



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116723841 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 08

(21) 申请号 202180086814.X

(22) 申请日 2021.10.21

(30) 优先权数据

63/104,933 2020.10.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/056003 2021.10.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/087234 EN 2022.04.28

(71) 申请人 伊利诺伊大学董事会

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 保罗·J·赫根罗特

马修·布德罗

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 王立普

(51) Int.Cl.

A61K 31/499 (2006.01)

权利要求书2页 说明书45页 附图8页

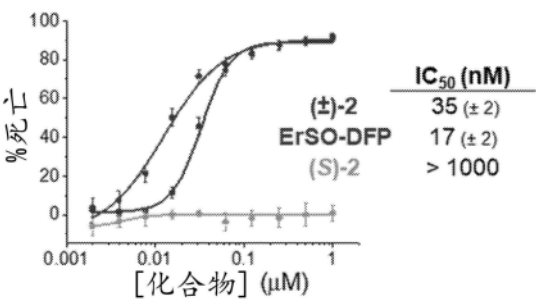
(54) 发明名称

对ER阳性癌症具有选择性的抗癌化合物

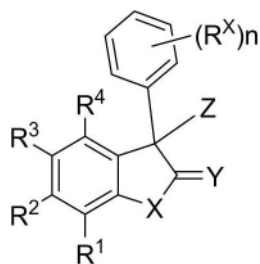
(57) 摘要

小分子ER α 生物调节剂可杀死抗性ER α 阳性乳腺癌、卵巢癌和子宫内膜癌细胞。在一个实施方案中,由于与BHPI和其他传统疗法(内分泌疗法、他莫昔芬和氟维司群/ICID)相比,小分子生物调节剂杀死治疗抗性癌症细胞的能力增强,因此提高了治疗效用。小分子生物调节剂不仅能抑制癌细胞的增殖,还能杀死癌细胞,从而防止多年后肿瘤的复发。本发明的化合物,例如ErSO-DFP,可有效地治疗ER α 阳性癌症,例如乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、子宫内膜癌等。

A.



1. 一种式I的化合物



(I),

其中,

X为O、S或 NR^A ;Y为 NR^A 、O或S;每个 R^A 独立地为H、烷基或氮保护基; R^1 是烷基、环烷基、杂环、芳基、杂芳基、卤代基、 $-OR^B$ 、 $-SR^B$ 或 $-N(R^B)_2$; R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地为H、三氟甲基、烷基、环烷基、杂环、芳基、杂芳基、卤代基、 $-OR^B$ 、 $-SR^B$ 或 $-N(R^B)_2$;每个 R^B 独立地为H、三氟甲基、烷基或杂原子保护基;每个 R^X 独立地为OH、卤代基、烷基、 $-OR^C$ 、 $-SR^C$ 、 $-S(=O)_2R^C$;每个 R^C 独立地为H、三氟甲基、烷基或杂原子保护基;

n是1、2、3、4、5或0;和

Z是任选被一个或多个取代基取代的6-、5-、4-、7-或8-元含氮杂环;

其中每个烷基、环烷基、杂环、芳基和杂芳基任选被一个或多个取代基取代;

或其盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中X是NH,Y是O。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中 R^1 是 CF_3 或 CH_3 。4. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地为H或卤代基。5. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中 R^X 是OH。6. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中一个 R^X 基团键合在苯环的对位或间位。

7. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中n是1、2或3。

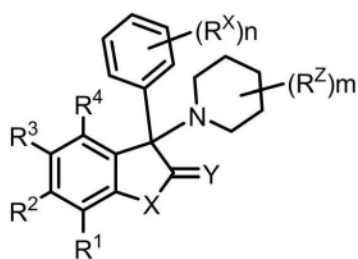
8. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中Z是键合在所述6-元含氮杂环的氮原子上的6-元含氮化合物。

9. 根据权利要求8所述的化合物,其中Z被两个或一个卤代基团取代。

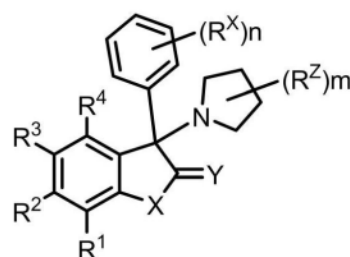
10. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中Z是4,4-二氟哌啶基。

11. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中所述含氮杂环为哌啶、吡咯烷、吗啉、哌嗪、氮杂环丁烷,每个取代基都可以任选地用1-6个取代基取代。

12. 根据权利要求1所述的化合物,其由式II或III表示:



(II) 或



(III) ;

其中

每个 R^Z 独立地为卤代基、硝基、烷基、 $-OR^D$ 、 $-SR^D$ 、 $-S(=O)_2R^D$; 其中每个 R^D 独立地为H、三氟甲基、烷基或杂原子保护基; 和

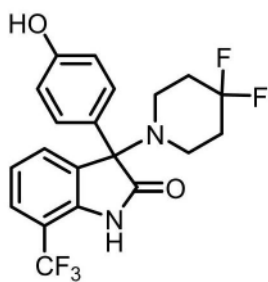
m是2、0、1、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

13. 根据权利要求12所述的化合物, 其中X为NH; Y是O; R^1 是 CF_3 或 CH_3 ; 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地为H或卤代基; R^X 是OH, 并且n是1、2或3。

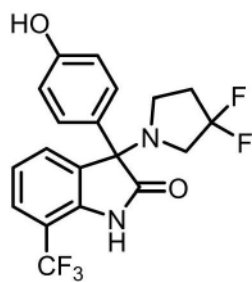
14. 根据权利要求12或13所述的化合物, 其中m是2且每个 R^Z 是卤代基。

15. 根据权利要求14所述的化合物, 其中每个卤代基是氟基。

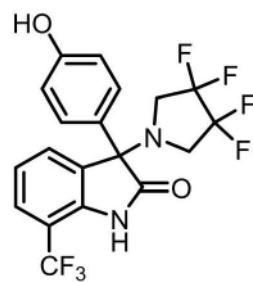
16. 根据权利要求1或12所述的化合物, 其中所述化合物为2、24或26:



(2)、

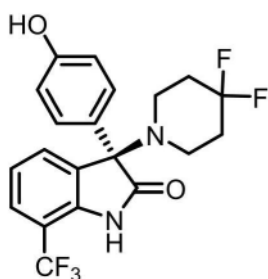


(24)或



(26)。

17. 所述化合物ErSO-DFP ((R)-2) :



(ErSO-DFP)。

18. 一种药物组合物, 其包含权利要求1、12或17中任一项所述化合物与药学上可接受的载体的组合。

19. 一种治疗ERα阳性癌症的方法, 包括向患有ERα的受试者施用权利要求1、12或17中任一项所述化合物, 其中从而治疗ERα阳性癌症。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述ERα阳性癌症为乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌或子宫内膜癌。

21. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述化合物为

(R)-3-(4,4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮; 或

(S)-3-(4,4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮。

对ER阳性癌症具有选择性的抗癌化合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求根据35U.S.C. §119(e), 于2020年10月23日提交的第63/104933号美国临时专利申请的优先权, 本申请通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 直接或间接靶向ER α 一直是治疗ER α +乳腺癌的最佳目标策略。这种策略试图阻断ER α 在诱导细胞生长和增殖中的典型功能, 因此称为内分泌治疗。尽管患者最初受益于内分泌治疗(通常使用他莫昔芬(tamoxifen)、氟维司群(fulvestrant)、阿那曲唑(anastrozole)等), 但耐药性和肿瘤再生是不可避免的, 并且这是一项主要的临床挑战。即使最近将内分泌治疗与CDK4/6或PI3KCA抑制剂联合使用, 耐药性致命疾病仍然普遍存在。这些耐药肿瘤通常会保持其ER α 的过度表达, 这表明利用ER α 的药物, 尤其是那些通过新机制起作用的药物, 可能会为多种患者群体提供有意义的临床益处, 所述患者群体通常被认为具有耐药性且其他治疗选择不能很好地满足其需求。

[0004] 传统的未折叠蛋白反应(UPR)的特征是响应蛋白质折叠能力不足而发出信号。还有另一种形式的UPR, 即预期未折叠蛋白反应(α -UPR), 其由细胞激活以“预期”未来过度活化生长。这种 α -UPR是跨激素特异性受体(包括ER α , 雄激素受体, 表皮生长因子受体等)的保守机制; α -UPR的诱导可以认为是ER α 的非典型功能。虽然 α -UPR具有细胞保护作用, 并且在多种情况下与耐药性相关, 但持续激活对癌细胞有毒, 并且被认为是将肿瘤保护途径转化为有效和选择性抗癌策略的机会。

[0005] 我们最近报道了小分子ErS0, 它是一种在ER α +癌细胞中过度激活ER α 依赖性 α -UPR, 从而在多种小鼠模型中根除ER α +乳腺肿瘤的化合物。ErS0对包含ER α 突变(Y537S和D538G)的乳腺癌细胞系的保持活性, 代表了内分泌治疗的主要临床耐药机制。ErS0在短孵育时间(例如6或24小时)内对培养物中ER α +细胞的选择性令人印象深刻, ER α +和ER α -癌细胞系之间的细胞IC₅₀差异>350倍。此外, 在细胞培养和异种移植模型中, 将ER α 敲入ER α 阴性的MDA-MB-231三阴性乳腺癌细胞会使这些细胞对ErS0显著敏感。ErS0利用ER α 的非典型活性(诱导 α -UPR)的能力可能使ErS0能够诱导肿瘤消退, 这与内分泌治疗通常观察到的细胞抑制活性形成对比。

[0006] 因此, 迫切需要具有细胞毒性而不仅仅是细胞抑制作用的新型小分子治疗药物来提供更有效的癌症治疗。

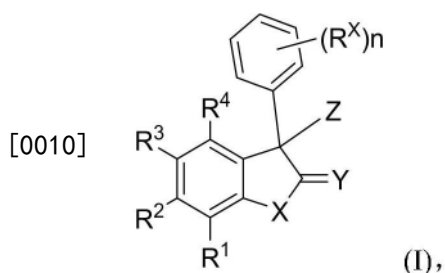
发明内容

[0007] 雌激素受体 α 阳性(ER α +)乳腺癌是这种疾病最常见的类型, 在美国每年有超过20万例新诊断病例。对于这些癌症, ER α 驱动肿瘤生长和疾病进展, 因此直接用ER α 拮抗剂和降解剂(例如他莫昔芬、氟维司群)或间接用芳香化酶抑制剂靶向ER α 已成为成功的治疗策略, 这些患者的总生存率显著提高。然而, 这种治疗很少能治愈, 患者通常会死于转移性、耐药性(通过ER α 突变和其他机制)疾病。小分子ErS0通过一种不同于临床批准的靶向ER α 的药物

的机制,即 α -UPR的过度激活,诱导ER α +乳腺癌细胞的有效ER α 依赖性死亡。ErS0在ER α +乳腺癌的多种小鼠模型中具有显著活性,在许多情况下诱导完全根除肿瘤。重要的是,即使在通过突变ER α 而对内分泌治疗耐药的乳腺癌细胞系和临床前肿瘤模型中进行评估,ErS0也是有力和有效的。虽然ErS0作为靶向ER α +肿瘤的新药具有巨大的前景,但在高浓度和长孵育时间下,其确实对培养的ER α 阴性(ER α -)细胞有一定的影响。

[0008] 在此,我们报道了ErS0修饰版的构建,重点是建立结构-活性关系,并鉴定ER α +和ER α -细胞之间具有更广泛差异活性的新变体。在这些研究过程中,我们发现ErS0-DFP是一种在细胞培养中诱导ER α +乳腺癌细胞死亡的有效化合物,其对ER α +癌细胞的选择性明显高于ER α -癌细胞,体内耐受性增强,体内抗肿瘤作用显著,在小鼠原位异种移植模型中诱导ER α +大肿瘤的显著消退。ErS0-DFP和相关分子代表了一类有趣的用于治疗ER α +癌症的新型化合物。

[0009] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了式I化合物:



[0011] 其中

[0012] X为O、S或NR^A;

[0013] Y为O、S或NR^A;

[0014] 每个R^A独立地为H、烷基或氮保护基团;

[0015] R¹是三氟甲基、三氟甲氧基、烷基、环烷基、杂环、芳基、杂芳基、卤代基、-OR^B、-SR^B或-N(R^B)₂;

[0016] R²、R³和R⁴各自独立地为H、三氟甲基、烷基、环烷基、杂环、芳基、杂芳基、卤代基、-OR^B、-SR^B或-N(R^B)₂;

[0017] 每个R^B独立地为H、三氟甲基、烷基或杂原子保护基团;

[0018] 每个R^X独立地为OH、卤代基、烷基、OR^C、SR^C、S(=O)₂R^C;

[0019] 每个R^C独立地为H、三氟甲基、烷基或杂原子保护基团;

[0020] n是0、1、2、3、4或5;

[0021] Z是任选被一个或多个取代基取代的3-8元含氮杂环;

[0022] 其中每个烷基、环烷基、杂环、芳基和杂芳基任选被一个或多个取代基取代;

[0023] 或其盐。

[0024] 当被取代时,烷基、环烷基、杂环、芳基和杂芳基可以被一个或多个选自OH、卤代基、硝基、烷基和如下文讨论的取代基所定义的取代基取代。例如,烷基可以被两个或三个卤代基基团取代,分别提供二卤烷基或三卤烷基(例如三氟甲基)。因此,可以取代式I的任何烷基或取代基以产生三氟甲基。

[0025] 在一个实施方案中,X是NH,Y是O。在一些实施方案中,R¹是CF₃或Me。在各种实施例中,R²、R³和R⁴各自独立地是H或卤代基。在特定实施方案中,R^X是OH。在各种实施例中,n是1、

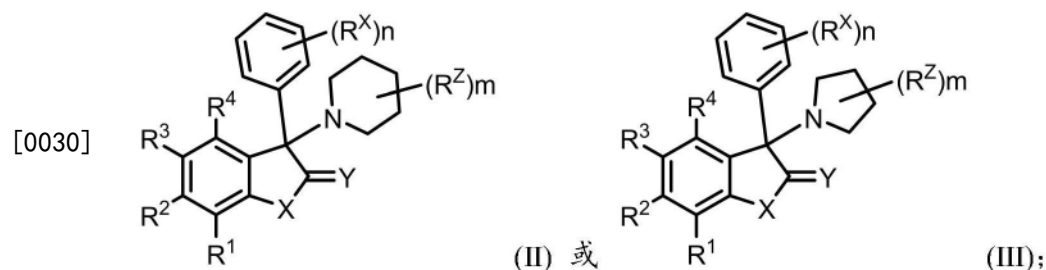
2或3。

[0026] 在一些实施方案中, R^X 是OH, n 是1、2或3。各种实施方案包括式I化合物, 其中 R^X 是OH, n 是1或2, 并且 R^X 基团位于它们所连接的苯环的间位或对位, 或者其中 R^X 是OH, n 是1, 并且 R^X 基团位于其所连接的苯环的对位。

[0027] 在一些实施方案中, Z 是通过杂环的氮原子连接到式I的3-、4-、5-、6-、7-或8-元含氮杂环。在各种实施方案中, 杂环可以被一个或两个卤代基基团取代。在另外的实施方案中, 杂环是在哌啶环的3-位被一个或两个氟基团取代的哌啶。在进一步的实施方案中, 杂环是哌啶、吗啉、哌嗪、吡咯烷、氮杂环庚烷、氮杂环丙烷、氮杂环丁烷或环庚亚胺(azocane), 其各种任选地被1-6个取代基取代。在一些实施方案中, Z 是4,4-二氟哌啶基, 3,3-二氟吡咯烷基或3,3,4,4-四氟吡咯烷基。

[0028] 在一个实施方案中, 式I化合物是左旋的。在替代实施方案中, 该化合物为式I右旋化合物。

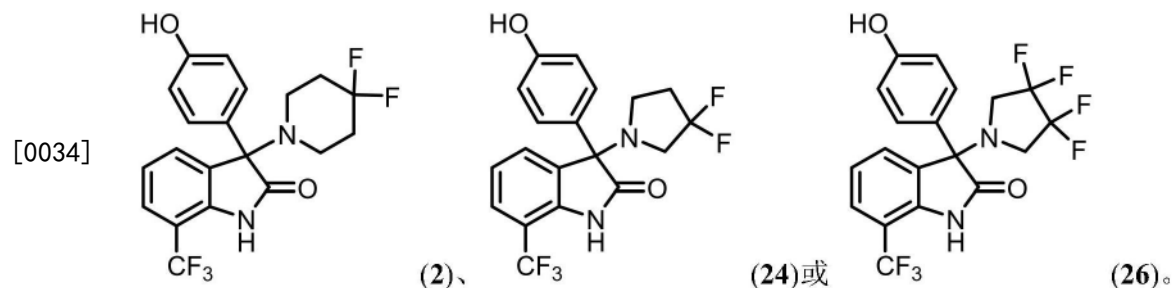
[0029] 在一些实施方案中, 式I化合物是式II或III化合物:



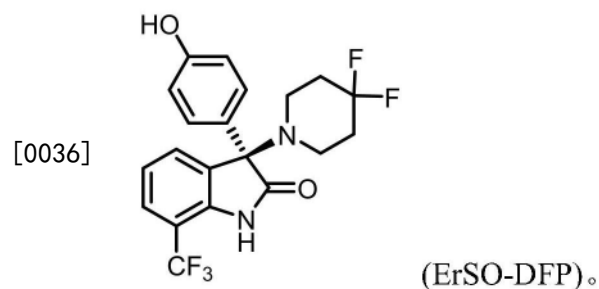
[0031] 其中每个 R^Z 独立地是OH、卤代基、硝基、烷基、 OR^D 、 SR^D 、 $S(=O)_2R^D$; 其中每个 R^D 独立地是H、三氟甲基、烷基或杂原子保护基团; m 是0-12; 或其盐。

[0032] 在一些实施方案中, X 是NH; Y 是O; R^1 是 CF_3 或Me; R^2 , R^3 和 R^4 各自独立为H或卤代基; R^X 是OH, n 是1、2或3。在各种实施方案中, m 是2, 每个 R^Z 是卤代基。在另外的实施方案中, 每个卤代基是氟基。

[0033] 在一些具体实施方案中, 式I、II或III化合物为2、24或26:



[0035] 在另一具体实施方案中, 式I或II化合物为ErSO-DFP:



[0037] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含式I或II化合物与药学上可接受的载体的组合。

[0038] 本发明还提供了一种治疗ER α 阳性癌症的方法,包括向患有ER α 阳性癌症的受试者施用治疗有效量的式I或II化合物,从而治疗ER α 阳性癌症。在一些实施方案中,ER α 阳性癌症是乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌或子宫内膜癌。在具体实施方案中,所述化合物是ErS0-DFP。

[0039] 本文所述式的化合物可以与 α -雌激素受体(ER)结合,并通过内质网中UPR的过度激活来杀死或抑制癌细胞的生长。在各种实施方案中,式I化合物具有细胞毒性。因此,在各种实施方案中,癌症可以是例如乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌或结肠癌。

[0040] 因此,本发明提供了新的式I-III化合物,用于合成式I-III化合物的中间体,以及制备式I-III化合物的方法。本发明还提供了式I-III化合物,其可用作合成其他有用化合物的中间体。本发明提供了式I-III化合物在治疗哺乳动物(例如人类)癌症中的用途。所施用的化合物可以是包括药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体的组合物的形式。

附图说明

[0041] 以下附图构成说明书的一部分,并包括在说明书中以进一步证明本发明的某些实施方案或各个方面。在一些情况下,通过参考附图并结合本文给出的详细描述,可以最好地理解本发明的实施方案。说明书和附图可以突出显示本发明的特定示例或特定方面。然而,本领域技术人员将理解,示例或方面的部分可以与本发明的其他示例或方面组合使用。

[0042] 图1:ErS0-DFP是相对于其祖化合物ErS0具有更好的LipE的活性抗癌药物。A、外消旋体2(($\pm$)-2)、ErS0-DFP和(S)-2对与化合物孵育24小时的MCF-7细胞的生物活性。通过阿尔玛蓝(alamar-blue)荧光评估细胞活力。用Raptinal(100 μ M)作为100%死亡对照。数据显示为平均值 $\pm$ 标准差; $n \geq 2$ 个独立重复。B、ErS0和ErS0-DFP的亲脂性效率。LipE的增加通常与更多的“类似药物”特征有关。

[0043] 图2:ErS0-DFP以比ErS0更宽的选择性窗口有效杀死ER α 阳性癌细胞系。针对选定的ER α 阳性(红色曲线)和ER α 阴性(蓝色曲线)癌细胞系的ErS0-DFP和ErS0活性的IC₅₀曲线。为了确定IC₅₀,将细胞与ErS0孵育24(A)或72(B)小时。通过阿尔玛蓝荧光测定活力,用Raptinal(100 μ M)作为100%死亡对照。数据绘制/表示为平均值 $\pm$ 标准差; $n \geq 3$ 个独立重复。黑色双面箭头显示了IC₅₀MCF-7和选择的ER α 阴性细胞系之间的治疗窗期(表3)。

[0044] 图3:ErS0-DFP以类似于ErS0的方式激活 α -UPR。将MCF-7细胞与如图所示化合物一起孵育,收获,并对 α -UPR活化的关键蛋白进行蛋白质印迹分析。对于剂量依赖性(右侧的印迹),将细胞与化合物(A)孵育4小时。使用ImageJ和肌动蛋白条带作为上样对照计算定量。数据绘制为平均值 $\pm$ 标准差(B)。印迹是3个独立重复的代表性图像。

[0045] 图4:当在小鼠中静脉内施用,ErS0-DFP达到生物学相关浓度。A、ErS0-DFP的药代动力学(PK)实验总结。数据绘制为平均值 $\pm$ 标准差;每个时间点 $n \geq 3$ 只小鼠。B、模拟胃液(SGF)稳定性测定结果。将目标化合物(100 μ M)与胃蛋白酶在SGF中孵育指定的时间,并通过LC-MS/MS测定化合物浓度。然后将浓度归一化为 $t=0$ 样品,并计算并绘制剩余百分比。使用GraphPadPRISM使用单相衰减方程($Y_0=100$, 稳定水平=0, $K>0$)计算半衰期($t_{1/2}$)和曲线。

红霉素是一种已知的酸敏感阳性对照。95%CI:95%置信区间,SD:标准差。显示的数据是N=2的代表。

[0046] 图5:ErSO-DFP在体内耐受性良好,是血脑屏障渗透剂。B、给小鼠静脉注射(I.V.)10mg/kg的ErSO-DFP或ErSO,15分钟后处死小鼠,收集其血清和脑(n=4只小鼠每种化合物)。通过LC-MS/MS测定ErSO/ErSO-DFP的浓度。每只小鼠的平均血液约为58.5mL/kg。数据绘制为平均值±标准差,统计:双尾不等方差t检验;n.s.:不显著 $p>0.05$ ($p=0.7224$)。

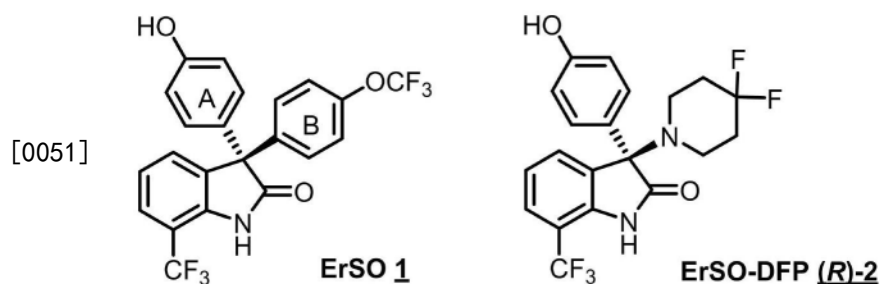
[0047] 图6:ErSO-DFP治疗导致低剂量的肿瘤严重消退,再加上高MTD,表明它是一种具有较大治疗指数的化合物。A、ErSO-DFP以与ErSO类似的方式消退MCF-7肿瘤。将MCF-7细胞(5×10^6)注射到补充有60天E2颗粒(0.36mg)的去卵巢的Nu/J小鼠的乳腺脂肪垫中,所得肿瘤生长至平均大小 $>300\text{mm}^3$ 。然后各组每周治疗一次,总剂量为3次(即 $3 \times \text{wk.}$),静脉注射施用;每个治疗组n=6。第14天后未治疗小鼠。B、在MCF-7原位研究期间观察到的小鼠体重百分比变化总结如A所示。通过双向方差分析,在任何时间点(n.s., p 值 >0.05),体重变化彼此之间没有无显著差异;每个治疗组n=6。

[0048] 图7:图表显示20mg/kg ErSO静脉注射(A)和20mg/kg ErSO-DFP静脉注射(B)的药代动力学。

具体实施方式

[0049] 根据临床前模型的数据,ErSO似乎有一个广泛的治疗窗期;在小鼠和犬科动物中,口服剂量大于150mg/kg时可以耐受。然而,如果改变ErSO的一些特征,可能会产生一种更有前景的药物。首先,与口服施用相比,静脉注射(20mg/kg)时,小鼠ErSO的最大耐受剂量显著降低,并且似乎存在一些物种特异性敏感性,大鼠的最大耐受剂量较低。其次,如本文所示和进一步详述的,在更长的孵育时间和更高的浓度下,ErSO对ER α +与ER α -癌细胞诱导细胞死亡的选择性在某些情况下开始减弱。在这里,我们试图构建和评估与ErSO相关的新型化合物,目的是鉴定具有最小ER α 独立效应的新线索;我们假设这种优化的化合物在体内具有更广泛的治疗窗期。除了它们的转化前景之外,更具选择性的化合物也将是用于 α -UPR的强大和清洁的ER α 依赖性激活的优越探针。在这里,我们报告了ErSO-DFP((R)-2(图示1),该化合物对对培养的ER α +癌细胞具有显著增加的选择性,ErSO类 α -UPR活化和效力,体内更大的治疗窗期和优异的药物类特性,同时在低剂量下保持ER α +乳腺癌小鼠模型中诱导肿瘤严重消退的能力。

[0050] 图示1:ErSO和ErSO-DFP的化学结构。



[0052] 定义

[0053] 包括以下定义以提供对说明书和权利要求的清晰和一致的理解。如本文所用,所述术语具有以下含义。本说明书中使用的所有其他术语和短语具有本领域技术人员所能理

解的普通含义。这些普通含义可以通过参考技术词典获得,例如Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14th Edition, by R.J.Lewis, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2001。

[0054] 说明书中对“一个(one)实施方案”、“一个(an)实施方案”等的引用,表明所描述的实施方案可以包括特定方面、特征、结构、部分或特性,但并非每个实施方案都必须包括该方面、特征、结构、部分或特性。此外,这些短语可以但不一定指说明书其他部分中提到的相同实施方案。此外,当结合实施方案描述特定方面、特征、结构、部分或特性时,无论是否明确描述,本领域技术人员都知道将该方面、特征、结构、部分或特性与其他实施方案影响或连接。

[0055] 除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“所述(the)”包括复数指代。因此,例如,对“一种化合物”的引用包括多个这样的化合物,因此化合物X包括多个化合物X。进一步注意,权利要求的起草可以排除任何任选元素。因此,该陈述旨在用作与本文所述的任何要素和/或权利要求要素叙述或使用“负面”限制的使用相关的排他性术语的使用的先行基础,例如“单独地”、“仅”等。

[0056] 术语“和/或”是指与该术语相关的任何一个项目、项目的任何组合或所有项目。本领域技术人员容易理解短语“一个或多个”和“至少一个”,特别是在阅读其用法时。例如,该短语可以表示1、2、3、4、5、6、10、100或列举的下限约10、100或1000倍高的任何上限。例如,苯环上的一个或多个取代基是指环上的一到五个取代基。

[0057] 正如本领域技术人员将理解的那样,所有数字,包括表示成分量、分子量等性质、反应条件等的数字,都是近似值,并且被理解为在所有情况下都可以通过术语“约”进行选择修改。这些值可以根据本领域技术人员利用本文描述的教导寻求获得的所需特性而变化。也可以理解,这些值本质上包含必然由其各自测试测量中发现的标准偏差产生的变化。当值表示为近似值时,通过使用前词“约”,可以理解,不带修饰语“约”的特定值也构成了另一个方面。

[0058] 术语“约(about)”和“约(approximately)”可以互换使用。这两个术语都可以指指定值的 $\pm 5\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 或 $\pm 25\%$ 的变化。例如,在一些实施方案中,“约50”可以具有从45%到55%的变化,或者如特定权利要求所定义的。对于整数范围,术语“约”可以包括一个或两个大于和/或小于范围两端所述整数的整数。除非本文另有说明,否则术语“约(about)”和“约(approximately)”旨在包括接近所述范围的值,例如重量百分比,这些值在各个成分、组合物或实施方案的功能方面是等效的。术语“约(about)”和“约(approximately)”也可以修饰本段上文讨论的列举范围的端点值。

[0059] 正如本领域技术人员将理解的,出于任何和所有目的,特别是就提供书面描述而言,本文所述的所有范围还包括任何和所有可能的子范围及其子范围的组合,以及构成该范围的各个值,特别是整数值。因此,可以理解,还公开了两个特定单元之间的每个单元。例如,如果公开了10-15,则还单独公开了11、12、13和14,并将其作为范围的一部分。列举的范围(例如,重量百分比或碳基团)包括该范围内的每个特定值、整数、小数或单位。任何列出的范围都可以很容易地被认为是足以描述并使相同的范围被分解为至少相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一或十分之一。作为非限制性示例,本文讨论的每个范围可以容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。本领域技术人员也将理解,所有语言,

例如“最多”、“至少”、“大于”、“小于”、“多于”、“或更多”等,包括列举的数字,这些术语指的是随后可以细分为子范围的范围,如上所述。以相同的方式,本文所述的所有比率也包括属于更广泛比率的所有子比率。因此,为自由基、取代基和范围列举的特定值仅用于说明;它们不排除自由基和取代基的其他定义值或定义范围内的其他值。将进一步理解,每个范围的端点相对于另一个端点都是重要的,并且独立于另一个端点。

[0060] 本发明提供了诸如体积、质量、百分比、比率等变量的范围、限制和偏差。本领域技术人员理解,诸如“数字1”到“数字2”的范围意味着包括整数和小数的连续数字范围。例如,1到10表示1、2、3、4、5、...9、10。也表示1.0、1.1、1.2、1.3...9.8、9.9、10.0,也表示1.01、1.02、1.03等等。如上所述,如果所公开的变量是一个小于“数字10”的数字,它表示一个包括小于数字10的整数和小数的连续范围。类似地,如果所公开的变量是大于“数字10”的数字,则它意味着包括大于数字10的整数和小数的连续范围。这些范围可以通过术语“约”进行修饰,其含义已在上文中描述。

[0061] 本领域技术人员还将容易地认识到,如果成员以共同的方式分组在一起,例如在马库什组(Markush group)中,本发明不仅包括作为整体列出的整个组,而且还包括该组的每个成员以及主组的所有可能的子组。另外,出于所有目的,本发明不仅包括主组,而且还包括缺少一个或多个组成员的主组。因此,本发明设想明确排除列举组的任何一个或多个成员。因此,但书可适用于所公开的类别或实施例中的任何一个或多个,由此所述元素、种类或实施方案中的任何一个或多个可被排除在此类类别或实施方案之外,例如,用于明确的负面限制。

[0062] 术语“接触”是指触摸、接触或立即或接近的行为,包括在细胞或分子水平上,例如在溶液、反应混合物、体外或体内产生生理反应、化学反应或物理变化。

[0063] “有效量”是指有效治疗疾病、紊乱和/或病症或产生列举效果的量。例如,有效量可以是有效减少正在治疗的病症或症状的进展或严重程度。本领域技术人员有能力确定有效治疗量。术语“有效量”旨在包括本文所述化合物的量,或本文所述化合物的组合的量,例如,有效治疗或预防宿主中的疾病或紊乱,或治疗疾病或紊乱的症状。因此,“有效量”通常是指提供所需效果的量。

[0064] 或者,本文使用的术语“有效量”或“有效治疗量”是指施用足够量的药物或组合物或组合物的组合,其将在一定程度上缓解所治疗的疾病或病症的一种或多种症状。结果可以是减少和/或减轻疾病的体征、症状或原因,或生物系统的任何其他期望的改变。例如,用于治疗用途的“有效量”是包含如本文所公开的化合物的组合物的量,所述化合物需要提供临床上显著的疾病症状减轻。可以使用诸如剂量递增研究等技术确定任何个别情况下的适当“有效”量。该剂量可以在一次或多次施用。然而,有效剂量的精确确定可能基于每位患者的个体因素,包括但不限于患者的年龄、体型、疾病类型或程度、疾病阶段、组合物的给药途径、所用补充疗法的类型或程度,正在进行的疾病过程和所需的治疗类型(例如,积极治疗与常规治疗)。

[0065] 术语“治疗(treating)”、“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”包括(i)预防疾病、病理或医疗状况的发生(例如预防);(ii)抑制疾病、病理或医疗状况或阻止其发展;(iii)缓解疾病、病理或医疗状况;和/或(iv)减轻与疾病、病理或医疗状况相关的症状。因此,术语“治疗(treating)”、“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”可以扩展到预防,并且可以包

括预防 (prevent)、预防 (prevention)、预防 (preventing)、降低、停止或逆转正在治疗的病症或症状的进展或严重程度。因此,术语“治疗”可以适当地包括医疗、治疗和/或预防性施用。

[0066] 如本文所用,“受试者”或“患者”是指具有疾病或其他恶性肿瘤症状或有疾病或其他恶性肿瘤风险的个体。患者可以是人类或非人类,并且可以包括例如用作研究目的的“模型系统”的动物品系或物种,例如本文所述的小鼠模型。相同地,患者可能包括成年人或青少年(例如儿童)。此外,患者可以是指可能受益于施用本文所述组合物的任何生物体,优选哺乳动物(例如人类或非人类)。哺乳动物的示例包括但不限于任何哺乳动物类别:人类、非人类灵长类动物,如黑猩猩,以及其他猿类和猴类;农场动物,如牛、马、绵羊、山羊、猪;家养动物,如兔子、狗和猫;实验动物包括啮齿动物,如大鼠、小鼠和豚鼠等。非哺乳动物的示例包括但不限于鸟类、鱼类等。在本文提供的方法的一个实施方案中,哺乳动物是人。

[0067] 如本文所用,术语“提供”、“施用”、“引入”在本文中可互换使用,是指通过导致化合物至少部分定位到所需位点的方法或途径将本发明化合物置于受试者体内。所述化合物可以通过任何适当的途径施用,从而导致递送至受试者中所需的部位。

[0068] 本文所述的化合物和组合物可以与另外的组合物一起施用或者与其他治疗药物组合施用,以延长组合物的稳定性和活性。

[0069] 术语“抑制(inhibit)”、“抑制(inhibiting)”和“抑制(inhibition)”是指减缓、停止或逆转疾病、感染、病症或细胞群的生长或进展。例如,与在没有治疗或接触的情况下发生的生长或进展相比,抑制可以大于约20%、40%、60%、80%、90%、95%或99%。

[0070] 本文中使用的术语“基本上”是一个广义术语,以其普通意义使用,包括但不限于大部分但不一定完全是指定的。例如,该术语可能指的是可能不是全部数值的100%的数值。完整的数值可以小于约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约15%或约20%。

[0071] 在本文中使用术语“包括”的地方,考虑使用术语“由.....组成”或“基本上由.....组成”来代替。如本文所用,“包括(comprising)”与“包括(including)”、“包含(containing)”或“特征在于(characterized by)”同义,并且是包容性的或开放式的,不排除其他未列举的元素或方法步骤。如本文所用,“包括”不包括方面元素中未指定的任何元素、步骤或成分。如本文所用,“基本上由.....组成”不排除不会实质性影响方面的基本和新颖特征的材料或步骤。在本文的每种情况下,术语“包括”、“基本上由.....组成”和“由.....组成”中的任何一个都可以替换为其他两个术语中的任何一个。本文中说明性描述的公开可以在不存在本文中未具体公开的任何一个或多个元素、限制或限制的情况下适当地实施。

[0072] 术语“卤代基”或“卤化物”是指氟基、氯基、溴基或碘基。类似地,术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0073] 术语“烷基”是指具有例如1-20个碳原子,并且通常具有1-12、1-10、1-8、1-6或1-4个碳原子的支链或非支链烃。如本文所用,术语“烷基”还包括下文定义的“环烷基”。示例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基(异丙基)、1-丁基、2-甲基-1-丙基(异丁基)、2-丁基(仲丁基)、2-甲基-2-丙基(叔丁基)、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊

基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、己基、辛基、癸基、十二烷基等。烷基可以未被取代或被取代,例如,用下面所述的取代基或本文中另外描述的取代基。烷基也可以任选地部分或完全不饱和。因此,烷基的叙述可以包括烯基或炔基。如上所述和举例说明,烷基可以是单价烃基,或者可以是二价烃基(即亚烷基)。

[0074] 亚烷基是在碳或碳链的两个不同碳原子上具有两个自由价的烷基。类似地,烯基和炔基分别是在两个不同碳原子上具有两个自由价的烯烃和炔烃。

[0075] 术语“环烷基”是指例如具有单个环或多个稠环的3至10个碳原子的环烷基。例如,环烷基包括单环结构如环丙基、环丁基、环戊基、环辛基等,或多环结构,例如金刚烷基等。环烷基可以是未取代的或被取代的。环烷基可以是单价或二价的,并且可以如烷基所述任选地被取代。环烷基可以任选地包括一个或多个不饱和基团,例如,环烷基可以包括一个或多个碳-碳双键,例如,1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基等。

[0076] 术语“杂环烷基”或“杂环”是指饱和或部分饱和的单环、双环或多环,其含有选自氮、硫、氧的至少一个杂原子,优选1-3个杂原子。每个环优选为3至10元环,更优选为4至7元环。合适的杂环烷基的示例包括吡咯基、四氢呋喃基、四氢呋喃基、哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、吗啉代、1,3-二氮杂环烷、1,4-二氮杂环烷、1,4-氧杂氮杂环烷、1,4-氧杂噻吩等。杂环可以被一个或多个取代基取代。

[0077] 术语“芳香族”是指本文所述的芳基或杂芳基或取代基。另外,芳族部分可以是双芳族部分、三芳族部分等。双芳族部分在两个芳族部分之间具有单键,例如但不限于联苯或联吡啶。类似地,三芳族部分在每个芳族部分之间具有单键。

[0078] 术语“芳基”是指从母体芳环系统的单个碳原子中除去至少一个氢原子而衍生的芳香烃基团。自由基连接位点可以位于母环系统的饱和或不饱和碳原子上。芳基可以有6到30个碳原子,例如约6-10个碳原子。芳基可以具有单个环(例如苯基)或多个缩合(稠合)环,其中至少一个环是芳族的(例如萘基、二氢菲基、茛基或蒽基)。典型的芳基包括但不限于衍生自苯、萘、蒽、联苯等的自由基。芳基可以未取代的或任选地被下述取代基取代。

[0079] 术语“杂芳基”是指含有一个、两个或三个芳环并且在芳环中含有至少一个氮、氧或硫原子的单环、双环或三环系统。杂芳基可以未取代或被取代,例如,如“被取代”的定义中所述,具有一个或多个,特别是一到三个取代基。除了一个或多个杂原子之外,典型的杂芳基在环骨架中还含有2-20个碳原子,其中环骨架包括一个5元环、一个6元环、两个5元环、两个6元环或一个与6元环稠合的5元环。杂芳基的示例包括但不限于2H-吡咯基、3H-吡咯基、4H-喹啉基、吡啶基、苯并噻唑基、苯并噻唑基、 β -咔啉基、咔唑基、色烯基、香草醛基、二苯并[b,d]呋喃基、呋喃氮基、呋喃基、咪唑基、亚胺二唑基、吡啶基、吡啶基、吡啶基、异苯并呋喃基、异吡啶基、异喹啉基、异噻唑基、异恶唑基、萘啶基、恶唑基、哌啶基(perimidinyl)、菲啶基、菲咯啉基、吩吡嗪基(phenarsazinyl)、吩嗪基(phenazinyl)、吩噻嗪基(phenothiazinyl)、吩恶噻基(phenoxathiinyl)、吩噁嗪基(phenoxazinyl)、酞嗪基、蝶啶基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、喹啉基、噻二唑基、噻蒽基(thianthrenyl)、噻唑基、噻吩基、三唑基、四唑基和吨基。在一个实施方案中,术语“杂芳基”表示含有五个或六个含碳环原子和1、2、3或4个独立选自

非过氧化物氧、硫和N(Z)的杂原子的单环芳族环,其中Z不存在或是H、O、烷基、芳基或(C1-C6)烷基芳基。在一些实施方案中,杂芳基表示由其衍生的约八至十个环原子的邻位稠合双环杂环,特别是苯衍生物或通过将丙烯基、三亚甲基或四亚甲基二基与其稠合而衍生的衍生物。

[0080] 如本文所用,术语“取代”或“取代基”旨在表示使用“取代”(或“取代基”)的表达式中所示基团上的一个或多个(例如,在各种实施方案中,1-10;在其他实施方案中,1-6;在一些实施方案中,1、2、3、4或5;在某些实施方案中,1、2或3;以及在其他实施方案中,1或2)氢被替换为以下选择所示基团或本领域技术人员已知的合适基团,前提是不超过所示原子的正常化合价,并且取代产生稳定的化合物。合适的指示基团(取代基)包括例如烷基、烯基、炔基、烷氧基、卤代烷基、羟烷基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、烷酰基、烷氧羰基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、羧烷基、烷基硫基、烷基亚磺酰基和烷基磺酰基。所示基团的取代基可以是本文所述取代基的特定列表中所述的取代基,或者如本领域技术人员所认识到的,可以是选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、卤代基、卤代烷基、羟基、羟烷基、芳基、杂芳基、杂环、环烷基、烷酰基、烷氧基羰基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三氟甲基硫代、二氟甲基、酰基氨基、硝基、三氟甲基、三氟甲氧基、羧基、羧基烷基、酮基、硫氧基、烷基硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基和氰基的取代基。所示基团的合适取代基可以键合到取代的碳原子上,包括F、Cl、Br、I、OR'、OC(O)N(R')₂、CN、CF₃、OCF₃、R'、O、S、C(O)、S(O)、亚甲二氧基、亚乙基二氧基、N(R')₂、SR'、SOR'、SO₂R'、SO₂N(R')₂、SO₃R'、C(O)R'、C(O)C(O)R'、C(O)CH₂C(O)R'、C(S)R'、C(O)OR'、OC(O)R'、C(O)N(R')₂、OC(O)N(R')₂、C(S)N(R')₂、(CH₂)₀₋₂NHC(O)R'、N(R')N(R')C(O)R'、N(R')N(R')C(O)OR'、N(R')N(R')CON(R')₂、N(R')SO₂R'、N(R')SO₂N(R')₂、N(R')C(O)OR'、N(R')C(O)R'、N(R')C(S)R'、N(R')C(O)N(R')₂、N(R')C(S)N(R')₂、N(COR')COR'、N(OR')R'、C(=NH)N(R')₂、C(O)N(OR')R'、或C(=NOR')R,其中R'可以是氢或碳基部分(例如(C₁-C₆)烷基),其中碳基部分本身可以进一步取代。当取代基是单价的时,例如F或Cl,其被单键取代的原子键合。当取代基是二价时,例如O,其被双键取代的原子键合;例如,被O取代的碳原子形成羰基,C=O。

[0081] 本文使用的立体化学定义和惯例通常遵循S.P.Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York和Wilens, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。本发明的化合物可以含有不对称或手性中心,因此以不同的立体异构形式存在。本发明化合物的所有立体异构体形式,包括但不限于非对映体、对映体和阿托异构体,以及其的混合物,例如外消旋混合物,其构成本发明的一部分。许多有机化合物以旋光形式存在,即它们具有旋转平面偏振光平面的能力。在描述旋光性化合物时,前缀D和L或R和S用于表示分子围绕其手性中心的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用于表示化合物对平面偏振光的旋转符号,其中(-)或l表示化合物是左旋的。以(+)或d为前缀的化合物是右旋的。对于给定的化学结构,这些立体异构体是相同的,只是它们是彼此的镜像。特定的立体异构体也可以称为对映体,这种异构体的混合物通常称为对映体混合物。对映体的50:50混合物被称为外消旋混合物或外消旋体(定义如下),其可能发生在化学反应或过程中没有立体选择性或立体特异性的情况下。

[0082] 术语“外消旋混合物”和“外消旋体”是指两种对映体物质的等摩尔混合物,没有旋

光性。

[0083] 本文使用的术语“对映体富集的”(“ee”)是指具有一种对映体比另一种对映体更大程度存在的混合物。因此,提供一种对映体比另一种对映体更大程度存在的反应将是“对映选择性”(或表现出“对映选择性”)。在本发明的一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约2%ee的混合物;在本发明的另一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约5%ee的混合物;在本发明的另一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约20%的混合物;在本发明的另一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约50%的混合物;在本发明的另一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约80%的混合物;在本发明的另一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约90%的混合物;在本发明的另一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约95%的混合物;在本发明的另一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约98%的混合物;在本发明的另一个实施方案中,术语“对映体富集的”是指具有至少约99%的混合物。术语“对映体富集的”包括对映体纯混合物,其是基本上不含相反旋光性物质的混合物,或者对映体的含量非常低,例如0.01%,0.001%或0.0001%。

[0084] 术语“IC₅₀”通常定义为在24小时内杀死50%细胞所需的浓度。

[0085] 名称“ErS0-DFP”是指化合物(R)-3-(4,4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮。

[0086] 本发明的实施方案

[0087] 在本文所述的每个式中,当式I或式II的可变元素被任选取代时,其可以被一个或多个取代基取代,例如本文取代基定义中描述的一个或多个取代基。任选被一个或多个取代基取代的烷基可以是例如被1-6个取代基、1-5个取代基、1-4个取代基、1-3个取代基、1个或2个取代基或1个取代基取代的烷基。任选被一个或多个取代基取代的烷基包括例如卤代基取代的烷基,例如CF₃、CHF₂、CH₂F、CH₂CF₃、CF₂CH₃或CF₂CF₃。

[0088] 在一些实施方案中,式I化合物是(S)-对映体。在其他实施方案中,式I化合物是(R)-对映体。类似地,在一些实施方案中,式II化合物是(S)-对映体,在其他实施方案中,式II化合物是(R)-对映体。如果式I或式II上的取代基产生具有一个以上立体中心的化合物,则本段中描述的(R)和(S)名称是指与ErS0-DFP中发现的立体中心相对应的化合物的立体中心的位置。

[0089] 在一些实施方案中,所述化合物是(R)-3-(4,4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮。在一些实施方案中,所述化合物是(S)-3-(4,4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮。在一些实施方案中,所述化合物是3-(4-羟基苯基)-3-(哌啶-1-基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(4,4-二氟-3-甲基哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(4-羟基苯基)-3-吗啉-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(氮杂环丙烷-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(4-羟基苯基)-3-(哌嗪-1-基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(4-羟基苯基)-3-(4-羟基哌啶-1-基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(4-羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)哌啶-1-基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(4-氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(3,3-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮;3-(3,3-二氟氮杂环丁烷-1-

基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮;或3-(4-羟基苯基)-3-(3,3,4,4-四氟吡咯烷-1-基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮。

[0090] 在其他实施方案中,所述化合物是(R)-3-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮或(R)-3-(4-羟基苯基)-3-(3,3,4,4-四氟吡咯烷-1-基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮。

[0091] 式I和式II化合物可通过内质网中UPR的过度活化来杀死癌细胞或抑制癌细胞的生长。癌细胞或由此产生的肿瘤可能是ER α 阳性。在某些实施方案中,化合物具有细胞毒性。在各种实施方案中,癌细胞是乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、子宫内膜癌细胞或本领域已知的其他EP阳性癌症。

[0092] 所述化合物可以通过口服、注射、皮下、舌下、直肠、输注、静脉内或通过本领域技术人员已知的其他方法施用。

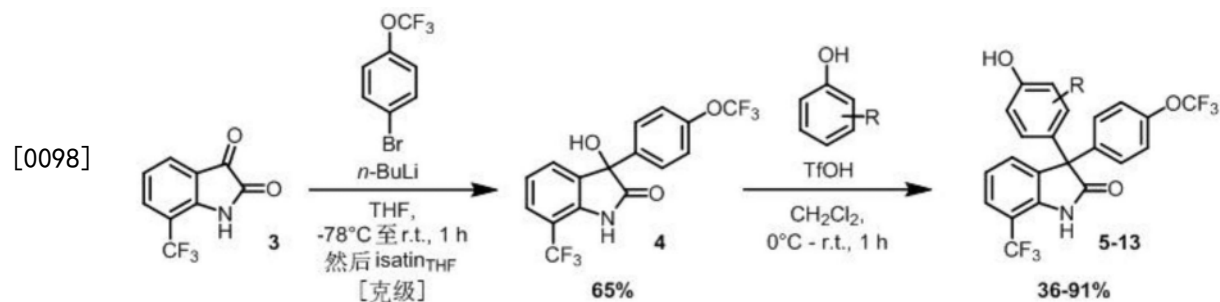
[0093] 结果

[0094] ErS0作为先导的评估显示,亲脂性是主要的可优化参数。ErS0被认为具有很强的亲脂性,clogD_{7.4}为6.44。虽然亲脂性可导致靶标结合的熵和焓增加,但疏水性太强的分子通常具有较差的“药物类”特性(例如高清除率、对非靶的抑制、口服生物利用度差以及抑制关键安全离子通道(如hERG)的倾向)。亲脂性被设想为通过系统改变ErS0(图1)的A/B环来调节的成熟的参数。因此,cLogD_{7.4}、细胞效力和选择性(即对ER α +和ER α -癌细胞的不同作用)以及亲脂性效率(LipE)优先用于鉴定有前景的衍生物。具体而言,根据多种药物开发活动,我们假设通过体内耐受性和疗效评估,具有较低clogD_{7.4}和较高LipE的化合物将是更好的化合物。

[0095] 酚类药效团(A环扰动)的探索

[0096] 关于3-(4-羟基苯基)吲哚啉-2-酮作为抗癌药效团有多篇报道。一致的观察结果表明,至少有一种酚对抗癌活性是必要的。虽然酚环上带有取代基的衍生物不太可能提供亲脂性的重大变化,但改变酚的电子结构可以提供抗癌活性最佳pKa的线索,而pKa发生重大变化的酚可能会改变体内代谢(例如葡萄糖醛酸化率)。为了探索ErS0苯酚的构效关系(SAR),评估了对酚环进行修饰的多种衍生物。利用简便且模块化的合成路线来构建这些衍生物,通过将锂化的B环添加到的7-三氟吡啶红(3)上形成叔醇4,然后通过Friedel-Craft型反应引入改变,得到化合物5-13(方案1)。

[0097] 方案1:酚衍生物的模块化合成。n-BuLi:正丁基锂,TfOH:三氟乙酸,isatin_{THF}:溶于四氢呋喃中的7-三氟甲基吡啶红(3),THF:四氢呋喃。



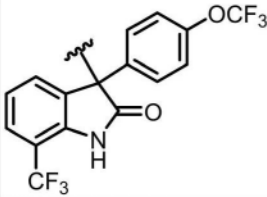
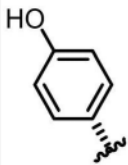
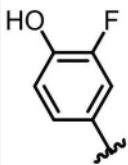
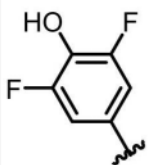
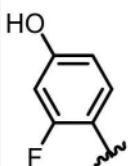
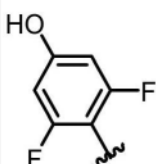
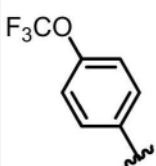
[0099] 表1显示了通过该过程合成的衍生物、酚类OH的预测pKa和对MCF-7癌细胞(ER α +乳腺癌细胞系)的抗癌活性。值得注意的是,在分析本文的生物学数据时,我们和其他

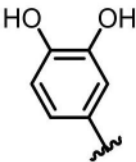
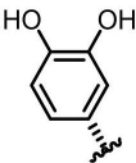
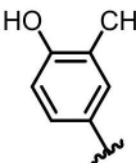
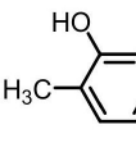
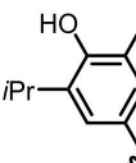
(Sci.Transl.Med., 2021, 13, 603)发现,对于这类化合物,只有一种对映体(通常是(R)-对映体)具有抗癌活性;因此,假设外消旋化合物具有其对映体纯对应物的一半效力。有趣的是,环上不同位置的氟取代(例如化合物5-8)提供了预测苯酚pKa值范围为7.50-8.39的化合物;通常,这种取代相对耐受,邻氟衍生物(5)是最活跃的。化合物6的活性丧失,其中苯酚在生理pH下主要被去质子化。观察到三氟甲基苯甲醚9缺乏活性,这有力地表明酚的不变性。酚邻位羟基化的化合物可以保持效力,化合物10及其单一对映体(ErS0-OH, (S)-10)所示;ErS0-OH是在ErS0的体外代谢产物评估过程中发现的次要代谢物(尽管仅在丰度小于1%时发现)。相反,在苯酚环上具有o-烷基化的化合物11-13是无活性的。总之,即使酚环的微小变化也会导致活性的严重损失。

[0100] 鉴于重点是显著改变ErS0的亲脂性,因此围绕酚的改变是无效的,唯一的例外是儿茶酚ErS0-OH,其cLogD_{7.4}(6.13)有所降低,并保持效力。ErS0-OH的初始体内耐受性评估证明了一个概念验证,即clogD_{7.4}的降低可能导致小鼠的静脉内耐受性更强,但是没有观察大鼠对所述化合物的耐受性的提高。值得注意的是,据报道,开发儿茶酚作为药物存在挑战,伴随着氧化倾向、邻醌形成和随后的混杂反应性。

[0101] 表1:A环衍生物的参数和细胞效力总结

[0102]

化合物		苯酚的 pKa ^{a,b}	cLogD _{7.4} ^a	IC ₅₀ (nM) ^c
ErSO (1)		9.48	6.44	20 _(± 2)
5		8.39	6.54	33 _(± 1)
6		7.50	6.48	> 1000
7		8.51	6.55	177 _(± 25)
8		7.56	6.50	549 _(± 18)
9		-	8.18	> 1000

[0103]	10		9.23, 12.44	6.13	49 _(± 9)
	ErSO-OH ((S)-10)		9.23, 12.44	6.13	24 _(± 4)
	11		9.84	6.96	> 1000
	12		10.19	7.47	> 1000
	13		10.44	8.93	> 1000

[0104] ^a:使用ChemAxon MarvinSketch计算pKa和cLogD_{7.4}。^b:据报道,pKa用于环A酸性质子。^c:为了确定IC₅₀,将MCF-7细胞与化合物孵育24小时,并通过阿尔玛蓝荧光测定活力。用Raptinal (100μM) 作为100%死亡对照。数据显示为平均值±标准差;n≥2个独立重复。iPr:异丙基。

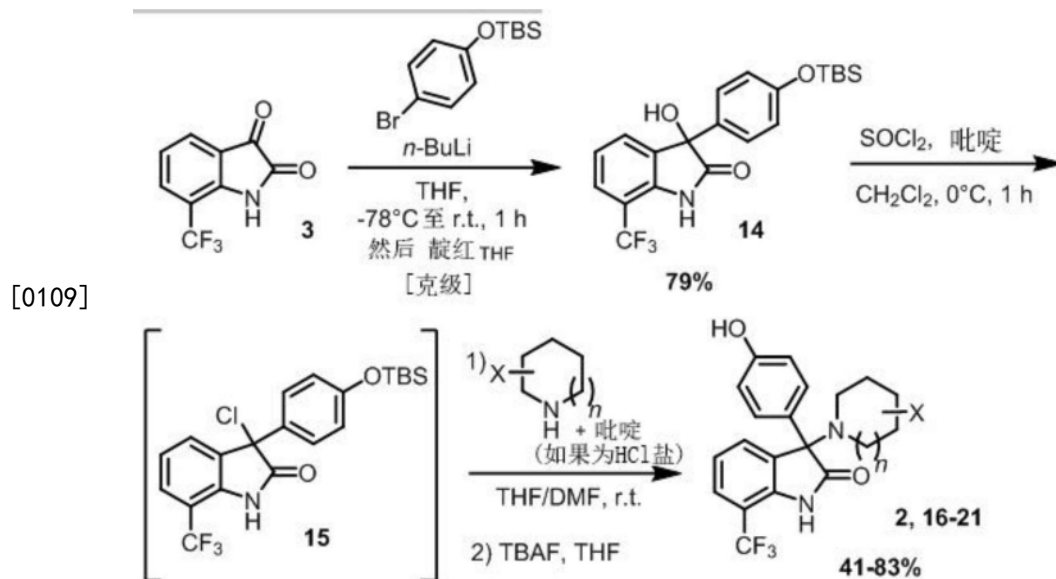
[0105] 探索B环,发现含胺物质

[0106] 虽然其他3-(4-羟基苯基)吡啶-2-酮已经改变了B环并在细胞培养和体内维持了有效的抗癌活性,但除了简单的未取代环烷烃(即环戊基、环己基、环庚基)之外,几乎没有探索。这个位置缺乏多样性可能是由于难以以非对映选择性和模块化方式合成此类的取代化合物。我们设想,这种具有极性功能的环的改变可能会导致具有亲脂性可调变化的生物活性衍生物。努力集中于引入含氮杂环,这将降低整体亲脂性;这种化合物在3-(4-羟基苯基)吡啶-2-酮支架上是前所未有的。

[0107] 这些含氮化合物的合成(方案2)以类似于用于获得环A衍生物的途径的方式进行,从7-三氟萘红(3)与原位产生的芳基有机锂的亲核攻击开始形成叔醇14。由于方案1中的Friedel-Crafts路线不适用于这些新的目标化合物,为了引入胺亲核体,产生不稳定的叔氯化物15,然后与适当的含氮杂环反应,TBS脱保护(方案2)提供了最终化合物2和16-21(表2)。

[0108] 方案2:B环衍生物的模块化合成。n-BuLi:正丁基锂,TBS:叔丁基二甲基硅烷基,

SOCl_2 : 亚硫酰氯, TBAF: 四丁基氟化铵, THF: 四氢呋喃, DMF: 二甲基甲酰胺。



[0110] 表2总结了来这些新型含氮化合物的活性。值得注意的是, $\text{cLogD}_{7.4}$ 值 (范围从 2.61-4.85) 明显低于其双芳基对应物。对培养的MCF-7细胞的评估显示, 令人惊讶的是, 4, 4-二氟取代的哌啶2和17保持了有效的抗癌活性, 与缺乏4, 4-二氟化的化合物16形成鲜明对比。化合物17是非对映体及其相应对映体 (总共4种化合物) 的混合物, 表明从4, 4-二氟哌啶的3-位分支的化合物可能保持效力。有趣的是, 似乎只有一种是具有活性的, 其 IC_{50} 与2相比加倍。在这组 (18-21) 中测试的所有其他化合物都缺乏有效的活性。

[0111] 表2: B环衍生物的参数和细胞效力总结

[0112]

化合物		$\text{cLogD}_{7.4}^a$	IC_{50} (nM) ^b
2		4.37	35($\pm$ 3)
16		4.14	> 1000

[0113]

17 ^c		4.74	70(± 14)
18		3.08	> 1000
19		4.57	> 1000
20		2.61	> 1000
21		4.85	135(± 5)

[0114] ^a:使用ChemAxon MarvinSketch计算cLogD_{7.4}。^b:为了确定IC₅₀,将MCF-7细胞与化合物孵育24小时,并通过阿尔玛蓝荧光测定活力。用Raptinal (100μM) 作为100%死亡对照。数据显示为平均值±标准差;n≥2个独立重复。^c:非对映体及其相应对映体的混合物,共4种化合物。

[0115] ErSO-DFP是一种有力的ERα依赖性抗癌化合物

[0116] 化合物2显示出相对于ErSO的亲脂性显著降低(cLogD_{7.4}分别为4.37和6.44),同时保持对MCF-7细胞的活性,值得深入评估。通过制备型手性色谱分离2的对映体,并通过X射线晶体学确定其绝对构型(图示2)。根据先前的观察,(R)-对映体((R)-2,创造的ErSO-DFP)是活性化学物质,大约是外消旋化合物的两倍;相反的对映体(S)-2对MCF-7细胞没有任何活性(图2B)。LipE可以是一个强大的参数,可以在药物开发活动中方便地跟踪效力和亲脂性。与ErSO相比,ErSO-DFP的LipE增加了2.5倍以上,这种转变是等势的,是ErSO-DFP亲脂性降低的直接结果(图2C)。

[0117] 图示2:ErSO-DFP是相对于其祖化合物ErSO具有优异LipE的活性抗癌剂。X射线晶体学证实了ErSO-DFP和(S)-2的化学结构。通过ChemAxon MarvinSketch计算的ErSO-DFP的物理化学参数。

[0118]

(S)-2	ErSO-DFP (R)-2	ErSO-DFP	
		M.W.	412.1
		pIC ₅₀	7.77
		cLogD _{7.4}	4.37

[0119]

		LipE	3.40
		TPSA	52.6
		clogBB	0.03
		CNS MPO	3.44

[0120] 与ErSO类似,ErSO-DFP对其他ER α +乳腺癌细胞系具有有效的活性,包括T47D细胞系及其治疗抗性ER α 突变型,T47D-ER α Y537S (TYS) 和T47D-ER α D538G (TDG) (表3)。最关键的是,对这些化合物针对ER α 细胞系的评估表明,与ErSO相比,ErSO-DFP具有明显更低的ER α 非依赖性活性;这种效应如表3所示,并且在图3中的剂量-反应曲线中最明显。虽然ErSO在多个ER α 阴性细胞系中具有ER α 依赖性杀伤的时间依赖性下降,最明显的是HCT-116和HT-29,但ErSO-DFP在这些细胞系中在24和72小时时无活性 ($IC_{50} > 25 \mu M$),在大多数情况下, IC_{50} 曲线底部接近0%的细胞死亡(图3)。例如,对于HCT-116细胞,ErSO的 IC_{50} 从11 μM 变为0.26 μM ,效力降至38%。相比之下,ErSO-DFP在24小时和72小时的 IC_{50} 均为55 μM ,在较低浓度的化合物中,效力接近0%。对于ErSO-DFP,在ER α +和ER α -癌细胞系之间观察到的 IC_{50} 值(在24小时和72小时测量)之间的平均差异>2750倍,相对于ErSO的555倍差异,细胞培养中选择性细胞杀伤的治疗窗期显著更宽。

[0121] 表3:ErSO和ErSO-DFP的细胞效力总结

[0122]

			ErSO	ErSO-DFP	
			cLogD _{7.4} ^a	6.44	4.37
ERα阳性	MCF-7	IC ₅₀ 24 hr (μM)	0.020±0.002	0.017±0.002	
		IC ₅₀ 72 hr (μM)	0.014±0.001	0.017±0.001	
		LipE (24hr)	1.24	3.40	
	T47D	IC ₅₀ 24 hr (μM)	0.020±0.001	0.016±0.002	
	TYS	IC ₅₀ 24 hr (μM)	0.010±0.001	0.007±0.001	
	TDG	IC ₅₀ 24 hr (μM)	0.015±0.001	0.009±0.001	

[0123]	ER α 阴性	MDA-MB-231	IC ₅₀ 24 hr (μ M)	23 $\pm$ 3	55 $\pm$ 5
			IC ₅₀ 72 hr (μ M)	8 $\pm$ 1	32 $\pm$ 4
			倍数变化 ^b	571	1882
		MDA-MB-436	IC ₅₀ 24 hr (μ M)	22 $\pm$ 1	64 $\pm$ 3
			IC ₅₀ 72 hr (μ M)	14 $\pm$ 1	55 $\pm$ 9
			倍数变化 ^b	1000	3235
		HCT-116	IC ₅₀ 24 hr (μ M)	11 $\pm$ 3	55 $\pm$ 6
			IC ₅₀ 72 hr (μ M)	0.26 $\pm$ 0.03	55 $\pm$ 11
			倍数变化 ^b	19	3235
		HT-29	IC ₅₀ 24 hr (μ M)	0.21 $\pm$ 0.06	33 $\pm$ 4
			IC ₅₀ 72 hr (μ M)	0.25 $\pm$ 0.07	27 $\pm$ 4
			倍数变化 ^b	18	1588

[0124] 为了测定IC₅₀,将癌细胞与化合物孵育24或72小时,并通过阿拉玛蓝荧光测量活力。用Raptinal (100 μ M) 作为100%死亡对照。数据显示为平均值 $\pm$ 标准差;n $\geq$ 3个独立重复。^a:使用ChemAxon MarvinSketch计算cLogD_{7.4}。^b:MCF-7和ER α 阴性细胞系的24/72小时IC₅₀值之间的平均倍数变化。

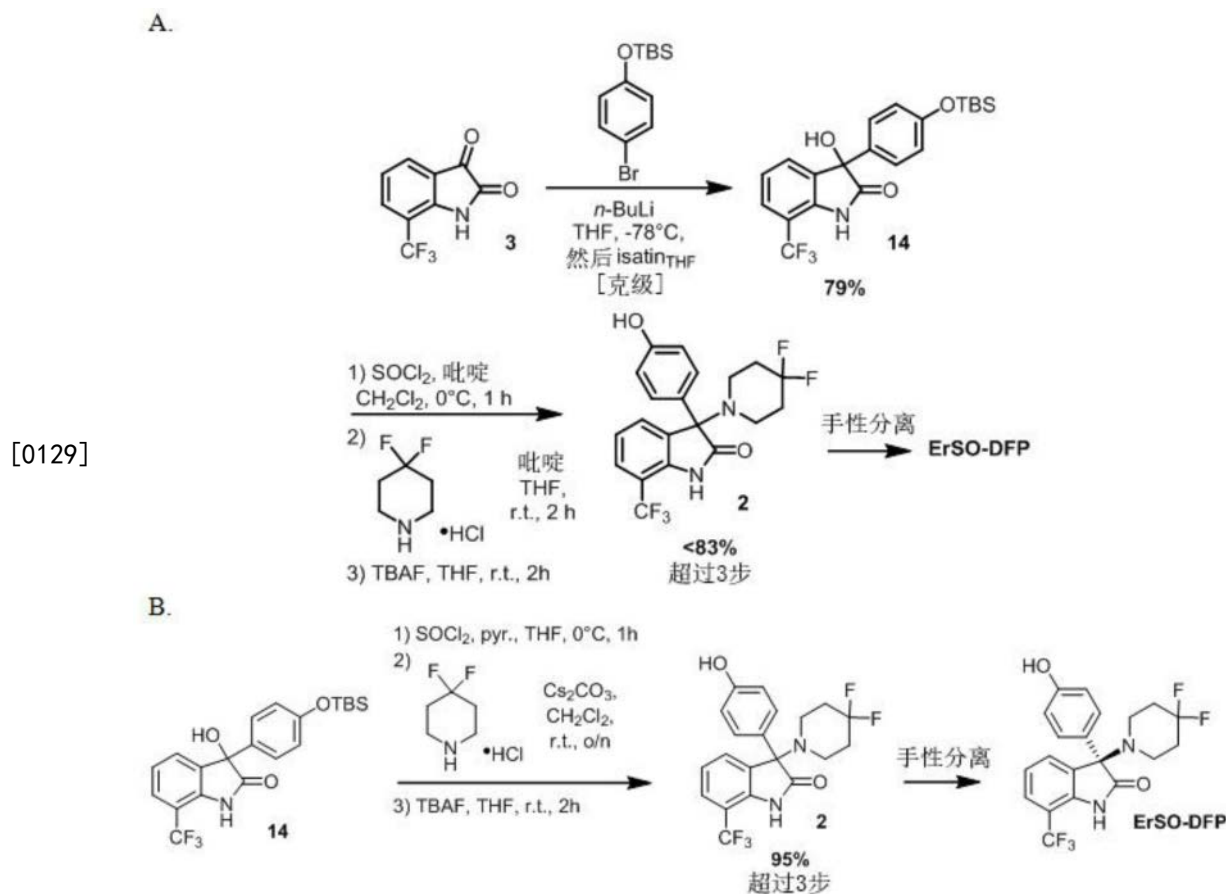
[0125] ErS0-DFP以类似于ErS0的方式激活预期的未折叠蛋白反应(a-UPR)。为了评估ErS0-DFP的抗癌活性是否通过类似于ErS0的机制诱导,对与a-UPR激活一致的关键蛋白(P-AMPK和P-EIF2 α 的出现,ATF6 α_{p90} 的裂解)进行了蛋白质印迹分析。在这些使用MCF-7细胞的实验中,ErS0-DFP以类似于ErS0的时间和浓度依赖性方式激活a-UPR(图4)。无活性对映体化合物(S)-2未见a-UPR活化。

[0126] ErS0-DFP的优化合成

[0127] 为了便于进一步研究,开发了一种专门针对ErS0-DFP稳健且可扩展的合成路线,

该路线对方案2中的一般路线进行了重要修改,并在方案3A中专门针对ErSO-DFP进行了显示。方案3A中的路线产生可用量的材料;然而,放大后观察到不一致的产率。从利用杂原子亲核试剂合成3,3-二取代羟吲哚啉的其他工作中得到启发,我们发现使用THF作为溶剂(步骤1,方案3B)产生了更清洁的叔氯中间体。在二氯甲烷中用过量的碳酸铯,搅拌过夜,然后进行TBAF脱保护,转变为更碱性的反应,是合成化合物2的高效途径,在3个步骤中以95%的产率产生(方案3B)。这些优化的条件似乎是通用的,并且对于除2之外的其他衍生物的合成是优选的(参见方法)。

[0128] 方案3:ErSO-DFP的优化合成。方法之间的主要变化以蓝色突出显示。*n*-BuLi:正丁基锂, isatin_{THF}:溶于THF中的7-三氟甲基靛红, SOCl₂:亚硫酰氯, TBS:叔丁基二甲基硅烷基, pyr.:吡啶, chiral separation(手性分离):方法中有充分描述。



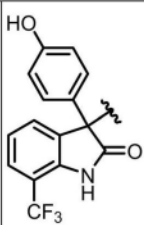
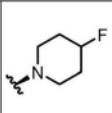
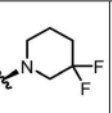
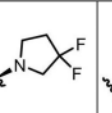
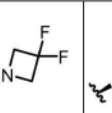
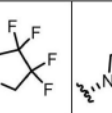
[0130] 其他含氟衍生物的构建和评估

[0131] 为了研究二氟哌啶药效团对ErSO-DFP活性的意外重要性,合成了一系列含有多种氟化杂环(哌啶、吡咯烷、氮杂环丁烷)的衍生物,化合物的cLogD_{7.4}范围为3.50-4.53(表4)。分离单个对映体,并针对ERα+乳腺癌细胞系MCF-7和三种ERα-癌细胞系MDA-MB-231、HCT-116和HT-29评估对映体纯化合物(R)-22-26。如表4所示,化合物(R)-22显著缺乏对MCF-7细胞的有效活性,表明二氟化对ErSO-DFP的抗癌功效的重要性。如(R)-23所示,相对于ErSO-DFP,将该哌啶二氟化移至3位(3,3-二氟哌啶)会微妙地降低活性。6-元二氟哌啶收缩为5-元3,3-二氟吡咯烷是可耐受的,产生有效的衍生物(R)-24。化合物(R)-25的IC₅₀增加证明,对4-元3,3-二氟氮杂环丁烷的进一步收缩耐受性不佳。

[0132] 四氟吡咯烷衍生物(R)-26是最有效的化合物,IC₅₀值为4-5nM。相反的对映体化合

物(S)-26对MCF-7细胞无活性,再次证明该化合物类中只有一种对映体具有抗癌活性。进一步评估了有效衍生物((R)-23、(R)-24、(R)-276)对ER α 癌细胞系MDA-MB-231、HCT-116和HT-29的活性。与ErS0-DFP数据一致,化合物(R)-23、(R)-24和(R)-26在化合物孵育24小时和72小时下对这些细胞系具有两位数的微摩尔效力。化合物(R)-26具有最大的倍数变化(≥ 3500),并且代表了最有效的含氟氮杂环衍生物。该组中的所有化合物(ErS0-DFP, (R)-23, (R)-24和(R)-26)在极性和纳摩尔效力增加的驱动下,在LipE中具有显著的增益。

[0133] 表4:化合物22-26的生物活性总结

			 (R)-22	 (R)-23	 (R)-24	 (R)-25	 (R)-26	 (S)-26
		cLogD _{7.4} ^a	3.50	4.18	4.10	3.83	4.53	4.53
ER α 阳性	MCF-7	IC ₅₀ 24 hr (μ M)	> 1	0.039 $\pm$ 0.01	0.017 $\pm$ 0.001	—	0.005 $\pm$ 0.001	> 1
		IC ₅₀ 72 hr (μ M)	0.147 $\pm$ 0.025	0.033 $\pm$ 0.001	0.022 $\pm$ 0.001	0.117 $\pm$ 0.003	0.004 $\pm$ 0.001	> 1 ^c
		LipE (24hr)	—	3.23	3.67	—	3.77	—
ER α 阴性	MDA-MB-231	IC ₅₀ 24 hr (μ M)	—	49 $\pm$ 4	51 $\pm$ 5	—	22 $\pm$ 2	—
		IC ₅₀ 72 hr (μ M)	—	22 $\pm$ 1	32 $\pm$ 3	—	14 $\pm$ 1	—

[0136]		倍数变化 ^b	—	667	1455	—	3500	—
	HCT-116	IC ₅₀ 24 hr (μ M)	—	38 $\pm$ 4	45 $\pm$ 5	—	24 $\pm$ 2	—
		IC ₅₀ 72 hr (μ M)	—	21 $\pm$ 4	20 $\pm$ 6	—	15 $\pm$ 3	—
		倍数变化 ^b	—	636	909	—	3750	—
	HT-29	IC ₅₀ 24 hr (μ M)	—	29 $\pm$ 1	35 $\pm$ 6	—	25 $\pm$ 1	—
		IC ₅₀ 72 hr (μ M)	—	25 $\pm$ 3	30 $\pm$ 5	—	15 $\pm$ 2	—
		倍数变化 ^b	—	758	1364	—	3750	—

[0136] 为了测定IC₅₀,将癌细胞与化合物孵育24或72小时,并通过阿拉玛蓝荧光测量活力。用Raptinal (100 μ M) 作为100%死亡对照。数据显示为平均值 $\pm$ 标准差;n $\geq$ 3个独立重复。^a:使用ChemAxon MarvinSketch计算cLogD_{7.4}。^b:MCF-7和ER α 阴性细胞系的24/72小时IC₅₀值之间的平均倍数变化。^c:n=2个独立的重复。n.d.:未测定。

[0137] ErSO-DFP在小鼠和大鼠中耐受性良好

[0138] 由于其在培养物中对ER α 细胞缺乏活性(所有ER α 细胞系和时间点的IC₅₀>25 μ M),且其起始材料(即4,4-二氟吡啶盐酸盐)易于从市场购买,因此进一步研究了ErSO-DFP的体内特征。相对于ErSO,ErSO-DFP在亲水性和LipE方面具有显著变化(图1,图2C)。研究了ErSO-DFP在小鼠中的药代动力学(PK)曲线以及小鼠和大鼠的耐受性。PK评估显示,尽管ErSO-DFP在小鼠中的口服利用度较差(F%:6%),但ErSO-DFP(静脉注射)达到了生物学相关浓度(图5B)。这种低F%可能是ErSO-DFP的酸稳定性有限的结果。在模拟胃液(SGF)稳定性测定(图5C,表5)中,ErSO-DFP和化合物(R)-23,(R)-24,(R)-26在SGF中的稳定性有限,半衰期为10-77分钟。这与观察到的ErSO(图5C,表5)半衰期>2小时相反,与小鼠中ErSO的%F的47%的一致。ErSO-DFP的酸不稳定性可能是酸促进消除的结果,这种反应性在Friedel-Craft型反应中用于构建3,3-联芳基衍生物(方案1)。为了验证这一假设,将化合物2置于三氟甲磺酸和苯酚亲核试剂中。事实上,Friedel-Craft反应产物27以20%的产率分离(图示3),尽管与化合物3反应(方案1)相比,反应时间较长,质量平衡回收率低。这些数据提供了初步证据,表明酸促进的消除可能是ErSO-DFP及其衍生物(R)-23,(R)-24,(R)-26的酸稳定性差的原因,

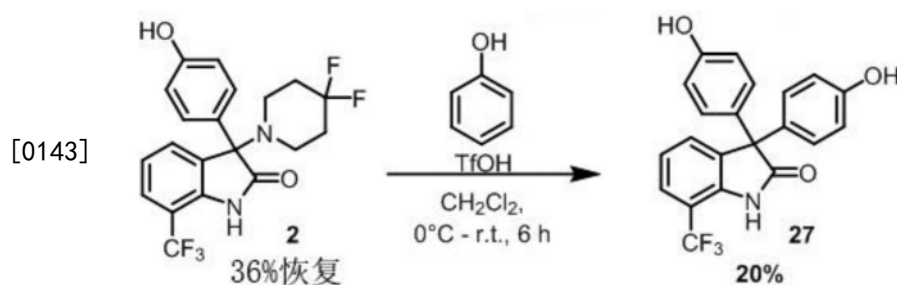
并影响其口服生物利用度。

[0139] 表5:模拟胃液 (SGF) 稳定性测定结果

化合物	$t_{1/2}$ (分钟) (95% CI)	120 分钟后剩余的 百分比 (SD)
红霉素	28 ₍₂₃₋₃₄₎	1 $\pm$ 1
ErSO	> 120	93 $\pm$ 1
ErSO-DFP	56 ₍₄₃₋₇₃₎	13 $\pm$ 1
(R)-23	10 ₍₈₋₁₁₎	0 $\pm$ 0
(R)-24	62 ₍₅₃₋₇₄₎	20 $\pm$ 1
(R)-26	77 ₍₆₆₋₉₁₎	27 $\pm$ 1

[0141] 将目标化合物 (100 μ M) 与胃蛋白酶在SGF中孵育指定的时间,并通过LC-MS/MS测量化合物浓度。然后将浓度归一化为t=0样品,计算并绘制剩余百分比。使用GraphPad PRISM使用单相衰减方程 ($Y_0=100$, 稳定水平=0, $K>0$) 计算半衰期 ($t_{1/2}$) 和曲线。红霉素是一种已知的酸敏感性阳性对照。95%CI:95%置信区间,SD:标准差。显示的数据代表N=2。

[0142] 图示3:化合物2与三氟甲磺酸和苯酚的反应总结。



[0144] 尽管口服生物利用度较差,但在小鼠中进行的一项直接PK实验(静脉注射)表明,ErSO-DFP_{max}约为ErSO浓度的两倍,AUC约为ErSO值的60%(表6,图7)。ErSO-DFP的清除速度比ErSO更快,清除值更高,计算的平均停留时间更低(表6,图7)。有了这些PK数据,确定了ErSO和ErSO-DFP的最大耐受剂量(MTD)。在小鼠和大鼠中,ErSO-DFP的耐受性均优于ErSO,静脉注射时耐受性增加近5倍;在这些实验中,静脉注射ErSO-DFP的MTD在小鼠中为95mg/kg,在大鼠中为>50mg/kg(表7)。鉴于类似的PK参数(表6),观察到的相对于ErSO的ErSO-DFP耐受性的改善似乎不是由于化合物暴露的差异。

[0145] 表6:ErSO和ErSO-DFP药代动力学总结。I.V.剂量为20mg/kg。

[0146]	因素	ErS0	ErS0-DFP	ErS0-DFP:ErS0
	C _{max} (ng/mL)	7712	14656	1.9
	AUC (h*ng/mL)	10127	6374	0.6
	MRT (h)	5.1	0.88	0.2
	CL (mL/min/kg)	33	52	1.6
	V _{ss} (mL/kg)	10161	2754	0.3

[0147] 相对于ErS0,ErS0-DFP具有不同的预测脑渗透率,cLogBB分别为0.03和0.25,CNS MP0评分分别为3.44至2.83。通过在小鼠中静脉注射10mg/kg,通过实验测量了ErS0-DFP的脑与血清比率。与预测差异的cLogBB预测和CNS MP0评分相反,ErS0-DFP维持与ErS0相似的血脑分配比(图6B),表明ErS0-DFP耐受性的增加不是BBB渗透性差的结果。总之,这些数据表明,当静脉注射时,ErS0-DFP在体内达到显著的治疗相关浓度,并且比ErS0具有更好的耐受性。

[0148] 表7:ErS0-DFP和ErS0的最大耐受剂量(MTD)实验总结

	生物体	小鼠				大鼠	
	施用	P.O.		I.V.		I.V.	I.V.
[0149]	化合物	ErSO	ErSO-DFP	ErSO	ErSO-DFP	ErSO	ErSO-DFP
	MTD (mg/kg)	> 150 ^a	>200	20	95	10-15	> 50
[0150]	倍数增加至 ErSO	--		4.8		3.3-5	

[0151] MTD测定为 $n \geq 2$,单剂量。^a:由Boudreau,M.W.等人.Sci.Transl.Med.2021,13,eabf1383报道。

[0152] ErS0-DFP在ER α 阳性乳腺癌小鼠模型中维持ErS0类活性

[0153] ErS0治疗对ER α +乳腺肿瘤的显著抗肿瘤作用表明其在选择性抗癌治疗中的潜力;在使用常规选择性雌激素受体降解剂/下调剂(SERD)和选择性雌激素受体调节剂(SERM)的小鼠肿瘤模型中,未见这种快速而显著的肿瘤消退。为了评估ErS0-DFP的抗肿瘤作用,将患有大(治疗前平均大小>300mm³)MCF-7肿瘤的小鼠每周一次用ErS0或ErS0-DFP治疗三次总剂量(静脉注射5mg/kg)。ErS0-DFP治疗导致MCF-7肿瘤的深度消退,与ErS0治疗小鼠的结果一致(图7A)。治疗耐受性良好,在整个研究中未观察到明显的体重变化(图7B)。使用该初始疗效数据结合头对头MTD研究(表7),很明显ErS0-DFP的治疗指数(TI)大于ErS0,可能增加约5倍或更多。为了完全建立TI值,需要使用ErS0-DFP进行进一步的剂量发现实验。

[0154] 讨论

[0155] 虽然内分泌治疗大大提高了ER α +乳腺癌患者的五年生存率,但仍然迫切需要治疗耐药性晚期ER α +乳腺癌。有许多寻求解决这一需求的新疗法的例子,包括新的下一代SERD和靶向ER α 的蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)。然而,这些内分泌疗法利用已知的抑制机制诱

导癌细胞的细胞抑制,并且在临床前模型中仅导致有限的肿瘤消退。最近报道的下一代SERD GDC-9545(giredestrant)证明了这一挑战,该药物在细胞培养中具有有效的抗增殖活性,但即使与CDK4/6抑制剂帕博西尼(palbociclib)联合使用也无法定量消退高度雌激素依赖性MCF-7肿瘤。这些药物引起的缓慢的肿瘤消退对临床应用有影响,包括对避免在肿瘤负荷大且长期内分泌治疗具有显著毒性的患者中使用内分泌治疗,从而导致患者依从性差的问题有影响。

[0156] 与内分泌疗法的细胞抑制活性相反, α -UPR激活剂有可能成为高效、速效、细胞毒性ER α 依赖性疗法。ErSO-DFP和ErSO是取代的3-(4-羟基苯基)吡啶-2-酮类抗癌小分子的成员。这一类的一个周所周知的成员是双醋酚丁(oxyphenisatin),一种使用了40多年的泻药,后来被证明对转化细胞和癌细胞具有抗增殖作用。双醋酚丁衍生物具有有效的抗癌活性。例如,Andruska等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2015,112(15),4737)公开了BHPI,一种通过ER α 介导的 α -UPR的过度活化来延缓ER α +癌细胞生长的双醋酚丁衍生物。 α -UPR与BHPI的“可药用性”的初步证明是发现ErSO的基础,ErSO是一种诱导明显且独特的细胞毒性 α -UPR过度活化的化合物。虽然祖化合物 α -UPR激活剂BHPI对大多数ER α +癌细胞系具有细胞抑制作用,但ErSO具有快速的细胞毒性,并且在临床前肿瘤模型中作为每周施用一次的单一药物诱导定量肿瘤消退。ErSO-DFP显示出与ErSO相似的抗肿瘤活性,每周一次静脉施用观察到显著的肿瘤消退,并且比ErSO具有更宽的治疗窗期。细胞抑制剂或细胞毒性 α -UPR激活剂之间这种转换的确切分子基础尚未阐明,但表型改变和肿瘤消退是清楚的。

[0157] 总体亲脂性(由cLogD_{7.4}预测)可能对化合物的选择性和特异性毒性特征产生重大影响。虽然亲脂性对于高亲和力配体和靶向作用机制至关重要,但亲脂性太大可能导致由脱靶机制和其他因素导致的治疗窗期变窄。ErSO的亲脂性效率差(LipE=1.26)可能在细胞培养中观察到的ER α 依赖性活性的下降中起作用。支持这种过度亲脂性可能对选择性产生问题的说法,ErSO-DFP和其他极性更高的化合物((R)-23,(R)-24,(R)-26)即使在72小时的孵育下,也能保持对ER α +和ER α -癌细胞系强烈的选择性。如ErSO-DFP所示,细胞培养中的这种选择性似乎也转化为体内更好的耐受性。

[0158] 如先前关于ErSO的报道,3-(4-羟基苯基)吡啶-2-酮可能患有大鼠物种形成毒性。这种毒性的确切潜在药理学解释和人类相关性尚不清楚。然而,在考虑耐受性时,双醋酚丁的多年临床应用令人鼓舞;虽然这种药物由于罕见的肝毒性而最终退出临床,但这种肝毒性对于泻药来说是不可接受的,但它被广泛使用了40年。无论如何,这种大鼠毒性可以用作该药物类别的关键临床前筛选。除了简单的环烷烃取代之外,只有一组有限的取代使3-(4-羟基苯基)吡啶-2-酮多样化。为了优化亲脂性效率、癌细胞系特异性和大鼠体内耐受性,我们开发了一种高度模块化的策略,以获得此类各种极性衍生物。除了本文中的ErSO-DFP和衍生物之外,该合成路线可用于未来的优化以扩展SAR并进一步调节所需参数(例如口服生物利用度)。正如ErSO-DFP所证明的,培养中配体亲脂性效率和癌细胞选择性的优先考虑应该导致化合物在小鼠和大鼠体内耐受性的提高,从而为正在进行的和未来的 α -UPR激活剂药物化学活动定义了一个强大的优化策略。

[0159] 用 α -UPR激活剂观察到的深远的抗肿瘤作用值得进一步研究,特别需要描述直接的靶标参与及其潜在机制的其他方面。当在较长的化合物孵育时间下评估ErSO在某些癌细胞系中明显的ER α 非依赖性作用时,可能会使围绕靶标参与、 α -UPR激活和癌细胞死亡的研究

究复杂化。为此,ErSO-DFP及其衍生物(例如(R)-26)是研究 α -UPR活化的更理想的化学探针,如它们在ER α 癌细胞系中的显著无活性所例证的。

[0160] 对ErSO-DFP活性进行二氟化的强烈必要性是这项研究的意外发现。氟原子可以对配体的理化和确认性质产生深远的影响,并有助于配体与其蛋白质靶标之间的各种相互作用。实际上,本文使用的氮杂环的氟化确实降低了相应共轭酸的预测pKa,并且pKa扰动可能是其有效活性的一个因素。此外,哌啶(和其他杂环)的氟化可以对化合物构象产生显著影响,并且可以改变溶液和/或靶标结合中的主要构象。与缺乏这种二氟化作用的化合物(例如16)相比,ErSO-DFP有效生物活性的确切驱动力仍然未知。氟化在各种药物类配体的开发中的关键作用是显而易见的,而ErSO-DFP和相关化合物是这种重要性的另一个例子。

[0161] 总之,使用亲脂性导向设计,我们报道了ErSO-DFP和相关衍生物的发现,其表现出有效和选择性的ER α 依赖性抗癌活性。ErSO-DFP保留了其祖化合物ErSO的许多积极特征,即有效的ER α WT/突变依赖性 α -UPR激活和癌细胞死亡。令人兴奋的是,尽管ErSO-DFP的极性更强,但仍能保持BBB的渗透性,为治疗耐药性ER α WT/突变阳性脑转移瘤的未来发展打开了大门。本文报道的ErSO-DFP和其他化合物有望开发用于治疗晚期ER α +乳腺癌和其他ER α +癌症的 α -UPR激活剂。

[0162] 一般合成方法

[0163] 本发明还涉及本发明化合物和组合物的制备方法。化合物和组合物可以通过任何适用的有机合成技术制备,例如下文所述的技术(实施例2)。许多这样的技术在本领域是众所周知的。然而,许多已知技术在Compendium of Organic Synthetic Methods(John Wiley&Sons,NewYork),Vol.1,Ian T.Harrison and Shuyen Harrison,1971;Vol.2,Ian T.Harrison and Shuyen Harrison,1974;Vol.3,Louis S.Hegedus and Leroy Wade,1977;Vol.4,Leroy G.Wade,Jr.,1980;Vol.5,Leroy G.Wade,Jr.,1984;和Vol.6,Michael B.Smith;以及标准的有机参考文件,如March's Advanced Organic Chemistry: Reactions,Mechanisms,and Structure,5th Ed.by M.B.Smith and J.March(John Wiley&Sons,New York,2001),Comprehensive Organic Synthesis;Selectivity,Strategy&Efficiency in Modern Organic Chemistry,in 9Volumes,Barry M.Trost,Ed.-in-Chief (Pergamon Press,NewYork,1993printing));Advanced Organic Chemistry,PartB: Reactions and Synthesis,Second Edition,Cary and Sundberg(1983);Protecting Groups in Organic Synthesis,Second Edition,Greene,T.W.,and Wutz,P.G.M.,John Wiley&Sons,New York;和Comprehensive Organic Transformations,Larock,R.C., Second Edition,John Wiley&Sons,NewYork(1999)。

[0164] 下面提供了用于制备本发明化合物的许多示例性方法。这些方法旨在说明此类制剂的性质,并不旨在限制适用方法的范围。

[0165] 通常,诸如温度、反应时间、溶剂、后处理程序等的反应条件将是本领域中用于进行特定反应的常见条件。引用的参考材料以及其中引用的材料包含这些条件的详细描述。通常,温度为-100℃至200℃,溶剂为非质子或质子,具体取决于所需条件,反应时间为1分钟至2天。后处理通常包括淬灭任何未反应的试剂,然后在水/有机层系统之间分配(萃取)并分离含有产物的层。

[0166] 氧化和还原反应通常在接近室温(约20℃)的温度下进行,对于金属氢化物还原,

温度经常降至0℃至-100℃。适当时也可以加热。溶剂对于还原通常是非质子的,对于氧化可以是质子的或非质子的。调整反应时间以实现所需的转化率。

[0167] 缩合反应通常在接近室温的温度下进行,尽管对于非平衡,动力学控制的缩合反应,降低温度(0℃至-100℃)也很常见。溶剂可以是质子(常见于平衡反应)或非质子(常见于动力学控制的反应)。标准合成技术,例如共沸去除反应副产物和使用无水反应条件(例如惰性气体环境),在本领域是常见的,并且将在适用时应用。

[0168] 保护基团。术语“保护基团”是指当与羟基或其他杂原子结合时防止在该基团上发生不需要的反应并且可以通过常规化学或酶促步骤除去以重建羟基的任何基团。所使用的特定可去除保护基团并不总是关键的,优选的可去除羟基保护基团包括常规取代基,例如烯丙基、苄基、乙酰基、氯乙酰基、硫代苄基、亚苄基、苯酰基、甲基甲氧基、甲硅烷基醚(例如三甲基甲硅烷基(TMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)或叔丁基二甲基甲硅烷基(TBS))和任何其他可以化学引入羟基官能团的基团,然后在与产品性质相容的温和条件下通过化学或酶促方法选择性去除。

[0169] 合适的杂原子保护基团是本领域技术人员已知的,并在T.W.Greene,Protecting Groups In Organic Synthesis;Wiley:NewYork,1981(“Greene”)及其引用的参考文献,以及Kocienski,Philip J.;Protecting Groups(Georg Thieme Verlag Stuttgart, NewYork,1994),两者均通过引用并入本文。

[0170] 保护基团是可用的、通常已知和使用的,并且任选地用于防止在合成过程中与受保护基团发生副反应,即通过本发明方法制备化合物的途径或方法。在大多数情况下,关于保护哪些基团,何时保护以及化学保护基团(“PG”或“P”)的性质的决定将取决于要保护的反应的化学性质(例如,酸性、碱性、氧化性、还原性或其他条件)和预期的合成方向。

[0171] 下面的实施例描述了本发明化合物的制备。正如本领域技术人员容易认识到的,本文所述式的各种其他化合物可以通过使用适当的市售或容易制备的起始材料和/或通过合成目标化合物期间添加取代基来制备。某些相关起始材料的制备已在国际专利公开No.WO 2020/009958(Shapiro等人)中进行了描述,这些申请通过引用并入本文。

[0172] 药物制剂

[0173] 本文所述化合物可用于制备治疗性药物组合物,例如,通过将化合物与药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体组合。这些化合物可以以盐或溶剂化物的形式添加到载体中。例如,在化合物具有足够的碱性或酸性以形成稳定的无毒酸或碱的情况下,可以适当地以盐的形式施用化合物。药学上可接受的盐的示例是由形成生理上可接受的阴离子的酸形成的有机酸加成盐,例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、乙酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐和 β -甘油磷酸盐。还可以形成合适的无机盐,包括盐酸盐、卤化物、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐。

[0174] 可以使用本领域众所周知的标准方法获得药学上可接受的盐,例如通过使足够碱性的化合物(例如胺)与合适的酸反应以提供生理上可接受的离子化合物。碱金属(例如钠、钾或锂)或碱土金属(例如钙)羧酸盐也可以通过类似的方法制备。

[0175] 本文所述的式化合物可以配制成药物组合物,并以多种形式施用于哺乳动物宿主,例如人类患者。这些形式可以适应选定施用途,例如口服或静脉外施用,通过静脉注射、肌肉注射、局部注射或皮下注射途径。

[0176] 本文所述的化合物可以与药学上可接受的载体(例如惰性稀释剂或可吸收的可食用溶媒)组合全身施用。对于口服施用,化合物可以封装在硬壳或软壳明胶胶囊中,压缩成片剂,或直接掺入患者饮食中。化合物也可以与一种或多种赋形剂组合,并以可食性片剂、口含片剂、片剂、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆、晶片等的形式使用。这种组合物和制剂通常含有至少0.1%的活性化合物。组合物和制剂的百分比可以变化,并且可以方便地为给定单位剂型重量的约0.5%至约60%,约1%至约25%,或约2%至约10%。这种治疗有用组合物中活性化合物的量可以使得可以获得有效剂量水平。

[0177] 口含片、片剂、丸剂、胶囊等也可以含有以下一种或多种:粘合剂,例如黄芩胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂如磷酸二钙;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等;和润滑剂,如硬脂酸镁。甜味剂,如蔗糖、果糖、乳糖或阿斯巴甜;或者可以添加调味剂,例如薄荷、冬青油或樱桃调味剂。当单位剂型是胶囊时,除了上述类型的材料外,它还可以含有液体载体,例如植物油或聚乙二醇。各种其他材料可以作为包衣存在或以其他方式改变固体单位剂型的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊可以用明胶、蜡、虫胶或糖等包被。糖浆或酏剂可能含有活性化合物,蔗糖或果糖作为甜味剂,对羟基苯甲酸甲酯和丙酯作为防腐剂,染料和调味剂,如樱桃或橙子香料。用于制备任何单位剂型的任何材料应在药学上可接受,并且在所用量上基本无毒。另外,活性化合物可以掺入缓释制剂和装置中。

[0178] 活性化合物可以通过输注或注射静脉内或腹膜内给药。活性化合物或其盐的溶液可以在水中制备,任选与无毒表面活性剂混合。分散体可以在甘油、液体聚乙二醇、三乙酸甘油酯或其混合物中或在药学上可接受的油中制备。在正常的储存和使用条件下,制剂可能含有防腐剂,以防止微生物的生长。

[0179] 适用于注射或输注的药物剂型可包括无菌水溶液、分散体或无菌粉末,所述无菌水溶液、分散体或无菌粉末包含适于临时制备无菌可注射或不可输注溶液或分散体的活性成分,所述无菌水溶液、分散体或无菌粉末任选地包封在脂质体中。最终剂型应在生产和储存条件下无菌,流动且稳定。液体载体或溶媒可以是溶剂或液体分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、植物油、无毒甘油酯及其合适的混合物。例如,可以通过形成脂质体,在分散的情况下保持所需的粒径,或通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和/或抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖,缓冲液或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过延迟吸收的药物实现,例如单硬脂酸铝和/或明胶。

[0180] 无菌注射溶液可以通过将所需量的活性化合物与上述各种其他成分(根据需要)混合在适当的溶剂中,然后选择性地进行过滤灭菌来制备。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉末,制备方法可以包括真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分的粉末以及溶液中存在的任何额外所需成分。

[0181] 本文所述化合物的有用剂量可以通过比较其体外活性和动物模型中的体内活性来确定。本领域已知用于推断小鼠和其他动物使用人类的有效剂量的方法;例如,请参见美国专利No. 4938949(Borch等人)。治疗中使用的化合物或活性盐或其衍生物的量不仅会因所选的特定化合物或盐而异,还会因给药途径、所治疗疾病的性质以及患者的年龄和状况而有所不同,最终将由主治医生或临床医生决定。

[0182] 然而,一般来说,合适的剂量将在约0.5至约100mg/kg的范围内,例如每天约10至约75mg/kg的体重,例如每天每公斤接受者体重3mg至约50mg,优选为6mg/kg/天至90mg/kg/天,最优选为15mg/kg/天至60mg/kg/天。

[0183] 所述化合物按单位剂型配制方便;例如,每单位剂型含有5至1000mg,方便地含有10至750mg,最方便地含有50至500mg的活性成分。在一个实施方案中,本发明提供了一种包含以这种单位剂型配制的本发明化合物组合物。

[0184] 所述化合物可以方便地以单位剂型施用,例如,每单位剂型含有5mg/m²至1000mg/m²的活性成分,方便地每单位剂型含有10mg/m²至750mg/m²的活性成分,最方便的是每单位剂型含有50mg/m²至500mg/m²的活性成分。所需剂量可以方便地以单剂量或以适当间隔分剂量施用,例如每天两次、三次、四次或更多次分剂量施用。分剂量本身可以进一步划分,例如,分成许多个离散的分散间隔的施用。

[0185] 所需剂量可以方便地以单剂量或分剂量的形式以适当间隔施用,例如,每天以两次、三次、四次或更多次剂量施用。分剂量本身可以进一步划分,例如,分为许多离散的分散间隔的给施用,例如从吸入器多次吸入或通过将多滴药滴入眼睛中。

[0186] 本文所述的化合物可以是有效的抗肿瘤剂,并且与BHPI相比具有更高的效力和/或降低的毒性。优选地,本发明化合物比BHPI更有效且毒性更小,和/或避免BHPI遇到的潜在分解代谢位点,即具有与BHPI不同的代谢特征。此外,本文所述的化合物比BHPI和其他已知化合物引起的失调程度轻。

[0187] 本发明提供了脊椎动物(例如哺乳动物)癌症的治疗方法,其涉及向患有癌症的哺乳动物施用有效量的本文所述化合物或组合物。所述哺乳动物包括灵长类、人类、啮齿动物、犬科、猫科、牛、绵羊、马、猪、山羊、牛等。癌症是指任何类型的恶性肿瘤,其通常以不期望的细胞增殖为特征,例如不受调节的生长,缺乏分化,局部组织侵袭和转移。可以通过本文所述化合物治疗的癌症包括例如乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌或子宫癌,特别是ER α 阳性的任何癌症。

[0188] 本发明化合物治疗癌症的能力可以通过使用本领域众所周知的测定方法来确定。例如,治疗方案的设计、毒性评估、数据分析、肿瘤细胞杀伤的定量以及使用可移植肿瘤筛选的生物学意义是已知的。另外,可以使用如下所述的测试来确定化合物治疗癌症的能力。

[0189] 以下实施例旨在说明上述发明,不应被解释为缩小其范围。本领域技术人员将容易地认识到,这些实施例提出了可以实施本发明的许多其他方式。应当理解,在本发明范围内,可以进行许多变化和修改。

[0190] 实施例

[0191] 实施例1:生物程序

[0192] 癌细胞系:培养条件和验证。所有细胞系均在37°C,5%CO₂下培养。所有ER α 阳性细胞系均在无酚红的培养基中生长。MCF-7在含有10%FBS和1%青霉素-链霉素(P/S)的EMEM中生长。T47D在含有10%FBS和1%P/S的MEM中培养。TYS和TDG细胞在补充有10%CD-FBS和1%P/S的MEM中生长。将HCT-116和MDA-MB-231细胞在补充有10%FBS和1%P/S的RPMI-1640中培养。将MDA-MB-436细胞在补充有10%FBS和1%P/S的DMEM中培养。HT-29在补充有10%FBS和1%P/s的McCoy培养基中培养。如前所述,所有细胞系均直接从ATCC细胞库中获得,和/或已使用PowerPlex16HS测定法(Promega)进一步验证⁵⁴。简而言之,收集>100万

个细胞,并使用细胞裂解缓冲液(50mM Tris,50mM EDTA,25mM蔗糖,100mM NaCl,1%SDS,pH 8)进行裂解。在亚利桑那大学遗传学核心(UAGC)进行了每个细胞系的DNA提取和短串联重复序列(STR)分析。将常染色体STR谱与参考数据库(例如ATCC,DSMZ和JCRB)进行比较。

[0193] 阿拉玛蓝荧光检测抗癌活性(IC_{50})。将每孔2000-15000个细胞接种在96孔板中。让细胞粘附,然后将测试化合物的DMSO储备溶液添加到每个孔中,每个孔中DMSO的最终浓度=1%;最终体积:100 μ L。在所需的孵育时间结束时(例如24或72小时),抽吸出每个孔中的培养基,并加入新的新鲜培养基(无化合物,100 μ L)。然后加入阿拉玛蓝溶液(每40mLPBS 4mg)(10 μ L)。孵育2-6小时后,使用SpectraMax M3酶标仪(Molecular Devices)测定每个孔的荧光($\lambda_{\text{激发}}=555\text{nm}$, $\lambda_{\text{发射}}=585\text{nm}$)。通过与100%死亡对照:100 μ M雷帕霉素处理的细胞进行比较来确定死亡百分比。使用Origin Pro V10计算剂量依赖性曲线和 IC_{50} 。

[0194] a-UPR免疫印迹/蛋白质印迹程序。将400000个MCF-7细胞/孔接种到6或12孔板中并使其粘附过夜。然后从每个孔中吸出培养基,然后相应地加入含有稀释的测试化合物(0.1%DMSO浓度)的新鲜培养基。将细胞孵育4或6小时,然后收获。然后使用含有磷酸酶(BioVision)和蛋白酶抑制剂混合物(Calbiochem)的RIPA缓冲液裂解PBS洗涤的细胞沉淀。使用BCA测定法(Pierce)测定蛋白质浓度。将含有10-15 μ g蛋白质的裂解物加载到4-20%梯度凝胶(BioRad)上,并进行SDS-PAGE。然后将蛋白质转移到膜(PDVF Millipore)上,并用BSA溶液(在40mL TBST中含有2g)封闭印迹1小时。封闭后,加入一抗并孵育过夜(使用制造商推荐的稀释液)。孵育过夜后,将印迹用TBST洗涤(每次洗涤孵育5分钟,洗涤3次),然后与HRP连接的二抗在TBST中孵育1小时。洗涤印迹(每次洗涤孵育10分钟,总共洗涤两次,每次10分钟)。然后按照制造商的方法添加SuperSignal West Pico溶液,并用ChemiDoc成像印迹。

[0195] 抗体。使用的抗体:磷酸化AMPK(Thr172):CST-2535,AMPK:CST-5832,磷酸化EIF2 α (Ser51):CST-3398,EIF2 α :CST-5324,ATF6 α :CST-65880, β -肌动蛋白-HRP偶联物:CST-5125, β -肌动蛋白:CST-4970,HRP连接的抗兔IgG:CST-7074。

[0196] IACUC指南和方案编号。所有体内研究均按照UIUC IACUC指南和批准的方案(IACUC方案:18075)进行。

[0197] 药代动力学(PK)研究。如图所示,雌性CD-1小鼠(Charles River,~25g小鼠)以20mg/kg或40mg/kg的剂量静脉内(i.v.尾静脉)或口服强饲法(P.O.)施用化合物(即ErS0或ErS0-DFP)。然后在时间点(#,#,#)处死3组小鼠。收集血液,离心并分离血浆,使用LC-MS/MS(伊利诺州的厄巴纳的UIUC代谢组学中心)对测试化合物进行定量。然后使用非线性回归编程(WinNonlin)分析测定的化合物浓度并估算药代动力学参数。

[0198] 模拟胃液(SGF)稳定性测定。通过向1000mL SGF(Fischer Scientific 7108-16)中加入3.2g胃蛋白酶(Sigma-Aldrich P7000)制备SGF,并使用pH计将pH调节至1.2。然后将含有胃蛋白酶的SGF加热至37 $^{\circ}$ C。然后将990 μ L加温的含有胃蛋白酶的SGF等分到多个Eppendorf管中,然后加入10 μ L 10mM DMSO测试化合物储备溶液。红霉素(MedChemExpress HY-B0220)是该稳定性测定的阳性对照。在整个实验过程中,将样品在37 $^{\circ}$ C下孵育,每15分钟涡旋一次。在每个所需的时间点(0、15、30、60、120分钟),取出100 μ L等分试样,并加入50 μ L乙腈淬灭。将样品储存在4 $^{\circ}$ C直至所有时间点完成。然后将样品涡旋,然后在4 $^{\circ}$ C离心机中以3000RPM澄清10分钟。收集上清液,并通过LC-MS/MS(伊利诺州的厄巴纳的UIUC代谢组学

中心)测定化合物浓度。测定的化合物浓度用于计算与 $t=0$ 样品相比剩余的百分比。使用GraphPad软件(单相衰减方程, $Y_0=100$,稳定水平 $=0$, $K>0$)将单相指数衰减方程拟合到每种化合物的数据中,并使用这些拟合方程计算半衰期($t_{1/2}$)。

[0199] 小鼠和大鼠的最大耐受剂量(MTD)实验。雌性CD-1小鼠(Charles River,7-8周龄)或CD Sprague-Dawley IGS大鼠(Charles River,250-350g)用所需剂量的ErS0或ErS0-DFP静脉注射(I.V.尾静脉)或口服强饲法(P.O.)治疗。在化合物施用后数天内监测啮齿动物的痛苦、嗜睡、神经毒性等迹象。如果耐受给定剂量,则研究更高剂量,直到观察到不可耐受的剂量(通常与急性毒性和/或致死性体征相关)或达到给定测试化合物的溶解度极限。MTD定义为耐受任何观察到的急性副作用且未观察到致死的最大剂量。

[0200] MCF-7原位肿瘤模型。Nu/J去卵巢小鼠(Jackson实验室)在肿瘤细胞接种前2-3天补充60天E2颗粒(0.36mg,美国创新中心)。将MCF-7细胞(5×10^6 ,在1:1HBSS:基质胶中)接种到乳腺脂肪垫中并使其建立,肿瘤生长至 $\sim 300-400\text{mm}^3$ (建立约21-28天)。ErS0和ErS0-DFP配制在5%DMSO、10%吐温-20和85%PBS中。然后将小鼠随机分组($n=6$ /组),并静脉内(I.V.尾静脉)注射溶媒(5%DMSO、10%吐温-20、85%PBS),ErS0(5mg/kg)或ErS0-DFP(5mg/kg),每周一次,共三次总剂量(第0天、第7天、第14天)。通过卡尺测量肿瘤大小,并记录小鼠体重。

[0201] BBB渗透研究。CD-1小鼠(Charles River)以指定的剂量静脉内(I.V.,尾静脉)注射ErS0或ErS0-DFP,并在注射后15分钟处死(每个时间点和剂量 $n=3$)。处死小鼠并收集血液。通过灌注去除残留的循环容量。将血样以13000RCF离心5分钟。收集所得上清液并保存在 -80°C ,然后进行分析。从颅穹窿收集大脑,称重,并用液氮速冻。将1000 μL 冷甲醇加入解冻的大脑中,然后使用手持式组织匀浆器将大脑匀浆。将所得浆料以13000RCF离心两次,每次离心10分钟,收集上清液并在分析前在 -80°C 冷冻。然后通过LC-MS/MS(伊利诺州的厄巴纳的UIUC代谢组学中心)分析样品,以确定血清和大脑中的ErS0或ErS0-DFP浓度。为了计算绝对脑:血清比率,每只小鼠的近似小鼠血容量为58.5mL/kg。

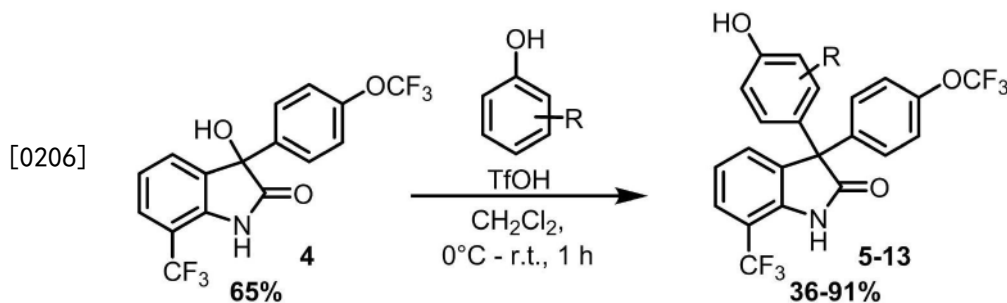
[0202] 实施例2:化学合成材料和方法

[0203] 通用方法:除非另有说明,否则本文所述的所有反应均在惰性气体(即氩气)下进行。化学试剂购自商业来源,使用时无需进一步纯化。7-三氟靛红(1)可商购(例如Oakwood Chemical-024866)。使用的所有溶剂都是无水的,或从商业渠道购买的,或通过使用PureSolv MD-5溶剂纯化系统的活性氧化铝柱获得。最终化合物通过纯乙腈过夜冻干干燥。在Bruker Avance III HD 500MHzNMR上用冷冻探针进行 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR实验。 CD_3OD 中获得的光谱分别为3.31ppm和49.00ppm的 ^1H 和 ^{13}C NMR光谱。对于 ^{19}F NMR,我们使用了来自相应 ^1H NMR实验的参考文献。所有NMR化学位移均以ppm(δ)、耦合常数(J,Hz)表示,峰值表示为:s=单峰,bs=宽单峰,d=双峰,t=三重峰,q=四重峰,m=多重峰。除非另有说明,否则 ^{13}C 和 ^{19}F 峰的多重性都是单峰,与 ^1H NMR使用的名称相同。利用电喷雾电离(ESI)在UIUC SCS质谱实验室获得高分辨率质谱(HRMS)。X射线晶体学是在UIUC SCS George L.ClarkX射线设备上使用Bruker D8 Venture Duo仪器进行的,该仪器可以确定绝对立体化学。可根据要求提供更多晶体学信息,并已保存在分子结构网上。使用HPLC在254nm处测定生物测定中使用的化合物的 $>95\%$ 纯度。手性HPLC通常会显示外消旋混合物的两个峰,这是本文中化合物的重要考虑因素,因为本文中这类化合物通常只有一个对映体显示出生物活性。对于一

些化合物(通篇表示),使用HPLC手性柱无法实现两种对映体的分离。

[0204] 1的合成,ErSO, (R)-3-(4-羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮的合成。如(Sci. Transl. Med., 2021, 13, 603)报道合成并分离了化合物1。¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ : 7.53 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.45 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.31 (d, J=8.9Hz, 2H), 7.25-7.14 (m, 3H), 7.03 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.74 (d, J=8.9Hz, 2H)。¹⁹F NMR (CD₃OD, 471MHz) δ : -59.48, -62.98。熔点: 91.1-94.8℃。

[0205] 4的合成, 3-羟基-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮的合成。在惰性气体下,向火焰干燥的圆底烧瓶中加入1-溴-4-(三氟甲氧基)苯(23.30mmol, 3.5mL),并溶解在THF(23mL)中。将反应混合物冷却至-78℃,并在10分钟内滴加n-BuLi(21.39mmol, 14.3mL)溶液。将反应物在-78℃下搅拌1小时。在另一个火焰干燥的烧瓶中,加入7-(三氟甲基)吲哚啉-2,3-二酮(9.30mmol, 2.0g),并在惰性气体下溶解在THF(23mL)中。室温下的靛红溶液滴加到-78℃的反应容器中超过15分钟。将所得混合物在-78℃下搅拌1小时,从冷浴中取出,加热至室温同时搅拌30分钟。用水(15mL)淬灭反应。将溶液倒入装有100mL EtOAc和100mL 1:1H₂O:饱和盐水的分液漏斗中。用乙酸乙酯(3×, ~50-100mL)萃取有机物,合并的有机层用盐水洗涤,然后用硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩。通过自动快速色谱法(SiO₂,洗脱溶剂:初始混合物0:100乙酸乙酯:己烷,梯度增加至50:50乙酸乙酯:己烷,柱体积超过18)纯化所得油。分离出4,产率为65%,为灰白色/黄色固体(6.07mmol, 2.29g)。¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ : 7.57 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.47 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.41 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.25 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.20 (t, J=7.8Hz, 1H)。¹³C NMR (CD₃OD, 126MHz) δ : 182.08, 150.31 (q, J=1.7Hz), 140.70 (q, J=2.28Hz), 140.54, 135.70, 129.90, 128.61, 127.35 (q, J=4.5Hz), 125.09 (q, J=270.9Hz), 124.04, 122.01, 121.88 (q, J=255.7Hz), 113.84 (q, J=33.3Hz), 77.09。¹⁹F NMR (CD₃OD, 471MHz) δ : -60.23 (s), -63.71 (s)。HRMS (ESI): C₁₆H₈NO₃F₆ [m+H]⁺的m/z计算值: 376.0408, 实测值: 376.0404。熔点: 59.5-61.8℃。



[0207] 一般程序A(化合物5-13)。向圆底烧瓶中加入化合物4(1.06mmol, 0.40g),并将目标苯酚(3.71mmol)溶于二氯甲烷(2.2mL)中。然后将反应混合物置于冰浴中,然后滴加三氟甲磺酸(TfOH, 0.4mL)。注意:三氟甲磺酸会溶解许多常见的塑料,尤其是注射器的柱塞,因此建议使用金属针或玻璃注射器。如果使用塑料注射器,请避免接触注射器的柱塞。然后将反应容器从冰浴中取出(或使冰融化),并在室温下搅拌1小时。然后将反应混合物倒入充满冰的饱和碳酸氢钠(水溶液, ~50mL)中,并用乙酸乙酯(3×)提取水溶液。将组合的有机层用硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。然后通过柱色谱法(SiO₂,洗脱溶剂:通常为初始混合物0:100乙酸乙酯:己烷,梯度增加至40:60乙酸乙酯:己烷)纯化所得油。

[0208] 5的合成, 3-(3-氟-4-羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吲哚

喹-2-酮的合成。通过一般程序A用2-氟苯酚合成。分离出5,产率为73%,为白色固体(0.192mmol,0.091g)。¹H NMR(CD₃OD,500MHz) δ:7.55(d,J=8.0Hz,1H),7.48(d,J=7.6Hz,1H),7.31(d,J=8.9Hz,2H),7.25(d,J=8.5Hz,2H),7.23(t,J=7.9Hz,1H),6.91(dd,J=12.3,2.4Hz,1H),6.88(t,J=8.7Hz,1H),6.83(dd,J=8.6,2.4Hz,1H)。¹³C NMR(CD₃OD,126MHz) δ:180.80,152.68(d,J=241.4Hz),149.94(q,J=1.9Hz),146.14(d,J=13.0Hz),141.74,139.88(q,J=2.1Hz),136.30,133.33(d,J=5.7Hz),131.16,131.09,126.18(q,J=4.5Hz),125.45(d,J=3.3Hz),125.1(q,J=268.9Hz),124.02,122.14,121.79(q,J=252.4Hz),118.81(d,J=3.3Hz),117.17(d,J=20.5Hz),113.91(q,J=33.3Hz),61.92。¹⁹F NMR(CD₃OD,471MHz) δ:-59.48,-63.01,-137.93(dd,J=12.4,8.9Hz)。HRMS(ESI):C₂₂H₁₃NO₃F₇[m+H]⁺的m/z计算值:472.0784,实测值:472.0792。HPLC手性纯度(λ:254nm):>99%。熔点:92.0-95.2℃。

[0209] 6的合成,3-(3,5-二氟-4-羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)喹啉-2-酮的合成。通过一般程序A用2,6-二氟苯酚合成。分离出6,产率为91%,为白色固体(0.961mmol,0.4702g)。¹H NMR(CD₃OD,500MHz) δ:7.57(d,J=8.1Hz,1H),7.51(d,J=7.6Hz,1H),7.37-7.18(m,5H),6.83-6.70(m,2H)。¹³C NMR(CD₃OD,126MHz) δ:180.24,153.76(dd,J=242.9,7.3Hz),150.05(q,J=1.6Hz),141.26,139.91(q,J=2.1Hz),135.65,135.32(t,J=16.1Hz),132.26(t,J=7.7Hz),131.11,131.09,126.65(q,J=4.5Hz),125.05(q,J=271.1Hz),123.80,121.86(q,J=256.0Hz),122.25,114.04(q,J=33.3Hz),112.83(m),61.66。¹⁹F NMR(CD₃OD,471MHz) δ:-60.23(s),-63.80(s),-135.17(d,J=8.7Hz)。HRMS(ESI):C₂₂H₁₂NO₃F₈[m+H]⁺的m/z计算值:490.0689,实测值:490.0687。HPLC手性纯度(λ:254nm):99%。熔点:63.2-65.9℃。

[0210] 7的合成,3-(2-氟-4-羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)喹啉-2-酮的合成。通过一般程序A用3-氟苯酚合成。分离出6,产率为68%,为白色固体(0.359mmol,0.169g)。¹H NMR(CD₃OD,500MHz) δ:7.56(d,J=7.6Hz,1H),7.44-7.32(m,3H),7.31-7.13(m,3H),6.84(t,J=8.9Hz,1H),6.57(dd,J=8.7,2.7Hz,1H),6.49(dd,J=13.0,2.5Hz,1H)。¹³C NMR(CD₃OD,126MHz) δ:180.91,162.64(d,J=246.6Hz),160.49(d,J=11.98Hz),148.85,140.30(q,J=1.95Hz),138.98,135.68,131.80(d,J=5.33Hz),131.12,130.79(d,J=2.93Hz),126.36(q,J=4.43Hz),125.16(q,J=271.0Hz),123.51,121.92,121.89(q,J=255.9Hz),120.54(d,J=13.41Hz),113.68(q,J=33.39Hz),112.30(d,J=2.69Hz),104.55(d,J=24.77Hz),59.14。¹⁹F NMR(CD₃OD,471MHz) δ:-60.21(s),-63.74(s),-110.66(m)。HRMS(ESI):C₂₂H₁₃NO₃F₇[m+H]⁺的m/z计算值:472.0784,实测值:472.0779。HPLC手性纯度(λ:254nm):97%。熔点:102.5-103.9℃。

[0211] 8的合成,3-(2,6-二氟-4-羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)喹啉-2-酮的合成。通过一般程序A用3,5-二氟苯酚合成。分离出8,产率为58%,为白色固体(0.160mmol,0.078g)。¹H NMR(CD₃OD,500MHz) δ:7.59(d,J=8.0Hz,1H),7.47(d,J=7.5Hz,1H),7.29(d,J=8.5Hz,2H),7.25(t,J=7.8Hz,1H),7.19(d,J=8.5Hz,2H),6.39(d,J=11.8Hz,2H)。¹³C NMR(CD₃OD,126MHz) δ:179.84,163.02(dd,J=247.0,10.8Hz),160.85(t,J=15.5Hz),150.03(q,J=2.0Hz),140.39(q,J=2.0Hz),140.14,134.68,130.56,129.71,126.81(q,J=4.4Hz),125.08(q,J=271.0Hz),123.82,121.89(q,J=255.7Hz),121.84,

113.81 (q, $J=33.3\text{Hz}$), 109.16 (t, $J=16.0\text{Hz}$), 101.16 (dd, $J=28.01, 2.1\text{Hz}$), 56.49。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -59.51, -63.08, -106.44 (d, 11.9Hz)。HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{F}_8$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 计算值: 490.0689, 实测值: 490.0691。LCMS 纯度 (λ : 254nm): >96%。熔点: >225 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0212] 9的合成, 3,3-双(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过一般程序A用三氟甲氧基苯合成。分离得到9, 产率为54%, 为白色固体 (0.144mmol, 0.075g)。 ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.58 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.52 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 7.33 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 4H), 7.27 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 4H), 7.24 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 180.34, 150.06 (q, $J=1.9\text{Hz}$), 141.38, 139.99 (q, $J=1.9\text{Hz}$), 135.85, 131.23, 131.17, 126.62 (q, $J=4.4\text{Hz}$), 125.07 (q, $J=271.3\text{Hz}$), 123.84, 122.27, 121.87 (q, $J=255.6\text{Hz}$), 114.05 (q, $J=34.0\text{Hz}$), 62.30。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -59.50, -63.05。HRMS (ESI): $\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{F}_9$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 计算值: 522.0752, 实测值: 522.0757。HPLC 手性纯度 (λ : 254nm): >98%。熔点: 176.6-178.1 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0213] 10的合成, 3-(3,4-二羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过一般程序A用邻苯二酚(1,2-二羟基苯)合成。分离出10, 产率为36%, 为白色固体 (0.160mmol, 0.075g)。 ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.53 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.44 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 7.34 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H), 7.26-7.18 (m, 3H), 6.71 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 6.67 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 6.49 (dd, $J=8.3, 2.3\text{Hz}$, 1H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 181.34, 149.79 (q, $J=1.7\text{Hz}$), 146.54, 146.31, 142.05, 139.85 (q, $J=2.0\text{Hz}$), 136.99, 133.33, 131.29, 131.06, 126.07 (q, $J=4.5\text{Hz}$), 125.16 (q, $J=270.8\text{Hz}$), 123.49, 121.97, 121.89 (q, $J=255.8\text{Hz}$), 120.66, 116.68, 116.25, 113.72 (q, $J=31.5\text{Hz}$), 62.29。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -59.49, -62.98。HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{F}_6$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 的计算值: 470.0827, 实测值: 470.0828。HPLC 手性纯度 (λ : 254nm): >98%。熔点: 95.8-101.9 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0214] (S)-10, (S)-3-(3,4-二羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的分离。使用制备型手性HPLC分离法(Lux®5uM纤维素-1250 $\times$ 21.2mm, AXIA™填充, 等度: 40% i-PrOH/己烷)将10分离成其各自的对映体。(S)-10分离, 为白色固体。 ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.53 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.44 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.34 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H), 7.29-7.16 (m, 3H), 6.71 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 6.66 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 6.49 (dd, $J=8.4, 2.3\text{Hz}$, 1H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 181.36, 149.80 (q, $J=1.7\text{Hz}$), 146.56, 146.33, 142.06, 139.85 (q, $J=2.1\text{Hz}$), 136.99, 133.34, 131.30, 131.07, 126.07 (q, $J=4.6\text{Hz}$), 125.17 (q, $J=270.8\text{Hz}$), 123.49, 121.97, 121.89 (q, $J=255.8\text{Hz}$), 120.66, 116.68, 116.26, 113.73 (q, $J=31.5\text{Hz}$), 62.29。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -59.49, -62.97。HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{F}_6$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 计算值: 470.0827, 实测值: 470.0829。HPLC 手性纯度 (λ : 254nm): >98%。熔点: 223.7-225.0 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0215] 11的合成, 3-(4-羟基-3-甲基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过一般程序A用2-甲基苯酚合成。11分离产率为83%, 为白色固体 (0.436mmol, 0.2035g)。 ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.53 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 7.44 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 7.31 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H), 7.25-7.16 (m, 3H), 6.92 (dd, $J=2.5, 0.8\text{Hz}$, 1H), 6.82 (dd, $J=8.4, 2.5\text{Hz}$, 1H), 6.69 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 2.11 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 180.21, 157.12, 149.80 (q, $J=1.8\text{Hz}$), 142.22, 139.81 (q, $J=2.1\text{Hz}$), 137.05, 132.51, 131.61,

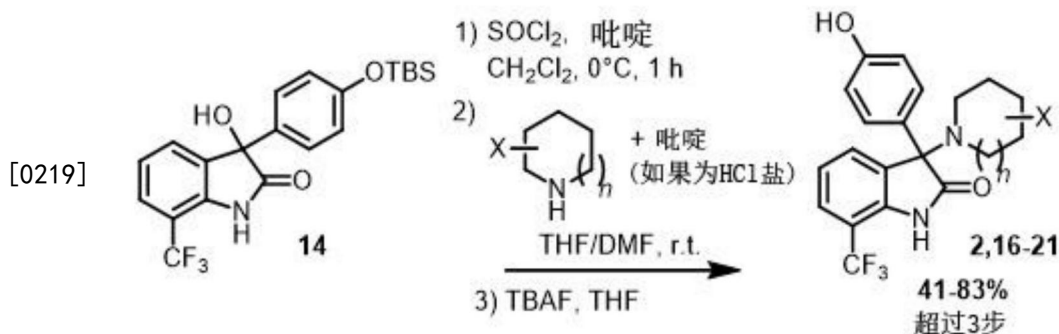
131.24, 131.07, 127.68, 126.07 (m, 复合体, ~2个碳), 125.16 (q, $J=271.0\text{Hz}$), 123.52, 121.96, 121.89 (q, $J=255.7\text{Hz}$), 115.57, 113.74 (q, $J=33.3\text{Hz}$), 63.08, 16.33。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -60.21 (s), -63.69 (s)。HRMS (ESI): $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{F}_6$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 计算值: 468.1034, 实测值: 468.1032。HPLC 手性纯度 (λ : 254nm): 99%。熔点: 93.3-98.2 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0216] 12的合成, 3-(4-羟基-3,5-二甲基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过一般程序A用2,6-二甲基苯酚合成。12分离产率为76%, 为灰白色固体 (0.203mmol, 0.098g)。 ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.53 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.45 (q, $J=1.9\text{Hz}$, 1H), 7.30 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H), 7.22 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.20 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 6.76 (s, 2H), 2.17 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 181.52, 154.21, 149.79, 142.18, 139.79 (q, $J=1.88\text{Hz}$), 137.09, 132.76, 131.27, 131.08, 129.20, 126.04 (q, $J=4.43\text{Hz}$), 125.93, 125.18 (q, $J=270.0\text{Hz}$), 123.51, 121.94, 121.89 (q, $J=255.4\text{Hz}$), 113.72 (q, $J=32.95\text{Hz}$), 62.30, 16.78。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -59.47, -62.95。HRMS (ESI): $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{F}_6$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 计算值: 482.1191, 实测值: 482.1195。HPLC 手性纯度 (λ : 254nm): >98%。熔点: 177.2-189.4 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0217] 13的合成, 3-(4-羟基-3,5-二异丙基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过一般程序A用2,6-二异丙基苯酚合成。13分离产率为64%, 为灰白色固体 (0.169mmol, 0.091g)。 ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.54 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.42 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 7.29 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 7.23 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 7.22 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 6.86 (s, 2H) 3.26 (7重峰, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 1.10 (dd, $J=6.7, 1.5\text{Hz}$, 12H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 181.60, 151.72, 149.78 (q, $J=1.5\text{Hz}$), 142.34, 139.88 (q, $J=2.1\text{Hz}$), 137.26, 136.99, 133.02, 131.27, 130.99, 126.04 (q, $J=4.4\text{Hz}$), 125.19 (q, $J=268.9\text{Hz}$), 124.34, 123.43, 121.90, 121.88 (q, $J=256.5\text{Hz}$), 113.85 (q, $J=32.9\text{Hz}$), 62.73, 23.30, 23.25。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -59.50, -62.96。HRMS (ESI): $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{NO}_3\text{F}_6$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 计算值: 538.1817, 实测值: 538.1819。HPLC 手性纯度 (λ : 254nm): 97%。熔点: 77.5-79.0 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0218] 14的合成, 3-(4-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)苯基)-3-羟基-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。在惰性气体下, 向火焰干燥的圆底烧瓶中加入(4-溴苯氧基)(叔丁基)二甲基硅烷 (29.30mmol, 7.2mL), 并溶解在THF (31mL) 中。将反应混合物冷却至-78 $^{\circ}\text{C}$, 并在10分钟内滴加n-BuLi溶液 (27.90mmol, 18.6mL)。将反应物在-78 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌1小时。在另一个火焰干燥的烧瓶中, 加入7-(三氟甲基)吡啶-2,3-二酮 (13.95mmol, 3.0g), 并在惰性气体下溶解在THF (31mL) 中。将这种室温下的靛红溶液在-78 $^{\circ}\text{C}$ 下在15分钟内滴加到反应容器中。将所得混合物在-78 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌1小时, 从冷浴中取出, 加热至室温, 同时搅拌30分钟。用水 (20mL) 淬灭反应。将溶液倒入装有100mL EtOAc和100mL 1:1H₂O: 饱和盐水的分液漏斗中。用乙酸乙酯 (3 $\times$, ~50-100mL) 萃取有机物, 合并的有机层用盐水洗涤, 然后用硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。通过自动快速色谱法 (SiO₂, 洗脱溶剂: 初始混合物0:100乙酸乙酯: 己烷, 梯度增加至40:60乙酸乙酯: 己烷, 柱体积超过20) 纯化所得油。分离出14, 产率为79%, 为黄色固体 (11.04mmol, 4.67g)。 ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.54 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.43 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 7.26 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 7.18 (dd, $J=8.1, 7.4\text{Hz}$, 1H), 6.81 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 0.97 (s, 9H), 0.18 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 181.43, 157.02, 140.53 (q, $J=2.3\text{Hz}$), 136.68, 134.05, 129.89, 128.11, 126.98 (q, $J=4.5\text{Hz}$), 125.12 (q, $J=271.0$), 123.80,

121.01, 113.60 (q, $J=33.2\text{Hz}$), 77.63, 26.12, 19.03, -4.34. ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -62.86 (s). HRMS (ESI): $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{NO}_3\text{Si}$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 计算值: 424.1556, 实测值: 424.1563. 熔点: 71.9-73.9°C.



[0220] 一般程序B(化合物2, 16-21)。将装有溶解在二氯甲烷(2.9mL)中的化合物14(0.394mmol)的圆底烧瓶冷却至 0°C 。加入吡啶(0.8mmol, 0.06mL), 然后加入亚硫酰氯(SOCl_2 , 0.591mmol, 0.04mL), 并将反应搅拌1小时。然后在剧烈搅拌下加入水($\sim 5\text{mL}$)。然后用乙酸乙酯萃取两相混合物(3次), 合并的有机层用盐水洗涤, 用硫酸钠干燥, 真空浓缩。向干净的反应容器中加入粗混合物, 并溶解在THF或DMF(3.9mL)中, 然后加入所需胺(3.94mmol)和吡啶(3.94mmol) (如果所需胺是 HCl 盐)。将反应混合物搅拌2-4小时(通过TLC跟踪反应以监测原料的消耗)。将反应物倒入1:1的水:盐水中, 用乙酸乙酯萃取(3次), 合并的有机层用硫酸钠干燥并真空浓缩。然后将原油溶解在THF(4mL)中, 加入TBAF溶液(1M在THF中, 2mL), 搅拌反应直至观察到原料完全消耗(通过TLC监测反应)。完成后, 将混合物倒入1:1饱和碳酸氢钠:盐水中, 用乙酸乙酯萃取(3次), 所得合并的有机层用硫酸钠干燥并真空浓缩。通过自动快速色谱柱色谱法(SiO_2 , 用 CH_2Cl_2 或乙醚加载到柱上, 洗脱溶剂:初始混合物0:100乙酸乙酯:己烷, 梯度增加至100:0乙酸乙酯:己烷, 柱体积约为20-30)。注意:方案3B, 下面的一般程序C)是合成这种化合物的理想合成路线。

[0221] 2, 3-(4, 4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮的合成。通用程序B用4, 4-二氟哌啶盐酸盐合成。分离出2, 产率为54%, 为白色固体(0.213mmol, 0.0875g), 产率为83%, 为白色固体(2.45mmol, 1.01g)。我们已经观察到该反应的批次间差异。

[0222] ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.56 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.52 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.33 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 7.20 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 6.77 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 2.95-2.45 (m, 4H), 2.02-1.87 (m, 4H). ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 179.94, 158.93, 140.07 (q, $J=2.2\text{Hz}$), 133.36, 130.46, 130.03, 129.45, 126.51 (q, $J=4.5\text{Hz}$), 125.12 (q, $J=271.0\text{Hz}$), 123.37, 123.0 (t, $J=241.0\text{Hz}$), 116.58, 113.63 (q, $J=33.1\text{Hz}$), 74.00, 45.13 (t, $J=5.5\text{Hz}$), 35.70 (t, $J=22.9\text{Hz}$). ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -63.70, -99.68 (bs). HRMS (ESI): $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{F}_5$ $[\text{m}+\text{H}]^+$ 的 m/z 计算值: 413.1288, 实测值: 413.1288. HPLC手性纯度(λ : 254nm): >99% (外消旋)。熔点: 93.5-95.2°C.

[0223] 16的合成, 3-(4-羟基苯基)-3-(哌啶-1-基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮的合成。通过通用程序B用哌啶合成。分离出16, 产率为65%, 为白色固体(0.257mmol, 0.0966g). ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.60-7.43 (m, 2H), 7.30 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.19 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 6.74 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 2.60-2.39 (m, 4H), 1.66-1.49 (m, 4H), 1.49-1.36 (m, 2H). ^{13}C NMR

(CD₃OD, 126MHz) δ : 180.49, 158.62, 140.22 (q, J=2.3Hz), 133.68, 130.72, 130.40, 129.71, 126.17 (q, J=4.4Hz), 125.21 (q, J=271.2Hz), 123.04, 116.33, 113.38 (q, J=33.1Hz), 74.94, 40.42, 27.64, 25.84。¹⁹F NMR (CD₃OD, 471MHz) δ : -63.66。HRMS (ESI): C₂₀H₂₀F₃N₂O₂ [m+H]⁺的m/z计算值: 377.1477, 实测值: 377.1491。HPLC手性纯度 (λ : 254nm): >99%。熔点: 99.6-100.7℃。

[0224] 17的合成, 3-(4,4-二氟-3-甲基哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过通用程序B用4,4-二氟-3-甲基哌啶盐酸盐合成。分离出17(非对映体的外消旋混合物, 共4种化合物), 产率为71%, 为白色固体(1.38mmol, 0.586g)。¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ : 7.63-7.45 (m, 2H), 7.33 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.23-7.11 (m, 1H), 6.77 (d, J=8.4Hz, 2H), 2.84-2.60 (m, 2H), 2.60-2.48 (m, 1H), 2.28 (q, J=11.4Hz, 1H), 2.19-1.75 (m, 3H), 1.06-0.77 (m, 3H)。¹³C NMR (CD₃OD, 126MHz) δ : 179.95/179.90 (2信号非对映体), 158.93, 140.06 (m), 133.35/133.30 (2信号非对映体), 130.48, 130.05/130.02 (2信号非对映体), 129.52/129.48 (2信号非对映体), 126.51 (q, J=4.6Hz), 125.12 (q, J=270.9Hz), 123.94/123.90 (2信号非对映体, t, J~247.0Hz), 123.35, 116.57, 113.62 (q, J=33.5Hz), 73.86, 51.95 (t, J=9.3Hz), 45.37 (m), 39.77 (m), 34.98 (t, J=23.5Hz), 10.51 (m)。¹⁹F NMR (CD₃OD, 471MHz) δ : -63.68, -102.29 (m)。HRMS (ESI): C₂₁H₂₀F₅N₂O₂ [m+H]⁺的m/z计算值: 427.1445, 实测值: 427.1426。HPLC手性纯度 (λ : 254nm): 99%。熔点: 109.5-114.5℃ (分解)。

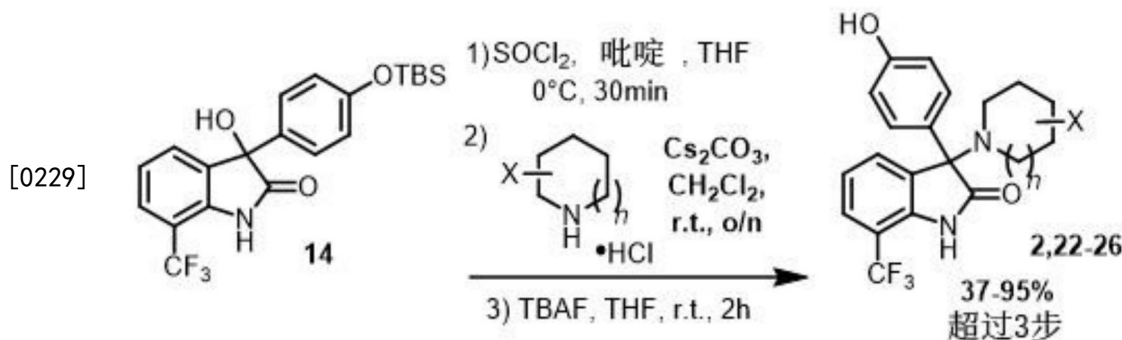
[0225] 18的合成, 3-(4-羟基苯基)-3-吗啉代-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过通用程序B用吗啉合成。分离出18, 产率为70%, 为白色固体(0.277mmol, 0.1046g)。¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ : 7.56 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.51 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.35 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.20 (dd, J=8.1, 7.5Hz, 1H), 6.76 (d, J=8.4Hz, 2H), 3.70-3.58 (m, 4H), 2.62-2.50 (m, 4H)。¹³C NMR (CD₃OD, 126MHz) δ : 179.78, 158.82, 140.24 (q, J=2.43Hz), 133.15, 130.72, 129.90, 129.38, 126.45 (q, J=4.47Hz), 125.10 (q, J=270.92Hz), 123.26, 116.51, 113.52 (q, J=33.18Hz), 74.20, 68.51, 48.75。¹⁹F NMR (CD₃OD, 471MHz) δ : -63.67 (s)。HRMS (ESI): C₁₉H₁₈F₃N₂O₃ [m+H]⁺的m/z计算值: 379.1270, 实测值: 379.1273。HPLC手性纯度 (λ : 254nm): 99%。熔点: 214.7-215.0℃ (分解)。

[0226] 19的合成, 3-(氮杂环丙烷-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过通用程序B用氮杂环戊烷合成。分离出19, 产率为56%, 为灰白色固体(0.133mmol, 0.052g)。¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ : 7.57 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.48 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.33 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.18 (t, J=7.8Hz, 1H), 6.73 (d, J=8.8Hz, 2H), 2.76-2.45 (m, 4H), 1.79-1.49 (m, 8H)。¹³C NMR (CD₃OD, 126MHz) δ : 181.24, 158.66, 139.92 (q, J=2.1Hz), 134.97, 131.95, 130.18, 129.65, 126.08 (q, J=4.5Hz), 125.21 (q, J=270.7Hz), 123.19, 116.28, 113.40 (q, J=33.2Hz), 75.76, 52.23, 31.03, 27.53。¹⁹F NMR (CD₃OD, 471MHz) δ : -63.68。HRMS (ESI): C₂₁H₂₂F₃N₂O₂ [m+H]⁺的m/z计算值: 391.1633, 实测值: 391.1619。HPLC手性纯度 (λ : 254nm): 98%。熔点: 103.1-104.3℃。

[0227] 20的合成, 3-(4-羟基苯基)-3-(4-羟基哌啶-1-基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过通用程序B用哌啶-4-醇合成。分离出20, 产率为67%, 为灰白色固体(0.135mmol, 0.053g)。¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ : 7.60-7.41 (m, 2H), 7.31 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.19 (t, J=7.8Hz, 1H), 6.75 (d, J=8.4Hz, 2H), 3.60-3.45 (m, 1H), 2.94-2.64 (m, 2H), 2.42-2.21 (m,

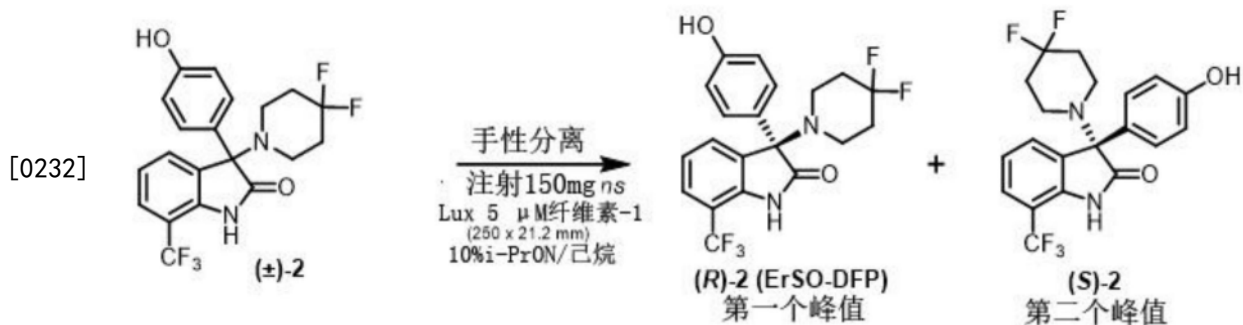
2H), 1.85-1.74 (m, 2H), 1.62-1.44 (m, 2H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 180.33, 158.72, 140.14 (q, $J=1.5\text{Hz}$), 133.64, 130.64, 130.39, 129.58, 126.26 (q, $J=4.6\text{Hz}$), 125.19 (q, $J=271.3\text{Hz}$), 123.16, 116.41, 113.44 (q, $J=33.2\text{Hz}$), 74.40, 68.91, 46.05, 35.85。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -63.67。HRMS (ESI): $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$ $[m+H]^+$ 的 m/z 计算值: 393.1426, 实测值: 393.1424。HPLC 手性纯度 (λ : 254nm): 99%。熔点: 143.5°C (分解)。

[0228] 21的合成, 3-(4-羟基苯基)-3-(4-(三氟甲氧基)哌啶-1-基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮的合成。通过通用程序B用4-(三氟甲氧基)哌啶合成。分离出21, 产率为41%, 为灰白色固体 (0.096mmol, 0.0443g)。 ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ : 7.55 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.51 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.32 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.20 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 6.76 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 4.39-4.24 (m, 1H), 2.87-2.64 (m, 2H), 2.54-2.22 (m, 2H), 2.09-1.90 (m, 2H), 1.85-1.69 (m, 2H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 126MHz) δ : 180.10, 158.83, 140.12 (q, $J=2.6\text{Hz}$), 133.46, 130.56, 130.12, 129.54, 126.41 (q, $J=4.5\text{Hz}$), 126.23 (q, $J=270.9\text{Hz}$), 123.30, 123.09 (q, $J=252.6\text{Hz}$), 116.50, 113.55 (q, $J=33.2\text{Hz}$), 76.84 (m), 74.28, 45.21, 33.37。 ^{19}F NMR (CD_3OD , 471MHz) δ : -59.98, -63.69。HRMS (ESI): $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_3$ $[m+H]^+$ 的 m/z 计算值: 461.1300, 实测值: 461.1300。HPLC 手性纯度 (λ : 254nm): 99%。熔点: 100.4-101.8°C。



[0230] 一般程序C(化合物2, 22-26)。向装有14 (1.77mmol, 0.75g) 的火焰干燥烧瓶中加入THF (5.9mL) 并冷却至 0°C 。加入吡啶 (5.32mmol, 0.42mL), 然后加入亚硫酰氯 (SOCl_2 , 8.85mmol, 0.65mL), 直到通过TLC (40:60乙酸乙酯:己烷) 监测消耗起始物质 (14); 添加 SOCl_2 后约30分钟。然后在剧烈搅拌下向反应中加入~30毫升水。然后用乙酸乙酯 (3 $\times$) 萃取所得溶液, 合并的有机层用盐水洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤并真空浓缩。将原油溶解在 CH_2Cl_2 (25.5mL) 中, 加入所需的胺盐酸盐 (3.55mmol, 0.56g), 然后加入碳酸铯 (Cs_2CO_3 , 14.18mmol, 5.01g)。反应搅拌过夜 (约16-18小时), 然后倒入水中 (约100毫升)。用 CH_2Cl_2 (3 $\times$) 萃取有机物, 合并的有机层用1:1盐水:饱和碳酸氢钠洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。然后将所得粗黄油溶解在THF (9.3mL) 中, 然后在THF溶液 (1M, 7.2mL) 中加入TBAF。加入TBAF后, 反应变成淡绿色, 反应搅拌2小时。将反应混合物倒入饱和碳酸氢钠 (~50mL) 中, 用乙酸乙酯 (3 $\times$) 萃取, 用1:1盐水:饱和碳酸氢钠洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。粗产物通过柱色谱法纯化 (SiO_2 , 典型柱条件:洗脱溶剂:初始混合物0:100乙酸乙酯:己烷, 2柱体积, 然后梯度增加至35:65乙酸乙酯:己烷, 10柱体积, 然后保持35:65乙酸乙酯:己烷, 2柱体积, 最后梯度增加至70%乙酸乙酯:己烷3.5柱体积)。

[0231] 2, 3-(4, 4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮的优化合成 (方案3B)。分离出2, 产率为95%, 为灰白色固体 (1.69mmol, 0.696g)。使用通用程序B, 所有表征数据均与上述报告2一致。



[0233] (R)-2, ErSO-DFP, (R)-3-(4,4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮和(S)-2, (S)-3-(4,4-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮的手性分离和分离。使用制备型手性HPLC分离法(Lux®5 μ M纤维素-1, LC柱, 250×21.2mm, AXIA™填充, 等度: 10% i-PrOH/己烷)将2分离成其各自的对映体。从纯乙腈冻干后, 手性分离产生: (R)-2(HPLC上的第一个峰), 为白色固体。¹H NMR(CD₃OD, 500MHz) δ : 7.56(d, J=7.5Hz, 1H), 7.52(d, J=8.0Hz, 1H), 7.33(d, J=8.4Hz, 2H), 7.24-7.14(m, 1H), 6.77(d, J=8.4Hz, 2H), 2.80-2.51(m, 4H), 2.02-1.85(m, 4H)。¹³C NMR(CD₃OD, 126MHz) δ : 179.94, 158.92, 140.09(q, J=2.2Hz), 133.37, 130.47, 130.05, 129.46, 126.53(q, J=4.4Hz), 125.12(q, J=271.1Hz), 123.37, 123.01(t, J=241.0Hz), 116.58, 113.63(q, J=33.2), 74.00, 45.13(t, J=5.6Hz), 35.70(t, J=22.9Hz)。¹⁹F NMR(CD₃OD, 471MHz) δ : -62.97(s), -98.87(bs)。HRMS(ESI): C₂₀H₁₈F₅N₂O₂[m+H]⁺的m/z计算值: 413.1288, 实测值: 413.1279。由COSY、HSQC、HMBC和DEPT135进行全结构鉴定。X射线证实了晶体结构。HPLC手性纯度(λ : 254nm): >99%。熔点: 214.1-215.7℃。

[0234] (S)-2(HPLC上的第二个峰), 从纯乙腈冻干后为白色固体。¹H NMR(CD₃OD, 500MHz) δ : 7.56(d, J=7.5Hz, 1H), 7.52(d, J=7.7Hz, 1H), 7.33(d, J=8.7Hz, 2H), 7.24-7.15(m, 1H), 6.77(d, J=9.0Hz, 2H), 2.71-2.50(m, 4H), 2.03-1.76(m, 4H)。¹³C NMR(CD₃OD, 126MHz) δ : 179.93, 158.91, 140.08(q, J=2.3Hz), 133.36, 130.46, 130.04, 129.45, 126.51(q, J=4.5Hz), 125.12(q, J=270.9Hz), 123.36, 123.00(t, J=241.0Hz), 116.57, 113.62(q, J=33.2Hz), 74.00, 45.13(t, J=5.6Hz), 35.71(t, J=22.9Hz)。¹⁹F NMR(CD₃OD, 471MHz) δ : -62.97(s), -98.97(bs)。HRMS(ESI): C₂₀H₁₈F₅N₂O₂[m+H]⁺的m/z计算值: 413.1288, 实测值: 413.1277。晶体结构: 经X射线分析证实。HPLC手性纯度(λ : 254nm): >99%。熔点: 198.0-199.1℃。

[0235] (R)-22的合成, (R)-3-(4-氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吲哚啉-2-酮的合成。通过通用程序C用4-氟哌啶盐酸盐合成。分离出22, 产率为57%, 为灰白色固体(0.538mmol, 0.212g)。使用制备型手性HPLC分离法(Lux®5 μ M纤维素-1, LC柱, 250×21.2mm, AXIA™填充, 等度: 10% i-PrOH/己烷)分离(R)-22。¹H NMR(CD₃OD, 500MHz) δ : 7.76-7.43(m, 2H), 7.32(d, J=8.6Hz, 2H), 7.19(t, J=7.8Hz, 1H), 6.75(d, J=9.0Hz, 2H), 4.59(dtt, J=48.6, 6.9, 3.5Hz, 1H), 2.80-2.59(m, 2H), 2.52-2.40(m, 2H), 2.00-1.63(m, 4H)。¹³C NMR(CD₃OD, 126MHz) δ : 180.22, 158.77, 140.16(q, J=2.2Hz), 133.49, 130.62, 130.22, 129.57, 126.35(q, J=4.6Hz), 125.16(q, J=271.0Hz), 123.22, 116.45, 113.50(q, J=33.2Hz), 89.59(d, J=170.5Hz), 74.43, 44.56(dd, J=17.4, 6.5Hz), 33.25(dd, J=19.5, 6.9Hz)。¹⁹F NMR(CD₃OD, 471MHz) δ : -63.68, -182.68(bs)。HRMS(ESI): C₂₀H₁₉F₄N₂O₂[m+H]⁺的m/

z 计算值:395.1383,实测值:395.1368。HPLC 手性纯度(λ :254nm):>99%。熔点:100.9℃(分解)。

[0236] (R)-23 的合成, (R)-3-(3,3-二氟哌啶-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过通用程序 C 用 3,3-二氟哌啶盐酸盐合成。分离出 23,产率为 58%,为灰白色固体(0.206mmol,0.085g)。使用制备型手性 HPLC 分离法(Lux®5 μ M 纤维素-1,LC 柱,250 $\times$ 21.2mm,AXIA™填充,等度:10% i-PrOH/己烷)分离 (R)-23。¹H NMR (CD₃OD,500MHz) δ :7.55-7.45(m,2H),7.35(d,J=8.7Hz,2H),7.18(t,J=7.8Hz,1H),6.78(d,J=8.8Hz,2H),2.87-2.74(m,2H),2.56-2.40(m,2H),1.98-1.79(m,2H),1.77-1.62(m,2H)。¹³C NMR (CD₃OD,126MHz) δ :179.60,158.89,139.99(q,J=2.4Hz),133.66,130.29,129.72,129.56,126.50(q,J=4.6Hz),125.10(q,J=271.0Hz),123.48,121.53(t,241.0Hz),116.60,113.61(q,J=33.3Hz),73.66,53.91(t,J=29.2Hz),47.71,33.60(t,J=23.3Hz),23.43(t,J=23.4Hz)。¹⁹F NMR (CD₃OD,471MHz) δ :-63.71,-102.32(m)。HRMS (ESI):C₂₀H₁₆F₅N₂O₂的 m/z 计算值 [m-H]⁻:411.1132,实测值:411.1119。HPLC 手性纯度(λ :254nm):>99%。熔点:96.3-100.3℃(分解)。

[0237] (R)-24 的合成, (R)-3-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过通用程序 C 用 3,3-二氟吡咯烷盐酸盐合成。分离出 24,产率为 66%,为白色固体(0.231mmol,0.092g)。使用制备型手性 HPLC 分离法(Lux®5 μ M 纤维素-1,LC 柱,250 $\times$ 21.2mm,AXIA™填充,等度:10% i-PrOH/己烷)分离 (R)-24。¹H NMR (CD₃OD,500MHz) δ :7.56(d,J=7.5Hz,1H),7.51(d,J=8.1Hz,1H),7.36(d,J=8.9Hz,2H),7.19(t,J=7.8Hz,1H),6.78(d,J=8.8Hz,2H),3.13(ddd,J=15.1,12.6,10.6Hz,1H),2.96(dt,J=14.4,11.1Hz,1H),2.86(dt,J=9.1,6.7Hz,1H),2.76(dt,J=9.3,7.2Hz,1H),2.28-2.14(m,2H)。¹³C NMR (CD₃OD,126MHz) δ :179.63,158.87,139.78(q,J=2.1Hz),133.50,130.36(t,J=246.9Hz),130.35,129.64,129.36,126.62(q,J=4.5Hz),125.08(q,J=270.9Hz),123.51,116.57,113.64(q,J=33.2Hz),70.90,56.33(t,J=30.5Hz),46.61(t,J=3.6Hz),36.15(t,J=24.5Hz)。¹⁹F NMR (CD₃OD,471MHz) δ :-63.71,-95.78(p,J=14.2Hz),-95.93(qd,J=14.9,11.25Hz)。HRMS (ESI):C₁₉H₁₄F₅N₂O₂的 m/z 计算值 [m-H]⁻:397.0975,实测值:397.0974。HPLC 手性纯度(λ :254nm):>99%。熔点:98.7℃(分解)。

[0238] (R)-25 的合成, (R)-3-(3,3-二氟氮杂环丁烷-1-基)-3-(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮的合成。通过通用程序 C 用 3,3-二氟氮杂环丁烷盐酸盐合成。分离出 25,产率为 37%,为白色固体(1.31mmol,0.502g)。使用制备型手性 HPLC 分离法(Lux®5 μ M 纤维素-1,LC 柱,250 $\times$ 21.2mm,AXIA™填充,等度:10% i-PrOH/己烷)分离 (R)-25。¹H NMR (CD₃OD,500MHz) δ :7.49(dd,J=11.6,7.8Hz,2H),7.35(d,J=8.7Hz,2H),7.14(t,J=7.8Hz,1H),6.78(d,J=8.7Hz,2H),3.93(td,J=12.5,9.6Hz,2H),3.52(td,J=12.4,9.6Hz,2H)。¹³C NMR (CD₃OD,126MHz) δ :180.00,158.91,139.80(q,J=2.0Hz),133.67,130.09,129.36,129.18,126.84(q,J=4.5Hz),125.04(q,J=270.9Hz),123.75,117.43(t,J=272.7Hz),116.68,113.70(q,J=33.3Hz),72.45,60.01(t,J=24.5Hz)。¹⁹F NMR (CD₃OD,471MHz) δ :-63.64,-102.64(p,J=12.4Hz)。HRMS (ESI):C₁₈H₁₂F₅N₂O₂的 m/z 计算值 [m-H]⁻:383.0819,实测值:383.0822。HPLC 手性纯度(λ :254nm):>99%。熔点:79.0-83.9℃。

[0239] (R)-26 的合成, (R)-3-(4-羟基苯基)-3-(3,3,4,4-四氟吡咯烷-1-基)-7-(三氟甲

基) 吡啶-2-酮的合成。通过通用程序C用3,3,4,4-四氟吡咯烷盐酸盐合成。分离出26, 产率为86%, 为白色固体(0.813mmol, 0.353g)。使用制备型手性HPLC分离法(Lux®5μM纤维素-1, LC柱, 250×21.2mm, AXIA™填充, 等度: 10% i-PrOH/己烷) 分离(R)-26。¹H NMR(CD₃OD, 500MHz) δ: 7.60(d, J=7.6Hz, 1H), 7.54(d, J=8.1Hz, 1H), 7.38(d, J=8.7Hz, 2H), 7.22(t, J=7.8Hz, 1H), 6.82(d, J=8.8Hz, 2H), 3.45-3.24(m, 2H, 与CD₃OD重叠), 3.12(q, J=12.5Hz, 2H)。¹³C NMR(CD₃OD, 126MHz) δ: 178.73, 159.27, 139.73(q, J=2.1Hz), 132.52, 130.19, 129.33, 128.43, 127.12(q, J=4.5Hz), 124.98(q, J=271.0Hz), 123.86, 119.90(tt, J=260.5, 23.5Hz), 116.87, 113.98(q, J=33.4Hz), 70.16, 54.26(t, J=27.9Hz)。¹⁹F NMR(CD₃OD, 471MHz) δ: -63.72, -120.61(t, J=13.2Hz)。HRMS(ESI): C₁₉H₁₂F₇N₂O₂的m/z计算值[m-H]⁻: 433.0787, 实测值: 433.0788。HPLC手性纯度(λ: 254nm): >99%。熔点: 112.3-115.3℃。

[0240] 使用制备型手性HPLC分离法(Lux®5μM纤维素-1, LC柱, 250×21.2mm, AXIA™填充, 等度: 10% i-PrOH/己烷) 分离(S)-26, (S)-3-(4-羟基苯基)-3-(3,3,4,4-四氟吡咯烷-1-基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮。¹H NMR(CD₃OD, 500MHz) δ: 7.60(d, J=7.5Hz, 1H), 7.54(d, J=8.0Hz, 1H), 7.38(d, J=8.6Hz, 2H), 7.22(t, J=7.8Hz, 1H), 6.82(d, J=8.6Hz, 2H), 3.58-3.25(m, 2H, 与CD₃OD重叠), 3.12(q, J=12.5Hz, 2H)。¹³C NMR(CD₃OD, 126MHz) δ: 178.73, 159.28, 139.74(q, J=2.2Hz), 132.52, 130.20, 129.33, 128.43, 127.13(q, J=4.5Hz), 124.98(q, J=271.0Hz), 123.87, 119.91(tt, J=260.5, 23.6Hz), 116.87, 113.98(q, J=33.3Hz), 70.16, 54.26(t, J=27.9Hz)。¹⁹F NMR(CD₃OD, 471MHz) δ: -63.73, -120.62(t, J=13.2Hz)。HRMS(ESI): C₁₉H₁₂F₇N₂O₂的m/z计算值[m-H]⁻: 433.0787, 实测值: 433.0786。HPLC手性纯度(λ: 254nm): >99%。熔点: 99.0-101.6℃。

[0241] 27, 3, 3-双(4-羟基苯基)-7-(三氟甲基)吡啶-2-酮。向圆底烧瓶中加入化合物2(0.243mmol, 0.10g), 并将苯酚(0.85mmol, 0.080g)溶于二氯甲烷(0.5mL)中。然后将反应混合物置于冰浴中, 然后滴加三氟甲磺酸(TfOH, 0.09mL)。注意: 三氟甲磺酸会溶解许多常见的塑料, 尤其是注射器的柱塞, 因此建议使用金属针或玻璃注射器。如果使用塑料注射器, 请避免接触注射器的柱塞。反应搅拌6小时, 同时使冰融化。然后将反应混合物倒入充满冰的饱和碳酸氢钠(水溶液, ~10mL)中, 并用乙酸乙酯(3×)萃取水溶液。将合并的有机层用硫酸钠干燥, 过滤并真空浓缩。然后通过柱色谱法(SiO₂, 洗脱溶剂: 初始混合物0:100乙酸乙酯:己烷, 梯度增加至35:65乙酸乙酯:己烷(15柱体积), 然后增加至70:30乙酸乙酯:己烷(7柱体积), 然后100:0乙酸乙酯:己烷(2柱体积)。27分离为白色固体(0.0480mmol, 0.0185g), 2分离为白色固体(0.0876mmol, 0.0361g)。¹H NMR(CD₃OD, 500MHz) δ: 7.49(d, J=8.1Hz, 1H), 7.39(d, J=7.6Hz, 1H), 7.17(t, J=7.9Hz, 1H), 7.01(d, J=8.6Hz, 4H), 6.72(d, J=8.7Hz, 4H)。¹³C NMR(CD₃OD, 126MHz) δ: 182.44, 158.04, 139.71(q, J=2.1Hz), 138.04, 133.45, 130.98, 130.51, 125.65(q, J=4.6Hz), 125.24(q, J=271.2Hz), 123.30, 116.24, 113.51(q, J=33.2Hz), 62.14。¹⁹F NMR(CD₃OD, 471MHz) δ: -63.65。HRMS(ESI): C₂₁H₁₅F₃NO₃[m+H]⁺的m/z计算值: 386.1004, 实测值: 386.1007。

[0242] 实施例3: 药物剂型。

[0243] 以下制剂说明了可用于治疗或预防性施用本文所述式化合物、本文具体公开的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物(以下称为“化合物X”)的代表性药物剂型。化合物X的一个具体例子是ErSO-DFP。

	<u>(i) 片剂 1</u>	<u>mg/片</u>
	‘化合物 X’	100.0
	乳糖	77.5
[0244]	聚维酮	15.0
	交联羧甲基纤维素钠	12.0
	微晶纤维素	92.5
	硬脂酸镁	<u>3.0</u>
		300
	<u>(ii) 片剂 2</u>	<u>mg/片</u>
	‘化合物 X’	20.0
[0245]	微晶纤维素	410.0
	淀粉	50.0
	淀粉乙醇酸钠	15.0
[0246]	硬脂酸镁	<u>5.0</u>
		500
	<u>(iii) 胶囊</u>	<u>mg/胶囊</u>
	‘化合物 X’	10.0
	胶体二氧化硅	1.5
[0247]	乳糖	465.5
	预糊化淀粉	120.0
	硬脂酸镁	<u>3.0</u>
		600
	<u>(iv) 注射液 1 (1 mg/mL)</u>	<u>mg/mL</u>
	‘化合物 X’ (游离酸形式)	1.0
	磷酸氢二钠	12.0
[0248]	磷酸二氢钠	0.7
	氯化钠	4.5
	1.0 N 氢氧化钠溶液	适量 (q.s.)
	(pH 调节至 7.0-7.5)	
	注射用水	q.s. 添加 1mL

	<u>(v) 注射液 2 (10 mg/mL)</u>	<u>mg/mL</u>
	‘化合物 X’ (游离酸形式)	10.0
	磷酸二氢钠	0.3
[0249]	磷酸氢二钠	1.1
	聚乙二醇 400	200.0
	0.1 N 氢氧化钠溶液	q.s.
	(pH 调节至 7.0-7.5)	
	注射用水	q.s. 添加 1mL
	<u>(vi) 气雾剂</u>	<u>mg/罐</u>
	‘化合物 X’	20
[0250]	油酸	10
	一氟三氯甲烷	5000
	二氯二氟甲烷	10000
[0251]	二氯四氟乙烷	5000
	<u>(vii) 外用凝胶 1</u>	<u>wt. %</u>
	‘化合物 X’	5%
	卡波姆 934	1.25%
[0252]	三乙醇胺	q.s.
	(pH 调节至 5-7)	
	对羟基苯甲酸甲酯	0.2%
	纯净水	q.s. 至 100g
	<u>(viii) 外用凝胶 2</u>	<u>wt. %</u>
	‘化合物 X’	5%
	甲基纤维素	2%
[0253]	对羟基苯甲酸甲酯	0.2%
	对羟基苯甲酸丙酯	0.02%
	纯净水	q.s. 至 100g

	<u>(ix) 外用软膏</u>	<u>wt. %</u>
	‘化合物 X’	5%
	丙二醇	1%
[0254]	无水软膏基质	40%
	聚山梨酯 80	2%
	对羟基苯甲酸甲酯	0.2%
	纯净水	q.s.至 100g
	<u>(x) 外用乳膏 1</u>	<u>wt. %</u>
	‘化合物 X’	5%
	白蜂蜡	10%
[0255]	液体石蜡	30%
	苯甲醇	5%
	纯净水	q.s.至 100g
	<u>(xi) 外用乳膏 2</u>	<u>wt. %</u>
[0256]	‘化合物 X’	5%
	硬脂酸	10%
	单硬脂酸甘油酯	3%
	聚氧乙烯硬脂醚	3%
	山梨糖醇	5%
[0257]	棕榈酸异丙酯	2%
	对羟基苯甲酸甲酯	0.2%
	纯净水	q.s.至 100g

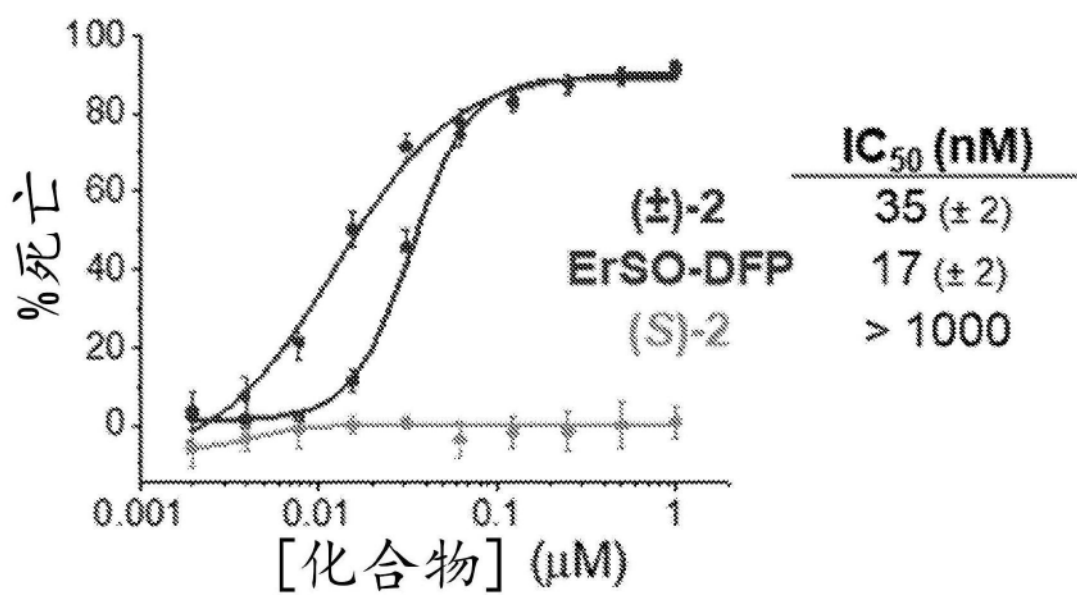
[0258] 这些制剂可通过制药领域中众所周知的常规程序制备。应理解，上述药物组合物可根据众所周知的制药技术进行改变，以适应不同量和类型的活性成分“化合物X”。气雾剂(vi)可以与标准的、计量剂量的气雾剂分配器结合使用。此外，具体的成分和比例是为了说明的目的。可以根据所需的剂型的所需性质，用合适的等同物替换成分，并且可以改变比例。

[0259] 尽管上面已经参考公开的实施方案和实施例描述了具体的实施方案，但是这样的实施方案仅仅是说明性的，并不限制本发明的范围。可以根据本领域的普通技术人员进行改变和修改，而不偏离如以下权利要求所定义的本发明的更广泛方面。

[0260] 所有出版物、专利和专利文献通过引用并入本文，如同通过引用单独并入一样。不应由此理解与本公开内容不一致的任何限制。已经参考各种具体和优选的实施方案和技术

描述了本发明。然而,应当理解,在保持在本发明的精神和范围内的同时,可以进行许多变化和修改。

A.



B.

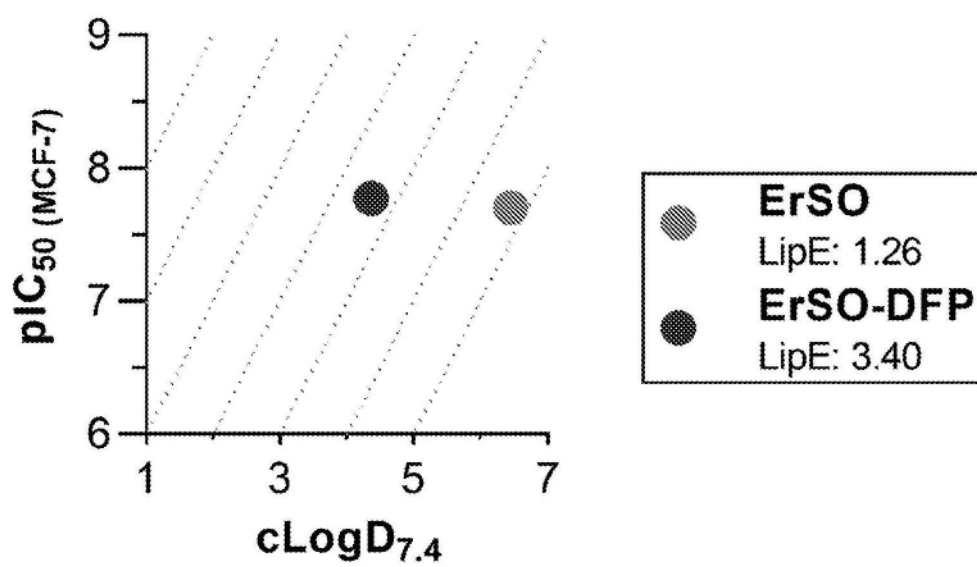


图1

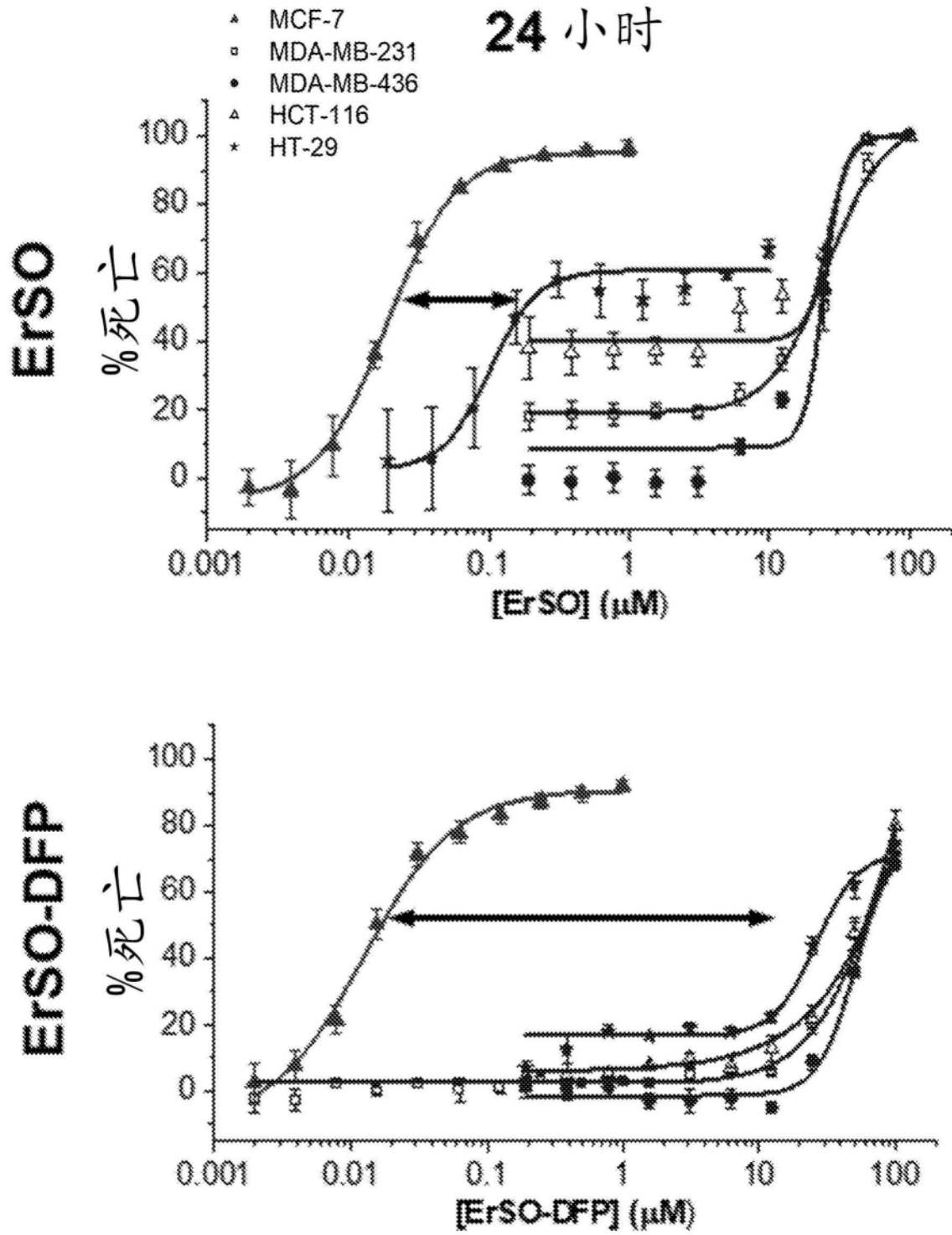


图2

B.

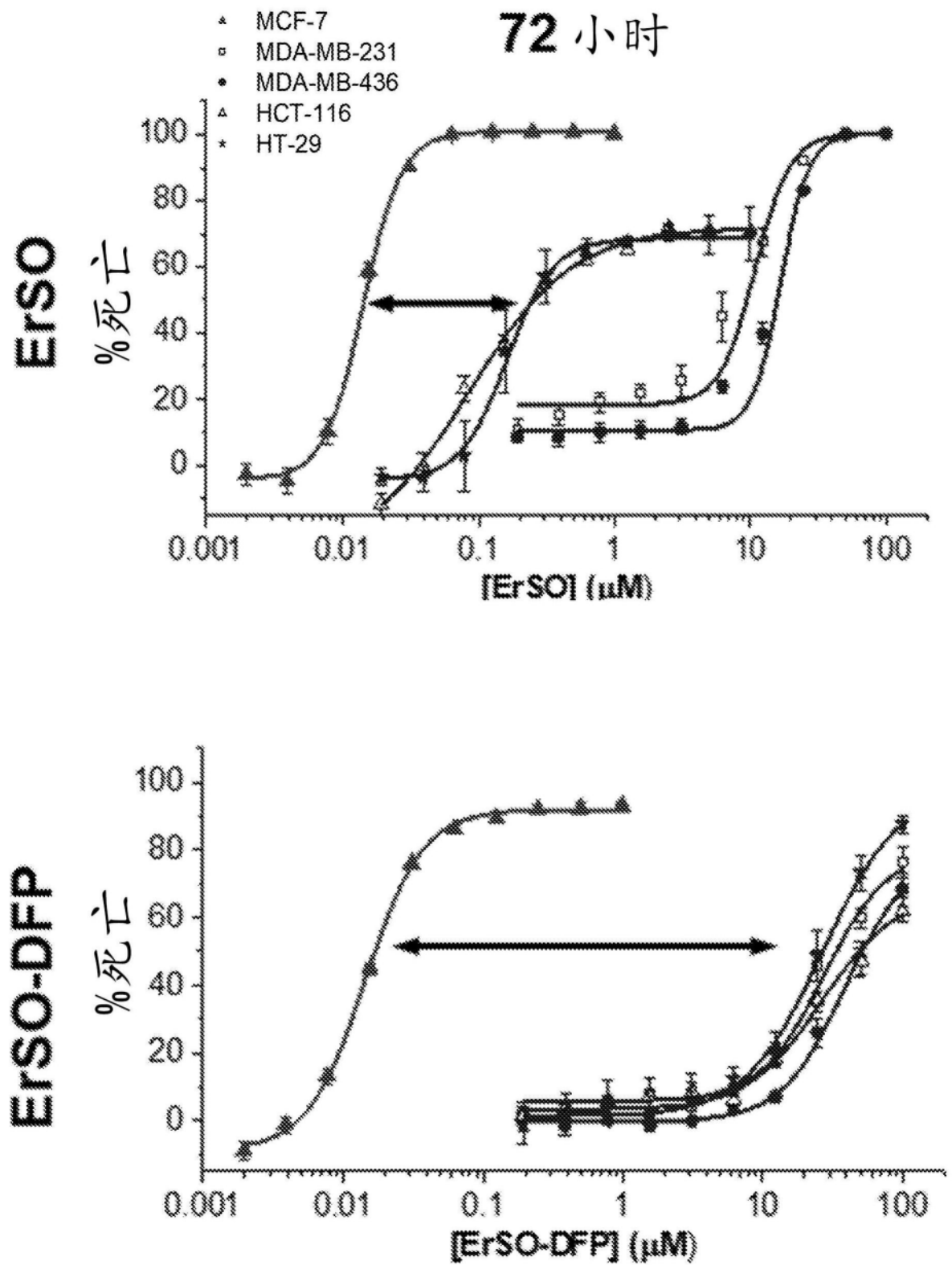


图2(续)

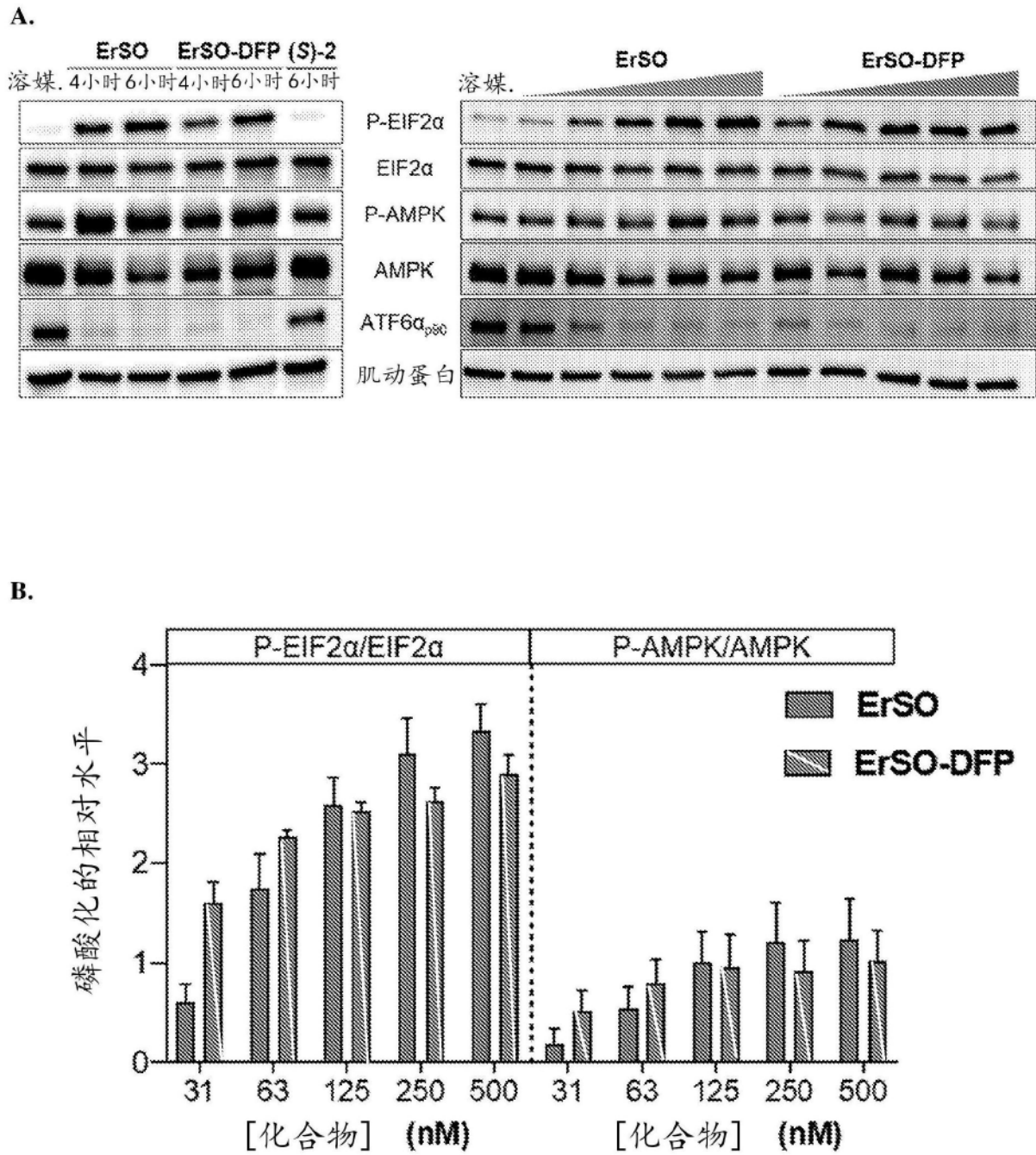
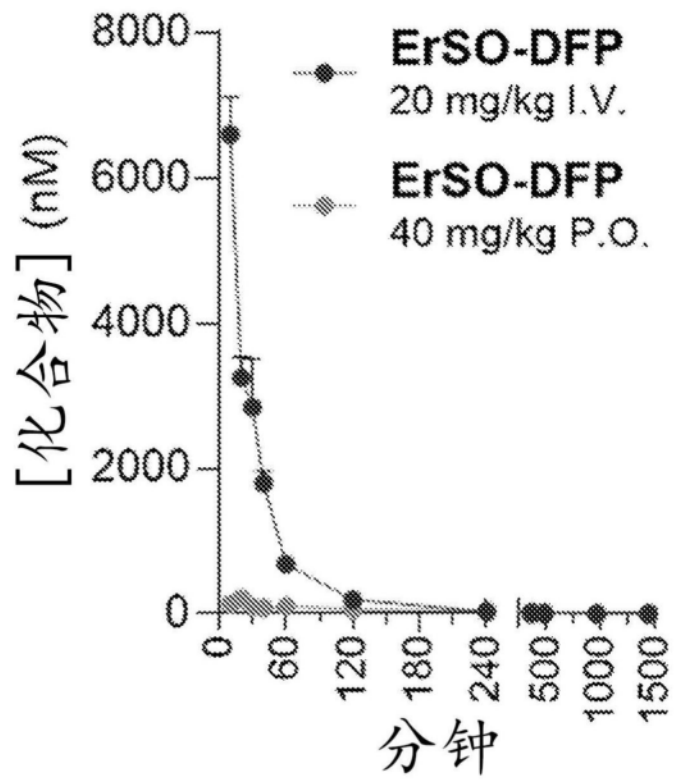


图3

A.



B.

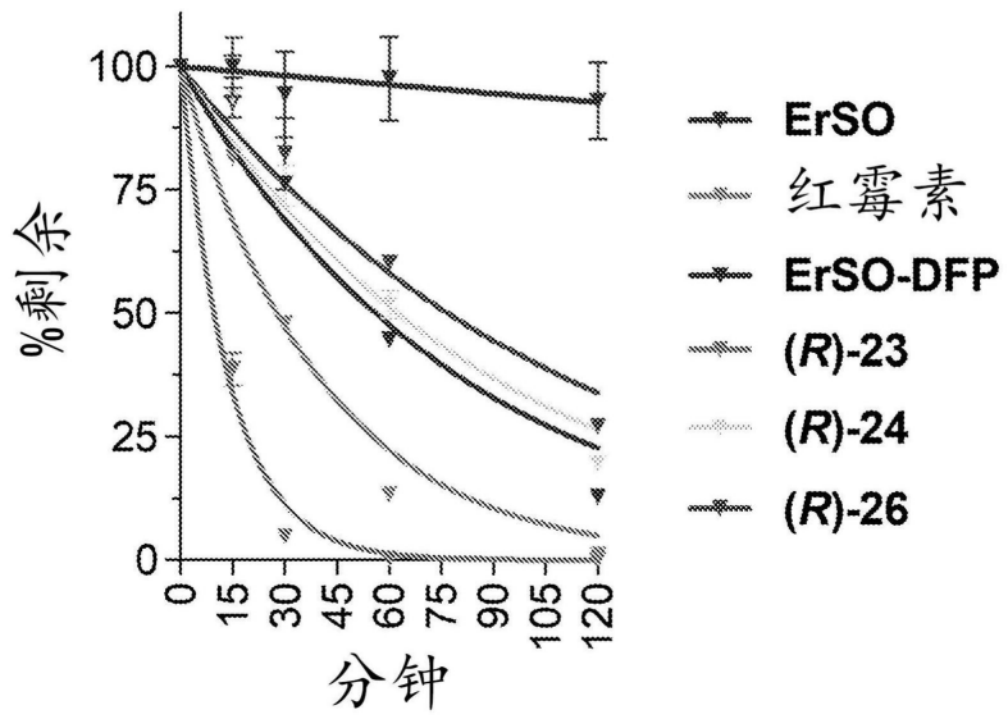


图4

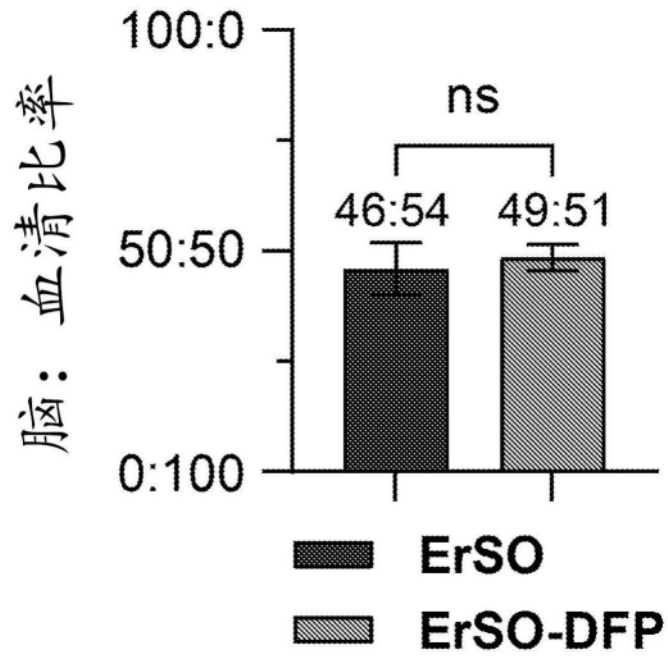


图5

A.

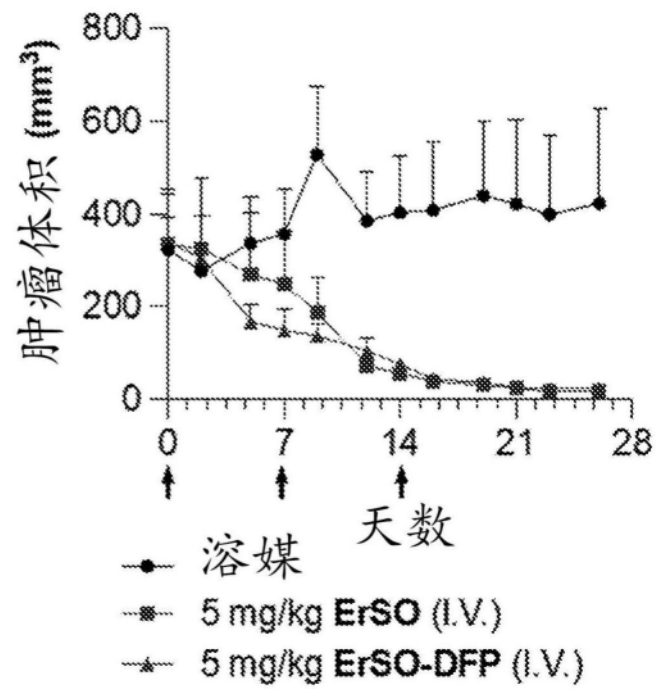


图6

B.

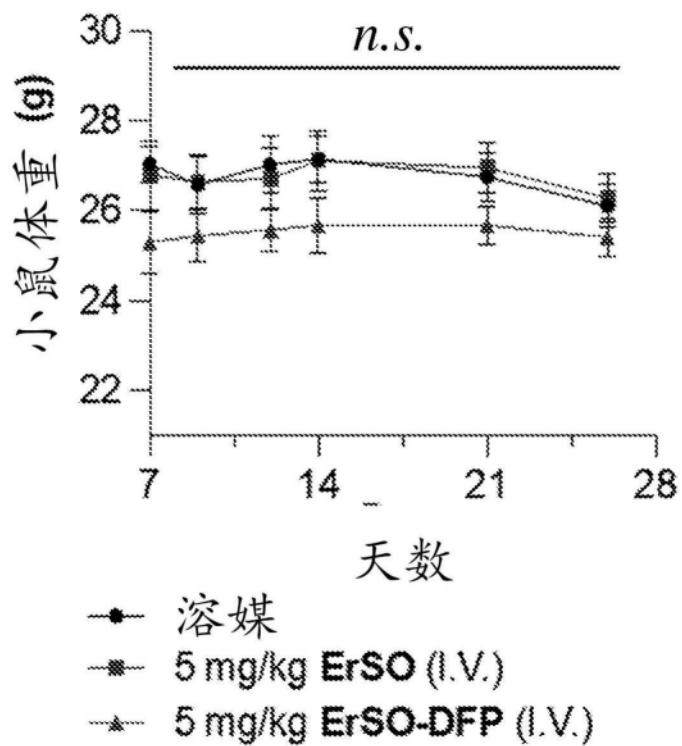


图6(续)

A.

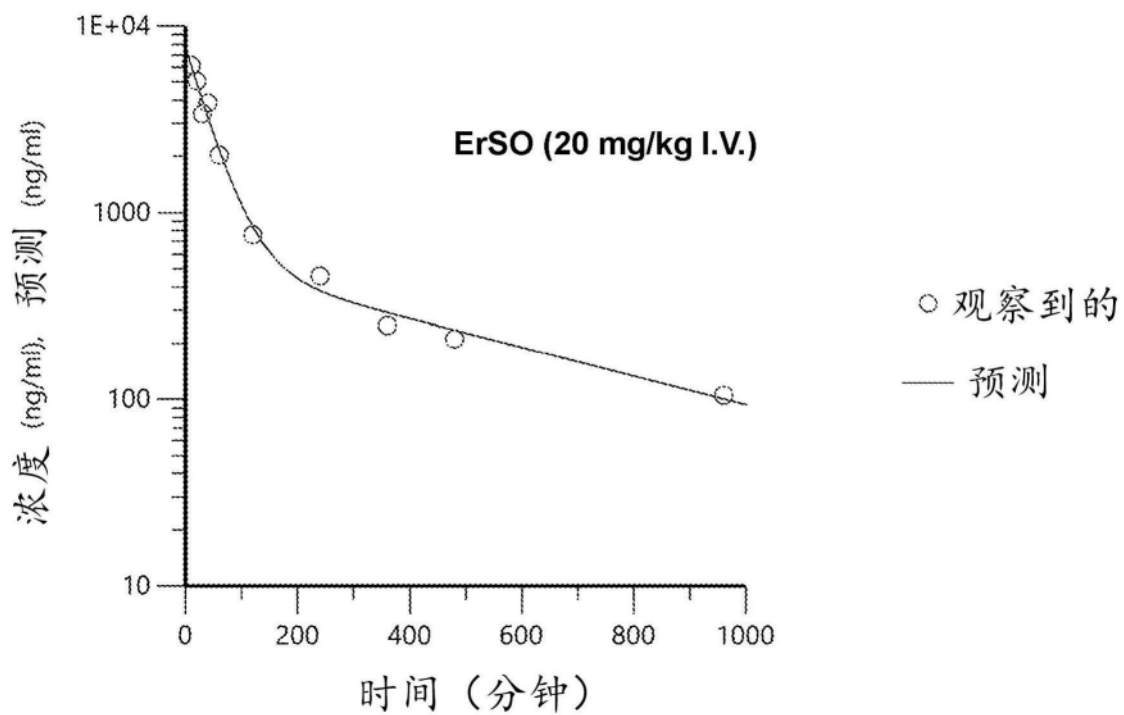


图7

B.

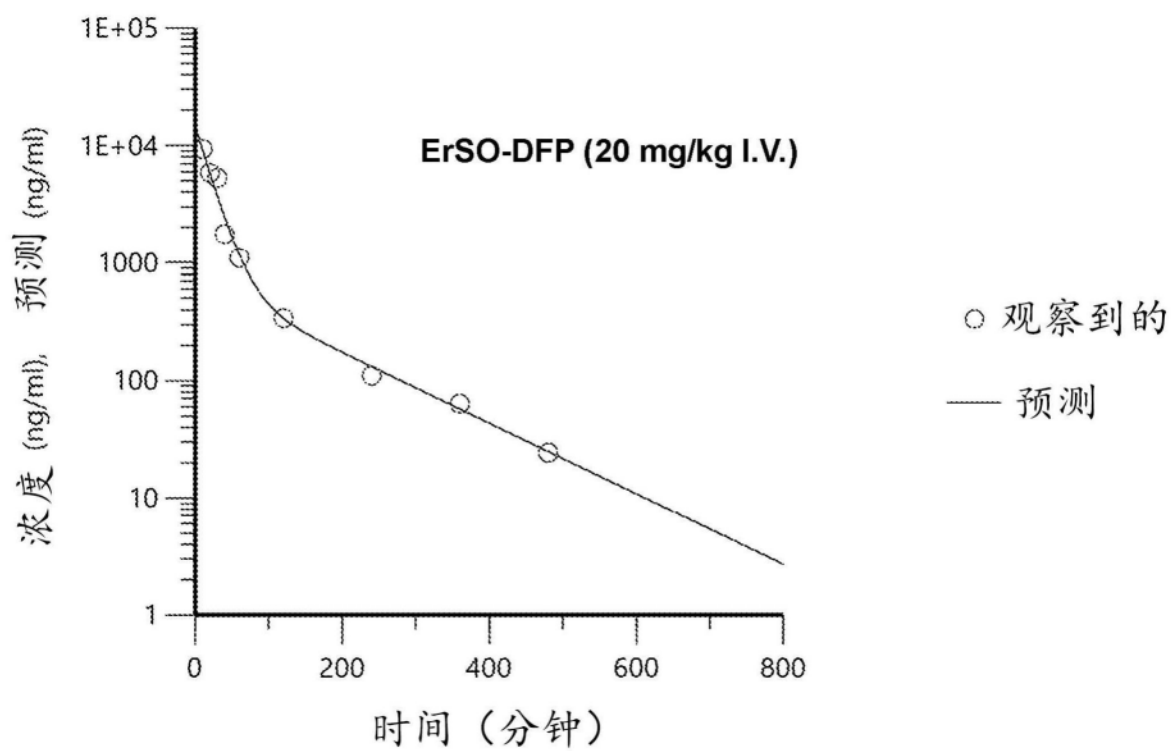


图7(续)