



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103200950 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201180037305. 4

(22) 申请日 2011. 06. 06

(30) 优先权数据

10165550. 4 2010. 06. 10 EP

11158464. 5 2011. 03. 16 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2013. 01. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/059300 2011. 06. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/154359 DE 2011. 12. 15

(73) 专利权人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 H-G·莱尔臣

B·斯泰尔特-路德维希

S·戈尔费亚 J·舒马赫

U·科兰兹

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 朱黎明

(51) Int. Cl.

A61K 38/08(2006. 01)

C07K 7/02(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 9618408 A1, 1996. 06. 20,

WO 9935164 A1, 1999. 07. 15,

US 2006275211 A1, 2006. 12. 07,

审查员 宋梦

权利要求书15页 说明书78页

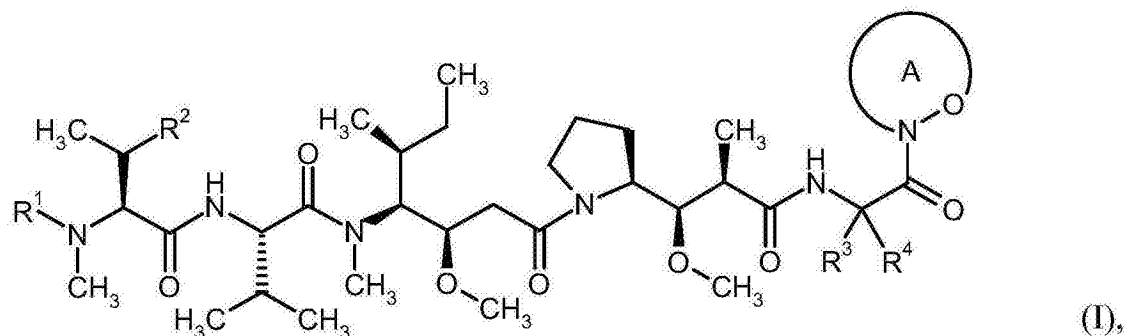
(54) 发明名称

新颖的耳他汀衍生物及其用途

(57) 摘要

本申请涉及新颖的单甲基耳他汀 F 的衍生物, 涉及制备这些衍生物的方法, 涉及这些衍生物用于治疗 and / 或预防疾病的用途, 以及还涉及这些衍生物用于制备治疗和 / 或预防疾病的药物的用途, 所述疾病更具体而言是过度增殖性疾病和 / 或血管新生性疾病, 例如癌性疾病。此类治疗可以单一治疗的形式或者与其它药物或进一步治疗性措施联用来实施。

1. 式 (I) 的化合物, 及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物



式中

R^1 表示氢、 (C_1-C_6) -烷基或式 Q^1-L^1-* 或 Q^2-L^2-* 的基团, 其中,

* 表示与氮原子相连的连接点;

Q^1 表示羟基羰基或 (C_1-C_4) -烷氧基羰基;

L^1 表示直链 (C_1-C_{12}) -烷二基, 其中两个碳原子可以以 1, 2 位、1, 3 位或 1, 4 位桥连的形式彼此连接, 与位于所述两个碳原子之间的任意碳原子一起形成苯环;

Q^2 表示羟基或氨基;

以及

L^2 表示直链 (C_2-C_{12}) -烷二基;

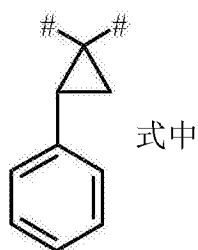
R^2 表示甲基或羟基;

R^3 表示氢或甲基;

R^4 表示异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、苯基、苄基、4-羟基苄基、4-羟基-3-硝基苄基、1-苯基乙基、二苯基甲基、1H-咪唑-4-基甲基或 1H-吡唑-3-基甲基;

或者

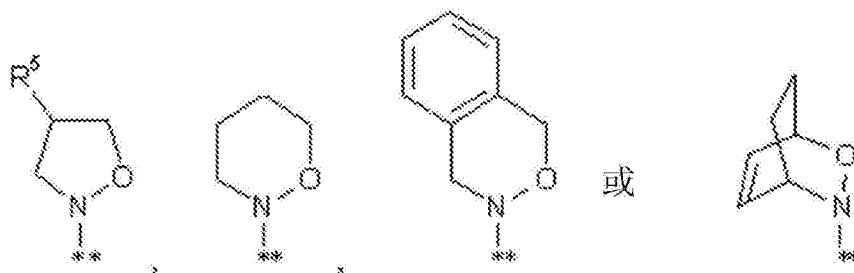
R^3 和 R^4 以及与两者都相连的碳原子一起形成下式结构的 2-苯基-环丙烷-1, 1-二基基团:



表示与所述分子的其它部分相连的连接点;

以及

包含有 N-O 基团的环 A 表示单环或双环的任选取代的具有下式结构的杂环:



式中

** 表示与羰基相连的连接点 ; 和

R^5 表示氢、羟基或苄氧基。

2. 如权利要求 1 所述的式 (I) 的化合物及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物, 其特征在于,

R^1 表示氢、 (C_1-C_4) -烷基或式 Q^1-L^1-* 或 Q^2-L^2-* 的基团, 其中,

* 表示与氮原子相连的连接点 ;

Q^1 表示羟基羰基或 (C_1-C_4) -烷氧基羰基 ;

L^1 表示直链 (C_1-C_{12}) -烷二基, 其中, 两个碳原子可以以 1, 3 位或 1, 4 位桥连的形式彼此连接, 与位于所述两个碳原子之间的一个或两个碳原子一起形成苯环 ;

Q^2 表示羟基或氨基 ;

以及

L^2 表示直链 (C_2-C_{12}) -烷二基 ;

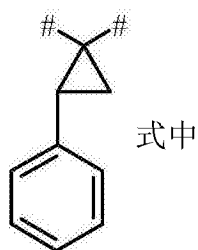
R^2 表示甲基或羟基 ;

R^3 表示氢 ;

R^4 表示苄基、4-羟基苄基、1-苯基乙基或 1H-吡啶-3-基甲基 ;

或者

R^3 和 R^4 以及与两者都相连的碳原子一起形成下式结构的 2-苯基-环丙烷-1, 1-二基基团 :

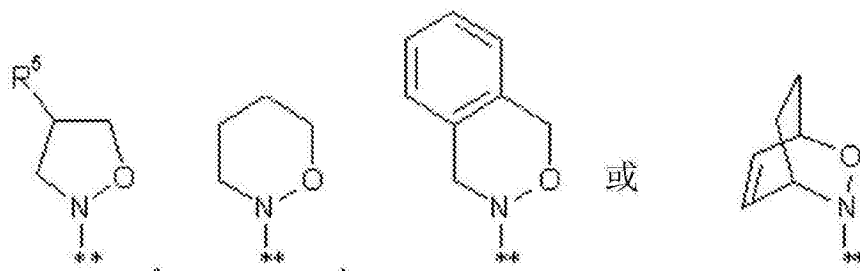


式中

表示与所述分子的其它部分相连的连接点 ;

以及

包含有 N-O 基团的环 A 表示单环或双环的任选取代的具有下式结构的杂环 :



式中

** 表示与羰基相连的连接点；

以及

R^5 表示氢、羟基或苄氧基。

3. 如权利要求 1 所述的式 (I) 的化合物及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物, 其特征在于,

R^1 表示氢、甲基或式 Q^1-L^1-* 或 Q^2-L^2-* 的基团, 其中,

* 表示与氮原子相连的连接点；

Q^1 表示羟基羰基、甲氧基羰基或乙氧基羰基；

L^1 表示直链 (C_1-C_6) - 烷二基, 其中, 两个碳原子可以以 1, 4 位桥连的形式彼此连接, 与位于所述两个碳原子之间的两个碳原子一起形成苯环；

Q^2 代表羟基或氨基；

以及

L^2 表示直链 (C_2-C_6) - 烷二基；

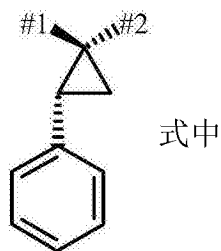
R^2 表示甲基；

R^3 表示氢；

R^4 表示苄基、1- 苯基乙基或 1H- 吡啶 -3- 基甲基；

或者

R^3 和 R^4 以及与两者都相连的碳原子一起形成下式结构的 (1S, 2R)-2- 苯基环丙烷 -1, 1- 二基基团：



式中

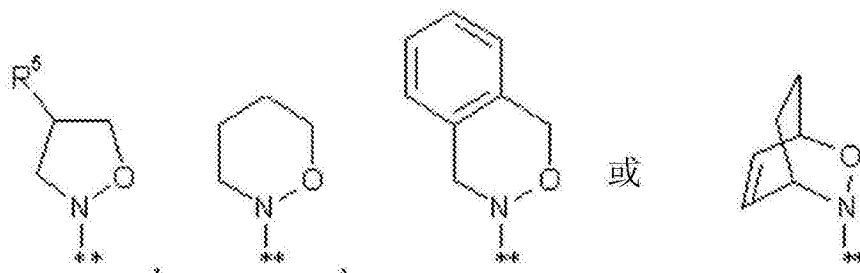
#1 表示与相邻氮原子相连的连接点；

以及

#2 表示与羰基相连的连接点；

以及

包含有 N-O 基团的环 A 表示单环或双环的任选取代的具有下式结构的杂环：



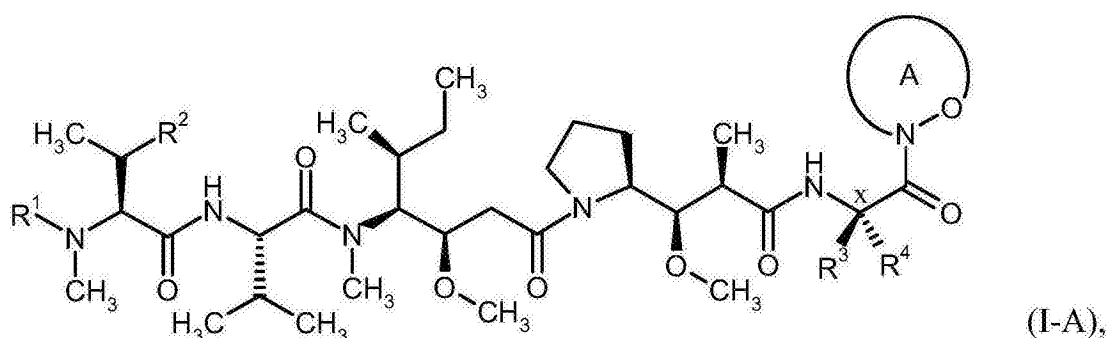
式中

** 表示与羰基相连的连接点；

以及

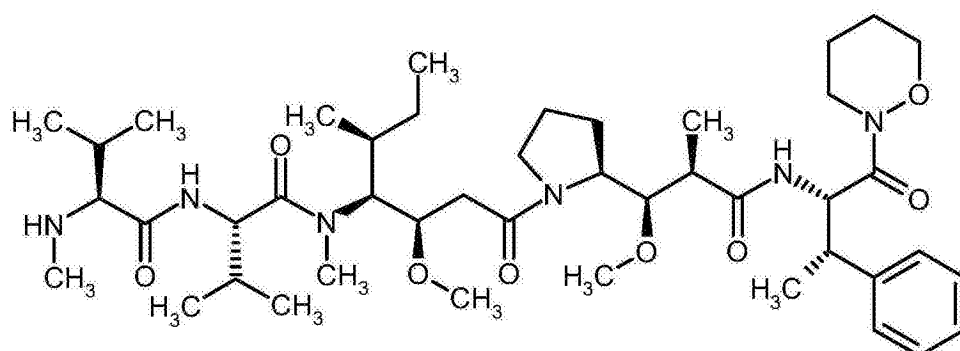
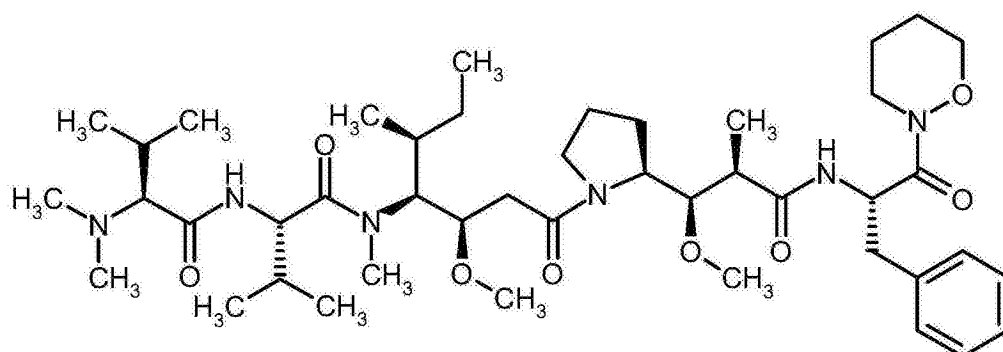
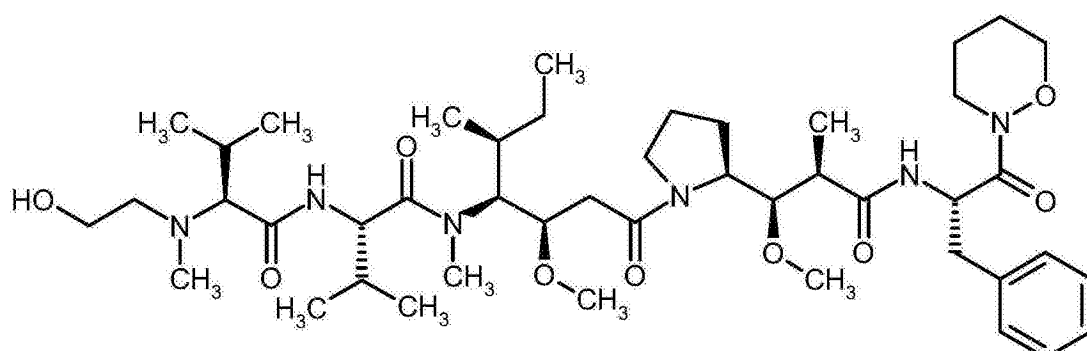
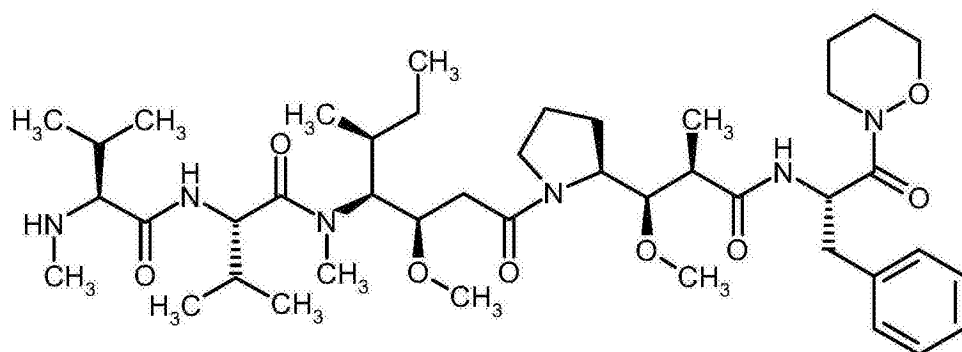
R^5 表示氢、羟基或苄氧基。

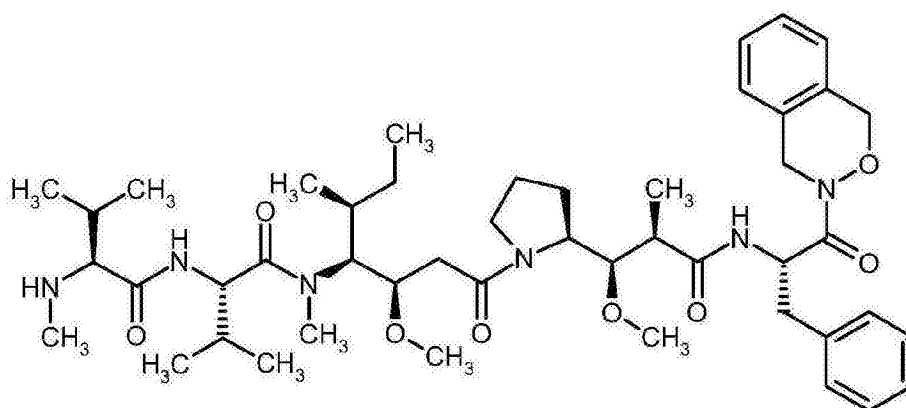
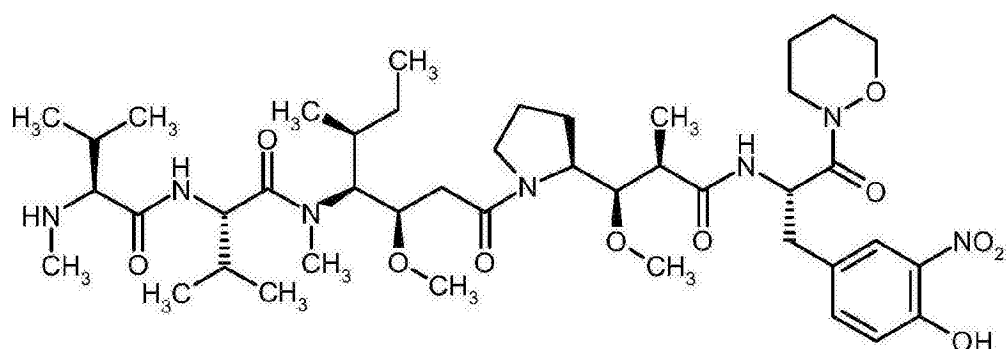
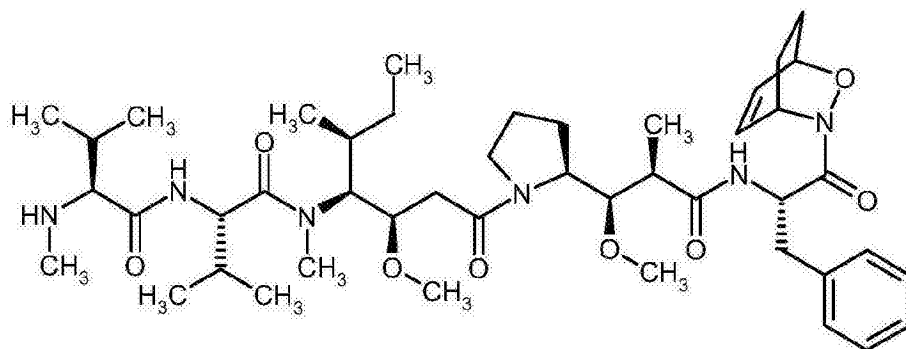
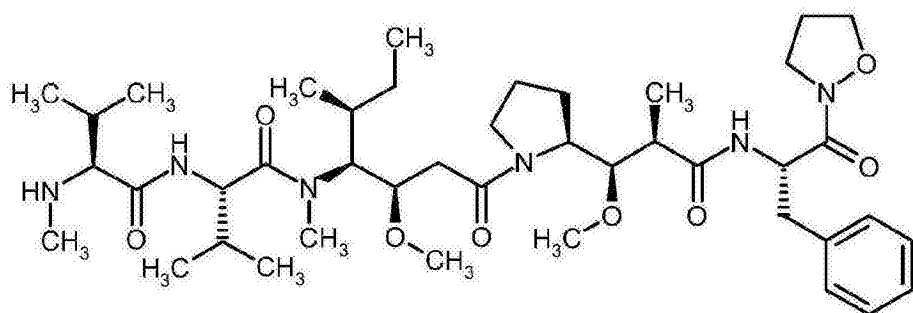
4. 如权利要求 1 所述的化合物及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物, 所述化合物具有式 (I-A) 的结构,

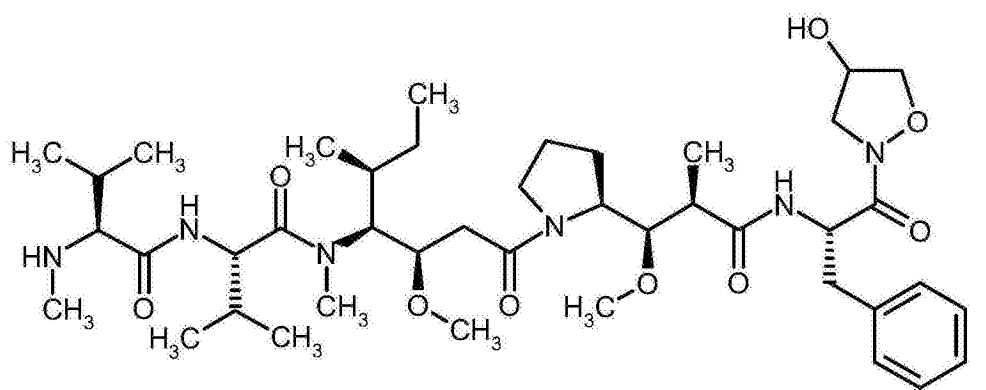
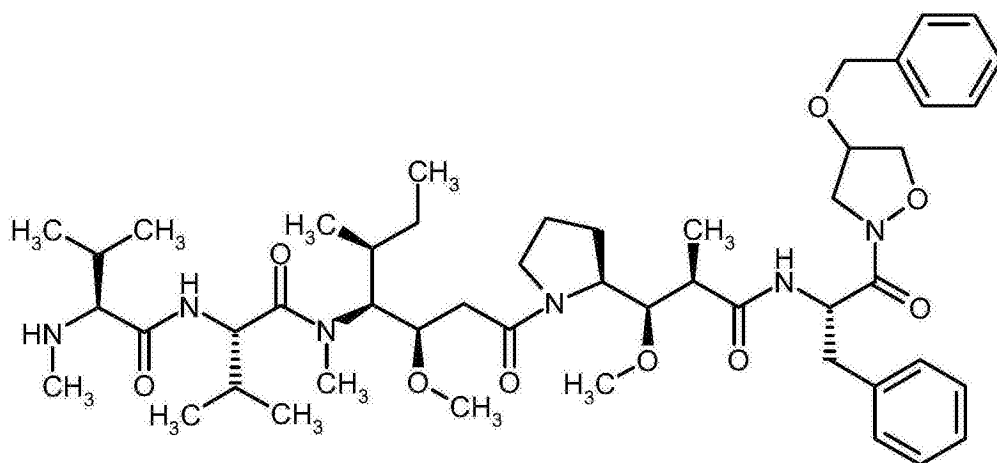
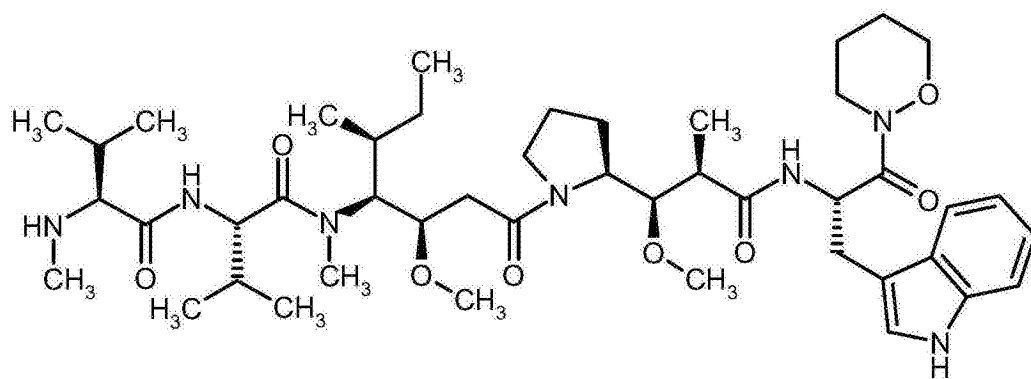


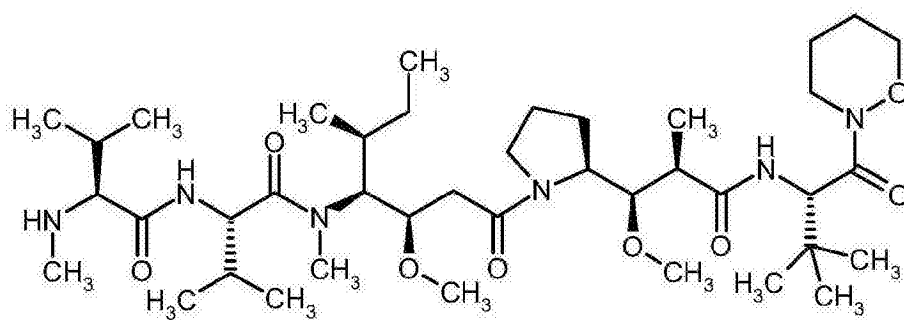
式中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和环 A 具有权利要求 1 所定义的含义, 并且带有基团 R^3 和 R^4 的 C^x 碳原子具有所示的 S 构型。

5. 如权利要求 1 所述的化合物, 及其盐或溶剂合物, 其特征在于, 所述化合物是选自下组的化合物:

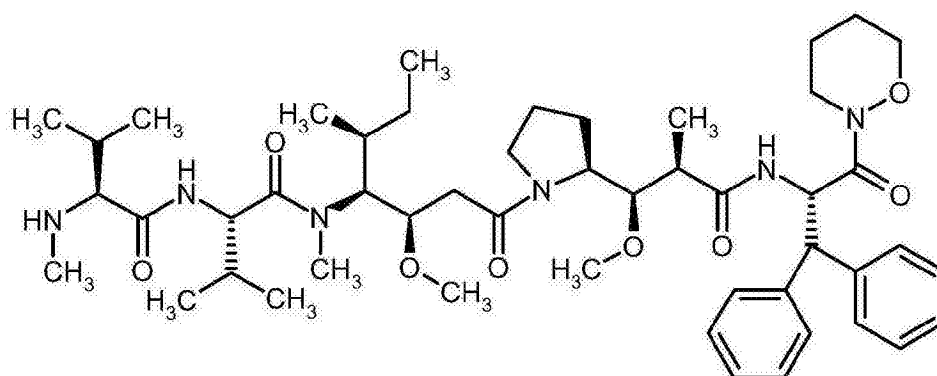




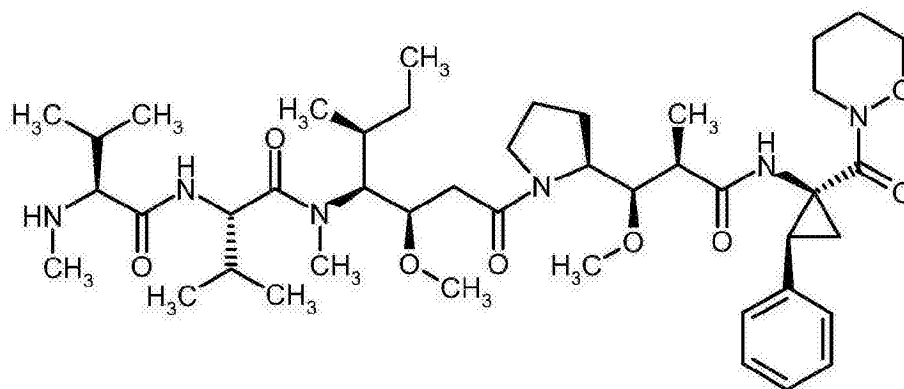




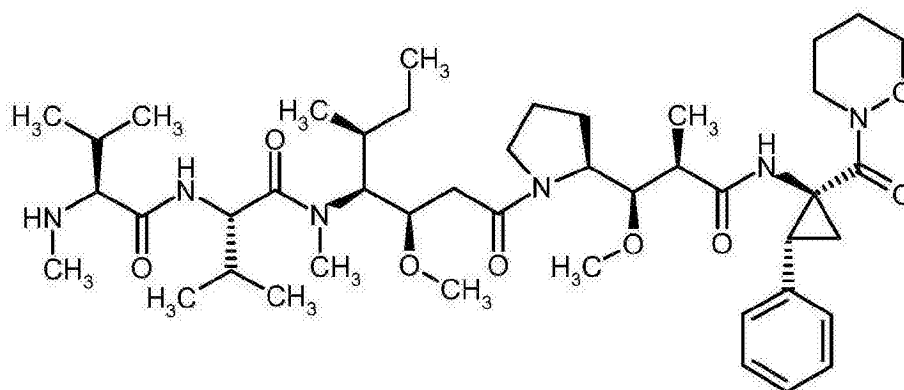
,



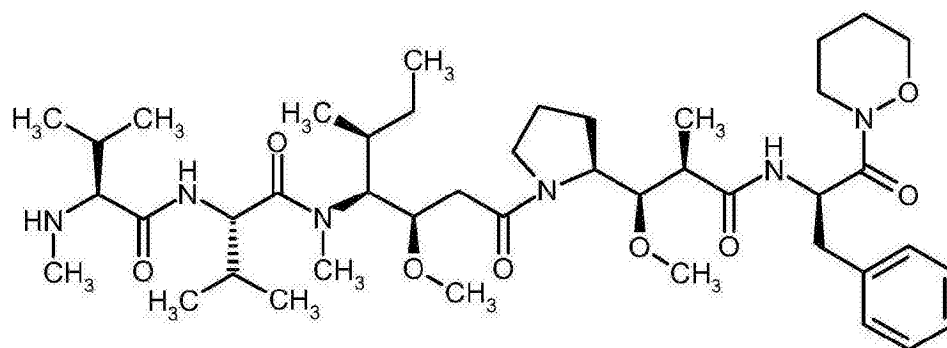
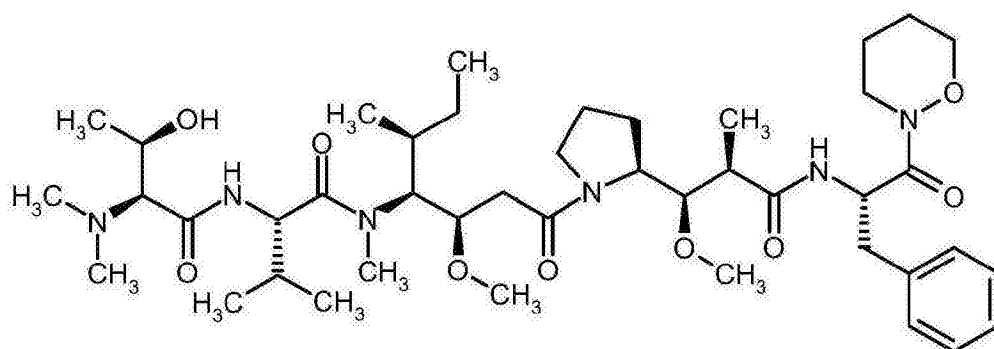
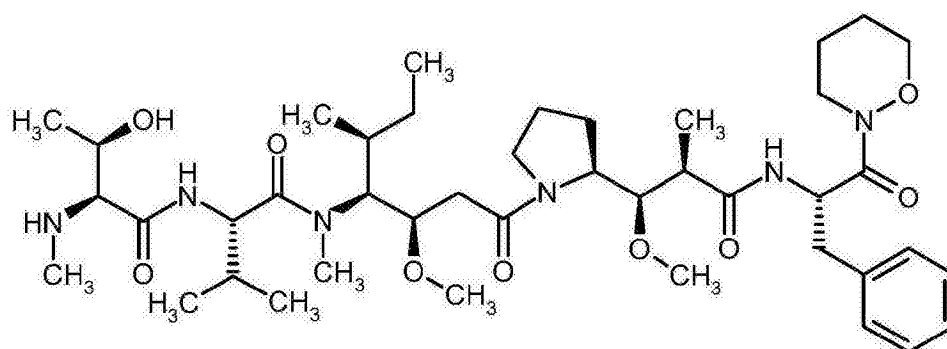
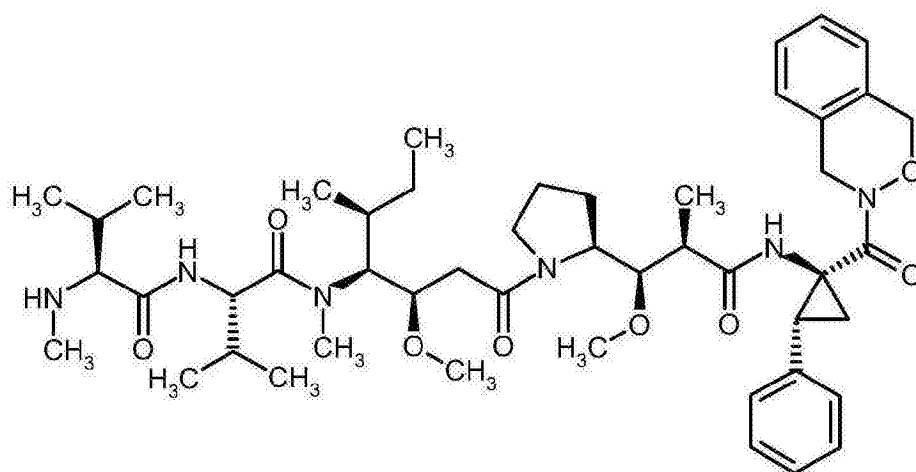
,

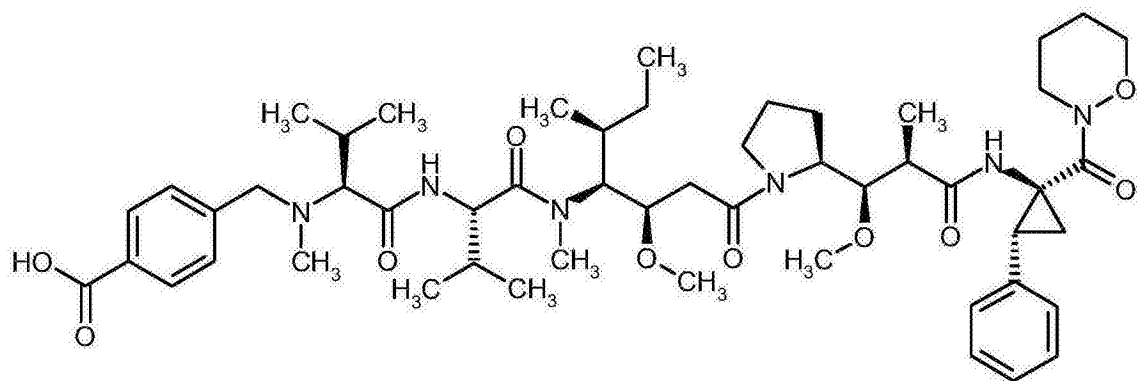
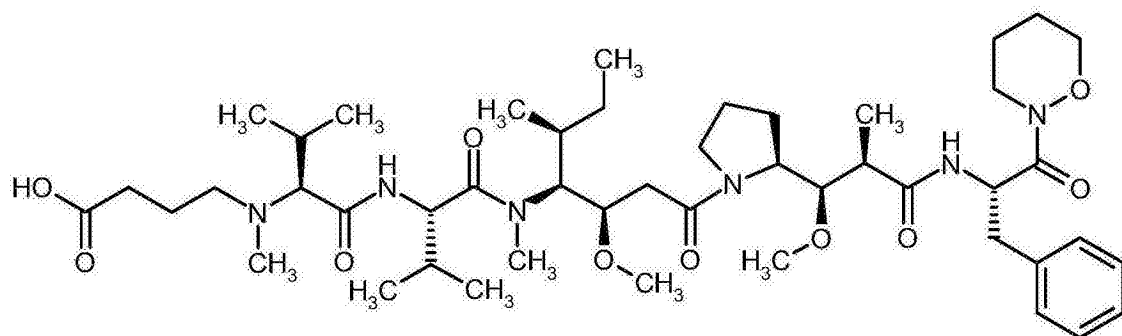
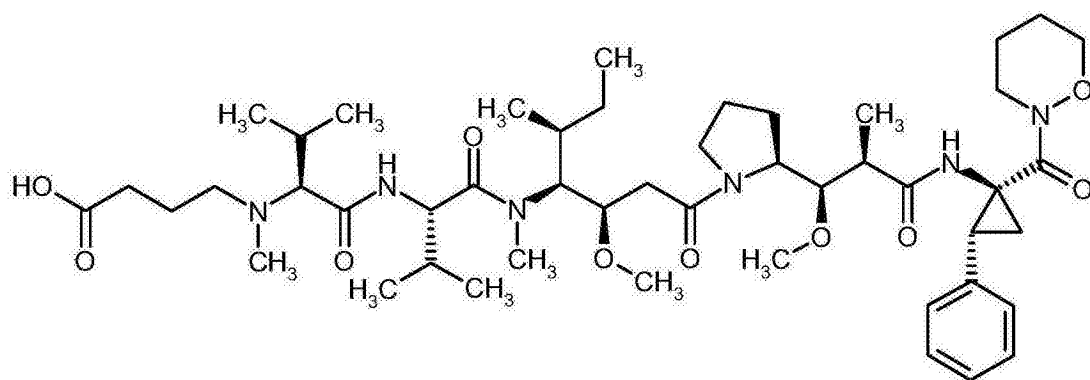
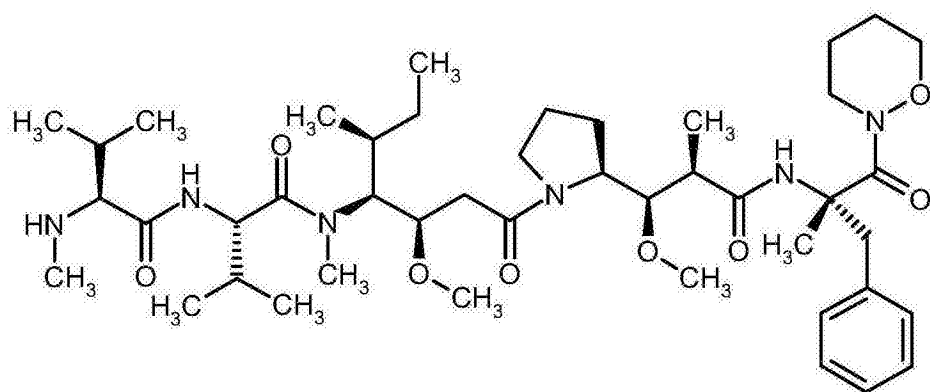


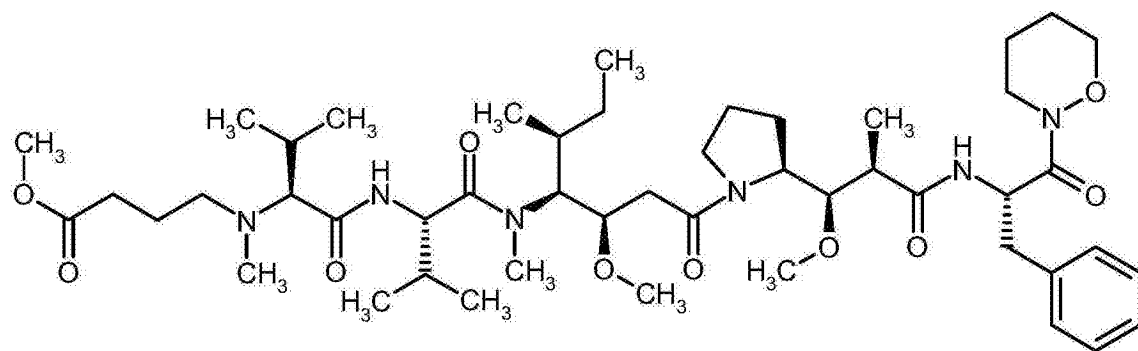
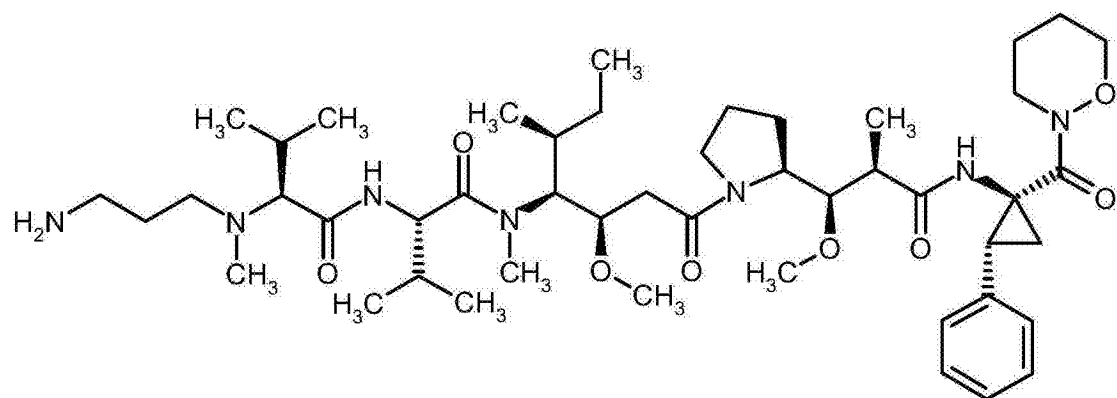
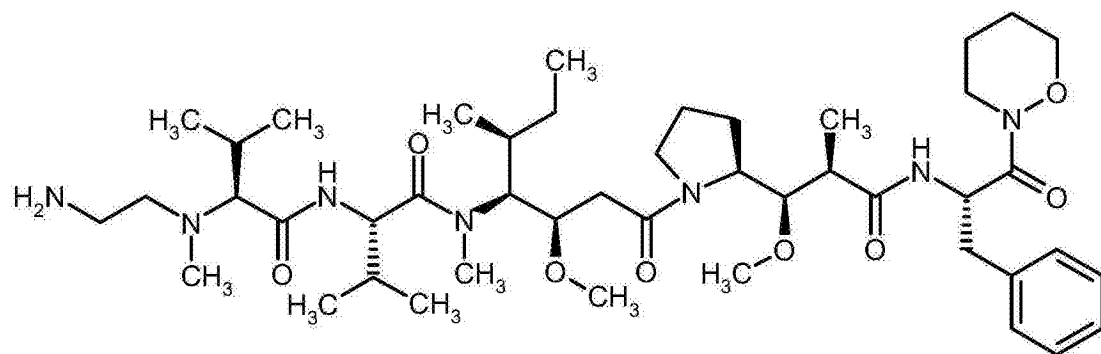
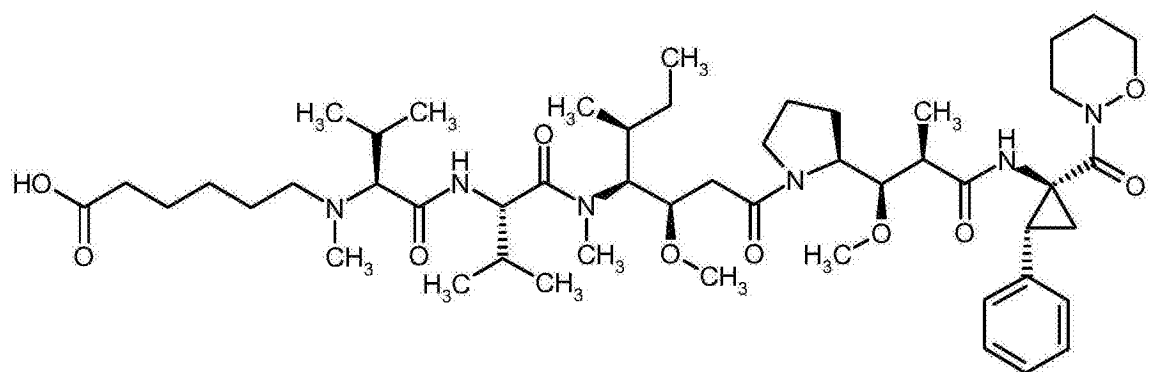
,

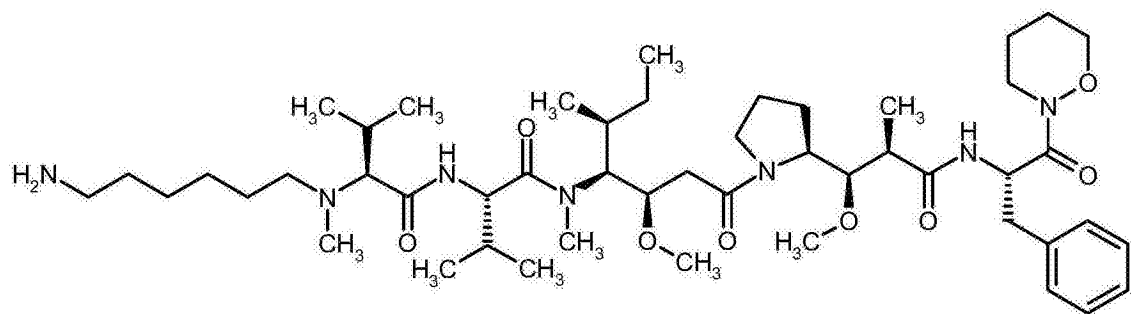


,

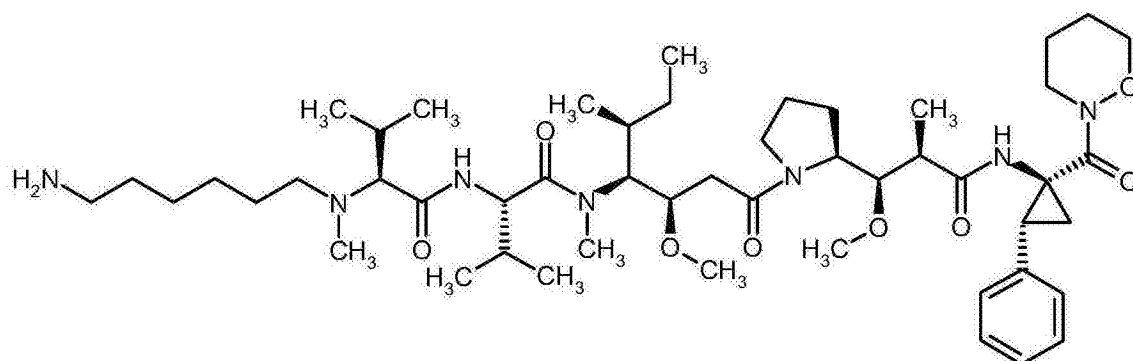




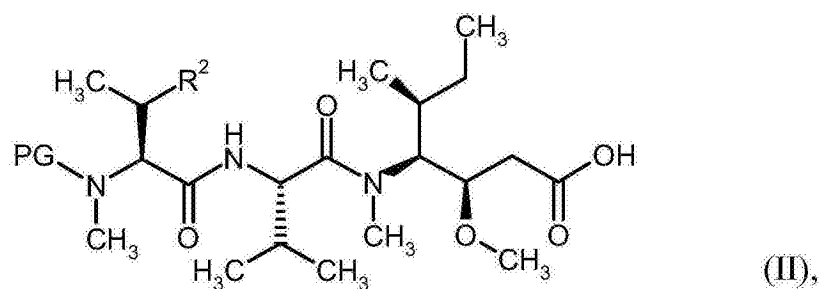




和



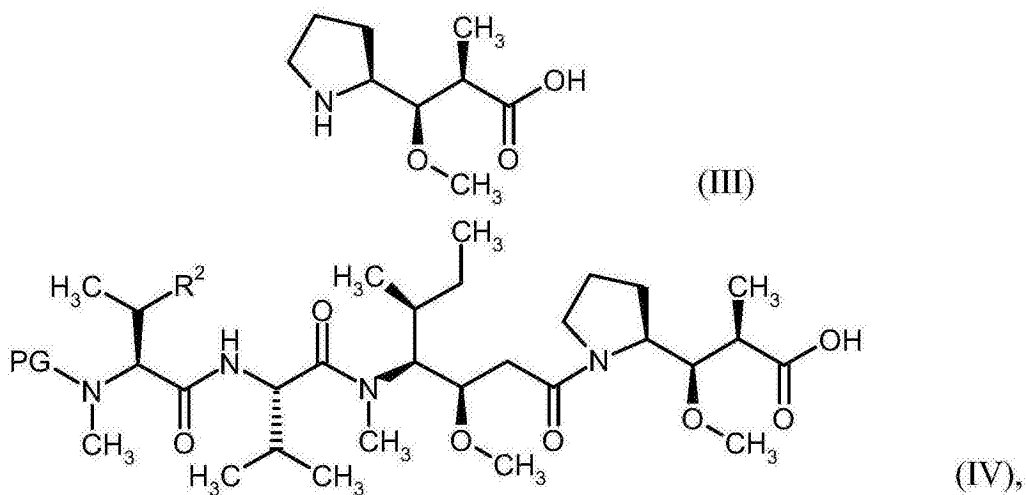
6. 如权利要求 1 所定义的式 (I) 的化合物的制备方法, 式 (II) 的化合物在 (II) 中的羧基功能被激活的情况下在惰性溶剂中, 通过以下方式 [A] 或方式 [B] 发生偶联, 得到式 (VI) 的化合物, 其中所述方式 [A] 是首先使式 (II) 的化合物与式 (III) 的化合物或其盐发生偶联, 得到式 (IV) 的化合物, 然后在惰性溶剂中在羧基功能被激活的情况下, 使式 (IV) 的化合物与式 (V) 的化合物或所述化合物的盐发生偶联, 得到式 (VI) 的化合物, 所述方式 [B] 是使式 (II) 的化合物与式 (VII) 的化合物或所述化合物的盐发生偶联, 得到式 (VI) 的化合物; 然后通过肽化学的常规方法对各自所得的式 (VI) 的化合物进行脱保护, 得到式 (I-B) 的化合物, 随后, 如果需要的话, 通过 (i) 使用式 (VIII) 的化合物通过碱引发的烷基化将式 (I-B) 的化合物转化为式 (I-C) 的化合物, 或者通过 (ii) 在存在合适的还原剂的条件下, 通过与式 (IX) 的化合物进行反应, 将式 (I-B) 的化合物转化为式 (I-D) 的化合物; 并且任选地, 将以这种方式获得的式 (I-B)、(I-C) 和 (I-D) 的化合物分离成其对映异构体和 / 或非对映异构体, 和 / 或用合适的 (i) 溶剂和 / 或 (ii) 碱或酸将式 (I-B)、(I-C) 和 (I-D) 的化合物转化为其溶剂合物、盐和 / 或所述盐的溶剂合物, 其中:



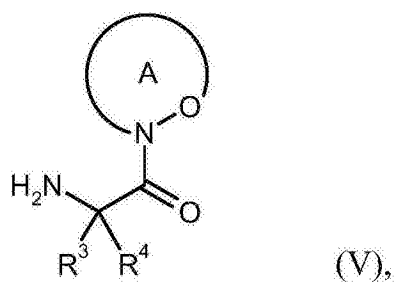
式中, R^2 具有如权利要求 1 所述的含义;

以及

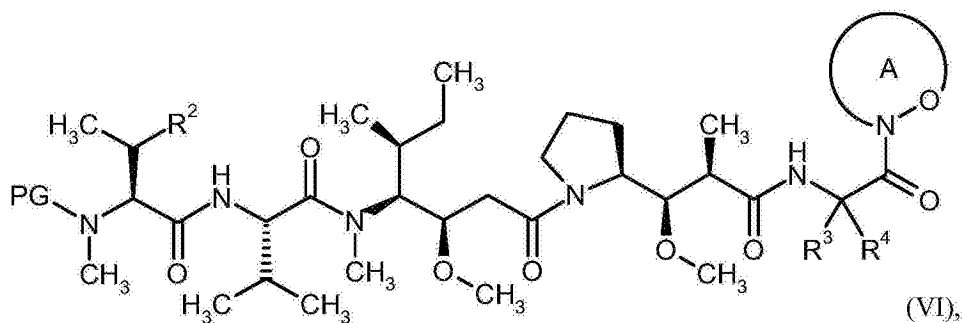
PG 表示氨基保护基团;



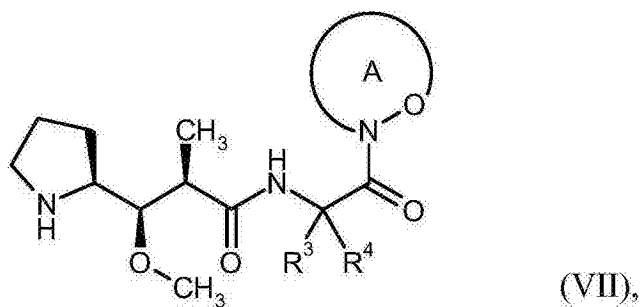
式中, R^2 具有如权利要求 1 所述的含义, PG 表示氨基保护基团;



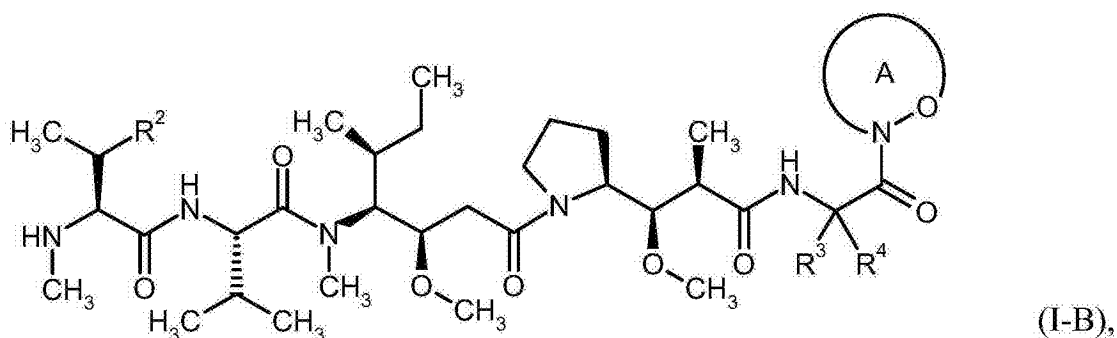
式中, R^3 、 R^4 和环 A 具有如权利要求 1 所述的含义;



式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、环 A 具有如权利要求 1 所述的含义, PG 表示氨基保护基团;



式中, R^3 、 R^4 和环 A 具有如权利要求 1 所述的含义;



式中, R^2 、 R^3 、 R^4 和环 A 具有如权利要求 1 所述的含义;

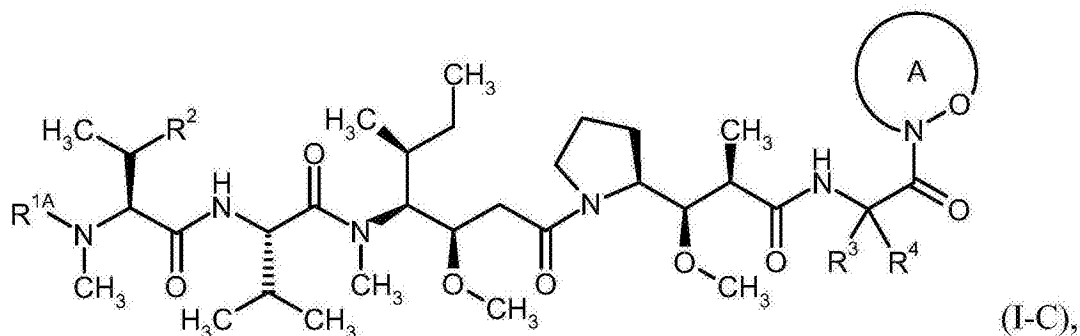


式中

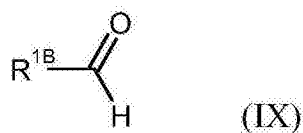
R^{1A} 具有如权利要求 1 所述 R^1 的含义,但不表示氢;

以及

X 表示氯、溴、碘、甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、或甲苯磺酸盐;

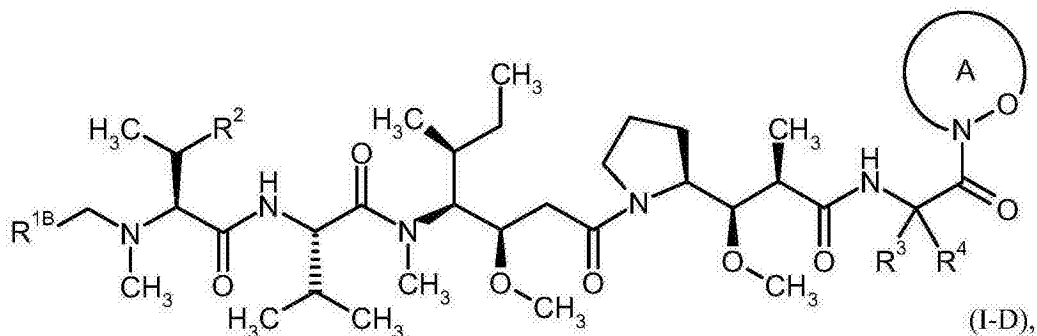


式中, R^{1A} 具有如权利要求 1 所述 R^1 的含义,但不表示氢, R^2 、 R^3 、 R^4 和环 A 具有如权利要求 1 所述的含义;



式中

R^{1B} 具有如权利要求 1 所述 R^1 的含义,但不表示氢,区别在于烷基链长减少了一个 CH_2 单元;



式中, R^{1B} 具有如权利要求 1 所述 R^1 的含义,但不表示氢,区别在于烷基链长减少了一个 CH_2 单元, R^2 、 R^3 、 R^4 和环 A 具有如权利要求 1 所述的含义。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述氨基保护基团 PG 选自(9H- 芴 -9- 基甲氧基)羰基、叔丁氧基羰基或苄氧基羰基。

8. 如权利要求 1 至 3 或 5 中任一项所述化合物在制备用于治疗 and / 或预防肾细胞癌或结肠癌的药物中的应用。

9. 药物,该药物包括如权利要求 1 至 3 或 5 中任一项所述的化合物,并与一种或多种惰性、无毒、药学上合适的助剂联用。

10. 药物,该药物包括如权利要求 1 至 3 或 5 中任一项所述的化合物,并与一种或多种其它活性化合物联用。

新颖的耳他汀衍生物及其用途

[0001] 本申请涉及新颖的单甲基耳他汀 F 的衍生物,涉及制备这些衍生物的方法,涉及这些衍生物用于治疗 and / 或预防疾病的用途,以及还涉及这些衍生物用于制备治疗和 / 或预防疾病的药物的用途,所述疾病更具体而言是过度增殖性疾病和 / 或血管新生性疾病,例如癌性疾病。此类治疗可以单一治疗的形式或者与其它药物或进一步治疗性措施联用来实施。

[0002] 癌性疾病是很多种组织中不受控制的细胞生长的结果。在很多情况中,新细胞穿透现有组织(侵袭性生长),或者它们转移至远端器官。癌性疾病发生在很多种器官中,并且该疾病通常以组织特异性方式发展。因此,作为通用术语的名称“癌性疾病”描述一大群不同器官、组织和细胞类型的定义的疾病。

[0003] 早期肿瘤可能能够通过手术和放疗措施除去。转移的肿瘤通常仅可通过化疗剂给予姑息性治疗。在该情况中目标是实现改善生命质量和延长剩余寿命的最佳组合。

[0004] 例如,目前胃肠外给药的大部分化疗剂通常不是针对肿瘤组织或肿瘤细胞目标导向的,由于其全身性给药,而是在体内非特定分布,因此包括在不希望接触该药物的位置,例如健康细胞、组织和器官。这可能导致不希望的副作用,以及甚至导致一般毒性的严重影响,然后该毒性通常极大限制了药物治疗有用的剂量的范围,或必须完全停止用药。

[0005] 因此,一方面,这些化疗剂在肿瘤细胞或立即包围组织中的改进的且选择性的可用性和相关的效果提高,以及另一方面,毒性副作用的最小化,已成为多年来新化疗剂的发展中的焦点。至今人们已作出很多尝试以发展将药物引入靶细胞的有效方法。然而,例如优化药物和细胞内目标的关联以及使相邻细胞的药物细胞间分布最小化仍然构成棘手的问题。

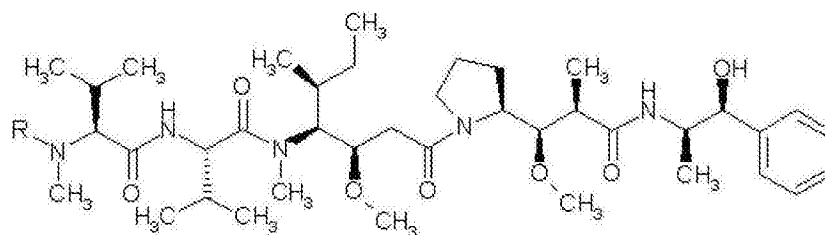
[0006] 例如,单克隆抗体适用于肿瘤组织和肿瘤细胞的靶向定位(addressing)。近年来,已看到此类用于临床治疗癌性疾病的抗体的重要性显著普遍提高,这是基于此类的试剂的活性,所述试剂例如曲妥珠单抗(贺赛汀)、利妥昔单抗(美罗华)、西妥昔单抗(爱必妥)和贝伐单抗(阿瓦斯丁),该试剂后来已被批准用于治疗单独的具体肿瘤疾病[例如,参见 G. P. Adams 和 L. M. Weiner, *Nat. Biotechnol.* **23**, 1147-1157 (2005)]。因此,对所谓的免疫偶联物(例如,前述 ADC) 的兴趣也已显著增加,其中针对肿瘤相关抗原的内化抗体通过连接单元(“接头”)与细胞毒性剂共价结合。在将 ADC 引入至肿瘤细胞中并随后切割偶联物之后,细胞毒性剂本身或另一种由细胞毒性剂形成的具有细胞毒活性的代谢物在肿瘤细胞内释放,在肿瘤细胞中能够直接地且选择性地发挥其作用。与癌性疾病的常规化疗相比,以该方式可以将对正常组织的破坏保持在极大接近极限内[例如,参见 J. M. Lambert, *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**, 543-549 (2005); A. M. Wu 和 P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **23**, 1137-1146 (2005); P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 235-244 (2009); L. Ducry 和 B. Stump, *Bioconjugate Chem.* **21**, 5-13 (2010)]。

[0007] 除了抗体,例如小分子药物领域的配体也可以用作粘合剂,其选择性地与具体目标位置(“靶标”) (例如受体) 结合[例如,参见 E. Ruoslahti 等人, *Science* **279**, 377-380 (1998); D. Karkan 等人, *PLoS ONE* **3**(6), e2469 (2008 年 6 月 25 日)]。还

已知细胞毒性药物和定位配体 (addressing ligand) 的偶联物在配体和药物之间存在确定的切割点用于药物的释放。例如,在肽链中可能存在这种类型的“预定的断裂点”,该肽链可在特定位点通过位于作用位置的特异性酶而选择性地被切割 [例如,参见 R. A. Firestone 和 L. A. Telan, 美国专利申请 US2002/0147138]。

[0008] 耳他汀 E (AE) 和单甲基耳他汀 E (MMAE) 是多拉司他汀的合成类似物,是线性假肽的特异性基团,所述线性假肽最初从海洋源分离并且其在一些情况中对于肿瘤细胞具有极有效的细胞毒活性 [例如参见综述 G. R. Pettit, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **70**, 1-79 (1997); G. R. Pettit 等人,《抗癌药物设计》(*Anti-Cancer Drug Design*) **10**, 529-544 (1995); G. R. Pettit 等人,《抗癌药物设计》(*Anti-Cancer Drug Design*) **13**, 243-277 (1998)]。

[0009]

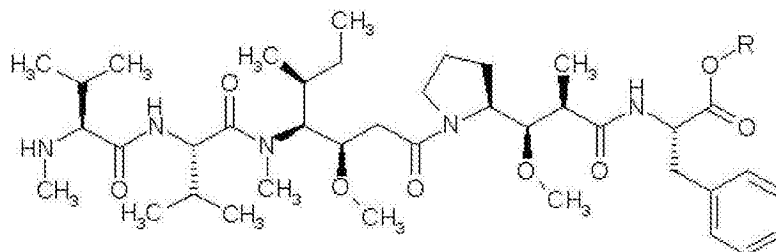


耳他汀 E (AE): R = CH₃
单甲基耳他汀 E (MMAE): R = H

[0010] 然而, MMAE 具有较高全身毒性的缺点。另外,当以抗体 / 活性化合物偶联物 (免疫偶联物) 的形式施用,该化合物与这类接头不相容,所述接头是抗体和不具有酶可切割性的预定断裂点的活性化合物之间的接头 [S. O. Doronina 等人, *Bio-conjugate Chem.* **17**, 114-124 (2006)]。

[0011] 单甲基耳他汀 F (MMAF) 是具有 C-末端苯丙氨酸单元的耳他汀衍生物,与 MMAE 相比,其仅具有中等抗增殖活性。这极可能可归因于游离羧基,该羧基的极性和电荷对该化合物进入细胞的能力有不利的影。在这种连接中, MMAF 的甲基酯 (MMAF-OMe) 已被描述为具有细胞进入能力的中性电荷的前药衍生物,与 MMAF 相比,对于各种增加了多个数量级的癌细胞系 MMAF-OMe 具有体外细胞毒性 [S. O. Doronina 等人, *Bioconjugate Chem.* **17**, 114-124 (2006)]。可假定该作用由 MMAF 本身产生,所述 MMAF 在摄取前药进入细胞后,通过细胞内的酯水解而快速释放。

[0012]



单甲基耳他汀 F (MMAF): R = H
单甲基耳他汀 F 甲基酯 (MMAF-OMe): R = CH₃

[0013] 然而,基于简单酯衍生物的药物化合物通常经受由于非特异性酯水解造成的化学不稳定性的风险,该非特异性酯水解不依赖于作用的目标位点,例如通过存在于血浆中的

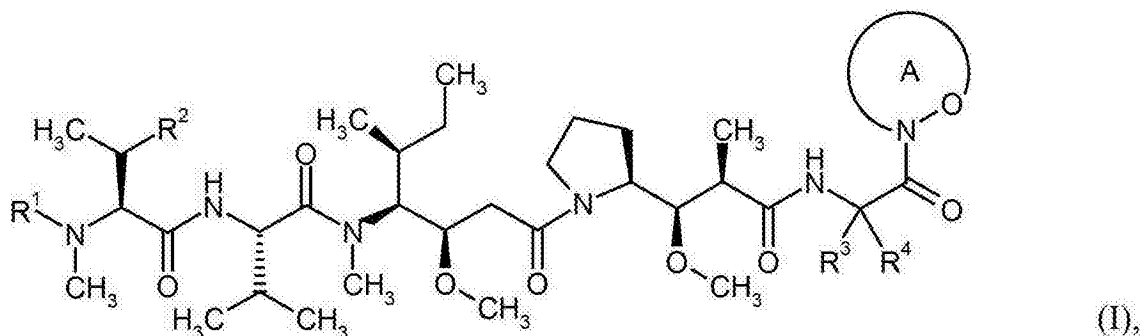
酯酶来进行水解；这种非特异性水解可大大限制了此类化合物在治疗中的可用性。

[0014] 因此,本发明的一个目的是鉴定仅由中等有效的单甲基耳他汀 F (MMAF) 开始制备的新颖的化合物,并且提供具有以下特征的这些化合物:首先,该化合物在全细胞分析中具有显著的较强细胞毒活性;其次,与简单的酯衍生物(例如 MMAF-OMe)相比,具有提高的血浆稳定性,特别是在治疗癌性疾病中。此类物质可特别适合作为毒簇用于与蛋白质(例如抗体)连接,或者与低分子量配体连接,以形成具有抗增殖作用的(免疫)偶联物。

[0015] WO2005/081711-A2 中公开了单甲基耳他汀 F (MMAF) 及其各种酯衍生物和酰胺衍生物。WO01/18032-A2 中描述了其它具有 C-末端酰胺取代的苯丙氨酸单元的其它耳他汀类似物。WO02/088172-A2 和 WO2007/008603-A1 要求保护 MMAF 类似物,该 MMAF 类似物涉及苯丙氨酸的侧链改性,而 WO2007/008848-A2 要求保护其中苯丙氨酸的羧基已经过改性的 MMAF 类似物。最近,WO2009/117531-A1 中描述了通过 C-末端连接的耳他汀偶联物[还参见 S. O. Doro-nina 等人, Bioconjugate Chem. 19, 1960-1963 (2008)]。

[0016] 现在,本发明提供了符合通式(I)的化合物,及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物:

[0017]



[0018] 式中,

[0019] R^1 表示氢、 (C_1-C_6) -烷基或式 Q^1-L^1* 或 Q^2-L^2* 的基团,其中,

[0020] * 表示与氮原子相连的连接点;

[0021] Q^1 表示羟基羰基、 (C_1-C_4) -烷氧基羰基或苄氧基羰基;

[0022] L^1 表示直链 (C_1-C_{12}) -烷二基,该直链 (C_1-C_{12}) -烷二基最多可被甲基取代四次,并且在直链 (C_1-C_{12}) -烷二基中,(a) 两个碳原子可以以 1,2 位、1,3 位或 1,4 位桥连的形式彼此连接,与位于所述发生桥连的两个碳原子之间的任意碳原子形成 (C_3-C_6) -环烷基环或苯环,或者 (b) 至多三个彼此不相邻的 CH_2 基团可被 -O- 代替;

[0023] Q^2 表示羟基、氨基或单- (C_1-C_4) -烷基氨基;

[0024] 以及

[0025] L^2 表示直链 (C_2-C_{12}) -烷二基,该直链 (C_2-C_{12}) -烷二基最多可被甲基取代四次,并且在直链 (C_2-C_{12}) -烷二基中,(a) 两个碳原子可以以 1,2 位、1,3 位或 1,4 位桥连的形式彼此连接,与位于所述发生桥连的两个碳原子之间的任意碳原子形成 (C_3-C_6) -环烷基环或苯环,或者 (b) 至多三个彼此不相邻的 CH_2 基团可被 -O- 代替;

[0026] R^2 表示甲基或羟基;

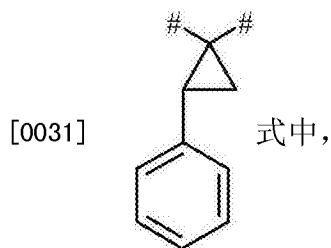
[0027] R^3 表示氢或甲基;

[0028] R^4 表示异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、苯基、苄基、4-羟基苄基、4-羟基-3-硝基

苄基、1- 苯基乙基、二苯基甲基、1H- 咪唑 -4- 基甲基或 1H- 吡唑 -3- 基甲基；

[0029] 或

[0030] R^3 和 R^4 以及两者都相连的碳原子一起形成下式结构的 2- 苯基环丙烷 -1, 1- 二基基团：

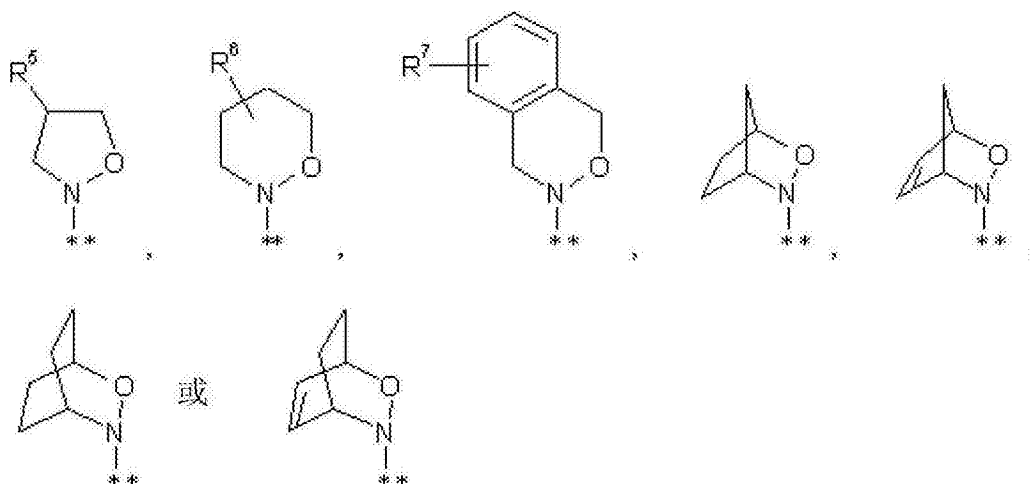


[0032] # 表示与所述分子的其它部分相连的连接点；

[0033] 以及

[0034] 包含有 N-O 基团的环 A 表示单环或双环的任选取代的具有下式结构的杂环：

[0035]



[0036] 式中，

[0037] ** 表示与羰基相连的连接点；

[0038] R^5 和 R^6 各自表示氢、羟基、 (C_1-C_4) - 烷氧基或苄氧基；

[0039] 以及

[0040] R^7 表示氢、氟、氯、氰基、甲基或三氟甲基。

[0041] 本发明的化合物是式(I)结构的化合物及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物，是符合以下所示结构式的并且由式(I)所涵盖的化合物及其盐、溶剂合物和所示盐的溶剂合物，以及还是下文作为工作实施例所确定的并且由式(I)所涵盖的化合物及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物，在一定程度上下文所示并且由式(I)所涵盖的化合物并非已经是盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物。

[0042] 根据它们的结构，本发明的化合物可以不同的立体异构体形式存在，即以构型异构体的形式或者在适当的情况下作为构象异构体(对映异构体和 / 或非对映异构体，包括阻转异构体的情况中的异构体)存在。因此，本发明包括对映异构体和非对映体及其各自的混合物。可以通过已知的方式从此类对映异构体和 / 或非对映体的混合物中分离立体异构体均一的组分；出于该目的，优选使用色谱法，更优选 HPLC 色谱法在非手性相或手性相上分离。

[0043] 当本发明的化合物可以互变异构体形式存在时,本发明包括所有的互变异构体形式。

[0044] 本发明内容中优选的盐是本发明化合物生理上可接受的盐。本发明还包括这样的盐:尽管该盐本身不适合于药物应用,但可将其用于(例如)分离或纯化本发明的化合物。

[0045] 本发明化合物生理上可接受的盐包括无机酸、羧酸和磺酸的酸加成盐,其例子是以下酸的盐,所述酸包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、萘二磺酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸、马来酸和苯甲酸。

[0046] 本发明化合物生理上可接受的盐还包括常规碱的盐,例如,(仅为示例性并优选)碱金属盐(例如钠盐和钾盐)、碱土金属盐(例如钙盐和镁盐)和衍生自氨或含有 1-16 个 C 原子的有机胺的铵盐,所述有机胺包括例如(仅为示例性并优选)乙胺、二乙胺、三乙胺、乙基二异丙基胺、单乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二环己基胺、二甲基氨基乙醇、普鲁卡因、二苄基胺、N-甲基哌啶、N-甲基吗啉、精氨酸、赖氨酸和 1,2-乙二胺。

[0047] 本发明内容中的溶剂合物是这些形式的本发明化合物,所述化合物通过与溶剂分子配位而形成的固态或液态形式的复合物。水合物是溶剂合物的一种具体形式,其中与水发生配位。本发明内容中的溶剂合物优选为水合物。

[0048] 另外,本发明还包括本发明化合物的前药。本文中术语“前药”指这样的化合物:该化合物本身可为生物活性或无生物活性的,但其在体内停留过程中转化为本发明的化合物(例如通过代谢或水解)。

[0049] 本发明的内容中,除非另有说明,取代基定义如下:

[0050] 本发明的内容中,(C₁-C₆)-烷基和(C₁-C₄)-烷基分别表示含有 1-6 和 1-4 个碳原子的直链或支链烷基基团。优选含有 1-4 个碳原子的直链或支链烷基。作为示例并优选下列基团,包括:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、2-戊基、3-戊基、新戊基、正己基、2-己基和 3-己基。

[0051] 本发明的内容中,(C₁-C₁₂)-烷二基、(C₁-C₆)-烷二基、(C₂-C₁₂)-烷二基和(C₂-C₆)-烷二基分别表示含有 1-12、1-6、2-12 和 2-6 个碳原子的直链 α , ω -二价烷基基团。作为示例并优选下列基团,包括:亚甲基、乙烷-1,2-二基(1,2-亚乙基)、丙烷-1,3-二基(1,3-亚丙基)、丁烷-1,4-基(1,4-亚丁基)、戊烷-1,5-二基(1,5-亚戊基)、己烷-1,6-二基(1,6-亚己基)、庚烷-1,7-基(1,7-亚庚基)、辛烷-1,8-二基(1,8-亚辛基)、壬烷-1,9-二基(1,9-亚壬基)、癸烷-1,10-二基(1,10-亚癸基)、十一烷-1,11-二基(1,11-亚十一烷基)和十二烷-1,12-二基(1,12-亚十二烷基)。

[0052] 本发明的内容中,(C₃-C₆)-环烷基表示含有 3-6 个碳原子的单环的饱和环烷基基团。作为示例并优选下列基团,包括:环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0053] 本发明的内容中,(C₁-C₄)-烷氧基表示含有 1-4 个碳原子的直链或支链烷氧基基团。作为示例并优选下列基团,包括:甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基和叔丁氧基。

[0054] 本发明的内容中,(C₁-C₄)-烷氧基羰基表示通过羰基 $[-C(=O)-]$ 连接的含有 1-4 个碳原子的直链或支链烷氧基基团。作为示例并优选下列基团,包括:甲氧基羰基、乙氧基羰基、正丙氧基羰基、异丙氧基羰基、正丁氧基羰基和叔丁氧基羰基。

[0055] 本发明的内容中,单-(C₁-C₄)-烷基氨基表示含有直链或支链烷基取代基的氨基

基团,其中所述烷基取代基含有 1-4 个碳原子。作为示例并优选下列基团,包括:甲基氨基、乙基氨基、正丙基氨基、异丙基氨基、正丁基氨基和叔丁基氨基。

[0056] 本发明的内容中,所有多次出现的基团具有其彼此独立的定义。如果本发明化合物中的基团是经取代的,除非另有说明,所述基团可一次或多次被取代。优选用一种取代基或两种相同的或不同的取代基进行取代。特别优选用一种取代基进行取代。

[0057] 本发明的内容中,优选符合式(I)结构的化合物,及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物,式中:

[0058] R^1 表示氢、 (C_1-C_4) -烷基或式 Q^1-L^1-* 或 Q^2-L^2-* 的基团,其中,

[0059] *表示与氮原子相连的连接点;

[0060] Q^1 表示羟基羰基或 (C_1-C_4) -烷氧基羰基;

[0061] L^1 表示直链 (C_1-C_{12}) -烷二基,其中,(a)两个碳原子可以以 1,3 位或 1,4 位桥连的形式彼此连接,与位于所述两个碳原子之间的一个或两个碳原子一起形成苯基环,或者(b)至多三个彼此不相邻的 CH_2 基团可被 -O- 取代;

[0062] Q^2 表示羟基、氨基或甲基氨基;

[0063] 以及

[0064] L^2 表示直链 (C_2-C_{12}) -烷二基,该直链 (C_2-C_{12}) -烷二基可被甲基单取代或双取代,并且其中至多三个彼此不相邻的 CH_2 基团可被 -O- 取代;

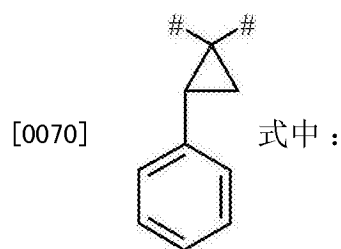
[0065] R^2 表示甲基或羟基;

[0066] R^3 表示氢;

[0067] R^4 表示苄基、4-羟基苄基、1-苯基乙基或 1H-吡啶-3-基甲基;

[0068] 或者

[0069] R^3 和 R^4 以及与两者都相连的碳原子一起形成下式结构的 2-苯基环丙烷-1,1-二基基团:

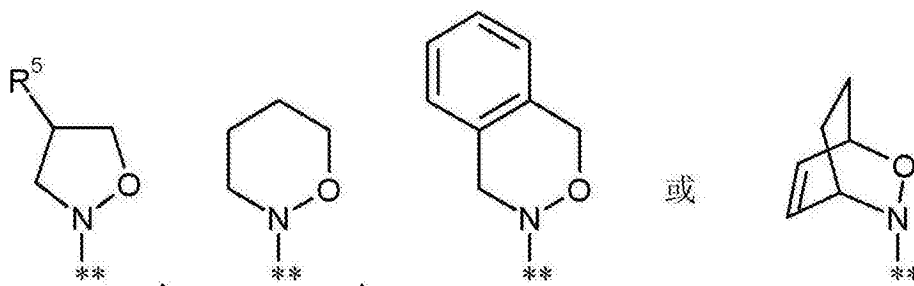


[0071] #表示与所述分子的其它部分相连的连接点;

[0072] 以及

[0073] 包含有 N-O 基团的环 A 表示单环或双环的任选取代的具有下式结构的杂环:

[0074]



[0075] 式中:

[0076] ** 表示与羰基相连的连接点；

[0077] 以及

[0078] R^5 表示氢、羟基或苄氧基。

[0079] 本发明的内容中, 特别优选符合式(I)结构的化合物, 及其盐、溶剂合物和盐的溶剂合物, 式中:

[0080] R^1 表示氢、甲基或式 Q^1-L^1-* 或 Q^2-L^2-* 的基团, 其中,

[0081] * 表示与氮原子相连的连接点;

[0082] Q^1 表示羟基羰基、甲氧基羰基或乙氧基羰基;

[0083] L^1 表示直链 (C_1-C_6) -烷二基, 其中, 两个碳原子可以以 1, 4 位桥连的形式彼此连接, 与位于所述两个碳原子之间的两个碳原子一起形成苯基环;

[0084] Q^2 代表羟基或氨基;

[0085] 以及

[0086] L^2 表示直链 (C_2-C_6) -烷二基;

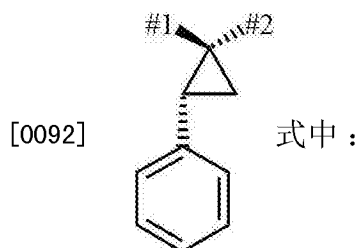
[0087] R^2 表示甲基;

[0088] R^3 表示氢;

[0089] R^4 表示苄基、1-苄基乙基或 1H-吡啶-3-基甲基;

[0090] 或者

[0091] R^3 和 R^4 以及与两者都相连的碳原子一起形成下式结构的 (1S, 2R)-2-苄基-环丙烷-1, 1-二基基团:



[0093] #1 表示与相邻氮原子相连的连接点;

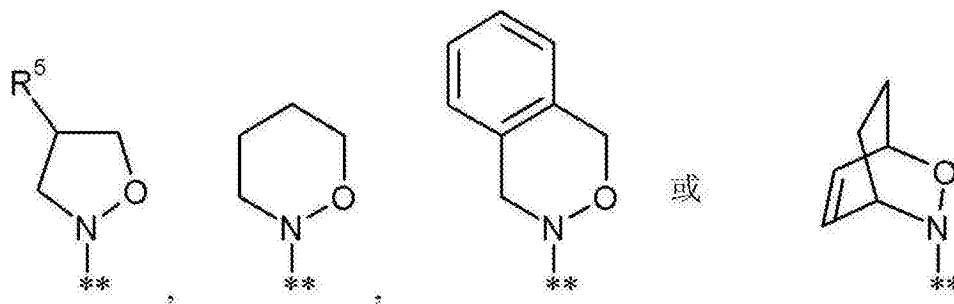
[0094] 以及

[0095] #2 表示与羰基相连的连接点;

[0096] 以及

[0097] 包含有 N-O 基团的环 A 表示单环或双环的任选取代的具有下式结构的杂环:

[0098]



[0099] 式中:

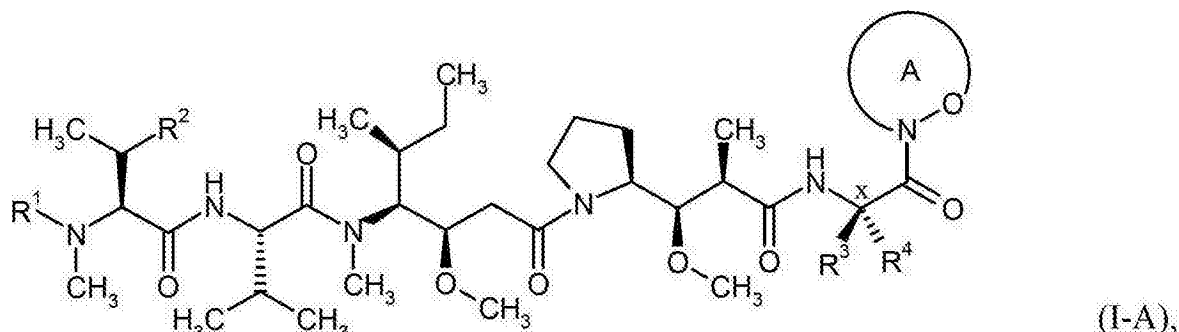
[0100] ** 表示与羰基相连的连接点;

[0101] 以及

[0102] R^5 表示氢、羟基或苄氧基。

[0103] 本发明内容中特别重要的是式(I-A)的化合物,及其盐、溶剂合物和所述盐的溶剂合物:

[0104]



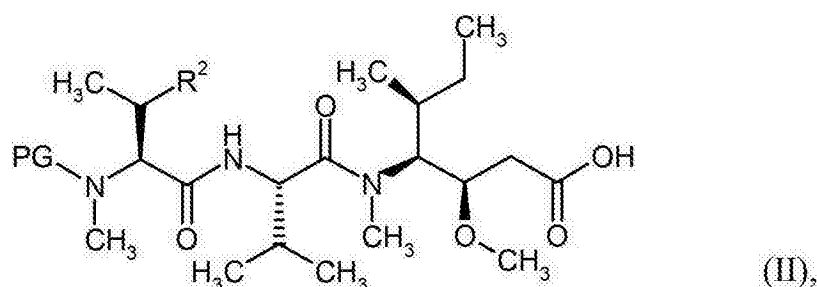
[0105] 式中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和环A具有上述含义,并且带有基团 R^3 和 R^4 的 C^x 碳原子具有所示S构型。

[0106] 独立于给定基团的各自组合,基团的各自组合或优选组合中给定的具体基团定义还可使用其它组合的基团定义代替。

[0107] 非常特别优选上述优选范围的两种或更多种的组合。

[0108] 另外,本发明提供了一种制备本发明式(I)化合物的方法,其特征在于,式(II)的化合物在(II)中的羧基功能被激活的情况下在惰性溶剂中,通过以下方式[A]或方式[B]发生偶联,得到式(VI)的化合物,其中所述方式[A]是首先使式(II)的化合物与式(III)的化合物或其盐发生偶联,得到式(IV)的化合物,然后在惰性溶剂中在羧基功能被激活的情况下,使式(IV)的化合物与式(V)的化合物或所述化合物的盐发生偶联,得到式(VI)的化合物,所述方式[B]是使式(II)的化合物与式(VII)的化合物或所述化合物的盐发生偶联,类似地得到式(VI)的化合物;然后通过肽化学的常规方法对各自所得的式(VI)的化合物进行脱保护,得到根据本发明的式(I-B)的化合物;随后(如果需要)通过(i)使用式(VIII)的化合物通过碱引发的烷基化将式(I-B)的化合物转化为式(I-C)的化合物,或者通过(ii)在存在合适的还原剂的条件下,通过与式(IX)的化合物进行反应,将式(I-B)的化合物转化为式(I-D)的化合物;并且任选地,将以这种方式获得的式(I-B)、(I-C)和(I-D)的化合物分离成其对映异构体和/或非对映异构体,和/或用合适的(i)溶剂和/或(ii)碱或酸将式(I-B)、(I-C)和(I-D)的化合物转化为其溶剂合物、盐和/或所述盐的溶剂合物,其中:

[0109]

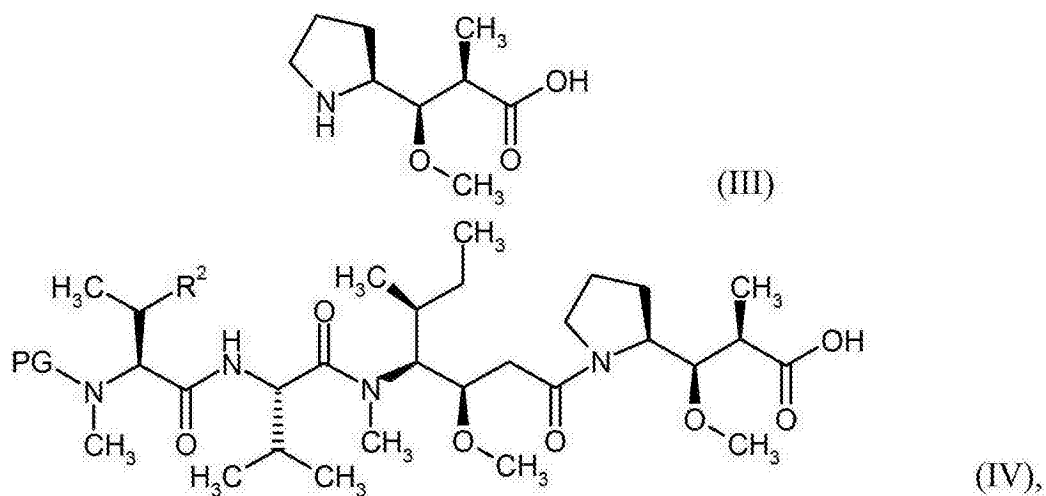


[0110] 式(II)中, R^2 具有上述含义;

[0111] 以及

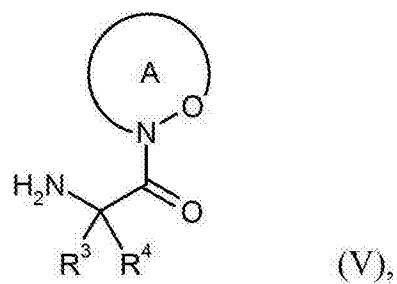
[0112] PG 表示氨基保护基团,例如(9H- 芴 -9- 基甲氧基)羰基、叔丁氧基羰基或苄氧基羰基;

[0113]



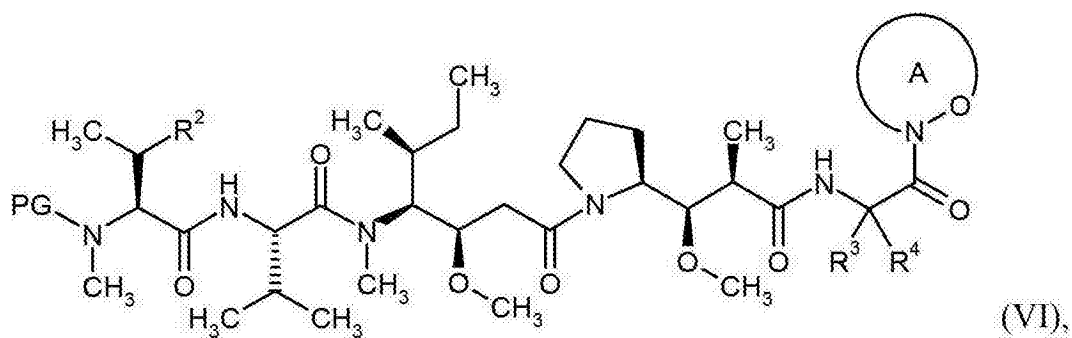
[0114] 式中, R^2 和 PG 具有上述含义;

[0115]



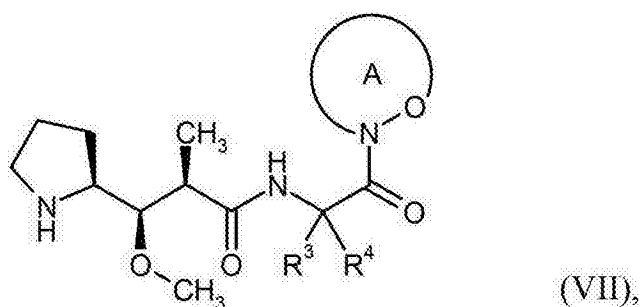
[0116] 式中, R^3 、 R^4 和环 A 具有上述含义;

[0117]



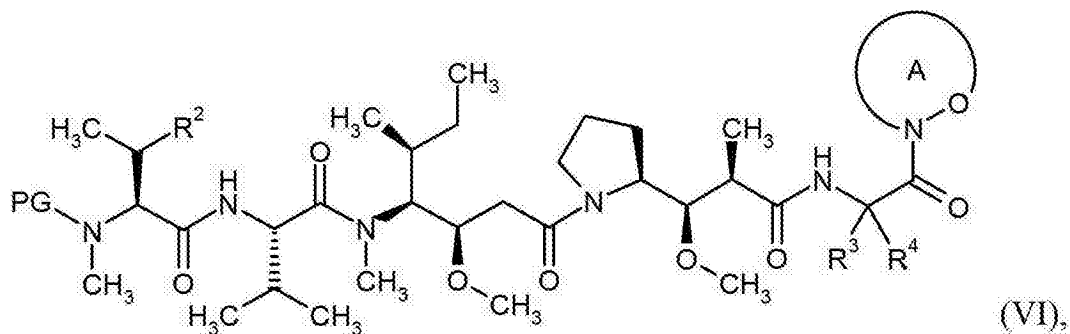
[0118] 式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、环 A 和 PG 具有上述含义;

[0119]



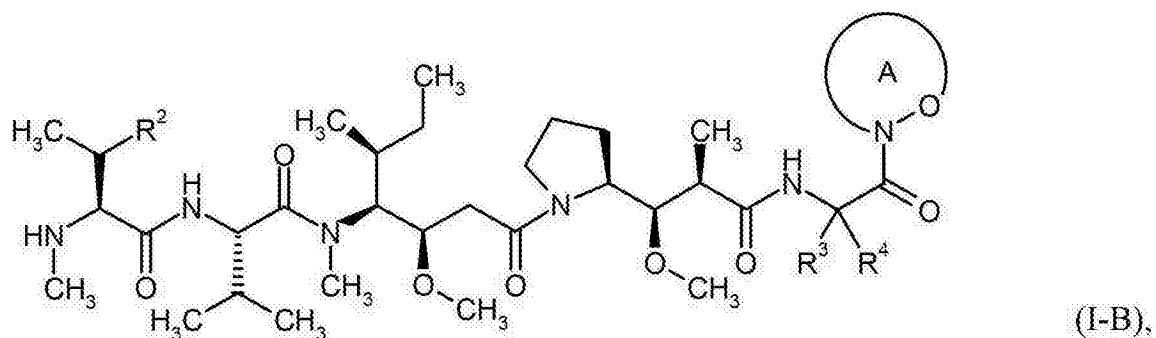
[0120] 式中, R^3 、 R^4 和环 A 具有上述含义 ;

[0121]



[0122] 式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、环 A 和 PG 具有上述含义 ;

[0123]



[0124] 式中, R^2 、 R^3 、 R^4 和环 A 具有上述含义 ;

[0125] R^{1A} -X (VIII)

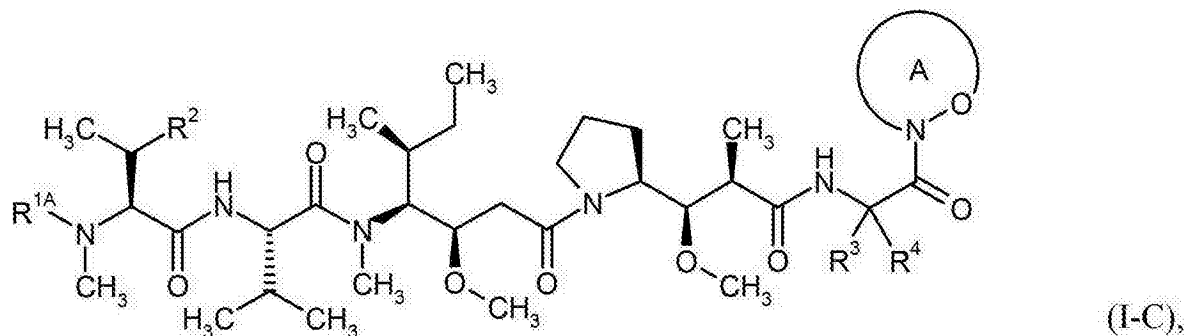
[0126] 式中 :

[0127] R^{1A} 具有上述 R^1 的含义,但不表示氢 ;

[0128] 以及

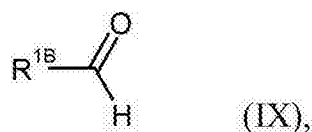
[0129] X 表示离去基团,例如氯、溴、碘、甲磺酸根、三氟甲磺酸根、或甲苯磺酸根 ;

[0130]



[0131] 式中, R^{1A} 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和环 A 具有上述含义;

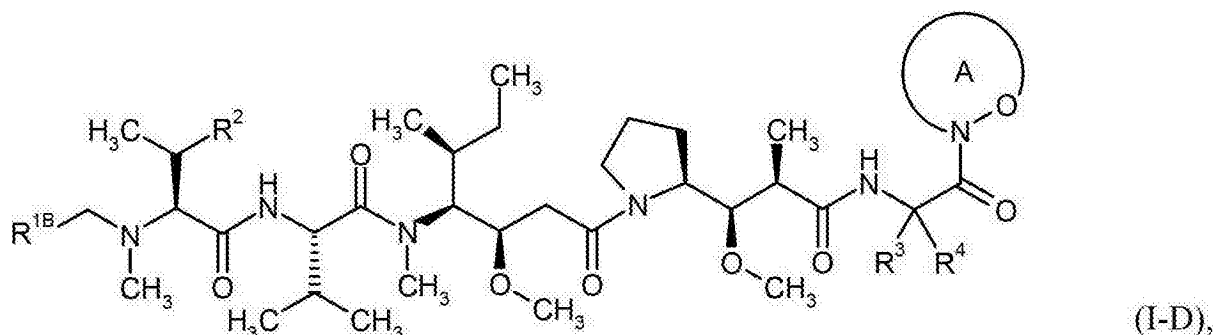
[0132]



[0133] 式中:

[0134] R^{1B} 具有上述 R^{1A} 的含义,区别在于烷基链长减少了一个 CH_2 单元;

[0135]



[0136] 式中, R^{1B} 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和环 A 具有上述含义。

[0137] 上述偶联反应(由各胺与羧酸组分形成酰胺)通常通过肽化学的常规方法来进行[例如,参见 M. Bodanszky,《肽合成的原理》(Principles of Peptide Synthesis), Springer-Verlag, Berlin, 1993; M. Bodanszky 和 A. Bodanszky,《肽合成的实践》(The Practice of Peptide Synthesis), Springer-Verlag, Berlin, 1984; H.-D. Jakubke 和 H. Jeschkeit,《氨基酸、肽、蛋白质》(Aminosäuren, Peptide, Proteine), Verlag Chemie, Weinheim, 1982]。

[0138] 偶联反应 (II)+(III) $\rightarrow$ (IV)、(IV)+(V) $\rightarrow$ (VI) 和 (II)+(VII) $\rightarrow$ (VI) 的惰性溶剂是选自下组的惰性溶剂,包括例如:醚类,例如乙醚、二异丙基醚、叔丁基甲基醚、四氢呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷或双-(2-甲氧基乙基)醚;烃类,例如苯、甲苯、二甲苯、戊烷、己烷、庚烷、环己烷或矿物油馏分;卤代烃类,例如二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳、1,2-二氯乙烷、三氯乙烯或氯苯;或偶极非质子溶剂类,例如丙酮、甲基乙基酮、乙腈、乙酸乙酯、吡啶、二甲亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、N,N'-二甲基丙基脲(DMPU)或N-甲基吡咯烷酮(NMP)。还可使用此类溶剂的混合物。优选使用N,N-甲基甲酰胺。

[0139] 用于这些偶联反应的合适的活化剂/缩合剂是选自下组的活化剂/缩合剂,包括例如:碳二亚胺类,例如N,N'-二乙基碳二亚胺、N,N'-丙基碳二亚胺、N,N'-二异丙基碳二亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)或N-(3-二甲氨基异丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC);光气衍生物类,例如N,N'-羰基二咪唑(CDI)或氯甲酸异丁酯;1,2-噁唑鎓化合物类,例如2-乙基-5-苯基-1,2-噁唑鎓3-硫酸盐或2-叔丁基-5-甲基异噁唑鎓高氯酸盐;酰氨基化合物类,例如2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-氢喹啉;磷化合物类,例如丙烷膦酸酐;氰基膦酸二乙酯;双-(2-氧代-3-噁唑烷基)磷酰氯、苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐或苯并三唑-1-基氧基三-(吡咯烷)磷六氟磷酸盐(PyBOP);或脲鎓(uranium)化合物,例如O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(TBTU)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐

(HBTU)、2-(2-氧代-1-(2H)-吡啶基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TPTU)、0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU)或0-(1H-6-氯苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TCTU);如果合适,与其它助剂联用,所述其它助剂例如1-羟基苯并三唑(HOBt)或N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu);以及合适的碱是碱金属碳酸盐,例如碳酸钠或碳酸钾,或叔胺碱类,例如三乙基胺、N-甲基吗啉、N-甲基哌啶、N,N-二异丙基乙基胺、吡啶或4-N,N-甲基氨基吡啶。

[0140] 本发明内容中,此类偶联反应优选使用的活化剂/缩合剂是N-(3-二甲基氨基异丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与1-羟基苯并三唑(HOBt)和N,N-异丙基乙基胺联用,或者类似地0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU)与N,N-异丙基乙基胺联用。

[0141] 偶联反应(II)+(III)→(IV)、(IV)+(V)→(VI)和(II)+(VII)→(VI)通常在-20至+60℃的温度范围内进行,优选在0至+40℃的温度范围内进行。所述反应可在大气压、升压或减压的条件下进行(例如从0.5至5巴);通常而言,所述反应在大气压下进行。

[0142] 用于反应(I-B)+(VIII)→(I-C)的合适的惰性溶剂是选自下组的惰性溶剂,包括例如:醚类,例如乙醚、二异丙基醚、甲基叔丁基醚、四氢呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷或双-(2-甲氧基乙基)醚;烃类,例如苯、甲苯、二甲苯、戊烷、己烷、庚烷、环己烷或矿物油馏分;或偶极非质子溶剂类,例如丙酮、甲基乙基酮、乙腈、二甲亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N-甲基乙酰胺(DMA)、N,N'-甲基丙烯基脲(DMPU)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)或吡啶。还可使用此类溶剂的混合物。优选使用N,N-二甲基甲酰胺。

[0143] 用于该烷基化反应的合适的碱具体为:碱金属氢氧化物类,例如氢氧化锂、氢氧化钠或氢氧化钾;碱金属或碱土金属碳酸盐类,例如碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙或碳酸铯;或常规有机胺类,例如三乙基胺、N-甲基吗啉、N-甲基哌啶、N,N-二异丙基乙基胺、吡啶或4-N,N-甲基氨基吡啶。优选使用碳酸钾或碳酸铯。如果合适,加入以下烷基化催化剂是有益的,例如:溴化锂或碘化锂、碘化钠或碘化钾、四正丁基溴化铵或四正丁基碘化铵或苄基三乙基溴化铵。

[0144] 反应(I-B)+(VIII)→(I-C)通常在-20至+60℃的温度范围内进行,优选在0至+40℃的温度范围内进行。所述反应可在大气压、升压或减压的条件下进行(例如从0.5至5巴);通常而言,所述反应在大气压下进行。

[0145] 反应(I-B)+(IX)→(I-D)在溶剂中进行,所述溶剂是还原胺化反应常用的溶剂且在所述反应条件下呈惰性,(如果合适的话)在存在酸性试剂和/或脱水剂作为催化剂的条件下进行。此类溶剂包括,例如醇类,例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇或叔丁醇;醚类,例如四氢呋喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷或双-(2-甲氧基乙基)醚;或其它溶剂,例如二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、N,N-二甲基甲酰胺或水。还可使用此类溶剂的混合物。优选地,所用的溶剂为1,4-二噁烷/水混合物,同时加有乙酸或稀盐酸作为催化剂。

[0146] 用于该反应的合适的还原剂具体为络合物硼氢化物,例如硼氢化钠、氰基硼氢化钠、三乙氧基硼氢化钠或硼氢化四正丁基铵。优选使用氰基硼氢化钠。

[0147] 反应(I-B)+(IX)→(I-D)通常在0至+120℃的温度范围内进行,优选+50至+100℃。所述反应可在大气压、升压或减压的条件下进行(例如从0.5至5巴);通常而言,所述反应在大气压下进行。

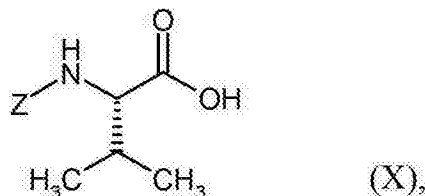
[0148] 如果有用或需要的话,在上述方法步骤中,基团 R^1 、 R^{1A} 、 R^{1B} 、 R^2 、 R^4 、 R^5 和 / 或 R^6 中包含的任意官能团(具体而言,例如氨基、羟基和羧基)还可以暂时性受保护的形式存在。在这些情况中,根据肽化学中已知的常规方法引入此类保护基团并除去[例如,参见 T.W.Greene 和 P.G.M. Wuts,《有机合成中的保护基团》(Protective Groups in Organic Synthesis), Wiley, 纽约,1999;M. Bodanszky 和 A. Bodanszky,《肽合成的实践》(The Practice of Peptide Synthesis), Springer-Verlag, 柏林,1984]。当存在两个或更多个受保护的基团时,任选地也可在单釜式反应中同时将所述受保护的基团释放,或者也可以在分开的反应步骤中释放。

[0149] 优选使用叔丁氧基羰基(Boc)、苄氧基羰基(Z)或(9H-芴-9-基甲氧基)羰基(Fmoc)作为氨基保护基团;对于羟基或羧基官能团,优选使用叔丁基或苄基作为保护基团。叔丁基或叔丁氧基羰基基团的除去通常是在惰性溶剂中通过使用强酸处理来完成的,所述强酸包括例如盐酸、氢溴酸或三氟乙酸,所述惰性溶剂包括例如乙醚、1,4-二噁烷、二氯甲烷或乙酸;任选地,该反应还可在不加入惰性溶剂的情况下进行。在苄基或苄氧基羰基作为保护基团的情况下,该基团优选在存在合适的钯催化剂的条件下通过氢解来除去,所述钯催化剂包括例如负载在活性炭上的钯。(9H-芴-9-基甲氧基)羰基基团通常使用仲胺碱(例如二乙基胺或哌啶)来除去。

[0150] 式(II)的化合物可通过肽化学的常规方法来制备,例如通过以下反应步骤来进行制备:

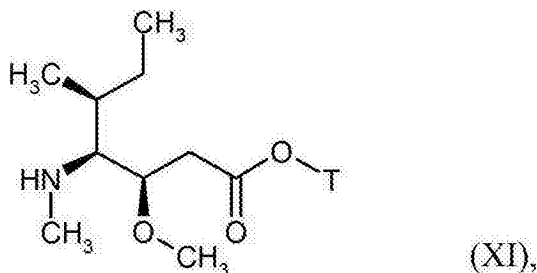
[0151] 首先,使式(X)的 N-(苄氧基羰基)-L-缬氨酸在缩合剂的帮助下与式(XI)的化合物或该化合物的盐发生偶联,得到式(XII)的化合物;

[0152]



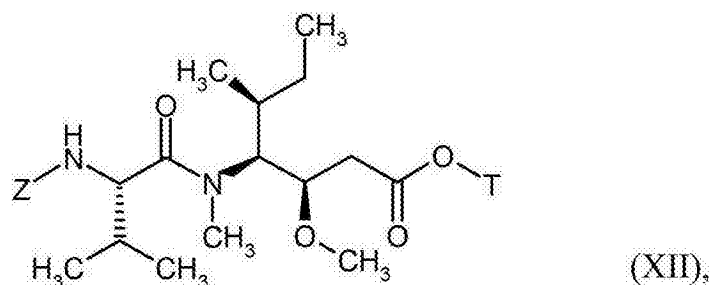
[0153] 式中, Z 表示苄氧基羰基保护基团;

[0154]



[0155] 式中, T 表示 (C_1-C_4) -烷基;

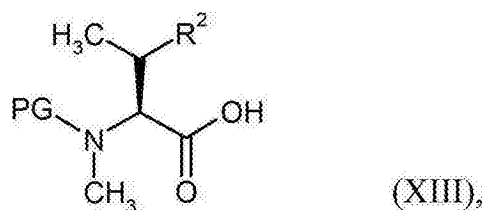
[0156]



[0157] 式中, T 和 Z 具有上述含义;

[0158] 然后, 在 Z 保护基团氢解除去之后, 在存在缩合剂的条件下使该化合物与式 (XIII) 的 N- 受保护的 N- 甲基 -L- 缬氨酸或 N- 甲基 -L- 苏氨酸发生偶联, 得到式 (XIV) 的化合物;

[0159]

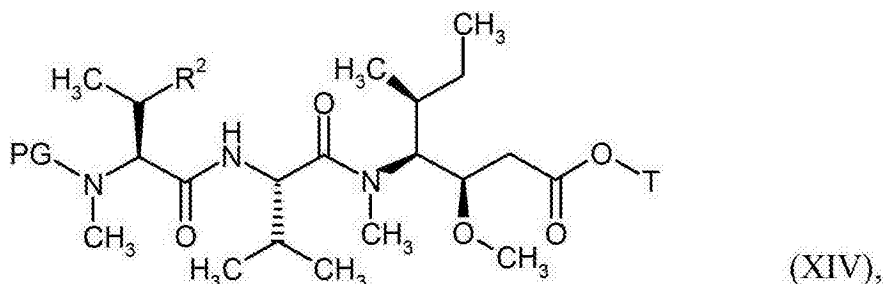


[0160] 式中, R^2 具有上述含义;

[0161] 以及

[0162] PG 表示氨基保护基团, 例如 (9H- 芴 -9- 基甲氧基) 羰基、叔丁氧基羰基或苄氧基羰基;

[0163]



[0164] 式中, R^2 、PG 和 T 具有上述含义;

[0165] 以及最后, 通过常规方法将 (XIV) 中的酯基 $-C(O)OT$ 转化为游离羧酸。

[0166] 偶联反应 (X)+(XI) $\rightarrow$ (XII) 和 Z- 脱保护的 (XII)+(XIII) $\rightarrow$ (XIV) 在与上述方法 [A] 和 [B] 的偶联步骤中类似的反应条件下进行。

[0167] 在处理步骤 (XIV) $\rightarrow$ (II) 中酯基 $-C(O)OT$ 的水解通过常规方法来进行, 所述方法为通过使用酸或者碱对惰性溶剂中的酯进行处理, 其中在后一种变体中初始形成的羧酸酯盐通过随后加入酸而转化为游离羧酸。在叔丁基酯的情况中, 优选使用酸进行裂解。

[0168] 在此, 选择化合物 (XI) 中的烷基基团 T 使得上述去除条件与化合物 (XIII) 中的各保护基团 PG 相容。

[0169] 用于酯水解的合适的碱是常规无机碱。这些碱具体包括碱金属或碱土金属氢氧化物, 例如氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化钡; 或碱金属或碱土金属碳酸盐, 例如碳酸钠、碳酸钾或碳酸钙。优选使用氢氧化锂、氢氧化钠或氢氧化钾。

[0170] 用于酯裂解的合适的酸通常为硫酸、氯化氢 / 氢氯酸、溴化氢 / 氢溴酸、磷酸、乙酸、三氟乙酸、甲苯磺酸、甲磺酸或三氟甲磺酸或其混合物, 如果合适的话, 同时加有水。在叔丁基酯的情况中优选使用氯化氢或三氟乙酸, 以及优选氢氯酸用于甲基酯。

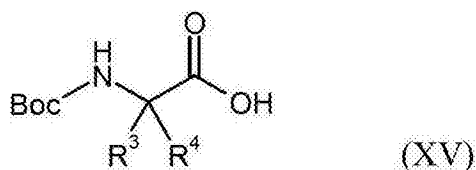
[0171] 适合于这些反应的惰性溶剂是水或用于酯裂解的常规有机溶剂。这些溶剂优选包括: 低级醇类, 例如甲醇、乙醇、正丙醇或异丙醇; 醚类, 例如乙醚、四氢呋喃、1, 4- 噁烷或 1, 2- 二甲氧基乙烷; 或其它溶剂, 例如二氯甲烷、丙酮、甲基乙基酮、N, N- 甲基甲酰胺或二甲亚砜。还可使用此类溶剂的混合物。在碱性酯水解的情况中, 优选使用水与以下溶剂的混合物, 所述溶剂包括 1, 4- 二噁烷、四氢呋喃、甲醇、乙醇和 / 或二甲基甲酰胺。在与三氟乙酸进行反应的情况中, 优选使用二氯甲烷; 在与氯化氢进行反应的情况中, 优选使用四氢呋喃、乙醚、1, 4- 二噁烷或水。

[0172] 所述酯裂解反应通常在 -20 至 +100℃ 的温度范围内进行, 优选 0 至 +50℃。

[0173] 式(V) 的化合物可通过与已知方法类似的方法来制备, 例如将式(XV) 的受保护的氨基酸在其羧基功能被激活的情况下, 分别通过以下方法 [C] 或 [D] 得到式(XVII) 的化合物, 然后通过用酸进行处理以常规方式除去(XVII) 中的 Boc 保护基团, 得到式(V) 的化合物, 其中所述方法 [C] 或 [D] 分别为:

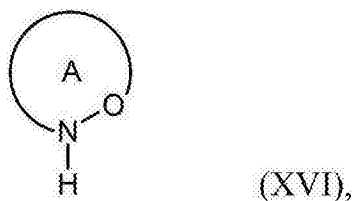
[0174] [C] 将式(XV) 的受保护的氨基酸在其羧基功能被激活的情况下, 与式(XVI) 的化合物或该化合物的盐发生偶联, 得到式(XVII) 的化合物:

[0175]



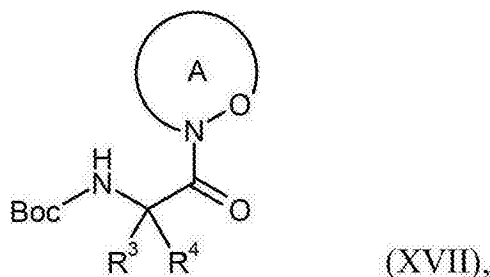
[0176] 式中, R³和 R⁴具有上述含义, 以及 Boc 表示叔丁氧基羰基保护基团;

[0177]



[0178] 式中, A 具有上述含义;

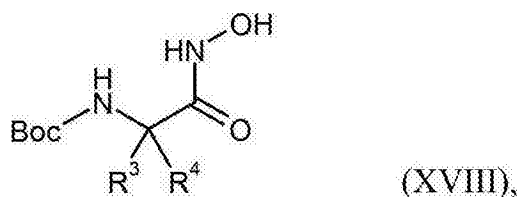
[0179]



[0180] 式中, R³、R⁴、环 A 和 Boc 具有上述含义;

[0181] [D] 将式(XV) 的受保护的氨基酸在其羧基功能被激活的情况下, 首先与羟胺或其盐发生偶联, 得到式(XVIII) 的化合物;

[0182]

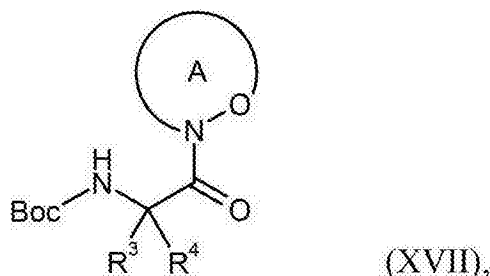
[0183] 式中, R^3 , R^4 和 Boc 具有上述含义;

[0184] 然后, 在存在碱的条件下使该化合物与式 (XIX) 的二溴化物发生烷基化反应, 进行环化反应后, 类似地得到式 (XVII) 的化合物;

[0185]

[0186] 式中, 连接基团 A' 对应于上述环 A 除了 N-O 基团之外的其它任选取代的元素;

[0187]

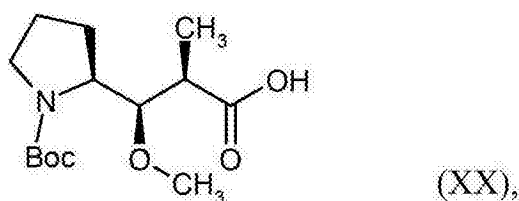
[0188] 式中, R^3 , R^4 、环 A 和 Boc 具有上述含义。[0189] 偶联反应 (XV)+(XVI) $\rightarrow$ (XVII) 和 (XV)+羟胺 $\rightarrow$ (XVIII) 在与上述方法 [A] 和 [B] 的偶联步骤类似的反应条件下进行。[0190] 处理步骤 (XVIII)+(XIX) $\rightarrow$ (XVII) 中用于环烷基化的碱优选为碱金属氢氧化物, 例如氢氧化锂、氢氧化钠或氢氧化钾, 或碱金属或碱土金属碳酸盐, 例如碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙或碳酸铯。

[0191] 用于该反应的合适的惰性溶剂具体为醇类, 例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇或叔丁醇, 或偶极非质子溶剂类, 例如丙酮、甲基乙基酮、N,N-二甲基甲酰胺或二甲亚砜。优选使用丙酮。

[0192] 反应 (XVIII)+(XIX) $\rightarrow$ (XVII) 通常在 +20 至 +120°C 的温度范围内进行, 优选 +50 至 +80°C。所述反应可在大气压、升压或减压的条件下进行 (例如从 0.5 至 5 巴); 通常而言, 所述反应在大气压下进行。

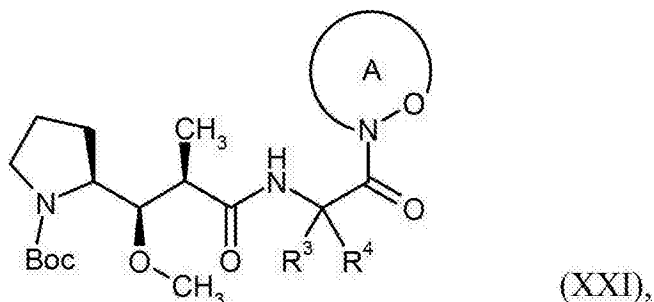
[0193] 对式 (VII) 的化合物而言, 其可通过以下方法获得, 所述方法包括以下步骤: 使上述化合物 (V) 与化合物 (XX) 发生偶联, 得到式 (XXI) 的化合物; 以及随后除去所述 Boc 保护基团。对化合物 (XX) 而言, 其可由化合物 (III) 通过引入合适的保护基团而获得。

[0194]



[0195] 式中, Boc 表示叔丁氧基羰基保护基团;

[0196]



[0197] 式中, R^3 、 R^4 、环 A 和 Boc 具有上述含义。

[0198] 偶联反应 (V) + (XX) $\rightarrow$ (XXI) 也在与上述方法 [A] 和 [B] 的偶联步骤类似的反应条件下进行。

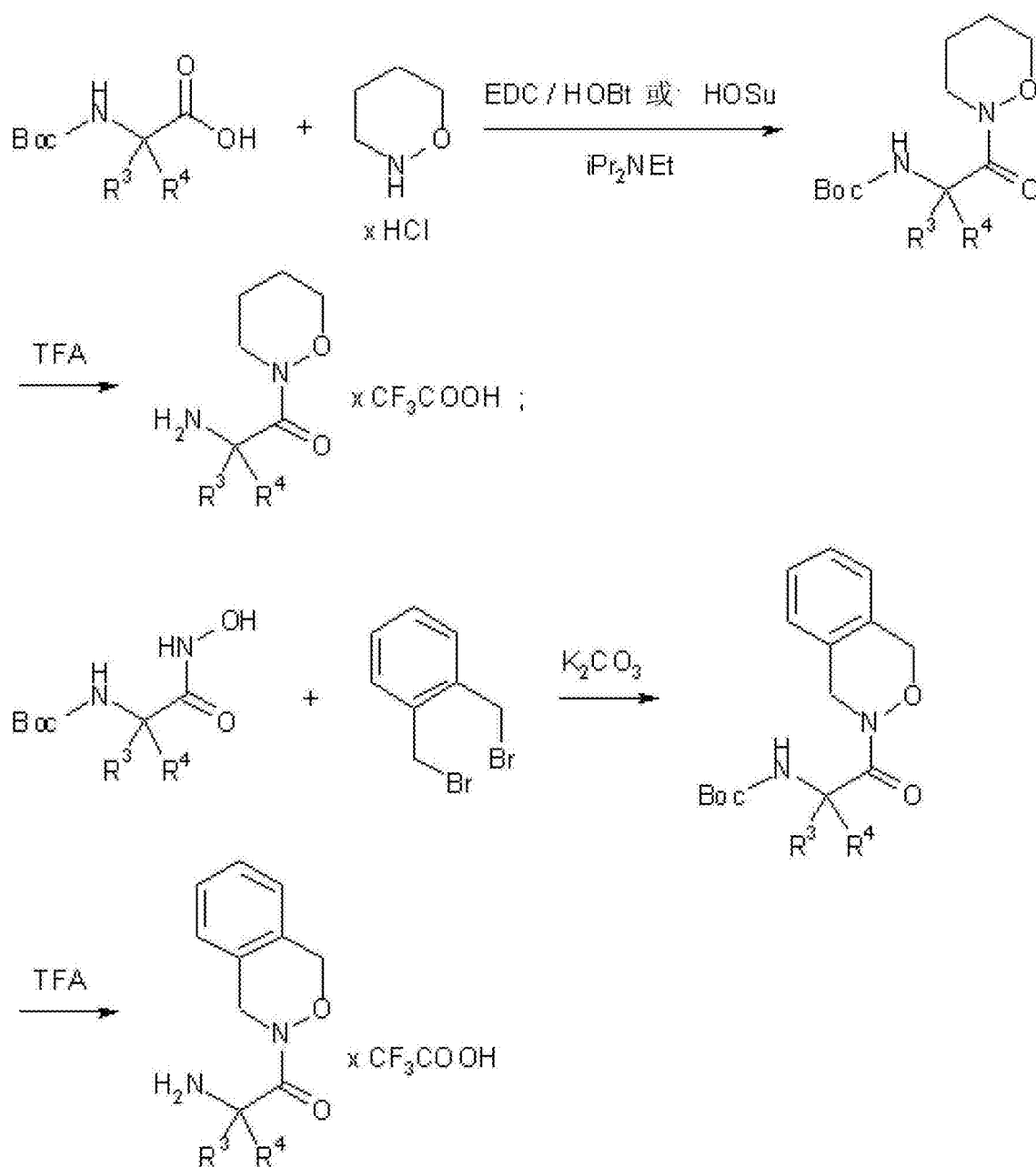
[0199] 式 (III)、(VIII)、(IX)、(X)、(XI)、(XIII)、(XV)、(XVI) 和 (XIX) 的化合物(如果合适,包括其手性或非对映异构体形式)是市售可得的或如文献中所述的此类化合物,或者其可通过对本领域技术人员显而易见的方式,以与文献中公开的方法类似的方法进行制备。在关于起始化合物和中间体的制备的部分中,实验部分还给出了许多关于原料制备的详尽的说明和文献信息。

[0200] 如果合适的异构纯的原料不可得,将本发明化合物分离成相应的对映异构体和/或非对映体还可优选在化合物 (V)、(VI)、(VII)、(XV)、(XVI)、(XVII)、(XVIII) 或 (XXI) 的步骤中尽可能早得进行,然后根据上述反应步骤使所述化合物以单独的形式进一步反应。立体异构体的此类分离可通过本领域技术人员已知的常规方法实现。优选使用色谱法在非手性或手性分离相上进行分离;在游离羧酸作为中间体的情况中,或者还可借助于手性碱通过非对映异构体盐进行分离。

[0201] 本发明化合物的制备可通过以下反应方案以示例性方式进行说明:

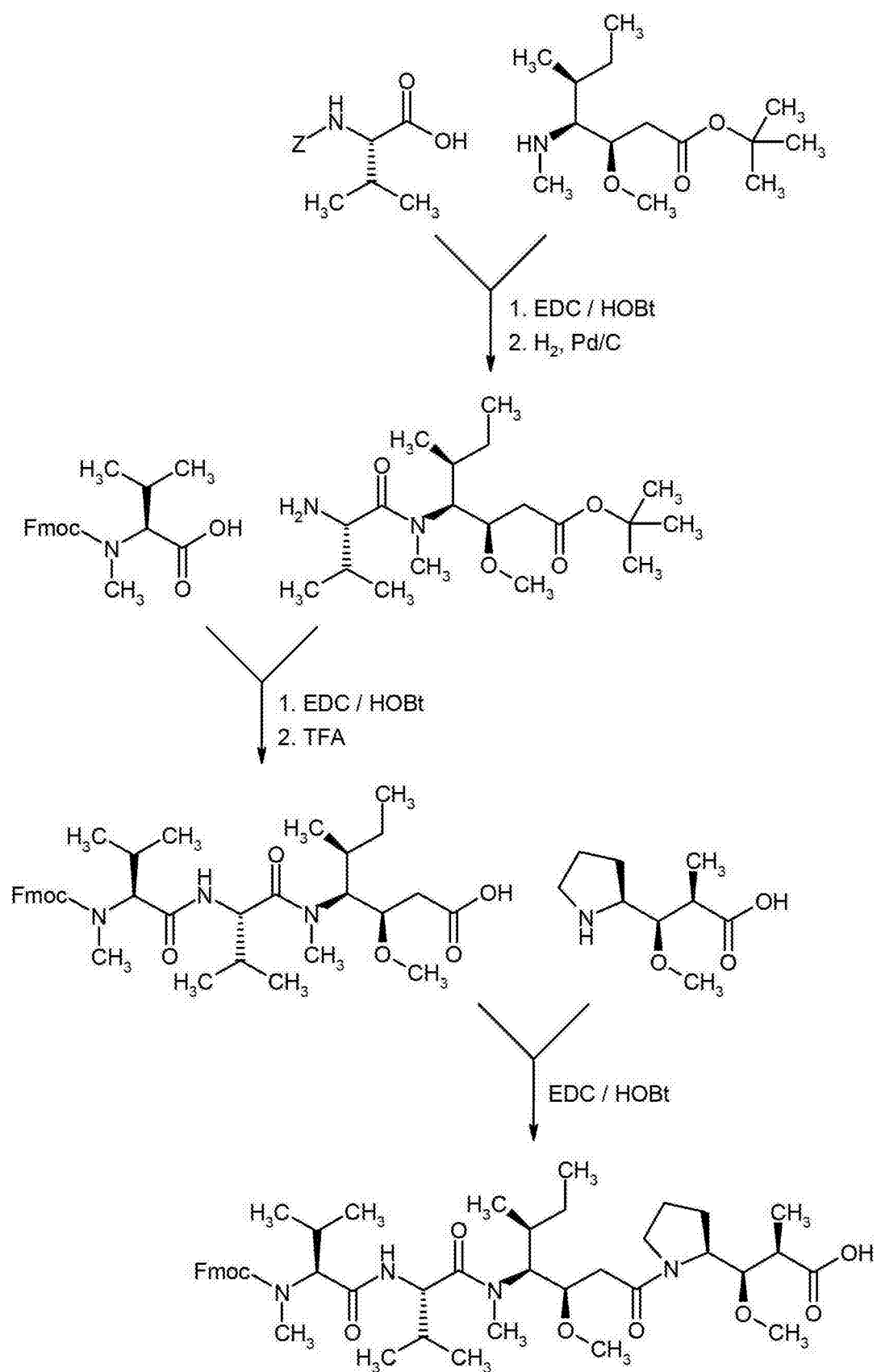
[0202] 方案 1

[0203]



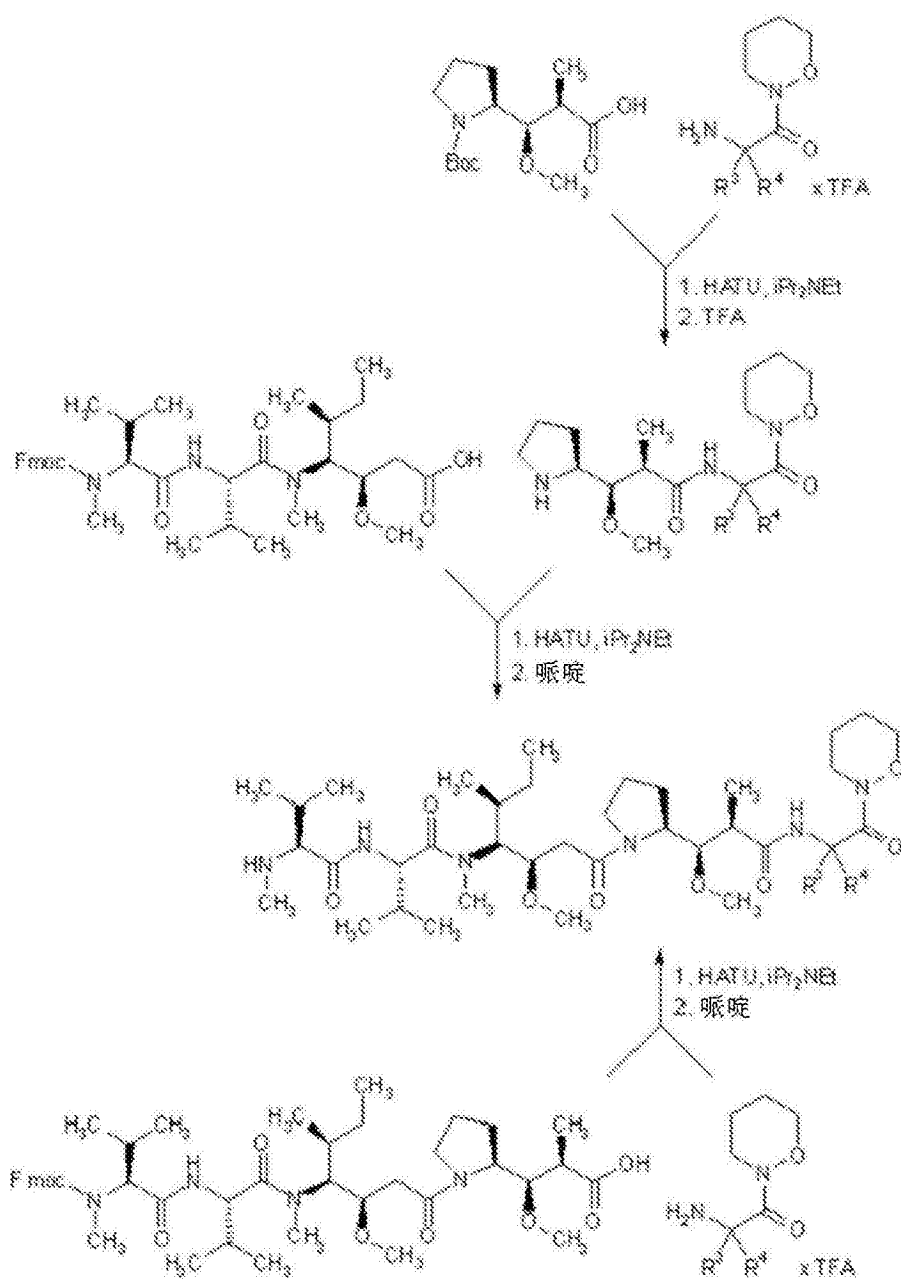
[0204] 方案 2

[0205]



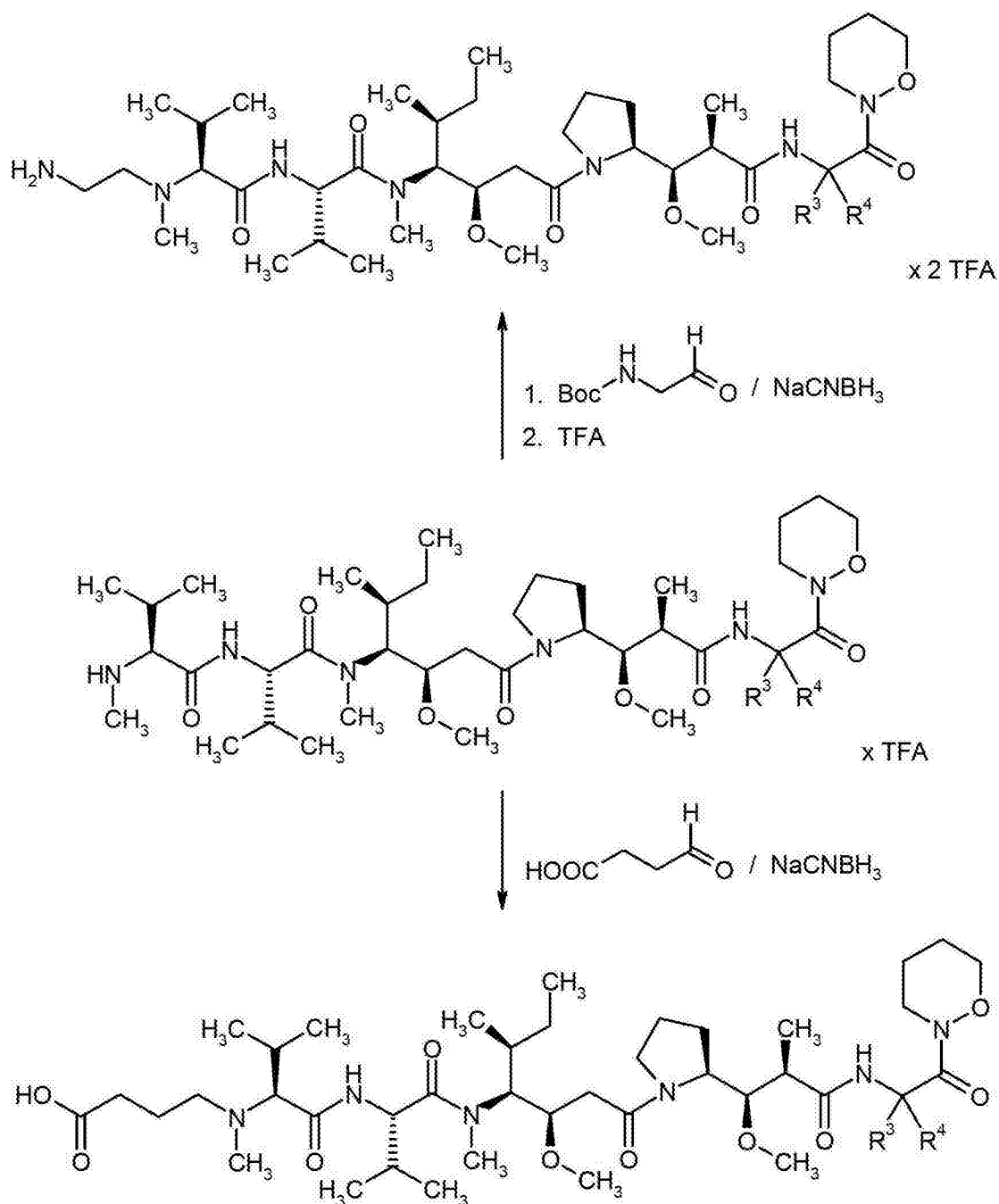
[0206] 方案 3

[0207]



[0208] 方案 4

[0209]



[0210] 本发明化合物具有有用的药理学性质，并可用于预防和治疗人和动物的疾病。

[0211] 与单甲基他汀 F (MMAF) 相比，本发明化合物具有显著较强的细胞毒活性，另外与已知的 MMAF 的酯衍生物 (例如 MMAF-OMe) 相比，其在血浆中具有显著较高的稳定性。基于性质的这些概况，因此本发明化合物通常在一定程度上适合于治疗人和哺乳动物的过度增殖性疾病。所述化合物在一方面能够抑制、阻断、减少或降低细胞增殖和细胞分裂，在另一方面，其可增加细胞凋亡。

[0212] 可使用本发明化合物治疗的过度增殖性疾病具体包括癌症和肿瘤疾病组。在本发明的内容中，具体而言，所述疾病应理解为包括但不限于以下疾病：乳腺癌和乳腺肿瘤 (导管和小叶形式，也是原位的)、呼吸道肿瘤 (小细胞和非小细胞癌，支气管癌)、脑肿瘤 (例如，脑干的脑肿瘤和下丘脑的脑肿瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤以及神经外胚层瘤和松果体瘤)、消化器官的肿瘤 (食道、胃、胆囊、小肠、大肠、直肠)、肝肿瘤 (包括肝细胞癌、

胆管细胞癌和混合的肝细胞和胆管细胞癌)、头部和颈部区域的肿瘤(喉、下咽、鼻咽、口咽、嘴唇和口腔)、皮肤肿瘤(鳞状上皮癌、卡波济氏肉瘤、恶性黑色素瘤、梅克尔(Merkel)细胞皮肤癌和非黑色素瘤的皮肤癌)、软组织肿瘤(包括软组织肉瘤、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、淋巴肉瘤和横纹肌肉瘤)、眼睛的肿瘤(包括眼内黑色素瘤和视网膜母细胞瘤)、内分泌及外分泌腺的肿瘤(如甲状腺、甲状旁腺、胰腺和唾液腺)、泌尿道的肿瘤(膀胱、阴茎、肾、肾盂和输尿管的肿瘤)以及生殖器官的肿瘤(女性的子宫内膜癌、子宫颈癌、卵巢癌、阴道癌、外阴癌和子宫癌,男性的前列腺癌和睾丸癌)。还包括以固体形式和作为循环血细胞的增殖性血液疾病,例如淋巴瘤、白血病和骨髓增生性疾病,例如,急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病和毛细胞白血病,以及艾滋病相关的淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、皮肤 T- 细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和中枢神经系统的淋巴瘤。

[0213] 上述人的疾病也可在具有类似病因的其它哺乳动物中发生,并且可使用本发明化合物对其进行治疗。

[0214] 在本发明的内容中,术语“治疗”或“处理”表示其常规含义,意在表示照顾和护理患者,目的在于对抗、减轻、减弱、缓解疾病或健康异常,改善由该疾病对生活状况造成的损害(例如,患有癌症疾病)。

[0215] 本发明还提供了本发明化合物用于治疗 and / 或预防疾病的用途,具体而言,所述疾病为上述疾病。

[0216] 本发明还提供了本发明化合物用于制备治疗和 / 或预防疾病的药物的用途,具体而言,所述疾病为上述疾病。

[0217] 本发明还提供了本发明化合物在用于治疗和 / 或预防疾病的方法中的用途,具体而言,所述疾病为上述疾病。

[0218] 本发明还提供了一种用于治疗 and / 或预防疾病的方法,具体而言,所述疾病为上述疾病,所述方法使用有效量的本发明化合物的至少一种。

[0219] 本发明化合物可单独使用,或(如果需要)与一种或多种其它药理学活性物质联用,只要该联用不会导致不希望的和不可接受的副作用即可。因此,本发明还提供了药物,该药物包括至少一种本发明化合物以及一种或多种其它药物,具体而言,本发明药物用于治疗 and / 或预防上述疾病。

[0220] 例如,本发明化合物可与已知的用于治疗癌症疾病的抗过度增殖性、抑制细胞生长的或细胞毒性的物质联用。作为示例,联用中可提及的合适的药物为选自下组的药物:

[0221] 阿地白介素、阿仑膦酸、干扰素、阿利维甲酸、别嘌醇、别嘌醇钠、帕洛诺司琼(Aloxi)、六甲蜜胺、氨基格鲁米特、氨磷汀、氨柔比星、安吡啶、阿那曲唑、甲磺酸多拉司琼、阿法达贝泊汀(Aranesp)、阿格拉宾、三氧化二砷、阿诺新、5- 氮杂胞苷、硫唑嘌呤、卡介苗(BCG) 或 Tice 种卡介苗(tice-BCG)、贝他定、醋酸倍他米松、倍他米松磷酸钠、贝沙罗汀、硫酸博来霉素、溴脲苷、硼替佐米、白消安、降钙素、阿仑单抗(Campath)、卡培他滨、卡铂、康士得(Casodex)、赛孚松(cefesone)、西莫白介素、柔红霉素、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯屈磷酸、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D(dactinomycin)、柔红霉素脂质体(DaunoXome)、地塞米松(Decadron)、磷酸地塞米松(Decadron phosphate)、戊酸雌二醇、地尼白介素、狄波美、地洛瑞林、右雷佐生、己烯雌酚、大扶康(Diflucan)、多西他奇、去氧

氟尿苷、阿霉素、屈大麻酚、钆-166-壳聚糖复合物 (DW-166HC)、醋酸亮丙瑞林 (Eligard)、拉布立酶 (Elitek)、盐酸表柔比星 (Ellence)、阿瑞吡坦 (Emend)、表阿霉素、阿法依伯汀、促红细胞生成素 (Epogen)、依铂、左旋咪唑片、雌二醇片 (Estrace)、雌二醇、雌莫司汀磷酸钠、炔雌醇、氨磷汀 (Ethyol)、羟乙磷酸、凡毕复 (Etopophos)、依托泊甙、法倔唑、法斯通 (farstone)、非格司亭、非那司提、非格司亭、氟尿苷、氟康唑、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶脱氧核苷、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、氟甲睾酮、氟他胺、福美司坦、福斯特比 (fosteabine)、福莫司汀、氟维司群、免疫球蛋白 (Gammagard)、吉西他滨、吉妥单抗、格列卫 (Gleevec)、卡莫司汀植入膜剂 (Gliadel)、戈舍瑞林、盐酸格拉司琼、组氨瑞林、和美新、氢化可的松、赤式-羟基壬基腺嘌呤、羟基脲、替伊莫单抗、伊达比星、异环磷酰胺、干扰素- α 、干扰素- α -2、干扰素- α -2 α 、干扰素- α -2 β 、干扰素- α -n1、干扰素- α -n3、干扰素- β 、干扰素- γ -1 α 、白细胞介素-2、甘乐能 (intron A)、易瑞沙、伊立替康、凯特瑞、香菇多糖硫酸、来曲唑、甲酰四氢叶酸、亮丙瑞林、醋酸亮丙瑞林、左旋四咪唑、左旋亚叶酸钙盐、左甲状腺素钠、左旋甲状腺素片、洛莫司汀、氯尼达明、大麻酚 (Marinol)、氮芥、甲钴胺、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、美法仑、酯化雌激素 (Menest)、6-巯基嘌呤、美司钠、氨甲蝶呤、氨基乙酰丙酸甲酯 (Metvix)、米替福新、米诺环素、丝裂霉素 C、米托坦、米托蒽醌、曲洛司坦 (Modrenal)、脂质体多柔比星 (Myocet)、奈达铂、聚乙二醇非格司亭 (Neulasta)、奥普瑞白介素 (Neumega)、非格司亭 (Neupogen)、尼鲁米特、他莫昔芬 (Nolvadex)、NSC-631570、OCT-43、奥曲肽、盐酸昂丹司琼、泼尼松龙 (Orapred)、奥沙利铂、紫杉醇、泼尼松磷酸钠制剂 (Pediapred)、培加帕酶、派罗欣 (Pegasys)、喷司他丁、溶链菌制剂 (Picibanil)、盐酸毛果芸香碱、吡柔比星、普卡霉素、吡吩姆钠、泼尼莫司汀、泼尼松龙、泼尼松、倍美力 (Premarin)、甲基苄肼、阿法依伯汀 (Procrit)、雷替曲塞、利比 (Rebif)、依替膦酸锶-186、利妥昔单抗、罗扰素 (roferon-A)、罗莫肽、毛果芸香碱片 (Salagen)、善得定、沙莫司亭、司莫司汀、西佐喃、索布佐生、甲强龙 (Solu-Medrol)、链佐星、氯化锶-89、左旋甲状腺素钠 (Synthroid)、他莫昔芬、坦索罗辛、他索纳明、他斯托内酯 (tastolactone)、泰索帝、替西白介素、替莫唑胺、替尼泊苷、丙酸睾酮、甲睾酮 (Testred)、硫鸟嘌呤、噻替派、促甲状腺素、替鲁膦酸、拓扑替康、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、曲奥舒凡、维生素 A 酸、甲氨蝶呤 (Trexall)、三甲基蜜胺、三甲曲沙、乙酸曲普瑞林、双羟萘酸曲普瑞林、优福定 (UFT)、尿苷、戊柔比星、维司力农、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、维鲁利秦 (Virulizin)、辛卡德 (Zinecard)、净司他丁斯酯、枢复宁 (Zofran) ;ABI-007、阿克比芬 (acolbifen)、艾克蒂木 (Actimmune)、阿菲尼塔克 (Affinitak)、氨基嘌呤、阿佐昔芬、阿索皮尼 (asoprisnil)、阿他美坦、阿曲生坦、阿瓦斯丁、BAY43-9006 (索拉非尼)、CCI-779、CDC-501、西乐葆、西妥昔单抗、克立那托、醋酸环丙孕酮、地西他滨、DN-101、阿霉素-MTC、dSLIM、度他雄胺、艾多特卡林 (edotecarin)、依氟鸟氨酸、依喜替康、芬维 A 胺、组胺二盐酸盐、组氨瑞林水凝胶植入剂、钆-166DOTMP、伊班膦酸、干扰素- γ 、内含子-PEG、伊沙匹隆、钥孔血蓝蛋白、L-651582、兰瑞肽、拉索昔芬、利布拉 (libra)、洛那法尼、米泼昔芬、米诺膦酸、MS-209、脂质体 MTP-PE、MX-6、那法瑞林、奈莫柔比星、新伐司他、诺拉曲特、奥利默森、翁可-TCS (onko-TCS)、奥斯德 (Osidem)、聚谷氨酸紫杉醇、帕米膦酸二钠、PN-401、QS-21、氟硫安定、R-1549、雷洛昔芬、豹蛙酶、13-顺式-维甲酸 (13-cis-retic acid)、赛特铂、西奥骨化醇、T-138067、特罗凯 (Tarceva)、二十二碳六烯酸紫杉醇、胸腺肽- α -1、噻唑羧胺核苷、替吡法尼、替拉扎明、TLK-286、托瑞

米芬、反式 MID-107R、伐司扑达、伐普肽、瓦他拉尼碱、维替泊芬、长春氟宁、Z-100、唑来膦酸及它们的组合。

[0222] 在优选的实施方式中，本发明化合物可与抗过度增殖剂(antihyperproliferativeagents)联用，作为示例(而非限制性)，所述抗过度增殖剂可为选自下组的试剂：

[0223] 氨鲁米特、L-天冬酰胺酶、硫唑嘌呤、5-氮杂胞苷、博莱霉素、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、利血生、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、柔毛霉素、己烯雌酚、2',2'-二氟脱氧胞苷、多西紫杉醇、多柔比星(阿霉素)、表柔比星、埃博霉素及其衍生物、赤式-羟基壬基腺嘌呤、乙炔雌二醇、依托泊苷、磷酸氟达拉滨、5-氟脱氧尿苷、5-氟脱氧尿苷单磷酸酯、5-氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、六甲基蜜胺、羟基脲、己酸羟孕酮、伊达比星、异环磷酰胺、干扰素、伊立替康、甲酰四氢叶酸、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、氨甲喋呤、丝裂霉素 C、米托坦、米托蒽醌、紫杉醇、喷司他丁、N-膦乙酰基 L-天冬氨酸(PALA)、普卡霉素、泼尼松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、司莫司汀、链脲霉素、他莫西芬、替尼泊苷、丙酸睾酮、硫鸟嘌呤、噻替派、拓扑替康、三甲基蜜胺、尿苷、长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0224] 本发明化合物还可以非常有前景的方式与生物治疗剂例如抗体(例如贝伐单抗、美罗华、爱必妥、赫赛汀)联用。本发明化合物还在与针对血管生成的治疗(例如，与贝伐单抗、阿西替尼、瑞森汀(recentin)、瑞格拉芬尼(regorafenib)、索拉非尼或舒尼替尼)联用中实现积极效果。由于其有利的副作用的概况，还特别适合与蛋白酶体抑制剂和 mTOR 抑制剂的联用以及与抗激素和甾体代谢酶抑制剂的联用。

[0225] 通常，通过本发明化合物与具有抑制细胞生长的或细胞毒性作用的其它试剂联用可追求以下目的：

[0226] • 与使用单一药物治疗相比，在降低肿瘤生长速率、减少其尺寸或甚至使其完全消除方面，具有改进的活性；

[0227] • 与单一治疗相比，以较低的剂量进行化疗的可能性；

[0228] • 与单独给药相比，具有少量副作用且可耐受性更高的治疗的可能性；

[0229] • 治疗更广范围的肿瘤疾病的可能性；

[0230] • 实现治疗较高的响应率；

[0231] • 与目前标准治疗相比，患者的存活时间更长。

[0232] 另外，本发明化合物还可用于与放疗和 / 或手术干预联用。

[0233] 本发明还提供了药物，该药物包括至少一种本发明化合物，并且通常与一种或多种惰性、无毒、药学上合适的赋形剂一起，本发明还提供了该药物用于上述目的用途。

[0234] 本发明化合物可全身和 / 或局部作用。出于该目的，可以以合适的方式给药，所述给药方式包括例如口服、胃肠道外、肺内(pulmonally)，鼻内、舌下、舌、口颊、直肠、经皮、透皮，结膜内(conjunctivally)、经耳(otically)或以植入物或支架的形式给药。

[0235] 本发明化合物可以这些途径的合适给药形式进行给药。

[0236] 根据现有技术，发挥快速释放和 / 或以改良方式释放本发明化合物以及以晶体和 / 或非晶化(amorphized)和 / 或溶解的形式包含本发明化合物功能的给药形式适合于口服给药，例如片剂(非包衣或包衣片剂、例如具有包衣的片剂，所述包衣耐受胃液或以延迟

的方式溶解或是不溶的并控制本发明化合物的释放)、膜剂 / 扁剂 (oblates) 或片剂 (其在口腔中快速分解)、膜剂 / 冻干剂、胶囊剂 (例如硬的或软的明胶胶囊)、薄膜包衣片、粒剂、团剂、粉剂、乳剂、混悬剂、气溶胶或溶液剂。

[0237] 可以不经吸收步骤 (例如静脉内、动脉内、心内、脊柱内或腰内) 或同时包括吸收 (例如肌内、皮下、皮内、经皮或腹膜内) 来实施胃肠道外给药。适合于胃肠道外给药的给药形式包括以溶液剂、混悬剂、乳剂、冻干剂或无菌粉剂的形式注射和输注制剂。

[0238] 对于其它给药途径, 例如吸入药物形式 (包括粉末吸入器, 喷雾器)、滴鼻剂、溶液剂或喷剂、片剂、膜剂 / 扁剂或舌、舌下或颊给药的胶囊、栓剂、耳或眼制剂、阴道胶囊剂, 水性混悬剂 (乳液、振荡混合物)、亲脂性混悬剂、软膏、乳膏、透皮治疗系统 (例如贴片)、乳、糊剂、泡沫剂、洒粉剂、植入物或支架是合适的。

[0239] 优选口服和胃肠道外给药, 特别是口服和静脉内给药。

[0240] 本发明的化合物可转化为所述给药形式。这可以通过已知的方式, 通过与惰性、无毒、药学上合适的赋形剂进行混合来实施。这些赋形剂包括但不限于载体物质 (例如微晶纤维素、乳糖、甘露醇)、溶剂 (例如液体聚乙二醇)、乳化剂和分散剂或湿润剂 (例如十二烷基硫酸钠、聚氧山梨醇油酸酯)、粘结剂 (例如聚乙烯基吡咯烷酮)、合成和天然聚合物 (例如白蛋白)、稳定剂 (例如抗氧化剂, 例如抗坏血酸)、着色剂 (例如, 无机颜料, 例如铁氧化物) 和味道和 / 或气味矫正剂。

[0241] 通常而言, 已证实在胃肠道外给药的情况中为了实现有效的结果, 给药量约为 0.001-1 毫克 / 千克体重是有益的, 优选约 0.01-0.5 毫克 / 千克体重。在口服给药的情况中, 所述剂量约为 0.01-100 毫克 / 千克体重, 优选约 0.01-20 毫克 / 千克体重, 非常特别优选 0.1-10 毫克 / 千克体重。

[0242] 然而, 根据以下情况可能需要发生与所述量的偏差, 具体而言取决于体重、给药途径、对活性化合物的个体表现、制剂的特性和进行给药的时间点或间隔。因此, 在一些情况中可能低于上述最小量即可, 而在其它情况中必须超过所述上限。在给药量较大的情况中, 可建议在一天内将其分配成几个单独剂量。

[0243] 以下工作实施例说明本发明。本发明不限于所述实施例。

[0244] 除非另有说明, 以下测试和实施例中百分数值是重量百分数, 份是重量份。在各情况中液体 / 液体溶液的溶剂比、稀释比和浓度数据与体积有关。

[0245] A. 实施例

[0246] 缩写和首字母缩写:

[0247] abs. 绝对

[0248] Ac 酰基

[0249] aq. 水性、水溶液

[0250] Boc 叔丁氧基羰基

[0251] br. 宽峰 (NMR 中)

[0252] Ex. 实施例

[0253] CI 化学电离 (MS 中)

[0254] d 双峰 (NMR 中)

[0255] d 天

[0256]	TLC	薄层色谱法
[0257]	DCI	直接化学电离(MS 中)
[0258]	dd	双二重峰(NMR 中)
[0259]	DMAP	4-N, N- 二甲基氨基吡啶
[0260]	DME	1, 2- 二甲氧基乙烷
[0261]	DMF	N, N- 甲基甲酰胺
[0262]	DMSO	甲亚砷
[0263]	DPBS	杜尔伯科磷酸盐缓冲盐水溶液
[0264]	dt	双三重峰(NMR 中)
[0265]	EDC	N'-(3- 二甲基氨基丙基)-N- 乙基碳二亚胺盐酸盐
[0266]	EI	电子冲击电离(MS 中)
[0267]	eq.	当量
[0268]	ESI	电喷雾电离(MS 中)
[0269]	FCS	胎牛血清
[0270]	Fmoc	(9H- 芴-9- 基甲氧基) 羰基
[0271]	sat.	饱和的
[0272]	GTP	5'- 三磷酸鸟苷
[0273]	h	小时
[0274]	HATU	0-(7- 氮杂苯并三唑-1- 基)-N, N', N'- 四甲基脲鎓六氟
[0275]		磷酸盐
[0276]	HEPES	4-(2- 羟乙基) 哌嗪-1- 乙磺酸
[0277]	HOAc	乙酸
[0278]	HOBt	1- 羟基-1H- 苯并三唑水合物
[0279]	HOSu	N- 羟基琥珀酰亚胺
[0280]	HPLC	高压、高效液相色谱
[0281]	conc.	浓缩的
[0282]	LC-MS	液相色谱- 偶合质谱
[0283]	m	多重峰(NMR 中)
[0284]	min	分钟
[0285]	MS	质谱
[0286]	MTT	溴化 3-(4, 5- 二甲基噻唑-2- 基)-2, 5- 二苯基-2H- 四唑盐
[0287]	NMM	N- 甲基吗啉
[0288]	NMP	N- 甲基-2- 吡咯烷酮
[0289]	NMR	核磁共振
[0290]	PBS	磷酸盐缓冲盐水溶液
[0291]	Pd/C	负载在活性碳上的钯
[0292]	quant.	定量(用于产率)
[0293]	quart	四重峰(NMR 中)
[0294]	quint	五重峰(NMR 中)

- [0295] R_f 保留指数(用于 TLC)
[0296] RT 室温
[0297] R_t 保留时间(用于 HPLC)
[0298] s 单峰(NMR 中)
[0299] t 三重峰(NMR 中)
[0300] tert 叔
[0301] TFA 三氟乙酸
[0302] THF 四氢呋喃
[0303] UV 紫外光谱法
[0304] v/v 体积与体积比(溶液的)
[0305] Z 苄氧基羰基
[0306] tog. 一起

[0307] HPLC 和 LC-MS 方法：

[0308] 方法 1 (LC-MS)：

[0309] 仪器：沃特斯公司 (Waters) 的 Acquity SQD UPLC 系统；柱：沃特斯公司的 Acquity UPLC HSS T31.850 毫米 x1 毫米；流动相 A：1 升水 +0.25 毫升的 99% 浓度的甲酸，流动相 B：1 升乙腈 +0.25 毫升的 99% 浓度的甲酸；梯度：0.0 分钟 90%A → 1.2 分钟 5%A → 2.0 分钟 5%A；流量：0.40 毫升 / 分钟；炉：50℃；UV 检测：210-400 纳米。

[0310] 方法 2 (LC-MS)：

[0311] 仪器：带有沃特斯公司的 UPLC Acquity 的 Micromass QuattroPremier；柱：Thermo Hypersil GOLD1.9 μ 50 毫米 x1 毫米；流动相 A：1 升水 +0.5 毫升的 50% 浓度的甲酸，流动相 B：1 升乙腈 +0.5 毫升的 50% 浓度的甲酸；梯度：0.0 分钟 90%A → 0.1 分钟 90%A → 1.5 分钟 10%A → 2.2 分钟 10%A；流量：0.33 毫升 / 分钟；炉：50℃；UV 检测：210 纳米。

[0312] 方法 3 (LC-MS)：

[0313] 仪器：带有 HPLC 安捷伦 (Agilent) 系列 1100 的 Micromass Quattro MicroMS；柱：Thermo Hypersil GOLD3 μ 20 毫米 x4 毫米；流动相 A：1 升水 +0.5 毫升的 50% 浓度的甲酸，流动相 B：1 升乙腈 +0.5 毫升的 50% 浓度的甲酸；梯度：0.0 分钟 100%A → 3.0 分钟 10%A → 4.0 分钟 10%A → 4.01 分钟 100%A (流量 2.5 毫升 / 分钟) → 5.00 分钟 100%A；炉：50℃；流量：2 毫升 / 分钟；UV 检测：210 纳米。

[0314] 方法 4 (LC-MS)：

[0315] MS 仪器类型：Micromass ZQ；HPLC 仪器类型：HP1100 系列；UV DAD；柱：Phenomenex Gemini3 μ 30 毫米 x3.00 毫米；流动相 A：1 升水 +0.5 毫升的 50% 浓度的甲酸，流动相 B：1 升乙腈 +0.5 毫升的 50% 浓度的甲酸；梯度：0.0 分钟 90%A → 2.5 分钟 30%A → 3.0 分钟 5%A → 4.5 分钟 5%A；流量：0.0 分钟 1 毫升 / 分钟 → 2.5 分钟 / 3.0 分钟 / 4.5 分钟 2 毫升 / 分钟；炉：50℃；UV 检测：210 纳米。

[0316] 方法 5 (HPLC)：

[0317] 仪器：HP1090 系列 II；柱：Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, 50 毫米 x4.6 毫米；前置柱：Merck Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e, 5 毫米 x4.6 毫米；进样体

积:5 微升;流动相 A:70% HClO_4 的水溶液(4 毫升/升),流动相 B:乙腈;梯度:0.00 分钟 20%B → 0.50 分钟 20%B → 3.00 分钟 90%B → 3.50 分钟 90%B → 3.51 分钟 20%B → 4.00 分钟 20%B;流量:5 毫升/分钟;柱温:40℃。

[0318] 方法 6 (HPLC):

[0319] 仪器:带有 DAD996 的沃特斯的公司的 2695;柱:Merck ChromolithSpeedROD RP-18e, 50 毫米 x4.6 毫米;前置柱:Merck Chromolith GuardCartridge Kit RP-18e, 5 毫米 x4.6 毫米;流动相 A:70% HClO_4 的水溶液(4 毫升/升),流动相 B:乙腈;梯度:0.00 分钟 5%B → 0.50 分钟 5%B → 3.00 分钟 95%B → 4.00 分钟 95%B;流量:5 毫升/分钟。

[0320] 方法 7 (LC-MS):

[0321] MS 仪器类型:Waters ZQ;HPLC 仪器类型:安捷伦 1100 系列;UV DAD;柱:Thermo Hypersil GOLD3 μ 20 毫米 x4 毫米;流动相 A:1 升水 +0.5 毫升的 50%浓度的甲酸,流动相 B:1 升乙腈 +0.5 毫升的 50%浓度的甲酸;梯度:0.0 分钟 100%A → 3.0 分钟 10%A → 4.0 分钟 10%A → 4.1 分钟 100%A(流量 2.5 毫升/分钟);炉:55℃;流量:2 毫升/分钟;UV 检测:210 纳米。

[0322] 方法 8 (LC-MS):

[0323] MS 仪器类型:Waters ZQ;HPLC 仪器类型:安捷伦 1100 系列;UV DAD;柱:Thermo Hypersil GOLD3 μ 20 毫米 x4 毫米;流动相 A:1 升水 +0.5 毫升的 50%浓度的甲酸,流动相 B:1 升乙腈 +0.5 毫升的 50%浓度的甲酸;梯度:0.0 分钟 100%A → 2.0 分钟 60%A → 2.3 分钟 40%A → 3.0 分钟 20%A → 4.0 分钟 10%A → 4.2 分钟 100%A(流量 2.5 毫升/分钟);炉:55℃;流量:2 毫升/分钟;UV 检测:210 纳米。

[0324] 方法 9 (LC-MS):

[0325] 仪器:沃特斯的公司的 Acquity SQD UPLC 系统;柱:沃特斯的公司的 AcquityUPLC HSS T31.8 μ 50 毫米 x1 毫米;流动相 A:1 升水 +0.25 毫升的 99%浓度的甲酸,流动相 B:1 升乙腈 +0.25 毫升的 99%浓度的甲酸;梯度:0.0 分钟 95%A → 6.0 分钟 5%A → 7.5 分钟 5%A;炉:50℃;流量:0.35 毫升/分钟;UV 检测:210-400 纳米。

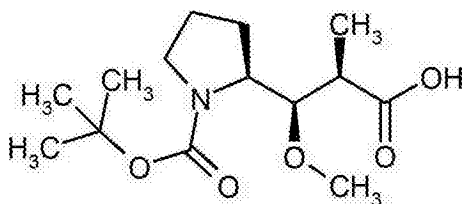
[0326] 对于以下未明确描述其制备的所有反应物或试剂,其均从通常可得的来源市售获得。对于以下同样未描述其制备的所有其它反应物或试剂,并且其不是市售可得的或其来源不是通常可得的,给出了描述其制备方法的公开文献。

[0327] 原料和中间体:

[0328] 原料 1

[0329] (2R, 3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸(Boc-多拉脯氨酸)

[0330]



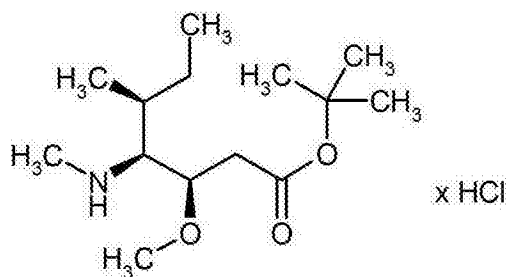
[0331] 所述标题化合物可根据文献方法通过各种途径制备,例如参见 Pettit 等人,《合成》(Synthesis)1996, 719;Shioiri 等人, Tetrahedron Lett. 1991, 32, 931;Shioiri 等

人, Tetrahedron 1993, 49, 1913 ;Koga 等人, Tetrahedron Lett. 1991, 32, 2395 ;Vidal 等人, Tetrahedron 2004, 60, 9715 ;Poncet 等人, Tetrahedron 1994, 50, 5345。在此, 以游离酸的形式(如图所示) 或以相应的二环己基胺盐的形式制备所述标题化合物。

[0332] 原料 2

[0333] (3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-(甲基氨基)庚酸叔丁酯盐酸盐(多拉异亮氨酸 -OtBu x HCl)

[0334]

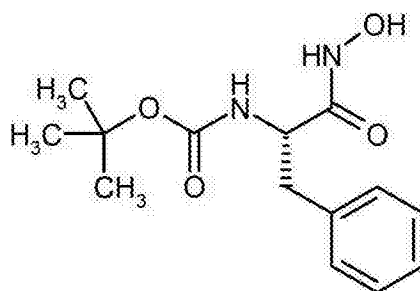


[0335] 所述标题化合物可根据文献方法通过各种途径制备, 例如参见 Pettit 等人, J. Org. Chem. 1994, 59, 1796 ;Koga 等人, Tetrahedron Lett. 1991, 32, 2395 ;Shioiri 等人, Tetrahedron Lett. 1991, 32, 931 ;Shioiri 等人, Tetrahedron 1993, 49, 1913。

[0336] 原料 3

[0337] N^o-(叔丁氧基羰基)-N-羟基-L-苯基丙氨酸酰胺

[0338]



[0339] 所述标题化合物可根据文献方法制备(A. Ritter 等人, J. Org. Chem. 1994, 59, 4602)。

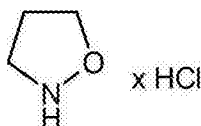
[0340] 产率: 750 毫克(理论上为 75%)

[0341] LC-MS (方法 3): R_t=1.67 分钟; MS (ESIpos): m/z=281 (M+H)⁺。

[0342] 原料 4

[0343] 1, 2-噁唑烷盐酸盐

[0344]

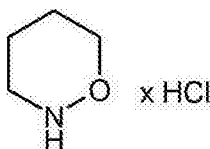


[0345] 所述标题化合物可根据文献方法制备, 例如参见 H. King, J. Chem. Soc. 1942, 432 ; 其也可市售获得。

[0346] 原料 5

[0347] 1, 2-噁嗪烷(Oxazinane) 盐酸盐

[0348]

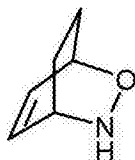


[0349] 所述标题化合物可根据文献方法制备,例如参见 H. King, J. Chem. Soc. 1942, 432。

[0350] 原料 6

[0351] 2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯

[0352]



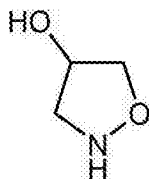
[0353] 所述标题化合物可根据文献方法以 Boc- 保护的形式制备(例如,参见 C. Johnson 等人, Tetrahedron Lett. 1998, 39, 2059);脱保护是以常规方式通过与三氟乙酸处理并随后中和来进行的。

[0354] 产率:149 毫克(理论上为 89%)。

[0355] 原料 7

[0356] 1,2-噁唑烷-4-醇

[0357]

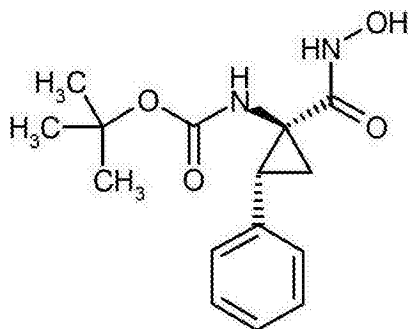


[0358] 所述标题化合物可根据文献方法制备,例如参见 N. Amlaiky, 《合成》(Synthesis) 1982, 5, 426。

[0359] 原料 8

[0360] [(1S, 2R)-1-(羟基氨甲酰基)-2-苯基环丙基]氨基甲酸叔丁酯

[0361]



[0362] 所述标题化合物可根据文献方法(A. Ritter 等人, J. Org. Chem. 1994, 59, 4602)由市售可得的 (1S, 2R)-1-[(叔丁氧基羰基)氨基]-2-苯基环丙烷羧酸(C. Cativiela 等人, Chirality 1999, 11, 583)制备。

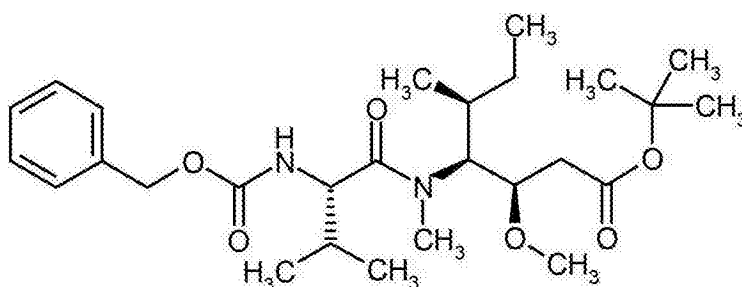
[0363] 产率:339 毫克(理论上为 59%)

[0364] LC-MS (方法 1): $R_t=0.82$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=293 (M+H)^+$ 。

[0365] 中间体 1

[0366] (3R, 4S, 5S)-4-[{N-[(苄氧基)羰基]-L-缬氨酰基}(甲基)氨基]-3-甲氧基-5-甲基庚酸叔丁酯

[0367]



[0368] 将 425 毫克 (1.7 毫摩) 的 N-[(苄氧基)羰基]-L-缬氨酸溶解于 50 毫升的 DMF 中,并依次加入 500 毫克 (1.7 毫摩) 的 (3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-(甲基氨基)庚酸叔丁酯盐酸盐 (原料 2)、356 毫克 (1.9 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、285 毫克 (1.9 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物和 655 毫克 (5.1 毫摩) 的 N,N-异丙基乙基胺。将该混合物在室温条件下搅拌 20 小时。添加另一份 142 毫克 (0.5 毫摩) 的 N-[(苄氧基)羰基]-L-缬氨酸、119 毫克 (0.6 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、95 毫克 (0.6 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物和 218 毫克 (1.7 毫摩) 的 N,N-二异丙基乙基胺,并将该混合物用超声处理 90 分钟。然后将该混合物倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。得到 329 毫克 (理论上为 40%) 的无色油状的标题化合物。

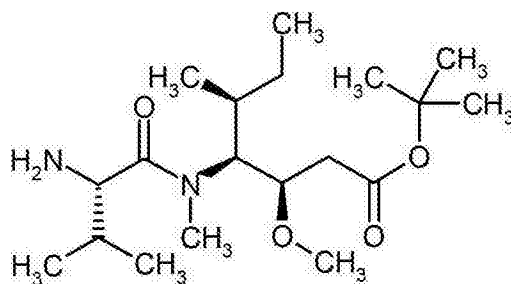
[0369] HPLC (方法 5): $R_t=2.5$ 分钟;

[0370] LC-MS (方法 1): $R_t=1.45$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=493 (M+H)^+$ 。

[0371] 中间体 2

[0372] (3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-[甲基(L-缬氨酰基)氨基]庚酸叔丁酯

[0373]



[0374] 将 500 毫克 (1 毫摩) 的 (3R, 4S, 5S)-4-[{N-[(苄氧基)羰基]-L-缬氨酰基}(甲基)氨基]-3-甲氧基-5-甲基庚酸叔丁酯 (中间体 1) 溶解于 50 毫升的甲醇中,并且在添加 100 毫克的 10% 负载在活性炭上的钯之后,在室温和大气压条件下氢化 1 小时。然后过滤除去该催化剂,并在减压条件下将溶剂除去。得到 370 毫克 (定量) 的几乎无色的油状标题化合物。

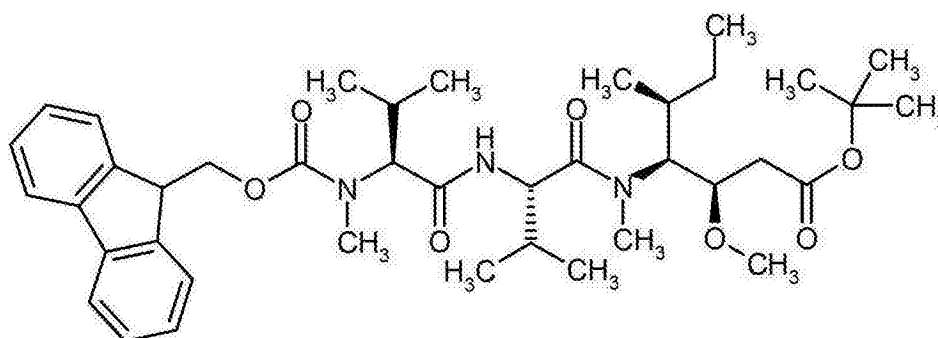
[0375] HPLC (方法 5): $R_t=1.59$ 分钟;

[0376] LC-MS (方法 1): $R_t=0.74$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=359 (M+H)^+$ 。

[0377] 中间体 3

[0378] N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-叔丁氧基-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0379]



[0380] 将 396 毫克 (1.1 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酸溶解于 20 毫升的 DMF, 并依次加入 365 毫克 (1 毫摩) 的 (3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-[甲基(L-缬氨酰基)氨基]庚酸叔丁酯(中间体 2)、234 毫克 (1.2 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 187 毫克 (1.2 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物。在室温条件下将该混合物搅拌过夜。然后将该反应倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相, 依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤, 用硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。该残留物无须进一步纯化即可直接用于下一个步骤。

[0381] 产率: 660 毫克(理论上为 68%)

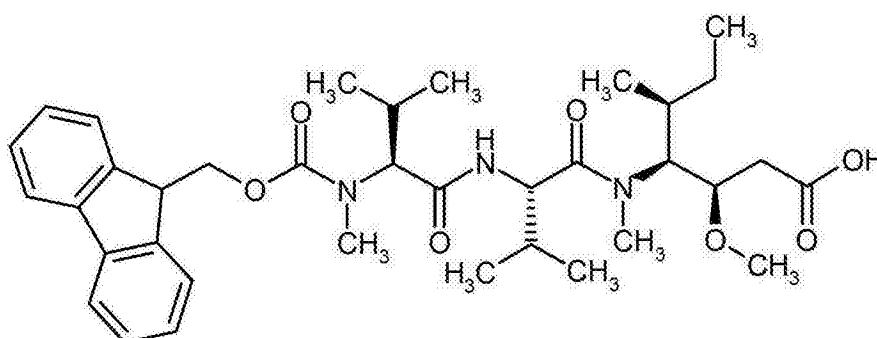
[0382] HPLC (方法 5): $R_t=3.0$ 分钟;

[0383] LC-MS (方法 1): $R_t=1.61$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=694$ (M+H)⁺。

[0384] 中间体 4

[0385] N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R, 3S, 4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0386]



[0387] 将 650 毫克 (0.94 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-叔丁氧基-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体 3) 收集在 5 毫升的二氯甲烷中, 添加 5ml 毫升的三氟乙酸并在室温条件下将该混合物搅拌过夜。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并将剩余的残留物通过制备型 HPLC 进行纯化。得到 430 毫克(理论上为 72%) 的无色泡沫状的标题化合物。

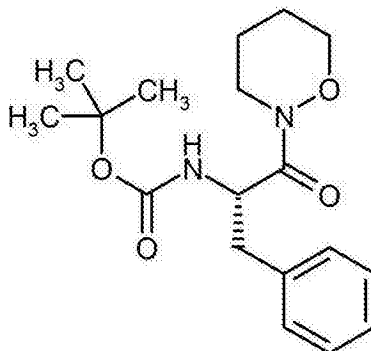
[0388] HPLC (方法 5): $R_t=2.4$ 分钟;

[0389] LC-MS (方法 2): $R_t=1.51$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=638$ (M+H)⁺。

[0390] 中间体 5

[0391] [(2S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基甲酸叔丁酯

[0392]



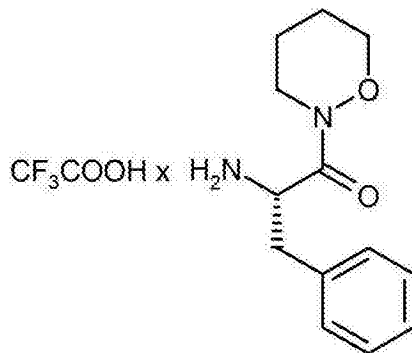
[0393] 将 500 毫克 (1.9 毫摩) 的 N-(叔丁氧基羰基)-L-苯基丙氨酸溶解于 10 毫升的 DMF 中,并依次添加 466 毫克 (3.8 毫摩) 的 1,2-噁嗪烷盐酸盐 (原料 5)、433 毫克 (2.3 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、382 毫克 (2.8 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物和 731 毫克 (5.7 毫摩) 的 N,N-二异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌过夜。然后将该反应倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。得到 620 毫克 (理论上为 98%) 的标题化合物。

[0394] HPLC (方法 5): $R_t=1.8$ 分钟;[0395] LC-MS (方法 2): $R_t=1.62$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=235$ ($M-C_4H_8-CO_2+H$)⁺。

[0396] 中间体 6

[0397] (2S)-2-氨基-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐

[0398]



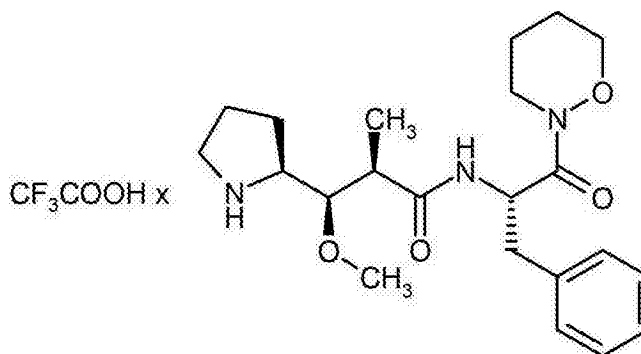
[0399] 将 620 毫克 (1.85 毫摩) 的 [(2S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基甲酸叔丁酯 (中间体 5) 收集在 5 毫升的二氯甲烷中,添加 10 毫升的三氟乙酸,将该混合物在室温条件下搅拌 30 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩,并由水/乙腈将剩余的残留物冻干。在这种方式中,获得 750 毫克无色泡沫状的标题化合物。

[0400] HPLC (方法 5): $R_t=0.45$ 分钟;[0401] LC-MS (方法 3): $R_t=1.09$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=235$ ($M+H$)⁺。

[0402] 中间体 7

[0403] (2R,3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(2S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐

[0404]



[0405] 首先, 从 50 毫克 (0.11 毫摩) 的 (2R, 3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸的二环己基胺盐中通过将该盐收集在乙酸乙酯中并用硫酸氢钾水溶液进行提取, 从而将 (2R, 3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸 (原料 1) 释放出来。用硫酸镁对该有机相进行干燥, 过滤并浓缩。将该残留物收集在 10 毫升的 DMF 中, 并依次添加 49 毫克 (0.11 毫摩) 的 (2S)-2-氨基-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐 (中间体 6)、61 毫克 (0.16 毫摩) 的 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐 (HATU) 和 56 微升 (0.16 毫摩) 的 N,N-二异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌 1 小时。然后将该反应浓缩并通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。得到 44 毫克 (理论上为 82%) 的 Boc-保护的中间体 (2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-羧酸叔丁酯。

[0406] HPLC (方法 5): $R_t=1.9$ 分钟;

[0407] LC-MS (方法 2): $R_t=1.27$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=504$ (M+H)⁺。

[0408] 将 44 毫克 (0.09 毫摩) 的该中间体收集在 3 毫升的二氯甲烷中, 添加 1 毫升的三氟乙酸, 并在室温条件下将该混合物搅拌 30 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并由水/乙腈将剩余的残留物冻干。得到 39 毫克 (理论上为 86%) 的无色泡沫状的标题化合物。

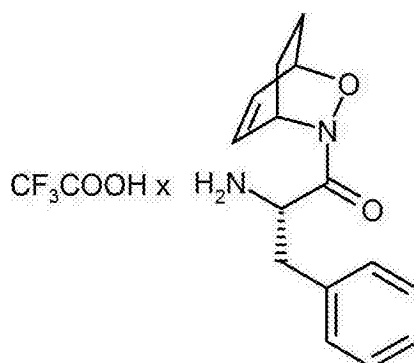
[0409] HPLC (方法 5): $R_t=0.94$ 分钟;

[0410] LC-MS (方法 1): $R_t=0.65$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=404$ (M+H)⁺。

[0411] 中间体 8

[0412] (2S)-2-氨基-1-(2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯-3-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐

[0413]



[0414] 将 41 毫克(0.37 毫摩)的 N-(叔丁氧基羰基)-L-苯基丙氨酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯收集在 10 毫升的 DMF 中,并添加 149 毫克(0.41 毫摩)的 2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯(原料 6)和 72 微升(0.41 毫摩)的 N,N-二异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌 1 小时。然后在减压条件下除去该溶剂,将该残留物收集在乙酸乙酯中,并用 5%浓度的柠檬酸溶液且再用 5%浓度的碳酸氢钠溶液进行提取。将该有机相浓缩,通过在硅胶上使用流动相甲苯/乙醇 10:1 的快速色谱对该残留物进行纯化。将合适的馏分进行合并,并在减压条件下除去该溶剂。在高真空条件下对该残留物进行干燥,得到 69 毫克(理论上为 47%)以非对映体的混合物形式的 Boc-保护的中间体 [(2S)-1-(2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基甲酸叔丁酯。

[0415] LC-MS (方法 1): R_t =1.1 分钟;MS(ESIpos): m/z =359 (M+H)⁺。

[0416] 将 64 毫克(0.18 毫摩)的该中间体收集在 10 毫升的二氯甲烷中,添加 1 毫升的三氟乙酸,并在室温条件下将该混合物搅拌 30 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩,并由水/二噁烷将剩余的残留物冻干。在这种方式中,获得 66 毫克(定量)无色泡沫状的标题化合物。

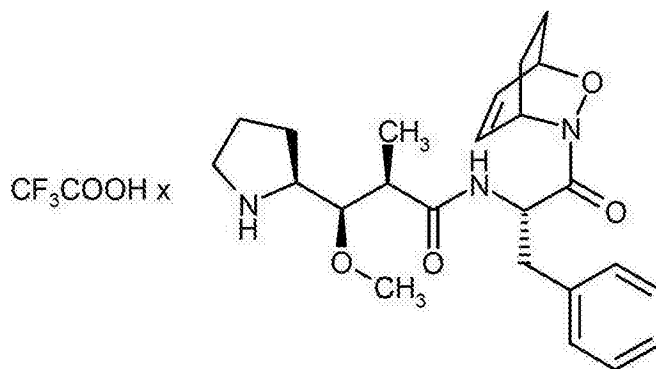
[0417] HPLC (方法 6): R_t =1.45 分钟;

[0418] LC-MS (方法 3): R_t =1.12 分钟;MS(ESIpos): m/z =259 (M+H)⁺。

[0419] 中间体 9

[0420] (2R,3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(2S)-1-(2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐

[0421]



[0422] 首先,从 83 毫克(0.18 毫摩)的 (2R,3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸的二环己基胺盐中通过将该盐收集在乙酸乙酯中并用硫酸氢钾水溶液进行提取,从而将 (2R,3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸(原料 1)释放出来。用硫酸镁对该有机相进行干燥,过滤并浓缩。将该残留物收集在 10 毫升的 DMF 中,并依次添加 66 毫克(0.18 毫摩)的 (2S)-2-氨基-1-(2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯-3-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐(中间体 8)、101 毫克(0.266 毫摩)的 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐(HATU)和 93 微升(0.53 毫摩)的 N,N-异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌 30 分钟。然后将该反应浓缩并通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。得到 52 毫克(理论上为 56%)的 Boc-保护的中间体 (2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧

基-2-甲基-3-[(2S)-1-(2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-羧酸叔丁酯。

[0423] HPLC (方法 6): $R_t=2.13$ 分钟;

[0424] LC-MS (方法 1): $R_t=1.13$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=528 (M+H)^+$ 。

[0425] 将 52 毫克 (0.1 毫摩) 的该中间体收集在 10 毫升的二氯甲烷中, 添加 1 毫升的三氟乙酸, 并在室温条件下将该混合物搅拌 20 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并且剩余的残留物用 20 毫升的乙醚进行研磨。10 分钟后, 滤除该混合物, 并且在高真空条件下将滤渣进行干燥。在这种方式中, 获得 39 毫克 (理论上为 72%) 的标题化合物。

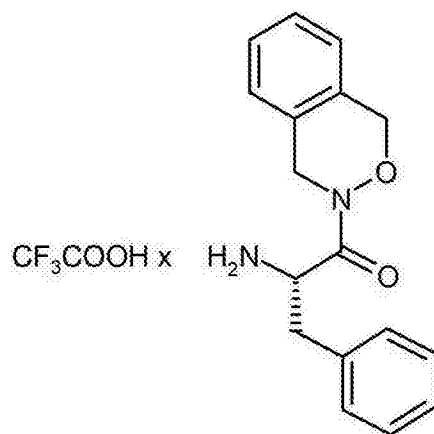
[0426] HPLC (方法 6): $R_t=1.62$ 分钟;

[0427] LC-MS (方法 1): $R_t=0.68$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=428 (M+H)^+$ 。

[0428] 中间体 10

[0429] (2S)-2-氨基-1-(1,4-二氢-3H-2,3-苯并噁嗪-3-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐

[0430]



[0431] 首先, 由 75 毫克 (0.27 毫摩) 的 N^o-(叔丁氧基羰基)-N-羟基-L-苯基丙氨酸酰胺 (原料 3) 开始, 与文献方法 (参见 H. King, J. Chem. Soc. 1942, 432) 类似地通过与 1,2-二(溴甲基)苯反应来制备 Boc-保护的中间体 [(2S)-1-(1,4-二氢-3H-2,3-苯并噁嗪-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基甲酸叔丁酯。

[0432] 产率: 36 毫克 (理论上为 35%)

[0433] LC-MS (方法 3): $R_t=2.49$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=383 (M+H)^+$ 。

[0434] 将 36 毫克 (0.094 毫摩) 的该中间体收集在 5 毫升的二氯甲烷中, 添加 0.5 毫升的三氟乙酸, 并在室温条件下将该混合物搅拌 20 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并将残留的残留物通过制备型 HPLC 进行纯化。将合适的馏分进行合并, 在减压条件下浓缩至体积约为 15 毫升, 然后冻干。得到 16 毫克 (理论上为 43%) 的无色泡沫状的标题化合物。

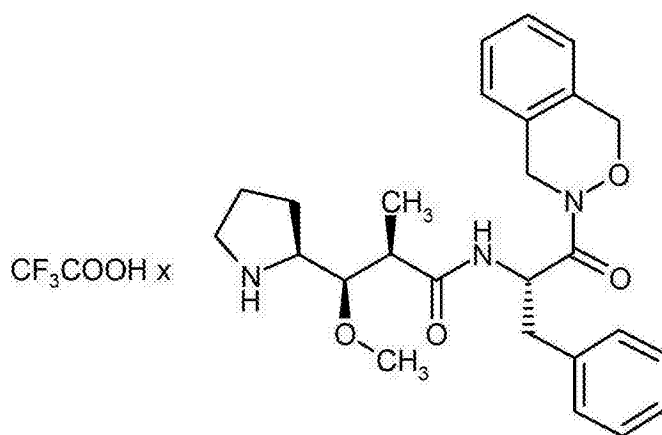
[0435] HPLC (方法 6): $R_t=1.7$ 分钟;

[0436] LC-MS (方法 1): $R_t=0.69$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=283 (M+H)^+$ 。

[0437] 中间体 11

[0438] (2R,3R)-N-[(2S)-1-(1,4-二氢-3H-2,3-苯并噁嗪-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐

[0439]



[0440] 首先, 从 15 毫克 (0.031 毫摩) 的 (2R, 3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸的二环己基胺盐中通过将该盐收集在乙酸乙酯中并用硫酸氢钾水溶液进行提取, 从而将 (2R, 3R)-3-[(2S)-1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基]-3-甲氧基-2-甲基丙酸 (原料 1) 释放出来。用硫酸镁对该有机相进行干燥, 过滤并浓缩。将该残留物收集在 10 毫升的 DMF 中, 并依次添加 16 毫克 (0.031 毫摩) 的 (2S)-2-氨基-1-(1, 4-二氢-3H-2, 3-苯并噁嗪-3-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐 (中间体 10)、18 毫克 (0.047 毫摩) 的 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N', N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (HATU) 和 16 微升 (0.53 毫摩) 的 N, N-二异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌 16 小时。然后将该反应浓缩, 并通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。得到 14 毫克 (理论上为 81%) 的 Boc-保护的中间体 (2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-1-(1, 4-二氢-3H-2, 3-苯并噁嗪-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-羧酸叔丁酯。

[0441] HPLC (方法 6): $R_t=2.35$ 分钟;

[0442] LC-MS (方法 2): $R_t=1.39$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=552 (M+H)^+$ 。

[0443] 将 14 毫克 (0.025 毫摩) 的该中间体收集在 5 毫升的二氯甲烷中, 添加 1 毫升的三氟乙酸, 并在室温条件下将该混合物搅拌 20 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并由二噁烷将剩余的残留物冻干。在这种方式中, 获得 14 毫克 (理论上为 98%) 的标题化合物。

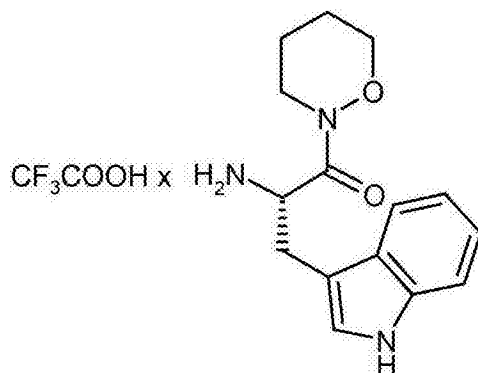
[0444] HPLC (方法 6): $R_t=1.83$ 分钟;

[0445] LC-MS (方法 1): $R_t=0.78$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=452 (M+H)^+$ 。

[0446] 中间体 12

[0447] (2S)-2-氨基-3-(1H-吡啶-3-基)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)丙-1-酮三氟乙酸盐

[0448]



[0449] 将 130 毫克 (0.324 毫摩) 的 N-(叔丁氧基羰基)-L-色氨酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯收集在 15 毫升的 DMF 中,并添加 50 毫克 (0.405 毫摩) 的 1,2-噁嗪烷盐酸盐 (原料 5) 和 140 微升的 N,N-二异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌 24 小时。然后添加相同量的 1,2-噁嗪烷盐酸盐和 N,N-二异丙基乙基胺。在室温条件下再搅拌 4 小时后,在减压条件下将该反应浓缩,将该残留物收集在二氯甲烷中,并先用碳酸氢钠溶液再用水进行提取。将该有机相浓缩,通过在硅胶上使用流动相二氯甲烷/乙酸乙酯 4:1 的快速色谱对该残留物进行纯化。将合适的馏分浓缩,并在高真空条件下将该残留物干燥。得到 63 毫克 (理论上为 52%) 的 Boc-保护的中间体 [(2S)-3-(1H-吡啶-3-基)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]氨基甲酸叔丁酯。

[0450] HPLC (方法 6): $R_t=2.05$ 分钟;

[0451] LC-MS (方法 3): $R_t=2.16$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=374 (M+H)^+$ 。

[0452] 将 63 毫克 (0.167 毫摩) 的该中间体收集在 15 毫升的二氯甲烷中,添加 2 毫升的三氟乙酸,并将该混合物在超声浴中处理 40 分钟。然后在减压条件下将该反应浓缩,并由二噁烷/水将残留物冻干。在这种方式中,获得 65 毫克 (理论上为 90%) 的标题化合物。

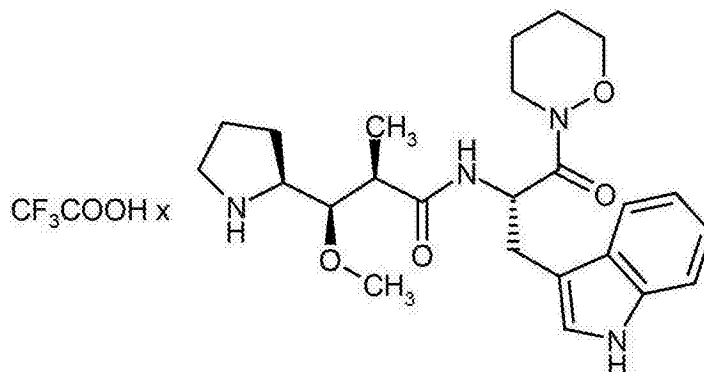
[0453] HPLC (方法 6): $R_t=1.53$ 分钟;

[0454] LC-MS (方法 1): $R_t=0.61$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=274 (M+H)^+$ 。

[0455] 中间体 13

[0456] (2R,3R)-N-[(2S)-3-(1H-吡啶-3-基)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐

[0457]



[0458] 通过与合成中间体 7 类似的方法,由原料 1 的二环己基胺盐和 (2S)-2-氨基-3-(1H-吡啶-3-基)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)丙-1-酮三氟乙酸盐 (中间体 12) 以两步制备该标题化合物。

[0459] 两步产率 :62 毫克(理论上为 67%)

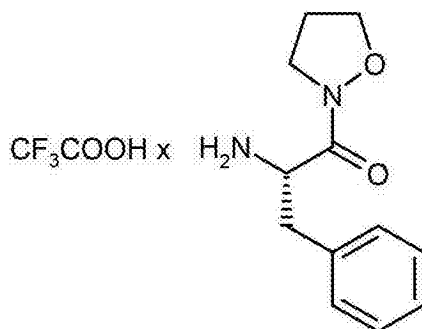
[0460] HPLC (方法 6) : $R_t=1.65$ 分钟 ;

[0461] LC-MS (方法 1) : $R_t=0.7$ 分钟 ;MS(ESIpos) : $m/z=443 (M+H)^+$ 。

[0462] 中间体 14

[0463] (2S)-2-氨基-1-(1,2-噁唑烷-2-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐

[0464]



[0465] 通过与合成中间体 5 和 6 类似的方法,由 N-(叔丁氧基羰基)-L-苯基丙氨酸和 1,2-噁唑烷盐酸盐(原料 4)以两步制备该标题化合物。

[0466] 两步产率 :1650 毫克(理论上为 97%)

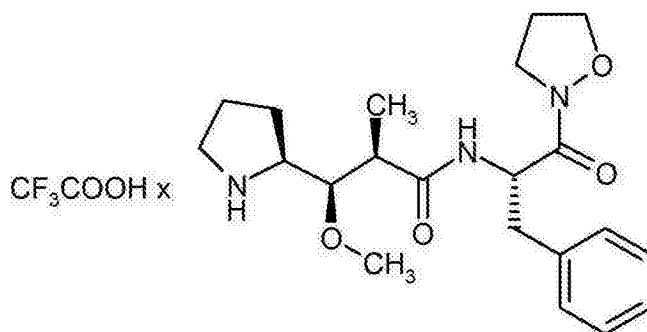
[0467] HPLC (方法 5) : $R_t=0.29$ 分钟 ;

[0468] LC-MS (方法 1) : $R_t=0.41$ 分钟 ;MS(ESIpos) : $m/z=221 (M+H)^+$ 。

[0469] 中间体 15

[0470] (2R,3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(2S)-1-(1,2-噁唑烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐

[0471]



[0472] 通过与合成中间体 7 类似的方法,由原料 1 的二环己基胺盐和 (2S)-2-氨基-1-(1,2-噁唑烷-2-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐(中间体 14)以两步制备该标题化合物。

[0473] 两步产率 :110 毫克(理论上为 97%)

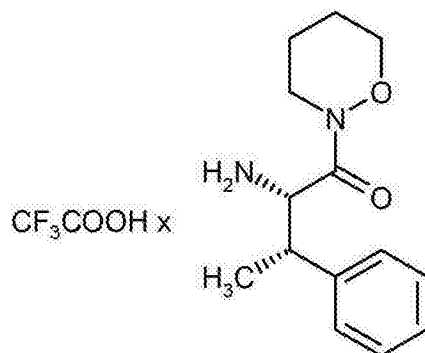
[0474] HPLC (方法 5) : $R_t=0.52$ 分钟 ;

[0475] LC-MS (方法 3) : $R_t=1.15$ 分钟 ;MS(ESIpos) : $m/z=390 (M+H)^+$ 。

[0476] 中间体 16

[0477] (2S,3S)-2-氨基-1-(1,2-噁唑烷-2-基)-3-苯基丁-1-酮三氟乙酸盐

[0478]



[0479] 通过与合成中间体 5 和 6 类似的方法,由 (β S)-N-(叔丁氧基羰基)-β-甲基-L-苯基丙氨酸和 1,2-噁嗪烷盐酸盐(原料 5)以两步制备该标题化合物。

[0480] 两步产率:652 毫克(理论上为 63%)

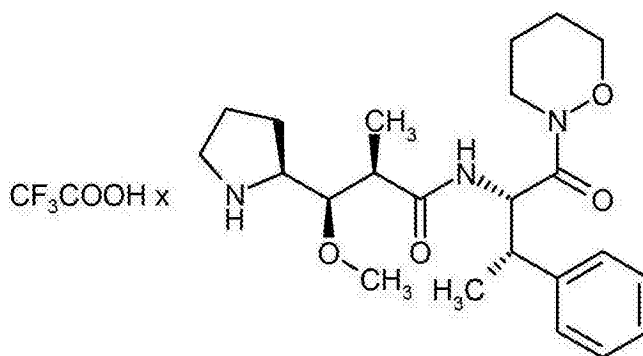
[0481] HPLC (方法 5): $R_t=0.53$ 分钟;

[0482] LC-MS (方法 1): $R_t=1.25$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=249$ (M+H)⁺。

[0483] 中间体 17

[0484] (2R,3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(2S,3S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丁-2-基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐

[0485]



[0486] 通过与合成中间体 7 类似的方法,由原料 1 的二环己基胺盐和 (2S,3S)-2-氨基-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-3-苯基丁-1-酮三氟乙酸盐(中间体 16)以两步制备该标题化合物。

[0487] 两步产率:101 毫克(理论上为 90%)

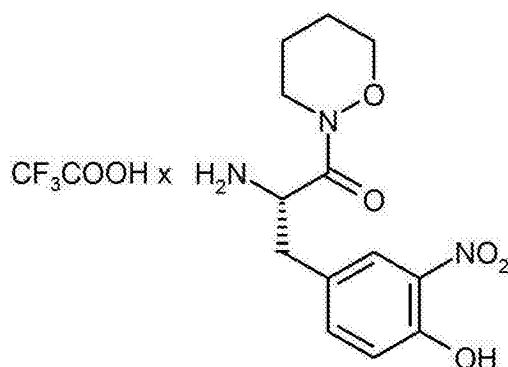
[0488] HPLC (方法 5): $R_t=1.07$ 分钟;

[0489] LC-MS (方法 3): $R_t=1.33$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=418$ (M+H)⁺。

[0490] 中间体 18

[0491] (2S)-2-氨基-3-(4-羟基-3-硝基苯基)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)丙-1-酮三氟乙酸盐

[0492]



[0493] 通过与合成中间体 5 和 6 类似的方法,由 N-(叔丁氧基羰基)-3-硝基-L-酪氨酸和 1,2-噁嗪烷盐酸盐(原料 5)以两步制备该标题化合物。

[0494] 两步产率:374 毫克(理论上为 47%)

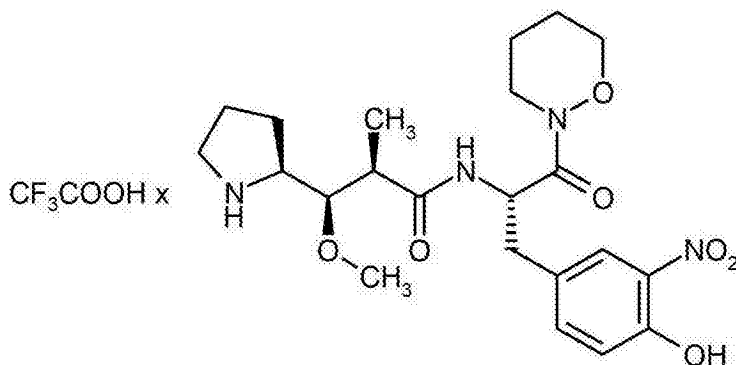
[0495] HPLC (方法 5): $R_t=0.4$ 分钟;

[0496] LC-MS (方法 1): $R_t=0.5$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=296$ (M+H)⁺。

[0497] 中间体 19

[0498] (2R,3R)-N-[(2S)-3-(4-羟基-3-硝基苯基)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐

[0499]



[0500] 通过与合成中间体 7 类似的方法,由原料 1 的二环己基胺盐和 (2S)-2-氨基-3-(4-羟基-3-硝基苯基)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)丙-1-酮三氟乙酸盐(中间体 18)以两步制备该标题化合物。所获得的产物的纯度为 63%,该产物无需进一步纯化即可用于后续反应。

[0501] 两步产率:128 毫克(理论上为 61%)

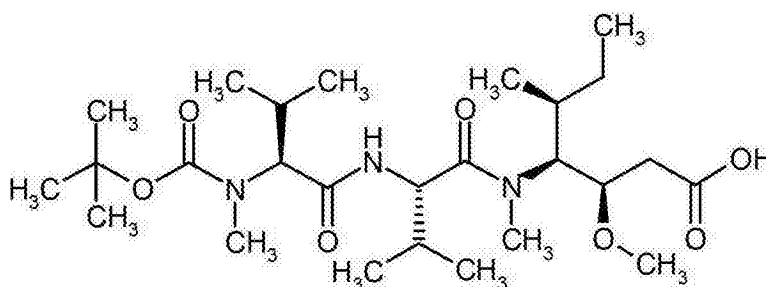
[0502] HPLC (方法 5): $R_t=0.8$ 分钟;

[0503] LC-MS (方法 3): $R_t=1.24$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=465$ (M+H)⁺。

[0504] 中间体 20

[0505] N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R,3S,4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0506]



[0507] 将 51 毫克 (0.08 毫摩) 的 N-[(9H- 芴 -9- 基甲氧基) 羰基]-N- 甲基 -L- 缬氨酸 -N-[(2R, 3S, 4S)-1- 羧基 -2- 甲氧基 -4- 甲基己 -3- 基]-N- 甲基 -L- 缬氨酸 (中间体 4) 溶解于 10 毫升的 DMF 中, 添加 0.5 毫升的哌啶。在室温条件下搅拌 10 分钟后, 在减压条件下将该反应浓缩, 并且该残留物用乙醚进行研磨。滤除不溶的组分, 并用乙醚重复洗涤。然后将滤渣收集在 5 毫升的二噁烷 / 水 (1:1) 中, 用 1N 氢氧化钠水溶液将该溶液的 pH 调节至 11。在超声处理下, 以多份的形式添加总量为 349 毫克 (1.6 毫摩) 的二碳酸二叔丁酯, 该溶液的 pH 保持在 11。待该反应结束后, 蒸发二噁烷, 并用柠檬酸将该水溶液的 pH 调节至 2-3。在各情况中用 50 毫升的乙酸乙酯将该混合物提取两次。合并该有机相, 用硫酸镁干燥, 并在减压条件下浓缩。将该残留物收集在乙醚中, 用戊烷沉淀该产物。通过倾析除去溶剂。用戊烷对该残留物进行重复消化 (digest), 最后在高真空条件下干燥。得到 31 毫克 (理论上为 93%) 的标题化合物。

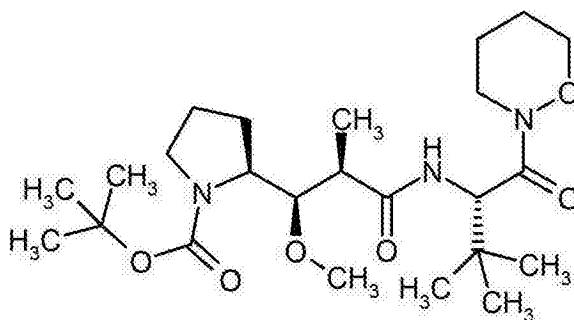
[0508] HPLC (方法 6): $R_t=2.2$ 分钟 ;

[0509] LC-MS (方法 2): $R_t=1.32$ 分钟 ; MS (ESIpos) : $m/z=516 (M+H)^+$ 。

[0510] 中间体 21

[0511] (2S)-2-[(1R, 2R)-3- { [(2S)-3, 3- 二 甲 基 -1-(1, 2- 噁 嗪 烷 -2- 基)-1- 氧 代 丁 -2- 基] 氨基 } -1- 甲氧基 -2- 甲基 -3- 氧代丙基] 吡咯烷 -1- 羧酸叔丁酯

[0512]



[0513] 与合成中间体 5 和 6 的方法类似, 通过将市售可得的 N-(叔丁氧基羰基)-3- 甲基 -L- 缬氨酸与 1, 2- 噁嗪烷盐酸盐 (原料 5) 发生偶联, 随后使用三氟乙酸进行脱保护并再与原料 1 发生另一偶联, 以三步制备该标题化合物。通过制备型 HPLC 对最终产物进行纯化。

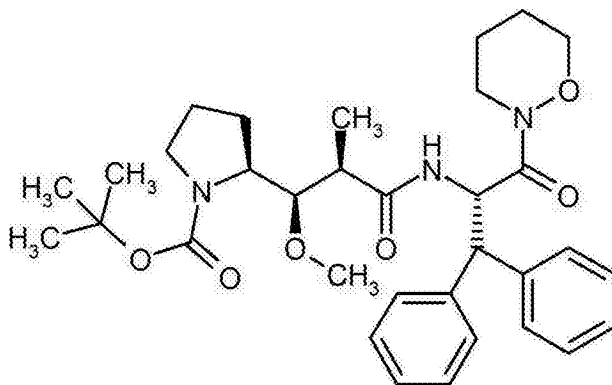
[0514] HPLC (方法 5): $R_t=1.92$ 分钟 ;

[0515] LC-MS (方法 7): $R_t=2.19$ 分钟 ; MS (ESIpos) : $m/z=470 (M+H)^+$ 。

[0516] 中间体 22

[0517] (2S)-2-[(1R, 2R)-1- 甲氧基 -2- 甲基 -3- { [(2S)-1-(1, 2- 噁 嗪 烷 -2- 基)-1- 氧 代 -3, 3- 二 苯 基 丙 -2- 基] 氨基 } -3- 氧代丙基] 吡咯烷 -1- 羧酸叔丁酯

[0518]



[0519] 与合成中间体 5 和 6 的方法类似,通过将市售可得的 N-(叔丁氧基羰基)-β-苯基-L-苯基丙氨酸与 1,2-噁嗪烷盐酸盐(原料 5)发生偶联,随后使用三氟乙酸进行脱保护并再与原料 1 发生另一偶联,以三步制备该标题化合物。通过制备型 HPLC 对最终产物进行纯化。

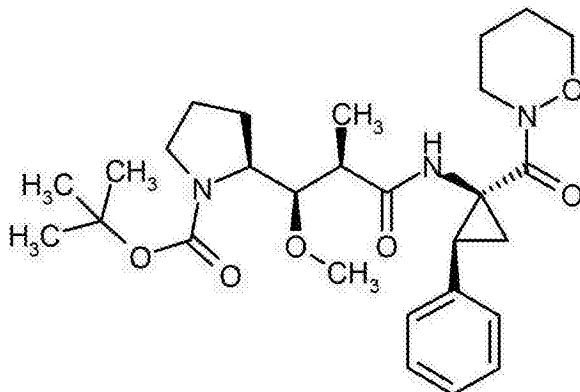
[0520] HPLC (方法 5): $R_t=2.07$ 分钟;

[0521] LC-MS (方法 1): $R_t=1.22$ 分钟;MS (ESIpos): $m/z=580 (M+H)^+$ 。

[0522] 中间体 23

[0523] (2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[[(1S,2S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-羧酸叔丁酯

[0524]



[0525] 与合成中间体 5 和 6 的方法类似,通过将市售可得的 (1S,2S)-1-[(叔丁氧基羰基)氨基]-2-苯基环丙烷羧酸与 1,2-噁嗪烷盐酸盐(原料 5)发生偶联,随后使用三氟乙酸进行脱保护并再与原料 1 发生另一偶联,以三步制备该标题化合物。通过制备型 HPLC 对最终产物进行纯化。

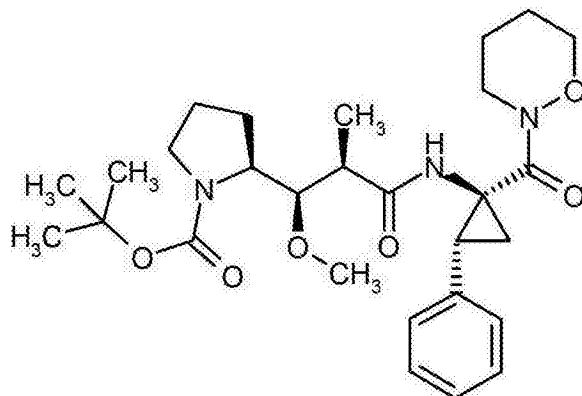
[0526] HPLC (方法 5): $R_t=2.19$ 分钟;

[0527] LC-MS (方法 3): $R_t=2.28$ 分钟;MS (ESIpos): $m/z=516 (M+H)^+$ 。

[0528] 中间体 24

[0529] (2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[[(1S,2R)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基-环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-羧酸叔丁酯

[0530]



[0531] 与合成中间体 5 和 6 的方法类似,通过将市售可得的 (1S, 2S)-1-[(叔丁氧基羰基)氨基]-2-苯基环丙烷羧酸与 1, 2-噁唑烷盐酸盐(原料 5) 发生偶联,随后使用三氟乙酸进行脱保护并再与原料 1 发生另一偶联,以三步制备该标题化合物。通过制备型 HPLC 对最终产物进行纯化。

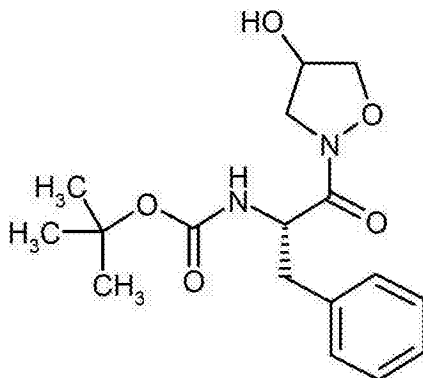
[0532] HPLC (方法 5): $R_t=2.12$ 分钟;

[0533] LC-MS (方法 2): $R_t=1.25$ 分钟;MS (ESIpos): $m/z=516 (M+H)^+$ 。

[0534] 中间体 25

[0535] [(2S)-1-(4-羟基-1, 2-噁唑烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基甲酸叔丁酯(非对映体 1 和 2)

[0536]



[0537] 将 200 毫克 (1.59 毫摩) 的 1, 2-噁唑烷-4-醇(原料 7) 收集在 10 毫升的 DMF 中,并添加 606 毫克 (1.67 毫摩) of 2, 5-二氧代吡咯烷-1-基-N-(叔丁氧基羰基)-L-苯基丙氨酸酯和 277 微升的 N, N-二异丙基乙基胺。在室温条件下搅拌 60 小时后,在减压条件下将该反应浓缩,并将该残留物收集在 100 毫升的乙酸乙酯中。在各情况中,用 5% 浓度的柠檬酸溶液和 10% 浓度的碳酸氢钠溶液将该混合物提取两次。然后在减压条件下将该有机相浓缩。通过在硅胶上使用流动相二氯甲烷/甲醇 98:2 的快速色谱对两种非对映体进行进一步纯化和分离。将合适的馏分浓缩,并在高真空条件下将该残留物干燥。

[0538] 非对映体 1:

[0539] 产率:154 毫克[仍被 N-(叔丁氧基羰基)-L-苯基丙氨酸污染,需要在下一个步骤中将 N-(叔丁氧基羰基)-L-苯基丙氨酸除去]

[0540] $R_f=0.44$ (二氯甲烷/甲醇 95:5)。

[0541] 非对映体 2:

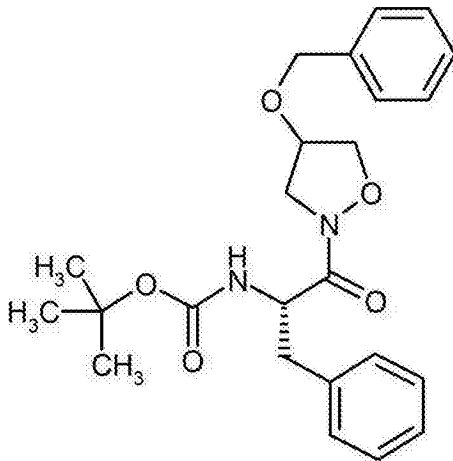
[0542] 产率:86 毫克(理论上为 16%)

[0543] $R_f=0.40$ (二氯甲烷 / 甲醇 95:5)。

[0544] 中间体 26

[0545] {(2S)-1-[4-(苄氧基)-1,2-噁唑烷-2-基]-1-氧代-3-苯基丙-2-基}氨基甲酸叔丁酯 (非对映体 1)

[0546]



[0547] 将 75 毫克 (约 0.22 毫摩) 的中间体 25 的非对映体 1 收集在 10 毫升的丙酮中, 并添加 228 毫克 (1.34 毫摩) 的溴化苄、616 毫克 (4.46 毫摩) 的碳酸钾和一抹刀尖的四正丁基碘化铵。在回流条件下对该反应进行加热 20 小时, 然后在减压条件下浓缩。使用 100 毫升的二氯甲烷对该残留物进行搅拌并过滤, 然后将该二氯甲烷相进行浓缩。通过制备型 HPLC 对剩余的残留物进行纯化。得到 68 毫克 (理论上为 72%) 的标题化合物。

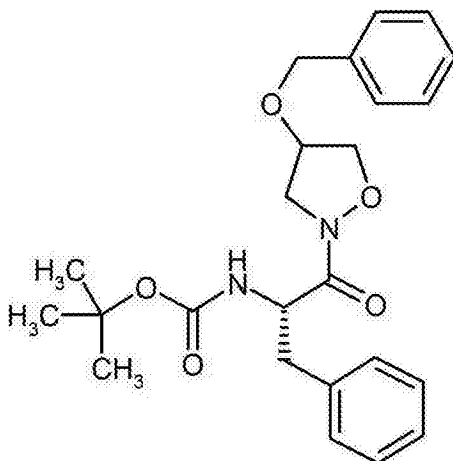
[0548] HPLC (方法 6): $R_t=2.31$ 分钟;

[0549] LC-MS (方法 1): $R_t=1.18$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=427$ (M+H)⁺。

[0550] 中间体 27

[0551] {(2S)-1-[4-(苄氧基)-1,2-噁唑烷-2-基]-1-氧代-3-苯基丙-2-基}氨基甲酸叔丁酯 (非对映体 2)

[0552]



[0553] 将 83 毫克 (0.25 毫摩) 的中间体 25 的非对映体 2 收集在 15 毫升的丙酮中, 并添加 127 毫克 (0.74 毫摩) 的溴化苄、682 毫克 (4.93 毫摩) 的碳酸钾和一抹刀尖的四正丁基碘化铵。在回流条件下对该反应进行加热 20 小时, 然后在减压条件下浓缩。使用 100 毫升的二氯甲烷对该残留物进行搅拌并过滤, 然后将该二氯甲烷相进行浓缩。通过制备型 HPLC

对剩余的残留物进行纯化。得到 87 毫克(理论上为 83%)的标题化合物。

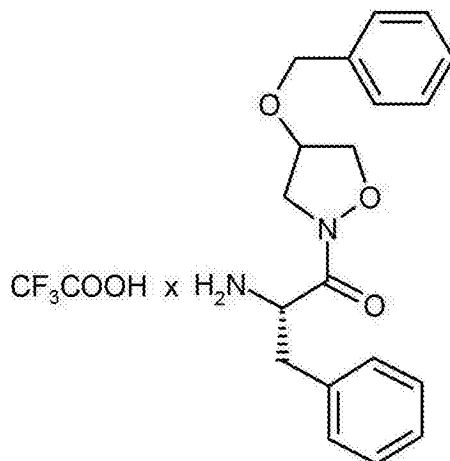
[0554] HPLC (方法 6): $R_t=2.30$ 分钟;

[0555] LC-MS (方法 1): $R_t=1.22$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=427$ (M+H)⁺。

[0556] 中间体 28

[0557] (2S)-2-氨基-1-[4-(苄氧基)-1,2-噁唑烷-2-基]-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐(非对映体 1)

[0558]



[0559] 将 68 毫克 (0.16 毫摩) {(2S)-1-[4-(苄氧基)-1,2-噁唑烷-2-基]-1-氧代-3-苯基丙-2-基} 氨基甲酸叔丁酯 (非对映体 1, 中间体 26) 收集在 10 毫升的二氯甲烷中, 添加 1 毫升的三氟乙酸, 并在室温条件下将该混合物搅拌 30 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并由二噁烷/水将剩余的残留物冻干。得到 69 毫克(理论上为 98%) 的无色泡沫状的标题化合物。

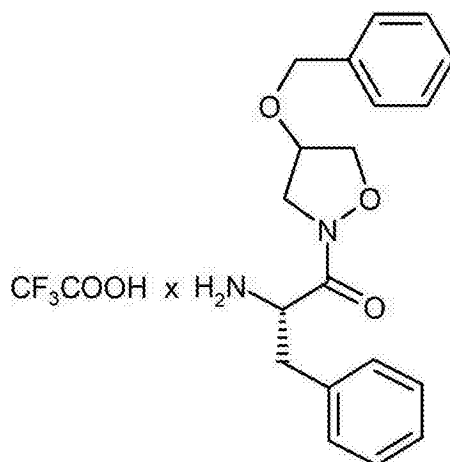
[0560] HPLC (方法 6): $R_t=1.72$ 分钟;

[0561] LC-MS (方法 3): $R_t=1.41$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=327$ (M+H)⁺。

[0562] 中间体 29

[0563] (2S)-2-氨基-1-[4-(苄氧基)-1,2-噁唑烷-2-基]-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐(非对映体 2)

[0564]



[0565] 将 82 毫克 (0.19 毫摩) {(2S)-1-[4-(苄氧基)-1,2-噁唑烷-2-基]-1-氧代-3-苯基丙-2-基} 氨基甲酸叔丁酯 (非对映体 2, 中间体 27) 收集在 10 毫升的二氯甲

烷中,添加 1 毫升的三氟乙酸,并在室温条件下将该混合物搅拌 30 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩,并由二噁烷 / 水将剩余的残留物冻干。得到 80 毫克(理论上为 95%)的无色泡沫状的标题化合物。

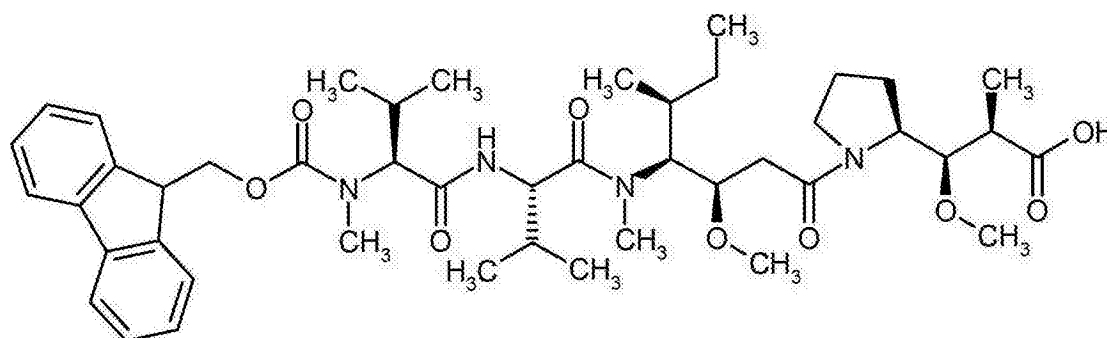
[0566] HPLC (方法 6): $R_t=1.80$ 分钟;

[0567] LC-MS (方法 3): $R_t=1.50$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=327 (M+H)^+$ 。

[0568] 中间体 30

[0569] N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0570]



[0571] 将 315 毫克 (0.494 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R, 3S, 4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体 4) 溶解于 12 毫升的 DMF 中,添加 104 毫克 (0.543 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 83 毫克 (0.543 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物,并在室温条件下将该混合物搅拌 90 分钟。添加 112 微升的 N,N-异丙基乙基胺和 149 毫克 (0.494 毫摩) 的 (2R, 3R)-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酸三氟乙酸盐,该盐由原料 1 通过使用三氟乙酸除去 Boc 保护基团而预先制得。在室温条件下将该混合物搅拌 2 小时,然后在高真空条件下浓缩。通过两种制备型 HPLC 对剩余的残留物进行纯化。得到 140 毫克(理论上为 35%)的无色泡沫形式的标题化合物。

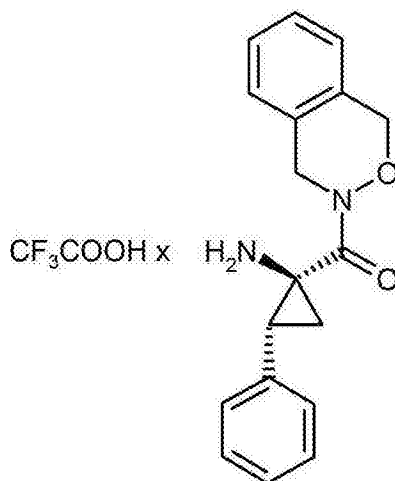
[0572] HPLC (方法 5): $R_t=2.40$ 分钟;

[0573] LC-MS (方法 1): $R_t=1.38$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=807 (M+H)^+$ 。

[0574] 中间体 31

[0575] [(1S, 2R)-1-氨基-2-苯基环丙基](1,4-二氢-3H-2,3-苯并噁嗪-3-基)甲酮三氟乙酸盐

[0576]



[0577] 通过与合成中间体 10 类似的方法, 由 [(1S, 2R)-1-(羟基氨甲酰基)-2-苯基环丙基]氨基甲酸叔丁酯 (原料 8) 开始制备该标题化合物。

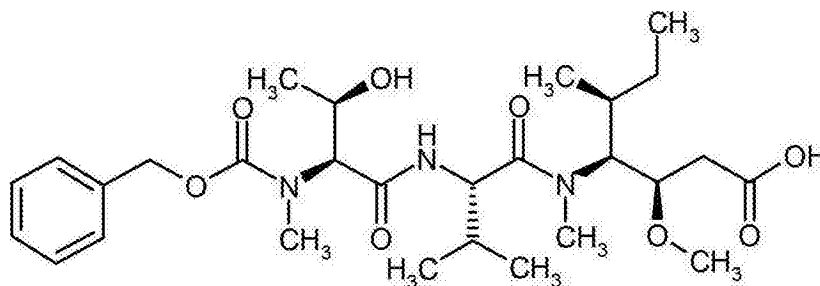
[0578] HPLC (方法 6): R_t =1.60 分钟;

[0579] LC-MS (方法 1): $R_t=0.70$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=295 (M+H)^+$.

[0580] 中间体 32

[0581] N-[(苄氧基)羰基]-N-甲基-L-苏氨酰基-N-[(2R, 3S, 4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基-己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0582]



[0583] 首先,从 237 毫克 (0.887 毫摩) 的 N-[(苄氧基)羰基]-N-甲基-L-苏氨酸的二环己基胺盐中通过将该盐收集在乙酸乙酯中,并用 5% 浓度的硫酸水溶液提取,将 N-[(苄氧基)羰基]-N-甲基-L-苏氨酸释放出来。用硫酸镁对该有机相进行干燥,过滤并浓缩。将该残留物收集在 16 毫升的 DMF 中,并依次添加 365 毫克 (1 毫摩) 的 (3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-[甲基(L-缬氨酰基)氨基]庚酸叔丁酯(中间体 2)、185 毫克 (0.967 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 148 毫克 (0.967 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物。将该混合物在室温条件下搅拌 2 小时。然后将该反应倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。得到 283 毫克(理论上为 53%)的叔丁酯中间体 N-[(苄氧基)羰基]-N-甲基-L-苏氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-叔丁氧基-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0584] HPLC (方法 5): R_t =2.17 分钟。

[0585] 将 283 毫克 (0.466 毫摩) 的该中间体收集在 5 毫升的二氯甲烷中, 添加 5 毫升的无水三氟乙酸, 并在室温条件下将该混合物搅拌 2 小时。然后在高真空条件下将该反应浓

缩,通过制备型 HPLC 对剩余的残留物进行纯化。得到 156 毫克(理论上为 61%)的无色泡沫状的标题化合物。

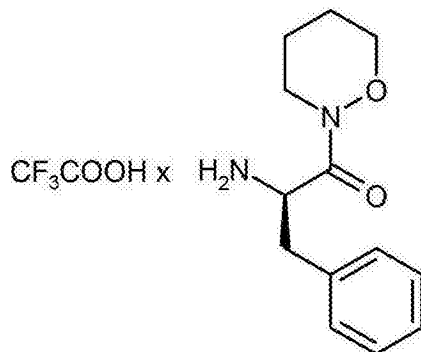
[0586] HPLC (方法 5): $R_t=1.50$ 分钟;

[0587] LC-MS (方法 2): $R_t=1.09$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=552$ (M+H)⁺。

[0588] 中间体 33

[0589] (2R)-2-氨基-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐

[0590]



[0591] 通过与合成中间体 6 类似的方法,由 N-(叔丁氧基羰基)-D-苯基丙氨酸开始制备该标题化合物。

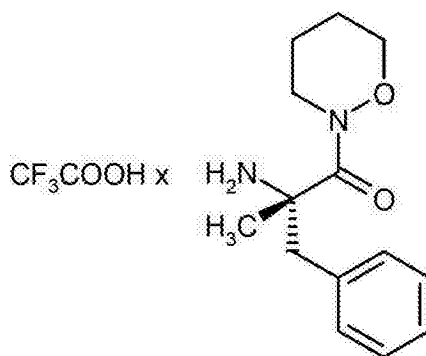
[0592] HPLC (方法 6): $R_t=1.40$ 分钟;

[0593] LC-MS (方法 1): $R_t=0.50$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=235$ (M+H)⁺。

[0594] 中间体 34

[0595] (2S)-2-氨基-2-甲基-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐

[0596]



[0597] 通过与合成中间体 6 类似的方法,由市售可得 N-(叔丁氧基羰基)-α-甲基-L-苯基丙氨酸开始制备该标题化合物。

[0598] HPLC (方法 5): $R_t=0.45$ 分钟;

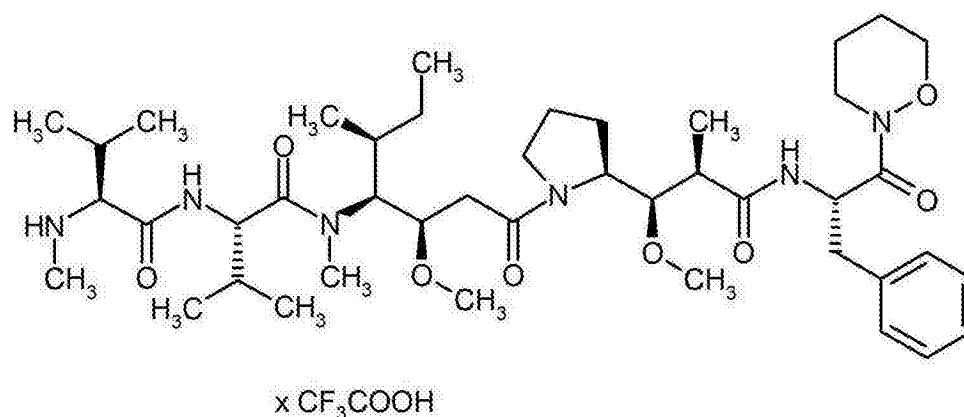
[0599] LC-MS (方法 2): $R_t=0.61$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=249$ (M+H)⁺。

[0600] 工作实施例:

[0601] 实施例 1

[0602] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0603]



[0604] 将 143 毫克 (0.223 毫摩) 的 N-[(9H- 芴 -9- 基甲氧基) 羰基]-N- 甲基 -L- 缬氨酰基 -N-[(2R, 3S, 4S)-1- 羧基 -2- 甲氧基 -4- 甲基己 -3- 基]-N- 甲基 -L- 缬氨酰胺 (中间体 4) 收集在 15 毫升的 DMF 中, 并依次添加 141 毫克 (0.22 毫摩) 的 (2R, 3R)-3- 甲氧基 -2- 甲基 -N-[(2S)-1-(1, 2- 噁嗪烷 -2- 基)-1- 氧代 -3- 苯基丙 -2- 基]-3-[(2S)- 吡咯烷 -2- 基] 丙酰胺三氟乙酸盐 (中间体 7)、102 毫克 (0.27 毫摩) 的 O-(7- 氮杂苯并三唑 -1- 基)-N, N, N', N'- 四甲基脒鎓六氟磷酸盐 (HATU) 和 128 微升 (0.74 毫摩) 的 N, N- 二异丙基乙基胺。将该混合物在室温条件下搅拌 3 小时。然后将该反应倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相, 依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤, 用硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。得到 275 毫克 (定量) 的 Fmoc 保护的中间体 N-[(9H- 芴 -9- 基甲氧基) 羰基]-N- 甲基 -L- 缬氨酰基 -N-[(3R, 4S, 5S)-3- 甲氧基 -1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1- 甲氧基 -2- 甲基 -3-[(2S)-1-(1, 2- 噁嗪烷 -2- 基)-1- 氧代 -3- 苯基丙 -2- 基] 氨基]-3- 氧代丙基] 吡咯烷 -1- 基]-5- 甲基 -1- 氧代庚 -4- 基]-N- 甲基 -L- 缬氨酰胺。

[0605] HPLC (方法 5): $R_t=2.73$ 分钟 ;

[0606] LC-MS (方法 4): $R_t=3.19$ 分钟 ;MS (ESIpos) : $m/z=1023 (M+H)^+$ 。

[0607] 将 46 毫克 (0.045 毫摩) 的该中间体溶解于 4 毫升的 DMF 中。待加入 1 毫升的哌啶后, 在室温条件下将该混合物搅拌 1 小时。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并通过制备型 HPLC (流动相 : 乙腈 +0.01%TFA/ 水 +0.01%TFA) 对该残留物进行纯化。得到 22 毫克 (理论上为 54%) 的无色泡沫状的标题化合物。

[0608] HPLC (方法 5): $R_t=1.68$ 分钟 ;

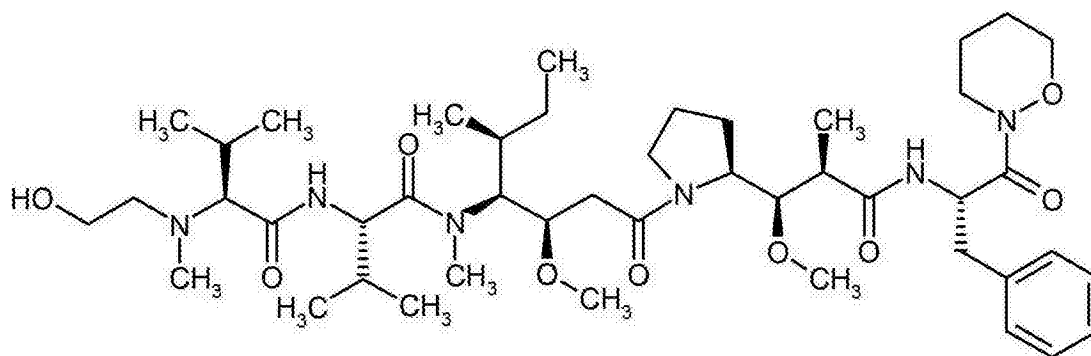
[0609] LC-MS (方法 2): $R_t=1.03$ 分钟 ;MS (ESIpos) : $m/z=801 (M+H)^+$

[0610] ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) : $\delta = 8.8$ (m, 2H), 8.7 (m, 1H), 8.42 和 8.15 (2d, 1H), 7.3-7.1 (m, 5H), 5.12 和 4.95 (2m, 1H), 4.70 和 4.62 (2m, 1H), 4.62 和 4.50 (2t, 1H), 4.1-3.9 (m, 3H), 3.85 (m, 1H), 3.75-3.6 (m, 2H), 3.23, 3.18, 3.17, 3.14, 3.02 和 2.96 (6s, 9H), 3.1-2.9 和 2.75 (2m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.4-2.1 (m, 2H), 2.05 (br. m, 2H), 1.85-1.55 (br. m, 6H), 1.5-1.2 (br. m, 3H), 1.1-0.8 (m, 18H), 0.75 (t, 3H) [隐藏在 H₂O 峰下的其它信号]。

[0611] 实施例 2

[0612] N-(2- 羟乙基)-N- 甲基 -L- 缬氨酰基 -N-[(3R, 4S, 5S)-3- 甲氧基 -1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1- 甲氧基 -2- 甲基 -3-[(2S)-1-(1, 2- 噁嗪烷 -2- 基)-1- 氧代 -3- 苯基丙 -2- 基] 氨基] 氨基]

-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺
[0613]



[0614] 将 50 毫克 (0.0411 毫摩) 的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1,2-噁唑烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐 (实施例 1) 溶解于 3 毫升的二噁烷/水 (1:1) 中,并添加 4.9 毫克 (0.081 毫摩) 的二聚乙二醇醛。然后添加 2.8 毫克 (0.045 毫摩) 的氰基硼氢化钠。使用 50 微升 0.1N 盐酸将该混合物的 pH 调节至 4-5,并在 100℃ 下搅拌 1 小时。然后将该反应倒入半饱和的碳酸氢钠水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相,用饱和氯化钠溶液进行洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。得到 21 毫克 (理论上为 61%) 的无色泡沫形式的标题化合物。

[0615] HPLC (方法 5): $R_t=1.69$ 分钟;

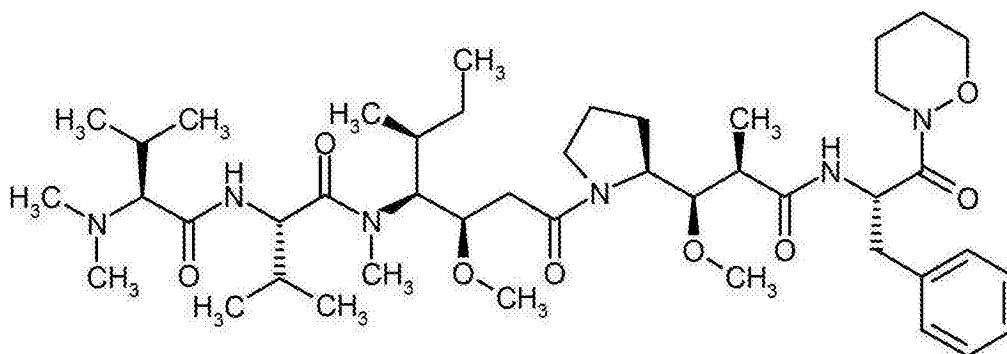
[0616] LC-MS (方法 1): $R_t=0.92$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=845 (M+H)^+$

[0617] $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 9.2$ (m, 1H), 8.9 (m, 1H), 8.4 和 8.15 (2d, 1H), 7.3-7.1 (m, 5H), 5.12 和 4.95 (2m, 1H), 4.70 和 4.62 (2m, 1H), 4.62 和 4.55 (2t, 1H), 4.1-3.9 (m, 3H), 3.9-3.7 (m, 5H), 3.23, 3.18, 3.17, 3.15, 3.02 和 2.98 (6s, 9H), 2.95 和 2.75 (2m, 2H), 2.8 (m, 3H), 2.46-2.00 (m, 4H), 1.85-1.55 (br. m, 6H), 1.5-1.2 (br. m, 3H), 1.1-0.8 (m, 18H), 0.75 (t, 3H) [隐藏在 H_2O 峰下的其它信号]。

[0618] 实施例 3

[0619] N,N-二甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1,2-噁唑烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0620]



[0621] 将 20 毫克 (0.022 毫摩) 的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基

基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(实施例1)溶解于1毫升的DMF中,并添加3.4毫克(1微升)的碘代甲烷和7.6毫克(0.055毫摩)的碳酸钾,并在室温条件下将该混合物搅拌1小时。然后添加相同量的碳酸钾,并在超声浴中将该反应处理10分钟。然后在减压条件下将溶剂蒸馏除去,并将剩余的残留物通过制备型HPLC进行纯化。得到8毫克(理论上为44%)的标题化合物。

[0622] HPLC(方法5): $R_t=1.71$ 分钟;

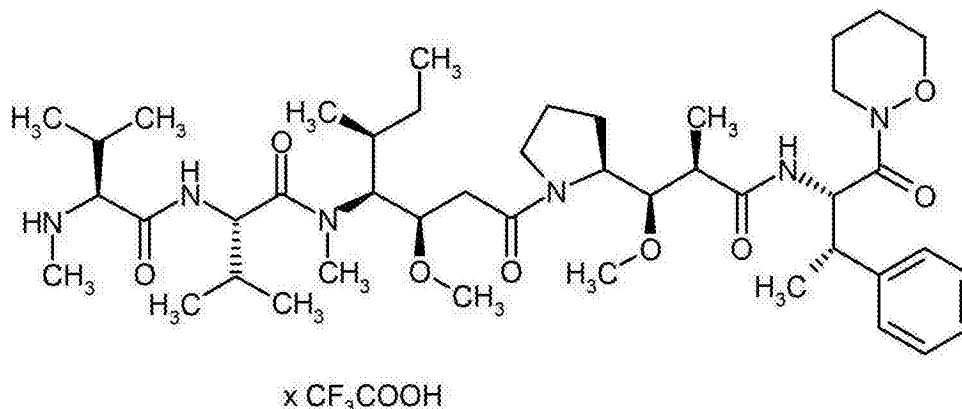
[0623] LC-MS(方法2): $R_t=1.04$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=815(M+H)^+$

[0624] 1H -NMR(600MHz, DMSO- d_6): $\delta=9.55$ (m, 1H), 8.9-8.7(m, 1H), 8.45和8.15(2d, 1H), 7.3-7.1(m, 5H), 5.12和4.95(2m, 1H), 4.70和4.62(2m, 1H), 4.62和4.55(2t, 1H), 4.1-3.9(m, 3H), 3.9-3.6(m, 3H), 3.55(m, 2H), 3.23, 3.18, 3.17, 3.15, 3.02和2.98(6s, 9H), 2.95和2.7(2m, 2H), 2.8-2.7(2br. s, 6H), 2.46-2.00(m, 4H), 1.85-1.55(br. m, 6H), 1.5-1.2(br. m, 3H), 1.1-0.8(m, 18H), 0.75(t, 3H)[隐藏在 H_2O 峰下的其它信号]。

[0625] 实施例4

[0626] N-甲基-L-缬氨酰胺基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S, 3S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丁-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0627]



[0628] 将126毫克(0.198毫摩)的N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰胺基-N-[(2R, 3S, 4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(中间体4)收集在10毫升的DMF中,并依次添加105毫克(0.198毫摩)的(2R, 3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(2S, 3S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丁-2-基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐(中间体17)、41.6毫克(0.217毫摩)的1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、33毫克(0.217毫摩)的1-羟基-1H-苯并三唑水合物和79微升(0.454毫摩)的N,N-异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌过夜。然后将该反应倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。得到220毫克(定量)的Fmoc-保护的中间体N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰胺基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲

基-3-[(2S, 3S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0629] HPLC (方法 5): $R_t=2.77$ 分钟;

[0630] LC-MS (方法 1): $R_t=1.5$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=1037$ (M+H)⁺。

[0631] 将 220 毫克 (0.212 毫摩) 的该中间体溶解于 5 毫升的 DMF 中。待加入 1 毫升的哌啶后, 在室温条件下将该混合物搅拌 1 小时。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并通过制备型 HPLC (流动相: 乙腈 +0.01%TFA/ 水 +0.01%TFA) 对该残留物进行纯化。得到 91 毫克 (理论上为 46%) 的无色泡沫状的标题化合物。

[0632] HPLC (方法 5): $R_t=1.71$ 分钟;

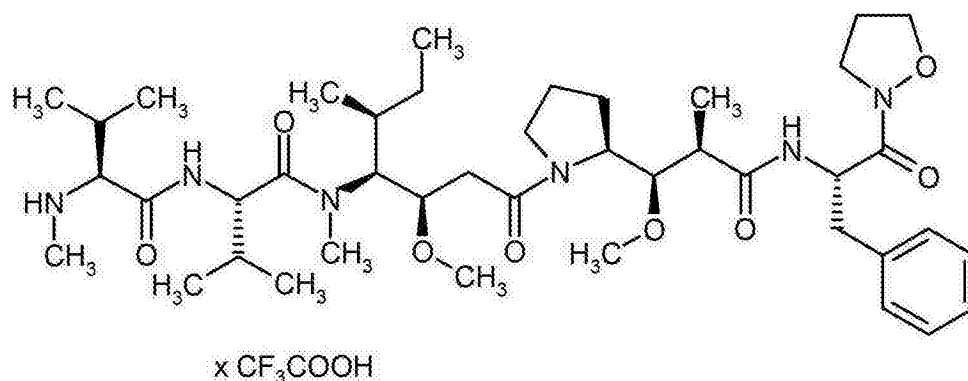
[0633] LC-MS (方法 1): $R_t=0.9$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=815$ (M+H)⁺

[0634] ¹H-NMR (600MHz, DMSO-d₆): $\delta=8.87$ 和 8.80 (2d, 2H), 8.75 (m, 1H), 8.40 和 7.98 (2d, 1H), $7.3-7.1$ (m, 5H), 5.45 和 5.2 (2t, 1H), 4.78 和 4.62 (2m, 1H), 4.73 和 4.58 (2t, 1H), $4.2-4.0$ (m, 3H), $3.7-3.6$ (m, 1H), 3.35 , 3.20 , 3.18 , 3.14 , 3.12 和 3.00 (6s, 9H), 3.1 和 2.95 (2m, 2H), 2.46 (m, 3H), $2.4-2.0$ (m, 4H), $1.9-1.6$ (m, 4H), $1.6-1.2$ (m, 5H), $1.1-0.75$ (m, 2 1H), 0.80 (t, 3H) [隐藏在 H₂O 峰下的其它信号]。

[0635] 实施例 5

[0636] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0637]



[0638] 将 138 毫克 (0.216 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R, 3S, 4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体 4) 收集在 14 毫升的 DMF 中, 并依次添加 109 毫克 (0.216 毫摩) 的 (2R, 3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐 (中间体 15)、45.6 毫克 (0.238 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、36.5 毫克 (0.38 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物和 49 微升 (0.281 毫摩) 的 N, N-异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌过夜。然后将该反应倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相, 依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤, 用硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。得到 170 毫克 (理论上为 78%) 的 Fmoc-保护的中间体 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲

基-3-[(2S)-1-(1,2-噁唑烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基}-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0639] HPLC (方法 5): $R_t=2.64$ 分钟;

[0640] LC-MS (方法 1): $R_t=1.44$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=1009$ (M+H)⁺。

[0641] 将 170 毫克 (0.168 毫摩) 的该中间体溶解于 5 毫升的 DMF 中。待加入 1 毫升的吡啶后,在室温条件下将该混合物搅拌 1 小时。然后在减压条件下将该混合物浓缩,并通过制备型 HPLC (流动相:乙腈+0.01%TFA/水+0.01%TFA)对该残留物进行纯化。得到 37 毫克 (理论上为 24%) 的无色泡沫状的标题化合物。

[0642] HPLC (方法 5): $R_t=1.57$ 分钟;

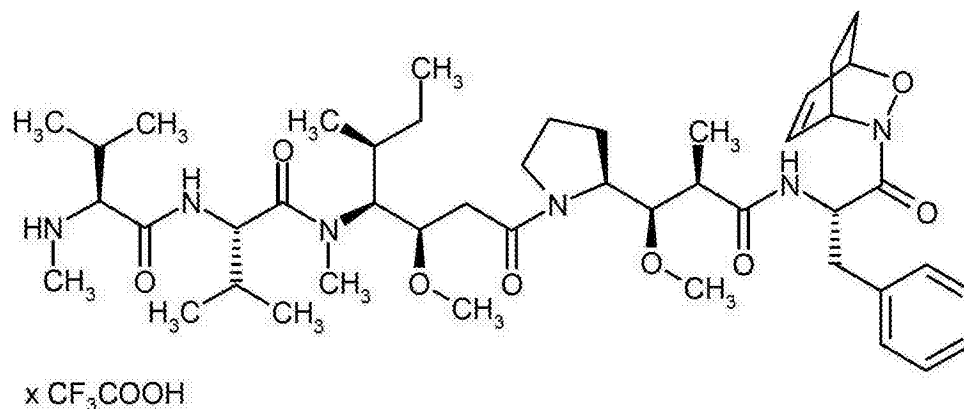
[0643] LC-MS (方法 1): $R_t=0.84$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=787$ (M+H)⁺

[0644] ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 8.9-8.7$ (m, 3H), 8.5 和 8.2 (2m, 1H), 7.3-7.1 (m, 5H), 5.6 和 5.4 (2m, 1H), 4.7 和 4.6 (2m, 1H), 4.65 和 4.55 (2t, 1H), 4.0-3.9 (m, 3H), 3.75-3.6 (m, 2H), 3.23, 3.20, 3.15, 3.05 和 2.98 (5s, 9H), 3.0 和 2.7 (2m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.35-2.15 (m, 4H), 2.1-2.0 (m, 2H), 1.85-1.6 (m, 3H), 1.45 (m, 1H), 1.25 (m, 1H), 1.1-0.85 (m, 18H), 0.75 (t, 3H) [隐藏在 H₂O 峰下的其它信号]。

[0645] 实施例 6

[0646] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基}-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0647]



[0648] 将 44.5 毫克 (0.071 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R,3S,4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体 4) 收集在 10 毫升的 DMF 中,并依次添加 38.6 毫克 (0.071 毫摩) 的 (2R,3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(2S)-1-(2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐 (中间体 9)、32.5 毫克 (0.086 毫摩) 的 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐 (HATU) 和 41 微升 (0.235 毫摩) 的 N,N-二异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌 1 小时。然后在减压条件下将该反应浓缩,并将该残留物收集在乙酸乙酯中。依次用 5% 浓度的柠檬酸溶液和 5% 浓度的碳酸氢钠溶液对该有机相进行洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并

浓缩。得到 73 毫克 (理论上为 98%) 的 Fmoc-保护的中间体 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(2-氧杂-3-氮杂双环[2.2.2]辛-5-烯-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0649] HPLC (方法6): R_t = 2.78 分钟;

[0650] LC-MS (方法3): R_t =2.96 分钟; MS (ESIpos): m/z =1047 (M+H)⁺。

[0651] 将 73 毫克 (0.071 毫摩) 的该中间体溶解于 5 毫升的 DMF 中。待添加 0.5 毫升的哌啶后,在室温条件下将该反应搅拌 10 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩,并用乙醚对该残留物进行重复消化。待该醚倾析出来后,通过制备型 HPLC(流动相:乙腈/0.1%TFA 水溶液)对该残留物进行纯化。得到 16 毫克(理论上为 26%)的无色泡沫状的标题化合物。

[0652] HPLC (方法 6): $R_t=1.94$ 分钟;

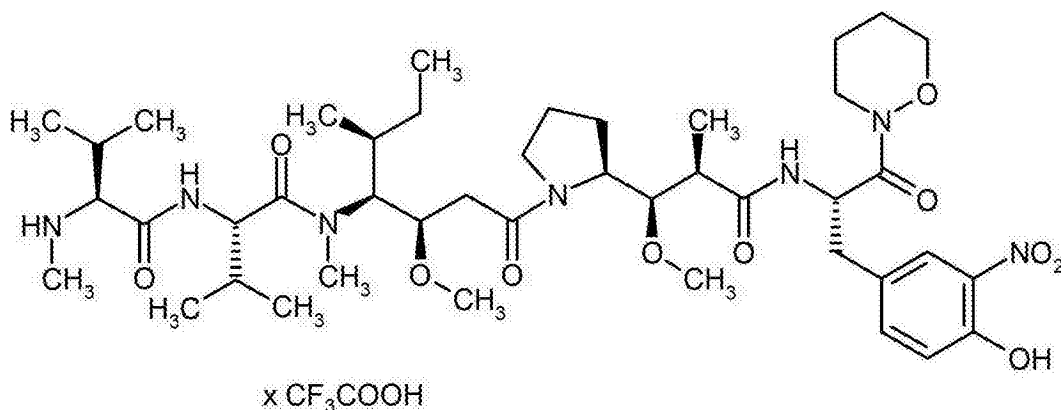
[0653] LC-MS (方法 3): $R_t=1.71$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=825 (M+H)^+$

[0654] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6): δ = 8.9–8.6 (m, 3H), 8.4, 8.3, 8.1 和 8.0 (4d, 1H), 7.3–7.1 (m, 5H), 6.7–6.5 (m, 2H), 5.2–4.8 (m, 3H), 4.75–4.55 (m, 3H), 4.05–3.95 (m, 1H), 3.7–3.4 (m, 4H), 3.22, 3.17, 3.15, 3.05, 3.02 和 2.95 (6s, 9H), 3.0 和 2.7 (2br. m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.4–1.2 (br. m, 13H), 1.1–0.85 (m, 18H), 0.75 (m, 3H) [隐藏在 H_2O 峰下的其它信号]。

[0655] 实施例 7

[0656] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-3-(4-羟基-3-硝基苯基)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0657]



[0658] 将 160 毫克 (0.251 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R,3S,4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体 4) 收集在 13 毫升的 DMF 中, 并依次添加 145 毫克 (0.251 毫摩) 的 (2R,3R)-N-[(2S)-3-(4-羟基-3-硝基苯基)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐 (中间体 19)、53 毫克 (0.276 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、42.2 毫克

(0.276 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物和 65 微升 (0.376 毫摩) 的 N,N-异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌过夜。然后将该反应倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩。得到 260 毫克(理论上为 96%)的粗 Fmoc-保护的中间体 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-(4-羟基-3-硝基苯基)-1-(1,2-噁唑烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺,其无需进一步纯化即可用于下一步。

[0659] 将 260 毫克 (0.24 毫摩) 的该中间体溶解于 3 毫升的 DMF 中。待加入 0.6 毫升的哌啶后,在室温条件下将该混合物搅拌 1 小时。然后在减压条件下将该混合物浓缩,并通过制备型 HPLC (流动相:乙腈+0.01%TFA/水+0.01%TFA) 对该残留物进行纯化。得到 105 毫克(理论上为 45%)的浅黄色泡沫状的标题化合物。

[0660] HPLC (方法 5): R_t =1.62 分钟;

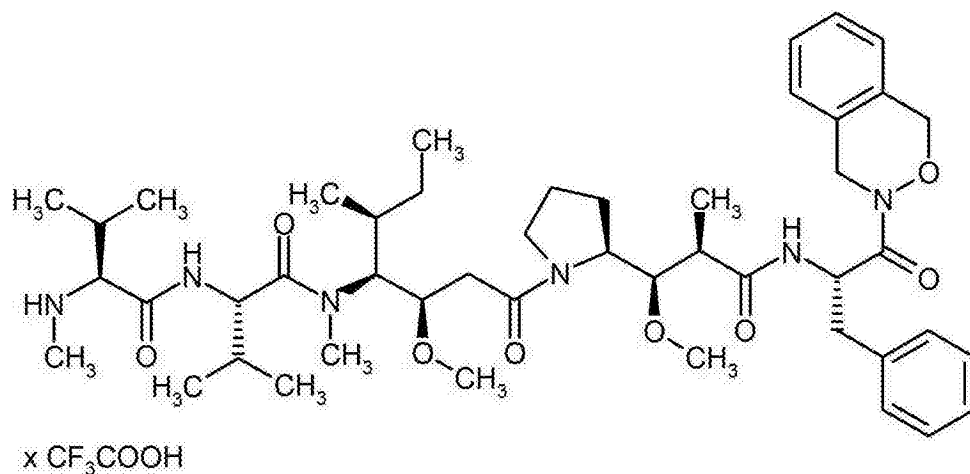
[0661] LC-MS (方法 1): R_t =0.87 分钟;MS(ESIpos): m/z =862 (M+H)⁺

[0662] ¹H-NMR(500MHz, DMSO-d₆): δ =10.85 和 10.72 (2s, 1H), 8.9-8.6 (m, 3H), 8.45 和 8.2 (2d, 1H), 7.70 和 7.72 (2s, 1H), 7.40 和 7.32 (2d, 1H), 7.01 和 7.00 (2d, 1H), 5.0-4.85 (m, 1H), 4.7-4.5 (m, 2H), 4.15-4.0 (m, 2H), 3.95-3.75 (m, 2H), 3.7-3.6 (m, 2H), 3.28, 3.21, 3.16, 3.15, 3.02 和 2.96 (6s, 9H), 2.9 和 2.75 (2m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.4-2.3 (m, 1H), 2.3-2.2 (m, 1H), 2.1-1.95 (br. m, 2H), 1.85-1.7 (m, 4H), 1.7-1.55 (m, 2H), 1.55-1.35 (m, 2H), 1.35 (m, 1H), 1.1-0.8 (m, 18H), 0.75 (t, 3H) [隐藏在 H₂O 峰下的其它信号]。

[0663] 实施例 8

[0664] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-(1,4-二氢-3H-2,3-苯并噁唑-3-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0665]



[0666] 将 15.8 毫克 (0.025 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(2R,3S,4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体 4) 收集在 5 毫升的 DMF 中,并依次添加 14 毫克 (0.025 毫摩) 的 (2R,3R)-N-[(2S)-1-(1,4-

氢-3H-2, 3- 苯并噁嗪-3- 基)-1- 氧代-3- 苯基丙-2- 基]-3- 甲氧基-2- 甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2- 基] 丙酰胺三氟乙酸盐 (中间体 11)、11.3 毫克 (0.03 毫摩) 的 0-(7- 氮杂苯并三唑-1- 基)-N,N,N', N'- 四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (HATU) 和 14 微升 (0.082 毫摩) 的 N,N- 二异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌 10 分钟。然后在减压条件下将该反应浓缩并通过制备型 HPLC 对该残留物直接进行纯化。得到 13 毫克 (理论上为 49%) 的 Fmoc- 保护的中间体 N-[(9H- 芴-9- 基甲氧基) 羰基]-N- 甲基-L- 缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-1-(1, 4- 二氢-3H-2, 3- 苯并噁嗪-3- 基)-1- 氧代-3- 苯基丙-2- 基] 氨基]-1- 甲氧基-2- 甲基-3- 氧代丙基] 吡咯烷-1- 基]-3- 甲氧基-5- 甲基-1- 氧代庚-4- 基]-N- 甲基-L- 缬氨酰胺。

[0667] HPLC (方法 6): $R_t=2.93$ 分钟;

[0668] LC-MS (方法 3): $R_t=3.10$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=1071 (M+H)^+$ 。

[0669] 将 13 毫克 (0.012 毫摩) 的该中间体溶解于 2 毫升的 DMF 中。待添加 0.5 毫升的哌啶后, 在室温条件下将该混合物搅拌 10 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩并通过制备型 HPLC (流动相: 乙腈/0.1%TFA 水溶液) 对该残留物进行纯化。得到 10 毫克 (理论上为 97%) 的标题化合物。

[0670] HPLC (方法 6): $R_t=2.10$ 分钟;

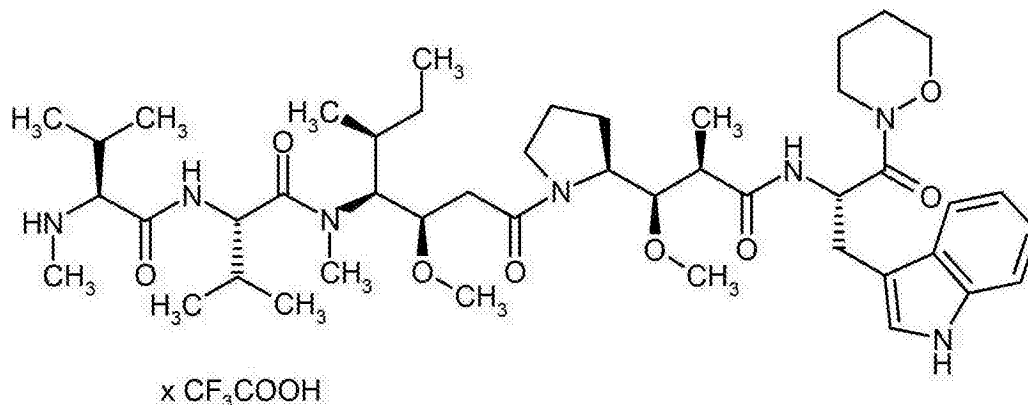
[0671] LC-MS (方法 1): $R_t=0.97$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=849 (M+H)^+$

[0672] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 8.90-8.62$ (m, 3H), 8.60 和 8.33 (2d, 1H), 7.35-7.1 (m, 9H), 5.4-5.0 (m, 4H), 4.7-4.5 (m, 3H), 3.95 (m, 1H), 3.7-3.4 (m, 3H), 3.24, 3.20, 3.18, 3.16, 3.10 和 3.08 (6s, 9H), 3.0 和 2.85 (2br. m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.3 (br. m, 2H), 2.05 (br. m, 2H), 1.9-1.6 (m, 3H), 1.5-1.2 (br. m, 2H), 1.1-0.85 (m, 18H), 0.75 (m, 3H) [隐藏在 H_2O 峰下的其它信号]。

[0673] 实施例 9

[0674] N- 甲基-L- 缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-3-(1H- 吡啶-3- 基)-1-(1, 2- 噁嗪烷-2- 基)-1- 氧代丙-2- 基] 氨基]-1- 甲氧基-2- 甲基-3- 氧代丙基] 吡咯烷-1- 基]-3- 甲氧基-5- 甲基-1- 氧代庚-4- 基]-N- 甲基-L- 缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0675]



[0676] 将 40 毫克 (0.076 毫摩) 的 N-(叔丁氧基羰基)-N- 甲基-L- 缬氨酰基-N-[(2R, 3S, 4S)-1- 羧基-2- 甲氧基-4- 甲基己-3- 基]-N- 甲基-L- 缬氨酰

胺（中间体 20）收集在 5 毫升的 DMF 中，并依次添加 43 毫克（0.078 毫摩）的（2R, 3R）-N-[(2S)-3-(1H-吡啶-3-基)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐（中间体 13）、35 毫克（0.093 毫摩）的 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N, N, N', N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐（HATU）和 45 微升（0.256 毫摩）的 N, N-二异丙基乙基胺。在室温条件下将该混合物搅拌 2 小时。然后在减压条件下将该反应浓缩，并通过制备型 HPLC 对该残留物直接进行纯化。得到 10 毫克（理论上为 14%）的 Boc-保护的中间体 N-(叔丁氧基羰基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-3-(1H-吡啶-3-基)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0677] HPLC（方法 6）： $R_t=2.52$ 分钟；

[0678] LC-MS（方法 1）： $R_t=1.35$ 分钟；MS(ESIpos)： $m/z=940$ (M+H)⁺。

[0679] 将 5 毫克（0.005 毫摩）的该中间体溶解于 3 毫升的二氯甲烷中。待加入 0.5 毫升的三氟乙酸后，将该反应在超声浴中处理 30 分钟，然后在室温条件下再搅拌 30 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩，向该残留物中添加乙腈，并再次将该混合物浓缩。由二噁烷/水冻干，得到 5 毫克（理论上为 99%）的标题化合物。

[0680] HPLC（方法 6）： $R_t=1.94$ 分钟；

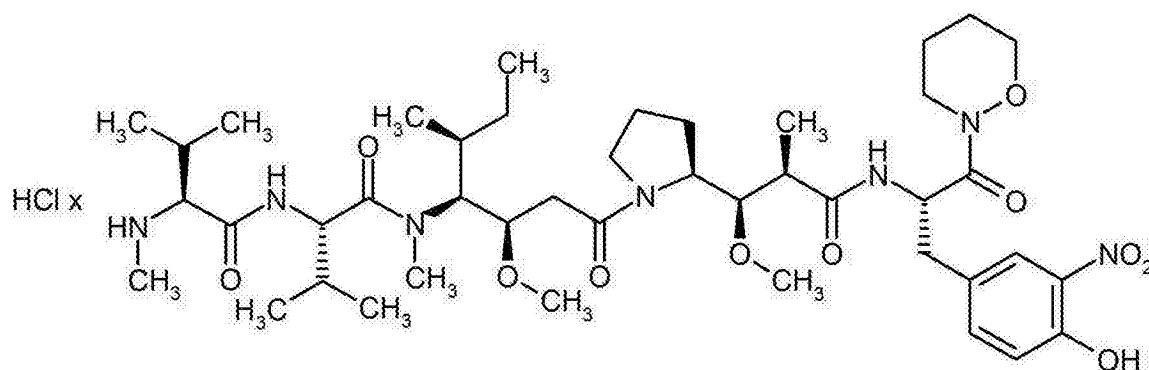
[0681] LC-MS（方法 2）： $R_t=0.99$ 分钟；MS(ESIpos)： $m/z=840$ (M+H)⁺

[0682] ¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆)： $\delta=10.8$ 和 8.8 (2m, 3H), 8.35 和 8.05 (2d, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.3 (d, 1H), $7.20-6.91$ (m, 3H), 5.12 和 4.95 (2m, 1H), $4.7-4.5$ (m, 2H), $4.1-3.9$ (m, 2H), 3.85 (m, 2H), $3.75-3.4$ (m, 5H), 3.21 , 3.15 , 3.14 , 3.10 , 2.95 和 2.85 (6s, 9H), 2.46 (m, 3H), $2.4-2.2$ (m, 2H), $2.1-1.9$ (m, 2H), $1.85-1.65$ (m, 4H), $1.65-1.2$ (m, 3H), 1.05 和 1.0 (2d, 3H), $0.95-0.8$ (m, 15H), 0.75 (m, 3H) [隐藏在 H₂O 峰下的其它信号]。

[0683] 实施例 10

[0684] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-3-(4-羟基-3-硝基苯基)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺盐酸盐

[0685]



[0686] 将 25 毫克（0.026 毫摩）的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-3-(4-羟基-3-硝基苯基)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丙-2-基]

氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(实施例7)溶解于2毫升的1N盐酸中,然后冻干。得到16.4毫克(理论上为71%)的浅黄色泡沫状的标题化合物。

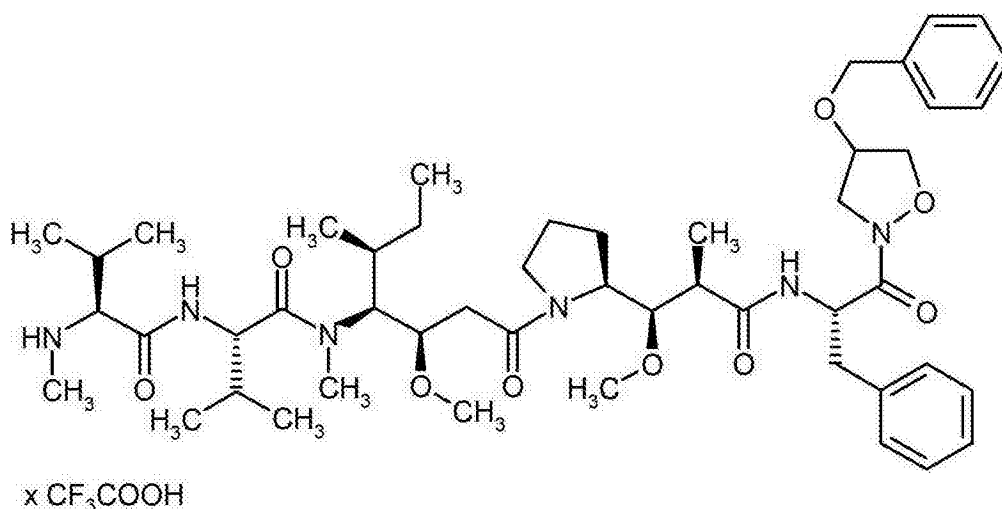
[0687] HPLC(方法5): $R_t=1.63$ 分钟;

[0688] LC-MS(方法1): $R_t=0.87$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=862(M+H)^+$ 。

[0689] 实施例 11

[0690] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-[4-(苄氧基)-1,2-噁唑烷-2-基]-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(非对映体1)

[0691]



[0692] 与合成实施例8的方法类似,通过将原料1与中间体28偶联,随后使用三氟乙酸脱保护,然后再与中间体4发生偶联,最后使用哌啶脱保护,从而制得该标题化合物。最终产物的纯化是通过制备型HPLC(流动相:乙腈/0.1%TFA水溶液)进行的。得到16.4毫克的标题化合物。

[0693] HPLC(方法5): $R_t=2.08$ 分钟;

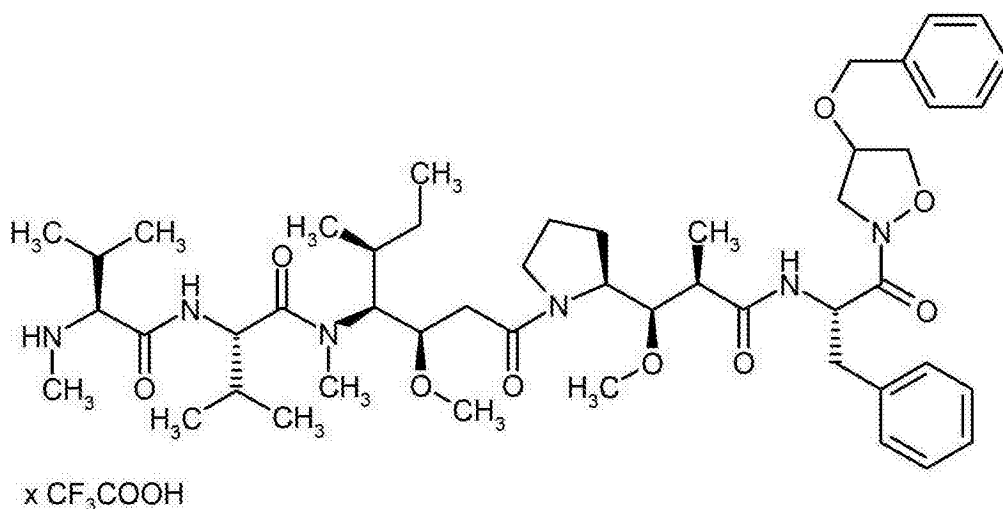
[0694] LC-MS(方法3): $R_t=1.90$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=893(M+H)^+$

[0695] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 8.8-8.6$ (m, 3H), 8.45和8.4(2d, 1H), 7.35-7.1(m, 10H), 5.2和5.0(2m, 1H), 4.7-4.5(m, 5H), 4.15(d, 1H), 4.0-3.6(m, 5H), 3.6-3.4(m, 2H), 3.75-3.4(m, 5H), 3.22, 3.16, 3.15, 3.05和2.96(5s, 9H), 3.1-2.9和2.8-2.6(2m, 2H), 2.45和2.44(2s, 3H), 2.4-2.2(m, 2H), 2.1-2.0(m, 2H), 1.85-1.6(m, 2H), 1.5-1.2(m, 3H), 1.1-0.8(m, 18H), 0.75(m, 3H)。

[0696] 实施例 12

[0697] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-[4-(苄氧基)-1,2-噁唑烷-2-基]-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(非对映体2)

[0698]



[0699] 与合成实施例 8 的方法类似,通过将原料 1 与中间体 29 偶联,随后使用三氟乙酸脱保护,然后再与中间体 4 发生偶联,最后使用哌啶脱保护,从而制得该标题化合物。最终产物的纯化是通过制备型 HPLC (流动相:乙腈/0.1% TFA 水溶液)进行的。得到 28 毫克的标题化合物。

[0700] HPLC (方法 5): $R_t=2.11$ 分钟;

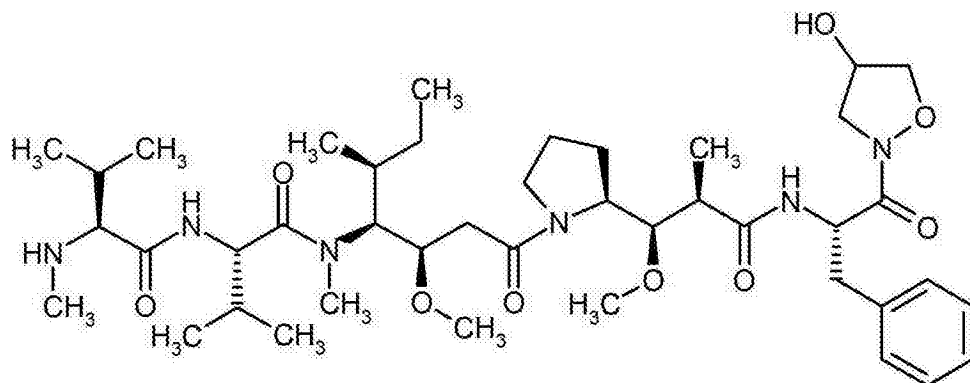
[0701] LC-MS (方法 7): $R_t=1.96$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=893 (M+H)^+$

[0702] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.9-8.6$ (m, 3H), 8.45 和 8.3 (2d, 1H), 7.4-7.1 (m, 10H), 5.2 和 4.95 (2m, 1H), 4.7-4.5 (m, 5H), 4.25 (d, 1H), 4.0-3.8 (m, 3H), 3.7-3.6 (m, 2H), 3.6-3.4 (m, 2H), 3.23, 3.19, 3.18, 3.15, 3.05 和 2.96 (6s, 9H), 3.1-3.0 和 2.8-2.65 (2m, 2H), 2.5-2.4 (m, 3H), 2.35-2.15 (m, 2H), 2.1-1.95 (m, 2H), 1.8-1.6 (m, 2H), 1.5-1.2 (m, 3H), 1.1-0.8 (m, 18H), 0.75 (m, 3H)。

[0703] 实施例 13

[0704] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-1-(4-羟基-1,2-噁唑烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (非对映体 2)

[0705]



[0706] 将 27 毫克 (0.03 毫摩) 实施例 12 的化合物收集在 42 毫升 THF 和 22 毫升水的混合物中,添加 1.35 毫升 2M 盐酸,并在室温和大气压条件下使用 10% 钯/碳将该混合物氢化 20 分钟。然后将该催化剂滤除,使用碳酸氢钠水溶液将该反应混合物中和。然后用乙酸乙

酯提取该混合物。待相分离后,将乙酸乙酯相浓缩,并通过在硅胶上使用流动相二氯甲烷/甲醇/17%氨溶液(125:3:0.3)的快速色谱对该残留物进行纯化。将合适的馏分浓缩,并由二噁烷将该残留物冻干。得到 25 毫克的标题化合物。

[0707] HPLC (方法 6): $R_t=1.74$ 分钟;

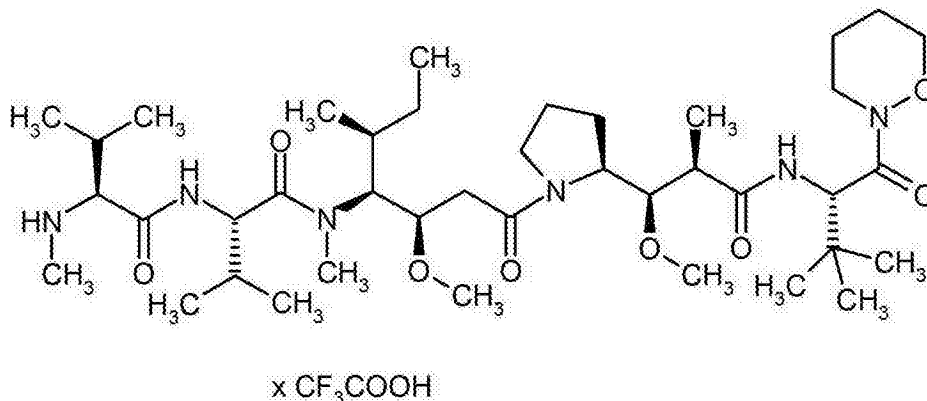
[0708] LC-MS (方法 8): $R_t=2.06$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=803$ (M+H)⁺

[0709] ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): $\delta=8.45$ 和 8.2 (2d, 1H), 8.1 (m, 1H), $7.3-7.1$ (m, 5H), 5.5 (m, 1H), 5.15 和 4.95 (2m, 1H), $4.7-4.4$ (m, 3H), $4.1-3.9$ (m, 3H), $3.5-3.4$ (m, 3H), 3.23 , 3.19 , 3.18 , 3.16 , 3.05 和 2.96 (6s, 9H), $3.1-3.0$ 和 $2.8-2.65$ (2m, 2H), $2.4-2.15$ (m, 5H), $2.1-1.95$ (m, 2H), $1.8-1.6$ (m, 3H), $1.5-1.2$ (m, 2H), $1.05-0.8$ (m, 18H), 0.75 (m, 3H)。

[0710] 实施例 14

[0711] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(2S)-3, 3-二甲基-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代丁-2-基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0712]



[0713] 由中间体 21 开始,首先使用三氟乙酸脱保护,随后与中间体 4 发生偶联,最后使用哌啶脱保护,以三步制得该标题化合物。最终产物的纯化是通过制备型 HPLC(流动相:乙腈+0.01%TFA/水+0.01%TFA)进行的。得到 2.5 毫克的标题化合物。

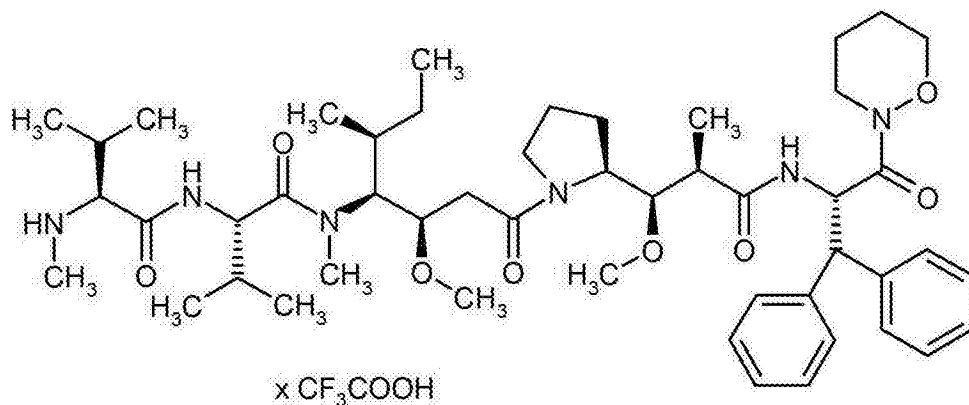
[0714] HPLC (方法 5): $R_t=1.67$ 分钟;

[0715] LC-MS (方法 1): $R_t=0.90$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=767$ (M+H)⁺。

[0716] 实施例 15

[0717] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3, 3-二苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0718]



[0719] 由中间体 22 开始, 首先使用三氟乙酸脱保护, 随后与中间体 4 发生偶联, 最后使用哌啶脱保护, 以三步制得该标题化合物。最终产物的纯化是通过制备型 HPLC(流动相: 乙腈 +0.01%TFA/ 水 +0.01%TFA) 进行的。得到 20 毫克的标题化合物。

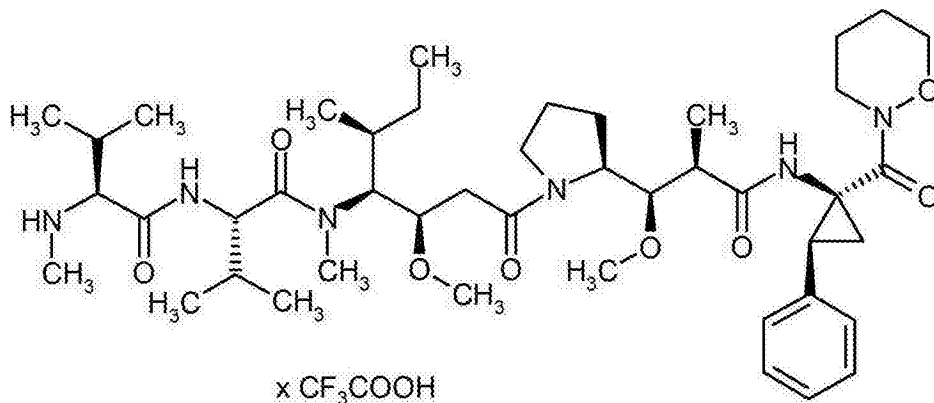
[0720] HPLC (方法 5): $R_t=1.78$ 分钟;

[0721] LC-MS (方法 1): $R_t=0.95$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=877 (M+H)^+$ 。

[0722] 实施例 16

[0723] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S, 2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)羰基]-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0724]



[0725] 由中间体 23 开始, 首先使用三氟乙酸脱保护, 随后与中间体 4 发生偶联, 最后使用哌啶脱保护, 以三步制得该标题化合物。最终产物的纯化是通过制备型 HPLC(流动相: 乙腈/0.1%TFA 水溶液) 进行的。得到 9 毫克的标题化合物。

[0726] HPLC (方法 6): $R_t=1.95$ 分钟;

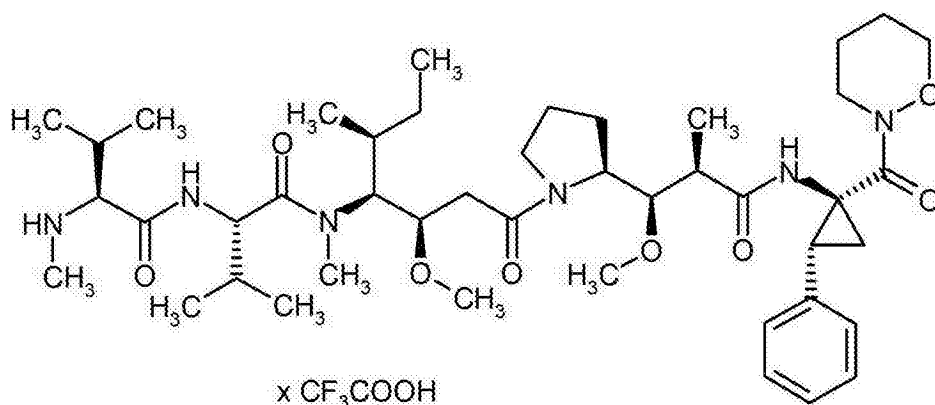
[0727] LC-MS (方法 1): $R_t=0.90$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=813 (M+H)^+$ 。

[0728] $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8.85$ (m, 2H), 8.7 (m, 1H), 8.2 和 7.8 (2s, 1H), 7.3-7.1 (m, 5H), 4.75 和 4.65 (2m, 1H), 4.7 和 4.6 (2t, 1H), 4.0-3.9 (m, 2H), 3.8 5 (m, 1H), 3.75-3.6 (m, 4H), 3.55 (m, 1H), 3.22, 3.20, 3.18, 3.17, 3.03 和 2.98 (6s, 9H), 2.92 和 2.82 (2t, 1H), 2.5-2.45 (m, 3H), 2.4-1.3 (m, 15H), 1.0-0.7 (m, 18H), 0.65 和 0.6 (2d, 3H) [隐藏在 H_2O 峰下的其它信号]。

[0729] 实施例 17

[0730] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基

基-2-甲基-3-[[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐 [0731]



[0732] 将 617 毫克 (1.2 毫摩) 的 (2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-羧酸叔丁酯 (中间体 24) 收集在 44 毫升的二氯甲烷中, 添加 4.4 毫升的三氟乙酸, 并在室温条件下将该混合物搅拌 30 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并由二噁烷/水将剩余的残留物冻干。得到 702 毫克 (定量) 脱保护的化合物 (2R, 3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐作为粗产物, 该粗产物无需进一步纯化即可用于下一步。

[0733] 将 470 毫克 (0.74 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰胺基-N-[(2R, 3S, 4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体 4) 收集在 57 毫升的 DMF 中, 并依次添加 390 毫克 (约 0.74 毫摩) 以上所得的 (2R, 3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐、336 毫克 (0.88 毫摩) 的 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N, N, N', N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐 (HATU) 和 423 微升 (2.4 毫摩) 的 N, N-二异丙基乙基胺。将该混合物在室温条件下搅拌 2 小时。然后将该反应倒入半饱和的氯化铵水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相, 依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和氯化钠溶液进行洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。得到 453 毫克 (理论上为 59%) 的 Fmoc-保护的中间体 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰胺基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0734] HPLC (方法 5): $R_t=2.58$ 分钟;

[0735] LC-MS (方法 1): $R_t=3.10$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=1035 (M+H)^+$ 。

[0736] 将 453 毫克 (0.438 毫摩) 的该中间体溶解于 24 毫升的 DMF 中。待添加 2.4 毫升的哌啶后, 在室温条件下将该反应搅拌 30 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩并通过制备型 HPLC (流动相: 乙腈/0.1%TFA 水溶液) 对该残留物进行纯化。得到 260 毫克 (理论上为 64%) 的无色泡沫状的标题化合物。

[0737] HPLC (方法 5): $R_t=1.64$ 分钟;

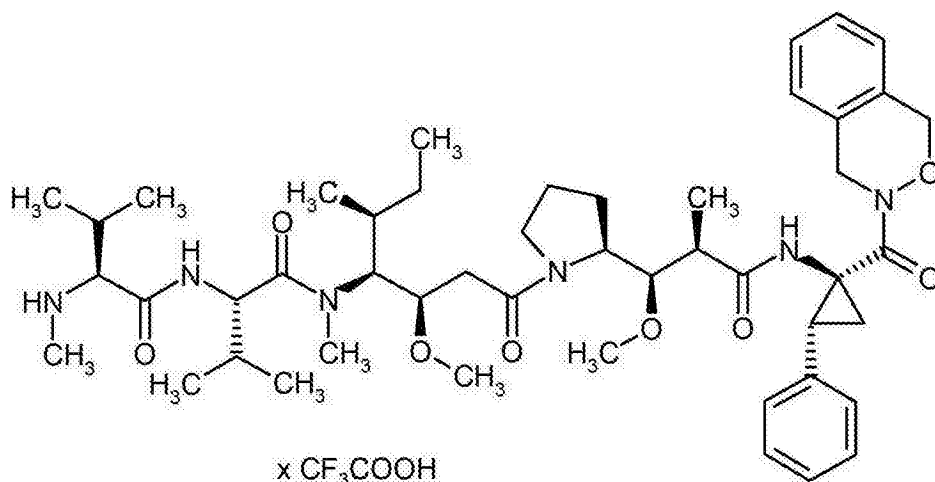
[0738] LC-MS (方法 1): $R_t=0.86$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=813 (M+H)^+$

[0739] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6): δ = 8.8 (m, 2H), 8.65 (m, 2H), 7.3-7.1 (m, 5H), 4.8-4.05 (m, 2H), 4.0 和 3.82 (2m, 2H), 3.8-3.5 (m, 8H), 3.32, 3.29, 3.20, 3.19, 3.12 和 3.00 (6s, 9H), 2.65 (t, 1H), 2.5-2.45 (m, 3H), 2.4-1.3 (m, 15H), 1.15-0.85 (m, 18H), 0.8 和 0.75 (2d, 3H) [隐藏在 H_2O 峰下的其它信号]。

[0740] 实施例 18

[0741] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(1S, 2R)-1-(1, 4-二氢-3H-2, 3-苯并噁嗪-3-基)羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0742]



[0743] 将 166 毫克 (0.196 毫摩) 的 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-2-羧基-1-甲氧基丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体 30) 收集在 40 毫升的 DMF 中, 并依次添加 80 毫克 (0.196 毫摩) 的 [(1S, 2R)-1-氨基-2-苯基环丙基] (1, 4-二氢-3H-2, 3-苯并噁嗪-3-基) 甲酮三氟乙酸盐 (中间体 31)、112 毫克 (0.294 毫摩) 的 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐 (HATU) 和 682 微升 (3.9 毫摩) 的 N,N-二异丙基乙基胺。然后在室温条件下将该混合物搅拌过夜。然后在减压条件下将该反应浓缩, 将该残留物收集在乙酸乙酯中, 并使用饱和氯化钠水溶液对该溶液进行洗涤。用硫酸镁对该有机相进行干燥, 过滤并浓缩。最后通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。在这种方式中, 获得 19 毫克 (理论上为 9%) 的 Fmoc-保护的中间体 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-3-[(1S, 2R)-1-(1, 4-二氢-3H-2, 3-苯并噁嗪-3-基)羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0744] HPLC (方法 5): R_t = 1.68 分钟;

[0745] LC-MS (方法 1): R_t = 1.51 分钟; MS (ESIpos): m/z = 1083 (M+H) $^+$ 。

[0746] 将 19 毫克 (0.015 毫摩) 的该中间体溶解于 4 毫升的 DMF 中。待添加 817 微升的哌啶后, 在室温条件下将该反应搅拌 5 分钟。然后在减压条件下将该混合物浓缩, 并首先使用乙醚对该残留物进行消化, 然后通过制备型 HPLC (流动相: 乙腈 + 0.1%TFA/0.1%TFA 水溶

液) 对该残留物进行纯化。将合适的馏分合并, 在减压条件下除去该溶剂, 然后由二噁烷 / 水将该残留物冻干。得到 12 毫克(理论上为 92%) 的无色泡沫状的标题化合物。

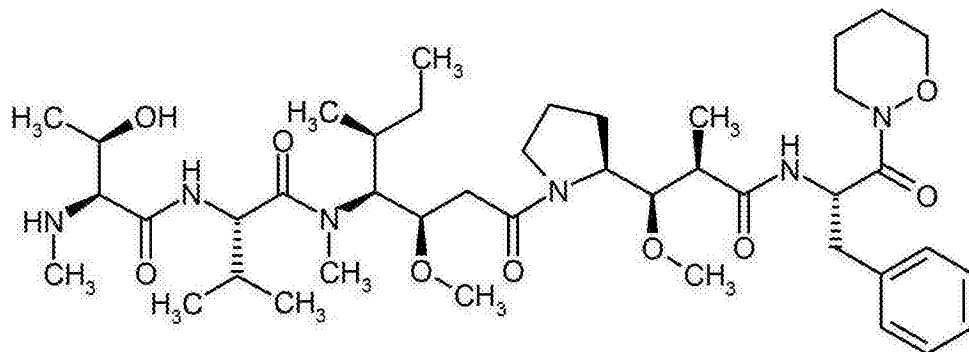
[0747] HPLC (方法6): R_t =2.0 分钟;

[0748] LC-MS (方法 1): $R_t=0.94$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=861$ ($M+H$)⁺。

[0749] 实施例 19

[0750] N-甲基-L-苏氨酸基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酸酰胺

[0751]



[0752] 将 100 毫克 (0.181 毫摩) 的 N-[(苄氧基)羰基]-N-甲基-L-苏氨酰基-N-[(2R, 3S, 4S)-1-羧基-2-甲氧基-4-甲基己-3-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 (中间体 32) 收集在 5 毫升的 DMF 中, 并依次添加 94 毫克 (0.181 毫摩) 的 (2R, 3R)-3-甲氧基-2-甲基-N-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰胺三氟乙酸盐 (中间体 7)、42 毫克 (0.218 毫摩) 的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、33 毫克 (0.218 毫摩) 的 1-羟基-1H-苯并三唑水合物和 63 微升 (0.36 毫摩) 的 N,N-二异丙基乙基胺。然后在室温条件下将该混合物搅拌 2 小时。然后在减压条件下除去该溶剂, 并通过制备型 HPLC 对该残留物进行纯化。得到 128 毫克 (理论上为 75%) 的 Z-保护的中间体 N-[(苄氧基)羰基]-N-甲基-L-苏氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺。

[0753] LC-MS (方法 2): R_t =1.32 分钟; MS (ESIpos): m/z =937 (M+H)⁺。

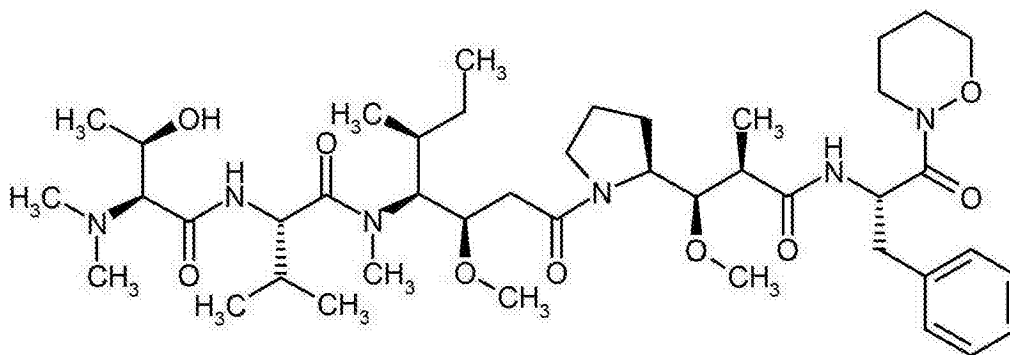
[0754] 将 100 毫克 (0.107 毫摩) 的该中间体溶解于 20 毫升的甲醇中, 在室温和大气压条件下, 用 10% 钯 / 碳氢化 1 小时。然后滤除该催化剂, 并将该溶剂蒸发。由二噁烷 / 水 (1 : 1) 将剩余的残留物冻干。得到 88 毫克 (理论上为 97%) 的标题化合物。

[0755] LC-MS (方法 1):R_t=0.83 分钟;MS(ESIpos):m/z=803(M+H)⁺。

[0756] 实施例 20

[0757] N, N- 二 甲 基 -L- 苏 氨 酰 基 -N-[(3R, 4S, 5S)-3- 甲 氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1- 甲氧基-2- 甲基-3-[(2S)-1-(1, 2- 噁 嗪 烷 -2- 基)-1- 氧代-3- 苯 基 丙 -2- 基] 氨 基 }-3- 氧 代 丙 基] 吡 咯 烷 -1- 基 }-5- 甲 基 -1- 氧 代 庚 -4- 基]-N- 甲 基 -L- 缬 氨 酰 胺

[0758]



[0759] 将 84 毫克 (0.105 毫摩) 的 N-甲基-L-苏氨酸基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酸酰胺 (实施例 19) 收集在 5 毫升的二噁烷/水 (1:1) 中, 并添加 31 微升 (0.418 毫摩) 的 37% 浓度的甲醛水溶液和 8 毫克 (0.126 毫摩) 的氰基硼氢化钠。然后使用 1 毫升 0.1N 盐酸将该混合物的 pH 调节至 6-7, 并在 100°C 下搅拌 1 小时。然后将该反应倒入半饱和的碳酸氢钠水溶液和乙酸乙酯的混合物中。分离除去该有机相, 用饱和氯化钠溶液进行洗涤, 用硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。最后由乙腈/水将该残留物冻干。得到 72 毫克 (理论上为 84%) 的无色泡沫形式的标题化合物。

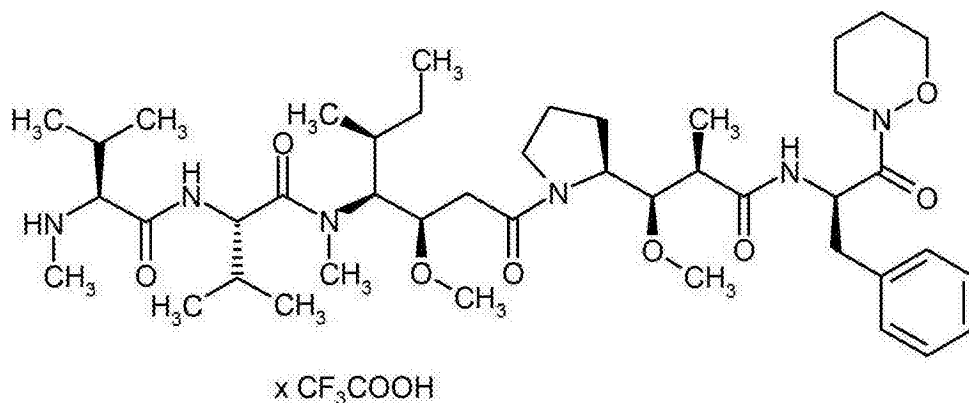
[0760] HPLC (方法 5): $R_t=1.6$ 分钟;

[0761] LC-MS (方法 2): $R_t=0.96$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=817$ (M+H)⁺。

[0762] 实施例 21

[0763] N-甲基-L-缬氨酸基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酸酰胺三氟乙酸盐

[0764]



[0765] 与合成实施例 18 的方法类似, 通过将中间体 30 与 (2R)-2-氨基-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐 (中间体 33) 偶联, 并随后用哌啶脱保护, 制得该标题化合物。最终产物的纯化是通过制备型 HPLC (流动相: 乙腈 + 0.1%TFA/0.1%TFA 水溶液) 进行的。

[0766] HPLC (方法 6): $R_t=1.9$ 分钟;

[0767] LC-MS (方法 1): $R_t=0.91$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=801$ (M+H)⁺

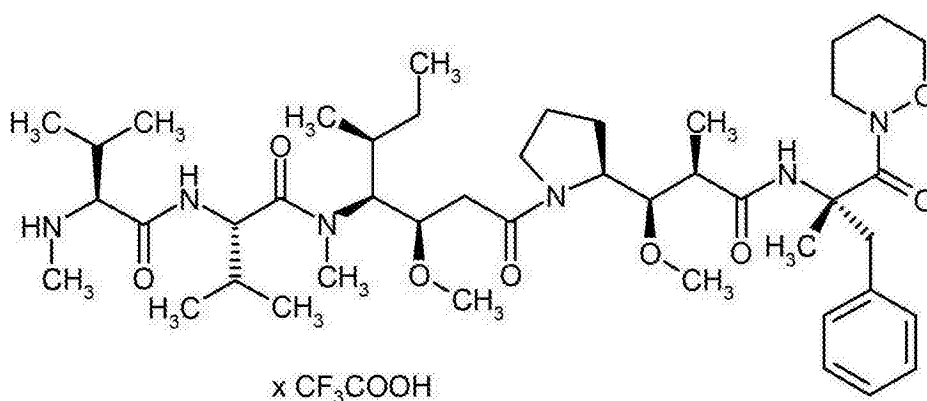
[0768] ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆): $\delta = 8.8$ (m, 2H), 8.65 (m, 1H), 8.32 和

8.1 (2d, 1H), 7.3-7.1 (m, 5H), 5.05 和 4.95 (2m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.62 和 4.56 (2t, 1H), 4.1-3.75 (m, 5H), 3.7-3.45 (m, 4H), 3.28, 3.22, 3.18, 3.17, 3.04 和 2.99 (6s, 9H), 2.9 和 2.75 (2m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.45-2.2 (m, 3H), 2.1-1.5 (m, 12H), 1.0-0.8 (m, 18H), 0.8 和 0.75 (2d, 3H) [隐藏在 H₂O 峰下的其它信号]。

[0769] 实施例 22

[0770] N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-2-甲基-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基}-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐

[0771]



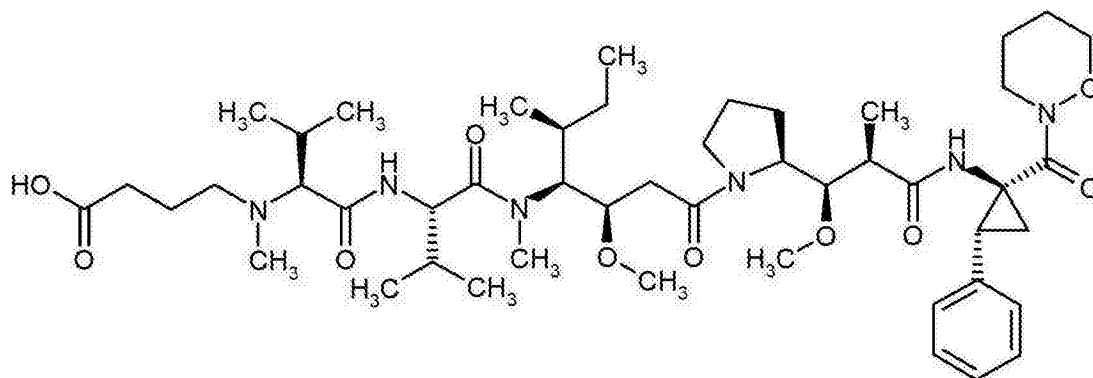
[0772] 与合成实施例 18 的方法类似, 通过将中间体 30 与 (2S)-2-氨基-2-甲基-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-3-苯基丙-1-酮三氟乙酸盐 (中间体 34) 偶联, 并随后用哌啶脱保护, 制得该标题化合物。最终产物的纯化是通过制备型 HPLC (流动相: 乙腈 +0.1%TFA/0.1%TFA 水溶液) 进行的。

[0773] LC-MS (方法 1): R_t=0.95 分钟; MS (ESIpos): m/z=815 (M+H)⁺。

[0774] 实施例 23

[0775] N-(3-羧丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)羰基]-2-苯基环丙基]氨基}-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0776]



[0777] 将 50 毫克 (0.054 毫摩) 的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基

羰基)-2-苯基环丙基]氨基}-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酸三氟乙酸盐(实施例17)溶解于8毫升的二噁烷/水(1:1)中,并添加70毫升(0.108毫摩)的15%浓度的4-氧代丁酸的水溶液。然后在100℃条件下将该反应搅拌1小时。待冷却至室温后,添加3.7毫克(0.059毫摩)的氰基硼氢化钠,并通过添加约300微升的0.1N盐酸将该混合物的pH调节至3。然后在100℃条件下将该反应再搅拌2小时。待冷却后,再添加70毫升(0.108毫摩)的15%浓度的4-氧代丁酸溶液,并再次在100℃条件下将该反应搅拌1小时。然后再添加3.7毫克(0.059毫摩)的氰基硼氢化钠,随后使用约300微升0.1N盐酸将pH重新调节至3。然后在100℃条件下将该反应再搅拌2小时。如果反应仍未完成,将该过程再重复一遍。最后,将该反应浓缩并通过制备型HPLC对该残留物进行纯化。在这种方式中,得到32毫克(理论上为65%)的无色泡沫形式的标题化合物。

[0778] HPLC (方法 6): $R_t=1.64$ 分钟;

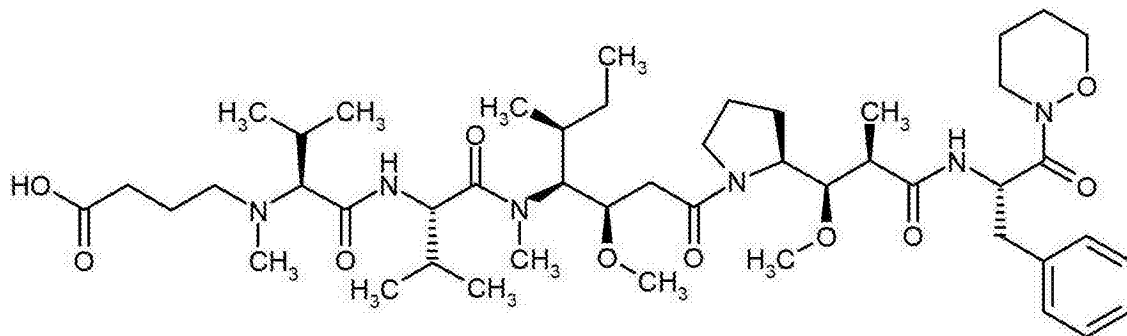
[0779] LC-MS (方法 9): R_t =4.76 分钟; MS (ESIpos): m/z =899 (M+H)⁺

[0780] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6) : δ = 8.95 和 8.8 (2m, 1H), 8.88 和 8.65 (2s, 1H), 7.4-7.1 (m, 5H), 5.0, 4.78, 4.65 和 4.55 (4m, 2H), 4.1-3.7 (m, 5H), 3.32, 3.29, 3.20, 3.12, 3.1 和 3.0 (6s, 9H), 2.75 (m, 2H), 2.63 (t, 1H), 2.4-2.2 (m, 4H), 2.1-1.2 (m, 12H), 1.2-0.8 (m, 16H), 0.75 (m, 3H) [隐藏在 H_2O 和 DMSO 峰下的其它信号]。

[0781] 实施例 24

[0782] N-(3-羧丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0783]



[0784] 与合成实施例 23 的方法类似, 通过使 50 毫克的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(实施例 1)与 4-氧代丁酸反应, 制得该标题化合物

[0785] 产率 :34 毫克 (理论上为 70%)

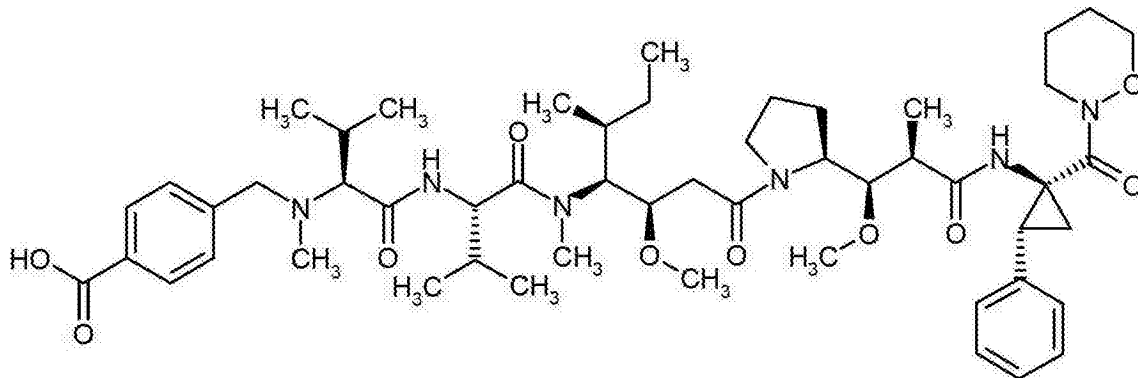
[0786] HPLC (方法 5): $R_t=1.64$ 分钟;

[0787] LC-MS (方法 9): R_t =4.77 分钟; MS (ESIpos): m/z =887 (M+H)⁺。

[0788] 实施例 25

[0789] N-(4-羧苄基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S,2R)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0790]



[0791] 与合成实施例 23 的方法类似, 通过使 15 毫克的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(实施例 17)与 4-甲酰基苯甲酸反应, 制得该标题化合物。

[0792] 产率:7.5 毫克 (理论上为 48%)

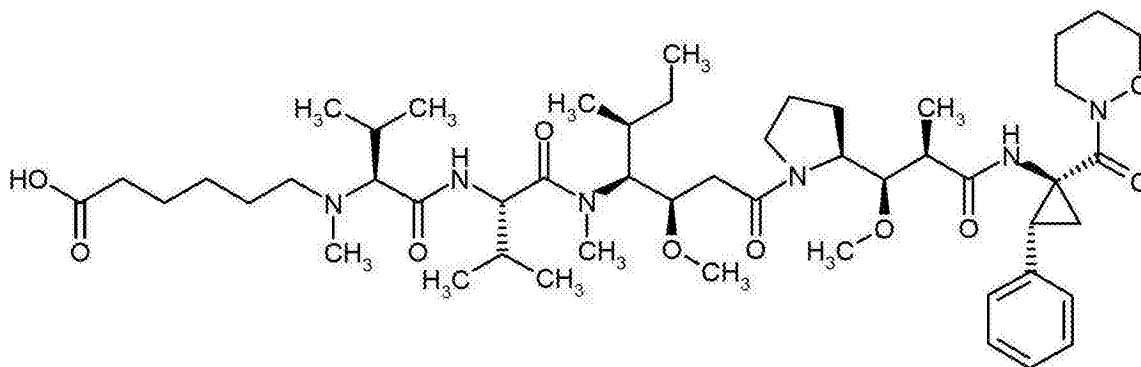
[0793] HPLC (方法 5): $R_t=1.75$ 分钟:

[0794] LC-MS (方法 1): $R_t=0.97$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=947$ (M+H)⁺。

[0795] 实施例 26

[0796] N-(5-羧戊基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S,2R)-1-(1,2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0797]



[0798] 将 10 毫克 (0.011 毫摩) 的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐 (实施例 17) 溶解于 2 毫升的二噁烷/水 (1:1) 中, 并添加 2.8 毫克

(0.022 毫摩) 的 6- 氧代己酸。然后在 100℃ 条件下将该反应搅拌 1 小时。待冷却至室温后, 添加 0.75 毫克 (0.012 毫摩) 的氰基硼氢化钠, 并通过添加 0.1N 盐酸将该混合物的 pH 调节至 3。然后在 100℃ 条件下将该反应再搅拌 1 小时。待冷却后, 再添加 2.8 毫克 (0.022 毫摩) 的 6- 氧代己酸, 然后再次在 100℃ 条件下将该反应搅拌 1 小时。再添加 0.75 毫克 (0.012 毫摩) 的氰基硼氢化钠, 然后使用 0.1N 盐酸将 pH 重新调节至 3。然后在 100℃ 条件下将该反应再搅拌 1 小时。然后将该步骤再重复一遍。最后, 将该反应浓缩并通过制备型 HPLC 对该粗产物进行纯化。得到 6.4 毫克 (理论上为 64%) 的无色泡沫形式的标题化合物。

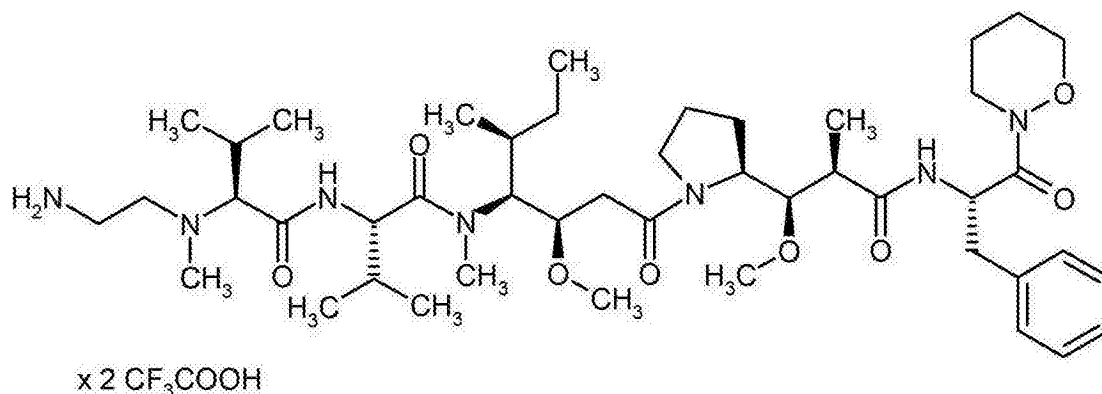
[0799] HPLC (方法 5): $R_t=1.68$ 分钟;

[0800] LC-MS (方法 9): $R_t=4.86$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=927 (M+H)^+$ 。

[0801] 实施例 27

[0802] N-(2-氨基乙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺二(三氟乙酸)盐

[0803]



[0804] 与合成实施例 2 的方法类似, 通过使 68 毫克的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐 (实施例 1) 与 (2-氧代乙基) 氨基甲酸叔丁酯反应, 并随后使用三氟乙酸除去 Boc 保护基团, 从而制得该标题化合物。

[0805] 产率: 49 毫克 (两步理论上为 62%)

[0806] HPLC (方法 5): $R_t=1.58$ 分钟;

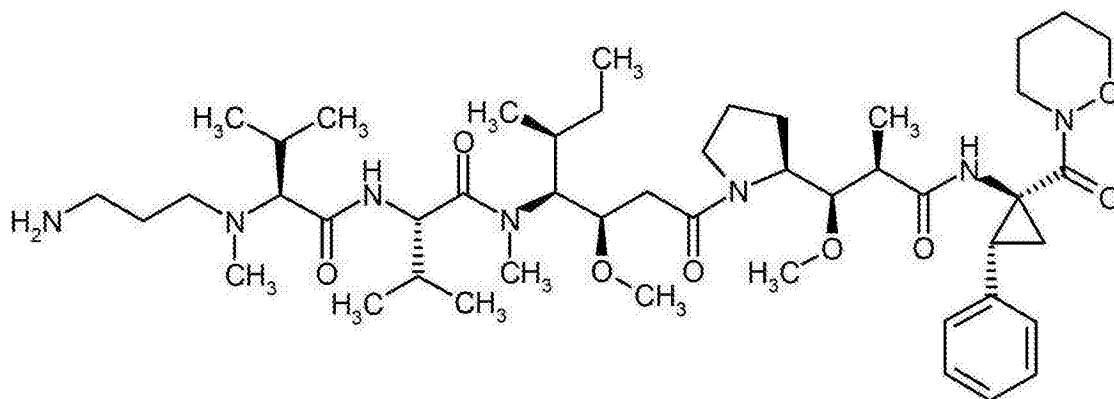
[0807] LC-MS (方法 2): $R_t=1.05$ 分钟; MS (ESIpos): $m/z=844 (M+H)^+$

[0808] ¹H-NMR (600MHz, DMSO-d₆): δ = 8.25 (m, 1H), 8.45 和 8.15 (2d, 1H), 7.65-7.55 (m, 3H), 7.23-7.1 (m, 5H), 5.12 和 4.95 (2m, 1H), 4.72 和 4.62 (2m, 1H), 4.6 和 4.52 (2t, 1H), 4.2-3.8 (m, 4H), 3.7 (d, 1H), 3.23, 3.20, 3.19, 3.18, 3.03 和 2.98 (6s, 9H), 3.0-2.7 (m, 6H), 2.4-1.2 (m, 15H), 1.05, 1.0, 0.88 和 0.82 (4d, 6H), 0.92 (m, 6H), 0.73 (m, 6H) [隐藏在 H₂O 峰下的其它信号]。

[0809] 实施例 28

[0810] N-(3-氨基丙基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-

[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基羰基)-2-苯基环丙基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺 [0811]



[0812] 与合成实施例 27 的方法类似,通过使 25 毫克 (0.027 毫摩) 的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐 (实施例 17) 与 (3-氧代丙基) 氨基甲酸苄基酯反应,并随后氢解除去 Z 保护基团 (在乙醇 (作为溶剂) 中使用 10% 负载在碳上的钯作为催化剂),从而制得该标题化合物。

[0813] 产率:11 毫克 (两步理论上为 41%)

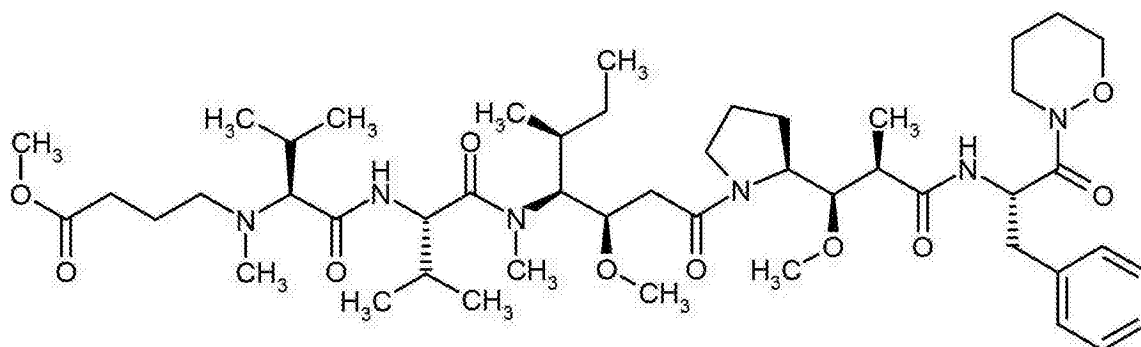
[0814] HPLC (方法 5): $R_t=1.53$ 分钟;

[0815] LC-MS (方法 1): $R_t=0.72$ 分钟;MS (ESIpos): $m/z=870$ (M+H)⁺。

[0816] 实施例 29

[0817] N-(4-甲氧基-4-氧代丁基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0818]



[0819] 与合成实施例 23 的方法类似,通过使 9.5 毫克的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐 (实施例 1) 与 4-氧代丁酸甲酯反应,制得该标题化合物。

[0820] 产率:4 毫克(理论上为 43%)

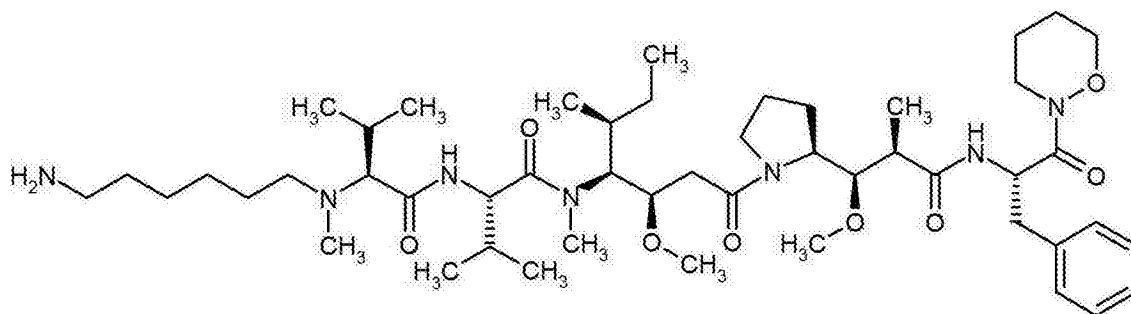
[0821] HPLC (方法 5): $R_t=1.73$ 分钟;

[0822] LC-MS (方法 9): $R_t=4.91$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=901$ (M+H)⁺。

[0823] 实施例 30

[0824] N-(6-氨基己基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基}-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0825]



[0826] 与合成实施例 28 的方法类似,通过使 20 毫克(16 微摩)的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基}-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺三氟乙酸盐(实施例 1)与(6-氧代己基)氨基甲酸苄基酯,并随后氢解除去 Z 保护基团(在甲醇(作为溶剂)中使用 10% 负载在碳上的钨作为催化剂),从而制得该标题化合物。

[0827] 产率:7.6 毫克(两步理论上为 55%)

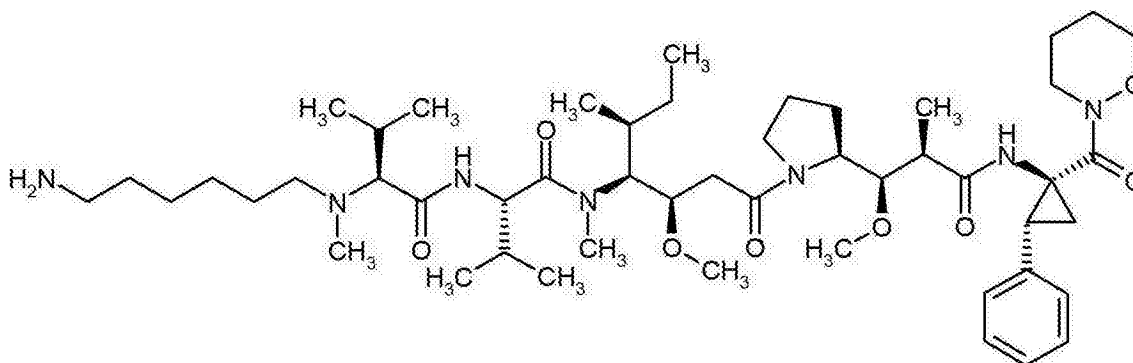
[0828] HPLC (方法 6): $R_t=1.8$ 分钟;

[0829] LC-MS (方法 1): $R_t=0.70$ 分钟;MS(ESIpos): $m/z=901$ (M+H)⁺。

[0830] 实施例 31

[0831] N-(6-氨基己基)-N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S, 2R)-1-(1, 2-噁嗪烷-2-基)羰基]-2-苯基环丙基]氨基}-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺

[0832]



[0833] 与合成实施例 28 的方法类似,通过使 200 毫克(0.108 毫摩)的 N-甲基-L-缬氨酰基-N-[(3R, 4S, 5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-[(1S, 2R)-1-

(1, 2- 噁嗪烷 -2- 基羰基)-2- 苯基环丙基] 氨基 }-3- 氧代丙基] 吡咯烷 -1- 基 }-5- 甲基 -1- 氧代庚 -4- 基]-N- 甲基 -L- 缬氨酰胺三氟乙酸盐 (实施例 17) 与 (6- 氧代己基) 氨基甲酸苄基酯反应, 并随后氢解除去 Z 保护基团 (在甲醇 (作为溶剂) 中使用 5% 负载在碳上的钨作为催化剂), 从而制得该标题化合物。

[0834] 产率 :69 毫克 (两步理论上为 65%)

[0835] HPLC (方法 5): $R_t=1.7$ 分钟 ;

[0836] LC-MS (方法 1): $R_t=0.76$ 分钟 ;MS (ESIpos) : $m/z=912 (M+H)^+$ 。

[0837] B. 生物学活性的评价

[0838] 本发明化合物的生物学活性可通过本领域技术人员已知的体外和体内检查来证实。例如, 本发明化合物的药理学和药代动力学性质可借助于下述试验进行测定 :

[0839] B-1. 对 786-0 RCC 细胞系的抗增殖作用的测定 :

[0840] 在 96 孔微量滴定板内将确定细胞数的人肾癌细胞系 786-0 播种在完全培养基中 (2500 或 7000 细胞 / 孔) 并在 $37^{\circ} \text{C}/5\% \text{CO}_2$ 的条件下孵育过夜。18 小时后, 用无血清培养基或含 2% FCS 的培养基代替该播种培养基。通过添加不同浓度 (10^{-5} – 10^{-14}M) 的各测试物质开始处理。选择的孵育时间为 48–96 小时。借助于 MTT 试验 (ATCC, 美国弗吉尼亚州马纳萨斯市 (Manassas, Virginia, USA), 目录号 30-1010K) 测定增殖。所述孵育时间后, 使 MTT 试剂与所述细胞孵育 4 小时, 随后通过加入去污剂过夜使所述细胞裂解。在 570 纳米处检测所形成的染料。未用测试物质进行处理但其它处理步骤相同的细胞, 其增殖被定义为 100%。由该测试获得的数据是三次测定, 并至少进行两次独立的实验。

[0841] 下表 1 列出该试验的各工作实施例的 IC_{50} 值。

[0842] 表 1

[0843]

工作实施例	$\text{IC}_{50} [\text{nM}]$
1	4
4	14
6	0.5
8	2.4
9	3
11	1.2
12	0.2
13	4
16	8

17	4
23	11
24	5
26	18

[0844] 为了比较,在该测试中单甲基耳他汀 F (MMAF) 的 IC_{50} 值为 260nM。

[0845] B-2. 对 HT29wt 细胞系的抗增殖作用的测定:

[0846] 在 96 孔微量滴定板内将确定细胞数的人结肠癌细胞系 HT29wt (野生型) 播种在完全培养基 (10%FCS-RPMI) (2500 细胞 / 孔) 中并在 37° C/5%CO₂ 的条件下孵育过夜。18 小时后,用含 10% FCS 的新鲜培养基代替该播种培养基。通过添加各测试物质开始处理。从待研究的物质,测定 10^{-5} - 10^{-14} M 浓度范围 (1:10- 稀释系列) 内的剂量 / 活性曲线。选择的孵育时间为 48-96 小时。借助于 MTT 试验 (ATCC, 美国弗吉尼亚州马纳萨斯市 (Manassas, Virginia, USA), 目录号 30-1010K) 测定增殖。所述孵育时间后,使 MTT 试剂与所述细胞孵育 4 小时,随后通过加入去污剂过夜使所述细胞裂解。在 570 纳米处检测所形成的染料。未用测试物质进行处理但其它处理步骤相同的细胞,其增殖被定义为 100%。由该测试获得的数据是三次测定,并至少进行两次独立的实验。

[0847] 下表 2 列出该试验的各工作实施例的 IC_{50} 值。

[0848] 表 2

[0849]

工作实施例	IC_{50} [nM]
1	0.1
2	0.5
4	0.2
9	1.4
17	0.5
18	1.2
23	0.7
24	1.5
29	0.1

[0850] 为了比较,在该测试中单甲基耳他汀 F (MMAF) 的 IC_{50} 值为 10nM。

[0851] B-3. 对微管蛋白聚合的作用的测定

[0852] 癌细胞是变性细胞,其经常导致肿瘤的形成,这也是细胞分裂增加的结果。微管形成纺锤体的纺锤丝,并且是细胞周期的必需组成部分。微管有规律的构建和分解使得染色体在子细胞中精确分裂,并构成连续的动态过程。该动态过程的破坏将导致不正确的细胞分裂,并最终导致细胞死亡。然而,癌细胞细胞分裂的增加也会使其对纺锤丝毒剂特别敏感,该纺锤丝毒药构成化疗的固定组分。纺锤丝毒剂(例如紫杉醇或大环内酯)会造成微管的聚合速率急剧升高,而长春花生物碱或单甲基耳他汀 E (MMAE)会造成微管的聚合速率急剧降低。在这两种情况中,细胞周期的必要活力被严重破坏。本发明内容中研究的化合物导致微管的聚合速率降低。

[0853] 使用来自细胞骨架有限公司 (Cytoskeleton) 的(美国科罗拉多州丹佛市 (Denver, Colorado, USA); 订单号: BK011) 的“基于荧光的微管聚合试验试剂盒”对微管蛋白聚合进行研究。在该实验中,向未聚合的微管蛋白添加 GTP,使得聚合自发地进行。该试验基于荧光团 4',6-二咪基-2-苯基吡啶 (DAPI) 与微管蛋白的结合。游离的 DAPI 和结合的 DAPI 可基于不同的发射光谱进行区分。由于与未聚合的微管蛋白相比,DAPI 对聚合的微管蛋白具有显著的高亲和性,因此通过结合 DAPI 荧光团使荧光增加可进行微管蛋白聚合。

[0854] 为了实施该试验,用水将本发明化合物(在 DMSO 溶液中)从其 10 毫摩的初始浓度稀释至 1 微摩。除了缓冲对照,还使用紫杉醇(具有聚合增加作用)和长春碱(具有聚合抑制作用)作为试验对照。使用具有半底部区域的 96 孔板进行测定。在 37°C 条件下在荧光计中监测微管蛋白聚合的动力学 1 小时。该激发波长为 355 纳米,并且在 460 纳米处监测发射。对于最初 10 分钟内的线性增加区域,对每分钟荧光的变化 ($\Delta F/\text{min}$) 进行计算,该变化表示微管的聚合速率。所述测试物质的效力基于其各自的聚合速率的降低来定量。

[0855] B-4. 体外血浆稳定性的测定:

[0856] 方法 A:

[0857] 将 1 毫克所研究的测试物质溶解于 0.5 毫升的乙腈/DMSO(9:1) 中。在 37°C 条件下从该溶液中将 20 微升溶液除去并添加至 1 毫升的大鼠或人血浆中(来自 Harlan&Winkelmann 的含有 Li 肝素的雄性 Wistar 大鼠的血浆,或源自全血样本的新鲜的人去白细胞血浆)。在添加样本后立即从经剧烈震荡的该血浆溶液中除去 100 微升等份(初始值作为参考)并添加至 300 微升的乙腈中,以及在添加样本 5、10、30、60、120、180 和 240 分钟后,以及任选地在添加样本 24 小时后除去 100 微升等份并添加至 300 微升的乙腈中。通过在 5000rpm 下离心 10 分钟,除去沉淀的血浆蛋白,并将 30 微升的上清液通过 HPLC 分析其未修饰的测试物质的含量。通过相应峰的面积百分比来定量。

[0858] 大鼠血浆的 HPLC 方法:

[0859] 仪器:带有 DAD、二元泵、自动采样器、柱温箱和恒温器的安捷伦 1200;柱:Kromasil100C18, 250 毫米 x4 毫米,5 微米;柱温:45°C;流动相 A:5 毫升高氯酸/1 水,流动相 B:乙腈;梯度:0-8 分钟 98%A、2%B;8-15 分钟 56%A、44%B;15-20 分钟 10%A、90%B;20-21 分钟 10%A、90%B;21-23 分钟 98%A、2%B;23-25 分钟 98%A、2%B;流量:2 毫升/分钟;UV 检测:220 纳米。

[0860] 人血浆的 HPLC 方法:

[0861] 仪器:带有 DAD、二元泵、自动采样器、柱温箱和恒温器的安捷伦 1100;柱:Kromasil100C18, 250 毫米 x4 毫米,5 微米;柱温:45°C;流动相 A:5 毫升高氯酸/1 水,流动

相 B :乙腈 ;梯度 :0-3 分钟 98%A、2%B ;3-10 分钟 65%A、35%B ;10-15 分钟 40%A、60%B ;15-21 分钟 10%A、90%B ;21-22 分钟 10%A、90%B ;22-24 分钟 98%A、2%B ;24-26 分钟 98%A、2%B ;流量 :2 毫升 / 分钟 ;UV 检测 :220 纳米。

[0862] 方法 B:

[0863] 在 37℃和温和搅拌的条件下在 5 小时内在大鼠或人血浆中孵育所述测试物质。在不同时间点(0、2、5、10、20、30、60、120、180 和 300 分钟)除去 100 微升等份。待添加内标(10 微升)后,通过添加 200 微升的乙腈使蛋白沉淀,并在 Eppendorf 离心机中使该混合物离心 5 分钟。向 150 微升的上清液中添加 150 微升的乙酸铵缓冲(pH3)后,通过 LC/MSMS 对未经修饰的测试物质的含量进行分析。

[0864] 下表 3 列出由大鼠血浆中的代表性工作实施例的这些数据测得的半衰期。

[0865] 表 3

[0866]

工作实施例	$t_{1/2}$ [小时]	方法
4	3	B
16	0.75	A
17	>24	A
18	>24	A
22	2	A
23	>24	A

[0867] 为了比较,大鼠血浆中单甲基耳他汀 F 的甲基酯(MMAF-OMe)的 $t_{1/2}$ 值(根据方法 A)为 <1 分钟。

[0868] 在人血浆中(作为示例)本发明工作实施例 1、17 和 21 的化合物在 24 小时后未观察到降解,而在此期间单甲基耳他汀 F 的甲基酯(MMAF-OMe)降解了约 20%。

[0869] B-5. 细胞渗透性的测定:

[0870] 物质的细胞渗透性可使用 Caco-2 细胞在流量试验(flux assay)中通过体外测试的方式进行研究[M. D. Troutman 和 D. R. Thakker, Pharm. Res. 20(8), 1210-1224(2003)]。出于该目的,将所述细胞在 24 孔过滤板上培养 15-16 天。为了测定渗透率,在 HEPES 缓冲中将各工作实施例从顶端(A)或基部(B)施加至所述细胞,并孵育 2 小时。0 小时和 2 小时后,将样本从顺式和反式隔室中取出。使用反相柱通过 HPLC(安捷伦 1200,德国柏林根)对样本进行分离。该 HPLC 系统通过涡轮增压离子喷雾接口(Turbo Ion Spray Interface)与三重四极杆质谱仪 API4000(Triple Quadrupole mass spectrometer API4000)(德国达姆施塔特的应用生物系统 Applera 公司(Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Germany))相连。所述渗透性基于 P_{app} 值进行评价,该 P_{app} 值使用由 Schwab 等人公开的公式进行计算[D. Schwab 等人, J. Med. Chem. 46, 1716-1725(2003)]。当 $P_{app}(B-A)$ 与 $P_{app}(A-B)$ 的比例 >2 或 <0.5 时,物质被归类为主动传输的。

[0871] B-6. P-糖蛋白(P-gp)底物性质的测定：

[0872] 许多肿瘤细胞对药物表达转运蛋白，并且这经常伴随对细胞生长抑制剂的抗性的发展。例如，不是具有此类转运蛋白(例如 P-糖蛋白(P-gp)或 BCRP)的底物的物质因此具有改进的活性概况。

[0873] P-gp(ABCB1)的物质的底物性质使用 LLC-PK1 细胞(该细胞过表达 P-gp(L-MDR1 细胞))通过流量试验的方式进行测定 [A. H. Schinkel 等人, J. Clin. Invest. 96, 1698-1705(1995)]。出于该目的，将 LLC-PK1 细胞或 L-MDR1 细胞在 96 孔过滤板上培养 3-4 天。为了测定渗透率，在 HEPES 缓冲中将各测试物质(单独或在存在抑制剂(例如伊维菌素(Ivermectin)或维拉帕米(Verapamil))的条件下)从顶端(A)或基部(B)施加至所述细胞，并孵育 2 小时。0 小时和 2 小时后，将样本从顺式和反式隔室中取出。使用反相柱通过 HPLC 对样本进行分离。该 HPLC 系统通过涡轮增压离子喷雾接口与三重四极杆质谱仪 API3000 (德国达姆施塔特的应用生物系统 Applera 公司)相连。所述渗透性基于 P_{app} 值进行评价，该 P_{app} 值使用由 Schwab 等人公开的公式进行计算 [D. Schwab 等人, J. Med. Chem. 46, 1716-1725(2003)]。当流出比 $P_{app}(B-A) : P_{app}(A-B) > 2$ 时，物质被归类为 P-gp 底物。

[0874] 作为评价 P-gp 底物性质的其它标准，L-MDR1 和 LLC-PK1 细胞中的流出比或在存在或不存在抑制剂的条件下的流出比可相互比较。如果这些值的差异大于 2，所研究的物质是 P-gp 底物。

[0875] C. 药物组合物的工作实施例

[0876] 本发明的化合物可通过以下方法转化为药物制剂：

[0877] 片剂：

[0878] 组成：

[0879] 100 毫克的本发明化合物、50 毫克乳糖(一水合物)、50 毫克玉米淀粉(天然)、10 毫克聚乙烯基吡咯烷酮(PVP25) (德国路德维希的巴斯夫公司(BASF, Ludwigshafen, Germany)) 和 2 毫克硬脂酸镁。

[0880] 片剂重量 212 毫克。直径 8 毫米，曲率半径 12 毫米。

[0881] 制备：

[0882] 使用 5% 浓度的 PVP 的水溶液(w/w)对本发明化合物、乳糖和淀粉的混合物进行造粒。干燥后，将该颗粒与硬脂酸镁混合 5 分钟。使用常规压片机对该混合物进行压制(参见上述片剂形式)。推荐的压制值为 15kN 的压力。

[0883] 口服给药的混悬剂：

[0884] 组成：

[0885] 1000 毫克的本发明化合物、1000 毫克乙醇(96%)、400 毫克 Rhodigel[®] (黄原胶，来自美国宾夕法尼亚州的 FMC 公司) 和 99 克水。

[0886] 10 毫升的口服混悬剂对应于 100 毫克本发明化合物的单独剂量。

[0887] 制备：

[0888] 将 Rhodigel 悬浮于乙醇中，并将本发明化合物添加至该混悬液中。在搅拌下加入水。将该混合物搅拌大约 6 小时，直至 Rhodigel 的溶胀结束。

[0889] 口服给药的溶液剂：

[0890] 组成：

[0891] 500 毫克的本发明化合物、2.5 克聚山梨酯和 97 克聚乙二醇 400。20 克的口服溶液剂对应于 100 毫克本发明化合物的单独剂量。

[0892] 制备：

[0893] 将本发明化合物悬浮于聚乙二醇和聚山梨酯的混合物中，同时进行搅拌。持续搅拌操作直至本发明化合物的完全溶解。

[0894] i. v. 溶液剂：

[0895] 将本发明化合物溶解于浓度低于饱和溶解度的生理上可接受的溶剂(例如等渗盐水溶液、葡萄糖溶液 5%和 / 或 PEG400 溶液 30%)中。对该溶液进行无菌过滤,并转移至无菌和无热原的注射容器中。