



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779077 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680081360.6

(22)申请日 2016.12.30

(30)优先权数据

62/273,246 2015.12.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/069511 2016.12.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/117538 EN 2017.07.06

(71)申请人 圣路易斯大学

地址 美国密苏里州

(72)发明人 彼得·G·鲁明斯基

大卫·W·格里格斯

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 沈敬亭 李海霞

(51)Int.Cl.

C07D 239/16(2006.01)

C07D 239/14(2006.01)

C07D 239/02(2006.01)

C07D 401/12(2006.01)

C07D 233/28(2006.01)

A61K 31/44(2006.01)

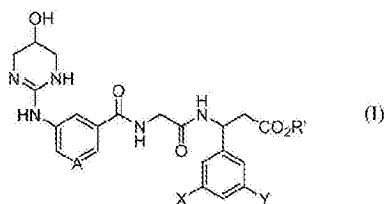
权利要求书6页 说明书84页 附图1页

(54)发明名称

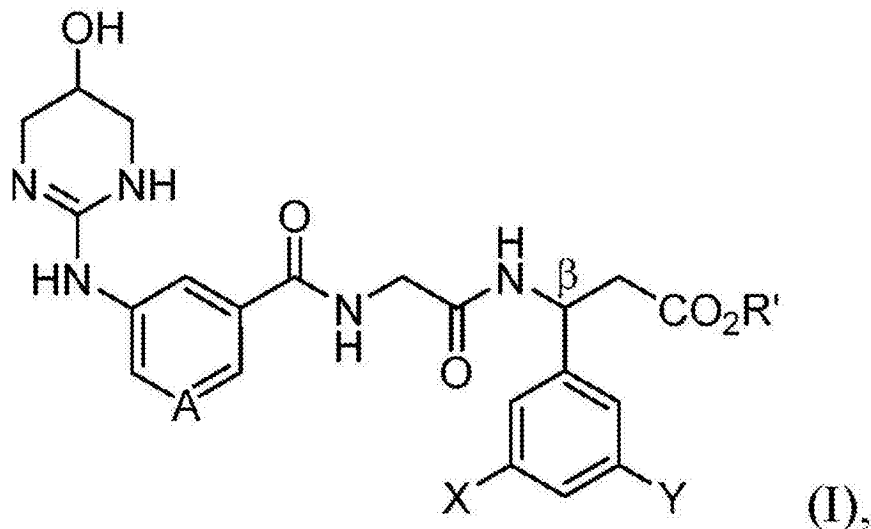
作为PAN整合素拮抗剂的间位氮杂环氨基苯甲酸衍生物

(57)摘要

本公开提供了下式的药剂:其中变量如本文中定义。本公开还提供了包含此类药剂的药物组合物、试剂盒和制品。本公开还提供了使用该药剂用于治疗多种疾病和障碍的方法。



1. 一种下式的化合物：



其中：

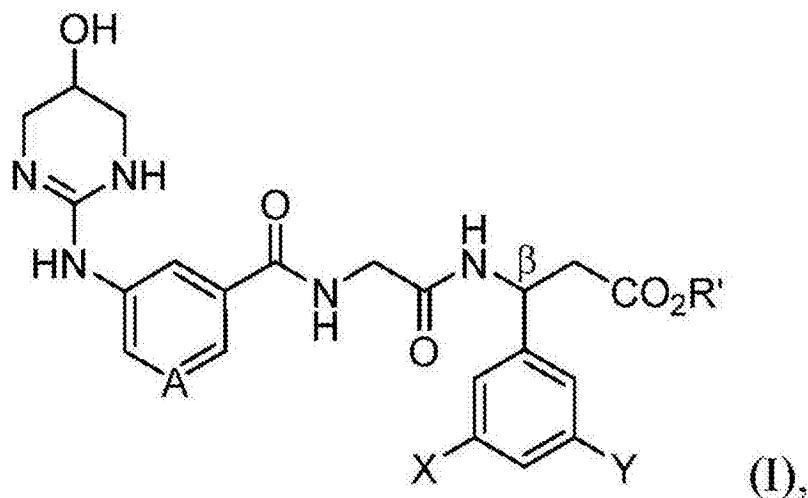
A是C-H、C-OH，或N；

R'为氢、烷基 (C≤8)、取代的烷基 (C≤8)，或体内可转换为氢的取代基；和

X和Y各自独立地是氰基、卤素、氟代烷氧基 (C1-2)、烷基 (C1-2)，或氟代烷基 (C1-2)，条件是X和Y不同时为氰基或烷基 (C1-2)；

或上式的药学上可接受的盐或互变异构体。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其进一步被定义为



其中：

A是C-OH或N；

R'是氢、烷基 (C≤8)、取代的烷基 (C≤8)，或体内可转换为氢的取代基；和

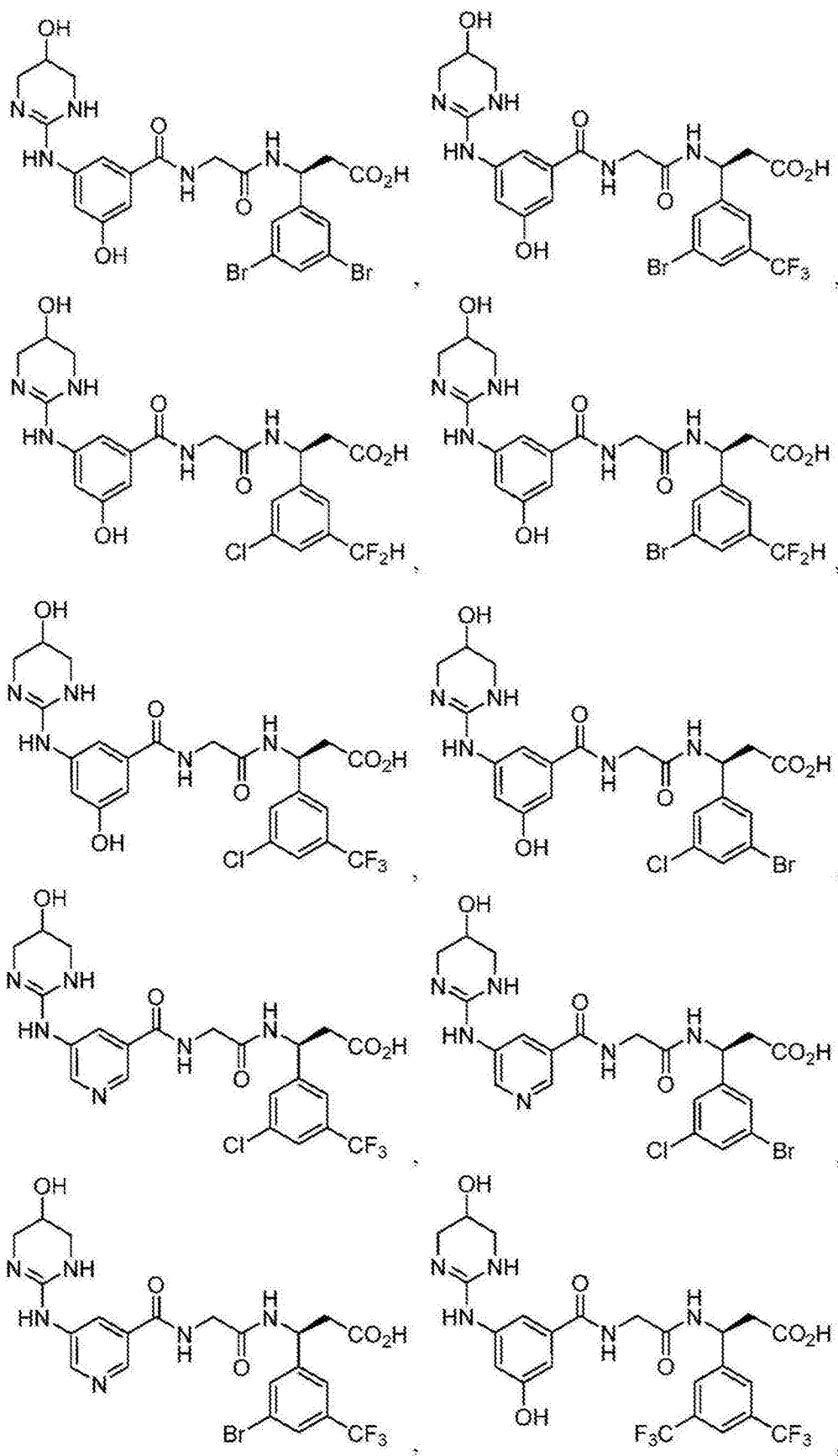
X和Y各自独立地是氰基、卤素、氟代烷氧基 (C1-2)、烷基 (C1-2)，或氟代烷基 (C1-2)，条件是X和Y不同时为氰基或烷基 (C1-2)；

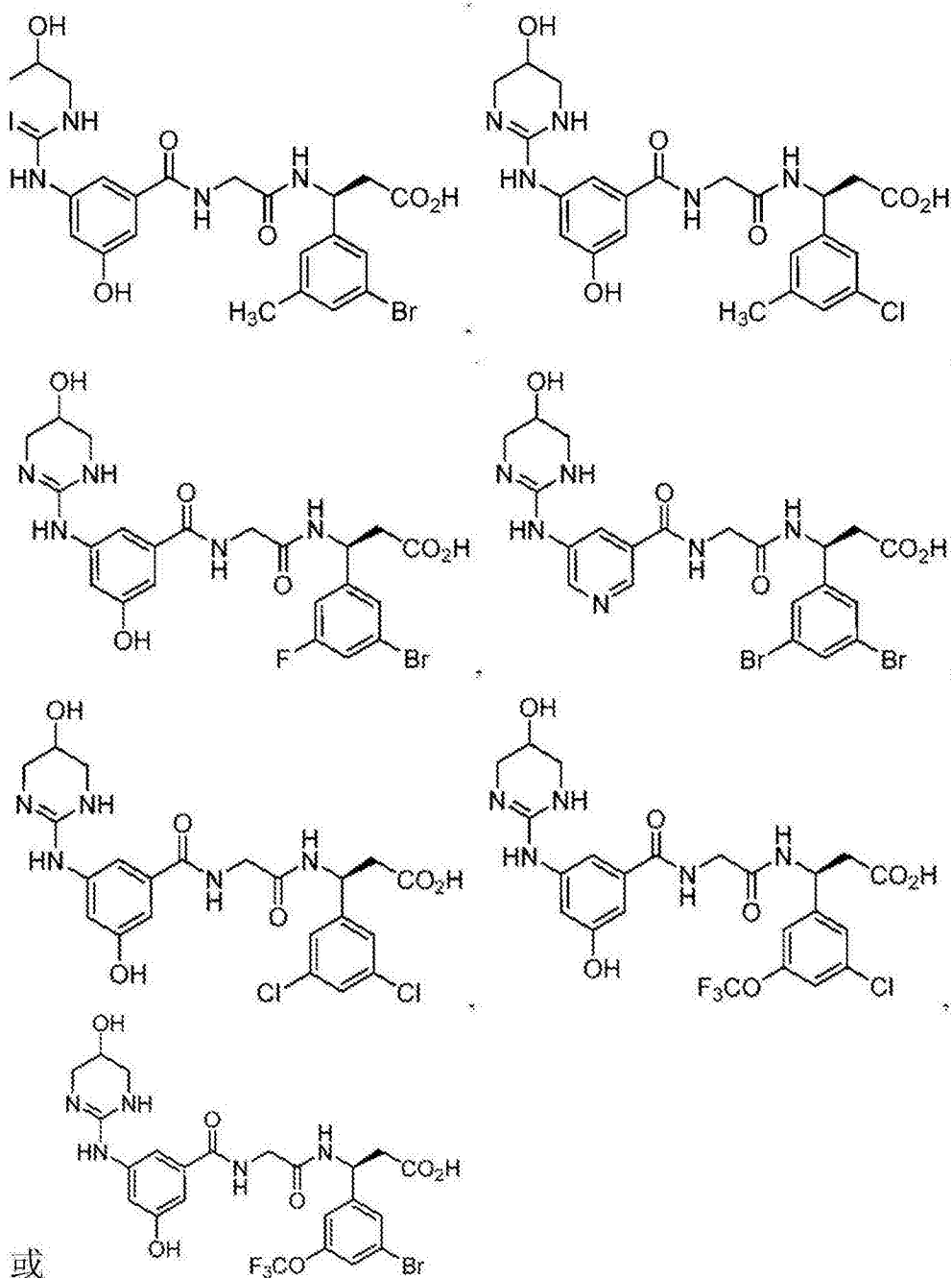
或上式的药学上可接受的盐或互变异构体。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物，其中A是N。

4. 根据权利要求1或2所述的化合物，其中A是C-OH。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的化合物,其中R'是氢。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中X是卤素。
7. 根据权利要求6所述的化合物,其中X是-F、-Cl,或-Br。
8. 根据权利要求7所述的化合物,其中X是-F。
9. 根据权利要求7所述的化合物,其中X是-Cl。
10. 根据权利要求7所述的化合物,其中X是-Br。
11. 根据权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中X是氟代烷氧基 (C1-2)。
12. 根据权利要求11所述的化合物,其中X是-OCF₃。
13. 根据权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中X是氟代烷基 (C1-2)。
14. 根据权利要求13所述的化合物,其中X是-CHF₂。
15. 根据权利要求13所述的化合物,其中X是-CF₃。
16. 根据权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中X是烷基 (C1-2)。
17. 根据权利要求16所述的化合物,其中X是-CH₃。
18. 根据权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中Y是卤素。
19. 根据权利要求18所述的化合物,其中Y是-F、-Cl,或-Br。
20. 根据权利要求18所述的化合物,其中Y是-F。
21. 根据权利要求18所述的化合物,其中Y是-Cl。
22. 根据权利要求18所述的化合物,其中Y是-Br。
23. 根据权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中Y是氟代烷氧基 (C1-2)。
24. 根据权利要求23所述的化合物,其中Y是-OCF₃。
25. 根据权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中Y是氟代烷基 (C1-2)。
26. 根据权利要求25所述的化合物,其中Y是-CHF₂。
27. 根据权利要求25所述的化合物,其中Y是-CF₃。
28. 根据权利要求1-15中任一项所述的化合物,其中Y是烷基 (C1-2)。
29. 根据权利要求28所述的化合物,其中Y是-CH₃。
30. 根据权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中X和Y各自独立地选自由-F、-Cl、-Br、-OCF₃、-CH₃、-CHF₂,和-CF₃组成的组,条件是X和Y不同时为-CH₃。
31. 根据权利要求1-30中任一项所述的化合物,其中标记β的碳原子为S构型。
32. 根据权利要求1所述的化合物,其进一步被定义为:





或上述式中任一种的药学上可接受的盐或互变异构体。

33. 根据权利要求1-32中任一项所述的化合物,其中所述化合物有效抑制选自 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha v\beta 6$,和 $\alpha v\beta 8$ 组成的组的三种或更多种RGD整合素,其中所述化合物的有效性对应于对于所述三种或更多种RGD整合素中的每一种 IC_{50} 值小于10nM,所述 IC_{50} 值是使用针对各个整合素功能的固相受体分析测试法 (SPRA) 进行测量的。

34. 根据权利要求1-32中任一项所述的化合物,其中所述化合物具有至少2小时的持续血浆半衰期,所述持续血浆半衰期是在大鼠中使用包含1mg化合物/kg大鼠的静脉推注进行测量的。

35. 一种药物组合物,包含:

a) 根据权利要求1-34中任一项所述的化合物;和

b) 赋形剂。

36. 一种治疗和/或预防对其需要的患者的疾病或障碍的方法, 包括以足以治疗和/或预防所述疾病或障碍的量向所述患者给药根据权利要求1-34中任一项所述的化合物。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述疾病或障碍与血管生成有关。

38. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述疾病或障碍与纤维化相关。

39. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述疾病或障碍与纤维化和/或血管生成相关。

40. 根据权利要求36-39中任一项所述的方法, 其中所述疾病或障碍是肺、肝、肾、心脏和胰腺纤维化、硬皮病、瘢痕、早产儿视网膜病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、增生性玻璃体视网膜病变、黄斑变性、糖尿病视网膜病变、癌症、骨质疏松症、自身免疫性疾病、恶性肿瘤体液性高钙血症、佩吉特病、牙周病、银屑病、关节炎、再狭窄, 和感染。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是肺纤维化。

42. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是肝纤维化。

43. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是心脏纤维化。

44. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是肾纤维化。

45. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是胰腺纤维化。

46. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是硬皮病。

47. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是瘢痕。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述瘢痕是真皮瘢痕。

49. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述瘢痕是视网膜瘢痕。

50. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述瘢痕是角膜瘢痕。

51. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是早产儿视网膜病变。

52. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是家族性渗出性玻璃体视网膜病变。

53. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是增生性玻璃体视网膜病变。

54. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是黄斑变性。

55. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是糖尿病视网膜病变。

56. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是癌症。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述癌症包括实体肿瘤生长或瘤形成。

58. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述癌症包括肿瘤转移。

59. 根据权利要求56的方法, 其中所述癌症是膀胱、血液、骨、脑、乳腺、中枢神经系统、宫颈、结肠、子宫内膜、食管、胆囊、生殖器、泌尿生殖道、头、肾、喉、肝、肺、肌肉组织、颈部、口腔或鼻粘膜、卵巢、胰腺、前列腺、皮肤、脾、小肠、大肠、胃、睾丸, 或甲状腺的癌症。

60. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述癌症是癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤, 或精原细胞瘤。

61. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是骨质疏松症。

62. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是自身免疫性疾病。

63. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述自身免疫障碍是多发性硬化症。

64. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是恶性肿瘤体液性高钙血症。

65. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述疾病或障碍是佩吉特病。

- 66. 根据权利要求40所述的方法,其中所述疾病或障碍是牙周病。
- 67. 根据权利要求40所述的方法,其中所述疾病或障碍是银屑病。
- 68. 根据权利要求40所述的方法,其中所述疾病或障碍是关节炎。
- 69. 根据权利要求68所述的方法,其中所述关节炎是类风湿关节炎。
- 70. 根据权利要求40所述的方法,其中所述疾病或障碍是再狭窄。
- 71. 根据权利要求40所述的方法,其中所述疾病或障碍是感染。
- 72. 根据权利要求36-71所述的方法,其中所述患者是人、猴、牛、马、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠,或其转基因物种。
- 73. 根据权利要求72所述的方法,其中所述患者是猴、牛、马、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠,或豚鼠。
- 74. 根据权利要求72所述的方法,其中所述患者是人。

作为PAN整合素拮抗剂的间位氮杂环氨基苯甲酸衍生物

[0001] 说明

[0002] 本申请要求享有2015年12月30日提交的美国序列号No.62/273,246 的优先权权益,在此通过引证的方式将其全部内容结合到本申请中。

[0003] 背景

I. 技术领域

[0004] 本公开涉及制药,医学和细胞生物学领域。更具体地,本公开涉及用作整合素受体拮抗剂的药剂(化合物),其具有作为一种或多种介导血管生成和纤维化的病理过程的整合素的拮抗剂的生物学活性。因此,这些化合物可以用于药物组合物和用于治疗疾病和障碍的方法中,该障碍包括由一种或多种此类整合素介导的障碍。

[0005] II. 相关技术的描述

[0006] 整合素是一个介导细胞与其他细胞和介导细胞与细胞外基质的相互作用的完整细胞质膜蛋白家族。大约三分之一的整合素家族成员直接结合到特异性氨基酸基序,精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD),这包含于其同源蛋白配体的序列中。本领域已经证实,含有该RGD序列的肽,以及模拟 RGD序列的合成小分子化合物,能够以不同程度的特异性与这些整合素受体结合,而由此抑制其与正常生理配体的结合(Millard,2011;Sun et al, 2014)。用这类药剂治疗的生物学效应取决于结构中反映的固有分子性质,正是这种性质决定了具体整合素或整合素的组合在一段时间内在身体组织中受抑制的程度。

[0007] 许多人类疾病的特征在于两种常见的病理机制之一或两者:血管生成和纤维化。RGD结合整合素的不同子集在驱动这些双重过程中具有主导作用,使得血管生成和纤维化的同时拮抗作用需要能够有效结合几种靶整合素的药剂。这与专门设计用于结合单个整合素的药剂形成对比,由于单个整合素的作用机制更加受限,则其在一些应用中可能不太有效。

[0008] 整合素已经证实在促进血管生成中具有一定作用,包括 $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ 和 $\alpha 5\beta 1$ 。 $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$ 最初被分别描述为角膜或绒毛膜尿囊膜(chorioallantoic)模型中bFGF和VEGF诱导的血管生成的介质。来自使用缺乏这些整合素的小鼠的研究的后续数据也支持 $\alpha 5\beta 1$ 的重要功能作用。该整合素 $\alpha 5\beta 1$ (也称为VLA-5)通常被称为“经典纤连蛋白受体”,反映了其与细胞外基质蛋白充分表征的相互作用。表达 $\alpha 5\beta 1$ 的细胞在引入第九和第十III型纤连蛋白重复的区域中结合至纤连蛋白,后者(第十III型纤连蛋白重复)含有对于整合素结合至关重要的RGD基序。据报道,除纤连蛋白外, $\alpha 5\beta 1$ 还与其他含有RGD的细胞外基质蛋白,包括纤维蛋白原,变性胶原和原纤蛋白-1相互作用(Bax et al,2003;Perdih,2010;Suehiro et al, 2000)。这些配体是作为组织中伤口愈合反应的一部分由细胞铺设的临时基质的组分。这种反应的关键组分是血管生成(新血管形成)和纤维化(瘢痕),其有利于急性损伤的愈合,但在许多疾病情况下可能是有害的。

[0009] RGD结合整合素的拮抗剂应当适用于治疗具有血管生成或纤维化作为其病理的主要部分的人类疾病。具体而言, $\alpha 5\beta 1$ 在血管生成中的重要作用受到众多研究的支持。例如,

缺乏这种整合蛋白的小鼠在第10-11天显示出胚胎致死性,该胚胎致死性具有包括胚胎和胚外脉管系统缺陷的表型 (Yang et al.,1993)。血管生成细胞因子如bFGF,IL-8,TGF β 和TNF α 在体外和体内都上调内皮细胞上的 $\alpha 5\beta 1$ 表达,并且免疫组织化学显示来自各种类型的人类肿瘤活检和动物中异种移植肿瘤的血管中 $\alpha 5\beta 1$ 和纤连蛋白染色都协调增加(Collo,1999;Kim et al.,2000)。特异性抑制 $\alpha 5\beta 1$ 的单克隆抗体和已被描述为 $\alpha 5\beta 1$ 抑制剂的化合物在许多实验模型中都显著降低血管生成(Kim et al,2000;Bhaskar et al,2007;Livant et al,2000; Zahn et al,2009)。

[0010] 由于 $\alpha 5\beta 1$ 的表达不限于内皮,它除了血管生成外还具有其他功能作用。它在许多细胞类型,包括成纤维细胞,造血细胞和免疫细胞,平滑肌细胞,上皮细胞和肿瘤细胞中都有不同程度的表达。肿瘤细胞上的表达已经涉及肿瘤生长和转移的进展(Adachi et al,2000;Blase et al,1995;Danen et al,1994;Edward,1995)。在人成纤维细胞中, $\alpha 5\beta 1$ 促进运动性和存活 (Lobert et al.,2010)。在胰腺星状细胞中,它与结缔组织生长因子相互作用而刺激粘附,迁移和纤维化(Gao and Brigstock,2006)。据证明, $\alpha 5\beta 1$ 的药理学拮抗作用在体外对人视网膜上皮细胞的附着迁移和增殖起到抑制作用,并且在向具有视网膜脱落的兔子玻璃体内给药时会降低视网膜细胞增殖和瘢痕(Li et al,2009;Zahn et al,2010)。

[0011] 除了 $\alpha 5\beta 1$ 之外,器官损伤后 β -1家族被上调的另一种RGD结合整合素是 $\alpha 8\beta 1$ 。研究表明,这种整合素会与组织肌成纤维细胞的标记物,纤维化的主要细胞介质共表达(Levine et al,2000;Bouzeghrane et al,2004)。 $\alpha 8\beta 1$ 的异位表达赋予细胞以RGD依赖性的方式增加在潜在TGF β ,这种主要的原纤维化(pro-fibrotic)细胞因子上的铺展和粘附(Lu et al.,2002)。

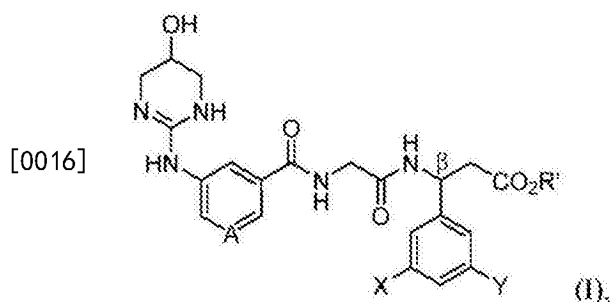
[0012] αv 家族的RGD-结合整合素已经涉及促进潜在的原纤维化细胞因子 TGF β 的生物活化。这通过结合至潜在相关肽(latency associated peptide) (LAP),特别是通过 $\alpha v\beta 6$ 和 $\alpha v\beta 8$,还有通过 $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$ 进行介导。此外, αv 整合素介导与伤口修复过程相关的不同细胞类型中的附粘,迁移,增殖和其他功能。这种功能冗余,差异细胞表达,和整合素基因敲除小鼠的已知纤维化表型,都暗示这整个子集的高度有效拮抗剂可能对治疗性开发特别有用。为了实现TGF β 活化,这些整合素都严格依赖于LAP 中所含的氨基酸序列arg-gly-aspartate(RGD)。实际上,在LAP的RGD序列中含有突变的小鼠不能进行TGF β 活化和重演TGF β -敲除小鼠的表型。 αv 整合素的表达从小鼠中的肌成纤维细胞中特异性地进行遗传消融,会在几种模型的器官损伤中赋予针对纤维化发展的保护作用,并且这种效力类似地通过采用已知为CWHM-12的RGD-结合整合素小分子整合素拮抗剂的连续输注治疗而提供(Henderson et al.,2013)。这种研究支持以下概念:同时抑制多种整合素对于预防或治疗一系列纤维化障碍可能具有特别的效用。

[0013] 先前描述于本领域中的多-整合素受体拮抗剂化合物通常要么缺乏对上述所有RGD整合素的已经证实的广谱效力,要么缺乏适合口服给药持续活性的药代动力学性质,或两者都缺乏。口服给药后在治疗上显著的浓度下的长血浆半衰期对于开发用于临床治疗的药物制剂而言是非常合乎需要的性质,允许通常无需医学监督的方便给药。

发明内容

[0014] 本公开提供了新型整合素受体拮抗剂,其药物组合物,其制备方法及其使用方法。

[0015] 在一些方面中,本公开提供了以下式的化合物:



[0017] 其中:

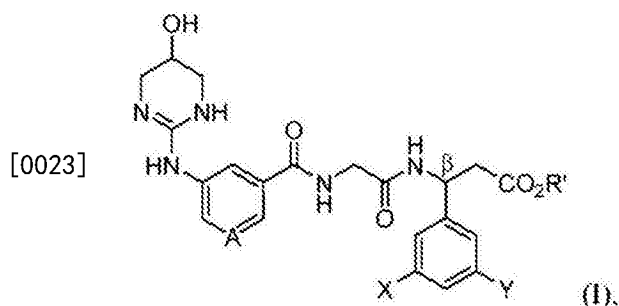
[0018] A是C-H,C-OH或N;

[0019] R'为氢,烷基 (C≤8),取代的烷基 (C≤8),或体内可转换为氢的取代基;和

[0020] X和Y各自独立地是氰基,卤素,氟代烷氧基 (C1-2),烷基 (C1-2)或氟代烷基 (C1-2),条件是X和Y不同时为氰基或烷基 (C1-2);

[0021] 或以上式的药学上可接受的盐或互变异构体。

[0022] 在一些实施方式中,该化合物进一步定义为:



[0024] 其中:

[0025] A是C-OH或N;

[0026] R'是氢,烷基 (C≤8),取代的烷基 (C≤8),或体内可转换为氢的取代基;和

[0027] X和Y各自独立地是氰基,卤素,氟代烷氧基 (C1-2),烷基 (C1-2)或氟代烷基 (C1-2),条件是X和Y不同时为氰基或烷基 (C1-2);

[0028] 或以上式的药学上可接受的盐或互变异构体。

[0029] 在一些实施方式中,A是N。在其他实施方式中,A是C-OH。在一些实施方式中,R'是氢。

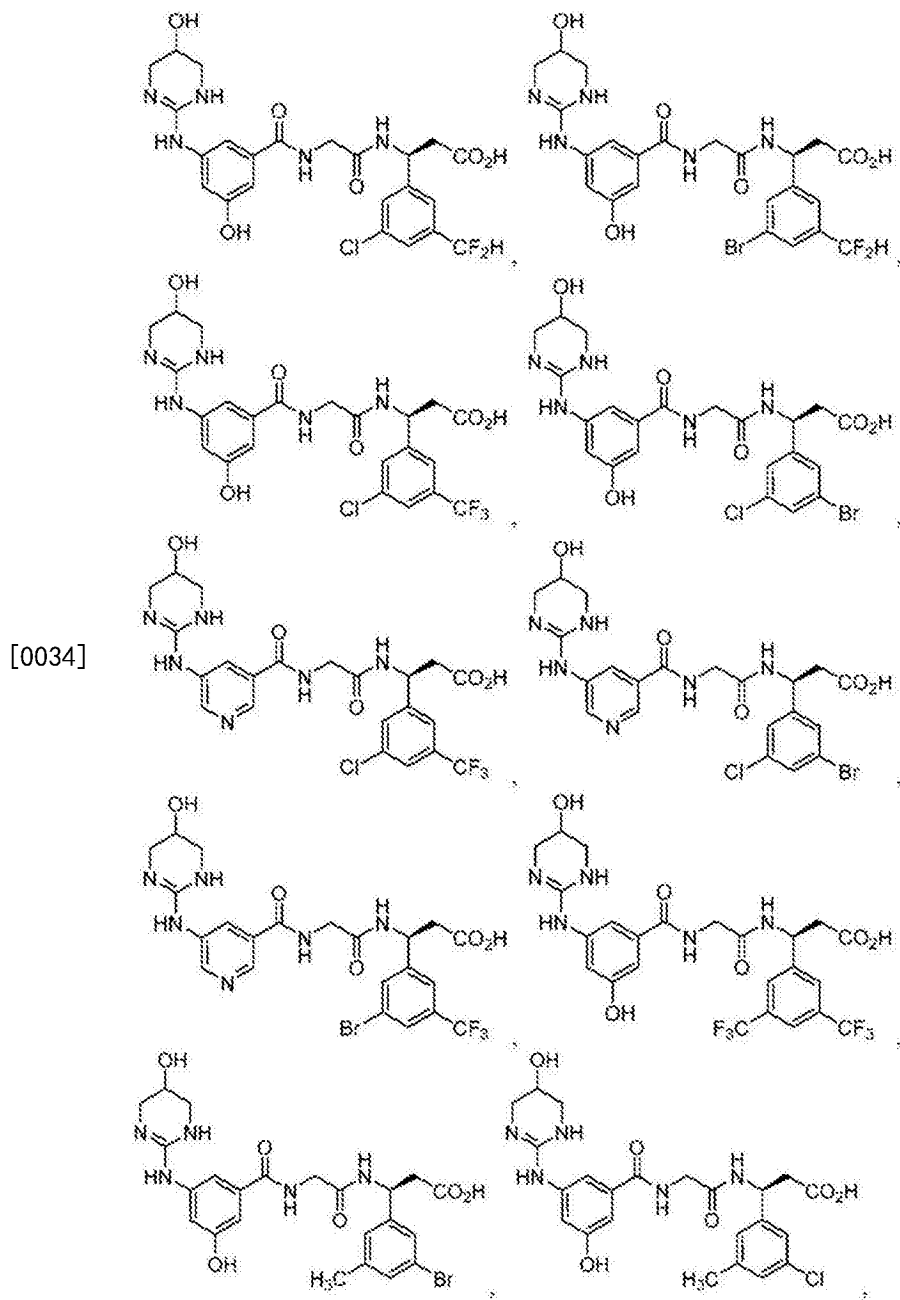
[0030] 在一些实施方式中,X是卤素如-F,-Cl或-Br。在一些实施方式中,X是-F。在其他实施方式中,X是-Cl。在其他实施方式中,X是-Br。在其他实施方式中,X是氟代烷氧基 (C1-2)如-OCF₃。在其他实施方式中,X是氟代烷基 (C1-2)。在一些实施方式中,X是-CHF₂。在其他实施方式中,X是-CF₃。在其他实施方式中,X为烷基 (C1-2)如-CH₃。

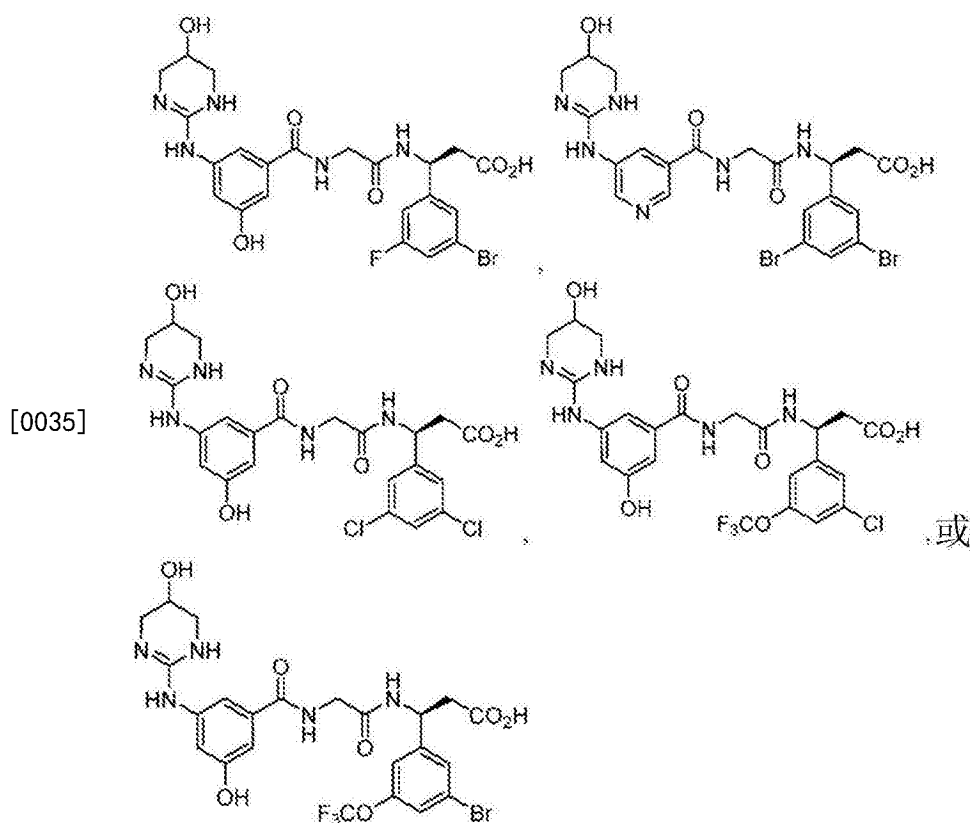
[0031] 在一些实施方式中,Y是卤素如-F,-Cl或-Br。在一些实施方式中,Y是-F。在其他实施方式中,Y是-Cl。在其他实施方式中,Y是-Br。在其他实施方式中,Y为氟代烷氧基 (C1-2)如-OCF₃。在其他实施方式中,Y是氟代烷基 (C1-2)。在一些实施方式中,Y是-CHF₂。在其他实施方式中,Y是-CF₃。在其他实施方式中,Y为烷基 (C1-2)如-CH₃。

[0032] 在一些实施方式中,X和Y各自独立地选自-F,-Cl,-Br,-OCF₃, -CH₃, -CHF₂和-

CF₃组成的组,条件是X和Y不同时为-CH₃。

[0033] 在一些实施方式中,标记B的碳原子处于S构型。在一些实施方式中,该化合物进一步定义为:





[0036] 或上述式中的任一种的药学上可接受的盐或互变异构体。

[0037] 在一些实施方式中,该化合物对抑制选自 $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ 和 $\alpha v\beta 8$ 组成的组中的三种或更多种RGD整合素是有效的,其中该化合物的有效性对应于对于该三种或更多种RGD整合素中的每一种 IC_{50} 值小于10nM,该 IC_{50} 值是使用针对各个整合素功能的固相受体分析测试法(SPRA)进行测量的。

[0038] 在一些实施方式中,该化合物具有允许口服给药后在患者中达到和/或维持治疗上显著的血浆浓度长达两小时或更长的药代动力学性质。在一些实施方式中,化合物具有至少2小时的持续血浆半衰期,该持续血浆半衰期是在大鼠中使用包含1mg化合物/kg大鼠的静脉推注测量的。

[0039] 在还有的另一方面中,本公开提供了药物组合物,其包含:

[0040] a) 本文中所述的化合物;和

[0041] b) 赋形剂。

[0042] 在仍然还有的另一方面中,本公开提供了在对其需要的患者中治疗和/或预防疾病或障碍的方法,包括以足以治疗和/或预防该疾病或障碍的量向该患者给药本文中所述的化合物或组合物。

[0043] 在一些实施方式中,该疾病或障碍与血管生成相关。在其他实施方式中,该疾病或障碍与纤维化相关。在一些实施方式中,该疾病或障碍与纤维化和/或血管生成相关。

[0044] 在一些实施方式中,该疾病或障碍为肺、肝、肾、心脏和胰腺纤维化、硬皮病、瘢痕、早产儿视网膜病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、增生性玻璃体视网膜病变、黄斑变性、糖尿病视网膜病变、癌症、骨质疏松症、自身免疫疾病、恶性肿瘤体液性高钙血症、佩吉特病、牙周病、银屑病、关节炎、再狭窄和感染。在一些实施方式中,该疾病或障碍是肺纤维

化。在其他实施方式中,该疾病或障碍是肝纤维化。在其他实施方式中,该疾病或障碍是心脏纤维化。在其他实施方式中,该疾病或障碍是肾纤维化。在其他实施方式中,该疾病或障碍是胰腺纤维化。

[0045] 在其他实施方式中,该疾病或障碍是硬皮病。在其他实施方式中,该疾病或障碍是瘢痕。在一些实施方式中,疤痕是真皮瘢痕。在其他实施方式中,该瘢痕是视网膜瘢痕。在其他实施方式中,该瘢痕是角膜瘢痕。

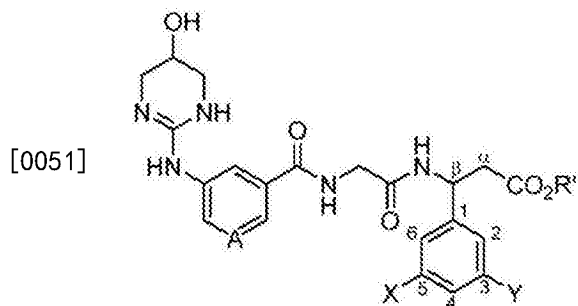
[0046] 在其他实施方式中,该疾病或障碍是早产儿视网膜病变。在其他实施方式中,该疾病或障碍是家族性渗出性玻璃体视网膜病变。在其他实施方式中,该疾病或障碍是增生性玻璃体视网膜病变。在其他实施方式中,该疾病或障碍是黄斑变性。在其他实施方式中,该疾病或障碍是糖尿病视网膜病变。

[0047] 在其他实施方式中,该疾病或障碍是癌症。在一些实施方式中,该癌症包括实体肿瘤生长或瘤形成。在一些实施方式中,该癌症包括肿瘤转移。在一些实施方式中,该癌症是膀胱,血液,骨,脑,乳腺,中枢神经系统,子宫颈,结肠,子宫内膜,食道,胆囊,生殖器,泌尿生殖道,头,肾,喉,肝,肺,肌肉组织,颈部,口腔或鼻粘膜,卵巢,胰腺,前列腺,皮肤,脾,小肠,大肠,胃,睾丸或甲状腺的癌症。在一些实施方式中,该癌症是癌,肉瘤,淋巴瘤,白血病,黑色素瘤,间皮瘤,多发性骨髓瘤或精原细胞瘤。

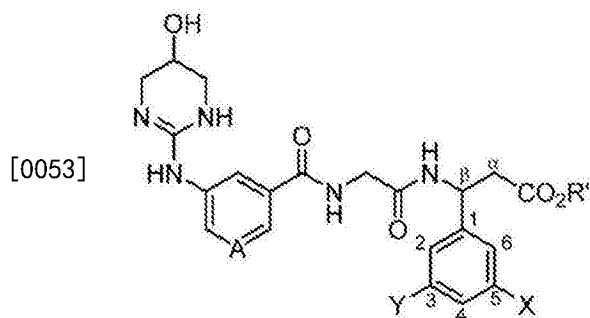
[0048] 在其他实施方式中,该疾病或障碍是骨质疏松症。在其他实施方式中,该疾病或障碍是自身免疫性疾病。在一些实施方式中,该自身免疫障碍是多发性硬化症。在其他实施方式中,该疾病或障碍是恶性肿瘤体液性高钙血症。在其他实施方式中,该疾病或障碍是佩吉特病。在其他实施方式中,该疾病或障碍是牙周病。在其他实施方式中,该疾病或障碍是银屑病。在其他实施方式中,该疾病或障碍是关节炎。在一些实施方式中,该关节炎是类风湿关节炎。在其他实施方式中,该疾病或障碍是再狭窄。在其他实施方式中,该疾病或障碍是感染。

[0049] 在一些实施方式中,该患者是人、猴、牛、马、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠,或其转基因物种。在一些实施方式中,该患者是猴、牛、马、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠,或豚鼠。在一些实施方式中,该患者是人。

[0050] 在一些方面中,本公开考虑到了以下事实:苯环与 β -氨基酸上的氨基酸骨架之间的键是自由旋转的。因此,在一些方面中,可以设想的是,结构可以旋转而使X基团处于朝着骨架的取向上,而Y远离骨架取向,以及在本说明书中以最常见画出示出X基团朝着骨架取向而Y基团远离骨架取向的如以下结构所示的方式。该结构:



[0052] 相当于以下结构:



[0054] 考虑到连接骨架中标记β的碳和芳环中标记1的碳的键是自由旋转。

[0055] 根据以下详细描述,本公开的其它目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解的是,尽管指出了本公开的具体实施方式,但详细描述和具体实施例仅仅都是以举例说明的方式给出,因为在本公开的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域那些技术人员根据该详细的描述将变得显而易见。应当注意的是,仅仅因为具体化合物归于一个具体通式并不意味着它也不能属于另一个通式。

附图说明

[0056] 以下附图构成了本说明书的部分并被包括在内从而进一步说明本公开的某些方面。通过参考一个或多个这些附图并结合本文中呈现的具体实施方式的详细描述,就可以更好地理解本公开。

[0057] 图1-整合素比较对照化合物(对照剂(comparators))和表1A&1B中所示的实施例对于每种整合素的效力的点图。水平线表示组平均值。使用双尾标准T检验进行统计分析用于比较组平均值。

具体实施方式

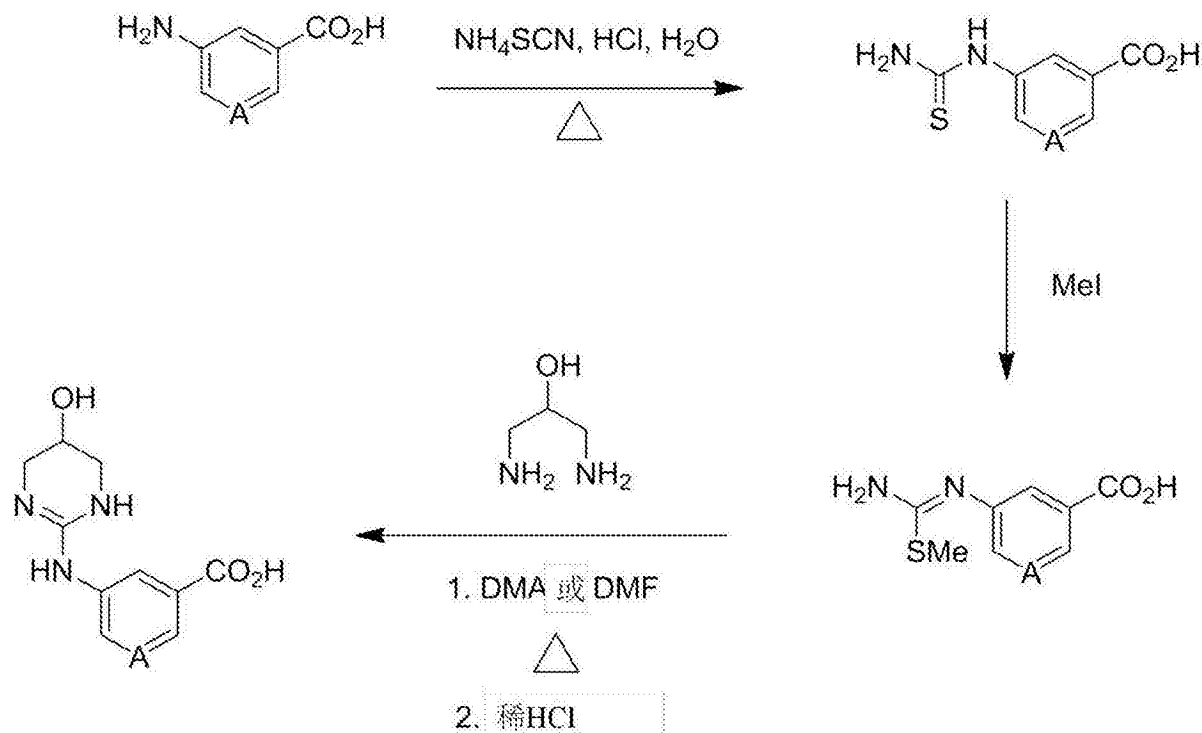
[0058] 本文公开了具有整合素受体拮抗剂特性的新化合物和组合物,其制备方法及其使用的方法,包括用于治疗和/或预防疾病的方法。

[0059] I. 化合物和合成方法

[0060] 本公开提供的化合物可以使用以下概述的方法制备并在实施例部分中进一步描述。表1中所示并列于表3-5中的对照化合物按照文献中的公开内容进行合成。另外,这些对照化合物也可以通过利用本领域技术人员在本文中描述的方法和工序很容易合成。用于制备适用于本公开的化合物的通用合成序列概述于方案I-VIII中。在合适的地方描述了本公开的解释说明以及各个方面的实际程序。以下方案和实施例旨在仅仅是对本公开的举例说明,而不是在范围或精神上对其进行限制。本领域技术人员将很容易理解的是,方案和实施例中描述的条件和工艺的已知变体能够用于合成本公开的化合物。所采用的原料和设备要么商购获得,要么能够通过以前报道的方法制备获得,并很容易地被本领域技术人员复制。

[0061] 方案I

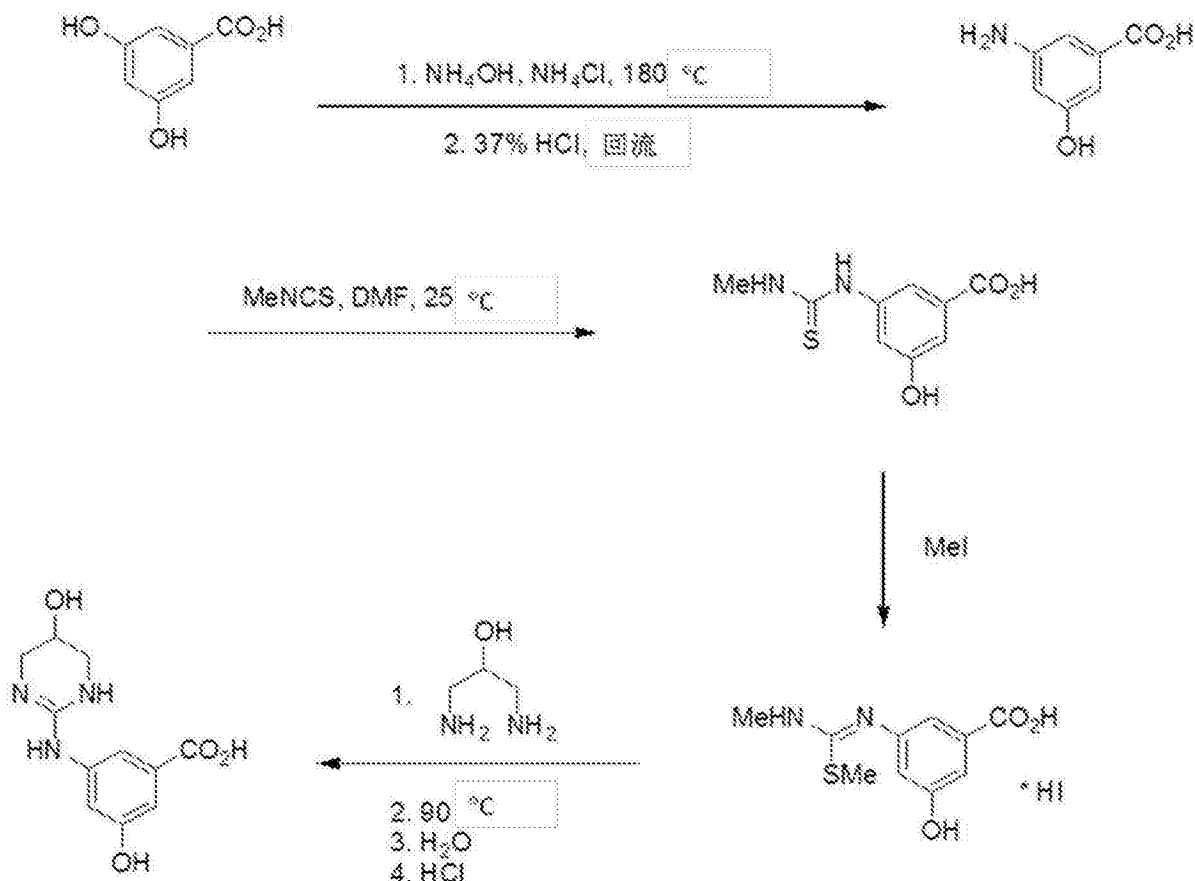
[0062]



[0063] 方案I举例说明了可以用于制备本公开式I的环状胍取代的左旋芳酸部分的通用方法,其随后能够与Gly- β -氨基酸酯偶联,或首先与Gly酯偶联,然后(酯水解后)偶联至合适的 β -氨基酸酯上。简而言之,在方案I中,合适的氨基苯(或吡啶)甲酸在热稀盐酸中与硫氰酸铵反应,在正常后处理后获得产生的3-硫脲苯(或吡啶)甲酸。起始的氨基苯(或吡啶)甲酸要么是商购获得的,要么能够通过还原相应的硝基苯(或吡啶)甲酸而将其转化为氨基苯(或吡啶)甲酸,硝基苯(或吡啶)甲酸能够商业获得,或通过硝化合适的苯(或吡啶)甲酸,随后还原成期望的氨基苯(或吡啶)甲酸,或通过本领域技术人员已知的其他报道的方法获得。硫脲中间体通过与碘甲烷在乙醇中回流而反应转化为S-甲基衍生物。合适的1,3-二氨基-2-羟基丙烷与所获得的中间体在热DMA(或DMF)中反应。一旦冷却,就生成沉淀并通过过滤分离两性离子产物。 HCl 盐可以通过从稀盐酸中冷冻干燥而获得。另外,通过除去挥发物并浓缩,可以从原始反应混合物中分离出产物。将所获得的产物吸收于水中并将pH调节至约5-7,其中两性离子产物沉淀并通过过滤分离。 HCl 盐可以如前所述获得,或简单地溶解于稀盐酸中并浓缩成固体并干燥而获得。

[0064] 方案II

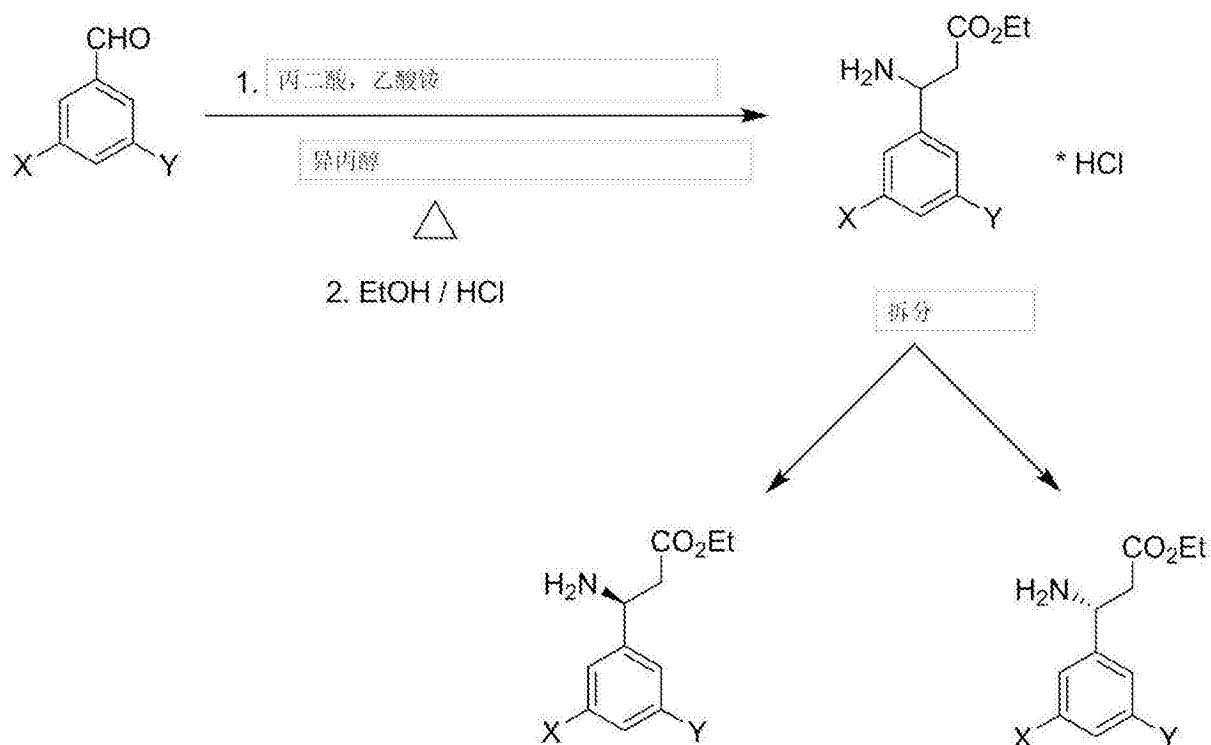
[0065]



[0066] 方案II举例说明了能够用于制备本公开式I的四氢嘧啶基并苯甲酸部分的方法，其然后可偶联至Gly-氨基酸酯或首先偶联至Gly酯，接着(酯水解后)偶联至适当的 β -氨基酸酯。简而言之，在方案II中，使用文献 Austr.J.Chem.1981或Becker et al,1983中描述的程序将3,5-二羟基苯甲酸转化成3-氨基-5-羟基-苯甲酸。产物在室温下与DMF中的异硫氰酸甲酯反应(Organic Process Research&Development,2004)，在正常后处理后得到3-N'-甲基硫脲-5-羟基苯甲酸。硫脲中间体在低于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 下与纯碘甲烷反应转化为S-甲基衍生物。1,3-二氨基-2-羟基丙烷与所获得的中间体在热DMA(或DMF)中反应。一旦冷却，就形成沉淀并通过过滤分离两性离子产物HCl盐可以通过从稀盐酸中冷冻干燥得到。或者，产物可以通过除去挥发物并浓缩而从原始反应混合物中分离出来。将所获得的产物吸收于水中并将pH调节至约5-7，其中两性离子产物发生沉淀并通过过滤分离。HCl盐可以如前所述获得，或简单地溶解于稀盐酸中并浓缩成固体并干燥而获得。

[0067] 方案III

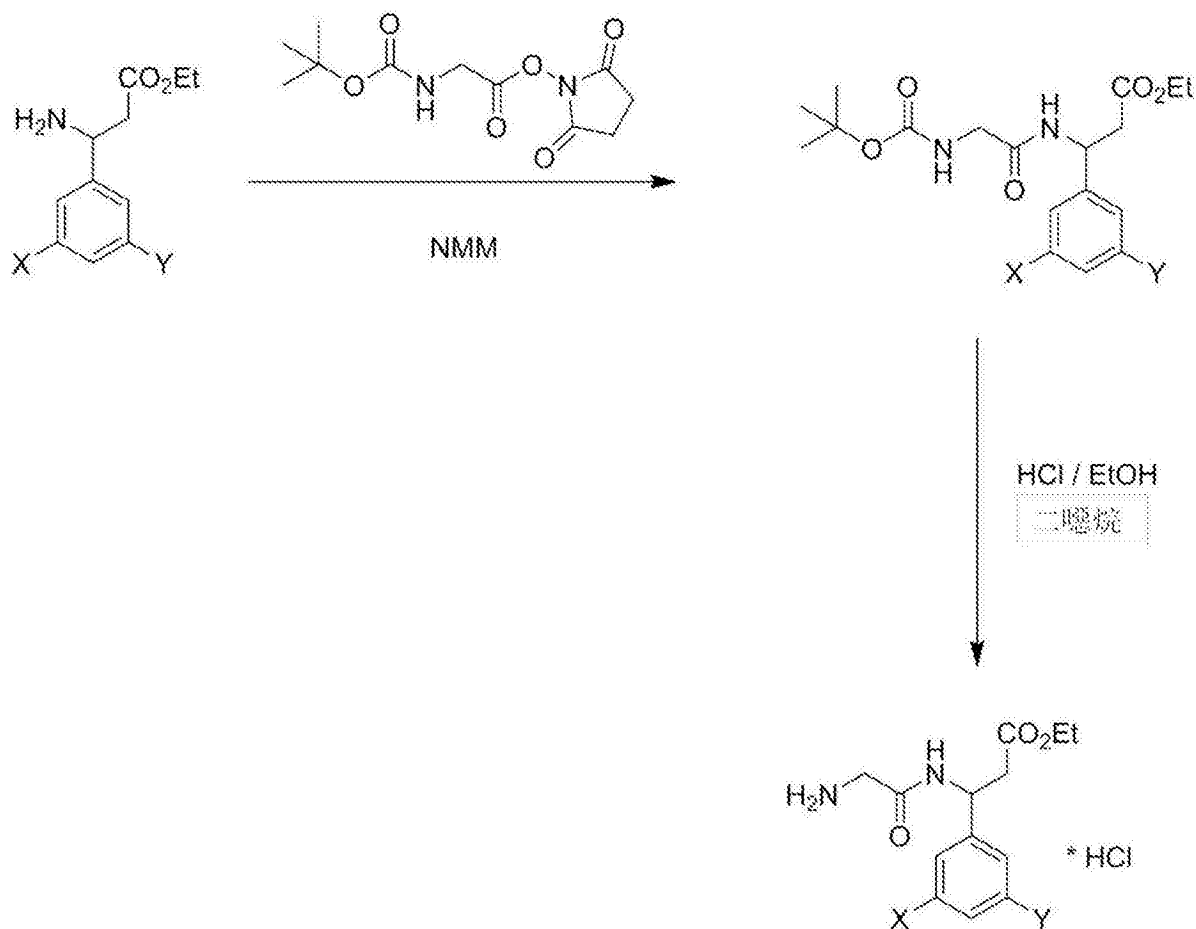
[0068]



[0069] 方案III举例说明了可以用于合成本公开的式I的 β 氨基酸酯部分的通用方法, 其从合适的苯甲醛开始。然后能够将该 β 氨基酸酯与Boc-甘氨酸偶联, 然后(在去除Boc保护基后)偶联至方案I和II中描述的合适芳香酸, 或偶联至与甘氨酸偶联的芳香酸。简言之, 在方案III中, 向合适的苯甲醛的异丙醇溶液中加入乙酸铵, 然后加入丙二酸。将反应混合物回流搅拌, 过滤所获得的沉淀, 并用热异丙醇洗涤并干燥, 而获得期望的外消旋 β 氨基酸。通过在过量的HCl气体存在下将该酸在过量的乙醇中加热而合成乙酯。这些外消旋 β -氨基酸酯能够通过手性色谱拆分或通过文献 Faulconbridge et al., 2000或Landis et al., 2002中描述的酶促拆分而拆分为(R)和(S)对映异构体, 两篇文献结合于本文中作为参考。在一些实施方式中, (S)对映异构体是 β -氨基酸基团的优选对映异构体。

[0070] 方案IV

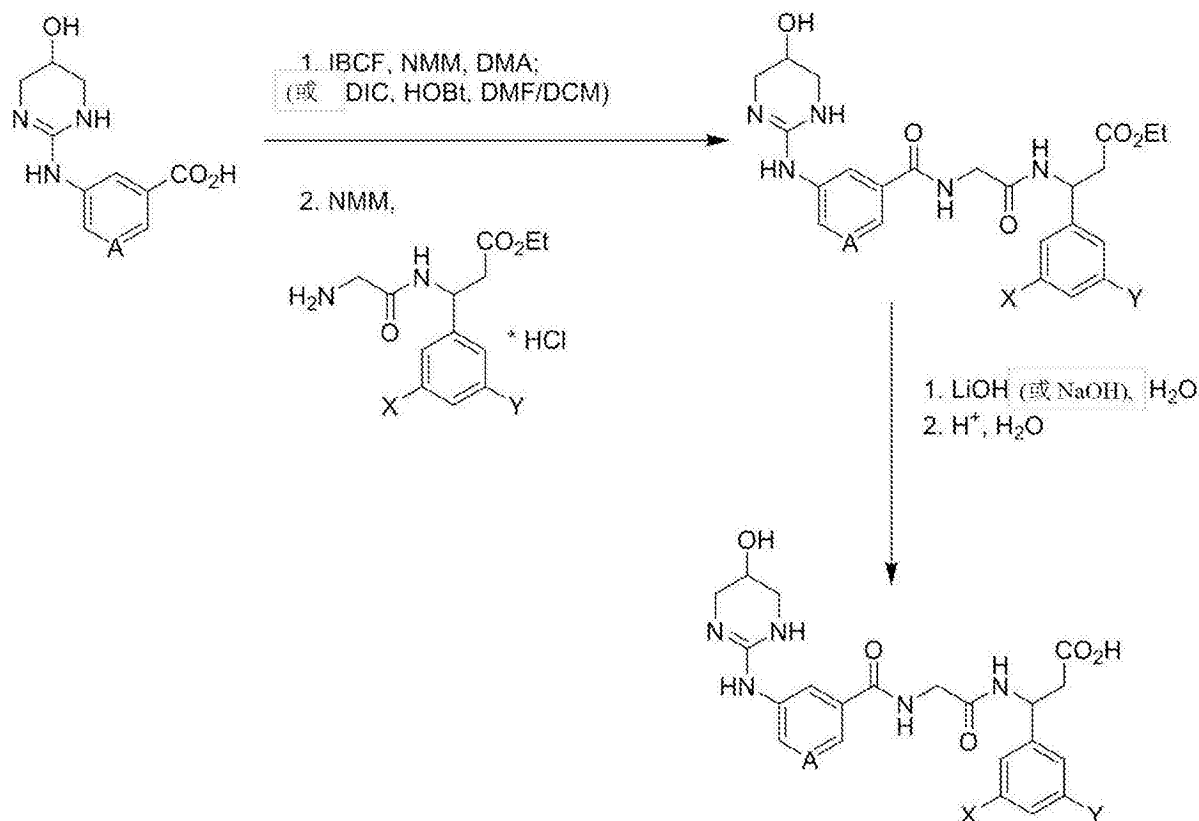
[0071]



[0072] 方案IV举例说明了可以用于制备本公开的式I的乙基-N-Gly-β氨基酸部分的通用方法,其能够与方案I和II中描述的式I的芳香酸部分进行偶联。该方法描述了将β氨基酸酯偶联至甘氨酸。简而言之,用活化的 Boc甘氨酸处理期望的β氨基酸酯(如上文方案III中所述)。除去Boc保护基(例如,通过用乙醇/HCl处理)得到相应β氨基酸酯的甘氨酸酰胺((S) 对映异构体通过利用上述方案中描述的(S)-β氨基酸酯提供)。

[0073] 方案V

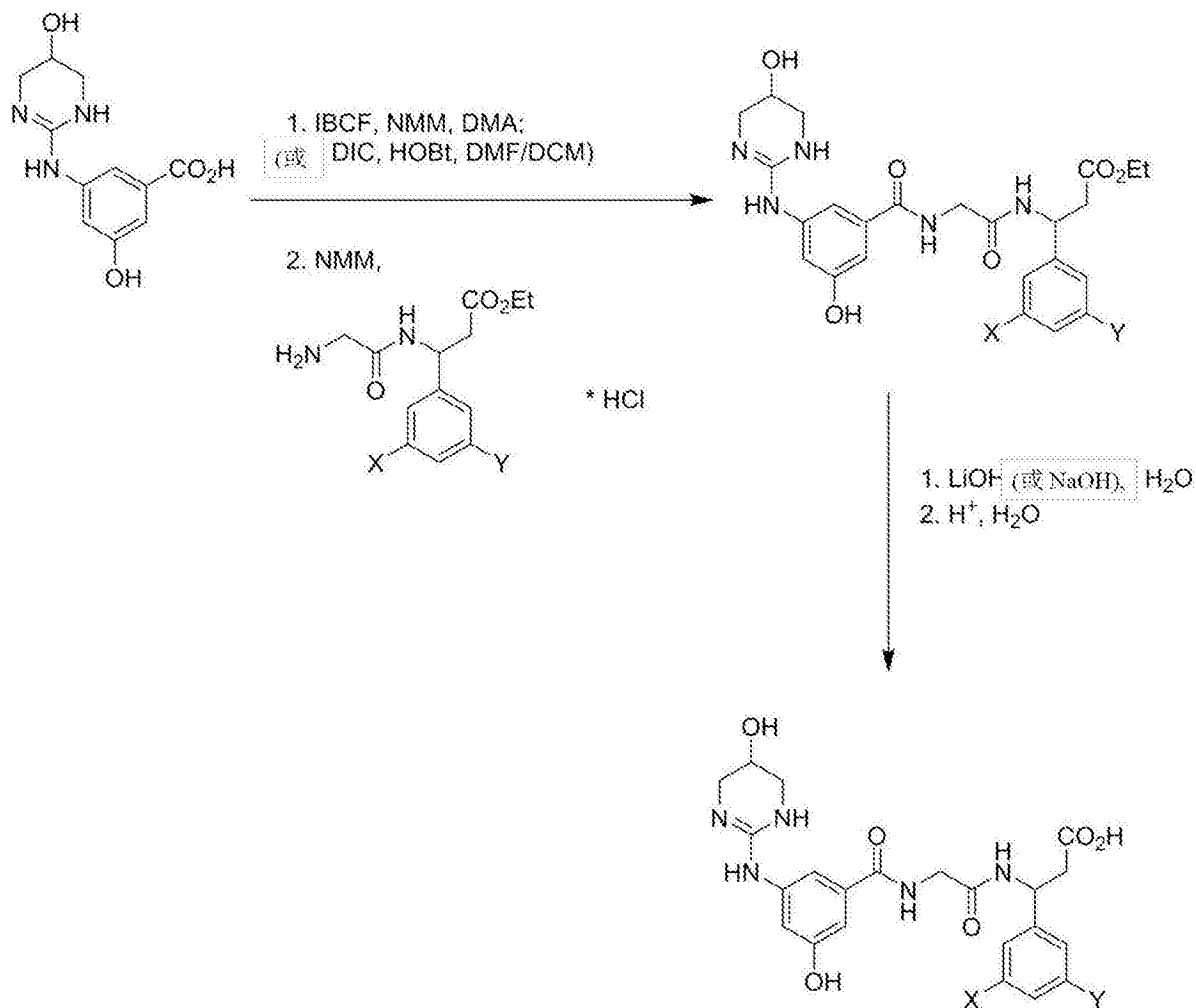
[0074]



[0075] 方案V举例说明可以用于制备本公开的各种化合物的通用方法。简而言之,使用已知方法活化式I(描述于方案I和II中)的环胍取代的左旋芳酸部分以进行偶联。因此,在溶解于合适的溶剂如DMA中后,加入等量的NMM。将反应混合物冷却至冰浴温度并加入IBCF。向混合的酸酐中间体中加入Gly-氨基酸酯(描述于方案IV中)和NMM。一旦反应完成,产物通过制备型HPLC纯化,而酯通过用碱如LiOH在合适的溶剂(二氧六环/水或乙腈/水)中处理而水解为酸。可替代地,能够使用合适的酸,如TFA。通过制备型HPLC分离产物或通过pH 5-7下分离两性离子并通过标准程序转化为期望的盐。(S)对映异构体通过利用上述方案中描述的(S)-β氨基酸酯提供。

[0076] 方案VI

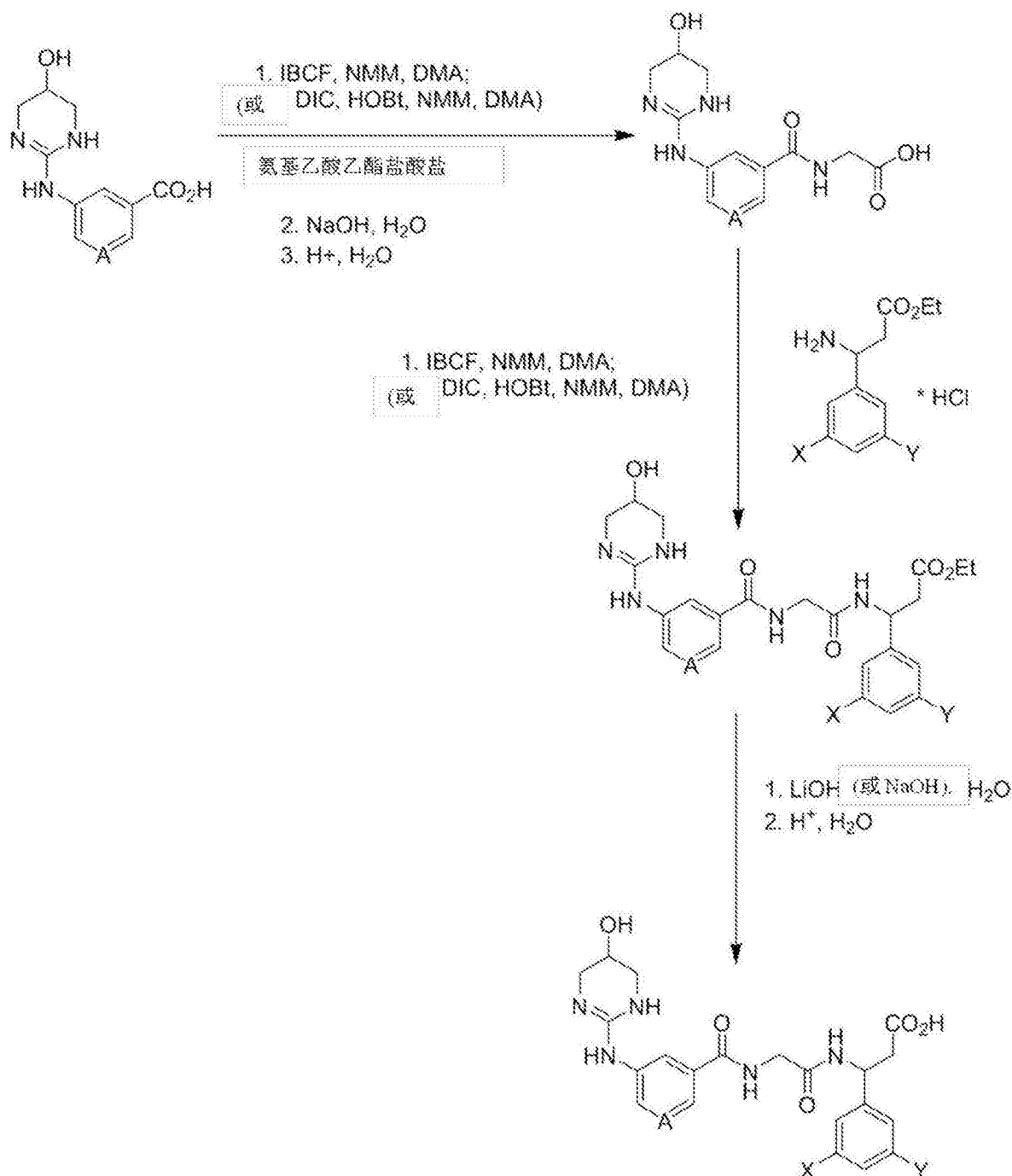
[0077]



[0078] 方案VI举例说明了可以用于制备本公开的各种化合物的通用方法。简而言之,使用已知方法活化3-羟基-5-[(1,4,5,6-四氢-5-羟基-2-嘧啶基)氨基]苯甲酸(描述于方案II中)以进行偶联。因此,在溶解于合适的溶剂如DMA中后,加入等量的NMM。将反应混合物冷却至冰浴温度并加入 IBCF。向混合的酸酐中间体中加入Gly-β-氨基酸酯(描述于方案IV中)和NMM。一旦反应完成,产物通过制备型HPLC纯化,酯通过用碱如LiOH 在合适的溶剂(二氧六环/水或乙腈/水)中处理而水解为酸。可替代地,能够使用合适的酸,如TFA。产物通过制备型HPLC分离或通过pH 5-7 下分离两性离子并通过标准程序转化为期望的盐。(S)对映异构体通过利用上述方案中描述的(S)-β氨基酸酯提供。

[0079] 方案VII

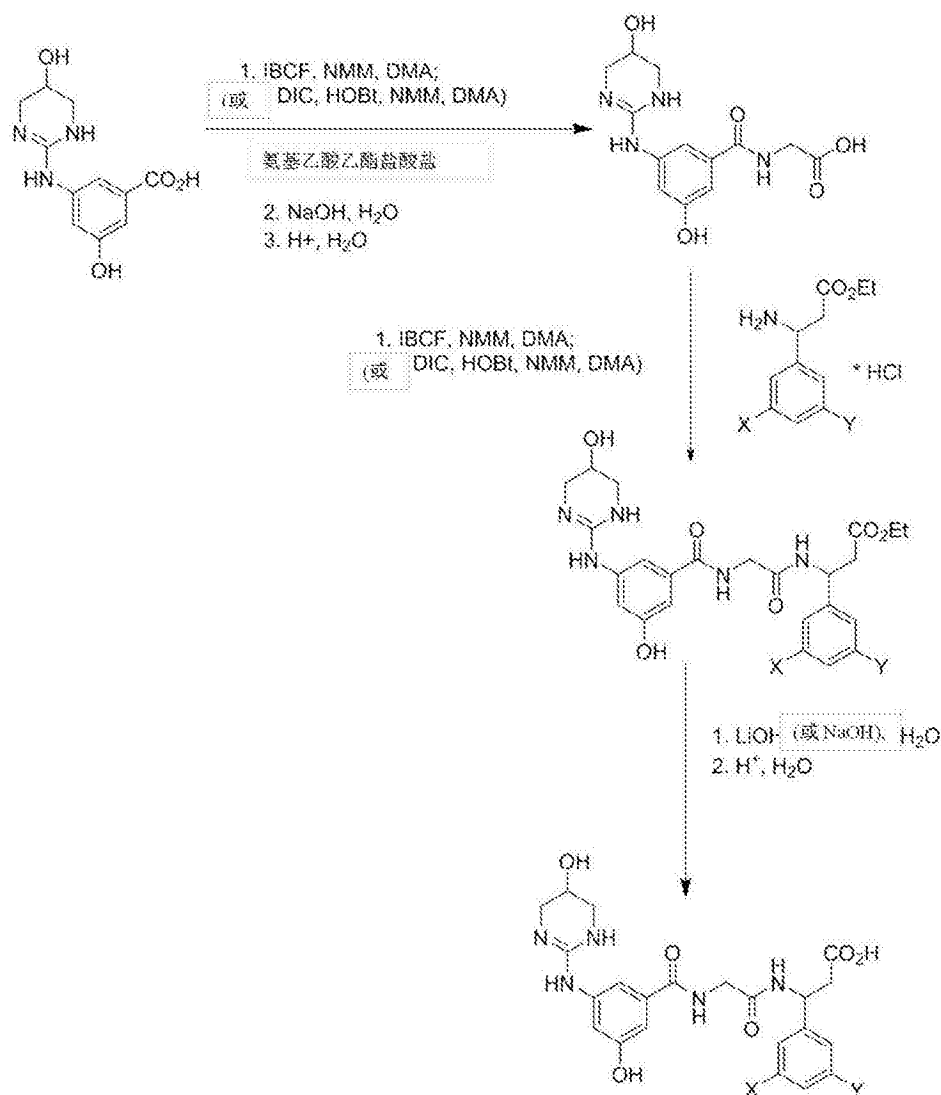
[0080]



[0081] 方案VII举例说明可以用于制备本公开的各种化合物的通用方法。简而言之,使用已知方法活化式I的环状脒取代的左旋芳香酸部分(例如,描述于方案I和II中)以进行偶联。因此,在溶解于合适的溶剂如DMA 中后,加入等量的NMM。将反应混合物冷却至冰浴温度并加入IBCF。向混合的酸酐中间体中加入甘氨酸乙酯盐酸盐和NMM。一旦反应完成,产物通过制备型HPLC纯化,并且通过用碱如NaOH在合适的溶剂(水,二恶烷/水或乙腈/水)中处理,然后酸化将酯水解成酸。然后使用已知方法将Gly加合物活化以进行偶联。因此,在溶解在合适的溶剂如DMA中后,加入等量的NMM。将反应混合物冷却至冰浴温度并加入IBCF。向混合的酸酐中间体中加入合适的β氨基酸酯盐(在上述方案III中描述)和NMM。一旦反应完成,产物通过制备型HPLC纯化,酯通过用碱如LiOH在合适的溶剂(二氧六环/水或乙腈/水)中处理

而水解为酸。可替代地,可以使用合适的酸,例如TFA。产物通过制备型HPLC或通过pH 5-7下分离两性离子并通过标准程序转化成期望的盐而分离((S)对映异构体通过利用上述方案中描述的(S)- β 氨基酸酯提供)。

[0082] 方案VIII



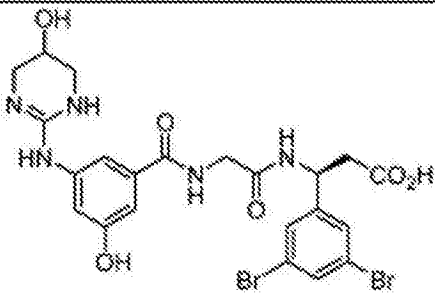
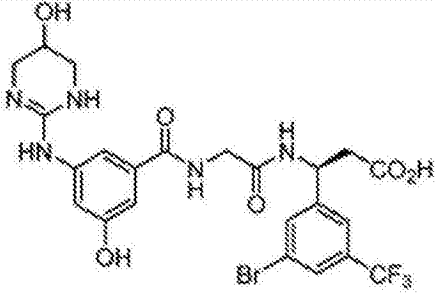
[0083]

[0084] 方案VIII举例说明了可以用于制备本文所述的各种化合物的通用方法。简而言之,使用已知方法将3-羟基-5-[(1,4,5,6-四氢-5-羟基-2-嘧啶基)氨基]苯甲酸(描述于方案II中)活化以进行偶联。因此,在溶解于合适的溶剂如DMA中之后,加入等量的NMM。将反应混合物冷却至冰浴温度并加入IBCF。向混合的酸酐中间体中加入甘氨酸乙酯HCl和NMM。一旦反应完成,产物通过制备型HPLC纯化,并通过用碱如NaOH在合适的溶剂(水,二噁烷/水或乙腈/水)中处理,使酯水解成酸,接着进行酸化。然后使用已知方法将该Gly加合物活化以进行偶联。因此,在溶解于合适的溶剂如DMA中后,加入等量的NMM。将反应混合物冷却至冰浴温度并加入IBCF。向混合的酸酐中间体中加入合适的 β 氨基酸酯盐(描述于上述方案III中)和NMM。一旦反应完成,产物通过制备型HPLC 纯化,而酯通过用碱如LiOH在合适的溶剂(二氧六环/水或乙腈/水)中处理而水解为酸。可替代地,能够使用合适的酸,如TFA。产物通过制备型HPLC或通过pH 5-7下分离两性离子并通过标准程序转化成期望的盐进行分离((S)对映异构体通过利用上述方案中描述的(S)- β 氨基酸酯提供)。

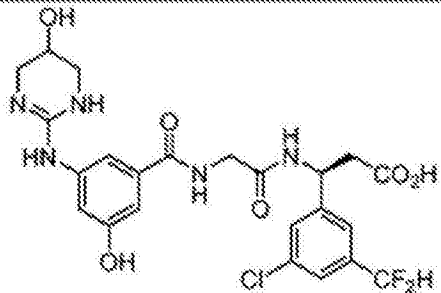
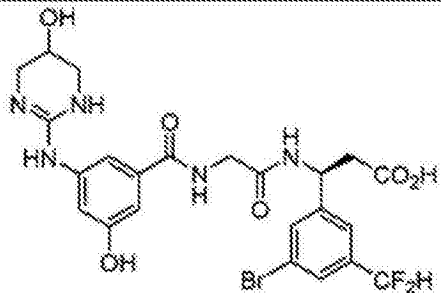
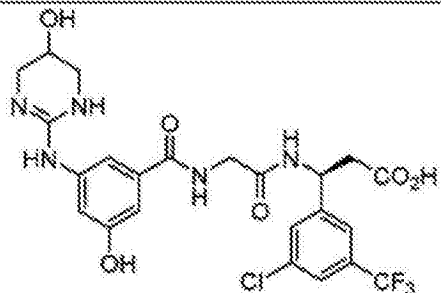
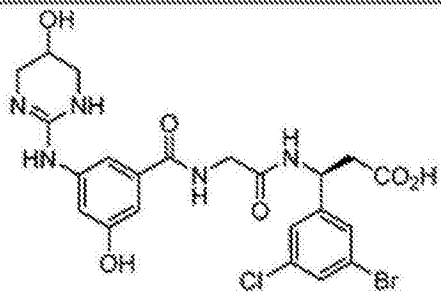
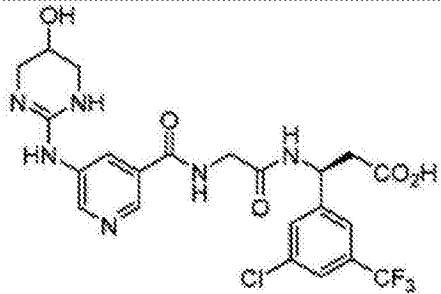
[0085] 在一些实施方式中,本公开的化合物是在表1A(下文),实施例和权利要求书中描述的那些化合物。

[0086] 表1A:本公开的实施例化合物

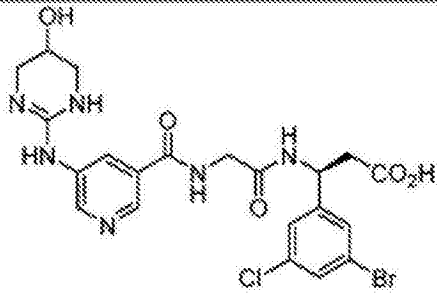
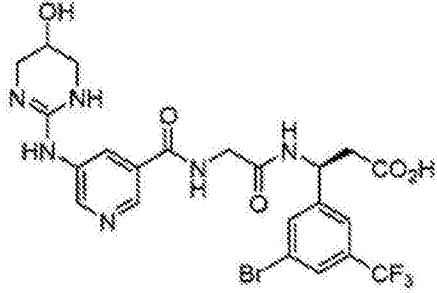
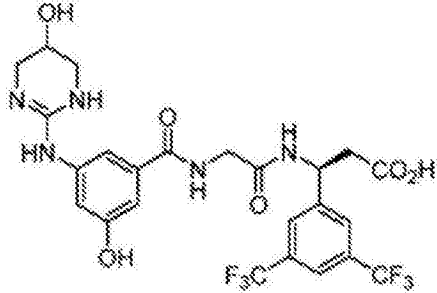
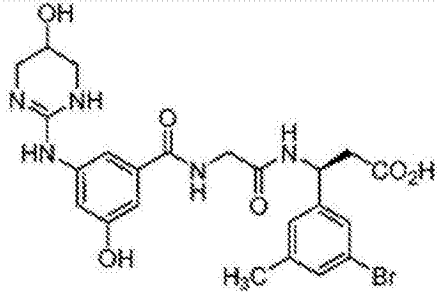
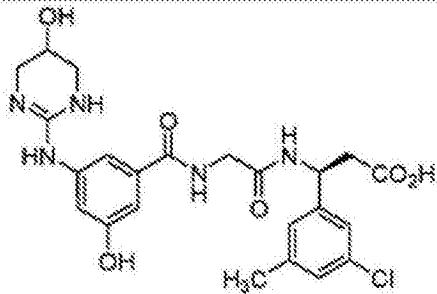
[0087]

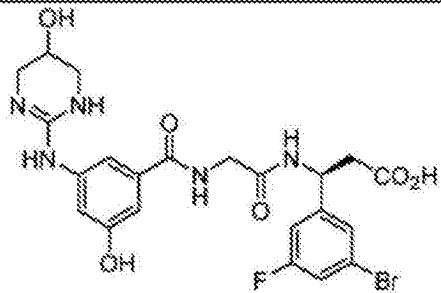
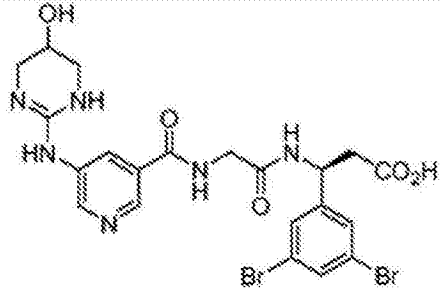
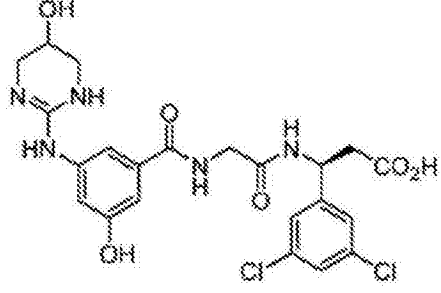
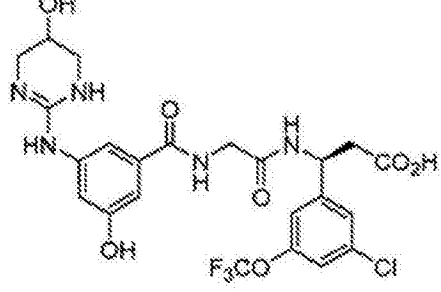
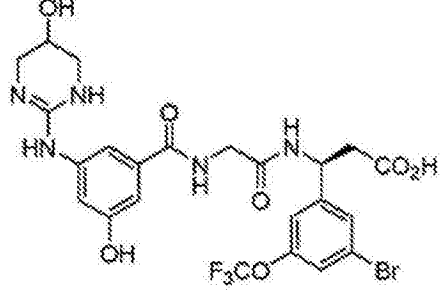
实施例编号	化合物结构
1	
2	

[0088]

实施例编号	化合物结构
3	
4	
5	
6	
7	

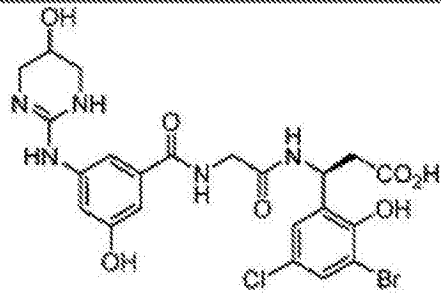
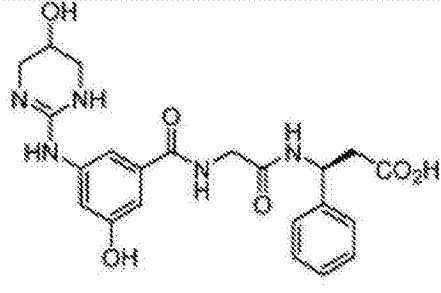
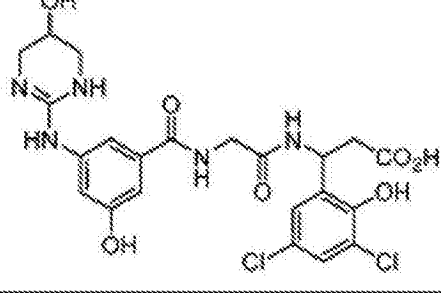
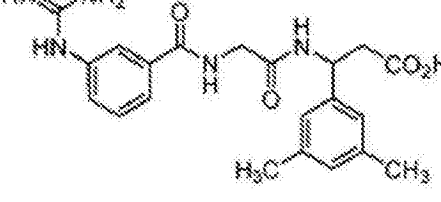
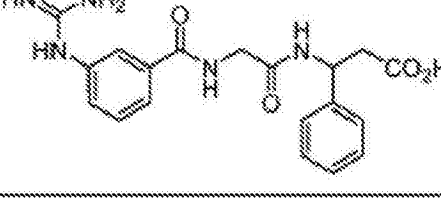
[0089]

实施例编号	化合物结构
8	
9	
10	
11	
12	

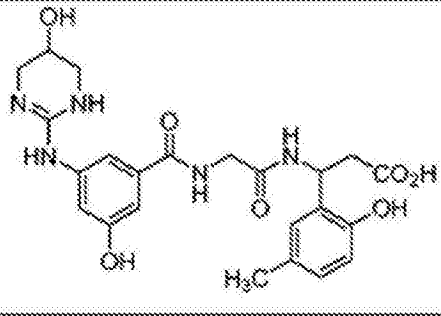
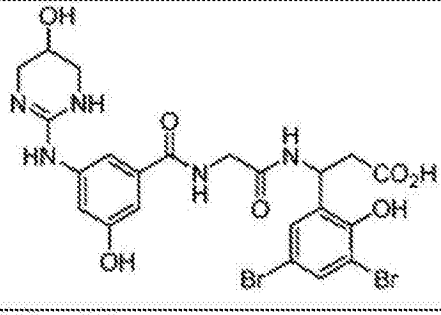
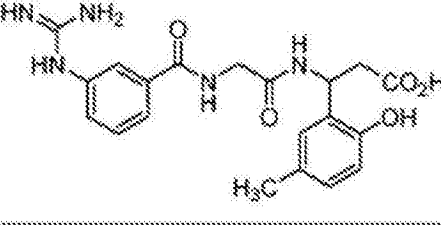
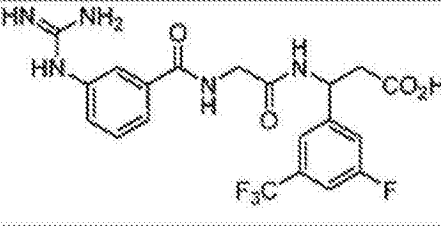
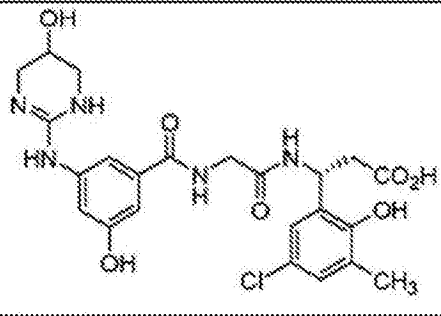
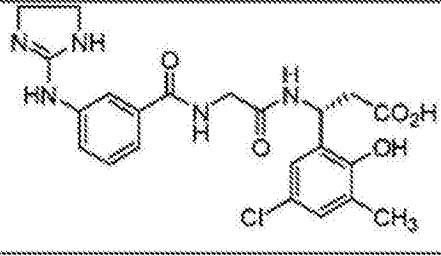
实施例编号	化合物结构
13	
14	
15	
16	
17	

[0091] 表1B:对照化合物

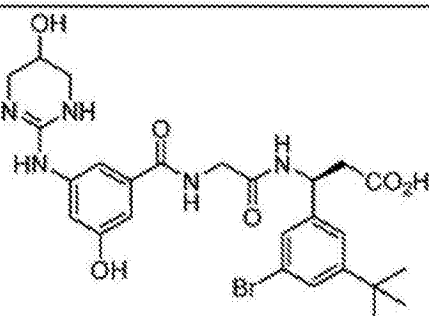
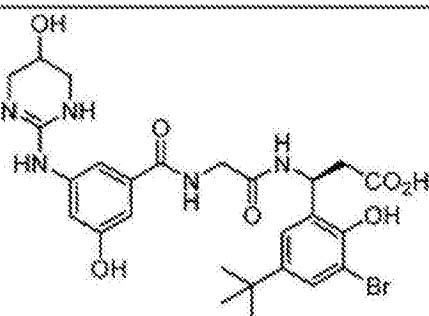
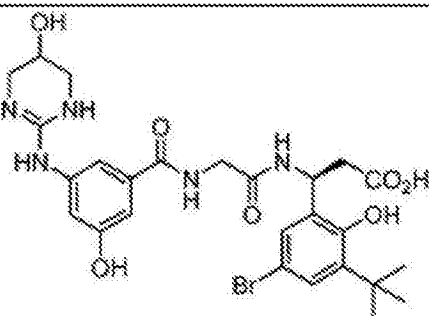
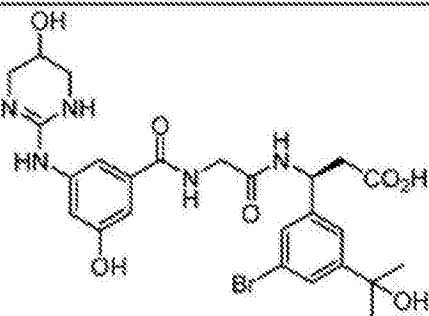
[0092]

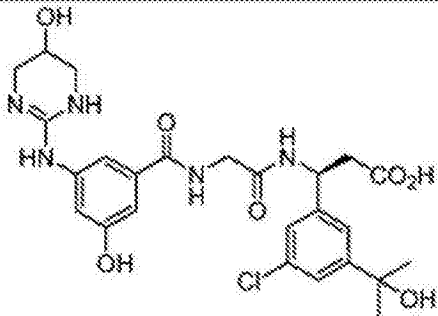
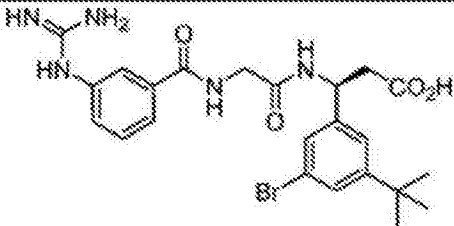
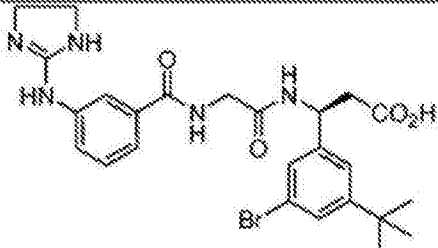
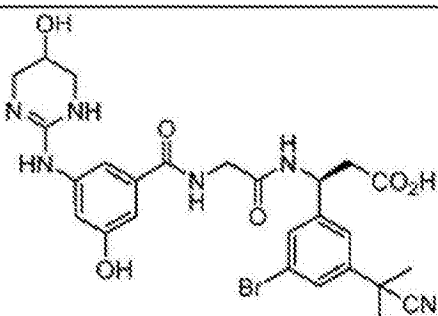
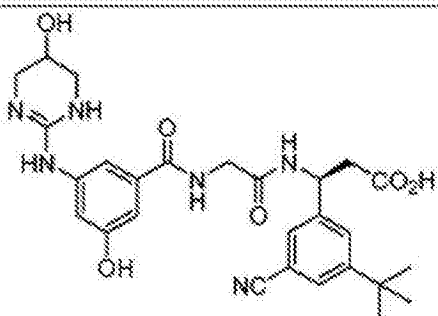
对照实施例编号	化合物结构
C1	
C2	
C3	
C4	
C5	

[0093]

对照实施例编号	化合物结构
C6	
C7	
C8	
C9	
C10	
C11	

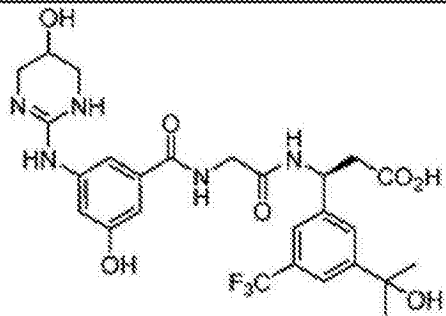
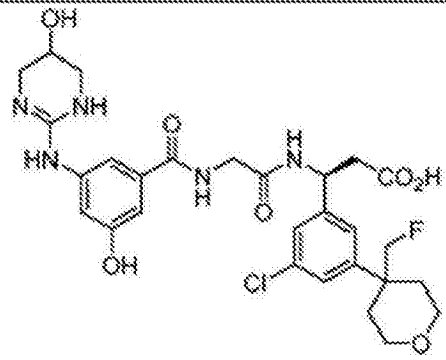
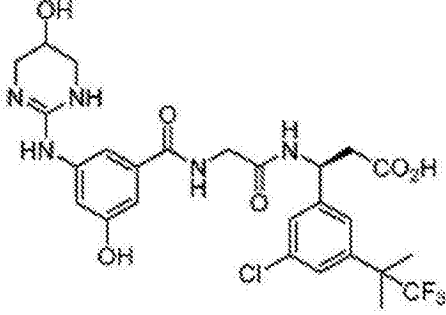
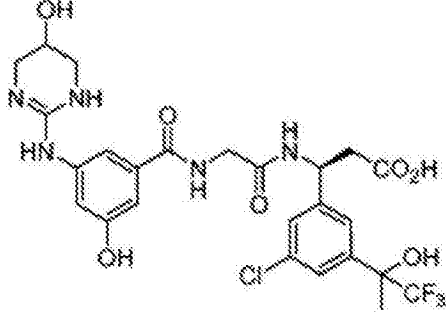
[0094]

对照实施例编号	化合物结构
C12	
C13	
C14	
C15	

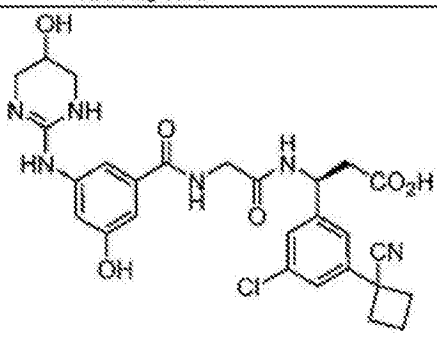
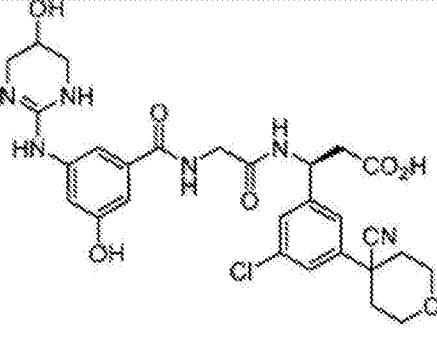
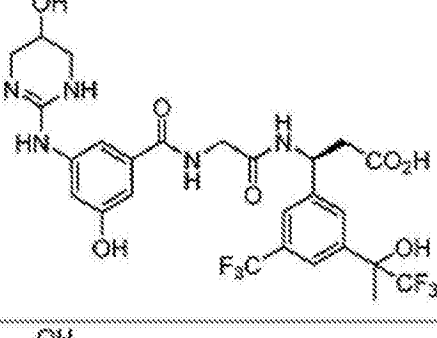
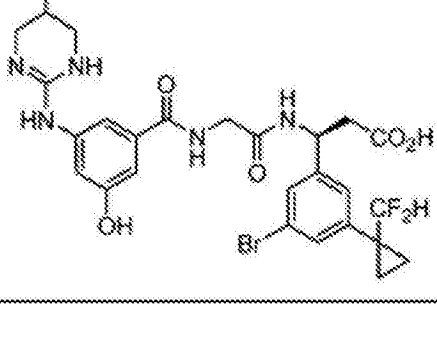
对照实施例编号	化合物结构
C16	
C17	
C18	
C19	
C20	

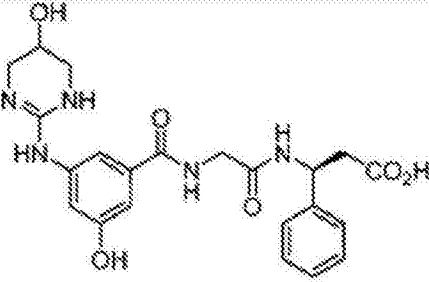
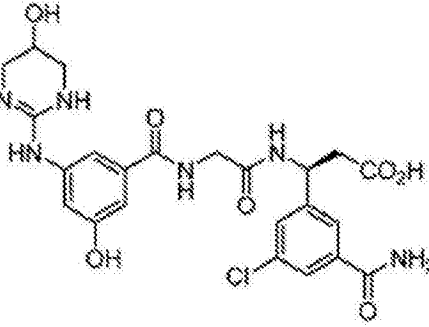
[0095]

[0096]

对照实施例编号	化合物结构
C21	
C22	
C23	
C24	

[0097]

对照实施例编号	化合物结构
C25	
C26	
C27	
C28	

对照实施例编号	化合物结构
C29	
C30	

[0099] 所有上述这些方法都能够使用美国专利6,013,651和6,028,223中教导的原理和技术以及由本领域技术人员应用的有机化学原理和技术进行进一步修改和优化,在此通过引证的方式将其全部内容结合到本申请中。例如,这样的原理和技术教导于March的《高等有机化学:反应,机理和结构 (Advanced Organic Chemistry: Reaction, Mechanisms, and Structure)》(2007)中,在此通过引证的方式将其全部内容结合到本申请中。

[0100] 用于本公开的方法中的化合物可以含有一个或多个不对称取代的碳或氮原子,并且可以以光学活性或外消旋形式分离。因此,除非具体指出具体的立体化学或异构体形式,否则结构的所有手性、非对映体、外消旋体形式,差向异构体形式和所有几何异构体形式都是能预想到的。在一些实施方式中,式I的 β -氨基酸部分是(S)构型。在一些实施方式中,(S)对映异构体是 β -氨基酸基团的优选对映异构体。化合物可以以外消旋体和外消旋混合物,单一对映异构体,非对映异构体混合物和单个非对映异构体出现。在一些实施方式中,获得了单个非对映异构体。本公开的化合物的手性中心能够具有S或R构型,正如IUPAC 1974推荐书所定义的。例如,立体异构体的混合物可以使用以下实施例部分中教导的技术以及其改进方法进行分离。还包括互变异构体形式以及这些异构体和互变异构体的药学上可接受的盐。

[0101] 构成本发明化合物的原子旨在包括这些原子的所有同位素形式。本公开的化合物包括具有一个或多个已经同位素改性或富集的原子的化合物,特别是具有药学上可接受的同位素的那些或适用于药学研究的那些。正如本文所用,同位素包括具有相同原子序数但不同质量数的那些原子。作为一般性而非限性的实例,氢的同位素包括氕和氘,而碳的同位素包括 ^{13}C 和 ^{14}C 。类似地,预期本公开的化合物的一个或多个碳原子可以被硅原子替代。此外,预期本公开的化合物的一个或多个氧原子可以被硫或硒原子替代。

[0102] 本公开的化合物也可以以前药形式存在。由于已知前药会增强药物的许多期望的性质(例如,溶解度,生物利用度,制造等),如果需要,用于本公开的一些方法中的化合物可以以前药形式递送。因此,本公开预期了本公开化合物的前药以及递送前药的方法。本公开

中使用的化合物的前药可以按照无论是在常规操作中,还是在体内,改性都会被切割成母体化合物的方式通过改性存在于化合物中的官能团而制备。因此,前药包括,例如,本文中描述的其中羟基,氨基或羧基与任何当前药给药于受试者时会经过切割而分别形成羟基、氨基或羧酸的基团键合的化合物。

[0103] 应当认识到的是,形成本公开的任何盐的一部分的具体阴离子或阳离子并不重要,只要该盐作为整体在药理学上是可接受的即可。药学上可接受的盐及其制备和使用方法的其他实例呈现于《药学上可接受的盐手册:性质和应用 (Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use)》(2002)中,在此通过引证的方式将其全部内容结合到本申请中。

[0104] 应当进一步认识到的是,本公开的化合物包括已经进一步改性而包含能够在体内可转化为氢的取代基的化合物。这包括那些可以通过酶学或化学手段,包括但不限于,水解和氢解作用而可转化为氢原子的基团。实例包括可水解基团,如酰基,具有氧羰基、氨基酸残基、肽残基、邻硝基苯基亚磺酰基、三甲基甲硅烷基、四氢吡喃基、二苯基次膦酰基等的基团。酰基的实例包括甲酰基、乙酰基、三氟乙酰基等。具有氧羰基的基团的实例包括乙氧羰基、叔丁氧羰基 ($-C(O)OC(CH_3)_3$, Boc)、苄氧羰基、对甲氧基苄氧羰基、乙烯氧羰基、 β -(对甲苯磺酰基)乙氧羰基等。合适的氨基酸残基包括,但不限于, Gly (甘氨酸)、Ala (丙氨酸)、Arg (精氨酸)、Asn (天冬酰胺)、Asp (天冬氨酸)、Cys (半胱氨酸)、Glu (谷氨酸)、His (组氨酸)、Ile (异亮氨酸)、Leu (亮氨酸)、Lys (赖氨酸)、Met (蛋氨酸)、Phe (苯丙氨酸)、Pro (脯氨酸)、Ser (丝氨酸)、Thr (苏氨酸)、Trp (色氨酸)、Tyr (酪氨酸)、Val (缬氨酸)、Nva (正缬氨酸)、Hse (高丝氨酸)、4-Hyp (4-羟脯氨酸)、5-Hyl (5-羟赖氨酸)、Ome (鸟氨酸) 和 β -Ala 的残基。合适的氨基酸残基的实例还包括用保护基保护的氨基酸残基。合适的保护基团的实例包括通常用于肽合成中的那些,包括酰基 (如甲酰基和乙酰基)、芳基甲氧基羰基 (如苄氧基羰基和对硝基苄氧基羰基)、叔丁氧基羰基 ($-C(O)OC(CH_3)_3$, Boc) 等。合适的肽残基包括含有 2 至 5 个氨基酸残基的肽残基。这些氨基酸或肽的残基能够以 D-型, L-型或其混合物的立体化学构型存在。另外,氨基酸或肽残基可以具有不对称碳原子。具有不对称碳原子的合适氨基酸残基的实例包括 Ala、Leu、Phe、Trp、Nva、Val、Met、Ser、Lys、Thr 和 Tyr 的残基。具有不对称碳原子的肽残基包括具有一个或多个具有不对称碳原子的组成氨基酸残基的肽残基。合适的氨基酸保护基团的实例包括通常用于肽合成的那些,包括酰基 (如甲酰基和乙酰基)、芳基甲氧基羰基 (如苄氧基羰基和/或硝基苄氧基羰基)、叔丁氧基羰基 ($-C(O)OC(CH_3)_3$) 等。“可在体内转化为氢”的取代基的其他实例包括可还原性消除的可氢解基团。合适的可还原性消除的可氢解基团的实例包括,但不限于,芳基磺酰基 (如邻甲苯磺酰基); 用苯基或苄氧基取代的甲基 (如苄基、三苯甲基和苄氧基甲基); 芳基甲氧基羰基 (如苄氧基羰基和邻甲氧基苄氧基羰基); 和卤代乙氧基羰基 (如 β, β, β -三氯乙氧基羰基和 β -碘乙氧基羰基)。

[0105] 本公开的化合物还可以具有以下优点: 无论是否适用于本文所述的适应症或其他方面, 它们比现有技术中已知的化合物更有效, 毒性更低, 更长效, 更强效, 副作用更少, 更容易吸收, 和/或药代动力学分布曲线更好 (例如, 更高的口服生物利用度和/或更低的清除率), 和/或具有其他有用的药理学、物理学或化学性质。

[0106] II. 生物活性

[0107] 在一些实施方式中, 本公开的化合物可以用于拮抗多种 RGD 结合整合素。在这些实

施方式中的一些中,该化合物可以用于治疗或预防其中大于一种整合素促进异常血管生成的疾病。例如,当共依赖性或血管生成无关的第二疾病过程受到能够同时采用抗血管生成拮抗剂影响的RGD整合素介导时,该化合物可能特别有用。已知肿瘤要依赖于新血管形成才能维持直径超过几毫米的生长。视网膜异常血管生成是许多致盲疾病的特征,如未成熟的年龄(wet age-related)相关的黄斑变性,玻璃体视网膜病,早产儿视网膜病和糖尿病性视网膜病。血管生成与肺和肝纤维化的进展以及类风湿性关节炎中滑膜血管(synovial pannus)的生长有关。

[0108] 整合素 $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$ 已经涉及促进血管生成(Avraamides et al.,2008),而使之可以预测除了其它整合素之外的它们的拮抗作用而提供对这一过程的超级阻断作用。还已知整合素 $\alpha v\beta 3$ 在肿瘤细胞转移中以及与骨质疏松症和一些癌症相关的骨吸收升高中发挥一定作用。本公开的拮抗剂对至少五种据报道在体外与潜在细胞因子TGF β 复合物结合的整合素具有不同的活性: $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha v\beta 6$ 和 $\alpha v\beta 8$ 。参见(Asano et al.,2005;Mu et al.,2002;Munger et al.,1999;Wipff et al.,2007;和Munger et al.,1998),在此通过引证的方式将其全部内容结合到本申请中。TGF β 常常与血管生成细胞因子VEGF共表达并诱导其合成(Ferrari et al.,2006)。除了具有血管调节活性外,TGF β 还是肺、肝、肾和皮肤等许多组织纤维化强有力的诱导因子(Nishimura,2009)。几乎所有的TGF β 都是从含有潜在相关肽(LAP)的复合物中的细胞分泌。整合素 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 和 $\alpha v\beta 6$ 与LAP内包含的RGD基序相互作用,在复合物中产生允许TGF β 结合活化原纤维化途径的细胞受体的构象变化。整合素 $\alpha v\beta 8$ 还以RGD依赖性方式活化TGF β ,但利用了与其他整合素不同的蛋白酶依赖性机制。

[0109] 潜在的TGF β 普遍存在于组织中,并且被整合素以空间和时间限制的方式活化。因此,据在特发性肺纤维化患者(Horan et al.,2008)或肝纤维化患者(Popov et al.,2008)中观察,肺或肝中的上皮整合素 $\alpha v\beta 6$ 的上调可以促进局部胶原沉积和瘢痕。类似的是, $\alpha v\beta 5$ 和较少程度的 $\alpha v\beta 3$ 存在于间充质细胞上并且能够活化间充质TGF β (Wipff et al.,2007;Scotton et al.,2009)。整合素 $\alpha v\beta 8$ 表达于上皮细胞、神经细胞、免疫细胞和间充质细胞类型的亚群上。在皮肤中,伴随伤口愈合过程的TGF β 活化作用介导基质沉积并促进瘢痕的形成。本公开的化合物凭借其同时抑制数种TGF β 活化整合素的能力,与先前描述的具有更多受限的抑制特征的化合物相比,在治疗纤维化方面具有更大功效的潜力。此外,本文提供的化合物,包括,例如,具有良好 $\alpha 5\beta 1$ 效力的化合物,可以用于治疗和/或预防以异常血管生成和纤维化病理为特征的疾病。

[0110] TGF β 是形成FoxP3⁺调节性T细胞(T_{reg})的重要诱导子(Yoshimura,2011)。在一些实施方式中,当单独给药或与现有疗法组合给药时,本公开的化合物,包括抑制TGF β 活化和/或降低T_{reg}活性的那些化合物,可以用于缓解疾病状态如癌症中的免疫抑制作用。采用这种化合物降低T_{reg}活性也有可能增强旨在预防或治疗癌症和传染病的疫苗活性。在IL-6存在的情况下,TGF β 促进初始T细胞向Th17细胞转化(Yoshimura,2011)。这些细胞促进各种自身免疫性疾病。据报道,在树突细胞上缺乏所有 $\alpha v\beta 8$ 表达的小鼠具有几乎完全免于实验性自身免疫性脑炎(一种多发性硬化症模型)的保护作用(Melton et al.,2010)。因此,本公开的化合物,包括抑制TGF β 活化和/或降低Th17活性的那些化合物,在单独或与现有疗法组合给药时能够用于预防或治疗自身免疫性疾病。

[0111] 已知整合素 $\alpha IIb\beta 3$ (也称为纤维蛋白原受体)的拮抗作用阻断作为血液凝固过程

的一部分的血小板聚集。因此,为了避免在治疗由整合素 $\alpha 5\beta 1$ 和其他整合素介导的障碍或疾病状态时出血增加,利用选择性地排除 $\alpha IIb\beta 3$ 的化合物将是有益的。

[0112] 正如以上讨论,整合素是介导与其他细胞和细胞外基质 (ECM) 的细胞相互作用的完整细胞质膜蛋白家族。这些蛋白质也在细胞信号传导中起作用,而由此调节细胞形状,运动性和细胞周期。整合素不仅执行受体典型的“外-内”信号传导,而且还执行“内-外”模式。因此,他们将信息从ECM转导至细胞中,以及将细胞的状态显示至外部,从而对环境变化作出快速而灵活的反应,例如,允许血小板凝血。

[0113] 整合素有很多种类,而许多细胞在其表面上具有多种类型。整合素对所有动物都至关重要,并且在所有研究过的动物从海绵到哺乳动物中都有发现。因此靶向整合素的化合物已经在包括伴侣动物、家畜动物、动物园动物以及野生动物在内的不同动物中都发现了许多用途。整合素已经在人类中进行了广泛研究。整合素与其他蛋白质如钙粘蛋白,免疫球蛋白超家族细胞粘附分子,选择蛋白和多配体蛋白聚糖 (syndecans) 一起作用而介导细胞-细胞和细胞-基质相互作用和通讯。整合素结合细胞表面和ECM组件,如纤连蛋白,玻连蛋白,胶原蛋白和层粘连蛋白。

[0114] 各自整合素由 α 和 β 糖蛋白亚基的非共价异源二聚化形成,其组合表达不同的生物学活性,如细胞粘附、迁移、增殖、分化和存活。目前,在哺乳动物中已经描述了24个整合素,其由18个 α 亚基和8个 β 亚基配对形成,如表2中所示。

[0115] 表2:整合素

[0116]

基因	蛋白	同义词	类型
ITGA7	ITGA7	FLJ25220	α
ITGA8	ITGA8		α
ITGA9	ITGA9	RLC	α
ITGA10	ITGA10		α
ITGA11	ITGA11	HsT18964	α
ITGAD	CD11D	FLJ39841	α
ITGAE	CD103	HUMINAE	α
ITGAL	CD11a	LFA1A	α
ITGAM	CD11b	MAC-1	α
ITGAV	CD51	VNRA,MSK8	α
ITGAW	ITGAW		α
ITGAX	CD11c		α
ITGB1	CD29	FNRB , MSK12 , MDF2	β

[0117]

ITGB2	CD18	LFA-1 , MAC-1 , MFI7	β
ITGB3	CD61	GP3A, GPIIIa	β
ITGB4	CD	104	β
ITGB5	ITGB5	FLJ26658	β
ITGB6	ITGB6		β
ITGB7	ITGB7		β
ITGB8	ITGB8		β

[0118] 另外,一些亚基的变体由差异拼接而形成;例如,存在 β -1亚基的四种变体。通过这些 α 和 β 亚基的不同组合,尽管数量根据不同的研究而变化,却会产生某些24种独特的整合素。

[0119] III. 治疗方法

[0120] 本公开涉及制药、医学和细胞生物学领域。更具体而言,它涉及可以用作整合素受体拮抗剂,包括在一些实施方式中,多-整合素受体拮抗剂的药物制剂(化合物)及其药物组合物。因此,这些化合物可以用于药物组合物和用于,例如,通过抑制或拮抗一种或多种这些整合素而治疗由一种或多种此类整合素介导的障碍的方法中。在本公开的几个方面中,本文提供的化合物可以用于生物学、预防学或治疗学领域的各种领域内,包括 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 3$ 、 $\alpha \nu \beta 5$ 、 $\alpha \nu \beta 6$ 和 $\alpha \nu \beta 8$ 整合素中的一种或多种发挥作用的那些领域。

[0121] 在另一方面中,本公开提供了使用一种或多种本文中公开的化合物及其药物组合物抑制或拮抗 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 6$ 、 $\alpha \nu \beta 3$ 、 $\alpha \nu \beta 5$ 、 $\alpha \nu \beta 6$ 和 $\alpha \nu \beta 8$ 中的一种或多种整合素的方法。在一些实施方式中,这些方法通过给药治疗有效量的本文提供的化合物会抑制与其相关的病理状况,如血管生成,包括肿瘤血管生成,纤维化和纤维化疾病,如肺、肾、心脏、肌肉和肝纤维化,瘢痕,如视网膜、角膜和皮肤瘢痕,视网膜病,包括糖尿病性视网膜病和黄斑变性,玻璃体视网膜病,包括早产儿视网膜病(ROP)和家族性渗出性玻璃体视网膜病(FEVR),骨质疏松症,恶性肿瘤体液性高钙血症,佩吉特氏病,肿瘤转移,实体瘤生长(瘤形成),关节炎,包括类风湿性关节炎,牙周病,银屑病,平滑肌细胞迁移和再狭窄,自身免疫性疾病如多发性硬化症,和感染性病原体。在一些实施方式中,该化合物作为药物组合物的一部分进行给药,该药物组合物进一步包含药用载体。在一些实施方式中,该化合物和/或其药物组合物可以口服,肠胃外或通过吸入喷雾,或局部以含常规药用载体、佐剂和赋形剂的单位剂量制剂进行给药。本文使用的所述术语“肠胃外”包括,例如,皮下,静脉内,肌内,胸骨内,灌注技术或腹膜内。在一些实施方式中,本公开的化合物通过适合于这种途径的药物组合物形式的任何合适途径进行给药和以对预期治疗有效的剂量进行给药。本领域普通技术人员使用医学领域熟悉的临床前的和临床的方法很容易确定预防或控制医学障碍的进展或治疗医学障碍期望的该化合物的治疗有效剂量。

[0122] 基于本领域技术人员熟知和理解的标准实验室实验技术和方法,以及与已知有用的化合物对比较,以上描述的该化合物能够用于治疗患有上述病理状况的患者。本领域技术人员将认识到,本公开最合适化合物的选择都处于本领域普通技术人员的能力范围内,并将取决于各种因素,包括标准分析测试法和动物模型中获得的的结果的评价。

[0123] 在另一方面中,本文提供的化合物可以用于生物学、预防学或治疗学领域的许多领域内,包括 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 3$ 、 $\alpha \nu \beta 5$ 、 $\alpha \nu \beta 6$ 和 $\alpha \nu \beta 8$ 中的一种或多种整合素发挥作用的那些领域。本公开进一步涉及治疗或抑制对这种治疗需要的哺乳动物中与之相关的病理状况,如血管生成,包括肿瘤血管生成,纤维化和纤维化疾病如肺纤维化,肾、心脏、肌肉和肝纤维化,硬皮病,瘢痕,如视网膜、角膜和皮肤瘢痕,视网膜病,包括糖尿病性视网膜病和黄斑变性,玻璃体视网膜病,包括早产儿视网膜病(ROP)和家族性渗出性玻璃体视网膜病(FEVR),骨质疏松症,恶性肿瘤体液性高钙血症,佩吉特氏病,肿瘤转移,实体瘤生长(瘤形成),关节炎,包括类风湿性关节炎,牙周病,银屑病,平滑肌细胞迁移和再狭窄。另外,这些药剂适用作抗病毒剂和抗微生物剂。进而,这些药剂经由抑制由抑制或拮抗靶向的整合素所致的TGF- β 活化而适用作免疫系统调节剂。这种免疫调节会影响T调节和T效应器细胞的免疫活性和功能,而因此能够用于治疗免疫相关病,包括自身免疫疾病如多发性硬化,以及用于治疗肿瘤和感染性病原体。

[0124] IV. 药物制剂和给药途径

[0125] 本公开的另一目的是提供包含一种或多种本文所述的化合物的药物组合物。这种组合物适用于抑制或拮抗整合素,包括,例如, $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 3$ 、 $\alpha \nu \beta 6$ 和 $\alpha \nu \beta 8$ 整合素。在一些实施方式中,本公开提供了包含使用一种或多种本文公开的化合物或其药物组合物有效抑制或拮抗 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 6$ 、 $\alpha \nu \beta 3$ 、 $\alpha \nu \beta 5$ 、 $\alpha \nu \beta 6$ 和 $\alpha \nu \beta 8$ 整合素中的一种或多种的化合物的药物组合物。在这些实施方式中的一些中,这种药物组合物进一步包含一种或多种无毒药用载体和/或稀释剂和/或佐剂。

[0126] 为了向对这种治疗需要的患者给药,药物制剂(也称为药剂、药物组合物、药品、医药品、药物、医药或医药用品)包含用适合于所示给药途径的一种或多种赋形剂和/或药物载体配制的治疗有效量的本发明的化合物。在一些实施方式中,本发明的化合物以适合治疗人和/或兽医学患者的方式配制。在一些实施方式中,制剂包括将一种或多种本发明的化合物与一种或多种以下赋形剂共混或组合:乳糖、蔗糖、淀粉、链烷酸纤维素酯、纤维素烷基酯、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、氧化镁、磷酸和硫酸的钠和钙盐、明胶、阿拉伯胶、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮和/或聚乙烯醇。在一些实施方式中,例如,对于口服给药,药物制剂可以片剂化或胶囊化。在一些实施方式中,该化合物可以溶解于水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇、玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、苯甲醇、氯化钠和/或各种缓冲剂中或在其中成浆。药物制剂可以进行常规的药物操作,如灭菌和/或可以含有药物载体和/或赋形剂如防腐剂,稳定剂,润湿剂,乳化剂,包封剂如脂质,树状聚合物,聚合物,蛋白质如白蛋白,或核酸,和缓冲液等。

[0127] 适用于本公开的药物组合物可以进行常规药物操作如灭菌和/或可以包含常规药物载体和赋形剂如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。

[0128] 本公开的化合物可以通过多种方法,例如,口服或通过注射(例如,皮下,静脉内,腹膜内等)进行给药。取决于给药途径,活性化合物可以包衣于某种材料中以保护该化合物免于可能使该化合物失活的酸和其它自然条件的作用。它们也可以通过连续灌注/输注给药于疾病或伤口部位。

[0129] 为了通过除了肠胃外给药以外的方式给药治疗性化合物,则可能需要用某种材料对该化合物包衣或与该化合物共给药,以防止其失活。例如,治疗性化合物可以在合适的载体,例如,脂质体或稀释剂中给药于患者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和缓冲水溶液。

脂质体包括水包油包水 CGF乳液以及常规脂质体。

[0130] 治疗性化合物也可以肠胃外,腹膜内,脊柱内或颅内给药。分散制剂能够制备于甘油,液体聚乙二醇及其混合物和油中。在通常的储存和使用条件下,这些制剂可以含有防腐剂而防止微生物的生长。

[0131] 药物组合物可以适用于可注射使用,包括无菌水溶液(在水中可溶的情况下)或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。在所有情况下,组合物必须是无菌的,并且必须是流体性至一定程度以便易于注射。它必须在制造和储存条件下是稳定的,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有,例如,水,乙醇,多元醇(例如,甘油,丙二醇和液体聚乙二醇等),其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣,通过在分散制剂的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂,就能够维持适当的流体性。通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等就能够防止微生物的作用。在许多情况下,在组合物中包含等渗剂,例如,糖,氯化钠或多元醇如甘露醇和山梨糖醇可能是有用的。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如,单硬脂酸铝或明胶能够延长可注射组合物的吸收。

[0132] 无菌注射溶液能够通过将所需量的治疗化合物与上述列举的一种或多种成分的组合按需要引入合适的溶剂中,然后过滤除菌而制备。通常而言,通过将治疗化合物引入含有基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其他成分的无菌载体中而制备分散制剂。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,这会产生活性成分(即,治疗化合物)外加来自其先前无菌过滤的溶液的任何其它所需成分的粉末。

[0133] 治疗性化合物能够,例如,用惰性稀释剂或可吸收的可食用载体口服给药。治疗性化合物和其他成分也可以封装于硬或软壳明胶胶囊中,压制成片剂或直接引入受试者的饮食中。对于口服治疗给药,治疗性化合物可以与赋形剂一起引入并以可摄取片剂、口腔片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等的形式使用。组合物和制剂中的治疗性化合物的百分比当然可以变化。在这种治疗有用的组合物中治疗性化合物的量是将会获得合适的剂量的量。

[0134] 在一些实施方式中,有利的是以剂量单位形式配制胃肠外组合物以便于实现给药和剂量均匀。本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗的受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有经计算与所需的药物载体结合产生所需的治疗效果的预定量的治疗化合物。本公开的剂量单位形式的规格取决于并且直接依赖于(a)治疗性化合物的独特特性和待实现的具体治疗效果,和(b)复配这种用于治疗患者中的所选障碍的治疗性化合物的技术领域内的固有限制。

[0135] 在一些实施方式中,治疗性化合物还可以局部给药于皮肤,眼睛或粘膜。可替代地,如果需要局部递送至肺部,则治疗性化合物可以通过以干粉或气雾剂制剂吸入进行给药。

[0136] 活性化合物以足以治疗与患者障碍相关的障碍的治疗有效剂量进行给药。例如,化合物的功效能够在可以预测治疗人类或另一种动物中的疾病的功效的动物模型系统,如所述实施例和附图中所示的模型系统中评价。

[0137] 治疗剂的有效剂量范围能够根据动物研究中对于各种不同动物确定的有效剂量

外推。通常而言,根据以下公式计算以mg/kg表示的人等效剂量(HED)(参见,例如,Reagan-Shawet al.,2008,在此通过引证的方式将其全部内容结合到本申请中):

[0138] $HED(mg/kg) = \text{动物剂量}(mg/kg) \times (\text{动物}K_m / \text{人类}K_m)$

[0139] 在换算中使用 K_m 因子会导致产生更准确的HED值,其是基于体表面积(BSA)而不仅仅基于体重的。人类和各种动物的 K_m 值是众所周知的。例如,平均60kg的人(具有BSA为 $1.6m^2$)的 K_m 为37,而20kg的孩子($BSA=0.8m^2$)将会具有25的 K_m ,一些相关的动物模型的 K_m 也是众所周知的,包括:小鼠 $K_m=3$ (假定体重0.02kg而BSA为0.007);仓鼠 $K_m=5$ (假定体重0.08kg而BSA为0.02);大鼠 $K_m=6$ (假定体重0.15kg而BSA为0.025)和猴 $K_m=12$ (假定体重3kg而BSA为0.24)。

[0140] 治疗组合物的精确用量取决于从业者的判断并且对于每个人是特定的。尽管如此,所计算的HED剂量提供一般性指导。影响剂量的其他因素包括患者的身体和临床状态,给药途径,预期治疗目标和具体治疗制剂的效力、稳定性和毒性。

[0141] 本公开的化合物或包含本公开的化合物的组合物要给药于受试者的实际剂量量可以通过物理和生理因素,如所治疗的动物的类型、年龄、性别、体重、病情严重程度、所治疗疾病的类型、先前或同时的治疗性干预,受试者的特发病和给药途径而确定。这些因素可以由技术人员确定。负责给药的从业者通常将会确定组合物中的活性成分的浓度和各个受试者的合适剂量。如果出现任何并发症,可以通过各个医生调节剂量。

[0142] 有效用量通常从约0.001mg/kg至约1000mg/kg,从约0.01mg/kg至约750mg/kg,从约100mg/kg至约500mg/kg,从约1.0mg/kg或约250mg/kg,约10.0mg/kg至约150mg/kg不等,按照每天一次或多次剂量给药,持续一天或数天(取决于给药方式和以上讨论的因素)。其他合适的剂量范围包括1mg至10000mg/天,100mg至10000mg/天,500mg至10000mg/天和500mg至1000mg/天。在一些具体的实施方式中,用量小于10,000mg/天,具有750mg至9000mg/天的范围。

[0143] 有效用量可以小于1mg/kg/天,小于500mg/kg/天,小于250mg/kg/天,小于100mg/kg/天,小于50mg/kg/天,小于25mg/kg/天,或小于10mg/kg/天。可替代地,它可以处于1mg/kg/天至200mg/kg/天的范围内。例如,关于糖尿病患者的治疗,与未治疗的受试者相比,单位剂量可以是使血糖降低至少40%的量。在另一个实施方式中,单位剂量是将血糖降低至非糖尿病受试者的血糖水平的 $\pm 10\%$ 的水平。

[0144] 在其他非限制性的实例中,剂量还可以包含每次给药约1 μ g/kg/体重,约5 μ g/kg/体重,约10 μ g/kg/体重,约50 μ g/kg/体重,约100 μ g/kg/体重,约200 μ g/kg/体重,约350 μ g/kg/体重,约500 μ g/kg/体重,约1mg/kg/体重,约5mg/kg/体重,约10mg/kg/体重,约50mg/kg/体重,约100mg/kg/体重,约200mg/kg/体重,约350mg/kg/体重,约500mg/千克/体重,至约1000mg/千克/体重或更多,以及其中可推导的任何范围。在本文所列数字的可推导范围的非限制性的实例中,基于上述数字,能够给药约5mg/kg/体重至约100mg/kg/体重,约5 μ g/kg/体重至约500mg/kg/体重等。

[0145] 在某些实施方式中,本公开的药物组合物可以包含,例如,至少约0.1%的本公开的化合物。在其他实施方式中,本公开的化合物可以占单位重量的约1%至约75%,或,例如,约25%–至约60%,以及其中可推导的任何范围。

[0146] 药物的单次或多次剂量都是设想的。本领域普通技术人员使用不外乎常规实验就

能够确定用于递送多剂量的所需时间间隔。作为一个实例,受试者可以每天约12小时的间隔每天两次给药。在一些实施方式中,药剂每天给药一次。

[0147] 药剂可以按照常规时间表给药。正如本文中所用,常规时间表是指预定的指定时间段。只要预定了时间表,则常规时间表可以涵盖长度相同或不同的时间段。例如,常规时间表可以涉及每天,每一天,每两天,每三天,每四天,每五天,每六天,每周,每月或任何设定的天数或星期之间给药两次。可替代地,预定的常规时间表可以涉及第一周每天两次给药,接着是几个月内以每日为基础等。在其他实施方式中,本公开规定药剂可以口服,并且定时服用,可以或不依赖于食物摄取。因此,例如,药剂能够每天早上和/或每天晚上服用,而不管受试者何时吃过或将吃什么。

[0148] V. 组合疗法

[0149] 除了用作单一疗法外,本公开的化合物还可用于组合疗法。有效的组合疗法可以采用包含两种药剂的单一组合物或药物制剂,或采用同时给药其中一种组合物包含本公开的该化合物而另一种包含所述第二药剂的两种不同的组合物或制剂实现。或者,治疗可以在几分钟到几个月的时间间隔之前或之后进行另一药物治疗。

[0150] 此类组合疗法的非限制性实例包括本公开的一种或多种化合物与另一种药剂,例如,抗炎剂、化疗剂、放疗、抗抑郁药、抗精神病剂、抗惊厥药、情绪稳定剂、抗感染剂、抗高血压剂、降胆固醇剂或其他血脂调节剂、促进体重减轻的药剂、抗血栓剂、治疗或预防心血管事件如心肌梗塞或中风的药剂、抗糖尿病剂、减少移植排异或移植物抗宿主病的药剂、抗关节炎剂、镇痛剂、抗哮喘剂或用于呼吸系统疾病的其他治疗,或用于治疗或预防皮肤病的药剂的组合。本公开的化合物可以与设计用于改善患者对癌症的免疫应答的药剂组合,包括(但不限于)癌症疫苗。

[0151] VI. 定义

[0152] 当用于化学基团的情形时:“氢”是指-H;“羟基”是指-OH;“氧代”是指=O;“羰基”是指-C(=O)-;“羧基”是指-C(=O)OH(也写作-COOH 或-CO₂H);“卤代”是指独立地为-F,-Cl,-Br或-I;和“氨基”是指-NH₂。

[0153] 在化学式的情况下,所述符号“-”是指单键,“=”是指双键,“≡”是指三键。符号“”表示可选的键,其如果存在要么是单键要么是双键。符号“”代表单键

或双键。因此,例如,式包括,,,和。并且应当理解的是,

没有一个这种环原子构成不只一个双键的部分。此外,应当注意的是,当连接一个或两个立体原子时共价键符号不表示任何优选的立体化学。相反,它涵盖了所有的立体异构体及其混合物。符号“”;在垂直穿过一个键(例如对于甲基的)时表示基团的连接点。应当注意的是,对于较大的基团,通常仅以这种方式识别连接点,以便帮助读者明确地识别连接点。符号“”是指连接到楔形物粗端的基团“在页面之外”的单键。符号“”是指连接到楔形物的粗端的基团“进入页面”的单键。符号“”是指围绕双键的几何结构(例如,E或Z)未定义情况下的单键。因此,这两种选择及其组合都是预期的。本申请中所示结构的原子上的任何未定义化合价都隐含表示与该原子键连的氢原子。

碳原子的一个黑点表示附连于该碳上的氢离开纸面取向。

[0154] 对于化学基团和化合物类别,基团或类别中的碳原子数目如下所示:“C_n”定义为基团/类别中碳原子的确切数目(n)。“C_{≤n}”定义为能够在基团/类别中的碳原子的最大数目(n),对于所讨论的基团/类别尽可能小的最小数目,例如,应当理解的是,基团“烯基(C_{≤8})”或类别“烯(C_{≤8})”中的最小碳原子数为2。与具有1至10个碳原子的烷氧基的“烷氧基(C_{≤10})”相比。“C_{n-n'}”定义了基团中碳原子的最小值(n)和最大值(n')。因此,“烷基(C₂₋₁₀)”表示具有2至10个碳原子的那些烷基。这些碳数指标可以在其修饰的化学基团或类别之前或之后,并且可以或不可以括在括号中,而并不表示意义上的任何改变。因此,所述术语“C₅烯烃”,“C₅-烯烃”,“烯烃(C₅)”和“烯烃C₅”都是同义的。

[0155] 术语“饱和的”在用于修饰化合物或化学基团时是指该化合物或化学基团不具有碳-碳双键并且也不具有碳-碳三键,除非如下所述。当术语用于修饰原子时,它是指原子不是任何双键或三键的一部分。在饱和基团的取代形式的情况下,可以存在一个或多个碳氧双键或碳氮双键。当存在这样的键时,不排除可能作为酮-烯醇互变异构或亚胺/烯胺互变异构的一部分出现的碳-碳双键。当术语“饱和的”用于修饰某种物质的溶液时,它是指物质不能再溶解于溶液中。

[0156] 术语“脂族”在无“取代的”修饰词使用时表示如此修饰的该化合物或化学基团是无环或环状但非芳族的烃化合物或基团。在脂族化合物/基团中,碳原子能够在直链、支链或非芳族的环(脂环)中连接在一起。脂族化合物/基团可以是饱和的,其通过单个碳-碳键连接(烷烃/烷基),或是不饱和的,用一个或多个碳-碳双键连接(烯烃/烯基)或用一个或多个碳-碳三键连接(炔烃/炔基)。

[0157] 术语“芳族的”在用于修饰化合物或化学基团时是指在完全共轭环状π体系中具有4n+2个电子的原子的平面不饱和环。

[0158] 术语“烷基”在无“取代”的修饰词使用时是指以碳原子作为连接点的直链或支链的无环结构且不含碳和氢以外的原子的一价饱和脂族基团。基团-CH₃(Me),-CH₂CH₃(Et),-CH₂CH₂CH₃(n-Pr或丙基),-CH(CH₃)₂(i-Pr,¹Pr或异丙基),-CH₂CH₂CH₂CH₃(n-Bu),-CH(CH₃)CH₂CH₃(仲丁基),-CH₂CH(CH₃)₂(异丁基),-C(CH₃)₃(叔丁基,叔丁基,t-Bu或^tBu)和-CH₂C(CH₃)₃(新戊基)是烷基的非限制性实例。术语“烷二基”当无“取代的”修饰词使用时是指具有一个或两个饱和碳原子作为连接点的直链或支链无环结构的不含碳-碳双键或三键并除碳和氢以外不含其他原子的二价饱和脂族基团。基团-CH₂- (亚甲基),-CH₂CH₂-, -CH₂C(CH₃)₂CH₂-和-CH₂CH₂CH₂-是链烷二基的非限制性实例。术语“偏亚烷基”在无“取代的”修饰词使用时是指其中R和R'独立地是氢或烷基的二价基团=CRR'。亚烷基的非限制性实例包括:=CH₂,=CH(CH₂CH₃),和=C(CH₃)₂。“烷烃”是指具有式H-R的一类化合物,其中R是如上定义的术语烷基。当任何这些术语与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH,-F,-Cl,-Br,-I,-NH₂,-NO₂,-CO₂H,-CO₂CH₃,-CN,-SH,-OCH₂CH₃,-C(O)CH₃,-NHCH₃,-NHCH₂CH₃,-N(CH₃)₂,-C(O)NH₂,-C(O)NHCH₃,-C(O)N(CH₃)₂,-OC(O)CH₃,-NHC(O)CH₃,-S(O)₂OH或-S(O)₂NH₂。以下基团是取代的烷基的非限制性实例:-CH₂OH,-CH₂Cl,-CF₃,-CH₂CN,-CH₂C(O)OH,-CH₂C(O)OCH₃,-CH₂C(O)NH₂,-CH₂C(O)CH₃,-CH₂OCH₃,-CH₂OC(O)CH₃,-CH₂NH₂,-CH₂N(CH₃)₂和-CH₂CH₂Cl。术语“卤代烷基”是取代的烷基的一个子集,其中氢原子取代仅限于卤素(即,-F,-Cl,-Br或-I),而使之除碳、氢和卤素以外不存在其它原子。基团-CH₂Cl是

卤代烷基的非限制性实例。术语“氟代烷基”是取代的烷基的子集,其中氢原子取代限于氟代,而使之除了碳、氢和氟之外不存在其他原子。所述基团 $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 是氟代烷基的非限制性实例。

[0159] 术语“烷氧基”在无“取代的”修饰词使用时是指基团 $-\text{OR}$,其中R 是烷基,该术语如上定义。非限制性实例包括: $-\text{OCH}_3$ (甲氧基), $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ (乙氧基), $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ (异丙氧基), $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ (叔丁氧基), $-\text{OCH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{O}$ -环戊基和 $-\text{O}$ -环己基。术语“氟代烷氧基”在无“取代的”修饰词使用时是指定义为 $-\text{OR}$ 的基团,其中R是氟代烷基。术语“烷硫基”和“酰硫基”在无“取代的”修饰词使用时是指基团 $-\text{SR}$,其中R分别是烷基和酰基。术语“醇”对应于其中至少一个氢原子已被羟基取代的如上定义的烷烃。术语“醚”对应于其中至少一个氢原子已经被烷氧基取代的如上定义的烷烃。当任何这些术语与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被 $-\text{OH}$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{SH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{NHCH}_3$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 或 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}_2$ 替代。

[0160] 在本说明书和/或权利要求中使用的术语“有效”是指足以实现所需的,预期的或期望的效果。当用于采用化合物治疗患者或受试者的情形时,“有效量”,“治疗有效量”或“药学有效量”是指该化合物在给药于受试者或患者以治疗疾病时足以实现对疾病的治疗的用量。

[0161] 正如本文所用,术语“ IC_{50} ”是指获得50%的最大响应的抑制剂量。这种定量测量指示需要多少具体药物或其他物质(抑制剂)才能将给定的生物学、生物化学或化学过程(或过程的组分,即酶,细胞,细胞受体或微生物)抑制一半。

[0162] 第一化合物的“异构体”是其中每个分子含有与第一化合物相同的组成原子,但是其中三维空间中这些原子的构型不同的单独化合物。

[0163] 正如本文所用,术语“患者”或“受试者”是指活的哺乳动物生物体,如人、猴、牛、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠,豚鼠或其转基因物种。在某些实施方式中,患者或受试者是灵长类动物。人类受试者的非限制性实例是成年人,青少年,婴儿和胎儿。

[0164] 正如本文通常使用,“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织、器官和/或体液接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或与合理的受益/风险比相称的其他问题或并发症的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0165] “药学上可接受的盐”是指如上定义的药学上可接受的并且具有所需药理学活性的本发明化合物的盐。这些盐包括与无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等形成的酸加成盐;或与有机酸如1,2-乙烷二磺酸、2-羟基乙磺酸、2-萘磺酸、3-苯丙酸、4,4'-亚甲基双(3-羟基-2-烯-1-甲酸)、4-甲基双环[2.2.2]辛-2-烯-1-甲酸、乙酸、脂族单羧酸和二羧酸、脂族硫酸、芳族硫酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环戊烷丙酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、谷氨酸、乙醇酸、庚酸、己酸、羟基萘甲酸、乳酸、月桂基硫酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘康酸、邻-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、草酸、对氯苯磺酸、苯基取代的链烷酸、丙酸、对甲苯磺酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、叔丁基乙酸、三甲基乙酸等。药学上可接受的盐还包括当存在的酸性质子能够与无机碱或有机碱反应时可以形成的碱加成盐。可接受的无机碱包括氢氧化钠、碳酸钠、氢氧化钾、氢氧化铝和氢氧化钙。可接受的有机碱包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇

(tromethamine)、N- 甲基葡糖胺等。应当认识到的是,只要盐作为整体在药理学上是可接受的,形成本公开的任何盐的一部分的具体阴离子或阳离子并不重要。药学上可接受的盐的其他实例及其制备和使用方法可以查阅《药学上可接受的盐手册:性质和用法》(P.H.Stahl&C.G.Wermuth主编,Verlag Helvetica Chimica Acta,2002)。

[0166] 本文使用的术语“药用载体”是指涉及携带或运输化学药物的药用材料,组合物或载体,如液体或固体填料,稀释剂,赋形剂,溶剂或封装材料。

[0167] “预防”或“防止”包括:(1)抑制可能有风险和/或易患疾病但尚未经历或呈现任何或全部病理或症状的受试者或患者中的疾病发作和/或(2)减缓可能有风险和/或易患疾病但尚未经历或呈现任何或全部的疾病的病理或症状的受试者或患者中的疾病的病理或症状的发作。

[0168] “前药”是指根据本公开在体内可代谢转化成抑制剂的化合物。前药自身对于给定的靶蛋白可能具有或不具有活性。例如,包含羟基的化合物可以作为通过体内水解转化为羟基化合物的酯而给药。可以在体内转化为羟基化合物的合适酯包括乙酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、磷酸盐、酒石酸盐、丙二酸盐、草酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、马来酸盐、亚甲基-双-β-羟基萘甲酸盐、龙胆酸盐(gentisates)、羟乙磺酸盐(isethionates)、二对甲基苯甲酰基酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、环己基氨基磺酸盐、奎尼酸盐、氨基酸的酯等。类似的是,包含胺基的化合物可以作为通过体内水解转化为胺化合物的酰胺进行给药。

[0169] “立体异构体”或“光学异构体”是给定化合物中相同的原子键合到相同的其他原子上但这些原子在三维中的构型不同的异构体。“对映异构体”是彼此镜像的给定化合物的立体异构体,如同左手和右手。“非对映异构体”是不是对映异构体的给定化合物的立体异构体。手性分子含有手性中心,也被称为立构中心或产立构中心(stereogenic center),其是分子中尽管并不一定是一个原子的带有基团而使任何两个基团交换会导致立体异构体的任意点。在有机化合物中,手性中心通常是碳、磷或硫原子,但其他原子也可能是有机和无机化合物中的立构中心。一个分子能够有多个立体中心,会给它提供许多立体异构体。在其立体异构性归因于四面体产立构中心(例如,四面体碳)的化合物中,假设可能的立体异构体的总数不会超过 2^n ,其中 n 是四面体立构中心的数目。具有对称性的分子经常具有比可能的最大数量更少的立体异构体。50:50的对映异构体混合物被称为外消旋混合物。可替代地,对映异构体的混合物可以是对映异构体富集的,而使其一种对映异构体以大于50%的量存在。通常而言,使用本领域已知的技术能够拆分或分离对映异构体和/或非对映异构体。据设想,对于立体化学尚未定义的任何立构中心或手性轴,立构中心或手性轴可以以其R型,S型或R和S型的混合物存在,包括外消旋和非外消旋混合物。如本文所用,短语“基本上不含其他立体异构体”是指组合物含有 $\leq 15\%$,更优选 $\leq 10\%$,甚至更优选 $\leq 5\%$,或最优选 $\leq 1\%$ 的另一种立体异构体。

[0170] “体内可转化为氢的取代基”是指通过酶学或化学手段,包括但不限于,水解和氢解而转化为氢原子的任何基团。实例包括可水解的基团,如酰基,具有氧羰基的基团,氨基酸残基,肽残基,邻硝基苯基亚磺酰基,三甲基甲硅烷基,四氢吡喃基,二苯基次膦酰基等。酰基的实例包括甲酰基,乙酰基,三氟乙酰基等。具有氧羰基的基团的实例包括乙氧羰基,叔丁氧羰基($-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$),苄氧羰基,对甲氧基苄氧羰基,乙烯氧羰基,β-(对甲苯磺酰

基) 乙氧羰基等。合适的氨基酸残基包括,但不限于,Gly(甘氨酸)、Ala(丙氨酸)、Arg(精氨酸)、Asn(天冬酰胺)、Asp(天冬氨酸)、Cys(半胱氨酸)、Glu(谷氨酸)、His(组氨酸)、Ile(异亮氨酸)、Leu(亮氨酸)、Lys(赖氨酸)、Met(蛋氨酸)、Phe(苯丙氨酸)、Pro(脯氨酸)、Ser(丝氨酸)、Thr(苏氨酸)、Trp(色氨酸)、Tyr(酪氨酸)、Val(缬氨酸)、Nva(正缬氨酸)、Hse(高丝氨酸)、4-Hyp(4-羟脯氨酸)、5-Hyl(5-羟赖氨酸)、Om(鸟氨酸)和 β -Ala的残基。合适的氨基酸残基的实例还包括用保护基保护的氨基酸残基。合适的保护基的实例包括在肽合成中典型采用的那些,包括酰基(如甲酰基和乙酰基),芳基甲氧基羰基(如苄氧基羰基和对硝基苄氧基羰基),叔丁氧基羰基($-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$)等。合适的肽残基包括包含2至5个氨基酸残基的肽残基。这些氨基酸或肽的残基能够以D-型,L-型或其混合物的立体化学构型存在。另外,氨基酸或肽残基可以具有不对称碳原子。具有不对称碳原子的合适氨基酸残基的实例包括Ala、Leu、Phe、Trp、Nva、Val、Met、Ser、Lys、Thr和Tyr的残基。具有不对称碳原子的肽残基包括具有一个或多个具有不对称碳原子的组成氨基酸残基的肽残基。合适的氨基酸保护基的实例包括通常用于肽合成的那些,包括酰基(如甲酰基和乙酰基),芳基甲氧基羰基(如苄氧基羰基和/或硝基苄氧基羰基),叔丁氧基羰基($-\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$)等。“可在体内转化为氢”的取代基的其他实例包括可还原性消除的可氢解基团。合适的可还原性消除的可氢解基团的实例包括,但不限于,芳基磺酰基(如邻甲苯磺酰基);用苯基或苄氧基取代的甲基(如苄基,三苯甲基和苄氧基甲基);芳基甲氧基羰基(如苄氧基羰基和邻甲氧基苄氧基羰基);和卤代乙氧基羰基(如 β,β,β -三氯乙氧基羰基和 β -碘乙氧基羰基)。

[0171] “治疗(Treatment)”或“治疗(treating)”包括(1)抑制经历或呈现疾病的病理学或症状学的受试者或患者中的疾病(例如,阻止病理学和/或症状学的进一步发展),(2)缓解经历或表现出疾病的病理学或症状学的受试者或患者中的疾病(例如,逆转病理学和/或症状学),和/或(3)实现正在经历或表现出疾病的病理学或症状学的受试者或患者中的疾病的任何可测量的减少。

[0172] 本文使用的其它缩写如下: ^1H NMR是质子核磁共振,AcOH是乙酸,Ar是氩,ACN或 CH_3CN 是乙腈,CHN分析是碳/氢/氮元素分析,CHNCl分析是碳/氢/氮/氯元素分析,CHNS分析是碳/氢/氮/硫元素分析,DI水是去离子水,DIC是二异丙基碳二亚胺,DMA是N,N-二甲基乙酰胺,DMAP是4-(N,N-二甲基氨基)吡啶,DMF是N,N-二甲基甲酰胺,EDC1是1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,EtOAc是乙酸乙酯,EtOH是乙醇,FAB MS是快速原子轰击质谱,g是克,HOBt是1-羟基苯并三唑水合物,HPLC是高效液相色谱,IBCF是氯甲酸异丁基酯,KSCN是硫氰酸钾,L是升,LiOH是氢氧化锂,MEM是甲氧基乙氧基甲基,MEMCl是甲氧基乙氧基甲基氯,MeOH是甲醇,mg是毫克, MgSO_4 是硫酸镁,m1是毫升,mL是毫升,MS是质谱,MTBE是甲基叔丁基醚, N_2 是氮, NaHCO_3 是碳酸氢钠,NaOH是氢氧化钠, Na_2SO_4 是硫酸钠,NMM是N-甲基吗啉,NMP是N-甲基吡咯烷酮,NMR是核磁共振, P_2O_5 是五氧化二磷,PTSA是对甲苯磺酸,RPHPLC是反相高效液相色谱,RT是室温,TFA是三氟乙酸,THF是四氢呋喃,TMS是三甲基甲硅烷基,而 Δ 表示加热反应混合物。

[0173] 上述定义取代任何结合于本文中作为参考的任何参考文献中的任何冲突定义。然而,某些术语被定义的事实不应当被视为任何未定义的术语都是不确定性的指示。相反,所使用的术语都被认为以术语描述本公开而使普通技术人员能够理解本公开的范围和实践。

[0174] VII. 实施例

[0175] 以下实施例都包括在内而说明本公开的优选实施方式。本领域技术人员应当理解的是,在随后的实施例中公开的技术代表本发明人发现的而在本公开的实践中发挥良好作用的技术,并且因此可以认为构成其实践的优选模式。然而,本领域技术人员根据本公开应当理解的是,在公开的具体实施方式中能够做出许多改变,并仍然能够获得相似或类似的结果,而不脱离本公开的精神和范围。

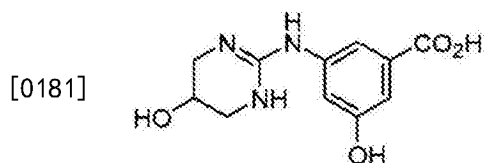
[0176] A. 仪器和通用方法

[0177] 分析性HPLC分析在Agilent 1100系统上完成,而LC-MS分析在 Agilent 1100系列 LC/MSD系统上完成。反相制备型HPLC纯化在Biotage KP-C18-HS 120g SNAP柱上使用含有0.05%TFA的乙腈/水梯度使用可变双波长UV检测器在Biotage SP4HPFC系统上完成。所有最终产物都通过分析型HPLC进行分析,并且在210,254和280nm处监测峰的纯度。¹H 和¹⁹F NMR谱在配备宽带NMR探头的Bruker Avance-III/400MHz光谱仪上在DMSO-d₆中记录。氘代溶剂的信号用作内部参比。化学位移以ppm (δ)表示,而偶合常数(J)以赫兹(Hz)报告。¹⁹F NMR检测源自最终纯化期间制备型HPLC溶剂中的TFA的最终产物的TFA盐的信号(-74ppm)。除非另有说明,否则反应都在干燥氮气氛下进行。

[0178] B. 化合物的制备

[0179] 实施例A

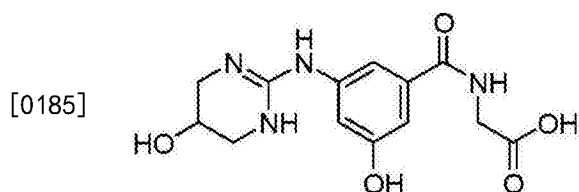
[0180] 3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酸的制备



[0182] 根据文献的程序合成3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酸(参见Organic Process Research&Development,8:571-575,2004,其结合于本文中作为参考)。

[0183] 实施例B

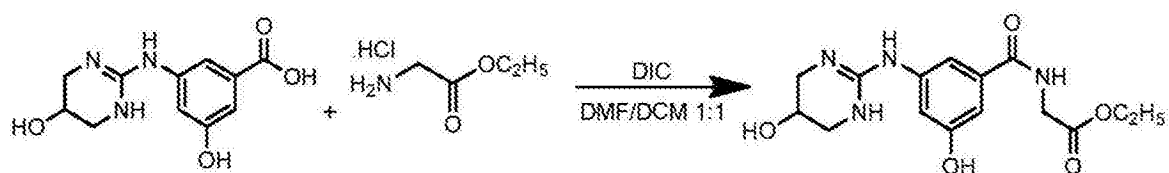
[0184] 2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸的制备



[0186] 根据以下程序制备2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸:

[0187] 3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酸与甘氨酸乙酯的偶联:

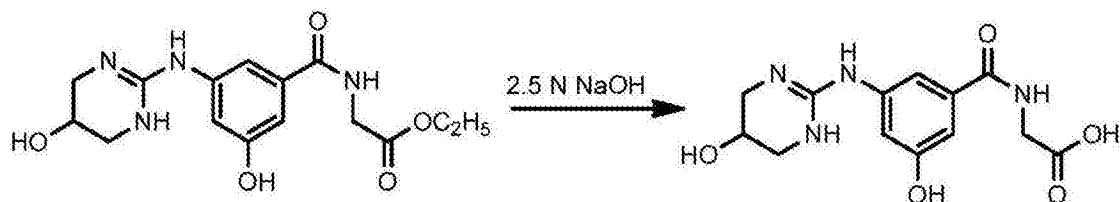
[0188]



[0189] 向(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基苯甲酸(9.013g,35.87mmo1)在DMF

(50.0mL) 和DCM (50.0mL) 的1:1混合物中的悬浮液中加入甘氨酸乙酯盐酸盐 (5.02g, 35.95mmol) 并将混合物在室温和氮气氛下搅拌。将纯的N,N'-二异丙基碳二酰亚胺 (6.75mL, 43.60mmol) 加入到上述反应混合物并将该混合物在室温下搅拌过夜, 从而获得无色悬浮液。粗反应混合物原样用于水解上述酯。

[0190]



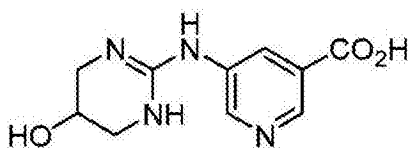
[0191] 将上述粗反应混合物冷却至10℃ (冰浴) 并在搅拌下缓慢加入2.5N NaOH溶液 (90.0mL), 溶液温度保持于20℃以下, 从而获得浅黄色溶液 / 悬浮液。将反应混合物在室温下搅拌1.5小时。在搅拌下将反应混合物用 5N HCl酸化至pH 5, 从而获得无色沉淀物, 并将混合物在室温下再搅拌 15min并过滤而得到无色固体。用水 (1×25mL) 然后用乙腈 (1×25mL) 洗涤固体。将固体真空干燥, 而得到无色粉末 (9.686g, 产率88%)。

[0192] ^1H NMR (400MHz, D_2O): δ 3.37 (dd, $J=12.7$ 和 3.1Hz , 2H), 3.50 (dd, $J=12.7$ 和 2.8Hz , 2H), 4.17 (s, 2H), 4.37 (m, 1H), 6.97 (t, $J=2.01\text{Hz}$, 1H), 7.17-7.26 (m, 2H)。样品的 ^1H NMR谱与产物的推荐结构一致。

[0193] 实施例C

[0194] 5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)烟酸的制备

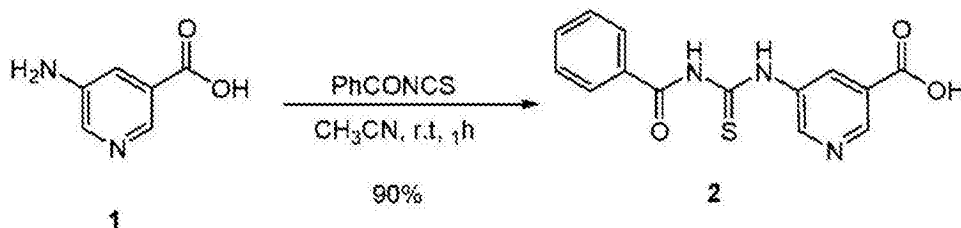
[0195]



[0196] 5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)烟酸根据以下程序制备:

[0197] 步骤1

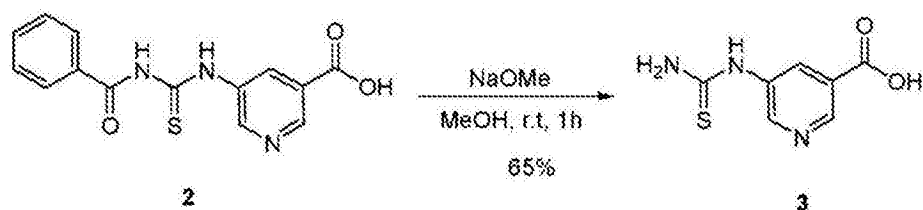
[0198]



[0199] 将化合物1 (40g, 0.3mol) 和苯甲酰基异硫氰酸酯 (95g, 0.58mol) 在 CH_3CN (2.0L) 中的混合物在室温下搅拌12h。TLC显示没有起始物质剩下。滤出沉淀并用 CH_3CN 洗涤, 干燥从而获得化合物2 (80g, 90%), 为淡黄色固体。

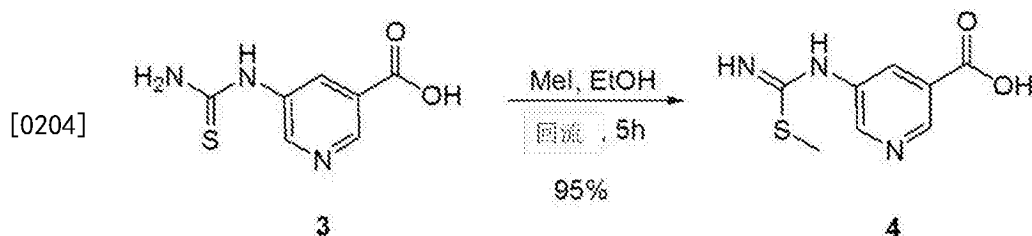
[0200] 步骤2

[0201]



[0202] 在室温下,向搅拌的化合物2 (80g,0.27mol) 的无水CH₃OH (500mL) 溶液中缓慢加入NaOMe (28.5g,0.53mol)。20min内产生澄清溶液,并将反应混合物搅拌1h。除去溶剂,而残余物用t-BuOMe研磨,留下浅黄色粉末。粉末用H₂O稀释,酸化至pH=2-3。过滤出形成的黄色固体,干燥从而得到化合物3 (33.7g,65%)。

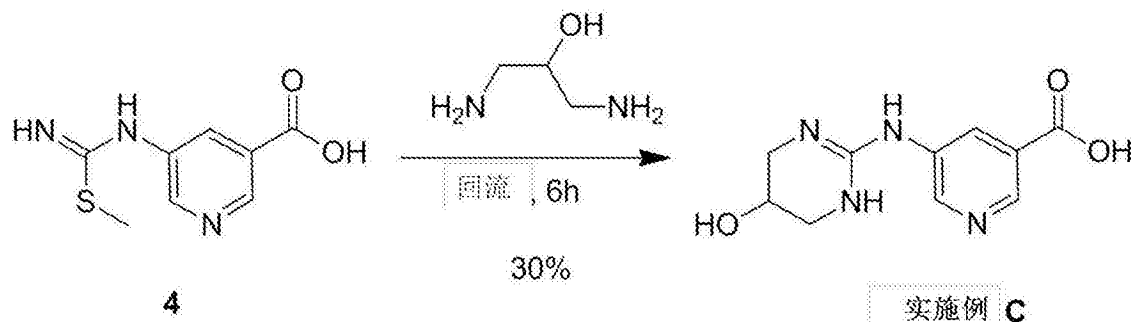
[0203] 步骤3



[0205] 在室温下,向搅拌的化合物3 (33.7g,0.17mol) 的DMF (200mL) 溶液中缓慢加入CH₃I (24.3g,0.17mol)。将反应混合物在室温下搅拌1h。TLC显示没有起始物质剩下。除去溶剂,得到化合物4 (34.3g,95%),为黄色油状物。

[0206] 步骤4

[0207]

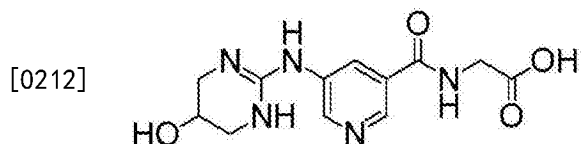


[0208] 将化合物4 (15.5g,0.074mol) 和羟基二氨基丙烷 (20g,0.22mol) 在DMF (100mL) 中的混合物加热回流并搅拌5h。过滤出形成的固体并干燥。得到实施例C (5.2g,30%),为白色固体。

[0209] LC/MS (M+H=237) 对于期望的产物是一致的。¹H NMR:DMSO-d₆ 400MHz δ13.053 (s, 1H), 9.881 (s, 2H), 8.783 (s, 1H), 8.630 (s, 1H), 7.897 (s, 1H), 4.112 (s, 1H), 3.410 (s, 2H), 3.228-3.190 (m, 2H)。

[0210] 实施例D

[0211] 2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酸的制备



[0213] 2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酸根据以下程序制备:

[0214] 步骤1

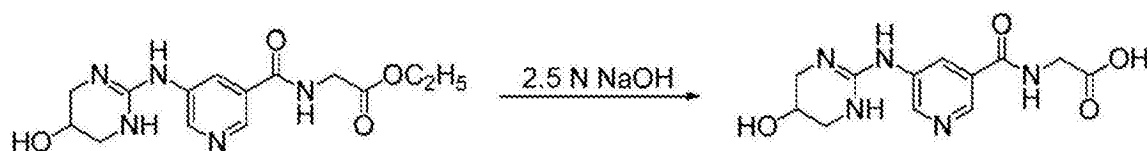
[0215]



[0216] 向5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢茛-2-基)氨基)烟酸(1.20g, 5.08mmol)在DMF(10.0mL)和DCM(10.0mL)的1:1混合物中的悬浮液中加入甘氨酸乙酯盐酸盐(0.798g, 5.717mmol),并将混合物在室温下氮气氛中搅拌10min。将纯的N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(1.10mL, 7.104mmol)加入到上述反应混合物中,并将混合物在室温下搅拌过夜而得到无色至奶油状混悬液。真空蒸发溶剂而得到淡黄色粘稠残余物。残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 322 (M+H), m/z 344 (M+Na) 和 m/z 643 (2M +H), $C_{14}H_{19}N_5O_4$ 的理论值: 321.33。粗产物在下一步原样用于皂化上述酯。

[0217] 步骤2

[0218]



[0219] 实施例D

[0220] 将上述粗产物溶于DMF/DCM(1:1)的混合物(10mL)中并将溶液冷却至10℃(冰浴),并在搅拌下缓慢加入2.5N NaOH溶液(10.0mL),将溶液温度保持于20℃以下,得到淡黄色溶液。将反应混合物在室温下搅拌过夜。在搅拌下将反应混合物用5N HCl酸化至pH 5,得到黄橙色溶液。用DCM(25mL)稀释混合物,分离有机层和水层。将水层真空蒸发,得到黄色胶状固体。使用水中含0.05%TFA的梯度10%-40%CH₃CN通过反相HPLC纯化粗产物,得到期望的产物,为无色至黄色胶状固体。将固体用乙腈研磨,得到无色至浅黄色结晶固体,将其从甲醇中重结晶,得到奶油状固体(869.3mg,产率59%)。固体的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 294 (M+H), 和 m/z 316 (M+Na)。理论值 $C_{12}H_{15}N_5O_4$: 293.28。¹H NMR(400MHz, D₂O): δ 3.19 (dd, J=12.47和3.67Hz, 2H), 3.37 (dd, J=12.47和2.93Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 4.11 (m, 1H), 8.12 (t, J=2.20Hz, 1H), 8.64 (d, J=2.45Hz, 1H), 8.90 (d, J=1.96Hz, 1H)。该化合物的¹H NMR谱与作为实施例D的产物的推荐结构一致。

[0221] β 氨基酸及其相应的 β 氨基酯中间体

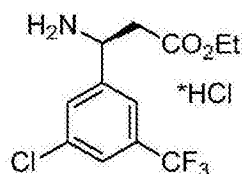
[0222] 在实施例1-17的合成中用作原料和试剂的 β 氨基酸及其相应的 β 氨基酯中间体能够按照以上方案III中所述进行合成。简而言之,这种 β 氨基酸和酯能够由合适的苯甲醛并在所描述的条件下合成。可替代地,合适的苯甲醛能够与丙二酸单乙或甲酯反应,从而直接得到外消旋 β 氨基乙基酯。下面描述了利用这种可替代方法的实施例。除非另有举例说明,否则所有相关的苯甲醛都很容易商购获得或能够通过本领域技术人员已知的方法由合适的溴苯,正丁基锂和DMF很容易合成。按照方案III所示,相应的外消旋 β -氨基酯能够要么经由超临界流体手性色谱分离,要么经由(S) β 氨基酯用Amano脂肪酶PS(Sigma Aldrich)进行选择性的酶促裂解为随后可以转化成(S)酯并原样用于本文中公开的实施例1-17的合成的易分离的(S) β 氨基酸而转化期望的(S)对映异构体。

[0223] 以下是举例说明在形成所有后续实施例1-17的合成中使用的所有 β -氨基酯中间

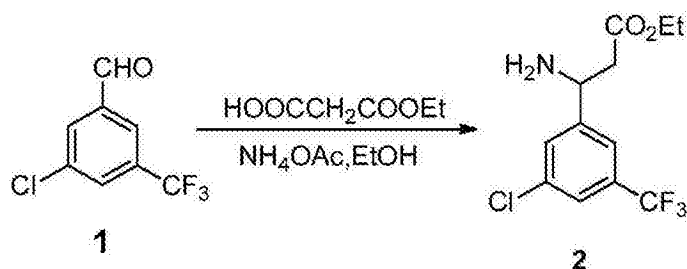
体的各个步骤中使用的各种通用程序的代表性方法,并且旨在举例说明这些方法的通用用途:

[0224] 实施例E

[0225] (3S)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



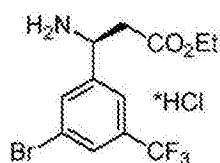
[0226]



[0227] 在70℃下搅拌在EtOH(30mL)中的NH₄OAc(1.33g,0.12mol), H₂OCCH₂COOEt(4.5g, 0.034mol)和苯甲醛1(3.6g,0.017mol)长达6h。浓缩混合物并通过添加NaHCO₃水溶液将其调节至pH=7.5。用EtOAc(3×50mL)萃取混合物。有机层用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并浓缩至干,得到油状物。通过硅胶色谱纯化粗产物,得到外消旋化合物2(1.5g, 29.4%)。(S)对映异构体,实施例E,使用实施例F(下文)所述的酶促拆分方案进行分离。

[0228] 实施例F

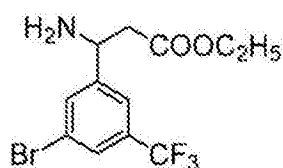
[0229] (3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



[0230]

[0231] 步骤1

[0232] 外消旋的3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]丙酸乙酯的制备

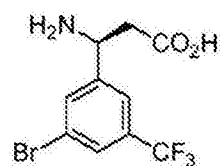


[0233]

[0234] (外消旋)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]丙酸乙酯根据制备实施例E所述的方法,用3-溴-5-三氟甲基苯甲醛代替3-氯-5-三氟甲基苯甲醛进行制备。

[0235] 步骤2

[0236] (3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]丙酸的制备

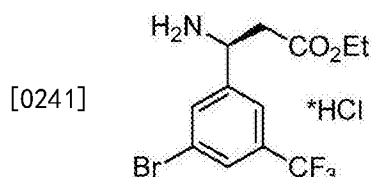


[0237]

[0238] 外消旋混合物的酶促拆分:在室温下搅拌(外消旋)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]丙酸乙酯(570.0mg,1.676mmol)在50mM KH_2PO_4 溶液(30.0mL)中的悬浮液,并通过加入1.0N NaOH 溶液和50mM KH_2PO_4 溶液将水层的pH调节至pH 8.32。将Amano脂肪酶PS(625.0mg)加入到上述悬浮液中,并将反应混合物在室温下搅拌2天。用MTBE(25mL)稀释混合物,并将反应混合物在室温下搅拌1h以萃取(R)-酯。通过LC-MS分析后丢弃含有(R)-酯的MTBE层。真空蒸发水层而得到含有(S)-酸以及Amano脂肪酶和磷酸盐缓冲盐的奶油状固体。上述粗产物通过反相HPLC,用含有0.05%TFA的10%-60% CH_3CN 水溶液梯度进行纯化,而得到期望的产物,为无色玻璃状固体(231.0mg)。所述产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 312 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 314 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 334 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$)和 m/z 336 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$); $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrF}_3\text{NO}_2$ 理论值:312.08。(S)-酸的分离的TFA盐原样用于(S)-酯的制备。

[0239] 步骤3

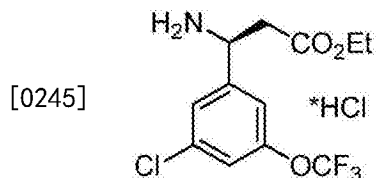
[0240] (3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐(实施例F)的制备



[0242] 向来自上述步骤2的(3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]丙酸TFA盐(231.0mg,0.542mmol)在无水乙醇(3mL)中的溶液中加入用于HCl气体饱和的无水乙醇(10mL)并将反应混合物在室温下搅拌1.5h。真空蒸发溶剂,得到无色结晶固体,(实施例F)(198.5mg,97%)。固体的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 340 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 342 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 362 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$)和 m/z 364 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$); $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrF}_3\text{NO}_2$ 的计算值:340.14。

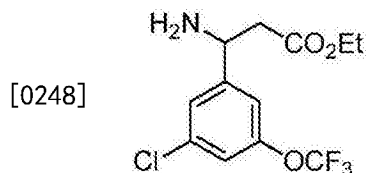
[0243] 实施例G

[0244] (3S)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



[0246] 步骤1

[0247] 外消旋3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯的制备

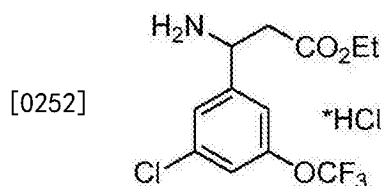


[0249] 将3-氯-5-(三氟甲氧基)苯甲醛(1.05g,4.676mmol),丙二酸单乙酯(1.54g,11.69mmol)和乙酸铵(1.985g,25.75mmol)的混合物在无水乙醇(30mL)中的溶液在80℃下加热过夜,得到无色溶液。将反应混合物冷却至室温,并真空蒸发溶剂,得到黄色粘稠液体。将残余物在饱和 NaHCO_3 水溶液(50mL)和乙酸乙酯(50mL)之间分配,移出有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并真空蒸发,得到黄棕色粘稠液体(1.56g)。粗产物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 312 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 314 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 334 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$),和 m/z 336 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$)。

Na); $C_{12}H_{13}ClF_3NO_3$ 的理论值: 311.68。LC-MS 还显示了副产物: (E)-3-(3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基)丙烯酸乙酯的质量: m/z 295 (^{35}Cl M+H) 和 m/z 297 (^{37}Cl M+H); $C_{12}H_{10}ClF_3O_3$ 理论值: 294.65。向粗残余物的无水乙醇 (2mL) 溶液中加入 2.0M HCl 的乙醚 (10.0mL) 溶液, 并将反应混合物在室温下搅拌 1h, 得到黄色溶液。将溶剂蒸发后的残余物在水 (25mL) 和二氯甲烷 (50mL) 之间分配。分离有机层和水层。将水层真空蒸发, 得到无色胶状残余物。残余物通过反相制备型 HPLC, 用含有 0.05% TFA 的梯度 10%-70% CH_3CN 水溶液进行纯化。纯的级分混合物真空蒸发, 得到期望的产物, 为无色结晶固体 (347.2mg, 产率 24%)。产物的 LC/MS 分析示出了期望产物的质量: m/z 312 (^{35}Cl M+H), m/z 314 (^{37}Cl M+H), m/z 334 (^{35}Cl M+Na) 和 m/z 336 (^{37}Cl M+Na); $C_{12}H_{13}ClF_3NO_3$ 理论值: 311.68。

[0250] 步骤2

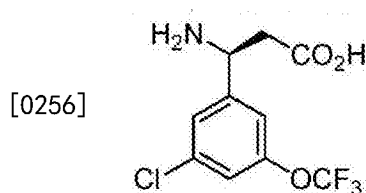
[0251] 外消旋3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



[0253] 向上述(外消旋)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯 TFA 盐 (347.2mg, 0.816mmol) 在无水乙醇 (2mL) 中的溶液中加入用干燥 HCl 气体饱和的无水乙醇 (5mL) 并将反应混合物在室温下搅拌 30min。真空蒸发溶剂, 得到无色胶状固体。将固体用己烷 (2×10mL) 浆化, 倾析出溶剂层, 并将残余物真空干燥, 得到无色结晶固体 (270.7mg, 产率 95%)。固体的 LC-MS 分析示出了期望产物的质量: m/z 312 (^{35}Cl M+H), m/z 314 (^{37}Cl M+H), m/z 334 (^{35}Cl M+Na) 和 m/z 336 (^{37}Cl M+Na); $C_{12}H_{13}ClF_3NO_3$ 理论值: 311.68。 1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.08 (d, $J=16.1$ 和 8.8 Hz, 1H, $CHH-C=O-$), 3.20 (dd, $J=16.4$ 和 10.3 Hz, 1H, $-CHH-C=O-$), 4.01 (q, $J=7.1$ 和 2.0 Hz, 2H, CH_3-CH_2-), 4.72 (m, 1H, $-NH_2-CH-CH_2-C=O-$), 7.62 (s, 1H, H-2), 7.64 (s, 1H, H-6), 7.80 (s, 1H, H-4), 8.87 (brs, 3H, $-NH_2 \cdot HCl$)。固体的 1H NMR 谱与产物的推荐结构一致。

[0254] 步骤3

[0255] (3S)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸的制备

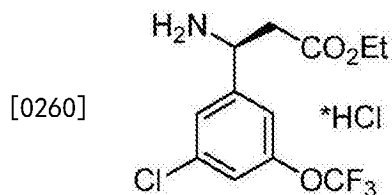


[0257] 外消旋混合物的酶促拆分: 将(外消旋)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐 (185.30mg, 0.532mmol) 在 50mM KH_2PO_4 溶液 (25.0mL) 中的悬浮液在室温下搅拌, 并通过加入 1.0N NaOH 溶液和 50mM KH_2PO_4 溶液将水层的 pH 调节至 pH 8.32。将 Amano 脂肪酶 PS (201.0mg) 加入到上述悬浮液中, 并将反应混合物在室温下搅拌 2 天。用 MTBE (25mL) 稀释混合物, 并将反应混合物在室温下搅拌 1h 以萃取 (R)-酯。通过 LC-MS 分析后丢弃含有 (R) 酯的 MTBE 层。真空蒸发水层, 得到含有 (S)-酸以及 Amano 脂肪酶和磷酸盐缓冲盐的奶油状固体。上述粗产物通过反相 HPLC, 用含有 0.05% TFA 的梯度 10%-70% CH_3CN 水溶液纯化, 得到期望的产物, 为无色玻璃状固体 (83.1mg)。产物的 LC/MS 分析示出了期望产物的

质量： m/z 284 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$)， m/z 286 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$)， m/z 306 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$)，和 m/z 308 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$)； $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{NO}_3$ 理论值：283.63。(S)-酸所分离的TFA盐原样用于制备(S)-酯。

[0258] 步骤4

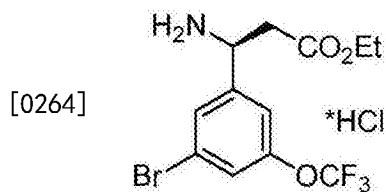
[0259] (3S)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐(实施例G)的制备



[0261] 向步骤3的(S)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸TFA盐(83.0mg, 0.209mmol)在无水乙醇(2.0mL)中的溶液中加入用干HCl气体饱和的无水乙醇(5mL),并将反应混合物在室温下搅拌1h,得到无色溶液。1h后,反应混合物的LC-MS分析显示了期望的产物:(3S)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯的质量: m/z 312 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 314 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 334 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$)和 m/z 336 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$); $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClF}_3\text{NO}_3$ 理论值:311.68。真空蒸发溶剂,得到酯的期望的HCl盐(实施例G),为无色结晶固体(68.70mg,产率94%)。

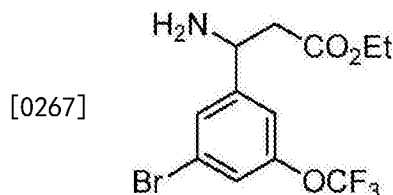
[0262] 实施例H

[0263] (3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



[0265] 步骤1

[0266] 外消旋3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯的制备

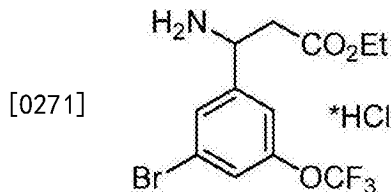


[0268] 将3-溴-5-(三氟甲氧基)苯甲醛(1.05g, 3.90mmol), 丙二酸单乙酯(1.31g, 9.91mmol)和乙酸铵(1.68g, 21.79mmol)的混合物在无水乙醇(25mL)中的溶液在80℃加热5h,得到无色溶液。将反应混合物冷却至室温,真空蒸发溶剂,得到无色粘稠液体。将残余物在饱和 NaHCO_3 水溶液(50mL)和乙酸乙酯(50mL)之间分配,移除有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并真空蒸发,得到淡黄色粘稠液体(1.40g)。粗产物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 356 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 358 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 378 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$),和 m/z 380 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$); $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrF}_3\text{NO}_3$ 理论值:356.14。LC-MS也显示了副产物:(E)-3-(3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基)丙烯酸乙酯的质量: m/z 339 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 341 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$); $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrF}_3\text{O}_3$ 理论值:339.11。向粗残余物在无水乙醇(2mL)中的溶液中加入2.0M HCl的乙醚溶液(15.0mL),将反应混合物在室温下搅拌30min,得到浅黄色溶液。将溶剂蒸发后的残余物在水(25mL)和二氯甲烷(25mL)之间分配。分离有机层和水层。将水层真空蒸发,得到无色胶状残余物。残余物通过反相制备型HPLC纯化,用含有0.05% TFA的梯度10%-70% CH_3CN 水溶液进行纯化。纯的级分混合

物真空蒸发,得到期望的产物,为无色结晶固体(442.5mg,产率31%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 356 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 358 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 378 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$) 和 m/z 380 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$); $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrF}_3\text{NO}_3$ 理论值:356.14。

[0269] 步骤2

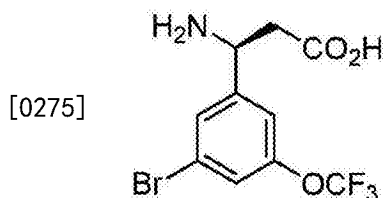
[0270] 外消旋3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



[0272] 向来自上述的(外消旋)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯 TFA盐(442.8mg,0.942mmol)的无水乙醇(2mL)溶液中加入2.0M HCl 乙醚溶液(10mL),并将反应混合物在室温下搅拌1h。真空蒸发溶剂,得到无色胶状固体。将固体用己烷($2 \times 10\text{mL}$)浆化,倾析掉溶剂层,并将残余物真空干燥,得到无色结晶固体(358.0mg,产率96%)。固体的LC-MS 分析示出了期望产物的质量: m/z 356 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 358 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 378 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$), 和 m/z 380 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$); $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrF}_3\text{NO}_3$ 理论值: 356.14。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.08 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 3.095 (双AB q, $J=16.4$ 和 8.7Hz , $J=16.4$ 和 10.3Hz , (每个1H), 2H, -CHH-C=O- 和 -CHH-C=O- ; 非对映异构体), 4.01 (dq, $J=7.1$ 和 2.0Hz , 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 4.72 (dd, $J=8.3$ 和 6.1Hz , 1H, $\text{-NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-C=O-}$), 7.65 (appt, $J=1.7\text{Hz}$, 1H), 7.73 (appt, $J=1.7\text{Hz}$, 1H), 7.90 (appt, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 8.74 (brs, 3H, $\text{-NH}_2\cdot\text{HCl}$)。固体的 ^1H NMR谱与产物的推荐结构一致。

[0273] 步骤3

[0274] (3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸的制备

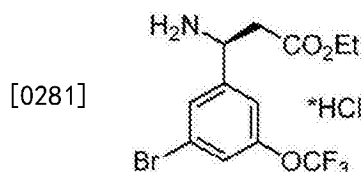


[0276] 外消旋混合物的酶促拆分:

[0277] 在室温下搅拌上述步骤2的(外消旋)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐(345.40mg,0.880mmol)在50mM KH_2PO_4 溶液(30.0mL)中的悬浮液并通过添加1.0N NaOH溶液和50mM KH_2PO_4 溶液将水层的pH调节至pH 8.32。将Amano脂肪酶PS(317.0mg)加入到上述悬浮液中,并将反应混合物在室温下搅拌过夜。用MTBE(25mL)稀释混合物,并将反应混合物在室温下搅拌1h以萃取(R)-酯。用LC-MS分析后丢弃含有(R)酯的MTBE层。真空蒸发水层得到含有(S)-酸以及Amano 脂肪酶和磷酸盐缓冲盐的奶油状固体。上述粗产物通过反相HPLC,用含有0.05% TFA的梯度10%-70% CH_3CN 水溶液纯化,得到期望的产物,为无色玻璃状固体(201.3mg)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 328 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 330 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 350 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$) 和 m/z 352 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$), $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrF}_3\text{NO}_3$ 理论值:328.08。(S)-酸所分离的TFA盐原样用于(S)-酯的制备。

[0278] 步骤4

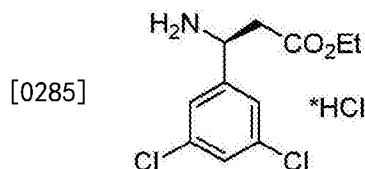
[0279] (3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐(实施例H)的
[0280] 制备



[0282] 向上述步骤3的(S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸TFA盐(201.30mg, 0.455mmol)的无水乙醇(2.0mL)溶液中加入用干HCl气体饱和的无水乙醇(5mL)并将反应混合物在室温下搅拌1.5h,得到无色溶液。1.5h后反应混合物的LC-MS分析证实期望的产物:(S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基]丙酸乙酯的质量: m/z 356 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 358 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 378 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$)和 m/z 380 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$)。C₁₂H₁₃BrF₃NO₃理论值:356.14。真空蒸发溶剂,得到酯的期望的HCl盐(实施例H),为无色结晶固体(171.0mg,产率95%)。

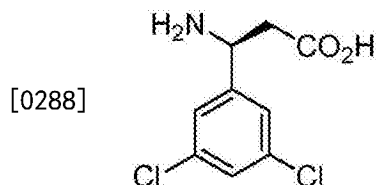
[0283] 实施例I

[0284] (3S)-3-氨基-3-[3,5-二氯-苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



[0286] 步骤1

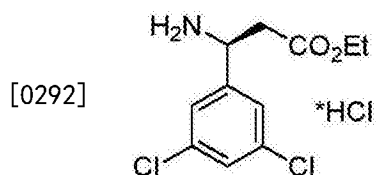
[0287] (S)-3-氨基-3-[3,5-二氯-苯基]丙酸的制备



[0289] 外消旋混合物的酶促拆分:在室温下搅拌(外消旋)-3-氨基-3-[3,5-二氯苯基]丙酸乙酯盐酸盐(根据本文所述的程序由3,5-二氯苯甲醛开始进行合成)(316.0mg, 1.058mmol)在50mM KH₂PO₄溶液(30.0mL)中的溶液,并通过加入1.0N NaOH溶液和50mM KH₂PO₄溶液将水层的pH调节至pH 8.32。将Amano脂肪酶PS(295.0mg)加入到上述悬浮液中,并将反应混合物在室温下搅拌2天。用MTBE(25mL)稀释混合物,并将反应混合物在室温下搅拌1h以萃取(R)-酯。用LC-MS分析后丢弃含有(R)酯的MTBE层。真空蒸发水层,得到含有(S)-酸以及Amano脂肪酶和磷酸盐缓冲盐的奶油状固体。上述粗产物通过反相HPLC,用含0.05% TFA的梯度10%-50% CH₃CN水溶液纯化,得到期望的产物,为无色玻璃状固体(103.0mg)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 234 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 236 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 256 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$)和 m/z 258 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$); C₉H₉Cl₂NO₂理论值:234.08。(S)-酸所分离的TFA盐原样用于(S)-酯的制备。

[0290] 步骤2

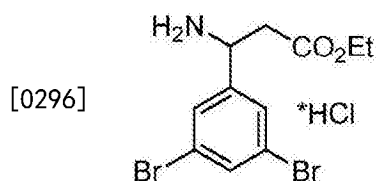
[0291] (3S)-3-氨基-3-[3,5-二氯-苯基]丙酸乙酯盐酸盐(实施例I)的制备



[0293] 向上述步骤1的(S)-3-氨基-3-[3,5-二氯苯基]丙酸(103.0mg,0.440mmol)在无水乙醇(2.0mL)中的悬浮液中加入用干HCl气体饱和的无水乙醇(5mL),并将反应混合物在室温下搅拌1h,得到无色溶液。1.5h后反应混合物的LC-MS分析示出了期望的产物:(S)-3-氨基-3-[3,5-二氯苯基]丙酸乙酯的质量: m/z 262 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 264 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 284 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$)和 m/z 286 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$)。 $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_2$ 理论值:262.13。将溶剂真空蒸发,得到酯的期望的HCl盐(实施例I),为无色结晶固体(131.20mg,产率99%)。

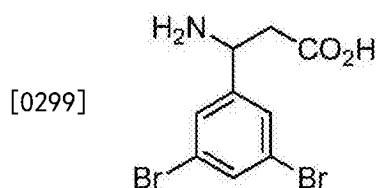
[0294] 实施例J

[0295] 外消旋3-氨基-3-[3,5-溴苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



[0297] 步骤1

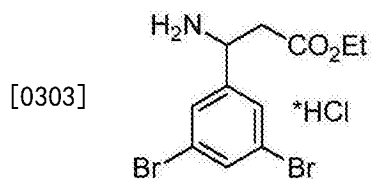
[0298] 外消旋3-氨基-3-[3,5-溴-苯基]丙酸的制备



[0300] 在氮气氛下将3,5-二溴-苯甲醛(50g,189.39mmol),丙二酸(39.39g,378.78mmol)和乙酸铵(29.19g,378.78mmol)的混合物在异丙醇(350mL)中的悬浮液加热回流14h,而得到厚的无色固体。将固体热过滤,用热异丙醇($2 \times 100\text{mL}$)洗涤并真空干燥,得到期望的外消旋产物,为无色固体(32.2g)。

[0301] 步骤2

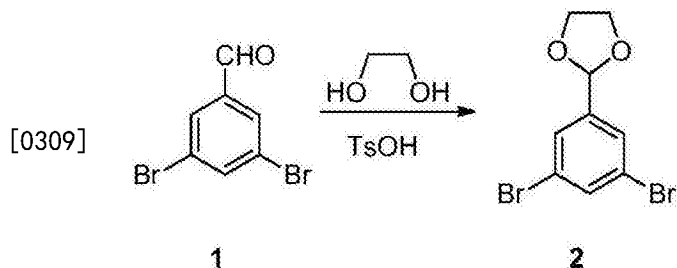
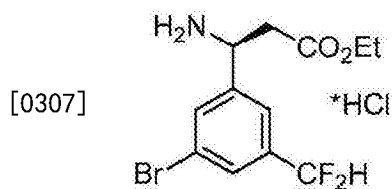
[0302] 外消旋3-氨基-3-[3,5-溴苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



[0304] 将无水乙醇(500mL,用干HCl气体饱和)加入上述步骤1的3-氨基-3-(3,5-二溴-苯基)-丙酸(32g,99.07mmol)中并加热反应混合物回流1.5h,得到浅黄色溶液。将溶剂真空除去,得到无色固体。用己烷洗涤固体($2 \times 100\text{mL}$)。倾析出溶剂层后,将残余物真空干燥,得到外消旋氨基酯盐酸盐(实施例J),为白色固体(38g)。

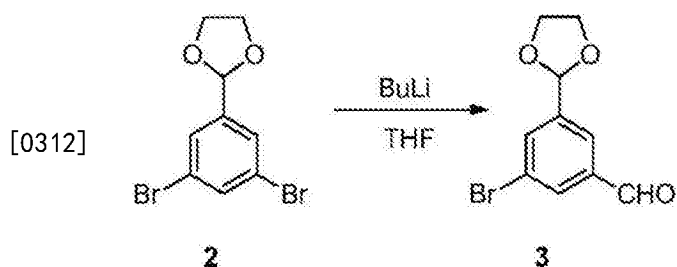
[0305] 实施例K

[0306] (3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-(二氟甲基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐的制备



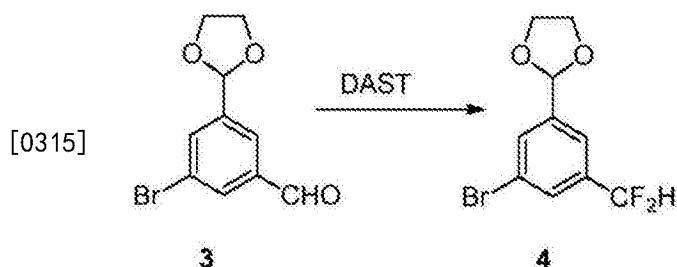
[0310] 在110℃下搅拌甲苯(20mL)中的3,5-二溴苯甲醛1(10g, 37.8mmol, 1.0当量), 乙烷-1,2-二醇(7.0g, 114mmol, 3.0当量)和TsOH(0.32g, 1.89mmol)长达4h。将混合物冷却至23℃并浓缩, 用EtOAc萃取。将有机层用盐水洗涤, 干燥(Na_2SO_4)并浓缩至干, 得到油状化合物2(9.2g, 83.6%)。

[0311] 步骤2



[0313] 在-78℃下搅拌THF(100mL)中的化合物2(9.2g, 29.8mmol, 1.0当量)。在-78℃下将n-BuLi(12mL, 1.0当量)滴加到上述混合物中。混合物在-78℃下搅拌1h。在-78℃下, 将DMF(4.56g, 1.5当量)滴加到上述混合物中。混合物在-78℃下搅拌3h, 然后温热至25℃。将水加入到混合物中, 并随后用乙酸乙酯萃取。有机层用盐水洗涤, 干燥(Na_2SO_4)并浓缩至干, 得到粗产物。粗产物通过硅胶色谱纯化, 得到化合物3(6.6g, 86.8%), 为白色固体。

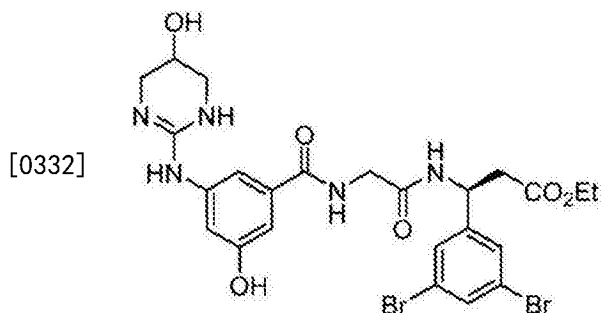
[0314] 步骤3



[0316] 将化合物3(6.6g, 0.026mol)加入到DCM(50mL)中, 然后将DAST(8.3g, 0.052mol)加入到溶液中, 并将反应在 N_2 下搅拌8h。溶液用 NaHCO_3 水溶液洗涤, 而混合物用DCM萃取。将有机层用盐水洗涤, 干燥(Na_2SO_4)并浓缩。粗物质通过硅胶色谱纯化, 得到化合物4(4.2g, 58.3%)。

[0317] 步骤4

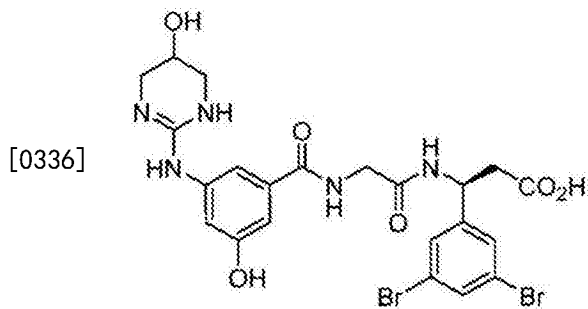
氨基) 苯甲酰胺基) 乙酰胺基] 丙酸乙酯的制备



[0333] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(513.80mg,1.667mmol),(3S)-3-氨基-3-(3,5-二溴苯基)丙酸乙酯盐酸盐(经由酶促脂肪酶分解方法形成的实施例J的(S)酯)(645.80mg,1.667mmol)和1-羟基苯并三唑水合物(52.0mg,0.340mmol)的混合物溶解于DMF(6mL)和二氯甲烷(6mL)的混合物中,并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min从而得到奶油状悬浮液。加入纯的N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(360.0μL,2.325mmol)并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发,得到产物的无色粘稠残余物:(3S)-3-[3,5-二溴苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 640 ($^{79}\text{Br}-^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 642 ($^{79}\text{Br}-^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 644 ($^{81}\text{Br}-^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 662 ($^{79}\text{Br}-^{79}\text{BrM}+\text{Na}$), m/z 664 ($^{79}\text{Br}-^{81}\text{BrM}+\text{Na}$)和 m/z 666 ($^{81}\text{Br}-^{81}\text{BrM}+\text{Na}$); $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_6$: 641.31。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0334] 步骤2

[0335] (3S)-3-(3,5-二溴苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备

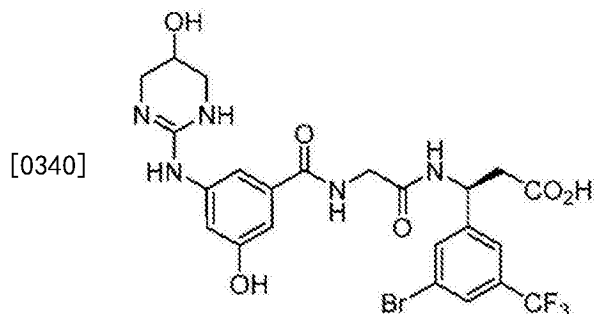


[0337] 在室温下向来自以上步骤1的粗(3S)-3-[3,5-二溴苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯(1.667mmol)在乙腈/水1:1混合物(10mL)中的溶液中加入氢氧化锂一水合物(350.0mg,8.341mmol)并在室温下搅拌反应混合物1h。用TFA(1.0mL,在10.0mL CH_3CN 中)中和混合物,并将混合物真空蒸发,得到无色胶状残余物。将上述粗产物通过反相HPLC,使用含有0.05%TFA的梯度10%-70% CH_3CN 水溶液纯化,冻干后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例1)(684.2mg,产率67%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 612 ($^{79}\text{Br},^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 614 ($^{79}\text{Br},^{81}\text{BrM}+\text{H}$)和 m/z 616 ($^{81}\text{Br},^{81}\text{BrM}+\text{H}$)。 $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_6$ 理论值:613.26。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.74(d, $J=7.10\text{Hz}$, 2H), 3.16(d, $J=12.23\text{Hz}$, 2H), 3.33(d, $J=11.25\text{Hz}$, 2H), 3.86(d, $J=5.87\text{Hz}$, 2H), 4.08(brs, 1H), 5.14(q, $J=7.34\text{Hz}$, 1H), 6.74

(appt, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 7.11 (appt, 1H), 7.14 (appt, $J=1.7\text{Hz}$, 1H), 7.56 (d, $J=1.71\text{Hz}$, 2H), 7.71 (t, $J=1.7\text{Hz}$, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.53 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 8.64 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 9.61 (s, 1H), 10.01 (brs, 1H), 12.40 (brs, 1H)。样品的 ^1H NMR谱与实施例1 所推荐结构一致。

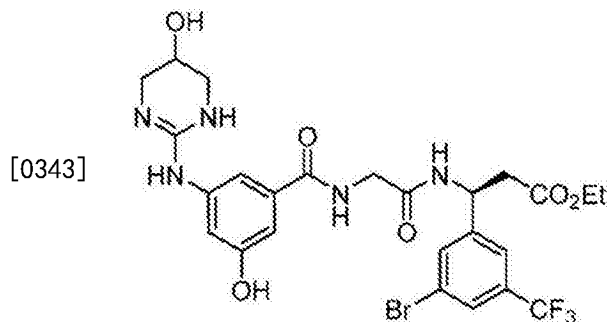
[0338] 实施例2

[0339] (3S)-3-(3-溴-5-(三氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0341] 步骤1

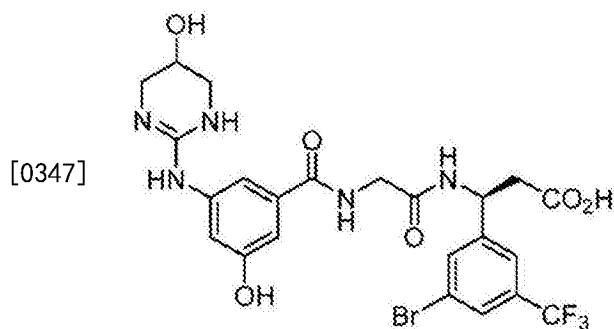
[0342] (3S)-3-(3-溴-5-(三氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯的制备



[0344] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B) (83.0mg, 0.269mmol), (3S)-3-氨基-3-(3-溴-5-(三氟甲基)苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例F) (102.0mg, 0.271mmol)的混合物溶解于 DMF (4mL) 和二氯甲烷 (4mL) 中从而获得奶油状悬浮液。向上述反应混合物中加入固体1-羟基苯并三唑水合物 (8.7mg, 0.057mmol), 并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min。加入N,N'-二异丙基碳二亚胺 (60.0μL, 0.387mmol) 并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发, 得到产物的无色胶状残余物: (3S)-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 630 ($^{79}\text{BrM} + \text{H}$), m/z 632 ($^{81}\text{BrM} + \text{H}$), m/z 652 ($^{79}\text{BrM} + \text{Na}$), 和 m/z 654 ($^{81}\text{BrM} + \text{Na}$); $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{BrF}_3\text{N}_5\text{O}_6$ 理论值: 630.41。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0345] 步骤2

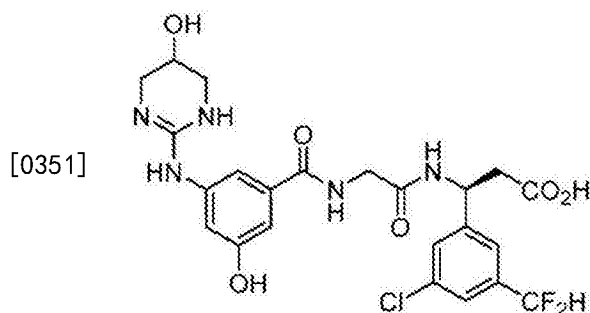
[0346] (3S)-3-(3-溴-5-(三氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0348] 在室温下向来自以上步骤1的 (3S)-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]丙酸乙酯 (0.344mmol) 在乙腈/水的1:1混合物 (4mL) 的混合物中的溶液中加入氢氧化锂一水合物 (77.0mg, 1.83mmol), 并将反应混合物在室温下搅拌1.5h, 混合物用TFA (1.0mL, 在10.0mL CH₃CN中) 中和, 并将混合物真空蒸发, 得到无色胶状残余物。上述粗产物通过反相HPLC, 使用含有0.05% TFA的梯度10%-60% CH₃CN水溶液纯化, 冻干后得到期望的产物, 为无色冻干固体 (实施例2) (124.0mg, 产率60%)。产物的 LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 602 (⁷⁹BrM +H), m/z 604 (⁸¹BrM +H); C₂₃H₂₃BrF₃N₅O₆ 理论值: 602.36。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 2.78 (d, J=7.3Hz, 2H), 3.16 (d, J=12.2Hz, 2H), 3.33 (d, J=12.2Hz, 2H), 3.87 (d, J=5.8Hz, 2H), 4.08 (appt, J=3.07Hz, 1H), 5.23 (q, J=7.3Hz, 1H), 6.74 (t, J=2.1Hz, 1H), 7.11 (t, J=1.8Hz, 1H), 7.14 (t, J=1.8Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 8.10 (brs, 2H), 8.61 (d, J=7.9Hz, 1H), 8.64 (t, J=5.9Hz, 1H), 9.60 (s, 1H), 10.02 (brs, 1H), 12.41 (brs, 1H, -COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例2所推荐结构一致。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆): δ -61.09 (S) 和 -73.82 (S)。

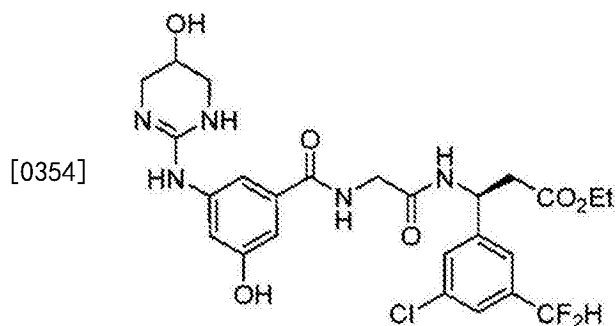
[0349] 实施例3

[0350] (3S)-3-[3-氯-5-(二氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0352] 步骤1

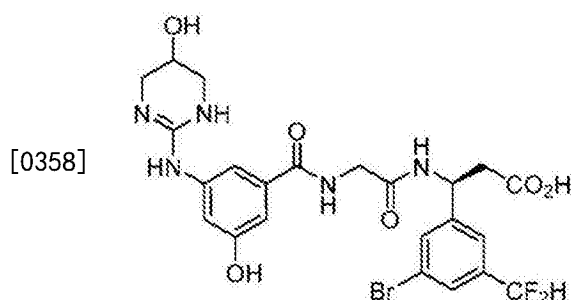
[0353] (3S)-3-[3-氯-5-(二氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯的制备



[0355] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(27.0mg;0.088mmol), (S)-3-氨基-3-(3-氯-5-(1-(二氟甲基)苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例L)(27.51mg,0.088mmol)的混合物溶解于DMF(1mL)和二氯甲烷(1mL)中,得到无色悬浮液。向上述反应混合物中加入固体1-羟基苯并三唑水合物(3.0mg,0.020mmol),并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min,加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(20.0μL, 0.129mmol),并将反应混合物在室温和氮气氛下搅拌过夜,真空蒸发溶剂,得到产物的淡黄色粘稠残留物:(3S)-3-(3-氯-5-(二氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 568 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 570 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 590 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$), 和 m/z 592 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$); $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{ClF}_2\text{N}_5\text{O}_6$ 理论值:567.97。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0356] 步骤2

[0357] (3S)-3-[3-氯-5-(二氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备

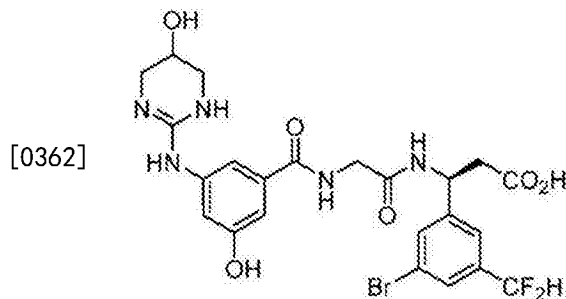


[0359] 在室温下向来自以上步骤1的粗(3S)3-(3-氯-5-(二氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯(0.088mmol)在乙腈/水的1:1混合物(4mL)的混合物中的溶液中加入氢氧化锂一水合物(20.0mg,0.477mmol),并将反应混合物在室温下搅拌过夜。用TFA(1mL,在10.0mL CH_3CN 中)中和混合物,并真空蒸发混合物,得到黄色胶状残余物。产物通过反相HPLC,用含有0.05% TFA的梯度10%-60% CH_3CN 水溶液纯化,冻干后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例3)(41.2mg,产率87%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 540 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$)和 m/z 542 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{ClF}_2\text{N}_5\text{O}_6$ 理论值:539.92。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.76 (d, $J=7.34\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 3.16 (d, $J=12.23\text{Hz}$, 2H), 3.33 (d, $J=10.76\text{Hz}$, 2H), 3.87 (dd/m, 3H), 4.08 (t, $J=3.18\text{Hz}$, 1H), 5.21 (q, $J=7.34\text{Hz}$, 1H) $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, 6.74 (t, $J=2.08\text{Hz}$, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.11 (t, $J=1.71\text{Hz}$, 1H), 7.13 (brs, 1H), 7.53 (brs, 1H), 7.59 (s, 1H), 8.14 (brs, 2H), 8.63 (t, $J=5.87\text{Hz}$, 1H), 9.67 (brs, 1H), 10.02 (brs, 1H), 12.44

(brs, 1H, -COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例3所推荐结构一致。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆) : δ-74.12 (s), 和-110.28 (d, J=56.0Hz)。

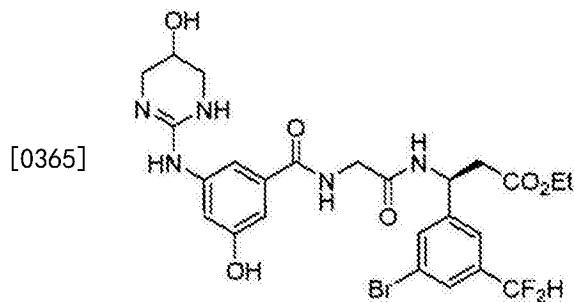
[0360] 实施例4

[0361] (3S)-3-[3-溴-5-(二氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸



[0363] 步骤1

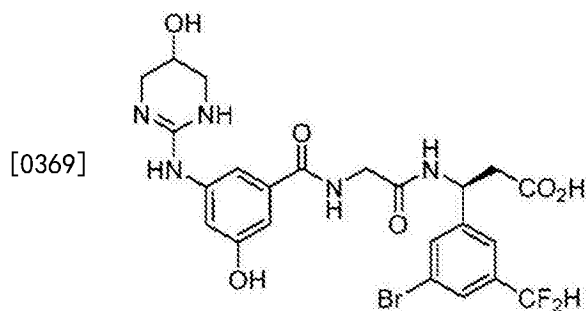
[0364] (3S)-3-[3-溴-5-(二氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸酯



[0366] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸 (实施例B) (25.0mg; 0.081mmol), (3S)-3-氨基-3-(3-溴-5-(1-(二氟甲基)苯基)丙酸乙酯盐酸盐 (实施例K) (29.08mg, 0.081mmol) 是混合物溶解于DMF (1mL) 和二氯甲烷 (1mL) 中, 得到无色悬浮液。向上述反应混合物中加入固体1-羟基苯并三唑水合物 (3.0mg, 0.020mmol), 并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min, 加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺 (20.0μL, 0.129mmol), 并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。真空蒸发溶剂, 得到产物的黄橙色粘稠残留物: (3S)-3-(3-溴-5-(二氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 612 (⁷⁹BrM+H), m/z 614 (⁸¹BrM+H), m/z 634 (⁷⁹BrM+Na), 和m/z 636 (⁸¹BrM+Na); C₂₅H₂₈BrF₂N₅O₆理论值: 612.42。粗残余物将原样用于步骤2中的皂化反应。

[0367] 步骤2

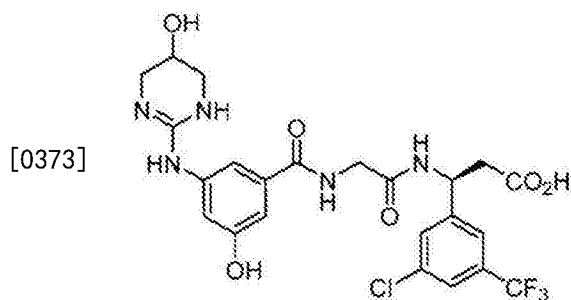
[0368] (3S)-3-[3-溴-5-(二氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0370] 在室温下向来自以上步骤1的粗(3S)-3-(3-溴-5-(二氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯(0.080mmol)在乙腈/水的1:1混合物(4mL)的混合物中的悬浮液中加入氢氧化锂一水合物(18.0mg,0.429mmol),并将反应混合物在室温下搅拌过夜。用TFA(500 μ L,在5.0mL CH₃CN中)中和混合物,并将混合物真空蒸发,得到黄色胶状残余物。上述粗产物通过反相HPLC,使用含有0.05%TFA的梯度10%-60%CH₃CN水溶液纯化,在冷冻干燥后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例4)(33.4mg,产率71%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 584 (⁷⁹BrM+H), m/z 586 (⁸¹BrM+H), m/z 606 (⁷⁹BrM+Na)和 m/z 608 (⁸¹BrM+Na);C₂₃H₂₄BrF₂N₅O₆理论值:584.37。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆): δ 2.76(d,J=7.34Hz,2H,-CH₂-COOH),3.16(d,J=12.47Hz,2H),3.33(d,J=10.76Hz,2H),3.87(dd/m,3H),4.08(t,J=2.90Hz,1H),5.21(q,J=7.34Hz,1H,-NH-CH-CH₂-COOH),6.74(t,J=2.08Hz,1H),7.02(appt,1H),7.14(appt,1H),7.56(s,1H),7.66(s,1H),7.72(s,1H),8.13(brs,1H),8.58(s,1H),8.62(t,J=5.99Hz,1H),9.65(brs,1H),10.02(brs,1H),12.40(brs,1H,-COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例4所推荐结构一致。¹⁹F NMR(376MHz,DMSO-d₆): δ -73.81(S)和-110.23(d,J=56.0Hz)。

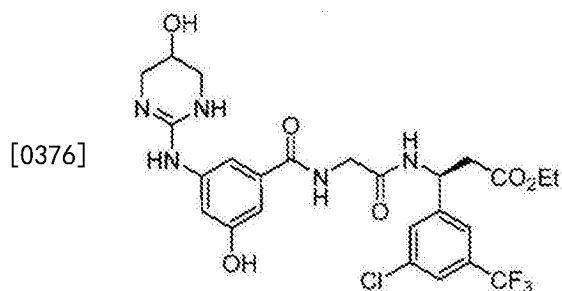
[0371] 实施例5

[0372] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0374] 步骤1

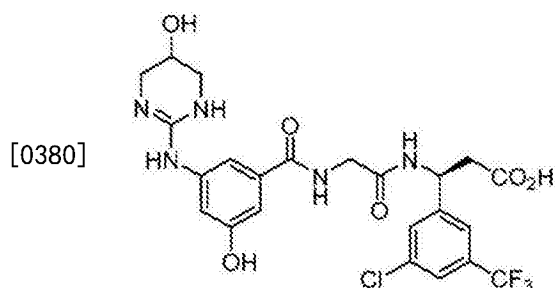
[0375] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯



[0377] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(43.0mg;0.139mmol), (3S)-3-氨基-3-(3-氯-5-(1-(三氟甲基)苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例E)(46.33mg,0.139mmol)溶解于DMF(1mL)和二氯甲烷(1mL)中,得到无色悬浮液。向上述反应混合物中加入固体1-羟基苯并三唑水合物(4.40mg,0.029mmol),并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min,加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(32.0μL,0.207mmol),并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。真空蒸发溶剂,得到产物的无色胶状残余物:(3S)-3-(3-氯-5-(三氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 586 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 588 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 608 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$)和 m/z 610 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$)。C₂₅H₂₇ClF₃N₅O₆理论值:585.96。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0378] 步骤2

[0379] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基]丙酸的制备

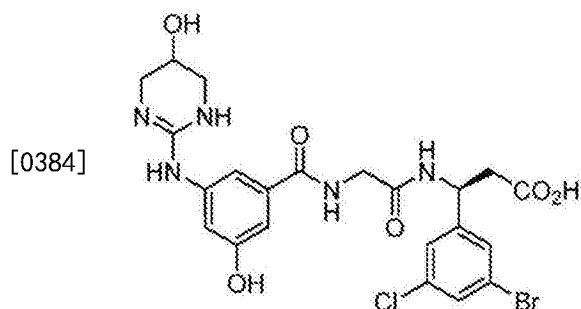


[0381] 在室温下向来自以上步骤1的粗(3S)-3-(3-氯-5-(三氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯(0.139mmol)在1:1乙腈/水混合物混合物(4mL)中的溶液中加入氢氧化锂一水合物(30.0mg,0.715mmol),并将反应混合物在室温下搅拌过夜。用TFA(1mL,在10.0mL CH₃CN中)中和混合物,并将混合物真空蒸发,得到奶油状胶质残余物。产物通过反相HPLC,使用含有0.05%TFA的梯度10%-60%CH₃CN水溶液纯化,冻干后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例5)(63.2mg,产率81%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 558 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$)和 m/z 560 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), C₂₃H₂₃ClF₃N₅O₆理论值:557.91。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ2.79(d,J=7.09Hz,2H,-CH₂-COOH),3.16(d,J=11.98Hz,2H),3.33(d,J=11.00Hz,2H),3.87(d,J=5.87Hz,2H),4.08(t,J=3.18Hz,1H),5.24(q,J=7.09Hz,1H,-NH-CH-CH₂-COOH),6.75(s,1H),7.11(s,1H),7.13(t,J=2.00Hz,1H),7.69(s,1H),7.74(s,1H),8.12(brs,1H),8.61(d,J=8.07Hz,1H),8.65(t,J=5.75Hz,1H),9.66(brs,1H),10.02(brs,1H),12.43(brs,1H,-COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例5所推荐结构一致。¹⁹F NMR(376MHz,DMSO-

d₆) : δ-61.11 (S) 和 -73.94 (S)。

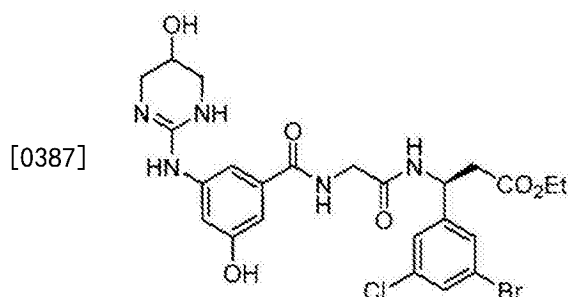
[0382] 实施例6

[0383] (3S)-3-[3-溴-5-氯-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-5-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基]丙酸的制备



[0385] 步骤1

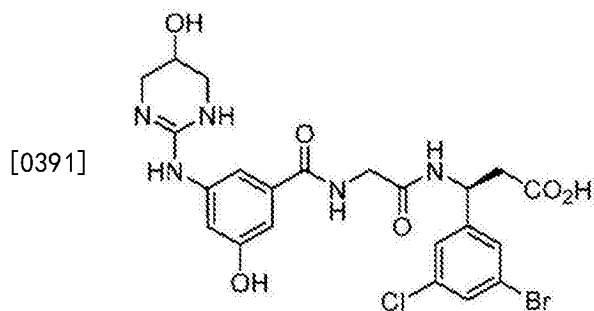
[0386] (3S)-3-[3-溴-5-氯-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基]丙酸乙酯的制备



[0388] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸 (实施例B) (82.0mg; 0.266mmol), (3S)-3-氨基-3-(3-溴-5-氯-苯基)丙酸乙酯盐酸盐 (由3-溴-5-氯苯甲醛开始按照上述方法合成) (91.40mg, 0.266mmol) 的混合物溶解于DMF (1.5mL) 和二氯甲烷 (1.5mL) 中, 得到奶油-橙色混悬液。向上述反应混合物中加入固体1-羟基苯并三唑水合物 (9.0mg, 0.059mmol), 并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min。加入 N,N'-二异丙基碳二酰亚胺 (60.0μL, 0.387mmol) 并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。真空蒸发溶剂, 得到产物的浑浊橙黄色胶状残余物: (3S)-3-(3-溴-5-氯-苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯。粗残余物的 LC-MS 分析示出了期望产物的质量: m/z 596 ($^{35}\text{Cl}, ^{79}\text{Br} \text{M}+\text{H}$), m/z 598 ($^{35}\text{Cl}, ^{81}\text{Br}, ^{37}\text{Cl}, ^{79}\text{Br} \text{M}+\text{H}$), m/z 600 ($^{37}\text{Cl}, ^{81}\text{Br} \text{M}+\text{HCl}$), m/z 618 ($^{35}\text{Cl}, ^{79}\text{Br} \text{M}+\text{Na}$), m/z 620 ($^{35}\text{Cl}, ^{81}\text{Br}, ^{37}\text{Cl}, ^{79}\text{Br} \text{M}+\text{Na}$) 和 m/z 622 ($^{37}\text{Cl}, ^{81}\text{Br} \text{M}+\text{Na}$); $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{BrClN}_5\text{O}_6$ 理论值: 596.86。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0389] 步骤2

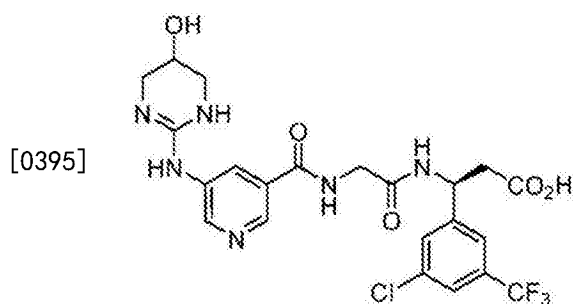
[0390] (3S)-3-[3-溴-5-氯-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基]丙酸的制备



[0392] 在室温下向来自以上步骤1的粗(3S)-3-(3-溴-5-氯-苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯(0.266mmol)在乙腈/水的1:1混合物(4mL)的混合物中的悬浮液中加入氢氧化锂一水合物(56.0mg, 0.1.334mmol)并将反应混合物在室温下搅拌4h,得到橙黄色溶液,并将混合物用TFA(1mL, 在10.0mL CH₃CN 中)中和,并将混合物真空蒸发,得到无色胶状残余物。将粗产物通过反相HPLC,使用含有0.05%TFA的梯度10%-60%CH₃CN水溶液纯化,在冷冻干燥后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例6)(88.7mg,产率 59%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量:m/z 568 (³⁵Cl,⁷⁹BrM+H), m/z 570 (³⁵Cl,⁸¹Br,³⁷Cl,⁷⁹BrM+H)和m/z 572 (³⁷Cl,⁸¹BrM+H); C₂₂H₂₃BrClN₅O₆理论值:568.80。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ2.74(d,J=7.34Hz, 2H,-CH₂-COOH),3.16(d,J=12.23Hz,2H),3.34(d,J=11.74Hz,2H),3.87(d,J=5.87Hz,2H),4.08(appt,1H),5.15(q,J=7.42Hz,1H,-NH-CH-CH₂-COOH),6.75(t,J=1.96Hz,1H),7.11(s,1H),7.14(s,1H),7.43(s,1H),7.52(s,1H),7.60(s,1H),8.13(brs,1H),8.84(d,J=8.07Hz,1H),8.64(t,J=5.87Hz,1H),9.65(brs,1H),10.03(brs,1H),12.45(brs,1H,-COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例6 所推荐结构一致。

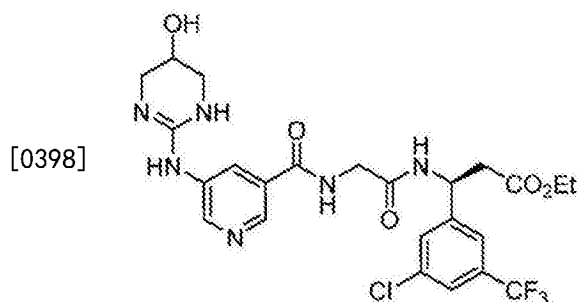
[0393] 实施例7

[0394] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸的制备



[0396] 步骤1

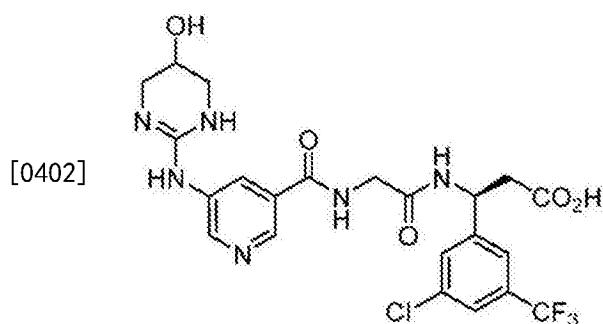
[0397] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯的制备



[0399] 将2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酸 (实施例D) (56.0mg, 0.115mmol), (3S)-3-氨基-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]丙酸乙酯盐酸盐 (实施例E) (38.05mg, 0.115mmol) 和1-羟基苯并三唑水合物 (3.5mg, 0.023mmol) 的混合物溶解于DMF (3mL) 和二氯甲烷 (3mL) 中并在室温氮气氛下搅拌10min, 得到奶油状悬浮液。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺 (25μL, 0.161mmol) 并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发, 得到中间产物无色胶状固体: (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 571 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 573 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$); m/z 593 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$), m/z 595 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$); $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_5$ 理论值: 570.95。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0400] 步骤2

[0401] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸的制备

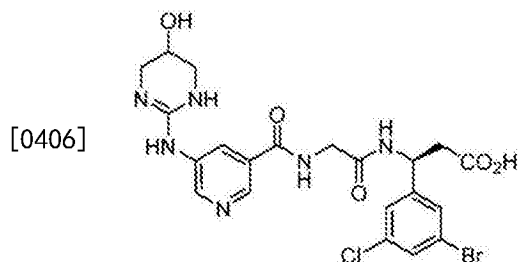


[0403] 向来自以上步骤1的 (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯 (0.115mmol) 在1:1乙腈/水混合物混合物 (4mL) 中的溶液中加入氢氧化锂一水合物 (25.0mg, 0.596mmol), 并将反应混合物在室温下搅拌1h。反应混合物用TFA (250μL, 在5mL CH_3CN 中) 中和, 并将混合物真空蒸发, 得到无色残余物。粗产物通过反相HPLC, 用含有0.05% TFA的梯度10%-70% CH_3CN 水溶液进行纯化, 冻干后得到期望的产物, 为无色冻干固体 (实施例7) (46.4mg, 产率74%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 558 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 560 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_5$ 理论值: 542.90。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.79 (d, $J=7.34\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 3.17 (d, $J=11.98\text{Hz}$, 2H), 3.36 (d, $J=11.98\text{Hz}$, 2H), 3.94 (d, $J=5.87\text{Hz}$, 2H), 4.11 (brt, 1H), 5.25 (q, $J=7.09\text{Hz}$, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 7.70 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.43 (brs, 2H), 8.59 (brs, 1H), 8.66 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H), 8.90 (brs, 1H), 9.04 (t, $J=5.75\text{Hz}$, 1H), 9.92 (s, 1H), 12.41 (brs, 1H, $-\text{COOH}$)。产物的 ^1H NMR谱与实施例7所推荐结构一

致。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆): δ-61.12 (S) 和-74.31 (S)。

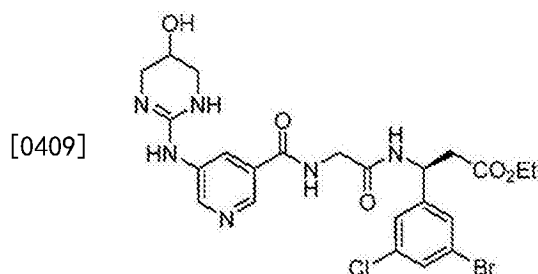
[0404] 实施例8

[0405] (3S)-3-(3-溴-5-氯-苯基)-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸的制备



[0407] 步骤1

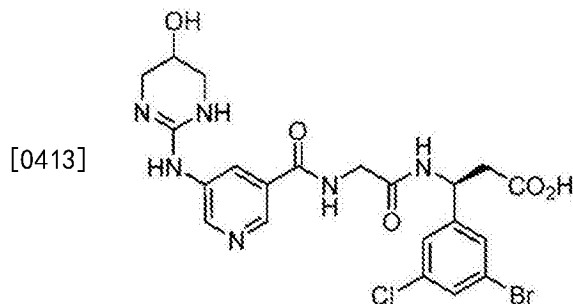
[0408] (3S)-3-(3-溴-5-氯-苯基)-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯的制备



[0410] 将2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6,4四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酸(实施例D)(80.0mg,0.164mmol), (3S)-3-氨基-3-[3-溴-5-氯苯基]丙酸乙酯盐酸盐(由3-溴-5-氯苯甲醛起始,按照上述方法合成)(56.15mg, 0.164mmol)和1-羟基苯并三唑水合物(6.0mg,0.039mmol)溶解于DMF (3mL)和二氯甲烷(3mL)中,并在室温氮气氛下搅拌10min,得到奶油状悬浮液。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(35.0μL,0.226mmol)并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发,得到中间产物无色固体:(3S)-3-[3-溴-5-氯-苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量:m/z 581 (³⁵Cl,⁷⁹BrM+H), m/z 583 (³⁵Cl,⁸¹Br,³⁷Cl,⁷⁹BrM+H), m/z 585 (³⁷Cl,⁸¹BrM+H), m/z 603 (³⁵Cl,⁷⁹BrM+Na), m/z 605 (³⁵Cl,⁸¹Br,³⁷Cl,⁷⁹BrM+Na)和m/z 607 (³⁷Cl,⁸¹BrM+Na);C₂₃H₂₆BrClN₆O₅理论值:581.85。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0411] 步骤2

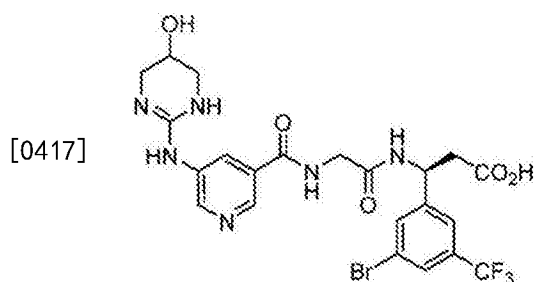
[0412] (3S)-3-(3-溴-5-氯-苯基)-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸的制备



[0414] 向 (3S)-3-[3-溴-5-氯-苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯 (0.164mmol) 在乙腈/水的1:1 混合物 (6mL) 中的悬浮液中加入氢氧化锂一水合物 (35.0mg, 0.834mmol), 并将反应混合物在室温下搅拌 2h。将反应混合物用TFA (250 μ L, 在5mL CH₃CN中) 中和, 并将混合物真空蒸发, 得到无色结晶固体。粗产物通过反相HPLC, 使用含有0.05% TFA的梯度10%-50% CH₃CN水溶液纯化, 在冷冻干燥后得到期望的产物, 为无色冻干固体 (实施例8) (55.0mg, 产率61%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 553 (³⁵Cl, ⁷⁹Br M + H), m/z 555 (³⁵Cl, ⁸¹Br, ³⁷Cl, ⁷⁹Br M + H) 和 m/z 557 (³⁵Cl, ⁸¹Br M + H); C₂₁H₂₂BrClN₆O₅ 理论值: 553.79。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 2.75 (d, J = 7.34Hz, 2H, -CH₂-COOH), 3.17 (d, J = 12.23Hz, 2H), 3.36 (d, J = 11.00Hz, 2H), 3.94 (d, J = 5.62Hz, 2H), 4.11 (t, J = 3.20Hz, 1H), 5.16 (q, J = 7.42Hz, 1H, -NH-CH-CH₂-COOH), 7.44 (t, J = 1.47Hz, 1H), 7.53 (apt, 1H), 7.60 (t, J = 1.83Hz, 1H), 8.03 (t, J = 2.08Hz, 1H), 8.42 (brs, 2H), 8.59 (d, J = 7.82Hz, 1H), 8.90 (brs, 1H), 9.03 (t, J = 5.87Hz, 1H), 9.90 (s, 1H), 12.42 (brs, 1H, -COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例8所推荐结构一致。

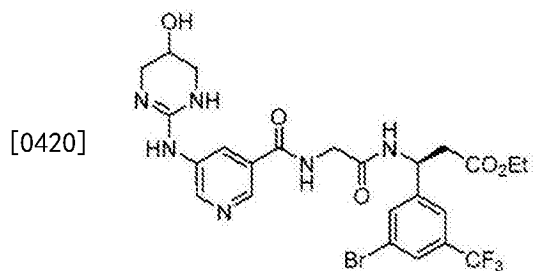
[0415] 实施例9

[0416] (3S)-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸



[0418] 步骤1

[0419] (3S)-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯的制备

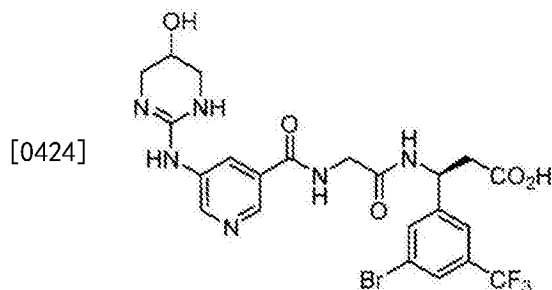


[0421] 将2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酸 (实施例D) (64.0mg, 0.131mmol), (3S)-3-氨基-3-(3-溴-5-(三氟甲基)苯基)丙酸乙酯盐酸盐 (实施例F) (49.31mg, 0.131mmol) 和1-羟基苯并三唑水合物 (5.0mg, 0.033mmol) 的混合物溶解于DMF (3mL) 和二氯甲烷 (3mL) 中并在室温氮气氛围下搅拌10min, 获得奶油状悬浮液。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺 (30.0 μ L, 0.194mmol) 并将反应混合物在室温氮气氛围下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发, 得到中间产物无色胶状固体: (3S)-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 615 (⁷⁹Br M + H), m/z 617 (⁸¹Br M + H),

m/z 637 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$) 和 m/z 639 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$); $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{BrF}_3\text{N}_6\text{O}_5$: 615.40。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0422] 步骤2

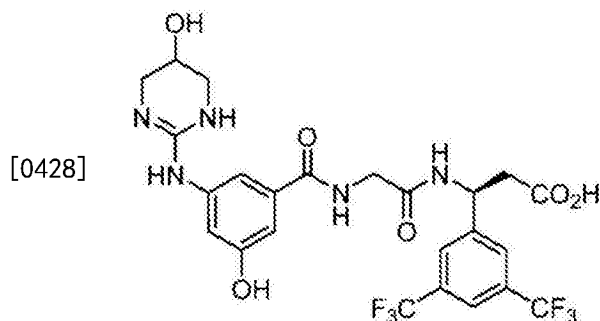
[0423] (3S)-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸制备



[0425] 向来自以上步骤1的 (3S)-3-[3-溴-5-(三氟甲基)苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯 (0.131mmol) 在1:1乙腈/水混合物的混合物 (6mL) 中的悬浮液中加入氢氧化锂一水合物 (30.0mg, 0.715mmol), 并将反应混合物在室温下搅拌 1h。将反应混合物用TFA (250 μL , 在5mL CH_3CN 中) 中和, 并将混合物真空蒸发, 得到无色结晶固体。粗产物通过反相HPLC, 使用含有0.05% TFA的梯度10%-60% CH_3CN 水溶液纯化, 在冷冻干燥后得到期望的产物, 为无色冻干固体 (实施例9) (69.6mg, 产率90%)。产物的LC/MS 分析示出了期望产物的质量: m/z 587 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 589 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$), m/z 609 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$) 和 m/z 611 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$); $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{BrF}_3\text{N}_6\text{O}_5$ 理论值: 587.35。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.79 (d, $J=7.34\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 3.17 (d, $J=12.47\text{Hz}$, 2H), 3.36 (d, $J=11.74\text{Hz}$, 2H), 3.94 (d, $J=5.87\text{Hz}$, 2H), 4.11 (brt, 1H), 5.24 (q, $J=7.25\text{Hz}$, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 7.73 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 8.02 (t, $J=2.08\text{Hz}$, 1H), 8.43 (brs, 2H), 8.59 (d, $J=1.96\text{Hz}$, 1H), 8.66 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H), 8.90 (s, 1H), 9.05 (t, $J=5.75\text{Hz}$, 1H), 9.92 (s, 1H), 12.43 (brs, 1H, $-\text{COOH}$)。产物的 ^1H NMR谱与实施例9所推荐结构一致。 ^{19}F NMR (376MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -61.10 (S) 和 -74.47 (S)。

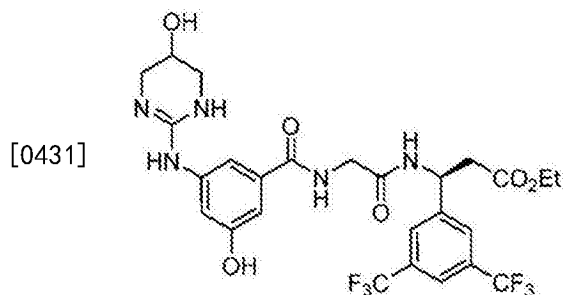
[0426] 实施例10

[0427] (3S)-3-[3,5-双(三氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0429] 步骤1

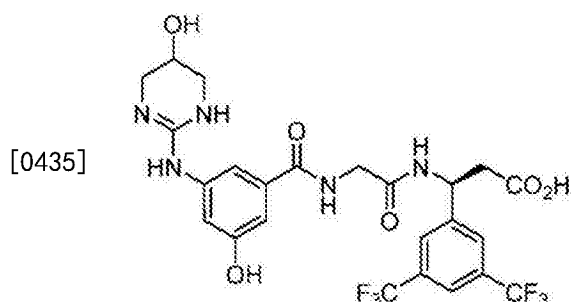
[0430] (3S)-3-[3,5-双(三氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯的制备



[0432] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(65.50mg;0.212mmol), (3S)-3-氨基-3-(3,5-双(1-(三氟甲基)苯基)丙酸乙酯盐酸盐(按照上述方法由3,5-双(三氟甲基)苯甲醛开始合成)(77.70mg,0.212mmol)的混合物溶解于DMF(2mL)和二氯甲烷(2mL)中,得到无色悬浮液。向上述反应混合物中加入固体1-羟基苯并三唑水合物(7.0mg,0.046mmol),并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(45.0μL,0.291mmol),并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜,真空蒸发溶剂,得到产物的无色胶状残余物:(3S)-3-(3,5-双(三氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量:m/z 620(M+H),和m/z 642(M+Na); C₂₆H₂₇F₆N₅O₆理论值:619.51。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0433] 步骤2

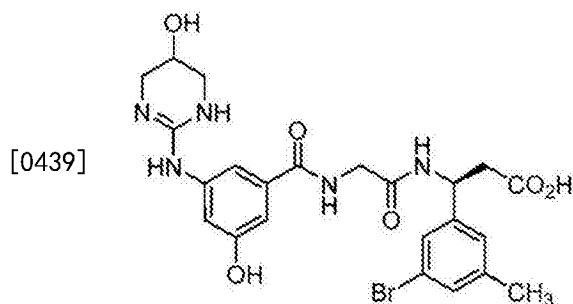
[0434] (3S)-3-[3,5-双(三氟甲基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基]丙酸的制备



[0436] 在室温下向来自以上步骤1的(3S)-3-(3,5-双(三氟甲基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯(0.212mmol)在1:1乙腈/水混合物的混合物(6mL)中的悬浮液中加入氢氧化锂一水合物(45.0mg, 1.072mmol),并将反应混合物在室温下搅拌1h。混合物用TFA(250μL,在5.0mL CH₃CN中)中和,并将混合物真空蒸发,得到无色胶状残余物。产物通过反相HPLC,使用含有0.05%TFA的梯度10%-60%CH₃CN水溶液纯化,冻干后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例10)(69.2mg,产率55%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量:m/z 592(M+H)和m/z 614(M+Na), C₂₄H₂₃F₆N₅O₆: 591.46。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆), δ2.83(d, J=7.34Hz, 2H, -CH₂-COOH), 3.15(d, J=12.23Hz, 2H), 3.33(brd, J=10.67Hz, 2H), 3.87(d, J=5.62Hz, 2H), 4.08(d, J=3.18Hz, 1H), 5.33(q, J=7.09Hz, 1H, -NH-CH-CH₂-COOH), 6.74(t, J=2.08Hz, 1H), 7.10(appt, 1H), 7.13(appt, 1H), 7.85-8.22(m, 4H), 8.48-8.93(m, 2H), 9.64(s, 1H), 10.02(brs, 1H), 12.45(brs, 1H, -COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例10所推荐结构一致。¹⁹F NMR(376MHz, DMSO-d₆): δ-61.14(S)和-73.73(S)。

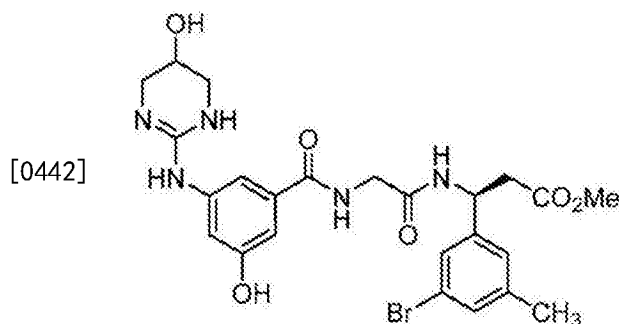
[0437] 实施例11

[0438] (3S)-3-[3-溴-5-甲基-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0440] 步骤1

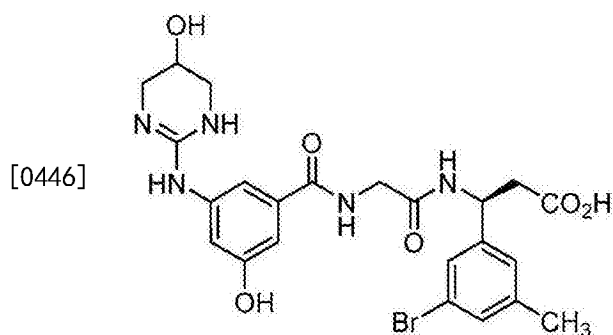
[0441] (3S)-3-[3-溴-5-甲基-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸甲酯的制备



[0443] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(94.70mg,0.307mmol), (3S)-3-氨基-3-(3-溴-5-甲基-苯基)丙酸甲酯盐酸盐(由3-溴-5-甲基苯甲醛开始按上述方法合成)(94.80mg, 0.307mmol)的混合物溶解于DMF(2mL)和二氯甲烷(2mL)中,得到奶油状悬浮液。将固体1-羟基苯并三唑水合物(10.20mg, 0.067mmol)加入到上述反应混合物中,并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min。加入 N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(70μL,0.452mmol)并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发,得到产物的无色胶状残余物:(3S)-3-[3-溴-5-甲基-苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸甲酯。所述粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量:m/z 562 ($^{79}\text{Br}+\text{H}$), m/z 564 ($^{81}\text{Br}+\text{H}$), m/z 584 ($^{79}\text{Br}+\text{M}+\text{Na}$)和m/z 586 ($^{81}\text{Br}+\text{M}+\text{Na}$), $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{BrN}_5\text{O}_6$ 理论值:562.41。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0444] 步骤2

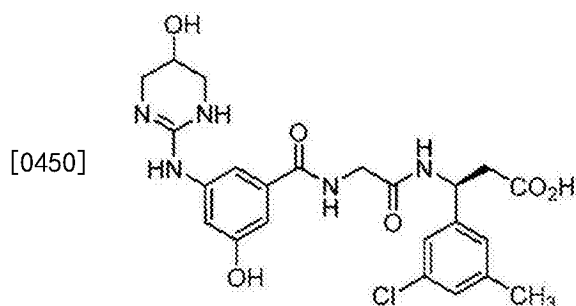
[0445] (3S)-3-[3-溴-5-甲基-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0447] 在室温下向粗((3S)-3-[3-溴-5-甲基-苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸甲酯(0.307mmol)在1:1乙腈/水混合物混合物(6mL)中的溶液中加入氢氧化锂一水合物(65mg,1.55mmol)并在室温下搅拌反应混合物1h,混合物用TFA(500 μ L,在5.0mL CH₃CN中)中和,并将混合物真空蒸发,得到无色胶状残余物。粗产物使用含有0.05%TFA的梯度10%-50%CH₃CN 水溶液,通过反相HPLC纯化,冻干后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例11)(105.3mg,产率62%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量:m/z 548 (⁷⁹BrM+H),m/z 550 (⁸¹BrM+H);C₂₃H₂₆BrN₅O₆理论值:548.39。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆): δ 2.28(s,3H,CH₃-),2.70(d,J=7.34Hz,2H,-CH₂-COOH),3.16(d,J=12.23Hz,2H),3.34(d,J=11.98Hz,2H),3.86(d,J=5.87Hz,2H),4.09(t,J=2.90Hz,1H),5.13(q,J=7.50Hz,1H,-NH-CH-CH₂-COOH),6.74(t,J=1.96Hz,1H),7.11(s,1H),7.14(appt,1H),7.28(appt,1H),7.31(appt,1H),8.13(brs,1H),8.13(brs,1H),8.48(d,J=8.31Hz,1H),8.61(t,J=5.87Hz,1H),9.64(s,1H),10.02(brs,1H),12.37(brs,1H,-COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例11所推荐结构一致。

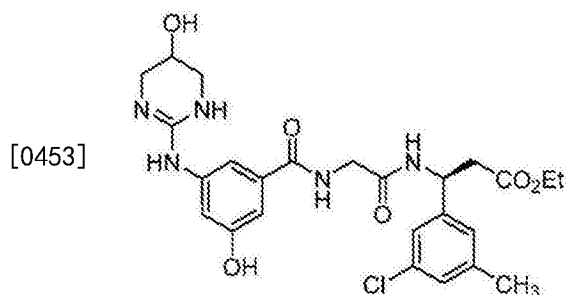
[0448] 实施例12

[0449] (3S)-3-[3-氯-5-甲基-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯的制备



[0451] 步骤1

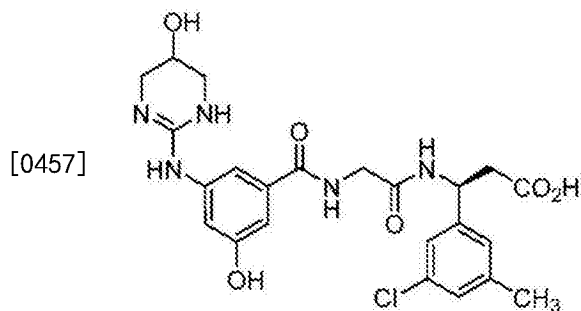
[0452] (3S) 3-(3-氯-5-甲基-苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯



[0454] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(81.80mg, 0.265mmol), (S)-3-氨基-3-(3-氯-5-甲基-苯基)丙酸乙酯盐酸盐(由3-氯-5-甲基苯甲醛开始,按照上述方法合成)(73.81mg, 0.265mmol)的混合物溶解于DMF(2mL)和二氯甲烷(2mL)中,得到奶油状悬浮液。将固体1-羟基苯并三唑水合物(8.4mg, 0.055mmol)加入到上述反应混合物中,并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(60μL, 0.390mmol),并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发,得到产物的无色胶状残余物:(3S)-3-[3-氯-5-甲基-苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 532 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 534 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 554 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$)和 m/z 556 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$), $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_5\text{O}_6$ 理论值:531.99。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0455] 步骤2

[0456] (3S)-3-[3-氯-5-甲基-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备

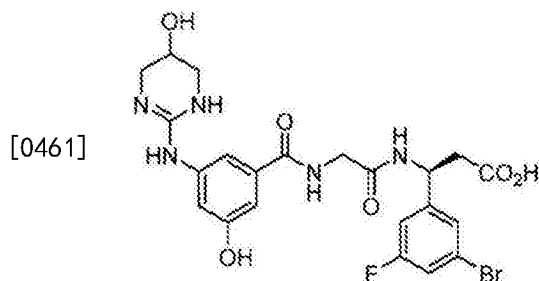


[0458] 在室温下向以上步骤1粗(3S)-3-[3-氯-5-甲基-苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯(0.265mmol)在乙腈/水的1:1混合物(6mL)中的溶液中室温加入锂氢氧化锂一水合物(56mg, 1.334mmol),并将反应混合物在室温下搅拌1h。用TFA(500μL, 5.0mL CH_3CN)中和混合物,将混合物真空蒸发,得到无色粘稠残余物。上述粗产物通过反相HPLC,使用含有0.05%TFA的梯度10%-50% CH_3CN 水溶液纯化,冻干后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例12)(89.4mg, 产率67%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 504 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 506 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 526 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$)和 m/z 528 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$); $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_6$ 理论值:503.94。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.29(s, 3H, CH_3), 2.70(d, $J=7.34\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 3.16(d, $J=11.98\text{Hz}$, 2H), 3.34(d, $J=11.00\text{Hz}$, 2H), 3.86(d, $J=5.87\text{Hz}$, 2H), 4.09(appt/m, 1H), 5.14(q, $J=7.25\text{Hz}$, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 6.74(t, $J=1.96\text{Hz}$, 1H), 7.11(d, $J=1.47\text{Hz}$, 2H), 7.14(t, 2H), 7.18(s, 1H), 8.14(brs, 2H), 8.48(d, $J=8.31\text{Hz}$, 1H), 8.61(t, $J=5.99\text{Hz}$,

1H), 9.67 (s, 1H), 10.03 (brs, 1H), 12.32 (brs, 1H, -COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例12所推荐结构一致。

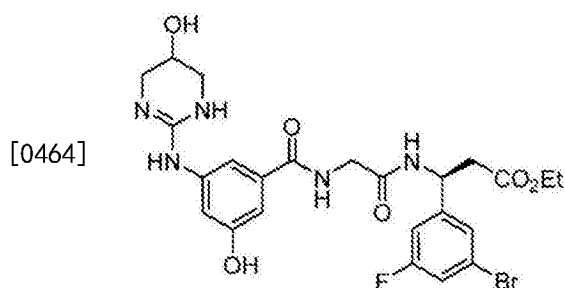
[0459] 实施例13

[0460] (3S)-3-[3-溴-5-氟-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-5-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0462] 步骤1

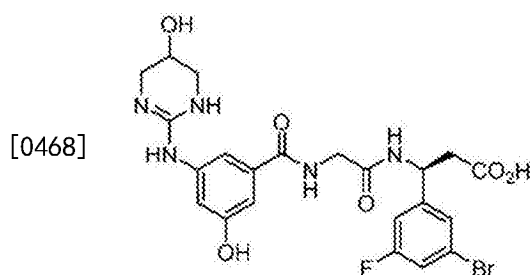
[0463] (3S)-3-[3-溴-5-氟-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯的制备



[0465] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(79.50mg, 0.258mmol), (3S)-3-氨基-3-(3-溴-5-氟-苯基)丙酸乙酯盐酸盐(根据上述方法从3-溴-5-氟苯甲醛开始合成)(84.22mg, 0.258mmol)的混合物溶解于DMF(2mL)和二氯甲烷(2mL)中,得到奶油状悬浮液。向上述反应混合物中加入固体1-羟基苯并三唑水合物(8.0mg, 0.052mmol),并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(60μL, 0.387mmol),并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发,得到产物的无色胶状残余物:(3S)-3-[3-溴-5-氟-苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量:m/z 580 (⁷⁹BrM+H), m/z 582 (⁸¹BrM+H), m/z 602 (⁷⁹BrM+Na), 和m/z 604 (⁸¹BrM+Na), C₂₄H₂₇BrFN₅O₆理论值:580.40。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0466] 步骤2

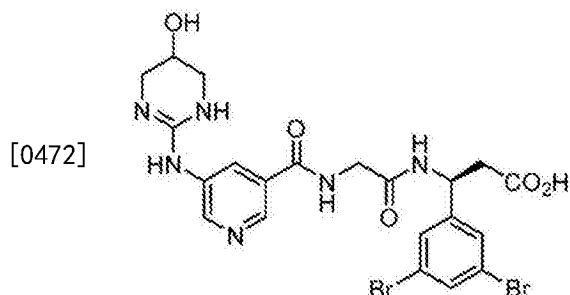
[0467] (3S)-3-[3-溴-5-氟-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0469] 在室温下向来自以上步骤1的粗(3S)-3-[3-溴-5-氟-苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯(0.258mmol)在乙腈/水的1:1混合物(6mL)中的溶液中加入氢氧化锂一水合物(55mg, 1.32mmol),并将反应混合物在室温下搅拌过夜。将混合物用TFA(250 μ L,在5.0mL CH₃CN中)中和,并将混合物真空蒸发,得到无色胶状残余物。上述粗产物通过反相HPLC,使用含有0.05%TFA的梯度10%-50%CH₃CN水溶液纯化,冻干后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例13)(110.3mg,产率77%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量:m/z 552 (⁷⁹BrM+H),和m/z 554 (⁸¹BrM+H); C₂₂H₂₃BrFN₅O₆理论值:552.35。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆): δ 2.74(d,J=7.58Hz,2H,-CH₂-COOH),3.16(d,J=12.23Hz,2H),3.34(d,J=10.80Hz,2H),3.87(d,J=5.87Hz,2H),4.08(t,J=3.18Hz,1H),5.17(q,J=7.34Hz,1H,-NH-CH-CH₂-COOH),6.75(t,J=1.96Hz,1H),7.11(t,J=1.47Hz,1H),7.14(appt,1H),7.21(t,J=1.71Hz,1H),7.24(appt,1H),7.41(m,2H),8.13(brs,1H),8.53(d,J=8.07Hz,1H),8.64(t,J=5.75Hz,1H),9.66(brs,1H),10.03(brs,1H),12.40(brs,1H,-COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例13所推荐结构一致。¹⁹F NMR(376MHz,DMSO-d₆): δ -74.07(S)和-110.57(t,J=8.85Hz)。

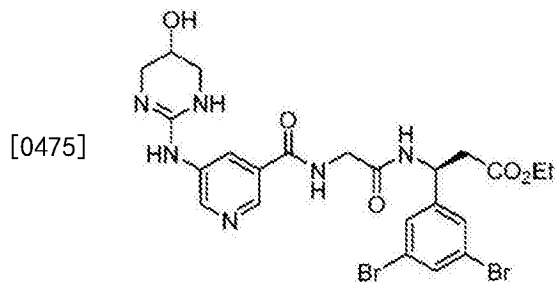
[0470] 实施例14

[0471] (3S)-3-(3,5-二溴苯基)-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸的制备



[0473] 步骤1

[0474] (3S)-3-(3,5-二溴苯基)-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯的制备

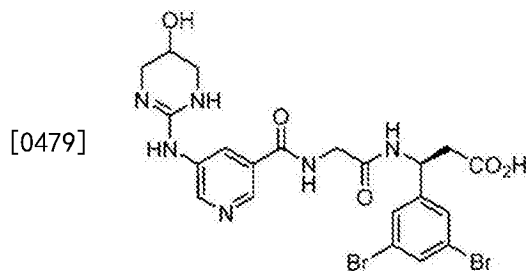


[0476] 将2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酸(实施例D)(78.0mg,0.266mmol),(3S)-3-氨基-3-(3,5-二溴苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例J的(S)酯)(103.06mg,0.266mmol)和1-将羟基苯并三唑水合物(8.15mg,0.053mmol)溶于DMF(2mL)和二氯甲烷(2mL)中,并在室温氮气氛围下搅拌10min,而得到奶油状悬浮液。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(60.0 μ L,0.387mmol)并将反应混合物在室温下在氮气氛围下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发,得到中间产物的无色结晶固体:(3S)-3-[3,5-二溴苯基]-3-[[2-

[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 625 ($^{79}\text{Br}, ^{79}\text{Br}\text{M}+\text{H}$), m/z 627 ($^{79}\text{Br}, ^{81}\text{Br}\text{M}+\text{H}$), m/z 629, ($^{81}\text{Br}, ^{81}\text{Br}\text{M}+\text{H}$), m/z 647 ($^{79}\text{Br}, ^{79}\text{Br}\text{M}+\text{Na}$), m/z 649 ($^{79}\text{Br}, ^{81}\text{Br}\text{M}+\text{Na}$) 和 m/z 651 ($^{81}\text{Br}, ^{81}\text{Br}\text{M}+\text{Na}$); $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_5$:626.30。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0477] 步骤2

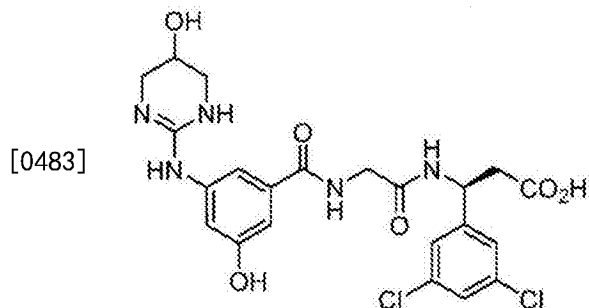
[0478] (3S)-3-(3,5-二溴苯基)-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸的制备



[0480] 向来自以上步骤1的(3S)-3-[3,5-二溴苯基]-3-[[2-[[5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基]吡啶-3-羰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯 (0.266mmol) 在乙腈/水的1:1混合物(6mL)中的悬浮液中加入氢氧化锂一水合物(56.0mg, 1.334mmol), 并将反应混合物在室温下搅拌1h。将反应混合物用TFA(250 μL , 在5mL CH_3CN 中)中和, 并将混合物真空蒸发, 得到无色结晶/胶状固体。粗产物通过反相HPLC, 使用含有 0.05% TFA的梯度10%-50% CH_3CN 水溶液纯化, 在冷冻干燥后得到期望的产物, 为无色冻干固体(实施例14) (82.5mg, 产率52%)。产物的LC/MS 分析示出了期望产物的质量: m/z 597 ($^{79}\text{Br}, ^{79}\text{Br}\text{M}+\text{H}$), m/z 599 ($^{79}\text{Br}, ^{81}\text{Br}\text{M}+\text{H}$), 和 m/z 601 ($^{81}\text{Br}, ^{81}\text{Br}\text{M}+\text{H}$)。 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_5$ 理论值:598.24。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.74 (d, $J=7.34\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 3.17 (d, $J=12.23\text{Hz}$, 2H), 3.36 (d, $J=11.0\text{Hz}$, 2H), 3.93 (d, $J=5.62\text{Hz}$, 2H), 4.11 (t, $J=3.06\text{Hz}$, 1H), 5.15 (q, $J=7.42\text{Hz}$, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 7.57 (d, $J=1.71\text{Hz}$, 1H), 7.72 (s, 1H), 8.03 (t, $J=2.20\text{Hz}$, 1H), 8.42 (brs, 1H), 8.59 (m, 2H), 8.90 (d, $J=1.71\text{Hz}$, 1H), 9.03 (t, $J=5.75\text{Hz}$, 1H), 9.88 (s, 1H), 12.42 (brs, 1H, $-\text{COOH}$)。产物的 ^1H NMR谱与实施例14所推荐结构一致。

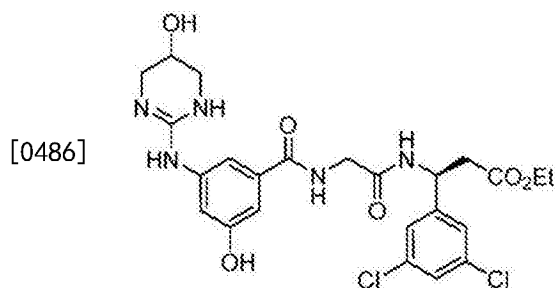
[0481] 实施例15

[0482] (3S)-3-[3,5-二氯-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基) 苯甲酰胺基) 乙酰胺基) 丙酸的制备



[0484] 步骤1

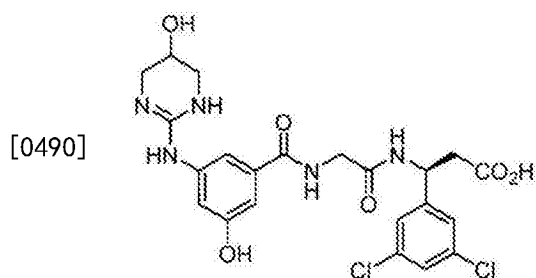
[0485] (3S) 3-(3,5-二氯苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基) 氨基) 苯甲酰胺基) 乙酰胺基) 丙酸乙酯的制备



[0487] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(87.0mg,0.282mmol),(3S)-3-氨基-3-(3,5-二氯苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例I)(84.26mg,0.282mmol)的混合物溶解于DMF(2mL)和二氯甲烷(2mL)中,得到奶油状悬浮液。将固体1-羟基苯并三唑水合物(9.0mg,0.059mmol)加入到上述反应混合物中,并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(65μL,0.420mmol)并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发,得到产物的无色胶状残余物:(3S)-[3-[3,5-二氯苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 552 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 554 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 574 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$)和 m/z 576 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$), $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_6$ 理论值:552.41。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0488] 步骤2

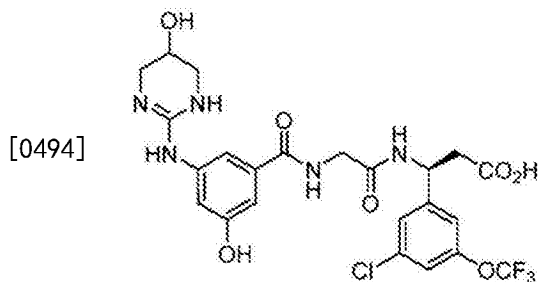
[0489] (3S)-3-[3,5-二氯-苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0491] 在室温下向来自以上步骤1的粗(3S)-3-[3,5-二氯苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯(0.282mmol)在乙腈/水的1:1混合物(6mL)的混合物中的溶液中加入氢氧化锂一水合物(60mg,1.43mmol),并将反应混合物在室温下搅拌2h。用TFA(100μL,在5.0mL CH_3CN 中)中和混合物,将混合物真空蒸发,得到无色粘稠的残余物。上述粗产物通过反相HPLC,使用含有0.05%TFA的梯度10%-50% CH_3CN 水溶液纯化,冻干后得到期望的产物,为无色冻干固体(实施例15)(101.2mg,产率68%)。所述产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 524 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$),和 m/z 526 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$); $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_6$ 理论值:524.35。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.75(d, $J=7.34\text{Hz}$,2H,- CH_2-COOH),3.16(brd, $J=11.98\text{Hz}$,2H),3.33(brd, $J=12.23\text{Hz}$,2H),3.87(d, $J=5.87\text{Hz}$,2H),4.08(brs,1H),5.15(q, $J=7.17\text{Hz}$,1H,-NH-CH- CH_2-COOH),6.75(t, $J=2.08\text{Hz}$,1H),7.11(appt,1H),7.14(appt,1H),7.40(d, $J=1.96\text{Hz}$,1H),7.49(appt,1H),8.12(s,2H),8.54(d, $J=8.07\text{Hz}$,1H),8.64(t, $J=5.87\text{Hz}$,1H),9.64(s,1H),10.02(brs,1H),12.40(brs,1H,-COOH)。产物的 ^1H NMR谱与实施例15所推荐结构一致。

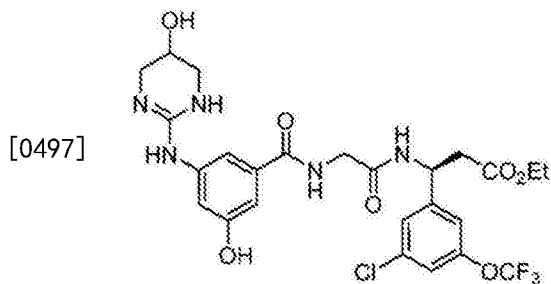
[0492] 实施例16

[0493] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0495] 步骤1

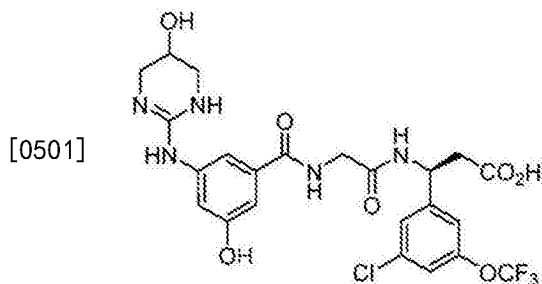
[0496] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯的制备



[0498] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸(实施例B)(61.0mg,0.198mmol), (3S)-3-氨基-3-(3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基)丙酸乙酯盐酸盐(实施例G)(68.89mg,0.198mmol)的混合物溶解于DMF(2mL)和二氯甲烷(2mL)中,得到奶油状悬浮液。将固体1-羟基苯并三唑水合物(6.1mg,0.040mmol)加入到上述反应混合物中,并将反应混合物在氮气氛下搅拌10min。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺(46μL,0.297mmol)并将反应混合物在室温氮气氛下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发,得到产物的奶油胶状残余物:(3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产物的质量: m/z 602 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 604 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 624 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$) 和 m/z 626 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$), $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}_7$ 理论值:601.96。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0499] 步骤2

[0500] (3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备

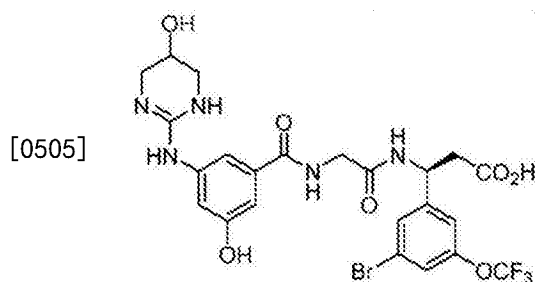


[0502] 在室温下向来自以上步骤1的粗(3S)-3-[3-氯-5-(三氟甲氧基)苯基]-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰基]氨基]乙酰基]氨基]丙

酸乙酯 (0.198mmol) 在乙腈/水的1:1混合物 (6mL) 中的溶液中加入氢氧化锂一水合物 (42mg, 1.10mmol), 并将反应混合物在室温下搅拌1h。用TFA (100 μ L, 在5.0mL CH₃CN中) 中和所述混合物, 将混合物真空蒸发, 得到无色粘稠的残余物。上述粗产物通过反相HPLC, 使用含有0.05% TFA的梯度10%-70% CH₃CN水溶液纯化, 在冷冻干燥后得到期望的产物, 为无色冻干固体 (实施例16) (69.50mg, 产率61%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量: m/z 574 ($^{35}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 576 ($^{37}\text{ClM}+\text{H}$), m/z 596 ($^{35}\text{ClM}+\text{Na}$) 和 m/z 598 ($^{37}\text{ClM}+\text{Na}$), C₂₃H₂₃ClF₃N₅O₇ 理论值: 573.91。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 2.76 (d, J=7.34Hz, 2H, -CH₂-COOH), 3.17 (d, J=12.47Hz, 2H), 3.34 (d, J=12.72Hz, 2H), 3.88 (d, J=5.87Hz, 2H), 4.09 (t, J=3.20Hz, 1H), 5.21 (q, J=7.17Hz, 1H, -NH-CH-CH₂-COOH), 6.76 (t, J=2.08Hz, 1H), 7.12 (t, J=1.59Hz, 1H), 7.14 (t, J=1.00Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.45 (d, J=0.73Hz, 1H), 7.49 (t, J=1.47Hz, 1H), 8.13 (brs, 1H), 8.58 (d, J=7.82Hz, 1H), 8.65 (t, J=5.87Hz, 1H), 9.64 (s, 1H), 10.03 (brs, 1H), 12.44 (brs, 1H, -COOH)。产物的¹H NMR谱与实施例16所推荐结构一致。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆): δ -56.83 (S) 和 -73.70 (S)。

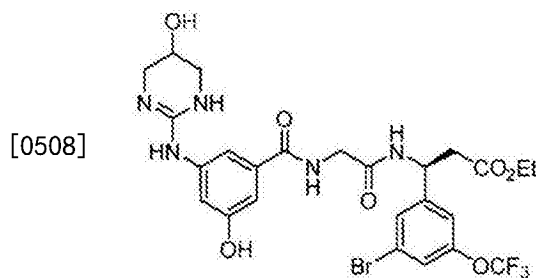
[0503] 实施例17

[0504] (3S)-3-(3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0506] 步骤1

[0507] (3S)-3-(3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸乙酯

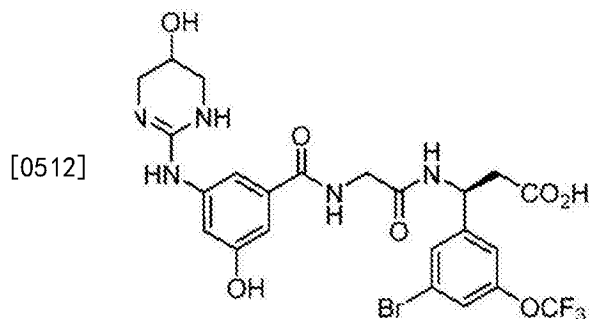


[0509] 将2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酸 (实施例B) (65.0mg, 0.211mmol), (S)-3-氨基-3-(3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基)丙酸乙酯盐酸盐 (实施例H) (82.75mg, 0.211mmol) 的混合物溶解于DMF (2mL) 和二氯甲烷 (2mL) 中, 获得无色悬浮液。向上述反应混合物中加入固体1-羟基苯并三唑水合物 (7.0mg, 0.046mmol), 并将反应混合物在氮气氛围下搅拌10min。加入N,N'-二异丙基碳二酰亚胺 (50 μ L, 0.323mmol) 并将反应混合物在室温氮气氛围下搅拌过夜。将溶剂真空蒸发, 得到产物的奶油状胶质残余物: (3S)-[3-(3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基)-3-[[2-[[3-羟基-5-[(5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基]苯甲酰胺基]氨基]乙酰基]氨基]丙酸乙酯。粗残余物的LC-MS分析示出了期望产

物的质量： m/z 646 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$)， m/z 648 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$)， m/z 668 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$) 和 m/z 670 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$)， $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{BrF}_3\text{N}_5\text{O}_7$ 理论值：646.41。粗残余物原样用于步骤2中的皂化反应。

[0510] 步骤2

[0511] (3S)-3-(3-溴-5-(三氟甲氧基)苯基)-3-(2-(3-羟基-5-((5-羟基-1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)氨基)苯甲酰胺基)乙酰胺基)丙酸的制备



[0513] 在室温下向来自上述步骤1的粗产物(0.211mmol)在乙腈/水的1:1 混合物(6mL)中的溶液中室温下加入氢氧化锂一水合物(48mg, 1.144mmol)，并将反应混合物在室温下搅拌1h。用TFA(0.1mL, 在5.0mL CH_3CN 中)中和混合物，并将混合物真空蒸发，得到无色粘稠残余物。上述粗产物通过反相HPLC，使用含有0.05%TFA的梯度10%-70% CH_3CN 水溶液纯化，在冷冻干燥后得到期望的产物，为无色冻干固体(实施例17) (83.2mg, 产率64%)。产物的LC/MS分析示出了期望产物的质量： m/z 618 ($^{79}\text{BrM}+\text{H}$)， m/z 620 ($^{81}\text{BrM}+\text{H}$)， m/z 640 ($^{79}\text{BrM}+\text{Na}$) 和 m/z 642 ($^{81}\text{BrM}+\text{Na}$)， $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{BrF}_3\text{N}_5\text{O}_7$: 618.36。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.75 (d, $J=7.09\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 3.16 (d, $J=12.23\text{Hz}$, 2H), 3.33 (d, $J=11.25\text{Hz}$, 2H), 3.87 (d, $J=5.87\text{Hz}$, 2H), 4.08 (t, $J=3.20\text{Hz}$, 1H), 5.19 (q, $J=7.42\text{Hz}$, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 6.75 (t, $J=1.96\text{Hz}$, 1H), 7.11 (appt, 1H), 7.14 (t, $J=1.70\text{Hz}$, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 8.12 (brs, 1H), 8.58 (d, $J=7.82\text{Hz}$, 1H), 8.64 (t, $J=5.87\text{Hz}$, 1H), 9.63 (brs, 1H), 10.02 (brs, 1H), 12.42 (brs, 1H, $-\text{COOH}$)。产物的 ^1H NMR谱与实施例17所推荐结构一致。 ^{19}F NMR(376MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -56.81 (S) 和 -73.81 (S)。

[0514] C. 生物分析测试结果

[0515] 在以下分析测试和实验研究中测试了本公开的化合物和对照化合物的活性。结果呈现在表2、3和4以及图1中。

[0516] 1. 用于 $\alpha 5\beta 1$ 功能的固相受体分析测试 (SPRA)

[0517] 将在TBS+缓冲液(25mM Tris pH 7.4, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 1mM MnCl_2)中稀释至2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化的人纤连蛋白(R&D Systems, 1918-FN)加入到96孔半孔透明微量滴定板(Greiner 675061)的孔(50 μL /孔)中并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。将孔用150 μL TBS+洗涤3次，并加入150 μL 封闭缓冲液(TBS+具有1%牛血清白蛋白, Sigma A7906)。将孔板在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h，而随后用TBS+缓冲液洗涤3次。在TBS+具有0.1%牛血清白蛋白中将重组人整合素 $\alpha 5\beta 1$ (R&D Systems, 3230-A5)稀释至0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将化合物按照1:100稀释到整合素溶液中，并随后根据标准模板将50 μL 添加到洗涤过的涂覆有纤连蛋白的孔板的空孔中，每个样品重复三次。在室温下孵育2h后，将孔板用150 μL 的TBS+缓冲液洗涤3次。向每个孔中加入50 μL 在TBS+/0.1%BSA中的0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生物素化抗- $\alpha 5$ 抗体(R&D Systems, BAF1864)，并盖上孔板并在室温下孵育1h。用150 μL TBS+缓冲液洗涤孔板3次后，

将50 μ L在 TBS+封闭缓冲液中稀释的缀合链霉亲和素的辣根过氧化物酶(R&D Systems, DY998)加入到孔中,并将孔板在室温孵育20min。将孔板用 TBS+缓冲液洗涤3次,然后向每个孔中加入50 μ L室温TMB底物(Sigma, T444),并将孔板在室温下孵育20min。使用Tecan Safire II读板仪在650nm 波长下通过比色检测进行读板。通过非线性回归(最佳拟合)分析构建浓度-响应曲线,并且计算每个化合物的IC₅₀值。

[0518] 2.用于 α v β 1功能的固相受体分析测试 (SPRA)

[0519] 将在TBS+缓冲液(25mM Tris pH 7.4,137mM NaCl,2.7mM KCl, 1mM CaCl₂,1mM MgCl₂,1mM MnCl₂)中稀释至5 μ g/mL的纯化的人纤连蛋白(R&D Systems,1918-FN)加入至96-孔半孔透明微量滴定板(Greiner 675061)的孔(50 μ L/孔)中,并在4℃下孵育过夜。将孔用150 μ L TBS+洗涤3次,并加入150 μ L封闭缓冲液(TBS+具有1%牛血清白蛋白,Sigma A7906)。将孔板在37℃下孵育1h,并随后用TBS+缓冲液洗涤3次。在TBS+/0.1%牛血清白蛋白中将重组人整合素 α v β 1(R&D Systems,6579-AV)稀释至2.0 μ g/mL。将化合物按照1:100稀释到整合素溶液中,并根据标准模板将50 μ L添加到洗涤过的涂覆有纤连蛋白的孔板的空孔中,每个样品重复三次。在室温下孵育2h后,将孔板用150 μ L TBS +缓冲液洗涤3次。向每个孔中加入50 μ L在TBS+/0.1%BSA中的1 μ g/mL 的生物素化抗- α v抗体(R&D Systems, BAF1219),盖上孔板并在室温下孵育1h。用150 μ L TBS+缓冲液洗涤孔板3次后,将50 μ L在TBS+封闭缓冲液中稀释的缀合链霉亲和素的辣根过氧化物酶(R&D Systems, DY998)加入到孔中,并将孔板在室温孵育20min。将孔板用TBS+缓冲液洗涤3次,然后向每个孔中加入50 μ L的TMB底物(Sigma,T4444),并将孔板在室温下孵育20min。使用Tecan Safire II读板仪在650nm波长下通过比色检测进行读板。通过非线性回归(最佳拟合)分析构建浓度- 响应曲线,并且计算每个化合物的IC₅₀值。

[0520] 3.用于 α v β 3功能的固相受体分析测试 (SPRA)

[0521] 在TBS+缓冲液(25mM Tris pH 7.4,137mM NaCl,2.7mM KCl,1mM CaCl₂,1mM MgCl₂,1mM MnCl₂)中稀释至1 μ g/mL的重组人玻连蛋白(R &D Systems,2308-VN)加入到96-孔半孔透明微量滴定板(Greiner 675061)的孔(50 μ L/孔)中,并在4℃下孵育过夜。将孔用150 μ L TBS+ 洗涤3次,并加入150 μ L封闭缓冲液(TBS+具有1%牛血清白蛋白,Sigma A7906)。将孔板在37℃下孵育1h,然后用TBS+缓冲液洗涤3次。在 TBS+/0.1%牛血清白蛋白中将重组人类整合素 α v β 3(R&D Systems, 3050-AV)稀释至1 μ g/mL。将化合物以1:100稀释到整合素溶液中,然后根据标准模板将50 μ L添加到洗涤过的涂覆有玻连蛋白的孔板的空孔中,每个样品重复三次。在室温下孵育2h后,将孔板用150 μ L的TBS+缓冲液洗涤3次。向每个孔中加入50 μ L在TBS+/0.1%BSA中的0.5 μ g/mL的生物素化抗- α v抗体(R&D Systems, BAF1219),盖上孔板并在室温下孵育1h。用150 μ L TBS+缓冲液洗涤孔板3次后,将50 μ L在TBS+封闭缓冲液中稀释的缀合链霉亲和素的辣根过氧化物酶(R&D Systems,DY998) 加入到孔中,并将孔板在室温孵育20min。用TBS+缓冲液洗涤板3次,然后向每个孔中加入50 μ L的TMB底物(Sigma,T4444),并将孔板在室温下孵育20min。使用Tecan Safire II读板仪在650nm波长下通过比色检测进行读板。通过非线性回归(最佳拟合)分析构建浓度-响应曲线,并且计算每个化合物的IC₅₀值。

[0522] 4.用于 α v β 5功能的固相受体分析测试 (SPRA)

[0523] 将在TBS+缓冲液(25mM Tris pH 7.4,137mM NaCl,2.7mM KCl, 1mM CaCl₂,1mM

MgCl₂, 1mM MnCl₂) 中 0.25μg/mL 的重组人玻连蛋白 (R&D Systems, 2308-VN) 加入到 96-孔半孔透明微量滴定板 (Greiner 675061) 的孔 (50μL/孔) 中, 并在 4℃ 下孵育过夜。将孔用 150μL TBS+ 洗涤 3 次, 并加入 150μL 封闭缓冲液 (TBS+ 具有 1% 牛血清白蛋白, Sigma A7906)。将孔板在 37℃ 下孵育 1h, 然后用 TBS+ 缓冲液洗涤 3 次。在 TBS+/0.1% 牛血清白蛋白中将重组人类整合素 αvβ5 (R&D Systems, 2528-AV) 稀释至 0.1μg/mL。将化合物以 1:100 稀释到整合素溶液中, 然后根据标准模板将 50μL 添加到洗涤过的涂覆有玻连蛋白的孔板的空孔中, 每个样品重复三次。在室温下孵育 2h 后, 将孔板用 150μL 的 TBS+ 缓冲液洗涤 3 次。向每个孔中加入 50μL 在 TBS+/0.1% BSA 中的 0.5μg/mL 的生物素化抗-αv 抗体 (R&D Systems, BAF1219), 盖上孔板并在室温下孵育 1h。用 150μL TBS+ 缓冲液洗涤孔板 3 次后, 将 50μL 在 TBS+ 封闭缓冲液中稀释的缀合链霉亲和素的辣根过氧化物酶 (R&D Systems, DY998) 加入到孔中, 并将孔板在室温孵育 20min。用 TBS+ 缓冲液洗涤板 3 次, 然后向每个孔中加入 50μL 的 TMB 底物 (Sigma, T4444), 并将孔板在室温下孵育 20min。使用 Tecan Safire II 读板仪在 650nm 波长下通过比色检测进行读板。通过非线性回归 (最佳拟合) 分析构建浓度-响应曲线, 并且计算每个化合物的 IC₅₀ 值。

[0524] 5. 用于 αvβ6 功能的固相受体分析测试 (SPRA)

[0525] 将在 TBS+ 缓冲液 (25mM Tris pH 7.4, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂) 中稀释至 0.25μg/mL 的重组人 LAP (R&D Systems, 246-LP) 加入到 96-孔半孔透明微量滴定板 (Greiner 675061) 的孔 (50μL/孔) 中, 并在 4℃ 下孵育过夜。将孔用 150μL TBS+ 洗涤 3 次, 并加入 150μL 封闭缓冲液 (TBS+ 具有 1% 牛血清白蛋白, Sigma A7906)。将孔板在 37℃ 下孵育 1h, 然后用 TBS+ 缓冲液洗涤 3 次。在 TBS+/0.1% 牛血清白蛋白中将重组人类整合素 αvβ6 (R&D Systems, 3817-AV) 稀释至 0.1μg/mL。将化合物以 1:100 稀释到整合素溶液中, 然后根据标准模板将 50μL 添加到洗涤过的涂覆有 LAP 的孔板的空孔中, 每个样品重复三次。在室温下孵育 2h 后, 将孔板用 150μL 的 TBS+ 缓冲液洗涤 3 次。向每个孔中加入 50μL 在 TBS+/0.1% BSA 中的 0.5μg/mL 的生物素化抗-αv 抗体 (R&D Systems, BAF1219), 盖上孔板并在室温下孵育 1h。用 150μL TBS+ 缓冲液洗涤孔板 3 次后, 将 50μL 在 TBS+ 封闭缓冲液中稀释的缀合链霉亲和素的辣根过氧化物酶 (R&D Systems, DY998) 加入到孔中, 并将孔板在室温孵育 20min。用 TBS+ 缓冲液洗涤板 3 次, 然后向每个孔中加入 50μL 的 TMB 底物 (Sigma, T4444), 并将孔板在室温下孵育 20min。使用 Tecan Safire II 读板仪在 650nm 波长下通过比色检测进行读板。通过非线性回归 (最佳拟合) 分析构建浓度-响应曲线, 并且计算每个化合物的 IC₅₀ 值。

[0526] 6. 用于 αvβ8 功能的固相受体分析测试 (SPRA)

[0527] 将在 TBS+ 缓冲液 (25mM Tris pH 7.4, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂) 中稀释至 0.5μg/mL 的重组人 LAP 蛋白 (R&D Systems, 246-LP) 加入到 96-孔半孔透明微量滴定板 (Greiner 675061) 的孔 (50μL/孔) 中, 并在 4℃ 下孵育过夜。将孔用 150μL TBS+ 洗涤 3 次, 并加入 150μL 封闭缓冲液 (TBS+ 具有 1% 牛血清白蛋白, Sigma A7906)。将孔板在 37℃ 下孵育 1h, 然后用 TBS+ 缓冲液洗涤 3 次。在 TBS+/0.1% 牛血清白蛋白中将重组人类整合素 αvβ8 (R&D Systems, 4135-AV) 稀释至 0.1μg/mL。将化合物以 1:100 稀释到整合素溶液中, 然后根据标准模板将 50μL 添加到洗涤过的涂覆有 LAP 的孔板的空孔中, 每个样品重复三次。在室温下孵育 2h 后, 将孔板用 150μL 的 TBS+ 缓冲液洗涤 3 次。向每个孔中

加入50 μ L在TBS+/0.1%BSA中的1 μ g/mL的生物素化抗- α v抗体(R&D Systems,BAF1219),盖上孔板并在室温下孵育 1h。用150 μ L TBS+缓冲液洗涤孔板3次后,将50 μ L在TBS+封闭缓冲液中稀释的缀合链霉亲和素的辣根过氧化物酶(R&D Systems,DY998)加入到孔中,并将孔板在室温孵育20min。用TBS+缓冲液洗涤板3次,然后向每个孔中加入50 μ L的TMB底物(Sigma,T4444),并将所述孔板在室温下孵育20min。使用Tecan Safire II读板仪在650nm波长下通过比色检测进行读板。通过非线性回归(最佳拟合)分析构建浓度-响应曲线,并且计算每个化合物的IC₅₀值。

[0528] 7.用于 α 8 β 1功能的固相受体分析测试(SPRA)

[0529] 将在TBS+缓冲液(25mM Tris pH 7.4,137mM NaCl,2.7mM KCl, 1mM CaCl₂,1mM MgCl₂,1mM MnCl₂)中稀释至1 μ g/mL的重组小鼠肾连蛋白蛋白质(R&D Systems,Inc,4298-NP)加入到96-孔半孔透明微量滴定板(Greiner 675061)的孔(50 μ L/孔)中,并在4℃下孵育过夜。将孔用150 μ L TBS+洗涤3次,并加入150 μ L封闭缓冲液(TBS+具有1%牛血清白蛋白, Sigma A7906)。将孔板在37℃孵育1h,并随后用TBS+ 洗涤3次。在TBS+/0.1%牛血清白蛋白中将重组人类整合素 α 8 β 1(R&D Systems,预发射(pre-launch))稀释至0.25 μ g/mL。将化合物以1:100稀释到整合素溶液中,并根据标准模板将50 μ L添加到洗涤过的涂覆有小鼠肾连蛋白的孔板的空孔中,每个样品重复三次。在室温下孵育2h后,将孔板用150 μ L TBS+洗涤3次。向每个孔中添加50 μ L在TBS+/0.1%BSA 中的0.5 μ g/mL的生物素化抗- β 1抗体(R&D Systems,BAF1778),并盖上孔板并在室温下孵育1h。在用150 μ L TBS+缓冲液洗涤板3次后,将50 μ L 在TBS+封闭缓冲液中稀释的缀合链霉亲和素蛋白的辣根过氧化物酶(R&D Systems,DY998)加入到孔中,并将孔板在室温下孵育20min。将孔板用TBS+洗涤3次,然后向每个孔中加入50 μ L TMB底物(Sigma T4444),并将孔板在室温下孵育20min。使用Tecan Safire II读板仪在 650nm波长下通过比色检测进行读板。通过非线性回归(最佳拟合)分析构建浓度-响应曲线,并计算每个化合物的IC₅₀值。

[0530] D.药代动力学分析

[0531] 1.材料

[0532] 向每个测试化合物中加入最小足量体积的二甲基亚砜(DMSO)以实现溶解。对于静脉内(IV)递送,随后将化合物配制成甘油缩甲醛溶液:盐水(20:80或40:60v/v)(Sigma Chemicals,St.Louis)。对于口服(P0)给药,化合物用0.5%甲基纤维素配制。将五至六种化合物溶液组合到IV 和P0盒式给药的单一混合溶液,而最终DMSO浓度对于IV和P0盒分别<0.6%或<1.2%。使用LC/MS/MS(液相色谱/质谱)系统在测试样品中检测分析物,该系统由LC-20AD泵(Shimadzu,Kyoto,Japan),HTC PAL 自动取样器(Leap technologies, Carrboro,N.C.)和ESI模式的Sciex API-4000质谱仪(AB Sciex,Foster City,CA.)组成。Amour C₁₈反相柱 (Analytical Sales and Services,Pompton Plains,N.J.)用于色谱分离。

[0533] 2.实验方案

[0534] 在圣路易斯大学进行的药代动力学(PK)研究使用了初始体重为200 至220g的雄性Sprague-Dawley大鼠。用以下化合物进行IV PK研究:实施例1-3和5-17以及对照化合物C12-C18,C29和C30。动物允许自由获取食物和水。将大鼠单独地安置并连接到颈静脉导管。每个盒式制剂被静脉注射给药于两只大鼠(1mL/kg体重)。每个盒式制剂含有在20:80或40/

60 甘油缩甲醛/盐水 (v/v) 中 1mg/kg 的 5-6 种化合物。在给药后 0.017, 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 6 和 24h 通过导管手动收集血液到肝素锂管中。在实验结束时将动物用 CO₂ 安乐死。

[0535] 用以下化合物进行口服 PK 研究: 实施例 1-3 和 5-17 以及对照化合物 C12, C14-16 和 C29-30。P0 盒式制剂按照每个盒含 5-6 个化合物通过口服灌胃给药于两只大鼠 (10mL/kg 体重)。口服剂量以在 0.5% 甲基纤维素中 2mg/kg/化合物给药。给药后 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 和 24h 的采血时间点采血至肝素锂管。在实验结束时将动物用 CO₂ 安乐死。

[0536] 向所有样品中按照 200ng/mL (最终) 加入内标, 以及 150μL 乙腈。将血浆样品 (总体积 50μL) 酌情用对照初始大鼠 (空白大鼠, naive rat) 血浆稀释以使样品测量值进入标准曲线的线性动态范围。将样品加盖并在多板涡旋器上混合 5min, 并在 3200rpm 下离心 5min。将上清液转移至 96-孔样品板上并加盖以进行 LC/MS/MS 分析。优化化合物并监测它们各自的 MRM 跃迁。流动相由 0.1% 甲酸 (水相) 和 100% 乙腈 (有机相) 组成, Amour C₁₈ 反相柱 (2.1 × 30mm, 5微米) 以 0.35mL/min 的流速。起始相为 0.9min 的 10% 乙腈, 然后在 0.4min 内增加至 90% 乙腈, 再保持 0.2min, 然后在 0.4min 内返回至 10% 乙腈。10% 乙腈再保持 1.6min。使用 Analyst 1.5.1 (AB Sciex, Foster City, CA) 对峰面积积分。

[0537] 通过 PRESCOS, LLC (San Diego, CA) 对对照化合物 C19-C28 进行类似的大鼠 PK 研究。使用初始体重为 195 至 220g 的雌性 Sprague-Dawley 大鼠。将在 40/60 甘油缩甲醛/盐水中具有 1mg/kg/化合物的盒式制剂静脉注射给药于三只大鼠。每只动物的给药剂量为 5mL/kg 体重。在给药后 0.017, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 和 8h 通过颈静脉导管将血液样品收集到 K2EDTA 管中。在实验结束时用 CO₂ 对动物安乐死。样品处理和通过 LC/MS/MS 的化合物测量由 HT Laboratories (San Diego, CA) 完成。

[0538] 表 3A-对照化合物的整合素分析测试结果

[0539]

	$\alpha 5 \beta 1$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha 8 \beta 1$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v \beta 1$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v \beta 3$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v \beta 5$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v \beta 6$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v \beta 8$ SPRA IC ₅₀ (nM)
对照化合物							
C1	16 ± 9	8 ± 2	17 ± 2	5 ± 2	3 ± 1	2 ± 1	3 ± 2
C2	8	3 ± 0	5	3	0.4	>1000	5
C3	40	14	7	2	2	1	2
C4	7	63	10	4	2	2	6
C5	24	383	17 ± 5	4	1	17 ± 2	66
C6	7 ± 4	17	8 ± 6	6	1	1	9 ± 6
C7	59	26	101	11	25	12	7
C8	38	594	13	5	5	2	18
C9	8 ± 3	40	5 ± 2	4 ± 1	0.4	1	6 ± 3
C10	18	10	14 ± 8	6	2	3	5
C11	33	17	16 ± 4	9	2	4	11

[0540] 表 3B-实施例的整合素分析测试结果

[0541]

	$\alpha 5\beta 1$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha 8\beta 1$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v\beta 1$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v\beta 3$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v\beta 5$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v\beta 6$ SPRA IC ₅₀ (nM)	$\alpha v\beta 8$ SPRA IC ₅₀ (nM)
实施例							
1	1 ± 0.5	1.3	2 ± 2	2.3 ± 0.1	0.2	0.4	0.3 ± 0.1
2	0.8	1.5	2	2.7 ± 0.4	0.4	0.3	0.5 ± 0.0
3	0.5	0.9	2	1	0.2	0.4	0.3
4	0.7	0.6	2	3	0.4	0.4	0.4
5	0.8	0.9	2	3	0.5	0.5	0.6
6	0.6	0.5	3	1	0.2	0.4	0.5
7	0.7	0.6	1	3	0.2 ± 0.0	0.3	0.4
8	0.6	0.6	1	4	0.1	0.4	0.4
9	0.3	0.5	1	3	0.3	0.3	0.3
10	1 ± 0.4	1.1	2 ± 1	4	1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
11	0.5	0.7	0.4	2	0.3	0.5	0.6
12	2	0.8	4 ± 2	4	0.4	0.6	0.7 ± 0.1
13	0.6	0.6	1	1.7 ± 0.0	0.1	0.4	1.0 ± 0.3
14	0.6	0.4	0.7	0.3	0.1	0.2	0.2
15	1 ± 0.3	1.2	4 ± 1	4	0.3	0.6	1.1 ± 0.3
16	1 ± 0.4	0.5	3 ± 2	3 ± 0.3	0.6	0.5	0.3 ± 0.1
17	1 ± 0.1	0.7	4 ± 2	2.8 ± 1.1	0.6	0.7	0.3 ± 0.1

[0542] 表4A-实施例的血浆半衰期

[0543]

实施例	在大鼠中1mg/kg IV推注剂量之后的血浆t _{1/2}
1	20.2hrs
2	9.1hrs
3	6.1hrs
4	未测试
5	6.6hrs
6	16.7hrs
7	4.6hrs
8	23.9hrs
9	5.6hrs
10	3.9hrs
11	24.0hrs
12	13.7hrs
13	11.0hrs
14	34.2hrs

15	23.8hrs
16	3.2hrs
17	4.1hrs

[0544] 表4B-对照化合物的血浆半衰期

[0545]

对照化合物	大鼠中1mg/kg iv推注剂量之后的血浆t _{1/2}
C12	0.5hrs
C13	1.1hrs
C14	1.0hr
C15	0.6hrs
C16	1.6hrs
C17	0.8hrs
C18	1.2hrs
C19	0.43hrs
C20	0.38hrs
C21	1.5hrs
C22	0.30hrs
C23	0.21hrs
C24	0.28hrs
C25	0.23hrs
C26	0.25hrs
C27	0.21hrs
C28	0.3hrs
C29	<.08hrs
C30	1.6hrs

[0546] 表5A-化合物的AUC血浆暴露

[0547]

实施例	大鼠中2mg/kg PO剂量之后的AUC (0-inf) (ng×hr/mL)
1	25048
2	19257
3	4870
4	未测试
5	11402
6	34386
7	3887
8	4468
9	4121
10	12969
11	9136

12	9107
13	13929
14	6502
15	15610
16	6808
17	13128

[0548] 表5B-对照化合物的AUC血浆暴露

[0549]

对照化合物	大鼠中2mg/kg PO剂量之后的AUC (0-inf) (ng×hr/mL)
C12	205
C14	224
C15	87
C16	62
C29	<1
C30	<1

[0550] 本文中描述实施例和选择的对照化合物的AUC在大鼠中单次2mg/kg 口服(PO)剂量后进行测定,证实了本公开的实施例的改进的血浆暴露。

[0551] 本文中公开的和要求保护的所有化合物、组合物和方法能够根据本公开进行制备和实施而无需过度实验。尽管本发明的化合物、组合物和方法已经根据优选实施方式进行了描述,但对于本领域技术人员而言显而易见的是,可以对本文中描述的组合物和方法以及方法的步骤或各步骤顺序实施变化而不脱离本公开的构思,精神和范围。更具体而言,显而易见的是化学和生理学上都相关的某些试剂可以替代本文所述的试剂而将会实现相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的是所有这些类似的替代和修改据认为是在由所附权利要求缩定义的本公开的精神、范围和构思之内。

[0552] 参考文献

[0553] 以下以其提供示例性方案或其他补充本文阐述的那些方案的细节的程度的参考文献,专门结合于本文中作为参考。

[0554] U.S. 专利号6,013,651

[0555] U.S. 专利号6,028,223

[0556] Adachi et al., Clin. Cancer Res., 6 (1) :96-101, 2000.

[0557] Asano et al., J. Immunol., 175 (11) :7708-7718, 2005.

[0558] Avraamides et al., Nat. Rev. Cancer, 8 (8) :604-617, 2008.

[0559] Bax et al., J. Biol. Chem., 278 (36) :34605-34616, 2003.

[0560] Becker et al., Tetrahedron, 39:4189-4192, 1983.

[0561] Bhaskar et al., J. Transl. Med., 5:61, 2007.

[0562] Blase et al., Int. J. Cancer, 60 (6) :860-866, 1995.

[0563] Bouzeghrane, et al., J. Mol. Cell. Cardiology, 36:343-353, 2004.

[0564] Clark, et al., Organic Process Research&Development, 8:51-61, 2004.

[0565] Clark, et al., Organic Process Research&Development, 8:571-575, 2004.

- [0566] Collo, J. Cell Sci., 112 (Pt 4) :569-578, 1999.
- [0567] Danen et al., Histopathology, 24 (3) :249-256, 1994.
- [0568] Edward, Curr. Opin. Oncol., 7 (2) :185-191, 1995.
- [0569] Engleman et al., J. Clin. Invest., 99 (9) :2284-2292, 1997.
- [0570] Faulconbridge et al., Tetrahedron Lett., 41:2679-2681, 2000.
- [0571] Ferrari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 (46) :17260-17265, 2006.
- [0572] Gao and Brigstock, Gut, 55:856-862, 2006.
- [0573] Girsch et al., J. Med. Chem., 50:1658-1667, 2007.
- [0574] Girsch et al., J. Med. Chem., 51:6752-6760, 2008.
- [0575] Greene & Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley, 1999.
- [0576] Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use, Stahl and Wermuth (Eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.
- [0577] Henderson, et al., Nat. Med., 19:1617-1624, 2013.
- [0578] Herlt, et al., Austr. J. Chem., 34 (6) :1319-1324, 1981.
- [0579] Horan et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 177 (1) :56-65, 2008.
- [0580] Jørgensen, et al., J. Am. Chem. Soc., 124 (42) :12557-12565, 2002.
- [0581] Kim et al., Am. J. Pathol., 156 (4) :1345-1362, 2000.
- [0582] Landis et al., Organic Process Research & Development, 6:539-546, 2002.
- [0583] Levine, et al., Am. J. Pathol., 156:1927-1935, 2000.
- [0584] Li et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 50 (12) :5988-5996, 2009.
- [0585] Livant et al., J. Clin. Invest., 105 (11) :1537-1545, 2000.
- [0586] Lobert et al., Dev. Cell, 19 (1) :148-159, 2010.
- [0587] Lu, et al., J. Cell Sci., 115:4641-4648, 2002.
- [0588] March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 2007.
- [0589] Melton et al., J. Clin. Invest., 120 (12) :4436-4444, 2010.
- [0590] Millard et al., Theranostics, 1:154-88, 2011.
- [0591] Mu et al., Cell Biol., 157 (3) :493-507, 2002.
- [0592] Munger et al., Cell., 96 (3) :319-328, 1999.
- [0593] Munger et al., Mol. Biol. Cell, 9:2627-2638, 1998.
- [0594] Nishimura, Am. J. Pathol., 175 (4) :1362-1370, 2009.
- [0595] Perdih, Curr. Med. Chem., 17 (22) :2371-2392, 2010.
- [0596] Popov et al., J. Hepatol., 48 (3) :453-464, 2008.
- [0597] Reagan-Shaw et al., FASEB J., 22 (3) :659-661, 2008.
- [0598] Scotton et al., J. Clin. Invest., 119 (9) :2550-2563, 2009.
- [0599] Suehiro et al., J. Biochem., 128 (4) :705-710, 2000.
- [0600] Sun, et al., Am. J. Therapeutics, 2014.
- [0601] Wipff et al., J. Cell Biol., 179 (6) :1311-1323, 2007.

-
- [0602] Yang et al., Development, 119 (4) :1093-1105, 1993.
- [0603] Yoshimura, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 350:127-147, 2011.
- [0604] Zahn et al., Arch. Ophthalmol., 127 (10) :1329-1335, 2009.
- [0605] Zahn et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 51 (2) :1028-1035, 2010.

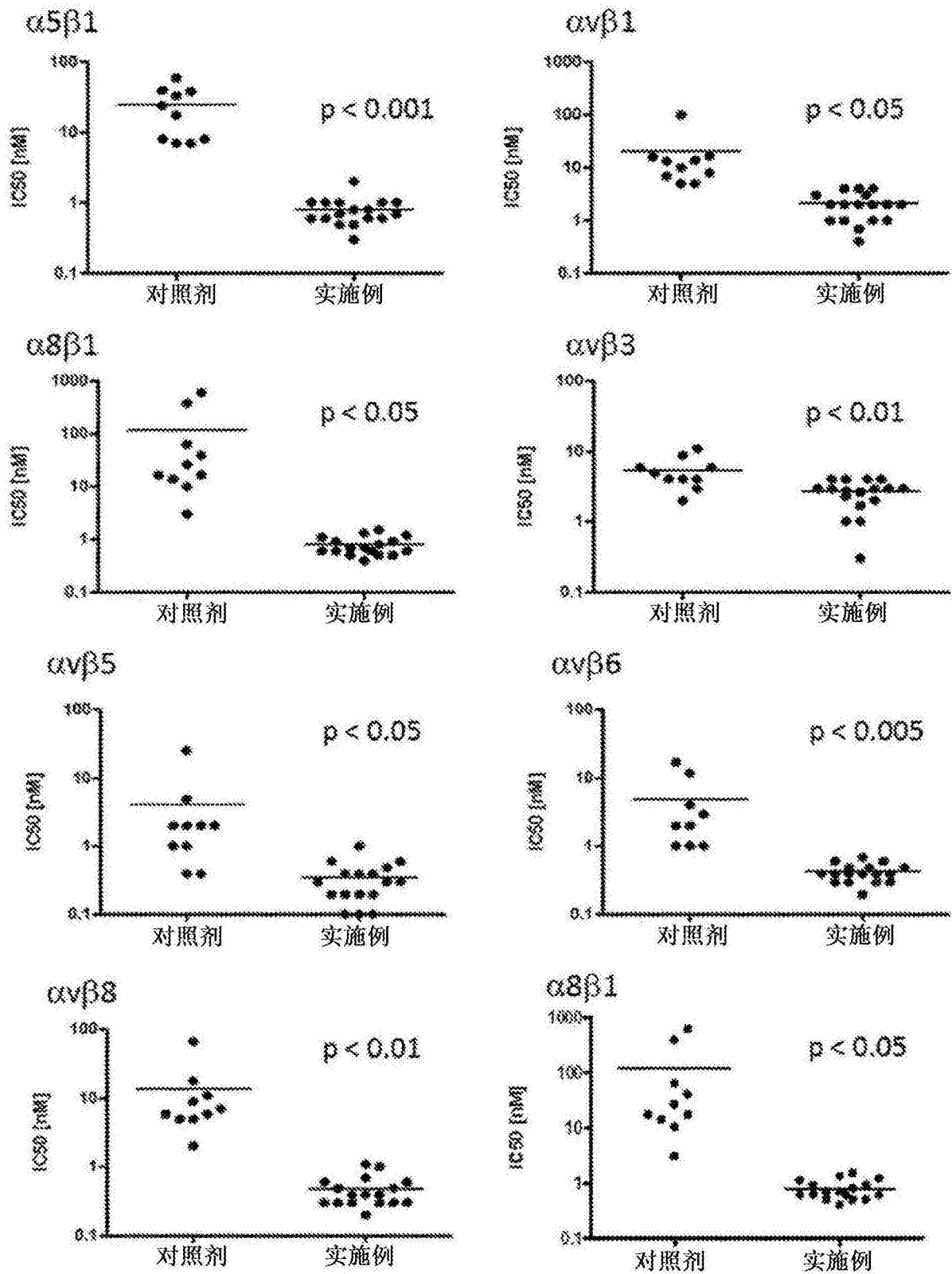


图1