



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116370448 A

(43) 申请公布日 2023.07.04

(21) 申请号 202310282338.X

A61K 31/18 (2006.01)

(22) 申请日 2018.04.25

A61K 31/275 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/490,280 2017.04.26 US

A61K 31/135 (2006.01)

A61K 31/133 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201880039788.3 2018.04.25

A61K 31/69 (2006.01)

A61K 31/695 (2006.01)

(71) 申请人 纳维托制药有限公司

A61K 31/415 (2006.01)

地址 美国马萨诸塞州

A61K 31/4196 (2006.01)

(72) 发明人 E·赛亚 G·维拉苏克

A61K 31/341 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

A61K 31/4453 (2006.01)

责任公司 11287

A61K 45/06 (2006.01)

专利代理人 范海云

A61K 31/445 (2006.01)

(51) Int.Cl.

A61K 31/42 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/4245 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 31/16 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书134页 附图45页

(54) 发明名称

SESTRIN-GATOR2相互作用的调节剂及其用

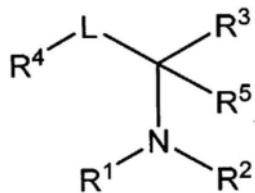
途

(57) 摘要

本申请涉及SESTRIN-GATOR2相互作用的调节剂及其用途。具体地，本发明提供化合物、其组合物及其使用方法。



1. 一种治疗有需要的患者的疾病、病症或病况的方法，其中所述疾病、病症或病况选自难治性抑郁症、溶酶体贮积病、JNCL、胱氨酸症、法布里病、MLIV、智力迟钝或遗传型自闭症，所述方法包括向所述患者投与式I化合物或其药学上可接受的组合物：

**I**

或其药学上可接受的盐，其中：

R<sup>1</sup>为H或C<sub>1-6</sub>烷基；

R<sup>2</sup>为R、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-苯基、-C(O)R、-SO<sub>2</sub>R或-C(O)N(R)<sub>2</sub>；

n为0、1或2；

各R独立地为氢、-CN或选自以下的任选地经取代的基团：饱和或不饱和C<sub>1-6</sub>脂肪族基、苯基、4元到7元饱和或部分不饱和单环碳环、具有1到4个杂原子的5元到6元单环杂芳基环或具有1到2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的4元到8元饱和或部分饱和杂环；

R<sup>3</sup>为环A、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)N(R)<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>、-S(O)R、-S(O)环A、-OR或-B(OR)<sub>2</sub>，其中同一硼上的两个OR基团与其中间原子结合在一起形成除所述硼及两个氧外具有0到3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元到8元单环饱和或部分不饱和环，或R<sup>3</sup>及R<sup>4</sup>结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环；

L为共价键或任选地经1到9个氟基取代的直链或支链C<sub>1-6</sub>亚烷基链；

环A为选自苯基的任选地经取代的环或具有1到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元杂芳基环；

R<sup>4</sup>为R、-CF<sub>3</sub>、-OR、-N(R)<sub>2</sub>、-Si(R)<sub>3</sub>或-SR，或R<sup>3</sup>及R<sup>4</sup>结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环；且

R<sup>5</sup>为H或C<sub>1-4</sub>烷基，

其中所述式I化合物不为表2中描绘的那些。

## SESTRIN-GATOR2相互作用的调节剂及其用途

[0001] 本申请是申请日为2018年4月25日，申请号为201880039788.3，发明名称为“SESTRIN-GATOR2相互作用的调节剂及其用途”的申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及适用于调节Sestrin-GATOR2相互作用，由此选择性地间接调节mTORC1活性的化合物及方法。本发明还提供包括本发明化合物的药学上可接受的组合物及使用所述组合物治疗各种病症的方法。

### 背景技术

[0003] 雷帕霉素复合物1(mTORC1)蛋白激酶的机理目标为感测多种多样的环境线索，例如生长因子、细胞应力及养分及能阶的主要生长调节剂。在活化时，mTORC1使底物磷酸化，所述底物增强合成代谢过程，例如mRNA转译及脂质合成；且限制分解代谢过程，例如自噬。mTORC1失调发生于广泛范围的疾病中，尤其包含糖尿病、癫痫症、神经退化、免疫反应、骨骼肌肉生长遏制及癌症(Howell等人，(2013) Biochemical Society transactions 41, 906-912; Kim等人，(2013) Molecules and cells 35, 463-473; Laplante及Sabatini，(2012) Cell 149, 274-293)。

[0004] 多个上游输入端(包含生长因子及能阶)经由调控Rheb(其为mTORC1的必需活化剂的较小GTP酶)的TSC复合物发信号给mTORC1(Brugarolas等人，(2004) Genes& Development 18, 2893-2904; Garami等人，(2003) Molecular Cell 11, 1457-1466; Inoki等人，(2003) Genes& Development 17, 1829-1834; Long等人，(2005) Current Biology 15, 702-713; Sancak等人，(2008) Science (New York, NY) 320, 1496-1501; Saucedo等人，(2003) Nature cell biology 5, 566-571; Stocker等人，(2003) Nature cell biology 5, 559-565; Tee等人，(2002) Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13571-13576)。氨基酸似乎并不会经由TSC-Rheb轴发信号给mTORC1而是经由杂二聚体Rag GTP酶起作用，所述杂二聚体Rag GTP酶分别由键结到RagC或RagD的RagA或RagB组成(Hirose等人，(1998) Journal of cell science 111(Pt 1), 11-21; Kim等人，(2008) Nature cell biology 10, 935-945; Nobukuni等人，(2005) Proc Natl Acad Sci U S A 102, 14238-14243; Roccio等人，(2005) Oncogene 25, 657-664; Sancak等人，(2008) Science (纽约, NY) 320, 1496-1501; Schürmann等人，(1995) The Journal of biological chemistry 270, 28982-28988; Sekiguchi等人，(2001) The Journal of biological chemistry 276, 7246-7257; Smith等人，(2005) The Journal of biological chemistry 280, 18717-18727)。Rag GTP酶控制mTORC1的亚细胞定位且氨基酸促进其募集到溶酶体表面，其中还驻留Rheb GTP酶(Buerger等人，(2006) Biochemical and Biophysical Research Communications 344, 869-880; Dibble等人，(2012) Molecular cell 147, 535-546; Saito等人，(2005) Journal of Biochemistry 137, 423-430; Sancak等人，(2008) Science (纽约, NY) 320, 1496-1501)。已鉴别出Rag GTP酶的路径上游的若干正组分。调节剂复合物使Rag GTP酶定位于溶酶体表面且与空泡ATP酶一起促

进用RagA/B上GDP交换GTP(Bar-Peled等人, (2012) Cell 150, 1196-1208; Sancak等人, (2010) Cell 141, 290-303; Zoncu等人, (2011) Science Signaling 334, 678-683)。不同FLCN-FNIP复合物作用于RagC/D且刺激其使GTP水解成GDP(Tsun等人, 2013)。当RagA/B装载有GTP且RagC/D装载有GDP时, 杂二聚体结合且募集mTORC1到溶酶体表面, 其中其可与其活化剂Rheb GTP酶接触。

[0005] 近期工作已鉴别出GATOR1多蛋白复合物为氨基酸感测路径的主要负调控剂且其缺失使得mTORC1信号传导对氨基酸不足完全不敏感(Bar-Peled等人, (2013) Science 340, 1100-1106; Panchaud等人, (2013) Science Signaling 6, ra42)。GATOR1由DEPDC5、Npr12及Npr13组成, 且为RagA/B的GTP酶活化蛋白(GAP)。具有五个已知次单元(WDR24、WDR59、Mios、Sec13及Seh1L)的GATOR2多蛋白复合物为GATOR1路径的正组分且在GATOR1上游或与GATOR1平行, 但直到最近, 其分子功能仍未知(Bar-Peled等人, (2013) Science 340, 1100-1106)。

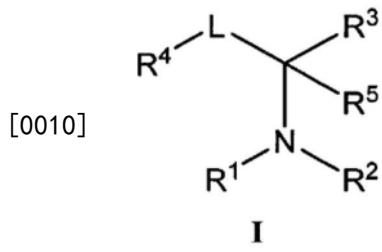
[0006] 最近, 关于mTORC1路径的额外信息已通过以下阐明: 鉴别GATOR2与Sestrin中的一或两者结合且证明所得Sestrin-GATOR2复合物调控mTORC1的亚细胞定位及活性。特定来说, Sestrin-GATOR2复合物的存在通过预防mTORC1易位到溶酶体膜来抑制mTORC1路径且降低mTORC1活性。通过氨基酸, 尤其亮氨酸及(在较低程度上)异亮氨酸、甲硫氨酸及缬氨酸, 对抗GATOR2与Sestrin, 且尤其Sestrin1及Sestrin2的相互作用。在亮氨酸存在下, GATOR2不与Sestrin1或Sestrin2相互作用且mTORC1能够迁移到活性的溶酶体膜。Sestrin1及Sestrin2使亮氨酸及(在较低程度上)异亮氨酸及甲硫氨酸直接结合(Chantranupong等人, (2014) Cell Rep.; 9(1): 1-8)。需要通过Sestrin1或Sestrin2结合亮氨酸以用于破坏其与GATOR2的相互作用及mTORC1的后续活化。不能结合亮氨酸的Sestrin2突变体无法将存在亮氨酸的信号发给mTORC1, 且耗乏Sestrin2的细胞及其同源物使得mTORC1对亮氨酸的不存在不敏感(Wolfson等人, (2015) Science pii:ab2674[印刷前电子版])。

[0007] Sestrin为不良表征的分子功能的三种相关蛋白质(Sestrin1、Sestrin2及Sestrin3)(Buckbinder等人, (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91, 10640-10644; Budanov等人, (2002) Cell 134, 451-460; Peeters等人, (2003) Human genetics 112, 573-580)。Sestrin2抑制mTORC1信号传导且已提出活化TSC的上游AMPK以及与TSC(Budanov及Karin, (2008) Cell 134, 451-460)相互作用, 但后续研究发现在AMPK不存在下通过Sestrin2抑制mTORC1(Peng等人, (2014) Cell 159(1): 122-33)进一步突出GATOR2复合物在响应于Sestrin2, 调节mTORC1方面发挥的重要作用。

[0008] 调节Sestrin-GATOR2复合物表示选择性地间接调节mTORC1活性的潜在治疗目标。

## 发明内容

[0009] 现已发现本发明化合物及其药学上可接受的组合物作为Sestrin-GATOR2调节剂为有效的。这类化合物具有通式I:



[0011] 或其药学上可接受的盐,其中各变量如本文所定义及描述。

[0012] 本发明化合物及其药学上可接受的组合物适用于治疗多种与mTORC1相关的疾病、病症或病况。这类疾病、病症或病况包含糖尿病、癫痫症、神经退化、免疫反应、骨骼肌肉生长遏制及细胞增殖病症(例如癌症),例如本文所描述的那些。

## 附图说明

[0013] 图1展示实例A的研究时刻表。雄性史泊格多利大鼠适应环境5天,且在第0天给药,如表6中所描述。给药后二十四小时(第1天),进行雌性尿液嗅闻测试(FUST)。在研究第2天(给药后48小时),进行运动活性(LMA)评定。大鼠禁食隔夜持续20小时,其后进行新颖遏制喂饲测试(NSFT)(给药后72小时)。

[0014] 图2展示FUST中Ket及NV-5138(I-90)的作用。所有数据表示为平均值±SEM(n=8/处理组)。\*p<0.05及\*\*p<0.01指示未配对双尾史都登氏t试验(students t-test)的显著差异。

[0015] 图3展示Ket及NV-5138(I-90)对LMA评定的作用。氯胺酮媒剂(Sal);NV-5138媒剂(Veh);氯胺酮(Ket);NV-5138(NV)。展示在30分钟的时间段内红外光束断裂的数目。所有数据表示为平均值±SEM(n=8/处理组)。通过未配对双尾史都登氏t试验观测到群组之间无显著差异。

[0016] 图4展示新颖遏制喂饲测试(NSFT)中Ket及NV-5138(I-90)的作用。氯胺酮媒剂(Sal);NV-5138媒剂(Veh);氯胺酮(Ket);NV-5138(NV)。展示喂饲等待时间,以秒为单位。所有数据表示为平均值±SEM(n=8/处理组)。\*\*p<0.01指示未配对双尾史都登氏t试验的显著差异。

[0017] 图5展示实例B的研究时刻表。雄性史泊格多利大鼠适应环境5天,在第0天给药,如表7中所描述。给药后一小时(第0天+1小时),处死群组1、2、3及4的大鼠,继而采集前额叶皮质(PFC),制备突触体,且进行WB分析。给药后二十四小时(第1天),处死群组5、6、7及8的大鼠,继而采集PFC,制备突触体,且进行WB分析。

[0018] 图6展示大鼠脑的PFC解剖的示意性图示。A)大鼠脑的背视图且两条黑线指示解剖位置以分隔大脑的PFC区域。B)大鼠脑的矢状图,黑色对角线表示去除嗅球的切口且两条黑色垂直线代表分隔PFC区域的切口。

[0019] 图7展示NV-5138(I-90)及Ket对给药投与后一小时由PFC制备的粗突触体中的pmTOR、pp70S6K及p4E-BP1含量的作用。pmTOR(A)、pp70S6K(B)及p4E-BP1(C)的倍数变化(标准化以控制Veh或Sal)。用于统计分析的总共n=6中的三个代表性WB展示pmTOR(A)、pp70S6K(B)及p4E-BP1(C)的上述曲线图。所有数据为平均值±SEM.\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001指示未配对双尾史都登氏t试验的显著差异。

[0020] 图8展示Ket及NV-5138 (I-90) 对给药投与后24小时由PFC制备的粗突触体中的GluR1、突触蛋白1及PSD95含量的作用。由PFC纯化的粗突触体中的GluR1 (A) 、突触蛋白1 (B) 及PSD95 (C) (标准化到相应控制组Sal或Veh) 的倍数变化。用于统计分析的总共n=6中的三个代表性WB展示GluR1 (A) 、突触蛋白1 (B) 及PSD95 (C) 的上述曲线图。所有数据为平均值±SEM。\*p<0.05及\*\*p<0.01指示未配对双尾史都登氏t试验(students t-test)的显著差异。

[0021] 图9展示实例C的时刻表研究。雄性史泊格多利大鼠适应环境5天，在第0天给药，如表8中所描述。给药后一小时(第0天+1小时)，处死群组1及2的大鼠，继而采集血浆及解剖的大脑区域以用于测定化合物含量及WB分析。

[0022] 图10展示解剖的大鼠脑区域的示意性图示。大鼠脑的矢状图，白色箭头指示针对WB分析解剖的区域。

[0023] 图11展示投与后1小时NV-5138 (I-90) 对多个大脑区域内pS6含量的作用。柱状图展示与Veh(在大鼠大脑的各种区域中标准化为1) 相比<sup>S240/244</sup>pS6的倍数变化。在图上展示用于定量分析的代表性WB。所有数据为平均值±SEM。\*p<0.05指示未配对双尾史都登氏t试验的显著差异。

[0024] 图12展示实例D的时刻表研究。雄性史泊格多利大鼠适应环境5天，在第0天给药，如表9中所描述。给药后一小时(第0天+1小时)，处死群组1、2及3的大鼠，采集血浆、大脑及外周组织，继而处理以用于WB分析。

[0025] 图13展示在经口投与之后1小时，Leu及NV-5138 (I-90) 对大脑及所选外周器官中的pS6含量的作用。柱状图展示标准化到大鼠脑及外周组织腓肠肌(Gastroc)；胫前部肌肉(TA)；附睾脂肪(Epi脂肪)中的Veh的pS6的倍数变化。代表性WB展示于曲线图上。所有数据为平均值±SEM(n=10/组)。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001及\*\*\*\*p<0.0001指示未配对双尾史都登氏t试验的显著差异。

[0026] 图14展示实例E的时刻表研究。在第0天给药，如表10中所描述。慢性不可预测性应激(CUS)程序在20天前开始且在第5天结束(组3及4,n=14/组)。通常将两组大鼠(组1及2,n=14/组)圈养25天且用作无应激(NS)组。第一次给药在第0天。给药后二十四小时(第1天)，在脱水6小时之后进行蔗糖偏好测试(SPT)。随后大鼠禁食隔夜持续20小时，其后进行NSFT(给药后48小时)。在第5天投与Veh或NV-5138的第二剂量，继而处死24小时，随后进行大脑采集、突触体制备及WB分析。

[0027] 图15展示大鼠脑的PFC解剖的示意性图示。A) 大鼠脑的背视图且两条黑线指示解剖位置以分隔大脑的PFC区域。B) 大鼠脑的矢状图，黑色对角线表示去除嗅球的切口且两条黑色垂直线代表分隔PFC区域的切口。

[0028] 图16展示21天前及第0天的NS及CUS大鼠的体重。处理NS及CUS大鼠两者且每周称重。所有数据为平均值±SEM(n=14/处理组)。\*\*\*\*p<0.0001指示双向ANOVA继而杜凯氏多次比较测试的显著差异。

[0029] 图17展示NV-5138 (I-90) 对NS及CUS大鼠中的SPT的作用。在NS及CUS程序结束时在第0天用Veh或NV-5138(160mg/kg)处理大鼠且给药后24小时进行SPT。在1小时暴露结束时，展示所有4组(偏好)的1%蔗糖与水的体积比率。所有数据为平均值±SEM(n=14/处理组)。\*p<0.05指示双向ANOVA继而杜凯氏多次比较测试的显著差异。

[0030] 图18展示NV-5138 (I-90) 对NS及CUS大鼠中的NSFT的作用。在NS及CUS程序结束时

用Veh或NV-5138处理大鼠且给药后48小时进行NSFT。柱状图展示NSFT中的喂饲等待时间。所有数据展示为平均值±SEM(n=14/处理组)。\*\*p<0.01及\*\*\*\*p<0.0001指示双向ANOVA继而杜凯氏多次比较测试的显著差异。

[0031] 图19展示NV-5138(I-90)对由NS及CUS大鼠的PFC制备的突触体中的GluR1及PSD95的作用。

[0032] 图20展示实例F的时刻表研究。在5天环境适应之后,在14天前,将双侧IT插管植入于所有大鼠的PFC中,继而为2周回收时间段。在第0天,投与测试物品,如研究设计表11中所示。

[0033] 图21展示PFC中的mTORC1抑制对FST中的经口NV-5138的药理学功效的作用。通过经口投与Veh-NV-5138或NV-5138(160mg/kg)30分钟后,通过IT向大鼠投与Veh-R或R。在经口投与之后进行FST 24小时。所有数据展示为平均值±SEM(n=6-7/处理组)。\*\*\*p<0.001及\*\*\*\*p<0.0001指示单向ANOVA继而杜凯氏多次比较测试的显著差异。

[0034] 图22展示使用LMA评定的处理的作用。通过经口投与Veh-NV-5138或NV-5138(I-90;160mg/kg)30分钟后,通过IT向大鼠投与Veh-R或R。在经口投与之后48小时测量LMA。所有数据展示为平均值±SEM(n=6-7/处理组)。通过单向ANOVA继而杜凯氏多次比较测试,在群组之间未观测到显著差异。

[0035] 图23展示PFC中的mTORC1抑制对经口NV-5138(I-90)的药理学功效的作用。通过经口投与Veh-NV-5138或NV-5138(160mg/kg)30分钟后,通过IT向大鼠投与Veh-R或R。在经口投与之后72小时,在20小时禁食时间段之后,进行NSFT。柱状图展示NFST(A) 及食物消耗量(B)。所有数据展示为平均值±SEM(n=6-7/处理组)。\*p<0.05指示单向ANOVA继而杜凯氏多次比较测试的显著差异。

[0036] 图24展示实例G的行为测试的时间研究。雄性史泊格多利大鼠在运送后5天全都适应环境。在第0天,投与测试物品,如研究设计表12中所示。在第3天及第7天进行FST且在20小时隔夜禁食之后第10天进行NSFT。

[0037] 图25展示给药后第3天及第7天Ket及NV-5138(I-90)对FST的作用。柱状图展示在给药后第3天及第7天进行FST。氯胺酮媒剂(Sal);NV-5138媒剂(Veh);氯胺酮(Ket);NV-5138(NV)。所有数据展示为平均值±SEM.\*p<0.05及\*\*p<0.01指示未配对双尾史都登氏t试验的显著差异。

[0038] 图26展示给药后第10天Ket及NV-5138(I-90)对NSFT的作用。氯胺酮媒剂(Sal);NV-5138媒剂(Veh);氯胺酮(Ket);NV-5138(NV)。条形图展示给药后第10天进行的NSFT(A) 及饲养笼食物消耗量(B)(组3、4、5及6)。所有数据展示为平均值±SEM。通过未配对双尾史都登氏t试验观测到群组之间无显著差异。

[0039] 图27展示实例H的研究时刻表。雄性史泊格多利大鼠适应环境5天,且在第0天投药,如表13中所描述。给药后二十四小时(第1天),处死大鼠,制备大脑切片且记录EPSC。随后通过棘密度及形态的显微术分析固定切片。

[0040] 图28展示5-HT及下视丘分泌素诱导的EPSC的频率。柱状图展示在PFC中通过全细胞膜片钳记录的给药之后24小时,神经元中的5-羟基色胺(5-HT)-EPSC及下视丘分泌素(Hcrt)-EPSC。所示细胞的数目来源于n=8只大鼠。所有数据表示为平均值±SEM。\*\*p<0.01及\*\*\*p<0.001指示未配对双尾史都登氏t试验的显著差异。

[0041] 图29展示NV-5138(I-90)对枝晶形态的作用。A) 在给药之后24小时神经生物素标记层V锥体细胞的顶簇的远端、中间及近端链段的较高放大率Z堆叠突起的代表性双光子图像。B) 分别展示媒剂及NV-5138组的从4及5个动物分离的来源于n=9个细胞/6-18个图像/细胞每 $\mu\text{m}$ 棘粗短、细长及蘑菇的定量的柱状图。所有数据表示为平均值±SEM.\*p<0.05指示未配对双尾史都登氏t试验的显著差异。

[0042] 图30展示来自给药后24小时媒剂或NV-5138(I-90)处理大鼠的切片中的5-HT及Hcrt诱导的EPSC的样品全细胞电压钳迹线。

[0043] 图31展示5-HT及Hcrt诱导的EPSC的累积概率分布及NV-5138(I-90)对频率而非幅值的作用。

[0044] 图32展示实例J的研究时刻表。雄性史泊格多利大鼠适应环境5天。在1天前,大鼠经受预游泳。在第0天开始,大鼠每隔一天接受Ket或Sal持续7天(第0天到第6天),或NV-5138一天一次持续7天(第0天到第6天),如表14中所描述。

[0045] 图33展示FST中Ket及NV-5138(I-90)的作用。NV-5138媒剂(Veh);生理盐水(Sal);氯胺酮(Ket,10mg/kg),NV-5138("NV";40或80mg/kg)。

[0046] 图34展示LMA中Ket及NV-5138(I-90)的作用。NV-5138媒剂(Veh);生理盐水(Sal);氯胺酮(Ket,10mg/kg),NV-5138("NV";40或80mg/kg)。

[0047] 图35展示NSFT及饲养笼喂饲对照组中的Ket及NV-5138(I-90)的作用。NV-5138媒剂(Veh);生理盐水(Sal);氯胺酮(Ket,10mg/kg),NV-5138("NV";40或80mg/kg)。

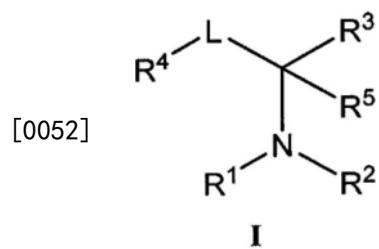
[0048] 图36展示Ket(0.3mg/kg)及NV-5138(I-90;160mg/kg)相比于氯二氮环氧化物(1mg/kg)在狨猴人类威胁测试中的作用。数据表示为平均值±SEM(n=10/处理组)。相对于相应媒剂群组,通过单向ANOVA,继而杜奈特测试,\*\*\*P<0.001.\*指示在这一组中给药的12个动物中的6个观测到呕吐。

[0049] 图37展示Ket(0.3mg/kg)及NV-5138(I-90;160mg/kg)相比于氯二氮环氧化物(1mg/kg)在狨猴人类威胁测试的运动控制中的作用。数据表示为平均值±SEM(n=10/处理组)。相对于相应媒剂群组,通过单向ANOVA,继而杜奈特测试,\*\*\*P<0.001.\*指示在这一组中给药的12个动物中的6个观测到呕吐。

## 具体实施方式

[0050] 1. 本发明的某些实施例的一般描述:

[0051] 本发明化合物及其组合物用作Sestrin-GATOR2调节剂。在某些实施例中,本发明提供式I化合物:



[0053] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0054] R<sup>1</sup>为H或C<sub>1-6</sub>烷基;

[0055] R<sup>2</sup>为R、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-苯基、-C(O)R、-SO<sub>2</sub>R或-C(O)N(R)<sub>2</sub>;

[0056] n为0、1或2;

[0057] 各R独立地为氢、-CN或选自以下的任选地经取代的基团:饱和或不饱和C<sub>1-6</sub>脂肪族基、苯基、4元到7元饱和或部分不饱和单环碳环、具有1到4个杂原子的5元到6元单环杂芳基环或具有1到2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的4元到8元饱和或部分饱和杂环;

[0058] R<sup>3</sup>为环A、-C(0)R、-C(0)OR、-C(0)N(R)<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>、-S(0)R、-S(0)环A、-OR或-B(OR)<sub>2</sub>,其中同一硼上的两个OR基团与其中间原子结合在一起形成除硼及两个氧外具有0到3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元到8元单环饱和或部分不饱和环,或R<sup>3</sup>及R<sup>4</sup>结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环;

[0059] L为共价键或任选地经1到9个氟基取代的直链或支链C<sub>1-6</sub>亚烷基链;

[0060] 环A为选自苯基的任选地经取代的环或具有1到4个杂原子独立地选自氮、氧或硫的任选地经取代的5元到6元杂芳基环;

[0061] R<sup>4</sup>为R、-CF<sub>3</sub>、-OR、-N(R)<sub>2</sub>、-Si(R)<sub>3</sub>或-SR,或R<sup>3</sup>及R<sup>4</sup>结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环;且

[0062] R<sup>5</sup>为H或C<sub>1-4</sub>烷基。

## 2. 化合物及定义:

[0064] 本发明化合物包含在本文中一般描述且通过本文所揭示的类别、子类及种类进一步说明的那些化合物。如本文所使用,除非另外指明,否则以下定义应适用。出于本发明的目的,化学元素根据元素周期表(Periodic Table of the Elements),CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics,第75版来鉴别。另外,有机化学的一般原理描述于“有机化学(Organic Chemistry)”,Thomas Sorrell,University Science Books,Sausalito:1999及“马奇的高级有机化学(March’s Advanced Organic Chemistry)”,第5版,编者:Smith, M.B. 及 March, J., John Wiley&Sons, New York:2001,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0065] 如本文所使用,术语“脂肪族”或“脂肪族基”意指完全饱和或含有一或多个不饱和单元的直链(即,非支链)或支链经取代或未经取代的烃链或完全饱和或含有一或多个不饱和单元,但不为芳香族的单环烃或双环烃(在本文中也称为“碳环”、“环脂肪族”或“环烷基”),其与分子剩余部分具有单一连接点。除非另外说明,否则脂肪族基含有1到6个脂肪族碳原子。在一些实施例中,脂肪族基含有1到5个脂肪族碳原子。在其它实施例中,脂肪族基含有1到4个脂肪族碳原子。在其它实施例中,脂肪族基含有1到3个脂肪族碳原子,且在其它实施例中,脂肪族基含有1到2个脂肪族碳原子。在一些实施例中,“环脂肪族”(或“碳环”或“环烷基”)指代完全饱和或含有一或多个不饱和单位,但不为芳香族的单环C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>烃,其与分子剩余部分具有单一连接点。适合的脂肪族基包含(但不限于)直链或支链经取代或未经取代的烷基、烯基、炔基及其混合,例如(环烷基)烷基、(环烯基)烷基或(环烷基)烯基。

[0066] 术语“杂原子”意指氧、硫、氮、磷或硅中的一或者者(包含氮、硫、磷或硅的任何氧化形式;任何碱性氮的季铵化形式;或杂环的可取代氮,例如N(如3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如吡咯烷基中)或NR<sup>+</sup>(如经N取代的吡咯烷基中))。

[0067] 如本文所使用的术语“不饱和”意指具有一或多个不饱和单元的部分。

[0068] 如本文所使用,术语“二价C<sub>1-8</sub>(或C<sub>1-6</sub>)饱和或不饱和、直链或支链烃链”指代如本文所定义为直链或支链的二价亚烷基、亚烯基及亚炔基链。

[0069] 术语“亚烷基”指代二价烷基。“亚烷基链”为聚亚甲基,即 $-(\text{CH}_2)_n-$ ,其中n为正整数,优选为1到6、1到4、1到3、1到2或2到3。经取代的亚烷基链为其中一或多个亚甲基氢原子经取代基置换的聚亚甲基。适合的取代基包含下文关于经取代的脂肪族基所描述的那些取代基。

[0070] 术语“亚烯基”指代二价烯基。经取代的亚烯基链为含有至少一个双键的聚亚甲基,其中一或多个氢原子经取代基置换。适合的取代基包含下文关于经取代的脂肪族基所描述的那些取代基。

[0071] 术语“卤素”意指F、Cl、Br或I。

[0072] 如在“芳烷基”、“芳烷氧基”或“芳氧基烷基”中单独使用或作为较大部分的一部分使用的术语“芳基”指代具有总共5到14个环成员的单环或双环环系统,其中系统中的至少一个环为芳香族且其中系统中的各环含有3到7个环成员。术语“芳基”可与术语“芳环”互换使用。在本发明的某些实施例中,“芳基”指代包含(但不限于)苯基、联苯基、萘基、蒽基及其类似基团的芳环系统,其可带有一或多个取代基。如本文所使用,在术语“芳基”范围内还包含芳环稠合到一或多个非芳香族环的基团,例如二氢茚基、邻苯二甲酰亚氨基、萘酰亚氨基、啡啶基或四氢萘基及其类似基团。

[0073] 单独使用或作为较大部分的一部分使用的术语“杂芳基”及“杂芳-”,例如“杂芳烷基”或“杂芳烷氧基”指代具有5到10个环原子,优选5、6或9个环原子;具有环状阵列中共享的6、10或14π电子;且除碳原子外具有一到五个杂原子的基团。术语“杂原子”指代氮、氧或硫,且包含氮或硫的任何氧化形式;及碱性氮的任何季铵化形式。杂芳基包含(但不限于)噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、恶唑基、异恶唑基、恶二唑基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、吲哚基、嘌呤基、腙啶基及蝶啶基。如本文所使用,术语“杂芳基”及“杂芳-”还包含杂芳环稠合到一或多个芳基、环脂肪族或杂环基环的基团,其中自由基或连接点在杂芳环上。非限制性实例包含吲哚基、异吲哚基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、二苯并呋喃基、吲唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、喹啉基、异喹啉基、吖啶基、酞嗪基、喹唑啉基、喹喏啉基、4H-喹嗪基、咔唑基、吖啶基、啡嗪基、啡噻嗪基、啡恶嗪基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基及吡啶并[2,3-b]-1,4-恶嗪-3(4H)-酮。杂芳基可为单环或双环的。术语“杂芳基”可与术语“杂芳基环”、“杂芳基”或“杂芳香族”互换使用,所述术语中的任一者包含任选地经取代的环。术语“杂芳烷基”指代经杂芳基取代的烷基,其中烷基及杂芳基部分独立地任选地经取代。

[0074] 如本文所使用,术语“杂环”、“杂环基”、“杂环自由基”及“杂环”可互换使用且指代稳定的5元到7元单环或7元到10员双环杂环部分,其为饱和或部分不饱和的,且除碳原子以外具有一或多个,优选一到四个如上文所定义的杂原子。当参考杂环的环原子使用时,术语“氮”包含经取代的氮。举例来说,在具有0到3个选自氧、硫或氮的杂原子的饱和或部分不饱和环中,氮可为N(如在3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或<sup>+</sup>NR(如在经N取代吡咯烷基中)。

[0075] 杂环可在任何杂原子或碳原子处连接到其侧基,从而产生稳定结构,且任何环原子可任选地经取代。这类饱和或部分不饱和杂环基团的实例包含(但不限于)四氢呋喃基、四氢噻吩基吡咯烷基、哌啶基、吡咯啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、噁唑烷基、哌嗪基、二氧杂环己烷基、二氧戊环基、二氮杂环、恶氮杂环、噁氮杂环、吗啉基及啶基。

术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基(heterocyclyl)”、“杂环基环(heterocyclic ring)”、“杂环基(heterocyclic group)”、“杂环部分(heterocyclic moiety)”及“杂环自由基(heterocyclic radical)”在本文中可互换使用,且还包含杂环基环稠合到一或多个芳基、杂芳基或环脂肪族环的基团,例如吲哚啉基、3H-吲哚基、色满基、啡啶基或四氢喹啉基。杂环基可为单环或双环的。术语“杂环基烷基”指代经杂环基取代的烷基,其中烷基及杂环基部分独立地任选地经取代。

[0076] 如本文所使用,术语“部分不饱和”指代包含至少一个双键或三键的环部分。如本文所定义,术语“部分不饱和”打算包涵具有多个不饱和位点的环,但并不打算包含芳基或杂芳基部分。

[0077] 如本文所描述,本发明化合物可含有“任选地经取代的”部分。一般来说,术语“经取代”无论前面是否有术语“任选地”均意指指定部分的一或多个氢经适合的取代基替换。除非另外指明,否则“任选地经取代的”基团可在基团的各可取代位置处具有适合的取代基,且当任何既定结构中的一个以上位置可经一个以上选自指定基团的取代基取代时,在每一位置处的取代基可相同或不同。本发明所预想的取代基的组合优选为形成稳定或化学可行的化合物的组合。如本文所使用,术语“稳定”指代化合物在经受允许其生产、检测及(在某些实施例中)其回收、纯化及用于本文所揭示的一或多种目的的条件时不发生实质性改变。

[0078] “任选地经取代的”基团的可取代碳原子上的适合的单价取代基独立地为卤素;-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>R°;-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>OR°;-O(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>R°;-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>C(O)OR°;- (CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>CH(OR°)<sub>2</sub>;-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>SR°;-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>Ph,其可经R°取代;-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>Ph,其可经R°取代; -CH=CHPh,其可经R°取代; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-吡啶基,其可经R°取代; -NO<sub>2</sub>; -CN; -N<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>N(R°)<sub>2</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>N(R°)C(O)R°; -N(R°)C(S)R°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>N(R°)C(O)NR°<sub>2</sub>; -N(R°)C(S)NR°<sub>2</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>N(R°)C(O)OR°; -N(R°)N(R°)C(O)R°; -N(R°)N(R°)C(O)NR°<sub>2</sub>; -N(R°)N(R°)C(O)OR°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>C(O)R°; -C(S)R°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>C(O)OR°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>C(O)SR°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>C(O)OSiR°<sub>3</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>OC(O)R°; -OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>SR-; SC(S)SR°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>SC(O)R°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>C(O)NR°<sub>2</sub>; -C(S)NR°<sub>2</sub>; -C(S)SR°; -SC(S)SR°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>OC(O)NR°<sub>2</sub>; -C(O)N(OR°)R°; -C(O)C(O)R°; -C(O)CH<sub>2</sub>C(O)R°; -C(NOR°)R°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>SSR°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>S(O)R°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>S(O)OR°; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>OS(O)R°; -S(O)NR°<sub>2</sub>; -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-4</sub>S(O)R°; -N(R°)S(O)NR°<sub>2</sub>; -N(R°)S(O)R°; -N(OR°)R°; -C(NH)NR°<sub>2</sub>; -P(O)R°; -P(O)R°<sub>2</sub>; -OP(O)R°<sub>2</sub>; -OP(O)(OR°)<sub>2</sub>; -SiR°<sub>3</sub>; -(C<sub>1-4</sub>直链或支链亚烷基)O-N(R°)<sub>2</sub>; 或-(C<sub>1-4</sub>直链或支链亚烷基)C(O)O-N(R°)<sub>2</sub>,其中各R°可如下文所定义经取代且独立地为氢、C<sub>1-6</sub>脂肪族基、-CH<sub>2</sub>Ph、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>Ph、-CH<sub>2</sub>- (5元到6元杂芳基环)或5元到6元饱和、部分不饱和或具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳环,或不管上述定义,两个单独出现的R°与其中间原子结合在一起形成3员到12员饱和、部分不饱和或具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳基单环或双环环,其可如下文所定义经取代。

[0079] R°上的适合的单价取代基(或两个单独出现的R°与其中间原子一起形成的环)独立地为卤素、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>R°、-(卤基R°)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>OR°、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>CH(OR°)<sub>2</sub>; -O(卤基R°)、-CN、-N<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>C(O)R°、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>C(O)OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>C(O)OR°、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>SR°、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>SH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>NHR°、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>NR°、-NO<sub>2</sub>、-SiR°<sub>3</sub>、-OSiR°<sub>3</sub>、-C(O)SR°、-(C<sub>1-4</sub>直链或支链亚烷基)C(O)OR°或-SSR°,其中各R°未经取代或在放于“卤基”之前的情况下仅经一

或多种卤素取代，且独立地选自C<sub>1-4</sub>脂肪族基、-CH<sub>2</sub>Ph、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>Ph或具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元到6元饱和、部分不饱和或芳环。R°的饱和碳原子上的适合的二价取代基包含=O及=S。

[0080] “任选地经取代的”基团的饱和碳原子上的适合的二价取代基包含以下：=O、=S、=NNR<sup>\*</sup><sub>2</sub>、=NNHC(O)R<sup>\*</sup>、=NNHC(O)OR<sup>\*</sup>、=NNHS(O)<sub>2</sub>R<sup>\*</sup>、=NR<sup>\*</sup>、=NOR<sup>\*</sup>、-O(C(R<sup>\*</sup><sub>2</sub>))<sub>2-3</sub>O-或-S(C(R<sup>\*</sup><sub>2</sub>))<sub>2-3</sub>S-，其中各单独出现的R<sup>\*</sup>选自氢、可如下文所定义经取代的C<sub>1-6</sub>脂肪族基或具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未经取代的5元到6元饱和、部分不饱和或芳环。键结到“任选地经取代的”基团的邻接可取代碳的适合的二价取代基包含：-O(CR<sup>\*</sup><sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>O-，其中各单独出现的R<sup>\*</sup>选自氢、可如下所定义经取代的C<sub>1-6</sub>脂肪族基或具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未经取代的5元到6元饱和、部分不饱和或芳环。

[0081] R<sup>\*</sup>的脂肪族基上的适合的取代基包含卤素、-R<sup>•</sup>、-(卤基R<sup>•</sup>)、-OH、-OR<sup>•</sup>、-O(卤基R<sup>•</sup>)、-CN、-C(O)OH、-C(O)OR<sup>•</sup>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sup>•</sup>、-NR<sup>•</sup><sub>2</sub>或-NO<sub>2</sub>，其中各R<sup>•</sup>未经取代或在放于“卤基”之前的情况下仅经一或多种卤素取代，且独立地为C<sub>1-4</sub>脂肪族基、-CH<sub>2</sub>Ph、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>Ph或具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元到6元饱和、部分不饱和或芳环。

[0082] “任选地经取代的”基团的可取代氮气上的适合的取代基包含-R<sup>†</sup>、-NR<sup>†</sup><sub>2</sub>、-C(O)R<sup>†</sup>、-C(O)OR<sup>†</sup>、-C(O)C(O)R<sup>†</sup>、-C(O)CH<sub>2</sub>C(O)R<sup>†</sup>、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>†</sup>、-S(O)<sub>2</sub>NR<sup>†</sup><sub>2</sub>、-C(S)NR<sup>†</sup><sub>2</sub>、-C(NH)NR<sup>†</sup><sub>2</sub>

[0083] 或-N(R<sup>†</sup>)S(O)<sub>2</sub>R<sup>†</sup>；其中各R<sup>†</sup>独立地为氢、可如下文所定义经取代的C<sub>1-6</sub>脂肪族基、未经取代的-OPh或具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未经取代的5元到6元饱和、部分不饱和或芳环，或不管上述定义，两个单独出现的R<sup>†</sup>与其中间原子结合在一起形成具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未经取代的3员到12员饱和、部分不饱和或芳基单环或双环环。

[0084] R<sup>†</sup>的脂肪族基上的适合的取代基独立地为卤素、-R<sup>•</sup>、-(卤基R<sup>•</sup>)、-OH、-OR<sup>•</sup>、-O(卤基R<sup>•</sup>)、-CN、-C(O)OH、-C(O)OR<sup>•</sup>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sup>•</sup>、-NR<sup>•</sup><sub>2</sub>或-NO<sub>2</sub>，其中各R<sup>•</sup>未经取代或在放于“卤基”之前的情况下仅经一或多种卤素取代，且独立地为C<sub>1-4</sub>脂肪族基、-CH<sub>2</sub>Ph、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>Ph或具有0到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元到6元饱和、部分不饱和环或芳环。

[0085] 如本文所使用，术语“药学上可接受的盐”指代在合理医学判断范围内适用于与人类及低等动物的组织接触而无异常毒性、刺激、过敏反应及其类似者且与合理益处/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐为所属领域中众所周知的。举例来说，S.M.Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19中详细描述药学上可接受的盐，所述文献以引用的方式并入本文中。本发明化合物的药学上可接受的盐包含来源于适合的无机及有机酸及碱的那些盐。药学上可接受的无毒性酸加成盐的实例为氨基与无机酸(例如氢氯酸、氢溴酸、磷酸、硫酸及过氯酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、顺丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、丁二酸或丙二酸)形成的盐，或通过使用所属领域中所用的其它方法(例如离子交换)形成的盐。其它药学上可接受的盐包含己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、反丁烯二酸盐、葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟碱酸

盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐及其类似者。

[0086] 来源于适当碱的盐包含碱金属盐、碱土金属盐、铵盐及 $N^{+}(C_{1-4} \text{烷基})_4$ 盐。代表性碱金属盐或碱土金属盐包含钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐及其类似盐。其它药学上可接受的盐包含(适当时)无毒性铵、季铵及使用相对离子(例如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低碳烷基磺酸根及芳基磺酸根)形成的胺阳离子。

[0087] 除非另外陈述,否则本文所描绘的结构还打算包含结构的所有异构(例如对映异构体、非对映异构体及几何异构(或构形异构))形式;例如各不对称中心的R及S构形、Z及E双键异构体及Z及E构形异构体。因此,本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映异构、非对映异构及几何异构(或构形异构)混合物处于本发明的范围内。除非另外陈述,否则本发明化合物的所有互变异构形式均处于本发明的范围内。另外,除非另外陈述,否则本文所描绘的结构还打算包含仅在存在一或多个经同位素增浓的原子的方面不同的化合物。举例来说,包含氢由氘或氚置换或碳由 $^{13}\text{C}$ 或 $^{14}\text{C}$ 增浓的碳置换、具有本发明结构的化合物处于本发明的范围内。这类化合物适用作例如分析工具,用作生物分析中的探针,或用作根据本发明的治疗剂。

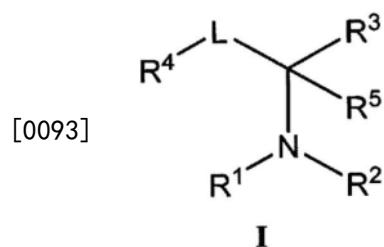
[0088] 如本文所使用,术语“亮氨酸模拟剂”定义为在25μM下相对于亮氨酸,使键结到GATOR2的Sestrin2的量减少至少约40%的化合物。在某些实施例中,“亮氨酸模拟剂”使键结到GATOR2的Sestrin2的量减少至少约100%,至少约150%或至少约200%。

[0089] 如本文所使用,术语“亮氨酸拮抗剂”定义为在25μM下相对于亮氨酸,将键结到GATOR2的Sestrin2的量提高至少约40%的化合物(表示为亮氨酸活性的-40%)。在某些实施例中,“亮氨酸拮抗剂”使键结到GATOR2的Sestrin2的量提高至少约100%,至少约150%,或至少约200%。

[0090] 如本文所使用,术语“可测量的亲和性”及“可测量地抑制”意指在包括本发明化合物或其组合物及Sestrin2、GATOR2及亮氨酸的样品与包括Sestrin2、GATOR2及亮氨酸,在所述化合物或其组合物不存在下的等效样品之间的与GATOR2结合的Sestrin2的可测量变化。

[0091] 3. 描述示范性实施例:

[0092] 在某些实施例中,本发明提供式I化合物:



[0094] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0095] R<sup>1</sup>为H或C<sub>1-6</sub>烷基;

[0096] R<sup>2</sup>为R、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-苯基、-C(O)R、-SO<sub>2</sub>R或-C(O)N(R)<sub>2</sub>;

[0097] n为0、1或2;

[0098] 各R独立地为氢、-CN或选自以下的任选地经取代的基团:饱和或不饱和C<sub>1-6</sub>脂肪族

基、苯基、4元到7元饱和或部分不饱和单环碳环、具有1到4个杂原子的5元到6元单环杂芳基环或具有1到2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的4元到8元饱和或部分饱和杂环；

[0099]  $R^3$ 为环A、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_2N(R)_2$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)OR$ 或 $-B(OR)_2$ ，其中同一硼上的两个OR基团与中间原子结合在一起形成除硼及两个氧外具有0到3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元到8元单环饱和或部分不饱和环，或 $R^3$ 及 $R^4$ 结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环；

[0100] L为共价键或任选地经1到9个氟基取代的直链或支链 $C_{1-6}$ 亚烷基链；

[0101] 环A为选自苯基的任选地经取代的环或具有1到4个杂原子独立地选自氮、氧或硫的任选地经取代的5元到6元杂芳基环；

[0102]  $R^4$ 为R、 $-CF_3$ 、 $-OR$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-Si(R)_3$ 或 $-SR$ ，或 $R^3$ 及 $R^4$ 结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环；且

[0103]  $R^5$ 为H或 $C_{1-4}$ 烷基。

[0104] 在一些实施例中，所提供的式I化合物不为以下表2中描绘的那些化合物。

[0105] 如上文一般所定义， $R^1$ 为H或 $C_{1-6}$ 烷基。在一些实施例中， $R^1$ 为H。在其它实施例中， $R^1$ 为 $C_{1-6}$ 烷基。在一些实施例中， $R^1$ 为甲基。在一些实施例中， $R^1$ 为异丁基。在一些实施例中， $R^1$ 选自以下表1中描绘的那些。在一些实施例中， $R^1$ 选自以下表2中描绘的那些。

[0106] 如上文一般所定义， $R^2$ 为R、 $-(CH_2)_n$ -苯基、 $-C(O)R$ 、 $-SO_2R$ 或 $-C(O)N(R)_2$ 。在一些实施例中， $R^2$ 为R。在一些实施例中， $R^2$ 为 $-(CH_2)_n$ -苯基。在一些实施例中， $R^2$ 为 $-C(O)R$ 。在一些实施例中， $R^2$ 为 $-SO_2R$ 。在一些实施例中， $R^2$ 为 $-C(O)N(R)_2$ 。在一些实施例中， $R^2$ 为甲基。在一些实施例中， $R^2$ 为 $-(CH_2)_n$ -苯基。在一些实施例中， $R^2$ 为 $-C(O)CH_3$ 。在一些实施例中， $R^2$ 选自以下表1中描绘的那些。在一些实施例中， $R^2$ 选自以下表2中描绘的那些。

[0107] 如上文一般所定义，n为0、1或2。在一些实施例中，n为0。在一些实施例中，n为1。在一些实施例中，n为2。

[0108] 如上文一般所定义， $R^3$ 为环A、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_2N(R)_2$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)OR$ 或 $-B(OR)_2$ ，其中同一硼上的两个-OR基团与中间原子结合在一起形成除硼及两个氧外具有0到3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元到8元单环饱和或部分不饱和环，或 $R^3$ 及 $R^4$ 结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环。

[0109] 在一些实施例中， $R^3$ 为 $-C(O)OH$ 。在一些实施例中， $R^3$ 为 $-C(O)N(R)_2$ 。在一些实施例中， $R^3$ 为 $-SO_3H$ 。在一些实施例中， $R^3$ 为 $-SO_2N(R)_2$ 。在一些实施例中， $R^3$ 为 $-B(OR)_2$ ，其中同一硼上的两个-OR基团与中间原子结合在一起形成除硼及两个氧外具有0到3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元到8元单环饱和、部分不饱和或杂环。在一些实施例中， $R^3$ 及 $R^4$ 结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环。

[0110] 在一些实施例中， $R^3$ 为环A。如上文一般所定义，环A为选自苯基的任选地经取代的环或具有1到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元杂芳基环。在一些实施例中，环A为任选地经取代的苯基。在一些实施例中，环A为具有1到4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元杂芳基环。在一些实施例中，环A为选自咪唑基、异恶唑基、1H-吡咯基（例如顺丁烯二酰亚氨基）、吡唑基、恶唑基、四唑基、噻唑基及三唑基的任选地经取代的5元杂芳基环。在一些实施例中，环A为具有1到2个氮原子的任选地经取

代的6元杂芳基环。在一些实施例中，环A为选自吡啶基及嘧啶基的任选地经取代的6元环。在一些实施例中，环A选自以下表1中描绘的那些。

[0111] 在一些实施例中，R<sup>3</sup>为(频哪醇根基)硼。在一些实施例中，R<sup>3</sup>选自以下表1中描绘的那些。在一些实施例中，R<sup>3</sup>选自以下表2中描绘的那些。

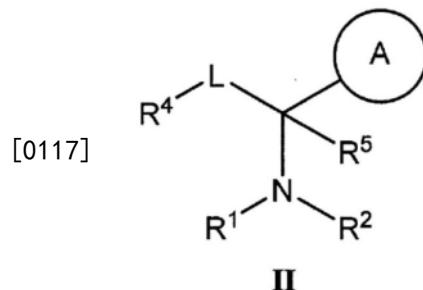
[0112] 如上文一般所定义，L为共价键或任选地经1到4个氟基取代的直链或支链C<sub>1-6</sub>亚烷基链。在一些实施例中，L为共价键。在一些实施例中，L为任选地经1到4个氟基取代的直链或支链C<sub>1-6</sub>亚烷基链。在一些实施例中，L为亚甲基。在一些实施例中，L为亚正丁基。在一些实施例中，L为亚乙基。在一些实施例中，L为亚正丙基。在一些实施例中，L选自以下表1中描绘的那些。在一些实施例中，L选自以下表2中描绘的那些。

[0113] 在一些实施例中，L为任选地经1到4个氟基取代的支链C<sub>1-6</sub>亚烷基链。在某些实施例中，L为-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>-</sup>。在其它实施例中，L为-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CF<sub>3</sub>)<sup>-</sup>。

[0114] 如上文一般所定义，R<sup>4</sup>为R、-CF<sub>3</sub>、-OR、-N(R)<sub>2</sub>、-Si(R)<sub>3</sub>或-SR，或R<sup>3</sup>及R<sup>4</sup>结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为R。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为-CF<sub>3</sub>。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为-OR。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为-N(R)<sub>2</sub>。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为-Si(R)<sub>3</sub>。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为-SR。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为异丙基。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为叔丁基。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为环丙基。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为环丁基。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为仲丁基。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为甲氧基。在一些实施例中，R<sup>4</sup>为甲硫基(methylthioyl)。在一些实施例中，R<sup>3</sup>及R<sup>4</sup>结合在一起形成具有0到1个选自氮、氧或硫的杂原子的任选地经取代的5元到6元环。在一些实施例中，R<sup>4</sup>选自以下表1中描绘的那些。在一些实施例中，R<sup>4</sup>选自以下表2中描绘的那些。

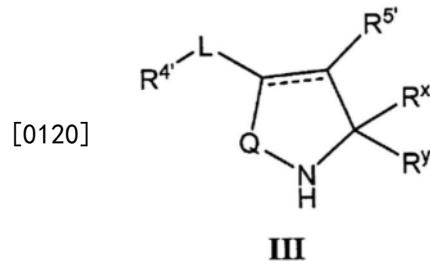
[0115] 如上文一般所定义，R<sup>5</sup>为H或C<sub>1-4</sub>烷基。在一些实施例中，R<sup>5</sup>为H。在一些实施例中，R<sup>5</sup>为C<sub>1-4</sub>烷基。在一些实施例中，R<sup>5</sup>为甲基。在一些实施例中，R<sup>5</sup>选自以下表1中描绘的那些。在一些实施例中，R<sup>5</sup>选自以下表2中描绘的那些。

[0116] 在某些实施例中，本发明提供式II化合物：

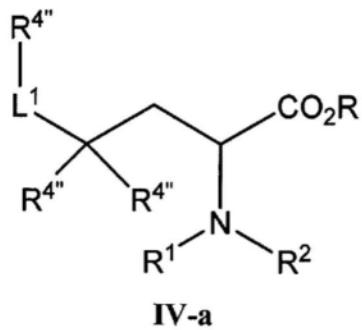
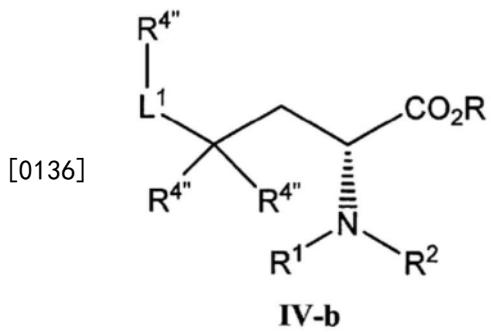
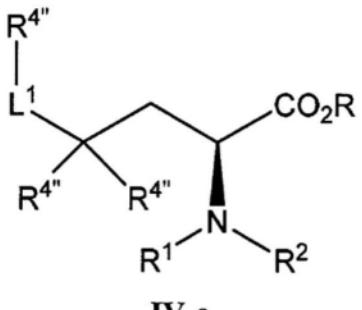


[0118] 或其药学上可接受的盐，其中各变量如上文所定义且如本文所提供的实施例(以单独及组合形式)中所描述。

[0119] 在某些实施例中，本发明提供式III化合物：



- [0121] 或其药学上可接受的盐,其中:
- [0122] Q为 $-C(R')_2-$ 或 $-NH-$ ;
- [0123]  $R^x$ 及 $R^y$ 中的每一者为氢,或 $R^x$ 及 $R^y$ 结合在一起形成=0;
- [0124] ----为双键或单键;
- [0125] 各R独立地为氢、-CN或选自以下的任选地经取代的基团: $C_{1-6}$ 脂肪族基、苯基、4元到7元饱和或部分不饱和单环碳环、具有1到4个杂原子的5元到6元单环杂芳基环或具有1到2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的4元到8元饱和或部分饱和杂环;
- [0126] 各R'独立地为氢、卤素、-CN或选自以下的任选地经取代的基团: $C_{1-6}$ 脂肪族基、苯基、4元到7元饱和或部分不饱和单环碳环、具有1到4个杂原子的5元到6元单环杂芳基环或具有1到2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的4元到8元饱和或部分饱和杂环;
- [0127] L为共价键或任选地经1到9个氟基取代的直链或支链 $C_{1-6}$ 亚烷基链;
- [0128]  $R^4$ 为R、 $-CF_3$ 、 $-OR$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-Si(R)_3$ 或 $-SR$ ;且
- [0129]  $R^5$ 为H、 $-OR$ 或 $C_{1-4}$ 烷基。
- [0130] 在一些实施例中,Q为 $-NH-$ 。在一些实施例中,Q为 $-CH_2-$ 。在一些实施例中,Q为 $-CHF-$ 。
- [0131] 在一些实施例中,L为 $-CH_2-$ 。
- [0132] 在一些实施例中,各 $R^x$ 及 $R^y$ 为氢。在一些实施例中, $R^x$ 及 $R^y$ 结合在一起形成=0。
- [0133] 在一些实施例中, $R^5$ 为H。在一些实施例中, $R^5$ 为 $-OH$ 。
- [0134] 在一些实施例中,----为单键。在一些实施例中,----为双键。
- [0135] 在某些实施例中,本发明提供式IV-a、IV-b或IV-c的化合物:

**IV-a****IV-b****IV-c**

[0137] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0138] R<sup>1</sup>为H或C<sub>1-6</sub>烷基;

[0139] R<sup>2</sup>为R、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-苯基、-C(O)R、-SO<sub>2</sub>R或-C(O)N(R)<sub>2</sub>;

[0140] 各R<sup>4"</sup>独立地为R、卤素或-CF<sub>3</sub>;

[0141] 各R独立地为氢、-CN或选自以下的任选地经取代的基团:饱和或不饱和C<sub>1-6</sub>脂肪族基、苯基、4元到7元饱和或部分不饱和单环碳环、具有1到4个杂原子的5元到6元单环杂芳基环或具有1到2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的4元到8元饱和或部分饱和杂环;且

[0142] L<sup>1</sup>为任选地经1到9个氟基取代的共价键或直链或支链C<sub>1-6</sub>亚烷基链。

[0143] 在一些实施例中,R<sup>1</sup>为H。在一些实施例中,R<sup>1</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基。

[0144] 在一些实施例中,R<sup>1</sup>选自以下表1中描绘的那些。

[0145] 在一些实施例中,R<sup>2</sup>为R。在一些实施例中,R<sup>2</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-苯基。在一些实施例中,R<sup>2</sup>为-C(O)R。

[0146] 在一些实施例中,R<sup>2</sup>选自以下表1中描绘的那些。

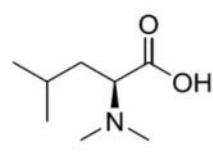
[0147] 在一些实施例中,各R<sup>4"</sup>独立地为R、卤素或-CF<sub>3</sub>。在一些实施例中,R<sup>4"</sup>为R。在一些实施例中,R<sup>4"</sup>为卤素。在一些实施例中,R<sup>4"</sup>为-CF<sub>3</sub>。在一些实施例中,R<sup>4"</sup>选自以下表1中描绘的那些。

[0148] 在一些实施例中,L<sup>1</sup>为共价键或任选地经1到9个氟基取代的直链或支链C<sub>1-6</sub>亚烷

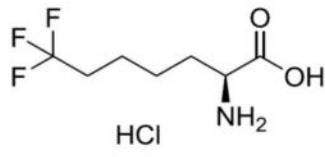
基链。在一些实施例中， $L^1$ 为共价键。在一些实施例中， $L^1$ 为任选地经1到9个氟基取代的直链或支链C<sub>1-6</sub>亚烷基链。在一些实施例中， $L^1$ 选自以下表1中描绘的那些。

[0149] 示范性本发明化合物阐述于以下表1中。

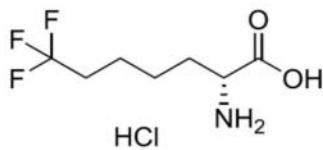
[0150] 表1.示范性化合物



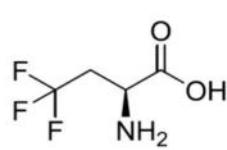
I-1



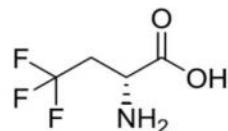
I-2



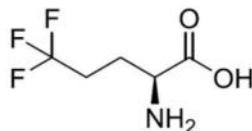
I-3



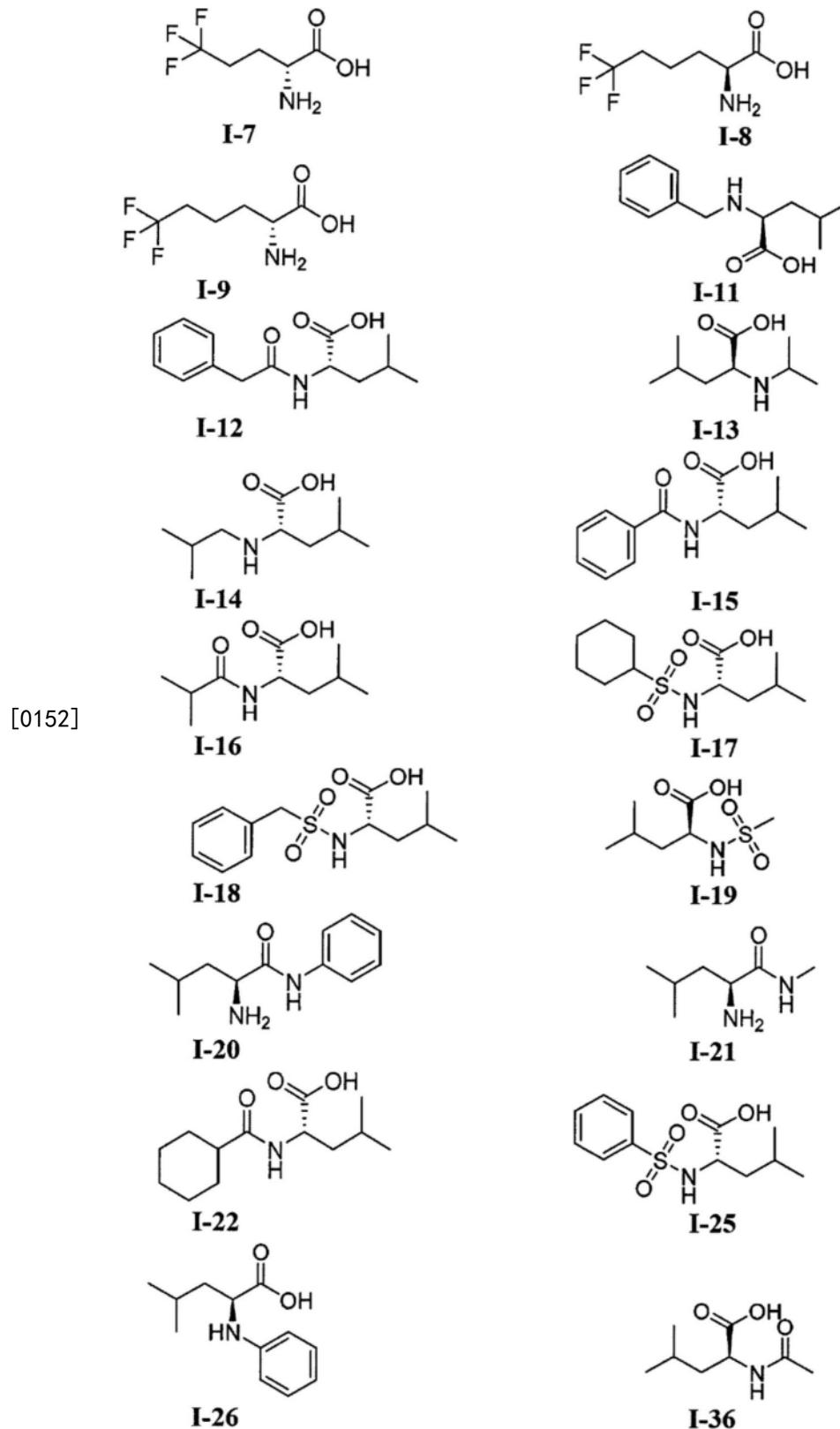
I-4

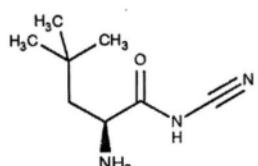
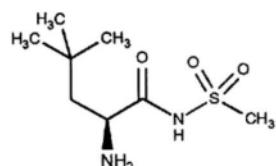
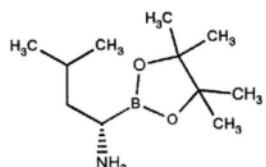
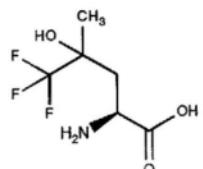
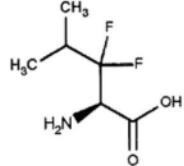
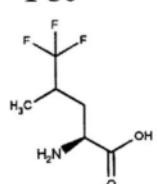
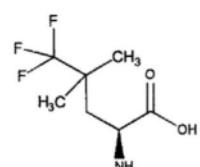
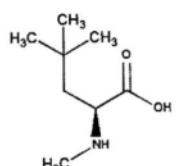
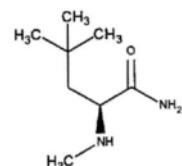
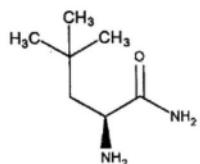
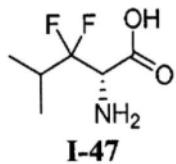
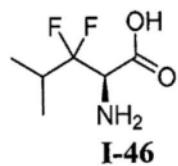
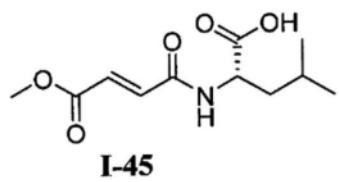


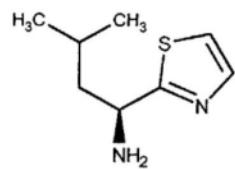
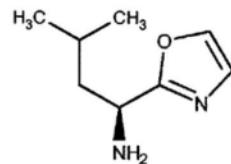
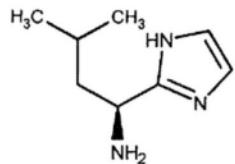
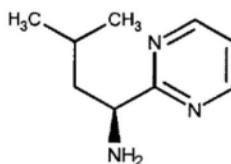
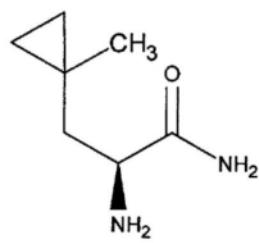
I-5



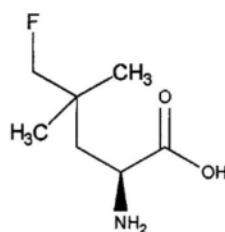
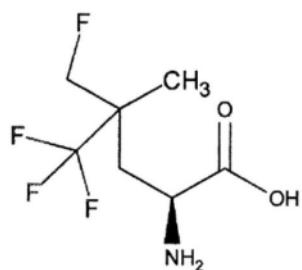
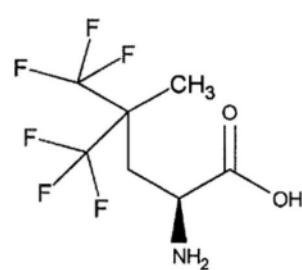
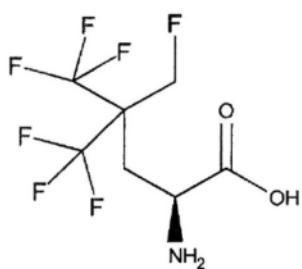
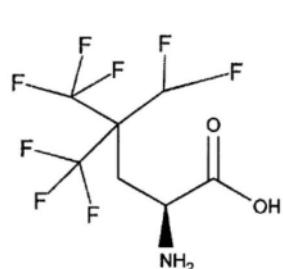
I-6

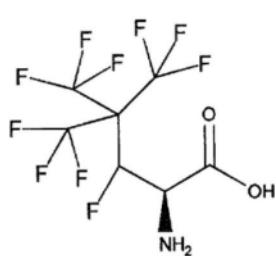
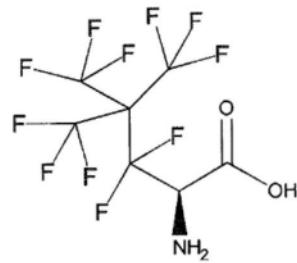
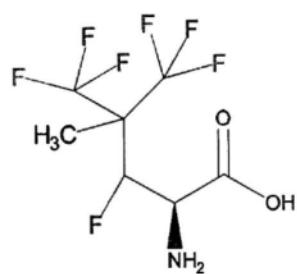
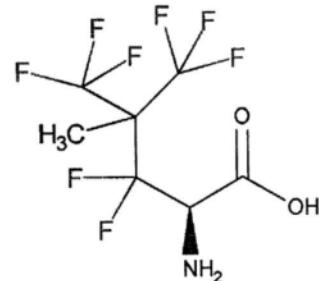
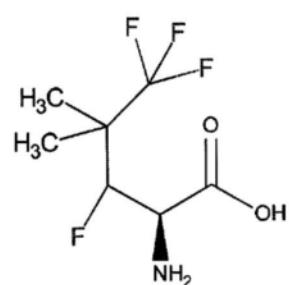
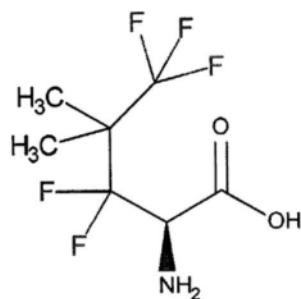
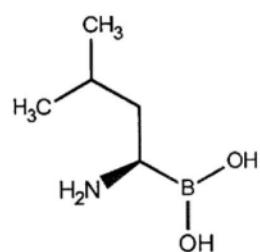
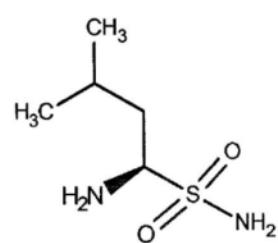


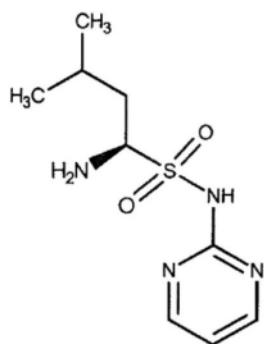
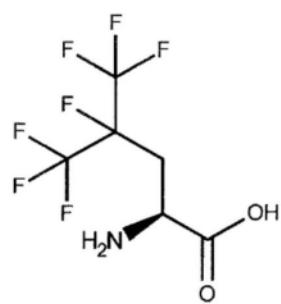
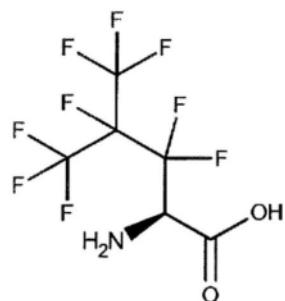


**I-58****I-59****I-60****I-61**

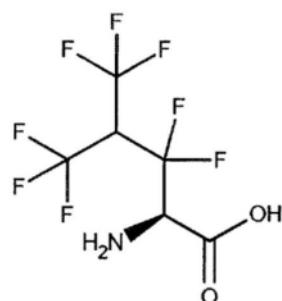
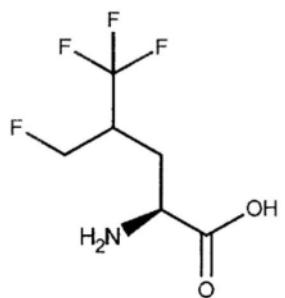
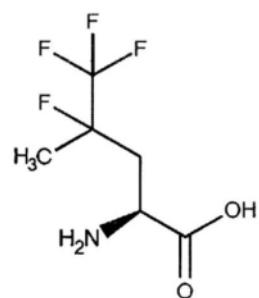
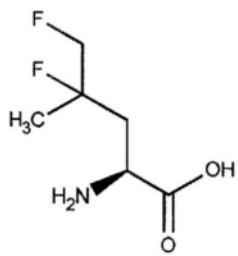
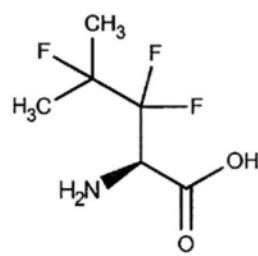
[0154]

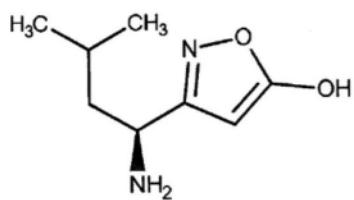
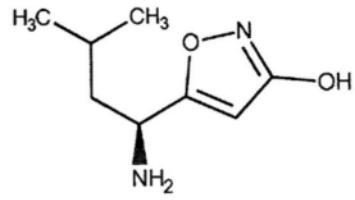
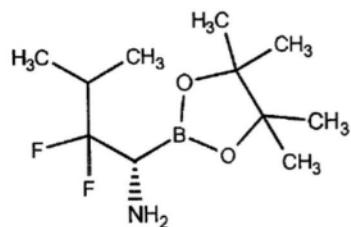
**I-62****I-63****I-64****I-65****I-66****I-67**

**I-68****I-69****I-70****I-71****I-72****I-73****I-74****I-75**

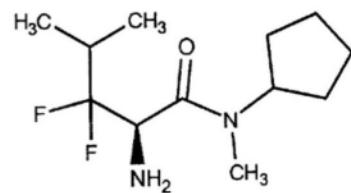
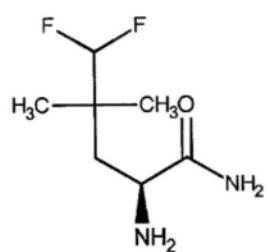
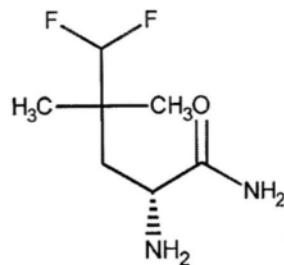
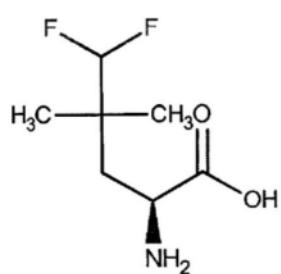
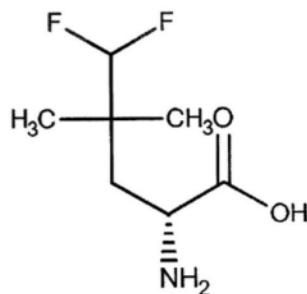
**I-76****I-77**

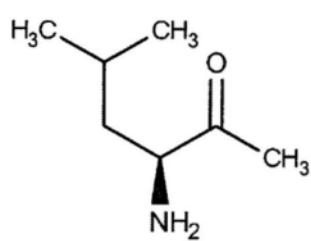
[0156]

**I-78****I-79****I-80****I-81****I-82****I-83**

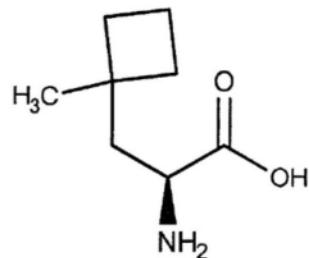
**I-84****I-85**

[0157]

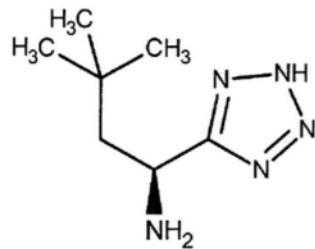
**I-86****I-87****I-88****I-89****I-90****I-91**



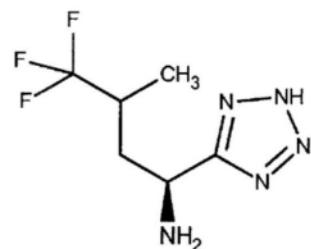
I-92



I-93

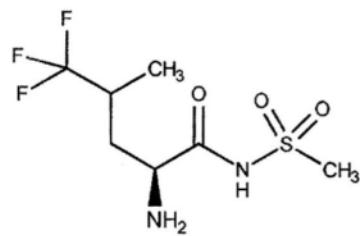


I-94

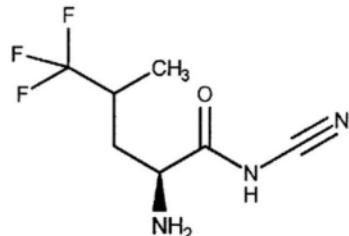


I-95

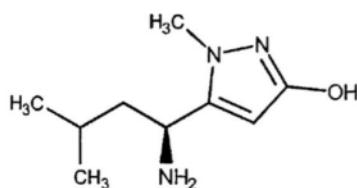
[0158]



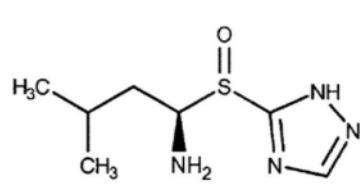
I-96



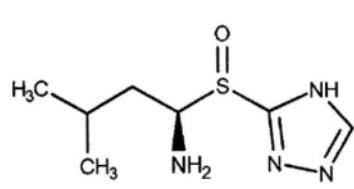
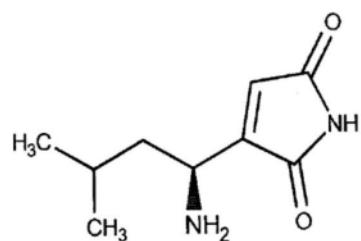
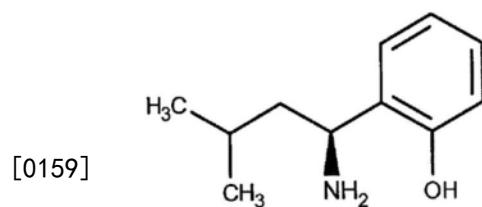
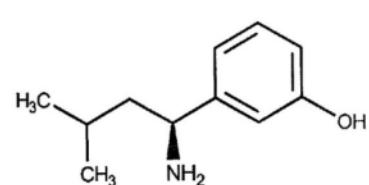
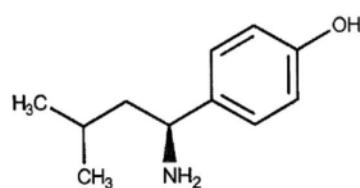
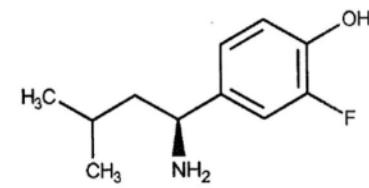
I-97

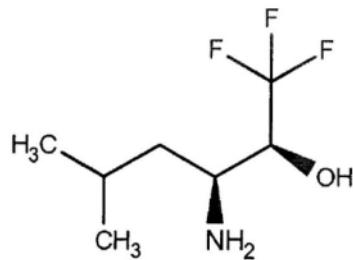
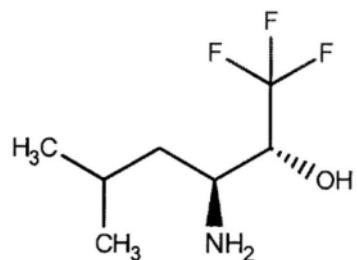
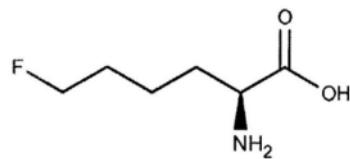
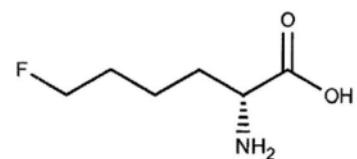


I-98

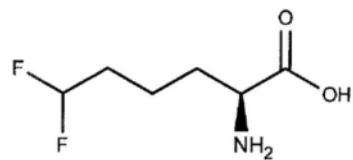
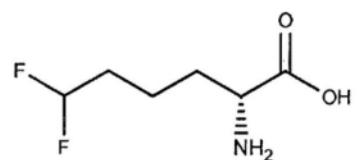
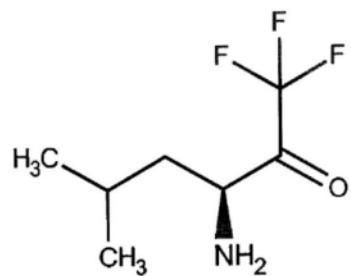


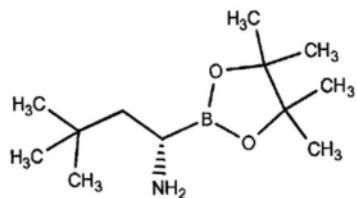
I-99

**I-100****I-101****I-102****I-103****I-104****I-105**

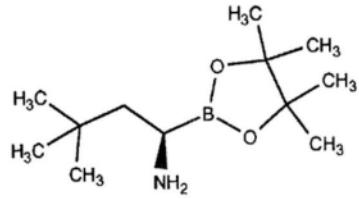
**I-106****I-107****I-108****I-109**

[0160]

**I-110****I-111****I-113**

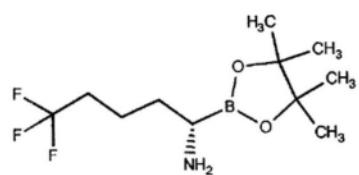


I-114

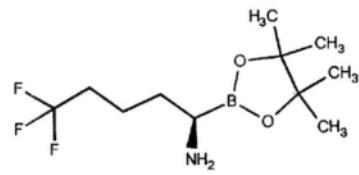


I-115

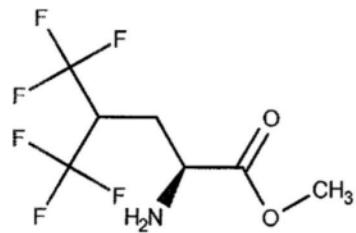
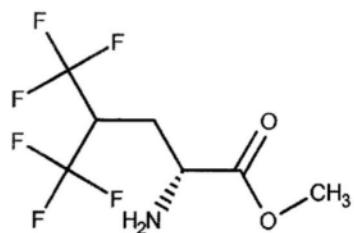
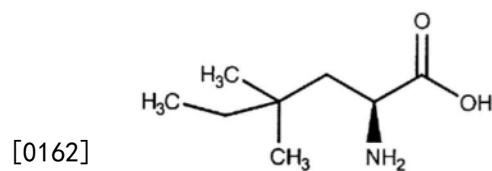
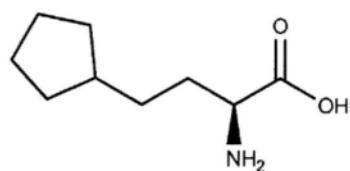
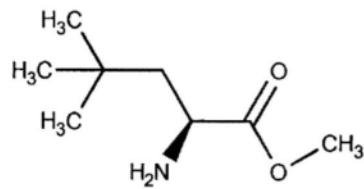
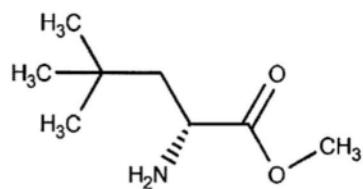
[0161]

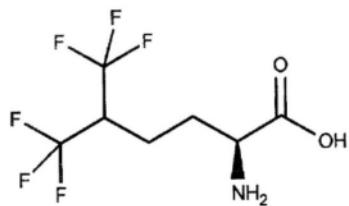
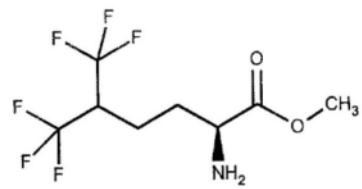
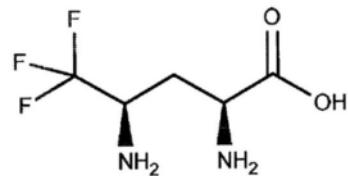


I-116

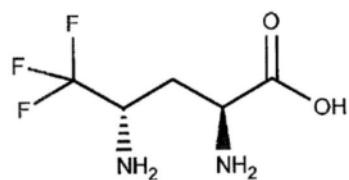
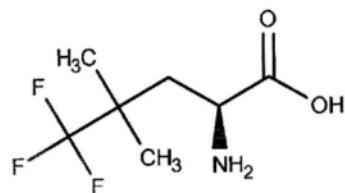
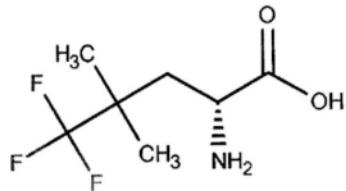
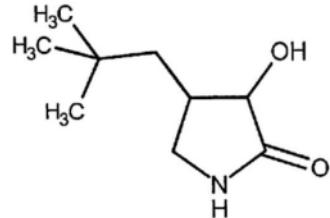
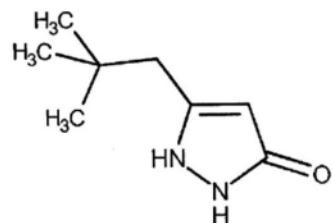


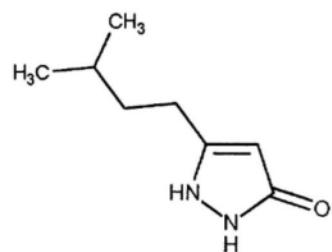
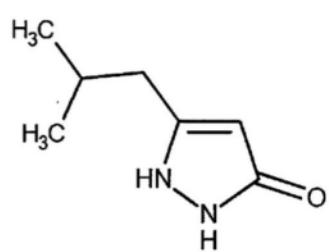
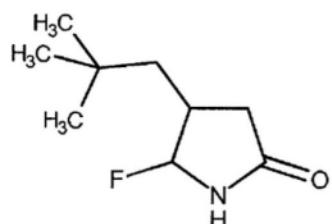
I-117

**I-118****I-119****I-120****I-121****I-122****I-123**

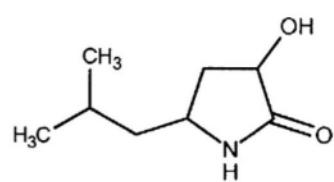
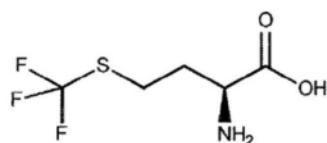
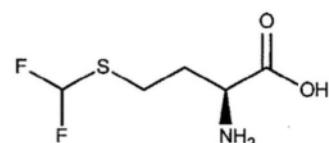
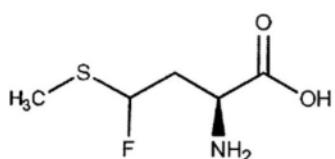
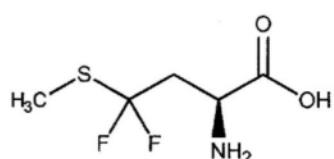
**I-124****I-125**

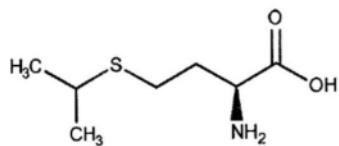
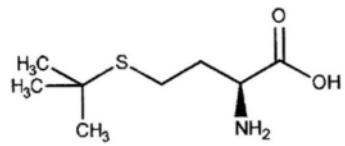
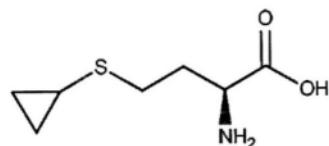
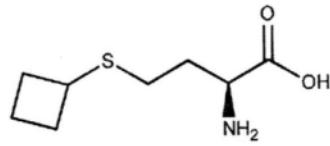
[0163]

**I-126****I-127****I-128****I-129****I-130****I-131**

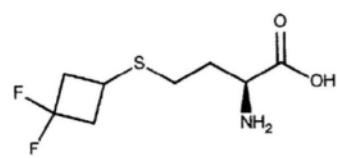
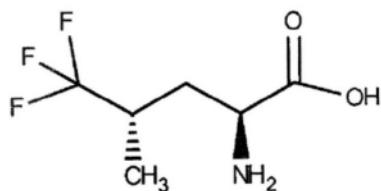
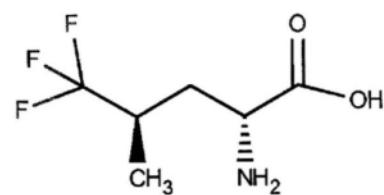
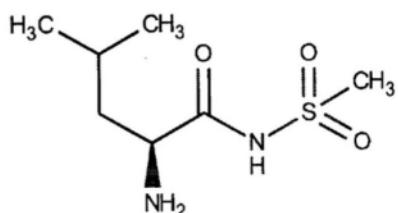
**I-132****I-133****I-134**

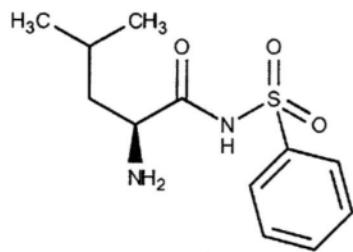
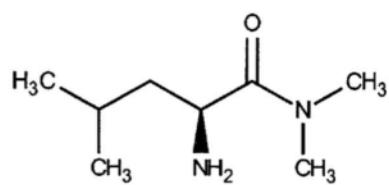
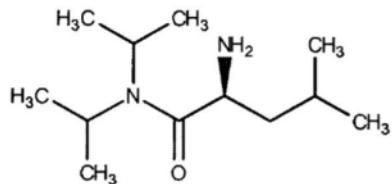
[0164]

**I-135****I-136****I-137****I-138****I-139**

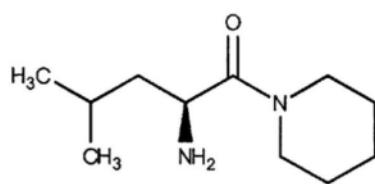
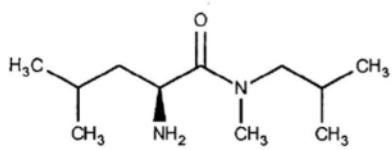
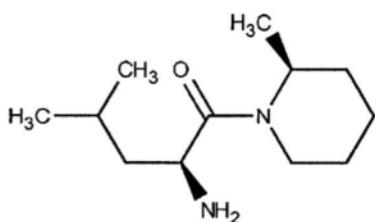
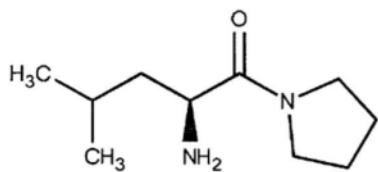
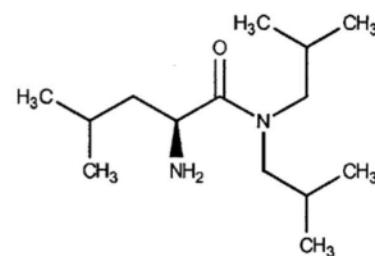
**I-140****I-141****I-142****I-143**

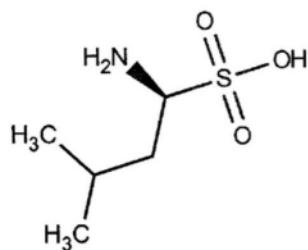
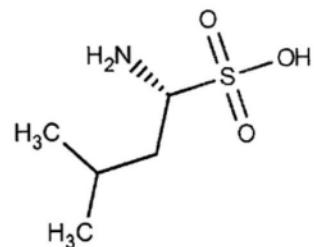
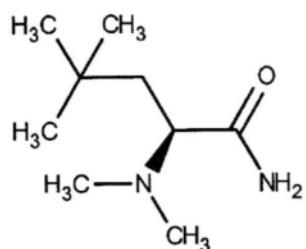
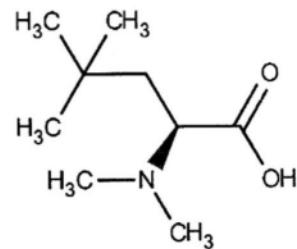
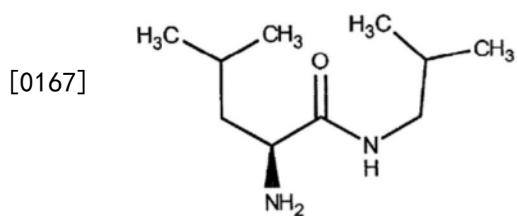
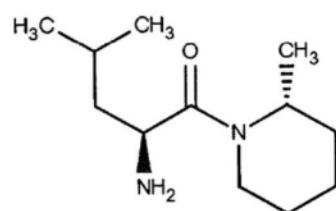
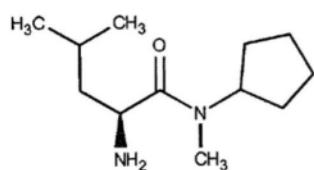
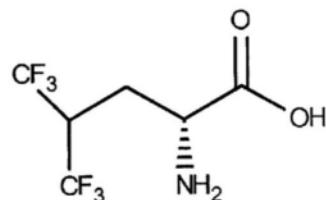
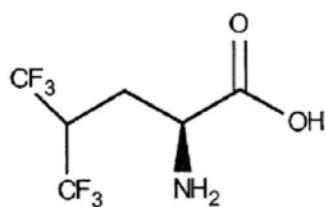
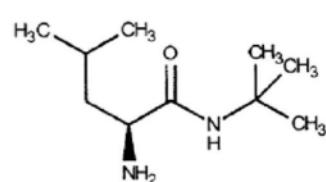
[0165]

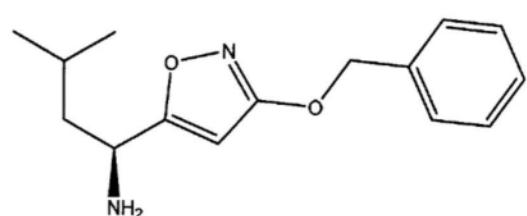
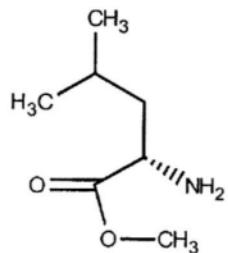
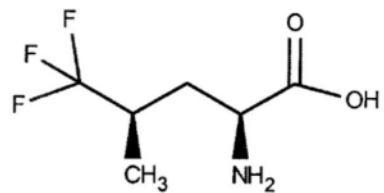
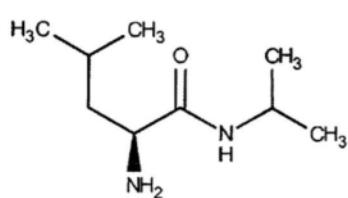
**I-144****I-145****I-146****I-147**

**I-148****I-149****I-150**

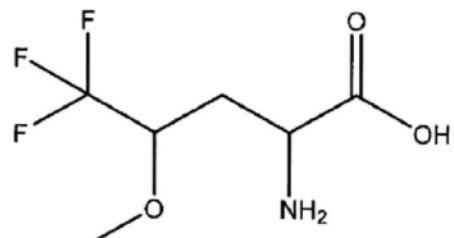
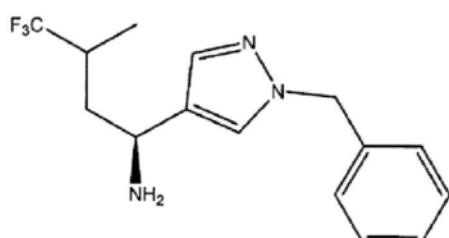
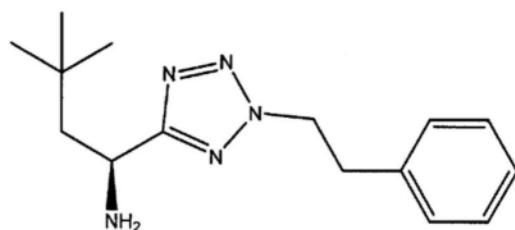
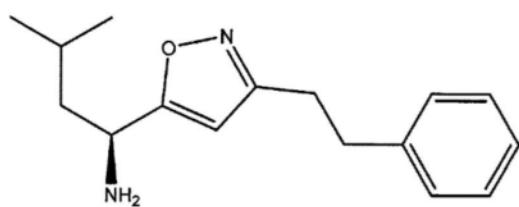
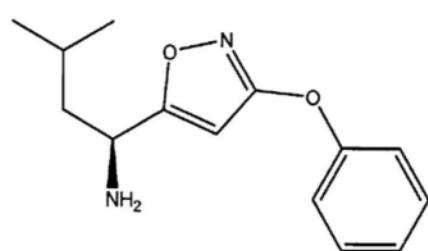
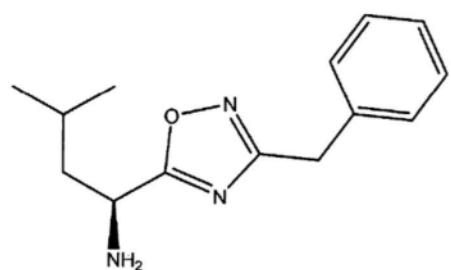
[0166]

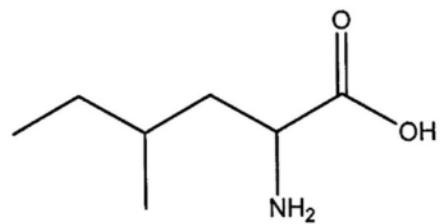
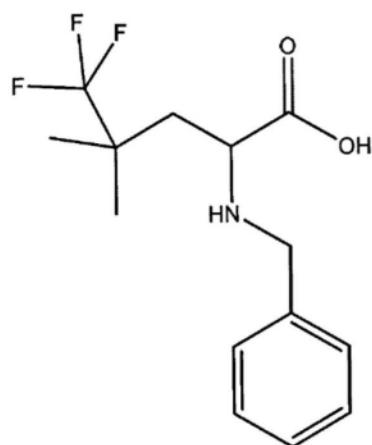
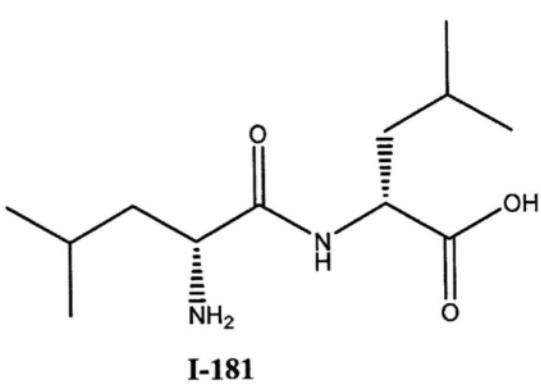
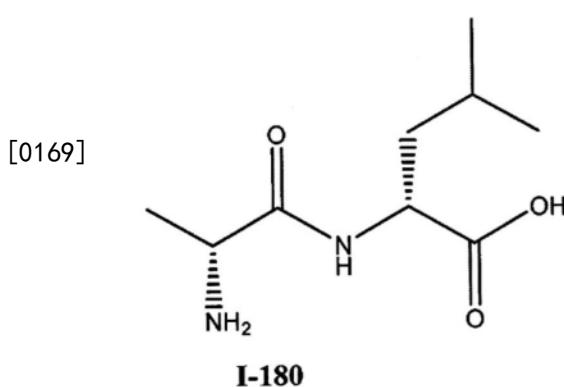
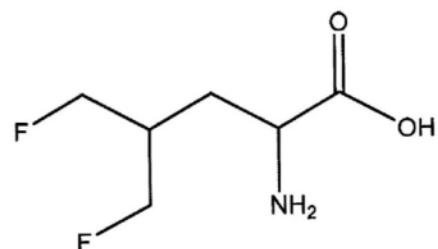
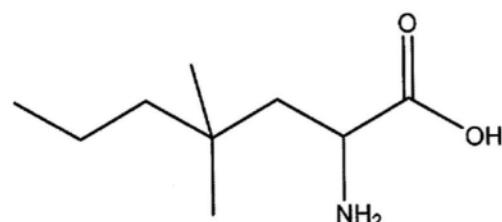
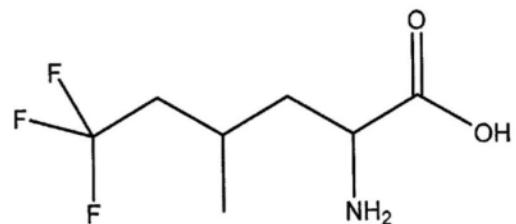
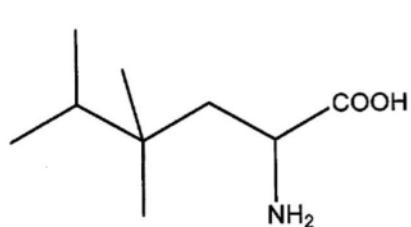
**I-151****I-152****I-153****I-154****I-155**

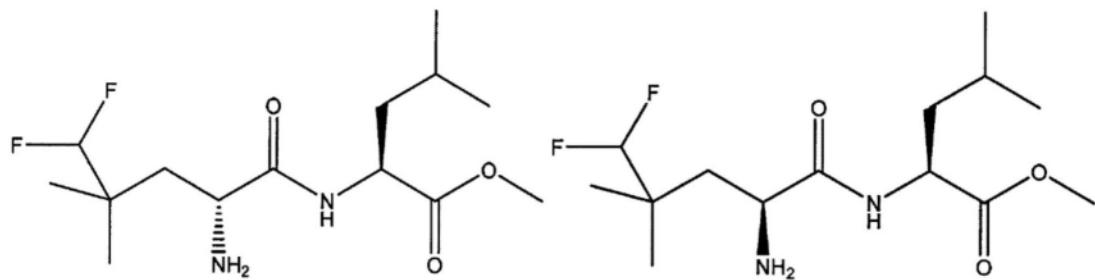
**I-156****I-157****I-158****I-159****I-160****I-161****I-162****I-163****I-164****I-165**



[0168]

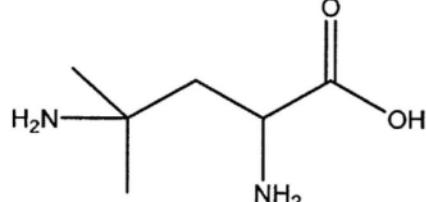




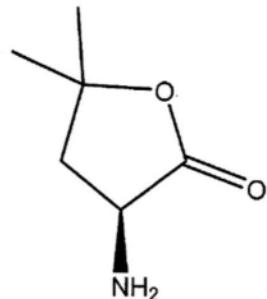


I-184

I-185

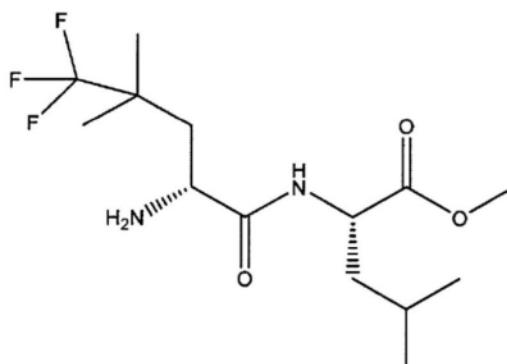


I-186

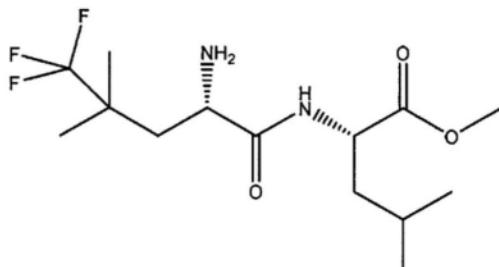


I-187

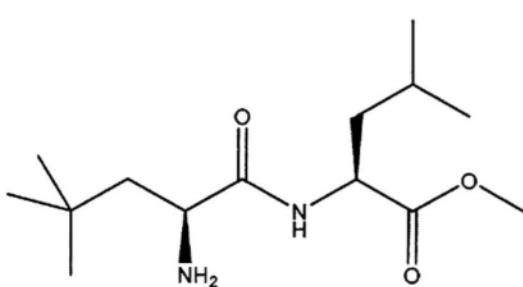
[0170]



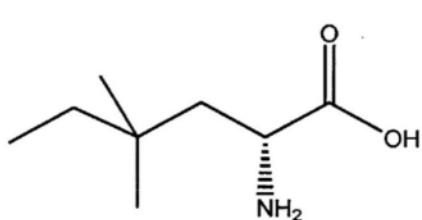
I-188



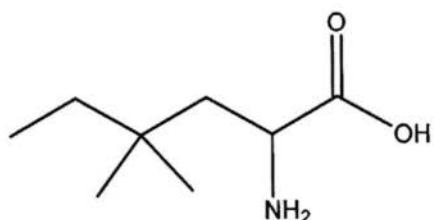
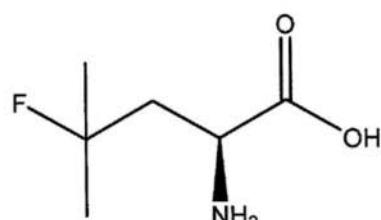
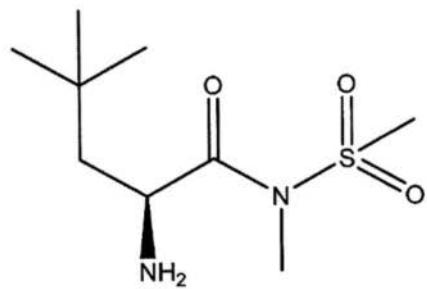
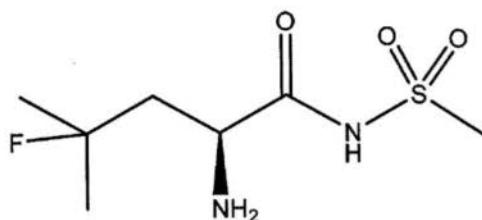
I-189



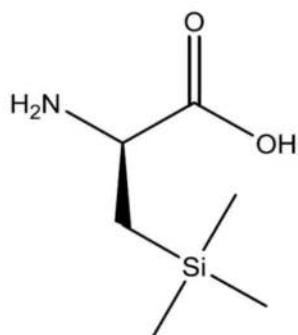
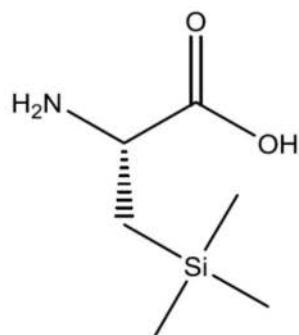
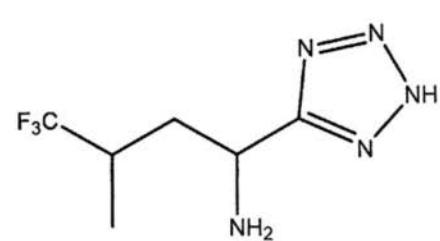
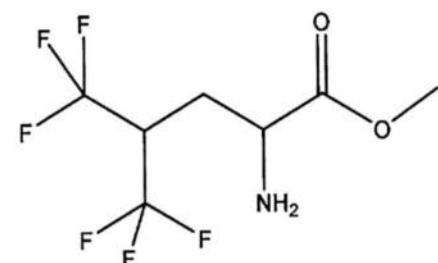
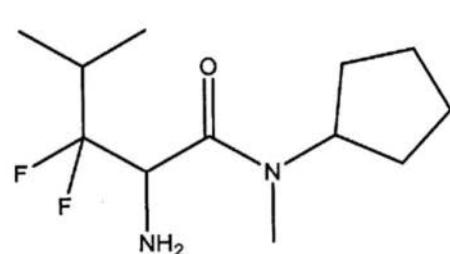
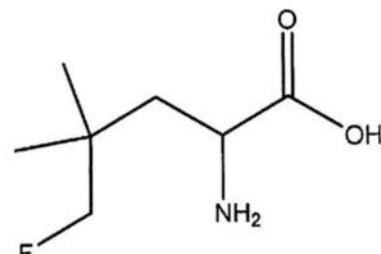
I-190

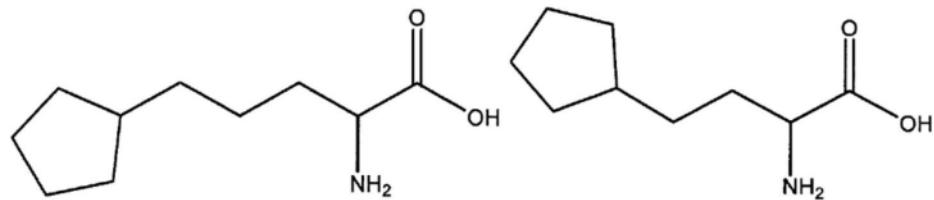


I-191



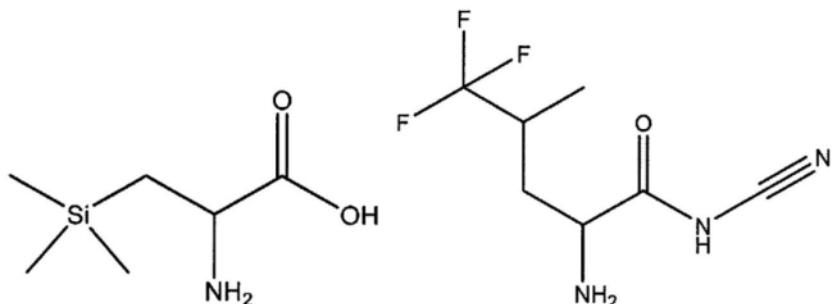
[0171]





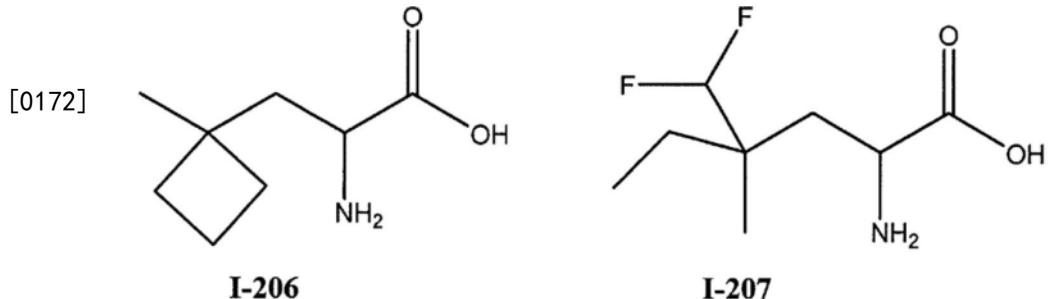
I-202

I-203



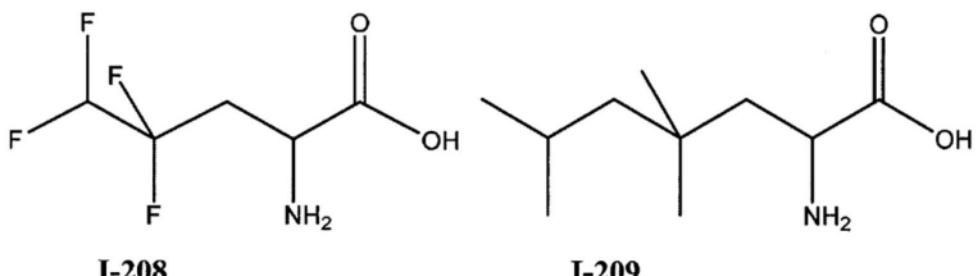
I-204

I-205



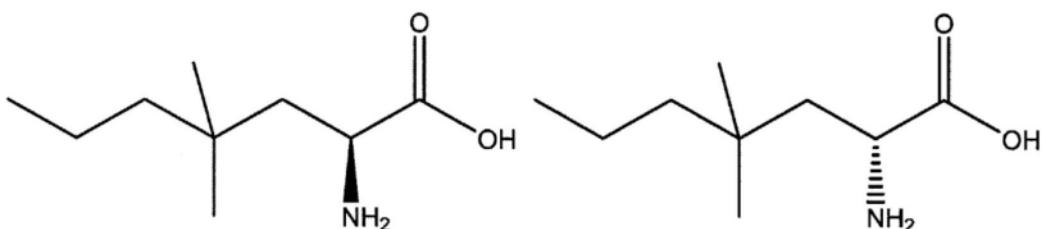
I-206

I-207



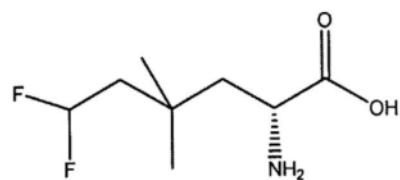
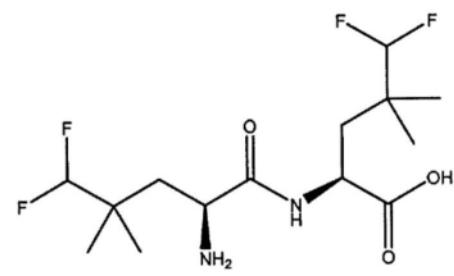
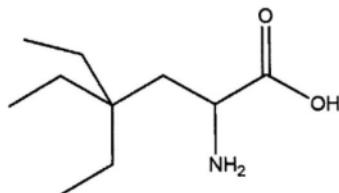
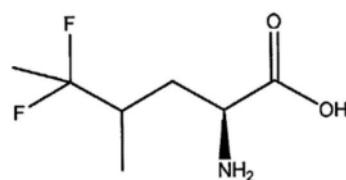
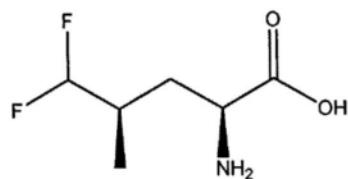
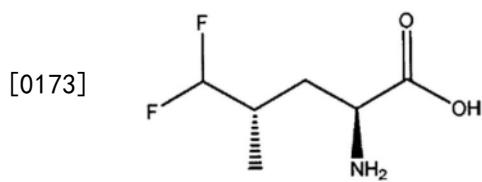
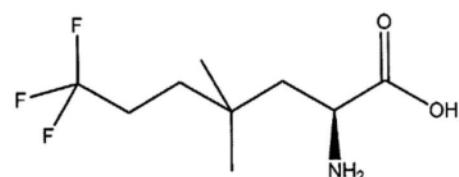
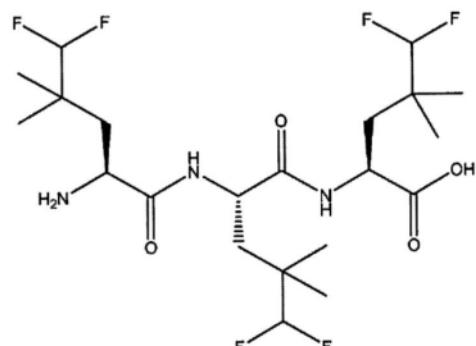
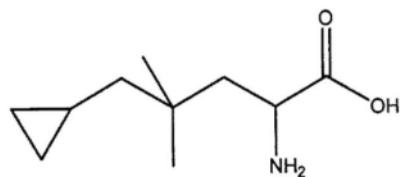
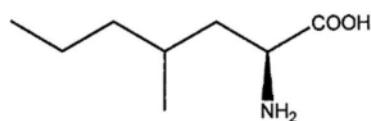
I-208

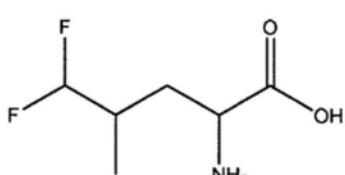
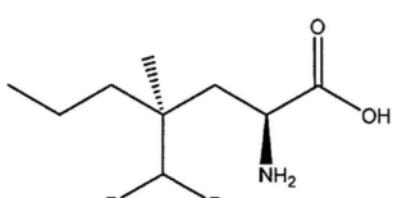
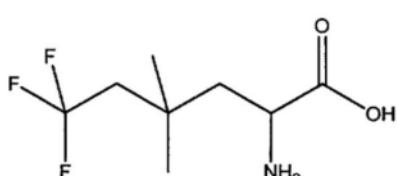
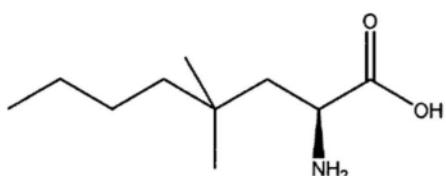
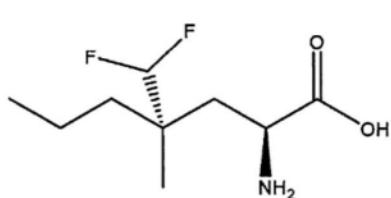
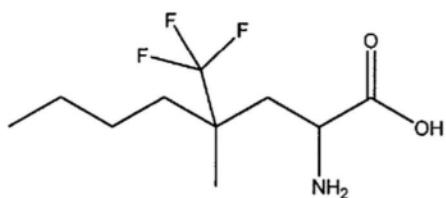
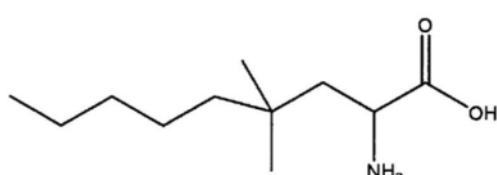
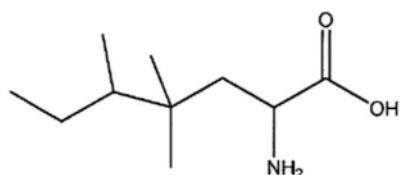
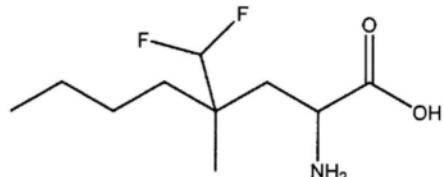
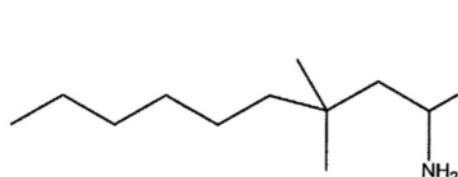
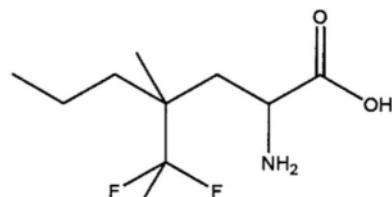
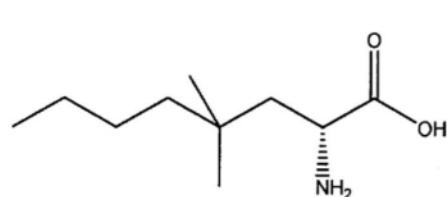
I-209



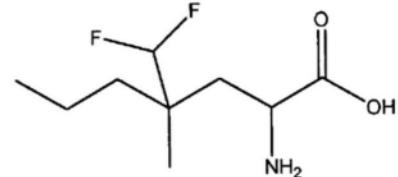
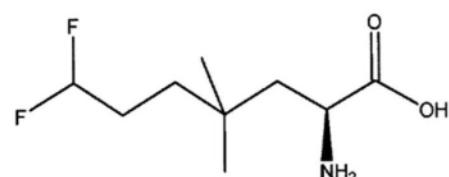
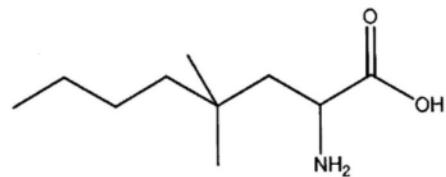
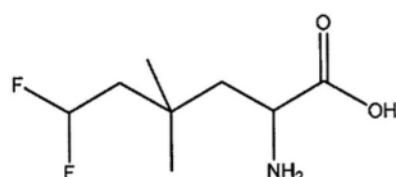
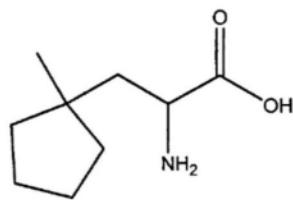
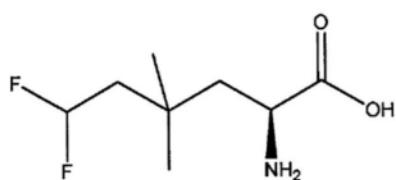
I-210

I-211

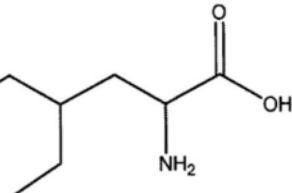
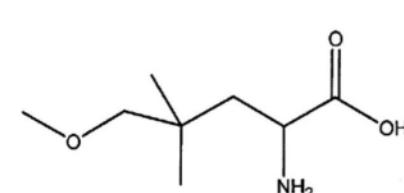
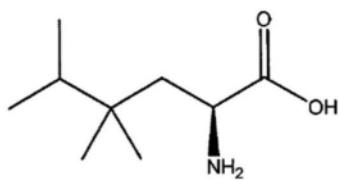
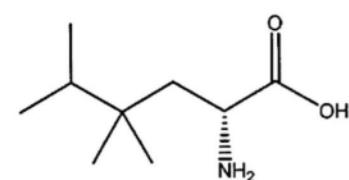
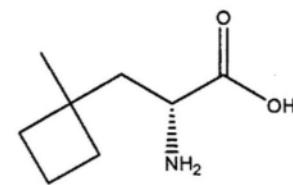
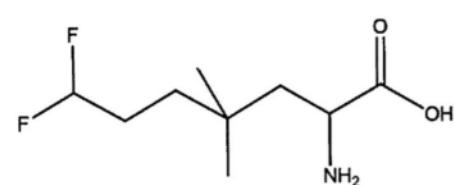


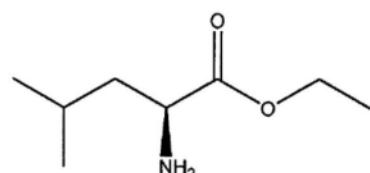


[0174]

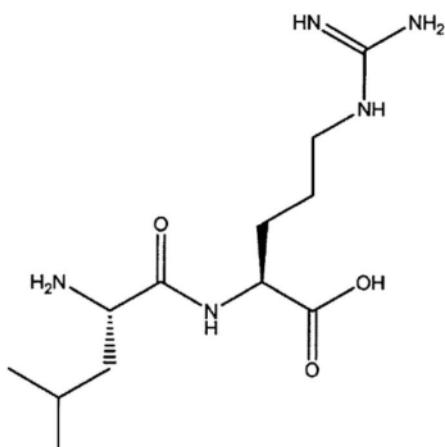


[0175]

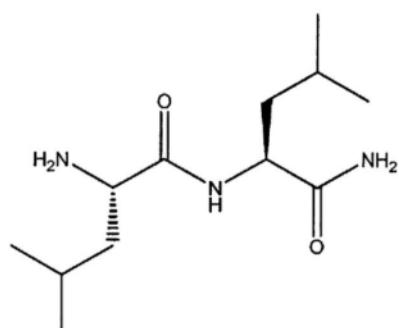




I-246

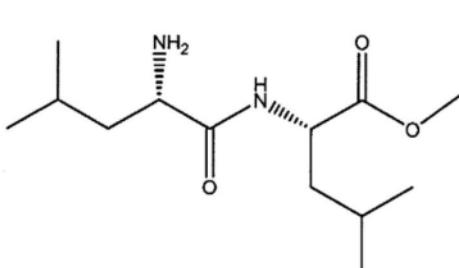


I-247

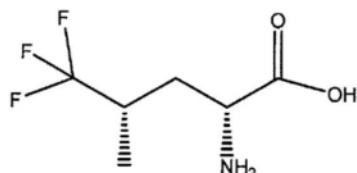


[0176]

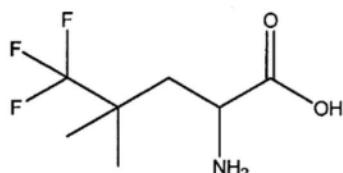
I-248



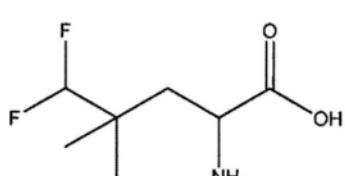
I-249



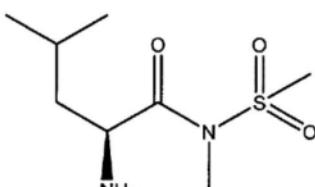
I-250



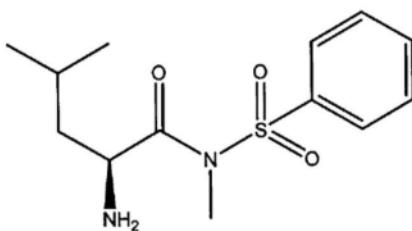
I-251



I-252



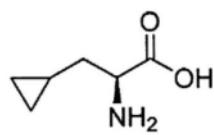
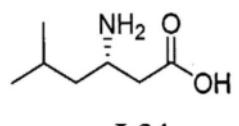
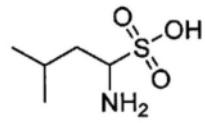
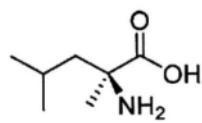
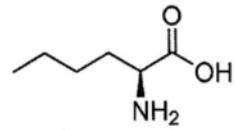
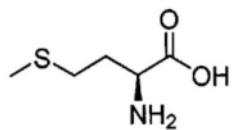
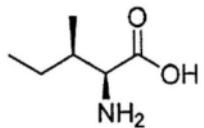
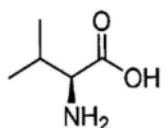
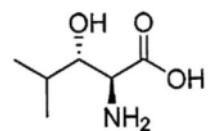
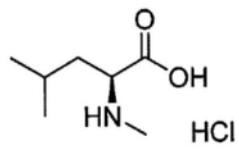
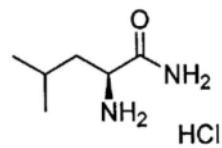
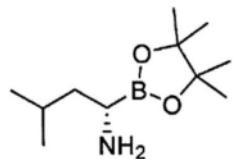
I-253



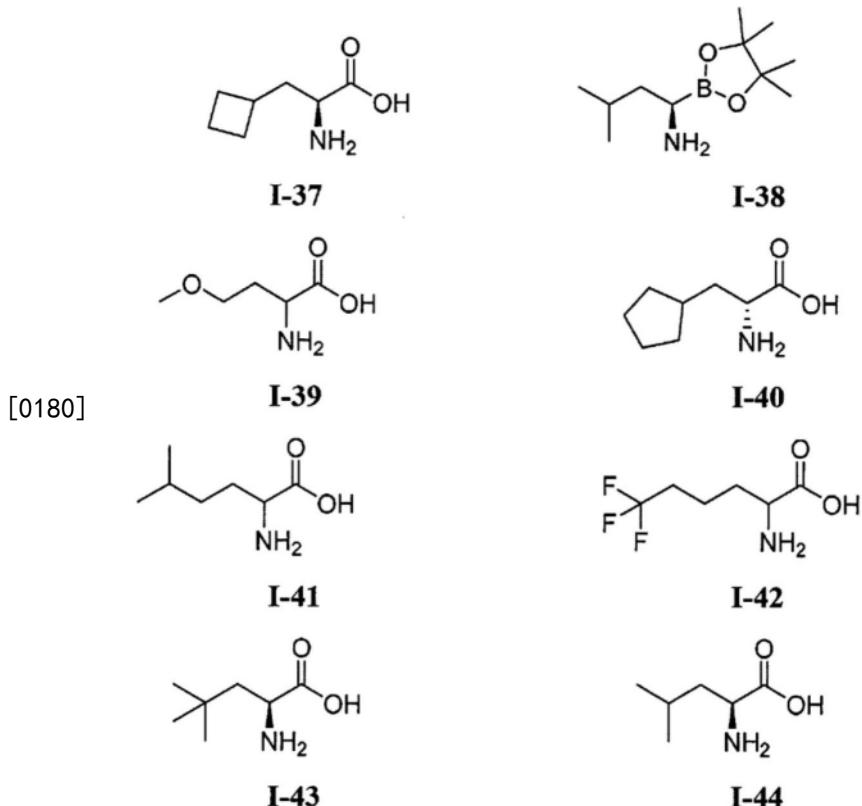
I-254

[0177] 示范性的本发明化合物阐述于以下表2中。

[0178] 表2.示范性化合物



[0179]



[0181] 在一些实施例中，本发明提供上表1中所阐述的化合物或其药学上可接受的盐。在一些实施例中，本发明提供上表2中所阐述的化合物或其药学上可接受的盐。

[0182] 4. 使用、调配及投与

[0183] 药学上可接受的组合物

[0184] 根据另一实施例，本发明提供一种组合物，其包括本发明化合物或其药学上可接受的衍生物及药学上可接受的载剂、佐剂或媒剂。本发明组合物中的化合物的量为使得能有效地可测量地抑制或活化生物样品或患者中的Sestrin-GATOR2相互作用。在某些实施例中，本发明组合物中的化合物的量为使得能有效地可测量地抑制或活化生物样品或患者中的Sestrin-GATOR2相互作用。在某些实施例中，调配本发明组合物以用于向需要这类组合物的患者投与。在一些实施例中，调配本发明组合物以用于向患者经口投与。

[0185] 如本文所使用，术语“患者”意指动物，优选为哺乳动物且最优选为人类。

[0186] 术语“药学上可接受的载剂、佐剂或媒剂”指代不破坏与其一起调配的化合物的药理学活性的无毒载剂、佐剂或媒剂。可用于本发明组合物中的药学上可接受的载剂、佐剂或媒剂包含(但不限于)离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人类血清白蛋白)、缓冲物质(例如磷酸盐)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质(例如鱼精蛋白硫酸盐、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐)、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯基吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇及羊毛脂。

[0187] 本发明组合物可经口、非经肠、通过吸入喷雾、局部、经直肠、经鼻、经颊、经阴道或借助于植入式贮器投与。如本文所使用的术语“非经肠”包含皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内及颅内注射或输注技术。优选地，组合物经口、腹膜内或静脉内投与。本发明组合物的无菌可注射形式可为水性或油性悬浮液。这些悬浮液可根据

所属领域中已知的技术使用适合的分散剂或湿润剂及悬浮剂来调配。无菌可注射制剂也可为于无毒非经肠可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如呈于1,3-丁二醇中的溶液形式。在可接受的媒剂及溶剂中,可采用的有水、林格氏溶液(Ringer's solution)及等张氯化钠溶液。另外,无菌不挥发性油常规用作溶剂或悬浮介质。

[0188] 出于这个目的,可采用任何温和不挥发性油,包含合成单甘油酯或二甘油酯。例如油酸的脂肪酸及其甘油酯衍生物适用于制备可注射剂,如天然药学上可接受的油,例如橄榄油或蓖麻油,尤其呈其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液也可含有长链醇稀释剂或分散剂,例如羧甲基纤维素或常用于调配药学上可接受的剂型(包含乳液及悬浮液)的类似分散剂。其它常用表面活性剂(例如Tween、Span及其它乳化剂)或常用于制造药学上可接受的固体、液体或其它剂型的生物可用性增进剂也可用于调配的目的。

[0189] 本发明的药学上可接受的组合物可以任何经口可接受的剂型经口投与,包含(但不限于)胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液。在用于经口使用的片剂的情况下,常用载剂包含乳糖及玉米淀粉。典型地还添加润滑剂,例如硬脂酸镁。就胶囊形式的经口投与而言,适用的稀释剂包含乳糖及干燥玉米淀粉。当为了经口使用需要水性悬浮液时,活性成分与乳化剂及悬浮剂组合。如果需要,还可添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0190] 或者,本发明的药学上可接受的组合物可以用于直肠投与的栓剂形式投与。这些栓剂可通过将药剂与适合的非刺激赋形剂混合来制备,所述赋形剂在室温下为固体但在直肠温度下为液体且因此将在直肠中熔融以释放药物。这类材料包含可可脂、蜂蜡及聚乙二醇。

[0191] 本发明的药学上可接受的组合物还可局部投与,尤其当治疗目标包含通过局部施用容易达到的区域或器官(包含眼睛、皮肤或低位肠道的疾病)时。容易制备适合的局部调配物用于这些区域或器官中的每一者。

[0192] 用于低位肠道的局部施用可以直肠栓剂调配物(参见上文)形式或以适合的灌肠调配物形式实现。还可使用局部经皮贴片。

[0193] 对于局部施用而言,所提供的药学上可接受的组合物可调配为含有悬浮或溶解于一或多种载剂中的活性组分的适合的软膏形式。用于本发明化合物的局部投与的载剂包含(但不限于)矿物油、液体石蜡脂、白石蜡脂、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡及水。或者,所提供的药学上可接受的组合物可以含有悬浮或溶解于一或多种药学上可接受的载剂中的活性组分的适合的洗剂或乳膏形式调配。适合的载剂包含(但不限于)矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、十六酯蜡、十六醇十八醇、2-辛基十二醇、苯甲醇及水。

[0194] 对于眼科使用而言,所提供的药学上可接受的组合物可调配为具有或不具有防腐剂(例如氯苄烷铵)、于pH值经调节的等张无菌生理食盐水中的微米尺寸化悬浮液,或优选为于pH值经调节的等张无菌生理食盐水中的溶液。或者,对于眼科使用而言,药学上可接受的组合物可以软膏(例如石蜡脂)形式调配。

[0195] 本发明的药学上可接受的组合物还可通过经鼻气雾剂或吸入剂来投与。这类组合物根据医药调配技术中熟知的技术制备,且可采用苯甲醇或其它适合的防腐剂、增强生物可用性的吸收促进剂、碳氟化合物及/或其它常规溶解剂或分散剂制备为于生理食盐水中的溶液。

[0196] 最优选地，调配本发明的药学上可接受的组合物以用于经口投与。这类调配物可与食物或不与食物一起投与。在一些实施例中，本发明的药学上可接受的组合物不与食物一起投与。在其它实施例中，本发明的药学上可接受的组合物与食物一起投与。

[0197] 可与载剂材料组合以产生呈单一剂型的组合物的本发明化合物的量将视所治疗的宿主及特定投与模式而变化。优选地，应调配所提供的组合物以使得可向接受这些组合物的患者投与0.01毫克/千克体重/天到100毫克/千克体重/天之间的剂量的抑制剂。

[0198] 还应理解，任何特定患者的特定剂量及治疗方案将视多种因素而定，所述因素包含所采用的特定化合物的活性、年龄、体重、一般健康、性别、膳食、投与时间、排泄率、药物组合及治疗医师的判断及所治疗的特定疾病的严重程度。组合物中的本发明化合物的量也视组合物中的特定化合物而定。

[0199] 化合物及药学上可接受的组合物的用途

[0200] 本文所描述的化合物及组合物一般适用于抑制或活化Sestrin-GATOR2相互作用。在一些实施例中，所提供的化合物或其组合物为Sestrin-GATOR2相互作用的活化剂。

[0201] 本发明中用作Sestrin-GATOR2相互作用的抑制剂或活化剂的化合物的活性可体外、体内或于细胞系中分析。体外分析包含测定Sestrin-GATOR2相互作用的抑制或活化的分析。替代体外分析对抑制剂或活化剂降低或提高Sestrin结合到GATOR2的能力进行定量。用于分析本发明中用作Sestrin-GATOR2相互作用的抑制剂或活化剂的化合物的详细条件阐述于以下实例中。

[0202] 如本文所使用，术语“治疗(treatment、treat及treating)”指代逆转、减轻如本文所描述的疾病或病症或其一或多种症状，延迟其发作，或抑制其进展。在一些实施例中，可在已出现一或多种症状之后投与治疗。在其它实施例中，治疗可在不存在症状时投与。举例来说，治疗可在症状发作之前向易感个体投与(例如根据症状病史及/或根据遗传性或其它易感性因素)。也可在症状已消退之后继续治疗，例如以预防或迟缓其复发。

[0203] 所提供的化合物为Sestrin-GATOR2相互作用的抑制剂或活化剂且因此适用于治疗与mTORC1活性相关的一或多种病症。因此，在某些实施例中，本发明提供一种用于治疗mTORC1介导的病症的方法，其包括向有需要的患者投与本发明化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。

[0204] 如本文所使用，术语“mTORC1介导的”病症、疾病及/或病况意指其中已知mTORC1起作用的任何疾病或其它有害条件。因此，本发明的另一实施例涉及治疗其中已知mTORC1起作用的一或多种疾病或减轻其严重程度。

[0205] 在一些实施例中，活化mTORC的方法用于治疗或预防抑郁症。(参见Ignácio等人，(2015)Br J Clin Pharmacol.11月27日)。因此，在一些实施例中，本发明提供一种治疗或预防有需要患者的抑郁症的方法，其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中，抑郁症为难治性抑郁症(“TRD”)。在一些实施例中，难治性抑郁症对一线治疗具有抗性。在一些实施例中，难治性抑郁症对二线治疗具有抗性。

[0206] 在一些实施例中，本发明提供一种治疗有需要患者的抑郁症的方法，其中所述患者抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物不到六周内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物不到四周内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者

在投与化合物或药学上可接受的组合物两周内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物不到两周内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物一周内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物七天内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物六天内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物五天内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物四天内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物三天内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物两天内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物一天内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，所述患者在投与化合物或药学上可接受的组合物二十四小时内抑郁量表评分降低了50%。在一些实施例中，抑郁量表评分选自蒙哥马利-艾森贝格抑郁评定量表(Montgomery-Asberg Depression Rating Scale, MADRS)、汉弥尔顿抑郁评定量表(HAMD-6)、抑郁症状自我评定量表的列表(IDS-SR)及临床总体印象严重程度量表(CGI-S)。

[0207] 在一些实施例中，本发明提供一种治疗有需要患者的抑郁症的方法，其包括向所述患者经口投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤，其中所述患者抑郁量表评分降低与经由i.p.注射投与的氯胺酮相当。在一些实施例中，抑郁量表评分降低由单次经口投与产生。在一些实施例中，抑郁量表评分降低由多次经口投与产生。

[0208] 在一些实施例中，活化mTORC1的方法用于诱导快速起效抗抑郁活性。因此，在一些实施例中，本发明提供一种在罹患TRD的有需要的患者中引发快速起效抗抑郁活性的方法，其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物两周内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物一周内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物七天内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物六天内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物五天内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物四天内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物三天内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物两天内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物一天内发生。在一些实施例中，快速起效抗抑郁活性在投与所述化合物或组合物不到二十四小时内发生。

[0209] 在一些实施例中，本发明提供一种在罹患抑郁症的有需要的患者中引发长效持久抗抑郁活性的方法，其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中，有需要的患者罹患TRD。在一些实施例中，长效持久抗抑郁活性在单次投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物之后持续至少二十四小时。在一些实施例中，长效持久抗抑郁活性持续超过一天。在一些实施例中，长效持久抗抑郁活性持续至少两天。在一些实施例中，长效持久抗抑郁活性持续至少三天。在一些实施例中，长效持久抗抑郁活性持续至少四天。在一些实施例中，长效持久抗抑郁活性持续至少五天。在一些实施例中，长效持久抗抑郁活性持续至少六天。在一些实施例中，长效持久抗抑郁活性持续至少

七天。

[0210] 在一些实施例中,本发明提供一种引发快速起效及长效持久抗抑郁活性的方法。

[0211] 在一些实施例中,本发明提供一种在个体中引发积极行为反应的方法,其包括向所述个体投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中,积极行为反应与情绪改善相关。在一些实施例中,积极行为反应与焦虑减少相关。在一些实施例中,积极行为反应与情绪改善相对应。在一些实施例中,积极行为反应与抗压能力改善相关。

[0212] 在一些实施例中,本发明提供一种在个体中引发快速起效积极行为反应的方法,其包括向所述个体投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中,积极行为反应在投与二十四小时内发生。在一些实施例中,积极行为反应在投与一天内发生。在一些实施例中,积极行为反应在投与两天内发生。在一些实施例中,积极行为反应在投与三天内发生。在一些实施例中,积极行为反应在投与四天内发生。在一些实施例中,积极行为反应在投与五天内发生。在一些实施例中,积极行为反应在投与六天内发生。在一些实施例中,积极行为反应在投与七天内发生。在一些实施例中,积极行为反应在投与一周内发生。

[0213] 在一些实施例中,本发明提供一种在个体中引发长效持久积极行为反应的方法,其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中,长效持久积极行为反应持续超过一天。在一些实施例中,长效持久积极行为反应持续至少两天。在一些实施例中,长效持久积极行为反应持续至少三天。在一些实施例中,长效持久积极行为反应持续至少四天。在一些实施例中,长效持久积极行为反应持续至少五天。在一些实施例中,长效持久积极行为反应持续至少六天。在一些实施例中,长效持久积极行为反应持续至少七天。

[0214] 在一些实施例中,本发明提供一种引发快速起效及长效持久积极行为反应的方法。

[0215] 在一些实施例中,本发明提供一种在有需要的患者中改善及/或逆转由慢性不可预测的压力(CUS)引起的行为及突触缺陷的方法,其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中,所述方法改善及/或逆转由CUS引起的行为缺陷。在一些实施例中,所述方法改善及/或逆转由CUS引起的突触缺陷。在一些实施例中,由CUS引起的突触缺陷为突触后蛋白质表达减少。在一些实施例中,突触后蛋白质表达减少为GLUR1或PSD95表达减少。

[0216] 在一些实施例中,活化mTORC1的方法用于治疗或预防自闭症程度。(参见Novarino等人,(2012) Science 10月19日,338:6105,第394到397页)。因此,在一些实施例中,本发明提供一种在有需要的个体中治疗或预防一定程度的自闭症的方法,其包括向所述个体投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中,自闭症为遗传型自闭症。

[0217] 在一些实施例中,本发明提供一种治疗有需要的患者的遗传型自闭症的方法,其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。SHANK3单倍剂量不足为Phelan-McDermid综合症(PMDS)的神经特征的致病因素,包含自闭症谱系障碍的高风险(Bidinosti等人(2016) Science Reports 351,1199-1203)。SHANK3缺失型神经元中的

mTORC1下调归因于通过其激酶、Cdc2类激酶2增强的磷酸化及丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶2A(PP2A)调节子单元B56b活化(Bidinosti等人(2016)Science Reports 351,1199-1203)。SHANK3突变小鼠展示自闭特点(Yang等人(2012)The Journal of Neuroscience 32,6525-6541)。具有自闭特点及运动延缓的患者在SLC7A5基因中携带有害的同种接合子突变。溶质载体转运蛋白7a5(SLC7A5)(定位于血脑势垒(BBB)处的较大中性氨基酸转运蛋白)在维持大脑BCAA的标准含量方面具有必不可少的作用。亮氨酸脑室内投与改善成年突变小鼠的异常行为(Tarlungeanu等人(2016)Cell 167,1481-1494)。

[0218] 在一些实施例中,本发明提供一种治疗有需要的患者的溶酶体贮积病或病症(“LSD”)的方法,其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。LSD为一组由溶酶体功能缺陷产生的遗传性代谢障碍。溶酶体贮积病由溶酶体功能障碍引起,通常由于缺乏脂质、糖蛋白(含糖蛋白质)或所谓的黏多糖代谢所需的单一酶。在一些实施例中,本发明提供一种治疗有需要的患者的脂质贮积病的方法,其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中,脂质贮积病选自鞘脂类代谢障碍(例如神经节苷脂贮积病、高歇氏(Gaucher)、尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease)或异染性脑白质营养不良)。在一些实施例中,本发明提供一种治疗神经节苷脂贮积病(例如泰-萨克斯病或脑白质障碍)的方法。在一些实施例中,本发明提供一种治疗有需要的患者的黏多糖贮积症的方法,其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中,黏多糖贮积症为亨特综合症(Hunter syndrome)或贺勒病(Hurler disease)。

[0219] 在一些实施例中,本发明提供一种治疗有需要的患者的JNCL(贝敦氏病(Batten Disease))的方法,其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。JNCL由产生非功能蛋白质的CLN3基因的外显子7及8的缺失引起.Battenin(由CLN3编码的全长蛋白质)为定位于晚期内体及溶酶体的跨膜蛋白,其中其已展示帮助调节pH、氨基酸平衡及小泡运输(Pearce等人(1999)Nature Genetics 22,1;Fossale等人(2004)BMC Neuroscience 10,5),mTOR活化需要自体吞噬所提供的细胞内养分,其在体外及体内JNCL模型中归因于不具有功能性battenin而降低(Cao等人(2006)Journal of Biological Chemistry 281,29)。

[0220] 在一些实施例中,本发明提供一种治疗有需要的患者的胱氨酸症的方法,其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。胱氨酸症为影响具有CSTN基因中的两个等位基因突变的那些人的常染色体隐性疾病;来自溶酶体的胱氨酸流出物中缺乏溶酶体胱氨酸转运蛋白cystinosin,导致胱氨酸晶体形成于肾脏上皮小管中及肾功能缺失。研究已展示,不具有CSTN及错误定位mTOR的细胞中的mTORC1信号传导缺乏或减少(Ivanova等人(2016)J Inherit Metab Dis.39(3),457-64;Andrzejewska等人(2016)J Am Soc Nephrol.27(6),1678-1688e)。这些缺陷可能无法通过半胱胺修复(Ivanova等人(2016)J Inherit Metab Dis.39(3),457-64;Andrzejewska等人(2016)J Am Soc Nephrol.27(6),1678-1688e)。还已发现Cystinosin结合mTORC1路径组分v-ATP酶、Rags及调节剂(Andrzejewska等人(2016)J Am Soc Nephrol.27(6),1678-1688e)。CTNS缺失型细胞展示自噬小体数目提高及伴随蛋白介导的自体吞噬减少(Napolitano等人(2015)EMBO Mol Med.7(2),158-74)。

[0221] 在一些实施例中，本发明提供一种治疗有需要的患者的法布里病 (Fabry disease) 的方法，其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在法布里病中， $\alpha$ -半乳糖缺陷导致酰基鞘鞍醇三己糖脂质的溶酶体积聚。在法布里病细胞模型中，体外及体内观测到降低的mTOR活性及提高的自体吞噬，其中 $\alpha$ -半乳糖被shRNA阻断 (Liebau等人 (2013) PLoS 8, e63506)。还在小鼠大脑中观测到活性过高的自体吞噬，其中 $\alpha$ -半乳糖经基因剔除 (Nelson等人 (2014) Acta Neuropathologica Communications 2, 20)。

[0222] 在一些实施例中，本发明提供一种治疗有需要的患者的IV型粘脂贮积症 (MLIV) 的方法，其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在MLIV 中，TRPML1溶酶体Ca (2+) 通道的突变造成无序溶酶体膜运输。果蝇中的MLIV基因剔除导致自体吞噬上调及mTOR活性降低，其两者均可通过以基因方法使mTORC1活化或通过给动物喂饲较高蛋白质饮食逆转 (Wong等人 (2012) Curr Biol. 22 (17), 1616-1621)。还在来自MLIV患者的成纤维细胞中观测到提高的自体吞噬 (Vergara jauregui等人 (2008) Human Molecular Genetics 17, 2723-2737)。

[0223] 在一些实施例中，本发明提供一种治疗有需要的患者的智力迟钝的方法，其包括向所述患者投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在智人中，塞勒布隆突变 (Cereblon mutation) 连接到轻度常染色体隐性非综合症智力迟钝。在迟钝的小鼠塞勒布隆基因剔除模型中，塞勒布隆缺失使AMPK活化，抑制mTOR且减少小脑中的蛋白质转译 (Lee等人 (2014) J Biol Chem. 289, 23343-52; Xu等人 (2013) J Biol Chem. 288, 29573-85)。

[0224] 在一些实施例中，本发明提供一种提高个体中的神经元蛋白表达的方法，其包括向所述个体投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中，神经元蛋白表达的提高在突触后神经元中发生。在一些实施例中，神经元蛋白表达的提高包含提高脑衍生神经营养因子 (BDNF) 的表达。在一些实施例中，神经元蛋白表达的提高包含谷氨酸受体1 (GluR1) 的表达提高。在一些实施例中，神经元蛋白表达的提高包含突触蛋白表达的提高。在一些实施例中，神经元蛋白表达的提高包含PSD95表达的提高。

[0225] 在一些实施例中，本发明提供一种提高个体的突触发生的方法，其包括向所述个体投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中，提高的突触发生涉及突触重塑。在一些实施例中，提高的突触发生涉及诱导树枝状棘。在一些实施例中，诱导树枝状棘使得树枝状棘密度提高。在一些实施例中，树枝状棘为细长棘。在一些实施例中，树枝状棘为蘑菇棘。

[0226] 在一些实施例中，本发明提供一种增强个体的突触功能的方法，其包括向所述个体投与所提供的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。在一些实施例中，个体的增强的突触功能涉及兴奋性突触后电流 (EPSC) 的提高。

[0227] 本发明的药学上可接受的组合物可视所治疗的感染的严重程度而经口、经直肠、非经肠、脑池内、阴道内、腹膜内、局部 (如通过散剂、软膏或滴剂)、经颊，作为经口或经鼻喷雾或其类似方式向人类及其它动物投与。在某些实施例中，本发明化合物可以每天约 0.01mg/kg 到约 50mg/kg 及优选约 1mg/kg 到约 25mg/kg 的个体体重的剂量水平经口或非经肠一日投与一或多次以获得所需治疗效果。

[0228] 用于经口投与的液体剂型包含 (但不限于) 药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬

浮液、糖浆及酏剂。除活性化合物之外，液体剂型可含有所属领域中常用的惰性稀释剂，例如水或其它溶剂；增溶剂及乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油（尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油及芝麻油）、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇及脱水山梨糖醇的脂肪酸酯；及其混合物。除惰性稀释剂之外，经口组合物也可包含佐剂，例如湿润剂、乳化剂及悬浮剂、甜味剂、调味剂及芳香剂。

[0229] 可根据已知技术使用适合的分散剂或湿润剂及悬浮剂来调配可注射制剂，例如无菌可注射水性或油性悬浮液。无菌可注射制剂也可为于无毒性非经肠可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液或乳液，例如呈于1,3-丁二醇中的溶液形式。在可接受的媒剂及溶剂中，可采用的有水、林格氏溶液、U.S.P. 及等张氯化钠溶液。另外，无菌不挥发性油常规用作溶剂或悬浮介质。出于这个目的，可采用包含合成单甘油酯或二甘油酯的任何温和的不挥发性油。另外，例如油酸的脂肪酸用于制备可注射剂。

[0230] 可例如通过经由细菌持留过滤器过滤或通过并入在使用之前可溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中的呈无菌固体组合物形式的灭菌剂来将可注射调配物灭菌。

[0231] 为延长本发明化合物的效果，通常需要减缓来自皮下或肌肉内注射的化合物的吸收。这可通过使用具有不良水溶性的结晶或非晶形材料的液体悬浮液来实现。化合物的吸收率则视其溶解率而定，溶解率又可能视晶体大小及结晶形式而定。或者，通过将化合物溶解或悬浮于油媒剂中来实现非经肠投与的化合物的延迟吸收。通过在例如聚丙交酯-聚乙交酯的生物可降解聚合物中形成化合物的微胶囊基质来制造可注射积存形式。视化合物与聚合物的比率及所采用的特定聚合物的性质而定，可控制化合物释放速率。其它生物可降解聚合物的实例包含聚(原酸酯)及聚(酸酐)。还通过将化合物覆埋于与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备储槽式可注射调配物。

[0232] 用于经直肠或经阴道投与的组合物优选为可通过将本发明化合物与适合的非刺激赋形剂或载剂（例如可可脂、聚乙二醇）混合而制备的栓剂；或在环境温度下为固体但在体温下为液体且因此在直肠或阴道腔中熔融且释放活性化合物的栓剂蜡。

[0233] 用于经口投与的固体剂型包含胶囊、片剂、丸剂、粉剂及粒剂。在这类固体剂型中，活性化合物可与以下各者混合：至少一种惰性、药学上可接受的赋形剂或载剂，例如柠檬酸钠或磷酸二钙；及/或a) 填充剂或扩充剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇及硅酸；b) 粘合剂，例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖及阿拉伯胶；c) 保湿剂，例如甘油；d) 崩解剂，例如琼脂-琼脂，碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐及碳酸钠；e) 阻溶剂，例如石蜡；f) 吸收促进剂，例如季铵化合物；g) 湿润剂，例如十六醇及单硬脂酸甘油酯；h) 吸收剂，例如高岭土及膨润土；及i) 润滑剂，例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固态聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物。在胶囊、片剂及丸剂的情况下，剂型还可包括缓冲剂。

[0234] 类似类型的固体组合物还可用作使用例如乳糖或牛乳糖以及高分子量聚乙二醇及其类似物的赋形剂的软填充及硬填充明胶胶囊中的填充剂。片剂、糖衣药丸、胶囊、丸剂及粒剂的固体剂型可制备有包衣及壳层，例如肠溶衣及医药调配技术中熟知的其它包衣。其可任选地含有乳浊剂，且还可具有仅在或优先在肠道的某一部分中释放或任选地以延迟方式释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包含聚合物质及蜡。类似类型的

固体组合物还可用作使用如乳糖以及高分子量聚乙二醇及其类似物的赋形剂的软及硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0235] 活性化合物还可与一或多种如上文所指出的赋形剂一起以微囊封形式存在。片剂、糖衣药丸、胶囊、丸剂及粒剂的固体剂型可制备有包衣及壳层，例如肠溶衣、释放控制包衣及医药调配技术中熟知的其它包衣。在这类固体剂型中，活性化合物可与至少一种惰性稀释剂（例如蔗糖、乳糖或淀粉）混杂。如在一般实践中，这类剂型还可包括除惰性稀释剂以外的其它物质，例如制锭润滑剂及其它制锭助剂，例如硬脂酸镁及微晶纤维素。在胶囊、片剂及丸剂的情况下，剂型还可包括缓冲剂。其可任选地含有乳浊剂，且还可具有仅在或优先在肠道的某一部分中释放或任选地以延迟方式释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包含聚合物质及蜡。

[0236] 用于局部或经皮投与本发明化合物的剂型包含软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、散剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴片。活性组分根据需要在无菌条件下与药学上可接受的载剂及任何所需防腐剂或缓冲剂混杂。经眼调配物、滴耳剂和滴眼剂也涵盖于本发明的范围内。另外，本发明涵盖使用经皮贴片，其具有向身体提供控制递送化合物的附加优点。这类剂型可通过在适当介质中溶解或分配化合物来制备。还可使用吸收增进剂来增加化合物通过皮肤的通量。速率可通过提供速率控制膜或通过将化合物分散于聚合物基质或凝胶中来控制。

[0237] 根据一个实施例，本发明涉及一种调节Sestrin-GATOR2相互作用，由此选择性地间接调节生物样品中的mTORC1活性的方法，其包括使所述生物样品与本发明化合物或包括所述化合物的组合物接触的步骤。

[0238] 如本文所使用，术语“生物样品”包含（但不限于）细胞培养物或其提取物；从哺乳动物获得的活组织检查材料或其提取物；及血液、唾液、尿液、粪便、精液、泪液或其它体液或其提取物。

[0239] 本发明的另一实施例涉及一种调节Sestrin-GATOR2相互作用，由此选择性地间接调节患者的mTORC1活性的方法，其包括向所述患者投与本发明化合物或包括所述化合物的组合物的步骤。

[0240] 根据另一实施例，本发明涉及一种调节Sestrin-GATOR2相互作用，由此间接选择性地调节患者的mTORC1活性的方法，其包括向所述患者投与本发明化合物或包括所述化合物的组合物的步骤。在其它实施例中，本发明提供一种用于治疗有需要的患者的mTORC1介导的病症的方法，其包括向所述患者投与根据本发明的化合物或其药学上可接受的组合物的步骤。这类病症在本文中详细描述。

[0241] 视待治疗的特定病况或疾病而定，通常投与以供治疗所述病况的额外治疗剂也可存在于本发明组合物中。如本文所使用，通常经投与以供治疗特定疾病或病况的额外治疗剂被称为“适于所治疗的疾病或病况”。

[0242] 在一些实施例中，所提供的化合物与抗抑郁治疗剂组合投与。抗抑郁治疗剂已为所属领域的一般技术人员所熟知且包含选择性血清素再吸收抑制剂（“SSRI”，例如舍曲林（sertraline）、草酸依西普兰（escitalopram）、西它普兰（citalopram）、氟伏沙明（fluvoxamine）、氟西汀（fluoxetine）、帕罗西汀（paroxetine））、抗抑郁剂（例如安非他酮（bupropion）、文拉法辛（venlafaxine）、米氮平（mirtazapine）、度洛西汀（duloxetine）、阿

米曲替林(amitriptyline)、丙咪嗪(imipramine)、司来吉兰(selegiline)、去甲替林(nortriptyline)、曲唑酮(trazodone)、去甲文拉法辛(desvenlafaxine)及阿立哌唑(aripiprazole))。

[0243] 在一些实施例中,所提供的化合物与适用于治疗一或多种LSD的额外治疗剂或方法组合投与。在一些实施例中,所提供的化合物与酶置换疗法、化学伴随蛋白疗法、骨髓移植、底物减少疗法、 $\alpha$ -L-艾杜糖苷、重组人类N-乙酰基半乳糖-4-硫酸酯酶(芳基硫酸酯酶B)、鞘糖脂生物合成抑制剂、N-丁基脱氧基野尻霉素(美格鲁特)、疏水性亚胺糖或 $\alpha$ -半乳糖A的抑制剂(例如1-脱氧-半乳野尻霉素)组合投与。

[0244] 那些额外药剂可与含本发明化合物的组合物分开投与,作为多次给药方案的一部分。或者,那些药剂可为单一剂型的一部分,在单一组合物中与本发明化合物一起混合。如果作为多次给药方案的一部分投与,那么两种活性剂可同时、依次或彼此间隔一定时间段(通常彼此间隔在5小时以内)提供。

[0245] 如本文所使用,术语“组合(combination/combined)”及相关术语指代同时或依次投与根据本发明的治疗剂。举例来说,本发明化合物可与另一治疗剂以个别单位剂型或共同呈单一单位剂型同时或依次投与。因此,本发明提供一种包括本发明化合物、其它治疗剂及药学上可接受的载剂、佐剂或媒剂的单一单位剂型。

[0246] 可与载剂物质组合产生单一剂型的本发明化合物及额外治疗剂(在包括如上文所描述的额外治疗剂的那些组合物中)的量将视所治疗的宿主及特定投与模式而变化。优选地,应调配本发明组合物以使得可投与0.01毫克/千克体重/天到100毫克/千克体重/天之间的剂量的本发明化合物。

[0247] 在包括额外治疗剂的那些组合物中,额外治疗剂及本发明化合物可协同作用。因此,这类组合物中额外治疗剂的量将小于仅利用所述治疗剂的单一疗法中所需的量。在这类组合物中,可投与0.01微克/千克体重/天到1,000微克/千克体重/天之间的剂量的额外治疗剂。

[0248] 存在于本发明组合物中的额外治疗剂的量将不超过通常将以包括所述治疗剂作为唯一活性剂的组合物形式投与的量。目前所揭示的组合物中额外治疗剂的量优选将在占通常存在于包括所述药剂作为唯一治疗活性剂的组合物中的量约50%到100%的范围内。

[0249] 本发明化合物或其医药组合物还可并入用于包覆可植入医疗装置的组合物中,所述可植入医疗装置例如假肢、人工瓣膜、血管移植物、支架及插管。血管支架例如已用于克服再狭窄(损伤后血管壁再变窄)。然而,使用血管支架或其它可植入装置的患者具有凝块形成或血小板活化的风险。可通过用包括激酶抑制剂的药学上可接受的组合物预包覆所述装置来预防或减轻这些非所需作用。用本发明化合物包覆的可植入装置为本本发明的另一实施例。

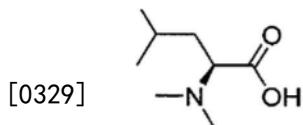
[0250] 范例

[0251] 如以下实例中所描绘,在某些示范性实施例中,根据以下通用程序来制备化合物。应了解,虽然通用方法描绘本发明的某些化合物的合成,但以下通用方法及所属领域的一般技术人员已知的其它方法可应用于如本文所描述的所有化合物及这些化合物中的每一者的子类及种类。

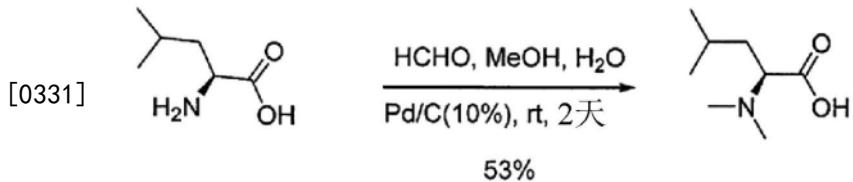
[0252] 实验部分所用的缩写列表。

- [0253] 4A MS: 4Å分子筛  
[0254] AcOH:乙酸  
[0255] ACN:乙腈  
[0256] Anhyd:无水  
[0257] Aq:水性  
[0258] Bn:苯甲基  
[0259] Boc:叔丁氧基羰基  
[0260] CbzCl:氯甲酸苯甲酯  
[0261] Cbz-OSu:N-(苯甲氧基羰基)丁二酰亚胺  
[0262] Cu(OAc)<sub>2</sub>:乙酸铜(II)  
[0263] d:天  
[0264] DAST:三氟化二乙基氨基硫  
[0265] DBU:1,8-重氮双环[5.4.0]十一-7-烯  
[0266] DCE:1,2-二氯乙烷  
[0267] DCM:二氯甲烷  
[0268] DEA:二乙胺  
[0269] DIBAL-H:二异丁基氢化铝  
[0270] DIPEA:N,N-二异丙基乙胺  
[0271] DMA:N,N-二甲基乙酰胺  
[0272] DMAP:4-二甲氨基吡啶  
[0273] DMF:N,N-二甲基甲酰胺  
[0274] DMSO:二甲亚砜  
[0275] DPPA:二苯基磷酰基叠氮化物  
[0276] EDC:1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐  
[0277] ee:对映异构过量  
[0278] ESI:电喷雾电离  
[0279] Et<sub>3</sub>N:三乙胺  
[0280] Et<sub>2</sub>O:二乙醚  
[0281] EtOAc:乙酸乙酯  
[0282] EtOH:乙醇  
[0283] Fmoc:芴基甲氧基羰基  
[0284] Fmoc-OSu:N-(9-芴基甲氧基羰基)丁二酰亚胺  
[0285] h:小时  
[0286] HATU:1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐  
[0287] HCOONH<sub>4</sub>:甲酸铵  
[0288] HPLC:高效液相色谱  
[0289] IBX:2-碘氧基苯甲酸  
[0290] IPA:异丙醇

- [0291] KOAc:乙酸钾  
[0292] M:摩尔  
[0293] Me:甲基  
[0294] MeOH:甲醇  
[0295] mins:分钟  
[0296] mL:毫升  
[0297] mM:毫摩尔  
[0298] mmol:毫摩尔  
[0299] MTBE:甲基叔丁基醚  
[0300] NaBH<sub>3</sub>CN:氰基硼氢化钠  
[0301] Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:碳酸钠  
[0302] NaHCO<sub>3</sub>:碳酸氢钠  
[0303] NMP:N-甲基吡咯烷  
[0304] NMR:核磁共振  
[0305] °C:摄氏度  
[0306] PBS:磷酸盐缓冲盐水  
[0307] Pd/C:钯/碳  
[0308] Pd(OH)<sub>2</sub>/C:皮尔曼氏催化剂(Pearlman's catalyst)PE:石油醚  
[0309] PhNH<sub>2</sub>:苯胺  
[0310] PPh<sub>3</sub>:三苯基膦  
[0311] Rel:相对  
[0312] rt:室温  
[0313] sat:饱和  
[0314] SFC:超临界流体色谱  
[0315] SOC<sub>2</sub>:亚硫酰氯  
[0316] TBAB:四正丁基溴化铵  
[0317] tBuOK:叔丁醇钾  
[0318] TEA:三乙胺  
[0319] Tf:三氟甲烷磺酸酯  
[0320] TfAA:三氟甲磺酸酐  
[0321] TFA:三氟乙酸  
[0322] TIPS:三异丙基硅烷基  
[0323] THF:四氢呋喃  
[0324] TMSCN:氰化三甲基硅烷  
[0325] pTSA:对甲苯磺酸  
[0326] TsOH:对甲苯磺酸  
[0327] 下文描述所提供的化合物的代表性非限制性实例的制备。  
[0328] 实例1: (S)-2-(二甲基氨基)-4-甲基戊酸[I-1].

**I-1**

[0330] 合成流程:

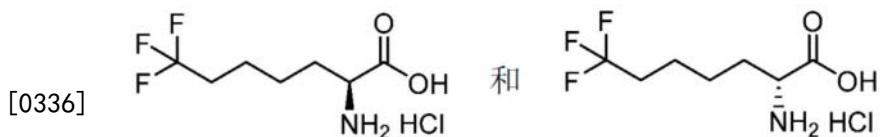


[0332] 程序及特征:

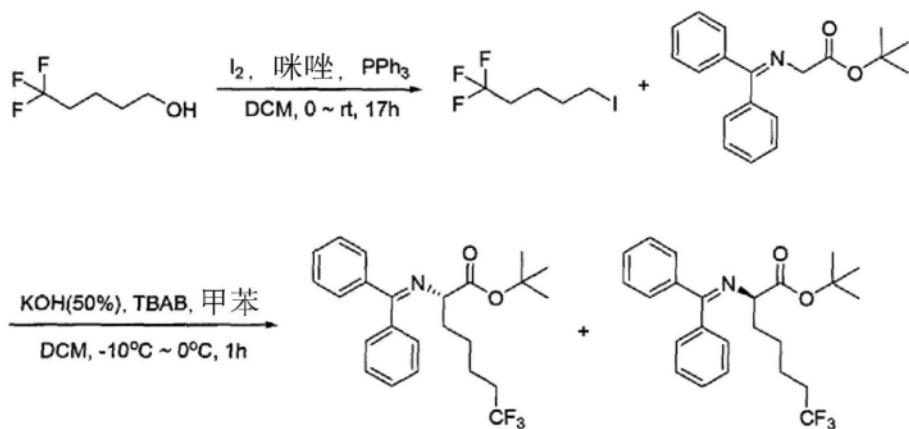
[0333] 步骤1: (S)-2-(二甲基氨基)-4-甲基戊酸:

[0334] 将甲醛(38%, 24.0g)及Pd/C(10%, 500mg)添加到(S)-2-氨基-4-甲基戊酸(2.0g, 15.24mmol)的溶液中, 过滤所得溶液(60mL)。在室温下使混合物氢化两天且过滤以去除催化剂。将滤液浓缩到干燥且将EtOH(30mL)添加到残余物中。搅拌混合物1小时且过滤。浓缩滤液, 得到呈白色粉末的(S)-2-(二甲基氨基)-4-甲基戊酸(1.3g, 8.16mmol, 53%)。ESI-MS ( $\text{EI}^+$ , m/z) : 160.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, MeOD-d<sub>4</sub>) : 83.47 (dd, J=4.4Hz, 10.0Hz, 1H), 2.85 (s, 6H), 1.89-1.74 (m, 2H), 1.62-1.55 (m, 1H), 1.00 (dd, J=2.8Hz, 6.8Hz, 6H)。

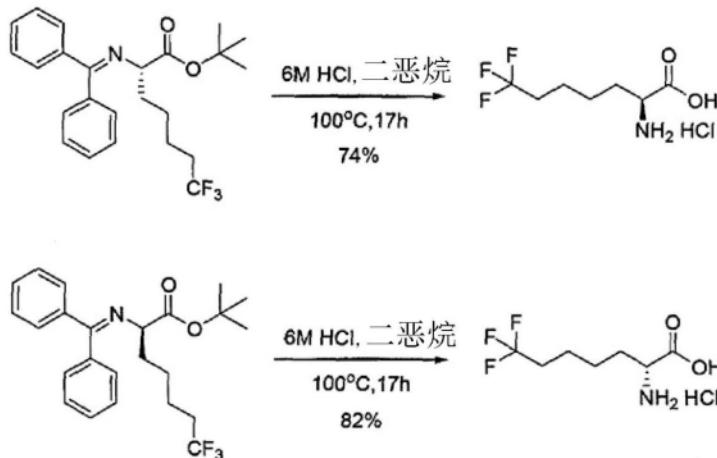
[0335] 实例2及3: (S)-2-氨基-7,7,7-三氟庚酸盐酸盐[I-2]及(R)-2-氨基-7,7,7-三氟庚酸盐酸盐[I-3]。

**I-2****I-3**

[0337] 合成流程:



[0338]



[0339] 程序及特征：

[0340] 步骤1:1,1,1-三氟-5-碘戊烷：

[0341] 在冰浴下,向5,5,5-三氟戊-1-醇(2.0g,14.0mmol)、咪唑(1.48g,21.7mmol)及PPh<sub>3</sub>(5.5g,21.0mmol)于DCM(40mL)中的溶液中添加I<sub>2</sub>(4.45g,17.5mmol)。使混合物升温到室温且搅拌隔夜。向上述混合物中添加Et<sub>2</sub>O(50mL),且随后搅拌10分钟。过滤混合物,且在65℃下蒸发滤液以在大气压下去除溶剂,用Et<sub>2</sub>O(30mL)稀释残余物,过滤混合物,且滤液用于下一步骤。

[0342] 步骤2:(S)-2-(二苯基亚甲基氨基)-7,7,7-三氟庚酸叔丁酯及(R)-2-(二苯基亚甲基氨基)-7,7,7-三氟庚酸叔丁酯：

[0343] 在-10℃下,向2-(二苯基亚甲基氨基)乙酸叔丁酯(2.0g,6.78mmol)及TBAB(109mg,0.339mmol)于甲苯(35mL)及DCM(15mL)中的溶液中添加KOH(50%,20mL),在5分钟之后,历经5分钟逐滴添加1,1,1-三氟-5-碘戊烷于Et<sub>2</sub>O(30mL)中的上述溶液,在-10℃到0℃下搅拌所得混合物1小时。溶液用水(200mL)稀释且用EA(100mL)萃取。有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤且在真空中浓缩,通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/10)及随后手性制备型HPLC[管柱,R,R-蛾螺-醇4.6×250mm 5μm;溶剂,MeOH(0.2%甲醇氨)]纯化粗产物,得到(S)-2-(二苯基亚甲基氨基)-7,7,7-三氟庚酸叔丁酯(200mg,0.48mmol,7.1%)及(R)-2-(二苯基亚甲基氨基)-7,7,7-三氟庚酸叔丁酯(200mg,0.48mmol,7.1%)。

[0344] (S)-2-(二苯基亚甲基氨基)-7,7,7-三氟庚酸叔丁酯(200mg,0.48mmol,7.1%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 243.1 [M+H]+。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.64 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.43-7.46 (m, 3H), 7.38-7.39 (m, 1H), 7.31-7.34 (m, 2H), 7.15-7.17 (m, 2H), 3.91 (dd, J=5.5Hz, 7.5Hz, 1H), 2.00-2.05 (m, 2H), 1.88-1.92 (m, 2H), 1.31-1.52 (m, 13H)。

[0345] (R)-2-(二苯基亚甲基氨基)-7,7,7-三氟庚酸叔丁酯(200mg,0.48mmol,7.1%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 243.1 [M+H]+。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.64 (d, J=7.0Hz, 2H), 7.43-7.46 (m, 3H), 7.38-7.39 (m, 1H), 7.31-7.34 (m, 2H), 7.15-7.17 (m, 2H), 3.92 (dd, J=5.5Hz, 7.5Hz, 1H), 2.00-2.05 (m, 2H), 1.88-1.92 (m, 2H), 1.31-1.52 (m, 13H)。

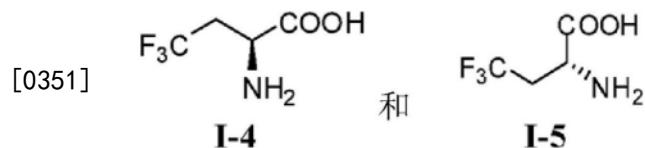
[0346] 步骤3: (S)-2-氨基-7,7,7-三氟庚酸盐酸盐[I-2]:

[0347] 将(S)-2-(二苯基亚甲基氨基)-7,7,7-三氟庚酸叔丁酯(200mg,0.48mmol)于6M HCl (10mL) 及二恶烷(5mL) 中的溶液加热到100℃持续17小时。溶液用Et<sub>2</sub>O (10mL×2) 萃取, 将水相浓缩到干燥, 得到呈白色固体的(S)-2-氨基-7,7,7-三氟庚酸盐酸盐(I-2) (82.7mg, 0.35mmol, 74%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 200.1 [M+H]+。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.93 (t, J=6.0Hz, 1H), 2.10-2.15 (m, 2H), 1.83-1.90 (m, 2H), 1.40-1.56 (m, 4H)。

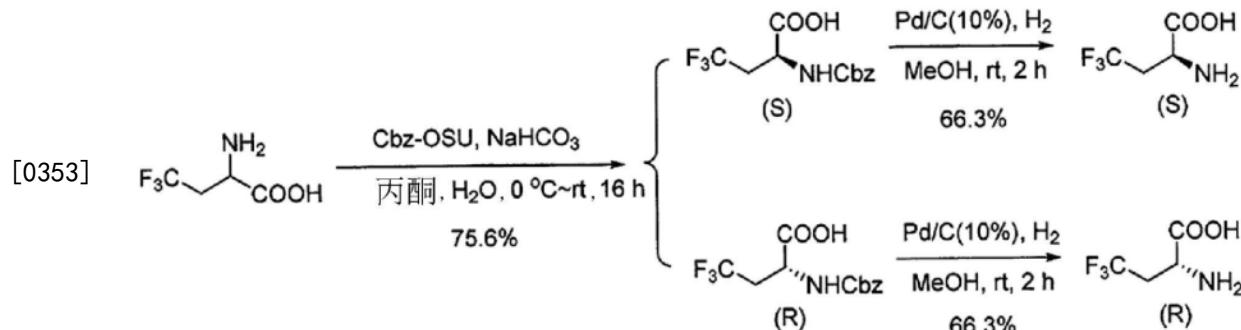
[0348] 步骤4: (R)-2-氨基-7,7,7-三氟庚酸盐酸盐[I-3]:

[0349] 将(R)-2-(二苯基亚甲基氨基)-7,7,7-三氟庚酸叔丁酯(200mg,0.48mmol)于6M HCl (10mL) 及二恶烷(5mL) 中的溶液加热到100℃持续17小时。溶液用Et<sub>2</sub>O (10mL×2) 萃取, 将水相浓缩到干燥, 得到呈白色固体的(R)-2-氨基-7,7,7-三氟庚酸盐酸盐(I-3) (91.6mg, 0.39mmol, 82%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 200.1 [M+H]+。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.92 (t, J=6.0Hz, 1H), 2.09-2.14 (m, 2H), 1.82-1.89 (m, 2H), 1.39-1.55 (m, 4H)。

[0350] 实例4及5: (S)-2-氨基-4,4,4-三氟丁酸[I-4]及(R)-2-氨基-4,4,4-三氟丁酸[I-5]。



[0352] 合成流程:



[0354] 程序及特征:

[0355] 步骤1: (S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4,4,4-三氟丁酸及(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4,4,4-三氟丁酸

[0356] 将N-(苯甲氧基羰基)丁二酰亚胺(1.75g, 7.01mmol)缓慢添加到2-氨基-4,4,4-三氟丁酸(1.0g, 6.36mmol)及NaHCO<sub>3</sub> (589mg, 7.01mmol)于丙酮(60mL)中的溶液中且在0℃

下过滤所得溶液(60mL)。在室温下搅拌混合物16小时。用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2×100mL)萃取反应混合物且水层用HCl(3M)酸化到约pH 4,且随后用EtOAc(3×150mL)萃取。有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥且在真空下蒸发溶剂。所得粗产物通过手性制备型HPLC(管柱,AY-H,4.6×250mm 5μm;溶剂,EtOH)纯化,得到呈白色固体的(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4,4,4-三氟丁酸(700mg,2.40mmol,37.8%)及(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4,4,4-三氟丁酸(700mg,2.40mmol,37.8%)。ESI-MS(EI+,m/z):314.0[M+Na]<sup>+</sup>。

[0357] (S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4,4,4-三氟丁酸。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):δ13.20(s,1H),7.84(d,J=9.0Hz,1H),7.40-7.30(m,5H),5.06(s,2H),4.31-4.27(m,1H),2.85-2.58(m,2H)。

[0358] (R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4,4,4-三氟丁酸。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):δ13.21(s,1H),7.85(d,J=8.5Hz,1H),7.38-7.30(m,5H),5.06(s,2H),4.31-4.27(m,1H),2.83-2.59(m,2H)。

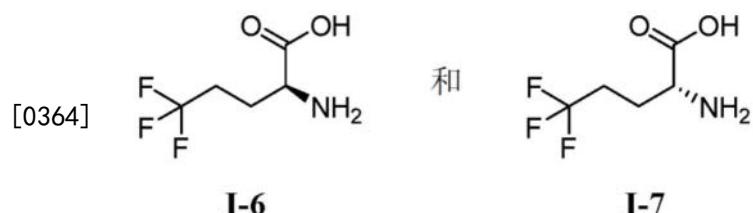
[0359] 步骤2:(S)-2-氨基-4,4,4-三氟丁酸[I-4]。

[0360] 在室温下在氢气气氛下搅拌(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4,4,4-三氟丁酸(700mg,2.40mmol)及Pd/C(10%)(200mg)于MeOH(50mL)中的混合物2小时。过滤混合物,且用MeOH(20mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈白色固体的(S)-2-氨基-4,4,4-三氟丁酸(I-4),(250mg,1.59mmol,66.3%)。ESI-MS(EI+,m/z):158.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>+1滴TFA+1滴D<sub>2</sub>O):δ4.32(t,J=6.0Hz,1H),3.03-2.82(m,2H)。

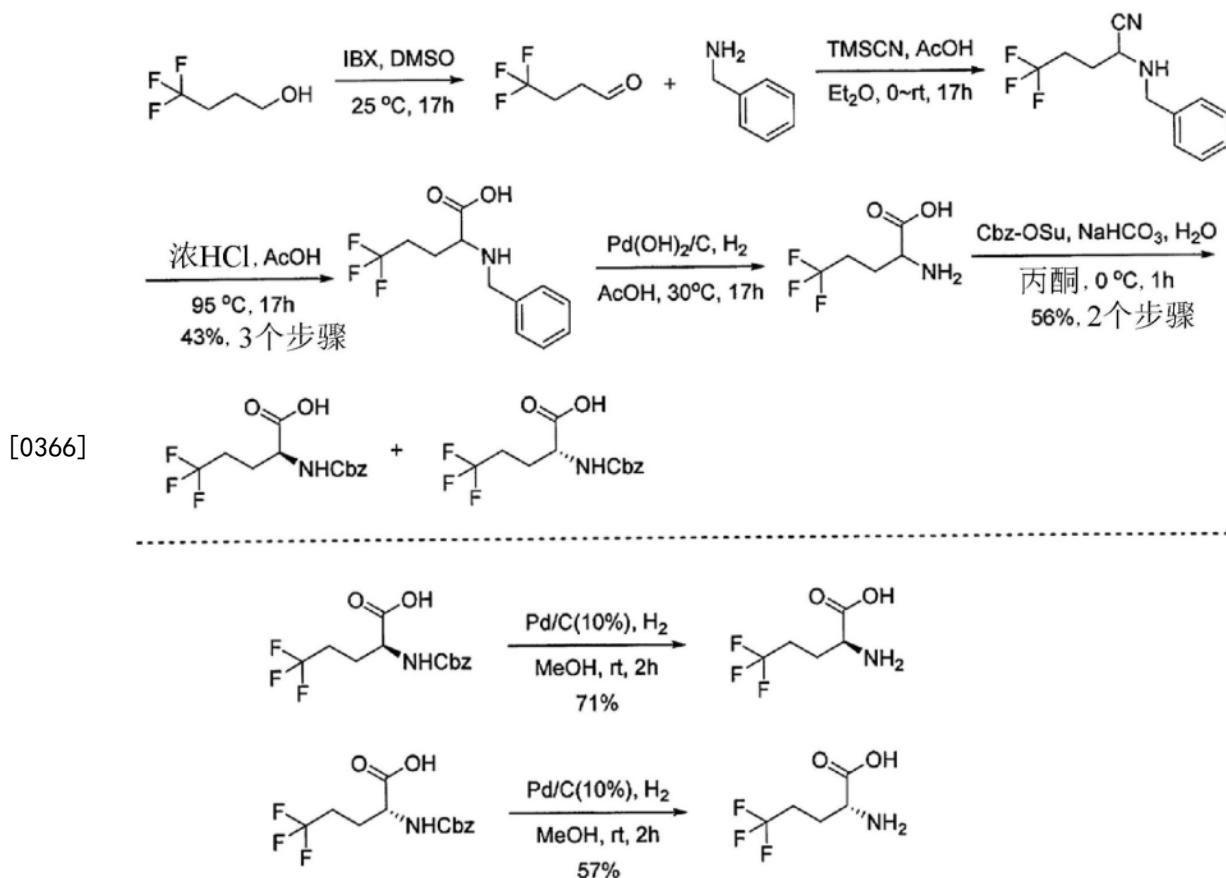
[0361] 步骤3:(R)-2-氨基-4,4,4-三氟丁酸[I-5]。

[0362] 在室温下在氢气气氛下搅拌(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4,4,4-三氟丁酸(700mg,2.40mmol)及Pd/C(10%)(200mg)于MeOH(50mL)中的混合物2小时。过滤混合物,且用MeOH(20mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈白色固体的(R)-2-氨基-4,4,4-三氟丁酸(I-5),(250mg,1.59mmol,66.3%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):158.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>+1滴TFA+1滴D<sub>2</sub>O):δ4.31(t,J=6.0Hz,1H),3.03-2.83(m,2H)。

[0363] 实例6及7:(S)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酸[I-6]及(R)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酸[I-7]。



[0365] 合成流程:



(20%, 400mg) 于AcOH(60mL) 中的混合物17小时。过滤混合物,且将滤液浓缩到干燥,得到呈棕色固体的2-氨基-5,5,5-三氟戊酸(3.0g,粗物质)。ESI-MS (EI+, m/z) : 172.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0376] 步骤5: (S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟戊酸及(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟戊酸:

[0377] 在冰浴下,向2-氨基-5,5,5-三氟戊酸(3.0g,粗物质)于NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液(100mL)及丙酮(100mL)中的溶液中添加Cbz-OSu(3.45g,13.9mmol),在2小时之后,用6M HCl将混合物调节到pH 3,用EtOAc(50mL×2)萃取,有机相用水(50mL)及盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),且在真空中浓缩,通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/2),且随后手性-制备型HPLC[管柱,AY-H 4.6×250mm 5μm;溶剂,MeOH(0.5% NH<sub>4</sub>OH)]纯化粗产物,得到呈白色固体的(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟戊酸(1.50g,4.92mmol,28%,2个步骤)及(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟戊酸(1.50g,4.92mmol,28%,2个步骤)。

[0378] (S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟戊酸(1.50g,4.92mmol,28%,2个步骤)。ESI-MS (EI+, m/z) : 328.0 [M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 12.86 (s, 1H), 7.71 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.31-7.39 (m, 5H), 5.05 (s, 2H), 4.05-4.10 (m, 1H), 2.34-2.41 (m, 1H), 2.21-2.29 (m, 1H), 1.84-1.97 (m, 2H)。

[0379] (R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟戊酸(1.50g,4.92mmol,28%,2个步骤)。ESI-MS (EI+, m/z) : 328.0 [M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 12.85 (s, 1H), 7.71 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.30-7.39 (m, 5H), 5.05 (s, 2H), 4.05-4.10 (m, 1H), 2.34-2.41 (m, 1H), 2.21-2.29 (m, 1H), 1.84-1.97 (m, 2H)。

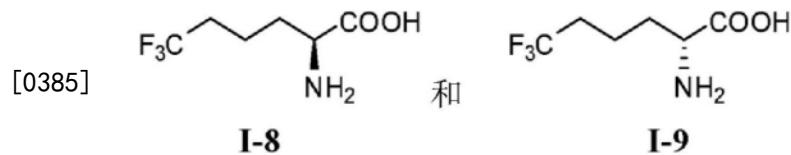
[0380] 步骤6: (S)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酸[I-6]:

[0381] 在室温下在氢气下搅拌(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟戊酸(500mg,1.64mmol)及Pd/C(10%)(50mg)于MeOH(20mL)中的混合物2小时。过滤混合物,且用MeOH(20mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈白色固体的(S)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酸(I-6),(200mg,1.17mmol,71%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 172.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 88.38 (s, 3H), 4.05 (d, J=4.4Hz, 1H), 2.34-2.55 (m, 2H), 1.95-20.9 (m, 2H)。

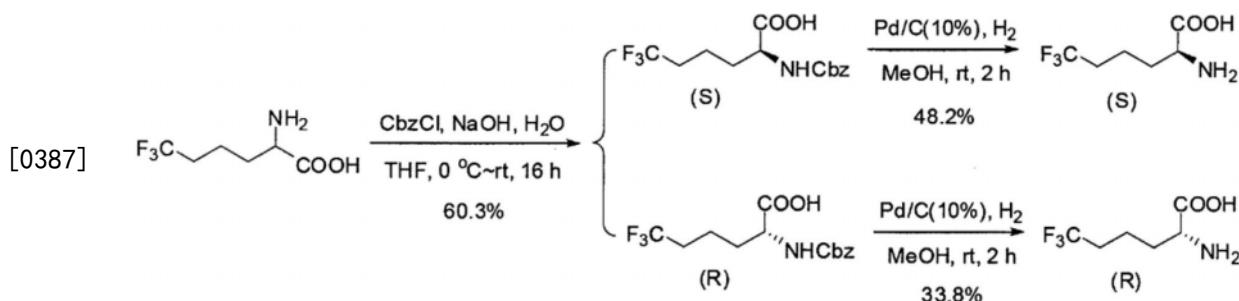
[0382] 步骤7: (R)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酸[I-7]:

[0383] 在室温下在氢气下搅拌(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟戊酸(500mg,1.64mmol)及Pd/C(10%)(50mg)于MeOH(20mL)中的混合物2小时。过滤混合物,且用MeOH(20mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈白色固体的(R)-2-氨基-5,5,5-三氟戊酸(I-7),(160mg,0.94mmol,57%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 172.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 8.38 (s, 3H), 4.05 (d, J=4.4Hz, 1H), 2.34-2.55 (m, 2H), 1.95-20.9 (m, 2H)。

[0384] 实例8及9: (S)-2-氨基-6,6,6-三氟己酸[I-8]及(R)-2-氨基-6,6,6-三氟己酸[I-9]。



[0386] 合成流程:



[0388] 程序及特征：

[0389] 步骤1：(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-6,6,6-三氟己酸及(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-6,6,6-三氟己酸

[0390] 在0℃下，将氯甲酸苯甲酯(554mg, 3.25mmol)缓慢添加到2-氨基-6,6,6-三氟己酸(556mg, 2.5mmol)及1M NaOH(25mL, 25mmol)于THF(25mL)中的溶液中，在室温下搅拌混合物16小时。反应混合物用DCM(2×100mL)萃取且水层用HCl(3M)酸化到约pH 4，且随后用EtOAc(3×50mL)萃取。有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥且在真空下蒸发溶剂。通过手性制备型HPLC(管柱：AY-H(250×4.6mm 5μm)；移动相：正己烷(0.1%DEA):EtOH(0.1% DEA)=90:10)纯化所得粗产物，得到呈白色固体的(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-6,6,6-三氟己酸(232mg, 0.73mmol, 29%)及(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-6,6,6-三氟己酸(250mg, 0.78mmol, 31.3%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 342.0 [M+Na]<sup>+</sup>。

[0391] (S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-6,6,6-三氟己酸, 1H-NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 12.68 (s, 1H), 7.66 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.38-7.32 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.00-3.96 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 2H), 1.80-1.51 (m, 4H)。

[0392] (R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-6,6,6-三氟己酸, 1H-NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 12.68 (s, 1H), 7.67 (d, J=8.5Hz, 1H), 7.38-7.30 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.00-3.96 (m, 1H), 2.33-2.15 (m, 2H), 1.82-1.51 (m, 4H)。

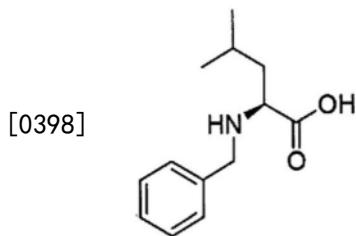
[0393] 步骤2：(S)-2-氨基-6,6,6-三氟己酸[I-8]。

[0394] 在室温下在氢气气氛下搅拌(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-6,6,6-三氟己酸(200mg, 0.63mmol)及Pd/C(10%) (50mg)于MeOH(20mL)中的混合物2小时。过滤混合物，且用MeOH(20mL)洗涤滤饼。浓缩滤液，得到呈白色固体的(S)-2-氨基-6,6,6-三氟己酸(I-8)，(56.2mg, 0.30mmol, 48.2%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 186.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>+1滴TFA+1滴D<sub>2</sub>O) : δ 3.99 (t, J=5.5Hz, 1H), 2.32-2.30 (m, 2H), 1.91-1.83 (m, 2H), 1.70-1.57 (m, 2H)。

[0395] 步骤3：(R)-2-氨基-6,6,6-三氟己酸[I-9]。

[0396] 在室温下在氢气气氛下搅拌(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-6,6,6-三氟己酸(250mg, 0.78mmol)及Pd/C(10%) (50mg)于MeOH(20mL)中的混合物2小时。过滤混合物，且用MeOH(20mL)洗涤滤饼。浓缩滤液，得到呈白色固体的(R)-2-氨基-6,6,6-三氟己酸(I-9)，(48.8mg, 0.26mmol, 33.8%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 186.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>+1drop TFA+1drop D<sub>2</sub>O) : δ 3.98 (t, J=6.5Hz, 1H), 3.33-2.28 (m, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 1.71-1.54 (m, 2H)。

[0397] 实例11：(S)-2-(苯甲基氨基)-4-甲基戊酸[I-11]。



[0399] 合成流程:



[0401] 程序及特征:

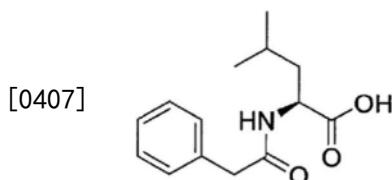
[0402] 步骤1: (S)-2-(苯甲基氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯:

[0403] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(800mg, 2.0mmol)于MeOH(30mL)中的搅拌溶液中添加苯甲醛(0.26g, 2.4mmol)及乙酸钾(0.4g, 4.1mmol),且在室温下搅拌混合物30分钟,随后添加氰基硼氢化钠(0.2g, 3.0mmol),在室温下再搅拌混合物5小时。混合物用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液(50mL)淬灭,用EtOAc(50mL×2)萃取,用所得溶液洗涤,过滤(50mL)及盐水(50mL)洗涤。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm),移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)浓缩纯化有机相,得到呈无色油状物的(S)-2-(苯甲基氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(200mg, 0.64mmol, 32%)。MS (EI+, m/z) : 312.3 [M+H]<sup>+</sup>。1H-NMR (500MHz, , MeOD) : δ 7.41~7.49 (m, 10H), 5.34 (dd, J=12.0Hz, 45.0Hz, 2H), 4.23 (q, J=12.0Hz, 2H), 4.07~4.09 (m, 3H), 1.68~1.85 (m, 3H), 0.94 (dd, J=8.5Hz, 20.5Hz, 6H)。

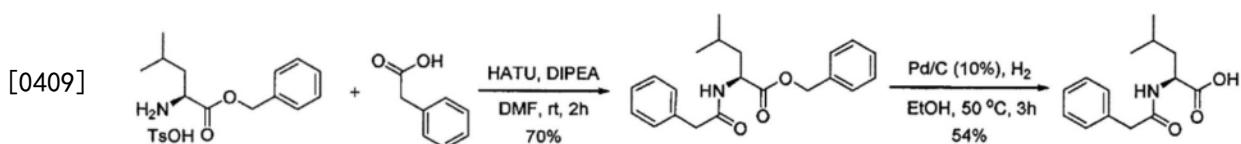
[0404] 步骤2: (S)-2-(苯甲基氨基)-4-甲基戊酸[I-11]:

[0405] 向(S)-2-(苯甲基氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(50mg, 0.16mmol)于MeOH(5mL)中的搅拌溶液中添加1M NaOH(0.5mL)。在室温下搅拌反应物4小时。浓缩所得溶液且通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm),移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化残余物,得到呈白色固体的(S)-2-(苯甲基氨基)-4-甲基戊酸(I-11),(21mg, 0.095mmol, 58%)MS (EI+, m/z) : 222.2 [M+H]<sup>+</sup>。1H-NMR (500MHz, DMSO-d6) : δ 89.32 (s, 1H), 7.43~7.50 (m, 5H), 4.17 (dd, J=13.0Hz, 44.0Hz, 2H), 3.82 (t, J=6.5Hz, 1H), 1.68~1.76 (m, 3H), 0.85~0.90 (m, 6H)。

[0406] 实例12: (S)-4-甲基-2-(2-苯基乙酰氨基)戊酸[I-12]:



[0408] 合成流程:



[0410] 程序及特征:

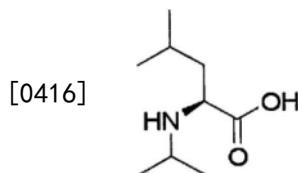
[0411] 步骤1: (S)-4-甲基-2-(2-苯基乙酰氨基)戊酸苯甲酯:

[0412] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(500mg, 1.27mmol)、2-苯乙酸(260mg, 1.91mmol)及HATU(726mg, 1.91mmol)于DMF(10mL)中的溶液中添加DIPEA(410mg, 3.18mmol)且在室温下搅拌溶液2小时。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液, 得到呈白色固体的(S)-4-甲基-2-(2-苯基乙酰氨基)戊酸苯甲酯(300mg, 0.88mmol, 70%)。MS(EI+, m/z): 340.2 [M+H]+。

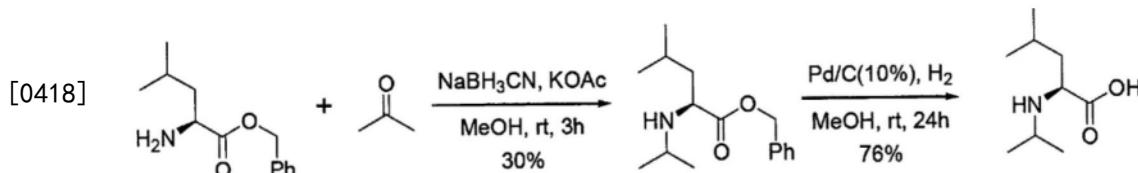
[0413] 步骤2: (S)-4-甲基-2-(2-苯基乙酰氨基)戊酸[I-12]:

[0414] 向(S)-4-甲基-2-(2-苯基乙酰氨基)戊酸苯甲酯(250mg, 0.74mmol)于EtOH(10mL)中的搅拌溶液中添加催化量的Pd/C(10%, 20mg)。在氢气气氛下在50℃下搅拌反应物3小时。过滤并浓缩所得溶液, 得到呈白色固体的(S)-4-甲基-2-(2-苯基乙酰氨基)戊酸(I-12), (100mg, 0.40mmol, 54%)。MS(EI+, m/z): 250.2 [M+H]+。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, MeOD): δ 7.24-7.32 (m, 5H), 4.44 (t, J=7.5Hz, 1H), 3.58 (s, 2H), 1.64-1.68 (m, 3H), 0.96 (d, J=6.0Hz, 3H), 0.91 (d, J=6.0Hz, 3H)。

[0415] 实例13: (S)-2-(异丙氨基)-4-甲基戊酸[I-13]:



[0417] 合成流程:



[0419] 程序及特征:

[0420] 步骤1: (S)-2-(异丙氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯:

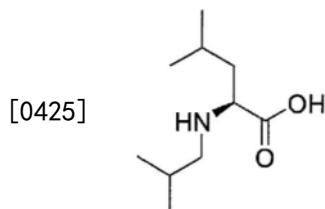
[0421] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(1.0g, 2.53mmol)于MeOH(30mL)中的搅拌溶液中添加丙酮(177mg, 3.05mmol)及乙酸钾(0.5g, 5.08mmol), 且在室温下搅拌混合物30分钟, 随后添加氰基硼氢化钠(0.24g, 3.81mmol), 在室温下再搅拌混合物3小时。混合物用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液(50mL)淬灭, 用EtOAc(50mL×2)萃取, 用所得溶液洗涤, 过滤(50mL)及盐水(50mL)洗涤。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)浓缩纯化有机相, 得到呈无色油状物的(S)-2-(异丙氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(200mg, 0.76mmol, 30%)。MS(EI+, m/z): 264.3 [M+H]+。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, MeOD): δ 87.22~7.29 (m, 5H), 5.07 (dd, J=11.5Hz, 17.0Hz, 2H), 3.33 (dd, J=6.5Hz, 8.5Hz, 1H), 2.54~2.59 (m, 1H), 1.30~1.48 (m, 3H), 0.72~0.94 (m, 12H)。

[0422] 步骤2: (S)-2-(异丙氨基)-4-甲基戊酸[I-13]:

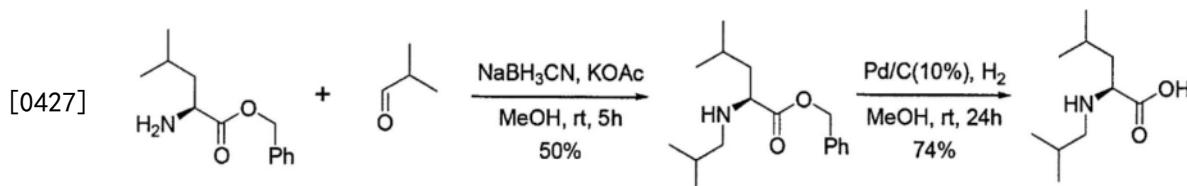
[0423] 向(S)-2-(异丙氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(200mg, 0.76mmol)于MeOH(10mL)中的搅拌溶液中添加催化量的Pd/C(10%, 50mg)。在氢气气氛下在室温下搅拌反应物24小时。过滤所得溶液且浓缩过滤液, 得到呈白色固体的(S)-2-(异丙氨基)-4-甲基戊酸(I-13),

(100mg, 0.57mmol, 76%)。MS (EI+, m/z) : 174.3 [M+H]+。1H-NMR (500MHz, MeOD) : δ 3.56 (dd, J = 6.0Hz, 8.5Hz, 1H), 3.33~3.40 (m, 1H), 1.75~1.86 (m, 2H), 1.53~1.58 (m, 1H), 1.31~1.36 (m, 6H), 0.96~1.02 (m, 6H)。3.85 (dd, J=5.5Hz, 8.5Hz, 1H), 2.87 (q, J=6.0Hz, 1H), 2.68 (dd, J=7.5Hz, 12.0Hz, 1H), 1.92~1.99 (m, 1H), 1.65~1.78 (m, 3H), 0.88~0.96 (m, 12H)。

[0424] 实例14: (S)-2-(异丁氨基)-4-甲基戊酸[I-14]:



[0426] 合成流程:



[0428] 程序及特征:

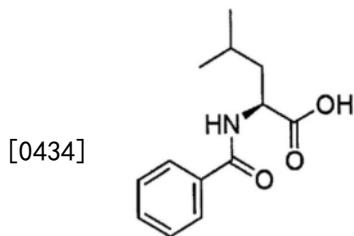
[0429] 步骤1: (S)-2-(异丁氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯:

[0430] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(1.0g, 2.53mmol)于MeOH(30mL)中的搅拌溶液中添加异丁醛(0.22g, 3.05mmol)及乙酸钾(0.5g, 5.08mmol),且在室温下搅拌混合物30分钟,随后添加氰基硼氢化钠(0.24g, 3.81mmol)。在室温下再搅拌混合物5小时。混合物用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液(50mL)淬灭,用EtOAc(50mL×2)萃取,用所得溶液洗涤,过滤(50mL)及盐水(50mL)洗涤。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm,移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)浓缩纯化有机相,得到呈无色油状物的(S)-2-(异丁氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(300mg, 1.08mmol, 50%)。MS (EI+, m/z) : 278.2 [M+H]+。1H-NMR (500MHz, DMSO-d6) : 89.16 (s, 1H), 9.14 (d, J=17.5Hz, 2H), 7.42~7.43 (m, 5H), 5.28 (q, J=12.0Hz, 2H), 4.08~4.09 (m, 1H), 2.87~2.89 (m, 1H), 2.65~2.66 (m, 1H), 1.91~1.95 (m, 1H), 1.62~1.71 (m, 3H), 0.88~0.94 (m, 12H)。

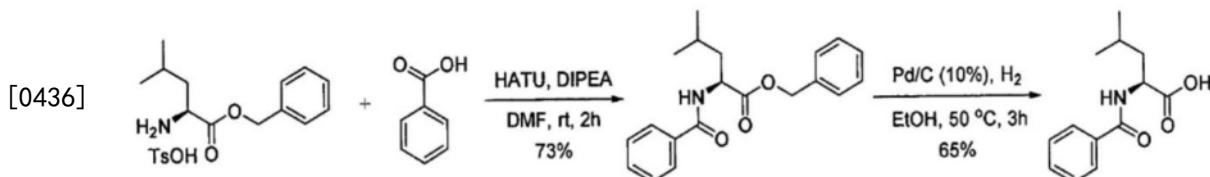
[0431] 步骤2: (S)-2-(异丁氨基)-4-甲基戊酸[I-14]:

[0432] 向(S)-2-(异丁氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(300mg, 1.08mmol)于MeOH(10mL)中的搅拌溶液中添加催化量的Pd/C(10%, 50mg)。在氢气气氛下在室温下搅拌反应物24小时。过滤所得溶液且浓缩过滤液,得到呈白色固体的(S)-2-(异丁氨基)-4-甲基戊酸(I-14),(150mg, 0.8mmol, 74%)。MS (EI+, m/z) : 188.3 [M+H]+。1H-NMR (500MHz, DMSO-d6) : 88.82 (s, 2H), 3.85 (dd, J=5.5Hz, 8.5Hz, 1H), 2.87 (q, J=6.0Hz, 1H), 2.68 (dd, J=7.5Hz, 12.0Hz, 1H), 1.92~1.99 (m, 1H), 1.65~1.78 (m, 3H), 0.88~0.96 (m, 12H)。

[0433] 实例15: (S)-2-苯甲酰氨基-4-甲基戊酸[I-15]:

**I-15**

[0435] 合成流程:



[0437] 程序及特征:

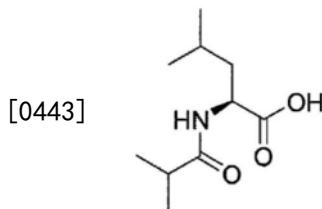
[0438] 步骤1: (S)-2-苯甲酰氨基-4-甲基戊酸苯甲酯:

[0439] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(500mg, 1.27mmol)、苯甲酸(223mg, 1.91mmol)及HATU(726mg, 1.91mmol)于DMF(10mL)中的溶液中添加DIPEA(410mg, 3.18mmol)且在室温下搅拌溶液2小时。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液, 得到呈白色固体的(S)-2-苯甲酰氨基-4-甲基戊酸苯甲酯(300mg, 0.92mmol, 73%)。MS(EI+, m/z): 326.2 [M+H]+。

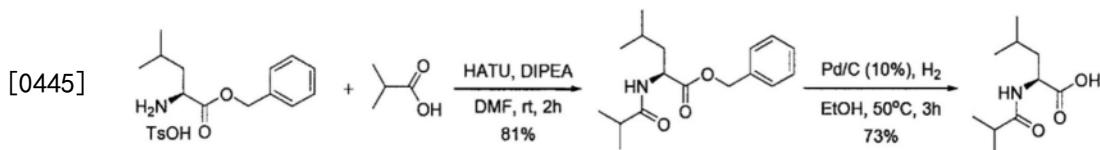
[0440] 步骤2: (S)-2-苯甲酰氨基-4-甲基戊酸[I-15]:

[0441] 向(S)-2-苯甲酰氨基-4-甲基戊酸苯甲酯(100mg, 0.46mmol)于EtOH(10mL)中的搅拌溶液中添加催化量的Pd/C(10%, 20mg)。在氢气气氛下在50°C下搅拌反应物3小时。过滤并浓缩所得溶液, 得到呈白色固体的(S)-2-苯甲酰氨基-4-甲基戊酸(I-15), (100mg, 0.42mmol, 65%)。MS(EI+, m/z): 236.2 [M+H]+。<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, MeOD): δ 87.87 (t, J=6.5Hz, 2H), 7.47-7.57 (m, 3H), 4.69 (dd, J=4.0Hz, 11.0Hz, 1H), 1.75-1.84 (m, 3H), 1.01 (dd, J=6.5Hz, 10.5Hz, 6H)。

[0442] 实例16: (S)-2-异丁酰氨基-4-甲基戊酸[I-16]:



[0444] 合成流程:



[0446] 程序及特征:

[0447] 步骤1: (S)-2-异丁酰氨基-4-甲基戊酸苯甲酯:

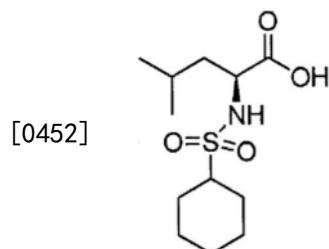
[0448] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(500mg, 1.27mmol)、异丁酸(168mg, 1.91mmol)及

HATU(726mg,1.91mmol)于DMF(10mL)中的溶液中添加DIPEA(410mg,3.18mmol)且在室温下搅拌溶液2小时。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm,移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液,得到呈白色固体的(S)-2-异丁酰氨基-4-甲基戊酸苯甲酯(300mg,1.03mmol,81%)。MS(EI+,m/z):292.2[M+H]+。

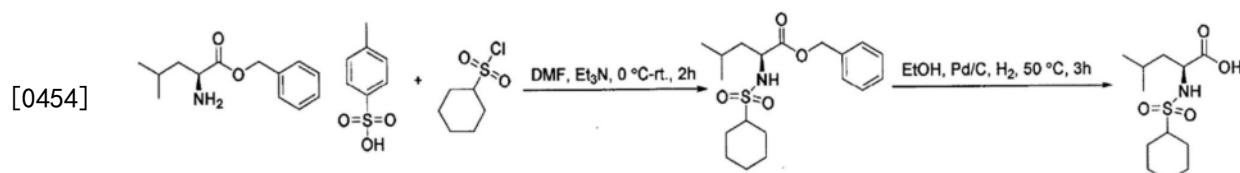
[0449] 步骤2: (S)-2-异丁酰氨基-4-甲基戊酸[I-16]:

[0450] 向(S)-2-(环己基甲酰氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(200mg,0.69mmol)于EtOH(10mL)中的搅拌溶液中添加催化量的Pd/C(10%,20mg)。在氢气气氛下在50℃下搅拌反应物3小时。过滤并浓缩所得溶液,得到呈白色固体的(S)-2-异丁酰氨基-4-甲基戊酸(100mg,0.50mmol,73%)。MS(EI+,m/z):202.2[M+H]+。<sup>1</sup>H-NMR(400MHz,MeOD):δ4.43(t,J=6.4Hz,1H),2.49-2.56(m,1H),1.60-1.74(m,3H),1.12(dd,J=2.4Hz,6.8Hz,6H),0.96(dd,J=6.4Hz,16.0Hz,6H)。

[0451] 实例17: (S)-2-(环己烷磺酰氨基)-4-甲基戊酸[I-17]:



[0453] 合成流程:



[0455] 程序及特征:

[0456] 步骤1: (S)-2-(环己烷磺酰氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯:

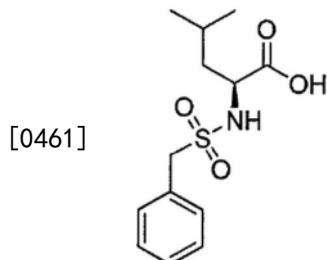
[0457] 向(S)-2-氨基-4-甲基戊酸苯甲酯4-甲基苯磺酸盐(500mg,1.27mmol)及Et3N(642.89mg,6.35mmol)于经冰浴冷却的DMF(3mL)中的溶液中添加环己烷磺酰氯(278.53mg,1.52mmol)。在25℃下搅拌混合物2小时。溶液用乙酸乙酯(10mL)稀释,用所得溶液洗涤,过滤(10mL×3)及盐水(10mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm,移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化粗产物,得到呈白色固体的(S)-2-(环己烷磺酰氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(200mg,0.544mmol,98%)。ESI-MS(EI+,m/z):368.3[M+H]+。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,DMSO-d6)δ7.70(d,J=9.0Hz,1H),7.38(t,J=6.5Hz,4H),7.37-7.32(m,1H),5.14(q,J=12.5Hz,2H),3.91(td,J=5.0Hz,9.5Hz,1H),2.69-2.74(m,1H),2.05(d,J=12.5Hz,1H),1.97(d,J=12.5Hz,1H),1.74-1.67(m,2H),1.57-1.51(m,2H),1.50-1.44(m,1H),1.36-0.99(m,5H),0.87(dt,J=10.5Hz,J=20.5Hz,6H)。

[0458] 步骤2: (S)-2-(环己烷磺酰氨基)-4-甲基戊酸[I-17]:

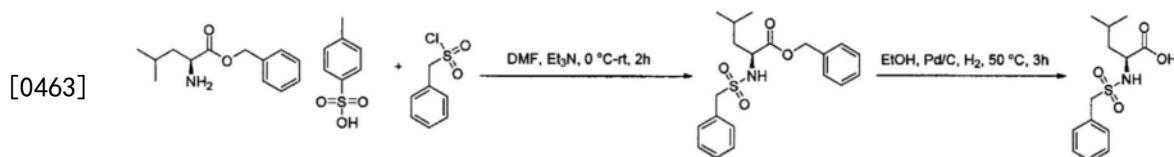
[0459] 向(S)-2-(环己烷磺酰氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(192mg,0.552mmol)于EtOH(3mL)中的溶液中添加Pd/C(20mg,10%)。在50℃下在氢气下搅拌反应混合物4小时。过滤混合物,

且用MeOH(10mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈白色固体的(S)-2-(环己烷磺酰氨基)-4-甲基戊酸(I-17),(23.3mg,0.084mmol,100%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):300.2[M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ12.75(s,1H),7.47(d,J=9.0Hz,1H),3.76(td,J=5.0Hz,9.5Hz,1H),2.82-2.69(m,1H),2.18-1.97(m,2H),1.82-1.69(m,3H),1.61(d,J=12.5Hz,1H),1.54-1.40(m,2H),1.39-1.07(m,5H),0.95-0.80(m,6H)。

[0460] 实例18:(S)-4-甲基-2-(苯基甲基磺酰氨基)戊酸[I-18]:



[0462] 合成流程:



[0464] 程序及特征:

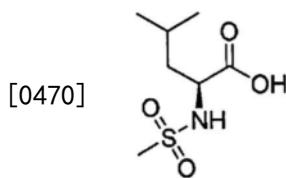
[0465] 步骤1:(S)-4-甲基-2-(苯基甲基磺酰氨基)戊酸苯甲酯:

[0466] 向(S)-2-氨基-4-甲基戊酸苯甲酯4-甲基苯磺酸盐(500mg,1.27mmol)及Et<sub>3</sub>N(642.89mg,6.35mmol)于经冰浴冷却的DMF(3mL)中的溶液中添加苯基甲烷磺酰氯(290.71mg,1.52mmol)。在25℃下搅拌混合物2小时。溶液用乙酸乙酯(10mL)稀释,用所得溶液洗涤,过滤(10mL×3)及盐水(10mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤且在真空中浓缩。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm,移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化粗产物,得到呈白色固体的(S)-4-甲基-2-(苯基甲基磺酰氨基)戊酸苯甲酯(149mg,0.396mmol,90%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):398.0[M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)87.81(d,J=8.5Hz,1H),7.52-7.18(m,9H),5.15(s,2H),4.28(dd,J=13.5Hz,44.5Hz,2H),3.87(dd,J=8.0Hz,15.0Hz,1H),1.57-1.15(m,4H),0.82(dd,J=4.5Hz,6.0Hz,6H)。

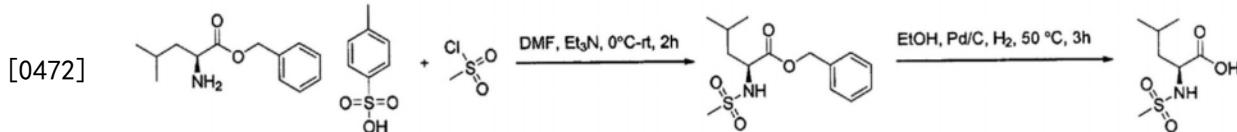
[0467] 步骤2:(S)-4-甲基-2-(苯基甲基磺酰氨基)戊酸[I-18]:

[0468] 向(S)-4-甲基-2-(苯基甲基磺酰氨基)戊酸苯甲酯(121mg,0.322mmol)于EtOH(3mL)中的溶液中添加Pd/C(20mg,10%)。在50℃下在氢气下搅拌此反应混合物4小时。过滤混合物,且用MeOH(10mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈白色固体的(S)-4-甲基-2-(苯基甲基磺酰氨基)戊酸(I-18),(41.2mg,0.144mmol,100%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):308.0[M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ12.77(s,1H),7.59(d,J=8.5Hz,1H),7.47-7.25(m,5H),4.30(dd,J=13.5Hz,37.0Hz,2H),3.75(dd,J=7.5Hz,15.5Hz,1H),1.65(dt,J=6.5Hz,13.5Hz,1H),1.45(t,J=7.2Hz,2H),0.85(dd,J=1.5Hz,6.5Hz,6H)。

[0469] 实例19:(S)-4-甲基-2-(甲基磺酰氨基)戊酸[I-19]:



[0471] 合成流程：



[0473] 程序及特征：

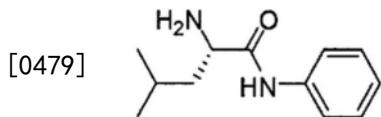
[0474] 步骤1: (S)-4-甲基-2-(甲基磺酰氨基)戊酸苯甲酯：

[0475] 向 (S)-2-氨基-4-甲基戊酸苯甲酯4-甲基苯磺酸盐 (500mg, 1.27mmol) 及  $\text{Et}_3\text{N}$  (642.89mg, 6.35mmol) 于经冰浴冷却的 DMF (3mL) 中的溶液中添加甲磺酰氯 (290.71mg, 1.52mmol), 在 25°C 下搅拌混合物 2 小时。溶液用乙酸乙酯 (10mL) 稀释, 用所得溶液洗涤, 过滤 ( $10\text{mL} \times 3$ ) 及盐水 (10mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并在真空中浓缩。通过制备型 HPLC (Boston C18 21 × 250mm 10 $\mu\text{m}$ , 移动相: A: 0.1% 三氟乙酸; B: 乙腈) 纯化粗产物, 得到呈白色固体的 (S)-4-甲基-2-(甲基磺酰氨基)戊酸苯甲酯 (192mg, 0.641mmol, 98%)。ESI-MS ( $\text{EI}^+$ , m/z) : 323.0 [M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.79 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 1H), 7.42-7.36 (m, 4H), 7.37-7.32 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.97 (td,  $J=6.0\text{Hz}, 9.0\text{Hz}$ , 1H), 2.85 (s, 3H), 1.68 (dq,  $J=6.5\text{Hz}, 13.0\text{Hz}$ , 1H), 1.54-1.46 (m, 2H), 0.91-0.82 (m, 6H)。

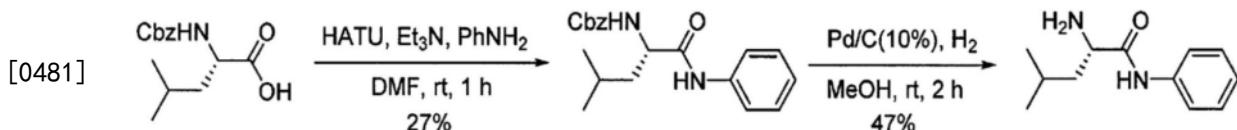
[0476] 步骤2: (S)-4-甲基-2-(甲基磺酰氨基)戊酸[I-19]：

[0477] 向 (S)-4-甲基-2-(甲基磺酰氨基)戊酸苯甲酯 (149mg, 0.497mmol) 于  $\text{EtOH}$  (3mL) 中的溶液中添加  $\text{Pd/C}$  (20mg, 10%)。在 50°C 下在氢气气氛下搅拌此反应混合物 4 小时。过滤混合物, 且用  $\text{MeOH}$  (10mL) 洗涤滤饼。浓缩滤液, 得到呈白色固体的 (S)-4-甲基-2-(甲基磺酰氨基) 戊酸 (I-19), (31.4mg, 0.150mmol, 100%)。ESI-MS ( $\text{EI}^+$ , m/z) : 232.1 [M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.82 (s, 1H), 7.56 (d,  $J=9.0\text{Hz}$ , 1H), 3.82 (dd,  $J=8.0\text{Hz}, 15.5\text{Hz}$ , 1H), 2.88 (s, 3H), 1.72 (dt,  $J=6.5\text{Hz}, 13.0\text{Hz}$ , 1H), 1.48 (t,  $J=7.0\text{Hz}$ , 2H), 0.89 (t,  $J=7.0\text{Hz}$ , 6H)。

[0478] 实例20: (S)-2-氨基-4-甲基-N-苯基戊酰胺[I-20]：



[0480] 合成流程：



[0482] 程序及特征：

[0483] 步骤1: (S)-4-甲基-1-氧代-1-(苯基氨基)戊-2-基氨基甲酸苯甲酯：

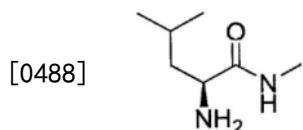
[0484] 在室温下, 向 (S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4-甲基戊酸 (1.0g, 3.77mmol) 于 DMF (20mL) 中的溶液中添加苯胺 (702mg, 7.55mmol)、HATU (1.72g, 4.52mmol) 及  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.14g,

11.31mmol)。在2小时之后,溶液用EtOAc(80mL)稀释,用所得溶液洗涤,过滤(80mL×3)及盐水(80mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤并在真空中浓缩。通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/3)纯化粗产物,得到呈白色固体的(S)-4-甲基-1-氧代-1-(苯基氨基)戊-2-基氨基甲酸苯甲酯(350mg,1.03mmol,27%)。ESI-MS(EI+,m/z):341.1[M+H]<sup>+</sup>。

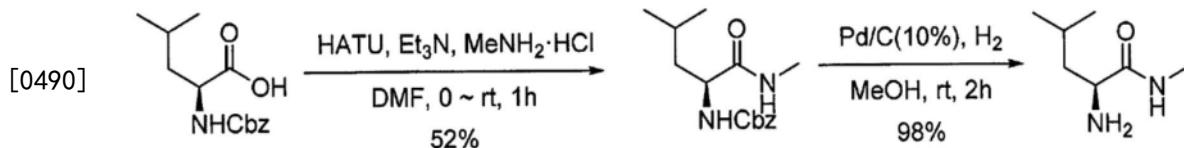
[0485] 步骤2:(S)-2-氨基-4-甲基-N-苯基戊酰胺[I-20]:

[0486] 在室温下在氢气下搅拌(S)-4-甲基-1-氧代-1-(苯基氨基)戊-2-基氨基甲酸苯甲酯(350mg,1.03mmol)及Pd/C(10%,50mg)于MeOH(10mL)中的混合物2小时。过滤混合物,且用MeOH(10mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈白色固体的(S)-2-氨基-4-甲基-N-苯基戊酰胺(I-20),(100mg,0.49mmol,47%)。ESI-MS(EI+,m/z):207.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):δ9.86(s,1H),7.63(dd,J=1.0Hz,8.5Hz,2H),7.31-7.27(m,2H),7.03(t,J=7.5Hz,1H),3.31(dd,J=5.0Hz,8.5Hz,1H),1.80-1.71(m,1H),1.50-1.44(m,1H),1.35-1.29(m,1H),0.90(dd,J=6.5Hz,14.0Hz,6H)。

[0487] 实例21:(S)-2-氨基-N,4-二甲基戊酰胺[I-21]:



[0489] 合成流程:



[0491] 程序及特征:

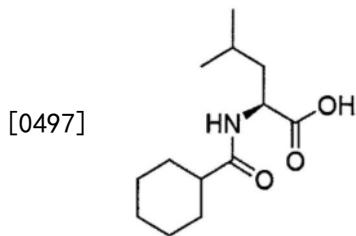
[0492] 步骤1:(S)-4-甲基-1-(甲基氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸苯甲酯:

[0493] 在25℃下,向(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-4-甲基戊酸(1.0g,3.77mmol)于DMF(20mL)中的溶液中添加MeNH<sub>2</sub>·HCl(509mg,7.54mmol)、HATU(1.72g,4.52mmol)及Et<sub>3</sub>N(1.14g,11.31mmol)。在2小时之后,溶液用EtOAc(80mL)稀释,用所得溶液洗涤,过滤(80mL×3)及盐水(80mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤并在真空中浓缩。通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/3)纯化粗产物,得到呈无色油状物的(S)-4-甲基-1-(甲基氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸苯甲酯(550mg,1.98mmol,52%)。ESI-MS(EI+,m/z):279.2[M+H]<sup>+</sup>。

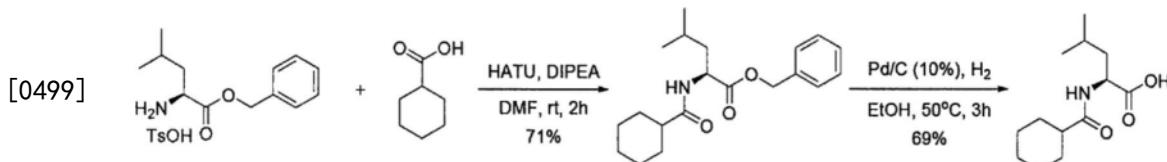
[0494] 步骤2:(S)-2-氨基-N,4-二甲基戊酰胺[I-21]:

[0495] 在室温下在氢气下搅拌(S)-4-甲基-1-(甲基氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸苯甲酯(300mg,1.08mmol)及Pd/C(10%)(50mg)于MeOH(10mL)中的混合物2小时。过滤混合物,且用MeOH(10mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈无色油状物的(S)-2-氨基-N,4-二甲基戊酰胺(I-21),(152mg,1.05mmol,98%)。ESI-MS(EI+,m/z):145.3[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):δ7.80(s,1H),3.10(dd,J=5.0Hz,9.0Hz,1H),2.57(dd,J=3.0Hz,5.0Hz,3H),1.81(s,2H),1.66-1.69(m,1H),1.34-1.39(m,1H),1.16-1.22(m,1H),0.81-0.87(m,6H)。

[0496] 实例22:(S)-4-甲基-2-(苯基氨基)戊酸[I-22]:



[0498] 合成流程:



[0500] 程序及特征:

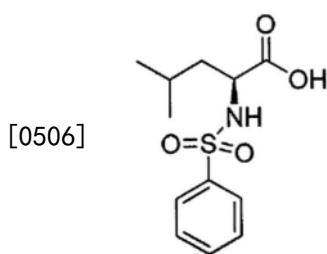
[0501] 步骤1: (S)-2-(环己基甲酰氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯:

[0502] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(500mg, 1.27mmol)、环己甲酸(244mg, 1.91mmol)及HATU(726mg, 1.91mmol)于DMF(10mL)中的溶液中添加DIPEA(410mg, 3.18mmol)且在室温下搅拌溶液2小时。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液, 得到呈白色固体的(S)-2-(环己基甲酰氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(300mg, 0.91mmol, 71%)。MS(EI+, m/z): 332.3[M+H]+。

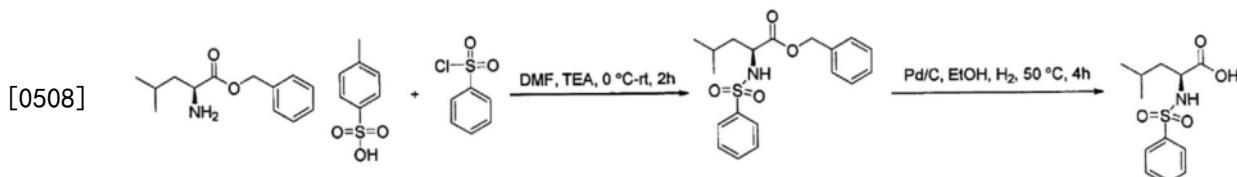
[0503] 步骤2: (S)-2-(环己基甲酰氨基)-4-甲基戊酸[I-22]:

[0504] 向(S)-2-(环己基甲酰氨基)-4-甲基戊酸苯甲酯(200mg, 0.60mmol)于EtOH(10mL)中的搅拌溶液中添加催化量的Pd/C(10%, 20mg)。在氢气气氛下在50°C下搅拌反应物3小时。过滤并浓缩所得溶液, 得到呈白色固体的(S)-2-(环己基甲酰氨基)-4-甲基戊酸(I-22), (100mg, 0.41mmol, 69%)。MS(EI+, m/z): 242.3[M+H]+。1H-NMR(500MHz, CD3OD): δ 84.43(t, J=7.5Hz, 1H), 2.29(td, J=8.0Hz, 11.0Hz, 1H), 1.74-1.85(m, 4H), 1.63-1.72(m, 4H), 1.43-1.49(m, 2H), 1.26-1.36(m, 3H), 0.96(dd, J=6.0Hz, 20.5Hz, 6H)。

[0505] 实例25: (S)-4-甲基-2-(苯基磺酰氨基)戊酸[I-25]:



[0507] 合成流程:



[0509] 程序及特征:

[0510] 步骤1: (S)-4-甲基-2-(苯基磺酰氨基)戊酸苯甲酯:

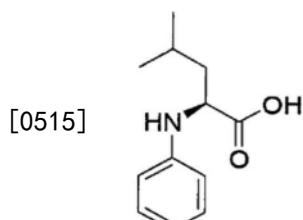
[0511] 向(S)-2-氨基-4-甲基戊酸苯甲酯4-甲基苯磺酸盐(300mg, 0.762mmol)及Et3N

(385.73mg, 3.81mmol)于经冰浴冷却的DMF (3mL) 中的溶液中添加苯磺酰氯 (148.12mg, 0.838mmol)。在25℃下搅拌混合物2小时。溶液用乙酸乙酯(10mL)稀释,用所得溶液洗涤,过滤( $10\text{mL} \times 3$ )及盐水(10mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩。粗产物(280mg, 纯度:85%, 产率:74%)直接用于下一步骤中。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 384.1 [M+Na]<sup>+</sup>。

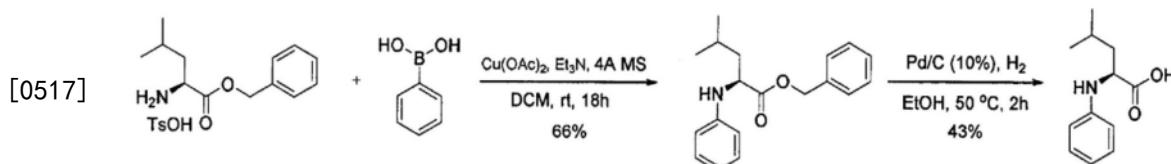
[0512] 步骤2: (S)-4-甲基-2-(苯基磺酰氨基)戊酸[I-25]:

[0513] 向(S)-4-甲基-2-(苯基磺酰氨基)戊酸苯甲酯(200mg, 0.553mmol)于EtOH (3mL) 中的溶液中添加Pd/C (20mg, 10%)。在50℃下在氢气气氛下搅拌所述反应混合物4小时。过滤混合物,且用MeOH (10mL)洗涤滤饼。浓缩滤液,得到呈白色固体的(S)-4-甲基-2-(苯基磺酰氨基)戊酸(I-25), (63.7mg, 0.234mmol, 100%)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 294.0 [M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.61 (s, 1H), 8.16 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.62 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.56 (t, J=7.4Hz, 2H), 3.63 (dd, J=8.5Hz, 14.5Hz, 1H), 1.53 (td, J=6.5Hz, 13.5Hz, 1H), 1.41-1.31 (m, 2H), 0.79 (d, J=6.6Hz, 3H), 0.66 (d, J=6.5Hz, 3H)。

[0514] 实例26: (S)-4-甲基-2-(苯基氨基)戊酸[I-26]:



[0516] 合成流程:



[0518] 程序及特征:

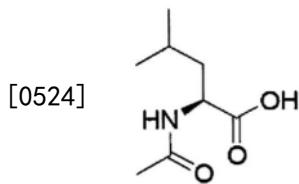
[0519] 步骤1: (S)-4-甲基-2-(苯基氨基)戊酸苯甲酯:

[0520] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(200mg, 0.51mmol)、苯基硼酸(186mg, 1.52mmol)及Cu(OAc)<sub>2</sub> (462mg, 2.54mmol)于DCM(10mL)中的混合物中添加4AMS (1.0g) 及Et<sub>3</sub>N (155mg, 1.52mmol)且在室温下搅拌混合物18小时。混合物用所得溶液淬灭,过滤(50mL),用EtOAc (50mL×2)萃取,用所得溶液洗涤,过滤(50mL)及盐水(50mL)洗涤。通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/20)浓缩纯化有机相,得到呈无色油状物的(S)-4-甲基-2-(苯基氨基)戊酸苯甲酯(100mg, 0.34mmol, 66%)。MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 298.2 [M+H]<sup>+</sup>。

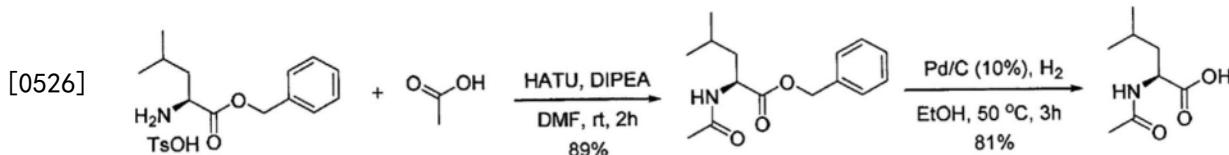
[0521] 步骤2: (S)-4-甲基-2-(苯基氨基)戊酸[I-26]:

[0522] 向(S)-4-甲基-2-(苯基氨基)戊酸苯甲酯(100mg, 0.34mmol)于EtOH (10mL) 中的搅拌溶液中添加催化量的Pd/C (10%, 20mg)。在氢气气氛下在50℃下搅拌反应物2小时。过滤并浓缩所得溶液,得到呈白色固体的(S)-4-甲基-2-(苯基氨基)戊酸(I-26), (30mg, 0.15mmol, 43%)。MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 208.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.23 (t, J=8.0Hz, 2H), 6.83 (t, J=7.6Hz, 1H), 6.66 (d, J=8.0Hz, 2H), 3.99 (d, J=8.4Hz, 1H), 2.87 (q, J=6.0Hz, 1H), 1.72~1.86 (m, 2H), 1.62~1.68 (m, 1H), 0.85~1.03 (m, 6H)。

[0523] 实例36: (S)-2-乙酰氨基-4-甲基戊酸[I-36]:



[0525] 合成流程:



[0527] 程序及特征:

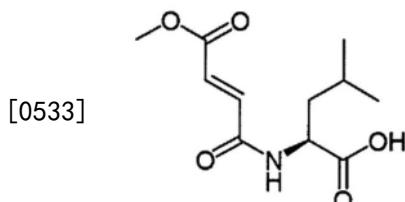
[0528] 步骤1: (S)-2-乙酰氨基-4-甲基戊酸苯甲酯:

[0529] 向L-亮氨酸苯甲酯对甲苯磺酸盐(500mg, 1.27mmol)、乙酸(114mg, 1.91mmol)及HATU(726mg, 1.91mmol)于DMF(10mL)中的溶液中添加DIPEA(410mg, 3.18mmol)且在室温下搅拌溶液2小时。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液, 得到呈白色固体的(S)-2-乙酰氨基-4-甲基戊酸苯甲酯(300mg, 1.14mmol, 89%)。MS(EI+, m/z): 264.2 [M+H]+。

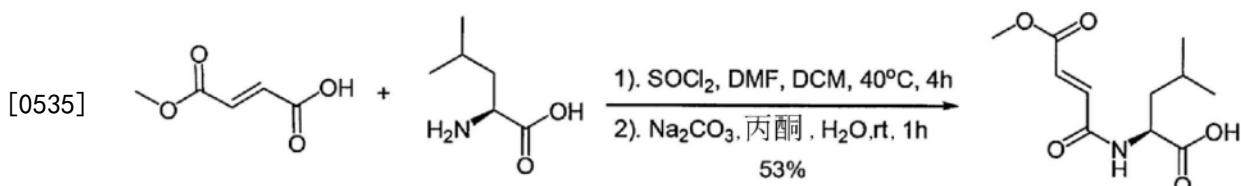
[0530] 步骤2: (S)-2-乙酰氨基-4-甲基戊酸[I-36]:

[0531] 向(S)-2-乙酰氨基-4-甲基戊酸苯甲酯(250mg, 0.74mmol)于EtOH(10mL)中的搅拌溶液中添加催化量的Pd/C(10%, 20mg)。在氢气气氛下在50°C下搅拌反应物3小时。过滤并浓缩所得溶液, 得到呈白色固体的(S)-2-乙酰氨基-4-甲基戊酸(I-36), (100mg, 0.57mmol, 81%)。MS(EI+, m/z): 174.2 [M+H]+。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, MeOD): δ 84.43 (dd, J=6.0Hz, 9.5Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.61-1.73 (m, 3H), 0.97 (dd, J=6.0Hz, 17.5Hz, 6H)。

[0532] 实例45: (S,E)-2-(4-甲氧基-4-氧代丁-2-烯酰氨基)-4-甲基戊酸[I-45]:



[0534] 合成流程:



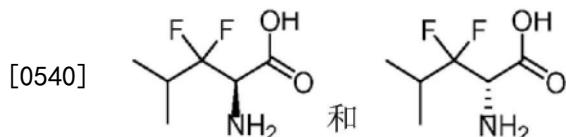
[0536] 程序及特征:

[0537] 步骤1: (S,E)-2-(4-甲氧基-4-氧代丁-2-烯酰氨基)-4-甲基戊酸[I-45]:

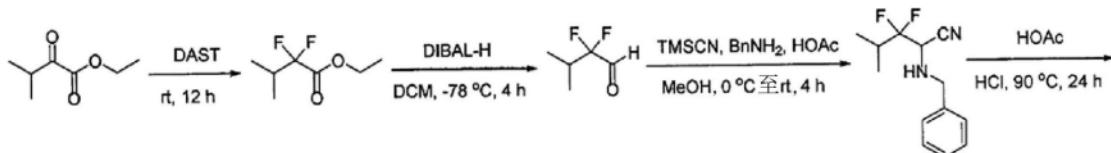
[0538] 向(E)-4-甲氧基-4-氧代丁-2-烯酸(1.0g, 7.69mmol)于DCM(30mL)中的溶液中添加SOC12(1.83g, 15.38mmol), 且随后DMF(0.1mL)。将溶液加热到40°C持续4小时。将溶液浓缩到干燥, 得到油。油用DCM(10mL)稀释。逐滴添加(S)-2-氨基-4-甲基戊酸(1.0g, 7.62mmol)于经冰浴冷却的丙酮(20mL)及Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>饱和溶液(20mL)中的溶液。在1小时之后, 溶

液用6M HCl溶液调节到pH 2, 用EtOAc (40×2) 萃取, 用所得溶液洗涤, 过滤(80mL×3), 及盐水(80mL) 洗涤, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩。通过色谱(二氧化硅, MeOH/DCM=1/20) 纯化粗产物, 得到呈黄色油状物的(S,E)-2-(4-甲氧基-4-氧化丁-2-烯酰氨基)-4-甲基戊酸(I-45), (1.0g, 4.11mmol, 53%)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 244.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.32 (d, J=15.2Hz, 1H), 7.05 (d, J=15.2Hz, 1H), 6.85-6.89 (m, 2H), 7.30-7.46 (m, 1H), 3.82 (s, 1H), 1.63-1.78 (m, 3H), 0.97 (d, J=4.8Hz, 6H)。

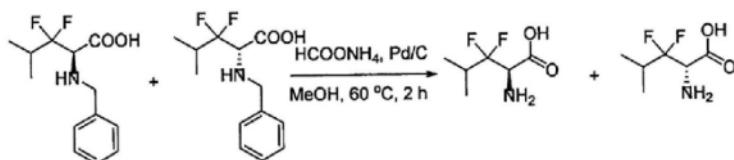
[0539] 实例46及47: (R)-2-氨基-3,3-二氟-4-甲基戊酸[I-46]及(S)-2-氨基-3,3-二氟-4-甲基戊酸[I-47]:



[0541] 合成流程:



[0542]



[0543] 程序及特征:

[0544] 步骤1:2,2-二氟-3-甲基丁酸乙酯:

[0545] 在室温下搅拌3-甲基-2-氧化丁酸乙酯(10g, 0.069mol) 及DAST(16.8g, 0.10mol) 的混合物12小时。在通过TLC检验之后, 将反应混合物逐滴缓慢添加到冷饱和碳酸氢钠水溶液。混合物用Et<sub>2</sub>O (300mL×2) 萃取, 且有机层用盐水洗涤, 干燥且浓缩, 得到直接用于下一步骤中的粗2,2-二氟-3-甲基丁酸乙酯(8.3g)。

[0546] 步骤2:2,2-二氟-3-甲基丁醛:

[0547] 在-78℃下在氩气下, 向粗2,2-二氟-3-甲基丁酸乙酯(8.3g) 于CH<sub>2</sub>C<sub>12</sub>(200mL) 中的溶液中逐滴添加DIBAL-H于己烷中的溶液(1.0M, 69mL, 69.0mmol), 且在-78℃下搅拌混合物30分钟。在通过TLC检验之后, 反应物用饱和柠檬酸淬灭且用Et<sub>2</sub>O萃取。萃取物用饱和柠檬酸、盐水洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 且在减压下浓缩, 得到不经纯化即紧接着用于下一步骤中的油性醛2,2-二氟-3-甲基丁醛(4.2g)。

[0548] 步骤3:2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊腈:

[0549] 使粗2,2-二氟-3-甲基丁醛(4.2g) 于50mL MeOH中的溶液冷却到0℃。在15分钟时间段内, 逐滴添加乙酸(冰, 2.1mL), 温度维持约0℃, 继而添加氰化三甲基硅烷(4.2mL)。将反应混合物升温到25℃且搅拌隔夜。将经过滤的冷所得溶液(200mL) 装入反应混合物中且用二氯甲烷(2×200mL) 萃取反应混合物。二氯甲烷层用所得溶液洗涤, 过滤(2×100mL), 继而盐水(2×50mL) 洗涤。二氯甲烷层经无水硫酸钠干燥且在减压下浓缩, 得到不经纯化即紧

接着用于下一步骤中的粗2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊腈(2.8g)。ESI-MS(EI+,*m/z*):238.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0550] 步骤4:2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊酸:

[0551] 在90℃下搅拌粗2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊腈(2.8g)于50mL浓盐酸及10mL HOAc中的溶液24小时且浓缩。通过制备型HPLC纯化残余物,得到呈白色固体的2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊酸(513mg)。通过手性HPLC纯化纯产物,得到(R)-2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊酸(80mg)及(S)-2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊酸(63mg),两者均为白色固体。ESI-MS(EI+,*m/z*):258.2[M+H]<sup>+</sup>。

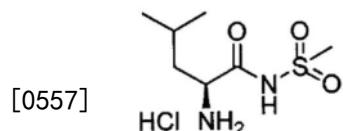
[0552] 步骤5-A:(R)-2-氨基-3,3-二氟-4-甲基戊酸[I-46]:

[0553] 在室温下,向(R)-2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊酸(80mg,0.31mmol)于20mL MeOH中的溶液中添加HCOONH<sub>4</sub>(98mg,1.56mmol)及Pd/C(100mg)。在60℃下搅拌混合物2小时。过滤且浓缩反应混合物,得到粗产物,其通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的(R)-2-氨基-3,3-二氟-4-甲基戊酸(I-46),(23mg,44%);<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,D<sub>2</sub>O):δ4.27(dd,J=24.0,3.5Hz,1H),2.55-2.42(m,1H),1.04(d,J=7.0Hz,3H),0.993(d,J=6.5Hz,3H)。

[0554] 步骤5-B:(S)-2-氨基-3,3-二氟-4-甲基戊酸[I-47]:

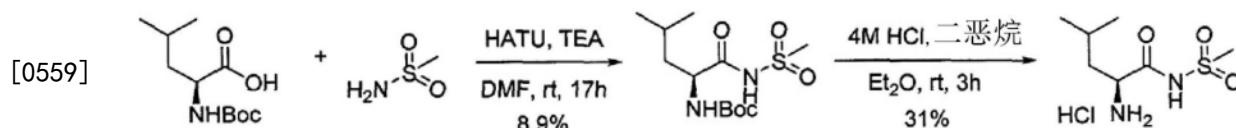
[0555] 在室温下,向(S)-2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊酸(63mg,0.24mmol)于15mL MeOH中的溶液中添加HCOONH<sub>4</sub>(77mg,1.22mmol)及Pd/C(100mg)。在60℃下搅拌混合物2小时。过滤且浓缩反应混合物,得到粗产物,其通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的(S)-2-氨基-3,3-二氟-4-甲基戊酸(I-47),(14mg,34%);<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,D<sub>2</sub>O):δ4.27(dd,J=24.0,3.5Hz,1H),2.55-2.42(m,1H),1.04(d,J=7.0Hz,3H),0.993(d,J=6.5Hz,3H)。

[0556] 实例147:(S)-2-氨基-4-甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-147].



I-147

[0558] 合成流程:



[0560] 程序及特征:

[0561] 步骤1:(S)-4-甲基-1-(甲基磺酰氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯:

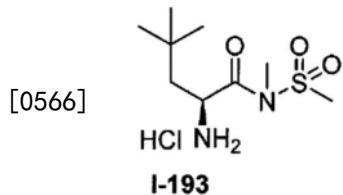
[0562] 向(S)-2-(叔丁氧羰基氨基)-4-甲基戊酸(1.0g,4.32mmol)、甲磺酰胺(452mg,4.75mmol)及HATU(1.8g,4.75mmol)于DMF(30mL)中的溶液中添加TEA(1.3g,12.9mmol)且在室温下搅拌溶液17小时。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm,移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液,得到呈白色固体的(S)-4-甲基-1-(甲基磺酰氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(130mg,0.42mmol,8.9%)。MS(EI-,*m/z*):307.0[M-H]<sup>-</sup>。

[0563] 步骤2:(S)-2-氨基-4-甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-147]:

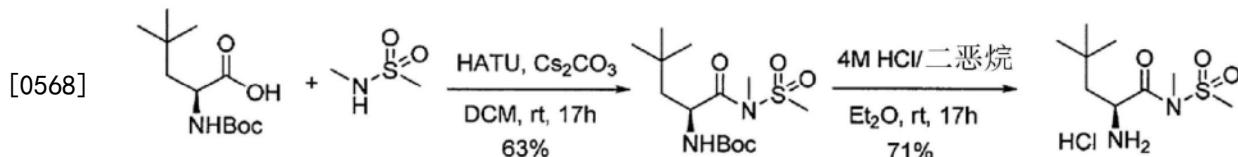
[0564] 添加(S)-4-甲基-1-(甲基磺酰氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(130mg,0.42mmol)于Et<sub>2</sub>O(15mL)中的溶液,在室温下搅拌4M HCl/二恶烷(5mL)3小时。过滤固体,得

到呈白色固体的 (S)-2-氨基-4-甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-147] (32mg, 0.13mmol, 31%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 209.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CD3OD) δ 3.96 (t, J=3.0Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 1.74-1.79 (m, 3H), 1.02-1.05 (m, 6H)。

[0565] 实例193: (S)-2-氨基-N,4,4-三甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-193]。



[0567] 合成流程:



[0569] 程序及特征:

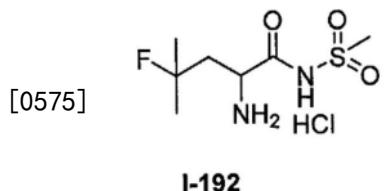
[0570] 步骤1: (S)-4,4-二甲基-1-(N-甲基甲磺酰氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯:

[0571] 向 (S)-2-(叔丁氧羰基氨基)-4,4-二甲基戊酸 (500mg, 1.97mmol) 于 DCM (60mL) 中的溶液中添加 HATU (900mg, 2.36mmol) 且在室温下搅拌 2 小时。随后将  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1.92g, 5.91mmol)、N-甲基甲磺酰胺 (322mg, 2.95mmol) 添加到混合物中且在室温下搅拌隔夜。溶液用水 (200mL) 稀释且用 DCM (100mL) 萃取。有机相用水 (100mL × 2) 及盐水 (100mL) 洗涤, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) , 过滤且在真空中浓缩, 通过色谱 (二氧化硅, 乙酸乙酯/石油醚 = 1/5) 纯化粗产物, 得到呈黄色油状物的 (S)-4,4-二甲基-1-(N-甲基甲磺酰氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯 (420mg, 1.25mmol, 63%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 359.1 [M+Na]<sup>+</sup>。

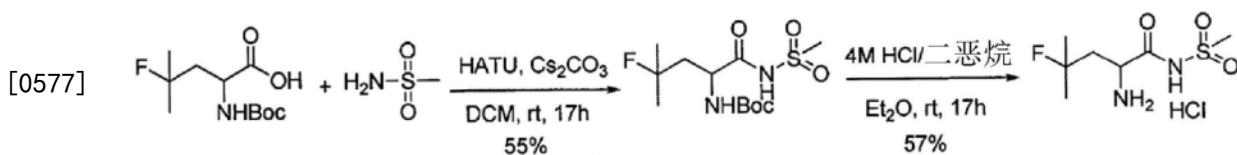
[0572] 步骤2: (S)-2-氨基-N,4,4-三甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-193]:

[0573] 添加 (S)-4,4-二甲基-1-(N-甲基甲磺酰氨基)-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯 (420mg, 1.25mmol) 于  $\text{Et}_2\text{O}$  (20mL) 中的溶液, 在室温下搅拌 4M HCl/二恶烷 (10mL) 17 小时。过滤固体, 得到呈白色固体的 (S)-2-氨基-N,4,4-三甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-193] (250mg, 0.13mmol, 71%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 237.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO) δ 8.55 (s, 3H), 4.59 (s, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 1.81-1.85 (m, 1H), 1.63-1.67 (m, 1H), 0.95 (s, 9H)。

[0574] 实例192:2-氨基-4-氟-4-甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-192]。



[0576] 合成流程:



[0578] 程序及特征：

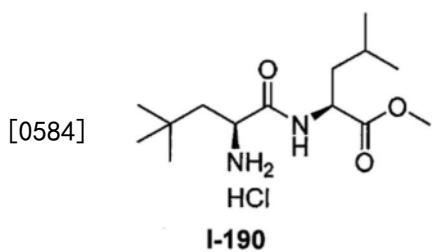
[0579] 步骤1:4-氟-4-甲基-1-(甲基磺酰氨基)-1-羟代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯：

[0580] 向4-氟-4-甲基-1-(甲基磺酰氨基)-1-羟代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(270mg, 1.08mmol)于DCM(50mL)中的溶液中添加HATU(451mg, 1.19mmol)且在室温下搅拌2小时。随后将 $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (1.06g, 3.24mmol)、甲磺酰胺(206mg, 2.17mmol)添加到混合物中且在室温下搅拌隔夜。溶液用水(200mL)稀释且用DCM(100mL)萃取。有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗涤，干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，过滤且在真空中浓缩，通过色谱(二氧化硅，乙酸乙酯/石油醚=1/5)纯化粗产物，得到呈黄色油状物的(S)-4,4-二甲基-1-(N-甲基甲磺酰氨基)-1-羟代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(200mg, 0.6mmol, 55%)。ESI-MS(EI+, m/z): 344.1 [M+NH4]<sup>+</sup>。

[0581] 步骤2:2-氨基-4-氟-4-甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-192]。

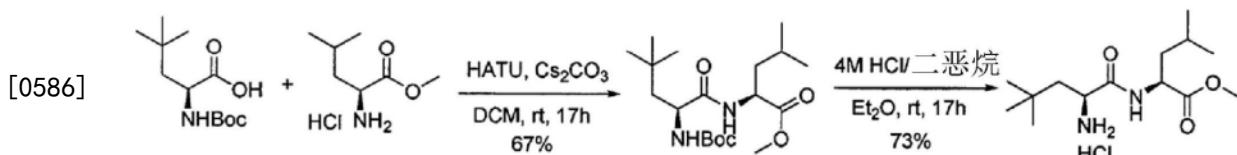
[0582] 添加(S)-4,4-二甲基-1-(N-甲基甲磺酰氨基)-1-羟代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(200mg, 0.6mmol)于Et<sub>2</sub>O(20mL)中的溶液，在室温下搅拌4M HCl/二恶烷(10mL)17小时。过滤固体，得到呈白色固体的2-氨基-4-氟-4-甲基-N-(甲磺酰基)戊酰胺盐酸盐[I-192](89.8mg, 0.34mmol, 57%)。ESI-MS(EI+, m/z): 227.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, DMSO) δ 8.44 (s, 3H), 4.02 (s, 1H), 3.25 (s, 3H), 2.16-2.25 (m, 1H), 2.03-2.10 (m, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.38 (s, 3H)。

[0583] 实例190:(S)-2-((S)-2-氨基-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-190]。



I-190

[0585] 合成流程：



[0587] 程序及特征：

[0588] 步骤1:(S)-2-((S)-2-(叔丁氧羰基氨基)-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯：

[0589] 向(S)-2-(叔丁氧羰基氨基)-4,4-二甲基戊酸(500mg, 2.0mmol)于DCM(80mL)中的溶液中添加HATU(900mg, 2.3mmol)且在室温下搅拌2小时。随后将 $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (1.95g, 6.0mmol)、(S)-2-氨基-4-甲基戊酸甲酯盐酸盐(555mg, 3.0mmol)添加到混合物中且在室温下搅拌隔夜。溶液用水(200mL)稀释且用DCM(100mL)萃取。有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗

涤, 干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤且在真空中浓缩, 通过色谱(二氧化硅, 乙酸乙酯/石油醚=1/5)纯化粗产物, 得到呈白色固体的(S)-2-((S)-2-(叔丁氧羰基氨基)-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯(500mg, 1.34mmol, 67%)。ESI-MS(EI+, m/z): 317.2[M-56]<sup>+</sup>。

[0590] 步骤2: (S)-2-((S)-2-氨基-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-190]。

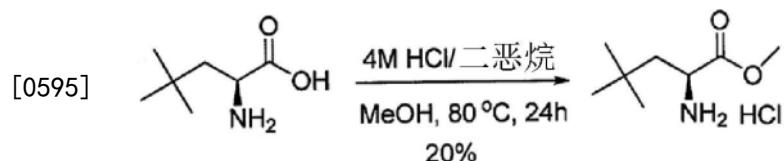
[0591] 添加(S)-2-((S)-2-(叔丁氧羰基氨基)-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯(500mg, 1.34mmol)于 $\text{Et}_2\text{O}$ (20mL)中的溶液, 在室温下搅拌4M HCl/二恶烷(10mL)17小时。过滤固体, 得到呈白色固体的(S)-2-((S)-2-氨基-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-190](300mg, 0.97mmol, 73%)。ESI-MS(EI+, m/z): 273.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, DMSO)  $\delta$  9.07-9.09(d,  $J$ =7.5Hz, 1H), 8.42(s, 3H), 4.29-4.34(m, 1H), 3.82(m, 1H), 3.60(s, 3H), 1.72-1.83(m, 2H), 1.50-1.62(m, 3H), 0.86-0.91(m, 15H)。

[0592] 实例122: (S)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-122]。



I-122

[0594] 合成流程:

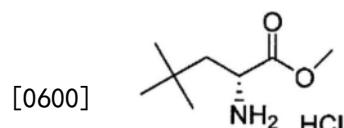


[0596] 程序及特征:

[0597] 步骤1: (S)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-122]:

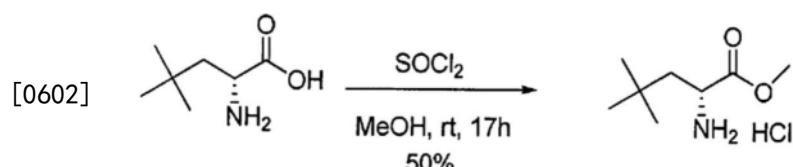
[0598] 添加(S)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸(100mg, 0.69mmol)于MeOH(10mL)中的溶液, 在80°C下搅拌4M HCl/二恶烷(10mL)24小时。浓缩混合物且用 $\text{Et}_2\text{O}$ 搅打残余物, 得到呈白色固体的(S)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-122](23.6mg, 0.12mmol, 20%)。ESI-MS(EI+, m/z): 160.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, CD3OD):  $\delta$  84.02-4.04(m, 1H), 3.86(s, 3H), 1.97-2.02(m, 1H), 1.64-1.68(m, 1H), 1.03-1.05(d, 9H), 。

[0599] 实例123: (R)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-123]。



I-123

[0601] 合成流程:



[0603] 程序及特征:

[0604] 步骤1: (R)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-123]:

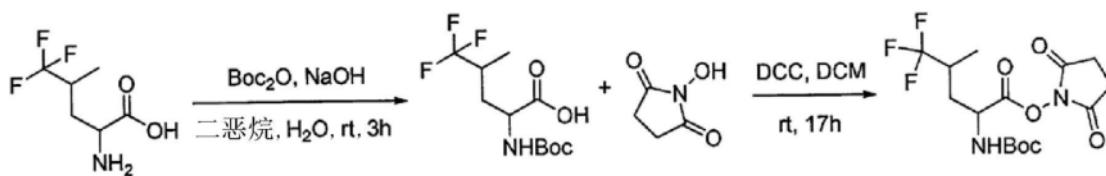
[0605] 向(R)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸(50mg,0.34mmol)于干燥MeOH(10mL)中的混合物中添加在室温下搅拌17小时的SOCl<sub>2</sub>(0.5mL)。浓缩混合物且用Et<sub>2</sub>O搅打残余物,得到呈白色固体的(R)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸甲酯盐酸盐[I-123](34.2mg,0.17mmol,50%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):160.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,CD3OD):δ4.02-4.04(m,1H),3.86(s,3H),1.97-2.02(m,1H),1.64-1.68(m,1H),1.03(s,9H)。

[0606] 实例205:2-氨基-N-氰基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酰胺盐酸盐[I-205].

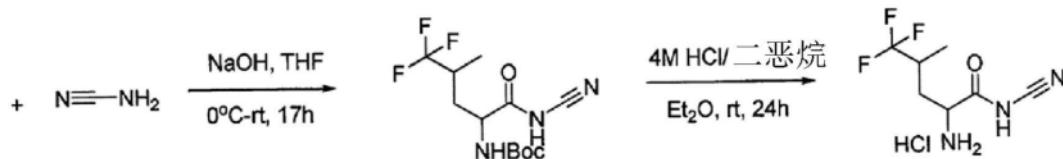


I-205

[0608] 合成流程:



[0609]



[0610] 程序及特征:

[0611] 步骤1:2-(叔丁氧羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸:

[0612] 使2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(250mg,1.35mmol)、Boc<sub>2</sub>O(353mg,1.62mmol)、NaOH(80mg,2.0mmol)的混合物溶解于二恶烷(10mL)及H<sub>2</sub>O(2mL)中。在室温下搅拌混合物3小时。溶液用水(200mL)稀释且用DCM(50mL)萃取。有机相用水(20mL×2)及盐水(10mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤并浓缩,得到呈无色油状物的粗2-(叔丁氧羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(385mg)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):307.9[M+Na]<sup>+</sup>。

[0613] 步骤2:2-(叔丁氧羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸2,5-二氧化代吡咯烷-1-酯:

[0614] 使2-(叔丁氧羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(385mg,1.35mmol)、1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(197mg,1.71mmol)、DCC(353mg,1.71mmol)的混合物溶解于DCM(15mL)中。在室温下搅拌混合物17小时。过滤且滤液用盐水(20mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤并浓缩,得到呈白色固体的粗2-(叔丁氧羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸2,5-二氧化代吡咯烷-1-酯(400mg)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):282.9[M-100]<sup>+</sup>。

[0615] 步骤3:1-氰氨基-5,5,5-三氟-4-甲基-1-氧化戊-2-基氨基甲酸叔丁酯:

[0616] 使2-(叔丁氧羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸2,5-二氧化代吡咯烷-1-酯(300mg,0.78mmol)、氰胺(66mg,1.57mmol)、NaOH(156mg,3.9mmol)的混合物溶解于THF(16mL)中。在0℃下搅拌混合物0.5小时且在室温下搅拌17小时。通过制备型HPLC(Boston

C1821×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液, 得到呈白色固体的1-氰氨基-5,5,5-三氟-4-甲基-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(45mg, 0.14mmol)。MS (EI+, m/z) :310.3 [M+H]<sup>+</sup>。

[0617] 步骤4:2-氨基-N-氰基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酰胺盐酸盐[I-205]:

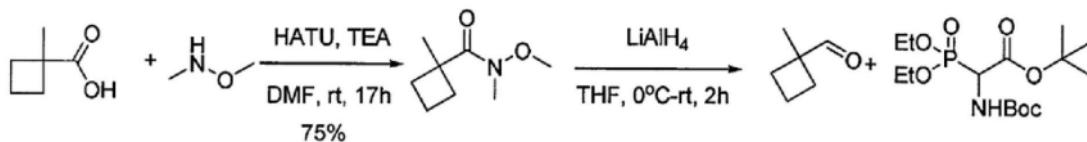
[0618] 添加1-氰氨基-5,5,5-三氟-4-甲基-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(45mg, 0.14mmol)于Et<sub>2</sub>O(20mL)中的溶液, 在室温下搅拌4M HCl/二恶烷(10mL)24小时。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液, 得到呈白色固体的2-氨基-N-氰基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酰胺盐酸盐[I-205](12.3mg, 0.05mmol, 27%)。MS (EI+, m/z) :210.1 [M+H]<sup>+</sup>。1H NMR (500MHz, CD3OD) δ 4.06-4.09 (m, 1H), 2.43-2.65 (m, 1H), 1.67-1.85 (m, 2H), 1.18-1.22 (m, 3H)。

[0619] 实例206:2-氨基-3-(1-甲基环丁基)丙酸[I-206].

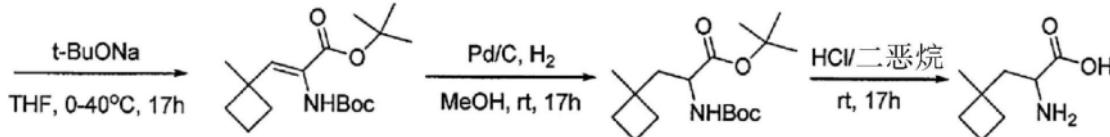


I-206

[0621] 合成流程:



[0622]



[0623] 程序及特征:

[0624] 步骤1:N-甲氧基-N,1-二甲基环丁烷甲酰胺:

[0625] 向1-甲基环丁烷甲酸(11.6g, 0.1mol)、N,O-二甲基羟胺盐酸盐(19.5g, 0.2mol)及HATU(42g, 0.11mol)于DMF(300mL)中的溶液中添加TEA(30.3g, 0.3mol)且在室温下搅拌溶液17小时。溶液用水(600mL)稀释且用EtOAc(400mL×2)萃取。有机相用1NHC1、饱和NaHCO<sub>3</sub>及盐水(100mL)洗涤, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤且在真空中浓缩, 得到呈无色油状物的N-甲氧基-N,1-二甲基环丁烷甲酰胺(12.2g, 0.07mol, 75%)。ESI-MS (EI+, m/z) :158.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0626] 步骤2:1-甲基环丁烷甲醛:

[0627] 在0℃下在N<sub>2</sub>下, 向N-甲氧基-N,1-二甲基环丁烷甲酰胺(2.0g, 12.7mmol)于无水THF(20mL)中的溶液中逐滴添加1M LiAlH<sub>4</sub>(19mL, 19mmol)。使混合物升温到室温且搅拌2小时。溶液用饱和赛格涅特盐(seignette sat)缓慢淬灭且用Et<sub>2</sub>O(100mL)萃取, 有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗涤, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤且用于下一步骤。

[0628] 步骤3:(Z)-2-(叔丁氧羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙烯酸叔丁酯:

[0629] 在0℃下, 向威悌(witting)反应剂(2.15g, 5.86mmol)于无水THF(80mL)中的溶液中添加t-BuONa(844mg, 8.79mmol)且搅拌1小时。随后添加1-甲基环丁烷甲醛的溶液且在室

温下搅拌17小时。溶液用EtOAc(100mL×2)萃取。有机相用盐水(100mL)洗涤，干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，过滤且在真空中浓缩。通过色谱(二氧化硅，乙酸乙酯/石油醚=1/30)纯化粗产物，得到呈无色油状物的(Z)-2-(叔丁氧羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙烯酸叔丁酯(700mg, 2.2mmol)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z): 200.2[M-56×2]<sup>+</sup>。

[0630] 步骤4:2-(叔丁氧羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸叔丁酯：

[0631] 在30℃下搅拌(Z)-2-(叔丁氧羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙烯酸叔丁酯(700mg, 2.2mmol)及Pd/C(10%, 100mg)于MeOH(100mL)中的混合物17小时。过滤混合物，且将滤液浓缩到干燥，得到呈无色油状物的2-(叔丁氧羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸叔丁酯(600mg, 粗物质)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z): 158.2[M-156]<sup>+</sup>。

[0632] 步骤5:2-氨基-3-(1-甲基环丁基)丙酸[I-206]：

[0633] 添加2-(叔丁氧羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸叔丁酯(600mg, 粗物质)于Et<sub>2</sub>O(20mL)中的溶液，在室温下搅拌4M HCl/二恶烷(10mL)17小时。浓缩溶液，得到2-氨基-3-(1-甲基环丁基)丙酸。MS(EI<sup>+</sup>, m/z): 158.0[M+H]<sup>+</sup>。

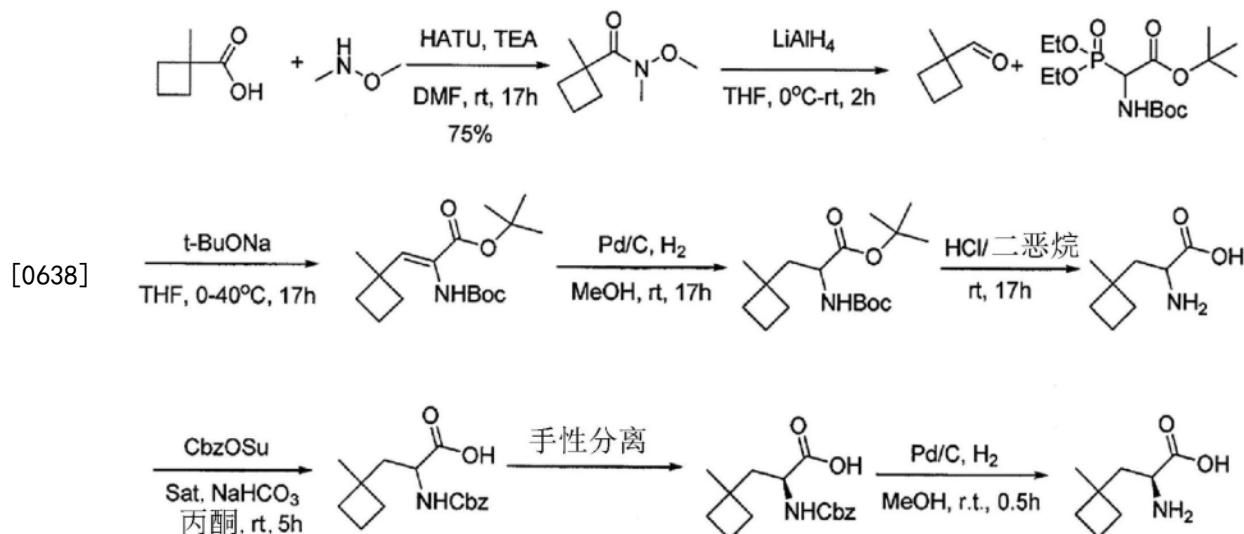
[0634] <sup>1</sup>H NMR(500MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.91(t, J=7.5Hz, 1H), 2.06-2.02(m, 1H), 1.88-1.64(m, 7H), 1.15(s, 3H)。

[0635] 实例93:S-2-氨基-3-(1-甲基环丁基)丙酸[I-93]。



I-93

[0637] 合成流程：



[0639] 程序及特征：

[0640] 2-氨基-3-(1-甲基环丁基)丙酸的程序与实例8相同

[0641] 步骤6:2-(苯甲氧基羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸：

[0642] 在室温下搅拌2-氨基-3-(1-甲基环丁基)丙酸(300mg, 粗物质)、CbzOSu(714mg, 2.8mmol)于丙酮(10mL)及饱和NaHCO<sub>3</sub>(3mL)的混合物中5小时。通过制备型HPLC(Boston

C18 21×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液, 得到呈白色固体的2-(苯甲氧基羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸(160mg, 0.54mmol)。MS (EI+, m/z) : 292.0 [M+H]<sup>+</sup>。

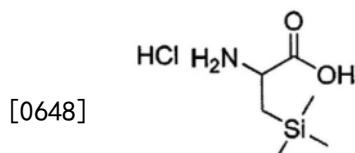
[0643] 步骤7: (S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸:

[0644] 通过手性HPLC纯化2-(苯甲氧基羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸(160mg, 0.54mmol), 得到呈白色固体的(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸(50mg, 0.17mmol)。MS (EI+, m/z) : 292.0 [M+H]<sup>+</sup>。

[0645] 步骤8: (S)-2-氨基-3-(1-甲基环丁基)丙酸[I-93]:

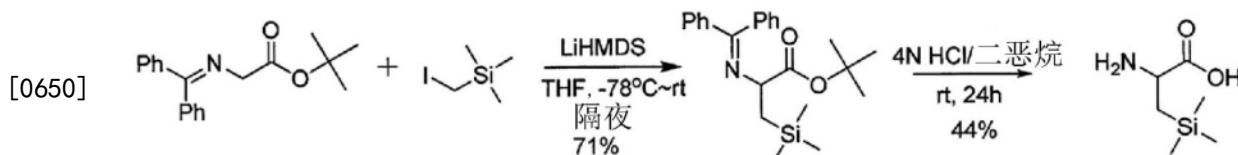
[0646] 在室温下搅拌(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-3-(1-甲基环丁基)丙酸(50mg, 0.17mmol)及Pd/C(10%, 10mg)于MeOH(10mL)中的混合物1小时。通过制备型HPLC(Boston C1821×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化溶液, 得到呈白色固体的(S)-2-氨基-3-(1-甲基环丁基)丙酸[I-93](2mg, 0.01mmol)。MS (EI+, m/z) : 292.0 [M+H]<sup>+</sup>。1H NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.76-3.79 (t, 1H), 1.96-2.00 (m, 1H), 1.61-1.86 (m, 7H), 1.11 (s, 3H)。

[0647] 实例204:2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-204]



**I-204**

[0649] 合成流程:



[0651] 程序及特征:

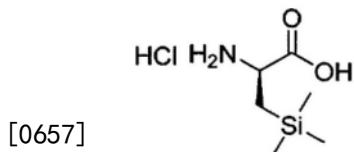
[0652] 步骤1:2-(二苯基亚甲基氨基)-3-(三甲基硅烷基)丙酸叔丁酯:

[0653] 使2-(二苯基亚甲基氨基)乙酸叔丁酯(2.5g, 8.47mmol)于THF(20mL)中的溶液冷却到-78°C, 随后在N<sub>2</sub>下逐滴添加LiHMDS(8.47mL, 8.47mmol)。在-78°C下搅拌溶液1小时。逐滴添加(碘甲基)三甲基硅烷(1.8g, 8.47mmol)。在-78°C到室温下搅拌溶液隔夜。溶液通过盐水(25mL×2)洗涤, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 浓缩且通过色谱(二氧化硅, 乙酸乙酯/石油醚=1/30)纯化, 得到呈黄色固体的2-(二苯基亚甲基氨基)-3-(三甲基硅烷基)丙酸叔丁酯(2.3g, 6.04mmol, 71%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 382.3 [M+H]<sup>+</sup>。

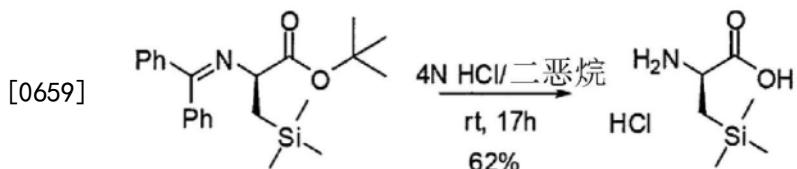
[0654] 步骤2:2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-204]:

[0655] 在室温下搅拌2-(二苯基亚甲基氨基)-3-(三甲基硅烷基)丙酸叔丁酯(500mg, 1.31mmol)于4M HCl/二恶烷(6mL)中的溶液17小时。添加DCM(80mL)。过滤固体, 得到呈白色固体的2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-204](113mg, 0.57mmol, 44%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 162.2 [M+H]<sup>+</sup>。1H NMR (500MHz, CD3OD) δ 13.78 (br, 1H), 8.33 (br, 1H), 3.75 (m, 1H), 1.00-1.14 (m, 2H), 0.06 (s, 9H)。

[0656] 实例201: (S)-2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-201].

**I-201**

[0658] 合成流程:

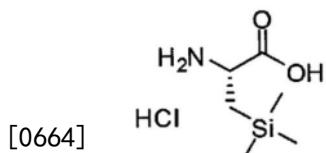


[0660] 程序及特征:

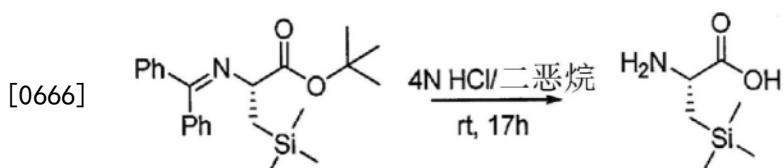
[0661] 步骤1: (S)-2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-201]:

[0662] 在室温下搅拌(S)-2-(二苯基亚甲基氨基)-3-(三甲基硅烷基)丙酸叔丁酯(300mg, 0.79mmol)于4M HCl/二恶烷(3ml)中的溶液17小时。添加DCM(40mL)。过滤固体, 得到呈白色固体的(S)-2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-201](92mg, 0.47mmol, 62%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 162.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CD3OD) δ 13.76 (br, 1H), 8.38 (br, 1H), 3.76 (m, 1H), 1.02-1.16 (m, 2H), 0.06 (s, 9H)。

[0663] 实例200: (R)-2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-200].

**I-200**

[0665] 合成流程:

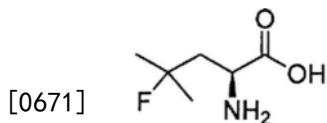


[0667] 程序及特征:

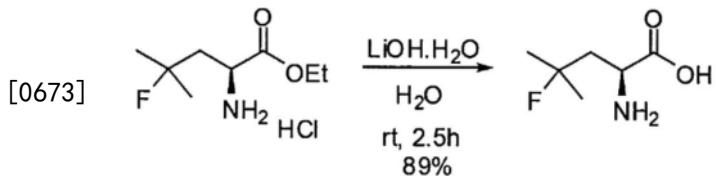
[0668] 步骤1: (R)-2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-200]:

[0669] 在室温下搅拌(R)-2-(二苯基亚甲基氨基)-3-(三甲基硅烷基)丙酸叔丁酯(300mg, 0.79mmol)于4M HCl/二恶烷(3ml)中的溶液17小时。添加DCM(40mL)。过滤固体, 得到呈白色固体的(R)-2-氨基-3-(三甲基硅烷基)丙酸盐酸盐[I-200](80mg, 0.41mmol, 52%)。ESI-MS (EI+, m/z) : 162.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CD3OD) δ 13.77 (br, 1H), 8.33 (br, 1H), 3.76 (m, 1H), 1.02-1.14 (m, 2H), 0.06 (s, 9H)。

[0670] 实例194: (S)-2-氨基-4-氟-4-甲基戊酸[I-194].

**I-194**

[0672] 合成流程:

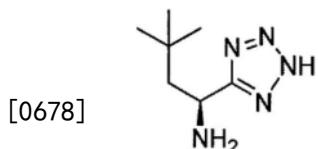


[0674] 程序及特征:

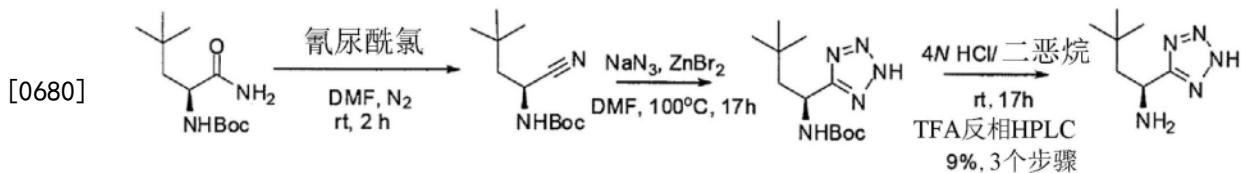
[0675] 步骤1: (S)-2-氨基-4-氟-4-甲基戊酸[I-194]:

[0676] 在室温下搅拌(S)-2-氨基-4-氟-4-甲基戊酸乙酯盐酸盐(65mg, 0.31mmol)、LiOH·H<sub>2</sub>O(29mg, 0.69mmol)于H<sub>2</sub>O(2mL)中的混合物2.5小时。随后,添加1N HCl以调节pH=3。直接通过反相HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm, 移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化混合物,得到呈白色固体的(S)-2-氨基-4-氟-4-甲基戊酸[I-194](40mg, 0.27mmol, 87%)。MS(EI+, m/z): 150.3 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CD3OD) δ 88.10(br, 2H), 3.79(m, 1H), 2.19-2.26(m, 1H), 1.97-2.05(m, 1H), 1.42(d, J<sub>Z</sub>=3.5Hz, 3H), 1.37(d, J<sub>Z</sub>=4.0Hz, 3H)。

[0677] 实例94: (S)-3,3-二甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺[I-94].

**I-94**

[0679] 合成流程:



[0681] 程序及特征:

[0682] 步骤1: (S)-1-氰基-3,3-二甲基丁基氨基甲酸叔丁酯:

[0683] 向(S)-1-氨基-4,4-二甲基-1-氧代戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(500mg, 2.1mmol)于DMF(10mL)中的溶液中添加氰尿酰氯(450mg, 2.5mmol)且在室温下搅拌2小时。随后,混合物通过盐水(100mL)稀释,用乙酸乙酯(50mL)萃取,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)且浓缩,得到呈黄色掺杂物的粗(S)-1-氰基-3,3-二甲基丁基氨基甲酸叔丁酯(500mg)。ESI-MS(EI+, m/z): 249.2 [M+Na]<sup>+</sup>。

[0684] 步骤2: (S)-3,3-二甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁基氨基甲酸叔丁酯:

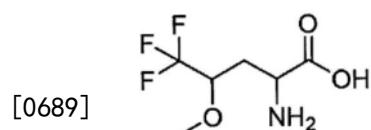
[0685] 在100°C下搅拌(S)-1-氰基-3,3-二甲基丁基氨基甲酸叔丁酯(粗物质500mg)、ZnBr<sub>2</sub>(900mg, 4.0mmol)、NaN<sub>3</sub>(260mg, 4.0mmol)于DMF(20mL)中的混合物17小时。混合物随后用盐水(200mL)稀释,用乙酸乙酯(60mL)萃取,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)且浓缩,得到呈黄色掺杂物的粗(S)-3,3-二甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁基氨基甲酸叔丁酯(400mg)。ESI-MS(EI+, m/z):

214.3 [M+H-56]<sup>+</sup>。

[0686] 步骤3: ((S)-3,3-二甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺[I-94]:

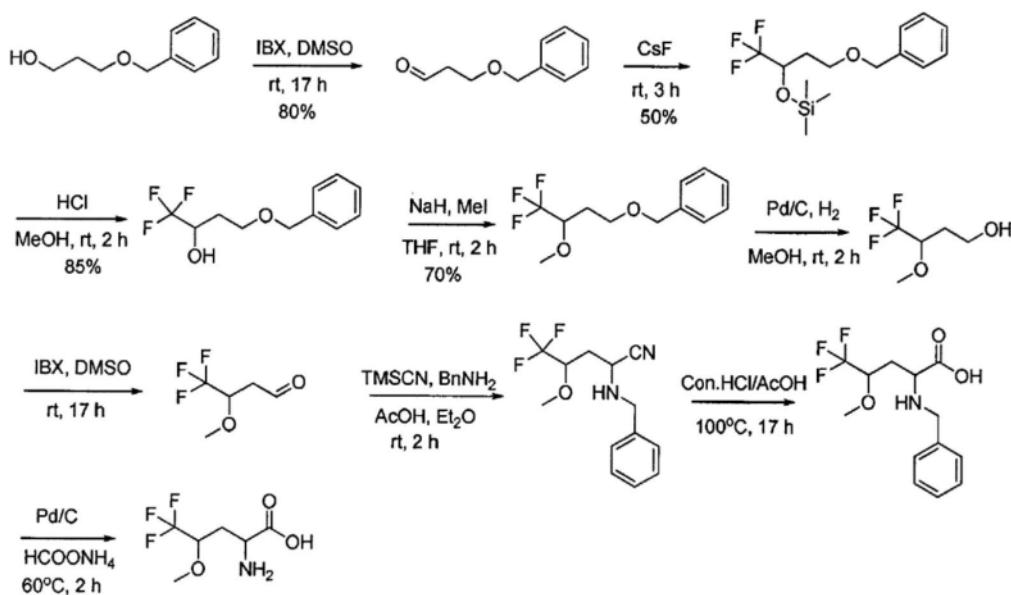
[0687] 在室温下搅拌(S)-3,3-二甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁基氨基甲酸叔丁酯(粗物质300mg)于4M HCl/二恶烷(3.5mL)中的溶液17小时。随后,浓缩溶液且直接通过反相HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm,移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化,得到呈白色固体的(S)-3,3-二甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺2,2,2-三氟乙酸盐[I-94](30mg,0.11mmol,9%,3个步骤)。MS(EI+,*m/z*):170.2 [M+H]<sup>+</sup>。1H NMR(500MHz,CD3OD) δ 8.18(br,3H), 4.48(m,1H), 2.14(m,1H), 1.73(dd,Jz=3.5,16.5Hz 1H), 0.72(s,9H)。

[0688] 实例175:合成2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊酸[I-175]:



I-175

[0690] 合成流程:



[0692] 程序及特征:

[0693] 步骤1: (S)-4-甲基-2-(苯基甲基磺酰氨基)戊酸苯甲酯:

[0694] 在冰浴下,向3-(苯甲氧基)丙-1-醇(10.0g,60.24mmol)于DMSO(100mL)中的溶液中添加IBX(20.2g,72.29mmol)。使混合物升温到室温且在所述温度下搅拌17小时。将反应混合物倒入水(300mL)中且用EA(200mL×2)萃取,有机相用水(200mL×3)及盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),且浓缩溶液且粗物质通过SGC纯化以获得淡黄色液体。(8.0g,81%)。

[0695] 1H NMR(500MHz,CDC13) δ 9.77(s,1H), 7.36-7.26(m,5H), 4.53(s,2H), 3.8-3.83(m,2H), 2.71-2.68(m,2H)。

[0696] 步骤2: (4-(苯甲氧基)-1,1,1-三氟丁-2-基氧基)三甲基硅烷:

[0697] 在室温下,向3-(苯甲氧基)丙醛(4.0g,24.4mmol)于THF(50mL)中的溶液中添加三甲基(三氟甲基)硅烷(10.4g,73.2mmol),继而添加CsF(0.37g,2.44mmol)。在室温下搅拌所得溶液2小时。随后通过水(100mL)淬灭且用EA(100mL×2)萃取,有机相用水(100mL×2)及

盐水(100mL)洗涤,干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),过滤并浓缩。通过ISCO拜泰齐(biotage)纯化粗物质以获得呈无色液体的(4-(苯甲氧基)-1,1,1-三氟丁-2-基氧基)三甲基硅烷。(4.5g,60%)

[0698]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) 87.38-7.29 (m, 5H), 4.51 (t, J=12Hz, 2H), 4.23-4.19 (m, 1H), 3.59-3.57 (m, 2H), 2.04-2.01 (m, 1H), 1.78-1.73 (m, 1H), 0.13 (s, 9H)。

[0699] 步骤3:4-(苯甲氧基)-1,1,1-三氟丁-2-醇:

[0700] 在室温下,搅拌4-(苯甲氧基)-1,1,1-三氟丁-2-醇(4.5g,14.7mmol)于HCl溶液(3M于MeOH中,50ml)中的溶液2小时。随后浓缩且通过ISCO拜泰齐纯化以获得呈无色液体的4-(苯甲氧基)-1,1,1-三氟丁-2-醇(2.75g,80%)。

[0701] 步骤4:((4,4,4-三氟-3-甲氧基丁氧基)甲基)苯:

[0702] 在0℃下,向4-(苯甲氧基)-1,1,1-三氟丁-2-醇(2.75g,11.75mmol)于THF(100mL)中的溶液中添加t-BuOK(1.58g,14.1mmol)且在所述温度下搅拌30分钟。随后添加MeI(2.17g,15.28mmol)且在室温下再搅拌1小时。反应物通过水(100mL)淬灭且用EA(100mL×2)萃取,有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗涤,干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),过滤并浓缩。通过ISCO拜泰齐纯化粗物质以获得呈无色液体的((4,4,4-三氟-3-甲氧基丁氧基)甲基)苯(2.04g,70%)。

[0703]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) 87.38-7.29 (m, 5H), 4.53 (t, J=12Hz, 2H), 3.78-3.74 (m, 1H), 3.66-3.57 (m, 2H), 3.5 (s, 3H), 2.03-1.96 (m, 1H), 1.78-1.57 (m, 1H)。

[0704] 步骤5:4,4,4-三氟-3-甲氧基丁-1-醇:

[0705] 在室温下搅拌((4,4,4-三氟-3-甲氧基丁氧基)甲基)苯(2.04g,8.23mmol)及Pd/C(0.5g)于MeOH(30mL)中的溶液2小时,随后过滤并浓缩以获得呈无色液体的4,4,4-三氟-3-甲氧基丁-1-醇。这种粗物质直接用于下一步骤。

[0706] 步骤6:4,4,4-三氟-3-甲氧基丁醛:

[0707] 在冰浴下,向4,4,4-三氟-3-甲氧基丁-1-醇(1.3g粗物质,来自最后步骤)于DMSO(20mL)中的溶液中添加IBX(2.76g,9.88mmol)。使混合物升温到室温且在所述温度下搅拌17小时。将反应混合物倒入水(80mL)中且用Et<sub>2</sub>O(80mL×2)萃取,有机相用水(80mL×3)及盐水(80mL)洗涤,且溶液直接用于下一步骤。

[0708] 步骤7:2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊腈:

[0709] 在冰浴下,向上述4,4,4-三氟-3-甲氧基丁醛于Et<sub>2</sub>O(160mL)中的溶液中添加苯甲基胺(2mL)、AcOH(2.0mL)及随后TMSCN(3mL)。使混合物升温到室温且在所述温度下搅拌17小时。溶液用水(200mL)稀释且用EA(100mL)萃取,有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗涤,干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),过滤且在真空中浓缩,得到用于下一步骤的呈棕色浓稠油状物的2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊腈(2.0g,粗物质)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):

[0710] 步骤8:2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊酸:

[0711] 将2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊腈(2.0g,粗物质)于浓HCl(30mL)及AcOH(10mL)中的溶液加热到100℃持续17小时。将溶液浓缩到干燥,用H<sub>2</sub>O(100mL)及ACN(50mL)稀释,pH用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液调节到3至4,过滤混合物且干燥,得到呈棕色固体的2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊酸(0.8g,35%,4个步骤)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):[M+H]<sup>+</sup>。

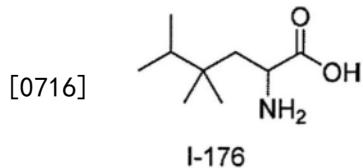
[0712] 步骤9:2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊酸[I-175]:

[0713] 在60℃下搅拌2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊酸(300mg,1.03mmol)及

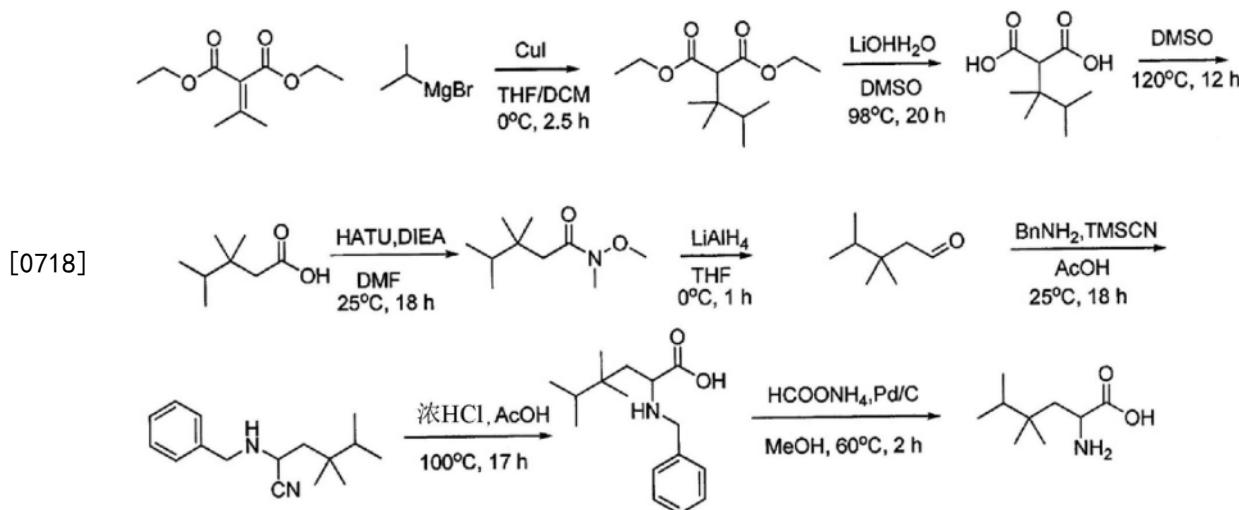
$\text{HCOONH}_4$  (650mg, 10.3mmol) 于  $\text{MeOH}$  (10mL) 中的溶液2小时, 随后过滤并浓缩。通过反相拜泰齐纯化粗物质以获得呈白色固体的2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲氧基戊酸[I-175]。

[0714]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇-d4)  $\delta$  4.23-4.19 (m, 1H), 3.96-3.88 (m, 1H), 3.64-3.6 (m, 3H), 2.29-2.22 (m, 1H), 2.04-1.97 (m, 1H)。

[0715] 实例176:2-氨基-4,4,5-三甲基己酸[I-176]:



[0717] 合成流程:



[0719] 程序及特征:

[0720] 步骤1:2- (2,3-二甲基丁-2-基)丙二酸二乙酯:

[0721] 使2- (丙-2-亚基)丙二酸二乙酯(2g, 10.0mmol)于THF(60mL)中的溶液冷却到0℃, 继而为碘化铜(I) (2.9g, 15.0mmol)。在0℃下搅拌混合物0.5小时。随后在0℃下将异丙基溴化镁(1mol/L, 30.0mL, 30.0mmol)逐滴添加到上述混合物中。在0℃下搅拌混合物2小时。混合物用HCl(1mol/L)淬灭, 用EtOAc(60mL×2)萃取。分离有机相, 用水(100mL×2)及盐水(130mL)洗涤, 干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤且在真空中浓缩, 得到呈黄色固体的2- (2,3-二甲基丁-2-基)丙二酸二乙酯(2.4g, 10.0mmol, 98%)。ESI-MS ( $\text{EI}^+$ , m/z) : 245.3 [M+H]<sup>+</sup>。

[0722] 步骤2:2- (2,3-二甲基丁-2-基)丙二酸:

[0723] 将2- (2,3-二甲基丁-2-基)丙二酸二乙酯乙酰胺(2.4g, 10.0mmol)及氢氧化锂水合物(2.1g, 50.0mmol)于DMSO(50mL)及水(10mL)中的混合物加热到98℃且保持20小时。冷却混合物, 通过HCl(1mol/L)酸化, 且分配于EtOAc(30mL)与水(30mL)之间。分离有机相, 用水(50mL×2)及盐水(50mL)洗涤, 干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤且在真空中浓缩, 得到呈黄色油状物的2- (2,3-二甲基丁-2-基)丙二酸(1.8g, 10.0mmol, 95%)。ESI-MS ( $\text{EI}^+$ , m/z) : 212.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0724] 步骤3:3,3,4-三甲基戊酸:

[0725] 将2- (2,3-二甲基丁-2-基)丙二酸(1.8g, 10.0mmol)于DMSO(30mL)中的溶液加热到120℃且保持12小时。冷却混合物, 且分配于EtOAc(50mL)与水(60mL)之间。分离有机相, 用水(60mL×2)及盐水(60mL)洗涤, 干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤且在真空中浓缩, 得到呈黄色油状物

的3,3,4-三甲基戊酸(1.4g,10.0mmol,95%)。ESI-MS (EI<sup>-</sup>,m/z) : 143.2 [M-H]<sup>+</sup>。

[0726] 步骤4:N-甲氧基-N,3,3,4-四甲基戊酰胺:

[0727] 在20℃下,向3,3,4-三甲基戊酸(1.4g,10.0mmol)于30mL DMF中的溶液中添加N,0-二甲基羟胺盐酸盐(1.2g,12.0mmol),继而为DIEA(3.8g,30.0mmol)。随后添加HATU(5.8g,15.0mmol)。在搅拌下将混合物加热到25℃且保持18小时。反应混合物用水,继而甲基叔丁基醚(50mL×2)淬灭。各相分离,有机层用盐水(80mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且在真空中浓缩,得到呈褐色油状物的N-甲氧基-N,3,3,4-四甲基戊酰胺(1.5g,90%)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>,m/z) : 188.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0728] 步骤4:3,3,4-三甲基戊醛:

[0729] 在0℃下,向N-甲氧基-N,3,3,4-四甲基戊酰胺(1.9g,0.01mol)于30mL THF中的溶液中添加LiAlH<sub>4</sub>(1g,0.03mol)。在0℃下搅拌混合物1小时。反应混合物用水,继而甲基叔丁基醚(50mL×2)淬灭。各相分离,有机层用盐水(80mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥且过滤。滤液含有直接用于下一步骤中的呈无色溶液的3,3,4-三甲基戊醛(1.3g,95%)。

[0730] 步骤5:2-(苯甲基氨基)-4,4,5-三甲基己腈:

[0731] 在冰浴下,向上述3,3,4-三甲基戊醛于甲基叔丁基醚(120mL)中的溶液中添加苯甲基胺(1.6mL)、AcOH(1.0mL)及随后的TMSCN(1.8mL)。使混合物升温到25℃且搅拌隔夜。溶液用水(60mL)稀释且用EtOAc(30mL)萃取,有机相用水(50mL×2)及盐水(50mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤且在真空中浓缩,得到用于下一步骤的呈褐色油状物的2-(苯甲基氨基)-4,4,5-三甲基己腈(2g,粗物质)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>,m/z) : 245.4 [M+H]<sup>+</sup>。

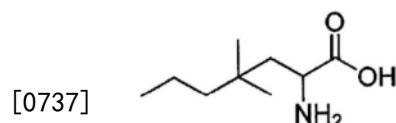
[0732] 步骤6:2-(苯甲基氨基)-4,4,5-三甲基己酸:

[0733] 将2-(苯甲基氨基)-4,4,5-三甲基己腈(2g,粗物质)于浓HCl(60mL)及AcOH(10mL)中的溶液加热到95℃持续18小时。使溶液冷却到15℃,用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液将pH调节到3至4,过滤混合物且干燥,得到呈白色固体的2-(苯甲基氨基)-4,4,5-三甲基己酸(0.6g,2.3mmol,30%,3个步骤)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>,m/z) : 264.4 [M+H]<sup>+</sup>。

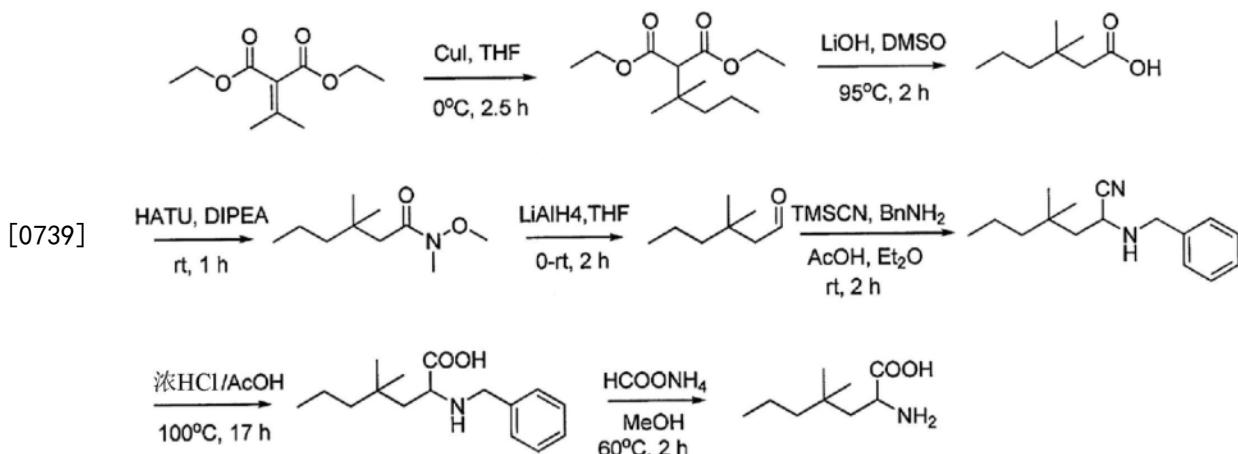
[0734] 2-氨基-4,4,5-三甲基己酸[I-176]:

[0735] 在室温下,向2-(苯甲基氨基)-4,4,5-三甲基己酸(78mg,0.3mmol)于8mL MeOH中的溶液中添加HCOONH<sub>4</sub>(0.13g,2.0mmol)及Pd/C(30mg)。在60℃下搅拌混合物2小时。过滤且浓缩反应混合物,得到粗产物,其通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的2-氨基-6,6,6-三氟-4-甲基己酸[I-176](40mg,90%);ESI-MS (EI<sup>+</sup>,m/z) : 174.3 [M+H]<sup>+</sup>;<sup>1</sup>H NMR (500MHz, MeOD) δ 3.56 (dd,J=7.2,4.9Hz,1H), 2.12 (dd,J=14.7,4.9Hz,1H), 1.66-1.51 (m,2H), 0.97 (d,J=14.9Hz,6H), 0.92 (dd,J=6.8,3.6Hz,6H)。

[0736] 实例178:2-氨基-4,4-二甲基庚酸[I-178]



[0738] 合成流程:

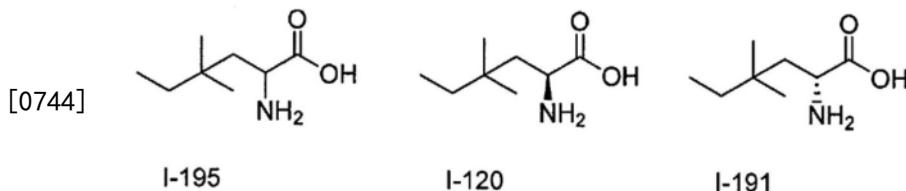


[0740] 程序及特征：

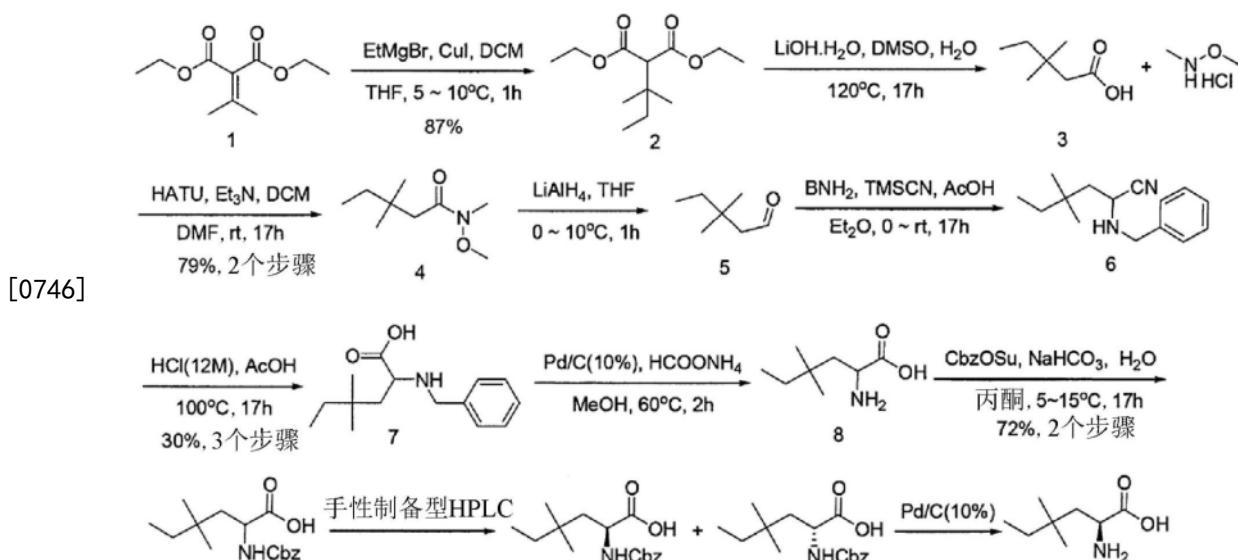
[0741] 程序与实例176中所使用相同

[0742] 2-氨基-4,4-二甲基庚酸[I-178]:<sup>1</sup>H NMR (500MHz, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 3.77 (t, J=6Hz, 1H), 2.09-2.05 (m, 1H), 1.6-1.56 (m, 1H), 1.37-1.26 (m, 4H), 1.01-0.92 (m, 9H)。

[0743] 实例195:2-氨基-4,4-二甲基己酸[I-195],(S)-2-氨基-4,4-二甲基己酸[I-120],(R)-2-氨基-4,4-二甲基己酸[I-191].



[0745] 合成流程:



[0747] 程序及特征：

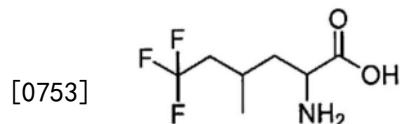
[0748] 程序与实例176中所使用相同

[0749] 2-氨基-4,4-二甲基庚酸[I-195]:<sup>1</sup>H NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.87 (t, J=6.0Hz, 1H), 1.93 (dd, J=15.0Hz, J=5.5Hz, 1H), 1.57 (dd, J=15.0Hz, J=6.5Hz, 1H), 1.22-1.26 (m, 2H), 0.86 (d, (dd, J=2.0Hz, 6H), 0.76 (t, J=7.5Hz, 3H)。

[0750] (S)-2-氨基-4,4-二甲基己酸[I-120]:<sup>1</sup>H NMR (500MHz, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 3.43 (dd, J=7.0Hz, J=5.0Hz, 1H), 1.95 (dd, J=15.0Hz, J=5.0Hz, 1H), 1.42 (dd, J=15.0Hz, J=7.0Hz, 1H), 1.23-1.28 (m, 2H), 0.87 (d, (dd, J=4.5Hz, 6H), 0.80 (t, J=7.5Hz, 3H)。

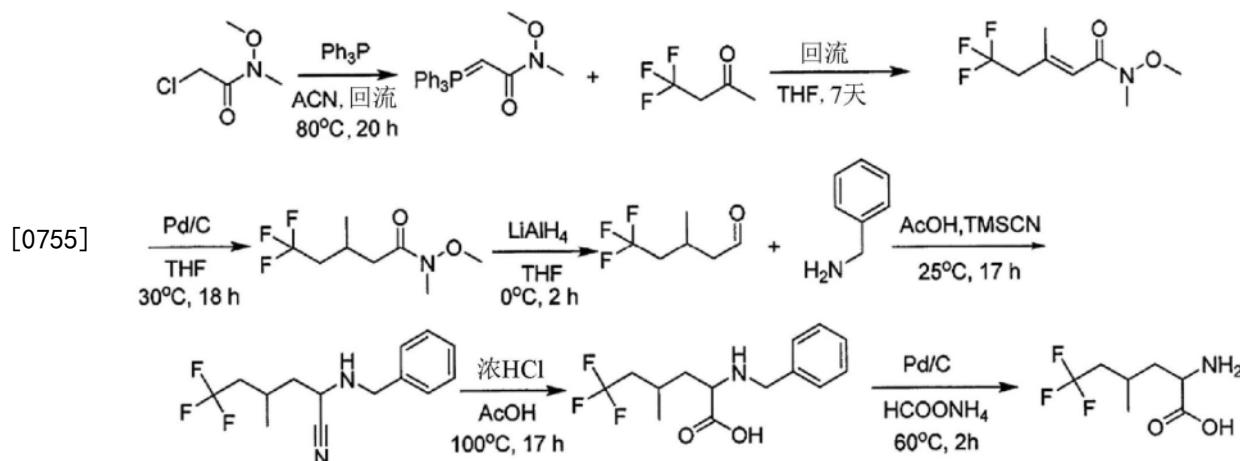
[0751] (R)-2-氨基-4,4-二甲基己酸[I-191]:<sup>1</sup>H NMR (500MHz, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 3.43 (dd, J=7.0Hz, J=5.0Hz, 1H), 1.95 (dd, J=15.0Hz, J=5.0Hz, 1H), 1.42 (dd, J=15.0Hz, J=7.0Hz, 1H), 1.23-1.28 (m, 2H), 0.87 (d, (dd, J=4.5Hz, 6H), 0.80 (t, J=7.5Hz, 3H)。

[0752] 实例177:2-氨基-6,6,6-三氟-4-甲基己酸[I-177]:



I-177

[0754] 合成流程:



[0756] 程序及特征:

[0757] 步骤1:N-甲氧基-N-甲基-2-(联三苯-15-亚磷烷基)乙酰胺:

[0758] 将(2-氯-N-甲氧基-N-甲基乙酰胺(13.7g, 0.1mol)及三苯基膦(26.2g, 0.1mol)于乙腈(200mL)中的混合物加热到80℃且保持20小时。冷却且浓缩混合物以在低于40℃下去除溶剂。使残余物溶解于二氯甲烷(200mL), 继而为2N KOH(100mL)中。在20℃下搅拌所得混合物1小时。各相分离, 有机层用盐水(200mL×3)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥且过滤。在真空中浓缩滤液, 得到呈黄色固体的N-甲氧基-N-甲基-2-(联三苯-15-亚磷烷基)乙酰胺(36g, 0.1mol, 98%)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z): 364.4 [M+H]<sup>+</sup>。

[0759] 步骤2: (E)-5,5,5-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基戊-2-烯酰胺:

[0760] 将N-甲氧基-N-甲基-2-(联三苯-15-亚磷烷基)乙酰胺(36.3g, 0.1mol)及4,4,4-三氟丁-2-酮(25.2g, 0.2mol)于四氢呋喃(500mL)中的混合物加热到70℃且保持7天。冷却且浓缩混合物以在低于40℃下在真空中去除溶剂。通过用0到35%乙酸乙酯/石油醚洗脱的硅胶管柱(200g, 200到300目, UV 254nm)纯化残余物, 得到呈黄色油状物的(E)-5,5,5-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基戊-2-烯酰胺(6g, 0.03mol, 28%)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z): 212.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0761] 步骤3:5,5,5-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基戊酰胺:

[0762] 在30℃下搅拌(E)-5,5,5-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基戊-2-烯酰胺(6g, 0.03mol)及Pd/C(10%, 400mg)于THF(100mL)中的混合物18小时。过滤混合物, 且在真空中将滤液浓

缩到干燥,得到呈黄色油状物的5,5,5-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基戊酰胺(6g,0.03mol,98%)。ESI-MS(EI+,m/z):214.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0763] 步骤4:5,5,5-三氟-3-甲基戊醛:

[0764] 在0℃下,向5,5,5-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基戊酰胺(6g,0.03mol)于100mL THF中的溶液中添加LiAlH<sub>4</sub>(1g,0.03mol)。在0℃下搅拌混合物1小时。反应混合物用水,继而甲基叔丁基醚(60mL×2)淬灭。各相分离,有机层用盐水(80mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥且过滤。含有滤液,得到直接用于下一步骤中的呈无色溶液的5,5,5-三氟-3-甲基戊醛(4.5g,95%)。

[0765] 步骤5:2-(苯甲基氨基)-6,6,6-三氟-4-甲基己腈:

[0766] 在冰浴下向上述5,5,5-三氟-3-甲基戊醛于甲基叔丁基醚(200mL)中的溶液中添加苯甲基胺(5mL)、AcOH(4.0mL)及随后TMSCN(5mL)。使混合物升温20℃且搅拌隔夜。溶液用水(100mL)稀释且用EtOAc(100mL)萃取,有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤且在真空中浓缩,得到用于下一步骤的呈褐色油状物的2-(苯甲基氨基)-6,6,6-三氟-4-甲基己腈(6g,粗物质)。ESI-MS(EI+,m/z):271.3[M+H]<sup>+</sup>。

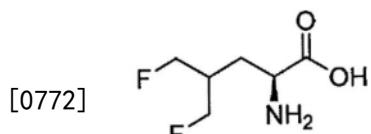
[0767] 步骤6:2-(苯甲基氨基)-6,6,6-三氟-4-甲基己酸:

[0768] 将2-(苯甲基氨基)-6,6,6-三氟-4-甲基己腈(3g,粗物质)于浓HCl(100mL)及AcOH(20mL)中的溶液加热到100℃持续17小时。使溶液冷却到15℃,用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液将pH调节到3至4,过滤混合物且干燥,得到呈白色固体的2-(苯甲基氨基)-6,6,6-三氟-4-甲基己酸(1g,13.4mmol,33%,3个步骤)。ESI-MS(EI+,m/z):290.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0769] 2-氨基-6,6,6-三氟-4-甲基己酸[I-177]:

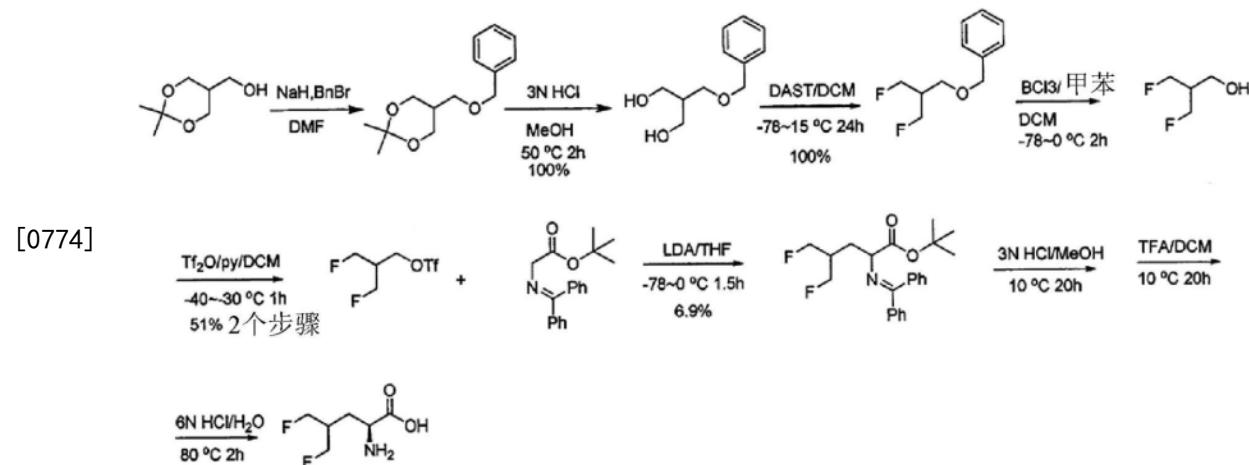
[0770] 在室温下向2-(苯甲基氨基)-6,6,6-三氟-4-甲基己酸(88mg,0.31mmol)于8mL MeOH中的溶液中添加HCOONH<sub>4</sub>(0.13g,2.0mmol)及Pd/C(30mg)。在60℃下搅拌混合物2小时。过滤且浓缩反应混合物,得到粗产物,其通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的2-氨基-6,6,6-三氟-4-甲基己酸[I-177](45mg,84%);ESI-MS(EI+,m/z):200.2[M+H]<sup>+</sup>;1H NMR(500MHz,DMSO)δ3.15(d,J=5.7Hz,1H),2.39-2.24(m,1H),2.19-1.96(m,2H),1.82-1.66(m,1H),1.63-1.35(m,1H),0.98(dd,J=16.5,6.2Hz,3H)。

[0771] 实例179:(S)-2-氨基-5-氟-4-(氟甲基)戊酸[I-179]



I-179

[0773] 合成流程:



[0775] 程序及特征：

[0776] 步骤1：5-(苯甲氧基甲基)-2,2-二甲基-1,3-二恶烷：

[0777] 在0℃下向(2,2-二甲基-1,3-二恶烷-5-基)甲醇(0.29g, 2.0mmol)于DMF(10mL)中的溶液中添加NaH(60%于油中, 0.12g, 3.0mmol)。在0℃下搅拌混合物0.2小时。随后添加(溴甲基)苯(0.45g, 2.6mmol)。使混合物升温到10℃持续3小时且保持18小时。反应混合物用冰水, 继而EtOAc(60mL)淬灭。各相分离, 有机层用盐水(60mL×3)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥且过滤。浓缩滤液且通过硅胶管柱(20g, UV 254nm, 用10%到50% EtOAc/PE洗脱)纯化残余物, 得到呈无色油状物的5-(苯甲氧基甲基)-2,2-二甲基-1,3-二恶烷(1), (0.46g, 0.2mol, 95%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 237.3 [M+H]<sup>+</sup>。

[0778] 步骤2：2-(苯甲氧基甲基)丙烷-1,3-二醇：

[0779] 向5-(苯甲氧基甲基)-2,2-二甲基-1,3-二恶烷(930mg, 3.94mmol)于MeOH(20mL)中的溶液中添加3N HCl水溶液(2mL)。在50℃下搅拌混合物2小时。浓缩反应混合物且用DCM(20mL)稀释, 通过盐水(15mL)洗涤, 干燥且蒸发, 得到粗无色油状物(780mg, 100%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 197 [M+H]<sup>+</sup>。

[0780] 步骤3：((3-氟-2-(氟甲基)丙氧基)甲基)苯：

[0781] 在-78℃下, 向2-(苯甲氧基甲基)丙烷-1,3-二醇(780mg, 3.94mmol)于DCM(20mL)中的预先冷却的溶液中逐滴添加DAST(1.9g, 11.8mmol)。在20℃下搅拌混合物24小时。在-78℃下反应混合物通过NaHCO<sub>3</sub>饱和水溶液(10mL)淬灭。分离DCM相且用盐水洗涤, 通过MgSO<sub>4</sub>干燥, 经由短硅胶垫过滤, 且随后浓缩, 得到粗无色油状物(800mg, 100%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 223 [M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.37-7.28(m, 5H), 4.65-4.57(m, 2H), 4.55-4.48(m, 4H), 3.57(d, J=6.2Hz, 2H), 2.50-2.34(m, 1H)。

[0782] 步骤4：3-氟-2-(氟甲基)丙-1-醇：

[0783] 在-78℃下, 向((3-氟-2-(氟甲基)丙氧基)甲基)苯(800mg, 3.94mmol)于DCM(20mL)中的预先冷却的溶液中逐滴添加BCl<sub>3</sub>/甲苯(1M, 6mL, 6.0mmol)。在-78到0℃下搅拌混合物2小时。在-78℃下通过H<sub>2</sub>O(0.5mL)淬灭反应混合物。DCM相通过MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤且溶液(约20mL)直接用于下一步骤中。

[0784] 步骤5：三氟甲烷磺酸3-氟-2-(氟甲基)丙酯：

[0785] 在-40℃下, 向3-氟-2-(氟甲基)丙-1-醇的预先冷却的溶液(8mL来自步骤4的溶液, 1.6mmol)中逐滴添加py(380mg, 4.8mmol), 随后Tf<sub>2</sub>O(1.36g, 4.8mmol)。在-30℃下搅拌

混合物1小时。在-40℃下通过盐水(20mL)淬灭反应混合物。分离DCM相且通过MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,且随后浓缩,得到直接用于下一步骤的粗褐色油状物(200mg,51%)。

[0786] 步骤6:2-(二苯基亚甲基氨基)-5-氟-4-(氟甲基)戊酸叔丁酯:

[0787] 在25分钟内在-78℃下,向2-(二苯基亚甲基氨基)乙酸叔丁酯(944mg,3.2mmol)于THF(20mL)中的预先冷却的溶液中添加LDA(2.5M于THF/甲苯/己烷中,1.28mL,3.2mmol)。在所述温度下搅拌混合物10分钟。在-78℃下逐滴添加三氟甲烷磺酸3-氟-2-(氟甲基)丙酯(200mg,0.82mmol)于THF(2mL)中的溶液。将反应混合物正好放置于冷却浴上且再搅拌1小时。反应混合物通过NH<sub>4</sub>Cl饱和水溶液(20mL)淬灭,用MTBE(30mL×2)萃取,用H<sub>2</sub>O、盐水(各自50mL)洗涤,干燥且浓缩得到粗物质,其通过色谱(硅胶,PE到5% EA/PE)纯化两次,得到呈白色固体的所需产物(22mg,6.9%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):388[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO)δ7.56-7.45(m,6H),7.41(t,J=7.4Hz,2H),7.18(d,J=6.3Hz,2H),4.50-4.17(m,4H),3.91(dd,J=7.7,5.5Hz,1H),2.11-1.97(m,1H),1.87(dd,J=12.7,5.5Hz,2H),1.38(s,9H)。

[0788] 步骤7:(S)-2-氨基-5-氟-4-(氟甲基)戊酸盐酸盐:

[0789] 在室温下,搅拌2-(二苯基亚甲基氨基)-5-氟-4-(氟甲基)戊酸叔丁酯(55mg,0.14mmol)于3N HCl/MeOH(2mL)中的溶液20小时。浓缩反应混合物且通过Et<sub>2</sub>O洗涤,得到粗固体,使其溶解于DCM/TFA(1:1,2mL)中且在室温下搅拌20小时。蒸发反应混合物且通过Et<sub>2</sub>O洗涤,得到粗固体,使其溶解于6N HCl(1mL)中且在80℃下搅拌2小时。蒸发且冻干反应混合物,得到粗产物,其通过RP-拜泰齐,使用3mM HCl/H<sub>2</sub>O纯化,得到呈白色固体的所需产物(8.3mg,29%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):168[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO)δ7.85(bs,3H),4.48(dd,J=48.3,14.2Hz,4H),3.46-3.36(m,1H),2.47-2.26(m,1H),1.78(dt,J=14.3,7.3Hz,1H),1.63-1.53(m,1H)。

[0790] 实例187:(S)-3-氨基-5,5-二甲基-二氢呋喃-2(3H)-酮[I-187]:



I-187

[0792] 合成流程:

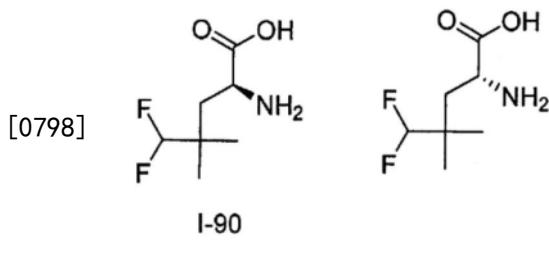


[0794] 程序及特征:

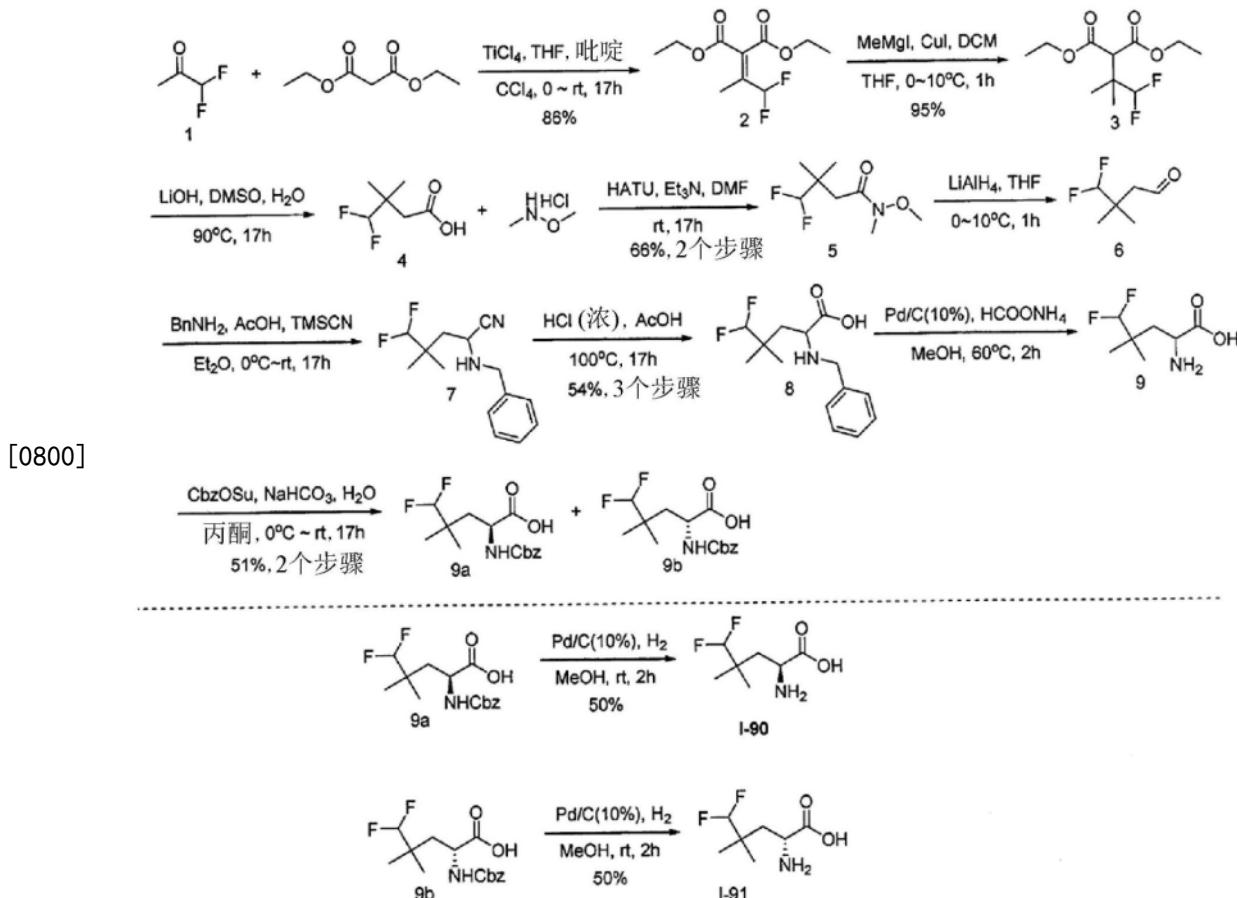
[0795] 步骤1:(S)-3-氨基-5,5-二甲基-二氢呋喃-2(3H)-酮[I-187]:

[0796] 向含有(S)-2-氨基-4-甲基戊-4-烯酸(100mg)的圆底烧瓶中添加浓HCl(1mL)及SOCl<sub>2</sub>(0.2mL)。在室温下搅拌混合物4小时。浓缩反应混合物且通过Et<sub>2</sub>O洗涤,得到粗固体,其通过RP-拜泰齐使用0.025% TFA/H<sub>2</sub>O/MeCN纯化,得到呈白色固体的所需产物(20.2mg,11.4%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):130.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO)δ8.80(bs,3H),4.58(dd,J=11.2,9.3Hz,1H),2.53-2.48(m,1H),2.13(t,J=11.7Hz,1H),1.45(s,3H),1.40(s,3H)。

[0797] 实例90:合成(S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸[I-90]:



[0799] 合成流程:



[0801] 程序及特征:

[0802] 步骤1:2-(1,1,1-三氟丙-2-亚基)丙二酸二乙酯:

[0803] 在冰浴下经20分钟将 $TiCl_4$  (65.8mL, 600mmol)逐滴添加到THF (1L)中, 添加 $CCl_4$  (30mL)。向混合物中添加丙二酸二乙酯 (48.0g, 300mmol) 及1,1-二氟丙-2-酮 (56.4g, 600mmol)。使混合物升温到室温且搅拌隔夜。在冰浴下经20分钟逐滴添加吡啶 (200mL), 将反应混合物倒入水 (2L) 中, 过滤, 且滤液用EtOAc (500mL×2) 萃取, 有机相用水 (600mL)、1M HCl (600mL×2)、水 (600mL)、饱和 $NaHCO_3$  (600mL) 及盐水 (600mL) 洗涤, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ) , 过滤且在真空中浓缩且通过色谱 (二氧化硅, 0% 到 5% 的乙酸乙酯/石油醚) 纯化, 得到呈无色液体的2-(1,1-二氟丙-2-亚基)丙二酸二乙酯 (60.9g, 258mmol, 86%)。ESI-MS ( $EI^+$ ,  $m/z$ ): 237.0 [ $M+H$ ]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz,  $CDCl_3$ ): δ 6.97 (t,  $J=55.5Hz$ , 1H), 4.25-4.33 (m, 4H), 2.03 (s, 3H), 1.29-1.34 (m, 6H)。

[0804] 步骤2:2-(1,1-二氟-2-甲基丙-2-基)丙二酸二乙酯:

[0805] 在-20℃下经1小时向2-(1,1-二氟丙-2-亚基)丙二酸二乙酯 (10.0g, 42.3mmol) 及

CuI (12.1g, 63.5mmol) 于 DCM (100mL) 及 THF (25mL) 中的混合物中逐滴添加 MeMgI (42.3mL, 130.5mmol), 将溶液倒入冰水 (200mL) 中且经 NH<sub>4</sub>Cl 饱和溶液 (100mL) 处理, 搅拌混合物 30 分钟且过滤, 滤液用 DCM (100mL) 萃取, 有机相用水 (100mL × 2) 及盐水 (100mL) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤且在真空中浓缩, 得到呈棕色液体的 2-(1,1-二氟-2-甲基丙-2-基)丙二酸二乙酯 (10.1g, 40.2mmol, 95%), 其用于下一步骤。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 253.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 86.05 (t, J=57.5Hz, 1H), 4.17-4.23 (m, 4H), 3.49 (s, 1H), 1.22-1.28 (m, 6H), 1.20 (s, 6H)。

[0806] 步骤3: 4,4-二氟-3,3-二甲基丁酸:

[0807] 将 2-(1,1-二氟-2-甲基丙-2-基)丙二酸二乙酯 (6.1g, 24.2mmol) 及 LiOH·H<sub>2</sub>O (5.1g, 121mmol) 于 DMSO (50mL) 及 H<sub>2</sub>O (0.5mL) 中的混合物加热到 90℃ 持续 17 小时。混合物用水 (200mL) 稀释, 用 DCM (100mL) 萃取, 水相用 6M HCl 溶液将 pH 调节到 3 至 4, 用 DCM (100mL × 2) 萃取, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤且在真空中浓缩, 得到呈棕色液体的 4,4-二氟-3,3-二甲基丁酸 (3.6g, 粗物质)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 151.1 [M-H]<sup>-</sup>。

[0808] 步骤4: 4,4-二氟-N-甲氧基-N,3,3-三甲基丁酰胺:

[0809] 在室温下搅拌 17 小时之后, 向 4,4-二氟-3,3-二甲基丁酸 (3.6g, 粗物质)、N,N-二甲基羟胺盐酸盐 (4.6g, 47.4mmol) 及 HATU (10.8g, 28.4mmol) 于 DMF (50mL) 中的溶液中添加 Et<sub>3</sub>N (7.18g, 71.1mmol)。过滤混合物, 且滤液用水 (200mL) 稀释, 用 Et<sub>2</sub>O (100mL × 2) 萃取, 用水 (100mL)、1M HCl (100mL) 及盐水 (100mL) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤且在真空中浓缩, 得到呈棕色液体的 4,4-二氟-N-甲氧基-N,3,3-三甲基丁酰胺 (3.1g, 15.9mmol, 66%, 2 个步骤)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 196.0 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 85.95 (t, J=57.5Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 2.51 (s, 2H), 1.12 (s, 6H)。

[0810] 步骤5: 4,4-二氟-3,3-二甲基丁醛:

[0811] 在冰浴下, 向 4,4-二氟-N-甲氧基-N,3,3-三甲基丁酰胺 (3.1g, 15.9mmol) 于 THF (80mL) 中的溶液中逐滴添加 LiAlH<sub>4</sub> (24mL, 24mmol)。在 1 小时之后, 混合物用柠檬酸溶液 (100mL) 泡灭, 溶液用 Et<sub>2</sub>O (100mL × 2) 萃取, 有机相用盐水 (100mL) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 且溶液用于下一步骤。

[0812] 步骤6: 2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊腈:

[0813] 在冰浴下, 向 4,4-二氟-3,3-二甲基丁醛于 Et<sub>2</sub>O (200mL) 中的上述溶液中添加 苯甲基胺 (3mL)、AcOH (3mL) 及随后 TMSCN (3mL), 在 0 到室温下搅拌溶液 17 小时, 且随后用 EtOAc (100mL) 稀释。溶液用 H<sub>2</sub>O (100mL × 2) 洗涤, 且随后浓缩, 得到呈棕色液体的 2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊腈 (3.2g, 粗物质)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 253.0 [M+H]<sup>+</sup>。

[0814] 步骤7: 2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸:

[0815] 将 2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊腈 (1.8g, 粗物质) 于浓 HCl (50mL) 及 AcOH (10mL) 中的溶液加热到 100℃ 持续 64 小时。浓缩混合物以去除溶剂, 用 1M NaOH 溶液将 pH 调节到 12, 用 PE (100mL) 萃取, 水相用 6M HCl 将 pH 调节到 5 至 6。形成白色固体, 过滤, 且滤饼用水 (50mL) 洗涤, 真空干燥, 得到呈白色固体的 2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸 (1.3g, 4.80mmol, 54%, 3 个步骤)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 272.0

[0816] 步骤8: 2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸:

[0817] 将 2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸 (1.3g, 4.80mmol)、HC<sub>2</sub>ONH<sub>4</sub>

(1.51g, 24mmol) 及Pd/C(10%, 200mg) 于MeOH(50mL) 中的混合物加热到60℃持续1小时。过滤混合物, 且浓缩滤液, 得到呈白色固体的2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸(1.0g, 粗物质)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 182.0

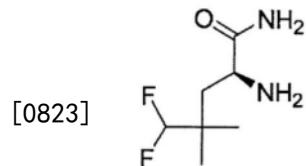
[0818] 步骤9: 2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸

[0819] 在冰浴下, 向2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸(1.0g, 粗物质) 及NaHCO<sub>3</sub>(1.27g, 14.4mmol) 于丙酮(30mL) 及H<sub>2</sub>O(30mL) 中的溶液中添加CbzOSu(2.39g, 9.6mmol)。在搅拌17小时之后, 混合物用1M HCl溶液将pH调节到3至4, 且溶液用EtOAc(50mL×2) 萃取, 用盐水(50mL) 洗涤, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) , 过滤且在真空中浓缩, 通过反相硅胶色谱, 且随后手性制备型HPLC[管柱, CC4 4.6×250mm 5μm; 溶剂, MeOH(0.2% 甲醇氨)]纯化粗产物, 得到呈两种无色油状物的(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸(400mg, 1.27mmol, 26%, 2个步骤) 及(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸(380mg, 1.21mmol, 25%, 2个步骤)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 316.0

[0820] 步骤10: (S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸:

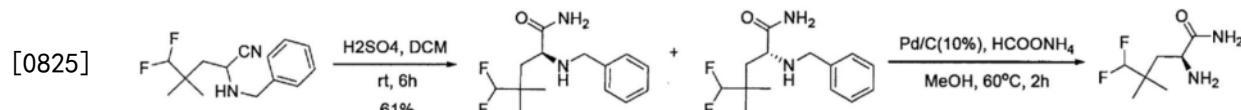
[0821] 在室温下, 在氢气下搅拌(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸(400mg, 1.27mmol) 及Pd/C(10%, 50mg) 于MeOH(30mL) 中的溶液中2小时, 过滤混合物且在真空中浓缩且通过反相硅胶色谱纯化, 得到(S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸(115.7mg, 0.64mmol, 50%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 182.0 <sup>1</sup>H-NMR(500MHz, MeOD-d4) : δ 85.60(t, J = 56.5Hz, 1H), 3.97(t, J = 6.0Hz, 1H), 2.07(dd, J = 15.5Hz, J = 5.5Hz, 1H), 1.77(dd, J = 15.5Hz, J = 6.5Hz, 1H), 0.96(d, J = 9.5Hz, 6H)。

[0822] 实例88: 合成(S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸[I-88]:



I-88

[0824] 合成流程:



[0826] 程序及特征:

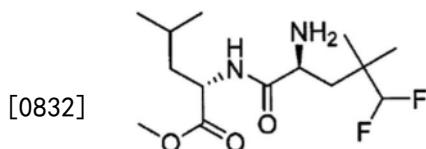
[0827] 步骤1: (S)-2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰胺:

[0828] 在冰浴下, 历经5分钟, 向2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊腈(1.2g, 4.76mmol) 于DCM(20mL) 中的溶液中逐滴添加浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(10mL) , 使混合物升温到室温且搅拌6小时。将混合物倒入冰水(100mL) 中, 溶液用10% NaOH溶液将pH调节到8至9, 且随后用EtOAc(100mL×2) 萃取, 有机相用水(100mL) 及盐水(100mL) 洗涤, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) , 过滤且在真空中浓缩且通过色谱(0% 到5% MeOH/DCM) , 且随后手性制备型HPLC[管柱, CC4 4.6×250mm 5μm; 溶剂, MeOH(0.2% 甲醇氨)]纯化, 得到呈两种无色液体的(S)-2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰胺(400mg, 1.48mmol, 31%) 及(R)-2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰胺(380mg, 1.41mmol, 30%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 253.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0829] 步骤2: (S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰胺:

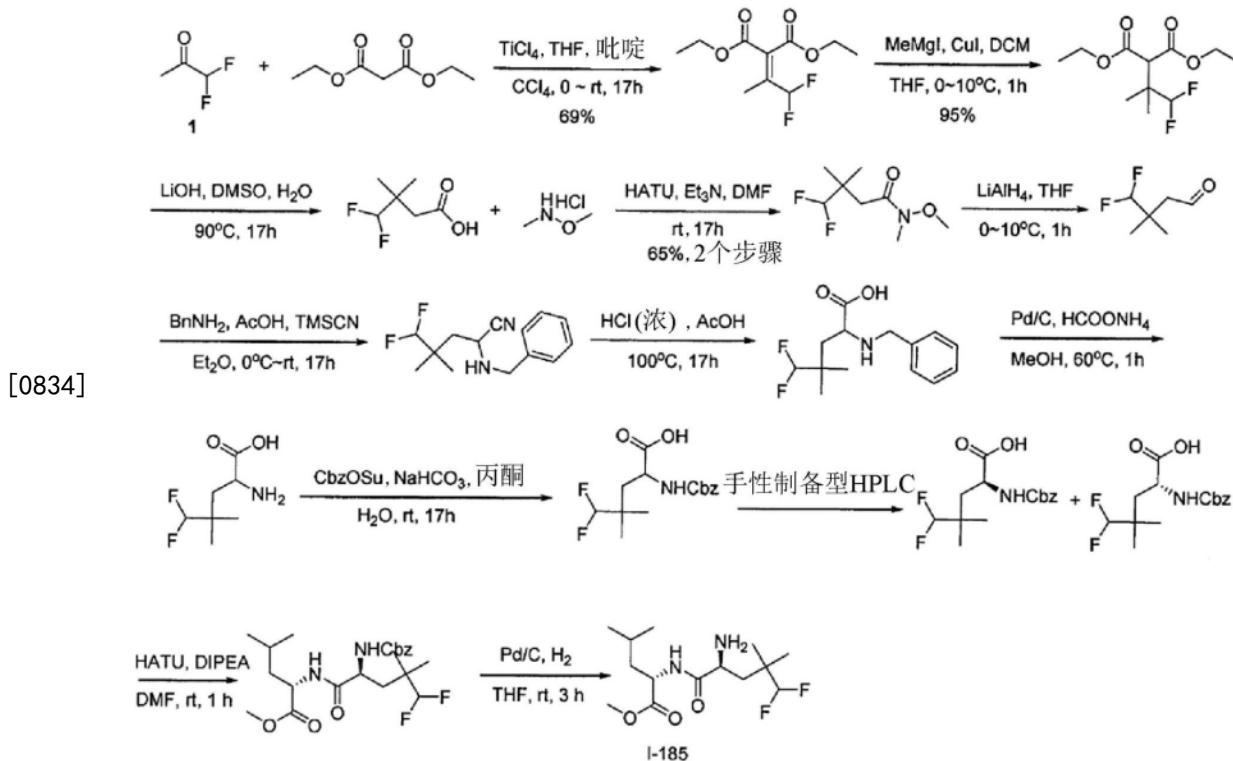
[0830] 将(S)-2-(苯甲基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰胺(200mg,0.74mmol)、 $\text{HCOONH}_4$ (233mg,3.7mmol)及Pd/C(10%,40mg)于MeOH(15mL)中的混合物加热到60℃持续1小时。过滤混合物,且浓缩滤液且通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的(S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰胺三氟乙酸(128mg,0.44mmol,59%)。ESI-MS( $\text{EI}^+$ , $m/z$ ):181.0 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz,MeOD-d4):85.66(t,J=56.5Hz,1H),3.95(dd,J=8.0Hz,J=5.0Hz,1H),2.14(dd,J=10.0Hz,J=8.0Hz,1H),1.83(dd,J=14.5Hz,J=5.5Hz,1H),1.12(d,J=15.0Hz,6H)。

[0831] 实例185:合成(S)-2-((S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯[I-185]:



I-185

[0833] 合成流程:



[0835] 程序及特征:

[0836] 2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸的程序与实例90相同

[0837] 步骤1:(S)-2-((S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯:

[0838] 在室温下,搅拌(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酸(150mg,0.476mmol)、HATU(199mg,0.524mmol)、(S)-2-氨基-4-甲基戊酸甲酯盐酸盐(104mg,0.571mmol)及DIPEA(123mg,0.952mmol)的溶液1小时,随后通过冰水(20mL)淬灭,用EA(2×

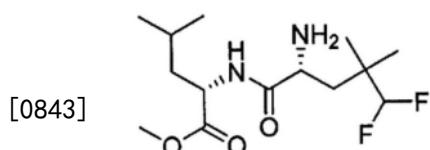
30mL)萃取,干燥,过滤并浓缩。通过反相硅胶色谱拜泰齐纯化粗物质以获得呈白色固体的(S)-2-((S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯(95mg,45%)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 443.0

[0839] 步骤2: (S)-2-((S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯:

[0840] 在室温下,搅拌(S)-2-((S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯(95mg,0.215mmol)及Pd/C(30mg)于THF(5mL)中的溶液2小时,随后过滤,浓缩。通过反相硅胶色谱拜泰齐纯化粗物质以获得呈白色固体的(S)-2-((S)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯(45mg,69%)。ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 309.0

[0841] <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, DMSO-d6) : 9.11 (d, J=7Hz, 1H), 8.41 (s, 3H), 5.81 (t, J=56.5Hz, 1H), 4.34-4.31 (m, 1H), 3.89-3.81 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 1.98-1.93 (m, 1H), 1.76-1.73 (m, 1H), 1.65-1.54 (m, 3H), 0.93-0.81 (m, 12H)。

[0842] 实例184:合成(S)-2-((R)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯[I-184]:



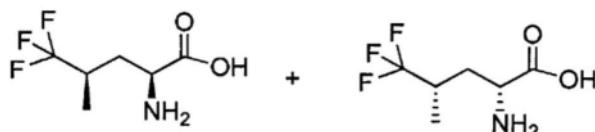
I-184

[0844] 程序与实例90、185相同。

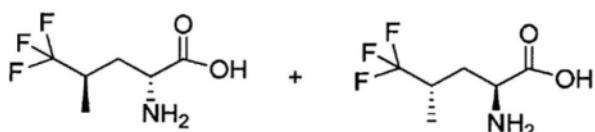
[0845] (S)-2-((R)-2-氨基-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯:ESI-MS (EI<sup>+</sup>, m/z) : 309.0

[0846] <sup>1</sup>H-NMR (500MHz, DMSO-d6) : 9.18 (d, J=7Hz, 1H), 8.38 (s, 3H), 5.79 (t, J=56.5Hz, 1H), 4.37-4.32 (m, 1H), 3.85-3.78 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 1.97-1.92 (m, 1H), 1.77-1.72 (m, 1H), 1.61-1.51 (m, 3H), 0.94-0.82 (m, 12H)。

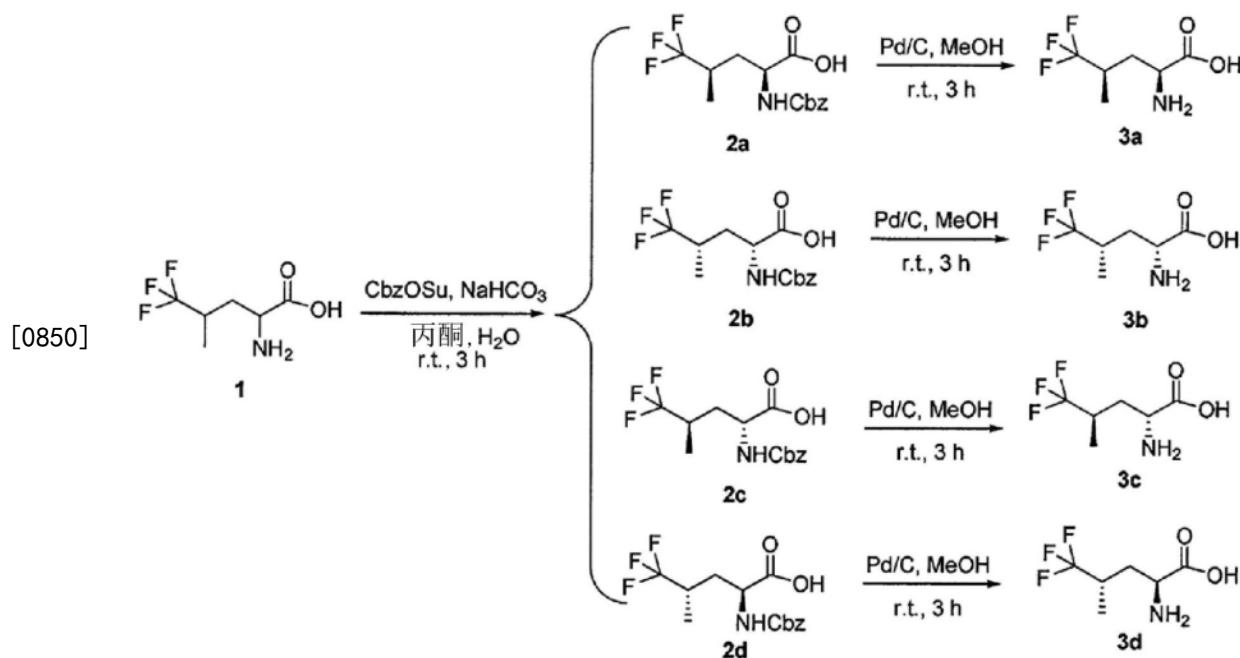
[0847] 实例145:合成(2S,4R)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸、(2R,4S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸、(2R,4R)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸及(2S,4S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸:[3d;I-145];[3c;I-146];[3a;I-167];[3b;I-250]



[0848]



[0849] 合成流程:



[0851] 程序及特征：

[0852] 步骤1：合成(2S,4R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸、(2R,4S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸、(2R,4R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸及(2S,4S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸：

[0853] 向2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(600mg,3.2mmol)于丙酮(10mL)及NaHCO<sub>3</sub>饱和水溶液(10mL)中的溶液中添加CbzOSu(970mg,3.9mmol)。在室温下搅拌混合物3小时。随后添加EtOAc(20mL)及H<sub>2</sub>O(20mL)，分离水溶液且进一步用EtOAc(2×20mL)萃取，合并萃取物且通过盐水(20mL)洗涤，通过无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤并浓缩，通过制备型HPLC纯化残余物，得到呈白色固体的2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(750mg)。通过手性HPLC纯化纯产物，得到四个异构体：(2S,4R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(150mg,15%)、(2R,4S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(40mg,3.9%)、(2R,4R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(50mg,4.9%)及(2S,4S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(80mg,7.8%)，其均为白色固体。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 342.0 [M+Na]<sup>+</sup>。

[0854] 步骤2-A：合成(2S,4R)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸：

[0855] 在室温下，搅拌(2S,4R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(150mg,0.47mmol)及Pd/C(75mg)于MeOH(15mL)中的溶液3小时。过滤且浓缩反应混合物，得到呈白色固体的(2S,4R)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(51.7mg,59%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 186.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, MeOD) : δ 3.64-3.60(m, 1H), 2.77-2.71(br, 1H), 2.24-2.18(m, 1H), 1.76-1.69(m, 1H), 1.25(d, J=7.0Hz, 3H)。

[0856] 步骤2-B：合成(2R,4S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸：

[0857] 在室温下，搅拌(2R,4S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(40mg,0.12mmol)及Pd/C(20mg)于MeOH(4mL)中的溶液3小时。过滤且浓缩反应混合物，得到呈白色固体的(2R,4S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(13.3mg,60%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 186.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, MeOD) : δ 3.51-3.47(m, 1H), 2.64-2.58(br, 1H), 2.12-2.06(m, 1H),

1.63-1.57 (m, 1H) , 1.13 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H)。

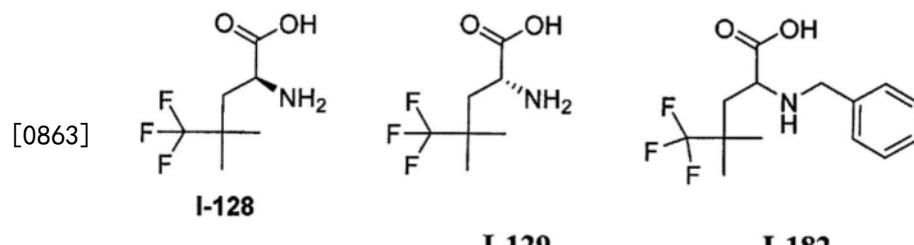
[0858] 步骤2-C:合成(2R,4R)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸:

[0859] 在室温下,搅拌(2R,4R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(50mg, 0.16mmol)及Pd/C(25mg)于MeOH(5mL)中的溶液3小时。过滤且浓缩反应混合物,得到呈白色固体的(2R,4R)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(18.0mg, 61%)。ESI-MS ( $\text{EI}^+$ , m/z) : 186.1 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (500MHz, MeOD) : 83.51-3.47 (m, 1H), 2.46-2.44 (br, 1H), 1.95-1.87 (m, 2H), 1.11 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H)。

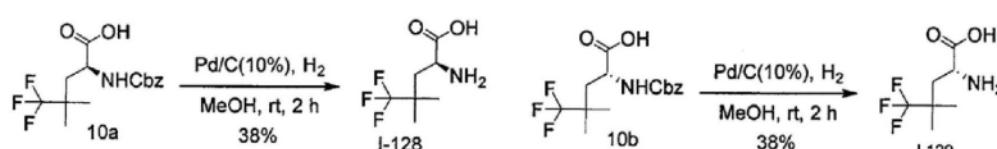
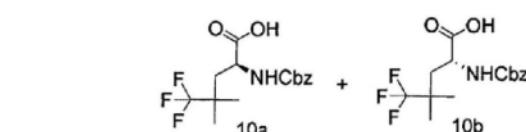
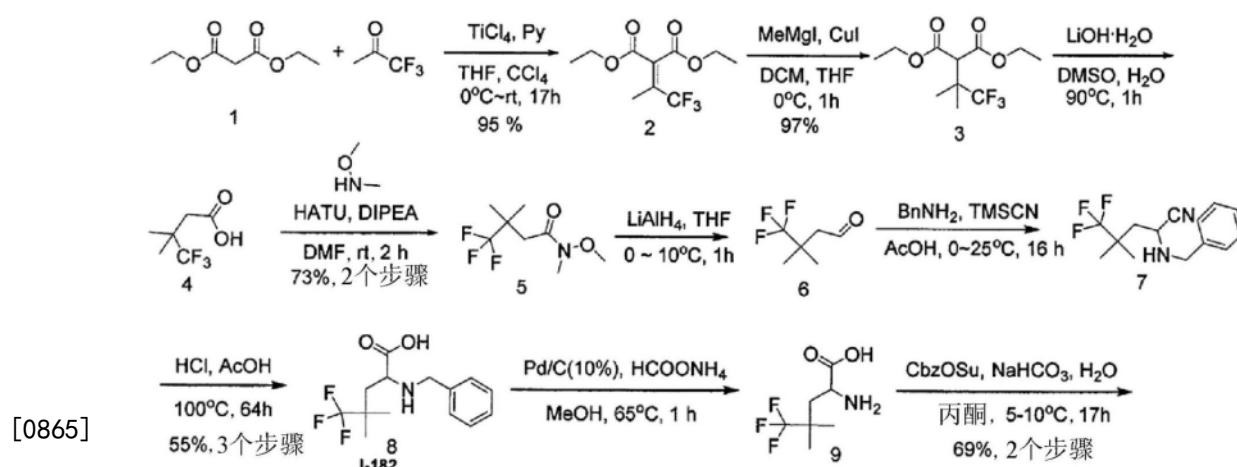
[0860] 步骤2-D:合成(2S,4S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸:

[0861] 在室温下,搅拌(2S,4S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(80mg, 0.25mmol)及Pd/C(40mg)于MeOH(8mL)中的溶液3小时。过滤且浓缩反应混合物,得到呈白色固体的(2S,4S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-甲基戊酸(38.1mg, 82%)。ESI-MS ( $\text{EI}^+$ , m/z) : 186.2 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (500MHz, MeOD) : 83.51-3.47 (m, 1H), 2.46-2.44 (br, 1H), 1.95-1.87 (m, 2H), 1.11 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H)。

[0862] 实例128: (S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酸(I-128):



[0864] 合成流程:

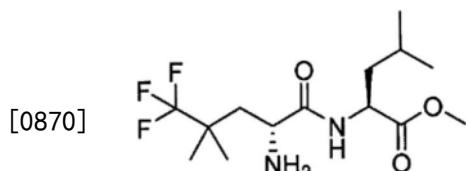


[0866] 程序及特征：

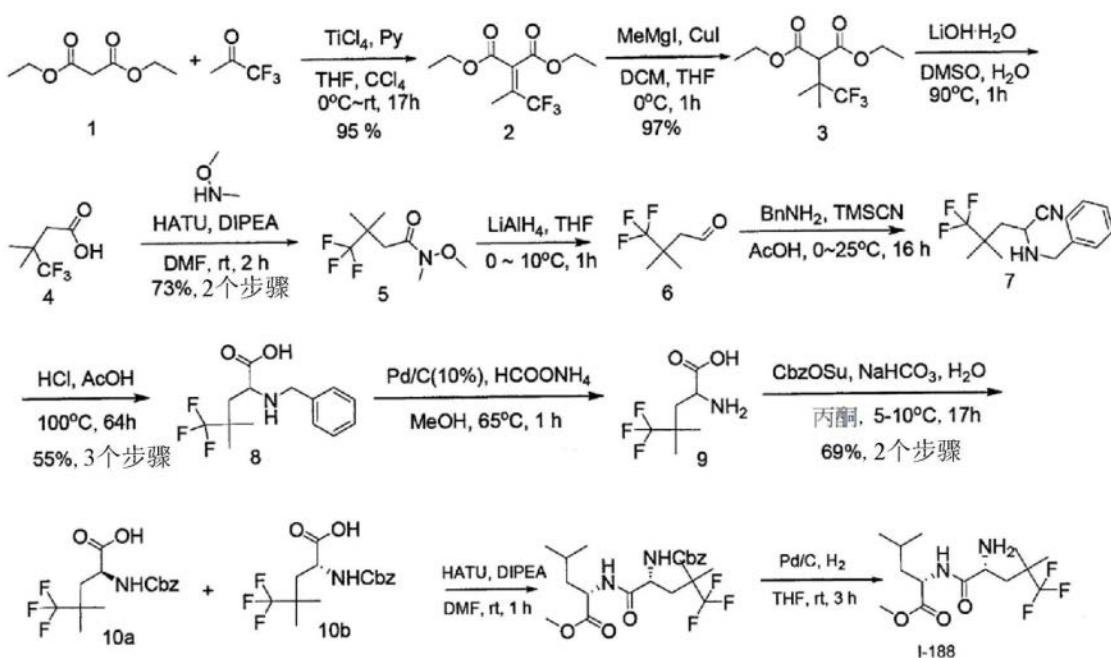
[0867] 所使用的程序与实例187中所使用相同。

[0868] (S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酸：ESI-MS ( $\text{EI}^+$ ,  $m/z$ ) : 200.1  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  3.94 (t,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 2.23 (dd,  $J=15.5\text{Hz}$ ,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 1.90 (dd,  $J=15.5\text{Hz}$ ,  $J=6.0\text{Hz}$ , 1H), 1.13 (d,  $J=8.5\text{Hz}$ , 6H)。

[0869] 实例188：(S)-2-((R)-2-氨基-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯[I-188]：



[0871] 合成流程：



[0873] 程序及特征：

[0874] 2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酸的程序与实例90相同

[0875] 步骤1：(S)-2-((R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯：

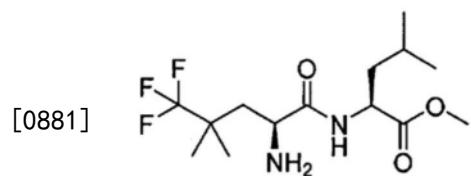
[0876] 在室温下搅拌(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酸(150mg, 0.45mmol)、HATU(188mg, 0.495mmol)、(S)-2-氨基-4-甲基戊酸甲酯盐酸盐(123mg, 0.675mmol)及DIPEA(175mg, 1.35mmol)的溶液1小时, 随后通过冰水(20mL)淬灭, 用EA(2×30mL)萃取, 干燥, 过滤并浓缩。通过反相硅胶色谱拜泰齐纯化粗物质以获得呈白色固体的(S)-2-((S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5-二氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯(120mg, 58%)。ESI-MS ( $\text{EI}^+$ ,  $m/z$ ) : 461.0

[0877] 步骤2：(S)-2-((R)-2-氨基-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯：

[0878] 在室温下搅拌(S)-2-((S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯(120mg,0.26mmol)及Pd/C(30mg)于THF(10mL)中的溶液2小时,随后过滤,浓缩。通过反相硅胶色谱拜泰齐纯化粗物质以获得呈白色固体的(S)-2-((S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯(49mg,57%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):326.0

[0879] <sup>1</sup>H-NMR(500MHz,MeOD-d4):4.47(t,J=7.5Hz,1H),3.99-3.97(m,1H),3.77(s,3H),2.33-2.28(m,1H),1.95-1.91(m,1H),1.69-1.68(m,3H),1.24-1.17(m,6H),1.00-0.94(m,6H)。

[0880] 实例189:(S)-2-((S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯[I-189]:

**I-189**

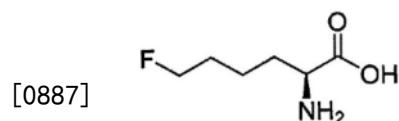
[0882] 合成流程:

[0883] 所使用的程序与实例188中所使用相同。

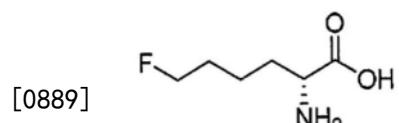
[0884] 程序及特征:

[0885] 实例189:(S)-2-((S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4,4-二甲基戊酰氨基)-4-甲基戊酸甲酯[I-189]:<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,MeOD-d4):4.52(t,J=7.5Hz,1H),4.02-3.99(m,1H),3.73(s,3H),2.35-2.30(m,1H),1.95-1.91(m,1H),1.78-1.67(m,3H),1.25(s,3H),1.17(s,3H),1.01-0.97(m,6H)。

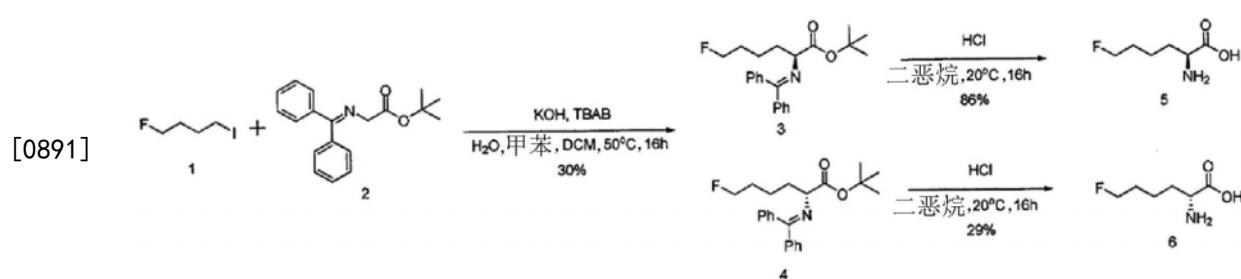
[0886] 实例108:(S)-2-氨基-6-氟己酸[I-108].

**I-108**

[0888] 实例109:(R)-2-氨基-6-氟己酸[I-109].

**I-109**

[0890] 合成流程:



[0892] 程序及特征：

[0893] 步骤1:2-(二苯基亚甲基氨基)-6-氟己酸叔丁酯：

[0894] 在50°C下搅拌1-氟-4-碘丁烷(2.0g, 9.90mmol)、2-(二苯基亚甲基氨基)乙酸叔丁酯(2.43g, 8.25mmol)、TBAB(266mg, 0.83mmol)及KOH(50%水溶液)(10mL)于DCM(10mL)及甲苯(25mL)中的混合物16小时。通过SGC(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/5)纯化溶液,得到呈无色油状物的2-(二苯基亚甲基氨基)-6-氟己酸叔丁酯(0.91g, 2.47mmol, 30%)。MS(EI+, m/z): 370.2 [M+H]<sup>+</sup>。

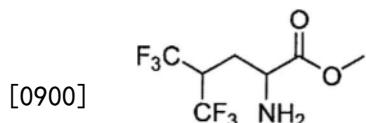
[0895] 步骤2: (S)-2-氨基-6-氟己酸[I-108]：

[0896] 在室温下搅拌(S)-2-(二苯基亚甲基氨基)-6-氟己酸叔丁酯(360mg, 0.97mmol)于二恶烷(10mL)及HCl(6M水溶液)中的溶液16小时。混合物用乙醚及水萃取。水层在pH调节到3至4之后用EA萃取。浓缩有机层,得到呈白色固体的(S)-2-氨基-6-氟己酸[I-108](125mg, 0.84mmol, 86%)。ESI-MS(EI+, m/z): 150.3 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, D2O) δ 4.469(t, J=6.0Hz, 1H), 4.351(t, J=6.0Hz, 1H), 3.950(t, J=6.0Hz, 1H), 1.904-1.820(m, 2H), 1.690-1.588(m, 2H), 1.456-1.388(m, 2H)。

[0897] 步骤2: (R)-2-氨基-6-氟己酸[I-109]：

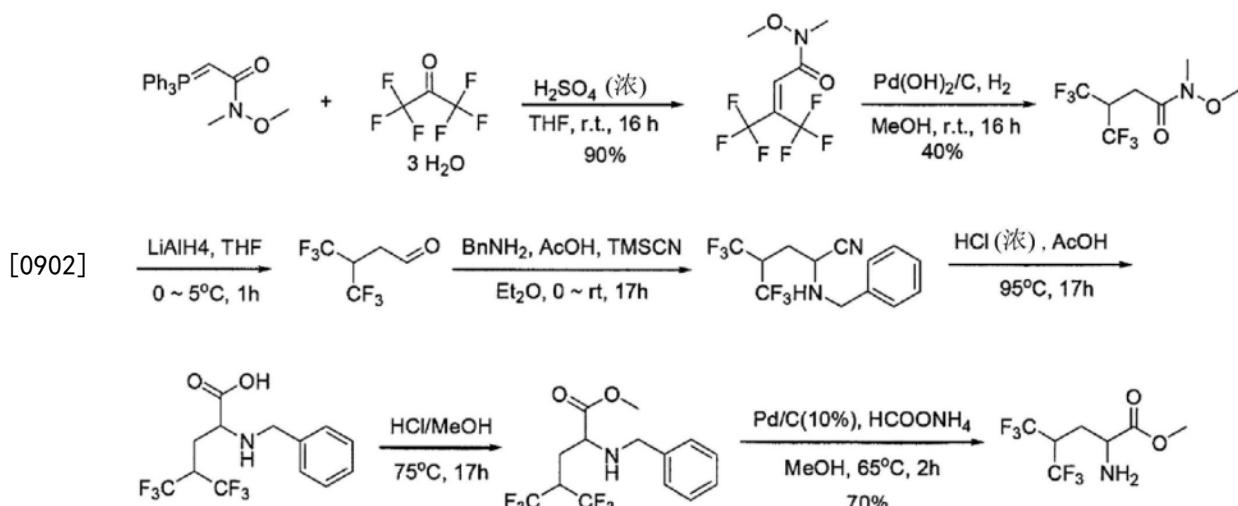
[0898] 在室温下搅拌(R)-2-(二苯基亚甲基氨基)-6-氟己酸叔丁酯(300mg, 0.81mmol)于二恶烷(10mL)及HCl(6M水溶液)中的溶液16小时。混合物用乙醚及水萃取。水层在pH调节到3至4之后用EA萃取。通过HPLC纯化有机层,得到呈白色固体的(R)-2-氨基-6-氟己酸[I-109](35mg, 0.23mmol, 29%)。ESI-MS(EI+, m/z): 150.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, D2O) δ 4.505(t, J=6.0Hz, 1H), 4.410(t, J=6.0Hz, 1H), 3.823(t, J=6.0Hz, 1H), 1.906-1.827(m, 2H), 1.722-1.639(m, 2H), 1.485-1.399(m, 2H)。

[0899] 实例198:2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸甲酯(I-198)：



I-198

[0901] 合成流程:



[0903] 程序及特征:

[0904] 步骤1:4,4,4-三氟-N-甲氧基-N-甲基-3-(三氟甲基)丁-2-烯酰胺:

[0905] 历经1小时,向六氟丙酮三水合物(30g,136mmol)的搅拌溶液中缓慢逐滴添加H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(100mL,浓),且将气态六氟丙酮引入N-甲氧基-N-甲基-2-(三苯基膦烯)-乙酰胺(10g,27.5mmol)于THF(200mL)的溶液中。在室温下搅拌混合物16小时。随后添加石油醚(200mL),滤出白色沉淀物。浓缩滤液,通过硅胶色谱(石油醚/乙酸乙酯=5/1到3/1)纯化残余物,得到呈淡色油状物的4,4,4-三氟-N-甲氧基-N-甲基-3-(三氟甲基)丁-2-烯酰胺(6.2g,24.7mmol,90%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):252.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>):δ7.15(s,1H),3.67(s,3H),3.26(s,3H)。

[0906] 步骤2:4,4,4-三氟-N-甲氧基-N-甲基-3-(三氟甲基)丁酰胺:

[0907] 在室温下在氢气气氛下搅拌4,4,4-三氟-N-甲氧基-N-甲基-3-(三氟甲基)丁-2-烯酰胺(4.5g,17.9mmol)、Pd(OH)<sub>2</sub>/C(620mg)于MeOH(100mL)中的混合物16小时。随后过滤并浓缩,得到呈淡色油状物的4,4,4-三氟-N-甲氧基-N-甲基-3-(三氟甲基)丁酰胺(1.8g,7.1mmol,40%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):254.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0908] 步骤3:4,4,4-三氟-3-(三氟甲基)丁醛:

[0909] 在冰浴下,向4,4,4-三氟-N-甲氧基-N-甲基-3-(三氟甲基)丁酰胺(1.8g,7.1mmol)于THF(50mL)中的溶液中逐滴添加LiAlH<sub>4</sub>(8.5mL,8.5mmol),在1小时之后,混合物用柠檬酸溶液(100mL)淬灭,溶液用Et<sub>2</sub>O(100mL×2)萃取,有机相用盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),且溶液用于下一步骤。

[0910] 步骤4:2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊腈:

[0911] 在冰浴下,向4,4,4-三氟-3-(三氟甲基)丁醛于Et<sub>2</sub>O(200mL)中的上述溶液中添加苯甲基胺(2mL)、AcOH(2mL)及随后TMSCN(2mL),在0到室温下搅拌溶液17小时,且随后用EtOAc(100mL)稀释。溶液用H<sub>2</sub>O(100mL×2)洗涤,且随后浓缩,得到呈棕色液体的2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊腈(2.1g,粗物质)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):311.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0912] 步骤5:2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸:

[0913] 将2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊腈(2.1g,粗物质)于浓HCl(50mL)及AcOH(10mL)中的溶液加热到100℃持续40小时。浓缩混合物以去除溶剂,用1M NaOH溶液将pH调节到12,用PE(100mL)萃取,用6M HCl将水相pH调节到5至6,形成白色固体,过滤,且用水(50mL)洗涤滤饼,真空干燥,得到呈白色固体的2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(1.0g,3.0mmol,42%,3个步骤)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):272.0

[0914] 步骤6:2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸甲酯:

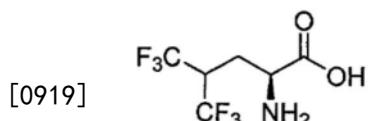
[0915] 将2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(800mg,2.4mmol)于HCl/MeOH(50mL,2M)中的溶液加热到75℃持续17小时。浓缩溶液且通过制备型HPLC(Boston C1821×250mm 10μm移动相:A:0.1% TFA;B:ACN)纯化,得到呈无色油状物的2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸甲酯(120mg,0.35mmol,15%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):344.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0916] 步骤7:2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸甲酯三氟乙酸:

[0917] 将2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸甲酯(100mg,0.30mmol)、HCOONH<sub>4</sub>(92mg,1.5mmol)及Pd/C(10%,20mg)于MeOH(10mL)中的混合物加热到65℃持续1小时。过滤混合物,且浓缩滤液且通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸甲酯三氟乙酸(76mg,0.21mmol,70%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):254.1[M+H]<sup>+</sup>

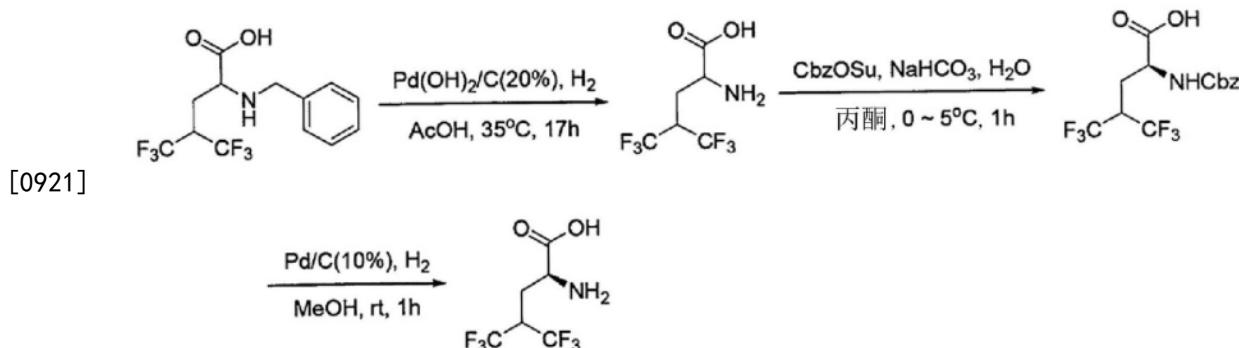
$+H_2^+$ 。 $^1H$  NMR (500MHz, MeOD-d<sub>4</sub>)  $\delta$  4.26 (dd, J=7.5Hz, J=6.0Hz, 1H), 3.91 (m, 4H), 2.49 (dd, J=8.5Hz, J=5.0Hz, 1H), 2.33-2.37 (m, 1H)。

[0918] 实例164: (S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(I-164) :



I-164

[0920] 合成流程:



[0922] 程序及特征:

[0923] 步骤1:2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸:

[0924] 在35°C下在氢气下搅拌2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(480mg, 1.46mmol)及Pd(OH)<sub>2</sub>/C(20%, 100mg)于AcOH(15mL)中的溶液17小时。过滤混合物且在真空中浓缩滤液,得到呈白色固体的2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(460mg,粗物质)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z): 240.2 [M+H]<sup>+</sup>。

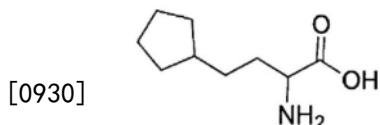
[0925] 步骤2:(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸:

[0926] 在冰浴下,向2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(460mg,粗物质)及NaHCO<sub>3</sub>(368mg, 4.38mmol)于丙酮(30mL)及H<sub>2</sub>O(30mL)中的溶液中添加CbzOSu(727mg, 2.92mmol)。在17小时之后,用1M HCl溶液将反应混合物pH调节到3至4,且溶液用EtOAc(50mL×2)萃取,用盐水(50mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤且在真空中浓缩,通过反相硅胶色谱,且随后手性制备型HPLC[管柱, CC4 4.6×250mm 5μm; 溶剂, MeOH(0.2% 甲醇氨)]纯化粗产物,得到呈两种无色油状物的(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(27mg, 0.072mmol, 5%, 2个步骤)及(R)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(22mg, 0.059mmol, 4%, 2个步骤)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z): 396.0 [M+Na]<sup>+</sup>。

[0927] 步骤3:(S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸:

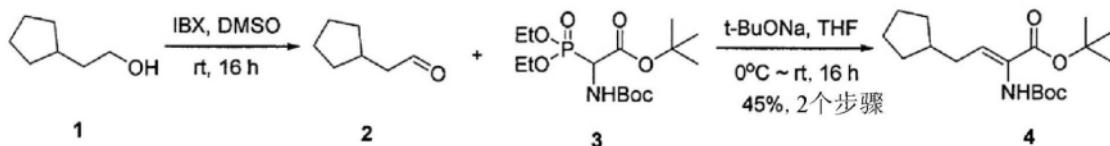
[0928] 在室温下,搅拌(S)-2-(苯甲氧基羰基氨基)-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸(27mg, 0.072mmol)及Pd/C(10%, 5mg)于MeOH(10mL)中的混合物1小时。过滤溶液且通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的(S)-2-氨基-5,5,5-三氟-4-(三氟甲基)戊酸[I-164](8.5mg, 0.036mmol, 49%)。MS(EI<sup>+</sup>, m/z): 240.2 [M+H]<sup>+</sup>。 $^1H$  NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.74-3.80 (m, 2H), 2.88-2.31 (m, 1H), 1.91-2.20 (m, 1H)。

[0929] 实例203:2-氨基-4-环戊基丁酸[I-203]:

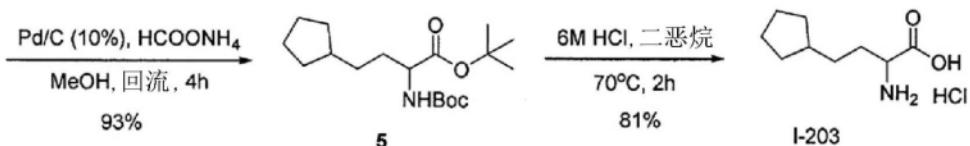


I-203

[0931] 合成流程:



[0932]



[0933] 程序及特征：

[0934] 步骤1:2-环戊基乙醛:

[0935] 在冰浴下,向3-环戊基丙-1-醇(2.0g,17.5mmol)于DMSO(40mL)中的溶液中添加IBX(7.35g,26.3mmol)。使混合物升温到室温且搅拌隔夜。将反应混合物倒入水(200mL)中且用Et<sub>2</sub>O(100mL×2)萃取,有机相用水(100mL×3)及盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),且溶液用于下一步骤。

[0936] 步骤2: (Z)-2-(叔丁基氨基)-4-环戊基丁-2-烯酸叔丁酯:

[0937] 在冰浴下,向威悌反应剂(2.5g,6.8mmol)于THF(50mL)中的溶液中添加NaOt-Bu(785mg,8.2mmol)。在1小时之后,添加2-环戊基乙醛于Et<sub>2</sub>O(200mL)中的上述溶液。使混合物升温到室温且搅拌隔夜。溶液用水(200mL)稀释且用EA(100mL×2)萃取,有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤且在真空中浓缩且通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/20)纯化,得到呈无色液体的(Z)-2-(叔丁氧羰基氨基)-4-环戊基丁-2-烯酸叔丁酯(1.0g,3.1mmol,45%,2个步骤)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):326.2[M+H]<sup>+</sup>。

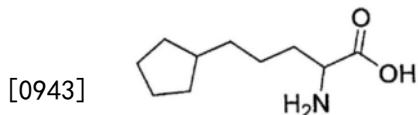
[0938] 步骤3:2-(叔丁氧羰基氨基)-4-环戊基丁酸叔丁酯:

[0939] 将(Z)-2-(叔丁氧羰基氨基)-4-环戊基丁-2-烯酸叔丁酯(240mg,0.74mmol)、 $\text{HCOONH}_4$ (233mg,3.7mmol)及Pd/C(10%,30mg)于MeOH(15mL)中的混合物加热到回流持续4小时。过滤并浓缩混合物,用Et<sub>2</sub>O(50mL)稀释,用水(50mL)及盐水(50mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤且在真空中浓缩,得到呈无色液体的2-(叔丁氧羰基氨基)-4-环戊基丁酸叔丁酯(224mg,0.69mmol,93%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):328.2[M+H]<sup>+</sup>。

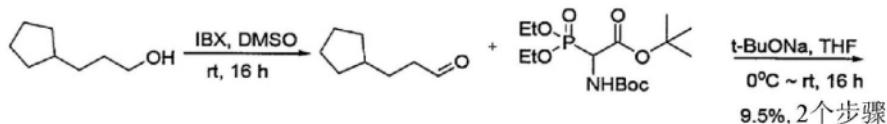
[0940] 步骤4:2-氨基-4-环戊基丁酸:

[0941] 将2-(叔丁氧羰基氨基)-4-环戊基丁酸叔丁酯(224mg,0.69mmol)于6M HCl(20mL)及二恶烷(10mL)中的溶液加热到70℃持续2小时。混合物在真空中浓缩,用水(30mL)稀释,用Et<sub>2</sub>O(20mL×2)萃取,且将滤液浓缩到干燥,得到呈白色固体的2-氨基-4-环戊基丁酸(114.9mg,0.52mmol,81%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):172.3[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,D<sub>2</sub>O):δ3.91(t,J=6.0Hz,1H),1.82-1.89(m,2H),1.66-1.72(m,3H),1.28-1.52(m,6H),1.00-1.01(m,2H)。

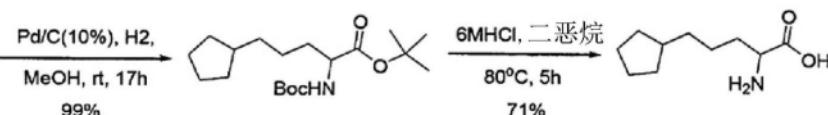
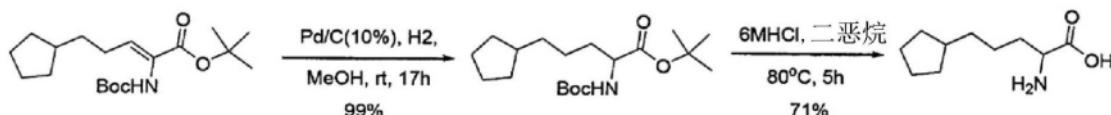
[0942] 实例202:2-氨基-5-环戊基戊酸[I-202]:

**I-202**

[0944] 合成流程:



[0945]



[0946] 程序及特征:

[0947] 步骤1:3-环戊基丙醛:

[0948] 在冰浴下,向3-环戊基丙-1-醇(1.0g,7.8mmol)于DMSO(20mL)中的溶液中添加IBX(3.28g,11.7mmol)。使混合物升温到室温且搅拌隔夜。将反应混合物倒入水(100mL)中且用Et<sub>2</sub>O(60mL×2)萃取,有机相用水(100mL×3)及盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),且溶液用于下一步骤。

[0949] 步骤2:(E)-2-(叔丁氧羰基氨基)-5-环戊基戊-2-烯酸叔丁酯:

[0950] 在冰浴下,向威梯反应剂(500mg,1.36mmol)于THF(15mL)中的溶液中添加NaOt-Bu(157mg,1.63mmol)。在1小时之后,添加3-环戊基丙醛于Et<sub>2</sub>O(100mL)中的上述溶液。使混合物升温到室温且搅拌隔夜。溶液用水(200mL)稀释且用EtOAc(100mL)萃取,有机相用水(100mL×2)及盐水(100mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤且在真空中浓缩且通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/20)纯化,得到呈无色液体的(E)-2-(叔丁氧羰基氨基)-5-环戊基戊-2-烯酸叔丁酯(250mg,0.74mmol,9.5%,2个步骤)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):340.2[M+H]<sup>+</sup>。

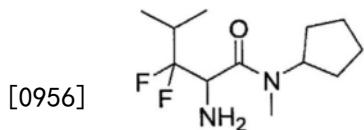
[0951] 步骤3:2-(叔丁氧羰基氨基)-5-环戊基戊酸叔丁酯:

[0952] 在室温下,在氢气下搅拌2-(叔丁氧羰基氨基)-5-环戊基戊-2-烯酸酯(250mg,0.74mmol)及Pd/C(10%,30mg)于MeOH(15mL)中的混合物17小时。过滤并浓缩混合物,得到呈无色液体的2-(叔丁氧羰基氨基)-5-环戊基戊酸叔丁酯(250mg,0.73mmol,99%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):342.2[M+H]<sup>+</sup>。

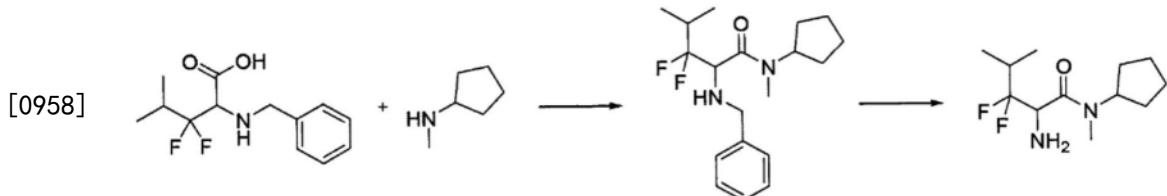
[0953] 步骤4:2-氨基-5-环戊基戊酸:

[0954] 将2-(叔丁氧羰基氨基)-5-环戊基戊酸酯(250mg,0.73mmol)于6M HCl(20mL)及二恶烷(10mL)中的溶液加热到80℃持续5小时。混合物在真空中浓缩,用水(30mL)稀释,用Et<sub>2</sub>O(20mL×2)萃取,且将滤液浓缩到干燥,得到呈白色固体的2-氨基-5-环戊基戊酸(115mg,0.52mmol,71%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):186.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(400MHz,D<sub>2</sub>O):δ3.84(t,J=6.0Hz,1H),1.79-1.84(m,2H),1.61-1.67(m,3H),1.25-1.49(m,8H),0.95-0.99(m,2H)。

[0955] 实例197:合成2-氨基-N-环戊基-3,3-二氟-N,4-二甲基戊酰胺[I-197]:

**I-197**

[0957] 合成流程:



[0959] 程序及特征:

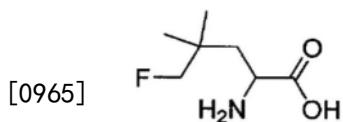
[0960] 步骤1:2-(苯甲基氨基)-N-环戊基-3,3-二氟-N,4-二甲基戊酰胺:

[0961] 在室温下搅拌2-(苯甲基氨基)-3,3-二氟-4-甲基戊酸(80mg,0.31mmol)、N-甲基环戊胺(62mg,0.62mmol)、HATU(141mg,0.37mmol)及Et<sub>3</sub>N(94mg,0.93)于DMF(2mL)中的混合物3小时。通过制备型HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm,移动相:A:0.1%TFA;B:ACN)纯化混合物,得到呈白色固体的2-(苯甲基氨基)-N-环戊基-3,3-二氟-N,4-二甲基戊酰胺(45mg,0.13mmol,43%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):339.0

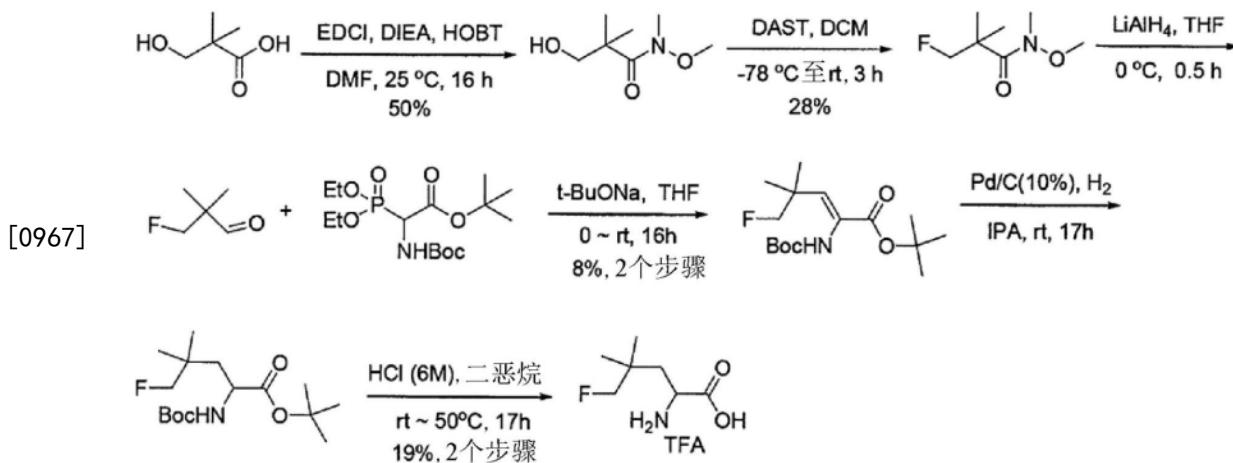
[0962] 步骤2:2-氨基-N-环戊基-3,3-二氟-N,4-二甲基戊酰胺:

[0963] 将2-(苯甲基氨基)-N-环戊基-3,3-二氟-N,4-二甲基戊酰胺(45mg,0.13mmol)、HC<sub>2</sub>ONH<sub>4</sub>(41mg,0.65mmol)及Pd/C(10%,10mg)于MeOH(5mL)中的混合物加热到60℃持续1小时。过滤混合物,且浓缩滤液且通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的2-氨基-N-环戊基-3,3-二氟-N,4-二甲基戊酰胺(16.3mg,0.066mmol,49%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):249.2 1H NMR(500MHz,MeOD-d<sub>4</sub>)δ5.26(dd,J=15.5Hz,J=6.0Hz,0.5H),5.08(dd,J=16.5Hz,J=5.0Hz,1H),4.28-4.31(m,0.5H),2.97(d,J=48.5Hz,3H),2.38(m,1H),1.65-1.99(m,8H),11.16(dt,J=6.5Hz,J=3.0Hz,6H)。

[0964] 实例196:2-氨基-5-氟-4,4-二甲基戊酸[I-196].

**I-196**

[0966] 合成流程:



[0968] 程序及特征：

[0969] 步骤1：3-羟基-N-甲氧基-N,2,2-三甲基丙酰胺：

[0970] 在室温下搅拌3-羟基-2,2-二甲基丙酸(10g, 84.7mmol)、N,N-二甲基羟胺盐酸盐(16.4g, 101.7mmol)、EDCI(24.4g, 127.1mmol)、HOBT(17.2g, 127.1mmol)及DIPEA(28mL, 169.5mmol)于DMF(200mL)中的混合物16小时。反应混合物用EtOAc(200mL×3)及水(100mL)萃取，合并有机层，其用1N HCl(30mL×2)、1N NaHCO<sub>3</sub>(30mL×2)及盐水(50mL)洗涤，干燥，浓缩，得到残余物，其通过色谱(二氧化硅，乙酸乙酯/石油醚=1/2)纯化，得到呈无色油状物的3-羟基-N-甲氧基-N,2,2-三甲基丙酰胺(6.9g, 50%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 162.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0971] 步骤2：3-氟-N-甲氧基-N,2,2-三甲基丙酰胺：

[0972] 向3-羟基-N-甲氧基-N,2,2-三甲基丙酰胺(4.5g, 27.9mmol)于冷却到-78°C的DCM(40mL)中的混合物中逐滴添加DAST(7.4mL, 55.9mmol)。随后在室温下搅拌1到2小时，再次冷却到-78°C，逐滴添加DAST(4mL, 27.9mmol)。在室温下再搅拌反应混合物1小时。使反应混合物冷却到-78°C，缓慢添加饱和NH<sub>4</sub>Cl(15mL)，添加DCM(50mL)，分离有机层，用饱和NH<sub>4</sub>Cl(30mL)、盐水(30mL×2)洗涤，干燥，浓缩产生残余物，其通过色谱(二氧化硅，乙酸乙酯/石油醚=1/4)纯化，得到呈无色油状物的3-氟-N-甲氧基-N,2,2-三甲基丙酰胺(1.9g, 28%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 164.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0973] 步骤3：3-氟-2,2-二甲基丙醛：

[0974] 向3-氟-N-甲氧基-N,2,2-三甲基丙酰胺(1.0g, 61.3mmol)于冷却到0°C的THF(10mL)中的混合物中逐滴添加LiAlH<sub>4</sub>(6.1mL, 61.3mmol, 1M于THF中)。随后在所述温度下搅拌0.5到1小时。缓慢添加饱和NH<sub>4</sub>Cl(10mL)，用Et<sub>2</sub>O(20mL×3)萃取，用水(15mL×2)及盐水(15mL)洗涤，干燥，直接用于下一步骤。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 无MS。

[0975] 步骤4：(Z)-2-(叔丁氧羰基氨基)-5-氟-4,4-二甲基戊-2-烯酸叔丁酯：

[0976] 在室温下搅拌3-氟-2,2-二甲基丙醛(约630mg, 6.1mmol, 来自上述步骤的Et<sub>2</sub>O溶液)、2-(叔丁氧羰基氨基)-2-乙氧基磷酰基-乙酸叔丁酯(2.25g, 6.1mmol)及t-BuONa(1.2g, 12.3mmol)于THF(15mL)中的混合物16小时。添加饱和NH<sub>4</sub>Cl(15mL)，用EA(30mL×3)萃取，与有机层合并，用水(15mL)及盐水(15mL)洗涤，干燥，浓缩产生残余物，其通过色谱(二氧化硅，石油醚到DCM)纯化，得到呈白色固体的(Z)-2-(叔丁氧羰基氨基)-5-氟-4,4-二甲基戊-2-烯酸叔丁酯(190mg, 0.60mmol, 8%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 206 [M-111]<sup>+</sup>。

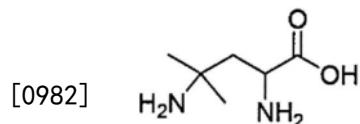
[0977] 步骤5：2-(叔丁氧羰基氨基)-5-氟-4,4-二甲基戊酸叔丁酯：

[0978] 在室温下在氢气下搅拌(Z)-2-(叔丁氧羰基氨基)-5-氟-4,4-二甲基戊-2-烯酸叔丁酯(190mg,0.60mmol)及Pd/C(10%,30mg)于IPA(15mL)中的混合物17小时。过滤并浓缩混合物,得到呈无色液体的2-(叔丁氧羰基氨基)-5-氟-4,4-二甲基戊酸叔丁酯(200mg,粗物质)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):342.2[M+Na]<sup>+</sup>。

[0979] 步骤6:2-氨基-5-氟-4,4-二甲基戊酸三氟乙酸:

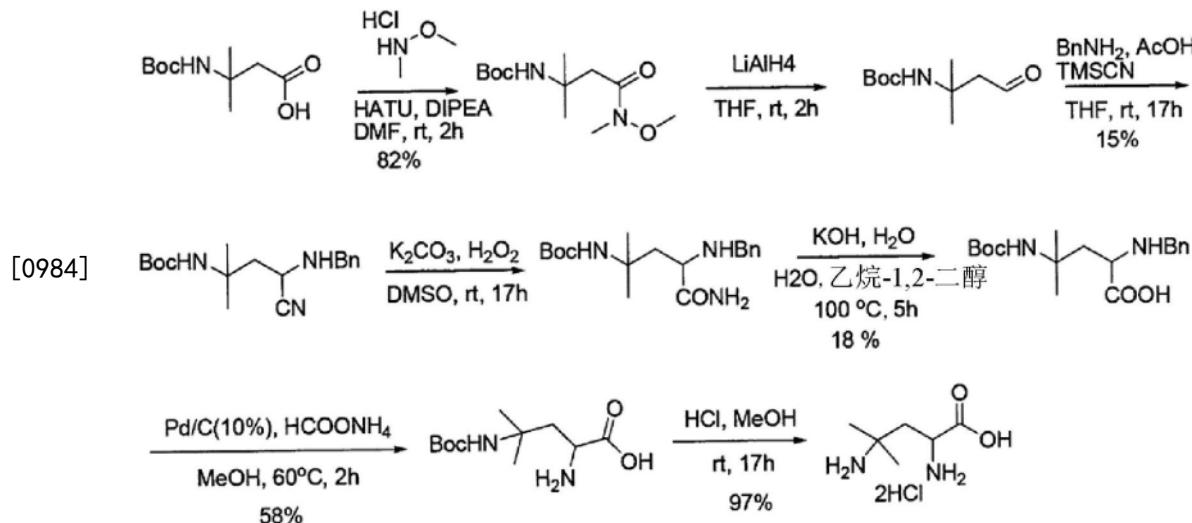
[0980] 将2-(叔丁氧羰基氨基)-5-氟-4,4-二甲基戊酸叔丁酯(200mg,粗物质)于6M HCl(20mL)及二恶烷(10mL)中的溶液加热到50℃持续17小时。在真空中浓缩混合物,用水(30mL)稀释,用Et<sub>2</sub>O(20mL×2)萃取,且在真空中浓缩滤液且通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的2-氨基-5-环戊基戊酸三氟乙酸(31.7mg,0.11mmol,19%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):164.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz,D<sub>2</sub>O):δ4.16(d,J=47.5Hz,1H),3.97(t,J=5.5Hz,1H),2.03(dd,J=15.5Hz,J=5.5Hz,1H),1.71(dd,J=15.5Hz,J=6.0Hz,1H),0.91(dd,J=15.0Hz,J=2.0Hz,6H)。

[0981] 实例186:合成2,4-二氨基-4-甲基戊酸[I-186]:



**I-186**

[0983] 合成流程:



[0985] 程序及特征:

[0986] 步骤1:4-(甲氧基(甲基)氨基)-2-甲基-4-氧代丁-2-基氨基甲酸叔丁酯:

[0987] 向3-(叔丁氧羰基氨基)-3-甲基丁酸(1g,4.61mmol)、N,N-二甲基羟胺盐酸盐(536mg,5.53mmol)、HATU(2.26g,5.99mmol)于DMF(15mL)中的溶液中添加DIPEA(1.49g,11.53mmol)。在室温下搅拌溶液2小时,随后通过盐水(100mL)稀释混合物,通过EtOAc(50mL×2)萃取。合并有机层,浓缩且通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/3)纯化,得到呈无色油状物的4-(甲氧基(甲基)氨基)-2-甲基-4-氧代丁-2-基氨基甲酸叔丁酯(1.0g,3.8mmol,82%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):261.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0988] 步骤2:2-甲基-4-氧代丁-2-基氨基甲酸叔丁酯:

[0989] 在室温下,向4-(甲氧基(甲基)氨基)-2-甲基-4-氧化丁-2-基氨基甲酸叔丁酯(3.8g,14.6mmol)于THF(50mL)中的溶液中添加LiAlH<sub>4</sub>(16mL,1M于THF中)。在室温下搅拌溶液2小时,通过Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O淬灭,过滤且通过THF洗涤,得到呈黄色溶液的2-甲基-4-氧化丁-2-基氨基甲酸叔丁酯(约14mmol于110mL THF中)。MS(EI<sup>+</sup>,m/z):146.3[M+H-56]<sup>+</sup>。

[0990] 步骤3:4-(苯甲基氨基)-4-氰基-2-甲基丁-2-基氨基甲酸叔丁酯:

[0991] 向2-甲基-4-氧化丁-2-基氨基甲酸叔丁酯(粗物质,约14mmol于110mL THF)中的溶液中添加BnNH<sub>2</sub>(2.2mL)及AcOH(2.2mL)。在室温下搅拌溶液10分钟。添加TMSCN(2.2mL)。在室温下搅拌混合物17小时。随后,浓缩反应混合物且通过色谱(二氧化硅,乙酸乙酯/石油醚=1/4),得到呈黄色掺杂物的4-(苯甲基氨基)-4-氰基-2-甲基丁-2-基氨基甲酸叔丁酯(670mg,2.11mmol,15%)。MS(EI<sup>+</sup>,m/z):318.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0992] 步骤4:5-氨基-4-(苯甲基氨基)-2-甲基-5-氧化戊-2-基氨基甲酸叔丁酯:

[0993] 向4-(苯甲基氨基)-4-氰基-2-甲基丁-2-基氨基甲酸叔丁酯(640mg,2.00mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(550mg,3.98mmol)于DMSO(16mL)中的混合物中添加30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.64mL,5.67mmol)且在室温下搅拌17小时。随后,通过H<sub>2</sub>O(200mL)稀释反应混合物,通过EtOAc(100mL×2)萃取。浓缩经合并的有机层,得到呈黄色掺杂物的2-(苯甲基氨基)-4-(叔丁氧羰基氨基)-4-甲基戊酸(粗物质,890mg)。MS(EI<sup>+</sup>,m/z):336.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0994] 步骤5:2-(苯甲基氨基)-4-(叔丁氧羰基氨基)-4-甲基戊酸:

[0995] 在100℃下搅拌5-氨基-4-(苯甲基氨基)-2-甲基-5-氧化戊-2-基氨基甲酸叔丁酯(粗物质,890mg,约2.0mmol)、KOH(406mg,7.25mmol)于乙烷-1,2-二醇(9mL)及H<sub>2</sub>O(9mL)中的混合物5小时。随后,通过盐水(200mL)稀释反应混合物,通过THF/EA=2:1(90mL×5)萃取,合并有机层,浓缩且通过反相HPLC(Boston C18 21×250mm 10μm,移动相:A:0.1%三氟乙酸;B:乙腈)纯化,得到呈白色固体的2-(苯甲基氨基)-4-(叔丁氧羰基氨基)-4-甲基戊酸(120mg,0.36mmol,18%)。MS(EI<sup>+</sup>,m/z):337.3[M+H]<sup>+</sup>。

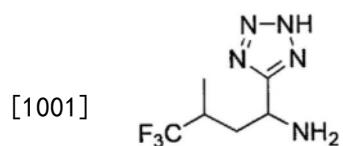
[0996] 步骤6:2-氨基-4-(叔丁氧羰基氨基)-4-甲基戊酸:

[0997] 将2-(苯甲基氨基)-4-(叔丁氧羰基氨基)-4-甲基戊酸(140mg,0.42mmol)、HCOONH<sub>4</sub>(132mg,2.1mmol)及Pd/C(10%,20mg)于MeOH(15mL)中的混合物加热到60℃持续1小时。过滤混合物,且浓缩滤液且通过反相硅胶色谱纯化,得到呈白色固体的2-氨基-4-(叔丁氧羰基氨基)-4-甲基戊酸(60mg,0.24mmol,58%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):247.2

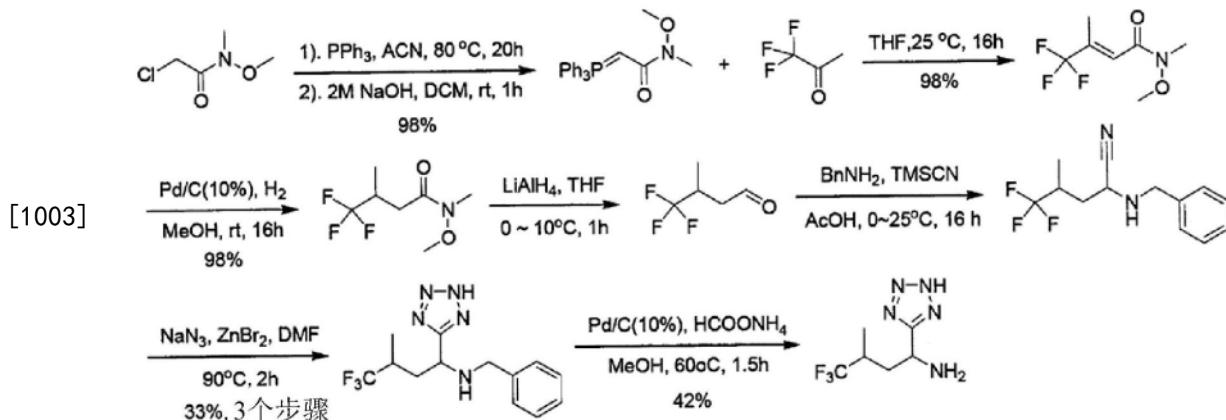
[0998] 步骤7:2,4-二氨基-4-甲基戊酸:

[0999] 在室温下搅拌2-氨基-4-(叔丁氧羰基氨基)-4-甲基戊酸(60mg,0.24mmol)于6M HCl(10mL)及二恶烷(0mL)中的溶液17小时。在真空中浓缩溶液,得到呈白色固体的2,4-二氨基-4-甲基戊酸(51.8mg,0.236mmol,97%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>,m/z):147.1 1H NMR(500MHz,D<sub>2</sub>O)δ4.04(dd,J=9.5Hz,J=3.5Hz,1H),2.32(dd,J=15.0Hz,J=9.5Hz,1H),1.94(dd,J=15.0Hz,J=3.0Hz,1H),1.38(dd,J=9.5Hz,J=5.0Hz,6H)。

[1000] 实例199:合成4,4,4-三氟-3-甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺[I-199]:



[1002] 合成流程：



[1004] 程序及特征：

[1005] 步骤1:N-甲氧基-N-甲基-2-(联三苯-15-亚磷烷基)乙酰胺：

[1006] 将2-氯-N-甲氧基-N-甲基乙酰胺(13.7g, 0.1mol)及三苯基膦(26.2g, 0.1mol)于乙腈(200mL)中的混合物加热到80℃且保持20小时。冷却且浓缩混合物以在低于40℃下去除溶剂。使残余物溶解于二氯甲烷(200mL), 继而为2N KOH(100mL)中。在20℃下搅拌所得混合物1小时。有机层用盐水(200mL×3)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥且过滤。在真空中浓缩滤液, 得到呈黄色固体的N-甲氧基-N-甲基-2-(联三苯-15-亚磷烷基)乙酰胺(36g, 0.1mol, 98%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 364.4 [M+H]<sup>+</sup>。

[1007] 步骤2: (E)-4,4,4-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基丁-2-烯酰胺：

[1008] 将N-甲氧基-N-甲基-2-(联三苯-15-亚磷烷基)乙酰胺(36.3g, 0.1mol)及1,1,1-三氟丙-2-酮(22.4g, 0.2mol)于四氢呋喃(500mL)中的混合物加热到20℃且保持20小时。冷却且浓缩混合物以在低于40℃下在真空中去除溶剂。通过用0到25%乙酸乙酯/石油醚洗脱的硅胶管柱(200g, 200到300目, UV 254nm)纯化残余物, 得到呈黄色油状物的(E)-4,4,4-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基丁-2-烯酰胺(19.5g, 0.1mol, 98%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 198.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[1009] 步骤3:4,4,4-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基丁酰胺：

[1010] 在26℃下搅拌(E)-4,4,4-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基丁-2-烯酰胺(2g, 0.01mol)及Pd/C(10%, 200mg)于THF(50mL)中的混合物持续18小时。过滤混合物, 且在真空中将滤液浓缩到干燥, 得到呈黄色油状物的4,4,4-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基丁酰胺(2g, 0.01mol, 98%)。ESI-MS(EI<sup>+</sup>, m/z) : 200.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[1011] 步骤4:4,4,4-三氟-3-甲基丁醛：

[1012] 在0℃下, 向4,4,4-三氟-N-甲氧基-N,3-二甲基丁酰胺(2g, 0.01mol)于40mL THF中的溶液中添加LiAlH<sub>4</sub>(0.4g, 0.01mol)。在0℃下搅拌混合物1小时。反应混合物用水, 继而甲基叔丁基醚(30mL×2)淬灭。有机层用盐水(50mL×3)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥且过滤。含有滤液, 得到直接用于下一步骤中的呈无色溶液的4,4,4-三氟-3-甲基丁醛(1.4g, 粗物质)。

[1013] 步骤5:2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊腈：

[1014] 在冰浴下, 向上述4,4,4-三氟-3-甲基丁醛于甲基叔丁基醚(100mL)中的溶液中添加苯甲基胺(1.5mL)、AcOH(1.0mL)及随后TMSCN(1.5mL)。使混合物升温20℃且搅拌隔夜。溶液用水(30mL)稀释且用EtOAc(30mL)萃取。有机相用水(30mL×2)及盐水(50mL)洗涤, 干燥

( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，过滤且在真空中浓缩，得到用于下一步骤的呈褐色油状物的2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊腈(2.6g,粗物质)。ESI-MS( $\text{EI}^+$ , $m/z$ ):257.3[M+H]<sup>+</sup>。

[1015] 步骤6:N-苯甲基-4,4,4-三氟-3-甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺:

[1016] 向2-(苯甲基氨基)-5,5,5-三氟-4-甲基戊腈(0.3g,粗物质)于DMF(10mL)中的溶液中添加 $\text{NH}_4\text{Cl}$ (0.15g,0.003mol)，且将 $\text{NaN}_3$ (0.21g,0.003mol)加热到95℃持续18小时。使溶液冷却到15℃且用EtOAc(20mL)萃取，有机相用水(20mL×2)及盐水(20mL)洗涤，干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，过滤且在真空中浓缩，得到呈白色固体的N-苯甲基-4,4,4-三氟-3-甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺(0.1g,0.5mmol,33%，3个步骤)。ESI-MS( $\text{EI}^+$ , $m/z$ ):300.3[M+H]<sup>+</sup>。

[1017] 4,4,4-三氟-3-甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺三氟乙酸:

[1018] 在室温下，向N-苯甲基-4,4,4-三氟-3-甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺(160mg,0.54mmol)于MeOH(15mL)中的溶液中添加 $\text{HCOONH}_4$ (0.17g,2.7mmol)及Pd/C(30mg)。在60℃下搅拌混合物2小时。过滤且浓缩反应混合物以产生粗产物，其通过反相硅胶色谱纯化，得到呈白色固体的4,4,4-三氟-3-甲基-1-(2H-四唑-5-基)丁-1-胺三氟乙酸(72.8mg,0.23mmol,42%)；ESI-MS( $\text{EI}^+$ , $m/z$ ):210.2[M+H]<sup>+</sup>； $^1\text{H NMR}$ (500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ4.67-4.93(m,1H),2.31-2.41(m,1H),2.00-2.12(m,2H),0.99(dd,J=16.8,J=6.4Hz,6H)。

[1019] 实例210蛋白质印迹分析

[1020] 所述筛选分析测量经由来自HEK293T细胞的稳定表达FLAG-WDR24的免疫沉淀纯化的GATOR2/Sestrin2复合物的体外测试化合物活性。经由通过慢病毒转导，HEK293T细胞(293T)经工程改造以稳定地表达N端带标记的FLAG-WDR24。慢病毒通过慢病毒转移载体pLJM60与ΔVPR包膜共同转染及使用XTremeGene 9转染剂(Roche Diagnostics)使CMV VSV-G将质粒封装到HEK-293T细胞中产生。在转染后24小时，将培养基换为补充有30%不活化胚胎血清的杜尔贝科氏修饰伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's media, DMEM)。含有病毒的上清液在转染之后48及72小时收集且传送通过0.45μm过滤器以消除细胞。6孔组织培养板中的靶细胞在含有8μg/mL凝聚胺的培养基中经感染且通过离心，在2,200rpm下进行自旋感染1小时。在感染之后二十四小时，去除病毒且选择具有适当的抗生素的细胞。随后使细胞于补充有10%胎牛血清及抗生素的DMEM中生长。

[1021] 为了筛选亮氨酸模拟剂化合物，将表达293T细胞的2,000,000个FLAG-WDR24接种于10cm组织培养板中。七十二小时后，将细胞放置于未调配有氨基酸且补充有5mM葡萄糖(-AARPMI,US Biological Life Sciences)的标准RPMI培养基中持续1小时，随后于裂解缓冲液中(40mM HEPES、1% Triton、10mMβ-甘油磷酸钠、10mM焦磷酸钠、2.5mM MgCl<sub>2</sub>及蛋白酶抑制剂)裂解。为了分离FLAG-WDR24/内源性-Sestrin2复合物，在4℃下用30μl抗标签树脂(SIGMA)使体积1ml的粗裂解物(等效于2-4mg总蛋白)经受免疫沉淀2小时，于冷裂解缓冲液加0.5M NaCl中洗涤两次且再悬浮于1ml冷胞溶质缓冲液(40mM HEPES pH 7.4、140mM KC1、10mM NaCl、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% TritonX-100)中。随后以各种浓度将测试化合物或对照物(过滤所得溶液或亮氨酸)添加到各免疫沉淀样品中且在4℃下在旋转下培育60分钟。在培育期之后，离心样品以使键结到抗标签树脂的FLAG-WDR24/内源性Sestrin2复合物集结，完全去除上清液且使树脂再悬浮于SDS-PAGE样品缓冲液中且沸腾5分钟。样品随后通过SDS-PAGE处理且用抗FLAG(SIGMA)及抗Sestrin2(细胞信号传导技术)抗体进行蛋白质印迹，如L.Chantranupong等人，Cell Reports 9:1-8(2014)中所描述。

[1022] 扫描所得蛋白质印迹且使用 LI-COR® 成像平台定量对应于Sestrin2及FLAG-WDR24的谱带强度。为了测定各条件的键结到GATOR2的Sestrin2的量,Sestrin2的谱带强度标准化为FLAG-WDR24的谱带强度。对于每批所测试的化合物,还进行阴性对照(过滤所得溶液)及阳性对照(亮氨酸,25μM,SIGMA)。通过亮氨酸耗尽键结到FLAG-WDR24的内源性Sestrin2经标准化以代表100%活性。重复分析化合物两次且各化合物的活性定量为亮氨酸活性百分比且取平均值。分析的重复尝试产生与水相比的亮氨酸的平均活性的20%的标准差;因此,重复两次使键结到GATOR2的Sestrin2的量在25μM下减少至少40%的测试化合物视为统计显著的且表征为亮氨酸模拟物。一些化合物提高键结到FLAG-WDR24的Sestrin2的量。使键结到GATOR2的Sestrin2的量提高超过40% (表示为小于-40% 亮氨酸活性) 的化合物表征为亮氨酸拮抗剂。

[1023] 实例211. 鉴别在Sestrin2及Sestrin2/GATOR2相互作用后模拟或拮抗亮氨酸活性的化合物的方法。

[1024] 引言

[1025] 在不足亮氨酸含量下Sestrin1及Sestrin2经由GATOR2组分WDR24及Seh1L与GATOR2相互作用。在亮氨酸足够的条件下,亮氨酸直接结合Sestrin2,从而诱导Sestrin2与GATOR2解离。以下方法的目的为鉴别模拟亮氨酸在结合到Sestrin2且分裂Sestrin2/GATOR2方面的作用的化合物。另外,方法鉴别拮抗结合到Sestrin2的亮氨酸且预防响应于亮氨酸Sestrin2与GATOR2解离的化合物。

[1026] 方法1(体外PPI分析)

[1027] 所述筛选分析测量经由来自HEK293T细胞的稳定表达Flag-WDR24的免疫沉淀纯化的GATOR2/Sestrin2复合物的体外化合物活性。经由通过慢病毒转导,HEK293T细胞(293T)经工程改造以稳定地表达N端带标记的Flag-WDR24。慢病毒通过慢病毒转移载体pLJM60与Δ VPR包膜共同转染及使用XTremeGene 9转染剂使CMV VSV-G将质粒封装到HEK-293T细胞中产生。在转染后24小时,将培养基换为补充有30%不活化胚胎血清的杜尔贝科氏修饰伊格尔培养基(DMEM),含有病毒的上清液在转染之后48及72小时收集且传送通过0.45μm过滤器以消除细胞。6孔组织培养板中的靶细胞在含有8μg/mL凝聚胺的培养基中经感染且通过离心,在2,200rpm下进行自旋感染1小时。在感染之后24小时,去除病毒且选择具有适当的抗生素的细胞。随后使细胞于补充有10%胎牛血清及抗生素的DMEM中生长。

[1028] 为了筛选亮氨酸模拟剂化合物,将表达293T细胞的2,000,000个Flag-WDR24接种于10cm组织培养板中。72小时后,将细胞放置于未调配有氨基酸且补充有5mM葡萄糖(-AA RPMI,US Biological Life Sciences)的标准RPMI培养基中持续1小时,随后于裂解缓冲液中(40mM HEPES、1% Triton、10mMβ-甘油磷酸钠、10mM焦磷酸钠、2.5mM MgCl<sub>2</sub>及蛋白酶抑制剂)裂解。Flag-WDR24/内源性Sestrin2复合物如下分离:在4°C下用30μl抗标签树脂(SIGMA)使体积1ml的粗裂解物(等效于2-4mg总蛋白)经受免疫沉淀(IP)2小时,于冷裂解缓冲液加0.5M NaCl中洗涤两次且再悬浮于1ml冷胞溶质缓冲液(40mM HEPES pH 7.4、140mM KC1、10mM NaCl、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% TritonX-100)中。随后在25μM的给定浓度下将化合物添加到各样品中且在4°C下在旋转下培育30分钟。在培育期之后,离心样品以使键结到抗标签树脂的Flag-WDR24/内源性Sestrin2复合物集结,完全去除上清液且使树脂再悬浮于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)样品缓冲液中且沸腾5分钟。随后通过SDS-

PAGE处理样品且用抗Flag (SIGMA) 及抗Sestrin2(细胞信号传导技术) 抗体进行蛋白质印迹法,如L.Chantranupong等人,Cell Reports 9:1-8(2014) 中所描述。

[1029] 扫描所得蛋白质印迹法且使用LI-COR®成像平台定量对应于Sestrin2及Flag-WDR24的谱带强度。为了测定各条件的键结到GATOR2的Sestrin2的量,Sestrin2的谱带强度标准化为Flag-WDR24的谱带强度。对于每批所测试的化合物,还进行阴性对照(水)及阳性对照(亮氨酸,25μM,SIGMA)。通过亮氨酸耗尽键结到Flag-WDR24的内源性Sestrin2经标准化以代表100%活性。重复分析化合物两次且各化合物的活性定量为亮氨酸活性百分比且取平均值。列出所测试的化合物的定量数据的表呈现于表3中。分析的重复尝试产生与水相比的亮氨酸的平均活性的20%的标准差;因此,重复使键结到GATOR2的Sestrin2的量在25μM下减少至少40%的测试化合物视为统计显著的且称为亮氨酸模拟物。一些化合物提高键结到Flag-WDR24的Sestrin2的量(展示为表3中的亮氨酸的负百分比活性)。展示小于-40%亮氨酸活性的化合物也作为采样且称为亮氨酸拮抗剂。

[1030] 方法2(基于细胞的mTORC1活化)

[1031] 为了表明鉴别为完整细胞中的亮氨酸模拟物的化合物的功效,经由蛋白质印迹测量响应于亮氨酸不足后化合物处理的mTORC1信号传导。在亮氨酸不足后,当在添加亮氨酸之后10到90分钟测量信号传导时,添加外源性亮氨酸使mTORC1活化,如Wang, S., Tsun, Z. 等人Science 347 (6218) :188-194 (2015) 中所描述。因此,设计类似分析以测试化合物是否鉴别为以类似方式活化mTORC1的亮氨酸模拟物。简单来说,将800,000个HEK293T细胞接种于补充有10%胎牛血清及抗生素的DMEM中的6孔板的各孔中。次日,将细胞放置于不具有亮氨酸(Thermo Scientific)或血清的经修饰的DMEM中1小时,继而在给定浓度下添加亮氨酸模拟剂(n=3)持续大于10分钟的某一时间段。细胞随后裂解,针对SDS-PAGE进行处理,且针对mTORC1底物磷酸化S6激酶(Thr389)及磷酸化4EBP1(Thr37/46) (细胞信号传导技术)及装载对照物(β-肌动蛋白,Santa Cruz Biotechnology),用抗体进行蛋白质印迹,如Kang, S.A. 等人Science 341 (6144) :364-374 (2013) 中所描述。使用LI-COR®成像平台,对应于磷酸化底物的强度随后标准化为肌动蛋白谱带。相对于未用化合物处理的亮氨酸不足细胞明显提高mTORC1信号传导的化合物(史都登氏t试验,p<0.05)在细胞中视为活性的。作为阳性对照,在100μM下将亮氨酸添加到亮氨酸不足细胞持续60分钟。

[1032] 方法3(基于细胞的mTORC1活化)

[1033] 为了表明鉴别为亮氨酸拮抗剂的化合物的功效或为了测定较弱亮氨酸模拟物是否增强完整细胞中的亮氨酸活性,重复如上所述的相同范例,但做出以下改变:将细胞放置于亮氨酸减DMEM培养基(如方法3中所描述)中持续60分钟,继而为化合物(n=3)持续大于或等于60分钟的某一时间段。在化合物处理之后,用30及100μM亮氨酸刺激细胞60分钟。经由蛋白质印迹测量mTORC1信号传导,如方法2中所描述。响应于30μM或100μM的亮氨酸,以统计显著方式减少mTORC1的肌动蛋白标准化磷酸化底物的含量的化合物(史都登氏t试验,p<0.05)于细胞中视为活性的。响应于30μM或100μM的亮氨酸,以统计显著方式提高mTORC1的肌动蛋白标准化磷酸化底物的含量的化合物(史都登氏t试验,p<0.05)于细胞中视为亮氨酸增强子。作为对照组,亮氨酸不足细胞在添加亮氨酸之前用水预处理。或者,以上文所描述的相同方式,但无亮氨酸不足及刺激,于HEK293T细胞中分析潜在亮氨酸拮抗剂。进行蛋白质印迹以测定基线mTORC1信号传导是否在充分供应的培养条件下化合物处理后减弱。

[1034] 方法4

[1035] 化合物调节细胞中的Sestrin2与GATOR2之间的相互作用的能力通过重复方法2及3中所描述的分析但在经工程改造以稳定地表达接种于10cm组织培养皿中的Flag-WDR24的HEK293T细胞中测量。内源性Sestrin 2与Flag-WDR24之间的相互作用在化合物处理( $n=3$ )之后从获自细胞的裂解物测量,如方法1中所描述。简单来说,为了在细胞处理之后测量键结到Flag-WDR24的内源性Sestrin2的量,用抗标签树脂进行免疫沉淀且针对SDS-PAGE及蛋白质印迹处理所得样品以测量键结到Flag-WDR24的内源性Sestrin 2的量。以统计显著方式(史都登氏t试验, $p<0.05$ )调节键结到GATOR2的Sestrin2的量的化合物作为采样。

[1036] 方法5(基于ALPHAlisa细胞的分析)

[1037] 为了以基于板的格式表明鉴别为完整细胞中的亮氨酸模拟物的化合物的功效,经由AlphaLISA测量响应于亮氨酸不足后化合物处理的mTORC1信号传导。简单来说,将1,000,000个HEK293T细胞接种于补充有10%胎牛血清的DMEM中的T-75细胞培养物烧瓶中。在细胞达到融合度之后,将其放置于不具有亮氨酸(Thermo Scientific)、具有10%渗析胎牛血清的经修饰的DMEM中持续1小时。随后使细胞胰蛋白酶化,且以50,000个细胞/孔重新接种于不具有亮氨酸、具有10%渗析胎牛血清的DMEM中的96孔黑色透明底部培养板中。使细胞粘着于板2小时,继而以给定浓度添加化合物( $n=4$ )持续大于1小时的某一时间段。在时间点达到之后,使细胞裂解且通过p-p70 S6K(Thr389) SureFire Ultra AlphaLISA套组,根据制造商的说明进行分析([http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-176283MAN\\_SureFire\\_TGR70S\\_p70\\_pT389.pdf](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-176283MAN_SureFire_TGR70S_p70_pT389.pdf))。相对于未经化合物处理的亮氨酸不足细胞,明显提高mTORC1信号传导的化合物(史都登氏t试验, $p<0.05$ )视为mTORC1活化剂。相对于未经化合物处理的亮氨酸不足细胞,明显降低mTORC1信号传导的化合物(史都登氏t试验, $p<0.05$ )视为细胞中的抑制剂。作为阳性对照,以100uM将亮氨酸添加到亮氨酸不足细胞中持续等于化合物处理的时间段。

[1038] 方法6,热偏移方案( $T_m$ 偏移) :

[1039] 全长密码子优化人类Sestrin2与His-MBP标签N端融合且克隆于pMAL6H-C5XT细菌表达载体中。将所述载体转移到大肠杆菌LBSTR(DE3)细胞(Kerafast)中。在37°C下使细胞生长到0.60D,随后用0.2mM IPTG在18°C下诱导蛋白质生产12-14小时。通过在6,000g下离心收集细胞,再悬浮于裂解缓冲液(50mM磷酸钾,pH 8.0,500mM NaCl、30mM咪唑、1mM DTT、10μg/ml核酸酶及1mM PMSF)中且通过声波处理裂解。通过在10,000g下离心20分钟清除裂解物。经由His标签的亲和性捕集,继而为离子交换及尺寸排阻色谱,Sestrin2蛋白质从可溶性洗脱份分离到接近100%纯度。对于热偏移分析,将Sestrin2蛋白质于稀释缓冲液(10mM Tris HC1 pH 7.4、150mM NaCl、1mM DTT、0.1mM EDTA)中稀释到2mg/ml。在进行热偏移分析之前,将2μl Sestrin2蛋白质与8μl ROX染料(Thermo Fisher)、1μL媒剂或化合物及每孔96孔板14μL稀释缓冲液合并,且在冰上培育1小时以允许化合物结合。热偏移分析随后在Agilent MX3005p上进行且各化合物在10μM、100μM及1000μM下重复分析三次。以剂量相关性方式,将与亮氨酸一起培育的Sestrin2熔融温度偏移2.16到11.61摄氏度。基于与媒剂一起培育的Sestrin2的重复热偏移测量的CV%可变性,2度或2度以上的正偏移视为统计显著的。

[1040] 方法7,间接配位体结合分析(ILBA)

[1041] Sestrin2结合到亮氨酸或其它配位体在完整细胞中、体外或在经由用来自细胞信号传导技术(CST, 目录号8487)的兔单株抗Sestrin2抗体的免疫检测纯化蛋白质的情况下检测。CST抗体结合到天然(非变性)Sestrin2通过以使得在亮氨酸结合后抗体降低亲和性的方式结合亮氨酸来调节。类似地, 天然Sestrin2的CST抗体的亲和性在化合物以与亮氨酸类似的方式结合到天然后降低。相反地, 如通过热偏移分析所测量的使Sestrin2去稳定的化合物提高CST抗体对非变性Sestrin2的亲和性。因此, 产生这种间接配位体结合分析(ILBA)的多种格式, 其在亮氨酸或化合物结合之后测量CST抗Sestrin2抗体的亲和性。在一个版本中, 用在氨基酸不足1小时时间段之后由人类细胞系产生的粗裂解物进行分析(细胞裂解于1% Triton、10mM $\beta$ -甘油磷酸酯、10mM焦磷酸钠、40mM HEPES [pH 7.4]、150mM NaCl及2.5mM MgCl<sub>2</sub>中)。裂解物随后与亮氨酸或其它化合物一起在冰上或在室温下培育1小时。在化合物培育之后, 样品经受CST抗Sestrin2抗体免疫沉淀1.5小时, 继而与蛋白质-A琼脂糖一起培育30分钟, 如L.Chantranupong等人, Cell Reports 9:1-8(2014)中所描述。经由离心使琼脂糖共轭抗体-蛋白质复合物沉淀且用兔多克隆抗Sestrin2抗体(Protein Tech, #10795-1-AP)使流过物经受第二轮免疫沉淀以测定相等样品之间的总Sestrin2蛋白含量。用免疫沉淀样品进行SDS-PAGE, 继而为来自SIGMA的小鼠单株抗Sestrin2抗体的蛋白印迹(目录号WH0083667M3)。亮氨酸结合诱导对应于Sestrin2的谱带强度在经来自CST的抗Sestrin2抗体免疫沉淀的样品的免疫印迹上的50%或更大的显著降低, 但未引起Sestrin2谱带在经Protein Tech抗体免疫沉淀的样品的免疫印迹上的变化。这个版本的分析还测量通过与化合物一起培育而诱导的Sestrin2的提高的不稳定性。以相同方式进行分析, 但使Sestrin2去稳定(如通过热偏移分析所测量)的化合物使得对应于使用CST抗体免疫沉淀的Sestrin2的免疫印迹谱带强度提高。

[1042] 这个分析也于过度表达N端耦合到Flag标签的Sestrin2的经培养的人类细胞中进行。在这个版本的分析中, 程序保持相同, 但用小鼠抗Flag抗体(#F3165, SIGMA)进行免疫印迹。当不能结合亮氨酸的Sestrin2的点突变形式进行ILBA时, 未观测到在亮氨酸或 $\gamma$ -甲基亮氨酸结合后CST抗体的亲和性降低。

[1043] 在另一版本的分析中, 经培养的人类细胞经受氨基酸不足1小时继而为亮氨酸或化合物刺激的某一组合。在刺激之后一小时, 除了1小时配位体结合步骤之外, 如上文所描述裂解及处理细胞。

[1044] 间接配位体结合分析也以多孔格式, 使用ALPHAlisa技术(Perkin Elmer)进行。这个版本的分析需要生物素化抗Sestrin2抗体, 抗生蛋白链菌素供体珠粒(Perkin Elmer)与抗Flag受体珠粒(Perkin Elmer)偶合以用于检测过度表达的Flag-Sestrin2, 或与小鼠抗Sestrin2抗体(SIGMA)及抗小鼠受体珠粒(Perkin Elmer)偶合以用于检测内源性Sestrin2。

[1045] 如上文所描述进行分析, 但进行以下修改: 对于分析的亮氨酸或化合物结合部分, 使在1小时氨基酸不足之后由暂时或稳定地过度表达人类Flag-Sestrin2细胞产生的粗裂解物在裂解缓冲液中稀释到0.8mg/ml总蛋白且排列在例如96孔板的多孔板中。为了检测内源性Sestrin2, 使粗裂解物在裂解缓冲液中稀释到4mg/ml总蛋白。将亮氨酸或化合物添加到各孔中且在冰上或在室温下在轻微搅动下培育板1小时。对于检测内源性Sestrin2的分析, 在配位体结合步骤期间, 使生物素化抗Sestrin2抗体(CST)在ALPHAlisa免疫分析缓冲

液(Perkin Elmer)中稀释到5nM,且将5nM小鼠抗Sestrin2抗体(SIGMA)与抗小鼠受体珠粒的4×坯料(40 $\mu$ g/ml)合并。对于Flag-Sestrin2的检测,在免疫分析缓冲液中制备抗标签受体珠粒的4×坯料(40 $\mu$ g/ml)。在配位体结合步骤之后,将5 $\mu$ L裂解物与10 $\mu$ L生物素化抗Sestrin2抗体、12.5 $\mu$ L小鼠Sestrin2抗体/抗小鼠受体珠粒混合物或抗Flag受体珠粒及10 $\mu$ L ALPHAlisa免疫分析缓冲液合并且在室温下培育1小时。最终,在暗处在Envision读板仪上读取板之前添加12.5 $\mu$ L抗生蛋白链菌素供体珠粒(160 $\mu$ g/ml于免疫分析缓冲液中)额外一小时。

[1046] 还如所描述,但利用在免疫分析缓冲液中经稀释的最终反应物浓度3ng/ml的纯化Sestrin2蛋白进行ALPHAlisa分析。

[1047] 最终,在裂解之前,在氨基酸不足条件下,用来自经亮氨酸或化合物处理的细胞的裂解物进行ALPHAlisa。在多孔板中进行基于细胞的处理,且每ALPHAlisa反应使用15 $\mu$ L裂解物(1mg/ml总蛋白)结合10 $\mu$ L生物素化抗体、12.5 $\mu$ L抗体/受体珠粒混合物及12.5 $\mu$ L抗生蛋白链菌素供体珠粒混合物。

[1048] 还用基于捕集的方法,例如如所属领域中进行的夹层ELISA进行间接配位体结合分析。在一个版本的分析中,使用Meso-Scale Discovery (MSD)产生的MULTI-ARRAY®技术进行ILBA。MSD系统基于结合到分析物的抗体的电化学发光检测。在溶解之前,用表达内源性Sestrin2的粗裂解物进行ILBA或体外或在细胞中进行过度表达Flag-Sestrin2及亮氨酸处理。对于内源性Sestrin2的体外ILBA,制备粗裂解物(0.8mg/ml总蛋白)且以针对ALPHAlisa ILBA描述相同的方式进行亮氨酸结合。在配位体结合完成之后,将来自CST的生物素化抗Sestrin2抗体添加到各孔中直到最终浓度为0.25 $\mu$ g/ml且在4°C下在轻微搅动下培育1小时。在以下方法中的一者中实现96孔板的孔中的各样品的捕集:经抗生蛋白链菌素涂布的MSD培养板或涂布有来自SIGMA的小鼠抗Sestrin2抗体的裸露的MSD培养板。捕集需要每孔25 $\mu$ L样品,继而在350rpm下在震荡下培育1小时。在样品捕集之后,用具有0.1% Tween (TBS-T)的Tris缓冲生理盐水洗涤孔三次。如果样品捕获于抗生蛋白链菌素涂布板上,那么随后在震荡下在350rpm下将小鼠单株抗Sestrin2抗体(SIGMA)添加到1 $\mu$ g/ml的最终浓度中持续1小时。孔再次在TBS-T中洗涤,且在震荡下在350rpm下以1 $\mu$ g/ml的最终浓度添加抗小鼠第二SULFO-TAG抗体(MSD)持续一小时。最终,用TBS-T洗涤孔三次且添加2×Read缓冲液(MSD)且紧接着在MSD仪器上读取板。如果在洗涤之后用涂布有小鼠抗Sestrin2抗体的裸露培养板捕获样品,那么在震荡下以1 $\mu$ g/ml的最终浓度添加抗生蛋白链菌素第二SULFO-TAG抗体(MSD)持续1小时,继而洗涤且在分析之前与Read缓冲液一起培育。

[1049] 在另一版本的所述分析中,分析过度表达Flag-Sestrin2的粗裂解物且用小鼠单株抗Flag抗体(SIGMA),使用如上文所描述的相同的基于MSD的方案捕获或检测。

[1050] 对于所有分析,以显著方式降低对应于Sestrin2的免疫反应性的信号的化合物视为亮氨酸模拟物,同时以显著方式提高信号的化合物视为潜在亮氨酸拮抗剂。

[1051] 表3展示本发明的所选化合物的活性。化合物编号对应于表1及2中的化合物编号。具有表示为“A”的活性的化合物相对于亮氨酸的活性% $\geq$ 40%,具有表示为“B”的活性的化合物相对于亮氨酸的活性% $\leq$ -40%;具有表示为“C”的活性的化合物相对于亮氨酸的活性%在-40与40%之间。在指定浓度下,具有表示为“D”的活性的化合物相对于DMSO对照的偏移为0.5到2倍,具有表示为“E”的活性的化合物相对于DMSO的偏移为2.1到5倍,具有表示

为“F”的活性的化合物相对于DMSO的偏移为5.1-10倍,且具有表示为“G”的活性的化合物相对于DMSO的偏移为10.1到14倍。

[1052] 相对于亮氨酸分析的活性%活性使用分析方法1测定。基于细胞的mTORC1活化分析的活性使用分析方法2测定。

[1053] 表3.示范性化合物的分析数据

化合物编号	亮氨酸活性: 活性%	基于细胞的 mTORC1 活化	基于细胞的 mTORC1 活化浓度(μM)
I-1	B		
I-2	B		
I-3	B		
I-4	C		
I-5	B		
I-6	C		
I-7	B		
I-8	B		
I-9	C	E	100
I-10	C	D	30 及 100
I-11	C		
I-12	C		
I-13	C		
I-14	B		
I-15	C		
I-16	C		
I-17	C		
I-18	C		
I-19	C		
I-20	C		
I-21	C		
I-22	C		
I-23	C	D 到 F	100
I-24	A		
I-25	C		
I-26	C		
I-27	A		
I-28	C		
I-29	A		
I-30	A		
I-31	A		

[1054]

化合物编号	亮氨酸活性: 活性%	基于细胞的 mTORC1 活化	基于细胞的 mTORC1 活化浓度(μM)
I-32	A		
I-33	C		
I-34	C		
I-35	A		
I-36	B		
I-37	A	E 到 F	100
I-38	C		
I-39	C		
I-40	A		
I-41	A		
I-42	A	D 到 F	100
I-43	A	D 到 E	100
I-44	A	D	100
I-45	B		
I-46	C	D	100
I-47	C	D	100
I-48	C		
I-49	C		
I-50	C		
I-145	A		
I-146	A		
I-147	A		
I-148	A		
I-149	C		
I-150	C		
I-151	C		
I-152	C		
I-153	C		
I-154	C		
I-155	C		
I-156	C		
I-157	B 到 C		
I-158	C		
I-159	A		
I-160	C		
I-161	C		
I-162	C		
I-163	A		
I-164	A		
I-165	A 到 C		
I-166	C		
I-167	A	D 到 F	100
I-168		D 到 E	100

[1055]

[1056] 表4展示在基于ALPHALisa细胞的分析(方法5)中具有活性的本发明的所选化合物。化合物编号对应于表1及2中的化合物编号。表4中列出的化合物为mTORC1活化剂且具有相对于阳性亮氨酸对照>2倍的活性。

[1057] 表4. 在基于ALPHALisa细胞的分析中具有活性的示范性化合物

[1058]

化合物编号
I-44
I-43
I-42
I-167
I-253
I-145
I-252
I-251
I-250
I-88
I-56
I-96
I-206
I-122
I-90
I-128
I-195
I-194
I-193
I-93
I-249
I-120
I-190
I-189
I-248
I-247
I-246
I-185
I-183
I-179
I-178
I-177
I-176
I-175
I-207
I-245
I-210
I-244
I-243
I-241
I-240
I-239
I-238
I-237
I-236
I-235

[1059]

化合物编号
I-234
I-233
I-232
I-231
I-230
I-229
I-228

[1060] 表5展示在热偏移分析(方法6)中具有活性的本发明的所选化合物。化合物编号对应于表1及2中的化合物编号。表5中列出的化合物展现2度或更多的正向偏移。

[1061] 表5. 在热偏移分析中具有活性的示范性化合物

[1062]

化合物编号
I-44
I-43
I-42
I-31
I-27
I-4
I-47
I-167
I-164
I-163
I-254
I-253
I-145
I-252
I-251
I-250
I-206
I-122
I-203
I-90
I-201
I-129
I-128
I-196
I-195
I-194
I-93
I-120
I-191
I-179
I-178
I-177
I-176
I-175

化合物编号
I-209
I-208
I-207
I-245
I-210
I-244
I-237
I-235
I-233
I-232
I-231
I-229

[1063]

[1064] 体内测试的通用材料及方法

[1065] 动物使用:在到达(耶鲁大学,New Haven CT)后将体重175-200g的雄性史泊格多利大白鼠(Charles River Laboratories,Wilmington,MA)群养且在开始实验研究之前适应环境5天。除了在方案指定禁食期间之外,为大鼠随意提供食物及水。每日监测动物的临床症状。合格的兽医提供所有啮齿动物程序的监管。所有人员接受耶鲁动物护理及使用委员会(IACUC)的训练。在耶鲁大学严格根据美国国家卫生研究院IACUC进行所有动物程序且经耶鲁动物护理及使用委员会批准。

[1066] 使用雌性尿液嗅探测试(FUST)的行为分析:根据所公布的程序(Malkesman, O. 等人,Biol Psychiatry 67(9):864-71(2010)),在给药后24小时进行FUST。简单来说,在其饲养笼中使大鼠适应浸渍于自来水中的棉签60分钟。随后,使大鼠接触第2个浸渍于自来水中的棉签且45分钟后使其接触注入11到14周龄发情雌性大鼠的新鲜大鼠尿液的第3个棉签。对于各动物,历经5分钟,对嗅闻棉尖涂覆器所花费的总时间进行定量。

[1067] 使用运动活性评定(LMA)的行为分析:于开放空间在装备有由平行红外光束排组成的自动化活性计量器中根据所公布的程序(Warner-Schmidt, J.L.&Duman, R.S. PNAS 104 (11):4647-52 (2007))评估LMA。对于各动物,历经30分钟间隔,记录射束断裂的数目。

[1068] 使用新颖遏制喂饲测试(NSFT)的行为分析:如先前所描述进行NSFT(Warner-Schmidt, J.L.&Duman, R.S. PNAS 104 (11):4647-52 (2007))。大鼠在其饲养笼中禁食20小时,且随后放置于塑料玻璃开放空间(76.5cm×76.5cm×40cm)中,其中心具有少量食物。使动物探究开放空间8分钟且记录摄食等待时间。

[1069] 使用蔗糖偏好测试(SPT)的行为分析:使大鼠适应适口的蔗糖1%蔗糖溶液48小时以避免新奇恐怖症。在第0天结束时大鼠经NV-5138或Veh处理且在第1天投与后24小时进行SPT。对于SPT,大鼠缺水6小时且暴露于具有相等体积1%蔗糖或水的两个瓶子60分钟。所消耗的蔗糖水的体积与1小时测试期间消耗的总水的比率如蔗糖偏好所定义(例如1的比率将指示大鼠仅消耗1%蔗糖,而0.5的比率将指示大鼠喝了等量1%蔗糖及水)。

[1070] 长期不可预测压力(CUS)条件:使大鼠接触顺序可变的12种不可预测应激源,预防如所描述的适应(Li, N. 等人,Biol Psychiatry 69(8):754-61(2011))。应用以下十二个应激源(每天2次,持续25天):旋转笼、开灯、关灯、冷压力、分离、游泳压力、剥夺食物及水、湿垫褥、频闪仪、笼倾斜、气味暴露及群养。无应激(NS)组中的动物通常在不施加外部应激源

的情况下圈养。处理NS及CUS大鼠两者且每周称重。

[1071] 猴类人类威胁测试(HTT)：历经较长时间段，定期地通过人类观测器的存在刺激猴。已知这类长期刺激提高血浆皮质醇且下丘脑-垂体-肾上腺功能的后续提高对抑郁症的病理生理学作出贡献。

[1072] 实例A：在化合物或氯胺酮的单次给药之后新颖遏制喂饲及雌性尿液嗅探测试的行为改变

[1073] 研究设计：在5天环境适应时间段之后，将体重在175与200g之间的三十二(32)个雄性史泊格多利雄性大鼠随机分组为4个研究组(n=8/处理组)。在研究第0天，分别通过腹膜内注射(i.p.)，在第1组及第2组中，大鼠接受生理盐水(Sal)或氯胺酮(Ket)的单次给药。第3组及第4组中的大鼠分别通过口服管饲接受NV-5138媒剂(Veh, 0.5%甲基纤维素/0.1% Tween-80)或NV-5138(160mg/kg)的单次给药。所有大鼠在给药后第1天24小时经受FUST。在给药之后第2天48小时，所有大鼠的LMA在开放空间中测量。大鼠随后禁食20小时且给药后72小时经受NSFT。研究设计呈现于表6中。测试物品投与的时刻表及3个行为测试概述于图1中。

[1074] 制备测试物品：以10mg/mL的浓度使Ket(Sigma, 目录号K1884)溶解于Sal中。对于第1组及第2组，分别i.p.注射1ml/kg体积的Sal或Ket。通过以50mg/mL的浓度溶解于Veh(0.5%甲基纤维素/0.1% Tween-80)中制备NV-5138(Navitor, 批次号06)。分别通过口服管饲给第3组及第4组中的研究动物投与基于动物的重量的给药体积(3.2mL/kg)的Veh或NV-5138。给药当天制备测试物品。

[1075] 结果：第一天FUST的结果概述于图2中。用Ket处理使雄性大鼠嗅闻雌性尿液所花费的时间量明显提高2.1倍(分别在Ket第2组与Sal第1组中, 17.4±3.9s相比于36.5±7.9s, p<0.05)。类似地，用NV-5138处理使雄性大鼠嗅闻雌性尿液所花费的时间量明显提高2.9倍(分别在NV-5138第4组相比于Veh第3组中, 33.8±2.9s相比于11.6±6.2s, p<0.01)。第2天LMA的结果概述于图3中。对射束断裂的平均数目进行定量。使用未配对2尾史都登氏t试验的群组之间的LMA无显著差异。第3天NSFT的结果概述于图4中。相比于第1组(Sal)，在第2组(Ket)中观测到摄食等待时间显著降低31%(p<0.01)。类似地，相比于第3组(Veh)，在第4组(NV)中观测到摄食等待时间显著降低36%(p<0.01)。

[1076] 表6: 研究设计实例A

	组	n	性别	体重(g)	途径	处理	行为测试
[1077]	第1组	8	M	175-200	i.p.	Sal	FUST、 LMA 及 NSFT
	第2组	8	M	175-200	i.p.	Ket (10 mg/kg)	
	第3组	8	M	175-200	经口	Veh	
	第4组	8	M	175-200	经口	NV-5138 (160 mg/kg)	

[1078] 实例B：单次剂量的NV-5138及氯胺酮投与对mTORC1信号传导路径的比较性作用及来源于大鼠前额叶皮层的突触体制剂中的突触蛋白表达

[1079] 研究设计：在5天环境适应时间段之后，将体重在175与200g之间的四十八(48)个雄性史泊格多利大白鼠随机分组为8个研究组(n=6/组)。在研究第0天，第3组及第7组中的大鼠接受Sal的单次给药，同时第4组及第8组接受Ket的单次给药(10mg/kg)，各自通过i.p.注射。第1组及第5组中的大鼠接受Veh的单次给药，同时第2组及第6组接受NV-5138的单次

给药(160mg/kg),各自通过口服管饲。在给药之后一小时,第1组到第4组中的大鼠通过清醒的断头术处死且继而采集PFC。粗突触体由PFC及三种mTORC1底物(pmTOR、pp70S6K及p4E-BP1)制备,且通过WB对相应的总蛋白装载对照物(mTOR、p70S6K及GAPDH)进行定量。在给药之后二十四小时,第5组到第8组中的大鼠通过清醒的断头术处死且采集PFC。粗突触体由PFC及突触蛋白质(GluR1及PSD95)制备,以及总蛋白装载对照物(GAPDH)通过WB定量。研究设计呈现于表7中。测试物品投与的时刻表及WB的大鼠的处死提供于图5中。

[1080] 用于投与的Ket及NV-5138的调配:以10mg/mL的浓度使Ket(Sigma,目录号K1884)溶解于Sal中。i.p.注射1mL/kg体积的通过以50mg/mL的浓度溶解于Veh中制备的NV-5138(Navitor,批次号06)。通过口服管饲投与基于动物重量的给药体积(3.2mL/kg)。给药当天制备测试物品。

[1081] 前额叶皮质突触体制备:解剖所有组(n=6/组)中的大鼠的大脑且在PBS中冲洗。PFC如图6中所示收集且在4℃下在均匀化缓冲液(0.32M蔗糖、pH 7.4的20mM HEPES、1mM EDTA、5mM NaF、1mM NaVO<sub>3</sub>及蛋白酶抑制剂混合液(Roche;#19543200))中均质化。在4℃下在2,800rpm下离心均质物10分钟,其后去除上清液且在4℃下在12,000rpm下再离心10分钟。使含有粗突触体的所得集结粒再悬浮于裂解缓冲液(50mM Tris-HCl(pH 7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、2mM EDTA、1mM NaVO<sub>3</sub>、5mM NaF及蛋白酶抑制剂混合液)中且在冰上在50%幅值下声波处理20秒。通过布莱德福(Bradford)分析测定蛋白质浓度且将所有样品与装载缓冲液(60mM Tris-HCl pH 6.8、20mM DTT、2% SDS、10%甘油、5% β-巯基乙醇及0.01%溴酚蓝)混合且存储于-20℃下直到WB分析为止。

[1082] 蛋白质印迹分析:如先前所描述进行GluR1、PSD95及GAPDH的蛋白质印迹分析。简单来说,将突触体制剂(15μg总蛋白)装载到用于电泳的10-15% SDS PAGE凝胶中且转移到转移缓冲液(10×预混合电泳缓冲液含有25mM Tris、192mM甘氨酸,pH 8.3;Bio-Rad)中的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。在室温下用阻断缓冲液(2% BSA在PBS-T中(10mM磷酸酯,pH 7.4、2.7mM KC1、137mM NaCl及0.1% Tween-20))堵塞PVDF膜1小时且随后在4℃下在阻断缓冲液中与如下第一抗体一起培育隔夜:1:1000的兔抗pmTOR(细胞信号传导;#5536)、1:1000的兔抗mTOR(细胞信号传导;#2972)、1:1000的兔抗pp70S6K(细胞信号传导;#9205)、1:1000的兔抗p70S6K(细胞信号传导;#2708)、1:1000的兔抗p4E-BP1(细胞信号传导;#2855)、1:1000的兔抗GluR1(细胞信号传导;#13185)、1:1000的兔抗突触蛋白1(细胞信号传导;#5297)、1:1000的兔抗PSD95(细胞信号传导;#9644)及1:1000的兔抗GAPDH(细胞信号传导;#5174)。次日,在PBS-T缓冲液中洗涤膜3次且与1:5000到1:10000的辣根过氧化酶共轭抗小鼠或抗兔二级抗体(Vector Laboratories Inc)一起培育1小时。在用PBS-T缓冲液最终三次洗涤之后,使用增强化学发光检测谱带。印迹随后在再生缓冲液(2% SDS、100mMβ-巯基乙醇、50mM Tris-HCl pH 6.8)中在50-55℃下培育30分钟,继而用PBS-T缓冲液洗涤三次。再生印迹在阻断溶液中保持1小时且与针对装载对照物的相应蛋白质或GAPDH的总含量的初级抗体一起培育。使用NIH Image J软件进行各蛋白质的磷酸化及总免疫反应性的密度计分析。所得密度计读数用于产生磷酸化蛋白质与其相应总蛋白含量或如所指示的GAPDH的比率。所得比率进一步标准化为各蛋白质的Sal或Veh处理对照组。

[1083] 结果:标准化为对照Veh或Sal的pmTOR、pp70S6K及P4E-BP的WB分析结果概述于图7中。NV-5138及Ket投与明显提高投与后1小时由PFC制备的粗突触体中的pmTOR及p4E-BP1的

含量。此外,NV-5138(而非Ket)明显提高投与后1小时pp70S6K的含量。突触蛋白GluR1及突触蛋白1的WB分析结果概述于图8中。NV-5138及Ket投与明显提高投与后24小时由PFC制备的粗突触体中的GluR1及突触蛋白1的含量。此外,Ket明显提高投与后24小时PSD95的含量,同时存在NV-5138投与后表达提高的趋势。

[1084] 表7:研究设计实例B

组	n	性别	体重(g)	时间点	途径	处理	所使用的 WB 抗体
[1085]	第1组	6	M	175-200	1 小时	经口	Veh
	第2组	6	M	175-200	1 小时	经口	NV-5138 (160 mg/kg)
	第3组	6	M	175-200	1 小时	i.p.	Sal
	第4组	6	M	175-200	1 小时	i.p.	Ket (10 mg/kg)
	第5组	6	M	175-200	24 小时	经口	Veh
	第6组	6	M	175-200	24 小时	经口	NV-5138 (160 mg/kg)
	第7组	6	M	175-200	24 小时	i.p.	Sal
	第8组	6	M	175-200	24 小时	i.p.	Ket (10 mg/kg)

[1086] 实例C:NV-5138的单一Roal剂量对大鼠大脑多个区域中的mTORC1信号传导路径的作用

[1087] 研究设计:在5天环境适应时间段之后,将十(10)个体重在175与200g之间的雄性大鼠随机分组为2个研究组(n=5/组)。第1组通过口服管饲接受Veh的单次投与且第2组通过口服管饲接受NV-5138的单次投与(160mg/kg在Veh中制备)。在投与后一小时,通过清醒的断头术处死大鼠,除了通过显微切割分离PFC、海马体、纹状体、新皮层及小脑之外,收集血浆以用于NV-5138暴露分析。由采集的组织制备总蛋白萃取物且提交到WB分析,继而为所选择的mTORC1底物的定量分析。研究设计呈现于表8中。测试物品投与的时刻表及WB大鼠的处死提供于图9中。

[1088] 调配NV-5138(160mg/ml):以160mg/mL的浓度通过溶解在Veh中制备NV-5138(Navitor,批次号09)。通过口服管饲给第2组中的研究动物投与基于动物的重量的给药体积(10mL/kg)。给药当天制备测试物品。

[1089] 蛋白质印迹分析:装载突触体制剂(15μg总蛋白)且在NuPAGE 4-12% Bis-Tris凝胶上分离且使用CAPS缓冲液(10mM 3-(环己基氨基)-1-丙磺酸,12.5%乙醇pH=10)转移到PVDF膜(Immobilon-FL PVDF膜,Millipore)。在转移之后,在室温下在奥德赛(Odyssey)阻断缓冲液(Licor)中培育膜1小时。在阻断之后,用第一抗体在4°C下培育膜隔夜。所使用的第一抗体为奥德赛阻断缓冲液中的1:1000的兔抗<sup>S400/440</sup>pS6(细胞信号传导;#5364)及1:10000的小鼠抗α-微管蛋白(Sigma;#T5168)。次日,在1×TBS-Tween(25mM Tris,pH 7.4、3.0mM KC1、140mM NaCl及0.05% Tween-20)中洗涤膜三次且在奥德赛阻断缓冲液中以1:20000与染料偶合的二次抗体(来自LI-COR的山羊抗小鼠IRdye680及山羊抗兔IRdye800)一起培育30分钟,随后在1×TBS-Tween中洗涤三次。使用奥德赛红外成像系统(LI-COR Bioscience)定量信号。所得密度计读数用于产生磷酸化蛋白质与α-微管蛋白的比率。所得比率进一步标准化为媒剂处理对照组。

[1090] 前额叶皮质突触体制剂:给药后一小时,通过清醒的断头术处死大鼠,收集血浆及大脑。各组(n=5,Veh;n=5,NV)解剖大脑且在PBS中冲洗。如图10中所示收集PFC、纹状体、

海马体、新皮层及小脑,且在4℃下在均匀化缓冲液(0.32M蔗糖、pH 7.4的20mM HEPES、1mM EDTA、5mM NaF、1mM NaVO<sub>3</sub>及蛋白酶抑制剂混合液(Roche;#19543200))中均质化。在2,800rpm下在4℃下离心匀浆10分钟,其后去除上清液且在12,000rpm下在4℃下再离心10分钟。使所得集结粒再悬浮于裂解缓冲液(50mM Tris-HCl(pH 7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、2mM EDTA、1mM NaVO<sub>3</sub>、5mM NaF及蛋白酶抑制剂混合液)中且在冰上在50%幅值下声波处理20秒。通过布莱德福分析测定总蛋白浓度且将所有样品与装载缓冲液(50mM Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、5%甘油、5%β-巯基乙醇及0.01%溴酚蓝)混合且存储于-20℃下直到WB分析为止。

[1091] 化合物分析:为了测定血浆中的化合物含量,从在乙腈中含有150μL内标物(甲苯磺丁脲)的50μL所得组织均质物沉淀蛋白质,继而在3000rpm下离心10分钟。将一百微升所得上清液添加到100μL水中,充分混合且在LC-MS/MS系统上使用用于评定化合物含量的以下程序注射:

[1092] • Phenomenex LUX纤维素管柱(4.6×150mm,5μm)

[1093] • 移动相A-0.1%甲酸水溶液

[1094] • 移动相B-含0.1%甲酸的乙腈

[1095] • 梯度:

[1096] o初始-40% A

[1097] o2分钟-40% A

[1098] o2.1分钟-2% A

[1099] o3分钟-2% A

[1100] o3.1分钟-40% A

[1101] o4分钟-40% A

[1102] • 流动速率0.8mL/min

[1103] • 管柱温度40℃

[1104] • Sciex 5500Triple Quad质谱

[1105] 结果:暴露于NV-5138的大脑区的结果概述于图11中。总之,在随意获得食物的大鼠中经口投与160mg/kg NV-5138在大部分但并非所有大脑的主要区域中产生mTORC1的显著活化。

[1106] 表8:实例C的研究设计

	组	n	性别	体重(g)	途径	处理	采集的组织	所使用的 WB 抗体
[1107]	第1组	5	M	175-200	经口	Veh	血浆、PFC、纹状体、海马体、新皮层及小脑	pS6 及 α-微管蛋白
	第2组	5	M	175-200	经口	NV-5138 (160 mg/kg)		

[1108] 实例D:NV-5138或亮氨酸的单一经口剂量对大鼠脑及所选外周器官中的mTORC1信号传导路径的作用

[1109] 研究设计:在5天环境适应时间段之后,将体重在175与200g之间的三十(30)个雄性大鼠随机分组为3个研究组(n=10)。通过口服管饲,如表9中所展示的剂量及图12中所展示的时刻表投与测试物品。给药后一小时,通过清醒的断头术处死大鼠,收集血浆、大脑及所选择的外周组织用于化合物含量及WB分析。针对WB制备的组织定量mTORC1底物pS6作为

mTORC1活性的度量。

[1110] 制备测试物品:通过分别以16mg/mL及100mg/mL的浓度溶解在Veh(0.5%甲基纤维素/0.1% Tween-80)中制备NV-5138(Navitor,批次号12)及亮氨酸(Leu,Sigma;#L8912)。通过口服管饲投与基于动物重量的给药体积(10mL/kg)。给药当天制备测试物品。

[1111] 组织制备:在给药后一小时,通过清醒的断头术处死大鼠,采集血浆、大脑及外周组织且紧接着冷冻在液氮中。解冻组织且在4℃下使用MP均质器在裂解缓冲液(细胞溶解缓冲液:每50mL新鲜溶液含1% Triton X-100、50mM HEPES pH 7.4、100mM NaCl、2mM EDTA、10mMβ-甘油磷酸盐、10mM焦磷酸钠及1个蛋白酶抑制剂突片)中均质化1分钟两次。随后在冰上在50%幅值下声波处理裂解物20秒。通过布莱德福分析测定蛋白质浓度且将所有样品与装载缓冲液(50mM Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、5%甘油、5%β-巯基乙醇及0.01%溴酚蓝)混合且存储于-20℃下直到WB分析为止。

[1112] 蛋白质印迹(WB)分析:装载等量各样品(15μg总蛋白)且在NuPAGE 4-12% Bis-Tris凝胶上分离且使用CAPS缓冲液(10mM 3-(环己基氨基)-1-丙磺酸,12.5%乙醇pH=10)转移到PVDF膜(Immobilon-FL PVDF膜,Millipore)。在转移之后,在室温下在奥德赛阻断缓冲液(Licor)中培育膜1小时。在阻断之后,用第一抗体在4℃下培育膜隔夜。所使用的第一抗体为奥德赛阻断缓冲液中的1:1000的兔抗S400/440pS6(细胞信号传导;#5364)、1:1000的小鼠抗GAPDH(Sigma;#G8795)及1:10000的小鼠抗α-微管蛋白(Sigma;#T5168)。次日,在1×TBS-Tween(25mM Tris,pH 7.4、3.0mM KCl、140mM NaCl及0.05% Tween-20)中洗涤膜三次且在奥德赛阻断缓冲液中以1:20000与染料偶合的二次抗体(来自LI-COR的山羊抗小鼠IRdye680及山羊抗兔IRdye800)一起培育30分钟,随后在1×TBS-Tween中洗涤三次。使用奥德赛红外成像系统(LI-COR Bioscience)定量信号。所得密度计读数用于产生磷酸化蛋白质与α-微管蛋白或GAPDH的比率。所得比率进一步标准化为媒剂处理对照组。

[1113] 化合物分析:为了测定组织制剂中的化合物含量,将3:1v:w(μL:mg)的比率的70%异丙醇添加到组织样品中,继而用珠粒搅拌器(Biospec)均匀化。蛋白质从150μL含有内标物(甲苯磺丁脲)的乙腈中的50μL所得组织均质物沉淀,继而在3000rpm下离心10分钟。将一百微升所得上清液添加到100μL水中,充分混合且在LC-MS/MS系统上使用用于评定化合物含量的以下程序注射:

- [1114] • Phenomenex LUX纤维素管柱(4.6×150mm,5μm)
- [1115] • 移动相A-0.1%甲酸水溶液
- [1116] • 移动相B-含0.1%甲酸的乙腈
- [1117] • 梯度:
  - [1118] o初始-40% A
  - [1119] o2分钟-40% A
  - [1120] o2.1分钟-2% A
  - [1121] o3分钟-2% A
  - [1122] o3.1分钟-40% A
  - [1123] o4分钟-40% A
  - [1124] • 流动速率0.8mL/min
  - [1125] • 管柱温度40℃

[1126] • Sciex 5500Triple Quad质谱

[1127] 结果:NV-5138的单次投与对mTORC1活化的结果概述于图13中。NV-5138产生mTORC1的显著活化,如相比于Leu的大鼠脑中提高的pS6含量所示,其中未观测到活化。相比于大脑处理,Leu及NV-5138明显提高大鼠肾脏、心脏、胫前部及附睾脂肪中的pS6含量。然而,在用Leu给药之后睾丸及肝脏中的pS6含量的显著提高,在NV-5138投与之后仅在睾丸中而非肝脏中观测到显著活化。

[1128] 表9:研究设计实例D

	组	N	性别	体重(g)	途径	处理	采集的组织	所使用的WB抗体
[1129]	第1组	10	M	175-200	经口	Veh	血浆、大脑、心脏、肺脏、肝脏、腓肠肌 脾脏、肾脏、睾丸、眼睛、胫前部、附睾 脂肪、胸腺	pS6、α-微管蛋白及GAPDH
	第2组	10	M	175-200	经口	Leu (500 mg/kg)		
	第3组	10	M	175-200	经口	NV-5138 (160 mg/kg)		

[1130] 实例E:NV-5138的单次给药对蔗糖偏好及新颖遏制喂饲测试的作用及突触蛋白表达

[1131] 研究设计:在5天环境适应时间段之后,将体重在175与200g之间的五十六(56)个雄性大鼠随机分组为4个研究组(n=14/处理组)。在研究前20天,使两组大鼠经受CUS 25天且使两组大鼠圈养,通常充当NS组。在CUS方案的第21天,大鼠通过口服管饲(第0天)接受Veh或NV-5138(160mg/kg)的单次给药。SPT及NSFT分别进行24及48小时后投与(1天及2天)。在行为测试完成后,在25天CUS方案之后,在第5天投与NV-5138或Veh的第二剂量且通过清醒的断头术处死大鼠24小时。粗突触体由PFC制备,且通过WB定量突触蛋白、GluR1及PSD95。研究设计呈现于表10中。测试物品投与、行为测试及WB大鼠的处死的时刻表提供于图14中。

[1132] 调配NV-5138 (50mg/mL):通过在Veh中溶解到50mg/mL的浓度制备NV-5138 (Navitor, 批次号07)。通过口服管饲,以160mg/kg的最终剂量的10mL/kg体积,向第2组及第4组中的大鼠投与溶液。向第1组及第3组投与等效体积的Veh。

[1133] 前额叶皮质突触体制备:解剖来自第1组(n=8)、第3组(n=7)及第4组(n=7)中的大鼠的大脑且在PBS中冲洗。不进行第2组的组织制备。如图15中所示收集PFC且在均匀化缓冲液(0.32M蔗糖、pH 7.4的20mM HEPES、1mM EDTA、5mM NaF、1mM NaVO<sub>3</sub>及蛋白酶抑制剂混合液(Roche;#19543200))中在4°C下均质化。均质物在2,800rpm下在4°C下离心10分钟,其后去除上清液且在12,000rpm下在4°C下再离心10分钟。使所得集结粒再悬浮于裂解缓冲液(50mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、2mM EDTA、1mM NaVO<sub>3</sub>、5mM NaF及蛋白酶抑制剂混合液)中且在冰上在50%幅值下声波处理20秒。通过布莱德福分析测定蛋白质浓度且将所有样品与装载缓冲液(60mM Tris-HCl pH 6.8、20mM DTT、2% SDS、10%甘油、5%β-巯基乙醇及0.01%溴酚蓝)混合且存储于-20°C下直到WB分析为止。

[1134] 蛋白质印迹分析:如先前所描述进行GluR1、PSD95及GAPDH的蛋白质印迹分析(Li, N.等人, Science 329(5994):959-964(2010))。简单来说,将突触体制剂(15μg蛋白质)装载到用于电泳的10-15% SDS PAGE凝胶中且转移到转移缓冲液(10×预混合电泳缓冲液含有25mM Tris、192mM甘氨酸, pH 8.3; Bio-Rad)中的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。在室温下用阻断

缓冲液(2% BSA在PBS-T中(10mM磷酸酯,pH 7.4、2.7mM KC1、137mM NaCl及0.1% Tween-20))阻断PVDF膜1小时且随后在4℃下在阻断缓冲液中与第一抗体一起培育隔夜:1:1000的兔抗GluR1(细胞信号传导;#13185)、1:1000的兔抗PSD95(细胞信号传导;#9644)及1:1000的兔抗GAPDH(细胞信号传导;#5174)。次日,在PBS-T缓冲液中洗涤膜3次且与1:5000到1:10000的辣根过氧化酶共轭抗小鼠或抗兔二级抗体一起培育1小时。在用PBS-T缓冲液最终三次洗涤之后,使用增强化学发光检测谱带。印迹随后在再生缓冲液(2% SDS、100mM $\beta$ -巯基乙醇、50mM Tris pH 6.8)中在50-55℃下培育30分钟,继而用PBS-T缓冲液洗涤三次。再生印迹在阻断溶液中保持1小时且与针对装载对照物的GAPDH的初级抗体一起培育。使用NIH Image J软件进行各蛋白质的总免疫反应性的密度计分析。所得密度计读数用于产生总蛋白与GAPDH的比率。所得比率进一步标准化为各蛋白质的NS-Veh组。

[1135] 结果:体重测量结果概述于图16中。在研究前21天,通过体重将大鼠随机分组为4组以使得其平均体重在CUS程序开始时相同。第1组(n=14)及第2组(n=14)圈养在其普通笼具中。从20天前到第0天,使第3组(n=14)及第4组(n=14)(注释:这些组中的每一者的一个动物在CUS期间)死亡,因此21天前的数据为各组中n=13)。在21天(第1天)之后,无应激(NS)大鼠平均增重180.1g,同时CUS大鼠与无应激基团相比增重少15%(134.9g)(p<0.0001)。SPT结果概述于图17中。SPT在第1天(给药后24小时)进行。在NS大鼠中,Veh及NV-5138组中1%蔗糖与用水量的平均比率相等(分别0.78及0.76)。相比之下,第3组中的大鼠展示0.59的平均1%蔗糖与水比率的蔗糖偏好降低(相比于所有其它组,p<0.05)。第4组中的大鼠具有与第2组一致(0.79的比率)的蔗糖溶液偏好。NSFT结果概述于图18中。在第1组及第2组中,在NV-5138处理之后48小时,摄食等待时间明显从596.7±24.7s降低到430.6±25.3s(p<0.01)。在21天CUS之后,第3组中的大鼠展现与第1组(p<0.01,596.7±24.7s)相比提高的摄食等待时间(773.9±36.2s)。相比于第3组(773.9±36.2s),在第4组中用NV-5138处理CUS动物明显使摄食等待时间降低到520.1±40.35s(p<0.0001)。在NSFT之后紧接着在饲养笼喂饲中未观测到显著差异,表明食欲降低不为这些结果因素。对饲养笼喂饲无作用。粗突触体中的GluR1及PSD95的蛋白质印迹分析结果概述于图19中。相比于第1组(\*\*p<0.01),第3组中的GluR1(A图)及PSD95(B图)的浓度明显降低(≈20%)。用NV-5138处理在给药后24小时产生突触标记物的标准化(\*\*p<0.01(对于GluR1)及\*p<0.05(对于PSD95))。

[1136] 表10:实例E的研究设计

	组	n	性别	体重(g)	途径	处理(第0天及第5天)	调理	行为测试	体外终点
[1137]	第1组	14	M	175-200	经口	Veh	NS	SPT, NSFT	通过 WB 的 GluR1 及 PSD95
	第2组	14	M	175-200	经口	NV, 160 mg/kg	NS		
	第3组	14 <sup>1</sup>	M	175-200	经口	Veh	CUS		
	第4组	14 <sup>1</sup>	M	175-200	经口	NV, 160 mg/kg	CUS		

[1138] 实例F:在大鼠中单次经口投与之后强迫游泳及新颖遏制喂饲测试中的NV-5138的药理学活性的mTORC1活化依赖性

[1139] 研究设计:在5天环境适应时间段之后,将体重在175与200g之间的二十(20)个雄性大鼠随机分组为3个研究组(n=6-7/组)。所有大鼠在给药之前2周以手术方式在PFC中植入有双侧IT插管。在给药当天,所有处理组接受双侧IT输注(0.5 $\mu$ L/侧),其含有雷帕霉素

(R) 媒剂(Veh-R, 10% DMSO)或雷帕霉素(R, 0.01nmol/μL), 其此前已展示完全抑制mTORC1活性。在鞘内输注之后三十分钟, 通过口服管饲投与NV-5138媒剂(Veh-NV, 0.5%甲基纤维素/0.1% Tween-80)或NV-5138(160mg/kg)。在经口给药之后指定时间(FST 24小时(第1天)、LMA 48小时(第2天)及NSFT 72小时(20小时禁食时间段之后第3天))评估各处理组。测量LMA以排除一般运动活性的总体改变。研究设计呈现于表11中, 其中手术程序时刻表、测试物品投与及行为测试提供于图20中。

[1140] 制备测试物品: 在10% DMSO(Veh-R)溶液中制备雷帕霉素(细胞信号传导; #9904)直到10μM的最终浓度。在通过口服管饲用NV-5138或Veh-NV处理之前, 经由IT输注30分钟将R或Veh-R两侧投与(每侧0.005nmol/0.5μL)到内侧PFC中。通过以50mg/mL的浓度溶解于Veh(0.5%甲基纤维素/0.1% Tween-80)中制备NV-5138(批次号07)。通过口服管饲给第2组及第3组中的研究动物投与基于动物的重量的给药体积(3.2mL/kg)。

[1141] 手术程序及雷帕霉素投与: 大鼠立体定向地于内侧PFC(从前囟坐标:+3.2AP, ±1.0ML, 从硬脑膜-3.5DV)中植入有导向插管(22GA)。在戊巴比妥(Nembutal)麻醉下(i.p. 55mg/kg)进行手术程序。手术后护理在于手术周围投与卡洛芬(carprofen)(5mg/kg)且局部投与三重抗生素。在2周恢复期之后, 以0.25μL/min的速率, 用超出导向插管0.5mm的注射插管(26GA)递送R(0.01nmol在1μL中用于PFC输注)或Veh-R 30分钟, 之后经口投与NV-5138或Veh-NV。基于表明mTORC1活性的有效及选择性抑制的前述报导, 挑选雷帕霉素的剂量。

[1142] 结果:FST结果概述于图21中。分别比较Veh-R/Veh-NV组与Veh-R/NV-5138(从268±11s到144±15s), 不动时间(这个模型中功效的初始度量)明显降低46% (p<0.0001)。这种差异因先前输注R而消除, 这通过对R/NV-5138与Veh-R/Veh-NV组之间的不动时间无显著作用及比较Veh-R/NV-5138相比于R/NV-5138的显著差异来指示(p<0.001)。LMA评定结果概述于图22中。处理组之间LMA无显著差异。新颖遏制喂饲测试结果概述于图23中。通过32%比较Veh-R/Veh-NV组(747±68s)与Veh-R/NV-5138(510±50s), 摄食等待时间(这个模型中功效的初始度量)明显降低46% (p<0.05)。这种差异因先前输注R而消除, 这通过对R/NV-5138与Veh-R/Veh-NV组之间的摄食等待时间无显著作用(图23,A图)指示。在NSFT之后紧接着观测到如通过总食物消耗量所测量的饲养笼喂饲无显著差异。

[1143] 表11: 实例F的研究设计

	组	n	性格	体重(g)	途径	处理 1	途径	处理 2	行为测试
[1144]	第 1 组	7	M	175-200	IT	Veh-R	经口	Veh-NV	FST、 LMA、 NSFT
	第 2 组	7	M	175-200	IT	Veh-R	经口	NV-5138 (160 mg/kg)	
	第 3 组	6	M	175-200	IT	R (0.01 nmol)	经口	NV-5138 (160 mg/kg)	

[1145] 实例G: 在氯胺酮的NV-5138的单次给药之后强迫游泳测试及新颖遏制喂饲测试的行为改变持续时间

[1146] 研究设计: 在5天环境适应时间段之后, 将体重在175与200g之间的四十八(48)个雄性大鼠随机分组为6个研究组(n=8/组)。所有测试物品的单次给药在第0天投与且在第3天、第7天及第10天后进行行为测试。第1组及第2组在第0天分别用NV-5138(160mg/kg, 通过口服管饲)及Ket(10mg/kg, 通过i.p.注射)给药且在第3天经受FST。第3组及第4组中的大鼠

分别通过口服管饲在第0天接受NV-5138媒剂(Veh)或NV-5138(160mg/kg)的单次给药。第5组及第6组中的大鼠分别通过i.p.注射在第0天接受Ket媒剂(Sal)或Ket(10mg/kg)的单次给药。第3组到第6组中的大鼠在第7天经受FST且在第10天经受NSFT。第3组到第6组中的所有大鼠在NSFT前一晚禁食20小时。研究设计呈现于表12中。测试物品投与的时刻表及行为测试提供于图24中。

[1147] 结果:FST结果概述于图25中。用Ket处理明显降低在单次给药之后3天进行的FST雄性大鼠不动所花费的时间的量,降低31% (分别在Sal第5组与Ket第2组中,137.9±12.18s相比于95.5±7.8s,p<0.05)。类似地,用NV-5138处理明显降低在单次给药之后3天进行的FST雄性大鼠不动所花费的时间的量,降低39% (分别在Veh第3组与NV-5138第1组中145.3±16.99s相比于87.9±9.0s,p<0.05)。Ket明显降低在单次给药之后7天进行的FST雄性大鼠不动所花费的时间的量,降低31% (分别在Sal第5组与Ket第6组中,137.9±12.18s相比于95.0±11.1s,p<0.05)。类似地,用NV-5138处理明显降低在单次给药之后7天进行的FST雄性大鼠不动所花费的时间的量,降低34% (分别在Veh第3组与NV-5138第4组中145.3±16.99s相比于96.0±11.3s,p<0.05)。NSFT及饲养笼喂饲对照结果概述于图26中。在经Sal及Ket处理的大鼠之间或经Veh及NV处理的大鼠之间未观测到显著差异。第3组到第6组之间饲养笼食物消耗量无差异。

[1148] 表12:研究设计实例G

组	n	性别	体重(g)	途径	处理:	行为测试
第1组	8	M	175-200	经口	NV-5138 (160 mg/kg)	FST 第3天 NSFT 第10天
第2组	8	M	175-200	i.p.	Ket 10 mg/kg	
第3组	8	M	175-200	经口	Veh	
第4组	8	M	175-200	经口	NV-5138 (160 mg/kg)	
第5组	8	M	175-200	i.p.	Sal	
第6组	8	M	175-200	i.p.	Ket 10 mg/kg	

[1150] 实例H:在NV-5138的单次给药之后层V锥体神经元的生理学改变

[1151] 研究设计:在5天环境适应时间段之后,将十六(16)个体重在175与200g之间的雄性大鼠随机分组为2个研究组(n=8)。在研究第0天,大鼠通过口服管饲接受NV媒剂(Veh, 0.5%甲基纤维素/0.1% Tween-80)或NV-5138(160mg/kg)的单次给药。在第1天,给药后24小时,处死大鼠,且制备大脑切片且进行PFC中的层V锥体神经元的全细胞膜片钳记录。研究设计呈现于表13中。测试物品投与的时刻表及生理学分析概述于图27中。

[1152] 制备测试物品:通过以50mg/mL的浓度溶解于Veh(0.5%甲基纤维素/0.1%Tween-80)中制备NV-5138(Navitor, 批次号07)。通过口服管饲给研究动物投与基于动物的重量的给药体积(3.2mL/kg)。给药当天制备测试物品。

[1153] 制备大脑切片:根据所公布的程序(Liu, R.J. 等人, J.Neurosci. 22 (21) : 9453-9464 (2002))制备大脑切片。简单来说,根据耶鲁动物护理及使用委员会批准的方案,用氯醛水合物(400mg/kg, i.p.)麻醉大鼠。在断头术之后,快速去除大脑且放置于冰冷(4°C)人造脑脊髓液(ACSF)中,其中蔗糖(252mM)替换为NaCl(蔗糖-ACSF)以防止细胞膨胀。解剖一块含有PFC的组织且在蔗糖-ACSF中用振荡叶片组织切片机(Leica VT1000S)切割冠状面切片(400μm)。在将切片放置于浸没记录腔室中之后,使浴温度升高到32°C。使已知浓度的药物溶解于ACSF中,经由活栓布置以快速流动速率(约4mL/min)施用,在7到10秒内到达切片。

用95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>平衡标准ACSF (pH=7.35)且含有128mM NaCl、3mM KC1、2mM CaCl<sub>2</sub>、2mM MgSO<sub>4</sub>、24mM NaHCO<sub>3</sub>、1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及10mM D-葡萄糖。在记录开始之前允许约1到2小时的恢复时间段。

[1154] 电生理学记录:通过视频显微术,使用Olympus BX50WI显微镜(×60IR透镜),用红外差异干扰对比度(IR/DIC)视频显微术(Olympus),根据所公布的程序(Lambe, E.K.& Aghajanian, G.K. Neuron 40 (1) : 139-150 (2003))目测层V中的锥体神经元。通过使用Flaming-Brown水平拉拔器(模型P-97; Sutter Instruments)从贴片夹具玻璃套管(Warner Instruments)拉伸低电阻贴片吸量管(3-5MΩ)。吸量管填充有以下溶液:115mM K葡萄糖酸盐、5mM KC1、2mM MgCl<sub>2</sub>、2mM Mg-ATP、2mM Na<sub>2</sub>ATP、10mM Na<sub>2</sub>-磷酸肌酸、0.4mM Na<sub>2</sub>GTP及10mM HEPES, pH 7.33。将神经生物素(0.3%)添加到移液管溶液中以标记细胞以便后续成像。用Axoclamp-2B放大器(Axon Instruments)进行全细胞记录。输出信号在3KHz下经受低通滤波,经由Cyberamp扩增×100,在15kHz下数字化,且通过使用pClamp 9.2/Digidata 1320软件(Axon Instruments)获得。在整个实验中监测的串联电阻通常在4与8MΩ之间。使串联电阻误差降到最低,如果串联电阻上升高于10Ω,那么丢弃细胞。在夹持接近休止电位(75mV±5mV)的连续单一电极电压-夹具模式(3000Hz低通滤波器)中研究突触后电流以使保持电流降到最低。在记录完成后,将切片转移到含4%多聚甲醛的0.1M磷酸盐缓冲液且在4°C下存储隔夜。随后用共轭到Alexa 594(1:1000; 英杰公司)的抗生素链菌素处理切片以用于在标记细胞中进行神经生物素目测。

[1155] 棘密度分析:前扣带(Cg1)及前边缘mPFC(Cg3)的层V内的标记神经元用两个光子Ti:用于分析的棘密度及形态(810纳米; Mai Tai, Spectra Physics, 山景城(Mountain View), 加利福尼亚州)的蓝宝石激光扫描系统成像,所述系统耦合到安装于Olympus BX50WI显微镜上的直接检测辐射率2000BioRad激光扫描器(Zeiss Micromaging, Thornwood, 纽约), 使用60×(0.9数值孔径)水浸没目标。这包含层V神经元的近端及远端簇以及棘顶端直径的总数目且指示棘成熟。顶部簇支链段的长度通过使用Neurolucida 10.2(MicroBrightField)在各Z堆叠的3D基质内测定。用Neurolucida探测器(版本10.2)的Autospine模块在原始图像堆叠(2-5个光学部分, 相隔1μm)上进行棘密度及棘顶端直径分析。在三个区域中采样棘密度及分段(起脊):簇端部在其接近软膜、约软膜与顶部躯干分叉点之间的中间位置及恰好分叉点远端的近端簇树突分支。根据总树枝状长度、棘密度及分段密度表示结果。根据棘密度, 每10μm表示结果。

[1156] 结果:层V锥体细胞的全细胞贴片记录的结果概述于图28中。在NV-5138的单次给药之后,相对于经媒剂处理的大鼠, 5-HT及Hcrt诱导的EPSC的频率明显提高。每组使用八个大鼠且每个大鼠记录3到5个细胞。5-HT及Hcrt诱导的EPSC的电压钳迹线展示于图30中。5-HT及Hcrt诱导的EPSC的累积概率分布及NV-5138的作用展示于图31中。树枝状棘密度及形态分析的结果概述于图29中。NV-5138的单次给药揭示总体棘密度显著提高, 其中层V锥体神经元树突中的“细长”及“蘑菇”棘亚型尤其提高。图像取自每个动物的1个载玻片, 分别来自第1组及第2组的4个经Veh处理的大鼠及5个经NV-5138处理的大鼠。在NV的单次经口投与之后24小时, mPFC层V锥体神经元的顶部树突的总密度明显提高。在指定“细长”及“蘑菇”的特定形态树枝状棘亚型中注意到显著提高。NV-5138投与相对于与此前针对氯胺酮观测到类似(Li, N. 等人, Science 329 (5994) : 959-964 (2010))但不同于使用类似程序的GLYX-13

(Liu, R.J. 等人, *Neuropsychopharmacology* 42(6) :1231-42(2017)) 的经媒剂处理的大鼠也明显提高5-HT及Hcrt诱导的EPSC的频率。这个研究展现,在NV-5138的单一经口投与之后直接mTORC1活化诱导功能树枝状棘形成,其涉及提高的突触信号传导及其它快速作用抗抑郁剂的情绪改进。

[1157] 表13:研究设计实例H

	组	n	性别	体重(g)	途径	处理	生理学分析
[1158]	第1组	8	M	175-200	经口	Veh	EPSC 记录, 树枝状棘密度
	第2组	8	M	175-200	经口	NV (160 mg/kg)	

[1159] 实例I:在化合物的每日给药或氯胺酮的每隔一天给药之后强迫游泳及新颖遏制喂食测试的行为改变

[1160] 研究设计:在5天环境适应时间段之后,将体重在175与200g之间的二十四(24)个雄性史泊格多利大白鼠随机分组为4个研究组(n=6/组)。在研究1天前,大鼠经受预游泳。在研究第0天开始时,第2组中的大鼠各自通过i.p.注射隔天(第0天、第2天、第4天及第6天)接受Ket(10mg/kg)的剂量。第1组中的大鼠通过口服管饲接受每日剂量的Veh持续7天(第0天到第6天)。第3组及第4组中的大鼠各自通过口服管饲接受NV-5138的每日剂量(40或80mg/kg)持续7天(第0天到第6天)。所有大鼠在第7天在最后一次给药后24小时经受FST。在第8天,在最后一次给药之后48小时,所有大鼠的LMA在开放空间中测量。大鼠随后禁食20小时且在第9天(最后一次给药后72小时)经受NSFT。研究设计呈现于表14中。测试物品投与的时刻表及行为测试概述于图32中。

[1161] 制备测试物品:以10mg/mL的浓度使Ket(Sigma, 目录号K1884)溶解于Sal中。向第2组投与1mL/kg Ket的注射体积(i.p.)。通过以50mg/mL的浓度溶解于Veh(0.5%甲基纤维素/0.1% Tween-80)中制备NV-5138。分别通过口服管饲给第1组、第3组及第4组中的研究动物每日投与基于Veh或NV-5138的动物的重量的给药体积(3.2mL/kg)。给药当天制备测试物品。

[1162] 结果:第7天FST的结果概述于图33中。第8天LMA的结果概述于图34中。第9天NSFT及饲养笼喂食对照结果概述于图35中。在80mg/kg下在FST及NSFT中观测到NV-5138的显著作用。氯胺酮在两个测试中均产生显著作用。在LMA或饲养笼喂食中未见显著作用。

[1163] 表14:实例J的研究设计

	组	n	性别	体重(g)	途径	处理	行为测试
[1164]	第1组	6	M	175-200	经口	Veh	FST、 LMA 及 NSFT
	第2组	6	M	175-200	i.p.	Ket (10 mg/kg)	
	第3组	6	M	175-200	经口	NV-5138 (40 mg/kg)	
	第4组	6	M	175-200	经口	NV-5138 (80 mg/kg)	

[1165] 实例J:狨猴人类威胁测试

[1166] 研究设计:将三十六(36)个狨猴(白鬓狨)配对且随机地分成处理组。在人类威胁测试(HTT)之前二十四小时,动物经媒剂、氯胺酮(0.3mg/kg; i.m.)或NV-5138(160mg/kg; p.o.)处理。第二天,相同动物经媒剂(s.c.)或利眠宁(1mg/kg; s.c.)处理。随后历经两个分钟时间段,用人类观测器的存在监测动物的威胁姿势次数。历经相同时段监测运动活性,如通过所观测到的跳跃次数所测量。

[1167] 结果:动物的威胁姿势次数概述于图36中。动物的跳跃次数概述于图37中。数据确

认,在急性投与之后二十四小时,氯胺酮诱导狨猴HTT中的抗焦虑/抗抑郁类特征,而无显著运动活性改变。然而,一半动物(6)产生轻度呕吐(数据未示出)。NV-5138产生类似的抗焦虑/抗抑郁类作用,而无运动削弱。重要的是,未观测到不良作用,例如呕吐。利眠宁产生类似结果。



图1

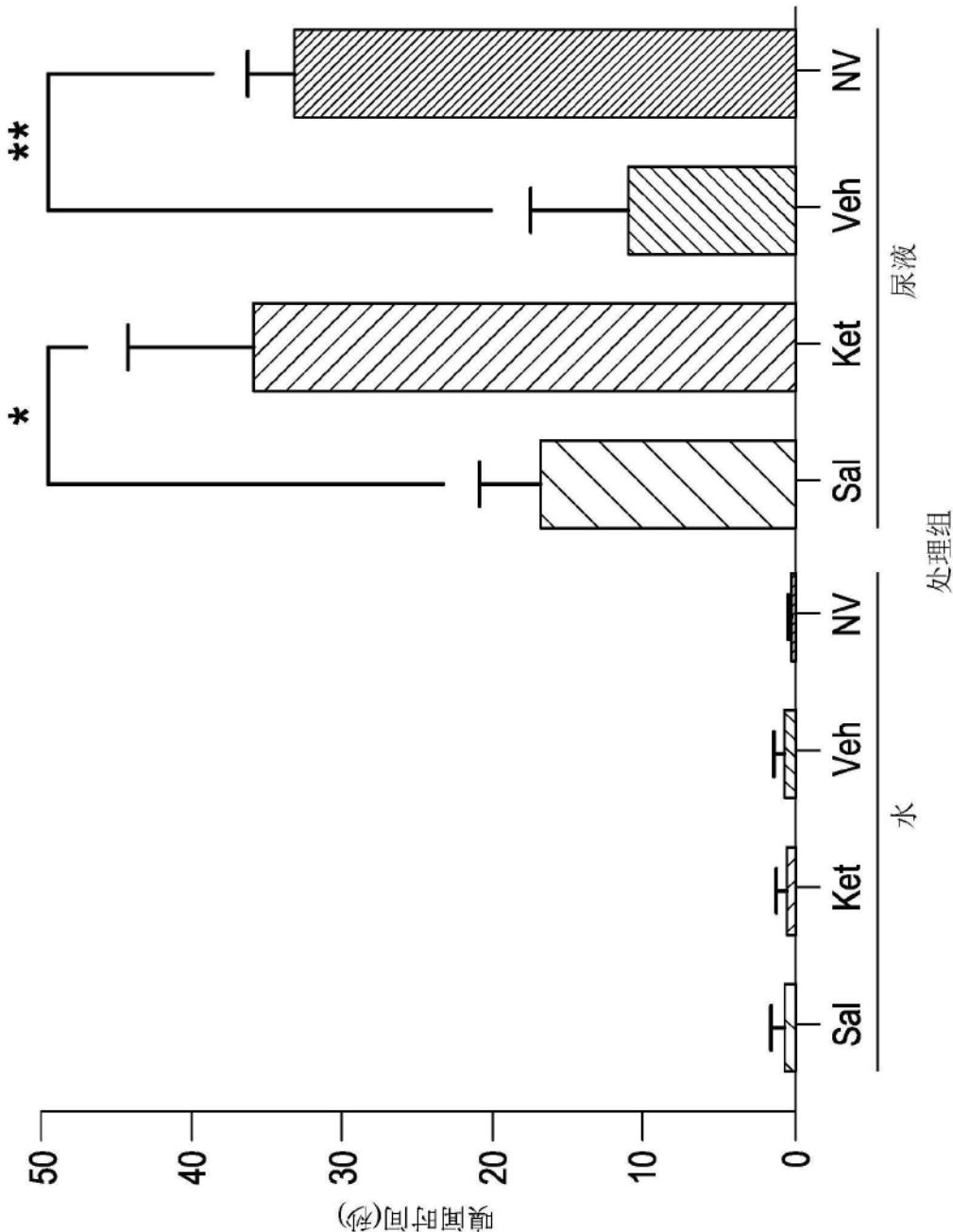


图2

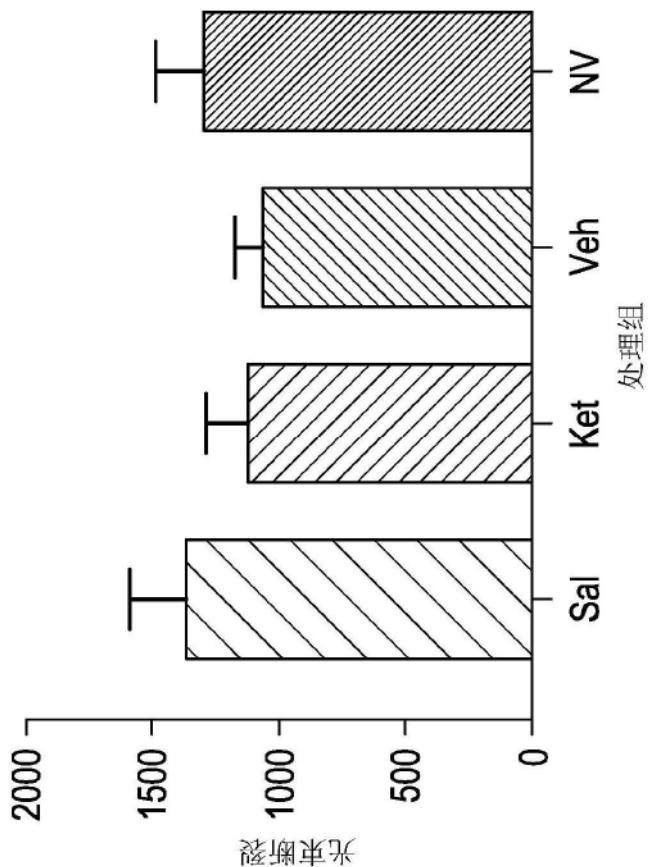


图3

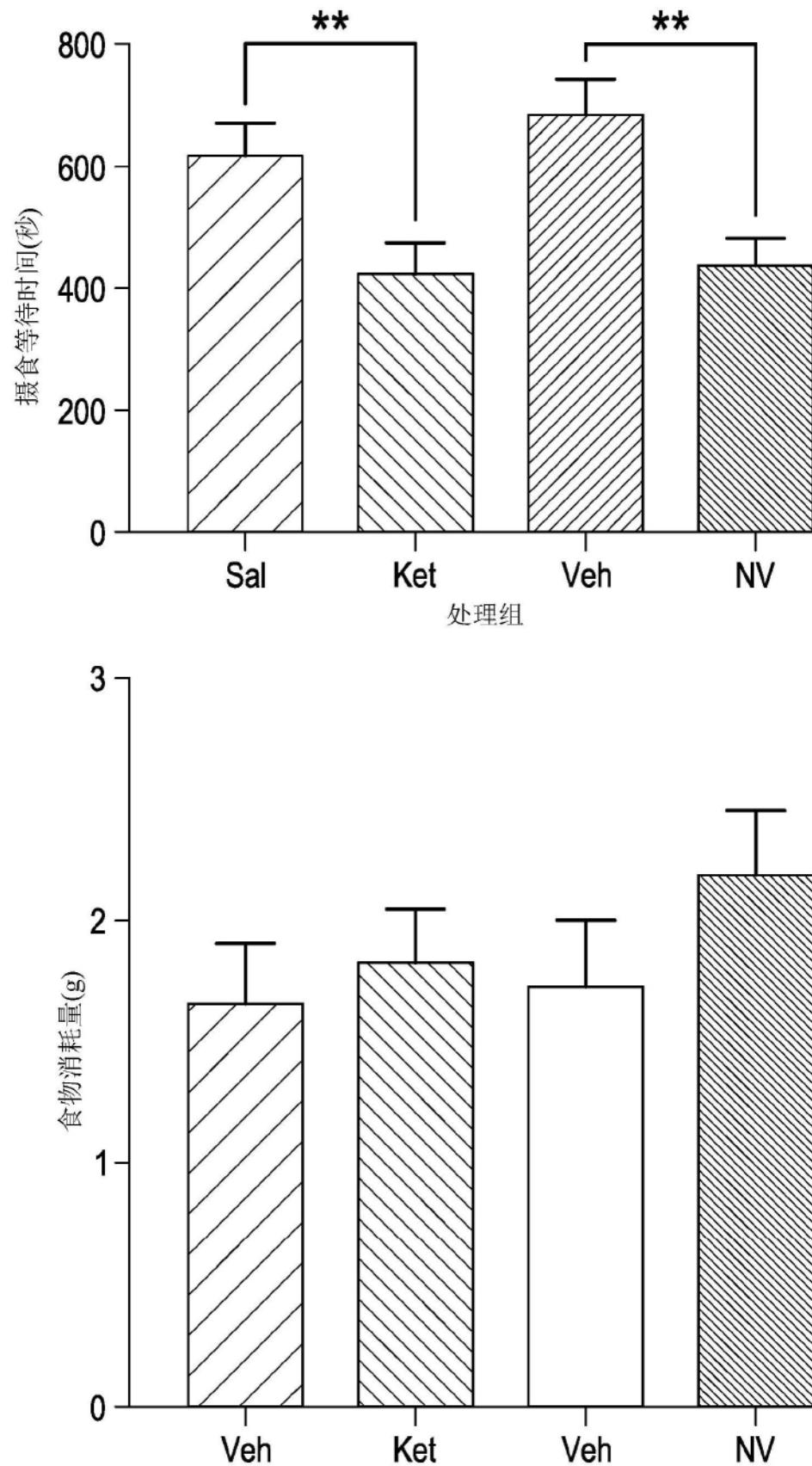


图4

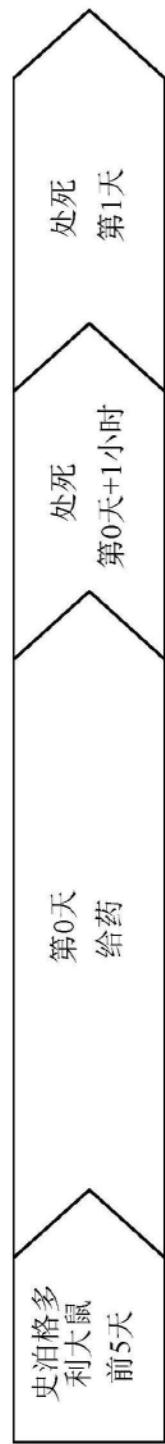


图5

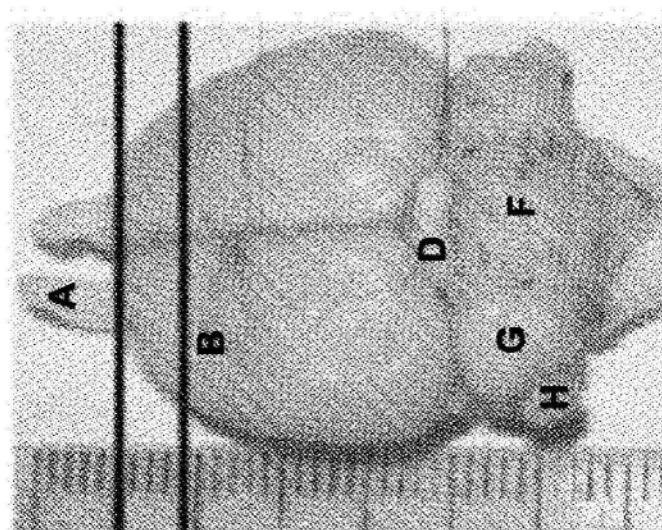


图6A

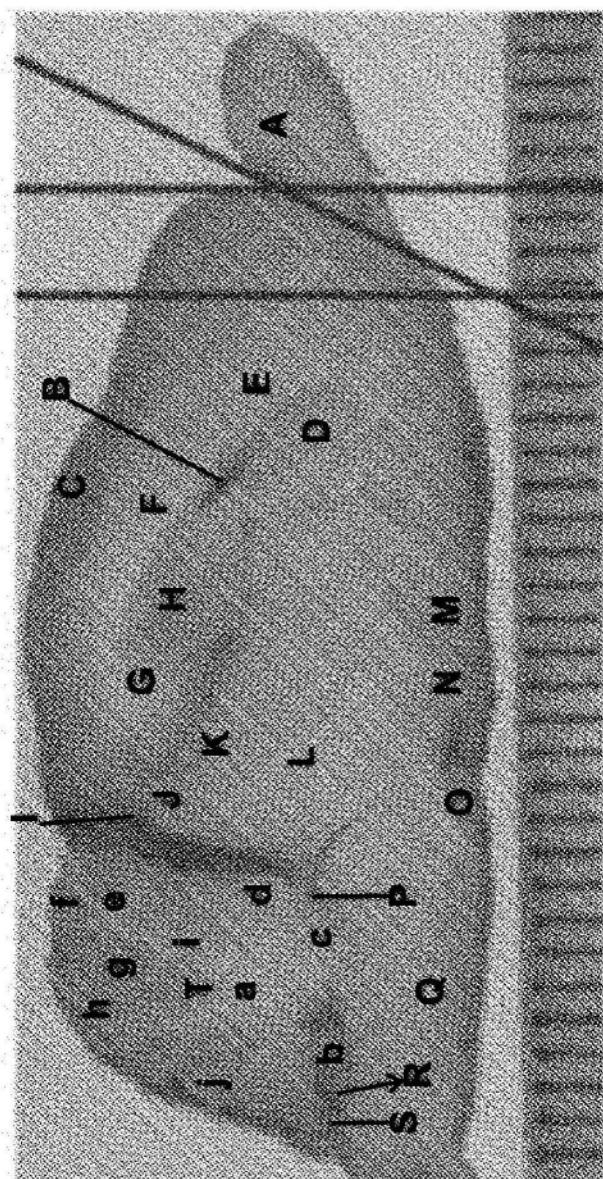


图6B

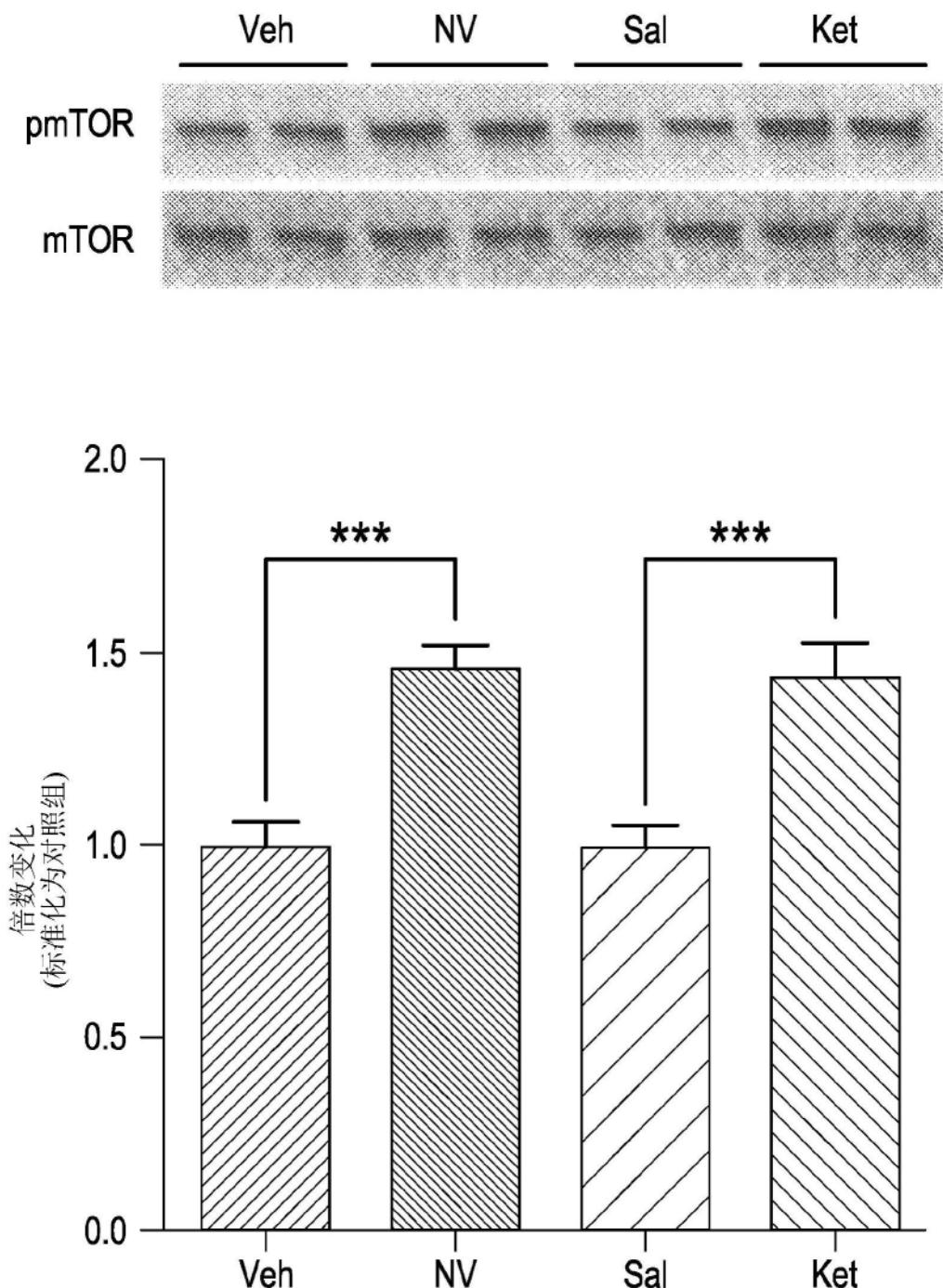


图7A

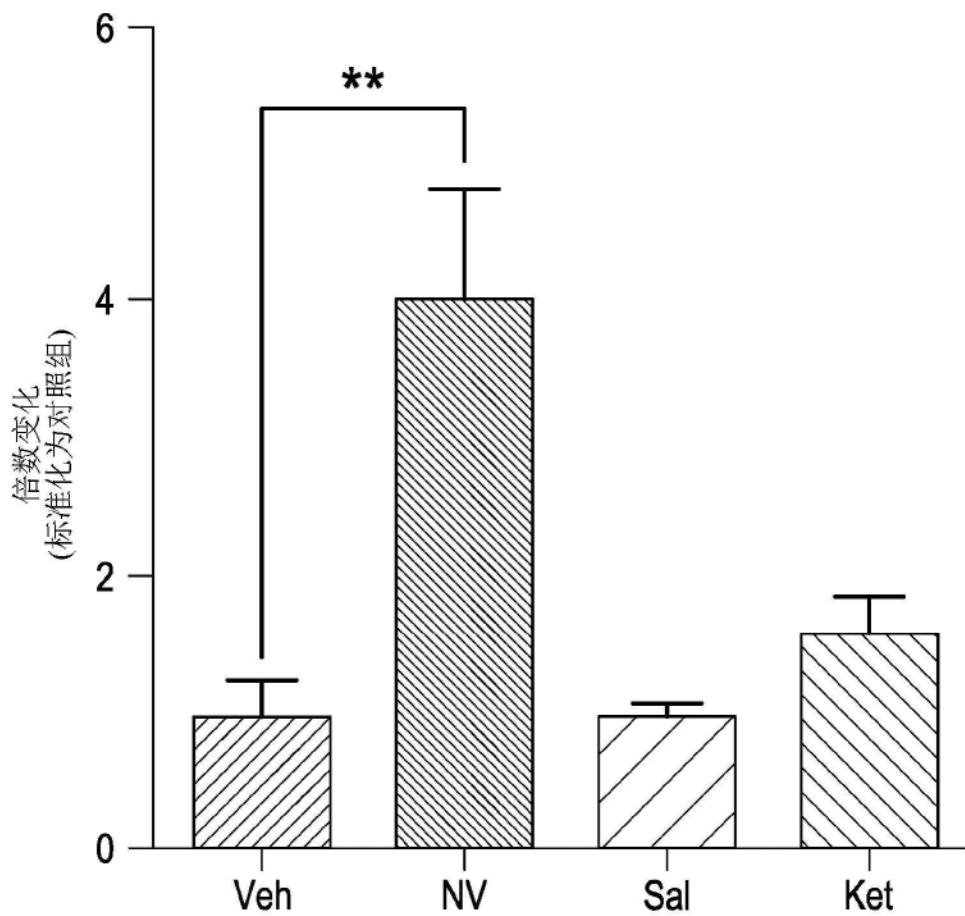
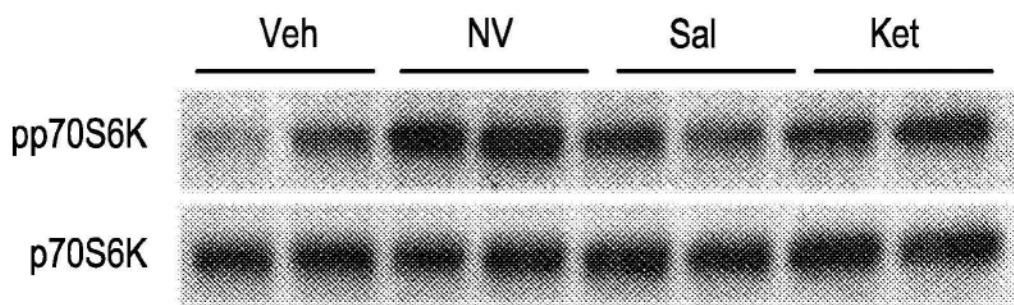


图7B

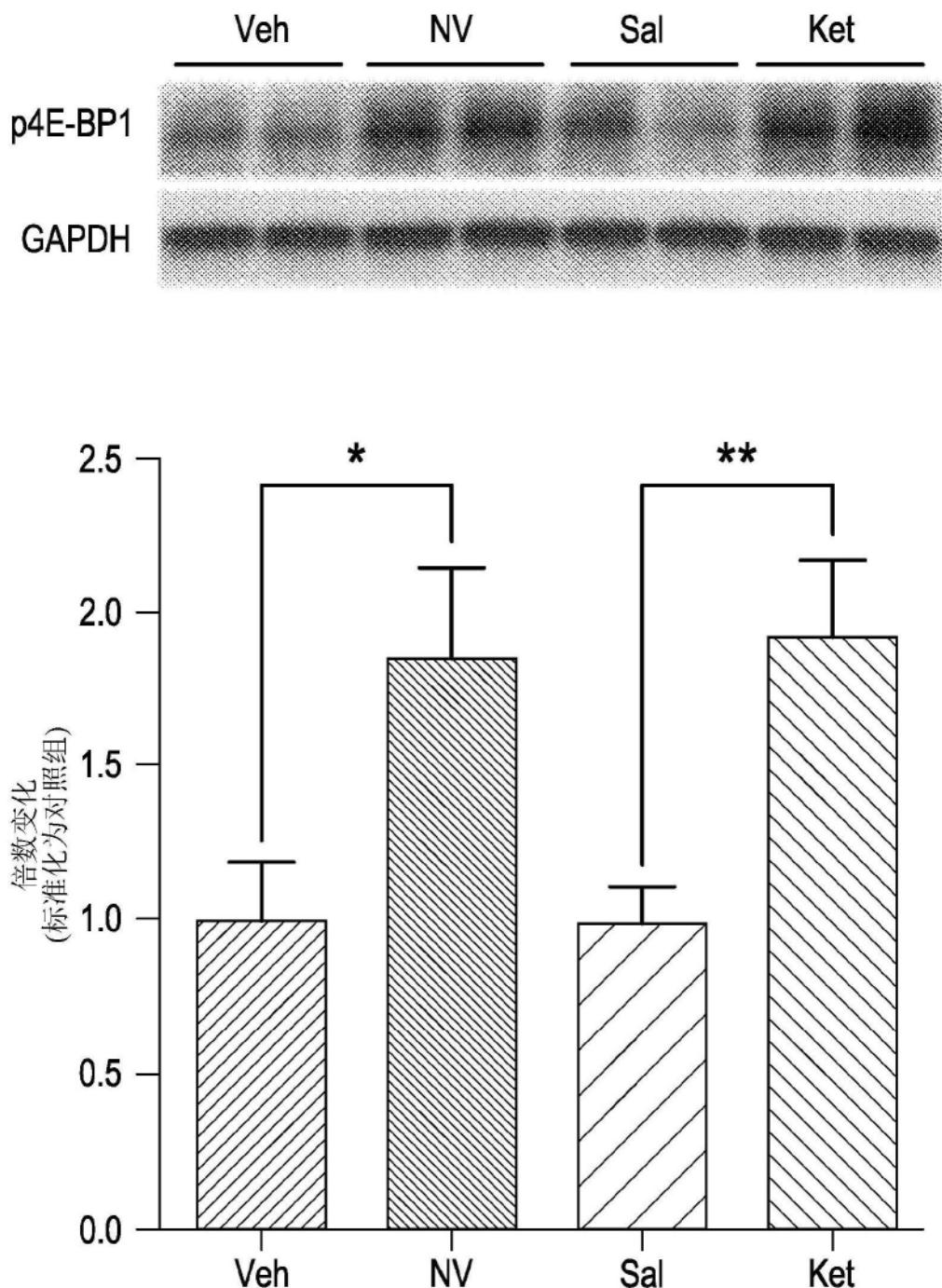


图7C

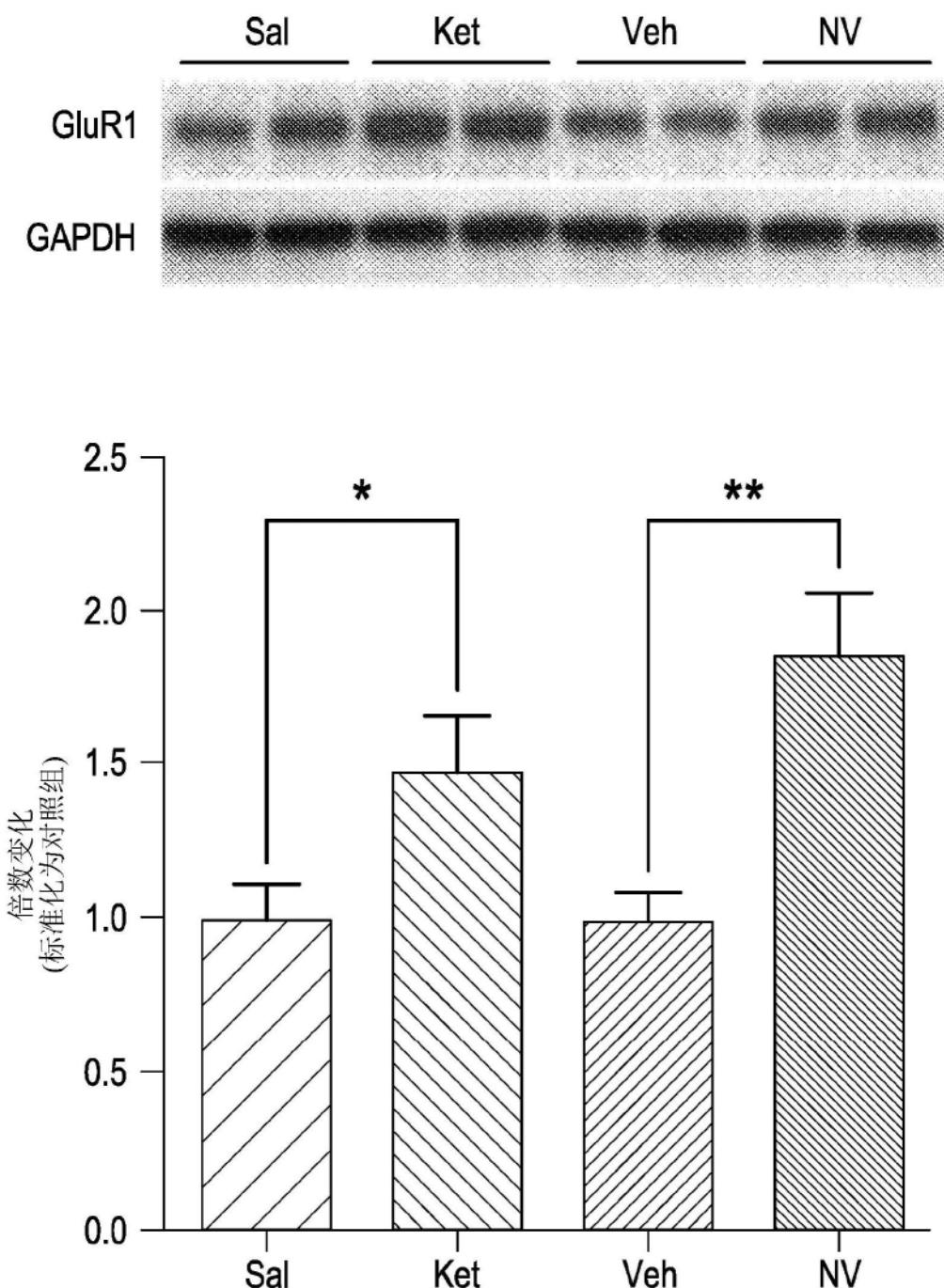


图8A

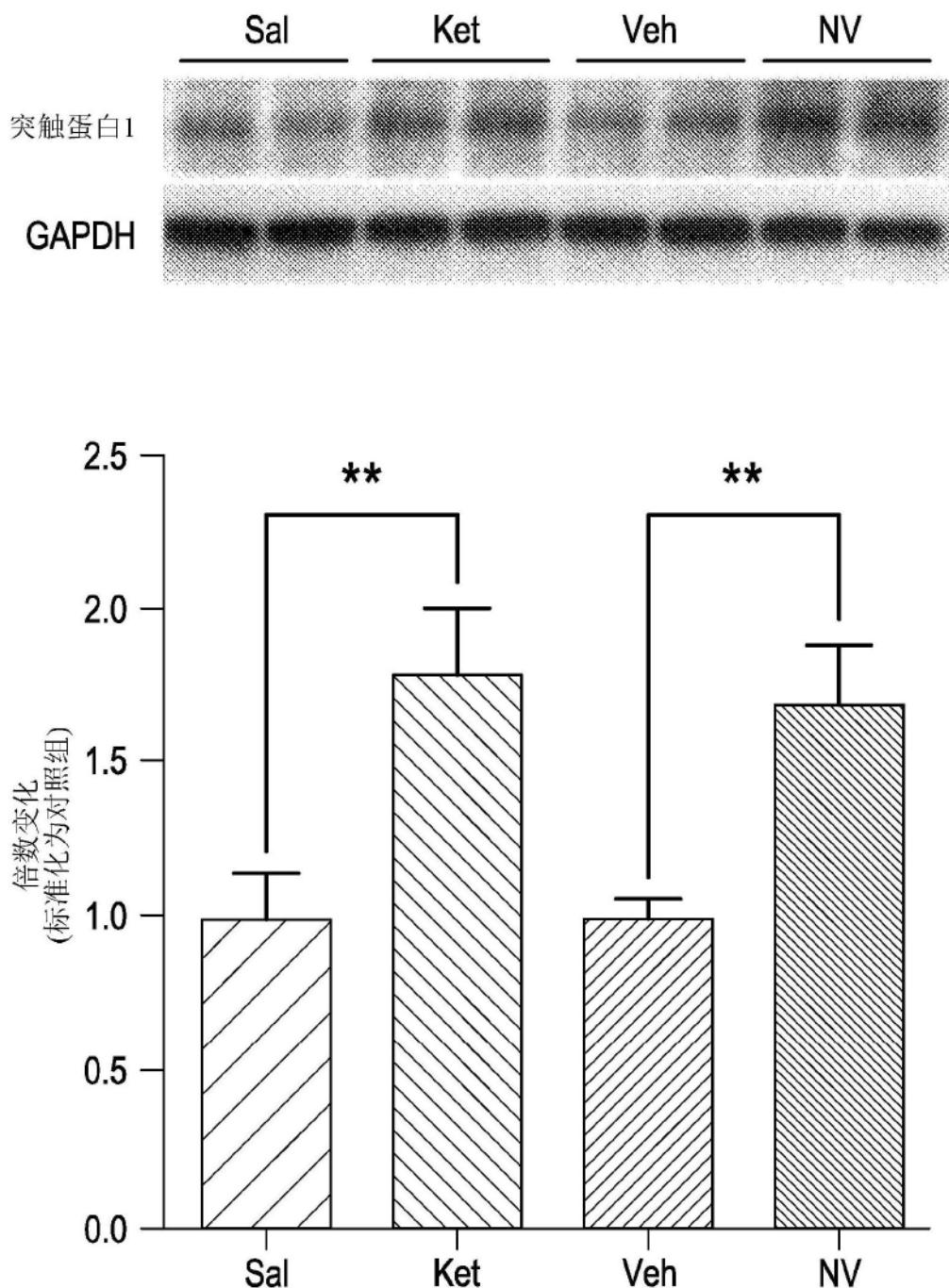


图8B

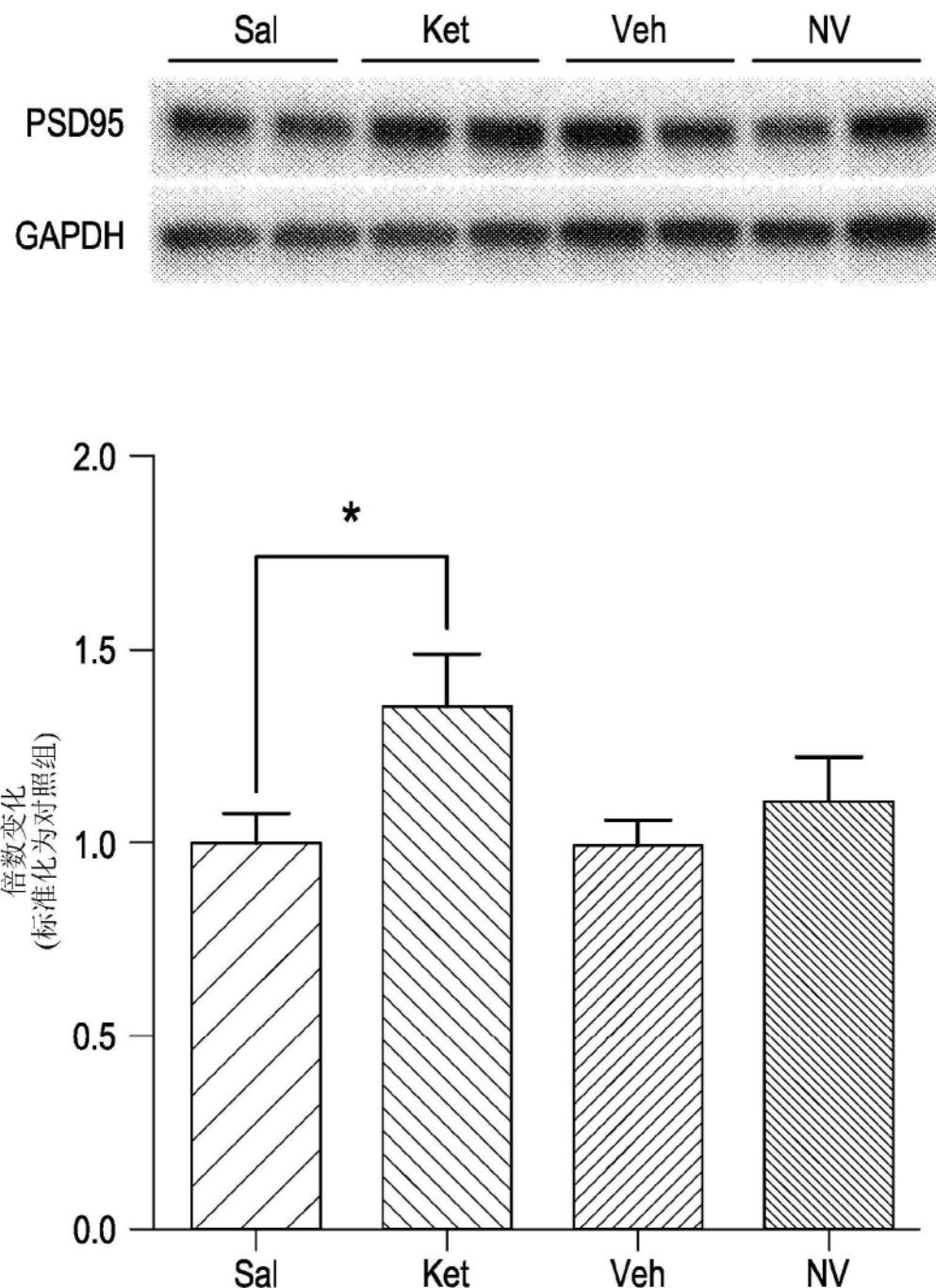


图8C



图9

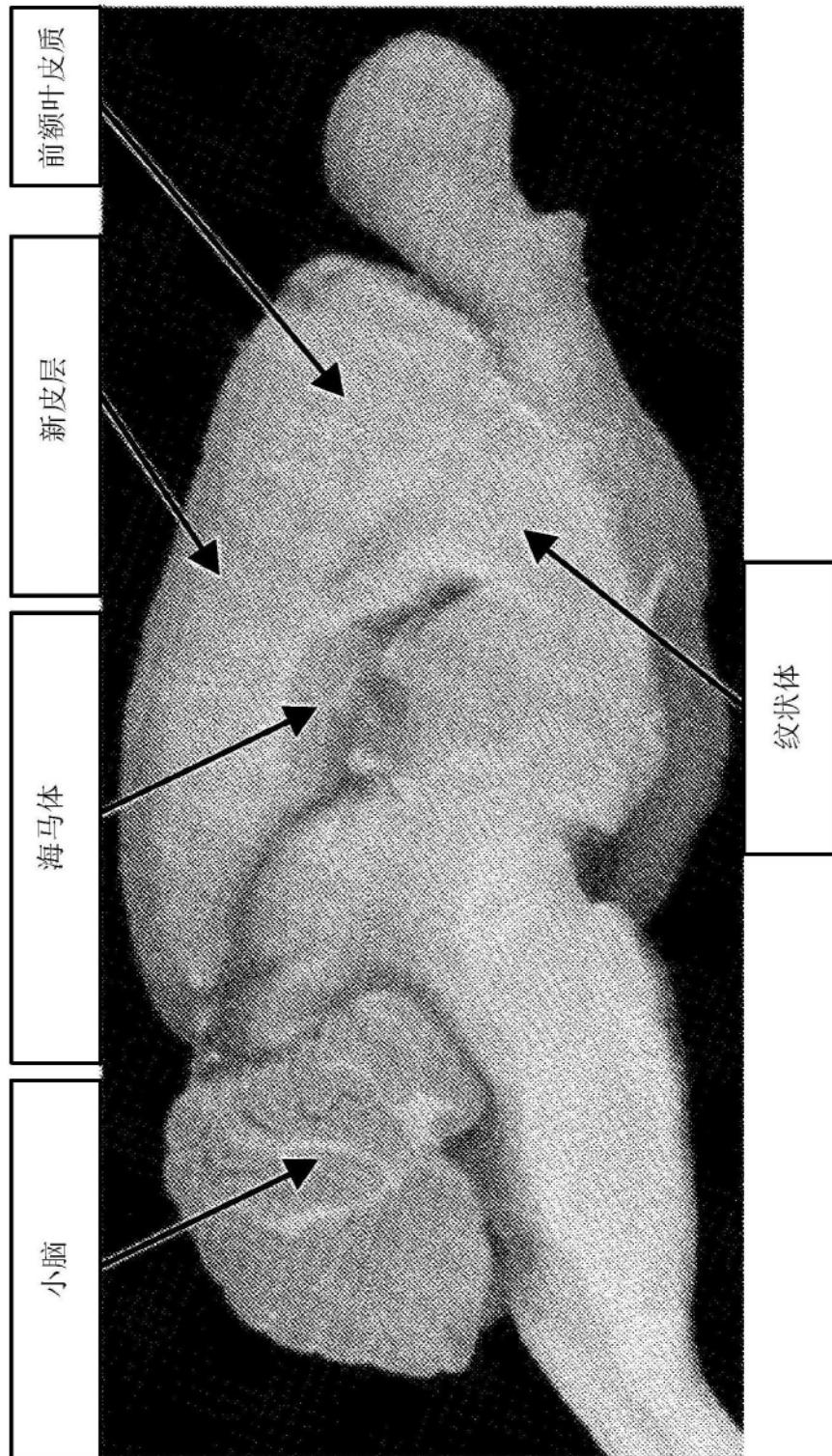


图10

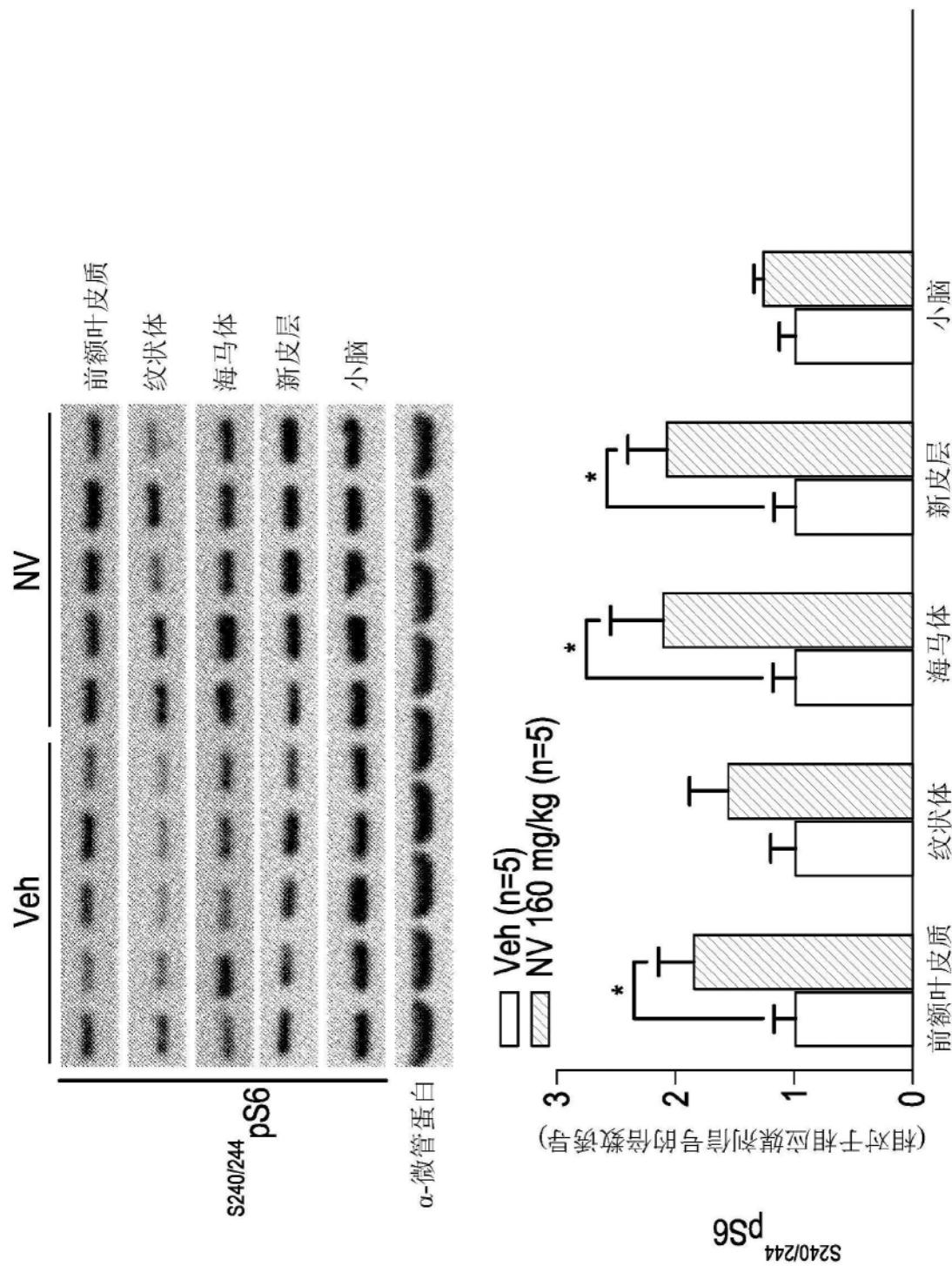


图11



图12

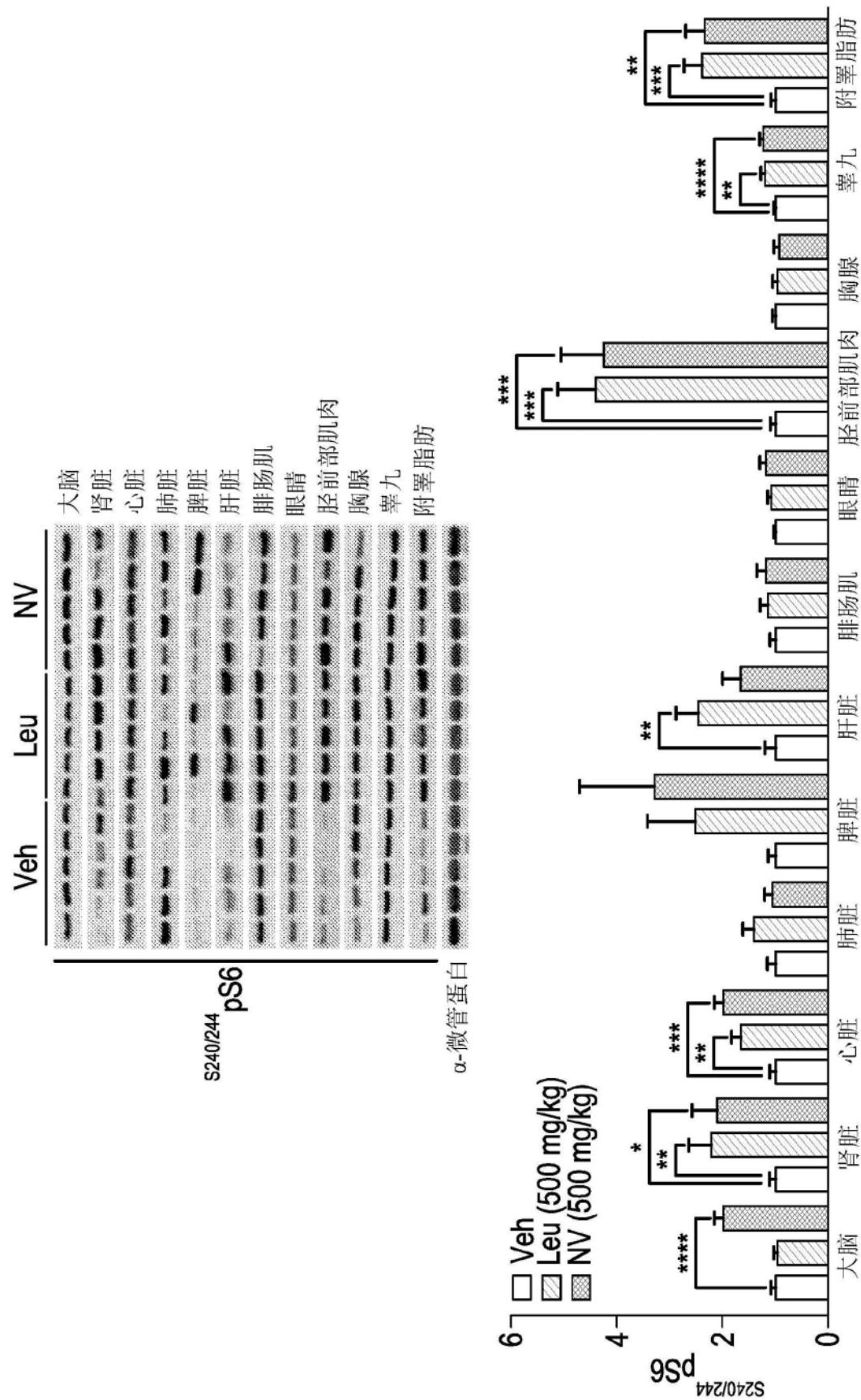
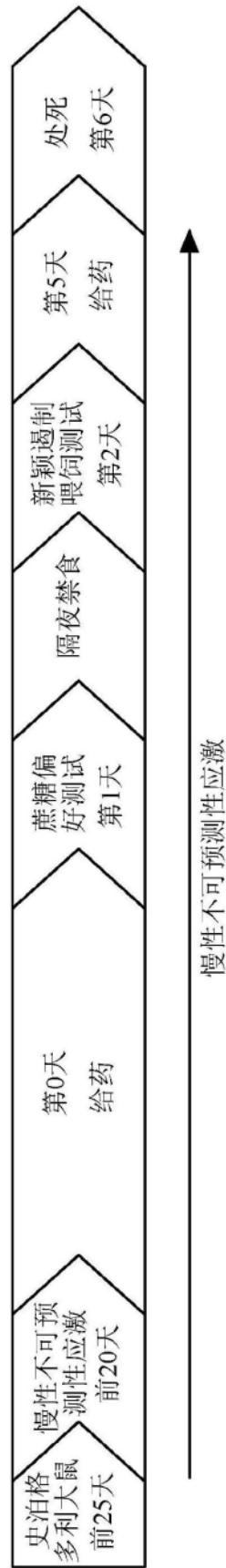


图13



慢性不可预测性应激

图14

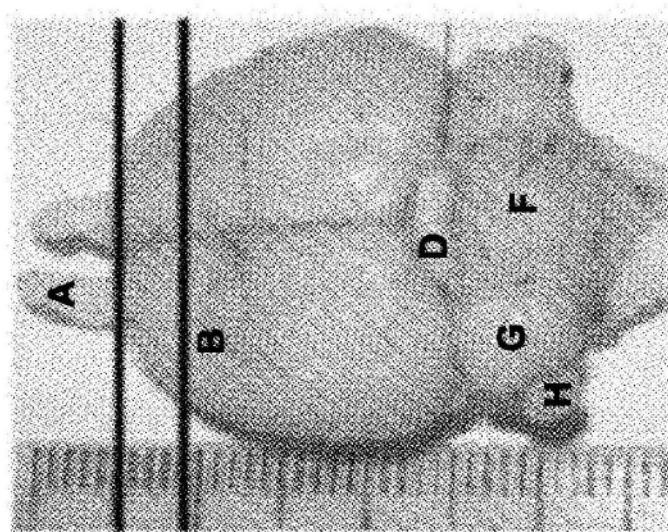


图15A

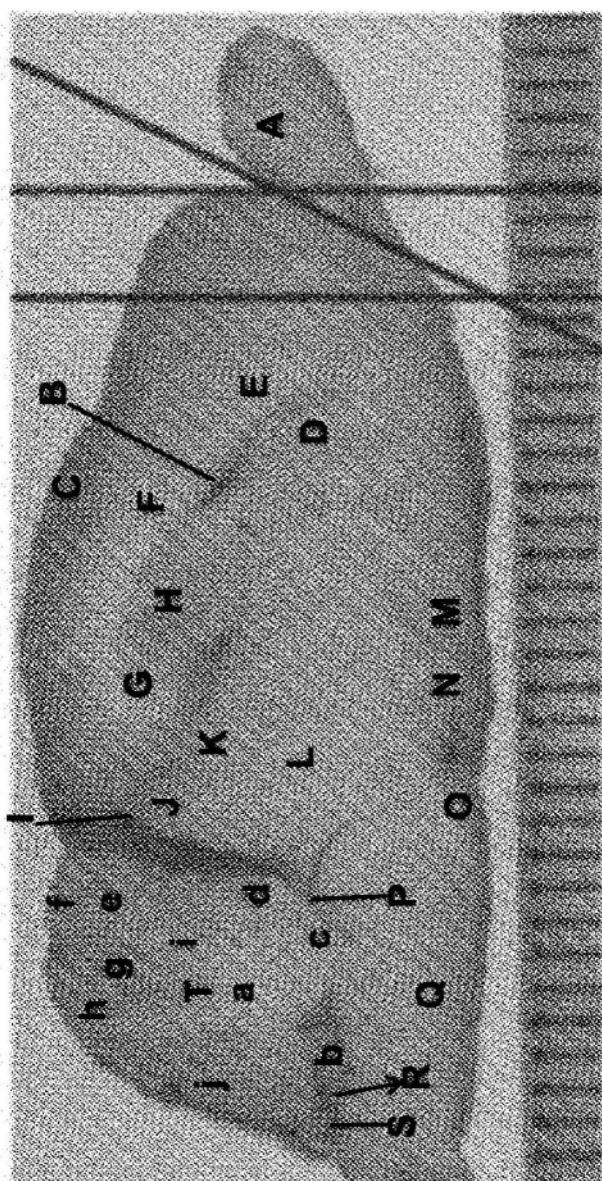


图15B

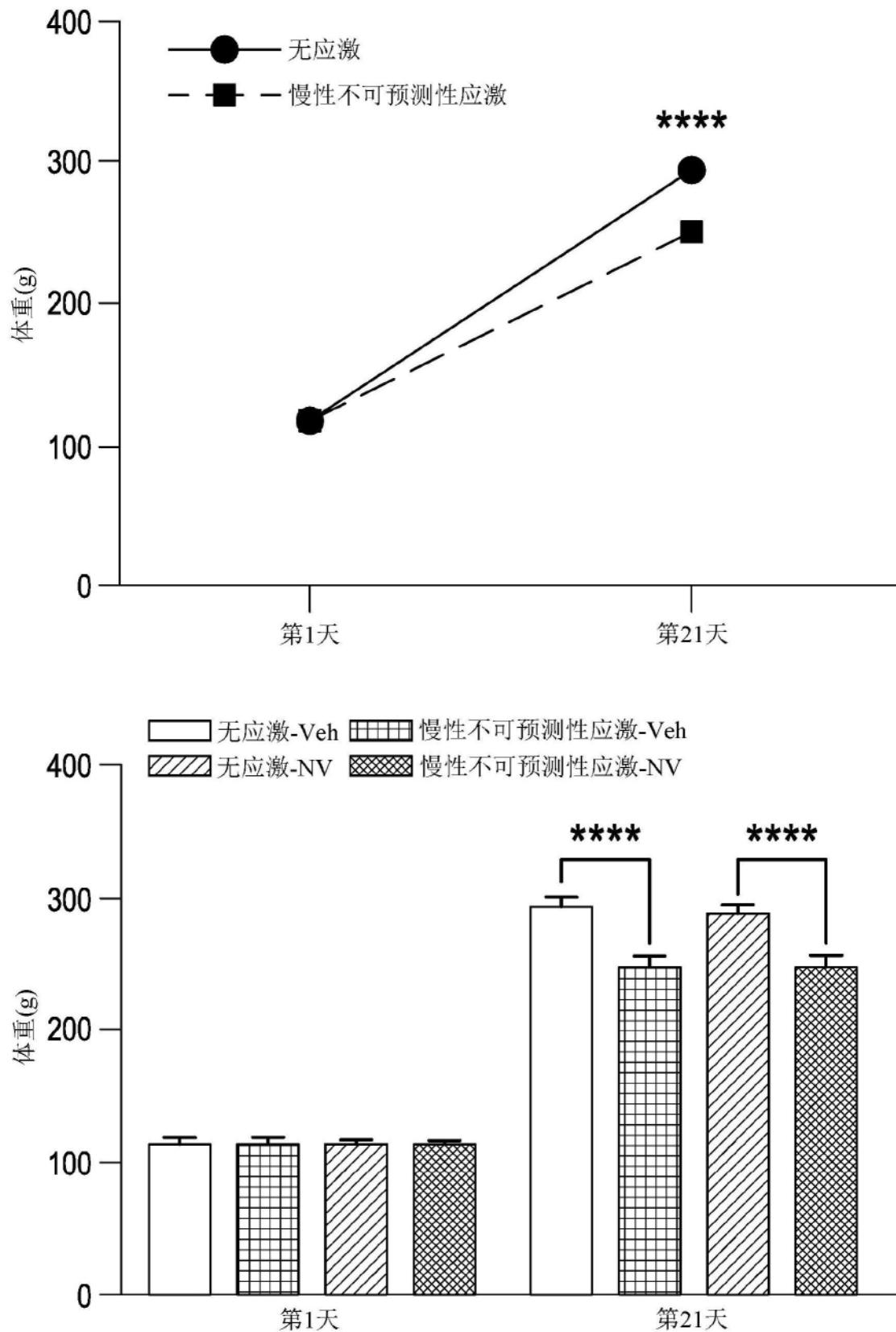


图16

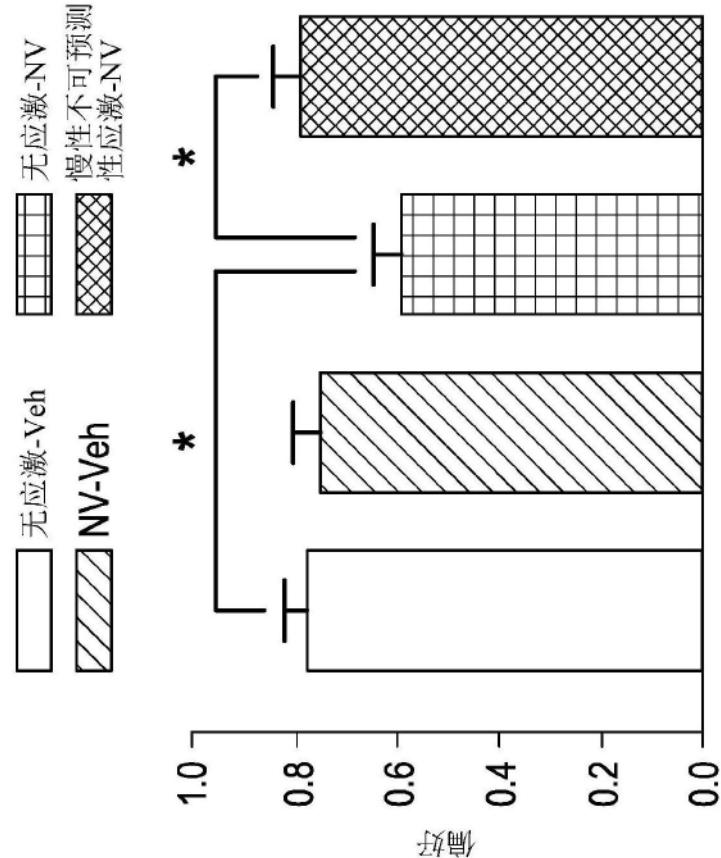


图17

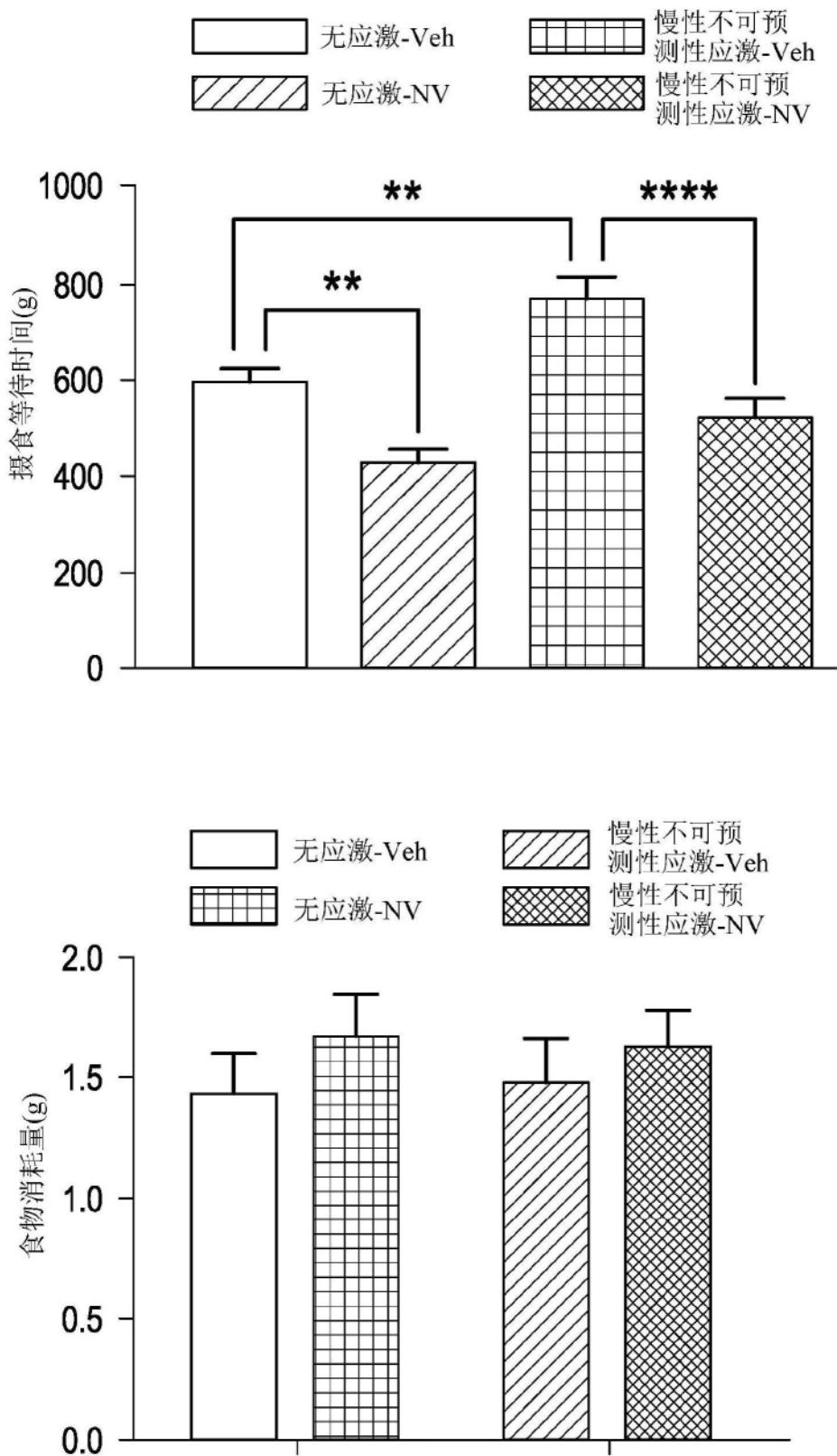


图18

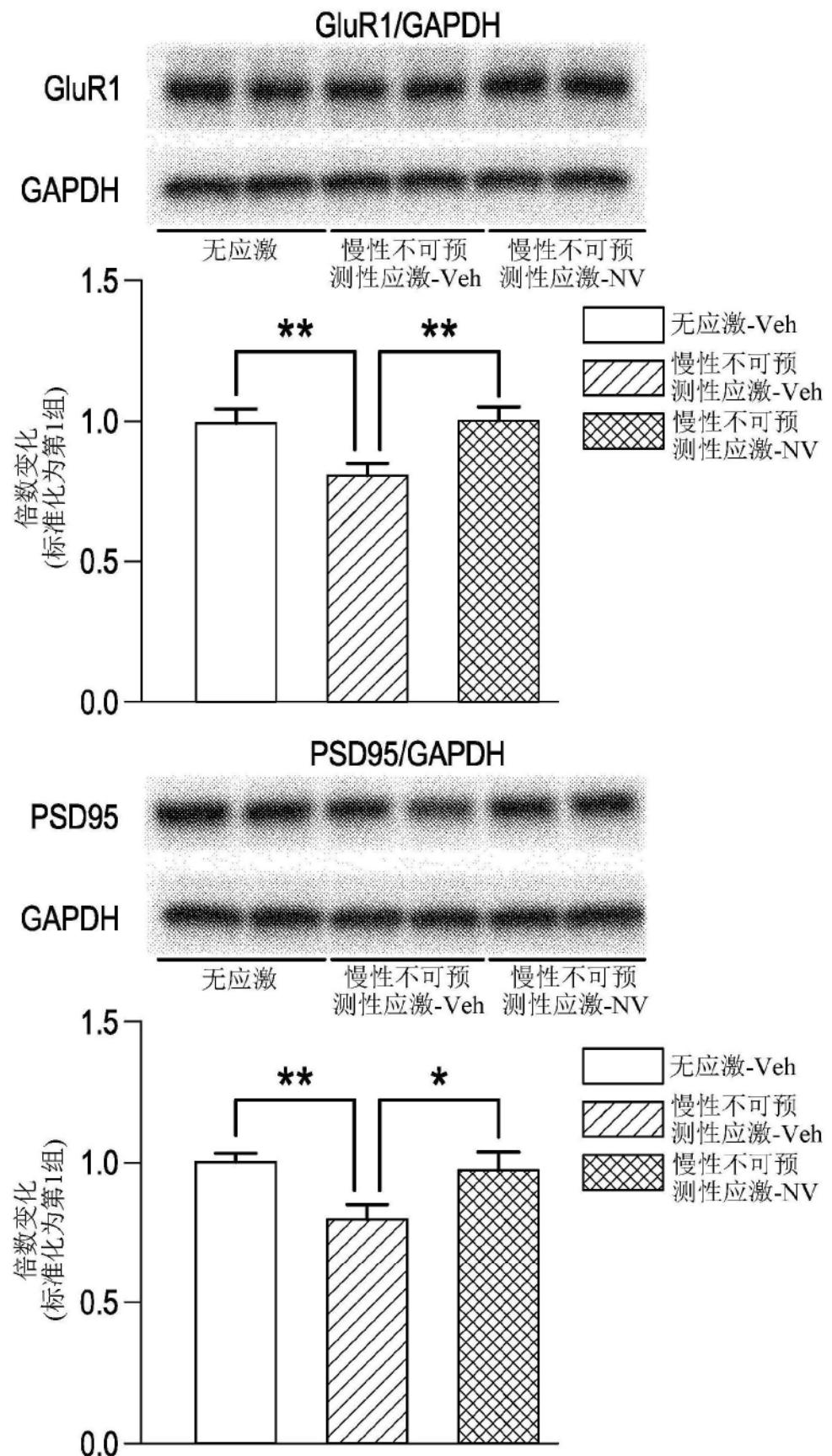


图19

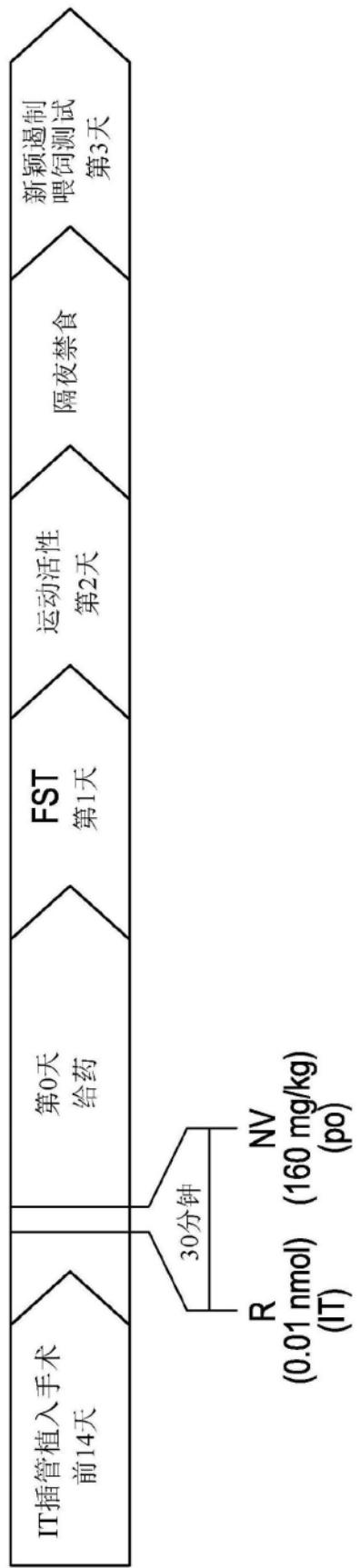


图20

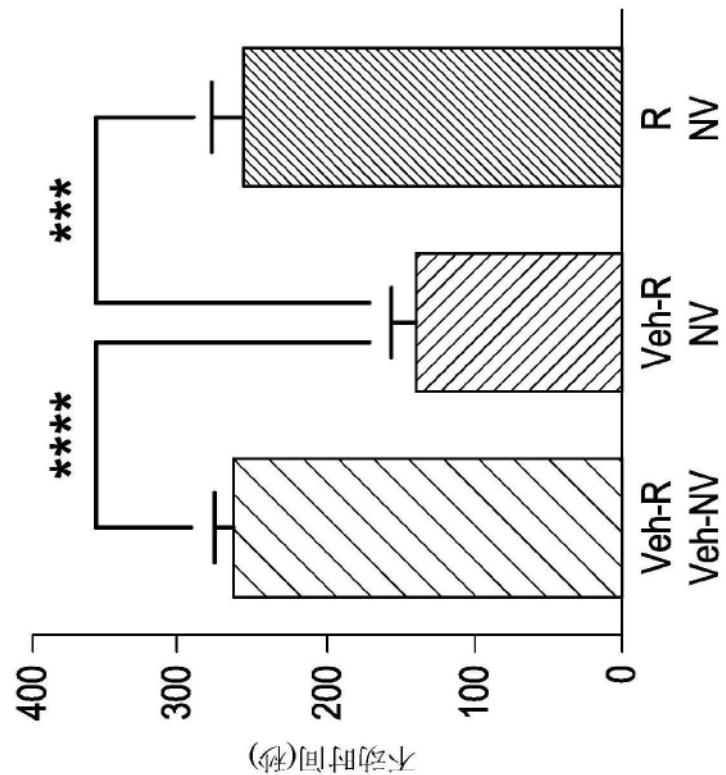


图21

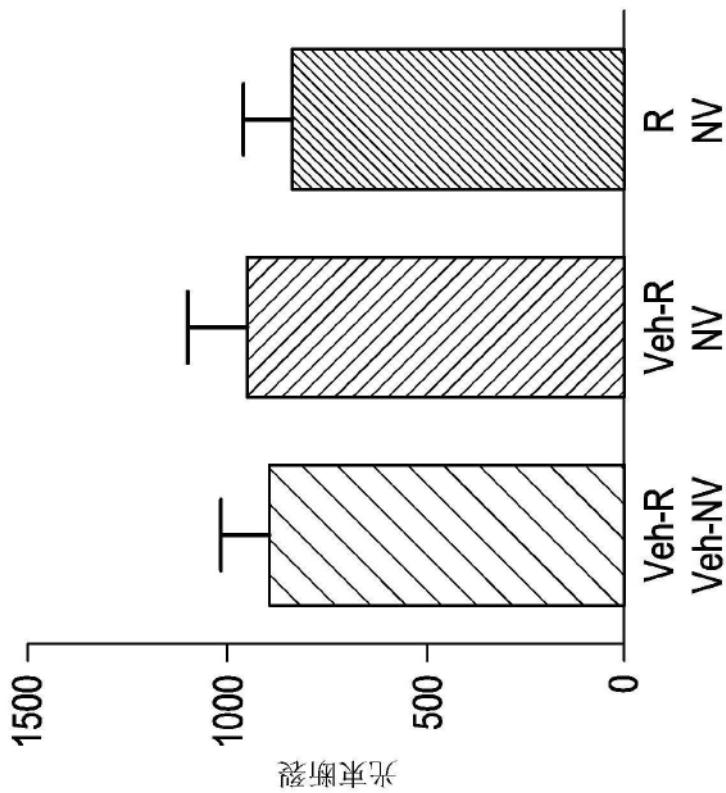


图22

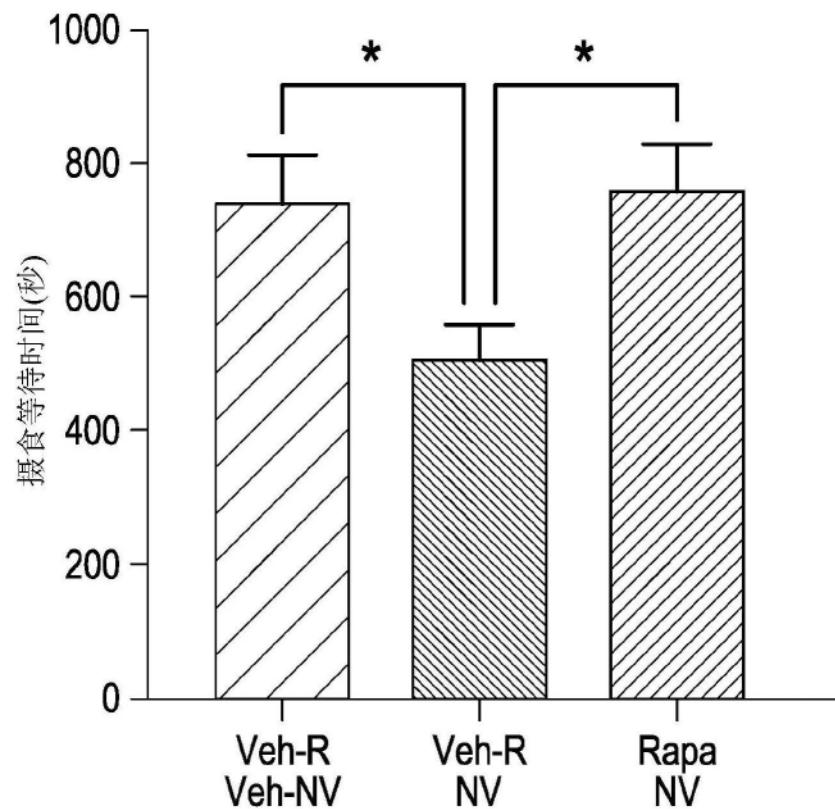


图23A

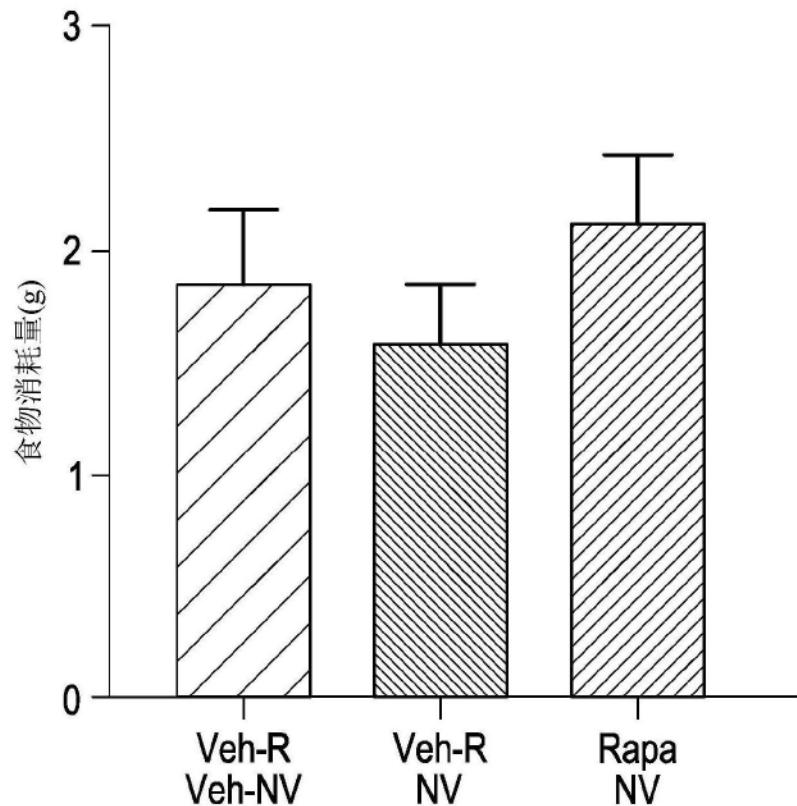


图23B



图24

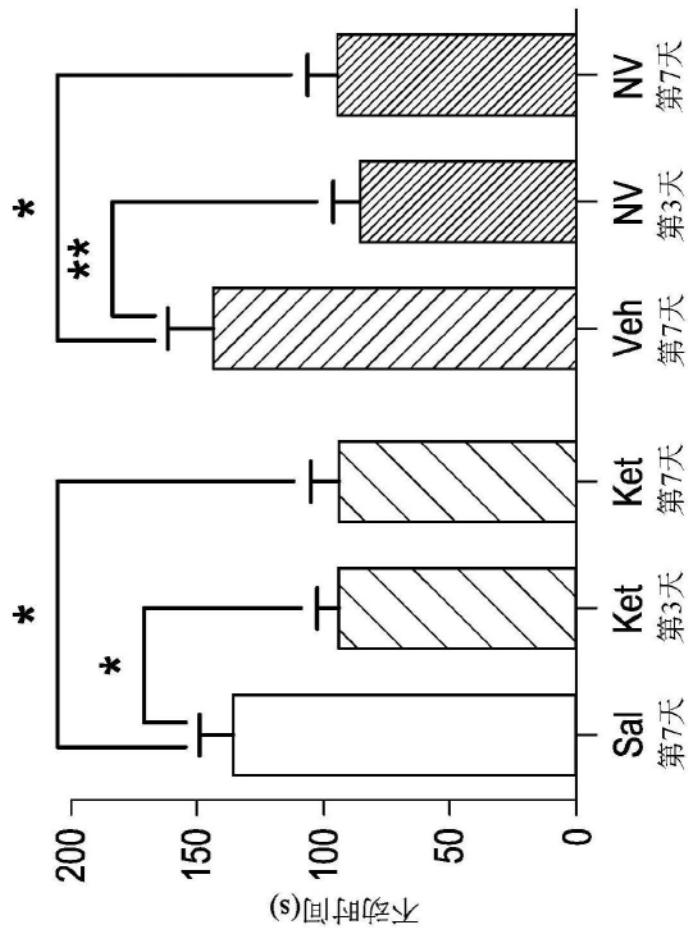


图25

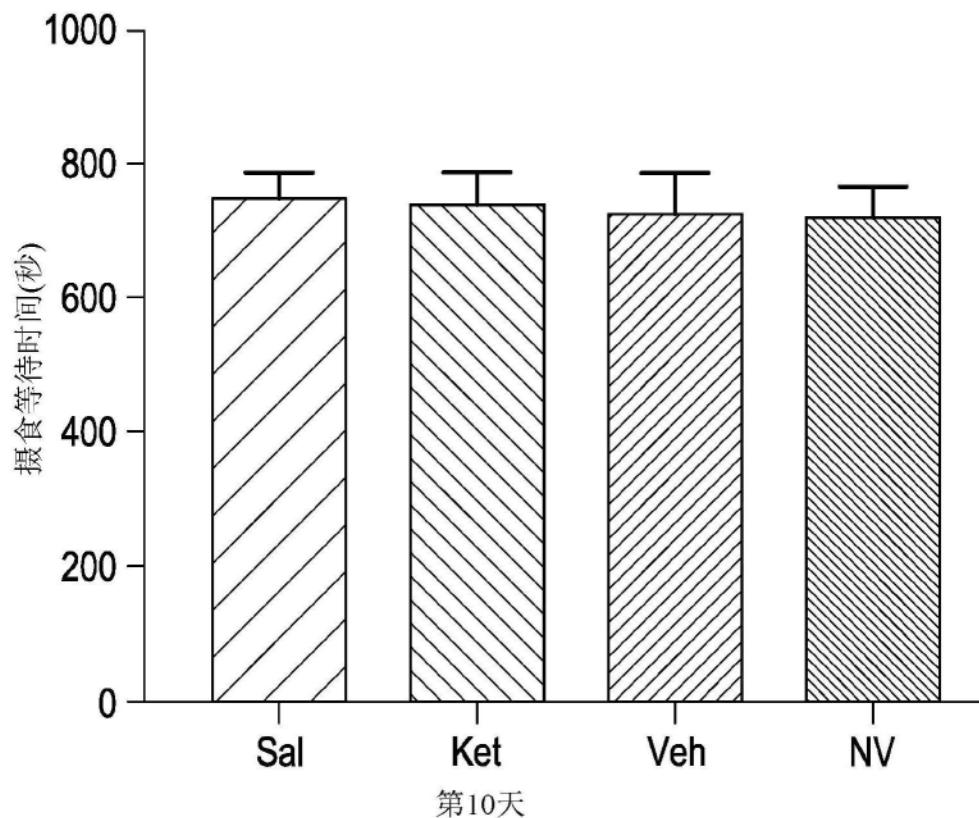


图26A

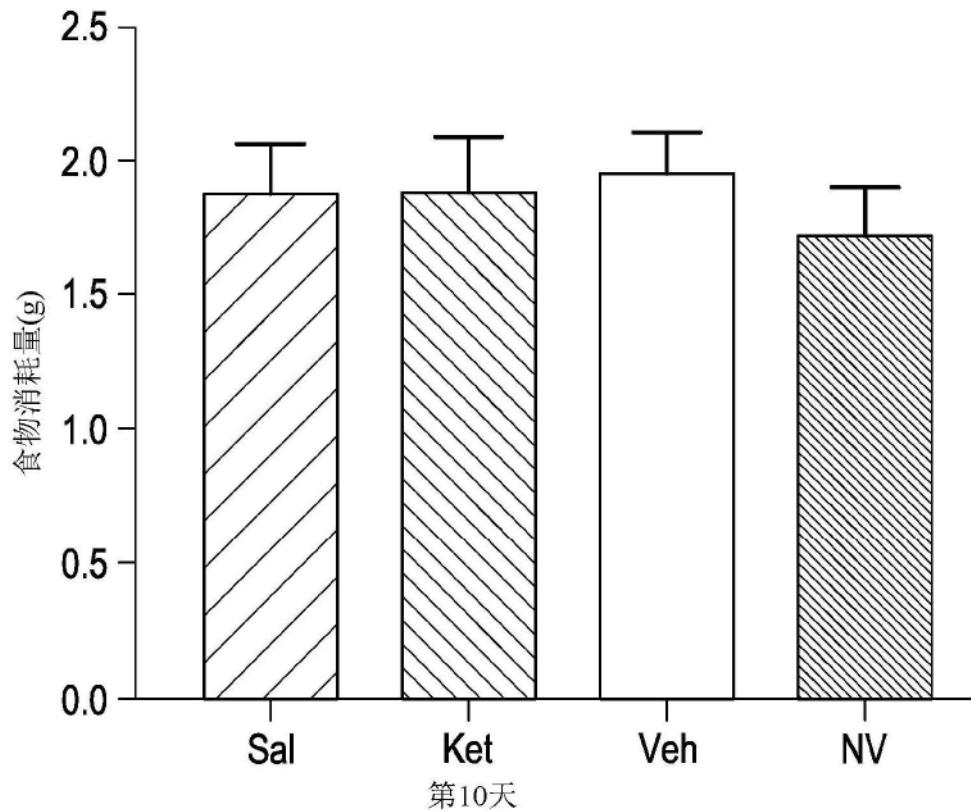


图26B



图27

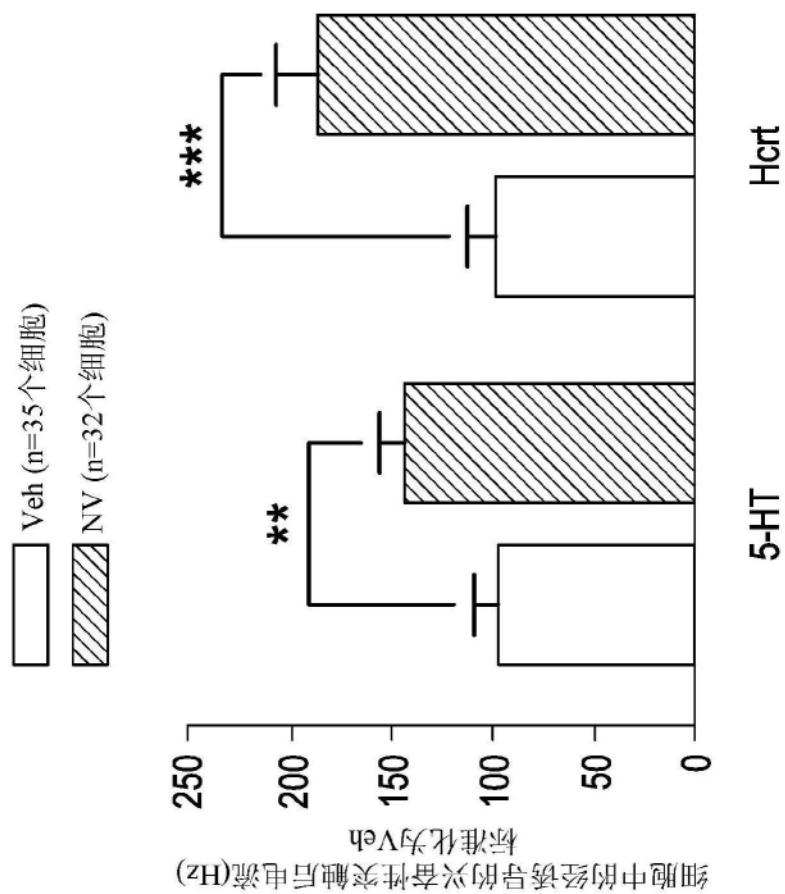


图28

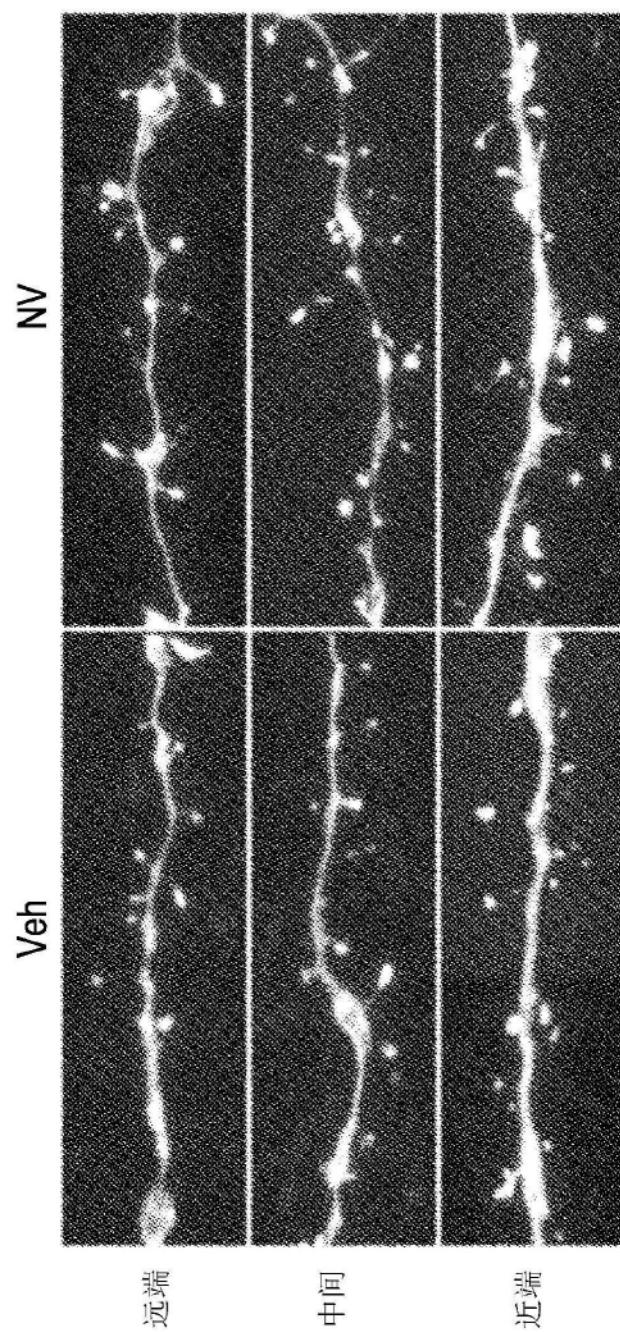


图29A

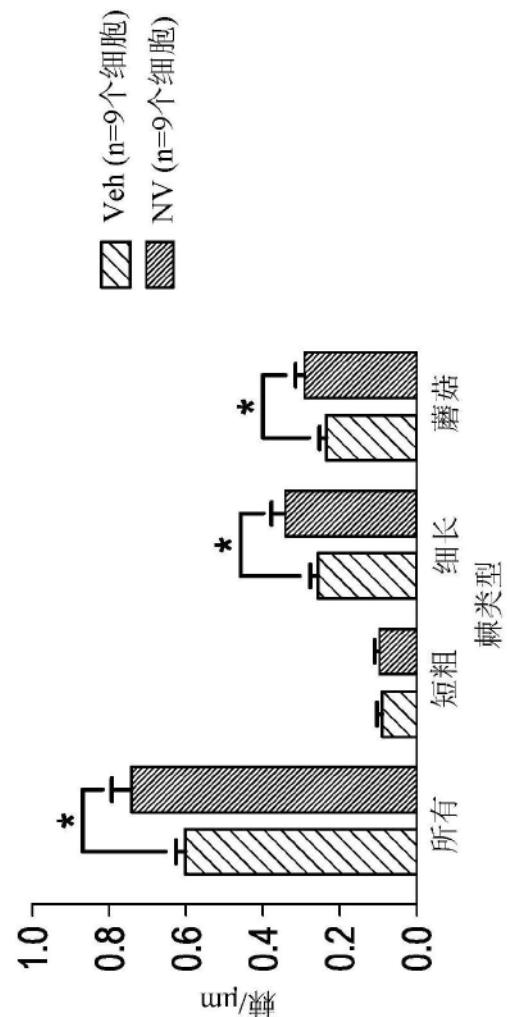


图29B

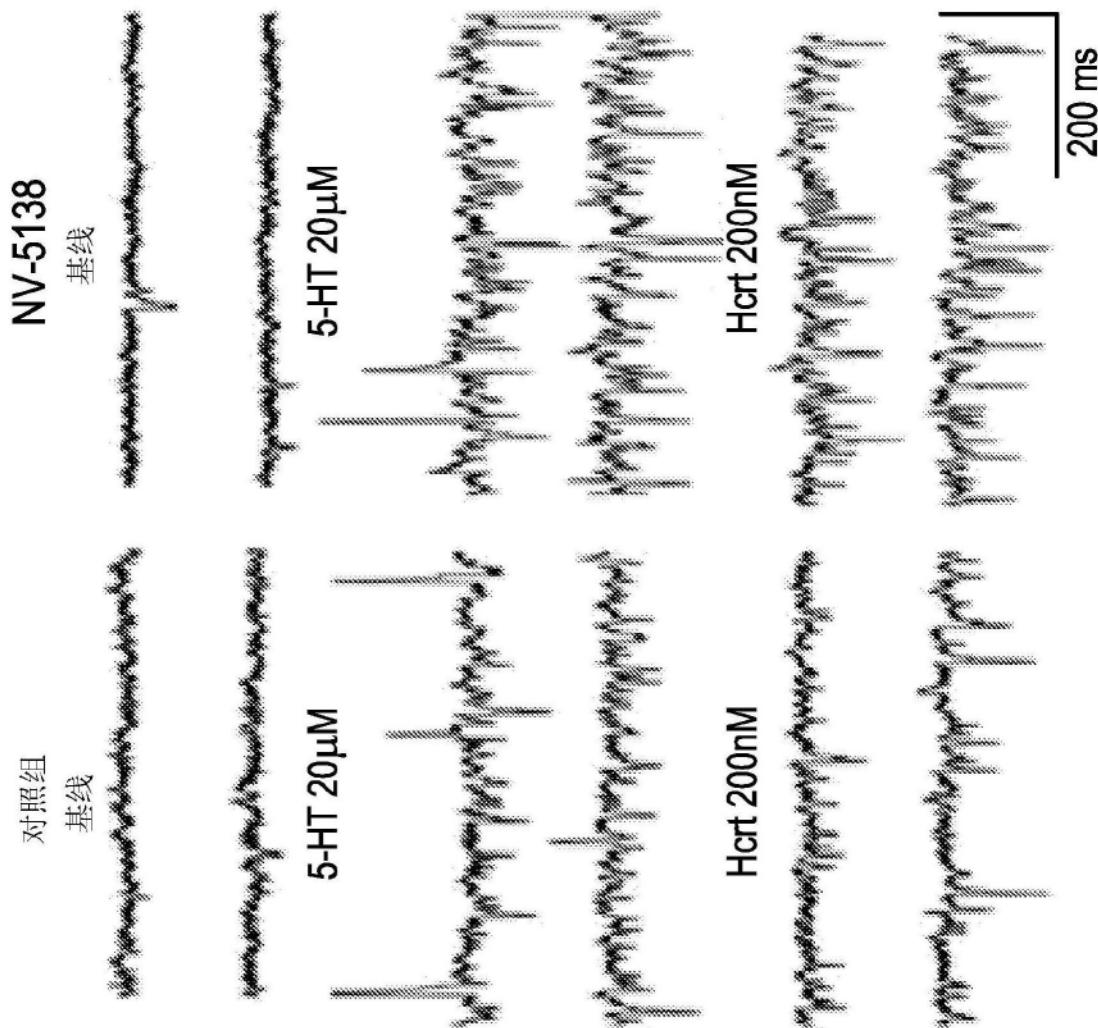


图30

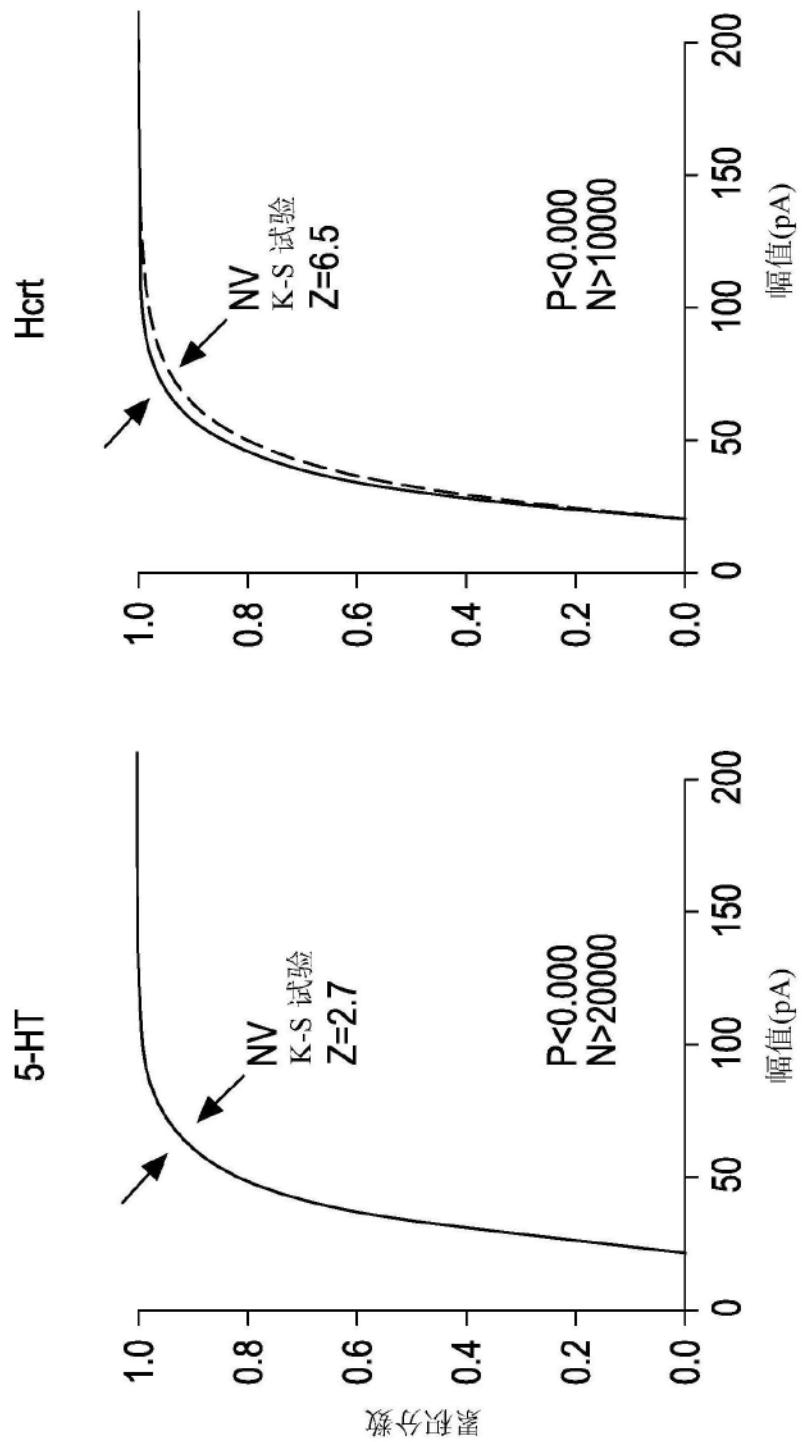


图31

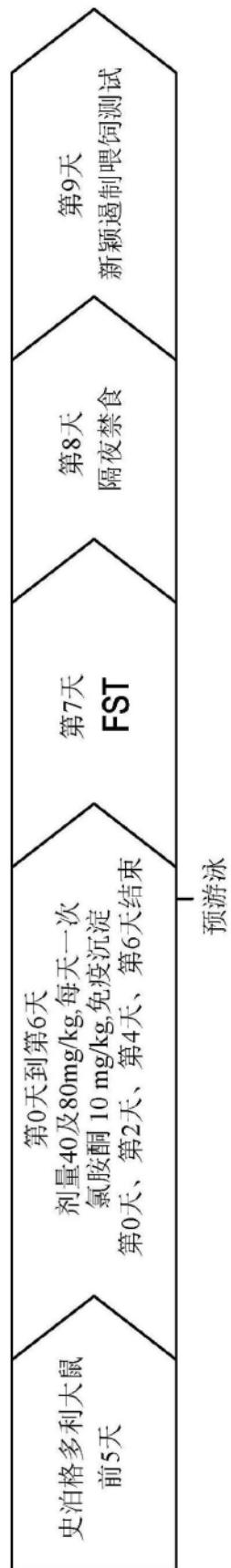


图32

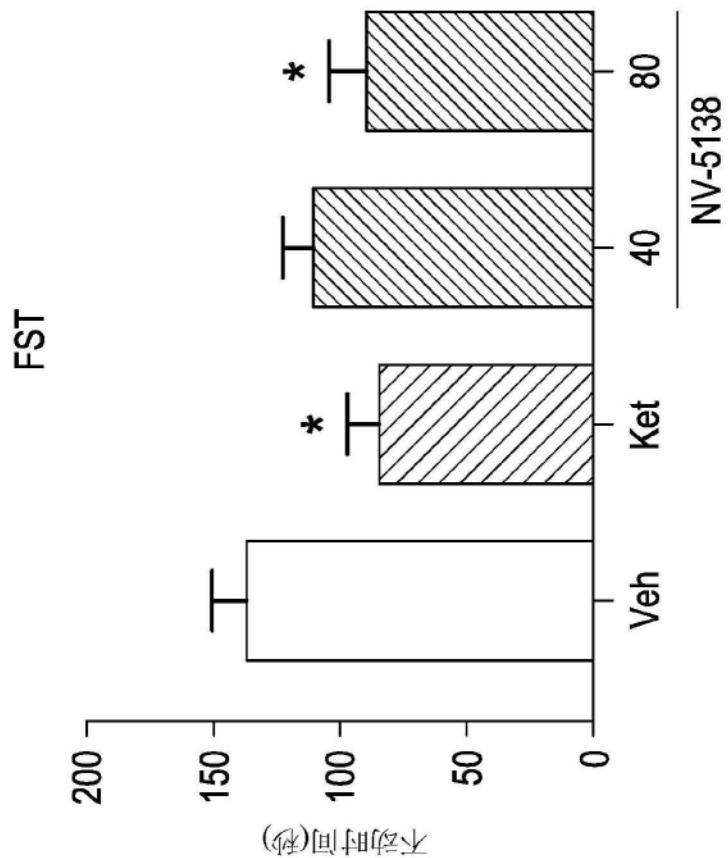


图33

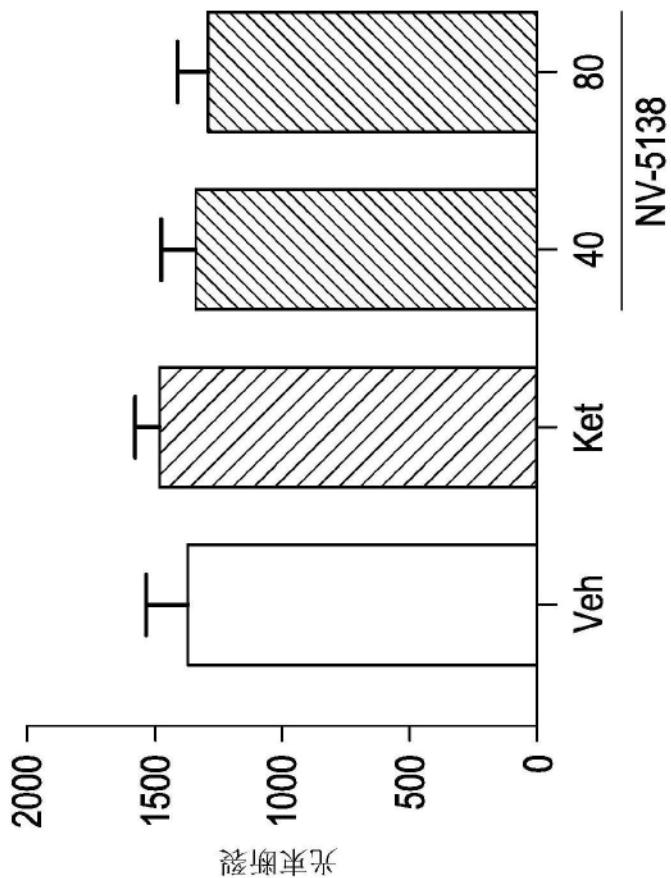


图34

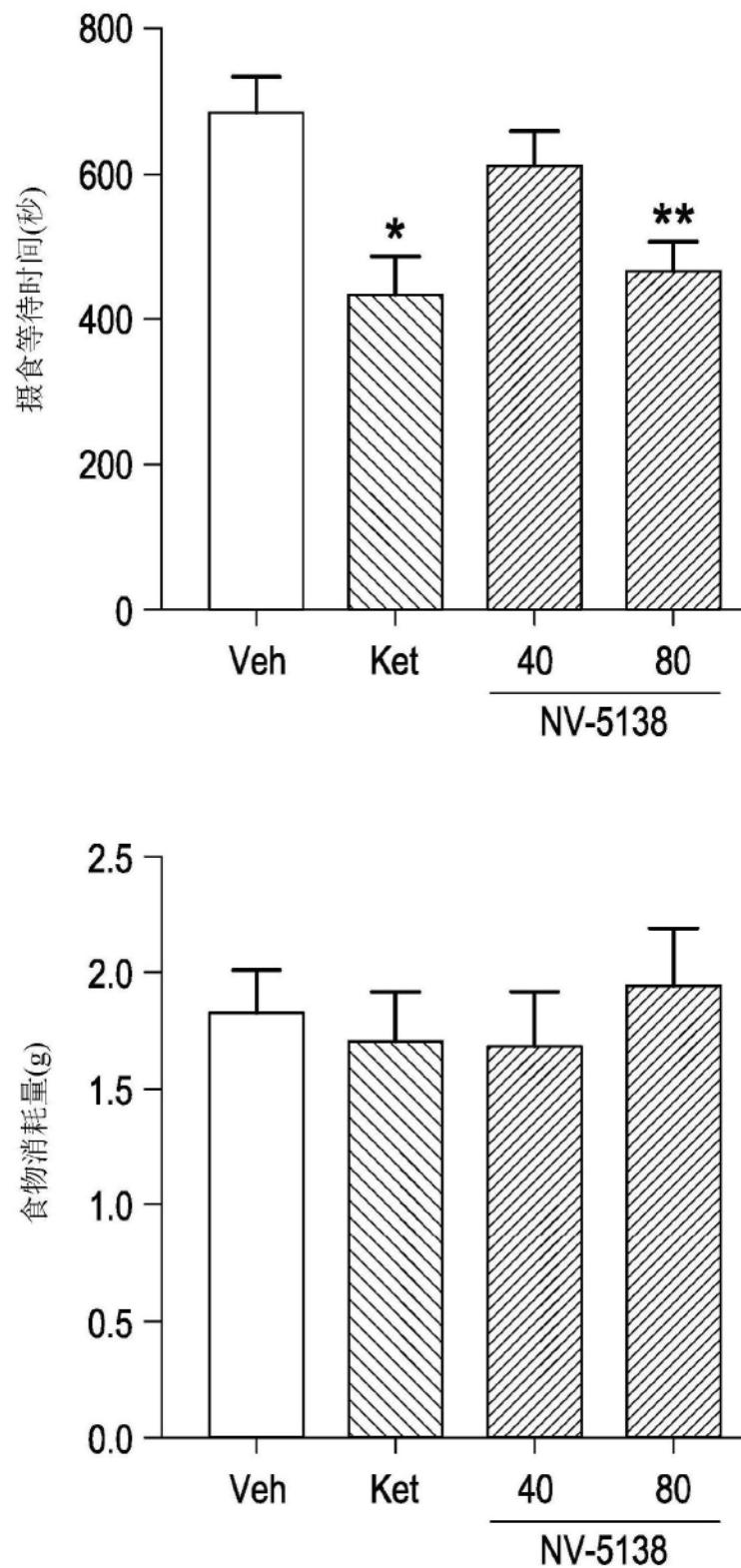


图35

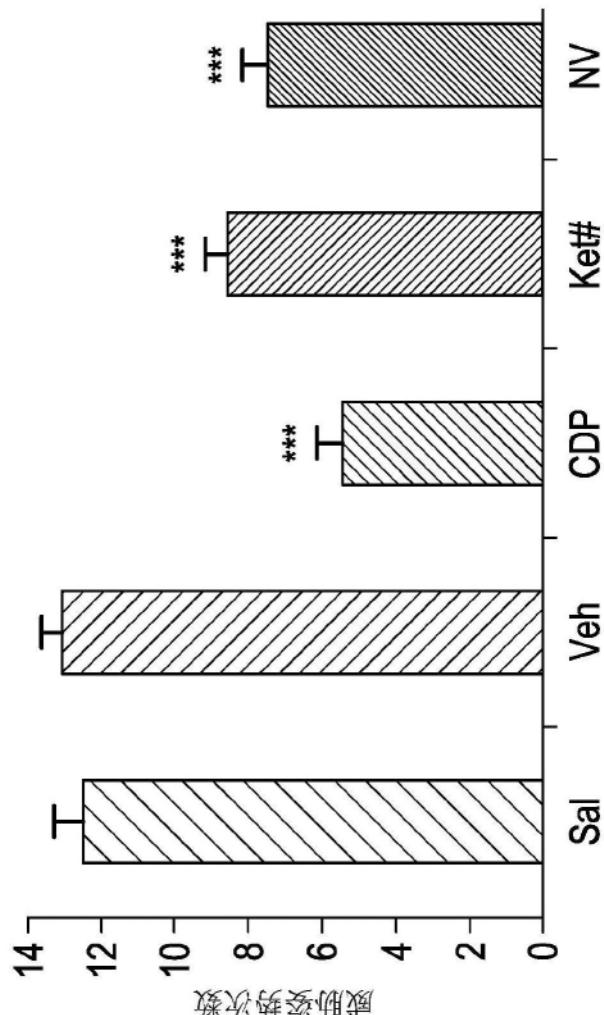


图36

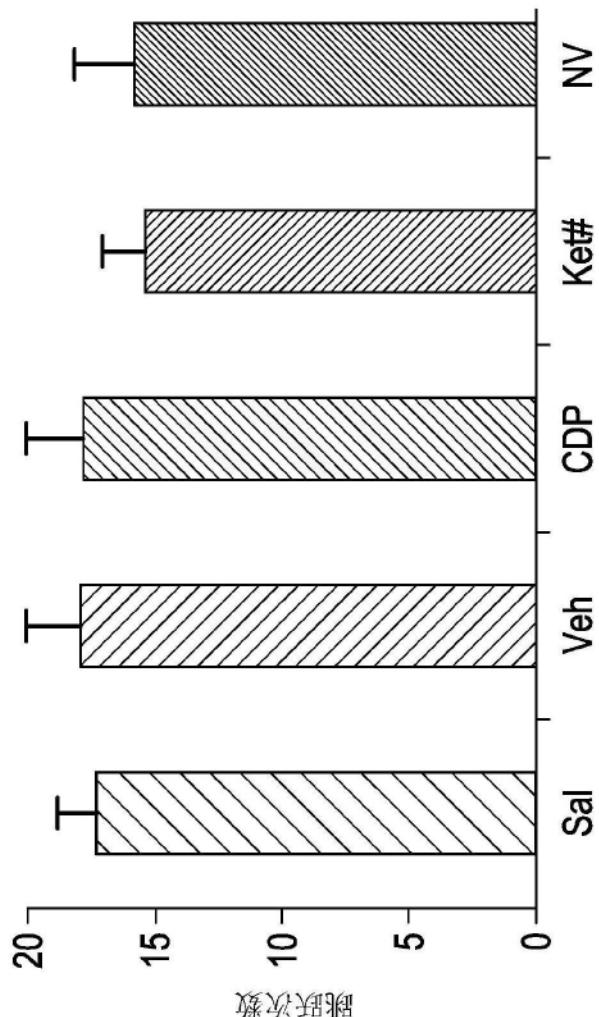


图37