



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117794580 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 29

(21) 申请号 202280055577.5

F • 莱曼 E • 圣安杰洛

(22) 申请日 2022.06.20

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

(30) 优先权数据

专利代理师 顾小曼

2108818.2 2021.06.18 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2024.02.07

A61K 47/54 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07D 235/06 (2006.01)

PCT/EP2022/066756 2022.06.20

A61K 31/4184 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 35/00 (2006.01)

W02022/263679 EN 2022.12.22

(71) 申请人 肿瘤多肽有限公司

地址 瑞典

(72) 发明人 A • 贝尔梅霍戈麦斯

P • 库马尔津太钦迪 C • 德梅尔

K • 法内尔加德 M • 法内尔加德

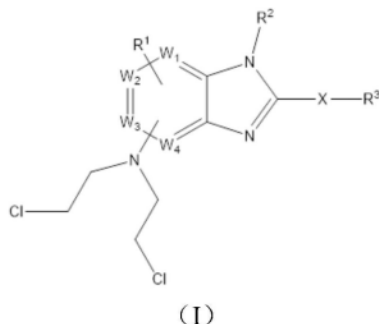
权利要求书9页 说明书93页 附图10页

(54) 发明名称

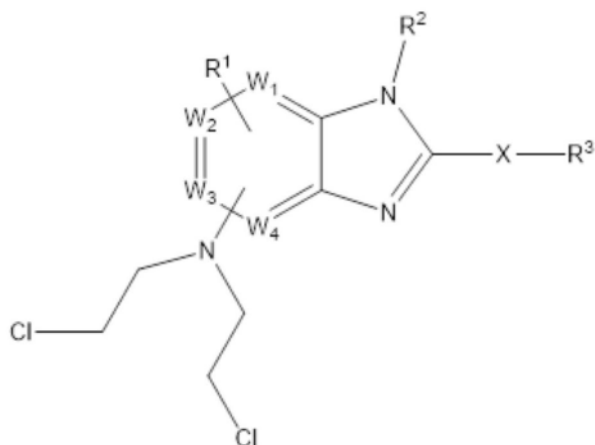
多肽偶联药物

(57) 摘要

本发明提供式(I)的化合物,其为肽酶增强的细胞毒性剂。本发明进一步提供包括所述化合物的药物组合物,以及所述化合物或药物组合物作为药物的用途,特别是用于治疗或预防癌症,例如多发性骨髓瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤,的用途。



1.一种式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯,包括这些酯、酰胺或氨基甲酸酯的盐,



(I)

其中，

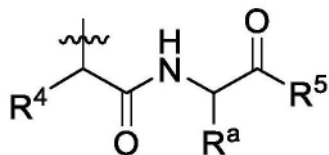
X为C₁₋₆亚烷基；

W_1 、 W_2 、 W_3 和 W_4 均为CH,或者 W_1 、 W_2 、 W_3 和 W_4 中的一个为N,其他为CH;

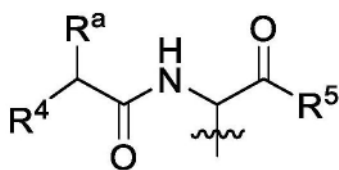
R¹选自H;任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₄烷基;和卤素;

R²选自H;任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的苯基;和任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₆烷基;且

R³为式(II)或式(III)的基团:



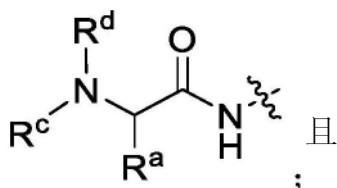
(II)



(III)

其中,

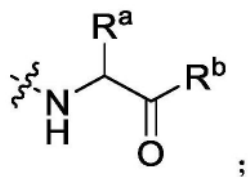
R^4 选自 $N(R^c)$ (R^d) 和式 (IV) :



日

(IV)

当 R^4 为式(IV)时, R^5 为 R^b ;当 R^4 为 $N(R^c)(R^d)$ 时, R^5 选自 R^b 和式(V):



(V)

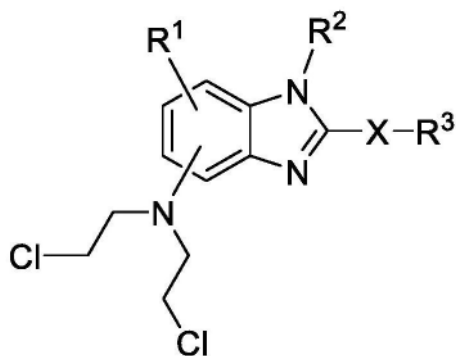
其中每个 R^a 独立地选自H; C_{1-6} 烷基;-CH₂-苯基;或-CH₂-包括1、2、3或4个选自N、O和S的杂原子的3至12元杂环基;其中所述 C_{1-6} 烷基任选地被1、2或3个独立地选自-OH、-OC₁₋₆烷基、-NH₂、-NHC(=NH)NH₂、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-SH、-SCH₃和卤素的取代基取代;并且所述苯基或杂环基任选地被1、2或3个独立地选自卤素、-NH₂、-OH、-OC₁₋₆烷基和-NO₂的取代基取代;

R^b 选自-OH;-N(R^e)(R^f);和任选地被一个或多个选自卤素、-OH、-CN、-N(R^e)(R^f)- C_{6-10} 芳基或包括一个或多个O、N或S原子且任选地被1、2或3个卤素取代的3至12元杂环的基团所取代的-OC₁₋₆烷基,和/或其中所述烷基任选地被1、2或3个O、N或S原子间断;

R^c 和 R^d 各自独立地选自H;- C_{1-6} 烷基;-C(O) C_{1-6} 烷基;和-CH₂-苯基,其中所述烷基或所述苯基任选地被1、2或3个卤素的基团取代;且

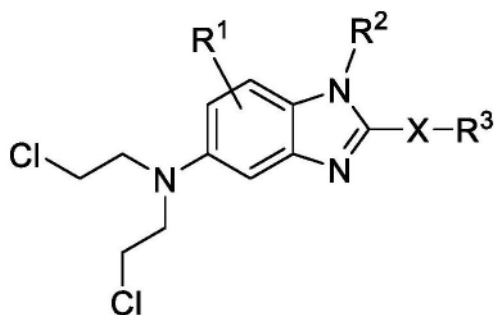
R^e 和 R^f 各自独立地选自H和- C_{1-6} 烷基,其中所述烷基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代;或者 R^e 和 R^f 与它们所连接的氮原子一起形成任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代的4元、5元或6元杂环。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其具有结构(Ia):



(Ia)

例如结构(Ib):



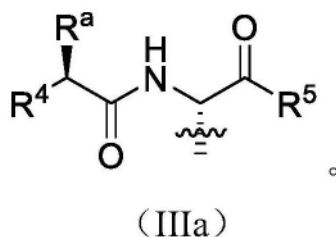
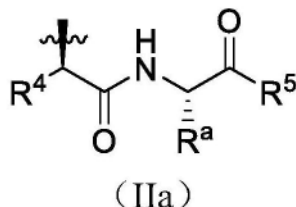
(Ib)

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中 R^1 为H。

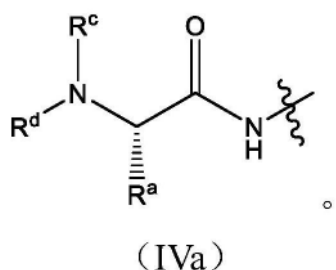
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物, 其中 R^2 选自任选地被1、2或3个卤素取代的苯基; 和任选地被1、2或3个卤素取代的 $-C_{1-6}$ 烷基; 例如任选地被1、2或3个卤素取代的 $-C_{1-4}$ 烷基, 例如甲基。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的化合物, 其中X为 $-CH_2-$ 或 $-CH_2-CH_2-$ 。

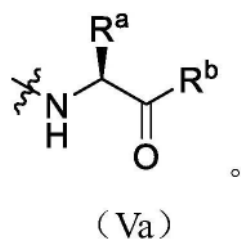
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物, 其中 R^3 为式(IIa)或式(IIIa)的基团:



7. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 其中 R^4 选自 $N(R^c)$ (R^d) 和式(IVa):



8. 根据权利要求1至7中任一项所述的化合物, 其中 R^4 为式(IV)或(IVa), R^5 为 R^b ; 且当 R^4 为 $N(R^c)$ (R^d) 时, R^5 选自 R^b 和式(Va), 其中式(Va)具有以下结构,



9. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物, 其中 R^4 为 NH_2 。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的化合物, 其中每个 R^a 独立地选自 $-C_{1-6}$ 烷基和 $-CH_2-$ 苯基; 其中所述 C_{1-6} 烷基任选地被 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-SCH_3$ 或卤素(例如, F或Cl)取代; 所述苯基任选地被1、2或3个独立地选自卤素(例如, F或Cl)、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-OC_{1-6}$ 烷基和 $-NO_2$ 的取代基取代。

11. 根据权利要求10所述的化合物, 其中每个 R^a 选自 $-C_{1-6}$ 烷基和 $-CH_2-$ 苯基; 其中所述苯基任选地被1、2或3个卤素取代基取代。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的化合物, 其中当 R^4 为式(IV)或(IVa)时, R^5 为-

OC₁₋₆烷基;当R⁴为NH₂时,R⁵为-OC₁₋₆烷基或式(V)或式(Va)。

13.根据权利要求12所述的化合物,其中当R^b为-OC₁₋₆烷基时,其选自甲氧基、乙氧基和异丙氧基。

14.根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物选自:

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物1);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物2);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(实施例化合物3);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物4);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物5);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(实施例化合物6);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物7);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物8);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物9);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯(实施例化合物10);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯(实施例化合物11);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯(实施例化合物12);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物13);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(实施例化合物14);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸异丙酯(实施例化合物15);

(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物16);

(2S)-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物21);

(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-

基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物22)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物23)；

2-吗啉乙醇(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(实施例化合物24)；

2-异丙氧基乙醇(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(实施例化合物25)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸异丙酯(实施例化合物26)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(实施例化合物27)；

3-(二甲基氨基)丙醇(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(实施例化合物28)；

(2-甲氧基-1-甲基-乙醇)(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(实施例化合物29)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-N,N,4-三甲基-戊酰胺(实施例化合物30)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-N,4-二甲基-戊酰胺(实施例化合物31)；

(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(甲基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物32)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-乙酰胺基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物34)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-乙酰胺基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物35)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-乙酰胺基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物36)；

(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物38)；

(2R)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物45)；

(2S)-2-[[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物46)；

(2R)-2-[[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物47)；

(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[6-[双(2-氯乙基)氨基]-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物48)；和

(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氟代乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物50)；

或其药学上可接受的盐、酰胺或氨基甲酸酯,包括该酰胺或氨基甲酸酯的盐。

15. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物选自:

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(实施例化合物19);和

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物20);

(2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(甲基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物33);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸(实施例化合物37);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸(实施例化合物39);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物40);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(实施例化合物42);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸(实施例化合物43);

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物44);和

(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氟代乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物51);

或其盐。

16. 一种药物组合物,包括权利要求1至15中任一项所述的化合物,以及药学上可接受的载体。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其还包括额外的治疗剂,例如类固醇、检查点抑制剂、核转运抑制剂、抗凋亡抑制剂、过继性细胞疗法、双特异性T细胞接合剂(BiTE)、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、蛋白酶体抑制剂(PI)、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂、多肽偶联药物(PDC)、烷化剂或DNA嵌入剂。

18. 权利要求1至15中任一项所述的化合物或权利要求16或17所述的药物组合物用作药物的用途。

19. 权利要求1至15中任一项所述的化合物或权利要求16或17所述的药物组合物在治疗或预防癌症中的用途。

20. 根据权利要求19所述的化合物或组合物的用途,其中癌症选自多发性骨髓瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤;例如多发性骨髓瘤、急性髓性白血病或淋巴瘤。

21. 根据权利要求19或20所述的化合物或组合物的用途,其中化合物或组合物与一种或多种额外的治疗剂一起施用(例如同时、序贯或单独),例如类固醇、检查点抑制剂、核转运抑制剂、抗凋亡抑制剂、过继性细胞疗法、双特异性T细胞接合剂(BiTE)、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)、蛋白酶体抑制剂(PI)、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂、多肽偶联药物(PDC)、烷

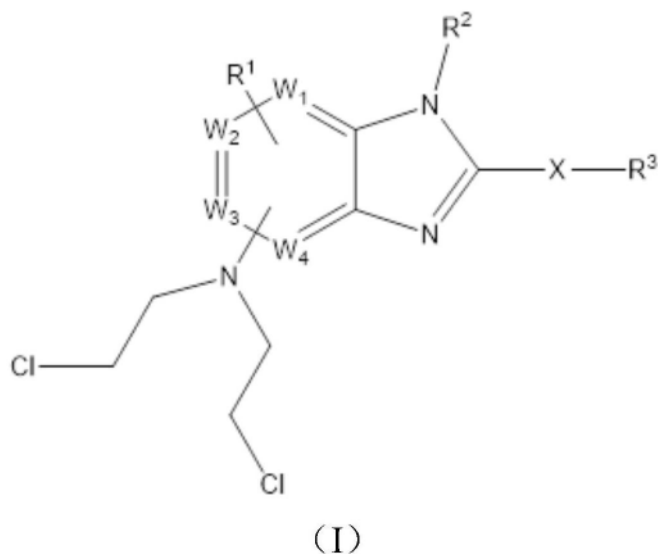
化剂或DNA嵌入剂。

22. 一种治疗患者的方法, 其包括施用有效量的权利要求1至15中任一项所述的化合物或权利要求16或17所述的药物组合物。

23. 一种治疗或预防癌症的方法, 包括施用有效量的权利要求1至15中任一项所述的化合物或权利要求16或17所述的药物组合物, 例如其中所述癌症是多发性骨髓瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤中的任一种; 例如多发性骨髓瘤、急性髓性白血病或淋巴瘤。

24. 权利要求1至15中任一项所述的化合物用于制造用于治疗或预防癌症的药物的用途, 例如其中所述癌症是多发性骨髓瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤中的任一种; 例如多发性骨髓瘤、急性髓性白血病或淋巴瘤。

25. 一种式 (I) 的化合物或其盐或溶剂化物



其中

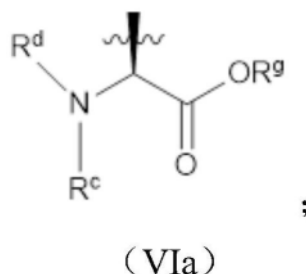
X为C₁₋₆亚烷基;

W₁、W₂、W₃和W₄均为CH, 或者W₁、W₂、W₃和W₄中的一个为N, 其他为CH;

R¹选自H; 任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₄烷基; 和卤素;

R²选自H; 任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的苯基; 和任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₆烷基; 且

R³为式 (VIa) :



其中, R^c和R^d各自独立地选自H、-C₁₋₆烷基、-C(O)C₁₋₆烷基和-CH₂-苯基, 其中所述烷基或所述苯基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代; 且

R^g独立地选自H和-C₁₋₆烷基, 其中所述烷基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代。

26. 根据权利要求25所述的化合物, 其中结构为权利要求2中所示的(Ia)或(Ib), 或者 R^1 、 R^2 或X如权利要求3至5中任一项中所述; R^c 和 R^d 均为H; 且 R^g 为H。

27. 根据权利要求25所述的化合物,其中所述化合物选自:

(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸(实施例化合物17)；

(S)-2-氨基-4-(5-(双(2-氯乙基)氨基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)丁酸(实施例化合物18)；

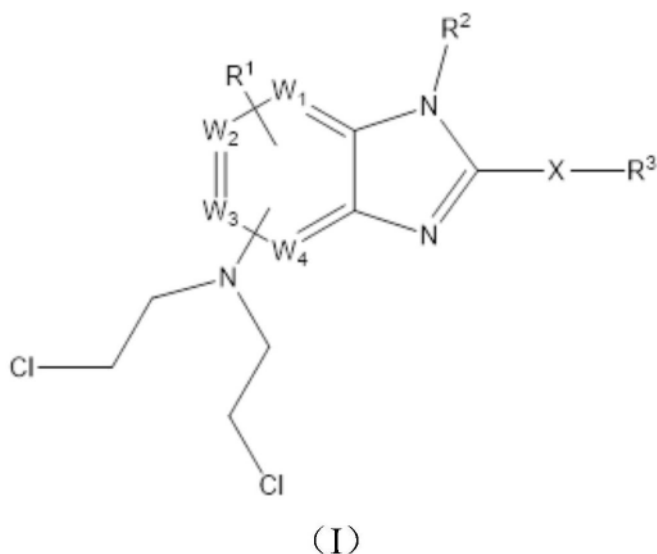
(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物38)：

(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酸(实施例化合物41);和

(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氟代乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸(实施例化合物49)；

或其盐。

28. 式(I)的化合物或其盐或溶剂化物在治疗选自多发性骨髓瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤的癌症,例如多发性骨髓瘤、急性髓性白血病或淋巴瘤中的用途,



其中

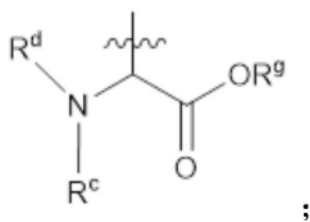
X为C₁₋₆亚烷基;

W₁、W₂、W₃和W₄均为CH,或者W₁、W₂、W₃和W₄中的一个为N,其他为CH;

R¹选自H;任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₄烷基;和卤素;

R²选自H;任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的苯基;和任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₆烷基;

R³为式(VI)：



(VI)

其中, R^c 和 R^d 各自独立地选自 H、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)C_{1-6}$ 烷基和 $-CH_2-$ 苯基, 其中所述烷基或所述苯基任选地被 1、2 或 3 个选自卤素的基团取代; 且

R^g 选自 H 和 $-C_{1-6}$ 烷基, 其中所述烷基任选地被 1、2 或 3 个选自卤素的基团取代。

29. 一种治疗选自多发性骨髓瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤的癌症, 例如多发性骨髓瘤、急性髓性白血病或淋巴瘤的方法; 包括施用有效剂量的如权利要求 28 中所述的化合物。

多肽偶联药物

技术领域

[0001] 本发明涉及作为多肽偶联药物(peptide drug conjugate,PDC)的化合物,以及该化合物在治疗疾病例如癌症中的用途。

背景技术

[0002] 据描述几种类型的人类恶性肿瘤中各种水解酶如肽酶、酯酶和蛋白酶的表达增加,特别是那些以快速增长和侵袭性表型为特征的恶性肿瘤(Pharmacol Ther.1999;83:67-123)。Zn²⁺依赖性膜结合胞外肽酶(ectopeptidase)氨肽酶N(APN,也称为CD13)广泛表达于哺乳动物细胞中,在癌症的发展,包括肿瘤细胞侵入、分化、增殖、凋亡、运动和血管生成等过程中发挥着重要作用(Cancer Lett.2006;243:135-43;Curr Med Chem.2007;14:639-47;Curr Med Chem.2008;15:2850-65)。APN的多种功能使其被称为“兼职(moonlighting)胞外酶”(Trends Mol Med.2008;14:361-71)。总之,这些能力表明APN是癌症治疗中潜在的治疗靶点。已使用不同的方法来开发针对该靶点的新药,包括酶抑制剂和APN靶向载体构建体(Cancer Sci.2011;102:501-8)。

[0003] 一类可通过利用恶性肿瘤中存在的水解酶(例如肽酶、酯酶和蛋白酶)来治疗癌症的药物是肽药物缀合物(PDC)。本申请的发明人已经发现,一类新的多肽偶联药物可用于癌症的治疗。

发明内容

[0004] 根据权利要求1,本发明提供式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯,包括该酯、酰胺或氨基甲酸酯的盐。

[0005] 本申请的发明人已发现,式(I)的化合物是有效的抗癌剂。具体地,本申请的发明人已在体外细胞毒性检验中证明,式(I)的化合物对各种血液癌细胞系表现出优异的体外细胞毒性。本申请的发明人还发现,式(I)的化合物在淋巴瘤的卵内鸡胚异种移植模型(in ovo chicken embryo xenograft model)中可有效减少肿瘤的生长。此外,本申请的发明人已发现,式(I)的化合物在癌细胞内容易水解形成被优先隔离并保留在细胞内且具有强烷基化活性的代谢物。

[0006] 本发明进一步提供包括根据本发明的化合物以及药学上可接受的载体的药物组合物。药物组合物可以任选地包括一种或多种额外的治疗剂,例如类固醇、检查点抑制剂(checkpoint inhibitor)、核转运抑制剂(nuclear transport inhibitor)、抗凋亡抑制剂(anti-apoptotic inhibitor)、细胞疗法(包括过继性细胞疗法)、双特异性T细胞接合剂(bi-specific T-cell engager,BiTE)、免疫调节酰亚胺药物(immunomodulatory imide drug,IMiD)、蛋白酶体抑制剂(proteasome inhibitor,PI)、组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase,HDAC)抑制剂、多肽偶联药物(PDC)、烷化剂或DNA嵌入剂。

[0007] 本发明进一步提供根据本发明的化合物或药物组合物用作药物的用途。此外,还提供根据本发明的化合物或药物组合物用于治疗或预防癌症,例如多发性骨髓瘤、骨肉瘤、

乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤的用途。

[0008] 本发明进一步提供一种治疗患者的方法,其包括施用药学上有效量的根据本发明的化合物或药物组合物。

[0009] 本发明进一步提供根据本发明的化合物用于制造用于治疗或预防癌症的药物的用途。

[0010] 本发明进一步提供根据权利要求25所述的其他的本发明化合物。

附图说明

[0011] 图1显示在体外处理MM.1S细胞后本发明的代谢物化合物(实施例化合物18)(用本发明的实施例化合物1处理后被鉴别出)(图1A)和苯达莫司汀(图1A)和美法仑(图1B)比较物的细胞内和细胞外浓度测量结果。

[0012] 图2显示实施例化合物1在卵内鸡胚模型中对来自于SU-DHL-4人淋巴瘤细胞系的异种移植物上的肿瘤生长的影响。

[0013] 图3(A)至(G)显示体外处理MM.1S细胞后本发明的化合物及其代谢物的细胞内和细胞外浓度测量结果。

[0014] 图4(A)至(C)显示评估本发明的化合物和对照物引起的DNA损伤的检验结果。

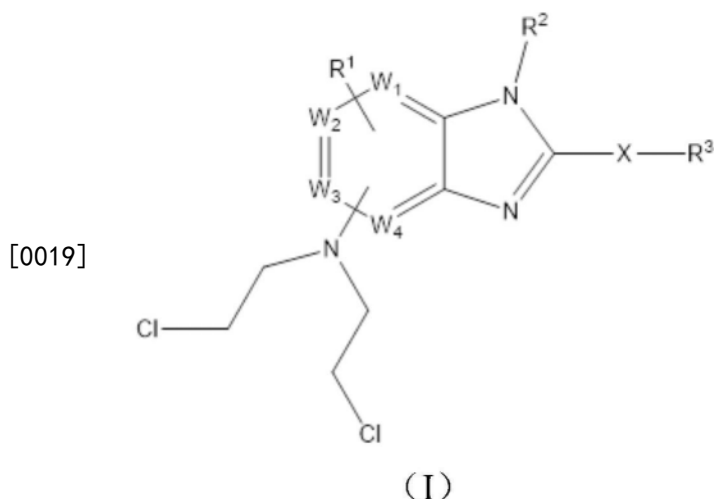
[0015] 图5(A)和(B)显示评估本发明的化合物和对照物引起的DNA断裂的分析结果。

具体实施方式

[0016] 本申请的发明人已发现一类新的对人类癌细胞,特别是人类血液癌细胞具有高度细胞毒性的PDC。如实施例部分所述,已经合成了各种本发明的实施例化合物,并在体外细胞毒性检验中对它们对几种血液癌细胞系的细胞毒性进行了测试。本申请的发明人发现,本发明的化合物非常有效,并且表现出针对血液癌细胞的选择性,如化合物针对成纤维细胞系BJ的细胞毒性较低所示。本申请的发明人还发现,实施例化合物1在使用人淋巴瘤细胞系SU-DHL-4的卵内鸡胚异种移植模型中能够特别有效地抑制肿瘤生长。

[0017] 在进一步的研究中,本申请的发明人发现,本发明的实施例化合物在MM.1S癌细胞内容易水解形成被隔离并保留在细胞内且具有强烷基化活性的代谢物,因此证明本发明的化合物是一类对治疗或预防癌症,特别是治疗或预防血液癌症有效的新型PDC。

[0018] 本发明提供式(I)的化合物:

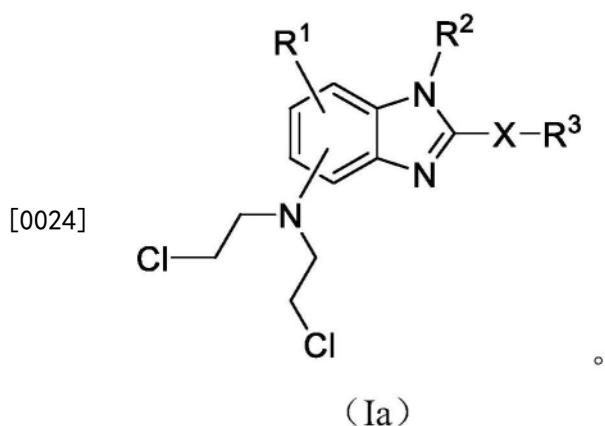


[0020] W_1 、 W_2 、 W_3 和 W_4 均为CH,或者 W_1 、 W_2 、 W_3 和 W_4 中的一个为N,其他为CH。

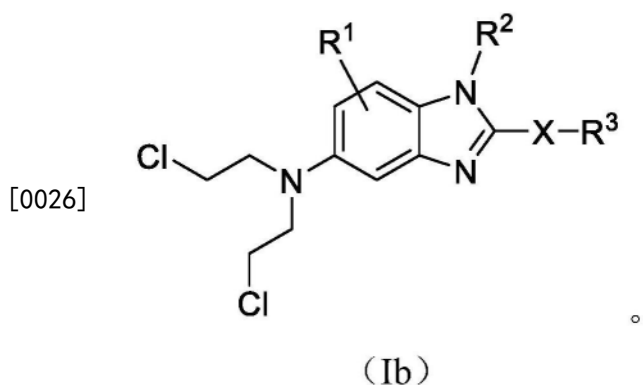
[0021] 在一实施方式中, W_2 、 W_3 和 W_4 均为CH, W_1 为N。

[0022] 容易看出, $-N(CH_2CH_2Cl)_2$ 基团通过环上的碳原子连接到分子的母核部分。对于相关的W基团,CH基团中的H相应地不存在。

[0023] 在优选的实施方式中, W_1 、 W_2 、 W_3 和 W_4 均为CH,因此式(I)为式(Ia)：



[0025] 在优选的实施方式中,式(I)为式(Ib),



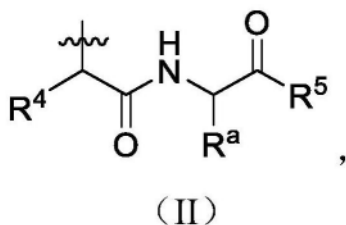
[0027] 在式(I)的化合物中,X是 C_{1-6} 亚烷基。例如,X可以是 C_{1-4} 亚烷基、 C_{1-3} 亚烷基、 C_{1-2} 亚烷基、 C_2 亚烷基或 C_1 亚烷基。X可以是直链或支链亚烷基。X位置处的亚烷基在本发明化合物的咪唑部分和肽部分(即化合物的 R^3 部分,如下所述)之间形成连接。已经发现,长度为1个碳或2个碳的X位置处的亚烷基连接基团(linker)是特别有效的。因此,在优选的实施方式

中, X是C₁亚烷基(即-CH₂-)或直链C₂亚烷基(即-CH₂-CH₂-)。

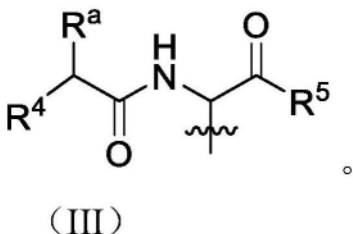
[0028] 在式(I)的化合物中, R¹选自H; 任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₄烷基; 和卤素(例如选自H、C₁₋₄烷基和卤素)。例如, R¹可以选自H、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、F、Cl、Br和I。任选地, 这些基团可以被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代。在某些实施方式中, R¹选自H、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、F和Cl。在某些优选的实施方式中, R¹为H。

[0029] 在式(I)的化合物中, R²选自H; 任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的苯基; 和任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的-C₁₋₆烷基。例如, R²可以选自H; 任选地被1、2或3个F或Cl取代的苯基; 和任选地被1、2或3个F或Cl取代的-C₁₋₄烷基(例如, 甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基)。在一实施方式中, R²选自任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的苯基; 和任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的-C₁₋₆烷基, 例如任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代的-C₁₋₄烷基(例如甲基)。在某些实施方式中, R²是未取代的-C₁₋₂烷基(例如甲基)或未取代的苯基。

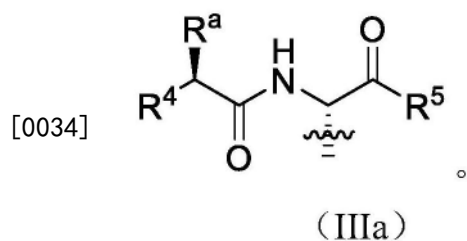
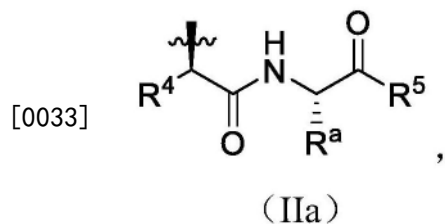
[0030] 在式(I)的化合物中, R³为式(II)或式(III)的基团:



[0031]

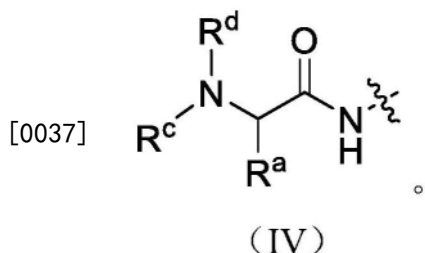


[0032] 在优选的实施方式中, R³为式(IIa)或式(IIIa)的基团:

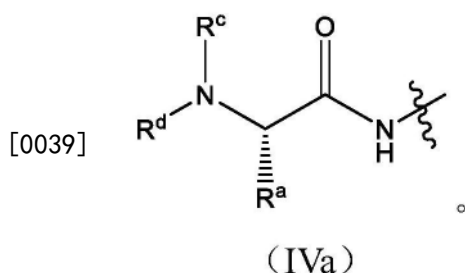


[0035] 为了避免疑义, 式(II)、(III)、(IIa)和(IIIa)中的 表示式(II)、(III)、(IIa)或(IIIa)与式(I)、(Ia)或(IIa)的连接点。

[0036] 在式 (II)、(IIa)、(III) 和 (IIIa) 中, R^4 选自 $N(R^c)$ (R^d) 和式 (IV) :



[0038] 在优选的实施方式中, R^4 选自 $N(R^c)$ (R^d) 和式 (IVa) :



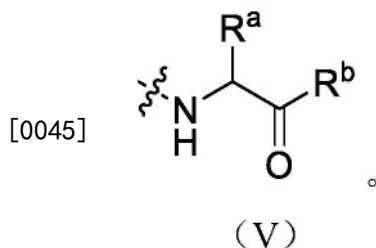
[0040] 为了避免疑义, 式 (IV) 和 (IVa) 中的  表示式 (IV) 或 (IVa) 与式 (II)、(III)、(IIa) 或 (IIIa) 的连接点。

[0041] 在式 (I) 的化合物中, 当 R^4 是为 (IV) 或 (IVa) 时, R^5 为 R^b 。

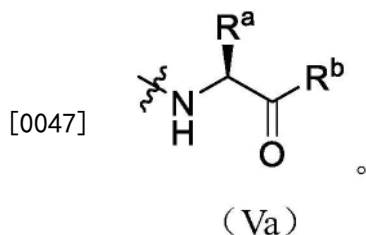
[0042] R^b 选自 -OH; -N (R^e) (R^f); 任选地被一个或多个选自卤素、-OH、-CN、-N (R^e) (R^f)、-C₆₋₁₀ 芳基或包括一个或多个 O、N 或 S 原子且任选地被 1、2 或 3 个卤素取代的 3 至 12 元杂环的基团所取代的 -OC₁₋₆ 烷基, 和/或其中所述烷基任选地被 1、2 或 3 个 O、N 或 S 原子间断。

[0043] 例如, 当 R^4 为式 (IV) 或 (IVa) 时, R^5 (其为 R^b) 可以选自 -OH 和 -OC₁₋₄ 烷基 (例如, 甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基或叔丁氧基)。优选地, 当 R^4 为式 (IV) 或 (IVa) 时, R^5 选自 -OH 和 -OC₁₋₃ 烷基 (例如甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)。更优选地, 当 R^4 为式 (IV) 或 (IVa) 时, R^5 选自甲氧基、乙氧基或异丙氧基。

[0044] 在式 (Ia) 的化合物中, 当 R^4 为 $N(R^c)$ (R^d) 时, R^5 选自 R^b 和式 (V) :



[0046] 在优选的实施方式中, 当 R^4 为 $N(R^c)$ (R^d) 时, R^5 为 -OH、-OC₁₋₆ 烷基或式 (Va) :



[0048] 为了避免疑义, 式 (V) 和 (Va) 中的  表示式 (V) 或 (Va) 与式 (II)、(III)、(IIa) 或 (IIIa) 的连接点。

[0049] 在 R^4 为 $N(R^c)(R^d)$ 的实施方式中, R^5 (其为 R^b)可以选自 $-OH$ 、 $-OC_{1-4}$ 烷基(例如,甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基或叔丁氧基),或者 R^5 可以选自式(V)和式(Va)。优选地,当 R^4 为 $N(R^c)(R^d)$ 时, R^5 选自 $-OH$ 、 $-OC_{1-3}$ 烷基(例如甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)和式(Va)。更优选地,当 R^4 为 $N(R^c)(R^d)$ 时, R^5 选自甲氧基、乙氧基或异丙氧基。

[0050] 本申请的发明人已经发现,式(I)的化合物,其中 R^4 为 $N(R^c)(R^d)$ 、式(IV)或(IVa),且 R^5 (气味 R^b)是 $-OC_{1-3}$ 烷基(例如,甲氧基、乙氧基或异丙氧基),对癌细胞尤其具有细胞毒性。因此,在某些优选的实施方式中,在式(I)的化合物中, R^5 为 $-OC_{1-3}$ 烷基(例如,甲氧基、乙氧基或异丙氧基)。也就是说,当 R^4 为 $N(R^c)(R^d)$ 、式(IV)或(IVa)时, R^5 优选为 $-OC_{1-3}$ 烷基(例如甲氧基、乙氧基或异丙氧基)。

[0051] 在某些实施方式中, R^5 为 $-OH$ 。

[0052] 在式(I)的化合物中,每个 R^a 独立地选自 H ; C_{1-6} 烷基; $-CH_2-$ 苯基; 或 $-CH_2-$ 包括1、2、3或4个选自 N 、 O 和 S 的杂原子的3至12元杂环基; 其中所述 C_{1-6} 烷基任选地被1、2或3个独立地选自 $-OH$ 、 $-OC_{1-6}$ 烷基、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-SCH_3$ 和卤素的取代基取代; 并且所述苯基或杂环基任选地被1、2或3个独立地选自卤素、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-OC_{1-6}$ 烷基、和 $-NO_2$ 的取代基取代。在某些实施方式中,每个 R^a 独立地选自 H ; $-C_{1-6}$ 烷基; $-CH_2-$ 吡啶基; $-CH_2-$ 苯基; 和 $-CH_2-$ 包括1、2、3或4个 N 或 S 原子的5元杂芳基; 其中 C_{1-6} 烷基任选地被 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-SCH_3$ 或卤素(例如, F 、 Cl 、 Br 或 I)取代; 苯基任选地被1、2或3个独立地选自卤素(例如, F 、 Cl 、 Br 或 I)、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-OC_{1-6}$ 烷基和 $-NO_2$ 的取代基取代。优选地,每个 R^a 独立地选自 H ; C_{1-4} 烷基; 和 $-CH_2-$ 苯基; 其中烷基或苯基任选地被1或2个卤素(例如, F 或 Cl)取代。例如,每个 R^a 可以独立地为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、 $-CH_2-$ 苯基、 $-CH_2-$ 氟苯基、 $-CH_2-$ 氯苯基、 $-CH_2-$ 二氟苯基或 $-CH_2-$ 二氯苯基。在某些优选的实施方式中,每个 R^a 可以独立地为异丙基、异丁基、仲丁基、 $-CH_2-$ 苯基或 $-CH_2-$ 氟苯基(即2-氟苄基、3-氟苄基或4-氟苄基)。

[0053] 在式(I)的化合物中, R^b 选自 $-OH$; $-N(R^e)(R^f)$; 和任选地被一个或多个选自卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-N(R^e)(R^f)$ 、 $-C_{6-10}$ 芳基或包括一个或多个 O 、 N 或 S 原子且任选地被1、2或3个卤素取代的3至12元杂环的基团所取代的 $-OC_{1-6}$ 烷基,和/或其中所述烷基任选地被1、2或3个 O 或 N 原子间断。在某些实施方式中, R^b 为 $-OH$ 或 $-OC_{1-6}$ 烷基,其中所述烷基任选地被1、2或3个 O 或 N 原子间断。在某些进一步的实施方式中, R^b 为 $-OH$ 或 $-OC_{1-6}$ 烷基,例如 $-OC_{1-6}$ 烷基。优选地, R^b 为 $-OC_{1-4}$ 烷基。例如, R^b 可以为甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基或仲丁氧基。在某些优选的实施方式中, R^b 为甲氧基、乙氧基或异丙氧基。更优选地, R^b 为乙氧基。

[0054] 在某些实施方式中, R^b 为 $-OH$ 。

[0055] R^c 和 R^d 各自独立地选自 H 、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)C_{1-6}$ 烷基和 $-CH_2-$ 苯基,其中所述烷基或所述苯基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代。在优选的化合物中, R^c 为 H 且 R^d 选自 H 、 $-C_{1-6}$ 烷基和 $-C(O)C_{1-6}$ 烷基,其中所述烷基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代。例如, R^c 为 H 且 R^d 选自 H 、 $-C_{1-4}$ 烷基和 $-C(O)C_{1-4}$ 烷基。例如, R^c 为 H 且 R^d 选自 H 、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、 $-C(O)$ 甲基、 $-C(O)$ 乙基、 $-C(O)$ 丙基、 $-C(O)$ 异丙基、 $-C(O)$ 丁基、 $-C(O)$ 异丁基和 $-C(O)$ 仲丁基。优选地, R^c 为 H 且 R^d 选自 H 、甲基和 $-C(O)$ 甲基。优选地, R^c 为 H 且 R^d 为 H 。

[0056] 在式(I)的化合物中, R^e 和 R^f 各自独立地选自 H 和 $-C_{1-6}$ 烷基,其中所述烷基任选地被

1、2或3个选自卤素的基团取代；或者 R^e 和 R^f 与它们所连接的氮原子一起形成任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代的4元、5元或6元杂环。在优选的化合物中， R^e 和 R^f 各自独立地选自H、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基和仲丁基。例如， R^e 和 R^f 各自独立地选自H和甲基。优选地， R^e 和 R^f 均为H，均为甲基，或者 R^e 和 R^f 中的一个为H而另一个为甲基。

[0057] 在某些实施方式中，本发明的化合物为式(Ia)，其中，

[0058] X为 $-C_{1-2}$ 亚烷基(即 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)；

[0059] R^1 为H；

[0060] R^2 为任选地被1、2或3个F取代的 $-C_{1-2}$ 烷基、或任选地被1、2或3个F取代的苯基，例如， R^2 可以为未取代的 $-C_{1-2}$ 烷基或未取代的苯基；

[0061] R^3 为式(IIa)或(IIIa)；

[0062] R^4 选自 $N(R^c)$ (R^d) 和式(IVa)；

[0063] 当 R^4 为式(IVa)时， R^5 (其为 R^b)为 $-\text{OC}_{1-4}$ 烷基；当 R^4 为 $N(R^c)$ (R^d)时， R^5 为 $-\text{OC}_{1-4}$ 烷基或式(Va)；

[0064] 每个 R^a 独立地选自H； $-C_{1-6}$ 烷基； $-\text{CH}_2-$ 吡啶基； $-\text{CH}_2-$ 苯基或 $-\text{CH}_2-$ 包括1、2、3或4个N或S原子的5元杂芳基；其中所述 $-C_{1-6}$ 烷基任选地被 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SCH}_3$ 、或卤素取代；所述苯基任选地被1、2或3个独立地选自卤素、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{O}-C_{1-6}$ 烷基和 $-\text{NO}_2$ 的取代基所取代；

[0065] R^b 为 $-\text{OC}_{1-6}$ 烷基；和

[0066] R^c 为H且 R^d 选自H、 $-C_{1-4}$ 烷基和 $-\text{C}(\text{O})C_{1-4}$ 烷基；

[0067] 或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯，包括该酯、酰胺或氨基甲酸酯的盐。

[0068] 在某些其它的实施方式中，本发明的化合物为式(Ia)，其中，

[0069] X为 $-C_{1-2}$ 亚烷基(即 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)；

[0070] R^1 为H；

[0071] R^2 为甲基或苯基；

[0072] R^3 为式(IIa)或(IIIa)；

[0073] R^4 为 $N(R^c)$ (R^d) 或式(IVa)；

[0074] R^5 (其为 R^b)为 $-\text{OC}_{1-3}$ 烷基；且

[0075] 每个 R^a 独立地选自H、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-\text{CH}_2-$ 吡啶基、 $-\text{CH}_2-$ 苯基；或 $-\text{CH}_2-$ 包括1、2、3或4个N或S原子的5元杂芳基；其中所述 $-C_{1-6}$ 烷基任选地被 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SCH}_3$ 或卤素取代；苯基任选地被1、2或3个独立地选自卤素、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{O}-C_{1-6}$ 烷基和 $-\text{NO}_2$ 的取代基取代；

[0076] 或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯，包括该酯、酰胺或氨基甲酸酯的盐。

[0077] 本申请的发明人已经发现，当化合物为式(Ia)时，本发明的化合物在体外细胞毒性检验和淋巴瘤的卵内鸡胚异种移植模型中对血液癌细胞尤其具有细胞毒性，其中，

[0078] X为 $-C_{1-2}$ 亚烷基(即 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)；

[0079] R^1 为H；

[0080] R^2 为甲基或苯基；

- [0081] R^3 为式 (IIa) 或 (IIIa) ;
- [0082] R^4 为 $N(R^c)$ (R^d) 或式 (IVa) ;
- [0083] R^5 (其为 R^b) 为 $-OC_{1-3}$ 烷基;且
- [0084] 每个 R^a 独立地选自异丙基、异丁基和 $-CH_2-$ 任选地被1个F取代的苯基 (例如, 2-氟苄基、3-氟苄基或4-氟苄基) ;
- [0085] 或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯, 包括该酯、酰胺或氨基甲酸酯的盐。
- [0086] 在某些其它的实施方式中, 本发明的化合物为式 (Ia) , 其中,
- [0087] X为 $-C_{1-2}$ 亚烷基 (即 $-CH_2-$ 或 $-CH_2-CH_2-$) ;
- [0088] R^1 为H;
- [0089] R^2 为任选地被1、2或3个F取代的 $-C_{1-2}$ 烷基或任选地被1、2或3个F取代的苯基, 例如, R^2 可以是未取代的 $-C_{1-2}$ 烷基或未取代的苯基;
- [0090] R^3 为式 (IIa) ;
- [0091] R^4 为 NH_2 ;
- [0092] R^5 (其为 R^b) 为 $-OC_{1-4}$ 烷基;且
- [0093] 每个 R^a 独立地选自H、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-$ 吡啶基、 $-CH_2-$ 苯基或 $-CH_2-$ 包括1、2、3或4个N或S原子的5元杂芳基;其中 $-C_{1-6}$ 烷基任选地被 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-SCH_3$ 或卤素取代;苯基任选地被1、2或3个独立地选自卤素、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-NO_2$ 的取代基取代;
- [0094] 或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯, 包括该酯、酰胺或氨基甲酸酯的盐。
- [0095] 在某些其它的实施方式中, 本发明的化合物为式 (Ia) , 其中,
- [0096] X为 $-C_{1-2}$ 亚烷基 (即 $-CH_2-$ 或 $-CH_2-CH_2-$) ;
- [0097] R^1 为H;
- [0098] R^2 为任选地被1、2或3个F取代的 $-C_{1-2}$ 烷基或任选地被1、2或3个F取代的苯基, 例如, R^2 可以是未取代的 $-C_{1-2}$ 烷基或未取代的苯基;
- [0099] R^3 为式 (IIIa) ;
- [0100] R^4 为 NH_2 ;
- [0101] R^5 为 $-OC_{1-4}$ 烷基;且
- [0102] 每个 R^a 独立地选自H、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-$ 吡啶基、 $-CH_2-$ 苯基或 $-CH_2-$ 包括1、2、3或4个N或S原子的5元杂芳基;其中 $-C_{1-6}$ 烷基任选地被 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-SCH_3$ 或卤素取代;苯基任选地被1、2或3个独立地选自卤素、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-NO_2$ 的取代基取代;
- [0103] 或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯, 包括该酯、酰胺或氨基甲酸酯的盐。
- [0104] 在某些其它的实施方式中, 本发明的化合物为式 (Ia) , 其中,
- [0105] X为 $-C_{1-2}$ 亚烷基 (即 $-CH_2-$ 或 $-CH_2-CH_2-$) ;
- [0106] R^1 为H;
- [0107] R^2 为任选地被1、2或3个F取代的 $-C_{1-2}$ 烷基或任选地被1、2或3个F取代的苯基, 例

如, R^2 可以是未取代的 $-C_{1-2}$ 烷基或未取代的苯基;

[0108] R^3 为式(IIIa);

[0109] R^4 为式(IVa);

[0110] R^5 为 $-OC_{1-4}$ 烷基;且

[0111] 每个 R^a 独立地选自H、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2$ -吡啶基、 $-CH_2$ -苯基或 $-CH_2$ -包括1、2、3或4个N或S原子的5元杂芳基;其中 $-C_{1-6}$ 烷基任选地被 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-SCH_3$ 或卤素取代;苯基任选地被1、2或3个独立地选自卤素、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-NO_2$ 的取代基取代;

[0112] 或其药学上可接受的盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯,包括该酯、酰胺或氨基甲酸酯的盐。

[0113] 在某些优选的实施方式中,本发明的化合物为:

[0114] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物1);

[0115] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物2);

[0116] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(实施例化合物3);

[0117] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物4);

[0118] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物5);

[0119] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(实施例化合物6);

[0120] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物7);

[0121] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物8);

[0122] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物9);

[0123] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯(实施例化合物10);

[0124] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯(实施例化合物11);

[0125] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯(实施例化合物12);

[0126] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物13);

[0127] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(实施例化合物14);

- [0128] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸异丙酯(实施例化合物15) ;
- [0129] (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物16) ;
- [0130] (2S)-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物21) ;
- [0131] (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物22) ;
- [0132] (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物23) ;
- [0133] 2-吗啉乙醇(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(实施例化合物24) ;
- [0134] 2-异丙氧基乙醇(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(实施例化合物25) ;
- [0135] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸异丙酯(实施例化合物26) ;
- [0136] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(实施例化合物27) ;
- [0137] 3-(二甲基氨基)丙醇(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(实施例化合物28) ;
- [0138] (2-甲氧基-1-甲基-乙醇)(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(实施例化合物29) ;
- [0139] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-N,N,4-三甲基-戊酰胺(实施例化合物30) ;
- [0140] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-N,4-二甲基-戊酰胺(实施例化合物31) ;
- [0141] (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(甲基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物32) ;
- [0142] (2S)-2-[[(2S)-2-乙酰胺基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物34) ;
- [0143] (2S)-2-[[(2S)-2-乙酰胺基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物35) ;
- [0144] (2S)-2-[[(2S)-2-乙酰胺基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(实施例化合物36) ;
- [0145] (2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物38) ;
- [0146] (2R)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物45) ;

[0147] (2S)-2-[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物46)；

[0148] (2R)-2-[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物47)；

[0149] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[6-[双(2-氯乙基)氨基]-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物48)；和

[0150] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物50)；

[0151] 或其药学上可接受的盐、酰胺或氨基甲酸酯,包括该酰胺或氨基甲酸酯的盐。

[0152] 本发明的化合物可以使用有机化学领域的技术人员已知的方法来制备。制备式(I)化合物的示例性方法描述于实施例部分。

[0153] 在实施方式中,本发明的化合物可以包括同位素原子。如本文所定义,同位素原子是天然存在的不是最常见的同位素元素的原子。氘是安全稳定的氢同位素。在一实施方式中,本发明的化合物的氘丰度水平大于氘的天然存在丰度。氘的天然存在丰度为0.0156mol%,其中mol%为样品的作为氘的氢的总摩尔的百分比。因此,在1摩尔天然存在的氢中,0.156mmol为氘,或在 6.022×10^{23} 个天然存在的氢原子样品中,有 9.39×10^{19} 个氘原子,或在6413个天然存在的氢原子样品中,有一个氘原子。大于氘的天然存在丰度的氘丰度水平可以为至少1mol%、5mol%、10mol%、50mol%、90mol%或98mol%氘。在某些实施方式中,本发明的化合物的氘丰度水平为至少1mol%、5mol%、10mol%、50mol%、90mol%或98mol%氘。制备氘代化合物的方法是所属领域已知的。参见例如,Sajiki,“过程化学的新视野”(2017),施普林格,第29-40页(Sajiki, New Horizons of Process Chemistry (2017), Springer, pg 29-40),和Hanson,“同位素标记的有机化学”(2011),第3章,英国皇家化学协会出版社(Hanson, The Organic Chemistry of Isotopic Labelling (2011), Chapter 3, RSC Publishing)。

[0154] 根据本发明的化合物中存在的取代基,化合物可以形成酯、酰胺、氨基甲酸酯和/或盐。适用于药物的本发明的化合物的盐为其中平衡离子在药学上可接受的盐。然而,具有非药学上可接受的平衡离子的盐也在本发明的范围内,例如用作制备本发明化合物及其药学上可接受的盐和生理功能衍生物的中间体。术语“生理功能衍生物”是指例如通过在体内可转化成本发明化合物的具有与本发明化合物相同的生理功能的本发明化合物的化学衍生物。酯、酰胺和氨基甲酸酯是生理功能衍生物的实例。

[0155] 适用于本发明的合适的盐的形式包括用有机或无机的酸或碱形成的盐。特别地,根据本发明的用酸形成的合适的盐包括用以下的酸形成的盐:无机酸,强有机羧酸,例如具有1至4个碳原子的未被取代或被例如卤素取代的链烷羧酸,或例如饱和或不饱和二羧酸,或例如羟基羧酸,或例如氨基酸,有机磺酸,例如未被取代的或被例如卤素取代的(C₁-C₄)烷基或芳基磺酸。药学上可接受的酸加成盐包括由盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、柠檬酸、酒石酸、乙酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙磺酸、三氟乙酸、琥珀酸、高氯酸、富马酸、马来酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸、羟乙磺酸、抗坏血酸、苹果酸、邻苯二甲酸、天冬氨酸和谷氨酸、赖氨酸和精氨酸形成的那些盐。其它酸例如草酸虽然其本身不是药学上可接受的,但可以用作获得本发明化合物及其

药上可接受的酸加成盐的中间体。

[0156] 药上可接受的碱盐包括铵盐、碱金属盐,例如钾盐和钠盐、碱土金属盐,例如钙盐和镁盐,以及与有机碱形成的盐,例如二环己胺、N-甲基-D-葡萄糖胺、吗啉、硫代吗啉、哌啶、吡咯烷,单、二或三低级烷基胺,例如乙基丙胺、叔丁基丙胺、二乙基丙胺、二异丙基丙胺、三乙基丙胺、三丁基丙胺或二甲基丙胺,或单、二或三羟基低级烷基胺,例如单乙醇胺、二乙醇胺或三乙醇胺。还可以进一步形成相应的内盐。

[0157] 优选的本发明的化合物的盐包括酸加成盐,例如由盐酸、氢溴酸、乙酸、对甲苯磺酸、酒石酸、硫酸、琥珀酸、磷酸、草酸、硝酸、甲磺酸、苹果酸、马来酸和柠檬酸形成的那些酸加成盐。更优选地,本发明的化合物的盐为盐酸盐(即由盐酸形成的加成盐)。

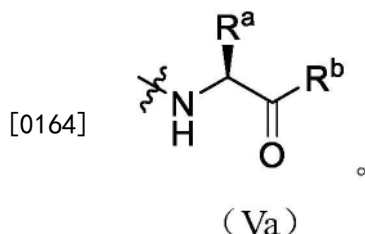
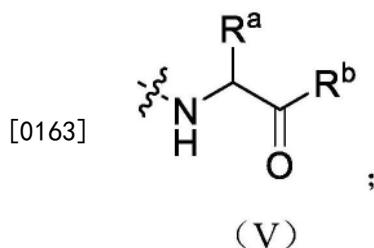
[0158] 本身无活性但在施用于接受者时能够转化为活性药物化合物的化合物称为“前药”。前药可以例如在体内转化(如在血液中水解)为具有药物作用的活性形式。药上可接受的前药描述于以下文献中:T.Higuchi和V.Stella,“作为新型递送系统的前药”,美国化学学会研讨会系列第14卷(1976)(T.Higuchi and V.Stella,Prodrugs as Novel Delivery Systems,Vol.14 of the A.C.S.Symposium Series(1976));“前药的设计”,H.Bundgaard编著,Elsevier,1985(“Design of Prodrugs”ed.H.Bundgaard,Elsevier,1985);和Edward B.Roche编著“药物设计中的生物可逆载体”,美国药物协会和Pergamon出版社,1987(Edward B.Roche,ed.,Bioreversible Carriers in Drug Design,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987)。

[0159] 本发明的权利要求1或权利要求25(及其相应的从属权利要求)的化合物可以前药的形式提供。前药的实例包括酯、酰胺和氨基甲酸酯。

[0160] 本发明的化合物可以具有转化为酯、酰胺或氨基甲酸酯的适当的基团。因此,本发明的化合物中由酸基团形成的典型酯基团和酰胺基团包括 $-COOR^G$ 、 $CONR^G_2$ 、 SO_2OR^G 或 $SO_2N(R^G)_2$,而本发明的化合物中由OH或 $-NHR^G$ 基团形成的典型酯基团和酰胺基团以及氨基甲酸酯基团包括 $OC(O)R^G$ 、 $NR^G C(O)R^G$ 、 $NR^G CO_2R^G$ 、 OSO_2R^G 和 $-NR^G SO_2R^G$,其中 R^G 选自 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基、 C_{3-8} 环烷基和 C_{3-8} 环烷基 C_{1-8} 烷基、卤代 C_{1-8} 烷基、二卤代 C_{1-8} 烷基、三卤代 C_{1-8} 烷基、苯基和苯基 C_{1-4} 烷基;更优选地, R^G 选自 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基和 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基。

[0161] 有机化学领域的技术人员将理解,许多有机化合物可以与它们在其中反映或者从其中沉淀或结晶的溶剂形成复合物。这些复合物被称为“溶剂化物”。例如,与水的复合物被称为“水合物”。复合物可以化学计量或非化学计量的量并入溶剂。溶剂化物描述于以下文献中:“水不溶性药物制剂”,第2版R.Lui编辑,CRC出版,第553页(Water-Insoluble Drug Formulation,2nd edn,R.Lui,CRC Press,page 553),和Byrn等人,Pharm.Res.,12(7),1995,945-954。本发明的化合物及其酯、酰胺、氨基甲酸酯和/或盐在制成溶液之前,可以为溶剂化物的形式。适合用作药物的本发明的化合物的溶剂化物为其中相关联的溶剂在药上可接受的溶剂化物。例如,水合物为药上可接受的溶剂化物。

[0162] 本申请的发明人已经发现,本发明的化合物在癌细胞内容易水解形成被优先隔离并保留在细胞内且具有强烷基化活性的代谢物,在上述本发明的化合物中, R^5 选自 $-OC_{1-6}$ 烷基、式(V)和式(Va)



[0165] R^b 选自 $-N(R^e)$ (R^f) 和 $-OC_{1-6}$ 烷基的基团。

[0166] 因此,本发明还提供了一种代谢物,其中所述代谢物具有式 (I)、(Ia) 或 (Ib) 的结构,其中,

[0167] X 为 C_{1-6} 亚烷基;

[0168] W_1 、 W_2 、 W_3 、 W_4 均为 CH, 或 W_1 、 W_2 、 W_3 、 W_4 中的一个为 N, 其他为 CH;

[0169] R^1 选自 H; 任选地被 1、2 或 3 个独立地选自卤素的基团取代的 C_{1-4} 烷基; 和卤素;

[0170] R^2 选自 H; 任选地被 1、2 或 3 个独立地选自卤素的基团取代的苯基; 和任选地被 1、2 或 3 个独立地选自卤素的基团取代的 C_{1-6} 烷基;

[0171] R^3 为式 (II)、(III)、(IIa) 或 (IIIa) 的基团;

[0172] R^4 选自 $N(R^c)$ (R^d)、式 (IV) 和式 (IVa);

[0173] 当 R^4 为式 (IV) 或 (IVa) 时, R^5 为 $-OH$; 当 R^4 为 $N(R^c)$ (R^d) 时, R^5 为 $-OH$ 、式 (V) 或式 (Va);

[0174] 每个 R^a 独立地选自 H; $-C_{1-6}$ 烷基; $-CH_2-$ 苯基; 或 $-CH_2-$ 包括 1、2、3 或 4 个选择 N、O 或 S 的杂原子的 3 元至 12 元杂环基; 其中所述 $-C_{1-6}$ 烷基任选地被 $-OH$ 、 $-OC_{1-6}$ 烷基、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-SCH_3$ 和卤素取代; 所述苯基或杂环基任选地被 1、2 或 3 个独立地选自卤素、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-OC_{1-6}$ 烷基和 $-NO_2$ 的取代基取代;

[0175] R^b 为 $-OH$;

[0176] 或其盐。

[0177] 如上文刚描述的代谢物化合物中的优选基团如上文中关于式 (I)、(Ia) 和 (Ib) 的化合物所描述。例如,在某些实施方式中,代谢物具有式 (I)、(Ia) 或 (Ib) 的结构,其中,

[0178] X 为 $-C_{1-2}$ 亚烷基 (即 $-CH_2-$ 或 $-CH_2-CH_2-$);

[0179] R^1 为 H;

[0180] R^2 为甲基或苯基;

[0181] R^3 为式 (IIa) 或 (IIIa);

[0182] R^4 选自 $N(R^c)$ (R^d) 和式 (IVa);

[0183] 当 R^4 为式 (IVa) 时, R^5 为 $-OH$; 当 R^4 为 $N(R^c)$ (R^d) 时, R^5 为 $-OH$ 或式 (Va);

[0184] 每个 R^a 独立地选自 H; $-C_{1-6}$ 烷基; $-CH_2-$ 吡啶基; $-CH_2-$ 苯基或 $-CH_2-$ 包括 1、2、3 或 4 个 N 或 S 原子的 5 元杂芳基; 其中 $-C_{1-6}$ 烷基任选地被 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-SCH_3$ 或卤素取代; 苯基任选地被 1、2 或 3 个独立地选自卤素、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ 烷基

和-NO₂的取代基取代;

[0185] R^b为OH;

[0186] 或其盐。

[0187] 在某些实施方式中,代谢物具有式(I)、(Ia)或(Ib)的结构,其中,

[0188] X为-C₁₋₂亚烷基(即-CH₂-或-CH₂-CH₂-);

[0189] R¹为H;

[0190] R²为甲基或苯基;

[0191] R³为式(IIa)或(IIIa);

[0192] R⁴为NH₂或式(IVa);

[0193] R⁵为-OH;

[0194] 每个R^a独立地选自H;-C₁₋₆烷基;-CH₂-吡啶基;-CH₂-苯基;或-CH₂-包括1、2、3或4个N或S原子的5元杂芳基;其中-C₁₋₆烷基任选地被-OH、-NH₂、-NHC(=NH)NH₂、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-SH、-SCH₃、或卤素取代;苯基任选地被1、2或3个独立地选自卤素、-NH₂、-OH、-OC₁₋₆烷基和-NO₂的取代基取代。优选地,每个R^a独立地选自异丙基、异丁基和-CH₂-任选地1个F取代的苯基(例如,2-氟苄基、3-氟苄基或4-氟苄基);

[0195] 或其盐。

[0196] 在某些优选的实施方式中,代谢物为:

[0197] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(实施例化合物19);和

[0198] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物20);

[0199] (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(甲基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物33);

[0200] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸(实施例化合物37);

[0201] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸(实施例化合物39);

[0202] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物40);

[0203] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸(实施例化合物42);

[0204] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸(实施例化合物43);

[0205] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物44);和

[0206] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物51);

[0207] 或其盐。

[0208] 本申请的发明人进一步发现,本发明的化合物在癌细胞内容易进一步水解,形成

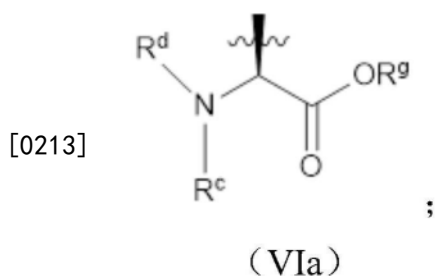
进一步、更高级的代谢物,其被优先隔离并保留在细胞内且具有强烷基化活性。因此,本发明还提供具有式(I)、(Ia)或(Ib)的结构代谢物,其中,

[0209] X为C₁₋₆亚烷基;

[0210] W₁、W₂、W₃和W₄均为CH,或者W₁、W₂、W₃和W₄中的一个为N,其他为CH;

[0211] R¹选自H;任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₄烷基;和卤素(例如,F或Cl);R²选自H、任选地被1、2或3个独立地选自卤素(例如,F或Cl)的基团取代的苯基;和任选地被1、2或3个独立地选自卤素(例如,F或Cl)的基团取代的-C₁₋₆烷基;且

[0212] R³为式(VIa):



[0214] 其中,R^c和R^d各自独立地选自H、-C₁₋₆烷基、-C(O)C₁₋₆烷基和-CH₂-苯基,其中所述烷基或所述苯基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代(优选地,R^c和R^d均为H);且

[0215] R^g独立地选自H和-C₁₋₆烷基,其中所述烷基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代(优选地,R^g为H)。

[0216] 为了避免疑义,式(VI)和(VIa)中的 $\sim$ 表示式(VI)或(VIa)与式(I)、(Ia)或(Ib)的连接点。

[0217] 在某些实施方式中,代谢物具有式(I)、(Ia)或(Ib)的结构,其中,

[0218] X为C₁₋₆亚烷基;

[0219] R¹选自H、C₁₋₄烷基、和卤素(例如,F或Cl);

[0220] R²选自H;被1、2或3个卤素(例如,F或Cl)取代的苯基;被1、2或3个卤素(例如,F或Cl)取代的-C₁₋₆烷基(例如选自被1、2或3个卤素(例如,F或Cl)取代的苯基;被1、2或3个卤素(例如,F或Cl)取代的C₁₋₆烷基);

[0221] R³为式(VIa);

[0222] R^c和R^d均为H;

[0223] 或其盐。

[0224] 在某些其它的实施方式中,代谢物具有式(I)、(Ia)或(Ib)的结构,其中,

[0225] X为C₁亚烷基(即-CH₂-)或C₂亚烷基(即-CH₂-CH₂-);

[0226] R¹选自H、-C₁₋₄烷基、和卤素(例如,F或Cl);

[0227] R²选自H;任选地被1、2或3个卤素(例如,F或Cl)取代的苯基;和任选地被1、2或3个卤素(例如,F或Cl)取代的-C₁₋₆烷基;

[0228] R³为式(VIa);

[0229] R^c和R^d均为H;

[0230] 或其盐。

[0231] 优选地,化合物为式(Ia)或(Ib)之一。

[0232] 因此,本发明还提供一种具有式(I)、(Ia)或(Ib)的结构的化合物,其中,

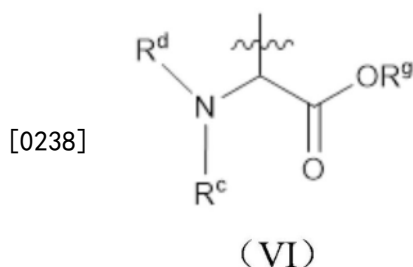
[0233] X为C₂₋₆亚烷基；

[0234] W₁、W₂、W₃、W₄均为CH，或W₁、W₂、W₃、W₄中的一个为N，其他为CH；

[0235] R¹选自H；任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的-C₁₋₄烷基和卤素（例如，F或Cl）；

[0236] R²选自H；任选地被1、2或3个独立地选自卤素（例如，F或Cl）的基团取代的苯基；和任选地被1、2或3个独立地选自卤素（例如，F或Cl）的基团取代的-C₁₋₆烷基；

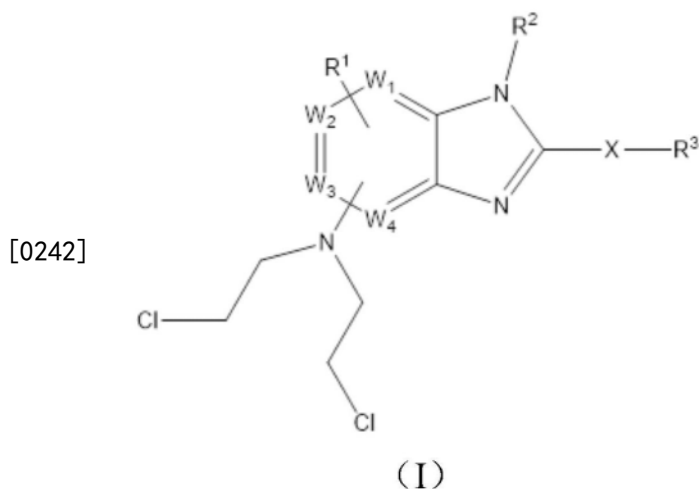
[0237] R³为式 (VI)



[0239] 其中，R^c和R^d各自独立地选自H、-C₁₋₆烷基、-C(O)C₁₋₆烷基和-CH₂-苯基，其中所述烷基或所述苯基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代（例如R^c和R^d均为H）；

[0240] R^g选自H和-C₁₋₆烷基，其中所述烷基任选地被1、2或3个选自卤素的基团取代（例如R^g是H）。

[0241] 更高级的代谢化合物可以用于药物治疗。因此，本发明进一步提供式 (I) 的化合物或其盐或溶剂化物用作药物，例如用于治疗选自多发性骨髓瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤的癌症；例如多发性骨髓瘤、急性髓性白血病或淋巴瘤的用途，



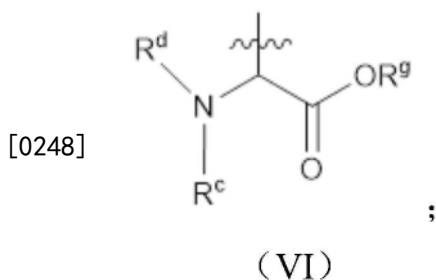
[0243] 其中，

[0244] X为C₁₋₆亚烷基；

[0245] W₁、W₂、W₃和W₄均为CH，或者W₁、W₂、W₃和W₄中的一个为N，其他为CH；

[0246] R¹选自H；任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₄烷基；和卤素；R²选自H、任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的苯基；和任选地被1、2或3个独立地选自卤素的基团取代的C₁₋₆烷基；且

[0247] R³为式 (VI)：



[0249] 其中, R^c 和 R^d 各自独立地选自 H、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基和 $-CH_2-$ 苯基, 其中所述烷基或所述苯基任选地被 1、2 或 3 个选自卤素的基团取代; 且

[0250] R^g 独立地选自 H 和 $-C_{1-6}$ 烷基, 其中所述烷基任选地被 1、2 或 3 个选自卤素的基团取代。

[0251] 这些化合物用作药物的用途的优选实施方式在本发明其他相关方面的上文中有所描述。

[0252] 在某些优选的实施方式中, 进一步的、更高级的代谢物为:

[0253] (2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸(实施例化合物17);

[0254] (S)-2-氨基-4-(5-(双(2-氯乙基)氨基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)丁酸(实施例化合物18);

[0255] (2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯(实施例化合物38);

[0256] (2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酸(实施例化合物41); 或

[0257] (2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氟代乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸(实施例化合物49);

[0258] 或其盐。

[0259] 本文描述的代谢物可以从经一种或多种式(I)的化合物处理的细胞中分离, 和/或可以使用标准有机化学技术来制备。制备本发明的代谢物的示例性方法描述于实施例部分。为避免疑义, 本文描述的代谢物是本发明化合物的进一步实施例, 并且可以以组合物的形式使用, 和/或作为药物以与本文对其他式(I)的化合物描述的相同的方式使用。

[0260] 除非在特定情况下另有限制, 以下定义适用于本说明书全文中使用的术语。

[0261] 本文所用的术语“烷基”是指直链的和支链的饱和烃基。烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、戊基和己基。在直链烷基中, 优选甲基、乙基、正丙基、异丙基和正丁基。在支链烷基中, 可以提及的有叔丁基、异丁基、1-乙基丙基和1-乙基丁基。

[0262] 本文所用的术语“环烷基”是指环体系饱和基团。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0263] 本文所用的术语“卤素”是指氟、氯、溴或碘。优选氟、氯和溴, 特别优选氟和氯。

[0264] 本文所用的术语“包括1、2、3或4个氮、氧或硫原子的杂芳基”是指碳原子的芳族环状基团中碳原子中的一个、两个、三个或四个被一个、两个、三个或四个独立地选自氮、氧和硫(优选氮和硫)的杂原子替代。包括1、2或3个氮和/或硫原子的5元杂芳基的实例包括噻

吩、噻唑、异噻唑、吡咯、吡咯啉、吡唑、吡唑啉、咪唑、咪唑啉、三唑和噻二唑。

[0265] 药物组合物

[0266] 根据本发明的化合物、组合物和药物组合物可以用于治疗和/或预防癌症、减少肿瘤生长和/或杀死肿瘤细胞。因此,本发明的化合物可以用于治愈患有癌症疾病的患者和/或延长其生存期。本发明对于治疗和/或预防癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤或混合型癌症尤其有用。例如,多发性骨髓瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、白血病和淋巴瘤。

[0267] 虽然有可能单独施用根据本发明的化合物,但优选的是其存在于组合物中,特别是存在于药物组合物中。药物组合物包括适合于口服、肠胃外(包括皮下、皮内、骨内输注、肌肉内、血管内(推注(bolus)或输注)、玻璃体内和髓内)、腹膜内、经粘膜、经皮、直肠和局部(包括真皮、口腔、舌下和眼内)施用的那些药物组合物,但最合适的途径可能取决于例如治疗的受试者的病况和病症。

[0268] 适合于口服施用的本发明的药物组合物可以呈现为以下形式:离散单位,例如各自含有预先确定的量的活性成分的胶囊、扁囊剂(cachets)或片剂;粉末或颗粒;水性液体或非水性液体中的溶液或悬浮液;或水包油型液体乳剂或油包水型液体乳剂。本发明的化合物还可以呈现为大丸剂(bolus)、药糖剂或糊剂的形式。各种药学上可接受的载体和其制剂描述于标准制剂论述例如E.W.Martin的《雷明顿制药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences by E.W.Martin)中。还参见Wang,Y.J.和Hanson,M.A.,《肠胃外科学与技术杂志》,技术报告编号10,增刊.42:2S,1988(Wang,Y.J.and Hanson,M.A., Journal of Parenteral Science and Technology,Technical Report No.10,Supp.42:2S,1988)。

[0269] 用于肠胃外施用的本发明的药物组合物包括水性和非水性无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和提供与预期接受者的血液等渗的制剂的溶质;以及可以包括悬浮剂和增稠剂的水性和非水性无菌悬浮液。优选地,制剂可以存在于单位剂量或分开剂量的容器中,例如密封安瓿和小瓶。制剂可以在冷冻干燥(冻干)条件下储存,仅需要在即将使用之前添加无菌液体载体,例如盐水或注射用水。即用型注射和输注溶液和悬浮液可以由无菌粉末、颗粒或其它干燥组合物制备。用于肠胃外施用的示例性组合物包括可注射溶液或悬浮液,其可以含有例如合适的无毒、肠胃外可接受的溶质、稀释剂或溶剂(如甘露醇、1,3-丁二醇、水、林格氏溶液(Ringer's solution)、等渗氯化钠溶液),或其他合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂(包括合成的甘油单酯或甘油二酯和脂肪酸(包括油酸)或克列莫佛(Cremaphor))。

[0270] 用于鼻腔、气溶胶或吸入施用的本发明的药物组合物包括盐水中的溶液,其可以含有例如苯甲醇或其它合适的防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂和/或如所属领域中已知的其它增溶剂或分散剂。

[0271] 用于直肠施用的本发明的药物组合物可以呈具有通常的载体(如可可脂、合成甘油酯或聚乙二醇)的栓剂的形式。这类载体在常温下通常为固体,但在直肠腔中液化和/或溶解以释放药物。

[0272] 用于在口腔(例如经颊或舌下)局部施用的本发明的药物组合物包括:包括调味基质(如蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)中的活性成分的锭剂(lozenges),和包括基质(如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)中的活性成分的糖锭剂(pastilles)。用于局部施用的示例性组

合物包括局部载体,例如Plastibase(用聚乙烯胶凝化的矿物油)。

[0273] 优选的单位剂量组合物为含有本发明的化合物或其合适部分的适合使用的探索剂量或治疗剂量。

[0274] 在优选的实施方式中,本发明的组合物基本上由本发明的化合物和至少一种药学上可接受的赋形剂组成。

[0275] 应当理解,除了上面特别提到的成分之外,考虑到所讨论的复合物的类型,用于本发明的组合物可以包括所属领域的其它常规试剂。

[0276] 本发明的组合物可以包括一种或多种另外的治疗剂。可以存在于本发明的组合物中的另外的治疗剂的实施例包括,但不限于,类固醇(泼尼松和地塞米松)、检查点抑制剂(如CTLA-4抑制剂和PD-1/PD-L1抑制剂)、核转运抑制剂(如塞利尼索(selinexor))、抗凋亡抑制剂(如维奈托克(Venetoclax))、过继性细胞疗法(如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法、自然杀伤(NK)细胞疗法、嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法和工程化T细胞受体疗法)、双特异性T细胞接合剂(BiTE)、免疫调节酰亚胺药物(IMiD)(如沙利度胺、来那度胺和泊马度胺)、蛋白酶体抑制剂(PI)(如硼替佐米、卡非佐米、伊沙佐米和马里佐米(marizomib))、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂(如帕比司他)、本发明的化合物以外的多肽偶联药物(PDC)(如美氟芬(melflufen))和常规化学疗法(例如烷化剂(如美法仑(melphalan)、环磷酰胺)和DNA嵌入剂(如阿霉素))。

[0277] 治疗

[0278] 如上所述,本发明的化合物是多肽偶联药物(PDCs)。本发明提供根据本发明的化合物或包括根据本发明的化合物以及药学上可接受的载体的组合物用作药物的用途。

[0279] 具体地,本发明发现的化合物和组合物可用于治疗和/或预防癌症。通过施用本发明的化合物或组合物可以治疗或预防的癌症的具体实例包括癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤或混合型癌症。通过施用本发明的化合物或组合物可以治疗或预防的示例性癌症包括,但不限于,血液/血细胞癌,例如白血病(如急性淋巴细胞白血病(包括成人和儿童急性淋巴细胞白血病);急性髓性白血病(包括成人和儿童急性髓性白血病);慢性淋巴细胞白血病(如B细胞慢性淋巴细胞白血病);慢性粒细胞白血病;和毛细胞白血病);淋巴瘤(如AIDS相关淋巴瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;霍奇金淋巴瘤(包括成人和儿童霍奇金淋巴瘤以及妊娠期霍奇金淋巴瘤);非霍奇金淋巴瘤(包括成人和儿童非霍奇金淋巴瘤以及妊娠期非霍奇金淋巴瘤);蕈样肉芽肿(mycosis fungoides);塞扎里氏综合征(Sezary syndrome);华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia);原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(primary mediastinal large B cell lymphoma);套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma);弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma);和原发性中枢神经系统淋巴瘤(primary central nervous system lymphoma));和其他血液癌症(如慢性骨髓增殖性疾病(chronic myeloproliferative disorders);多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤(multiple myeloma/plasma cell neoplasm);骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes);和骨髓增生异常/骨髓增生性疾病(myelodysplastic/myeloproliferative disorders));骨肉瘤、卵巢癌、乳腺癌;肺癌;胶质母细胞瘤;视网膜母细胞瘤和上述癌症的转移。

[0280] 本申请的发明人已经发现,本发明的化合物尤其对血液癌细胞具有细胞毒性。因此,本发明的化合物特别有利于治疗或预防一种或多种前述的血液癌症。

[0281] 此外,所属化合物还可以用于治疗实体瘤。本发明的化合物和组合物还可以用于治疗或预防疾病或病症的方法中,所述方法包括将本发明的化合物或本发明的组合物适用于有需要的受试者的步骤。因此,本发明的化合物或组合物可以施用于患有癌症(特别是血液癌症)或处于其发展风险中的受试者。

[0282] 本发明的化合物还可以用于制造药物,特别是用于制造要施用于患有癌症(特别是血液癌症)或处于其发展风险中的受试者的药物。

[0283] 实现治疗效果所需的本发明的化合物的量将随着特定的施用途径和治疗的受试者的特征而变化,例如物种、年龄、体重、性别、医疗状况、特定疾病或病况及其严重程度,以及其它相关医学和身体因素。普通技术医师可易于确定和施用治疗或预防疾病或病况所需的有效量的本发明的化合物。

[0284] 本发明的化合物或其盐和/或其溶剂化物可以每天(包括每天数次)、每两天或每三天、每周、每两周、每三周或每四周或以高单剂量施用,其取决于要治疗的受试者的疾病或病症。

[0285] 优选地,本发明的化合物或本发明的代谢物或其盐和/或其溶剂化物(不包括任何平衡离子或溶剂的质量)每次施用可以以约1mg至150mg的量施用。例如,1mg、2mg、3mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、110mg、120mg、130mg、140mg或150mg。另外可选地,本发明的化合物或其盐和/或其溶剂化物(不包括任何平衡离子或溶剂的质量)可以单次高剂量施用。单次高剂量可为约150mg至800mg。例如,150mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg或800mg。

[0286] 尽管本发明的化合物在本发明中可以作为唯一的活性成分使用,但其也可以与一种或多种另外的治疗剂组合使用,并且此类组合的用途提供了本发明的一优选实施方式。此类另外的治疗剂可以为可用于治疗或预防癌症的药剂或其它药学上的活性材料。此类药剂是所属领域中已知的。本文描述了适用于本发明的另外的治疗剂的实例。

[0287] 一种或多种另外的治疗剂可以与本发明的化合物一起/自施用本发明的化合物起同时、序贯(sequential)或单独施用。这类组合的各个组分可以在治疗过程中的不同时间单独施用,或者以分开或单独的组合形式同时施用。

[0288] 根据本发明的用途优选的单位剂量组合物为含有有效剂量或其适当部分的本发明的化合物的单位剂量组合物。

[0289] 试剂盒

[0290] 本发明提供一种试剂盒(kit),其包括式(I)的化合物、一种或多种药学上可接受的赋形剂以及任选的一种或多种另外的治疗剂。此类另外的治疗剂的实例包括本文描述的适合用于本发明、且作为另外的治疗剂任选地存在于本发明的药物组合物中的另外的治疗剂。

[0291] 本发明的试剂盒可用于治疗和/或预防癌症,特别是血液癌症。

[0292] 在某些实施方式中,试剂盒包括一个或多个容器,还可以包括采样装置,如瓶子、袋子(例如静脉输液袋)、小瓶、注射器和试管。其它组件可以包括针头、稀释剂、洗涤剂和缓冲液。有用地,试剂盒可以包括至少一个容器,其包括药学上可接受的有机溶剂或药学上可接受的缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。

[0293] 优选地,本发明的试剂盒包括说明书,例如指导使用者将规定量的本发明的化合

物或组合物与规定量的生理学上可接受的水性溶剂或稀释剂、药学上可接受的有机溶剂和/或任选的一种或多种另外的治疗剂混合的说明书。该说明书还可以提供储存条件和/或施用说明的指导。

[0294] 为了避免疑义,本发明的化合物或组合物、任选的生理学上可接受的水性溶剂或稀释剂、任选的一种或多种药学上可接受的有机溶剂以及任选的一种或多种另外的治疗剂以适合于制备根据本发明的药物制剂的形式和量存在于根据本发明的试剂盒中。本领域技术人员可以容易地确定适合于根据本发明的用途的本发明的化合物或组合物、生理学上可接受的水性溶剂或稀释剂、药学上可接受的有机溶剂和任选的一种或多种另外的治疗剂的量。

[0295] 等同方式

[0296] 本文已广泛且一般性地描述了本发明。本领域普通技术人员将很容易理解,本文描述的所有参数、尺寸、材料和配置均是示例性的,并且实际的参数、尺寸、材料和/或配置将取决于特定的使用本发明的教导的一种或多种应用。本领域技术人员将认识到,或能够仅仅使用常规实验来确定本文描述的本发明的具体实施方式的许多等同方式。因此,应当理解,前述实施方式仅以实例的方式呈现,并且在所附权利要求及其等同方式的范围内,可以以不同于具体描述和要求保护的方式实施本发明。本发明涉及本文描述的每个单独的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。另外,两个或更多个这样的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合,如果这样的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法相互一致,则都包括在本发明的范围内。此外,落入一般公开范围内的每个较窄的种类和下位分组也形成本发明的一部分。这包括本发明的一般描述,带有从上位概念中移除任何主题的附带条件或否定性限制,而无论本文是否具体列举了所删除的材料。

[0297] 通过引用并入

[0298] 本文提及或引用的文章、专利和专利申请以及所有其它文件和电子可用信息的内容均通过引用整体并入本文,其程度与每个单独的出版物被具体且单独地表明通过引用并入的程度相同。申请人保留将来自任何此类文章、专利、专利申请或其它物理和电子文件中的任何和所有材料和信息在物理上并入本申请的权利。

[0299] 用以下实施例说明本发明。

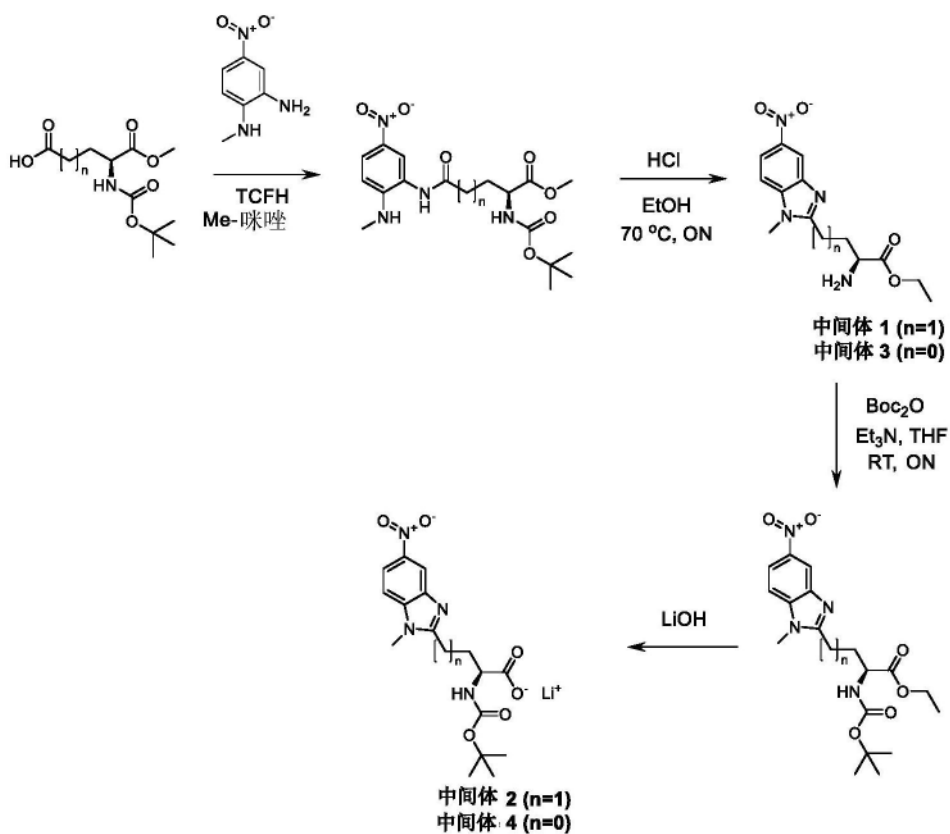
[0300] 实施例:

[0301] 实施例化合物:

[0302] 本发明的化合物可以根据所属领域技术人员已知的方法制备。本领域技术人员可以容易地设计出其他反应路线以及各种不同的溶剂、温度和其他反应条件。

[0303] 根据通用路线1合成中间体1-4。首先,在相应的受保护氨基酸和苯胺之间进行酰胺化反应。所得产物在酸性条件下环化,形成苯并咪唑杂环,进而形成中间体1 ($n=1$) 和3 ($n=0$)。BOC保护后皂化得到中间体3 ($n=1$) 和4 ($n=0$)。

[0304] 路线1

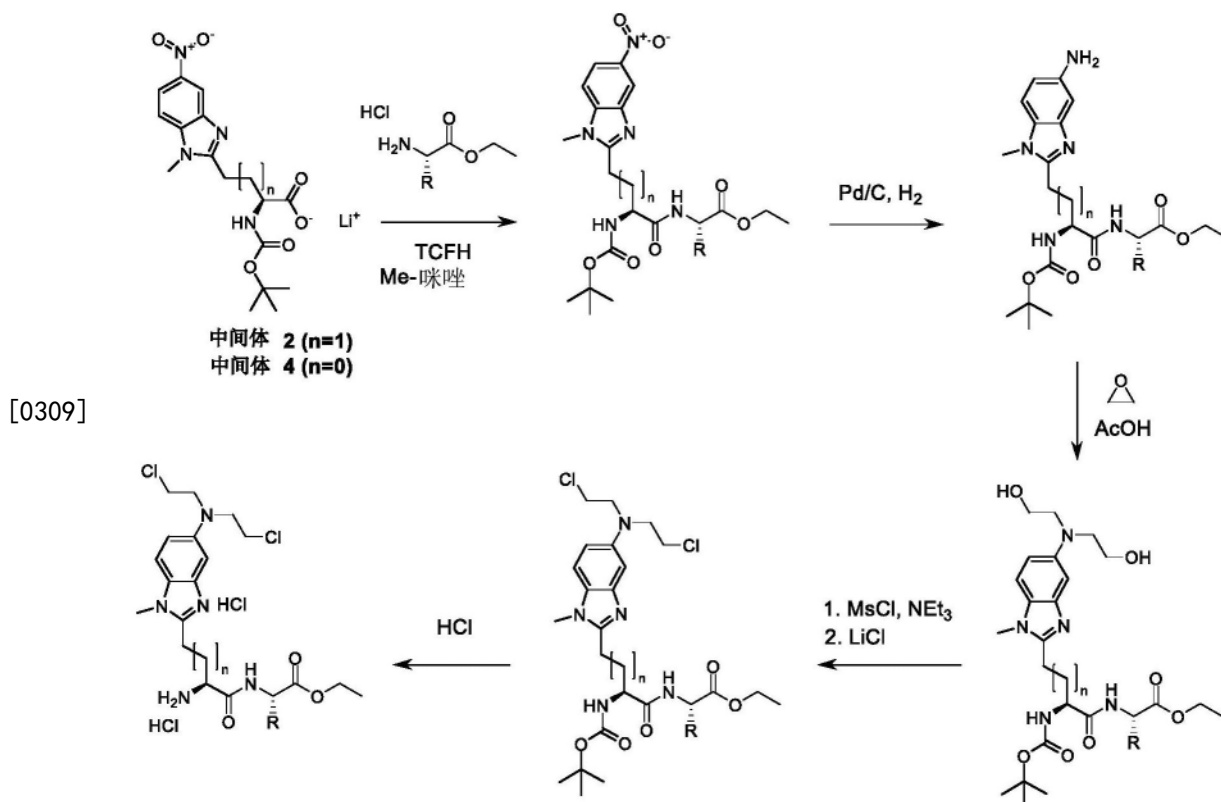


[0305]

[0306] 中间体 (2或4) 与相应的受保护氨基酸之间通过TCFH进行多肽偶联,得到所需的二肽。硝基的还原在加压的氢气气氛下用Pd/C进行。形成的苯胺在酸性条件下用环氧乙烷进行烷基化。甲磺酸化后进行氯置换,得到氮芥部分。最后,用HCl或TFA去除BOC保护基团,得到所需的类似物(路线2)。

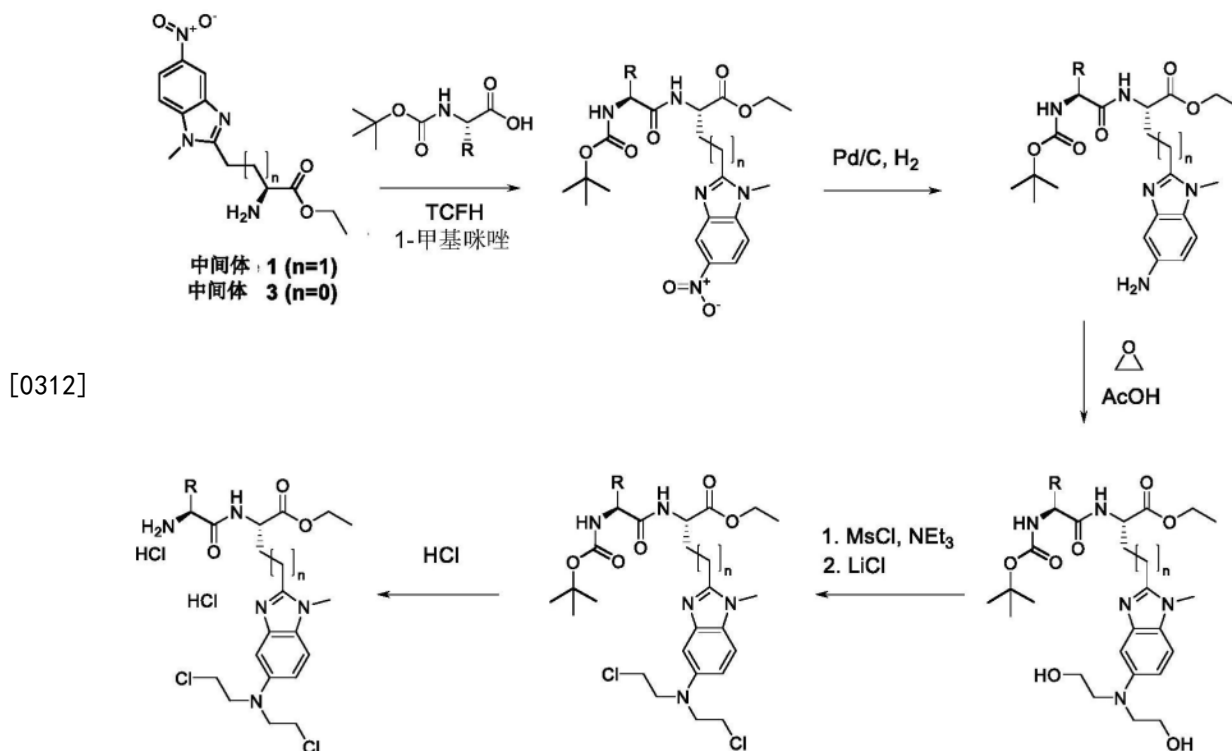
[0307] 中间体2和4也可以根据路线13合成。

[0308] 路线2



[0310] 根据路线2中描述的合成路线合成实施例化合物1至6。按下文的详细描述合成实施例化合物13至15、19、20、22至36、39、40至42和44至51。用上述类似的策略应用于合成实施例化合物7至12,其在二肽的C端具有苯并咪唑取代基(路线3)。按下文的详细描述合成实施例化合物16、21、37和43。

[0311] 路线3



[0313] 材料和方法

[0314] 通用方法A

[0315] 使用Kinetex XB C₁₈ (5 μ m, 21 $\times$ 100mm) 色谱柱, 以含0.1% TFA的MilliQ H₂O/CH₃CN为流动相(酸性条件)(流速25mL/min, 梯度15min) 在Gilson HPLC系统上进行制备HPLC。基于紫外信号收集级分。通过使用Kinetex XB C₁₈ (2.6 μ m, 3.0 $\times$ 50mm) 色谱柱, 以含0.1% TFA的MilliQ H₂O/CH₃CN为流动相(酸性条件) 或使用Kinetex EV0 C₁₈ (2.6 μ m, 3.0 $\times$ 50mm) 色谱柱, 以含10mM NH₄HCO₃ (pH 10) 的MilliQ H₂O/CH₃CN为流动相(碱性条件)(流速1mL/min) 这两种方法, 在Agilent系列1100系统上进行分析。使用Agilent 1100系列液相色谱/质量选择检测器(MSD) 进行电喷雾电离质谱(ESI-MS), 获得目标分子的伪分子[M+H]⁺离子。

[0316] 在25 $^{\circ}$ C下用配备5mm三重共振探头的Varian Inova 600MHz仪器记录核磁共振(NMR) 谱。

[0317] 通用方法B

[0318] 某些实施例使用通用方法B。在硅胶60A, 40-63 μ m上进行快速色谱法。使用ACE 5C₈ Prep, 100 $\times$ 21.2mm色谱柱在配备UV检测器的Gilson系统上进行制备HPLC。使用配备电喷雾接口和紫外二极管阵列检测器的Agilent 1100系列液相色谱/质量选择检测器(MSD) (单四极杆) 进行HPLC-MS分析。通过使用ACE 3C₈ (3.0 $\times$ 50mm) 色谱柱(乙腈在0.1% TFA水溶液中的梯度3分钟, 流速为1mL/min) 或Xbridge C₁₈ (3.0 $\times$ 50mm) 色谱柱(乙腈在10mM碳酸氢铵中的梯度3分钟, 流速为1mL/min) 这两种方法进行分析。在25 $^{\circ}$ C下用Bruker 400MHz仪器记录¹H-NMR谱。

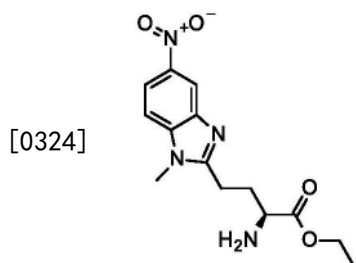
[0319] 常用通用方法

[0320] 对于制备成盐酸盐的实施例化合物, 将HCl (例如, 1,4-二噁烷中4M) 添加到来自制备色谱的合并的纯级分中, 以用HCl代替三氟乙酸。

[0321] 用来自Biovia, Dotmatics and PerkinElmer的软件(ChemDraw) 对化合物命名。另外, 市售的起始原料和试剂使用商业名称或俗名。

[0322] 使用Mestrelab Research S.L.Chemistry提供的MestReNova处理谱图, 使用残留溶剂作为内标, 以ppm (δ) 报告化学位移。以Hz给出的峰的裂分表示如下: s, 单峰; d, 双峰; dd, 双二重峰; ddd, 双二倍二重峰; t, 三重峰; dt, 双三重峰; q, 四重峰; dq, 双四重峰; p, 五重峰; h, 六重峰; m, 多重峰; br s, 宽单峰。一低场质子(大约14.5-14.9ppm) 有时会超出范围, 不总是包括在多重峰报告中。

[0323] 中间体1: (2S)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基) 丁酸乙酯

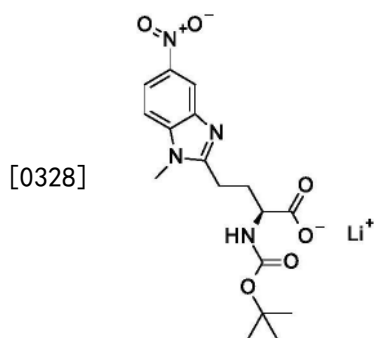


[0325] 在室温下向(4S)-4-(叔丁氧基羰基氨基)-5-甲氧基-5-氧代-戊酸(7.46g, 28.6mmol)、N1-甲基-4-硝基-苯-1,2-二胺(5.01g, 30.0mmol)、1-甲基咪唑(4.78mL, 60.0mmol) 的MeCN (220mL) 溶液中加入[氯(二甲基氨基)亚甲基]-二甲基铵; 六氟磷酸盐

(8.81g, 31.4mmol) [轻微放热]。混合物在室温下搅拌1h并减压蒸馏挥发物。将粗品溶解在DCM(400mL)中并用2N HCl:水1:4的溶液(200mL)洗涤。分离有机相,用过量MgSO₄干燥,过滤并浓缩,得到棕色固体。粗产物(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-(甲基氨基)-5-硝基-苯胺基]-5-氧代-戊酸甲酯(13.4g, 28.4mmol, 收率:99%),不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:87%;MS (ESI+) m/z=354[M+H-tBu]⁺。

[0326] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-(甲基氨基)-5-硝基-苯胺基]-5-氧代-戊酸甲酯(11.7g, 28.5mmol)的EtOH(400mL)溶液中加入氯化氢(12.0mol/L, 42.3mL, 507mmol),混合物在70℃搅拌过夜。减压蒸馏反应物并添加水(500mL)。用EtOAc(2×200mL)洗涤水相。丢弃有机相。将水相与EtOAc(500mL)混合并用固体K₂CO₃中和至pH 9-10。用EtOAc(2×300mL)萃取水相。有机相用MgSO₄干燥,过滤并减压蒸馏得到粗产物,(2S)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(中间体1),其不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:83%;MS (ESI⁺) m/z=307[M+H]⁺。

[0327] 中间体2:(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸锂

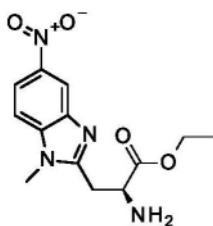


[0329] 向(2S)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(中间体1)(5.73g, 18.7mmol)粗品的THF(100mL)溶液中加入三乙胺(3.13mL, 22.4mmol)和二碳酸二叔丁酯(4.49g, 20.6mmol),混合物在室温下搅拌过夜。粗品经减压浓缩,溶解在EtOAc(200mL)中并用0.5N HCl(200mL)洗涤。分离各相并用EtOAc(2×50mL)萃取水相。有机相用MgSO₄干燥,过滤并减压蒸发。加入Et₂O(150mL),固体开始沉淀。将烧瓶冷却至0℃并静置30min。过滤收集固体并用冷Et₂O(3×50mL)洗涤。减压干燥固体,得到(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(4.70g, 11.6mmol, 3个步骤的收率:55%),呈浅黄色固体。HPLC纯度:96%;MS (ESI+) m/z=407[M+H]⁺。

[0330] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(1.47g, 3.62mmol)的THF(20mL)和MeOH的溶液(20mL)中加入水(5mL)和LiOH·H₂O(0.159g, 3.80mmol),混合物在室温下搅拌过夜。粗产物(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸锂(中间体2)不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:100%;MS (ESI+) m/z=379[M(羧酸)+H]⁺。

[0331] 中间体3:(2S)-2-氨基-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸乙酯

[0332]



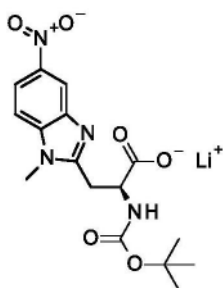
[0333] 根据与中间体1相同的过程合成中间体3,但使用(3S)-3-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲氧基-4-氧代-丁酸作为起始原料:

[0334] 步骤1:分离粗产物基(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-[2-(甲氨基)-5-硝基-苯胺基]-4-氧代-丁酸甲酯,呈棕色固体(收率71%)。HPLC纯度:71%; $m/z=341$ ($M+H-tBu$)⁺。

[0335] 步骤2:分离(2S)-2-氨基-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸乙酯(中间体3),呈黄橙色固体(收率98%)。HPLC纯度:91%; $m/z=293$ ($M+H$)⁺。

[0336] 中间体4:(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸酯锂

[0337]



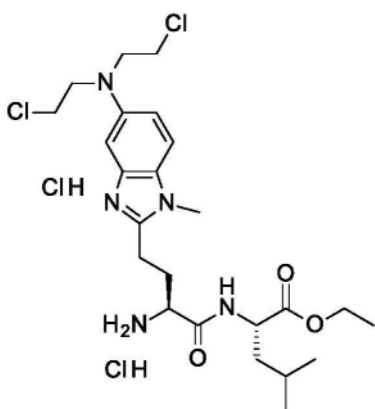
[0338] 根据与中间体2相同的过程合成中间体4,但使用(2S)-2-氨基-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸乙酯(中间体3)作为起始原料。

[0339] 步骤1:分离粗产物(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸乙酯,呈棕色固体(收率83%)。HPLC纯度:97%; $m/z=393$ [$M+H$]⁺。

[0340] 步骤2:分离(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸锂(中间体4),呈黄橙色固体(定量收率)。HPLC纯度:91%; $m/z=365$ [M (羧酸)+ H]⁺。

[0341] 实施例1:(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物1)

[0342]



[0343] 步骤1:在室温下向(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酸乙酯盐酸盐(0.581g,2.97mmol)、(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸锂(中间体2)(1.04g,2.70mmol)和1-甲基咪唑(0.452mL,5.67mmol)的MeCN(30mL)溶液中加入[氯(二甲

基氨基) 亚甲基]-二甲基铵六氟磷酸盐(0.834g, 2.97mmol)。混合物在室温下搅拌1h。用柠檬酸溶液(10%水溶液)淬灭反应并蒸发挥发物。粗品用水稀释并用EtOAc($\times 3$)萃取。有机相用MgSO₄干燥, 过滤并减压蒸发。粗品经硅胶色谱(DCM $\rightarrow$ DCM/MeOH(10%))纯化, 得到(2S)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯, 呈浅黄色泡沫(1.27g, 2.44mmol, 收率90%)。HPLC纯度: 96%; MS (ESI+) $m/z = 520 [M+H]^+$ 。

[0344] 步骤2: 将(2S)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(1.27g, 0.00244mmol)溶解在EtOH(30mL)中并置于H-反应器中。加入Pd/C(10%, 0.130g, 0.000122mmol)并将反应器密封。用氮气吹扫。在3bar下将H₂充入反应器中并将反应物在35℃下搅拌1.5h。用氮气吹扫排出氢气。用硅藻土过滤除去催化剂。蒸发溶剂, 分离出粗产物(2S)-2-[[[(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.670g, 1.37mmol, 收率85%), 不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度: 93%; MS (ESI+) $m/z = 490 [M+H]^+$ 。

[0345] 步骤3: 将(2S)-2-[[[(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(670mg, 0.00137mmol)溶解于乙酸(5mL)中, 加入环氧乙烷(2.30mol/L, 5.95mL, 0.0137mmol), 反应物在室温下搅拌24h。真空除去挥发物, 将粗物质溶解在DCM中, 并用饱和NaHCO₃水溶液洗涤。有机层用水和盐水洗涤, 经分相器分相并浓缩。将粗品用硅胶色谱纯化(DCM $\rightarrow$ DCM/MeOH(10%)), 得到(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.340g, 0.589mmol, 收率43%), 呈类白色(pale-white)泡沫。HPLC纯度: 96%; MS (ESI+) $m/z = 578 [M+H]^+$ 。

[0346] 步骤4: 向(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(340mg, 0.589mmol)和三乙胺(0.238g, 2.35mmol)的DCM溶液(10mL)中加入甲磺酰氯(0.141mL, 1.82mmol)。反应混合物在室温下搅拌20min, 然后用NaHCO₃(饱和): 水(2/5)(20mL)、0.3M HCl(20mL)和盐水(20mL)的混合物洗涤。用MgSO₄干燥有机相, 过滤, 并减压蒸发。

[0347] 将DMF(10mL)中的粗混合物(甲磺酸化中间体)和氯化锂(0.374g, 8.83mmol)加热至60℃并保持2.5h。将反应混合物用甲苯(40mL)和EtOAc(40mL)的混合物稀释, 然后用盐水(3 $\times$ 50mL)洗涤, 用MgSO₄干燥, 过滤, 并蒸发溶剂, 得到粗残余物。粗品以DCM $\rightarrow$ DCM/MeOH(5%)为洗脱剂用快速色谱法纯化。得到最终化合物(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯, 呈淡黄色泡沫(0.308g, 0.481mmol, 收率82%)。甲磺酸化中间体的HPLC: MS (ESI+) $m/z = 734 [M+H]^+$ 。所需化合物的HPLC纯度: 96%; MS (ESI+) $m/z = 614 [M+H]^+$ 。

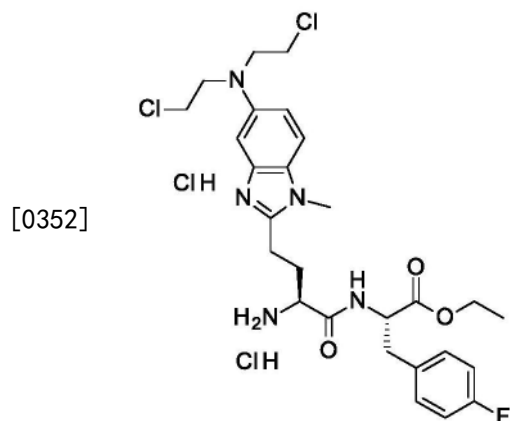
[0348] 步骤5: 向(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(308mg, 0.476mmol)的EtOH(15mL)溶液中加入二噁烷中的氯化氢(4M)(4.00mol/L, 1.79mL, 7.14mmol), 混合物在室温下搅拌过夜。蒸发溶剂, 得到粗产物, 将其在Et₂O中搅拌。过滤形成灰白色(off-white)固体, 用Et₂O(2 $\times$ 10mL)洗涤, 并用EtOAc(2mL)洗涤, 真空干燥, 得到最终产物(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸

盐(实施例化合物1),呈灰白色固体(0.170g,0.272mmol,收率:57%)。HPLC纯度:95%,MS (ESI+) $m/z=514[M+H]^+$ 。

[0349] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.86 (br s, 1H), 9.31 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 8.60 (d, $J=5.3\text{Hz}$, 3H), 7.75 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.15 (dd, $J=9.4, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.93 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.34-4.27 (m, 1H), 4.15-4.06 (m, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 4H), 3.78 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 4H), 3.43-3.30 (m, 2H), 2.41-2.25 (m, 2H), 1.81-1.71 (m, 1H), 1.64 (ddd, $J=13.7, 10.4, 5.1\text{Hz}$, 1H), 1.54 (ddd, $J=13.8, 9.2, 4.7\text{Hz}$, 1H), 1.18 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.92 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 0.88 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H)。

[0350] 实施例1也已根据对于实施例46所描述的方法合成。

[0351] 实施例2: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物2)



[0353] 使用实施例1中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0354] 步骤1:分离得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(5.14g,8.99mmol,收率86%),呈白色固体。HPLC纯度:99%;MS (ESI+) $m/z=572[M+H]^+$ 。

[0355] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6 , 存在旋转异构体) δ 8.44 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 8.37 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 8.15 (dd, $J=8.9, 2.2\text{Hz}$, 1H), 7.75 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.26 (dd, $J=8.4, 5.6\text{Hz}$, 2H), 7.10-7.01 (m, 3H), 4.51-4.44 (m, 1H), 4.10-4.04 (m, 1H), 4.02 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.06-2.92 (m, 2H), 2.92-2.83 (m, 2H), 2.13-2.02 (m, 2H), 1.37 (s, 8H, 主要旋转异构体), 1.21 (s, 1H, 次要旋转异构体), 1.08 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H)。

[0356] 步骤2:分离得到粗产物(2S)-2-[[(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(4.83g,0.00892mol,收率93%),呈浅黄色泡沫。粗品直接用于下一步。HPLC纯度:96%;MS (ESI+) $m/z=542[M+H]^+$ 。

[0357] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6 , 存在旋转异构体) δ 8.49 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.28 (dd, $J=8.5, 5.7\text{Hz}$, 2H), 7.14-7.03 (m, 4H), 6.69 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.53 (dd, $J=8.5, 2.1\text{Hz}$, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.49-4.41 (m, 1H), 4.07-3.98 (m, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.07-2.94 (m, 2H), 2.82-2.70 (m, 2H), 2.08-1.98 (m, 1H), 1.98-1.87 (m, 1H), 1.37 (s, 8H, 主要旋转异构体), 1.19 (s, 1H, 次要旋转异构体), 1.13-1.03 (m, 3H)。

[0358] 步骤3:分离得到所需产物(2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(3.00g,

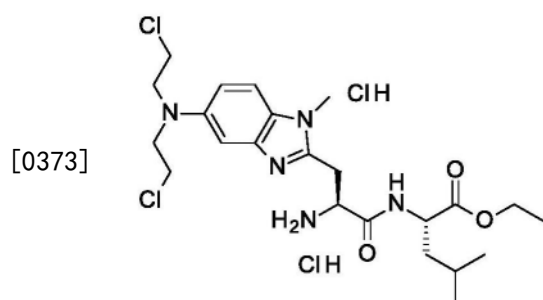
=564[M+H]⁺。

[0369] 步骤4:得到所需化合物(2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(836mg,收率65%),呈棕色油状。HPLC纯度:93%,MS (ESI+)m/z=600[M+H]⁺。甲磺酸化中间体的HPLC:MS (ESI+)m/z=720[M+H]⁺。

[0370] 步骤5:向(2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(纯度93%,216mg,0.334mmol)的EtOH(2mL)溶液中加入二噁烷中的氯化氢(4.00mol/L,0.836mL,3.34mmol),25℃下搅拌3h。蒸发并用制备色谱(酸性缓冲液)纯化得到粗品。将制备色谱过程中获得的级分保存在冰浴中,直至进行LC-MS分析。加入二噁烷中的HCl(4M,1mL),立即冻干样品,得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物3)(54mg,收率:28%),呈微灰粉色固体。HPLC纯度:98%,MS (ESI+)m/z=500[M+H]⁺。

[0371] ¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆) δ14.78(s,1H),9.07(d,J=7.3Hz,1H),8.67-8.50(m,3H),7.75(d,J=9.1Hz,1H),7.15(d,J=9.2Hz,1H),6.93(d,J=2.4Hz,1H),4.21(dd,J=7.3,5.5Hz,2H),4.18-4.07(m,2H),3.90(s,3H),3.83(t,J=6.7Hz,4H),3.78(t,J=6.2Hz,4H),3.33(dq,J=24.7,8.5Hz,2H),2.40-2.22(m,2H),2.14(ddt,J=14.0,12.5,6.9Hz,1H),1.19(t,J=7.1Hz,3H),0.97(dd,J=6.9,5.4Hz,6H)。

[0372] 实施例4:(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物4)



[0374] 使用实施例1中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0375] 步骤1:分离得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(1.36g,2.42mmol,收率89%),呈浅黄色泡沫。HPLC纯度:90%;MS (ESI+)m/z=506[M+H]⁺。

[0376] 步骤2:分离得到粗产物(2S)-2-[[(2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(1.47g,2.78mmol,收率100%),呈黄色油状,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%;MS (ESI+)m/z=476[M+H]⁺。

[0377] 步骤3:得到粗产物(2S)-2-[[(2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(1.50g,2.42mmol,收率86%),呈棕色固体。HPLC纯度:91%,MS (ESI+)m/z=564[M+H]⁺。

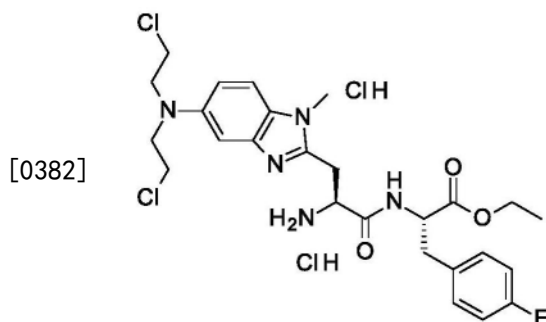
[0378] 步骤4:分离得到所需化合物(2S)-2-[[(2S)-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.550g,

0.870mmol, 收率33%), 呈黄色油状。HPLC纯度: 95%, MS (ESI+) $m/z = 600 [M+H]^+$ 。甲磺酸化中间体的HPLC: MS (ESI+) $m/z = 720 [M+H]^+$ 。

[0379] 步骤5: 向(2S)-2-[[(2S)-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(纯度95%, 200mg, 0.316mmol)的EtOH(15mL)溶液中加入二噁烷中的氯化氢(4M) (4.00mol/L, 1.19mL, 4.75mmol), 室温搅拌过夜。蒸发溶剂并用制备色谱纯化得到粗品(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物4) (0.112g, 0.189mmol, 收率: 60%), 呈白色固体。HPLC纯度: 100%, MS (ESI+) $m/z = 500 [M+H]^+$ 。

[0380] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.75 (br s, 1H), 9.29 (dd, $J = 7.8, 2.5\text{Hz}$, 1H), 8.86 (s, 3H), 7.78 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 7.18 (dd, $J = 9.4, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.91 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 4.49 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 1H), 4.34 (ddd, $J = 10.0, 7.5, 4.9\text{Hz}$, 1H), 4.06-4.01 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.90-3.74 (m, 9H), 3.65 (dd, $J = 15.4, 6.6\text{Hz}$, 1H), 1.72 (ddd, $J = 11.9, 7.9, 5.9\text{Hz}$, 1H), 1.56 (ddd, $J = 13.7, 10.0, 5.2\text{Hz}$, 1H), 1.50 (ddd, $J = 13.9, 9.0, 5.0\text{Hz}$, 1H), 1.15 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 0.88 (dd, $J = 16.2, 6.6\text{Hz}$, 6H)。

[0381] 实施例5: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物5)



[0383] 使用实施例1中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0384] 步骤1: 分离得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(1.36g, 2.19mmol, 收率81%), 呈浅黄色泡沫。HPLC纯度: 90%; MS (ESI+) $m/z = 558 [M+H]^+$ 。

[0385] 步骤2: 得到粗品(2S)-2-[[(2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(954mg, 收率73%), 呈灰白色固体, 不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度: 98%; MS (ESI+) $m/z = 528 [M+H]^+$ 。

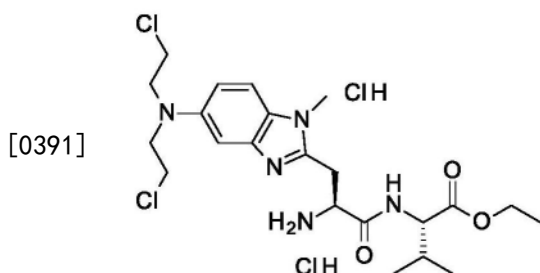
[0386] 步骤3: 得到粗产物(2S)-2-[[(2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(964mg, 收率85%), 呈棕色油状, 静置后固化。该化合物不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度: 96%, MS (ESI+) $m/z = 616 [M+H]^+$ 。

[0387] 步骤4: 分离得到(2S)-2-[[(2S)-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(0.635g, 0.924mmol, 收率69%), 呈黄色油状。HPLC纯度: 95%, MS (ESI+) $m/z = 652 [M+H]^+$ 。甲磺酸化中间体HPLC: MS (ESI+) $m/z = 772 [M+H]^+$ 。

[0388] 步骤5:用制备HPLC纯化粗产物(酸性条件;流速25mL/min,15min内梯度从12% B到42% B。收集UV-信号在239nm处的级分),将二噁烷中的4N HCl(1mL)加入到合并的级分中,将其冻干,得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸噁乙酯二盐酸盐(实施例化合物5)(78mg, 0.121mmol, 收率:13%),呈灰白色固体。HPLC纯度:97%, MS (ESI+) $m/z=552 [M+H]^+$ 。

[0389] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.66 (br s, 1H), 9.31 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 8.79 (s, 3H), 7.81-7.67 (m, 1H), 7.33-7.28 (m, 2H), 7.15 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.12-7.06 (m, 2H), 6.88 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.59 (p, $J=8.4, 7.7\text{Hz}$, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.01 (dddd, $J=13.6, 10.8, 7.2, 3.8\text{Hz}$, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.84 (ddt, $J=23.1, 12.2, 6.2\text{Hz}$, 4H), 3.77 (ddd, $J=9.3, 7.2, 4.8\text{Hz}$, 5H), 3.63 (s, 1H), 3.05-2.95 (m, 2H), 1.10 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H)。

[0390] 实施例6: (2S) -2-[[(2S) -2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物6)



[0392] 使用实施例1中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0393] 步骤1:分离得到所需产物(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(0.992g,1.82mmol,收率67%),呈浅黄色泡沫。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z=492$ $[M+H]^+$ 。

[0394] 步骤2:得到粗产物(2S)-2-[[[(2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(931mg, 收率98%), 呈棕色油状, 不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:98%; MS (ESI+) m/z = 462 $[M+H]^+$ 。

[0395] 步骤3:得到粗产物(2S)-2-[[(2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(0.848g,1.39mmol,收率70%),呈黄色油状,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%,MS (ESI+) m/z = 550 $[M+H]^+$ 。

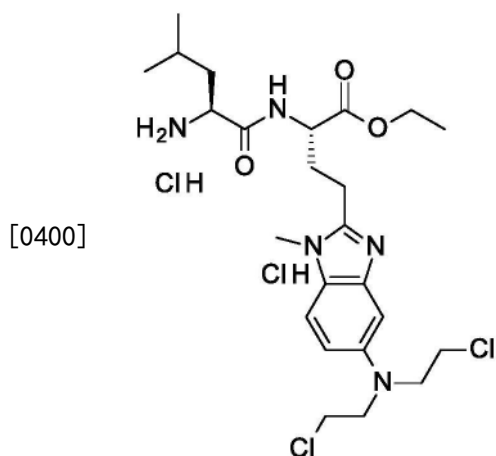
[0396] 步骤4:分离得到(2S)-2-[[[(2S)-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯(0.210g,0.340mmol,收率22%),呈黄色油状。HPLC纯度:95%,MS(ESI+)m/z=586[M+H]⁺。甲磺酸化中间体的HPLC:MS(ESI+)m/z=706[M+H]⁺。

[0397] 步骤5:用制备HPLC纯化粗产物(流速25mL/min,15min内梯度从8% B到38% B。收集UV-信号在239nm处的级分)得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物6)(85mg, 0.147mmol, 收率43%),呈灰白色固体。HPLC纯度:97%,MS (ESI+) m/z = 486 $[M+H]^+$ 。

[0398] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.77 (br s, 1H), 9.04 (d, J =7.9Hz, 1H), 8.85 (s, 3H), 7.78 (d, J =9.2Hz, 1H), 7.17 (dd, J =9.6, 2.3Hz, 1H), 6.90 (d, J =2.4Hz, 1H), 4.59 (s, 1H),

4.26 (dd, $J=7.9, 5.5\text{Hz}$, 1H), 4.07-3.99 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.89-3.75 (m, 9H), 3.59 (dd, $J=15.5, 6.8\text{Hz}$, 1H), 2.12-2.03 (m, 1H), 1.15 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.92 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 6H)。

[0399] 实施例7: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物7)



[0401] 步骤1:在室温下向(2S)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(中间体1)(1.00g, 3.26mmol)、(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酸水合物(0.814g, 3.26mmol)和1-甲基咪唑(0.546mL, 6.86mmol)的MeCN(30mL)溶液中加入[氯(二甲基氨基)亚甲基]-二甲基铵六氟磷酸盐(1.01g, 3.59mmol)。混合物在室温下搅拌1h。用柠檬酸溶液(10%水溶液)淬灭反应并蒸发挥发物。将粗品用水稀释并用EtOAc($\times 3$)萃取。有机相用 MgSO_4 干燥,过滤并减压蒸发。粗品用DCM $\rightarrow$ DCM/MeOH(10%)通过硅胶色谱纯化,得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(90%, 1.47g, 2.54mmol, 收率78%),呈浅黄色泡沫。HPLC纯度:90%;MS(ESI $^+$) $m/z=520$ [M+H] $^+$ 。

[0402] 步骤2:将(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(1.47g, 0.00283mol)溶解在EtOH(30mL)中并置于H-反应器中。添加Pd/C(10%, 0.151g, 0.000141mol)并将反应器密封。用氮气吹扫。在3bar下将 H_2 充入反应器中并将反应物在35 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌1.5h。用氮气吹扫排出氢气。用硅藻土过滤除去催化剂。蒸发溶剂,得到粗产物(2S)-4-[5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(1.20g, 2.21mmol, 收率78%),呈棕色泡沫,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%;MS(ESI $^+$) $m/z=490$ [M+H] $^+$ 。

[0403] 步骤3:将(2S)-4-[5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(1.26g, 2.45mmol, 纯度95%)溶解于乙酸(5mL)中。加入环氧乙烷(2.3M, 10.6mL),反应物在室温下搅拌24h。真空除去挥发物,将粗物质溶解在DCM中,并用饱和 NaHCO_3 水溶液洗涤。有机层用水和盐水洗涤,通过分相器筒(cartridge)并浓缩,得到(2S)-4-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(1.38g, 收率93%),呈棕色油状,静置后固化。产物不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:95%;MS(ESI $^+$) $m/z=578$ [M+H] $^+$ 。

[0404] 步骤4:向(2S)-4-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(1.38g, 2.27mmol, 纯度95%)和三

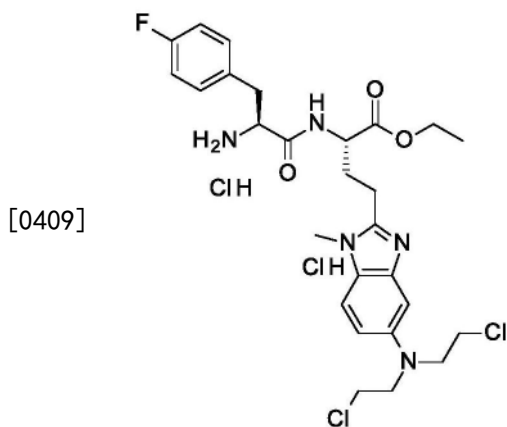
乙胺 (1.27mL, 9.08mmol) 的 DCM 溶液 (50mL) 中加入甲磺酰氯 (0.544mL, 7.03mmol), 混合物在室温下搅拌 10min。反应混合物用 NaHCO_3 (饱和): 水 (2:5) (100mL)、0.3M HCl (100mL) 和盐水 (100mL) 的混合物洗涤。有机相通过分相器筒并减压蒸发。粗品 (2S) - 4 - [5 - [双 (2 - 甲磺酰氧基乙基) 氨基] - 1 - 甲基 - 苯并咪唑 - 2 - 基] - 2 - [[(2S) - 2 - (叔丁氧基羰基氨基) - 4 - 甲基 - 戊酰基] 氨基] 丁酸乙酯不进行进一步纯化就用于下一步。

[0405] 将 (2S) - 4 - [5 - [双 (2 - 甲磺酰氧基乙基) 氨基] - 1 - 甲基 - 苯并咪唑 - 2 - 基] - 2 - [[(2S) - 2 - (叔丁氧基羰基氨基) - 4 - 甲基 - 戊酰基] 氨基] 丁酸乙酯 (1.82g, 1.64mmol, 纯度 66%) 溶解在 DMF (5mL) 中。加入 LiCl (1.04g, 24.6mmol), 反应物在 60°C 加热 1h。反应混合物用甲苯 (10mL) 和 EtOA (10mL) 的混合物稀释, 然后用盐水 (3 × 20mL) 洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 过滤并蒸发。用快速色谱 (乙酸乙酯在 DCM 中的梯度从 0 - 20%) 纯化得到粗品。合并含有所需化合物的级分并浓缩, 得到 (2S) - 4 - [5 - [双 (2 - 氯乙基) 氨基] - 1 - 甲基 - 苯并咪唑 - 2 - 基] - 2 - [[(2S) - 2 - (叔丁氧基羰基氨基) - 4 - 甲基 - 戊酰基] 氨基] 丁酸乙酯 (652mg, 收率 62%), 呈棕色油状。甲磺酸化中间体的 HPLC: MS (ESI+) $m/z = 734 [M+H]^+$ 。所需化合物的 HPLC 纯度: 96%; MS (ESI+) $m/z = 614 [M+H]^+$ 。

[0406] 步骤 5: 向 (2S) - 4 - [5 - [双 (2 - 氯乙基) 氨基] - 1 - 甲基 - 苯并咪唑 - 2 - 基] - 2 - [[(2S) - 2 - (叔丁氧基羰基氨基) - 4 - 甲基 - 戊酰基] 氨基] 丁酸乙酯 (205mg, 0.316mmol, 纯度 95%) 的 EtOH (2mL) 溶液中加入二噁烷中的氯化氢 (4.00mol/L, 1.19mL, 4.75mmol), 混合物在 25°C 下搅拌 3h。蒸发溶剂, 得到粗品, 并用制备色谱 (酸性缓冲液, 流速 25mL/min, 15min 内梯度从 7% B 到 37% B。基于 235nm 处的 UV - 信号收集级分) 纯化。将级分保存在冰浴中直至进行 LC-MS 分析。加入二噁烷中的 HCl (4M, 1mL), 立即冻干样品, 得到 (2S) - 2 - [[(2S) - 2 - 氨基 - 4 - 甲基 - 戊酰基] 氨基] - 4 - [5 - [双 (2 - 氯乙基) 氨基] - 1 - 甲基 - 苯并咪唑 - 2 - 基] 丁酸乙酯二盐酸盐 (实施例化合物 7) (50mg, 收率 26%), 呈黄色油状。HPLC 纯度: 95%, MS (ESI+) $m/z = 514 [M+H]^+$ 。

[0407] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.41 (s, 1H), 9.04 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 1H), 8.22 (d, $J = 5.3\text{Hz}$, 3H), 7.74 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 7.15 (dd, $J = 9.4, 2.3\text{Hz}$, 1H), 6.90 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 4.51 (ddd, $J = 9.6, 8.0, 4.9\text{Hz}$, 2H), 4.10 (d, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (t, $J = 6.7\text{Hz}$, 4H), 3.78 (t, $J = 6.9\text{Hz}$, 4H), 3.18 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 2.42 - 2.32 (m, 1H), 2.19 - 2.09 (m, 1H), 1.70 (dp, $J = 13.4, 6.8\text{Hz}$, 1H), 1.61 (dt, $J = 13.9, 7.0\text{Hz}$, 1H), 1.55 (dt, $J = 14.1, 7.5\text{Hz}$, 1H), 1.19 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 0.92 (dd, $J = 16.4, 6.5\text{Hz}$, 6H)。

[0408] 实施例 8: (2S) - 2 - [[(2S) - 2 - 氨基 - 3 - (4 - 氟苯基) 丙酰基] 氨基] - 4 - [5 - [双 (2 - 氯乙基) 氨基] - 1 - 甲基 - 苯并咪唑 - 2 - 基] 丁酸乙酯二盐酸盐 (实施例化合物 8)



[0410] 使用实施例7中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0411] 步骤1:分离得到(2S)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(1.87g,2.94mmol,收率90%),呈浅黄色泡沫。HPLC纯度:90%;MS(ESI+)m/z=572[M+H]⁺。

[0412] 步骤2:得到粗品(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]丁酸乙酯(1.78g,收率90%),呈浅黄色固体,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%;MS(ESI+)m/z=542[M+H]⁺。

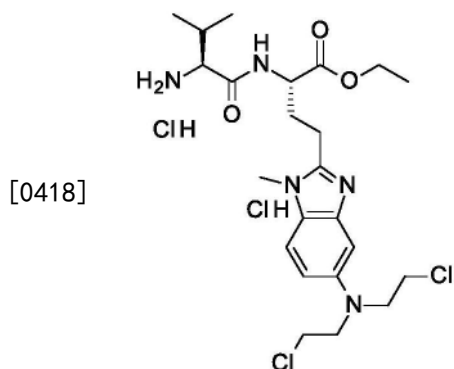
[0413] 步骤3:得到粗产物(2S)-4-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]丁酸乙酯(1.74g,收率86%),呈浅棕色固体。该化合物不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:92%,MS(ESI+)m/z=630[M+H]⁺。

[0414] 步骤4:分离得到(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]丁酸乙酯(628mg,收率37%),呈棕色油状。HPLC纯度:92%,MS(ESI+)m/z=666[M+H]⁺。甲磺酸化中间体HPLC:MS(ESI+)m/z=786[M+H]⁺。

[0415] 步骤5:用制备HPLC纯化粗产物(酸性条件,流速25mL/min,15min内梯度从11% B到40% B。收集UV-信号在235nm处的级分)。向合并的级分中加入二噁烷中的HCl(4M,1mL),立即冻干样品,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物8)(35mg,收率23%),呈灰白色固体。HPLC纯度:95%,MS(ESI+)m/z=566[M+H]⁺。

[0416] ¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆) δ14.61(s,1H),9.57(d,J=7.6Hz,1H),8.40(d,J=5.5Hz,3H),7.75(d,J=9.2Hz,1H),7.45-7.36(m,2H),7.15(dtd,J=9.4,7.4,6.9,2.3Hz,3H),6.91(d,J=2.4Hz,1H),4.44(ddd,J=9.5,7.6,4.3Hz,1H),4.22(d,J=6.8Hz,1H),4.08(q,J=7.1Hz,2H),3.95(s,3H),3.83(t,J=6.8Hz,4H),3.78(t,J=6.1Hz,4H),3.36-3.25(m,2H),3.19(dd,J=14.0,5.7Hz,1H),2.98(dd,J=14.0,8.0Hz,1H),2.40-2.31(m,1H),2.17(dtd,J=14.6,9.5,5.5Hz,1H),1.18(t,J=7.1Hz,3H)。

[0417] 实施例9:(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物9)



[0419] 使用实施例7中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0420] 步骤1:分离得到(2S)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(0.757g,1.35mmol,收率41%),呈浅黄色泡

沫。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z=506$ $[M+H]^+$ 。

[0421] 步骤2:得到粗产物(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]丁酸乙酯(0.642g,1.28mmol,收率:86%),呈浅棕色固体,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:95%;MS (ESI+) $m/z=476$ $[M+H]^+$ 。

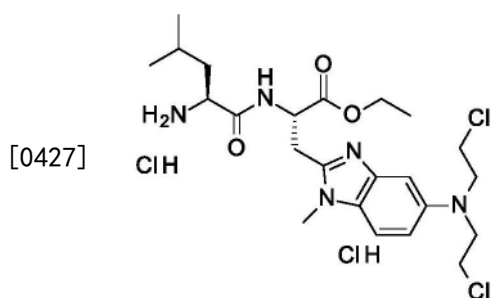
[0422] 步骤3:得到粗产物(2S)-4-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]丁酸乙酯(0.685g,1.09mmol,收率85%),呈棕色油状,静置后固化。该化合物不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%,MS (ESI+) $m/z=564$ $[M+H]^+$ 。

[0423] 步骤4:分离得到(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]丁酸乙酯(0.402g,0.623mmol,收率58%),呈浅棕色油状。HPLC纯度:93%,MS (ESI+) $m/z=600$ $[M+H]^+$ 。甲磺酸化中间体HPLC:MS (ESI+) $m/z=720$ $[M+H]^+$ 。

[0424] 步骤5:蒸发粗产物并用制备HPLC纯化(酸性缓冲液,流速25mL/min,15min内梯度从7% B到36% B。收集UV-信号在235nm处的级分)。将制备中获得的级分保存在冰浴中,加入二噁烷中的HCl (4M,1mL),立即冻干样品,得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物9)(12mg,收率6.3%),呈灰白色固体。HPLC纯度:95%,MS (ESI+) $m/z=500$ $[M+H]^+$ 。

[0425] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.70 (s, 1H), 9.37 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 8.44 (d, $J=5.7\text{Hz}$, 3H), 7.75 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.15 (dd, $J=9.3, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.91 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.46 (ddd, $J=10.0, 7.6, 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.10 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 4H), 3.80-3.77 (m, 4H), 3.74-3.63 (m, 1H), 3.52-3.41 (m, 1H), 3.31 (ddd, $J=15.9, 9.6, 6.8\text{Hz}$, 1H), 2.37 (dt, $J=13.3, 4.9\text{Hz}$, 1H), 2.20-2.10 (m, 2H), 1.18 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 1.04-0.94 (m, 6H)。

[0426] 实施例10: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物10)



[0428] 使用实施例7中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0429] 步骤1:分离得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸乙酯(1.68g,2.99mmol,收率87%),呈浅黄色泡沫。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z=506$ $[M+H]^+$ 。

[0430] 步骤2:得到粗产物(2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]丙酸乙酯(1.50g,2.90mmol,收率87%),呈棕色泡沫,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:92%;MS (ESI+) $m/z=476$ $[M+H]^+$ 。

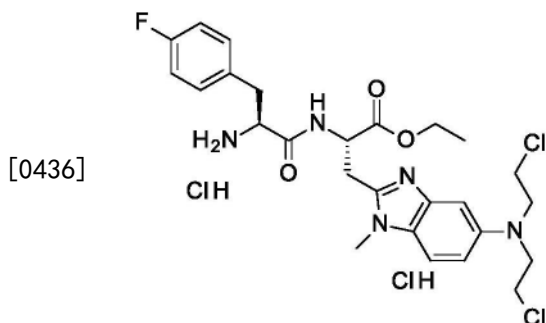
[0431] 步骤3:得到粗产物(2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]丙酸乙酯(1.20g,1.60mmol,收率52%),呈棕色固体。HPLC纯度:75%,MS (ESI+) $m/z=564[M+H]^+$ 。

[0432] 步骤4:分离得到(2S)-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-甲基-戊酰基]氨基]丙酸乙酯(0.430g,0.680mmol,收率32%),呈黄色油状。HPLC纯度:95%,MS (ESI+) $m/z=600[M+H]^+$ 。甲磺酸化中间体HPLC:MS (ESI+) $m/z=720[M+H]^+$ 。

[0433] 步骤5:用制备HPLC纯化粗产物(酸性条件,流速25mL/min,15min内梯度从6% B至36% B。收集UV-信号在237nm处的级分)。向合并的级分中加入二噁烷中的4N HCl(1mL),将其冻干,得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物10)(0.102g,0.169mmol,收率53%),呈白色固体。HPLC纯度:95%,MS (ESI+) $m/z=500[M+H]^+$ 。

[0434] 1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.85 (br s, 1H), 9.56 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 8.40 (s, 3H), 7.76 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 5.02 (q, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.12 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.87-3.73 (m, 9H), 3.67 (dd, $J=15.8, 6.1$ Hz, 1H), 3.58 (dd, $J=15.6, 8.2$ Hz, 1H), 1.64 (dt, $J=13.4, 6.7$ Hz, 1H), 1.52 (hept, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.14 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.87 (dd, $J=9.5, 6.5$ Hz, 6H)。

[0435] 实施例11:(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物11)



[0437] 使用实施例7中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0438] 步骤1:分离得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸乙酯(0.794g,1.14mmol,收率29%),呈浅黄色固体。HPLC纯度:80%;MS (ESI+) $m/z=558[M+H]^+$ 。

[0439] 步骤2:得到粗品(2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]丙酸乙酯(772mg,收率93%),呈浅棕色固体,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:91%;MS (ESI+) $m/z=528[M+H]^+$ 。

[0440] 步骤3:得到粗产物(2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]丙酸乙酯(817mg,收率91%),呈棕色油状,静置后固化。该化合物不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:95%,MS (ESI+) $m/z=616[M+H]^+$ 。

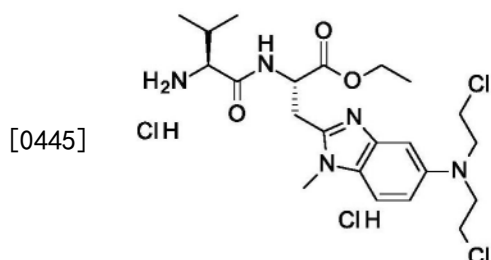
[0441] 步骤4:分离得到(2S)-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]丙酸乙酯(449mg,收率51%),

呈棕色油状。HPLC纯度:86%,MS (ESI+) $m/z=652[M+H]^+$ 。甲磺酸化中间体HPLC:MS (ESI+) $m/z=772[M+H]^+$ 。

[0442] 步骤5:用制备色谱纯化粗产物(酸性缓冲液,流速25mL/min,15min内梯度从10% B至40% B。收集UV-信号在237nm处的级分)。向合并的级分中加入二噁烷中的HCl (4M, 1mL),立即冻干样品,得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物11) (12mg,收率15%),呈灰白色固体。HPLC纯度:96%,MS (ESI+) $m/z=552[M+H]^+$ 。

[0443] 1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.73 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 8.32 (s, 3H), 7.77-7.67 (m, 1H), 7.33 (dt, $J=9.6, 4.9$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J=8.7$ Hz, 3H), 6.94 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 4.98 (q, $J=7.5$ Hz, 1H), 4.12 (dtt, $J=10.8, 6.7, 3.7$ Hz, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (t, $J=6.8$ Hz, 4H), 3.77 (t, $J=6.4$ Hz, 4H), 3.14 (dd, $J=14.1, 6.0$ Hz, 1H), 2.97 (dd, $J=14.1, 7.8$ Hz, 1H), 1.13 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.87-0.81 (m, 2H)。

[0444] 实施例12: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物12)



[0446] 使用实施例7中描述的方法分5个步骤制备标题化合物。

[0447] 步骤1:分离得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸乙酯(0.428g, 0.784mmol, 收率23%),呈黄色固体。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z=492[M+H]^+$ 。

[0448] 步骤2:得到粗品(2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]丙酸乙酯(393mg, 收率93%),呈黄色固体,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:95%;MS (ESI+) $m/z=462[M+H]^+$ 。

[0449] 步骤3:得到粗产物(2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]丙酸乙酯(0.305g, 0.499mmol, 收率58%),呈棕色固体。该化合物不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%,MS (ESI+) $m/z=550[M+H]^+$ 。

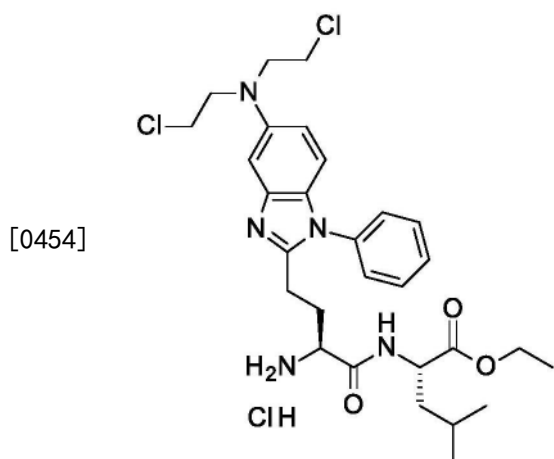
[0450] 步骤4:分离得到(2S)-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酰基]氨基]丙酸乙酯(0.168g, 0.272mmol, 收率37%),呈黄色油状。HPLC纯度:95%,MS (ESI+) $m/z=586[M+H]^+$ 。甲磺酸化中间体HPLC:MS (ESI+) $m/z=706[M+H]^+$ 。

[0451] 步骤5:蒸发粗产物并用制备HPLC纯化粗产物(酸性条件,流速25mL/min,15min内梯度从5% B至34% B。收集UV-信号在238nm处的级分)。向合并的级分中加入二噁烷中的HCl (4M, 1mL),立即冻干溶液,得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-甲基-丁酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物12)

(45mg, 0.0724mmol, 收率27%)。HPLC纯度:90%, MS (ESI+) $m/z = 486 [M+H]^+$ 。

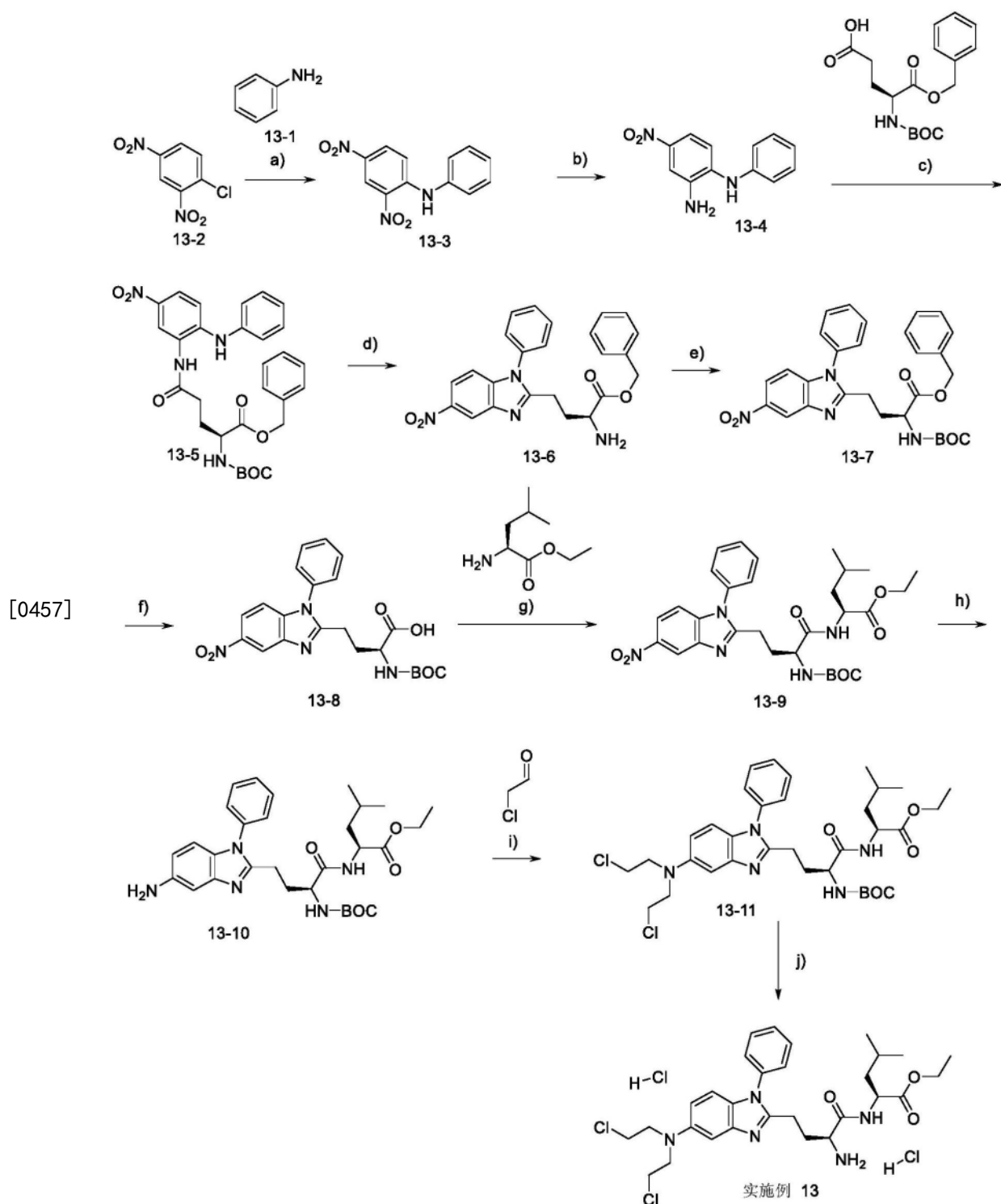
[0452] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 13.82 (br s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.49-7.30 (m, 3H), 6.85 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 6.25 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 1H), 6.05 (d, $J=2.5\text{Hz}$, 1H), 4.15 (q, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 3.22 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.96-2.86 (m, 8H), 2.80 (dt, $J=9.3, 4.1\text{Hz}$, 2H), 2.66 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 1.22 (dq, $J=13.4, 6.7\text{Hz}$, 1H), 0.23 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.11-0.00 (m, 6H)。

[0453] 实施例13: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐 (实施例化合物13)



[0455] 实施例13根据如下的路线4合成:

[0456] 路线4: a) TEA, MeOH, 60°C; b) 连二亚硫酸钠, EtOH, 80°C; c) HATU, TEA, DMF, rt; d) 12M HCl, EtOH, 70°C; e) BOC2O, TEA, THF, rt; f) LiOH-H₂O, 1,4-二噁烷, 水, 50°C; g) HATU, TEA, DMF, rt; h) Pd/C 10%, H₂气氛, EtOH, rt; i) NaBH₃CN, TFA, EtOH, rt; j) TFA, DCM然后12M HCl, 室温。



[0458] 2,4-二硝基-N-苯基苯胺(化合物13-3)

[0459] 将TEA(6.19mL,44.4mmol)加至1-氯-2,4-二硝基苯(3.00g,14.8mmol,化合物13-2)和苯胺(1.35mL,14.8mmol,化合物13-1)的MeOH(150mL)溶液中。反应物在60℃下搅拌过夜。停止加热反应物,形成了浅砖红色固体。将固体过滤并用冰冷的MeOH洗涤,得到标题化合物(3.26g,12.54mmol,收率85%)。HPLC纯度:95%,MS(ESI+)m/z=260[M+H]⁺。

[0460] 4-硝基-N1-苯基-苯-1,2-二胺(化合物13-4)

[0461] 在80℃下将连二亚硫酸钠(6.57g,37.7mmol)加至EtOH(120mL)和水(30mL)的混合

溶剂中的2,4-二硝基-N-苯基苯胺(3.26g,12.6mmol)。搅拌反应物1h。蒸发有机溶剂,加入更多的水。用DCM萃取化合物。弃去水相。DCM相含有滤出的固体。滤液用盐水洗涤,用MgSO₄干燥,过滤并蒸发溶剂,得到标题化合物(1.25g,5.45mmol,收率43%)。HPLC纯度:95%,MS (ESI+) $m/z=230 [M+H]^+$ 。

[0462] (2S)-5-(2-苯胺基-5-硝基-苯胺基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-氧代-戊酸苄酯(化合物13-5)

[0463] 将HATU(2.28g,6.00mmol)加至DMF(15mL)中的(4S)-5-苄氧基-4-(叔丁氧基羰基氨基)-5-氧代-戊酸(1.93g,5.73mmol)和TEA(2.28mL,16.4mmol)中。将4-硝基-N1-苯基-苯-1,2-二胺(1.25g,5.45mmol)加至该混合物中。反应物搅拌过夜。加入甲苯(70mL),用水(100mL)和盐水(60mL)洗涤有机相。有机相用MgSO₄干燥,过滤并蒸发溶剂,得到标题化合物(2.90g,5.45mmol,收率97%)。HPLC纯度:88%,MS (ESI+) $m/z=449 [M+H-BOC]^+$ 。该物质照此用于下一步。

[0464] (2S)-2-氨基-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸苄酯(化合物13-6)

[0465] 向(2S)-5-(2-苯胺基-5-硝基-苯胺基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-氧代-戊酸苄酯(2.99g,5.45mmol)的EtOH(37mL)溶液中加入12M HCl(8.18mL,98.1mmol),混合物在70℃下搅拌40分钟。粗品用水(200mL)稀释并用4M NaOH小心地中和至pH 7。产物用乙酸乙酯(3×100mL)萃取,有机相用MgSO₄干燥,过滤并蒸发溶剂,得到标题化合物(2.35g,5.45mol,定量收率)。HPLC纯度:65%,MS (ESI+) $m/z=431 [M+H]^+$ 。该物质照此用于下一步。

[0466] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸苄酯(化合物13-7)

[0467] 向THF(25mL)中的(2S)-2-氨基-4-(6-硝基-3-苯基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酸苄酯(2.35g,0.00545mol)加入TEA(2.28mL,0.0163mol)和叔丁氧基羰基碳酸叔丁酯(1.43g,6.54mmol)。混合物在室温下搅拌过周末。加入咪唑(0.111g,1.63mol)以除去过量的BOC₂O,反应物进一步搅拌1h。蒸发溶剂,残余物用乙酸乙酯溶解。有机相用5%柠檬酸洗涤,用MgSO₄干燥,过滤并蒸发溶剂。粗品在硅胶上进行快速色谱纯化,用石油醚(p-ether)中20至30%乙酸乙酯进行梯度洗脱,得到标题化合物(2.21g,4.17mmol,收率76%)。HPLC纯度77%,MS (ESI+) $m/z=531 [M+H]^+$ 。

[0468] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸(化合物13-8)

[0469] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸苄酯(2.21g,4.17mmol)的含水(10mL)的1,4-二噁烷(30mL)溶液中加入LiOH·H₂O(0.699g,16.7mmol)。反应物在50℃下搅拌40分钟,室温下用乙酸乙酯稀释并用5%柠檬酸洗涤。有机相用MgSO₄干燥,过滤并蒸发溶剂,得到标题化合物(1.83g,0.00415mol,定量收率)。HPLC纯度80%,MS (ESI+) $m/z=441 [M+H]^+$ 。该物质照此用于下一步。

[0470] (2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物13-9)

[0471] 将HATU(1.74g,0.00457mol)加至DMF(30mL)中的(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸(1.83g,0.00415mol)、(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酸乙酯盐酸盐(0.894g,0.00457mol)和三乙胺(2.32mL,0.0166mol)的混合物中。反应物搅拌1小

时。加入甲苯,混合物用5%柠檬酸和盐水洗涤。有机相用 MgSO_4 干燥,过滤并蒸发溶剂,得到标题化合物(1.82g,0.00312mol,收率75%)。HPLC纯度:95%,MS (ESI+) $m/z=582$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。该物质照此用于下一步。

[0472] (2S)-2-[[(2S)-4-(5-氨基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物13-10)

[0473] 将乙醇(90mL)中的(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(1.81g,0.00311mol)和Pd/C 10% (0.331g,0.00311mol)的混合物在 H_2 气氛下搅拌4小时。过滤出固体物质并蒸发溶剂,得到标题化合物(1.71g,0.00311mol,定量收率)。该物质照此用于下一步。HPLC纯度:93%,MS (ESI+) $m/z=552$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0474] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.26 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.60 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 7.55-7.49 (m, 1H), 7.43 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 6.92 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 6.80-6.75 (m, 2H), 6.52 (dd, $J=8.5, 2.1\text{Hz}$, 1H), 4.81 (s, 2H), 4.24 (ddd, $J=9.9, 7.6, 5.0\text{Hz}$, 1H), 4.09-3.96 (m, 3H), 2.77-2.64 (m, 2H), 2.20-2.09 (m, 1H), 1.99-1.87 (m, 1H), 1.70-1.44 (m, 3H), 1.33 (s, 9H), 1.14 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.89 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 0.82 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H)。

[0475] (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物13-11)

[0476] 将 NaBH_3CN (0.137g, 0.00218mol) 加至室温下搅拌的EtOH (6mL) 中的(2S)-2-[[(2S)-4-(5-氨基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.300g, 0.000544mol)、2-氯乙醛(50.0%水溶液, 0.344mL, 0.00272mol)和TFA (0.242mL, 3.26mmol)的混合物中。20分钟后加入额外的2-氯乙醛(50%水溶液, 0.344mL, 2.72mmol)和 NaBH_3CN (0.137g, 2.18mmol)。最后, 10分钟后加入额外的2-氯乙醛(50%水溶液, 0.344mL, 2.72mmol)、 NaBH_3CN (0.137g, 2.18mmol)和TFA (0.242mL, 3.26mmol)。向混合物中加入乙酸乙酯, 有机相用饱和碳酸钠和盐水洗涤。在硅胶上用快速色谱纯化化合物两次, 第一次用DCM中的2% EtOH洗脱, 并用石油醚中的20至30%乙酸乙酯洗脱, 得到标题化合物(0.158g, 0.00234mol, 收率43%)。HPLC纯度:97%, MS (ESI+) $m/z=676$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

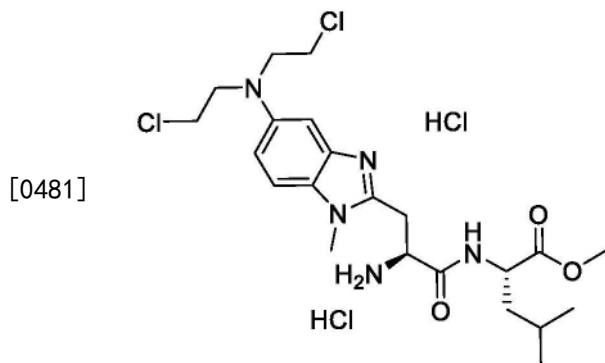
[0477] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯盐酸盐(实施例化合物13)

[0478] 用DCM (2mL) 中的TFA (2mL) 处理(2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(190mg, 0.281mmol)。蒸发溶剂, 粗品残余物用制备HPLC纯化, 在配备有UV检测器的Gilson系统上进行多次进样, 使用ACE 5C8 Prep, 100×21.2mm色谱柱(0.1% TFA水溶液), 梯度25-50%乙腈。合并纯级分, 得到750mL溶液。向冰冷的溶液中加入12M HCl (3mL), 得到0.05M HCl溶液。冻干除去溶剂, 得到标题化合物(实施例化合物13) (92mg, 0.159mmol, 收率53%)。MS (ESI+) $m/z=576$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0479] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.04 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 8.54-8.42 (m, 3H), 7.73-7.62 (m, 4H), 7.16-7.01 (m, 3H), 4.28-4.20 (m, 2H), 4.06-3.97 (m, 3H), 3.88-3.73 (m, 8H), 3.14 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.41-2.24 (m, 2H), 1.76-1.65 (m, 1H), 1.61-1.46 (m, 2H), 1.13 (t, $J=$

7.1Hz, 3H), 0.89 (dd, $J=18.0, 6.5$ Hz, 6H)。

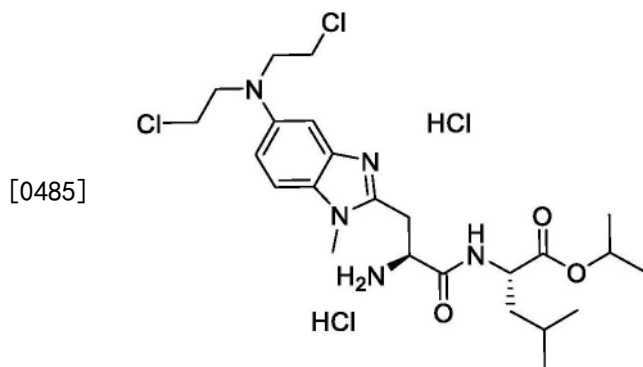
[0480] 实施例14: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯二盐酸盐(实施例化合物14)



[0482] 将(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物4) (11mg, 0.0182mmol) 溶解在 MeOH(2mL) 中。加入一滴HCl, 反应混合物在70℃下搅拌过夜。用制备色谱(酸性缓冲液; 流速 25mL/min, 15min内梯度从10%B至40%B。收集UV-信号在238nm处的级分) 纯化样品。将二噁烷中的HCl(4M, 0.01mL) 加至合并的级分中, 样品立即冻干, 得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯二盐酸盐(实施例化合物14) (3.5mg, 0.00619mmol, 收率34%), 呈黄色固体。HPLC纯度: 99%; MS (ESI+) $m/z=486$ [M+H]⁺。

[0483] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 14.8 (s, 1H), 9.09 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.59 (s, 3H), 7.62 (s, 1H), 6.89 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.37 (dt, $J=31.5, 7.6$ Hz, 2H), 3.93-3.70 (m, 11H), 3.54 (s, 3H), 2.51 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 1.63 (dq, $J=12.5, 6.3$ Hz, 1H), 1.56-1.45 (m, 2H), 1.31-1.17 (m, 1H), 0.85 (dd, $J=13.8, 6.5$ Hz, 6H)。

[0484] 实施例15: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸异丙酯二盐酸盐(实施例化合物15)



[0486] 将(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物4) (10mg, 0.0166mmol) 溶解在异丙醇(2mL) 中。加入一滴HCl, 反应混合物在70℃下搅拌过夜。用制备色谱(酸性缓冲液; 流速 25mL/min, 15min内梯度从11% B至42% B。收集UV-信号在239nm处的级分) 纯化样品。将二噁烷中的HCl(4M, 0.01mL) 加至合并的级分中, 样品立即冻干, 得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸异丙酯二

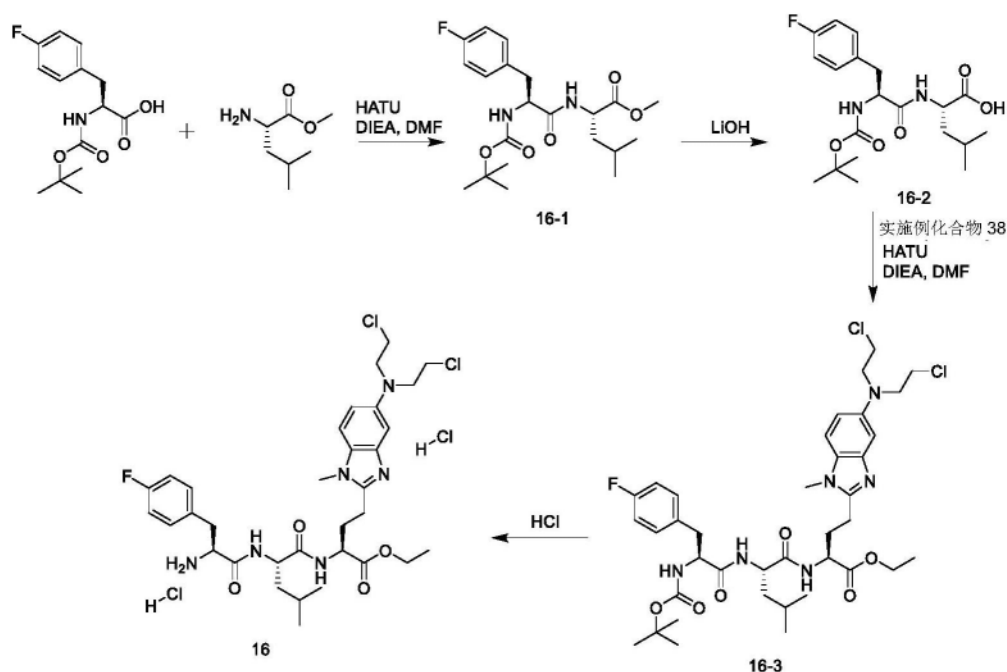
盐酸盐(实施例化合物15) (4.8mg, 0.00793mmol, 收率48%), 呈黄色固体。HPLC纯度: 97%; MS (ESI+) $m/z = 514 [M+H]^+$ 。

[0487] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.60 (s, 1H), 9.14 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 8.68 (s, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 4.83 (h, $J = 6.3\text{Hz}$, 1H), 4.44 (t, $J = 6.9\text{Hz}$, 1H), 4.28 (ddd, $J = 9.8, 7.6, 5.2\text{Hz}$, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.81 (dt, $J = 12.4, 6.9\text{Hz}$, 4H), 3.75 (dd, $J = 9.9, 4.8\text{Hz}$, 4H), 3.58 (s, 2H), 1.68 (ddt, $J = 15.3, 12.9, 6.6\text{Hz}$, 1H), 1.50 (qdd, $J = 13.8, 9.3, 5.3\text{Hz}$, 2H), 1.14 (dd, $J = 36.1, 6.3\text{Hz}$, 6H), 0.86 (dd, $J = 17.3, 6.6\text{Hz}$, 6H)。

[0488] 实施例16: (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物16)

[0489] 根据以下路线5合成实施例16:

[0490] 路线5



[0492] (2S)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯(化合物16-1)

[0493] 在室温下向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酸(0.700g, 0.00247mol)的DMF(5.0mL)溶液中加入HATU(0.940g, 0.00247mol)和DIEA(0.423mL, 0.00247mol), 然后加入(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酸甲酯(0.395g, 0.00272mol)。所得混合物在室温下搅拌过夜。反应混合物用 H_2O 稀释并用DCM萃取。将有机层干燥(Na_2SO_4)并在20℃以下真空浓缩。粗品用BUCHI自动快速系统(10g色谱柱, EtOAc/石油醚)纯化, 得到(2S)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(0.420g, 1.02mmol, 收率41%), 呈白色固体。HPLC纯度: 75%; MS (ESI+) $m/z = 411 [M+H]^+$ 。

[0494] (2S)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(化合物16-2)

[0495] 向(2S)-2-[[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(420mg, 1.02mmol)的THF(1.5mL)溶液中加入 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (47.2mg, 1.13mmol)的水

(0.5mL) 溶液。混合物在室温下搅拌1h。沉淀的固体经过滤和干燥,得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(350mg,0.883mmol,收率86%),呈白色固体。HPLC纯度:85%;MS(ESI+)m/z=341[M+H-tBu]⁺。

[0496] (2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(化合物16-3)

[0497] 室温下向(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(95.0mg,0.240mmol)的DMF(3.0mL)溶液中加入HATU(91.1mg,0.240mmol)、DIEA(0.0820mL,0.479mmol)和(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物38)(125mg,0.264mmol)。所得混合物在室温下搅拌过夜。反应混合物用H₂O稀释,并用DCM经相分离器萃取。将有机层干燥(Na₂SO₄),并在20℃以下真空浓缩。粗品用制备HPLC(酸性缓冲液;流速25mL/min,15min内梯度从31% B至57% B。收集UV-信号在235nm处的级分)纯化,得到(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(80.0mg,0.103mmol,收率:43%),呈灰白色固体。HPLC纯度:100%;MS(ESI+)m/z=779[M+H]⁺。

[0498] (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物16)

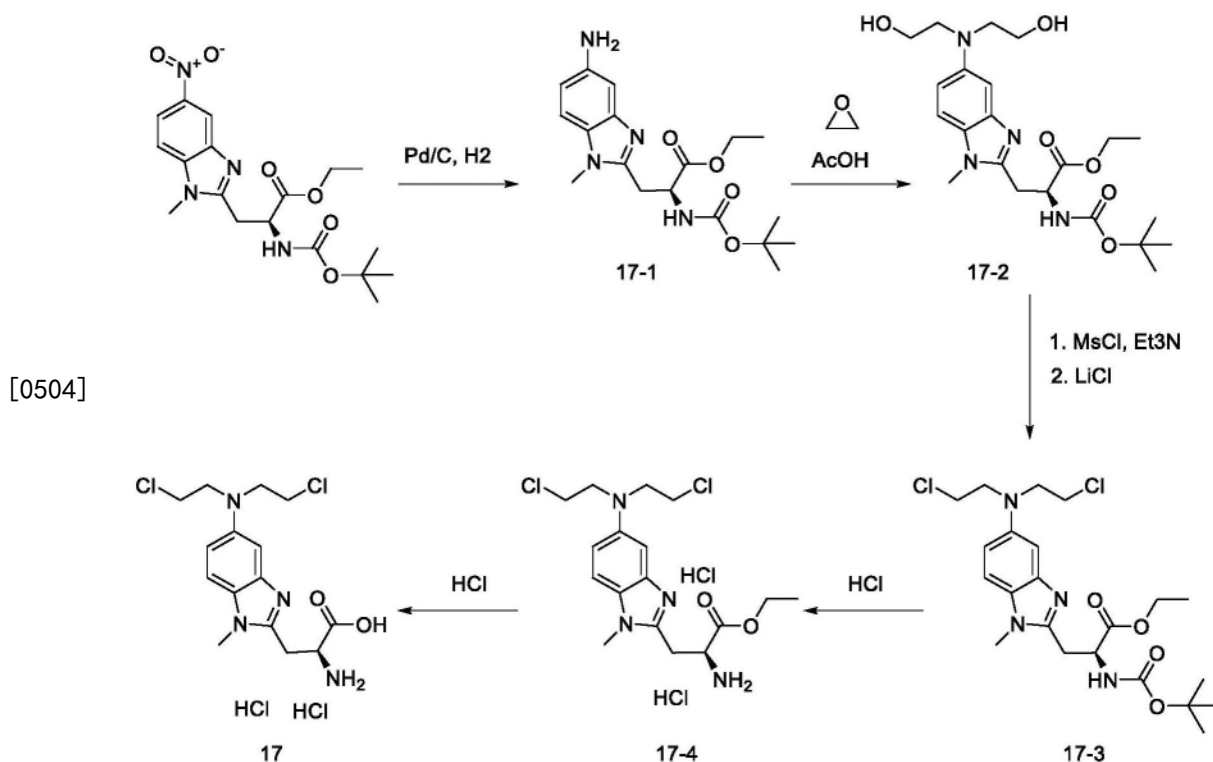
[0499] 向EtOH(1mL)中的(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(80.0mg,0.103mmol)中加入二噁烷中的HCl(4.00mol/L,0.128mL,0.513mmol),反应混合物搅拌过夜。反应完成后,在约15℃下蒸发溶剂,并立即送去进行制备HPLC(酸性缓冲液;流速25mL/min,15min内梯度从12% B至44% B。收集UV-信号在235nm处的级分)纯化。将所有收集的纯HPLC级分保存在Mivacuum上以蒸发乙腈,并将二噁烷中的HCl(4M,0.01mL)加至合并的所得级分中。立即将混合物置于冷冻干燥机的干冰冷浴中冷冻,得到(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物16)(6.00mg,0.00797mmol,收率8%),呈白色粉末。HPLC纯度:95%;MS(ESI+)m/z=679[M+H]⁺。

[0500] ¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆) δ14.4(br s,1H),8.80-8.71(m,2H),8.24-8.01(m,3H),7.36-7.25(m,2H),7.18-7.08(m,2H),6.97-6.82(m,1H),4.53-4.32(m,2H),4.19-3.99(m,3H),3.90-3.67(m,12H),3.09(m,4H),2.88(dd,J=14.2,8.3Hz,1H),2.38-2.26(m,1H),2.21-2.09(m,1H),1.67(dq,J=13.5,6.6Hz,1H),1.55-1.43(m,2H),1.17(t,J=7.1Hz,3H),0.93(d,J=6.6Hz,3H),0.89(d,J=6.6Hz,3H)。

[0501] 实施例17:(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸二盐酸盐(实施例化合物17)

[0502] 根据以下路线6合成实施例17:

[0503] 路线6



[0505] (2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯(化合物17-1)

[0506] 将(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丙酸乙酯(路线1)(573mg, 1.42mmol)溶解在EtOH(10mL)中并置于H-反应器中。加入10% Pd/C(75.4mg)并将反应器密封。用氮气吹扫。在3bar下将H₂充入反应器中并将反应物在35℃下搅拌3h。用氮气吹扫排出氢气。用硅藻土过滤除去催化剂。蒸发溶剂,得到粗品(2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯(421mg, 1.13mmol, 收率74%),呈黄色固体,不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%;MS(ESI+)m/z=363[M+H]⁺。

[0507] (2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯(化合物17-2)

[0508] 将(2S)-3-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯(421mg, 1.13mmol)溶解在乙酸(5mL)中。加入环氧乙烷(2.3M, 4.55mL),反应物在室温下搅拌24小时。蒸发溶剂,粗物质溶解在DCM中,用饱和NaHCO₃水溶液洗涤。有机层用水和盐水洗涤,并通过分相器。物质经浓缩得到(2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯(0.421g, 0.888mmol, 收率85%),呈棕色油状,其纯度足以用于下一步。HPLC纯度:95%;MS(ESI+)m/z=451[M+H]⁺。

[0509] (2S)-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯(化合物17-3)

[0510] 向(2S)-3-[5-[双(2-羟乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯(421g, 0.888mmol, 纯度95%)和三乙胺(0.495mL, 3.55mmol)的DCM(10mL)溶液中加入甲磺酰氯(0.213mL, 2.75mmol),反应混合物在室温下搅拌20min。反应混合物用NaHCO₃(饱和):水(2:5)(50mL)、0.3M HCl(50mL)和盐水(50mL)的混合物洗涤。有机相通过

分相器,并减压蒸发。不进行进一步纯化立即将粗品 (2S) -3-[5-[双(2-甲磺酰氧基乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯用于下一步。

[0511] 将 (2S) -3-[5-[双(2-甲磺酰氧基乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯 (521mg, 0.79mmol, 纯度92%) 溶解于DMF (5mL)。加入LiCl (0.502g, 11.9mmol), 反应物在60℃加热2h。反应混合物用甲苯 (10mL) 和EtOAc (10mL) 的混合物稀释, 然后用盐水 (3×20mL) 洗涤, 用MgSO₄干燥, 过滤并蒸发。所得粗品用DCM中乙酸乙酯梯度0-20%通过快速色谱纯化。合并并浓缩含有所需化合物的级分, 得到 (2S) -3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯 (375mg, 0.692mmol, 收率88%), 呈棕色油状。HPLC纯度: 90%; MS (ESI+) m/z = 487 [M+H]⁺。HPLC纯度 (甲磺酸化中间体): 95%; MS (ESI+) m/z = 607 [M+H]⁺。

[0512] (2S) -2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐 (化合物17-4)

[0513] 向 (2S) -3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸乙酯 (375mg, 0.692mmol, 纯度90%) 的EtOH (5mL) 溶液中加入二噁烷中的氯化氢 (4.00mol/L, 1.73mL, 6.92mmol), 在25℃下搅拌3h。减压蒸馏溶剂, 得到 (2S) -2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐 (0.307g, 0.660mmol, 收率95%), 呈灰白色固体。HPLC纯度: 99%; MS (ESI+) m/z = 387 [M+H]⁺。

[0514] (2S) -2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸二盐酸盐 (实施例化合物17)

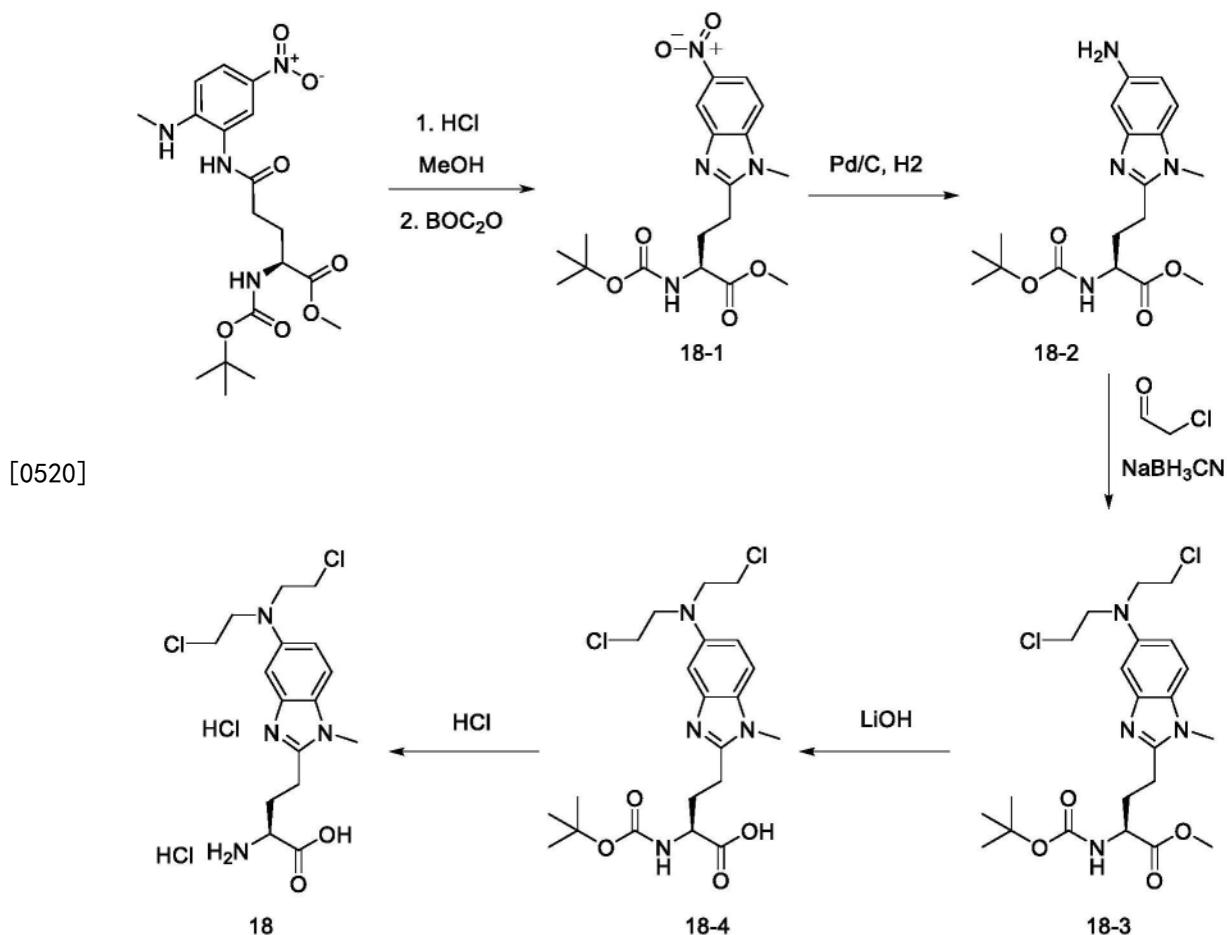
[0515] 将 (2S) -2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯 (30mg, 0.064mmol) 和5N HCl (0.025mL) 在室温下搅拌4小时。将温度缓慢升高至60℃。温度升至100℃并搅拌30分钟。将反应物冷却至室温, 真空除去挥发物。粗品用制备HPLC (酸性缓冲液; 流速25mL/min, 15min内梯度从1% B至28% B。收集UV-信号在236nm处的级分) 纯化, 得到 (2S) -2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸二盐酸盐 (实施例化合物17) (8mg, 0.022mmol, 收率26%), 呈类浅粉色 (pale light pink) 固体。HPLC纯度: 95%; MS (ESI+) m/z = 359 [M+H]⁺。

[0516] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 14.90 (s, 1H), 8.93 (s, 3H), 7.75 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.15 (dd, J=9.3, 2.4Hz, 1H), 6.91 (d, J=2.3Hz, 1H), 4.65 (t, J=7.6Hz, 1H), 3.84-3.71 (m, 13H)。

[0517] 实施例18: (S) -2-氨基-4-(5-(双(2-氯乙基)氨基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)丁酸二盐酸盐 (实施例化合物18)

[0518] 根据以下路线7合成实施例18:

[0519] 路线7



[0521] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(化合物18-1)

[0522] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-(甲基氨基)-5-硝基-苯胺基]-5-氧代-戊酸甲酯(路线1)(50g, 98.2mmol)的MeOH(150mL)溶液中加入氯化氢水溶液(12.0mol/L, 73.6mL, 884mmol), 混合物在70℃搅拌30分钟。反应混合物溶解在水(500mL)中, 用EtOAc(2×150mL)洗涤。水相与EtOAc(300mL)混合并用固体K₂CO₃中和至pH 9-10。水相用EtOAc(2×100mL)萃取。有机相用MgSO₄干燥, 过滤并减压蒸馏, 得到(2S)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸甲酯(26.0g, 82.7mmol, 收率84%), 呈微红色固体。粗品不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度: 93%; MS (ESI+) m/z = 293 [M+H]⁺。

[0523] 向(2S)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸甲酯(26g, 82.7mmol)的THF(100mL)溶液中加入三乙胺(13.8mL, 99.3mmol)和叔丁氧基羰基碳酸叔丁酯(20.9mL, 91mmol), 混合物在室温下搅拌过夜。粗品减压浓缩, 溶解在EtOAc(400mL), 用0.5N HCl(400mL)洗涤。分离各相, 水相用EtOAc(2×200mL)萃取。有机相用MgSO₄干燥, 过滤并减压蒸发。将粗品溶解在少量THF中, 加入Et₂O。混合物在0℃冷却并保持30min。过滤得到固体并用冷Et₂O洗涤。减压干燥固体, 得到(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯(27g, 68.8mmol, 收率83%), 呈灰白色固体。HPLC纯度: 100%; MS (ESI+) m/z = 393 [M+H]⁺。

[0524] (2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(化合物18-2)

[0525] 将(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸甲酯(1.95g, 4.97mmol)溶解在MeOH(15mL)中并置于H-反应器中。加入10% Pd/C(264mg), 并将反应器密封。用氮气吹扫。在3bar下将H₂充入反应器中并将反应物在35℃下搅拌2h。用氮气吹扫排出氢气。用硅藻土过滤除去催化剂。蒸发溶剂, 得到粗品(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(1.8g, 定量收率), 呈灰白色(微粉色)固体, 不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度: 95%; MS (ESI+) m/z 363 [M+H]⁺。

[0526] (2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(化合物18-3)

[0527] 将2-氯乙醛(1.30g, 1.05mL, 8.28mmol, 50%, 10eq.)加至(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(300mg, 0.83mmol)、TFA(0.369mL, 4.97mmol, 6eq.)和MeOH(10mL)的溶液中。反应混合物在0℃搅拌15min, 然后用时5min加入NaBH₃CN(104mg, 1.66mmol, 2eq.), 混合物在0℃搅拌20min。加入水(10mL)、NaHCO₃(10mL)和EtOAc(10mL)并分层。水层用EtOAc(3×10mL)萃取。合并的有机层用盐水(2×20mL)洗涤, 无水MgSO₄干燥, 过滤并减压浓缩。粗品残余物用硅胶柱纯化, 用石油醚中80% EtOAc洗脱产物。合并级分并浓缩, 得到(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(207mg, 0.425mmol, 收率51%)。HPLC纯度: 93%; MS (ESI+) m/z 487 [M+H]⁺。

[0528] (2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(化合物18-4)

[0529] 将(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(207mg, 0.425mmol)和LiOH·H₂O(54mg, 1.27mmol)的混合物悬浮在1,4-二噁烷(12mL)和水(4mL)中。反应混合物在50℃加热20min。使溶液达到室温并加入水(20mL)。然后, 混合物用1M HCl酸化至pH 5, 产物用EtOAc(3×70mL)萃取。合并的有机相用盐水(100mL)洗涤, 无水MgSO₄干燥, 过滤并在旋转蒸发器上浓缩, 得到(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基-氨基)丁酸(188mg, 0.397mmol, 收率94%)。HPLC纯度: 95%; MS (ESI+) m/z 473 [M+H]⁺。

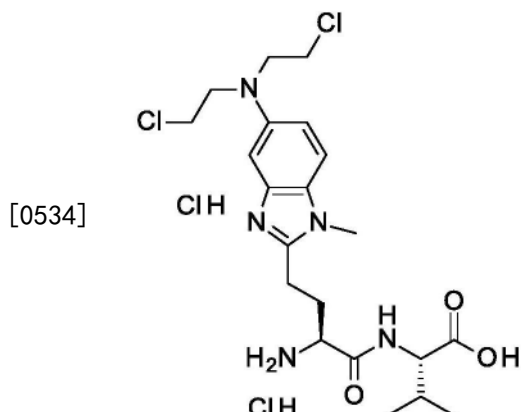
[0530] (S)-2-氨基-4-(5-(双(2-氯乙基)氨基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)丁酸二盐酸盐(实施例化合物18)

[0531] 将(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(188mg, 0.397mmol)溶解在二氯甲烷(3mL)中, 滴加二噁烷中的4M HCl(1.0mL)。反应混合物在室温下搅拌3h, 然后加入乙醚(15mL)。加入乙醚后, 形成沉淀, 将其过滤分离并真空干燥, 得到(S)-2-氨基-4-(5-(双(2-氯乙基)氨基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)丁酸二盐酸盐(实施例化合物18)(118mg, 0.288mmol, 收率73%)。HPLC纯度: 95%; MS (ESI+) m/z 373 [M+H]⁺。

[0532] ¹H NMR(600MHz, CD₃OD) δ7.71(d, J=9.3Hz, 1H), 7.18(dd, J=9.3, 2.4Hz, 1H), 6.97(d, J=2.4Hz, 1H), 4.23(dd, J=7.3, 5.5Hz, 1H), 3.99(s, 3H), 3.89(t, J=6.8Hz, 4H), 3.76(t, J=6.7Hz, 4H), 3.54-3.44(m, 1H), 3.44-3.35(m, 1H), 2.61-2.49(m, 1H), 2.49-2.37(m, 1H)。

[0533] 实施例19: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪

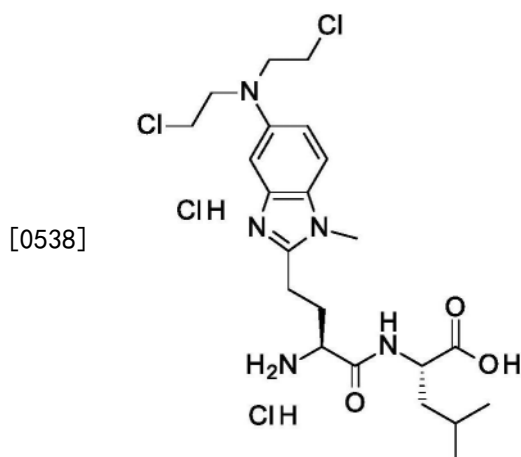
唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸二盐酸盐(实施例化合物19)



[0535] 向(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物3)(15.3mg,0.0264mmol)的THF:MeOH(2:1,1mL)溶液中加入一水氢氧化锂水溶液(0.5M,0.0555mL)。混合物在室温下搅拌过夜。过滤样品并用制备色谱纯化(酸性缓冲液,流速25mL/min,15min内梯度从2%B至31%B。收集UV-信号在235nm处的级分)。将乙醇中的HCl(2.5M,1mL)加至合并的级分中,立即冻干样品,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-甲基-丁酸二盐酸盐(实施例化合物19)(5.8mg,0.0106mmol,收率40%),呈白色固体。HPLC纯度:99%;MS(ESI+)m/z=472[M+H]⁺。

[0536] ¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆) δ14.72(s,1H),12.91(s,1H),8.86(d,J=7.7Hz,1H),8.55(d,J=5.2Hz,3H),7.73(d,J=9.2Hz,1H),7.13(dd,J=9.4,2.4Hz,1H),6.90(d,J=2.4Hz,1H),4.19(dd,J=7.7,5.1Hz,2H),3.86(s,3H),3.81(t,J=6.8Hz,4H),3.76(t,J=6.9Hz,4H),3.31(h,J=9.4Hz,2H),2.33(ddd,J=13.1,9.4,6.8Hz,1H),2.23(ddt,J=13.9,9.5,6.9Hz,1H),2.19-2.10(m,1H),0.94(dd,J=6.9,3.6Hz,6H)。

[0537] 实施例20:(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物20)

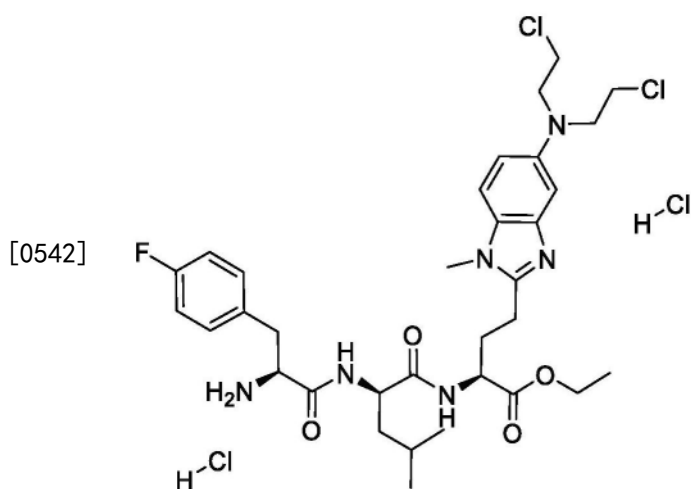


[0539] 将(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物1)(15mg,0.0255mmol)溶解在HCl(4M,二噁烷中,0.319mL),室温下搅拌48小时。粗品用制备色谱纯化(酸性缓冲液,流速25mL/min,15min内梯度从9%B至42%B。收集UV-信号在235nm处的级分),得到(2S)-2-

[[(2S) -2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物20) (7.3mg, 0.013mmol, 收率51%), 呈白色固体。HPLC纯度: 99%; MS (ESI+) $m/z = 486 [M+H]^+$ 。

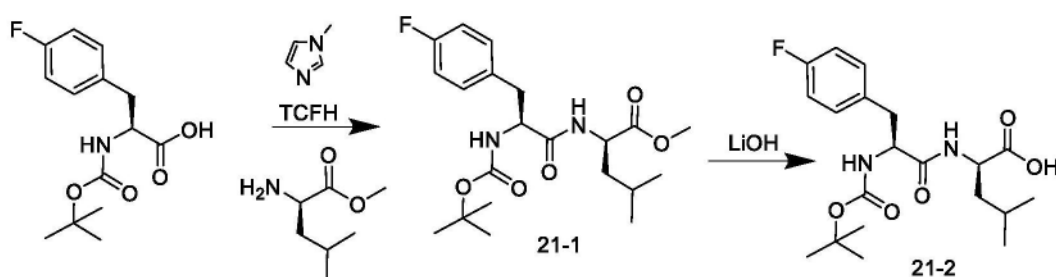
[0540] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.64 (s, 1H), 12.92 (s, 1H), 9.00 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 8.49 (d, $J = 5.6\text{Hz}$, 3H), 7.73 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 7.13 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 1H), 6.90 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 4.26 (ddd, $J = 10.0, 7.3, 5.1\text{Hz}$, 1H), 4.05-3.99 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (t, $J = 6.9\text{Hz}$, 4H), 3.76 (d, $J = 6.3\text{Hz}$, 4H), 3.30 (s, 2H), 2.32 (p, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 2.26-2.19 (m, 1H), 1.76-1.69 (m, 1H), 1.57 (pt, $J = 9.4, 5.0\text{Hz}$, 2H), 0.89 (dd, $J = 24.6, 6.6\text{Hz}$, 6H)。

[0541] 实施例21: (2S) -2-[[(2R) -2-[[(2S) -2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物21)

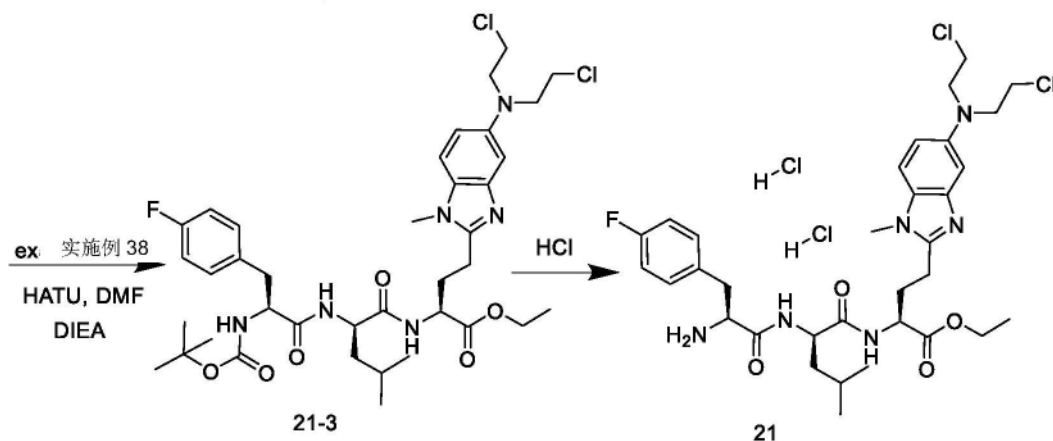


[0543] 根据以下路线8合成实施例21:

[0544] 路线8



[0545]



[0546] (2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(化合物21-1)

[0547] 在室温下向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酸(500mg, 0.00176mol)、(2R)-2-氨基-4-甲基-戊酸甲酯盐酸盐(0.417g, 0.00229mol)、1-甲基咪唑(0.436mL, 0.00547mol)的MeCN(8mL)溶液中加入[氯(二甲基氨基)亚甲基]-二甲基铵六氟磷酸盐(0.545g, 0.00194mol)。混合物在室温下搅拌1h。加入EtOAc(10mL)后加入H₂O(10mL)。分离各相,水相用EtOAc(5mL)洗涤,合并的有机相用MgSO₄干燥,减压蒸发。将粗品吸附在硅藻土上,用Buchi Pure C-810Flash系统(20g色谱柱,EtOAc:石油醚0:100至50:50)上纯化,得到(2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(480mg, 0.00117mol, 收率66%),呈白色固体。HPLC纯度:95%;MS(ESI+)m/z 411[M+H]⁺。

[0548] (2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(化合物21-2)

[0549] 向(2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯(200mg, 0.000487mol)的THF(10mL)溶液中加入一水氢氧化锂(0.0215g, 0.000512mol)水溶液(0.5mL)。混合物在室温下搅拌1h后加入EtOAc(10mL)、1N HCl(0.5mL)和水(10mL)。分离各相,水相用EtOAc(10mL)进一步萃取。合并的有机相用盐水(10mL)洗涤,Na₂SO₄干燥,过滤并减压蒸发,得到(2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(0.185g, 0.000467mol, 收率96%),呈无色粘稠油状。HPLC纯度:94%;MS(ESI+)m/z 341[M-tBu]⁺。

[0550] (2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(化合物21-3)

[0551] 在室温下向DMF(3.0mL)中的(2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(95.0mg, 0.240mmol)中加入HATU(91.1mg, 0.240mmol)和DIEA(0.0820mL, 0.479mmol),再加入(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物38)(125mg, 0.264mmol)。所得混合物在室温下搅拌过夜。反应混合物用H₂O稀释,用DCM萃取。将有机层干燥(Na₂SO₄),真空浓缩并用制备色谱纯化。冷冻干燥纯的级分,得到(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(0.080g, 0.103mmol, 收率43%),呈白色固体。HPLC纯度:97%;MS(ESI+)m/z=779[M+H]⁺。

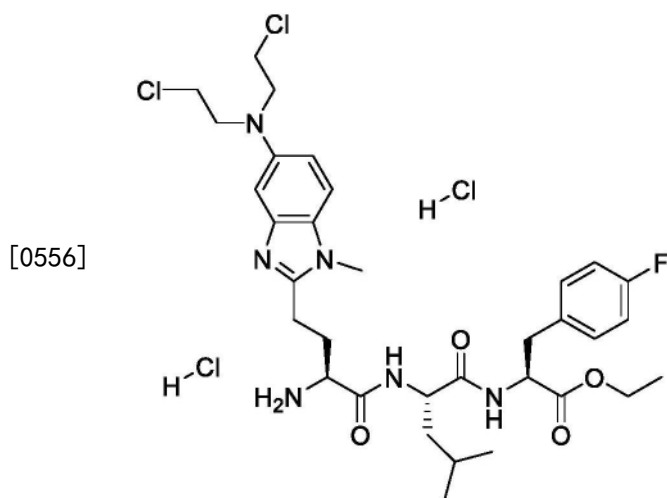
[0552] (2S)-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物21)

[0553] 向EtOH(1mL)中的(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]丁酸乙酯(80.0mg, 0.103mmol)中加入二噁烷中的HCl(4.00mol/L, 0.128mL, 0.513mmol),反应混合物搅拌过夜。反应完成后,蒸发溶剂,粗品用制备色谱纯化。收集纯的

级分并冷冻干燥,得到(2S)-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物21) (6mg, 0.0079mmol, 收率8%), 呈白色固体。HPLC纯度: 99%; MS (ESI+) $m/z = 679 [M+H]^+$ 。

[0554] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.15 (s, 1H), 8.80-8.64 (m, 2H), 8.06 (s, 3H), 7.38-7.22 (m, 2H), 7.22-7.08 (m, 2H), 6.95-6.81 (m, 1H), 4.51-4.27 (m, 2H), 4.14-3.96 (m, 3H), 3.89-3.67 (m, 12H), 3.13 (s, 1H), 3.14 (m, 2H), 3.07 (dd, $J = 14.3, 4.9\text{Hz}$, 1H), 2.87 (dd, $J = 14.2, 8.3\text{Hz}$, 1H), 2.35-2.25 (m, 1H), 2.21-2.07 (m, 1H), 1.76-1.60 (m, 1H), 1.58-1.39 (m, 2H), 1.17 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 0.93 (d, $J = 6.6\text{Hz}$, 3H), 0.90 (d, $J = 6.5\text{Hz}$, 3H)。

[0555] 实施例22: (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物22)

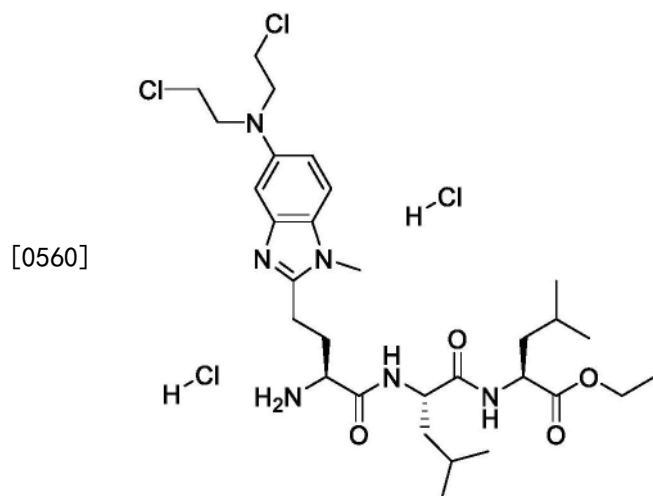


[0557] 将1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15eq, 68mg, 0.355mmol)加入DMF (2mL) 中的4-甲基吗啉(1.15eq, 0.039mL, 0.355mmol)、氰基乙醛酸乙酯-2-肟(1.00eq, 44mg, 0.308mmol)、(2S)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯(1.15eq, 74.9mg, 0.355mmol)和(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物20) (1.00eq, 150mg, 0.308mmol)的混合物中。反应混合物在室温下搅拌3h。加入水,混合物用DCM萃取。有机相用10% K_2HPO_4 和10% NaCl洗涤,随后用0.25M HCl和10% NaCl酸洗,通过相分离器筒并蒸发。粗品用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物22) (4mg, 0.0053mmol, 收率2%), 呈白色固体。HPLC纯度: 99%; MS (ESI+) $m/z = 679 [M+H]^+$ 。

[0558] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.34 (br s, 1H), 8.72 (d, $J = 7.7\text{Hz}$, 2H), 8.34 (s, 3H), 7.68 (s, 1H), 7.25 (dd, $J = 8.3, 5.5\text{Hz}$, 2H), 7.01 (t, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 6.90 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 4.43 (dq, $J = 15.5, 7.7\text{Hz}$, 2H), 4.05-3.96 (m, 2H), 3.95 (q, $J = 6.5, 5.8\text{Hz}$, 1H), 3.84-3.69 (m, 11H), 3.13-2.98 (m, 4H), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.0\text{Hz}$, 1H), 2.23 (dq, $J = 13.4, 6.8, 6.1\text{Hz}$, 1H), 2.10 (dd, $J = 15.9, 8.1\text{Hz}$, 1H), 1.69 (dp, $J = 13.5, 6.7\text{Hz}$, 1H), 1.47 (t, $J = 7.4\text{Hz}$, 2H),

1.08 (t, J=7.1Hz, 3H), 0.91 (dd, J=19.1, 6.5Hz, 6H)。

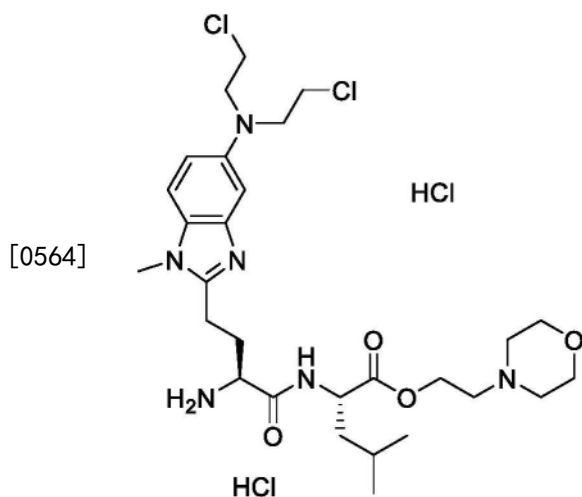
[0559] 实施例23: (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物23)



[0561] 将4-甲基吗啉(1.15eq, 0.039mL, 0.355mmol)加至DMF(2mL)中的(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物20)(1.00eq, 150mg, 0.308mmol)、(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酸乙酯(1.15eq, 56mg, 0.355mmol)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15eq, 68mg, 0.355mmol)和氰基乙醛酸乙酯-2-肼(1.00eq, 44mg, 0.308mmol)的混合物中。反应混合物在室温下搅拌3h。加入水,混合物用DCM萃取。有机相用10% K_2HPO_4 和10% NaCl洗涤,随后用0.25M HCl和10% NaCl酸洗,通过相分离器筒并蒸发。获得的粗品用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物23)(5.1mg, 0.00728mmol, 收率2%),呈固体。HPLC纯度:95%;MS(ESI+)m/z=627[M+H]⁺。

[0562] ¹H NMR(600MHz, DMSO-d₆) δ14.41(br s, 1H), 8.76(s, 1H), 8.54(d, J=7.6Hz, 1H), 8.24(d, J=123.3Hz, 3H), 7.70(s, 1H), 6.90(d, J=2.3Hz, 1H), 6.57(s, 1H), 4.39(dt, J=13.0, 6.5Hz, 1H), 4.27(ddd, J=10.6, 7.5, 4.9Hz, 1H), 4.10-4.00(m, 2H), 3.97(d, J=7.5Hz, 1H), 3.91-3.71(m, 11H), 3.1(m, 2H), 2.25(dt, J=13.5, 7.2Hz, 1H), 2.13(s, 1H), 1.73(dt, J=13.4, 6.3Hz, 1H), 1.64(dd, J=13.9, 7.0Hz, 1H), 1.53(tddd, J=22.7, 14.1, 9.6, 5.1Hz, 4H), 1.15(t, J=7.1Hz, 3H), 0.95(d, J=6.5Hz, 3H), 0.92(d, J=6.5Hz, 3H), 0.87(d, J=6.6Hz, 3H), 0.78(d, J=6.5Hz, 3H)。

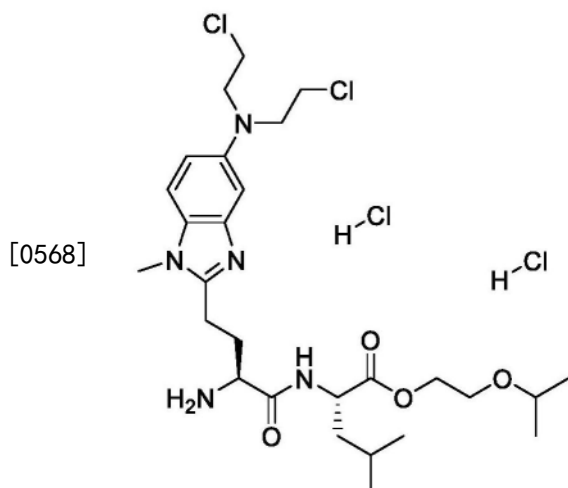
[0563] 实施例24:2-吗啉乙醇(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯二盐酸盐(实施例化合物24)



[0565] 将(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(1.00eq, 50mg, 0.0758mmol)悬浮在THF (2mL)中,加入氯化亚砷(5.53eq, 31 μ L, 0.420mmol)。反应物在室温下搅拌30分钟,然后加入4-(2-羟乙基)吗啉(5.00eq, 0.046mL, 0.379mmol)。混合物在室温下搅拌3小时。过滤反应混合物并用制备色谱纯化,得到2-吗啉乙醇(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯二盐酸盐(实施例化合物24) (6mg, 0.0089mmol, 收率12%),呈固体。HPLC纯度:99%;MS (ESI+) m/z = 599[M+H]⁺。

[0566] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 14.79 (s, 1H), 11.42 (s, 1H), 9.36 (d, J = 7.3Hz, 1H), 8.55 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.44 (td, J = 13.5, 11.9, 5.2Hz, 2H), 4.11 (s, 1H), 3.96-3.74 (m, 15H), 3.56 (s, 2H), 3.15 (s, 6H), 2.32 (q, J = 7.6Hz, 2H), 1.74 (dq, J = 13.3, 6.6, 6.1Hz, 1H), 1.63 (dddd, J = 18.6, 13.8, 9.1, 4.6Hz, 2H), 0.91 (dd, J = 20.5, 6.5Hz, 6H)。

[0567] 实施例25: 2-异丙氧基乙醇(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯二盐酸盐(实施例化合物25)

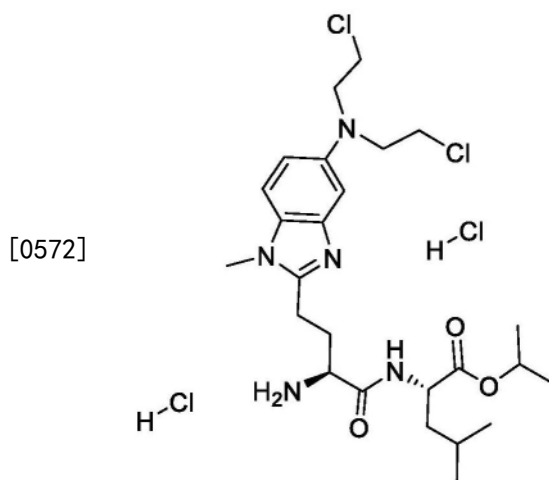


[0569] 在-5℃将(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(1.00eq, 50mg, 0.0758mmol)分批加入到乙二醇单异丙醚(5.00eq, 0.042mL, 0.379mmol)的MeCN (2mL)溶液和氯化亚砷(5.53eq, 31 μ L, 0.420mmol)中。使反应物达到室温,然后在30℃下加热3h。真空以与甲苯共

沸来除去溶剂,然后用高真空泵干燥。所得粗品用制备色谱纯化,得到2-异丙氧基乙醇(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯二盐酸盐(实施例化合物25) (6.2mg, 0.0096mmol, 收率12%), 呈固体。HPLC纯度:95%; MS (ESI+) $m/z = 572 [M+H]^+$ 。

[0570] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.77 (s, 1H), 9.25 (d, $J = 7.0\text{Hz}$, 1H), 8.56 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.93 (dd, $J = 10.1, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.37-4.28 (m, 1H), 4.23 (dq, $J = 8.1, 4.4, 3.9\text{Hz}$, 1H), 4.09 (ddt, $J = 13.8, 10.7, 5.5\text{Hz}$, 2H), 3.90-3.74 (m, 11H), 3.54 (td, $J = 8.6, 7.0, 3.6\text{Hz}$, 3H), 2.36-2.24 (m, 2H), 1.77 (dd, $J = 13.9, 6.7\text{Hz}$, 1H), 1.60 (ddt, $J = 28.1, 13.4, 8.4\text{Hz}$, 2H), 1.05 (dd, $J = 18.5, 6.1\text{Hz}$, 6H), 0.91 (dd, $J = 25.5, 6.5\text{Hz}$, 6H)。—CH₂信号隐藏在H₂O信号之下。

[0571] 实施例26: (2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸异丙酯二盐酸盐(实施例化合物26)

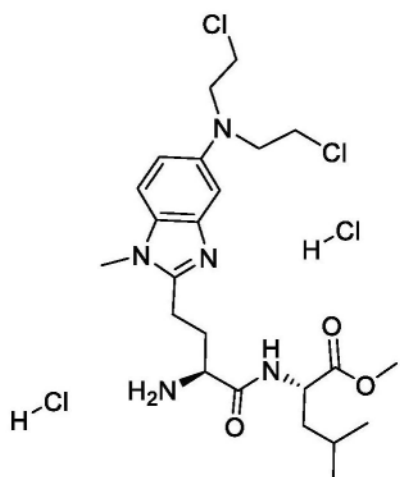


[0573] 在-5℃将(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(1.00eq, 50mg, 0.0758mmol)分批加入异丙醇(200eq, 1.2mL, 15.2mmol)和氯化亚砷(5.53eq, 31 μ L, 0.420mmol)的溶液中。使反应物达到室温,并搅拌3h。与甲苯共沸以蒸发除去溶剂,然后用高真空泵干燥。所得粗品用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸异丙酯二盐酸盐(实施例化合物26) (32mg, 0.053mmol, 收率69%), 呈灰白色固体。HPLC纯度:98%; MS (ESI+) $m/z = 528 [M+H]^+$ 。

[0574] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.79 (s, 1H), 9.20 (d, $J = 7.0\text{Hz}$, 1H), 8.55 (s, 3H), 7.74 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 7.15 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.90 (p, $J = 6.3\text{Hz}$, 1H), 4.26 (dt, $J = 11.0, 5.7\text{Hz}$, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.80 (dt, $J = 33.7, 6.9\text{Hz}$, 8H), 3.37-3.32 (m, 2H), 2.31 (dh, $J = 22.0, 7.3\text{Hz}$, 2H), 1.75 (p, $J = 6.7\text{Hz}$, 1H), 1.62 (ddd, $J = 15.0, 10.2, 5.1\text{Hz}$, 1H), 1.53 (ddd, $J = 13.9, 9.2, 4.9\text{Hz}$, 1H), 1.18 (dd, $J = 11.4, 6.3\text{Hz}$, 6H), 0.90 (dd, $J = 27.2, 6.5\text{Hz}$, 6H)。

[0575] 实施例27: (2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯二盐酸盐(实施例化合物27)

[0576]

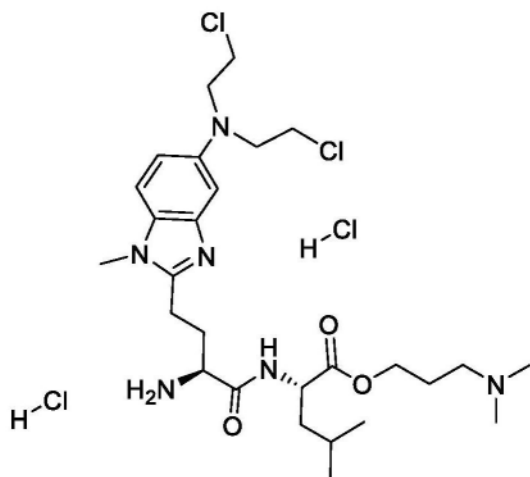


[0577] 将(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(实施例化合物20) (1.00eq, 35mg, 0.06260mmol) 溶解在0.4mL MeOH(137eq.)中。将氯化亚砷(5.72eq, 30 μ L, 0.411mmol)在室温下滴加至该溶液中。将反应物在室温下搅拌4.5小时。粗反应混合物用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸甲酯二盐酸盐(实施例化合物27) (14mg, 0.0244mmol, 收率33%), 呈灰白色。HPLC纯度:97%; MS (ESI+) $m/z = 500 [M+H]^+$ 。

[0578] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.86 (s, 1H), 9.32 (d, $J = 7.1\text{Hz}$, 1H), 8.61 (s, 3H), 7.74 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 7.15 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.33 (dt, $J = 11.1, 5.5\text{Hz}$, 1H), 4.10 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.80 (dt, $J = 33.0, 6.9\text{Hz}$, 8H), 3.65 (s, 3H), 3.35 (h, $J = 10.1, 8.5\text{Hz}$, 2H), 2.33 (ddq, $J = 30.2, 15.1, 7.5\text{Hz}$, 2H), 1.75 (p, $J = 6.7\text{Hz}$, 1H), 1.65 (td, $J = 12.2, 10.3, 5.1\text{Hz}$, 1H), 1.54 (ddd, $J = 14.2, 9.6, 4.7\text{Hz}$, 1H), 0.90 (dd, $J = 23.3, 6.5\text{Hz}$, 6H)。

[0579] 实施例28-3-(二甲基氨基)丙醇(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯二盐酸盐(实施例化合物28)

[0580]

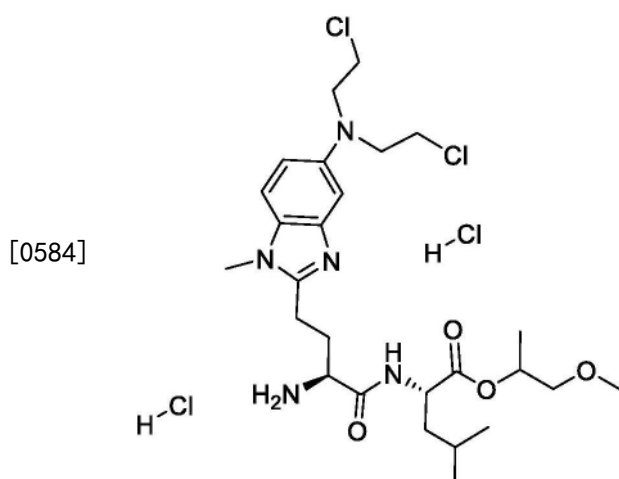


[0581] 将(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物1) (1.00eq, 50mg, 0.0851mmol) 溶解在THF(1mL)中。加入HCl(4M, EtOAc中) (10.0eq, 0.21mL, 0.851mmol), 随后加入3-二甲基氨基-1-丙醇(10.0eq, 0.10mL, 0.851mmol)。反应物在80 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌4小时。将混合物过滤并用制

备色谱纯化,得到3-(二甲基氨基)异丙醇(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯二盐酸盐(实施例化合物28)(2mg,0.0031mmol,收率3%),呈灰白色固体。HPLC纯度:95%;MS (ESI+) $m/z=571[M+H]^+$ 。

[0582] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 15.9 (br s, 1H), 10.7 (br s, 1H), 9.43 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 8.55 (d, $J=73.7\text{Hz}$, 3H), 7.79 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.34 (s, 1H), 4.18-4.12 (m, 2H), 3.76 (s, 11H), 3.09 (s, 1H), 2.73 (d, $J=20.6\text{Hz}$, 6H), 2.34 (s, 1H), 2.01 (q, $J=7.8, 7.3\text{Hz}$, 2H), 1.81-1.52 (m, 4H), 1.23 (s, 4H), 0.97-0.89 (m, 6H)。

[0583] 实施例29-(2-甲氧基-1-甲基-乙醇)(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯二盐酸盐(实施例化合物29)

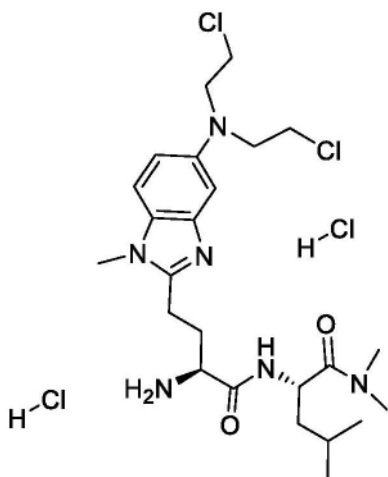


[0585] 将(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物20)(1.0eq, 36mg, 0.0644mmol)溶解在1-甲氧基-2-丙醇(55eq, 0.40mL, 4.07mmol)中,室温下滴加氯化亚砷(5.6eq, 30 μL , 0.411mmol)。反应物在室温下搅拌1小时,然后在40 $^{\circ}\text{C}$ 下加热21小时。粗反应混合物用制备色谱纯化,得到(2-甲氧基-1-甲基-乙醇)(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸酯二盐酸盐(实施例化合物29)(2.7mg, 0.0043mmol, 收率6%),呈灰白色固体。HPLC纯度:99%;MS (ESI+) $m/z=558[M+H]^+$ 。

[0586] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.88 (s, 1H), 9.30 (p, $J=6.1\text{Hz}$, 1H), 8.60 (s, 3H), 7.75 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.15 (d, $J=9.1\text{Hz}$, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.96 (dtd, $J=16.3, 6.5, 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.28 (qd, $J=11.2, 10.4, 6.1\text{Hz}$, 1H), 4.13-4.05 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 4H), 3.78 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 4H), 3.40-3.33 (m, 4H), 3.22 (d, $J=13.7\text{Hz}$, 3H), 2.34 (dd, $J=18.1, 9.2\text{Hz}$, 2H), 1.77 (td, $J=9.9, 9.3, 4.6\text{Hz}$, 1H), 1.62 (ddd, $J=15.1, 12.3, 7.7\text{Hz}$, 1H), 1.53 (ddt, $J=13.8, 9.6, 4.8\text{Hz}$, 1H), 1.14 (dd, $J=11.9, 6.5\text{Hz}$, 3H), 0.90 (dd, $J=26.5, 6.6\text{Hz}$, 6H)。

[0587] 实施例30-(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-N,N,4-三甲基-戊酰胺二盐酸盐(实施例化合物30)

[0588]

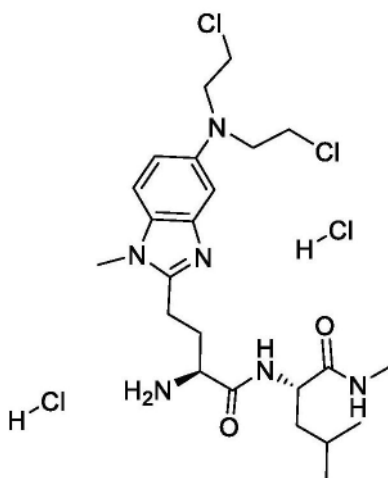


[0589] 将3-(3-二甲基氨基丙基)-1-乙基-碳二亚胺盐酸盐(1.15eq, 59mg, 0.308mmol)加至DMF(1mL)中的(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物20)(1.00eq, 150mg, 0.268mmol)、二甲胺盐酸盐(1.15eq, 25mg, 0.308mmol)、(2E)-氰基(羟基亚氨基)乙酸乙酯(1.00eq, 38mg, 0.268mmol)和N-甲基吗啉(2.00eq, 0.059mL, 0.536mmol)的混合物中。反应物在室温下搅拌3h。加入水和DCM,混合物用10%K₂HPO₄和10% NaCl萃取两次,随后用0.25M HCl和10% NaCl酸洗。浓缩有机相,所得粗品用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-N,N,4-三甲基-戊酰胺二盐酸盐(实施例化合物30)(13mg, 0.022mmol, 收率8%),呈固体。HPLC纯度:95%;MS(ESI+) m/z=513[M+H]⁺。

[0590] ¹H NMR(600MHz, DMSO-d₆) δ14.63(s, 1H), 8.87(s, 1H), 8.51(s, 3H), 7.73(s, 1H), 7.14(s, 1H), 6.91(d, J=2.4Hz, 1H), 4.72(ddd, J=11.0, 7.5, 3.6Hz, 1H), 4.00(s, 1H), 3.89(s, 3H), 3.82(d, J=6.7Hz, 4H), 3.77(t, J=6.4Hz, 4H), 3.3(m, 2H), 3.04(s, 3H), 2.84(s, 3H), 2.39-2.30(m, 1H), 2.19(dq, J=14.3, 7.3Hz, 1H), 1.75-1.67(m, 1H), 1.50(ddd, J=14.7, 10.8, 4.2Hz, 1H), 1.39(ddd, J=13.7, 9.8, 3.6Hz, 1H), 0.92(t, J=6.1Hz, 6H)。

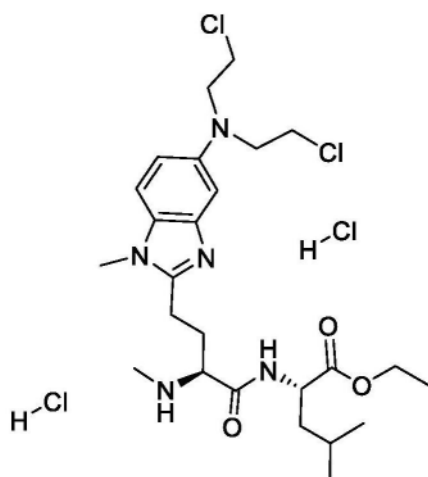
[0591] 实施例31-(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-N,4-二甲基-戊酰胺二盐酸盐(实施例化合物31)

[0592]



[0593] 根据以下路线9合成实施例31:

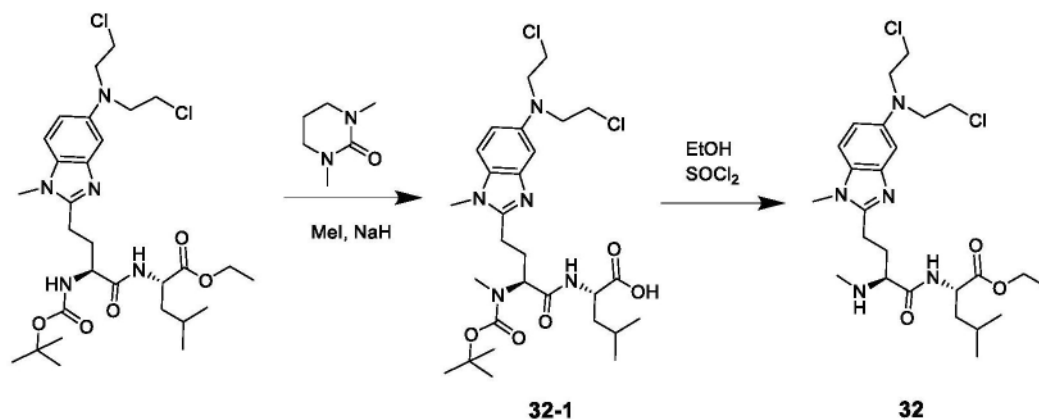
[0602]



[0603] 根据以下路线10合成实施例32:

[0604] 路线10

[0605]



[0606] (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[叔丁氧基羰基(甲基)氨基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(化合物32-1)]

[0607] 向(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物1的合成路线中的步骤4)(300mg, 0.488mmol)在干燥THF(3mL)中加入溶液中加入氢化钠(50%; 59mg, 1.46mmol)。混合物在室温下搅拌至无气体逸出。将1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮(0.12mL, 1.03mmol)加入反应混合物中,然后加入碘甲烷(0.27mL, 4.39mmol)。反应物在室温下搅拌过夜。用水小心地淬灭反应,并用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[叔丁氧基羰基(甲基)氨基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(105mg, 0.175mmol, 收率36%),呈白色固体。HPLC纯度:99%;MS(ESI+)m/z=600[M+H]⁺。

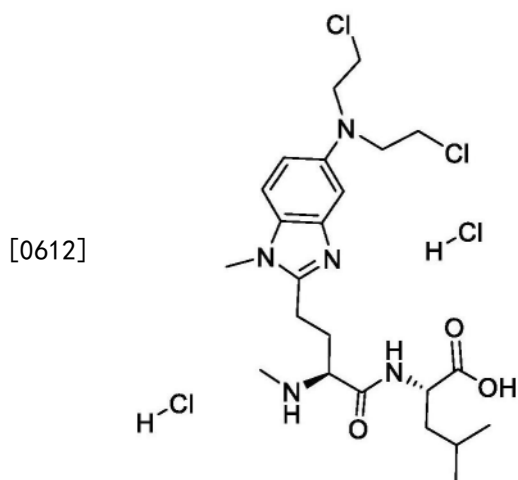
[0608] (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(甲基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物32)]

[0609] 在-5℃下将(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[叔丁氧基羰基(甲基)氨基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(42mg, 0.0699mmol)分批加入乙醇(2mL)和氯化亚砷(31μL, 0.420mmol)的溶液中。反应物在室温下搅拌5分钟,然后回流2h。使反应物达到温度,并在真空下与甲苯共沸蒸发溶剂,然后通过高真空泵干燥。粗品用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-

基]-2-(甲基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物32)(25mg, 0.041mmol, 收率59%), 呈灰白色固体。HPLC纯度:99%; MS (ESI+) $m/z=528[M+H]^+$ 。

[0610] 1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.84 (s, 1H), 9.43 (d, $J=7.0$ Hz, 3H), 7.73 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 4.35 (ddd, $J=11.0, 7.0, 4.7$ Hz, 1H), 4.12 (p, $J=7.0$ Hz, 2H), 4.04 (dd, $J=8.0, 4.8$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.83 (t, $J=6.8$ Hz, 4H), 3.77 (t, $J=6.5$ Hz, 4H), 3.30 (t, $J=8.4$ Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.47 (dd, $J=8.5, 4.9$ Hz, 1H), 2.28 (dq, $J=14.8, 7.9$ Hz, 1H), 1.69 (dddd, $J=39.0, 15.1, 9.7, 5.6$ Hz, 2H), 1.57 (ddd, $J=13.8, 9.2, 4.8$ Hz, 1H), 1.19 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.91 (dd, $J=26.6, 6.5$ Hz, 6H)。

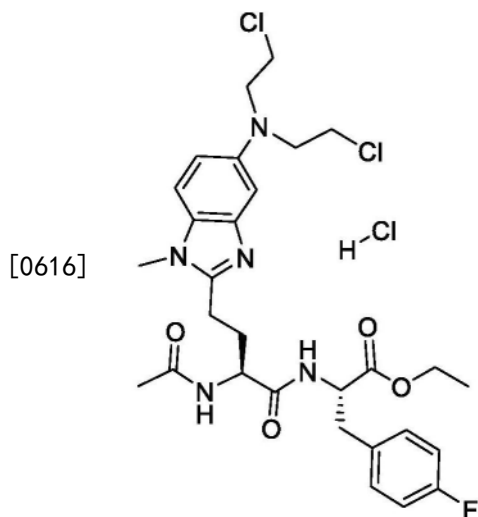
[0611] 实施例33: (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(甲基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物33)



[0613] 将(2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-[叔丁氧基羰基(甲基)氨基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸(化合物32-1)(12mg, 0.0200mmol)溶解在乙醇(1mL)中。加入HCl(4M, 二噁烷中)(50 μ L, 0.200mmol), 反应物在室温下搅拌3h。将反应混合物过滤并用制备色谱纯化, 得到(2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(甲基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物33)(4mg, 0.0069mmol, 收率34%), 呈灰白色固体。HPLC纯度:97%; MS (ESI+) $m/z=500[M+H]^+$ 。

[0614] 1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.43 (s, 1H), 13.03 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.16-6.98 (m, 1H), 6.92 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 4.34 (q, $J=7.5$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J=7.8, 4.7$ Hz, 1H), 3.87-3.72 (m, 11H), 3.14 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.44-2.36 (m, 1H), 2.21 (ddt, $J=19.1, 13.7, 5.8$ Hz, 1H), 1.70 (dp, $J=13.2, 6.6$ Hz, 1H), 1.62 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 0.92 (dd, $J=28.5, 6.5$ Hz, 6H)。

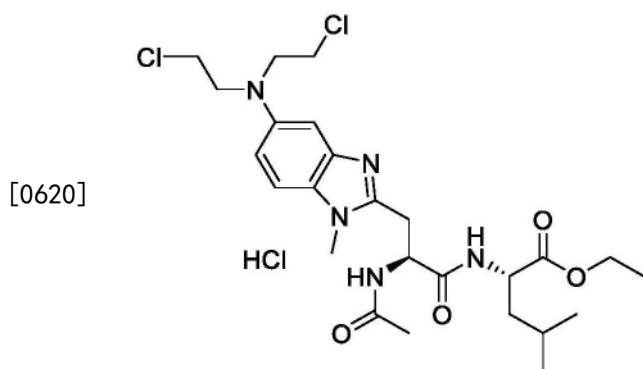
[0615] 实施例34: (2S)-2-[[(2S)-2-乙酰胺基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例化合物34)



[0617] 将(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯]盐酸盐(实施例化合物2)(15mg,0.0233mmol)溶解在乙腈(1mL)中。加入N,N-二异丙基乙胺(0.00553mL,0.0317mmol),随后加入乙酰氯(0.00227mL,0.0318mmol),反应物在室温下搅拌3h。反应混合物用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-乙酰胺基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯]盐酸盐(实施例化合物34)(7mg,0.0108mmol,收率41%),呈灰白色固体。HPLC纯度:99%;MS(ESI⁺)m/z=608[M+H]⁺。

[0618] ¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆)δ14.20(s,1H),8.49(d,J=7.2Hz,1H),8.18(d,J=8.3Hz,1H),7.70(d,J=9.1Hz,1H),7.29-7.19(m,2H),7.14-7.04(m,3H),6.86(d,J=2.4Hz,1H),4.40(dtd,J=20.2,8.2,6.1Hz,2H),4.00(qd,J=7.2,2.2Hz,2H),3.84-3.74(m,11H),3.05(q,J=9.3,8.4Hz,2H),3.00-2.88(m,2H),2.09(ddd,J=13.9,8.2,4.3Hz,1H),2.04-1.94(m,1H),1.76(s,3H),1.06(t,J=7.1Hz,3H)。

[0619] 实施例35:(2S)-2-[[[(2S)-2-乙酰胺基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯]盐酸盐(实施例化合物35)

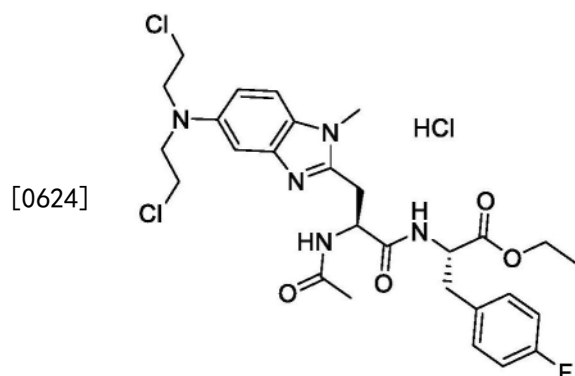


[0621] 将(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯]二盐酸盐(实施例化合物4)(11mg,0.0182mmol)溶解在乙腈(1mL)中。加入N,N-二异丙基乙胺(0.00381mL,0.0219mmol),随后加入乙酰氯(0.00156mL,0.0219mmol),反应物在室温下搅拌3h。反应混合物用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-乙酰胺基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯]盐酸盐(实施例化合物35)(8mg,0.0138mmol,收率76%),呈白色固

体。HPLC纯度:99%;MS (ESI+) $m/z=542$ $[M+H]^+$ 。

[0622] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.16 (s, 1H), 8.56 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 8.41 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.72 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.12 (dd, $J=9.2, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.87 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 4.83 (td, $J=8.0, 6.5\text{Hz}$, 1H), 4.26 (ddd, $J=9.8, 7.6, 5.2\text{Hz}$, 1H), 4.00 (qd, $J=7.2, 1.2\text{Hz}$, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.81 (dd, $J=8.9, 6.4\text{Hz}$, 4H), 3.76 (t, $J=6.1\text{Hz}$, 4H), 3.29 (dd, $J=15.0, 7.8\text{Hz}$, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.61-1.49 (m, 2H), 1.46 (ddd, $J=13.7, 8.9, 5.1\text{Hz}$, 1H), 1.11 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.83 (dd, $J=25.2, 6.4\text{Hz}$, 6H)。

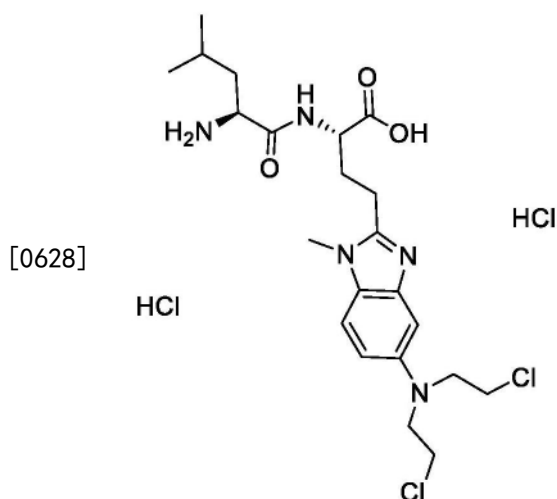
[0623] 实施例36: (2S)-2-[[(2S)-2-乙酰胺基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例化合物36)



[0625] 将(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物5) (15mg, 0.0228mmol) 溶解在乙腈(1mL)中。加入N,N-二异丙基乙胺(0.00476mL, 0.0273mmol), 随后加入乙酰氯(0.00195mL, 0.0273mmol), 反应物在室温下搅拌3h。反应混合物用制备色谱纯化, 得到(2S)-2-[[(2S)-2-乙酰胺基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例化合物36) (10.6mg, 0.0168mmol, 收率71%), 呈白色固体。HPLC纯度:97%;MS (ESI+) $m/z=594$ $[M+H]^+$ 。

[0626] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.18 (s, 1H), 8.62 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 8.34 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.71 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.24-7.18 (m, 2H), 7.12 (dd, $J=9.2, 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.10-7.03 (m, 2H), 6.86 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.83 (td, $J=8.0, 6.5\text{Hz}$, 1H), 4.45 (td, $J=8.0, 6.1\text{Hz}$, 1H), 3.97 (qd, $J=7.1, 2.1\text{Hz}$, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85-3.79 (m, 4H), 3.75 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 4H), 3.25 (dd, $J=15.0, 7.9\text{Hz}$, 2H), 3.01-2.89 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.04 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H)。

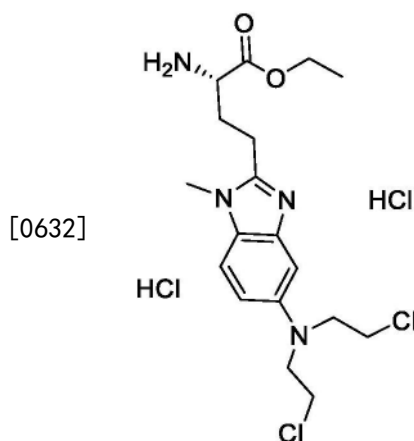
[0627] 实施例37: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸二盐酸盐(实施例化合物37)



[0629] 向(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物7)(6mg,0.0102mmol)的THF:MeOH(2:1,1mL)溶液中加入一水氢氧化锂水溶液(0.5M,0.0238mL)。混合物在室温下搅拌过夜,然后过滤并用制备色谱纯化,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸二盐酸盐(实施例化合物37)(1mg,0.00177mmol,收率16%),呈白色固体。HPLC纯度:99%;MS(ESI+)m/z=486[M+H]⁺。

[0630] ¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆) δ14.50(s,1H),13.04(s,1H),9.14(d,J=8.0Hz,1H),8.38(d,J=5.4Hz,3H),7.73(d,J=9.2Hz,1H),7.13(dd,J=9.3,2.4Hz,1H),6.88(d,J=2.4Hz,1H),4.37(td,J=8.8,4.0Hz,1H),3.91(s,3H),3.86(q,J=6.6Hz,1H),3.81(t,J=6.8Hz,4H),3.76(t,J=6.6Hz,4H),3.32-3.22(m,2H),2.36(t,J=8.8Hz,1H),2.12(ddt,J=14.0,9.2,4.7Hz,1H),1.69(dq,J=13.3,6.6Hz,1H),1.59(dt,J=13.9,7.1Hz,1H),1.51(dt,J=14.2,7.4Hz,1H),0.90(dd,J=22.4,6.5Hz,6H)。

[0631] 实施例38:(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物38)

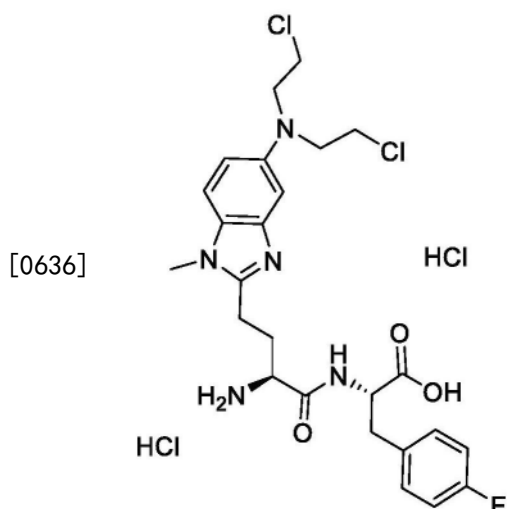


[0633] 向(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸乙酯(根据路线6合成,使用在路线1中描述为起始原料的(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸乙酯)(559mg,1.06mmol,纯度95%)的EtOH(5mL)溶液中加入二噁烷中的氯化氢(4.00mol/L,2.65mL,10.6mmol),反应混合物在25℃下搅拌3h。减压蒸馏溶剂得到粗产物,将其用制备色谱纯化,得到(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-

氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物38)(416mg, 0.877mmol, 收率83%), 呈白色固体。HPLC纯度:99%; MS (ESI+) $m/z = 401 [M+H]^+$ 。

[0634] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.81 (s, 1H), 8.86 (s, 3H), 7.85-7.68 (m, 1H), 7.15 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 6.92 (d, $J=5.0\text{Hz}$, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.21 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 3.93 (t, $J=4.4\text{Hz}$, 3H), 3.84 (q, $J=6.0\text{Hz}$, 4H), 3.78 (t, $J=5.8\text{Hz}$, 4H), 3.36 (dq, $J=16.9, 6.1\text{Hz}$, 2H), 2.44-2.31 (m, 2H), 1.25 (q, $J=6.3\text{Hz}$, 3H)。

[0635] 实施例39: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸二盐酸盐(实施例化合物39)



[0637] 将(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物2)(10.2mg, 0.015mmol)溶解在HCl(4M, 二噁烷中, 0.0758mL)在室温下搅拌48小时。反应混合物用制备色谱纯化, 得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-3-(4-氟苯基)丙酸二盐酸盐丁酸酯(实施例化合物39)(2.3mg, 0.00348mmol, 收率25%), 呈白色固体。HPLC纯度:99%; MS (ESI+) $m/z = 538 [M+H]^+$ 。

[0638] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.74 (s, 1H), 13.10 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 8.54 (s, 3H), 7.73 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 1H), 7.36 (ddd, $J=8.1, 5.6, 2.1\text{Hz}$, 2H), 7.16-7.07 (m, 3H), 6.91 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 4.47 (td, $J=8.4, 4.8\text{Hz}$, 1H), 4.04 (q, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 3.87 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 3H), 3.82 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 4H), 3.76 (d, $J=6.2\text{Hz}$, 4H), 3.32 (s, 2H), 3.10 (dd, $J=14.1, 4.7\text{Hz}$, 1H), 2.98 (dd, $J=14.1, 8.9\text{Hz}$, 1H), 2.38-2.22 (m, 2H)。

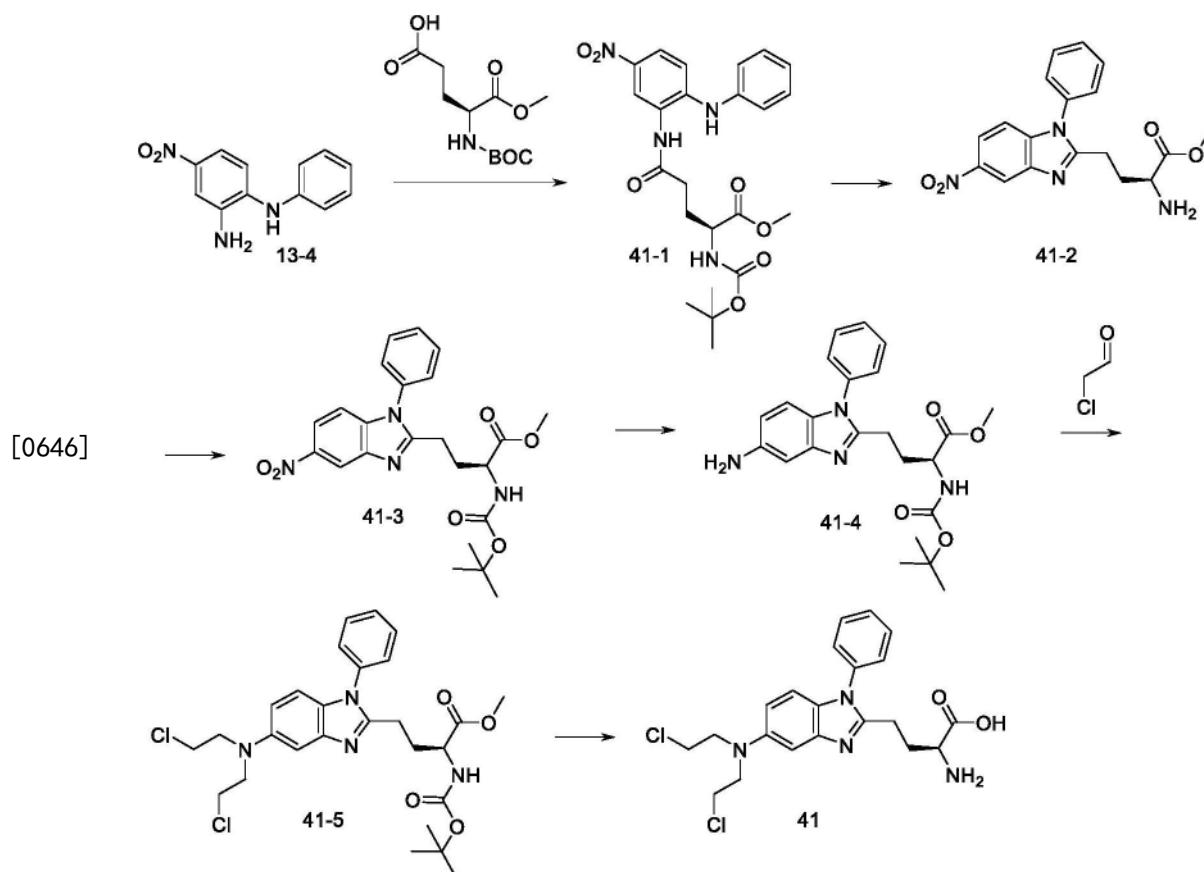
[0639] 实施例40: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物40)



[0642] 实施例41: (2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酸(实施例化合物41)



[0645] 路线11



[0647] (2S)-5-(2-苯胺基-5-硝基-苯胺基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-氧代-戊酸甲酯 (化合物41-1)

[0648] 将Boc-Glu-OMe (1.63g, 0.00624mol) 溶解在无水DMF (15mL) 中。加入DIEA (2.97mL, 0.0170mol), 随后加入4-硝基-N1-苯基-苯-1,2-二胺 (1.30g, 0.00567mol; 13-4) 和COMU (2.91g, 0.00681mol)。反应物在室温下搅拌过夜。真空蒸发除去大部分DMF, 然后加入甲苯 (10mL), 有机相用水 (3×100mL) 洗涤。有机相用MgSO₄干燥, 过滤, 蒸发溶剂, 得到标题化合物 (41-1), 呈深棕色油状, 粗品 (5.61g)。HPLC纯度: 48%; (ESI+) m/z 373 [M+H-BOC]⁺。该物质不进行进一步纯化就用于下一步。

[0649] (2S)-2-氨基-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸甲酯 (化合物41-2)

[0650] 向粗品 (2S)-5-(2-苯胺基-5-硝基-苯胺基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-氧代-戊酸甲酯 (5.61g, 纯度48%; 41-1) 的EtOH (100mL) 溶液中加入12M HCl (15mL), 混合物在70℃搅拌45分钟。反应混合物用水 (100mL) 稀释, 用4M NaOH (约45mL) 小心中和至pH 7, 用EtOAc (3×100mL) 萃取。有机相用MgSO₄干燥, 过滤, 蒸发溶剂, 得到标题化合物 (41-2), 呈深红棕色固体产物 (2.04g)。HPLC纯度: 60%; MS (ESI+) m/z 355 [M+H]⁺。该物质不进行进一步纯化就用于下一步。

[0651] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸甲酯 (化合物41-3)

[0652] 向粗品 (2S)-2-氨基-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸甲酯 (2.04g) 的THF (25mL) 溶液中加入TEA (2.38mL) 和叔丁氧基羰基碳酸叔丁酯 (1.49g), 混合物在室温下搅拌1h。蒸发溶剂, 残余物溶解在EtOAc中。有机相用5%柠檬酸洗涤, 用MgSO₄干燥, 过滤, 然后蒸

发溶剂。在硅胶上用快速色谱纯化粗品,用石油醚中20至80%EtOAc梯度洗脱,得到标题化合物(41-3)(1.13g,0.00249mmol,收率44%)。HPLC纯度:95%;MS(ESI+)m/z 455[M+H]⁺。

[0653] (2S)-4-(5-氨基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(化合物41-4)

[0654] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(5-硝基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)丁酸甲酯(0.330g,0.000581mol,纯度80%)的MeOH(20mL)溶液中加入Pd/C(10.0%,0.0734g,0.000069mol),并抽真空。连接氢气气球,混合物在室温下搅拌4h。过滤除去Pd/C,蒸干溶剂,得到(2S)-4-(5-氨基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(190mg,0.000636mol;41-4)。HPLC纯度:90%;MS(ESI+)m/z 425[M+H]⁺。

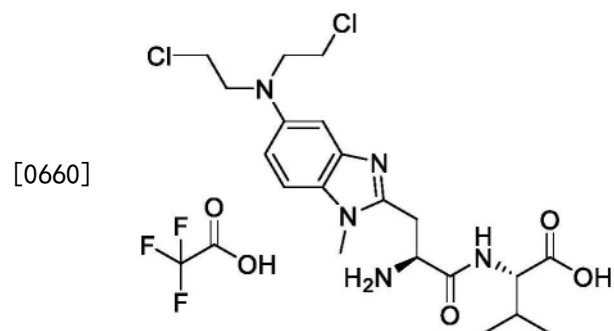
[0655] (2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(化合物41-5)

[0656] 将NaBH₃CN(120mg)加至EtOH(20mL)中的(2S)-4-(5-氨基-1-苯基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(90%,300mg,0.636mmol,纯度90%)、2-氯乙醛(50%,0.24mL)和TFA(0.19mL)的混合物中。混合物在室温下搅拌3h。加入3额外当量的NaBH₃CN、2-氯乙醛和TFA,反应物在室温下搅拌1h。加入甲苯和饱和NaHCO₃,分离有机相并用水洗涤。蒸发溶剂,并在硅胶上用快速色谱纯化浅棕色固体残余物,用石油醚中50至100%EtOAc洗脱,得到(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(190mg,0.000311mol,收率49%)。HPLC纯度:90%;MS(ESI+)m/z=550[M+H]⁺。

[0657] (2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酸二盐酸盐(实施例化合物41)

[0658] 将(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(190mg,0.000311mol)溶解在1,4-二噁烷(5.00mL)中,然后加入水(1.5mL)和LiOH·H₂O(44mg)。混合物在50℃下搅拌20min,然后加入水(10mL)和DCM(10mL),用1M HCl(水溶液)调节pH至6-7。分离各相,有机相用水洗涤,用MgSO₄干燥。将HCl(4M,1,4-二噁烷中,0.50mL,0.004mol)加入有机相中,澄清溶液在室温下搅拌1h。除去沉淀物中的溶剂相,用乙醚洗涤沉淀物。然后将其重新溶解在少量水中并立即冷冻干燥,得到(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-苯基-苯并咪唑-2-基]丁酸二盐酸盐(实施例化合物41)(138mg,0.000242mol,收率78%),呈固体。HPLC纯度:89%;MS(ESI+)m/z=435[M+H]⁺。

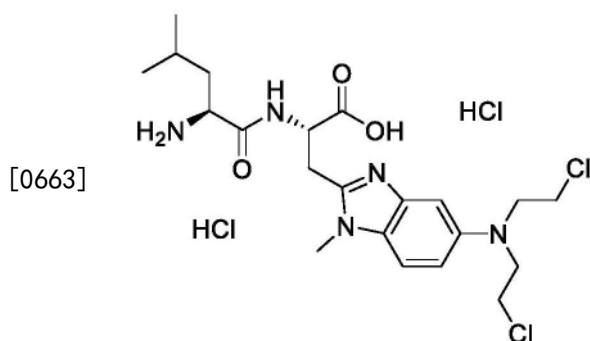
[0659] 实施例42:(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸·2,2,2-三氟乙酸(实施例化合物42)



[0661] 将(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]

丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸乙酯二盐酸盐(化合物6) (12mg, 0.02mmol) 溶解在THF (1mL)、MeOH (0.5mL) 和0.5M LiOH(水溶液, 0.13mL, 0.065mmol) 的混合物中。反应混合物在室温下搅拌过夜。蒸发有机溶剂, 残余物用制备HPLC纯化, 得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸·2,2,2-三氟乙酸(实施例化合物42) (2.6mg, 0.00454mmol, 收率21%), 呈固体。HPLC纯度: 95%; MS (ESI+) $m/z = 458 [M+H]^+$ 。

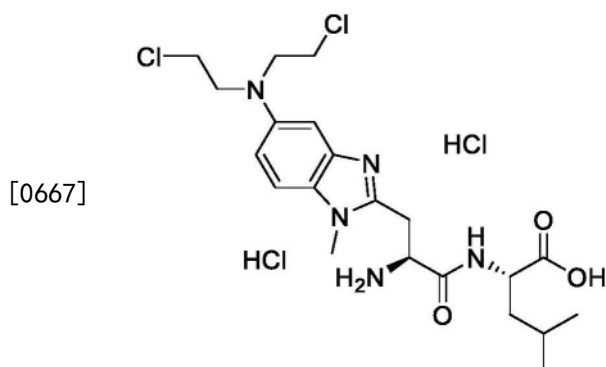
[0662] 实施例43: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸二盐酸盐(实施例化合物43)



[0664] 向(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物10) (12mg, 0.02mmol) 中加入1M HCl (水溶液) (1mL), 反应物在室温下搅拌过夜。加入浓HCl (10滴)。四小时后, 再加入0.3mL 浓HCl, 混合物搅拌过夜。将混合物转移至圆底烧瓶中, 向混合物中加入水, 将其冻干, 得到(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酰基]氨基]-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酸二盐酸盐(实施例化合物43) (5mg, 0.00917mmol, 收率44%), 呈固体。HPLC纯度: 95%; MS (ESI+) $m/z = 472 [M+H]^+$ 。

[0665] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.78 (s, 1H), 9.40 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 1H), 8.38 (s, 3H), 7.76 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 7.16 (dd, $J = 9.2, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.94 (d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 4.93 (td, $J = 7.9, 5.7\text{Hz}$, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.80 (dt, $J = 33.0, 6.8\text{Hz}$, 9H), 3.64 (dd, $J = 15.5, 5.9\text{Hz}$, 1H), 3.60-3.56 (m, 2H), 1.67-1.60 (m, 1H), 1.50 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 0.85 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 6H)。

[0666] 实施例44: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物44)

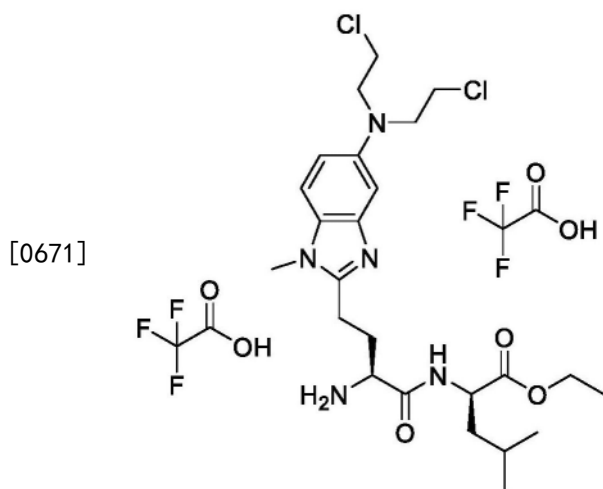


[0668] 向(2S)-2-[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物4) (10mg, 0.017mmol) 中加入1M

HCl(水溶液)(1mL),反应物在室温下搅拌过夜。加入浓HCl(10滴),反应物搅拌过夜。将混合物转移至圆底烧瓶中,用水稀释并冻干,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-3-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丙酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物44)(5mg,0.00917mmol,收率53%),呈固体。HPLC纯度:95%;MS(ESI+)m/z=472[M+H]⁺。

[0669] ¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆) δ14.61(s,1H),9.11(d,J=7.7Hz,1H),8.73(s,3H),7.75(d,J=9.3Hz,1H),7.16(d,J=9.4Hz,1H),6.92(d,J=2.4Hz,1H),4.51-4.44(m,1H),4.27(q,J=7.6Hz,1H),3.94(s,3H),3.87-3.75(m,9H),3.66(d,J=6.6Hz,2H),1.76-1.68(m,1H),1.55(dt,J=8.8,4.6Hz,2H),0.88(dd,J=19.5,6.5Hz,6H)。

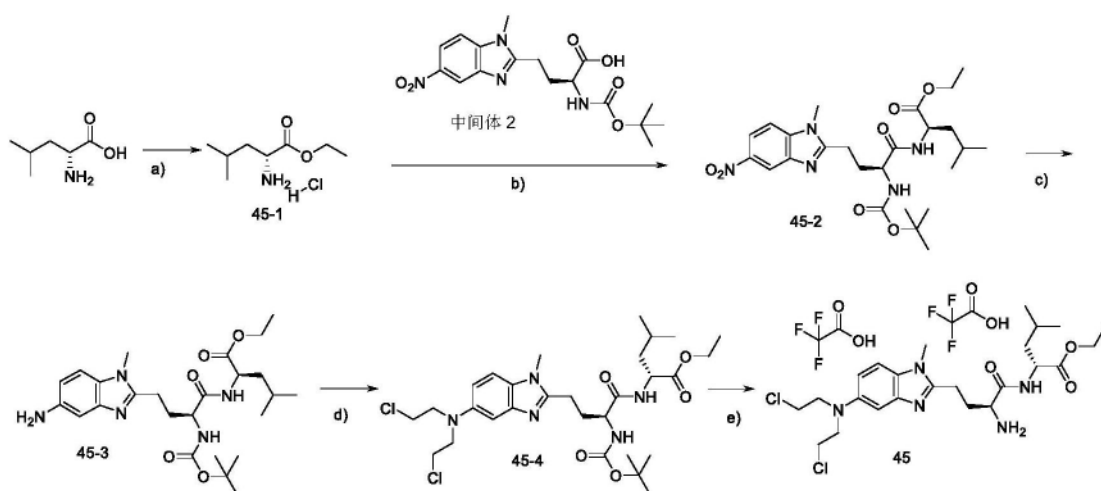
[0670] 实施例45:(2R)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯·二-2,2,2-三氟乙酸(实施例化合物45)



[0672] 根据以下路线12合成实施例45:

[0673] 路线12.试剂和条件:a)1.2eq.SOCl₂,乙醇,0℃至回流;b)HATU,TEA,DMF;c)碳载10%钯(用约55%水润湿),乙醇,5% AcOH;d)2-氯乙醛(15eq),NaBH₃CN(10eq),TFA(12eq),EtOH;e)4M HCl,二噁烷:EtOH:DCM

[0674] 路线12



[0676] R-亮氨酸乙酯盐酸盐(化合物45-1)

[0677] 在25mL烧瓶中,加入(2R)-2-氨基-4-甲基-戊酸(1.00g,0.00762mol)和无水乙醇(6.00mL)。反应物在冰浴中冷却,滴加氯化亚砷(0.667mL,0.00915mol),得到浆液。加入后,

反应物在回流下搅拌2h 30min。蒸发溶剂,残余物悬浮于Et₂O(16mL)中并搅拌1h。过滤产物得到标题化合物(45-1)(1.36g,0.00693mol,收率91%)。HPLC纯度:99%;MS(ESI+)m/z=160[M+H]⁺。

[0678] ((S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)丁酰基)-D-亮氨酸乙酯(化合物45-2)

[0679] 向DMF(4.60mL)中的(2S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸(中间体2)(0.500g,0.00132mol)、R-亮氨酸乙酯盐酸盐(0.259g,0.00132mol)和TEA(0.553mL,0.00396mol)的混合物中加入HATU(0.502g,0.00132mol)。反应物搅拌2h,然后加入水(9mL)。产物出油。用移液管除去液体。向湿的半固体中加入EtOH(5mL)。加热至80℃溶解半固体。加入水(5mL)直至出现沉淀。停止加热。产物出油。蒸发溶剂,残余物溶解在甲苯中,并用水洗涤。有机相用MgSO₄干燥,过滤并蒸发溶剂,得到标题化合物(45-2)(0.575g,0.00111mol,收率:84%)。HPLC纯度:97%;MS(ESI+)m/z=520[M+H]⁺。该物质不进行进一步纯化就用于下一步。

[0680] (2R)-2-[[[(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物45-3)

[0681] 含AcOH(1.30mL)的EtOH(25.0mL)中的(2R)-2-[[[(2S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(575mg,0.00111mol)和碳载10%钯(用约55%水润湿)(0.262g,0.00111mol)的混合物搅拌过夜。用硅藻土过滤固体物质,得到标题化合物(542mg,1.11mmol,收率100%)。HPLC纯度:98%;MS(ESI+)m/z=490[M+H]⁺。该物质不进行进一步纯化就用于下一步。

[0682] (2R)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物45-4)

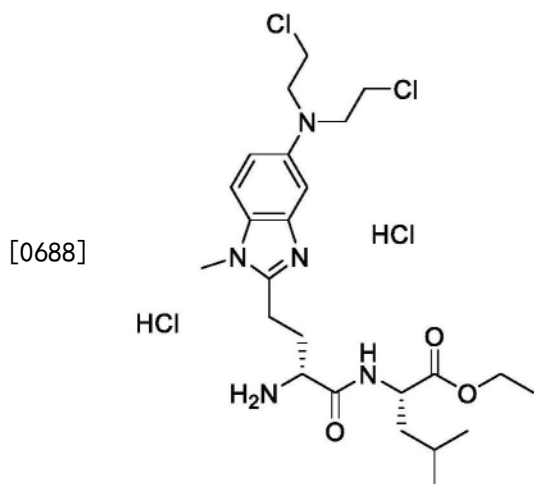
[0683] 室温下,将NaBH₃CN(0.348g,0.00554mol)加至EtOH(30mL)中的(2R)-2-[[[(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.542g,0.00111mol;45-3)、2-氯乙醛(50%,0.701mL,0.00554mol)和TFA(0.493mL,0.00664mol)的混合物中。搅拌20分钟后,加入额外的NaBH₃CN(0.348g,0.00554mol)和2-氯乙醛(5.0%,0.701mL,0.00554mol)。反应物进一步搅拌20分钟,然后加入2-氯乙醛(50%,0.701mL,0.00554mol)。反应物进一步搅拌2小时,然后加入甲苯,有机相用碳酸氢钠和盐水洗涤。有机相用MgSO₄干燥,过滤并蒸发溶剂。化合物在球形硅胶上用快速色谱纯化,用DCM中的2% EtOH洗脱,得到标题化合物45-4(209mg,0.340mmol,收率31%)。HPLC纯度:95%;MS(ESI+)m/z=614[M+H]⁺。

[0684] (2R)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯·二-2,2,2-三氟乙酸(化合物实施例45)

[0685] 将二噁烷(1.40mL)中的4M HCl加至DCM(1.40mL)和EtOH(0.860mL)混合物中的(2R)-2-[[[(2S)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.209g,0.000340mol)中。反应物搅拌5h,然后蒸发溶剂,得到纯度90%的粗产物。粗产物溶解在含30%水的MeCN中,并用制备HPLC纯化,ACE色谱柱,用10至60% MeCN/水(0.1% TFA)洗脱,得到标题化合物(实施例化合物45)(104mg,0.140mmol,收率49%)。HPLC纯度:99%;MS(ESI+)m/z=514[M+H]⁺。

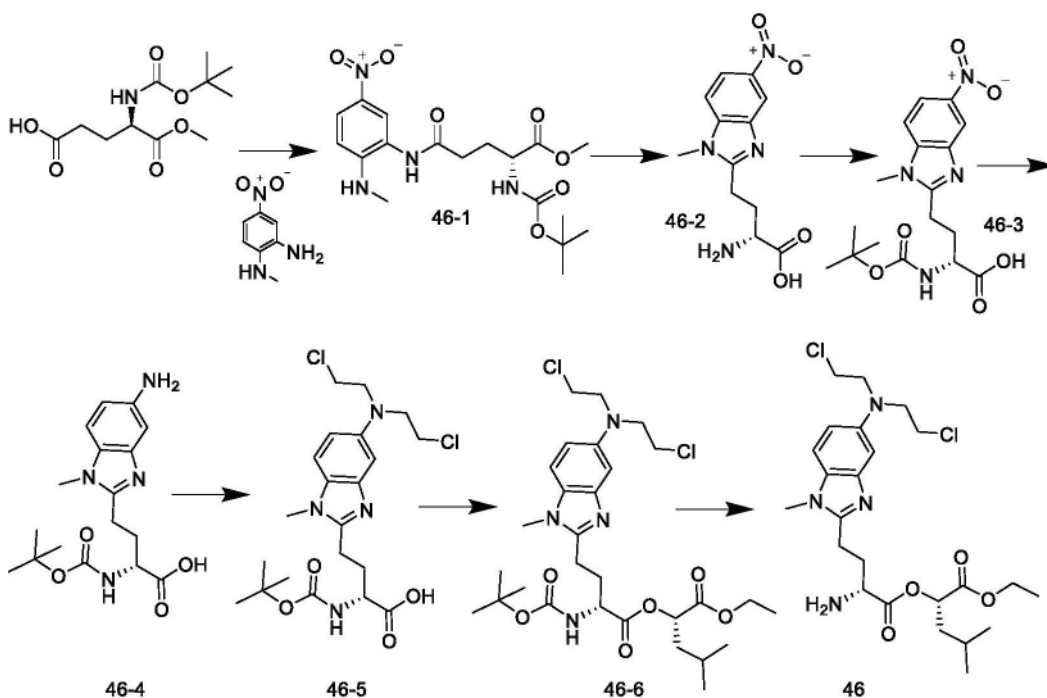
[0686] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 9.18-8.99 (m, 1H), 8.41 (s, 3H), 7.70-7.59 (m, 1H), 7.13-7.02 (m, 1H), 6.94 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 4.33 (q, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 4.13 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 4.07-4.01 (m, 1H), 3.85-3.71 (m, 11H), 3.17-3.07 (m, 2H), 2.25 (q, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 1.65-1.52 (m, 3H), 1.21 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.89 (d, $J=6.1\text{Hz}$, 3H), 0.86 (d, $J=6.1\text{Hz}$, 3H)。

[0687] 实施例46: (2S)-2-[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物46)



[0689] 根据以下路线13合成实施例46:

[0690] 路线13



[0692] (2R)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-(甲基氨基)-5-硝基-苯胺基]-5-氧代-戊酸甲酯(化合物46-1)

[0693] 向N-叔丁氧基羰基-D-谷氨酸 α -甲酯(1.00eq, 2.00g, 7.65mmol)、1-甲基咪唑(1.00eq, 0.61mL, 7.65mmol)和N1-甲基-4-硝基-苯-1,2-二胺(1.34g, 8.037mmol)的MeCN(20mL)溶液中缓慢加入氯(二甲基氨基)-N,N-二甲基甲亚铵(methaniminium)六氟磷酸盐

(TCFH) (1.10eq, 2.36g, 8.42mmol)。混合物在室温下搅拌1h, 然后加入水(200mL)。有机相通过分相器筒, 蒸发并真空干燥, 得到(2R)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-(甲基氨基)-5-硝基-苯胺基]-5-氧代-戊酸甲酯(3.1g, 7.55mmol, 收率99%), 呈固体。HPLC纯度: 99%; MS (ESI+) $m/z = 843 [2M+Na]^+$ 。

[0694] (2R)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸(化合物46-2)

[0695] 将(2R)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-(甲基氨基)-5-硝基-苯胺基]-5-氧代-戊酸甲酯(1.00eq, 3.10g, 7.55mmol)加入盐酸中(4M, 水溶液)(18.0eq, 34mL, 136mmol)。加入后, 加热混合物并在100℃下无塞搅拌2h。使反应达到室温并过滤少量棕色固体。滤液在冰浴中冷却并小心地加入10M NaOH直至pH达到2。之后, 加入4M NaOH溶液直至pH到5.2。过滤所得固体, 用水和Et₂O洗涤并真空干燥, 得到(2R)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸(2.3g, 7.52mmol, 收率>99%), 呈固体。HPLC纯度: 91%; MS (ESI+) $m/z = 279 [M+H]^+$ 。

[0696] (2R)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸(化合物46-3)

[0697] 向(2R)-2-氨基-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸(1.00eq, 2.30g, 7.52mmol)的水(10mL)溶液中加入NaOH(4M, 水溶液)(1.10eq, 2.1mL, 8.27mmol)。向溶液中加入二碳酸二叔丁酯(1.40eq, 2.4mL, 10.5mmol), 混合物在室温下搅拌2h。形成沉淀。加入额外的4M NaOH(0.5eq.), 反应物在室温下搅拌3h。调节pH至9.2, 反应混合物用Et₂O(3×300mL)洗涤。弃去获得的有机相, 将水相蒸发以除去Et₂O残余物。将4M HCl滴加到水相中。收集所得固体, 用水洗涤, 干燥, 得到(2R)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸(1.85g, 4.59mmol, 收率61%), 呈固体。HPLC纯度: 94%; MS (ESI+) $m/z = 379 [M+H]^+$ 。

[0698] (2R)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(化合物46-4)

[0699] 将(2R)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(1-甲基-5-硝基-苯并咪唑-2-基)丁酸(1.00eq, 300mg, 0.769mmol)溶解在乙醇(5mL)中, 并置于H-反应器中。加入Pd/C 10% (0.0500eq, 8.2mg, 0.0385mmol)并密封反应器。用氮气吹扫。在3bar下将H₂充入反应器中, 反应物在室温下搅拌2h。用氮气吹扫排出氢气。用硅藻土过滤除去催化剂。蒸发溶剂, 得到(2R)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(235mg, 0.690mmol, 收率94%)。HPLC纯度: 95%; MS (ESI+) $m/z = 349 [M+H]^+$ 。

[0700] (2R)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(化合物46-5)

[0701] 将(2R)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(1.00eq, 253mg, 0.690mmol)悬浮于乙醇(2mL)中。加入氰基硼氢化钠(3.00eq, 130mg, 2.07mmol), 随后加入三氟乙酸(1.50eq, 0.079mL, 1.03mmol), 然后滴加氯乙醛(50%, 3.00eq, 0.26mL, 2.07mmol)。反应混合物搅拌30分钟。加入额外2个当量的NaBH₃CN、氯乙醛和TFA, 反应物在室温下搅拌2h。滴加4M NaOH将pH调节至3.6。蒸发乙醇, 加入水, 用EtOAc萃取水相。蒸发有机相, 分离得到粗品(2R)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(303mg, 0.557mmol, 收率81%), 呈固体。HPLC纯度: 87%;

MS (ESI+) $m/z = 473 [M+H]^+$ 。

[0702] (2S)-2-[[[(2R)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物46-6)]

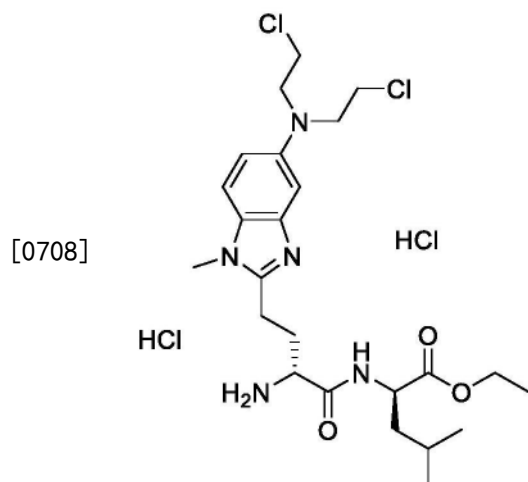
[0703] 将1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.15eq, 41mg, 0.211mmol)加至MeCN(3mL)中的(2R)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(1.00eq, 100mg, 0.184mmol)、(2S)-2-氨基-4-甲基戊酸乙酯(1.15eq, 34mg, 0.211mmol)、乙基氰基乙醛酸乙酯-2-肼(1.00eq, 26mg, 0.184mmol)和4-甲基吗啉(1.15eq, 23μL, 0.211mmol)的混合物中。反应混合物在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物并用制备色谱纯化。将纯的级分冷冻干燥,得到(2S)-2-[[[(2R)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(17mg, 0.0275mmol, 收率15%)。HPLC纯度:99%;MS (ESI+) $m/z = 614 [M+H]^+$ 。

[0704] (2S)-2-[[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物46)]

[0705] 将(2S)-2-[[[(2R)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(1.00eq, 17.1mg, 0.0275mmol)溶解在MeCN(2mL)中,加入盐酸(4M, 二噁烷中)(5.00eq, 35μL, 0.139mmol)。反应物在室温下搅拌1h。过滤混合物并用制备色谱纯化,合并纯的级分并冷冻干燥,得到(2S)-2-[[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物46)(14.3mg, 0.0234mmol, 收率84%),呈固体。HPLC纯度:96%;MS (ESI+) $m/z = 514 [M+H]^+$ 。

[0706] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.81 (s, 1H), 9.23 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 8.59 (s, 3H), 7.75 (d, $J = 9.1\text{Hz}$, 1H), 7.15 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 6.94 (d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 4.30-4.24 (m, 1H), 4.11 (q, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 4.04 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.83 (t, $J = 6.7\text{Hz}$, 4H), 3.77 (t, $J = 6.6\text{Hz}$, 4H), 3.2-3.3 (m, 2H), 2.32 (dp, $J = 29.8, 7.6\text{Hz}$, 2H), 1.69-1.57 (m, 2H), 1.53 (ddd, $J = 13.8, 8.5, 5.6\text{Hz}$, 1H), 1.20 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 0.87 (dd, $J = 21.4, 6.3\text{Hz}$, 6H)。

[0707] 实施例47: (2R)-2-[[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物47)]



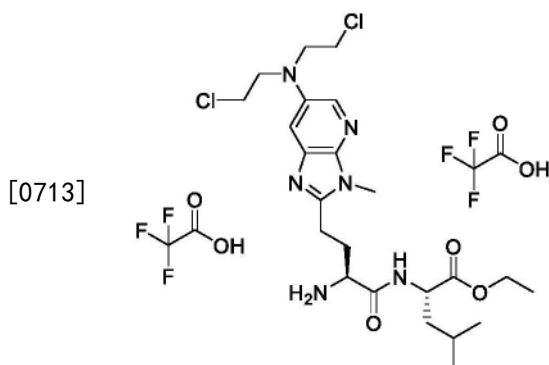
[0709] 根据路线13合成实施例47,但用D-亮氨酸乙酯盐酸盐(1.15eq, 41mg, 0.211mmol)

作为多肽与化合物46-5偶联的起始原料,分离得到(2R)-2-[[[(2R)-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯·2,2,2-三氟乙酸(27mg,0.0375mmol,收率20%),呈固体。HPLC纯度:99%;MS (ESI+) $m/z = 614 [M+H]^+$ 。

[0710] 分离得到(2R)-2-[[[(2R)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物47)(6mg,0.0097mmol,收率25%),呈固体。HPLC纯度:95%;MS (ESI+) $m/z = 514 [M+H]^+$ 。

[0711] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.79 (s, 1H), 9.25 (d, $J = 7.0\text{Hz}$, 1H), 8.69-8.47 (m, 3H), 7.75 (d, $J = 9.1\text{Hz}$, 1H), 7.15 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.31 (dt, $J = 11.3, 5.7\text{Hz}$, 1H), 4.16-4.04 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.83 (d, $J = 6.7\text{Hz}$, 4H), 3.78 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 4H), 3.38-3.33 (m, 2H), 2.32 (dp, $J = 23.6, 7.6, 7.0\text{Hz}$, 2H), 1.75 (h, $J = 6.9\text{Hz}$, 1H), 1.64 (td, $J = 12.3, 10.8, 5.1\text{Hz}$, 1H), 1.55 (ddd, $J = 14.0, 9.4, 4.8\text{Hz}$, 1H), 1.18 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 0.90 (dd, $J = 25.1, 6.5\text{Hz}$, 6H)。

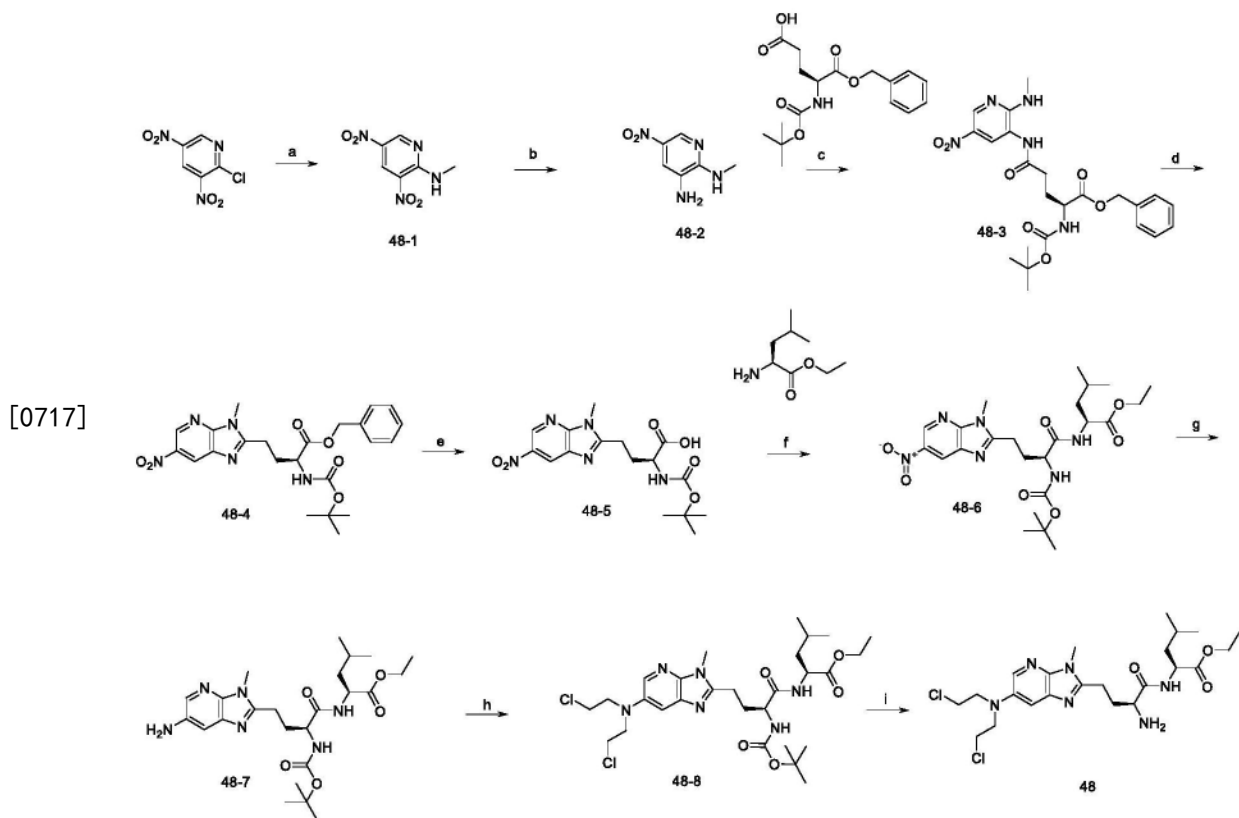
[0712] 实施例48: (2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[6-[双(2-氯乙基)氨基]-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯·二-2,2,2-三氟乙酸(实施例化合物48)



[0714] 根据以下路线14合成实施例48:

[0715] 路线14. 试剂和条件。a) MeNH_2 , MeOH, 0°C ; b) 20% 硫化铵水溶液, MeOH, 加热; c) HATU, DIPEA, DMF, 室温; d) $n\text{-PrOH}$, 100°C ; e) $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, THF, MeOH, H_2O , 室温; f) HATU, DIPEA, DMF, 室温; g) Pd/C 10%, H_2 , EtOH; h) 氯乙醛溶液 (~55wt. %, H_2O 中), NaBH_3CN , TFA, EtOH; i) TFA, DCM 0°C -室温, 然后12M HCl。

[0716] 路线14



[0718] N-甲基-3,5-二硝基-吡啶-2-胺(化合物48-1)

[0719] 在0-5℃下,向2-氯-3,5-二硝基吡啶(4.0g,0.0196mol)的MeOH(40mL)悬浮液中滴加MeNH₂(4.32mL,40vol%,0.059mol)的水溶液和MeOH(16mL)的混合物。形成黄色沉淀,过滤收集沉淀,用MeOH和水洗涤,真空干燥过夜,得到N-甲基-3,5-二硝基-吡啶-2-胺(3.00g,0.0151mol,收率77%)。HPLC纯度:95%;MS(ESI+)m/z=199[M+H]⁺。

[0720] N2-甲基-5-硝基-吡啶-2,3-二胺(化合物48-2)

[0721] 将N-甲基-3,5-二硝基-吡啶-2-胺(2.80g, 14.1mmol)悬浮于甲醇(60mL)中,加入20%硫化铵水溶液(24.1mL)。升高温度至75℃,混合物搅拌2.5h。然后反应物在室温下搅拌过夜。混合物置于冰浴中并形成沉淀。过滤收集固体,真空干燥过夜,得到N2-甲基-5-硝基-吡啶-2,3-二胺(3.39g, 大于理论收率),呈红棕色固体。该物质不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z = 169 [M+H]^+$ 。

[0722] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[[2-(甲基氨基)-5-硝基-3-吡啶基]氨基]-5-氧代-戊酸苄酯(化合物48-3)

[0723] 向(4S)-5-苄氧基-4-(叔丁氧基羰基氨基)-5-氧代-戊酸(1.00g,2.97mmol)的二甲基甲酰胺(7.50mL)溶液中加入HATU(1.36g,3.57mmol)和DIEA(1.04mL,5.45mmol),反应物搅拌2min,然后加入N2-甲基-5-硝基-吡啶-2,3-二胺(化合物48-2)(0.500g,2.97mmol)。反应物在室温下搅拌22h。加入EtOAc,有机相用盐水洗涤(3×),用硫酸镁干燥,倾析并浓缩,得到(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[[2-(甲基氨基)-5-硝基-3-吡啶基]氨基]-5-氧代-戊酸苄酯(2.74g,大于理论收率)。该物质不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:80%;MS(ESI+)m/z=488[M+H]⁺。

[0724] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑[4,5-b]吡啶-2-基)丁酸

苄酯(化合物48-4)

[0725] 将1-丙醇(20.0mL)中的(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[[2-(甲基氨基)-5-硝基-3-吡啶基]氨基]-5-氧代-戊酸苄酯(1.07g, 2.19mmol)在100℃加热6天(与在更小规模上进行相比,反应速度更慢)。蒸发1-丙醇并加入EtOAc。有机相用盐水洗涤,用硫酸镁干燥并浓缩。粗物质用快速色谱纯化(SiO_2 , 12g, 石油醚/EtOAc 0-100%),得到(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酸苄酯(280mg, 收率27%)。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z = 470 [M+H]^+$ 。

[0726] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酸(化合物48-5)

[0727] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酸苄酯(0.280g, 0.596mmol)的含水(0.2mL)的四氢呋喃(1.20mL)/甲醇(1.20mL)的溶液中加入 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.0425g, 1.01mmol)。反应物在室温下搅拌2h。加入EtOAc和5%柠檬酸,并分离各相。有机相用硫酸镁干燥,过滤并蒸发溶剂,得到(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酸(0.240g)。该物质不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:95%;MS (ESI+) $m/z = 380 [M+H]^+$ 。

[0728] (2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物48-6)

[0729] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酸(0.240g, 0.633mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(1.50mL)溶液中加入(2S)-2-氨基-4-甲基-戊酸乙酯盐酸盐(0.124g, 0.633mmol)和HATU(0.289g, 0.759mmol),随后加入N,N-二异丙基乙胺(0.204g, 1.58mmol)。然后反应物在室温下搅拌过夜。加入EtOAc,有机相用盐水洗涤(3×),用 MgSO_4 干燥,过滤并浓缩。粗物质用快速色谱纯化(SiO_2 , 石油醚/EtOAc 0-100%),得到(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.340g)。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z = 521 [M+H]^+$ 。

[0730] (2S)-2-[[(2S)-4-(6-氨基-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物48-7)

[0731] 乙醇(20.0mL)中(2S)-2-[[(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-4-(3-甲基-6-硝基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.340g, 0.653mmol)和Pd/C 10%(0.0695g, 0.653mmol)的混合物在 H_2 (大气压)中搅拌过夜。滤出催化剂并蒸发溶剂,得到标题化合物(2S)-2-[[(2S)-4-(6-氨基-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(0.273g, 收率85%),呈透明粘稠油状。该物质不进行进一步纯化就用于下一步。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z = 491 [M+H]^+$ 。

[0732] (2S)-2-[[(2S)-4-[6-[双(2-氯乙基)氨基]-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物48-8)

[0733] 在室温下,向(2S)-2-[[(2S)-4-(6-氨基-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(170mg, 0.346mmol)中加入氯乙醛(0.22mL, 50%水溶液)和TFA(0.12mL),然后加入氰基硼氢化钠(109mg, 1.73mmol),反应物在室温下搅拌30min,在该时间点观察到转化了50%。再次加入相同量的所有上述试剂,反应物再搅拌30min。真空蒸发挥发物。粗产物溶解在乙酸乙酯中,用饱和碳酸钠水溶液、盐水

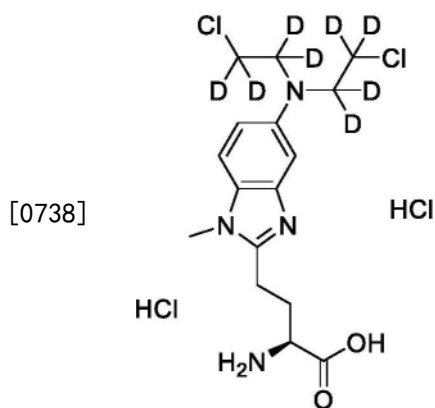
洗涤,用硫酸钠干燥,过滤并浓缩。粗物质用快速色谱(12g硅胶柱,DCM中70-90% MeOH)纯化,得到标题化合物(2S)-2-[[[(2S)-4-[6-[双(2-氯乙基)氨基]-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(75mg,收率35%),呈无色粘稠油状。HPLC纯度:95%;MS (ESI+) $m/z=615[M+H]^+$ 。

[0734] (2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[6-[双(2-氯乙基)氨基]-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯·二-2,2,2-三氟乙酸(实施例化合物48)

[0735] 在5℃下,向(2S)-2-[[[(2S)-4-[6-[双(2-氯乙基)氨基]-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物48-8)(35mg, 0.057mmol)的DCM(2mL)溶液中加入TFA(0.1mL)。反应物在5℃搅拌30min,然后使其升温至室温。然后加入额外的TFA(0.2mL),反应物在室温下搅拌3h。粗物质用反相酸性制备HPLC纯化(10-90%乙腈,0.1% TFA水溶液)。浓缩纯的级分,得到(2S)-2-[[[(2S)-2-氨基-4-[6-[双(2-氯乙基)氨基]-3-甲基-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯·二-2,2,2-三氟乙酸(实施例化合物48)(11.3mg,收率39%),呈固体。HPLC纯度:95%;MS (ESI+) $m/z=515[M+H]^+$ 。

[0736] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 9.04 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 8.57-8.26 (m, 3H), 8.10 (d, $J=2.6\text{Hz}$, 1H), 7.43 (d, $J=2.7\text{Hz}$, 1H), 4.38-4.30 (m, 1H), 4.12-4.08 (m, 2H), 4.05-4.02 (m, 1H), 3.81-3.73 (m, 11H), 3.13 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 2.39-2.22 (m, 2H), 1.77-1.67 (m, 1H), 1.65-1.52 (m, 2H), 1.17 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.93 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 0.89 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H)。

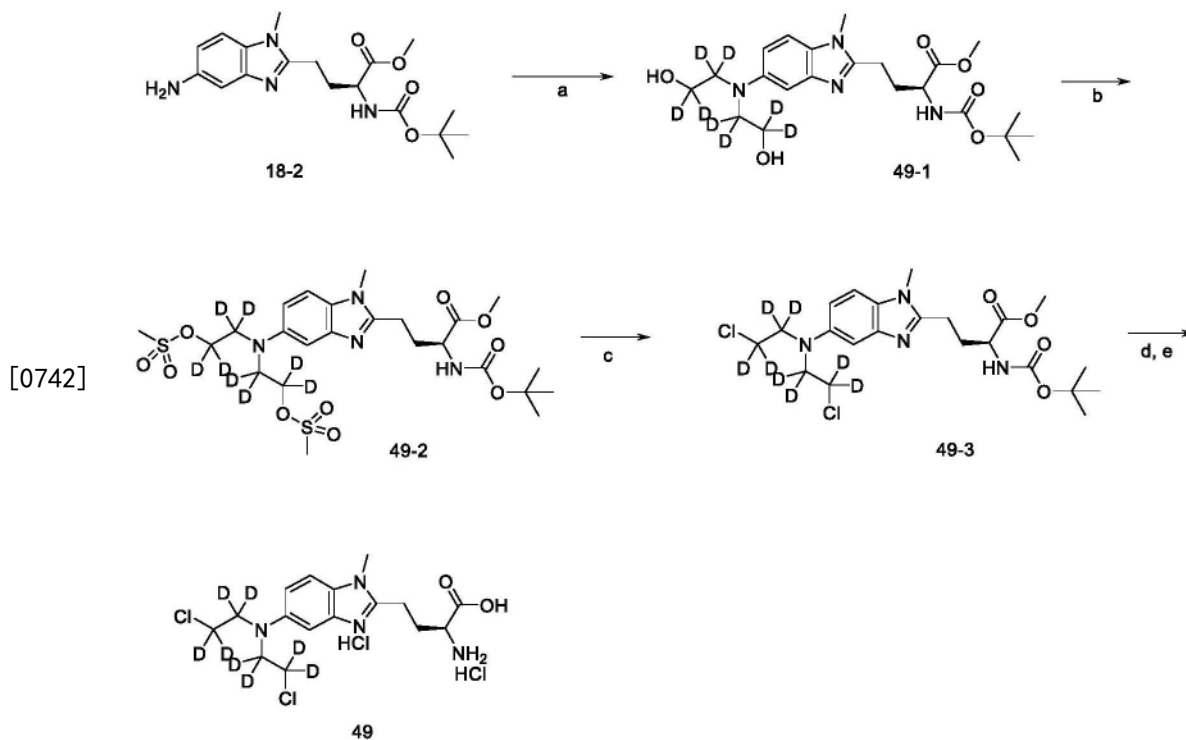
[0737] 实施例49: (2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氟代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸二盐酸盐(实施例化合物49)



[0739] 根据以下路线15合成实施例49:

[0740] 路线15

[0741] 路线15. 试剂和条件: a) 2-溴乙醇- d_4 , KI, CaCO_3 , 1,4-二噁烷/水, 90℃, 17h; b) 甲磺酰氯, 三乙胺, 室温, 1h; c) LiCl, DMF, 60℃, 2h; d) LiOH· H_2O , 1,4-二噁烷, 50℃, 20min; e) HCl, 1,4-二噁烷中, DCM, 室温, 1h。



[0743] (2S)-4-[5-[双(1,1,2,2-四氘代-2-羟基-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(化合物49-1)

[0744] 在密闭反应管中,向(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(化合物18-2)(50mg,0.138mmol)的1,4-二噁烷(1.00mL)/水(0.500mL)混合物的溶液中加入 CaCO_3 (21.5mg,0.214mmol)和催化量的KI(5.1mg,0.0306mmol),随后加入2-溴乙醇- d_4 (39.5mg,0.306mmol)。反应物在90℃下加热17小时,之后将混合物用乙腈稀释并在XBridge色谱柱上用制备HPLC纯化,用含有50mM NH_4HCO_3 的水溶液中10至80% MeCN洗脱。得到标题化合物(49-1),呈白色固体,含有至多19%单烷基化副产物和2%过度烷基化副产物(29mg)。MS(ESI+) $m/z = 459 [\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0745] (2S)-4-[5-[双(1,1,2,2-四氘代-2-甲磺酰氧基-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(化合物49-2)

[0746] 将(2S)-4-[5-[双(1,1,2,2-四氘代-2-羟基-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(29mg,0.06mmol)溶解在干燥的二氯甲烷(1.00mL)中,并冷却至0℃。然后加入三乙胺(20mg,0.20mmol)和甲磺酰氯(0.0096mL,0.124mmol),混合物在室温下搅拌直至完全转化。加入水,洗涤DCM相,干燥,得到标题化合物(49-2)粗产物(31mg),呈棕色油状,其不进行进一步纯化就用于下一步。MS(ESI+) $m/z = 615 [\text{M}+\text{H}]^+$ 。

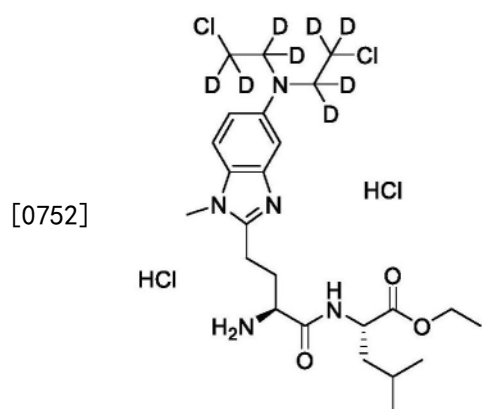
[0747] (2S)-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(化合物49-3)

[0748] 将(2S)-4-[5-[双(1,1,2,2-四氘代-2-甲磺酰氧基-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(21mg,0.035mmol)溶解在干燥的二甲基甲酰胺(0.50mL)中,然后加入LiCl(30mg,0.70mmol),混合物在60℃搅拌直至完全转化。混合物用石油醚中50至100% EtOAc在硅胶上用快速色谱纯化,得到产物(14mg,收率92%),呈灰白色油状。HPLC纯度:90%;MS(ESI+) $m/z = 495 [\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0749] (2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸二盐酸盐(实施例化合物49)

[0750] 将(2S)-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸甲酯(13mg, 0.026mmol)溶解在1,4-二噁烷(1.0mL)中,然后加入水(0.3mL)和LiOH·H₂O(26mg, 0.063mmol)。混合物在50℃搅拌20分钟,然后加入水(2mL)和二氯甲烷(1mL),用HCl水溶液将pH调节至5-6。分离各相,有机相用水洗涤并干燥。向干燥的有机相中加入过量的1,4-二噁烷中的HCl(4mol/L),澄清溶液在室温下搅拌30分钟。混合物浓缩至干,得到(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酸二盐酸盐(实施例化合物49)(6mg, 收率55%),呈固体。HPLC纯度:97%; MS (ESI+) m/z = 381 [M+H]⁺。

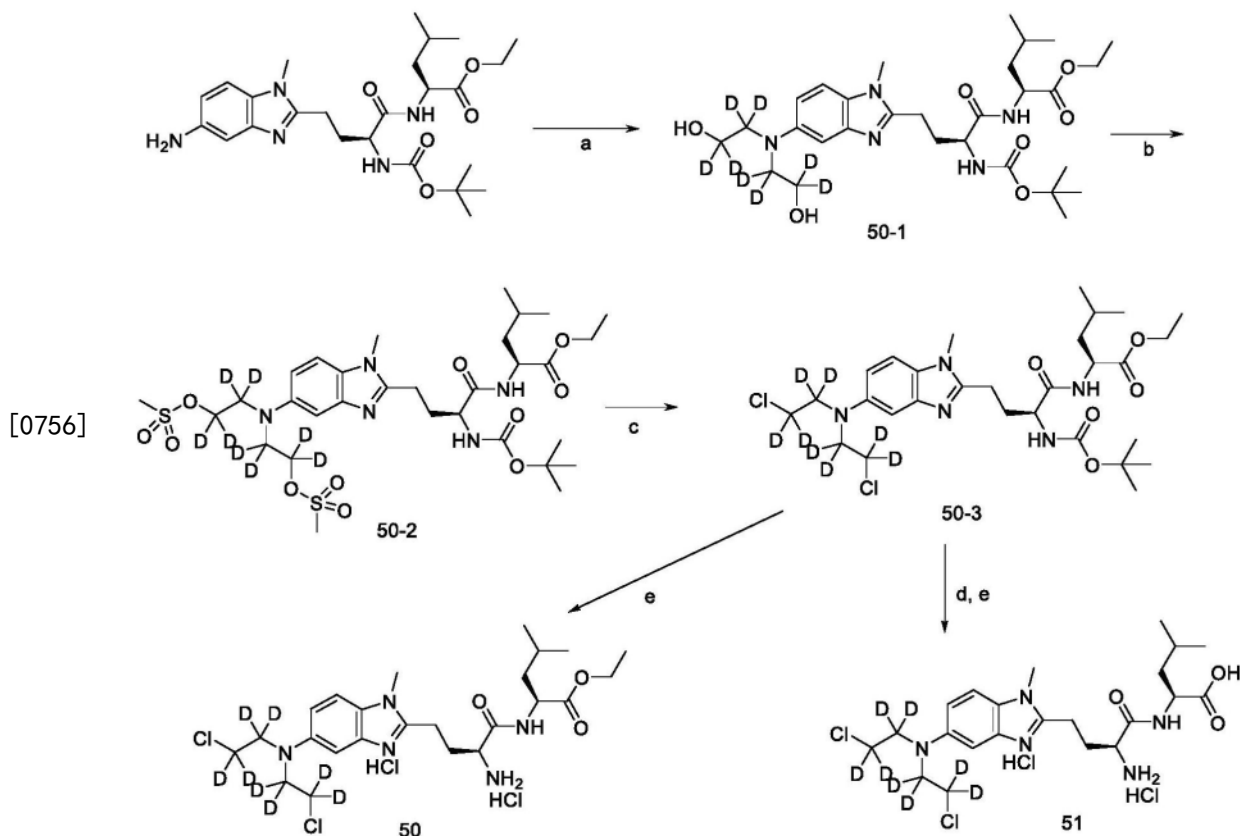
[0751] 实施例50: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯二盐酸盐(实施例化合物50)



[0753] 根据以下路线16合成实施例50:

[0754] 路线16

[0755] 方案16. 试剂和条件: a) 2-溴乙醇-d₄, KI, CaCO₃, 1,4-二噁烷/水, 90℃, 17h; b) 甲磺酰氯, 三乙胺, 室温, 1h; c) LiCl, DMF, 60℃, 2h; d) LiOH·H₂O, 1,4-二噁烷, 50℃, 20min; e) HCl, 1,4-二噁烷中, DCM, 室温, 1h。



[0757] (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(1,1,2,2-四氘代-2-羟基-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物50-1)

[0758] 标题化合物(50-1)由(2S)-2-[[(2S)-4-(5-氨基-1-甲基-苯并咪唑-2-基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(根据合成实施例化合物1的步骤2的描述制备)根据对于化合物49-1的合成所述的方法制备(39mg, 收率65%)。HPLC纯度:80%;MS (ESI+) $m/z=586[M+H]^+$ 。

[0759] (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(1,1,2,2-四氘代-2-甲磺酰氧基-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物50-2)

[0760] 标题化合物(50-2)由化合物50-1根据对于化合物49-2的合成所述的方法制备(26mg, 收率71%)。MS (ESI+) $m/z=742[M+H]^+$ 。

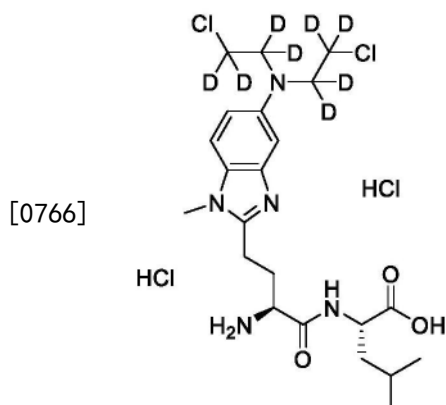
[0761] (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(化合物50-3)

[0762] 标题化合物(50-3)由化合物50-2根据对于化合物49-3的合成所述的方法制备(20mg, 收率92%)。HPLC纯度:90%;MS (ESI+) $m/z=622[M+H]^+$ 。

[0763] (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸乙酯(实施例化合物50)

[0764] 标题化合物(实施例化合物50)由化合物50-3根据对于实施例化合物1的合成中步骤5所述的方法制备, 仅轻微改动条件(DCM作为溶剂, 反应时间为1h)(9mg, 收率4%)。HPLC纯度:95%;MS (ESI+) $m/z=522[M+H]^+$ 。

[0765] 实施例51: (2S)-2-[[(2S)-2-氨基-4-[5-[双(2-氯-1,1,2,2-四氘代-乙基)氨基]-1-甲基-苯并咪唑-2-基]丁酰基]氨基]-4-甲基-戊酸二盐酸盐(实施例化合物51)



[0767] 根据路线16合成实施例51。该化合物由化合物50-3根据对于实施例化合物49的合成中最后数个步骤所述的方法制备(8mg, 收率68%)。HPLC纯度: 95%; MS (ESI+) $m/z = 494 [M + H]^+$ 。

[0768] 生物实施例:

[0769] 生物实施例1-在MM.1S细胞活性检验中评估体外细胞毒性:

[0770] 方法: MM.1S细胞在添加10 μ g/ μ L青霉素/链霉素、10%热灭活FBS、0.1mM丙酮酸钠、1 $\times$ MEM NEAA (ThermoFisher) 和1mM HEPES的RPMI培养基1640 (IX) 中培养。在暴露于测试化合物之前, 细胞生长至对数期。

[0771] 将测试化合物(实施例化合物1至36、38至41和45至48)和比较化合物(苯达莫司汀、白消安、美法仑、苯丁酸氮芥和培磷酰胺(4-hydroperoxy cyclophosphamide))溶解在100% DMSO中并加到384孔检验板中。加入额外的DMSO以保持所有孔中DMSO的终浓度(0.2%)相同。每孔加入25 μ L浓度为100000个细胞/mL的细胞悬液。细胞在CO₂培养箱中于37 $^{\circ}$ C培养72h。将板平衡至室温30分钟, 然后向所有孔中加入20 μ L CellTiter-Glo[®] 2.0 (Promega) 试剂。然后使板稳定20分钟, 然后用Envision酶标仪记录发光(发射光滤光片700nm)。将酶标仪数据归一化为阴性对照(未处理) vs 阳性对照(用400 μ M氯丙嗪处理细胞72h), 由4参数Logistic回归曲线拟合获得IC₅₀。

[0772] 结果: 已评估了测试化合物体外抑制MM.1S细胞增殖和引起细胞毒性的能力。剂量反应可以由实验获得, 并显示在下表1中。测试化合物对MM.1S细胞表现出良好的细胞毒性。在该检验中发现, 比起苯达莫司汀、白消安、美法仑、苯丁酸氮芥和培磷酰胺, 实施例化合物1至16、21至32、34至36、38和45至48更具细胞毒性。

[0773] 表1. 对MM.1S细胞的细胞毒性

[0774]

实施例编号	MM.1S IC50 (μM)	MM.1S, IC50, 标准偏差 (μM)	MM.1S, n
1	0.0068	0.0022	20
2	0.0078	0.0029	7
3	0.0068	0.0012	2
4	0.0066	0.0017	2
5	0.0226	0.0079	2
6	0.0987	0.0381	4
7	0.0229	0.0108	2
8	0.0144	0.0031	2
9	0.0225	0.0025	2
10	0.0192	0.0037	8
11	0.0147	0.0011	2
12	0.0125	0.0045	2
13	0.049	0.0249	7
14	0.0087	0.0012	2
15	0.0091	0.0007	2
16	0.025	0.0076	2
17	39.967	4.5325	2
18	20.244	20.968	14
19	4.0199	0.6051	2
20	5.753	1.149	6
21	0.0266	0.0016	3
22	0.0313	0.0018	2

[0775]

23	0.0418	0.0017	2
24	0.1561	0.0247	2
25	0.0185	0.002	3
26	0.0068	0.0019	2
27	0.0082	0.0014	2
28	0.352	-	1
29	0.0014	-	1
30	0.0397	0.0081	4
31	0.181	0.008	2
32	0.0143	0.002	3
33	79.872	13.613	2
34	0.0683	0.0087	8
35	0.0867	0.0087	2
36	0.0575	0.0047	2
38	0.052	0.0158	7
39	>1.996	-	1
40	7.177	0.709	2
41	16.507	4.3134	2
45	0.512	0.1113	3
46	0.0591	0.0137	3
47	1.7124	0.7595	3
48	0.205	0.0262	2
苯达莫司汀	23.963	6.7392	12
美法仑	4.2451	0.7017	10
白消安	180.3	-	1
苯丁酸氮芥	6.873	6.4333	2
培磷酰胺	7.2953	-	1

[0776] 生物实施例2-评估血液细胞系、人外周血单核细胞和正常成纤维细胞的体外细胞毒性：

[0777] 方法：用于这些实验的细胞系列于下表2中。所有细胞在RPMI培养基1640 (IX) 中培养。所有培养基均添加10 μ g/ μ L青霉素/链霉素、10%热灭活FBS、0.1mM丙酮酸钠、1 $\times$ MEM NEAA (ThermoFisher) 和1mM HEPES。DERL-2细胞具有较高的FBS (20%) 并加入40ng/mL IL-2。将hPBMC解冻并使其适应过夜，然后用10 μ g/mL PHA-M和40ng/mL IL-2刺激4小时，然后暴露于测试化合物。除hPBMC外，在暴露于测试化合物之前，所有细胞生长至对数期。

[0778] 表2. 用于体外细胞毒性实验的细胞系

[0779]

细胞系ID	说明
U937	组织细胞性淋巴瘤

THP-1	急性髓性白血病
DOHH-2	B细胞淋巴瘤
HG-3	慢性淋巴细胞白血病 (CLL)
SC-1	B细胞淋巴瘤
SU-DHL-8	B-细胞非霍奇金淋巴瘤
Toledo	弥漫性大B细胞淋巴瘤
DERL-2	T细胞淋巴瘤
SUP-T1	T细胞淋巴瘤
AMO-1	多发性骨髓瘤
EJM	多发性骨髓瘤
KMS-12-BM	多发性骨髓瘤
MM.1S	多发性骨髓瘤
OPM-2	多发性骨髓瘤
RPMI8226	多发性骨髓瘤 (耐药)
U266	多发性骨髓瘤
SK-MM-1	浆细胞白血病
hPBMC	人外周血单核细胞
BJ	成纤维细胞 (正常细胞)

[0780] 将测试化合物溶解在100% DMSO中并加到384孔检验板中。加入额外的DMSO以保持所有孔中DMSO的终浓度(0.2%)相同。每孔加入25 μ L浓度为100000个细胞/mL的细胞悬液。细胞在CO₂培养箱中于37℃培养72h。将板平衡至室温30分钟,然后向所有孔中加入20 μ L **CellTiter-Glo® 2.0** (Promega) 试剂。然后使板稳定20分钟,然后用Envision酶标仪记录发光(发射光滤光片700nm)。将酶标仪数据归一化为阴性对照(未处理) vs 阳性对照(用400 μ M 氯丙嗪处理细胞72h),由4参数Logistic回归曲线拟合获得IC₅₀。

[0781] 结果:用几种不同的血液学来源的细胞评估了测试化合物体外抑制细胞增殖的能力。另外用非恶性的人外周血单核细胞(hPBMC)和成纤维细胞(BJ)评估了细胞毒性。表3显示所有测试的化合物从实验中获得的剂量反应。在该表中,结果以细胞毒性IC50 μ M+/-标准偏差(测试次数)的形式给出。nd=未确定的值。

[0782] 表3a和b.测试化合物对正常细胞系和癌细胞系的细胞毒性

[0783] 表3a:

[0784]

化合物:	1	2	10	13
THP-1	0.016 +/-0 (1)	nd	nd	nd
U937	0.0098 +/- 0.0025 (4)	0.0142 +/- 0.0042 (2)	0.0194 +/- 0.0049 (2)	nd
AMO-1	0.0497 +/- 0.0196 (3)	nd	nd	0.9646 +/- 0.2196 (3)
EJM	0.0271 +/- 0.0059 (2)	nd	nd	0.356 +/- 0.0451 (2)
KMS-12-BM	0.0079 +/- 0.002 (2)	nd	nd	0.1373 +/- 0.0142 (2)
MM.1S	0.0068 +/- 0.0022 (20)	0.0078 +/- 0.0029 (7)	0.0192 +/- 0.0037 (8)	0.049 +/- 0.0249 (7)
OPM-2	0.1734 +/- 0.0576 (2)	nd	nd	2.1102 +/- 0.6334 (2)
RPMI-8226	0.0906 +/- 0.0549 (6)	0.0415 +/- 0.004 (2)	0.3352 +/- 0.0102 (2)	1.7213 +/- 0.391 (2)
SK-MM-1	0.0347 +/- 0.024 (5)	0.0383 +/- 0.0316 (3)	0.0624 +/- 0.0288 (2)	nd
U266	0.0214 +/- 0.0085 (2)	nd	nd	0.4002 +/- 0.136 (2)
DOHH-2	0.0042 +/- 0.0005 (4)	0.0053 +/- 0.0007 (2)	0.0639 +/- 0.0237 (2)	nd
HG-3	0.0257 +/- 0.0052 (4)	0.0257 +/- 0.0103 (2)	0.0713 +/- 0.0069 (2)	nd
SC-1	0.0133 +/- 0.0051 (5)	0.021 +/- 0.0044 (2)	0.1686 +/- 0.0874 (2)	0.1344 +/-0 (1)
SU-DHL-8	0.0199 +/- 0.0032 (4)	0.0204 +/- 0.0009 (2)	0.0221 +/- 0.0054 (2)	nd
Toledo	0.0045 +/- 0.0026 (4)	0.0066 +/- 0.0021 (2)	0.0085 +/- 0.0003 (2)	nd
DERL-2	0.006 +/- 0.0007 (3)	0.0078 +/- 0.0011 (3)	0.0226 +/- 0.0058 (3)	nd
SUP-T1	0.0127 +/-	0.0178 +/-	0.0356 +/-	nd

[0785]

	0.004 (3)	0.0053 (3)	0.0076 (3)	
BJ	1.0745 +/-0 (1)	nd	nd	>1.996 +/- (1)
hPBMC	0.0054 +/- 0.0021 (2)	0.0075 +/- 0.002 (2)	0.0264 +/- 0.0097 (2)	nd

[0786] 表3b

[0787]

化合物:	30	34	38	苯达莫司汀	美法仑
THP-1	nd	nd	nd	40.204 +/- 28.995 (2)	4.3058 +/-0 (1)
U937	nd	0.3966 +/- 0.0382 (2)	0.0253 +/- 0.0008 (2)	27.061 +/- 7.409 (3)	nd
AMO-1	0.6528 +/- 0.0666 (3)	0.7576 +/- 0.1497 (3)	nd	56.977 +/- 8.7068 (4)	8.3424 +/- 1.8996 (3)
EJM	0.1734 +/- 0.0191 (2)	0.6368 +/- 0.0192 (2)	nd	64.64 +/- 2.4078 (3)	40.017 +/- 1.2365 (2)
KMS-12-BM	0.045 +/- 0.0164 (2)	0.1046 +/- 0.0047 (2)	nd	27.469 +/- 6.1077 (3)	9.829 +/- 1.1877 (2)
MM.1S	0.0397 +/- 0.0081 (4)	0.0683 +/- 0.0087 (8)	0.052 +/- 0.0158 (7)	23.963 +/- 6.7392 (12)	4.2451 +/- 0.7017 (10)
OPM-2	0.3218 +/- 0.0557 (2)	0.9609 +/- 0.336 (2)	nd	81.878 +/- 7.837 (3)	10.176 +/- 1.7559 (2)
RPMI-8226	0.4924 +/- 0.0701 (2)	1.4476 +/- 0.2263 (2)	0.6764 +/- 0.1445 (2)	111.12 +/- 34.705 (10)	32.486 +/- 3.8841 (2)
SK-MM-1	nd	0.6039 +/- 0.4592 (3)	0.1752 +/- 0.0525 (2)	73.498 +/- 21.704 (3)	nd
U266	0.1314 +/- 0.0024 (2)	0.2661 +/- 0.1386 (2)	nd	83 +/- 41.993 (3)	18.85 +/- 3.4229 (2)
DOHH-2	nd	0.5428 +/- 0.1497 (2)	0.0281 +/- 0.0099 (2)	10.701 +/- 5.9963 (2)	nd
HG-3	nd	0.8877 +/- 0.1628 (2)	0.0498 +/- 0.0236 (2)	25.787 +/- 13.589 (2)	nd
SC-1	0.0537 +/-0 (1)	1.0624 +/- 0.2814 (3)	0.0772 +/- 0.0116 (2)	25.141 +/- 7.3961 (3)	8.6422 +/-0 (1)
SU-DHL-8	nd	0.2022 +/- 0.1099 (2)	0.0714 +/- 0.0244 (2)	14.264 +/- 3.6275 (3)	nd
Toledo	nd	0.3276 +/- 0.0368 (2)	0.0162 +/- 0.0047 (2)	12.519 +/- 6.2427 (3)	nd

[0788]	DERL-2	nd	nd	nd	21.071 +/- 3.1768 (3)	1.8822 +/- 0.3506 (3)
	SUP-T1	nd	nd	nd	33.527 +/- 11.372 (3)	2.9645 +/- 0.371 (3)
	BJ	>1.996 +/- (1)	>1.996 +/- (1)	nd	>598.8 +/- (2)	103.64 +/- 38.599 (2)
	hPBMC	nd	nd	nd	15.803 +/- 6.6175 (2)	3.6018 +/- 1.8923 (2)

[0789] 可以看出,比起现有技术的两种化合物,本发明的化合物始终更具细胞毒性。

[0790] 生物实施例3-评估实施例18(用实施例1处理后)、苯达莫司汀和美法仑的细胞保留/流出:

[0791] 方法:将 2×10^6 个细胞/mL的MM.1S细胞按每孔250 μ L接种到96孔板中。将细胞在测试化合物的存在下孵育5、15和60min,然后在+4 $^{\circ}$ C下离心5min以沉淀细胞。立即将细胞培养基收集到第二块孔板中,并在-80 $^{\circ}$ C储存直至进一步分析。沉淀的细胞用冰冷的PBS洗涤一次,然后在-80 $^{\circ}$ C储存,直至进一步分析。

[0792] 用乙腈:二甲基甲酰胺(9:1含有内标物)裂解细胞并沉淀培养基中的蛋白质。离心样品并用LC-MS/MS(ACQUITY UPLC-Xevo TQ-S micro)分析上清液以确定化合物浓度。

[0793] 使用实施例化合物1、苯达莫司汀和美法仑作为测试化合物。

[0794] 结果:结果如图1所示。图1(A)显示苯达莫司汀和实施例化合物1形成的代谢物(实施例化合物18)的细胞内浓度和细胞外浓度。可以看出,用实施例化合物1处理后,实施例化合物18在细胞内快速形成,并且发现在细胞外的培养基中其水平很低。这些结果表明,实施例化合物1的水解发生在细胞内部,并且实施例化合物1的代谢物保留在细胞内。可以检测到低细胞内浓度的苯达莫司汀,且其水平随着时间的推移而降低。苯达莫司汀的细胞外浓度相当高,并随着时间的推移而降低。

[0795] 图1(B)显示了实验过程中随着时间的推移美法仑的细胞内浓度和细胞外浓度。用美法仑体外处理MM.1S细胞后,检测到低细胞内浓度的美法仑。在整个实验过程中,美法仑的细胞外浓度很高且恒定。

[0796] 生物实施例4-在鸡胚异种移植模型中在体内评估测试化合物的细胞毒性:

[0797] 方法:在第9天(受精后)用 3×10^6 SU-DHL-4肿瘤细胞接种受精的白来亨鸡蛋(White Leghorn eggs)。第11、13、15和17天,向活卵注射100 μ L实施例化合物1(8.4 μ M(0.008mg/kg)、33.5 μ M(0.033mg/kg)、167.5 μ M(0.164mg/kg))、苯达莫司汀(Bendam.) (8.4 μ M(0.005mg/kg)、33.5 μ M(0.02mg/kg)、167.5 μ M(0.1mg/kg))或溶媒。第18天,取出肿瘤并称重。

[0798] 结果:实施例化合物1对肿瘤重量的影响具有明显的剂量依赖性(图2)。对于实施例化合物1,相比于溶媒的肿瘤减少在8.4 μ M、33.5 μ M和167.5 μ M下分别为38%、70%和82%。对于苯达莫司汀,相比于溶媒的肿瘤减少仅在33.5 μ M和167.5 μ M下是明显的,分别减少30%和76%。因此,实施例化合物1在该模型中显示出有效的肿瘤细胞毒性。

[0799] 生物实施例5-评估PDC化合物和代谢物的细胞保留/流出:

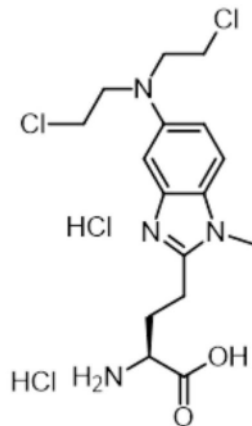
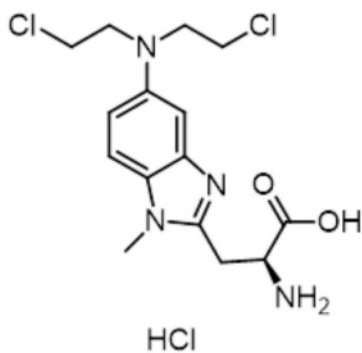
[0800] 方法:生物实施例3中描述的方法。

[0801] 对实施例化合物1、2、3、4、6、7和10进行考察。细胞内代谢物由所有测试的化合物形成。用于处理细胞的化合物被代谢为酯水解化合物(此处称为代谢物A)和酰胺水解化合物(称为代谢物B)。实施例化合物的结构以及各化合物的两种代谢物的结构如表4所示。测试条件下形成的代谢物B为结构如实施例17和18的化合物:

17:

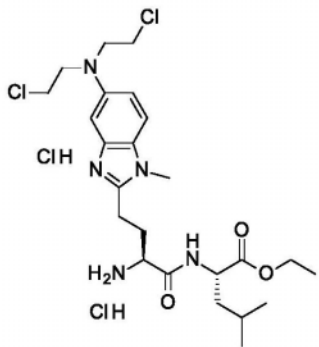
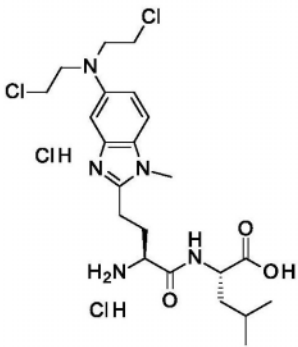
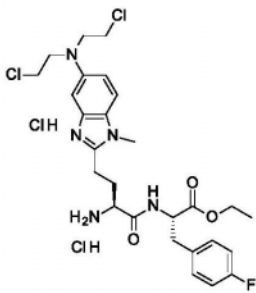
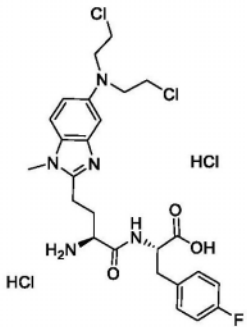
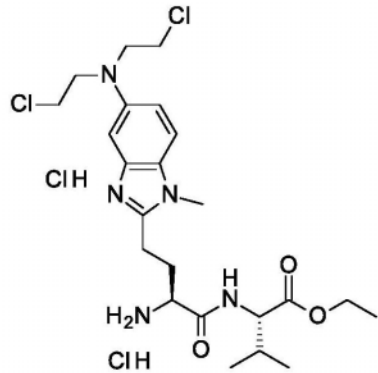
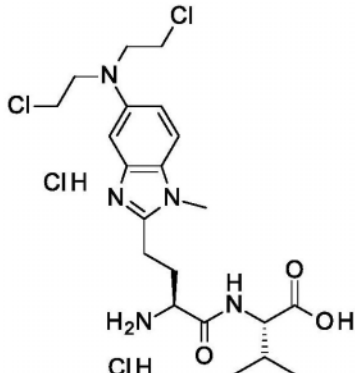
18:

[0802]



[0803] 表4:

[0804]

Ex	结构	代谢物 A	代谢物 B
1	1 	20 	18
2	2 	39 	18
3	3 	19 	18

[0805]

4	4	44	17
6	6	42	17
7	7	37	18
10	10	43	17

[0806] 代谢物的细胞内浓度随着时间的推移缓慢下降。在细胞外的培养基中极少检测到或检测不到代谢物的细胞外浓度。这些结果表明,实施例化合物的水解发生在细胞内,并且实施例化合物的代谢物保留在细胞内。

[0807] 生物实施例6-评估测试化合物的直接DNA损伤:

[0808] 方法:根据Furda等,Methods Mol Biol,2012.1中描述的方案,用QIAGEN基因组tip 20/G从MM.1S细胞制备DNA。将1 μ g DNA用0.25 μ M化合物在37 $^{\circ}$ C处理30分钟。使用DMSO作为对照处理。使用Phusion Hot Start II High Fidelity PCR Master Mix(Thermo Scientific)和针对HPRT的引物或针对线粒体DNA(mtDNA)的引物,对20ng处理过的DNA进行PCR扩增,分别生成10.4或8.9kb的片段。PCR反应物在1%琼脂糖凝胶上分离,并通过ChemiDocTMMP成像系统(BioRad)可视化。考察了实施例化合物1、2和38,以及作为化合物1的代谢物的化合物18和20。将它们与苯达莫司汀、美法仑和DMSO对照进行比较。化合物1、2、18和20在使用HPRT引物时的结果如图4(A)所示;在使用mtDNA引物时的结果如图4(B)所示。化合物18和38在使用HPRT引物和mtDNA引物时的结果如图4(C)所示。

[0809] 结果:从图4中可以看出,在测试浓度下,美法仑和苯达莫司汀对细胞核和线粒体DNA的DNA损伤没有影响或影响非常小。实施例化合物1和2对细胞核和线粒体DNA均具有强烈的DNA损伤作用,如在凝胶上检测不到PCR条带的事实所示。实施例化合物18和38有效地损伤了细胞核和线粒体DNA,只能检测到微弱的PCR条带。实施例化合物20也具有DNA损伤作用,但与实施例化合物1、2和18相比程度较小,但大于苯达莫司汀或美法仑。

[0810] 生物实施例7-评估测试化合物引起的DNA断裂

[0811] 方法:用0.006、0.06、0.6或6 μ M的实施例化合物1或苯达莫司汀处理 1×10^6 MM.1S细胞(CRL-2974,ATCC)24h。孵育后,用PBS(10010-015,Gibco)洗涤细胞,在流式细胞仪固定缓冲液(FC004,R&D Systems)中固定10min,并于-20 $^{\circ}$ C在70%乙醇中保存过夜。实验中存在脱氧胸苷类似物(BrdUTP),用于标记DNA断裂位点。第二天,使用AP0-BrdUTMTUNEL检测试剂盒,根据制造商的方案(A23210,Invitrogen)对细胞进行洗涤和染色,然后使用BD FACSCantoTMII进行分析。TUNEL阳性细胞的百分比表示具有断裂的DNA的细胞的百分比。

[0812] 结果:实施例化合物1和苯达莫司汀孵育24小时对DNA损伤的剂量反应效果如图5(A)所示。所有数据均以平均值SD表示(n=2)表示。暴露于实施例化合物1 24小时以依赖于剂量的方式诱导DNA损伤,而在孵育24小时后未发现苯达莫司汀对DNA损伤有明显作用。用0.6 μ M测试化合物或苯达莫司汀(n=2)处理24h后,Alexa fluor 488强度的代表性FACS柱状图如图5(B)所示。FACS柱状图的最上面的一对是实施例化合物1;中间的一对是苯达莫司汀,最下面的一对是DMSO对照。值得注意的是,用0.6 μ M实施例化合物1处理24小时引起>90%测试细胞的DNA断裂,但苯达莫司汀则并非如此。实施例化合物1能更有效地引起DNA损伤。

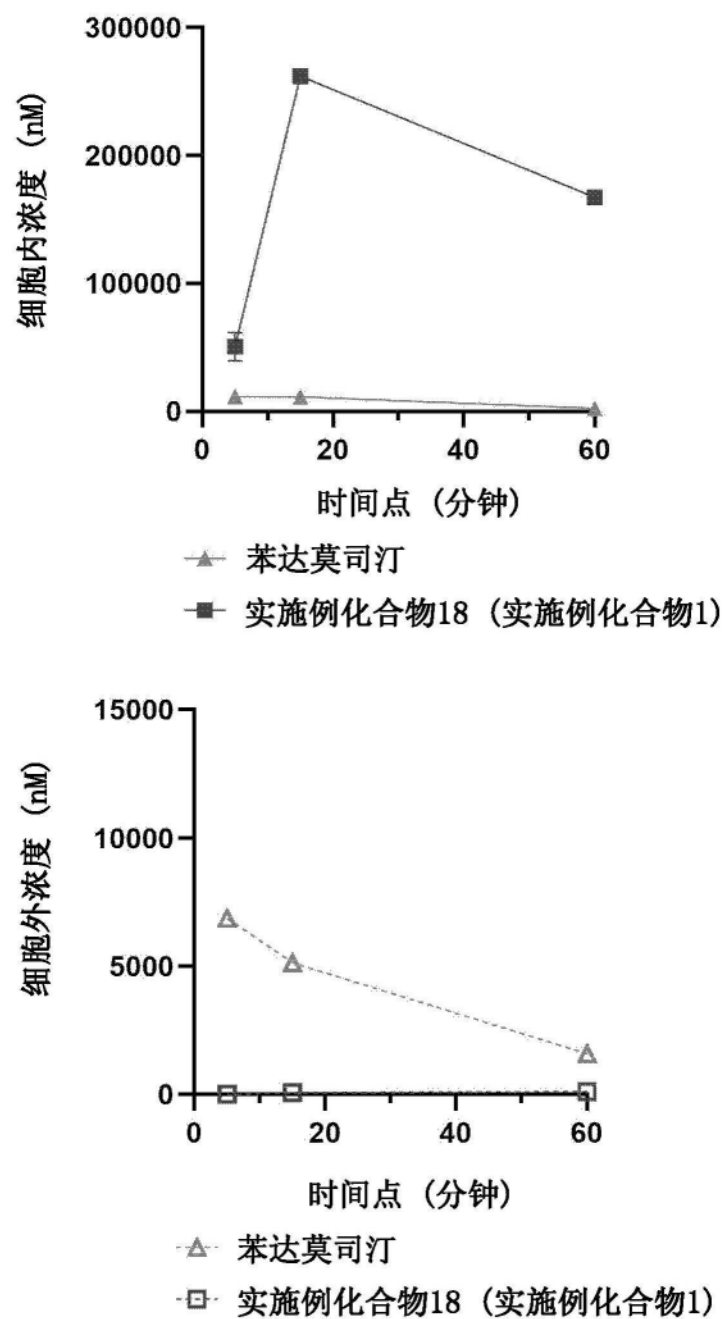


图1(A)

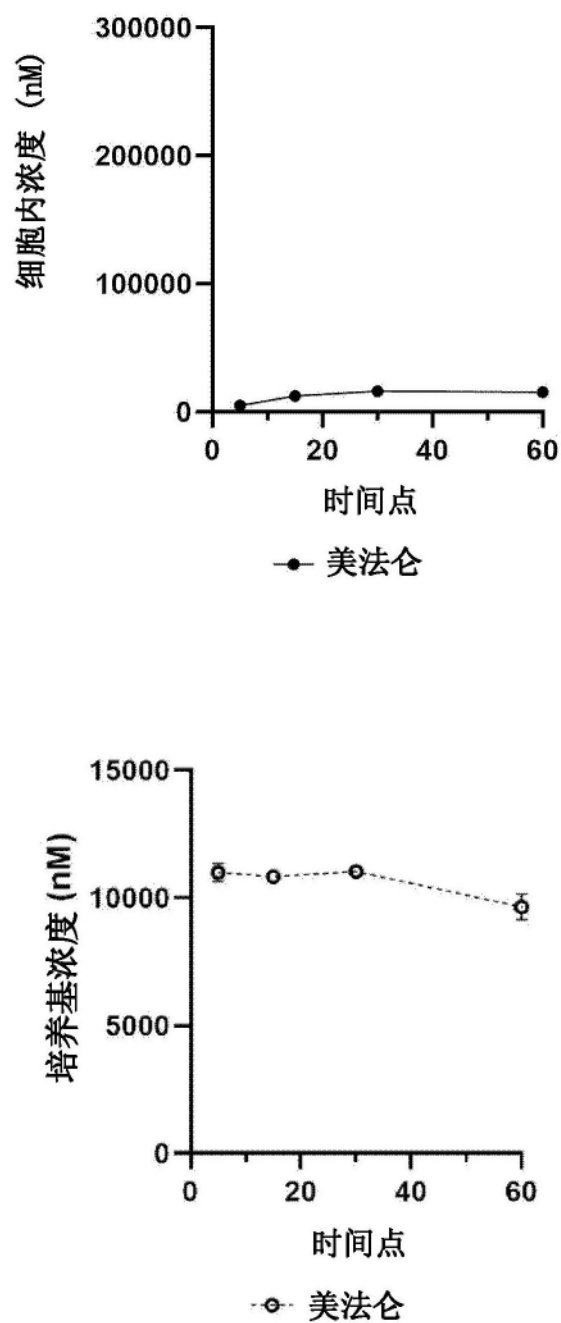


图1(B)

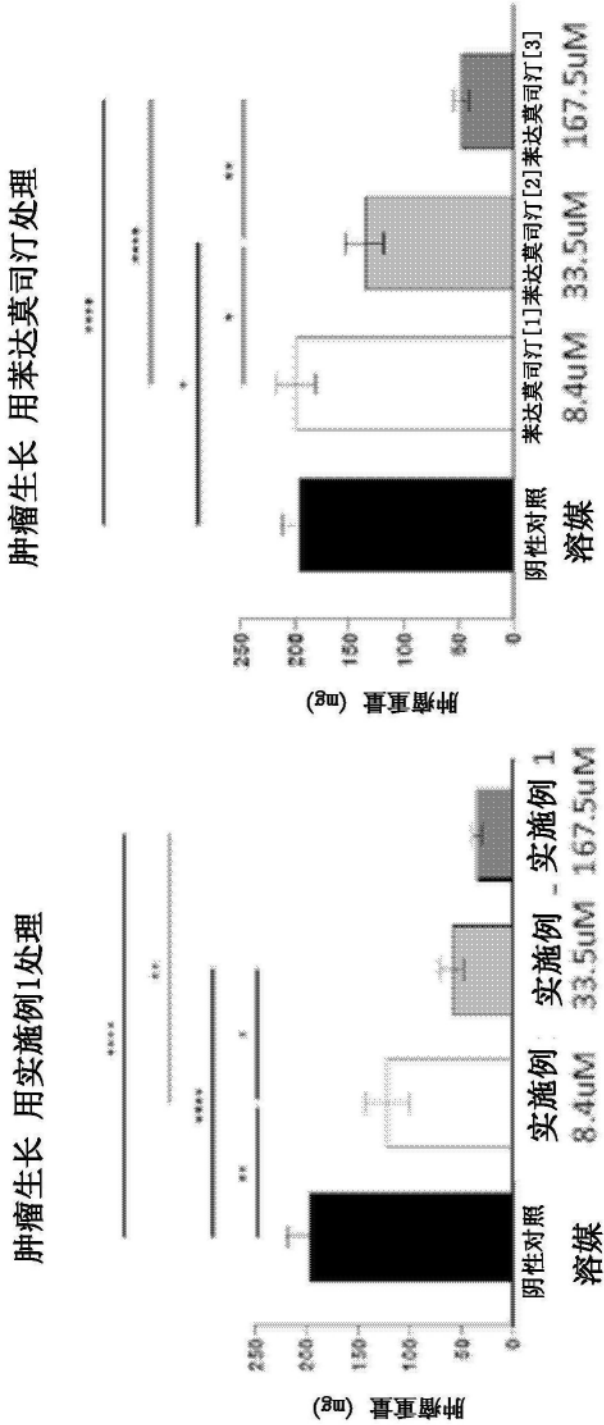


图2

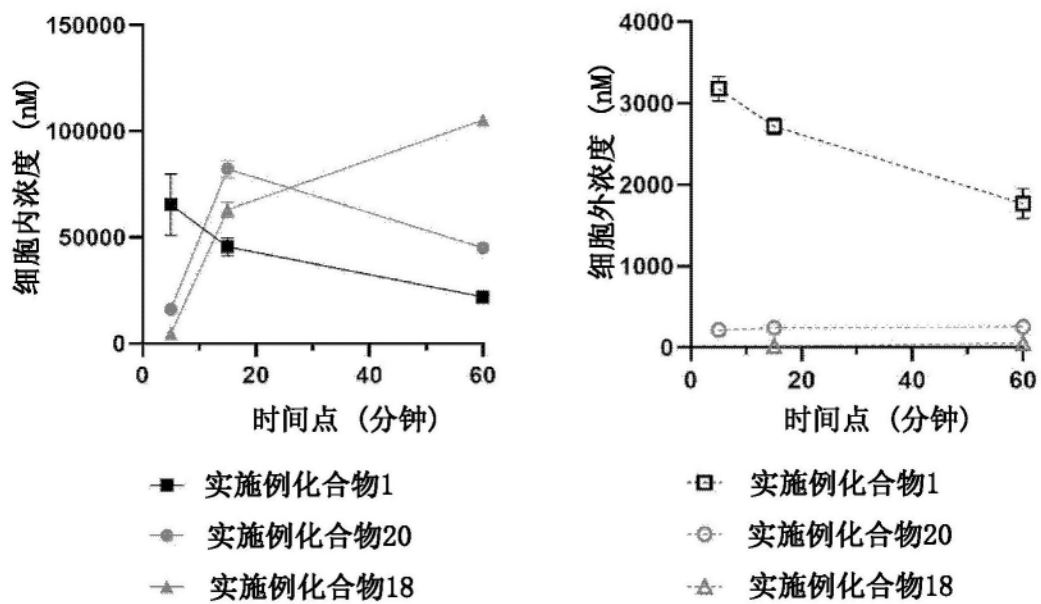


图3(A)

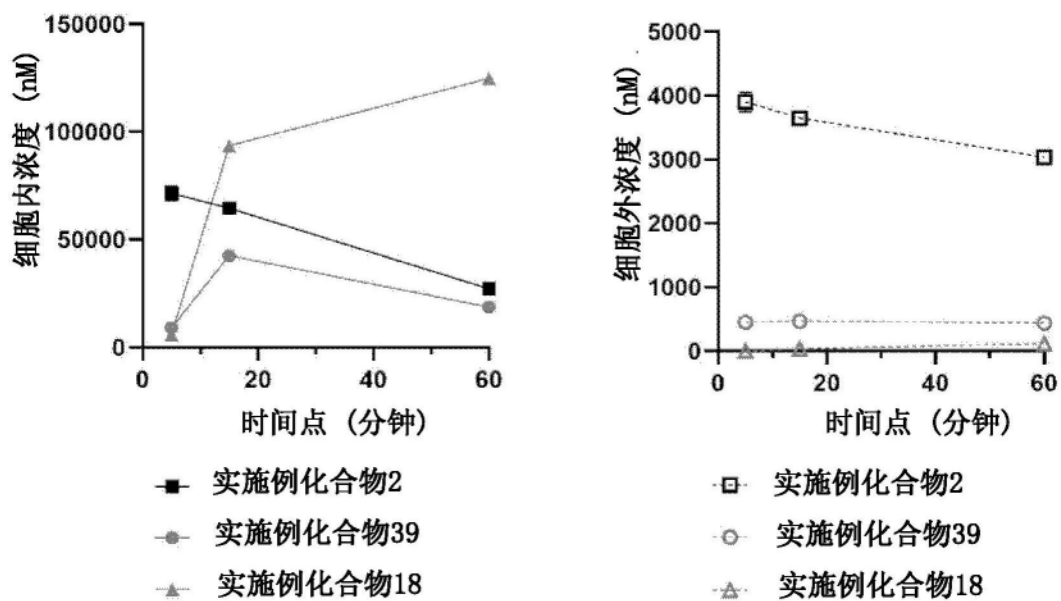


图3(B)

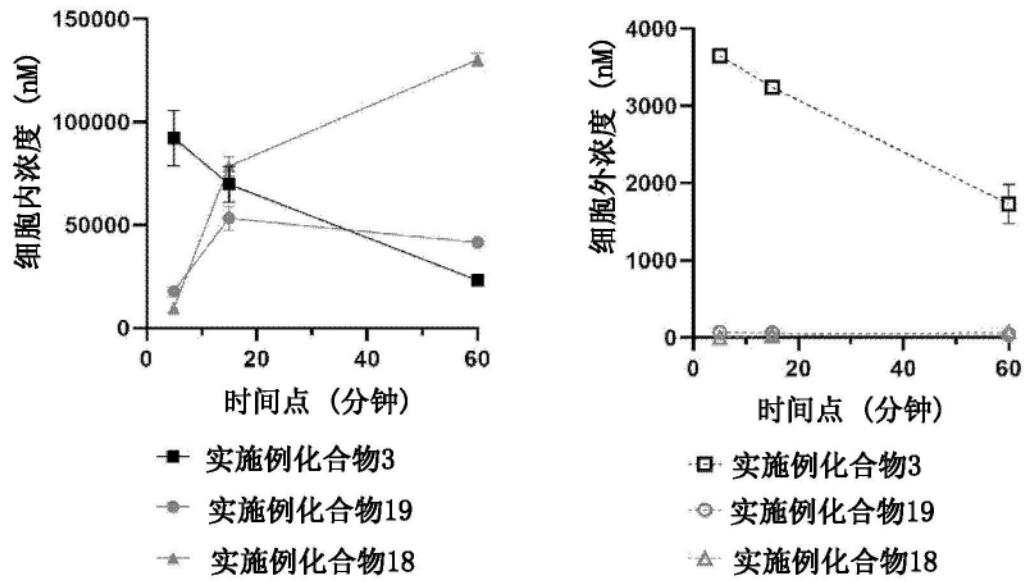


图3(C)

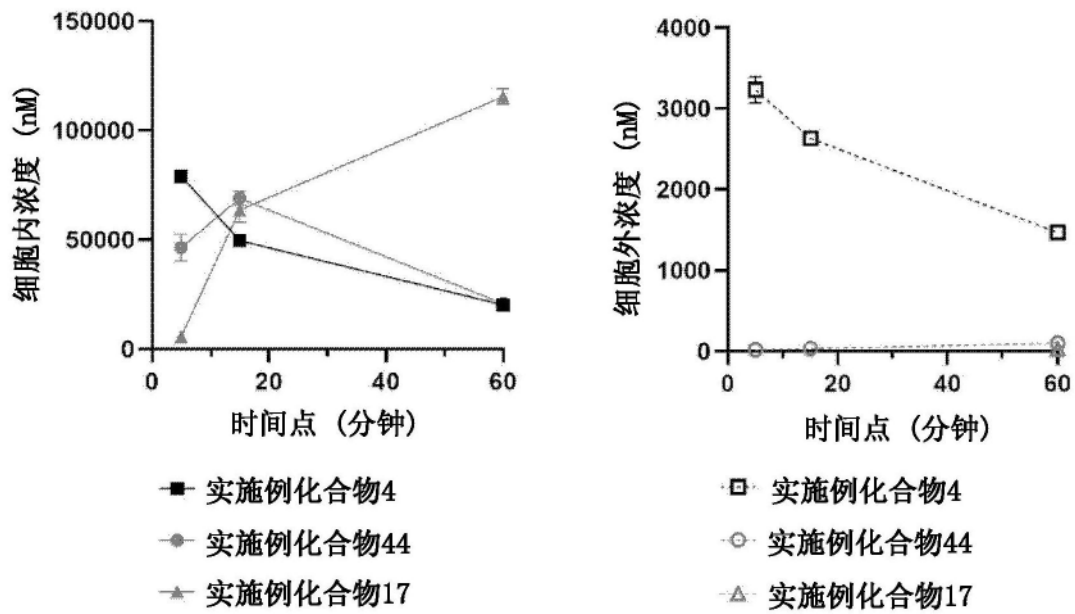


图3(D)

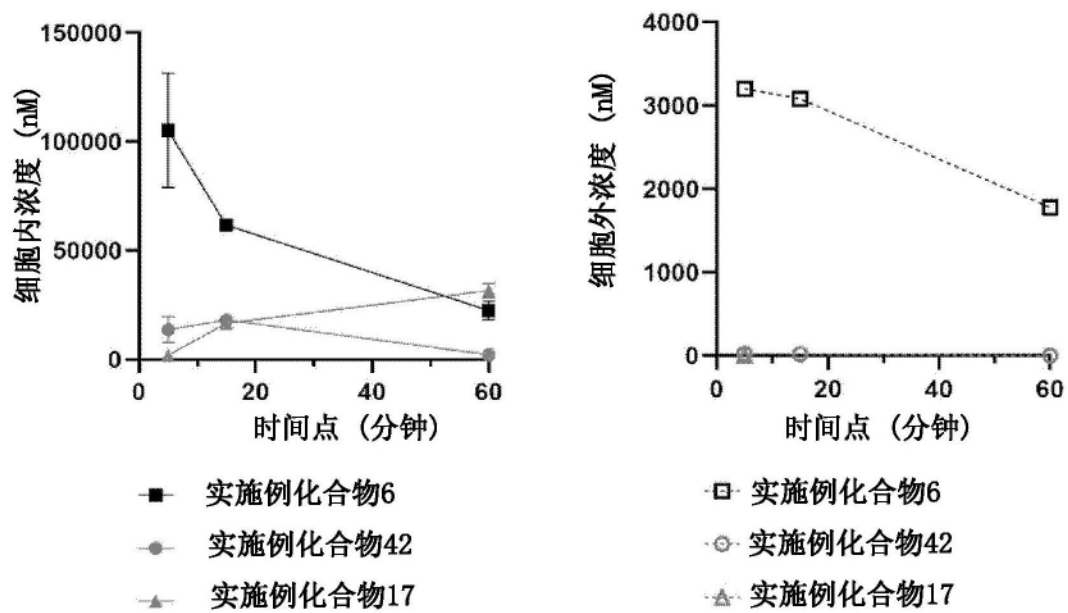


图3(E)

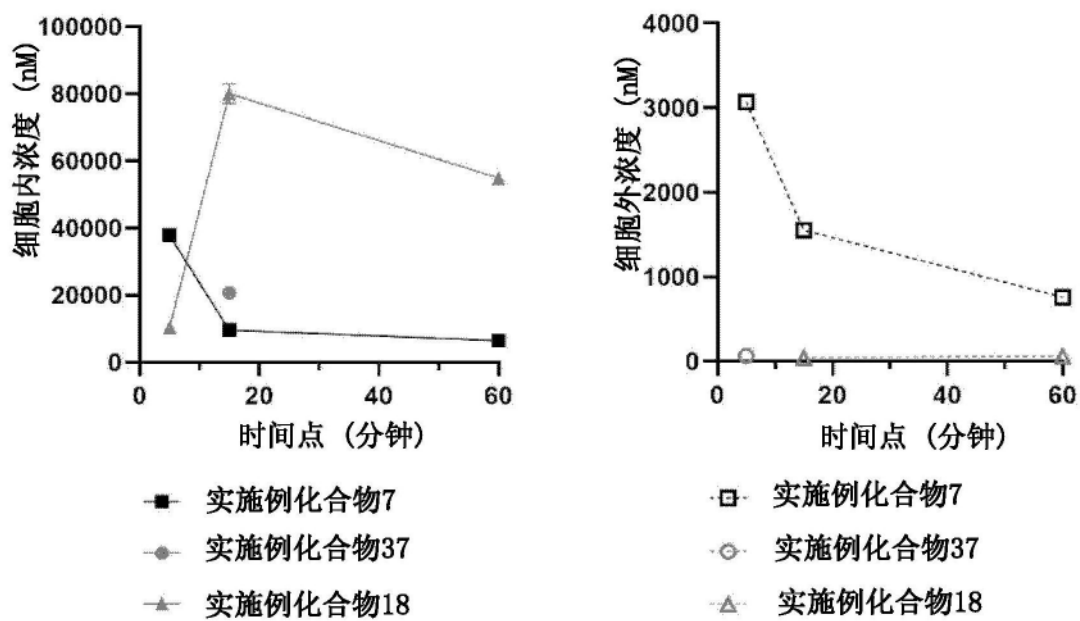


图3(F)

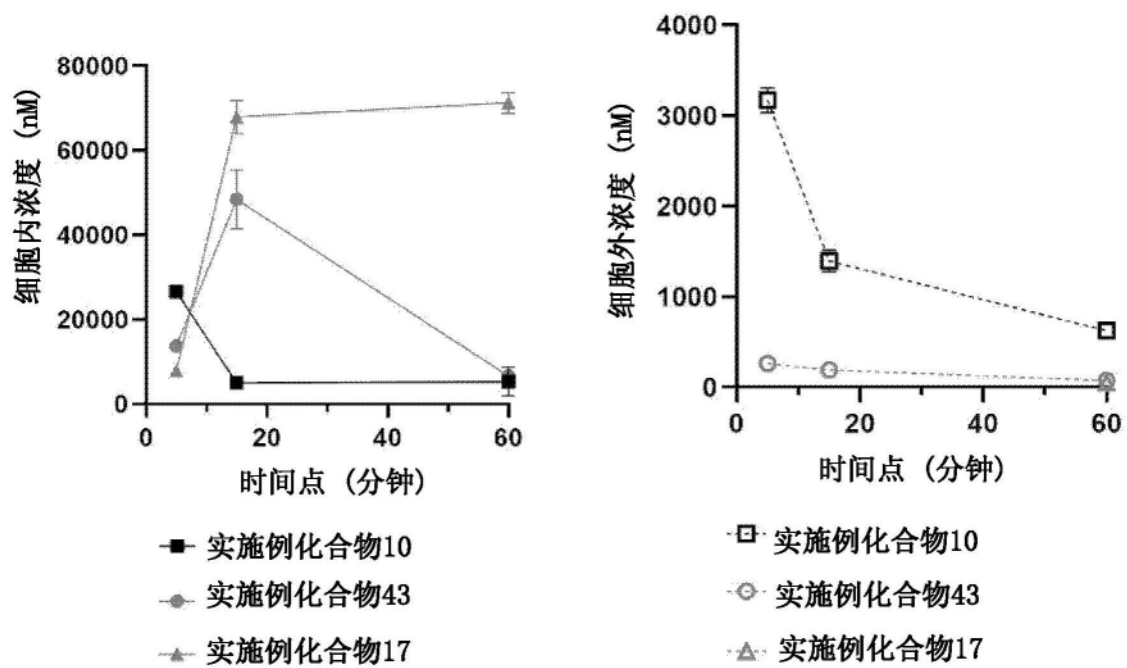


图3(G)

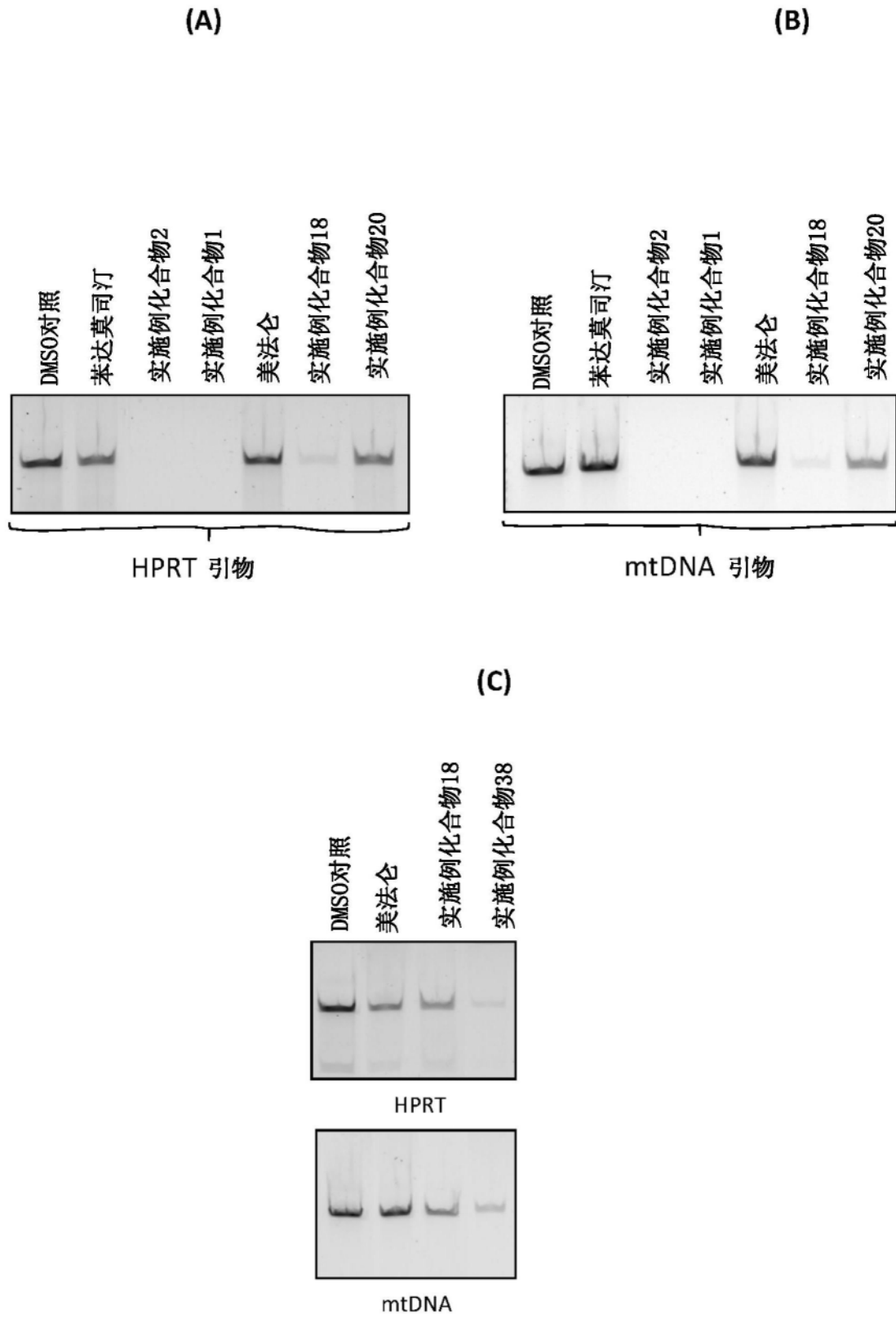


图4

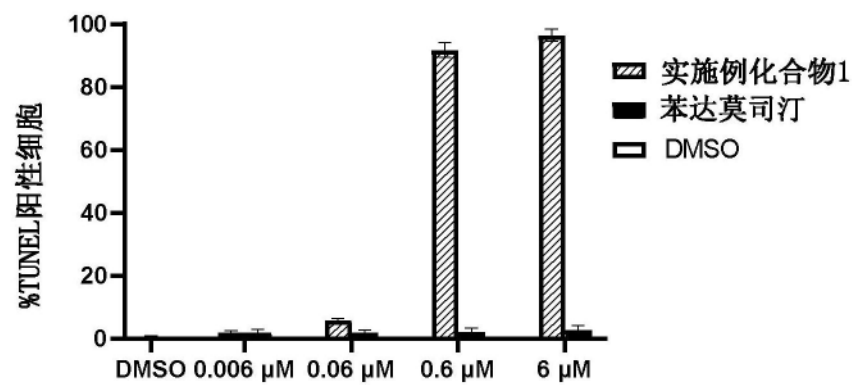


图5(A)

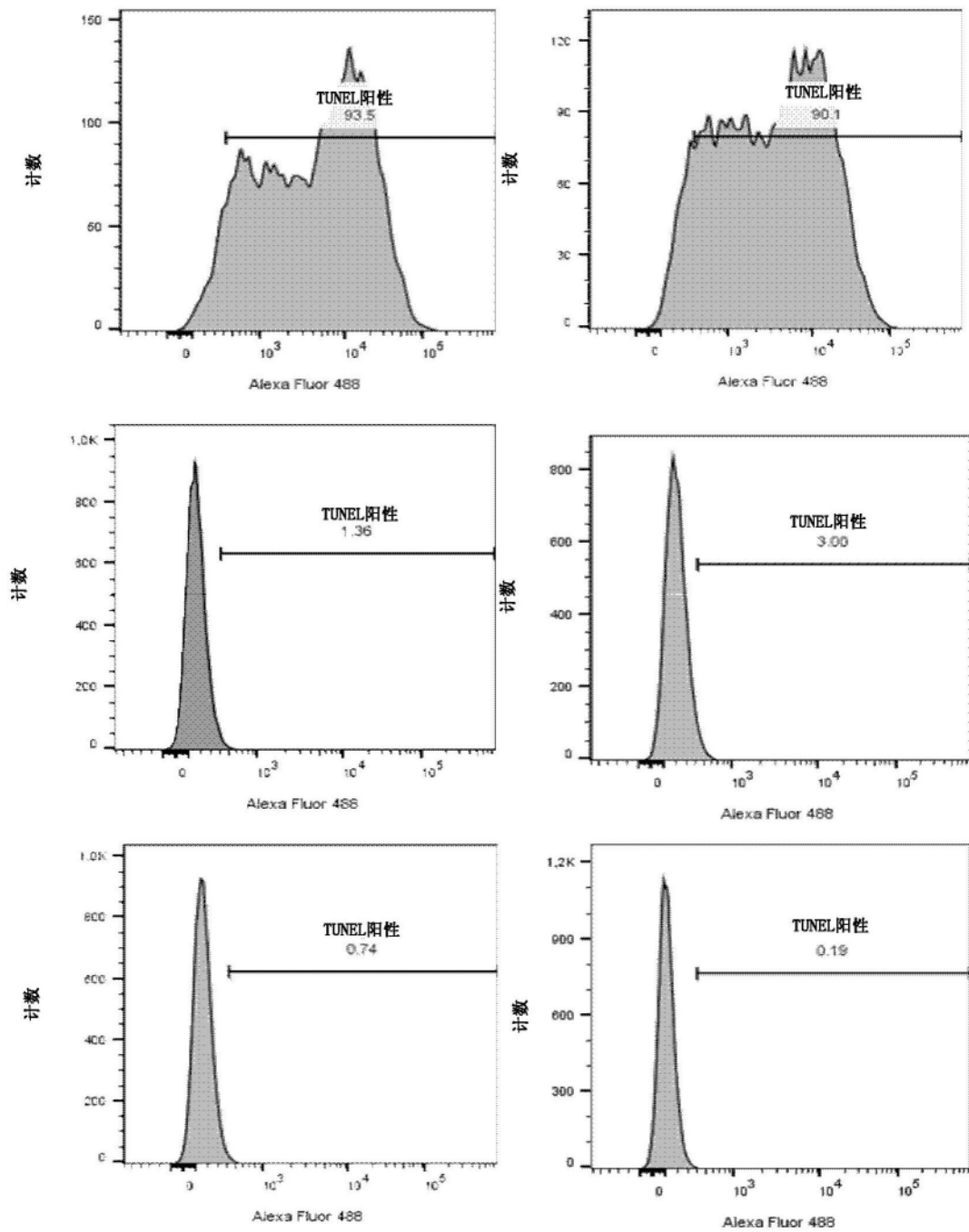


图5(B)