



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 108349967 B

(45) 授权公告日 2022.02.15

(21) 申请号 201680067261.2

(22) 申请日 2016.11.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108349967 A

(43) 申请公布日 2018.07.31

(30) 优先权数据
62/260787 2015.11.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/079251 2016.11.30

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2017/093300 EN 2017.06.08

(73) 专利权人 阿斯利康(瑞典)有限公司
地址 瑞典南泰利耶
专利权人 癌症研究科技有限公司

(72) 发明人 M.R.V. 芬莱 J.W.M. 尼辛克
M.D. 查尔斯 M.J. 伍德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 梁谋 鲁炜

(51) Int.Cl.
C07D 417/14 (2006.01)
A61K 31/501 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2015/181539 A1, 2015.12.03
CN 105051041 A, 2015.11.11
US 2002/0115698 A1, 2002.08.22
WO 2015/138902 A1, 2015.09.17
Krupa Shukla et al., Design,
Synthesis, and Pharmacological Evaluation
of Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-
thiadiazol-2-yl)ethyl Sulfide 3 (BPTES)
Analogues as Glutaminase Inhibitors.
《Journal of Medicinal Chemistry》.2012,第
55卷

审查员 林鹏

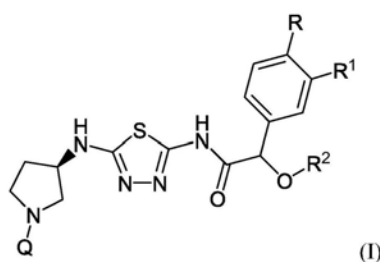
权利要求书2页 说明书33页

(54) 发明名称

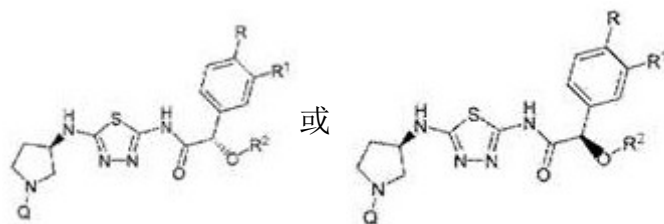
1,3,4-噻二唑化合物及其在治疗癌症中的
用途

(57) 摘要

一种具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中:Q可以是5-甲基吡嗪-3-基、5-氯吡嗪-3-基、6-甲基吡嗪-3-基、或6-氟吡嗪-3-基;R可以是氢、氟、或甲氧基;R¹可以是氢、甲氧基、二氟甲氧基、或三氟甲氧基;并且R²可以是甲基或乙基。该具有化学式(I)的化合物可以抑制谷氨酰胺酶,例如GLS1。



1. 一种具有如下化学式的化合物：



或其药学上可接受的盐，其中：

Q是5-甲基哒嗪-3-基、5-氯哒嗪-3-基、6-甲基哒嗪-3-基或6-氟哒嗪-3-基；

R是氢、氟或甲氧基；

R¹是氢、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；并且

R²是甲基或乙基。

2. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中Q是6-甲基哒嗪-3-基、或6-氟哒嗪-3-基。

3. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中R是氢或氟。

4. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中R是氢。

5. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中R¹是甲氧基、二氟甲氧基、或三氟甲氧基。

6. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中R²是甲基。

7. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中该化合物选自下组，该组由以下各项组成：

(2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺；

(2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-苯基-乙酰胺；

(2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酰胺；

(2S)-2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺；

(2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺；

(2S)-2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺；

(2S)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺；

(2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺；

N-[5-[[(3R)-1-(5-氯哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酰胺；

(2S)-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;以及

(2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺。

8.如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中该化合物选自下组,该组由以下各项组成:

(2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

(2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酰胺;

(2S)-2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

(2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

(2S)-2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

(2S)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺;

(2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

(2S)-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;以及

(2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺。

9.一种药物组合物,其包含如权利要求1-8中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的稀释剂或载体。

10.如权利要求1-8中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗至少部分由GLS1介导的疾病的药物中的用途。

11.如权利要求1-8中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

12.根据权利要求11所述的用途,其中所述癌症是乳腺癌、肺癌、胰腺癌、肾癌或肝细胞癌。

1,3,4-噻二唑化合物及其在治疗癌症中的用途

技术领域

[0001] 本说明书总体上涉及经取代的1,3,4-噻二唑化合物及其药学上可接受的盐。这些化合物作用于谷氨酰胺酶1酶(“GLS1”),并且因此本说明书还涉及此类化合物及其盐治疗或预防GLS1介导的疾病(包括癌症)的用途。本说明书进一步涉及包含这些化合物和盐的药物组合物;包含这些化合物和盐的试剂盒;制备这些化合物和盐的方法;用于制备这些化合物和盐的中间体;以及使用这些化合物和盐治疗GLS1介导的疾病、包括癌症的方法。

[0002] 背景

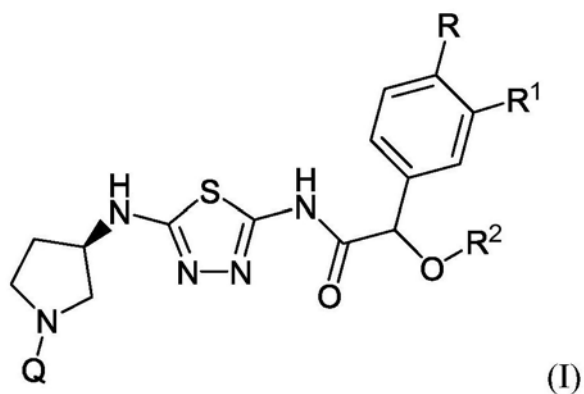
[0003] 谷氨酰胺是最丰富的血浆氨基酸并且参与许多生长促进途径。特别地,谷氨酰胺参与TCA循环中的氧化和维持细胞氧化还原平衡,并且还提供氮用于核苷酸和氨基酸合成(库睿(Curi)等,生物科学前沿(Front.Biosci.)2007,12,344-57;德巴丁斯(DeBerardinis)和程(Cheng),癌基因(Oncogene)2010,313-324,每者通过引用以其整体结合在此)。许多癌细胞依赖于谷氨酰胺代谢作为细胞代谢变化的结果,包括瓦伯格效应,其中糖酵解丙酮酸转化为乳酸而不是用于产生乙酰辅酶A(库珀诺(Koppenol)等人,自然综述(Nature Reviews)2011,11,325-337,每者通过引用以其整体结合在此)。由于这种依赖于谷氨酰胺代谢的结果,这样的癌细胞对外源谷氨酰胺水平的变化敏感。此外,现有证据表明谷氨酰胺分解在某些癌症类型中起关键作用(亨斯利(Hensley)等人,临床研究期刊(J.Clin.Inves).2013,123,3678-3684,每者通过引用以其整体结合在此),并且与已知的致癌驱动因子例如Myc相关(丹格(Dang),癌症研究(CancerRes).2010,70,859-863,每者通过引用以其整体结合在此)。

[0004] 谷氨酰胺分解代谢为谷氨酸的第一步由谷氨酰胺酶催化,谷氨酰胺酶以GLS1和GLS2这两种亚型存在,这两种亚型最初鉴定为分别在肾和肝中表达。已知肾谷氨酰胺酶(GLS1)比肝谷氨酰胺酶(GLS2)更普遍地表达,并且具有2种剪接变体,KGA和较短的GAC亚型,两者都位于线粒体中。(埃嘎迪(Elgadi)等人,生理与基因组学(Physiol.Genomics)1999,1,51-62;卡斯格(Cassago)等人,美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.)2012,109,1092-1097,每者通过引用以其整体结合在此)。GLS1表达与许多疾病类型中的肿瘤生长和恶性肿瘤相关(王(Wang)等人,癌症细胞(Cancer Cell)2010,18,207-219;范德华(van der Heuvel)等人,癌症生物学与治疗(Cancer Bio.Ther.)2012,13,1185-1194,每者通过引用以其整体结合在此)因此,预期GLS1的抑制剂可用于治疗癌症,作为单一疗法或与其他抗癌剂组合。

发明内容

[0005] 在一个方面,提供了一种具有化学式(I)的化合物:

[0006]



[0007] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0008] Q是5-甲基吡嗪-3-基、5-氯吡嗪-3-基、6-甲基吡嗪-3-基或6-氟吡嗪-3-基;

[0009] R是氢、氟或甲氧基;

[0010] R¹是氢、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基;并且[0011] R²是甲基或乙基。

[0012] 在另一方面,药物组合物包括具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的稀释剂或载体。

[0013] 在另一方面,具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,用于在疗法中使用。

[0014] 在另一方面,具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,用于治疗癌症。

[0015] 另一方面,具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0016] 在另一方面,用于在需要这种治疗的温血动物中治疗癌症的方法包括给予温血动物治疗有效量的具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

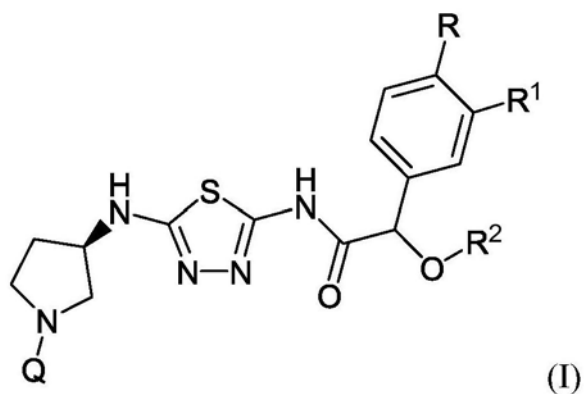
[0017] 其他方面将从说明书和权利要求书中显而易见。

[0018] 详细说明

[0019] 许多实施例在整个说明书中详细描述并且对于本领域的读者将是显而易见的。本发明不被解释为受限于其任何具体的一个或多个实施例。

[0020] 提供具有化学式(I)的化合物:

[0021]



[0022] 或其药学上可接受的盐,其中:

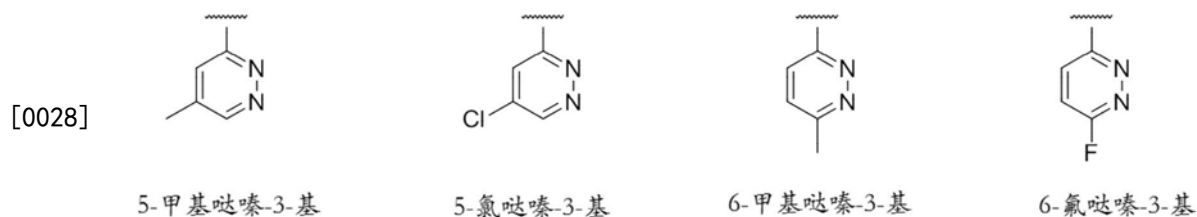
[0023] Q是5-甲基吡嗪-3-基、5-氯吡嗪-3-基、6-甲基吡嗪-3-基或6-氟吡嗪-3-基;

[0024] R是氢、氟或甲氧基;

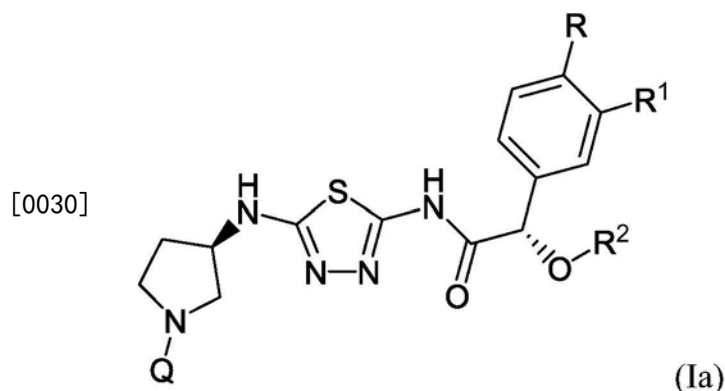
[0025] R^1 是氢、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基;并且

[0026] R^2 是甲基或乙基。

[0027] 5-甲基吡嗪-3-基、5-氯吡嗪-3-基、6-甲基吡嗪-3-基、或6-氟吡嗪-3-基环具有以下结构:



[0029] 在一些实施例中,具有化学式(I)的化合物具有下化学式(Ia):



[0031] 其中Q、R、 R^1 和 R^2 是如上定义的。

[0032] 术语“药学上可接受的”用于指定对象(例如盐、剂型、稀释剂或载体)是适合在患者中使用的。药学上可接受的盐的实例列表可以发现于:药用盐手册:性质、选择和使用(the Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use), P.H. 斯塔尔(Stahl)和C.G. 韦穆特(Wermuth)编辑,魏因海姆(Weinheim)/苏黎世(Zürich):威利(Wiley)-VCH出版社/VHCA, 2002, 将其通过引用以其整体结合在此。具有化学式(I)的化合物的适合的药学上可接受的盐例如是酸加成盐。在技术人员已知的条件下,具有化学式(I)的化合物的酸加成盐可以通过使该化合物与适合的无机酸或有机酸接触来形成。酸加成盐可以使用例如无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸形成。酸加成盐也可以使用例如有机酸如三氟乙酸、甲磺酸或苯磺酸形成。

[0033] 因此,在一个实施例中,提供具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中该药学上可接受的盐是盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、三氟乙酸盐、甲磺酸盐或苯磺酸盐。

[0034] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中该药学上可接受的盐是盐酸盐或氢溴酸盐。

[0035] 具有化学式(I)化合物的其他合适的药学上可接受的盐是碱-加成盐。具有化学式(I)的化合物的碱加成盐可以通过使该化合物与合适的无机碱或有机碱在本领域技术人员已知的条件下接触而形成。碱加成盐可以使用例如无机碱如碱金属氢氧化物(例如氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化锂)或碱土金属氢氧化物(例如氢氧化钙或氢氧化镁)形成。碱加成盐也可以使用例如有机碱如甲胺、二甲胺、三甲胺、哌啶、吗啉或三-(2-羟乙基)胺来形成。

[0036] 因此,在一个实施例中,提供具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其

中该药学上可接受的盐是氢氧化钠盐、氢氧化钾盐、氢氧化锂盐、氢氧化钙盐、氢氧化镁盐、甲胺盐、二甲胺盐、三甲胺盐、哌啶盐、吗啉盐或三-(2-羟乙基)胺盐。

[0037] 在一个实施例中,提供具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中该药学上可接受的盐是盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、三氟乙酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、氢氧化钠盐、氢氧化钾盐、氢氧化锂盐、氢氧化钙盐、氢氧化镁盐、甲胺盐、二甲胺盐、三甲胺盐、哌啶盐、吗啉盐或三-(2-羟乙基)胺盐。

[0038] 另一实施例提供本文定义的任何实施例(例如权利要求1的实施例),条件是选自由以下各项组成的组中的一个或多个具体实例(例如一个、两个或三个具体实例,或者可替代地一个具体实例)单独地被排除:实例1(a)、1(b)、2、3、4(a)、4(b)、5(a)、5(b)、6(a)、6(b)、7(a)、7(b)、8(a)、8(b)、9(a)、9(b)、10(a)、10(b)、11(a)、11(b)、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33(a)、和33(b)。

[0039] 化学式(I)中的可变基团的一些值如下。这些值可以与任何定义、权利要求(例如权利要求1)、或本文所定义的实施例组合使用以提供另外的实施例。

[0040] Q可以是6-甲基哒嗪-3-基或6-氟哒嗪-3-基。

[0041] Q可以是5-甲基哒嗪-3-基或5-氯哒嗪-3-基。

[0042] Q可以是5-甲基哒嗪-3-基。

[0043] Q可以是5-氯哒嗪-3-基。

[0044] Q可以是6-甲基哒嗪-3-基。

[0045] Q可以是或6-氟哒嗪-3-基。

[0046] R可以是氢或氟。

[0047] R可以是氢。

[0048] R¹可以是甲氧基、二氟甲氧基、或三氟甲氧基。

[0049] R²可以是甲基。

[0050] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,其中:

[0051] Q是6-甲基哒嗪-3-基或6-氟哒嗪-3-基;并且

[0052] R¹是甲氧基或三氟甲氧基。

[0053] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,其中:

[0054] Q是6-甲基哒嗪-3-基或6-氟哒嗪-3-基;

[0055] R是氢;并且

[0056] R¹是甲氧基或三氟甲氧基。

[0057] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,其中:

[0058] Q是6-甲基哒嗪-3-基或6-氟哒嗪-3-基;

[0059] R是氢;

[0060] R¹是甲氧基或三氟甲氧基;并且

[0061] R²是甲基。

[0062] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,其中:

[0063] Q是6-甲基哒嗪-3-基或6-氟哒嗪-3-基;并且

[0064] R是氟。

[0065] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,其中

所述化合物选自下组,该组由以下各项组成:

[0066] (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0067] (2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-苯基-乙酰胺;

[0068] (2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酰胺;

[0069] (2S)-2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0070] (2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0071] (2S)-2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0072] (2S)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺;

[0073] (2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0074] N-[5-[[(3R)-1-(5-氯哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酰胺;

[0075] (2S)-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;以及

[0076] (2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺。

[0077] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,其中所述化合物选自下组,该组由以下各项组成:

[0078] (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0079] (2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酰胺;

[0080] (2S)-2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0081] (2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0082] (2S)-2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0083] (2S)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺;

[0084] (2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;

[0085] (2S)-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺;以及

[0086] (2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺。

[0087] 本说明书中所描述的化合物和盐可以按溶剂化形式和非溶剂化形式存在。例如,溶剂化形式可以是水合形式,如半水合物、一水合物、二水合物、三水合物或其可替代的数量。本发明包括所有这些溶剂化和非溶剂化形式的具有化学式(I)的化合物。

[0088] 本说明书中描述的化合物和盐的原子能以不同的同位素形式存在。本发明包括具有化学式(I)的化合物的所有同位素形式,包括¹¹C或¹³C碳和¹H、²H(氘)或³H(氚)氢。

[0089] 本说明书中所描述的化合物和盐可以按互变异构体的混合物存在。“互变异构体”是结构异构体,其存在于由氢原子的迁移产生的平衡中。本发明包括具有化学式(I)的化合物的所有互变异构体。

[0090] 具有化学式(I)的化合物能以不同的非对映体形式制备。本发明包括具有化学式(I)的化合物的所有非对映体形式。

[0091] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,其为≥95%,≥98%或≥99%的非对映体过量(%de)的单一非对映异构体。在一个实施例中,单一非对映异构体以≥99%的非对映异构体过量(%de)存在。

[0092] 认为抑制GLS1的化合物,即具有化学式(I)的化合物及其药学上可接受的盐预期在疗法(例如治疗至少部分由GLS1介导的疾病或医学病症,包括癌症)中是有用的。

[0093] 在提及“癌症”的情况下,这包括非转移性癌症和转移性癌症两者,使得治疗癌症涉及治疗原发性肿瘤和肿瘤转移两者。

[0094] 在一个实施例中,该癌症是转移性癌症。

[0095] 在一个实施例中,该癌症是非转移性癌症。

[0096] “GLS1抑制活性”是指相对于在不存在具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的情况下的GLS1的活性而言,作为对具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的存在的直接或间接反应,GLS1的活性降低。这种活性的降低可以是由于具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐与GLS1的直接相互作用,或者由于具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐与转而影响GLS1活性的一种或多种其他因素的相互作用。例如,具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐可以通过直接结合GLS1、通过(直接或间接地)引起另一种因子降低GLS1活性、或通过(直接或间接地)降低细胞或生物体中存在的GLS1的量而降低GLS1。

[0097] 术语“疗法”旨在具有其正常的含义:治疗疾病或矫正或补偿基础病理。术语“疗法”还包括“预防”,除非有相反的具体指示。术语“治疗的”和“治疗地”应以相应的方式被解释。

[0098] 术语“治疗有效量”是指如本文任何实施例中所述的具有化学式(I)的化合物的量,该量在受试者中有效提供“治疗”。在癌症的情况下,如在以上“疗法”、“治疗”和“预防”的定义中所述的,治疗有效量可以在受试者中引起任何可观察的或可测量的变化。例如,该有效量可以减少癌症或肿瘤细胞的数量;减少整体肿瘤大小;抑制或阻止肿瘤细胞浸润到外周器官,包括例如软组织和骨;抑制和停止肿瘤转移;抑制和停止肿瘤生长;在一定程度

上减轻与癌症相关的一种或多种症状;降低发病率和死亡率;提高生活质量;或这些效果的组合。有效量可以是足以减少响应于GLS1活性抑制的疾病的症状的量。对于癌症疗法,例如可以通过评估存活期、疾病进展时间(TTP)、应答率(RR)、响应期、和/或生命质量来测定体内疗效。如由本领域技术人员所认可的,有效量可以取决于给予途径、赋形剂的使用、以及与其他药剂共同使用而改变。例如,在使用联合疗法的情况下,在动物患者中,对于治疗靶向的失调,当联合时,本说明书中描述的具有化学式(I)的化合物或药学上可接受的盐的量和其他一种或多种药学上有活性的药剂的量是共同有效的。在本上下文中,如果当联合时,这些组合量足以降低对如上所述的GLS1活性的抑制有反应的疾病的症状,则这些组合量为“治疗有效量”。通常,这样的量可以由本领域技术人员通过例如从本说明书中描述的具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的剂量范围开始来确定或从其他一种或多种药理学活性化合物的批准的或公开的一个或多个剂量范围来确定。

[0099] 术语“预防”旨在具有其正常含义,并包括防止疾病发展的初级预防和继发性预防,其中该疾病已经发展并且患者被暂时或永久保护对抗疾病的加重或恶化。

[0100] 术语“治疗”(treatment)与“疗法”(therapy)同义地使用。类似地,术语“治疗”可以被认为是应用疗法,其中“疗法”如本文所定义。

[0101] 在一个实施例中,提供了包含具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物。在一个实施例中,药物组合物包括游离碱形式的具有化学式(I)的化合物。在另一个实施例中,药物组合物包括具有化学式(I)的化合物的药学上可接受的盐。

[0102] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,用于在疗法中使用。

[0103] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐,用于治疗癌症。

[0104] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐用于生产治疗癌症的药物的用途。

[0105] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,用于治疗由GLS1介导的疾病。在一个实施例中,由GLS1介导的疾病是癌症。在一些实施例中,癌症可以是乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌、肾癌或肝细胞癌。

[0106] “三阴性乳腺癌”是不表达或低表达雌激素受体,孕酮受体和Her2/neu的基因的任何乳腺癌。

[0107] 在一个实施例中,提供具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗由GLS1介导的疾病的药物中的用途。在一个实施例中,由GLS1介导的疾病是癌症。在一些实施例中,癌症可以是乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌、肾癌或肝细胞癌。

[0108] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐用于生产治疗癌症的药物的用途。

[0109] 在一个实施例中,提供了抑制GLS1的方法,其包括给予具有化学式(I)的化合物。

[0110] 在一个实施例中,提供了用于治疗其中GLS1的抑制在需要这种治疗的温血动物中是有益的疾病的方法,该方法包括向该温血动物给予治疗有效量的具有化学式(I)的化合

物或其药学上可接受的盐。

[0111] “温血动物”包括例如人。

[0112] 在一个实施例中,提供了用于在需要这种治疗的温血动物中治疗癌症的方法,该方法包括向该温血动物给予治疗有效量的具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,癌症可以是乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌、肾癌或肝细胞癌。

[0113] 在本说明书中所描述的癌症治疗可以作为单一疗法是有用的,或者除了给予具有化学式(I)的化合物以外,还可以包括常规手术、放射疗法或化学疗法;或这些另外的疗法的组合。这种常规手术、放射疗法或化学疗法可以与具有化学式(I)的化合物同时地、顺序地或分开地给予,以进行治疗。

[0114] 因此,在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种另外的抗肿瘤物质,用于在癌症的治疗中使用。

[0115] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种另外的抗肿瘤物质,用于在癌症的治疗中同时地、分开地或顺序地使用。

[0116] 在一个实施例中,提供了具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,用于在癌症的治疗中使用,其中具有化学式(I)的化合物与至少一种另外的抗肿瘤物质被同时地、分开地或顺序地给予。

[0117] 在一个实施例中,提供了在需要这种治疗的温血动物中治疗癌症的方法,该方法包括向该温血动物给予具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐以及至少一种另外的抗肿瘤物质,其中具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及另外的抗肿瘤物质的量在产生抗癌作用方面是共同有效的。

[0118] 在一个实施例中,提供了在需要这种治疗的温血动物中治疗癌症的方法,该方法包括向所述温血动物给予具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,并且向所述温血动物同时地、分开地或顺序地给予至少一种另外的抗肿瘤物质,其中具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及另外的抗肿瘤物质的量在产生抗癌作用方面是共同有效的。

[0119] 在任何实施例中,该另外的抗肿瘤物质是紫杉烷。在一个实施例中,紫杉烷是紫杉醇。在一个实施例中,紫杉烷是多西他赛。

[0120] 在任何实施例中,另外的抗肿瘤物质是铂剂。在一个实施例中,铂剂是顺铂、奥沙利铂或卡铂。

[0121] 根据另一个实施例,提供了试剂盒,其包含:

[0122] a) 处于第一单位剂型的、具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐;

[0123] b) 处于第二单位剂型的第二抗肿瘤物质;

[0124] c) 用于容纳该第一和第二单位剂型的容器;以及任选地,

[0125] d) 使用说明书。

[0126] 具有化学式(I)的化合物及其药学上可接受的盐可以作为药物组合物被给予,这些药物组合物包含一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体。因此,在一个实施例中,提供了包含具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物。

[0127] 这些组合物可处于适合于以下的形式：口服使用（例如作为片剂、锭剂、硬或软胶囊剂、水性或油性悬浮液、乳剂、可分散粉剂或颗粒剂、糖浆剂或酏剂），局部使用（例如作为乳膏剂、软膏剂、凝胶剂、或者水性或油性溶液或悬浮液），通过吸入给予（例如作为细碎粉末或液体气雾剂），通过吹入给予（例如作为细碎粉末），或肠胃外给予（例如作为用于静脉内、皮下、肌内给药的无菌水性或油性溶液），或作为栓剂。可以通过常规程序使用常规药物赋形剂来获得这些组合物。因此，旨在口服使用的组合物可以含有例如一种或多种着色剂、甜味剂、调味剂和/或防腐剂。

[0128] 在一个实施例中，提供了包含具有化学式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物，用于在疗法中使用。

[0129] 在一个实施例中，提供了包含具有化学式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物，用于在癌症的治疗中使用。在一些实施例中，癌症可以是乳腺癌（例如三阴性乳腺癌）、肺癌（例如非小细胞肺癌）、胰腺癌、肾癌或肝细胞癌。

[0130] 具有化学式 (I) 的化合物通常以 $5-5000\text{mg}/\text{m}^2$ 动物体面积，即约 $0.1-100\text{mg}/\text{kg}$ 的单位剂量给予温血-动物，并且这通常提供治疗有效-剂量。单位剂型如片剂或胶囊剂通常含有例如 $1-250\text{mg}$ 的活性成分。每日剂量将必然取决于所治疗的宿主、具体的给予途径、共给予的任何疗法、以及正在治疗的疾病的严重性而变化。因此，治疗任何具体患者的执业医师可以确定最佳剂量。

[0131] [实例]

[0132] 通过以下实例阐明多个实施例。本发明不被解释为受限于这些实例。

[0133] 在实例的制备期间，通常：

[0134] a) 操作在环境温度下进行，即在约 17°C 至 30°C 的范围内和在惰性气体如氮气的气氛下进行，除非另有说明；

[0135] b) 通过旋转蒸发或使用Genevac真空设备进行蒸发，并且在通过过滤去除残余固体之后进行后处理程序；

[0136] c) 使用Grace Resolve预填充的二氧化硅柱在自动Isco Combiflash Companion上并且在使用RedisepGoldC18柱的（反相闪蒸）Isco Combiflash Rf上进行快速色谱纯化；

[0137] d) 产率，在存在的情况下，不必是可达到的最大值；

[0138] e) 具有化学式 (I) 的终产物的结构通过核磁共振(NMR) 光谱法证实，伴随在 δ 规模上测量的NMR化学位移值。使用布鲁克高级(Bruker Avance) 700 (700MHz)，布鲁克高级(Bruker Avance) 500 (500MHz)，布鲁克400 (400MHz) 或布鲁克300 (300MHz) 仪器测定质子磁共振谱； ^{19}F NMR在282MHz或376MHz测定； ^{13}C NMR在75MHz或100MHz测定；除非另有说明，测量在约 20°C - 30°C 进行；使用以下缩写：s，单峰；d，双峰；t，三重峰；q，四重峰；m，多重峰；dd，双二重峰；ddd，双二重峰的双重峰；dt，双三重峰；bs，宽信号；

[0139] f) 还使用基于具有2996 PDA和2000amu ZQ单四极杆质谱仪的沃特斯(Waters) 2790/95LC系统的HPLC系统，在液相色谱(LCMS) 之后，通过质谱法表征具有化学式 (I) 的终产物。所用溶剂为A=水，B=乙腈，C=50:50乙腈:水0.1%甲酸并且D=50:50乙腈:水0.1%氢氧化铵。在 $1.1\text{mL}/\text{min}$ 的流速下，将 $5\mu\text{L}$ 样品注射到 $50\times 2.15\mu\text{m}$ Phenomenex GeminiNX柱上。梯度从95%A到95%B持续4.0分钟，恒定5%C输注（用于酸分析，D用于碱分析）。在返回

开始条件之前,将流动保持在95%B下0.5分钟。在质谱仪上在正模式和负模式下在从150至850amu下并且在PDA上的220-320nm下获得数据。还在使用具有样品管理器、AcquityPDA和SQD质谱仪的沃特斯Acquity二元泵的UPLC系统上进行LCMS。所用溶剂为A1=0.1%甲酸(水溶液),B10.1%甲酸的乙腈溶液,A2=0.1%氢氧化铵(水溶液)并且B20.1%氢氧化铵的乙腈溶液。在1mL/min的流速下,将1μL样品注射到50×2.11.7μm沃特斯BEH柱(在40℃)。梯度经1.30分钟从97%A1至97%B1,然后保持0.2分钟并返回到开始条件(用A1和B1代替A2和B2用于碱分析)。在质谱仪上在正模式和负模式下在从150至1000amu下并且在PDA上的245-320nm下获得数据。

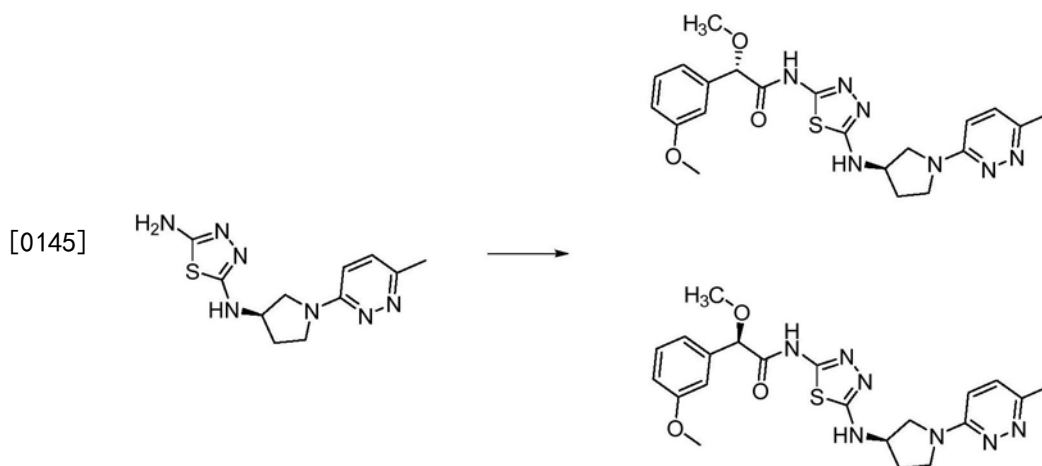
[0140] g) 中间体通常没有完全表征,并且通过薄层色谱、质谱、HPLC和/或NMR分析评估纯度;

[0141] h) 使用以下缩写:h=小时;r.t.=室温(约17℃-30℃);conc.=浓缩;FCC=使用二氧化硅的快速柱色谱;AIBN=偶氮二异丁腈;DCM=二氯甲烷;DIPEA=二异丙基乙胺;DMA=N,N-二甲基乙酰胺;DMF=N,N-二甲基甲酰胺;DMSO=二甲基亚砜;EDC=1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺;Et₂O=乙醚;EtOAc=乙酸乙酯;EtOH=乙醇;HATU=1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐;HOBT=羟基苯并三唑;K₂CO₃=碳酸钾;MeOH=甲醇;MeCN=乙腈;MgSO₄=无水硫酸镁;Na₂SO₄=无水硫酸钠;NBS=N-溴琥珀酰亚胺;TFA=三氟乙酸;THF=四氢呋喃;sat.=饱和水溶液。

[0142] 在下面的许多实例中,描述了化合物的非对映体对。例如,实例1(a)和实例1(b)的化合物表示化合物的非对映体对,其在单一反应的产物中形成混合物,随后分离。在这样的实例中,立体化学的任何指定不是绝对的。作为说明,实例1(a)和1(b)涉及所述化合物的(2S,3R)和(2R,3R)非对映异构体;然而,并不意味着实例1(a)被确定地指定为(2S,3R)非对映异构体并且实例1(b)被确定为(2R,3R)非对映异构体。

[0143] 实例1(a)和1(b)

[0144] (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺和(2R)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺



[0146] 在21℃下,在氮下,将HATU(329mg,0.87mmol)添加到在DMF(6mL)中的2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸(中间体14,141mg,0.72mmol),N2-[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体1,200mg,0.72mmol)和DIPEA(0.25mL,

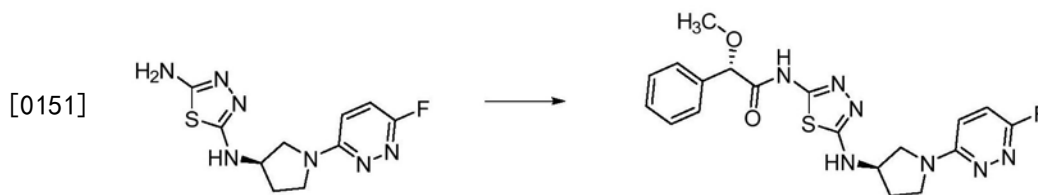
1.44mmol) 中。将所得溶液在21℃下搅拌2小时。使用SCX柱通过离子交换色谱法纯化粗混合物。使用1MNH₃的MeOH溶液将所需产物从柱上洗脱,将纯级分蒸发至干,得到粗产物,将其通过FCC(SiO₂,0至12%MeOH的DCM溶液)进一步纯化。将纯级分蒸发至干,得到非对映异构体的混合物,为淡黄色胶状物(95mg)。非对映异构体通过制备型HPLC(LuxC2柱,20μm,50mm×250mm,100%MeOH,200mL/min)分离,得到:

[0147] 第一洗脱异构体实例1(a) 2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺(58mg,18%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,30℃) δ2.05(1H,td),2.21-2.35(1H,m),2.41(3H,s),3.40-3.47(1H,m),3.55(2H,ddd),3.69-3.75(4H,m),4.31-4.46(1H,m),4.93(1H,s),6.82(1H,d),6.87-6.94(1H,m),6.99-7.07(2H,m),7.22(1H,d),7.29(1H,t),7.61(1H,d),12.13(1H,s)。m/z:ES⁺[M+H]⁺456。

[0148] 第二洗脱异构体实例1(b) 2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺(55mg,17%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,30℃) δ2.05(1H,td),2.21-2.35(1H,m),2.41(3H,s),3.4-3.47(1H,m),3.55(2H,ddd),3.69-3.75(4H,m),4.31-4.46(1H,m),4.93(1H,s),6.82(1H,d),6.87-6.94(1H,m),6.99-7.07(2H,m),7.22(1H,d),7.29(1H,t),7.61(1H,d),12.13(1H,s)。m/z:ES⁺[M+H]⁺456。

[0149] 实例2

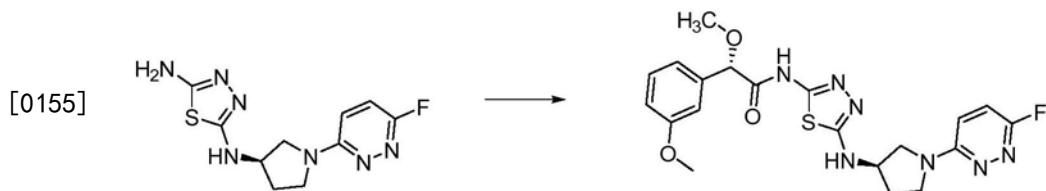
[0150] (2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-苯基-乙酰胺



[0152] 在25℃下,将HOBT(120mg,0.78mmol)添加到在DMF(3mL)中的N2-[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体4,220mg,0.78mmol)、(2S)-2-甲氧基-2-苯基-乙酸(130mg,0.78mmol)和EDC(300mg,1.56mmol)中。将所得混合物在25℃下搅拌3小时。将粗产物通过制备型HPLC(XBridge C18 OBD柱,5μm,50mm×150mm)纯化。将极性渐减的水(含有0.05%甲酸)和MeCN的混合物用作流动相。将含有所需化合物的级分蒸发至干,得到呈白色固体的实例2(2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-苯基-乙酰胺(95mg,27.8%)。¹HNMR(400MHz,MeOD,22℃) δ2.16-2.23(m,1H),2.36-2.44(m,1H),3.44(s,3H),3.55-3.69(m,3H),3.82-3.86(m,1H),4.46-4.51(m,1H),4.93(s,1H),7.15-7.19(m,1H),7.24-7.27(m,1H),7.35-7.43(m,3H),7.47-7.49(m,2H)。m/z:ES⁺[M+H]⁺430。

[0153] 实例3

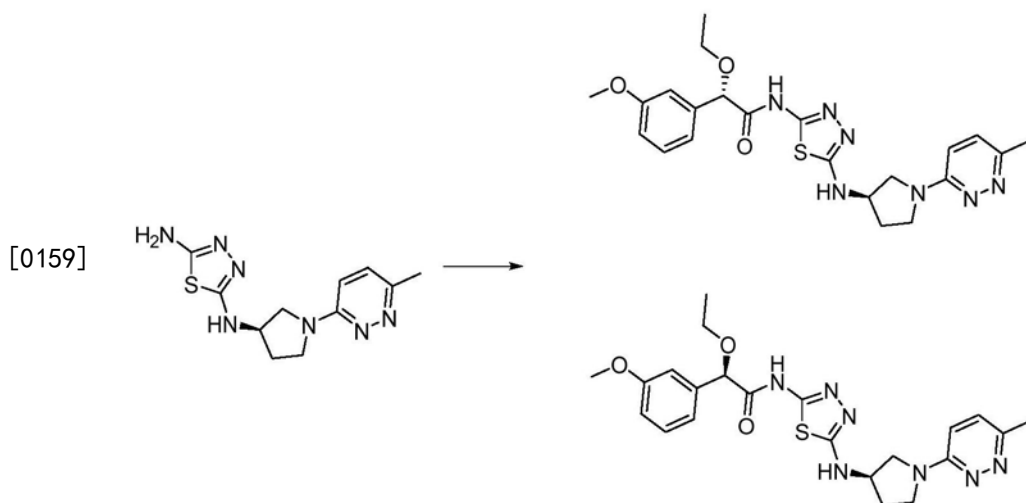
[0154] (2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酰胺



[0156] 在21℃下,在N₂下,将HATU(405mg,1.07mmol)添加到在DMF(8mL)中的(2S)-2-(3-甲氧基苯基)乙酸(中间体12,174mg,0.89mmol)、N2-[(3R)-1-(6-氟吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体4,250mg,0.89mmol)和DIPEA(0.155mL,0.89mmol)中。将所得到的溶液在0℃下搅拌持续45分钟。将该粗产物通过离子交换层析,使用SCX柱进行纯化。使用1MNH₃的MeOH溶液将所需产物从柱上洗脱,将纯级分蒸发至干,得到胶状物。将粗产物通过FCC(SiO₂,0至9%MeOH的DCM溶液)纯化。将纯级分蒸发至干,用乙醚/DCM研磨并过滤,得到呈奶油色固体的实例3(2S)-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酰胺(185mg,45%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,30℃)δ2.12(1H,td),2.3-2.46(1H,m),3.37(3H,s),3.52(1H,dd),3.59-3.67(2H,m),3.81(4H,m),4.34-4.56(1H,m),5.00(1H,s),6.97(1H,ddd),7.03-7.14(2H,m),7.22(1H,dd),7.32-7.51(2H,m),7.73(1H,d),12.20(1H,s)。m/z:ES⁺[M+H]⁺486。

[0157] 实例4(a)和4(b)

[0158] (2S)-2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺和(2R)-2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺



[0160] 将2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸(中间体15,0.11g,0.54mmol)和N2-[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体1,0.15g,0.54mmol)称重到圆底烧瓶中,然后添加DIPEA(0.1mL,0.54mmol)和DMF(5mL)。然后将所得溶液用HATU(0.21g,0.54mmol)处理,并在室温下、在N₂下搅拌24小时。在减压下除去溶剂,并将残余的胶状物溶于DCM中,吸附到二氧化硅上并通过FCC(SiO₂0-10%MeOH的DCM溶液)纯化。在减压下蒸发纯的级分,得到标题化合物,为浅黄色泡沫。将泡沫溶解在甲醇中并添加到SCX离子交换柱中,用DCM,然后甲醇洗涤,然后用2M的NH₃在MeOH中的溶液洗脱。在减压下除去溶剂,并通过制备型HPLC(SunFireC18柱,5μm,50mm×19mm,流速25mL/min)进一步纯化。使用极性比率渐减的含有0.1%甲酸的水和MeCN作为流动相。将纯级分蒸发至干,得到作为非对映异

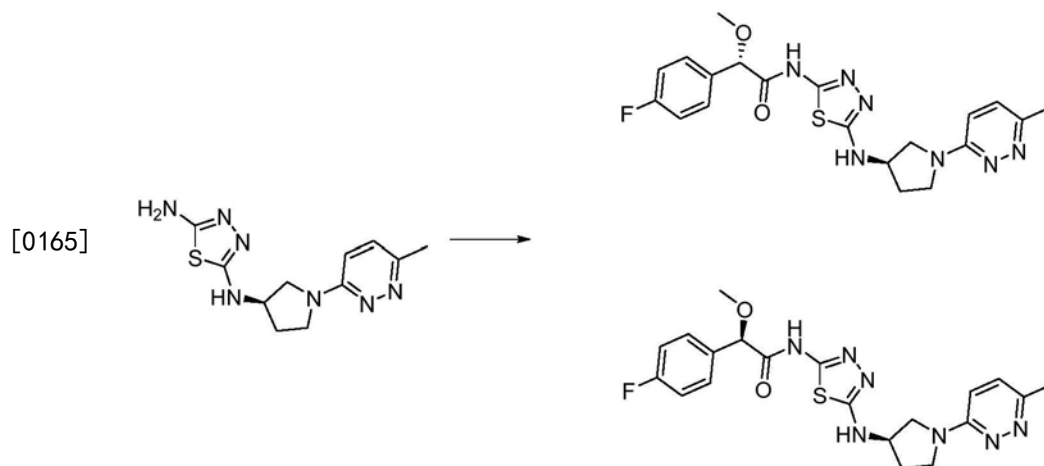
构体的混合物的产物,为白色固体(67mg)。通过制备型HPLC(Phenomenex Lux C4柱,20 μ m,50mm $\times$ 250mm,MeOH,120mL/min)分离非对映异构体,得到:

[0161] 第一洗脱异构体实例4(a) 2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺(25mg,37%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,30 $^{\circ}$ C) δ 1.17(3H,t),1.99-2.09(1H,m),2.22-2.32(1H,m),2.40(3H,s),3.40-3.56(5H,m),3.69-3.73(1H,m),3.74(3H,s),4.32-4.40(1H,m),5.04(1H,s),6.83(1H,d),6.89(1H,dd),7.00-7.05(2H,m),7.22(1H,d),7.28(1H,t),7.65(1H,d),12.10(1H,s).m/z:ES⁺[M+H]⁺470。

[0162] 第二洗脱异构体实例4(b) 2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺(25mg,37%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,30 $^{\circ}$ C) δ 1.17(3H,t),1.97-2.09(1H,m),2.21-2.31(1H,m),2.40(3H,s),3.39-3.56(5H,m),3.70-3.73(1H,m),3.74(3H,s),4.33-4.40(1H,m),5.04(1H,s),6.84(1H,d),6.87-6.92(1H,m),7.01-7.05(2H,m),7.23(1H,d),7.28(1H,t),7.65(1H,d),12.11(1H,s).m/z:ES⁺[M+H]⁺470。

[0163] 实例5(a)和5(b)

[0164] (2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺和(2R)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺



[0166] 在室温下,在N₂下,将N2-[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体1,0.15g,0.541mmol)和2-(4-氟苯基)-2-甲氧基乙酸(中间体16,0.1g,0.541mmol)溶于DMF(2mL)中。将混合物搅拌5分钟,然后添加DIPEA(0.34mL,1.943mmol)和HATU(0.21g,0.541mmol),然后在室温下搅拌持续2小时。然后将粗混合物通过5g SCX柱,用MeOH洗涤,然后用2NNH₃的MeOH溶液洗脱。在减压下蒸发碱性级分,得到橙色胶状物,将其通过制备型HPLC(SunFireC18柱,5 μ m,50mm $\times$ 19mm,流速25mL/min)纯化。使用极性比率渐减的含有0.1%甲酸的水和MeCN作为流动相。合并纯级分,减压蒸发并通过2gSCX柱,用MeOH洗涤,然后用2N NH₃的MeOH溶液洗脱。将碱性级分蒸发至干,得到非对映异构体的混合物,为灰白色泡沫。通过制备型HPLC(Amy-C柱,5 μ m,20mm $\times$ 250mm,含有0.1%v/v NH₃改性剂的2:3庚烷:EtOH,21mL/min)分离非对映异构体,得到:

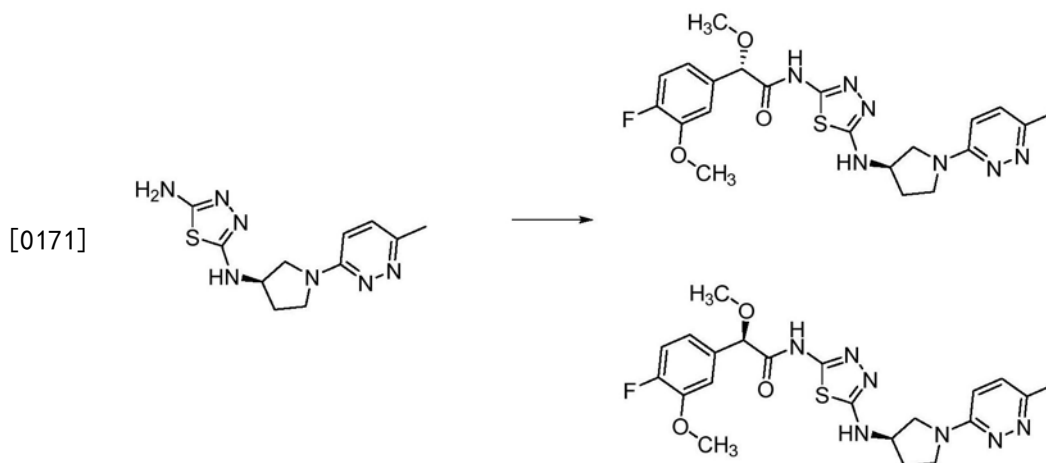
[0167] 第一洗脱异构体实例5(a) 2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒

噻-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺 (55.3mg, 23.0%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, 21°C) δ 2.04 (1H, dq), 2.26 (1H, dt), 2.41 (3H, s), 3.30 (3H, s), 3.57-3.41 (3H, m), 3.72 (1H, dd), 4.36 (1H, q), 4.98 (1H, s), 6.83 (1H, d), 7.22 (3H, ddd), 7.55-7.44 (2H, m), 7.66 (1H, d), 12.28 (s, 1H)。m/z: ES⁺[M+H]⁺444。

[0168] 第二洗脱异构体实例5 (b) 2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺 (59.2mg, 24.7%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, 21°C) δ 2.04 (1H, dq), 2.31-2.23 (1H, m), 2.41 (3H, s), 3.30 (3H, s), 3.44 (1H, dd), 3.59-3.49 (2H, m), 3.71 (1H, dd), 4.36 (1H, q), 4.97 (1H, s), 6.82 (1H, d), 7.22 (3H, ddd), 7.53-7.46 (2H, m), 7.64 (1H, d), 12.28 (1H, s)。m/z: ES⁺[M+H]⁺444。

[0169] 实例6 (a) 和6 (b)

[0170] (2S)-2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺和(2R)-2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺



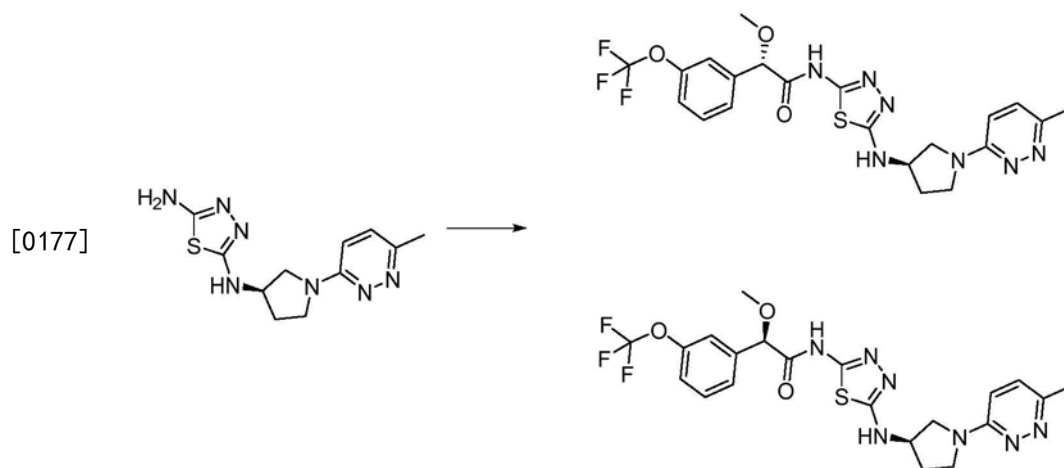
[0172] 在室温下,在氮气下,将N2-[(3R)-1-(6-甲基吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体1, 200mg, 0.72mmol)和2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-乙酸(中间体18, 150mg, 0.72mmol)溶解在DMF (2mL)中。将混合物搅拌5分钟,然后添加DIPEA (0.34mL, 1.94mmol)和HATU (0.27g, 0.72mmol),然后在室温下搅拌过夜。使粗混合物通过5gSCX柱,用MeOH洗涤,然后用2M在MeOH中的NH₃溶液洗脱。蒸发碱性级分,得到粗产物,为橙色胶状物,将其通过制备型HPLC (SunFireC18柱, 5μm, 50mm×19mm, 流速25mL/min)纯化。使用极性比率渐减的含有0.1%甲酸的水和MeCN作为流动相。合并纯级分,蒸发并通过2gSCX柱,用MeOH洗涤,然后用2MNH₃的MeOH溶液洗脱。蒸发碱性级分,得到非对映异构体的混合物,为灰白色固体。然后通过SFC (LuxC3柱, 5μm, 21.2mm×250mm, 含有NH₃改性剂的MeOH/CO₂35%, 50mL/min)分离非对映异构体,得到:

[0173] 第一洗脱异构体实例6 (a) 2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺 (34mg, 10%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, 21°C) δ 1.98-2.12 (1H, m), 2.21-2.33 (1H, m), 2.41 (3H, s), 3.32 (3H, s), 3.40-3.58 (3H, m), 3.69-3.79 (1H, m), 3.84 (3H, s), 4.32-4.41 (1H, m), 4.95 (s, 1H), 6.83 (1H, d), 6.98-7.05 (1H, m), 7.19-7.28 (3H, m), 7.68 (1H, d)。m/z: ES⁺[M+H]⁺474。

[0174] 第二洗脱异构体实例6 (b) 2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺 (44mg, 13%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆, 21°C) δ 1.99-2.10 (1H, m), 2.23-2.34 (1H, m), 2.41 (3H, s), 3.31 (3H, s), 3.41-3.48 (1H, m), 3.50-3.56 (2H, m), 3.67-3.78 (1H, m), 3.84 (3H, s), 4.32-4.39 (1H, m), 4.94 (1H, s), 6.82 (1H, d), 6.98-7.04 (1H, m), 7.17-7.30 (3H, m), 7.65 (1H, d). m/z: ES⁺[M+H]⁺ 474。

[0175] 实例7 (a) 和7 (b)

[0176] (2S)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺和(2R)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺



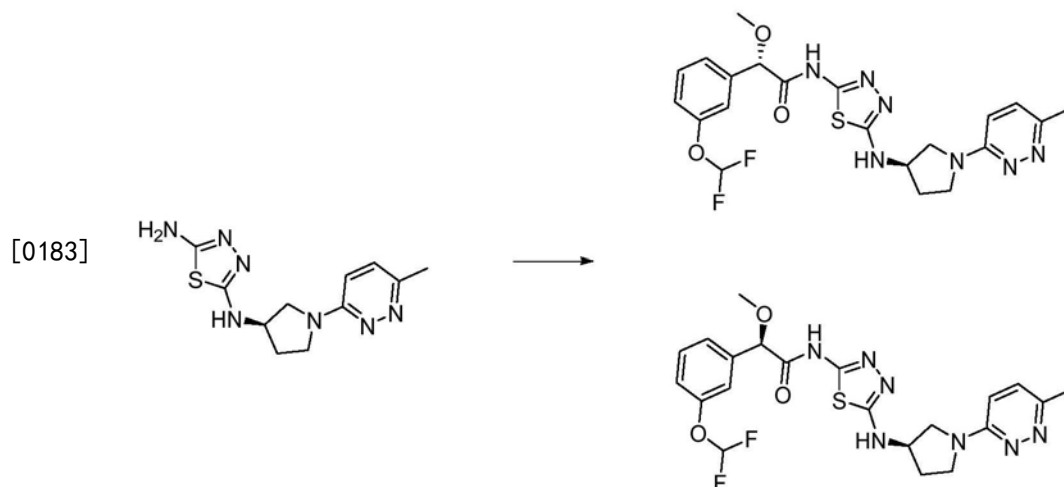
[0178] 将DIPEA (0.14mL, 0.81mmol)、HATU (247mg, 0.65mmol) 和2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸 (中间体19, 160mg, 0.65mmol) 添加到在DMF (4mL) 中的N2-[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺 (中间体1, 150mg, 0.54mmol) 溶液中。将混合物在室温下搅拌18小时。然后将其用水 (5mL) 稀释, 然后萃取到DCM (10mL) 中, 蒸发并通过制备型HPLC (XBridge OBD C18柱, 5μm, 50mm×19mm, 流速为25mL/min) 纯化。使用极性比率渐减的含有0.3mL/LNH₄OH的水和MeCN作为流动相。然后蒸发纯级分, 得到非对映异构体的混合物。通过制备型HPLC (Amy-C柱, 5μm, 4.6mm×250mm, 含有NH₃调节剂的庚烷/EtOH 7/3, 21mL/min) 分离非对映异构体, 得到:

[0179] 第一洗脱异构体实例7 (a) 2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺 (50mg, 18%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆, 21°C) δ 1.96-2.11 (1H, m), 2.20-2.37 (1H, m), 2.41 (3H, s), 3.34 (3H, s), 3.42-3.60 (3H, m), 3.66-3.78 (1H, m), 4.37 (1H, q), 5.07 (1H, s), 6.84 (1H, d), 7.23 (1H, d), 7.37 (1H, d), 7.41-7.58 (3H, m), 7.72 (1H, d), 12.37 (1H, s). m/z: ES⁺[M+H]⁺ 510。

[0180] 第二洗脱异构体实例7 (b) 2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺 (34mg, 12%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆, 21°C) δ 1.97-2.13 (1H, m), 2.20-2.34 (1H, m), 2.41 (3H, s), 3.34 (3H, s), 3.39-3.60 (3H, m), 3.66-3.77 (1H, m), 4.36 (1H, d), 5.07 (1H, s), 6.83 (1H, d), 7.23 (1H, d), 7.37 (1H, d), 7.43-7.60 (3H, m), 7.72 (1H, d), 12.36 (1H, s). m/z: ES⁺[M+H]⁺ 510。

[0181] 实例8 (a) 和8 (b)

[0182] (2S)-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺和(2R)-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺



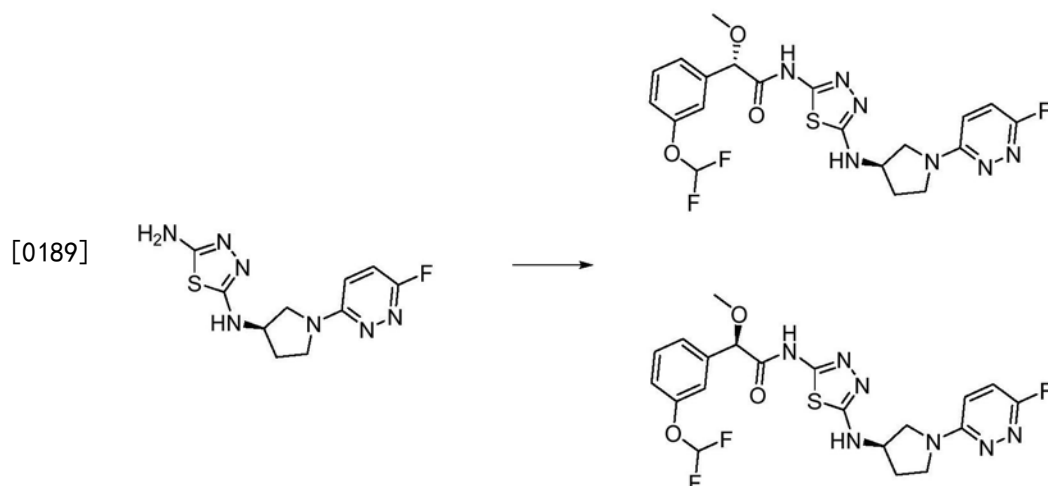
[0184] 将2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-乙酸(中间体20,0.11g,0.469mmol)和N2-[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体1,0.13g,0.469mmol)称重到圆底烧瓶中。添加DMF(3mL)和DIPEA(0.15g,1.172mmol),然后添加HATU(0.18g,0.469mmol),将所得溶液在室温下、在氮气下搅拌15小时。在减压下除去溶剂,将残余的胶状物溶于DCM中,吸收到二氧化硅上,通过FCC(SiO₂,含有0.1%NH₃的DCM溶液的1%-10%MeOH)纯化。在减压下蒸发纯的级分,得到淡黄色胶状物,将其通过制备型手性SFC(LuxC3柱,5μm,21.2mm×250mm,流速50mL/min,波长210nm,用40:60MeOH:CO₂+0.1%NH₃作为洗脱剂),得到:

[0185] 第一洗脱异构体实例8(a) [3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺(48mg,20%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,30℃)δ2.07-2.00(1H,m),2.31-2.22(1H,m),2.40(3H,s),3.34(3H,s),3.58-3.41(3H,m),3.71(1H,dd),4.38-4.34(1H,m),5.01(1H,s),6.83(1H,d),7.49-7.04(6H,m),7.71(1H,d),12.31(1H,s)。m/z:ES⁺[M+H]⁺492。

[0186] 第二洗脱异构体实例8(b) [3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺(45mg,19%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,30℃)δ2.08-2.00(1H,m),2.34-2.21(1H,m),2.40(3H,s),3.32(3H,s),3.57-3.42(3H,m),3.71(1H,dd),4.36(1H,m),5.01(1H,s),6.82(1H,d),7.49-7.04(6H,m),7.69(1H,d),12.26(1H,s)。m/z:ES⁺[M+H]⁺492。

[0187] 实例9(a)和9(b)

[0188] (2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺和(2R)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺



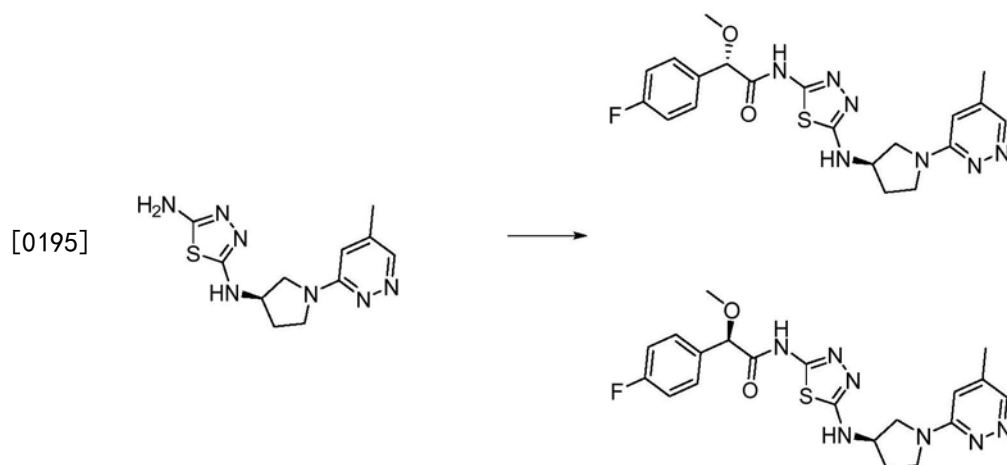
[0190] 在21℃下,在N₂下,将HATU(811mg,2.13mmol)添加到在DMF(12mL)中的2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-乙酸(中间体20,454mg,1.96mmol)、N2-[(3R)-1-(6-氟吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体4,500mg,1.78mmol)和DIPEA(0.31mL,1.78mmol)中。将所得到的溶液在21℃下搅拌持续45分钟。将该粗产物通过离子交换层析,使用SCX柱进行纯化。使用1MNH₃的MeOH溶液将所需产物从柱上洗脱,并将级分蒸发为胶状物。将粗产物通过FCC(SiO₂,0-8%MeOH的DCM溶液)纯化。将级分蒸发至干,得到胶状固体。将粗产物通过FCC(SiO₂,0-9%MeOH的EtOAc溶液)进一步纯化。将纯级分蒸发至干,用DCM/乙醚研磨,过滤,得到为黄色固体(210mg)的非对映异构体的混合物。通过制备型HPLC(Phenomenex Lux C2柱,20μm,50mm×250mm,使用EtOH作为洗脱液,120mL/min)分离非对映异构体,得到:

[0191] 第一洗脱异构体实例9(a) (2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺(72mg,8%)。¹HNMR(400MHz,DMSO,30℃)δ2.02(1H,dd),2.25(1H,dq),3.29(3H,s),3.39-3.57(3H,m),3.70(1H,dd),4.34(1H,d),4.98(1H,s),6.97-7.25(3H,m),7.27-7.35(2H,m),7.38-7.48(1H,m),7.64(1H,d),12.19(1H,s).m/z:ES⁻[M-H]⁻494。

[0192] 第二洗脱异构体实例9(b) (2R)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-N-[5-[[(3R)-1-(6-氟吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺(95mg,11%)。¹HNMR(400MHz,DMSO,30℃)δ2.02(1H,dd),2.25(1H,dq),3.29(3H,s),3.39-3.57(3H,m),3.70(1H,dd),4.34(1H,d),4.98(1H,s),6.97-7.25(3H,m),7.27-7.35(2H,m),7.38-7.48(1H,m),7.64(1H,d),12.19(1H,s).m/z:ES⁻[M-H]⁻494。

[0193] 实例10(a)和10(b)

[0194] (2S)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺和(2R)-2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基吡啶-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺



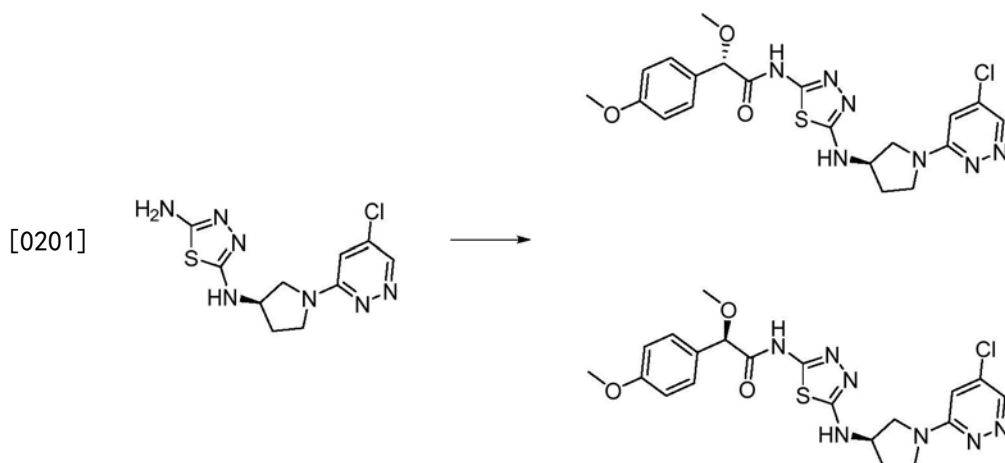
[0196] 在室温下,在 N_2 下,将N2-[(3R) -1- (5-甲基哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基] -1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体7,100mg,0.36mmol)和2- (4-氟苯基) -2-甲氧基乙酸(中间体16,66mg,0.36mmol)溶解在DMF (2.0mL) 中。将混合物搅拌5分钟,然后添加DIPEA (0.09mL,0.54mmol) 和HATU (165mg,0.43mmol),然后在室温下搅拌过夜。使粗混合物通过5gSCX柱,用MeOH洗涤,然后用2M NH_3 的MeOH溶液洗脱。蒸发碱性级分,得到橙色胶状物。粗产物通过制备型HPLC (SunFireC18柱,5 μ m,50mm $\times$ 19mm,25mL/min) 纯化。使用极性比率渐减的含有0.1%甲酸的水和MeCN作为流动相。合并含有所需物质的级分,蒸发并通过5gSCX柱,用MeOH洗涤,然后用2M NH_3 的MeOH溶液洗脱。蒸发碱性级分,得到为灰白色固体 (70mg) 的非对映异构体的混合物。非对映异构体通过制备型HPLC (LuxC4柱,20 μ m,50mm $\times$ 250mm,100%MeOH,120mL/min) 分离,得到:

[0197] 第一洗脱异构体实例10 (a) 2- (4-氟苯基) -2-甲氧基-N-[5-[[(3R) -1- (5-甲基哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基] 氨基] -1,3,4-噻二唑-2-基] 乙酰胺 (25mg,16%)。 1H NMR (400MHz, DMSO, 30 $^{\circ}C$) 2.01-2.11 (1H,m), 2.20 (3H,s), 2.28 (1H,dt), 3.31 (3H,s), 3.48 (1H,dd), 3.52-3.61 (2H,m), 3.74 (1H,dd), 4.33-4.41 (1H,m), 4.98 (1H,s), 6.69 (1H,s), 7.21 (2H,t), 7.47-7.53 (2H,m), 7.63 (1H,d), 8.36 (1H,s), 12.20 (1H,s)。m/z: $ES^+[M+H]^+444$ 。

[0198] 第二洗脱异构体实例10 (b) 2- (4-氟苯基) -2-甲氧基-N-[5-[[(3R) -1- (5-甲基哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基] 氨基] -1,3,4-噻二唑-2-基] 乙酰胺 (26mg,17%)。 1H NMR (400MHz, DMSO, 30 $^{\circ}C$) 2.00-2.1 (1H,m), 2.21 (3H,s), 2.27 (1H,dt), 3.31 (3H,s), 3.45-3.60 (3H,m), 3.74 (1H,dd), 4.32-4.40 (1H,m), 4.97 (1H,s), 6.69 (1H,d), 7.17-7.25 (2H,m), 7.47-7.53 (2H,m), 7.59 (1H,d), 8.36 (1H,d)。m/z: $ES^+[M+H]^+444$ 。

[0199] 实例11 (a) 和11 (b)

[0200] (2S) -N-[5-[[(3R) -1- (5-氯哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基] 氨基] -1,3,4-噻二唑-2-基] -2-甲氧基-2- (4-甲氧基苯基) 乙酰胺和(2R) -N-[5-[[(3R) -1- (5-氯哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基] 氨基] -1,3,4-噻二唑-2-基] -2-甲氧基-2- (4-甲氧基苯基) 乙酰胺



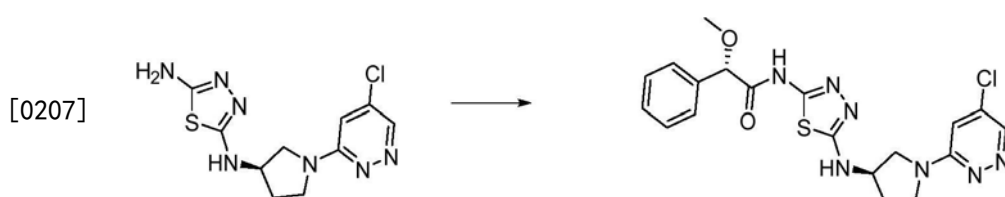
[0202] 将N2-[(3R) -1- (5-氯哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体9,100mg,0.34mmol)和2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酸(中间体21,70mg,0.34mmol)溶解在DMF(2.0mL)中,并且用DIPEA(0.15mL,0.84mmol)和HATU(190mg,0.50mmol)处理,然后在室温下搅拌过夜。将粗混合物用水(10mL)稀释并萃取到DCM(10mL)中。然后蒸发DCM,将粗产物通过制备型HPLC(SunFireC18柱,5 μ m,50mm $\times$ 19mm,25mL/min)纯化。使用极性比率渐减的含有0.1%甲酸的水和MeCN作为流动相。合并含有所需物质的级分,蒸发并通过SCX柱,用MeOH洗涤,然后用2MNH₃的MeOH溶液洗脱。蒸发碱性级分,得到为灰白色固体(35mg)的非对映异构体的混合物。非对映异构体通过制备型HPLC(LuxC4柱,20 μ m,50mm $\times$ 250mm,100% MeOH,120mL/min)分离,得到:

[0203] 第一洗脱异构体实例11(a) N-[5-[[(3R) -1- (5-氯哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酰胺(12mg,7.5%)。¹HNMR(400MHz,DMSO,30 $^{\circ}$ C) 2.03-2.13(1H,m),2.23-2.33(1H,m),3.49-3.63(3H,m),3.75(3H,s),3.76-3.80(1H,m),4.33-4.42(1H,m),4.89(1H,s),6.90-6.96(2H,m),7.10(1H,d),7.34-7.41(2H,m),7.60(1H,d),8.55(1H,d),12.10(1H,s);m/z:ES⁺[M+H]⁺476.3H被3.3ppm处的水峰掩蔽

[0204] 第二洗脱异构体实例11(b) N-[5-[[(3R) -1- (5-氯哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酰胺(15mg,9.4%)。¹HNMR(400MHz,DMSO,30 $^{\circ}$ C) 2.01-2.12(1H,m),2.22-2.31(1H,m),3.27(3H,s),3.47-3.62(3H,m),3.75(3H,s),3.76-3.79(1H,m),4.33-4.42(1H,m),4.86(1H,s),6.89-6.96(2H,m),7.10(1H,d),7.34-7.41(2H,m),7.51(1H,d),8.55(1H,d)。m/z:ES⁺[M+H]⁺476。

[0205] 实例12

[0206] (2S)-N-[5-[[(3R) -1- (5-氯哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-苯基-乙酰胺



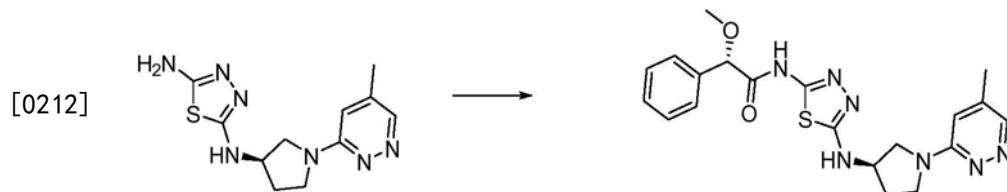
[0208] 将DIPEA(0.04mL,0.20mmol),N2-[(3R) -1- (5-氯哒嗪-3-基) 吡咯烷-3-基]-1,3,

4-噻二唑-2,5-二胺(中间体9,40mg,0.13mmol)和(2S)-2-甲氧基-2-苯基乙酸(20mg,0.13mmol)添加到在DMF(2mL)中的HATU(61mg,0.16mmol)溶液中。将混合物在25℃下搅拌18小时。然后将其用水(5mL)稀释,然后萃取到DCM(10mL)中并在减压下蒸发。粗产物通过制备型HPLC(SunFireC18柱,5 μ m,50mm $\times$ 19mm,25mL/min)纯化。使用极性比率渐减的含有0.1%甲酸的水和MeCN作为流动相。然后蒸发适当的级分并通过碱性制备色谱法再次纯化。使用XBridge柱(5微米,C18,50 $\times$ 19mm)。将极性比率渐减的含有0.1%氢氧化铵和乙腈的水用作流动相。然后将纯级分蒸发并在真空烘箱中干燥,得到:

[0209] 为白色固体的(2S)-N-[5-[[(3R)-1-(5-氯哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-苯基-乙酰胺(15mg,25%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,25℃) δ 1.98-2.14(1H,m),2.17-2.36(1H,m),3.30(3H,s),3.44-3.64(3H,m),3.69-3.81(1H,m),4.28-4.42(1H,m),4.96(1H,s),7.11(1H,d),7.30-7.47(5H,m),7.69(1H,d),8.55(1H,d),12.24(1H,s).m/z:ES⁺[M+H]⁺446,448。

[0210] 实例13

[0211] (2S)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-苯基-乙酰胺



[0213] 将DIPEA(0.09mL,0.54mmol),HATU(164mg,0.43mmol)和(2S)-2-甲氧基-2-苯基乙酸(60mg,0.36mmol)添加到在DMF(2mL)中的N2-[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体7,100mg,0.36mmol)溶液中。将混合物在室温下搅拌2小时。然后将其用水(5mL)稀释,萃取到DCM(10mL)中并在减压下蒸发。粗产物通过制备型HPLC(SunFireC18柱,5 μ m,50mm $\times$ 19mm,25mL/min)纯化。使用极性比率渐减的含有0.1%甲酸的水和MeCN作为流动相。然后将收集的级分通过SCX柱,用甲醇洗涤,然后用2M氨的甲醇溶液洗脱。蒸发氨(在甲醇中),并将残余物在真空烘箱中干燥,得到:

[0214] 为白色固体的(2S)-2-甲氧基-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-苯基-乙酰胺(28mg,18%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,25℃) δ 2.01-2.10(1H,m),2.19(3H,s),2.22-2.34(1H,m),3.31(3H,s),3.42-3.60(3H,m),3.70-3.74(1H,m),4.30-4.42(1H,m),4.98(1H,s),6.70(1H,s),7.30-7.42(3H,m),7.43-7.49(2H,m),7.70(1H,d),8.35(1H,s),12.26(1H,s).m/z:ES⁺[M+H]⁺426

[0215] 其他实例

[0216] 以与上述实例类似的方式制备以下实例的化合物。

[0217]	实例编号	名称	MS 数据
--------	------	----	-------

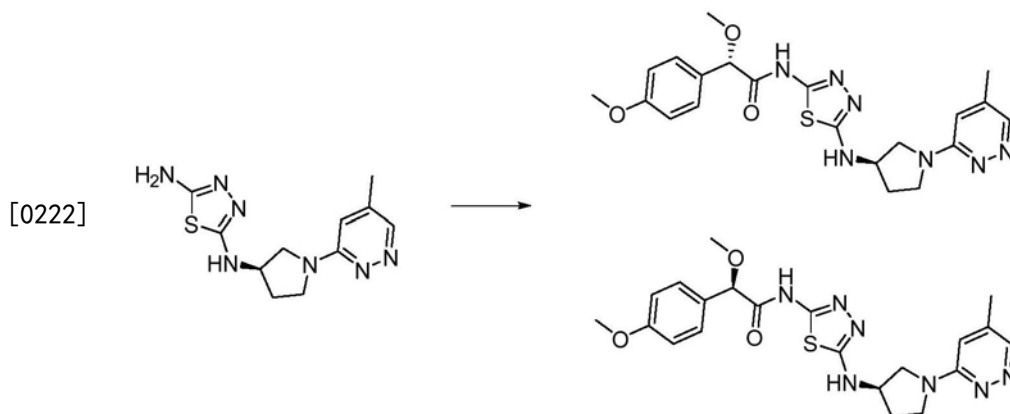
[0218]

14	(2 <i>S</i>)-2-甲氧基- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-苯基-乙酰胺	<i>m/z</i> :ES+ [<i>M</i> + <i>H</i>]+ 425
15	2-乙氧基-2-(4-甲氧基苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺	<i>m/z</i> :ES+ [<i>M</i> + <i>H</i>]+ 470
16	2-乙氧基-2-(4-甲氧基苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺	<i>m/z</i> :ES+ [<i>M</i> + <i>H</i>]+ 470
17	<i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 514
18	<i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 514
19	2-(4-氟苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 448;
20	2-(4-氟苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 448
21	<i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酰胺	<i>m/z</i> (ES-), [<i>M</i> - <i>H</i>]- = 458
22	<i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酰胺	<i>m/z</i> (ES-), [<i>M</i> - <i>H</i>]- = 458
23	2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 478
24	2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 478
25	2-乙氧基-2-(4-氟苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 462
26	2-乙氧基-2-(4-氟苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 462
27	2-乙氧基-2-(4-氟苯基)- <i>N</i> -[5-[[<i>(3R)</i>]-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺	<i>m/z</i> (ES+), [<i>M</i> + <i>H</i>]+ = 458

[0219]	28	2-乙氧基-2-(4-氟苯基)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺	m/z (ES+), [M+H] ⁺ = 458
	29	2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺	m/z (ES+), [M+H] ⁺ = 456
	30	2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺	m/z (ES+), [M+H] ⁺ = 456
	31	(2S)-2-甲氧基-N-[5-[[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-苯基-乙酰胺	m/z (ES+), [M+H] ⁺ = 426
	32	(2S)-N-[5-[[[(3R)-1-(5-氯哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]-2-甲氧基-2-苯基-乙酰胺	m/z (ES+), [M+H] ⁺ = 446

[0220] 实例33 (a) 和33 (b)

[0221] (2R)-2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-N-[5-[[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺和(2S)-2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-N-[5-[[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺



[0223] 在室温下,在N₂下,将N2-[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺(中间体7,0.05g,0.173mmol)和N-[(二甲基氨基)(3H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧基)亚甲基]-N-甲基甲基铵六氟磷酸盐,HATU(0.08g,0.208mmol)溶解在DMF(2mL)中。将混合物搅拌5分钟,然后添加2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酸(中间体21,0.04g,0.173mmol)和DIPEA(0.05mL,0.26mmol)。将反应在室温下在N₂下搅拌过夜。使粗混合物通过5gSCX柱,用MeOH洗涤,然后用2MNH₃的MeOH溶液洗脱。在减压下蒸发碱性级分,得到为橙色胶状物的不纯的产物。粗产物通过制备型HPLC(SunFireC18柱,5μm,50mm×19mm,25mL/min)纯化。将极性比率渐减的含有0.1%甲酸的水和MeCN用作流动相。将含有所需物质的级分合并,在减压下蒸发,通过5gSCX柱,用MeOH洗涤,然后用2MNH₃的MeOH溶液洗脱。在减压下蒸发碱性级分,得到为灰白色固体的非对映异构体的混合物。通过制备型手性SFC(LuxC1柱,5μm,21.2mm×250mm,流速50mL/min,波长210nm,用40:60MeOH:CO₂+0.1%NH₃作为洗脱液)分离非对映异构体,得到:

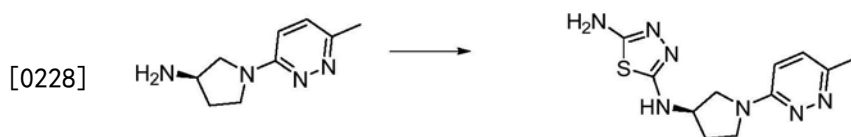
[0224] 第一洗脱异构体实例33 (a) 2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-N-[5-[[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺(6.6mg,8%)。¹HNMR

(400MHz, DMSO-d₆) δ 12.18 (1H, s), 8.36 (1H, d), 7.68 (1H, d), 7.41-7.34 (2H, m), 6.99-6.90 (2H, m), 6.71 (1H, s), 4.90 (1H, s), 4.45-4.30 (1H, m), 3.74 (3H, s), 3.64-3.37 (4H, m), 3.27 (3H, s), 2.35-2.23 (1H, m), 2.20 (3H, s), 2.09-1.98 (1H, m). m/z: ES⁺[M+H]⁺456.

[0225] 第二洗脱实例33 (b) 2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-N-[5-[[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基]-1,3,4-噻二唑-2-基]乙酰胺 (5.7mg, 6%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 12.18 (1H, s), 8.35 (1H, d), 7.66 (1H, d), 7.37 (2H, d), 6.94 (2H, d), 6.70 (1H, d), 4.89 (1H, s), 4.43-4.29 (1H, m), 3.74 (3H, s), 3.73-3.69 (1H, m), 3.60-3.45 (3H, m), 3.27 (3H, s), 2.34-2.23 (1H, m), 2.20 (3H, s), 2.10-2.01 (1H, m). m/z: ES⁺[M+H]⁺456.

[0226] 中间体1

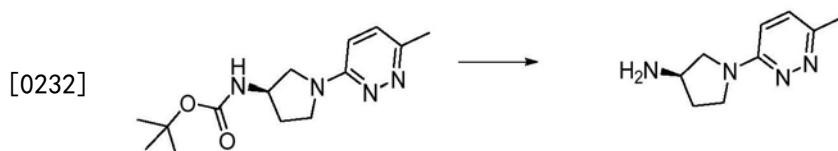
[0227] N2-[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺



[0229] 将5-溴-1,3,4-噻二唑-2-胺 (912mg, 5.07mmol)、(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-胺 (中间体2, 860mg, 4.83mmol) 和DIPEA (0.924mL, 5.31mmol) 溶解到DMF (10mL) 中。将反应加热至100℃持续1小时, 然后在室温下放置过夜。将该粗产物通过离子交换层析, 使用SCX柱进行纯化。使用1M NH₃的MeOH溶液将所需产物从柱上洗脱, 将纯级分蒸发至干燥, 得到粗产物。将其溶于DCM/MeOH中, 吸附到二氧化硅上并通过FCC (SiO₂, 0至20% MeOH的DCM溶液) 纯化。将纯级分蒸发至干, 得到为棕色胶状物的N2-[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺 (350mg, 26%)。m/z: ES⁺[M+H]⁺278.

[0230] 中间体2

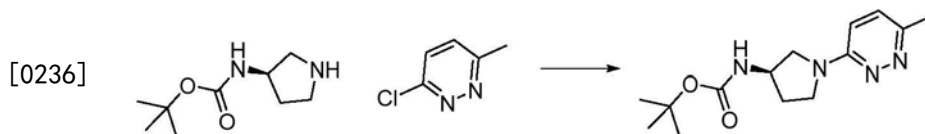
[0231] (3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-胺



[0233] 在21℃下, 在氮气下, 将三氟乙酸 (12mL) 添加到在DCM (60mL) 中的叔丁基N-[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯 (中间体3, 2.1g, 7.54mmol) 中。将所得溶液在21℃下搅拌2小时。将粗产物通过离子交换色谱法使用SCX柱纯化。使用7M NH₃的MeOH溶液从柱上洗脱所需产物, 并将纯级分蒸发至干燥, 得到为黄色油状物的(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-胺 (1.6g, 119%), 将其静置固化。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, 27℃) δ 1.56-1.8 (1H, m), 2.04 (1H, m), 2.39 (3H, s), 3.07 (1H, m), 3.37-3.43 (1H, m), 3.47-3.66 (3H, m), 4.08 (1H, s), 6.73 (1H, d), 7.19 (1H, d). m/z: ES⁺[M+H]⁺179.

[0234] 中间体3

[0235] 叔丁基N-[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯

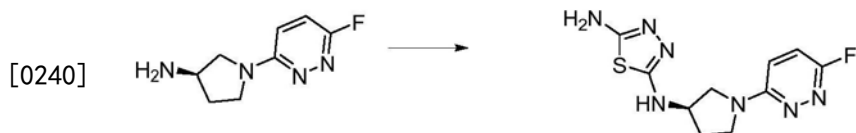


[0237] 将DIPEA (8.49mL, 48.62mmol)、叔丁基N-[(3R)-吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯 (3.62g,

19.45mmol)、3-氯-6-甲基哒嗪(2.5g,19.45mmol)和正丁醇(30mL)的混合物在130℃下搅拌12小时,然后冷却过周末。蒸发反应混合物并且将粗产物通过FCC(SiO_2 ,0至10%1M NH_3 的MeOH的EtOAc溶液)纯化。将纯级分蒸发至干,得到为黄色固体的叔丁基N-[(3R)-1-(6-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯(2.1g,38.8%)。 ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6 ,27℃) δ 1.39(9H,s),1.88(1H,m),2.14(1H,m),2.40(3H,s),3.23(1H,m),3.37-3.45(1H,m),3.47-3.58(1H,m),3.61(1H,m),3.99-4.2(1H,m),6.77(1H,d),7.20(2H,m);m/z:ES $^+$ [M+H] $^+$ 279。

[0238] 中间体4

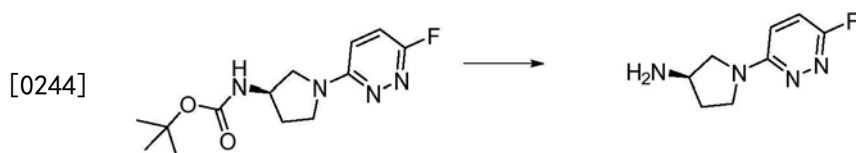
[0239] N2-[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噁二唑-2,5-二胺



[0241] 在室温下,将DIPEA(3.48mL,19.96mmol)添加到无水DMF(40mL)中的5-溴-1,3,4-噁二唑-2-胺(1.797g,9.98mmol)和(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-胺(中间体5,2g,10.98mmol)中。将所得溶液在80℃下搅拌4小时。将粗产物通过离子交换色谱法使用SCX柱纯化。使用1M NH_3 的MeOH溶液从柱上洗脱所需产物,并且将纯级分蒸发至干,得到为棕色固体的N2-[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噁二唑-2,5-二胺(2.9g,103%)。 ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6 ,30℃) δ 1.90-2.12(1H,m),2.23(1H,dt),3.42(1H,dd),3.47-3.61(2H,m),3.69(1H,dd),4.25(1H,dq),6.25(2H,s),7.04(1H,d),7.14(1H,dd),7.33(1H,dd).m/z:ES $^+$ [M+H] $^+$ 282。

[0242] 中间体5

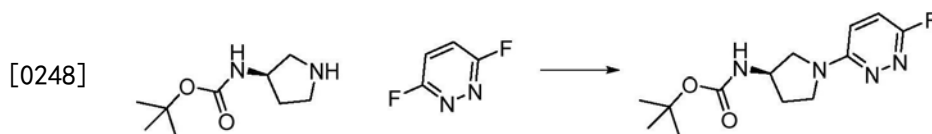
[0243] (3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-胺



[0245] 在25℃下,将叔丁基N-[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯(中间体6,6g,21.25mmol)添加到DCM(70mL)和TFA(14.00mL)中。将所得溶液在25℃下搅拌4小时。将粗产物通过离子交换色谱法使用SCX柱纯化。使用1M NH_3 的MeOH溶液将所需产物从柱上洗脱,将纯级分蒸发至干燥,得到为浅黄色胶状固体的(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-胺(2.0g,52%)。 ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6 ,30℃) δ 1.55-1.83(1H,m),1.98-2.13(1H,m),2.89-3.14(1H,m),3.29-3.43(1H,m),3.54(3H,ddt),7.06(1H,dd),7.30(1H,dd).m/z:ES $^+$ [M+H] $^+$ 183。

[0246] 中间体6

[0247] 叔丁基N-[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯

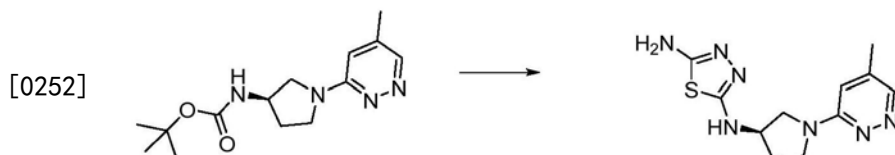


[0249] 将3,6-二氟哒嗪(6.06g,52.21mmol)叔丁基N-[(3R)-吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯(9.72g,52.21mmol)、DIPEA(22.80mL,130.53mmol)和正丁醇(140mL)的混合物在130℃下搅

拌10小时。将反应混合物用EtOAc (750mL) 稀释,并用水 (150mL) 洗涤两次。将有机层经 Na_2SO_4 干燥,过滤并蒸发以提供粗产物。然后将其溶于DCM中,粗产物通过FCC (SiO_2 , 30% -65% EtOAc的庚烷溶液) 纯化。将纯级分蒸发至干,得到为奶油状固体的叔丁基N-[(3R)-1-(6-氟哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯(15g, 102%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , 30°C) δ 1.46 (9H, s), 1.91-2.13 (1H, m), 2.32 (1H, dq), 3.40 (1H, dd), 3.56-3.72 (2H, m), 3.78 (1H, dd), 4.37 (1H, s), 4.70 (1H, s), 6.78 (1H, dd), 6.98 (1H, dd). m/z : $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 283$ 。

[0250] 中间体7

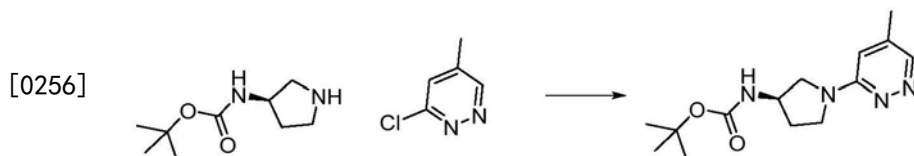
[0251] N2-[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺



[0253] 将叔丁基(3R)-3-[(5-甲基哒嗪-3-基)氨基]吡咯烷-1-甲酸酯(中间体8, 200mg, 0.72mmol)溶于DCM (5mL) 中,并用TFA (5mL) 处理。将其在室温下搅拌2小时,然后蒸发至干,得到黄色油状物。然后将其溶于乙腈 (5mL) 中,用DIPEA (0.38mL, 2.15mmol) 处理,接着用5-溴-1,3,4-噻二唑-2-基胺 (130mg, 0.72mmol) 处理,然后加热至80°C持续3小时。将反应混合物蒸发并通过FCC (SiO_2 , 0-10% 2M NH_3 的MeOH(在DCM中) 溶液) 纯化。合并含有产物的级分并蒸发,得到N2-[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺 (100mg, 50%)。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 25°C) δ 1.99-2.05 (1H, m), 2.18-2.31 (4H, m), 3.38-3.58 (3H, m), 3.67-3.71 (1H, m), 4.19-4.30 (1H, m), 6.31 (2H, s), 6.70 (1H, s), 7.09 (1H, d), 8.36 (1H, s). m/z : $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 278$ 。

[0254] 中间体8

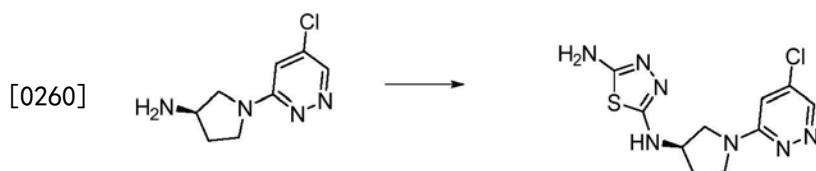
[0255] 叔丁基(3R)-3-[(6-氯哒嗪-3-基)氨基]吡咯烷-1-甲酸酯



[0257] 将叔丁基N-[(3R)-吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯(250mg, 1.34mmol)溶解到1-丁醇 (2mL) 中,并且用3-氯-5-甲基哒嗪 (0.25M在DCM中, 2.68mL, 1.34mmol) 处理,随后用DIPEA (0.48mL, 2.68mmol) 处理。将混合物加热至140°C持续2小时。将反应混合物冷却至室温,用水 (10mL) 稀释并萃取到DCM (10mL) 中。蒸发溶剂并且并通过FCC (SiO_2 , 0-10% 甲醇的DCM溶液) 纯化残余物。合并含有产物的级分并蒸发,得到叔丁基N-[(3R)-1-(5-甲基哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯 (200mg, 53%)。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 25°C) δ 1.40 (9H, s), 1.85-1.93 (1H, m), 2.07-2.18 (1H, m), 2.20 (3H, s), 3.24-3.28 (1H, m), 3.38-3.48 (1H, m), 3.48-3.59 (1H, m), 3.60-3.65 (1H, m), 4.10-4.15 (1H, m), 6.67 (1H, s), 7.24 (1H, d), 8.35 (1H, d). m/z : $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 279$ 。

[0258] 中间体9

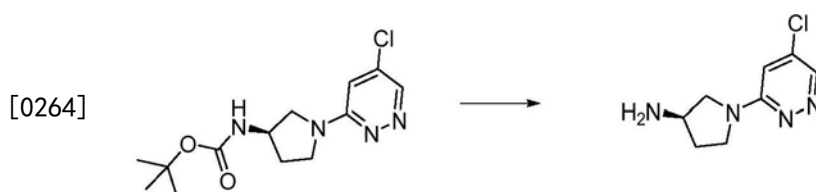
[0259] N2-[(3R)-1-(5-氯哒嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺



[0261] 将(3R)-1-(5-氯吡嗪-3-基)吡咯烷-3-胺(中间体10, 50mg, 0.25mmol)溶解于乙腈(5mL)中,随后用DIPEA(0.07mL, 0.38mmol)处理,随后通过5-溴-1,3,4-噻二唑-2-基胺(50mg, 0.25mmol)处理,并加热至80℃持续3小时。然后蒸发反应混合物并通过FCC(SiO₂, 0-10% 2MNH₃的MeOH(在DCM中)溶液)纯化。合并含有产物的级分,蒸发,得到N2-[(3R)-1-(5-氯吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]-1,3,4-噻二唑-2,5-二胺,其直接用于下一步(50mg, 66%) m/z: ES⁺[M+H]⁺ 298, 300。

[0262] 中间体10

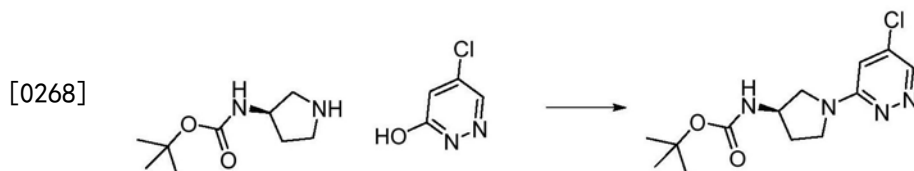
[0263] (3R)-1-(5-氯吡嗪-3-基)吡咯烷-3-胺



[0265] 将叔丁基N-[(3R)-1-(5-氯吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯(中间体11, 77mg, 0.25mmol)溶于DCM(1mL)中,并且用TFA(1mL)处理,并在室温下搅拌2小时。然后将其蒸发至干,并通过SCX柱,用甲醇洗涤并用2M甲醇氨洗脱。蒸发碱性级分,得到(3R)-1-(5-氯吡嗪-3-基)吡咯烷-3-胺,其直接用于下一步(50mg, 99%) m/z: ES⁺[M+H]⁺ 199, 201。

[0266] 中间体11

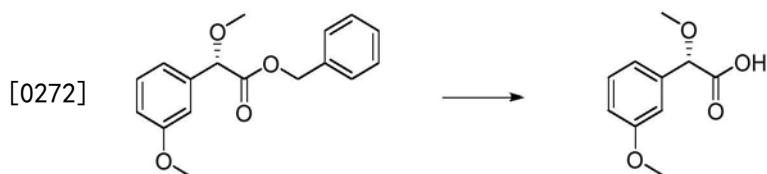
[0267] 叔丁基N-[(3R)-1-(5-氯吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯



[0269] 将5-氯吡嗪-3-醇(0.2g, 1.53mmol)溶于DCM(2mL)和三乙胺(0.47mL, 3.37mmol)中,并冷却至-20℃。然后用三氟甲磺酸酐(1M在DCM中, 3.22mL, 3.22mmol)滴加处理。然后使反应混合物缓慢返回至室温。通过添加水(10mL)淬灭,并萃取到DCM(10mL)中。将有机物用1M HCl(10mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并蒸发,得到(5-氯吡嗪-3-基)三氟甲磺酸酯。然后将其溶于DMF(2mL)中,并冷却至0℃,然后用三乙胺(0.21mL, 1.53mmol)和叔丁基N-[(3R)-吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯(290mg, 1.53mmol)处理。然后使其回到室温,用水(20mL)稀释并萃取到DCM(20mL)中。将有机物蒸发并通过FCC(SiO₂, 0-10% MeOH的DCM溶液)纯化。合并含有产物的级分,蒸发,得到叔丁基N-[(3R)-1-(5-氯吡嗪-3-基)吡咯烷-3-基]氨基甲酸酯,(77mg, 17%)。 ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, 25℃) δ 1.40 (9H, s), 1.84-1.99 (1H, m), 2.05-2.20 (1H, m), 3.32-3.34 (1H, m), 3.42-3.60 (2H, m), 3.60-3.73 (1H, m), 4.00-4.28 (1H, m), 7.08 (1H, d), 7.26 (1H, d), 8.55 (1H, d) m/z: ES⁺[M+H]⁺ 299, 301。

[0270] 中间体12

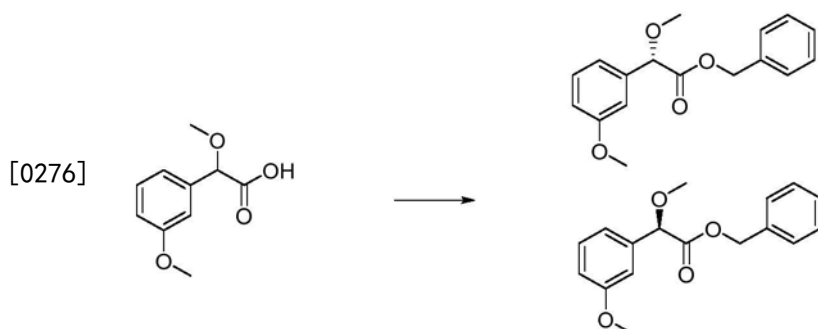
[0271] (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸



[0273] 将在乙醇中的苄基 (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基) 乙酸酯 (中间体13 (a), 7.85g, 27.42mmol) 和10%Pd/C (1g, 27.42mmol) 在氢气氛下在环境温度下搅拌4小时。将反应混合物通过硅藻土过滤, 用MeOH洗涤。然后蒸发有机物, 得到透明油状的 (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基) 乙酸 (6.0g, 112%, 含有一些MeOH)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆, 30°C) δ3.29 (3H, s), 3.74 (3H, s), 4.72 (1H, s), 6.77-7.06 (3H, m), 7.28 (1H, t), 12.77 (1H, s)。

[0274] 中间体13 (a)

[0275] 苄基 (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基) 乙酸



[0277] 在21°C下, 在氮气下, 将苄基溴化物 (7.81mL, 65.75mmol) 逐滴添加到在DMF (200mL) 中的2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基) 乙酸 (中间体14, 10.75g, 54.79mmol)、碳酸钾 (11.36g, 82.19mmol) 中。将所得混合物在85°C下搅拌4小时, 然后在环境温度下搅拌过周末。将反应混合物用EtOAc (600mL) 稀释, 并用水 (200mL) 洗涤两次。将有机层用Na₂SO₄干燥, 过滤并蒸发, 得到粗产物, 将其通过FCC纯化 (SiO₂ 10%-25%EtOAc的庚烷溶液)。将纯级分蒸发至干, 得到无色油状物 (10.5g)。

[0278] 在21°C下, 在氮气下, 将苄基溴化物 (5.59mL, 47.09mmol) 逐滴添加到在DMF (150mL) 中的2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基) 乙酸 (中间体14, 7.7g, 39.25mmol)、碳酸钾 (8.14g, 58.87mmol) 中。将所得混合物在85°C下搅拌4小时, 然后在环境温度下搅拌过周末。

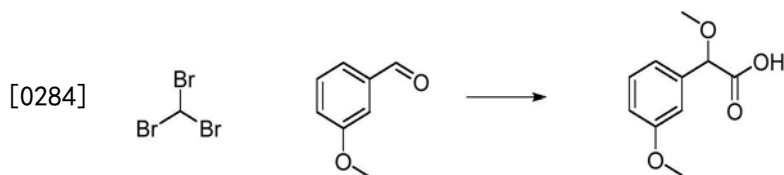
[0279] 然后将反应在85°C下再加热4小时, 然后冷却至室温。将反应混合物用EtOAc (500mL) 稀释, 并用水 (200mL) 洗涤两次。将有机层经Na₂SO₄干燥, 过滤并蒸发以提供粗产物。粗产物通过FCC (SiO₂ 10%-25%EtOAc的庚烷溶液) 纯化。将纯级分蒸发至干, 得到浅黄色油状物 (6g)。将来自两个反应的产物合并, 并通过手性HPLC分离对映体。(ChiralpakOD柱, 20μm, 100mm×250mm, 使用庚烷:EtOH的95/5混合物作为洗脱剂, 250mL/min)。将含有所需化合物的级分蒸发至干, 得到:

[0280] 第一洗脱异构体中间体13 (a) 苄基 (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基) 乙酸酯 (7.86g, 39%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆, 27°C) δ3.37 (3H, s), 3.78 (3H, s), 5.02 (1H, s), 5.20 (2H, s), 6.75-7.10 (3H, m), 7.20-7.52 (6H, m)。

[0281] 第二洗脱异构体中间体13 (b) 苄基 (2R)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基) 乙酸酯 (7.9g, 39%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆, 27°C) δ3.37 (3H, s), 3.78 (3H, s), 5.02 (1H, s), 5.20 (2H, s), 6.75-7.10 (3H, m), 7.20-7.52 (6H, m)。

[0282] 中间体14

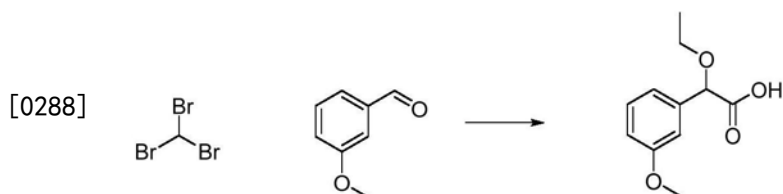
[0283] 2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸



[0285] 在0℃下,经2小时将氢氧化钾(2.267g,40.40mmol)在MeOH(10mL)中的溶液以小份添加到3-甲氧基苯甲醛(1g,7.34mmol)和溴仿(0.771mL,8.81mmol)的在MeOH(5.00mL)中的搅拌混合物中。然后将混合物温热至室温,并搅拌过夜。在减压下过滤固体,用MeOH(15mL)冲洗固体。将滤液蒸发为浓稠的白色糊状物,然后重新溶于水(50mL)中。然后将其用Et₂O(50mL)洗涤,然后将水部分酸化至pH2(约5mL2M HCl溶液)。然后将水相用EtOAc(3×50mL)萃取。将合并的有机物用MgSO₄干燥并过滤,然后减压蒸发溶剂,得到为黄色油状物(1.4g,97%)的2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆,30℃) δ 3.18(3H,s),3.75(3H,s),4.74(1H,s),6.82-7.05(3H,m),7.29(1H,m),12.78(1H,s)。

[0286] 中间体15

[0287] 2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸



[0289] 在0℃下,经1小时,向3-甲氧基苯甲醛(5.0g,36.72mmol)和溴仿(3.85mL,44.06mmol)在乙醇(40mL)中的搅拌混合物中滴加氢氧化钾(11.33g,201.98mmol)在乙醇(60mL)中的溶液。添加完成后,将混合物在室温下搅拌过夜。通过过滤除去形成的沉淀,蒸发滤液,得到糊状物,将其溶于水(100mL)中,用EtOAc(2×100mL)萃取。然后将水相用2M HCl酸化至pH=2,并用EtOAc(2×100mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并蒸发,得到浅棕色油状物。将其吸附到二氧化硅上,通过FCC(SiO₂,5%MeOH的DCM溶液)纯化,得到为浅棕色油状物的2-乙氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸(3.1g,40%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃,21℃) δ 1.28(3H,t),2.09(1H,s),3.64-3.52(2H,m),3.81(3H,s),4.86(1H,s),6.89(1H,ddd),6.99(1H,m),7.03(1H,m),7.29(1H,t).m/z:ES⁻[M-H]⁻209。

[0290] 中间体16

[0291] 2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-乙酸

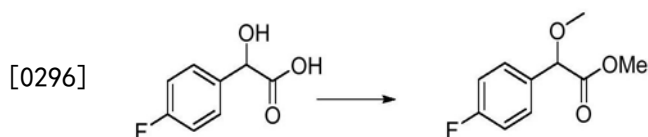


[0293] 将甲基2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-乙酸酯(中间体17,1.32g,6.66mmol)溶解到甲醇(24mL)中,并且在室温下搅拌。添加氢氧化钾(0.45g,7.992mmol)在甲醇(12mL)中的溶液,并将混合物在室温下搅拌5小时。将混合物蒸发至干,在水和EtOAc(各70mL)之间分配。将水层用EtOAc(70mL)洗涤,然后用2N盐酸酸化至pH2。然后用EtOAc(2×100mL)萃取。将有机物

干燥(MgSO_4)并蒸发,得到为透明胶状物的2-(4-氟苯基)-2-甲氧基-乙酸(1.16g,94%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) 3.42(3H,s) 4.77(1H,s), 7.10-7.04(2H,m), 7.44-7.40(2H,m)。

[0294] 中间体17

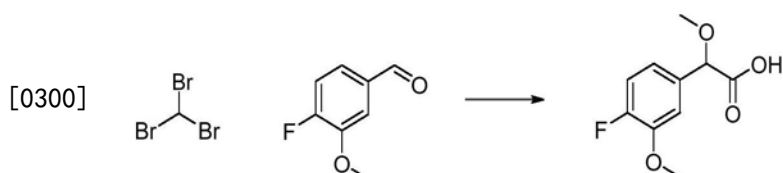
[0295] 甲基2-(4-氟苯基)-2-甲氧基乙酸酯



[0297] 在室温下,将碳酸铯(7.64g,23.45mmol)溶解到DMF(20mL)中,添加碘甲烷(2.4mL,38.55mmol),随后添加2-(4-氟苯基)-2-羟基乙酸(2.0g,11.75mmol),并将混合物在室温下搅拌48小时。在减压下蒸发DMF,并将残余物在EtOAc和水(各75mL)之间分配。将有机物用水(75mL)洗涤,干燥(MgSO_4),减压蒸发,并且通过FCC(SiO_2 ,3:1环己烷:EtOAc)纯化。将纯级分蒸发至干,得到为无色油状物的甲基2-(4-氟苯基)-2-甲氧基乙酸酯(1.68g,72%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3 ,20°C) δ 3.40(3H,s), 3.72(3H,s), 4.76(1H,s), 7.09-7.03(2H,m), 7.44-7.40(2H,m)。

[0298] 中间体18

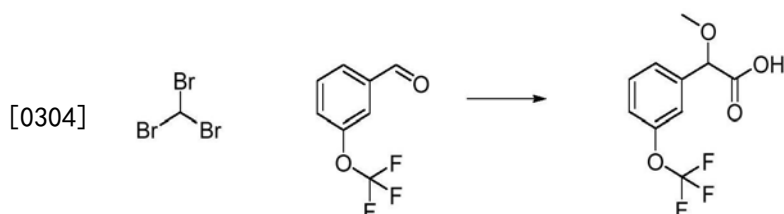
[0299] 2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-乙酸



[0301] 在0°C下,经1小时,向4-氟-3-甲氧基-苯甲醛(1.0g,6.48mmol)和溴仿(0.68mL,7.785mmol)在MeOH(10mL)中的搅拌混合物中添加氢氧化钾(2.0g,35.682mmol)的MeOH(20mL)溶液。添加后,将混合物搅拌并温热至室温过夜。通过过滤除去所得沉淀。蒸发滤液,得到糊状物,将其溶于水(100mL)中,用EtOAc(2×100mL)萃取。然后将水相用2NHC1酸化至pH=2。将其用EtOAc(2×100mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO_4),过滤并在减压下蒸发,得到粗产物。粗产物通过FCC(SiO_2 ,0-5%MeOH的DCM溶液)进一步纯化,得到为无色油状物的2-(4-氟-3-甲氧基-苯基)-2-甲氧基-乙酸(0.66g,47%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3 ,30°C) δ 3.43(3H,s), 3.90(3H,s), 4.75(1H,s), 6.95-7.00(1H,m), 7.10-7.04(2H,m)。m/z:ES⁻[M-H]⁻ 213。

[0302] 中间体19

[0303] 2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸

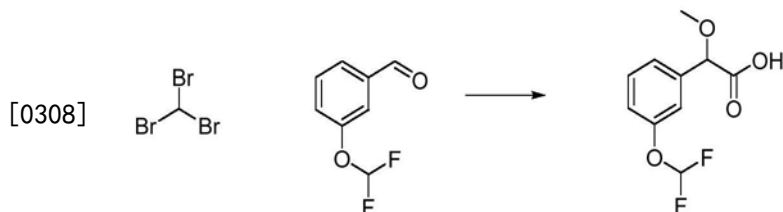


[0305] 经2小时在0°C将氢氧化钾(1.851g,33.00mmol)在MeOH(10mL)中的溶液以小份加入到3-(三氟甲氧基)苯甲醛(1.141g,6mmol)和溴仿(0.630mL,7.20mmol)在MeOH(5.00mL)中的搅拌溶液中。然后将混合物温热至室温,并搅拌过夜。在反应混合物中形成白色沉淀。

在减压下滤出固体,用MeOH(15mL)冲洗滤饼。将滤液蒸发为浓稠的白色糊状物,然后重新溶于水(50mL)中。然后将其用Et₂O(50mL)洗涤。将水相酸化至pH=2(约5mL2MHC1溶液),然后萃取到EtOAc(3×50mL)中。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并减压蒸发,得到澄清油状物。将粗产物通过FCC(SiO₂,10%-50%EtOAc的庚烷溶液)纯化。将纯级分蒸发至干,得到为无色油状物的2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸(0.832g,55%)。¹HNMR(400MHz,CDC1₃,30℃)δ3.47(3H,s),4.81(1H,s),7.20-7.24(1H,m),7.33(1H,s),7.37-7.46(2H,m).m/z:ES⁻[M-H]⁻249.4。

[0306] 中间体20

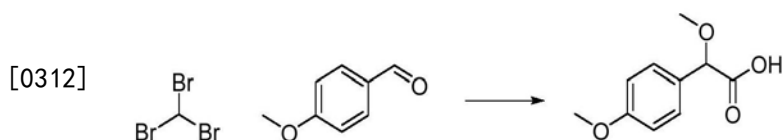
[0307] 2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-乙酸



[0309] 在0℃下,经1小时,向3-(二氟甲氧基)苯甲醛(2.0g,11.61mmol)和溴仿(1.22mL,13.94mmol)在MeOH(40mL)中的搅拌混合物中滴加氢氧化钾(3.59g,63.90mmol)的MeOH(60mL)溶液。添加完成后,将混合物温热至室温过夜搅拌。通过过滤除去沉淀,蒸发滤液,得到糊状物,将其溶于水(100mL)中,用EtOAc(2×75mL)萃取。然后将水相用2MHC1酸化至pH=1,并用EtOAc(2×75mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤,并蒸发,得到浅棕色油。将其通过FCC(SiO₂,95:5环己烷:EtOAc+0.1%甲酸,增至8:2EtOAc:环己烷+0.1%甲酸)纯化。在减压下蒸发适当的级分,得到为无色油状物的2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-乙酸(1.3g48%)。¹H NMR(400MHz,CDC1₃,21℃)δ3.46(3H,s),4.80(1H,s),6.53(1H,t),7.10-7.15(1H,m),7.22-7.23(1H,m),7.29-7.32(1H,m),7.39(1H,t).m/z:ES⁻[M-H]⁻231。

[0310] 中间体21

[0311] 2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酸



[0313] 在0℃下,经30分钟,向对甲氧基苯甲醛(3.58g,26.29mmol)和溴仿(2.76mL,31.55mmol)在MeOH(30mL)中的搅拌混合物中滴加氢氧化钾(8.12g,144.65mmol)的MeOH(60mL)溶液。添加完成后,将混合物温热至室温搅拌过夜。第二天早上通过过滤除去沉淀。蒸发滤液,得到糊状物,将其溶于水(100mL)中,用EtOAc(2×100mL)萃取,以除去任何残留的未反应的起始醛。然后将水相用2NHC1酸化至pH=2。将其用EtOAc(2×100mL)萃取。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并蒸发,得到为橙色胶状物(3.1g,60%)的2-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)乙酸。¹HNMR(400mHz,DMSO,30℃)3.27(3H,s),3.75(3H,s),4.69(1H,s),6.93(2H,d),7.30(2H,d),12.45(1H,brs).m/z:ES⁻[M-H]⁻195。

[0314] 生物分析

[0315] 使用以下测定来测量在此描述的化合物的效果:a)GLS酶效力测定;b)GLS细胞效力测定;c)GLS细胞增殖测定。在测定的描述中,通常:

[0316] i. 使用以下缩写:CO₂=二氧化碳;DMEM=杜氏改良伊格尔培养基;DMSO=二甲亚砜;EDTA=乙二胺四乙酸;EGTA=乙二醇四乙酸;FCS=胎牛血清;h=小时;NBS=非结合表面;SDS=十二烷基硫酸钠;TRIS=三(羟甲基)氨基甲烷。

[0317] ii. 使用Genedata智能拟合模型计算IC₅₀值。IC₅₀值是抑制50%生物活性的测试化合物的浓度。

[0318] 测定a):GLS酶效力测定

[0319] 使用谷氨酸氧化酶/AmpLexRed偶联测定来测量化合物在体外结合并抑制GLS1活性的能力。纯化在大肠杆菌中表达的6His标记的GLS蛋白(氨基酸63-669),并以等分试样保存在-80℃。将GLS1稀释至2x工作浓度,并在室温下孵育以允许四聚体/二聚体形式达到稳定状态。测定测量在包含50mM TRIS (pH7.8)、100mM NaPO₄ (pH7.8)、0.001%v/vTween20的缓冲液中进行。将纯化的重组GLS1蛋白在测定缓冲液中稀释至12nM,并在室温下预孵育30分钟。通过在100%DMSO中稀释以制备用于12点浓度响应的正确剂量范围并且使用LabcyteEcho555声学分配器将适当体积(2.5-60nL)分配到384孔微量测定板(Greiner产品代码784900)中来制备测试化合物。通过用DMSO溶液回填来将DMSO浓度维持在2%。然后使用BioRapr自动分配器(Beckman-Coulter)将3μL稀释的GLS1蛋白(12nM)分配到每个孔中,并在室温下孵育15分钟。然后添加3μL的在测定缓冲液中稀释的100mM谷氨酰胺,并将反应在室温孵育60分钟。然后通过添加在100mM TRIS (pH7.5)中的45μM6-(2-溴乙炔基)-2,3-二甲基-喹唑啉-4-酮、75μM AmpLexRed、0.375单位/mL辣根过氧化物酶、0.12单位/mL谷氨酸氧化酶来终止反应。在黑暗中在室温下30分钟后,使用535/590nm光学滤波器在Perkin Elmer En Vision上读取平板,并且使用Genedata分析原始数据以产生IC₅₀值。其中用测定缓冲液替换6His标记的GLS蛋白和谷氨酰胺的测定的人工制品版本也用于排除对测定组分的非特异性影响。

[0320] 测定b):GLS细胞效力测定

[0321] 通过使用测量细胞谷氨酸盐耗竭的PC3偶联测定来评价化合物抑制细胞GLS活性的潜力。通过在100%DMSO中稀释以制备用于12点浓度响应的正确剂量范围并且使用LabcyteEcho555声学分配器将适当体积(5-120nL)分配到384孔微量测定板(科宁(Corning)产品代码3712)中来制备测试化合物。通过用DMSO溶液回填来将DMSO浓度维持在0.3%。PC3细胞在不含苯酚的DMEM、10%透析的FCS、2mM谷氨酰胺中生长,并通过胰蛋白酶消化分散,以每孔 5.6×10^3 细胞在40μL生长培养基中直接接种到含有分配的化合物的384孔测定板中。在37℃下孵育6小时后,吸出5%CO₂生长培养基,并且细胞在含有10mM TRIS pH7.4、100mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1mM NaF、20mM Na₄P₂O₇、2mM Na₃VO₄、1mM Triton X-100、10%甘油、0.1%SDS和0.5%脱氧胆酸盐的15μL缓冲液中裂解。然后将4μL细胞裂解物转移到384孔NBS板(科宁产品编号3575)中,并添加35μL27.5μM AmpLex Red、0.1375U/mL辣根过氧化物酶、0.044U/mL谷氨酸氧化酶、100mM TRIS pH7.5。在黑暗中在室温下30分钟后,使用535/590nm光学滤波器在Perkin Elmer En Vision上读取平板,并且使用专有软件分析原始数据以产生IC₅₀值。

[0322] 测定c):GLS细胞增殖测定

[0323] 使用384孔板NCI-H1703细胞增殖测定法测量化合物抑制细胞生长的能力。将NCI-H1703细胞在不含酚红的RPMI1640、10%FCS和2mM谷氨酰胺中生长,并在40μL生长培养基中

以每孔750个细胞的密度接种进入澄清底384孔测定板(科宁产品代码3712)中,并在37℃, 5%CO₂下孵育24小时。通过在100%DMSO中稀释以制备用于12点浓度响应的正确剂量范围并将适当体积(5-120nL)直接分配到含有铺板细胞的测定板中来制备测试化合物。通过使用DMSO溶液回填来将DMSO浓度维持在0.3%。将板在37℃、5%CO₂孵育5天,添加SytoxGreen和皂苷至终浓度分别为2μM和0.25%,并孵育6小时,然后分析。在AcumeneX3 (TTPLabtech公司)上使用488nm激发和FITC滤光片组(500-530nm)针对发射读取平板。通过使用GeneData软件分析将曲线拟合至第零天生长的最大抑制来计算IC₅₀值。

[0324] 测定a) -c)的结果显示在表1中。

[0325] 表1. 测定数据

[0326]

实例	测定 a) 酶 IC ₅₀ μM	测定 b) GLS 细胞 MOA 平均 IC ₅₀ μM	测定 c) 增殖平均 IC ₅₀ μM
1(a)	0.0554	0.000566	0.00459
1(b)	0.406	0.137	0.454
2	0.0303	0.000965	0.0167
3	0.0388	0.000384	0.00362
4(a)	0.0792	0.000457	0.00664
4(b)	0.29	0.0431	0.389
5(a)	0.155	0.00278	0.0441
5(b)	0.975	-	1.02
6(a)	0.0827	-	0.0209
6(b)	2.53	0.0736	0.926
7(a)	0.0952	0.000556	0.00308
7(b)	0.334	0.0127	0.0256
8(a)	0.0994	0.0013	0.00548
8(b)	0.643	0.0221	0.117

[0327]

实例	测定 a) 酶 IC ₅₀ μM	测定 b) GLS 细胞 MOA 平均 IC ₅₀ μM	测定 c) 增殖平均 IC ₅₀ μM
9(a)	0.0227	0.00056	0.00309
9(b)	0.0989	0.0185	0.469
10(a)	0.0311	0.00105	1.21
10(b)	0.241	0.0179	0.204
11(a)	0.0159	-	0.0544
11(b)	0.0848	0.0105	0.129
12	0.0353	0.000451	0.00307
13	0.0592	0.000658	0.00848
14	0.0443	0.00104	0.0227
15	0.277	0.0348	0.567
16	0.0809	0.00274	0.055
17	0.0243	0.000251	0.00174
18	0.0653	0.00491	0.0168
19	0.0557	0.0047	0.0719
20	0.323	0.0795	1.27
21	0.223	0.0537	0.93
22	0.0189	0.00245	0.0369
23	0.265	0.197	0.106
24	0.0713	0.00101	0.0116
25	1.09	0.0632	0.686
26	0.0948	0.00212	0.0219
27	2.38	0.0722	1.22
28	0.096	0.00357	0.0732
29	1.28	-	0.586
30	0.119	0.00529	0.0437
31	0.0592	0.000658	0.00848
32	0.0353	0.000451	0.00307
33(a)	0.148	0.0192	0.0189
33(b)	0.0799	0.00235	0.0379