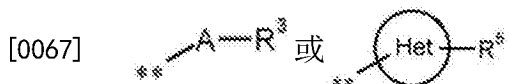


[0063] 式中

[0064] \*表示与氮原子的连接位点，

[0065] R<sup>1</sup>表示苯基或1H-吡啶-3-基，

[0066] R<sup>2</sup>代表氢或下式的基团



[0068] 式中

[0069] \*\*表示与相应T基团的基团的连接位点，

[0070] A表示乙烯-1,2-二基或丙烯-1,3-二基，

[0071] R<sup>3</sup>表示可由(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧基羰基或羧基取代的苯基，

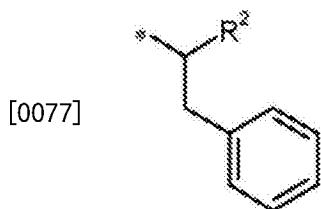
[0072] Het是选自吡唑基、咪唑基、1,3-噁唑基、1,3-噻唑基、1,2,4-噁二唑基和1,3,4-噁二唑基的二价5元杂芳环，

[0073] R<sup>5</sup>表示可被(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧基羰基或羧基取代的苯基。

[0074] 本发明的范围内，尤其优选的是式(I)化合物以及其盐和溶剂合物及该盐的溶剂合物，式中：

[0075] L表示直链(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-烷二基，

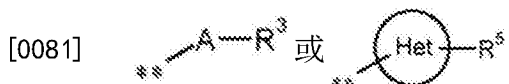
[0076] T代表下式基团



[0078] 式中

[0079] \*表示与氮原子的连接位点，

[0080] R<sup>2</sup>代表氢或下式的基团



[0082] 式中

[0083] \*\*表示与相应T基团的基团的连接位点，

[0084] A表示乙烯-1,2-二基，

[0085] R<sup>3</sup>表示可被甲氧基羰基或羧基取代的苯基，

[0086] Het是1,3,4-噁二唑-2,5-基，

[0087] R<sup>5</sup>是可被甲氧基羰基或羧基取代的苯基。

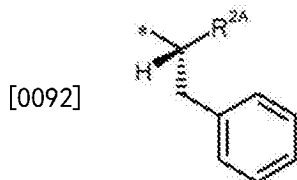
[0088] 在本发明的范围内，特别重要的是式(I)化合物以及其盐和溶剂合物及这些盐的

溶剂合物,式中:

[0089] L代表丙烷-1,3-二基。

[0090] 在本发明的范围内,特别重要的是式(I)化合物以及其盐和溶剂合物及这些盐的溶剂合物,式中:

[0091] T代表下式的基团



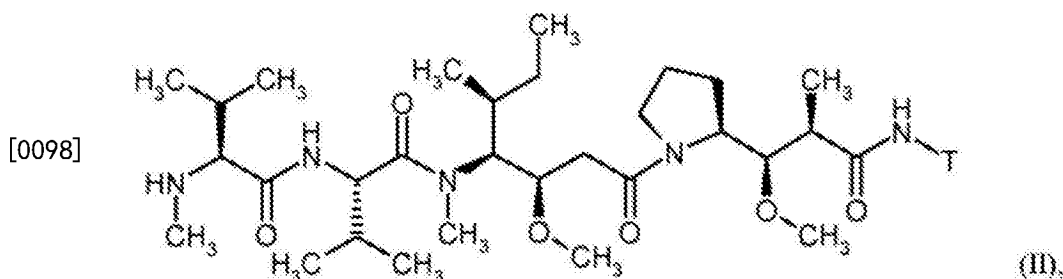
[0093] 式中:

[0094] \*表示与氮原子的连接位点,

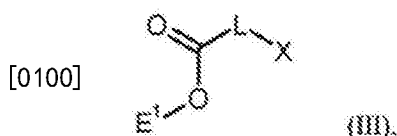
[0095] R<sup>2A</sup>具有上述定义的R<sub>2</sub>的含义,但不表示氢。

[0096] 不管各组合如何定义,基团的各自组合和/或优选组合中给出的详细基团定义也可被其它组合中任何基团定义所代替。最优选的是上述定义的两个或更多个优选范围的组合。

[0097] 另外,本发明方法的另一个主题是用于制备本发明式(I)化合物的方法,其特征在于,式(II)的化合物通过以下方式[A]或方式[B]在惰性溶剂中进行反应,式(II)中的T具有上述含义,



[0099] [A]由式(III)的化合物碱诱导进行烷基化,



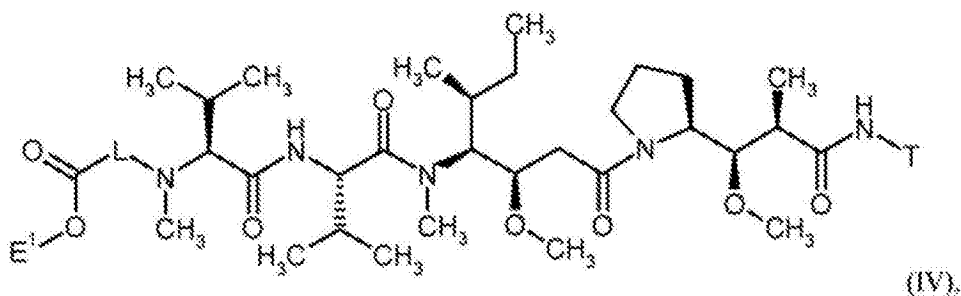
[0101] 式(III)中,L具有上述含义,

[0102] E<sup>1</sup>代表氢、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基或苄基,

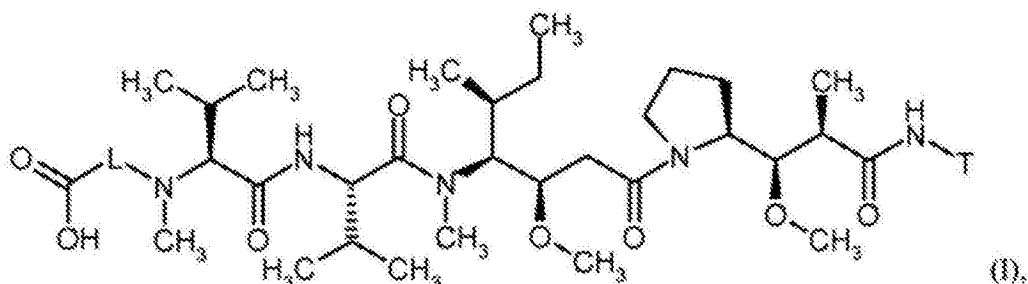
[0103] X代表离去基团,例如氯、溴、碘、甲磺酸根、三氟甲磺酸根或甲苯磺酸根,

[0104] 以形成式(IV)的化合物

[0105]

[0106] 式(IV)中,  $E^1$ 、L和T具有上面给出的含义,[0107] 然后,在 $E^1$ 代表(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基或苄基的情况下,利用常规方法切除该酯基,因此正如式(III)中的 $E^1$ 代表氢的情况下,得到式(I)的羧酸,

[0108]

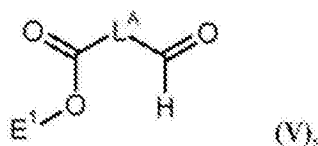


[0109] 式中,L和T具有上面给出的含义,

[0110] 或者

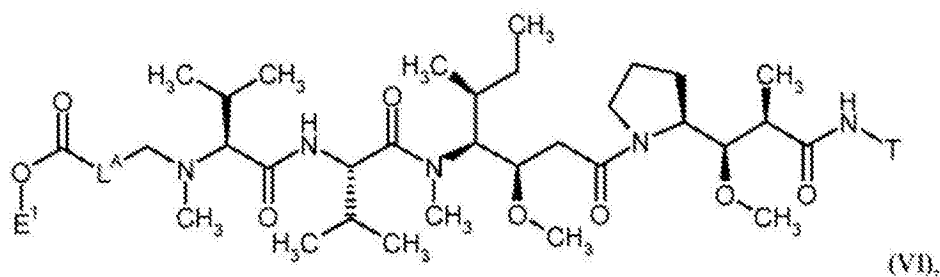
[0111] [B]在合适的还原剂存在下,与式(V)的化合物发生反应,

[0112]

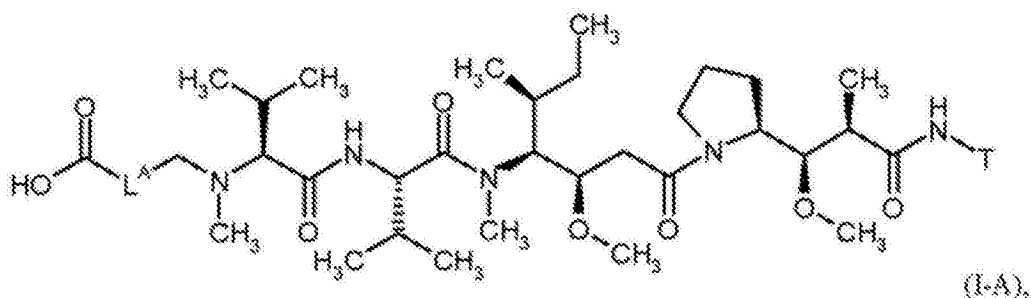
[0113]  $E^1$ 代表氢、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基或苄基,[0114]  $L^A$ 具有上述L的含义,区别在于烷基链长减少了一个CH<sub>2</sub>单元,

[0115] 从而转化为式(VI)的化合物,

[0116]

[0117] 式(VI)中, $E^1$ 、 $L^A$ 和T具有上述含义,[0118] 然后,在 $E^1$ 代表(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基或苄基的情况下,利用常规方法切除该酯基,因此正如式(V)中的 $E^1$ 代表氢的情况,得到式(I-A)的羧酸,

[0119]



[0120] 式(I-A)中,  $L^A$ 和T具有上面给出的含义,

[0121] 并且, 任选地将所得式(I)和/或(I-A)化合物分离成其对映异构体和/或非对映体和/或与相应的(i)溶剂和/或(ii)碱或酸反应形成它们的溶剂合物、盐和/或这些盐的溶剂合物。

[0122] 用于(II)+(III)→(IV)反应的合适惰性溶剂的例子包括醚类, 例如乙醚、二异丙基醚、甲基叔丁基醚、四氢呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷或双-(2-甲氧基乙基)醚; 烃类, 例如苯、甲苯、二甲苯、戊烷、己烷、庚烷、环己烷或石油馏分; 或者偶极非质子溶剂, 例如丙酮、甲基乙基酮、乙腈、二甲亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、N,N'-二甲基丙基脲(DMPU)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)或吡啶。还可以使用上述溶剂的混合物。优选丙酮或N,N-二甲基甲酰胺。

[0123] 用于这些烷基化反应的合适的碱具体包括: 碱金属氢氧化物, 例如氢氧化锂、氢氧化钠或氢氧化钾; 碱金属或碱土金属的碳酸盐, 例如碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙或碳酸铯; 或者常用的有机胺类, 例如三乙胺、N-甲基吗啉、N-甲基哌啶、N,N-二异丙基乙基胺、吡啶或4-N,N-二甲基氨基吡啶。优选的是使用碳酸钾或碳酸铯。任选地有利的是添加以下烷基化催化剂, 例如溴化锂或碘化锂、碘化钠或碘化钾、四正丁基溴化铵或四正丁基碘化铵或苄基三乙基溴化铵。

[0124] 通常在-20℃至+100℃、优选0℃至+50℃的温度范围内实施(II)+(III)→(IV)反应。该反应可在常压、高压或减压(例如0.5巴至5巴)下进行。通常是在常压下进行。

[0125] 任选地在作为催化剂的酸和/或脱水剂(water-withdrawing agent)的存在下, 在溶剂中进行(II)+(V)→(VI)反应, 该溶剂在反应条件下为惰性并通常是用于还原胺化。这种溶剂包括, 例如醇类, 例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇或叔丁醇; 醚类, 例如四氢呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷或双(2-甲氧基乙基)醚; 或者其它溶剂, 例如二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、N,N-二甲基甲酰胺或甚至水。同样, 也可以使用这些溶剂的混合物。这里所使用的优选溶剂是1,4-二噁烷/水混合物, 向该混合物中添加乙酸或稀盐酸作为催化剂。

[0126] 用于此反应的合适还原剂具体包括络合物硼氢化物, 例如硼氢化钠、氰基硼氢化钠、三乙氧基硼氢化钠或硼氢化四正丁基铵。优选氰基硼氢化钠。

[0127] 通常在0℃至+120℃、优选+50℃至+100℃的温度范围内实施(II)+(V)→(VI)反应。该反应可在常压、高压或减压(例如0.5巴至5巴)下进行。通常是在常压下进行。

[0128] 在处理步骤(IV)→(I)和(VI)中利用常用方法切除酯基 $E^1$  [ $E^1 = (C_1-C_4)$ -烷基或苄基], 该常用方法为在惰性溶剂中用酸或碱处理该酯, 从而在最后的转化形式中, 将首先获得的羧酸盐通过随后加入酸而转化为游离羧酸。在叔丁基酯的情况中, 优选使用酸进行裂

解。在苯酯的情况下,可以在合适的钯催化剂(例如活性碳上的钯)存在下利用氢解来实现裂解。

[0129] 这里通过选择来源于化合物(III)和/或(V)的酯基 $E^1$ ,而使得其裂解条件适合化合物(IV)和(VI)中的相应基团T。

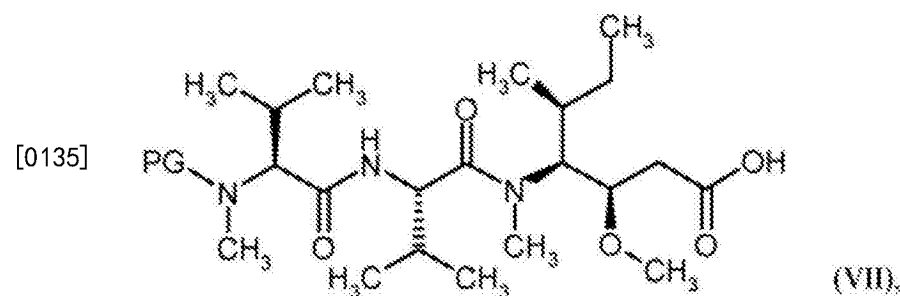
[0130] 常用的无机碱适合用作酯水解的碱。这些碱特别包括碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物,例如氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化钡;或者碱金属碳酸盐或碱土金属碳酸盐,例如碳酸钠、碳酸钾或碳酸钙。优选氢氧化锂、氢氧化钠或氢氧化钾。

[0131] 用于酯裂解反应的合适的酸通常包括:硫酸、盐酸/氢氯酸、氢溴酸/溴化氢、磷酸、乙酸、三氟乙酸、甲苯磺酸、甲磺酸或三氟甲磺酸或者其混合物,任选地添加水。在叔丁酯的情况下优选盐酸或三氟乙酸,在甲酯的情况下优选盐酸。

[0132] 适用于这些反应的惰性溶剂包括水或者通常用于酯裂解的有机溶剂。这些溶剂优选地包括:低级醇类,例如甲醇、乙醇、正丙醇或异丙醇;醚类,例如乙醚、四氢呋喃、1,4-二噁烷或1,2-二甲氧基乙烷;或者其它溶剂,例如二氯甲烷、丙酮、甲基乙基酮、N,N-二甲基甲酰胺或二甲亚砜。还可使用这些溶剂的混合物。在碱性酯水解的情况下,优选的是使用水与1,4-二噁烷、四氢呋喃、甲醇、乙醇和/或二甲基甲酰胺的混合物。在与三氟乙酸反应的情况下,优选二氯甲烷,在与氯化氢反应的情况中,优选四氢呋喃、乙醚、1,4-二噁烷或水。

[0133] 酯裂解通常在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至 $+100^{\circ}\text{C}$ 、优选 $0^{\circ}\text{C}$ 至 $+50^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内进行。

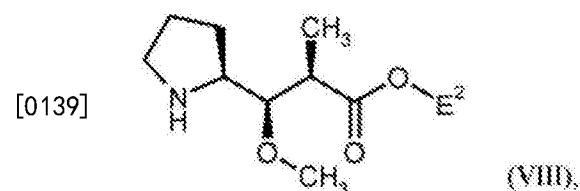
[0134] 式(II)的化合物可以使用常用的肽化学方法,通过在惰性溶剂中式(VII)的羧基官能激活的情况下,使式(VII)的化合物以下方式发生偶联来合成,



[0136] 式中:

[0137] PG代表氨基保护基团,例如(9H-芴-9-基甲氧基)羰基、叔丁氧基羰基或苄氧基羰基,

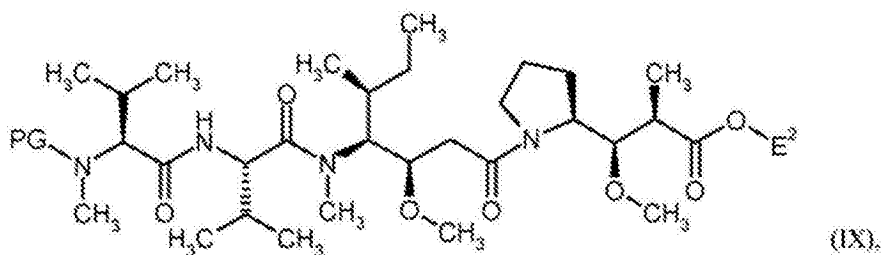
[0138] [C]首先与式(VIII)的化合物或该化合物的盐偶联生成式(IX)的化合物,



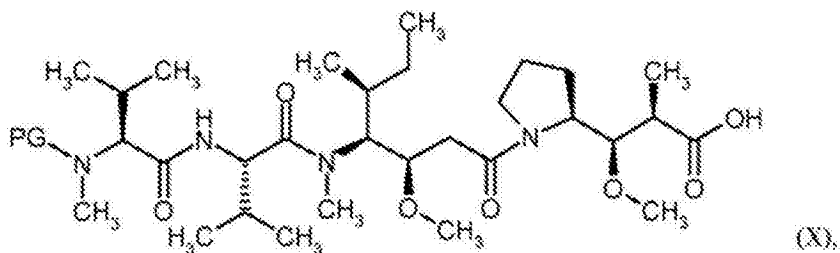
[0140] 式(VIII)中:

[0141]  $E^2$ 代表氢、 $(C_1-C_4)$ -烷基或苄基,

[0142]

[0143] 式 (IX) 中,  $E^2$  和 PG 具有上面给出的含义,[0144] 然后, 在  $E^2$  代表  $(C_1-C_4)$ -烷基或苄基的情况下, 采用常用方法切除该酯基, 然后所得的式 (X) 的羧酸,

[0145]



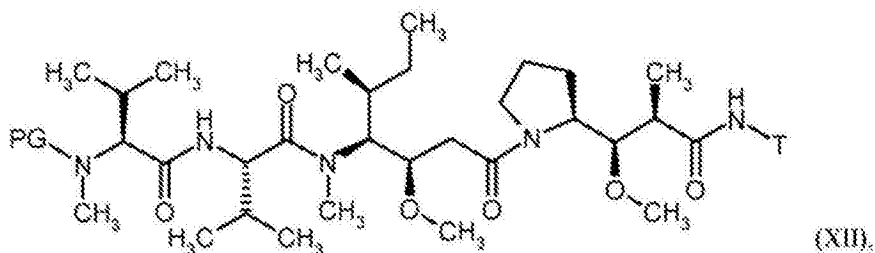
[0146] 式 (X) 中, PG 具有上述含义,

[0147] 在惰性溶剂中在羧基官能激活的情况下与式 (XI) 的化合物

[0148]  $H_2N-T$  (XI)

[0149] 或与该化合物的盐偶联形成式 (XII) 化合物,

[0150]



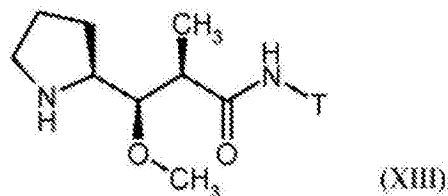
[0151] 式 (XI) 中, T 具有上述含义,

[0152] 式 (XII) 中, PG 和 T 具有上述含义,

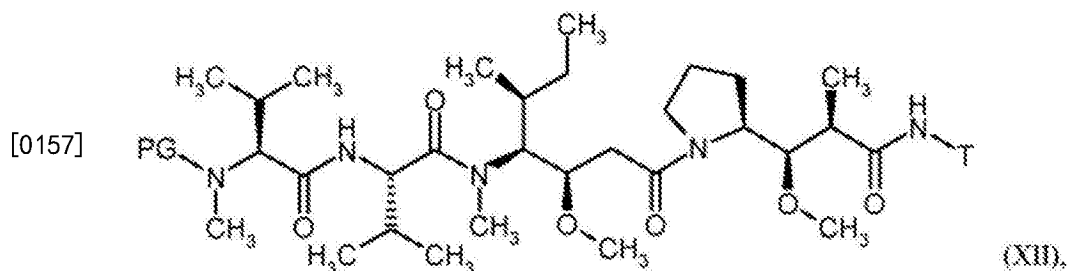
[0153] 或者

[0154] [D] 与式 (XIII) 的化合物,

[0155]



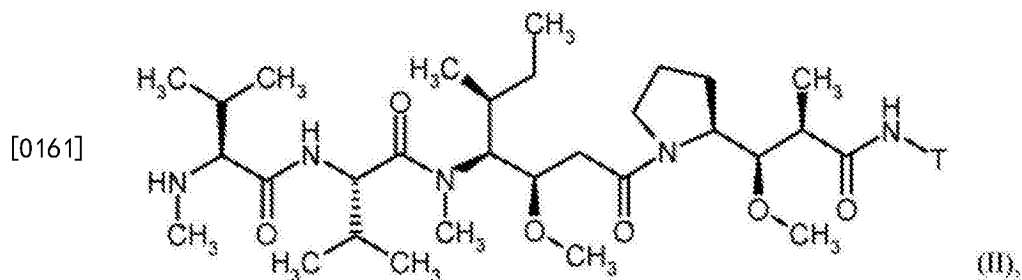
[0156] 或该化合物的盐偶联, 同样形成式 (XII) 的化合物



[0158] 式(XIII)中,T具有上面给出的含义,

[0159] 式(XII)中,PG和T具有上面给出的含义,

[0160] 然后以常用方式对式(XII)的化合物进行脱保护,以形成式(II)的化合物



[0162] 式(II)中,T具有上述含义。

[0163] 上述偶联反应(由各胺与羧酸组分形成酰胺)根据肽化学的标准方法来进行(例如,参见M.Bodanszky,《肽合成的原理》(Principles of Peptide Synthesis),Springer-Verlag,Berlin,1993;M.Bodanszky和A.Bodanszky,《肽合成的实践》(The Practice of Peptide Synthesis),Springer-Verlag,Berlin,1984;H.-D.Jakubke和H.Jeschkeit,《氨基酸、肽、蛋白质》(Aminosäuren,Peptide,Proteine),Verlag Chemie,Weinheim,1982)。

[0164] 用于这些偶联反应(VII)+(VIII)→(IX)、(X)+(XI)→(XII)和(VII),(XIII)→(XII)的惰性溶剂是包括:例如醚类,例如乙醚、二异丙醚、叔丁基甲基醚、四氢呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷或双(2-甲氧基乙基)醚;烃类,例如苯、甲苯、二甲苯、戊烷、己烷、庚烷、环己烷或矿物油馏分;卤代烃类,例如二氯甲烷、三氯甲烷、四氯甲烷、1,2-二氯乙烷、三氯乙烯或氯苯;或者偶极非质子溶剂类,例如丙酮、甲基乙基酮、乙腈、乙酸乙酯、吡啶、二甲亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、N,N'-二甲基丙烯基脲(DMPU)或N-甲基吡咯烷酮(NMP)。还可使用上述溶剂的混合物。优选N,N-二甲基甲酰胺。

[0165] 适用于这些偶联的活化剂/缩合剂包括,例如碳二亚胺类,例如N,N'-二乙基碳二亚胺、N,N'-二丙基碳二亚胺、N,N'-二异丙基碳二亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)或者N-(3-二甲氨基异丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC);光气衍生物类,例如N,N'-羰基二咪唑(CDI)或氯甲酸异丁酯,1,2-噁唑鎓化合物类,例如2-乙基-5-苯基-1,2-噁唑鎓-3-硫酸盐或2-叔丁基-5-甲基异噁唑鎓高氯酸盐,酰胺基化合物类,例如2-乙氧基-1-乙氧基羰基1,2-二氢喹啉,α-氯胺类,例如1-氯-2-甲基-1-二甲基氨基-1-丙烯;磷化合物,例如丙烷磷酸酐、氰基磷酸二乙酯、双(2-氧代-3-噁唑烷基)磷酰氯、苯并三唑-1-基氧基-三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐或苯并三唑-1-基氧基-三(吡咯烷)磷六氟磷酸盐(PyBOP)或脲鎓类化合物,例如O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TBTU)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸(HBTU)、2-(2-氧代-1-(2H)-吡啶基)-1,1,3,3-四甲

基脲鎓四氟硼酸盐 (TPTU)、O-(7-氮杂苯并-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (HATU) 或 O-(1H-6-氯苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐 (TCTU), 任选地与其它助剂联用, 所述其它助剂如 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 或 N-羟基琥珀酰亚胺 (HOSu), 或者以碱的形式, 碱金属碳酸盐, 例如碳酸钠或碳酸钾, 或叔胺碱类, 例如三乙胺、N-甲基吗啉、N-甲基哌啶、N,N-二异丙基乙胺、吡啶或 4-N,N-二甲基氨基吡啶。

[0166] 本发明的上下文中, 用于上述偶联反应的优选的活化剂/缩合剂包括 N-(3-二甲氨基异丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 连同 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 和 N,N-二异丙基乙胺, 或者类似地 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (HATU) 连同 N,N-二异丙基乙胺。

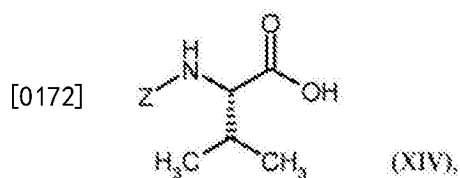
[0167] 通常在 -20℃ 至 +60℃、优选 0℃ 至 +40℃ 的温度范围内实施 (VII) + (VIII) → (IX)、(X) + (XI) → (XII) 和 (VII) + (XIII) → (XII) 反应。该反应可在常压、高压或减压 (例如 0.5 巴至 5 巴) 下进行。通常是在常压下进行。

[0168] 如果有用或如果需要, 任选地存在于化合物中的官能团, 例如且特别是氨基、羟基和羧基也能以临时保护的形式存在于上述处理步骤中。根据肽化学的标准方法引入此类保护基团并除去 (例如, 参见 T.W. Greene 和 P.G.M. Wuts, 《有机合成中的保护基团》(Protective Groups in Organic Synthesis), Wiley, 纽约, 1999; M. Bodanszky 和 A. Bodanszky, 《肽合成的实践》(The Practice of Peptide Synthesis), Springer-Verlag, 柏林, 1984)。当存在多个保护基团时, 可任选地在单釜式反应步骤中同时释放或在单独反应步骤中释放。

[0169] 优选的氨基保护基团是叔丁氧基羰基 (Boc)、苄氧基羰基 (Z)、或 (9H-芴-9-基甲氧基) 羰基 (Fmoc); 优选叔丁基或苄基作为羟基或羧基官能团的保护基团 PG<sup>2</sup>。通常在惰性溶剂, 例如乙醚、1,4-二噁烷、二氯甲烷或乙酸中用强酸, 例如盐酸、氢溴酸或三氟乙酸处理叔丁基或叔丁氧基羰基来对其裂解。该反应也可任选地在不加惰性溶剂的情况下进行。在把苄基或苄氧基羰基用作保护基团的情况下, 该基团优选在合适的钯催化剂存在的条件下通过氢解来除去, 所述钯催化剂例如负载在活性炭上的钯。(9H-芴-9-基甲氧基) 羰基通常使用仲胺碱 (例如二乙基胺或哌啶) 来裂解。

[0170] 对化合物 (VIII) [E<sup>2</sup> = (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基或苄基] 中的酯基团 E<sup>2</sup> 加以选择, 使其裂解的条件与化合物 (VII) 的相应保护基团 PG 相容。

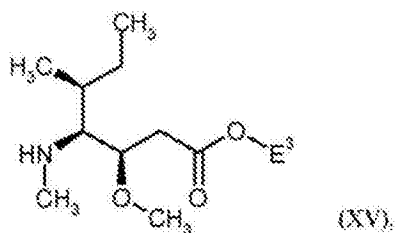
[0171] 式 (II) 的化合物可通过相似方法制备, 例如通过以下反应步骤而制备: 先将式 (XIV) 的 N-(苄氧基羰基)-L-缬氨酸



[0173] 式 (XIV) 中, Z 表示苄氧基羰基保护基团,

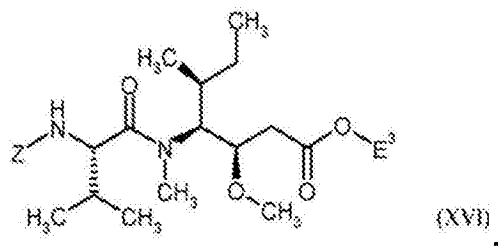
[0174] 在缩合剂的作用下与式 (XV) 的化合物

[0175]



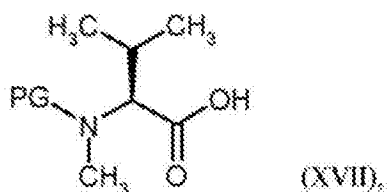
[0176] 或该化合物的盐偶联形成式 (XVI) 的化合物

[0177]

[0178] 式 (XV) 中,  $E^3$  表示  $(C_1-C_4)$ -烷基,[0179] 式 (XVI) 中,  $E^3$  和 Z 具有上述含义,

[0180] 然后, 在氢解除去 Z 保护基团之后, 在缩合剂存在的条件下使该化合物与式 (XVII) 的 N-受保护的 N-甲基-L-缬氨酸发生偶联,

[0181]

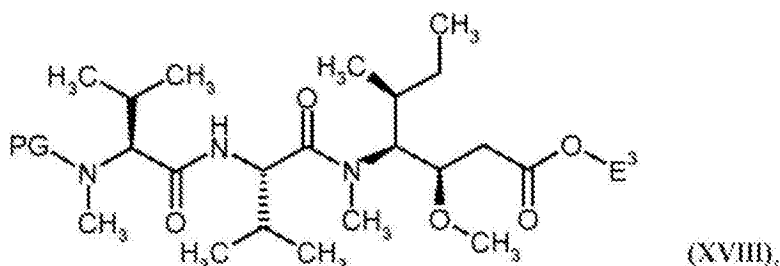


[0182] 式 (XVII) 中:

[0183] PG 表示氨基保护基, 例如 (9H-芴-9-基甲氧基) 羰基、叔丁氧基羰基或苄氧基羰基,

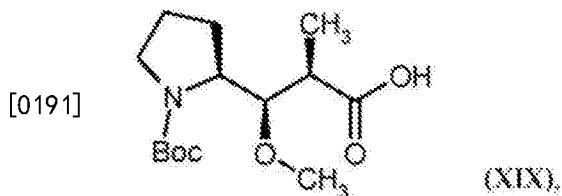
[0184] 以形成式 (XVIII) 的化合物,

[0185]

[0186] 式 (XVIII) 中,  $E^3$  和 PG 具有上述含义,[0187] 然后用常用方法使 (XVIII) 中的酯基  $-C(O)O-E^3$  发生反应以形成游离的羧基 (VII)。[0188] 偶联反应  $(XIV) + (XV) \rightarrow (XVI)$  和 Z 脱保护的  $(XVI) + (XVII) \rightarrow (XVIII)$  在与上述 [C] 和 [D] 方法中偶联步骤所述的反应条件下进行。[0189] 酯基  $-C(O)O-E^3$  在反应步骤  $(XVIII) \rightarrow (VII)$  中的水解以类似于步骤 [A] 和 [B] 中针对酯基  $E^1$  所描述的部分方式进行。对化合物 (XV) 中的烷基基团  $E^3$  加以选择, 使其裂解条件与化合物 (XVII) 的相应保护基 PG 相容。

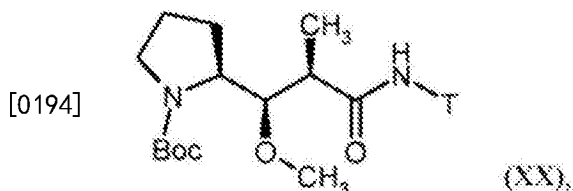
[0190] 式 (XIII) 的化合物还能通过以下方式得到: 将上述化合物 (XI) 和化合物 (XIX) 偶

联，



[0192] 式 (XIX) 中, Boc 表示叔丁氧基羰基保护基,

[0193] 以形成式 (XX) 的化合物



[0195] 式 (XX) 中, Boc 和 T 具有上述含义,

[0196] 然后裂解 Boc 保护基。

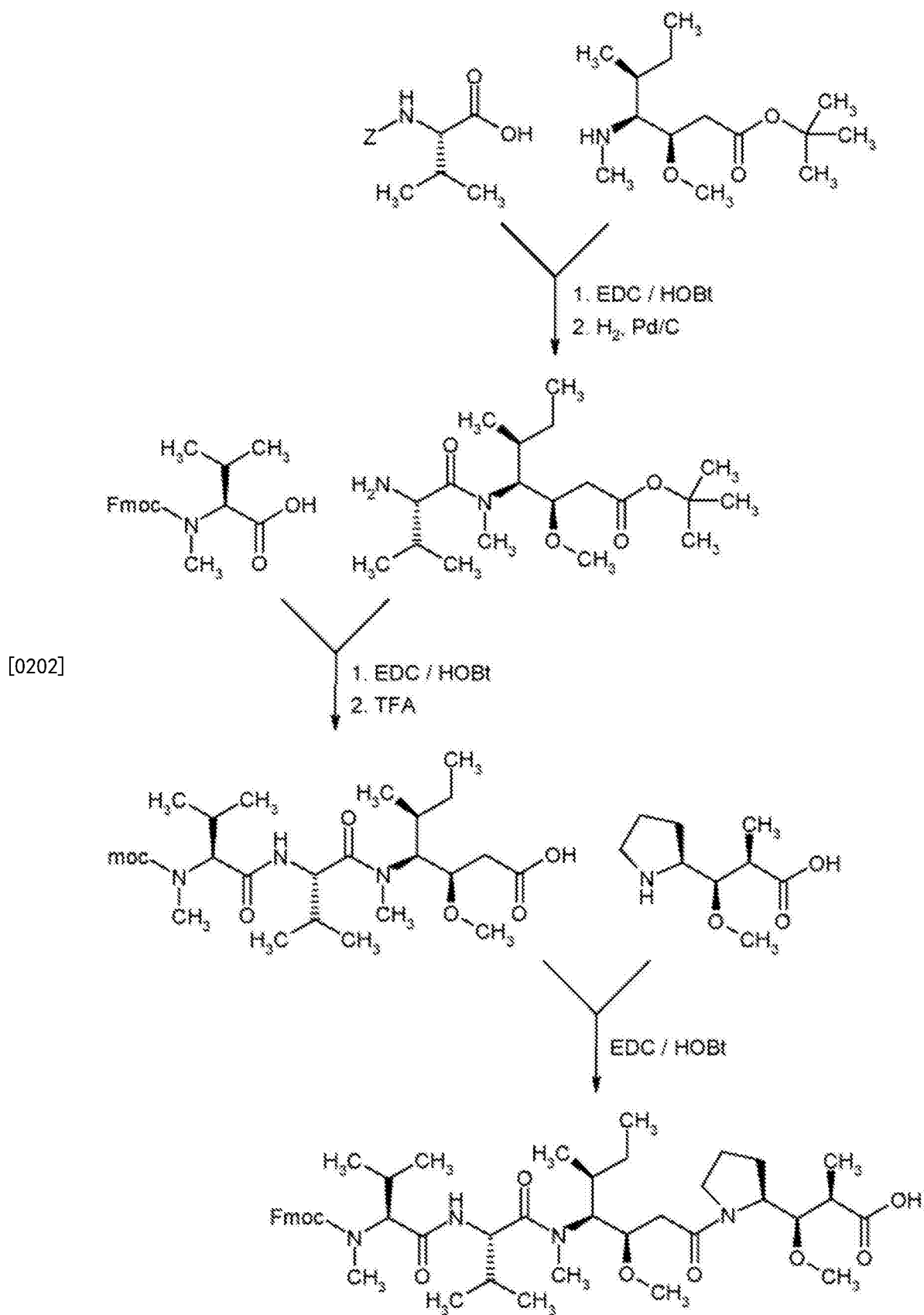
[0197] 偶联反应 (XI) + (XIX) → (XX) 进而在类似于方法 [C] 和 [D] 的偶联步骤中描述的条件下进行。

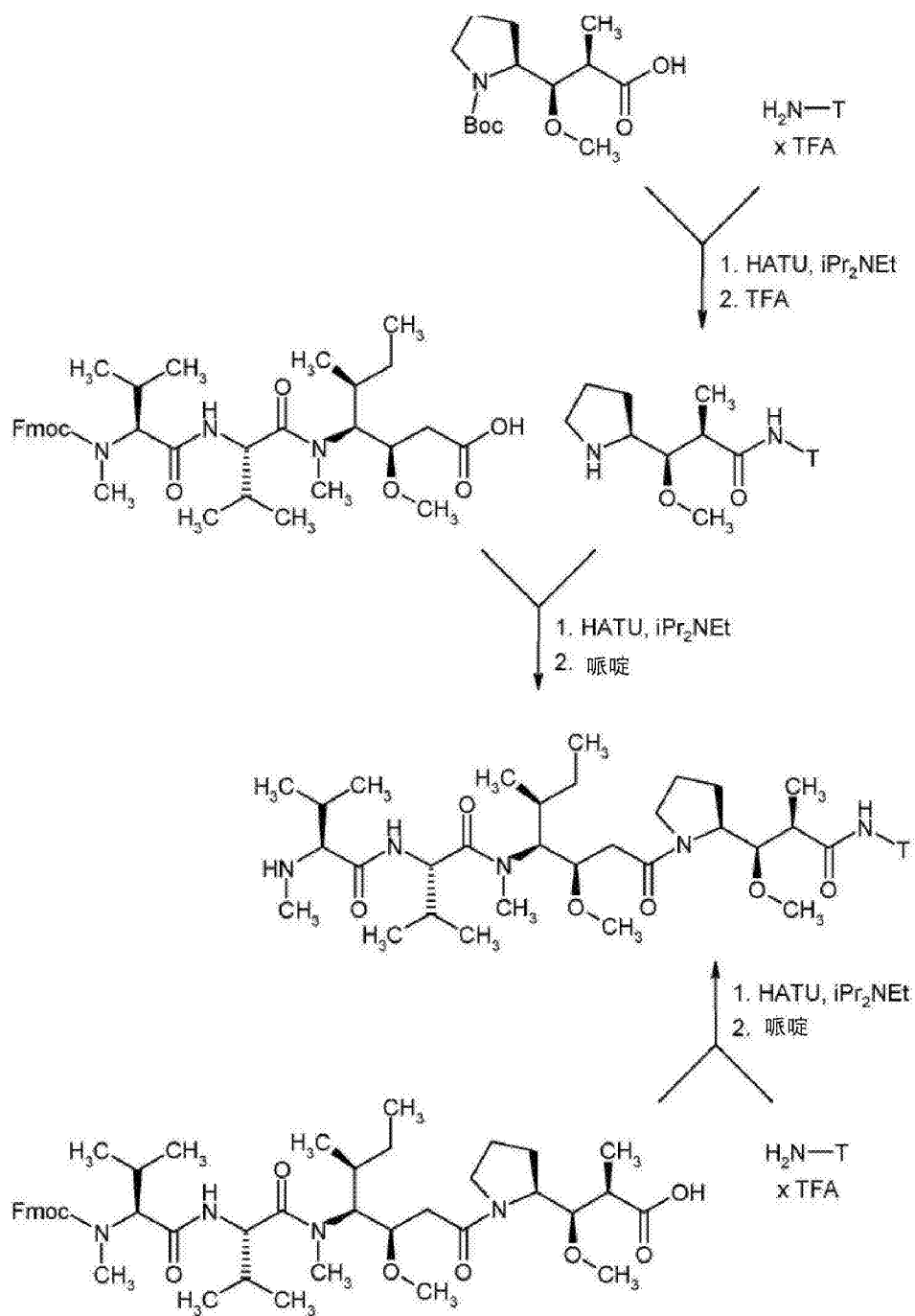
[0198] 式 (III)、(V)、(VIII)、(XI)、(XIV)、(XV)、(XVII) 和 (XIX) 的化合物, 如果适用的话包括其手性或非对映异构体形式, 可市售购得或已在文献中描述或可通过文献中公开的方法以本领域技术人员容易理解的方式合成。文献中关于原料合成的多处具体公开和说明也可参加合成原料和中间体合成的实验部分。

[0199] 如果相应的异构纯的原料无法获得, 根据本发明的化合物可在化合物 (V)、(VI)、(VII)、(XV)、(XVI)、(XVII)、(XVIII) 或 (XXI) 阶段方便地分离成相应的对映异构体和/或非对映体, 然后根据上述反应步骤使所述化合物以单独的形式进一步反应。这种立体异构体的分离可通过本领域技术人员熟悉的常规方法进行。优选使用在手性和/或非手性分离相中的色谱方法。作为中间体的游离羧酸的情况中, 在手性碱的作用下通过非对映异构体盐的分离也是种替代方式。

[0200] 可通过以下反应方案以示例性方式来说明本发明化合物的合成:

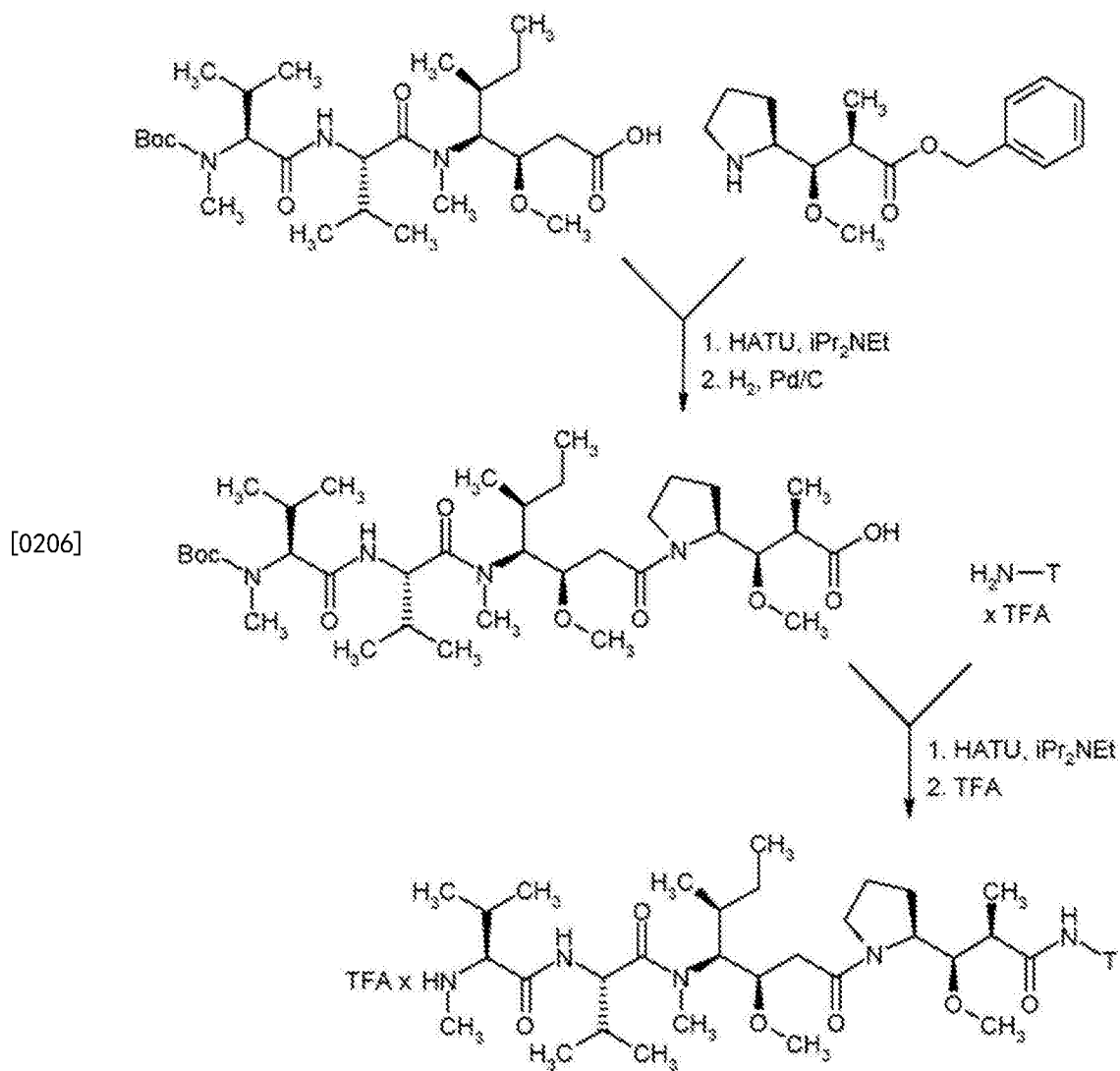
[0201] 方案1



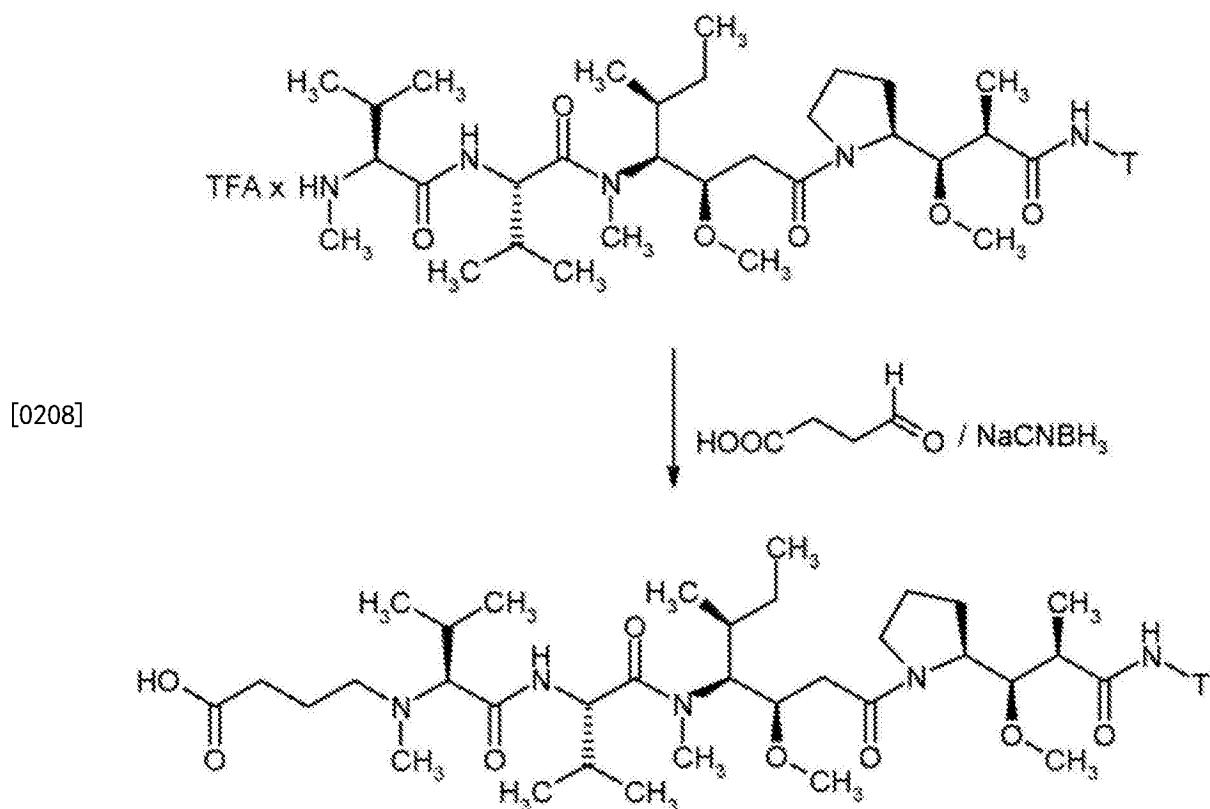


[0204]

[0205] 方案3



[0207] 方案4



[0209] 这些化合物具有有利的药理学特性并且可用于预防和治疗人和动物的疾病。

[0210] 与现有技术中已知的其它耳他汀衍生物相比,根据本发明的化合物中存在的N-末端羧基烷基[式(I)中的 $\text{HOO-C-L-}$ ]并不仅仅发挥作为与抗体蛋白或其它配体的可能连接的作用,经证明还出人意料地具有对这些化合物有利的性质的组成型结构元件。

[0211] 与(例如)单甲基耳他汀F(MMAF)相比,根据本发明的这些化合物具有更强的细胞毒活性,或者在作为细胞转运蛋白的底物的同时具有更低性能。

[0212] 因此,根据本发明的化合物特别适合于治疗通常发生于人和动物中的过度增殖性疾病。所述化合物在一方面能够抑制、阻断、减少或降低细胞增殖和细胞分裂,在另一方面可增加细胞凋亡。

[0213] 可使用本发明化合物治疗的过度增殖性疾病具体包括癌症和肿瘤疾病组。可以理解这些疾病特别包括但不限于以下在本发明范围内的疾病:乳腺癌和乳腺肿瘤(导管和小叶形式,也是原位的)、呼吸道肿瘤(小细胞和非小细胞癌,支气管癌)、脑肿瘤(例如,脑干的脑肿瘤和下丘脑的脑肿瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤以及神经外胚层瘤和松果体瘤)、消化道(食道、胃、胆囊、小肠、大肠、直肠)的肿瘤、肝肿瘤(包括肝细胞癌、胆管细胞癌和混合的肝细胞和胆管细胞癌)、头部和颈部的肿瘤(喉、下咽、鼻咽、口咽、嘴唇和口腔)、皮肤肿瘤(鳞状上皮癌、卡波济氏肉瘤、恶性黑色素瘤、梅克尔(Merkel)细胞皮肤癌和非黑色素瘤的皮肤癌)、软组织肿瘤(包括软组织肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、淋巴肉瘤和横纹肌肉瘤)、眼睛的肿瘤(包括眼内黑色素瘤和视网膜母细胞瘤)、内分泌及外分泌腺的肿瘤(如甲状腺、甲状旁腺、胰腺和唾液腺)、泌尿道的肿瘤(膀胱、阴茎、肾、肾盂和输尿管的肿瘤)以及生殖器官的肿瘤(女性的子宫内膜癌、子宫颈癌、卵巢癌、阴道癌、外阴癌和子宫癌,男性的前列腺癌和睾丸癌)。还包括以固体形式和作为循环血细胞的增殖性血液疾病,例如淋巴瘤、白血病和骨髓增生性疾病,例如急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞

白血病、慢性骨髓性白血病和毛细胞白血病,以及艾滋病相关的淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、皮肤T-细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和中枢神经系统的淋巴瘤。

[0214] 这些已经充分鉴定的人类疾病也可在具有类似病因的其它哺乳动物中发生,并且可使用本发明化合物对其进行治疗。

[0215] 用根据本发明的化合物治疗上述癌症类型包括治疗这些癌症及其转移或循环形式。

[0216] 术语“治疗”或“处理”在本发明范围中采用其常规含义,指为了对抗、减缓、减少或改善疾病或健康障碍以及改善受该疾病(例如癌症)影响的生活质量的目的,对患者进行护理、治疗或会诊。

[0217] 因而,本发明的另一主题涉及根据本发明的化合物在治疗和/或预防疾病,特别是上述疾病中的应用。

[0218] 本发明的另一主题涉及根据本发明的化合物在生产治疗和/或预防疾病,特别是上述疾病的药物中的应用。

[0219] 本发明的另一主题涉及根据本发明的化合物在治疗和/或预防疾病,特别是上述疾病的方法中的应用。

[0220] 本发明的另一主题涉及一种使用有效量的至少一种本发明化合物来治疗和/或预防疾病,特别是上述疾病的方法。

[0221] 本发明化合物可单独使用,或者(如果需要)与一种或更多种其它药理学活性物质联用,只要该联用不导致不良反应和不可接受的副作用即可。因此本发明的另一主题涉及含有至少一种本发明化合物和一种或更多种其它活性成分,特别是用于治疗 and/或预防上述疾病的成分的药物。

[0222] 本发明的化合物可与(例如)用于治疗癌症的已知抗过度增殖性、细胞增长抑制性或细胞毒性物质联用。合适的联用药物的例子包括以下:

[0223] 阿地白介素、阿仑磷酸、 $\alpha$ 夫隆(alfaferone)、阿利维A酸、别嘌呤醇、别嘌醇(aloprim)、阿乐喜(aloxi)、六甲蜜胺、氨基格鲁米特、氨磷汀、氨柔比星、安吡啶、阿那曲唑、anzmet、阿法达贝泊汀、阿格拉宾(arglabin)、三氧化二砷(arsentrioxide)、依西美坦(aromasine)、磷酸钠、贝沙罗汀、硫酸博来霉素、溴忒、硼替佐米、白消安、降钙素、阿来佐单抗(campath)、卡培他滨、卡铂、康士得、斯非松(cefesone)、西莫白介素、柔红霉素、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、枸橼酸柔红霉素脂质体(daunoxome)、地塞米松(decadrone)、磷酸地塞米松、戊酸雌二醇、地尼白介素2、狄波美(depomedrol)、地洛瑞林、右雷佐生、乙底酚、大扶康、多西紫杉醇、去氧氟尿苷、多柔比星、屈大麻酚、DW-166HC、醋酸亮丙瑞林、埃立特(elitek)、表阿霉素(ellence)、阿瑞吡坦(emend)、表柔比星、 $\alpha$ -红细胞生成素、阿法依伯汀、依他铂、左旋咪唑片、爱斯粹(estrace)、雌二醇、雌莫司汀磷酸钠、乙炔雌二醇、阿密磷定、羟乙磷酸、凡毕复、依托泊甙、法倔唑、法斯通(farstone)、非格司亭、非那雄胺、非格斯汀(fligrastim)、氟尿苷、氟康唑、氟达拉滨、5-磷酸氟尿嘧啶脱氧核苷、5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟甲睾酮、氟他胺、福美坦、福斯替宾(fosteabine)、福莫司汀、氟维司群、 $\gamma$ 加尔(gammagard)、吉西他滨、吉姆单抗(gemtuzumab)、伊马替尼(gleevec)、格立得(gliadel)、戈舍瑞林(goserelin)、盐酸格拉司琼(granisetron hydrochloride)、组氨瑞林(histrelin)、和美新(hycamtine)、氨酚氢可

酮(hydrocortone)、赤式-羟基壬基腺嘌呤、羟基脲、替伊莫单抗(ibrutinomab tiuxetan)、伊达比星、异环磷酰胺、干扰素 $\alpha$ 、干扰素 $\alpha$ -2、干扰素 $\alpha$ -2 $\alpha$ 、干扰素 $\alpha$ -2 $\beta$ 、干扰素 $\alpha$ -n1、interferon- $\alpha$ -n3、干扰素 $\beta$ 、干扰素 $\gamma$ -1 $\alpha$ 、白介素-2、内含子A、伊丽沙、伊立替康、凯特瑞、硫酸香菇多糖(lentinane sulfate)、来曲唑、亚叶酸钙(leucovorine)、亮丙瑞林、乙酸亮丙瑞林、左旋咪唑、亚叶酸钙盐、左甲状腺素钠、立渥克(levoxy1)、洛莫司汀、氯尼达明、屈大麻酚、氮芥、甲钴胺、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、美法伦(melphalan)、门尼斯特(menest)、6-巯嘌呤、mesna、甲氨蝶呤、美特维克、米替福新、米诺环素、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、曲洛司坦、麦欧斯特(myocet)、奈达铂、培非格司亭(neulasta)、纽米迦(neumega)、非格司亭((neupogen)、尼鲁米特、诺瓦得士、NSC-631570、OCT-43、奥曲肽、盐酸昂丹司琼、奥普雷德(orapred)、奥沙利铂、紫杉醇(paclitaxel)、派迪普雷德(pediapred)、培门冬酶、派罗欣、喷司他丁、匹斯邦尼(picibanil)、盐酸匹鲁卡品、吡柔比星、普利霉素、吡菲尔钠、泼尼氮芥、泼尼松龙、泼尼松、普雷马林、丙卡巴肼、普罗克瑞(procrit)、雷替曲塞(raltitrexed)、利比、铼186依替膦酸、利妥昔单抗(rituximab)、罗夫伦A(roferone A)、罗莫肽、萨拉根(salagen)、善得定(sandostatin)、沙格司亭、司莫司汀、西佐喃、索布佐生、甲强龙、链脲菌素、氯化锶-89、斯卓德(synthroid)、他莫昔芬、坦索罗辛(tamsulosine)、塔索尼敏(tasonermin)、睾内酯(tastolactone)、泰索帝(taxoter)、替西白介素、替莫唑胺、替尼泊忒、丙酸睾酮、甲睾酮(testred)、硫鸟嘌呤、噻替派、促甲状腺素、替鲁膦酸、托泊替坎、托瑞米芬(toremifen)、托西莫单抗、曲妥珠单抗、曲洛酯(teosulfane)、维甲酸、甲氨蝶呤、三甲基三聚氰胺、三甲曲沙、乙酸曲普瑞林(triptoreline acetate)、双羟萘酸曲普瑞林(triptoreline pamoate)、优福定、尿苷、valrubicin、维司力农、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、维卢力嗪、右雷佐生、净司他丁斯酯、zofran;ABI-007、阿考比芬、干扰素 $\gamma$ -1 $\beta$ (actimmune)、阿非尼塔克(affinitak)、氨蝶呤钠、阿佐昔芬、阿索佩斯尼(asoprisnil)、阿他美坦、阿曲生坦(atrasentan)、阿伐他汀、BAY43-9006(索拉非尼)、CCI-779、CDC-501、西乐葆、西妥昔单抗、克立那托、乙酸环丙孕酮、地西他滨、DN-101、多柔比星MTC、dSLIM、度他雄胺、埃朵特克琳(edotecarin)、依氟鸟氨酸、依喜替康(exatecan)、芬维A胺、二盐酸组胺、组氨瑞林水凝胶植入剂(histrelina-hydrogel implant)、钬-166-DOTMP、伊班膦酸、干扰素 $\gamma$ 、内含子PEG、伊沙匹隆、钼孔血蓝素、L-651582、兰瑞肽、拉索夫酚(lasofloxifen)、力巴(libra)、洛那法尼(lonafarnib)、米罗昔芬(miproxifen)、米诺膦酸(minodronate)、MS-209、脂质体MTP-PE(liposomalMTP-PE)、MX-6、那法瑞林(nafareline)、奈莫柔比星、新伐司他、诺拉曲塞、奥吡莫森(oblimersen)、onko-TCS、奥斯登(osidem)、紫杉醇多聚谷胺酸、帕米膦酸二钠、PN-401、QS-21、夸西泮、R-1549、雷洛昔芬、豹蛙酶、13-顺维甲酸、沙铂、沙铂、T-138067、特罗凯、塔克普辛(taxoprexine)、胸腺素 $\alpha$ -1、噻唑呋林、替吡法尼(tipifarnib)、替拉扎明、TLK-286、托瑞米芬、反MID107R(transmid107R)、伐司朴达、伐普肽、瓦他拉尼碱(vatalanib)、维替泊芬、长春氟宁、Z-100、唑来膦酸及其组合。

[0224] 在一个优选实施方式中，本发明化合物可与抗过度增殖剂(antihyperproliferative agents)联用，作为示例(而非限制性)，所述抗过度增殖剂可为选自下组的药物：

[0225] 氨鲁米特、L-天冬酰胺酶、硫唑嘌呤、5-氮杂胞苷、博来霉素、白消安、卡铂、卡莫司

汀、苯丁酸氮芥、顺铂、利血生、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、柔毛霉素、己烯雌酚、2',2'-二氟脱氧胞苷、多西紫杉醇、多柔比星(阿霉素)、表柔比星、埃博霉素及其丝氨酸衍生物、赤式-羟基壬基腺嘌呤、乙炔雌二醇、依托泊苷、磷酸氟达拉滨、5-氟脱氧尿苷、5-氟脱氧尿苷单磷酸酯、5-氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、六甲基蜜胺、羟基脲、己酸羟孕酮、伊达比星、异环磷酰胺、干扰素、伊立替康、甲酰四氢叶酸、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、氨甲喋呤、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、紫杉醇、喷司他丁、N-膦乙酰基L-天冬氨酸(PALA)、普卡霉素、泼尼松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、司莫司汀、链脲霉素、他莫西芬、替尼泊苷、丙酸睾酮、硫鸟嘌呤、噻替派、拓扑替康、三甲基蜜胺、尿苷、长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0226] 根据一种有前途的特性,根据本发明的化合物也可与生物治疗剂例如抗体(如阿伐他汀、美罗华、爱必妥、赫赛汀)联用。本发明化合物还可与针对血管生成的药物(例如,用贝伐单抗、阿西替尼、瑞森汀(recentin)、瑞格拉芬尼(regorafenib)、索拉非尼或舒尼替尼)联用而实现积极效果。本发明化合物也特别适合于与蛋白酶体抑制剂或mTOR抑制剂联用以及与抗激素和甾体代谢酶抑制剂联用,因为它们的副作用情况比较有利。

[0227] 通常,通过将本发明化合物与具有抑制细胞生长或细胞毒作用的其它药物联用可实现以下目的:

[0228] • 与使用单一药物治疗相比,在减慢肿瘤生长、减少其尺寸或者甚至使其完全消除肿瘤方面具有改进的效能;

[0229] • 与单一疗法相比,能够以较低剂量进行化疗;

[0230] • 与单剂量相比,能够以较小的副作用进行可耐受的治疗;

[0231] • 能够治疗更广谱的肿瘤;

[0232] • 实现更高的对治疗的应答率;

[0233] • 相比目前的标准疗法,患者存活时间更长。

[0234] 另外,本发明化合物还可与与放疗和/或手术干预相结合。

[0235] 本发明的另一点涉及包含至少一种本发明化合物,通常还包含一种或更多种惰性的、无毒的药学上合适的赋形剂的药物及其用于上述目的的应用。

[0236] 根据本发明的化合物可以全身性的和/或局部的。为此,它们经合适途径给药,例如经口服、肠道外、肺、鼻、舌下、舌、含服、直肠、经皮、结膜或耳途径或者以植入物和/或支架的形式给药。

[0237] 对于这些给药方法,本发明化合物可采用适合的剂型给药。

[0238] 对于口服给药,根据文献所述发挥作用并快速递送根据本发明的化合物的合适剂型和/或以改良的剂型包括晶体和/或无定形和/或溶解形式的本发明化合物,该形式例如片剂(包衣或未包衣的片剂,例如具有肠溶衣后不溶性包衣,或者控制本发明化合物释放的缓释片剂)、在口腔内快速崩解的片剂或膜剂/扁球剂、膜剂/冻干剂、胶囊(例如,硬或软明胶胶囊)、包衣丸剂、颗粒剂、微丸、粉剂、乳剂、混悬剂、气溶胶或溶液剂。

[0239] 可采用肠胃外给药以绕过吸收步骤(例如静脉内、动脉内、心内、脊柱内或腰椎内)或包括吸收(例如肌内、皮下、皮内、经皮或腹膜内)。适于胃肠道外给药的剂型包括采用溶液剂、混悬剂、乳剂、冻干剂或无菌粉剂形式的输注和注射制剂。

[0240] 对于其它给药途径,适用吸入药物形式(包括粉末吸入器,喷雾器)、滴鼻剂、溶液

剂或喷剂、舌、舌下或颊给药的片剂、膜剂、扁剂或胶囊、栓剂、耳或眼制剂、阴道栓剂,水性混悬剂(乳液、振摇混合物)、亲脂性混悬剂、软膏、乳膏、透皮治疗系统(例如贴片)、乳品、糊剂、泡沫剂、洒粉剂、植入物或支架。

[0241] 优选口服给药和胃肠道外给药,特别是口服给药和静脉给药。

[0242] 可将本发明化合物转化为所述剂型。这可以通过已知的方式,通过与惰性、无毒、药学上合适的赋形剂进行混合来实施。这些赋形剂包括但不限于载剂(例如微晶纤维素、乳糖、甘露醇)、溶剂(例如液体聚乙二醇)、乳化剂和分散剂或湿润剂(例如十二烷基硫酸钠、聚氧山梨醇油酸酯)、粘合剂(例如聚乙烯基吡咯烷酮)、合成和天然聚合物(例如白蛋白)、稳定剂(例如抗氧化剂,例如抗坏血酸)、着色剂(例如,无机颜料,例如铁氧化物)和味道和/或气味矫正剂。

[0243] 通常对于肠道外给药,已证明有利的是以约为0.001-1mg/kg体重、优选约为0.01-0.5mg/kg体重的剂量给药以实现良好效果。对于口服给药,剂量约为0.01-100mg/kg体重、优选约为0.01-20mg/kg体重、尤其优选约为0.1-10mg/kg体重。

[0244] 但可任选来自所述的必需含量,即取决于体重、给药途径、对活性成分的个体反应、给药类型以及给药物质的时间和间隔。因此,在一些情况下可能低于上述最小量即可,而在其它情况中必须超过所述上限。在给予更大剂量的情况下,可取的是将剂量分成分散于一天内的多次单独剂量。

[0245] 以下是本发明的示范性实施方式。本发明并不局限于所述实施例。

[0246] 除非另有说明,以下测试和实施例中的百分含量是重量百分数。份数是重量份数。液体/液体溶液的溶剂比、稀释比和浓度数据分别是基于体积。

[0247] A. 实施例

[0248] 缩写和首字母缩写:

|        |      |               |
|--------|------|---------------|
| [0249] | abs. | 绝对            |
| [0250] | Ac   | 乙酰基           |
| [0251] | aq.  | 水性、水性溶液       |
| [0252] | Boc  | 叔丁氧基羰基        |
| [0253] | br.  | 宽度(NMR中)      |
| [0254] | Bsp. | 示例            |
| [0255] | ca.  | 约,近似          |
| [0256] | CI   | 化学电离(MS中)     |
| [0257] | d    | 双峰(NMR中)      |
| [0258] | d    | 天             |
| [0259] | TLC  | 薄层色谱法         |
| [0260] | DCI  | 直接化学电离(MS中)   |
| [0261] | dd   | 双二重峰(NMR中)    |
| [0262] | DMAP | 4-N,N-二甲基氨基吡啶 |
| [0263] | DME  | 1,2-二甲氧基乙烷    |
| [0264] | DMF  | N,N-二甲基甲酰胺    |
| [0265] | DMSO | 二甲亚砜          |

|        |                |                                       |
|--------|----------------|---------------------------------------|
| [0266] | DPBS           | 杜尔伯科磷酸盐缓冲盐水溶液                         |
| [0267] | dt             | 双三重峰 (NMR中)                           |
| [0268] | theor.         | 理论上                                   |
| [0269] | EDC            | N'-(3-二甲氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺盐酸盐             |
| [0270] | EI             | 电子碰撞电离 (MS中)                          |
| [0271] | eq.            | 当量                                    |
| [0272] | ESI            | 电子喷雾电离 (MS中)                          |
| [0273] | FCS            | 胎牛血清                                  |
| [0274] | Fmoc           | (9H-芴-9-基甲氧基) 羰基                      |
| [0275] | GC-MS          | 气相色谱-质谱                               |
| [0276] | sat.           | 饱和                                    |
| [0277] | GTP            | 5'-三磷酸鸟苷                              |
| [0278] | h              | 小时                                    |
| [0279] | HATU           | O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐 |
| [0280] | HEPES          | 4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸                     |
| [0281] | HOAc           | 乙酸                                    |
| [0282] | HOBt           | 1-羟基-1H-苯并三唑水合物                       |
| [0283] | HOSu           | N-羟基琥珀酰亚胺                             |
| [0284] | HPLC           | 高压、高效液相色谱                             |
| [0285] | HR-MS          | 高分辨率质谱                                |
| [0286] | conc.          | 浓缩的                                   |
| [0287] | LC-MS          | 液相色谱-结合质谱                             |
| [0288] | m              | 多重峰 (NMR中)                            |
| [0289] | min            | 分钟                                    |
| [0290] | MS             | 质谱                                    |
| [0291] | MTBE           | 甲基叔丁基醚                                |
| [0292] | MTT            | 溴化3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2H-四唑盐    |
| [0293] | NMM            | N-甲基吗啉                                |
| [0294] | NMP            | N-甲基-2-吡咯烷酮                           |
| [0295] | NMR            | 核磁共振                                  |
| [0296] | PBS            | 磷酸盐缓冲盐溶液                              |
| [0297] | Pd/C           | 活性炭载钯                                 |
| [0298] | quant.         | 定量 (产率中)                              |
| [0299] | quart          | 四重峰 (NMR中)                            |
| [0300] | quint          | 五重峰 (NMR中)                            |
| [0301] | R <sub>f</sub> | 保留指数 (DC中)                            |
| [0302] | RT             | 室温                                    |
| [0303] | R <sub>t</sub> | 保留时间 (HPLC中)                          |
| [0304] | s              | 单重峰 (NMR中)                            |

[0305] t 三重峰 (NMR中)

[0306] tert 叔

[0307] TFA 三氟乙酸

[0308] THF 四氢呋喃

[0309] UV 紫外光谱法

[0310] v/v 体积/体积比 (溶液的)

[0311] Z 苄氧基羰基

[0312] tog. 一起

[0313] HPLC、LC-MS和GC-MS方法:

[0314] 方法1 (LC-MS):

[0315] 仪器:沃特斯公司 (Waters) 的Acquity SQD UPLC系统;柱:沃特斯公司的Acquity UPLC HSS T31.8 $\mu$ 50mm $\times$ 1mm;洗脱剂A:1升水+0.25mL99%甲酸;洗脱液B:1升乙腈+0.25mL99%甲酸;梯度:0.0分钟90%A $\rightarrow$ 1.2分钟5%A $\rightarrow$ 2.0分钟5%A;流量:0.40mL/分钟;炉:50 $^{\circ}$ C;UV检测:210–400nm。

[0316] 方法2 (LC-MS):

[0317] 仪器:带有沃特斯公司的UPLC Acquity的Micromass Quattro Premier;柱:Thermo Hypersil GOLD1.9 $\mu$ 50mm $\times$ 1mm;洗脱剂A:1升水+0.5mL50%甲酸;洗脱液B:1升乙腈+0.5mL50%甲酸;梯度:0.0分钟90%A $\rightarrow$ 0.1分钟90%A $\rightarrow$ 1.5分钟10%A $\rightarrow$ 2.2分钟10%A;流量:0.33mL/分钟;炉:50 $^{\circ}$ C;UV检测:210nm。

[0318] 方法3 (LC-MS):

[0319] 仪器:带有HPLC安捷伦 (Agilent) 系列1100的Micromass QuattromicromS;柱:Thermo Hypersil GOLD3 $\mu$ 20mm $\times$ 4mm;洗脱剂A:1升水+0.5mL50%甲酸;洗脱液B:1升乙腈+0.5mL50%甲酸;梯度:0.0分钟100%A $\rightarrow$ 3.0分钟90%A $\rightarrow$ 4.0分钟10%A $\rightarrow$ 4.01分钟10%A (流量:2.5mL/分钟) $\rightarrow$ 5.00分钟100%A;炉:50 $^{\circ}$ C;流量:2mL/分钟;UV检测:210nm。

[0320] 方法4 (LC-MS):

[0321] MS仪器类型: Micromass ZQ; HPLC仪器类型: HP1100系列; UV DAD; 柱: Phenomenex Gemini3 $\mu$ 30mm $\times$ 3.00mm; 洗脱剂A: 1升水+0.5mL50%甲酸; 洗脱液B: 1升乙腈+0.5mL50%甲酸; 梯度: 0.0分钟90%A $\rightarrow$ 2.5分钟30%A $\rightarrow$ 3.0分钟5%A $\rightarrow$ 4.5分钟5%A; 流量: 0.0分钟1mL/分钟 $\rightarrow$ 2.5分钟/3.0分钟/4.5分钟2mL/分钟; 炉: 50 $^{\circ}$ C; UV检测: 210nm。

[0322] 方法5 (HPLC):

[0323] 仪器: HP1090系列II; 柱: Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, 50mm $\times$ 4.6mm; 前置柱: Merck Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e, 5mm $\times$ 4.6mm; 进样体积: 5 $\mu$ L; 洗脱剂A: 70% $\text{HClO}_4$ 的水溶液 (4mL/L); 洗脱剂B: 乙腈; 梯度: 0.00分钟20%B $\rightarrow$ 4.00分钟20%B; 流量: 5mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C。

[0324] 方法6 (HPLC):

[0325] 仪器: 带有DAD996的沃特斯公司的2695; 柱: Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, 50mm $\times$ 4.6mm; 前置柱: Merck Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e, 5mm $\times$ 4.6mm; 洗脱剂A: 70% $\text{HClO}_4$ 的水溶液 (4mL/L); 洗脱剂B: 乙腈; 梯度: 0.00分钟5%B $\rightarrow$ 3.00分钟95%B $\rightarrow$ 4.00分钟95%B; 流量: 5mL/分钟。

[0326] 方法7 (LC-MS) :

[0327] 仪器类型:Waters ZQ;HPLC仪器类型:安捷伦1100系列;UV DAD;柱:Thermo Hypersil GOLD3 $\mu$ 20mm $\times$ 4mm;洗脱剂A:1升水+0.5mL50%甲酸;洗脱液B:1升乙腈+0.5mL50%甲酸;梯度:0.0分钟100%A $\rightarrow$ 3.0分钟10%A $\rightarrow$ 4.0分钟10%A $\rightarrow$ 4.1分钟100%A(流量:2.5mL/分钟);炉:55 $^{\circ}$ C;流量:2mL/分钟;UV检测:210nm。

[0328] 方法8 (LC-MS) :

[0329] MS仪器类型:Waters ZQ;HPLC仪器类型:安捷伦1100系列;UV DAD;柱:Thermo Hypersil GOLD3 $\mu$ 20mm $\times$ 4mm;洗脱剂A:1升水+0.5mL50%甲酸;洗脱液B:1升乙腈+0.5mL50%甲酸;梯度:0.0分钟100%A $\rightarrow$ 2.0分钟60%A $\rightarrow$ 2.3分钟40%A $\rightarrow$ 3.0分钟20%A $\rightarrow$ 4.0分钟10%A $\rightarrow$ 4.2分钟100%A(流量:2.5mL/分钟);炉:55 $^{\circ}$ C;流量:2mL/分钟;UV检测:210nm。

[0330] 方法9 (LC-MS) :

[0331] 仪器:沃特斯公司(Waters)的Acquity SQD UPLC系统;柱:沃特斯公司的Acquity UPLC HSS T31.8 $\mu$ 50mm $\times$ 1mm;洗脱剂A:1升水+0.25mL99%甲酸;洗脱液B:1升乙腈+0.25mL99%甲酸;梯度:0.0分钟95%A $\rightarrow$ 6.0分钟5%A $\rightarrow$ 7.5分钟5%A;炉:50 $^{\circ}$ C;流量:0.35mL/分钟;UV检测:210-400nm。

[0332] 方法10 (HPLC) :

[0333] 仪器:安捷伦1200系列;柱:Agilent Eclipse XDB-C185 $\mu$ 4.6mm $\times$ 150mm;前置柱:Phenomenex KrudKatcher一次性前置柱;进样体积:5 $\mu$ l;洗脱剂A:1升水+0.01%三氟乙酸;洗脱剂B:1升乙腈;梯度:0.0分钟10%B $\rightarrow$ 1.00min10%B $\rightarrow$ 1.50分钟90%B $\rightarrow$ 5.5分钟10%B;流量:2mL/分钟;柱温:30 $^{\circ}$ C。

[0334] 方法11 (LC-MS) :

[0335] 仪器:沃特斯公司(Waters)的Acquity SQD UPLC系统;柱:沃特斯公司的Acquity UPLC HSS T31.8 $\mu$ 30mm $\times$ 2mm;洗脱剂A:1升水+0.25mL99%甲酸;洗脱液B:1升乙腈+0.25mL99%甲酸;梯度:0.0分钟90%A $\rightarrow$ 1.2分钟5%A $\rightarrow$ 2.0分钟5%A;流量:0.60mL/分钟;炉:50 $^{\circ}$ C;UV检测:208-400nm。

[0336] 方法12 (GC-MS) :

[0337] 仪器:Micromass GCT,GC6890;柱:Restek RTX-35,15m $\times$ 200 $\mu$ m $\times$ 0.33 $\mu$ m;氦气恒定流速:0.88mL/分钟;炉:70 $^{\circ}$ C;进口:250 $^{\circ}$ C;梯度:70 $^{\circ}$ C,30 $^{\circ}$ C/分钟 $\rightarrow$ 310 $^{\circ}$ C(保持3分钟)。

[0338] 方法13 (HR-MS) :

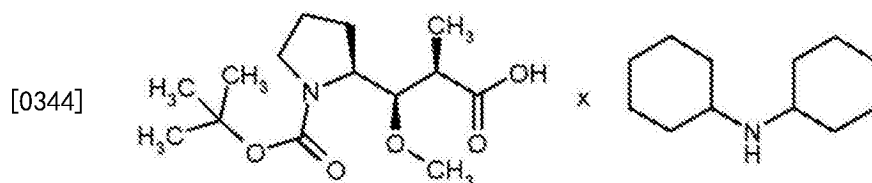
[0339] 仪器:热科学公司(Thermo Scientific)LTQ Orbitrap XL;正FTMS ESI

[0340] 在下文中未明确描述制备方法的所有反应物和试剂可从常用易得市售来源获得。至于在下文中未明确描述制备方法且无法市售购得或其获取来源不易得到的所有其它反应物和试剂,已引用加载其制备方法的公开文献。

[0341] 起始化合物和中间体:

[0342] 起始化合物1

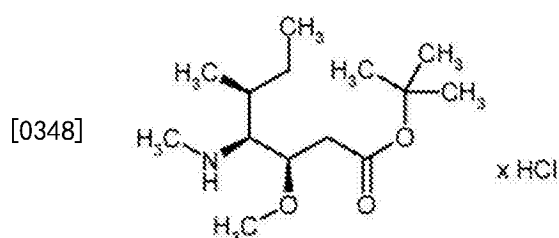
[0343] (2R,3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸(Boc-多拉脯氨酸)二环己基胺盐



[0345] 该标题化合物可根据文献方法通过各种方法合成,例如参见Pettit等人,《合成》(Synthesis) 1996,719;Shioiri等人,Tetrahedron Lett.1991,32,931;Shioiri等人,Tetrahedron 1993,49,1913;Koga等人,Tetrahedron Lett.1991,32,2395;Vidal等人,Tetrahedron 2004,60,9715;Poncet等人,Tetrahedron 1994,50,5345。这里是根据Shioiri等人的方法(Tetrahedron Lett.1991,32,931)而合成。

[0346] 起始化合物2

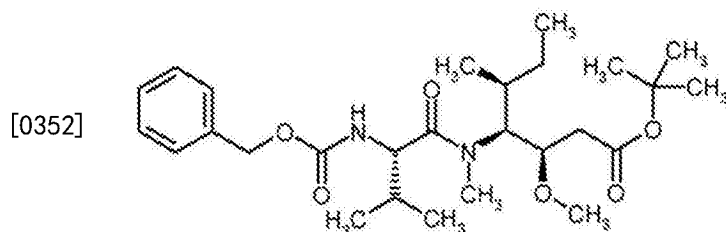
[0347] (3R,4S,5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-(甲基氨基)庚酸叔丁酯盐酸盐(多拉异亮氨酸-OtBu×HCl)



[0349] 所述标题化合物可根据文献方法通过各种方法合成,例如参见Pettit等人,J.Org.Chem.1994,59,1976Shioiri等人,Koga等人,Tetrahedron Lett.91,32,2395;Shioiri等人,Tetrahedron Lett.1991,32,931;Shioiri等人,Tetrahedron 1993,49,1913。这里是根据Koga等人的方法(Tetrahedron Lett.1991,32,2395)而合成。

[0350] 中间体1

[0351] (3R,4S,5S)-4-[N-[(苄氧基)羰基]-L-缬氨酰基](甲基氨基)-3-甲氧基-5-甲基庚酸叔丁酯



[0353] 将425mg (1.7mmol)的N-[(苄氧基)羰基]-L-缬氨酸溶解于50mL DMF中,依次混合500mg (1.7mmol)的(3R,4S,5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-(甲基氨基)庚酸叔丁酯盐酸盐(起始化合物2)、356mg (1.9mmol)的1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、285mg (1.9mmol)的1-羟基-1H-苯并三唑水合物和655mg (5.1mmol)的N,N-二异丙基乙基胺。在室温下将该混合物搅拌20小时。添加142mg (0.5mmol)的N-[(苄氧基)羰基]-L-缬氨酸、119mg (0.6mmol)的1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、95mg (0.6mmol)的1-羟基-1H-苯并三唑水合物和218mg (1.7mmol)的N,N-二异丙基甲基胺,对该混合物用进行90分钟超声处理。然后将该批次倒入50%饱和的氯化铵水溶液与乙酸乙酯的混合物中。分离有机相,用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。随后用制备

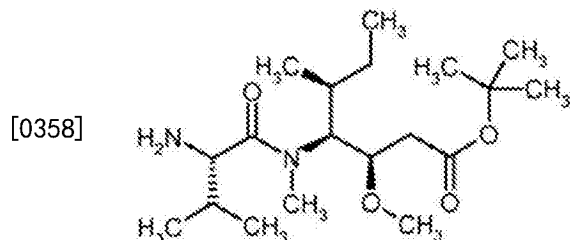
型HPLC对残留物进行纯化,产生329mg(理论上为40%)无色油状物形态的标题化合物。

[0354] HPLC(方法5): $R_t=2.5$ 分钟;

[0355] LC-MS(方法1): $R_t=1.45$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=493$ (M+H)<sup>+</sup>。

[0356] 中间体2

[0357] (3R,4S,5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-[甲基(L-缬氨酰基)氨基]庚酸叔丁酯

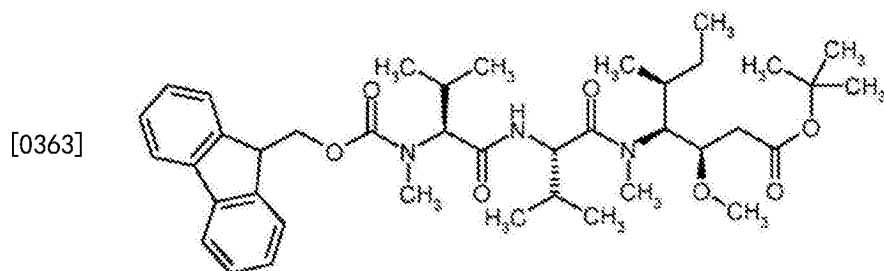


[0359] 将500mg(1mmol)的(3R,4S,5S)-4-[N-[(苄氧基)羰基]-L-缬氨酰基](甲基)氨基]-3-甲氧基-5-甲氧基庚酸叔丁酯(中间体1)溶解于50mL甲醇中,在添加100mg10%负载在活性炭上的钨后,在室温和常压下氢化1小时。然后过滤除去催化剂并且在真空下除去溶剂,产生370mg(定量)几乎无色的油状物形态的标题化合物。HPLC(方法5): $R_t=1.59$ 分钟;

[0360] LC-MS(方法1): $R_t=0.74$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=359$ (M+H)<sup>+</sup>。

[0361] 中间体3

[0362] N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-叔丁氧基-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



[0364] 将396mg(1.1mmol)的N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酸溶解于DMF中随后依次与365mg(1mmol)的(3R,4S,5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-[甲基(L-缬氨酰基)氨基]庚酸叔丁酯(中间体2)、234mg(1.2mmol)的1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和187mg(1.2mmol)的1-羟基-1H-苯并三唑水合物混合。将该混合物在室温下搅拌一夜。然后将该批次倒入50%饱和的氯化铵水溶液与乙酸乙酯的混合物中。分离有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。该残留物无需纯化即可直接用于下一个步骤。

[0365] 产量:660mg(理论上为68%)

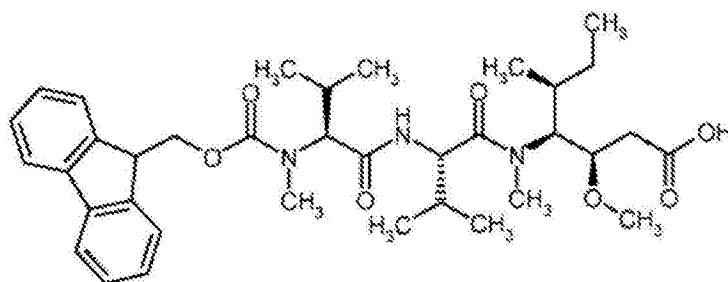
[0366] HPLC(方法5): $R_t=3.0$ 分钟;

[0367] LC-MS(方法1): $R_t=1.61$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=694$ (M+H)<sup>+</sup>。

[0368] 中间体4

[0369] N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R,3S,4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0370]



[0371] 将650mg (0.94mmol) 的N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-叔丁氧基-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体3)溶解于5mL二氯甲烷,与5mL三氟乙酸混合,在室温下搅拌一夜。随后真空浓缩该混合物,用制备型HPLC纯化该残留物,产生430mg(理论上为40%)无色油状形态的标题化合物。

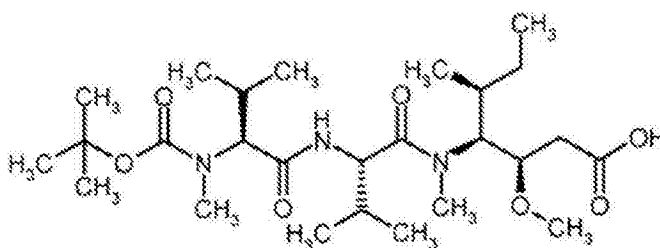
[0372] HPLC(方法5): $R_t=2.4$ 分钟;

[0373] LC-MS(方法2): $R_t=1.51$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=638$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0374] 中间体5

[0375] N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R,3S,4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基-己烷-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0376]



[0377] 将51mg (0.08mmol) N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R,3S,4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体4)溶解于10mL DMF,与0.5mL哌啶混合。在室温下搅拌10分钟后,使该批次在真空下蒸发,将所得剩余物与乙醚搅拌。滤除不溶的组分,用乙醚洗涤数次。然后将滤渣溶解于5mL二噁烷/水(1:1)中,用1N氢氧化钠水溶液将该溶液的pH值调节为11。在超声处理下,以多份的形式添加总量为349mg (1.6mmol)的二碳酸二叔丁酯,该溶液的pH值保持在11。反应结束后,蒸发掉二噁烷,用柠檬酸将该水溶液的pH值调节为2至3。每次用50mL乙酸乙酯进行两次萃取。将合并的有机相用MgSO<sub>4</sub>干燥,真空浓缩。将残留物溶解于乙醚中,用戊烷沉淀该产物。通过倾析分离溶剂。再用戊烷消化该残留物,最后在高真空中干燥,产生31mg(理论上为93%)的标题化合物。

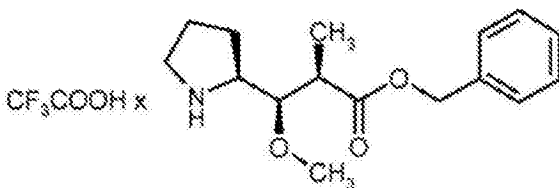
[0378] HPLC(方法6): $R_t=2.2$ 分钟;

[0379] LC-MS(方法2): $R_t=1.32$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=516$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0380] 中间体6

[0381] (2R,3R) 甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基] 丙酸苄酯三氟乙酸盐

[0382]



[0383] 首先,通过溶于150mL乙酸乙酯并用100mL的0.5%水性硫酸提取,从1.82g (3.88mmol)的二环己基胺盐(起始化合物1)释放出(2R,3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸。将该有机相用硫酸镁干燥,过滤,浓缩。将该残留物溶解于10mL二噁烷和10mL水中,与517mg (4.66mmol)碳酸铯混合,在超声浴中处理5分钟。然后将其在真空中浓缩,所得剩余物与DMF共蒸馏一次。然后将残余物溶解于15mL DMF,与1990mg (11.64mmol)苄基溴混合。所述混合物在超声浴中处理15分钟,然后在真空下浓缩。使该残留物在乙酸乙酯和水之间分配。分离有机相,用溴化钠溶液清洗,然后浓缩。最后用制备型HPLC纯化该残留物,得到1170mg (理论上为80%)经Boc保护的中间体(2S)-2-[(1R,2R)-3-(苄氧基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-羧酸叔丁酯。

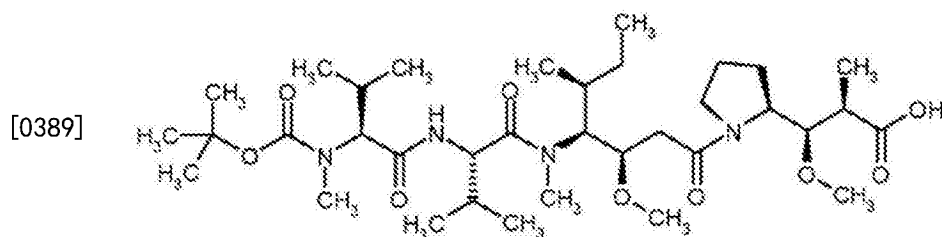
[0384] 将该1170mg的中间体立即溶解于15mL二氯甲烷,与5mL三氟乙酸混合。在室温下搅拌10分钟后,将该批次真空浓缩,将剩余物从二噁烷中冻干。在高真空下干燥后,得到1,333mg (理论上84%)黄色油状的标题化合物。

[0385] HPLC(方法5): $R_t=1.5$ 分钟;

[0386] LC-MS(方法1): $R_t=0.59$ 分钟;MS (ESIpos): $m/z=278$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0387] 中间体7

[0388] N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



[0390] 使1200mg (2.33mmol)的N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R,3S,4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己烷-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体5)与910.8mg (2.33mmol)苄基-(2R,3R)-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酸三氟乙酸钠(中间体6)、1327mg (3.49mmol)的O-(7-杂氮苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐和2027μL N,N-二异丙基乙胺在50mL的DMF中混合,并在室温下搅拌5分钟。接着在真空下除去溶剂。将残留的剩余物溶解于乙酸乙酯,然后依次在5%的柠檬酸水溶液和饱和碳酸氢钠溶液中萃取。分离并浓缩有机相。通过制备型HPLC对该残留物进行纯化。混合,将该产品馏分浓缩,在高真空下干燥该残留物,产生1000mg (理论上55%)树脂状的苄酯中间体N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-(苄氧基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0391] LC-MS(方法1): $R_t=1.56$ 分钟;MS (ESIpos): $m/z=775$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0392] 将全部的所得该中间体溶解于25mL的甲醇与二氯甲烷(20:1)混合物中,通过在常压下使用10%活性炭上的钨作为催化剂进行水合而脱去苄酯基。在室温下搅拌30分钟后,滤除催化剂,将该滤液真空浓缩,产生803mg (理论上为91%)白色固体形式的标题化合物。

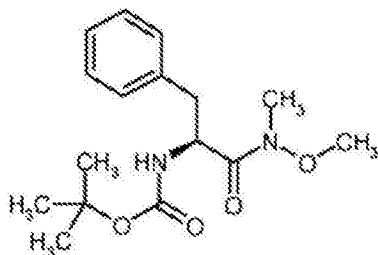
[0393] HPLC(方法5): $R_t=2.1$ 分钟;

[0394] LC-MS (方法1) :  $R_t=1.24$  分钟; MS (ESIpos) :  $m/z=685$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0395] 中间体8

[0396] N<sup>d</sup>-(叔丁氧基羰基)-N-甲氧基-L-苯基丙氨酸酰胺

[0397]



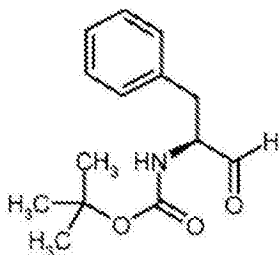
[0398] 将1000mg (3.77mmol) N-(叔丁氧基羰基)-L-苯丙氨酸置于10mL二氯甲烷中并和733mg (4.52mmol) 1,1'-羰基二咪唑混合。将该批料搅拌15分钟直到气体生成过程结束。之后将该混合物与441mg (4.52mmol) N,0-二甲基盐酸羟胺和657 $\mu$ L (3.77mmol) N,N-二异丙基乙胺混合,在室温下搅拌1小时。之后用二氯甲烷稀释该批次,依次用蒸馏水、0.5N盐酸和饱和氯化钠溶液清洗。分离有机相,将混合的水相用乙酸乙酯再次萃取。将混合的有机相用硫酸镁干燥,真空浓缩,产生1090mg (理论上为93%) 的标题混合物。

[0399] LC-MS (方法1) :  $R_t=1.02$  分钟; MS (ESIpos) :  $m/z=309$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0400] 中间体9

[0401] [(2S)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基甲酸叔丁酯

[0402]



[0403] 将1090mg (3.5mmol) N<sup>d</sup>-(叔丁氧基羰基)-N-甲氧基-N-甲基-L-苯丙氨酸酰胺溶于20mL 2-甲基四氢呋喃中,冷却至0℃。然后向THF中缓慢加入4.2mL (4.2mmol) 的1M氢化铝锂溶液,在0℃下将该反应混合物搅拌30分钟。之后小心地添加5%硫酸氢钾水溶液。随后用水稀释该批次,用MTBE萃取。用硫酸镁干燥有机相,真空浓缩,产生820mg (理论上为94%) 的标题混合物。

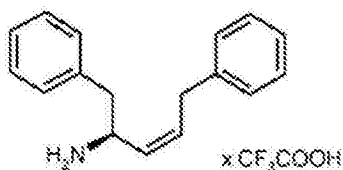
[0404] GC-MS (方法12) :  $R_t=5.61$  分钟; MS (ESIpos) :  $m/z=220$  (M-29)<sup>+</sup>

[0405] <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  [ppm] = 1.15-1.42 (m, 9H), 7.11-7.39 (m, 5H), 9.52 (s, 1H) [溶剂峰值下隐藏的其他信号]

[0406] 中间体10

[0407] (2S,3Z)-1,5-二苯基戊-3-烯-2-胺三氟乙酸盐

[0408]



[0409] 在氩气中,将842 $\mu$ L (2.1mmol) 2.5m溶于己烷中的正丁基锂溶液在-78℃下加入溶

于125mL THF的986mg (2.2mmol) 三苯基-(2-苯乙基) 溴化磷悬液[例如,可根据 R.W.Hartmann,M.Reichert,Archiv der Pharmazie333,145 (2000);K.C.Nicolaou等人, European J.Chem.1,467 (1995)的方法合成]中,然后将该混合物在0℃下搅拌1小时。之后将该反应混合物冷却回-78℃,加入5mL干燥THF中含有500mg (2.0mmol) [(2S)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基甲酸叔丁酯的溶液。将该批次加热至0℃,在此温度下再搅拌3小时。通过加入饱和氯化铵水溶液而终止反应。用MTBE稀释该混合物,分离该相,用硫酸镁干燥有机相,真空浓缩。在硅胶柱中使用5:1的环己烷/乙酸作为流动相对残留物进行纯化。浓缩相应馏分后,获得173mg (理论上25.6%) 经Boc-保护的中间体, [(2S,3Z)-1,5-二苯基戊-3-烯-2-基]氨基甲酸叔丁酯。

[0410]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.16-1.46 (m, 9H), 2.62 (dd,  $J$ =13.20Hz, 7.34Hz, 1H), 2.73-3.18 (m, 1H), 4.56 (t,  $J$ =7.46Hz, 1H), 5.27-5.57 (m, 1H), 6.98-7.32 (m, 10H) [溶剂峰值下隐藏的其它信号]。

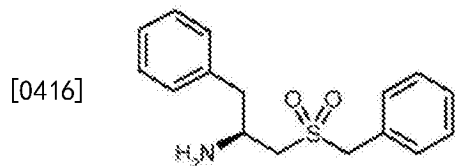
[0411] 将173mg (512 $\mu$ mol) 中间体 [(2S,3Z)-1,5-二苯基戊-3-烯-2-基]氨基甲酸叔丁酯置于16mL二氯甲烷中,与4mL三氟乙酸混合,在室温下静置30分钟。之后将该反应混合物浓缩,在真空下干燥该残留物,产生180mg (理论产率为99%) 的标题混合物。

[0412] LC-MS (方法1):  $R_t$ =0.74分钟;MS (ESIpos):  $m/z$ =238 (M+H) $^+$ 。

[0413]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.64-2.83 (m, 1H), 2.88-3.22 (m, 2H), 4.00-4.55 (m, 1H), 5.16-5.46 (m, 1H), 5.48-5.78 (m, 1H), 6.60-6.89 (m, 2H), 7.14 (s, 3H), 7.22-7.36 (m, 5H), 7.89-8.27 (m, 2H)。

[0414] 中间体11

[0415] (2S)-1-(苄基磺酰基)-3-苯基丙-2-胺



[0417] 将200mg (1.13mmol) (4S)-4-苄基-1,3-苄基-1,3-噁唑烷-2-酮置于3mL叔丁烷中并与280mg (2.26mmol) 苄基硫醇混合。在回流下将该混合物加热2天。然后在旋转蒸发器上浓缩该批次,所得中间体 (2S)-1-(苄基硫烷基)-3-苯基丙-2-胺在不处理的条件下进一步反应。

[0418] HPLC (方法10):  $R_t$ =2.63分钟;

[0419] LC-MS (方法1):  $R_t$ =0.67分钟;MS (ESIpos):  $m/z$ =258 (M+H) $^+$ 。

[0420] 将上述所得粗中间体溶解于2mL的30%过氧化氢和5mL甲酸溶液中,在室温下搅拌12小时。然后将该反应混合物倒入饱和硫酸钠水溶液中,用乙酸萃取3次。将有机相用 $\text{MgSO}_4$ 干燥,真空浓缩。用制备型HPLC将所得产物纯化,产生343mg (理论上为61%) 标题化合物。

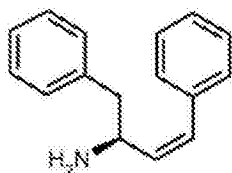
[0421] HPLC (方法10):  $R_t$ =2.40分钟;

[0422] LC-MS (方法1):  $R_t$ =0.65分钟;MS (ESIpos):  $m/z$ =290 (M+H) $^+$ 。

[0423] 中间体12

[0424] (2S,3Z)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-胺

[0425]



[0426] 将552.7mg (9.85mmol) 氢氧化钾溶于甲烷,吸附到1.1g氧化铝上,然后在高真空下干燥。在5-10℃下,将307μL (3.3mmol) 二溴二氟甲烷逐滴加入含240mg (0.82mmol) (2S)-1-苄基磺酰基)-3-苯基丙-2-胺和用该方法在氢氧化铝上制备的1.56g氢氧化钾的溶解于正丁醇的溶液。将反应混合物在室温下搅拌2小时,然后用Celite过滤,将残留物再次用二氯甲烷充分清洗。将滤液浓缩,对所得滤液进行真空干燥。用制备型HPLC对所得粗产物进行纯化,产生98mg (理论上为35%) E/Z非对映体比例为4:1的标题化合物。

[0427] HPLC (方法10) :  $R_t$  = 2.46分钟;

[0428] LC-MS (方法1) :  $R_t$  = 0.75分钟; MS (ESIpos) :  $m/z$  = 224 (M+H)<sup>+</sup>。

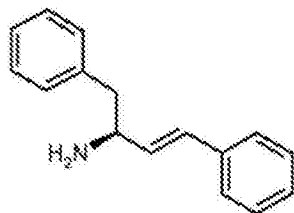
[0429] 将以上所得的E/Z非对映体混合物溶于2mL乙醇和0.2mL N,N-二异丙基乙胺中,用HPLC在手性相[柱: aice1 Chiralpak AD-H, 5μm, 250mm × 20mm; 洗脱液: 己烷/(乙烷+0.2%二乙胺) 50:50v/v; UV检测: 220nm; 温度: 30℃]中分离。在旋转蒸发器上浓缩该相应馏分,对该残留物真空干燥,产生10mg纯Z异构体形式的标题化合物。

[0430] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  [ppm] = 2.71 (d, J = 6.60Hz, 2H), 3.73-3.95 (m, 1H), 5.42-5.67 (m, 1H), 6.21-6.50 (m, 1H), 7.08-7.38 (m, 10H) [溶剂峰值下隐藏的其它信号]。

[0431] 中间体13

[0432] (2S,3E)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-胺

[0433]



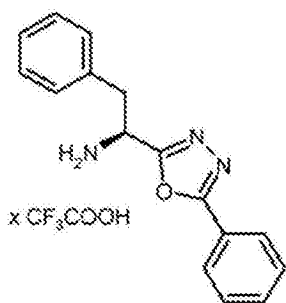
[0434] 如中间体12中所述,在色谱非对映体分离过程中的手性相中得到产量为45mg的标题化合物(纯E异构体)。

[0435] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  [ppm] = 2.62-2.83 (m, 2H), 3.52-3.71 (m, 1H), 6.18-6.30 (m, 1H), 6.34-6.46 (m, 1H), 6.98-7.57 (m, 10H) [溶剂峰值下隐藏的其它信号]。

[0436] 中间体14

[0437] (1S)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙胺三氟乙酸盐

[0438]



[0439] 将200mg (0.75mmol) N-(叔丁氧基羰基)-L-苯丙氨酸在0℃下置于5.5mL二氯甲烷

中,与128mg (0.79mmol) 1,1'-羰基二咪唑混合。30分钟后,加入103mg (0.75mmol) 苯甲酰肼。最后在45分钟后0℃下加入500mg (1.5mmol) 四溴化碳和395mg (1.5mmol) 三苯基膦。该批次先在0℃下搅拌2小时,再在室温下搅拌一夜。然后在旋转蒸发器上浓缩该混合物,在高真空下干燥该剩余物。最后用制备型HPLC纯化所得粗产物,得到217mg (理论上78%) Boc保护的中间体[(1S)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]甲酸叔丁酯。

[0440] HPLC(方法10): $R_t$ =3.01分钟;

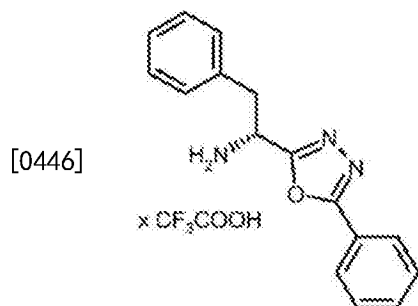
[0441] LC-MS(方法1): $R_t$ =1.15分钟;MS (ESIpos): $m/z$ =366 (M+H)<sup>+</sup>。

[0442] 将217mg (0.59mmol) 该中间体溶于3mL二氯甲烷,与0.6mL三氯乙酸混合,在室温下搅拌30分钟。然后对该混合物进行真空浓缩。将该残留物进一步真空干燥,然后从二噁烷中冻干,得到214mg (理论上90%) 白色固体形态的标题化合物。HPLC(方法10): $R_t$ =2.43分钟;

[0443] LC-MS(方法1): $R_t$ =0.62分钟;MS (ESIpos): $m/z$ =266 (M+H)<sup>+</sup>。

[0444] 中间体15

[0445] (1R)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙胺三氟乙酸盐



[0447] 将200mg (0.75mmol) N-(叔丁氧基羰基)-D-苯丙氨酸在0℃下置于5.5mL二氯甲烷中并和128.3mg (0.79mmol) 1,1'-羰基二咪唑混合。30分钟后,加入103mg (0.75mmol) 苯甲酰肼。最后在45分钟后0℃下加入500mg (1.5mmol) 四溴化碳和395mg (1.5mmol) 三苯基膦。先将该批次在0℃下搅拌2小时,再在室温下搅拌一夜。然后在旋转蒸发器上浓缩该混合物,在高真空下将剩余物干燥。最后用制备型HPLC纯化所得粗产物,得到219mg (理论上为80%) Boc保护的中间体[(1R)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基甲酸叔丁酯。

[0448] HPLC(方法10): $R_t$ =3.01分钟;

[0449] LC-MS(方法2): $R_t$ =1.36分钟;MS (ESIpos): $m/z$ =366 (M+H)<sup>+</sup>。

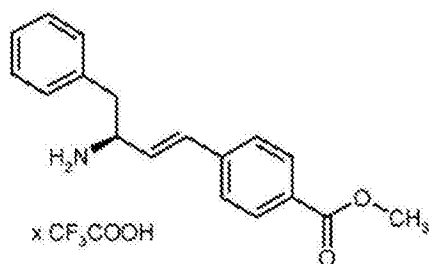
[0450] 将219mg (0.6mmol) 该中间体溶于3mL二氯甲烷,与0.6mL三氯乙酸混合,在室温下搅拌30分钟。然后对该混合物进行真空浓缩。将剩余的残留物在真空下进一步干燥,然后从二噁烷中冻干,得到196mg (理论产率为86%) 白色固体的标题化合物。

[0451] HPLC(方法10): $R_t$ =2.41分钟。

[0452] 中间体16

[0453] 4-[(1E,3S)-3-氨基-4-苯基丁-1-烯-1-基]苯甲酸甲酯三氟乙酸盐

[0454]



[0455] 将0.9mg (4 $\mu$ mol) 乙酸钡溶解于5mL DMF中,然后依次与20.8mg (97 $\mu$ mol) 4-溴苯甲酸甲酯、20mg (81 $\mu$ mol) (S)-1-苯基丁-3-烯-2-基氨基甲酸叔丁酯、1.1mg (8 $\mu$ mol) 苯基脒和11.2mg (81 $\mu$ mol) 碳酸钾混合。然后在微波装置 (Emrys™Optimizer) 中将反应混合物在160℃下搅拌15分钟。然后将该混合物过滤,通过制备型HPLC (洗脱液:含0.1%TFA的甲醇/水梯度) 从滤液中分离出其各成分,得到21.3mg (理论上为68%) 的标题化合物。

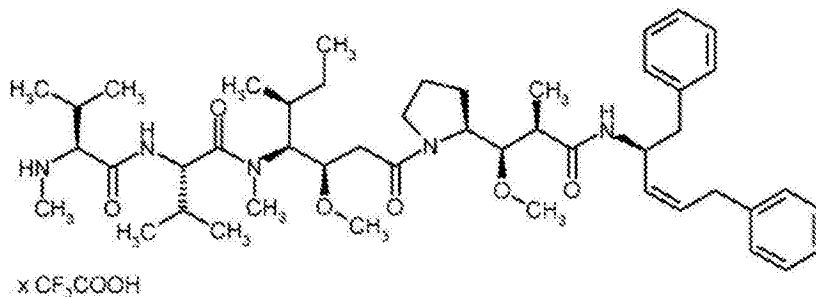
[0456] HPLC (方法10) : $R_t$ =3.23分钟;

[0457] LC-MS (方法11) : $R_t$ =1.32分钟;MS (ESIpos) : $m/z$ =382 (M+H)<sup>+</sup>。

[0458] 中间体17

[0459] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3Z)-1,5-二苯基戊-3-烯-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0460]



[0461] 将15mg (22 $\mu$ mol) N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体7) 溶解于750 $\mu$ L DMF中,与11.44 $\mu$ L (66 $\mu$ mol) N,N-二异丙基乙胺和10mg (26 $\mu$ mol) HATU混合。室温下将该批次搅拌30分钟。然后加入8.5mg (24 $\mu$ mol) (2S,3Z)-1,5-二苯基戊-3-烯-2-胺三氟乙酸盐。然后立即用制备型HPLC从该反应混合物中分离出其成分,产生18.1mg (理论上91%) 白色固体的经Boc保护的中间体N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3Z)-1,5-二苯基戊-3-烯-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0462] HPLC (方法10) : $R_t$ =4.74分钟;

[0463] LC-MS (方法11) : $R_t$ =1.58分钟;MS (ESIpos) : $m/z$ =905 (M+H)<sup>+</sup>。

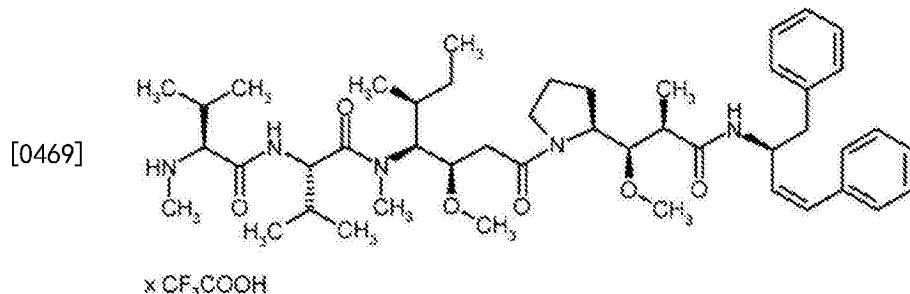
[0464] 将16mg (18 $\mu$ mol) 的该中间体溶于1mL二氯甲烷,与0.2mL三氯乙酸混合在室温下搅拌30分钟。然后对该混合物进行真空浓缩。将该残留物在真空下进一步干燥,然后在二噁烷中冻干,由此得到15.8mg (理论上为97%) 的标题化合物。

[0465] HPLC (方法10) : $R_t$ =2.66分钟;

[0466] LC-MS (方法1) :  $R_t=1.03$  分钟; MS (ESIpos) :  $m/z=805$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0467] 中间体18

[0468] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3Z)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐



[0470] 首先采用与合成中间体17相似的方法,通过使20mg (29 $\mu\text{mol}$ ) N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体7)与7.1mg (32 $\mu\text{mol}$ ) (2S,3Z)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-胺(中间体12)反应,而合成N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3Z)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0471] 产量:9.2mg (理论上为35%)

[0472] HPLC (方法10) :  $R_t=4.52$  分钟;

[0473] LC-MS (方法1) :  $R_t=1.54$  分钟; MS (ESIpos) :  $m/z=891$  (M+H)<sup>+</sup>。

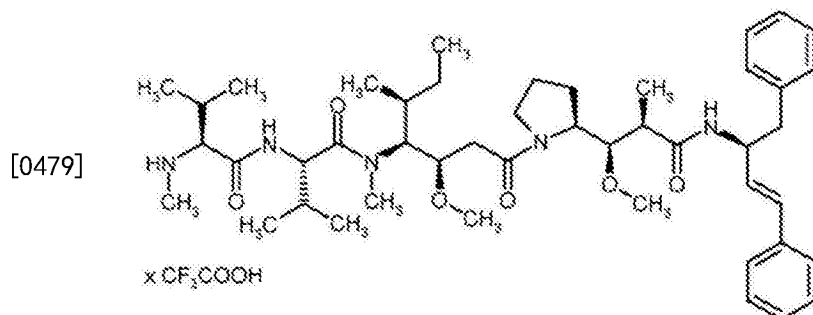
[0474] 然后通过用三氟乙酸切断Boc保护基团,而获得9.5mg (理论上99%)的标题化合物。

[0475] HPLC (方法10) :  $R_t=2.58$  分钟;

[0476] LC-MS (方法1) :  $R_t=0.97$  分钟; MS (ESIpos) :  $m/z=791$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0477] 中间体19

[0478] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3E)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐



[0480] 首先采用与合成中间体17相似的方法,通过使20mg (29 $\mu\text{mol}$ ) N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体7)与7.1mg

(32 $\mu$ mol) (2S,3E)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-胺(中间体13)反应,而合成N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3E)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯酮-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0481] 产量:15.1mg(理论上为58%)

[0482] HPLC(方法10): $R_t$ =4.2分钟;

[0483] LC-MS(方法1): $R_t$ =1.51分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =891(M+H)<sup>+</sup>。

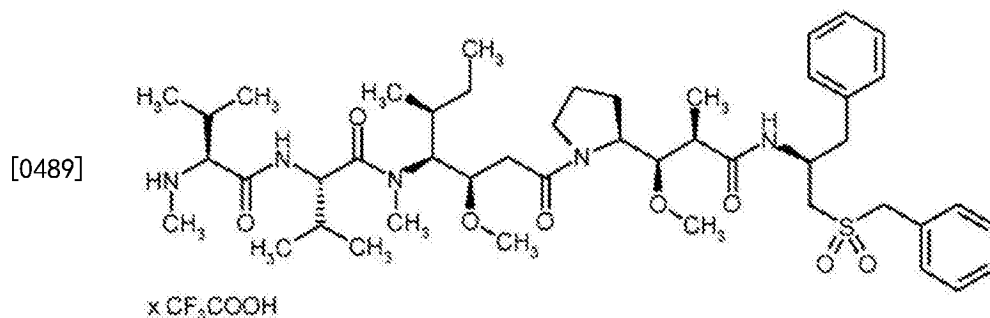
[0484] 然后在用三氟乙酸断裂Boc保护基团之后,获得15.7mg(理论上99%)的标题化合物。

[0485] HPLC(方法10): $R_t$ =2.62分钟;

[0486] LC-MS(方法1): $R_t$ =0.97分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =791(M+H)<sup>+</sup>。

[0487] 中间体20

[0488] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-苄基磺酰基]-3-苯基丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐



[0490] 首先采用与合成中间体17相似的方法,通过使20mg(29 $\mu$ mol)N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体7)与9.3mg(20 $\mu$ mol)(2S)-1-(苄基磺酰基)-3-苯基丙-2-胺(中间体11)反应,而合成N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-苄基磺酰基]-3-苯基丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯酮-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0491] 产量:19.2mg(理论上为68%)

[0492] HPLC(方法10): $R_t$ =3.5分钟;

[0493] LC-MS(方法1): $R_t$ =1.41分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =957(M+H)<sup>+</sup>。

[0494] 然后在用三氟乙酸断裂Boc保护基团之后,获得19.3mg(理论上99%)的标题化合物。

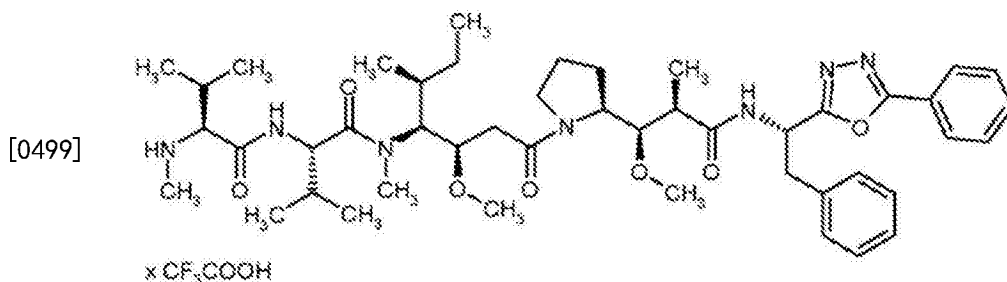
[0495] HPLC(方法10): $R_t$ =2.52分钟;

[0496] LC-MS(方法1): $R_t$ =0.86分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =857(M+H)<sup>+</sup>。

[0497] 中间体21

[0498] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基]丙基]吡咯

烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐



[0500] 首先采用与合成中间体17相似的方法,通过使20mg (29 $\mu\text{mol}$ ) N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体7)与12.2mg (32 $\mu\text{mol}$ ) (1S)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙胺三氟乙酸盐(中间体14)发生反应,而合成N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基]丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0501] 产量:22mg (理论上为81%)

[0502] HPLC(方法10): $R_t$ =3.74分钟;

[0503] LC-MS(方法1): $R_t$ =1.45分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =933 (M+H)<sup>+</sup>。

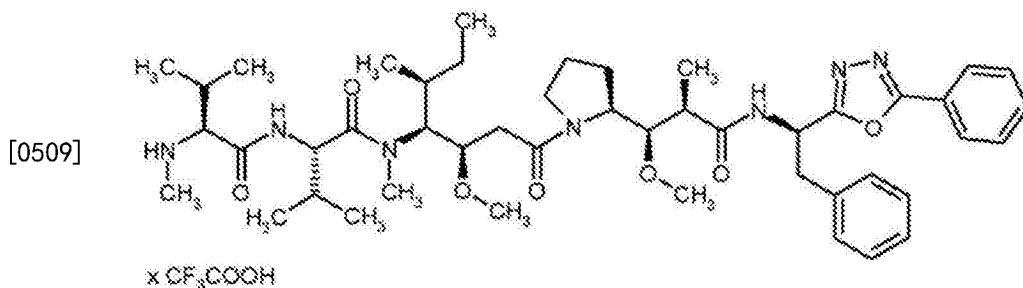
[0504] 然后在用三氟乙酸切断Boc保护基团之后,获得22.4mg (理论上98%)标题化合物。

[0505] HPLC(方法10): $R_t$ =2.52分钟;

[0506] LC-MS(方法1): $R_t$ =0.85分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =833 (M+H)<sup>+</sup>。

[0507] 中间体22

[0508] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1R)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基]丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐



[0510] 首先采用与合成中间体17相似的方法,通过使20mg (29 $\mu\text{mol}$ ) N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体7)与12.2mg (32 $\mu\text{mol}$ ) (1R)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙胺三氟乙酸盐(中间体15)反应,而合成N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1R)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基]丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0511] 产量:17mg (理论上为64%)

[0512] HPLC(方法10): $R_t=3.74$ 分钟;

[0513] LC-MS(方法1): $R_t=1.45$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=933$ (M+H)<sup>+</sup>。

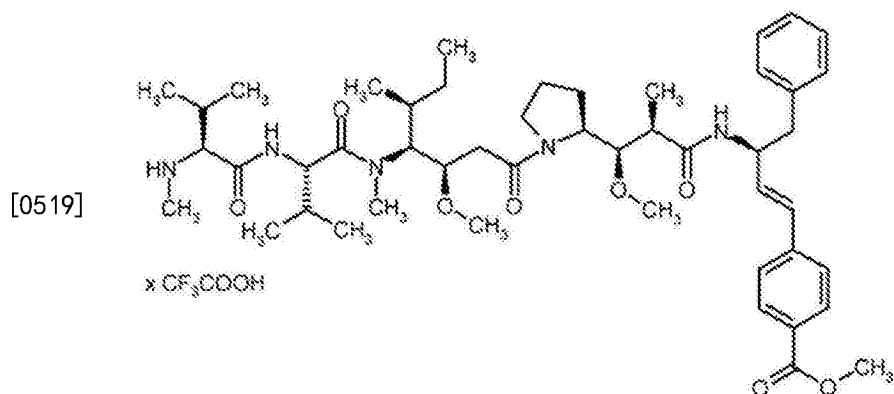
[0514] 然后在用三氟乙酸切断Boc保护基团之后,获得17.1mg(理论上99%)的标题化合物。

[0515] HPLC(方法10): $R_t=2.55$ 分钟;

[0516] LC-MS(方法11): $R_t=0.85$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=833$ (M+H)<sup>+</sup>。

[0517] 中间体23

[0518] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-3-[(2S,3E)-4-[4-(甲氧基羰基)苯基]-1-苯基丁-3-烯-2-基]氨基]-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐



[0520] 首先用与合成中间体17相似的方法,通过使20mg (29 $\mu\text{mol}$ ) N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体7)与12.7mg (32 $\mu\text{mol}$ ) 甲基-4-[(1E,3S)-3-氨基-4-苯基丁-1-烯-1-基]苯甲酸三氟乙酸盐(中间体16)发生反应,而合成N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-3-[(2S,3E)-4-[4-甲氧基羰基)苯基]-1-苯基丁-3-烯-2-基]氨基]-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0521] 产量:8.8mg(理论上为32%)

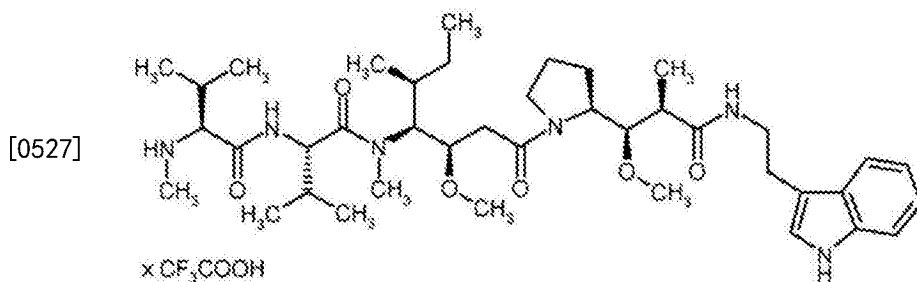
[0522] LC-MS(方法1): $R_t=1.53$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=949$ (M+H)<sup>+</sup>。

[0523] 然后在用三氟乙酸断裂Boc保护基团之后,获得8mg(理论上为90%)标题化合物。

[0524] LC-MS(方法1): $R_t=1.00$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=849$ (M+H)<sup>+</sup>。

[0525] 中间体24

[0526] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2-(1H-吡啶-3-基)乙基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐



[0528] 在室温下向含有100mg (146 $\mu\text{mol}$ )的N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体7)的30mL DMF中加入76 $\mu\text{L}$  (438 $\mu\text{mol}$ )的N,N-二异丙基乙胺、83mg (219 $\mu\text{mol}$ ) HATU和26mg (161 $\mu\text{mol}$ ) 2-(1H-吡啶-3-基)乙胺。室温下搅拌该混合物15分钟。然后真空浓缩该反应混合物并用制备型HPLC从该残留物中分离其成分,产生101mg (理论上83%)经Boc保护的中间体,N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2-(1H-吡啶-3-基)乙基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

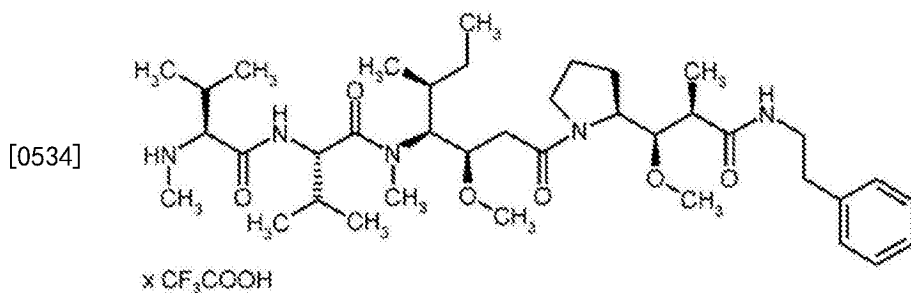
[0529] LC-MS (方法1):  $R_t=1.32$ 分钟;  $m/z=828$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0530] 将101mg (122 $\mu\text{mol}$ )的该中间体溶于15mL二氯甲烷,与1mL三氯乙酸混合并在室温下搅拌30分钟。然后将该混合物真空浓缩并用水/乙腈对残留物冻干,以定量产率产生108mg几乎无色的泡沫形态的标题化和物。

[0531] LC-MS (方法1):  $R_t=0.84$ 分钟; MS (ESIpos):  $m/z=728$  (M+H)<sup>+</sup>。

[0532] 中间体25

[0533] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(2-苯基乙基)氨基]丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐



[0535] 以类似于合成中间体24的两步法获得标题化合物,开始时使60mg (88 $\mu\text{mol}$ ) 中间体7与10mg (88 $\mu\text{mol}$ ) 2-苯基乙胺偶联,然后用三氟乙酸切除Boc。由此产生34mg (理论上97%) 标题化合物。

[0536] HPLC (方法5):  $R_t=2.71$ 分钟;

[0537] LC-MS (方法1):  $R_t=0.80$ 分钟; MS (ESIpos):  $m/z=689$  (M+H)<sup>+</sup>。

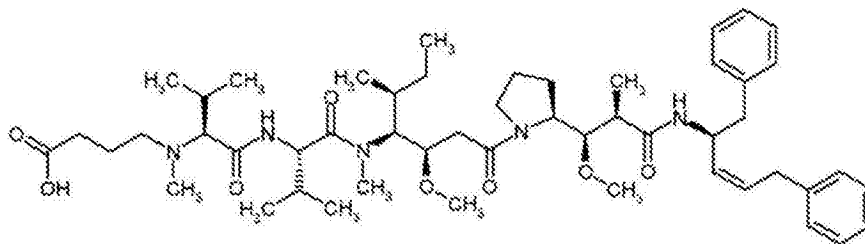
[0538] 示例性实施方式

[0539] 实施例1

[0540] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2S,3Z]-1,5-二苯基戊-3-烯-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-

基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0541]



[0542] 将14.5mg (16 $\mu$ mol) N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3Z)-1,5-二苯基戊-3-烯-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(中间体17)溶解于1mL二噁烷/水(1:1),与20.4 $\mu$ L (32 $\mu$ mol) 15%的4-氧代丁酸水溶液混合。然后在100℃下对该批次搅拌1小时。冷却至室温后,加入1.1mg (17 $\mu$ mol) 氰基硼氢化钠,加入约50 $\mu$ L 0.1N盐酸而将该混合物的pH值调至3。然后在100℃下将该批次搅拌2小时。冷却至室温后,再加入1.1mg (17 $\mu$ mol) 氰基硼氢化钠,通过加入约300 $\mu$ L 0.1N盐酸将该混合物的pH值调至3。然后在100℃下再次搅拌批料2小时。若所述处理未完成,则重复一次以上该过程。最后,将该批次浓缩,用制备型HPLC纯化粗产物,从二噁烷中冻干,由此获得13.1mg (理论上为93%) 白色固体形态的标题化合物。

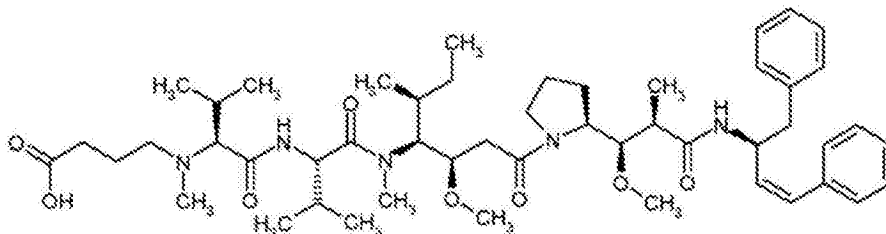
[0543] HPLC(方法10): $R_t$ =2.63分钟;

[0544] LC-MS(方法1): $R_t$ =1.01分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =891 (M+H)<sup>+</sup>。

[0545] 实施例2

[0546] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3Z)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0547]



[0548] 用类似于实施例1的合成方法将9mg (10 $\mu$ mol) N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3Z)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(中间体18)溶解于0.6mL二噁烷/水(1:1)中,在氰基硼氢化钠存在下与15%的4-氧代丁酸水溶液发生反应。在从二噁烷中冻干后,获得5.6mg (理论上为64%) 白色固体形态的标题化合物。

[0549] HPLC(方法10): $R_t$ =2.61分钟;

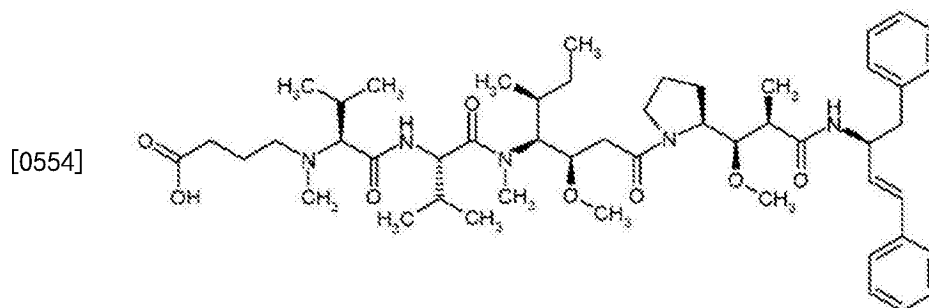
[0550] LC-MS(方法11): $R_t$ =0.94分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =877 (M+H)<sup>+</sup>。

[0551] HR-MS(方法13): $m/z$ =876.5。

[0552] 实施例3

[0553] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-

{[(2S,3E)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



[0555] 用类似于实施例1的合成方法将15.5mg (10 $\mu$ mol) N-甲基-L-缬氨酰胺基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(2S,3E)-1,4-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(中间体19)溶解于1.0mL二噁烷/水(1:1),在氰基硼氢化钠存在下与15%4-氧代丁酸水溶液反应。在从二噁烷中冻干后,获得10.3mg(理论上为68%)白色固体形态的标题化合物。

[0556] HPLC(方法10): $R_t$ =2.59分钟;

[0557] LC-MS(方法11): $R_t$ =0.94分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =877 (M+H)<sup>+</sup>。

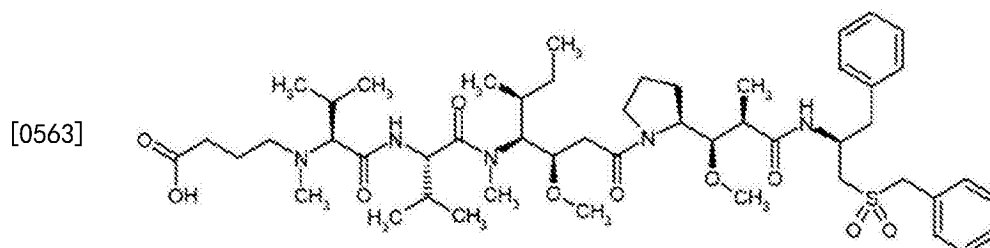
[0558] HR-MS(方法13): $m/z$ =876.6;

[0559] <sup>1</sup>H-NMR(500MHz,二氯甲烷-d<sub>2</sub>): $\delta$ [ppm]=0.72-1.21(m,18H),1.23-1.47(m,3H),1.51-2.22(m,8H),2.25-2.54(m,5H),2.65-2.86(m,2H),2.90-3.47(m,16H),3.53-4.46(m,6H),4.71-5.27(m,4H),5.46-5.72(m,1H),6.10-6.36(m,1H),

[0560] 6.44-6.67(m,2H),7.03-7.67(m,10H),9.13(br.s,1H)

#### [0561] 实施例4

[0562] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰胺基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(2S)-1-(苄基硫烷基)-3-苯基丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



[0564] 用类似于实施例1的合成方法,将19.3mg (20 $\mu$ mol) N-甲基-L-缬氨酰胺基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(2S)-1-(苄基硫烷基)-3-苯基丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(中间体20)溶解于1.2mL二噁烷/水(1:1)中,在氰基硼氢化钠存在下与15%的4-氧代丁酸水溶液发生反应。用二噁烷冻干后,产出8.6mg(理论上为45%)白色固体形态的标题化合物。

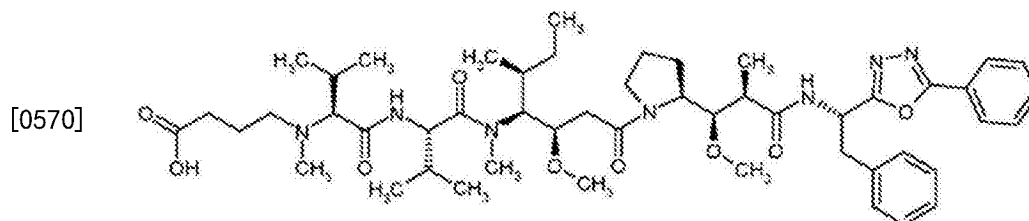
[0565] LC-MS(方法11): $R_t$ =0.85分钟;MS(ESIpos): $m/z$ =943 (M+H)<sup>+</sup>。

[0566] HR-MS (方法13) :  $m/z=942.6$ 。

[0567]  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz, 二氯甲烷- $d_2$ ) :  $\delta$  [ppm] = 0.72-1.23 (m, 18H), 1.26-1.56 (m, 2H), 1.60-1.94 (m, 4H), 1.95-2.17 (m, 3H), 2.22-2.54 (m, 5H), 2.69-2.87 (m, 2H), 2.90-3.27 (m, 11H), 3.31-3.53 (m, 8H), 3.58-4.20 (m, 7H), 4.25-4.54 (m, 3H), 4.59-5.15 (m, 4H), 6.22 (br.s, 1H), 6.97-8.00 (m, 10H), 9.13 (br.s, 1H)

#### [0568] 实施例5

[0569] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



[0571] 用类似于实施例1的合成方法,将22.4mg (24 $\mu\text{mol}$ ) N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐 (中间体21) 溶解于1.4mL二噁烷/水(1:1),在氰基硼氢化钠存在下与15%4-氧代丁酸水溶液发生反应。在从二噁烷中冻干后,获得8.2mg (理论产率为38%) 白色固体形态的标题化合物。

[0572] HPLC (方法10) :  $R_t=2.54$ 分钟;

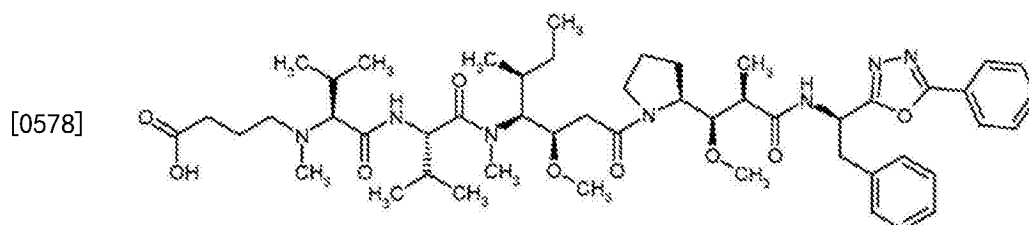
[0573] LC-MS (方法1) :  $R_t=0.94$ 分钟;MS (ESIpos) :  $m/z=919$  (M+H) $^+$ 。

[0574] HR-MS (方法13) :  $m/z=918.6$ 。

[0575]  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz, 二氯甲烷- $d_2$ ) :  $\delta$  [ppm] = 0.58-1.21 (m, 20H), 1.25-1.52 (m, 2H), 1.62-2.19 (m, 8H), 2.28-2.50 (m, 5H), 2.64-2.84 (m, 2H), 2.89-3.16 (m, 6H), 3.19-3.52 (m, 10H), 3.59-4.00 (m, 4H), 4.02-4.40 (m, 3H), 4.66-5.13 (m, 3H), 5.61 (d, 1H), 7.32 (d, 5H), 7.49-7.69 (m, 3H), 7.93-8.16 (m, 2H), 9.07 (br.s, 1H)。

#### [0576] 实施例6

[0577] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1R)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



[0579] 用类似于实施例1的合成方法,将17.1mg (18 $\mu\text{mol}$ ) N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1R)-2-苯基-1-(5-苯基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚烷-4-

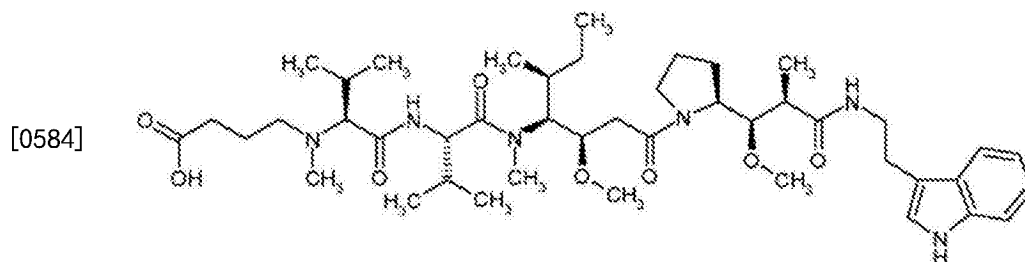
基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(中间体22)溶解于0.6mL二噁烷/水(1:1)中,在氰基硼氢化钠的存在下与15%4-氧代丁酸水溶液反应。从二噁烷中冻干后,获得14.8mg(理论产率为89%)白色固体形态的标题化合物。

[0580] HPLC(方法10): $R_t=2.54$ 分钟;

[0581] LC-MS(方法1): $R_t=0.92$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=919$ (M+H)<sup>+</sup>。

#### [0582] 实施例7

[0583] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(1H-吡啶-3-基)乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



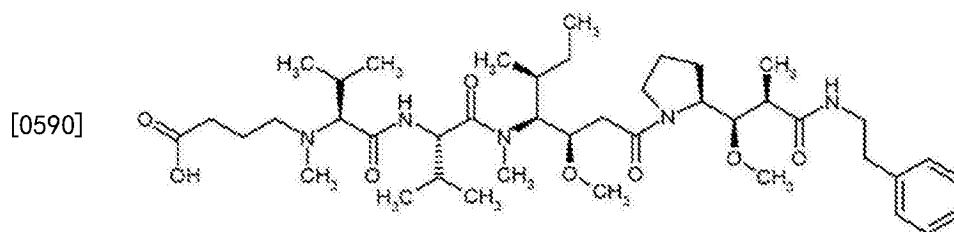
[0585] 用类似于实施例1的合成方法,在氰基硼氢化钠存在下使100mg(119 $\mu$ mol)N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(1H-吡啶-3-基)乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(中间体24)与15%4-氧代丁酸水溶液发生反应,而合成标题化合物。

[0586] 产量:50mg(理论产率为49%)

[0587] LC-MS(方法1): $R_t=0.87$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=814$ (M+H)<sup>+</sup>。

#### [0588] 实施例8

[0589] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(2-苯基乙基)氨基]丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



[0591] 用类似于实施例1的合成方法,在氰基硼氢化钠的存在下使57mg(71 $\mu$ mol)N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(2-苯基乙基)氨基]丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(中间体25)与15%4-氧代丁酸水溶液发生反应,而合成标题化合物。

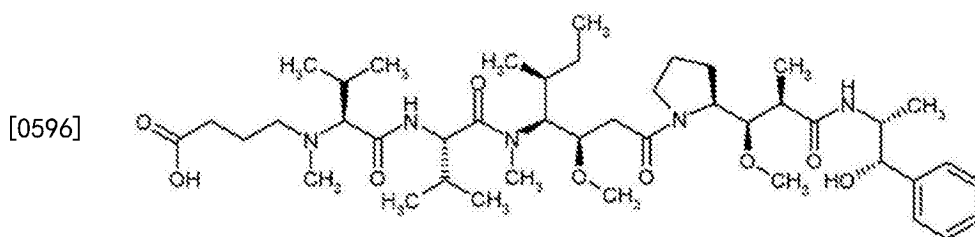
[0592] 产量:10mg(理论上为19%)

[0593] LC-MS(方法1): $R_t=0.85$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=775$ (M+H)<sup>+</sup>。

#### [0594] 实施例9

[0595] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-

{[(1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙-2-基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺



[0597] 用类似于实施例1的合成方法,在氰基硼氢化钠存在下使57mg (71 $\mu$ mol) N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐[类似于将中间体7与(1S,2R)-(+)-去甲麻黄碱(norephedrine)发生偶联反应,然后用三氟乙酸脱保护从而合成的中间体17]与15%的4-氧代丁酸水溶液发生反应,以合成标题化合物。

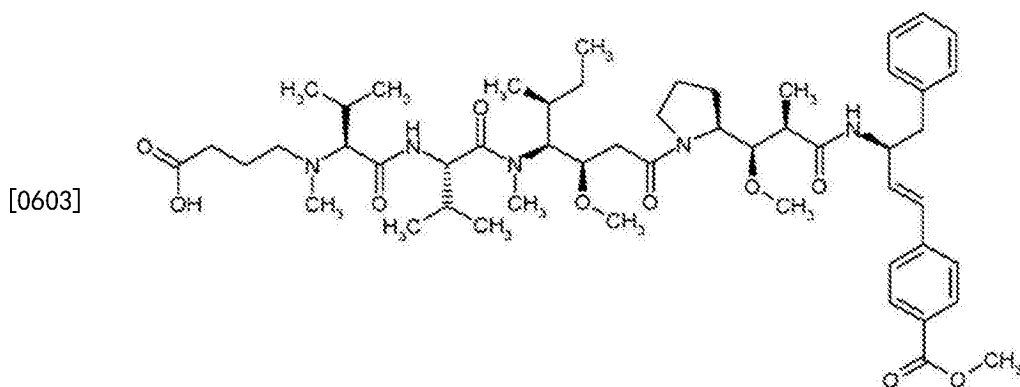
[0598] 产量:94mg (理论上为84%)

[0599] LC-MS (方法1):  $R_t=0.79$ 分钟;MS (ESIpos):  $m/z=805$  (M+H)<sup>+</sup>。

#### [0600] 实施例10

[0601] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-3-[(2S,3E)-4-[4-(甲氧基羰基)苯基]-1-苯基丁-3-烯-2-基]氨基]-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0602] 用类似于实施例1的合成方法将45mg (47 $\mu$ mol) N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-3-[(2S,3E)-4-[4-(甲氧基羰基)苯基]-1-苯基丁-3-烯-2-基]氨基]-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(中间体23)在氰基硼氢化钠的存在下与15%的4-氧代丁酸水溶液反应,合成标题化合物。



[0604] 产量:33.9mg (理论上为78%)

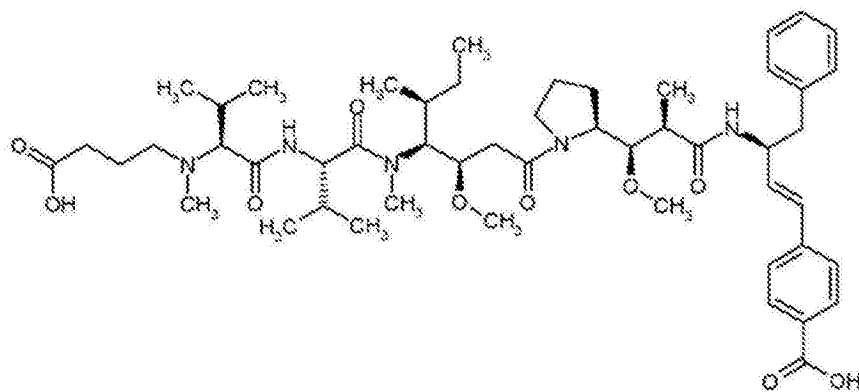
[0605] LC-MS (方法1):  $R_t=1.02$ 分钟;MS (ESIpos):  $m/z=933$  (M+H)<sup>+</sup>。

#### [0606] 实施例11

[0607] N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S,3E)-4-(4-羧基苯基)-1-二苯基丁-3-烯-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]

基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0608]



[0609] 将33.9mg (36 $\mu$ mol) N-(3-羧基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰胺-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-3-[(2S,3E)-4-[4-(甲氧基羰基)苯基]-1-苯基丁-3-烯-2-基]氨基]-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(实施例10)置于1.1mL THF/水(1:1)中,与3.5mg (145 $\mu$ mol)氢氧化锂混合。在室温下将反应混合物搅拌一夜,然后通过加入1N盐酸酸化,每次用10mL萃取两次。将该混合有机相用硫酸镁干燥,浓缩,产生18.3mg (纯度为84%,理论上为46%)标题混合物。

[0610] LC-MS (方法9):  $R_t$ =4.98分钟;MS (ESIpos):  $m/z$ =919 (M+H)<sup>+</sup>。

[0611] B. 生物学效力的评估

[0612] 本发明化合物的生物学活性可通过(例如)本领域技术人员已知的体外和体内检查来证实。例如,可借助于下述试验进行测定本发明化合物的药理学和药代动力学性质:

[0613] B-1. 对HT29wt细胞系的抗增殖作用的测定:

[0614] 在96孔微量滴定板内将确定细胞数的人结肠癌细胞系HT29wt (野生型)接种在完全培养基(10%FCS-RPMI) (2500细胞/孔)中,在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>的条件下培养一夜。18小时后,用含10%FCS的新鲜培养基代替接种培养基。通过加入各测试物而开始处理。测定待研究物质在10<sup>-5</sup>-10<sup>-14</sup>m浓度范围(1:10稀释系列)内的剂量/效应曲线。所选择的培养时间为48-96小时。借助MTT实验(ATCC,美国弗吉尼亚州马纳萨斯,目录号30-1010K)来测定增殖。在所选择的培养时间的最后,用MTT试剂将细胞培养4小时,随后通过加入去污剂处理一夜而使细胞裂解。在570纳米处检测所形成的染料。将用相同方法处理但不加入测试物的细胞的增殖定义为100%值。由该测试获得的数据代表了三次测定,并且至少进行两次独立的实验。

[0615] 表1中列出了该实验的代表性实施方式的IC<sub>50</sub>值,如下:

[0616] 表1

[0617]

| 示例性实施方式 | IC <sub>50</sub> [nM] |
|---------|-----------------------|
| 1       | 15                    |
| 2       | 3.3                   |
| 3       | 0.3                   |
| 4       | 1.1                   |
| 5       | 0.1                   |
| 6       | 0.1                   |

|    |     |
|----|-----|
| 8  | 0.5 |
| 9  | 6   |
| 11 | 4.5 |

[0618] 为了进行比较,在该测试中单甲基耳他汀F (MMAF) 的IC<sub>50</sub>值为10nM。

#### [0619] B-2. 对微管蛋白聚合的影响的测定

[0620] 癌细胞是蜕变或肿瘤细胞,它们经常通过增加细胞分离导致肿瘤发展。微管形成纺锤体的纺锤丝,并且是细胞周期的必需组成部分。微管的调节形成和分解能准确地将染色体分配到子细胞中并形成连续的动态过程。干扰该动态循环导致有缺陷的细胞分裂,最终导致细胞死亡。然而,增加的细胞分裂使它们易受纺锤丝毒素影响,所述纺锤丝毒素是化疗的固定成分。纺锤丝毒剂(例如紫杉醇或大环内酯)会造成微管的聚合速率大幅度增加,而长春花生物碱或单甲基耳他汀E (MMAE) 会造成微管的聚合速率大幅度降低。在这两种情况下,细胞周期所必需的动力对干扰敏感。本发明上下文中所研究的化合物导致微管的聚合速率降低。

[0621] 使用细胞骨架有限公司的(美国科罗拉多州丹佛市(Denver, Colorado, USA); 订单号: BK011)的“基于荧光的微管聚合试验试剂盒”来研究微管聚合。在该实验中,向未聚合的微管蛋白添加GTP,使得聚合自发地进行。该试验基于荧光团4',6-二咪基-2-苯基吲哚(DAPI)与微管蛋白的结合。游离的DAPI和结合的DAPI可基于不同的发射光谱进行区分。与未聚合的微管蛋白相比,DAPI对聚合的微管蛋白的亲和力高得多,因此可基于所结合的DAPI荧光团的荧光增加来监控微管蛋白聚合。

[0622] 为进行该实验,将溶解在DMSO中的测试物在水中稀释,从其初始浓度10nM稀释至1 μM。除了缓冲液对照,提高聚合的紫杉醇和抑制聚合的长春碱也可作为实验对照。关于测定,使用96孔板一半底部面积在荧光仪上于37℃对微管聚合动力学监控1小时。该激发波长为355nm,在460nm处监测发射。在最初的10分钟内呈线性上升的范围内,计算每分钟的荧光变化(ΔF/分钟),该变化表示微管的聚合速率。根据各自聚合速率的降低来定量测试物的效力。

#### [0623] B-3. 体外血浆稳定性的测定:

##### [0624] 方法A:

[0625] 将1毫克的测试物溶解于0.5毫升乙腈/DMSO (9:1) 中。从该溶液中取出20μL,在37℃条件下添加至1毫升的大鼠或人血浆中(来自Harlan&Winkelmann含有Li肝素的雄性Wistar大鼠的血浆,和/或源自全血样本的新鲜的去白细胞人血浆)。加样后(初始值作为参考变量)立即取100μL等份,以及在加样5、10、30、60、120、180和240分钟后,以及任选地24小时后取100μL等份,添加到300μL乙腈中。将沉淀的血浆蛋白以5000rpm离心10分钟,然后对30μL上清液进行HPLC分析,以测定未变化测试物的含量。基于相应峰的面积百分率对这些结果进行定量分析。

##### [0626] 大鼠血浆的HPLC方法:

[0627] 仪器: 附带DAD、二元泵、自动采样器、柱温箱和恒温器的安捷伦1200; 柱: Kromasil 100C18, 250mm×4mm, 5μm; 柱温: 45℃; 洗脱剂A: 5mL高氯酸/L水, 洗脱剂B: 乙腈; 梯度: 0-8分钟98%A, 2%B; 8-15分钟56%A, 44%B; 15-20分钟10%A, 90%B; 20-21分钟10%A, 90%B; 21-23分钟98%A, 2%B; 23-25分钟98%A, 2%B; 流速: 2mL/分钟; UV检测: 220nm。

[0628] 人血浆的HPLC方法:

[0629] 仪器: 附带DAD、二元泵、自动采样器、柱温箱和恒温器的安捷伦1100; 柱: Kromasil100C18, 250mm×4mm, 5μm; 柱温: 45℃; 洗脱剂A 5mL高氯酸/L水, 洗脱剂B: 乙腈; 梯度: 0-3min 98%A, 2%B; 3-10min 65%A, 35%B; 10-15min 40%A, 60%B; 15-21min 10%A, 90%B; 21-22min 10%A, 90%B; 22-24min 98%A, 2%B; 24-26min 98%A, 2%B; 流量: 2mL/min; UV检测: 220nm。

[0630] 方法B:

[0631] 在37℃下, 将各测试物在大鼠血浆和/或人血浆中培养5小时, 同时温和搅拌。在各种时间点(0、2、5、10、20、30、60、120、180和300分钟)提取100μ等份。添加内标(10μL)后, 通过添加200微升并将该混合物在Eppendorf离心管中离心5分钟而使蛋白质沉淀。向150μL上清液中添加150μL乙酸铵缓冲液(pH=3), 然后通过LC/MSMS对未变化测试物的含量进行分析。

[0632] B-4. 细胞渗透性的测定:

[0633] 可以使用Caco-2细胞在流出试验(flux assay)中通过体外测试的方式对一物质的细胞渗透性进行分析[M.D.Troutman和D.R.Thakker, Pharm.Res. 20 (8), 1210-1224 (2003)]。出于该目的, 将所述细胞在24孔过滤板上培养15-16天。为测定渗透性, 将各测试物从顶部(A)或基部(B)加到细胞上的HEPES缓冲液中并培养2小时。0小时和2小时后, 从顺式和反式隔室中取出样本。使用反相柱通过HPLC(安捷伦1200, 德国柏布林根)对样本进行分离。该HPLC系统通过涡轮增压离子喷雾接口与三重四极杆质谱仪API4000(德国达姆施塔特的应用生物系统Applera公司(Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Germany))相连。基于 $P_{app}$ 值对渗透性进行评价, 该 $P_{app}$ 值是使用由Schwab等人公开的公式而计算[D.Schwab等人, J.med.Chem. 46, 1716-1725 (2003)]。如果 $P_{app}(B-a)$ 和 $P_{app}(A-B)$ 的比率 $>2$ 或 $<0.5$ , 则将物质归类为是主动转运的。

[0634] 从B至A [ $P_{app}^{(B-A)}$ ]的渗透性对细胞内释放的毒簇尤为重要。渗透性越低, 细胞内释放后的物质在细胞内停留时间就越长, 因此, 能够与生化目标(本文中: 微管蛋白)产生相互作用时间也就越长。

[0635] 以下表2中示出了该实验中各示例性实施方式的渗透性数据:

[0636] 表2

[0637]

| 示例性实施方式 | $P_{app}(B-A)$<br>[nm/s] |
|---------|--------------------------|
| 2       | 157                      |
| 3       | 179                      |
| 4       | 19                       |
| 5       | 29                       |
| 6       | 45                       |
| 7       | 11                       |
| 8       | 10                       |
| 9       | 4.5                      |
| 11      | 2                        |

[0638] 作为对比,单甲基耳他汀E(MMAE)与单甲基耳他汀F(MMAF)在该测试中的 $P_{app}(B-A)$ 值分别为89nm/s和73nm/s。

[0639] B-5. 对P-糖蛋白(P-gp)底物性质的测定:

[0640] 许多肿瘤细胞表达活性成分和药物的转运蛋白,这经常与抵抗细胞生长抑制的发展有关。因此,不是这种转运蛋白(例如P-糖蛋白(P-gp)或BCRP)的底物的物质具有改进的活性。

[0641] P-gp(ABCB1)的物质的底物性质使用LLC-PK1细胞(该细胞过表达P-gp(L-MDR1细胞))通过流量试验的方式进行测定[A.H.Schinkel等人,J.Clin.Invest.96,1698-1705(1995)]。出于该目的,将LLC-PK1细胞或L-MDR1细胞在96孔过滤板上培养3-4天。为测定渗透性,将各测试物,单独地或者在抑制剂(例如,伊维菌素或维拉帕米)存在的条件下从顶端(A)或基部(B)施加到细胞上的HEPES缓冲液中并培养2小时。0小时和2小时后,从顺式和反式隔室中取出样品。使用反相柱通过HPLC对样本进行分离。该HPLC系统通过涡轮增压离子喷雾接口与三重四极杆质谱仪API3000(德国达姆施塔特的应用生物系统Applera公司(AppliedBiosystems Applera,Darmstadt,Germany))相连。所述渗透性基于 $P_{app}$ 值进行评价,该 $P_{app}$ 值使用由Schwab等人公开的公式进行计算[D.Schwab等人,J.med.Chem.46,1716-1725(2003)]。当流出比 $P_{app}(B-A):P_{app}(A-B)>2$ 时,物质被归类为P-gp底物。

[0642] 作为评价P-gp底物性质的其它标准,L-MDR1和LLC-PK1细胞中的流出比或在存在或不存在抑制剂的条件下的流出比可相互比较。如果这些值的差异大于2,那么所研究的物质是P-gp底物。

[0643] C. 药物组合物的示例性实施方式

[0644] 可通过以下方法将根据本发明的化合物转变成药物制剂。

[0645] 片剂:

[0646] 组成:

[0647] 100mg本发明化合物、50mg乳糖(一水合物)、50mg玉米淀粉(天然)、10mg聚乙烯基

吡咯烷酮 (PVP25) (德国路德维希的巴斯夫公司 (BASF, Ludwigshafen, Germany)) 和 2mg 硬脂酸镁。

[0648] 片重 212mg; 直径 8mm; 曲率半径 12mm。

[0649] 制备:

[0650] 使用 5% 的 PVP 水溶液 (w/w) 对本发明化合物、乳糖和淀粉的混合物进行造粒。干燥后, 将颗粒与硬脂酸镁混合 5 分钟。使用常规压片机将该混合物压片 (参见上述片剂形式)。将 15kN 的压片力用作压制片剂的指导值。

[0651] 口服给药的混悬剂:

[0652] 组成:

[0653] 1000mg 本发明化合物、1000mg 乙醇 (96%)、400mg Rhodigel® (黄原胶, 来自美国宾夕法尼亚州的 FMC 公司) 和 99 克水。

[0654] 10mL 的混悬剂对应于单剂量的 100mg 本发明化合物。

[0655] 口服给药的溶液剂:

[0656] 组成:

[0657] 500mg 本发明化合物、2.5g 聚山梨醇酯和 97g 聚乙二醇 400。20g 该口服溶液剂对应于单剂量的 100mg 本发明化合物。

[0658] 制备:

[0659] 将本发明化合物悬浮于聚乙二醇和聚山梨酯的混合物中并同时搅拌。持续搅拌直至本发明化合物完全溶解。

[0660] 静脉注射溶液剂:

[0661] 将本发明化合物以低于饱和溶解度的浓度溶解于生理学上可接受的溶剂 (例如等渗盐水溶液、5% 葡萄糖溶液和/或 30% PEG400 溶液) 中。将该溶液过滤灭菌, 罐装入无菌且无热原的注射小瓶中。