



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105764909 B

(45)授权公告日 2019.12.06

(21)申请号 201480060274.8

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(22)申请日 2014.10.29

代理人 彭鲲鹏 郑斌

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105764909 A

(51)Int.Cl.

(43)申请公布日 2016.07.13

C07F 9/09(2006.01)

(续)

(30)优先权数据

13191457.4 2013.11.04 EP

(56)对比文件

WO 03008626 A2, 2003.01.30, 全文.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2013163576 A1, 2013.10.31, 全文.

2016.05.03

Kopp, Florian et al. peptide

(86)PCT国际申请的申请数据

Macrocyclization: The Reductase of the

PCT/EP2014/073258 2014.10.29

Nostocyclopeptide Synthetase Triggers the
Self-Assembly of a Macrocylic Imine.
《Journal of the American Chemical
Society》.2006, 第128卷第16478-16479页.

(87)PCT国际申请的公布数据

Yurgilevich, V. P. et al. Some

W02015/063177 EN 2015.05.07

prerequisites to the use of pantothenic
acid preparations in the complex therapy
of rheumatism.《Pantotenovoi Kisloto》
.1977, 第167-9页. (续)

(73)专利权人 阿西耶斯生物公司

审查员 赵立立

地址 斯洛文尼亚卢布尔雅那

权利要求书2页 说明书17页 附图3页

专利权人 格罗宁根大学

格罗宁根大学医院

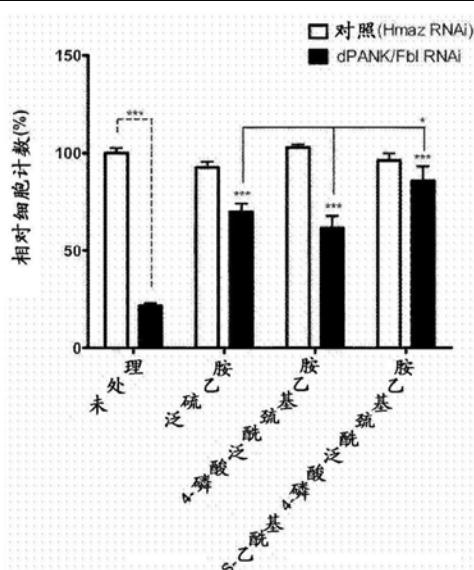
(72)发明人 布兰科·延科 格雷格·科塞茨

赫尔沃耶·佩特科维科 (续)

(54)发明名称

用于治疗泛酸激酶相关神经变性(PKAN)的
稳定泛酰巯基乙胺衍生物及用于合成这样的化
合物的方法

(57)摘要

本发明涉及(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙
胺衍生物、其合成方法以及这样的化合物的相
关医疗用途。优选的医疗用途涉及神经变性疾病如
PKAN的治疗。

[接上页]

(72)发明人 艾达·波德戈塞克贝尔克
热尔卡·帕霍尔 阿伦·库萨科
(续)

(51) Int.Cl.
A61K 31/661(2006.01) (续)

(56)对比文件

Velikodvorskaya, V. V. et al. Substrate specificity of acetyl-CoA carboxylase from rat liver.《Biokhimiya (Moscow)》.1990, 第55卷第1018-24页.

Gerngross, T. U. et al. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules in vitro.《Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America》.1995, 第92卷第6279-83页.

Negrel, Jonathan et al. The phosphohydrolysis of hydroxycinnamoyl-coenzyme A thio esters in plant extracts.《Phytochemistry》.1984, 第23卷第31-4页.

Banns, Heather et al. The synthesis of acetylcholine from acetyl-CoA, acetyl-dephospho-CoA and acetyl pantetheine phosphate by choline acetyltransferase.《Journal of Neurochemistry》.1977, 第29卷第433-7页.

Bartling, Craig M. et al. Steady-State Kinetics and Mechanism of LpxD, the N-Acyltransferase of Lipid A Biosynthesis.《Biochemistry》.2008, 第47卷第5290-5302页.

Tran, Lucky et al. Insights into protein-protein and enzyme-substrate interactions in modular polyketide synthases.《Chemistry & Biology》.2010, 第17卷第705-716页.

Alexander L. Mandel et al. Modular Synthesis of Pantetheine and Phosphopantetheine.《ORGANIC LETTERS》.2004, 第6卷第4801-4803页.

Zhuang, Zhihao et al. Divergence of Function in the Hot Dog Fold Enzyme Superfamily: The Bacterial Thioesterase YciA.《Biochemistry》.2008, 第47卷第2789-

2796页.

Vitali, Francesca et al. Production of vancomycin aglycone conjugated to a peptide carrier domain derived from a biosynthetic non-ribosomal peptide synthetase.《Chemical Communications》.2003, 第21卷第2718-2719页.

Srivastava, D. K. et al. Dehydrogenase and Oxidase Reactions of Medium-Chain Fatty Acyl-CoA Dehydrogenase Utilizing Chromogenic Substrates: Role of the 3,5-Adenosine Diphosphate Moiety of the Coenzyme A Thioester in Catalysis.《Biochemistry》.1995, 第34卷第4625-32页.

Nikawa, Junichi et al. Inhibitory effects of long-chain acyl coenzyme A analogs on rat liver acetyl coenzyme A carboxylase.《FEBS Letters》.1979, 第102卷第223-6页.

Luo, Lusong et al. Role of Active Site Binding Interactions in 4-Chlorobenzoyl-Coenzyme A Dehalogenase Catalysis.《Biochemistry》.2001, 第40卷第15684-15692页.

Hoffmann, Laurent et al. Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis.《Journal of Biological Chemistry》.2001, 第276卷第36831-36838页.

Lee, Che-Hung et al. Investigation of the solution conformation of coenzyme A and its derivatives by hydrogen-1 and phosphorus-31 fast Fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy.《Journal of the American Chemical Society》.1975, 第97卷第1225-36页.

Singh, Manoranjan et al. S-Acetyl phosphopantetheine: deacetyl citrate lyase S-acetyltransferase from Klebsiella aerogenes.《Biochemical and Biophysical Research Communications》.1973, 第53卷第1-9页.

(续)

[接上页]

(72)发明人 奥达·科妮莉亚·玛丽亚·西邦
巴拉吉·斯里尼瓦桑

(51)Int.Cl.

A61P 25/28(2006.01)

(56)对比文件

Hu, Le-Le et al. Predicting biological functions of compounds based on chemical-chemical interactions.《PLoS One》.2011, 第6卷第e29491页.

Nguyen, Tran Giac et al. New substrates and inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase.《Hoppe-Seylers Zeitschrift fuer Physiologische Chemie》.1984, 第365卷第1-8页.

Katarzyna Siudeja et al. Impaired Coenzyme A metabolism affects histone and tubulin acetylation in Drosophila and human cell models of pantothenate kinase associated neurodegeneration.《EMBO Mol Med》.2011, 第3卷第755-766页.

Robins, Lori I. et al. Structural Basis for the Sugar Nucleotide and Acyl-Chain Selectivity of Leptospira interrogans LpxA.《Biochemistry》.2009, 第48卷第6191-6201页.

Borgaro, Janine G. et al. Substrate Recognition by β -Ketoacyl-ACP Synthases.《Biochemistry》.2011, 第50卷第10678-10686页.

Geib, Nina et al. New insights into the first oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2008, 第18卷第3081 -3084页.

A. G. et al. Interaction of acetyl-CoA fragments with rat liver acetyl-CoA carboxylase, Rabinkov.《European Journal of Biochemistry》.1990, 第193卷第351-3页.

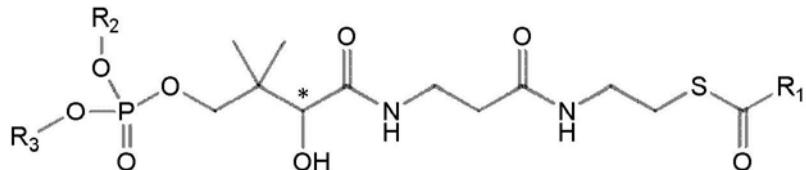
Ploskon, Eliza et al. Recognition of Intermediate Functionality by Acyl Carrier Protein over a Complete Cycle of Fatty Acid Biosynthesis.《Chemistry & Biology (Cambridge, MA, United States)》.2010, 第17卷第776-785页.

Bartling, Craig M. et al. Steady-State Kinetics and Mechanism of LpxD, the N-Acyltransferase of Lipid A Biosynthesis.《Biochemistry》.2008, 第47卷第5290-5302页.

Negrel, Jonathan et al. The biosynthesis of feruloyltyramine in Nicotiana Tabacum.《Phytochemistry》.1984, 第23卷第2797-801页.

Hartmann, Dagmar et al. Spatial arrangement of coenzyme and substrates bound to L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase as studied by spin-labeled analogs of NAD⁺ and CoA.《Biochemistry》.1991, 第30卷第2782-90页.

1. 具有以下结构式的化合物或者其可药用盐：



(结构 I),

其中：

R₁为-H、未经取代或经取代的C₁-C₈烷基、经取代或未经取代的C₃-C₁₀环烷基、经取代或未经取代的C₆-C₁₈芳基、经取代或未经取代的具有1至5个选自N、O和S之杂原子的3元至15元非芳族杂环基、经取代或未经取代的具有1至5个选自N、O和S之杂原子的3元至15元芳族杂环基、-C=NR₁₁、-CN、-OR₁₁、-OC(0)R₁₁、-NR₁₁R₁₂、-NR₁₁C(0)R₁₂、-NO₂、-N=CR₁₁R₁₂、或者-卤素；

R₂和R₃独立地选自：H和新戊酰氧基甲基，其中R₂和R₃中的至少一个是新戊酰氧基甲基；

R₁₁和R₁₂各自独立地选自氢、经取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经取代或未经取代的C₃-C₁₀环烷基、经取代或未经取代的C₆-C₁₈芳基、经取代或未经取代的具有1至5个选自N、O和S之杂原子的3元至15元杂环基、经取代或未经取代的C₁-C₈烷氧基、以及卤素；

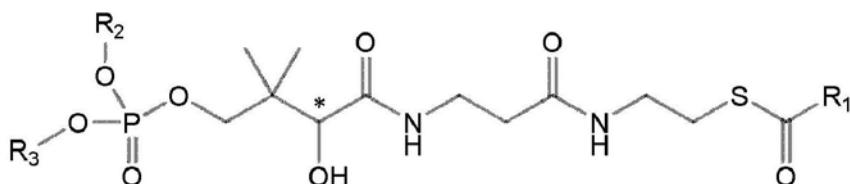
其中每个取代基独立地选自卤素、氰基、羟基、硝基、叠氮基、C₁-C₆烷酰基、甲酰胺基、C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、C₁-C₁₂烷氧基、苯氧基、具有一个或更多个硫醚键的C₁-C₁₂烷基硫基、具有一个或更多个亚磺酰基键的C₁-C₁₂烷基亚磺酰基、具有一个或更多个磺酰基键的C₁-C₁₂烷基磺酰基、具有一个或更多个N原子的C₁-C₁₂氨基烷基、苯基、萘基、以及苄基。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其中R₁为C₁-C₈烷基。

3. 根据权利要求2所述的化合物，其中R₁为甲基、乙基、丙基、或丁基。

4. 根据权利要求3所述的化合物，其中R₁为甲基。

5. 具有以下结构式的化合物或者其可药用盐在制备可用于治疗泛酸激酶相关神经变性的药物中的用途：

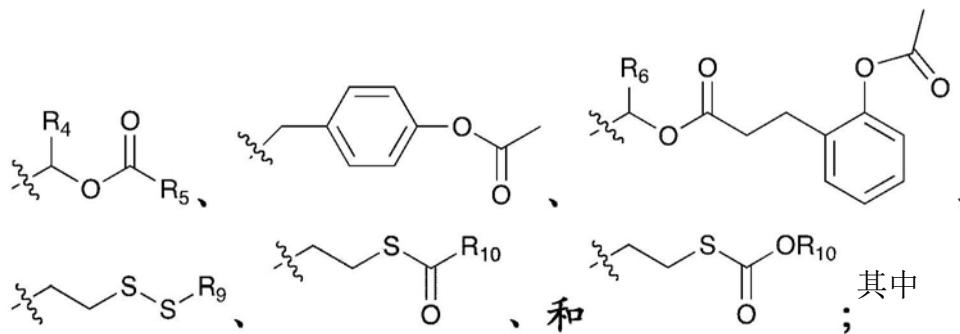


(结构 I),

其中：

R₁为-H、未经取代或经取代的C₁-C₈烷基、经取代或未经取代的C₃-C₁₀环烷基、经取代或未经取代的C₆-C₁₈芳基、经取代或未经取代的具有1至5个选自N、O和S之杂原子的3元至15元非芳族杂环基、经取代或未经取代的具有1至5个选自N、O和S之杂原子的3元至15元芳族杂环基、-C=NR₁₁、-CN、-OR₁₁、-OC(0)R₁₁、-NR₁₁R₁₂、-NR₁₁C(0)R₁₂、-NO₂、-N=CR₁₁R₁₂、或者-卤素；

R₂和R₃独立地选自：-H、-甲基、-乙基、-苯基、乙酰氧基甲基、新戊酰氧基甲基、



R₄为-H或-烷基；

R₅为-H或-烷基；

R₆为-H、-烷基、或-CH₂(CO)OCH₃；

R₉为-H或-烷基；

R₁₀为-H或-烷基；

R₁₁和R₁₂各自独立地选自氢、经取代或未经取代的C₁-C₈烷基、经取代或未经取代的C₃-C₁₀环烷基、经取代或未经取代的C₆-C₁₈芳基、经取代或未经取代的具有1至5个选自N、O和S之杂原子的3元至15元杂环基、经取代或未经取代的C₁-C₈烷氧基、以及卤素；

其中每个取代基独立地选自卤素、氰基、羟基、硝基、叠氮基、C₁-C₆烷酰基、甲酰胺基、C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、C₁-C₁₂烷氧基、苯氧基、具有一个或更多个硫醚键的C₁-C₁₂烷基硫基、具有一个或更多个亚磺酰基键的C₁-C₁₂烷基亚磺酰基、具有一个或更多个磺酰基键的C₁-C₁₂烷基磺酰基、具有一个或更多个N原子的C₁-C₁₂氨基烷基、苯基、萘基、以及苄基。

6. 根据权利要求5所述的用途，其中R₂和R₃为相同残基。
7. 根据权利要求6所述的用途，其中R₂和R₃各自为H。
8. 根据权利要求5所述的用途，其中R₁为C₁-C₈烷基。
9. 根据权利要求8所述的用途，其中R₁为甲基、乙基、丙基、或丁基。
10. 根据权利要求9所述的用途，其中R₁为甲基。
11. 根据权利要求5所述的用途，其中R₁为甲基且R₂和R₃各自为H。
12. 根据权利要求11所述的用途，其中所述化合物为D立体异构体。
13. 根据权利要求11所述的用途，其中所述其可药用盐为钙盐。
14. 根据权利要求5所述的用途，其中所述药物用于经口施用。
15. 根据权利要求5所述的用途，其中所述药物为片剂或胶囊。
16. 根据权利要求5所述的用途，其中所述药物为混悬剂。
17. 根据权利要求5所述的用途，其中所述药物用于肠胃外施用。
18. 根据权利要求5所述的用途，其中所述药物用于静脉内施用。
19. 根据权利要求5所述的用途，其中所述药物为溶液剂。
20. 根据权利要求5所述的用途，其中所述药物用于腹膜内施用、肌内施用、皮下施用、舌下施用、或局部施用。

用于治疗泛酸激酶相关神经变性(PKAN)的稳定泛酰巯基乙胺衍生物及用于合成这样的化合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及泛酰巯基乙胺(pantetheine)衍生物、其合成及其医疗用途。

背景技术

[0002] 泛酸激酶相关神经变性(pantothenate kinase-associated neurodegeneration,PKAN)是罕见的遗传性神经变性疾病。该疾病由编码泛酸激酶2(PANK2)的基因中的突变引起。泛酸激酶2在辅酶A的从头生物合成途径中使泛酸(pantothenate)磷酸化为4'-磷酸泛酸。在PKAN患者中,PANK2(人中已知的四种PANK同种型之一,并且定位于线粒体)受到影响,并导致严重的神经变性和过早死亡(Zhou,B.等,Nat.Genet.,2001,28,345)。

[0003] 泛酸、4'-磷酸泛酸、泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺都被建议作为治疗PKAN的潜在试剂。例如,作为泛酸激酶步骤的下游CoA代谢途径的中间体,4'-磷酸泛酸和4'-磷酸泛酰巯基乙胺都被设想为PKAN的潜在治疗选择(Zhou,B.等,Nat.Genet.,2001,28,345,WO 2003/008626)。泛硫乙胺(pantethine)(泛酰巯基乙胺的二硫化物)已显示出对PKAN的果蝇模型的救援(Rana,A.等,PNAS,2010,107,6988)。

[0004] 泛酸和泛酰巯基乙胺的磷酸化衍生物的使用和测试由于缺乏合适的制备方法和纯化过程而受到阻碍。大部分对于合成各种磷酸化泛酸衍生物的研究在很久以前已经进行,当时可用的分析技术是有限的。因此,在许多情况下,产品的结构和纯度只是猜测,而不是另外确定。此外,在大多数情况下,没有对过程进行很好地描述并且其再现性存在问题(King,T.E.等,J.Biol.Chem.,1951,191,515;King,T.E.Science,1950,112,562;J.Baddiley和E.M.Thain,J.Chem.Soc.,1953,1610;Kopelevich,V.M.,Khim.Farm.Zh.,1967,11,26;Hashimoto,Chem.Lett.,1972,595)。

[0005] 最近,描述了4'-磷酸泛酸的化学合成。所描述的合成方法是冗长的6步合成过程(Strauss等,Biochemistry,2004,43,15520)。在同一出版物中公开了对于4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰半胱氨酸的较早的合成方法。

[0006] 尽管泛硫乙胺是救援果蝇PKAN模型的强效化合物,但是在血清中泛硫乙胺通过泛酰巯基乙胺酶迅速转化为维生素B5和半胱胺(Wittwer等,J.Clin.Invest.,1985,76,1665),并且因此化合物泛硫乙胺不太可能有效地治疗PKAN。这已经通过我们自己未发表的观测所证实。

[0007] 虽然已经推测4'-磷酸泛酰巯基乙胺的医疗用途,但是迄今尚未预见(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺衍生物的医疗用途。特别地,尚未提出这样的化合物可用于治疗神经变性疾病,如PKAN。

[0008] 作为(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺衍生物组的成员,(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺已经从结构上被描述(Lee,C-H.和Sarma,R.H.,JACS,1975,97,1225)。然而,尚未报道该化合物的经济上可行的化学合成方法或者可能的医疗用途。

[0009] 已经描述了 (S)-苯甲酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺作为合成CoA衍生物的中间体 (WO2012/17400)。然而,该化合物的药物用途还未可见。

[0010] 已知提高化合物在医药治疗中的功效的方法,特别是提高药物化合物穿透膜或血脑屏障的能力的方法。经常发现磷酸化化合物的医疗用途受到化合物穿透细胞膜之较差能力的限制。这归因于磷酸基团上的负电荷,其不易于穿过细胞膜。因此,掩蔽磷酸基团以产生中和的形式并且使用经掩蔽的化合物作为前药,使得药物递送至细胞内部,其中存在于细胞中的酯酶随后可使磷酸基团的保护基团断裂以释放活性形式的药物。由此可以提高具有生物活性的磷酸化化合物的生物利用度 (Schultz, K. Bioorg. Med. Chem., 2003, 11, 885)。通常用于此目的的掩蔽基团为酰氧基烷基,如新戊酰氧基甲基 (POM) 和乙酰氧基甲基 (AM)。具体地已显示POM衍生物在缓冲液和血浆中稳定。

发明内容

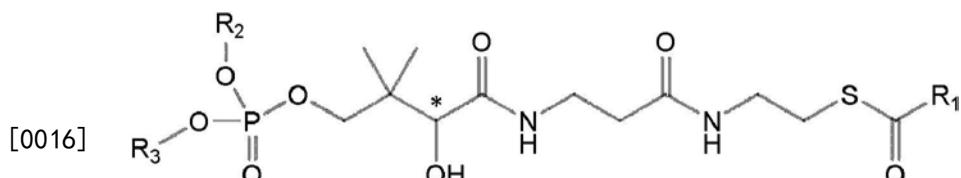
[0011] 在这种背景下,本发明的一个目的是提供可用于治疗神经变性疾病(如PKAN)的结构新颖的化合物。本发明的另一个目的是提供可用于治疗神经变性疾病(如PKAN)的新化合物,所述化合物在治疗该疾病时更有效。本发明的又一个目的是提供可用于治疗神经变性疾病(如PKAN)的新化合物,所述化合物具有更小的副作用,例如,在治疗疾病时表现出降低的毒性。本发明的再一个目的是提供可用于治疗神经变性疾病的新化合物,所述化合物在人血清中更稳定。

[0012] 本发明的另一个目的是提供衍生自辅酶A生物合成途径之中间体的化合物的新医疗用途。本发明还涉及使用本发明化合物的治疗方法,并且涉及可用于治疗神经变性疾病如PKAN的药物。本发明还涉及用于本发明化合物的有效合成方法和可用于本发明的治疗方法的化合物。

[0013] 在一个实施方案中,本发明涉及4'-磷酸泛酰巯基乙胺的硫酯衍生物如 (S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺(即, (S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺衍生物),及其用于治疗神经变性疾病如PKAN的用途。

[0014] 本发明还涉及 (S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺之多种其他衍生物的合成方法。

[0015] 因此,本发明涉及具有以下结构式的化合物或者其可药用盐或溶剂化物:



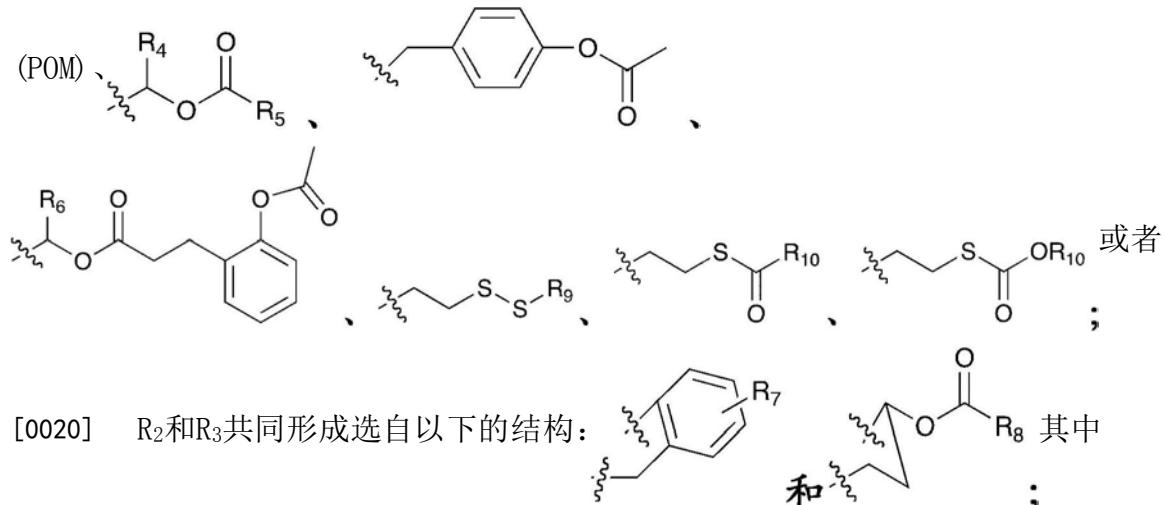
(结构 I),

[0017] 其中:

[0018] R₁为-H、未经取代或经取代的烷基、未经取代或经取代的烯基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的芳基烷基、经取代或未经取代的非芳族杂环基、经取代或未经取代的芳族杂环基、经取代或未经取代的杂环基烷基、-COR₁₁、-C(0)OR₁₁、-C(0)NR₁₁R₁₂、-C=NR₁₁、-CN、-OR₁₁、-OC(0)R₁₁、-NR₁₁R₁₂、-NR₁₁C(0)R₁₂、-

NO₂、-N=CR₁₁R₁₂或者-卤素；优选C₁-C₁₀烷基，更优选-甲基、-乙基、-丙基或-丁基，例如叔丁基，最优选-甲基；

[0019] R₂和R₃独立地选自：-甲基、-乙基、-苯基、乙酰氨基甲基(AM)、新戊酰氨基甲基



[0021] R₄为-H或-烷基，优选-甲基；

[0022] R₅为-H或-烷基，优选C₁-C₄烷基，最优选-甲基或叔丁基；

[0023] R₆为-H、-烷基或-CH₂(CO)OCH₃；

[0024] R₇为-H、-烷基或-卤素；

[0025] R₈为-H、-烷基，优选叔丁基；

[0026] R₉为-H、-烷基，优选C₁-C₄烷基；

[0027] R₁₀为-H、-烷基，优选C₁-C₄烷基；

[0028] R₁₁和R₁₂各自独立地选自氢、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的烯基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂环基、经取代或未经取代的烷氧基、经取代或未经取代的芳氧基或者卤素；

[0029] 前提条件是所述化合物不是(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺或(S)-苯甲酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺。

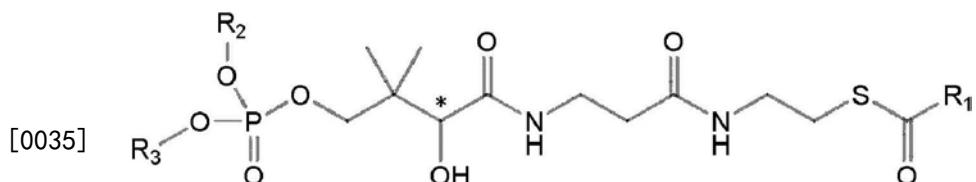
[0030] 在以上限定中优选的烷基为-甲基、-乙基、-丙基、-丁基，优选叔丁基。

[0031] 一般优选结构I的D立体异构体。

[0032] 在本发明的结构中，由波浪线覆盖的直线表示各残基连接至结构I的共价键。

[0033] 在一些优选实施方案中，R₂和R₃为相同残基。特别优选双-POM和双-AM结构。

[0034] 本发明的另一方面涉及具有以下结构式的化合物或者其可药用盐或溶剂化物，其用作药物：

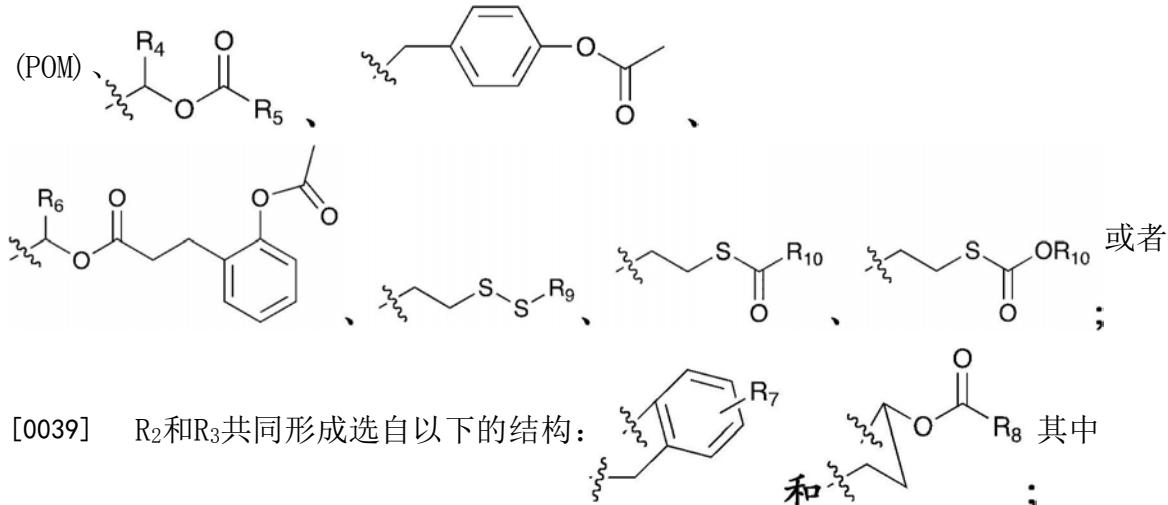


(结构 I),

[0036] 其中：

[0037] R_1 为-H、未经取代或经取代的烷基、未经取代或经取代的环烷基、经取代或未经取代的烯基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的芳基烷基、经取代或未经取代的非芳族杂环基、经取代或未经取代的芳族杂环基、经取代或未经取代的杂环基烷基、-COR₁₁、-C(0)OR₁₁、-C(0)NR₁₁R₁₂、-C=NR₁₁、-CN、-OR₁₁、-OC(0)R₁₁、-NR₁₁R₁₂、-NR₁₁C(0)R₁₂、-NO₂、-N=CR₁₁R₁₂或者-卤素；优选C₁-C₁₀烷基，更优选-甲基、-乙基、-丙基或丁基，例如叔丁基，最优选-甲基，最优选-甲基；

[0038] R_2 和 R_3 独立地选自：-H、-甲基、-乙基、-苯基、乙酰氧基甲基(AM)、新戊酰氧基甲基



[0040] R_4 为-H或-烷基，优选-甲基；

[0041] R_5 为-H或-烷基，优选C₁-C₄烷基，最优选-甲基或叔丁基；

[0042] R_6 为-H、-烷基或-CH₂(CO)OCH₃；

[0043] R_7 为-H或-烷基或-卤素；

[0044] R_8 为-H或-烷基，优选叔丁基；

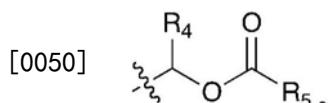
[0045] R_9 为-H、-烷基，优选C₁-C₄烷基；

[0046] R_{10} 为-H、-烷基，优选C₁-C₄烷基；

[0047] R_{11} 和 R_{12} 各自独立地选自氢、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的烯基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂环基、经取代或未经取代的烷氧基、经取代或未经取代的芳氧基或者卤素。

[0048] 在本发明的任何方面的一些特别优选的实施方案中， R_2 和 R_3 均为-乙基或均为-苯基。在另一些优选实施方案中， R_2 为-乙基并且 R_3 为-苯基，或者 R_3 为-乙基并且 R_2 为-苯基。

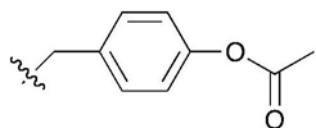
[0049] 在第二个优选实施方案中， R_2 和 R_3 均为



[0051] 其中 R_4 为-H、甲基； R_5 为烷基，如甲基或叔丁基。优选地 R_4 为-H并且 R_5 为-甲基。因此， R_2 和 R_3 可均为乙酰氧基甲基(AM)。在另一个实施方案中， R_4 为-H并且 R_5 为叔丁基。因此， R_2 和 R_3 可均为新戊酰氧基甲基(POM)。

[0052] 在第三个优选实施方案中， R_2 和 R_3 均为

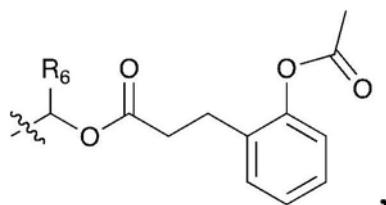
[0053]



(乙酰氧基苄基)。

[0054] 在第四个优选实施方案中, R_2 和 R_3 均为

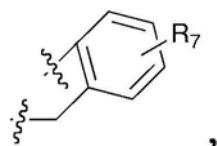
[0055]



[0056] 其中 R_6 为 $-H$ 、 $-$ 烷基或 $-CH_2(CO)OCH_3$ 。

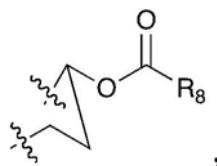
[0057] 在第五个优选实施方案中, 磷酸基团形成根据以下结构的环状磷酸酯:

[0058]



[0059] 其中 R_7 为烷基或卤素或者所述环状磷酸酯包括:

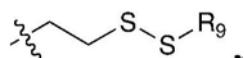
[0060]



[0061] 其中 R_8 为叔丁基。

[0062] 在第六个实施方案中, R_2 和 R_3 均为 $S-[$ (2-羟基乙基) 亚磺酰基] -2- 硫基乙基 (DTE) , 或者

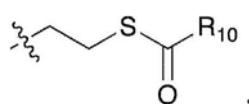
[0063]



[0064] 其中 R_9 为烷基, 优选-甲基、-乙基、-丙基或-丁基, 如叔丁基。

[0065] 在第七个优选实施方案中, R_2 和 R_3 均为 S -酰基-2-硫基乙基 (SATE) , 或者

[0066]



[0067] 其中 R_{10} 为烷基, 优选-甲基、-乙基、-丙基或-丁基, 如叔丁基。

[0068] 优选的烷基为-甲基、-乙基、-丙基、-丁基, 优选叔丁基。

[0069] 一般优选结构 I 的 D 立体异构体。

[0070] 在优选实施方案中, 所述药物可用于治疗神经变性疾病、癫痫或癌症, 优选神经变性疾病或癫痫, 甚至更优选神经变性疾病。在一些特别优选的实施方案中, 所述神经变性疾病为泛酸激酶相关神经变性 (PKAN)。

[0071] 因此, 本发明的一个方面涉及通过向有需要的对象施用治疗有效量的如上文所述的本发明化合物来治疗神经变性疾病、癫痫或癌症 (优选神经变性疾病或癫痫; 甚至更优选神经变性疾病) 的方法。在一些特别优选的实施方案中, 所述神经变性疾病为泛酸激酶相关神经变性 (PKAN)。

[0072] 本发明还涉及生产如上文所述的本发明化合物的方法,所述方法包括使4' -磷酸泛酸与(S)-取代的巯基乙胺反应以得到(S)-取代的-4' -磷酸泛酰巯基乙胺的步骤。

[0073] 在一些优选实施方案中,所述方法包括在使4' -磷酸泛酸与(S)-取代的巯基乙胺(例如,(S)-三苯甲基-巯基乙胺)反应以得到(S)-取代的-4' -磷酸泛酰巯基乙胺(例如,(S)-三苯甲基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺)的步骤之前将泛酸酶促转化为4' -磷酸泛酸。

[0074] 在一些优选实施方案中,所述方法还包括将(S)-取代的-4' -磷酸泛酰巯基乙胺(例如,(S)-三苯甲基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺)转化为4' -磷酸泛酰巯基乙胺。

[0075] 在一些优选实施方案中,所述方法还包括通过硫酯化将4' -磷酸泛酰巯基乙胺转化为(S)-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺(例如,转化为(S)-乙酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺)。

[0076] 在一些优选实施方案中,所述方法还包括用羧酸的氯甲基酯或碘甲基酯形成所述(S)-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸酯。

[0077] 本发明还涉及生产如上文所述的本发明化合物的方法,所述方法包括以下步骤:a)使泛酸与(S)-取代的巯基乙胺反应以产生(S)-取代的泛酰巯基乙胺,b)使S-取代的泛酰巯基乙胺与磷酸化剂(如二苄基氯磷酸酯)反应以获得S-取代的4' -磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸酯,如S-三苯甲基-4' -二苄基磷酸泛酰巯基乙胺,以及c)将所述(S)-取代的-4' -磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸酯(例如,(S)-三苯甲基-4' -二苄基磷酸泛酰巯基乙胺转化为4' -磷酸泛酰巯基乙胺。

[0078] (S)-取代基可以是文献中已知的任何硫醇保护基团,通常形成硫醚键或硫酯键,例如三苯甲基苄基、苯甲酰基、硬脂酰基或棕榈酰基。

[0079] 在一些优选实施方案中,所述方法还包括通过硫酯化将4' -磷酸泛酰巯基乙胺转化为(S)-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺(例如,转化为(S)-乙酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺)。

[0080] 在一些优选实施方案中,所述方法还包括用羧酸的氯甲基酯或碘甲基酯形成所述(S)-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸酯。

[0081] 此外,本发明涉及生产如上所述的本发明化合物的方法,所述方法包括以下步骤:使(S)-取代的泛酰巯基乙胺(如(S)-酰基泛酰巯基乙胺)与磷酸化剂(如双[(新戊酰氧基)甲基氯磷酸酯]反应以获得S-取代的4' -磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸酯(如S-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺的双(新戊酰氧基甲基)酯)。

[0082] (S)-取代基的通式为R₁(C=O)-,其中

[0083] R₁为-H、未经取代或经取代的烷基、未经取代或经取代的烯基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的芳基烷基、经取代或未经取代的非芳族杂环基、经取代或未经取代的芳族杂环基、经取代或未经取代的杂环基烷基、-COR₁₁、-C(O)OR₁₁、-C(O)NR₁₁R₁₂、-C=NR₁₁、-CN、-OR₁₁、-OC(O)R₁₁、-NR₁₁R₁₂、-NR₁₁C(O)R₁₂、-NO₂、-N=CR₁₁R₁₂或者-卤素;优选C₁-C₁₀烷基,更优选-甲基、-乙基、-丙基或-丁基,例如叔丁基,最优选-甲基,最优选-甲基。

附图说明

[0084] 图1示出了根据本发明的(S)-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺衍生物的化学酶促路线。PANK=泛酸激酶;R¹、R³、R⁴不必与权利要求中所限定的R₁、R₃、R₄相同。

[0085] 图2示出了与泛硫乙胺相比4' -磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4' -磷酸泛酰巯

基乙胺在血清中提高的稳定性(实施例2)。PBS,磷酸盐缓冲盐水;FCS,胎牛血清。

[0086] 图3示出了在PKAN细胞模型中与泛硫乙胺相比4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的救援潜力(实施例3)。(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺是最有效的。

[0087] 图4示出了在用HOPAN处理的细胞中泛硫乙胺、4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的救援潜力(实施例4)。(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺是最有效的。

[0088] 图5示出了在用HOPAN处理的人PKAN细胞模型中4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的救援(实施例5)。4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺是有效救援分子。

[0089] 图6示出了泛硫乙胺、4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺对人HEK293细胞的细胞毒性的比较(实施例6)。与4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺相比,泛硫乙胺毒性更高。

[0090] 发明详述

[0091] 根据本发明,术语“神经变性疾病”应当解释为具有本领域通常理解的含义。在一些优选实施方案中,“神经变性疾病”选自:泛酸激酶相关神经变性(PKAN)、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、痴呆共济失调毛细血管扩张、常染色体显性小脑性共济失调、Batten病、皮质基底节变性、克-雅二氏病、致死性家族性失眠症、内侧主导型遗传性运动感觉神经病、婴儿雷弗素姆病(Infantile Refsum disease)、JUNQ和IPOD、运动性共济失调、莱姆病、马-约二氏(Machado-Joseph)病、脑桥小脑发育不全的智力迟钝和头小畸形、多系统萎缩、神经棘红细胞增多症(Neuroacanthocytosis)、尼曼-匹克病、脑桥小脑发育不全、雷弗素姆病、桑德霍夫病、Shy-Drager综合征、脊髓小脑性共济失调、脊髓亚急性联合变性、亚急性硬化性全脑炎、脊髓痨、泰-萨克斯病、中毒性脑病和刺猬摇摆综合征(Wobbly hedgehog syndrome)。在本发明的上下文中优选的神经变性疾病是泛酸激酶相关神经变性(PKAN)、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、痴呆;最优先选泛酸激酶相关神经变性(PKAN)。

[0092] 在本发明的上下文中,“烷基”是指由碳原子和氢原子组成的直链或支链烃基团(不包含饱和度),所述烷基具有1至8个碳原子并且通过单键连接至分子的其余部分,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、正戊基等。烷基可任选地经一个或更多个取代基取代,所述取代基如芳基、卤素、羟基、烷氧基、羧基、氨基、氰基、羰基、酰基、烷氧基羰基、氨基、硝基、巯基、烷基硫基等。如果被芳基取代,我们则称为“芳烷基”基团,如苄基和苯乙基。

[0093] “烯基”是指具有通过双键共价连接的至少两个碳原子的烷基基团。

[0094] “环烷基”是指饱和或部分饱和的稳定的3至10元单环或双环基团,其仅由碳和氢原子组成,如环己基或金刚烷基。除非另有限定,否则术语“环烷基”意指包括任选地被一个或更多个取代基(如烷基、卤素、羟基、氨基、氰基、硝基、烷氧基、羧基、烷氧基羰基)取代的环烷基。

[0095] “芳基”是指单环和多环基团,包括含有单独和/或稠合的芳基的多环基团。典型的芳基包含1至3个单独或稠合的环并且包含6至约18个碳环原子,例如苯基、萘基、茚基、菲基或蒽基基团。芳基可任选地被一个或更多个取代基(如羟基、巯基、卤素、烷基、苯基、烷氧

基、卤代烷基、硝基、氰基、二烷基氨基、氨基烷基、酰基、烷氧基羰基等)取代。

[0096] “杂环基”是指稳定的3元至15元环基团,其由碳原子和1至5个选自氮、氧和硫的杂原子组成,优选具有一个或更多个杂原子的4元环至8元环,更优选具有一个或更多个杂原子的5元环或6元环。其可以是芳香性的或者不是。出于本发明的目的,杂环可为单环、双环或三环体系,其可包括稠环系统;并且杂环基中的氮、碳或硫原子可任选被氧化;氮原子可任选地被季铵化;并且杂环基团可为部分饱和或完全饱和的或者是芳香性的。这样的杂环的实例包括,但不限于,吖庚因、苯并咪唑、苯并噻唑、呋喃、异噻唑、咪唑、吲哚、哌啶、哌嗪、嘌呤、喹啉、噻二唑、四氢呋喃、香豆素、吗啉;吡咯、吡唑、恶唑、异恶唑、三唑、咪唑等。

[0097] “烷氧基”是指式-OR_a的基团,其中R_a是如上文所限定的烷基基团,例如,甲氧基、乙氧基、丙氧基等。

[0098] 本文中提及的本发明化合物中“经取代的”基团是指在一个或更多个可用位置处被一个或更多个合适的基团取代的指定部分,所述合适的基团例如,卤素如氟、氯、溴和碘,氰基,羟基,硝基,叠氮基,烷酰基如C1-6烷酰基(如酰基)等,甲酰胺基,包括具有1至约12个碳原子或1至约6个碳原子并且更优选1至3个碳原子的那些基团的烷基,包括具有一个或更多个不饱和键和2至约12个碳或2至约6个碳原子的基团的烯基和炔基,具有一个或更多个氧键和1至约12个碳原子或1至约6个碳原子的烷氧基,芳氧基如苯氧基,包括具有一个或更多个硫醚键和1至约12个碳原子或1至约6个碳原子的那些部分的烷基硫基,包括具有一个或更多个亚磺酰基键和1至约12个碳原子或1至约6个碳原子的那些部分的烷基亚磺酰基,包括具有一个或更多个磺酰基键和1至约12个碳原子或1至约6个碳原子的那些部分的烷基磺酰基,氨基烷基如具有一个或更多个N原子和1至约12个碳原子或1至约6个碳原子的基团;具有6个或更多个碳的碳环芳基,特别是苯基或萘基以及芳烷基如苄基。除非另有指示,否则任选地经取代的基团可在该基团的每个可取代位置具有取代基,并且每个取代都彼此独立。

[0099] 术语“可药用盐或溶剂化物”是指任何可药用盐、溶剂化物或任何在施用于接受者后能够提供(直接或间接)如本文所述的化合物的其他化合物。然而,应理解,非可药用盐也落入本发明的范围之内,因为其可用于制备可药用盐。盐、前药和衍生物的制备可以通过本领域中已知的方法来进行。例如,本文中提供的化合物的可药用盐由包含碱性或酸性部分的母体化合物通过常规化学方法来合成。通常例如通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计算量的适当的碱或酸在水中或在有机溶剂中或在二者的混合物中反应来制备这样的盐。通常,优选非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。酸加成盐的实例包括矿物酸加成盐,例如,盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐;以及有机酸加成盐,例如乙酸盐、马来酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐和对甲苯磺酸盐。碱加成盐的实例包括无机盐,例如钠盐、钾盐、钙盐、铵盐、镁盐、铝盐和锂盐;以及有机碱盐,例如乙二胺、乙醇胺、N,N-二亚烷基乙醇胺、三乙醇胺、葡糖胺和碱性氨基酸盐。

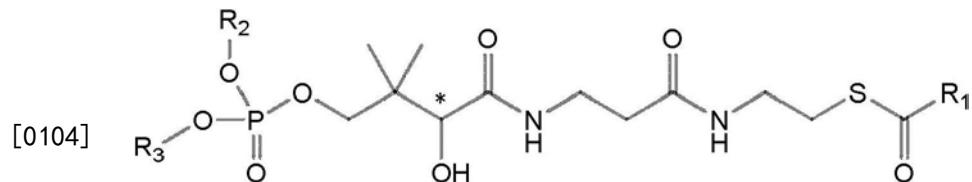
[0100] 本发明总体上涉及神经变性疾病的治疗和可用于这样的治疗的化合物。在一个优选实施方案中,神经变性疾病是泛酸激酶相关神经变性(PKAN)。

[0101] PKAN被认为是由酶泛酸激酶2的功能受损而引起的。合成辅酶A需要泛酸激酶(Rana, A. 等, PNAS, 2010, 107, 6988)。已证明在PKAN的苍蝇模型中,化合物泛硫乙胺使辅酶A

的水平恢复,从而救援PKAN的所有疾病特征(Rana, A. 等,PNAS,2010,107,6988)。然而,使用泛硫乙胺治疗人对象受到以下事实的限制:泛硫乙胺在人血清和人肠道中不稳定并迅速转化为维生素B5和半胱胺(Wittwer等,J Clin Invest,1985,76,1665),并且泛硫乙胺对野生型苍蝇是有毒性的(Rana, A. 等,PNAS,2010,107,6988)。本发明通过提供基于以下化合物的治疗方法克服该缺陷,所述化合物在血清中具有改善的稳定性并且该化合物比泛硫乙胺的毒性小。

[0102] 在第一方面中,本发明涉及用于治疗神经变性疾病(优选PKAN)的新类别的药物,其在本文中表示为(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺。在这组化合物中,只有(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺(Lee, C-H. 和Sarma, R.H., JACS, 1975, 97, 1225)和(S)-苯甲酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺(WO2012/017400)在结构方面是已知的。在本发明之前,尚未认识到这组化合物(特别是已知的物质(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-苯甲酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺)的药用潜力。

[0103] 在第二方面中,本发明涉及在哺乳动物细胞中释放具有生物活性的(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的前药。在这些前药中,磷酸基团被这样的部分掩蔽,所述部分促进这些化合物转移通过细胞膜以及血脑屏障。这样的前药具有以下化学结构:



(结构式 I),

[0105] 其中R₁如所附权利要求中所限定,或者R₁可为-CH₃、-C₂H₅、-C₃H₇、-C₄H₉;以及R₂和R₃如所附权利要求中所限定,或者R₂和R₃可为-CH₂O(CO) tBu、-CH₂O(CO) Me。优选D异构体。

[0106] 优选磷酸酯化合物,因为其提高了穿透膜或者例如血脑屏障的潜力。本领域中公知制备这样的S-酰基-磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸酯的方法。实施例7中提供了示例性合成方法。Schultz提供了通过药物活性成分的磷酸基团酯化而形成前药的其他合适方法的综述(2003, "Prodrugs Of biologically active phosphates", Bioorg Med Chem 11:885),其在此作为具体参考,并且其内容通过所允许程度的引用并入本文。

[0107] 本发明的第三方面涉及用于生产如权利要求中所限定的(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺衍生物(包括其具有经掩蔽的磷酸基团的前药)的新的和经济上可行的方法。磷酸基团的掩蔽优选磷酸基团的酯化。

[0108] 本发明基于以下观察:两种新泛硫乙胺衍生物,即4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺与泛硫乙胺相比表现出在人血清中提高的稳定性以及较小毒性。此外,惊奇地发现,在PKAN的果蝇疾病模型中(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺比泛硫乙胺(和4'-磷酸泛酰巯基乙胺)更有效。

[0109] 基于通过4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺对神经疾病模型中的细胞的有效援救、这两种化合物在血清中提高的稳定性以及基于该化合物降低的毒性,我们得出结论,落在通用结构I下的该组化合物(如权利要求中所限定)优于所有目前已知的PKAN疗法、提出的PKAN疗法和/或正在开发的PKAN疗法。注意,目前没有可用于阻止

或逆转PKAN症状的获批准的疗法。通用结构式I的化合物是本发明的用于神经变性疾病的有用疗法,特别是用于PKAN。

[0110] 已知在PKAN的苍蝇模型和细胞模型中,蛋白质乙酰化的水平降低(Siudeja等,EMBO Mol Med 2011,3,755)。我们已经表明,组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂(如曲古抑菌素A(TSA)和丙戊酸)救援PKAN模型中的蛋白质乙酰化缺陷。泛硫乙胺也救援PKAN模型中的乙酰化缺陷。蛋白质乙酰化所需的乙酰基团的来源是乙酰基-辅酶A。本发明人认为(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺是迅速转化成乙酰基-CoA的化合物,从而增加蛋白质乙酰化。对多种疾病,使用HDAC抑制剂并且具体地目前在从癌症、至癫痫、至神经变性的疾病范围内使用丙戊酸。缺点是丙戊酸具有严重的副作用。我们认为,根据本发明的(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺及其衍生物可以在恢复或增加蛋白质乙酰化中用作丙戊酸的替代物而不引起严重的副作用。结构I的化合物,如(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺,可以在多种治疗中用作丙戊酸的替代物。因此,(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺衍生物(如(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺衍生物)可以用于治疗目前使用丙戊酸治疗的疾病。具体实例为:癌症、癫痫、阿尔茨海默病。

[0111] 因此,在本发明的上下文中,特别优选的医学适应症为如上限定的神经变性疾病,特别是PKAN,还有癫痫和癌症。

[0112] 本发明的化合物在血清中表现出优于例如泛硫乙胺的稳定性的惊人发现,可以事后通过其对泛酰巯基乙胺较低的灵敏度来解释。本发明的(S)-酰化化合物(例如(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺)增加的救援潜力超过4'-磷酸泛酰巯基乙胺,目前还未很好地理解,因为可以预期两个分子可以同等地转化为辅酶A,其是PKAN中缺乏的分子并最有可能引起疾病。我们的结果显示,本发明的化合物如(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺及其衍生物具有较高的救援潜力,表明其更有效地转化为辅酶A,或直接转化为乙酰基-CoA,这可能是有益的。然而,这仅仅是猜测。本发明的化合物在治疗上述疾病中观察到的优异效力的原因并没有被很好地理解。

[0113] 在本发明的范围内,我们合成了4'-磷酸泛酸、4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺并测试其在PKAN的细胞系模型中救援细胞的能力。我们证明,(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺在使具有受损的泛酸激酶活性的PKAN细胞模型恢复正常生长方面优于先前提出的4'-磷酸泛酰巯基乙胺(具有游离的巯基)、磷酸泛酸和泛硫乙胺。

[0114] 我们还确定,(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺及其衍生物,如(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺,在血清中比具有游离巯基的泛硫乙胺更稳定。

[0115] 在一些优选实施方案中,具有酰氧基烷基的(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸基团的衍生化,如新戊酰氧基甲基(POM)和乙酰氧基甲基(AM)提供了进一步的有利性质,因为这样的前药衍生物更容易穿透哺乳动物的血脑屏障。这对于有效治疗神经变性疾病特别重要。

[0116] 当使用(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺时磷酸基团的衍生化在化学上容易实现,而与此相反,在4'-磷酸泛酰巯基乙胺的情况下这样的衍生化更加困难(如果不是不可能的话)。这是由于游离的巯基在所需的化学反应中的干扰。

[0117] 设计从市售泛酸酯(维生素B5)至(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的可行合成路

线形成本发明的一个重要方面。只有通过所述合成路线的可用性,才能使测定后者化合物改善的生物活性成为可能。

[0118] 简言之,泛酸被酶促转化为4' -磷酸泛酸。然后在溶剂中在偶联剂和活化剂的存在下使分离的4' -磷酸泛酸与(S)-取代的巯基乙胺反应。将以这种方式获得的(S)-三苯甲基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺从反应混合物中分离,接着将其转化为4' -磷酸泛酰巯基乙胺。最后,用相应的硫代酸(如硫代乙酸)通过硫酯化将4' -磷酸泛酰巯基乙胺转化为(S)-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺。

[0119] 或者,在溶剂中在偶联剂和活化剂的存在下使泛酸与预先制备的(S)-经取代的巯基乙胺反应。将以这种方式获得的(S)-三苯甲基-4' -泛酰巯基乙胺从反应混合物中分离,接着在溶剂中在碱的存在下用二苄基氯磷酸酯使其磷酸化。去除苄基和三苯甲基保护基团得到4' -磷酸泛酰巯基乙胺。最后,用相应的硫代酸(如硫代乙酸)通过硫酯化将4' -磷酸泛酰巯基乙胺转化为(S)-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺。

[0120] 掩蔽磷酸基团包括用相应的羧酸氯甲酯(如新戊酸氯甲酯和乙酸氯甲酯)由(S)-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺形成磷酸酯。

[0121] 或者,磷酸基团的掩蔽可以通过以下进行:在溶液中在碱的存在下用合适的磷酸化剂(如双[(新戊酰氧基)甲基氯磷酸酯])使S-取代的泛酰巯基乙胺(如(S)-乙酰基-4' -泛酰巯基乙胺)磷酸化以获得S-酰基-4' -磷酸泛酰巯基乙胺的双(新戊酰氧基甲基)酯。

[0122] 本发明还提供了用于向患者施用的药物组合物,所述药物组合物包含本发明的化合物或其可药用盐,优选地连同可药用载体、辅剂或载剂。

[0123] 本发明的药物组合物的实例包括用于经口、局部、肠胃外或舌下施用的任何固体(片剂、丸剂、胶囊、颗粒剂等)或液体(溶液剂、混悬剂或乳剂)组合物。

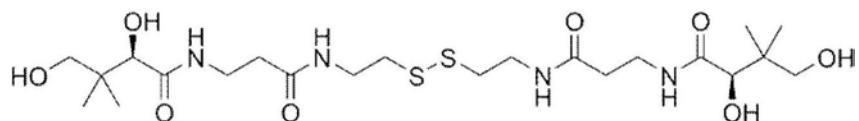
[0124] 在一个优选实施方案中,药物组合物为经口形式的固体或液体。用于经口施用(包括舌下施用)的合适的剂型可为片剂、胶囊、糖浆剂或溶液剂,以及可包含本领域已知的常规赋形剂,例如粘合剂,如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨醇、西黄蓍胶或聚乙烯吡咯烷酮;填充剂,如乳糖、糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨醇或甘氨酸;压片润滑剂,如硬脂酸镁;崩解剂,如淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、淀粉羟乙酸钠或微晶纤维素;或可药用湿润剂如十二烷基硫酸钠。

[0125] 可以通过任何合适的方法施用本发明的化合物或组合物,如静脉内输注、经口制剂以及腹膜内施用、肌内施用、皮下施用、舌下施用、局部施用和静脉内施用。由于方便患者及待治疗疾病的慢性特性,优选经口施用(特别是舌下施用)。

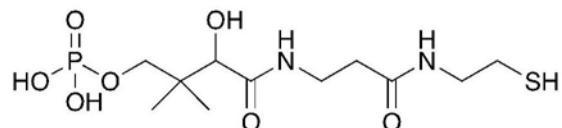
[0126] 本发明的化合物和组合物可与其他药物一起使用以提供联合疗法。所述其他药物可形成同一组合物的一部分,或者作为同时施用或在不同时间施用的单独组合物来提供。

[0127] 本发明化合物的合适剂量为0.1mg/kg至1000mg/kg体重/天,优选0.1mg/kg至100mg/kg体重/天,更优选1mg/kg至50mg/kg体重/天。优选每天施用1次、2次、3次或4次,优选每天1次或2次。

[0128] 以下结构式是与本发明上下文相关的:

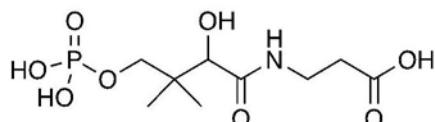


(泛硫乙胺);

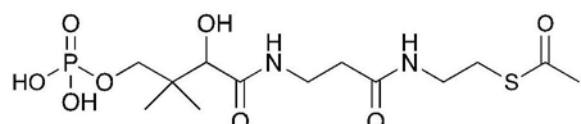


[0129]

(4'-磷酸泛酰巯基乙胺);

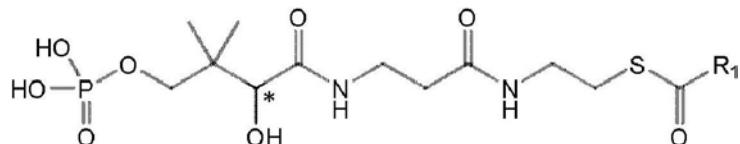


(4'-磷酸泛酸);



((S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺);

[0130]



((S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺)。

实施例

[0131] 实施例1: (S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的合成

[0132] 将泛酸酶促转化为4'-磷酸泛酸。然后在溶剂中在偶联剂和活化剂的存在下使分离的4'-磷酸泛酸与(S)-取代的巯基乙胺反应。将以这种方式获得的(S)-三苯甲基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺从反应混合物中分离,接着将其转化为4'-磷酸泛酰巯基乙胺。最后,用相应的硫代酸(如硫代乙酸)通过硫酯化将4'-磷酸泛酰巯基乙胺转化为(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺。在一个实例中,磷酸基团通过酯化而被掩蔽,以改善化合物的膜穿透潜力。掩蔽磷酸基团通过如下实现:用相应的羧酸之卤代甲基酯(如新戊酸氯甲酯、新戊酸碘甲酯、乙酸氯甲酯和乙酸碘甲酯)由(S)-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺形成磷酸酯。

[0133] 实施例2:与泛硫乙胺相比,4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺在血清中提高的稳定性

[0134] 该实施例示出了与泛硫乙胺相比,(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺在胎牛血清(FCS)中优异的稳定性。

[0135] 已显示泛硫乙胺可通过泛酰巯基乙胺酶在血清中迅速转化为维生素B5和半胱胺

(Wittwer等,1985,76,1665)。我们如实施例1中所述合成了(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺,随后评估了这些化合物在FCS中的稳定性。

[0136] 材料和方法:将泛硫乙胺(购自Sigma)、(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺以1mM的最终浓度在37°C下在FCS中和在PBS中孵育30分钟。孵育之后,对样品进行处理以去除蛋白质,并使用HPLC分析来评估剩余化合物的量,从而表明各个化合物的稳定性。

[0137] 结果:泛硫乙胺显著降解(60%),最有可能是通过泛酰巯基乙胺酶而降解,而(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺是稳定的并且降解小于10%。实验以一式三份进行,在图2中误差条表示标准偏差。

[0138] 实施例3:4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺在细胞PKAN疾病模型中的救援潜力

[0139] 在果蝇S2细胞中使用RNAi法下调dPANK/fb1(果蝇中PANK直系同源)是已建立的体外PKAN疾病模型(Rana,A.等,PNAS,2010,107,6988;Siudeja等,EMBO Mol med.2011,3,755;Siudeja等,PLoS One 2012,7,e443145)。通过RNAi下调dPANK/fb1引起细胞存活率的降低。救援化合物如泛硫乙胺、4'-磷酸泛酰巯基乙胺或(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺使细胞存活率恢复。引入实施例以比较泛硫乙胺、(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺在这样的模型系统中的救援效率。

[0140] 材料和方法:培养果蝇施耐德S2细胞(Drosophila Schneider's S2cell)并对其进行如前所述的RNAi处理(Rana,A.等,2010,107,6988.)。向细胞添加100μM的泛硫乙胺、(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺并通过测定细胞存活率来评估救援潜力。

[0141] 结果:结果示于图3中。该图表明(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺显著救援了dPANK/fb1下调的果蝇S2细胞中的细胞计数缺陷。出人意料地发现与泛硫乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺相比,(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺具有优异的救援潜力。实验以一式三份进行,误差条表示标准偏差。

[0142] 实施例4:在HOPAN测定中的救援潜力

[0143] 在另外的实验中,用化学抑制剂HOPAN(hopanthenate,CAS17097-76-6,IUPAC:4-[(2R)-2,4-二羟基-3,3-二甲基丁酰基]氨基]丁酸钙)处理果蝇S2细胞。经HOPAN处理的细胞也用作PKAN的模型。经HOPAN处理的细胞也显示出细胞生存力的降低。由此,引入该结果以比较泛硫乙胺、(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺在这样的模型系统中的救援效率。

[0144] 材料和方法:培养果蝇施耐德S2细胞并在含有和不含(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺的情况下对其进行HOPAN(0.5mM)处理两天(Siudeja.K.等,EMBO Mol Med.2011,3,755)。比较100μM的(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺的救援效率。

[0145] 结果:如下所示的结果表明与4'-磷酸泛酰巯基乙胺相比,(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺显著救援了HOPAN(0.5mM)诱导的细胞计数缺陷。实验以一式三份进行;在图4中误差条表示标准偏差。

[0146] 实施例5:HOPAN模型中HEK细胞的救援

[0147] 与果蝇S2细胞相似,PKAN疾病模型也可以通过在哺乳动物细胞系中使用HOPAN来诱导。在HOPAN诱导的PKAN模型系统中(即,在哺乳动物HEK293细胞中)研究(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺的救援效率。

[0148] 材料和方法:在补充有10%透析的FCS (Thermo Scientific) 的缺乏维生素B5的DMEM (Thermo Scientific) 中,在含有和不含HOPAN (0.5mM)、(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺的情况下培养HEK293细胞4天。比较100μM的(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺的救援效率。

[0149] 结果:如下所示的结果表明在哺乳动物HEK293细胞中,(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺也显著降低了HOPAN诱导的细胞计数缺陷。实验以一式三份进行;在图5中误差条表示标准偏差。

[0150] 实施例6:毒性

[0151] 用增加浓度的泛硫乙胺、4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺处理人HEK293细胞以测定并比较这些化合物的毒性。细胞计数下降表明毒性。与4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺相比,泛硫乙胺在更低的浓度下诱导毒性,证明与泛硫乙胺相比,4'-磷酸泛酰巯基乙胺和(S)-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的毒性更低。参见图6。

[0152] 实施例7:S-酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的双(新戊酰氧基甲基)酯的制备

[0153] 根据本发明的磷酸酯衍生物可使用以下过程合成:

[0154] 如下新鲜制备新戊酸碘甲酯:在N₂气氛中于30℃下使新戊酸氯甲酯(0.151g,1mmol)与碘化钠(0.3g,2mmol)在乙腈(1mL)中反应5小时。向反应混合物中添加二氯甲烷(5mL)和水(5mL)并搅拌。相分离之后,用2%硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)水溶液洗涤有机层并在真空下浓缩,得到0.194g作为淡黄色油的新戊酸碘甲酯(0.8mmol,80%)。将S-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺(0.04g,0.1mmol)悬浮于DMF(1mL)中。添加三乙胺(0.042mL,0.3mmol)和新戊酸碘甲酯(0.073g,0.3mmol)。将混合物在40℃左右搅拌过夜,然后去除溶剂并使残余物溶解在乙酸乙酯中。将混合物用盐水洗涤、经硫酸钠干燥、过滤并在减压下浓缩。通过柱色谱对粗产物进行纯化,得到0.016g S-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的双(新戊酰氧基甲基)酯(0.025mmol,25%)。

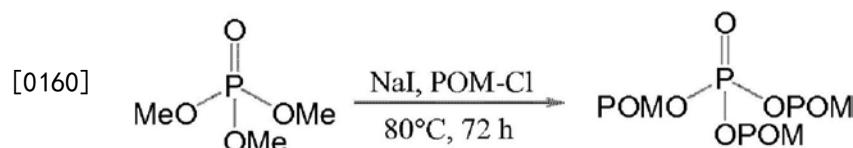
[0155] 本发明的磷酸酯衍生物由于其增加的膜穿透潜力而具有改善的生物利用度。

[0156] 实施例8:用于制备S-乙酰基-4'-磷酸泛酰巯基乙胺的双(新戊酰氧基甲基)酯的替代方法

[0157] 磷酸化试剂的制备

[0158] 根据公开文献(Hwang Y等,Organic Letters.2004,6,1555;Ruda,GF等,ChemMedChem.2007,2,1169)制备了用于使S-乙酰基-泛酰巯基乙胺磷酸化的双(POM)氯磷酸酯:

[0159] 三(POM)磷酸酯的制备



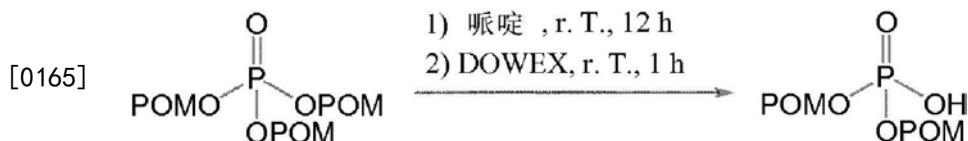
[0161] 向磷酸三甲酯(7.01g,50mmol)的无水CH₃CN(42mL)溶液中依次添加新戊酸氯甲酯

(29.35g, 195mmol) 和 NaI (22.52g, 150mmol)。将反应混合物在回流 (80°C) 下加热 72 小时, 冷却至环境温度并用 Et₂O (400mL) 稀释。有机相用水 (2×100mL)、饱和 Na₂S₂O₃ 溶液 (2×100mL) 洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。在硅胶上用己烷 // EtOAc 4:1 洗脱纯化, 得到粘性黄色油 (14.6g, 66%) :

[0162] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 5.66 (d, J=13.7Hz, 6H), 1.24 (s, 27H) ppm; ³¹P NMR (120MHz, CDCl₃) δ-4.74 (s) ppm;

[0163] HRMS (M+H⁺) 的 C₁₈H₃₄O₁₀P 计算值为 441.1890, 实测值为 441.1901。

[0164] 双 (POM) 磷酸氢酯的制备



[0166] 将三 (POM) 磷酸酯 (1g, 2.3mmol) 溶解在脲 (7mL) 中并在室温下搅拌 12 小时。将溶液浓缩并进一步在真空中蒸发直到恒定重量 (935mg, 产率 99.0%)。将粗制油 (935mg, 2.28mmol) 溶解在水 (20mL) 中并用 Dowex W50X2H⁺型树脂 (19.2g, 11.4mmol, 0.6mmol/g) 处理。在环境温度下搅拌该悬液 1 小时。将树脂过滤并用水洗涤。将滤液浓缩并在真空下干燥, 得到白色固体 (613mg, 产率 82%)。

[0167] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.45 (bs, 1H), 5.62 (d, J=13.2Hz, 4H), 1.23 (s, 18H) ppm; ³¹P NMR (120MHz, CDCl₃) δ-3.17 (s) ppm.

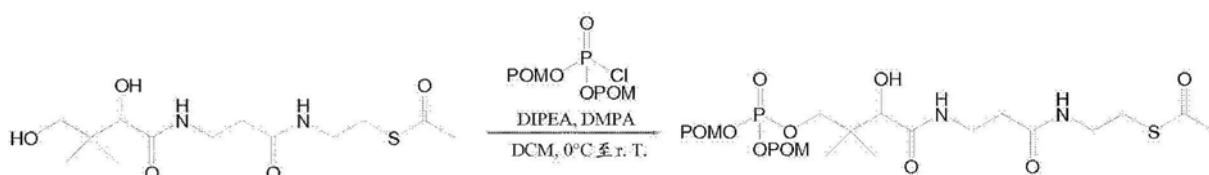
[0168] 双 (POM) 氯磷酸酯的制备



[0170] 在氩气中于环境温度下将双 (POM) 磷酸氢酯 (613mg, 1.88mmol) 和 DMF (7.3μL, 0.094mmol) 的 DCM (7.5mL) 溶液逐滴添加至搅拌的草酰氯 (889μL, 9.38mmol) 的 DCM (7.5mL) 溶液中。将反应混合物搅拌 2 小时。在氩气下蒸发溶剂以提供粗制黄色油 (671mg, 1.86mmol), 其直接用于下一步骤中。

[0171] S-乙酰基-磷酸泛酰巯基乙胺双 [(新戊酰氧基) 甲基] 酯的制备

[0172]



[0173] 如 [E. Walton 等, J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 1146] 中所述来制备 S-乙酰基-泛酰巯基乙胺。在氩气中于 0°C 下向搅拌的 10ml DCM 中的 S-乙酰基-泛酰巯基乙胺 (463mg, 1.45mmol)、N,N-二异丙基乙胺 (308μL, 1.77mmol) 和 4-二甲氨基吡啶 (10.9mg, 0.09mmol) 溶液中逐滴添加 10ml DCM 中的双 (POM) 氯磷酸酯 (590mg, 1.88mmol) 溶液。将反应混合物升温至室温并搅拌 12 小时。用水 (10ml) 淬灭反应并用 DCM (2×20ml) 萃取。有机相用 NH₄Cl 的饱和溶液洗涤, 用 Na₂SO₄ 干燥并在减压下浓缩。在硅胶上用 DCM/MeOH 92:8 洗脱纯化, 得到作为黄

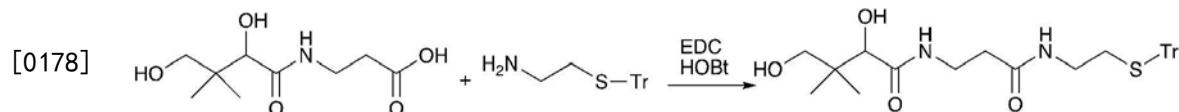
色油的产物(401mg,产率44%):

[0174] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 87.25 (app t, $J=6.2\text{Hz}$, 1H), 6.39 (app t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 5.61-5.71 (m, 4H), 4.13 (dd, $J=10.0, 6.9\text{Hz}$, 1H), 4.08 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 1H), 3.97 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 3.75 (dd, $J=10.0, 7.2\text{Hz}$, 1H), 3.51-3.63 (m, 2H), 3.34-3.50 (m, 2H), 2.95-3.09 (m, 2H), 2.39-2.47 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.242 (s, 9H), 1.240 (s, 9H), 1.12 (s, 3H), 0.88 (s, 3H) ppm; ^{31}P NMR (120MHz, CDCl_3) δ -2.64 (s) ppm.

[0175] 实施例9: 用于合成4'-磷酸泛酰巯基乙胺的替代方法

[0176] D-泛酸由其半钙盐 (Aldrich, $\geq 99.0\%$) 与草酸反应而制备。S-三苯甲基半胱胺如 Mandel 等人报道的 [A.L. Mandel 等, Org. Lett. 2004, 6, 26, 4801-4803] 由半胱胺盐酸盐和三苯甲基氯而合成。二苄基氯磷酸酯如由 Itoh 等人所述的 [K. Itoh 等, Org. Lett. 2007, 9, 5, 879-882] 由磷酸二苄酯与 N-氯代琥珀酰亚胺在作为溶剂的甲苯中反应而制备。所有其他化学品由商业来源获得并在没有进一步纯化的情况下使用; 半胱胺盐酸盐 (Aldrich, $\geq 98.0\%$)、三苯甲基氯 (Aldrich, 97.0%)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺 (Aldrich, $\geq 97.0\%$)、1-羟基苯并三唑水合物 (Aldrich, $\geq 97.0\%$)、磷酸二苄酯 (Aldrich, 工业级)、N-氯代琥珀酰亚胺 (Aldrich, 98%)。使用60目至100目的硅胶 **60 Å** (Aldrich) 进行柱色谱。在氢型100目至200目的DOWEX 50WX2 (Aldrich) 上进行阳离子交换色谱。在25°C 下用Varian Unity Inova 300MHz光谱仪 (300MHz/75MHz) 记录 ^1H 和 ^{13}C 的NMR。以ppm为单位记录相对于作为内标的TMS (其中以 CDCl_3 记录光谱) 或者相对于残余溶剂信号 (当使用 D_2O 时) 的化学位移 (δ)。在具有负离子电喷雾电离的Autospec质谱仪上获得高分辨质谱。

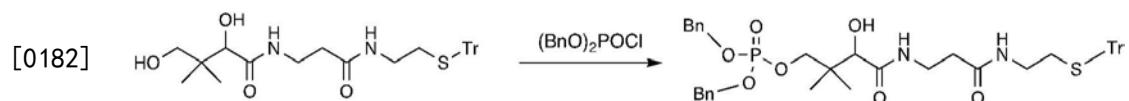
[0177] a) 偶联反应——S-三苯甲基泛酰巯基乙胺的合成



[0179] 在无水乙腈 (100mL) 中分别制备: (A) D-泛酸 (2.19g, 10.0mmol) (B) S-三苯甲基半胱胺 (3.19g, 10.0mmol) 和 (C) N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺 (1.55g, 10.0mmol) 以及1-羟基苯并三唑水合物 (1.35g, 10.0mmol)。当 (A)、(B) 和 (C) 混合在一起时, 添加三乙胺 (10.4mL, 75mmol)。将该混合物在室温下搅拌24小时并通过添加水来淬灭。用乙醚萃取产物。用1M盐酸、 NaHCO_3 饱和水溶液和盐水洗涤合并的有机相。有机层经硫酸钠干燥并在真空中浓缩, 得到作为浅黄色晶体的S-三苯甲基泛酰巯基乙胺 (3.53g, 68%)。

[0180] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 80.85 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 2.29 (t, $J=6.2\text{Hz}$, 2H), 2.38 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 2H), 3.03 (dd, $J=6.0, 5.2\text{Hz}$, 2H), 3.45 (m, 4H), 3.92 (s, 1H), 6.20 (t, $J=5.7\text{Hz}$, 1H, NH), 7.21 (m, 3H), 7.27 (m, 6H), 7.39 (m, 6H) .

[0181] b) 磷酸化——S-三苯甲基-4'-二苄基磷酸泛酰巯基乙胺的合成



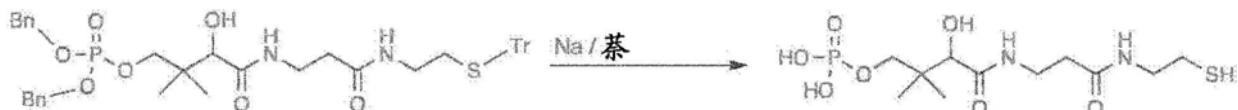
[0183] 二苄基氯磷酸酯通过在室温下使磷酸二苄酯 (2.16g, 8.24mmol) 与N-氯琥珀酰亚胺 (1.21g, 9.06mmol) 在甲苯 (40mL) 中反应2小时而新鲜制备。将混合物过滤并在真空中蒸发滤液并添加到S-三苯甲基泛酰巯基乙胺 (2.86g, 5.49mmol)、二异丙基乙胺 (3.06mL)、4-二甲氨基吡啶 (0.067g, 0.55mmol) 的无水乙腈溶液中。将混合物在室温下搅拌2小时。将产

物萃取到二氯甲烷-水性NaHCO₃体系的有机相中。有机萃取物用水和盐水洗涤，并经Na₂SO₄干燥。蒸发溶剂得到作为深棕色油(4.69g)的粗制S-三苯甲基-4'-二苄基磷酸泛酰巯基乙胺，将其进一步通过快速色谱纯化，得到半晶体浅黄色产物(0.640g, 0.82mmol)。合成和纯化S-三苯甲基-4'-二苄基磷酸泛酰巯基乙胺的产率为15%。

[0184] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 0.75 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 2.32 (t, J=6.1Hz, 2H), 2.4 (t, J=6.5Hz, 2H), 3.06 (dd, J=6.5, 6.2Hz, 2H), 3.47 (dd, J=6.1, 6.0Hz, 2H), 3.60 (dd, J=9.9, 7.3Hz, 1H), 3.85 (s, 1H), 4.00 (dd, J=9.9, 7.0Hz, 1H), 5.04 (m, 4H), 5.80 (t, J=5.5Hz, 1H, NH), 7.18-7.42 (m, 25H) .

[0185] c) 去保护——4'-磷酸泛酰巯基乙胺的合成

[0186]



[0187] 将溶解于四氢呋喃(70mL)的萘(12.9g, 100.6mmol)添加到含金属钠(2.21g, 96.1mmol)的四氢呋喃(50mL)中。2小时之后，将溶液冷却至(35±5) °C，并缓慢添加溶解于四氢呋喃(70mL)的S-三苯甲基-4'-二苄基磷酸泛酰巯基乙胺(1.85g, 2.37mmol)。将该混合物搅拌2小时，同时保持温度低于-30 °C。通过添加水淬灭反应，然后添加二氯甲烷。用二氯甲烷和乙醚洗涤水相，在真空下浓缩并穿过阳离子交换柱(DOWEX 50WX2)。通过LCMS分析级分并收集包含产物的级分，并在真空下浓缩。通过添加作为钙盐的Ca(OH)₂(332mg, 0.838mmol, 35%)使4'-磷酸泛酰巯基乙胺沉淀。通过与文献[Lee, C-H. 等, J. Am. Chem. Soc. 1975, 1225-1236]对比NMR数据并通过HRMS确认产物结构。

[0188] ¹H NMR (300MHz, D₂O) δ 0.86 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 2.54 (t, J=6.3Hz, 2H), 2.87 (t, J=6.3Hz, 2H), 3.43 (dd, J=10.3, 5.0Hz, 1H), 3.54 (m, 4H), 3.76 (dd, J=10.3, 6.5Hz, 1H), 4.14 (s, 1H) .

[0189] 实测C₁₁H₂₂N₂O₇SP[M-H]⁻的HRMS质量为357.0880, 其对应于预期质量357.0885。

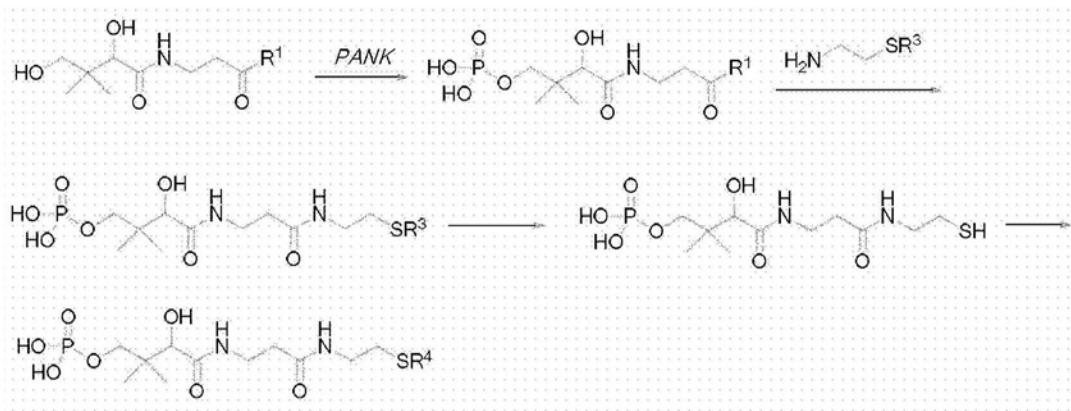


图1

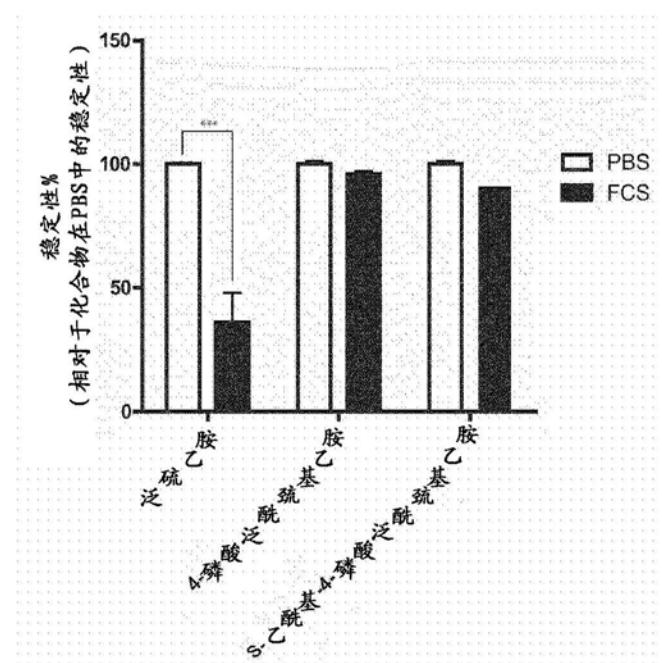


图2

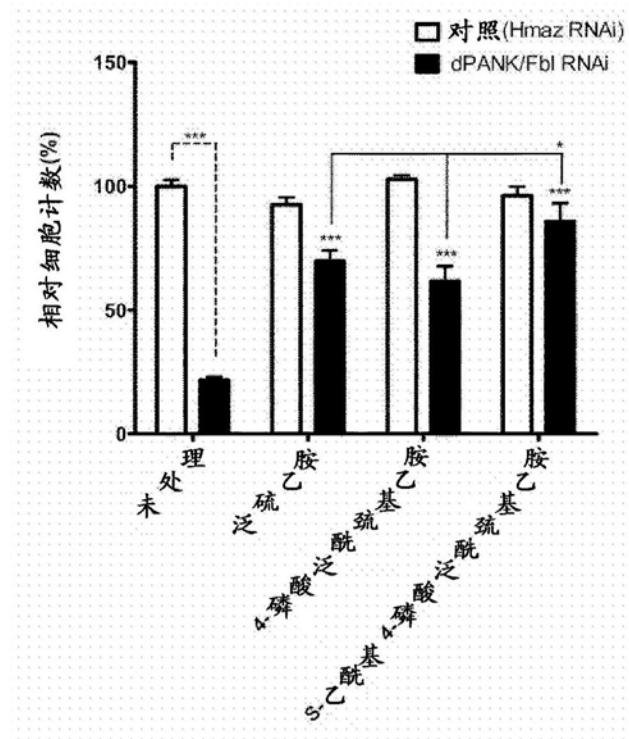


图3

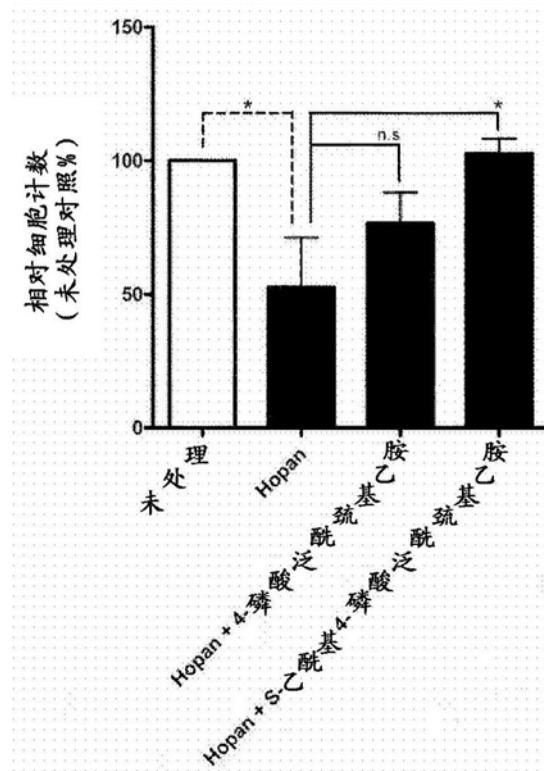


图4

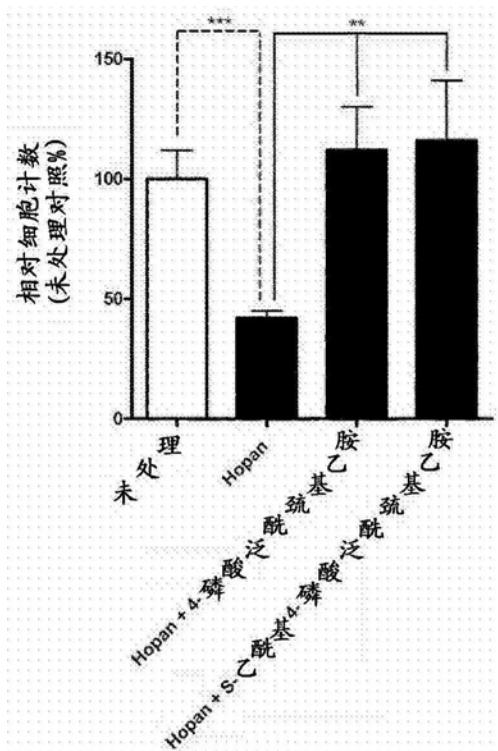


图5

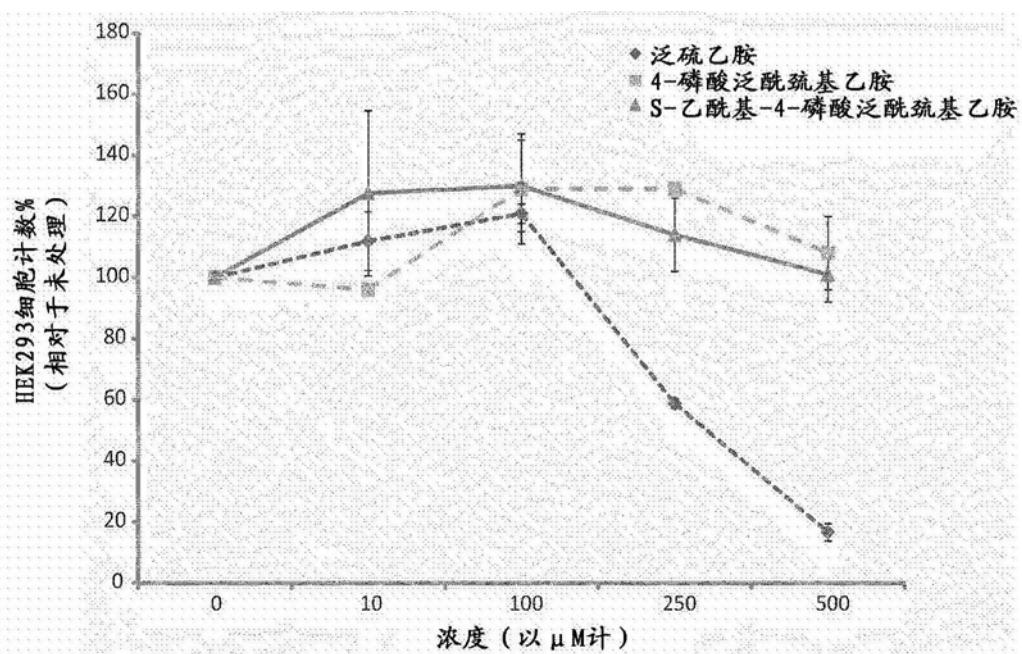


图6