



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106916177 B

(45)授权公告日 2019.04.23

(21)申请号 201710178276.2

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2017.03.23

A61P 9/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 29/00(2006.01)

申请公布号 CN 106916177 A

A61P 37/00(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

(43)申请公布日 2017.07.04

A61P 13/08(2006.01)

C07B 59/00(2006.01)

(73)专利权人 南京陵瑞医药科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市栖霞区仙林街道纬地路9号F7栋689室

(56)对比文件

CN 105732683 A, 2016.07.06, 权利要求1-10.

(72)发明人 朱永强 雷萌 白恩赫 冯华云

CN 106496259 A, 2017.03.15, 权利要求1-10.

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所 (普通合伙) 32204

CN 102066386 A, 2011.05.18, 说明书摘要, 权利要求1、49, 说明书第[0474]-[0477]、[0512]段.

代理人 郑立发

审查员 杨杰

(51) Int. Cl.

C07F 5/02(2006.01)

C07H 23/00(2006.01)

A61K 31/69(2006.01)

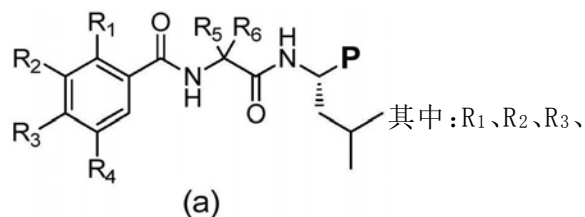
权利要求书2页 说明书22页

## (54)发明名称

一种氘代的二肽硼酸或其酯类化合物及其合成方法与用途

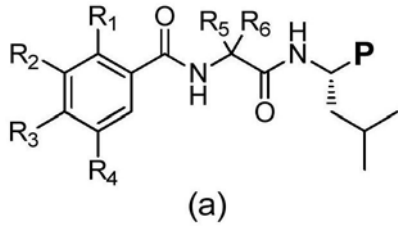
## (57)摘要

本发明公开了一种氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物、或其晶型、或药学上可接受的水合物或溶剂合物,其结构如下式(a)所示,



R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>独立地选自氢、氘或卤素,或一个或多个氘代的或全氘代的C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基;并且R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>中至少一个是氘代的或是氘。本发明化合物可以有效抑制蛋白酶体,有效治疗或预防癌症、心血管疾病、炎症、免疫性疾病、肾病、血管发生或前列腺疾病。

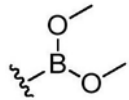
1. 一种氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物,其结构如下式(a)所示,



其中:

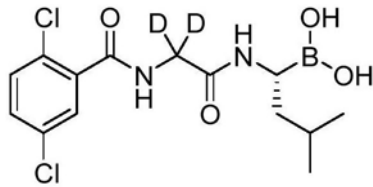
R<sub>1</sub>和R<sub>4</sub>均为卤素,R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>均为氢,R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>均为氘;

P基团为硼酸基,或者是由以下片段与 $\alpha$ -羟基羧酸或 $\beta$ -羟基羧酸形成硼酸酯或酸酐基团,或者是由以下片段与具有不在同一碳原子上的两个或两个以上独立羟基结构的化合物形成硼酸酯基团,所述 $\alpha$ -羟基羧酸或 $\beta$ -羟基羧酸选自乙醇酸,苹果酸,六氢扁桃酸,2-羟基异丁酸,枸橼酸,扁桃酸,乳酸,3-羟基-丁酸, $\beta$ -羟基异戊酸,2-羟基-3,3-二甲基丁酸,2-羟基-3-甲基丁酸,-羟基异己酸,酒石酸,水杨酸或苯甲酸;所述具有不在同一碳原子上的两个或两个以上独立羟基结构的化合物选自二乙醇胺,酒石酸, $\alpha$ -D-葡萄糖或D-核糖;

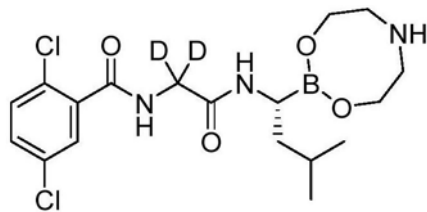


其中B为硼原子,并且与式(a)连接的原子为B。

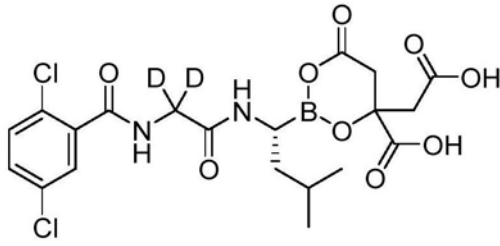
2. 一种氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物,其特征在于,所述化合物名称为((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸(化合物NNU-455),化学结构式如下:



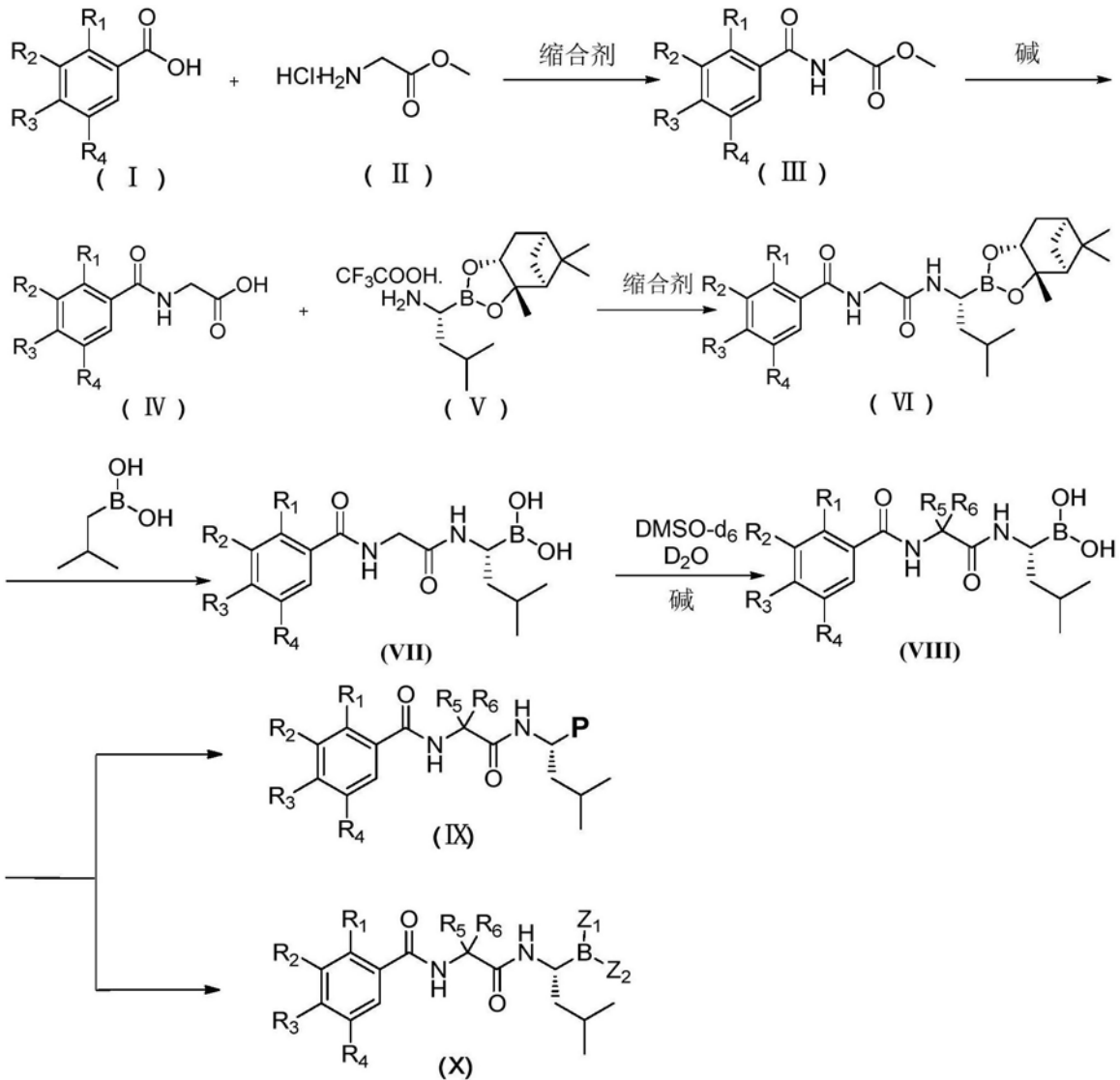
3. 一种氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物,其特征在于,所述化合物名称为((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸二乙醇胺酯(化合物NNU-458),化学结构式如下:



4. 一种氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物,其特征在于,所述化合物名称为((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸枸橼酸酯(化合物NNU-459),化学结构式如下:



5. 权利要求1-4任一项所述的氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物的制备方法,其特征在于,包括以下所示反应过程:



其中,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 和 $R_6$ 和P基团同权利要求1。

6. 权利要求1-4任一项所述的氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物在制备抑制蛋白酶体药物中的应用。

7. 权利要求1-4任一项所述的氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物在制备治疗和预防蛋白酶体相关疾病药物中的应用。

8. 权利要求1-4任一项所述的氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物在制备治疗或预防癌症、心血管疾病、炎症、免疫性疾病、肾病、血管发生或前列腺疾病药物中的应用。

## 一种氘代的二肽硼酸或其酯类化合物及其合成方法与用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物合成领域,具体涉及一种氘代的二肽硼酸或其酯类化合物及其合成方法与用途。

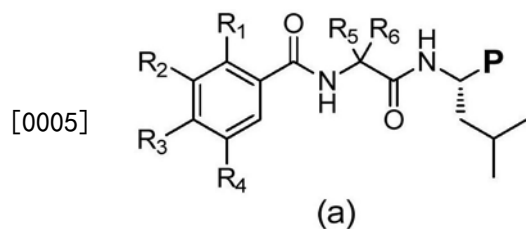
### 背景技术

[0002] 泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin-Proteasome Pathway,简称UPP)是细胞内蛋白质系统降解的主要途径,并参与许多生理上重要的细胞进程,包括信号转导,免疫应答,未折叠蛋白反应和细胞周期进展。这一途径与心脑血管疾病、癌症及神经系统退行性疾病的发病等都有着重要的关系。针对这一新型靶点,2003年第一个蛋白酶体抑制剂硼替佐米(PS-341)获FDA批准上市,用于治疗复发性骨髓瘤。2004年该药又被批准在欧盟上市,用于多发性骨髓瘤。2005年9月,该药由西安杨森引进,首次在我国广州上市。在2007年7月11日又被美国FDA批准用于治疗复发或难治性套细胞淋巴瘤(Mantle Cell Lymphoma,简称MCL)。2014年万珂的销售额达到30.69亿美元,成为全球最畅销的肿瘤药物前20之一。万珂在中国市场售价为每3.5毫克约13000元,治疗一个周期费用约4万元,如此昂贵的费用对于许多患者是非常沉重的经济负担。2015年12月美国FDA又批准了第一个口服蛋白酶体抑制剂Ixazomib上市,用于治疗多发性骨髓瘤。但是目前的临床数据显示,这类药物也存在比较多的副作用,如疲劳乏力、恶心、腹泻以及神经病变等。而且,因此,如何开发出一种价格低廉、毒副作用低的高疗效蛋白酶体抑制剂口服药物是我们目前需要重点解决的问题。

### 发明内容

[0003] 发明目的:针对上述技术问题,本发明目的提供一类新型的具有蛋白酶体抑制活性和更好药效学性能的化合物及其合成方法和用途。

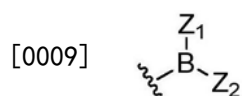
[0004] 技术方案:本发明第一方面公开了一种氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物、或其晶型、或药学上可接受的水合物或溶剂合物,其结构如下式(a)所示,



[0006] 其中:

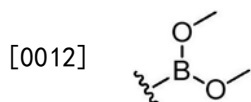
[0007]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 独立地选自氢、氘或卤素,或一个或多个氘代的或全氘代的 $C_1$ - $C_4$ 烷基;并且 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 中至少一个是氘代的或是氘;

[0008] P基团选自以下片段:



[0010] 其中,B为硼原子, $Z_1$ 、 $Z_2$ 独立地选自羟基、 $C_1$ - $10$ 的烷氧基或芳氧基;

[0011] 或者P基团是由以下片段与其他化合物所形成的含有N、S和/或O的杂环基团，

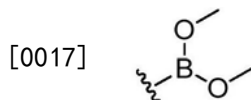


[0013] 其中B为硼原子，并且与式 (a) 连接的原子为B。

[0014] 优选，所述R<sub>1</sub>和R<sub>4</sub>均为卤素，R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>中有两个氢和两个氘。

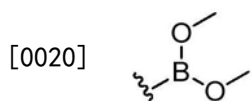
[0015] 优选，所述R<sub>1</sub>和R<sub>4</sub>均为氯，R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>均为氢、R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>均为氘。

[0016] 优选，P基团是由以下片段与α-羟基羧酸或β-羟基羧酸形成硼酸酯或酸酐基团，



[0018] 其中B为硼原子，并且与式 (a) 连接的原子为B。

[0019] 优选，P基团是由以下片段与具有不在同一碳原子上的两个或两个以上独立羟基结构的化合物形成硼酸酯基团，



[0021] 其中B为硼原子，并且与式 (a) 连接的原子为B。

[0022] 在另一优选例中，氘代在氘取代位置的氘同位素含量至少是大于天然氘同位素含量(0.015%)，较佳地大于30%，更佳地大于50%，更佳地大于75%，更佳地大于95%，更佳地大于99%。

[0023] 在另一优选例中，式 (I) 化合物至少含有1个氘原子，更佳地2个氘原子。

[0024] 在另一优选例中，R<sub>1</sub>、R<sub>4</sub>选自卤素；更佳的是氯；

[0025] 在另一优选例中，R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>为氢；

[0026] 在另一优选例中，R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>分别独立地选自氢、氘、氘代甲基、氘代乙基、卤素。

[0027] 在一些实施例中硼酸酯部分是五元环。在另一些实施例中，硼酸酯部分是六元环。在其他一些实施例中，硼酸酯部分是五元环和六元环的混合物。

[0028] 如本文所用，术语“独立地选自”是多个基团分别选自某些取代基，并且各基团之间没有相互联系，例如“R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>独立地选自氢、氘或卤素”，是指R<sub>1</sub>选自氢、氘或卤素，R<sub>2</sub>选自氢、氘或卤素，并且R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>基团之间没有相互联系。

[0029] 如本文所用，术语“α-羟基羧酸”是指含有直接连接到相对于羧酸基团的α位置的碳原子上的羟基的化合物。如本文所用，术语“α-羟基羧酸”不旨在限于仅具有一个羟基和一个羧酸基团的化合物。

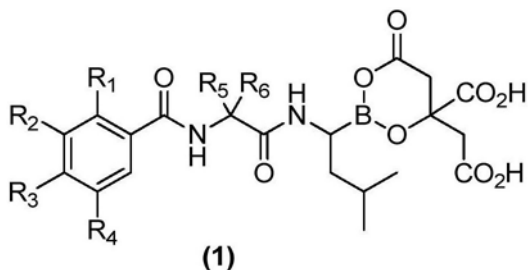
[0030] 如本文所用，术语“β-羟基羧酸”是指含有直接连接到相对于羧酸基团的β位的碳原子上的羟基的化合物。如本文所用，术语“β-羟基羧酸”不旨在限于仅具有一个羟基和一个羧酸基团的化合物。

[0031] 在一些实施方案中，β-羟基羧酸选自苹果酸，枸橼酸，3-羟基丁酸，β-羟基异戊酸和水杨酸。在一些其它实施方案中，β-羟基羧酸选自苹果酸，枸橼酸，3-羟基丁酸，β-羟基异戊酸，酒石酸和水杨酸。在某些实施方案中，β-羟基羧酸是枸橼酸。β-羟基羧酸的一些其它非限制性实例包括葡庚糖酸，麦芽糖酸，乳糖酸和半乳糖二酸。β-羟基羧酸的一些其它非限制性实例包括敌草酸，1-羟基-2-萘甲酸和3-羟基-2-萘甲酸。

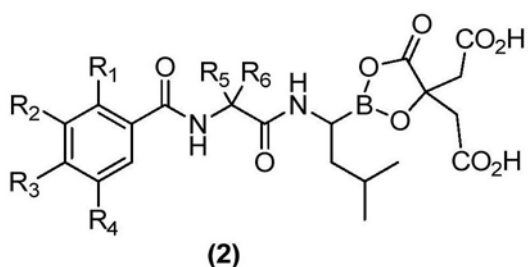
[0032] 在一些实施方案中,  $\alpha$ -羟基酸或 $\beta$ -羟基酸选自乙醇酸, 苹果酸, 六氢扁桃酸, 2-羟基异丁酸, 枸橼酸, 扁桃酸, 乳酸, 3-羟基-丁酸,  $\beta$ -羟基异戊酸, 2-羟基-3,3-二甲基丁酸, 2-羟基-3-甲基丁酸,  $\gamma$ -羟基异己酸, 酒石酸, 水杨酸和苯甲酸。

[0033] 在一些实施方案中, 具有不在同一碳原子上的两个或两个以上独立羟基结构的化合物选自二乙醇胺, 酒石酸,  $\alpha$ -D-葡萄糖, D-核糖等。

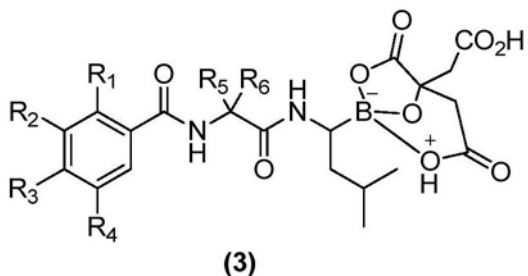
[0034] 当上述 $\alpha$ -羟基羧酸或 $\beta$ -羟基羧酸是枸橼酸时, 式 (a) 的结构可以是以下两种结构:



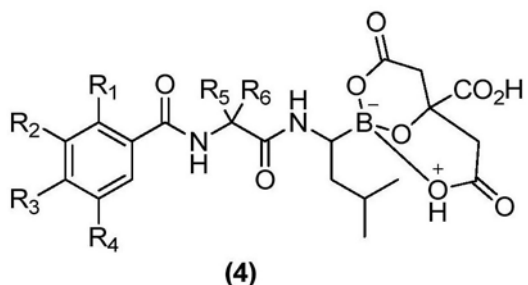
[0035]



[0036] 在另一些实施方案中,  $\alpha$ -羟基羧酸或 $\beta$ -羟基羧酸是枸橼酸时, 羧酸与硼原子之间可以形成另外的键。不受任何化学键合理理论的限制, 在这样的实施方案中, 式 (a) 也可以由式 (3) 或 (4) 表示:



[0037]

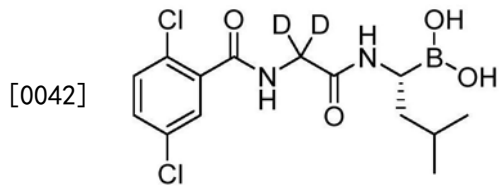


[0038] 还存在其他不受任何化学键和理论的限制的, 可以用于描述如 (3) 或 (4) 羟基羧酸与硼酸进一步键和的其他形式, 本文不再一一描述。

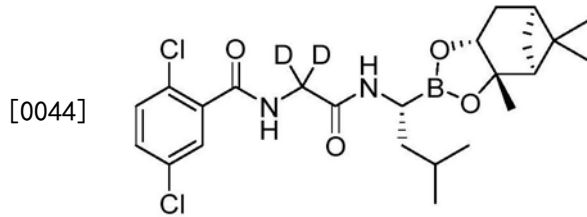
[0039] 本发明化合物中的 $R_5$ 、 $R_6$ 基团所连接的碳原子可以为消旋体, 也可以具有光学活性。

[0040] 另一优选例中, 所属化合物是选自下组的优选化合物:

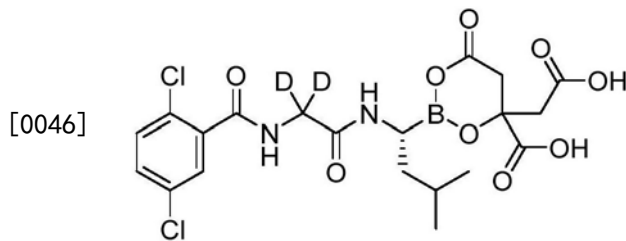
[0041] ((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸;



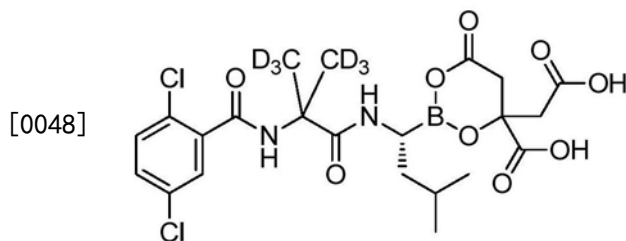
[0043] ((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸-(+)- $\alpha$ -蒎烷二醇酯



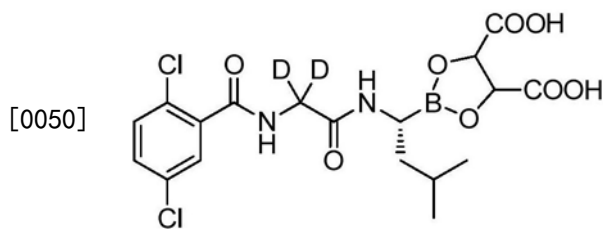
[0045] ((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸枸橼酸酯



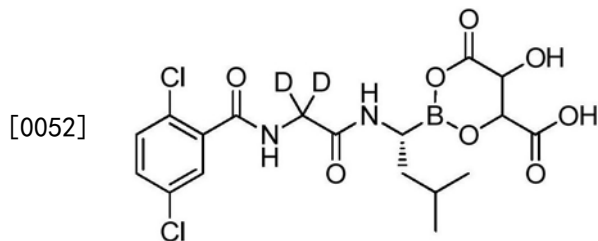
[0047] ((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-氘代二甲基-乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸枸橼酸酯



[0049] ((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸酒石酸酯

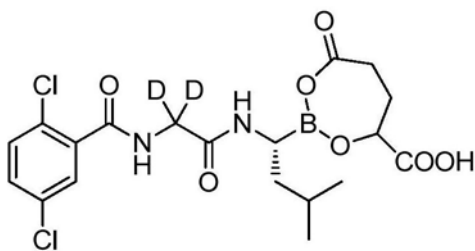


[0051] 酒石酸((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸酯



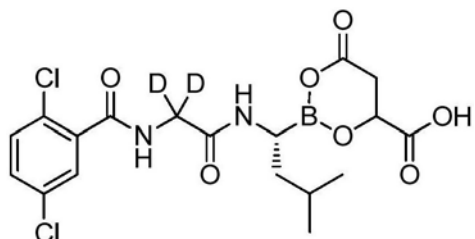
[0053] ((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸 $\alpha$ -羟基戊二酸酯

[0054]



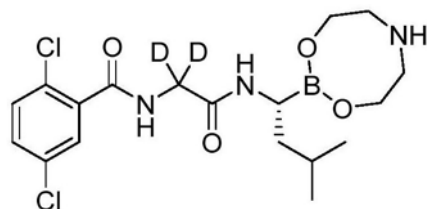
[0055] ((R)-1-((S)-2-(2,5-苯甲酰胺基)-2-氘-乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸苹果酸酯

[0056]



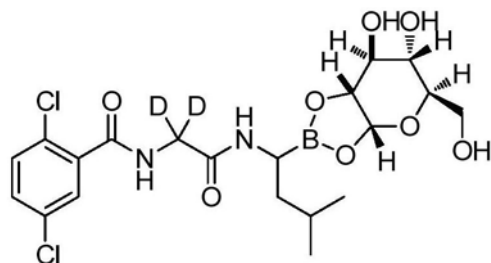
[0057] ((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸二乙醇胺酯

[0058]



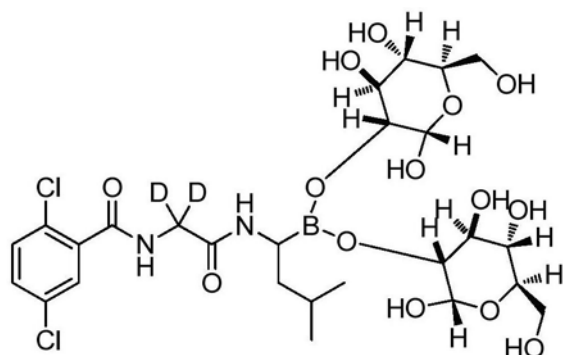
[0059] ((R)-1-((R)-2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘-乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸葡萄糖酯

[0060]

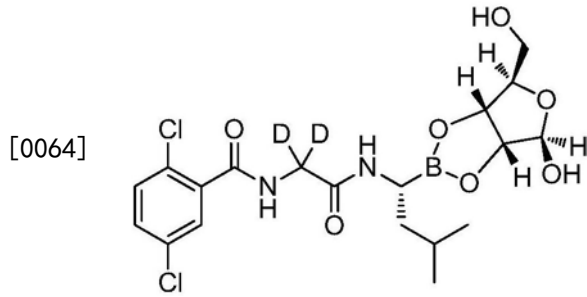


[0061] ((R)-1-((R)-2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘-乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸二葡萄糖酯

[0062]

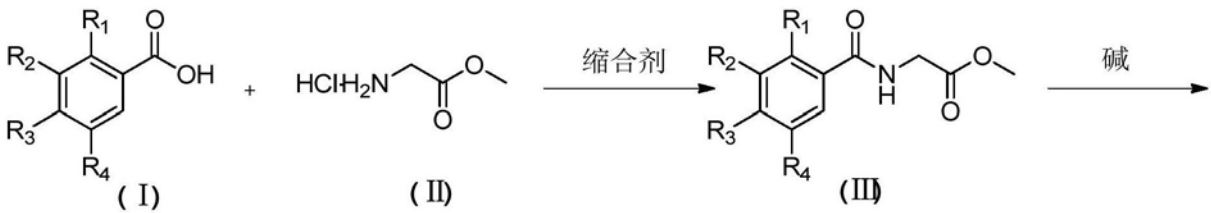


[0063] ((R)-1-((R)-2-(2,5-苯甲酰胺基)-2-二氘-乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸核糖酯

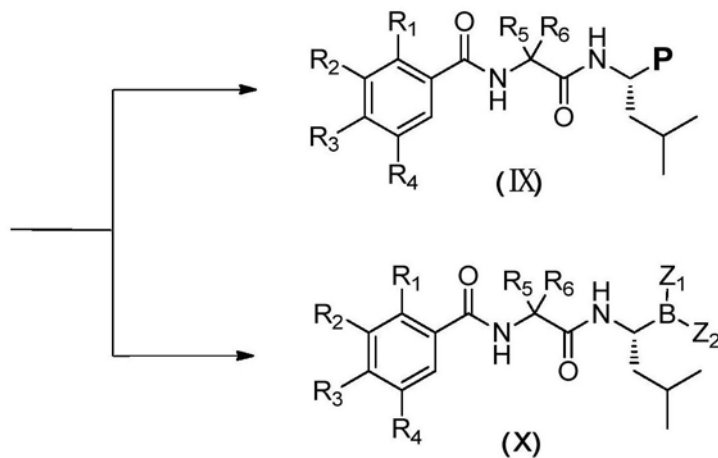
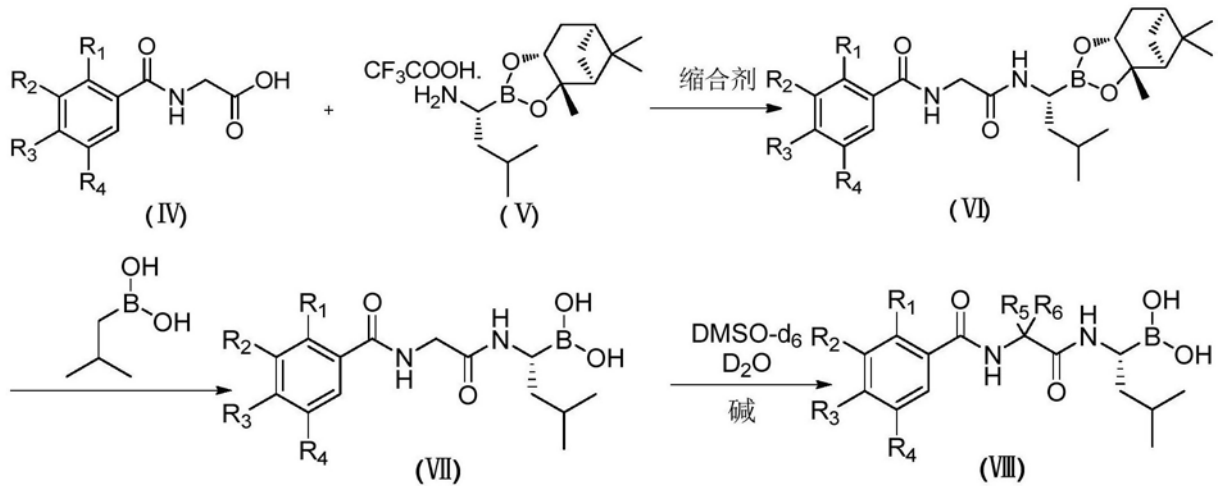


[0065] 本发明第二方面提供了所述的氘代的二肽硼酸或硼酸酯类化合物、或其晶型、或药学上可接受的水合物或溶剂合物的制备方法,包括以下所示反应过程:

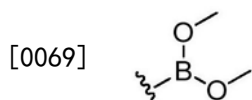
[0066]



[0067]

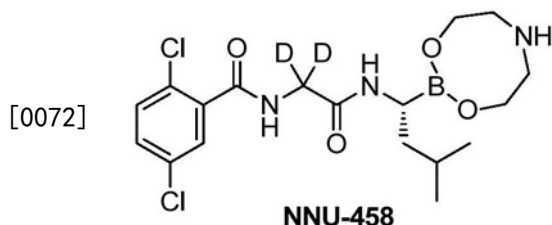


[0068] 其中,P基团是由以下片段与其他化合物所形成的含有N、S和/或O的杂环基团,

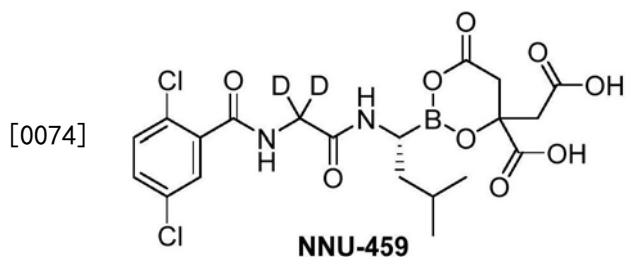


[0070] 其中B为硼原子,并且与式(a)连接的原子为B。

[0071] 本发明的一种特别优选的化合物是((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸二乙醇胺酯(化合物NNU-458)。



[0073] 本发明的另一种特别优选的化合物是((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸枸橼酸酯

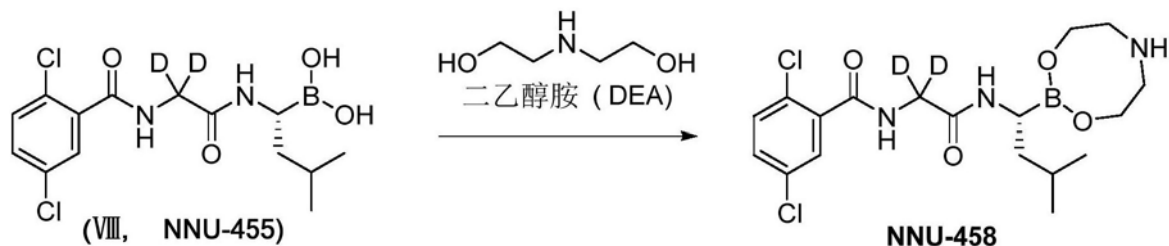


[0075] 本发明提供了它们的制备方法。

[0076] 所述方法包括:

[0077] 在沸腾的乙酸乙酯中,化合物(VIII)即NNU-455,与二乙醇胺(DEA)反应,通过缓慢降温析晶得到终产物NNU-458;

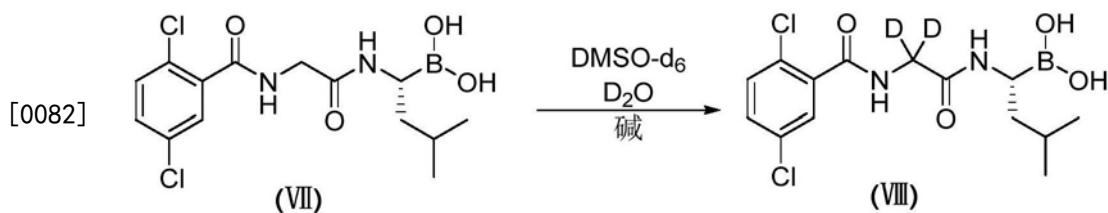
[0078]



[0079] 在另一优选例中,可以通过类似方法让NNU-455与枸橼酸反应,生成NNU-459。

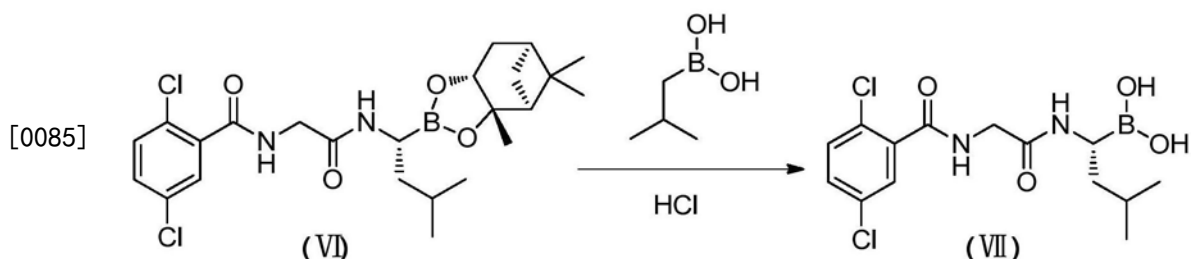
[0080] 在另一优选例中,化合物(VIII)通过以下方法制备:

[0081] 在惰性溶剂、重水、DMSO-d<sub>6</sub>以及碱的作用下,化合物(VII)反应形成所述化合物(VIII)。



[0083] 在另一优选例中,化合物(VII)通过以下方法制备:

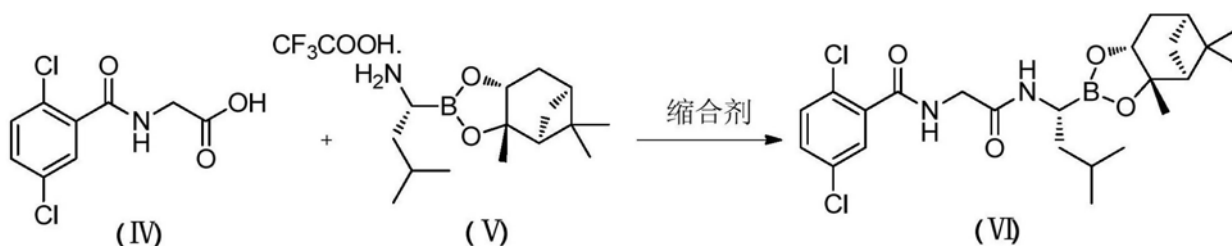
[0084] 化合物(VI)在酸的作用下与异丁基硼酸反应生成化合物(VII);



[0086] 在另一优选例中,化合物(VI)通过以下方法制备:

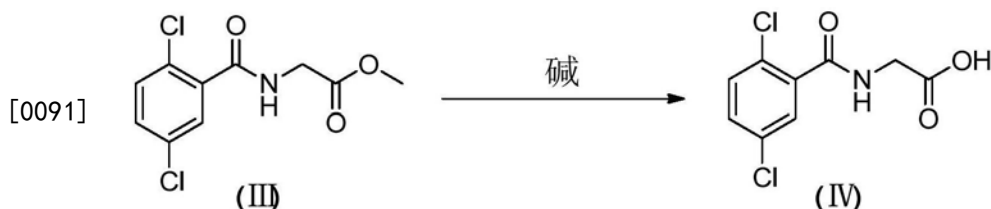
[0087] 在惰性溶剂中,化合物(IV)与化合物(V)在缩合剂以及碱的作用下,脱水缩合形成所述化合物(VI)。

[0088]



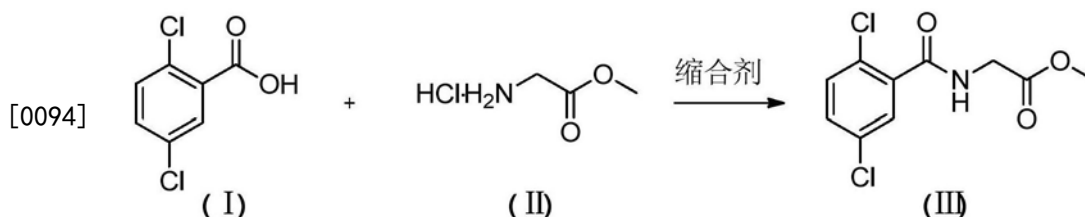
[0089] 在另一优选例中,化合物(IV)通过以下方法得到:

[0090] 在甲醇和水的溶液中,在碱的作用下化合物(III)脱甲基得到化合物(IV)



[0092] 在另一优选例中,化合物(III)通过以下方法得到:

[0093] 在惰性溶剂中,2,5-二氯苯甲酸(I)和化合物(II)在缩合剂和碱的作用下,得到化合物(III)



[0095] 在另一优选例中,所述的碱选自碳酸钾、碳酸铯、氯化钠、氯化钾、氢氧化钾、氢氧化钠或组合。

[0096] 上述反应中常见的肽缩合剂为N,N-二环己基-碳二亚胺(缩写为DCC),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(缩写为EDC.HCl),1-羟基苯并三氮唑(缩写为HOBt)或氯甲酸异丁酯。

[0097] 在另一优选例中,各反应温度在-20~100℃下进行。

[0098] 在本发明的第三方面,提供了一种制备药物组合物的方法,包括步骤:将药学上可接受的载体与本发明第一方面中所述的化合物,或其药学上可接受的晶型、水合物或溶剂合物进行混合,从而形成药物组合物。

[0099] 在本发明的第四方面,提供了一种药物组合物,它含有药学上可接受的载体和本发明第一方面中所述的化合物,或其晶型、药学上可接受的水合物或溶剂合物。

[0100] 在另一优选例中,所述的药物组合物为注射剂、囊剂、片剂、丸剂、散剂或颗粒剂。

[0101] 在另一优选例中,所述的药物组合物还含有另外的治疗药物,所述的另外的治疗药物为癌症、心血管疾病、炎症、免疫性疾病、肾病、血管发生、前列腺疾病的药物。

[0102] 更佳地,所述的治疗药物包括(但不限于):5-氟尿嘧啶、AV412、阿瓦斯丁<sup>TM</sup>(avastin, bevacizumab)、贝沙罗汀(bexarotene)、硼替佐米(bortezomib)、骨化三醇(calcitriol)、卡奈替尼(canertinib)、卡培他滨(capecitabine)、碳铂(carboplatin)、塞来考昔(celecoxib)、西妥昔单抗(cetuximab)、CHR-2797、顺铂(cisplatin)、达沙替尼(dasatinib)、地高辛(digoxin)、enzastaurin、埃罗替尼(Erlotinib)、依托泊甙(etoposide)、依维莫司(everolimus)、氟维司群(fulvestrant)、吉非替尼(gefitinib)、2,2-二氟脱氧胞嘧啶核苷(gemcitabine)、金雀异黄素(genistein)、伊马替尼(imatinib)、依立替康(irinotecan)、拉帕替尼(lapatinib)、来那度胺(lenalidomide)、来曲唑(letrozole)、亚叶酸(leucovorin)、马妥珠单抗(matuzumab)、奥沙利铂(oxaliplatin)、紫杉醇(paclitaxel)、帕尼单抗(panitumumab)、PEG化的粒细胞集落刺激因子(pegfilgrastin)、PEG化的 $\alpha$ -干扰素(pegylated alfa-interferon)、培美曲(pemetrexed)、Polyphenon E、沙铂(satraplatin)、西罗莫司(sirolimus)、舒尼替尼(sutent, sunitinib)、舒林酸(sulindac)、泰索帝(taxotere)、替莫唑胺(temodar, temozolomide)、Torisel(temsirolimus)、TGOltipifarnib、曲妥单抗(trastuzumab)、丙戊酸(valproic acid)、长春氟宁(vinflunine)、Volociximab, vorinostat和XL647。

[0103] 在本发明的第五方面,提供了本发明第一方面中所述的化合物,或其晶型、药学上可接受的盐、水合物或溶剂合物的用途,它们被用于制备抑制蛋白酶体的药物组合物。

[0104] 在另一优选例中,所述的化合物可以用于治疗和预防与蛋白酶体靶点相关的疾病。

[0105] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于治疗 and 预防以下疾病:癌症、心血管疾病、炎症、免疫性疾病、肾病、血管发生、或前列腺疾病。

[0106] 在另一优选例中,所述的癌症包括(但不限于):多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌、子宫癌、直肠癌、脑癌、头癌、颈癌、皮肤癌、前列腺癌、乳腺癌、实体肿瘤、肾癌、血癌、肝癌、胃癌、或胰腺癌。

[0107] 在本发明的第六方面,提供了一种治疗方法,它包括步骤:给需要治疗的对象施用本发明第一方面中所述的化合物,或其晶型、药学上可接受的水合物或溶剂合物,或施用本发明第三方面中所述的药物组合物,从而抑制蛋白酶体。更佳地,所述的疾病包括:癌症、心血管疾病、炎症、免疫性疾病、肾病、血管发生或前列腺疾病。

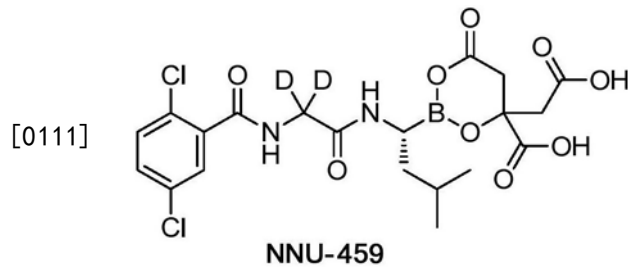
[0108] 应理解,在本发明范围中,上述的技术特征和在下文中具体描述的各技术特征可以相互组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 具体实施方式

[0109] 经研究发现,本发明的氘代二肽硼酸及硼酸酯与未氘代的化合物相比,具有更优异的药物动力学和/或药效学性能,因此更适合作为抑制蛋白酶体的化合物,进而更适用于

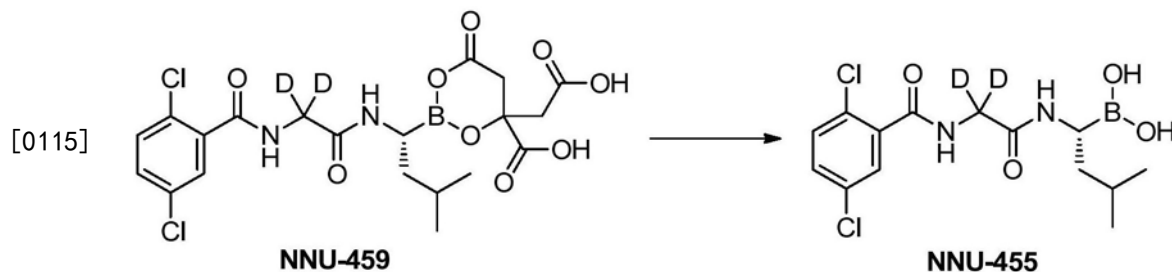
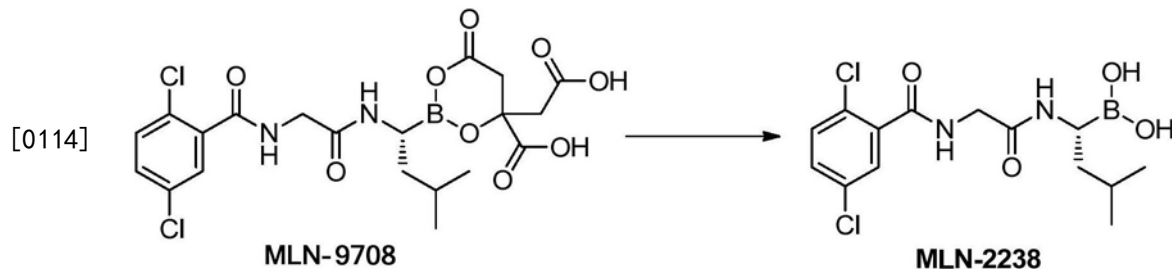
制备治疗癌症及相关疾病的药物。在此基础上完成了本发明。

[0110] 以((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸枸橼酸酯(化合物NNU-459)为例。



[0112] 大鼠体内药代动力学实验结果显示,NNU-459比MLN9708的半衰期 $T_{2/1}$ 延长,曲线下面积AUC显著增加,NNU-459表观清除率也比MLN9708显著减少。同时在人的肝微粒体稳定性实验中,化合物NNU-459的体内活性成分(NNU-455)的半衰期( $T_{1/2}=108.3\text{min}$ )也要比MLN9708的活性成分(MLN2238)的半衰期( $T_{1/2}=57.3\text{min}$ )显著增长。

[0113] 此外在体外实验中,对肿瘤细胞系U266、RPMI-8266以及乳腺癌细胞系MAD-MB-231抑制的 $IC_{50}$  (nM)上,NNU-459也比对照化合物MLN-9708表现出更好的活性。



[0116] 定义

[0117] 如本文所用,“氘代”指化合物或基团中的一个或多个氢被氘取代。氘代可以是一取代、二取代、多取代或全取代。术语“一个或多个氘代的”与“一次或多次氘代”可互换使用。

[0118] 在另一优选例中,氘代在氘取代未知的氘同位素含量至少是大于天然氘同位素含量(0.015%),较佳地大于30%,更佳地大于50%,更佳地大于75%,更佳地大于95%,更佳地大于99%。

[0119] 在另一优选例中,式化合物至少含有1个氘原子,更佳的为2个氘原子。

[0120] 活性成分

[0121] 如本文所用术语“本发明化合物”指式(a)所示化合物。该术语还包括及式(a)化合物的各种晶型形式、药学上可接受的水合物或溶剂合物。

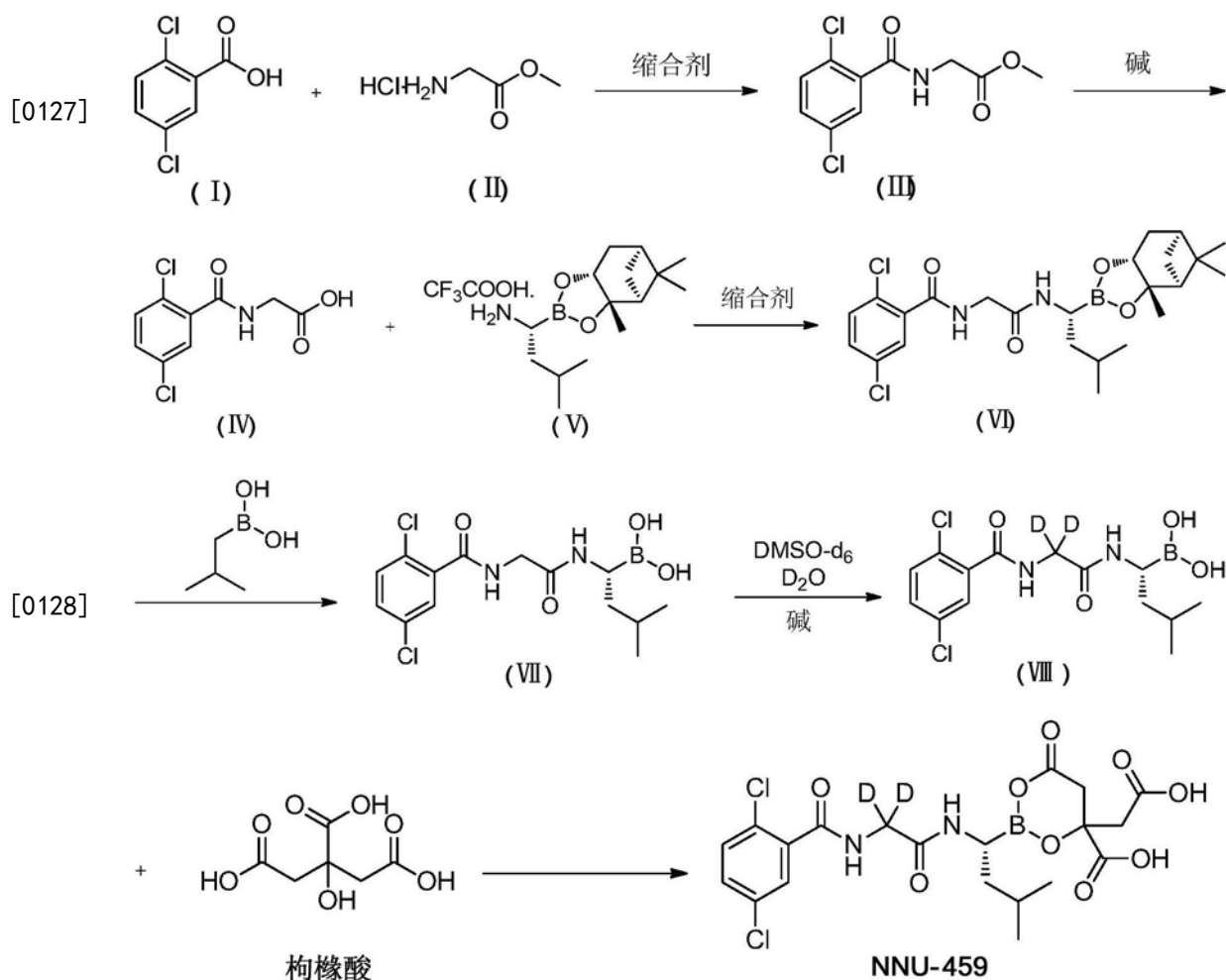
[0122] 制备方法

[0123] 下面更具体地描述本发明式(a)结构化合物的制备方法,但这些具体方法不对本发明构成任何限制。本发明化合物还可以任选将在本说明书中描述的或本领域已知的各种合成方法组合起来而方便的制得,这样的组合可由本发明所属领域的技术人员容易的进行。

[0124] 本发明使用的未氘代的二肽硼酸及其酯类的制备方法是已知的。对应氘代的二肽硼酸及其酯类可以用相应的氘代硼酸化合物为原料。用同样的路线合成。

[0125] 以NNU-459为例,一种优选的制备流程如下。

[0126] 合成路线:



[0129] 2,5-二氯苯甲酸(化合物I)和甘氨酸甲酯盐酸盐(化合物II),在肽缩合剂和碱的作用下反应得到(2,5-二氯苯甲酰基)甘氨酸甲酯(化合物III);然后化合物III在碱的作用下发生皂化反应得到(2,5-二氯苯甲酰基)甘氨酸(化合物IV);化合物IV与(aR,3aS,4S,6S,7aR)-六氢-3a,8,8-三甲基- $\alpha$ -(2-甲基丙基)-4,6-甲桥-1,3,2-苯并二氧硼烷-2-甲胺2,2,2-三氟乙酸盐(化合物V)在肽缩合剂和碱的作用下,反应生成((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氟乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸-(+)- $\alpha$ -蒎烷二醇酯(化合物VI);在甲醇中,在1N盐酸的作用下化合物5与异丁基硼酸反应生成((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸(化合物VII);然后在四氢呋喃中,在碳酸钾与氘代DMSO和重水的作用下,生成((R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氟乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸(化合物VIII);化合物VII在沸腾的乙酸乙酯中,与枸橼酸反应得到化合物NNU-459。

[0130] 具体的合成方法在实施例1中有详细的说明。

[0131] 药物组合物和施用方法。

[0132] 由于本发明化合物具有优异的对蛋白酶体的抑制活性,因此本发明化合物及其各种晶型,药学上可接受的水合物或溶剂合物,以及含有本发明化合物为主要活性成分的药物组合物可用于治疗、预防以及缓解由对蛋白酶体介导的疾病。根据现有技术,本发明化合物可用于治疗以下疾病:癌症,心血管疾病,肥胖病,糖尿病等等。

[0133] 本发明的药物组合物包含安全有效量范围内的本发明化合物或其药理上可接受的盐及药理上可以接受的赋形剂或载体。其中“安全有效量”指的是:化合物的量足以明显改善病情,而不至于产生严重的副作用。通常,药物组合物含有1-2000mg本发明化合物/剂,更佳地,含有10-200mg本发明化合物/剂。较佳地,所述的“一剂”为一个胶囊或药片。

[0134] “药学上可以接受的载体”指的是:一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质,它们适合于人使用,而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能和本发明的化合物以及它们之间相互掺和,而不明显降低化合物的药效。

[0135] 术语“载体”,“赋形剂”或“载体”在本文中可互换使用,并且包括任何和所有溶剂,稀释剂和其它液体载体,分散或悬浮助剂,表面活性剂,pH调节剂,等渗剂,增稠或乳化试剂,防腐剂,固体粘合剂,润滑剂等,适合于所需的特定剂型。除非任何常规载体介质与本发明化合物不相容,例如通过产生任何不期望的生物效应或与药物组合物的任何其它组分相互作用使化合物减效或失效,或产生有害物质,否则其用途被认为在本发明的范围。

[0136] 药学上可以接受的载体包括但不限于离子交换剂,氧化铝,硬脂酸铝,卵磷脂,血清蛋白如人血清白蛋白,缓冲物质如磷酸盐,碳酸盐,氢氧化镁和铝甘氨酸,山梨酸或山梨酸钾,饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物,水,无热原水,盐或电解质如硫酸鱼精蛋白,磷酸二钠,磷酸氢二钠,氯化钠和锌盐,胶体二氧化硅,三硅酸镁,聚乙烯吡咯烷酮,聚丙烯酸酯,聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物,羊毛脂,糖如乳糖,葡萄糖,蔗糖和甘露醇,淀粉如玉米淀粉和马铃薯淀粉,纤维素及其衍生物如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素和乙纤维素,粉末黄耆胶;麦芽,明胶,滑石粉,赋形剂如可可脂和栓剂蜡,油如花生油,棉籽油,葵花籽油,芝麻油,橄榄油,玉米油和大豆油,二醇如丙二醇和聚乙二醇,酯如油酸乙酯和月桂酸乙酯,琼脂,海藻酸,等渗盐水,复方氯化钠注射液,醇如乙醇,异丙醇醇,十六醇和甘油,环糊精如羟丙基 $\beta$ -环糊精和磺丁基醚 $\beta$ -环糊精,润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,石油烃如矿物油和凡士林。着色剂,脱模剂,包衣剂,甜味剂,调味剂和芳香剂,防腐剂和抗氧化剂也可以根据配方师的判断存在于组合物中。

[0137] 本发明的药物组合物可以通过本领域公知的方法制备,例如常规的制粒,混合,溶解,包封,冻干或乳化方法等。组合物可以以各种形式生产,包括颗粒,沉淀或颗粒、粉末,包括冷冻干燥,旋转干燥或喷雾干燥粉末,无定形粉末,片剂,胶囊,糖浆,栓剂,注射剂,乳剂,酏剂,混悬剂或溶液。

[0138] 本发明化合物或药物组合物的施用方式没有特别限制,根据优选的实施方案,将本发明的组合物配制用于对哺乳动物,优选地对人类的药物施用。本发明的这些药物组合物可以通过口服,消化道外给药,通过吸入喷雾,局部,直肠,鼻,颊,阴道或经由植入型药盒施用。本文所用的术语“消化道外给药”包括皮下,静脉内,肌内,关节内,滑膜内,胸骨内,鞘内,肝内和颅内注射或输注技术。优选地,组合物经口,静脉内或皮下施用。本发明的制剂可

以设计为短效,快速释放或长效。另外,化合物可以局部而不是全身方式施用,例如在肿瘤部位施用(例如通过注射)。

[0139] 用于口服给药的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂,微乳剂,溶液剂,混悬剂,糖浆剂和酏剂。除了活性化合物之外,液体剂型可以含有本领域通常使用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,例如乙醇,异丙醇,碳酸乙酯,乙酸乙酯,苄基醇,苯甲酸苄酯,丙二醇,1,3-丁二醇,环糊精,二甲基甲酰胺,油(特别是棉籽油,花生油,玉米油,胚芽油,橄榄油,蓖麻油和芝麻油),甘油,四氢糠醇,聚乙二醇和脂肪酸酯,脱水山梨醇及其混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包括佐剂,例如润湿剂,乳化剂和悬浮剂,甜味剂,旋转剂和芳香剂。

[0140] 用于口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,活性化合物与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合,如枸橼酸钠或磷酸二钙,或与下述成分混合:(a) 填料或增容剂,例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸;(b) 粘合剂,例如,羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶;(c) 保湿剂,例如,甘油;(d) 崩解剂,例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、和碳酸钠;(e) 缓溶剂,例如石蜡;(f) 吸收加速剂,例如,季胺化合物;(g) 润湿剂,例如,鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(h) 吸附剂,例如,高岭土;(i) 润滑剂,例如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,或其混合物。胶囊剂、片剂和丸剂中,剂型也可包含缓冲剂。

[0141] 固体剂型如片剂、糖丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可采用包衣和壳材制备,如肠衣和其它本领域公知的材料。它们可包含不透明剂,并且,这种组合物中活性化合物或化合物的释放可以延迟的方式在消化道内的某一部分中释放。可采用的包埋组分的实例是聚合物物质和蜡类物质。必要时,活性化合物也可与上述赋形剂中的一种或多种形成微胶囊形式。

[0142] 除了这些惰性稀释剂外,组合物也可包含助剂,如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香料。

[0143] 可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性悬浮液,可根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制。无菌可注射制剂还可以是在胃肠外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,例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的载体和溶剂是水,复方氯化钠注射液,和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸用于制备注射剂。可注射制剂可以通过例如通过细菌截留过滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述无菌固体组合物可在使用前溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中。配制用于胃肠外给药的组合物可通过推注或通过定时推注注射,或可通过连续输注给药。

[0144] 用于局部或经皮施用本发明化合物的剂型包括软膏,散剂,霜剂,洗剂,凝胶,粉剂,溶液,喷雾剂,吸入剂或贴剂。将活性组分在无菌条件下与药学上可接受的载体和任何需要的防腐剂或可能需要的缓冲液混合。眼用制剂,滴耳剂和滴眼剂也被认为在本发明的范围内。此外,本发明考虑使用透皮贴剂,其具有向身体提供化合物的受控递送的附加优点。这样的剂型可以通过将化合物溶解或分散在适当的介质中来制备。吸收增强剂也可用于增加化合物穿过皮肤的通量。可以通过提供速率控制膜或通过将化合物分散在聚合物基

质或凝胶中来控制速率。

[0145] 在一些实施方案中,本发明提供了化合物和本文所述的其它赋形剂的药物组合物。在一些其它实施方案中,本发明提供了NNU-455的化合物和本文所述的其它赋形剂的药物组合物。在另一些实施方案中,本发明提供了包含NNU455的枸橼酸酯(NNU-459)和二乙醇胺酯(NNU-458)与本文所述的其它赋形剂的药物组合物。

[0146] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂通过使用具有低水或低水分含量的赋形剂,并使用干燥或非水制剂方法制备,提供活性化合物的稳定的固体口服剂型。

[0147] 本发明化合物可以单独给药,或者与其他药学上可接受的化合物联合给药。

[0148] 使用药物组合物时,是将安全有效量的本发明化合物适用于需要治疗的哺乳动物(如人),其中施用剂量为药学上认为的有效给药剂量,对于60kg体重的人而言,日给药剂量通常为1~2000mg,优选20~500mg。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0149] 本发明的化合物与现有技术中已知的不携带氘的化合物相比,具有一系列优点:

[0150] (1) 本发明化合物对蛋白酶体具有优异的抑制性。

[0151] (2) 通过氘化这一技术改变生物体中的代谢,使药物的代谢半衰期延长,这导致首过效应(First-pass effect)的降低。在这种情况下,可以改变剂量并形成长效制剂,其也可以长效制剂的形式改善适用性。

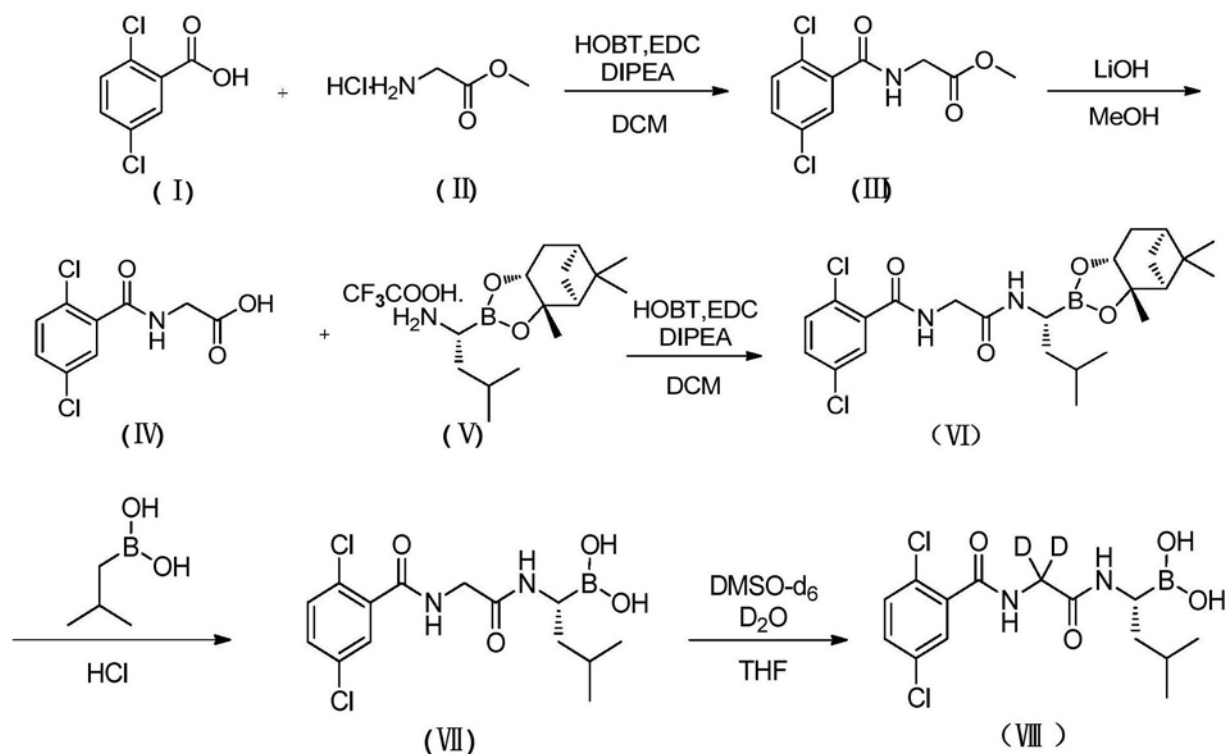
[0152] (3) 通过氘化还改变了药物动力学作用,因为氘代化合物完全形成另一水合物膜,以致在生物体中的分布明显不同于未氘代的化合物。

[0153] (4) 用氘取代化合物中的氢原子,由于其同位素效应,能够提高化合物在动物体内的药物浓度,以提高药物疗效。

[0154] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则份数和百分比为重量份和重量百分比。

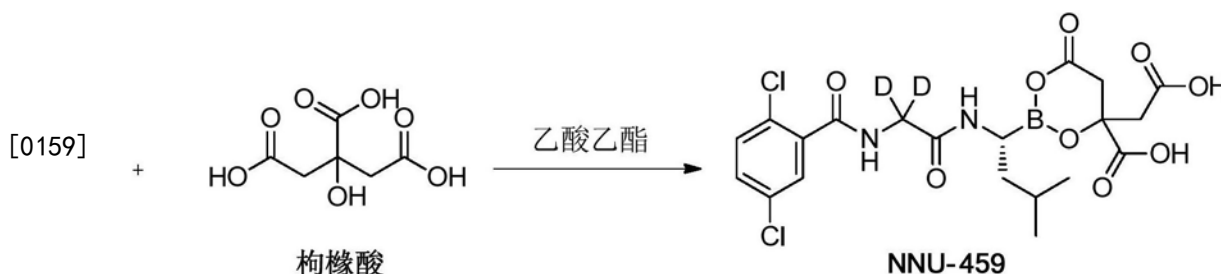
[0155] 实施例1: (S)-N-(2,5-二氯苯甲酰基)-2,2-二氘乙酰胺-D-亮氨酸硼酸枸橼酸酯(化合物NNU-459)。合成路线:

[0156]



[0157] (S)-N-(2,5-二氯苯甲酰基)甘氨酸(IV)的制备:

[0158] 将2,5-二氯苯甲酸(7.6g,40mmol)和HOBT(8.1g,40mmol)溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(200mL)中,在-10℃下反应10min,加入EDC.HCl(11.5g,60mmol)反应30min,加入化合物II(5g,40mmol),反应10min后加入DIPEA(18.1g,140mmol),反应20min后升至室温反应过夜。TLC检测反应,分别用10%的盐酸溶液(200mL),5%的NaHCO<sub>3</sub>溶液



[0160] (200mL)和饱和食盐水(2×200mL)洗涤,CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>层用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,减压蒸除溶剂,得油状化合物9.32g,,收率88.9%。

[0161] 取上步所得化合物III(129mg,0.31mmol)用2.5mLMeOH溶解,加入LiOH·H<sub>2</sub>O(39mg,0.92mmol)和H<sub>2</sub>O(0.8mL),TLC检测,2h后反应完毕。旋干有机相,用乙醚(2×1mL)萃取水相,水相滴加盐酸至pH值为2~3,产生大量白色固体,乙酸乙酯萃取,减压蒸除溶剂,得白色的(S)-N-(2,5-二氯苯甲酰基)甘氨酸106mg,收率86.0%,m.p.169.3-170.8℃。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO)δ3.91(-CH<sub>2</sub>,d,J=6.0Hz,2H),7.48(-CONH,d,J=8.7Hz,1H),7.55(-Ph,d,J=1.3Hz,2H),8.89(-Ph,t,J=5.9Hz,1H),12.71(-COOH,s,1H)。MS(ESI):m/z 246.1[M-H]<sup>-</sup>。

[0162] (S)-N-(2,5-二氯苯甲酰基)乙酰胺-D-亮氨酸硼酸-(+)-α-蒎烷二醇酯(VI)的制备

[0163] 将化合物IV (340mg, 0.84mmol) 和HOBt (218g, 1.67mmol) 溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (18mL) 中, 在-10℃下反应10min, 加入EDC.HCl (321mg, 1.67mmol) 反应30min, 加入 (aR, 3aS, 4S, 6S, 7aR) - 六氢-3a, 8, 8-三甲基- $\alpha$ - (2-甲基丙基) -4, 6-甲桥-1, 3, 2-苯并二氧硼烷-2-甲胺2, 2, 2-三氟乙酸盐 (317mg, 0.84mmol), 反应10min后加入DIPEA (433mg, 3.35mmol), 反应20min后升至室温反应过夜。TLC检测反应, 分别用10%的盐酸溶液 (20mL), 5%的NaHCO<sub>3</sub>溶液 (20mL) 和饱和食盐水 (2×20mL) 洗涤, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>层用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 经柱层析分离得油状目标化合物480mg, 收率87.6%。

[0164] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.83 (-CH<sub>3</sub>, s, 3H), 0.91 (-CH<sub>3</sub>, s, 6H), 1.19 (-CH<sub>2</sub>, d, J=10.8Hz, 1H), 1.24 (-CH<sub>2</sub>, d, J=7.1Hz, 1H), 1.27 (-CH<sub>3</sub>, s, 3H), 1.38 (-CH<sub>3</sub>, s, 3H), 1.59-1.69 (-CH, m, 1H), 1.70 (-CH, s, 1H), 1.77-1.85 (-CH<sub>2</sub>, m, 1H), 1.86-1.92 (-CH<sub>2</sub>, m, 1H), 1.96-2.01 (-CH, m, 1H), 2.11-2.21 (-CH<sub>2</sub>, m, 1H), 2.25-2.36 (-CH<sub>2</sub>, m, 1H), 3.31 (-CH, dd, J<sub>1</sub>=6.2Hz, J<sub>2</sub>=14.5Hz, 1H), 4.15 (-CH<sub>2</sub>, d, J=5.3Hz, 2H), 4.28 (-CH, dt, J<sub>1</sub>=6.3Hz, J<sub>2</sub>=12.5Hz, 1H), 6.39 (-CONH, d, J=5.1Hz, 1H), 7.24 (-CONH, d, J=4.6Hz, 1H), 7.34 (-Ph, d, J=1.4Hz, 2H), 7.58-7.65 (-Ph, m, 1H). MS (ESI): m/z 495.3 [M+H]<sup>+</sup>.

[0165] (R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-乙酰氨基)-3-甲基丁基) 硼酸 (VII) 的制备:

[0166] 将化合物VI (317mg, 0.49mmol) 溶于3mL的MeOH中, 依次加入异丁基硼酸 (247mg, 2.43mmol)、正己烷 (3mL) 和1N HCl (1.2mL, 1.2mmol), 反应搅拌过夜。TLC检测反应, 正己烷相用MeOH (2×3mL) 萃取2次, 正己烷 (3mL) 洗涤甲醇相1次, 减压蒸除甲醇, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×2mL) 萃取水相2次, 用饱和食盐水 (3×5mL) 洗涤有机相至水相呈中性。减压蒸除溶剂, 经柱层析分离得到纯产物193mg, 收率76.5%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  0.82 (-CH<sub>3</sub>, s, 3H), 0.84 (-CH<sub>3</sub>, s, 3H), 1.19-1.28 (-CH<sub>2</sub>, m, 2H), 1.61 (-CH, td, J<sub>1</sub>=6.6Hz, J<sub>2</sub>=13.2Hz, 1H), 2.66 (-CH, s, 1H), 4.04 (-CH<sub>2</sub>, d, J=5.6Hz, 2H), 7.55 (-Ph, d, J=1.3Hz, 2H), 7.66 (-Ph, s, 1H), 8.82 (-CONH, d, J=46.3Hz, 1H), 8.99 (-CONH, t, J=5.7Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz)  $\delta$  22.91, 25.94, 39.90, 44.28, 60.37, 129.20, 129.45, 131.25, 131.34, 132.97, 135.53, 166.38, 171.16. MS (ESI): m/z 359.2 [M-H]<sup>-</sup>. HRMS (ESI): calcd for C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>BCl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup>+383.0710, found 383.0727.

[0167] (R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氟乙酰氨基)-3-甲基丁基) 硼酸 (VIII) 的制备:

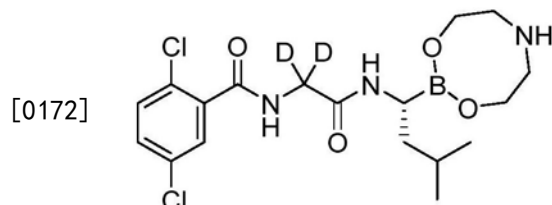
[0168] 将化合物VII (500mg, 1.38mmol) 溶于16ml无水四氢呋喃中, 加入碳酸钾 (191.4mg, 1.38mmol)、DMSO-d<sub>6</sub> (3.75ml)、重水 (2.5ml), 65℃油浴搅拌反应5小时。LC-MS检测反应结束后, 减压蒸除四氢呋喃, 加入少量水, 用乙酸乙酯萃取, 然后有机相用水洗两次, 饱和食盐水洗一次, 减压蒸除溶剂, 经柱层析分离得到产物纯品278mg, 收率55.6%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD)  $\delta$  0.93 (-CH<sub>3</sub>, s, 3H), 0.95 (-CH<sub>3</sub>, s, 3H), 1.29 (-CH, s, 1H), 1.41-1.36 (-CH<sub>2</sub>, m, 2H), 2.78 (-CH, dd, J<sub>1</sub>=8.9, J<sub>2</sub>=6.3Hz, 1H), 7.49 (-Ph, d, J=1.4Hz, 2H), 7.61 (-Ph, t, J=1.3Hz, 1H), MS (ESI): observed: m/z 375 [M-H]<sup>-</sup>.

[0169] (R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氟乙酰氨基)-3-甲基丁基) 硼酸枸橼酸酯 (NNU-459) 的制备:

[0170] 将枸橼酸 (192.12mg, 0.39mmol) 溶解于2mL乙酸乙酯中, 升温至74℃, 待枸橼酸完全溶解后, 加入溶于1mL乙酸乙酯的化合物VII (363.03mg, 0.36mmol), 缓慢降温至60℃, 反应

3h,再缓慢降温至25℃过夜。TLC检测反应,过滤,滤饼真空烘干得纯产物90.0mg,收率48.6%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) δ 0.86 (-CH<sub>3</sub>, d, J=6.3Hz, 6H), 1.39-1.21 (-CH<sub>2</sub>, m, 2H), 1.70 (-CH, d, J=26.1Hz, 1H), 2.81-2.52 (-CH<sub>2</sub>, m, 4H), 2.88 (-CH, s, 1H), 7.78-7.44 (-Ph, m, 3H), 9.12 (-NH, s, 1H), 10.73 (-NH, s, 1H), 12.15 (-COOH, s, 2H)。MS (ESI): observed:m/z 519[M]<sup>+</sup>。

[0171] 实施例2:(R)-1-(2-(2,5-苯甲酰胺基)-2,2-二氘乙酰氨基)-3-甲基丁基)硼酸二乙醇胺酯(化合物NNU-458)



[0173] 按照实施例1中所述方法,不同点在于,用二乙醇胺替换枸橼酸,从而制得目标化合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) 0.85-0.74 (-CH<sub>3</sub>, m, 6H), 1.33-1.16 (-CH<sub>2</sub>, m, 2H), 1.64-1.51 (-CH, m, 1H), 2.98-2.63 (-CH<sub>2</sub>, m, 4H), 3.13 (-CH, td, J<sub>1</sub>=14.0Hz, J<sub>2</sub>=7.1Hz, 1H), 3.67 (-CH<sub>2</sub>, dd, J<sub>1</sub>=11.4Hz, J<sub>2</sub>=5.8Hz, 4H), 5.24 (-NH, t, J=22.6Hz, 1H), 6.58 (-NH, d, J=28.1Hz, 1H), 7.01 (-NH, d, J=8.4Hz, 1H), 7.65-7.43 (-Ph, m, 3H), 8.79 (d, J=36.3Hz, 1H)。MS (ESI): observed:m/z 432.3[M+H]<sup>+</sup>

[0174] 实施例3:大鼠中药代动力学评价

[0175] SD雄性大鼠12只,体重220±20g,随机分为四组。

[0176] 其中两组按0.500mg·kg<sup>-1</sup>剂量分别尾静脉注射给予0.100mg·mL<sup>-1</sup>NNU-459以及MLN-9708,并于给药前及给药后10min、20min、30min、1h、2h、4h、8h、12h、24h和36h,由颈静脉采血约0.200mL,置于装有EDTA-K<sub>2</sub>的试管中,高速离心(7800×g)5min后分离血浆,于-15℃~-35℃保存。用于比较NNU-459与MLN-9708静脉注射方式给药的药代动力学差异。

[0177] 另外两组按1.50mg·kg<sup>-1</sup>的剂量分别灌胃给予0.150mg·mL<sup>-1</sup>NNU-459及MLN-9708,并于给药前及给药后5min、10min、20min、30min、1h、2h、4h、8h、12h、24h和36h,由颈静脉采血约0.200mL,置于装有EDTA-K<sub>2</sub>的试管中,高速离心(7800×g)15min后分离血浆,于-15℃~-35℃保存。用于比较NNU-459与MLN-9708口服方式给药的药代动力学差异。

[0178] 结果显示,不论是经静脉注射还是口服给药NNU-459的半衰期都要优于MLN-9708,尤其是经口服给药途径,NNU-459的半衰期为(13.2±7.97小时)明显高于MLN-9708的半衰期(5.80±1.33小时)。

[0179] 从上面结果看出,本发明化合物在动物体内具有更好的药物动力学,因而具有更好的药效学和治疗效果。

[0180] 另外,通过氘化,本发明化合物在生物体中的代谢过程有所改变。这导致首过效应(First-pass effect)的降低。在这种情况下,可以改变剂量并形成长效制剂,其也可以长效制剂的形式改善适用性。

[0181] 另外,通过氘化还改变了药物动力学作用,因为氘代化合物完全形成另一水合物膜,以致在生物体中的分布明显不同于未氘代的化合物。

[0182] 实施例4:NNU-455与MLN-2238的肝微粒体稳定性实验

[0183] 测定在不同物种的肝微粒体中, NNU-459和MLN-9708的体内活性物质NNU-455与MLN-2238的稳定性。

[0184] 肝微粒体和NADPH辅酶的准备:

[0185] i. 人肝微粒体工作溶液(2×): 取0.3mL的人肝微粒体储存液(20mg/mL)加入到5.7mL磷酸盐缓冲液, 得1.0mg/mL的工作溶液。

[0186] ii. 大鼠肝微粒体工作溶液(2×): 取0.3mL的大鼠肝微粒体储存液(20mg/mL)加入到5.7mL磷酸盐缓冲液, 得1.0mg/mL的工作溶液。

[0187] iii. 小鼠肝微粒体工作溶液(2×): 取0.3mL的小鼠肝微粒体储存液(20mg/mL)加入到5.7mL磷酸盐缓冲液, 得1.0mg/mL的工作溶液。

[0188] iv. 犬肝微粒体工作溶液(2×): 取0.3mL的犬肝微粒体储存液(20mg/mL)加入到5.7mL磷酸盐缓冲液, 得1.0mg/mL的工作溶液。

[0189] v. 猴肝微粒体工作溶液(2×): 取0.3mL的猴肝微粒体储存液(20mg/mL)加入到5.7mL磷酸盐缓冲液, 得1.0mg/mL的工作溶液。

[0190] vi. NADPH辅酶的工作溶液(2.5×): 取600 $\mu$ L的NADP(100mM)、600 $\mu$ L的G6P(200mM)、240 $\mu$ L的G6PDH(250U/mL)和480 $\mu$ L的氯化镁溶液(300mM)加入到18.08mL的磷酸缓冲液, 得NADPH辅酶的工作溶液。

[0191] 工作溶液的制备

[0192] i. 阳性对照的工作溶液(10×): 维拉帕米作为阳性对照, 用DMSO配成20mM储备液, 再用磷酸缓冲液稀释为10 $\mu$ M工作溶液。

[0193] ii. 测试品的工作溶液(10×): 先用DMSO配成10mM储备液, 然后用50%的甲醇-水稀释到100 $\mu$ M, 再用磷酸缓冲液稀释成10 $\mu$ M浓度的工作溶液。

[0194] 终止液的制备: 用甲醇配置100ng/mL甲苯磺丁脲作为含内标的终止液。

[0195] 按照下表1顺序加入反应所需基质, 测试品每个时间点做3个平行, 阳性对照物每个时间点做3个平行。

[0196]

测试组	1. 阳性对照/ 测试品的工作 溶液	2. 终止 液	3. 磷酸 缓冲液	4. NADPH 反应体系	5. 肝微粒 体的工作溶 液	6. 37度 孵育	7. 终止液
T0 组	10 $\mu$ L	300 $\mu$ L	40 $\mu$ L		50 $\mu$ L		
T5, T10, T20, T30, T60 组	10 $\mu$ L			40 $\mu$ L	50 $\mu$ L	不同孵 育时间	300 $\mu$ L
NCF60 组	10 $\mu$ L		40 $\mu$ L		50 $\mu$ L		300 $\mu$ L

[0197] 反应完成后, 将样品在4 $^{\circ}$ C, 4000rpm离心20min。取100 $\mu$ L的上清加上200 $\mu$ L甲醇用于质谱定量分析。化合物在不同孵育时间点的浓度用Aa/Ai(化合物与内标质谱信号峰面积的比值)表示。将同一化合物每个时间点的浓度除以0时间点浓度得到剩余率, 计算公式如下:

[0198] 半衰期:

[0199] 将不同时间点的剩余百分比以指数回归模型作图, 用下列一级动力学公式计算半衰期:

$$[0200] \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{-k} = \frac{0.693}{-k}$$

[0201] 清除率 (CL) :

$$[0202] \quad CL = V_d \times \frac{0.693}{t_{1/2}} = V_d \times (-k)$$

[0203] 其中,  $V_d$  为表观分配系数

$$[0204] \quad V_d = \frac{\text{反应体系的体积}}{\text{反应体系中人肝微粒体的含量}}$$

[0205] 实验结果见表1, 在人肝微粒体中, NNU-455的半衰期 (108.3min) 要显著长于MLN-2238的半衰期 (57.3min), 同时Y455的清除率 (12.8 $\mu$ L/min/mg) 也明显少于MLN-2238 (24.2 $\mu$ L/min/mg)。

[0206] 表1在不同物种肝微粒体中NNU-455的稳定性实验结果

[0207]

Compound	Human Liver Microsomes			Rat Liver Microsomes			Mouse Liver Microsomes		
	$T_{1/2}$ (min)	CL ( $\mu$ L/min/mg)	CL <sub>int</sub> (mL/min/kg)	$T_{1/2}$ (min)	CL ( $\mu$ L/min/mg)	CL <sub>int</sub> (mL/min/kg)	$T_{1/2}$ (min)	CL ( $\mu$ L/min/mg)	CL <sub>int</sub> (mL/min/kg)
MLN2238	57.3	24.2	21.8	30.0	46.2	83.2	35.7	38.8	152.8
Y455	108.3	12.8	11.5	42.3	32.8	59.0	33.8	41.0	161.4
Verapamil	10.0	139.2	125.3	8.8	158.0	284.4	6.8	204.6	805.6

[0208]

Compound	Dog Liver Microsomes			Monkey Liver Microsomes		
	$T_{1/2}$ (min)	CL ( $\mu$ L/min/mg)	CL <sub>int</sub> (mL/min/kg)	$T_{1/2}$ (min)	CL ( $\mu$ L/min/mg)	CL <sub>int</sub> (mL/min/kg)
MLN2238	58.2	23.8	34.3	495.0	2.8	3.8
Y455	52.5	26.4	38.0	169.0	8.2	11.1
Verapamil	8.3	166.6	239.9	8.1	170.8	230.6

[0209] 以上实验结果表明, 本发明中的化合物NNU-459在体内更不容易被代谢清除, 从而拥有更好的代谢动力学性质以及药效。

[0210] 实施例5: 化合物抑制体外肿瘤细胞的活性检测

[0211] 本专利利用的检测液为单溶液细胞增殖检测盒, 来自Promega公司; 所用的细胞为U266, RPMI8226。实验体系为110 $\mu$ L, 其中含有细胞悬液90 $\mu$ L, 检测液10 $\mu$ L, 药物 (抑制剂) 10 $\mu$ L, 其终浓度为4.54 $\times 10^{-8}$ M~1.77 $\times 10^{-9}$ M, 最后一个浓度是0M, 实际配置浓度为5 $\times 10^{-7}$ M~1.95 $\times 10^{-8}$ M, 最后一个浓度是0M。具体实验过程如下:

[0212] 1、药物配置：

[0213] 准确称量药物，加入DMSO溶解至 $10^{-2}$ M。用移液器吸取1 $\mu$ L加至199 $\mu$ L DMSO得到 $5 \times 10^{-5}$ M，然后从 $5 \times 10^{-5}$ M浓度药物中吸取3.3 $\mu$ L加326.7 $\mu$ L无血清的RPMI1640培养基得到 $5 \times 10^{-7}$ M，1.5倍梯度稀释，得到 $3.3 \times 10^{-7}$ M、 $2.2 \times 10^{-7}$ M、 $1.48 \times 10^{-7}$ M、 $9.87 \times 10^{-8}$ M、 $6.58 \times 10^{-8}$ M、 $4.38 \times 10^{-8}$ M、 $2.92 \times 10^{-8}$ M、 $1.95 \times 10^{-8}$ M浓度的药物，最后一个浓度0M为不加药。

[0214] 2、细胞悬液配置：

[0215] 细胞分别计数后，稀释配置U266为 $1 \times 10^4$ 个/孔，RPMI8226为 $1 \times 10^4$ 个/孔。

[0216] 3、反应体系制备：

[0217] 96孔荧光酶标板中每孔加入细胞悬液90 $\mu$ L，孵育24h；然后每孔中加入10 $\mu$ L待测样品，使用化合物MLN-9708为阳性对照药，孵育24h；反应完毕后，每孔加入10 $\mu$ L检测液，孵育2-3h，490nm荧光酶标仪 (BMG LABTECH POLARstar OPTIMA Microplate Reader) 检测吸光度。

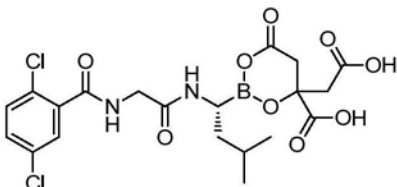
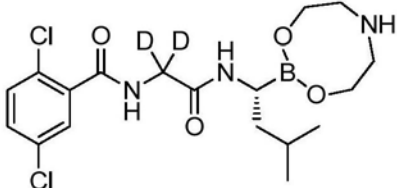
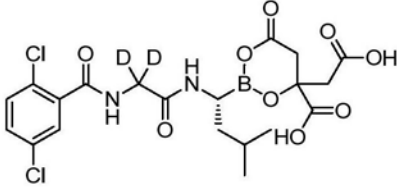
[0218] 4、数据处理

[0219] 计算扣除本底后不同浓度药物作用下所得产物的吸光度，运用GraphPad Prism软件，计算药物对细胞毒性的IC<sub>50</sub>浓度。

[0220] 5、结果

[0221] 如表2所示，在体外培养的两种不同多发性骨髓瘤细胞系 (U266、RPMI8226)，以及人乳腺癌细胞系MAD-MB-231细胞中。NNU-459、NNU-458的IC<sub>50</sub>均与MLN-9708相似，显示出相同或更好的抑制肿瘤的活性。

[0222] 表2化合物NNU-458、NNU-459以及MLN-9708对不同肿瘤细胞系的活性

编号	结构	Cell		
		RPMI8226	U266B1	MDA-MB-231
MLN-9708		14.10	14.51	21.81
[0223] NNU-458		17.60	15.27	20.71
NNU-459		11.26	12.93	16.84

[0224] 实施例6: 药物组合物

[0225] 本发明中的药物可以采取但不限于如下的药物组合物：

[0226] 药物组合物1

[0227]

成分	每单位剂量用量 (mg)	用量 (%w/w或w/w)
所述化合物	4	1.3
硅化微晶纤维素	292.4	97.5
滑石粉	0.6	0.2
硬脂酸镁	3	1
内容物重量	300	100

[0228] 药物组合物2

[0229]

成分	每单位剂量用量 (mg)	用量 (%w/w或w/w)
所述化合物	4	1.3
微晶纤维素	231.8	77.3
预胶化淀粉	60	20
二氧化硅	1.2	0.4
硬脂酸镁	3	1
内容物重量	300	100

[0230] 药物组合物3

[0231]

成分	每单位剂量用量 (mg)	用量 (%w/w或w/w)
所述药剂	4	1.3
微晶纤维素	246.8	82.3
甘露醇	45	15
滑石粉	1.2	0.4
硬脂酸镁	3	1
内容物重量	300	100

[0232] 药物组合物4

[0233]

成分	每单位剂量用量 (mg)	用量 (%w/w或w/w)
所述化合物	3	1.5
微晶纤维素	150	75
玉米淀粉	45	22.5
硬脂酸镁	2	1
内容物重量	200	100

[0234] 药物组合物5

[0235]

成分	每单位剂量用量 (mg)	用量 (%w/w 或 w/w)
所述化合物	3	1.5
甘露醇	120	60
乳糖	45	37.5

[0236]

硬脂酸镁	2	1
内容物重量	200	100

[0237] 药物组合物6

[0238]

成分	每单位剂量用量 (mg)	用量 (%w/w或w/w)
所述化合物	3	1.5
甘露醇	100	50
微晶纤维素	95	47.5
硬脂酸镁	2	1
内容物重量	200	100

[0239] 药物组合物7

[0240]

成分	每单位剂量用量 (mg)	用量 (%w/w或w/w)
所述化合物	2.3	1.15
微晶纤维素	195	97.5
滑石粉	0.7	0.35
硬脂酸镁	2	1
内容物重量	200	100

[0241] 药物组合物8

[0242]

成分	每单位剂量用量 (mg)	用量 (%w/w或w/w)
所述化合物	2.3	1.15
硅化微晶纤维素	155	77.5
甘露醇	40	20
滑石粉	0.7	0.35
硬脂酸镁	2	1
内容物重量	200	100

[0243] 按常规方法,将上述药物组合物按比例混合均匀以后,装入不透明的白色明胶胶囊中。

[0244] 在本实施例中,“所述化合物”包括化合物NNU-455及其枸橼酸酯(NNU-459)和二乙醇胺酯(NNU-458)。

[0245] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。