

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07D 403/06 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680035223.5

[43] 公开日 2008 年 10 月 8 日

[11] 公开号 CN 101282965A

[22] 申请日 2006.9.21

[21] 申请号 200680035223.5

[30] 优先权

[32] 2005.9.22 [33] US [31] 60/719,474

[86] 国际申请 PCT/US2006/036946 2006.9.21

[87] 国际公布 WO2007/038251 英 2007.4.5

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.24

[71] 申请人 斯克利普斯研究院

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 梁丛薪 冯扬波

[74] 专利代理机构 北京申翔知识产权代理有限公司

代理人 周春发

权利要求书 18 页 说明书 41 页 附图 3 页

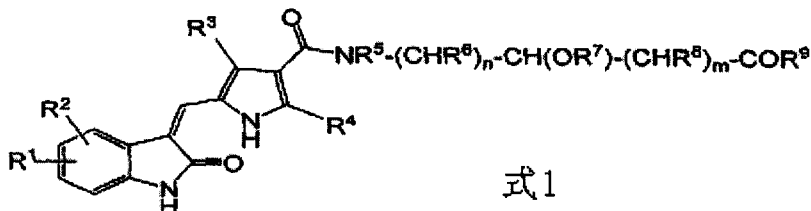
[54] 发明名称

基于烷氧基吡啶酮的蛋白激酶抑制剂

[57] 摘要

基于烷氧基吡啶酮的酸和酰胺衍生物作为蛋白激酶的抑制剂，具有增强的和出乎意料的药物性质，适用于治疗涉及异常蛋白激酶活性的疾病，如癌症。

1. 一种由式 1 表示的化合物:



其中:

R^1 选自氢、卤素、(C1-C6) 烷基、(C3-C8) 环烷基、(C1-C6) 卤烷基、羟基、(C1-C6) 烷氧基、氨基、(C1-C6) 烷基氨基、酰胺、磺胺、氰、取代或未取代的 (C6-C10) 芳香族羟基;

R^2 选自氢、卤素、(C1-C6) 烷基、(C3-C8) 环烷基、(C1-C6) 卤烷基、羟基、(C1-C6) 烷氧基、(C2-C8) 烷氧基烷基、氨基、(C1-C6) 烷基氨基、(C6-C10) 芳香族羟基氨基;

R^3 选自氢、(C1-C6) 烷基、(C6-C10) 芳香族羟基、(C5-C10) 杂芳香族羟基和酰胺;

R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^8 都独立地选自氢和 (C1-C6) 烷基;

R^7 是 (C1-C6) 烷基;

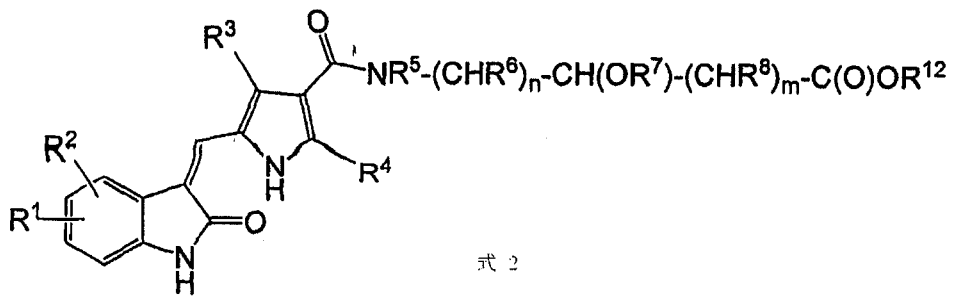
R^9 选自氢基、(C1-C6) O-烷基、(C3-C8) O-环烷基和 $NR^{10}R^{11}$;
 R^{10} 和 R^{11} 都独立地选自氢、(C1-C6) 烷基、(C1-C6) 羟基烷基、(C1-C6) 二羟基烷基、(C1-C6) 烷氧基、(C1-C6) 烷基羧酸、(C1-C6) 烷基磷酸、(C1-C6) 烷基磺酸、(C1-C6) 羟基烷基羧酸、(C1-C6) 烷基酰胺、(C3-C8) 环烷基、(C5-C8) 杂环烷基、(C6-C8) 芳香族羟基、(C5-C8) 杂芳香族羟基、(C3-C8) 环烷基羧酸、或者 R^{10} 和 R^{11} 以及 N 组成一个 (C5-C8) 杂环化合物, 该杂环化合物未被取代或被一个或多个羟基、酮基、乙醚和羧酸所取代;

$n=1$ 或 2 或 3; 并且

$m=0$ 或 1 或 2;

或者, 一种可药用的盐、它的异构体、它的异构体的一种可药用的盐或者药物前体。

2. 根据权利要求 1 的化合物、盐、异构体或药物前体, 由式 2 表示:



其中， R^{12} 选自氢、(C1-C6)烷基以及(C3-C8)环烷基。

3. 根据权利要求 2 的化合物、盐、异构体或药物前体，其中：

R^1 和 R^2 独立地选自氢和氟；

R^3 和 R^4 是甲基；

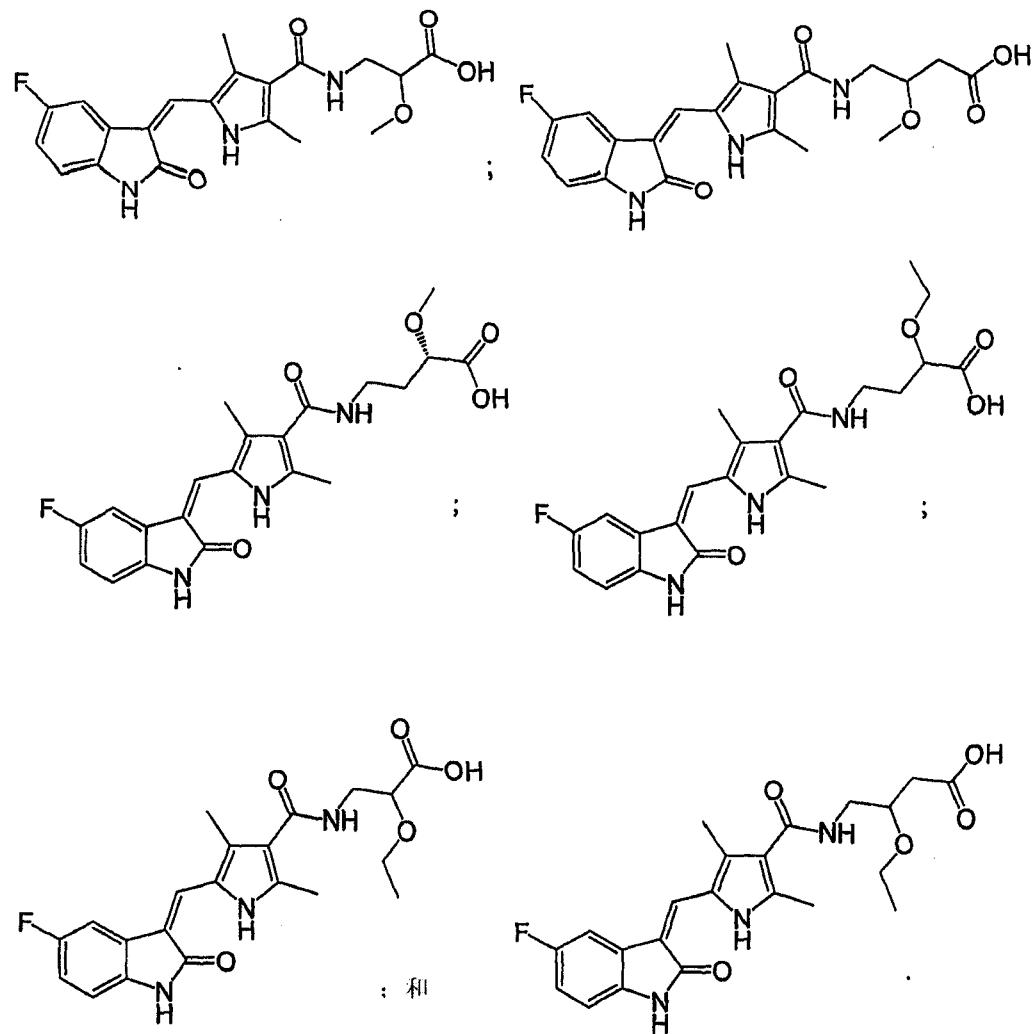
R^5 、 R^6 、 R^8 、和 R^{12} 是氢；

R^7 是(C1-C6)烷基；

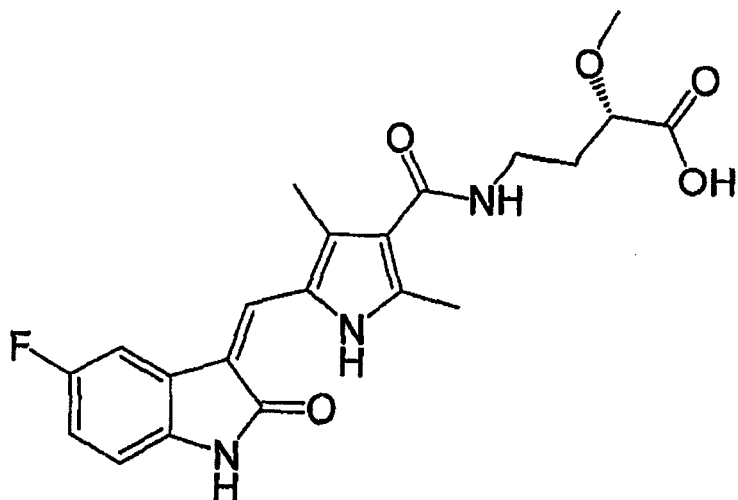
$n=1$ 或 2 ；并且

$m=0$ 或 1 。

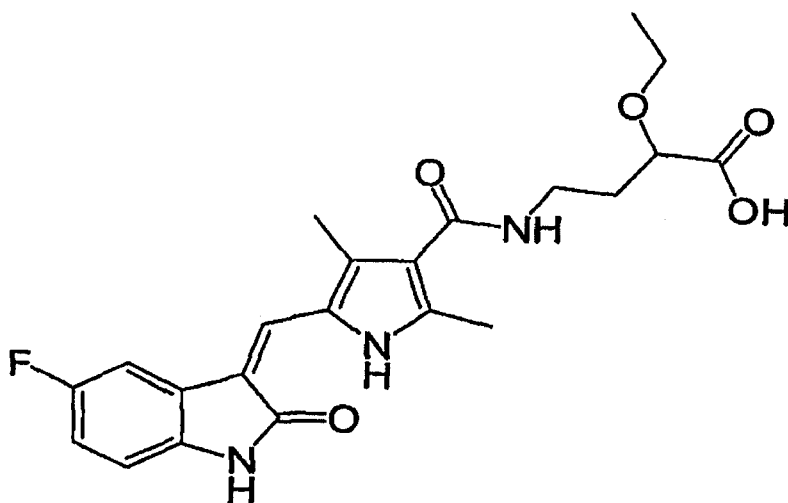
4. 根据权利要求 3 的化合物、盐、异构体或药物前体，选自：



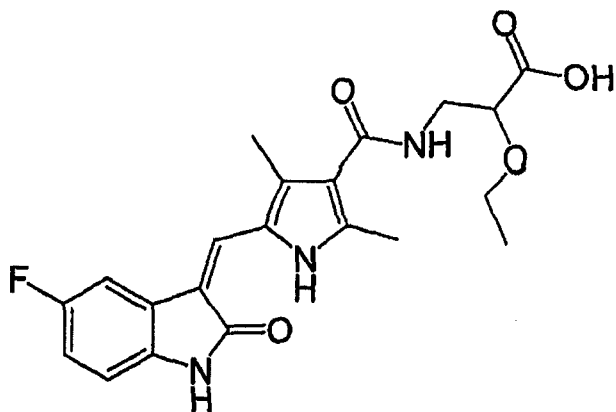
5. 根据权利要求 3 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



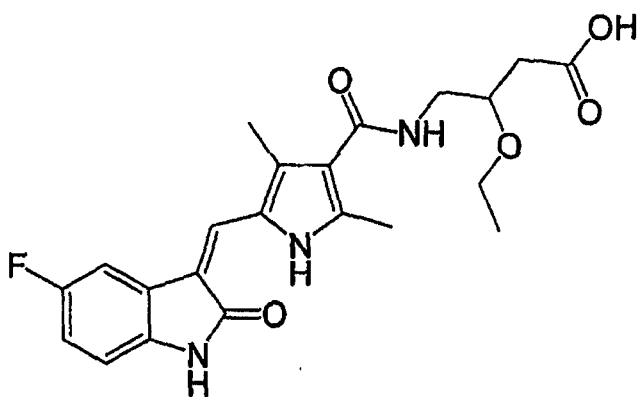
6. 根据权利要求 3 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



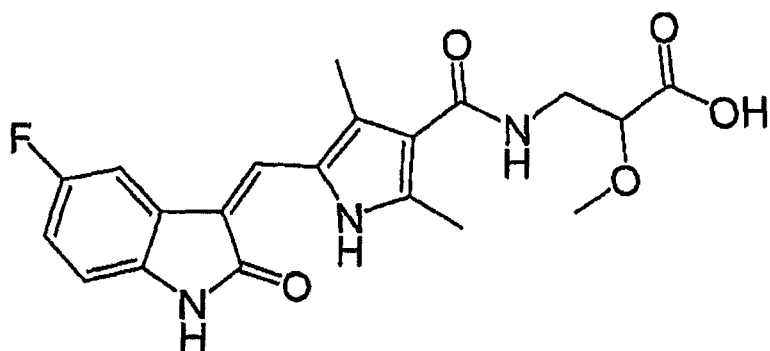
7. 根据权利要求 3 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



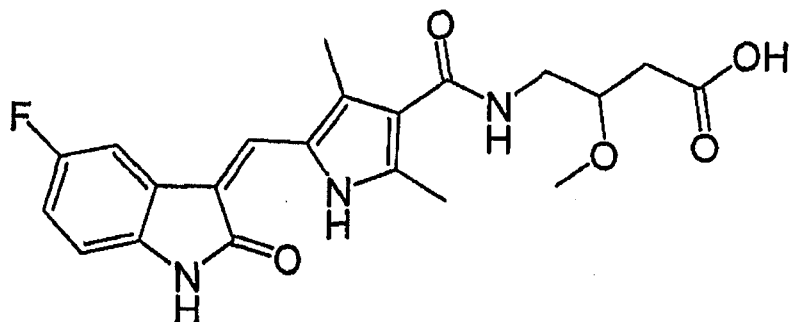
8. 根据权利要求3的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



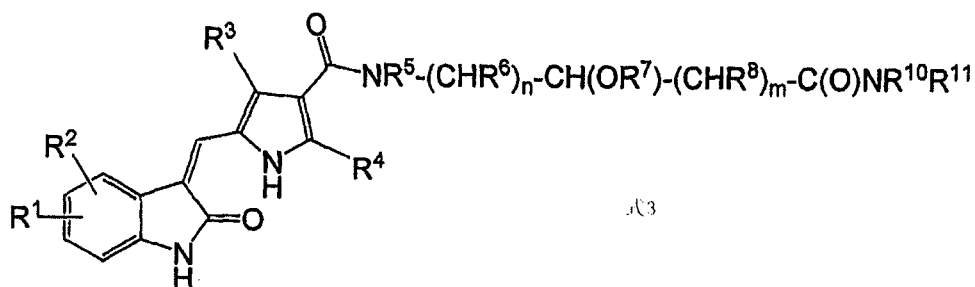
9. 根据权利要求3的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



10. 根据权利要求3的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



11. 根据权利要求3的化合物、盐、异构体或药物前体，由式3表示：



12. 根据权利要求9的化合物、盐、异构体或药物前体，其中：

R^1 和 R^2 独立地选自氢、卤素和氰；

R^3 选自氢、(C1-C6)烷基、(C6-C10)芳香族羟基、(C5-C10)杂芳香族羟基以及酰胺；

R^4 , R^5 , R^6 和 R^8 独立地选自氢、(C1-C6)烷基；

R^7 是 (C1-C6)；

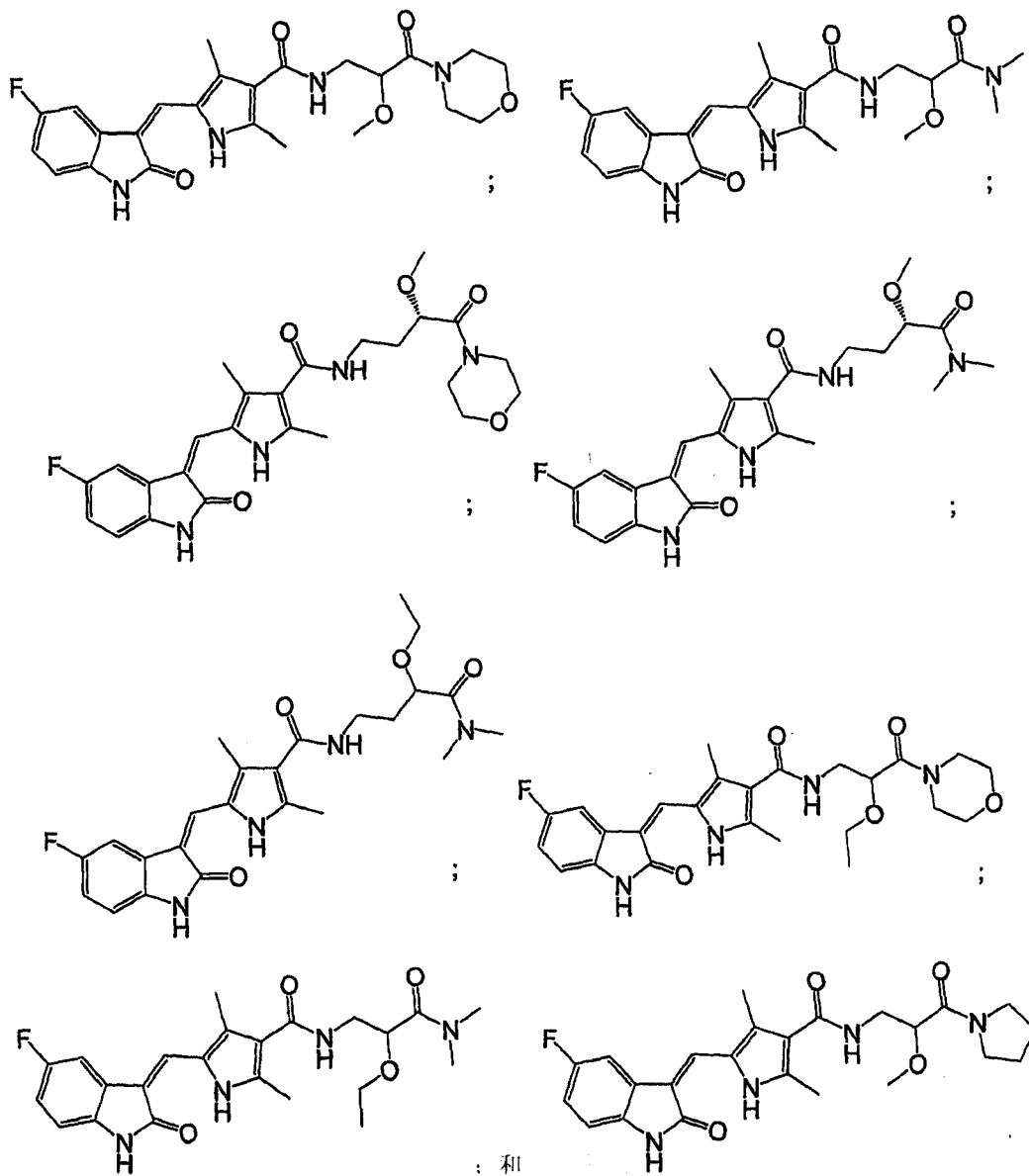
$n=1$ 或 2 ；

$m=0$ 或 1 ；并且

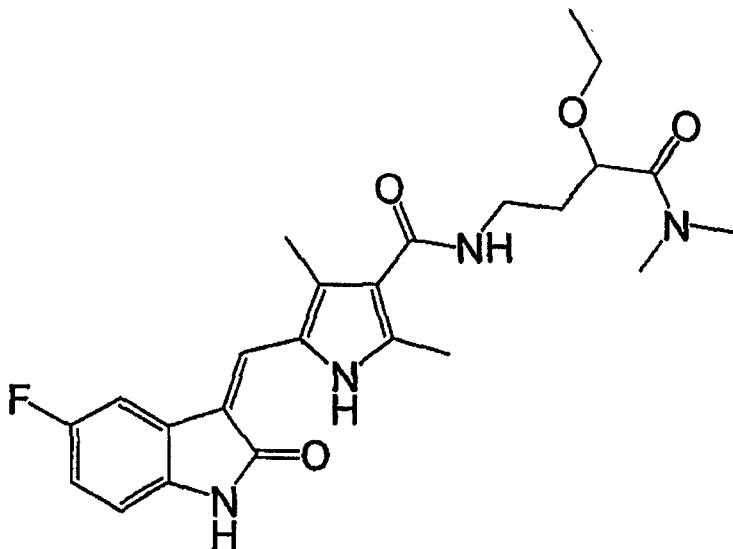
R^{10} 和 R^{11} 选自氢、(C1-C6)烷基、(C1-C6)羟基烷基、(C2-C6)二羟基烷基、(C1-C6)烷氧基、(C2-C6)烷基羧酸、(C1-C6)烷基磷酸、(C1-C6)烷基磺酸、(C2-C6)羟基烷基羧酸、(C1-C6)烷基酰基、(C3-C8)环烷基、(C5-C8)杂环烷基、(C6-C8)芳香族羟基、(C5-C8)杂芳香族羟基、(C4-C8)环烷基羧酸、或者 R^{10} 和 R^{11} 以及 N 组成一个 (C5-C8) 杂环化合物，该杂环化合物未被取代或被一个或多个羟基、酮基、乙醚和羧酸所取代。

13. 根据权利要求 12 的化合物、盐、异构体或药物前体，其中 m 为 0。

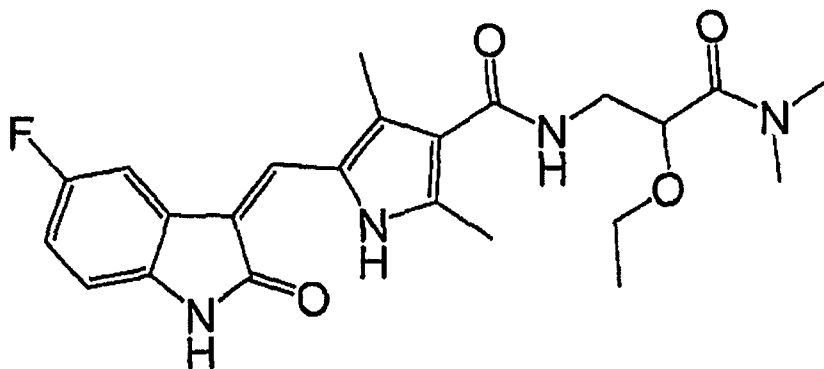
14. 根据权利要求 13 的化合物、盐、异构体或药物前体，选自下面的结构：



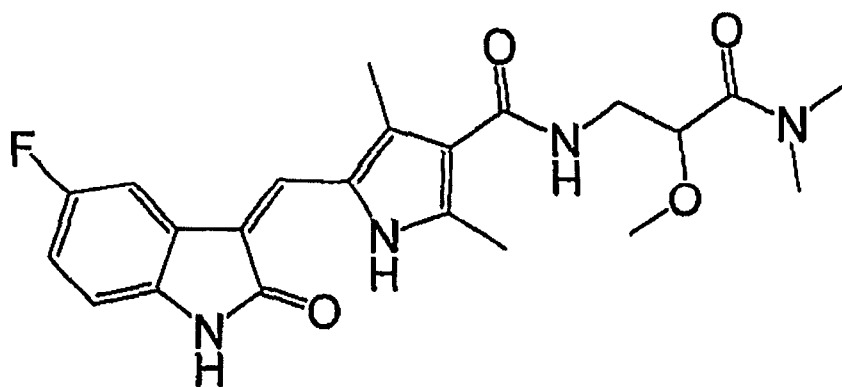
15. 根据权利要求 14 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



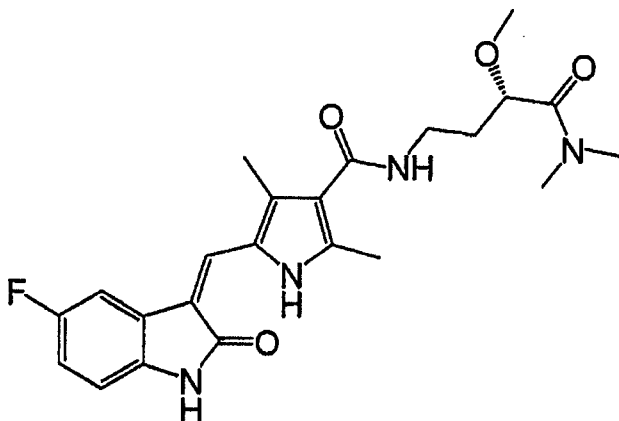
18. 根据权利要求 14 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



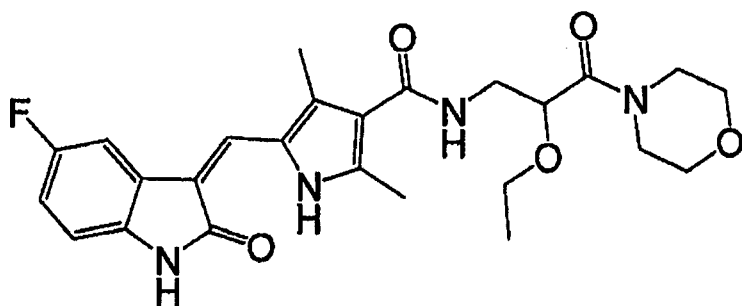
19. 根据权利要求 14 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



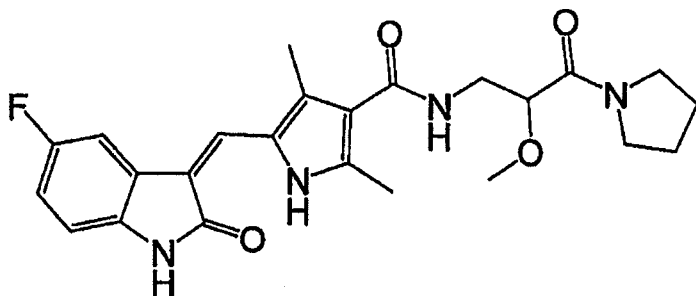
20. 根据权利要求 14 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



21. 根据权利要求 14 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：

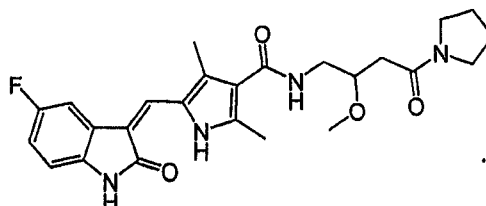
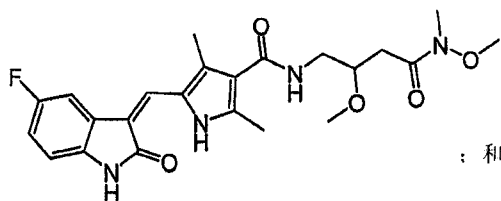
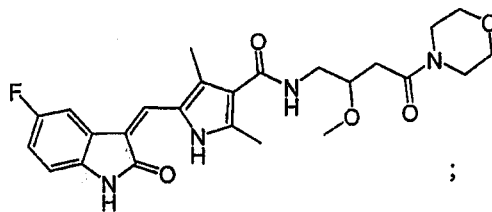
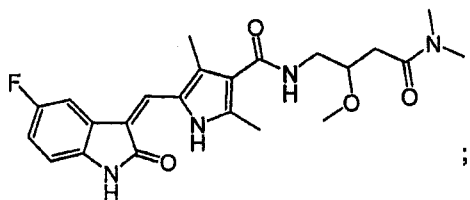
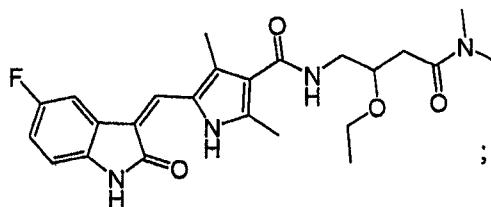
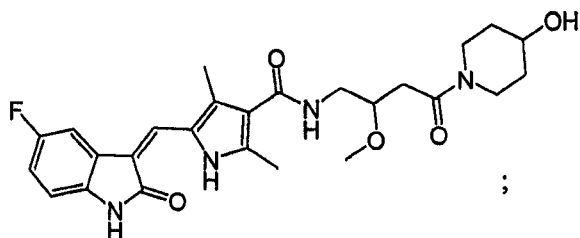


22. 根据权利要求 14 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：

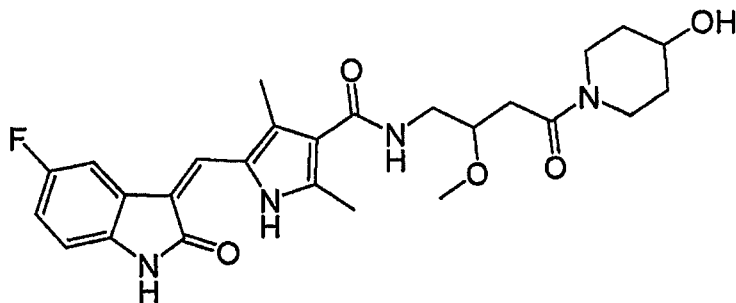


23. 根据权利要求 12 的化合物、盐、异构体或药物前体, 其中 m 为 1。

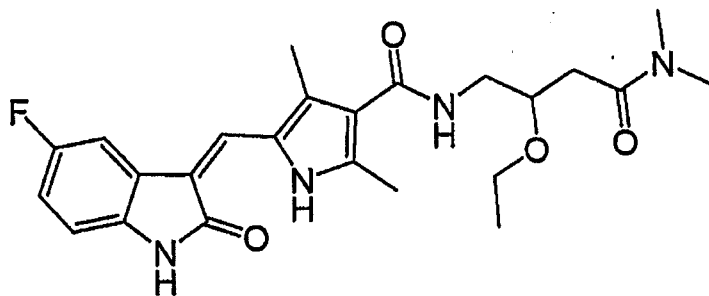
24. 根据权利要求 23 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



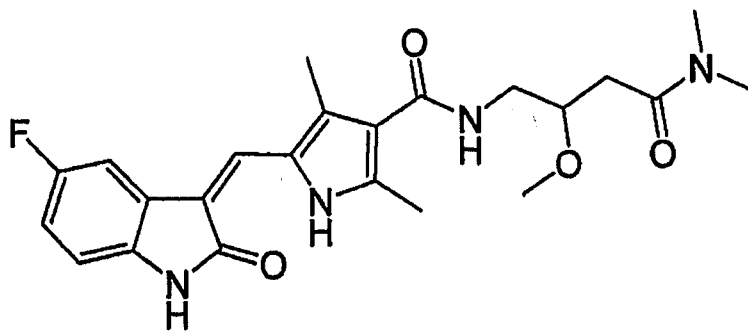
25. 根据权利要求 24 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



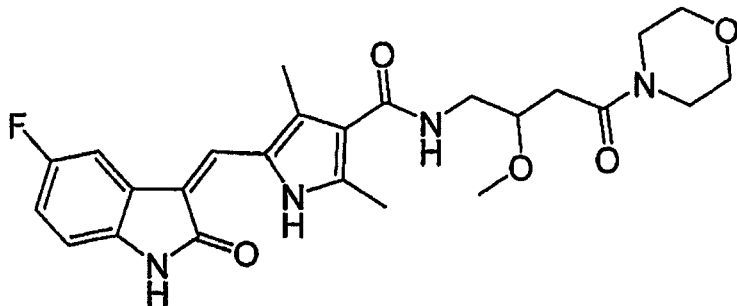
26. 根据权利要求 24 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



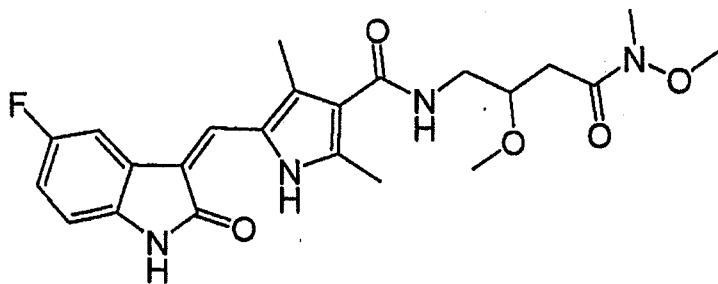
27. 根据权利要求 24 的化合物、盐、异构体或药物前体，由下面的结构表示：



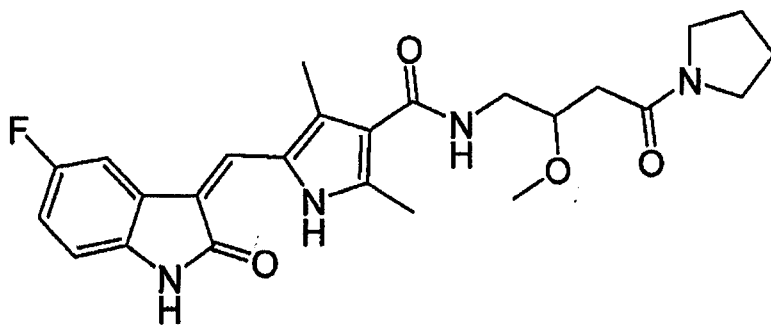
28. 根据权利要求 24 的化合物、盐、异构体或药物前体, 由下面的结构表示:



29. 根据权利要求 24 的化合物、盐、异构体或药物前体, 由下面的结构表示:



30. 根据权利要求 24 的化合物、盐、异构体或药物前体, 由下面的结构表示:



32. 一种使用如权利要求 1-31 所示的化合物或盐来调节蛋白激酶催化活性的方法。

33. 对于权利要求 32 的方法，其中所述的蛋白激酶选自 VEGF 受体和 PDGF 受体。

基于烷氧基吡啶酮的蛋白激酶抑制剂

发明领域：

本发明涉及蛋白激酶抑制剂和它们在治疗涉及异常蛋白激酶活性的疾病方面的用途，如癌症和发炎。尤其特别的，本发明涉及基于烷氧基吡啶酮的衍生物和它们可用作蛋白激酶抑制剂的可药用的盐。

技术背景：

蛋白激酶是催化丝氨酸、酪氨酸和苏氨酸蛋白残基的羟基集团磷酸化作用的酶。细胞生命的很多方面（例如细胞的生长、分化、增殖、细胞周期和存活）依赖蛋白激酶的活性。此外，异常蛋白激酶活性涉及许多疾病，如癌症和发炎。因此，相当大的精力被投入到找出调节蛋白激酶活性的方法上。特别地，作了很多尝试来找出充当蛋白激酶抑制剂的小分子。

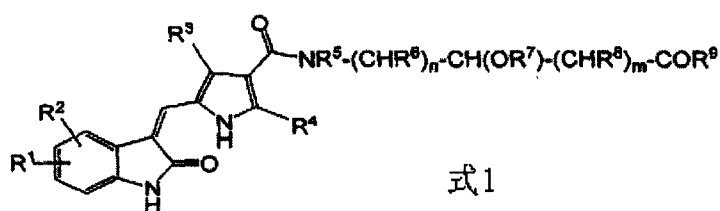
一些吡咯-吡啶酮衍生物被证明作为蛋白激酶抑制剂具有出色的活性（Larid 等 FASEB J. 16, 681, 2002；Smolich 等 Blood, 97, 1413, 2001；Mendel 等 Clinical Cancer Res. 9, 327, 2003；Sun 等 J. Med. Chem. 46, 1116, 2003）。这些化合物的临床效用已被期待，但由于其相对的差水溶性和/或其他的药物性质，部分地受到怀疑。我们需要的是一个改变了的吡咯-吡啶酮衍生物家族，同时具有

抑制剂活性和增强的药物性质。

发明概述：

本发明指向基于烷氧基吲哚酮的衍生物以及它们作为蛋白激酶抑制剂的用途。在这里揭示了基于烷氧基吲哚酮的派生物具有增强的和出乎意料的药物性质，从而将这一家族的化合物与已知的具有蛋白激酶抑制活性的吡咯-吲哚酮派生物区分开来。在这里还揭示了基于烷氧基吲哚酮的衍生物有益于治疗涉及异常蛋白激酶活性的疾病，如癌症。

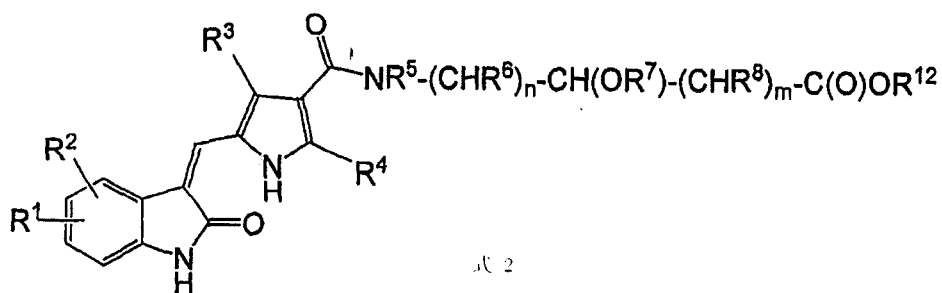
本发明的第一方面指向由式 1 表示的化合物：



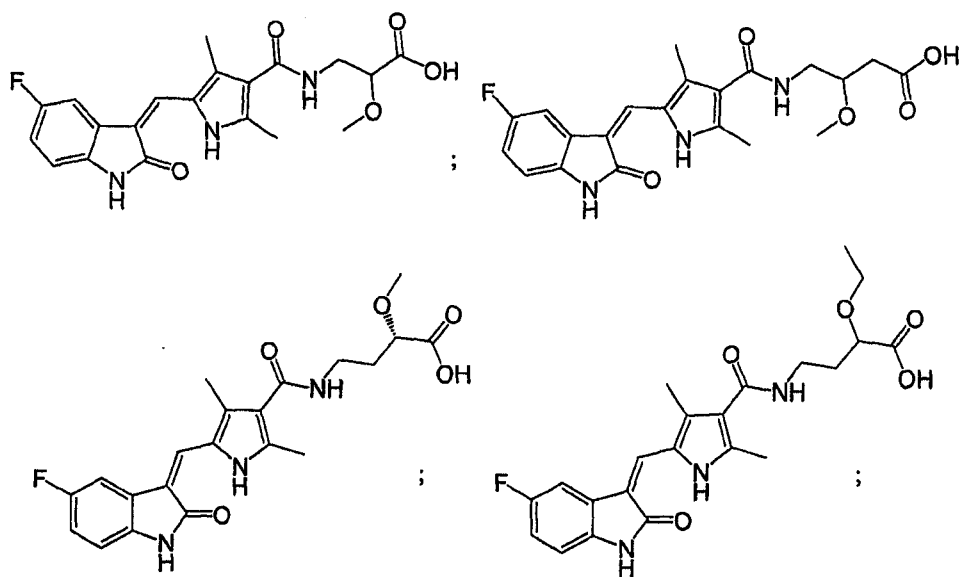
在式 1 中， R1 选自氢、卤素、(C1-C6) 烷基、(C3-C8) 环烷基、(C1-C6) 卤烷基、羟基、(C1-C6) 烷氧基、氨基、(C1-C6) 烷基氨

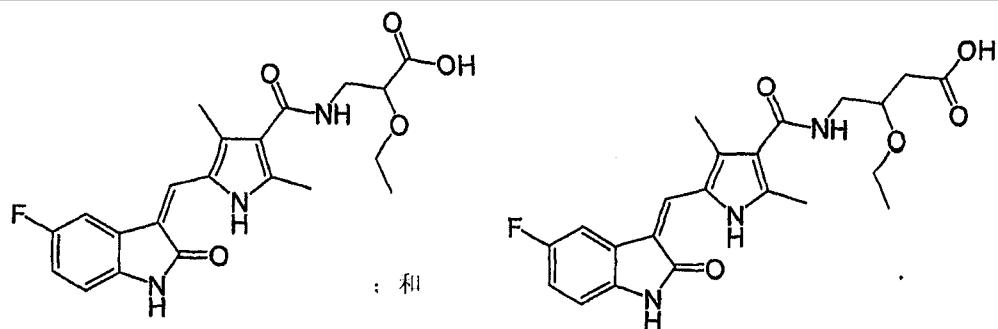
基、酰胺、磺胺、氰、取代或未取代的(C6-C10)芳香族羟基; R^2 选自氢、卤素、(C1-C6)烷基、(C3-C8)环烷基、(C1-C6)卤烷基、羟基、(C1-C6)烷氧基、(C2-C8)烷氧基烷基、氨基、(C1-C6)烷基氨基、(C6-C10)芳香族羟基氨基; R^3 选自氢、(C1-C6)烷基、(C6-C10)芳香族羟基、(C5-C10)杂芳香族羟基和酰胺; R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^8 都独立地选自氢和(C1-C6)烷基; R^7 是(C1-C6)烷基; R^9 选自氢基、(C1-C6)O-烷基、(C3-C8)O-环烷基和 $NR^{10}R^{11}$; R^{10} 和 R^{11} 都独立地选自氢、(C1-C6)烷基、(C1-C6)羟基烷基、(C1-C6)二羟基烷基、(C1-C6)烷氧基、(C1-C6)烷基羧酸、(C1-C6)烷基膦酸、(C1-C6)烷基磺酸、(C1-C6)羟基烷基羧酸、(C1-C6)烷基酰胺、(C3-C8)环烷基、(C5-C8)杂环烷基、(C6-C8)芳香族羟基、(C5-C8)杂芳香族羟基、(C3-C8)环烷基羧酸、或者 R^{10} 和 R^{11} 以及N组成一个(C5-C8)杂环化合物,该杂环化合物未被取代或被一个或多个羟基、酮基、乙醚和羧酸所取代,且 $n=1, 2, 3$, $m=0, 1, 2$ 。另外,本发明的该方面还可以指向一种可药用的盐、它的异构体、它的异构体的一种可药用的盐或者式I所述化合物的药物前体。

对于该发明的第一方面,其优选的亚属指向由式2表示的化合物,盐,异构体或者药物前体。

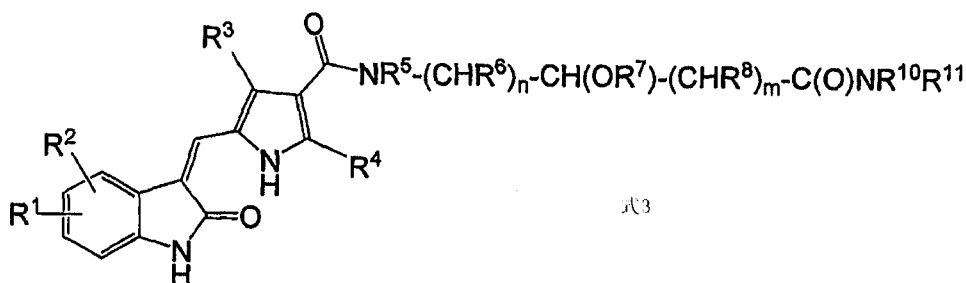


在式 2 中, R^{12} 选自氢、(C1-C6) 烷基以及 (C3-C8) 环烷基, 其他基团与式 1 中定义的一样。在优选实施例中, R^1 和 R^2 独立地选自氢和氟, R^3 和 R^4 是甲基, R^5 、 R^6 、 R^8 、和 R^{12} 是氢, R^7 是 (C1-C6) 烷基, 并且 $n=1$ 或 2, $m=0$ 或 1。优选的种类包括下列化合物:





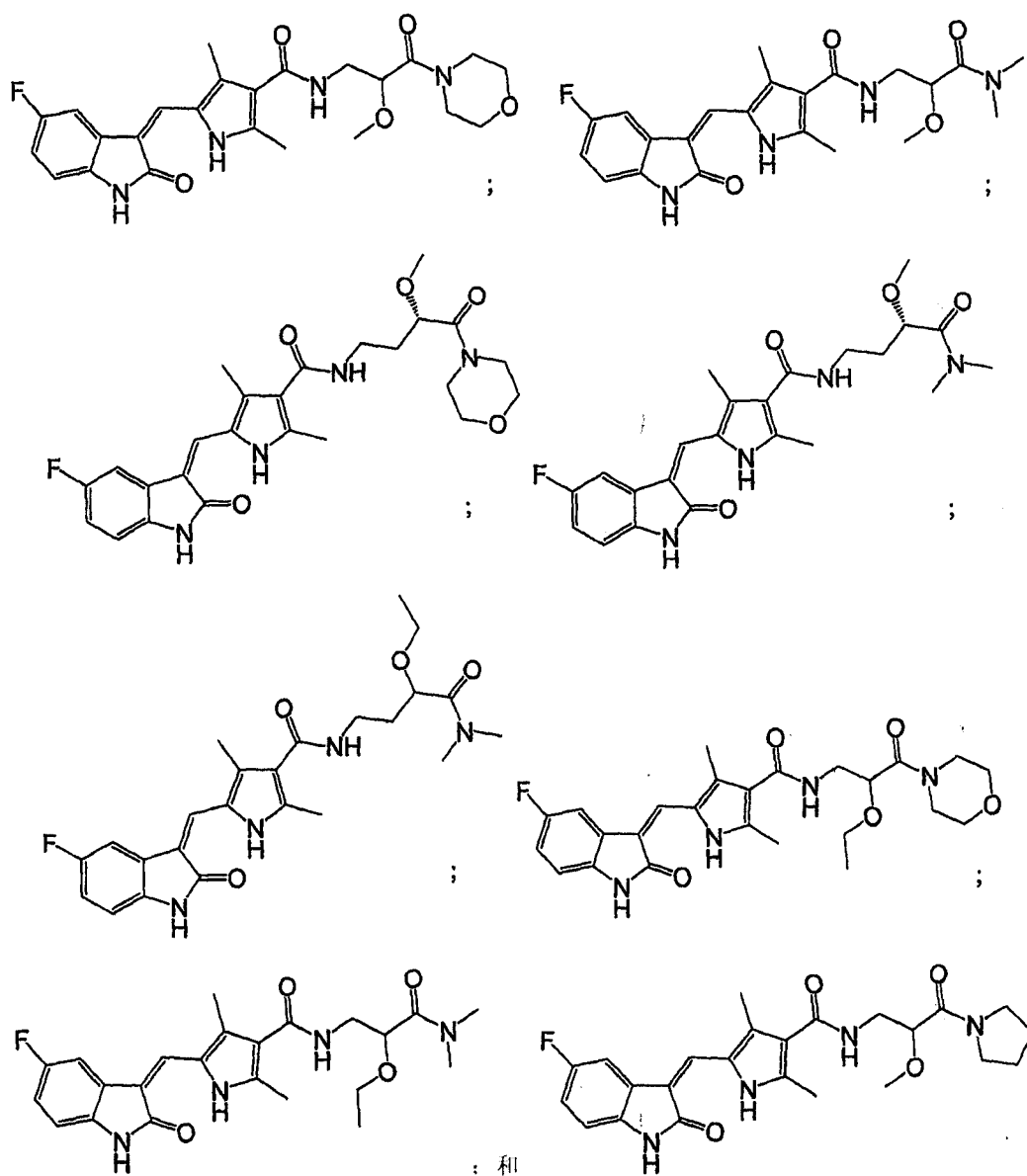
对于该发明的第一方面，其第二个优选的亚属指向由式 3 表示的化合物、盐、异构体或者药物前体：



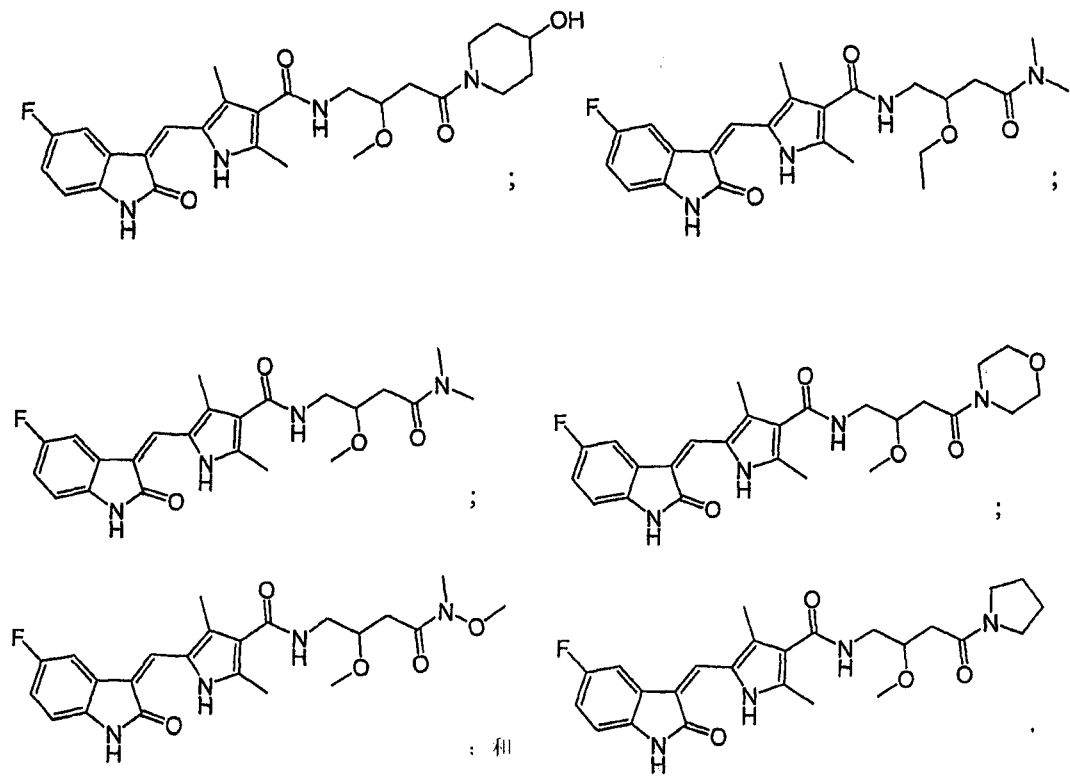
在式 3 中，各个 R 基团与式 1 中的一样。在优选的实施例中，R¹ 和 R² 独立地选自氢、卤素和氰，R³ 选自氢、(C1-C6) 烷基、(C6-C10) 芳香族羟基、(C5-C10) 杂芳香族羟基以及酰胺，R⁴，R⁵，R⁶ 和 R⁸ 独立地选自氢、(C1-C6) 烷基，R⁷ 是 (C1-C6) 烷基，其中 n=1 或 2，m=0 或 1。R¹⁰ 和 R¹¹ 选自氢、(C1-C6) 烷基、(C1-C6) 羟基烷基、(C2-C6) 二羟基烷基、(C1-C6) 烷氧基、(C2-C6) 烷基羧酸、(C1-C6) 烷基磷酸、(C1-C6) 烷基磺酸、(C2-C6) 羟基烷基羧酸、(C1-C6) 烷基酰基、(C3-C8) 环烷基、(C5-C8) 杂环烷基、(C6-C8) 芳香族羟基、(C5-C8) 杂芳香族

羟基、(C4-C8) 环烷基羧酸、或者 R^{10} 和 R^{11} 以及 N 组成一个 (C5-C8) 杂环化合物, 该杂环化合物未被取代或被一个或多个羟基、酮基、乙醚和羧酸所取代。

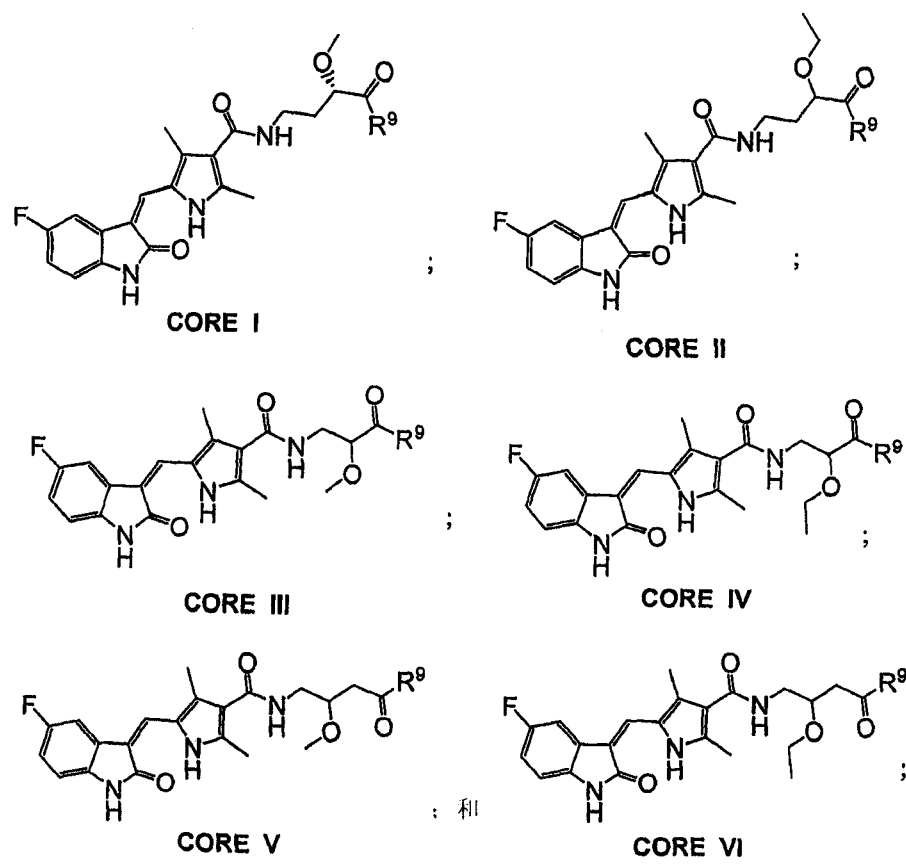
在该第二亚属的第一子群中, $m=0$ 。第一子群优选的种类如下列结构表示:



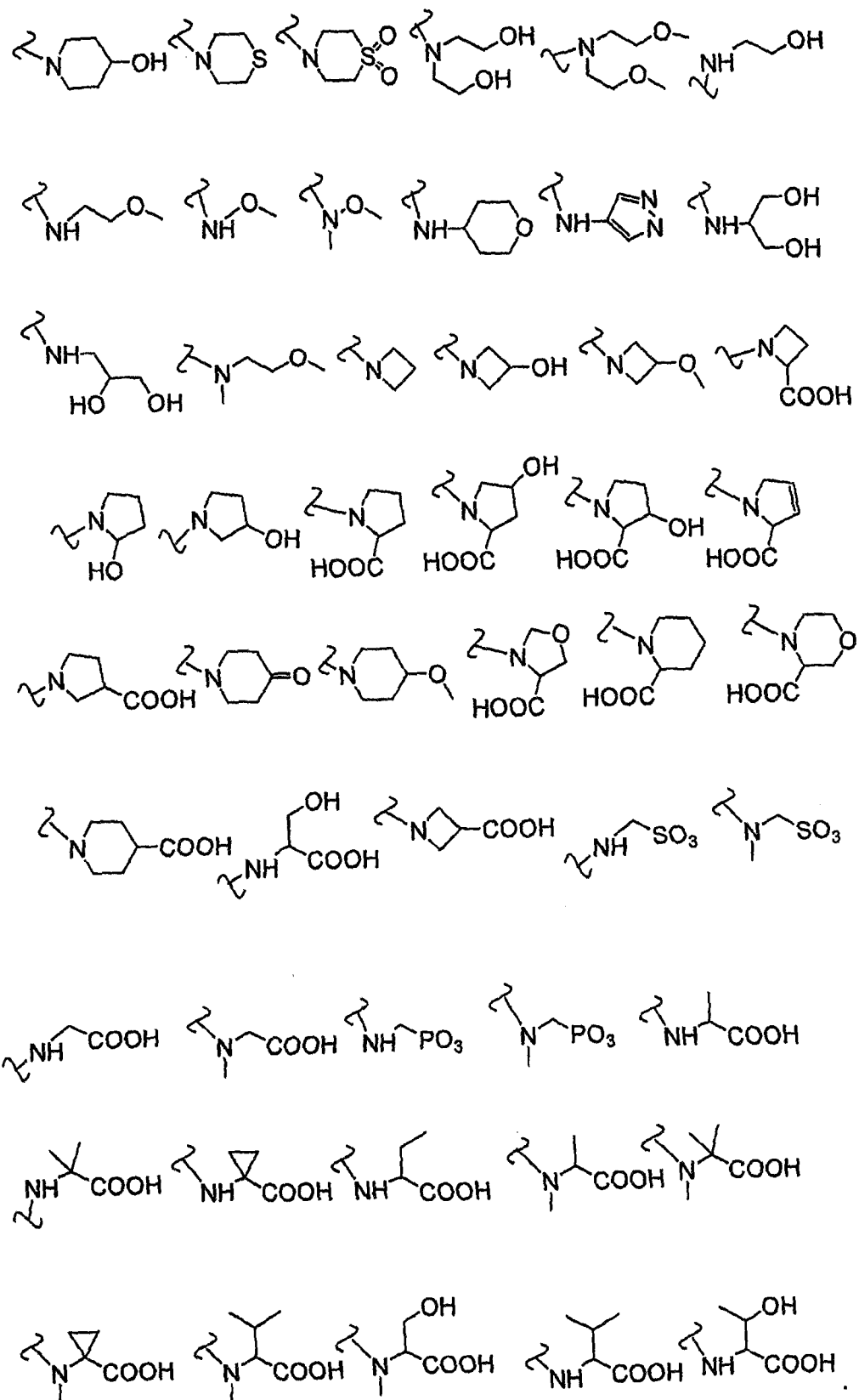
在该第二亚属的第二子群中， $m=1$ 。第二子群优选的种类如下列结构表示：



本发明第二方面的种类如下列结构表示：



其中 R⁹ 选自如下列结构表示的自由基:



本发明的另一方面指向一种使用由上述式 1-3 表示的化合物或盐来调节蛋白激酶催化活性的方法。优先选择的模式是，蛋白激酶选自受体 VEGF 和 PDGF。

附图简要描述:

图 1 说明了一个用于合成 3-烷氧基-4-酰化氨基酰胺派生物与活性酰化剂 1-3 的方案, 其中 3-烷氧基-4-酰化氨基酰胺派生物从甲基 3-羟基-4-氨基丁酸酯氢氯化物开始。

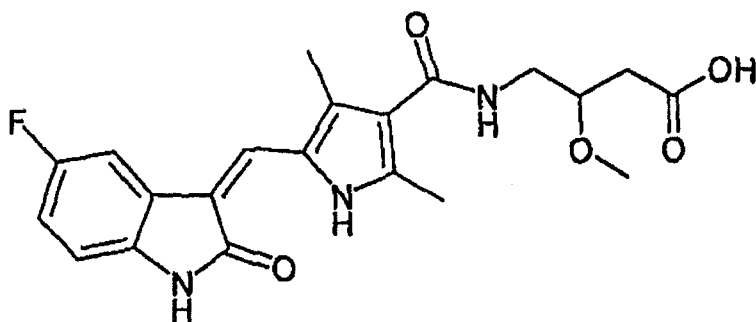
图 2 说明了一个用于合成 2-烷氧基-3-酰化氨基酰胺派生物与活性酰化剂 1-3 的方案, 其中 2-烷氧基-3-酰化氨基酰胺派生物从甲基 2-羟基-3-氨基丁酸酯氢氯化物开始。

图 3 说明了一个用于合成 (2S)-2 烷氧基-4-酰化氨基酰胺派生物与活性酰化剂 1-3 的方案, 其中 (2S)-2 烷氧基-4-酰化氨基酰胺派生物从甲基 (2S)-2-羟基-4-氨基丁酸酯氢氯化物开始。

详细描述:

例 1-8: 酸(1-4)和酰胺(1-5)的合成如图 1 所示。本领域的技术人员能够理解和完成该一般合成过程的变体, 因此本发明的化合物能够由这些本领域的技术人员合成。

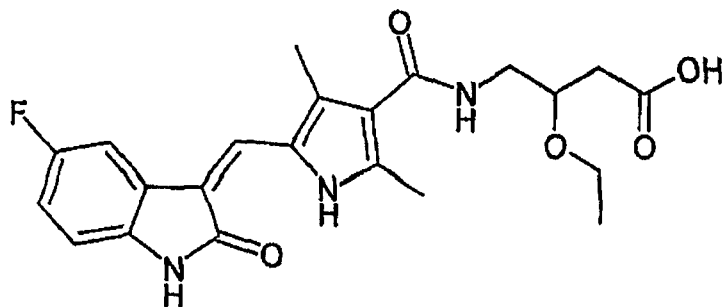
例 1: 4-({5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡咯-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羰基}-氨基)-3-甲氧基-丁酸



向甲基 4-氨基-3-羟基丁酸 (1.0 当量, 通过在含有 1.2 当量 HCL 的无水甲醇中回流游离氨基酸制备) 和 DIEA (5 当量) 的 DCM 溶液中在 25 °C 分批添加 Mmt-Cl (1.1 当量)。搅拌一整夜后, 用减压蒸馏移除 DCM。残留物悬浮在乙酸乙酯中, 使用盐水 (3x) 清洗并使用无水 Na₂SO₄ 干燥。此后, 乙酸乙酯被除去, 残留物在高度真空中干燥一整夜, 通过快速色谱技术就可以得到化合物 1-1。在氩气氛下向化合物 1-1 的无水 DMF 溶液中加入 NaH (1.5 当量)。在 25 °C 下搅拌 1 个小时后, 向溶液中加入 MeI (5 当量), 然后将得到的悬浮液在 25 °C 下轻轻摇晃一整夜。在真空下除去 DMF, 残留物悬浮在乙酸乙酯中, 使用盐水 (3x) 清洗并使用无水 Na₂SO₄ 干燥。乙酸乙酯通过蒸馏被除

去后，将得到的残留物使用 1% TFA 的 DCE/DCM 溶液处理 30 分钟。然后，通过减压蒸馏移除有机溶剂，将得到的残留物使用己烷（3x）捣成粉，从而得到游离氨基酸 1-2。该氨基酸可以直接用于下面的步骤，并不需要任何的提纯和表征。在 25 °C 下向 1-2（2 当量）和 DIEA（5 当量）的 DMF 溶液中加入化合物 1-3（1 当量）。搅拌 30 分钟后（LC-MS 显示 1-3 完全消耗掉），加入 KOH（5 当量）的水溶液，然后再搅拌该溶液 2 个小时（LC-MS 显示完全水解）。在减压蒸馏下除去溶剂，加入 HCL（1 N 多）得到沉淀物。收集该沉淀物并使用过滤的方式用水清洗，然后在高度真空下干燥从而得到标题所示化合物（95%基于化合物 1-3）。LC-MS: 254nm 单峰, MH^+ 用 $C_{21}H_{22}FN_3O_5$ 计算的值: 416, 实际获得值: 416。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.67 (s, 1H), 12.18 (b, 1H), 10.90 (s, 1H), 7.75 (de1, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.92 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.43-3.31 (m, 2H), 3.22 (s, 3H), 2.52-2.35 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H)。

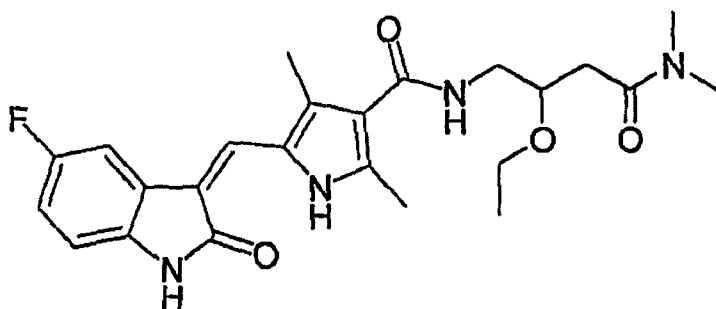
例 2: 3-乙氧基-4-({5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡啶-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羰基}-氨基)-丁酸



制备该标题所示化合物使用的步骤与合成示例 1 化合物十分类似，只不过是使用碘乙烷而不是碘甲烷来获取 3-乙氧基化合物（9.7% 基于化合物 1-3）。LC-MS: 254 nm 单峰, MH^+ 用 $C_{22}H_{24}FN_3O_5$ 计算的值: 430, 实际获得值: 430。

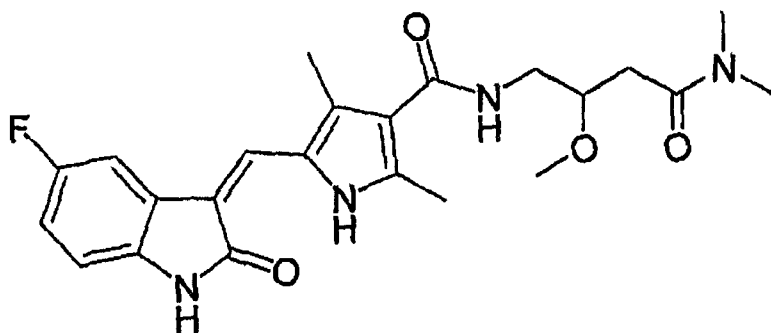
例 3-8: 合成酰胺 (1-5) 的一般过程: 向含 HATU (1.05mmol) 和 DIEA (5 当量) 的酸 (1-4) 的 DMF 溶液 (5ml) 中, 加入一种胺 (2 当量)。在 25℃ 下搅拌 2 小时后, 加入 HCL 水溶液 (2ml, 1N)。制备高效液相色谱处理, 获得纯净的酰胺产品, 随后 LC-MS 和 NMR 图谱结构表征。

例 3: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡咯-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸(3-二甲基胺甲酰基-2-乙氧基-丙基)-酰胺



制备高效液相色谱, 从 30 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 13mg 标题所示化合物 (41%)。LC-MS: 254nm 单峰, MH^+ 用 $C_{24}H_{29}FN_4O_4$ 计算的值: 457, 实际获得值: 457。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.68 (s, 1 H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, 9.2 Hz, 1H), 7.72 (s, 1 H), 7.60 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.92 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, 8.4Hz, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.58-3.45 (m, 2H), 3.40-3.27 (m, 2H, buried in water signals), 2.97 (s, 3H), 2.82 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)。

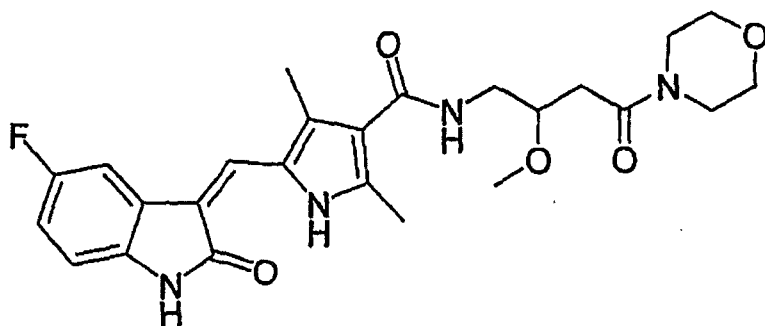
例 4: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡咯-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸(3-二甲基胺甲醚基-2-甲氧基-丙基)-酰胺



制备高效液相色谱, 从 120 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 46 mg 标题所示化合物 (36%)。LC-MS: 254nm 单峰, MH^+ 用 $C_{23}H_{27}FN_4O_4$ 计算的值: 443, 实际获得值: 443。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, 9.2 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.63 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.92 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, 8.8 Hz, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.42-3.31 (m, 2H), 3.30 (s,

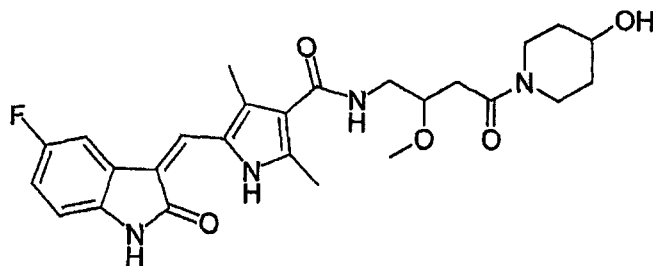
3H), 2.97 (s, 3H), 2.82 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.63-2.43 (m, 2H)。

例 5: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡咯-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 (2-甲氧基-4-吗啉-4-基-4-酮基-丁基)-酰胺



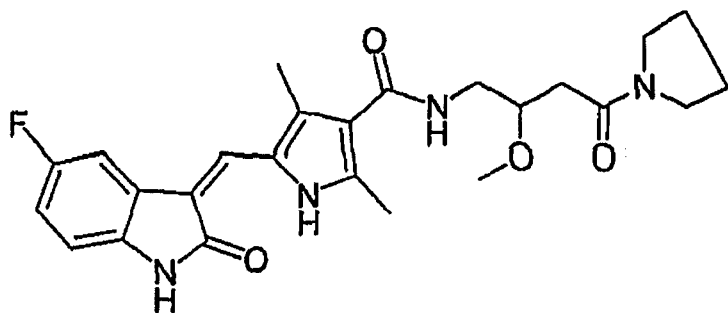
制备高效液相色谱, 从 110 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 48 mg 标题所示化合物 (37%)。LC-MS: 254nm 单峰, MH^+ 用 $C_{25}H_{29}FN_4O_6$ 计算的值: 485, 实际获得值: 485。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, 9.2 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.63 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.92 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, 8.4 Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.55 (m, 4H), 3.47 (m, 4H), 3.38 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 2.60 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H)。

例 6: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吲哚-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 [4-(4-羟基-哌啶-1-基)-2-甲氧基-4-酮基-丁基]-酰胺



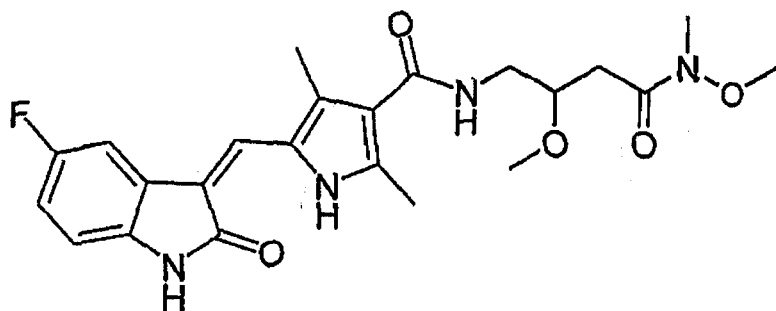
制备高效液相色谱, 从 50 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 20 mg 标题所示化合物 (33%)。LC-MS: 254nm 单峰, MH^+ 用 $C_{26}H_{31}FN_4O_5$ 计算的值: 499, 实际获得值: 499。 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, 9.6 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.63 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.4$ Hz, 8.4 Hz, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.68 (b, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.15 (m, 1H), 3.01 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.55 (m, 2H), 2.50 (m, 1H), 2.45 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.70 (m, 2H), 1.30 (m, 2H)。

例 7: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吲哚-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 (2-甲氧基-4-酮基-4-吡咯啉-1-基-丁基)-酰胺



制备高效液相色谱, 从 110 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 40 mg 标题所示化合物 (32%)。LC-MS: 254nm 单峰, MH^+ 用 $C_{25}H_{29}FN_4O_4$ 计算的值: 469, 实际获得值: 469。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, 9.6 Hz, 1 H), 7.71 (s, 1 H), 7.63 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, 8.8 Hz, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.50-3.25 (m, 6H), 3.30 (s, 3H), 2.55-2.45 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.86 (m, 2H), 1.76 (m, 2H)。

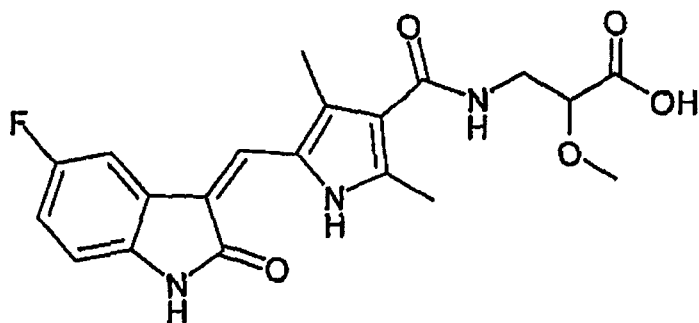
例 8: 5-[5-氟-2-酮基-1, 2-二氢-吲哚-(3Z)-亚基甲基]-2, 4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 [2-甲氧基-3-(甲氧基-甲基-胺甲酯基)-丙基]-酰胺



制备高效液相色谱, 从 80 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 15 mg 标题所示化合物 (15%)。LC-MS: 254nm 单峰, MH^+ 用 $C_{23}H_{27}FN_4O_5$ 计算的值: 459, 实际获得值: 459。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 10.90 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, 9.2 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.68 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.84 (dd, $J = 4.4$ Hz, 8.4 Hz, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.50-3.35 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 2.55-2.45 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H)。

例 9-15: 酸 (2-3) 和酰胺 (2-4) 的合成如图 2 所示。该一般过程的变体可以由本领域的技术人员理解和实现。因此本发明的化合物可以由这些技术人员合成。

例 9: 3-({5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡啶-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羰基}-氨基)-2-甲氧基-丙酸

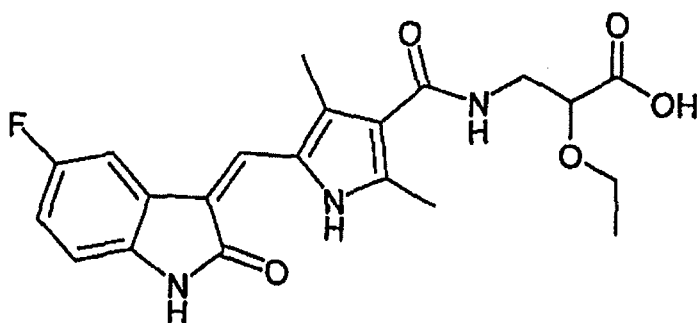


在 25 °C 下向甲基 3-氨基-2-羟基丙酸甲酯 (1.0 当量, 通过异丝氨酸在含 1.2 当量 HCL 的无水甲醇中回流游离氨基酸制备) 和 DIEA (5 当

量)的 DCM 溶液中分批添加 Mmt-Cl (1.1 当量)。搅拌一整夜后,用减压蒸馏移除 DCM。残留物悬浮在乙酸乙酯中,使用盐水 (3x) 清洗并通过无水 Na_2SO_4 干燥。除去乙酸乙酯,将残留物在高度真空下干燥一整夜,使用快速色谱技术得到化合物 2-1。在氩气氛下向含有化合物 2-1 的无水 DMF 溶液中加入 NaH (1.5 当量)。在 25 °C 下搅拌 1 个小时后,加入 MeI (5 当量),然后将得到的悬浮液在 25 °C 下轻轻搅拌一整夜。在真空下除去 DMF,残留物悬浮在乙酸乙酯中,使用盐水 (3x) 清洗并使用无水 Na_2SO_4 干燥。通过蒸馏将乙酸乙酯除去后,将残留物在 1% TFA 的 DCE/DCM 溶液中处理 30 分钟。然后,通过减压蒸馏移除有机溶剂,将得到的残留物使用己烷 (3x) 磨成粉便得到游离氨基酸 2-2。该氨基酸可直接用于下面的步骤,不需要提纯和表征。在 25 °C 下向含有 2-2 (2 当量) 和 DIEA (5 当量) 的 DMF 溶液中加入化合物 1-3 (1 当量)。搅拌 30 分钟后 (LC-MS 显示 1-3 已完全消耗掉),加入 KOH (5 当量) 水溶液,将该溶液再搅拌 2 小时 (LC-MS 显示完全水解)。在减压蒸馏下除去溶剂,加入 HCL (1 N 多) 得到沉淀物。通过过滤得到沉淀物,使用水清洗并在高度真空下干燥便得到标题所示化合物 (99% 基于化合物 1-3)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH^+ 用 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_5$ 计算的值: 402, 实际获得值: 402。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz), δ 13.67 (s, 1H), 12.83 (b, 1H), 10.90 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.69 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.92 (m, 1H), 6.82 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.90 (m, 1H),

3.55 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.32 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.40 (s, 3H)。

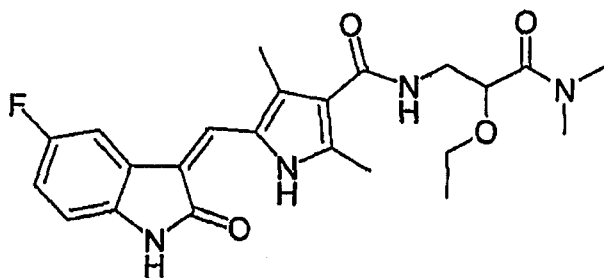
例 10: 2-乙氧基-3-({5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吲哚-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羰基}-氨基)-丙酸



制备该标题所示化合物使用的步骤与合成示例 9 化合物十分类似，只不过是使用碘乙烷而不是碘甲烷来获取 2-乙氧基化合物（38% 基于化合物 1-3）。LC-MS: 254 nm 单峰， MH^+ 用 $C_{21}H_{22}FN_4O_5$ 计算的值：416，实际获得值：416。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.67 (s, 1H), 12.80 (b, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.68 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.92 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.00 (dd, $J = 5.2$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.58 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.14 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

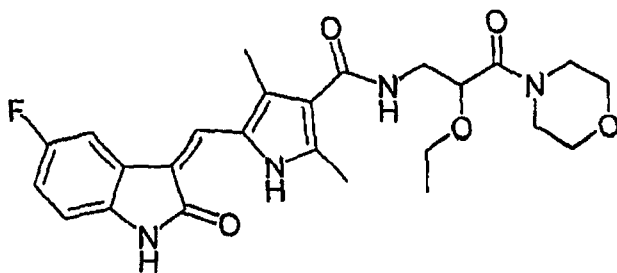
例 11-15: 合成酰胺 (化合物 2-4) 的一般过程: 向含有酸 (化合物 2-3)、HATU (1.05mmol) 和 DIEA (5 当量) 的 DMF 溶液 (5ml) 中加入相应的胺 (2 当量)。将溶液在 25 °C 下搅拌 2 小时后, 加入 HCL 水溶液 (2 mL, 1N)。制备高效液相色谱处理便得到纯净的酰胺产品, 随后 LC-MS 和 NMR 图谱结构表征。

例 11: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡啶-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1 H-吡咯-3-羧酸 (2-二甲基胺甲酰基-2-乙氧基-乙基)-酰胺



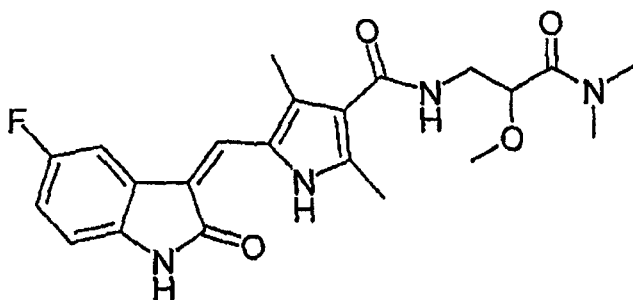
制备高效液相色谱, 从 70 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 46 mg 标题所示化合物 (62%)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH^+ 用 $C_{23}H_{27}FN_4O_4$ 计算的值: 443, 实际获得值: 443.

例 12: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡啶-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1 H-吡咯-3-羧酸 (2-乙氧基-3-吗啉-4-yl-基-酮基-丙基)-酰胺



制备高效液相色谱, 从 70 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 40 mg 标题所示化合物 (49%)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH^+ 用 $C_{25}H_{29}FN_4O_5$ 计算的值: 485, 实际获得值: 485。 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ 13.67 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.70 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.73-3.35 (m, 12H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.12 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)。

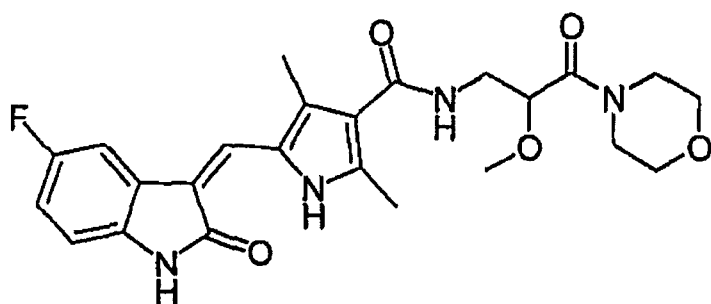
例 13: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡咯-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 (2-二甲基胺甲酯基-2-甲氧基-乙基)-酰胺



制备高效液相色谱, 从 115 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 93 mg 标题所示化合物 (76%)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH^+ 用 $C_{22}H_{25}FN_4O_4$ 计算的值:

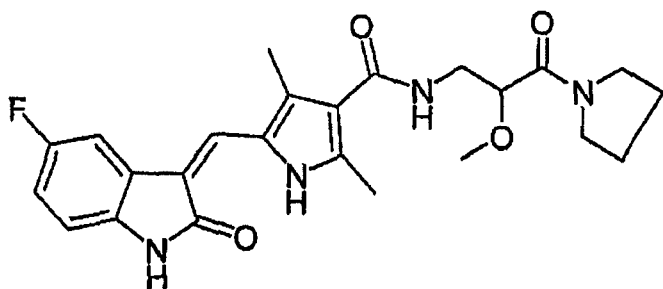
429, 实际获得值: 429。¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 10.90 (s, 1H), 7.75 (dd, J = 2.4 Hz, J = 9.6 Hz, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.71 (s, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, J = 4.8 Hz, J = 8.8 Hz, 1H), 4.40 (dd, J = 4.8 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.24 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 2.86 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H)。

例 14: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡啶-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 (2-甲氧基-3-吗啉-4-基-3-酮基-丙基)-酰胺



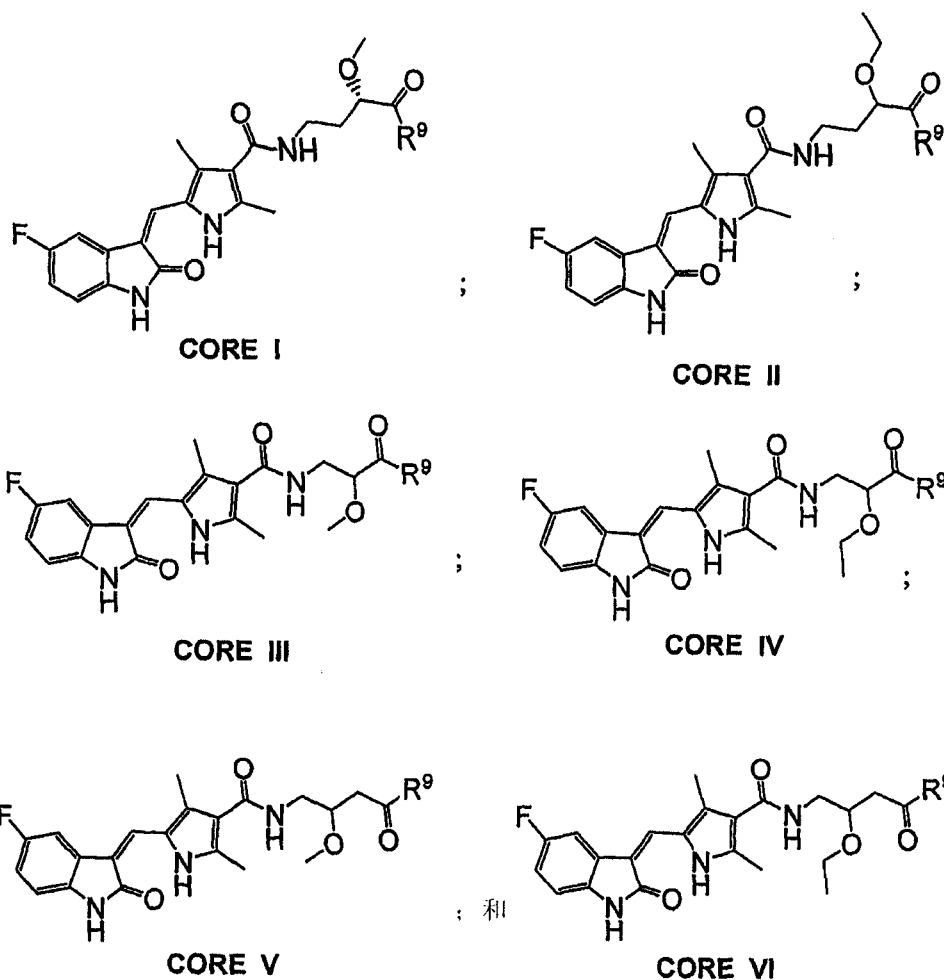
制备高效液相色谱, 从 115 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 98 mg 标题所示化合物 (73%)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH⁺用 C₂₄H₂₇FN₄O₅ 计算的值: 471, 实际获得值: 471。¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz), δ 13.67 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.75 (dd, J = 2.4 Hz, J = 9.6 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.70 (m, 1H), 6.92 (m, 1H), 6.83 (dd, J = 4.8 Hz, J = 8.8 Hz, 1H), 4.34 (dd, J = 4.8 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 3.85-3.30 (m, 10H), 3.26 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.42 (s, 3H)。

例 15: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吲哚-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 (2-甲氧基-3-酮基-3-吡咯啉-1-基-丙基)-酰胺



制备高效液相色谱, 从 115 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 86 mg 标题所示化合物 (66%)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH^+ 用 $C_{24}H_{27}FN_4O_4$ 计算的值: 455, 实际获得值: 455。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.67 (s, 1 H), 10.89 (s, 1 H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.70 (m, 1 H), 7.71 (s, 1 H), 6.93 (m, 1 H), 6.83 (dd, $J = 4.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 4.20 (dd, $J = 5.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 3.60-3.47 (m, 3H), 3.43-3.28 (m, 3H), 3.26 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 1.88 (m, 2H), 1.78 (m, 2H)。

例 16-315: 更多的酰胺示例如下面表格所示:



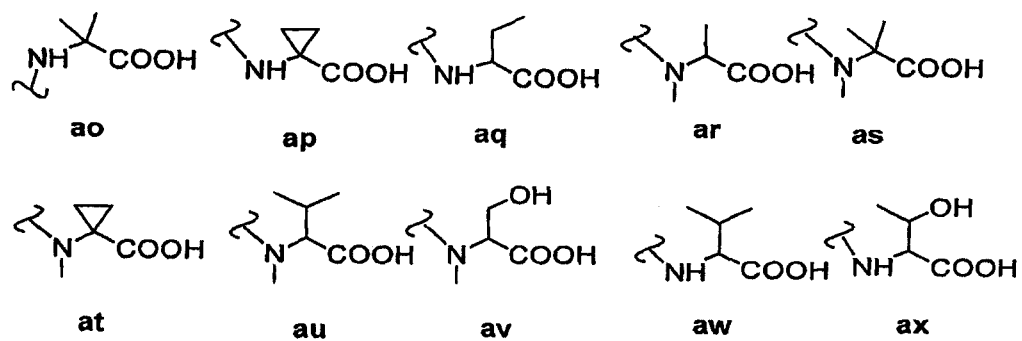
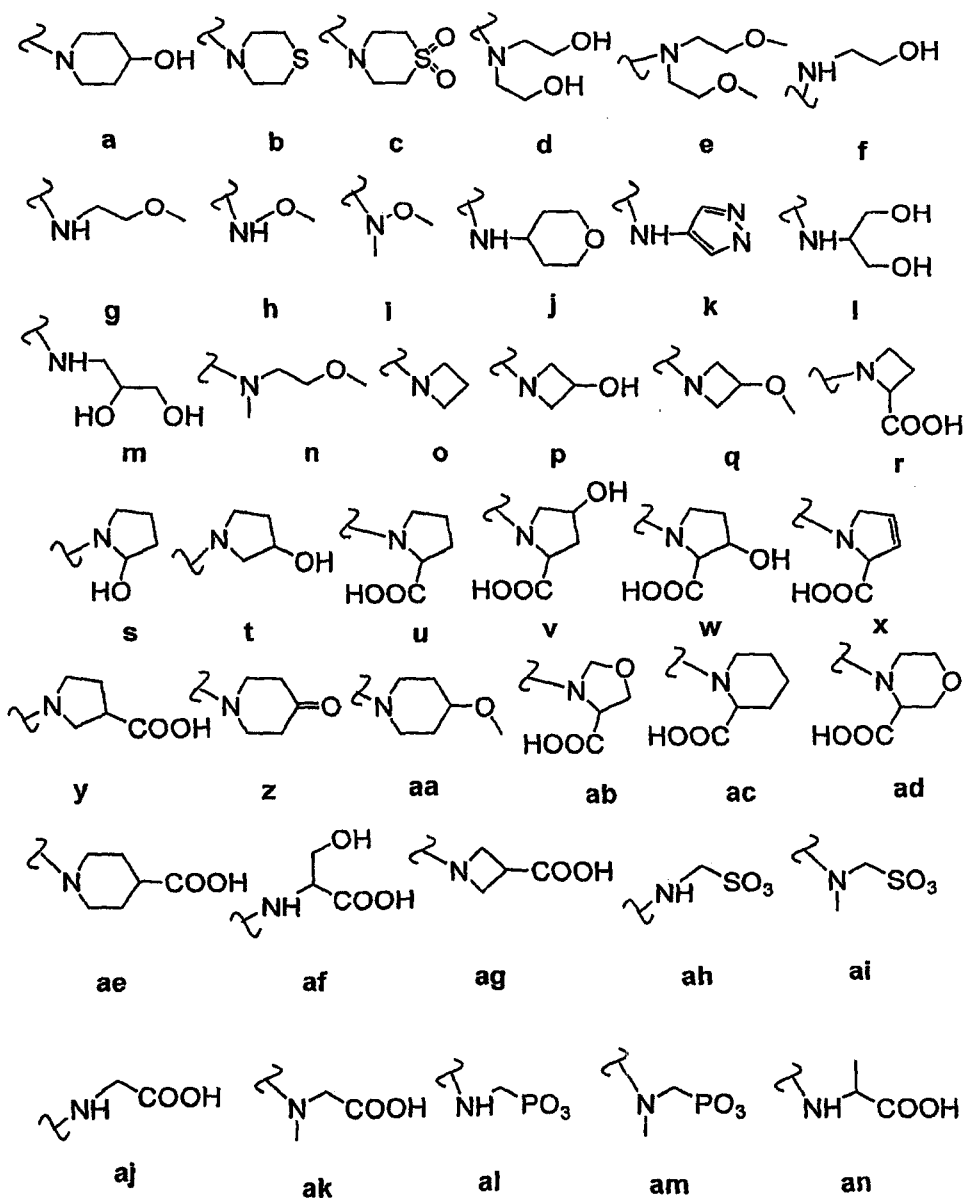
Ex#	Core	R	Ex#	Core	R	Ex#	Core	R
16	I	a	66	II	a	116	III	a
17	I	b	67	II	b	117	III	b
18	I	c	68	II	c	118	III	c
19	I	d	69	II	d	119	III	d
20	I	e	70	II	e	120	III	e
21	I	f	71	II	f	121	III	f
22	I	g	72	II	g	122	III	g
23	I	h	73	II	h	123	III	h
24	I	i	74	II	i	124	III	i
25	I	j	75	II	j	125	III	j
26	I	k	76	II	k	126	III	k
27	I	l	77	II	l	127	III	l
28	I	m	78	II	m	128	III	m
29	I	n	79	II	n	129	III	n
30	I	o	80	II	o	130	III	o

Ex#	Core	R	Ex#	Core	R	Ex#	Core	R
31	I	p	81	II	p	131	III	p
32	I	q	82	II	q	132	III	q
33	I	r	83	II	r	133	III	r
34	I	s	84	II	s	134	III	s
35	I	t	85	II	t	135	III	t
36	I	u	86	II	u	136	III	u
37	I	v	87	II	v	137	III	v
38	I	w	88	II	w	138	III	w
39	I	x	89	II	x	139	III	x
40	I	y	90	II	y	140	III	y
41	I	z	91	II	z	141	III	z
42	I	aa	92	II	aa	142	III	aa
43	I	ab	93	II	ab	143	III	ab
44	I	ac	94	II	ac	144	III	ac
45	I	ad	95	II	ad	145	III	ad
46	I	ae	96	II	ae	146	III	ae
47	I	af	97	II	af	147	III	af
48	I	ag	98	II	ag	148	III	ag
49	I	ah	99	II	ah	149	III	ah
50	I	ai	100	II	ai	150	III	ai
51	I	aj	101	II	aj	151	III	aj
52	I	ak	102	II	ak	152	III	ak
53	I	al	103	II	al	153	III	al
54	I	am	104	II	am	154	III	am
55	I	an	105	II	an	155	III	an
56	I	ao	106	II	ao	156	III	ao
57	I	ap	107	II	ap	157	III	ap
58	I	aq	108	II	aq	158	III	aq
59	I	ar	109	II	ar	159	III	ar
60	I	as	110	II	as	160	III	as
61	I	at	111	II	at	161	III	at
62	I	au	112	II	au	162	III	au
63	I	av	113	II	av	163	III	av
64	I	aw	114	II	aw	164	III	aw
65	I	ax	115	II	ax	165	III	ax

Ex#	Core	R	Ex#	Core	R	Ex#	Core	R
166	IV	a	216	V	a	266	VI	a
167	IV	b	217	V	b	267	VI	b
168	IV	c	218	V	c	268	VI	c
169	IV	d	219	V	d	269	VI	d
170	IV	e	220	V	e	270	VI	e
171	IV	f	221	V	f	271	VI	f
172	IV	g	222	V	g	272	VI	g
173	IV	h	223	V	h	273	VI	h
174	IV	i	224	V	i	274	VI	i
175	IV	j	225	V	j	275	VI	j
176	IV	k	226	V	k	276	VI	k
177	IV	l	227	V	l	277	VI	l
178	IV	m	228	V	m	278	VI	m
179	IV	n	229	V	n	279	VI	n
180	IV	o	230	V	o	280	VI	o
181	IV	p	231	V	p	281	VI	p
182	IV	q	232	V	q	282	VI	q
183	IV	r	233	V	r	283	VI	r
184	IV	s	234	V	s	284	VI	s
185	IV	t	235	V	t	285	VI	t
186	IV	u	236	V	u	286	VI	u
187	IV	v	237	V	v	287	VI	v
188	IV	w	238	V	w	288	VI	w
189	IV	x	239	V	x	289	VI	x
190	IV	y	240	V	y	290	VI	y
191	IV	z	241	V	z	291	VI	z
192	IV	aa	242	V	aa	292	VI	aa
193	IV	ab	243	V	ab	293	VI	ab
194	IV	ac	244	V	ac	294	VI	ac
195	IV	ad	245	V	ad	295	VI	ad
196	IV	ae	246	V	ae	296	VI	ae
197	IV	af	247	V	af	297	VI	af
198	IV	ag	248	V	ag	298	VI	ag
199	IV	ah	249	V	ah	299	VI	ah
200	IV	ai	250	V	ai	300	VI	ai
201	IV	aj	251	V	aj	301	VI	aj
202	IV	ak	252	V	ak	302	VI	ak
203	IV	al	253	V	al	303	VI	al
204	IV	am	254	V	am	304	VI	am
205	IV	an	255	V	an	305	VI	an
206	IV	ao	256	V	ao	306	VI	ao
207	IV	ap	257	V	ap	307	VI	ap
208	IV	aq	258	V	aq	308	VI	aq
209	IV	ar	259	V	ar	309	VI	ar
210	IV	as	260	V	as	310	VI	as
211	IV	at	261	V	at	311	VI	at

Ex#	Core	R	Ex#	Core	R	Ex#	Core	R
212	IV	au	262	V	au	312	VI	au
213	IV	av	263	V	av	313	VI	av
214	IV	aw	264	V	aw	314	VI	aw
215	IV	ax	265	V	ax	315	VI	ax

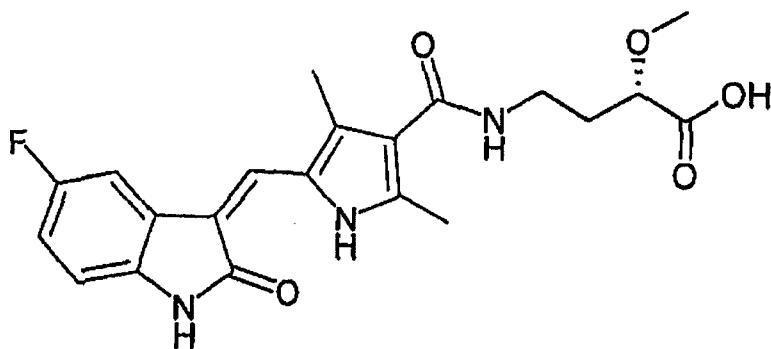
在上述表格中，R⁹选自如下列结构所示的自由基：



这些酰胺, 例 16-315, 可以按照上述程序和/或已知程序, 被本领域的技术人员制造。

例 316-320: 酸 (3-3) 和酰胺 (3-4) 的合成如图 3 所示。该一般合成过程的变体可以由本领域的技术人员理解和实施, 因此本发明的化合物可以由本领域的技术人员合成。

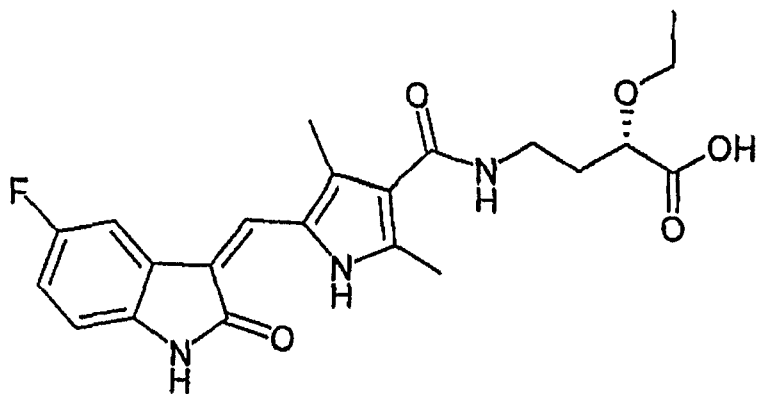
例 316: (S)-4-({5-[5-氟-2-酮基-1, 2-二氢-吡啶-(3Z)-亚基甲基]-2, 4-二甲基-1H-吡咯-3-羰基}-氨基)-2-甲氧基-丁酸



在 25 °C 下向甲基 4-氨基-2-羟基丁酸 (1.0 当量, 通过在含有 1.2 当量 HCL 的无水甲醇中回流游离氨基酸制备) 和 DIEA (5 当量) 的 DCM 溶液中分批加入 Mmt-Cl (1.1 当量)。搅拌一整夜后, 用减压蒸馏移除 DCM。残留物悬浮在乙酸乙酯中, 使用盐水 (3x) 清洗并使用无水 Na₂SO₄ 干燥残留物。除去乙酸乙酯, 在高度真空下将残留物干燥一整夜, 通过快速色谱技术得到化合物 3-1。在氩气下向化合物 3-1 的无水 DMF 溶液中加入 NaH (1.5 当量)。在 25 °C 下搅拌 1 小时后,

加入 MeI (5 当量)，然后将得到的悬浮物在 25 °C 下轻轻搅拌一整夜。在真空下除去 DMF，残留物悬浮在乙酸乙酯中，使用盐水 (3x) 清洗并通过无水 Na₂SO₄ 干燥。通过蒸馏将乙酸乙酯除去后，将得到的残留物使用 1% TFA 的 DCE/DCM 溶液处理 30 分钟。然后，通过减压蒸馏移除有机溶剂，将得到的残留物使用己烷磨成粉便得到游离氨基酸 3-2。该氨基酸可直接用于下面的步骤，并不需要提纯和表征。在 25 °C 下向含有 3-2 (2 当量) 和 DIEA (5 当量) 的 DMF 溶液中加入化合物 1-3 (1 当量)。搅拌 30 分钟后 (LC-MS 显示 1-3 完全消耗掉)，加入 KOH 水溶液 (5 当量)，接着搅拌 2 小时 (LC-MS 显示完全水解)。在减压蒸馏下除去溶剂，加入 HCL (1N 多) 得到沉淀物。过滤收集该沉淀物并使用水清洗，在高度真空下干燥便得到标题所示化合物 (97% 基于化合物 1-3)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH⁺ 用 C₂₁H₂₂FN₃O₅ 计算的值: 416, 实际获得值: 416。 ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 12.80 (b, 1H), 10.90 (s, 1H), 7.76 (dd, J = 2.4 Hz, J = 9.6 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.65 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, J = 4.8 Hz, J = 8.4 Hz, 1H), 3.77 (dd, J = 4.0 Hz, J = 8.8 Hz, 1H), 3.40-3.30 (m, 2H), 3.30 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.92 (m, 1H), 1.78 (m, 1H)。

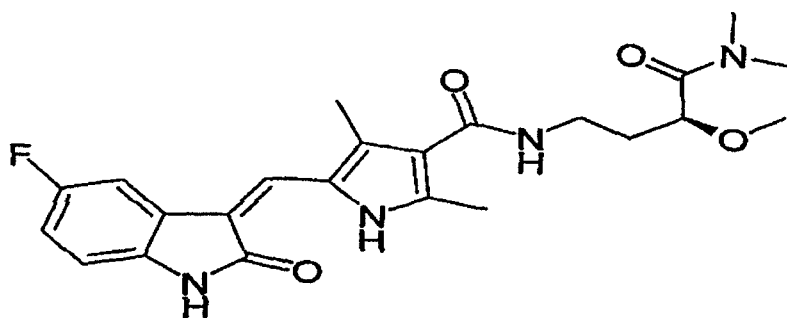
例 317: (S)-2-乙氧基-4-({5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡啶-3-基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羰基}-氨基)-丁酸



使用与合成例 316 化合物相似的步骤来制备标题所示化合物，只不过使用碘乙烷而不是碘甲烷来获取 2-乙氧基化合物（84%基于化合物 1-3）。LC-MS: 254 nm 单峰， MH^+ 用 $C_{22}H_{24}FN_3O_5$ 计算的值: 430，实际获得值: 430。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 12.70 (b, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.66 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.85 (dd, $J = 4.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.58 (m, 1H), 3.40-3.25 (m, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.92 (m, 1H), 1.77 (m, 1H), 1.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)。

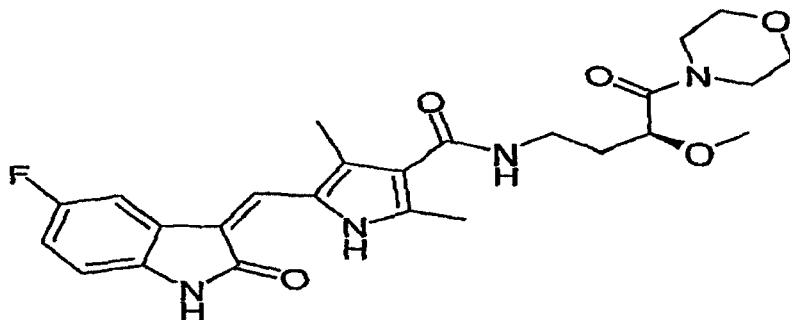
例 318-320: 合成酰胺（化合物 3-4）的通常过程。将相应的胺（2 当量）加入含有酸（化合物 3-3）、HATU (1.05 mmol) 和 DIEA (5 当量) 的 DMF 溶液 (5 mL) 中。将该溶液在 25 °C 下搅拌 2 小时，加入 HCL 水溶液 (2 mL, 1 N)。制备高效液相色谱处理得到纯净的酰胺产品，随后 LC-MS 和 NMR 图谱结构表征。

例 318: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吲哚-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 ((S)-3-二甲基胺甲酰基-3-甲氧基-丙基)-酰胺



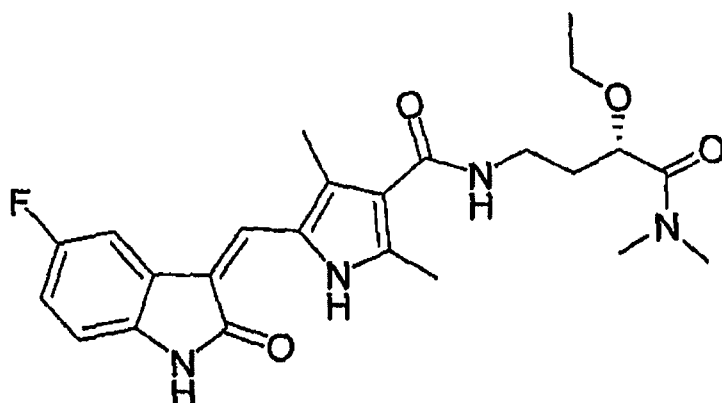
制备高效液相色谱, 从 60 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 37 mg 标题所示化合物 (58%)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH^+ 用 $C_{23}H_{27}FN_4O_4$ 计算的值: 443, 实际获得值: 443。 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.6$ Hz, 1 H), 7.72 (s, 1H), 7.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 4.20 (dd, $J = 4.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.30 (m, 2H), 3.27 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.80 (m, 2H)。

例 319: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吲哚-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1 H-吡咯-3-羧酸 ((S)-3-甲氧基-4-吗啉-4-基-4-酮基-丁基)-酰胺



制备高效液相色谱, 从 60 mg 起始材料 (酸) 中, 得到 32 mg 标题所示化合物 (46%)。LC-MS: 254 nm 单峰, MH^+ 用 $C_{25}H_{29}FN_4O_5$ 计算的值: 485, 实际获得值: 485。 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ 13.68 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.83 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.57 (m, 6H), 3.47 (m, 2H), 3.28 (m, 2H), 3.23 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.79 (m, 2H)。

例 320: 5-[5-氟-2-酮基-1,2-二氢-吡啶-(3Z)-亚基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸 ((S)-3-二甲基胺甲酯基-3-乙氧基-丙基)-酰胺



制备高效液相色谱，从 120 mg 起始材料（酸）中，得到 67 mg 标题所示化合物（57%）。LC-MS: 254 nm 单峰， MH^+ 用 $C_{24}H_{29}FN_4O_4$ 计算的值：457，实际获得值：457。 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ 13.67 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.56 (m, 1H), 6.91 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 3.45–3.25 (m, 4H), 3.03 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.80 (m, 2H)。

在这里所描述的化合物，是目前首选实例化的代表，是作为例子使用的，并不用于限制发明的范围。一个所属技术领域的专业人员，显而易见的，可以在不离开本发明的范围和精神下，对在这里透露的本发明做出不同的替代和更改。

VEGFR 生化测试

该化合物的生化活性，由大不列颠联合王国敦提市的 Upstate 有限公司，根据以下程序来测试。在最终反应体积 25 μ l 中，

KDR(h) (5-10mU) 和 8mM MOPS (3-(N-吗啉)丙磺酸) pH7.0、0.2mM EDTA、0.33mg/ml 髓鞘碱蛋白、10mM 乙酸镁、以及[γ - ^{33}P -ATP] (比活度约 500cpm/pmol, 按要求浓缩) 一起培养。加入 MgATP 混合物, 起始反应。在室温下培养 40 分钟后, 加入 5 μ l 3%的磷酸溶液终止反应。然后, 10 μ l 反应物在一台 P30 过滤机上被辨认, 并且用 75mM 磷酸洗三次, 每次 5 分钟, 甲醇预干燥一次, 闪烁计数。

本发明的化合物使用上述方法进行测试, 其 IC_{50} 在 1 - 5,000 nM 之间。

PDGFR 磷酸化测试

将 NIH3T3 细胞以 96 孔板的浓度接种到 DMEM + 10% FBS 中。细胞附着之后将细胞血清饥饿培养一整夜, 然后再加入化学测试化合物使终浓度达到 0.1% DMSO (二甲基亚砷)。细胞在 37 °C 下被培养 1 小时后从培养箱中移出, 然后使用 PDGF-BB 在室温下刺激 15 分钟, 不过在这之前可以允许细胞冷却到室温达 20 分钟。将细胞置于冰上 5 分钟, 除去细胞培养基并使用 100 μ L/孔的溶解液在 4 °C 下溶解细胞 1 小时。将培养板在 4 °C 下以 2000 rpm 的速度离心转动 30 分钟, 用 ELISA (酶联免疫吸附剂测定法) 来测定溶解的磷酸化 PDGFR。

高结合力的微孔反应板在室温下使用抗小鼠 PDGFR-b 捕获抗体的 PBS 溶液培养一整夜后, 使用 PBS+0.05% Tween20 清洗并在室温下使用 PBS+1 % BSA 阻断 4 小时, 然后再次清洗。100 μ L 溶解物/孔在 4 °C 下培养一整夜。清洗培养板并在板孔中以 100 μ L 孔的溶解液/浓

度在 37 °C 下培养小鼠抗酪氨酸磷酸化 HRP 抗体 2 小时。再次清洗培养板并使用 TMB 作为显色液进行比色检测。

本发明的大部分化合物在该测试中显示 IC_{50} 小于 1 μ M。

VEGFR 磷酸化测试

将 NIHT3T 细胞过量小鼠 VEGFR-2 (受体-1) 以 96 孔板的浓度接种到 DMEM + 10% FBS 中。细胞附着 4 小时后将细胞血清饥饿培养一整夜, 然后加入化学测试化合物使终浓度达到 0.1% DMSO (二甲基亚砷)。在 37 °C 下培养 1 小时之后使用 VEGF165 在 37 °C 下刺激细胞 15 分钟。将细胞置于冰上 5 分钟, 除去细胞培养基并使用冰冷的 PBS 清洗一次, 然后使用 50 μ L/孔的溶解液在 4 °C 下溶解细胞 1 小时。将培养板在 4 °C 下以 2000 rpm 的速度离心转动 10 分钟, 用 ELISA 来测定溶解的磷酸化 VEGFR。

高结合力的微孔反应板在室温下使用 VEGFR 抗体的 50 μ L PBS 溶液培养一整夜后, 使用 PBS+0.05% Tween20 清洗并在室温下使用 PBS+1 % BSA 阻断 4 小时, 然后再次清洗。将 50 μ L /孔的溶解物在 4 °C 下培养一整夜。清洗培养板并在板孔中以 50 μ L/孔的浓度在 37 °C 下培养小鼠抗酪氨酸磷酸化 HRP 抗体 2 小时。再次清洗培养板并使用 TMB 作为显色液进行比色检测。

本发明的大部分化合物在该测试中显示 IC_{50} 小于 1 μ M。

细胞测试：HUVEC（人类脐静脉血管内皮细胞）：VEGF 诱导下的增殖

该化合物的细胞活性，通过 HUVEC 细胞在 VEGF 诱导下的增殖来测试。HUVEC 细胞（Cambrex 公司，CC-2517）在 5%CO₂ 和 37℃ 下，被保持在 EGM[培养基]（Cambrex 公司，CC-3124）中。HUVEC 细胞被接种到 EGM 中，接种浓度 5000 细胞数/孔（96 孔板）。在细胞附着之后（1 小时），EGM 培养基被替换为 EBM[培养基]（Cambrex 公司，CC-3129）+0.1%FBS（胎牛血清）（ATTC, 30-2020），细胞在 37℃ 下培养 20 小时。培养基被替换为 EBM+1%FBS，化合物用 DMSO（二甲基亚砜）稀释成一系列浓度，加入到细胞中，终浓度为 0-5000nM 和 1%DMSO。在 37℃ 下 1 小时预培养之后，用 10ng/ml VEGF（Sigma 公司，V7259）刺激细胞，37℃ 下培养 45 小时。细胞的增殖用 BrdU（溴脱氧尿嘧啶核苷）DNA 掺入 4 小时来测量[译注：BrdU 将替换 DNA 中的胸腺嘧啶]，BrdU 标记用 ELISA（酶联免疫吸附剂测定法）（Roche 试剂盒，16472229）来测定，用 1M H₂SO₄ 使反应停止。使用干涉波长 690nm，在 450nm 测量吸光率。

附图详细描述：

图 1 显示了用于合成从甲基 3-羟基-4-氨基丁酸酯氢氯化物开始的 3-烷氧基-4-酰化氨基酰胺派生物与活性酰化剂 1-3 的方案。起始材料氨基酯氢氯化物通过在含有 1.2 当量 HCL 的无水甲醇中回流游离氨基酸制备。在与仲羟基生成中性羟基酯 1-1 时，氨基和它的单甲氧基三苯甲基派生物一样受到保护。羟基使用甲基或者碘乙烷来烷基化

从而生成受保护的氨基烷氧基酯。在 1% 的三氟乙酸中除去 Mmt 得到氨基氢氯化物或者三氟乙酸化合物 1-2。将该化合物使用酰化剂 1-3 快速酰化并将甲基酯通过氢氧化钾的水/DMF 溶液水解后得到 1-4。然后将游离酸暴露于 HATU、胺以及二异丙基乙胺的 DMF 溶液中得到烷氧基酸 1-5。

图 2 显示了用于合成从甲基 2-羟基-3-氨基丁酸酯氢氯化物开始的 2-烷氧基-3-酰化氨基酰胺派生物与活性酰化剂 1-3 的方案。起始材料氨基酯氢氯化物通过在含有 1.2 当量 HCL 的无水甲醇中回流游离氨基酸制备。在与仲羟基生成中性羟基酯 1-1 时，氨基和它的单甲氧基三苯甲基派生物一样受到保护。羟基使用甲基或者碘乙烷来烷基化从而生成受保护的氨基烷氧基酯。在 1% 的三氟乙酸中除去 Mmt 得到氨基氢氯化物或者三氟乙酸化合物 2-2。将该化合物使用酰化剂 1-3 快速酰化并将甲基酯通过氢氧化钾的水/DMF 溶液水解后得到 2-4。然后将游离酸暴露于 HATU、胺以及二异丙基乙胺的 DMF 溶液中得到烷氧基酸 2-5。

图 3 显示了用于合成从甲基 (2S)-2-羟基-4-氨基丁酸酯氢氯化物开始的 (2S)-2-烷氧基-4-酰化氨基酰胺派生物与活性酰化剂 1-3 的方案。起始材料氨基酯氢氯化物通过在含有 1.2 当量 HCL 的无水甲醇中回流游离氨基酸制备。在与仲羟基生成中性羟基酯 1-1 时，氨基和它的单甲氧基三苯甲基派生物一样受到保护。羟基使用甲基或者碘乙烷来烷基化从而生成受保护的氨基烷氧基酯。在 1% 的三氟乙酸中除去 Mmt 得到氨基氢氯化物或者三氟乙酸化合物 3-2。将该化合物使用酰

化剂 1-3 快速酰化并将甲基酯通过氢氧化钾的水/DMF 溶液水解后得到 3-4。然后将游离酸暴露于 HATU、胺以及二异丙基乙胺的 DMF 溶液中得到烷氧基酸 3-5。

