



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110709393 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201880034909.5

(74)专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理

(22)申请日 2018.05.16

有限公司 11728

(30)优先权数据

1707856.9 2017.05.16 GB

代理人 尹吉伟

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.26

(51)Int.Cl.

C07D 409/04(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2018/051333 2018.05.16

C07D 409/14(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/211277 EN 2018.11.22

A61K 31/427(2006.01)

A61K 31/444(2006.01)

A61K 31/506(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 阿克蒂克制药股份有限公司

地址 挪威奥斯陆

(72)发明人 乔·克拉韦内斯 B·西恩

权利要求书10页 说明书64页 附图12页

S·朗德沃尔 C·A·博恩

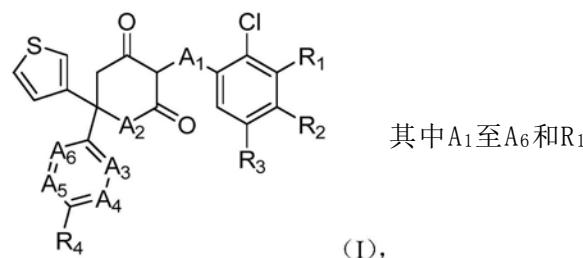
K·妮达

(54)发明名称

LDHA活性抑制剂

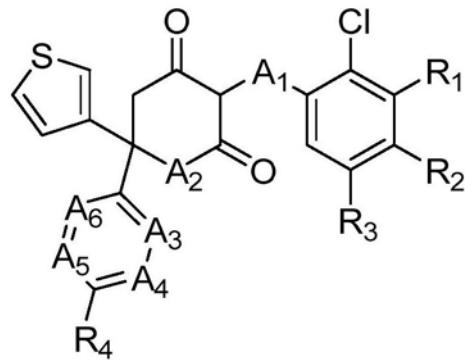
(57)摘要

本发明提供式(I)的化合物、其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐和前体药物：



至R<sub>4</sub>如本文限定。这样的化合物适合用于治疗或预防由乳酸脱氢酶A(LDHA)的活化介导的疾病或病状，例如癌症。

1. 一种式(I)的化合物、其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐或前体药物：



(I)

其中：

A<sub>1</sub>为-0-、-CH<sub>2</sub>-或-S-；

A<sub>2</sub>为NR (其中R为H或C<sub>1-3</sub>烷基) 或-0-；

A<sub>3</sub>为N或CR<sub>5</sub>；

A<sub>4</sub>为N或CR<sub>6</sub>；

A<sub>5</sub>为N或CR<sub>7</sub>；

A<sub>6</sub>为N或CR<sub>8</sub>；

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>独立地选自H和卤素；

R<sub>4</sub>选自：

-H；

-卤素；

-4至6元杂环, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基; 和

-OR<sub>9</sub>, 其中R<sub>9</sub>为4至6元杂环, 所述4至6元杂环任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基; 和

-OR<sub>10</sub>, 其中R<sub>10</sub>为C<sub>3-8</sub>环烷基；

R<sub>5</sub>选自：

-H；

-羟基；

-C<sub>1-6</sub>烷基；和

-C<sub>1-6</sub>烷氧基；

R<sub>6</sub>选自：

-H；

-卤素；

-C<sub>1-6</sub>烷基, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、氨基、氰基和硝基；

-C<sub>1-6</sub>烷氧基,其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、氨基、氰基、硝基和C<sub>3-8</sub>环烷基;

-4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:卤素、羟基、C<sub>1</sub>-6烷基、C<sub>1</sub>-6烷氧基、C<sub>1</sub>-6卤代烷基、C<sub>1</sub>-6羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1</sub>-6烷基、-C(0)-C<sub>1</sub>-6烷基、氨基、氰基和硝基;和

-OR<sub>11</sub>，其中R<sub>11</sub>为4至6元杂环，所述4至6元杂环任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代：卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基；和

-0R<sub>12</sub>，其中R<sub>12</sub>为C<sub>3-8</sub>环烷基；

R<sub>7</sub>和R<sub>8</sub>独立地选自：

-H;

-羟基；

-C<sub>1-6</sub>烷基；和

-C<sub>1-6</sub>烷氧基；

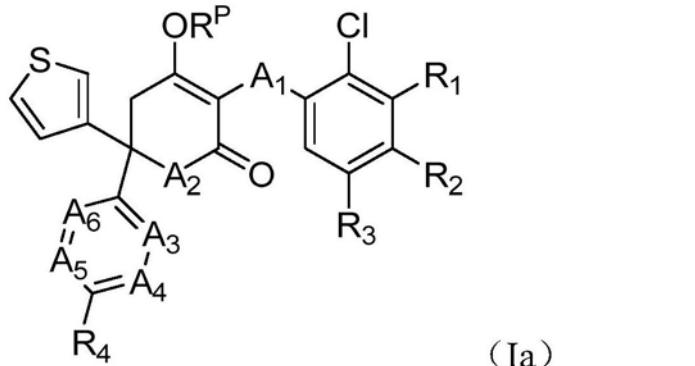
条件为：

A<sub>3</sub>和A<sub>4</sub>不同时为N;

$A_5$ 和 $A_6$ 不同时为N;且

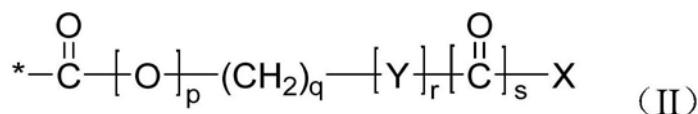
当A<sub>2</sub>为NR时，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的至少一个为卤素。

2. 具有式(Ia)的根据权利要求1所述的化合物、其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐或前体药物：



其中A<sub>1</sub>至A<sub>6</sub>和R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>如在权利要求1中所限定；且

$R^P$ 为H或具有式(I)的基团：



其中：

\*表示基团与分子的其余部分的连接点；

Y为-0-或NR<sup>i</sup>，其中R<sup>i</sup>为H或C<sub>1-3</sub>烷基（例如CH<sub>3</sub>）；

X选自：

-H:

-羟基：

-NR<sup>j</sup>R<sup>k</sup>,其中R<sup>j</sup>和R<sup>k</sup>各自独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基(优选C<sub>1-3</sub>烷基,例如CH<sub>3</sub>) ;  
 --C<sub>1-12</sub>烷基,其任选地被一个或多个亲水基团取代;  
 --C<sub>1-12</sub>烷基,其任选地被一个或多个芳基或杂芳基取代,所述芳基和杂芳基可以任选被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:卤代基、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷氧基和C<sub>1-6</sub>羟烷基;和

-芳基或杂芳基,其可任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:卤代基、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷氧基和C<sub>1-6</sub>羟烷基;

p为0或1;

q为0到6的整数;

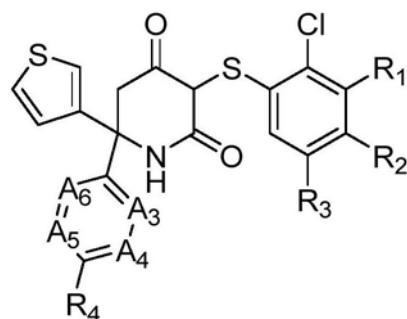
r为0或1;且

s为0或1。

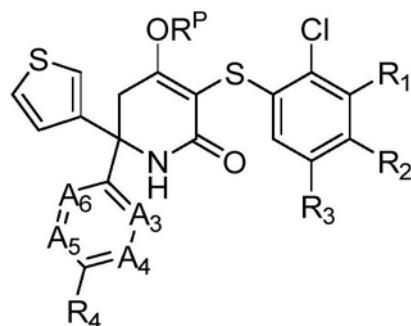
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中A<sub>1</sub>为-S-。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的化合物,其中A<sub>2</sub>为NH。

5. 具有式(III)或(IIIa)的根据权利要求1所述的化合物、或其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物:



(III)

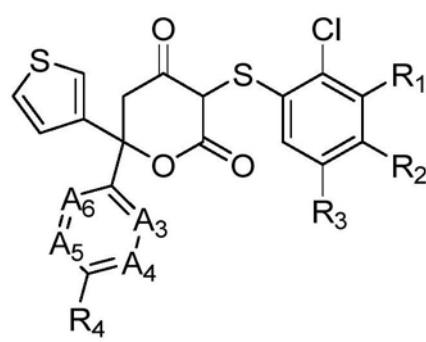


(IIIa)

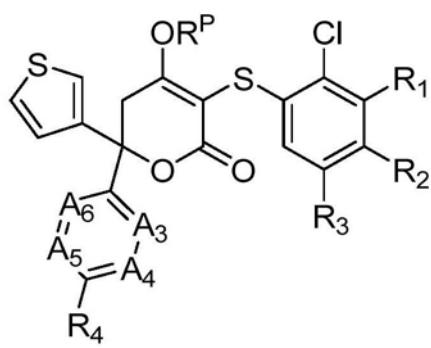
其中A<sub>3</sub>至A<sub>6</sub>,R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>和R<sup>P</sup>如在权利要求1或权利要求2中所限定。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的化合物,其中A<sub>2</sub>为0。

7. 具有式(IV)或(IVa)的根据权利要求1所述的化合物、或其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物:



(IV)



(IVa)

其中A<sub>3</sub>至A<sub>6</sub>,R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>和R<sup>P</sup>如在权利要求1或权利要求2中所限定。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中A<sub>5</sub>为CH。

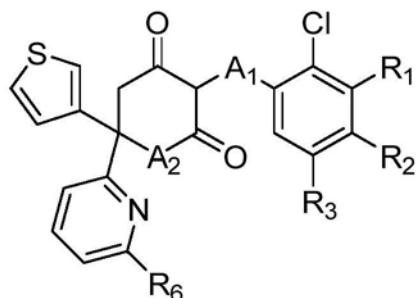
9. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中A<sub>6</sub>为CH。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中A<sub>3</sub>为N。

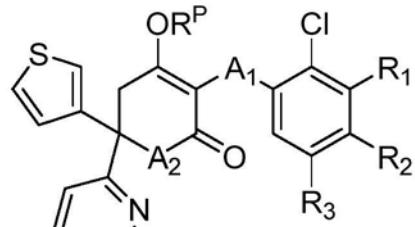
11. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中A<sub>4</sub>为CR<sub>6</sub>,优选其中R<sub>6</sub>不为H。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R<sub>4</sub>为H。

13. 具有式(V)或(Va)的根据权利要求1所述的化合物、或其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物:



(V)



(Va)

其中A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、R<sub>1</sub>至R<sub>3</sub>、R<sub>6</sub>和R<sup>P</sup>如在权利要求1至4和6中任一项所限定,优选其中R<sub>6</sub>不为H。

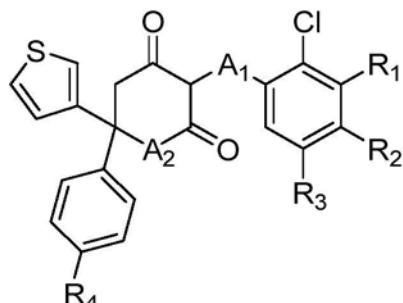
14. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R<sub>6</sub>为卤素(例如Br或Cl,优选Br),或任选地取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R<sub>6</sub>为被C<sub>3-8</sub>环烷基取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基,例如为被未取代的环戊基取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基。

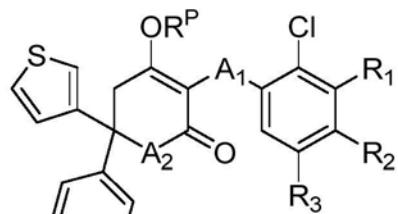
16. 根据权利要求1至6、11、12、14和15中任一项所述的化合物,其中A<sub>3</sub>为CR<sub>5</sub>,优选其中A<sub>3</sub>为CH。

17. 根据权利要求1至6、11、12、14和15中任一项所述的化合物,其中A<sub>3</sub>为CH且A<sub>4</sub>为CR<sub>6</sub>,优选其中R<sub>6</sub>为H。

18. 具有式(VI)或(VIa)的根据权利要求1所述的化合物、或其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物:



(VI)



(VIa)

其中A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>和R<sup>P</sup>如权利要求1-4、6和12中任一项所限定。

19. 根据权利要求1至11和14至18中任一项所述的化合物,其中R<sub>4</sub>选自:

-H

-卤素;和

-4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H的取代基取代,-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基。

20. 根据权利要求1至11和14至18中任一项所述的化合物,其中R<sub>4</sub>为H,Br或吗啉基。

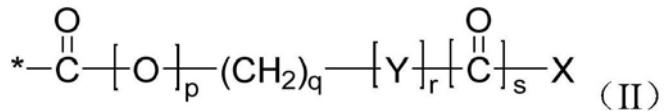
21. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的至少一个为卤素,优选其中R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的一个或两个为卤素。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R<sub>1</sub>为卤素并且R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>为H,其中R<sub>2</sub>为

卤素并且R<sub>1</sub>和R<sub>3</sub>为H,或者其中R<sub>3</sub>为卤素并且R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>为H。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R<sub>1</sub>或R<sub>3</sub>为Cl,或R<sub>2</sub>为-F。

24. 根据权利要求2至23中任一项所述的化合物,其中R<sup>P</sup>代表具有式(II)的基团:



其中

Y为-O-或NR<sup>i</sup>,其中R<sup>i</sup>为H或C<sub>1-3</sub>烷基(例如CH<sub>3</sub>),优选-O-或NH,例如-O-;

X选自:

-NR<sup>j</sup>R<sup>k</sup>,其中R<sup>j</sup>和R<sup>k</sup>各自独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基(优选C<sub>1-3</sub>烷基,例如CH<sub>3</sub>);

--C<sub>1-12</sub>烷基(优选为C<sub>1-6</sub>烷基),其任选地被一个或多个独立地选自-OR'(其中R'为H或C<sub>1-3</sub>烷基,例如CH<sub>3</sub>),和-NR"2(其中每个R"独立地选自H和C<sub>1-3</sub>烷基,例如CH<sub>3</sub>)的亲水性基团取代;和

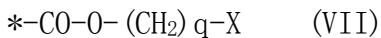
-芳基或杂芳基,其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷氧基和C<sub>1-6</sub>羟烷基;和

p、q、r和s如在权利要求2中所限定。

25. 根据权利要求2至24中任一项所述的化合物,其中Y为-O-。

26. 根据权利要求2至25中任一项所述的化合物,其中X为C<sub>1-12</sub>烷基(优选C<sub>1-6</sub>烷基),所述C<sub>1-12</sub>烷基任选地被一个或多个选自-OR'(其中R'为H或C<sub>1-3</sub>烷基,例如CH<sub>3</sub>)和-NR"2(其中每个R"独立地选自H和C<sub>1-3</sub>烷基,例如CH<sub>3</sub>)的基团取代。

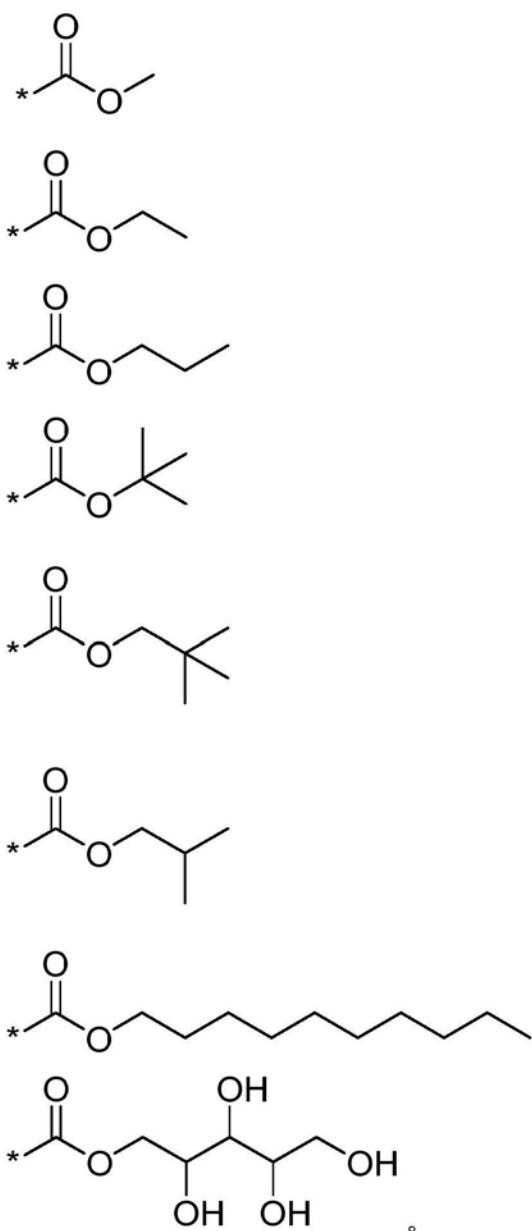
27. 根据权利要求2至26中任一项所述的化合物,其中R<sup>P</sup>为式(VII)的基团:



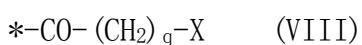
其中\*和q如在权利要求1中所限定,优选其中q为0或1;且

X如在权利要求2、24和26中任一项所限定。

28. 根据权利要求27所述的化合物,其中式(VII)的基团选自以下中的任一个:



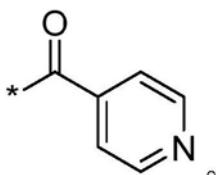
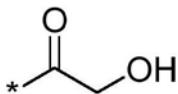
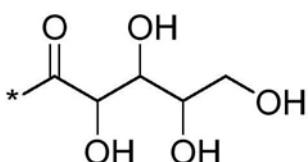
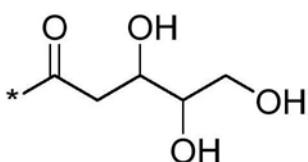
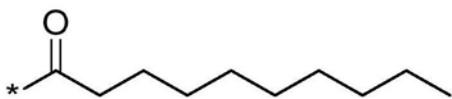
29. 根据权利要求2至26中任一项所述的化合物,其中R<sup>P</sup>为式(VIII)的基团:



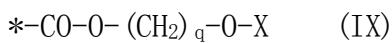
其中\*和q如在权利要求2中所限定,优选其中q为0或1;且

X如在权利要求2、24和26中任一项所限定。

30. 根据权利要求29所述的化合物,其中式(VIII)的基团选自以下中的任一个:

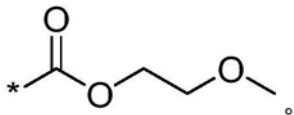


31. 根据权利要求2至26中任一项所述的化合物,其中R<sup>P</sup>为式(IX)的基团:

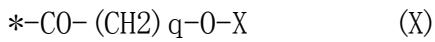


其中\*和q如在权利要求2中所限定,优选其中q为0或1;且X如在权利要求2、24和26中任一项所限定。

32. 根据权利要求31所述的化合物,其中式(IX)的基团为:

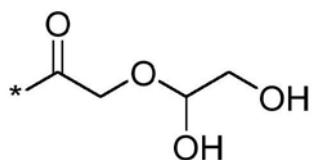


33. 根据权利要求2至26中任一项所述的化合物,其中R<sup>P</sup>为式(X)的基团:

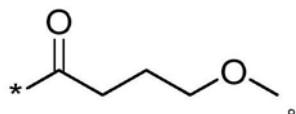


其中\*和q如在权利要求2中所限定,优选其中q为0或1;且X如在权利要求2、24和26中任一项所限定。

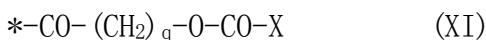
34. 权利要求33的化合物,其中式(X)的基团为:



或

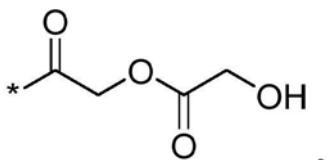


35. 根据权利要求2至26中任一项所述的化合物,其中R<sup>P</sup>为式(XI)的基团:



其中\*和q如在权利要求2中所限定,优选其中q为0或1;且X如在权利要求2、24和26中任一项所限定。

36. 根据权利要求35所述的化合物,其中式(XI)的基团为:



37. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其选自以下:

6-[6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基]-3-[ (2,4-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫代]-6-(6-乙氧基吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-3-[ (2,5-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2,3-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-3-[ (2,3-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫代]-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

3-[ (2,3-二氯苯基) 硫代]-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

3-[ (2,5-二氯苯基) 硫代]-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基) 呲啶-2,4-二酮;

5-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-2-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸乙酯;

6'-(环戊基甲氧基)-5-[ (2,3-二氯苯基) 硫代]-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2' -联吡啶]-4-基碳酸甲酯;

5-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫代]-6'-(环戊基甲氧基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2' -联吡啶]-4-基乙酸酯;

5-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫代]-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四

## 氢吡啶-4-基碳酸丙酯

5-((2,3-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸乙酯；

6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸癸酯；

5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

6-(5-溴吡啶-2-基)-3-((2-氯苯基)硫代)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮；

3-((2-氯苯基)硫代)-6-(嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮；

3-((2-氯苯基)硫代)-6-(吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮；

2-(5-溴吡啶-2-基)-5-((2-氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-3,6-二氢-2H-吡喃-4-基碳酸甲酯

6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,4-二氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

3-((2-氯苯基)硫代)-6-(2-吗啉代嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮；

5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸异丁酯；

5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基乙酸酯；

5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基新戊酸酯；

3-((2,4-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮；

5-((2,4-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基异烟酸酯；

5-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸异丁酯；

5-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

5-((2-氯苯基)硫代)-2-(2-吗啉代嘧啶-5-基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-3,6-二氢-2H-吡喃-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

及其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐和前体药物。

38. 一种药物组合物，包含根据权利要求1至37中任一项所述的式(I)或(Ia)的化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物，以及一种或多种药学上可接受

的载体、赋形剂或稀释剂。

39. 根据权利要求1至37中任一项所述的式(I)或(Ia)的化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物,所述化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物用于治疗或用作药物。

40. 根据权利要求1至37中任一项所述的式(I)或(Ia)的化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物,所述化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物用于抑制LDHA,例如用于优先于抑制LDHB而“选择性”抑制LDHA。

41. 根据权利要求1至37中任一项所述的式(I)或(Ia)的化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物,所述化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物用于治疗或预防响应于LDHA的抑制的疾病或病症,例如,由LDHA的活化介导的疾病或病症。

42. 根据权利要求40或权利要求41所述的化合物,其用于治疗或预防癌性生长或肿瘤或其转移。

43. 根据权利要求42所述的化合物,其用于治疗和/或预防以下癌症中的任一种:肉瘤,包括成骨和软组织肉瘤;癌,例如乳腺癌、肺癌、脑癌、膀胱癌、甲状腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、子宫癌、肝癌、肾癌、前列腺癌、宫颈癌和卵巢癌;淋巴瘤,包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤;神经母细胞瘤,黑素瘤,骨髓瘤,威尔姆斯肿瘤;白血病,包括急性淋巴细胞白血病和急性成髓细胞白血病;星形细胞瘤,神经胶质瘤和成视网膜细胞瘤。

44. 根据权利要求42所述的化合物,其用于治疗和/或预防乳腺癌或胰腺癌。

45. 根据权利要求40或权利要求41所述的化合物,其用于治疗或预防与细胞过度增殖相关的病状或代谢性疾病,所述代谢性疾病例如是癫痫。

46. 根据权利要求45所述的化合物,其用于治疗或预防炎性病症,所述炎性病症例如是类风湿性关节炎、多发性硬化或过敏性病状,所述过敏性病状例如是哮喘。

47. 根据权利要求1至37中任一项所述的式(I)或(Ia)的化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防响应于LDHA的抑制的疾病或病症,例如由LDHA的活化介导的疾病或病症,优先用于治疗或预防增殖性病症,所述增生性病症例如是癌症。

48. 根据权利要求48所述的用途,用于治疗或预防如在权利要求42至46中任一项所限定的疾病或病症。

49. 一种治疗或预防响应于LDHA的抑制的疾病或病症、例如通过LDHA的活化介导的疾病或病症的方法,所述方法包括对需要其的患者(例如人受试者)施用药学有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的式(I)或(Ia)的化合物、其互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐或前体药物的步骤。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中,所述疾病或病症如在权利要求42至46中任一项所限定。

## LDHA活性抑制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及新型化合物,涉及包含它们的药物组合物及其作为药物的用途。

[0002] 更具体地,本发明涉及抑制乳酸脱氢酶A(“LDHA”)活性的化合物。这些化合物可用于治疗或预防由LDHA的活化介导的疾病或病状,包括以过度增殖性细胞为特征的疾病,例如癌症。

[0003] 该化合物特别用于抗低氧和/或高糖酵解性癌症,例如胰腺癌和乳腺癌。

### 背景技术

[0004] 在有氧的情况下,正常分化的细胞主要依靠线粒体中的氧化磷酸化来产生ATP形式的能量。葡萄糖首先通过糖酵解途径在细胞溶质中代谢,从而导致丙酮酸的产生。然后在线粒体三羧酸循环中将丙酮酸进一步转化为CO<sub>2</sub>。后一过程与NADH的产生有关,NADH在氧化磷酸化期间驱动ATP的产生。

[0005] 健康的细胞通过称为“厌氧糖酵解”的过程对低氧水平起反应。在厌氧糖酵解期间,丙酮酸转化为乳酸,以允许NAD<sup>+</sup>连续再生,这对于糖酵解至关重要。但是,癌细胞主要依靠葡萄糖发酵,并且即使在充足的氧气水平下,产生的丙酮酸也被转化为乳酸。癌细胞中这种向“有氧糖酵解”的转变被称为“瓦尔堡效应”。

[0006] 有氧糖酵解使肿瘤细胞能够将更多的碳结合到生物质中,并产生不依赖于氧气的细胞过程所需的ATP。在几项研究中已经表明,糖酵解代谢的这种变化与癌细胞中葡萄糖摄取的增加有关,这导致不良的预后和肿瘤侵袭性的增加。葡萄糖代谢途径中的多种糖酵解酶可与有氧糖酵解相关。先前已经提出通过抑制各种代谢酶来干扰该代谢途径,作为治疗癌症和其他代谢疾病的方法。然而,靶向癌症自身的已改变的代谢有待于由市售药物解决。

[0007] 通过酶乳酸脱氢酶(LDH)催化丙酮酸向乳酸的转化,该酶使用NADH作为辅因子。该酶包含四聚体结构,由两个亚基LDHA(M,肌肉)和LDHB(H,心脏)的组合建立。这些亚基的结构排列产生五个亚型:两个主要在心脏中发现的同源四聚体LDH1(H<sub>4</sub>,LDHB)和骨骼肌中存在的LDH5(M<sub>4</sub>,LDHA),以及其他组织(例如,肺和肾脏)中发现的三个异四聚体。第六亚型,同型四聚体LDHC(C<sub>4</sub>),是睾丸和精子特异的,并且与雄性可育性有关。

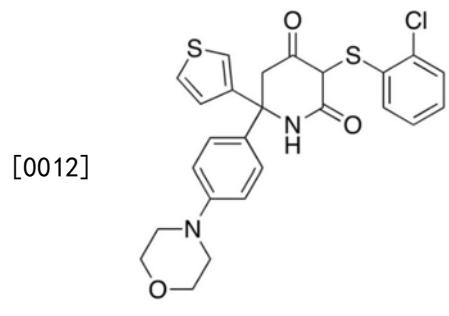
[0008] 多项研究表明,LDHA在肿瘤的存活中起关键作用,并且其表达在癌组织中上调。乳酸水平升高导致细胞外酸中毒,从而使肿瘤侵袭和转移。报告描述了LDHA表达的沉默导致缺氧下肿瘤增殖减少、肿瘤生长减少,线粒体呼吸刺激表明在癌症治疗中代谢改变具有很强的潜力。此外,乳酸脱氢酶M亚基缺乏的患者在有氧条件下没有肌肉僵硬或肌红蛋白尿的症状,证实LDHA为安全的药物靶标,对其的抑制不会导致严重的副作用。

[0009] LDHA在促进浸润性肿瘤细胞中的糖酵解中起关键作用,因为它有助于耗尽糖酵解活性产生的丙酮酸库。另外,丙酮酸会可用于氧化脱羧和细胞呼吸中的进一步下游反应。在许多类型的癌细胞中检测到LDHA的过度表达,并且shRNA介导的LDHA敲除导致显著抑制糖酵解依赖性癌细胞系中肿瘤的生长。通过乳酸脱氢酶B(“LDHB”)催化逆反应(其中外源性乳酸转化为内源性丙酮酸)。LDHB主要发现于心脏和红细胞中,在锻炼期间,无氧肌肉活动产

生的过量乳酸很高,这有助于在跳动的心脏中产生能量。这表明实现对这种特定酶的选择性的能力会是理想的。抑制LDHA活性,特别是“选择性”抑制LDHA活性的能力,因此代表用于开发治疗癌症和相关疾病的新治疗方法的有吸引力的途径。

[0010] 已经报道了多种LDHA抑制剂，并提出将其用于治疗各种癌症。其中一些为Genentech, Inc.在WO2015/140133中描述的某些哌啶-二酮化合物。发现在该较早申请中公开的许多化合物在LDHA酶抑制检测中显示出低的LDHA IC<sub>50</sub>值，但是，在癌细胞中缺乏抑制检测。

[0011] 由Genentech, Inc. 提交的相关申请 W02015/142903 涉及控制用于产生重组蛋白的哺乳动物细胞培养物中乳酸的产生。描述了相同的哌啶-二酮化合物，并在相同的 LDHA 酶抑制检测中测试了它们抑制 LDHA 的能力。在衍生自稳定转染以产生重组人源化单克隆抗体的 CHO-K1 宿主的 CHO 细胞中测试化合物 44 (在 W02015/142903 中称为“Gx”- 参见以下结构)，以便确定其对 CHO 细胞生长的影响，培养存活率，乳酸产量和产物产量。“Gx”具有以下结构：



[0013] 在这些早期Genentech申请的发明人撰写的随后论文中,这种特定的LDHA抑制剂(在文献中称为“GNE-140”)用于探究LDHA在体外和体内在肿瘤生长中的作用(请参见Nature Chemical Biology DOI:10.1038/NCHEMIO.2143,2016年8月1日)。在MIA PaCa-2人胰腺细胞中,“GNE-140”对LDHA的抑制迅速影响了整体代谢,然而仅在连续LDHA抑制2天后才发生细胞死亡。值得注意的是,“GNE 140”在体内由于其快速清除而无法持续抑制LDHA持续1小时以上。作者得出结论,LDHA抑制剂需要药代动力学特性,其可以提供多天的持续的体内靶标调节,以便增加其临床效用。

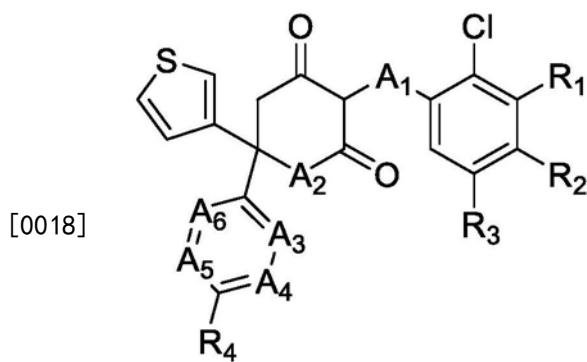
[0014] 因此,仍然需要替代的LDHA抑制剂。

[0015] 现在我们已经发现了显示出LDHA抑制活性并且至少在一些实施方式中表现出“选择性的”LDHA抑制活性的选定种类的化合物。这些化合物提供了现有技术中已知的LDHA抑制剂的替代，例如WO2015/140133和WO2015/142903中所描述的那些。它们的性能使得它们特别适合用于治疗或预防由LDHA的活化介导的病状或病症，例如用作针对低氧和/或高度糖酵解肿瘤的抗癌剂。

[0016] 如本文将描述的,至少在一些实施方式中,根据本发明的化合物提供了相对于在WO2015/140133和WO2015/142903中公开的那些化合物的改进。

## 发明内容

[0017] 在一方面,本发明涉及式(I)的化合物,其立体异构体,互变异构体,药学上可接受的盐或前体药物:



(I)

[0019] 其中：

[0020] A<sub>1</sub>为-0-,-CH<sub>2</sub>-或-S-；[0021] A<sub>2</sub>为NR(其中R为H或C<sub>1-3</sub>烷基)或-0-；[0022] A<sub>3</sub>为N或CR<sub>5</sub>；[0023] A<sub>4</sub>为N或CR<sub>6</sub>；[0024] A<sub>5</sub>为N或CR<sub>7</sub>；[0025] A<sub>6</sub>为N或CR<sub>8</sub>；[0026] R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>独立地选自H和卤素；[0027] R<sub>4</sub>选自：

[0028] -H；

[0029] -卤素；

[0030] -4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代；[0031] -OR<sub>9</sub>,其中R<sub>9</sub>为4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代；和-OR<sub>10</sub>,其中R<sub>10</sub>为C<sub>3-8</sub>环烷基；[0032] R<sub>5</sub>选自：

[0033] -H；

[0034] -羟基；

[0035] -C<sub>1-6</sub>烷基；和[0036] -C<sub>1-6</sub>烷氧基；[0037] R<sub>6</sub>选自：

[0038] -H；

[0039] -卤素；

[0040] -C<sub>1-6</sub>烷基,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代；[0041] -C<sub>1-6</sub>烷氧基,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、氨基、氰基、硝基和C<sub>3-8</sub>环烷基的取代基取代；[0042] -4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤

代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代；和

[0043] -OR<sub>11</sub>，其中R<sub>11</sub>为4至6元杂环，其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代；和

[0044] -OR<sub>12</sub>，其中R<sub>12</sub>为C<sub>3-8</sub>环烷基；

[0045] R<sub>7</sub>和R<sub>8</sub>独立地选自：

[0046] -H；

[0047] -羟基；

[0048] -C<sub>1-6</sub>烷基；和

[0049] -C<sub>1-6</sub>烷氧基；

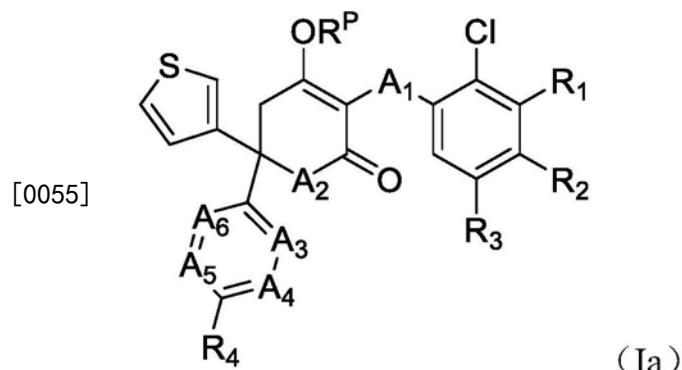
[0050] 条件为：

[0051] A<sub>3</sub>和A<sub>4</sub>不同时为N。

[0052] A<sub>5</sub>和A<sub>6</sub>不同时为N；和

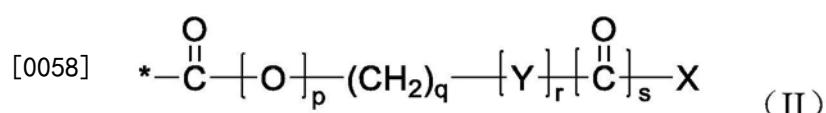
[0053] 当A<sub>2</sub>为NR时，R<sub>1</sub>，R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的至少一个为卤素。

[0054] 在另一方面，本发明涉及式(I)化合物及其衍生物的互变异构体，例如式(Ia)化合物，其立体异构体，药学上可接受的盐和前体药物：



[0056] 其中A<sub>1</sub>至A<sub>6</sub>和R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>如本文限定；并且

[0057] R<sup>P</sup>为H或具有式(II)的基团：



[0059] 其中：

[0060] \*表示基团与分子其余部分的连接点；

[0061] Y为-O-或NR<sup>i</sup>，其中R<sup>i</sup>为H或C<sub>1-3</sub>烷基(例如CH<sub>3</sub>)；

[0062] X选自：

[0063] -H；

[0064] -羟基；

[0065] -NR<sup>j</sup>R<sup>k</sup>，其中R<sup>j</sup>和R<sup>k</sup>各自独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基(优选C<sub>1-3</sub>烷基，例如CH<sub>3</sub>)；

[0066] --C<sub>1-12</sub>烷基，其任选地被一个或多个亲水基团取代；

[0067] --C<sub>1-12</sub>烷基，其任选地被一个或多个芳基或杂芳基取代，所述芳基和杂芳基可以

任选地被一个或多个选自卤代基、羟基、C<sub>1</sub>-6烷基、C<sub>1</sub>-6烷氧基、C<sub>1</sub>-6卤代烷基、C<sub>1</sub>-6卤代烷氧基和C<sub>1</sub>-6羟烷基的取代基取代；和

[0068] -芳基或杂芳基，其可以任选地被一个或多个选自卤代基、羟基、C<sub>1</sub>-6烷基、C<sub>1</sub>-6烷氧基、C<sub>1</sub>-6卤代烷基、C<sub>1</sub>-6卤代烷氧基和C<sub>1</sub>-6羟烷基的取代基取代；

[0069] p为0或1；

[0070] q为0到6的整数；

[0071] r为0或1；和

[0072] s为0或1。

[0073] 在另一方面，本发明涉及药物组合物，其包含式(I)或(Ia)的化合物、其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐或前体药物，以及一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0074] 在另一方面，本发明涉及式(I)或(Ia)的化合物、其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐或前体药物用于治疗的用途或用作药物的用途。

[0075] 在另一方面，本发明涉及式(I)或(Ia)的化合物，其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐或前体药物用于在抑制LDHA中的用途，例如用于优先于抑制LDHB而“选择性”抑制LDHA中的用途。

[0076] 在另一方面，本发明涉及式(I)或(Ia)的化合物，其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐或前体药物用于治疗或预防响应于LDHA的抑制的疾病或病症的用途，例如，由LDHA的活化介导的疾病或病症，优先用于治疗或预防增生性病症，例如癌症。

[0077] 本发明的另一方面涉及式(I)或(Ia)的化合物、其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐或前体药物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防响应于LDHA的抑制的疾病或病症，例如由LDHA的活化介导的疾病或病症，优先用于治疗或预防增生性病症，所述增生性病症例如是癌症。

[0078] 本发明的另一方面涉及一种治疗或预防响应于LDHA的抑制的疾病或病症、例如通过LDHA的活化介导的疾病或病症的方法，所述方法包括对需要其的患者(例如人受试者)施用药学有效量的式(I)或(Ia)的化合物、其立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐或前体药物的步骤。

[0079] 发明详述

[0080] 定义

[0081] 如本文所用的术语“烷基”是指单价饱和的直链或支链的碳链。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基等。烷基优选包含1-6个碳原子，例如，1-4个碳原子。除非另有说明，否则任何烷基可以在一个或多个位置被合适的取代基取代。当存在一个以上的取代基时，这些取代基可以相同或不同。合适的取代基包括羟基、C<sub>1</sub>-6烷氧基、氨基、氰基和硝基、或卤素原子(例如F、Cl或Br)。

[0082] 如本文所用的术语“烷氧基”是指-O-烷基，其中烷基如本文限定。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基等。除非另有说明，任何烷氧基都可以在一个或多个位置被合适的取代基取代。当存在一个以上的取代基时，这些取代基可以相同或不同。合适的取代基包括羟基、C<sub>1</sub>-6烷氧基、氨基、氰基和硝基、或卤素原子(例如F、Cl或Br)。

[0083] 如本文所用的术语“芳基”是指芳族环体系。这样的环体系可以为单环或双环的，并且包含至少一个不饱和芳族环。当这些包含双环时，这些可以稠合。优选地，这样的体系包含6-20个碳原子，例如6个或10个碳原子。这种基团的实例包括苯基、1-萘基和2-萘基。优选的芳基为苯基。除非另有说明，否则任何芳基均可被一个或多个本文所述的取代基取代。当存在一个以上的取代基时，这些可以相同或不同。

[0084] 术语“环烷基”是指单价的饱和环状碳体系。它包括单环和双环。单环可包含3至8个碳原子，而双环可包含7至14个碳原子。单环环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基等。除非另有说明，否则任何环烷基均可在一个或多个位置被合适的取代基取代。当存在一个以上的取代基时，这些取代基可以相同或不同。合适的取代基包括羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、氨基、氰基和硝基、或卤素原子（例如F、Cl或Br）。

[0085] 术语“卤素”，“卤代基”或“卤素原子”在本文可互换使用，并且是指-F、-Cl、-Br或-I。

[0086] 术语“卤代烷基”是指本文限定的烷基，其中烷基的至少一个氢原子被卤素原子取代，优选被F、Cl或Br取代。这样的基团的实例包括-CH<sub>2</sub>F、-CHF<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-CCl<sub>3</sub>、-CHCl<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>等。

[0087] 术语“羟烷基”是指如本文限定的烷基，其中烷基的至少一个氢原子被羟基取代。此类基团的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基等，其中一个或多个氢原子被-OH取代。

[0088] 如本文所用的术语“杂环”是指饱和或部分不饱和的4至6元（优选5或6元）碳环体系，其中至少一个环原子为选自氮、氧和硫的杂原子，其余的环原子为碳。杂环结构可以通过碳原子或通过氮原子与分子的其余部分连接。杂环的实例包括但不限于四氢呋喃、哌啶、吡咯烷、二恶烷、吗啉等。除非另有说明，否则本文提及的任何杂环可以任选地被一个或多个相同或不同的基团（例如羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、氨基、氰基或硝基、或卤素原子（例如F、Cl或Br））取代。

[0089] 如本文所用的术语“杂芳基”是指杂环芳族基团。这样的基团可以为单环或双环的，并且包含至少一个不饱和杂芳族环体系。在这些为单环的情况下，这些包含5元或6元环，其包含至少一个选自氮、氧和硫的杂原子并且包含足够的共轭键以形成芳族体系。在这些为双环的情况下，它们可以包含9-11个环原子。杂芳基的实例包括噻吩、噻吩基、吡啶基、噻唑基、呋喃基、吡咯基、三唑基、咪唑基、恶二唑基、恶唑基、吡唑基、咪唑啉基、恶唑啉基、噻唑基、四唑基、噻二唑基、苯并咪唑基、苯并恶唑基、苯并呋喃基、吲哚基、异吲哚基、吡啶酮基（pyridonyl）、哒嗪基、嘧啶基、咪唑吡啶基、恶唑吡啶基、噻唑吡啶基、咪唑并哒嗪基、恶唑并哒嗪基、噻唑并哒嗪基和嘌呤基。除非另有说明，否则本文提及的任何杂芳基环可任选地被本文所述的一个或多个基团取代。当存在一个以上的取代基时，这些取代基可以相同或不同。

[0090] 术语“亲水基团”是指能够氢键合的取代基。亲水基团的实例包括但不限于羟基、巯基和氨基。

[0091] 当提及一个或多个取代基时，是指被1至12个取代基取代，所述取代基可独立地选自本文限定的组。在一个实施方式中，可存在1、2、3、4、5或6个取代基，优选1、2或3个取代基，例如1或2个取代基。

[0092] 本发明的化合物可以包含一个或多个立体中心,因此可以不同的立体异构形式存在。术语“立体异构体”是指具有相同化学组成但是在原子或基团的空间排列方面不同的化合物。立体异构体的实例为对映异构体和非对映异构体。术语“对映异构体”是指化合物的两种立体异构体,它们为彼此不可重叠的镜像。术语“非对映异构体”是指具有两个或更多个不是彼此镜像的立体中心的立体异构体。本发明被视为扩展到非对映异构体和对映异构体,以及外消旋混合物和其中对映异构体的比例不为1:1的对映异构体富集的混合物。

[0093] 本文所述的化合物可以拆分为它们的对映异构体和/或非对映异构体。例如,当这些仅包含一个立体中心时,这些可以外消旋体或外消旋混合物的形式(对映异构体的50:50的混合物)提供,或者可以以纯对映异构体的形式提供,即以R-或S-形式提供。可以通过本领域已知的方法将任何以外消旋体形式存在的化合物分离成它们的对映异构体,例如在手性相上的柱分离或通过从光学活性溶剂中重结晶。那些具有至少两个不对称碳原子的化合物可以使用本身已知的方法(例如通过色谱法和/或分步结晶)基于它们的物理化学差异而拆分成它们的非对映异构体,并且当这些化合物以外消旋形式获得时,它们随后可以被拆分成它们的对映异构体。

[0094] 如本文所用的术语“互变异构体”是指易于通过化学反应相互转化的结构异构体,该化学反应可能涉及质子迁移并伴随着单键和相邻双键的转换。它尤其包括酮-烯醇互变异构体。根据条件,化合物可以主要以酮或烯醇形式存在,并且本发明不旨在限于本文给出的任何结构式中所示的特定形式。

[0095] 如本文所用的术语“药学上可接受的盐”是指本文描述的任何化合物的任何药学上可接受的有机盐或无机盐。药学上可接受的盐可包括一种或多种另外的分子,例如抗衡离子。抗衡离子可以为任何能稳定母体化合物上电荷的有机基团或无机基团。如果本发明的化合物为碱,则可以通过使游离碱与有机或无机酸反应来制备合适的药学上可接受的盐。如果本发明的化合物为酸,则可以通过使游离酸与有机或无机碱反应来制备合适的药学上可接受的盐。在本文中描述了合适的盐的非限制性实例。

[0096] 术语“药学上可接受的”是指所述化合物或组合物与所述制剂的其他组分或与待治疗的患者(例如人)在化学和/或毒理学上相容。

[0097] “药物组合物”是指适合用于医学目的任何形式的组合物。

[0098] 术语“前体药物”是指活性化合物的衍生物,该衍生物在使用条件下例如在体内发生转化以释放活性药物。前体药物可以在药理上为无活性的(但不是必要的)直到转化为活性药物。如本文所用的术语“前体药物”扩展至在生理条件下转化为本文所述的任何活性化合物的任何化合物。合适的前体药物包括在生理条件下水解为所需分子或通过体内酶作用转化为活性药物的化合物。

[0099] 前体药物通常可通过使用前体基团掩蔽母体分子中的一个或多个官能团而获得,所述官能团被认为至少部分是活性所必需的。如本文所用,“前体基团”是指用于掩蔽活性药物内的官能团并且在指定的使用条件下(例如向身体施用)经历转化(例如裂解)以释放官能团,从而提供活性药物。前体基团通常通过在使用条件下(例如,体内)可裂解的一个或多个键与活性药物的官能团连接。在使用条件下(例如通过水解)可自发地发生前体基团的裂解,或者其可以通过其他物理或化学手段(例如通过酶,暴露于光,暴露于温度变化或pH值变化等)来催化或诱导。在通过其他物理或化学手段诱导裂解的情况下,这些裂解对于使

用条件(例如在靶向肿瘤部位处的pH条件)可以为内源的,或者这些可以外源提供。

[0100] 如本文所用的“治疗”包括可使人类或非人类动物(例如非人类哺乳动物)受益的任何治疗应用。人和兽医治疗都在本发明的范围内,然而本发明主要针对人的治疗。治疗可以涉及现有疾病或病状,或者其也可以为预防性的。

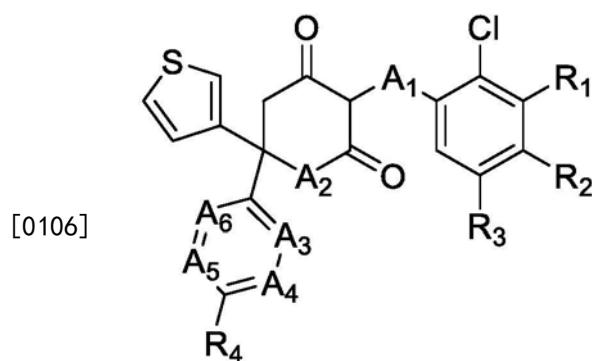
[0101] 如本文所用的“药学有效量”涉及将导致期望的药理和/或治疗效果的量,即有效实现其预期目的的试剂的量。尽管各个患者的需求可能会变化,但是确定有效量的活性剂的最佳范围在本领域技术人员的能力范围内。通常,根据多种因素选择用于采用本文所述化合物治疗疾病或病症的剂量方案,所述多种因素包括医学病状的性质及其严重性。

[0102] 如本文所用的“乳酸脱氢酶A”或“LDHA”是指主要在肌肉中表达的酶,其将源自糖酵解的丙酮酸转化为乳酸,以及将NADH氧化成NAD<sup>+</sup>。

[0103] 本文中对“乳酸脱氢酶A活性”或“LDHA活性”的任何引用均涉及丙酮酸向乳酸的转化,涉及细胞增殖活性,或涉及乳酸脱氢酶A或其片段的任何其他酶促活性。相应地应理解“乳酸脱氢酶A抑制剂”或“乳酸脱氢酶A的抑制”。因此,“乳酸脱氢酶A抑制剂”是指减少乳酸脱氢酶A的丙酮酸向乳酸的转化,指降低乳酸脱氢酶A的增殖活性,或者指以其他方式降低乳酸脱氢酶A的酶活性的化合物。这样的减少不需要是完全的,但通常减少至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%,或者可能高达至少90%或至少95%。在本发明的某些实施方式中,本文描述的化合物“选择性地”抑制乳酸脱氢酶A的酶活性。只要该化合物抑制乳酸脱氢酶A的活性比抑制乳酸脱氢酶B的活性的程度大,则这种抑制被认为是“选择性的”。

[0104] 本发明至少部分基于以下发现:对已知LDHA抑制剂的某些修饰导致化合物不仅保留其LDHA抑制活性,而且还表现出对LDHA抑制的选择性。这一发现导致该化合物用于治疗受试者(例如,人)的病状或疾病的用途,这是由LDHA的活化介导的。当以本文所述的某些衍生物的形式提供这些化合物时,进一步提高了化合物的细胞膜渗透性。

[0105] 在一方面,本发明提供式(I)的化合物,它们的立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐和前体药物:



(I)

[0107] 其中:

[0108] A<sub>1</sub>为-0-, -CH<sub>2</sub>-或-S-;

[0109] A<sub>2</sub>为NR(其中R为H或C<sub>1-3</sub>烷基)或-0-;

[0110] A<sub>3</sub>为N或CR<sub>5</sub>;

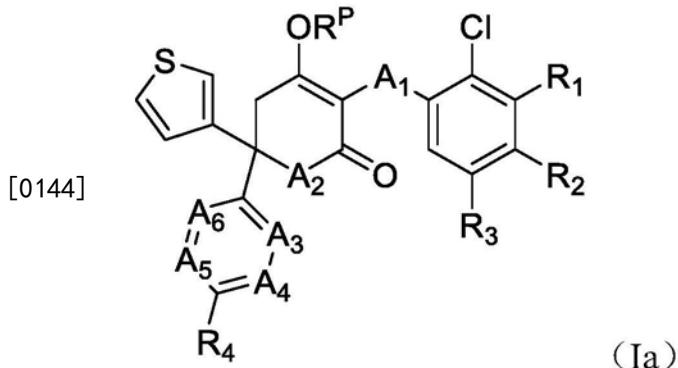
[0111] A<sub>4</sub>为N或CR<sub>6</sub>;

- [0112]  $A_5$ 为N或CR<sub>7</sub>;
- [0113]  $A_6$ 为N或CR<sub>8</sub>;
- [0114]  $R_1, R_2$ 和 $R_3$ 独立地选自H和卤素;
- [0115]  $R_4$ 选自:
- [0116] -H;
- [0117] -卤素;
- [0118] -4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-0-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代;和
- [0119] -OR<sub>9</sub>,其中R<sub>9</sub>为4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-0-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代;和
- [0120] -OR<sub>10</sub>,其中R<sub>10</sub>为C<sub>3-8</sub>环烷基;
- [0121] R<sub>5</sub>选自:
- [0122] -H;
- [0123] -羟基;
- [0124] -C<sub>1-6</sub>烷基;和
- [0125] -C<sub>1-6</sub>烷氧基;
- [0126] R<sub>6</sub>选自:
- [0127] -H;
- [0128] -卤素;
- [0129] -C<sub>1-6</sub>烷基,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代;
- [0130] -C<sub>1-6</sub>烷氧基,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、氨基、氰基、硝基和C<sub>3-8</sub>环烷基的取代基取代;
- [0131] -4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-0-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代;
- [0132] -OR<sub>11</sub>,其中R<sub>11</sub>为4至6元杂环,其任选地被一个或多个选自卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-0-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基的取代基取代;和
- [0133] -OR<sub>12</sub>,其中R<sub>12</sub>为C<sub>3-8</sub>环烷基;
- [0134] R<sub>7</sub>和R<sub>8</sub>独立地选自:
- [0135] -H;
- [0136] -羟基;
- [0137] -C<sub>1-6</sub>烷基;和
- [0138] -C<sub>1-6</sub>烷氧基;
- [0139] 条件为:
- [0140] A<sub>3</sub>和A<sub>4</sub>不同时为N。

[0141] A<sub>5</sub>和A<sub>6</sub>不同时为N;和

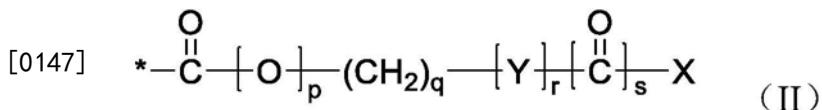
[0142] 当A<sub>2</sub>为NR时,R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的至少一个为卤素。

[0143] 在另一方面,本发明提供式(Ia)化合物,它们的互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐和前体药物:



[0145] 其中A<sub>1</sub>至A<sub>6</sub>和R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>根据权利要求1限定;和

[0146] R<sup>P</sup>为H或具有式(II)的基团:



[0148] 其中:

[0149] \*表示基团与分子的其余部分的连接点;

[0150] Y为—O—或NR<sup>i</sup>,其中R<sup>i</sup>为H或C<sub>1-3</sub>烷基(例如CH<sub>3</sub>);

[0151] X选自:

[0152] —H;

[0153] —羟基;

[0154] —NR<sup>j</sup>R<sup>k</sup>,其中R<sup>j</sup>和R<sup>k</sup>各自独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基(优选C<sub>1-3</sub>烷基,例如CH<sub>3</sub>);

[0155] —C<sub>1-12</sub>烷基,其任选地被一个或多个亲水基团取代;

[0156] —C<sub>1-12</sub>烷基,其任选地被一个或多个芳基或杂芳基取代,所述芳基和杂芳基可以任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:卤代基、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷氧基和C<sub>1-6</sub>羟烷基;和

[0157] —芳基或杂芳基,其可以任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:卤代基、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷氧基和C<sub>1-6</sub>羟烷基;

[0158] p为0或1;

[0159] q为0到6的整数;

[0160] r为0或1;和

[0161] s为0或1。

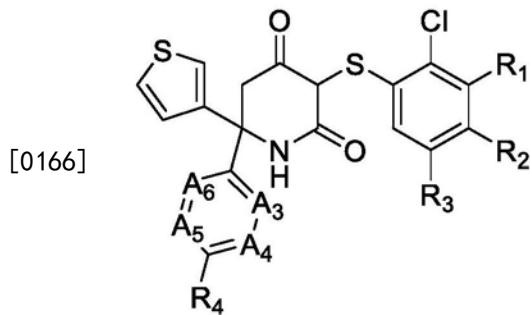
[0162] 本文所述的任何实施方式可涉及式(I)的化合物或涉及式(Ia)的化合物,它们的互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐和前体药物。

[0163] 在一个实施方式中,A<sub>1</sub>为—S—。

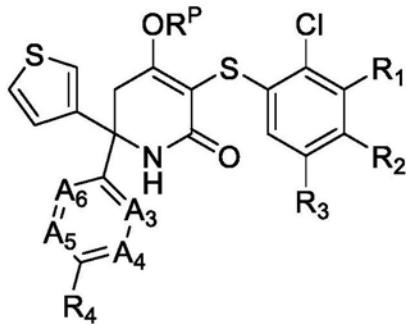
[0164] 在一个实施方式中,A<sub>2</sub>为NH或N-甲基,优选为NH。

[0165] 在一个实施方式中,本发明涉及式(III)和(IIIa)的化合物,它们的互变异构体、

立体异构体、药学上可接受的盐和前体药物：



(III)

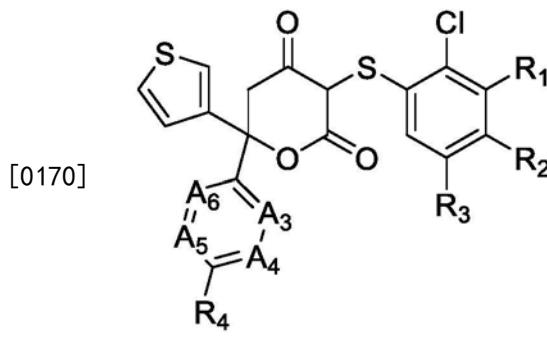


(IIIa)

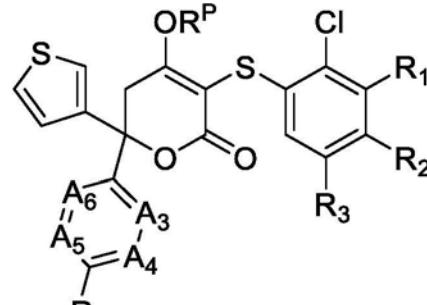
[0167] 其中A<sub>3</sub>至A<sub>6</sub>,R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>和R<sup>P</sup>如本文限定。

[0168] 在另一个实施方式中,A<sub>2</sub>为0。在A<sub>2</sub>为0的情况下,R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>可以为H或卤素。在一个实施方式中,A<sub>2</sub>为0,并且R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的至少一个为卤素。

[0169] 在一个实施方式中,本发明涉及式(IV)和(IVa)的化合物,它们的互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐和前体药物:



(IV)



(IVa)

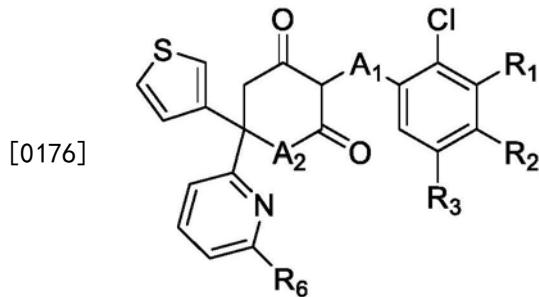
[0171] 其中A<sub>3</sub>至A<sub>6</sub>,R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>和R<sup>P</sup>如本文限定。

[0172] 在一个实施方式中,A<sub>5</sub>为N。在一个实施方式中,A<sub>4</sub>和A<sub>5</sub>均为N。

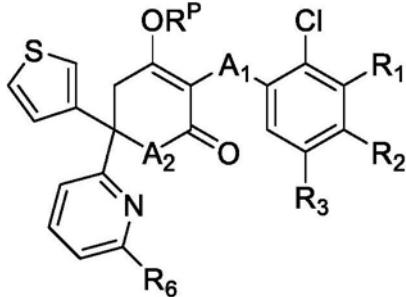
[0173] 在一个实施方式中,A<sub>5</sub>为CR<sub>7</sub>,其中R<sub>7</sub>为H。在一个实施方式中,A<sub>6</sub>为CR<sub>8</sub>,其中R<sub>8</sub>为H。在一个实施方式中,A<sub>5</sub>和A<sub>6</sub>都为CH。

[0174] 在一个实施方式中,A<sub>3</sub>为N。当A<sub>3</sub>为N时,A<sub>4</sub>不为N,即CR<sub>6</sub>。在一个实施方式中,当A<sub>3</sub>为N时,A<sub>4</sub>为CR<sub>6</sub>且R<sub>4</sub>为H。在另一个实施方式中,当A<sub>3</sub>为N时,A<sub>4</sub>为CR<sub>6</sub>,其中R<sub>6</sub>不为H,且R<sub>4</sub>为H。在另一个实施方式中,当A<sub>3</sub>为N时,A<sub>4</sub>为CR<sub>6</sub>,其中R<sub>6</sub>为H,且R<sub>4</sub>不为H。

[0175] 在一个实施方式中,本发明涉及式(V)和(Va)的化合物,它们的互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐和前体药物:



(V)



(Va)

[0177] 其中A<sub>1</sub>,A<sub>2</sub>,R<sub>1</sub>至R<sub>3</sub>,R<sub>6</sub>和R<sup>P</sup>如本文限定。

[0178] 在本发明化合物的一个实施方式中,例如在式(V)和(Va)的化合物中,R<sub>6</sub>可以不为

H。例如, R<sub>6</sub>可以选自以下中的任何一种:

[0179] -卤素;

[0180] -C<sub>1-6</sub>烷基, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、氨基、氰基和硝基;

[0181] -C<sub>1-6</sub>烷氧基, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、氨基、氰基、硝基和C<sub>3-8</sub>环烷基;

[0182] -4至6元杂环, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基; 和

[0183] -OR<sub>11</sub>, 其中R<sub>11</sub>为4至6元杂环, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基; 和

[0184] -OR<sub>12</sub>, 其中R<sub>12</sub>为C<sub>3-8</sub>环烷基。

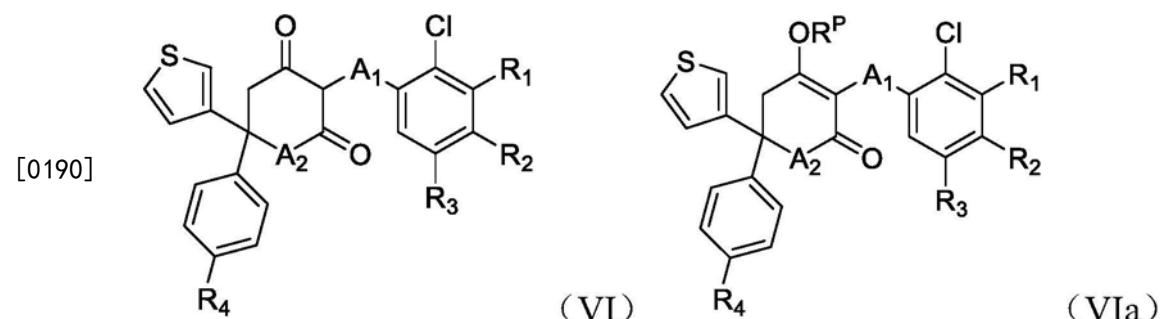
[0185] 在一个实施方式中, R<sub>6</sub>为卤素(例如Br或Cl, 优选Br), 或任选地取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基。

[0186] 在一个实施方式中, R<sub>6</sub>为本文限定的任选地取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基。当其被取代时, 合适的取代基包括C<sub>3-8</sub>环烷基, 例如未取代的环戊基。

[0187] 在一个实施方式中, A<sub>3</sub>为CR<sub>5</sub>。在另一个实施方式中, A<sub>3</sub>为CH。

[0188] 在一个实施方式中, 当A<sub>3</sub>为CH时, A<sub>4</sub>为CR<sub>6</sub>。在另一个实施方式中, 当A<sub>3</sub>为CH时, A<sub>4</sub>为CR<sub>6</sub>, 其中R<sub>6</sub>为H。

[0189] 在一个实施方式中, 本发明涉及式(VI)和(VIa)的化合物, 它们的互变异构体、立体异构体、药学上可接受的盐和前体药物:



[0191] 其中A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>和R<sup>P</sup>如本文限定。

[0192] 在本发明化合物的一个实施方式中, 例如在式(VI)和(VIa)的化合物中, R<sub>4</sub>可以不为H。例如, R<sub>4</sub>可以选自以下中的任何一种:

[0193] -卤素;

[0194] -4至6元杂环, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基;

[0195] -OR<sub>9</sub>, 其中R<sub>9</sub>为4至6元杂环, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基; 和

[0196] -OR<sub>10</sub>, 其中R<sub>10</sub>为C<sub>3-8</sub>环烷基。

[0197] 在一个实施方式中, R<sub>4</sub>选自:

[0198] -H;

[0199] -卤素; 和

[0200] -4至6元杂环, 其任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代: 卤素、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>羟烷基、-CO<sub>2</sub>H、-C(0)-O-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(0)-C<sub>1-6</sub>烷基、氨基、氰基和硝基。

[0201] 在一个实施方式中, R<sub>4</sub>选自:

[0202] -H;

[0203] -Br或Cl, 优选Br; 和

[0204] -未被取代的4至6元杂环。

[0205] 在一个实施方式中, R<sub>4</sub>为H, Br或吗啉基。

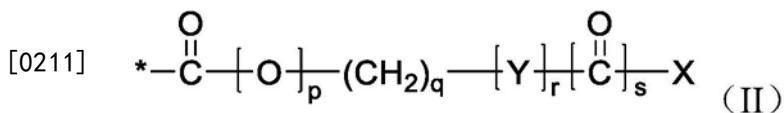
[0206] 在本文所述的任何化合物中, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>各自独立地选自H和卤素, 条件为当A<sub>2</sub>为NH或N(C<sub>1-3</sub>烷基)时, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的至少一个为卤素。

[0207] 在本发明的某些实施方式中, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的一个或两个为卤素。在一个实施方式中, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的一个为卤素。在另一个实施方式中, R<sub>1</sub>为卤素并且R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>为H。在另一个实施方式中, R<sub>2</sub>为卤素并且R<sub>1</sub>和R<sub>3</sub>为H。在另一个实施方式中, R<sub>3</sub>为卤素并且R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>为H。

[0208] 当R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的一个或多个为卤素时, 它们可以独立地选自-F、-Cl和-Br。在一个实施方式中, 这些选自-F和-Cl。

[0209] 在一个实施方式中, R<sub>1</sub>或R<sub>3</sub>为Cl, 或R<sub>2</sub>为-F。

[0210] 在一个实施方式中, R<sup>P</sup>代表具有式(II)的基团:



[0212] 其中

[0213] Y为-O-或NR<sup>i</sup>, 其中R<sup>i</sup>为H或C<sub>1-3</sub>烷基(例如CH<sub>3</sub>), 优选-O-或NH, 例如-O-;

[0214] X选自:

[0215] -NR<sup>j</sup>R<sup>k</sup>, 其中R<sup>j</sup>和R<sup>k</sup>各自独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基(优选C<sub>1-3</sub>烷基, 例如CH<sub>3</sub>);

[0216] --C<sub>1-12</sub>烷基(优选为C<sub>1-6</sub>烷基), 其任选地被一个或多个独立地选自由以下的亲水性基团取代: -OR' (其中R'为H或C<sub>1-3</sub>烷基, 例如CH<sub>3</sub>), 和-NR''<sub>2</sub> (其中每个R''独立地选自H和C<sub>1-3</sub>烷基, 例如CH<sub>3</sub>); 和

[0217] -可任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代的芳基或杂芳基: 卤代基、羟基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷氧基和C<sub>1-6</sub>羟烷基; 和

[0218] p、q、r和s如本文限定。

[0219] 在一个实施方式中, Y为-O-。

[0220] 在一个实施方式中, X为C<sub>1-12</sub>烷基(优选C<sub>1-6</sub>烷基), 其任选地被一个或多个选自由以下的基团取代: -OR' (其中R'为H或C<sub>1-3</sub>烷基, 例如CH<sub>3</sub>) 和-NR''<sub>2</sub> (其中每个R''独立地选自H和C<sub>1-3</sub>烷基, 例如CH<sub>3</sub>)。

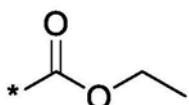
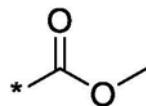
[0221] 在一个实施方式中, R<sup>P</sup>为式(II)的基团, 其中p为1, 且r和s各自为0。在该实施方式中, R<sup>P</sup>为式(VII)的基团:

[0222]  $*-\text{CO}-\text{O}-\text{(CH}_2\text{)}_q-\text{X}$  (VII)

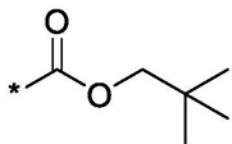
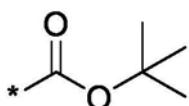
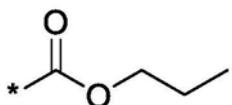
[0223] 其中\*,q和X如本文限定。

[0224] 在式(VII)中,X可以为任选地取代的C<sub>1-12</sub>烷基,其中烷基可以为直链或支链的。短链烷基可以为优选的,例如任选地取代的C<sub>1-6</sub>烷基,例如C<sub>1-4</sub>烷基。在一个实施方式中,X为未取代的烷基。在一个实施方式中,q为0或1。

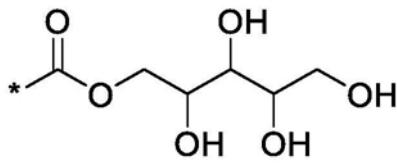
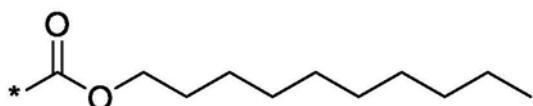
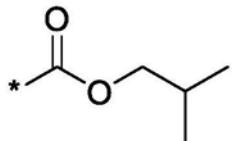
[0225] 式(VII)的基团的非限制性实例包括以下(其中\*表示基团与分子的其余部分的连接点):



[0226]



[0227]



[0228] 在一个实施方式中,R<sup>P</sup>为式(II)的基团,其中p,r和s各自为0。在该实施方式中,R<sup>P</sup>为式(VIII)的基团:

[0229]  $*-\text{CO}-\text{(CH}_2\text{)}_q-\text{X}$  (VIII)

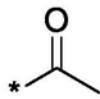
[0230] 其中\*,q和X如本文限定。

[0231] 在式(VIII)中,X可以为任选地取代的C<sub>1-12</sub>烷基,其中烷基可以为直链或支链的。短链烷基可以为优选的,例如任选地取代的C<sub>1-6</sub>烷基,例如C<sub>1-4</sub>烷基。在一个实施方式中,X为

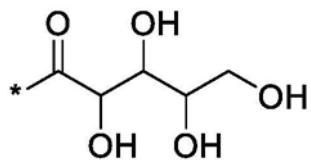
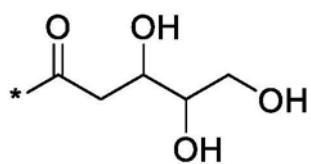
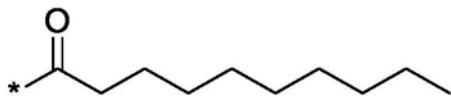
未取代的烷基。在一个实施方式中, q为0或1。

[0232] 在式(VIII)中,X可以为任选地取代的芳基或杂芳基,例如未取代的杂芳基。在一个实施方式中,q为0或1,优选为0。

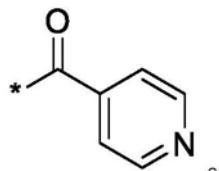
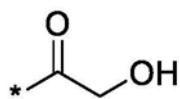
[0233] 式(VIII)的基团的非限制性实例包括以下(其中\*表示基团与分子的其余部分的连接点):



[0234]



[0235]



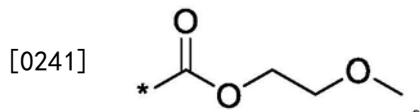
[0236] 在一个实施方式中,R<sup>P</sup>为式(II)的基团,其中Y为-0-,p和r各自为1且s为0。在该实施方式中,R<sup>P</sup>为式(IX)的基团:

[0237] \*-CO-0-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-0-X (IX)

[0238] 其中\*,q和X如本文限定。

[0239] 在式(IX)中,X可以为任选地取代的C<sub>1-12</sub>烷基,其中烷基可以为直链或支链的。短链烷基可以为优选的,例如任选地取代的C<sub>1-6</sub>烷基,例如C<sub>1-4</sub>烷基。在一个实施方式中,X为未取代的烷基。在一个实施方式中,q为0或1。优选地q为1。

[0240] 式(IX)的基团的非限制性实例包括以下(其中\*表示基团与分子的其余部分的连接点):



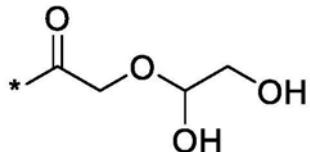
[0242] 在一个实施方式中,  $R^P$  为式 (II) 的基团, 其中  $Y$  为  $-O-$ ,  $p$  和  $s$  各自为 0 且  $r$  为 1。在该实施方式中,  $R^P$  为式 (X) 的基团:

[0243]  $*-CO-(CH_2)_q-O-X$  (X)

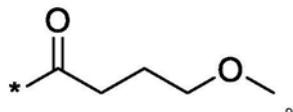
[0244] 其中  $*$ ,  $q$  和  $X$  如本文限定。

[0245] 在式 (X) 中,  $X$  可以为任选地取代的  $C_{1-12}$  烷基, 其中烷基可以为直链或支链的。短链烷基可以为优选的, 例如任选地取代的  $C_{1-6}$  烷基, 例如  $C_{1-4}$  烷基。在一个实施方式中,  $X$  为未取代的烷基。在一个实施方式中,  $q$  为 0 或 1。

[0246] 式 (X) 的基团的非限制性实例包括以下 (其中  $*$  表示基团与分子的其余部分的连接点):



[0247]



。

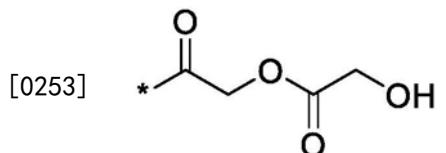
[0248] 在一个实施方式中,  $R^P$  为式 (II) 的基团, 其中  $Y$  为  $-O-$ ,  $p$  为 0 且  $r$  和  $s$  各自为 1。在该实施方式中,  $R^P$  为式 (XI) 的基团:

[0249]  $*-CO-(CH_2)_q-O-CO-X$  (XI)

[0250] 其中  $*$ ,  $q$  和  $X$  如本文限定。

[0251] 在式 (XI) 中,  $X$  可以为任选地取代的  $C_{1-12}$  烷基, 其中所述烷基可以为直链或支链的。短链烷基可以为优选的, 例如任选地取代的  $C_{1-6}$  烷基, 例如  $C_{1-4}$  烷基。在一个实施方式中,  $X$  为未取代的烷基。在一个实施方式中,  $q$  为 0 或 1。

[0252] 式 (XI) 的基团的非限制性实例包括以下 (其中  $*$  表示基团与分子的其余部分的连接点):



[0253]

。

[0254] 根据本发明的化合物的实例包括但不限于以下:

[0255] 6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-3-[ (2,4-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 味啶-2,4-二酮;

[0256] 6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 味啶-2,4-二酮;

[0257] 3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-6-(噻吩-3-基) 味啶-2,4-二酮;

[0258] 3-((2-氯-4-氟苯基) 硫代)-6-(6-乙氧基吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基) 味啶-2,4-二酮;

[0259] 6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-3-[ (2,5-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基)

哌啶-2,4-二酮；

[0260] 6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2,3-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮；

[0261] 6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-3-[ (2,3-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮；

[0262] 3-((2-氯-4-氟苯基) 硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮；

[0263] 3-((2,3-二氯苯基) 硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮；

[0264] 3-((2,5-二氯苯基) 硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮；

[0265] 3-((2-氯苯基) 硫代)-6-(嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基) 二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮；

[0266] 3-((2-氯苯基) 硫代)-6-(吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基) 二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮；

[0267] 3-((2-氯苯基) 硫代)-6-(2-吗啉基嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基) 二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮；

[0268] 5-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-2-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-2H-吡啶-4-基碳酸乙酯；

[0269] 6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,3-二氯苯基) 硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸甲酯；

[0270] 5-((2-氯-4-氟苯基) 硫代)-6'-(环戊基甲氧基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基乙酸酯；

[0271] 5-((2-氯-4-氟苯基) 硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸丙酯

[0272] 5-((2,3-二氯苯基) 硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸乙酯；

[0273] 6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,5-二氯苯基) 硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸癸酯；

[0274] 5-((2,5-二氯苯基) 硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基) 酯；

[0275] 2-(5-溴吡啶-2-基)-5-((2-氯苯基) 硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-3,6-二氢-2H-吡喃-4-基碳酸甲酯

[0276] 6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,4-二氯苯基) 硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸(2-甲氧基乙基) 酯；

[0277] 6-(5-溴吡啶-2-基)-3-((2-氯苯基) 硫代)-6-(噻吩-3-基) 二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮；

[0278] 3-((2,4-二氯苯基) 硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮；

[0279] 5-((2,4-二氯苯基) 硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基) 酯；

[0280] 6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,5-二氯苯基) 硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸(2-甲氧基乙基) 酯；

[0281] 5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸异丁酯；

[0282] 5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基乙酸酯；

[0283] 5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基新戊酸酯；

[0284] 5-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸异丁酯；

[0285] 5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基异烟酸酯；

[0286] 5-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

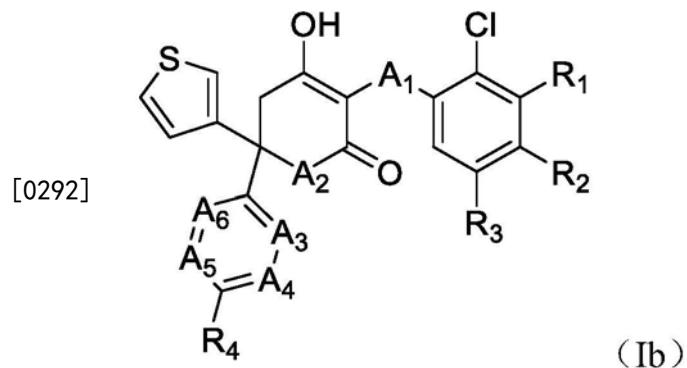
[0287] 5-((2-氯苯基)硫代)-2-(2-吗啉基嘧啶-5-基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-3,6-二氢-2H-吡喃-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

[0288] 6'--(环戊基甲氧基)-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯；

[0289] 及它们的立体异构体、互变异构体、药学上可接受的盐和前体药物。

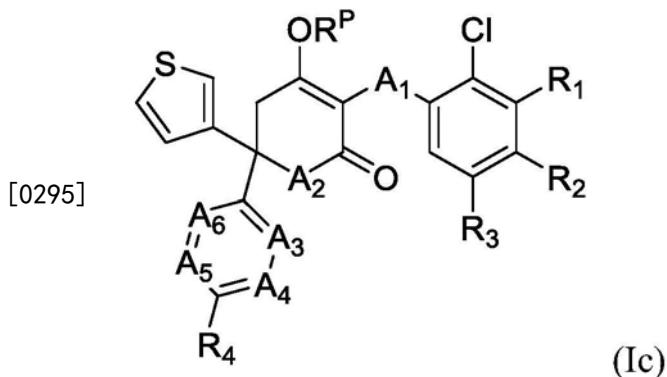
[0290] 根据本发明的化合物可以与无机酸或有机酸或碱转化为其盐，特别为其药学上可接受的盐。可用于此目的的酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸、磺酸、甲磺酸、磷酸、富马酸、琥珀酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、马来酸、乙酸、三氟乙酸和抗坏血酸。可适用于此目的的碱包括碱金属和碱土金属的氢氧化物，例如氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铯、氨和有机胺，例如二乙胺、三乙胺、乙醇胺、二乙醇胺、环己胺和二环己胺。形成盐的步骤在本领域中是常规的。

[0291] 在一个实施方式中，本发明的化合物可以其相应的烯醇衍生物的形式提供。这些包括由式(Ib)表示的化合物、它们的立体异构体、药学上可接受的盐和前体药物：



[0293] 其中A<sub>1</sub>至A<sub>6</sub>和R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>如本文限定。这些基团中的任何一个可以根据本文关于式(I)的化合物描述的任何实施方式来限定。

[0294] 在一个实施方式中，本发明的化合物为式(Ic)的化合物、它们的立体异构体、药学上可接受的盐和前体药物的那些：

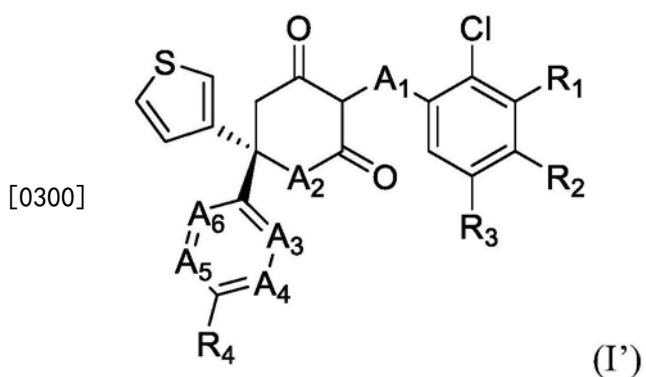


[0296] 其中A<sub>1</sub>至A<sub>6</sub>,R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>如本文限定,且R<sup>P</sup>为如本文限定的式(II)的基团。

[0297] 式(Ic)中的A<sub>1</sub>至A<sub>6</sub>,R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>和R<sup>P</sup>中的任何一个可以根据本文针对式(I)的化合物所述的任何实施方式来限定。

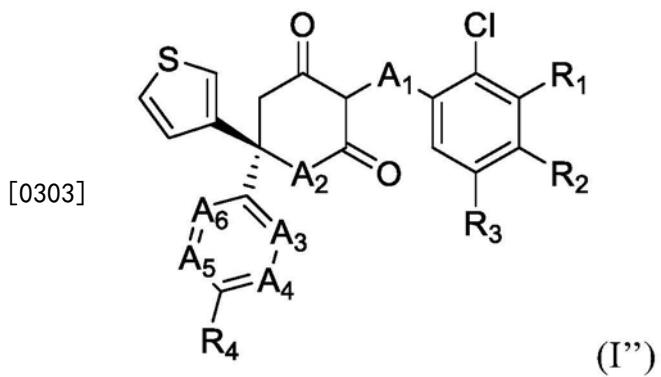
[0298] 可以理解,本文所述的化合物可以各种立体异构形式存在,包括对映异构体,非对映异构体及其混合物。本发明包括本文所述化合物的所有光学异构体和光学异构体的混合物。因此,作为非对映异构体、外消旋体和/或对映异构体存在的化合物在本发明的范围内。

[0299] 在一个实施方式中,本发明提供了具有以下立体化学的化合物、它们的互变异构体、药学上可接受的盐和前体药物:



[0301] 其中A<sub>1</sub>至A<sub>6</sub>和R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>如本文限定。

[0302] 在另一个实施方式中,本发明提供了具有以下立体化学的化合物、它们的互变异构体、药学上可接受的盐和前体药物:



[0304] 其中A<sub>1</sub>至A<sub>6</sub>和R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>如本文限定。

[0305] 具有这种立体化学的化合物(Ia),(III),(IIIa),(IV),(IVa),(V),(Va),(VI)和(VIa)中的任何一种,以及在适当情况下的任何互变异构体、药学上可接受的盐或其前体药

物形成本发明的其他实施方式。

[0306] 本发明的任何化合物可以替代地以前体药物的形式提供。前体药物可通过使用本文限定的前体基团掩蔽母体分子中的一个或多个官能团而获得。适用于掩蔽活性化合物中的官能团以提供前体药物的各种各样的前体基团为本领域众所周知的。例如，羟基官能团可以被掩蔽为可以在体内水解以提供母体羟基的酯、磷酸酯或磺酸酯。酰胺官能团可在体内水解以提供母体氨基。羧基可以被掩蔽为可以在体内水解以提供母体羧基的酯或酰胺。合适的前体基团的其他实例对于本领域技术人员将是显而易见的。

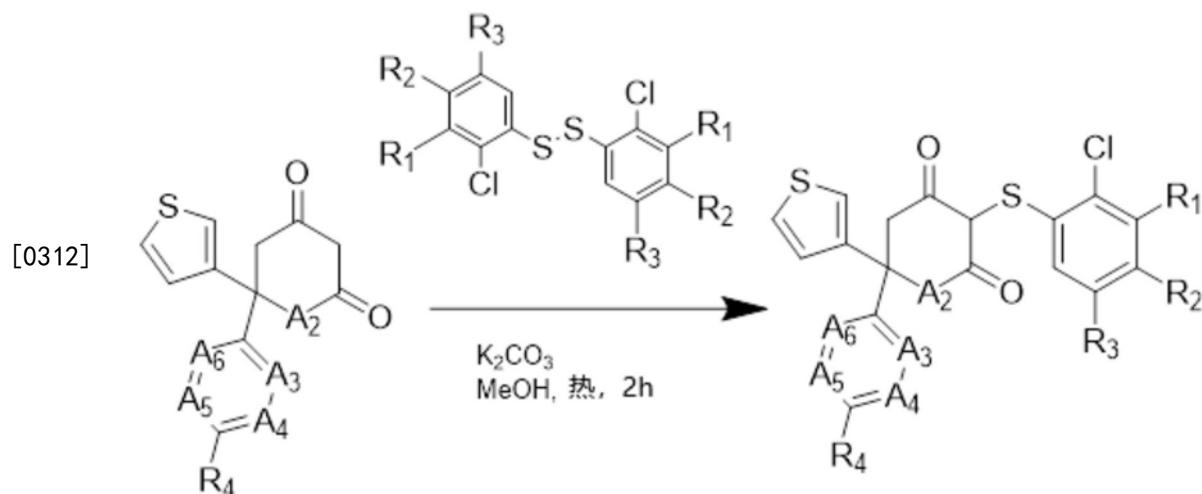
[0307] 在一个实施方式中，本发明的化合物具有羟基官能团，该羟基官能团可以被衍生以产生合适的前体药物。例如，羟基可以转化为烷基酯或芳基酯、磷酸酯、磺酸酯等。

[0308] 合适的前体基团包括与它们连接的-O-原子一起形成烷基酯、磷酸酯、磺酸酯、碳酸酯或氨基甲酸酯基团的那些。根据需要，例如根据前体药物的期望的油或水溶解度，其预期的施用方式和/或目标位置处的其预期新陈代谢模式，可以选择前体基团的确切性质以产生活性药物化合物。所述前体基团可以为例如亲水的或亲脂的，以根据需要增加或减少水溶性。前体基团的选择还可以赋予其他所需的性能，例如增强的胃肠道吸收，改善的药物稳定性等。

[0309] 可以使用本领域已知的合成方法，例如使用与WO2015/140133 (其全部内容通过引用并入本文) 中描述的方法类似的方法，从容易获得的起始材料制备根据本发明的化合物。

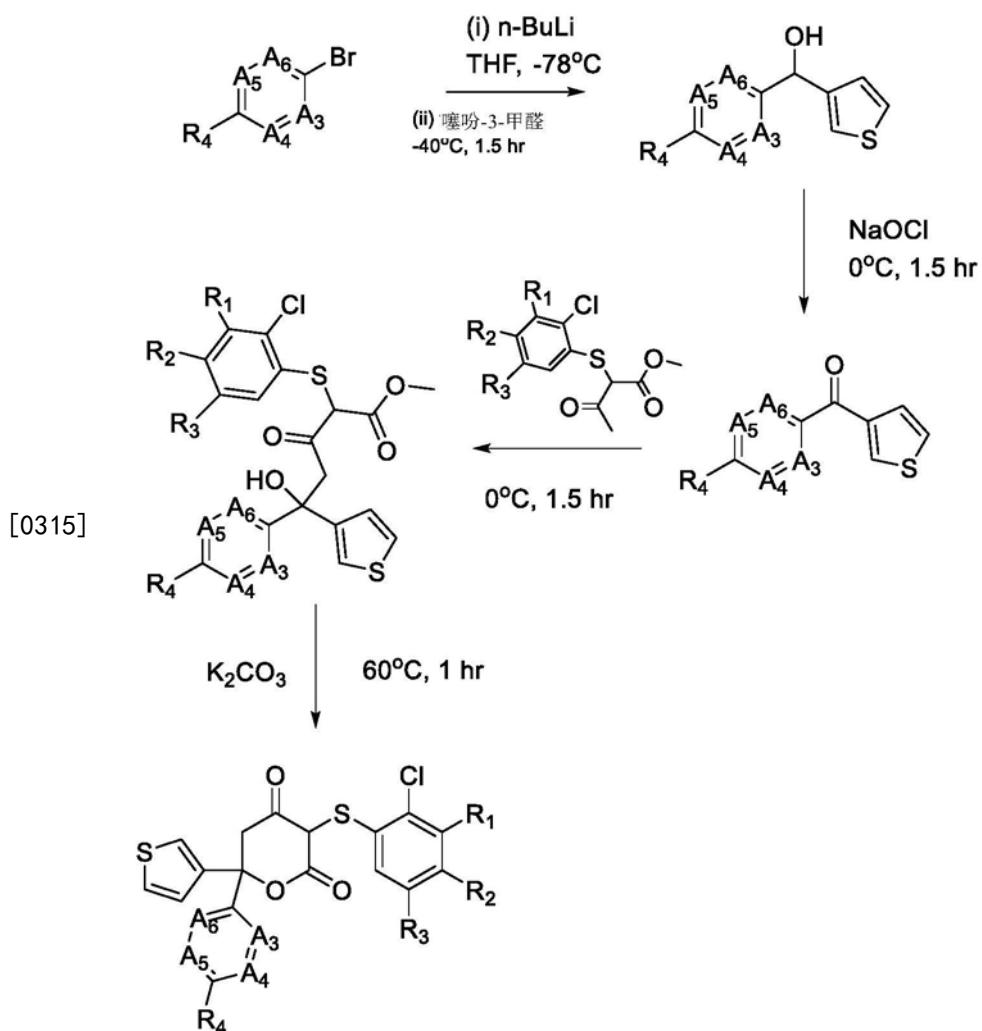
[0310] 下列方案示出了用于制备本发明的化合物和关键中间体的一般方法。这样的方法构成了本发明的另一方面。用作起始材料的化合物从文献中是可知的或可以商购。替代地，这些可以容易地通过文献中已知的方法获得。将可以理解，可以使用其他合成途径使用不同的起始材料、不同的试剂和/或不同的反应条件来制备化合物。在实施例中找到如何制备根据本发明的化合物的更详细的描述。

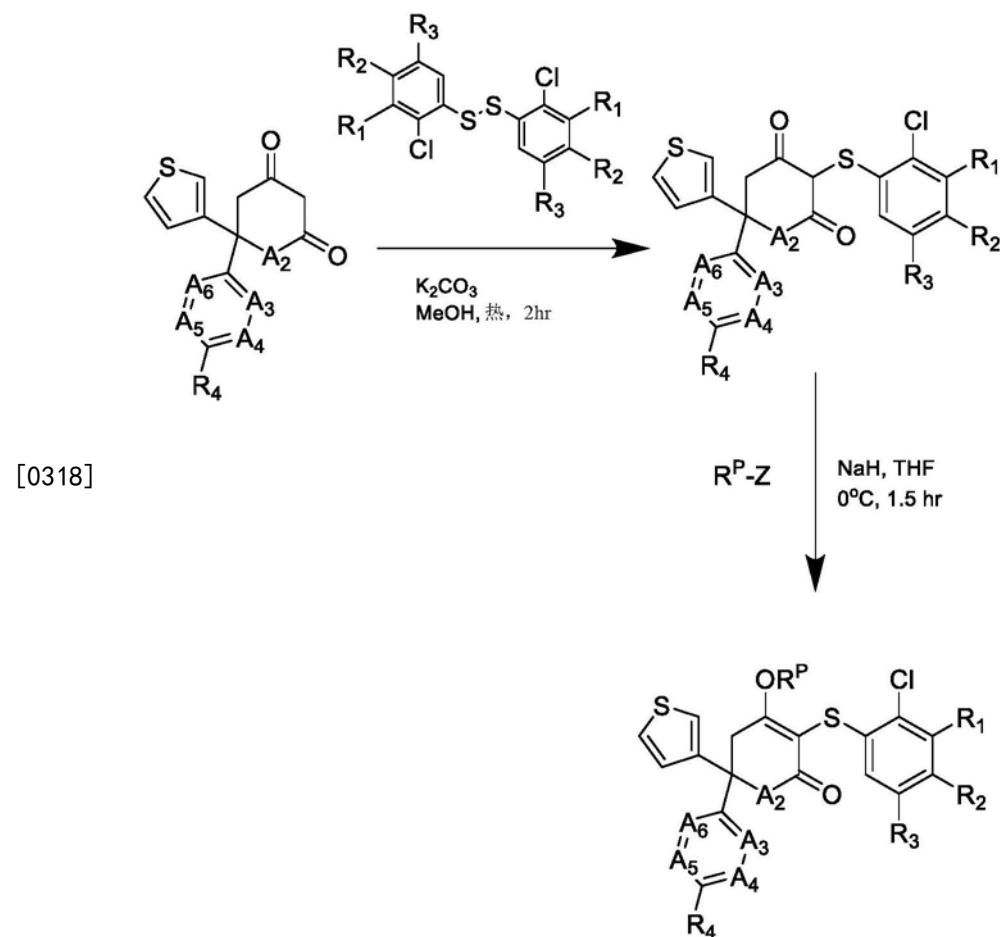
[0311] 方案1：



[0313] 在方案1中，A<sub>2</sub>为NR (其中R为H或C<sub>1-3</sub>烷基)，且A<sub>3</sub>至A<sub>6</sub>，R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>如本文限定。

[0314] 方案2：





[0319] 在方案3中, A<sub>2</sub>至A<sub>6</sub>, R<sub>1</sub>至R<sub>4</sub>和R<sup>P</sup>如本文限定, 并且Z为离去基团, 例如卤素原子, 例如, Cl。

[0320] 根据本发明的化合物具有有价值的药理性能, 特别为对LDHA的抑制作用。考虑到它们抑制LDHA的能力, 根据本发明的化合物适合于治疗和/或预防由LDHA的活化介导的任何病状或疾病。

[0321] LDHA在多种癌症的病理学中起着核心作用。因此, 本发明的化合物特别适合于预防和/或治疗LDHA被上调的恶性癌症和前恶性癌症病状, 例如癌性生长或肿瘤及其转移; 肿瘤(例如, 肉瘤和癌等), 尤其为实体瘤。

[0322] 更具体地, 该化合物可有效治疗和/或预防以下癌症: 肉瘤, 包括成骨和软组织肉瘤; 癌, 例如乳腺癌、肺癌、脑癌、膀胱癌、甲状腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、子宫癌、肝癌、肾癌、前列腺癌、宫颈癌和卵巢癌; 淋巴瘤, 包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤; 神经母细胞瘤、黑素瘤、骨髓瘤、威尔姆斯肿瘤; 白血病, 包括急性淋巴细胞白血病和急性成髓细胞白血病; 星形细胞瘤, 神经胶质瘤和成视网膜细胞瘤。

[0323] 根据本发明可以治疗的癌症的实例包括结肠癌(例如结肠直肠癌)、胰腺癌(例如胰腺腺癌)、胃癌、肝癌(例如肝细胞癌和肝母细胞瘤)、肾脏的肾母细胞瘤、髓母细胞瘤、皮肤癌(例如黑色素瘤)、非小细胞肺癌、宫颈癌、卵巢癌(例如卵巢子宫内膜癌)、膀胱癌、甲状腺癌(例如变性甲状腺癌)、头颈癌、乳腺癌、前列腺癌和胶质母细胞瘤。

[0324] 特别优选地, 本文描述的化合物可以用于治疗和/或预防乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌和前列腺癌以及成胶质细胞瘤。胰腺癌和乳腺癌的

治疗为本发明的优选方面。

[0325] 从另一方面来看,本发明因此提供了本文所述的用于医疗的化合物。除非另有说明,否则本文所用的术语“医疗”旨在包括治疗和预防。

[0326] 在另一方面,本发明提供了如本文所述的化合物,其用于治疗或预防本文所述的任何病状,例如用于治疗或预防结肠癌(例如结肠直肠癌)、胰腺癌、胃癌、肝癌(例如肝细胞癌和肝母细胞瘤)、肾威尔姆斯肿瘤、髓母细胞瘤、皮肤癌(例如黑素瘤)、非小细胞肺癌、宫颈癌、卵巢子宫内膜癌、膀胱癌、未分化甲状腺癌、头颈癌、乳腺癌、前列腺癌或胶质母细胞瘤。

[0327] 在另一方面,本发明提供了本文所述的化合物在制备用于治疗或预防本文所述的任何病状的方法的药物中的用途。

[0328] 还提供了治疗人类或非人类动物体以抵抗或预防本文所述的任何病状的方法,例如抵抗或预防结肠癌(例如结肠直肠癌)、胰腺癌、胃癌、肝癌(例如肝细胞癌和肝母细胞癌)、肾威尔姆斯瘤、成髓细胞瘤、皮肤癌(例如黑素瘤)、非小细胞肺癌、宫颈癌、卵巢子宫内膜癌、膀胱癌、未分化甲状腺癌、头颈癌、乳腺癌、前列腺癌或胶质母细胞瘤,所述方法包括向所述身体施用有效量的本文所述的化合物的步骤。

[0329] 本文描述的化合物也可用于治疗或预防与细胞过度增殖和其他代谢疾病(例如癫痫)相关的其他病状。

[0330] 大脑需要大量的能量来运行,而其高能量需求通过其主要能源葡萄糖(由血流提供)来满足。但是,大脑还可以使用其他能量底物,例如酮体和乳酸。酮在长期饥饿期间被消耗,而乳酸则在严格的身体活动(例如锻炼)中被消耗。自19世纪20年代以来,高脂低碳水化合物的生酮饮食已被用作患有耐药性癫痫的癫痫患者控制并从而减少其发作的一种方法(Geyelin, Med. Rec. 99:1037-1039, 1921; Peterman, Am. J. Dis. Child. 28:28-33, 1924; 和 Neal等, Lancet Neurol. Vol. 7 (6) :500-506, 2008)。这表明癫痫病为一种代谢性疾病,其可以从LDHA抑制剂中获益作为治疗。

[0331] 星形胶质细胞,大脑中的星形胶质细胞,利用葡萄糖并将其转化为乳酸,然后在神经元中转化为丙酮酸-这称为星形胶质神经元乳酸穿梭。当癫痫病发作时,神经元在神经元兴奋期间将乳酸作为能量源大量消耗(Gallagher等, Brain 132:2839-2849, 2009)。丙酮酸(一种在神经元中产生的有机化合物)已表明可通过使神经细胞去极化来促进癫痫引起的活动(Sada等, Science 347, 6228:1362-1367, 2015)。丙酮酸和乳酸可以通过LDH酶相互转化,并由此受到调节。草氨酸盐,草酸半酰胺的盐,丙酮酸的结构类似物和已知的LDHA抑制剂直接注射到具有颞叶癫痫的小鼠的海马中,发现其抑制癫痫发作的作用(Sada等,如上)。LDH的抑制消除了乳酸的去极化作用,并且还导致神经细胞变得超极化,这意味着它们的兴奋性降低,更稳定,因此不易发生癫痫活动。这些观察结果共同表明,LDHA抑制剂可模仿生酮饮食,也可以作为用于癫痫的可能的抗惊厥药物。

[0332] 高度增殖的细胞(例如癌细胞)具有高的能量需求,并且需要不断供应生物合成前体,用以构建大分子(例如DNA,蛋白质和脂质)。为了满足这一需求,增加了葡萄糖的摄取-当发生损伤时,在感染或发炎期间,免疫和炎性细胞中也观察到类似的效果。在发炎期间,T细胞被活化,因此将其代谢转换为使用效率较低但较快的有氧糖酵解过程,该过程独立于线粒体功能并涉及增加的乳酸生产(MacIver等, Annu. Rev. Immunol. 31:259-283, 2013;

Palmer等,Front. Immunol,6:1,2015)。使用患有自身免疫性疾病(例如哮喘和关节炎)的小鼠进行的实验表明,糖酵解抑制剂(例如二氯乙酸盐)可减轻其炎症(Bian等人,Arthritis Res. Ther. 11, R132, 2009)。还存在已知具有抗炎特性的天然存在的化合物,例如孜然和佩泼克西酮(panepoxydone)三甲双胍,它们也已显示出抑制LDHA的作用(Das等,PLoS ONE 9, e99583, 2014;Arora等,Oncotarget 6:662-678, 2015)。

[0333] 本文所述的LDHA抑制剂能够将细胞代谢从有氧糖酵解转变回到氧化性磷酸化,因此也适合用作炎症性病症(如类风湿性关节炎)、多发性硬化症和过敏性病状(如哮喘)的医疗用途,因为这些病状的特征在于增加的糖酵解和LDH活性。

[0334] 为了在医疗或预防性治疗中使用,通常将本发明的化合物配制成药物制剂。在另一方面,本发明因此提供了一种药物组合物,其包含根据本发明的化合物以及一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0335] 用于医疗用途的可接受的载体、赋形剂和稀释剂是本领域众所周知的,并且可以根据预期的施用途径和标准药学实践进行选择。实例包括粘合剂、润滑剂、悬浮剂、涂布剂、增溶剂、防腐剂、湿润剂、乳化剂、表面活性剂、甜味剂、着色剂、调味剂、抗氧化剂、着嗅剂、缓冲剂、稳定剂和/或盐。

[0336] 根据本领域众所周知的技术,本发明的化合物可以与一种或多种常规载体和/或赋形剂一起配制。通常,该组合物将适于口服或肠胃外施用,例如通过皮内注射、皮下注射、腹膜内注射或静脉内注射。

[0337] 例如,使用常规赋形剂,例如溶剂、稀释剂、粘合剂、精油、香气、pH调节剂、粘度调节剂、抗氧化剂等,它们可以配制成常规的口服施用形式,例如,片剂、包衣片剂、胶囊、散剂、颗粒、溶液、分散剂、悬浮剂、糖浆、乳液等。例如,合适的赋形剂可包括玉米淀粉、乳糖、葡萄糖、微晶纤维素、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、酒石酸、水、乙醇、甘油、山梨糖醇、聚乙二醇、丙二醇、十六烷基硬脂醇、羧甲基纤维素或脂肪物质(例如饱和脂肪),或其合适的混合物等。

[0338] 在采用肠胃外施用的情况下,这可以例如通过静脉内、皮下或肌肉内注射的方式进行。为此目的,可以使用包含活性剂的无菌溶液,例如水包油乳剂。如果存在水,则可以添加适当的缓冲体系(例如磷酸钠、乙酸钠或硼酸钠)以防止在储存条件下的pH漂移。

[0339] 口服组合物的使用,例如片剂、包衣片剂、胶囊、糖浆等,为特别优选的。

[0340] 使用常规技术,例如溶解和/或混合步骤,可以制备制剂。

[0341] 实现本文所述化合物所期望活性的所需的剂量将取决于多种因素,例如所选化合物,其施用方式和频率,治疗为治疗性还是预防性的,疾病或病状的性质和严重程度等。通常,医生将确定最适合单独受试者的实际剂量。任何特定患者的具体剂量水平和施用频率都可以变化,并且取决于多种因素,例如所用特定化合物的活性,该化合物的代谢稳定性和作用时间,患者的年龄,施用的方式和时间,以及特定病状的严重程度。化合物和/或药物组合物可以按照每天1至10次,例如每天一次或两次的方案来施用。对于对人患者口服和肠胃外施用,该试剂的日剂量水平可以为单一剂量或分剂量。

[0342] 本文描述的化合物的合适的日剂量期望在0.1mg至1g化合物;1mg至500mg化合物;1mg至300mg化合物;5mg至100mg化合物,或10mg至50mg化合物的范围。“每日剂量”是指每24小时的剂量。

[0343] 使用用于功能活性的标准测试,可以分析本发明化合物的药理性质。在实施例中提供了用于测试本发明化合物的详细方案。

### 具体实施方式

[0344] 现在将通过以下非限制性实施例并参考附图更详细地描述本发明,其中:

[0345] 图1示出了在与根据本发明的各种化合物孵育后24、72和120小时处的MDA-MB-231癌细胞的细胞存活率;

[0346] 图2示出了在用根据本发明的各种化合物孵育后24、72和120小时处的MDA-MB-468癌细胞的细胞存活率;

[0347] 图3示出了在与实施例24的已知化合物(其对应于W02015/142903中的化合物44)与实施例8和10的化合物孵育后120小时处MDA-MB-231和MDA-MB-468癌细胞的细胞存活率;

[0348] 图4示出了与实施例25的已知化合物(其对应于W02015/142903中的化合物194)与实施例1、3和5的化合物孵育后120小时处MDA-MB-231和MDA-MB-468癌细胞的细胞存活率;

[0349] 图5示出了用实施例10和17的化合物孵育后120小时处的MDA-MB-231和MDA-MB-468癌细胞的细胞存活率;

[0350] 图6示出了在用实施例1至23的化合物孵育之后,MDA-MB-468细胞和MIA PaCa-2癌细胞中的乳酸百分数;

[0351] 图7示出了与用实施例24的已知化合物(对应于W02015/142903中的化合物44)孵育相比,用实施例8、9、10和29的化合物孵育后的MDA-MB-468细胞和MIA PaCa-2癌细胞中的乳酸百分数;

[0352] 图8示出了与用实施例25的已知化合物(对应于W02015/142903中的化合物194)孵育相比,用实施例1、3、5和7的化合物孵育后,MDA-MB-468细胞和MIA PaCa-2癌细胞中的乳酸百分数;

[0353] 图9示出了用实施例10、17和31的化合物孵育后,MDA-MB-468细胞和MIA PaCa-2癌细胞中的乳酸百分数;

[0354] 图10示出了用实施例8、14、32和33的化合物孵育后,MDA-MB-468细胞和MIA PaCa-2癌细胞中的乳酸百分数;

[0355] 图11示出了与其对映异构体中的一种(对映异构体1)相比,用实施例10的化合物(作为外消旋混合物)孵育后的MDA-MB-468细胞中的乳酸百分数(左图),和对于实施例10化合物的相同对映异构体的MIA PaCa-2细胞,MDA-MB-231细胞,BT-549细胞,MCF-7细胞和MDA-MB-468细胞中的乳酸百分数(右图);和

[0356] 图12示出了用指示浓度的实施例10的化合物孵育后,在120小时的时间过程中,以3小时的间隔的MDA-MB-468癌细胞的细胞存活率(左图)和对于不同化合物浓度的实施例10化合物,在孵育96小时后,未处理的MDA-MB-468癌细胞的活细胞百分数(右图)。

[0357] 实施例中所述的化学反应可以容易地适于制备根据本发明的其他LDHA抑制剂,例如通过使用本领域已知的其他试剂,通过改变反应条件和/或通过选择任何合适的保护基团等。

[0358] 可商购的所有试剂和溶剂无需进一步纯化即可使用。在BrukerAVII-400MHz, AVIII-400MHz或DPX-300MHz光谱仪上记录NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) 光谱。以赫兹(Hz)报告偶合常数(J),

以相对于CDCl<sub>3</sub>(对于<sup>1</sup>H为7.26ppm,对于<sup>13</sup>C为77.16ppm)、甲醇-d4(对于<sup>1</sup>H为3.31ppm,对于<sup>13</sup>C为49.15ppm)、和DMSO-d6(对于<sup>1</sup>H为2.50ppm,对于<sup>13</sup>C为39.52ppm)的百万分率(ppm)的份数报道化学位移。所有产率均未校正。

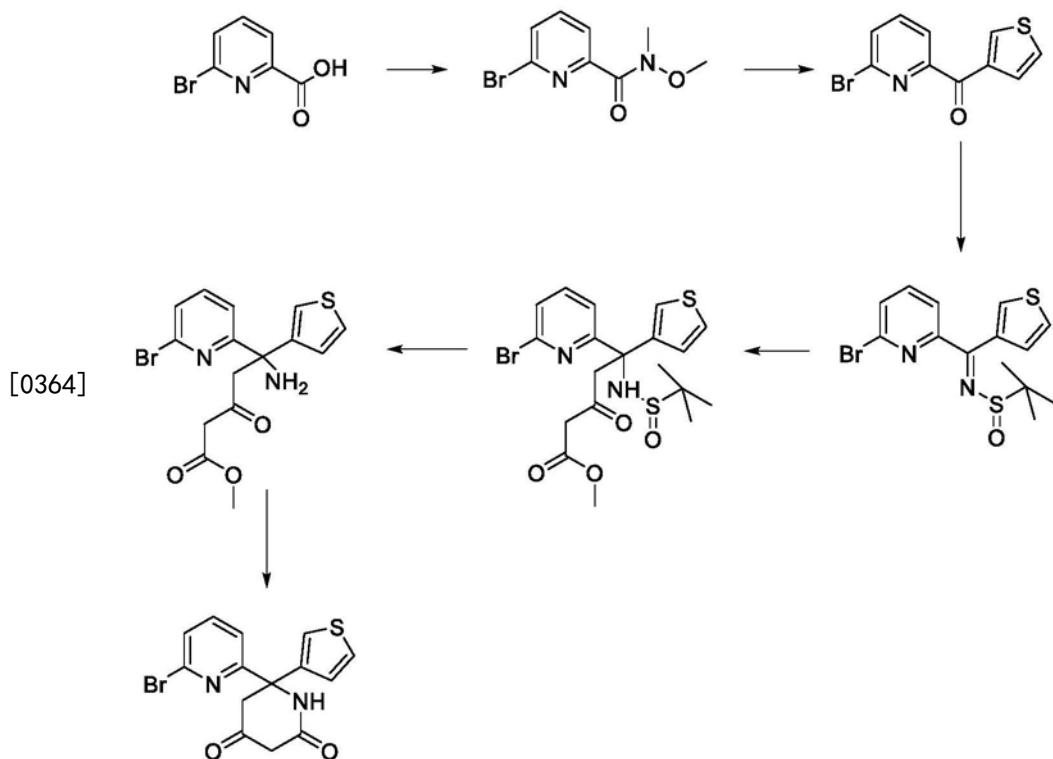
[0359] 缩略语:

[0360] DCM:二氯甲烷。hr:小时;MeOH:甲醇;THF:四氢呋喃;e.e.:对映异构体过量;R<sub>t</sub>:保留时间。

[0361] 起始材料的制备:

[0362] 使用W02015/140133中描述的程序或其适当修改的形式制备所有哌啶-二酮起始材料。

[0363] A. 6-(6-溴吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备:



[0365] 步骤A:将N,N-二甲基羟胺盐酸盐(14.6g,0.15mol),HATU(57.0g,0.15mol)和二异丙基乙胺(47.8g,0.37mol)添加到6-溴吡啶甲酸(25.3g,0.125mol)在DCM(370mL)的浆料中。将混合物在室温搅拌3小时。将反应混合物用1M HCl水溶液(2×200mL)洗涤,过滤以去除任何白色固体。减压浓缩后,将粗产物通过Kugelrohr蒸馏和硅胶色谱法纯化(己烷/乙酸乙酯:10至25%),得到6-溴-N-甲氧基-N-甲基吡啶甲基酰胺,收率为74%。

[0366] 步骤B:在-78℃下,将正丁基锂(48mL,0.12mol)缓慢添加至3-溴噻吩(19.6g,0.12mol)在二异丙醚(280mL)中的溶液。在-78℃下搅拌30分钟后,缓慢添加在二异丙醚(30mL)中的6-溴-N-甲氧基-N-甲基吡啶甲基酰胺(22.5g,92mmol),并将混合物在-78℃下搅拌2小时。将反应混合物用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(85mL)淬灭,然后加热至环境温度。溶液用乙酸乙酯(110mL)稀释,用水(3×100mL)和盐水(50mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩,得到(6-溴吡啶-2-基)(噻吩-3-基)甲酮,产率为56%。

[0367] 步骤C:将(6-溴吡啶-2-基)(噻吩-3-基)甲酮(13.8g,51.5mmol)和乙醇钛(31.4mL,150mmol)添加至2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(12.2g,100mmol)在THF(200mL)中的溶

液。将混合物在回流下搅拌20小时。使溶液冷却至环境温度，并倒入冰水中，过滤，并用乙酸乙酯(5×100mL)洗涤。滤液用乙酸乙酯(2×50mL)萃取，合并的有机相用盐水(50mL)洗涤，经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩。粗产物通过快速色谱法纯化(SiO<sub>2</sub>,己烷/乙酸乙酯:10至25%)，得到N-((6-溴吡啶-2-基)(噻吩-3-基)亚甲基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺，产率为88%。

[0368] 步骤D:在0℃下，将在THF(20mL)中的3-氧代丁酸甲酯(10.5g,90mmol)添加到NaH(3.6g,90mmol)在THF(200mL)中的悬浮液。将正丁基锂(36mL,90mmol)缓慢添加到混合物中，并将反应在0℃下搅拌30分钟。向混合物中添加在THF(50mL)中的N-((6-溴吡啶-2-基)(噻吩-3-基)亚甲基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(16.4g,45mmol)并在0℃下再搅拌2小时。使混合物温热至室温过夜，并冷却至0℃。用饱和NH<sub>4</sub>Cl(100mL)使反应淬灭，并用乙酸乙酯(85mL)稀释。有机相用水(2×100mL)洗涤，用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤并浓缩，得到甲基5-(6-溴吡啶-2-基)-5-((叔丁基亚磺酰基)氨基)-3-氧代-5-(噻吩-3-基)戊酸酯。

[0369] 步骤E:在0℃下将TMSCl(19.1g,0.18mol)缓慢添加至甲醇(100mL)，并将混合物添加至在MeOH(200mL)中的甲基5-(6-溴吡啶-2-基)-5-((叔丁基亚磺酰基)氨基)-3-氧代-5-(噻吩-3-基)戊酸酯(45mmol)中。将混合物在室温搅拌1小时，然后冷却至0℃，并使用2M NaOH水溶液(80mL)缓慢调节至pH 7。在减压下除去溶剂。粗产物用乙酸乙酯(2×100mL)萃取，合并的有机相用盐水(50mL)洗涤，经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤并浓缩，得到甲基5-氨基-5-(6-溴吡啶-2-基)-3-氧代-5-(噻吩-3-基)戊酸酯。

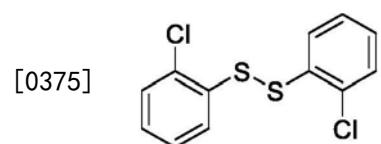
[0370] 步骤F:将碳酸钾(20.7g,150mmol)添加到5-氨基-5-(6-溴吡啶-2-基)-3-氧代-5-(噻吩-3-基)戊酸酯(45mmol)在MeOH(150mL)中的溶液。将混合物在回流下搅拌2小时，并在室温下过夜。减压去除甲醇，将粗产物溶于水(100mL)，并用乙酸乙酯(2×40mL)洗涤。使用3N HCl水溶液(95mL)将水层酸化至pH4。用乙酸乙酯(5×40mL)萃取水相。合并的有机相用无水MgSO<sub>4</sub>干燥，过滤并浓缩，以3个步骤得到6-(6-溴-2-吡啶基)-6-(3-噻吩基)哌啶-2,4-二酮，收率为41%。

[0371] B.二硫化物的制备：

[0372] 方法A:将苯硫醚(6.2mmol,1当量(aq))溶解在DCM(1mL)中。添加CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH(3mL)和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液(0.66mL,6.8mmol,1.1当量)。在剧烈搅拌下将反应混合物在室温下搅拌过夜。过滤白色沉淀物，并在减压下干燥，得到所需的二硫化物。

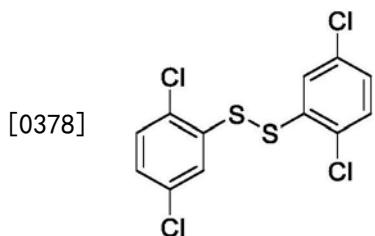
[0373] 方法B:将苯硫醚(10mmol,1当量)溶解在CHCl<sub>3</sub>(50mL)中，并添加1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲(1.43g,5mmol,0.5当量)。在室温下1小时后，添加饱和硫代硫酸钠水溶液(10mL)。分离各个相，并用DCM(2×20mL)萃取水相。合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤并在减压下浓缩。粗产物通过硅胶快速色谱纯化(庚烷/乙酸乙酯:95/5)，得到所需的二硫化物。

[0374] 1,2-双(2-氯苯基)二硫烷的制备：



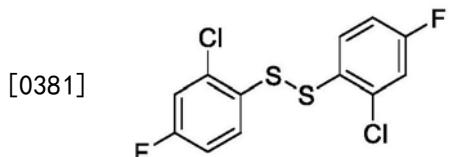
[0376] 方法A:产率=91%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz):δ=7.57(dd,J=8.0,1.6Hz,1H),7.37(dd,J=8.0,1.6Hz,1H),7.22(td,J=8.0,1.6Hz,1H),7.16(td,J=8.0,1.6Hz,1H)。

[0377] 1,2-双(2,5-二氯苯基)二硫烷的制备：



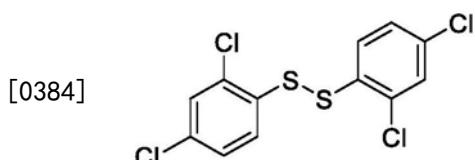
[0379] 方法B:产率=72%。<sup>1</sup>H NMR:  $\delta$ =7.52 (d,  $J$ =2.0Hz, 1H), 7.30 (d,  $J$ =8.4Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J$ =8.4, 2.0Hz, 1H)。

[0380] 1,2-双(2-氯-4-氟苯基)二硫烷的制备:



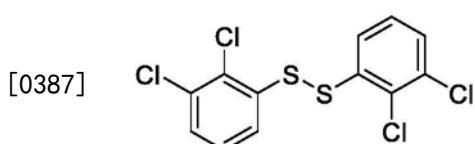
[0382] 方法A:产率=70%。<sup>1</sup>H NMR:  $\delta$ =7.53 (dd,  $J$ =11.6, 7.6Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J$ =10.8, 7.6Hz, 1H), 6.97 (ddd,  $J$ =11.6, 10.8, 3.6Hz, 1H)。

[0383] 1,2-双(2,4-二氯苯基)二硫烷的制备:



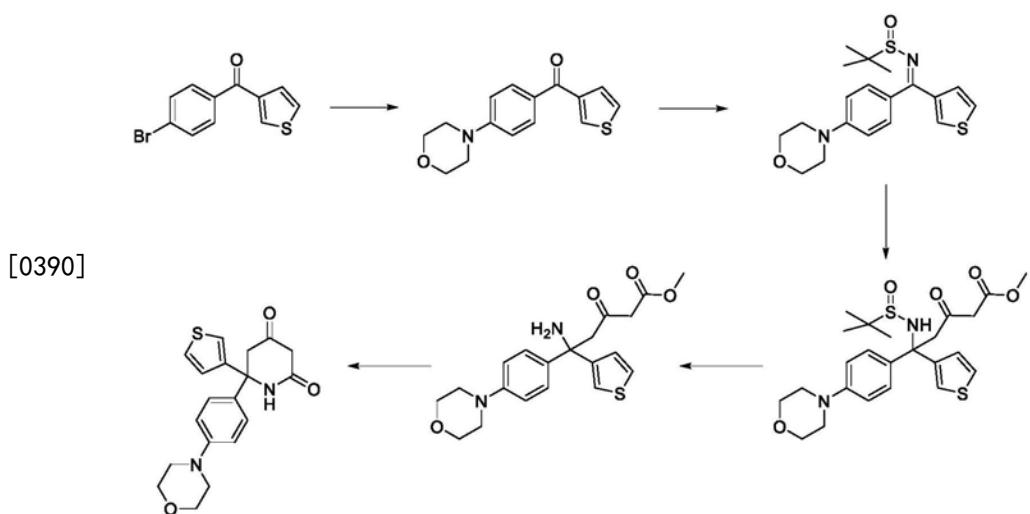
[0385] 方法A:产率=92%。<sup>1</sup>H NMR:  $\delta$ =7.46 (d,  $J$ =11.2Hz, 1H), 7.39 (d,  $J$ =2.8Hz, 1H), 7.21 (dd,  $J$ =11.2, 2.8Hz, 1H)。

[0386] 1,2-双(2,3-二氯苯基)二硫烷的制备:



[0388] 方法B:产率=73%。<sup>1</sup>H NMR (300MHz):  $\delta$ =7.42 (dd,  $J$ =10.8, 2.0Hz, 1H), 7.33 (dd,  $J$ =10.8, 2.0Hz, 1H), 7.16 (t,  $J$ =10.8Hz, 1H)。

[0389] C.6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备



[0391] 根据W02015/140133中描述的程序制备(4-溴苯基)(噻吩-3-基)甲酮。

[0392] 步骤A: (4-溴苯基)(噻吩-3-基)甲酮(3.00g, 11.2mmol, 1当量), 吡啶(1.60mL, 18.0mmol, 1.5当量), 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(xantphos) (393mg, 0.68mmol, 0.06当量), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (311mg, 0.34mmol, 0.03当量) 和K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (4.30g, 20.0mmol, 1.8当量) 在甲苯(110mL) 中的溶液在回流下搅拌18小时。将混合物冷却, 在硅藻土(Celite) 上过滤, 并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法(SiO<sub>2</sub>, 庚烷/乙酸乙酯:8/2至2/1至1/1) 纯化, 以得到[4-(吡啶-4-基)苯基](噻吩-3-基)甲酮(2.90g, 10.6mmol), 产率为95%。

[0393] 步骤B: [4-(吡啶-4-基)苯基](噻吩-3-基)甲酮(5.43g, 19.9mmol, 1当量), 叔丁基亚磺酰胺(7.26g, 60.0mmol, 3当量) 和Ti(OEt)<sub>4</sub> (20.9mL, 100mmol, 5当量) 在THF(80mL) 中的溶液在回流下搅拌66小时。将混合物倒在冰上, 并用乙酸乙酯(2×20mL) 洗涤。将水相用乙酸乙酯(2×100mL) 萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法(SiO<sub>2</sub>, 庚烷/乙酸乙酯:8/2至7/3至1/1) 纯化, 得到2-甲基-N-[4-(吡啶-4-基)苯基](噻吩-3-基)亚甲基丙烷-2-亚磺酰胺(4.74g, 12.6mmol), 产率为63%。

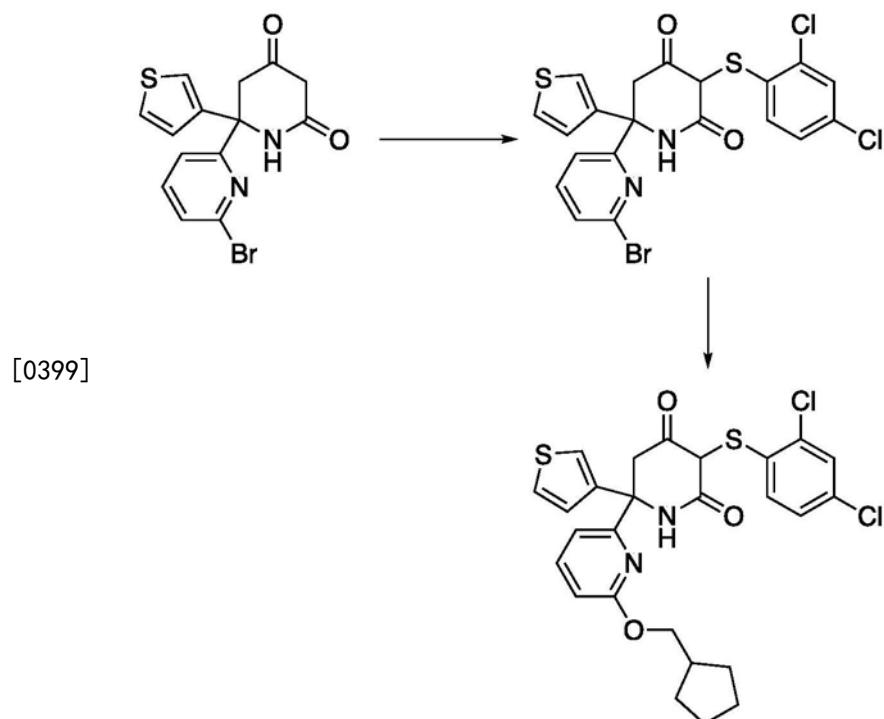
[0394] 步骤C: 在0℃下, 向NaH(1.01g, 25.2mmol, 2当量) 在THF(50mL) 中的悬浮液添加乙酰乙酸甲酯(2.92g, 25.2mmol, 2当量)。在0℃下5分钟后, 添加正丁基锂(10.1mL, 25.2mmol, 2当量), 并将反应混合物在0℃下搅拌30分钟。添加2-甲基-N-[4-(吡啶-4-基)苯基](噻吩-3-基)亚甲基丙烷-2-亚磺酰胺(4.74g, 12.6mmol, 1当量) 在THF(13mL) 中的溶液, 并在0℃下继续搅拌1.5小时。TLC显示剩余的起始材料。因此, 另一部分试剂用乙酰乙酸甲酯(1.3mL), NaH(500mg) 和正丁基锂(5.0mL) 制备, 并添加到反应混合物中。在0℃下1.5小时后, 通过添加饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(20mL) 使反应停止。分离各相, 水相用乙酸乙酯(2×50mL) 萃取, 合并的有机相用盐水(40mL)、饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液(40mL) 和1M HCl(40mL) 洗涤, 用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法(SiO<sub>2</sub>, 庚烷/乙酸乙酯:3/1至2/1至1/1至1/3至乙酸乙酯) 纯化, 以得到甲基5-((叔丁基亚磺酰基)氨基)-5-(4-吡啶代苯基)-3-氧化-5-(噻吩-3-基)戊酸酯(3.40g, 6.90mmol), 产率为55%。

[0395] 步骤D: 向甲基5-((叔丁基亚磺酰基)氨基)-5-(4-吡啶代苯基)-3-氧化-5-(噻吩-3-基)戊酸酯(3.40g, 6.90mmol, 1当量) 在甲醇(69mL) 中的溶液添加TMSCl(2.62mL, 20.7mmol, 3当量)。将反应混合物在室温下搅拌1小时。通过添加2M NaOH水溶液(11mL) 使反应停止, 并在减压下去除甲醇。将水相用乙酸乙酯(3×50mL) 萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩, 以得到粗产物(2.65g), 将其直接用于下一步骤。

[0396] 步骤E: 5-氨基-5-(4-吡啶代苯基)-3-氧化-5-(噻吩-3-基)戊酸酯(2.65g, 6.82mmol, 1当量) 和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.83g, 20.5mmol, 3当量) 在甲醇(34mL) 中的溶液在回流下搅拌2小时。将混合物减压浓缩, 并用1M HCl水溶液(30mL) 稀释。将水相用乙酸乙酯(3×50mL) 萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法纯化(SiO<sub>2</sub>, 庚烷/乙酸乙酯:4/1至2/1至1/1至1/3至乙酸乙酯至2%MeOH), 以两个步骤得到6-(4-吡啶代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(726mg, 1.87mmol), 收率为30%。

[0397] 最终化合物的制备:

[0398] 实施例1-6-[6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基]-3-[(2,4-二氯苯基)硫烷基]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备

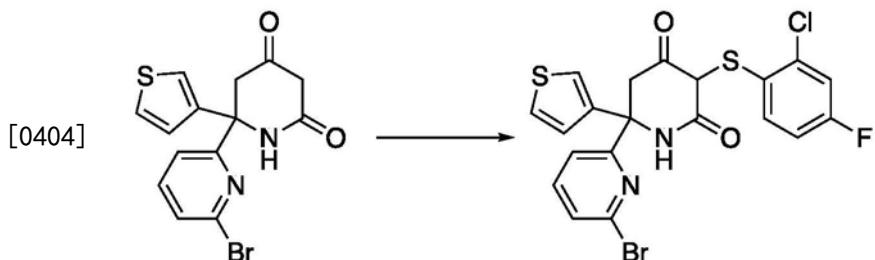


[0400] 步骤A: 向6-(6-溴吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(500mg, 1.4mmol, 1当量)在MeOH(14mL)中的溶液中添加1,2-双(2,4-二氯苯基)二硫烷(303mg, 0.85mmol, 0.6当量)和碳酸钾(593mg, 4.3mmol, 3当量)。反应在回流下搅拌2小时,并在减压下浓缩。添加水(10mL)和1M HCl(7mL),水相用乙酸乙酯(3×15mL)萃取。合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并在减压下浓缩。粗产物通过硅胶快速色谱法纯化(洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:70/30至30/70)以得到6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2,4-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮(487mg, 0.92mmol),产率为65%。

[0401] 步骤B: 在0℃下,向NaH(76mg, 1.9mmol, 5当量)在THF(4mL)的悬浮液中添加环戊烷甲醇(204μL, 1.9mmol, 5当量)。将反应在0℃下搅拌30分钟,然后将6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2,4-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮(200mg, 0.38mmol, 1当量)。将反应在回流下搅拌过夜,并通过添加水(10mL)和1M HCl(5mL)淬灭。将水相用乙酸乙酯(3×15mL)萃取,并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法纯化粗产物(洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:75/25),得到6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-3-[ (2,4-二氯苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮(115mg, 0.21mmol),产率为55%。

[0402] <sup>1</sup>H NMR(MeOD-d4, 400MHz): δ=7.75(t, J=8.0Hz, 1H), 7.49(dd, J=9.2, 3.2Hz, 1H), 7.35(d, J=2.0Hz, 1H), 7.32(dd, J=6.8, 1.2Hz), 7.19-7.17(m, 2H), 6.80-6.76(m, 2H), 5.94(d, J=8.0Hz, 1H), 4.29-4.21(m, 2H), 3.91(d, J=16.4Hz, 1H), 3.47(d, J=16.4Hz, 1H), 2.35-2.29(m, 1H), 1.85-1.77(m, 2H), 1.68-1.54(m, 4H), 1.41-1.31(m, 2H)。

[0403] 实施例2-6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮的制备

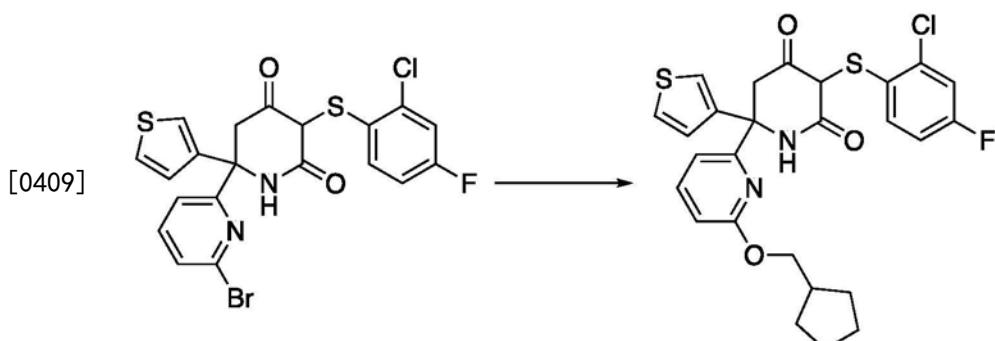


[0405] 向6-(6-溴吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(500mg,1.4mmol,1当量)在MeOH(14mL)中的溶液中添加1,2-双(2-氯-4-氟苯基)二硫烷(550mg,1.7mmol,1.2当量)和碳酸钾(593mg,4.3mmol,3当量)。将反应在回流下搅拌2小时,并在减压下浓缩。添加水(10mL)和1M HCl(7mL),并且水相用乙酸乙酯(3×15mL)萃取。合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并在减压下浓缩。通过硅胶快速色谱法纯化粗产物(洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:70/30至30/70),以得到6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮(466mg,0.91mmol),产率为64%。

[0406] <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d6, 400MHz) :  $\delta$  = 11.79 (br s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.88 (t,  $J$  = 8.0Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J$  = 8.8, 8.0Hz, 2H), 7.56 (dd,  $J$  = 5.2, 3.2Hz, 1H), 7.36 (dd,  $J$  = 8.8, 2.8Hz, 1H), 7.34 (dd,  $J$  = 2.8, 1.2Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J$  = 8.8, 1.2Hz, 1H), 6.72 (td,  $J$  = 8.8, 2.8Hz, 1H), 5.95 (dd,  $J$  = 8.8, 6.0Hz, 1H), 3.82 (d,  $J$  = 16.4Hz, 1H), 3.42 (d,  $J$  = 16.4Hz, 1H)。

[0407] <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d6, 100MHz) :  $\delta$  = 166.1, 164.4, 158.9 (d,  $J$  = 242Hz), 144.4, 140.7, 140.1, 133.2 (d,  $J$  = 4Hz), 129.3 (d,  $J$  = 10Hz), 127.0, 127.0, 126.4, 125.8 (d,  $J$  = 7.7Hz), 122.2, 120.6, 116.5 (d,  $J$  = 25Hz), 114.2 (J = 21Hz), 60.5。

[0408] 实施例3-3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮的制备



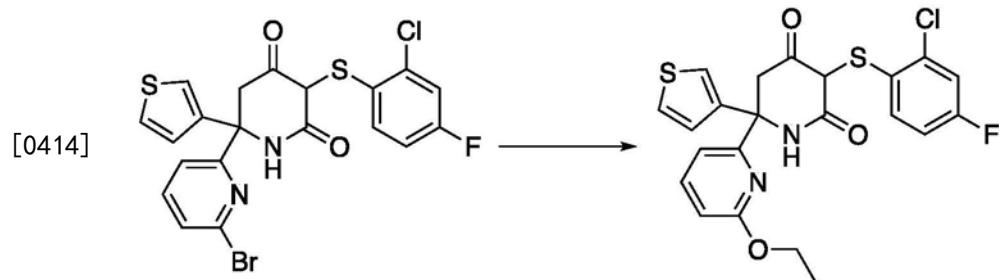
[0410] 在0℃下,将环戊烷甲醇(263μL,2.5mmol,5当量)添加到NaH(98mg,2.5mmol,5当量)在THF(5mL)中的悬浮液中。将反应在0℃下搅拌30分钟,然后添加6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮(250mg,0.49mmol,1当量)。然后将反应在回流下搅拌过夜,并通过添加水(10mL)和1M HCl(5mL)淬灭。将水相用乙酸乙酯(3×15mL)萃取,并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并在减压下浓缩。粗产物通过硅胶快速色谱法纯化(洗脱剂:庚烷/乙酸乙酯:75/25),以得到3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮(192mg,0.36mmol),产率为74%。

[0411] <sup>1</sup>H NMR (MeOD-d4, 400MHz) :  $\delta$  = 7.71 (dd,  $J$  = 8.0, 7.6Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J$  = 8.8,

7.2Hz, 1H) , 7.27 (dd,  $J=2.8, 1.2$ Hz, 1H) , 7.15–7.11 (m, 2H) , 7.09 (dd,  $J=4.8, 2.8$ Hz, 1H) , 6.75 (d,  $J=8.4$ Hz, 1H) , 6.54 (td,  $J=8.4, 2.8$ Hz, 1H) , 5.99 (dd,  $J=8.8, 6.0$ Hz, 1H) , 4.27–4.18 (m, 2H) , 3.87 (d,  $J=16.4$ Hz, 1H) , 3.45 (d,  $J=16.4$ Hz, 1H) , 2.36–2.28 (m, 1H) , 1.83–1.74 (m, 2H) , 1.66–1.53 (m, 4H) , 1.39–1.29 (m, 2H) 。

[0412]  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD-d4, 100MHz) :  $\delta=166.9, 161.6, 158.6$  (d,  $J=245$ Hz) , 157.2, 143.5, 138.2, 130.7 (d,  $J=4$ Hz) , 124.8 (d,  $J=8.5$ Hz) , 124.7, 124.5, 120.1, 114.7 (d,  $J=25$ Hz) , 112.3 (d,  $J=21$ Hz) , 111.8, 108.0, 100.0, 68.3, 59.3, 39.1, 37.3, 27.5, 23.4。

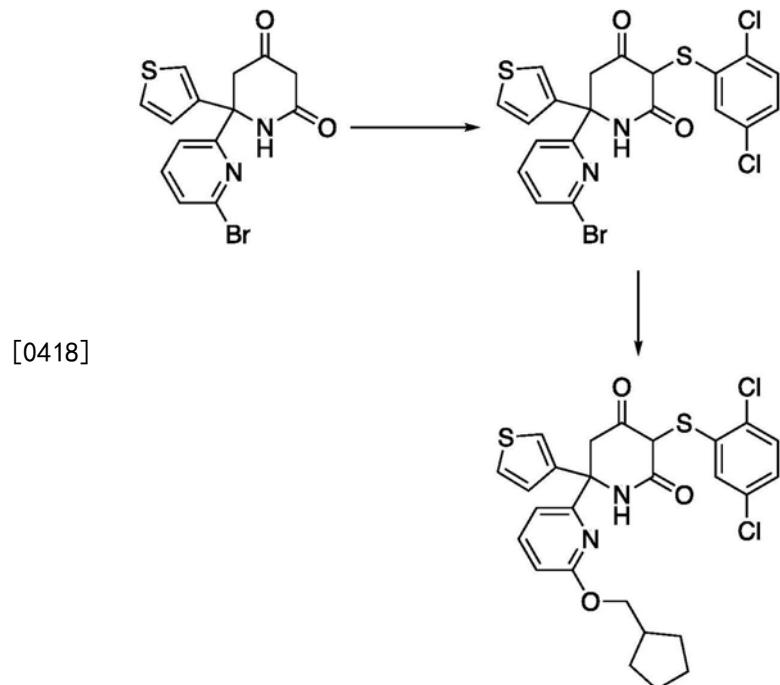
[0413] 实施例4-3-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6-(6-乙氧基吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备



[0415] 使用乙醇和6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮, 根据实施例3的程序以90%的产率制备该化合物。

[0416]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 300MHz) :  $\delta=7.71$  (dd,  $J=8.1, 7.5$ Hz, 1H) , 7.44 (dd,  $J=5.1, 3.0$ Hz, 1H) , 7.27 (dd,  $J=3.0, 1.2$ Hz, 1H) , 7.15 (dd,  $J=5.1, 1.5$ Hz, 1H) , 7.12 (d,  $J=7.5$ Hz, 1H) , 7.09 (dd,  $J=8.4, 2.7$ Hz, 1H) , 6.75 (dd,  $J=8.1, 0.6$ Hz, 1H) , 6.55 (td,  $J=8.1, 2.7$ Hz, 1H) , 6.00 (dd,  $J=9.0, 5.7$ Hz, 1H) , 4.40 (q,  $J=6.9$ Hz, 2H) , 3.90 (d,  $J=16.5$ Hz, 1H) , 3.47 (d,  $J=16.5$ Hz, 1H) , 1.34 (t,  $J=6.9$ Hz, 3H) 。

[0417] 实施例5-6-[6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基]-3-[ (2,5-二氯苯基)硫烷基]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备



[0419] 步骤A: 将1,2-双(2,5-二氯苯基)二硫烷(480mg, 1.4mmol, 0.6当量)和碳酸钾(930mg, 6.8mmol, 3当量)添加至6-(6-溴吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(790mg, 2.3mmol, 1当量)在MeOH(23mL)中的溶液。将反应在回流下搅拌2小时, 然后在减压下浓缩。添加水(10mL)和1M HCl(7mL), 水相用乙酸乙酯(3×15mL)萃取。合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗产物通过硅胶快速色谱法纯化(洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:70/30至30/70), 以得到6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[(2,5-二氯苯基)硫代]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(179mg, 0.34mmol), 产率为15%。

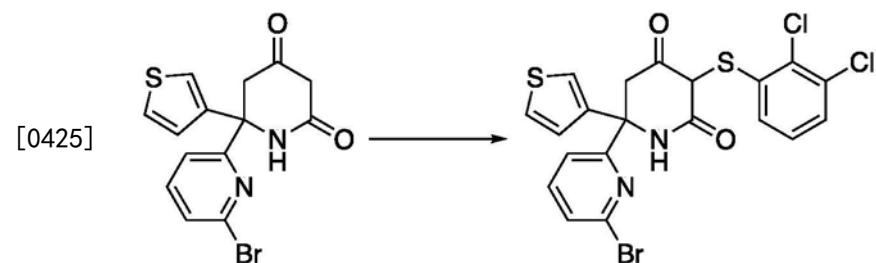
[0420] <sup>1</sup>H NMR (MeOD-d4, 400MHz) : δ = 7.75 (t, J = 7.6Hz, 1H), 7.61-7.56 (m, 2H), 7.45 (br s, 1H), 7.24-7.22 (m, 2H), 7.11 (d, J = 1.2Hz, 1H), 6.97 (d, J = 8.4Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 3.98 (d, J = 16.4Hz, 1H), 3.46 (d, J = 16.4Hz, 1H)。

[0421] 步骤B: 在0℃下, 将环戊烷甲醇(172μL, 1.6mmol, 5当量)添加到NaH(64mg, 1.6mmol, 5当量)在THF(3.5mL)中的悬浮液。将反应在0℃下搅拌30分钟, 然后添加6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[(2,5-二氯苯基)硫烷基]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(170mg, 0.32mmol, 1当量)。然后将反应物在回流下搅拌过夜, 并通过添加水(10mL)和1M HCl(5mL)淬灭。将水相用乙酸乙酯(3×15mL)萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。将粗产物通过硅胶快速色谱法纯化(洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:75/25), 以得到6-[6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基]-3-[(2,5-二氯苯基)硫烷基]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(104mg, 0.19mmol), 产率为59%。

[0422] <sup>1</sup>H NMR (MeOD-d4, 400MHz) : δ = 7.69 (t, J = 8.0Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 4.8, 3.2Hz, 1H), 7.24-7.21 (m, 2H), 7.12-7.09 (m, 2H), 6.96 (dd, J = 8.8, 2.8Hz, 1H), 6.71 (d, J = 8.0Hz, 1H), 6.26 (d, J = 2.4Hz, 1H), 4.28-4.18 (m, 2H), 9.25 (d, J = 16.4Hz, 1H), 3.42 (d, J = 16.4Hz, 1H), 2.36-2.28 (m, 1H), 1.83-1.74 (m, 2H), 1.65-1.52 (m, 4H), 1.40-1.29 (m, 2H)。

[0423] <sup>13</sup>C NMR (MeOD-d4, 100MHz) : δ = 166.5, 161.6, 158.0, 143.7, 138.3, 137.5, 131.1, 128.5, 127.0, 124.7, 124.3, 123.5, 123.0, 119.9, 111.5, 68.2, 59.1, 39.1, 37.4, 27.6, 23.5。

[0424] 实施例6-6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[(2,3-二氯苯基)硫烷基]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备



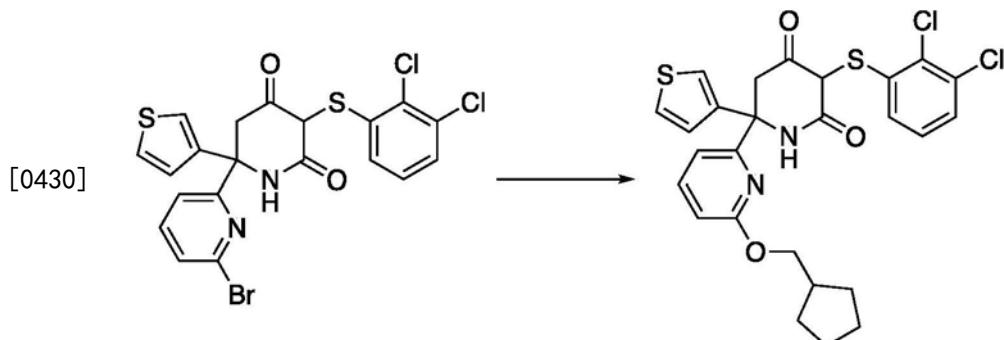
[0426] 将1,2-双(2,3-二氯苯基)二硫烷(463mg, 1.3mmol, 1.2当量)和碳酸钾(456mg, 3.3mmol, 3当量)添加到6-(6-溴吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(400mg, 1.1mmol, 1当量)在MeOH(11mL)中的溶液。将反应在回流下搅拌2小时, 并在减压下浓缩。添加水(10mL)和1M HCl(7mL), 水相用乙酸乙酯(3×15mL)萃取。合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗产物通过硅胶快速色谱法纯化(洗脱剂:庚烷/乙酸乙酯:70/30至30/70), 以得到6-(6-溴吡啶-2-基)-3-[(2,3-二氯苯基)硫烷基]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,

4-二酮 (447mg, 0.85mmol), 产率为77%。

[0427]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 400MHz) :  $\delta$  = 7.74 (t,  $J$  = 8.0Hz, 1H), 7.59 (t,  $J$  = 7.6Hz, 1H), 7.47 (dd,  $J$  = 5.2, 3.2Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J$  = 2.8, 1.6Hz, 1H), 7.15 (d,  $J$  = 1.2Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J$  = 2.8, 1.2Hz, 1H), 6.79 (t,  $J$  = 8.0Hz, 1H), 5.99 (d,  $J$  = 8.0, 1H), 3.89 (d,  $J$  = 16.4Hz, 1H), 3.49 (d,  $J$  = 16.4Hz, 1H)。

[0428]  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD-d4, 100MHz) :  $\delta$  = 176.6, 169.4, 164.9, 145.7, 142.1, 141.3, 141.0, 134.0, 129.2, 128.6, 128.4, 128.0, 127.3, 127.0, 124.6, 123.5, 121.6, 95.5, 62.1, 41.9, 14.5。

[0429] 实施例7-6-[6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基]-3-[ (2,3-二氯苯基)硫烷基]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备

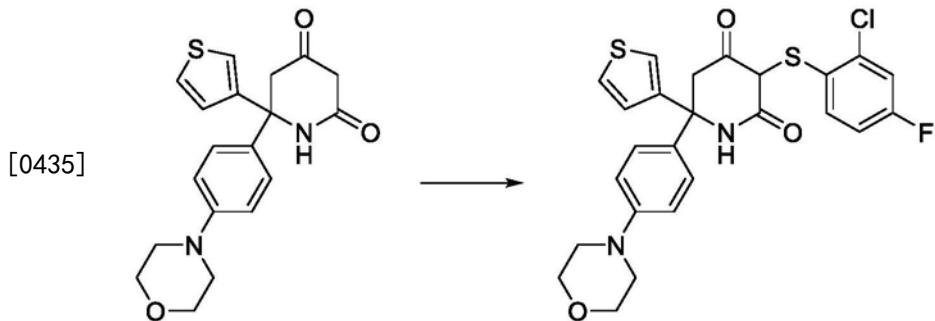


[0431] 在0℃下, 将环戊烷甲醇 (151 $\mu\text{L}$ , 1.4mmol, 5当量) 添加到NaH (56mg, 1.4mmol, 5当量) 在THF (3.5mL) 中的悬浮液。将反应在0℃下搅拌30分钟, 然后添加6- (6-溴吡啶-2-基)-3-[ (2,3-二氯苯基)硫烷基]-6- (噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮 (150mg, 0.28mmol, 1当量)。然后将反应物在回流下搅拌过夜, 并通过添加水 (10mL) 和1M HCl (5mL) 淬灭。将水相用乙酸乙酯 (3×15mL) 萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗产物通过硅胶快速色谱法纯化 (洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:75/25至50/50), 以得到6-[6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基]-3-[ (2,3-二氯苯基)硫烷基]-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮 (73mg, 0.13mmol), 产率为48%。

[0432]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 400MHz) :  $\delta$  = 7.71 (t,  $J$  = 8.0Hz, 1H), 7.45-7.43 (m, 1H), 7.28-7.27 (m, 1H), 7.15-7.11 (m, 3H), 6.76-6.69 (m, 2H), 5.90 (d,  $J$  = 8.0Hz, 1H), 4.27-4.18 (m, 1H), 3.88 (d,  $J$  = 16.4Hz, 1H), 3.45 (d,  $J$  = 16.4Hz, 1H), 2.35-2.27 (m, 2H), 1.80-1.74 (m, 2H), 1.63-1.52 (m, 4H), 1.37-1.30 (m, 2H)。

[0433]  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD-d4, 100MHz) :  $\delta$  = 169.8, 164.5, 161.1, 146.4, 141.2, 133.9, 129.1, 128.4, 127.6, 127.4, 126.9, 124.6, 123.0, 114.8, 110.9, 71.2, 62.2, 42.1, 40.2, 30.5, 26.3。

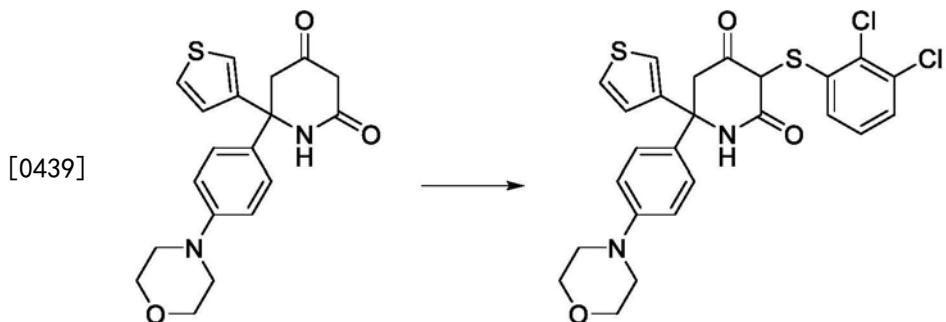
[0434] 实施例8-3-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备



[0436] 使用6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和1,2-双(2-氯-4-氟苯基)二硫烷,根据实施例2制备该化合物,产率为55%。

[0437]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 400MHz) :  $\delta$  = 7.56 (dd,  $J$  = 5.2, 2.8Hz, 1H), 7.35 (d,  $J$  = 8.8Hz, 2H), 7.32-7.31 (m, 1H), 7.21-7.16 (m, 2H), 7.02 (d,  $J$  = 8.8Hz, 2H), 7.60 (td,  $J$  = 8.4, 2.4Hz, 1H), 5.96 (dd,  $J$  = 8.8, 5.6Hz, 1H), 3.85 (dd,  $J$  = 4.8, 4.8Hz, 4H), 3.28 (s, 2H), 3.20 (dd,  $J$  = 5.2, 4.4Hz, 4H)。

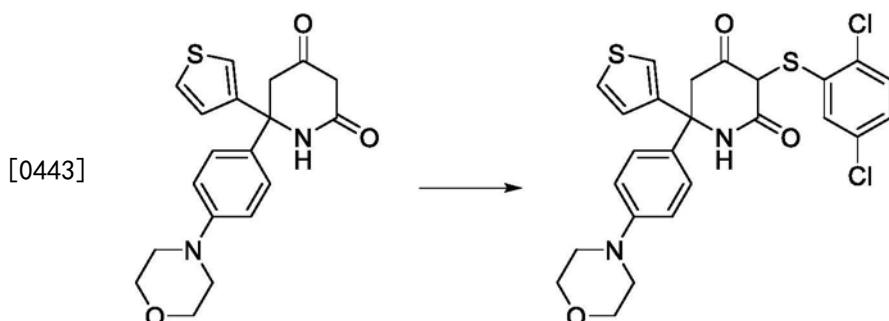
[0438] 实施例9-3-((2,3-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备



[0440] 使用6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和1,2-双(2,3-二氯苯基)二硫烷,根据实施例2制备该化合物,产率为55%。在该实施例中,使用(S)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺代替外消旋体,进行起始材料的制备的步骤B。

[0441]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 300MHz) :  $\delta$  = 7.51 (dd,  $J$  = 5.1, 3.0Hz, 1H), 7.34 (d,  $J$  = 9.0Hz, 2H), 7.28-7.27 (m, 1H), 7.17 (dd,  $J$  = 5.1, 1.5Hz, 1H), 7.13 (dd,  $J$  = 8.1, 1.5Hz, 1H), 7.00 (d,  $J$  = 9.0Hz, 2H), 6.73 (t,  $J$  = 8.1Hz, 1H), 5.92 (dd,  $J$  = 8.1, 1.5Hz, 1H), 3.87-3.84 (m, 4H), 3.46 (s, 2H), 3.21-3.17 (m, 4H)。

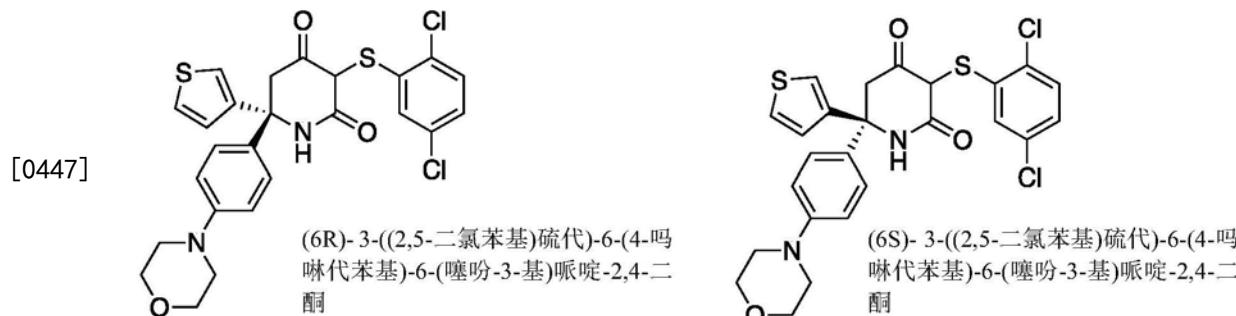
[0442] 实施例10-3-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备



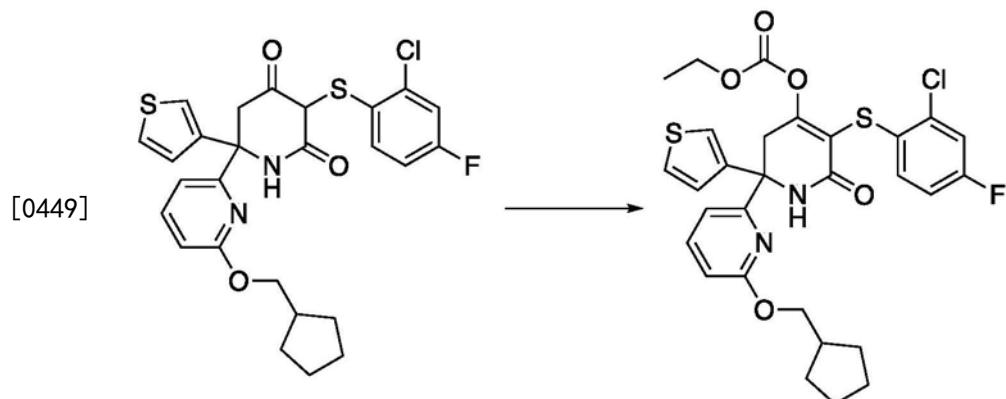
[0444] 使用6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和1,2-双(2,5-二氯苯基)二硫烷,根据实施例2制备该化合物,产率为55%。

[0445]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 400MHz) :  $\delta = 7.50$  (dd,  $J = 5.2, 3.2\text{Hz}$ , 1H), 7.33 (d,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 2H), 7.28 (d,  $J = 8.4\text{Hz}$ , 1H), 7.26 (dd,  $J = 2.8, 1.2\text{Hz}$ , 1H), 7.14 (d,  $J = 4.8, 1.2\text{Hz}$ , 1H), 7.03-7.01 (m, 1H), 7.00 (d,  $J = 9.2\text{Hz}$ , 2H), 6.30 (d,  $J = 2.8\text{Hz}$ ), 3.84-3.82 (m, 4H), 3.50 (s, 2H), 3.20-3.17 (m, 4H)。

[0446] 实施例10在测试中被检测为外消旋体和另外地为单一对映异构体。通过使用乙醇/乙腈/二乙胺(90/10/0.1)溶剂体系进行最终产物的手性制备HPLC,可以得到单独的对映异构体。使用相同的溶剂体系在ChiralPak IC柱上通过HPLC对对映异构体的分析,表明对映异构体已经以对映异构体过量100.0% (对映异构体1:R<sub>t</sub>=5.0分钟) 和99.4% (对映异构体2:R<sub>t</sub>=7.0分钟) 分离。



[0448] 实施例11-5-[ (2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-2-[6- (环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-6- 氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸乙酯的制备



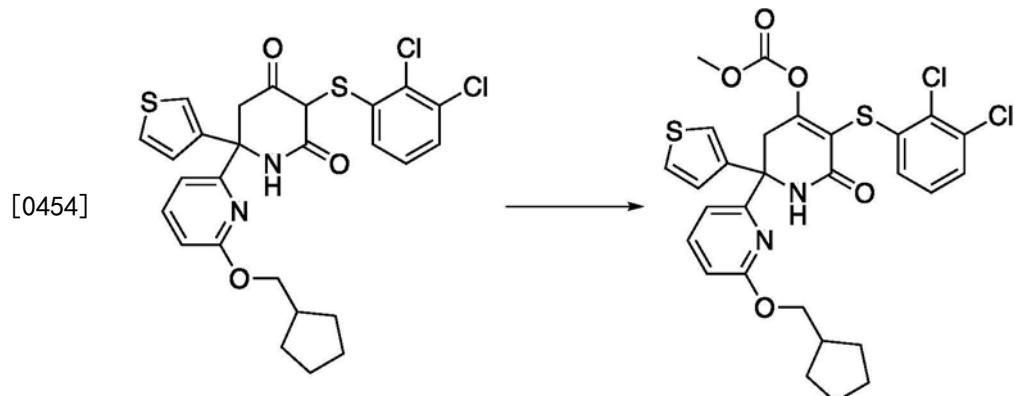
[0450] 在0℃下,向3-((2-氯-4-氟苯基) 硫代)-6-(6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基) 哌啶-2,4-二酮(80mg, 0.15mmol, 1当量) 在DCM(1.5mL) 中的溶液中添加二异丙基胺乙胺(40 $\mu\text{L}$ , 0.23mmol, 1.5当量)。在0℃下5分钟后,添加氯甲酸乙酯(17 $\mu\text{L}$ , 0.18mmol, 1.2当量),并将反应在0℃下搅拌1.5小时。通过添加饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(2mL) 和水(5mL) 使反应淬灭,并用乙酸乙酯(3×10mL) 萃取水相。合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。粗产物通过硅胶快速色谱法纯化(洗脱剂:庚烷/乙酸乙酯:80/20至50/50),以得到5-[(2-氯-4-氟苯基) 硫烷基]-2-[6-(环戊基甲氧基) 吡啶-2-基]-6-氧-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸乙酯(55mg, 91 $\mu\text{mol}$ ),产率61%。

[0451]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 400MHz) :  $\delta = 7.70$  (t,  $J = 7.6\text{Hz}$ , 1H), 7.45-7.42 (m, 1H), 7.26-7.25 (m, 1H), 7.14-7.11 (m, 2H), 7.06 (d,  $J = 7.2\text{Hz}$ , 1H), 6.75 (d,  $J = 8.4\text{Hz}$ , 1H), 6.65 (td, J

=8.0,2.8Hz,1H),6.32(dd,J=8.4,5.6Hz,1H),4.26-4.21(m,3H),4.17-4.12(m,1H),3.94(d,J=17.2Hz,1H),3.58(d,J=17.2Hz,1H),2.36-2.29(m,1H),1.83-1.75(m,2H),1.66-1.54(m,4H),1.38-1.27(m,2H),1.29(t,J=7.2Hz,3H)。

[0452]  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD-d4, 100MHz) :  $\delta$ =166.1,164.5(d,J=221Hz),164.4,160.6,151.8,145.7,141.1,134.5(d,J=10.6Hz),131.5(d,J=8.6Hz),131.2(d,J=3.6Hz),127.7,127.4,123.5,117.8(d,J=25.5Hz),116.1,115.5(d,J=21.7Hz),115.1,111.1,71.3,67.0,62.8,41.3,40.2,30.49,30.43,26.36,26.32,14.3。

[0453] 实施例12-6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,3-二氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸甲酯的制备

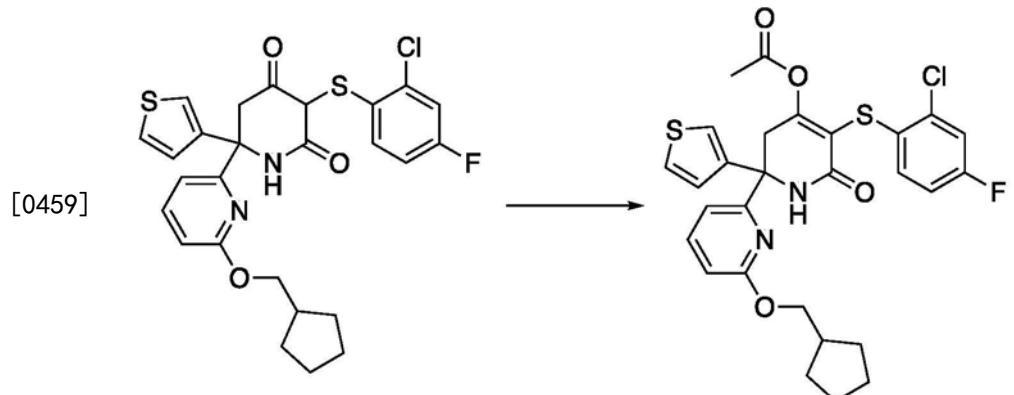


[0455] 使用氯甲酸甲酯和6-(6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基)-3-((2,3-二氯苯基)硫代)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮,根据实施例11制备该化合物,产率为51%。

[0456]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 400MHz) :  $\delta$ =7.73(t,J=8.0Hz,1H),7.47-7.44(m,1H),7.30-7.27(m,1H),7.22(d,J=8.0Hz,1H),7.14(d,J=5.2Hz,1H),7.09(d,J=7.6Hz,1H),6.80-6.76(m,2H),6.03(d,J=8.0Hz,1H),4.26-4.14(m,2H),3.98(d,J=16.8Hz,1H),3.84(s,3H),3.64(d,J=16.8Hz,1H),2.36-2.28(m,1H),1.82-1.74(m,2H),1.67-1.52(m,4H),1.39-1.30(m,2H)。

[0457]  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD-d4, 101MHz) :  $\delta$ =167.0,165.9,164.5,160.6,152.4,149.7,145.7,141.1,138.9,134.2,130.4,128.6,128.2,127.7,127.5,127.0,123.6,115.4,115.2,111.2,71.3,62.9,56.8,40.2,30.46,30.44,26.3。

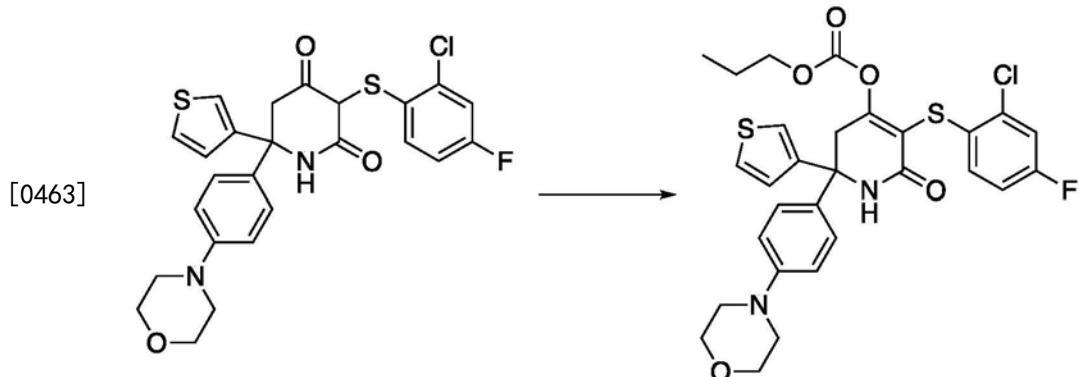
[0458] 实施例13-5-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6'-(环戊基甲氧基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基乙酸酯的制备



[0460] 使用乙酰氯和3-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6-(环戊基甲氧基)哌啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮,根据实施例11制备该化合物,产率为42%。

[0461]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 7.66$  (br s, 1H), 7.44 (t,  $J = 8.0\text{Hz}$ , 1H), 7.39 (dd,  $J = 5.2, 3.2\text{Hz}$ , 1H), 7.24-7.23 (m, 1H), 7.16 (dd,  $J = 5.2, 1.2\text{Hz}$ , 1H), 7.03 (dd,  $J = 8.0, 2.4\text{Hz}$ , 1H), 6.62-6.57 (m, 2H), 6.48 (d,  $J = 7.2\text{Hz}$ ), 6.09 (dd,  $J = 8.8, 5.6\text{Hz}$ , 1H), 4.15-4.05 (m, 4H), 3.25 (d,  $J = 17.2\text{Hz}$ , 1H), 2.45 (s, 3H), 2.33 (q,  $J = 7.6\text{Hz}$ , 1H), 1.85-1.78 (m, 2H), 1.67-1.56 (m, 4H), 1.40-1.32 (m, 2H)。

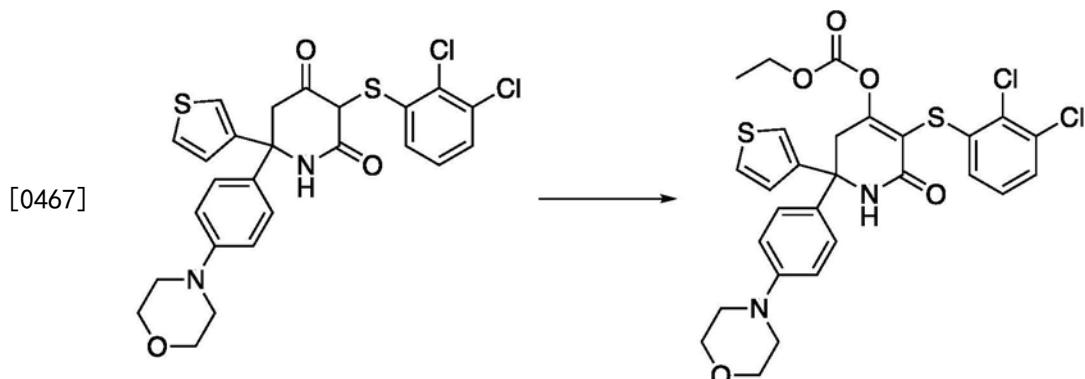
[0462] 实施例14-5-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢哌啶-4-基碳酸丙酯的制备



[0464] 使用3-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸正丙酯,根据实施例11制备该化合物,产率为68%。

[0465]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{MeOD-d4}$ , 400MHz) :  $\delta = 7.52$  (dd,  $J = 5.2, 2.8\text{Hz}$ , 1H), 7.35-7.33 (m, 1H), 7.31 (d,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 2H), 7.16-7.13 (m, 2H), 7.00 (d,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 2H), 6.64 (td,  $J = 8.4, 2.8\text{Hz}$ , 1H), 6.20 (dd,  $J = 8.8, 6.0\text{Hz}$ , 1H), 4.17 (t,  $J = 6.4\text{Hz}$ , 2H), 3.87-3.85 (m, 4H), 3.60 (br s, 2H), 3.21-3.18 (m, 4H), 1.71 (sext,  $J = 7.2\text{Hz}$ , 2H), 0.97 (t,  $J = 7.2\text{Hz}$ , 3H)。

[0466] 实施例15-5-((2,3-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢哌啶-4-基碳酸乙酯的制备

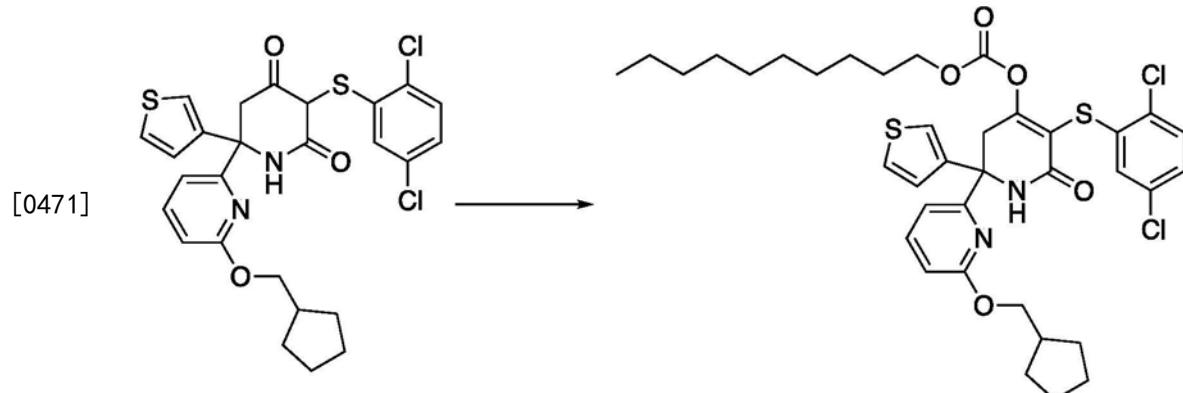


[0468] 使用3-((2,3-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸乙酯,根据实施例11制备该化合物,产率为60%。

[0469]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{MeOD-d4}$ , 300MHz) :  $\delta = 7.51$  (dd,  $J = 5.1, 3.0\text{Hz}$ , 1H), 7.35 (dd,  $J = 6.0, 1.5\text{Hz}$ , 1H), 7.31 (d,  $J = 9.0\text{Hz}$ , 2H), 7.20 (dd,  $J = 8.1, 1.5\text{Hz}$ , 1H), 7.15 (dd,  $J = 6.6, 1.5\text{Hz}$ , 1H), 6.99 (d,  $J = 9.0\text{Hz}$ , 2H), 6.78 (t,  $J = 8.1\text{Hz}$ , 1H), 6.00 (dd,  $J = 8.1, 1.5\text{Hz}$ , 1H), 4.57 (m,

1H) , 4.24 (q,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H) , 3.86–3.81 (m, 4H) , 3.62 (s, 2H) , 3.19–3.16 (m, 4H) , 1.28 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H)。

[0470] 实施例16-6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸癸酯的制备

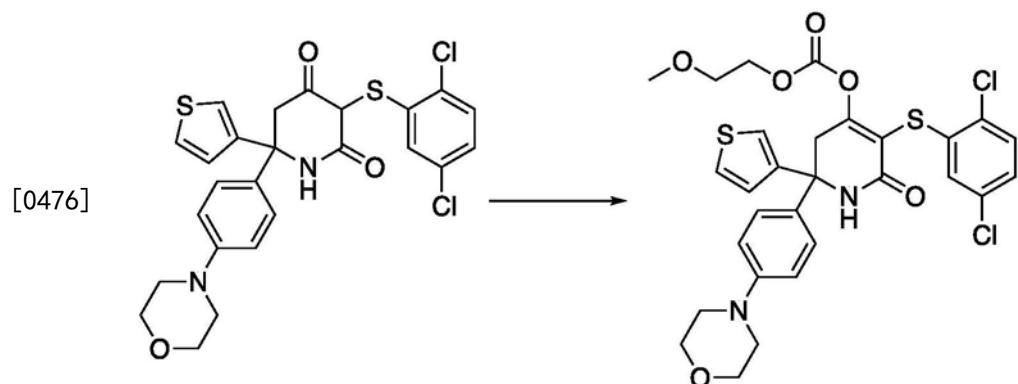


[0472] 使用6-(6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基)-3-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和碳酸氯癸酯,根据实施例11制备该化合物,产率为50%。

[0473]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 400MHz) :  $\delta=7.80$  (dd,  $J=8.0, 7.6\text{Hz}$ , 1H) , 7.53 (dd,  $J=4.8, 2.8\text{Hz}$ , 1H) , 7.40–7.38 (m, 2H) , 7.20–7.16 (m, 3H) , 6.80 (dd,  $J=8.0, 0.8\text{Hz}$ , 1H) , 6.44 (d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.32 (m, 2H) , 4.26–4.19 (m, 4H) , 4.09 (d,  $J=17.2\text{Hz}$ , 1H) , 3.62 (d,  $J=17.2\text{Hz}$ , 1H) , 2.38 (q,  $J=7.6\text{Hz}$ , 1H) , 1.86–1.79 (m, 2H) , 1.70–1.56 (m, 6H) , 1.42–1.32 (m, 16H) , 0.94 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H)。

[0474]  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD-d4, 100MHz) :  $\delta=166.5, 164.5, 164.1, 160.7, 151.6, 146.0, 141.6, 138.1, 133.9, 131.9, 130.7, 128.13, 127.98, 127.96, 127.6, 123.4, 115.0, 114.6, 111.4, 101.2, 71.11, 71.09, 62.6, 32.9, 30.52, 30.49, 30.48, 30.32, 30.15, 29.4, 26.6, 26.37, 26.33, 23.7, 14.8。$

[0475] 实施例17-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯的制备

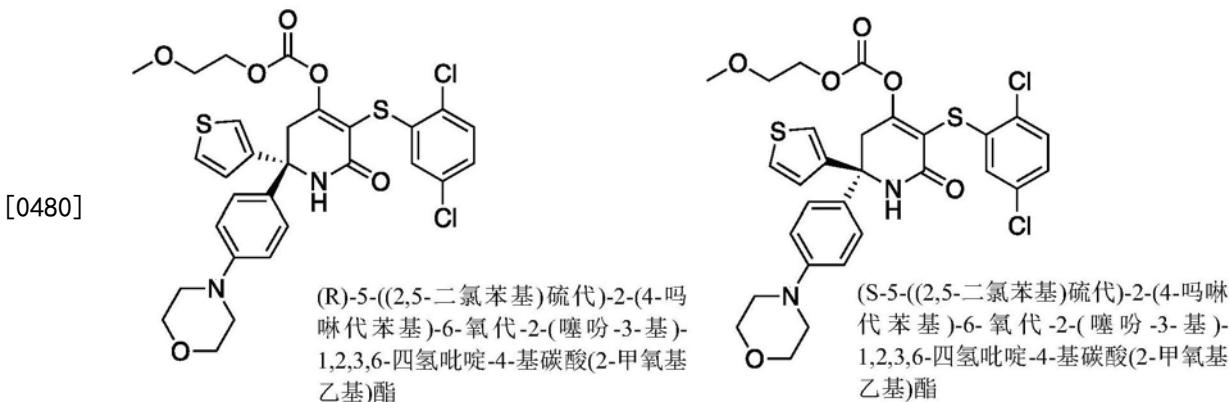


[0477] 使用3-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸2-(甲氧基)乙酯,根据实施例11制备该化合物,产率为60%。

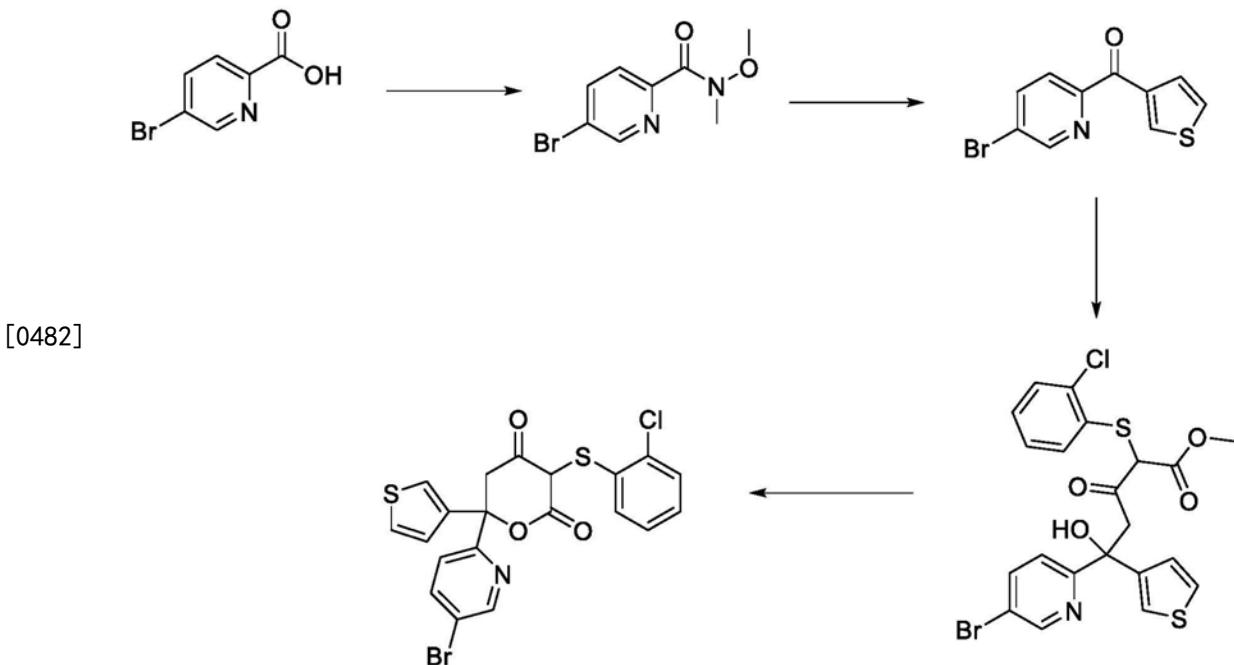
[0478]  $^1\text{H}$  NMR (MeOD-d4, 300MHz) :  $\delta=7.46$  (dd,  $J=5.1, 3.0\text{Hz}$ , 1H) , 7.31–7.28 (m, 2H) , 7.28–7.25 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 2H) , 7.10 (dd,  $J=5.1, 1.5\text{Hz}$ , 1H) , 7.05 (d,  $J=8.7, 2.4\text{Hz}$ , 1H) , 6.98 (d,  $J=9.0\text{Hz}$ , 2H) , 6.42 (d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.57 (s, 1H) , 4.34–4.31 (m, 2H) , 3.84–3.81

(m, 4H), 3.63–3.59 (m, 4H), 3.34 (s, 3H), 3.18–3.15 (m, 4H)。

[0479] 实施例17的化合物在测试中被检测为外消旋体和另外地为单一一对映异构体。可以通过使用乙醇/乙腈/二乙胺(90/10/0.1)溶剂体系进行起始材料的手性制备HPLC来获得单独的对映异构体。通过使用相同溶剂体系在ChiralPak IC柱上的分析型HPLC进行的对映异构体分析,表明对映异构体已经以对映异构体过量100% (对映异构体1:R<sub>t</sub>=5.0分钟) 和99.4% (对映异构体2:R<sub>t</sub>=7.0分钟) 分离。然后可以分别对每种对映异构体实施实施例11中的方法。



[0481] 实施例18-制备6- (6-溴-2-吡啶基) -3- (2-氯苯基) 硫烷基-6- (3-噻吩基) 四氢毗喃-2,4-二酮



[0483] 步骤A:在0℃下,将1,1' - 羰基二咪唑(21.1g,130mmol)添加到5-溴吡啶甲酸(20.2g,100mmol)在DCM的溶液中。将混合物在0℃下搅拌2小时,并添加三甲胺(42mL,300mmol)。在0℃下继续搅拌45分钟,并添加N,0-二甲基羟胺盐酸盐(12.7g,130mmol)。使混合物升温至室温过夜,并用DCM(300mL)稀释。将有机相用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液洗涤(两次),用水和饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,并在减压下浓缩,以得到5-溴-N-甲氧基-N-甲基吡啶甲酰胺,产率为58%。

[0484] 步骤B:在-78℃下,经过15分钟向3-溴噻吩(6.5mL,69mmol)在二异丙醚(175mL)中

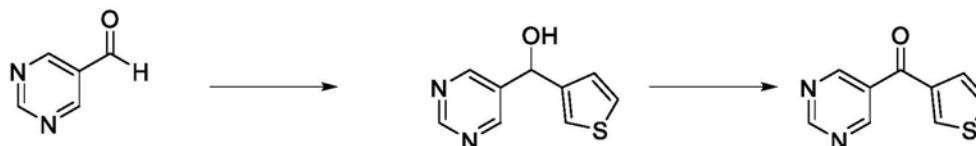
的溶液中缓慢添加正丁基锂 (27.6mL, 69mmol) 在己烷的溶液。将混合物在-78℃下搅拌30分钟，并添加5-溴-N-甲氧基-N-甲基吡啶甲基酰胺 (14.1g, 57.6mmol) 在二异丙醚 (10mL) 中的溶液。将混合物在-78至-70℃之间的温度下搅拌2小时。添加饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (75mL) , 水相用乙酸乙酯萃取 (3次)。合并的有机相用盐水洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩。粗产物通过快速柱色谱法 (硅胶, 洗脱液:庚烷/乙酸乙酯=20%至30至50) 纯化, 以得到 (5-溴吡啶-2-基) (噻吩-3-基) 甲酮, 产率为66%。

[0485] 步骤C:在-78℃下,向二异丙胺 (309μL, 2.2mmol) 在THF (4mL) 中的溶液添加正丁基锂 (0.84mL, 2.1mmol) 在己烷中的溶液。在-78℃下10分钟后,添加在THF (2mL) 中的2-((2-氯苯基) 硫代)-3-氧代丁酸甲酯 (259mg, 1.0mmol)。将混合物在0℃下搅拌30分钟,并添加在THF (2mL) 中的 (5-溴吡啶-2-基) (噻吩-3-基) 甲酮 (161mg, 0.6mmol)。在0℃下1.5小时后,将反应用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液淬灭,并将水相用乙酸乙酯萃取 (3次)。合并的有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩。粗产物通过快速柱色谱法纯化 (硅胶, 洗脱液:庚烷/乙酸乙酯=10%至20), 以得到甲基5-(5-溴吡啶-2-基)-2-((2-氯苯基) 硫代)-5-羟基-3-氧代-5-(噻吩-3-基) 戊酸酯, 产率为83%。

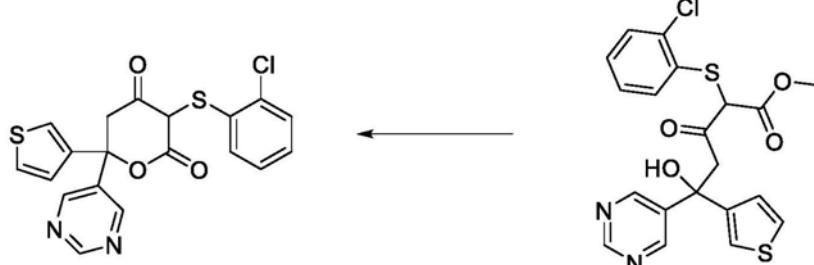
[0486] 步骤D:5-(5-溴吡啶-2-基)-2-((2-氯苯基) 硫代)-5-羟基-3-氧代-5-(噻吩-3-基) 戊酸酯 (255mg, 0.48mmol) 和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200mg, 1.44mmol) 在甲醇 (2.4mL) 中的溶液在60℃下搅拌6小时。将混合物在减压下浓缩,并用水和HCl水溶液稀释。将水相用乙酸乙酯萃取 (3次), 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩。粗产物通过快速柱色谱法纯化 (硅胶, 洗脱液:庚烷/乙酸乙酯=20%), 以得到6-(6-溴-2-吡啶基)-3-(2-氯苯基) 硫烷基-6-(3-噻吩基) 四氢吡喃-2,4-二酮, 产率为61%。

[0487] <sup>1</sup>H NMR (300MHz) : δ = 8.61 (dd, J = 2.1, 0.6Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.4, 2.1Hz, 1H), 7.75 (br s, 1H), 7.61 (dd, J = 8.4, 0.6Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 3.0, 1.5Hz, 1H), 7.33-7.26 (m, 2H), 7.12 (dd, J = 5.1, 1.5Hz, 1H), 7.06 (td, J = 7.8, 1.5Hz, 1H), 6.90-6.84 (m, 1H), 6.21 (dd, J = 7.8, 1.2Hz, 1H), 4.04 (d, J = 17.4Hz, 1H), 3.55 (d, J = 17.4Hz, 1H)。

[0488] 实施例19-3-((2-氯苯基) 硫代)-6-(嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基) 二氢-2H-吡喃-2,4 (3H)-二酮的制备



[0489]



[0490] 步骤A:在-78℃下向嘧啶-5-甲醛(1.0g,6.3mmol)在THF(63mL)中的溶液添加在己烷中的四甲基乙二胺(1.4mL,9.5mmol)和正丁基锂(2.8mL,6.9mmol)。在-78℃下30分钟后,添加噻吩-3-甲醛(830μL,9.5mmol),并将混合物在1.5小时的时段内温热至-40℃,并在-40℃下再搅拌30min。通过添加NH<sub>4</sub>Cl饱和水溶液来终止反应,并用乙酸乙酯稀释。有机相用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩。粗产物通过快速柱色谱法(硅胶,洗脱液:庚烷/乙酸乙酯=30%至50至70)纯化,以得到嘧啶-5-基(噻吩-3-基)甲醇,收率为41%。

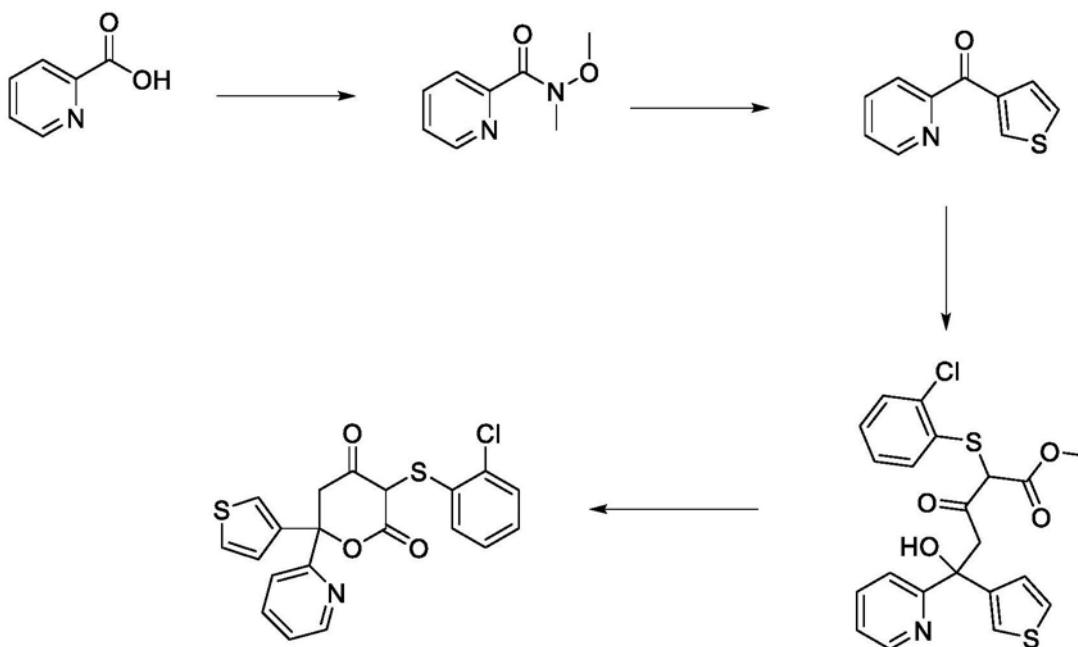
[0491] 步骤B:在0℃下,向嘧啶-5-基(噻吩-3-基)甲醇(480mg,2.5mmol)在二氯甲烷中的溶液添加TEMPO(3.9mg,25μmol)、KBr(20mg,0.25mmol),四丁基硫酸氢铵(41mg,0.12mmol)和NaOCl在水中的溶液(2.4mL,3.2mmol)。将混合物在0℃下剧烈搅拌1.5小时,并用水稀释。将水相用二氯甲烷萃取(两次),并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩。粗产物通过快速柱色谱法纯化(硅胶,洗脱液:庚烷/乙酸乙酯=20%至30至50),以得到嘧啶-5-基(噻吩-3-基)甲酮,产率为60%。

[0492] 步骤C:使用嘧啶-5-基(噻吩-3-基)甲酮,根据实施例18的步骤C,制备2-((2-氯苯基)硫代)-5-羟基-3-氧代-5-(嘧啶-5-基)-5-(噻吩-3-基)戊酸甲酯,产率为56%。

[0493] 步骤D:2-((2-氯苯基)硫代)-5-羟基-3-氧代-5-(嘧啶-5-基)-5-(噻吩-3-基)戊酸甲酯(250mg,0.78mmol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(323mg,2.34mmol)在甲醇中的溶液在回流下搅拌7小时。将混合物在减压下浓缩,并用水和HCl水溶液稀释。将水相用乙酸乙酯萃取(3次),并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩。粗产物通过快速柱色谱法纯化(硅胶,洗脱液:DCM/MeOH=0%至1至2%),以得到3-((2-氯苯基)硫代)-6-(嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮,收率为30%。

[0494] <sup>1</sup>H NMR(300MHz):δ=9.11(s,1H),8.81(s,2H),7.48-7.47(m,2H),7.21-7.13(m,2H),6.95-6.90(m,1H),6.80-6.75(m,1H),5.90(d,J=8.1Hz,1H),3.63(d,J=17.4Hz,1H),3.48(d,J=17.4Hz,1H)。

[0495] 实施例20-3-((2-氯苯基)硫代)-6-(吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮的制备



[0497] 步骤A:在0℃下向2-吡啶甲酸(5.0g,41mmol)在DCM中的溶液中添加1,1'-羰基二咪唑(8.6g,53mmol)。将混合物在0℃搅拌1.5小时,并添加三甲胺(17mL,120mmol)和N,N-二甲基羟胺盐酸盐(5.2g,53mmol)。使混合物温热至室温过夜,并用DCM(300mL)稀释。有机相用1M HCl水溶液和饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法纯化(硅胶,洗脱液:庚烷/乙酸乙酯=30%至50至70%),以得到N-甲氧基-N-甲基吡啶甲酰胺,收率为81%。

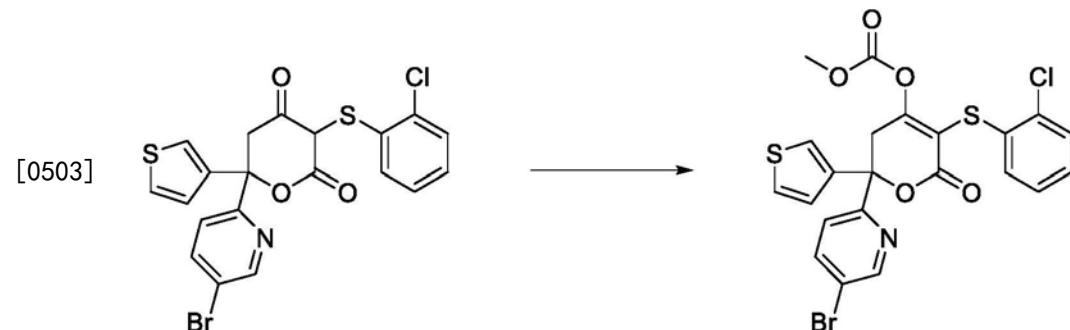
[0498] 步骤B:使用N-甲氧基-N-甲基吡啶甲酰胺,根据实施例18的步骤B,制备吡啶-2-基(噻吩-3-基)甲酮,产率为91%。

[0499] 步骤C:使用吡啶-2-基(噻吩-3-基)甲酮,根据实施例18的步骤C,制备2-((2-氯苯基)硫代)-5-羟基-3-氧代-5-(吡啶-2-基)-5-(噻吩-3-基)戊酸甲酯,产率为79%。

[0500] 步骤D:根据实施例18的步骤D,制备3-((2-氯苯基)硫代)-6-(吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮,产率为61%。

[0501] <sup>1</sup>H NMR (300MHz) :  $\delta = 8.40-8.38$  (m, 1H), 7.65-7.57 (m, 2H), 7.22-7.13 (m, 3H), 7.09-6.95 (m, 2H), 6.71 (td,  $J=7.8, 1.5$ Hz, 1H), 6.56 (td,  $J=7.8, 1.2$ Hz, 1H), 5.71 (dd,  $J=7.8, 1.5$ Hz, 1H), 3.86 (d,  $J=17.4$ Hz, 1H), 3.45 (d,  $J=17.4$ Hz, 1H)。

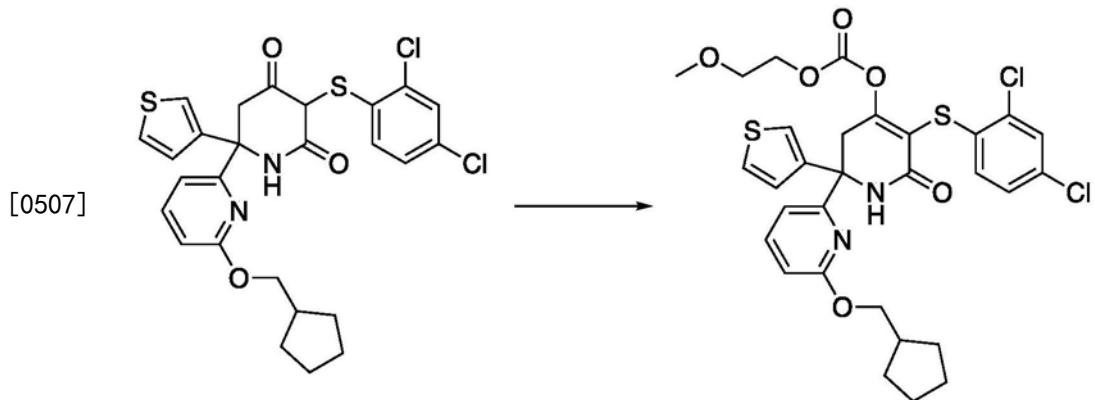
[0502] 实施例21-2-(5-溴吡啶-2-基)-5-((2-氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-3,6-二氢-2H-吡喃-4-基碳酸甲酯的制备



[0504] 在0℃下,向6-(5-溴吡啶-2-基)-3-((2-氯苯基)硫代)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮在DCM中的溶液中添加二异丙基胺乙胺。在0℃下5分钟后,添加氯甲酸甲酯,并将反应在0℃下搅拌1.5小时。通过添加水(2mL)使反应淬灭,并用DCM(3×10mL)萃取水相。合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。通过硅胶快速色谱法纯化粗产物(洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:90/10至70/30),得到2-(5-溴吡啶-2-基)-5-((2-氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-3,6-二氢-2H-吡喃-4-基碳酸甲酯,产率为24%。

[0505] <sup>1</sup>H NMR (300MHz) :  $\delta = 8.62$  (d,  $J=2.4$ Hz, 1H), 7.80 (dd,  $J=8.7, 2.4$ Hz, 1H), 7.54 (d,  $J=8.7$ Hz, 1H), 7.37-7.35 (m, 1H), 7.33-7.30 (m, 1H), 7.27-7.24 (m, 1H), 7.12-7.03 (m, 2H), 6.91-6.85 (m, 1H), 6.34 (dd,  $J=7.8, 1.5$ Hz, 1H), 4.07 (d,  $J=18.0$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.79 (d,  $J=18.0$ Hz, 1H)。

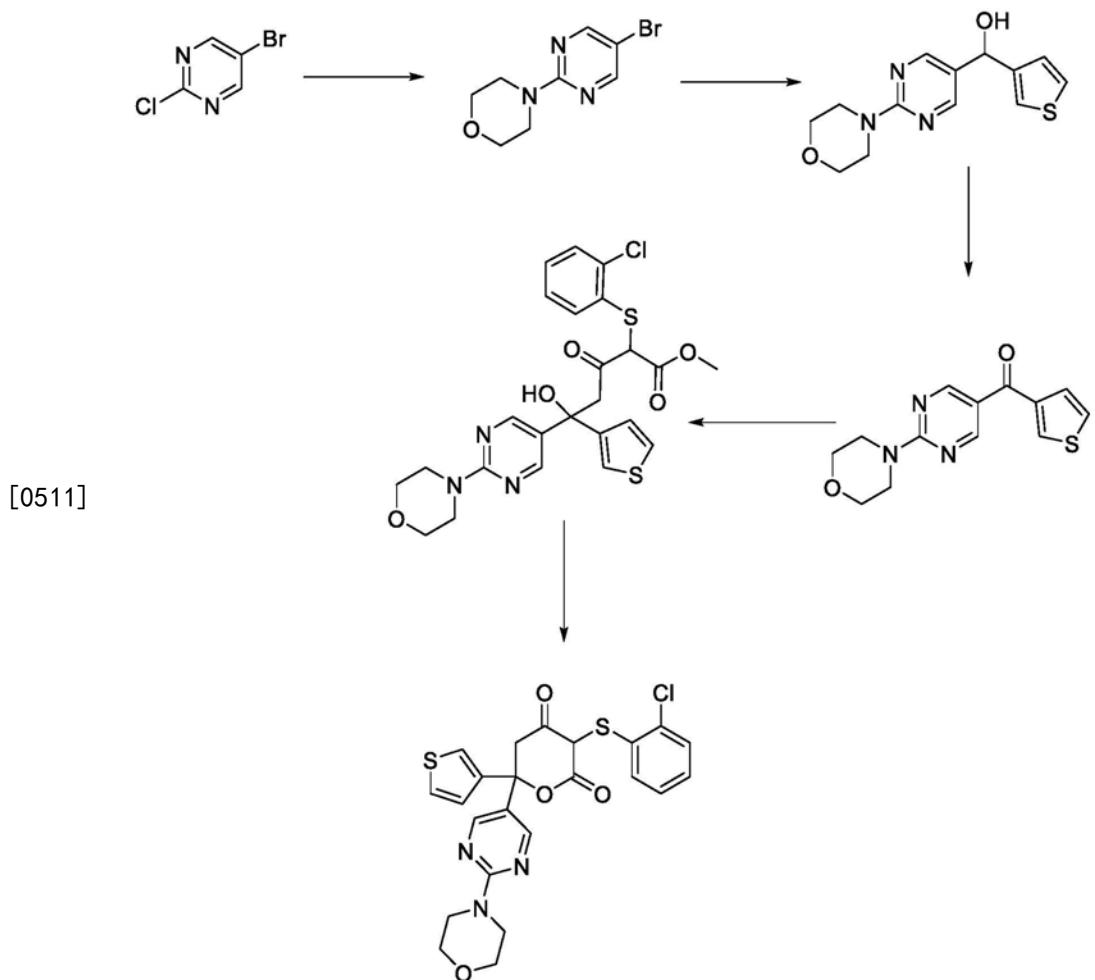
[0506] 实施例22-6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,4-二氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯



[0508] 使用6-(6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基)-3-((2,4-二氯苯基)硫代)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸2-甲氧基乙酯,根据实施例21制备该化合物,产率为58%。

[0509]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz) :  $\delta$  = 7.59 (dd,  $J$  = 8.4, 7.2Hz, 1H) , 7.32 (dd,  $J$  = 5.1, 3.0Hz, 1H) , 7.22-7.20 (m, 2H) , 7.04 (dd,  $J$  = 5.1, 1.5Hz, 1H) , 6.88 (dd,  $J$  = 7.2, 0.6Hz, 1H) , 6.82 (dd,  $J$  = 8.4, 2.4Hz, 1H) , 6.70 (dd,  $J$  = 8.4, 0.6Hz, 1H) , 6.30 (d,  $J$  = 8.4Hz, 1H) , 4.35-4.32 (m, 2H) , 4.17-4.15 (m, 2H) , 3.60 (d,  $J$  = 17.1Hz, 1H) , 3.64-3.61 (m, 2H) , 3.38 (s, 3H) , 3.34 (d,  $J$  = 17.1Hz, 1H) , 2.36-2.27 (m, 1H) , 1.86-1.76 (m, 2H) , 1.67-1.53 (m, 4H) , 1.39-1.30 (m, 2H) 。

[0510] 实施例23-3-((2-氯苯基)硫代)-6-(2-吗啉代嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮的制备



[0512] 步骤A: 在室温下向吗啉(1.44g, 16.5mmol)在MeCN(70mL)中的溶液中添加K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(2.28g, 16.5mmol)。在室温下1小时后, 添加5-溴-2-氯-嘧啶(2.90g, 15mmol), 并将反应混合物在回流下搅拌18小时。通过添加水(50mL)使反应停止, 并分离各个相。将水相用乙酸乙酯(2×50mL)萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩, 以定量收率得到4-(5-溴嘧啶-2-基)吗啉。

[0513] 步骤B: 在-78℃下, 向4-(5-溴嘧啶-2-基)吗啉(3.6g, 14.9mmol)在THF(150mL)中的溶液添加TMEDA(3.33mL, 22.4mmol)和在己烷中的正丁基锂(6.6mL, 16.4mmol)。在-78℃下30分钟后, 添加噻吩-3-甲醛(1.96mL, 22.4mmol), 并将混合物在-78℃和-70℃之间的温度下搅拌2小时。通过添加NH<sub>4</sub>Cl饱和水溶液使反应停止, 并用乙酸乙酯(2×100mL)萃取水相。合并的有机相用盐水(50mL)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。将粗物质通过快速柱色谱法(硅胶, 洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:15至20至30至50至70%)纯化, 得到(2-吗啉代嘧啶-5-基)(噻吩-3-基)甲醇, 收率为76%。

[0514] 步骤C: 在0℃下, 向(2-吗啉代嘧啶-5-基)(噻吩-3-基)甲醇(310mg, 1.12mmol)、硫酸四丁基硫酸氢铵(19.0mg, 0.06mmol)、KBr(13.3mg, 0.11mmol)和TEMPO(1.8mg, 0.01mmol)在DCM(2mL)中的溶液中添加在水中的NaOCl(1.08g, 1.45mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌1.5小时, 并通过添加饱和Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>水溶液(5mL)和饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液(5mL)来停止。将水相用DCM(3×10mL)萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法(SiO<sub>2</sub>, 庚烷/EA:20至30至50%)纯化, 以得到(2-吗啉代嘧啶-5-基)(噻吩-3-基)甲酮, 产率为78%。在95℃下, 将乙酰乙酸甲酯(1.3mL, 12.1mmol)、2-氯-苯基-二硫化物(3.8g, 13.3mmol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(5.0g, 36mmol)在DMF(36mL)中的混合物搅拌4小时。将混合物用甲基叔丁基醚(100mL)和1M HCl水溶液(50mL)稀释。有机相用盐水(3×100mL)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗产物通过快速色谱法纯化(硅胶, 洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:1%至2至3至5%), 以得到2-((2-氯苯基)硫代)-3-氧代丁酸甲酯, 产率为39%。

[0515] 步骤D: 在-78℃下, 向二异丙胺(0.34mL, 2.4mmol)的THF(5mL)溶液中缓慢添加正丁基锂(0.88mL, 2.2mol)的己烷溶液。在-78℃下10分钟后, 添加2-((2-氯苯基)硫代)-3-氧代丁酸甲酯(285mg, 1.1mmol)的THF(2mL)溶液, 并在0℃下继续搅拌30分钟。

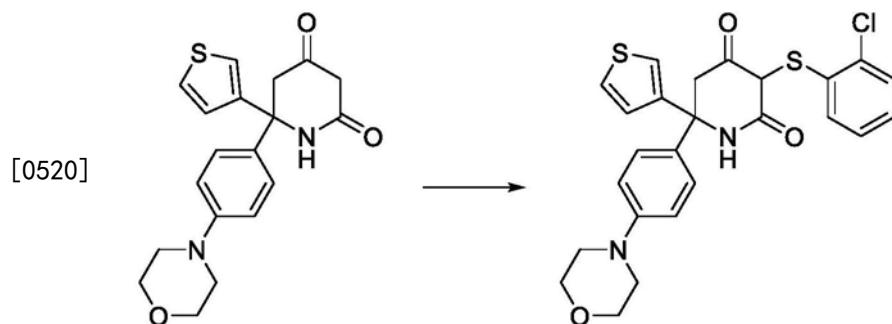
[0516] 添加在THF(2mL)中的(2-吗啉基嘧啶基-5-基)(噻吩-3-基)甲酮(230mg, 0.84mmol), 并将混合物在0℃下搅拌1小时。添加饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(5mL)使反应停止, 水相用乙酸乙酯(3×10mL)萃取, 合并的有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并减压浓缩。粗物质通过快速柱色谱法纯化(硅胶, 洗脱液:DCM至1%MeOH至2至4%), 以得到2-((2-氯苯基)硫代)-5-羟基-5-(2-吗啉代嘧啶)-5-基)-3-氧代-5-(噻吩-3-基)戊酸甲酯, 产率为98%。

[0517] 步骤E: 2-((2-氯苯基)硫代)-5-羟基-5-(2-吗啉代嘧啶-5-基)-3-氧代-5-(噻吩-3-基)戊酸甲酯(439mg, 0.82mmol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(340mg, 2.5mmol)在甲醇(4mL)中的溶液在回流下搅拌5小时。将混合物减压浓缩, 并用水(5mL)和1M HCl水溶液(5mL)稀释。将水相用乙酸乙酯(3×10mL)萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法纯化(硅胶, 洗脱液:DCM至1%MeOH至2至4%), 以得到3-((2-氯苯基)硫代)-6-(2-吗啉代嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮, 产率为43%。

[0518] <sup>1</sup>H NMR (300MHz) : δ = 8.31 (s, 2H), 7.43-7.40 (m, 1H), 7.34 (dd, J = 2.7, 1.5Hz, 1H), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.11 (dd, J = 5.0, 1.4Hz, 1H), 7.05 (td, J = 7.7, 1.5Hz, 1H), 6.88

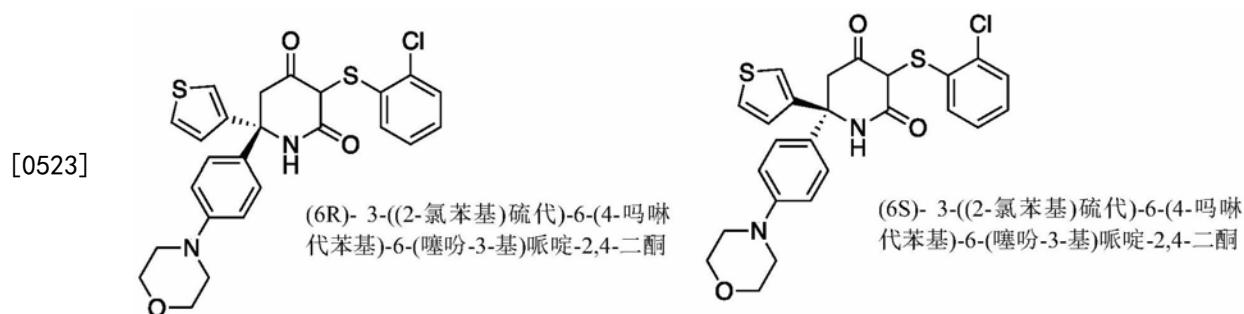
(td,  $J=7.7, 1.5\text{Hz}$ , 1H), 6.21 (dd,  $J=7.9, 1.4\text{Hz}$ , 1H), 3.98–3.94 (m, 1H), 3.83–3.73 (m, 8H), 3.47 (s, 2H)。

[0519] 实施例24-3-((2-氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备(WO2015/142903中的实施例44)

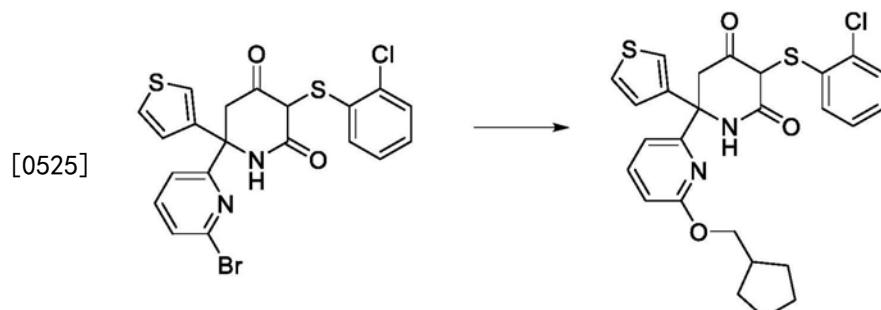


[0521] 6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮(50mg, 0.14mmol), 1,2-双(2-氯苯基)二硫烷(48mg, 0.17mmol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(58mg, 0.42mmol)在甲醇(1.5mL)中的溶液在回流下搅拌2小时。将该混合物减压浓缩，并在水(3mL)和1M HCl水溶液(1mL)中稀释。将水相用乙酸乙酯(3×5mL)萃取，并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法(SiO<sub>2</sub>,庚烷/乙酸乙酯:2/1至1/1至1/3)纯化，以得到3-((2-氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮，产率为61%。分析数据与文献(ACS Med. Chem. Lett. 7:896–901, 2016)中的相同。

[0522] 实施例24的化合物在测试中被检测为外消旋体和另外地为单一对映异构体。使用乙醇/乙腈/二乙胺(90/10/0.1)溶剂体系，通过对最终产物的手性制备型HPLC，可以获得单独对映异构体。通过使用相同溶剂体系在ChiralPak IC柱上通过分析型HPLC对对映异构体的分析，表明对映异构体已经以对映异构体过量为100% (对映异构体1:R<sub>t</sub>=5.5分钟)和97% (对映异构体2:R<sub>t</sub>=7.5分钟)分离。



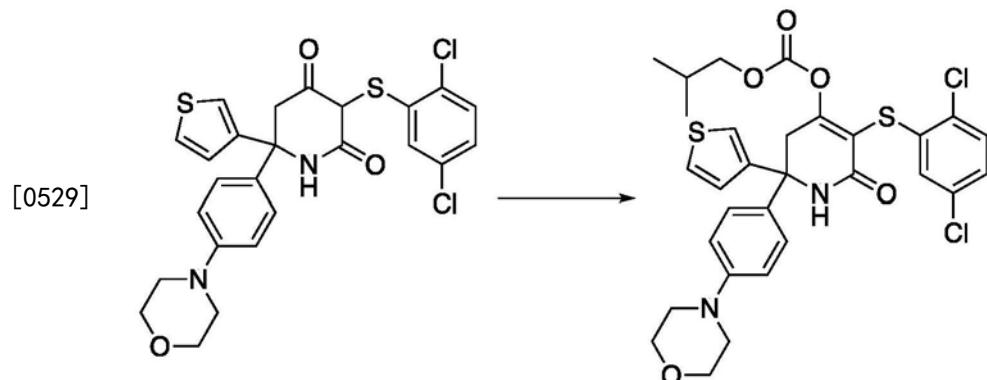
[0524] 实施例25-3-((2-氯苯基)硫代)-6-(6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备(在WO2015/142903中的实施例194)



[0526] 在0℃下向NaH (61mg, 1.5mmol) 在THF (3mL) 中的悬浮液添加CpMeOH (0.16mL, 1.5mmol)。在0℃下30分钟后, 添加6-(6-溴吡啶-2-基)-3-((2-氯苯基)硫代)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮 (150mg, 0.30mmol), 将反应混合物在回流下搅拌18小时。通过添加水 (10mL) 和1M HCl (3mL) 使反应停止。将水相用乙酸乙酯 (3×10mL) 萃取, 并将合并的有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并在减压下浓缩。粗物质通过快速柱色谱法(硅胶, 洗脱液:庚烷/乙酸乙酯:8/2至7/3至1/1)纯化, 以得到3-((2-氯苯基)硫代)-6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮, 产率为62%。

[0527] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOH-d4) : δ = 7.70 (t, J = 7.8Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 5.0, 3.0Hz, 1H), 7.28 (br s, 1H), 7.22 (d, J = 7.9Hz, 1H), 7.15-7.12 (m, 2H), 6.94 (t, J = 7.8Hz, 1H), 6.77-6.73 (m, 2H), 5.98 (d, J = 8.0Hz, 1H), 4.22 (m, 2H), 3.91 (d, J = 16.4Hz, 1H), 3.45 (d, J = 16.4Hz, 1H), 3.45 (s, 1H), 2.35-2.28 (m, 1H), 1.82-1.73 (m, 2H), 1.64-1.51 (m, 4H), 1.38-1.30 (m, 2H)。

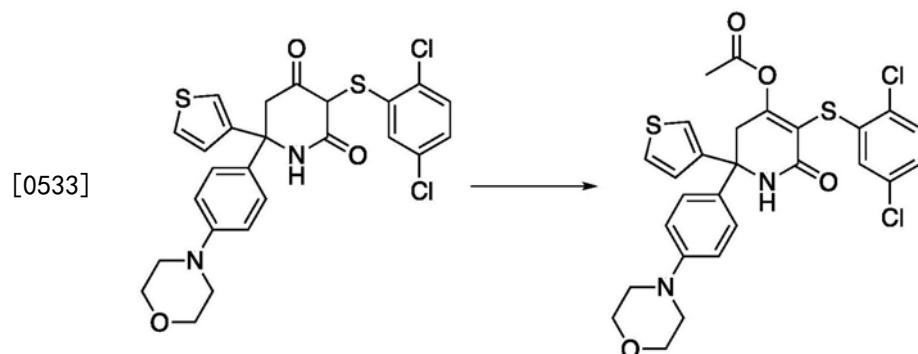
[0528] 实施例26-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸异丁酯的制备



[0530] 使用3-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸异丁酯, 根据实施例11的方法制备该化合物, 产率为60%。

[0531] <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7.37 (dd, J = 5.1, 3.0Hz, 1H), 7.23 (d, J = 8.9Hz, 2H), 7.19-7.17 (m, 1H), 7.18 (d, J = 8.6Hz, 2H), 6.97 (dd, J = 2.7, 1.5Hz, 1H), 6.95 (d, J = 1.8Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.8Hz, 2H), 6.53 (d, J = 2.4Hz, 1H), 6.39 (br s, 1H), 4.96 (d, J = Hz, 2H), 3.87-3.84 (m, 4H), 3.55 (s, 2H), 3.19-3.16 (m, 4H), 1.97 (hept, J = 6.8Hz, 1H), 1.26 (t, J = 7.1Hz, 2H), 0.92 (d, J = 6.8Hz, 6H)。

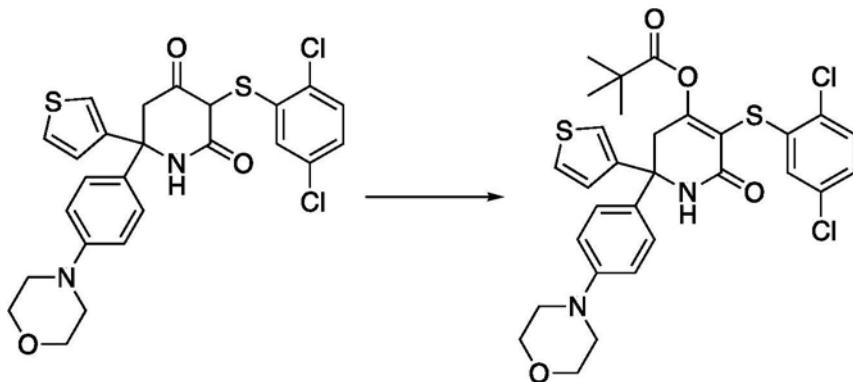
[0532] 实施例27-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基乙酸酯



[0534] 使用3-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和乙酰氯,根据实施例11的方法制备该化合物,产率为42%。

[0535]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 7.37$  (dd,  $J=5.0, 3.0\text{Hz}$ , 1H), 7.23 (d,  $J=8.9\text{Hz}$ , 2H), 7.17 (dd,  $J=3.0, 1.4\text{Hz}$ , 1H), 7.17 (d,  $J=8.5\text{Hz}$ , 1H), 6.99-6.97 (m, 1H), 6.97-6.95 (m, 1H), 6.90 (d,  $J=8.9\text{Hz}$ , 2H), 6.52 (d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H), 6.45 (br s, 1H), 3.87-3.84 (m, 4H), 3.51 (s, 2H), 3.19-3.16 (m, 4H), 2.16 (s, 3H)。

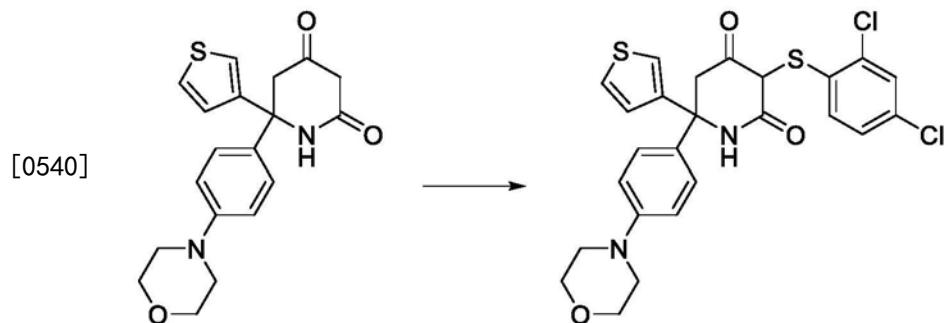
[0536] 实施例28-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基新戊酸酯的制备



[0537] 使用3-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和新戊酰氯,根据实施例11的方法制备该化合物,产率为48%。

[0538]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 7.37$  (dd,  $J=5.1, 3.1\text{Hz}$ , 1H), 7.24 (d,  $J=9.0\text{Hz}$ , 2H), 7.19 (dd,  $J=3.0, 1.2\text{Hz}$ , 1H), 7.16 (d,  $J=8.6\text{Hz}$ , 1H), 6.99-6.93 (m, 2H), 6.89 (d,  $J=8.9\text{Hz}$ , 2H), 6.45 (d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H), 6.40 (br s, 1H), 3.87-3.83 (m, 4H), 3.52 (s, 2H), 3.19-3.16 (m, 4H), 1.17 (s, 9H)。

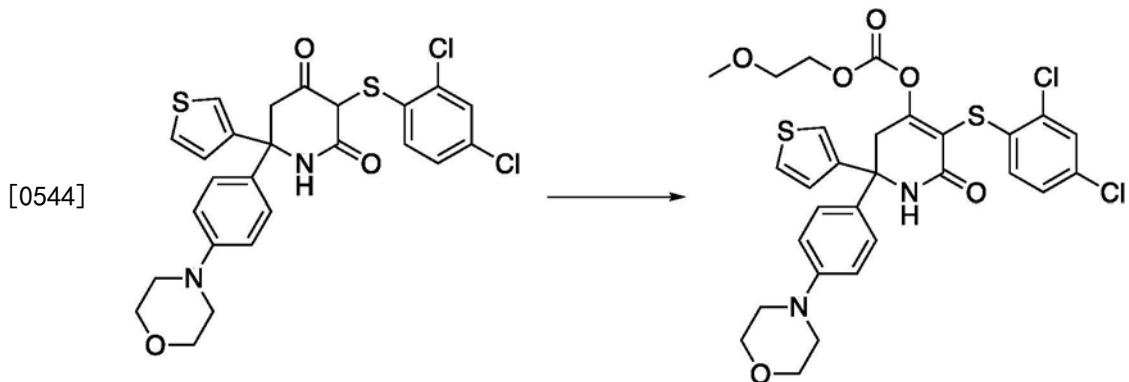
[0539] 实施例29-3-((2,4-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的制备



[0541] 使用6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和1,2-双(2,4-二氯苯基)二硫烷,根据实施例2的方法,制备该化合物,收率为50%。

[0542]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{MeOD-d}_4$ , 300MHz) :  $\delta = 7.49$  (dd,  $J=5.0, 3.0\text{Hz}$ , 1H), 7.33 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 7.26-7.22 (m, 2H), 7.14 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 6.98 (d,  $J=8.9\text{Hz}$ , 2H), 6.72 (dd,  $J=7.6, 2.0\text{Hz}$ , 1H), 5.84 (d,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 3.86-3.83 (m, 4H), 3.43 (s, 2H), 3.20-3.17 (m, 4H)。

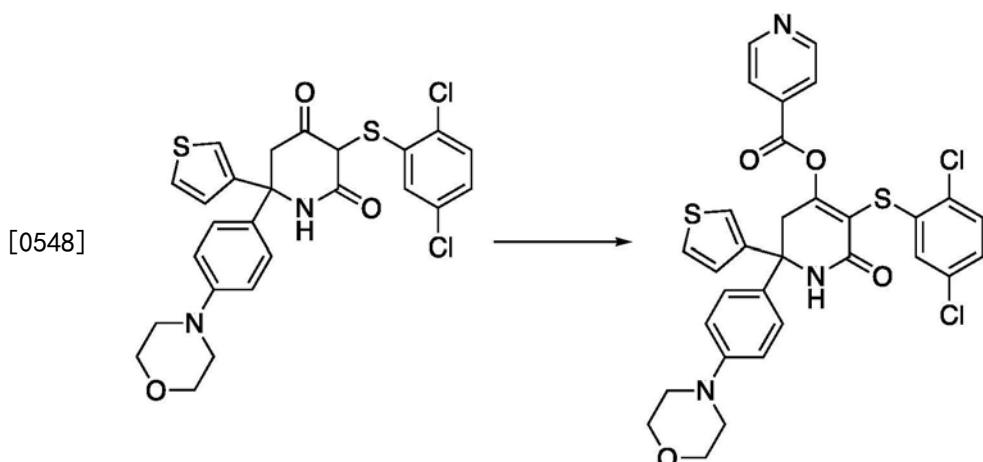
[0543] 实施例30-5-((2,4-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯的制备



[0545] 使用3-((2,4-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸2-(甲氧基)乙酯,根据实施例11的方法制备该化合物,产率为47%。

[0546]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 7.39$  (dd,  $J = 5.0, 3.0\text{Hz}$ , 1H), 7.24 (d,  $J = 2.2\text{Hz}$ , 1H), 7.20 (d,  $J = 8.9\text{Hz}$ , 2H), 7.18 (dd,  $J = 3.0, 1.5\text{Hz}$ , 1H), 6.98 (d,  $J = 5.0, 1.5\text{Hz}$ , 1H), 6.87 (d,  $J = 8.9\text{Hz}$ , 2H), 6.77 (d,  $J = 8.5, 2.2\text{Hz}$ , 1H), 6.47 (br s, 1H), 6.16 (d,  $J = 8.5\text{Hz}$ , 1H), 4.35-4.31 (m, 2H), 3.89-3.86 (m, 4H), 3.63-3.60 (m, 2H), 3.52 (br s, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.20-3.17 (m, 4H)。

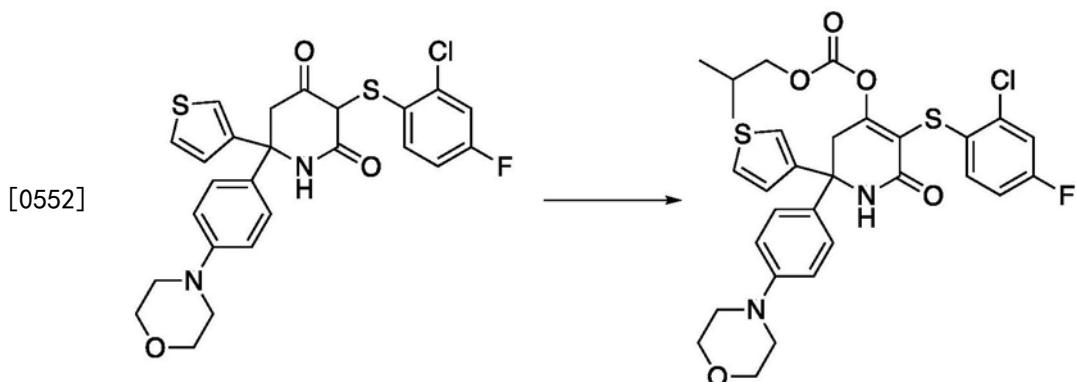
[0547] 实施例31-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基异烟酸酯的制备



[0549] 使用3-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和异烟酰氯盐酸盐,根据实施例11的方法制备该化合物,产率为42%。

[0550]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 8.79$  (br s, 2H), 7.73 (d,  $J = 5.0\text{Hz}$ , 2H), 7.41-7.38 (m, 1H), 7.29 (br s, 1H), 7.22 (br s, 1H), 7.10 (d,  $J = 8.5\text{Hz}$ , 1H), 7.01-6.94 (m, 4H), 6.64 (d,  $J = 2.3\text{Hz}$ , 2H), 3.90-3.87 (m, 4H), 3.67 (s, 2H), 3.22-3.19 (m, 4H)。

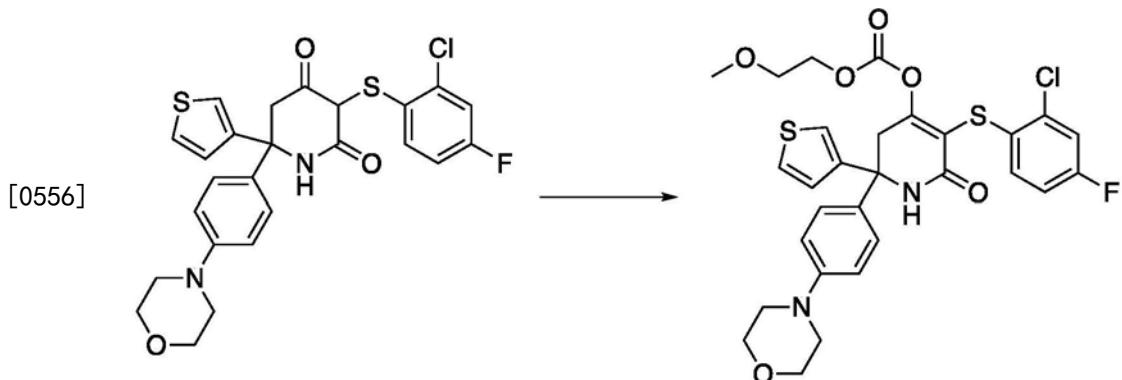
[0551] 实施例32-5-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-碳酸异丁酯的制备



[0553] 使用3-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸异丁酯,根据实施例11的方法制备该化合物,收率为76%。在这种情况下,根据一种改进的方法制备3-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮,其中在合成6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的步骤B中,用(S)-叔丁基亚磺酰亚胺代替外消旋体。然后,步骤C以一定程度的非对映异构体进行,通过<sup>1</sup>H NMR分析非对映异构体,表明非对映异构体的比例为85:15。该比例将以最终产物的对映异构体比例表示。

[0554] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta = 7.36$  (dd,  $J = 5.0, 3.0$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.18-7.16 (m, 1H), 6.99 (dd,  $J = 8.4, 2.7$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 5.0, 1.5$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.62-6.55 (m, 2H), 6.42 (dd,  $J = 8.8, 5.8$  Hz, 1H), 3.96 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 3.88-3.85 (m, 4H), 3.49 (br s, 2H), 3.19-3.16 (m, 4H), 1.96 (hept,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 0.93 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H)。

[0555] 实施例33-5-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-2-(4-吗啉代苯基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯的制备

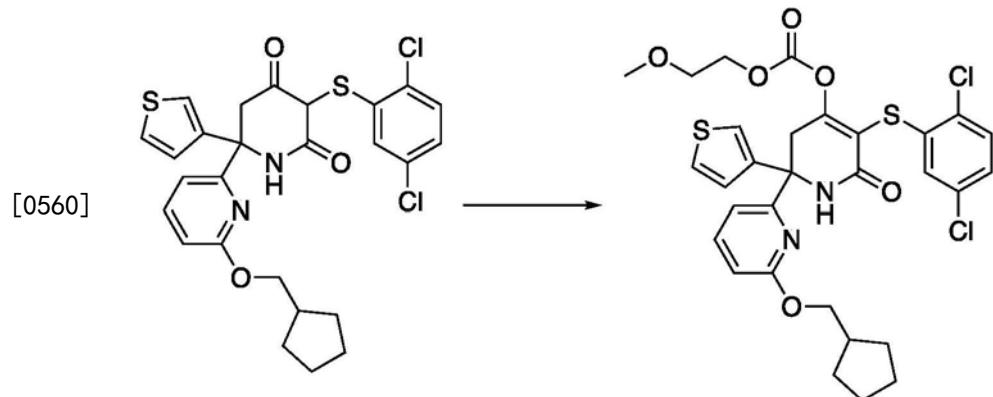


[0557] 使用3-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸2-甲氧基乙酯,根据实施例11的方法制备该化合物,产率为40%。在这种情况下,根据一种改进的方法制备3-((2-氯-4-氟苯基)硫代)-6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮,其中在合成6-(4-吗啉代苯基)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮的步骤B中,用(S)-叔丁基亚磺酰亚胺代替外消旋体。然后,步骤C以一定程度的非对映异构体进行,通过<sup>1</sup>H NMR分析非对映异构体,表明非对映异构体的比例为85:15。该比例将以最终产物的对映异构体比例表示。

[0558] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta = 7.38-7.36$  (m, 1H), 7.20 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.17 (m,

1H) , 7.00 (dd,  $J=8.3, 2.6\text{Hz}$ , 1H) , 6.96 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H) , 6.92–6.88 (m, 2H) , 6.58 (td,  $J=8.4, 2.6\text{Hz}$ , 1H) , 6.39 (dd,  $J=8.7, 5.8\text{Hz}$ , 1H) , 4.34–4.32 (m, 2H) , 3.89 (m, 4H) , 3.63–3.61 (m, 2H) , 3.50 (d,  $J=2.6\text{Hz}$ , 2H) , 3.38 (s, 3H) , 3.20–3.18 (m, 4H) 。

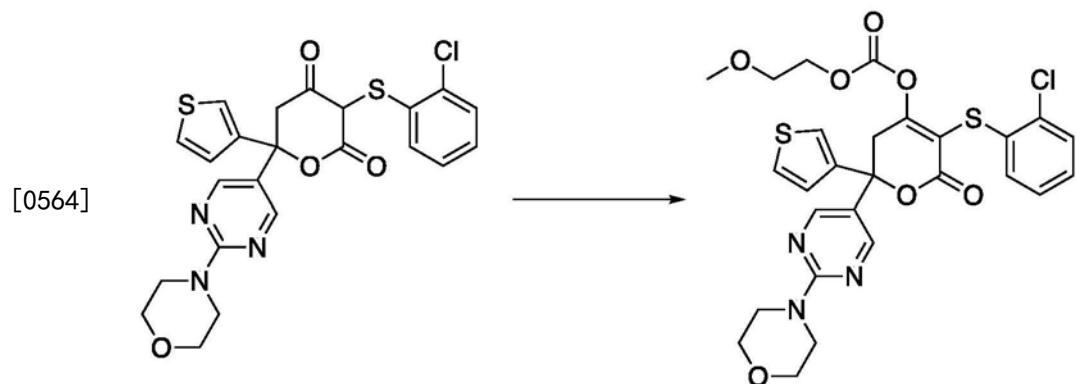
[0559] 实施例34-6'-(环戊基甲氧基)-5-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-1,2,3,6-四氢-[2,2'-联吡啶]-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯的制备



[0561] 使用6-(6-(环戊基甲氧基)吡啶-2-基)-3-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(噻吩-3-基)哌啶-2,4-二酮和氯甲酸2-(甲氧基)乙酯,根据实施例11的方法,制备该化合物,产率为63%。

[0562]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta=7.60$  (dd,  $J=8.2, 7.5\text{Hz}$ , 1H) , 7.30 (dd,  $J=5.0, 3.0\text{Hz}$ , 1H) , 7.20 (dd,  $J=3.0, 1.5\text{Hz}$ , 1H) , 7.17 (d,  $J=8.5\text{Hz}$ , 2H) , 7.01 (dd,  $J=5.0, 1.4\text{Hz}$ , 1H) , 6.98 (dd,  $J=8.5, 1.4\text{Hz}$ , 1H) , 6.91 (d,  $J=7.3\text{Hz}$ , 1H) , 6.68 (d,  $J=8.2\text{Hz}$ , 1H) , 6.58 (d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.35–4.32 (m, 2H) , 4.16 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 2H) , 3.86 (d,  $J=17.0\text{Hz}$ , 1H) , 3.64–3.58 (m, 3H) , 3.37 (s, 3H) , 2.35–2.26 (m, 1H) , 1.86–1.74 (m, 2H) , 1.65–1.56 (m, 4H) , 1.41–1.31 (m, 2H) 。

[0563] 实施例35-5-((2-氯苯基)硫代)-2-(2-吗啉代嘧啶-5-基)-6-氧代-2-(噻吩-3-基)-3,6-二氢-2H-吡喃-4-基碳酸(2-甲氧基乙基)酯的制备



[0565] 使用3-((2-氯苯基)硫代)-6-(2-吗啉基嘧啶-5-基)-6-(噻吩-3-基)二氢-2H-吡喃-2,4(3H)-二酮和氯甲酸2-(甲氧基)乙酯,根据实施例11制备该化合物,产率为38%。

[0566]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta=8.29$  (s, 2H) , 7.44–7.39 (m, 2H) , 7.28–7.22 (m, 1H) , 7.09 (dd,  $J=4.43, 2.17\text{Hz}$ , 1H) , 7.04 (td,  $J=7.66, 1.54\text{Hz}$ , 1H) , 6.87 (td,  $J=7.63, 1.44\text{Hz}$ , 1H) , 6.29 (dd,  $J=7.93, 1.52\text{Hz}$ , 1H) , 4.39–4.33 (m, 2H) , 3.90–3.71 (m, 10H) , 3.66–3.59 (m, 5H) 。

[0567] 实施例36-偶联心肌黄酶测试

[0568] 使用偶联酶测试研究化合物的抑制特性,该测定通过心肌黄酶将乳酸脱氢酶(LDH)反应与荧光试卤灵的生产联系起来。

[0569] 人乳酸脱氢酶(LDH)催化丙酮酸和乳酸之间可逆的相互转化。使用NADH或NAD<sup>+</sup>作为辅因子,LDH能够催化正向反应(丙酮酸转化为乳酸)和反向反应(乳酸至丙酮酸)。取决于各种因素(例如底物的利用率、必需的辅因子的存在、温度和pH值),反应沿任一方向进行。酶的不同亚型(LDH A、B和C)有利于不同的反应方向-LDHA有利于从丙酮酸转化为乳酸,而LDHB则优先将乳酸氧化为丙酮酸。

[0570] 偶联测试依赖于由LDH(异构体A、B和C)将乳酸转化为丙酮酸的过程中NAD<sup>+</sup>氧化为NADH。产生的NADH在心肌黄酶反应中充当辅因子,其将非荧光的刃天青还原为荧光的试卤灵。因此,该测试间接监测丙酮酸的产生速率。尽管由于分子的固有荧光(激发:340nm,发射:460nm)而可以直接监测NADH的消耗,但是与直接读出方法相关的问题仍然存在。已经表明,由于类似于NADH的荧光性质,化学库中的许多化合物干扰测试。通过心肌黄酶将LDH反应与刃天青向荧光试卤灵的转化相结合将测试转移至更长的波长减少了这种化合物的干扰。因此选择测试方向以提供稳健和可靠的测试。

[0571] 将优选方向上的LDHA反应应用在NADH氧化为NAD<sup>+</sup>的情况下丙酮酸向乳酸的转化会需要使LDHA反应进行至完全反应的约80%,然后再添加心肌黄酶测试试剂以避免酶竞争NADH。结果,由于过高的转化率会导致获得的IC<sub>50</sub>值降低,因此这种方法会预期更容易出错(Davis等,ASSAY and Drug Dev.Tech.14 (3):175-179,2016)。当不按照LDHA的优选方向进行测试时,与其他LDHA抑制剂化合物的较早公布结果相比,预计可获得更保守的IC<sub>50</sub>值。因此,实际的IC<sub>50</sub>值可能因此预期会较低。

[0572] 为了确定IC<sub>50</sub>值,采用了来自Bembenek等的偶联心肌黄酶测试(A Fluorescence-Based Coupling Reaction for Monitoring the Activity of Recombinant Human NAD Synthetase.ASSAY and Drug Development Technologies,2005.3 (5):533-541)。使用2倍、3倍或4倍系列稀释液(包括11种单独浓度,从5000μM开始至30μM)一式两份测试化合物。添加代表100%抑制或草氨酸盐抑制对照的无底物对照(测试中最终的草氨酸盐浓度为28.7mM)和包含完全的底物溶液以及代表完全未抑制反应的DMSO的对照。草氨酸盐是LDH的良好表征的抑制剂,其在体外以高特异性抑制mM范围的LDH酶活性(Papacostantinou等,J.Biol.Chem.236:278-284,1961)。对照允许计算每个数据点的抑制百分比。检测缓冲液由50mM HEPES(pH7.4)、5mM MgCl<sub>2</sub>和0.05%的普罗尼克酸F127组成。

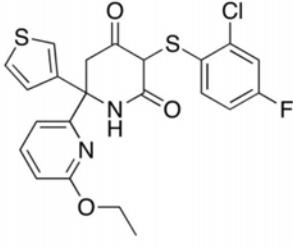
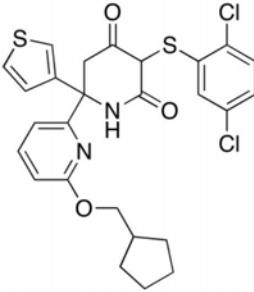
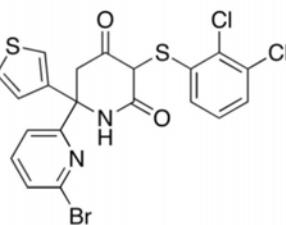
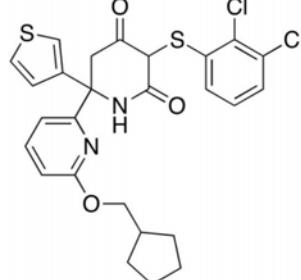
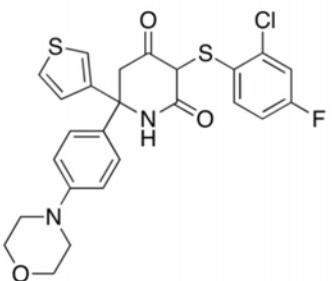
[0573] 使用CyBi<sup>®</sup>-SELMA自动移液器,将反应孔中导致最终浓度为4-7nM LDHA或6nM LDHB的酶溶液以及0.2U/ml的心肌黄酶分配到384孔板中(Greiner bio-one)。将化合物稀释液和酶在室温下孵育至少20分钟。此后,添加底物溶液(最终浓度:500μM乳酸,150μM NAD<sup>+</sup>,3μM刃天青),使反应进行10分钟。通过添加停止溶液(最终浓度:20mM EDTA,400mM NaCl,40mM丙酮酸)使反应猝灭。在Perkin Elmer Victor X平板阅读器上,在560nm的激发波长和590nm的发射波长下孵育5分钟后,读出荧光。

[0574] 计数器筛选用于去除仅抑制心肌黄酶反应的假阳性。因此,将仅包含心肌黄酶的酶溶液与化合物稀释系列一起孵育。添加导致最终浓度为15μM的NADH和3μM的刃天青的底物溶液,并如上所述进行测试。仅包含刃天青的底物溶液用作100%的抑制对照。

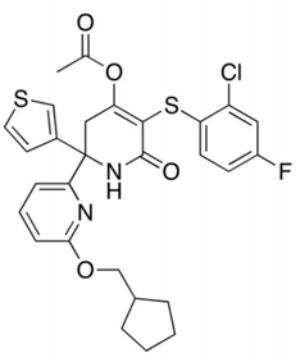
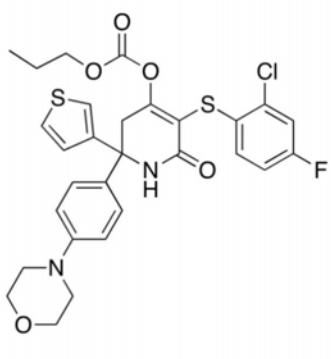
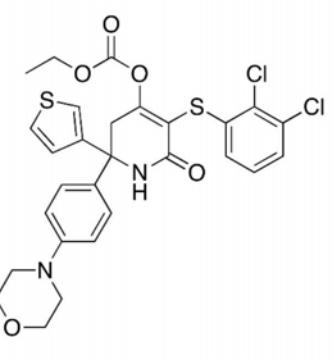
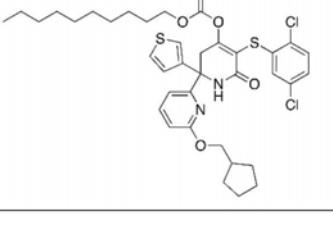
[0575] 将荧光数据相对于DMSO和抑制对照进行归一化,从而得到每种化合物浓度的抑制百分数。使用标准的4参数拟合(Levenberg-Marquardt拟合程序),将剂量响应曲线拟合在KaleidaGraph([www.synergy.com](http://www.synergy.com))或Dotmatics软件包([www.dotmatics.com](http://www.dotmatics.com))中,得出测试化合物的IC<sub>50</sub>值。结果列于表1。

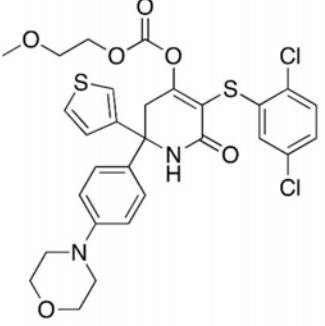
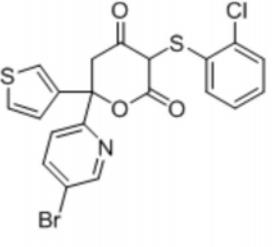
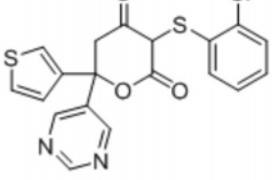
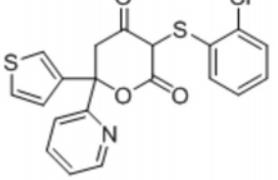
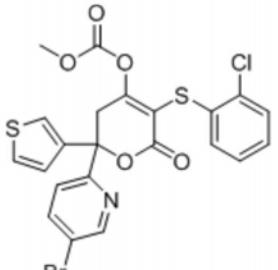
[0576] 表格1

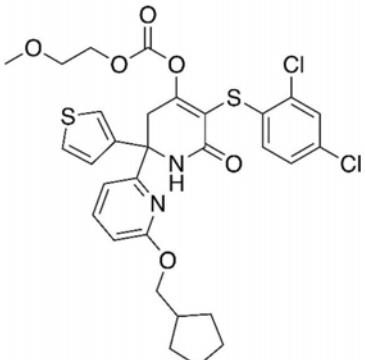
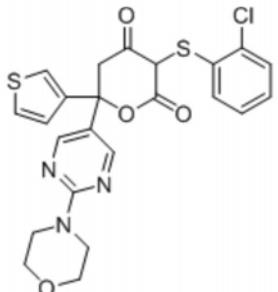
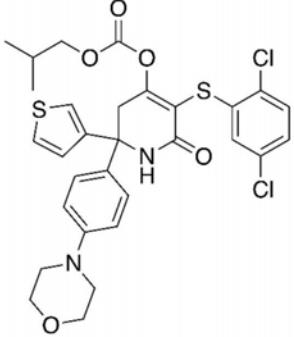
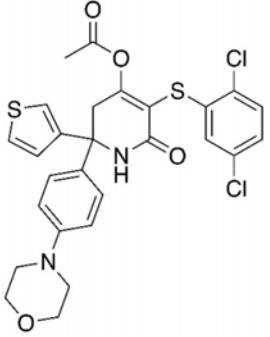
实施例编号	化合物	IC <sub>50</sub> LDHA [μM]	IC <sub>50</sub> LDHB [μM]
1		-	---
2		-	---
3		+	---

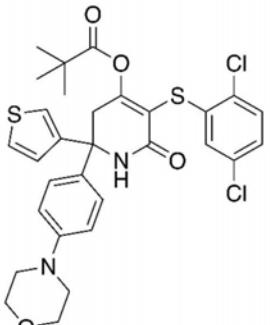
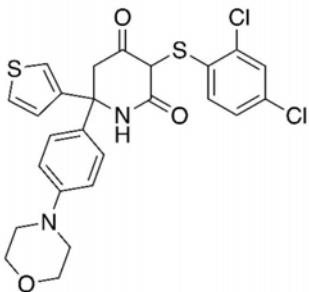
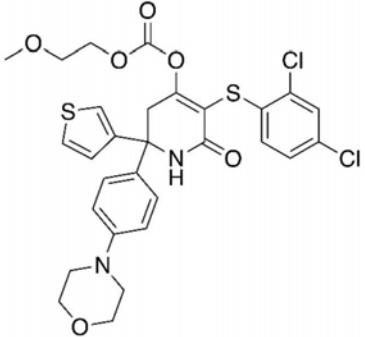
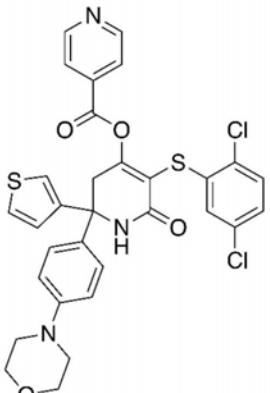
4		-	---
5		++	-
6 [0578]		---	---
7		-	---
8		++	++

9		+	---
10		++	++
[0579]		---	---
12		---	---

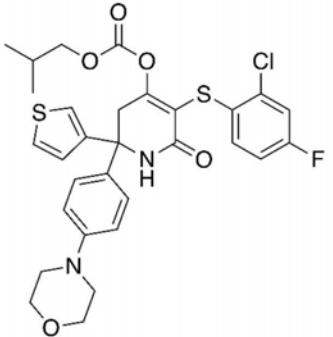
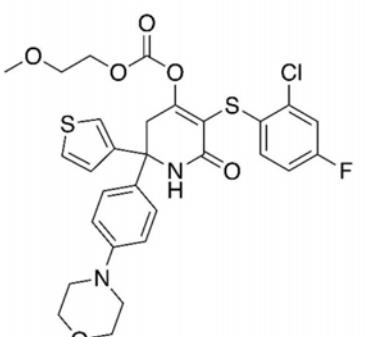
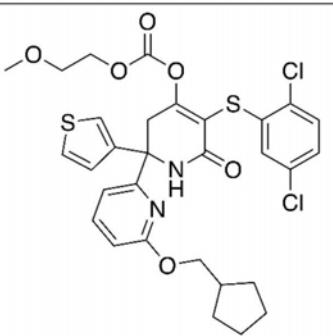
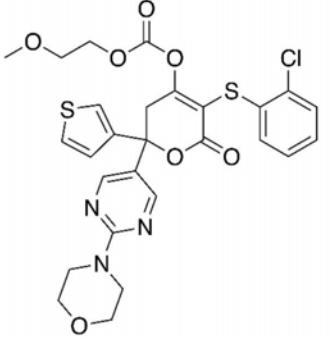
13		---	---
14 [0580]		--	--
15		--	---
16		---	---

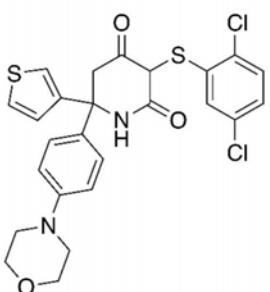
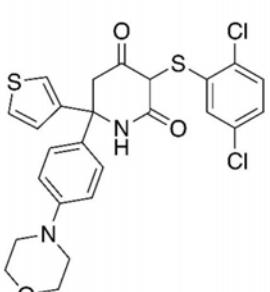
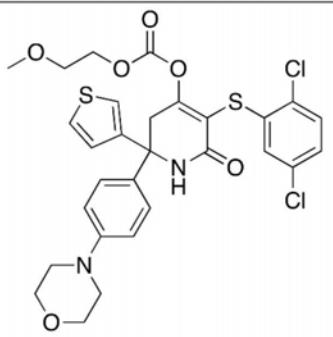
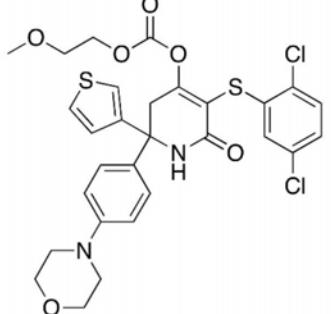
17		-	-
18		+	-
19 [0581]		+	-
20		+	+
21		-	-

22		---	---
23		+	+
[0582]		--	--
27		-	--

28		-	--
29		--	---
[0583]		---	---
31		+	+

[0584]

32		---	---
33		+	---
34		---	---
35		-	-

[0585]	10 对映异构体 1		+	-
	10 对映异构体 2		-	---
[0586]	17 对映异构体 1		-	---
	17 对映异构体 2		+	---

[0586] +++ 0.01至0.1 $\mu$ M[0587] ++ >0.1至0.5 $\mu$ M[0588] + >0.5至10 $\mu$ M[0589] - >10至50 $\mu$ M[0590] -- >50至100 $\mu$ M[0591] --- >100 $\mu$ M[0592] 实施例37-等温滴定量热法 (ITC)

[0593] 使用MicorCal PEAQ ITC仪器进行ITC实验。在实验之前,使用GE Healthcare的微型透析试剂盒,在4°C下,针对50mM磷酸钾缓冲液(pH7.4)、150mM NaCl,0.002%普鲁尼克酸

F-127, 将LDHA透析过夜。将测试的化合物在DMSO中溶解至100mM。透析后, 将蛋白质在4°C下以14,000 rpm离心30分钟。使用前, 将用于参比细胞的缓冲液和MilliQ水脱气。使用Nanodrop通过A280 nm测量值确定蛋白质浓度。所有ITC实验均在25°C且在以750 rpm的转速搅拌下进行。在典型的实验中, 将目标化合物以20μM的量加载到样品细胞中, 并以连续注射将LDHA (在注射器中的200μM) 滴定到化合物溶液中。在所有溶液中, NADH (1mM) 和DMSO浓度 (2%) 是匹配的。使用MicroCal PEAQ-ITC分析软件分析数据并将数据拟合到单个位点结合模型, 得出结合常数K<sub>d</sub>, 焓ΔH, 熵ΔS和化学计量比N。

[0594] 实施例3、5和10的化合物的结合结果呈现于表2中。这些结果表明该化合物为特异性的并与LDHA结合。

[0595] 表2

实施例编号	化合物	$K_d$ [nM]	$\Delta H$	$-\Delta S$	N	
			[kJ/mol]	[kJ/mol]		
[0596]	3		373	-15.4	21.4	0.721
[0597]	5		671	-18.2	17	0.548
	10		43.2	-46	3.95	0.796

## [0598] 实施例38-在癌细胞系MDA-MB-231, MDA-MB-468和MIAPaCa-2中的体外检测

[0599] 细胞培养

[0600] 在具有5%CO<sub>2</sub>的温度为37°C的培养箱中,在补充有10%热灭活的胎牛血清(FBS)和抗生素(链霉素和青霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM+F12)中进行培养人乳腺癌细胞系MDA-MB-468,MDA-MB-23和胰腺癌细胞系MIA PaCa-2(American Type Culture Collection(ATCC))。所有细胞培养试剂均由Sigma Aldrich制造。

[0601] 筛选细胞存活率测试:

[0602] 使用Alexa Fluor® 488 Annexin V/死细胞凋亡试剂盒(Dead Cell Apoptosis Kit)(ThermoFisher),确定化合物对细胞存活率的影响。膜联蛋白V结合凋亡细胞表面上的磷脂酰丝氨酸,而第二种染料碘化丙啶(PI)结合核酸。该标记物不会进入完好的细胞,因此可以选择性地染色死细胞。将细胞以10,000个细胞/孔的密度接种到96孔培养板的200μL培养基中。孵育16小时后,将化合物以浓度依赖的方式添加细胞中,最高浓度为100μM。在24、72和120小时后测定细胞存活率。收集上清液以包括分离的细胞。用0.05%胰蛋白酶使贴壁细胞脱离,并与上清液合并。样品用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤,并在膜联蛋白结合缓冲液中与膜联蛋白V和PI一起孵育15分钟。孵育后立即使用LSRFortessa(或LSRII)流式细胞仪分析细胞。评估中包括以下对照-未经处理的细胞,仅使用DMSO的对照和2-脱氧葡萄糖(2-DOG)。2-DOG为已知的糖酵解抑制剂(Wick等,J.Biol.Chem.224,(2):953-959,1957),在这种情况下用作细胞死亡的阳性对照。使用FlowJo(Treestar)分析数据。

[0603] 上面描述的基于流的膜联蛋白细胞存活率测试法以96孔形式用作低细胞数的筛选测试,以利于使用不同条件检测多种化合物。分别使用乳酸测试和半胱天冬酶测试评估了某些化合物对不同癌细胞类型的糖酵解途径及其凋亡特性的作用。

[0604] 乳酸测试:

[0605] 通过测量癌细胞的乳酸产生量来测试化合物对糖酵解途径的抑制作用。将细胞以每孔20,000个细胞的密度接种到96孔培养板中的200μL完全培养基中。第二天,去除培养基,并添加新鲜培养基以及2倍系列稀释液,其中包括10个起始浓度为90μM的单独数据点。将细胞在37°C下进一步孵育75分钟。通过与50μL“微透析”-乳酸试剂(按照制造商的说明制备)混合,测定每个孔中的全部100μL细胞培养基中的50μL。15分钟后,红紫色醌亚胺的形成在530nm处以光度法测量,并与细胞中产生的乳酸成正比。使用范围为0至20nM的乳酸(Abcam)稀释系列,平行于每个实验制备标准曲线。使用Kaleida Graph([www.synergy.com](http://www.synergy.com))分析数据,并使用标准4参数拟合(Levenberg-Marquardt拟合程序)确定IC<sub>50</sub>值。

[0606] 半胱天冬酶测试:

[0607] 使用CellEvent™ Caspase-3/7绿色检测试剂(Thermo Fisher)详细确定了所选化合物对细胞存活率的影响。当添加到组织培养基中时,该非荧光底物穿过细胞膜,在此处被凋亡细胞的活化半胱天冬酶-3/7裂解,导致绿色荧光染料的释放和核DNA的染色。使用IncuCyte®基本分析仪可以监测和量化caspase-3/7的动力学活化。

[0608] 稳定表达CytoLight Red荧光染料的MDA-MB-468细胞(通过用Lenti,EF-1α的慢病毒转导引入并用嘌呤霉素选择)以每孔2,000个细胞的密度接种在96孔培养板的100μL培养基中。孵育20小时后,去除培养基,以浓度依赖性的方式将新鲜的培养基和化合物添加细胞中,最高浓度为100μM。通过每三小时用滤光片拍摄绿色和红色荧光信号来确定细胞存活率。使用IncuCyte分析程序(Essen biosciences)和KaleidaGraph软件分析凋亡细胞(绿色信号)占总细胞数(红色信号)的比率。

[0609] 图1和图2分别示出对于乳腺癌细胞系MDA-MB-231和MDA-MB-468,实施例1至23的各种化合物(表示为化合物1至23)的筛选测试结果。

[0610] 针对实施例24和25的已知化合物重复这些实验,以将结果与根据本发明的结构相似的化合物进行比较。图3中示出了实施例24的化合物(WO2015/142903中的化合物44)以及实施例8和10的化合物的结果。

[0611] 图4示出了实施例25的化合物(WO2015/142903中的化合物196)以及实施例1、3和5的化合物的结果。

[0612] 在图5中示出了实施例10和17的化合物的结果比较。实施例17为实施例10的化合物的衍生物。

[0613] 对于乳腺癌细胞系MDA-MB-468和胰腺癌细胞系MIAPaCa-2,图6中示出了实施例1至23的化合物(表示为化合物1至23)的结果。

[0614] 图7示出了与实施例24的已知化合物(WO2015/142903中的化合物44)相比,实施例8、9、10和29的结构相似的化合物的结果。

[0615] 图8示出了与实施例25的化合物(WO2015/142903中的化合物196)相比的实施例1、3、5和7的化合物的结果。

[0616] 图9中示出了实施例10和17以及31的化合物的结果比较。实施例17的化合物为实施例10的化合物的衍生物。

[0617] 图10示出了与实施例8的化合物相比,实施例14、32和33的化合物的效果。

[0618] 图11示出了在MDA-MB-468细胞系上,用作外消旋混合物的实施例10的化合物与实施例10的化合物的富集对映异构体(对映异构体1)的比较(左图)。该图还示出了实施例10的化合物的富集对映异构体在各种其他所示细胞系上的结果(右图)。

[0619] 图12示出在MDA-MB-468细胞系上在120小时的时间过程中实施例10的化合物在细胞存活率上的效果(左图)和用不同浓度的实施例10化合物孵育96小时后未处理的MDA-MB-468细胞的活细胞百分数(右图)。

## MBA-MD-231 细胞

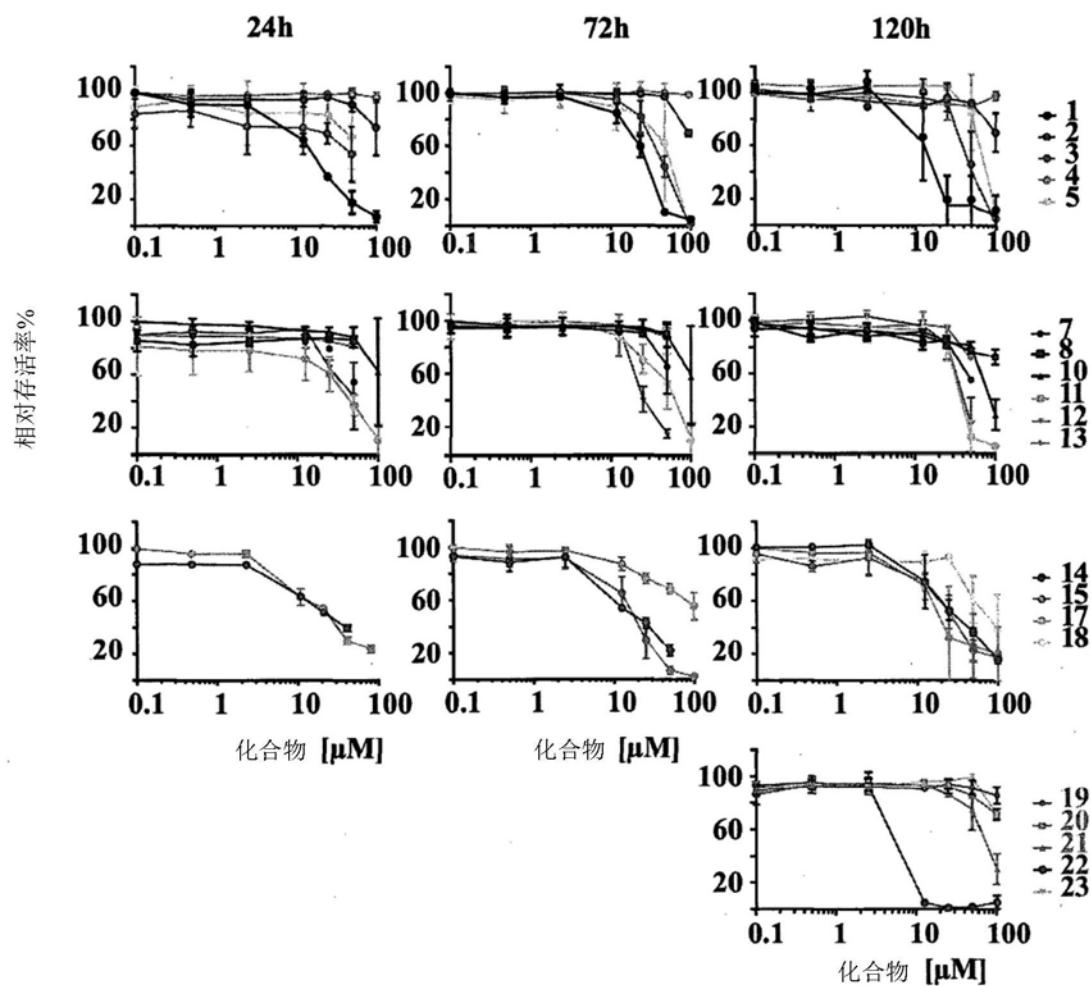


图1

## MBA-MD-468 细胞

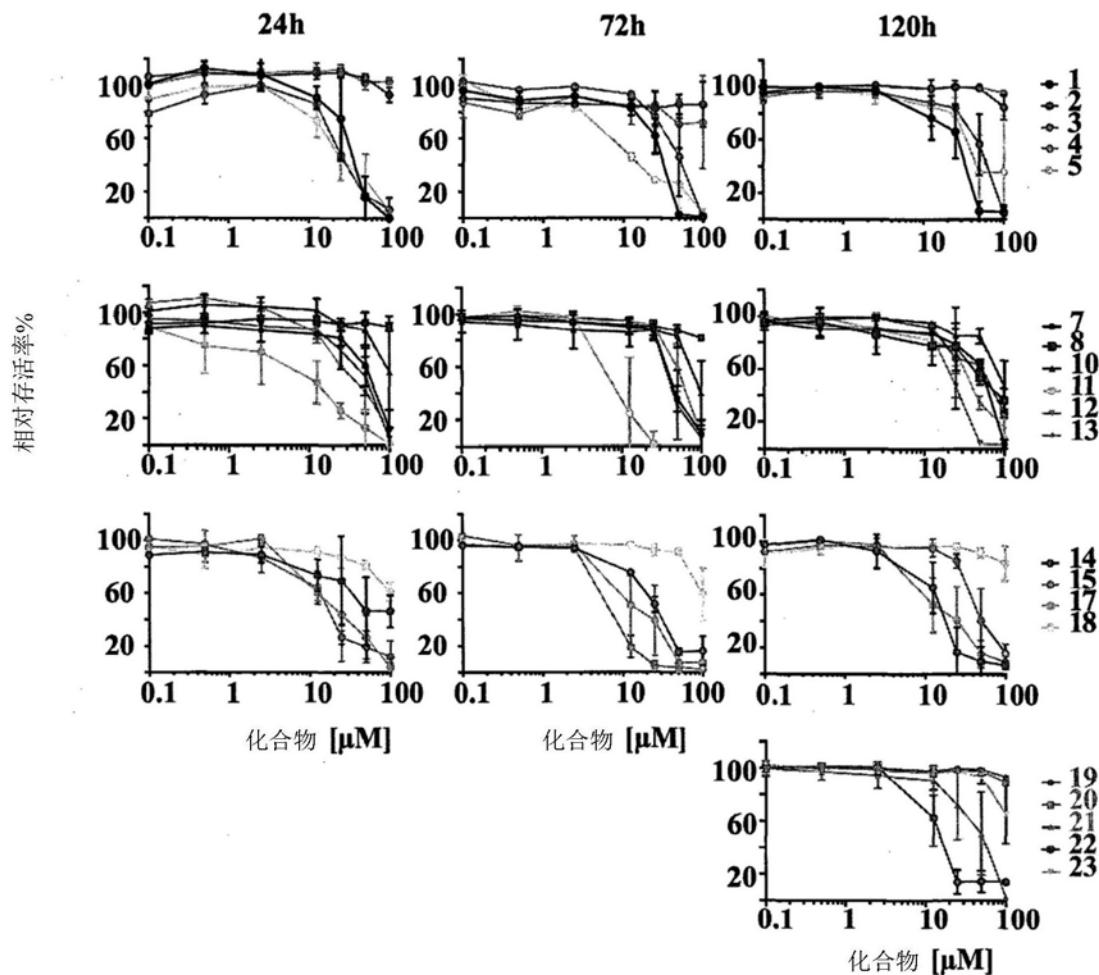
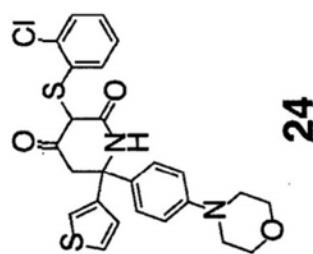
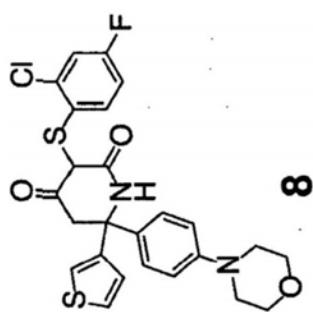
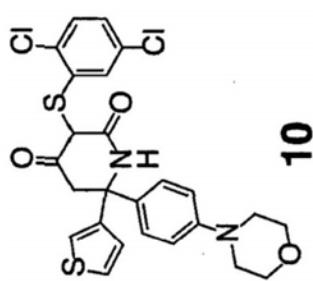
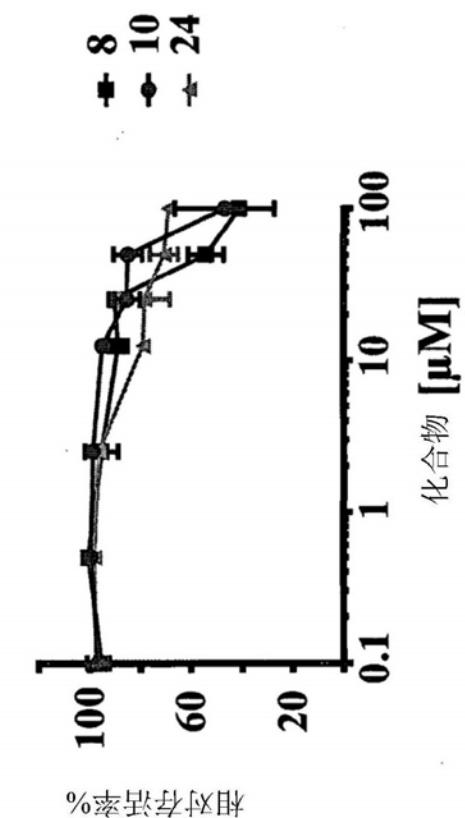


图2

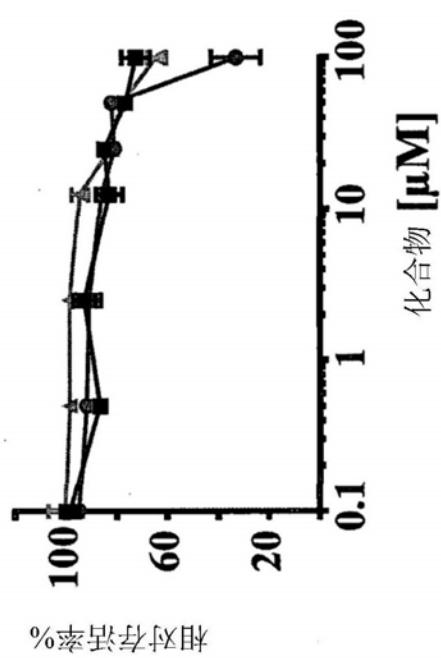


MDA-MB-468 - 120h



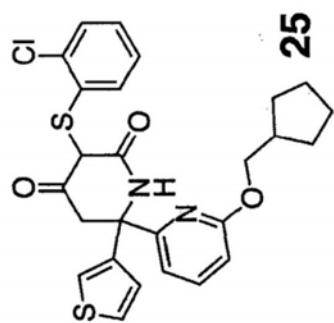
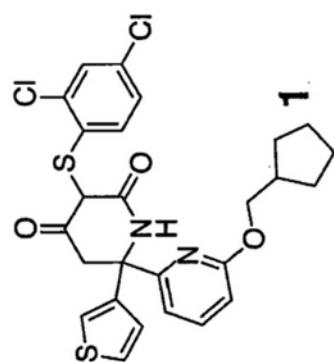
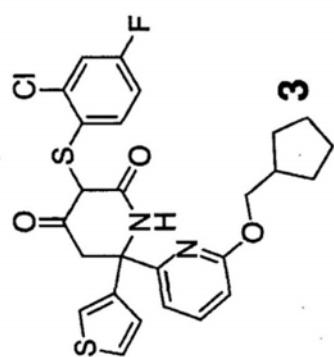
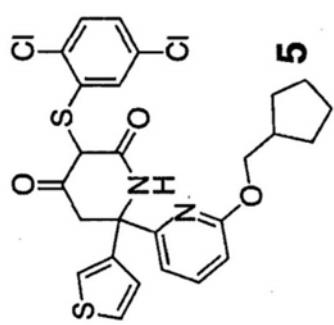
相对存活率 %

MDA-MB-231 - 120h

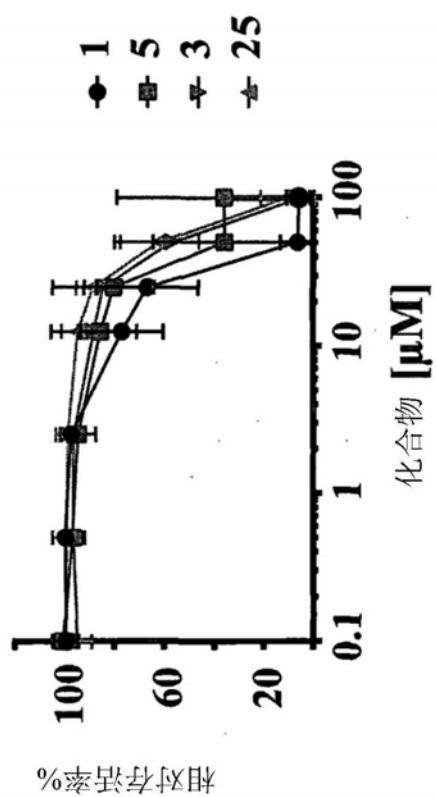


相对存活率 %

图3



MDA-MB-468 - 120h



MDA-MB-231 - 120h

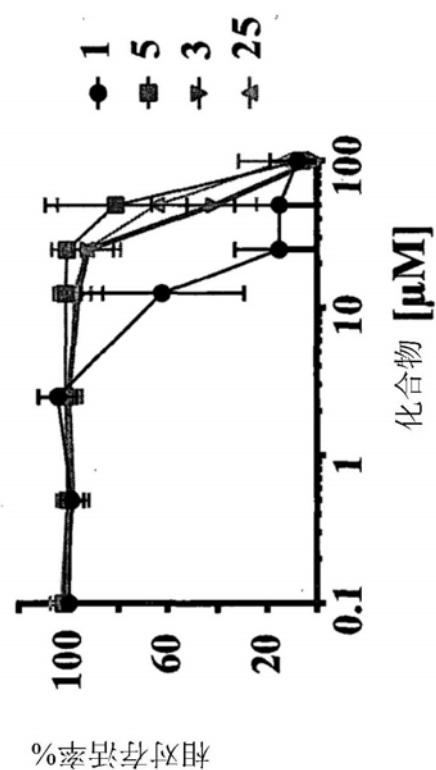


图4

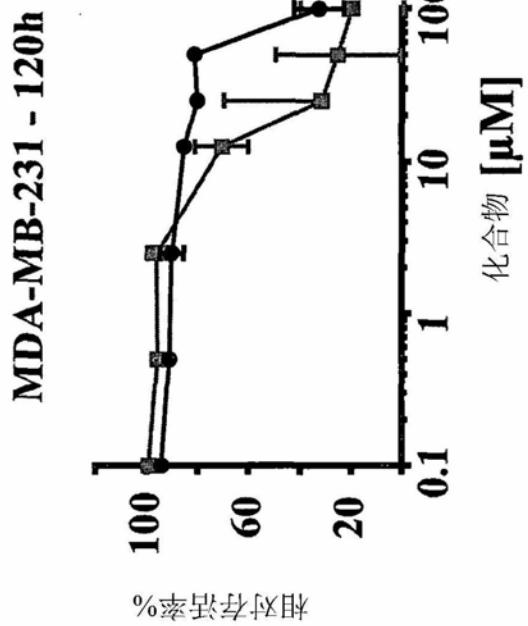
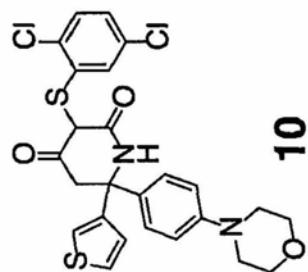
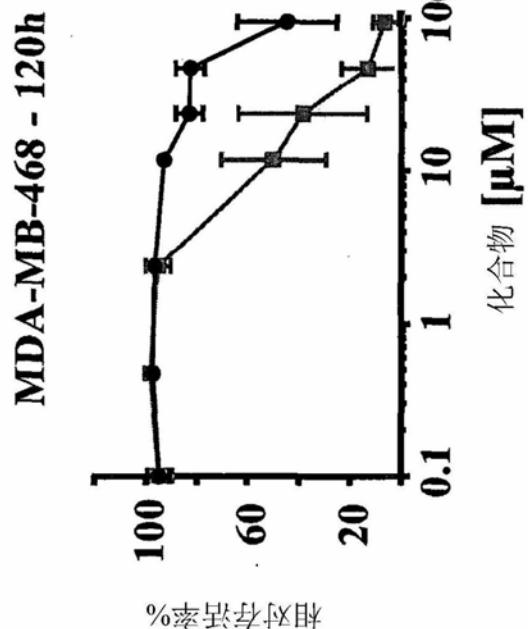
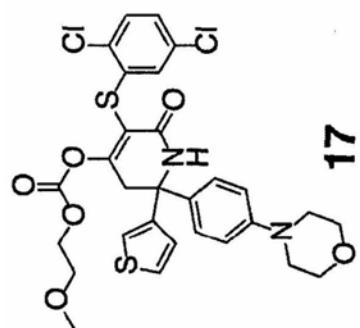


图5

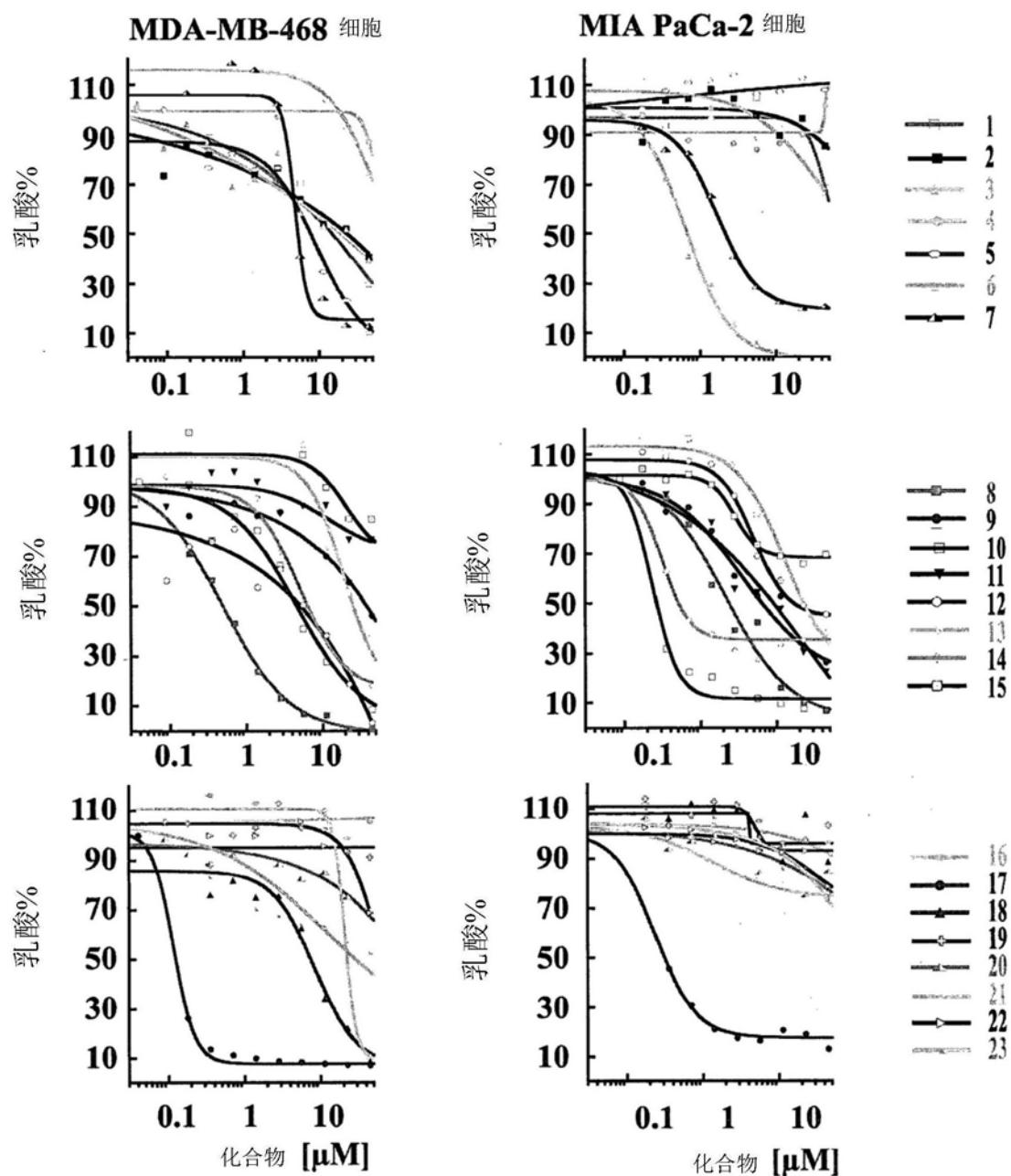


图6

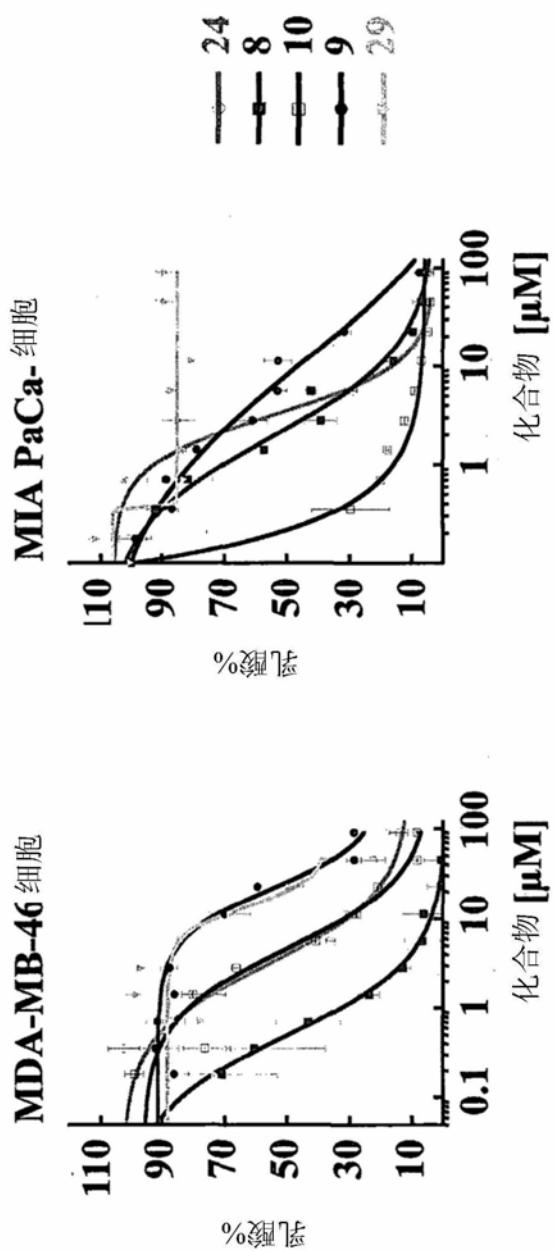
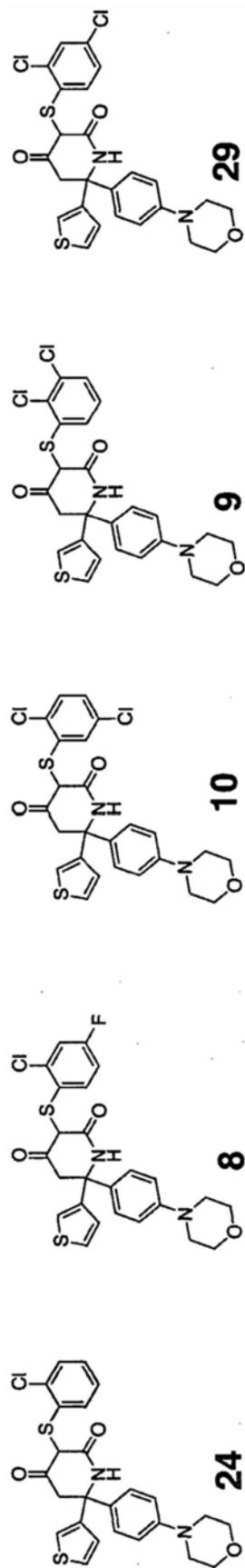


图7

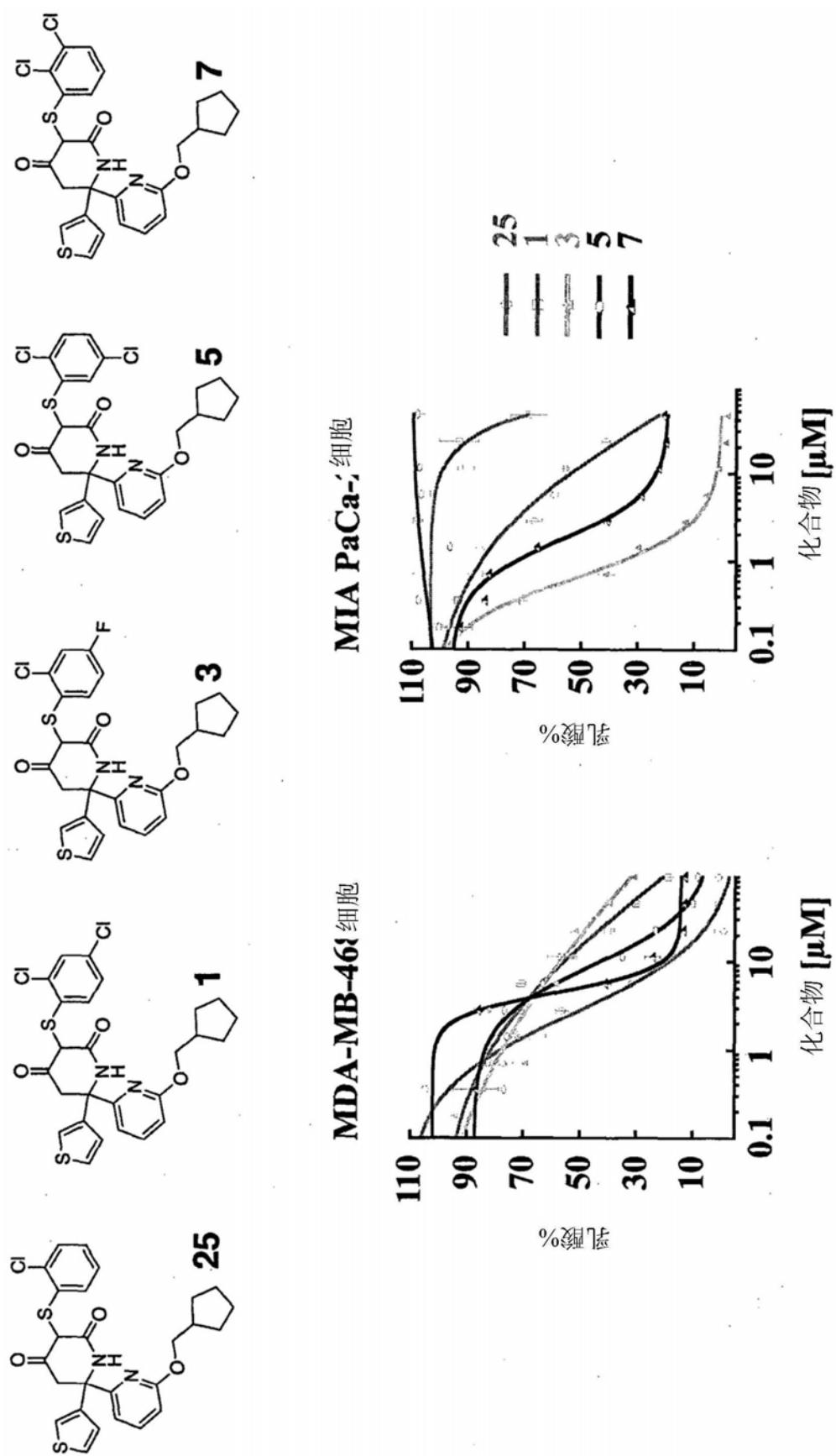


图8

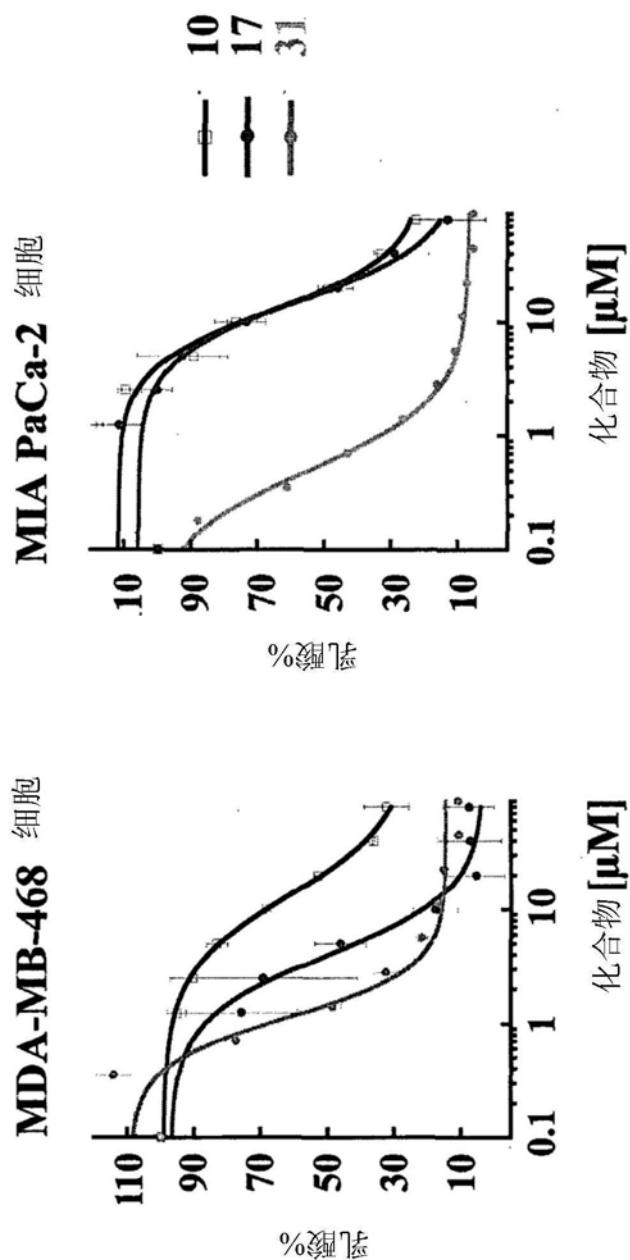
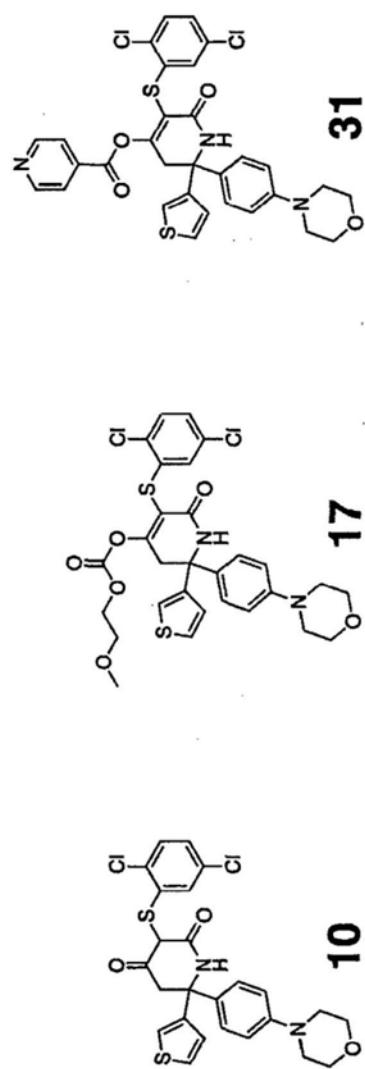


图9

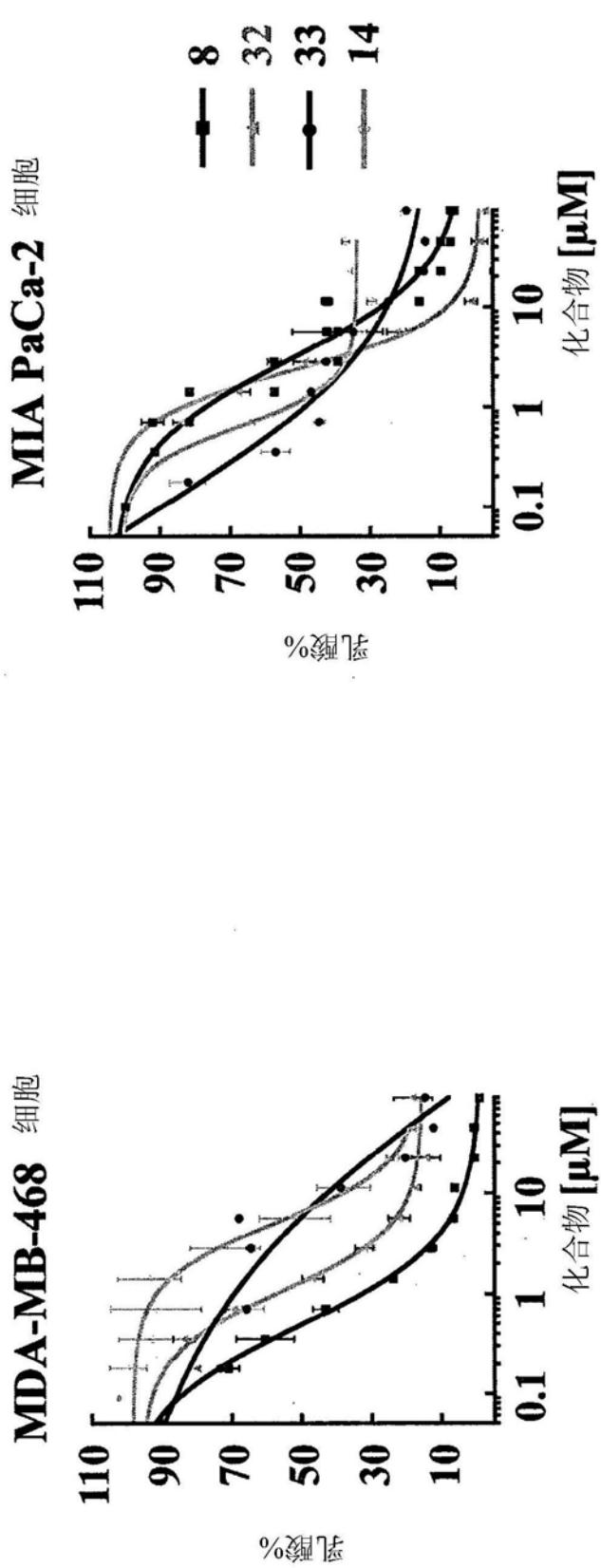
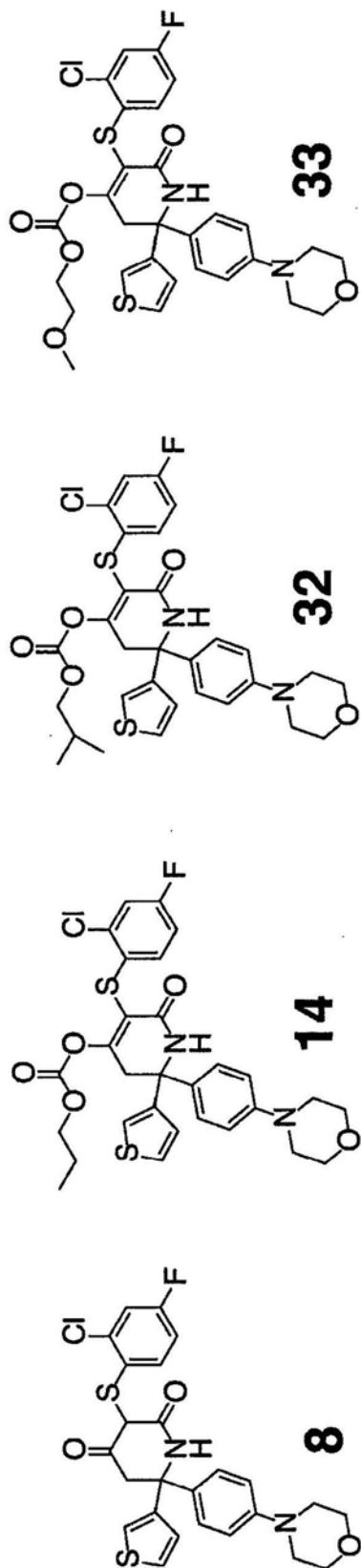
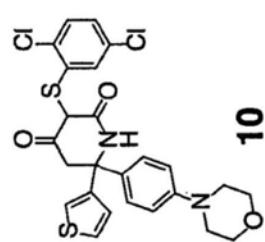
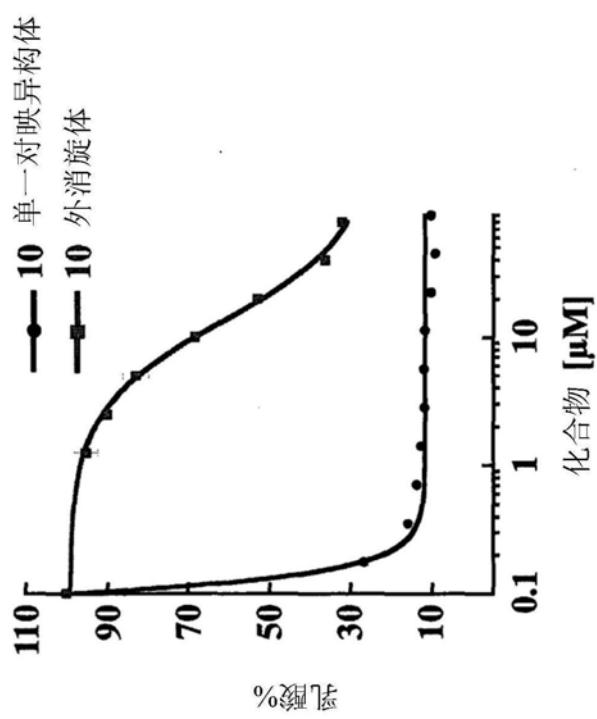


图10



MDA-MB-468 细胞



化合物 10 (单一对映异构体)

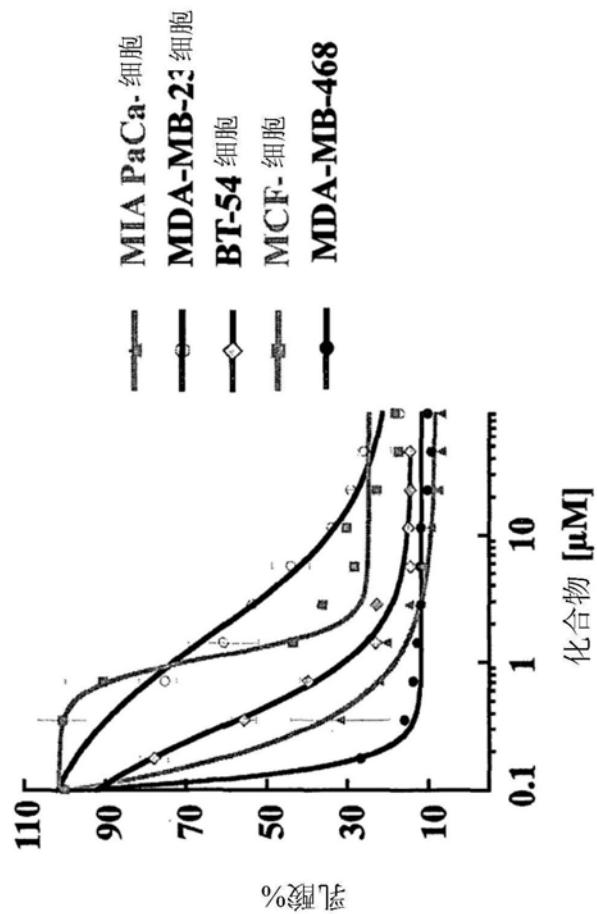
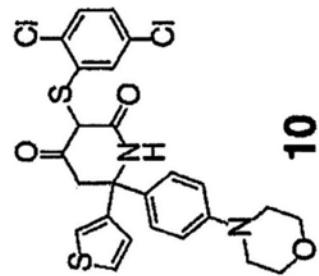
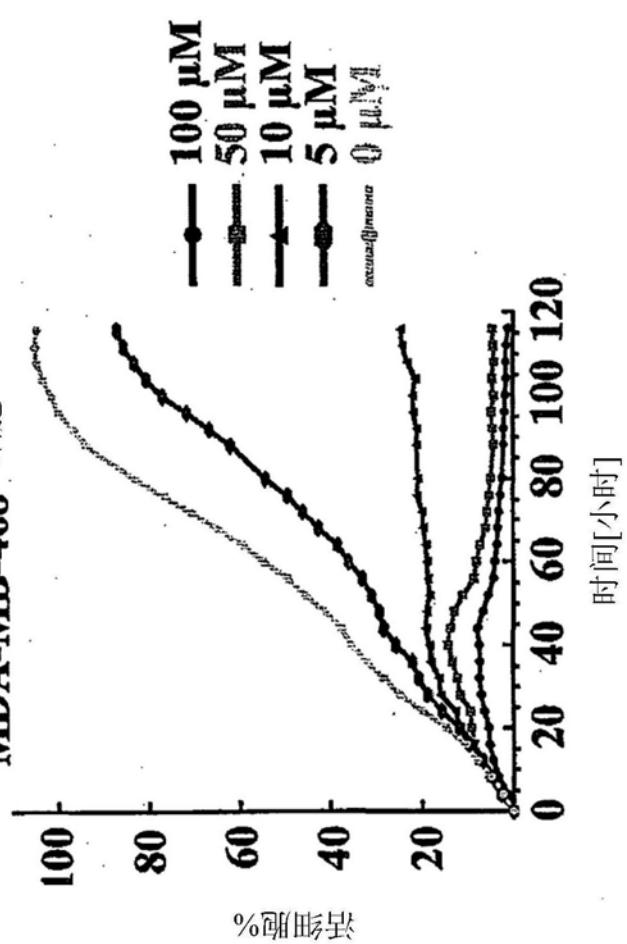


图11



MDA-MB-468 细胞



在 96 小时后的 MDA-MB-468 细胞

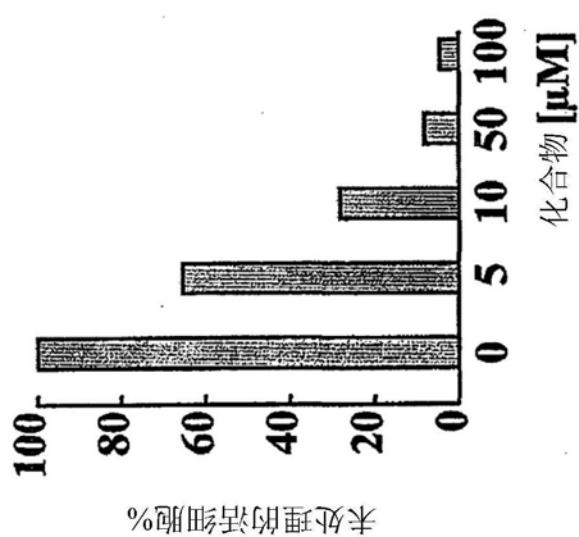


图12