

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480018431.5

[51] Int. Cl.

C07C 323/62 (2006.01)
C07D 231/12 (2006.01)
C07D 213/32 (2006.01)
C07D 235/06 (2006.01)
C07D 233/64 (2006.01)
C07D 211/20 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 6 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100393700C

[51] Int. Cl. (续)

C07D 233/54 (2006.01)
C07D 213/83 (2006.01)
C07D 257/04 (2006.01)
C07C 255/29 (2006.01)
A61K 31/275 (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)
A61K 31/4406 (2006.01)
A61K 31/4402 (2006.01)
A61K 31/4409 (2006.01)

[22] 申请日 2004. 6. 28

[21] 申请号 200480018431.5

[30] 优先权

[32] 2003. 6. 30 [33] US [31] 60/483,678

[86] 国际申请 PCT/CA2004/000948 2004. 6. 28

[87] 国际公布 WO2005/000800 英 2005. 1. 6

[85] 进入国家阶段日期 2005. 12. 29

[73] 专利权人 麦克弗罗斯特(加拿大)公司
地址 加拿大魁北克省

[72] 发明人 C·拜利 C·布拉克 S·克兰
D·J·麦凯 R·奥巴拉
J·罗比肖

[56] 参考文献

WO0196285 A1 2001. 12. 20

WO03041649 A2 2003. 5. 22

审查员 韩 平

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张轶东 王景朝

权利要求书 6 页 说明书 61 页

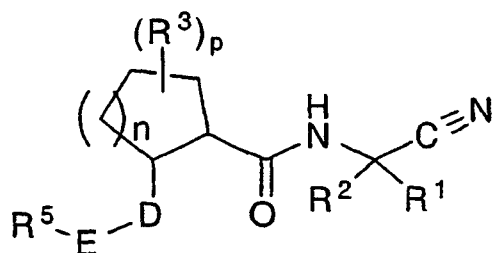
[54] 发明名称

组织蛋白酶半胱氨酸蛋白酶抑制剂

[57] 摘要

本发明涉及一类具有通式(I)的化合物,可作为半胱氨酸蛋白酶抑制剂,包括但不限于组织蛋白酶K、L、S和B的抑制剂。这些化合物可用作骨吸收抑制剂来治疗疾病,如骨质疏松症。

1. 一种下式的化合物:



其中

R^1 是氢, R^2 是氢, 或 R^1 和 R^2 与跟它们相连的碳原子一起构成 C_{3-8} 环烷基的环, 其中所述环系任选地被一个或两个独立地选自 C_{1-6} 烷基、羟烷基、卤烷基或卤素的取代基取代;

每个 R^3 独立地选自下述基团: 氢、卤素和 C_{1-2} 烷基, 其中所述烷基任选地被卤素取代; 或者两个 R^3 基团与跟它们相连的碳一起构成 C_{3-4} 的环烷基环, 其中所述基团任选地被卤素取代;

D 是芳基或杂芳基, 其中每个所述的芳基或杂芳基任选地在碳或杂原子上被一个至五个独立地选自下述基团的取代基取代: C_{1-6} 烷基、卤代烷基、卤素、酮基、烷氧基、 $-SR^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-OR^6$ 、 $-OR^7$ 、 $-N(R^7)_2$ 、 $-SO_2R^6$ 和 $-SO_2R^8$;

E 是芳基, 其任选地在碳或杂原子上被一个至五个独立地选自下述基团的取代基取代: C_{1-6} 烷基、卤代烷基、卤素、酮基、烷氧基、 $-SR^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-OR^6$ 、 $-OR^7$ 、 $-N(R^7)_2$ 、 $-SO_2R^6$ 和 $-SO_2R^8$;

R^5 是 $-SO_mR^7$ 、 $-SO_mR^6$ 、 $-R^8SR^6$ 、 $SO_mN(R^c)(R^d)$ 、 $-SO_mCH(R^8)(R^9)$ 、 $-SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})C(O)(C_{0-6} \text{ 烷基})NR^{10}$ 、 $-SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})N(R^{10})_2$ 、 $-SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})R^{10}$ 、 $-SO_m(C_{3-8} \text{ 环烷基})R^{10}$ 、 $-SO_2N(R^8)C(O)(R^7)$ 或 $-SO_2(R^8)C(O)N(R^7)_2$ 、 $-NR^8C(O)NR^8S(O)_2R^6$ 、 $-OSO_2R^8$ 、 $-N(R^8)SO_2(R^8)$ 、 $-C(R^8)(R^9)SC(R^8)(R^9)(R^6)$ 或 R^8S- 、 $-C(O)C(R^a)(R^b)S(R^a)$; 其中所述基团在碳或杂原子上任选地被一个至五个独立地选自下述基团的取代基取代: C_{1-6} 烷基、卤素、酮基、氰基、卤代烷基、羟烷基、 $-OR^6$ 、 $-OR^7$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHS(O)_2R^8$ 、 $-R^6SO_2R^7$ 、 $-SO_2R^7$ 、 $-SO(R^7)$ 、 $-SR^7$ 、 $-SR^6$ 、 $-SO_mN(R^c)(R^d)$ 、 $-SO_mN(R^8)C(O)(R^7)$ 、 $-C(R^8)(R^9)N(R^8)(R^9)$ 、 $-C(R^8)(R^9)OH$ 、 $-COOH$ 、 $-C(O)(O)(R^7)$ 、 $-C(O)(O)C(R^7)_3$ 、 $-C(R^a)(R^b)C(O)N(R^a)(R^b)$ 、 $-C(O)(R^a)$ 、 $-N(R^8)C(R^8)(R^9)(R^6)$ 、

$N(R^8)CO(R^6)$ 、 $-NH(CH_2)_2OH$ 、 $-NHC(O)OR^8$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、杂环基、芳基、杂芳基、 $(C_{1-4}$ 烷基)杂芳基和 $(C_{1-4}$ 烷基)芳基；其中 R^5 定义各不相同；

R^6 是氢、芳基、芳基 (C_{1-4}) 烷基、 $(C_{1-4}$ 烷基)芳基、杂芳基、杂芳基 (C_{1-4}) 烷基、 $(C_{1-4}$ 烷基)杂芳基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 (C_{1-4}) 烷基或杂环基 (C_{1-4}) 烷基，其中所述基团任选地被一个、两个或三个独立地选自下述基团的取代基取代：卤素、烷氧基和 $-SO_2R^7$ ；

R^7 是氢或任选地被一个、两个或三个独立地选自下述基团的取代基取代的 C_{1-6} 烷基：卤素、烷氧基、氰基、 $-N(R^8)(R^9)$ 和 $-SR^8$ ；

R^8 是氢或 C_{1-6} 烷基；

R^9 是氢或 C_{1-6} 烷基；

R^{10} 是氢、 C_{1-6} 烷基、氰基、芳基、杂芳基、杂环基、 SO_m 杂芳基、 $(C=N)O(C_{1-6}$ 烷基)或 $(C_{1-6}$ 烷基) $NH(SO_m)$ 杂芳基；

R^a 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $(C_{1-6}$ 烷基)芳基、 $(C_{1-6}$ 烷基)羟基、 $-O(C_{1-6}$ 烷基)、羟基、卤素、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基或杂环基，其中所述的烷基、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基和杂环基可以任选地在碳原子或杂原子上被一个、两个或三个独立地选自 C_{1-6} 烷基或卤素的取代基取代；

R^b 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $(C_{1-6}$ 烷基)芳基、 $(C_{1-6}$ 烷基)羟基、烷氧基、羟基、卤素、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基或杂环基，其中所述的烷基、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基和杂环基可以任选地在碳原子或杂原子上被一个、两个或三个独立地选自 C_{1-6} 烷基和卤素基团的取代基取代；

或者 R^a 和 R^b 可以与跟它们相连的或处于它们之间的碳原子一起形成 C_{3-8} 环烷基或 C_{3-8} 杂环基，其中所述的 3-8 元环系可任选地被一个或两个独立地选自 C_{1-6} 烷基和卤素的取代基取代；

R^c 是氢或 C_{1-6} 烷基，它任选地被一个、两个或三个独立地选自卤素和 $-OR^6$ 的取代基取代；

R^d 是氢或 C_{1-6} 烷基，它任选地被一个、两个或三个独立地选自卤素和 $-OR^6$ 的取代基取代；

或者 R^c 和 R^d 可以与跟它们相连的或处于它们之间的氮原子一起形成 C_{3-8} 杂环基的环，其中所述环任选地被一个或两个独立地选自 C_{1-6} 烷基、卤素、羟基、烷氧基和酮基的取代基取代；

n 是从 1 到 3 的整数;

m 是从 0 到 2 的整数;

p 是从 1 到 3 的整数;

其中,

所述芳基指的是任何稳定的在每个环中最多有 12 个原子的单环或二环碳环, 其中至少一个环是芳香环;

所述杂芳基是一种稳定的单环、二环或三环体系, 每个环中最多有 10 个原子, 其中至少一个环是芳香环并且包含从 1 到 4 个选自 O、N 和 S 的杂原子; 或其药学上可接受的盐或立体异构体。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 n 是 2。

3. 权利要求 2 的化合物, 其中每个 R^3 独立地选自氢或卤素。

4. 权利要求 2 的化合物, 其中 R^5 是 $-\text{SO}_m\text{R}^7$ 、 $-\text{SO}_m\text{R}^6$ 、 $-\text{R}^8\text{SR}^6$ 、 $\text{SO}_m\text{N}(\text{R}^c)(\text{R}^d)$ 、 $-\text{SO}_m\text{CH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ 、 $-\text{SO}_m(\text{C}_{1-6}\text{烷基})\text{C}(\text{O})(\text{C}_{0-6}\text{烷基})\text{NR}^{10}$ 、 $-\text{SO}_m(\text{C}_{1-6}\text{烷基})\text{N}(\text{R}^{10})_2$ 、 $-\text{SO}_m(\text{C}_{1-6}\text{烷基})\text{R}^{10}$; $-\text{SO}_m(\text{C}_{3-8}\text{环烷基})\text{R}^{10}$; $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^8)\text{C}(\text{O})(\text{R}^7)$ 或 $-\text{SO}_2(\text{R}^8)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^7)_2$; 其中所述基团任选地在碳或杂原子上被一个到五个独立地选自下述基团的取代基取代: C_{1-6} 烷基、卤素、酮基、氰基、卤代烷基、羟烷基、 $-\text{OR}^6$ 、 $-\text{OR}^7$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}^8$ 、 $-\text{R}^6\text{SO}_2\text{R}^7$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^7$ 、 $-\text{SO}(\text{R}^7)$ 、 $-\text{SR}^7$ 、 $-\text{SR}^6$ 、 $-\text{SO}_m\text{N}(\text{R}^c)(\text{R}^d)$ 、 $-\text{SO}_m\text{N}(\text{R}^8)\text{C}(\text{O})(\text{R}^7)$ 、 $-\text{C}(\text{R}^8)(\text{R}^9)\text{N}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ 、 $-\text{C}(\text{R}^8)(\text{R}^9)\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{O})(\text{R}^7)$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{O})\text{C}(\text{R}^7)_3$ 、 $-\text{C}(\text{R}^a)(\text{R}^b)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^a)(\text{R}^b)$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{R}^a)$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)\text{C}(\text{R}^8)(\text{R}^9)(\text{R}^6)$ 、 $-\text{N}(\text{R}^8)\text{CO}(\text{R}^6)$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OR}^8$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、杂环基、芳基、杂芳基、 $(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 杂芳基和 $(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 芳基。

5. 权利要求 1 的化合物, 选自:

- 1) (1R,2R)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
- 2) (1R,2R)-N-(1-氰基环丙基)-5,5-二氟-2-[4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基]环己烷甲酰胺;
- 3) (1R/S,2R/S)-N-(氰基甲基)-5,5-二氯-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
- 4) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[[1-甲基-3-(4-甲硫基)苯基]-1H-吡唑-4-基]环己烷甲酰胺;
- 5) N-(氰基甲基)-2-{4'-[(氰基甲基)硫基]联苯-2-基}-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

- 6) 2-{4'-[(2-氨基-2-氧代乙基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;
- 7) N-(氰基甲基)-2-[4'-({2-[(氰基甲基)-氨基]-2-氧代乙基}硫基)-联苯-2-基]-5,5-二氟环己烷甲酰胺;
- 8) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(2-吡啶-2-基-乙基)-硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;
- 9) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-2-基-甲基)-硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;
- 10) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-3-基-甲基)-硫基]-联苯-2-基}环己烷甲酰胺;
- 11) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-4-基-甲基)-硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;
- 12) 2-{4'-[(1H-苯并咪唑-6-基甲基)-硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;
- 13) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(1H-咪唑-4-基-甲基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;
- 14) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(1H-咪唑-2-基-甲基)-硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;
- 15) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[1-(1H-咪唑-2-基-甲基)-1H-咪唑-2-基]甲基}硫基-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
- 16) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[2-(1H-咪唑-4-基)乙基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
- 17) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[2-(1H-咪唑-2-基)乙基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
- 18) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
- 19) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[2-(1-甲基哌啶-4-基)乙基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
- 20) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[2'-氟-4'-(甲硫基)-联苯-2-基]环己烷甲酰胺;
- 21) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[(5-苯基-1H-咪唑-2-基)甲基]硫基}联苯-2-

基)环己烷甲酰胺;

22) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(2-吡啶-4-基乙基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

23) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-{(2-[(吡啶-2-基磺酰基)氨基]乙基)硫基}联苯-2-基]环己烷甲酰胺;

24) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[2-((吡啶-2-基磺酰基){2-[(吡啶-2-基磺酰基)氨基]乙基}氨基)乙基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺;

25) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(1H-四唑-5-基甲基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

26) 2-{4'-[(1-氰基环丙基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

27) 1-{[2'-(2-{[(氰基甲基)-氨基]羰基}-4,4-二氟环己基-联苯-4-基]硫基}环丙烷甲亚胺酸甲酯;

28) 2-(4'-{[2-(1H-苯并咪唑-2-基)乙基]硫基}联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

29) 2-{4'-[(1H-苯并咪唑-7-基甲基)-硫基]-联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

30) N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-{(2-[(甲基磺酰基)-氨基]乙基)硫基}联苯-2-基]环己烷甲酰胺;

31) 2-{4'-[(1H-苯并咪唑-2-基甲基)-硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

或其药学上可接受的盐或立体异构体。

6. N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{2-[(甲基磺酰基)-氨基]乙基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺, 其药学上可接受的盐或立体异构体。

7. 一种药物组合物, 它包含根据权利要求 1-6 中任一项的化合物、药学上可接受的盐或立体异构体以及药学上可接受的载体。

8. 根据权利要求 1-6 中任一项的化合物、药学上可接受的盐或立体异构体在制备用于治疗需要治疗的哺乳动物的下列病症的药物中的用途: 骨质疏松症、糖皮质激素诱导的骨质疏松症、佩吉特病、异常增量的骨代谢、牙周疾病、牙齿损耗、骨折、类风湿性关节炎、骨关节炎、假肢周围骨质溶解症、成骨不

全、动脉粥样硬化、肥胖症、慢性阻塞性肺病、转移性骨病、恶性高血钙和多发性骨髓瘤。

9. 一种药物组合物，它包含权利要求 1-6 中任一项的化合物、药学上可接受的盐或立体异构体以及另一种选自下列的药物：有机双膦酸盐、雌激素受体调节剂、雌激素受体 β 调节剂、雄激素受体调节剂、破骨细胞质子 ATP 酶抑制剂、HMG-CoA 还原酶抑制剂、整联蛋白受体拮抗剂或成骨细胞合成代谢剂、非甾体抗炎药、选择性环加氧酶-2 抑制剂、白介素-1 β 抑制剂、LOX/COX 抑制剂及其药学上可接受的盐和混合物。

10. 根据权利要求 1-6 中任一项的化合物、药学上可接受的盐或立体异构体和另一药物在制备治疗有所需要的哺乳动物的下述病症的药物中的用途：骨质疏松症、糖皮质激素诱导的骨质疏松症、佩吉特病、异常增量的骨代谢、牙周疾病、牙齿损耗、骨折、类风湿性关节炎、骨关节炎、假肢周围骨质溶解症、成骨不全、动脉粥样硬化、肥胖症、慢性阻塞性肺病、转移性骨病、恶性高血钙和多发性骨髓瘤，其中另一药物选自：有机双膦酸盐、雌激素受体调节剂、雄激素受体调节剂、破骨细胞质子 ATP 酶抑制剂、HMG-CoA 还原酶抑制剂、整联蛋白受体拮抗剂，或成骨细胞合成代谢药剂、非甾体抗炎药、选择性环加氧酶-2 抑制剂、白介素-1 β 抑制剂、LOX/COX 抑制剂及其药学上可接受的盐和混合物药物。

组织蛋白酶半胱氨酸蛋白酶抑制剂

发明背景

人体及其他哺乳动物的各种机能失调涉及或与异常骨骼吸收有关。上述的机能失调包括但不限于：骨质疏松症、糖皮质激素诱导的骨质疏松症、佩吉特病、异常增量的骨代谢、牙周疾病、牙齿损耗、骨折、类风湿性关节炎、骨关节炎、假肢周围骨质溶解症、成骨不全、转移性骨病、恶性高血钙和多发性骨髓瘤。上述机能失调中最常见之一为骨质疏松症，在绝经后的妇女中发病率最高。骨质疏松症是一种全身性骨骼疾病，以低骨质和骨骼组织的微结构退化为特征，从而增加了骨脆性和骨折敏感度。骨质疏松性骨折是老龄人群中的主要致病和致死因素。有多达 50%的女性和三分之一的男性可能患上骨质疏松性骨折。老龄人群中大部分已处于低骨密度状态，极易发生骨折。在预防和治疗骨质疏松症及其他与骨吸收有关的病症方面有大量需求。由于骨质疏松症，与其他与骨损耗有关的机能失调一样，通常是慢性病，人们认为合理的治疗应当是典型的慢性疗法。

骨质疏松症的特征是：逐渐损失骨结构和矿物质，导致骨强度和骨折率的增加。通过维持在产生新骨骼的成骨细胞和分解或吸收骨骼的破骨细胞之间的平衡，骨骼不断地被改造。在一些疾病状态下和老化进程中，骨骼形成和吸收之间的平衡被破坏；骨骼以更快的速度流失。这种吸收大于形成的长期不平衡，可导致骨骼构造更加弱化和更容易发生骨折。

骨吸收主要是通过破骨细胞完成的，破骨细胞是一种多核巨细胞。破骨细胞按如下方式吸收骨骼：通过形成附着在骨骼组织上的原始细胞，继而形成一种细胞外间隔或空隙。该空隙通过质子-ATP 泵维持低 pH 状态。空隙中的酸化环境可导致骨骼的初脱矿物质化，继之以骨骼蛋白质或胶原的降解，该降解通过如半胱氨酸蛋白酶的蛋白酶类进行。见 Delaisse,J.M.等,1980, Bio chem. J 192:365-368; Delaisse,J.等,1984,Bio chem. Bio phys Res Commun: 441-447; Delaisse,J.M.等,1987, Bone 8:305-313, 上述文献在此全文引入作为参考。胶原构成了骨骼的有机基质的 95%。因此，涉及胶原降解的蛋白酶类是一种骨骼代

谢的主要成分，结果发生和发展了骨质疏松症。

组织蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶类中的木瓜蛋白酶超家族。这些蛋白酶类在正常生理以及病理的结缔组织降解中起一定作用。组织蛋白酶在细胞内的蛋白质降解、代谢和改造中举足轻重。迄今为止，已经从许多来源中鉴定和测序了大量组织蛋白酶。这些组织蛋白酶在各式各样的组织中天然存在。例如，组织蛋白酶 B、C、F、H、L、K、O、S、V、W 和 Z 已被克隆。组织蛋白酶 K(其众所周知的是缩写 cat K)亦称组织蛋白酶 O 和组织蛋白酶 O₂。见 PCT 申请 WO96/13523, Khepri Pharmaceuticals 公司, 1996 年 5 月 9 日公开, 其在此全文引入作为参考。组织蛋白酶 L 与正常的溶酶体蛋白酶解以及若干疾病, 包括但不限于黑素瘤转移有关。组织蛋白酶 S 与阿尔茨海默氏病、动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺炎和某些自身免疫功能失调, 包括但不限于青少年发病糖尿病、多发性硬化、寻常性天疱疮、格雷夫斯氏症、重症肌无力、全身红斑狼疮、类风湿性关节炎和桥本甲状腺炎; 变应性紊乱, 包括但不限于哮喘; 以及外源性免疫反应, 包括但不限于器官移植或组织嫁接的排异作用。在瘤内发现了增加的组织蛋白酶 B 水平和酶的重新分配, 表明其在瘤发病和转移中起作用。此外, 异常的组织蛋白酶 B 活动涉及下述疾病态, 如类风湿性关节炎、骨关节炎、卡氏肺囊虫病、急性胰腺炎、炎性航空病和骨骼与关节机能失调有牵连。

哺乳动物的组织蛋白酶与类木瓜蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶类有关, 这些酶是由致病的寄生虫, 包括来自原生动物门、扁形动物门、植物线虫和节肢动物的寄生虫种类表达的。这些半胱氨酸蛋白酶类在这些有机体的生命周期中起着重要的作用。

半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 如 E-64(反环氧琥珀酰-L-亮氨酸胺-(4-胍基)丁烷), 已知对抑制骨吸收有效。参见 Delaisse, J.M.等, 1987, Bone 8:305-313, 该文献在此全文引入作为参考。近来, 组织蛋白酶 K 被克隆并发现其在破骨细胞中具有特异性表达, 参见 Tezuka, K.等, 1994; J Biol Chem 269: 1106-1109; Shi, G.P.等, 1995, FEBS Lett 357:129-134; Bromme, D.及 Okamoto, K., 1995, Biol Chem Hoppe Seyler 376:379-384; Bromme, D.等 1996, J Biol Chem 271:2126-2132; Drake, F.H.等, 1996, J Biol Chem 271:12511-12516, 上述文献在此全文引入作为参考。与克隆并发的常染色体隐性异常、致密性成骨不全以骨吸收的减少的骨硬化表型为特征, 已经被定位于存在于组织蛋白酶 K 基因中

的突变。到目前为止,已经知道在组织蛋白酶 K 基因中的所有突变都能消除胶原酶活性。参见 Gelb, B.D.等, 1996, Science 273:1236-1238; Johnson, M.R.等, 1996, Genome Res 6:1050-1055; Hou, W.-S 等, 1999 J.Clin.Invest.103,731-738, 上述文献在此全文引入作为参考。因此,似乎是组织蛋白酶 K 与破骨细胞介导的骨吸收有关。

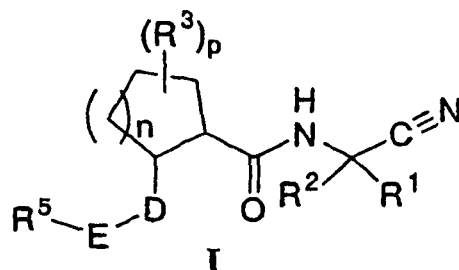
组织蛋白酶 K 是作为 37kDa 的前原酶被合成的,它位于溶酶体隔室中,在低 pH 值下,认为它自行激活成为成熟的 27kDa 酶。参见 McQueney, M.S.等, 1997, J Biol Chem 272:13955-13960; Littlewood-Evans, A.等, 1997, Bone 20:81-86, 上述文献在此全文引入作为参考。组织蛋白酶 K 与组织蛋白酶 S 最为密切相关,在氨基酸水平上具有 56% 的序列同一性。组织蛋白酶 K 的 S₂P₂ 基质专一性与分别在 P1 和 P2 位置上对带正电荷的残基如精氨酸和疏水性的残基如苯丙氨酸或亮氨酸具有偏好的组织蛋白酶 S 的 S₂P₂ 基质专一性相似。参见 Bromme, D.等, 1996, J Biol Chem 271:2126-2132; Bossard, M.J.等, 1996, J Biol Chem 271:12517-12524, 上述文献在此全文引入作为参考。组织蛋白酶 K 在较宽范围的 pH 值下具有活性,在 pH 值 4-8 时活性显著,因此允许在破骨细胞的消溶空隙中有良好的催化活性的 pH 值约为 4-5。

人体 I 型胶原是骨骼中的主要胶原,是组织蛋白酶 K 的良好底物。参见 Kafienah, W., 等, 1998, Bio chem. J 331:727-732, 其在此全文引入作为参考。在使用反寡核苷酸表达为组织蛋白酶 K 的体外实验中,显示了减弱的体外骨吸收,这可能是因为组织蛋白酶 K mRNA 翻译的减少而引起的。参见 Inui, T., 等人, 1997, J Biol Chem 272:8109-8112, 其在此全文引入作为参考。已经解析出组织蛋白酶 K 的晶体结构。参见 McGrath, M.E.等, 1997, Nat Struct Biol 4:105-109; Zhao, B.等, 1997, Nat Struct Biol 4:109-11, 其在此全文引入作为参考。对于基于组织蛋白酶 K 抑制剂的选择性肽的研究也有所进展,参见 Bromme, D.等, 1996, Bio chem J 315:85-89; Thompson, S.K.等, 1997, Proc Nat Acad Sci USA 94:14249-14254, 其在此全文引入作为参考。据上述文献可以看出,组织蛋白酶 K 的抑制剂可以减少骨吸收。这种抑制剂将可能有效地治疗涉及骨吸收的疾病,比如骨质疏松症。

发明概述

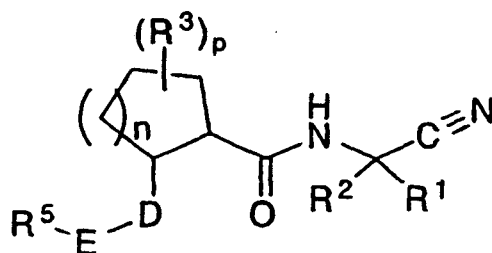
本发明涉及一类化合物,所述化合物能够治疗和/或预防需要治疗和/或预

防的哺乳动物的组织蛋白酶依赖症或病状。本发明的实施方案之一以式 I 化合物、药学上可接受的盐、立体异构体和其 N-氧化物衍生物说明：



发明详述

本发明涉及下述化学式的化合物：



其中 R^1 是氢、 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 链烯基，其中所述烷基和链烯基任选地被下述基团取代： C_{3-6} 环烷基、 $-SR^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-SOR^6$ 、 $-SOR^7$ 、 $-SO_2R^6$ 、 $-SO_2R^7$ 、 $-SO_2CH(R^7)(R^8)$ 、 $-OR^7$ 、 $-OR^6$ 、 $-N(R^7)_2$ 、一至六个卤素、芳基、杂芳基或杂环基，其中所述芳基、杂芳基和杂环基基团任选地被一个或两个独立地选自下述基团的取代基取代： C_{1-6} 烷基、卤素、羟烷基、羟基、烷氧基和酮基；

R^2 是氢、 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 链烯基，其中所述烷基和链烯基任选地被下述基团取代： C_{3-6} 环烷基、 $-SR^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-SOR^6$ 、 $-SOR^7$ 、 $-SO_2R^6$ 、 $-SO_2R^7$ 、 $-SO_2CH(R^7)(R^8)$ 、 $-OR^7$ 、 $-OR^6$ 、 $-N(R^7)_2$ 、一至六个卤素、芳基、杂芳基或杂环基，其中所述芳基、杂芳基和杂环基任选地被一个或两个独立选自下述基团的取代基取代： C_{1-6} 烷基、卤素、羟烷基、羟基、烷氧基或酮基；

或者 R^1 和 R^2 可以与跟它们相连的碳原子一起构成 C_{3-8} 的环烷基或杂环基的环，其中所述环系任选地被一个或两个独立地选自下述基团的取代基取代： C_{1-6} 烷基、羟烷基、卤代烷基和卤素；

每个 R^3 独立地选自下述基团：氢、卤素和 C_{1-2} 烷基，其中所述烷基任选地被卤素取代；或

两个 R^3 基团与跟它们相连的碳原子一起构成 C_{3-4} 的环烷基环，其中所述基团任选地被卤素取代；

D 是 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 链烯基、 C_{2-3} 炔基、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基或杂环基，其中每个所述的芳基、杂芳基、环烷基和杂环基可以是单环或双环，任选地在碳或杂原子上被一个至五个选自下述基团的取代基取代： C_{1-6} 烷基、卤代烷基、卤素、酮基、烷氧基、 $-SR^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-OR^6$ 、 $-OR^7$ 、 $-N(R^7)_2$ 、 $-SO_2R^6$ 和 $-SO_2R^8$ ；

E 是 C_{2-3} 链烯基、 C_{2-3} 炔基、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基或杂环基，其中每个所述芳基、杂芳基、环烷基和杂环基基团，可以是单环或双环，任选地在碳或杂原子上被一个至五个独立地选自下述基团的取代基取代： C_{1-6} 烷基、卤代烷基、卤素、酮基、烷氧基、 $-SR^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-OR^6$ 、 $-OR^7$ 、 $-N(R^7)_2$ 、 $-SO_2R^6$ 和 $-SO_2R^8$ ；

R^5 是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素、硝基、氰基、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基、杂环基、 $-C(O)OR^8$ 、 $-C(O)OSi[CH(CH_3)_2]_3$ 、 $-OR^6$ 、 $-OR^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-R^8C(O)R^6$ 、 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)N(R^a)(R^b)$ 、 $-C(O)N(R^7)(R^7)$ 、 $-C(O)N(R^8)(R^9)$ 、 $-C(R^8)(R^9)OH$ 、 $-SO_mR^7$ 、 $-SO_mR^6$ 、 $-R^8SR^6$ 、 $-R^6$ 、 $-C(R^6)_3$ 、 $-C(R^8)(R^9)N(R^6)_2$ 、 $-NR^8C(O)NR^8S(O)_2R^6$ 、 $-SO_mN(R^c)(R^d)$ 、 $-SO_mCH(R^8)(R^9)$ 、 $-SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})C(O)(C_{0-6} \text{ 烷基})NR^b$ 、 $-SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})N(R^{10})_2$ 、 $-SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})R^b$ 、 $-SO_m(C_{3-8} \text{ 环烷基})R^b$ 、 $-SO_2N(R^8)C(O)(R^7)$ 、 $-SO_2(R^8)C(O)N(R^7)_2$ 、 $-OSO_2R^8$ 、 $-N(R^8)(R^9)$ 、 $-N(R^8)C(O)N(R^8)(R^6)$ 、 $-N(R^8)C(O)R^6$ 、 $-N(R^8)C(O)R^8$ 、 $-N(R^8)C(O)OR^8$ 、 $-N(R^8)SO_2(R^8)$ 、 $-C(R^8)(R^9)NR^8C(R^8)(R^9)R^6$ 、 $-C(R^8)(R^9)N(R^8)R^6$ 、 $-C(R^8)(R^9)N(R^8)(R^9)$ 、 $-C(R^8)(R^9)SC(R^8)(R^9)(R^6)$ 、 R^8S- 、 $-C(R^a)(R^b)N(R^a)C(R^a)(R^b)(R^6)$ 、 $-C(R^a)(R^b)N(R^a)(R^b)$ 、 $-C(R^a)(R^b)C(R^a)(R^b)N(R^a)(R^b)$ 、 $-C(O)C(R^a)(R^b)N(R^a)(R^b)$ 、 $-C(R^a)(R^b)N(R^a)C(O)R^6$ 、 $-C(O)C(R^a)(R^b)S(R^a)$ 、 $C(R^a)(R^b)C(O)N(R^a)(R^b)$ 、 $-B(OH)_2$ 、 $-OCH_2O-$ 或者 4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基；其中所述基团任选地在碳或杂原子上被一个至五个独立地选自下述基团的取代基取代： C_{1-6} 烷基、卤素、酮基、氰基、卤代烷基、羟烷基、 $-OR^6$ 、 $-OR^7$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHS(O)_2R^8$ 、 $-R^6SO_2R^7$ 、 $-SO_2R^7$ 、 $-SO(R^7)$ 、 $-SR^7$ 、 $-SR^6$ 、 $-SO_mN(R^c)(R^d)$ 、 $-SO_mN(R^8)(O)(R^7)$ 、 $-C(R^8)(R^9)N(R^8)(R^9)$ 、 $-C(R^8)(R^9)OH$ 、 $-COOH$ 、 $-C(O)(O)(R^7)$ 、 $-C(O)(O)C(R^7)_3$ 、 $-C(R^a)(R^b)C(O)N(R^a)(R^b)$ 、 $-C(O)(R^a)$ 、

$N(R^8)C(R^8)(R^9)(R^6)$ 、 $-N(R^8)CO(R^6)$ 、 $-NH(CH_2)_2OH$ 、 $-NHC(O)OR^8$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、杂环基、芳基、杂芳基、 (C_{1-4}) 烷基杂芳基和 (C_{1-4}) 烷基芳基；

R^6 是氢、芳基、芳基 (C_{1-4}) 烷基、 (C_{1-4}) 烷基芳基、杂芳基、杂芳基 (C_{1-4}) 烷基、 (C_{1-4}) 烷基杂芳基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 (C_{1-4}) 烷基或杂环基 (C_{1-4}) 烷基、其中所述基团任选地被一个、两个或三个独立地选自下述基团的取代基取代：卤素、烷氧基和 $-SO_2R^7$ ；

R^7 是氢或 C_{1-6} 的烷基，该烷基任选地被一个、两个或三个独立地选自下述基团的取代基取代：卤素、烷氧基、氰基、 $-N(R^8)(R^9)$ 和 $-SR^8$ ；

R^8 是氢或 C_{1-6} 烷基；

R^9 是氢或 C_{1-6} 烷基；

R^{10} 是氢、 C_{1-6} 烷基、氰基、芳基、杂芳基、杂环基、 SO_m 杂芳基、 $(C=N)O(C_{1-6})$ 烷基或 (C_{1-6}) 烷基 $NH(SO_m)$ 杂芳基；

R^a 是氢、 C_{1-6} 烷基、 (C_{1-6}) 烷基芳基、 (C_{1-6}) 烷基羟基、 $-O(C_{1-6})$ 烷基、羟基、卤素、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基或杂环基，其中所述烷基、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基和杂环基可以任选地在碳原子或杂原子上被一个、两个或三个独立地选自 C_{1-6} 烷基或卤素的取代基取代；

R^b 是氢、 C_{1-6} 烷基、 (C_{1-6}) 烷基芳基、 (C_{1-6}) 烷基羟基、烷氧基、羟基、卤素、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基或杂环基，其中所述烷基、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基和杂环基可以任选地在碳原子或杂原子上被一个、两个或三个独立地选自 C_{1-6} 烷基和卤素基团的取代基取代；

或者 R^a 和 R^b 可以与跟它们相连的或处于它们之间的碳原子一起形成 C_{3-8} 环烷基环或 C_{3-8} 杂环基环，其中所述 3-8 元的环系可以任选地被一或两个独立地选自 C_{1-6} 烷基和卤素的取代基取代；

R^c 是氢或 C_{1-6} 烷基，该烷基任选地被一个、两个或三个独立地选自卤素和 $-OR^6$ 的取代基取代；

R^d 是氢或 C_{1-6} 烷基，该烷基任选地被一个、两个或三个独立地选自卤素和 $-OR^6$ 的取代基取代；

或者 R^c 和 R^d 可以与跟它们相连的或处于它们之间的氮原子一起形成 C_{3-8} 杂环基的环，其中所述环任选地被一个或两个独立地选自 C_{1-6} 烷基、卤素、羟基、烷氧基和酮基的取代基取代；

n 是从 1 到 3 的整数;

m 是自 0 到 2 的整数;

p 是自 1 到 3 的整数;

及其药学上可接受的盐、立体异构体和其 N-氧化物衍生物。

在本发明的一个实施方案中, R^1 和 R^2 每个均为氢。在本发明的另一个实施方案中, 当 R^1 和 R^2 在相同的碳原子上时, 可以与跟它们相连的碳原子一起形成 3-8 元环烷基环系, 其中所述环系任选地被 C_{1-6} 烷基、羟烷基、卤烷基和卤素取代。可以形成的环系实施例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。优选形成环丙基的实施方案。

在本发明的另一个实施方案中, R^1 或 R^2 与跟它们相连的碳原子一起形成 3-8 元杂环的环系, 其中所述环系任选地被 C_{1-6} 烷基、羟烷基、卤烷基或卤素取代。可以形成的环系实施例包括哌啶基、吡咯烷基或四氢吡喃基。

在本发明的一个实施方案中, 每个 R^3 是氢或卤素。在一类实施方案中, 两个 R^3 基团与同一个碳相连(成对取代)。在一小类中, 每个 R^3 均为卤素。在进一步的小类中, 每个 R^3 均为氟。

在本发明的一个实施方案中, D 是芳基或杂芳基。优选的杂芳基基团的实施方案是吡啶、噻唑、异噻唑、咪唑、异咪唑、三唑、咪唑和噻二唑。

本发明的一个实施方案中, E 是芳基或杂芳基。

本发明的一个实施方案中, R^5 是 $-SO_mR^7$ 、 $-SO_mR^6$ 、 $-R^8SR^6$ 、 $SO_mN(R^c)(R^d)$ 、 $-SO_mCH(R^8)(R^9)$ 、 $-SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})C(O)(C_{0-6} \text{ 烷基})NR^{10}$ 、 $-SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})N(R^{10})_2$ 、 $SO_m(C_{1-6} \text{ 烷基})R^{10}$; $-SO_m(C_{3-8} \text{ 环烷基})R^{10}$; $-SO_2N(R^8)C(O)(R^7)$ 或 $-SO_2(R^8)C(O)N(R^7)_2$; 其中所述基团任选地在碳原子或杂原子上被一个到五个独立地选自下述基团的取代基取代: C_{1-6} 烷基、卤素、酮基、氰基、卤代烷基、羟烷基、 $-OR^6$ 、 $-OR^7$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHS(O)_2R^8$ 、 $-R^6SO_2R^7$ 、 $-SO_2R^7$ 、 $-SO(R^7)$ 、 $-SR^7$ 、 $-SR^6$ 、 $-SO_mN(R^c)(R^d)$ 、 $-SO_mN(R^8)C(O)(R^7)-C(R^8)(R^9)N(R^8)(R^9)$ 、 $-C(R^8)(R^9)OH$ 、 $-COOH$ 、 $-C(O)(O)(R^7)$ 、 $-C(O)(O)C(R^7)_3$ 、 $-C(R^a)(R^b)C(O)N(R^a)(R^b)$ 、 $-C(O)(R^a)$ 、 $-N(R^8)C(R^9)(R^6)$ 、 $-N(R^8)CO(R^6)$ 、 $-NH(CH_2)_2OH$ 、 $-NHC(O)OR^8$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、杂环基、芳基、杂芳基、 $(C_{1-4} \text{ 烷基})$ 杂芳基和 $(C_{1-4} \text{ 烷基})$ 芳基。

在本发明的一个实施方案中, n 是 2。

本发明的一个实施方案中, p 是 1。本发明的另一个实施方案中, p 是 2。

在本发明的另一个实施方案中，p 是 3。

在本发明的一个实施方案中，R^a 和 R^b 具有这样的定义，使得它们与跟它们相连的碳或氮一起构成单环或双环的碳环或杂环，每个环有 5-7 个环原子。杂环可任选地包括除了氮原子之外的 1 个或 2 个额外的选自 N、O 和 S 的杂原子。所述碳环和杂环可以任选地被一个或多个选自 C₁₋₆ 烷基和卤素的取代基取代。

参照前述优选实施方案，意味着除非特别指出，否则包括所有特定基团和优选基团的组合。

本发明的特定实施方案包括但不限于：

2-(2-溴苯基)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺；

2-(2-溴苯基)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基]环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基]环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基]环己烷甲酰胺；

N-(1-氰基环丙基)-5,5-二氟-2-[4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基]环己烷甲酰胺；

N-(1-氰基环丙基)-5,5-二氟-2-[4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基]环己烷甲酰胺；

N-(1-氰基环丙基)-5,5-二氟-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

2-(4'-苄氧基-1,1'-联苯-2-基)-N-氰基甲基环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-2-(4'-羟基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-2-(4'-氟-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-2-(4-甲磺酰基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-氟-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-2-(4'-乙烯基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-2-(4'-环丙基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(5-甲磺酰基-4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(1-氰基环丙基)-5,5-二氟-2-(5-甲磺酰基-4-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-2-(4'-氟甲基-硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-2-(2'-甲基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺；

N-(氰基甲基)-2-(4'-甲基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-乙基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-丙基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(3'-异丙基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-异丙基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
2-(4'-叔丁基-1, 1'-联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(3'-三氟甲基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(3'-氟-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(2'-氟-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
2-(4-氯-1, 1'-联苯-2-基)-N-氰基甲基环己烷甲酰胺;
2-(3'-氯-1, 1'-联苯-2-基)-N-氰基甲基环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(3'-羟甲基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
2'-(2-{[(氰基甲基)氨基]羰基}-环己基)-1, 1'-联苯-3-羧酸;
2'-(2-{[(氰基甲基)氨基]羰基}-环己基)-1, 1'-联苯-4-羧酸;
N-(氰基甲基)-2-(3'-甲氧基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(2'-乙氧基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-乙氧基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(3'-异丙氧基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-异丙氧基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-苯氧基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-三氟甲氧基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(2'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(3'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-乙硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
2-(3'-氨基-1, 1'-联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-二甲氨基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(3'-硝基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
2-(3'-乙酰氨基-1,1'-联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-异丁基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(2-吡啶-4-基苯基)环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-2-(2-喹啉-8-基苯基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[2-(2-甲氧基嘧啶-5-基)苯基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(2-吡啶-3-基苯基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(2-噻吩-3-基苯基)环己烷甲酰胺;
2-(4'-乙酰基-1, 1'-联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(1,1':2',1''-三联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
2-(4'-氰基-1, 1'-联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
2-(3'-氰基-1, 1'-联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
6-(3-溴苯基)-N-氰基甲基环己-3-烯-1-羧酰胺;
2-(3-溴苯基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
4-[3'-(2-(氰基甲基氨基羰基环己基)-1,1'-联苯-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁基酯];
N-(氰基甲基)-2-(4'-哌嗪-1-基-1, 1'-联苯-3-基)环己烷甲酰胺;
2-(3-溴苯基)-N-(氰基甲基)-4-甲基环戊烷甲酰胺;
(4R)-2-(3-溴苯基)-N-(氰基甲基)-4-甲基环戊烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-甲氧基-1,1'-联苯-3-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-3-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-甲磺酰基-1,1'-联苯-3-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(5-苯基-1,3-噁唑-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(5-苯基-1,3-噻唑-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(5-苯基-1,3-噻唑-2-基)环己烷甲酰胺;
2-(2-溴苯基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-苯基环己烷甲酰胺;
5,5-二氯-N-(氰基甲基)-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[1-甲基-3-(4-甲硫基)苯基-1H-吡唑-4-基]环己烷甲酰胺;
6-(2-溴苯基)-N-(氰基甲基)螺[2.5]辛烷-5-甲酰胺;
2-(3-溴-1-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(氰基甲基)-5, 5-二氟环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-6-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)螺[2.5]辛烷-5-甲酰胺;
2-(2-溴苯基)-5, 5-二氯-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;

2-(3-溴-1-甲基-1H-吡唑-4-基)-5,5-二氟-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(Z)-2-(4-甲硫基-苯基)乙烯基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[2-(4-甲硫基-苯基)乙基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(Z)-2-(4-甲磺酰基-苯基)乙烯基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[2-(4-甲磺酰基-苯基)乙基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(Z)-2-[(4-三氟甲基-硫基)苯基]乙烯基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(E)-2-(4-甲磺酰基-苯基)乙烯基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-{2-2-[(4-三氟甲基-硫基)苯基]乙基}环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-乙炔基环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(4-甲硫基-苯基)乙炔基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(4-甲磺酰基-苯基)乙炔基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(4-[(三氟甲基)-硫基]苯基)乙炔基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-(苯基乙炔基)-环己烷甲酰胺;
2-[(4-溴苯基)乙炔基]-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
2-(1, 1'-联苯-4-基乙炔基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(4'-(甲硫基)-1,1'-联苯-4-基)乙炔基]-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(3-氟苯基)-乙炔基]-环己烷甲酰胺;
2-[(3-氯苯基)乙炔基]-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[(4-吡啶-4-基苯基)乙炔基]环己烷甲酰胺;
2-(3-溴苯基)乙炔基-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
2-(1, 1'-联苯-3-基乙炔基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
2-[(2-溴苯基)乙炔基]-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
2-(1, 1'-联苯-2-基乙炔基)-N-(氰基甲基)-环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[[4(6-甲氧基吡啶-2-基)噻吩-3-基]乙炔基]环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-{4'-[(氰基甲基)硫基]-联苯-2-基}-5, 5-二氟环己烷甲酰胺;
2-{4'-[(2-氨基-2-氧代乙基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5, 5-二氟环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-2-[4'-{(2-[(氰基甲基)氨基]-2-氧代乙基)硫基}联苯-2-基]-5, 5-二氟环己烷甲酰胺;
N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(2-吡啶-2-基乙基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺

胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-2-基乙基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-3-基甲基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-4-基甲基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

胺;

2-{4'-[(1H-苯并咪唑-2-基甲基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

2-{4'-[(1H-苯并咪唑-6-基甲基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(1H-咪唑-4-基甲基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(1H-咪唑-2-基甲基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-{[(1-咪唑-2-基甲基)-1H-咪唑-2-基]甲基}硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-{[2-(1H-咪唑-4-基)乙基]硫基}联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-{[2-(1H-咪唑-2-基)乙基]硫基}联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-{[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]硫基}联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-{[2-(1-甲基哌啶-4-基)乙基]硫基}联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(2'-氟-4'-甲硫基-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-{[(5-苯基-1H-咪唑-2-基)甲基]硫基}联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(2-吡啶-4-基乙基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-({2-[(吡啶-2-基磺酰基)氨基]乙基}硫基)-联苯-2-基]环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-{2-[(吡啶-2-基磺酰基){2-[(吡啶-2-基磺酰基)氨基]乙基}氨基]乙基}硫基]-联苯-2-基)环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(1H-四唑-5-基甲基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺;

2-{4'-[(1-氰基环丙基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

1-{[2'-(2-{[(氰基甲基)氨基]羰基}-4,4-二氟环己基)联苯-4-基]硫基}环丙烷甲亚胺酸甲酯;

2-{4'-[2-(1H-苯并咪唑-2-基)乙基]硫基}联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

2-{4'-[(1H-苯并咪唑-7-基甲基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-({2-[(甲磺酰基)氨基]乙基}硫基)联苯-2-基]环己烷甲酰胺;

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-{2-[(甲磺酰基)氨基]乙基}联苯-2-基]环己烷甲酰胺;

及其药学上可接受的盐、立体异构体和 N-氧化物衍生物。

在本发明的范围内也包括由如上所述的式 I 化合物和其药学上可接受的载体组成的药物组合物。本发明也预计包括由药学上可接受的载体和在本申请中具体公开的任一化合物组成的药物组合物。本发明的这些和其它方面可明显从中包含的教导得知。

用途:

本发明的化合物是组织蛋白酶抑制剂,因此可用于治疗或预防哺乳动物,特别是人类的组织蛋白酶依赖症或病状。尤其本发明的化合物是组织蛋白酶 K 的抑制剂,因此可用于治疗或预防哺乳动物,特别是人类的组织蛋白酶 K 依赖症或病状。

“组织蛋白酶依赖症或病状”是指取决于一种或多种组织蛋白酶的活性的病理情况。“组织蛋白酶 K 依赖症或病状”是指取决于一种或多种组织蛋白酶

K 的活性的病理情况。与组织蛋白酶 K 的活性有关的疾病包括：骨质疏松症、糖皮质激素诱导的骨质疏松症、佩吉特病、异常增量的骨代谢、牙周疾病、牙齿损耗、骨折、类风湿性关节炎、骨关节炎、假肢周围骨质溶解症、成骨不全、动脉粥样硬化、肥胖症、慢性阻塞性肺病，以及包括骨骼新陈代谢症、恶性高钙血和多发性骨髓瘤在内的癌症。使用本发明要求保护的化合物治疗上述病症时，所需的治疗剂量由本领域技术人员根据特定的病状而变化。虽然治疗和预防都预计属于本发明的范围之内，但是这些病症的治疗是优选的。

本发明的一个实施方案是抑制需要抑制组织蛋白酶活性的哺乳动物中的组织蛋白酶活性的方法，包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。

该实施方案中的一类方法中是其中组织蛋白酶活性为组织蛋白酶 K 活性的方法。

本发明的另一个实施方案是治疗或预防需要治疗或预防的哺乳动物中的组织蛋白酶依赖症的方法，包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。

该实施方案中的一种方法是其中组织蛋白酶活性为组织蛋白酶 K 活性的方法。

本发明的另一个实施方案是抑制需要抑制的哺乳动物中的骨骼损失的方法，包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。本发明的另一个实施方案是减少需要减少的哺乳动物中骨骼损失的方法，包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。在骨吸收抑制中的组织蛋白酶 K 抑制剂的应用见诸下述文献，Stroup, G.B., Lark, M.W., Veber, D.F., Bhattacharya, A., Blake, S., Dare, L.C., Erhard, K.F., Hoffman, S.J., James, I.E., Marquis, R.W., Ru, Y., Vasko-Moser, J.A., Smith, B.R., Tomaszek, T. 和 Gowen, M. Potent and selective inhibition of human cathepsin K leads to inhibition of bone resorption in vivo in a nonhuman primate. *J. Bone Miner. Res.*, 16:1739-1746; 2001; 和 Votta, B.J., Levy, M.A., Badger, A., Dodds, R.A., James, I.E., Thompson, S., Bossard, M.J., Carr, T., Connor, J.R., Tomaszek, T.A., Szewczuk, L., Drake, F.H., Veber, D., 和 Gowen, M. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both in vivo and in vitro, *J. Bone Miner. Res.* 12:1396-1406;

1997。

本发明的另一个实施方案是，治疗或预防需要治疗或预防的哺乳动物的骨质疏松症的方法，包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。组织蛋白酶 K 在骨质疏松症治疗或防止中的应用见诸下述文献，Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P., 和 Vonfigura, K. Impaired osteoclast bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13453-13458; 1998。

本发明的另一个实施方案是，治疗或预防需要治疗或预防的哺乳动物的类风湿性关节炎的方法，包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。在文献中已知关节周骨骼的逐步破坏是类风湿性关节炎(RA)病人中关节功能障碍和病残的主要原因，参见 Goldring SR, “Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis”. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2002; 14:406-10。

来自 RA 病人的关节组织分析证明，组织蛋白酶 K 阳性的破骨细胞是介导与风湿症滑液损害有关的病灶的骨吸收的细胞型，参见 Hou, W-S, Li, W, Keyszer, G, Weber, E, Levy, R, Klein, MJ, Gravallesse, EM, Goldring, SR, Bromme, D, “Comparison of Cathepsin K and S expression within the Rheumatoid and Osteoarthritic Synovium”, *Arthritis Rheumatism* 2002; 46:663-74。此外，全身性的骨骼损耗是与重度 RA 有关的主要致病因素。在慢性 RA 病人中，臀部和脊柱的骨折频率实质上是增加了，参见 Gould A, Sambrook, P, Devlin J et al, “Osteoclastic activation is the principal mechanism leading to secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis” *J. Rheumatol.* 1998; 25:1282-9。在治疗或防止关节下骨骼吸收和全身性骨骼损耗的类风湿性关节炎时，应用组织蛋白酶 K 抑制剂代理了一种采用药理学介入风湿性关节炎的进展的理性方法。

本发明的另一个实施方案是，治疗或预防需要治疗或预防的哺乳动物的骨关节炎发展的方法，包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。在文献中已知与骨关节炎(OA)并发的关节中已经明确的改变包括关节软骨表面的磨损、周围关节软骨的骨化/骨关节炎以及软骨下多骨硬化和孢囊形成，参见 Oettmeier R, Abendroth, K, “Osteoarthritis and bone: osteologic types of osteoarthritis of the hip”, *Skeletal Radiol.* 1989; 18:165-74。最近，已经提出了软

骨下骨骼硬化对 OA 的启动和发展的潜在贡献。作为关节对反复的脉动负载的响应的关节的僵化的软骨下骨骼不太能够通过关节来削弱和分散力,使得骨骼承受更大的通过关节软骨表面的机械应力。这反而加速了软骨的磨损和纤维化,参见 Radin, EL 和 Rose RM, "Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilaged amage", Clin.Orthop.1986; 213: 34-40。通过诸如组织蛋白酶 K 抑制剂之类的抗吸收剂对过度的关节下骨吸收的抑制,可能导致对软骨下骨骼代谢的抑制,从而可能产生一种有利的对 OA 发展的影响。

除上述假设之外,最近在滑液纤维母细胞、巨噬状细胞和从滑膜和采自 OA 病人的关节软骨样品的软骨细胞中,都鉴定了组织蛋白酶 K 蛋白质的表达,参见 Hou, W-S, Li, W, Keyszer, G, Weber, E, Levy, R, Klein, MJ, Gravalles, EM, Goldring, SR, Bromme, D, "Comparison of Cathepsin K and S expression within the Rheumatoid and Osteoarthritic Synovium", Arthritis Rheumatism 2002; 46:663-74; 以及 Dodd, RA, Connor, JR, Drake, FH, Gowen, M, "Expression of Cathepsin K messenger RNA in giant cells and their precursors in human osteoarthritic synovial tissues" .Arthritis Rheumatism 1999; 42:1588-93; 以及 Konttinen, YT, Mandelin, J, Li, T-F, Salo, J, Lassus, Jetal. "Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis", Arthritis Rheumatism 2002; 46: 953-60。这些最近的研究涉及组织蛋白酶 K 在消毁与骨关节炎发展有关的关节软骨中 II 型胶原中的作用。如本发明中所述,组织蛋白酶 K 抑制剂在治疗或防止骨关节炎中的应用包括两个不同的机制,一个是关于破骨细胞推动的软骨下骨骼代谢,第二个是关于 OA 病人的滑膜和软骨中 II 型胶原变性的直接抑制。

本发明的另一个实施方案是治疗需要治疗的哺乳动物的癌症的方法,包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。已有文献报道,组织蛋白酶 K 是在人体乳腺癌、前列腺癌和脊索癌中表达的,并且具有使基质退化的能力,参见 Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Parley D, Wlodarski B, Kokubo T, Inaoka T, Sloane J, Evans DB, Gallagher JA, "The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma."Cancer Res 1997 Dec 1; 57(23): 5386-90, Brubaker KD, Vessella RL, TrueL D, Thomas R, Corey E "Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate

cancer progression." *J Bone Miner Res* 2003 18, 222-30, Haeckel C, Krueger S, Kuester D, Ostertag H, Samii M, Buehling F, Broemme D, Czerniak B, Roessner A. "Expression of cathepsin K in chordoma." *Hum Pathol* 2000 Jul; 31(7):834-40.

本发明的另一个实施方案是治疗需要治疗的哺乳动物的动脉硬化症的方法, 包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。已有文献报道, 组织蛋白酶 K 在人体粉瘤中表达并具有显著的弹性蛋白酶活性, 参见 Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. "Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells." *J Clin Invest* 1998 Aug 102, 576-83。

本发明的另一个实施方案治疗需要治疗的哺乳动物的肥胖症的方法, 包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。已有文献报道, 组织蛋白酶 K mRNA 在若干肥胖症小鼠模型的脂肪组织和男性肥胖症患者的脂肪组织中的数量增加了, 参见 Chiellini C, Costa M, Novelli SE, Amri EZ, Benzi L, Bertacca A, Cohen P, Del Prato S, Friedman JM, Maffei M. "Identification of cathepsin K as a novel marker of adiposity in white adipose tissue." *J Cell Physiol* 2003, 195, 309-21。

本发明的另一个实施方案是治疗需要治疗的哺乳动物的慢性阻塞性肺病的方法, 包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。已有文献报道, 组织蛋白酶 K 在肺部纤维化中起到作用, 参见 Buehling, F., et al., "Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis," *Am J Pathol*. 2004 Jun; 164 (6):2203-16。

本发明的另一个实施方案是治疗需要治疗的哺乳动物的寄生虫感染的方法, 包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。已有文献报道, 哺乳动物组织蛋白酶与木瓜蛋白酶类似的半胱氨酸蛋白酶有关, 后者在寄生虫的生命周期中起到重要作用。所述寄生虫与下述疾病有关: 疟疾、美洲锥虫病、刚果锥虫病、利什曼病、贾第鞭毛虫病、毛滴虫病、阿米巴病、血吸虫病、片吸虫病、肺吸虫病和肠内蛔虫病, 参见 Lecaille F, Kaleta J, Bromme D., Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 2002 102, 4459-88。

本发明的另一个实施方案是治疗需要治疗的哺乳动物的严重急性呼吸道综

合症(SARS)的方法,包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。

本发明的另一个实施方案是治疗需要治疗的哺乳动物的转移性骨病的方法,包括给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物。已有文献报道,破骨细胞是造成骨吸收骨吸的原因,转移性肿瘤诱导的骨质的破坏和高血钙症可通过破骨细胞进行。因此,抑制破骨细胞可以预防骨质的破坏和骨质的转移,参见 Miyamoto, T.和 Suda, T., "Differentiation and function of osteoclasts, "Keio J Med 2003 Mar; 52(1): 1-7。

本发明的另一种实施方案是给予哺乳动物治疗有效剂量的上述任一化合物或药物组合物,用于治疗与组织蛋白酶 S 有关的哺乳动物疾病,包括阿尔茨海默氏病、动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺炎和某些自身免疫机能失调,包括但不限于青少年发病糖尿病、多发性硬化、寻常性天疱疮、格雷夫斯氏症、重症肌无力、全身红斑狼疮、类风湿性关节炎和桥本甲状腺炎;变应性紊乱,包括但不限于哮喘;以及外源性免疫反应,包括但不限于器官移植或组织嫁接的排异作用。已有文献报道,组织蛋白酶 S 的活性与上述疾病状态有关,参见 Munger JS, Haass C, Lemere CA, Shi GP, Wong WS, Teplow DB, Selkoe DJ, Chapman HA. Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A beta peptides: a distinct role for cathepsin S. *Biochem J* 1995 311,299-305, Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, Kodama T, Tsimikas S, Witztum JL, Lu ML, Sakara Y, Chin MT, Libby P, Shi GP. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2003 111, 897-906, Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ Jr, Chapman HA Jr, Shapiro SD, Elias JA. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 2000 106,1081-93, Shi GP, Sukhova GK, Kuzuya M, Ye Q, Du J, Zhang Y, Pan JH, Lu ML, Cheng XW, Iguchi A, Perrey S, Lee AM, Chapman HA, Libby P. Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res* 2003 92,493-500, Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA, Rudensky AY. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and

diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 1999 10,207-17。

可作为本发明范例的是，上述任一化合物在制备用于治疗/或预防哺乳动物骨质疏松症的药物中的用途，优选的实施方案是，上述任一化合物在制备用于治疗/或预防疾病的药物中的用途，所述疾病为：骨骼损耗、骨吸收、骨折、新陈代谢骨病、和/或与组织蛋白酶功能相关的疾病。

本发明的化合物可以向哺乳动物，优选人体给药，单独给药或与药学上可接受的载体或稀释剂联合给药，优选联合给药。根据标准的药学惯例，在药物组合物中任选地与如明矾这样的已知助剂联合用药。化合物可以口服或胃肠外给药，包括静脉注射、肌肉注射、腹腔内的、皮下的、直肠和局部的给药途径。

对于口服使用的片剂，通常使用包括乳糖和玉米淀粉的载体，通常加入如硬脂酸镁的润滑剂。对于胶囊式的口服给药，有效的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。对于本发明中的治疗性化合物的口服法，所选化合物可以以如片剂或胶囊、或以水溶液或悬浮液的形式给药。对于以片剂或胶囊形式的口服给药，活性药物组分可以与口服、无毒的药学上可接受的惰性载体混合，惰性载体例如是乳糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、硫酸钙、甘露糖醇、山梨糖醇等；对于液态的口服给药，口服的药物组分可以与任何口服、无毒的药学上可接受的惰性载体混合，惰性载体如乙醇、丙三醇、水等。此外，当需要或必要时，也可以混合适当的粘合剂、润滑剂、分解剂和着色剂成为混合物。适当的粘合剂包括淀粉、明胶、如葡萄糖或 β -乳糖的天然糖、玉米甜味剂、如阿拉伯胶、黄蓍胶或海藻酸钠的天然树胶和合成树胶，羧甲基纤维素、聚乙二醇、石蜡等。可用于该剂型的润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。分解剂包括但不限于：淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土、黄原胶等。当需要使用口服的水悬浮液时，将活性成分与乳化剂和悬浮剂混合。如果需要，可以加入某些甜味剂和/或调味剂。对于肌肉注射、腹腔内、皮下和静脉注射给药，通常制备成含有活性成分的无菌液和具有适当调节及缓冲的 pH 值的溶液。对于静脉注射用，应控制溶质的总浓度以使制剂等渗。

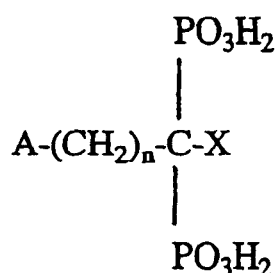
本发明的化合物还可以以脂质体运载体系的形式给药，如以小单层脂质体、大单层脂质体及多层脂质体给药。脂质体可由各种磷脂，如胆固醇、硬脂

酰胺或卵磷脂形成。

本发明的化合物也可通过使用作为单独载体的单克隆抗体进行输运, 其中化合物分子与载体偶联, 本发明的化合物也可以与作为可靶向的药物载体的可溶性聚合物偶联。这种聚合物可能包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基甲基丙烯酰胺-酚、聚羟基-乙基天(门)冬酰胺-酚或被十六酰残基取代的聚氧化乙烯-聚赖氨酸。此外, 本发明的化合物可以与一类可用于达到药物的可控制性释放的可生物降解的聚合物偶联, 例如与聚乳酸、聚乙二醇酸、聚乳酸及聚乙醇酸的共聚物、聚 ϵ -己内酯、多羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚丙烯腈及交联的或两亲性嵌段共聚物水凝胶偶联。

本发明的化合物也可以与已知的药剂的联合用药, 这些药剂可用于治疗或预防骨质疏松症、糖皮质激素诱导的骨质疏松症、佩吉特病、异常增量的骨代谢、牙周疾病、牙齿损耗、骨折、类风湿性关节炎、骨关节炎、假肢周围骨质溶解症、成骨不全、转移性骨病、恶性高血钙和多发性骨髓瘤。目前已经公开的化合物, 与其它在治疗或预防骨质疏松症或其它骨骼疾病中有效药物的联合使用, 都包括在本发明范围之内。本领域的技术人员应该认识到, 基于所述药物和疾病的特殊性质, 药物的联合使用可能是有益的。所述药物包括: 有机双膦酸盐; 雌激素受体调节剂; 雄激素受体调节剂; 破骨细胞质子 ATP 酶的抑制剂; HMG-CoA 还原酶抑制剂; 整合蛋白受体拮抗剂; 成骨细胞合成代谢的药剂, 如 PTH; 非甾体消炎药物; 选择性环加氧酶-2 抑制剂; 白介素-1 β 抑制剂; LOX/COX 抑制剂; 以及其药学上可接受的盐和混合物。优选本发明的化合物和有机双膦酸盐的组合物。也优选本发明的化合物和雌激素受体调节剂的组合物。也优选本发明的化合物和雄激素受体调节剂的组合物。也优选本发明的化合物和成骨细胞合成代谢的药剂的组合物。

"有机双膦酸盐"包括, 但不限于, 下述化学式的化合物:



其中 n 是从 0 到 7 的整数, 其中 A 和 X 独立地选自下述基团: H、OH、卤素、 NH_2 、SH、苯基、 $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ 烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_{30}$ 支链或环烷基、包含两到三个 N 的双环结构、 $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ 取代的烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烃基取代的 NH_2 、 $\text{C}_3\text{-C}_{30}$ 支链或环烷基取代的 NH_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 二烷基取代的 NH_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基取代的硫基、苯硫基、卤苯基硫基、 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基取代苯基、吡啶基、呋喃基、吡咯烷基、咪唑基、咪唑并吡啶基和苯甲基, 使得当 n 是 0 时, A 和 X 都不能选自 H 或 OH; 或 A 和 X 与跟它们相连的碳原子一起构成 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 环。

在上式中, 为了给化学式提供足够的原子选择, 烷基可以是直链、支链或环状的, 条件是为该化学式选择了足够的原子。 $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ 取代的烷基可包括多种取代基, 其非限定性的实例包括选自下列的取代基: 苯基、吡啶基、呋喃基、吡咯烷基、咪唑酮基、 NH_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基或二烃基取代 NH_2 、OH、SH 和 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷氧基。

上述化学式也意指包括复杂的碳环、芳香环和杂原子结构作为 A 和/或 X 取代基, 其非限定性的实例包括萘基、喹啉基、异喹啉基、金刚烷基和氯代苯硫基。

药学上可接受的盐和双膦酸盐的衍生物在此也是可用的。盐的非限定性实例包括选自由下述物质组成的组: 碱金属、碱土金属、铵和单、双、三或四- $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基取代的铵。优选的盐选自由钠、钾、钙、镁和铵盐组成的组。更优选钠盐。其衍生物的非限定性的实例包括选自由酯、水合物和酰胺组成的组。

应注意到, 在此使用的在引用本发明的治疗剂时提到的术语"双膦酸盐"和"双膦酸盐类"也包括二膦酸盐、联膦酸和双膦酸, 以及这些原料的盐和衍生物。除非特别指出, 否则在提到双膦酸盐或多个双膦酸盐中用的特殊术语并不限制于本发明的范围。就本领域技术而言, 由于当前混合术语的使用, 在本发明中涉及的双膦酸盐化合物的具体重量或百分数, 除非特别标明, 否则在此都以酸的有效重量为准。例如, "约 5 毫克的骨吸收抑制剂双膦酸盐可选自下述化合物的组: 阿仑膦酸盐、其药学上可接受的盐和其混合物, 以阿仑膦酸的有效重量为准"一句, 是指所选择的双膦酸盐化合物的数量是以 5 毫克阿仑膦酸为基准计算的。

本发明使用的双膦酸盐的非限定性实例包括:

阿仑膦酸盐, 亦称阿仑膦酸, 4-氨基-1-羟基亚丁基-1,1 双膦酸, 阿仑膦酸

钠或阿仑膦酸一钠三水合物, 4-氨基-1-羟基亚丁基-1,1-双膦酸一钠三水合物。

下述的美国专利公开了阿仑膦酸盐: 4,922,007, Kieczkowski 等, 1990 年 5 月 1 日出版; 5,019,651, Kieczkowski 等, 1991 年 5 月 28 日出版; 5,510,517, Dauer 等, 1996 年 4 月 23 日出版; 5,648,491, Dauer 等, 1997 年 7 月 15 日出版, 所有文献在此全文引入作为参考。

环庚基氨基亚甲基-1,1-双膦酸, YM175, Yamanouchi(因卡膦酸二钠盐, 以往通称英卡膦酸钠盐), 如美国专利 4,970,335, 中所述 Isomura 等, 1990 年 11 月 13 日出版, 其在此全文引入作为参考。

1,1-二氯亚甲基-1,1-二膦酸(氯屈膦酸), 和二钠盐(氯屈膦酸二钠盐, Procter 和 Gamble), 记载在比利时专利 672,205 中(1966)和 J.Org.Chem32,4111(1967), 这两篇在此都全文引入作为参考。

1-羟基-3-(1-吡咯烷基)-亚丙基-1,1-双膦酸(EB-1053)。

1-羟基乙烷-1,1-二膦酸(羟乙膦酸)。

1-羟基-3-(N-甲基-N-戊基氨基)亚丙基-1,1-双膦酸, 也称作 BM-210955, Boehringer-Mannheim(埃本膦酸盐), 公开于 1990 年 5 月 22 日出版的美国专利 U.S.4,927,814, 在此全文引入作为参考。

1-羟基-2-咪唑并-(1,2-a)吡啶-3-亚乙基(米诺膦酸二钠)。

6-氨基-1-羟基亚己基-1,1-双膦酸(奈立膦酸钠)。

3-二甲胺-1-羟基亚丙基-1,1-双膦酸(奥帕膦酸钠盐)。

3-氨基-1-羟基亚丙基-1,1-双膦酸(帕米膦酸二钠盐)。

[2-(2-吡啶基)亚乙基]-1,1-双膦酸(吡屈膦酸盐), 公开于美国专利 No.4,761,406, 在此全文引入作为参考。

1-羟基-2-(3-吡啶基)-亚乙基-1,1-双膦酸(利塞膦酸盐)。

(4-氯苯基)硫基甲烷-1,1-双膦酸(替鲁膦酸盐), 公开于美国专利 4,876,248, Breliere 等 1989 年 10 月 24 日, 在此全文引入作为参考。

1-羟基-2-(1H-咪唑-1-基)-亚乙基-1,1-双膦酸(唑来膦酸盐)。

双膦酸盐的非限定性实例包括阿仑膦酸盐、英卡膦酸盐、氯屈膦酸盐、羟乙膦酸盐、埃本膦酸盐、因卡膦酸盐、米诺膦酸盐、奈利膦酸盐、奥帕膦酸盐、帕米膦酸盐、吡屈膦酸盐、利塞膦酸盐、替鲁膦酸盐、唑来膦酸盐和其药学上可接受的盐与酯。特别优选的双膦酸盐(们)是阿仑膦酸盐, 尤其是阿仑膦酸的

钠、钾、钙、镁或铵盐。例如优选阿仑膦酸的钠盐，尤其是阿仑膦酸的水合物钠盐。盐可以是与整数摩尔水或非整数摩尔水的水合物。更优选阿仑膦酸的水合物钠盐，尤其是阿仑膦酸一钠三水合物。

公知可使用两种或更多种双膦酸盐活性物的混合物。

有机的双膦酸盐的精确剂量要根据剂量表、所选择的特定双膦酸盐、哺乳动物或人体的年龄、大小、性别和身体状态、所治疗的病症的特性和强度及其他相关的医学和生理因素而变化。因此，精确的药学上的有效量不能预先指定，可以容易地由医护人员或临床医师决定。适当的数量可通过从动物模型和人体临床研究的常规试验中确定。通常，选择双膦酸盐的适当量来达到骨吸收抑制作用的量，如，给予骨吸收抑制量的双膦酸盐。对于人体，有效的双膦酸盐的口服剂量一般从约 1.5 到约 6000ug/kg 体重，优选为约 10 到约 2000ug/kg 体重。对于阿仑膦酸盐一钠三水合物，普通人体的给药剂量通常在约 2mg/天到约 40mg/天的范围内，优选为约 5mg/天到约 40mg/天。在美国目前批准的用于预防骨质疏松症的阿仑膦酸盐一钠三水合物剂量是 5mg/天，用于治疗骨质疏松症的剂量是 10mg/天，用于治疗佩吉特症的剂量是 40mg/天。

在可供选择的剂量方案中，除了每日给药外，双膦酸盐可间隔给药，例如以每周一次的剂量，每周两次的剂量，双周剂量和每月两次的剂量给药。在每周一次的剂量方案中，阿仑膦酸一钠三水合物可以以 35mg/周或 70mg/周的剂量给药。

"选择性的雌激素受体调节剂"是指介入或抑制雌激素与受体结合的化合物，而不论以何种机制。雌激素受体调节剂的实例包括但不限于雌激素、孕激素、雌二醇、屈落昔芬、雷落昔芬、拉索昔芬、TSE-424、它莫昔芬、艾多昔芬、LY353381、LY117081、托热米昔芬、氟维司群、4-[7-(2,2-二甲基-1-氧代丙氧基-4-甲基-2-[4-[2-(1-哌啶基)乙氧基]苯基]-2H-1-苯并吡喃-3-基]-苯基-2,2-二甲基丙酸盐、4,4'-二羟基苯甲酮-2,4-二硝基苯基脲和 SH646。

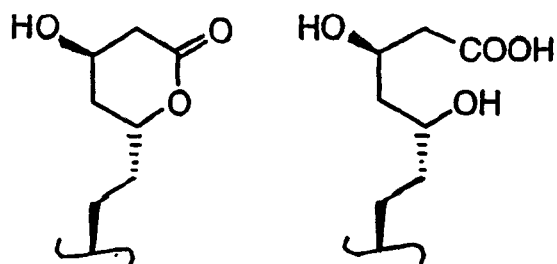
"雌激素受体 β 调节剂"是经 ER α 介导的事件，选择性地激动或拮抗雌激素受体 β (ER 激动 ERO 增加色氨酸羟化酶基因(TPH, 5-羟色胺合成中的关键酶)的转录的化合物。雌激素受体 β 拮抗剂的实施例在 PCT 国际出版物 WO01/82923 中有所公开，2001 年 11 月 08 日，WO02/41835，2002 年 5 月 20 日，两者在此全文引入作为参考。

"雄激素受体调节剂"是指无论以何种机制,介入或抑制雄激素结合至受体的化合物。雄激素受体调节剂的实例包括非那雄胺和其他 5 α -还原酶抑制剂、尼鲁米特、氟他米特、比卡鲁米特、立阿唑和阿比特龙醋酸盐。

"破骨细胞质子 ATP 酶抑制剂"是指存在于破骨细胞顶端膜上的质子 ATP 酶抑制剂,已有报道其在骨吸收流程中起到显著作用。质子泵代表着骨吸收抑制剂设计的一个有吸引力的目标,可治疗和防止骨质疏松症和相关新陈代谢症。参见 C.Farina 等, "Selective inhibitors of the osteoclast vacuolar proton ATPase as novel bone antiresorptive agents," DDT, 4:163-172 (1999), 其在此全文引入作为参考。

"HMG-CoA 还原酶抑制剂"是指 3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA 还原酶。具有 HMG-CoA 还原酶抑制活性的化合物,可通过使用本领域众周知试验简单确认。例如,参见相关试验记载或引用在 U.S.Patent 4,231,938 col.6, 和 WO84/02131 pp.30-33。术语"HMG-CoA 还原酶抑制剂"和"作为 HMG-CoA 还原酶的抑制剂"在此使用时具有相同意义。

可使用的 HMG-CoA 还原酶抑制剂的实例包括但不限于洛弗斯特丁(MEVACOR[®]);参见美国专利 4,231,938, 4,294,926 和 4,319,039), 辛伐他汀(ZOCOR[®]);参见美国专利 4,444,784, 4,820,850 和 4,916,239), 普伐他汀(PRAVACHOL[®]);参见美国专利 4,346,227, 4,537,859, 4,410,629, 5,030,447 和 5,180,589), 氟伐他汀(LESCOL[®]);参见美国专利 5,354,772, 4,911,165, 4,929,437, 5,189,164, 5,118,853, 5,290,946 和 5,356,896), 阿伐他汀(LIPITOR[®]);参见美国专利 5,273,995, 4,681,893, 5,489,691 和 5,342,952)和西伐他汀(作为 rivastatin 和 BAYCHOL[®]已知;参见美国专利 5,177,080)。这些结构式与另外的可用于本发明方法的 HMG-CoA 还原酶抑制剂公开于 M.Yalpani, 第 87 页"Cholesterol Lowering Drugs", Chemistry&Industry, pp.85-89(1996 年 11 月 5 日)和美国专利 4,782,084 and 4,885,314。在此使用的术语 HMG-CoA 还原酶抑制剂包括所有的药学上可接受的内酯与开放-酸的形式(即其中内酯环被打开而形成游离酸)以及具有 HMG-CoA 还原酶抑制活性的盐与酯形式的化合物,因此这些盐、酯、开放-酸与内酯形式的用途都包括在本发明的范畴内。对内酯部分与其相应的开放-酸的形式的图解说明如下列的结构 I 和 II 所示。



内酯

I

开放-酸

II

在其中可以存在的开放-酸形式的 HMG-CoA 还原酶抑制剂中, 优选盐和酯形式可以由开放-酸形成, 所有此类形式均包括在本文使用的术语"HMG-CoA 还原酶抑制剂"的意义的范围内。优选地, HMG-CoA 还原酶抑制剂选自洛弗斯特汀和辛伐他汀, 最优选辛伐他汀。就 HMG-CoA 还原酶抑制剂而言, 术语"药学上可接受的盐"意指本发明中使用的化合物的无毒盐, 其通常通过游离酸与适当的有机的或无机碱反应来制备, 特别是由阳离子形成的盐如钠、钾、铝、钙、锂、镁、锌、和四甲基铵盐, 也包括由胺类形成的盐, 如与氨、乙二胺、N-甲基葡糖胺、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄基苯乙基胺、1-对氯苄基-2-吡咯烷-1'-基-甲基苯并咪唑、二乙基胺、哌嗪和三羟甲基氨基甲烷。更多的盐形式的 HMG-CoA 还原酶抑制剂的实例可以包括但不限于醋酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、重碳酸盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、乙二胺四乙酸钙盐、右旋樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、克拉维酸盐、柠檬酸盐、二盐酸化物、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸酯、依托酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、乙二醇酰基对氨基苯基胂酸盐、己基间苯二酚盐、氯化胺、氢溴化物、氢氯化物、羟基萘甲酸盐、碘化物、异硫羧酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、苦杏仁酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、双羟基萘酸盐、棕榈酸盐、核黄素苷酸酯、磷酸盐/二磷酸、多聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、碱式醋酸盐、琥珀酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐、8-氯茶碱盐、甲苯磺酸盐、三乙基碘化物和戊酸盐。

所记述 HMG-CoA 还原酶抑制剂化合物的酯衍生物可以作为前药, 当吸

收至温血动物血液中时,可以以一种方式分解,使得以释放药物形式并允许药物提供增强的治疗效能。

如上文所述的"整联蛋白受体拮抗剂"是指:选择性地拮抗、抑制或抵消生理学的配体与 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白结合的化合物,选择性地拮抗、抑制或抵消生理性配位体与 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白结合的化合物,选择性地拮抗、抑制或抵消生理性配位体与 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白和 $\alpha_v\beta_5$ 整联蛋白结合的化合物,和拮抗、抑制或抵消在毛细血管内皮细胞上表达的特定整联蛋白(们)的化合物。该术语也指 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_8$ 、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 和 $\alpha_6\beta_4$ 整联蛋白的拮抗剂。该术语也指 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_8$ 、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 和 $\alpha_6\beta_4$ 整联蛋白中的任意组合的拮抗剂。H.N.Lode 和同事在 PNAS USA 96:1591-1596(1999)观察到,在自发性肿瘤转移的消除中,抗血管基因 α_v 整联蛋白拮抗剂和瘤-特异性抗体-细胞活素(干扰白细胞素-2)融合蛋白之间具有协同效应。他们的研究结果提示,这种组合拮抗剂在治疗癌症和转移性肿瘤生长方面有巨大潜力。 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白受体拮抗剂通过一种崭新的、与现有所知药物完全不同的机制抑制骨吸收。整联蛋白是杂二聚跨膜粘着受体,介导细胞-细胞和细胞-基质的相互作用。 α 和 β 整联蛋白亚基相互发生非共价反应,并以二阶阳离子依赖的方式结合细胞外基质配体。在破骨细胞上含量最高的整联蛋白是 $\alpha_v\beta_3$ ($>10^7$ /破骨细胞),其在细胞骨架组织中起比率-限制作用,对于细胞迁移和极化至关重要。 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗效果选自对骨吸收的抑制、对再狭窄的抑制、对黄斑变性的抑制、对关节炎的抑制以及对癌的抑制和对新陈代谢生长的抑制。

"成骨细胞合成代谢剂"是指可架构骨骼的试剂,如 PTH。已知在动物和人体中,甲状旁腺激素(PTH)或其氨基末端片段和类似物的间歇式给药可预防、阻止、部分逆转骨骼损耗和刺激骨的形成。参见 D.W.Dempster 等人的论述,"Anabolic actions of parathyroid hormone on bone,"Endocr Rev14:690-709(1993)。已有研究表明,在刺激骨形成和由此提高骨骼质量和强度方面,甲状旁腺激素的临床有效性。在 RM Neer 等, New Eng J Med 344 1434-1441(2001)中已有结果报道。

此外,甲状旁腺激素-相关蛋白质片段或类似物,如 PTHrP-(1-36)已证明可有效抗钙尿。[参见 M. A. Syed 等, "Parathyroid hormone-related protein-(1-36) stimulates renal tubular calcium reabsorption in normal human volunteers: implications

for the pathogenesis of humoral hypercalcemia of malignancy, "JCEM 86:1525-1531 (2001)]而且也可能作为治疗骨质疏松症的合成代谢试剂。

"非甾体抗炎药"或 NSAIDs, 经环加氧酶(COX)-1 和 COX-2, 可抑制从花生四烯酸到前列腺素的新陈代谢, 非限定性 NSAIDs 实例包括: 乙酰水杨酸、异丁苯丙酸、甲氧萘丙酸、环氟拉嗪、依托度酸、非诺落芬、氟吡落芬、吲哚氯甲酰、酮落芬、酮落酸、美落夕康、萘丁美酮、甲丙嗪、吡罗夕康、舒林酸、甲苯酰吡啶乙酸、二氟苯水杨酸、甲氯胺苯酸酯和苯基保泰松。

"选择性环加氧酶-2 抑制剂"或 COX-2 抑制剂, 是指一种非甾体抗炎药(NSAID), 可以抑制能导致疼痛和体内炎症的 COX-2 辅酶。COX-2 抑制剂的非限定性实例包括: 塞来昔布、依托考昔布, 帕瑞昔布, 罗非昔布, 伐地昔布和鲁米考昔布。

"白介素-1 β 的抑制剂"或 IL-1 β 是指在 IL-1 的抑制剂, 是通过单核细胞、巨噬细胞及其他细胞产生的可溶性因子, 它活化 T-淋巴细胞并加强它们对有丝分裂原或免疫抗原的反应。IL-1 β 抑制剂的非限定性实例包括双醋瑞因和大黄酸。

"LOX/COX 抑制剂"是指参与花生四烯酸路径的抑制剂或所有的三种主要的酶, 即 5-LOX、COX-1 和 COX-2。LOX/COX 抑制剂的非限定性实例是利克飞龙。

若配制成固定剂量, 这种组合产品时使用在如下所述剂量范围内的本发明的化合物和其他在其核准剂量范围内的药学活化剂(们)。当组合制剂不适当时, 备选地, 本发明的化合物可以与已知的药学上可接受的试剂顺序使用。

与本发明化合物有关的术语"给药"和其变(如"服用"化合物), 意指引入化合物或化合物的前药到需要治疗的动物中。当本发明的化合物或其前药与一种或多种其他的活性药物(如, 细胞毒素试剂等)联合使用时, "给药"和其变化形式均应理解为包括同时和顺序的引入化合物或其前药和其他试剂。本发明包括在本发明范围内的化合物的前药。通常, 这样的前药是本发明化合物的功能性衍生物, 其在体内易转变为所需的化合物。因此, 在本发明的治疗方法中, 术语"服用"包括使用那些已知化合物, 或虽然未知但是可以在体内转化成已知化合物的化合物的各种状况的治疗。对于选择和制备适当前药衍生物的常规过程被描述在例如, 在"Design of Prodrugs, "ed.H.Bundgaard, Elsevier, 1985, 其在

此全文引入作为参考。这些化合物的代谢产物，包括在将本发明的化合物引入生物学环境时产生的活性物质。

在此使用的术语"组合物"意指包括包含特定量的特定成分的，以及直接或间接地由特定量的特定成分组合产生的任何产品。

在此使用的术语"治疗有效量"意指活性化合物或药物试剂的量，该量可在组织、系统、动物或人体中引起生物学或医学反应，是研究人员、兽医、医生或其他的临床医师所追求的。

在此使用的术语，疾病的"治疗"或"疗法"包括：预防疾病，如导致在可能招致或易感染疾病，但仍未经历或显示疾病症状的哺乳动物中，疾病的临床症状不再发展；抑制疾病，如，阻止或减少疾病或其临床症状的发展；或减轻疾病，如，导致疾病或其临床症状的逆转。

在此使用的术语"骨吸收"是指通过破骨细胞退化骨骼的过程。

本发明也包括可有效地治疗骨质疏松症或其他的骨骼机能失调的药物组合物，该治疗包括以本发明的治疗有效量的化合物给药，其中可以包括或不包括药学上可接受的载体或稀释剂。适用于本发明的组合物包括：含有本发明化合物和其药理学上可接受的载体的水溶液，例如，pH7.4 的盐水。该溶液可通过局部的弹丸注射，引入病人的血液中。

当依据本发明的化合物对受试验人体给药时，每日的剂量一般可通过处方医师决定，剂量通常根据年龄、体重和个体病人的反应以及病人症状的严重程度而决定。

一种应用范例是，以适量化合物对进行组织蛋白酶依赖症治疗的哺乳动物给药。本发明的口服剂量，作为指示性效果，可介于 0.01 毫克/公斤/天(mg/kg/天)到约 100 毫克/公斤/天，优选 0.01 到 10 毫克/公斤/天，最优选 0.1 至 5.0mg/kg/天。对于口服给药，优选片剂的药物组合物，其中含有 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100 和 500 毫克活性成分，该活性成分根据受治疗病人的症状调整剂量。典型的药剂一般包含从约 0.01 毫克至约 500 毫克的活性成分，优选自约 1 毫克至约 100 毫克的活性成分。静脉内匀速注射时，最大优选剂量在从约 0.1 至约 10 毫克/公斤/分钟的范围内变化，有利的是，本发明的化合物可在单一日剂量中给药，或将总日剂量分为每日二、三或四次给药。此外，本发明的优选化合物以适当鼻腔内载体形式于鼻腔内给药，或用

该领域众所周知的技术，以皮肤贴片形式经过皮肤路线给药。在经过皮肤输送系统的整个剂量给药过程中，连续给药当然优于间断给药。

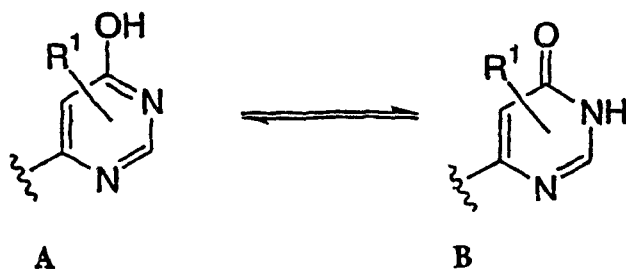
本发明的化合物可与对治疗组织蛋白酶介导的症状有用的其他试剂组合使用。该组合的个别成分可以在治疗过程中的不同时期单独给药，或者同时分开给药，或者以单一的组合形式给药。由此可以认为，本发明包括所有可同时进行的或可交替的治疗方法，术语“给药”具有与之相应的释义。应当了解的是，本发明化合物与其他可有效治疗组织蛋白酶介导的症状的试剂的组合的范围，原则上包括与任何可有效地治疗有关雌激素功能失调症的药物组合物的任意组合。

因此，本发明的范围包括：本发明要求保护的化合物与第二试剂的组合的应用，所述第二试剂选自：有机双膦酸盐；雌激素受体调节剂；雄激素受体调节剂；破骨细胞质子 ATP 酶抑制剂；HMG-CoA 还原酶抑制剂；整联蛋白受体拮抗剂；成骨细胞合成代谢试剂，如 PTH；非甾体抗炎药；选择性环加氧酶-2 抑制剂；白介素-1 β 抑制剂；LOX/COX 抑制剂和其药学上可接受的盐和混合物。

从这里所包含的教导中，本发明的这些和其他方面是显而易见的。

定义

本发明的化合物可以有不对称中心、手性轴和手性平面(如下所述 E. L. Eliel 和 S.H. Wilen, *Stereochemistry of Carbon Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1994, pages 1119-1190)，可以是消旋体、外消旋体混合物和单独的非对映体，所有可能的异构体和混合物，包括光学异构体，均被归入本发明中。此外，在此公开的化合物可以以互变异构体存在，即使只公开了化合物的一个互变异构结构，但是两种互变异构体形式均包括在本发明的范围内。例如，以下任何关于化合物 A 的权利要求应理解为包括互变结构 B，反之亦然，也包括其混合物。



当任何变量(如 R^1 、 R^2 、 R^a 等)在任何组成要素中出现超过一次,其各自出现的定义就彼此独立。而且,只有当这种组合结果能产生稳定的化合物时,要素和变量的组合才是可允许的。从取代基画到环系的路线标示着所标示的键可连接在任一可取代的环碳原子上。若环系是多环的,意指该键只连接在邻环上的任一适当碳原子上。

应当理解,本发明化合物上的取代基和取代型式,可以由本领域的普通技术人员进行选择,从而提供化学上稳定的,可容易地通过本领域已知的方法进行合成,也可从易得的起始原料用以下公布的方法合成的化合物。应当理解,若取代基自身被超过一个的取代基团所取代,那么只要可以得到稳定结构的结果,这些多个基团可能在相同的碳原子或不同的碳原子上取代。"任选被一个或多个取代基取代"一词应当被看成等价于"任选地被至少一个取代基取代"一词,并且在此情况下,优选的方案将含有零到三个取代基。

本文使用的"烷基",除非另作说明,意指含有一至十个碳原子的包括支链和直链的饱和脂肪族烃基团。例如 C_1 - C_{10} ,如在" C_1 - C_{10} 烷基"中被定义为包括在直链、支链、环状结构中具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个碳原子的基团。如" C_1 - C_{10} 烷基 I"具体包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等。

"烷氧基"或"烷基氧基",除非另有说明,表示其中烷基通过一个氧桥连接的如上面定义的烷基。烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基等。

术语"环烷基"或"碳环",除非另有说明,意指三至八个碳原子的环状烷烃的环,或在该范围内的任何数目的环烷烃(如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或环辛基)。

若碳原子的个数未具体指定,则术语"烯基"是指直链或支链的非芳香烃基,包含 2 至 10 个碳原子和至少 1 个碳碳双键。优选地,存在 1 个碳碳双键,并且最多可以存在 4 个非芳香族的碳碳双键。因此," C_2 - C_6 烯基"意指含有 2 到 6 个碳原子的烯基。烯基基团包括乙烯基、丙烯基、丁烯基和环己烯基。如上针对烷基所述的,若已经指定取代的烯基,那么烯基的直链、支链或环状的部分可以包含双键并且可以被取代。

术语"炔基",除非另有说明,是指直链的或支链的烃基,包含 2 至 10 个碳原子,含有至少 1 个碳碳三键。最多含有 3 个碳碳三键。因此," C_2 - C_6 炔基"

意指含有 2 到 6 个碳原子的炔基。炔基基团包括乙炔基、丙炔基和丁炔基。如上针对烷基所述的,若炔基基团已被指定,那么炔基的直链、支链或环状部分可以包含三键并且可以被取代。

在某些情况中,可以用包括零个碳原子的范围来定义取代基,如(C_0-C_6)亚烷基-芳基。若芳基是苯基,则该定义可包括苯基本身以及 $-CH_2Ph$ 、 $-CH_2CH_2Ph$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)Ph$ 等。

本文所用的"芳基",意指任何稳定的在每个环中最多有 12 个原子的单环或二环碳环,其中至少一个环是芳香环。这种芳基的实例包括苯基、萘基、四氢萘基、2,3-二氢化茚基、联苯基、菲基、蒽基或茚基。如果其中芳基取代基是二环的并且其中一个环是非芳香环,则应该理解连接是经芳环连接的。

本文使用的术语"杂芳基",表示一种稳定的单环、二环或三环体系,每个环中最多有 10 个原子,其中至少一个环是芳香环并且包含从 1 到 4 个选自 O、N 和 S 的杂原子。在此定义范围内的杂芳基包括但不限于:苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并呋喃基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、呋唑基、呋啉基、噻啉基、呋喃基、二氢吡啶基、吡啶基、吡啶吡嗪基、吡唑基、异苯并呋喃基、异氮茚基、异喹啉基、异噻唑基、异噁唑基、萘并吡啶基、噁二唑基、噁唑基、噁唑啉基、异噻啉基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并吡啶基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、喹喔啉基、四唑基、四唑并吡啶基、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、三唑基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并呋喃基、二氢苯并噻吩基、二氢苯并噁唑基、二氢吡啶基、二氢喹啉基、亚甲基二氧基苯、苯并噻唑基、苯并噻吩基、喹啉基、异喹啉基、噁唑基和四氢喹啉。如果杂芳基取代基是二环的,并且其中一个环为非芳族环或无杂原子,则应该理解该连接只经芳环或经含杂原子的环连接的。若杂芳基包含氮原子,那么应该理解此定义范围也包括其相应的 N-氧化物。

正如本领域技术人员所理解的,本文使用的"卤素"或"卤原子"包括氯、氟、溴和碘。术语"酮基"意指羰基($C=O$)。

术语"氯代烷基",除非另作说明,意指被一个至五个,优选一个至三个卤素取代的,如上文定义的烷基。代表性的实例包括但不限于三氟甲基、二氯乙基等。

术语"羟烷基",意指一至六个碳原子的线性一价羟基,或被一个或二个羟

基取代的三至六个碳原子的支链的一价烃基, 假若存在两个羟基, 则二者不在同一个碳原子上。代表性的实例包括但不局限于羟甲基、2-羟乙基、2-羟基丙基、3-羟基丙基等。

本文使用的术语"杂环"或"杂环基", 除非另作说明, 意指5至10元的非芳香环, 包含1到4个选自O、N、S、SO或SO₂的杂原子, 并且包括二环基团。因此, "杂环基"包括但不局限于下列基团: 哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、吗啉基、硫代吗啉基、四氢吡喃基、二氢哌啶基、四氢噻吩基等。若杂环包含氮原子, 那么应当理解此定义范围也包括其相应的N-氧化物。

本发明也包括式I的N-氧化物衍生物及其受保护的衍生物。例如, 当式I化合物包含一个可氧化的氮原子时, 可用本领域的公知方法将氮原子转化为N-氧化物。当式I化合物也包含如羟基、羧基、巯基或任何含氮原子的基团时, 这些基团可以用适当的保护基保护。适当的保护基一览表可见: T.W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc. 1981, 在此引入全文作为参考。式I化合物的保护性衍生物可用本领域公知方法制备。

当术语"烷基"或"芳基"或其任何前缀字根以一个取代基的名称出现(如, 芳基 C₀₋₈ 烷基)时, 应理解为包括了上文给出的对于"烷基"和"芳基"的限定。指定的碳原子个数(如 C₁₋₁₀)将独立地指在烷基或环状烷基部分的碳原子个数, 或较大取代基的烷基部分的碳原子数, 其中烷基作为其前缀字根出现。

本发明化合物的药学上可接受的盐包括, 本发明化合物的无机或有机酸形式的常规无毒盐。例如, 常规的无毒盐包括来源于无机酸的盐: 如, 由盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸形成的盐等, 也包括从有机酸制备的盐, 有机酸例如为醋酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘甲酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、安息香酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基-安息香酸、反丁烯二酸、甲苯磺酸、甲基磺酸、乙烷二磺酸、草酸、异乙硫酸、三氟醋酸等。上述药学上可接受的盐及其他典型的药学上可接受的盐的制备在 Bergetal., "Pharmaceutical Salts, "J.Pharm.Sci., 1977:66:1-19 中有更全面的描述, 在此引入参考。本发明的化合物的药学上可接受的盐可用常规的化学方法自包含碱性或酸性部分的本发明化合物合成。通常碱性化合物的盐采用离子交换色谱法或通过使游离碱与化学计量的或过量的所需形成盐的无机或有机酸在适当的溶剂或者各种溶剂的组合

中反应而制备。同样地，酸性化合物的盐是通过用适当的无机或有机碱反应而形成的。

为了本说明书的目的，下列缩写有下述含义：

BuLi	=	丁基锂
CBr ₄	=	四溴甲烷
CH ₂ Cl ₂	=	二氯甲烷
CHCl ₃	=	氯仿
(CH ₃ O) ₂ CO	=	碳酸二甲基酯
DAST	=	三氟化二乙基氨基硫
DIBAL-H	=	氢化二异丁基铝
DIPEA	=	二异丙基乙胺
DMF	=	N,N-二甲基甲酰胺
DMSO	=	二甲亚砜
Et ₃ N	=	三乙胺
EtOH	=	乙醇
KH ₂ PO ₄	=	磷酸二氢钾
HCl	=	盐酸
MeOH	=	甲醇
MgBr	=	溴化镁
MgSO ₄	=	硫酸镁
Na ₂ CO ₃	=	碳酸钠
NaOMe	=	甲醇钠
Na ₂ SO ₄	=	硫酸钠
PCl ₅	=	五氯化磷
PdCl ₂ (dppf)	=	[1,1'-双(二苯膦基)二茂铁]二氯化钯(II)
PG	=	保护基
PPh ₃	=	三苯基膦
Pr ₂ NEt	=	N,N-二异丙基乙胺
PyBOP	=	苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷基膦鎓-六氟磷酸盐
rt	=	室温

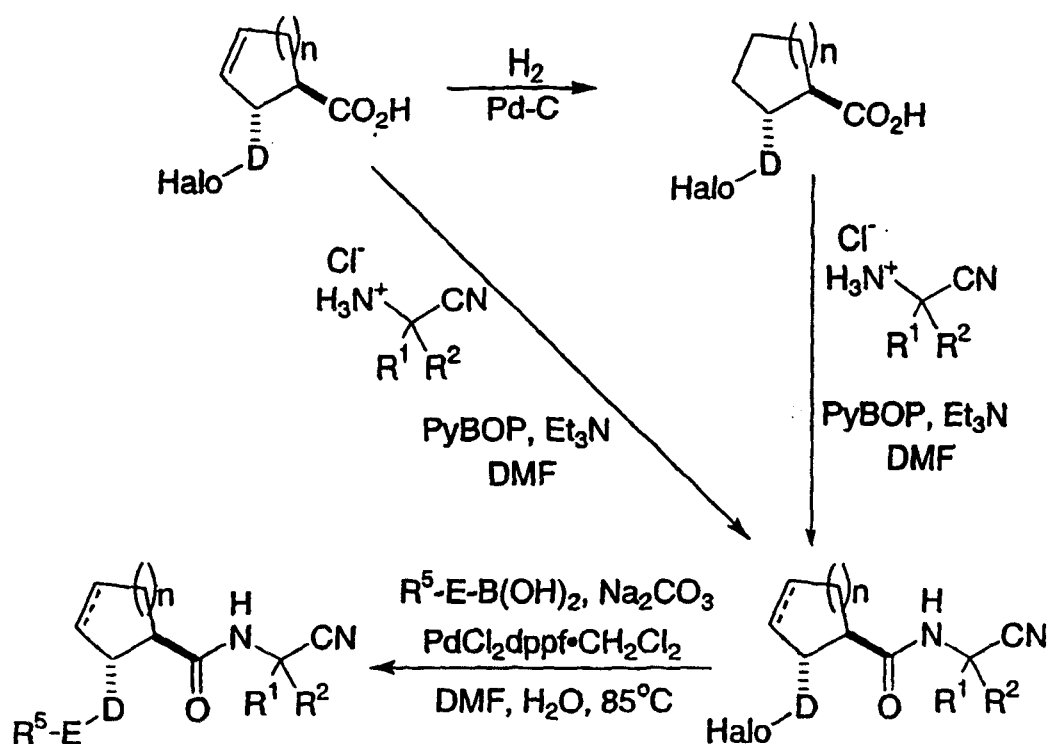
sat.aq.	=	饱和水的
TBAF	=	四丁铵氟化物
TfO	=	三氟甲基磺酸盐
THF	=	四氢呋喃
tlc	=	薄层色谱法
TMSBr	=	溴化三甲基硅烷
Me	=	甲基
Et	=	乙基
n-Pr	=	正丙基
i-Pr	=	异丙基
n-Bu	=	正丁基
i-Bu	=	异丁基
s-Bu	=	仲丁基
t-Bu	=	叔丁基

本发明的新化合物可根据下述的一般流程, 用适当原料制备, 下列具体实施例可更进一步例证。但是, 实施例中举例说明的化合物并不应解释成构成本发明化合物的唯一类别。本领域的技术人员应能知道, 下列制备过程的条件和流程的各种已知变化方式都可用于制备这些化合物。除非另作说明, 所有的温度都是摄氏温度。

反应流程

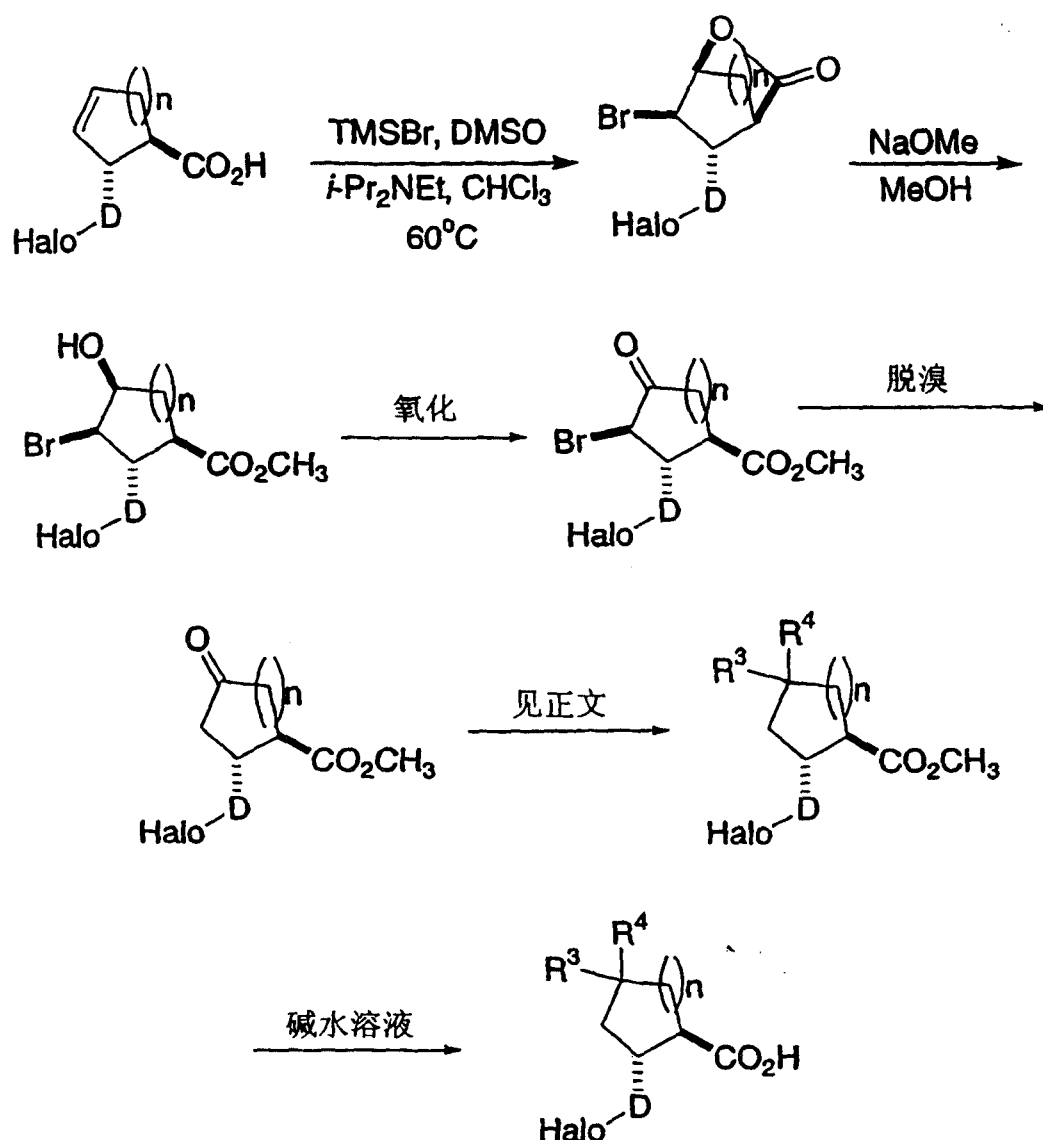
本发明的化合物可根据如下所述的流程 1 制备。不饱和的或饱和的环状羧酸(从烯烃的氢化制备, 参见 Sakito, Y.; Suzukamo, G. *Chem. Lett.* 1986, 621-624(n=1) 和 Morin, R.; Manuel, C.; Mazmanian, C. *Eur. J. Med. Chem.* 1976, 11, 493-499(n=2)) 与一个适当取代的氨基乙腈连接, 以制备本发明的化合物。如图所示, 若 D 上的取代基是卤素, 则用钯-催化的 Suzuki 偶联合适的硼酸来提供所示的本发明的附加化合物。

流程 1



本发明的化合物可根据如下所述的流程 2 制备。可以用 TMSBr/DMSO/DIPEA 将来自流程 1 的不饱和酸转变为溴代内酯(参见 Miyashita, K.; Tanaka, A.; Mizuno, H.; Tanaka, M.; Iwata, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1994, 847-851)。在甲醇盐催化下, 内酯开环得到溴代羟基酯, 通过氧化醇, 然后以例如锌进行还原性脱溴作用而将溴代羟基酯转变为相应的酮。然后分别用 DAST 或 PCl_5 处理该酮, 转为相应的偕-二氟($\text{R}^3, \text{R}^4=\text{F}$)或偕-二氯($\text{R}^3, \text{R}^4=\text{Cl}$)化合物。或者, 可用甲基三苯基磷盐通过 Wittig 反应, 将该酮转变为相应的外型-亚甲基化合物, 进而通过 Simmons-Smith 型环丙烷化反应, 转变为螺-环丙烷衍生物, 更进一步, 在适当的催化剂存在下, 用氢处理环丙烷产物, 得到偕-二甲基($\text{R}^3, \text{R}^4=\text{CH}_3$)衍生物。如流程 1 中所述, 以碱水溶液水解酯官能团, 进行肽偶联反应和 Suzuki 反应, 得到本发明的化合物, 其在环烷基片段上带有各种取代基。

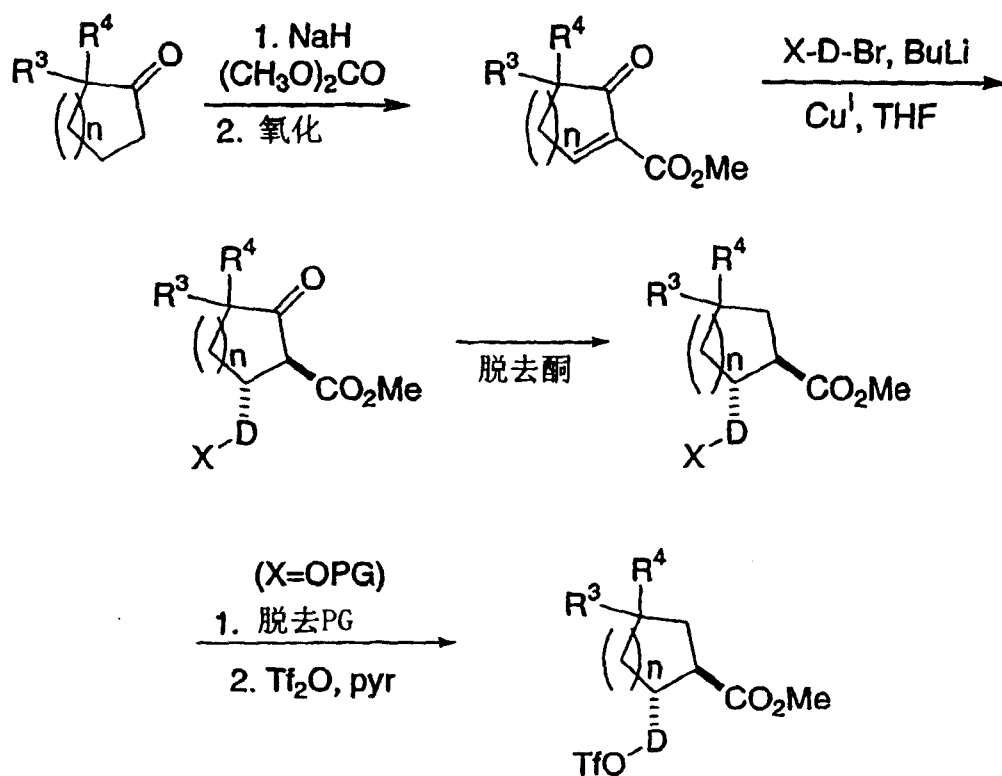
流程 2



本发明的化合物也可依流程 3 制备。通过用合适的碱例如氢化钠处理，然后用碳酸二甲基酯猝灭所得的烯醇化物阴离子，继之以 $\text{PhSeCl/pyr/H}_2\text{O}_2$ 氧化，可以将适当取代的环烷酮(如 R^3 , $\text{R}^4=\text{F}$; Cl ; 螺-环丙基或 CH_3 , 分别参见 Patrick, T. B.; Scheibel, J. J.; Cantrell, G. L. J. Org. Chem. 1981, 46, 3917-3918; Harmata, M.; Shao, L. Synthesis 1999, 1534-1540; Crandall, J. K.; Seidewand, R. J. J. Org. Chem. 1970, 35, 697-701; 或 Negishi, E.; Chatterjee, S. Tetrahedron Lett. 1983, 24, 1341-1344,)转变为 α -不饱和的酮酯。该化合物可作为共轭加成反应中的亲电子试剂，与各种亲核试剂反应，亲核试剂例如但不限于双官能基的有机铜试

剂。还原性地脱去酮官能团经由甲苯磺酰基脒(参见 Taber, D.F; Malcolm, S.C.J.Org.Chem.1998, 63,3717-3721), 或者备选地, 通过缩硫醛的 Raney 镍脱硫反应(参见 Newman, M.S.; Walborsky, H.M. J.Am.Chem.Soc., 1950,72,4296-4297), 继之以如流程 2 中所述的酯水解和肽偶联反应, 得到本发明的化合物。当 X 是被保护的氧官能团时, 就进行 Suzuki 反应(经由三氟甲磺酸), 继之以如流程 2 中所述的酯水解和肽偶联反应, 提供了本发明的化合物。

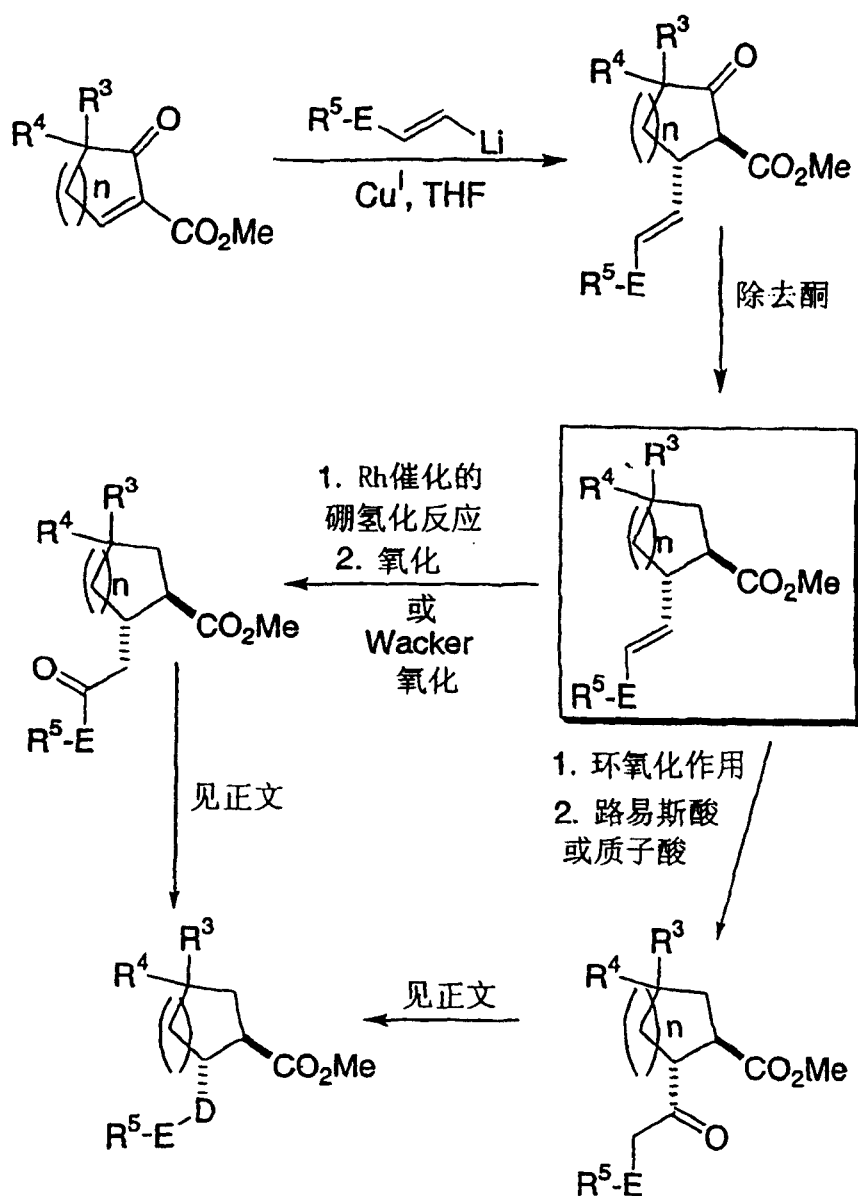
流程 3



其中 D 是杂环的本发明化合物的不同系列可以如流程 4 中所示来制备。铜介导的乙烯基锂或镁物质共轭加成到来自流程 3 的 α -不饱和的酮酯, 继之以如流程 2 所述的酮脱去反应, 得到一种通用的中间体烯烃(加方框的), 在一种情况下, 通过铑催化的硼氢化反应, 随之发生氧化反应或发生 Wacker 氧化反应, 或在另一种情况下, 通过环氧化反应继之以酸催化的环氧化物重排(参见 Ranu, B.C.; Jana, U.J.Org.Chem, 1998,63, 8212-16 在此参考)可以将该中间体烯烃选择性地转变(当 E=芳基或者杂芳基时)为两种位置异构体酮中的一种(参

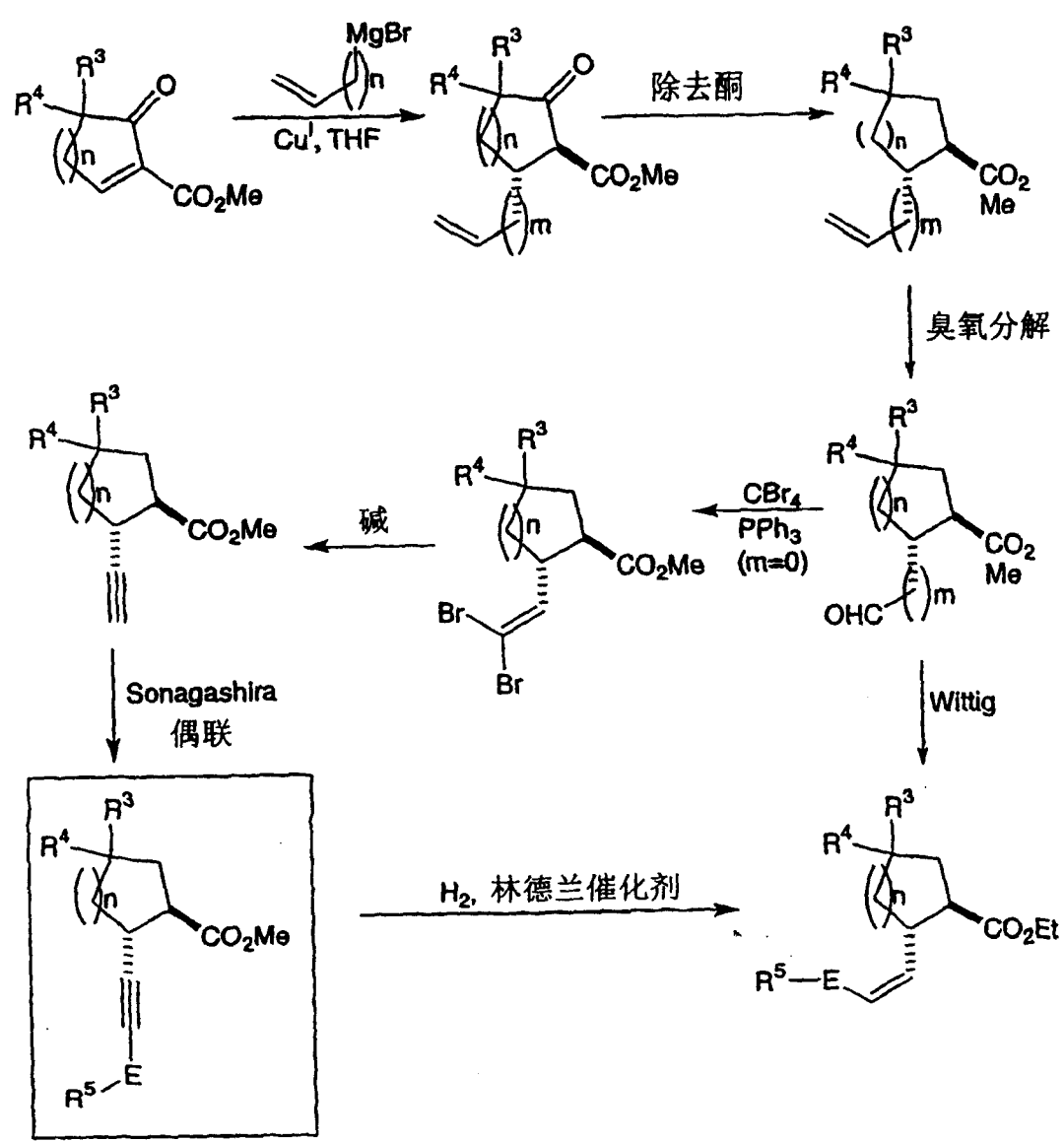
见 Hayashi, T.; Matsumoto, Y. *Tetrahedron Asymmetry* 1991, 2, 601-612 在此参考)。也可以随后通过经由相应的 α -苯硫基酮的羰基换位使这些酮相互转变。(参见 Thost, B.M.; Hiroi, K.; Kurozumi, S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 438-440)。然后根据沿用已久的文献先例(参见 Gauthier, J.Y. 等 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 87-92 在此参考), 可以将这些 α -甲基酮中的每一个, 均更进一步地转变为各种杂环, 如噻唑、异噻唑、噁唑、异噁唑、三唑、咪唑、噻二唑等。按照流程 1 的酯水解和肽偶联反应得到本发明的化合物。

流程 4

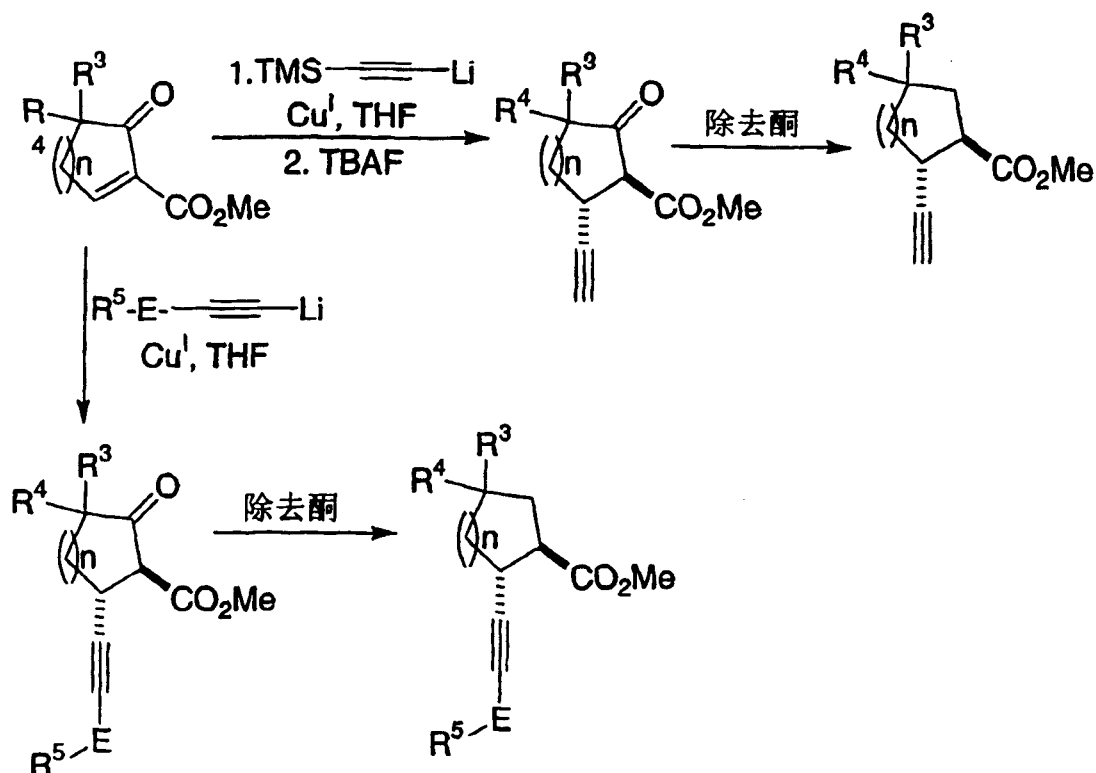


本发明的化合物也可依流程 5a 制备。在合适的铜(I)催化剂存在下, 乙烯基($m=0$)或者烯丙基($m=1$)格氏试剂加成到来自流程 3 的__-不饱和的酮酯, 得到共轭加成产物。还原除去酮的还原转移以及与臭氧反应得到相应的醛。用四溴化碳、三苯基膦以及碱, 可以将这种来源于乙烯基格氏试剂($m=0$)与不饱和的酮酯共轭加成的醛, 转变成末端炔。然后 Sonagashira 反应可提供另外一种可用于制备本发明化合物的通用中间体(加方框的), 其中 D 为烯烃、炔烃或是杂环。另外, 这种中间体也能直接通过炔部分与流程 3 所示的前面提到的不饱和酮酯的 1, 4 加成而得到(参见 Eriksson, M.; Ilieski, T.; Nilsson, M.; Olsson, T.J.Org.Chem.1997,62,182-187), 如流程 5b 所示。

流程 5A

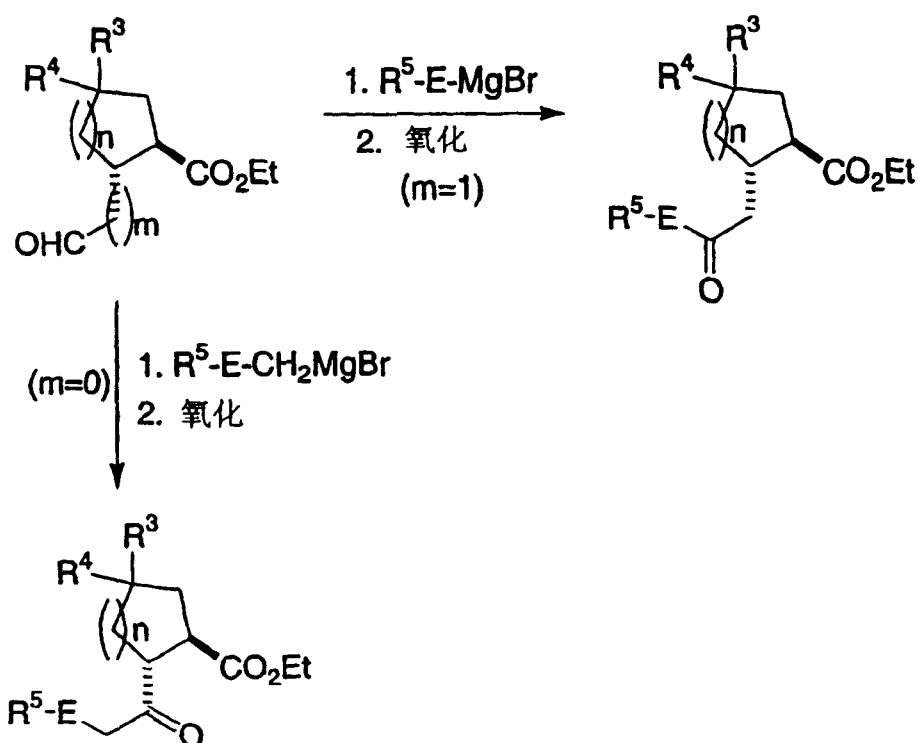


流程 5B



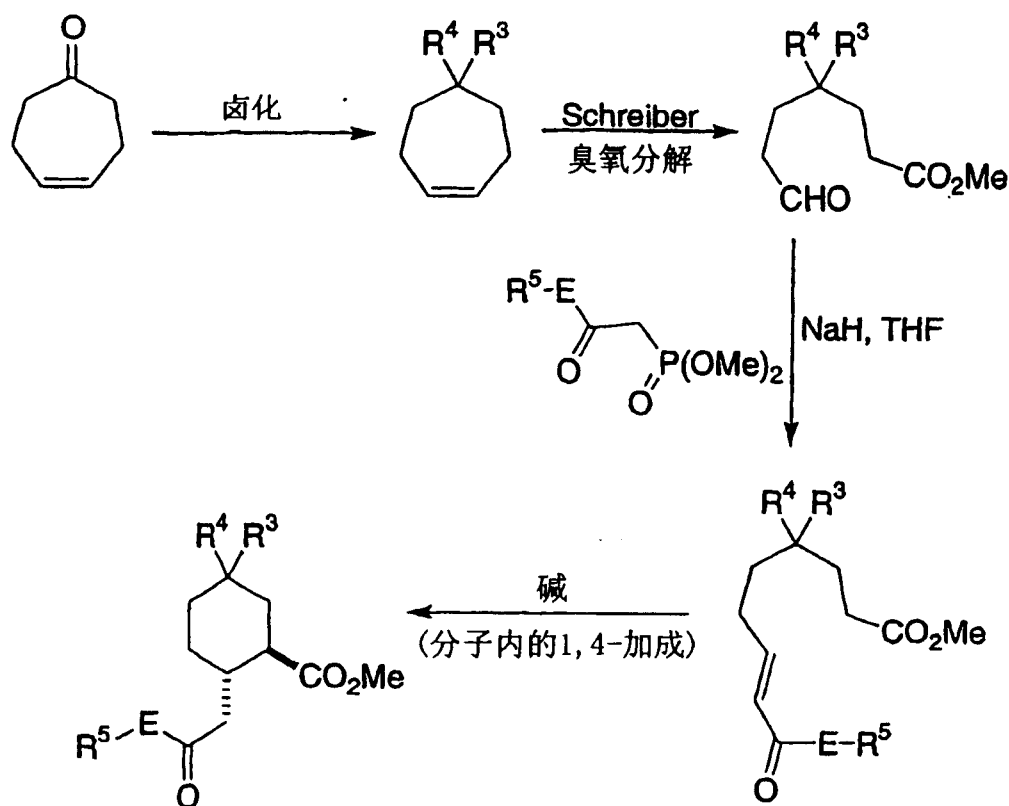
本发明的化合物也可按照流程 5c 中所示的化学反应路线制备。其中，将同系的醛中间体($m=0$, $m=1$)进行格利雅加成，该醛源于与流程 5a 中相应的末端烯烃发生臭氧分解反应，然后使所得的醇发生氧化反应，得到位置异构体-亚甲基酮和随后按照流程 4 得到本发明化合物。

流程 5C



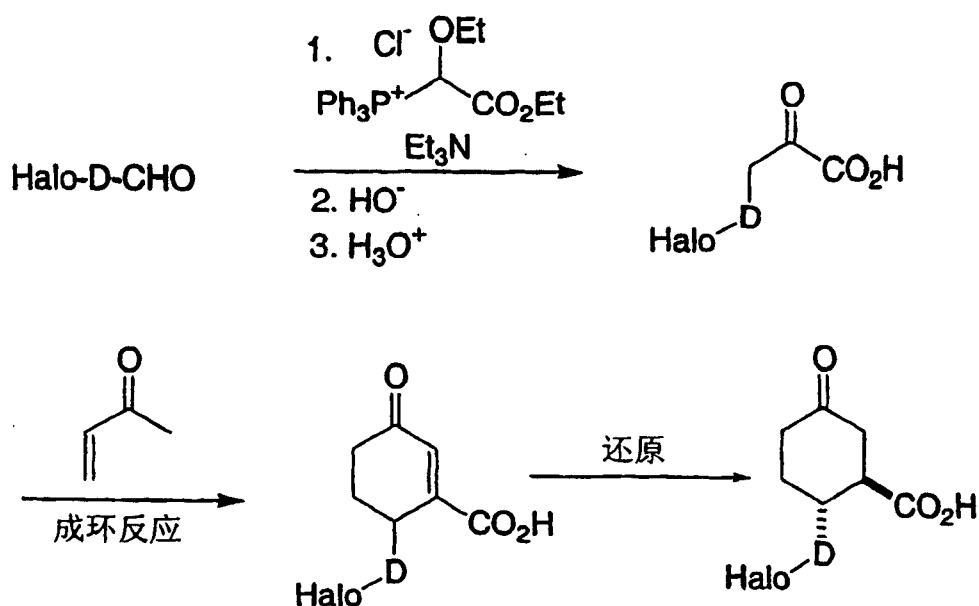
本发明的化合物也可以按照流程 6 的方法制备, 按照流程 2 中讨论的方法, 环庚-4-烯-1-酮 (参见 Louis, J.; Bielawski, C.W.; Grubbs, R.H.J.Am.Chem.Soc.2001,123,11312-11313) 可以被转变成各种偕二取代衍生物, 并且进一步通过 Schreiber 臭氧分解法转变为末端不同的醛酯 (参见 Schreiber, S.L.; Claus, R.E.; Reagen, J.TetrahedronLett.1982,23, 3867-3870)。然后与一种合适的 α -磷酸基酮进行霍纳-华兹沃斯-埃蒙斯型的烯化反应, 通过分子内的 1,4-加成, 生成 α -甲基酮, 后者按照流程 4 能转变成本发明的化合物。

流程 6



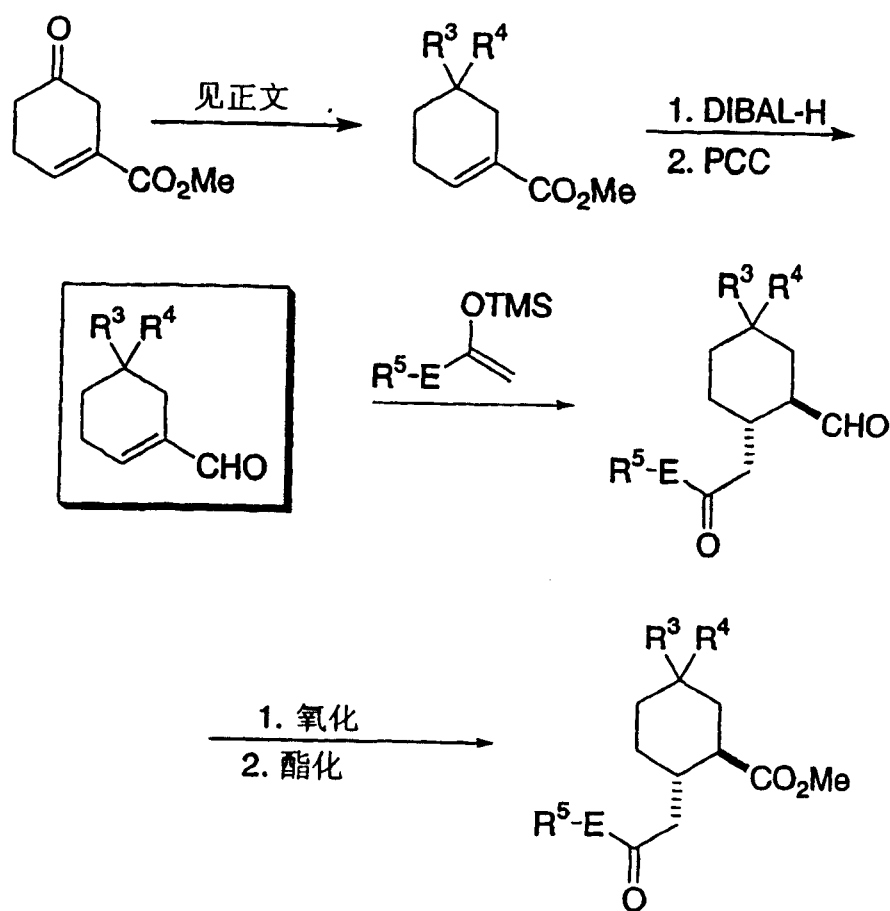
本发明的化合物也可以按照流程 7 来制备。各种醛类化合物与乙氧基(乙氧基羰基)甲基)三苯基磷氯化物发生 Wittig 反应, 在水解烯醇醚和酯官能团之后, 产生酮酸类衍生物(参见 Bach, K.K.; El-Seedi, H.R.; Jensen, H.M.; Nielsen, H.B.; Thomsen, I.; Torssell, K.B.G. *Tetrahedron* 1994, 50, 7543-7556)。进行罗宾森成环反应/随后还原(参见 Ziegler, F.E.; Condon, M.E. *J. Org. Chem.* 1971, 36, 3707-3713), 得到环己酮中间体, 后者能按照流程 2 转变成本发明的化合物。

流程 7

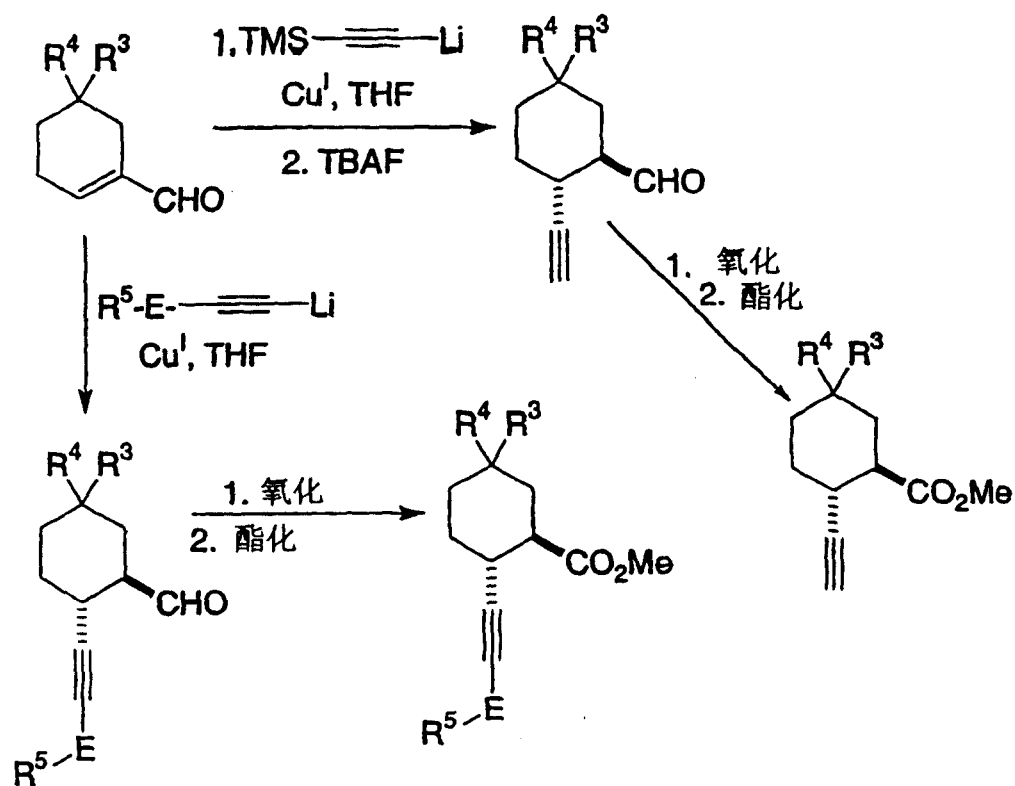


本发明的化合物也可以按照流程 8 来制备。因此, 用 DAST 或者五氯化磷处理已知的 α,β -不饱和酮酯(参见 Webster, F.X.; Silverstein, R.M.Synthesis 1987,922-924), 分别产生相应的偕二氟($\text{R}^3, \text{R}^4=\text{F}$)和偕二氯化合物。然后依次进行还原/氧化反应, 从酯类得到 α,β -不饱和醛。甲基酮衍生的烯醇-甲硅烷基醚发生亚胺离子催化的 Mukaiyama-Michael 加成(Brown, S.P.; Goodwin, N.C.; Macmillan D.W.C.J.Am.Chem.Soc. 2003,125,1192-94), 将醛氧化为酸, 用重氮甲烷进行酯化得到酮酯, 后者可以按照流程 4 被转变为本发明的化合物。有机合成领域的技术人员将会理解, 如流程 8 中所示的 α,β -不饱和醛中间体(加方框的)也可按照流程 3 至 5a-c 所示的共轭加成策略转变成本发明的化合物; 这方面的内容在流程 9 中所阐明(注意与流程 5b 作类比)。

流程 8



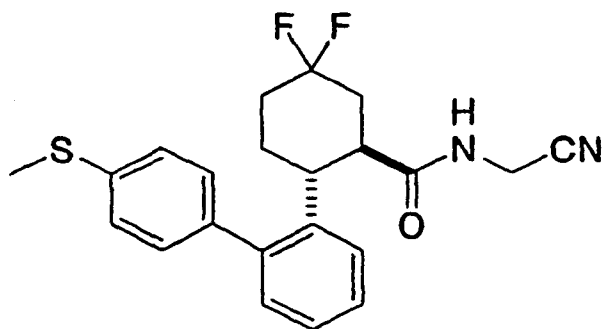
流程9



下面的实施例阐述了选择的本发明的化合物的合成方法:

实施例 1

(1R,2R)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺的合成



在 0°C 下, 向二甲基亚砜(1.10mL, 15.5mmol)的氯仿(15mL)溶液中逐滴加

入三甲基溴硅烷(1.96mL, 15.1mmol), 在该温度下搅拌 30 分钟。加入固体形式的(-)-(1R,6R)-6-(2-溴苯基)环己-3-烯-1-羧酸(4.24g, 15.1mmol; 通过使用(R)-苯乙基胺拆分 1, 3-丁二烯和 2-溴代肉桂酸的外消旋狄尔斯-阿尔德加成产物 [Morin, R.; Manuel, C.; Mazmanian, C. Eur. J. Med. Chem. 1976, 11, 493-499] 而制备的 93% ee, $[\alpha]_D^{25} = -62^\circ$ (c=1.0, CHCl₃)), 在室温下搅拌 1 小时, 之后在 0°C 下加入二异丙基乙基胺(2.65mL, 15.2mmol), 然后回流 24 小时。然后将反应器内容物冷却至室温, 用乙酸乙酯稀释, 并依次用水、5%盐酸、水和盐水洗涤, 将有机相用硫酸钠干燥。真空浓缩得到(1R,2R,4R,5S)-4-溴-2-(2-溴苯基)-6-氧杂双环[3.2.1]辛烷-7-酮油状固体。

将预先制备好的甲醇钠(0.4M 的甲醇溶液中)加入(1R,2R,4R,5S)-4-溴-2-(2-溴苯基)-6-氧杂双环[3.2.1]辛烷-7-酮(5.43g, 15.1mmol)的甲醇(20ml)溶液中, 在室温下搅拌 1.5 小时。然后用 0.5M 的盐酸溶液(50ml)处理混合物, 用旋转蒸发器减压蒸除甲醇。残留物在水和乙酸乙酯之间进行分配, 分层, 将水相用另外的乙酸乙酯萃取, 将合并的有机相用水、5%的碳酸钠溶液(2x75mL)和盐水洗涤, 通过硫酸钠干燥。与乙醚/正己烷一起研磨, 在真空下浓缩, 得到(1R,2R,4R,5S)-4-溴-2-(2-溴苯基)-5-羟基环己烷甲酸甲酯微黄色固体。

在 0°C 下, 将新制备的琼斯试剂(2.7M, 7.0mL)加入(1R,2R,4R,5S)-4-溴-2-(2-溴苯基)-5-羟基环己烷甲酸(2.50g, 6.38mmol)的丙酮溶液(25ml)中, 在室温下搅拌 40 分钟。然后用水稀释混合物, 并用乙醚萃取三次。合并所有萃取液, 用水、饱和碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤, 用硫酸钠干燥。真空浓缩得到(1R,2R,4R)-4-溴-2-(2-溴苯基)-5-氧代环己烷甲酸甲酯的无色浆状物质。

将 1M 的磷酸二氢钾(32ml)溶液加入(1R,2R,4R)-4-溴-2-(2-溴苯基)-5-羟基环己烷甲酸甲酯(2.49g, 6.38mmol)和锌粉(21g, 330mmol)的四氢呋喃(58mL)浆液中, 室温下快速搅拌 1 小时。通过硅藻土过滤混合物, 用乙酸乙酯和水充分洗涤过滤垫。将滤液转移到分液漏斗中, 摇晃, 分离各层。用盐水洗涤有机相, 并用硫酸钠干燥。真空浓缩得到(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-5-氧代环己烷甲酸甲酯的无色固体。

在 -20°C 下将(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-5-氧代环己烷甲酸甲酯(1.69g, 5.46mmol)的二氯甲烷(23mL)溶液用甲醇(22mL, 10mol%)和二乙氨基硫物三氟化(DAST)(1.73mL, 13.1mmol)处理, 用 1.5 小时慢慢温热到室温, 并在室温下持

续搅拌 30 分钟。然后，在 0℃下，通过仔细地加入饱和碳酸氢钠溶液来淬灭过量反应试剂。然后将反应器内的物质用二氯甲烷稀释，并且用饱和的碳酸氢钠水溶液和水洗涤，再用硫酸钠干燥。真空浓缩得到(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-5,5-二氟环己烷甲酸甲酯的稠的褐色的浆液。

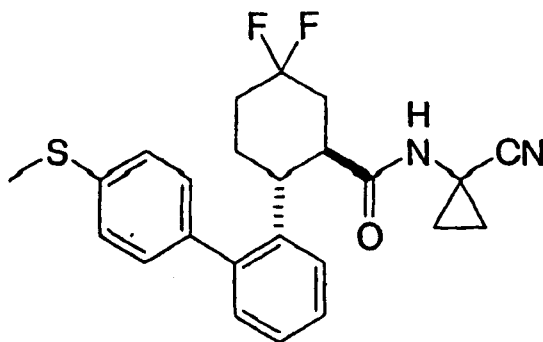
将 2M 的氢氧化锂的水溶液(26ml)加入到(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-5,5-二氟环己烷甲酸甲酯在甲醇(20ml)和四氢呋喃(10ml)的混合物的溶液中，在室温下快速搅拌 15 小时。将反应混合物用水稀释，并用乙醚萃取，然后用 2M 盐酸酸化至 pH2，再用乙酸乙酯萃取 2 次。合并乙酸乙酯萃取物，用盐水洗涤，硫酸钠干燥，并经过浓缩处理，得到(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-5,5-二氟环己烷甲酸的棕褐色的泡沫。

将(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-5,5-二氟环己烷甲酸(820mg, 2.58mmol)、苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基膦六氟磷酸盐(1.49g, 2.86mmol)和氨基乙腈盐酸盐(530mg, 5.73mmol)在 N,N-二甲基甲酰胺(5.0ml)中的混合物冷却到 0℃，并且用三乙胺(1.26mL, 9.04mmol)处理。在室温下搅拌所得的浆液 2.5 小时，然后倒入水中，并用乙酸乙酯萃取 3 次。将合并的萃取物用盐水洗涤，并用硫酸钠干燥。真空浓缩后，将剩余物进行硅胶色谱分离，用 2/3 的乙酸乙酯/正己烷洗脱，得到(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺的微黄色泡沫。

将(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺(579mg, 1.62mmol)、4-(甲硫基)苯硼酸(342mg, 2.04mmol)、二氯化钯(dppf)·二氯甲烷(68mg, 0.083mmol)和 2.0M 碳酸钠水溶液(1.22mL, 2.44mmol)在氮气下在 N,N-二甲基甲酰胺(4.6ml)中加热到 85℃。反应 17 小时后，将反应混合物冷却到室温，在乙酸乙酯和水之间分配，分层。用另外的乙酸乙酯萃取水相，合并有机相，用盐水洗涤，硫酸钠干燥。真空浓缩，将残留物进行硅胶色谱，用 35/65 的乙酸乙酯/正己烷洗脱，得到微黄色泡沫状的标题化合物。 $[\alpha]_D^{25} = -10^\circ (c=1.2, \text{三氯甲烷})$, MS(-ESI):399.2[M-H]⁻。

实施例 2

(1R,2R)-N-(1-氰基环丙基)-5,5-二氟-2-[4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基]环己烷甲酰胺的合成

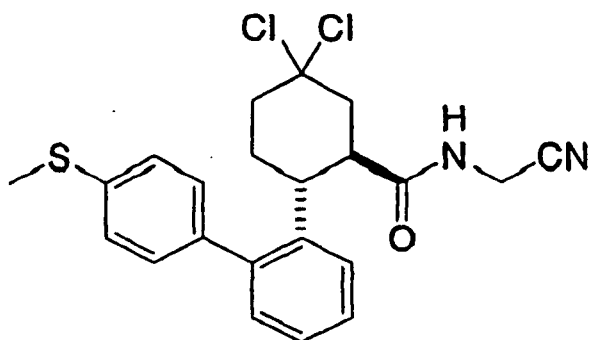


将来自实施例 1 的(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-5,5-二氟环己烷甲酸(820mg, 2.58mmol)、苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷鎓六氟磷酸盐(1.48g, 2.85mmol)和 1-氨基环丙烷甲腈盐酸盐(674mg, 5.68mmol)在 N,N-二甲基甲酰胺(5.0ml)中的混合物冷却到 0℃, 用三乙胺(1.26mL, 9.04mmol)处理。在室温下搅拌所得的浆液 2.5 小时, 然后倒入水中, 用乙酸乙酯萃取 3 次。合并萃取液, 用盐水洗涤, 硫酸钠干燥。真空浓缩, 将残留物进行硅胶色谱, 用 38/62 的乙酸乙酯/正己烷洗脱, 得到(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-N-(1-氰基环丙基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺的微黄色固体。

在氮气下将(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-N-(1-氰基环丙基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺(518mg, 1.35mmol)、4-甲硫基苯硼酸(285mg, 1.70mmol)、二氯化钯(dppf)·二氯甲烷(61mg, 0.075mmol)和 2.0M 碳酸钠水溶液(1.02mL, 2.04mmol)在 N,N-二甲基甲酰胺(4.0ml)中加热到 85℃。在该温度下反应 17 小时后, 将反应混合物冷却到室温, 在乙酸乙酯和水之间分配, 分层。再用乙酸乙酯萃取水相, 合并有机相, 用盐水洗涤, 硫酸钠干燥。真空浓缩, 将残留物进行硅胶色谱, 用 30/70 的乙酸乙酯/正己烷洗脱, 得到微黄色泡沫状的标题化合物。[α]_D²⁵ = 41°(c=0.95, 三氯甲烷), MS(-ESI):425.3[M-H]⁻.

实施例 3

(1R/S,2R/S)-N-(氰基甲基)-5,5-二氯-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺的合成

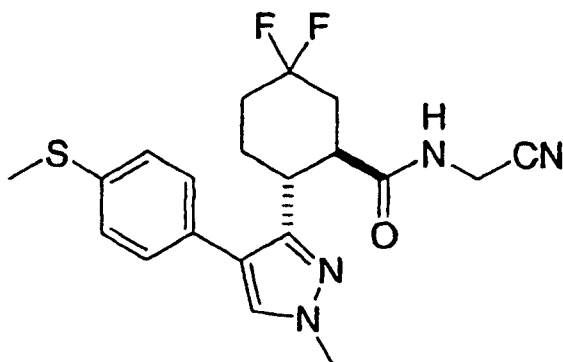


将来自实施例 1 的(1R/S,2R/S)-2-(2-溴苯基)-5-氧代环己烷甲酸甲酯(663mg, 2.13mmol)溶于甲苯(1.5mL)中, 搅拌, 在室温下搅拌用五氯化磷(1.1g, 5.3mmol)处理 4 小时。冷却至 0℃, 仔细地加入 2M 氢氧化钠溶液。混合物在水和乙醚之间分配, 分层。再用乙醚萃取液相, 合并萃取液, 用水和盐水洗涤, 硫酸镁干燥。真空浓缩, 将残留物进行硅胶色谱, 用 5/95 的乙酸乙酯/正己烷洗脱, 得到将残留(1R/S,2R/S)-2-(2-溴苯基)-5,5-二氯环己烷甲酸甲酯的无色固体。

根据由(1R,2R)-2-(2-溴苯基)-5,5-二氟环己烷甲酸甲酯来制备(1R,2R)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺所用的标准方法(参见实施例 1), 从(1R/S,2R/S)-2-(2-溴苯基)-5,5-二氯环己烷甲酸甲酯制得标题化合物, 为无色固体, MS(+ESI:405.2)[M+H]⁺。

实施例 4

N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[[1-甲基-3-(4-甲硫基)苯基]-1H-吡唑-4-基]环己烷甲酰胺的合成



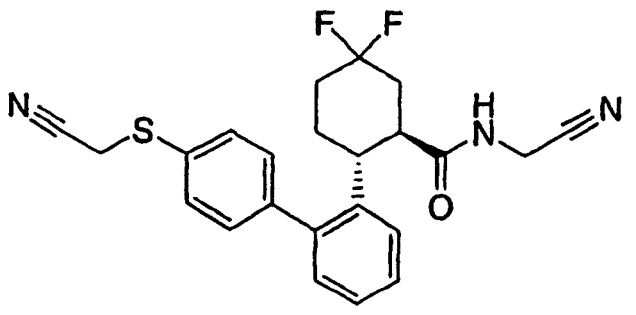
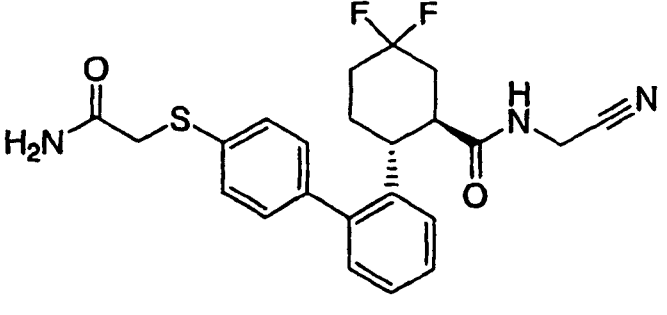
将4-溴-1-甲基-1H-吡唑-3-甲醛(1.00g, 5.29mmol)、丙二酸(825mg, 7.94mmol)

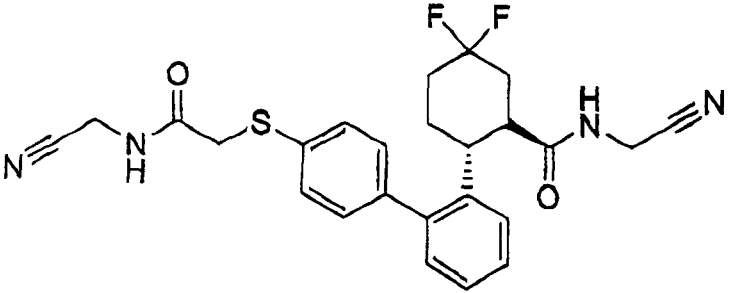
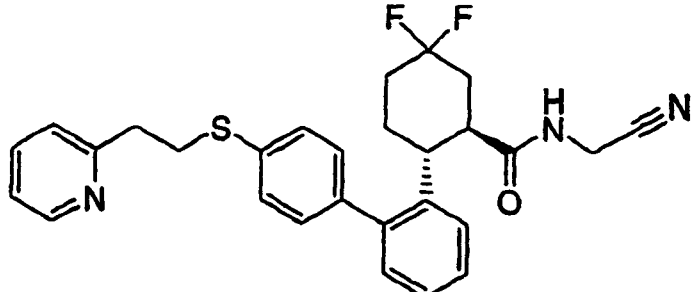
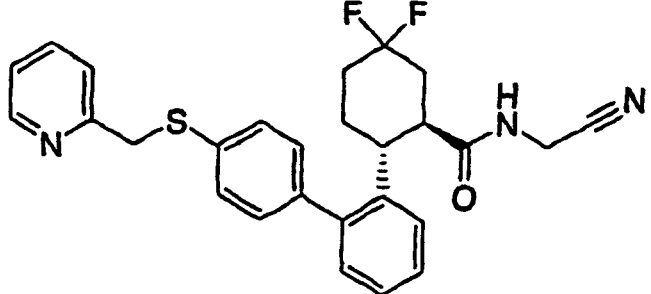
和哌啶(0.12mL, 1.2mmol)的吡啶(0.60mL)溶液加热至回流 3 小时。然后将反应混合物倒入 10%的盐酸中, 并用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取物, 通过硫酸钠干燥, 真空浓缩, 得到(2E)-3-(4-溴-1-甲基-1H-吡唑-3-基)丙-2-烯酸的无色固体。

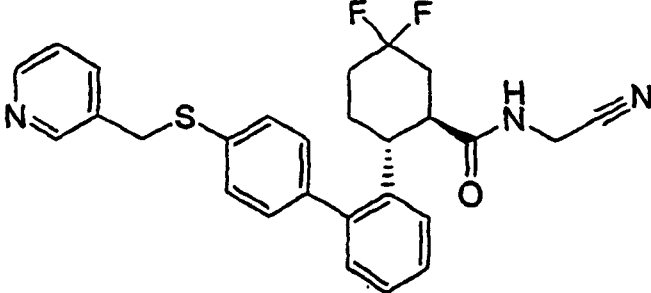
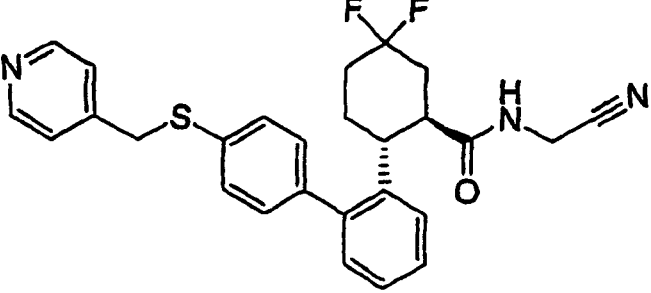
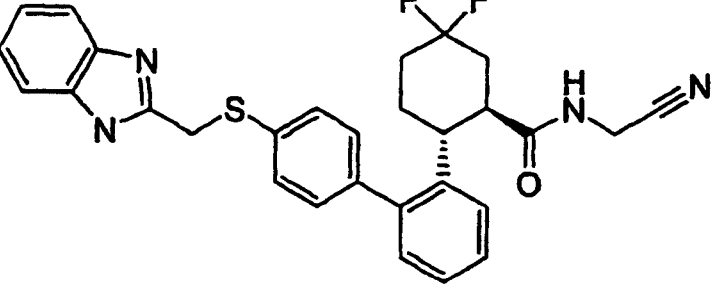
根据用于从(1R,6R)-6-(2-溴苯基)环己-3-烯-1-羧酸和 1, 3-丁二烯制备(1R,2R)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基)环己烷甲酰胺的标准方法, 从(2E)-3-(4-溴-1-甲基-1H-吡唑-3-基)丙-2-烯酸制得标题化合物, 为无色泡沫, MS(+ESI):405.2[M+H]⁺。(参见实施例 1)

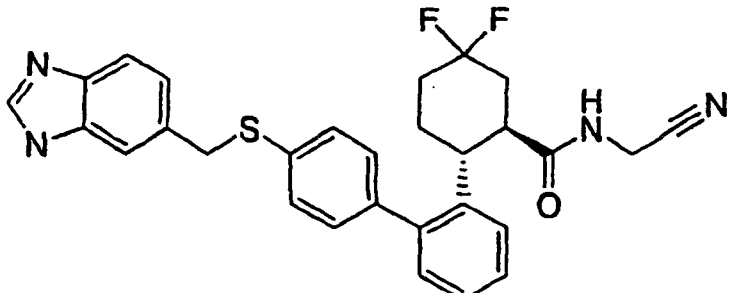
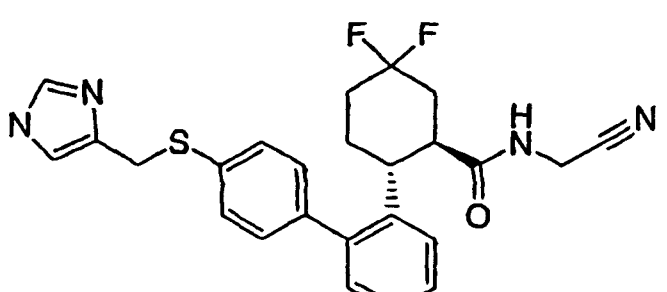
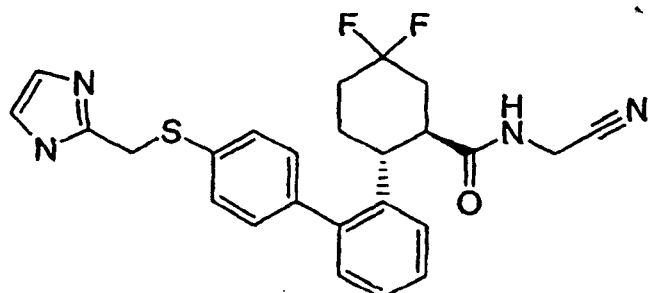
实施例 5-31

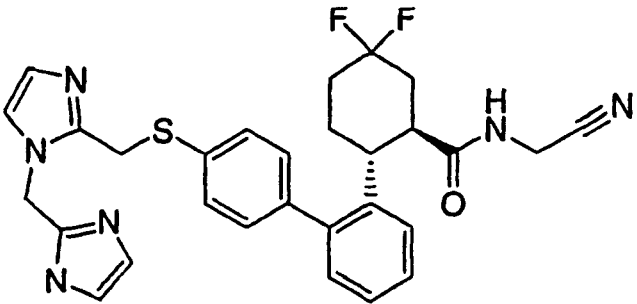
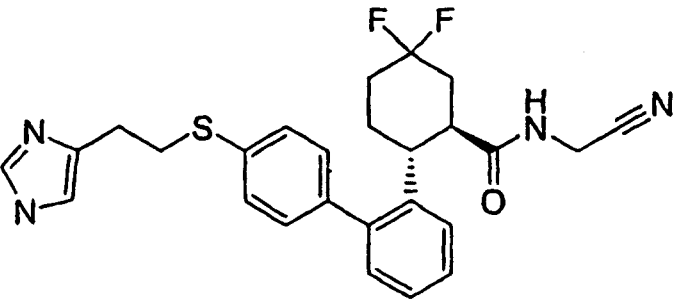
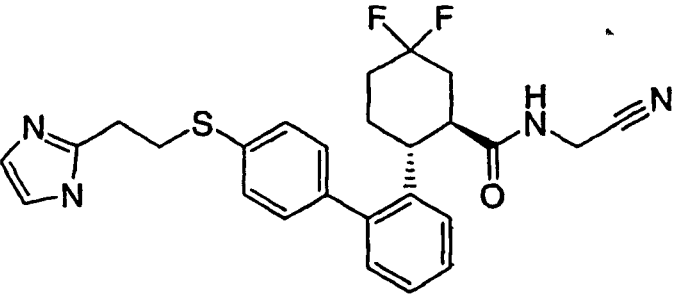
使用之前实施例记载的类似方法制备了下述化合物:

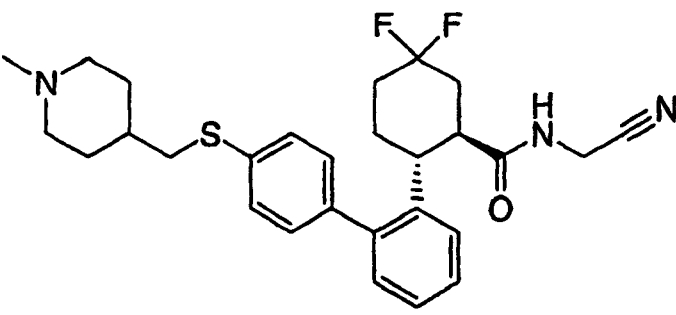
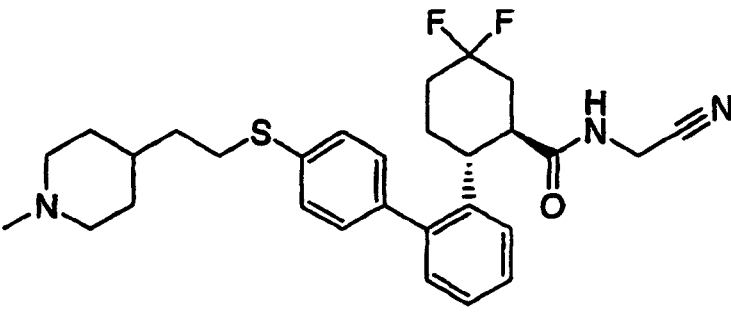
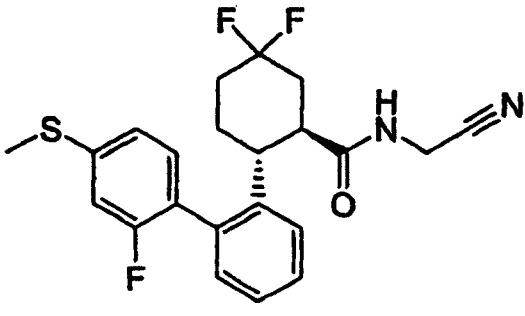
5	 N-(氰基甲基)-2-{4'-[(氰基甲基)硫基]联苯-2-基}-5,5-二氟环己烷甲酰胺	MS(-ESI):424.2 [M-H] ⁻
6	 2-{4'-[(2-氨基-2-氧代乙基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺	MS(+ESI):466.0 [M+Na] ⁺

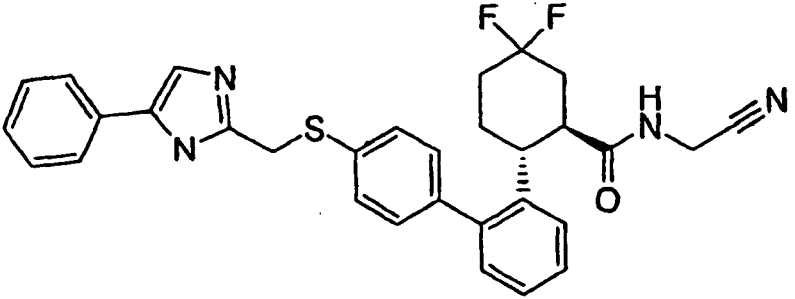
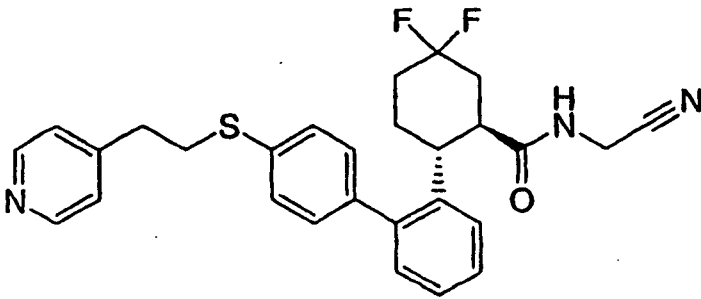
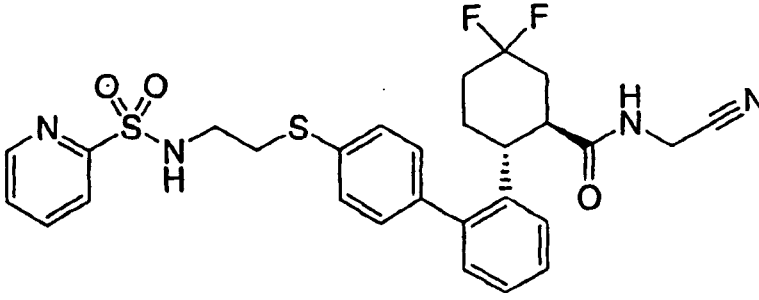
7	 N-(氰基甲基)-2-[4'-({2-[(氰基甲基)-氨基]-2-氧代乙基}硫基)-联苯-2-基]-5,5-二氟环己烷甲酰胺	MS(-ESI):481.1 [M-H] ⁻
8	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(2-吡啶-2-基-乙基)-硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺	MS(+ESI):490.3 [M+H] ⁺
9	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-2-基-甲基)-硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺	MS(+ESI):500.0 [M+Na] ⁺

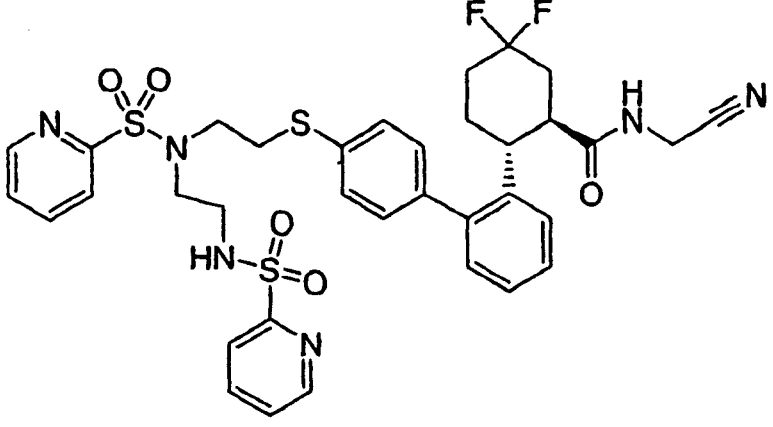
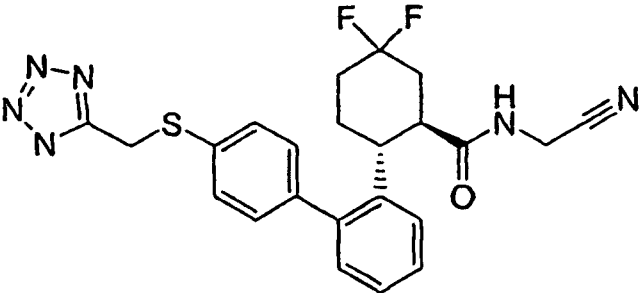
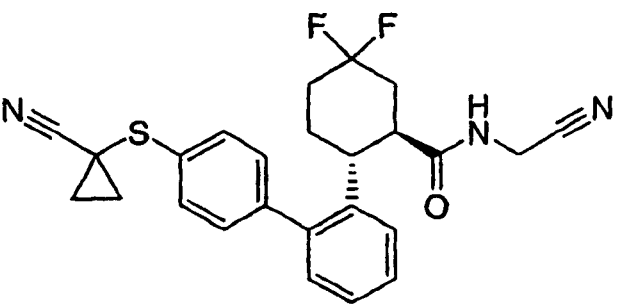
10	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-3-基-甲基)-硫基]-联苯-2-基}环己烷甲酰胺	MS(+ESI):500.0 [M+Na] ⁺
11	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(吡啶-4-基-甲基)-硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺	MS(+ESI):500.0 [M+Na] ⁺
11.1	 2-{4'-[(1H-苯并咪唑-2-基甲基)-硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺	MS(+ESI):517.1 [M+H] ⁺

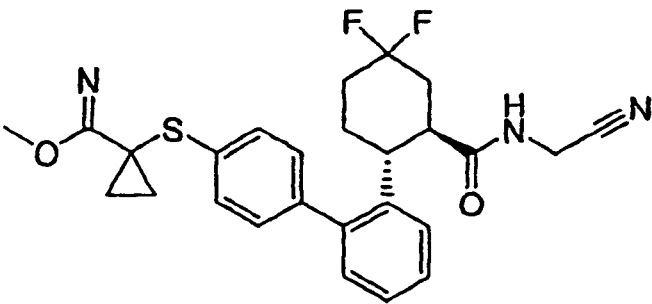
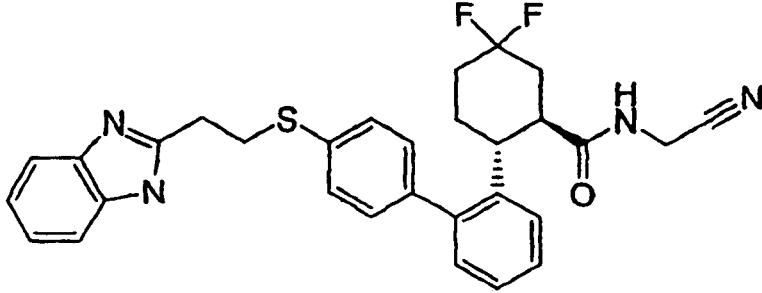
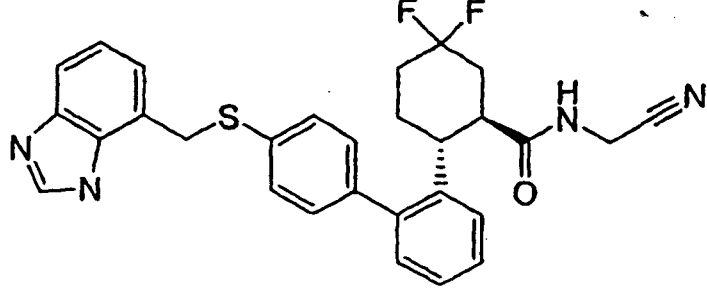
12	 <chem>N#CCNC(=O)[C@H]1CC[C@@H](c2ccccc2-c3ccc(SCC4C5=NC6=CC=CC=C5N=C6)cc4)C1(F)F</chem>	MS(+ESI):517.3 [M+H] ⁺
13	 <chem>N#CCNC(=O)[C@H]1CC[C@@H](c2ccccc2-c3ccc(SCC4C5=CN=C4)cc5)C1(F)F</chem>	MS(+ESI):467.1 [M+H] ⁺
14	 <chem>N#CCNC(=O)[C@H]1CC[C@@H](c2ccccc2-c3ccc(SCC4C5=CN=C4)cc5)C1(F)F</chem>	MS(+ESI):467.3 [M+H] ⁺

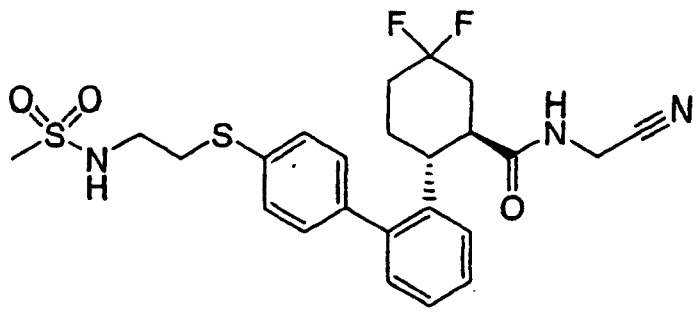
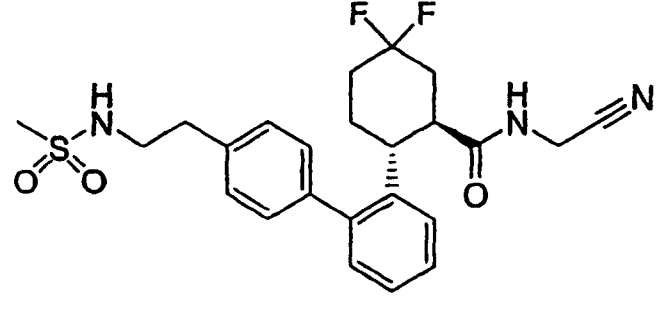
15	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[1-(1H-咪唑-2-基-甲基)-1H-咪唑-2-基]甲基}硫基-联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):547.3 [M+H] ⁺
16	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[2-(1H-咪唑-4-基)乙基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):481.2 [M+H] ⁺
17	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[2-(1H-咪唑-2-基)乙基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):481.2 [M+H] ⁺

18	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):498.3 [M+H] ⁺
19	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[2-(1-甲基哌啶-4-基)乙基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):512.3 [M+H] ⁺
20	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[2'-氟-4'-(甲硫基)-联苯-2-基]环己烷甲酰胺	MS(-APCI):417.1 [M-H] ⁻

21	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[(5-苯基-1H-咪唑-2-基)甲基]磺基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):543.0 [M+H] ⁺
22	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(2-吡啶-4-基乙基]磺基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):491.8 [M+H] ⁺
23	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-({2-[(吡啶-2-基磺酰基)氨基]乙基}磺基)联苯-2-基]环己烷甲酰胺	MS(+ESI):571.0 [M+H] ⁺

24	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{[2-((吡啶-2-基磺酰基){2-[(吡啶-2-基磺酰基)氨基]乙基}氨基)乙基]硫基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):755.0 [M+H] ⁺
25	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-{4'-[(1H-四唑-5-基甲基)硫基]联苯-2-基}环己烷甲酰胺	MS(-ESI):466.8 [M-H] ⁻
26	 2-{4'-[(1-氰基环丙基)硫基]联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺	MS(-ESI):450.2 [M-H] ⁻

27	 1-{[2'-(2-[[[(氰基甲基)-氨基]羰基]-4,4-二氟环己基-联苯-4-基]硫基)环丙烷甲亚胺酸甲酯	MS(+ESI):484.2 [M+H] ⁺
28	 2-(4'-{[2-(1H-苯并咪唑-2-基)乙基]硫基}联苯-2-基)-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺	MS(+ESI):531.2 [M+H] ⁺
29	 2-{4'-[(1H-苯并咪唑-7-基甲基)-硫基]-联苯-2-基}-N-(氰基甲基)-5,5-二氟环己烷甲酰胺	MS(+ESI):517.1 [M+H] ⁺

30	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-[4'-({2-[(甲基磺酰基)-氨基]乙基}硫基)联苯-2-基]环己烷甲酰胺	MS(-ESI):506.2 [M-H] ⁻
31	 N-(氰基甲基)-5,5-二氟-2-(4'-{2-[(甲基磺酰基)-氨基]乙基}联苯-2-基)环己烷甲酰胺	MS(+ESI):498.1 [M+H] ⁺

药物组合物

作为本发明的一个具体的实施方案,将 100mg 的(1R, 2R)-N-(氰基甲基)-5, 5-二氟-2-[4'-甲硫基-1,1'-联苯-2-基]环己烷甲酰胺和充分磨碎的乳糖配合,配制成总量为 580 至 590mg 以填充粒径为 0 的硬质胶囊。

本申请中公开的化合物在下面的分析中显示出活性。此外,本申请中公开的这些化合物相对于之前公开的化合物,具有增强的药理学性能。

组织蛋白酶 K 分析

在二甲基亚砜(DMSO)中制备从 500 μM 到 0.0085 μM 浓度的受试化合物的系列稀释液。从每一个稀释液中抽取 2 μL 二甲基亚砜溶液,加入到 50 μL 的分析缓冲剂(MES, 50mM(pH5.5); EDTA, 2.5mM; DTT2.5mM 和 10%DMSO)和 25 μL 人组织蛋白酶 K(0.4nM)的分析缓冲液中。将该分析溶液在震荡器中混合 5 到 10 秒,在室温下培养 15 分钟。然后将溶在 25 μL 分析缓冲剂中的

Z-Leu-Arg-AMC($8\ \mu\text{M}$)加入分析液中。水解香豆素离去基团(AMC),然后用分光荧光测定法($\text{Ex}\ \lambda=355\text{nm}$; $\text{Em}\ \lambda=460\text{nm}$)测定 10 分钟。通过将实验值与剂量反应曲线的标准数学模型来拟合计算抑制百分率。

组织蛋白酶 L 分析

在二甲基亚砜(DMSO)中配制从 $500\ \mu\text{M}$ 到 $0.0085\ \mu\text{M}$ 浓度的受试化合物系列稀释液。从每个稀释液中抽取 $2\ \mu\text{L}$ 二甲基亚砜溶液,加入到 $50\ \mu\text{L}$ 的分析缓冲剂(MES, 50mM ($\text{pH}5.5$); EDTA, 2.5mM ; DTT, 2.5mM 和 10% DMSO)和 $25\ \mu\text{L}$ 人组织蛋白酶 L(0.5mM)的分析缓冲液中。将该分析溶液在震荡器中混合 5 到 10 秒,在室温下培养 15 分钟。然后,将溶在 $25\ \mu\text{L}$ 分析缓冲剂中的 Z-Leu-Arg-AMC($8\ \mu\text{M}$)加入分析液中。水解香豆素离去基团(AMC),然后用分光荧光测定法($\text{Ex}\ \lambda=355\text{nm}$; $\text{Em}\ \lambda=460\text{nm}$)测定 10 分钟。通过将实验值与剂量反应曲线的标准数学模型拟合来计算抑制百分率。

组织蛋白酶 B 分析

在二甲基亚砜(DMSO)中配制从 $500\ \mu\text{M}$ 到 $0.0085\ \mu\text{M}$ 浓度的受试化合物系列稀释液。从每个稀释液中抽取 $2\ \mu\text{L}$ 的二甲基亚砜溶液,加入到 $50\ \mu\text{L}$ 的分析缓冲剂(MES, 50mM ($\text{pH}5.5$); EDTA, 2.5mM ; DTT, 2.5mM 和 10% DMSO)和 $25\ \mu\text{L}$ 人组织蛋白酶 B(4.0nM)的分析缓冲液中。在震荡器中混合该分析溶液 5 到 10 秒,在室温下培养 15 分钟。然后,将溶在 $25\ \mu\text{L}$ 分析缓冲剂中的 Z-Leu-Arg-AMC($8\ \mu\text{M}$)加入分析液中。水解香豆素离去基团(AMC),用分光荧光测定法($\text{Ex}\ \lambda=355\text{nm}$; $\text{Em}\ \lambda=460\text{nm}$)测定 10 分钟。通过将实验值与剂量反应曲线的标准数学模型拟合来计算抑制百分率。

组织蛋白酶 S 分析

在二甲基亚砜(DMSO)中配制从 $500\ \mu\text{M}$ 到 $0.0085\ \mu\text{M}$ 浓度的受试化合物的系列稀释液。从每个稀释液中抽取 $2\ \mu\text{L}$ 的二甲基亚砜溶液,加入到 $50\ \mu\text{L}$ 的分析缓冲剂(MES, 50mM ($\text{pH}5.5$); EDTA, 2.5mM ; DTT, 2.5mM 和 10% DMSO)和 $25\ \mu\text{L}$ 人组织蛋白酶 S(20nM)的分析缓冲液中。在震荡器中混合该分析溶液 5 到 10 秒,在室温下培养 15 分钟。然后,将溶在 $25\ \mu\text{L}$ 分析缓冲剂中的 Z-Leu-Arg-AMC($8\ \mu\text{M}$)加入分析液中。水解香豆素离去基团(AMC)10 分钟,用分光荧光测定法($\text{Ex}\ \lambda=355\text{nm}$; $\text{Em}\ \lambda=460\text{nm}$)测定。通过将实验值与剂量反应曲线的标准数学模型拟合来计算抑制百分率。