



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115836073 B

(45) 授权公告日 2024.08.27

(21) 申请号 202180040683.1

(22) 申请日 2021.06.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115836073 A

(43) 申请公布日 2023.03.21

(30) 优先权数据
2008598.1 2020.06.08 GB
2016758.1 2020.10.22 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/065112 2021.06.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/249909 EN 2021.12.16

(73) 专利权人 特殊治疗有限公司
地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 C·A·卢克霍斯特 M·I·肯普
P·W·汤普森 M·L·施托克利

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 谭玮

(51) Int.Cl.
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/422 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2016156816 A1, 2016.10.06

审查员 李莎莎

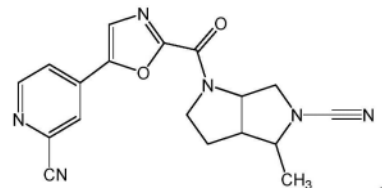
权利要求书3页 说明书61页

(54) 发明名称

用于治疗线粒体功能障碍、癌症和纤维化的
作为USP30抑制剂的1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁
唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-B]吡咯-5
(1H)-甲腈

(57) 摘要

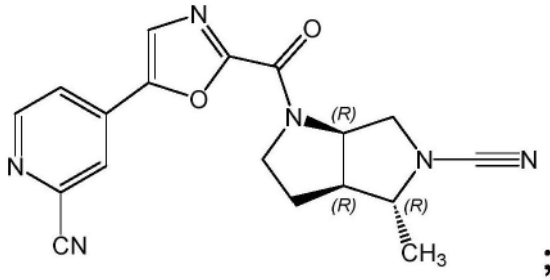
本发明涉及具有作为去泛素化酶USP30的抑
制剂的活性的六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-
甲腈,其可用于多种治疗领域中,包括涉及线粒
体功能障碍的病症、癌症和纤维化:



CN 115836073 B

1. 化合物, 其为:

(3aR, 4R, 6aR) - 1 - (5 - (2 - 氰基吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3, 4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲腈, 其具有下式



或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗或预防涉及线粒体功能障碍的病症。

3. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗或预防涉及线粒体功能障碍的病症, 所述涉及线粒体功能障碍的病症为癌症或纤维化。

4. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述涉及线粒体功能障碍的病症选自: 帕金森病; 阿尔茨海默氏病; 肌萎缩性侧索硬化; 亨廷顿病; 缺血; 中风; 路易体痴呆; 额颞叶痴呆; 多发性硬化; 线粒体脑病、乳酸性酸中毒和中风样发作综合征; 母系遗传性糖尿病和耳聋; 莱伯遗传性视神经病变; Danon病; 糖尿病; 糖尿病性肾病; 代谢障碍; 心力衰竭; 导致心肌梗死的缺血性心脏病; 精神病学疾病; 多种硫酸酯酶缺乏症; 黏脂贮积症II; 黏脂贮积症III; 黏脂贮积症IV; GM1 - 神经节苷脂贮积病; 神经元蜡样质 - 脂褐质沉积症; 阿尔珀斯病; 巴思综合征; β -氧化缺乏症; 肉碱-酰基-肉碱缺乏症; 肉碱缺乏症; 肌酸缺乏综合征; 辅酶Q10缺乏症; 复合体I缺乏症; 复合体II缺乏症; 复合体III缺乏症; 复合体IV缺乏症; 复合体V缺乏症; COX缺乏症; 慢性进行性眼外肌麻痹综合征; CPT I缺乏症; CPT II缺乏症; 戊二酸尿症II型; 卡恩斯-塞尔综合征; 乳酸性酸中毒; 长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症; 利氏病或综合征; 致死性婴儿心肌病; 勒夫特病; 中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症; 肌阵挛型癫痫和破碎红纤维综合征; 线粒体细胞病; 线粒体隐性共济失调综合征; 线粒体DNA耗竭综合征; 肌神经胃肠道障碍和脑病; 皮尔逊综合征; 丙酮酸脱氢酶缺乏症; 丙酮酸羧化酶缺乏症; 中/短链3-羟基酰基辅酶A脱氢酶缺乏症; 极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症; 过氧化物酶体障碍; 甲基丙二酸血症; 甲基戊酸激酶缺乏症; 年龄依赖性的认知功能和肌肉强度下降; 以及与所有神经变性和神经精神病学障碍相关的认知损害。

5. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述涉及线粒体功能障碍的病症为神经变性疾病。

6. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述涉及线粒体功能障碍的病症选自: 精神分裂症; 和神经病、共济失调、视网膜色素变性-母系遗传性利氏综合征。

7. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述涉及线粒体功能障碍的病症为母系遗传性利氏综合征 (MILS) 或神经病共济失调和视网膜色素变性 (NARP)。

8. 根据权利要求4所述的用途, 其中所述涉及线粒体功能障碍的病症选自帕金森病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿病、缺血、中风、路易体痴呆、多系统萎缩、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性和额颞叶痴呆。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述帕金森病选自与 α -突触核蛋白、parkin、PINK1、GBA和LRRK2中的突变有关的帕金森病,以及常染色体隐性的青少年帕金森病或早发型帕金森病(EOPD),其中parkin或PINK1被突变、截短或删除。

10. 根据权利要求5所述的用途,其中所述神经变性疾病是利氏综合征或利氏病。

11. 根据权利要求5所述的用途,其中所述神经变性疾病是X-连锁的利氏病或利氏综合征法国-加拿大变体。

12. 根据权利要求3所述的用途,其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌、脑癌、黑素瘤、骨癌、肝癌、软组织癌、组织器官癌、血细胞癌、套细胞淋巴瘤、神经母细胞瘤、软组织肉瘤、脂肪肉瘤、成纤维细胞肉瘤、平滑肌肉瘤、肝细胞癌、骨肉瘤、食道癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、尤因肉瘤、鼻咽癌和其中BCL-2家族的蛋白发生突变或过表达或表达不足的癌症。

13. 根据权利要求3所述的用途,其中所述癌症选自白血病、软骨肉瘤和非小细胞肺癌。

14. 根据权利要求3所述的用途,其中所述癌症选自CML和AML。

15. 根据权利要求3所述的用途,其中所述癌症为转移性癌。

16. 根据权利要求3所述的用途,其中所述纤维化选自与在创伤、炎症、组织修复、免疫反应、细胞增生和瘤形成以后发生的细胞外基质组分的积累相关的纤维化或纤维化障碍。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述纤维化选自与主要器官疾病相关的纤维化或纤维化障碍、纤维增生性障碍和与创伤相关的瘢痕形成。

18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述纤维化选自与间质性肺病、肝硬化、非酒精性脂肪肝病、肾脏疾病、移植肾功能延迟、心脏或血管疾病、眼部疾病相关的纤维化或纤维化障碍,全身和局部硬皮病,瘢痕疙瘩,肥厚性瘢痕,动脉粥样硬化,再狭窄,迪皮特朗氏挛缩,外科手术并发症,化疗药物诱导的纤维化,辐射诱导的纤维化,意外损伤和烧伤,腹膜后纤维化,和腹膜纤维化/腹膜瘢痕形成。

19. 根据权利要求16所述的用途,其中所述纤维化选自非酒精性脂肪性肝炎、类风湿性关节炎和硬皮病。

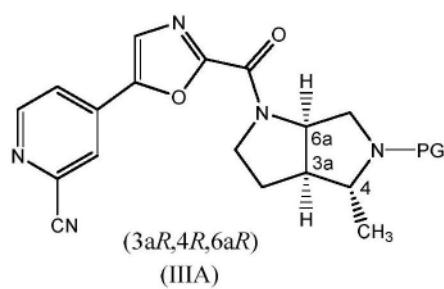
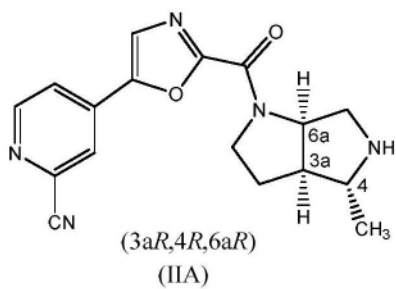
20. 根据权利要求18所述的用途,其中所述与间质性肺病相关的纤维化选自结节病、硅沉着病、药物反应、感染、胶原血管病、系统性硬化症、肺纤维化、间质性肺病、隐源性致纤维性肺炎、闭塞性细支气管炎和支气管扩张。

21. 根据权利要求18所述的用途,其中所述与间质性肺病相关的纤维化选自特发性肺纤维化和普通型间质性肺炎。

22. 根据权利要求18所述的用途,其中所述肾脏疾病是急性肾脏疾病、急性肾损伤或慢性肾脏疾病。

23. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

24. 选自式 (IIA) 和 (IIIA) 的化合物:



或所述化合物的盐；且其中PG是保护基，其选自叔丁基氧基羰基、苄氧基羰基、对甲氧基苄基羰基、9-苄基甲氧基羰基、乙酰基、苯甲酰基、苄基、氨基甲酸酯、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、对甲氧基苄基、甲苯磺酰基、三氯乙氧基羰基、4-硝基苯磺酰基和2-硝基苯基次磺酰基。

用于治疗线粒体功能障碍、癌症和纤维化的作为USP30抑制剂的1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-B]吡咯-5(1H)-甲腈

发明领域

[0001] 本发明涉及具有作为去泛素化酶泛素C-端水解酶30(也称作泛素特异性肽酶30(USP30))的抑制剂活性的六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈类、其用途、其制备方法和含有所述抑制剂的组合物。该抑制剂在多种治疗领域(包括涉及线粒体功能障碍的病症、癌症和纤维化)中具有效用。

[0002] 以下引用或依赖的所有文件明确地通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 泛素是由76个氨基酸组成的小蛋白,其对于细胞中蛋白功能的调节是重要的。泛素化和去泛素化是酶促介导的过程,通过该过程泛素共价结合靶蛋白或通过去泛素化酶(DUB)从靶蛋白切割,其中在人细胞中存在大约100种DUB,它们基于序列同源性被分成亚家族。USP家族的特征在于其共同的Cys和His盒,该盒含有对于其DUB活性至关重要的Cys和His残基。泛素化和去泛素化过程已经被牵涉到许多细胞功能的调节,包括细胞周期进程、细胞凋亡、细胞表面受体修饰、DNA转录和DNA修复的调节。因此,泛素系统已经被牵涉到许多疾病状态的发病机制,所述疾病状态包括炎症、病毒感染、代谢功能障碍、CNS障碍和肿瘤发生。

[0005] 泛素是线粒体动力学的主要调节剂。线粒体是动态细胞器,其生物发生、融合和裂变事件经由许多关键因子(诸如线粒体融合蛋白(mitofusin))的泛素化受到翻译后调控的调节。在人类中,USP30是在线粒体外膜中发现的517个氨基酸的蛋白(Nakamura等人,2008, Mol Biol 19:1903-11)。它是具有线粒体寻址信号(mitochondrial addressing signal)的唯一去泛素化酶,并且已经被证实使许多线粒体蛋白去泛素化。已经证实,USP30抵抗parkin介导的线粒体自噬,并且USP30活性的下降可以拯救parkin介导的线粒体自噬中的缺陷(Bingol等人,2015, Nature 510:370-5; Gersch等人,2017, Nat Struct Mol Biol 24(11):920-930; Cunningham等人,2015, Nat Cell Biol 17(2):160-169)。USP30失活也可以增加线粒体蛋白输入,可能通过TOM蛋白的泛素化(Jacoupy等人,2019, Sci Rep 9(1):11829)。USP30的一小部分已定位于过氧化物酶体,所述过氧化物酶体通过线粒体和ER囊泡的融合产生,其中USP30可能拮抗Pex2/过氧化物酶体自噬(pexophagy)途径(Riccio等人,2019, J Cell Biol 218(3):798-807)。E3Ub连接酶March5和去泛素酶USP30与移位酶结合并调节线粒体输入,而March5抵抗线粒体输入并指导底物的降解,USP30去泛素化底物以促进其输入(Phu等人,2020, Molecular Cell 77,1107-1123)。

[0006] 线粒体功能障碍可以被定义为线粒体含量减少(线粒体自噬或线粒体生物发生)、线粒体活性和氧化磷酸化降低,但是也可以被定义为活性氧物质(ROS)产生的调节。因此,线粒体功能障碍在非常众多的老化过程和病理学中有作用。

[0007] 例如,帕金森病影响全世界约1000万人(帕金森病基金会),且其特征在于黑质中多巴胺能神经元的丧失。作为PD基础的确切机制尚不清楚;但是,线粒体功能障碍逐渐被认

为是PD中多巴胺能神经元易感性的关键决定因素,并且是家族性和散发性疾病以及毒素诱导的帕金森症的特征。Parkin是已经被牵涉到早发型PD的许多蛋白之一。虽然大多数PD病例与 α -突触核蛋白中的缺陷相关,但10%的帕金森病病例与特定的遗传缺陷有关,其中之一是在泛素E3连接酶parkin中。Parkin和蛋白激酶PTEN诱导的假定激酶1 (PINK1) 协同使受损线粒体的线粒体膜蛋白泛素化,从而导致线粒体自噬。线粒体自噬的失调导致氧化性应激增加,这已经被描述为PD的特征。因此,USP30的抑制可能是治疗PD的潜在策略。例如,具有导致活性降低的parkin突变的PD患者可以通过USP30的抑制得到治疗性代偿。

[0008] 已经报道,USP30的耗竭会增强线粒体的线粒体自噬清除率,并且还增强parkin诱导的细胞死亡。还已经证实USP30调节BAX/BAK依赖性的细胞凋亡,与parkin过表达无关。USP30的耗竭使癌细胞对BH-3模拟物诸如ABT-737敏感,而不需要parkin过表达。因此,已经证明了USP30的抗细胞凋亡作用,且因此USP30是抗癌疗法的潜在靶标。

[0009] 在批准蛋白酶体抑制剂硼替佐米(**万珂®**)用于治疗多发性骨髓瘤以后,泛素-蛋白酶体系统作为癌症治疗靶标已经受到关注。用硼替佐米的延长治疗受限于其相关毒性和耐药性。但是,预期靶向蛋白酶体的泛素-蛋白酶体途径上游的特定方面(例如,DUB)的治疗策略被更好地耐受(Bedford等人,2011,Nature Rev 10:29-46)。

[0010] 纤维化疾病(包括肾、肝和肺纤维化)是发病率和死亡率的主要原因,并且可以影响所有组织和器官系统。纤维化被视为对组织或器官的急性或慢性应激的结果,其特征在于细胞外基质沉积、血管/小管/导管/气道通畅性降低和功能受损,最终导致器官衰竭。许多纤维化病症是由生活方式或环境因素促成;但是,一部分纤维化病症可以通过遗传触发物引发或确实被视为特发性的(即没有已知原因)。某些纤维化疾病诸如特发性肺纤维化(IPF)可以用非特异性激酶抑制剂(尼达尼布)或没有充分表征的作用机理的药物(吡非尼酮)治疗。器官纤维化(诸如肾或肝纤维化)的其它治疗会减轻对器官本身的压力(例如用于肝硬化的 β 阻滞剂,用于慢性肾脏疾病的血管紧张素受体阻滞剂)。对生活方式因素的注意(诸如葡萄糖和饮食控制)也可以影响疾病的进程和严重程度。

[0011] 线粒体功能障碍已经被牵涉到许多纤维化疾病,其中在功能障碍下游的氧化性应激是关键致病介体,同时ATP产生减少。在临床前模型中,线粒体自噬途径的破坏(通过parkin或PINK1的突变或敲除)会加重肺纤维化和肾纤维化,并有证据表明氧化性应激增加。

[0012] Kurita等人,2017,Respiratory Research 18:114公开了促纤维化肌成纤维细胞的积累是IPF中纤维化重塑的关键过程。据称近期的发现表明自噬/线粒体自噬(溶酶体降解机制的组成部分)参与IPF发病机制,并且线粒体自噬通过调节线粒体活性氧物质(ROS)介导的血小板-衍生的生长因子受体(PDGFR)活化已经被牵涉到肌成纤维细胞分化。Kurita的结果表明,吡非尼酮诱导PARK2介导的线粒体自噬,并在线粒体自噬不足的情况下抑制肺纤维化发展,这可以至少部分地解释IPF治疗的抗纤维化机制。

[0013] Williams等人,2015,Pharmacol Res. 12月;102:264-269讨论了PINK1-Parkin介导的自噬通过经线粒体自噬除去受损的线粒体在保护酒精和对乙酰氨基酚诱导的肝损伤中的作用。经建议,USP8的药理学稳定性或USP15和USP30的失活可能是上调Parkin诱导的线粒体自噬的潜在治疗靶标并进而保护免于药物诱导的肝损伤。但是,应当指出,DUB在转录和翻译后都受到调节,这可能使靶向这些特异性酶的药物开发具有挑战性,并且此外,证

实了磷酸化的泛素对DUB具有抗性。作者得出的结论是,上调PINK1稳定化或激酶活性可能是比抑制DUB更有效的靶标。

[0014] Williams等人,2015,Biomolecules 5,2619-2642,和Williams等人,2015,Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 309:G324-G340综述了牵涉进肝脏线粒体稳态的调节中的机制以及这些机制可以如何保护免于酒精诱导的肝疾病。

[0015] Luciani等人,2020,Nat.Commun.11,970报道了终末分化细胞(terminally differentiated cell)中线粒体网络的失调促成广泛的障碍,包括甲基丙二酸血症(MMA)。MMA是最常见的遗传性代谢障碍之一,其归因于线粒体甲基丙二酰基-辅酶A变位酶(MMUT)的缺乏。MMUT缺乏会诱导代谢和线粒体改变,所述改变因PINK1/Parkin介导的线粒体自噬中的异常而加重,从而造成功能失调的线粒体的积累,其触发上皮应激并最终导致细胞损伤。提示原发性MMUT缺乏症、线粒体病变、线粒体自噬功能障碍和上皮应激之间的联系,并提供了MMA的潜在治疗前景。

[0016] Kluge等人,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,2018,282655-2659报道了USP30的选择性抑制剂加速线粒体自噬。

[0017] 在PCT申请WO 2016/046530 (US 15/513125、US 15/894025、US 16/448066)、WO 2016/156816 (US 15/558632、US 16/297937、US 16/419558、US 16/419747、US 16/788446)、WO 2017/009650 (US 15/738900)、WO 2017/093718 (US 15/776149)、WO 2017/103614 (US 15/781615)、WO 2017/149313 (US 16/078518)、WO 2017/109488 (US 16/060299)、WO 2017/141036 (US 16/070936)、WO 2017/163078 (US 16/087515)、WO 2017/158381 (US 16/080229)、WO 2017/158388 (US 16/080506)、WO 2018/065768 (US 16/336685)、WO 2018/060742 (US 16/336202)、WO 2018/060689 (US 16/334836)、WO 2018/060691 (US 16/336363)、WO 2018/220355 (US 16/615040)、WO 2018/234755 (US 16/615709)、WO 2020/212350、WO 2020/212351、WO 2021/043870、PCT/EP2021/059032和PCT/EP2021/064166中公开了多个系列的N-氰基-取代的杂环的衍生物作为去泛素化酶抑制剂,它们中的每一篇明确地通过引用并入本文。PCT申请WO 2019/171042 (US 16/977019) (其明确地通过引用并入本文) 公开了N-氰基吡咯烷类作为USP30的抑制剂用于治疗纤维化疾病的用途。

[0018] Falgueyret等人,2001,J.Med.Chem.44,94-104,和PCT申请WO 01/77073涉及作为组织蛋白酶K和L的抑制剂的氰基吡咯烷类,其在治疗骨质疏松症和其它骨吸收相关病症方面具有潜在效用。PCT申请WO 2015/179190涉及N-酰基乙醇胺水解酸性酰胺酶抑制剂,其在治疗溃疡性结肠炎和克罗恩氏病方面具有潜在效用。PCT申请WO 2013/030218涉及作为泛素特异性蛋白酶(诸如USP7)的抑制剂的喹唑啉-4-酮化合物,其在治疗癌症、神经变性疾病、炎症性障碍和病毒感染方面具有潜在效用。PCT申请WO 2015/017502和WO 2016/019237涉及布鲁顿氏酪氨酸激酶的抑制剂,其在治疗疾病诸如自身免疫性疾病、炎性疾病和癌症中具有潜在效用。PCT申请WO 2009/026197、WO 2009/129365、WO 2009/129370和WO 2009/129371涉及作为组织蛋白酶C的抑制剂的氰基吡咯烷类,其在治疗COPD中具有潜在效用。美国专利申请US 2008/0300268涉及作为酪氨酸激酶受体PDGFR的抑制剂的多芳族化合物。PCT申请WO 2019/222468、WO 2019/071073、WO 2020/036940和WO 2020/072964、Rusilowicz-Jones等人,2020,bioRxiv2020.04.16.044206(2020年4月20日)、和Tsefou等

人, bioRxiv2021.02.02.429344 (2021年2月2日) 涉及作为USP30抑制剂的含有氰胺的化合物。Yue等人, 2014, Cell Research, 24, 482-496 涉及作为USP30抑制剂的二萜类衍生物15-氧代绣线菊内酯(15oxospiramilactone), 其诱导线粒体融合。

[0019] PCT申请W0 2015/183987涉及在治疗癌症、纤维化、自身免疫性疾病或病症、炎性疾病或病症、神经变性疾病或病症或感染的方法中的包含去泛素酶抑制剂和人血清白蛋白的药物组合物。应当指出, 据称去泛素酶(包括UCHL5/UCH37、USP4、USP9X、USP11和USP15)已经被牵涉进TGF- β 信号传递途径的调节, 该途径的中断会导致神经变性和纤维化疾病、自身免疫功能障碍和癌症。

[0020] PCT申请W0 2006/067165涉及使用吲哚酮(indolinone) 激酶抑制剂治疗纤维化疾病的方法。PCT申请W0 2007/119214涉及使用内皮缩血管肽受体拮抗剂治疗早期肺纤维化的方法。PCT申请W0 2012/170290涉及使用THC酸治疗纤维化疾病的方法。PCT申请W0 2018/213150涉及磺酰胺USP30抑制剂, 其在治疗涉及线粒体缺陷的病症中具有潜在效用。Larson-Casey等人, 2016, Immunity 44, 582-596 涉及巨噬细胞Akt1激酶介导的线粒体自噬、细胞凋亡抗性和肺纤维化。Tang等人, 2015, Kidney Diseases 1, 71-79 综述了线粒体自噬在肾脏病理生理学中的潜在作用。

[0021] 需要用于治疗或预防涉及线粒体功能障碍的病症、癌症和纤维化以及与其相关的各种症状和病症的安全的、可替代的和/或改进的方法和组合物。尽管不希望受任何特定理论或机制约束, 据信, 本发明的化合物起作用以抑制酶USP30, 这又上调Parkin诱导的线粒体自噬。

[0022] 将急性肾损伤(AKI) 定义为在7天或更短时间内发生的肾功能突然下降, 损伤的严重程度基于在肾脏疾病改善全球结果(Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)) 指南中所述的血清肌酐(SCr) 升高和尿输出减少进行分级。每年约1330万人发生AKI, 其中85%生活在发展中国家, 并且认为每年会导致约170万人死亡(Mehta等人, 2015, Lancet 385(9987):2616-2643)。AKI很可能导致永久性肾损伤(即慢性肾脏疾病; CKD), 并且也可能导致对非肾器官的损伤。AKI是一个重要的公共卫生问题, 特别是当考虑到发生偶然性CKD、进行性CKD、终末期肾脏疾病和心血管事件的患者的绝对数目时。已发现AKI在因为COVID-19住院的患者中普遍存在, 并且与住院死亡率密切相关, 据报道线粒体损伤和功能障碍是一种潜在的病理生理学机制和治疗靶标(Kellum等人, Nephrol Dial Transplant (2020) 35:1652-1662)。

[0023] AKI和CKD被视为同一疾病谱的连续统一体(Chawla等人, 2017, Nat Rev Nephrol 13(4):241-257)。经历冠状动脉旁路移植术(CABG) 的患者处于肾损伤的高风险中。在用于治疗 and/或预防AKI的医学产品的开发方面存在明显未得到满足的医疗需求。

[0024] 肾脏是一个高代谢需求的部位, 在体内表现出高线粒体自噬率(McWilliams等人, 2018, Cell Metab 27(2):439-449e435)。肾近端小管上皮细胞(RPTEC) (一种为了溶质/离子交换具有显著ATP需求的细胞类型) 富含线粒体, 并且是肾脏中急性肾损伤(AKI) 的主要效应细胞。线粒体功能障碍已经被牵涉进AKI/CKD机制, 这既通过来自临床前AKI和CKD模型的多个系列证据, 也通过在患者活组织检查中显示异常线粒体表型的数据(Emma等人, 2016, Nat Rev Nephrol 12(5):267-280; Eirin等人, 2017, Handb Exp Pharmacol 240:229-250)。此外, 原发性线粒体疾病经常表现为肾脏症状, 诸如在患有MELAS/MIDD的患者中

的局灶性节段性肾小球硬化症 (Kawakami等人,2015,J Am Soc Nephrol 26 (5) :1040-1052),以及在患有辅酶Q缺乏症的患者中的原发性肾小管病变。mtDNA中的突变可以造成母系遗传性小管间质性 (tubulointerstitial) 疾病 (Connor等人,2017,PLoS Genet 13 (3) : e1006620)。

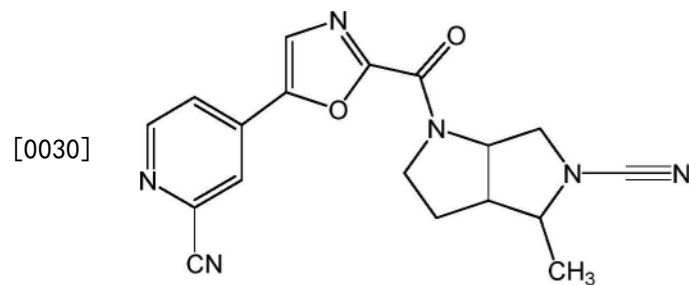
[0025] 关于肾损伤中的线粒体质量控制, (Tang等人,2018,Autophagy14 (5) :880-897) 证实了PINK1 KO和PARK2 KO小鼠在缺血性AKI后肾损伤加重,从而提示,PINK1/PARKIN介导的线粒体自噬在IRI后在肾脏中起保护作用。另外,parkin/PINK1线粒体自噬会保护免于顺铂诱导的肾损伤 (Wang等人,2018,Cell Death Dis 9 (11) :1113)。有限的CKD模型可用于线粒体自噬研究,纤维化中线粒体质量控制的支持性证据来自对纤维化肺病症诸如COPD和IPF的研究。Parkin敲除的动物响应于博来霉素显示加重的肺纤维化 (Kobayashi等人,2016,J Immunol,197:504-516)。类似地,来自parkin敲除的 (KO) 动物的气道上皮细胞显示对香烟烟气的加重纤维化和衰老应答 (Araya等人,2019,Autophagy 15 (3) :510-526)。

[0026] 通过它们模拟与人病症一致的纤维化病理学 (例如胶原沉积) 的能力,临床前模型可用于研究潜在的新治疗剂。临床前模型可以是毒素介导的 (例如用于肺和皮肤纤维化的博来霉素)、外科手术的 (例如用于急性小管间质性纤维化的缺血/再灌注损伤模型和单侧输尿管阻塞模型) 和遗传性的 (例如用于糖尿病性肾病的糖尿病性 (db/db) 小鼠)。例如,先前针对指定IPF治疗 (尼达尼布和吡非尼酮) 给出的两个实例在博来霉素肺纤维化模型中显示出效力。

[0027] 因此,需要作为USP30抑制剂的化合物,其用于治疗或预防其中指示抑制USP30的病症。特别地,需要USP30抑制剂,其具有合适的和/或改进的性能以便最大化针对目标疾病的效力。

[0028] 发明概述

[0029] 本发明提供了式 (I) 的化合物:



[0031] 或其药学上可接受的盐。

[0032] 本发明还涉及式 (I) 的化合物的用途,特别是在治疗涉及线粒体功能障碍的病症、癌症和纤维化中的用途,还涉及其制备方法和含有所述化合物的药物组合物。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明涉及USP30抑制剂,其具有合适的和/或改善的性能以便最大化对目标疾病的效力。这样的性能包括,例如,效能、选择性、物理化学性能、ADME (吸收、分布、代谢和排泄) 性能 (包括PK (药代动力学) 特性) 和安全性谱。

[0035] 通常需要在有关测定中使药物分子对靶酶的效能最大化以便降低要施用给患者的有效/起效剂量。使用本文描述的体外生化荧光偏振 (FP) 测定,可以试验本发明的化合物的USP30亲和力。

[0036] USP30是位于线粒体的外膜中的跨膜蛋白,线粒体是存在于细胞内的产生能量的细胞器。因此,能够在体外证明细胞活性是有利的,因为这是可能指示在其生理环境中(即在此处USP30抑制剂化合物能够穿透细胞)结合靶标的更大能力的许多组成部分之一。USP30细胞蛋白质印迹(WB)测定旨在使用不可逆活性探针试验化合物对细胞中USP30的活性以监测USP30活性。与细胞蛋白质印迹测定类似,靶标结合评估(离体)可以在来自施用化合物的动物的脑或肾组织样品中进行。

[0037] 为了将靶标结合知识扩展到下游药效动力学,可以进行TOM20(一种线粒体外膜蛋白)泛素化的评估。

[0038] 一般而言,重要的是,药物对其期望的靶酶尽可能具有选择性;额外的活性产生副作用的可能性。许多DUB的确切生理作用尚未完全确定,但是,无论这些DUB可能发挥或不发挥什么作用,确保任何药物相对于未知生理功能的相关机制靶标具有选择性是一个合理的药物化学规则。可以针对其筛选本发明化合物的DUB酶的代表性例子是UCHL1、UCHL3、UCHL5、YOD1、SEN2、SEN6、TRABID、BAP1、Cezanne、MINDY2/FAM63B、OTU1、OTUD3、OTUD5、OTUD6A、OTUD6B、OTUB1/UBCH5B、OTUB2、CYLD、VCPIP、AMSH-LP、JOSD1、JOSD2、USP1/UAF1、USP2、USP4、USP5、USP6、USP7、USP8、USP9x、USP10、USP11、USP12/UAF1、USP13、USP14、USP15、USP16、USP19、USP20、USP21、USP22、USP24、USP25、USP28、USP32、USP34、USP35、USP36、USP45、USP46/UAF1、USP47和USP48。优选地,本发明的化合物相对于这些DUB酶中的一种或多种对USP30具有良好选择性。

[0039] 除了相对于其它DUB酶的选择性外,药物对其它靶标的低亲和力也是重要的,并且可以针对多组靶标进行药理性能分析以评估潜在脱靶效应的可能性并使潜在脱靶效应最小化。可以针对其筛选本发明化合物的靶标的例子是工业标准Eurofins-Cerep SafetyScreen44组的那些,其包括44种靶标作为GPCR受体、转运蛋白、离子通道、核受体和激酶和非激酶酶的代表性选择。优选地,本发明的化合物对该筛选组的靶标具有不显著的亲和力。可以针对其筛选本发明化合物的靶标的其它例子是Thermo Fisher SelectScreen激酶谱分析组的激酶,其包括39种靶标作为激酶酶的代表性选择。优选地,本发明的化合物对该筛选组的靶标具有不显著的亲和力。此外,可以针对其筛选本发明化合物的特定酶类别的例子是组织蛋白酶(例如组织蛋白酶A、B、C、H、K、L、L2、S、V和Z)。优选地,本发明的化合物相对于这些酶中的一种或多种对USP30具有良好选择性。

[0040] 也需求具有有利药代动力学性能使得它们适合于口服施用的化合物。口服施用的药物应当具有良好的生物利用度;这是一种容易穿过胃肠(GI)道并且在其从胃肠道进入体循环时不经受广泛代谢的能力。一旦药物进入体循环,代谢速率在确定药物在体内的停留时间方面也是重要的。

[0041] 因此,药物分子具有能轻易穿过胃肠道并且仅在体内缓慢代谢的性能显然是有利的。Caco-2测定是一种被广泛接受的用于预测给定分子穿过胃肠道的能力的模型。药物分子的代谢的大部分通常发生在肝脏中,并且使用全细胞肝细胞(动物或人)的体外测定是被广泛接受的用于测量给定分子对肝脏中代谢的敏感性的方法。这样的测定旨在从肝细胞计算清除率值预测体内清除率。

[0042] 预计具有良好Caco-2通量且对肝细胞稳定的化合物具有良好的口服生物利用度(通过胃肠道的良好吸收和在它穿过肝脏时化合物的最少提取)和在体内的长停留时间,该

时间对于药物有效而言是足够的。

[0043] 化合物的溶解度是为了预期的药理学应答在体循环中实现期望的药物浓度的一个重要因素。低水溶性是新化学实体的制剂开发遇到的一个问题,并且为了被吸收,药物必须以溶液的形式存在于吸收部位处。可以使用比浊溶解度测定测量化合物的动力学溶解度,来自该测定的数据还可以与Caco-2渗透性数据结合使用以预测剂量依赖性的人肠吸收。

[0044] 可以使用指示化合物的暴露性能的标准测定来测量的其它参数包括、例如血浆稳定性(半衰期测量)、血液AUC、 C_{\max} 、 C_{\min} 和 T_{\max} 值。

[0045] CNS障碍(包括阿尔茨海默氏病、帕金森病和本文描述的其它障碍)的治疗需要药物分子靶向脑,这需要适当穿透血脑屏障。因此,需求具有有效血脑穿透性能并在脑中提供合适的停留时间以起效的USP30抑制剂。通过利用MDR1-MDCK细胞单层(用MDR-1转染的Madin-Darby犬肾细胞,MDR-1导致人外流转运蛋白P-糖蛋白的过表达)体外通量测定,可以测量化合物可以穿过血脑屏障的可能性。此外,也可以使用体内动物模型直接在脑和血浆中测量暴露。

[0046] 也需求具有有利安全性谱的化合物,可以通过多种标准体外和体内方法测量安全性谱。可以使用细胞毒性反向筛选(counter-screen)来测定在特定细胞系(例如HCT116)中的抗增殖/细胞毒性作用,这通过响应于线粒体活性的rezasurin(alarBlue™)到resofurin的荧光检测实现。

[0047] 还可以进行毒理学和安全性研究以鉴定不良作用的潜在靶器官,并定义治疗指数以设定在临床试验中的初始起始剂量。监管要求通常要求在至少两种实验动物物种中进行研究,一种啮齿动物(大鼠或小鼠)和一种非啮齿动物(兔、狗、非人灵长类动物或其它合适的物种)。

[0048] 细菌回复突变测定(埃姆斯试验)可以用于评价本发明化合物的致突变性能,其通常使用细菌菌株鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),该菌株是用于氨基酸组氨酸的生物合成的突变体。

[0049] 通过评价微核的存在,微核测定可以用于确定化合物是否具有遗传毒性。微核可以含有由DNA断裂(断裂剂)产生的染色体片段或由有丝分裂器的破坏(非整倍体诱变剂(aneugens))产生的完整染色体。

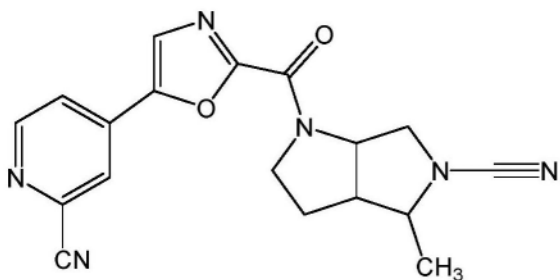
[0050] hERG预测器测定提供了关于试验化合物与钾通道的可能结合以及在超声心动图上的潜在QT延长的有价值信息。hERG电流的抑制造成QT间期延长,从而导致潜在致死性室性快速型心律失常(尖端扭转型室性心动过速)。通常,测定数据可以从自动化膜片钳测定平台产生。

[0051] 因此,本发明涉及USP30抑制剂,其具有合适的和/或改进的性能以便最大化对目标疾病的效力。这样的性能包括,例如,效能、选择性、物理化学性能、ADME(吸收、分布、代谢和排泄)性能(包括PK(药代动力学)特性)和安全性谱。

[0052] 本发明的最优选化合物对USP30非常有效(如在本文描述的生化测定中所测得的),并且相对于其它DUB和组织蛋白酶对USP30具有显著更多的选择性。本发明的化合物的显著的和意料之外的性能使它们特别适合用于治疗 and/或预防与USP30活性相关的疾病。

[0053] 根据第一方面,本发明提供了式(I)的化合物:

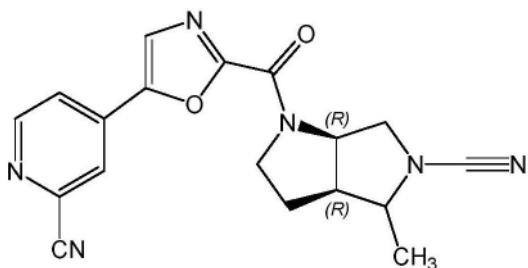
[0054]



[0055] 或其药学上可接受的盐。

[0056] 在第一个优选方面,本发明提供了式 (IA) 的化合物:

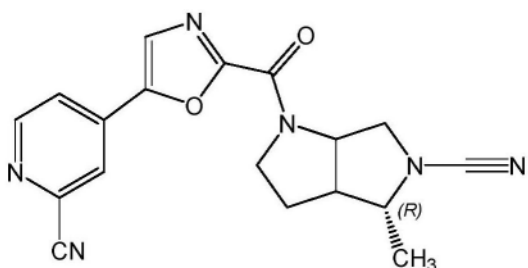
[0057]



[0058] 或其药学上可接受的盐。

[0059] 在第二个优选方面,本发明提供了式 (IB) 的化合物:

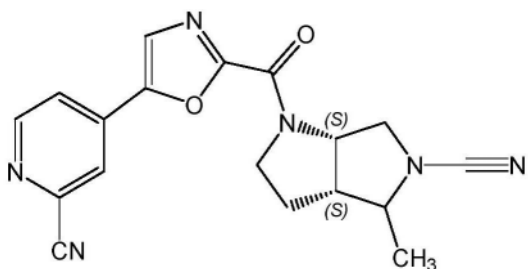
[0060]



[0061] 或其药学上可接受的盐。

[0062] 在第三个优选方面,本发明提供了式 (IC) 的化合物:

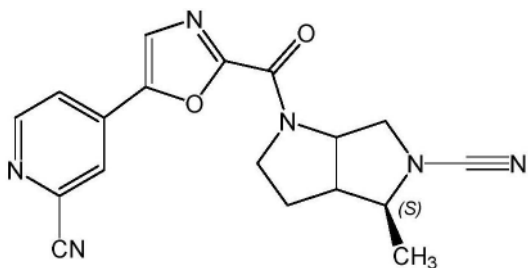
[0063]



[0064] 或其药学上可接受的盐。

[0065] 在第四个优选方面,本发明提供了式 (ID) 的化合物:

[0066]



[0067] 或其药学上可接受的盐。

[0068] 优选的式(I)的化合物选自:

[0069] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0070] (3aS,4S,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0071] (3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0072] (3aS,4R,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0073] (3aR,4R,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0074] (3aS,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0075] (3aR,4S,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;和

[0076] (3aS,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0077] 或其药学上可接受的盐。

[0078] 更优选的式(I)的化合物选自:

[0079] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0080] (3aS,4S,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0081] (3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;和

[0082] (3aS,4R,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0083] 或其药学上可接受的盐。

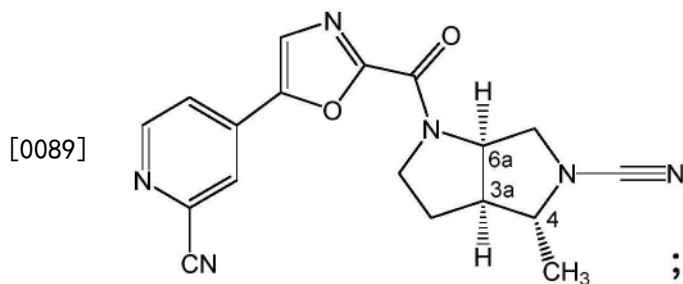
[0084] 最优选的式(I)的化合物是:

[0085] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0086] 或其药学上可接受的盐。

[0087] 实施例1是本发明的最优选化合物。

[0088] 这种最优选的式(I)的化合物作为单一的右旋立体异构体存在,其已被鉴定为具有以下具有所示绝对构型的结构:



[0090] (3aR, 4R, 6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈。

[0091] 式(I)的化合物具有三个手性中心,并因此可以以八种立体化学构型存在。根据下面的实验,双环的合成被认为产生了顺式-稠合环系统,从而产生四种可能的立体异构体。最优的式(I)的化合物的立体化学构型是实施例1的构型,它是在生化测定中对USP30最具活性的化合物。

[0092] 已经通过下述实验制备了四种立体异构体;实施例1-4。当在实验条件($c=0.05\text{g}/100\text{cm}^3$, MeOH)下测量时,实施例1和3是右旋的,且实施例2和4是左旋的。当通过两种不同的方法制备时,实施例1产生 $[\alpha]_D^{25}=+208^\circ$ 和 $+204^\circ$ 的旋光度测量值。小的变化可能是由于实验差异或光学纯度的差异。实施例3产生了 $[\alpha]_D^{25}=+166^\circ$ 的旋光度测量值。

[0093] 此外,本发明涉及顺式-稠合的立体异构体,其在如所述测量时是右旋的,并且具有在 $+204^\circ$ 至 $+208^\circ$ 范围内的近似旋光度。取决于光学纯度,这种立体异构体在基本纯时可以产生在 $+190^\circ$ 至 $+220^\circ$ 范围内的旋光度。这样的图清楚地将本发明的这种化合物与同样是右旋的其它顺式-稠合的立体异构体区分开。

[0094] 此外,本发明涉及:

[0095] (+)-(3aR*, 4R*, 6aR*)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈(I);

[0096] 或其药学上可接受的盐。

[0097] 此外,本发明涉及通过实施例1的实验程序产生的主要立体异构体。

[0098] 式(I)的化合物的药学上可接受的盐包括其酸加成盐和碱盐(包括二盐)。

[0099] 合适的酸加成盐由形成无毒盐的酸形成。例子包括乙酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、羟苯酰苯甲酸盐(hibenzate)、盐酸盐/氯化物、氢溴酸盐/溴化物、氢碘酸盐/碘化物、磷酸氢盐、羟乙基磺酸盐、D-和L-乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、棕榈酸盐(palmate)、磷酸盐、蔗糖酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐硫酸盐、D-和L-酒石酸盐和甲苯磺酸盐。

[0100] 合适的碱盐由形成无毒盐的碱形成。例子包括铝、铵、精氨酸、二苄基乙二胺、钙、胆碱、二乙胺、二乙醇胺、甘氨酸、赖氨酸、镁、葡甲胺、乙醇胺、钾、钠、氨丁三醇和锌盐。

[0101] 关于合适的盐的综述,参见Stahl和Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH, 魏因海姆, 德国(2002)。

[0102] 通过将式(I)的化合物的溶液与期望的酸或碱(根据需要)混合在一起,可以容易地制备式(I)的化合物的药学上可接受的盐。所述盐可以从溶液中沉淀并可以通过过滤收

集或可以通过溶剂的蒸发来回收。

[0103] 根据本发明的药学上可接受的溶剂化物包括水合物和溶剂化物,其中结晶的溶剂可以被同位素取代,例如D₂O、丙酮-d₆、DMSO-d₆。

[0104] 笼形包合物、药物-宿主包合络合物也在本发明的范围内,其中与上述溶剂化物相反,药物和宿主以非化学计量的量存在。关于这样的络合物的综述,参见Haleblian的J.Pharm Sci,64(8),1269-1288(1975年8月)。

[0105] 在下文中所有对式(I)的化合物的提及包括对其盐的提及以及对式(I)的化合物及其盐的溶剂化物和笼形包合物的提及。

[0106] 本发明包括如上文所定义的式(I)的化合物的所有多晶型物。

[0107] 式(I)的化合物的所谓“前药”也在本发明的范围内。因此,某些本身几乎没有药理活性或没有药理活性的式(I)的化合物的衍生物在施用至身体内或身体上时被代谢,可以产生具有期望活性的式(I)的化合物。这样的衍生物被称作“前药”。

[0108] 例如,可以如下生产根据本发明的前药:用例如H Bundgaard的“Design of Prodrugs”(Elsevier,1985)中所述的某些本领域技术人员已知作为“前-部分(promoieties)”的某些部分替代在式(I)的化合物中存在的适当官能团。

[0109] 最后,某些式(I)的化合物自身可以充当式(I)的其它化合物的前药。

[0110] 含有氮原子的式(I)的化合物的某些衍生物还可以形成相应的N-氧化物,并且这样的化合物也在本发明的范围内。

[0111] 在本发明的范围内包括式(I)的化合物的所有互变异构形式。

[0112] 用于制备/分离各对映异构体的常规技术包括从合适的光学纯的前体手性合成,或使用例如手性高效液相色谱法(HPLC)拆分外消旋体(或盐或衍生物的外消旋体)。可替换地,外消旋体(或外消旋的前体)可以与合适的光学活性化合物例如醇反应,或者在式(I)的化合物含有酸性或碱性部分的情况下,与碱或酸诸如1-苯基乙胺或酒石酸反应。得到的非对映异构体混合物可以通过色谱法和/或分步结晶分离,并且将一种或两种非对映异构体通过技术人员众所周知的方式转化为相应的纯对映异构体。本发明的手性化合物(及其手性前体)可以使用色谱法(通常HPLC)以对映异构体富集形式获得,在不对称树脂上使用由烃、通常庚烷或己烷组成的流动相,所述流动相含有0-50体积%的丙烷-2-醇(通常2%至20%)和0-5体积%的烷基胺(通常0.1%二乙胺)。浓缩洗脱液,得到富集的混合物。本发明包括式(I)的化合物的所有晶体形式,包括其外消旋体和外消旋混合物(混合物)。通过本领域技术人员已知的常规技术,可以分离立体异构体混合物-参见,例如,E.L.Elciel和S.H.Wilen的“Stereochemistry of Organic Compounds”(Wiley,New York,1994)。

[0113] 本发明的最优选的式(I)的化合物可以与优选的式(I)的化合物的一种或多种其它立体异构体组合存在。例如,所述化合物可以与其对映异构体一起存在,即作为外消旋体存在,或者它可以与非对映异构体一起存在。

[0114] 本发明优选的式(I)的化合物优选地作为单一立体异构体存在。优选的式(I)的化合物被分离为单一立体异构体,并且可以以至少60%、优选至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%例如96%、97%、98%、99%或100%的立体异构体过量存在。立体异构体过量可以是对映体过量的量度或可以是非对映体比率的量度。

[0115] 本发明还包括式(I)的化合物的所有药学上可接受的同位素变体。将同位素变体

定义为其中至少一个原子被具有相同原子数但原子质量不同于在自然界中通常发现的原子质量的原子替代的变体。

[0116] 适用于包含在本发明化合物中的同位素的例子包括：氢的同位素，诸如²H和³H，碳的同位素，诸如¹³C和¹⁴C，氮的同位素，诸如¹⁵N，氧的同位素，诸如¹⁷O和¹⁸O，磷的同位素，诸如³²P，硫的同位素，诸如³⁵S，氟的同位素，诸如¹⁸F，和氯的同位素，诸如³⁶Cl。

[0117] 用同位素诸如氘取代本发明的化合物可能提供某些由更大代谢稳定性引起的治疗优点，例如，增加的体内半衰期或减小的剂量需求，且因此在某些情况下可能是优选的。

[0118] 式(I)的化合物的某些同位素变体，例如，掺入放射性同位素的那些，可用在药物和/或底物组织分布研究中。考虑到它们易于掺入和检测方便，放射性同位素氘和¹⁴C对于该目的是特别有用的。

[0119] 通过本领域技术人员已知的常规技术，或通过附随实施例和制备中所述的那些类似的方法，使用合适试剂的适当同位素变体，通常可以制备式(I)的化合物的同位素变体。

[0120] 式(I)的化合物是去泛素化酶USP30的抑制剂。

[0121] 根据另一个方面，本发明提供了用于用作药物的如本文中定义的式(I)的化合物、其互变异构体、或所述化合物或互变异构体的药学上可接受的盐。

[0122] 根据另一个方面，本发明提供了治疗或预防哺乳动物的已知USP30的抑制会产生有益效果或可以证实USP30的抑制会产生有益效果的障碍或病症的方法，其包含给所述哺乳动物施用治疗有效量的如本文中定义的式(I)的化合物、其互变异构体、或所述化合物或互变异构体的药学上可接受的盐。

[0123] 根据另一个方面，本发明提供了如本文中定义的式(I)的化合物、其互变异构体、或所述化合物或互变异构体的药学上可接受的盐在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防已知USP30的抑制会产生有益效果或可以证实USP30的抑制会产生有益效果的障碍或病症。药物的制备可以尤其包括式(I)的化合物或其盐的化学合成，或包含所述化合物或盐的组合物或制剂的制备，或包含所述化合物的任何药物的包装。

[0124] 根据另一个方面，本发明提供了一种抑制患者中的USP30的方法，其包含给所述患者施用治疗有效量的如本文中定义的式(I)的化合物、其互变异构体、或所述化合物或互变异构体的药学上可接受的盐。

[0125] 受益于USP30活性的障碍或病症选自涉及线粒体功能障碍的病症、癌症和纤维化。

[0126] 在本发明的所有方面的一个优选实施方案中，受益于USP30活性的障碍或病症是涉及线粒体功能障碍的病症。

[0127] 线粒体功能障碍是由线粒体的缺陷引起，线粒体是存在于身体的每个细胞(红细胞除外)中的专门隔室。当线粒体失灵时，在细胞内产生的能量越来越少，随之而来的是细胞损伤或甚至细胞死亡。如果该过程在身体各处重复，发生这种情况的受试者的生命会受到严重损害。线粒体疾病似乎最常出现在对能量要求非常高的器官中，诸如脑、心脏、肝脏、骨骼肌、肾脏以及内分泌和呼吸系统。

[0128] 涉及线粒体功能障碍的病症可以选自涉及线粒体自噬缺陷的病症、涉及线粒体DNA突变的病症、涉及线粒体氧化性应激的病症、涉及线粒体膜电位缺陷的病症、线粒体生物发生、涉及线粒体形状或形态缺陷的病症、以及涉及溶酶体贮积缺陷的病症。

[0129] 具体地,涉及线粒体功能障碍的病症可以选自:神经变性疾病;多发性硬化(MS);线粒体脑病、乳酸性酸中毒和中风样发作(MELAS)综合征;母系遗传性糖尿病和耳聋(MIDD);莱伯遗传性视神经病变(LHON);癌症(包括,例如,乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌、脑癌、黑素瘤、骨癌或组织器官的其它癌症和血细胞癌诸如淋巴瘤和白血病、多发性骨髓瘤、转移性癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、鼻咽癌、结肠直肠癌和非小细胞肺癌);神经病、共济失调、视网膜色素变性、母系遗传性利氏综合征(NARP-MILS);Danon病;糖尿病;糖尿病性肾病;代谢障碍;心力衰竭;导致心肌梗死的缺血性心脏病;精神病学疾病、例如精神分裂症;多种硫酸酯酶缺乏症(MSD);黏脂贮积症II(ML II);黏脂贮积症III(ML III);黏脂贮积症IV(ML IV);GM1-神经节苷脂贮积病(GM1);神经元蜡样质-脂褐质沉积症(NCL1);阿尔珀斯病;巴思综合征; β -氧化缺乏症;肉碱-酰基-肉碱缺乏症;肉碱缺乏症;肌酸缺乏综合征;辅酶Q10缺乏症;复合体I缺乏症;复合体II缺乏症;复合体III缺乏症;复合体IV缺乏症;复合体V缺乏症;COX缺乏症;慢性进行性眼外肌麻痹综合征(CPEO);CPT I缺乏症;CPT II缺乏症;戊二酸尿症II型;卡恩斯-塞尔综合征;乳酸性酸中毒;长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(LCHAD);利氏病或综合征;利氏综合征法国-加拿大(LSFC)变体;致死性婴儿心肌病(LIC);勒夫特病;中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(MCAD);肌阵挛型癫痫和破碎红纤维(MERRF)综合征;线粒体细胞病;线粒体隐性共济失调综合征;线粒体DNA耗竭综合征;肌神经胃肠道障碍和脑病;皮尔逊综合征;丙酮酸脱氢酶缺乏症;丙酮酸羧化酶缺乏症;POLG突变;中/短链3-羟基酰基辅酶A脱氢酶(M/SCHAD)缺乏症;极长链酰基辅酶A脱氢酶(VLCAD)缺乏症;过氧化物酶体障碍;甲基丙二酸血症;甲羟戊酸激酶缺乏症;年龄依赖性的认知功能和肌肉强度下降;以及与神经变性和神经精神病学障碍相关的认知损害。

[0130] 涉及线粒体功能障碍的病症可以是CNS障碍,例如神经变性疾病。

[0131] 神经变性疾病包括、但不限于帕金森病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、亨廷顿病、缺血、中风、路易体痴呆、多系统萎缩(MSA)、进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底节变性(CBD)和额颞叶痴呆。

[0132] 具体地,本发明的化合物可用于治疗或预防帕金森病,包括、但不限于与 α -突触核蛋白、parkin、PINK1、GBA和LRRK2中的突变有关的PD,以及常染色体隐性的青少年帕金森病(AR-JP)或早发型帕金森病(EOPD),其中parkin或PINK1被突变、截短或删除。

[0133] 具体地,本发明的化合物可用于治疗与神经变性和神经精神病学障碍相关的认知损害,包括,例如,与阿尔茨海默氏病和帕金森病相关的认知损害、AD和PD的临床前或前驱形式、亨廷顿病、路易体痴呆疾病、与精神分裂症相关的认知损害、情绪障碍、双相和重性抑郁障碍。

[0134] 当用于治疗或预防涉及线粒体功能障碍的病症时,本文描述的本发明的化合物或其药物组合物可以与一种或多种另外的药剂组合。所述化合物可以与一种或多种另外的药剂组合,所述另外的药剂选自左旋多巴、多巴胺激动剂、单氨基加氧酶(MAO)B抑制剂、儿茶酚O-甲基转移酶(COMT)抑制剂、抗胆碱能药、利鲁唑、金刚烷胺、胆碱酯酶抑制剂、美金刚、丁苯那嗪、抗精神病药、地西洋、氯硝西洋、抗抑郁药和抗惊厥药。所述化合物可以与减少/除去神经变性疾病中的致病蛋白聚集体的药剂组合,所述药剂是例如减少/除去帕金森病、多系统萎缩或路易体痴呆中的 α -突触核蛋白的药剂;减少/除去阿尔茨海默氏病或进行性

核上性麻痹中的Tau的药剂;减少/除去ALS或额颞叶痴呆中的TDP-43的药剂。

[0135] 在本发明的所有方面的另一个优选实施方案中,受益于USP30活性的障碍或病症是癌症。所述癌症可能与线粒体功能障碍相关。优选的癌症包括,例如,乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌、脑癌、黑素瘤、骨癌或组织器官的其它癌症和血细胞癌诸如淋巴瘤和白血病、多发性骨髓瘤、转移性癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、鼻咽癌、结肠直肠癌、结肠直肠癌和非小细胞肺癌。

[0136] 具体地,本发明的化合物可用于治疗或预防其中细胞凋亡途径失调的癌症,和更具体地其中BCL-2家族的蛋白发生突变或过表达或表达不足的癌症。

[0137] 纤维化是指在创伤、炎症、组织修复、免疫反应、细胞增生和瘤形成以后发生的细胞外基质组分的积累。通过本发明的化合物和组合物可以治疗的纤维化障碍尤其包括与主要器官疾病相关的纤维化/纤维化障碍,例如间质性肺病(ILD)、肝硬化、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)(肝纤维化)、肾脏疾病(肾纤维化)、急性肾损伤(AKI)、急性肾脏疾病(AKD)、慢性肾脏疾病(CKD)、移植肾功能延迟、心脏或血管疾病(心脏纤维化)和眼部疾病;纤维增生性障碍,例如,全身和局部硬皮病、瘢痕疙瘩和肥厚性瘢痕、动脉粥样硬化、再狭窄和迪皮特朗氏挛缩;与创伤相关的瘢痕形成,例如,外科手术并发症、化疗药物诱导的纤维化(例如博来霉素诱导的纤维化)、辐射诱导的纤维化、意外损伤和烧伤);腹膜后纤维化(奥蒙德氏病);和接受腹膜透析的患者中的腹膜纤维化/腹膜瘢痕形成,通常在肾移植后。参见,例如,Wynn等人,2004,Nat Rev Immunol.8月;4(8):583-594。因此,本发明涉及治疗或预防主要器官(包括、例如肺、肝、肾、心脏、皮肤、眼、胃肠道、腹膜和骨髓)的纤维化/纤维化障碍和/或与主要器官(包括、例如肺、肝、肾、心脏、皮肤、眼、胃肠道、腹膜和骨髓)相关的纤维化/纤维化障碍和本文描述的其它疾病/障碍的方法,以及用于所述方法中的化合物和组合物。

[0138] 所述化合物可以与用作肾脏疾病治疗的药剂组合,所述药剂包括抗糖尿病剂、心血管疾病药剂以及靶向疾病有关途径诸如氧化性应激(包括、但不限于nrf2/keap-1途径)和抗细胞凋亡途径(包括、但不限于抗p53药剂)的新型药剂。

[0139] 间质性肺病(ILD)包括其中肺部炎症和纤维化为最终常见病理学途径的障碍,例如,结节病、硅沉着病、药物反应、感染和胶原血管病,诸如类风湿性关节炎和系统性硬化症(硬皮病)。肺的纤维化障碍包括、例如肺纤维化、特发性肺纤维化(IPF)、普通型间质性肺炎(UIP)、间质性肺病、隐源性致纤维性肺泡炎(CFA)、闭塞性细支气管炎和支气管扩张。

[0140] 特发性肺纤维化(IPF)是最常见的ILD类型并且尚无已知的原因。

[0141] 所述化合物可以与作为IPF治疗和潜在ILD治疗的药剂(包括尼达尼布和吡非尼酮)组合。

[0142] 肝硬化具有与ILD相似的原因,并且包括,例如,与病毒性肝炎,血吸虫病和慢性酒精中毒相关的硬化。

[0143] 肾脏疾病可能与糖尿病相关(糖尿病可以损伤肾脏并使肾脏形成瘢痕,从而导致进行性功能丧失),以及还与高血压疾病相关。肾纤维化可能发生在肾脏疾病的任何阶段,从损伤后急性肾脏疾病(AKD)和慢性肾脏疾病(CKD)诸如偶然性CKD和进行性CKD到终末期肾脏疾病(ESRD)。肾纤维化可以作为心血管疾病诸如高血压或糖尿病的结果而发生,高血压和糖尿病都对肾功能造成巨大压力,其促进纤维化应答。但是,肾纤维化也可以是特发性

的(没有已知原因),并且某些遗传性线粒体疾病也出现肾纤维化表现和相关症状。

[0144] 心脏病可以产生瘢痕组织,所述瘢痕组织可以损害心脏的泵送能力。

[0145] 眼部疾病包括,例如,黄斑变性以及视网膜和玻璃体视网膜病变,它们可以损害视力。

[0146] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及特发性肺纤维化(IPF)的治疗或预防。

[0147] 在另一个优选的实施方案中,本发明涉及肾纤维化的治疗或预防。

[0148] 在另一个优选的实施方案中,本发明涉及急性肾损伤(AKI)的治疗或预防,尤其在高风险患者中。例子包括手术后AKI,例如器官移植,诸如由于缺血再灌注损伤、移植物功能延迟;肿瘤学,诸如化学疗法引起的AKI;造影剂诱导的肾病,诸如直接的小管细胞毒性、血液动力学缺血和渗透效应;急性间质性肾炎,诸如由于药物或感染;由阻塞诸如肾结石引起的AKI;和COVID-19诱导的AKI。特定的高风险患者亚组是正在接受心脏外科手术(例如,冠状动脉旁路移植术和/或瓣膜外科手术)的患者。对于AKI存在已确定的静态危险因素,诸如年龄65岁或更大、胰岛素依赖型糖尿病、CKD(具有小于60ml/min/1.73m²的估计肾小球滤过率[eGFR]的成年人是特别危险的)、心力衰竭、肝疾病、AKI病史。

[0149] 在另一个优选的实施方案中,本发明涉及由这样的AKI引起的急性肾脏疾病(AKD)或慢性肾脏疾病(CKD)的治疗或预防,包括、例如,小管间质性纤维化和糖尿病性肾病。

[0150] 在另一个优选的实施方案中,本发明涉及肝疾病的治疗或预防,所述肝疾病包括、但不限于NAFLD、NASH、肝硬化、门静脉高血压、急性肝衰竭和肝细胞癌。肝疾病诸如NAFLD和NASH可能与各种代谢病症诸如代谢综合征和II型糖尿病相关,其也会增加各种糖尿病相关病状的风险,包括糖尿病性视网膜病变和周围神经病变。

[0151] 当用于治疗或预防涉及肝病和代谢功能障碍的病症时,如本文所述的本发明的化合物或其药物组合物可以与一种或多种另外的药剂组合,所述另外的药剂包括二甲双胍、磺酰脲类、DPP-4抑制剂、GLP-1激动剂、PPAR激动剂、SGLT2抑制剂、血管紧张素-转换酶(ACE)抑制剂和血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)。

[0152] 利氏综合征是一种罕见的影响中枢神经系统的遗传性神经代谢障碍。这种进行性障碍开始于3个月至2岁之间的婴儿。它罕见地发生在青少年和成人中。利氏综合征可以由编码线粒体蛋白的核DNA中的突变、线粒体DNA中的突变(母系遗传性利氏综合征-MILS)造成,或由位于X染色体的短臂上的称作丙酮酸脱氢酶的酶的缺乏造成(X-连锁的利氏综合征)。利氏综合征的症状通常迅速进展。最早的征象可能是吸吮能力差,以及头部控制和运动技能的丧失。这些症状可能伴有食欲不振、呕吐、易怒、持续哭闹和癫痫发作。随着障碍进展,症状还可能包括全身无力、肌张力缺乏和乳酸性酸中毒发作,其可以导致呼吸和肾功能受损。

[0153] 在母系遗传性利氏综合征(MILS)中,线粒体DNA中的基因突变(以>90%的高比例)干扰在运动移动中发挥作用的脑区域中的运行细胞的能量来源。线粒体DNA中的基因突变导致这些细胞中长期缺乏能量,这又影响中枢神经系统并导致运动功能进行性退化。当导致MILS的线粒体DNA中的基因突变较不丰富(低于90%)时,这种病症称作神经病共济失调和视网膜色素变性(NARP)。还存在利氏病的一种形式(被称作X-连锁的利氏病),其为产生另一组对细胞代谢重要的物质的基因中的突变的结果。存在利氏综合征的另一种变体,其被称作法国-加拿大变体,其特征在于称作LRPPRC的基因中的突变。类似的神经学症状表达

为利氏综合征的症状,尽管在法国-加拿大变体中通常也观察到了肝脂肪变性。

[0154] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及利氏综合征或病的治疗或预防,包括、例如,X-连锁的利氏病、利氏综合征法国-加拿大变体和/或与利氏病相关的症状。

[0155] 所述化合物可以与可用作线粒体疾病治疗的新型药剂(包括、但不限于烟酰胺核苷)组合。

[0156] 对“治疗”的提及包括在暂时或永久基础上改善症状、缓解症状、消除症状的原因的手段。本发明的化合物可用于治疗在人类和其它哺乳动物中的本文中公开的疾病。

[0157] 在另一个实施方案中,本发明包括本文中公开的疾病的预防性治疗并且包括预防或减慢所述障碍或病症的症状的出现的出现的手段。本发明的化合物可用于预防在人类和其它哺乳动物中的本文中公开的疾病。

[0158] 需要治疗或预防的患者可以例如是患有所述病症或处于患所述病症的风险中的人或其它哺乳动物。

[0159] 根据另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含如本文中定义的式(I)的化合物或所述化合物或互变异构体的药学上可接受的盐、以及药学上可接受的稀释剂或载体。

[0160] 本发明的药物组合物包含与任何药学上可接受的载体、辅助剂(adjutant)或媒介物组合的本发明的任何化合物。药学上可接受的载体的例子是本领域技术人员已知的,并且包括、但不限于防腐剂、填充剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、助悬剂、甜味剂、矫味剂、芳香剂、抗细菌剂、抗真菌剂、润滑剂和分散剂,取决于施用模式和剂型的性质。所述组合物可以是例如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒、酏剂、锭剂、栓剂、糖浆剂和液体制备物(包括混悬剂和溶液)的形式。在本发明的上下文中的术语“药物组合物”是指包含活性剂且另外包含一种或多种药学上可接受的载体的组合物。所述组合物可以进一步含有选自例如稀释剂、辅助剂、赋形剂、媒介物、防腐剂、填充剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、助悬剂、甜味剂、矫味剂、芳香剂、抗细菌剂、抗真菌剂、润滑剂和分散剂的成分,取决于施用模式和剂型的性质。

[0161] 如本文中所述的本发明的化合物或其药物组合物可以单独使用或与一种或多种另外的药学试剂组合。所述化合物可以与另外的抗肿瘤治疗剂(例如,化疗药物或其它调节蛋白的抑制剂)组合。在一个实施方案中,另外的抗肿瘤治疗剂是BH-3模拟物。在另一个实施方案中,BH-3模拟物可以选自、但不限于ABT-737、ABT-199、ABT-263和奥巴克拉(Obatoclastax)中的一种或多种。在另一个实施方案中,另外的抗肿瘤剂是化学治疗剂。化学治疗剂可以选自、但不限于奥拉帕尼、丝裂霉素C、顺铂、卡铂、奥沙利铂、电离辐射(IR)、喜树碱、伊立替康、托泊替康、替莫唑胺、紫杉烷、5-氟嘧啶、吉西他滨和多柔比星。

[0162] 对于纤维化障碍的治疗或预防,例如,如本文中所述的本发明的化合物或其药物组合物可以单独使用或与一种或多种另外的药学试剂组合,所述另外的药学试剂选自抗胆碱能药剂、 β -2模拟物、类固醇、PDE-IV抑制剂、p38 MAP激酶抑制剂、NK1拮抗剂、LTD4拮抗剂、EGFR抑制剂和内皮缩血管肽拮抗剂。

[0163] 具体地,如本文中所述的本发明的化合物或其药物组合物可以单独使用或与一种或多种另外的药学试剂组合,所述另外的药学试剂选自:一般免疫抑制药物,诸如皮质类固醇,免疫抑制剂或细胞毒剂,或抗纤维化剂,诸如吡非尼酮或非特异性的激酶抑制剂(例如尼达尼布)。

[0164] 本发明的药物组合物可以以任何适当有效的方式施用,诸如口服、胃肠外、局部、吸入、鼻内、直肠、阴道内、眼和耳。适合用于递送本发明的化合物的药物组合物和它们的制备方法将是本领域技术人员容易明白的。这类组合物和用于它们的制备的方法可以参见,例如,“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第19版(Mack Publishing Company, 1995)。

[0165] 口服施用

[0166] 可以口服施用本发明的化合物。口服施用可以包括吞咽,从而化合物进入胃肠道;或可以采用含服或舌下施用,由此使化合物自嘴直接进入血流。

[0167] 适用于口服施用的制剂包括固体制剂诸如片剂、含有微粒、液体或粉末的胶囊剂、锭剂(包括液体填充的)、咀嚼物、多微粒和纳米微粒、凝胶、薄膜(包括粘膜粘着剂)、胚珠样制剂(ovule)、喷雾剂和液体制剂。

[0168] 液体制剂包括混悬剂、溶液、糖浆剂和酏剂。这样的制剂可以用作软胶囊或硬胶囊中的填充剂并且通常包含载体,例如,水、乙醇、丙二醇、甲基纤维素或合适的油,以及一种或多种乳化剂和/或助悬剂。液体制剂还可以通过将固体(例如得自药囊)重构来制备。

[0169] 本发明的化合物也可以以快速溶解、快速崩解剂型使用,诸如Liang和Chen(2001)在Expert Opinion in Therapeutic Patents,11(6),981-986中描述的那些。

[0170] 使用制剂化学家已知的标准方法,例如,通过直接压制、制粒(干法、湿法或熔融)、熔融凝结或挤出,可以制备典型的片剂。片剂制剂可以包含一个或多个层并且可以是包衣的或未包衣的。

[0171] 适用于口服施用的赋形剂的例子包括:载体,例如,纤维素、碳酸钙、磷酸氢钙、甘露醇和柠檬酸钠,制粒粘合剂,例如,聚乙烯基吡咯烷、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和明胶,崩解剂,例如,羟基乙酸淀粉钠和硅酸盐,润滑剂,例如,硬脂酸镁和硬脂酸,润湿剂,例如,月桂基硫酸钠,防腐剂,抗氧化剂,香料和着色剂。

[0172] 用于口服施用的固体制剂可以配制成立即释放和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、受控双重释放、靶向释放和程序化释放。合适的调节释放技术诸如高能分散体、渗透和包衣颗粒的细节可以参见Verma等人,Pharmaceutical Technology On-line,25(2),1-14(2001)。其它调节释放制剂描述于美国专利号6,106,864。

[0173] 胃肠外施用

[0174] 本发明的化合物还可以直接施用进血流、肌肉或内脏器官。胃肠外施用的适宜手段包括静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌肉内和皮下。用于胃肠外施用的合适装置包括针(包括显微操作针)注射器、无针注射器和输注技术。

[0175] 胃肠外制剂通常是可能含有赋形剂诸如盐、碳水化合物和缓冲剂(优选调至3-9的pH)的水溶液,但是,对于一些应用,它们可以更适当地被配制为无菌的非水性溶液或被配制为要与合适的媒介物(诸如无菌的、无热原的水)结合使用的干燥形式。

[0176] 使用本领域技术人员众所周知的标准制药技术,可以容易地完成在无菌条件下胃肠外制剂的制备,例如,通过冷冻干燥。

[0177] 通过合适的加工,例如,使用高能喷雾干燥的分散体和/或通过使用适当的制剂技术,诸如使用增溶剂,可以增加用于制备胃肠外溶液的式(I)的化合物的溶解度。

[0178] 可以将用于胃肠外施用的制剂配制成立即和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、受控双重释放、靶向释放和程序化释放。

[0179] 本发明的药物组合物还包括本领域已知的用于绕过血脑屏障的组合物和方法, 可以被直接注射到脑中。合适的注射区域包括大脑皮质、小脑、中脑、脑干、下丘脑、脊髓和心室组织, 以及包括颈动脉体和肾上腺髓质在内的PNS区域。

[0180] 剂量

[0181] 化合物的有效剂量的大小当然会随着要治疗的病症的严重程度和施用途径的性质而变化。适当剂量的选择是在医师的能力范围内。每日剂量范围是约10 μ g至约100mg/千克人和非人动物体重, 并且通常可以是每剂量约10 μ g至30mg/千克体重。可以每天施用上述剂量1-3次。

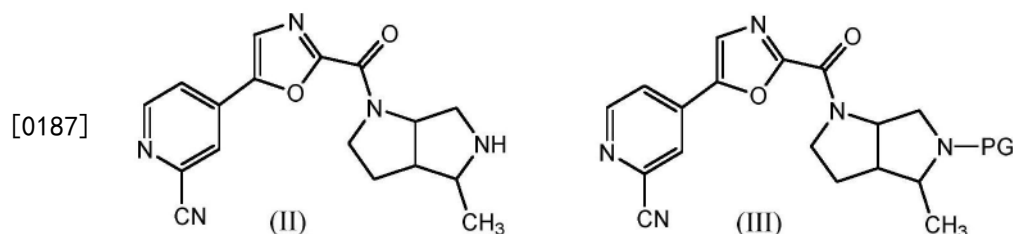
[0182] 例如, 口服施用可能需要5mg至1000mg、诸如5至500mg的总每日剂量, 而静脉内剂量可能仅需要0.01-30mg/kg体重, 诸如0.1-10mg/kg, 更优选地0.1-1mg/kg体重。可以在单剂量或分份剂量中施用总每日剂量。

[0183] 技术人员还会明白, 在某些病症的治疗或预防中, 本发明的化合物可以在“根据需要”基础上(即根据需要或期望)作为单剂量施用。

[0184] 合成方法

[0185] 使用以下一般反应方案和代表性实施例中所述的方法, 可以制备式(I)的化合物。在适当的情况下, 在方案中的单独转化可以以不同的顺序完成。通过以下非限制性实施例说明本发明, 其中使用了以下缩写和定义。通过液相色谱法-质谱法(LCMS)或¹H NMR或两者表征化合物。

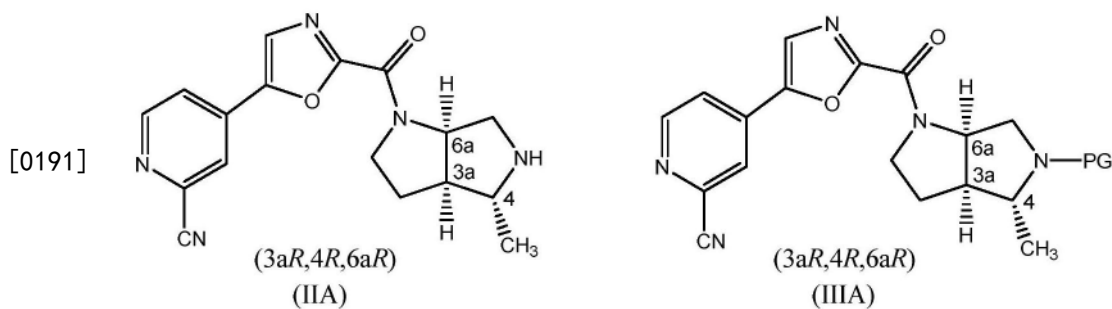
[0186] 根据另一个方面, 本发明提供了一种用于制备式(I)的化合物的方法, 其包含使用标准方法将式(III)的化合物去保护以产生胺(II), 其然后可以与溴化氰反应以产生对应的式(I)的化合物:



[0188] 其中PG是保护基。

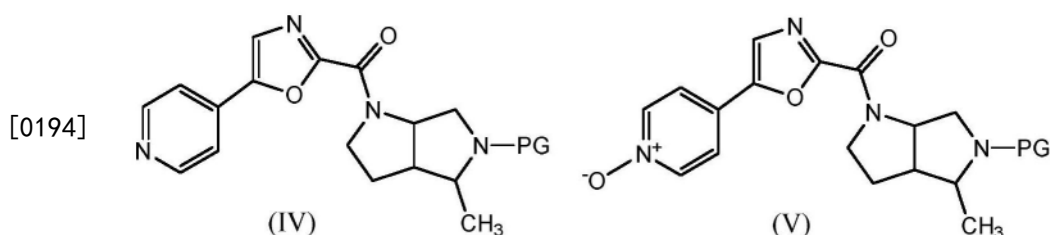
[0189] 在另一个方面, 本发明提供了选自式(II)和(III)的化合物或所述化合物的盐, 其中PG是保护基。

[0190] 在一个优选的实施方案中, 本发明提供了选自式(IIA)和(IIIA)的化合物或所述化合物的盐:



[0192] 其中PG是保护基。

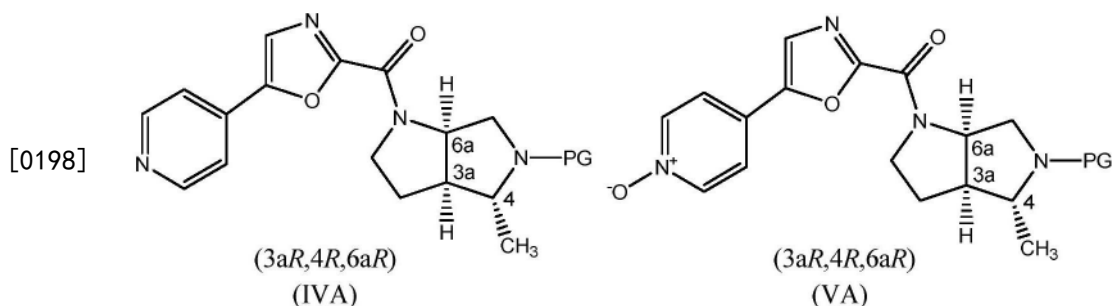
[0193] 根据另一个方面,本发明提供了一种用于制备式(III)的化合物的方法,其包含使用标准方法(诸如用间氯过苯甲酸)氧化式(IV)的化合物,以产生N-氧化物(V),其然后可以与三甲基氰硅烷和二甲基氨甲酰氯反应以产生对应的式(III)的化合物:



[0195] 其中PG是保护基。

[0196] 在另一个方面,本发明提供了选自式(IV)和(V)的化合物或所述化合物的盐,其中PG是保护基。

[0197] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了选自式(IVA)和(VA)的化合物或所述化合物的盐:



[0199] 其中PG是保护基。

[0200] 保护基优选地选自叔丁基氧基羰基(BOC)、苄氧基羰基(Cbz)、对甲氧基苄基羰基(MeOZ)、9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)、乙酰基(Ac)、苯甲酰基(Bz)、苄基(Bn)、氨基甲酸酯、对甲氧基苄基(PMB)、3,4-二甲氧基苄基(DMPM)、对甲氧基苯基(PMP)、甲苯磺酰基(Ts)、三氯乙氧基羰基(Troc)、4-硝基苯磺酰基(Nosyl)和2-硝基苯基次磺酰基(Nps)。最优选的是BOC和Cbz。

[0201] 缩写

	br s	宽单峰(NMR 信号)	MeOH	甲醇
	CO	一氧化碳	min	分钟
	d	双峰(NMR 信号)	MsCl	甲磺酰氯
	dba	二苄基丙酮	N₂	氮气
	(L)-DBTA	二苯甲酰基-L-酒石酸一水合物	NMP	<i>N</i> -甲基吡咯烷酮
	DCM	二氯甲烷	p-TSA	4-甲苯磺酸
	DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺	rac	外消旋的
	DMSO	二甲基亚砷	rt	室温
	d.r.	非对映体比率	R_f	保留因子
[0202]	e.e.	对映体过量	s	单峰(NMR 信号)
	ES	电喷射	SFC	超临界流体色谱法
	EtOAc	乙酸乙酯	SOCl₂	亚硫酰氯
	h	小时	TBD	1,5,7-三氮杂双环[4.4.0]癸-5-烯
	H₂	氢气	TEA	三乙胺
	HPLC	高效液相色谱法	TFA	三氟乙酸
	IPA	丙烷-2-醇	THF	四氢呋喃
	LCMS	液相色谱法-质谱法	TMSCN	三甲基氰硅烷
	m	多重峰(NMR 信号)	vol	体积
	MeCN	乙腈		
[0203]		<u>LCMS/HPLC/SFC方法</u>		
[0204]		<u>方法C</u>		

[0205]

流动相	(A)	2 mM 乙酸铵和 0.1%的甲酸在水中的溶液	
	(B)	0.1%的甲酸在乙腈中的溶液	
仪器	具有 PDA 和 SQ 检测器的 Waters ACQUITY H Class		
柱	BEH C18 (50 mm x 2.1 mm) 1.7 μ m		
流速	0.550 mL/min		
柱温箱温度	环境温度		
运行时间	3.0 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.01	0.55	98	2
0.30	0.55	98	2
0.60	0.55	50	50
1.10	0.55	25	75
2.00	0.60	0	100
2.70	0.60	0	100
2.71	0.55	98	2
3.00	0.55	98	2

[0206]

方法C1

[0207]

流动相	(A)	2 mM 乙酸铵和 0.1%的甲酸在水中的溶液	
	(B)	0.1%的甲酸在乙腈中的溶液	
仪器	具有 PDA 和 SQ 检测器的 Waters ACQUITY UPLC H Class		
柱	BEH C18 (50 mm x 2.1 mm) 1.7 μ m		
流速	0.550 mL/min		
柱温箱温度	环境温度		
运行时间	2.0 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.00	0.55	95	5
0.60	0.60	30	70
0.80	0.65	10	90

[0208]	1.10	0.65	0	100
	1.70	0.65	0	100
	1.71	0.55	95	5
	2.00	0.55	95	5

[0209] 方法E

流动相	(A)	0.1% v/v (30% v/v 氨水)在水中的溶液	
	(B)	100% MeOH	
仪器	具有 PDA 检测器的 Waters e2695 HPLC		
柱	X-bridge C8 (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
柱温箱温度	45 $^{\circ}$ C		
流速	1.0 mL/min		
运行时间	45 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	1.0	10	90
5.00	1.0	20	80
10.00	1.0	30	70
30.00	1.0	30	70
35.00	1.0	60	40
35.01	1.0	90	10
40.00	1.0	90	10
40.01	1.0	10	90
45.00	1.0	10	90

[0211] 方法F

流动相	(A)	10 mM 乙酸铵在水中的溶液	
	(B)	100% 乙腈	
仪器	连接 Agilent 6120 质量检测器和 PDA 检测器的 Agilent 1290 Infinity RRLC		
柱	YMC TRIART, C18 (150 mm x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	1.0 mL/min		
柱温箱温度	环境温度		
运行时间	12.0 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B

[0212]

0.01	1.0	90	10
5.00	1.0	10	90
7.00	1.0	0	100
11.00	1.0	0	100
11.01	1.0	90	10
12.00	1.0	90	10

[0213]

[0214]

方法H

流动相	(A)	5 mM 碳酸氢铵在水中的溶液	
	(B)	100% 乙腈	
仪器	具有 2020 单个四极杆质量检测器的 Shimadzu Nexera UFLC		
柱	Waters X-bridge C18 (50 x 4.6 mm) 3.5 μ m		
柱温箱温度	环境温度		
流速	1.0 mL/min		
运行时间	8.0 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.01	1.0	95	5
3.50	1.0	10	90
4.50	1.0	5	95
6.00	1.0	5	95
6.01	1.0	95	5
8.00	1.0	95	5

[0215]

[0216]

方法H1

	流动相	(A)	5 mM 碳酸氢铵在水中的溶液		
		(B)	100% 乙腈		
[0217]	仪器	具有 2020 单个四极杆质量检测器的 Shimadzu Nexera UFLC			
	柱	Waters X-bridge C18 (50 x 4.6 mm) 3.5 μ m			
	柱温箱温度	环境温度			
	流速	1.0 mL/min			
	运行时间	6.0 min			
	梯度				
		时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
[0218]		0.01	1.0	95	5
		2.80	1.0	15	85
		3.50	1.0	5	95
		5.00	1.0	5	95
		5.01	1.0	95	5
		6.00	1.0	95	5
[0219]	<u>方法H3</u>				

[0220]

流动相	(A)	5 mM 碳酸氢铵在水中的溶液	
	(B)	100% 乙腈	
仪器	Shimadzu Nexera 高压 UHPLC 和 LCMS-2020		
柱	Waters X-bridge C18 (50 x 4.6 mm), 3.5 μ m		
柱温箱温度	环境温度		
流速	1.0 mL/min		
运行时间	6.0 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.01	1.0	95	5
2.80	1.0	15	85
3.50	1.0	5	95
5.00	1.0	5	95
5.01	1.0	95	5
6.00	1.0	95	5

[0221]

方法X

[0222]

流动相	(A)	10 mM 乙酸铵和 0.1%的甲酸在水中的溶液	
	(B)	0.1%的甲酸在乙腈中的溶液	
仪器	连接 Agilent 6120 质量检测器和 PDA 检测器的 Agilent 1290 Infinity RRLC		
柱	YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	1.0 mL/min		
柱温箱温度	环境温度		
运行时间	30.0 min		

梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.01	1.0	90	10
10.00	1.0	60	40
20.00	1.0	20	80
25.00	1.0	0	100
28.00	1.0	0	100
28.01	1.0	90	10
30.00	1.0	90	10

[0224] 方法X2

流动相	(A)	0.1% v/v (30% v/v 氨水)在水中的溶液	
	(B)	0.1% v/v (30% v/v 氨水)在乙腈中的溶液	
仪器	具有 PDA 检测器的 Waters e2695 HPLC		
柱	X-bridge C8 (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	1.0 mL/min		
运行时间	40.0 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.0	1.0	95	5
5.00	1.0	95	5
10.00	1.0	70	30
15.00	1.0	70	30
25.00	1.0	40	60
30.00	1.0	10	90
35.00	1.0	10	90
35.01	1.0	95	5

[0226] 方法Y4

[0227]	流动相	(A)	液体二氧化碳	
		(B)	0.1% 二乙胺在丙烷-2-醇: 乙腈(50:50)中的溶液	
	仪器	Waters SFC Investigator 和 PDA 检测器		
	柱	Chiralpak IH (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
	流速	4.0 mL/min		
	运行时间	10.0 min		
	梯度			
	时间	流速	% B 开始	% B 结束

[0228]	(min)	(mL/min)		
	0-5	4.0	5	50
	5-10	4.0	50	50

[0229] 方法Y11

[0230]	流动相	(A)	0.1% 二乙胺在正己烷中的溶液	
		(B)	0.1% 二乙胺在丙烷-2-醇: 乙腈(70:30)中的溶液	
	仪器	Agilent 1260 Series HPLC 和 PDA 检测器		
	柱	Chiralpak IC (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
	流速	1.0 mL/min		
	运行时间	25.0 min		
	梯度			
	时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
	0.01	1.0	80	20
	5.00	1.0	50	50
	10.00	1.0	30	70
	20.00	1.0	30	70
	20.01	1.0	80	20
	25.00	1.0	80	20

[0231] 方法Y13

[0232]	流动相	(A)	液体二氧化碳	
		(B)	0.1% 二乙胺在丙烷-2-醇: 乙腈(50:50)中的溶液	
	仪器	Waters SFC Investigator 和 PDA 检测器		
	柱	Chiralpak IC (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
	流速	4.0 mL/min		
	运行时间	8.0 min		
	梯度			
	时间 (min)	流速 (mL/min)	% B 开始	% B 结束
	0-5	4.0	5	50
	5-8	4.0	50	50

[0233] 方法Y15

[0234]	流动相	(A)	0.1% 二乙胺在正己烷中的溶液	
		(B)	0.1% 二乙胺在丙烷-2-醇: 乙腈(70:30)中的溶液	
	仪器	Agilent 1260 系列 HPLC 和 PDA 检测器		
	柱	Chiralpak IC (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
	流速	1.0 mL/min		

[0235]	运行时间	25.0 min		
	梯度			
	时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
	0.01	1.0	80	20
	5.00	1.0	45	55
	10.00	1.0	30	70
	15.00	1.0	30	70
	20.00	1.0	80	20
	25.00	1.0	80	20

[0236] 方法Y17

流动相	(A)	0.1% 二乙胺在甲醇中的溶液	
	(B)	0.1% 二乙胺在乙腈中的溶液	
仪器	Agilent 1260 系列 HPLC 和 PDA 检测器		
柱	Chiralpak IG (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	1.0 mL/min		
运行时间	20.0 min		
等度(isocratic)			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0.01	20.00	50	50

[0238] 方法Y20

流动相	(A)	液体二氧化碳	
	(B)	0.1% 二乙胺在丙烷-2-醇: 乙腈(50:50)中的溶液	
仪器	Waters SFC Investigator 和 PDA 检测器		
柱	Chiralpak IH (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	4.0 mL/min		
运行时间	9.0 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% B 开始	% B 结束
0-5	4.0	5	50
5-9	4.0	50	50

[0240] 方法Y22

流动相	(A)	液体二氧化碳
-----	-----	--------

	(B)	0.2% NH ₄ OH 在甲醇中的溶液	
仪器	具有 PDA 检测器的 Waters SFC Investigator		
柱	Chiralpak IC (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	4.0 mL/min		
运行时间	10 min.		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% B 开始	% B 结束
0-5	4.0	5	50
5-10	4.0	50	50

[0243] 方法Y23

流动相	(A)	0.1% 二乙胺在甲醇中的溶液	
	(B)	液体二氧化碳	
仪器	具有 PDA 检测器的 Agilent 1100 系列 HPLC		
柱	Chiralpak IG (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	1.0 mL/min		
运行时间	8 min.		
等度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0-8	1.0	100	0

[0245] 方法Y24

流动相	(A)	液体二氧化碳	
	(B)	0.1% 二乙胺在甲醇: 乙腈(50:50)中的溶液	
仪器	具有 PDA 检测器的 Waters SFC Investigator		
柱	Chiralpak AD-H (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	4.0 mL/min		
运行时间	14 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% B 开始	% B 结束
0-5	4.0	5	50
5-9	4.0	50	50

[0247] 方法Y25

流动相	(A)	液体二氧化碳	
	(B)	0.1% 二乙胺在丙烷-2-醇: 乙腈(50:50)中的溶液	
仪器	具有 PDA 检测器的 Waters SFC Investigator		
柱	Chiralpak AD-H (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	4.0 mL/min		
运行时间	15 min		
梯度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% B 开始	% B 结束
0-5	4.0	5	50
5-10	4.0	50	50

[0249] 方法Y26

流动相	(A)	0.1% 二乙胺在甲醇中的溶液	
	(B)	液体二氧化碳	
仪器	具有 PDA 检测器的 Agilent 1100 系列 HPLC		
柱	Chiralpak IG (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
流速	1.0 mL/min		
运行时间	9 min.		
等度			
时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0-9	1.0	100	0

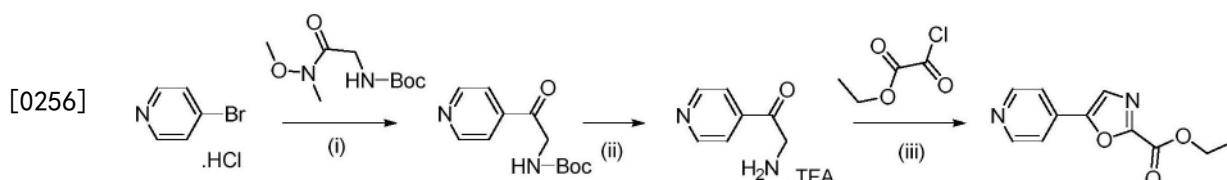
[0251] 方法Y28

[0252]	流动相	(A)	0.1% 二乙胺在正己烷中的溶液
		(B)	0.1% 二乙胺在丙烷-2-醇: 乙腈(70:30)中的溶液
	仪器	具有 PDA 检测器的 Agilent 1260 infinity series HPLC	

[0253]	柱	Chiralpak IC (250 x 4.6 mm), 5 μ m		
	流速	1.0 mL/min		
	运行时间	40.0 min		
	等度			
	时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
	0.01-40	1.0	60	40

[0254] 中间体A

[0255] 5-(吡啶-4-基)噁唑-2-甲酸乙酯



[0257] (i) *i*-PrMgCl, THF, 室温; (ii) TFA, DCM, 0 $^{\circ}$ C 至室温; (iii) TEA, DCM, 0 $^{\circ}$ C 至室温。

[0258] 步骤(i)

[0259] (2-氧代-2-(吡啶-4-基)乙基)氨基甲酸叔丁酯

[0260] 将4-溴吡啶盐酸盐 (CAS 19524-06-2, 来自CombiBlocks, 8.0g, 41.2mmol) 用5% Na₂CO₃水溶液 (300mL) 处理并用DCM (2x100mL) 萃取。将合并的有机相经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物立即溶解在干燥THF (50mL) 中, 并在室温在N₂下逐滴加入异丙基氯化镁 (2M的在THF中的溶液, 20.57mL, 41.2mmol)。将得到的深色溶液在室温搅拌1.5h, 在这期间形成沉淀物。同时, 在0 $^{\circ}$ C向(2-(甲氧基(甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸叔丁酯 (7.1g, 32.9mmol) 在THF (50mL) 中的搅拌悬浮液中逐滴加入异丙基氯化镁 (2M的在THF中的溶液, 16.4mL, 32.9mmol)。将溶液搅拌10min, 然后在室温逐滴加入到吡啶基格氏试剂 (pyridyl Grignard) 中。将混合物在室温搅拌16h, 然后倒入水 (200mL) 中, 并用EtOAc (2x200mL) 萃取。将合并的有机相经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物通过柱色谱法 (30% EtOAc在正己烷类中的溶液) 纯化以得到(2-氧代-2-(吡啶-4-基)乙基)氨基甲酸叔丁酯 (4.8g, 20.3mmol, 49%收率)。

[0261] LCMS: 方法C, 1.40min, MS: ES+237.1; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm: 8.88-8.89 (d, J=5.6Hz, 2H), 7.77-7.79 (d, J=6.8Hz, 2H), 5.49 (br s, 1H), 4.69-4.71 (d, J=4.4Hz, 2H), 1.52 (s, 9H)。

[0262] 步骤(ii)

[0263] 2-氨基-1-(吡啶-4-基)乙烷-1-酮TFA盐

[0264] 在0℃向(2-氧代-2-(吡啶-4-基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(4.8g, 20.34mmol)在DCM(50mL)中的搅拌溶液中逐滴加入TFA(2.4mL, 5体积)。将混合物缓慢地温热至室温并搅拌2h,然后在减压下与DCM(3x100mL)一起浓缩以提供2-氨基-1-(吡啶-4-基)乙烷-1-酮TFA盐(7.0g,定量收率)。

[0265] LCMS:方法C,0.29min,MS:ES+136.96;¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)δppm:8.91-8.93(d,J=6.0Hz,2H),8.36(br s,3H),7.92-7.94(d,J=6.0Hz,2H),4.68(t,J=5.2Hz,2H)。

[0266] 步骤(iii)

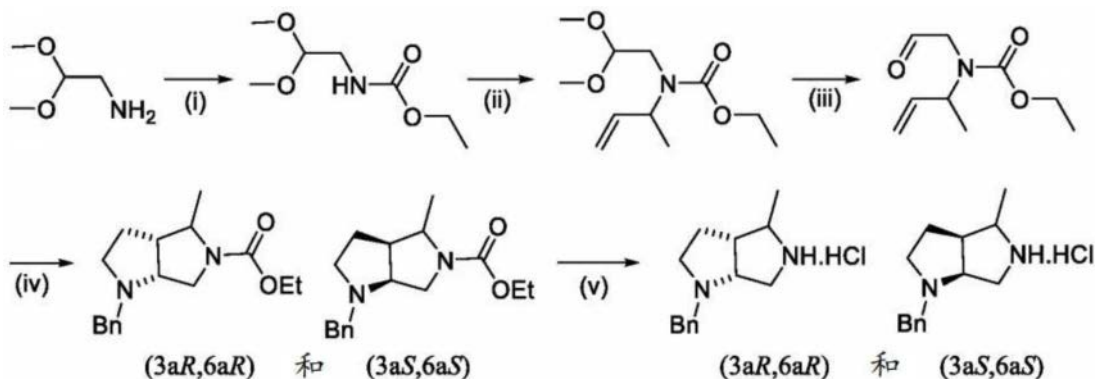
[0267] 5-(吡啶-4-基)噁唑-2-甲酸乙酯

[0268] 一式两份地进行该反应。在室温向2-氨基-1-(吡啶-4-基)乙烷-1-酮TFA盐(3.0g, 12mmol)在DCM(80mL)中的搅拌溶液中逐滴加入TEA(3.75g, 5.17mL, 37.2mmol)。在0℃逐滴加入草酰氯乙酯(ethyl chlorooxalate)(1.63g, 1.33mL, 12mmol)。将混合物缓慢地温热至室温并搅拌24h。将两批合并并倒入水(200mL)中,并用DCM(2x200mL)萃取。将合并的有机相经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物通过柱色谱法(40%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以得到5-(吡啶-4-基)噁唑-2-甲酸乙酯(0.45g, 2.06mmol, 经2步10%收率)。

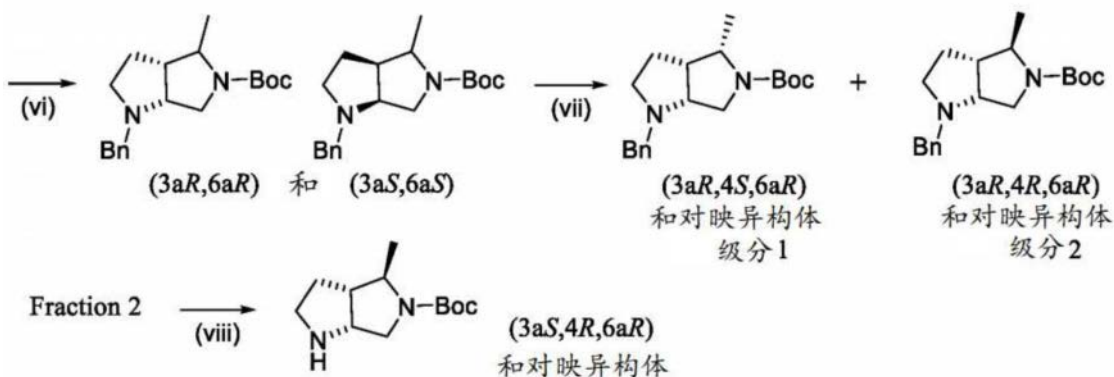
[0269] LCMS:方法C,1.29min,MS:ES+219.25;¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)δppm:8.74-8.75(d,J=5.6Hz,2H),8.29(s,1H),7.79-7.80(d,J=6.0Hz,2H),4.40-4.45(q,J=7.2,Hz,2H),1.37(t,J=6.8Hz,3H)。

[0270] 中间体B

[0271] 外消旋-(3aS,4R,6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯



[0272]



[0273] (i) EtOC(O)Cl, NaOH, DCM, 0℃至室温; (ii) NaH, DMF, 3-氯丁-1-烯, 0℃至室温; (iii) HCO₂H, 0℃然后100℃; (iv) N-苄基甘氨酸, 甲苯, 110℃; (v) 浓HCl, 110℃; (vi) (BOC)₂O, TEA, 4-二甲基氨基吡啶, DCM, 0℃至室温; (vii) 色谱分离; (viii) Pd(OH)₂, MeOH, H₂, 室

温。

[0274] 步骤(i)

[0275] (2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯

[0276] 在0℃向2,2-二甲氧基乙烷-1-胺(CAS 22483-09-6,来自Combi-blocks,12.5g,118.9mmol)在DCM(100mL)中的搅拌溶液中逐滴加入水性氢氧化钠(5.2g,130.8mmol)在水(31mL)中的溶液。加入氯甲酸乙酯(14.2g,130.8mmol)并将混合物在室温搅拌16h。将该混合物和重复反应混合物倒入水(500mL)中,并用DCM(3x500mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩以产生(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯(36.5g,定量收率)。

[0277] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm:7.15(s,1H),4.34(t,J=5.2Hz,1H),3.98(q,J=7.2Hz,2H),3.24(s,6H),3.05(t,J=5.6Hz,2H),1.15(t,J=7.2Hz,3H)。

[0278] 步骤(ii)

[0279] 丁-3-烯-2-基-(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯

[0280] 在0℃历时2h向(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯(12.1g,68.3mmol)在DMF(50mL)中的搅拌溶液中逐份加入NaH(60%在矿物油中,6.84g,170.9mmol)。将混合物在0℃搅拌2h,然后加入3-氯丁-1-烯(7.6mL,75.2mmol)并将混合物在室温搅拌20h。将该混合物和两个重复反应混合物淬灭进冰冷的水(300mL)中,并用EtOAc(3x500mL)萃取。将合并的有机相用冷水(3x150mL)和盐水(2x150mL)洗涤。将有机相经无水Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物通过柱色谱法(碱性氧化铝,5%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以产生丁-3-烯-2-基-(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯(15.5g,67.0mmol,经2步28%收率)。

[0281] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm:5.88-5.94(m,1H),5.08-5.11(m,2H),4.41-4.48(m,2H),4.05-4.06(m,2H),3.18-3.35(m,8H),1.18-1.24(m,6H)。

[0282] 步骤(iii)

[0283] 丁-3-烯-2-基(2-氧代乙基)氨基甲酸乙酯

[0284] 在0℃向丁-3-烯-2-基(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯(15.5g,67.0mmol)的搅拌溶液中逐滴加入甲酸(36mL)。将混合物在100℃加热2h然后冷却至室温,倒入冰冷的水(200mL)中,并用EtOAc(3x300mL)萃取。将合并的有机相用饱和NaHCO₃溶液(3x100mL)洗涤。将有机相经无水Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩以产生丁-3-烯-2-基-(2-氧代乙基)氨基甲酸乙酯(11.3g,61.1mmol,91%收率)。

[0285] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm:9.47(s,1H),5.75-5.85(m,1H),5.10-5.15(m,2H),4.65-4.77(m,1H),3.80-4.07(m,4H),1.10-1.18(m,6H)。

[0286] 步骤(iv)

[0287] 外消旋-(3aR,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸乙酯

[0288] 在室温向丁-3-烯-2-基-(2-氧代乙基)氨基甲酸乙酯(4.7g,25.4mmol)在甲苯(100mL)中的搅拌溶液中加入N-苄基甘氨酸(CAS17136-36-6,来自Combi-blocks,4.2g,25.4mmol)。将混合物在110℃加热16h然后在减压下浓缩。将残余物通过柱色谱法(碱性氧化铝,7%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以产生外消旋-(3aR,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸乙酯(3.2g,11.1mmol,43%收率)。

[0289] LCMS:方法C,1.33min,两个宽峰合并,没有两种非对映异构体的基线分离,MS:ES+

289.3。

[0290] 步骤(v)

[0291] 外消旋-(3aR,6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯HCl盐

[0292] 将外消旋-(3aR,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸乙酯(3.2g,11.1mmol)在浓HCl(40mL,12.5体积)中的搅拌溶液在100℃加热16h。将混合物冷却至室温,并在减压下浓缩以产生外消旋-(3aR,6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯HCl盐(3.72g,定量收率)。

[0293] LCMS:方法F,4.45min和4.92min,两种非对映异构体,MS:ES+217.3。

[0294] 步骤(vi)

[0295] 外消旋-(3aR,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0296] 在0℃向外消旋-(3aR,6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯HCl盐(3.7g,14.65mmol)在DCM(40mL)中的搅拌溶液中加入三乙胺(10.3mL,73.5mmol)、4-二甲基氨基吡啶(0.09g,0.73mmol)和二碳酸二叔丁酯(3.83g,17.58mmol)。将混合物温热至室温并搅拌5h,然后倒入水(100mL)中,并用DCM(2x150mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。对残余物进行在步骤(vii)中的色谱分离。

[0297] 步骤(vii)

[0298] 外消旋-(3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(主要异构体)和

[0299] 外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(次要异构体)

[0300] 将来自步骤(vi)的残余物通过柱色谱法(碱性氧化铝,2%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以4.2:1比率产生两个分离的级分。

[0301] 第一洗脱的级分,级分1,外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(次要异构体,0.50g)被分离为无色油。TLC:Rf 0.5(30%EtOAc/正己烷类)。

[0302] LCMS:方法C,1.46min,MS:ES+317.4和方法X,13.70min,MS:ES+317.3。

[0303] 第二洗脱的级分,级分2,外消旋-(3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(主要异构体,2.10g,6.63mmol,45%收率)被分离为无色油。TLC:Rf 0.4(30%EtOAc/正己烷类)。

[0304] LCMS:方法C,1.46min,MS:ES+317.4和方法X,13.37min,MS:ES+317.3;d.r.99:1,通过方法X。

[0305] 将级分2继续进行步骤(viii)。

[0306] 步骤(viii)

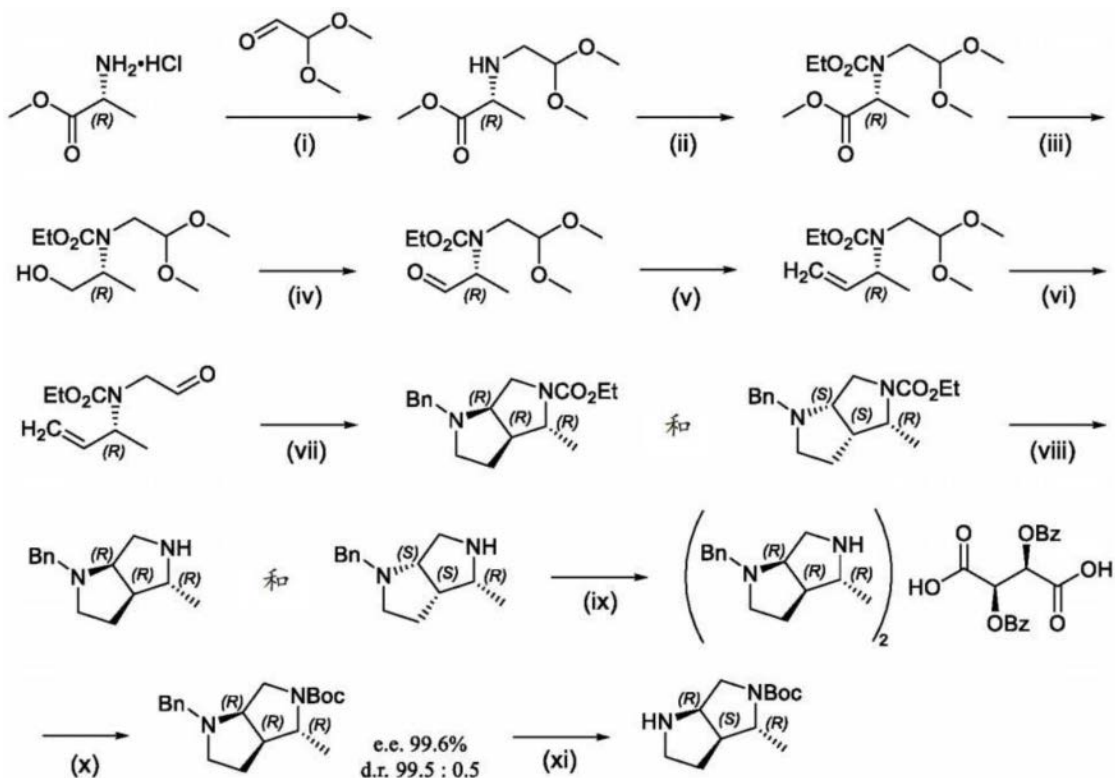
[0307] 外消旋-(3aS,4R,6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0308] 向外消旋-(3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]-吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(级分2,主要异构体,0.50g,1.58mmol)在MeOH(10mL)中的搅拌溶液中加入20%Pd(OH)₂(50%湿度,250mg,50%w/w)并用H₂气在室温吹扫4h。将混合物穿过硅藻土床过滤,用MeOH(50mL)洗涤并在减压下浓缩以产生外消旋-(3aS,4R,6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(0.33g,1.46mmol,92%收率)。

[0309] LCMS:方法C,1.29min,MS:ES+227.32。

[0310] 中间体C

[0311] (3aS,4R,6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯



[0313] 步骤(i)

[0314] (2,2-二甲氧基乙基)-D-丙氨酸甲酯

[0315] 在0℃向2,2-二甲氧基乙醛(97.01g,931.89mmol)在MeOH(100mL)中的搅拌混合物中加入D-丙氨酸甲酯HCl(100.0g,716.84mmol)。将混合物在室温搅拌2h。在N₂气氛下在0℃逐份加入氰基硼氢化钠(58.52g,931.89mmol)并在室温搅拌18h。将混合物在硅藻土上过滤,并用MeOH(2x200mL)洗涤。将滤液在减压下浓缩并将残余物倒入水(1000mL)中并用DCM(2x1000mL)萃取。将合并的有机相经硫酸钠干燥并在40℃在减压下浓缩以提供作为淡黄色油的(2,2-二甲氧基乙基)-D-丙氨酸甲酯(135.0g,705.95mmol,98%收率)。

[0316] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δppm:4.41-4.54(m,1H),3.75(s,3H),3.47-3.50(m,1H),3.38-3.46(m,6H),2.76-2.81(m,1H),2.64-2.68(m,1H),1.31-1.35(d,J=7.2Hz,3H)。

[0317] 将该方法使用D-丙氨酸甲酯HCl(500g,1200g和1200g规模)以相同方式重复3次以提供子标题化合物(分别680g、1625g和1625g)。所有三批的组合重量:4065g,21.25mol。

[0318] 步骤(ii)

[0319] N-(2,2-二甲氧基乙基)-N-(乙氧基羰基)-D-丙氨酸甲酯

[0320] 在室温向碳酸氢钠(88.95g,1058mmol)在水(810mL)中的搅拌混合物中加入(2,2-二甲氧基乙基)-D-丙氨酸甲酯(135g,705.95mmol)在THF(810mL)中的溶液。将氯甲酸乙酯(91.93g,847.14mmol)加入冷却的两相溶液(-5至5℃)中并将混合物在室温搅拌2h。将混合物倒入水(1.35L)中,并用EtOAc(2x675mL)萃取。将合并的有机相用饱和KHSO₄溶液(675mL)洗涤,经硫酸钠干燥并在40℃在减压下浓缩以得到作为油的N-(2,2-二甲氧基乙基)-N-(乙

氧基羰基)-D-丙氨酸甲酯(150.0g,569.71mmol,80%收率)。

[0321] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ ppm:4.52 (m, 2H), 4.15-4.27 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.40-3.63 (m, 9H), 1.50-1.52 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 1.23-1.39 (m, 3H)。

[0322] 将该方法使用(2,2-二甲氧基乙基)-D-丙氨酸甲酯(680g、1000g、1000g和1250g规模)以相同方式重复4次以提供子标题化合物(分别775g、1360g、1365g和1375g)。所有三批的组合重量:5025g,19.09mol。

[0323] 步骤(iii)

[0324] (R)-(2,2-二甲氧基乙基)(1-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸乙酯

[0325] 在0℃向N-(2,2-二甲氧基乙基)-N-(乙氧基羰基)-D-丙氨酸甲酯(100g,379.8mmol)在乙醇(1.8L)和THF(200mL)中的搅拌混合物中逐滴加入 LiBH_4 (2M的在THF中的溶液,949.5mL,1899.04mmol)。将混合物在室温搅拌18h,然后通过加入氯化铵(50g)在水(500mL)中的冷溶液2次进行淬灭,并在减压下浓缩以除去多余的挥发性有机溶剂。将残余物溶解于EtOAc(500mL)中。将有机相分离,经硫酸钠干燥并在40℃在减压下浓缩以得到作为油的(R)-(2,2-二甲氧基乙基)(1-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸乙酯(72.0g,306.01mmol,81%收率)。

[0326] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ ppm:4.85-4.86 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.15-4.24 (m, 3H), 3.71-3.72 (m, 2H), 3.41-3.56 (m, 6H), 3.14-3.19 (m, 1H), 2.99-3.05 (m, 2H), 1.28-1.34 (m, 3H), 1.13-1.15 (m, 1H), 1.03-1.05 (m, 1H)。

[0327] 将该方法使用N-(2,2-二甲氧基乙基)-N-(乙氧基羰基)-D-丙氨酸甲酯(500g、500g、1200g、1200g和1200g规模)以相同方式重复5次以提供子标题化合物(分别336g、336g、929g、930g和930g)。所有三批的组合重量:3533g,15.01mol。

[0328] 步骤(iv)

[0329] (R)-(2,2-二甲氧基乙基)(1-氧代丙烷-2-基)氨基甲酸乙酯

[0330] 在室温向(R)-(2,2-二甲氧基乙基)(1-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸乙酯(400.0g,1700.1mmol)在DCM:水(1.04L,1:1)中的搅拌混合物中加入 NaHCO_3 (428g,5100mmol)和TEMPO(2.6g,17.0mmol)。在0℃将次氯酸钠的溶液(1M NaOCl 溶液新鲜制备自固体 $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,391.1g,2210.13mmol,用4.98L水稀释)加入两相溶液中。将混合物温热至室温并搅拌18h,然后小心地用10% (w/v) 硫代硫酸钠水溶液(2.8L)淬灭,并用DCM(2x4.0L)萃取。将有机相经硫酸钠干燥并在40℃在减压下浓缩以得到作为油的(R)-(2,2-二甲氧基乙基)(1-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸乙酯(360g,1543.3mmol,90.78%收率)。

[0331] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ ppm:9.59 (s, 1H), 4.46-4.48 (m, 1H), 4.16-4.24 (m, 2H), 3.84-3.89 (m, 1H), 3.52-3.56 (m, 1H), 3.42-3.47 (m, 6H), 3.30-3.40 (m, 1H), 1.38-1.41 (m, 3H), 1.22-1.34 (m, 3H)。

[0332] 将该方法使用(R)-(2,2-二甲氧基乙基)(1-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸乙酯(1100g、840g和1200g)以相同方式重复3次以提供子标题化合物(分别1026g、820g和1020g)。所有三批的组合重量:3226g,13.83mol。

[0333] 步骤(v)

[0334] (R)-丁-3-烯-2-基(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯

[0335] 在0℃向甲基三苯基溴化磷(137.7g,385.8mmol)在THF(1.8L)中的搅拌混合物中

逐滴加入KHMDS (1M的在THF中的溶液, 401.26ml, 401.2mmol)。将混合物在室温搅拌1h, 然后在-78℃在N₂气氛下逐滴加入(R)-(2,2-二甲氧基乙基)(1-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸乙酯(72.0g, 308.6mmol)在THF(576mL)中的溶液。将混合物在室温搅拌18h然后用MeOH(2.2mL)淬灭并在室温搅拌30min。将混合物浓缩, 与己烷(3x1500mL)一起共蒸馏, 冷却至0℃并过滤以除去沉淀的MePPh₂O和PPh₃O。将有机相浓缩, 冷却, 并再次过滤。将得到的滤液在40℃在减压下浓缩以得到作为浅棕色油的(R)-丁-3-烯-2-基(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯(65g, 1543.3mmol, 91%收率)。

[0336] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) ppm: δ5.92-6.03 (m, 1H), 5.11-5.16 (m, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.17-4.23 (m, 2H), 3.45 (s, 6H), 3.27 (m, 2H), 2.67-2.72 (m, 1H), 1.26-1.33 (m, 6H)。

[0337] 将该方法使用(R)-(2,2-二甲氧基乙基)(1-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸乙酯(735g、1417g和1020g)以相同方式重复3次以提供子标题化合物(分别644g、1262g和860g)。所有三批的组合重量: 2831g, 12.24mol。

[0338] 步骤(vi)

[0339] (R)-丁-3-烯-2-基(2-氧代乙基)氨基甲酸乙酯

[0340] 在室温向(R)-丁-3-烯-2-基(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯(300.0g, 1297.07mmol)在丙酮(6.0L)和水(600mL)中的搅拌混合物中加入对甲苯磺酸一水合物(78.9g, 415.06mmol)。将混合物在60℃加热18h, 将其冷却至室温并在减压下浓缩。将混合物浓缩并将残余物倒入饱和NaHCO₃溶液(1500mL)中, 并用EtOAc(2x1000mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩以得到作为淡黄色油的(R)-丁-3-烯-2-基(2-氧代乙基)氨基甲酸乙酯(230g, 1242.5mmol, 96%收率)。

[0341] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δppm: 9.55 (s, 1H), 5.79-5.86 (m, 1H), 5.05-5.25 (m, 2H), 5.00-5.05 (m, 1H), 4.12-4.22 (m, 2H), 3.70-3.92 (m, 2H), 1.24-1.31 (m, 6H)。

[0342] 将该方法使用(R)-丁-3-烯-2-基(2,2-二甲氧基乙基)氨基甲酸乙酯(1020g、670g和860g)以相同方式重复3次以提供子标题化合物(分别795g、480g、605g)。所有三批的组合重量: 2110g, 11.39mol。

[0343] 步骤(vii)

[0344] (3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸乙酯与(3aS, 4R, 6aS)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸乙酯的混合物(非对映异构体的约70:30混合物)

[0345] 在配备Dean-Stark设备的10L圆底烧瓶中, 在室温搅拌(R)-丁-3-烯-2-基-(2-氧代乙基)氨基甲酸乙酯(200.0g, 1079.7mmol)在甲苯(7.2L, 36体积)中的混合物。将N-苄基甘氨酸(214.02g, 1295.7mmol)加入混合物, 然后将其在120℃加热18h, 将其冷却至室温并在减压下浓缩。将残余物倒入饱和NaHCO₃溶液(2000mL)中并用DCM(2x1000mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩以产生作为棕色油的子标题化合物(非对映异构体的约70:30混合物)(306.0g, 1061.06mmol, 98%收率)。

[0346] LCMS: 方法H3, 3.46min, 非对映异构体的混合物, MS: ES+289.2; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δppm: 7.16-7.40 (m, 5H), 4.16 (m, 2H), 3.91 (m, 2H), 3.65 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.18 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.64-2.72 (m, 1H), 2.40 (s, 1H), 2.33 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 1.30 (t, 3H), 1.20 (d, J=5.2Hz, 3H); 手性HPLC: 方法Y26, 5.23min-主要峰; 5.61min-次

要峰。

[0347] 将该方法使用(R)-丁-3-烯-2-基-(2-氧代乙基)氨基甲酸乙酯(515g、600g和760g)以相同方式重复3次以提供子标题化合物(分别751g、880g和970g)。所有四批的合并重量:2907g,10.09mol。

[0348] 步骤(viii)

[0349] (3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯与(3aS,4R,6aS)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯的混合物

[0350] 将步骤(vii)的产物(非对映异构体的约70:30混合物,300.0g,1040.25mmol)在HBr水溶液(48重量%,1988mL 16644.12mmol)中的搅拌混合物加热至回流保持6h。将混合物倒入水(1.5L,5体积)中,并用甲苯(3x600mL,2体积)洗涤。将水层用K₂CO₃(约2.0kg,14563.5mmol)碱化直到pH~10,并用DCM(3x1.5L)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩。将残余物溶解在DCM(500mL)中并用1N NaOH溶液(150mL)彻底洗涤。将水层用DCM(200mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩以产生作为棕色油的子标题化合物(非对映异构体的约70:30混合物)(155.0g,716.49mmol,69%收率)。

[0351] LCMS:方法F,3.05min,非对映异构体的混合物,MS:ES+217.2;¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δppm:7.21-7.40(m,5H),3.63-3.87(m,1H),3.42-3.59(m,1H),3.08-3.23(m,1H),2.83-3.09(m,3H),2.77(m,1H),2.65(s,1H),2.20-2.36(m,2H),1.99(m,1H),1.49(m,1H),1.02-1.21(m,3H);手性HPLC:方法Y26,4.98min和5.55min,仅看到两个单独峰。

[0352] 将该方法使用(3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸乙酯(非对映异构体的约70:30混合物,1100g和1700g)以相同方式重复2次以提供子标题化合物(分别575g和838g)。所有三批的组合重量:1568g,7.24mol。

[0353] 步骤(ix)

[0354] (3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯.0.5(L)-DBTA盐

[0355] 向步骤(viii)的产物(非对映异构体的约70:30混合物,2.5g,11.56mmol)中加入2.5%的水于THF中的溶液(19.2mL)。在室温加入(2R,3R)-2,3-双(苯甲酰氧基)琥珀酸水合物(1.28g,3.57mmol,来自Angene)在2.5%的水于THF中的溶液(6.8mL,2.75体积)中的溶液,并将溶液在室温搅拌2.5h。将沉淀的固体通过在减压下过滤进行收集,并将滤饼用2.5%的水于THF中的溶液(2x10mL)洗涤以产生白色固体(3.0g)。

[0356] 将白色固体(3.0g)在2.5%的水于THF中的溶液(36mL)中的悬浮液加热至回流保持1h以得到澄清溶液。然后将混合物冷却至室温保持1h,然后在室温在没有搅拌下保持1h。将结晶的固体通过在减压下过滤进行收集,并将滤饼用2.5%的水于THF中的溶液(2x10mL)洗涤,并在减压下在40℃干燥以产生作为白色固体的(3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯.0.5L-DBTA(2.4g,3.03mmol,26%收率)。

[0357] 手性HPLC:方法Y22,5.35min。

[0358] 步骤(ix):替代

[0359] 向步骤(viii)的产物(非对映异构体的约70:30混合物,150.0g,693.38mmol)中加入2.5%的水于THF中的溶液(1.2L)。给溶液接种来自先前合成批的(3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯.0.5(L)-DBTA盐(700mg)。在室温加入(2R,3R)-2,3-双(苯

甲酰氧基)琥珀酸水合物(79.50g, 221.88mmol, 来自Angene)在2.5%的水于THF中的溶液(412mL, 2.75体积)中的溶液,并将溶液在室温搅拌3h。将反应混合物在室温保持3h。将沉淀的固体通过在减压下过滤进行收集,并将滤饼用2.5%的水于THF中的溶液(2x1500mL)洗涤以产生黄色固体(178.0g)。

[0360] 第一次结晶:将黄色固体(178.0g)在2.5%的水于THF中的溶液(2670mL)中的悬浮液加热至回流保持1h以得到澄清溶液。然后将混合物冷却至室温保持1h,然后在室温在没有搅拌下原样保持1h。将结晶的固体通过在减压下过滤进行收集,并将滤饼用2.5%的水于THF中的溶液(2x1780mL)洗涤,并在减压下在40℃干燥以产生作为白色固体的(3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯.0.5L-DBTA(113.0g, 142.0mmol)。

[0361] 第二次结晶:将来自第一次结晶的固体(113.0g)重新悬浮在2.5%的水于THF中的溶液(1695mL)中并加热至回流保持1h以形成溶液。然后将混合物冷却至室温并在室温在没有搅拌下原样保持1h。将结晶的固体通过在减压下过滤进行收集,并将滤饼用2.5%的水于THF中的溶液(2x1130mL)洗涤,并在减压下在40℃干燥以产生作为白色固体的(3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯.0.5L-DBTA盐(103.0g, 130.22mmol, 18%收率)。

[0362] 手性HPLC:方法Y22, 5.31min。

[0363] 将该方法使用(3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基八氢-吡咯并[3,4-b]吡咯(非对映异构体的约70:30混合物, 570g和838g)以相同方式重复2次以提供子标题化合物(分别478g和778g)。所有三批的组合重量:1359g, 1.72mol。

[0364] 步骤(x)

[0365] (3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0366] 将(3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并-[3,4-b]吡咯.0.5L-DBTA盐(100.0g, 126.42mmol)在THF:水(1800mL, 1:1.25)中的搅拌混合物在50℃加热。在50℃逐份加入NaHCO₃(31.86g, 379.28mmol)。将混合物冷却至25℃,加入二碳酸二叔丁酯(66.14g, 303.42mmol)并将两相混合物在室温剧烈搅拌16h。将混合物倒入水(500mL)中,并用EtOAc(2x1L)萃取。将合并的有机相用饱和NaHCO₃水溶液(2x300mL)洗涤,经无水Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩。将残余物使用柱色谱法(100-200硅胶, 20%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以产生作为灰色粘稠油的(3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(45.0g, 142.20mmol, 61%收率)。

[0367] LCMS:方法H3, 3.96min, MS:ES+317.2; ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δppm:7.23-7.36(m, 5H), 3.79(s, 1H), 3.62(s, 1H), 3.42(s, 2H), 3.09-3.14(m, 1H), 3.02-3.05(m, 1H), 2.81(s, 1H), 2.34(s, 1H), 2.18-2.25(m, 1H), 1.96-2.04(m, 1H), 1.46-1.55(m, 1H), 1.40(s, 9H), 1.08-1.10(d, J=6.0Hz, 3H);手性HPLC:方法Y23, 4.31min, 99.6%e.e., 99.5:0.5d.r。

[0368] 将该方法使用(3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并-[3,4-b]吡咯.0.5L-DBTA盐(200g和1000g)以相同方式重复2次以提供子标题化合物(分别134g和685g)。所有三批的组合重量:864g, 2.73mol。

[0369] 步骤(xi)

[0370] (3aS, 4R, 6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0371] 向(3aR, 4R, 6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

(200.0g, 632.01mmol) 在乙醇 (1.6L) 中的搅拌混合物中加入 10% Pd/C (50% 湿度, 100.0g, 0.5% w/w), 然后用 H₂ 气在室温吹扫 4h。将混合物穿过硅藻土 **Hyflow®** 床过滤, 用 MeOH (2x500mL) 洗涤并在减压下浓缩以产生作为无色油的 (3aS, 4R, 6aR) -4-甲基六氢吡咯并 [3, 4-b] 吡咯-5(1H) -甲酸叔丁酯 (134.0g, 592.08mmol, 96% 收率)。

[0372] LCMS: 方法 H3, 2.22min, MS: ES+227.2; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δppm: 3.75-3.82 (m, 1H), 3.48-3.49 (m, 2H), 3.04-3.08 (m, 1H), 2.85-2.91 (m, 1H), 2.32-2.38 (m, 1H), 2.22 (s, 2H), 2.00-2.05 (m, 1H), 1.64-1.70 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.15-1.19 (d, J=6.4Hz, 3H); 手性 HPLC: 方法 Y13, 4.55min。

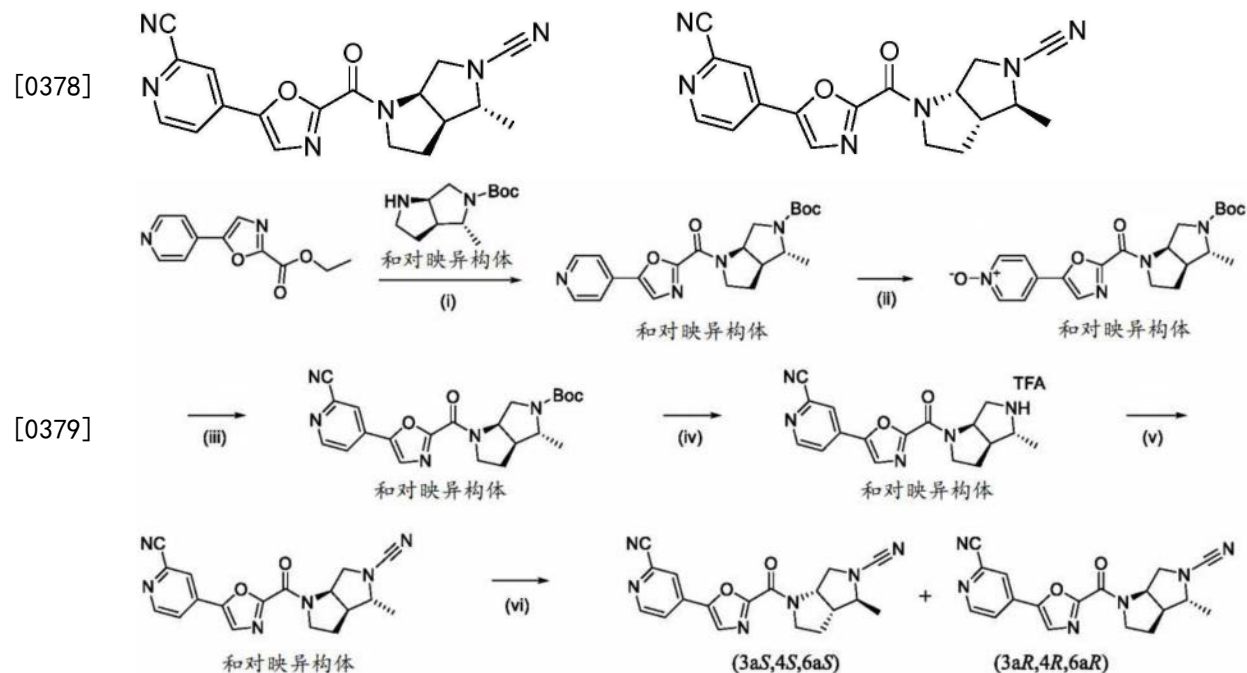
[0373] 将该方法使用 (3aR, 4R, 6aR) -1-苄基-4-甲基六氢吡咯并 [3, 4-b] 吡咯-5(1H) -甲酸叔丁酯 (570g) 以相同方式重复以提供子标题化合物 (400g)。两批的合并重量: 534g, 2.36mol。

[0374] 实施例 1

[0375] (+) - (3aR*, 4R*, 6aR*) -1- (5- (2-氰基吡啶-4-基) 噁唑-2-羰基) -4-甲基六氢吡咯并 [3, 4-b] 吡咯-5(1H) -甲腈和

[0376] 实施例 2

[0377] (-) - (3aR*, 4R*, 6aR*) -1- (5- (2-氰基吡啶-4-基) 噁唑-2-羰基) -4-甲基六氢吡咯并 [3, 4-b] 吡咯-5(1H) -甲腈



[0380] (i) TBD, THF, 0°C 至室温; (ii) m-CPBA, 0°C 至室温; (iii) TMSCN, 二甲基氨甲酰氯, MeCN, 0°C 至室温; (iv) TFA, DCM, 0°C 至室温; (v) K₂CO₃, BrCN, THF, 0°C 至室温; (vi) 手性制备型 HPLC 纯化。

[0381] 步骤 (i)

[0382] 外消旋 - (3aR, 4R, 6aR) -4-甲基-1- (5- (吡啶-4-基) 噁唑-2-羰基) 六氢吡咯并 [3, 4-b] 吡咯-5(1H) -甲酸叔丁酯

[0383] 在 0°C 向 5- (吡啶-4-基) 噁唑-2-甲酸乙酯 (5.0g, 22.93mmol) 和外消旋 - (3aS, 4R,

6aR) -4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(4.15g, 18.35mmol) 在THF(50mL) 中的搅拌溶液中逐份加入TBD(4.78g, 34.39mmol)。将混合物温热至室温并搅拌1h, 然后倒入水(50mL) 中, 并用EtOAc(2x200mL) 萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(硅胶, 2% MeOH在DCM中的溶液) 纯化以产生外消旋-(3aR, 4R, 6aR) -4-甲基-1-(5-(吡啶-4-基) 噁唑-2-羰基) 六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(5.5g, 13.82mmol, 60%收率)。

[0384] LCMS: 方法C1, 1.14min, MS: ES+399.4。

[0385] 步骤(ii)

[0386] 外消旋-4-(2-((3aR, 4R, 6aR) -5-(叔丁氧基羰基) -4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基) 噁唑-5-基) 吡啶1-氧化物

[0387] 在0℃向消旋-(3aR, 4R, 6aR) -4-甲基-1-(5-(吡啶-4-基) 噁唑-2-羰基) 六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(5.5g, 13.82mmol) 在DCM(60mL) 中的搅拌溶液中逐份加入间氯过苯甲酸(4.77g, 27.64mmol)。将混合物温热至室温并搅拌24h。将反应混合物倒入饱和NaHCO₃溶液(200mL) 中, 并用EtOAc(2x300mL) 萃取。将合并的有机相用饱和NaHCO₃溶液(3x100mL)、10% 硫代硫酸钠(200mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩以产生外消旋-4-(2-((3aR, 4R, 6aR) -5-(叔丁氧基羰基) -4-甲基-八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基) 噁唑-5-基) 吡啶1-氧化物(4.80g, 11.58mmol, 83%收率)。

[0388] LCMS: 方法C1, 1.15min, MS: ES+415.6。

[0389] 步骤(iii)

[0390] 外消旋-(3aR, 4R, 6aR) -1-(5-(2-氰基吡啶-4-基) 噁唑-2-羰基) -4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0391] 在0℃向外消旋-4-(2-((3aR, 4R, 6aR) -5-(叔丁氧基羰基) -4-甲基-八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基) 噁唑-5-基) 吡啶1-氧化物(4.80g, 11.58mmol) 在乙腈(50mL) 中的搅拌溶液中逐滴加入二甲基氨甲酰氯(3.11g, 2.68mL, 28.97mmol) 和TMSCN(3.45g, 34.74mmol)。将混合物温热至室温并搅拌16h, 然后倒入水(200mL) 中, 并用EtOAc(2x300mL) 萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(硅胶, 2% MeOH在DCM中的溶液) 纯化以产生外消旋-(3aR, 4R, 6aR) -1-(5-(2-氰基吡啶-4-基) 噁唑-2-羰基) -4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(5.1g, 12.05mmol, 定量收率)。

[0392] LCMS: 方法C1, 1.28min, MS: ES+[M+18]441.4。

[0393] 步骤(iv)

[0394] 外消旋-4-(2-((3aR, 4R, 6aR) -4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基) 噁唑-5-基) 吡啶腈

[0395] 在0℃向外消旋-(3aR, 4R, 6aR) -1-(5-(2-氰基吡啶-4-基) 噁唑-2-羰基) -4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(5.1g, 2.16mmol) 在DCM(50mL) 中的搅拌溶液中逐滴加入TFA(10mL, 2体积)。将混合物温热至室温并搅拌2h, 然后在减压下浓缩以产生外消旋-4-(2-((3aR, 4R, 6aR) -4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基) 噁唑-5-基) 吡啶腈TFA盐(5.0g, 11.44mmol, 经2步98%收率)。

[0396] LCMS: 方法C1, 0.91min, MS: ES+324.3。

[0397] 步骤(v)

[0398] 外消旋-(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈

[0399] 在室温向外消旋-4-(2-((3aR,4R,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶腈TFA盐(0.14g,0.33mmol)在THF(6mL)中的搅拌溶液中加入K₂CO₃(0.14g,1.00mmol)并搅拌10min。在0℃加入溴化氰(0.03g,0.27mmol)。将混合物在0℃搅拌15min,然后倒入水(10mL)中,并用EtOAc(3x10mL)萃取。将合并的有机相经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物通过使用正戊烷(2x10mL)研磨进行纯化以产生外消旋-(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]-吡咯-5(1H)-甲腈(0.08g,0.23mmol,经2步88%收率)。

[0400] LCMS:方法H,2.49min,MS:ES+349.1;¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm:8.89(d,J=4.8Hz,1H),8.51(s,1H),8.36(s,0.7H),8.34(s,0.3H),8.05(d,J=5.2Hz,1H),5.11-5.19(m,0.4H),4.57-4.63(m,0.7H),4.24-4.29(m,0.8H),3.89-4.01(m,2H),3.42-3.57(m,2.6H),2.51-2.61(m,0.5H,被遮蔽的(obscured)),1.85-2.05(m,2H),1.30(d,J=6.4Hz,3H),旋转异构体的混合物。

[0401] 还从外消旋-4-(2-((3aR,4R,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)-噁唑-5-基)吡啶腈TFA盐(5.0g)类似地制备子标题化合物(1.9g,5.45mmol,47%收率)。

[0402] 步骤(vi)

[0403] 实施例1:(+)-(3aR*,4R*,6aR*)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈和

[0404] 实施例2:(-)-(3aR*,4R*,6aR*)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈

[0405] 将外消旋体分离成对映异构体实施例1和实施例2

[0406] 使用与紫外检测器偶联的Shimadzu LC-20AP仪器,用Chiralpak IC 250mm x 21.0mm,5微米柱,通过HPLC色谱分离,从外消旋化合物外消旋-(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈(1.5g)分离两种对映异构体中的每一种。将流速设定至20.0mL/min。流动相为(A)0.1%DEA在正己烷类中的溶液和(B)0.1%DEA在70:30IPA/MeCN中的溶液。在295nmλ最大值记录紫外光谱。用等度流动相40:60B/A在70-分钟阶段中进行色谱法以提供下面描述的两种对映异构体,洗脱时间分别为40.0min和55.6min。

[0407] 较快洗脱的级分(实施例2)

[0408] (-)-(3aR*,4R*,6aR*)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈

[0409] 收率(0.44g,1.26mmol),白色固体。

[0410] LCMS:方法H,2.56min,MS:ES+349.2。

[0411] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm:8.89(d,J=4.8Hz,1H),8.51(s,1H),8.35-8.37(m,1H),8.06-8.07(m,1H),5.12-5.17(m,0.4H),4.59-4.62(m,0.7H),4.25-4.29(m,0.7H),3.91-4.02(m,2H),3.42-3.59(m,2.7H),2.57-2.61(m,0.5H,被遮蔽的),1.85-2.05(m,2H),1.31(d,J=6.4Hz,3H),旋转异构体的混合物。

[0412] 手性HPLC:方法Y11,12.89min;>99% ee。

[0413] 熔点=142°C至146°C。

[0414] $[\alpha]_D^{25} = -208^\circ$ ($c=0.05\text{g}/100\text{cm}^3$, MeOH)。

[0415] 较慢洗脱的级分(实施例1)

[0416] (+) - (3aR*, 4R*, 6aR*) - 1 - (5 - (2 - 氰基吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲腈

[0417] 收率(0.48g, 1.38mmol), 白色固体。

[0418] LCMS:方法H, 2.56min, MS:ES+349.2。

[0419] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 8.89 (d, $J=4.4\text{Hz}$, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.36-8.38 (m, 1H), 8.06-8.07 (m, 1H), 5.12-5.16 (m, 0.4H), 4.57-4.65 (m, 0.7H), 4.22-4.30 (m, 0.7H), 3.91-4.02 (m, 2H), 3.41-3.58 (m, 2.7H), 2.61-2.63 (m, 0.5H, 被遮蔽的), 1.82-2.07 (m, 2H), 1.31 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H), 旋转异构体的混合物。

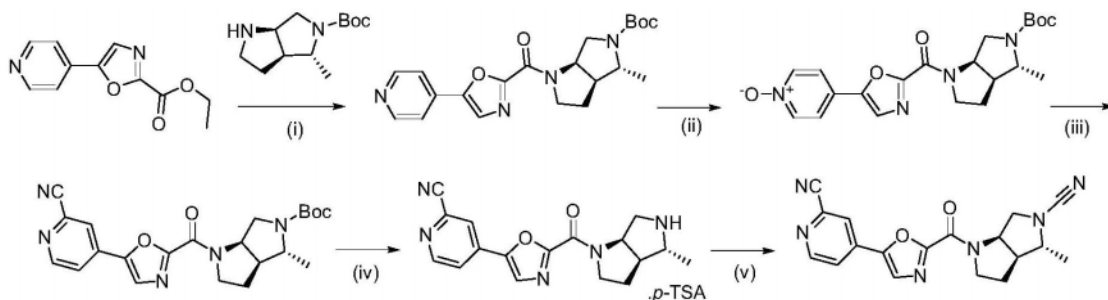
[0420] 手性HPLC:方法Y11, 15.09min;>99% ee。

[0421] $[\alpha]_D^{25} = +208^\circ$ ($c=0.05\text{g}/100\text{cm}^3$, MeOH)。

[0422] 通过类似的方法制备的材料批:熔点=144°C至146°C。

[0423] 实施例1替代合成。

[0424] (+) - (3aR, 4R, 6aR) - 1 - (5 - (2 - 氰基吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲腈



[0425]

[0426] 步骤(i)

[0427] (3aR, 4R, 6aR) - 4 - 甲基 - 1 - (5 - (吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) 六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲酸叔丁酯

[0428] 在0°C向5 - (吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 甲酸乙酯(37.0g, 169.72mmol)和(3aS, 4R, 6aR) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲酸叔丁酯(30.70g, 135.64mmol)在THF(370mL)中的搅拌混合物中逐份加入TBD(28.32g, 203.47mmol)。将混合物温热至室温并搅拌2h,然后倒入水(370mL)中,并用EtOAc(2x370mL)萃取。将合并的有机相经无水 Na_2SO_4 干燥,过滤并在减压下浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(硅胶, 5% MeOH在DCM中的溶液)纯化以产生作为淡黄色固体的(3aR, 4R, 6aR) - 4 - 甲基 - 1 - (5 - (吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) 六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲酸叔丁酯(29.0g, 72.78mmol, 43%收率)。

[0429] LCMS:方法H3, 2.79min, MS:ES+399.2; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.72-8.82 (m, 2H), 8.20-8.24 (m, 1H), 7.76-7.77 (m, 2H), 5.10-5.11 (m, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.57-3.85 (m, 4H), 2.09-2.14 (m, 1H), 1.73-1.86 (m, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.21-1.10 (m, 3H); 手性HPLC:方法Y24, 5.35min。

[0430] 将该方法使用(3aS,4R,6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(165g和457g)以相同方式重复2次以提供子标题化合物(分别255g和620g)。所有三批的组合重量:904g,2.27mol。

[0431] 步骤(ii)

[0432] 4-(2-((3aR,4R,6aR)-5-(叔丁氧基羰基)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶1-氧化物

[0433] 在0℃向(3aR,4R,6aR)-4-甲基-1-(5-(吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(29.0g,72.82mmol)在DCM(435mL)中的搅拌混合物中逐份加入间氯过苯甲酸(37.69g,218.46mmol)。将混合物温热至室温并搅拌20h,然后倒入饱和NaOH溶液(725mL,25体积)中,并用DCM(2x290mL)萃取。将合并的有机相用10%硫代硫酸钠(290mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩以产生作为黄色固体的4-(2-((3aR,4R,6aR)-5-(叔丁氧基羰基)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶1-氧化物(28.30g,68.32mmol,94%收率)。

[0434] LCMS:方法H3,2.41min,MS:ES+259.0(M-56);¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δppm:8.25-8.26(m,2H),8.08-8.11(m,1H),7.78-7.79(m,2H),5.08-5.09(m,0.4H),4.54(m,0.6H),4.02-4.09(m,1H),3.66-3.82(m,4H),2.07-2.12(m,2H),1.64-1.84(m,1H),1.38(s,9H),1.15-1.19(m,3H);手性HPLC:方法Y25,6.13min。

[0435] 将该方法使用(3aR,4R,6aR)-4-甲基-1-(5-(吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(255g和620g)以相同方式重复2次以提供子标题化合物(分别235g和550g)。所有三批的组合重量:813.3g,1.96mol。

[0436] 步骤(iii)

[0437] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并-[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0438] 在0℃向4-(2-((3aR,4R,6aR)-5-(叔丁氧基羰基)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶1-氧化物(28.30g,68.32mmol)在乙腈(1132mL)中的搅拌混合物中逐滴加入二甲基氨甲酰氯(22.04g,18.87mL,204.96mmol)和TMSCN(20.33g,204.96mmol)。将混合物在80℃加热2h,使其冷却至室温并然后倒入水(280mL)中,并用EtOAc(2x280mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩以产生作为棕色油的(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并-[3,4-b]-吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(28.0g,66.16mmol,97%收率)。

[0439] LCMS:方法H3,3.06min,MS:ES+368.0(M-56);¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm:8.87-8.88(m,1H),8.48(s,1H),8.34-8.36(m,1H),8.03-8.05(m,1H),4.55(s,1H),4.02(s,1H),3.55-3.84(m,3H),2.74(s,2H),2.08-2.13(m,1H),1.75-1.83(m,1H),1.38(s,9H),1.16-1.20(m,3H);手性HPLC:方法Y4,4.67min。

[0440] 将该方法使用4-(2-((3aR,4R,6aR)-5-(叔丁氧基羰基)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶1-氧化物(235g和550g)以相同方式重复2次以提供子标题化合物(分别180g和470g)。所有三批的组合重量:678g,1.60mol。

[0441] 步骤(iv)

[0442] 4-(2-((3aR,4R,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶

脒p-TSA盐

[0443] 在0℃向(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(28.0g,66.16mmol)在乙脒(560mL)中的搅拌混合物中逐份加入p-TSA(66.07g,383.72mmol)。将混合物温热至室温并搅拌5h,然后在减压下浓缩以产生作为黄色油的4-(2-((3aR,4R,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶脒p-TSA盐(115.0g,定量收率)。

[0444] LCMS:方法H3,1.97min,MS:ES+324.0;手性HPLC:方法Y20,5.17min。

[0445] 将该方法使用(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(650g)以相同方式重复以提供子标题化合物(1000g)。两批的合并重量:1115g,3.44mol。

[0446] 步骤(v)

[0447] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲脒

[0448] 在室温向4-(2-((3aR,4R,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)-噁唑-5-基)吡啶脒p-TSA盐(180.0g,363.22mmol)在THF:水(5.4L,2:1)中的搅拌溶液中加入K₂CO₃(145.26g,1052.63mmol)并搅拌5min。在0℃加入溴化氰(26.0g,245.61mmol)。将混合物温热至室温并搅拌1h,然后将混合物在减压下浓缩并将残余物倒入冰冷水(2L)中以形成沉淀物。将固体通过在减压下过滤进行收集。将固体再次悬浮于水(2L)中并在室温搅拌2h,然后在减压下过滤。将固体材料用冷水(1L)洗涤,随后用正己烷类(500mL)、乙醚(100mL)和IPA(100mL)洗涤以产生(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲脒(40.0g,114.83mmol,32%收率)。

[0449] LCMS:方法H3,2.50min,MS:ES+349.0;¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm:8.89(d,J=5.2Hz,1H),8.50(s,1H),8.35-8.37(m,1H),8.05-8.06(m,1H),5.12-5.13(m,0.4H),4.57-4.61(m,0.6H),4.23-4.28(m,0.7H),3.89-4.00(m,2H),3.41-3.58(m,2.4H),2.54-2.67(m,1H,被遮蔽的),1.89-2.06(m,2H),1.27-1.30(m,3H),旋转异构体的混合物;HPLC:方法X2,19.78min,99.96%;手性HPLC:方法Y15,15.29min;>99%e.e.;熔点=147℃至149℃;[α]_D²⁵=+202°(c=0.05g/100cm³,MeOH)。

[0450] 步骤(v)(替代合成)

[0451] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲脒

[0452] 在室温向4-(2-((3aR,4R,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)-噁唑-5-基)吡啶脒p-TSA盐(115.0g,232.06mmol)在THF:水(804mL,9:5)中的搅拌溶液中加入K₂CO₃(98.22g,711.76mmol)并搅拌10min。在0℃加入溴化氰(18.86g,177.94mmol)。将混合物温热至室温并搅拌2h,然后倒入水(1150mL)中,并用EtOAc(2x1150mL)萃取。将合并的有机相经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物悬浮于IPA(575mL)中并在80℃加热2h以形成澄清溶液。将混合物缓慢地冷却至室温以形成结晶固体,将其通过在减压下过滤进行收集,用冷IPA(115mL)洗涤并在减压下干燥以产生(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲脒(15.0g,43.08mmol,19%收率)。

[0453] 将该方法使用4-(2-((3aR,4R,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)-

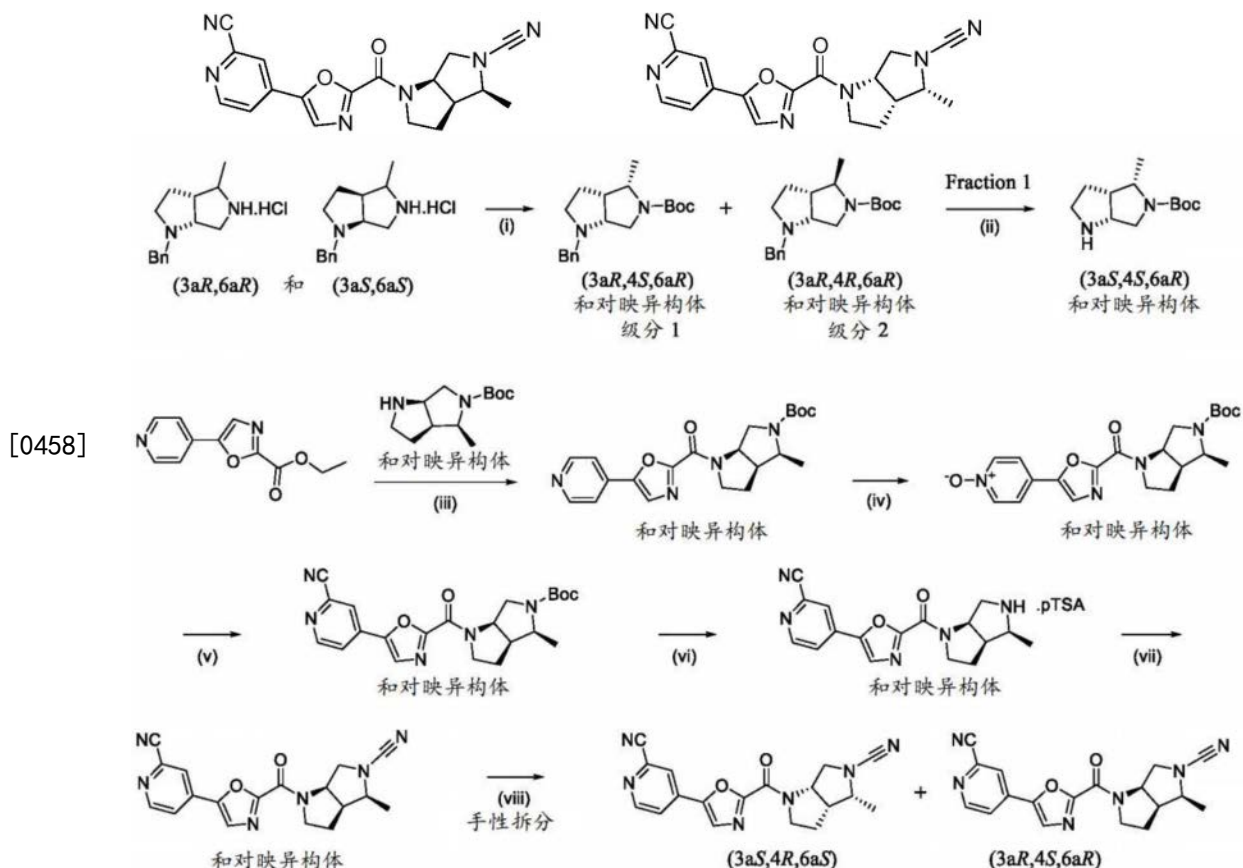
噁唑-5-基)吡啶脒p-TSA盐(1000g)以相同方式重复以提供标题化合物(288g)。将288g和15g的(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]-吡咯-5(1H)-甲脒在THF(909mL,3体积)中的溶液在室温搅拌2h以形成澄清溶液。将溶剂在减压下除去以得到白色固体,将其用戊烷(300mL,1体积)进一步洗涤并在减压下在45°C以下干燥4h以产生(3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]-吡咯-5(1H)-甲脒(303.0g)。

[0454] LCMS:方法H3,2.52min,MS:ES+349.0;¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)δppm:8.87(d,J=3.6Hz,1H),8.48(s,1H),8.30-8.38(m,1H),8.04-8.05(m,1H),5.12-5.13(m,0.4H),4.59-4.60(m,0.6H),4.23-4.27(m,0.6H),3.91-4.02(m,2H),3.41-3.56(m,2.4H),2.54-2.61(m,1H,被遮蔽的),1.84-2.04(m,2H),1.30(d,J=6.4Hz,3H),旋转异构体的混合物;手性HPLC:方法Y15,15.11min;HPLC:方法E,27.87min;>99%e.e.,99.5:0.5d.r.;熔点=161°C至162°C;[α]_D²⁵=+204°(c=0.05g/100cm³,MeOH)。

[0455] 实施例3和实施例4

[0456] (+)-(3aR*,4S*,6aR*)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲脒,和

[0457] (-)-(3aR*,4S*,6aR*)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲脒



[0459] 步骤(i)

[0460] 外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(次要异构体)和外消旋-(3aR,4R,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-

甲酸叔丁酯(主要异构体)

[0461] 在0℃向外消旋-(3aR,6aR)-1-苄基-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯HCl盐(通向中间体B的步骤(v)产物,68.0g,269.31mmol)在DCM(700mL)中的搅拌溶液中加入三乙胺(136.0g,187.3mL,1346.55mmol)、4-二甲基吡啶(1.64g,13.46mmol)和二碳酸二叔丁酯(70.51g,323.17mmol)。将混合物温热至室温并搅拌6h,然后倒入水(1000mL)中,并用DCM(2x1000mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200号大小,7-9%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以产生作为两个分离的级分的子标题化合物:级分1(次要异构体,0.8g,2.53mmol,0.94%收率)和级分2(主要异构体,38.0g,120.25mmol,45%收率)。

[0462] 级分1LCMS:方法H1,4.19min,MS:ES+317.2。级分2LCMS:方法H1,3.87min,MS:ES+317.0。对次要异构体级分1继续进行步骤(ii)。

[0463] 步骤(ii)

[0464] 外消旋-(3aS,4S,6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0465] 向外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-苄基-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]-吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(级分1,次要异构体,0.8g,2.53mmol)在乙醇(10mL)中的搅拌溶液中加入10%Pd/C(50%湿度,0.8g)并用氢气在室温吹扫16h。将混合物穿过**Celite**[®]过滤,用乙醇(50mL)洗涤并在减压下浓缩以产生外消旋-(3aS,4S,6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(0.42g,1.85mmol,73%收率)。

[0466] LCMS:方法H1,2.25min,MS:ES+227.2。

[0467] 步骤(iii)

[0468] 外消旋-(3aR,4S,6aR)-4-甲基-1-(5-(吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0469] 将5-(吡啶-4-基)噁唑-2-甲酸乙酯(0.49g,2.25mmol)和外消旋-(3aS,4S,6aR)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(0.41g,1.79mmol)在甲苯(7mL)中的搅拌溶液在40℃加热10min以溶解两种起始材料,然后冷却至0℃,随后在0℃逐滴加入TBD(0.15g,1.12mmol)在甲苯(2mL)中的溶液。将混合物温热至室温并搅拌3h,然后倒入水(50mL)中,并用EtOAc(2x50mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(硅胶,80-90%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以产生外消旋-(3aR,4S,6aR)-4-甲基-1-(5-(吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(0.43g,1.09mmol,48%收率)。

[0470] LCMS:方法H1,2.88min,MS:ES+399.2。

[0471] 步骤(iv)

[0472] 外消旋-4-(2-((3aR,4S,6aR)-5-(叔丁氧基羰基)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶1-氧化物

[0473] 在0℃向外消旋-(3aR,4S,6aR)-4-甲基-1-(5-(吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(0.43g,1.08mmol)在DCM(7mL)中的搅拌溶液中逐份加入间氯过苯甲酸(0.37g,2.16mmol)。将混合物温热至室温并搅拌16h。将混合物倒入水(100mL)中,并用EtOAc(2x100mL)萃取。将合并的有机相用饱和NaHCO₃溶液(2x100mL)、10%硫代硫酸钠(2x100mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩以产生外消旋-4-(2-((3aR,4S,

6aR)-5-(叔丁氧基羰基)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶1-氧化物(0.39g,0.95mmol,87%收率)。

[0474] LCMS:方法H1,2.50min,MS:ES+[M-56]359.0。

[0475] 步骤(v)

[0476] 外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯

[0477] 在室温向外消旋-4-(2-((3aR,4S,6aR)-5-(叔丁氧基羰基)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶1-氧化物(0.39g,0.94mmol)在MeCN(7mL)中的搅拌溶液中逐滴加入二甲基氨甲酰氯(0.30g,0.26mL,2.83mmol)和三甲基氰硅烷(0.28g,0.36mL,2.83mmol)。将混合物在80℃加热2h,然后倒入10%Na₂CO₃在水中的溶液(50mL)中,并用EtOAc(2x50mL)萃取。将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(硅胶,80-90%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以产生外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]-吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(0.38g,0.89mmol,95%收率)。

[0478] LCMS:方法H1,3.15min,MS:ES+[M-56]368.0。

[0479] 步骤(vi)

[0480] 外消旋-4-(2-((3aR,4S,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶腈

[0481] 在0℃向外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲酸叔丁酯(0.38g,0.89mmol)在DCM(10mL)中的搅拌溶液中逐份加入对甲苯磺酸一水合物(0.84g,4.45mmol)。将混合物温热至室温并搅拌6h,然后在减压下浓缩以产生外消旋-4-(2-((3aR,4S,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶腈p-TSA盐(0.52g,定量收率)。

[0482] LCMS:方法H1,1.93min,MS:ES+324.0。

[0483] 步骤(vii)

[0484] 外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈

[0485] 在室温向外消旋-4-(2-((3aR,4S,6aR)-4-甲基八氢吡咯并[3,4-b]吡咯-1-羰基)噁唑-5-基)吡啶腈p-TSA盐(0.52g,1.01mmol)在THF(10mL)和水(5mL)中的搅拌溶液中加入K₂CO₃(0.70g,5.05mmol)并搅拌5min。在0℃加入溴化氰(0.13g,1.21mmol)。将混合物温热至室温并搅拌1h,然后倒入水(50mL)中,并用EtOAc(2x50mL)萃取。将合并的有机相经Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(硅胶,90-95%EtOAc在正己烷类中的溶液)纯化以产生外消旋-(3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈(0.18g,0.52mmol,经2步57%收率)。

[0486] LCMS:方法H1,2.48min,MS:ES+349.0;¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)δppm 8.88(d,J=5.2Hz,1H),8.50(s,1H),8.35(d,J=3.6Hz,1H),8.05(dd,J=5.2,1.2Hz,1H),5.06-5.10(m,0.6H),4.56-4.60(m,0.7H),4.16-4.21(m,0.7H),3.44-3.95(m,4H),2.81-2.93(m,1H),1.77-1.99(m,2H),1.25(d,J=6.4Hz,3H),旋转异构体的混合物;HPLC:方法E,28.58min;98.8:1.2d.r。

[0487] 步骤(viii)

[0488] 实施例3: (+) - (3aR*, 4S*, 6aR*) - 1 - (5 - (2 - 氰基吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲腈, 和

[0489] 实施例4: (-) - (3aR*, 4S*, 6aR*) - 1 - (5 - (2 - 氰基吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲腈

[0490] 使用与紫外检测器偶联的Shimadzu LC-20AP仪器, 用Chiralpak IG 250mm x 21.0mm, 5微米柱, 通过色谱分离从外消旋化合物外消旋 - (3aR, 4S, 6aR) - 1 - (5 - (2 - 氰基吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲腈 (0.10g, 0.29mmol) 分离两种对映异构体中的每一种。将流速设定至20.0mL/min。流动相为(A) 0.1%DEA在MeOH中的溶液和(B) 0.1%DEA在MeCN中的溶液。在292nm λ 最大值记录紫外光谱。用等度流动相50:50B/A在35分钟阶段中进行色谱法以提供下面描述的两种对映异构体, 洗脱时间分别为8.03min和12.95min。

[0491] 较快洗脱的级分(实施例3)

[0492] (+) - (3aR*, 4S*, 6aR*) - 1 - (5 - (2 - 氰基吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲腈

[0493] 收率(23mg, 0.07mmol)。LCMS: 方法H1, 2.49min, MS: ES+349.0; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8.88(d, J=4.8Hz, 1H), 8.50(s, 1H), 8.35(d, J=3.6Hz, 1H), 8.05(dd, J=5.2, 1.2Hz, 1H), 5.06-5.11(m, 0.6H), 4.56-4.61(m, 0.7H), 4.16-4.22(m, 0.7H), 3.43-3.95(m, 4H), 2.81-2.95(m, 1H), 1.77-1.98(m, 2H), 1.25(d, J=6.4Hz, 3H), 旋转异构体的混合物; 手性HPLC: 方法Y17, 8.11min。

[0494] 较慢洗脱的级分(实施例4)

[0495] (-) - (3aR*, 4S*, 6aR*) - 1 - (5 - (2 - 氰基吡啶 - 4 - 基) 噁唑 - 2 - 羰基) - 4 - 甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯 - 5(1H) - 甲腈

[0496] 收率(19mg, 0.05mmol)。LCMS: 方法H1, 2.49min, MS: ES+349.0; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8.88(d, J=4.8Hz, 1H), 8.50(s, 1H), 8.35(d, J=3.2Hz, 1H), 8.05(d, J=4.8, 1.2Hz, 1H), 5.06-5.11(m, 0.6H), 4.56-4.60(m, 0.7H), 4.16-4.21(m, 0.7H), 3.43-3.95(m, 4H), 2.81-2.95(m, 1H), 1.77-1.99(m, 2H), 1.25(d, J=6.4Hz, 3H), 旋转异构体的混合物; 手性HPLC: 方法Y17, 13.17min。

[0497] 实施例3: 白色固体; 手性HPLC: 方法Y17, 8.11min; >99% e.e.; 99.5:0.5d.r.; 熔点=206 $^{\circ}\text{C}$ 至207 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = +166^{\circ}$ (c=0.05g/100cm 3 , MeOH)。

[0498] 实施例4: 白色固体; 手性HPLC: 方法Y17, 13.17min; >99% e.e.; 99.5:0.5d.r.; 熔点=206 $^{\circ}\text{C}$ 至207 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -156^{\circ}$ (c=0.05g/100cm 3 , MeOH)。

[0499] 实施例1-4的手性HPLC.

[0500] 使用HPLC和手性HPLC方法分析实施例1-4。在单个系统中未观察到这四种异构体的基线分离, 因此使用手性HPLC(方法Y28)来确定对映体纯度, 而使用非手性HPLC(方法E)来确定非对映体比率。

[0501] 本发明的化合物的生物活性

[0502] 缩写:

[0503] TAMRA 羧基四甲基罗丹明

- [0504] PCR 聚合酶链式反应
 [0505] PBS 磷酸盐缓冲盐水
 [0506] EDTA 乙二胺四乙酸
 [0507] Tris 2-氨基-2-(羟基甲基)-1,3-丙二醇
 [0508] NP-40 Nonidet P-40, 辛基苯氧基聚乙氧基乙醇
 [0509] BSA 牛血清白蛋白
 [0510] PNS 周围神经系统
 [0511] BH3 Bcl-2同源性结构域3
 [0512] PTEN 磷酸酶和张力蛋白同系物
 [0513] SDS-PAGE 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
 [0514] DMSO 二甲亚砜
 [0515] YFP 黄色荧光蛋白
 [0516] VME 乙烯基甲基酯
 [0517] HA 血凝素
 [0518] Ahx 氨基己酸

[0519] USP30生化IC₅₀测定

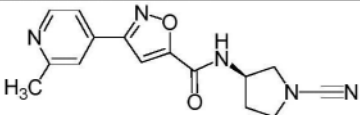
[0520] 在96-孔聚丙烯V形底板(Greiner#651201)中以及在50%DMSO中的21倍终浓度(对于100 μ M的终浓度,2100 μ M)制备稀释板。典型的8点稀释系列终浓度为100、30、10、3、1、0.3、0.1、0.03 μ M。在黑色384孔板(小体积, Greiner 784076)中一式两份进行反应,最终反应体积为21 μ l。将1 μ l的50%DMSO或稀释的化合物添加到板中。将USP30(Boston Biochem#E582)在反应缓冲液(40mM Tris, pH 7.5, 0.005%吐温20, 0.5mg/ml BSA, 5mM β -巯基乙醇)中稀释以达到4nM的最终测定浓度,并且将10 μ l稀释的USP30添加到化合物中。将酶和化合物在室温温育30分钟。通过添加50nM的经由异肽键连接至泛素的TAMRA标记的肽作为荧光偏振底物,启动反应。加入底物并然后在室温温育2小时以后立即读出反应。在Pherastar Plus (BMG Labtech)上进行读出。 λ 激发540nm; λ 发射590nm。

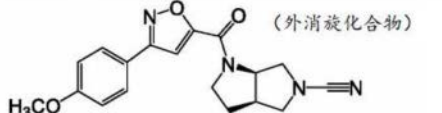
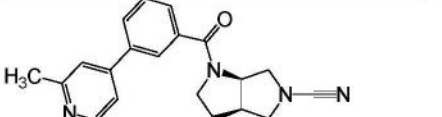
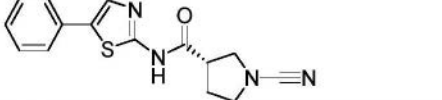
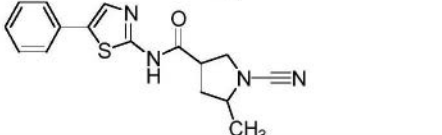
[0521] 示例性化合物在USP30生化IC₅₀测定中的活性:

[0522]	实施例	IC ₅₀ (nM)
	1	11
	2	1078
	3	338
	4	>3000

[0523] 参考实施例

[0524] 示例性化合物在USP30生化IC₅₀测定中的活性:

[0525]	参考实施例	结构	来源	USP30 IC ₅₀ (nM)
	A		WO 2016/156816 实施例 270	270

B	 (外消旋化合物)	WO 2016/156816 实施例 56	70
C		WO 2016/156816 实施例 241	72
D		WO 2016/046530 实施例 1	310
E		WO 2016/046530 实施例 88	4400

[0527] 脱靶药理学

[0528] 对实施例1在Eurofins CEREP SafetyScreen44组中进行药理学特征分析。在10 μ M的单一浓度,在本组中对所有靶标观察到小于50%的结合或酶活性的抑制。由于在该测定中对靶标的低亲和力,实施例1具有脱靶相互作用的低概率。

[0529] 安全性药理学

[0530] 在0.01至30 μ M之间的浓度,在稳定表达的CHO细胞中评价了实施例1对hERG钾通道的影响。实施例1在30 μ M产生了27%的hERG电流振幅的最大抑制值,表明影响QT间期的微小倾向。

[0531] 遗传毒理学

[0532] 在细菌回复突变测定(Ames)和体外微核测定中评估了实施例1。在有和没有外源性代谢活化的情况下进行所有体外试验,使用的浓度不超过受细胞毒性或不溶解性限制的浓度。当在有和没有代谢活化的情况下在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)菌株TA98、TA100、TA1535和TA97a和大肠杆菌(*Escherichia Coli*)菌株WP2uvrA pKM101的回复突变测定中试验高达5000 μ g/板时,实施例1没有诱导突变。

[0533] 使用在TK6细胞中的体外微核测定评估染色体损伤的诱导。当在有外源性代谢活化存在下温育3小时然后恢复27小时,以及当在没有外源性代谢活化存在下温育27小时然后恢复27小时,实施例1对于微核诱导而言是阴性的。

[0534] TOM20-泛素化测定

[0535] 可以用线粒体去极化剂(离子载体(例如CCCP、缬氨霉素)、线粒体复合物抑制剂(寡霉素、抗霉素A))攻击人细胞系来诱导TOM20的泛素化,然后在有USP30抑制剂存在下进一步促进泛素化。随后通过细胞裂解物的蛋白质印迹法评估TOM20泛素化,由于添加的每个泛素分子的8kDa分子量增加,可能检测到TOM20泛素化加合物,从而导致TOM20免疫反应带呈梯状。可以使用梯状免疫反应带的化学发光密度测定法量化TOM20泛素化水平。

[0536] USP30内源性细胞靶标接合测定

[0537] 将稳定地过表达YFP-Parkin的HeLa细胞接种到6孔培养皿中。附着后,将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下用适当浓度的试验化合物或媒介物对照处理1小时。如下制备全细胞裂解物:将细胞刮入冷PBS中,离心,并在裂解缓冲液(50mM Tris-碱,pH 7.5,50mM NaCl,1%NP-40/Igepal CA-630,2mM MgCl₂,10%甘油,5mM β -巯基乙醇,不含EDTA的cOmpleteTM微型片剂

(Roche), PhosStop片剂(Roche))中裂解10分钟。将来自澄清的细胞裂解物的20 μ g蛋白的等同物与最终浓度为2.5 μ M的HA-Ahx-Ahx-Ub-VME探针一起在室温温育。通过添加5x SDS样品负载缓冲液来停止反应,并通过SDS PAGE和蛋白质印迹法分离蛋白。使用抗-USP30绵羊S746D抗体(MRC PPU Reagents and Services)和缀合的兔抗绵羊第二IgG(H+L)辣根过氧化物酶(Thermo#31480)检测USP30,并使用ECL试剂(GE#RPN2109)在GE LAS4000成像仪上显像。通过定量对应于USP30以及与Ub-VME探针结合的USP30的条带来测量靶标接合,并将该比例的表达与媒介物处理的对照进行对比。

[0538] 体外细胞毒性(细胞Tox) :

[0539] 使用alamarBlue™在HCT116人结肠直肠癌细胞中测定作为测定终点。在96小时连续化合物暴露期间测量化合物细胞毒性。

[0540] 进一步研究

[0541] log P:分配系数;亲脂性测量。

[0542] log D:分布系数;亲脂性测量。

[0543] TPSA:拓扑极性表面积。

[0544] 比浊溶解度:将在DMSO中制备的试验化合物溶液稀释到水性缓冲液中。使用比浊法通过在620nm处测量吸光度作为终点。

[0545] FaSSIF:在pH 6.5测量的禁食状态的人工肠液。

[0546] Hep C1小鼠:小鼠细胞中的体外肝细胞清除率。

[0547] Hep C1人:人细胞中的体外肝细胞清除率。

[0548] 血浆 $f_{u,p}$:通过体外平衡透析测定的血浆制品中化合物的游离部分。应当理解,仅未结合的(游离的)化合物能够与靶标接合。

[0549] 脑 $f_{u,br}$:通过体外平衡透析测定的脑匀浆制品中化合物的游离部分。应当理解,仅未结合的(游离的)化合物能够与靶标接合。

[0550] Cl_u :体外清除率。此处所定义的 Cl_u 为缩放清除率(scaled clearance),其又从固有清除率计算。固有清除率是由于肝代谢反应而预测的清除率,由化合物在肝细胞制品中的温育确定。以mL/min/kg为单位的该值越低,化合物越稳定。

[0551] Cl 体内清除率:每单位时间的从中完全除去物质的血浆(或任何基质)的体积的药代动力学测量。以mL/min/kg为单位的该值越低,化合物越稳定。

[0552] 口服F:口服生物利用度。

[0553] MDR1-MDCK(Madin-Darby犬肾细胞单层)(体外)通量测定。

[0554] WT-MDCK(野生型)体外通量。

[0555] Kp_{uu} 为脑中未结合的药物与血浆中未结合的药物之比,并且可以指示治疗外周适应症和/或CNS适应症的潜力。

[0556]	研究	实施例 1	
	细胞 TE WB	内源性 USP30 EC ₅₀ (μM)	0.026
	细胞 Tox	HCT116 EC ₅₀ (μM)	> 30
	物理化学	在 pH 7.4 测量的 Log D	1.4
		TPSA	110
		比浊溶解度(μM)	65
肝细胞 Cl 小鼠	在 pH 6.5 测量的 FaSSIF (μM)	488	
	缩放 Cl _u (mL/min/kg)	40	

[0557]	肝细胞 Cl 人	缩放 Cl _u (mL/min/kg)	18
	稳定性	小鼠血浆 t _{1/2} (min)	> 120
	MDR1-MDCK	有效外流比	3.2
	WT-MDCK	外流比, A-B P _{app} 通量(10 ⁻⁶ cm/s)	0.8, 16

[0558]	研究	实施例 1	
	结合小鼠	血浆 f _{u,p} /脑 f _{u,br}	0.14/0.30
	PK 小鼠 2 mg/kg 静脉内	Cl 血浆(mL/min/kg)	19
	PK 小鼠 10 mg/kg	口服 F (%)	87
	TOM20-Ub 1.5 倍增益	抗霉素 A/寡霉素线粒体自噬触发 EC1.5x (μM)	0.010
	未结合的血浆 C _{max} /TOM20-Ub 细胞效能(10 mg/kg 口服剂量-小鼠)		292
	小鼠和大鼠 PK 微透析 30 mg/kg 口服	小鼠 K _{puu} (PFC _u /血浆 _u)	0.90
		小鼠 PFC _u /细胞 TOM20-Ub	125 倍
		大鼠 K _{puu} (PFC _u /血浆 _u)	0.43
		小鼠 PFC _u >9x 细胞 TOM20-Ub	0.5 h 至 > 6 h
	大鼠 PFC _u >9x 细胞 TOM20-Ub	0.75 h 至 2.25 h	
狗 PK 30 mg/kg 口服	K _{puu} (CSF/血浆 _u)	0.41	

[0559] 实施例1具有证明相对于其它化合物的潜在优势的有益性能。例如,如在小鼠中测量的,观察到的19mL/min/kg的静脉内血浆清除率很低,证明了有价值的血浆稳定性,并且该化合物具有87%的出色口服生物利用度。

[0560] 实施例1在口服给药后显示出在体内的高CNS分布,如通过在小鼠和大鼠中30mg/kg给药后对脑区域的微透析取样所确定的。在给药后数小时内观察到实施例1的高未结合浓度,导致在CNS中靶标覆盖的适当估计持续时间。此外,当以30mg/kg口服给药给狗时,实施例1表现出向脑脊髓液(CSF)的高分配。

	化合物	实施例 1	参考实 施例 A	参考实 施例 B	参考实 施例 C	
[0561]	DUB IC ₅₀ (μM)	USP30	0.011	0.27	0.070	0.072
	DUB	USP2、USP6、USP10、	24.9-107.2	0.90-59.4	0.54-38.8	4.0-92.4
	IC ₅₀ (μM)	USP16、USP21、 USP25、USP28				
	相对于 7 种 DUB 对 USP30 的 DUB 选择性偏好	> 2260	3.3-220	7.7-554	56-1283	
[0562]	组织蛋白 酶 IC ₅₀ (μM)	组织蛋白酶 B	205.1	4.1	1.4	1.2
		组织蛋白酶 K	109.9	0.54	16.2	0.44
		组织蛋白酶 L	42.1	2.1	1.8	1.3
		组织蛋白酶 S	259.6	20.2	9.2	22.8
		组织蛋白酶 V	247.5	9.1	2.3	18.5
		B、K、L、S、V	≥42.1	0.54-20.2	1.8-16.2	0.44-22.8
	相对于组织蛋白酶对 USP30 的选择性偏好	> 3800	2-75	20-231	6.1-317	
	肝细胞 Cl 小鼠	缩放 Cl _u (mL/min/kg)	40	92	> 121	108
	稳定性	小鼠血浆 t _{1/2} (min)	> 120	63	21	16
	化合物	实施例 1	参考实 施例 D	参考实 施例 E		
[0563]	DUB IC ₅₀ (μM)	USP30	0.011	0.31	4.4	
		UCHL1	> 300	0.25	6.8	
	相对于 UCHL1 对 USP30 的 DUB 选择性偏好	> 27000	0.8	1.5		

[0564] 对比数据

[0565] 参考实施例A、B、C、D和E是已知的DUB抑制剂,它们已经被鉴定为具有USP30抑制剂的活性并且与本发明的化合物具有一些结构相似性,具有氰胺结构特征。在W0 2016/046530中公开了参考实施例D和E具有UCHL1抑制活性。

[0566] 与参考实施例A、B和C相比,实施例1显示出显著提高的肝细胞代谢稳定性(如在小鼠肝细胞中测量的)。与参考实施例A、B和C相比,实施例1显示出显著提高的血浆稳定性(至少2-8倍,如在小鼠血浆中测量的)。

[0567] 对USP30的效能

[0568] 如在生化测定中测量的,本发明的实施例1对USP30的效能显著高于参考实施例A、B、C、D和E。实施例1是参考实施例B和C的效能的6倍以上,是参考实施例A和D的效能的24倍以上,并且是参考实施例E的效能的400倍。

[0569] 相对于其它DUB对USP30的选择性

[0570] 所提供的数据证实,与参考实施例A、B和C相比,实施例1相对于七种DUB (USP2、

USP6、USP10、USP16、USP21、USP25和USP28)对USP30显著更具有选择性。实施例1对USP30的效能是对七种DUB中的每一种的效能的2260倍以上。这是相对于参考实施例A和B的显著选择性优势,参考实施例A和B对USP30的效能分别是对七种DUB中的每一种的效能的低至3.3倍和7.7倍。参考实施例C比A和B更具选择性,但对USP30的效能是对另一种DUB的效能的56倍,但仍明显不如实施例1。

[0571] 相对于UCHL1对USP30的选择性

[0572] 所提供的数据证实,与参考实施例D和E相比,实施例1相对于UCHL1对USP30显著更具有选择性。实施例1对USP30的效能是对UCHL1的效能的27000倍以上,而参考实施例D和对USP30的效能分别仅是对UCHL1的效能的0.8倍和1.5倍。

[0573] 相对于组织蛋白酶B、K、L、S和V对USP30的选择性

[0574] 所提供的数据证实,与参考实施例A、B和C相比,实施例1相对于组织蛋白酶(B、K、L、S和V)对USP30显著更具有选择性。实施例1对USP30的效能是对每种组织蛋白酶的效能的3800倍以上。与参考实施例A、B和C相比,这是一个显著的选择性优势。

[0575] 具体而言,实施例1对USP30的效能是对组织蛋白酶B的效能的18000倍以上,与此相比,参考实施例B和C对USP30的效能分别仅是对组织蛋白酶B的效能的20倍和16.7倍。实施例1对USP30的效能是对组织蛋白酶K的效能的9900倍以上,与此相比,参考实施例A和C对USP30的效能分别仅是对组织蛋白酶K的效能的2倍和6.1倍。

[0576] 本发明的实施例1相对于现有技术的参考实施例的如上所鉴定的优点是显著的和意料之外的。就其本身且尤其是组合而言,这种优势使所述化合物特别适用于治疗或预防与USP30活性相关的疾病。

[0577] 临床前体内模型

[0578] 使用来自公开的文献的标准研究程序,可以试验本发明的化合物在代表性体内疾病模型中的效力,所述标准研究程序包括、例如:

[0579] (a) 博来霉素诱导的肺纤维化模型,这是一种主要的特发性肺纤维化的临床前体内模型。[Kobayashi等人,2016,J Immunol,197(2):504-516]。

[0580] (b) 饮食诱导的NAFLD和葡萄糖稳态模型。[Nishida等人,2013,Lab Invest;2月;93(2):230-41]。

[0581] (c) 帕金森病的MPTP模型,这是一种常用的范例,用于观察由化学地诱导的线粒体功能障碍引发的脑的多巴胺能系统中的神经变性。[Karuppagounder等人,2014,Sci Rep.2014年5月2日;4:4874]。

[0582] (d) Ndufs4KO利氏综合征模型。[Kruse等人,2008,Cell Metab.4月;7(4):312-20]。

[0583] (e) 年老啮齿动物模型:对海马、认知和运动功能的影响。[Kobilo等人,2014,Learn Mem.Jan 17;21(2):119-26;Creed等人,2019,Neuroscience.Jun 15;409:169-179;Van Skike等人,2020,Aging Cell.19:e13057]。

[0584] 年老的啮齿动物会自然发展海马神经变性,从而支持认知能力的生化和功能变化。考虑到神经元中作为线粒体能量产生的一部分的谷氨酰胺利用之间的密切关系,谷氨酰胺/谷氨酸轴(glutamine/glutamate axis)可以作为海马健康的替代指标。

[0585] (f) 单侧输尿管阻塞性肾脏疾病模型(UUO)。[Chevalier等人,2009,Kidney Int

75(11):1145-1152]。

[0586] UUO造成以肾小管细胞损伤、间质性炎症和纤维化为特征的肾损伤。它用作不可逆的肾后性急性肾损伤(AKI)的模型。实验性UUO已经阐明了细胞凋亡、炎症和纤维化的分子机制,所有这些都是肾损伤中的关键过程,无论原发性损伤如何。因此,UUO模型为研究人员提供了除阻塞之外的信息(Chevalier等人,2009,Kidney Int 75(11):1145-1152)。

[0587] 在UUO模型中评估了实施例1,以确定该化合物减轻进行性小管间质性纤维化和慢性肾脏疾病(CKD)的能力。

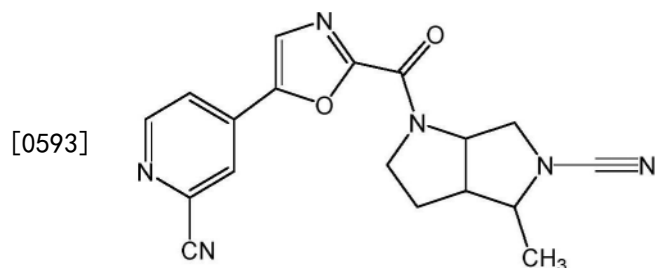
[0588] 在研究的第1天,给成年C57BL/6小鼠根据下述给药施用方案之一通过经口管饲法给药;媒介物、1.5或5mg/kg实施例1(口服)每天2次。在第1天在给药后2小时,研究小鼠接受手术以在两个点结扎左输尿管。随后通过观察肾积水引起的肾盂膨胀证实成功的UUO手术。根据它们的规定方案对动物给药10天,在该时间点收获肾脏,或进行组织病理学评估和蛋白/RNA评估。进行了天狼猩红染色以评估胶原沉积的程度,并采用IHC评估相对 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达。

[0589] 结果表明,每天2次给药的1.5和5mg/kg实施例1(口服)在统计学上减少了胶原沉积,如在结扎的肾脏中减少的天狼猩红染色所证实的。 α -SMA染色的评估表明,当与媒介物处理的对照组对比时,每天2次1.5mg/kg实施例1的口服给药导致UUO损伤的肾中的 α -SMA水平的统计学降低。

[0590] (g) 双侧肾蒂钳夹可以诱导AKI,导致缺血再灌注损伤(IRI),导致肾功能严重丧失、肾小管损伤和炎症[Lu等人.2012.J Nephrol.25(5):738-45]。

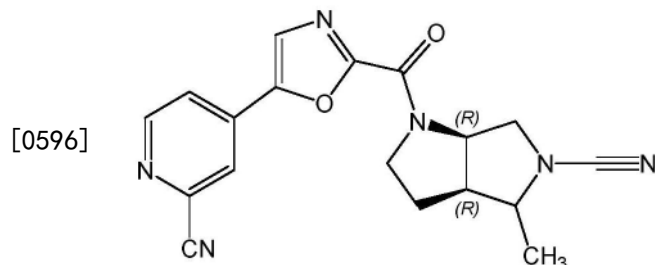
[0591] 本发明的段落

[0592] 1.式(I)的化合物:



[0594] 或其药学上可接受的盐。

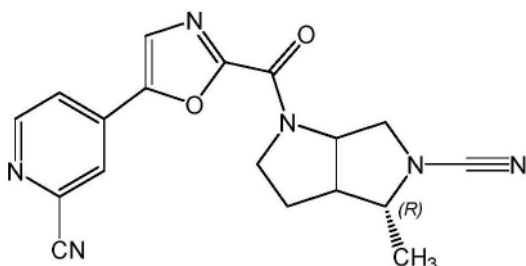
[0595] 2.根据段落1的化合物,其具有式(IA):



[0597] 或其药学上可接受的盐。

[0598] 3.根据段落1的化合物,其具有式(IB):

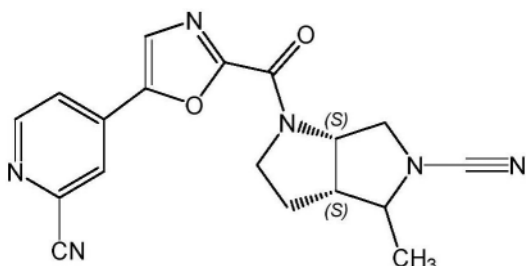
[0599]



[0600] 或其药学上可接受的盐。

[0601] 4. 根据段落1的化合物,其具有式(IC):

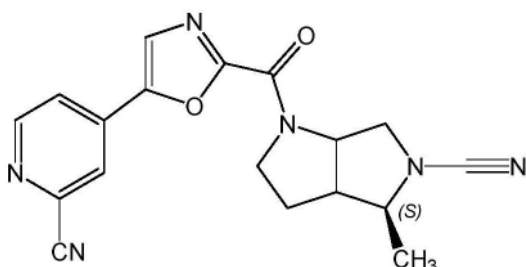
[0602]



[0603] 或其药学上可接受的盐。

[0604] 5. 根据段落1的化合物,其具有式(ID):

[0605]



[0606] 或其药学上可接受的盐。

[0607] 6. 根据段落1的化合物,其选自:

[0608] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0609] (3aS,4S,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0610] (3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0611] (3aS,4R,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0612] (3aR,4R,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0613] (3aS,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0614] (3aR,4S,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;和

[0615] (3aS,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-

b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0616] 或其药学上可接受的盐。

[0617] 7. 根据段落6的化合物,其选自:

[0618] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0619] (3aS,4S,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0620] (3aR,4S,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;和

[0621] (3aS,4R,6aS)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0622] 或其药学上可接受的盐。

[0623] 8. 根据段落7的化合物,其为:

[0624] (3aR,4R,6aR)-1-(5-(2-氰基吡啶-4-基)噁唑-2-羰基)-4-甲基六氢吡咯并[3,4-b]吡咯-5(1H)-甲腈;

[0625] 或其药学上可接受的盐。

[0626] 9. 根据段落1-8中的任一段的化合物或其药学上可接受的盐,用于用作药物。

[0627] 10. 根据段落1-8中的任一段的化合物或其药学上可接受的盐,用于治疗或预防涉及线粒体功能障碍的病症、癌症或纤维化。

[0628] 11. 根据段落1-8中的任一段的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防涉及线粒体功能障碍的病症、癌症或纤维化。

[0629] 12. 一种用于治疗或预防涉及线粒体功能障碍的病症、癌症或纤维化的方法,所述方法包含给有此需要的患者施用有效量的根据段落1-8中的任一段的化合物或其药学上可接受的盐的步骤。

[0630] 13. 根据段落10-12的化合物、用途或方法,其中所述涉及线粒体功能障碍的病症选自:CNS障碍;神经变性疾病;帕金森病;阿尔茨海默氏病;肌萎缩性侧索硬化;亨廷顿病;缺血;中风;路易体痴呆;额颞叶痴呆;多发性硬化;线粒体脑病、乳酸性酸中毒和中风样发作综合征;母系遗传性糖尿病和耳聋;莱伯遗传性视神经病变;神经病、共济失调、视网膜色素变性-母系遗传性利氏综合征;Danon病;糖尿病;糖尿病性肾病;代谢障碍;心力衰竭;导致心肌梗死的缺血性心脏病;精神病学疾病、精神分裂症;多种硫酸酯酶缺乏症;黏脂贮积症II;黏脂贮积症III;黏脂贮积症IV;GM1-神经节苷脂贮积病;神经元蜡样质-脂褐质沉积症;阿尔珀斯病;巴思综合征; β -氧化缺乏症;肉碱-酰基-肉碱缺乏症;肉碱缺乏症;肌酸缺乏综合征;辅酶Q10缺乏症;复合体I缺乏症;复合体II缺乏症;复合体III缺乏症;复合体IV缺乏症;复合体V缺乏症;COX缺乏症;慢性进行性眼外肌麻痹综合征;CPT I缺乏症;CPT II缺乏症;戊二酸尿症II型;卡恩斯-塞尔综合征;乳酸性酸中毒;长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;利氏病或综合征;利氏综合征法国-加拿大变体;致死性婴儿心肌病;勒夫特病;中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;肌阵挛型癫痫和破碎红纤维综合征;线粒体细胞病;线粒体隐性共济失调综合征;线粒体DNA耗竭综合征;肌神经胃肠道障碍和脑病;皮尔逊综合征;丙酮酸脱氢酶缺乏症;丙酮酸羧化酶缺乏症;POLG突变;中/短链3-羟基酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;极

长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;过氧化物酶体障碍;甲基丙二酸血症;甲羟戊酸激酶缺乏症;年龄依赖性的认知功能和肌肉强度下降;以及与所有神经变性和神经精神病学障碍相关的认知损害。

[0631] 14. 根据段落13的化合物、用途或方法,其中所述神经变性疾病选自帕金森病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿病、缺血、中风、路易体痴呆、多系统萎缩、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、额颞叶痴呆;和与 α -突触核蛋白、parkin、PINK1、GBA和LRRK2中的突变有关的帕金森病,以及常染色体隐性的青少年帕金森病或早发型帕金森病(EOPD),其中parkin或PINK1被突变、截短或删除。

[0632] 15. 根据段落13的化合物、用途或方法,其中所述神经变性疾病是利氏综合征或病、X-连锁的利氏病、利氏综合征法国-加拿大变体和/或与利氏病相关的症状。

[0633] 16. 根据段落10-12的化合物、用途或方法,其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌、脑癌、黑素瘤、骨癌、肝癌、软组织癌、组织器官癌、血细胞癌、CML、AML、套细胞淋巴瘤、神经母细胞瘤、黑素瘤、软组织肉瘤、脂肪肉瘤、成纤维细胞肉瘤、平滑肌肉瘤、肝细胞癌、骨肉瘤、食道癌、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、转移性癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、鼻咽癌、结肠直肠癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、其中细胞凋亡途径失调的癌症和其中BCL-2家族的蛋白发生突变或过表达或表达不足的癌症。

[0634] 17. 根据段落10-12的化合物、用途或方法,其中所述纤维化选自与在创伤、炎症、组织修复、免疫反应、细胞增生和瘤形成以后发生的细胞外基质组分的积累相关的纤维化或纤维化障碍。

[0635] 18. 根据段落17的化合物、用途或方法,其中所述纤维化选自与主要器官疾病相关的纤维化或纤维化障碍、纤维增生性障碍和与创伤相关的瘢痕形成。

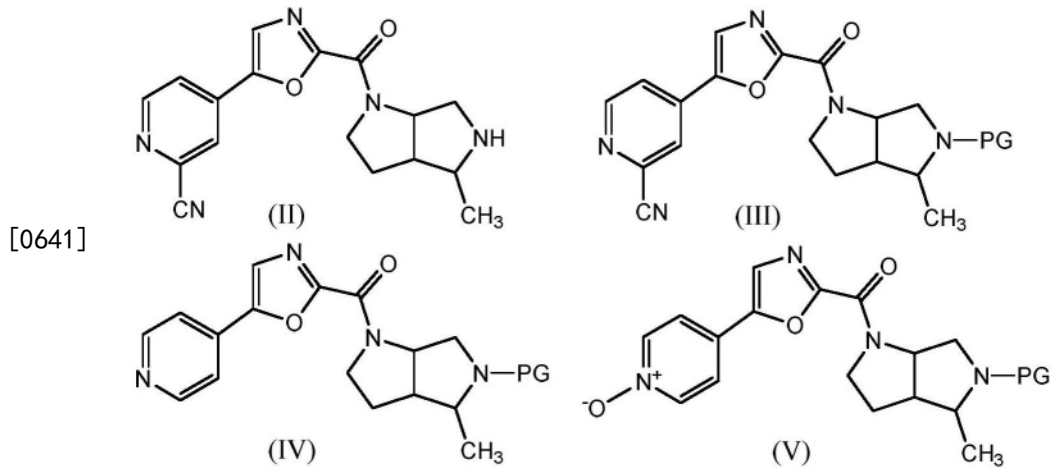
[0636] 19. 根据段落18的化合物、用途或方法,其中所述纤维化选自与间质性肺病、肝硬化、非酒精性脂肪肝病、非酒精性脂肪肝病和非酒精性脂肪性肝炎、肾脏疾病、急性肾脏疾病、急性肾损伤、慢性肾脏疾病、移植肾功能延迟、心脏或血管疾病、眼部疾病相关的纤维化或纤维化障碍,全身和局部硬皮病,瘢痕疙瘩,肥厚性瘢痕,动脉粥样硬化,再狭窄,迪皮特朗氏挛缩,外科手术并发症,化疗药物诱导的纤维化,辐射诱导的纤维化,意外损伤和烧伤,腹膜后纤维化,和腹膜纤维化/腹膜瘢痕形成。

[0637] 20. 根据段落19的化合物、用途或方法,其中所述与间质性肺病相关的纤维化选自结节病、硅沉着病、药物反应、感染、胶原血管病、类风湿性关节炎、系统性硬化症、硬皮病、肺纤维化、特发性肺纤维化、普通型间质性肺炎、间质性肺病、隐源性致纤维性肺泡炎、闭塞性细支气管炎和支气管扩张。

[0638] 21. 根据段落19的化合物、用途或方法,其中所述肾脏疾病是急性肾脏疾病、急性肾损伤或慢性肾脏疾病。

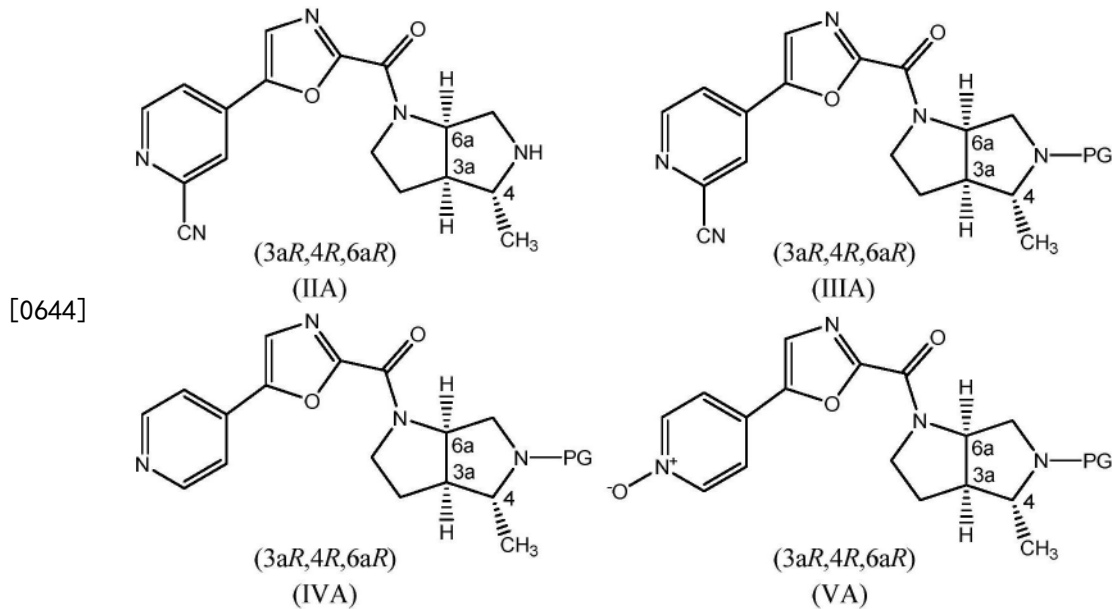
[0639] 22. 一种药物组合物,其包含根据段落1-8中的任一段的化合物或其药学上可接受的盐、以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0640] 23. 选自式(II)、(III)、(IV)和(V)的化合物:



[0642] 或所述化合物的盐；且其中PG是保护基，其优选地选自叔丁基氧基羰基、苄氧基羰基、对甲氧基苄基羰基、9-苄基甲氧羰基、乙酰基、苯甲酰基、苄基、氨基甲酸酯、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、对甲氧基苄基、甲苯磺酰基、三氯乙氧基羰基、4-硝基苯磺酰基和2-硝基苯基次磺酰基。

[0643] 24. 根据段落23的化合物，其选自式 (IIA)、(IIIA)、(IVA) 和 (VA)：



[0645] 或所述化合物的盐。