



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101981011 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 200980111627. 1

C07D 405/12 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 03. 25

C07D 405/14 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07D 413/14 (2006. 01)

61/040, 776 2008. 03. 31 US

A61K 31/4427 (2006. 01)

A61K 31/44 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 43/00 (2006. 01)

2010. 09. 29

审查员 赵霞

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/038203 2009. 03. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/123896 EN 2009. 10. 08

(73) 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 S·哈迪达-鲁阿 M·米勒 周竞兰

B·贝尔 P·格鲁特努伊斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 王贵杰

(51) Int. Cl.

C07D 213/75 (2006. 01)

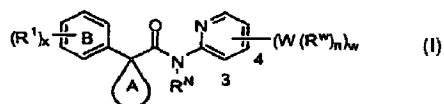
权利要求书1页 说明书74页

(54) 发明名称

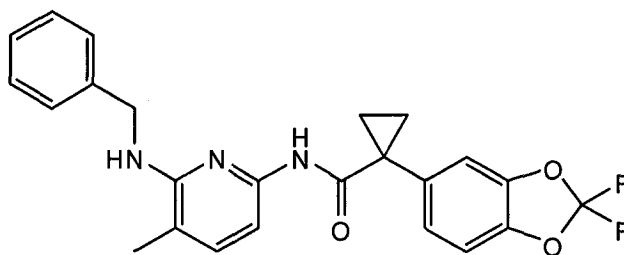
作为 CFTR 调节剂的吡啶基衍生物

(57) 摘要

本发明涉及式 (I) 的可用作 ATP- 结合盒 (“ABC”) 转运蛋白或其片段 (包括囊性纤维化跨膜传导调节因子 (“CFTR”)) 的调节剂、其组合物和与之有关的方法。本发明还涉及使用这种调节剂治疗 ABC 转运蛋白介导的疾病的方法。



1. 化合物：



或其药学上可接受的盐。

2. 药物组合物,所述组合物包含：

(i) 权利要求 1 的化合物；和

(ii) 药学上可接受的载体。

3. 权利要求 2 的组合物,所述组合物还包含另外的活性剂,所述另外的活性剂选自溶粘蛋白剂、支气管扩张剂、抗生素、抗感染剂、抗炎剂、CFTR 校正剂和营养剂。

4. 权利要求 1 的化合物在制备用于调节细胞膜中 ABC 转运蛋白的药物中的用途。

5. 权利要求 4 的用途,其中所述 ABC 转运蛋白是 CFTR。

6. 权利要求 1 的化合物在制备用于治疗患者中牵涉 ABC 转运蛋白活性的病症、疾病或障碍的药物中的用途。

7. 权利要求 6 的用途,其中所述 ABC 转运蛋白是 CFTR。

8. 权利要求 6 的用途,其中所述病症、疾病或障碍选自囊性纤维化,遗传性肺气肿,遗传性血色素沉着症,凝血-纤维蛋白溶解缺陷症,脂质加工缺陷症,溶酶体贮积病,先天性甲状腺机能亢进症,遗传性低纤维蛋白原血症,ACT 缺乏症,尿崩症,海绵状脑病,COPD,干眼病和斯耶格伦病。

9. 权利要求 6 的用途,其中所述病症、疾病或障碍选自 C 蛋白缺陷症,家族性高胆固醇血症,I-细胞疾病/假性-赫尔勒综合症和遗传性克-雅病。

10. 权利要求 6 的用途,其中所述病症、疾病或障碍选自 1 型遗传性血管性水肿,1 型乳糜微粒血症,无 β 脂蛋白血症,粘多糖病,桑德霍夫/泰-萨克斯病,克里格勒-纳贾尔综合症 II 型,多内分泌腺病/高胰岛素血症,糖尿病,拉伦侏儒症,髓过氧化物酶缺乏症,原发性甲状旁腺机能减退,黑色素瘤,聚糖病 CDG1 型,成骨不全,后叶激素转运蛋白性尿崩症,肾性尿崩症,夏-马-图综合征,佩-梅病,阿尔茨海默病,帕金森病,肌萎缩性侧索硬化,进行性核上性麻痹,皮克病,亨廷顿病,I 型脊髓小脑性共济失调,脊髓与延髓肌肉萎缩,齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩,肌强直性营养不良,法布里病和斯-施综合征。

11. 用于体外或体内测定生物样品中 ABC 转运蛋白或其片段活性的试剂盒,所述试剂盒包括：

(i) 包含权利要求 1 的化合物的组合物；和

(ii) 关于下列内容的说明书：

a) 使所述组合物与所述生物样品接触；

b) 测定所述 ABC 转运蛋白或其片段的活性。

作为 CFTR 调节剂的吡啶基衍生物

[0001] 本发明的技术领域

[0002] 本发明涉及可用作 ATP- 结合盒 (“ABC”) 转运蛋白或其片段 (包括囊性纤维化跨膜传导调节因子 (“CFTR”)) 的调节剂、其组合物和与之有关的方法。本发明也涉及使用这种调节剂治疗 ABC 转运蛋白介导的疾病的方法。

[0003] 本发明的背景

[0004] ABC 转运蛋白是一组膜转运蛋白,其调节各种药理活性剂、潜在毒性药物和异生物质的转运。ABC 转运蛋白是同源膜蛋白,它们结合和利用细胞三磷酸腺苷 (ATP) 供它们的特异性活性。这些转运蛋白中有些被发现是多药耐药性蛋白 (象 MDR1-P 糖蛋白或多药耐药性蛋白 MRP1),为恶性癌细胞防御化疗剂。直到现在,已经鉴别了 48 种人 ABC 转运蛋白,基于它们的序列同一性和功能分为 7 个家族。

[0005] ABC 转运蛋白在体内具有多种重要的生理作用,并且提供对来自环境的有害化合物的防御。因此,它们代表重要的潜在药物靶,因为可以治疗与该转运蛋白缺陷相关的疾病、防止药物从靶细胞中被转运出来和干预 ABC 转运蛋白活性调节可能有益的其他疾病。

[0006] 与疾病相关的 ABC 转运蛋白家族成员之一是 cAMP/ATP- 介导的阴离子通道 CFTR。CFTR 在各种细胞类型中被表达,包括吸收和分泌细胞,其中它调节阴离子流过膜和其他离子通道和蛋白的活性。在上皮细胞中,CFTR 的正常功能是维持全身包括呼吸和消化组织中电解质转运的关键。CFTR 是大约 1480 个氨基酸组成的蛋白质,这些氨基酸编码由跨膜区的串联重复单元构成的蛋白质,所述跨膜区各包含六个跨膜螺旋和一个核苷酸结合结构域。两个跨膜区被一个大的极性调节性 (R)- 结构域分开,后者含有多个调节通道活性和细胞运输的磷酸化位点。

[0007] 编码 CFTR 的基因已被鉴别和测序 (参见 Gregory, R. J. 等人 (1990) Nature 347 : 382-386 ; Rich, D. P. 等人 (1990) Nature 347 : 358-362), (Riordan, J. R. 等人 (1989) Science 245 : 1066-1073)。这种基因的缺陷导致 CFTR 突变,从而引起囊性纤维化 (“CF”),这是人类最常见的致命性遗传疾病,影响大约两千五百分之一在美国出生的婴儿。在全部美国人口中,多达一千万人携带有缺陷性基因的单一副本,没有明显的疾病效应。相反,带有两个 CF 相关性基因副本的个体患有 CF 的虚弱性和致命效应,包括慢性肺病。

[0008] 在囊性纤维化患者中,在呼吸上皮中内源性表达的 CFTR 中的突变造成顶端阴离子分泌减少,导致离子和流体转运失衡。产生的阴离子转运减少促成了肺中粘液蓄积增加且附带微生物感染,最终导致 CF 患者死亡。除了呼吸疾病以外,CF 患者通常患有胃肠问题和胰腺机能不全,如果不进行治疗,就会导致死亡。此外,存在囊性纤维化的男性不育,且存在囊性纤维化的女性生育力降低。与两个 CF 相关基因副本的严重效应相反,带有单一 CF 相关基因副本的个体表现对霍乱和腹泻所致脱水的抗性增加 - 这也许解释了人群内相对高频率的 CF 基因的原因。

[0009] CF 染色体 CFTR 基因的序列分析已经揭示了各种致病性突变 (Cutting, G. R. 等人 (1990) Nature 346 : 366-369 ; Dean, M. 等人 (1990) Cell 61 : 863 : 870 ; 和 Kerem, B-S. 等人 (1989) Science 245 : 1073-1080 ; Kerem, B-S 等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :

8447-8451)。迄今为止,已经鉴别了> 1000 种导致疾病的 CF 基因突变 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)。最普遍的突变为 CFTR 氨基酸序列 508 位苯丙氨酸的缺失且通常被称为 $\Delta F508$ -CFTR。这种突变发生在大约 70% 囊性纤维化病例中并且与严重性疾病相关。

[0010] $\Delta F508$ -CFTR 中 508 残基的缺失妨碍了初生蛋白正确地折叠。这导致该突变蛋白不能退出内质网(“ER”)和运输至质膜。其结果是,膜中通道数量远远少于表达野生型 CFTR 的细胞。除了转运减低以外,突变还导致有缺陷的通道门控。总之,膜中通道数量减少和有缺陷的门控引起跨越上皮的阴离子转运减少,引起有缺陷的离子和体液转运 (Quinton, P. M. (1990), FASEB J. 4 :2709-2727)。不过,研究已经显示,膜中 $\Delta F508$ -CFTR 的数量减少是功能性的,尽管少于野生型 CFTR (Dalemans 等人, (1991), Nature Lond. 354 :526-528 ; Denning 等人,文献同上 ;Pasyk 和 Foskett (1995), J. Cell. Biochem. 270 :12347-50)。除了 $\Delta F508$ -CFTR 以外,其它导致有缺陷的转运、合成和 / 或通道门控的致病性 CFTR 突变可能被增量或减量调节,以改变阴离子分泌和改变疾病进展和 / 或严重性。

[0011] 尽管 CFTR 除了阴离子以外还转运多种分子,不过显然这种作用(阴离子的转运)代表了跨越上皮转运离子和水的重要机理中的一种要素。其他要素包括上皮 Na^+ 通道、ENaC、 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共同转运蛋白、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和底外侧膜 K^+ 通道,它们负责摄取氯化物进入细胞。

[0012] 这些要素一起发挥作用,经由它们在细胞内的选择性表达和定位实现跨越上皮的定向转运。借助存在于顶端膜上的 ENaC 与 CFTR 和在细胞底外侧表面上表达的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵与 Cl^- 通道的协调活性,发生氯化物的吸收。氯化物从腔侧的次级主动转运引起细胞内氯化物的蓄积,然后可以被动地经由 Cl^- 通道离开细胞,导致向量转运。 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共同转运蛋白, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和底外侧膜 K^+ 通道在底外侧表面上的排列和腔侧上的 CFTR 协调氯化物经由腔侧上 CFTR 的分泌。因为水可能从不主动转运其本身,它跨越上皮的流动依赖于由钠和氯化物的大量流动所生成的微小跨上皮渗透梯度。

[0013] 除了囊性纤维化以外,CFTR 活性的调节也可以有益于其它不直接由 CFTR 突变所导致的疾病,如分泌性疾病和其它由 CFTR 介导的蛋白质折叠疾病。这些疾病包括但不限于慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、干眼病和斯耶格伦综合征。

[0014] COPD 是以气流受限为特征的,它是进行性的,不是完全可逆的。气流受限是由于粘液分泌过多,肺气肿和细支气管炎所致。突变或野生型 CFTR 的活化剂提供 COPD 中常见的粘液分泌过多和粘液纤毛廓清率减低的潜在治疗。具体而言,增加跨越 CFTR 的阴离子分泌可以有利于体液转运进入气道表面液体,以水化粘液,优化纤毛周围的体液粘度。这将引起粘液纤毛廓清率增强和与 COPD 有关的症状减少。干眼病是以泪水产生降低和异常泪膜脂质,蛋白质与粘蛋白行为为特征的。干眼有很多原因,其中一些包括年龄,Lasik 眼手术,关节炎,药物治疗,化学 / 热灼伤,变态反应和疾病,如囊性纤维化和斯耶格伦氏综合征。增加经由 CFTR 的阴离子分泌将增强体液从角膜内皮细胞和眼周围分泌腺体的转运,以增加角膜的水化作用。这将有助于缓解与干眼病有关的症状。斯耶格伦综合征是一种自身免疫疾病,其中免疫系统攻击体内各处产生水分的腺体,包括眼、口、皮肤、呼吸组织、肝、阴道和肠。症状包括眼、口和阴道干燥以及肺疾病。该疾病也与类风湿性关节炎,系统性狼疮,系统性硬化和多肌炎 / 皮肤肌炎有关。有缺陷的蛋白质转运据信会导致该疾病,治疗选择是

有限的。CFTR 活性调节剂可以水化各种受疾病影响的器官,帮助改善有关症状。

[0015] 正如上文所讨论的,据信 $\Delta F508$ -CFTR 中 508 残基的缺失防止初生蛋白正确地折叠,导致这种突变蛋白不能退出 ER 和运输至质膜。其结果是,存在于质膜的成熟蛋白数量不足,上皮组织内氯化物的转运显著减少。事实上,这种 ABC 转运蛋白被 ER 机构有缺陷的 ER 加工的细胞现象已被显示不仅是 CF 疾病的基础,而且是广泛的其它孤立性与遗传性疾病的基础。ER 机构可能发生故障的两种方式要么是与蛋白质的 ER 输出的偶联丧失,引起降解,要么是这些有缺陷 / 误折叠的蛋白质的 ER 蓄积 [Aridor M. 等人, *Nature Med.*, 5(7), pp 745-751(1999); Shastri, B. S. 等人, *Neurochem. International*, 43, pp 1-7(2003); Rutishauser, J. 等人, *Swiss Med Wkly*, 132, pp 211-222(2002); Morello, JP 等人, *TIPS*, 21, pp. 466-469(2000); Bross P. 等人, *Human Mut.*, 14, pp. 186-198(1999)]。与第一类 ER 故障有关的疾病有囊性纤维化(由误折叠的 $\Delta F508$ -CFTR 引起,正如上文所讨论的),遗传性肺气肿(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶非 Piz 变体引起),遗传性血色素沉着症,凝血-纤维蛋白溶解缺陷症,如蛋白 C 缺陷症,1 型遗传性血管性水肿,脂质加工缺陷症(lipid processing deficiencies),如家族性高胆固醇血症,1 型乳糜微粒血症,无 β 脂蛋白血症,溶酶体贮积病,如 I-细胞疾病 / 假性-赫尔勒综合症(pseudo-Hurler),粘多糖病(由溶酶体加工酶引起),桑德霍夫 / 泰-萨克斯病(Sandhof/Tay-Sachs)(由 β -己糖胺酶引起),克里格勒-纳贾尔综合症(Crigler-Najjar) II 型(由 UDP-葡萄糖醛基-sialyl-转移酶引起),多内分泌腺病 / 高胰岛素血症(hyperinsulemia),糖尿病(由胰岛素受体引起),拉伦(Laron)侏儒症(由生长激素受体引起),髓过氧化物酶(myeloperoxidase)缺乏症,原发性甲状旁腺机能减退症(由前促甲状旁腺激素引起),黑色素瘤(由酪氨酸酶引起)。与后一类 ER 故障有关的疾病有聚糖病(glycanosis)CDG 1 型,遗传性肺气肿(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 PiZ 变体引起),先天性甲状腺功能亢进症,成骨不全(由 I、II、IV 型前胶原引起),遗传性低纤维蛋白原血症(由纤维蛋白原引起),ACT 缺乏症(由 $\alpha 1$ -抗凝乳蛋白酶引起),尿崩症(DI),后叶激素运载蛋白性(neurophyseal)DI(由后叶加压素/V2-受体引起),肾性 DI(由水通道蛋白 II 引起),夏-马-图(Charcot-Marie Tooth)综合征(由外周髓磷脂蛋白 22 引起),佩-梅(Perlizaesus-Merzbacher)病,神经变性疾病,如阿尔茨海默(Alzheimer's)病(由 β APP 和早老蛋白引起),帕金森(Parkinson's)病,肌萎缩性侧索硬化,进行性核上性麻痹,皮克(Pick's)病,若干聚谷氨酰胺神经障碍,如亨廷顿(Huntington)病, I 型脊髓小脑性共济失调(spino cerebular ataxia type I),脊髓与延髓肌肉萎缩,齿状核红核(dentatorubal)苍白球丘脑下部核萎缩,和肌强直性营养不良,以及海绵状脑病,如遗传性克-雅(Creutzfeldt-Jakob)病(由朊病毒蛋白加工缺陷引起),法布里(Fabry disease)病(由溶酶体 α -半乳糖苷酶 A 引起),斯-施(Straussler-Scheinker)综合征,慢性阻塞性肺疾病(COPD),干眼病和斯耶格伦(**Sjögren's**)综合征。

[0016] 除了 CFTR 活性的增量调节以外,CFTR 调节剂减少 CFTR 分泌阴离子也可以有益于分泌性腹泻的治疗,其中作为促分泌性活化的氯化物转运的结果,上皮水转运戏剧性地增加。该机理牵涉 cAMP 的升高和 CFTR 的刺激。

[0017] 尽管腹泻有大量原因,不过由过量氯化物转运所致腹泻性疾病的主要后果是共同的,包括脱水、酸中毒、生长减退和死亡。

[0018] 急性与慢性腹泻在世界很多地区代表了主要的医学问题。腹泻在不到五岁的儿童

中既是营养不良的显著因素,又是死亡的主导原因(5,000,000例死亡/年)。

[0019] 分泌性腹泻也是获得性免疫缺陷综合征(AIDS)和慢性炎症肠疾病(IBD)患者中的危险病症。每年从工业化国家到发展中国家旅行的人中有一千六百万人患上腹泻,腹泻病例的严重性和数量因旅行的国家和地区而异。

[0020] 牲畜和宠物,如牛、猪、马、绵羊、山羊、猫和狗的腹泻也称为家畜腹泻病,是这些动物死亡的主要原因。腹泻可以由任何重大转变所致,如断奶或身体运动,以及应答于多种细菌或病毒感染,一般发生在动物生命的前几个小时内。

[0021] 最常见的致腹泻性细菌是肠毒性大肠杆菌(ETEC),具有K99纤毛抗原。腹泻的常见病毒原因包括轮状病毒和冠形病毒。其他感染性成分包括隐孢子虫、兰伯氏贾第虫和沙门氏菌等。

[0022] 轮状病毒感染的症状包括水样便的排泄,脱水和虚弱。冠形病毒导致更严重的新生动物疾病,具有比轮状病毒感染更高的死亡率。不过经常是年幼动物可能同时感染有一种以上病毒或者病毒与细菌微生物的组合。这戏剧性地增加疾病的严重性。

[0023] 因此,对可以用于调节哺乳动物细胞膜中ABC转运蛋白活性的ABC转运蛋白活性调节剂及其组合物存在需求。

[0024] 对使用这种ABC转运蛋白活性调节剂治疗ABC转运蛋白介导的疾病的方法存在需求。

[0025] 对调节离体哺乳动物细胞膜中ABC转运蛋白活性的方法存在需求。

[0026] 对可以用于调节哺乳动物细胞膜中CFTR活性的CFTR活性调节剂存在需求。

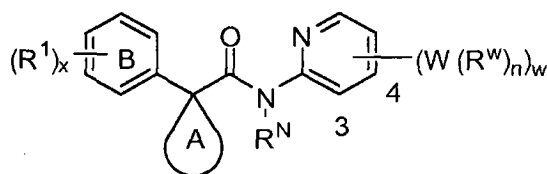
[0027] 对使用这种CFTR活性调节剂治疗CFTR-介导的疾病的方法存在需求。

[0028] 对调节离体哺乳动物细胞膜中CFTR活性的方法存在需求。

[0029] 发明概述

[0030] 目前发现本发明的化合物及其药学上可接受的组合物用作ABC转运蛋白活性、特别是CFTR活性的调节剂。这些化合物具有式I:

[0031]



I

[0032] 或其药学上可接受的盐,其中R^N、环A、环B、W、R^W、R¹、n、w和x如下所述。

[0033] 这些化合物和药学上可接受的组合物可用于治疗多种疾病、障碍或病症或者减轻其严重性,所述疾病,障碍或病症包括但不限于囊性纤维化,遗传性肺气肿,遗传性血色素沉着症,凝血-纤维蛋白溶解缺陷症,如蛋白C缺陷症,1型遗传性血管水肿,脂质加工缺陷症,如家族性高胆固醇血症,1型乳糜微粒血症,无β脂蛋白血症,溶酶体贮积病,如I-细胞疾病/假性-赫尔勒综合症,粘多糖病,桑德霍夫/泰-萨克斯病,克里格勒-纳贾尔综合症I型,多内分泌腺病/高胰岛素血症,糖尿病,拉伦侏儒症,髓过氧化物酶缺乏症,原发性甲状旁腺机能减退症,黑色素瘤,聚糖病CDG 1型,遗传性肺气肿,先天性甲状腺功能亢

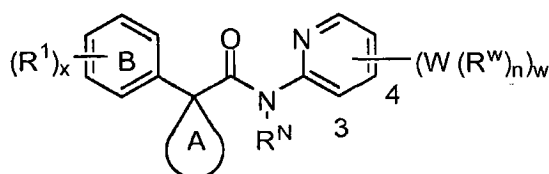
进症,成骨不全,遗传性低纤维蛋白原血症,ACT 缺乏症,尿崩症(di),后叶激素运载蛋白性di,肾性DI,夏-马-图综合征,佩-梅病,神经变性疾病,如阿尔茨海默病,帕金森病,肌萎缩性侧索硬化,进行性核上性麻痹,皮克病,若干聚谷氨酰胺神经障碍,如亨廷顿病,I 型脊髓小脑性共济失调,脊髓与延髓肌肉萎缩,齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩,和肌强直性营养不良,以及海绵状脑病,如遗传性克-雅病,法布里病、斯-施综合征,COPD,干眼病和斯耶格伦病。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明化合物的一般描述:

[0036] 本发明涉及式 I 的化合物:

[0037]



I

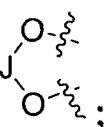
[0038] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0039] R^N 是 H、烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基或杂环烷基;

[0040] A 是任选地被取代的 3-7 元单环;

[0041] B 任选地与 5-7 元环稠合,所述 5-7 元环选自脂环族基团、芳基、杂环基团和杂芳基;

[0042] R^1 是卤素、烷基、OH、烷氧基、烷硫基、三氟甲氧基;或

[0043] 相邻原子上的两个 R^1 一起形成 

[0044] 其中 J 选自 CH_2 、 CF_2 或 $C(CH_3)_2$;

[0045] W 独立地是键或任选地被取代的 (C1-C6) 亚烷基链,其中至多两个 W 的亚甲基单元独立地被 $-CO-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 或 $-NR'$ 替代;

[0046] R' 独立地是 H、烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基或杂环烷基;

[0047] R^w 独立地是 H、卤素、CN、 NO_2 、 $N(R)_2$ 、 CF_3 、 OCF_3 、OH、OR、 $C(O)N(R)_2$ 、 $C(O)R$ 、 CO_2R 、 $-O(C1-C6)$ 亚烷基 $-OR$ 、 $-O(C1-C6)$ 亚烷基 $-N(R)_2$ 、 $-O(C1-C6)$ 亚烷基-杂环烷基或任选地被取代的脂族基团、脂环族基团、芳基、芳氧基、杂环基团或杂芳基,其中在被取代时, R^w 被至多两个 R^2 取代;

[0048] R^2 是卤素、CN、 NO_2 、 CF_3 、 OCF_3 、OR、 $OC(O)R$ 、 $OC(O)N(R)_2$ 、SR、 $S(O)R$ 、 SO_2R 、 $SO_2N(R)_2$ 、 SO_3R 、 $C(O)R$ 、 CO_2R 、 $C(O)N(R)_2$ 、 $N(R)_2$ 、 $NRC(O)R$ 、 $NRCO_2R$ 、 $NRC(O)N(R)_2$ 、 $NRSO_2R$ 、 $B(OH)_2$ 或 $NRSO_2N(R)_2$;

[0049] R 独立地是 H、烷基、环烷基、杂环基团、芳基或杂芳基;

[0050] n 是 1 或 2;

[0051] w 是包括 0 和 4 在内的 0-4 的整数;且

[0052] x 是包括 0 和 5 在内的 0-5 的整数;条件是当 W 是键且 R^w 是脂环族基团、杂脂环族

基团、芳基或杂芳基时, -W-R" 与吡啶基环的 3- 或 4- 位连接。

[0053] 化合物和定义:

[0054] 本发明的化合物包括上面一般描述的那些化合物并且进一步示例为本文公开的类型、亚类和种类。本文适用下列定义, 另有说明的除外。

[0055] 本文所用的术语“ABC- 转运蛋白”表示包含至少一个结合结构域的 ABC- 转运蛋白质或其片段, 其中所述蛋白质或其片段是体内或体外存在的。本文所用的术语“结合结构域”表示 ABC- 转运蛋白上能够与调节剂结合的结构域。例如参见 Hwang, T. C. 等人, J. Gen. Physiol. (1998) :111 (3), 477-90。

[0056] 本文所用的术语“CFTR”表示囊性纤维化跨膜传导调节因子或其有调节剂活性的突变体, 包括但不限于 $\Delta F508$ CFTR 和 G551D CFTR (参见, 例如, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, 关于 CFTR 突变)。

[0057] 本文所用的术语“调节”表示增加或降低达到可测量的量。

[0058] 出于本发明的目的, 化学元素根据 Periodic Table of the Elements, CAS 版, Handbook of Chemistry and Physics, 第 75 版鉴定。另外, 有机化学的一般原理描述在“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito :1999 和“March' s Advanced Organic Chemistry”, 第 5 版, Ed. :Smith, M. B. 和 March, J., John Wiley & Sons, New York :2001 中, 将这些文献的全部内容引入本文作为参考。

[0059] 正如本文所描述的, 本发明化合物可以任选地被一个或多个取代基取代, 如上文的一般阐述, 或者本发明特定种类、小类和品种的例证。将被领会到的是, 措辞“任选地被取代”与措辞“取代或未取代”可互换使用。一般而言, 术语“取代”无论前面有无术语“任选地”, 都表示给定结构中的氢原子基团被所指定的取代基所代替。除非另有指示, 否则任选地被取代的基团可以在该基团每个可取代的位置具有取代基, 当任意给定结构中一个以上位置被一个以上选自指定组的取代基取代时, 取代基在每个位置可以是相同或不同的。由本发明所涵盖的取代基组合优选地是导致稳定的或化学上可行的化合物生成的那些。本文所用的术语“稳定”表示在受到允许它们生产、检测、优选它们的回收、纯化的条件的处理时和用于一种或多种本文公开的目的时基本上不改变的化合物。在有些实施方案中, 稳定的化合物或化学上可行的化合物是在没有水分或其他化学反应性条件的存在下、在 40°C 或以下的温度下保存至少一周时基本上不改变者。

[0060] 本文所用的术语“脂族基团”或“脂族基”或“烷基”表示直链 (即不分支) 或支链的、取代或未取代的烃链, 它是完全饱和的或者含有一个或多个不饱和单元, 或者表示单环烃或二环烃, 它是完全饱和的或者含有一个或多个不饱和单元, 但是不是芳族的 (本文也称之为“碳环”、“脂环族基团”或“环烷基”), 它与分子其余部分具有单一的连接点。除非另外说明, 脂族基含有 1-20 个脂族碳原子。在一些实施方案中, 脂族基含有 1-10 个脂族碳原子。在其他实施方案中, 脂族基含有 1-8 个脂族碳原子。在其他实施方案中, 脂族基含有 1-6 个脂族碳原子, 并且在其他实施方案中, 脂族基含有 1-4 个脂族碳原子。在一些实施方案中, “脂环族基团” (或者“碳环”或“环烷基”) 表示单环 C_3-C_8 烃或者二环 C_8-C_{12} 烃, 它是完全饱和的或者含有一个或多个不饱和单元, 但是不是芳族的, 它具有与分子其余部分单一的连接点, 其中所述二环环系中任意单独的环具有 3-7 个成员。适合的脂族基团包括但不限于直链或支链取代或未取代的烷基、烯基、炔基及其杂合物, 如 (环烷基) 烷基、(环烯

基)烷基或(环烷基)烯基。

[0061] 本文所用的术语“杂脂族基团”表示其中一个或两个碳原子独立地被一个或多个氧、硫、氮、磷或硅替代的脂族基团。杂脂族基团可以是取代或未取代的、分支或不分支的、环状或无环的,并且包括“杂环”、“杂环基”、“杂脂环族基团”或“杂环的”基团。

[0062] 本文所用的术语“杂环”、“杂环基”、“杂脂环族基团”或“杂环的”表示非芳族的、单环、二环或三环环系,其中一个或多个环成员是独立地选择的杂原子。在一些实施方案中,“杂环”、“杂环基”、“杂脂环族基团”或“杂环的”基团具有 3-14 个环成员,其中一个或多个环成员是独立地选自氧、硫、氮或磷的杂原子,并且该系统中每个环含有 3-7 个环成员。

[0063] 术语“杂原子”表示一个或多个硼、氧、硫、氮、磷或硅(包括氮、硫、磷或硅的任意氧化形式;任意碱性氮或杂环的可取代氮的季铵化形式,例如 N(如在 3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或 NR^+ (如在 N-取代的吡咯烷基中))。

[0064] 本文所用的术语“不饱和”意味着某一结构部分具有一个或多个不饱和单元。

[0065] 本文所用的术语“烷氧基”或“烷硫基(thioalkyl)”表示如前文所定义的烷基,通过氧(“烷氧基”)或硫(“烷硫基”)原子连接于主体碳链。

[0066] 术语“卤代脂族基团”和“卤代烷氧基”表示视情况而定被一个或多个卤原子取代的脂族基团或烷氧基。术语“卤素”表示 F、Cl、Br 或 I。卤代脂族基团的实例包括 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2-$ 或全卤代烷基如 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 。

[0067] 单独或者作为更大结构部分“芳烷基”、“芳烷氧基”或“芳氧基烷基”的一部分使用的术语“芳基”表示单环、二环和三环环系,具有总计 5-14 个环成员,其中该系统中至少一个环是芳族的,并且其中该系统中每个环含有 3-7 个环成员。术语“芳基”可以与术语“芳基环”互换使用。术语“芳基”也表示如下所定义的杂芳基环系。

[0068] 单独或者作为更大结构部分例如“杂芳烷基”或“杂芳基烷氧基”的一部分使用的术语“杂芳基”表示单环、二环和三环环系,具有总计 5-14 个环成员,其中该系统中至少一个环是芳族的,该系统中至少一个环含有一个或多个杂原子,并且该系统中每个环含有 3-7 个环成员。术语“杂芳基”可以与术语“杂芳基环”或术语“杂芳族基团”互换使用。

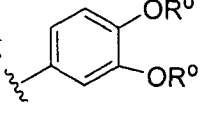
[0069] 芳基(包括芳烷基、芳烷氧基、芳氧基烷基等)或杂芳基(包括杂芳烷基和杂芳烷氧基等)可以含有一个或多个取代基。芳基或杂芳基的不饱和碳原子上适合的取代基选自卤素; $-\text{R}^\circ$; $-\text{OR}^\circ$; $-\text{SR}^\circ$;1,2-亚甲二氧基;1,2-亚乙二氧基;任选被 R° 取代的苯基(Ph);任选被 R° 取代的 $-\text{O}(\text{Ph})$;任选被 R° 取代的 $-(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{Ph})$;任选被 R° 取代的 $-\text{CH}=\text{CH}(\text{Ph})$; $-\text{NO}_2$; $-\text{CN}$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{S}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{SO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{C}(=\text{NH})-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$;和 $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NHC}(\text{O})\text{R}^\circ$,其中每次独立出现的 R° 选自氢、任选地被取代的 C_{1-6} 脂族基团、未取代的 5-6 元杂芳基或杂环、苯基、 $-\text{O}(\text{Ph})$ 或 $-\text{CH}_2(\text{Ph})$,或者尽管有如上定义,在相同取代基或不同取代基上的两次独立出现的 R° 与每个 R° 基团所键合的原子一起形成 3-8 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环,其具有 0-3 个独立地选自氮、氧和硫的杂原子。 R° 的脂族基团上的任选的取代基选自 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基团)、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基团) $_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族基团、 OH 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基团)、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}$ 脂族基团)、 $\text{O}(\text{卤代 } \text{C}_{1-4} \text{ 脂族基团})$ 和卤代 C_{1-4} 脂族基团,其中上述 R° 的 C_{1-4} 脂族基团各自未被取代。

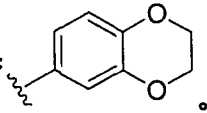
[0070] 脂族或杂脂族基团或者非芳族杂环可以含有一个或多个取代基。脂族或杂脂族基团或者非芳族杂环的饱和碳上适合的取代基选自上文关于芳基或杂芳基不饱和碳所举出的那些,并且另外包括下列基团: $=O$ 、 $=S$ 、 $=NNHR^*$ 、 $=NN(R^*)_2$ 、 $=NNHC(O)R^*$ 、 $=NNHCO_2$ (烷基)、 $=NNHSO_2$ (烷基)和 $=NR^*$,其中每个 R^* 独立地选自氢和任选地被取代的 C_{1-6} 脂族基团。 R^* 的脂族基团上的任选的取代基选自 NH_2 、 $NH(C_{1-4}$ 脂族基团)、 $N(C_{1-4}$ 脂族基团) $_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族基团、 OH 、 $O(C_{1-4}$ 脂族基团)、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $CO_2(C_{1-4}$ 脂族基团)、 O (卤代 C_{1-4} 脂族基团)和卤代(C_{1-4} 脂族基团),其中上述 R^* 的 C_{1-4} 脂族基团各自未被取代。

[0071] 非芳族杂环氮上任选的取代基选自 $-R^+$ 、 $-N(R^+)_2$ 、 $-C(O)R^+$ 、 $-CO_2R^+$ 、 $-C(O)C(O)R^+$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^+$ 、 $-SO_2R^+$ 、 $-SO_2N(R^+)_2$ 、 $-C(=S)N(R^+)_2$ 、 $-C(=NH)-N(R^+)_2$ 和 $-NR^+SO_2R^+$;其中 R^+ 是氢、任选地被取代的 C_{1-4} 脂族基团、任选地被取代的苯基、任选地被取代的 $-O(Ph)$ 、任选地被取代的 $-CH_2(Ph)$ 、任选地被取代的 $-(CH_2)_{1-2}(Ph)$ 、任选地被取代的 $-CH=CH(Ph)$;或者具1-4个独立地选自氧、氮或硫的杂原子的未取代的5-6元杂芳基或杂环,或者尽管有如上定义,在相同取代基或不同取代基上的两次独立出现的 R^+ 与每个 R^+ 基团所键合的原子一起形成3-8元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基,其具有0-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子。 R^+ 的脂族基团或苯基环上的任选的取代基选自 NH_2 、 $NH(C_{1-4}$ 脂族基团)、 $N(C_{1-4}$ 脂族基团) $_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族基团、 OH 、 $O(C_{1-4}$ 脂族基团)、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $CO_2(C_{1-4}$ 脂族基团)、 O (卤代 C_{1-4} 脂族基团)和卤代(C_{1-4} 脂族基团),其中上述 R^+ 的 C_{1-4} 脂族基团各自未被取代。

[0072] 术语“亚烷基链”表示直链或支链碳链,它可以是完全饱和的或者具有一个或多个不饱和单元,并且与分子其余部分具有两个连接点。术语“螺亚环烷基”表示可以是完全饱和或具有一个或多个不饱和单元并且具有来自同一环碳原子的与分子其余部分的两个连接点的碳环。

[0073] 如上文所述,在一些实施方案中,两次独立出现的 R^0 (或者 R^+ 或任意其他在本文中有类似定义的变量)与它们所键合的原子一起形成3-8元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环,其具有0-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子。两次独立出现的 R^0 (或者 R^+ 或任意其他在本文中有类似定义的变量)与每一变量所键合的原子一起所形成的典型环包括但不限于下列:a)两次独立出现的 R^0 (或者 R^+ 或任意其他在本文中有类似定义的变量)键合于同一原子,并且与该原子一起形成一个环,如 $N(R^0)_2$,其中出现的两个 R^0 与氮原子一起构成哌啶-1-基、哌嗪-1-基或吗啉-4-基;和b)两次独立出现的 R^0 (或者 R^+ 或任意其他在本文中有类似定义的变量)键合于不同原子,并且与这些原子一起构成一个环

 其中苯基被两次出现的 OR^0 取代,这两次出现的 R^0 与它们所键合的氧原子一起形成稠合的6元含氧环:

 将被理解的是,两次独立出现的 R^0 (或者 R^+ 或任意其他在本文中有类似定义的变量)与每一变量所键合的原子一起可以形成多种其他环,上述详细实例不打算限制性的。

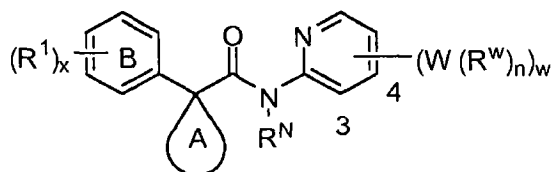
[0074] 除非另有规定,否则本文所描绘的结构也意味着包括该结构的所有异构(例如对映异构、非对映异构和几何异构(或构象异构))形式;例如每一不对称中心的R与S构型,(Z)与(E)双键异构体,和(Z)与(E)构象异构体。因此,这些化合物的单一立体化学异构

体以及对映异构、非对映异构和几何异构（或构象异构）混合物都属于本发明的范围。除非有相反规定，否则本发明化合物的所有互变异构形式都属于本发明的范围。另外，除非有相反规定，否则本文所描绘的结构也意味着包括仅在一个或多个同位素富集原子的存在上有所不同的化合物。例如，除了氢被氘或氚代替或者碳被 ^{13}C - 或 ^{14}C - 富集的碳替代以外具有本发明结构的化合物都属于本发明的范围。这类化合物例如可用作生物学测定法中的分析工具或探针。

[0075] 典型化合物的描述：

[0076] 在一个实施方案中，本发明涉及式 I 的化合物：

[0077]



I

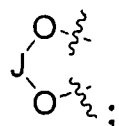
[0078] 或其药学上可接受的盐，其中：

[0079] R^{N} 是 H、烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基或杂环烷基；

[0080] A 是任选地被取代的 3-7 元单环；

[0081] B 任选地与 5-7 元环稠合，所述 5-7 元环选自脂环族基团、芳基、杂环基团和杂芳基；

[0082] R^1 是卤素、烷基、OH、烷氧基、三氟甲氧基；或相邻原子上的两个 R^1 一起形成



[0083] 其中 J 选自 CH_2 、 CF_2 或 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ；

[0084] W 独立地是键或 (C1-C6) 亚烷基链，其中至多两个 W 的亚甲基单元独立地被 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 或 $-\text{NR}'-$ 替代；

[0085] R' 独立地是 H、烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基或杂环基团；

[0086] R^{w} 独立地是 H、卤素、CN、 NO_2 、 $\text{N}(\text{R})_2$ 、 CF_3 、 OCF_3 、OH、OR、 $\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 CO_2R 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{O}(\text{C1-C6})$ 亚烷基 $-\text{OR}$ 、 $-\text{O}(\text{C1-C6})$ 亚烷基 $-\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{O}(\text{C1-C6})$ 亚烷基 - 杂环或任选地被取代的脂族基团、脂环族基团、芳基、芳氧基、杂环基团或杂芳基，其中在被取代时， R^{w} 被至多两个 R^2 取代；

[0087] R^2 是卤素、CN、 NO_2 、 CF_3 、 OCF_3 、OR、 $\text{OC}(\text{O})\text{R}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、SR、 $\text{S}(\text{O})\text{R}$ 、 SO_2R 、 $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$ 、 SO_3R 、 $\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 CO_2R 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $\text{N}(\text{R})_2$ 、 $\text{NRC}(\text{O})\text{R}$ 、 NRCO_2R 、 $\text{NRC}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 NRSO_2R 、 $\text{B}(\text{OR})_2$ 或 $\text{NRSO}_2\text{N}(\text{R})_2$ ；

[0088] R 独立地是 H、烷基、环烷基、杂环基团、芳基或杂芳基；

[0089] n 是 1 或 2；

[0090] w 是包括 0 和 4 在内的 0-4 的整数；且

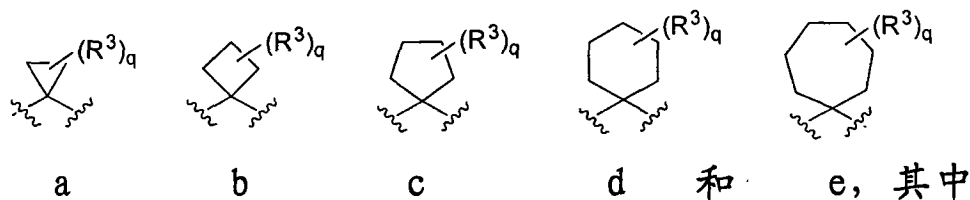
[0091] x 是包括 0 和 5 在内的 0-5 的整数；

[0092] 条件是当 W 是键且 R^{w} 是脂环族基团、杂脂环族基团、芳基或杂芳基时， $-\text{W}-\text{R}^{\text{w}}$ 与吡

啶基环的 3- 或 4- 位连接。

[0093] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 A 选自:

[0094]



[0095] R^3 是烷基、烷芳基、芳基或杂芳基;且

[0096] q 是包括 0 和 4 在内的 0-4 的整数。在进一步的实施方案中, A 是 在

进一步的实施方案中, A 是 。

[0097] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 x 是 2。

[0098] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 R^1 是卤素。在另一个实施方案中, R^1 是氯。在另一个实施方案中, R^1 是烷基。在另一个实施方案中, R^1 是甲基。在另一个实施方案中, R^1 是 OH。在另一个实施方案中, R^1 是烷氧基。在进一步的实施方案中, R^1 是甲氧基。在另一个实施方案中, R^1 是烷硫基。在另一个实施方案中, R^1 是甲硫基。在进一步的实施方案中, R^1 是三氟甲氧基。

[0099] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中相邻原子

上的两个 R^1 一起形成 其中 J 选自 CH_2 、 CF_2 或 $C(CH_3)_2$ 。在进一步的实施方案中, J 是

CH_2 。在进一步的实施方案中, J 是 CF_2 。

[0100] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 R^N 是 H 或烷基。在进一步的实施方案中, R^N 是 H。在进一步的实施方案中, R^N 是烷基。

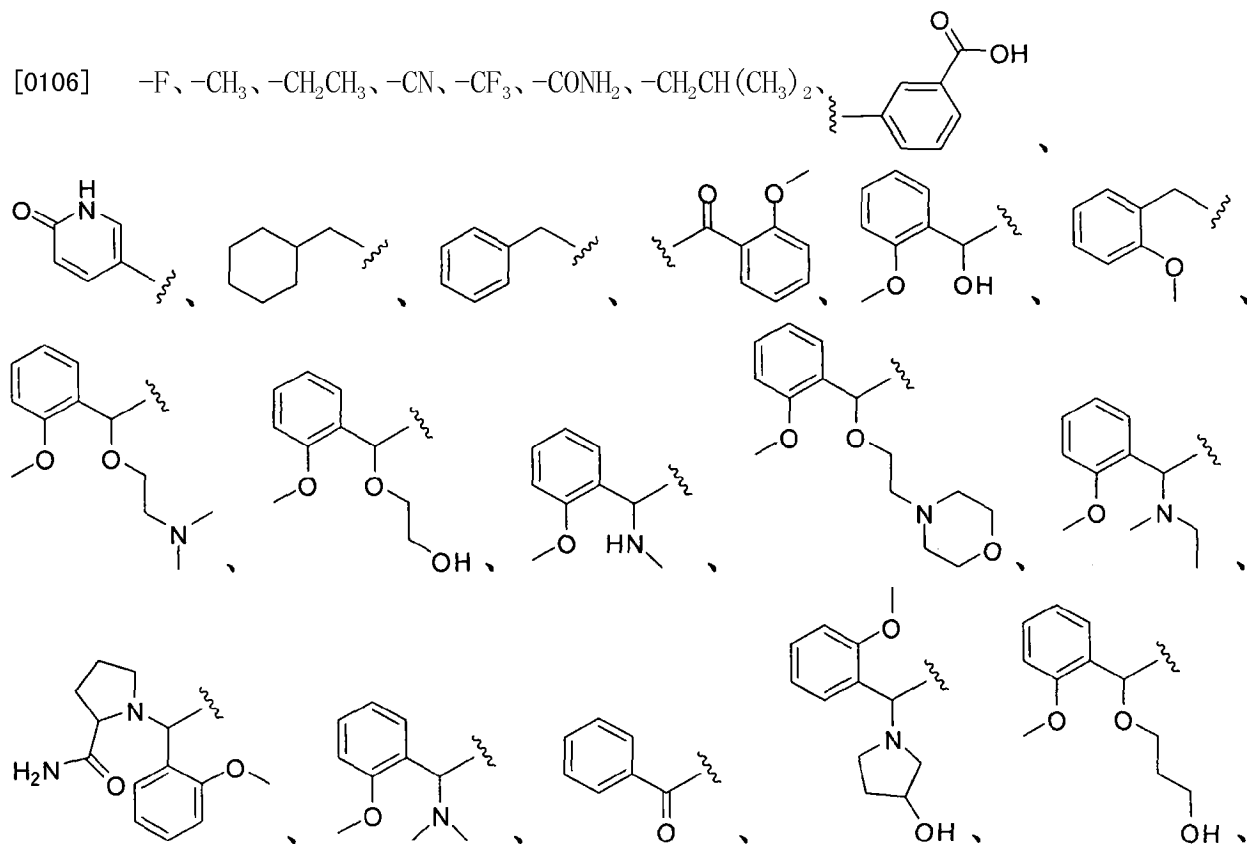
[0101] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 w 是 0。在进一步的实施方案中, w 是 1。在进一步的实施方案中, w 是 2。

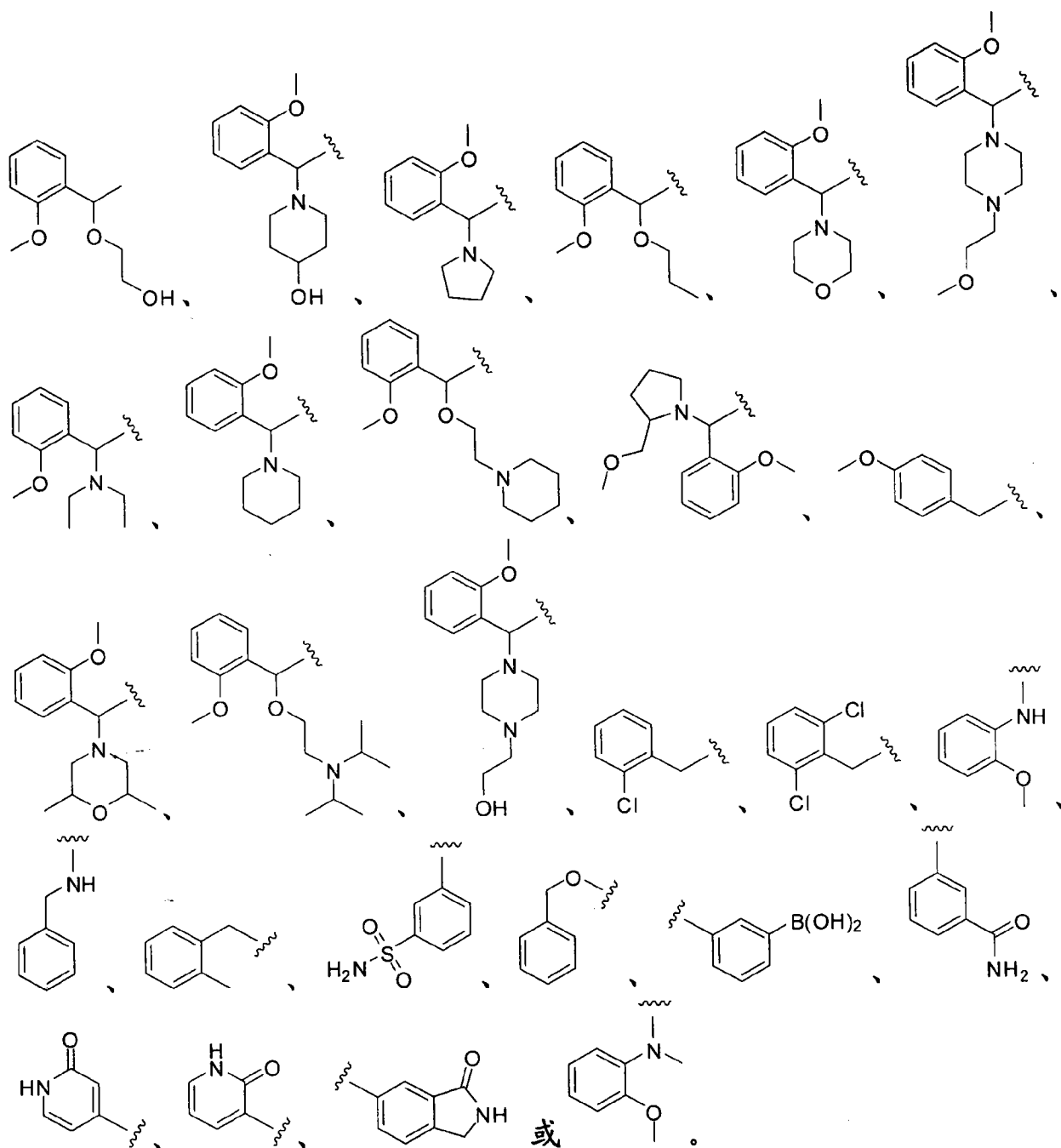
[0102] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 n 是 1。在进一步的实施方案中, n 是 2。

[0103] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 W 是键。在进一步的实施方案中, W 是任选地被取代的 (C1-C6) 亚烷基链。在进一步的实施方案中, W 是 $-CH_2-$ 。在进一步的实施方案中, W 是 $-NH-$ 。在进一步的实施方案中, W 是 $-O-$ 。在进一步的实施方案中, W 是 $-CO-$ 。在进一步的实施方案中, W 是 $-OCH_2-$ 。

[0104] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 R^W 是 H。在进一步的实施方案中, R^W 是 OH。在进一步的实施方案中, R^W 是杂环基团。在进一步的实施方案中, R^W 是芳基。在进一步的实施方案中, R^W 是苯基。在进一步的实施方案中, R^W 是杂芳基。在进一步的实施方案中, R^W 是吡啶基。在进一步的实施方案中, R^W 是烷氧基。在进一步的实施方案中, R^W 是环烷基。在进一步的实施方案中, R^W 是环己基。

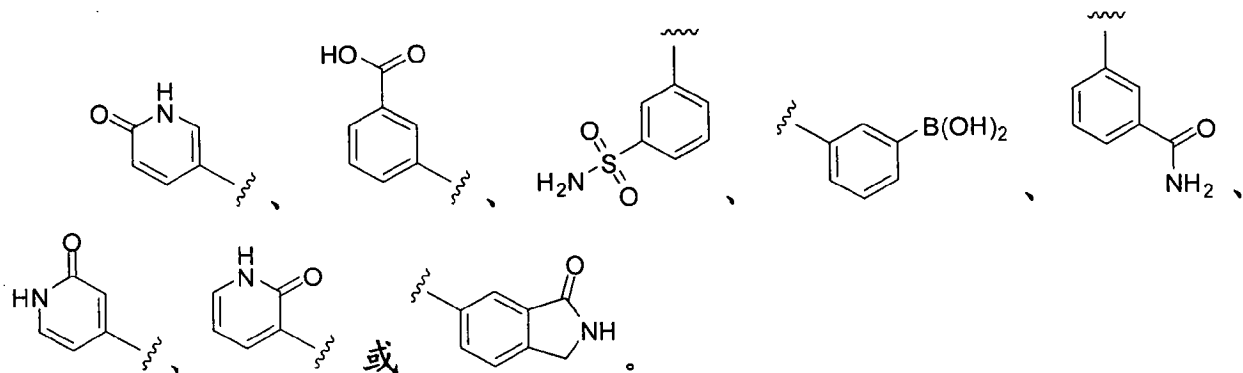
[0105] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 I 的化合物和所伴随的定义,其中 $-W-R^w$ 是无环基团。在另一个实施方案中, $-W-R^w$ 是芳基、杂芳基、脂环族基团或杂脂环族环。在进一步的实施方案中, $-W(R^w)_n$ 选自如下:





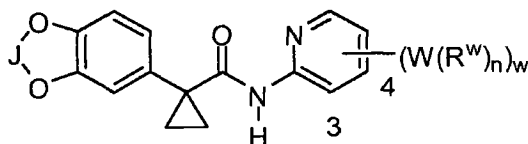
[0107] 在进一步的实施方案中, $-W(R^w)_n$ 选自如下:

[0108]



[0109] 在另一个实施方案中,本发明涉及具有式 Ia 的化合物:

[0110]

**Ia**

[0111] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0112] J 是 CH₂ 或 CF₂;

[0113] W 独立地是键或 (C1-C6) 亚烷基链,其中至多两个 W 的亚甲基单元独立地被 -CO-、-O- 或 -NR' - 替代;

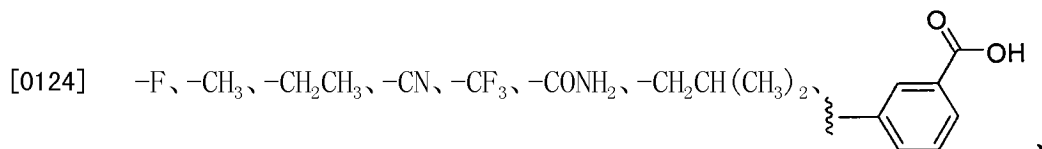
[0114] R' 独立地是 H 或烷基;

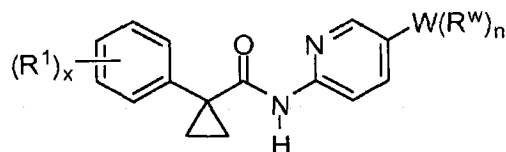
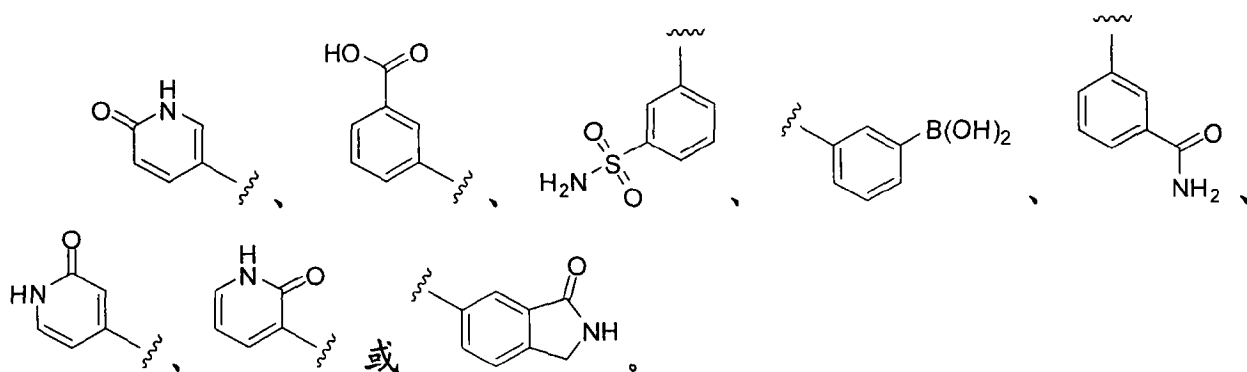
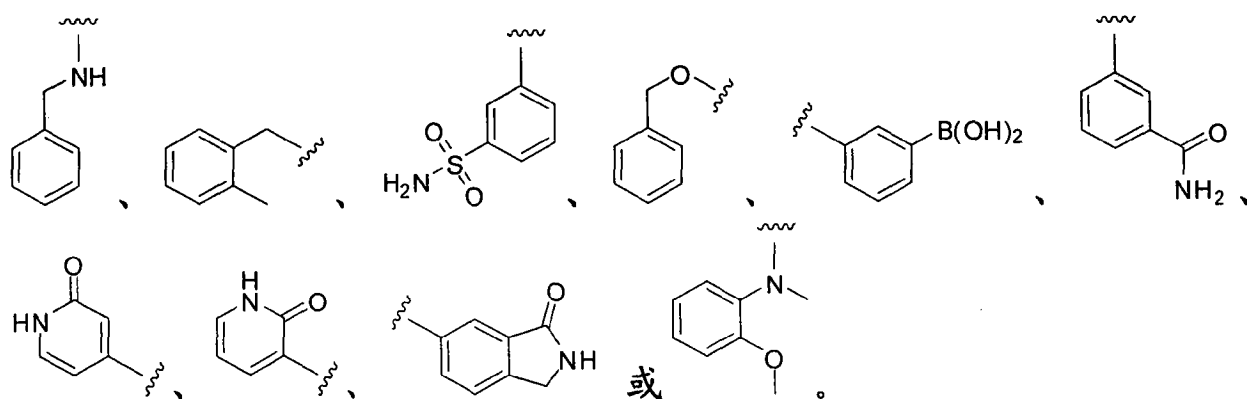
[0115] R^w 独立地是 H、卤素、CN、N(R)₂、CF₃、OH、CO₂R、C(O)N(R)₂、-O(C1-C6) 亚烷基 -OR、-O(C1-C6) 亚烷基 -N(R)₂、-O(C1-C6) 亚烷基 - 杂环或任选地被取代的脂族基团、脂环族基团、芳基、芳氧基、杂环基团或杂芳基,其中在被取代时,R^w 被至多两个 R² 取代;[0116] R² 是卤素、OR、CO₂R、C(O)N(R)₂、SO₂N(R)₂、B(OR)₂ 或 N(R)₂;

[0117] R 独立地是 H、烷基、环烷基、杂环基团、芳基或杂芳基;

[0118] n 是 1 或 2;且

[0119] w 是包括 0 和 4 在内的 0-4 的整数;

[0120] 条件是当 W 是键且 R^w 是脂环族基团、杂脂环族基团、芳基或杂芳基时,-W-R^w 与吡啶基环的 3- 或 4- 位连接。[0121] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 Ia 的化合物和所伴随的定义,其中 J 是 CH₂。在进一步的实施方案中,J 是 CF₂。[0122] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 Ia 的化合物和所伴随的定义,其中 -W-R^w 是无环基团。在另一个实施方案中,本发明涉及式 Ia 的化合物和所伴随的定义,其中 -W-R^w 是芳基、杂芳基、脂环族基团或杂脂环族环。[0123] 在另一个实施方案中,本发明涉及式 Ia 的化合物和所伴随的定义,其中 -W(R^w)_n 选自如下:



Ib

[0129] 或其药学上可接受的盐, 其中:

[0130] R^1 是卤素、烷基、OH、烷氧基、烷硫基、三氟甲氧基; 或

[0131] 相邻原子上的两个 R^1 一起形成 ;

[0132] 其中 J 选自 CH_2 、 CF_2 或 $C(CH_3)_2$;

[0133] W 是 $-NR'$ 、 $-CO-$ 或 $-CH_2-$;

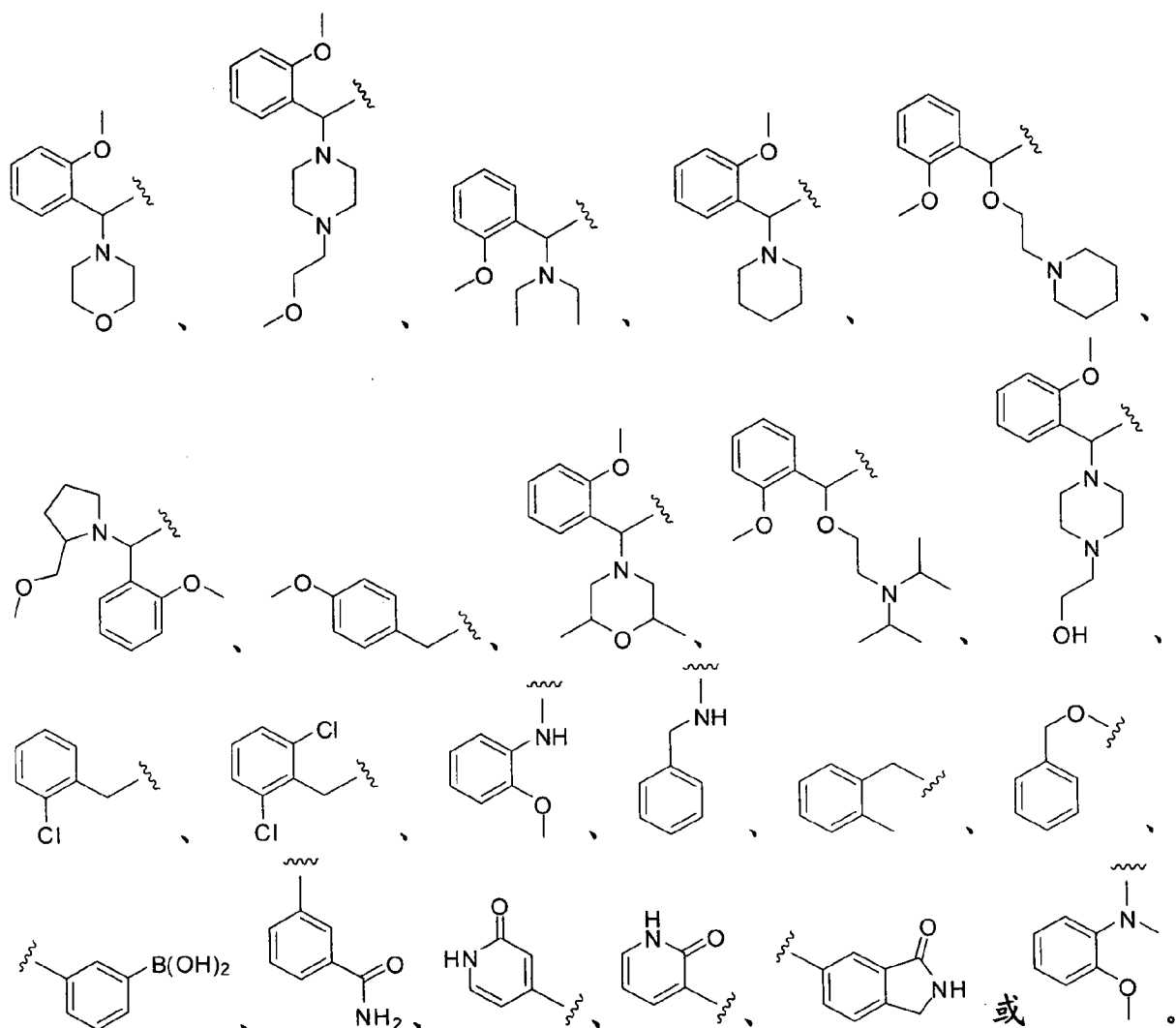
[0134] R' 独立地是 H 或烷基;

[0135] R^w 独立地是 H、卤素、CN、 $N(R)_2$ 、 CF_3 、OH、 CO_2R 、 $C(O)N(R)_2$ 、 $-O(C1-C6)$ 亚烷基、 $-OR$ 、 $-O(C1-C6)$ 亚烷基、 $-N(R)_2$ 、 $-O(C1-C6)$ 亚烷基、杂环或任选地被取代的脂族基团、脂族基团、芳基、芳氧基、杂环基团或杂芳基, 其中在被取代时, R^w 被至多两个 R^2 取代;

[0136] R^2 是卤素、OR、 CO_2R 、 $C(O)N(R)_2$ 、 $SO_2N(R)_2$ 、 $B(OR)_2$ 或 $N(R)_2$;

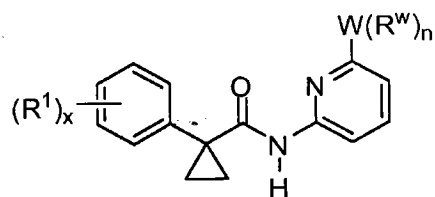
[0137] R 独立地是 H、烷基、环烷基、杂环基团、芳基或杂芳基;

[0138] n 是 1 或 2; 且



[0143] 在另一个实施方案中,本发明涉及具有式 Ic 的化合物:

[0144]



Ic

[0145] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0146] R¹ 是卤素、烷基、OH、烷氧基、烷硫基、三氟甲氧基；或

[0147] 相邻原子上的两个 R¹ 一起形成 :

[0148] 其中 J 选自 CH_2 、 CF_2 或 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$;

[0149] W 是 $-NR'$ 、 $-CO-$ 或 $-CH_2-$;

[0150] R' 独立地是 H 或烷基；

[0151] R^w 独立地是 H、卤素、CN、 $N(R)_2$ 、 CF_3 、OH、 CO_2R 、 $C(O)N(R)_2$ 、 $-O(C1-C6)$ 亚烷

基 -OR、-O(C1-C6) 亚烷基 -N(R)₂、-O(C1-C6) 亚烷基 - 杂环或任选地被取代的脂族基团、脂族基团、芳基、芳氧基、杂环基团或杂芳基, 其中在被取代时, R^w 被至多两个 R² 取代;

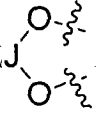
[0152] R² 是卤素、OR、CO₂R、C(O)N(R)₂、SO₂N(R)₂、B(OR)₂ 或 N(R)₂;

[0153] R 独立地是 H、烷基、环烷基、杂环基团、芳基或杂芳基;

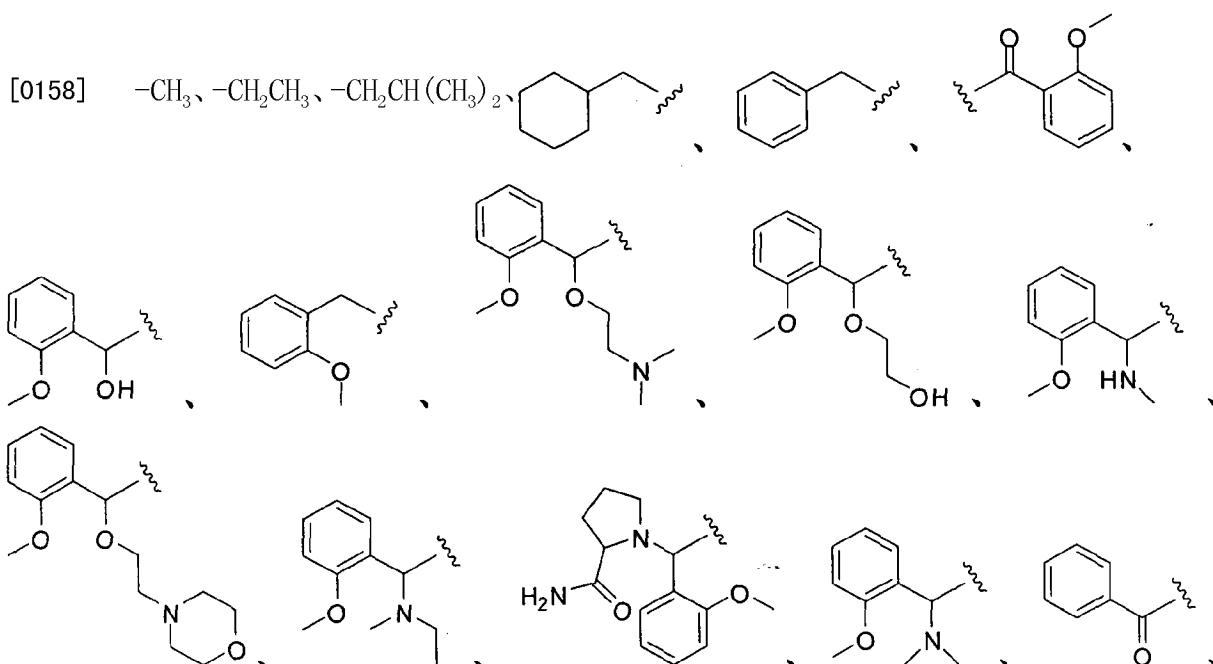
[0154] n 是 1 或 2; 且

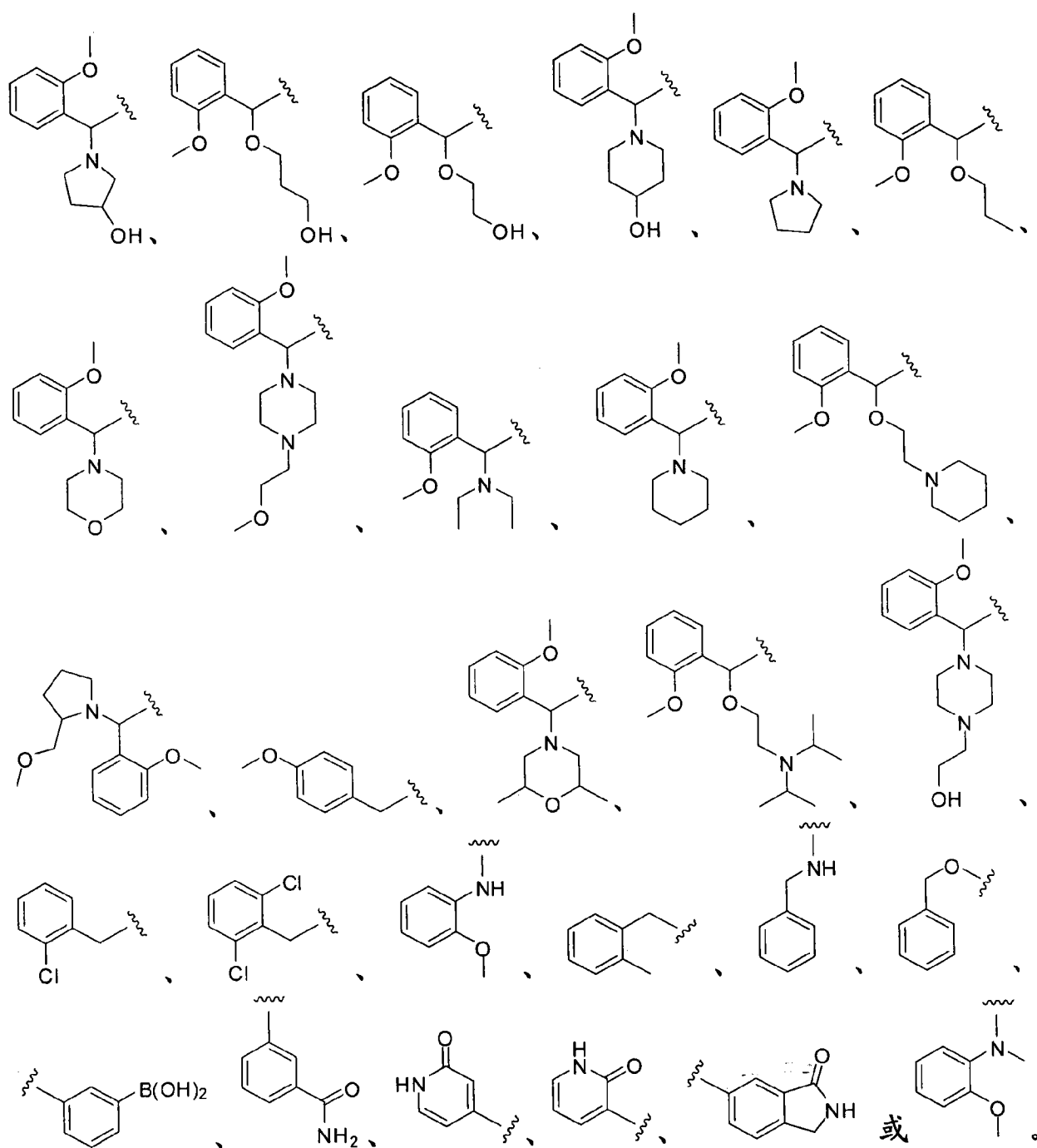
[0155] x 是包括 0 和 5 在内的 0-5 的整数。

[0156] 在另一个实施方案中, 本发明涉及式 Ic 的化合物和所伴随的定义, 其中相邻原子

上的两个 R¹ 一起形成  且 J 是 CH₂。在另一个实施方案中, J 是 CF₂。

[0157] 在另一个实施方案中, 本发明涉及式 Ic 的化合物和所伴随的定义, 其中 -W(R^w)_n 选自如下:

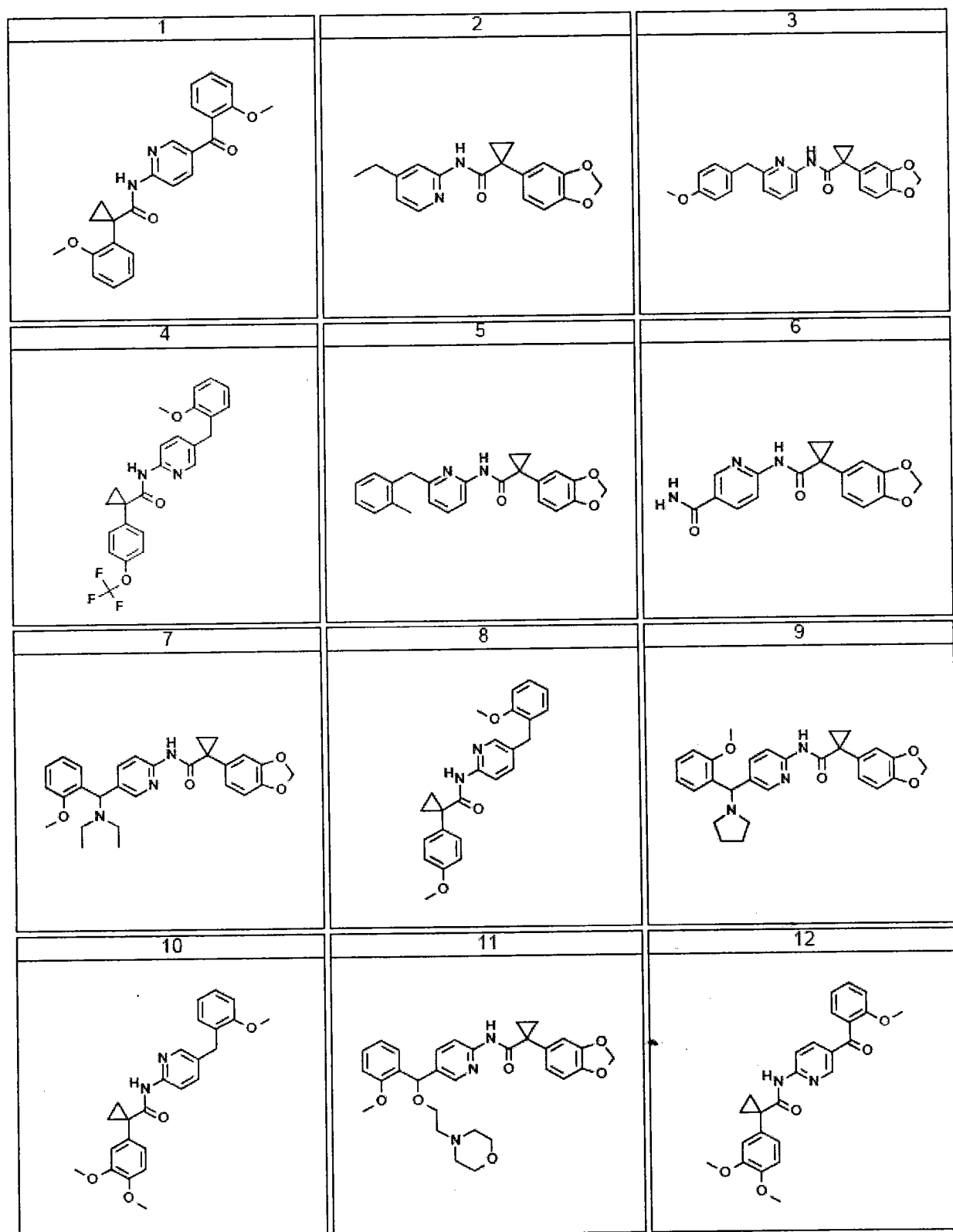




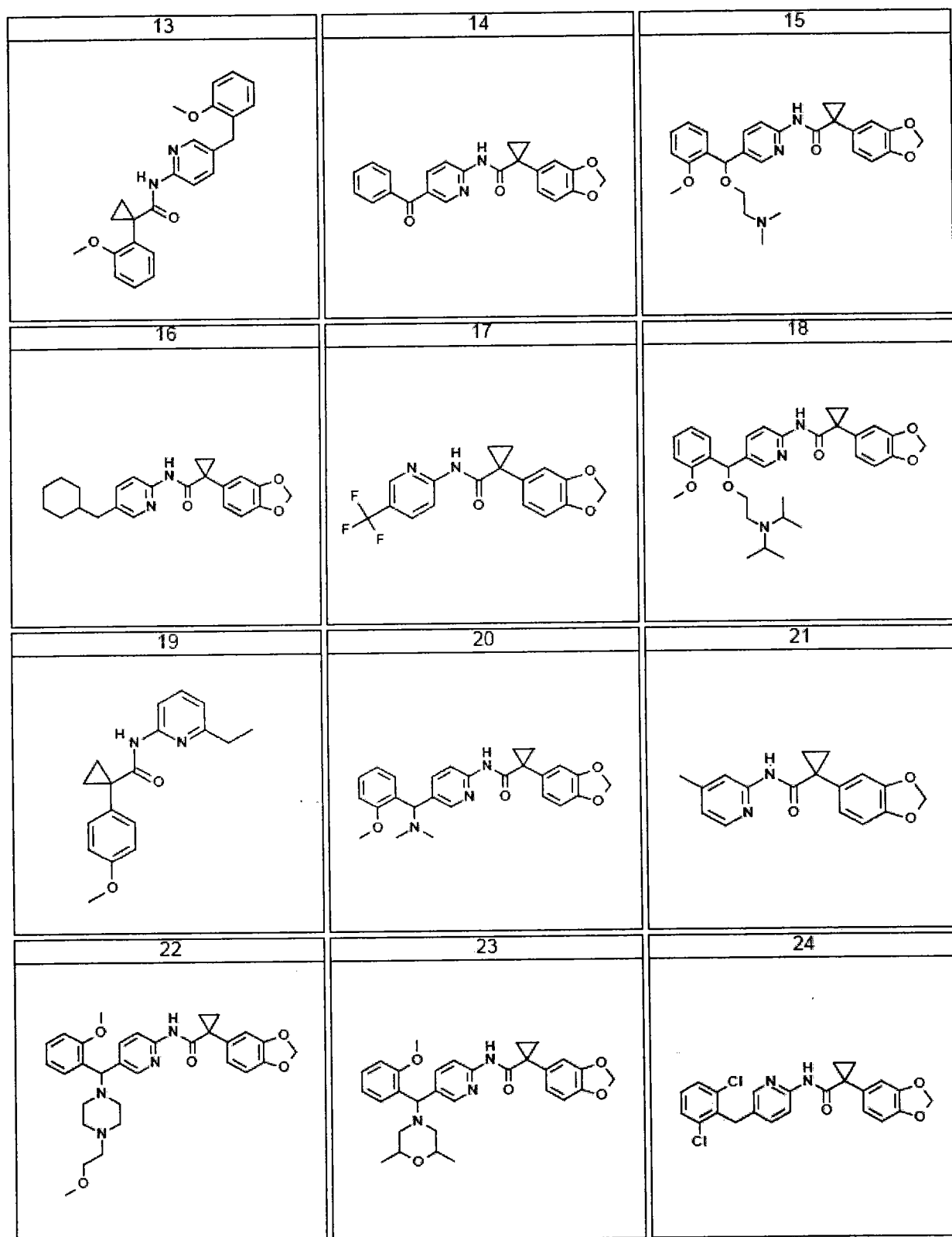
[0159] 在另一个实施方案中,本发明涉及表 1 的化合物。

[0160] 表 1.

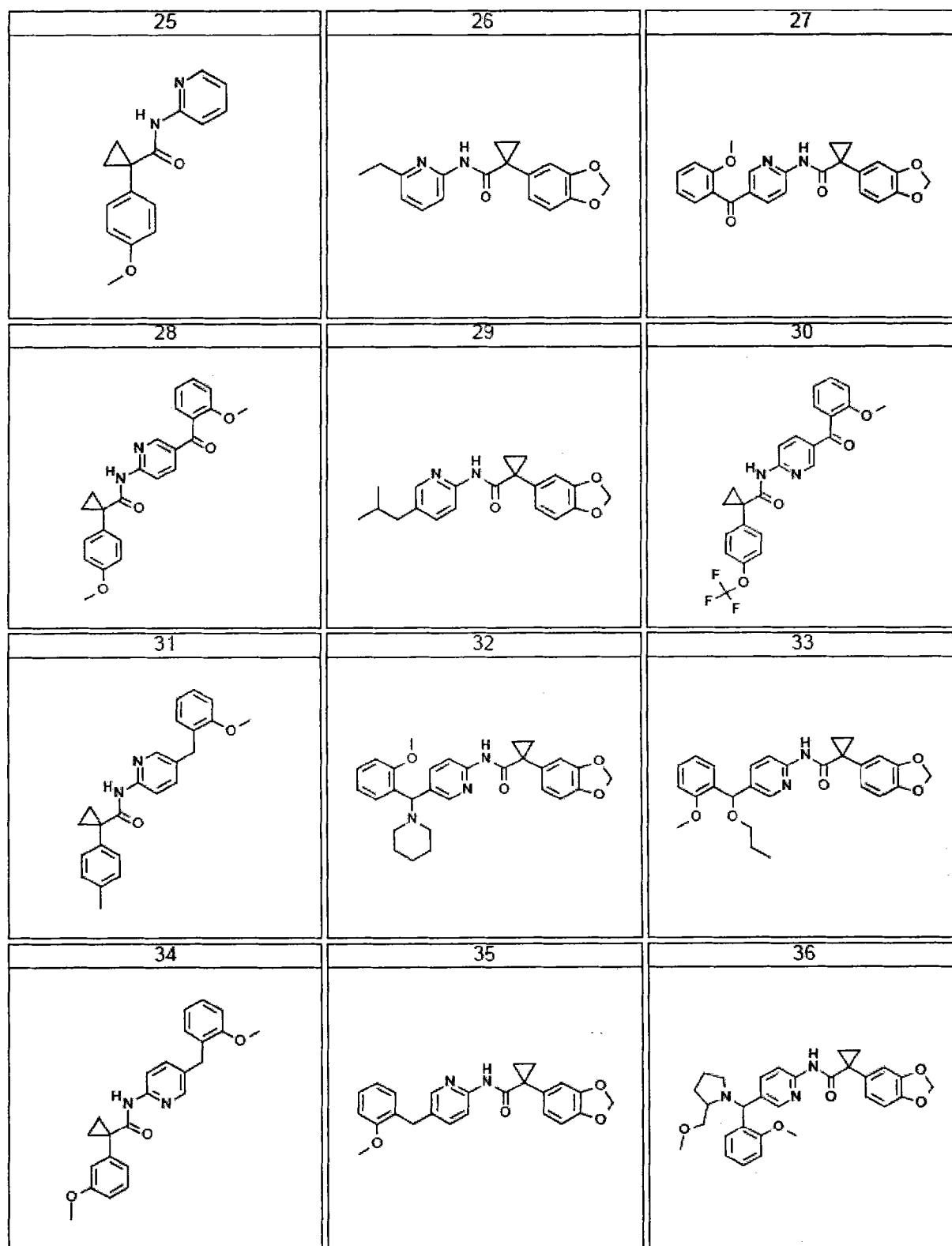
[0161]



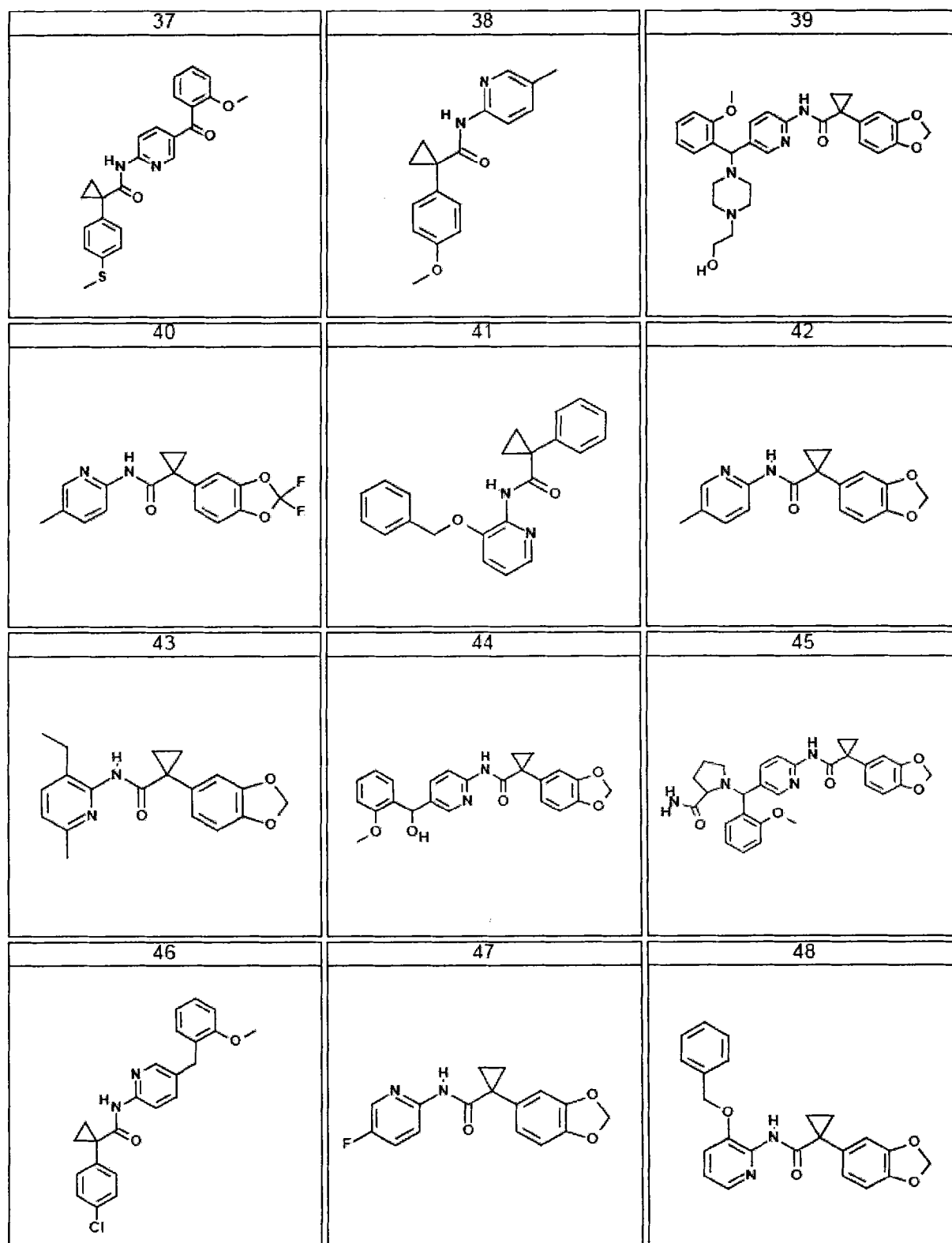
[0162]



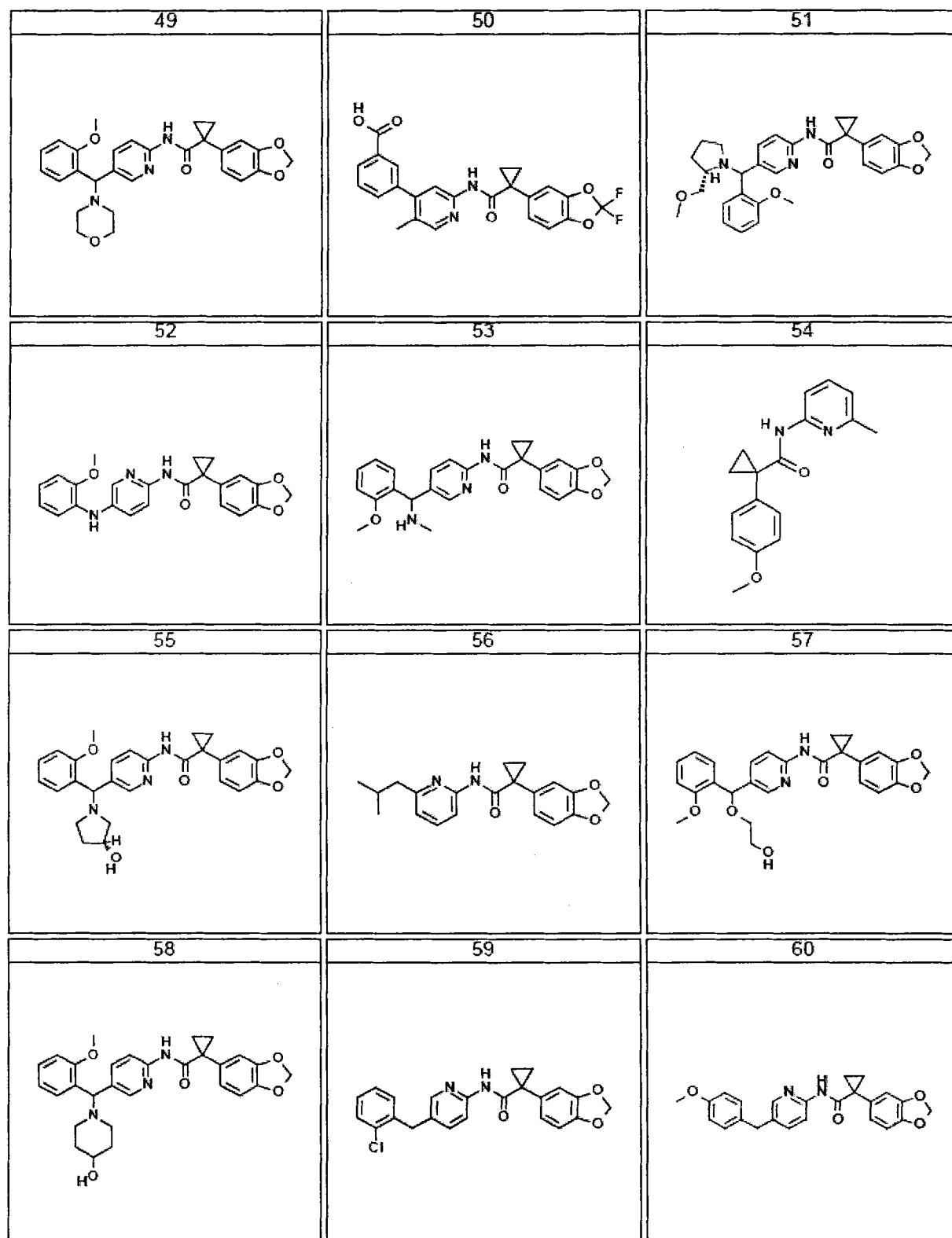
[0163]



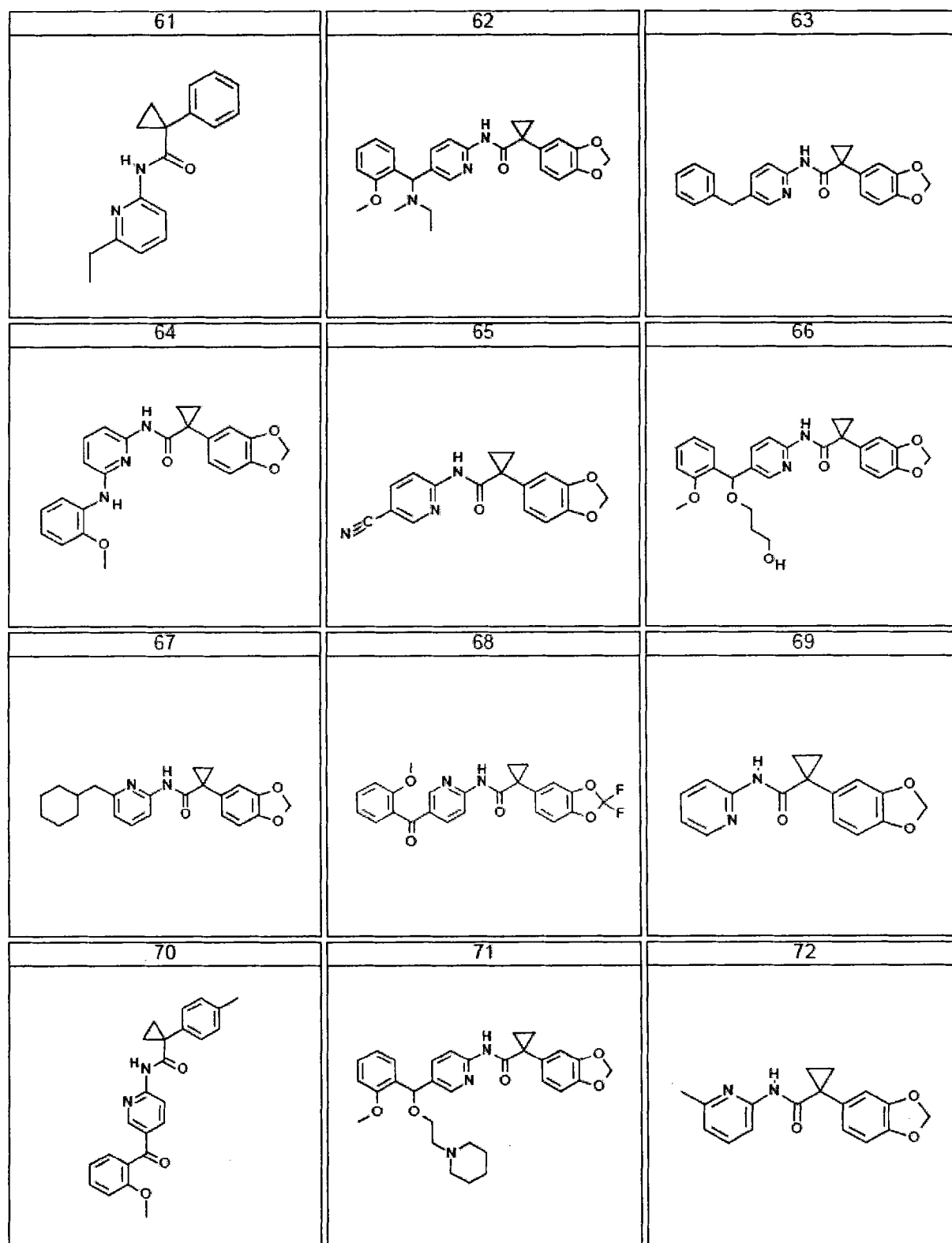
[0164]



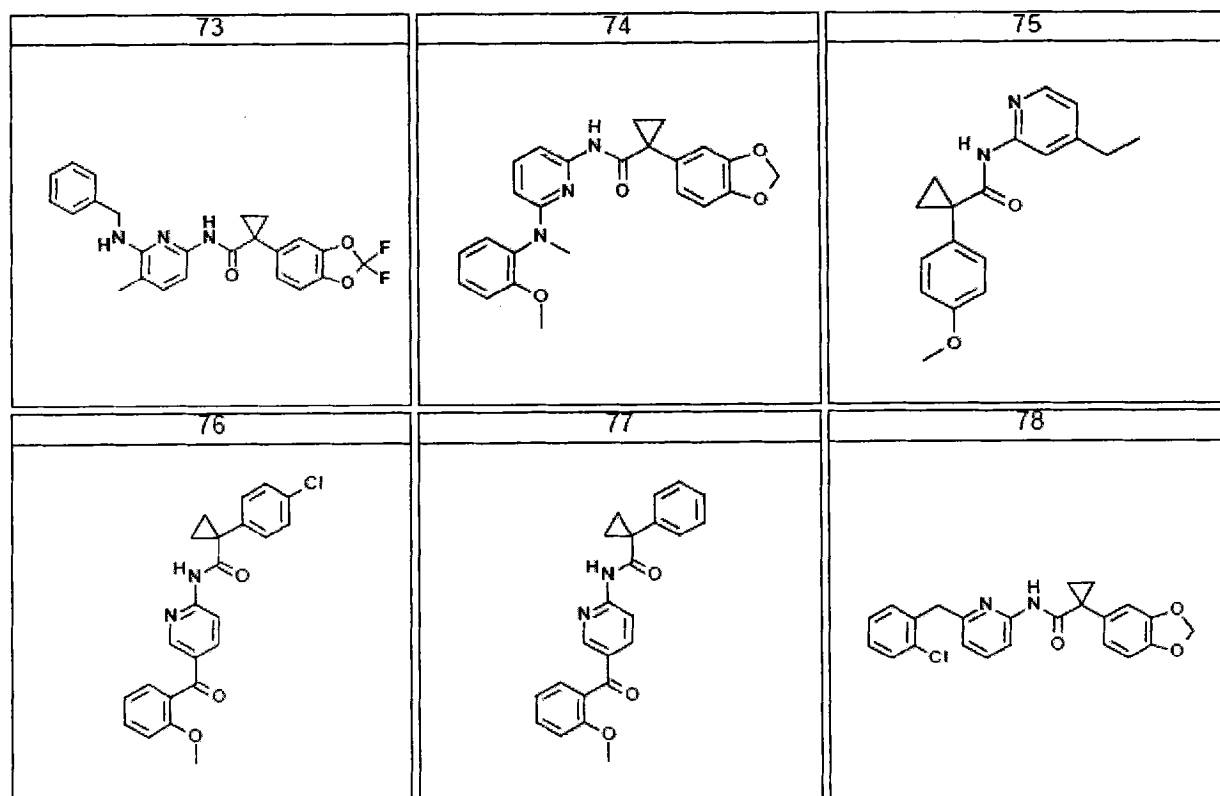
[0165]



[0166]



[0167]



[0168] 在另一个实施方案中,本发明涉及药物组合物,该药物组合物包含:(i) 本发明的化合物;和(ii) 药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,该药物组合物还包含另外的活性剂,该另外的活性剂选自溶粘蛋白剂、支气管扩张剂、抗生素、抗感染剂、抗炎剂、CFTR 校正剂(corrector) 和营养剂。

[0169] 在另一个实施方案中,本发明涉及细胞膜中 ABC 转运蛋白的调节方法,所述方法包括使所述细胞与本发明化合物接触的步骤。在另一个实施方案中,ABC 转运蛋白是 CFTR。

[0170] 在另一个实施方案中,本发明涉及治疗患者中牵涉 ABC 转运蛋白活性的病症、疾病或障碍的方法,所述方法包括对所述患者给予本发明的化合物的步骤。在另一个实施方案中,ABC 转运蛋白是 CFTR。在另一个实施方案中,所述病症、疾病或障碍选自囊性纤维化,遗传性肺气肿,遗传性血色素沉着症,凝血-纤维蛋白溶解缺陷症,如 C 蛋白缺陷症,1 型遗传性血管性水肿,脂质加工缺陷症,如家族性高胆固醇血症,1 型乳糜微粒血症,无 β 脂蛋白血症,溶酶体贮积病,如 I- 细胞疾病/假性-赫尔勒综合症,粘多糖病,桑德霍夫/泰-萨克斯病,克里格勒-纳贾尔综合症 II 型,多内分泌腺病/高胰岛素血症,糖尿病,拉伦侏儒症,髓过氧化物酶缺乏症,原发性甲状旁腺机能减退,黑色素瘤,聚糖病 CDG 1 型,遗传性肺气肿,先天性甲状腺机能亢进症,成骨不全,遗传性低纤维蛋白原血症,ACT 缺乏症,尿崩症(di),后叶激素转运蛋白性 di,肾性 DI,夏-马-图综合征,佩-梅病,神经变性疾病,如阿尔茨海默病,帕金森病,肌萎缩性侧索硬化,进行性核上性麻痹,皮克病,若干聚谷氨酰胺神经障碍,如亨廷顿病,I 型脊髓小脑性共济失调,脊髓与延髓肌肉萎缩,齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩,和肌强直性营养不良,以及海绵状脑病,如遗传性克-雅病,法布里病,斯-施综合征,COPD,干眼病和斯耶格伦病。

[0171] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于体外或体内测定生物样品中 ABC 转运蛋白或其片段活性的试剂盒,所述试剂盒包括:(i) 包含本发明化合物的第一种组合物;和(ii)

关于下列内容的说明书 :a) 使所述组合物与所述生物样品接触 ;和 b) 测定所述 ABC 转运蛋白或其片段的活性。

[0172] 一般合成路线

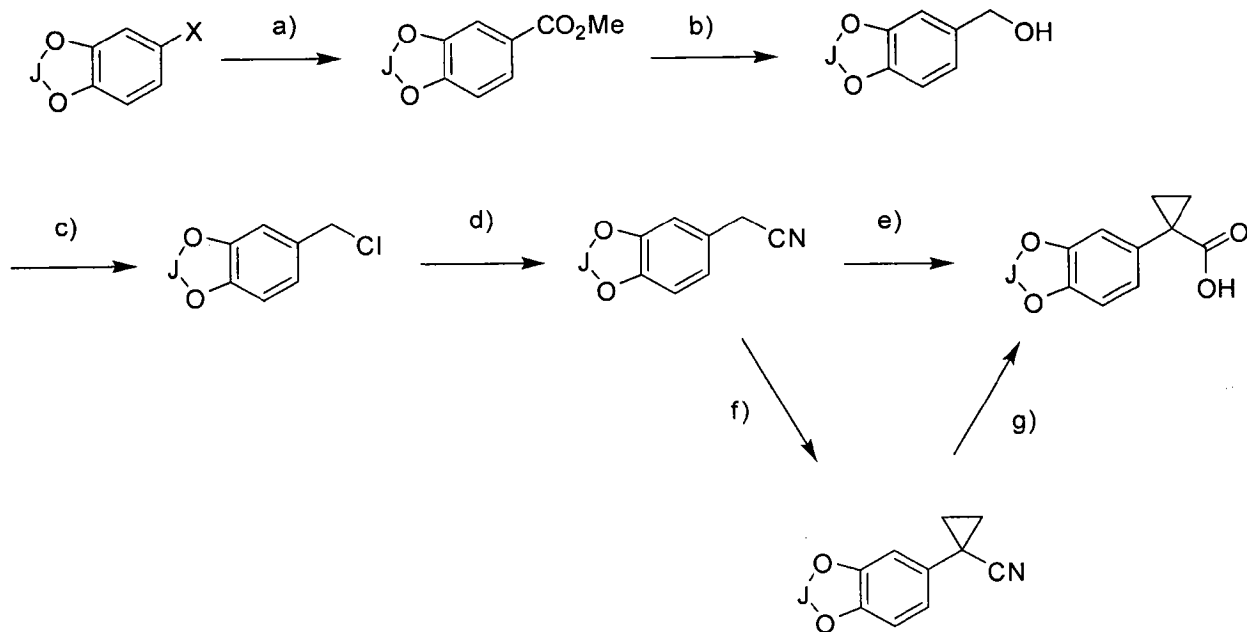
[0173] 可以通过本领域众所周知的方法制备式 I 的化合物。如下示例的是式 I 化合物的典型制备方法。如下合成路线 I 示例了式 I 化合物的典型合成方法。

[0174] 合成路线

[0175] 可以通过公知方法和如合成路线 I-IV 中所示例的制备本发明的化合物。

[0176] 合成路线 I. 环丙基酸的制备

[0177]

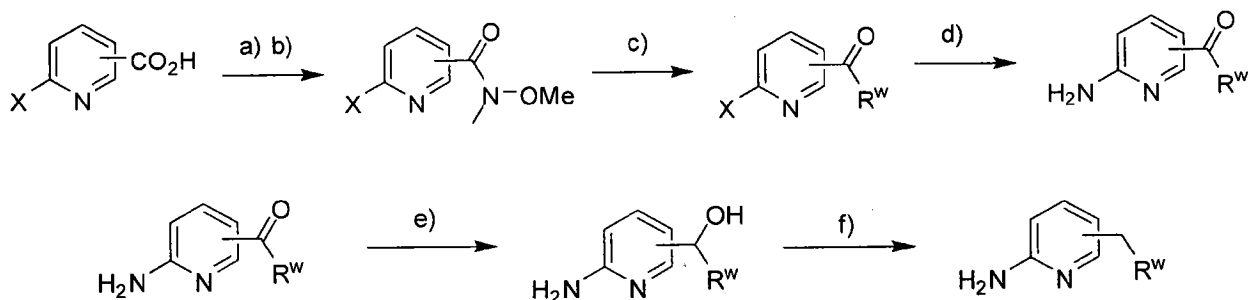


[0178] $X = \text{Br}$ 或 I ;

[0179] a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CO , MeOH ;b) LiAlH_4 ;c) SOCl_2 ;d) NaCN ;e) $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, NaOH , Δ T ;f) $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, NaOH ;g) NaOH , Δ T。

[0180] 合成路线 II. 氨基吡啶基结构单元的制备

[0181]

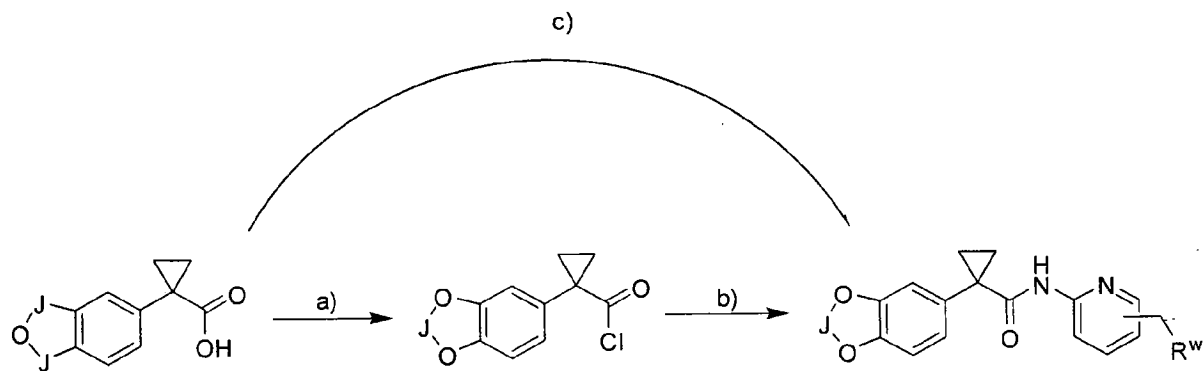


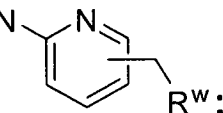
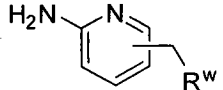
[0182] $X = \text{Cl}$ 、 Br 或 I ;

[0183] a) ClCO_2 $i\text{Bu}$, Et_3N ;b) $\text{HN}(\text{OMe})_2 \cdot \text{HCl}$; c) R^wM ($\text{M} = \text{Li}$, MgBr) ;d) NH_3 , EtOH ;e) NaBH_4 , MeOH ;f) Et_3SiH , TFA 。

[0184] 合成路线 III. 酰胺偶合

[0185]



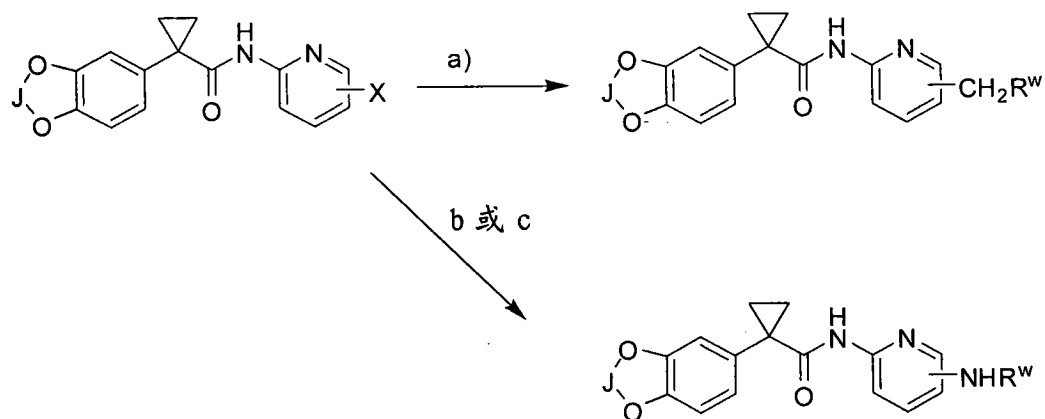
[0186] a) SOCl_2 , DMF ; b) 吡啶, ; c) HATU, Et_3N , DMF,  或

可替代选择地：

[0187] 合成路线 IV. 酰胺类的衍生

[0188] 合成路线 IVa

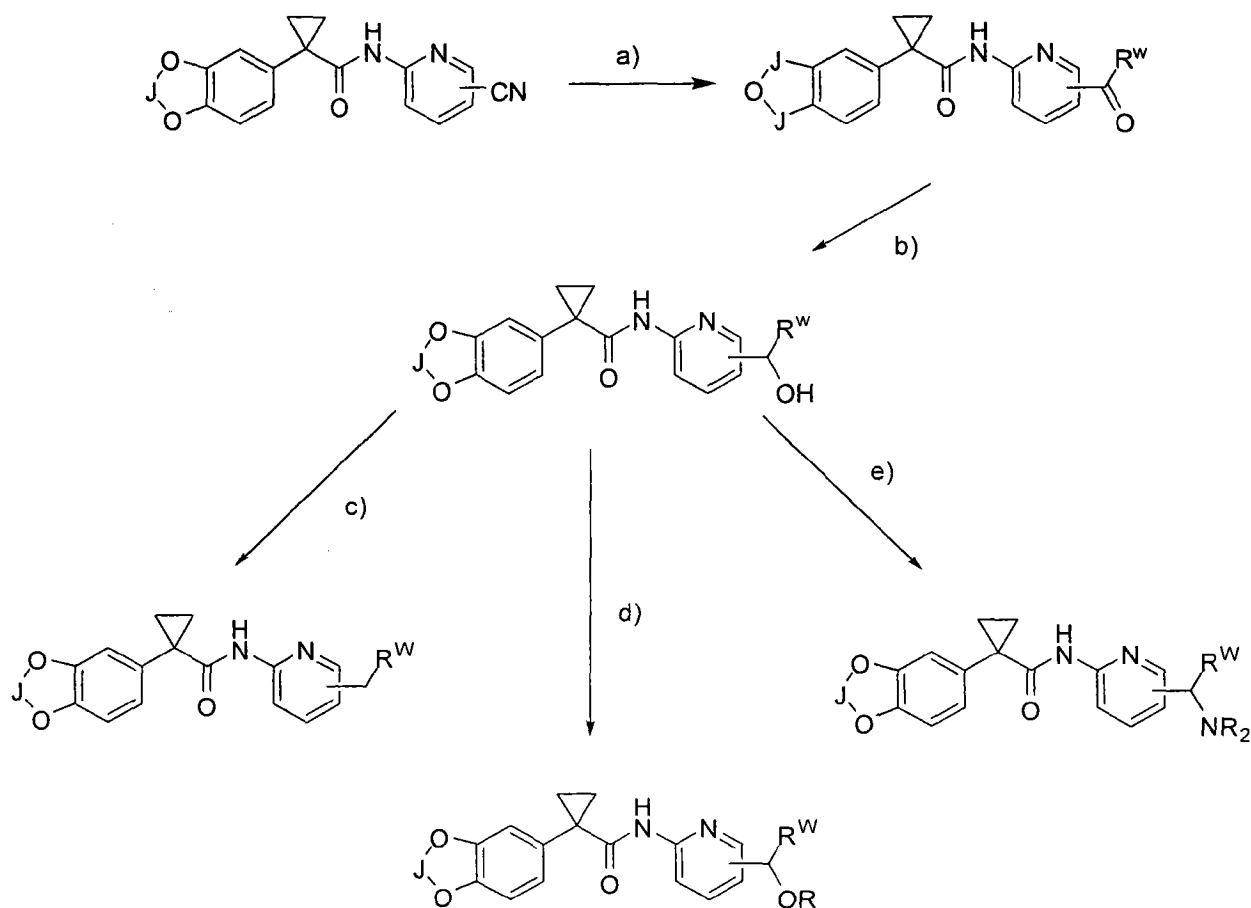
[0189]

[0190] $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ 或 I ;

[0191] a) $\text{R}^w\text{CH}_2\text{ZnY}_n$, $(\text{dppf})_2\text{PdCl}_2$, THF ($\text{Y} = \text{Cl}$, $n = 2$; $\text{Y} = \text{Br}$, $n = 1$) ; b) R^wNH_2 , $(\text{dppf})_2\text{PdCl}_2$, Xantphos, K^tOBu , 二噁烷, Et_3N ; c) R^wNH_2 。

[0192] 合成路线 IVb

[0193]



[0194] a) R^wMgBr ; b) $NaBH_4$, MeOH ; c) Et_3SiH , TFA ; d) ROH , $p-TsOH$, 甲苯 ; e) 1) $MsCl$, DIEA ; 2) R_2NH , DIEA。

[0195] 本领域技术人员易于理解适合于本发明各种取代基的合成途径适合于这种反应条件和步骤。

[0196] 用途、制剂和给药

[0197] 药学上可接受的组合物

[0198] 正如上文所讨论的, 本发明提供可用作 ABC- 转运蛋白调节剂、因而可用于治疗下列疾病、障碍或病症的化合物: 如囊性纤维化, 遗传性肺气肿, 遗传性血色素沉着症, 凝血-纤维蛋白溶解缺陷症, 如 C 蛋白缺陷症, 1 型遗传性血管性水肿, 脂质加工缺陷症, 如家族性高胆固醇血症, 1 型乳糜微粒血症, 无 β 脂蛋白血症, 溶酶体贮积病, 如 I- 细胞疾病 / 假性-赫尔勒综合症, 粘多糖病, 桑德霍夫 / 泰-萨克斯病, 克里格勒-纳贾尔综合症 II 型, 多内分泌腺病 / 高胰岛素血症, 糖尿病, 拉伦侏儒症, 髓过氧化物酶缺乏症, 原发性甲状旁腺机能减退, 黑色素瘤, 聚糖病 CDG 1 型, 遗传性肺气肿, 先天性甲状腺机能亢进症, 成骨不全, 遗传性低纤维蛋白原血症, ACT 缺乏症, 尿崩症 (DI), 后叶激素转运蛋白性 DI, 肾性 DI, 夏-马-图综合征, 佩-梅病, 神经变性疾病, 如阿尔茨海默病, 帕金森病, 肌萎缩性侧索硬化, 进行性核上性麻痹, 皮克病, 若干聚谷氨酰胺神经障碍, 如亨廷顿病, I 型脊髓小脑性共济失调, 脊髓与延髓肌肉萎缩, 齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩, 和肌强直性营养不良, 以及海绵状脑病, 如遗传性克-雅病 (由朊病毒蛋白加工缺陷引起), 法布里病, 斯-施综合征, COPD, 干眼病和斯耶格伦病。

[0199] 因此, 在本发明的另一方面, 提供了药学上可接受的组合物, 其中这些组合物包含

任意上述化合物,并且任选地包含药学上可接受的载体、助剂或媒介物。在某些实施方案中,这些组合物任选地还包含一种或多种另外的治疗剂。

[0200] 也将被领会到的是,某些本发明化合物可以以游离形式存在供治疗,或者适当地为其药学上可接受的衍生物。按照本发明,药学上可接受的衍生物包括但不限于药学上可接受的盐、酯、这类酯的盐或者任意其他加合物或衍生物,一旦对需要的患者给药,即能够直接或间接提供如本文所述的化合物或者其代谢产物或残余物。

[0201] 本文所用的术语“药学上可接受的盐”表示这样的盐,在合理的医学判断范围内,它们适合用于与人体和低等动物组织接触,没有不适当的毒性、刺激性、变态反应等,并且与合理的利益/风险比相称。“药学上可接受的盐”表示本发明化合物的任意无毒性盐或酯盐,一旦对接受者给药,即能够直接或间接提供本发明化合物或其抑制活性代谢物或残余物。本文所用的术语“其抑制活性代谢物或残余物”表示其代谢物或残余物也是 ATP- 结合盒转运蛋白的抑制剂。

[0202] 药学上可接受的盐是本领域众所周知的。例如, S. M. Berge 等在 J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19 中详细描述了药学上可接受的盐,引用在此作为参考。本发明化合物的药学上可接受的盐包括由适合的无机酸和有机酸与碱衍生的那些。药学上可接受的无毒性酸加成盐的实例有氨基与无机酸或与有机酸形成的盐,无机酸例如为盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸,有机酸例如为乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸,或者采用本领域所用的其他方法,如离子交换。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2- 羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2- 萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3- 苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对- 甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。从适当的碱衍生的盐包括碱金属、碱土金属、铵和 $N^+(C_{1-4} \text{ 烷基})_4$ 盐。本发明也涵盖如本文所公开的化合物的任意碱性含氮基团的季铵化作用。借助这类季铵化作用可以得到水或油可溶性或可分散性产物。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等的盐。在适当时,其他药学上可接受的盐包括无毒的铵盐、季铵盐和胺阳离子盐,利用抗衡离子形成,该抗衡离子为如卤素负离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根和芳基磺酸根。

[0203] 正如上文所描述的,本发明的药学上可接受的组合物另外包含药学上可接受的载体、助剂或媒介物,本文所用的它们包括任意和所有的溶剂、稀释剂或其他适合于所需特定剂型的液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 公开过各种用于配制药学上可接受的组合物的载体及其已知的制备技术。除了任意常规载体介质与本发明化合物不相容以外,如产生任何不需要的生物学效应或者以有害方式影响药学上可接受的组合物中的任何其他组分,其用途也为本发明所关注。能够充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白质(例如人血清白蛋白)、缓冲物质(例如磷酸盐、

甘氨酸、山梨酸或山梨酸钾)、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质(例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁)、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、蜡类、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、羊毛脂、糖类(例如乳糖、葡萄糖和蔗糖)、淀粉(例如玉米淀粉和马铃薯淀粉)、纤维素及其衍生物(例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素)、粉碎的黄蓍胶、麦芽、明胶、滑石、赋形剂(例如可可脂和栓剂用蜡)、油类(例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油)、二醇(例如丙二醇或聚乙二醇)、酯类(例如油酸乙酯和月桂酸乙酯)、琼脂、缓冲剂(例如氢氧化镁和氢氧化铝)、藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液、乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及其他无毒的相容性润滑剂,如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及根据制剂人员的判断,在组合物还可以含有着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂与香料、防腐剂和抗氧化剂。

[0204] 化合物和药学上可接受的组合物的用途

[0205] 在另一方面中,本发明提供治疗牵涉 ABC- 转运蛋白活性的病症、疾病或障碍的方法。在一些实施方案中,本发明提供治疗牵涉 ABC- 转运蛋白活性缺陷的病症、疾病或障碍的方法,该方法包括对此需要的受试者、优选哺乳动物给予包含式 (I) 化合物的组合物。

[0206] 在一些优选的实施方案中,本发明提供治疗如下疾病的方法:囊性纤维化,遗传性肺气肿(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶非 PiZ 变体引起),遗传性血色素沉着症,凝血-纤维蛋白溶解缺陷症,如蛋白 C 缺陷症,1 型遗传性血管性水肿,脂质加工缺陷症,如家族性高胆固醇血症,1 型乳糜微粒血症,无 β 脂蛋白血症,溶酶体贮积病,如 I- 细胞疾病/假性-赫尔勒综合症,粘多糖病(由溶酶体加工酶引起),桑德霍夫/泰-萨克斯病(由 β -己糖胺酶引起),克里格勒-纳贾尔综合症 II 型(由 UDP-葡萄糖醛基-sialyl-转移酶引起),多内分泌腺病/高胰岛素血症,糖尿病(由胰岛素受体引起),拉伦侏儒症(由生长激素受体引起),髓过氧化物酶缺乏症,原发性甲状旁腺机能减退症(由前促甲状旁腺激素引起),黑色素瘤(由酪氨酸酶引起)。与后一类 ER 故障有关的疾病有聚糖病 CDG 1 型,遗传性肺气肿(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 PiZ 变体引起),先天性甲状腺功能亢进症,成骨不全(由 I、II、IV 型前胶原引起),遗传性低纤维蛋白原血症(由纤维蛋白原引起),ACT 缺乏症(由 $\alpha 1$ -抗凝乳蛋白酶引起),尿崩症(DI),后叶激素运载蛋白性 DI(由后叶加压素/V2-受体引起),肾性 DI(由水通道蛋白 II 引起),夏-马-图综合征(由外周髓磷脂蛋白 22 引起),佩-梅病,神经变性疾病,如阿尔茨海默病(由 β APP 和早老蛋白引起),帕金森病,肌萎缩性侧索硬化,进行性核上性麻痹,皮克病,若干聚谷氨酰胺神经障碍,如亨廷顿病, I 型脊髓小脑性共济失调,脊髓与延髓肌肉萎缩,齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩,和肌强直性营养不良,以及海绵状脑病,如遗传性克-雅病(由朊病毒蛋白加工缺陷引起),法布里病(由溶酶体 α -半乳糖苷酶 A 引起),斯-施综合征,慢性阻塞性肺疾病(COPD),干眼病和斯耶格伦综合征,该方法包括对所述哺乳动物给予有效量的包含式 (I) 化合物或上述其优选实施方案的组合物的步骤。

[0207] 按照替代的优选实施方案,本发明提供治疗囊性纤维化的方法,该方法包括对所述哺乳动物给予有效量的一种组合物的步骤,所述组合物包含如上所述的式 (I) 化合物或其优选的实施方案。

[0208] 按照本发明,化合物或药学上可接受的组合物的“有效量”是就治疗一种或多种下列疾病或者减轻其严重性而言有效的量:囊性纤维化,遗传性肺气肿(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶非

Piz 变体引起), 遗传性血色素沉着症, 凝血-纤维蛋白溶解缺陷症, 如蛋白 C 缺陷症, 1 型遗传性血管性水肿, 脂质加工缺陷症, 如家族性高胆固醇血症, 1 型乳糜微粒血症, 无 β 脂蛋白血症, 溶酶体贮积病, 如 I- 细胞疾病 / 假性-赫尔勒 (Hurler) 综合症, 粘多糖病 (由溶酶体加工酶引起), 桑德霍夫 / 泰-萨克斯病 (由 β -己糖胺酶引起), 克里格勒-纳贾尔综合症 II 型 (由 UDP-葡萄糖醛基-sialyl-转移酶引起), 多内分泌腺病 / 高胰岛素血症, 糖尿病 (由胰岛素受体引起), 拉伦侏儒症 (由生长激素受体引起), 髓过氧化物酶缺乏症, 原发性甲状旁腺机能减退症 (由前促甲状旁腺激素引起), 黑色素瘤 (由酪氨酸酶引起)。与后一类 ER 故障有关的疾病有聚糖病 CDG 1 型, 遗传性肺气肿 (由 α 1-抗胰蛋白酶 PiZ 变体引起), 先天性甲状腺功能亢进症, 成骨不全 (由 I、II、IV 型前胶原引起), 遗传性低纤维蛋白原血症 (由纤维蛋白原引起), ACT 缺乏症 (由 α 1-抗凝乳蛋白酶引起), 尿崩症 (DI), 后叶激素运载蛋白性 DI (由后叶加压素 /V2-受体引起), 肾性 DI (由水通道蛋白 II 引起), 夏-马-图综合征 (由外周髓磷脂蛋白 22 引起), 佩-梅病, 神经变性疾病, 如阿尔茨海默病 (由 β APP 和早老蛋白引起), 帕金森病, 肌萎缩性侧索硬化, 进行性核上性麻痹, 皮克病, 若干聚谷氨酰胺神经障碍, 如亨廷顿病, I 型脊髓小脑性共济失调, 脊髓与延髓肌肉萎缩, 齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩, 和肌强直性营养不良, 以及海绵状脑病, 如遗传性克-雅病 (由朊病毒蛋白加工缺陷引起), 法布里病 (由溶酶体 α -半乳糖苷酶 A 引起), 斯-施综合征, 慢性阻塞性肺疾病 (COPD), 干眼病和斯耶格伦综合征。

[0209] 根据本发明方法的化合物和组合物可以利用就治疗一种或多种下列疾病或者减轻其严重性而言有效的任意量和任意给药途径给药: 囊性纤维化, 遗传性肺气肿 (由 α 1-抗胰蛋白酶非 PiZ 变体引起), 遗传性血色素沉着症, 凝血-纤维蛋白溶解缺陷症, 如蛋白 C 缺陷症, 1 型遗传性血管性水肿, 脂质加工缺陷症, 如家族性高胆固醇血症, 1 型乳糜微粒血症, 无 β 脂蛋白血症, 溶酶体贮积病, 如 I- 细胞疾病 / 假性-赫尔勒综合症, 粘多糖病 (由溶酶体加工酶引起), 桑德霍夫 / 泰-萨克斯病 (由 β -己糖胺酶引起), 克里格勒-纳贾尔综合症 II 型 (由 UDP-葡萄糖醛基-sialyl-转移酶引起), 多内分泌腺病 / 高胰岛素血症, 糖尿病 (由胰岛素受体引起), 拉伦侏儒症 (由生长激素受体引起), 髓过氧化物酶缺乏症, 原发性甲状旁腺机能减退症 (由前促甲状旁腺激素引起), 黑色素瘤 (由酪氨酸酶引起)。与后一类 ER 故障有关的疾病有聚糖病 CDG 1 型, 遗传性肺气肿 (由 α 1-抗胰蛋白酶 PiZ 变体引起), 先天性甲状腺功能亢进症, 成骨不全 (由 I、II、IV 型前胶原引起), 遗传性低纤维蛋白原血症 (由纤维蛋白原引起), ACT 缺乏症 (由 α 1-抗凝乳蛋白酶引起), 尿崩症 (DI), 后叶激素运载蛋白性 DI (由后叶加压素 /V2-受体引起), 肾性 DI (由水通道蛋白 II 引起), 夏-马-图综合征 (由外周髓磷脂蛋白 22 引起), 佩-梅病, 神经变性疾病, 如阿尔茨海默病 (由 β APP 和早老蛋白引起), 帕金森病, 肌萎缩性侧索硬化, 进行性核上性麻痹, 皮克病, 若干聚谷氨酰胺神经障碍, 如亨廷顿病, I 型脊髓小脑性共济失调, 脊髓与延髓肌肉萎缩, 齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩, 和肌强直性营养不良, 以及海绵状脑病, 如遗传性克-雅病 (由朊病毒蛋白加工缺陷引起), 法布里病 (由溶酶体 α -半乳糖苷酶 A 引起), 斯-施综合征, 慢性阻塞性肺疾病 (COPD), 干眼病和斯耶格伦综合征。

[0210] 所需精确量将因受治疗者而异, 这依赖于受治疗者的品种、年龄与一般条件、感染的严重性、特定的药物、其给药方式等。本发明化合物优选地配制在剂量单元形式中, 以有利于给药和剂量的一致性。本文所用的措辞“剂量单元形式”表示物理上离散的药物单元,

对所治疗的患者而言是适当的。不过将被理解的是,本发明化合物和组合物的总每日用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任意特定患者或生物体的具体有效剂量水平将依赖于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重性;所采用的具体化合物的活性;所采用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给药的时间、给药的途径和所采用的具体化合物的排泄速率;治疗的持续时间;与所采用的具体化合物联合或同时使用的药物;和医药领域熟知的其他因素。本文所用的术语“患者”表示动物,优选哺乳动物,最优选人。

[0211] 本发明的药学上可接受的组合物可以对人和其他动物口服、直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(以粉剂、软膏剂或滴剂)、颊、以口用或鼻用喷雾剂等方式给药,这依赖于所治疗感染的严重性。在一些实施方案中,本发明化合物可以被口服或肠胃外给药,剂量水平为每天约 0.01mg/kg- 约 50mg/kg、优选约 1mg/kg- 约 25mg/kg 受治疗者体重,一天一次或多次,以获得期望的治疗效果。

[0212] 口服给药的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆剂和酏剂。除了活性化合物以外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂,如水或其他溶剂,增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄基酯、丙二醇、1,3- 丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、麦胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇的脂肪酸酯,和它们的混合物。除了惰性稀释剂以外,口服组合物也可以包含助剂,如湿润剂、乳化与悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香料。

[0213] 使用适合的分散剂或湿润剂和悬浮剂,可以按照已知技术配制可注射制剂,如无菌可注射的水性或油性悬浮液。无菌可注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液或乳液,如在 1,3- 丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的载体和溶剂有水、林格氏溶液、U. S. P. 和等渗氯化钠溶液。另外,常规上采用无菌的不挥发油作为溶剂或悬浮介质。为此,可以采用任何温和的固定油,包括合成的单- 或二- 甘油酯。另外,在注射剂的制备中也可以使用脂肪酸,如油酸。

[0214] 可注射制剂可以这样进行灭菌,如通过细菌截留性滤器过滤,或者掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂,可以在使用前将其溶解或分散在无菌的水或其他无菌可注射介质中。

[0215] 为了延长本发明化合物的作用,经常需要延缓化合物在皮下或肌肉注射后的吸收。这可以利用水溶性差的结晶性或无定形物质的液体悬浮液来实现。化合物的吸收速率取决于它的溶解速率,后者反过来又可能取决于晶体大小和晶型。或者,将化合物溶解或悬浮在油类载体中,实现肠胃外给药化合物形式的延迟吸收。可注射的储库形式是这样制备的,在生物可降解的聚合物中,如聚交酯 (polylactide)- 聚乙醇酸交酯,生成化合物的微囊包封基质。根据化合物与聚合物的比例和所采用特定聚合物的属性,可以控制化合物的释放速率。其他生物可降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储库型可注射制剂也可以将化合物包含在与机体组织相容的脂质体或微乳中来制备。

[0216] 直肠或阴道给药组合物优选地是栓剂,它们可以这样制备,将本发明化合物与适合的无刺激性赋形剂或载体混合,如可可脂、聚乙二醇或栓剂用蜡,它们在环境温度下是固体,但是在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中融化,释放出活性化合物。

[0217] 口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这类固体剂型中，将活性化合物与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载体混合，如柠檬酸钠或磷酸二钙，和 / 或 a) 填充剂或增容剂，如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸，b) 粘合剂，如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶，c) 润湿剂，如甘油，d) 崩解剂，如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠，e) 溶解延迟剂，如石蜡，f) 吸收促进剂，如季铵化合物，g) 湿润剂，如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯，h) 吸收剂，如高岭土和膨润土，和 i) 润滑剂，如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下，该剂型也可以包含缓冲剂。

[0218] 也可以采用相似类型的固体组合物作为软或硬的填充的明胶胶囊剂中的填充剂，胶囊所用赋形剂例如乳糖或奶糖以及高分子聚乙二醇等。片剂、锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂等固体剂型可以带有包衣和外壳，如肠溶衣和药物配制领域熟知的其他包衣。它们可以任选含有遮光剂，也可以是仅仅或优先在肠道某一部分释放活性成分的组合物，可选地为延迟的方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡类。也可以采用相似类型的固体组合物作为软与硬的填充的明胶胶囊剂中的填充剂，胶囊所用赋形剂例如乳糖或奶糖以及高分子聚乙二醇等。

[0219] 活性化合物也可以是微囊包封的形式，其中含有一种或多种上述赋形剂。片剂、锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂等固体剂型可以带有包衣和外壳，如肠溶衣、释放控制性包衣和药物配制领域熟知的其他包衣。在这类固体剂型中，可以将活性化合物与至少一种惰性稀释剂混合，如蔗糖、乳糖或淀粉。在正常情况下，这类剂型也可以包含除惰性稀释剂以外的其他物质，如压片润滑剂和其他压片助剂，如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下，剂型也可以包含缓冲剂。它们可以可选地含有遮光剂，也可以是仅仅或优先在肠道某一部分释放活性成分的组合物，可选地为延迟的方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡类。

[0220] 本发明化合物的局部或透皮给药剂型包括软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。将活性组分在无菌条件下与药学上可接受的载体和任何需要的防腐剂或缓冲剂混合，根据需要而定。眼科制剂、滴耳剂和滴眼剂也被涵盖在本发明的范围内。另外，本发明涵盖透皮贴剂的使用，它们具有控制化合物向机体递送的附加优点。这类剂型可以通过将化合物溶解或分散在恰当的介质中来制备。也可以使用吸收增强剂以增加化合物穿过皮肤的通量。可以通过提供速率控制膜或者将化合物分散在聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0221] 正如上文一般描述的，本发明化合物可用作 ABC- 转运蛋白调节剂。因而，不希望局限于任意特定理论，化合物和组合物特别可用于治疗这样一种疾病、病症或障碍或者减轻其严重性，其中在该疾病、病症或障碍中牵涉 ABC- 转运蛋白活性过高或无活性。当在特定疾病、病症或障碍中牵涉 ABC- 转运蛋白活性过高或无活性时，该疾病、病症或障碍也可以被称为“ABC- 转运蛋白 - 介导的疾病、病症或障碍”。因此，在另一方面，本发明提供治疗这样一种疾病、病症或障碍或者减轻其严重性的方法，其中在该疾病状态中牵涉 ABC- 转运蛋白活性过高或无活性。

[0222] 在本发明中用作 ABC- 转运蛋白调节剂的化合物的活性可以按照本领域和本文实施例所一般描述的方法加以测定。

[0223] 也将被领会到的是,本发明的化合物和药学上可接受的组合物可以用在联合疗法中,也就是说,化合物和药学上可接受的组合物可以在一种或多种其他所需治疗剂或医药程序同时、之前或随后给药。用在联合方案中的特定疗法组合(治疗剂或程序)将考虑所需治疗剂和/或程序与所要达到的所需治疗效果的可相容性。也将被领会到的是,所用疗法可以对同一病症达到所需效果(例如,本发明化合物可以与另一种用于治疗同一病症的药物同时给药),或者它们可以达到不同的效果(例如控制任何副作用)。如本文所用的,在正常情况下给药以治疗或预防特定疾病或病症的其他治疗剂被称为“就所治疗的疾病或病症而言是适当的”。

[0224] 在一个实施方案中,另外的活性剂选自溶粘蛋白剂、支气管扩张剂、抗生素、抗感染染料、抗炎剂、非本发明化合物的 CFTR 调节剂或营养剂。

[0225] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是选自如下的化合物:庆大霉素、姜黄素、环磷酰胺、4-苯基丁酸盐、麦格司他、非洛地平、尼莫地平、Philoxin B、金雀异黄素、芹菜配基、cAMP/cGMP 调节剂如咯利普兰、西地那非、米力农、他达拉非、氨力农、异丙肾上腺素、沙丁胺醇和 almeterol、脱氧精胍菌素、HSP 90 抑制剂、HSP 70 抑制剂、蛋白体抑制剂例如 epoxomicin、乳胞素等。

[0226] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是公开在 WO 2004028480、WO 2004110352、WO 2005094374、WO 2005120497 或 WO 2006101740 中的化合物。

[0227] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是显示 CFTR 调节活性的苯并(c)喹啉衍生物或显示 CFTR 调节活性的苯并吡喃衍生物。

[0228] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是公开在 US 7202262、US 6992096、US 20060148864、US 20060148863、US 20060035943、US 20050164973、WO 2006110483、WO 2006044456、WO 2006044682、WO 2006044505、WO 2006044503、WO 2006044502 或 WO 2004091502 中的化合物。

[0229] 在另一个实施方案中,另外的活性剂是公开在 WO 2004080972、WO 2004111014、WO 2005035514、WO 2005049018、WO 2006002421、WO 2006099256、WO 2006127588 或 WO 2007044560 中的化合物。

[0230] 在另一个实施方案中,另外的活性剂选自如下文献中公开的化合物:2005 年 6 月 24 日提交的美国专利申请顺序号 US 11/165,818,作为公布的美国专利申请号是 US 2006/0074075,将其完整引入本文参考。在另一个实施方案中,另外的活性剂是 N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺。这些组合用于治疗本文所述的疾病包括囊性纤维化。这些组合物还用于本文所述的试剂盒。

[0231] 其他治疗剂在本发明组合物中的含量将不超过在包含该治疗剂作为唯一活性成分的组合物中通常的给药量。优选地,其他治疗剂在目前所公开的组合物中的量将是通常的包含该药物作为唯一治疗活性成分的组合物中的含量的约 50% -100%。

[0232] 本发明化合物或其药学上可接受的组合物也可以引入到涂覆可植入医药装置的组合物中,如假肢、人工瓣膜、脉管移植物、斯坦特印模和导管。因此,本发明在另一方面包括涂覆可植入装置的组合物,其包含如上一般性描述和在本文的大类与小类中所述的本发明化合物,和适合于涂覆所述可植入装置的载体。在另一方面,本发明包括涂有组合物的可植入装置,所述组合物包含如上一般性描述和在本文大类与小类中所述的本发明化合物,

和适合于涂覆所述可植入装置的载体。适合的涂料和涂覆可植入装置的一般制备方法描述在美国专利 6,099,562、5,886,026 和 5,304,121 中。涂料通常是生物可相容的聚合材料,如水凝胶聚合物、聚甲基二硅氧烷、聚己内酯、聚乙二醇、聚乳酸、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物和它们的混合物。涂料可以可选地进一步被适合的氟硅酮、多糖、聚乙二醇、磷脂或其组合的表层所覆盖,以赋予组合物的控释特征。

[0233] 本发明的另一方面涉及在生物样品或患者中调节 ABC- 转运蛋白活性(例如体外或体内),该方法包括对患者给予式 I 化合物或包含所述化合物的组合物或者使所述生物样品与式 I 化合物或包含所述化合物的组合物接触。本文所用的术语“生物样品”非限制性地包括细胞培养物及其提取物;从哺乳动物或其提取物获得的活组织检查材料;和血液、唾液、尿、粪便、精液、泪液或其他体液或者其提取物。

[0234] 在生物样品中调节 ABC- 转运蛋白活性可用于本领域技术人员已知的多种目的。这类目的的实例包括但不限于 ABC- 转运蛋白在生物学与病理学现象中的研究;和新型 ABC- 转运蛋白调节剂的对比评价。

[0235] 在另一个实施方案中,提供了体外或体内调节阴离子通道活性的方法,所述方法包括使所述通道与式 (I) 化合物接触的步骤。在优选的实施方案中,该阴离子通道是氯离子通道或碳酸氢根通道。在其他优选的实施方案中,该阴离子通道是氯离子通道。

[0236] 按照可替代选择的实施方案,本发明提供增加细胞膜中功能性 ABC- 转运蛋白数量的方法,所述方法包括使所述细胞与式 (I) 化合物接触的步骤。本文所用的术语“功能性 ABC- 转运蛋白”表示能够有转运活性的 ABC- 转运蛋白。在优选的实施方案中,所述功能性 ABC- 转运蛋白是 CFTR。

[0237] 按照另一种优选的实施方式,通过测定跨膜电压电位来测定 ABC- 转运蛋白的活性。测定生物样品中跨膜电压电位的手段可以采用本领域的任意已知方法,如光学膜电位测定法或其他电生理学方法。

[0238] 光学膜电位测定法采用如 Gonzalez 和 Tsien 所述的电压-敏感性 FRET 传感器(参见, Gonzalez, J.E. 和 R.Y. Tsien(1995) “Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells” *Biophys J* 69(4):1272-80 和 Gonzalez, J.E. 和 R.Y. Tsien (1997) “Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer” *Chem Biol* 4(4):269-77) 与测定荧光变化的仪器的组合,如电压/离子探针读数器 (VIPR) (参见, Gonzalez, J.E., K. Oades, 等人 (1999) “Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets” *Drug Discov Today* 4(9):431-439)。

[0239] 这些电压敏感性测定法基于膜溶性、电压敏感性染料 DiSBAC₂(3) 与荧光磷脂 CC2-DMPE 之间荧光共振能量转移 (FRET) 的变化,所述荧光磷脂连接于质膜的外部小叶,充当 FRET 供体。膜电位 (V_m) 的变化导致带负电的 DiSBAC₂(3) 跨越质膜重新分布,从 CC2-DMPE 转移的能量相应地改变。荧光发射的变化可以利用 VIPR™ II 监测,它是一种整合的液体处理器和荧光检测器,被设计用来在 96- 或 384- 孔微量滴定板中进行基于细胞的筛选。

[0240] 在另一方面中,本发明提供试剂盒,用于体外或体内测定生物样品中 ABC- 转运蛋白或其片段的活性,所述试剂盒包括 (i) 包含式 (I) 化合物或任意上述实施方案的组合物;和 (ii) 关于下列内容的说明书:a) 使该组合物与该生物样品接触;和 b) 测定所述 ABC- 转

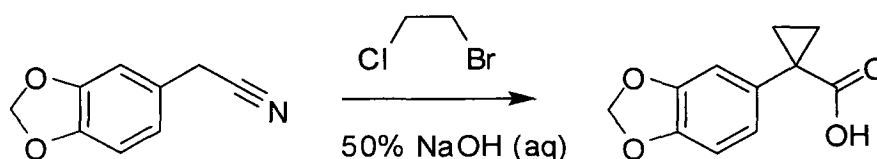
运蛋白或其片段的活性。在一个实施方案中,试剂盒进一步包括关于下列内容的说明书:a)使另外的组合物与该生物样品接触;b)测定在所述另外的化合物的存在下所述 ABC- 转运蛋白或其片段的活性;和 c) 比较在另外的化合物的存在下 ABC- 转运蛋白活性与在式 (I) 组合物的存在下 ABC- 转运蛋白的密度。在优选的实施方案中,所述试剂盒用于测定 CFTR 的密度。

[0241] 为了可以更加充分地理解本文所述发明,提供下列实施例。应当理解,这些实施例仅供说明,不以任何方式被解释为限制本发明。

实施例

[0242] 1- 苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基 - 环丙烷甲酸的制备

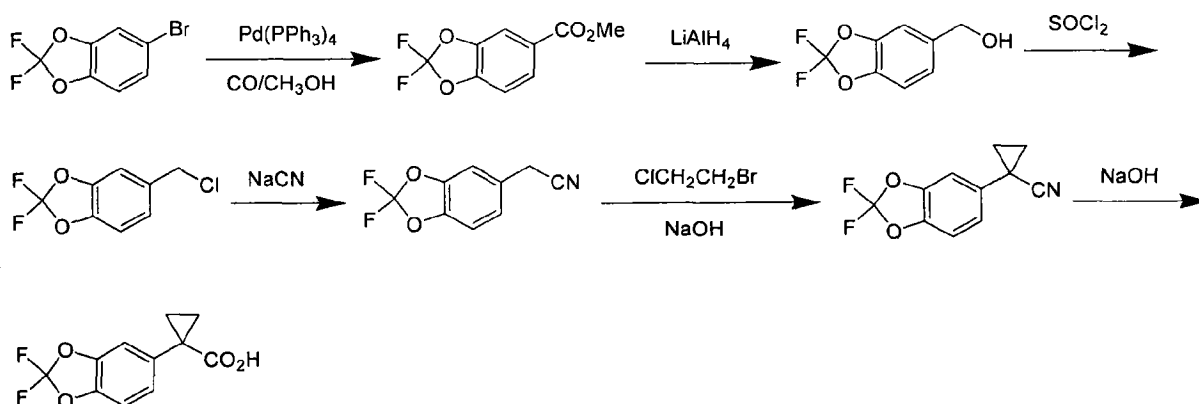
[0243]



[0244] 将 2-(苯并 [d][1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基) 乙腈 (5.10g 31.7mmol)、1- 溴 -2- 氯 - 乙烷 (9.00mL 109mmol) 和氯化苄基三乙基铵 (0.181g, 0.795mmol) 的混合物在 70℃ 加热, 然后向该混合物中缓慢加入 50% (wt./wt.) 氢氧化钠水溶液 (26mL)。将该反应在 70℃ 搅拌 24 小时, 然后在 130℃ 加热 48 小时。用水 (400mL) 稀释深棕色反应混合物, 用等体积的乙酸乙酯萃取一次, 用等体积的二氯甲烷萃取一次。用浓盐酸将碱性水溶液酸化至 pH 小于 1, 过滤沉淀, 用 1M 盐酸洗涤。将固体物质溶于二氯甲烷 (400mL), 用等体积的 1M 盐酸萃取两次, 用饱和氯化钠水溶液萃取一次。用硫酸钠干燥有机溶液, 蒸发至干, 得到白色至浅黄白色固体 (5.23g, 80%)。ESI-MS m/z 计算值 206.1, 测定值 207.1 ($M+1$)⁺。保留时间 2.37 分钟。¹H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 1.07-1.11 (m, 2H), 1.38-1.42 (m, 2H), 5.98 (s, 2H), 6.79 (m, 2H), 6.88 (m, 1H), 12.26 (s, 1H)。

[0245] 1-(2,2-二氟-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸的制备

[0246]



[0247] 步骤 a: 2,2-二氟-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-甲酸甲酯

[0248] 将 5- 溴 -2,2- 二氟 - 苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 (11.8g, 50.0mmol) 和四 (三苯膦) 钯 (0) [$Pd(PPh_3)_4$, 5.78g, 5.00mmol] 在包含乙腈 (30mL) 和三乙胺 (10mL) 的甲醇 (20mL)

中的溶液在一氧化碳气氛 (55 PSI) 中、在 75°C (油浴温度) 搅拌 15 小时。过滤冷却的反应混合物, 将滤液蒸发至干。通过硅胶柱色谱法纯化残余物, 得到粗 2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-甲酸甲酯 (11.5g), 将其直接用于下一步。

[0249] 步骤 b: (2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇

[0250] 在 0°C 将溶于 20mL 无水四氢呋喃 (THF) 的粗 2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-甲酸甲酯 (11.5g) 缓慢加入到氢化铝锂 (4.10g, 106mmol) 在无水 THF (100mL) 中的混悬液中。然后将该混合物温热至室温。在室温搅拌 1 小时后, 将该反应混合物冷却至 0°C, 用水 (4.1g)、然后用氢氧化钠 (10% 水溶液, 4.1mL) 处理。过滤得到的淤浆, 用 THF 洗涤。将合并的滤液蒸发至干, 通过硅胶柱色谱法纯化残余物, 得到 (2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇 (7.2g, 38mmol, 两步内 76%), 为无色油。

[0251] 步骤 c: 5-氯甲基-2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯

[0252] 在 0°C 将亚硫酸酐 (45g, 38mmol) 缓慢加入到 (2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇 (7.2g, 38mmol) 在二氯甲烷 (200mL) 中的溶液中。将得到的混合物在室温搅拌过夜, 然后蒸发至干。使残余物分配在饱和碳酸氢钠水溶液 (100mL) 与二氯甲烷 (100mL) 之间。用二氯甲烷 (150mL) 萃取分离的水层, 用硫酸钠干燥有机层, 过滤, 蒸发至干, 得到粗 5-氯甲基-2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 (4.4g), 将其直接用于下一步。

[0253] 步骤 d: (2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈

[0254] 将粗 5-氯甲基-2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 (4.4g) 和氰化钠 (1.36g, 27.8mmol) 在二甲亚砜 (50mL) 中的混合物在室温搅拌过夜。将该反应混合物倾入冰, 用乙酸乙酯 (300mL) 萃取。用硫酸钠干燥有机层, 蒸发至干, 得到粗 (2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈 (3.3g), 将其直接用于下一步。

[0255] 步骤 e: 1-(2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷腈

[0256] 在 70°C 将氢氧化钠 (50% 水溶液, 10mL) 缓慢加入到粗 (2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈、氯化苄基三乙基铵 (3.00g, 15.3mmol) 和 1-溴-2-氯乙烷 (4.9g, 38mmol) 中的混合物中。将该混合物在 70°C 搅拌过夜, 然后用水 (30mL) 稀释该反应混合物, 用乙酸乙酯萃取。用硫酸钠干燥合并的有机层, 蒸发至干, 得到粗 1-(2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷腈, 将其直接用于下一步。

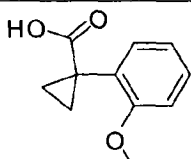
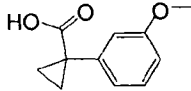
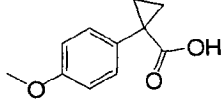
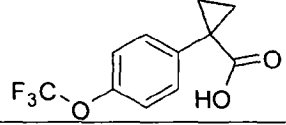
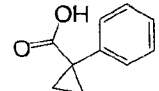
[0257] 步骤 f: 1-(2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸

[0258] 将 1-(2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷腈 (来自上一步的粗品) 在 10% 氢氧化钠水溶液 (50mL) 中回流 2.5 小时。用乙醚 (100mL) 洗涤冷却的反应混合物, 用 2M 盐酸将水相酸化至 pH 2。过滤沉淀的固体, 得到 1-(2,2-二氟-苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸, 为白色固体 (0.15g, 四步内 1.6%)。ESI-MS m/z 计算值 242.04, 测定值 241.58 ($M+1$)⁺; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.14-7.04 (m, 2H), 6.98-6.96 (m, 1H), 1.74-1.64 (m, 2H), 1.26-1.08 (m, 2H)。

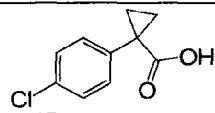
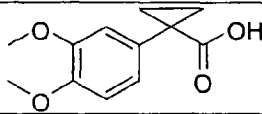
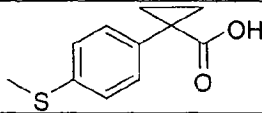
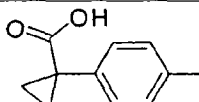
[0259] 下表 2 包含羧酸结构单元的清单, 其为商购的或通过上述方法制备。

[0260] 表 2: 羧酸结构单元

[0261]

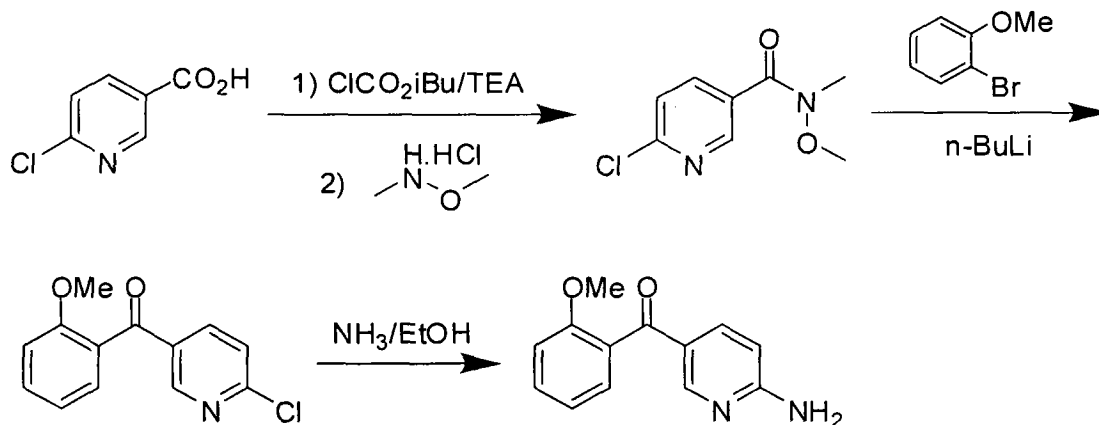
名称	结构
1-(2-甲氧基苯基)环丙烷-1-甲酸	
1-(3-甲氧基苯基)环丙烷-1-甲酸	
1-(4-甲氧基苯基)环丙烷-1-甲酸	
1-[4-(三氟甲氧基)苯基]环丙烷-1-甲酸	
1-苯基环丙烷-1-甲酸	

[0262]

1-(4-氯苯基)环丙烷-1-甲酸	
1-(3,4-二甲氧基苯基)环丙烷甲酸	
1-(4-(甲硫基)苯基)环丙烷甲酸	
1-对-甲苯基环丙烷甲酸	

[0263] (6-氨基吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酮的制备

[0264]



[0265] 步骤 a :6-氯-N-甲氧基-N-甲基-烟酰胺

[0266] 在-25℃、在N₂气氛中向6-氯-烟酸(94.5g,0.6mol)在二氯甲烷(1000mL)中

的溶液中加入 N-甲基吗啉 (181.8g, 1.8mol), 然后加入氯甲酸异丁酯 (81.9g, 0.6mol)。将该混合物搅拌 15 分钟, 然后加入 O,N-二甲基羟基胺盐酸盐 (64.35g, 0.66mol)。将该混合物在 -25℃ 搅拌 30min, 缓慢温热至室温。将该混合物在室温再搅拌 1 小时, 加入 NaHCO₃ 饱和溶液 (800mL)。用二氯甲烷 (500mLx3) 萃取分离的水层。用水和盐水洗涤合并的有机层。蒸发溶剂, 得到粗产物, 通过柱色谱法纯化, 得到纯产物 6-氯-N-甲氧基-N-甲基-烟酰胺, 为白色固体 (56g, 46.6%)。

[0267] 步骤 b: (6-氯吡啶-3-基)-(2-甲氧基苄基)-甲酮

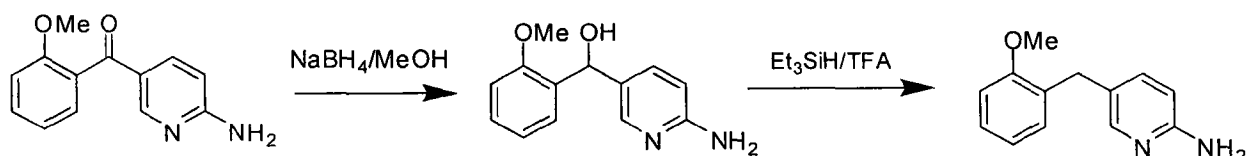
[0268] 在 -78℃、在 N₂ 气氛中向 1-溴-2-甲氧基-苯 (49.2g, 0.263mol) 在干 THF (500mL) 中的溶液中滴加 n-BuLi (2.5M 的己烷溶液, 105mL, 0.263mol)。将该混合物在该温度下搅拌 1 小时, 然后滴加 6-氯-N-甲氧基-N-甲基-烟酰胺 (50g, 0.25mol) 在 THF (100mL) 中的溶液。将该反应混合物温热至室温, 搅拌过夜, 然后用 NH₄Cl 饱和溶液 (300mL) 淬灭。用乙酸乙酯 (3X300mL) 萃取分离的水层。用盐水洗涤合并的有机层, 用 Na₂SO₄ 干燥, 真空蒸发, 得到粗产物, 将其通过柱色谱法纯化, 得到 (6-氯吡啶-3-基)-(2-甲氧基苄基)-甲酮, 为白色固体 (31g, 47.6%)。

[0269] 步骤 c: (6-氨基-吡啶-3-基)-(2-甲氧基苄基)-甲酮

[0270] 将 6-氯-吡啶-3-基)-(2-甲氧基-苄基)-甲酮 (30g, 0.121mol) 在乙醇 (150ml) 和无水氨 (100ml) 中的溶液置于容器 (bomb) 中并且在 145℃ 加热 16 小时。真空除去溶剂, 通过柱色谱法纯化残余物, 得到 (6-氨基-吡啶-3-基)-(2-甲氧基苄基)-甲酮 (18g, 65.2%)。¹H NMR (DMSO-d₆): δ: 8.12 (s, 1H), 7.68 (d, J = 8.8Hz, 1H), 7.47 (t, J = 7.2, 1H), 7.21 (d, J = 7.2, 1H), 7.13 (d, J = 7.2, 1H), 7.03 (d, 1H), 6.96 (br, 2H), 6.44 (d, J = 8.8, 1H), 3.69 (s, 3H)。MS (ESI) m/e (M+H⁺) 229.27。

[0271] 5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-胺的制备

[0272]



[0273] 步骤 a: (6-氨基吡啶-3-基)-(2-甲氧基苄基)-甲酮

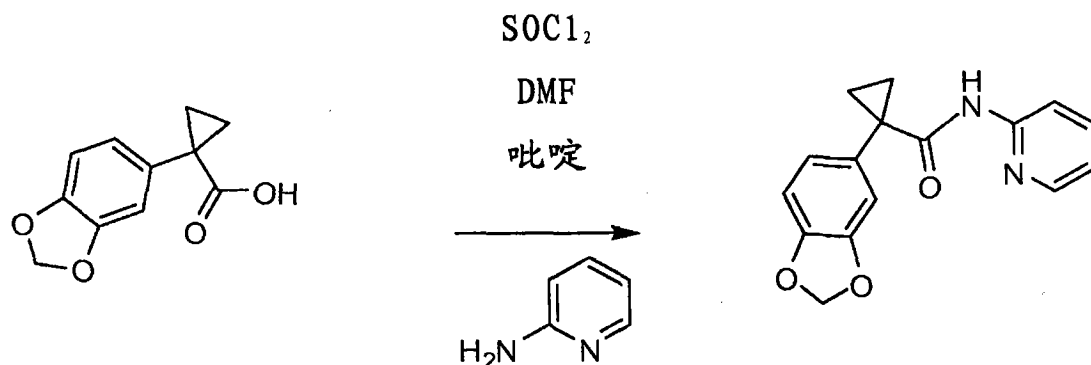
[0274] 在 0℃ 向 (6-氨基-吡啶-3-基)-(2-甲氧基-苄基)-甲酮 (14g, 61.4mmol) 在 CH₃OH (150mL) 中的溶液中逐步加入 NaBH₄ (3.48g, 92.1mmol)。添加完成后, 将该反应温热至室温, 在室温搅拌 1 小时。真空除去溶剂, 向残余物中加入水 (100mL)。用二氯甲烷 (100mLx3) 萃取该混合物。用 NaHCO₃ 饱和溶液和盐水洗涤合并的有机层, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩, 得到粗产物, 将其不经进一步纯化直接用于下一步。

[0275] 步骤 b: 5-(2-甲氧基-苄基)-吡啶-2-基胺

[0276] 将来自上述步骤的粗化合物、Et₃SiH (57g, 491mmol) 和 TFA (112g, 982mmol) 在 CH₂Cl₂ (150mL) 中的混合物在室温搅拌过夜。减压除去过量 Et₃SiH、TFA 和 CH₂Cl₂。在水中搅拌残余物; 过滤固体沉淀, 用乙醚和石油醚洗涤, 得到 5-(2-甲氧基-苄基)-吡啶-2-基胺, 为 TFA 盐 (5g, 2步 24.8%)。¹H NMR (DMSO-d₆): δ 13.5 (br, 1H), 7.93 (brs, 2H), 7.75-7.73 (m, 2H), 7.22 (t, J = 8.0Hz, 1H), 7.19 (d, J = 7.2Hz, 1H), 6.98 (d, J = 8.0Hz, 1H), 6.90-6.86 (m, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.76 (s, 3H)。MS (ESI) m/e (M+H⁺) 215.27。

[0277] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

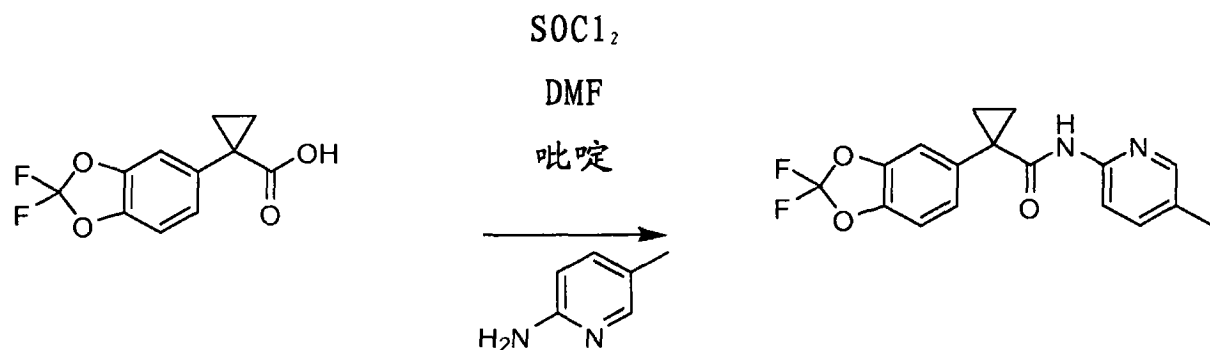
[0278]



[0279] 将 1-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-环丙烷甲酸 (41mg, 0.20mmol) 置于氮气气氛下的烘干烧瓶中。加入亚硫酰氯 (0.3mL) 和 N,N-二甲基甲酰胺 (0.03mL), 将该溶液在室温搅拌 10 分钟。真空除去过量的亚硫酰氯, 将得到的固体混悬于无水吡啶 (1mL)。然后将该溶液缓慢加入到吡啶-2-胺 (19mg, 0.20mmol) 在无水吡啶 (1mL) 中的溶液中。将得到的混合物在 110℃ 搅拌 15 小时。然后过滤粗产物, 蒸发至干, 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (1mL), 通过使用含有 0.05% 三氟乙酸的 0-99% 乙腈水溶液梯度的反相制备型液相色谱法纯化, 得到纯产物 (5.9mg, 0.021mmol, 10%)。ESI-MS m/z 计算值 282.1, 测定值 283.1 ($M+1$)⁺。保留时间 2.13 分钟。

[0280] 1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

[0281]



[0282] 将 1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酸 (2.32g, 9.58mmol) 置于氮气气氛下的烘干烧瓶中。加入亚硫酰氯 (3mL) 和 N,N-二甲基甲酰胺 (0.3mL), 将该溶液在室温搅拌 30 分钟。真空除去过量的亚硫酰氯, 将得到的固体混悬于无水二氯甲烷 (10mL)。然后将该溶液缓慢加入到 5-甲基吡啶-2-胺 (0.798g, 7.38mmol) 在包含三乙胺 (4.11mL, 29.5mmol) 的无水二氯甲烷 (10mL) 中的溶液中。将得到的混合物在室温搅拌 15 小时。然后用 1M 盐酸水溶液将粗产物洗涤两次, 用碳酸氢钠饱和水溶液洗涤两次, 最终用氯化钠饱和水溶液洗涤两次。用硫酸钠干燥有机层, 蒸发至近干, 然后用使用 0-30% 乙酸乙酯的己烷溶液梯度的 120g 硅胶纯化, 得到纯产物 (1.20g, 3.60mmol, 48.7%)。ESI-MS m/z 计算值 332.1, 测定值 333.1 ($M+1$)⁺。保留时间 1.48 分钟。

[0283] 按照与上述类似的方式由适合反应物制备下表 3 中举出的化合物：

[0284] 表 3.

[0285]

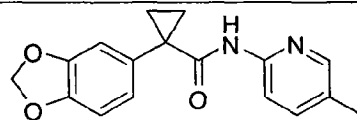
名称	结构
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-氰基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(4-乙基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(4-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)烟酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(三氟甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(3-乙基-6-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-乙基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-氟吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	

[0286]

N-(5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-基)-1-(2-甲氧基苄基)环丙烷甲酰胺	
N-(5-(3-甲氧基苄基)吡啶-2-基)-1-(2-甲氧基苄基)环丙烷甲酰胺	
N-(3-(苄基氧基)吡啶-2-基)-1-苄基环丙烷甲酰胺	
1-(4-甲氧基苄基)-N-(5-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
N-(6-乙基吡啶-2-基)-1-苄基环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(3-(苄基氧基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
N-(4-乙基吡啶-2-基)-1-(4-甲氧基苄基)环丙烷甲酰胺	
1-(4-甲氧基苄基)-N-(6-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
N-(6-乙基吡啶-2-基)-1-(4-甲氧基苄基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(3-乙基-6-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-氟吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	

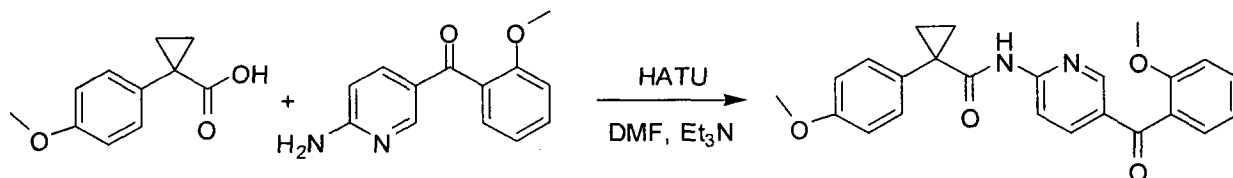
[0287]

1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-甲基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺



[0288] N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)-1-(4-甲氧基苯基)环丙烷甲酰胺的制备

[0289]



[0290] 将 1-(4-甲氧基苯基)环丙烷甲酸 (19.2mg, 0.100mmol) 和 (6-氨基吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酮 (22.8g, 0.100mmol) 溶于包含三乙胺 (0.042mL, 0.300mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF, 0.7mL)。加入 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (HATU, 38.0mg, 0.100mmol), 将该溶液在 70℃ 搅拌 72 小时。然后通过使用含有 0.05% 三氟乙酸的 0-99% 乙腈水溶液梯度的反相制备型液相色谱法纯化该混合物, 得到纯产物 (4.2mg, 0.010mmol, 10%)。ESI-MS m/z 计算值 402.2, 测定值 403.5 (M+1)⁺。保留时间 3.50 分钟。

[0291] 按照与 N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)-1-(4-甲氧基苯基)环丙烷甲酰胺类似的方式由适合的反应物制备下表 4 中举出的化合物:

[0292] 表 4.

[0293]

名称	结构
N-(5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-基)-1-(4-甲氧基苯基)环丙烷甲酰胺	
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	

[0294]

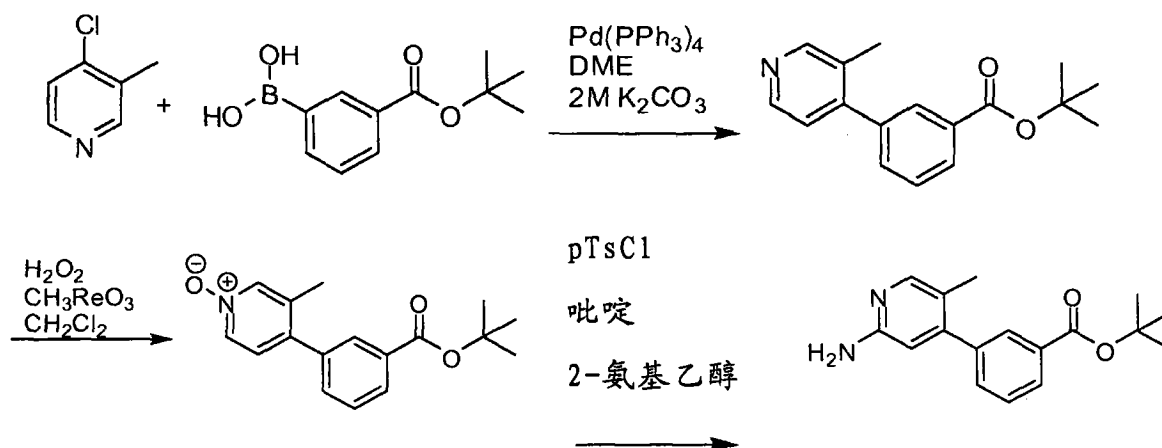
1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)-1-(4-甲氧基苯基)环丙烷甲酰胺	
N-(5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-基)-1-对-甲苯基环丙烷甲酰胺	
1-(4-氯苯基)-N-(5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(3,4-二甲氧基苯基)-N-(5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(3-甲氧基苯基)-N-(5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
N-(5-(2-甲氧基苄基)吡啶-2-基)-1-(4-(三氟甲氧基)苯基)环丙烷甲酰胺	
N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)-1-苯基环丙烷甲酰胺	
N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)-1-对-甲苯基环丙烷甲酰胺	
1-(4-氯苯基)-N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	

[0295]

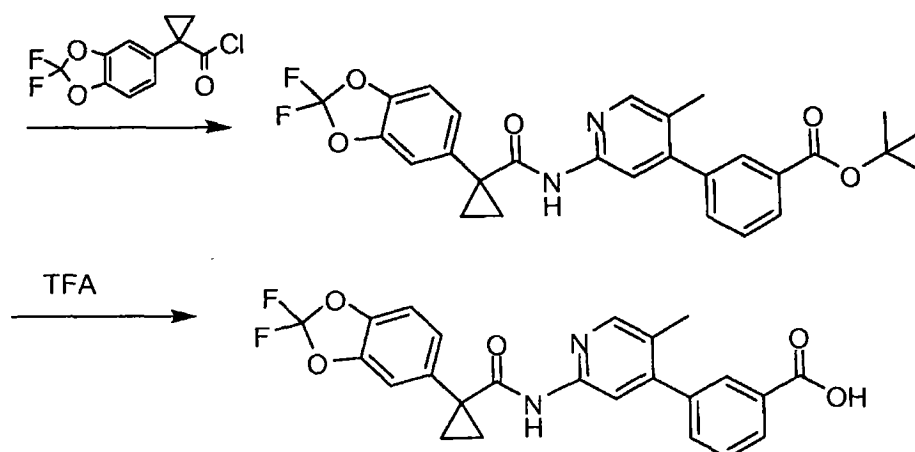
1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
1-(3,4-二甲氧基苯基)-N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺	
N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)-1-(2-甲氧基苯基)环丙烷甲酰胺	
N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)-1-(4-(甲硫基)苯基)环丙烷甲酰胺	
N-(5-(2-甲氧基苯甲酰基)吡啶-2-基)-1-(4-(三氟甲氧基)苯基)环丙烷甲酰胺	

[0296] 3-(2-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-5-甲基吡啶-4-基)苯甲酸的制备

[0297]



[0298]



[0299] 步骤 a :3-(3-甲基吡啶-4-基)苯甲酸叔丁酯

[0300] 将 4-氯-3-甲基吡啶 (2.00g, 15.7mmol)、3-(叔丁氧羰基)苯基硼酸 (5.42g, 24.4mmol)、2M 碳酸钾水溶液 (31.4mL, 62.8mmol) 和四(三苯膦)钯 ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 0.906g, 0.784mmol) 混悬于 1,2-二甲氧基乙烷 (DME, 150mL)。搅拌得到的混合物, 加热至 80℃ 60 小时。将粗反应混合物冷却至室温, 然后分离各层。将有机层蒸发至干, 然后用使用 0-70% 乙酸乙酯的己烷溶液梯度的 120g 硅胶纯化, 得到纯产物, 为淡黄色油 (3.02g, 11.2mmol, 71.4%)。

[0301] 步骤 b :4-(3-(叔丁氧羰基)苯基)-3-甲基吡啶 1-氧化物

[0302] 将 3-(3-甲基吡啶-4-基)苯甲酸叔丁酯 (0.500g, 1.86mmol) 溶于二氯甲烷 (0.800mL) 和 30% 过氧化氢 (0.421mL) 的混合物。加入甲基三氧铈 (VII) (2.3mg, 0.92mmol), 将该反应混合物剧烈搅拌 5 小时。然后分离各层, 用亚硫酸钠处理有机层, 然后用硫酸钠干燥。过滤粗产物, 蒸发至干, 不经进一步纯化使用。ESI-MS m/z 计算值 285.1, 测定值 286.1 ($\text{M}+1$)⁺。保留时间 1.22 分钟。

[0303] 步骤 c :3-(2-氨基-5-甲基吡啶-4-基)苯甲酸叔丁酯

[0304] 在氩气气氛中将 4-(3-(叔丁氧羰基)苯基)-3-甲基吡啶 1-氧化物 (0.467g, 1.64mmol) 溶于吡啶 (0.53mL) 和乙腈 (15mL) 的混合物。加入 4-甲基苯-1-磺酰氯 (0.406g, 2.13mmol), 将该反应混合物在 75℃ 搅拌 72 小时。然后加入乙醇胺 (7mL), 将该反应混合物在室温搅拌 5 分钟。使粗产物分配在二氯甲烷与饱和碳酸氢钠水溶液之间。分离各层, 用饱和氯化钠水溶液洗涤有机层。用硫酸钠干燥有机层, 然后用使用 0-100% 乙酸乙酯的己烷溶液梯度的 40g 硅胶纯化, 得到纯产物 (0.169g, 0.594mmol, 36.3%)。ESI-MS m/z 计算值 284.2, 测定值 285.1 ($\text{M}+1$)⁺。保留时间 1.28 分钟。¹H NMR (400.0MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.94-7.91 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 1.7\text{Hz}$, 1H), 7.62-7.56 (m, 2H), 6.33 (s, 1H), 5.78 (s, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.55 (s, 9H)。

[0305] 步骤 d :3-(2-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-5-甲基吡啶-4-基)苯甲酸叔丁酯

[0306] 将 1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酸 (144mg, 0.593mmol) 置于氮气气氛下的烘干烧瓶中。加入亚硫酸酐 (1mL) 和 N,N-二甲基甲酰胺 (0.1mL), 将该溶液在室温搅拌 30 分钟。真空除去过量的亚硫酸酐, 将得到的固体混悬于 2mL 无水二氯甲烷。然后将该溶液缓慢加入到 3-(2-氨基-5-甲基吡啶-4-基)苯甲酸叔

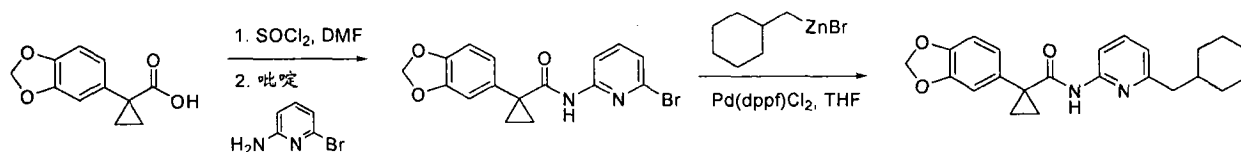
丁酯 (129mg, 0.454mmol) 在 5mL 包含三乙胺 (0.165mL, 1.19mmol) 的无水二氯甲烷的溶液中。将得到的混合物在室温搅拌 15 小时。将产物蒸发至近干, 然后用使用 0-40% 乙酸乙酯的己烷溶液梯度的 12g 硅胶纯化, 得到纯产物, 为黄色固体 (162mg, 0.319mmol, 70.3%)。ESI-MS m/z 计算值 508.2, 测定值; 509.1 ($M+1$)⁺。保留时间 2.22 分钟。¹H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8.85 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.98-7.96 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.64-7.62 (m, 2H), 7.57 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 1.7$, 8.3Hz, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.55 (s, 9H), 1.51-1.49 (m, 2H) 1.19-1.15 (m, 2H)。

[0307] 步骤 e: 3-(2-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-5-甲基吡啶-4-基)苯甲酸

[0308] 将 3-(2-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-5-甲基吡啶-4-基)苯甲酸叔丁酯 (40. mg, 0.079mmol) 溶于二氯甲烷 (1mL)。加入三氟乙酸 (0.500mL), 将该反应混合物在室温搅拌 1 小时。将粗反应混合物蒸发至干, 得到纯产物。ESI-MS m/z 计算值 452.1, 测定值 453.0 ($M+1$)⁺。保留时间 1.64 分钟。¹H NMR (400.0MHz, DMSO- d_6) δ 9.01 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.03-8.00 (m, 1H), 7.89 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H), 7.68-7.64 (m, 2H), 7.58 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 1.7$, 8.3Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 1.54-1.51 (m, 2H), 1.21-1.17 (m, 2H)。

[0309] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-(环己基甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

[0310]



[0311] 步骤 a: 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺

[0312] 向 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酸 (2.4g, 11.6mmol) 在亚硫酸氯 (2.5mL, 34.7mmol) 中的溶液中加入 N,N-二甲基甲酰胺 (0.1mL)。将该反应混合物在室温搅拌 30 分钟, 然后蒸发至干, 得到酰氯。

[0313] 向在吡啶 (10mL) 中的 6-溴吡啶-2-胺 (2.0g, 11.6mmol) 中加入酰氯。将该反应加热至 100°C 12 小时。用二氯甲烷 (30mL) 稀释该反应, 用 1N NaOH (3x20mL) 洗涤。用 Na₂SO₄ 干燥有机层, 蒸发至干。通过硅胶色谱法纯化粗物质 (用 0-50% 乙酸乙酯的己烷溶液洗脱), 得到产物 (2.9g, 8.0mmol, 70%)。ESI-MS m/z 计算值 360.01, 测定值 361.1 ($M+1$)⁺。保留时间 3.59 分钟。

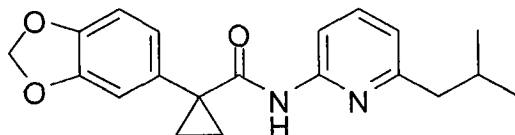
[0314] 步骤 b: 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-(环己基甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺

[0315] 向 0.5M 溴化(环己基甲基)锌(II)的 THF 溶液 (0.8mL, 0.4mmol) 中加入 [1, 1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II) (8mg, 0.01mmol), 将该反应在氮气气氛中搅拌 20 分钟。加入 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺 (36mg, 0.1mmol), 将该反应在 150°C 在微波中照射 10 分钟。用饱和氯化铵溶液 (2mL) 和饱和乙二胺四乙酸二钠盐溶液 (2mL) 使反应停止。将该混合物搅拌 30 分钟, 然后

用二氯甲烷 (3x4mL) 萃取。用 Na_2SO_4 干燥有机层, 蒸发。将粗产物溶于 DMSO (1mL), 通过使用包含 0.05% 三氟乙酸的 0-99% 乙腈水溶液梯度的反相制备型液相色谱法纯化, 得到纯产物 (20mg, 0.05mmol, 50%)。ESI-MS m/z 计算值 378.19, 测定值 379.1 ($M+1$)⁺; 保留时间 3.55 分钟。

[0316] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-异丁基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

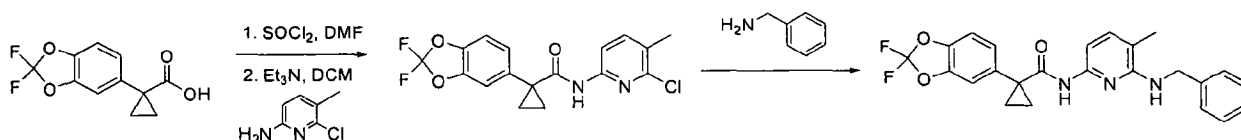
[0317]



[0318] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-(环己基甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式, 由 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺和氯化异丁基锌 (I I) 制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-异丁基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0319] N-(6-(苄基氨基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰胺的制备

[0320]



[0321] 步骤 a: N-(6-氯-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰胺

[0322] 向在亚硫酸氯 (17mL, 233mmol) 中的 1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酸 (18.8g, 78mmol) 中加入 N,N-二甲基甲酰胺 (0.2mL, 2.6mmol)。将该反应混合物在室温搅拌 2 小时。真空除去过量亚硫酸氯和 N,N-二甲基甲酰胺, 将得到的酰氯直接用于下一步。

[0323] 向 6-氯-5-甲基吡啶-2-胺 (11.1g, 78mmol) 和三乙胺 (22.0mL, 156mmol) 在二氯甲烷 (100mL) 中的溶液中加入 1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷羰基氯 (20.3g, 78mmol) 在二氯甲烷 (50mL) 中的溶液。将得到的反应混合物在室温搅拌 18 小时。然后用 1N NaOH 水溶液 (2x200mL)、1N HCl 水溶液 (1x200mL) 和饱和 NaHCO_3 水溶液 (1x200mL) 洗涤该反应混合物。用硫酸钠干燥有机层, 蒸发至得到产物 (26.9g, 73.3mmol, 94% 2-步)。ESI-MS m/z 计算值 366.06, 测定值 367.3 ($M+1$)⁺。保留时间 2.19 分钟。¹H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.30 (s, 1H), 7.89-7.87 (m, 1H), 7.78-7.76 (m, 1H), 7.54-7.53 (m, 1H), 7.41-7.39 (m, 1H), 7.33-7.30 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 1.52-1.49 (m, 2H), 1.19-1.16 (m, 2H)。

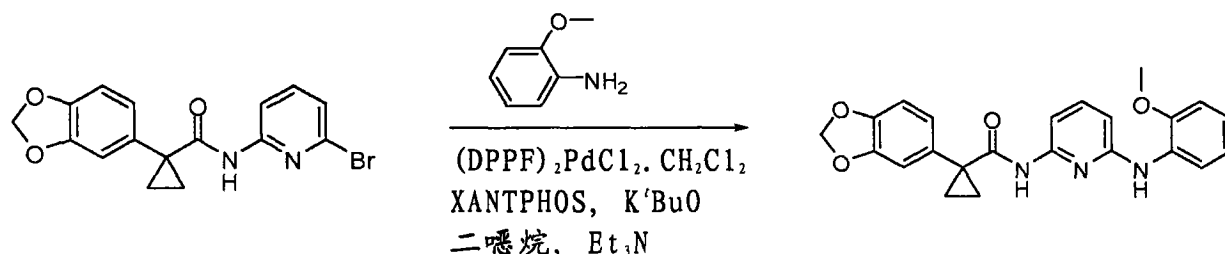
[0324] 步骤 b. N-(6-(苄基氨基)-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰胺

[0325] 向苄胺 (0.5mL, 4.6mmol) 中加入 N-(6-氯-5-甲基吡啶-2-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰胺 (37mg, 0.1mmol), 将该反应混合

物在 170℃ 在微波中照射 60 分钟。通过使用包含 0.05% 三氟乙酸的 0-99% 乙腈水溶液梯度的反相制备型液相色谱法纯化产物,得到纯产物。ESI-MS m/z 计算值 437.4,测定值 438.3($M+1$)⁺;保留时间 1.83 分钟。

[0326] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-(2-甲氧基苯基氨基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

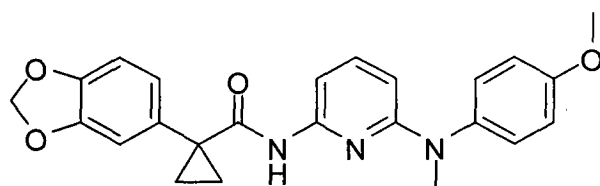
[0327]



[0328] 向 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺 (72mg, 0.2mmol)、XANTPHOS (7.00mg, 0.008mmol)、K^tBuO (31mg, 0.28mmol)、(DPPF)₂PdCl₂·CH₂Cl₂ (33.00mg, 0.24mmol) 和 2-甲氧基苯胺 (30mg, 0.24mmol) 中加入 1,4-二噁烷 (0.400mL) 和三乙胺 (0.200mL)。将该反应混合物在微波反应器中加热至 150℃ 10 分钟。将得到的物质冷却至室温。减压蒸发溶剂。将得到的混合物溶于二氯甲烷,用 H₂O 洗涤。用 Na₂SO₄ 无水干燥有机层,减压蒸发。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物,得到 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-(2-甲氧基苯基氨基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺,然后用 HCl 的 MeOH 溶液处理,形成 HCl 盐 (2.4mg, 0.0055mmol, 2.7%)。ESI-MS m/z 计算值 403.1,测定值 404.5($M+1$)⁺;保留时间 3.01 分钟。

[0329] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-((2-甲氧基苯基)(甲基)氨基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

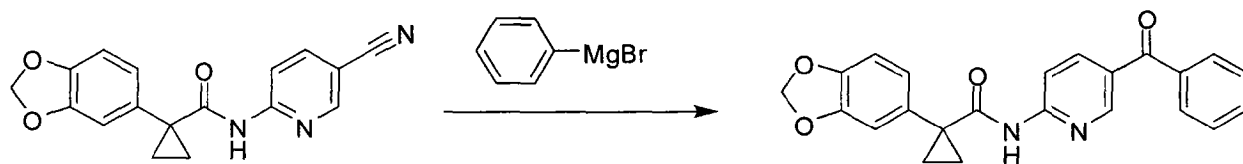
[0330]



[0331] 使用 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-(2-甲氧基苯基氨基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的方法,通过使 2-甲氧基-N-甲基苯胺与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺反应,合成 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-((2-甲氧基苯基)(甲基)氨基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0332] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-苯甲酰基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

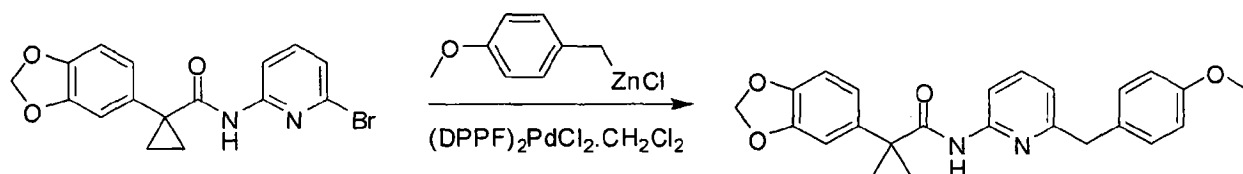
[0333]



[0334] 在 0℃ 向 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5- 氰基吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺 (61.00mg, 0.20mmol) 在 THF (1mL) 中的溶液中缓慢加入溴化苯基镁 (133 μ L, 3M, 0.40mmol) 在乙醚中的溶液, 将该反应混合物温热至室温, 在室温搅拌 80 小时。将盐酸 (1M) 加入到反应物质中。用乙酸乙酯萃取产物。用无水 Na_2SO_4 干燥有机层, 减压蒸发。将粗产物溶于 DMSO (1mL), 过滤, 通过反相制备型 HPLC 纯化, 得到 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5- 苯甲酰基吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺, 为 TFA 盐 (18mg, 0.035mmol, 18%)。ESI-MS m/z 计算值 386.1, 测定值 387.1 ($M+1$)⁺; 保留时间 3.45 分钟。

[0335] 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(6-(4- 甲氧基苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺的制备

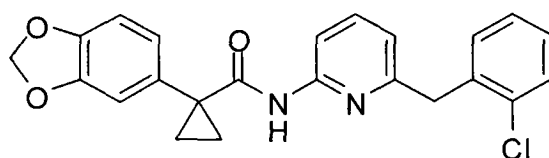
[0336]



[0337] 在氮气气氛中向 $(\text{DPPF})_2\text{PdCl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (17mg, 0.02mmol) 中加入氯化 (4- 甲氧基苄基) 锌 (II) (1.60mL, 0.5M, 0.80mmol) 在 THF 中的溶液, 在室温搅拌 5 分钟。在氮气气氛中向其中缓慢加入 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(6- 溴吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺 (72mg, 0.20mmol) 在 THF (800 μ L) 中的溶液。将该反应在微波反应器中加热至 150℃ 10 分钟。将得到的物质冷却至室温。向反应物质中加入 Na_2EDTA 和饱和 NH_4Cl 水溶液, 在室温搅拌 30 分钟。用二氯甲烷萃取产物。用无水 Na_2SO_4 干燥有机层, 减压蒸发。将粗产物溶于 DMSO (1mL), 过滤, 通过反相制备型 HPLC 纯化, 得到 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(6-(4- 甲氧基苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺, 为 TFA 盐 (27mg, 0.052mmol, 26%)。ESI-MS m/z 计算值 402.2, 测定值 403.0 ($M+1$)⁺; 保留时间 3.24 分钟。

[0338] 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(6-(2- 氯苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺的制备

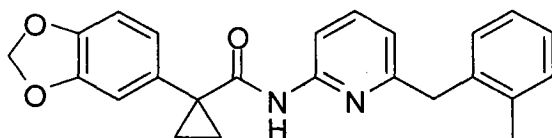
[0339]



[0340] 使用 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(6-(4- 甲氧基苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺的方法, 通过使氯化 (2- 氯苄基) 锌 (II) 与 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(6- 溴吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺反应, 合成 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(6-(2- 氯苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺。

[0341] 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(6-(2- 甲基苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺的制备

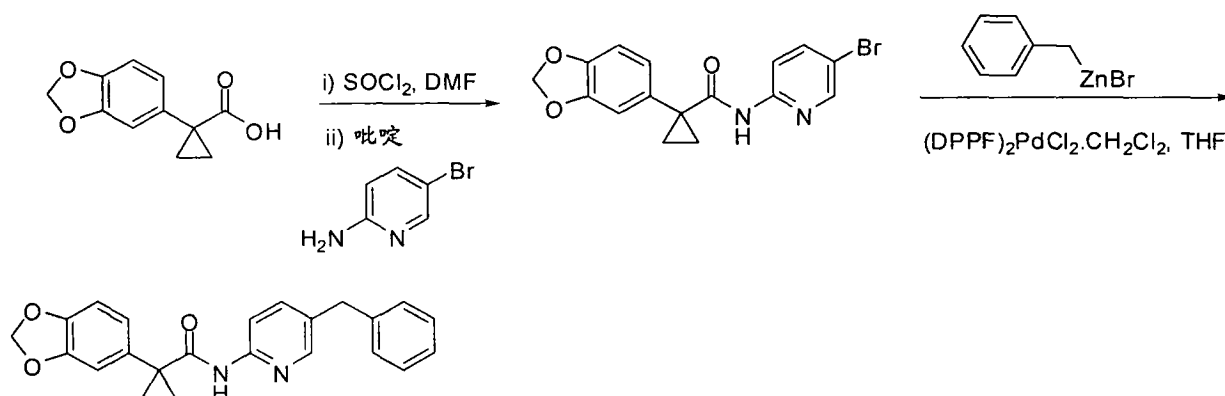
[0342]



[0343] 使用 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-(4-甲氧基苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的方法,通过使氯化(2-甲基苄基)锌(II)与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺反应,合成 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(6-(2-甲基苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺(VRT-810361)。

[0344] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-苄基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

[0345]



[0346] 步骤 a: 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺

[0347] 向 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酸(9.50g, 46.00mmol)中加入亚硫酸氯(10.00mL, 138.00mmol)和 DMF(4 滴), 搅拌该反应混合物, 在 60℃ 加热 30 分钟。减压蒸发过量的亚硫酸氯。将部分酰氯(14.4mmol)溶于吡啶(10mL), 缓慢加入到在吡啶(10mL)中的 5-溴吡啶-2-胺(14.4mmol)中。将该反应混合物在 110℃ 搅拌 1 小时 30 分钟。减压蒸发吡啶。将得到的混合物溶于二氯甲烷(100mL), 用 1N NaOH(3x25mL)洗涤。用无水 Na₂SO₄ 干燥有机层, 减压蒸发。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物, 得到 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺(4.20g, 11.7mmol, 81%)。

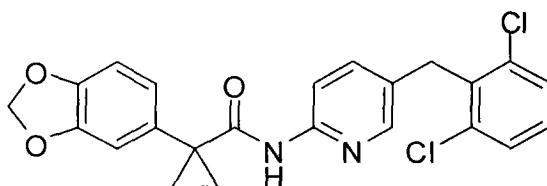
[0348] 步骤 b: 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-苄基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺

[0349] 在氮气气氛中将溴化苄基锌(II)(1.60mL, 0.5M, 0.8mmol)在 THF 和 (DPPF)₂PdCl₂·CH₂Cl₂(17mg, 0.02mmol) 中的溶液在室温搅拌 20 分钟。向其中加入 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺(72mg, 0.20mmol)在 THF(800 μL) 中的溶液, 将该反应混合物在微波反应器中加热至 150℃ 10 分钟。将得到的物质冷却至室温。向反应物质中加入 Na₂EDTA 和饱和 NH₄Cl 水溶液, 在室温搅拌 20 分钟。用二氯甲烷萃取产物。用无水 Na₂SO₄ 干燥有机层, 减压蒸发。将粗产物溶于 DMSO(1mL), 过滤, 通过反相制备型 HPLC 纯化, 得到 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-苄基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺, 为 TFA 盐(15mg, 0.031mmol, 15%)。ESI-MSm/z 计算值 372.1,

测定值 $373.1 (M+1)^+$; 保留时间 7.14 分钟。

[0350] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(2,6-二氯苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

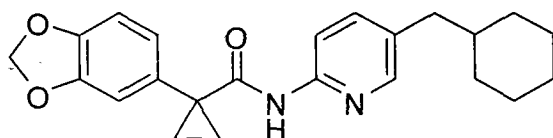
[0351]



[0352] 使用 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-苄基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的方法,通过使 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺与氯化(2,6-二氯苄基)锌(II)反应,合成 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(2,6-二氯苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0353] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(环己基甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

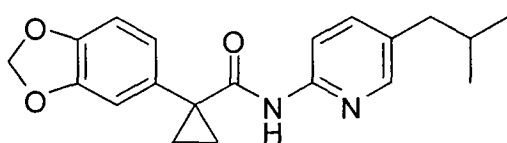
[0354]



[0355] 使用 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-苄基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的方法,通过使 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺与溴化(环己基甲基)锌(II)反应,合成 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(环己基甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0356] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-异丁基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

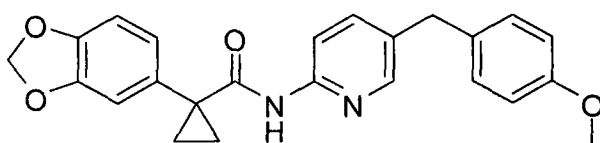
[0357]



[0358] 使用 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-苄基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的方法,通过使 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-溴吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺与溴化异丁基锌(II)反应,合成 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-异丁基吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0359] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(4-甲氧基苄基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

[0360]

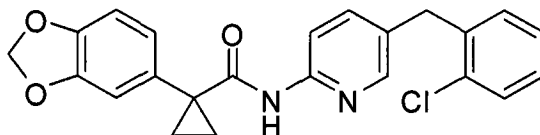


[0361] 使用 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-苄基吡啶-2-基)环丙烷

甲酰胺的方法,通过使 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5- 溴吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺与氯化 (4- 甲氧基苄基) 锌 (II) 反应,合成 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5-(4- 甲氧基苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺。

[0362] 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5-(2- 氯苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺的制备

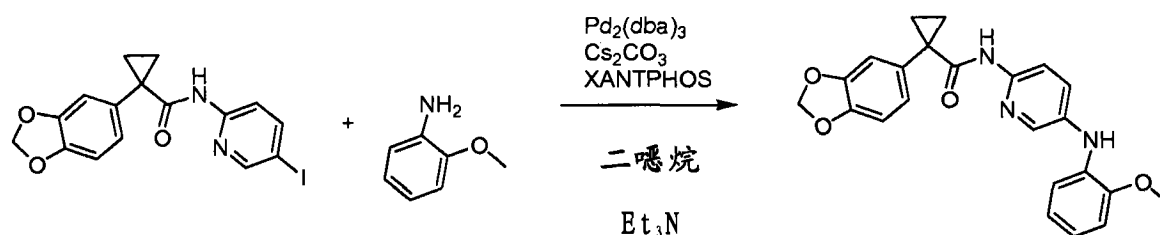
[0363]



[0364] 使用 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5- 苄基吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺的方法,通过使 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5- 溴吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺与氯化 (2- 氯苄基) 锌 (II) 反应,合成 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5-(2- 氯苄基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺。

[0365] 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5-(2- 甲氧基苄基氨基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺的制备

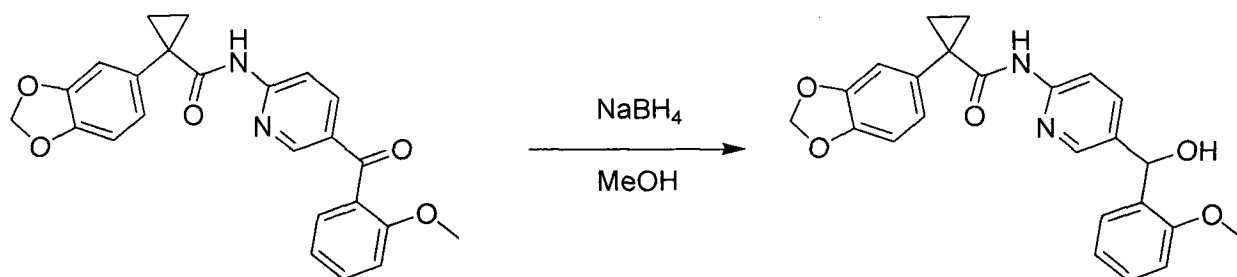
[0366]



[0367] 将 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5- 碘吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺 (816mg, 0.200mmol) 混悬于 1,4- 二噁烷 (0.4mL) 和三乙胺 (0.2mL), 其包含碳酸铯 (91.2mg, 0.0280mmol)、三 (二亚苄基丙酮) 二钯 (0) (1.8mg, 0.0020mmol)、2- 甲氧基苯胺 (0.027mL, 0.24mmol) 和 (9,9- 二甲基 -9H- 咕吨 -4,5- 二基) 双 (二苄基膦) (XANTPHOS, 2.3mg, 0.0040mmol)。将该反应混合物加热至 100℃ 15 小时。然后过滤粗产物,蒸发至干,溶于 N, N- 二甲基甲酰胺 (1mL),通过使用包含 0.05% 三氟乙酸的 0-99% 乙腈水溶液梯度的反相制备型液相色谱法纯化,得到纯产物 (2.6mg, 0.0049, 2.4%)。ESI-MS m/z 计算值 403.2,测定值 404.5 ($M+1$)⁺。保留时间 2.73 分钟。

[0368] 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5-(羟基 (2- 甲氧基苄基) 甲基) 吡啶 -2- 基) 环丙烷甲酰胺的制备

[0369]

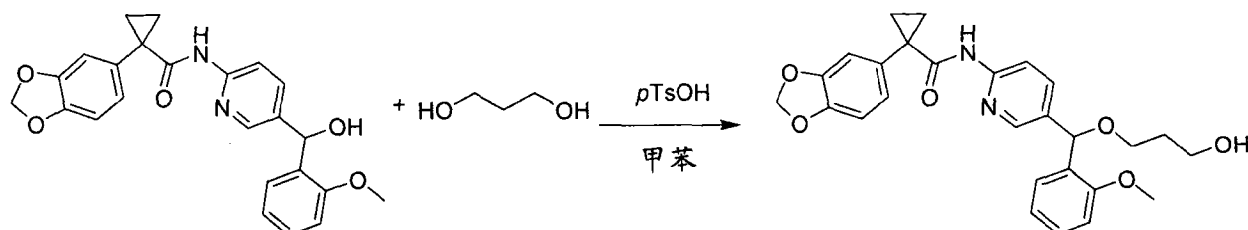


[0370] 将 1-(苯并 [d] [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基)-N-(5-(2- 甲氧基苄甲酰基) 吡

啉-2-基)环丙烷甲酰胺(0.50g,1.2mmol)混悬于25mL甲醇。分小部分加入硼氢化钠(0.454g,12.0mmol)。搅拌1小时后,将该反应混合物蒸发至干,用使用15-70%乙酸乙酯的己烷溶液梯度的40g硅胶纯化,得到纯产物,为白色固体(0.2125g,0.5078mmol,42%)。ESI-MS m/z 计算值418.6,测定值419.3(M+1)⁺。保留时间2.59分钟。

[0371] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((3-羟基丙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

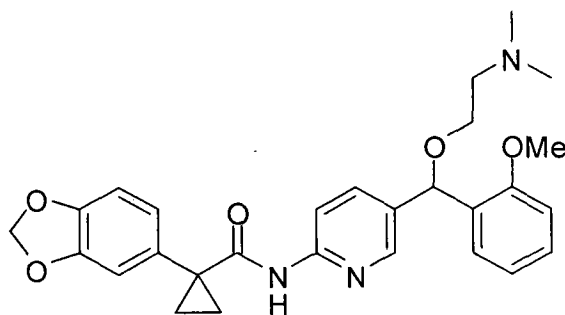
[0372]



[0373] 将1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((羟基(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺(41.8mg,0.100mmol)混悬于包含4-甲基苯磺酸水合物(pTsOH,23.8mg,0.125mmol)和丙-1,3-二醇(9.89mg,0.130mmol)的2mL甲苯中。然后将该反应混合物在微波反应器中加热至140℃5分钟。然后过滤粗产物,蒸发至干,溶于N,N-二甲基甲酰胺(1mL),通过使用包含0.05%三氟乙酸的0-99%乙腈水溶液梯度的反相制备型液相色谱法纯化,得到纯产物(26.5mg,0.0556mmol,55.6%)。ESI-MS m/z 计算值476.5,测定值477.3(M+1)⁺。保留时间2.71分钟。

[0374] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-(二甲基氨基)乙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

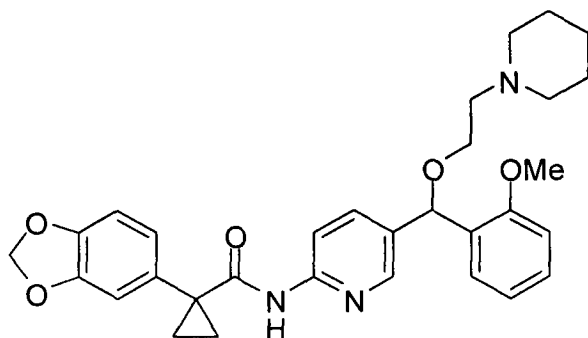
[0375]



[0376] 按照与1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((3-羟基丙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((羟基(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺和2-(二甲基氨基)乙醇制备1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-(二甲基氨基)乙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0377] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(2-(哌啶-1-基)乙氧基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

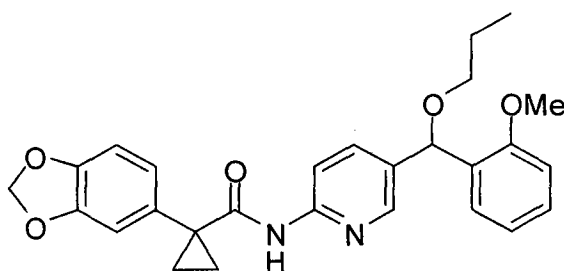
[0378]



[0379] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((3-羟基丙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(羟基(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺和 2-(哌啶-1-基)乙醇制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(2-(哌啶-1-基)乙氧基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0380] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(丙氧基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

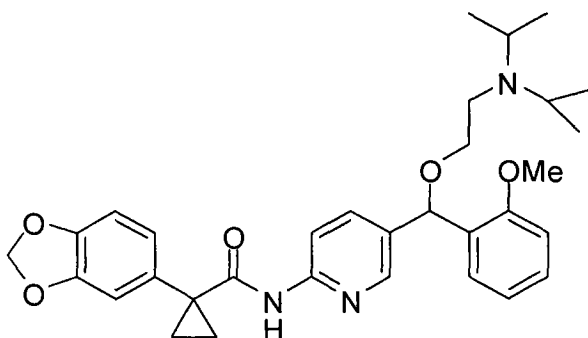
[0381]



[0382] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((3-羟基丙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(羟基(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺和丙-1-醇制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(丙氧基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0383] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-(二异丙基氨基)乙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

[0384]

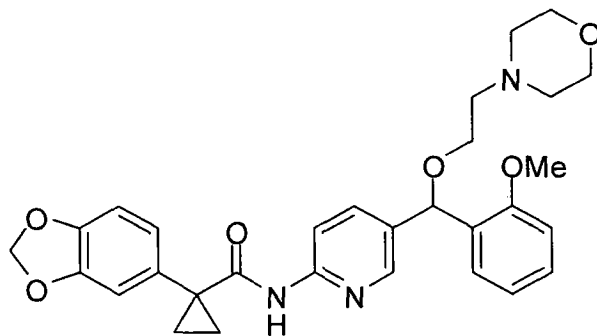


[0385] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((3-羟基丙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由 1-(苯并[d][1,3]间

二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(羟基(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺和2-(二异丙基氨基)乙醇制备1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-(二异丙基氨基)乙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0386] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(2-吗啉代乙氧基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

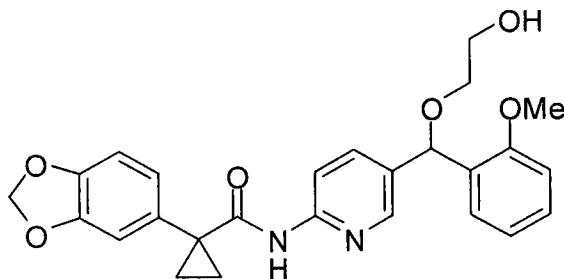
[0387]



[0388] 按照与1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((3-羟基丙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(羟基(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺和2-吗啉代乙醇制备1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(2-吗啉代乙氧基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0389] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-羟基乙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

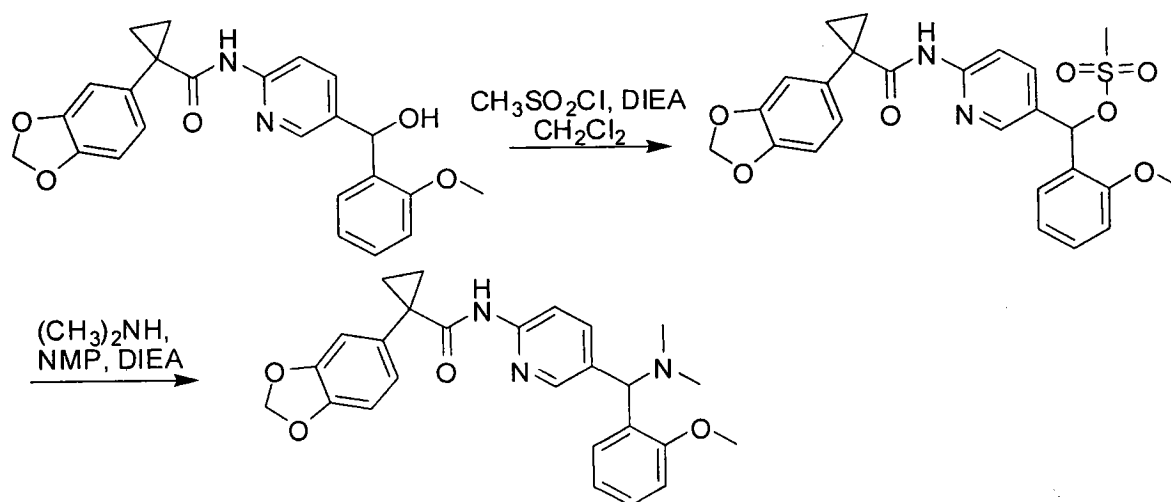
[0390]



[0391] 按照与1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((3-羟基丙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(羟基(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺和乙-1,2-二醇制备1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-羟基乙氧基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0392] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

[0393]



[0394] 步骤a: 甲磺酸 (6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯

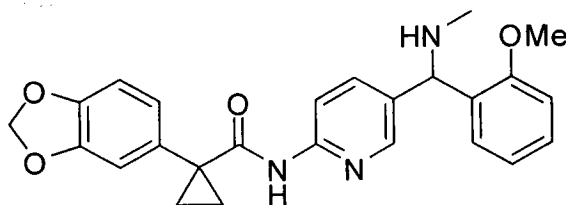
[0395] 在 0℃ 将甲磺酰氯 (56 μl, 0.72mmol) 缓慢加入到 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸 {5-[羟基-(2-甲氧基-苯基)-甲基]-吡啶-2-基}-酰胺 (50mg, 0.12mmol) 和 DIEA (24 μl, 0.14mmol) 在二氯甲烷 (2ml) 中的混合物中。将该反应混合物在环境温度搅拌 3 小时。蒸发溶剂, 将残余物不经任何额外的纯化用于下一步。

[0396] 步骤b: 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺

[0397] 将甲磺酸 (6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯 (0.12mmol) 溶于 NMP (2ml), 然后添加 2M 二甲胺的 THF (600 μl, 0.12mmol) 和 DIEA (21 μl, 0.12mmol) 溶液。将该反应混合物维持在环境温度 16 小时。对得到的混合物进行 HPLC 纯化, 得到靶物质的三氟乙酸盐 (55mg, 82%), 为无色固体。¹H-NMR (DMSO): δ 8.43 (s, 1H), δ 8.40 (d, J = 2Hz, 1H), δ 8.06 (d, J = 8.7Hz, 1H), δ 7.96 (dd, J = 2Hz, J = 8.7Hz, 1H), δ 7.56 (bd, J = 6.5Hz, 1H), δ 7.39 (bt, J = 6.5Hz, 1H), δ 7.05-7.11 (m, 3H), δ 6.96 (s, 2H), δ 6.05 (s, 2H), δ 5.68 (bm, 1H), δ 3.85 (s, 3H), δ 2.75 (s, 6H), δ 1.42-1.45 (m, 2H), δ 1.13-1.16 (m, 2H)。

[0398] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(甲基氨基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

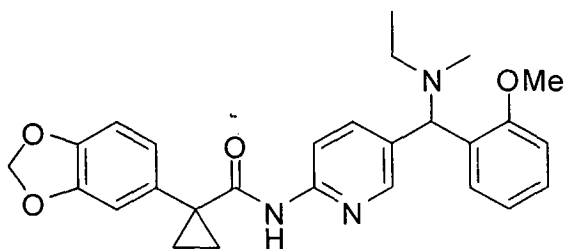
[0399]



[0400] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式, 由甲磺酸 (6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和甲胺制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(甲基氨基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0401] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((乙基(甲基)氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

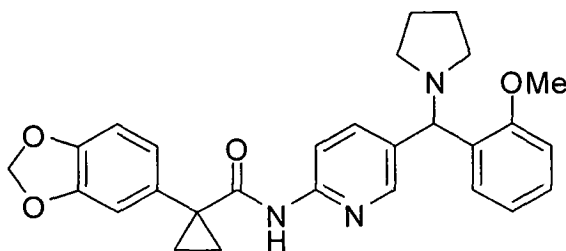
[0402]



[0403] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和 N-甲基乙胺制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((乙基(甲基)氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0404] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(吡咯烷-1-基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

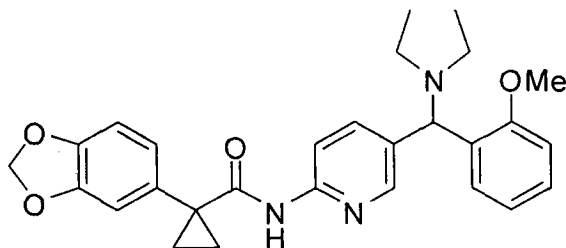
[0405]



[0406] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和吡咯烷制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(吡咯烷-1-基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0407] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二乙基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

[0408]

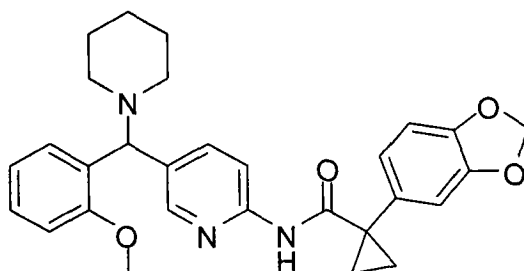


[0409] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和二乙胺制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二乙基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

基) 甲基) 吡啶-2-基) 环丙烷甲酰胺。

[0410] 1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(哌啶-1-基) 甲基) 吡啶-2-基) 环丙烷甲酰胺的制备

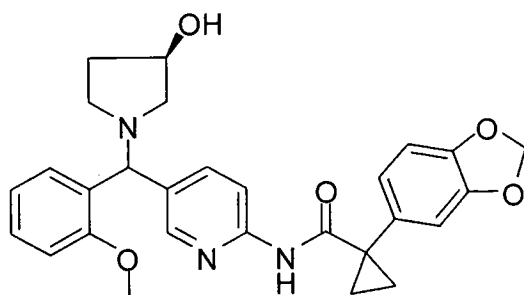
[0411]



[0412] 照与 1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基) 甲基) 吡啶-2-基) 环丙烷甲酰胺类似的方式, 由甲磺酸 (6-(1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基) 环丙烷甲酰氨基) 吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基) 甲酯和哌啶制备 1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(哌啶-1-基) 甲基) 吡啶-2-基) 环丙烷甲酰胺。

[0413] 1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(((R)-3-羟基吡咯烷-1-基)(2-甲氧基苯基) 甲基) 吡啶-2-基) 环丙烷甲酰胺的制备

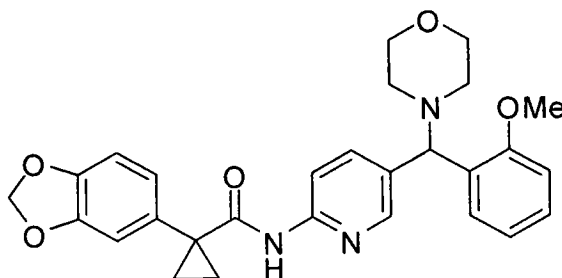
[0414]



[0415] 按照与 1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基) 甲基) 吡啶-2-基) 环丙烷甲酰胺类似的方式, 由甲磺酸 (6-(1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基) 环丙烷甲酰氨基) 吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基) 甲酯和 (R)-3-羟基吡咯烷制备 1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(((R)-3-羟基吡咯烷-1-基)(2-甲氧基苯基) 甲基) 吡啶-2-基) 环丙烷甲酰胺。

[0416] 1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(吗啉代) 甲基) 吡啶-2-基) 环丙烷甲酰胺的制备

[0417]

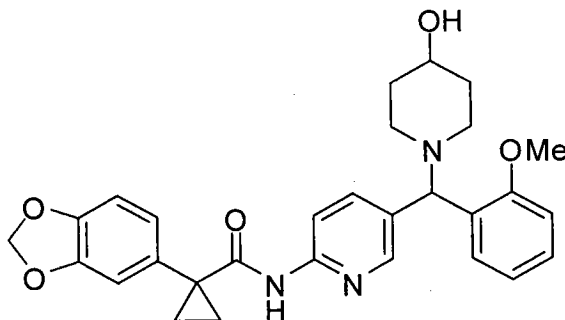


[0418] 按照与 1-(苯并[d][1,3] 间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲

氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和吗啉制备1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-甲氧基苯基)(吗啉代)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0419] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((4-羟基哌啶-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

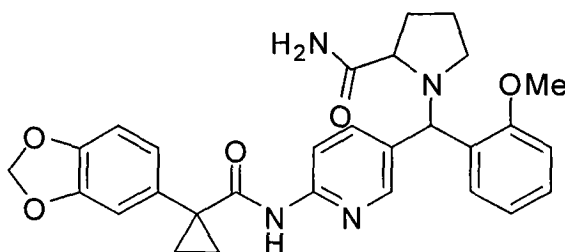
[0420]



[0421] 按照与1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和4-羟基哌啶制备1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((4-羟基哌啶-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0422] 1-((6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡咯烷-2-甲酰胺的制备

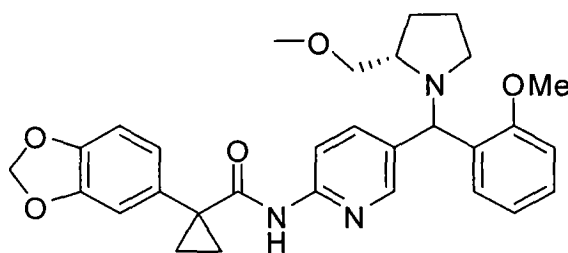
[0423]



[0424] 按照与1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和吡咯烷-2-甲酰胺制备1-((6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡咯烷-2-甲酰胺。

[0425] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(((S)-2-(甲氧基甲基)吡咯烷-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

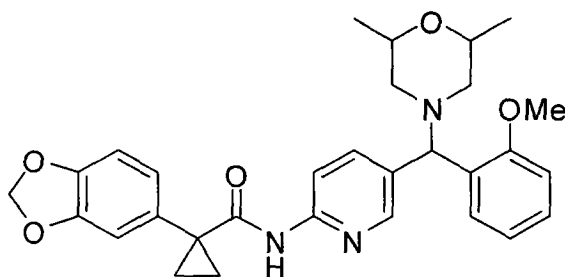
[0426]



[0427] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和哌啶制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-(((S)-2-(甲氧基甲基)吡咯烷-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0428] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2,6-二甲基吗啉代)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

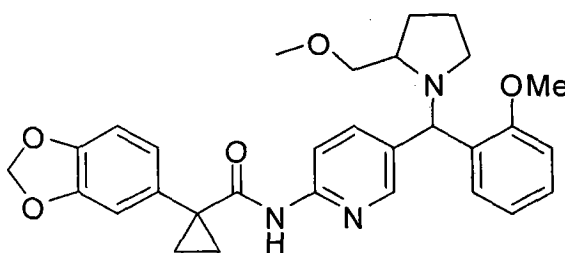
[0429]



[0430] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和 2,6-二甲基吗啉制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2,6-二甲基吗啉代)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0431] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-(甲氧基甲基)吡咯烷-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备

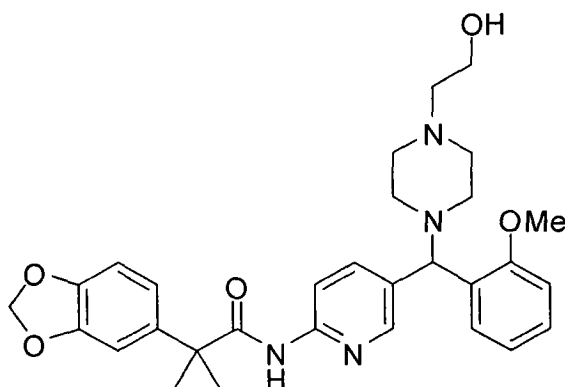
[0432]



[0433] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和 2-(甲氧基甲基)吡咯烷制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((2-(甲氧基甲基)吡咯烷-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

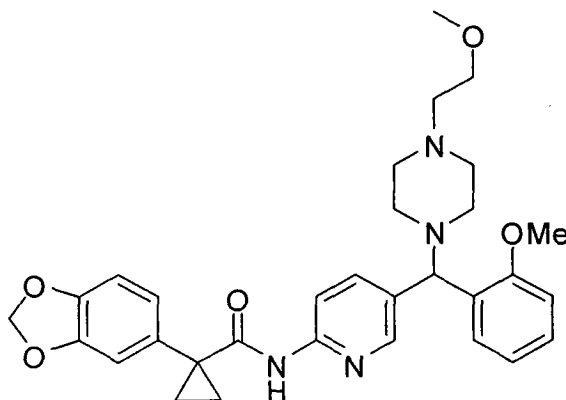
[0434] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((4-(2-羟基乙基)哌

嗪-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备
[0435]



[0436] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和 2-(哌嗪-1-基)乙醇制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0437] 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((4-(2-甲氧基乙基)哌嗪-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺的制备
[0438]



[0439] 按照与 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((二甲基氨基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺类似的方式,由甲磺酸(6-(1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)吡啶-3-基)(2-甲氧基苯基)甲酯和 1-(2-甲氧基乙基)哌嗪制备 1-(苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(5-((4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-基)(2-甲氧基苯基)甲基)吡啶-2-基)环丙烷甲酰胺。

[0440] 如下列出的是根据上述实施例制备的本发明化合物的特征数据。

[0441] 表 5.

[0442]

Cmpd. No.	LC/MS M+1	LC/RT min.
1	403.1	3.48
2	311.1	2.26
3	403.1	3.24
4	443.5	3.4
5	387.1	3.44
6	326.3	2.33
7	474.3	2.94
8	389.3	3.2
9	472.3	2.88
10	419.3	2.91
11	532.3	2.39
12	433.3	3.3
13	389.1	2.89
14	387.1	3.45
15	390.3	2.93
16	379.3	8.16
17	351.1	3.5
18	546.5	2.59
19	297.1	2.67

[0443]

Cmpd. No.	LC/MS M+1	LC/RT min.
20	446.3	2.8
21	297.3	2.09
22	545.5	2.74
23	516.3	2.96
24	441.3	8.81
25	269.1	2.82
26	311.3	2.4
27	417.3	3.5
28	403.5	3.57
29	339.3	6.6
30	457.5	3.79
31	373.3	3.33
32	486.3	2.94
33	461.5	3.6
34	389.1	2.97
35	403.3	3.15
36	516.3	2.97
37	419.3	3.69
38	283.1	2.68
39	531.5	2.61
40	333.1	1.48
41	345.1	3.07
42	297.3	2.18
43	325.3	2.13
44	419.3	2.57
45	515.5	2.75
46	393.1	3.3

[0444]

Cmpd. No.	LC/MS M+1	LC/RT min.
47	301.3	3.05
48	389.1	2.55
49	488.3	2.8
50	453	1.63
51	516.3	3.01
52	404.5	2.73
53	432.3	2.74
54	283.1	2.61
55	488.3	2.76
56	339.2	3.19
57	463.5	2.66
58	502.3	2.75
59	407.5	3.39
60	403.5	3.11
61	267.1	1.6
62	460.3	2.86
63	373.1	7.14
64	404.5	3.01
65	308.1	3.07
66	477.3	2.71
67	379.1	3.56
68	453.1	3.69
69	283.1	2.13
70	387.3	3.7
71	530.5	2.53
72	297.3	2.19
73	438.3	1.83

[0445]	Cmpd. No.	LC/MS M+1	LC/RT min.
	74	418.3	2.87
	75	297.1	2.48
	76	407.5	3.69
	77	373.1	3.5
	78	407	3.6

[0446] 检测和测定化合物的 $\Delta F508$ -CFTR 校正性质的测定法

[0447] 测定化合物 $\Delta F508$ -CFTR 调节性质的膜电位光学方法

[0448] 本测定法使用荧光电压敏感染料,以使用荧光培养板读出器(例如 FLIPR III, Molecular Devices, Inc.)测定膜电位改变,作为 NIH 3T3 细胞中功能性 $\Delta F508$ -CFTR 增加的读出值。用于该响应的驱动力是预先用化合物处理后、然后加载电压敏感染料通过单一液体添加步骤产生氯离子梯度与通道活化。

[0449] 校正化合物的鉴别

[0450] 为了鉴别校正与 $\Delta F508$ -CFTR 有关的运输缺陷的小分子,开发了单加入 HTS 测定模式。在 37°C 、5% CO_2 、90%湿度下将包含细胞的测定板在组织培养孵育箱内孵育 ~ 2 -4 小时。然后在粘附到测定板底部后准备将细胞暴露于化合物。

[0451] 在有或没有(阴性对照)测试化合物的存在下,在 37°C 、5% CO_2 、90%湿度下,在组织培养孵育箱内,将细胞在无血清的培养基中孵育 16-24 小时。随后将细胞用克雷布斯林格(Krebs Ringer)溶液冲洗 3 次,并加载电压敏感再分布染料。为了活化 $\Delta F508$ -CFTR,向每孔加入 $10\mu\text{M}$ 福司扣林和 CFTR 强化剂(potentiator)染料木素($20\mu\text{M}$)以及无 Cl^- 培养基。无 Cl^- 培养基的加入促进响应于 $\Delta F508$ -CFTR 活化的 Cl^- 流出,使用电压敏感染料光学监测所致膜的去极化。

[0452] 强化剂化合物的鉴别

[0453] 为了鉴别 $\Delta F508$ -CFTR 的强化剂,开发了双加入 HTS 测定模式。这种 HTS 测定法使用荧光电压敏感染料,以测定 FLIPR III 上的膜电位改变,作为温度-校正的 $\Delta F508$ CFTR NIH 3T3 细胞中 $\Delta F508$ CFTR 门控(电导)增加的测量值。用于该响应的驱动力是 Cl^- 离子梯度与在单一液体添加步骤中用福司扣林进行通道活化的结合,其中在预先用强化剂化合物(和 DMSO 媒介物对照)处理细胞、然后加载再分布染料后使用荧光培养板读出器例如 FLIPR III。

[0454] 溶液:

[0455] 浴溶液 #1:(以 mM 计)NaCl 160, KCl 4.5, CaCl_2 2, MgCl_2 1, HEPES10, pH 7.4, NaOH。

[0456] 无氯浴溶液:浴溶液 #1 中的氯化物盐用葡糖酸盐替代。

[0457] 细胞培养

[0458] 使用稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞进行膜电位的光学测定。在

175cm² 培养烧瓶中,将细胞维持在 37℃下、在 5% CO₂ 和 90%湿度中和 Dulbecco 改进 Eagle 培养基中,其中补充有 2mM 谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA, β -ME、1X 青霉素 / 链霉素 (pen/strep) 和 25mM HEPES。就全部光学测定而言,将细胞按~ 20,000/孔接种在 384-孔涂有基质胶 (matrigel) 包被的板中,在 37℃下培养 2 小时,然后在 27℃下培养 24 小时,供强化剂测定。就校正测定而言,在 27℃或 37℃下将细胞与和与化合物一起培养 16-24 小时。

[0459] 测定化合物的 Δ F508-CFTR 调节性质的电生理测定法

[0460] Ussing 室测定法

[0461] 对表达 Δ F508-CFTR 的极化气道上皮细胞进行 Ussing 室实验,以进一步表征在光学测定法中鉴别的 Δ F508-CFTR 调节剂。从支气管组织中分离非-CF 和 CF 气道上皮细胞,如上所述培养 (Galiotta, L. J. V., Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, G. A., & Zegarria-Moran, O. (1998) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34, 478-481), 在用 NIH3T3-条件培养基预包被的 Costar® Snapwell™ 滤膜上铺板。4 天后,除去顶部培养基,使细胞在空气液体界面上生长 > 14 天,然后使用。这产生完全分化的柱状细胞单层,其具纤毛,这些特征属于气道上皮细胞的特征。非-CF HBE 分离自不具有任何已知肺病的不吸烟者。CF-HBE 分离自对 Δ F508-CFTR 而言纯合型的患者。

[0462] 将生长在 Costar® Snapwell™ 细胞培养插件 (insert) 上的 HBE 固定在 Ussing 室 (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA) 内,使用电压钳系统 (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA) 测定在有底外侧至顶部 Cl⁻ 梯度 (I_{sc}) 的存在下经上皮电阻和短路电流。简言之,在 37℃、在电压钳记录条件下 (V_{保持} = 0mV) 检验 HBE。底外侧溶液包含 (以 mM 计) 145NaCl、0.83K₂HPO₄、3.3KH₂PO₄、1.2MgCl₂、1.2CaCl₂、10 葡萄糖、10HEPES (用 NaOH 将 pH 调整至 7.35), 顶部溶液包含 (以 mM 计) 145 葡萄糖酸 Na、1.2MgCl₂、1.2CaCl₂、10 葡萄糖、10HEPES (用 NaOH 将 pH 调整至 7.35)。

[0463] 校正化合物的鉴别

[0464] 典型的方案采用底外侧至顶端膜 Cl⁻ 浓度梯度。为了建立这种梯度,对底外侧膜使用正常的林格氏溶液 (ringer), 而顶端 NaCl 被等摩尔葡萄糖酸钠替代 (用 NaOH 滴定至 pH 7.4), 得到跨越上皮的大幅 Cl⁻ 浓度梯度。所有实验均是用完整单层进行的。为了充分活化 Δ F508-CFTR, 向顶侧施加福司扣林 (10 μ M) 和 PDE 抑制剂 IBMX (100 μ M), 继之以加入 CFTR 强化剂染料木素 (50 μ M)。

[0465] 正如在其他细胞类型中所观察到的,在低温下孵育稳定表达 Δ F508-CFTR 的 FRT 细胞和分离自患 CF 病患者 (CF-HBE) 的人支气管上皮细胞会增加 CFTR 在质膜中的功能密度。为了测定校正化合物的活性,将细胞与 10 μ M 测试化合物在 37℃下一起孵育 24-48 小时,随后洗涤 3 次,然后记录。将 cAMP- 和染料木素 - 介导的化合物 - 处理的细胞 I_{sc} 相对于 37℃对照校准,以 wt-HBE 中 CFTR 活性百分比表示。与 37℃对照相比,细胞与校正化合物预孵育显著增加 cAMP- 和染料木素 - 介导的 I_{sc}。

[0466] 强化剂化合物的鉴别

[0467] 典型的方案采用底外侧至顶端膜 Cl⁻ 浓度梯度。为了建立这种梯度,对底外侧膜使用正常的林格液,而顶端 NaCl 被等摩尔葡萄糖酸钠替代 (用 NaOH 滴定至 pH 7.4), 得到跨越上皮的大幅 Cl⁻ 浓度梯度。向细胞培养插件顶面加入福司扣林 (10 μ M) 和所有测试化合

物。比较假定的 $\Delta F508$ -CFTR 强化剂与已知强化剂染料木素的功效。

[0468] 膜片钳记录

[0469] 如上所述使用穿孔-膜片记录构件监测 $\Delta F508$ -NIH3T3 细胞中的总 Cl^- 电流 (Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) *J. Neurosci. Methods* 37, 15-26)。使用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) 在 22°C 进行电压钳记录。移液管溶液包含 (以 mM 计) 150N-甲基-D-葡萄糖胺 (NMDG)- Cl^- 、2MgCl₂、2CaCl₂、10EGTA、10HEPES 和 240 μ g/ml 两性霉素-B (用 HCl 调整至 pH 7.35)。胞外培养基包含 (以 mM 计) 150NMDG- Cl^- 、2MgCl₂、2CaCl₂、10HEPES (用 HCl 调整至 pH 7.35)。使用安装了 Digidata 1320A/D 界面的 PC 与 Clampex 8 (Axon Instruments Inc.) 进行脉冲发生、生成、数据获取和分析。为了活化 $\Delta F508$ -CFTR, 向浴中加入 10 μ M 福司扣林和 20 μ M 染料木素, 每隔 30sec 监测一次电流-电压相关性。

[0470] 校正化合物的鉴别

[0471] 为了测定校正化合物增加功能性 $\Delta F508$ -CFTR 在质膜中的密度的活性, 我们使用上述穿孔-膜片-记录技术在使用校正化合物处理 24 小时后测定电流密度。为了完全活化 $\Delta F508$ -CFTR, 向细胞中加入 10 μ M 福司扣林和 20 μ M 染料木素。在我们的记录条件下, 在 27°C 24 小时孵育后的电流密度高于在 37°C 24 小时孵育后观察到的电流密度。这些结果与在质膜中 $\Delta F508$ -CFTR 密度下低温孵育的已知效果一致。为了测定校正化合物对 CFTR 电流密度的效果, 将在 37°C 细胞与 10 μ M 测试化合物一起孵育 24 小时, 将电流密度与 27°C 和 37°C 的对照组比较 (% 活性)。记录前, 用胞外记录介质将细胞洗涤 3 次, 以除去任何测试化合物。与 10 μ M 校正化合物一起预孵育比 37°C 对照组显著增加了 cAMP- 和染料木素-依赖性电流。

[0472] 强化剂化合物的鉴别

[0473] 还使用穿孔-膜片-记录技术研究了 $\Delta F508$ -CFTR 强化剂增加稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 细胞中宏观 $\Delta F508$ -CFTR Cl^- 电流 ($I_{\Delta F508}$) 的能力。从光学测定法中鉴别的强化剂引起 $I_{\Delta F508}$ 剂量-依赖性增加, 其具有与在光学测定法中观察到的类似的功效和效力。在检验的全部细胞中, 施加强化剂前后的逆转电位均在 -30mV 左右, 为计算的 E_{Cl} (-28mV)。

[0474] 细胞培养

[0475] 使用稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞进行全细胞记录。在 175cm² 培养烧瓶中, 将细胞维持在 37°C 下、在 5% CO₂ 和 90% 湿度中和 Dulbecco 改进 Eagle 培养基中, 其中补充有 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA, β -ME、1X 青霉素/链霉素和 25mM HEPES。就全细胞记录而言, 将细胞按 2,500-5,000 个细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上, 在 27°C 下培养 24-48 小时, 然后用于测试强化剂活性; 在 37°C 与或不与校正化合物一起孵育, 以测定校正剂活性。

[0476] 单通道记录

[0477] 使用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc.), 如上所述利用所切除的内侧外翻膜片观察在 NIH3T3 细胞中稳定表达的经过 wt-CFTR 和温度校正的 $\Delta F508$ -CFTR 的门控活性 (Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R. G., Pavirani, A., Lecocq, J-P., La zdunski, M. (1991) *Nature* 354,

526-528)。移液管包含(以 mM 计):150NMDG、150 天冬氨酸、5CaCl₂、2MgCl₂ 和 10HEPES(用 Tris 碱将 pH 调整至 7.35)。浴包含(以 mM 计):150NMDG-Cl、2MgCl₂、5EGTA、10TES 和 14Tris 碱(用 HCl 将 pH 调整至 7.35)。切下后,通过添加 1mM Mg-ATP、75nM 催化亚单位的 cAMP- 依赖性蛋白激酶(PKA ;Promega Corp.Madison, WI) 和 10mM NaF 以抑制蛋白磷酸酶来活化 wt- 和 ΔF508-CFTR,从而防止电流减少。将移液管电位维持在 80mV。分析来自包含 ≤ 2 活性通道的膜片的通道活性。在实验过程中同时开放的最大数量确定了活性通道数量。为了测定单通道电流振幅,在 100Hz “离线”过滤来自 120sec 的 ΔF508-CFTR 活性的数据,然后用于构建全 - 点振幅直方图,使用 Bio-Patch Analysis 软件(Bio-Logic Comp. France)、用多高斯函数拟合。根据 120sec 的通道活性确定总微观电流和开放概率(P_o)。使用 Bio-Patch 软件或由相关性 $P_o = I/i(N)$ 确定 P_o, 其中 I = 电流平均值, i = 单通道电流振幅, N = 膜片中的活性通道数量。

[0478] 细胞培养

[0479] 使用稳定表达 ΔF508-CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞进行切下膜的膜片钳记录。在 175cm² 培养烧瓶中,将细胞维持在 37℃ 下、在 5% CO₂ 和 90% 湿度中和 Dulbecco 改进 Eagle 培养基中,其中补充有 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA, β-ME、1X 青霉素 / 链霉素和 25mMHEPES。就单通道记录而言,将细胞按 2,500-5,000 个细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上,在 27℃ 下培养 24-48 小时后使用。

[0480] 测定表 1 的化合物以显示如上述测定法中测定的校正活性。

[0481] 本发明的化合物用作 ATP 结合盒转运蛋白的调节剂。使用上述方法,测定本发明化合物的活性即 EC50 并且如表 6 所示。

[0482] 表 6.

[0483]

IC50/EC50 宾 (Bins): +++ <= 2.0 < ++ <= 5.0 < +		
百分比活性宾 (Bins): + <= 25.0 < ++ <= 100.0 < +++		
Cmpd. No.	宾 EC50 (BinnedEC50)	宾最大效力 (BinnedMaxEfficacy)
1	+	++
2	+	+++
3	+++	+++
4	+	+++
5	+++	+++
6	+	++
7	+++	+++
8	++	++
9	++	+++

[0484]

IC50/EC50 宾 (Bins): +++ <= 2.0 < ++ <= 5.0 < +		
百分比活性宾 (Bins): + <= 25.0 < ++ <= 100.0 < +++		
Cmpd. No.	宾 EC50 (BinnedEC50)	宾最大效力 (BinnedMaxEfficacy)
10	++	++
11	++	+++
12	+	++
13	++	++
14	++	+++
15	++	++
16	+++	+++
17	++	++
18	+++	++
19	+	++
20	++	+++
21	+	+++
22	+++	++
23	+++	+++
24	+++	+++
25	+	++
26	++	+++
27	++	+++
28	+	+++
29	++	+++
30	+	++
31	++	++
32	+++	+++
33	++	+++
34	++	++

[0485]

IC50/EC50 宾 (Bins): +++ <= 2.0 < ++ <= 5.0 < +		
百分比活性宾 (Bins): + <= 25.0 < ++ <= 100.0 < +++		
Cmpd. No.	宾 EC50 (BinnedEC50)	宾最大效力 (BinnedMaxEfficacy)
35	+++	+++
36	+++	+++
37	++	+++
38	+	++
39	+++	++
40	++	+++
41	+	++
42	+	+++
43	+	++
44	+	+++
45	++	+++
46	++	+++
47	+	+++
48	+	++
49	+++	+++
50	++	++
51	+++	+++
52	+++	+++
53	++	+++
54	+	++
55	++	+++
56	+	+++
57	++	+++
58	++	+++
59	+++	+++

[0486]

IC50/EC50 宾 (Bins): +++ <= 2.0 < ++ <= 5.0 < +		
百分比活性宾 (Bins): + <= 25.0 < ++ <= 100.0 < +++		
Cmpd. No.	宾 EC50 (BinnedEC50)	宾最大效力 (BinnedMaxEfficacy)
60	+++	+++
61	+	++
62	++	+++
63	+++	+++
64	+++	++
65	+	++
66	++	+++
67	++	+++
68	++	+++
69	+	+++
70	++	+++
71	+++	++
72	+	+++
73	+++	+++
74	+++	+++
75	+	++
76	+	+++
77	+	++
78	+++	+++