



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110382506 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201880016097.1

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2018.03.06

代理人 徐晶 李志强

(30)优先权数据

17189778.8 2017.09.07 EP

62/468070 2017.03.07 US

(51)Int.Cl.

C07D 513/04(2006.01)

A61K 31/542(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/055403 2018.03.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/162445 EN 2018.09.13

(71)申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时·比尔斯·特恩豪特斯路30号

(72)发明人 S.F.A.范布兰德特 H.J.M.吉森
A.M.沃斯 D.厄尔里希

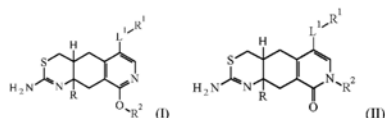
权利要求书3页 说明书50页

(54)发明名称

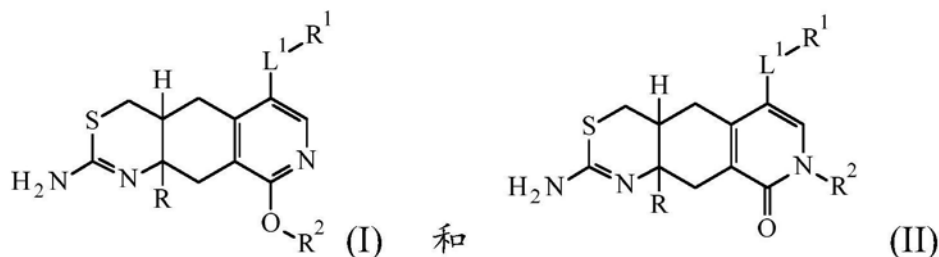
β -分泌酶的抑制剂

(57)摘要

本发明涉及具有式(I)和(II)所示结构的 β 分泌酶的三环抑制剂(I)和(II)其中这些基团是如在说明书中所定义的。本发明还涉及包含此类化合物的药物组合物,涉及用于制备此类化合物和组合物的方法,并且涉及此类化合物和组合物用于防止和治疗其中涉及 β -分泌酶的障碍的用途,这些障碍如阿尔茨海默病(AD)、轻度认知损害、衰老、痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与中风相关的痴呆、与帕金森病相关的痴呆、与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆、年龄相关性黄斑变性、2型糖尿病以及其他代谢障碍。



1. 一种具有式 (I) 的化合物



或其互变异构体或立体异构形式, 其中

R 是任选地被 1 个、2 个或 3 个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基, 该组由以下组成: 卤素、C₁₋₃烷氧基、氰基、2-氰基-吡啶-5-基、3-氰基-吡啶-5-基、和嘧啶-5-基;

-L¹- 选自 -CH₂-NH- (C=O) - 和 - (C=O) -NR^{1a}-;

R¹ 选自下组, 该组由以下组成: C₃₋₆环烷基、Ar、Het、Ar-CH₂-、Het-CH₂-、和 4-吗啉基-CH₂-; 其中

Ar 是苯基或任选地被 1 个、2 个或 3 个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基, 该组由以下组成: 卤素、氰基、C₁₋₃烷基、单卤代-C₁₋₃烷基、多卤代-C₁₋₃烷基、C₃₋₆环烷基、C₁₋₃烷氧基、单卤代-C₁₋₃烷氧基和多卤代-C₁₋₃烷氧基; 并且

Het 选自下组, 该组由以下组成: 吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、三唑基、四唑基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、吡啶基、咪唑基、1H-苯并咪唑基、苯并噁唑基、和苯并噻唑基, 其各自任选地被 1 个、2 个或 3 个各自独立地选自下组的取代基取代, 该组由以下组成: 卤素、氰基、C₁₋₃烷基、单卤代-C₁₋₃烷基、多卤代-C₁₋₃烷基、C₃₋₆环烷基、C₁₋₃烷氧基、单卤代-C₁₋₃烷氧基和多卤代-C₁₋₃烷氧基; 并且

a) R^{1a} 是 H 或 C₁₋₃烷基, 或者

b) -NR¹R^{1a} 一起形成选自下组的杂环基团, 该组由以下组成: 吡咯烷-1-基、哌啶-1-基、哌嗪-1-基、吗啉-4-基、硫代吗啉-4-基、5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡啶-6-基、6,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-4(5H)-基、和 8-氧杂-3-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基, 其各自任选地被 1 个、2 个或 3 个各自独立地选自下组的取代基取代, 该组由以下组成: C₁₋₃烷基、C₁₋₃烷氧基、(C₁₋₃烷氧基)C₁₋₃烷基、C₃₋₆环烷基、氰基、氧代、卤素-苯基、(C₁₋₃烷基)苯基、(C₁₋₃烷氧基)苯基、卤素-苯氧基、(C₁₋₃烷基)苯氧基、(C₁₋₃烷氧基)苯氧基、C₁₋₃烷基-(C=O)-、C₃₋₆环烷基-(C=O)-、吡啶基、嘧啶基、吡唑基、和噻唑基; 并且

R² 是氢或 C₁₋₃烷基;

或其药学上可接受的加成盐或溶剂化物。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中

-L¹- 是 - (C=O) -NR^{1a}-;

a) R^{1a} 是 H 或 C₁₋₃烷基, 并且 R¹ 选自下组, 该组由以下组成: C₃₋₆环烷基、Ar、和 Het; 或者

b) -NR¹R^{1a} 一起形成选自下组的杂环基团, 该组由以下组成: 吡咯烷-1-基、哌啶-1-基、哌嗪-1-基、吗啉-4-基、硫代吗啉-4-基、5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡啶-6-基、6,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-4(5H)-基、和 8-氧杂-3-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基, 其各自任选地被 1 个、2 个或 3 个各自独立地选自下组的取代基取代, 该组由以下组成: C₁₋₃烷基、C₁₋₃烷氧基、

(C₁₋₃烷氧基) C₁₋₃烷基、C₃₋₆环烷基、氰基、氧代、卤素-苯基、(C₁₋₃烷基) 苯基、(C₁₋₃烷氧基) 苯基、卤素-苯氧基、(C₁₋₃烷基) 苯氧基、(C₁₋₃烷氧基) 苯氧基、C₁₋₃烷基-(C=O)-、C₃₋₆环烷基-(C=O)-、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、和噻唑基，其中

Ar是苯基或任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基，该组由以下组成：卤素、氰基、C₁₋₃烷基、单卤代-C₁₋₃烷基、多卤代-C₁₋₃烷基、C₃₋₆环烷基、C₁₋₃烷氧基、单卤代-C₁₋₃烷氧基和多卤代-C₁₋₃烷氧基；并且

Het选自下组，该组由以下组成：吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、和哒嗪基，其各自任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代，该组由以下组成：卤素、氰基、C₁₋₃烷基、多卤代-C₁₋₃烷基、和C₁₋₃烷氧基。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物，其中

-NR¹R^{1a}一起形成选自下组的杂环基团，该组由以下组成：吡咯烷-1-基、哌啶-1-基、哌嗪-1-基、吗啉-4-基、1,1-二氧化硫代吗啉-4-基，其各自任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₁₋₃烷氧基、(C₁₋₃烷氧基) C₁₋₃烷基、氰基、氧代、C₁₋₃烷基-(C=O)-、和C₃₋₆环烷基-(C=O)-。

4. 根据权利要求1所述的化合物，其中

-L¹-是-CH₂-NH-(C=O)-；并且

R¹选自下组，该组由以下组成：C₃₋₆环烷基、Ar、Het、Ar-CH₂-、Het-CH₂-、和4-吗啉基-CH₂-。

5. 根据权利要求1或4所述的化合物，其中

R¹选自下组，该组由以下组成：C₃₋₆环烷基、Ar、Het、和4-吗啉基-CH₂-；其中

Ar是苯基或任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基，该组由以下组成：卤素、氰基、C₁₋₃烷基、单卤代-C₁₋₃烷基、多卤代-C₁₋₃烷基、C₃₋₆环烷基、C₁₋₃烷氧基、单卤代-C₁₋₃烷氧基和多卤代-C₁₋₃烷氧基；并且

Het选自下组，该组由以下组成：吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、和哒嗪基，其各自任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代，该组由以下组成：卤素、氰基、C₁₋₃烷基、多卤代-C₁₋₃烷基、和C₁₋₃烷氧基。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物，其中

R是被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基，该组由以下组成：卤素、C₁₋₃烷氧基、氰基、2-氰基-吡啶-5-基、3-氰基-吡啶-5-基、和嘧啶-5-基。

7. 一种药物组合物，该药物组合物包含治疗有效量的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

8. 一种用于制备药物组合物的方法，该方法包括：将药学上可接受的载体与治疗有效量的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物混合。

9. 一种如在权利要求1至6中任一项所定义的化合物，该化合物用作药物。

10. 一种如在权利要求1至6中任一项所定义的化合物，该化合物用于阿尔茨海默病(AD)、轻度认知损害、衰老、痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与中风相关的痴呆、与帕金森病相关的痴呆或与β-淀粉样蛋白相关的痴呆的治疗、防止或预防。

11. 一种治疗选自下组的障碍的方法，该组由以下组成：阿尔茨海默病、轻度认知损害、衰老、痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与中风相关的痴呆、与帕金森病相关的痴呆以及与β-

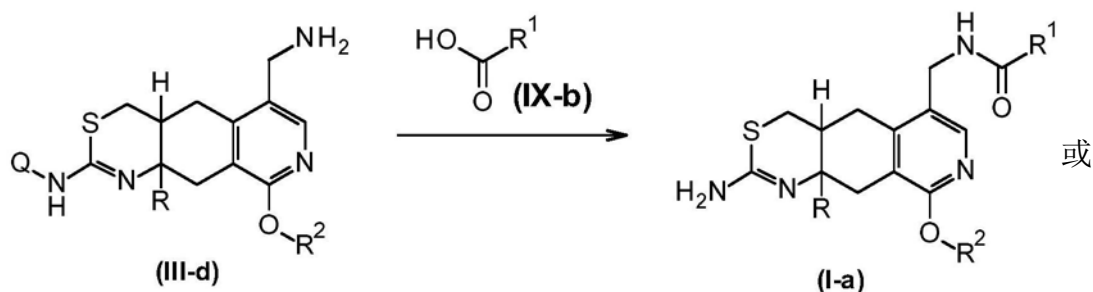
淀粉样蛋白相关的痴呆,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物或根据权利要求7所述的药物组合物。

12.一种用于调节 β -位点淀粉样蛋白裂解酶活性的方法,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物或根据权利要求7所述的药物组合物。

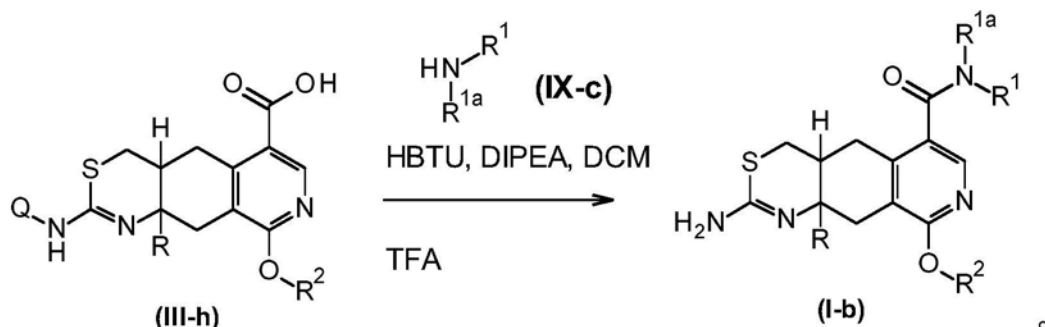
13.根据权利要求1至6中任一项所述的化合物或根据权利要求7所述的药物组合物用于制造药物的用途,该药物用于治疗或防止阿尔茨海默病(AD)、轻度认知损害、衰老、痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与中风相关的痴呆、与帕金森病相关的痴呆或与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆。

14.一种用于制备根据式(I-a)或(I-b)的化合物的方法,其中 R 、 R^1 和 R^2 是如在权利要求1至6中任一项所定义的,该方法包括步骤a)或b)

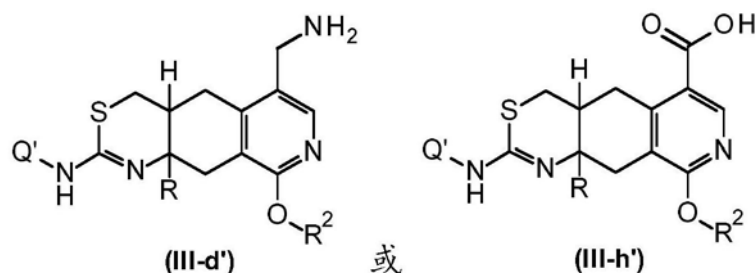
a)使具有式(III-d)的化合物其中 Q 是保护基团,与具有式(IX-b)的化合物其中 R^1 是如在权利要求1、4、5或6中任一项所定义的,在偶联剂存在下在适当的碱存在下,进行反应



b)使具有式(III-h)的中间体其中 Q 是保护基团并且 R 和 R^2 是如在权利要求1或6中任一项所定义的,与具有式(IX-c)的胺其中 R^1 和 R^{1a} 是如在权利要求1、2、3或6中任一项所定义的,在偶联剂和适当的碱存在下,进行反应



15.一种具有式(III-d')或(III-h')的化合物,

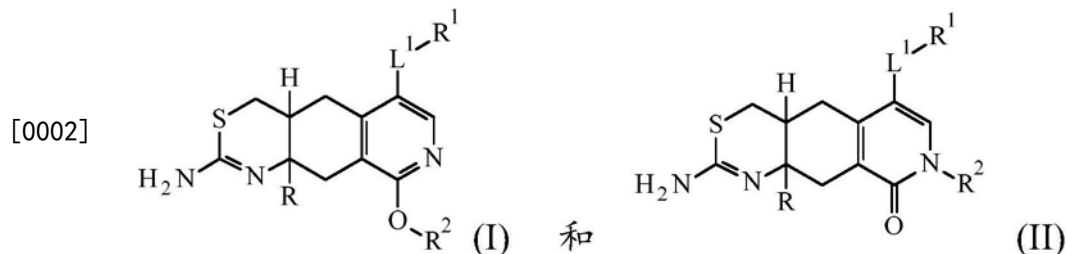


其中 Q' 是H或保护基团,并且 R 和 R^2 是如在权利要求1至6中任一项所定义的。

β -分泌酶的抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及具有式(I)和(II)所示结构的β分泌酶的三环抑制剂



[0003] 以及其互变异构体和立体异构形式,其中这些基团是如在说明书中所定义的。本发明还涉及包含此类化合物的药物组合物,涉及用于制备此类化合物和组合物的方法,并且涉及此类化合物和组合物用于防止和治疗其中涉及 β -分泌酶的障碍的用途,这些障碍如阿尔茨海默病(AD)、轻度认知损害、衰老、痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与中风相关的痴呆、与帕金森病相关的痴呆、与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆、年龄相关性黄斑变性、2型糖尿病以及其他代谢障碍。

背景技术

[0004] 阿尔茨海默病 (AD) 是一种与老化相关的神经退行性疾病。AD患者遭受认知缺陷和记忆丧失连同行为问题,如焦虑。超过90%的罹患AD的那些病例具有散发形式的障碍,而不到10%的病例是家族性或遗传性的。在美国,年龄65岁的人约十分之一患有AD,而年龄85岁的每两个的个体中就有一个患有AD。距初次诊断的平均预期寿命是7-10年,并且AD患者需要生活辅助设施或家庭成员的大量护理。随着群体中老年人数量的不断增加,AD成为日益增长的医疗问题。当前可用于AD的疗法只治疗该疾病的症状,并且包括改善认知特性的乙酰胆碱酯酶抑制剂连同控制与这种疾病相关的行为问题的抗焦虑药和抗精神病药。

[0005] AD患者脑中的标志性病理特征是由tau蛋白的高度磷酸化产生的神经原纤维缠结以及由 β -淀粉样蛋白1-42 (A β 1-42) 肽聚集形成的淀粉样蛋白斑。A β 1-42形成低聚物,然后形成原纤维,并且最终形成淀粉样蛋白斑。这些低聚物和原纤维被认为是尤其毒害神经的并且可以引起与AD相关的大多数神经学损伤。防止A β 1-42形成的药剂具有成为用于AD治疗的缓解疾病药剂的潜能。A β 1-42产生自淀粉样前体蛋白 (APP), 由770个氨基酸构成。A β 1-42的N-末端被 β -分泌酶 (BACE1) 裂解,然后 γ -分泌酶裂解C-末端。除了A β 1-42之外, γ -分泌酶还释放A β 1-40 (主要的裂解产物)、连同A β 1-38和A β 1-43。这些A β 形式也可以聚集以形成低聚物和原纤维。因此,预期BACE1抑制剂将防止A β 1-42连同A β 1-40、A β 1-38和A β 1-43的形成,并且将是AD治疗中的潜在治疗剂。

[0006] 2型糖尿病(T2D)是由胰岛素抗性和来自胰腺β细胞的胰岛素分泌不足引起的,这导致血糖控制差和高血糖。患有T2D的患者具有微血管和大血管疾病、以及一系列相关并发症(包括糖尿病肾病、视网膜病变和心血管疾病)的增加了的风险。T2D流行率的上升与世界人口的日益增长的久坐生活方式和高能量食物摄入有关。

[0007] β 细胞衰竭和随后的胰岛素分泌急剧下降以及高血糖标志着T2D的发病。目前大多

数治疗不能防止表征明显的T2D的β细胞团块的损失。然而, GLP-1类似物、胃泌素和其他药剂的最近发展表明, β细胞的保存和增殖是可能实现的, 这导致葡萄糖耐量改善和更慢进展为明显的T2D。

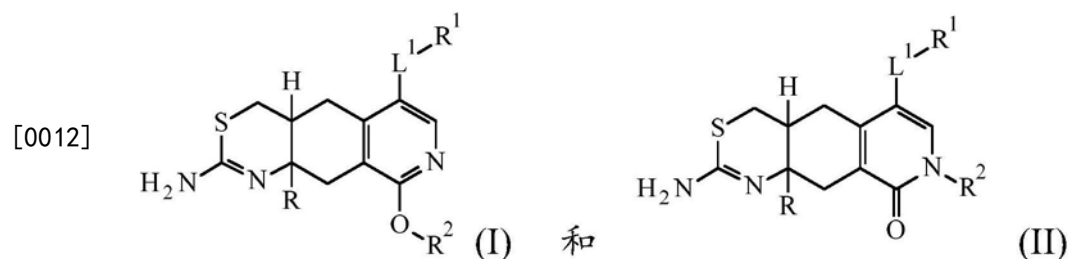
[0008] Tmem27已被鉴定为促进β细胞增殖和胰岛素分泌的蛋白质。Tmem27是42kDa的膜糖蛋白, 其从β细胞的表面组成性地脱落, 这导致全长细胞Tmem27的降解。在转基因小鼠中Tmem27的过度表达增加了β细胞团块, 并且改善了糖尿病的饮食诱导的肥胖DIO模型中的葡萄糖耐量。此外, 在啮齿动物β细胞增殖测定(例如, 使用INS1e细胞)中Tmem27的siRNA敲除降低了增殖速率, 这表明Tmem27在控制β细胞团块方面的作用。

[0009] BACE2是负责降解Tmem27的蛋白酶。它是膜结合的天冬氨酰蛋白酶, 并与人胰腺β细胞中的Tmem27共定位。还已知它能够降解APP、IL-1R2和ACE2。降解ACE2的能力表明BACE2可能在控制高血压方面的作用。

[0010] BACE1和/或BACE2的抑制剂另外可以用于治疗性和/或预防性治疗肌萎缩性侧索硬化(ALS)、动脉血栓形成、自身免疫/炎症性疾病、癌症(如乳腺癌)、心血管疾病(如心肌梗死和中风)、皮炎、唐氏综合征、胃肠疾病、多形性成胶质细胞瘤、格雷夫斯病、亨廷顿病、包涵体肌炎(IBM)、炎症反应、卡波西肉瘤、科斯特曼疾病(Kostmann Disease)、红斑狼疮、巨噬细胞肌筋膜炎、幼年特发性关节炎、肉芽肿性关节炎、恶性黑素瘤、多发性骨髓瘤、类风湿关节炎、干燥综合征、脊髓小脑性共济失调1型、脊髓小脑性共济失调7型、惠普耳氏病或威尔逊氏病。

发明内容

[0011] 本发明涉及具有式(I)和(II)的化合物,



[0013] 以及其互变异构体和立体异构形式, 其中

[0014] R是任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基, 该组由以下组成: 卤素、C₁₋₃烷氧基、氰基、2-氰基-吡啶-5-基、3-氰基-吡啶-5-基、和嘧啶-5-基;

[0015] -L¹-选自-CH₂-NH-(C=O)-和-(C=O)-NR^{1a}-;

[0016] R¹选自下组, 该组由以下组成: C₃₋₆环烷基、Ar、Het、Ar-CH₂-、Het-CH₂-、和4-吗啉基-CH₂-; 其中

[0017] Ar是苯基或任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基, 该组由以下组成: 卤素、氰基、C₁₋₃烷基、单卤代-C₁₋₃烷基、多卤代-C₁₋₃烷基、C₃₋₆环烷基、C₁₋₃烷氧基、单卤代-C₁₋₃烷氧基和多卤代-C₁₋₃烷氧基; 并且

[0018] Het选自下组, 该组由以下组成: 吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、三唑基、四唑基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、吡啶基、吡唑基、1H-苯并咪唑基、苯并噁唑基、和苯并噻唑基, 其各自任选地被1

个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代,该组由以下组成:卤素、氰基、 C_{1-3} 烷基、单卤代- C_{1-3} 烷基、多卤代- C_{1-3} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-3} 烷氧基、单卤代- C_{1-3} 烷氧基和多卤代- C_{1-3} 烷氧基;并且

[0019] a) R^{1a} 是H或 C_{1-3} 烷基,或者

[0020] b) $-NR^1R^{1a}$ 一起形成选自下组的杂环基团,该组由以下组成:吡咯烷-1-基、哌啶-1-基、哌嗪-1-基、吗啉-4-基、硫代吗啉-4-基、5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡啶-6-基、6,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-4(5H)-基、和8-氧杂-3-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基,其各自任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代,该组由以下组成 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、(C_{1-3} 烷氧基) C_{1-3} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、氰基、氧代、卤素-苯基、(C_{1-3} 烷基)苯基、(C_{1-3} 烷氧基)苯基、卤素-苯氧基、(C_{1-3} 烷基)苯氧基、(C_{1-3} 烷氧基)苯氧基、 C_{1-3} 烷基-(C=O)-、 C_{3-6} 环烷基-(C=O)-、吡啶基、嘧啶基、吡唑基、和噻唑基;并且

[0021] R^2 是氢或 C_{1-3} 烷基;

[0022] 及其药学上可接受的加成盐和溶剂化物。

[0023] 本发明的例证是包含药学上可接受的载体以及任何以上所述的化合物的药物组合物。本发明的例证是通过混合任何以上所述的化合物与药学上可接受的载体制成的药物组合物。本发明例证了用于制备药物组合物的方法,该方法包括将任何以上所述的化合物与药学上可接受的载体混合。

[0024] 本发明例示了治疗由 β -分泌酶介导的障碍的方法,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的任何以上所述的化合物或药物组合物。

[0025] 本发明进一步例示了抑制 β -分泌酶的方法,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的任何以上所述的化合物或药物组合物。

[0026] 本发明的一个实例是治疗选自下组的障碍的方法,该组由以下组成:阿尔茨海默病、轻度认知损害、衰老、痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与中风相关的痴呆、与帕金森病相关的痴呆、与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆、以及年龄相关性黄斑变性,优选地是阿尔茨海默病、2型糖尿病以及其他代谢障碍,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的任何以上所述的化合物或药物组合物。

[0027] 本发明的另一个实例是任何以上所述的化合物用于在治疗有需要的受试者中的以下疾病中使用:(a) 阿尔茨海默病、(b) 轻度认知损害、(c) 衰老、(d) 痴呆、(e) 路易体痴呆、(f) 唐氏综合征、(g) 与中风相关的痴呆、(h) 与帕金森病相关的痴呆、(i) 与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆、或(j) 年龄相关性黄斑变性、(k) 2型糖尿病以及(l) 其他代谢障碍。

具体实施方式

[0028] 本发明涉及如在上文中所定义的具有式(I)和(II)的化合物以及其药学上可接受的加成盐和溶剂化物。具有式(I)的化合物是 β 分泌酶(也称作 β -位点裂解酶、BACE、BACE1、Asp2或膜天冬氨酸蛋白酶2或BACE2)的抑制剂,并且在阿尔茨海默病、轻度认知损害、衰老、痴呆、与中风相关的痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与帕金森病相关的痴呆、与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆以及年龄相关性黄斑变性,优选地是阿尔茨海默病、轻度认知损害或痴呆,更优选地是阿尔茨海默病、2型糖尿病以及其他代谢障碍的治疗中可以有用的。

[0029] 在一个实施例中,本发明涉及如本文所定义的具有式(I)和(II)的化合物,其中

[0030] $-L^1-$ 是 $-(C=O)-NR^{1a}-$;

[0031] a) R^{1a} 是H或 C_{1-3} 烷基,并且 R^1 选自下组,该组由以下组成: C_{3-6} 环烷基、Ar、和Het-;或者

[0032] b) $-NR^1R^{1a}$ 一起形成选自下组的杂环基团,该组由以下组成:吡咯烷-1-基、哌啶-1-基、哌嗪-1-基、吗啉-4-基、硫代吗啉-4-基、5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-b]吡啶-6-基、6,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-4(5H)-基、和8-氧杂-3-氮杂二环[3.2.1]辛-3-基,其各自任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代,该组由以下组成 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、(C_{1-3} 烷氧基) C_{1-3} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、氰基、氧代、卤素-苯基、(C_{1-3} 烷基)苯基、(C_{1-3} 烷氧基)苯基、卤素-苯氧基、(C_{1-3} 烷基)苯氧基、(C_{1-3} 烷氧基)苯氧基、 C_{1-3} 烷基- $(C=O)-$ 、 C_{3-6} 环烷基- $(C=O)-$ 、吡啶基、嘧啶基、吡唑基、和噻唑基;其中

[0033] Ar是苯基或任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基,该组由以下组成:卤素、氰基、 C_{1-3} 烷基、单卤代- C_{1-3} 烷基、多卤代- C_{1-3} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-3} 烷氧基、单卤代- C_{1-3} 烷氧基和多卤代- C_{1-3} 烷氧基;并且

[0034] Het选自下组,该组由以下组成:吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、和哒嗪基,其各自任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代,该组由以下组成:卤素、氰基、 C_{1-3} 烷基、多卤代- C_{1-3} 烷基、和 C_{1-3} 烷氧基;并且

[0035] R 和 R^2 是如本文所定义的。

[0036] 在特别的实施例中,本发明涉及如本文所定义的具有式(I)和(II)的化合物,其中

[0037] $-L^1-$ 是 $-(C=O)-NR^{1a}-$;

[0038] $-NR^1R^{1a}$ 一起形成选自下组的杂环基团,该组由以下组成:吡咯烷-1-基、哌啶-1-基、哌嗪-1-基、吗啉-4-基、和1,1-二氧化硫代吗啉-4-基,其各自任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、(C_{1-3} 烷氧基) C_{1-3} 烷基、氰基、氧代、 C_{1-3} 烷基- $(C=O)-$ 、和 C_{3-6} 环烷基- $(C=O)-$;并且

[0039] R 和 R^2 是如本文所定义的。

[0040] 在另外的实施例中,本发明涉及如本文所定义的具有式(I)和(II)的化合物,其中

[0041] $-L^1-$ 是 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$;

[0042] R^1 选自下组,该组由以下组成: C_{3-6} 环烷基、Ar、Het、Ar- CH_2- 、Het- CH_2- 、和4-吗啉基- CH_2- ;并且

[0043] R 和 R^2 是如本文所定义的。

[0044] 在另外的实施例中,本发明涉及如本文所定义的具有式(I)和(II)的化合物,其中

[0045] $-L^1-$ 是 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$;

[0046] R^1 选自下组,该组由以下组成: C_{3-6} 环烷基、Ar、Het、和4-吗啉基- CH_2- ;其中

[0047] Ar是苯基或任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基,该组由以下组成:卤素、氰基、 C_{1-3} 烷基、单卤代- C_{1-3} 烷基、多卤代- C_{1-3} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-3} 烷氧基、单卤代- C_{1-3} 烷氧基和多卤代- C_{1-3} 烷氧基;并且

[0048] Het选自下组,该组由以下组成:吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、和哒嗪基,其各自任选地被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代,该组由以下组成:卤素、氰基、 C_{1-3} 烷基、多卤代- C_{1-3} 烷基、和 C_{1-3} 烷氧基;并且

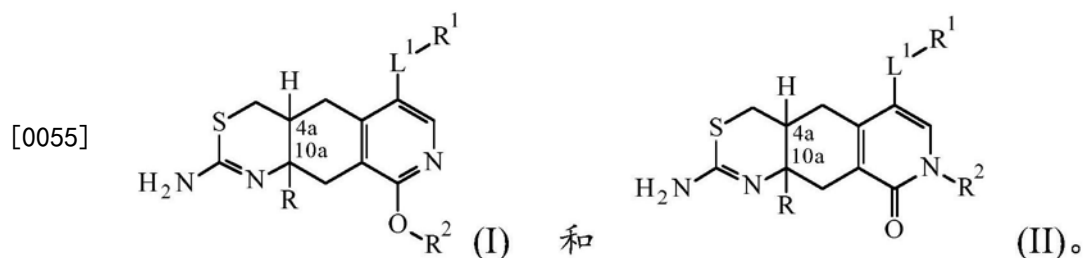
[0049] R 和 R^2 是如本文所定义的。

[0050] 在另外的实施例中,本发明涉及如本文所定义的具有式(I)和(II)的化合物,其中
 [0051] R是被1个、2个或3个各自独立地选自下组的取代基取代的苯基,该组由以下组成:卤素、C₁₋₃烷氧基、氰基、2-氰基-吡啶-5-基、3-氰基-吡啶-5-基、和嘧啶-5-基;并且

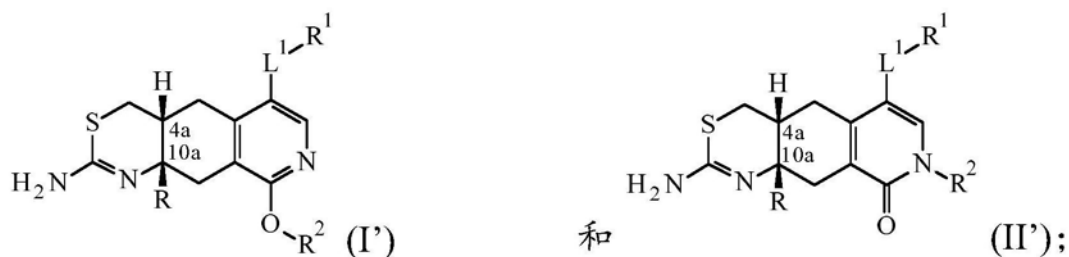
[0052] L¹、R和R¹是如本文所定义的。

[0053] 在另外的实施例中,R²是C₁₋₃烷基,特别是甲基。

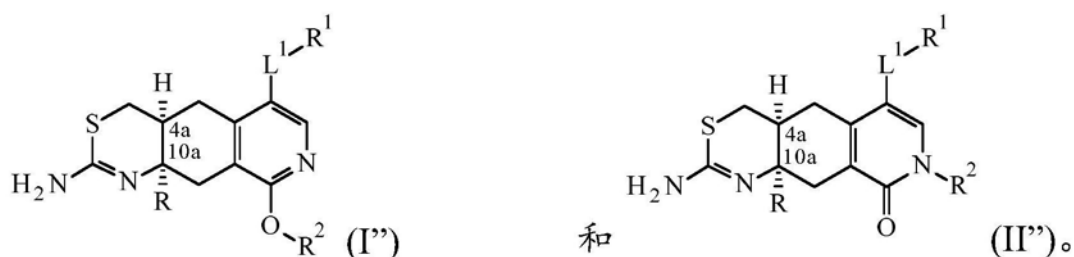
[0054] 本发明特别涉及其中三环支架中的碳中心C_{4a}和C_{10a}具有顺式构型(即,H和R朝向支架平面的同一侧投影)的化合物



[0056] 因此,特别地,本发明涉及如下表示的具有式(I')和(II')的化合物以及具有式(I'')和(II'')的化合物,其中三环核心在(I')和(II')中处于图形的平面中并且H和R投影在图形平面的上方(用粗体楔形 $\blacktriangle$ 示出键),或者其中三环核心处于图形的平面中并且H和R投影在图形平面的下方(用平行线 $\cdots$ 的楔形示出键):



[0057]



[0058] 定义

[0059] “卤素”应当表示氟、氯以及溴;“C₁₋₃烷基”应当表示分别具有1个、2个或3个碳原子的直链或支链饱和烷基基团,例如甲基、乙基、1-丙基、2-丙基等;“C₁₋₃烷氧基”应当表示醚基团,其中C₁₋₃烷基如前所定义;“单卤代-和多卤代-C₁₋₃烷基”应当表示被1个、2个、3个或在可能的情况下被如前所定义的更多个卤素原子取代的如前所定义的C₁₋₃烷基;“单卤代-和多卤代-C₁₋₃烷氧基”应当表示醚基团,其中单卤代-和多卤代-C₁₋₃烷基如前所定义;

[0060] “C₃₋₆环烷基”应当表示环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0061] 如本文使用的术语“受试者”是指动物,优选地是哺乳动物,最优选地是人类,该受试者是或已经成为治疗、观察或实验的对象。

[0062] 如本文使用的术语“治疗有效量”意指由研究员、兽医、医师或其他临床医生寻找

的,在组织系统、动物或人类中引起生物学或医学响应的活性化合物或药物试剂的量,该响应应包括正在被治疗的疾病或障碍的症状的减轻。

[0063] 如本文使用的,术语“组合物”旨在涵盖包含处于特定量的特定成分的产品,连同直接或间接地源于处于特定量的特定成分的组合的任何产品。

[0064] 在上下文中,术语“具有式(I)的化合物”意指包括其加成盐、溶剂化物以及立体异构体。

[0065] 在上下文中,术语“立体异构体”或“立体化学异构形式”可互换地使用。

[0066] 本发明包括呈纯立体异构体形式或呈两种或更多种立体异构体的混合物的具有式(I)的化合物的所有立体异构体。

[0067] 对映体是彼此不可重叠镜像的立体异构体。一对对映体的1:1混合物是外消旋体或外消旋混合物。非对映体(或非对映异构体)是不为对映体的立体异构体,即它们不以镜像形式相关。如果化合物含有双键,则这些取代基可以呈E或Z构型。如果化合物含有双取代的环烷基基团,则这些取代基可以呈顺式或反式构型。因此,本发明包括对映体、非对映体、外消旋体、E异构体、Z异构体、顺式异构体、反式异构体及其混合物。

[0068] 绝对构型是根据卡恩-英戈尔德-普雷洛格(Cahn-Ingold-Prelog)系统指定的。不对称原子处的构型由R或S指定。绝对构型未知的已拆分的化合物可以根据它们旋转平面偏振光的方向而由(+)或(-)指定。

[0069] 当鉴定一种特定立体异构体时,这意指所述立体异构体基本上不含其他异构体,即与其他异构体的关联小于50%,优选地小于20%,更优选地小于10%,甚至更优选地小于5%,特别是小于2%并且最优选地小于1%。因此,当具有式(I)的化合物例如被指定为(R)时,这意指该化合物基本上不含(S)异构体;当具有式(I)的化合物例如被指定为E时,这意指该化合物基本上不含Z异构体;当具有式(I)的化合物例如被指定为顺式时,这意指该化合物基本上不含反式异构体。

[0070] 用于在医学中使用,本发明的化合物的加成盐是指无毒性“药学上可接受的加成盐”。然而,其他盐可以适用于制备根据本发明的化合物或其药学上可接受的加成盐。化合物的合适的药学上可接受的加成盐包括可以例如通过将化合物的溶液与药学上可接受的酸的溶液混合而形成的酸加成盐,该药学上可接受的酸如盐酸、硫酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、乙酸、苯甲酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸或磷酸。此外,在本发明的化合物携带酸性部分时,其合适的药学上可接受的加成盐可以包括碱金属盐,例如钠盐或钾盐;碱土金属盐,例如钙盐或镁盐;以及与合适的有机配体形成的盐,例如季铵盐。

[0071] 可以用于制备药学上可接受的加成盐的代表性酸包括但不限于以下:乙酸、2,2-二氯乙酸、酰化氨基酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、(+)-樟脑酸、樟脑磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基-乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、D-葡萄糖醛酸、L-谷氨酸、β-氧代-戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸、乳糖酸、马来酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(±)-DL-扁桃酸、甲磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、磷酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、单宁酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟甲基磺酸以及十一碳烯酸。可以用于制备药学上可接受的加成盐

的代表性碱包括但不限于以下：氨、L-精氨酸、苯乙苄胺、苯乍生、氢氧化钙、胆碱、二甲基乙醇胺、二乙醇胺、二乙胺、2-(二乙氨基)-乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、海巴明、1H-咪唑、L-赖氨酸、氢氧化镁、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、氢氧化钾、

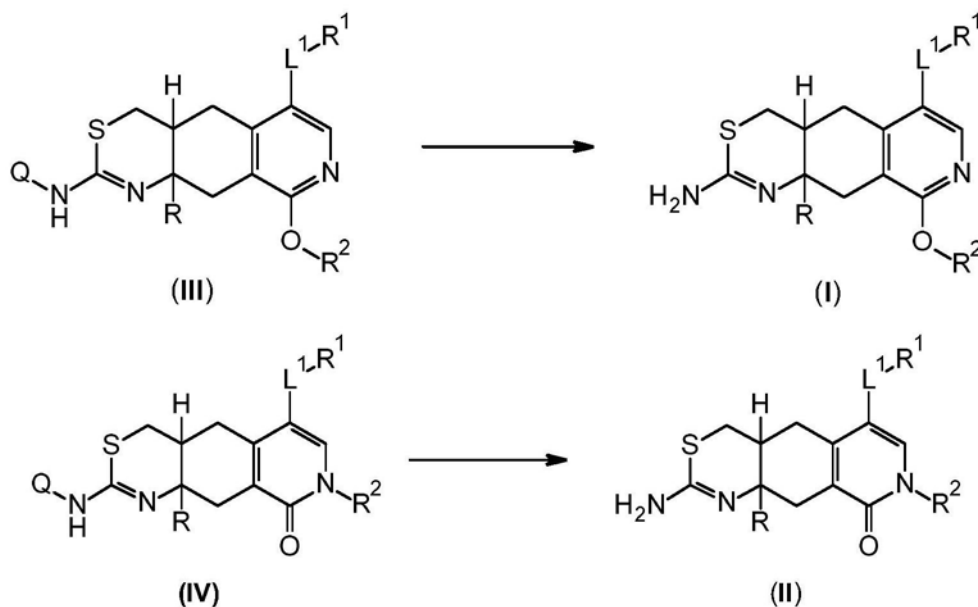
[0072] 1-(2-羟乙基)吡咯烷、仲胺、氢氧化钠、三乙醇胺、氨丁三醇以及氢氧化锌。特定的盐是三氟乙酸加成盐。

[0073] 化合物的名称根据由化学文摘社 (Chemical Abstracts Service) (CAS) 商定的命名规则或者根据由国际纯粹与应用化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry) (IUPAC) 商定的命名规则来产生。在互变异构形式的情况下,产生该结构的描绘的互变异构形式的名称。其他未描绘的互变异构形式也被包括在本发明的范围内。

[0074] 化合物的制备

[0075] 实验程序1

[0076] 根据式 (I) 和 (II) 的最终化合物可以通过脱保护具有式 (III) 和 (IV) 的中间体化合物来制备,其中Q代表碱不稳定性(例如酰基)或酸不稳定性(例如三苯甲基)保护基团(反应方案1)。此类反应可在本领域已知的反应条件下进行。

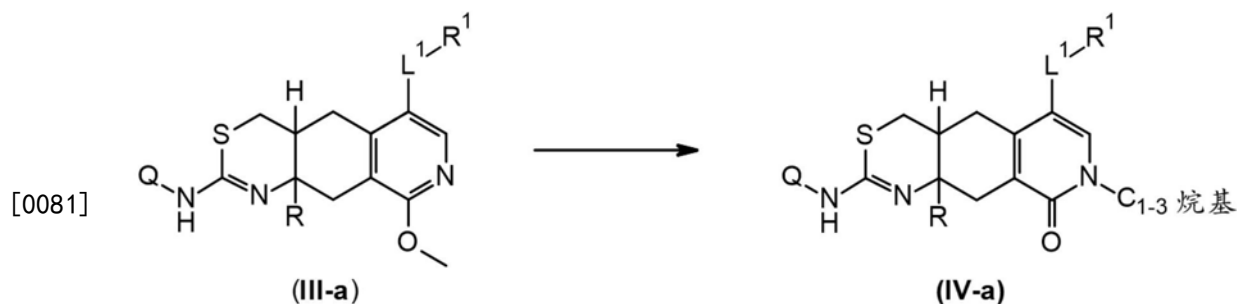


反应方案 1

[0078] 中间体化合物的制备

[0079] 实验程序2

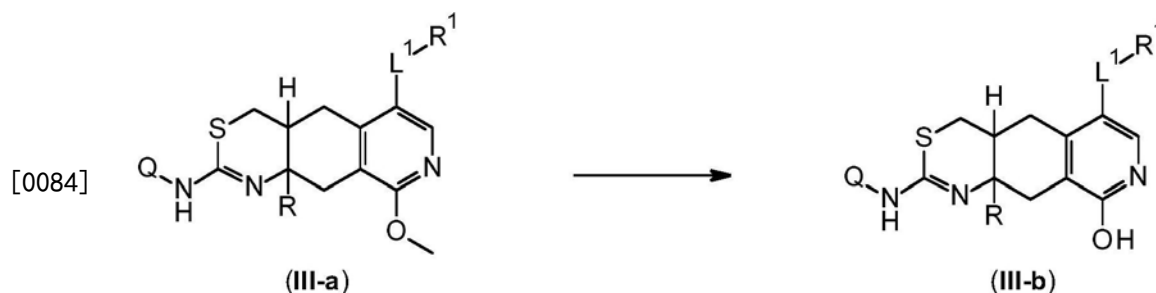
[0080] 具有式 (IV) 的中间体 (其中R²是C₁₋₃烷基,在本文中称为具有式 (IV-a) 的中间体), 可以通过相应的具有式 (III) 的中间体 (其中R²是甲基,在本文中称为具有式 (III-a) 的中间体) 与C₁₋₃烷基碘化物的反应来制备(反应方案2)。可以在热条件(例如像,在100℃加热该反应混合物)下进行该反应。在反应方案2中,所有的变量是如在式 (I) 中所定义的。



反应方案 2

[0082] 实验程序3

[0083] 具有式 (III) 的中间体化合物 (其中R²是氢, 在本文中称为 (III-b)) 可以遵循本领域已知的O-脱甲基化程序从具有式 (III-a) 的中间体化合物来制备。所述转化可以通过以下方式合宜地进行: 将中间体 (III-a) 用合适的O-脱甲基化剂 (如三甲基氯硅烷), 在合适的添加剂 (如碘化钠) 存在下, 在合适的惰性溶剂 (如乙腈) 中, 在合适的反应条件 (如在便利的温度下, 典型地为50℃) 下进行处理, 持续一段时间以保证该反应完成。在反应方案3中, 所有的变量是如在式 (I) 中所定义的。



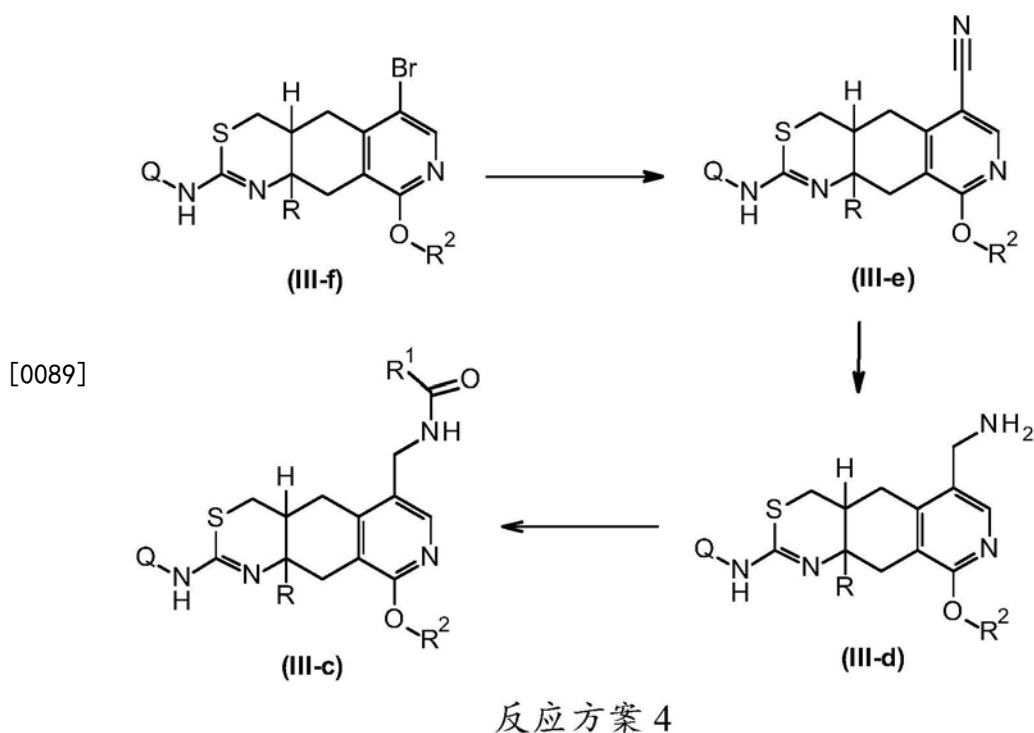
反应方案 3

[0085] 实验程序4

[0086] 具有式 (III) 的中间体化合物 (其中-L¹-R¹是-CH₂-NH-(C=O)-R¹, 在本文中称为具有式 (III-c) 的中间体) 可以通过标准肽偶联方法 (例如像, 用适当的羧酸在碱 (如三乙胺) 和肽偶联试剂 (如HBTU) 存在下, 在合适的溶剂 (如DCM) 中, 在便利的温度 (如室温) 下, 对中间体 (III-d) 进行处理, 持续一段时间以保证该反应完成) 从具有式 (III-d) 的中间体来制备。

[0087] 具有式 (III-d) 的中间体化合物可以通过本领域已知的还原程序 (例如像, 在便利的温度 (如室温) 下, 用还原剂 (如氢化铝锂) 处理溶解在合适的溶剂 (如THF) 中的中间体化合物 (III-e), 持续一段时间以保证该反应完成) 从具有式 (III-e) 的中间体化合物来制备。

[0088] 具有式 (III-e) 的中间体可以通过本领域已知的氧化程序从相应的具有式 (III-f) 的中间体来制备。所述氧化可以通过以下方式合宜地进行: 将相应的具有式 (III-f) 的中间体化合物用氧化剂 (例如像氧化锌), 在合适的Pd催化剂 (例如像双 (二苯亚甲基丙酮) 钯 (0)、合适的配体 (例如像1,1'-双 (二苯基膦基) 二茂铁和锌粉) 存在下, 在合适的惰性溶剂 (例如像DMA等) 中, 在合适的温度 (例如像120℃) 下进行处理, 直到该反应完成。在反应方案4中, 所有的变量是如在式 (I) 中所定义的。

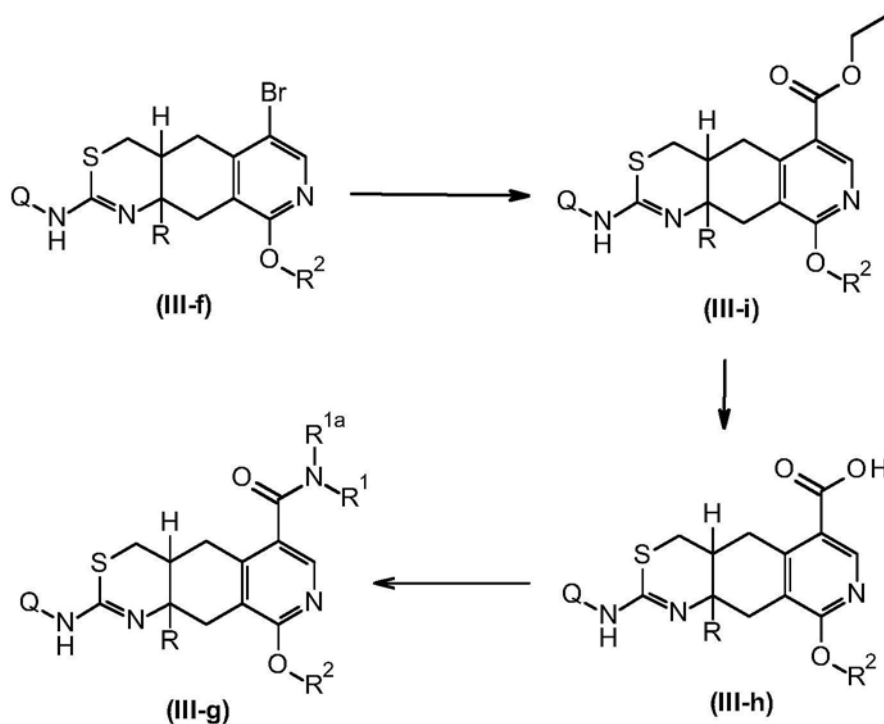


[0090] 实验程序5

[0091] 具有式 (III) 的中间体化合物 (其中 $-L^1-R^1$ 是 $-(C=O)-NR^{1a}R^1$, 在本文中称为具有式 (III-g) 的中间体) 可以通过标准肽偶联方法 (例如像, 用适当的胺在碱 (如三乙胺) 和肽偶联试剂 (如 HBTU) 存在下, 在合适的溶剂 (如 DCM) 中, 在便利的温度 (如室温) 下, 对中间体 (III-h) 进行处理, 持续一段时间以保证该反应完成) 从具有式 (III-h) 的中间体来制备。

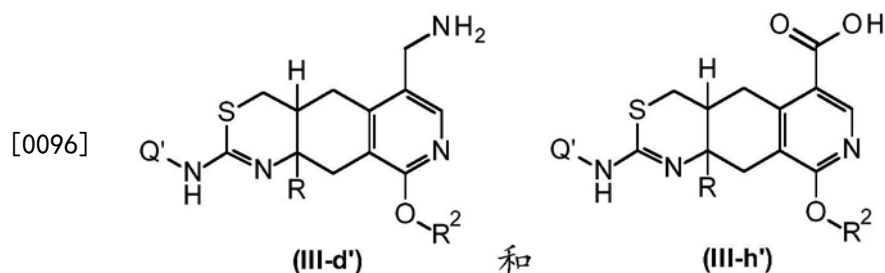
[0092] 具有式 (III-h) 的中间体化合物可以通过标准水解程序 (例如像, 用氢氧化物 (如氢氧化锂) 在合适溶剂的混合物 (如水/二噁烷) 中, 在便利的温度 (如 80°C) 下, 对中间体 (III-i) 进行处理, 持续一段时间以保证该反应完成) 从具有式 (III-i) 的中间体化合物来制备。

[0093] 具有式 (III-h) 和 (III-i) 的中间体化合物可以遵循本领域已知的钯催化的羰基化程序从相应的具有式 (III-f) 的中间体来制备。所述羰基化可以通过以下方式合宜地进行: 将具有式 (III-f) 的中间体化合物在一氧化碳气氛下, 在合适的钯催化剂 (例如像乙酸钯)、合适的配体 (如 1,3-双(二苯基膦基)丙烷) 以及合适的碱 (如乙酸钾) 存在下, 在合适的反应溶剂或溶剂的混合物 (例如像 THF/EtOH) 中搅拌。可以在高压釜中在合适的压力 (例如像 30 巴) 下, 在便利的温度 (典型地为 120°C) 下进行该反应, 持续一段时间以保证该反应完成。在反应方案 5 中, 所有的变量是如在式 (I) 中所定义的。



反应方案 5

[0095] 具有式 (III-d) 和 (III-h) 的中间体是合成本发明化合物的有用的中间体。因此，在一个实施例中，本发明涉及具有式 (III-d') 的化合物以及涉及具有式 (III-h') 的化合物



[0097] 其中Q' 是H或保护基团,并且R和R²是如针对本文具有式 (I) 的化合物所定义的。

[0098] 实验程序6

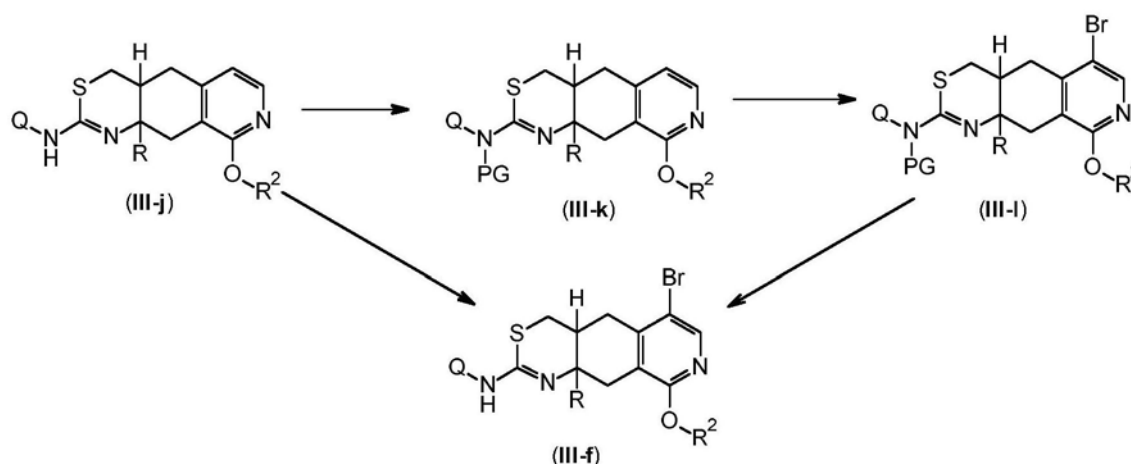
[0099] 具有式 (III-f) 的中间体化合物可以通过本领域中已知的溴化程序从具有式 (III-j) 的中间体化合物来制备。所述溴化可以通过以下方式合宜地进行:将相应的具有式 (III-j) 的中间体化合物用溴化剂 (例如像N-溴代琥珀酰亚胺),在合适的惰性溶剂 (例如像乙腈等) 中,在合适的温度 (例如像室温) 下进行处理直到该反应完成,例如16小时。

[0100] 遵循本领域已知的程序,可能需要通过保护基团PG (例如像叔丁氧基羰基基团) 对具有式 (III-j) 的中间体化合物进行保护。所述反应可以通过以下方式合宜地进行:将中间体化合物 (III-j) 用二碳酸二叔丁酯,在合适的催化剂 (如4- (二甲基氨基) 吡啶 (DMAP)) 存在下,在合适的惰性溶剂 (如THF) 中,在合适的反应条件 (如在便利的温度下,典型地为 r. t.) 下进行处理,持续一段时间以保证该反应完成。

[0101] 然后可以如上所述溴化受保护的中间体 (III-k) 以产出 (III-l),然后可以将该 (III-l) 通过用合适的酸 (例如像,三氟乙酸或甲酸) 在合适的溶剂中,或在纯净的环境温度下处理进行脱保护以产出中间体 (III-f)。

[0102] 在反应方案6中,Q和PG是保护基团,并且所有其他变量是如在式(I)中所定义的。

[0103]



反应方案 6

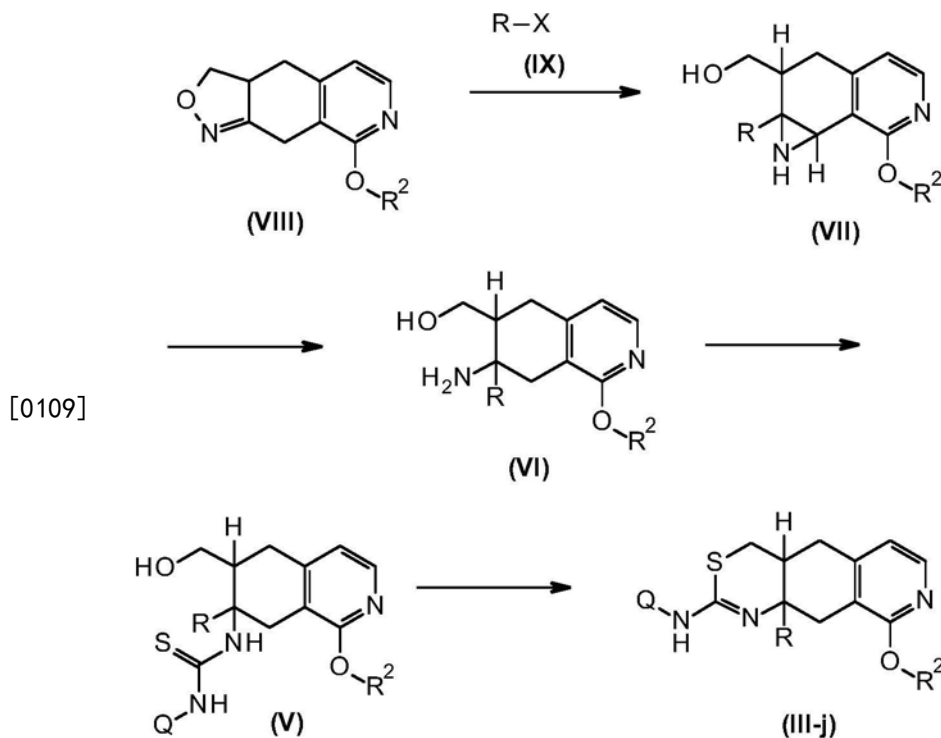
[0104] 实验程序7

[0105] 具有式(III-j)的中间体化合物可以遵循本领域中已知的环化程序从具有式(V)的中间体化合物来制备。所述环化可以通过以下方式合宜地进行:将具有式(V)的中间体化合物用合适的试剂(如1-氯-N,N-2-三甲基丙烯胺),在合适的反应溶剂(例如像DCM)中,在合适的反应条件(如在便利的温度下,典型地为r.t.)下进行处理,持续一段时间以保证该反应完成。

[0106] 具有式(V)的中间体化合物可以通过使相应的具有式(VI)的中间体化合物与合适的试剂如苄基异硫氰酸酯(得到化合物(V)和(III)),其中Q是苯基(C_6H_5),在合适的惰性溶剂(例如像DCM)中,在便利的温度下(典型地为r.t.)进行反应直到该反应完成,例如3小时来制备。

[0107] 具有式(VI)的中间体化合物可以遵循本领域中已知的氮丙啶开环程序从相应的具有式(VII)的中间体化合物来制备。所述反应可以通过以下方式进行:将反应物在氢气氛围下,在适当的催化剂(例如像拉尼镍)存在下,在合适的溶剂(例如像烷醇(例如甲醇、乙醇等))中,在便利的温度(典型地为r.t.)下搅拌直到该反应完成,例如6小时。

[0108] 具有式(VII)的中间体化合物可以通过使相应的具有式(VIII)的中间体化合物与具有式(IX)的中间体进行反应来制备,其中X是卤素并且R是如式(I)中所定义的。该反应可以在合适的反应惰性溶剂(如THF)中,在合适的反应条件(如在合适的温度下,典型地在-78℃与室温之间的范围)下进行,持续一段时间以保证该反应完成。可以商业获得或根据文献程序合成具有式(IX)的中间体化合物。



反应方案 7

[0110] 实验程序8

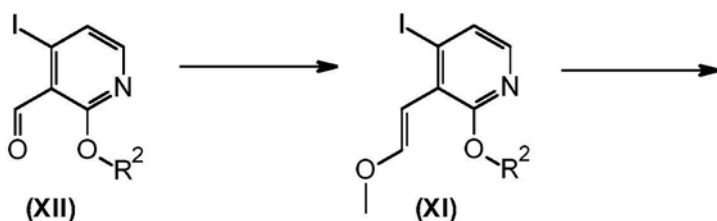
[0111] 具有式 (VIII) 的中间体化合物可以遵循本领域中已知的环化程序通过使相应的具有式 (X) 的中间体化合物进行反应来制备。所述环化可以通过以下方式合宜地进行：将具有式 (X) 的中间体化合物用合适的酸 (例如像盐酸) 在合适的反应惰性溶剂 (如THF) 中, 在合适的反应条件 (如在合适的温度下, 典型地为 50°C) 下进行处理, 持续一段时间以保证该反应完成。

[0112] 具有式 (X) 的中间体化合物可以遵循本领域中已知的偶联程序通过使具有式 (XI) 的中间体化合物进行反应来制备。所述转化可以通过以下方式合宜地进行：将具有式 (XI) 的中间体化合物在合适的金属化试剂 (如异丙基氯化镁氯化锂络合物) 和合适的有机铜酸前体 (例如像氰化铜 (I) 二 (氯化锂) 络合物溶液) 存在下转化为相应的氰铜酸试剂, 随后添加合适的卤化物 (如烯丙基溴)。可以在合适的惰性溶剂 (例如像THF等溶剂) 中, 在便利的温度 (典型地为 -70°C -r.t.) 下进行反应, 持续一段时间以保证该反应完成。

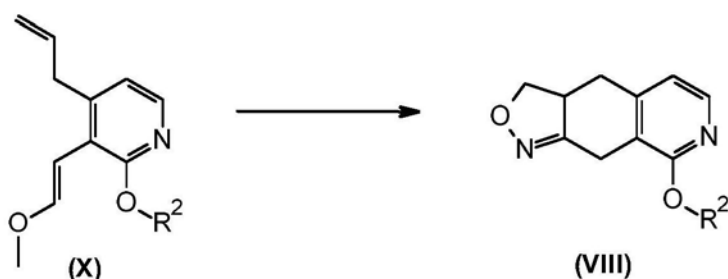
[0113] 具有式 (XI) 的中间体化合物可以遵循本领域中已知的维蒂希反应 (Wittig reaction) 程序通过使具有式 (XII) 的中间体化合物进行反应来制备。所述反应可以通过以下方式合宜地进行：将具有式 (XII) 的中间体化合物用合适的磷盐 (例如像甲氧基甲基三苯基氯化磷), 在合适的碱 (例如像双 (三甲基甲硅烷基) 胺基钾) 存在下, 在合适的反应惰性溶剂 (例如像甲苯) 中, 在便利的温度 (典型地为 -10°C -r.t.) 下进行处理, 持续一段时间以保证该反应完成。

[0114] 通常可以商业获得或根据文献程序合成具有式 (XII) 的中间体化合物。

[0115] 在反应方案8中, 所有的变量是如在式 (I) 中所定义的。



[0116]



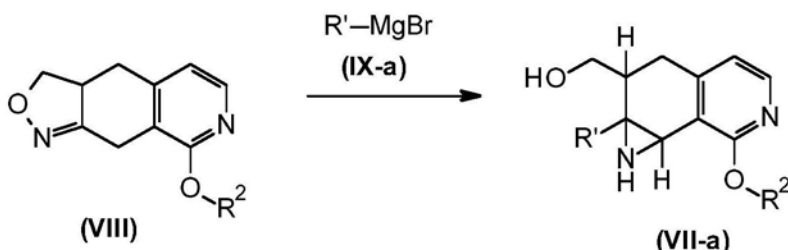
[0117]

反应方案 8

[0118] 实验程序9

[0119] 可替代地,具有式 (VIII) 的中间体化合物可经历具有式 (IX-a) 的有机金属类的添加,其中R' 是可以通过使用本领域技术人员已知的程序转化为R的任何基团,这些程序例如像交叉偶联反应、烷基化反应和脱保护反应。中间体化合物 (VII-a) 可以使用前面实例中所述的相同合成途径在合成中进行。本领域技术人员将能够判断在合成序列的哪一点上,R' 到R的转化适于进行。

[0120]



反应方案 9

[0121] 化合物的制备-流动化学

[0122] 使用如本文所述的Cyclops™平台合成和筛选多种化合物,该平台以高成功范围(61%–96%成功率)进行工作。流动合成系统利用了Vapourtec®R4反应器和R2泵模块,具有由FlowCommander™软件控制的集成阀和试剂环。根据化学的复杂性,使用了多达四个反应器、泵和阀。来自最终反应器的输出物流入HPLC进样阀,使得等分试样的产物能够进样到纯化系统。由于合成系统中的分散导致材料损失在若干个方面被最小化。首先,在整个系统中使用小孔管,因为这使得分散最小化。其次,选择试剂环尺寸以保证在反应器中实现反应物和产物的稳态浓度。最后,定时进样到HPLC以保证在最大产物浓度点,即在稳态条件下取出等分试样。通常,使用新鲜的试剂瓶和/或原位生成试剂可以改善合成结果。

[0123] 实验程序10

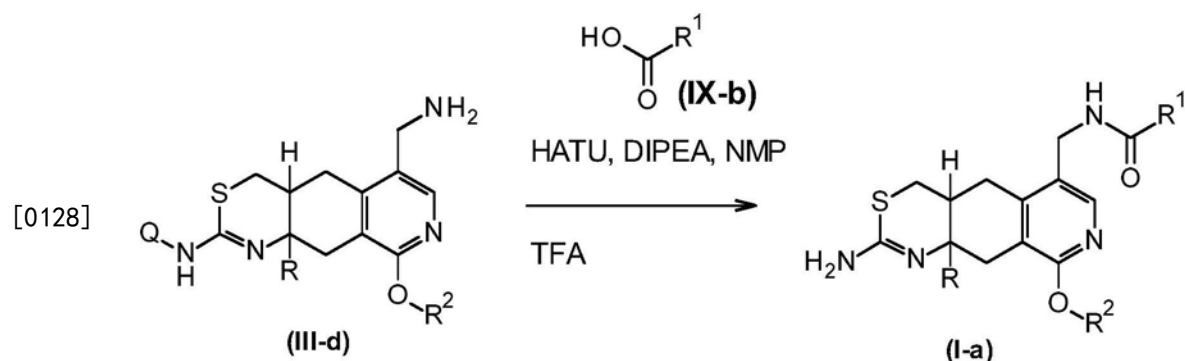
[0124] 具有式 (I) 的化合物(其中-L¹-R¹是-CH₂-NH-(C=O)-R¹,在本文中称为具有式 (I-a) 的化合物) 可以使用适当的偶联剂(例如像HATU)在适当的碱(如DIPEA)存在下,从具有式 (III-d) 的中间体(其中Q是保护基团,例如像三苯甲基)来制备。尽管使用低至1.2当量进行

反应,但典型地使用2当量的胺或酸偶联伴侣(IX-b)来保证最大转化率。典型地,使用1.2当量的HATU,并且相对于(III-d),DIPEA以三倍过量存在。将碱(如DIPEA)添加到(III-d)中。

[0125] 对于每种组分,酰胺形成的进样环尺寸典型地为250 μ L。用于脱保护的酸溶液(例如TFA)是0.5ml进样的在NMP中的33%TFA。

[0126] 典型地,使用NMP作为溶剂在40 $^{\circ}$ C下在流动中进行酰胺形成20min以给出受保护的产物。

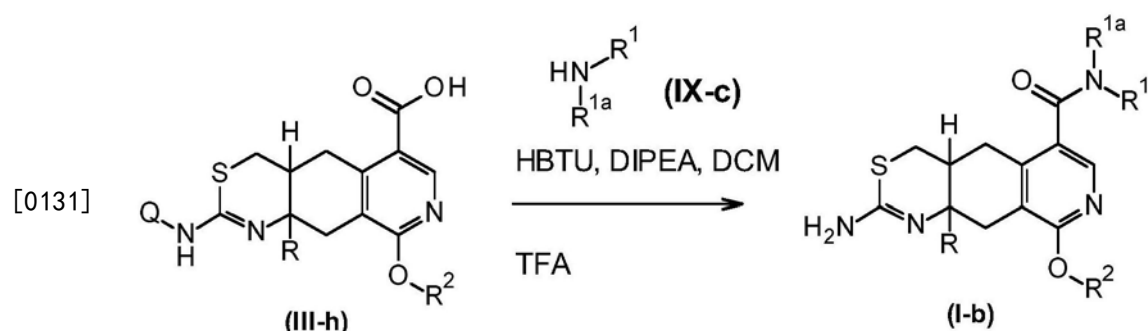
[0127] 可以根据已知的程序(例如通过使用在NMP中的33%TFA)去除保护基团,例如三苯甲基基团。然后将其添加到第一反应的流出物中,并且典型地在120 $^{\circ}$ C下将随后的混合物加热,持续15min。在反应方案10中,所有的变量是如在式(I)中所定义的。



反应方案 10

[0129] 实验程序11

[0130] 具有式(I)的化合物(其中 $-L^1-R^1$ 是 $-(C=O)-NR^{1a}R^1$,在本文中称为具有式(I-b)的化合物)可以通过使用适当的偶联剂(例如像HBTU)在适当的碱(如DIPEA)存在下,在合适的溶剂(例如像DCM)中,在保证该反应完成的条件下与具有式(IX-c)的胺进行反应,从具有式(III-h)的中间体(其中Q是保护基团,例如像三苯甲基)来制备。在反应方案11中,所有的变量是如在式(I)中所定义的。



反应方案 11

[0132] 药理学

[0133] 本发明的化合物及其药学上可接受的组合物抑制BACE,并且因此可用于治疗或防止以下疾病:阿尔茨海默病(AD)、轻度认知损害(MCI)、衰老、痴呆、路易体痴呆、脑淀粉样血管病、多发性梗死性痴呆、唐氏综合征、与帕金森病相关的痴呆、阿尔茨海默型痴呆、血管性痴呆、归因于HIV病的痴呆、归因于头部创伤的痴呆、归因于亨廷顿氏病的痴呆、归因于皮克氏病的痴呆、归因于克雅二氏病的痴呆、额颞痴呆、拳击员痴呆、与 β -淀粉样蛋白相关的痴

呆、以及年龄相关性黄斑变性、2型糖尿病以及其他代谢障碍。

[0134] 如本文使用的,术语“治疗”旨在是指其中可能存在一种疾病的进展的减缓、中断、遏制或阻止或症状的缓解的所有过程,但未必指示所有症状的全部消除。

[0135] 本发明还涉及用于在治疗或防止以下疾病或病症中使用的根据通式(I)的化合物、其立体异构形式或其药学上可接受的酸或碱加成盐,这些疾病或病症选自下组,该组由以下组成:AD、MCI、衰老、痴呆、路易体痴呆、脑淀粉样血管病、多发性梗死性痴呆、唐氏综合征、与帕金森病相关的痴呆、阿尔茨海默型痴呆、与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆、以及年龄相关性黄斑变性、2型糖尿病以及其他代谢障碍。

[0136] 本发明还涉及用于在治疗、防止、缓解、控制或降低以下疾病或病症的风险中使用的根据通式(I)的化合物、其立体异构形式或其药学上可接受的酸或碱加成盐,这些疾病或病症选自下组,该组由以下组成:AD、MCI、衰老、痴呆、路易体痴呆、脑淀粉样血管病、多发性梗死性痴呆、唐氏综合征、与帕金森病相关的痴呆、阿尔茨海默型痴呆、与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆、以及年龄相关性黄斑变性、2型糖尿病以及其他代谢障碍。

[0137] 如在上文已经提及的,术语“治疗”未必指示所有症状的全部消除,而是还可以指在上面提及的任何障碍中的对症治疗。鉴于具有式(I)的化合物的效用,提供治疗罹患任一种上文中提及的疾病的受试者如温血动物(包括人类)的方法,或防止受试者如温血动物(包括人类)罹患任一种上文中提及的疾病的方法。

[0138] 所述方法包括向受试者如温血动物(包括人类)给予,即,全身给予或局部给予,优选口服给予治疗有效量的具有式(I)的化合物、其立体异构形式、其药学上可接受的加成盐或溶剂化物。

[0139] 因此,本发明还涉及用于防止和/或治疗任何上文中提及的疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的根据本发明的化合物。

[0140] 本发明涉及用于调节 β -位点淀粉样蛋白裂解酶活性的方法,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的根据本发明的和如权利要求书中所定义的化合物或根据本发明的和如权利要求书中所定义的药物组合物。

[0141] 治疗方法还可包括以每天一到四次摄入之间的方案给予活性成分。在这些治疗方法中,根据本发明的化合物优选地在给予之前进行配制。如在下文中所述的,合适的药物配制品通过已知程序使用熟知并且容易可得的成分来制备。

[0142] 可以适合于治疗或防止阿尔茨海默病或其症状的本发明的化合物可以单独给予或与一种或多种另外的治疗剂联合给予。联合疗法包括:含有具有式(I)的化合物以及一种或多种另外的治疗剂的单个药物剂量配制品的给予,连同具有式(I)的化合物和以其自身分开的药物剂量配制品存在的每种另外的治疗剂的给予。例如,可以向患者给予一起处于单个口服剂量组合物(如片剂或胶囊)中的具有式(I)的化合物和治疗剂,或可以将每种药剂以分开的口服剂量配制品给予。

[0143] 技术人员将熟悉本文提及的疾病或病症的替代性命名、疾病分类学以及分类系统。例如,美国精神病学协会的《精神障碍的诊断与统计学手册》第五版(DSM-5™)利用术语,如神经认知障碍(NCD)(重度和轻度两者),特别是归因于阿尔茨海默病、归因于创伤性脑损伤(TBI)、归因于路易体疾病、归因于帕金森病或归因于血管性NCD(如表现为多发性梗塞的血管性NCD)的神经认知障碍。技术人员可以使用此类术语作为用于一些本文提及的疾病或

病症的替代性命名。

[0144] 药物组合物

[0145] 本发明还提供了用于防止或治疗其中 β -分泌酶的抑制是有益的疾病的组合物,该疾病是如阿尔茨海默病(AD)、轻度认知损害、衰老、痴呆、路易体痴呆、唐氏综合征、与中风相关的痴呆、与帕金森病相关的痴呆、以及与 β -淀粉样蛋白相关的痴呆、以及年龄相关性黄斑变性、2型糖尿病和其他代谢障碍。所述组合物包含治疗有效量的根据式(I)的化合物以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0146] 虽然活性成分可以单独给予,但其优选地是作为药物组合物存在。因此,本发明进一步提供了药物组合物,该药物组合物包含根据本发明的化合物连同药学上可接受的载体或稀释剂。该载体或稀释剂在与该组合物的其他成分相容的意义上必须是“可接受的”并且对于其接受者是无害的。

[0147] 可以通过制药领域所熟知的任何方法来制备本发明的药物组合物。治疗有效量的呈碱形式或加成盐形式的作为活性成分的特定化合物与药学上可接受的载体组合成紧密混合物,该载体可以取决于给予所希望的制剂形式而采用多种多样的形式。令人希望的是这些药物组合物处于适合于,优选适合于全身给予,如口服、经皮或肠胃外给予;或局部给予,如经由吸入、鼻喷雾、滴眼剂或经由霜剂、凝胶剂、洗发剂等的单位剂型。例如,在制备呈口服剂型的组合物时,可以使用任何常见药物介质,例如像在口服液体剂型(如悬浮液、糖浆、酏剂以及溶液)的情况下,是水、二醇、油、醇等;或在散剂、丸剂、胶囊以及片剂的情况下,是固体载体,如淀粉、糖、高岭土、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。片剂和胶囊剂由于其给予简易性而代表了最有利的口服单位剂型,在该情况下显然采用固体药物载体。对于肠胃外组合物而言,该载体通常将包含至少呈大部分的无菌水,但也可以包括其他成分例如以辅助溶解性。例如可制备可注射溶液,其中该载体包含盐溶液、葡萄糖溶液或盐水和葡萄糖溶液的混合物。也可以制备可注射悬浮液,在这种情况下可以采用适当的液体载体、助悬剂等。在适合于经皮给予的组合物中,该载体任选地包含渗透增强剂和/或合适的可湿润剂,任选地与小比例的具有任何性质的合适添加剂组合,这些添加剂不会对皮肤造成任何显著有害作用。所述添加剂可促进向皮肤给予和/或可有助于制备所希望的组合物。这些组合物能够以不同方式,例如作为透皮贴剂、作为滴剂或作为软膏剂给予。

[0148] 尤其有利的是以单位剂型配制以上提及的药物组合物以实现给予简易性和剂量均一性。如本说明书和权利要求书中所用的单位剂型在本文中是指适合作为单位剂量的物理离散单位,每一单位含有经计算以与所需的药物载体结合而产生所希望的治疗作用的预定量的活性成分。此类单位剂型的实例是片剂(包括刻痕或包衣片剂)、胶囊、丸剂、散剂包、糯米纸囊剂、可注射溶液或悬浮液、茶匙剂、汤匙剂等,及其分开的多个。

[0149] 如本领域的技术人员所熟知的,给予的确切剂量和频率取决于所使用的具有式(I)的特定化合物,所治疗的特定病症,所治疗的病症的严重程度,特定患者的年龄、体重、性别、障碍程度以及总体身体健康状况,连同个体可以服用的其他药物。此外,显而易见的是,所述有效日用量可以降低或提高,这取决于所治疗的受试者的应答和/或取决于给出本发明的化合物处方的医生的评估。

[0150] 取决于给予模式,该药物组合物将包含按重量计从0.05%至99%,优选地按重量计从0.1%至70%,更优选地按重量计从0.1%至50%的活性成分,以及按重量计从1%至

99.95%，优选地按重量计从30%至99.9%，更优选地按重量计从50%至99.9%的药学上可接受的载体，所有的百分数都基于该组合物的总重量。

[0151] 本发明化合物可以用于全身给予，如口服、经皮或肠胃外给予；或局部给予，如经由吸入、鼻喷雾、滴眼剂或经由霜剂、凝胶剂、洗发剂等给予。化合物优选地经口给予。如本领域的技术人员所熟知的，给予的确切剂量和频率取决于所使用的根据式(I)的特定化合物，所治疗的特定病症，所治疗的病症的严重程度，特定患者的年龄、体重、性别、障碍程度以及总体身体健康状况，连同个体可以服用的其他药物。此外，显而易见的是，所述有效日用量可以降低或提高，这取决于所治疗的受试者的应答和/或取决于给出本发明的化合物处方的医生的评估。

[0152] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的具有式(I)的化合物的量将取决于治疗的疾病、哺乳动物种类以及特定给予模式而变化。然而，作为一般指导，本发明的这些化合物的合适单位剂量可以例如优选地含有0.1mg至约1000mg之间的活性化合物。优选的单位剂量是在1mg至大约500mg之间。更优选的单位剂量是在1mg至大约300mg之间。甚至更优选的单位剂量是在1mg至大约100mg之间。此类单位剂量可以每天超过一次地被给予，例如一天2次、3次、4次、5次或6次，但是优选每天1次或2次，这样使得对于一个70kg的成人每次给予的总剂量是每kg受试者体重在0.001mg至约15mg的范围内。优选的剂量是每次给予每kg受试者体重0.01mg至约1.5mg，并且此类疗法可以持续多个星期或月，并且在一些情况中，持续多年。然而，如本领域技术人员充分理解的，将理解的是，针对任何特定患者的特定剂量水平取决于多种因素，包括所采用的特定化合物的活性；所治疗的个体的年龄、体重、总体身体健康状况、性别以及饮食；给予时间及途径；排泄率；先前已经给予的其他药物；以及经历治疗的特定疾病的严重程度。

[0153] 典型剂量可以是一天服用一次或一天多次的一片1mg至约100mg片剂或1mg至约300mg，或者一天服用一次的、并且含有在比例上含量较高的活性成分的一粒延时释放(time-release)的胶囊或片剂。延时释放效应可以通过在不同的pH值下溶解的胶囊材料、通过渗透压缓慢释放的胶囊、或者通过控制释放的任何其他已知手段来获得。

[0154] 如本领域技术人员将理解的，在一些情况下有必要使用这些范围外的剂量。此外，应当注意临床医生或治疗医师结合个体患者反应将知道如何以及何时开始、中断、调节或终止治疗。

[0155] 对于以上提供的组合物、方法以及试剂盒，本领域技术人员将理解，用于各个的优选化合物是根据以上优选提到的那些化合物。用于组合物、方法和试剂盒的其他优选化合物是在以下非限制性实例中提供的那些化合物。

[0156] 实验部分

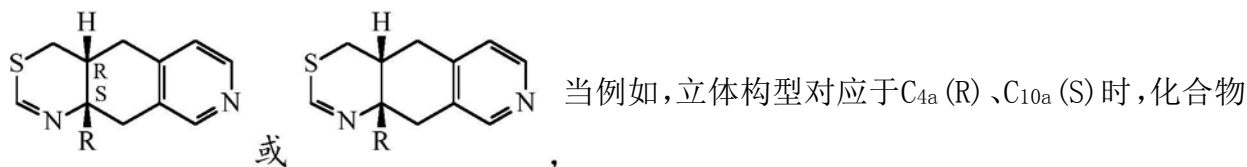
[0157] 在下文中，术语“aq.”意指水性的，“r.m.”意指反应混合物，“r.t.”或“RT”意指室温，“DIPEA”意指N,N-二异丙基乙胺，“DIPE”意指二异丙基醚，“THF”意指四氢呋喃，“DMF”意指二甲基甲酰胺，“DCM”意指二氯甲烷，“EtOH”意指乙醇，“EtOAc”意指乙酸乙酯，“AcOH”意指乙酸，“iPrOH”意指异丙醇，“iPrNH₂”意指异丙胺，“ACN”或“MeCN”意指乙腈，“MeOH”意指甲醇，“Pd(OAc)₂”意指二乙酸钯(II)，“rac”意指外消旋的，“sat.”意指饱和的，“SFC”意指超临界流体色谱法，“SFC-MS”意指超临界流体色谱法/质谱法，“LC-MS”意指液相色谱法/质谱法，“GCMS”意指气相色谱法/质谱法，“HPLC”意指高效液相色谱法，“RP”意指反相，“UPLC”

意指超高效液相色谱法,“ R_t ”意指保留时间(以分钟计),“ $[M+H]^+$ ”意指化合物的游离碱的质子化质量,“HATU”意指0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯,“HBTU”意指N,N,N,N-四甲基-0-(1H-苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸盐,“Xantphos”意指(9,9-二甲基-9H-咕吨-4,5-二基)双[二苯基膦],“TFA”意指三氟乙酸,“ Et_2O ”意指二乙醚,“DMSO”意指二甲亚砜,“NMP”意指N-甲基吡咯烷酮,“NMR”意指核磁共振,“LDA”意指二异丙基氨基锂,“DIPA”意指二异丙胺,“n-BuLi”意指正丁基锂。“h”意指小时。“min”意指分钟,“sol.”意指溶液,“BOC”意指叔丁氧基羰基,“DMA”意指N,N-二甲基乙酰胺,“DMAP”意指二甲基氨基吡啶,“mw”意指微波,“NBS”意指N-溴代琥珀酰亚胺,“ $Pd(PPh_3)_4$ ”意指四(三苯基膦)钯(0),“DBU”意指1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯,“SQD”意指单四极检测器,“MSD”意指质量选择检测器,“BEH”意指桥接的乙基硅氧烷/二氧化硅杂合物,“DAD”意指二极管阵列检测器,“HSS”意指高强度二氧化硅,“Q-ToF”意指四极飞行时间质谱仪,“CLND”意指化学发光氮检测器,以及“ELSD”意指蒸发光扫描检测器。

[0158] 立体化学构型的分配和图形表示

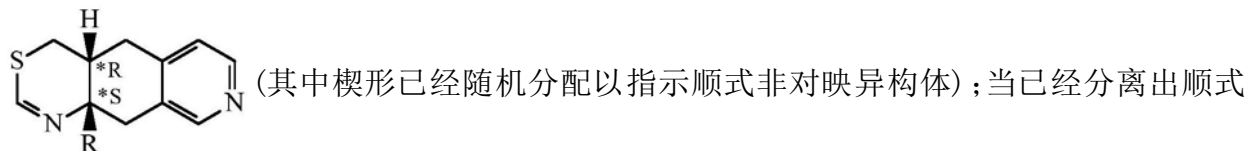
[0159] 中间体/化合物的中心 C_{4a} 和 C_{10a} 的立体构型表示如下:

[0160] a) 当中间体/化合物是对映体纯的并且已知绝对立体构型时,核心已经表示为

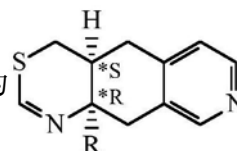


是单一非对映异构体和对映体纯的;

[0161] b) 当中间体/化合物是对映体纯的但尚未确定绝对立体构型时,核心已经表示为

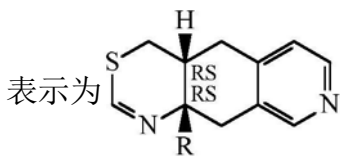


相对构型的另一种纯的对映体时,中间体/化合物已经表示为



他分离的对映体纯的中间体/化合物;

[0162] c) 当中间体/化合物是顺式相对构型的两种对映体的外消旋混合物时,核心已经

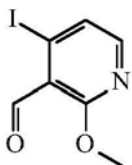


[0163] 已经基于化学合成方法和NMR(相对立体构型的分配)以及化合物30和中间体26连同多种对映体纯的类似物与BACE 1酶的共结晶,中间体/化合物的绝对立体化学构型已经合理化,这使得能够确定化合物中R基团的优选取向,以及所显示的化合物的体外活性。

[0164] A. 中间体的制备

[0165] 中间体1

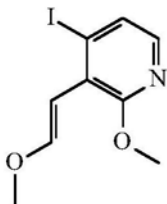
[0166]



[0167] 将DIPA (3.5mL, 25mmol) 在THF (100mL) 中的混合物冷却至-20℃并滴加正丁基锂 (2.7M在庚烷中, 9.2mL, 25mmol)。搅拌10min后, 将反应混合物冷却至-75℃并滴加在THF (50mL) 中的2-碘-3-碘吡啶 (5.55g, 25mmol)。在-65℃下继续搅拌2h。将反应混合物冷却至-75℃并滴加在THF (25mL) 中的甲酸乙酯 (2.3mL, 28mmol)。10min后, 滴加甲醇钠 (5.8mL, 0.95g/mL, 25mmol, 25%纯度)。去除冷却浴, 并允许反应混合物达到r.t. 并用盐水 (50mL)、Et₂O (100mL) 进行处理, 并且分离各层。将水层用Et₂O (100mL) 萃取, 并且将合并的有机层用盐水 (50mL) 处理, 经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以得到中间体1 (6.15g, 94%), 将其按原样用于下一反应步骤中。

[0168] 中间体2

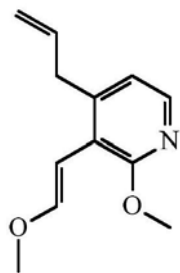
[0169]



[0170] 在-10℃下, 向甲氧基甲基三苯基氯化磷 (8.4g, 24mmol) 在甲苯 (150mL) 中的搅拌混合物中滴加双 (三甲基甲硅烷基) 胺基钾 (0.7M在甲苯中, 34mL, 24mmol)。在此温度下继续搅拌30min。滴加在甲苯 (20mL) 中的中间体1 (2.1g, 8mmol), 并且2h后, 将反应混合物用水 (50mL) 猝灭, 并且分离各层。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以得到棕褐色油。通过柱色谱法 (二氧化硅, EtOAc/庚烷0/100至10/90) 纯化该油, 以提供呈油的中间体2 (1.86g, 80%)。

[0171] 中间体3

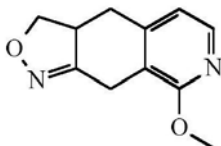
[0172]



[0173] 向中间体2 (30g, 100mmol) 在THF (500mL) 中的搅拌且冷却 (-70℃) 的混合物中滴加异丙基氯化镁-氯化锂络合物 (105mL, 1.3M, 140mmol), 同时保持内部温度低于-65℃。添加完成之后, 继续搅拌1.5h。然后在-70℃下, 滴加氧化铜 (I) 二 (氯化锂) 络合物溶液 (105mL, 1M, 110mmol), 并且15min后, 滴加烯丙基溴 (28mL, 31mmol)。允许反应混合物达到r.t., 然后用盐水 (100mL) 猝灭, 用Et₂O (0.3L) 和水 (0.1L) 稀释, 并且分离各层。将有机层首先用氨分批洗涤直到蓝色消失 (5x0.2L), 然后用盐水 (0.1L) 洗涤。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以得到残余物, 将该残余物通过柱色谱法 (二氧化硅, DCM/庚烷98/2至100/0) 进行纯化以得到中间体3 (19.6g, 93%)。

[0174] 中间体4

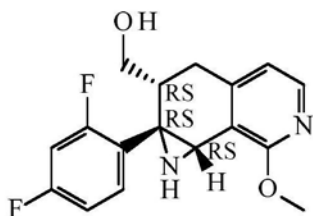
[0175]



[0176] 将中间体3 (19.6g, 95mmol) 在THF (200mL) 中的搅拌溶液用水性6M HCl (70mL, 420mmol) 处理, 并在50℃下加热反应混合物30min。将反应混合物倾倒入冰水 (0.2L) 中并用饱和Na₂CO₃溶液处理直到中性pH。将反应混合物用DCM (3x0.1L) 萃取并且将合并的有机层经MgSO₄干燥。向所得溶液中添加三乙胺 (40mL, 290mmol) 然后添加羟基胺盐酸盐 (8g, 120mmol), 并且继续搅拌1h。将反应混合物用饱和NaHCO₃溶液 (0.1L) 稀释, 并且分离各层。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并转移到1L 4颈烧瓶 (配备有机械搅拌器) 中, 并冷却至0℃ (内部温度)。向该冷却的溶液中滴加次氯酸钠 (210mL, 470mmol)。完成添加后, 允许反应混合物达到r.t., 并在r.t.下继续搅拌过夜。分离各层并且将水层用DCM (0.2L) 萃取。将合并的有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以给出固体, 将该固体从DIPE (0.1L) 中再结晶以得到中间体4 (8.64g, 44%)。

[0177] 中间体5

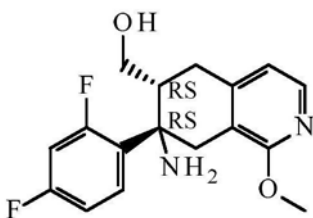
[0178]



[0179] 在氮气下, 将1-溴-2,4-二氟苯 (9.699mL, 70.51mmol) 在43mL的THF中搅拌, 并将反应混合物冷却至-15℃。在-15℃下, 滴加异丙基氯化镁 (2M在THF中, 43.048mL, 86.1mmol), 并在0℃-5℃下搅拌反应混合物1h, 然后再次冷却至-15℃。滴加溶解在43mL的THF中的中间体4 (7.2g, 35.26mmol)。允许混合物达到r.t., 然后滴加到60mL的NH₄Cl饱和溶液中并用EtOAc萃取。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以给出中间体5 (11.15g, 99%, 顺式/反式混合物)。

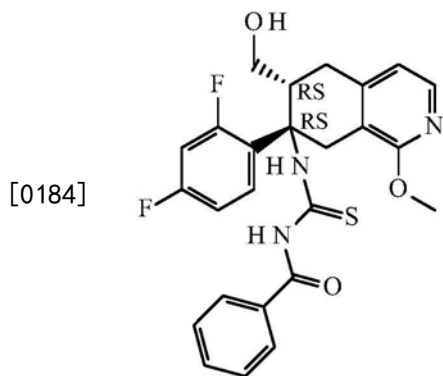
[0180] 中间体6

[0181]



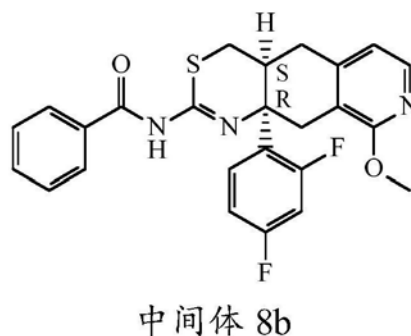
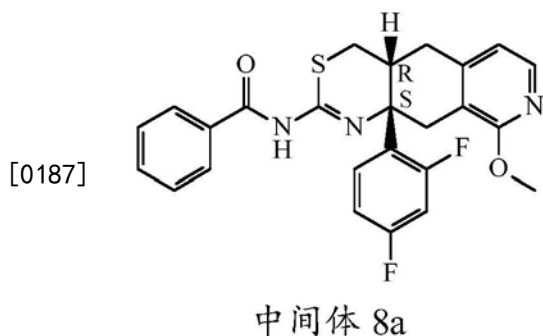
[0182] 将在EtOH (473mL) 中的Raney®-镍 (64g) 和噻吩 (4%在DIPE中, 85mL) 置于氢化烧瓶中, 然后添加溶解在EtOH (473mL) 中的中间体5 (17.2g, 54mmol)。将烧瓶脱气, 然后用氢气冲洗, 然后在14℃下搅拌6h。将反应混合物经dicalite®过滤并用EtOH和THF洗涤, 然后通过蒸发来浓缩产物。将产物进行纯化 (二氧化硅, MeOH/DCM, 0/100至6/94)。蒸发纯级分, 以产出中间体6 (10.34g, 60%)。

[0183] 中间体7



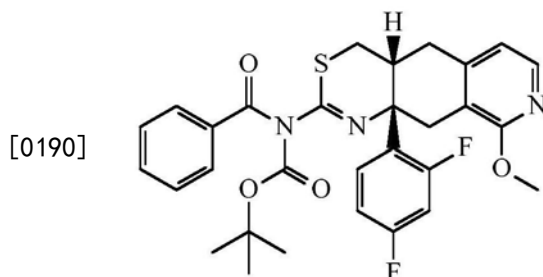
[0185] 将中间体6 (2.32g, 7.24mmol) 在冰浴中溶解在130mL的DCM中, 然后向混合物中滴加在20mL的DCM中的异硫氰酸苯甲酰酯 (1.66g, 10.14mmol), 并允许在r.t.下将反应搅拌1.5h。向仍在搅拌的反应混合物中添加少量冰, 并且使用DCM萃取产物; 将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并通过蒸发浓缩。通过柱色谱法 (二氧化硅, EtOAc/庚烷, 0/100至80/20) 纯化有机层。收集含有产物的级分并且通过蒸发浓缩, 以产出中间体7 (3.50g, 定量的)。

[0186] 中间体8a和8b



[0188] 在r.t.下, 在氮气流下, 将中间体7 (3.5g, 7.24mmol) 在DCM (91mL) 中搅拌, 然后滴加1-氯-N,N,2-三甲基丙烯胺 (2.62mL, 19.80mmol), 并允许将反应混合物搅拌10min。反应完成, 然后用20mL的饱和水性NaHCO₃溶液猝灭并允许搅拌10min。将有机材料使用DCM萃取, 经MgSO₄干燥, 过滤并通过蒸发浓缩。将该材料在DIPE中搅拌以得到白色固体, 将该白色固体滤出并在烘箱中干燥以产出2.46g的混合物, 将该混合物通过制备型SFC (固定相: Chiralpak Diacel AD 30x250mm; 流动相: CO₂, 含有0.2% iPrNH₂的MeOH) 纯化, 以产出中间体8a (1.99g, 33%纯对映体) 和中间体8b (1.67, 28%纯对映体)。

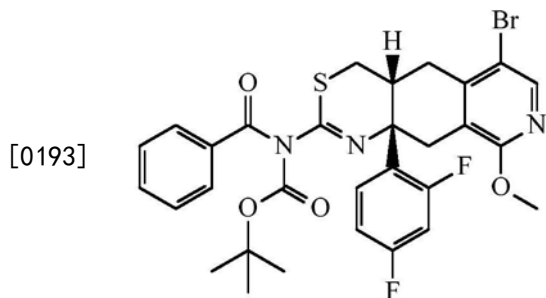
[0189] 中间体9



[0191] 将中间体8a (2.2g, 0.0047mol) 在THF (20mL, 0.89g/mL, 0.25mol) 中的搅拌混合物用BOC-酸酐 (1.24g, 0.0057mol) 和DMAP (50mg, 0.00041mol) 处理。在r.t.下搅拌1h后, 将反应混合物用饱和NaHCO₃溶液 (20mL)、水 (50mL) 和EtOAc (100mL) 稀释, 并且分离各层。将水层

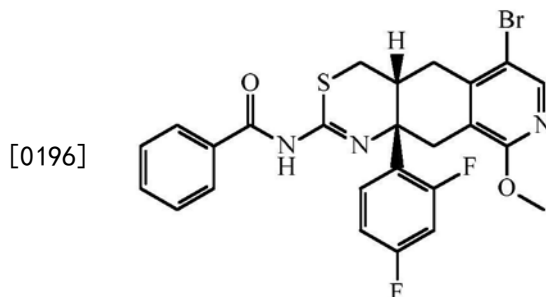
用EtOAc (50mL) 萃取。将合并的有机层用盐水 (20mL) 处理,经MgSO₄干燥,过滤并在真空中浓缩,以给出呈白色泡沫的中间体9 (2.77g, 99%)。

[0192] 中间体10



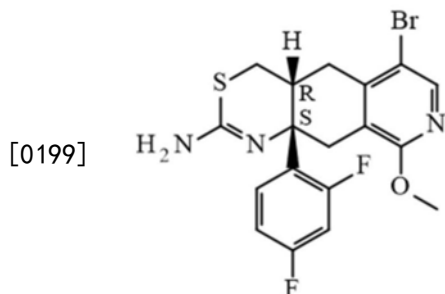
[0194] 向中间体9 (2.77g, 0.0049mol) 在ACN (250mL, 0.79g/mL, 4.81mol) 中的搅拌混合物中分小份添加N-溴代琥珀酰亚胺 (1g, 0.0056mol), 并在r. t. 下将随后的反应混合物搅拌4天, 然后添加更多的N-溴代琥珀酰亚胺 (0.2g, 0.0011mol), 并继续再搅拌3h。将反应混合物用40mL的饱和NaHCO₃、水 (0.1L)、EtOAc (200mL) 稀释, 并且分离各层。将水层用EtOAc (50mL) 萃取, 并且将合并的有机层用盐水 (0.1L) 处理, 经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以得到灰白色固体。将其通过硅胶柱色谱法使用120g Redisep快速柱, 以在庚烷中的0-50% EtOAc的梯度洗脱来纯化, 以得到呈亮白色固体的中间体10 (2.1g, 产率67%)。

[0195] 中间体11



[0197] 在r. t. 下, 将中间体10 (13.71g, 21mmol) 和甲酸 (79.7mL, 2.1mmol) 搅拌1h。蒸发反应混合物中存在的甲酸并将产物用Na₂CO₃碱化, 然后用DCM萃取。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并通过蒸发浓缩, 以产出从DIPE中结晶的产物。将晶体滤出并干燥, 产出中间体11 (9.32g, 81%)。

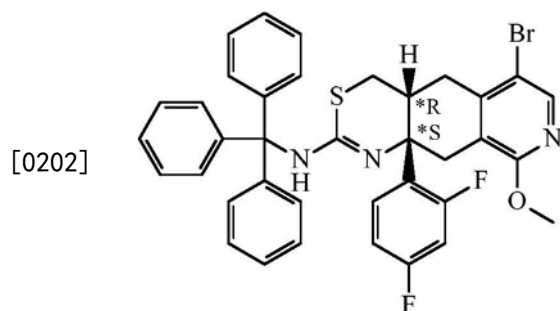
[0198] 中间体12



[0200] 将中间体11 (9.32g, 17mmol)、DBU (25.5mL, 171mmol) 和MeOH (192.8mL) 放置在压力管中并在60℃下搅拌过夜。将反应混合物通过蒸发浓缩, 然后通过柱色谱法 (二氧化硅, DCM至5% MeOH在DCM中) 纯化该材料两次。合并含有产物的级分并且通过蒸发浓缩, 以产出中间

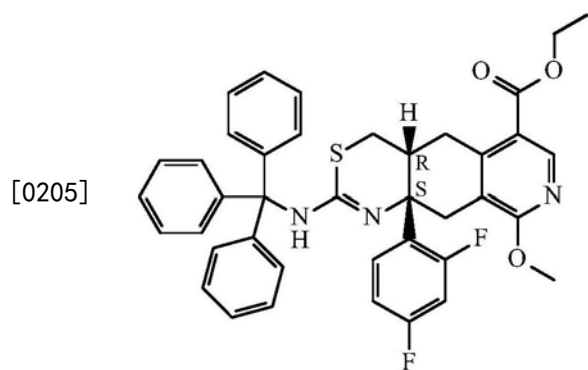
体12 (6.84g, 91%)。

[0201] 中间体13



[0203] 将中间体12 (0.87g, 1.976mmol) 溶解在干乙腈 (76mL) 中, 然后添加Et₃N (0.55mL, 3.95mmol), 随后添加三苯基氯甲烷 (0.826g, 2.96mmol)。然后将反应混合物加热至80℃, 持续1.5h, 然后蒸发溶剂并将残余物溶解在EtOAc中。在使用K₂CO₃碱化混合物后, 将有机层用盐水洗涤 (x3), 并且分离各相。将合并的有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩。通过快速柱色谱法 (硅胶, EtOAc/庚烷, 0/100至10/90) 纯化粗产物。收集所希望的级分并且在真空中蒸发。将化合物从MeOH研磨, 并且滤出晶体并干燥, 以产出呈白色固体的中间体13 (1.3g, 96%)。

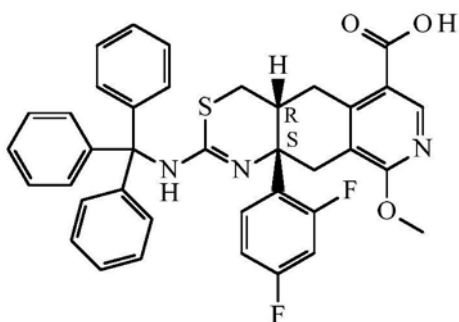
[0204] 中间体14



[0206] 在氮气氛下, 将75mL不锈钢高压釜用中间体13 (1.1g, 1.61mmol)、Pd (OAc)₂ (77.2mg, 0.34mmol)、1,3-双(二苯基膦)丙烷 (44mg, 0.107mmol)、乙酸钾 (385mg, 3.93mmol)、THF (20mL)、以及EtOH (20mL) 填充。将高压釜关闭并加压至30巴CO。将反应混合物在120℃下搅拌19h。蒸发该反应混合物, 然后添加水和DCM, 并且将混合物经dicalite®过滤。将有机材料用DCM萃取, 经MgSO₄干燥, 过滤并通过蒸发浓缩以产出1.48g的产物, 将该产物通过柱色谱法 (二氧化硅, MeOH/DCM, 0/100至2/98) 纯化, 并且合并含有产物的级分并通过蒸发浓缩, 以产出中间体14 (0.902g, 83%)。

[0207] 中间体15

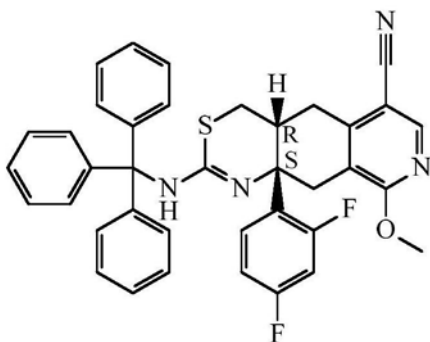
[0208]



[0209] 将中间体14 (1.137g, 1.682mmol)、氢氧化锂 (484mg, 20.189mmol)、水 (130mL) 和1,4-二噁烷 (130mL) 在80℃下搅拌3h, 直到实现完全转化为所希望的产物。然后蒸发二噁烷并且将混合物用AcOH酸化直到pH大约为3。随后将反应混合物用DCM萃取, 将有机层收集, 经MgSO₄干燥, 并且在真空中蒸发溶剂。通过柱色谱法 (二氧化硅, MeOH/DCM, 0/100至5/95) 纯化残余物以产出中间体15, 将其在烘箱中干燥以得到固体 (0.845g, 78%)。

[0210] 中间体16

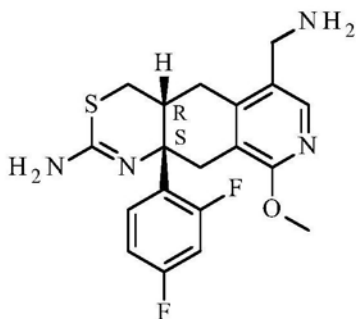
[0211]



[0212] 在mw小瓶中, 将三(二苯亚甲基丙酮)二钯(0) (519.4mg, 0.57mmol) 和1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁 (649.7mg, 1.17mmol) 混合在DMA (106.7mL) 中, 并且使用氮气将该混合物脱气10min。然后添加中间体13 (1.6g, 2.34mmol), 随后添加锌 (183.9mg, 2.81mmol) 和Zn(CN)₂ (2.20g, 18.8mmol)。将小瓶加帽, 并在150℃下加热4h。将反应混合物倾倒在冰水上并搅拌, 这导致棕色固体的形成。将固体滤出, 溶解在DCM中并用水洗涤。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并通过蒸发浓缩。通过柱色谱法 (二氧化硅, MeOH/DCM, 0/100至1/99) 纯化产物。合并纯级分并通过蒸发浓缩, 以产出中间体16 (1.47g, 定量的)。

[0213] 中间体17

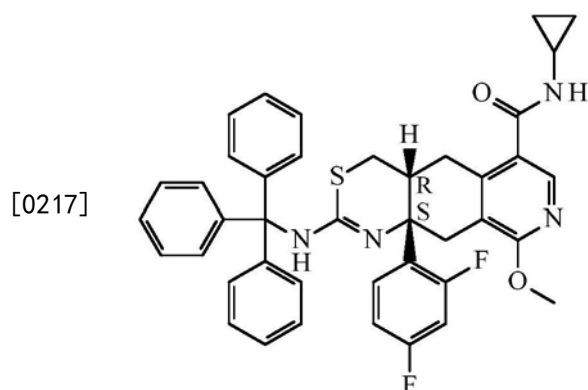
[0214]



[0215] 在-20℃下, 在氮气流下, 将中间体16 (1.47g, 2.3mmol) 溶解在THF (干) (147mL) 中并且滴加LiAlH₄ (2M在THF中, 2.34mL, 4.7mmol)。将反应加温到r.t. 并且允许搅拌16h。将反应混合物在冰浴中冷却, 并用10mL的罗谢尔盐溶液 (1.5M在H₂O中) 猝灭。将有机材料用DCM

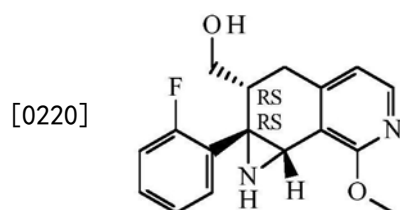
萃取,经MgSO₄干燥,过滤并通过蒸发浓缩。将其在二氧化硅上纯化;洗脱液:DCM→5%MeOH/NH₃在DCM中,并且合并含有产物的级分,通过蒸发浓缩并在烘箱中干燥2h,以产出中间体16(0.74g,50%);回收220mg的起始材料。

[0216] 中间体18



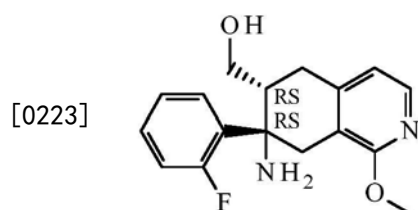
[0218] 将中间体15(90mg,0.14mmol)在DCM(2.25mL)中搅拌,并且添加DIPEA(0.12mL,0.70mmol)和HBTU(52.69mg,0.139mmol),在r.t.下继续搅拌0.5h。将环丙胺(0.0116mL,0.167mmol)添加到该溶液中,并在r.t.下继续搅拌1h。添加NaOH(1N溶液,3mL)并且将反应混合物搅拌5min。将有机层分离,经MgSO₄干燥,过滤并通过蒸发浓缩。通过柱色谱法(二氧化硅,MeOH/DCM,0/100至4/96)纯化有机残余物,并且合并含有产物的级分并通过蒸发浓缩,以产出中间体18(135mg,72%纯度,定量的)。

[0219] 中间体19



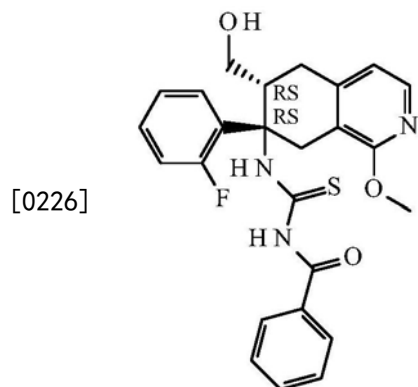
[0221] 向2-氟苯基溴化镁(20mL,1M,20mmol)的搅拌的、冷却的(5℃)非均质混合物中滴加中间体4(2g,9.8mmol)在甲苯(40mL)中的溶液。添加完成之后,继续搅拌30min,然后将反应混合物用饱和水性NH₄Cl溶液(50mL)、水(0.1L)猝灭,并且分离各层。将水相用EtOAc(3x0.1L)萃取并将合并的有机层用盐水(0.1L)处理,经MgSO₄干燥,过滤并在真空中浓缩以给出残余物,将该残余物通过柱色谱法(二氧化硅,EtOAc/DCM,0/100至100/0)进行纯化以得到呈灰白色泡沫的中间体19(2.45g,83%,顺式/反式93/7)。

[0222] 中间体20



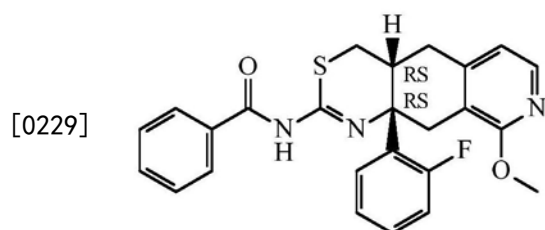
[0224] 遵循与所报导的用于合成中间体6的程序相似的合成程序来制备中间体20。从中间体19(2.8g,9.32mmol)开始,获得中间体20(2.8g,定量的,顺式/反式96/4),并按原样用于下一步骤中。

[0225] 中间体21



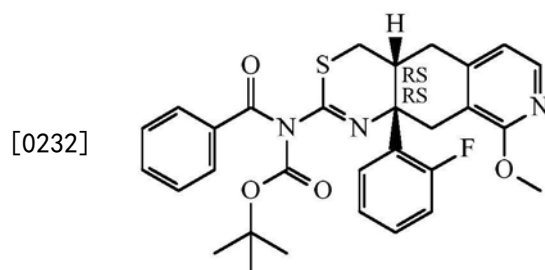
[0227] 遵循与所报导的用于合成中间体7的程序相似的合成程序来制备中间体21。从中间体20 (1.6g, 5.29mmol) 开始, 获得呈白色泡沫的中间体21 (2.22g, 90%, 顺式)。

[0228] 中间体22



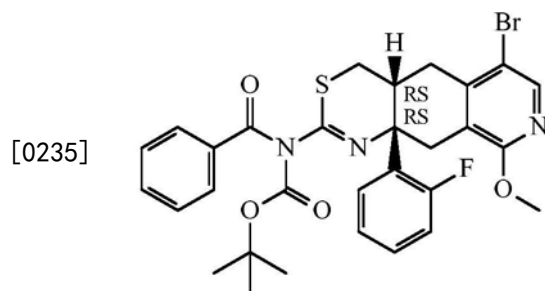
[0230] 遵循与所报导的用于合成中间体8的程序相似的合成程序来制备中间体22。从中间体21 (2.22g, 4.77mmol) 开始, 获得呈白色固体的中间体22 (1.4g, 66%, 顺式)。

[0231] 中间体23



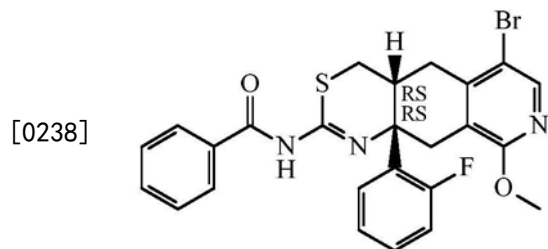
[0233] 向中间体22 (1.5g, 3.4mmol) 在THF (20mL) 中的搅拌混合物中添加BOC-酸酐 (0.9g, 4.1mmol) 和DMAP (0.01g, 0.082mmol), 并且在r. t. 下搅拌反应混合物3h。将反应混合物用饱和水性NaHCO₃溶液 (5mL) 稀释, 分离各层, 并且将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩。通过柱色谱法 (二氧化硅, MeOH/DCM, 0/100至2/98) 纯化残余物, 以得到呈白色固体的中间体23 (1.1g, 60%, 顺式)。

[0234] 中间体24



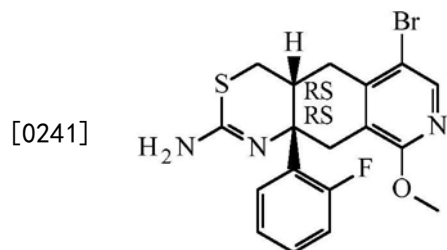
[0236] 向中间体23 (1.1g, 2mmol) 在MeCN (50mL) 中的搅拌悬浮液中分小份添加NBS (0.46g, 2.6mmol)。16h后, 将反应混合物用DCM (0.1L) 和饱和水性NaHCO₃溶液稀释, 并且分离各层。将有机层用盐水处理, 经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩, 以给出固体。通过柱色谱法 (二氧化硅, EtOAc/庚烷, 0/100至50/50) 纯化该粗品, 以得到呈白色固体的中间体24 (0.8g, 64%, 顺式)。

[0237] 中间体25



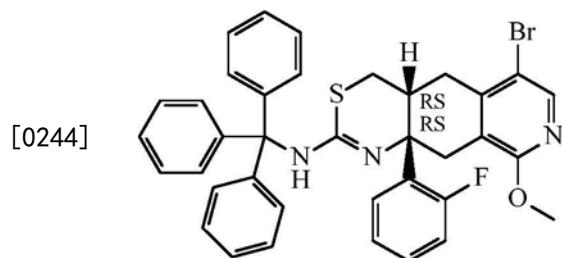
[0239] 将中间体24 (0.8g, 1.3mmol) 在DCM (20mL) 中的搅拌混合物用TFA (1mL, 13mmol) 处理。1h后, 在r. t. 下, 将混合物用饱和水性NaHCO₃溶液稀释直到pH大约为8, 并且分离各层。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以给出呈白色固体的中间体25 (0.67g, 99%, 顺式)。

[0240] 中间体26



[0242] 向中间体25 (0.15g, 0.24mol) 在DCM (5mL) 中的搅拌混合物中添加TFA (1mL, 13mmol)。在10min后, 将反应混合物用DCM (20mL) 和饱和水性NaHCO₃溶液稀释直到碱性pH, 并且分离各层。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩, 以给出油。将该油溶解在MeOH (10mL) 中并且用DBU (0.36mL, 2.4mmol) 处理。将反应混合物在65℃下加热16h, 然后将反应混合物在真空中浓缩, 以得到油。通过快速色谱法 (二氧化硅, 7M氨在MeOH/DCM中, 0/100至4/96) 纯化该油以得到油, 将其用Et₂O研磨。将所得的白色固体干燥 (真空烘箱, 60℃, 1h) 以得到中间体26 (47mg, 47%, 顺式)。

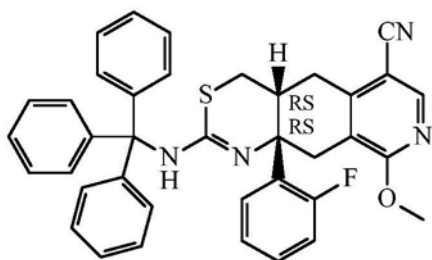
[0243] 中间体27



[0245] 遵循与所报导的用于合成中间体13的程序相似的合成程序来制备中间体27。从中间体26 (0.47g, 1.11mmol) 开始, 获得中间体27 (0.396g, 54%, 顺式)。

[0246] 中间体28

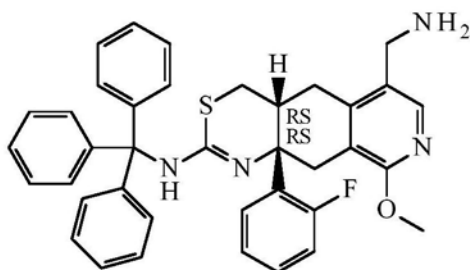
[0247]



[0248] 将微波管用在二甲基乙酰胺 (10mL) 中的三(二苯亚甲基丙酮)二钯(0) (25mg, 0.027mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁 (30mg, 0.053mmol) 填充,并用氮气脱气,然后添加中间体27 (150mg, 0.226mmol)、锌粉 (5mg, 0.076mmol) 和氰化锌 (108mg, 0.9mmol)。将管加帽,并在120℃下加热12h。允许反应混合物冷却,倾倒入冰水 (30mL) 中并用EtOAc (2x20mL) 萃取。将合并的有机层用水 (2x5mL) 处理,经MgSO₄干燥,过滤并在真空中浓缩,以给出棕色固体。通过柱色谱法(二氧化硅, MeOH/DCM, 0/100至1/99)纯化该固体以得到呈白色固体的中间体28 (0.159g, 定量的, 顺式), 将其按原样用于下一步骤中。

[0249] 中间体29

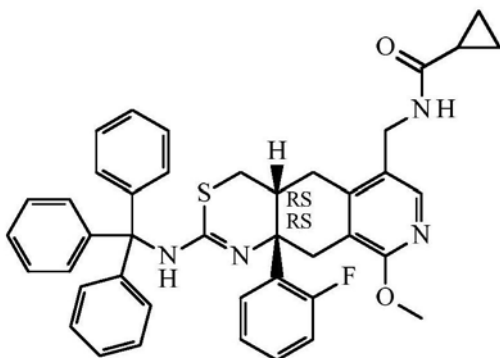
[0250]



[0251] 向中间体28 (0.24g, 0.39mmol) 在THF (10mL) 中的冰冷溶液中滴加氢化铝锂 (2M在THF中, 0.39mL, 0.79mmol)。允许反应混合物达到r.t. 并搅拌16h。然后添加饱和罗谢尔盐溶液 (5mL), 随后添加EtOAc (20mL), 并且分离各层。将水层用EtOAc (3x10mL) 萃取, 并且将合并的有机层用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 并且过滤后在真空中浓缩。然后通过柱色谱法(二氧化硅, 7M氨在MeOH/DCM中, 0/100至5/95)纯化粗材料, 以得到中间体29 (0.14g, 58%, 顺式)。

[0252] 中间体30

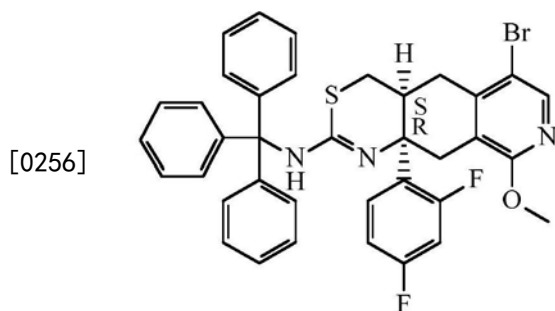
[0253]



[0254] 向中间体29 (0.12g, 0.195mmol)、环丙烷羧酸 (20mg, 0.23mmol) 和三乙胺 (0.1mL, 0.72mmol) 在DCM (20mL) 中的搅拌混合物中一次性添加HBTU (90mg, 0.237mmol)。在r.t. 下搅拌2h后, 将反应混合物用水 (1mL) 稀释并且分离各层。随后将有机层用水 (2mL) 和1M HCl (0.5mL) 处理, 然后用1M NaOH (1mL) 处理。将溶液经MgSO₄干燥, 过滤并在真空中浓缩以得到灰白色固体, 将该灰白色固体通过柱色谱法(二氧化硅, EtOAc/庚烷, 0/100至50/50)进行纯

化以得到呈白色固体的中间体30 (85mg, 64%, 顺式)。

[0255] 中间体31



[0257] 遵循与所报导的用于合成中间体14 (按顺序中间体8a、9、10、11、12、13至14) 的程序相似的合成程序,从中间体8b开始制备中间体31。

[0258] B. 最终化合物的制备

[0259] 实例E1-根据一般程序流动化学制备酰胺化合物

[0260] 在一个容器中,将中间体17 (25mg) 和碱 (例如DIPEA (17 μ L)) 溶解在溶剂 (例如NMP (400 μ L)) 中。在第二个和第三个容器中,将偶联剂 (例如HATU (17.6mg)) 和酸偶联剂 (2当量) 溶解在溶剂 (例如NMP (400 μ L)) 中。在最后的容器中,放置了酸的储备溶液 (例如33% TFA在NMP (2mL) 中)。

[0261] 将前三个容器加载到吉尔森215上并进样到250 μ L进样环中,随后加载到加热至40 $^{\circ}$ C的2mL不锈钢圈上,每个泵以33 μ L/min运行。将酸 (TFA) 溶液加载到0.5mL进样环中,并自动峰匹配到加热至120 $^{\circ}$ C的2mL不锈钢圈上。酸 (TFA) 泵以33 μ L/min运行。流出物通过20 μ L环自动进样到平台的纯化和测定部分中。

[0262] 提及RP HPLC涉及使用制备型HPLC进行纯化的样品。通过冷冻干燥将级分冻干。基于每个样品调节梯度曲线以最大化所需化合物与任何中间体之间的分辨率。

[0263] 制备型HPLC系统由以下组分组成:

[0264] 带有H₂头的吉尔森 (Gilson) 322泵 (0.3至30ml/min)

[0265] 带有半制备流通池的吉尔森155检测器 (0.5mm通路长度)

[0266] 吉尔森819注射器模块

[0267] 吉尔森506系统接口模块

[0268] 吉尔森FC204级分收集器,设置为100x16mm管

[0269] 通过优立博 (Unipoint) 5.11进行控制

[0270] HPLC柱: 菲罗门 (Phenomenex) Luna, 5 μ m C18 (2), 150mm x 21.2mm

[0271] 溶剂A: 含有10mM乙酸铵的HPLC级水 (pH未调节)

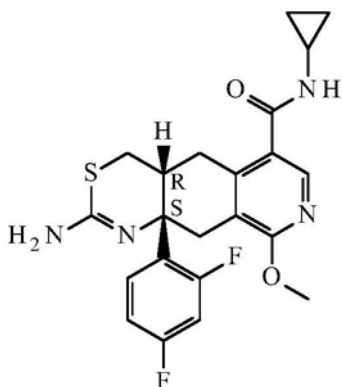
[0272] 溶剂B: HPLC级乙腈

[0273] 检测: 230和260nm

[0274] 温度: 环境温度

[0275] 实例E2-化合物1的制备

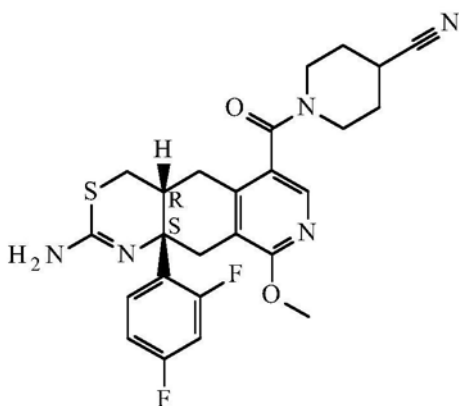
[0276]



[0277] 将中间体18 (135mg, 0.20mmol) 在TFA (6mL) 中在60℃下搅拌1.5h。蒸发TFA并且将有机残余物用Na₂CO₃中和, 然后在DCM与水之间分配。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并通过蒸发浓缩。将其通过柱色谱法 (二氧化硅, MeOH/DCM, 0/100至8/92) 进行纯化, 并且合并含有产物的级分并通过蒸发浓缩。将产物进一步在烘箱中干燥过夜, 以产出化合物1 (52mg, 60%)。

[0278] 实例E3-化合物22的制备

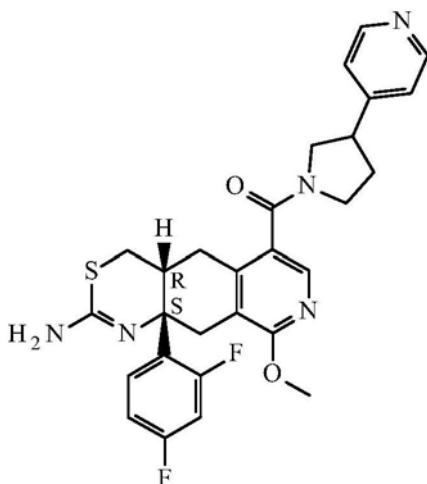
[0279]



[0280] 将中间体15 (100mg, 0.154mmol) 溶解在NMP (300μL) 中, 并且添加N-乙基-N-异丙基丙-2-胺 (81μL, 0.463mmol) 和哌啶-4-甲腈 (17.01mg, 0.154mmol), 随后添加HATU (70.4mg, 0.185mmol)。允许将反应静置10min, 然后通过LCMS分析, 并发现反应完成。添加2,2,2-三氟乙酸 (151μL, 1.975mmol) 并将混合物在120℃下加热20min。将混合物倾倒入水中并且用DCM萃取。将有机相收集, 过滤并蒸发以给出胶质, 将该胶质通过RP HPLC (溶剂B-最小10%, 中间体55%, 最大95%) 进行纯化以给出呈白色固体的化合物22 (21.6mg, 28%)。

[0281] 实例E4-化合物26的制备

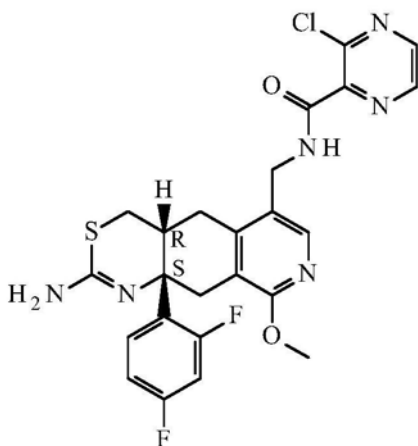
[0282]



[0283] 将中间体15 (100mg, 0.154mmol) 溶解在NMP (300 μ L) 中, 并且添加N-乙基-N-异丙基丙-2-胺 (100mg, 0.772mmol) 和4-(吡咯烷-3-基) 吡啶 (22.88mg, 0.154mmol), 随后添加HATU (70.4mg, 0.185mmol)。允许将反应静置10min, 然后通过LCMS分析, 并发现反应完成。将混合物倾倒入水中并且用DCM萃取。将有机相收集, 过滤并蒸发以给出胶质。添加2,2,2-三氟乙酸 (151 μ L, 1.975mmol) 并将混合物在120 $^{\circ}$ C下加热20min。将混合物倾倒入水中并且用DCM萃取。将有机物干燥, 过滤并蒸发以给出胶质, 将该胶质通过RP HPLC (溶剂B-最小10%, 中间体60%, 最大95%) 进行纯化以给出呈白色固体的化合物26 (14.1mg, 17%)。

[0284] 实例E5-化合物48的制备

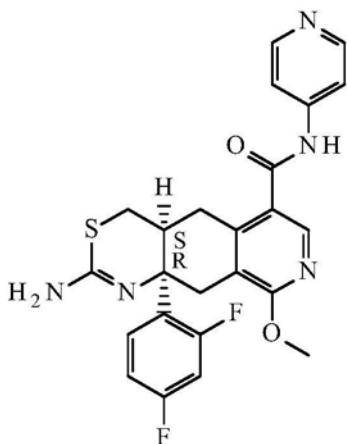
[0285]



[0286] 将中间体17 (50mg, 0.079mmol) 溶解在NMP (300 μ L) 中, 并且添加N-乙基-N-异丙基丙-2-胺 (41.3 μ L, 0.237mmol) 和3-氯吡啶-2-羧酸 (13.78mg, 0.087mmol), 随后添加HATU (36.1mg, 0.095mmol)。允许将反应静置10min, 然后通过LCMS分析, 并发现反应完成。添加2,2,2-三氟乙酸 (151 μ L, 1.975mmol) 并将混合物在120 $^{\circ}$ C下加热20min。将混合物倾倒入水中并且用DCM萃取。将有机物干燥, 过滤并蒸发以给出胶质, 将该胶质通过RP HPLC (溶剂B-最小10%, 中间体55%, 最大95%) 进行纯化以给出呈白色固体的化合物48 (10mg, 24%)。

[0287] 实例E6-化合物4的制备

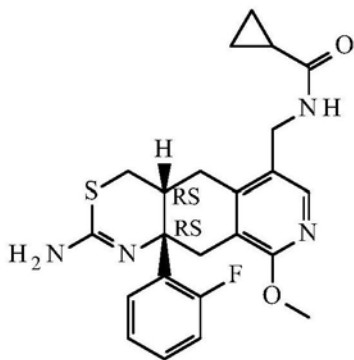
[0288]



[0289] 在50℃下,在Sigma-Aldrich®微反应器(V=1mL,Rt=5min)中混合,将中间体31(33.8mg,0.05mmol)和4-氨基吡啶(5.2mg,0.055mmol)在1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(440mL)和THF(220μL)(0.150ml/min)以及LHDMS(1.0M在THF中,220μL,0.22mmol)(0.050ml/min)中的两种溶液用两个注射器泵进行泵送。然后将TFA(880μL,11.5mmol)添加到粗混合物中并且在微波辐射下在120℃下加热5min。将溶剂在真空中蒸发以产出粗品,将该粗品通过RP HPLC(固定相:C18 Sunfire 30x100mm 5μm,流动相:梯度从在水中的80%0.1%TFA溶液,20%CH₃CN至在水中的0%0.1%TFA溶液,100%CH₃CN)进行纯化以产出化合物4(11mg,43%)。

[0290] 实例E7-化合物29的制备

[0291]

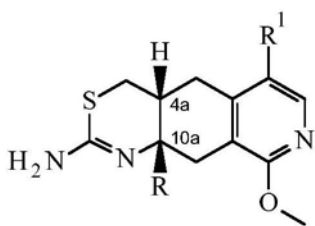


[0292] 将中间体30(0.085g,0.012mmol)在MeOH(7mL)和乙酸(7mL)中的搅拌混合物在80℃下加热16h。将反应混合物在真空中浓缩,然后用DCM(20mL)稀释并且用饱和水性Na₂CO₃(2mL)处理。分离各层,并且将有机层经MgSO₄干燥,过滤并浓缩以给出油,将该油通过柱色谱法(4g Redisep快速柱,0-10%7NNH₃/MeOH在DCM中的梯度)进行纯化以得到呈白色固体的化合物29(0.032g,59%)。

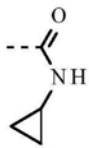
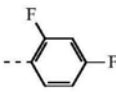
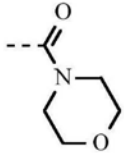
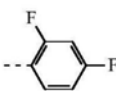
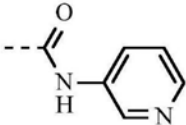
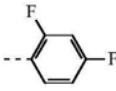
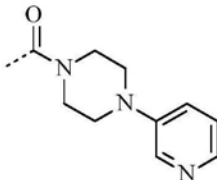
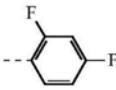
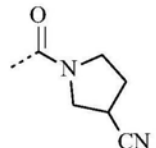
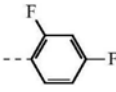
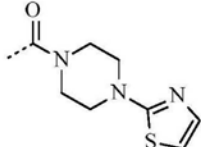
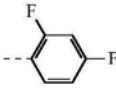
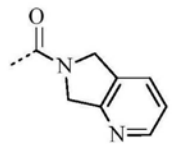
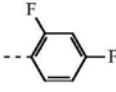
[0293] 下表1和2列出了通过类似于上述实例(由实例编号指示)之一例示的(*实例编号)和制备的具有式(I)和(II)的化合物。在没有指明盐形式的情况下,该化合物作为游离碱获得。‘Ex.No.’是指合成该化合物所依据的方案的实例编号。‘Co.No.’意指化合物编号。

[0294] 表1.具有式(I)的化合物为C_{4a}(R)、C_{10a}(S)构型

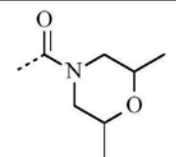
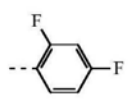
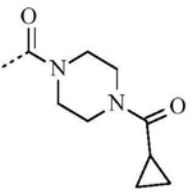
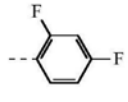
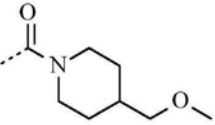
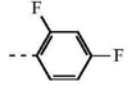
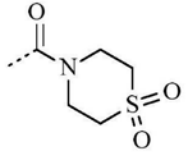
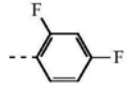
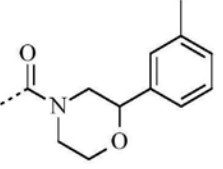
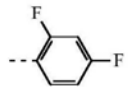
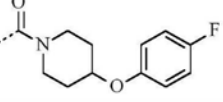
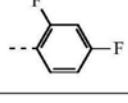
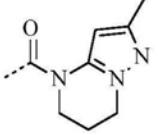
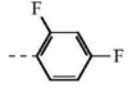
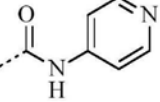
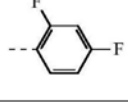
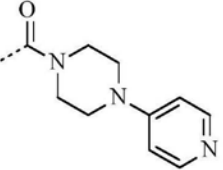
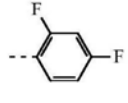
[0295]



[0296]

化合物编号 (Co. No.)	实例编号	R ¹	R	盐形式
1	*E2			
1a				.TFA
2	E2			
2a				.TFA
3	E2			
5	E3			
6	E3			
7	E3			
8	E3			

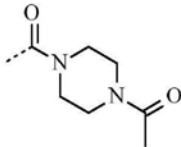
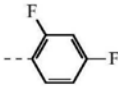
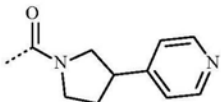
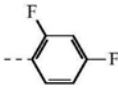
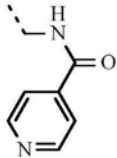
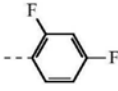
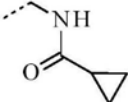
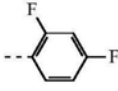
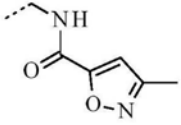
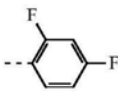
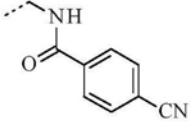
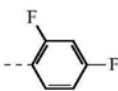
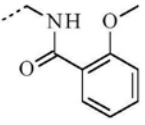
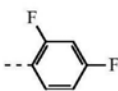
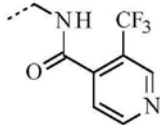
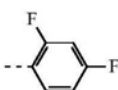
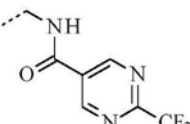
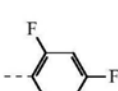
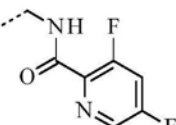
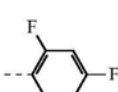
[0297]

化合物编号 (Co. No.)	实例编号	R ¹	R	盐形式
9	E3	 顺式或反式		
10	E3			
11	E3			
12	E3			
13	E3			
14	E3			
15	E3			
16	E3			
17	E3			

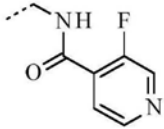
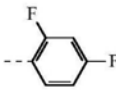
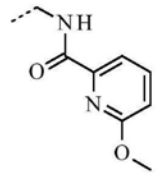
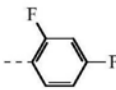
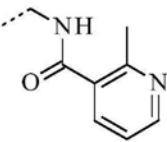
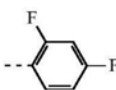
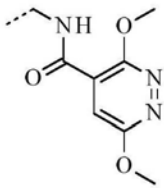
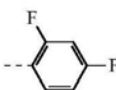
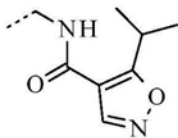
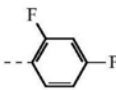
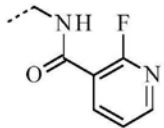
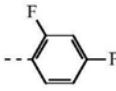
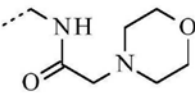
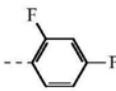
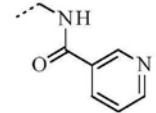
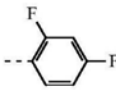
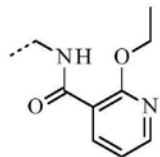
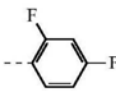
[0298]

化合物编号 (Co. No.)	实例编号	R ¹	R	盐形式
18	E3			
19	E3			
20	E3			
21	E3			
22	*E3			
23	E3			
24	E3			
25	E3			
26	*E6			

[0299]

化合物编号 (Co. No.)	实例编号	R ¹	R	盐形式
27	E3			
28	E1			
30	E11			.TFA
31	E1			
31a				.TFA
32	E26			
32a				.TFA
33	E1			
34	E1			
35	E1			
36	E1			
37	E1			

[0300]

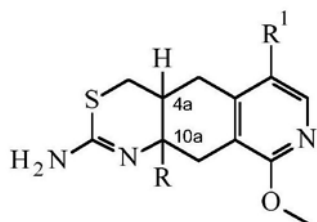
化合物编号 (Co. No.)	实例编号	R ¹	R	盐形式
38	E1			
39	E1			
40	E1			
41	E1			
42	E1			
43	E1			
44	E1			
45	E1			
46	E1			

[0301]

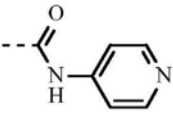
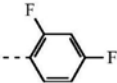
化合物编号 (Co. No.)	实例编号	R ¹	R	盐形式
47	E1			
48	*E5			
49	E1			
50	E1			
51	E1			

[0302] 表2. 具有式 (I) 和 (II) 的化合物

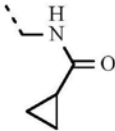
[0303]



[0304]

化合物编号 (Co. No.)	实例编号	R ¹	R	立体构型/盐
4	*E6			C _{4a} (S); C _{10a} (R) 单一非对映异构体 纯对映体/ .TFA

[0305]

化合物编号 (Co. No.)	实例编号	R ¹	R	立体构型/盐
29	*E7			C _{4a} (RS); C _{10a} (RS) 单一非对映异构体顺式, 外 消旋混合物

[0306] C. 分析部分

[0307] LCMS (液相色谱法/质谱法)

[0308] LCMS一般程序

[0309] 使用LC泵、二极管阵列 (DAD) 或UV检测器以及如在对应的方法中所指定的柱进行高效液相色谱法 (HPLC) 测量。如果必要的话, 包括另外的检测器 (参见以下方法表)。

[0310] 将来自柱的流带至配置有大气压离子源的质谱仪 (MS)。设置调谐参数 (例如扫描范围、停留时间) 以便获得允许鉴别化合物的标称单一同位素分子量 (MW) 的离子是在技术人员知识内。使用适当的软件进行数据采集。

[0311] 通过其实验保留时间 (R_t) 和离子描述化合物。如果未在数据表中不同地指定, 那么报道的分子离子对应于 [M+H]⁺ (质子化的分子) 和/或 [M-H]⁻ (去质子的分子)。对于具有多种同位素模式的分子 (例如Br、Cl) 来说, 报道的值是针对最低同位素质量获得的值。获得的所有结果具有与使用的方法通常相关的实验不确定性。

[0312] 表3: LCMS方法代码 (以mL/min表示流速; 以℃表示柱温度 (T); 以分钟表示运行时间)

[0313]

方法代码	仪器	柱	流动相	梯度	流速 ----- 柱温度	运行时间
------	----	---	-----	----	--------------------	------

[0314]

1	沃特斯： Alliance®-DAD -ZQ 和 ELSD 2000 阿尔泰克 (Alltech)	沃特斯： Xterra MS C18 (3.5 μm, 4.6*100 mm)	A: 25 mM CH ₃ COONH ₄ 在 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 中 B: CH ₃ CN C: CH ₃ OH D: (40% CH ₃ CN 和 40% CH ₃ OH 以及含有 0.25% CH ₃ COOH 的 20% H ₂ O)	6.5 min 内从 100% A 至 1% A、49% B 和 50% C, 0.5 min 内至 1% A 和 99% B, 1 min 内至 100% D, 保持 1.0 min, 0.5 min 内至 100% A 并保 持 1.5 min。	1.6 ----- 40	11
1	沃特斯： Acquity® UPLC®-DAD 和 SQD	沃特斯： HSS T3 (1.8 μm, 2.1*100 mm)	A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ 在 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 中 B: CH ₃ CN	2.10 min 内从 100% A 至 5% A, 0.90 min 内至 0% A, 0.5 min 内至 5% A	0.7 ----- 55	3.5
2	沃特斯： Acquity® UPLC®-DAD 和 SQD	沃特斯： BEH C18 (1.7 μm, 2.1*50 mm)	A: 10 mM CH ₃ COONH ₄ 在 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 中 B: CH ₃ CN	1.3 min 内从 95% A 至 5% A, 保持 0.7 min。	0.8 ----- 55	2
3	沃特斯： Acquity® IClass UPLC® -DAD 和 Xevo G2-S QTOF	沃特斯： CSH™ C18 (1.7 μm, 2.1x50 mm)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ 6.5mM + 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	4.6 min 内从 95% A 至 5% A, 保持 0.4 min	1 ----- 50	5

[0315] 熔点

[0316] 值是峰值或熔融范围,并且所获得的值具有通常与这种分析方法相关的实验不确定性。

[0317] 对于多种化合物,熔点是用DSC823e (梅特勒-托利多 (Mettler-Toledo)) 来确定的。使用30℃/分钟的温度梯度来测量熔点。最高温度是400℃。

[0318] 表4. 分析数据- R_t 意指保留时间 (以分钟计), $[M+H]^+$ 意指该化合物的质子化质量,方法是指用于 (LC) MS的方法。

[0319]

化合物编号 (Co. No.)	R_t	$[M+H]^+$	方法	熔点
1	1.59	445	1	n.d.
2	0.81	475	2	n.d.
3	0.84	482	2	n.d.
4	1.80	482.1	3	n.d.
5	5.17	551.62	3	n.d.
6	5.02	484.53	3	n.d.
7	5.56	557.65	3	n.d.
8	5.05	508.55	3	n.d.
9	5.34	503.58	3	n.d.
10	5.08	542.61	3	n.d.
11	5.49	517.60	3	n.d.
12	5.03	523.59	3	n.d.
13	6.64	565.65	3	n.d.
14	6.68	583.64	3	n.d.
15	3.86	525.59	3	n.d.
16	5.19	482.52	3	n.d.
17	4.45	551.62	3	n.d.
18	4.96	510.57	3	n.d.
19	5.1	501.56	3	n.d.
20	5.57	473.55	3	n.d.
21	4.91	496.54	3	n.d.
22	5.21	498.56	3	n.d.
23	5.33	503.58	3	n.d.
24	6.39	580.66	3	n.d.
25	6.3	565.65	3	n.d.
26	5.04	536.61	3	n.d.
27	4.67	516.58	3	n.d.
29	1.47	441	1	n.d.
30	0.83	496	2	n.d.
31a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33	5.57	520.57	3	n.d.
34	5.66	525.58	3	n.d.
35	5.32	564.54	3	n.d.

[0320]

化合物编号 (Co. No.)	R _t	[M+H] ⁺	方法	熔点
36	5.93	565.53	3	n.d.
37	5.45	532.53	3	n.d.
38	5.02	514.53	3	n.d.
39	5.83	526.57	3	n.d.
40	4.85	510.57	3	n.d.
41	5.46	557.58	3	n.d.
42	6.01	528.59	3	n.d.
43	5.06	514.53	3	n.d.
44	4.71	518.59	3	n.d.
45	4.82	496.54	3	n.d.
46	5.83	540.60	3	n.d.
47	5.81	526.57	3	n.d.
48	5.18	531.98	3	n.d.
49	5.49	557.58	3	n.d.
50	4.97	497.53	3	n.d.
51	5.93	536.57	3	n.d.

[0321] n.d. 意指未确定; b.r. 意指宽范围

[0322] NMR

[0323] 对于多种化合物, 在以400MHz操作的Bruker DPX-400光谱仪上, 或在以360MHz操作的Bruker DPX-360光谱仪上, 或在以600MHz操作的光谱仪上, 使用氯仿-d (氘化的氯仿, CDCl₃) 或DMSO-d₆ (氘化的DMSO, 二甲基-d₆亚砜) 作为溶剂记录¹H NMR谱。将化学位移 (δ) 报告为相对于四甲基硅烷 (TMS) (用作内部标准) 的百万分率 (ppm)。

[0324] 表5. ¹H NMR结果

[0325]

化合物编号 (Co. No.)	¹ H NMR 结果
2	¹ H NMR (360 MHz, 氯仿- <i>d</i>) δ ppm 2.80 - 3.45 (m, 10 H) 3.53 - 3.87 (m, 7 H) 3.93 (s, 3 H) 6.79 - 6.94 (m, 2 H) 7.29 - 7.38 (m, 1 H) 7.87 (s, 1 H)
4*	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2.90 - 3.43 (m, 7 H) 3.96 (s, 3 H) 7.22 - 7.33 (m, 2 H) 7.39 - 7.50 (m, 1 H) 8.17 (d, <i>J</i> =6.82 Hz, 2 H) 8.48 (s, 1 H) 8.76 (d, <i>J</i> =6.83 Hz, 2 H) 8.91 (br. s, 1 H) 9.54 (br. s, 1 H) 10.96 (br. s., 1 H) 11.66 (s, 1 H)

[0326] *硫代脒基团被质子化

[0327] D. 药理学实例

[0328] 在本发明中提供的化合物是β-位点APP-裂解酶1 (BACE1) 的抑制剂。BACE1 (天冬氨酸蛋白酶) 的抑制被认为是与阿尔茨海默病 (AD) 的治疗有关的。来自β-淀粉样前体蛋白

(APP)的 β -淀粉样蛋白肽(AB)的产生和累积被认为在AD的发作和进展中发挥关键作用。通过在AB结构域的N末端和C末端分别由 β 分泌酶和 γ -分泌酶引起连续裂解而从淀粉样前体蛋白(APP)产生A β 。

[0329] 具有式(I)的化合物凭借它们抑制酶活性的能力而被预期基本上对BACE1具有作用。使用下文描述的并且适于此类化合物(并且更具体地,根据式(I)的化合物)的鉴定的基于生物化学荧光共振能量转移(FRET)的测定和SKNBE2细胞中的细胞 α Lisa测定而测试的此类抑制剂的行为示于表8和表9中。

[0330] 基于BACE1生物化学FRET的测定

[0331] 该测定是基于荧光共振能量转移测定(FRET)的测定。用于该测定的底物是含有淀粉样前体蛋白(APP) β -分泌酶裂解位点的‘瑞典(Swedish)’Lys-Met/Asn-Leu突变的APP源的13个氨基酸的肽。该底物还含有两个荧光团:(7-甲氧基香豆素-4-基)乙酸(Mca)是具有320nm的激发波长和405nm的发射波长的荧光供体并且2,4-二硝基苯基(Dnp)是专有的猝灭剂受体。已选择这两个基团之间的距离,以使得在光激发后,供体荧光能量通过共振能量转移被受体显著地猝灭。在被BACE1裂解后,荧光团Mca与猝灭基团Dnp分离,恢复供体的全荧光产额。荧光的增加与蛋白水解速率线性相关。

[0332] 简言之,在384孔规格中,在化合物或DMSO的存在下,将0.04 μ g/ml最终浓度的重组BACE1蛋白在室温下与20 μ M底物一起在孵育缓冲液(pH 5.0的50mM柠檬酸盐缓冲液,0.05%PEG)中孵育450分钟。接下来,通过在不同孵育时间(0、30、60、90、120和450min)处的荧光测量(在320nm处激发并且在405nm处发射)而直接测量蛋白水解的量。对于每个实验,使用时间曲线(在0min与120min之间的每30min)来确定我们发现高对照的最低基础信号的时间。使用该时间(Tx)的信号减去在450min处的信号。结果以RFU表示为在T450与Tx之间的差异。

[0333] 通过最小二乘法根据对照最小%对化合物浓度图拟合最佳拟合曲线。由此可以获得IC₅₀值(引起50%活性抑制的抑制浓度)。

[0334] LC=低对照值的中值

[0335] =低对照:没有酶的情况下的反应

[0336] HC=高对照值的中值

[0337] =高对照:有酶的情况下的反应

[0338] 作用% = $100 - [(样品 - LC) / (HC - LC) * 100]$

[0339] 对照% = $(样品 / HC) * 100$

[0340] 对照最小% = $(样品 - LC) / (HC - LC) * 100$

[0341] 以下示例性化合物基本上如以上所述地进行测试并且展现以下活性:

[0342] 表6.

[0343]

化合物 编号	基于生物 化学 FRET 的测定 pIC ₅₀
1	7.12
1a	7.18
2	6.66
2a	6.62
3	7.12
22	6.89
28	7.69
30	7.53
30a	7.18
31	7.09
31a	6.95
32	6.96
32a	6.74
48	7.66

[0344] SKNBE2细胞中的细胞αLisa测定

[0345] 在两个αLisa测定中,对产生并分泌到人神经母细胞瘤SKNBE2细胞的培养基中的总Aβ和Aβ1-42水平进行定量。该测定是基于表达野生型淀粉样前体蛋白(hAPP695)的人神经母细胞瘤SKNBE2。将这些化合物稀释并且添加到这些细胞中,孵育18小时,然后进行Aβ1-42和总Aβ的测量。通过夹心αLisa测量总Aβ和Aβ1-42。αLisa是针对总Aβ和Aβ1-42的检测分别使用附接到链霉亲和素包被的珠球上的生物素化抗体AbN/25和偶联受体珠球的抗体Ab4G8或cAb42/26的夹心测定。在总Aβ或Aβ1-42的存在下,这些珠球紧密靠近。供体珠球的激发引起单线态氧分子的释放,这触发受体珠球中的级联能量转移,从而导致光发射。在孵育1小时之后测量光发射(在650nm处激发并且在615nm处发射)。

[0346] 通过最小二乘法根据对照最小%对化合物浓度图拟合最佳拟合曲线。由此可以获得IC₅₀值(引起50%活性抑制的抑制浓度)。

[0347] LC=低对照值的中值

[0348] =低对照:在没有化合物的情况下预孵育细胞,在αLisa中没有生物

[0349] 素酰化的Ab

[0350] HC=高对照值的中值

[0351] =高对照:在没有化合物的情况下预孵育的细胞

[0352] 作用% = $100 - [(样品 - LC) / (HC - LC) * 100]$ [0353] 对照% = $(样品 / HC) * 100$ [0354] 对照最小% = $(样品 - LC) / (HC - LC) * 100$

[0355] 以下示例性化合物基本上如以上所述地进行测试并且展现以下活性:

[0356] 表7.

[0357]

化合物 编号	SKNBE2 细胞 中的细胞 α Lisa 测定 A β 42 pIC ₅₀	SKNBE2 细胞 中的细胞 α Lisa 测定 总 A β pIC ₅₀
1	8.02	
1a	7.72	7.64
2	7.32	
2a	7.33	7.3
3	7.25	
22	7.07	
28	7.54	
30	7.31	
30a	7	7.09
31	7.48	
31a	7.39	7.36
32	7.41	
32a	7.07	7.02
48	7.78	

[0358] 基于BACE2生物化学FRET的测定

[0359] 该测定是基于荧光共振能量转移测定 (FRET) 的测定。用于该测定的底物包含淀粉样前体蛋白 (APP) β -分泌酶裂解位点的‘瑞典’ Lys-Met/Asn-Leu突变。该底物还含有两个荧光团：(7-甲氧基香豆素-4-基) 乙酸 (Mca) 是具有320nm的激发波长和405nm的发射波长的荧光供体并且2,4-二硝基苯基 (Dnp) 是专有的猝灭剂受体。已选择这两个基团之间的距离, 以使得在光激发后, 供体荧光能量通过共振能量转移被受体显著地猝灭。在被 β -分泌酶裂解后, 荧光团Mca与猝灭基团Dnp分离, 恢复供体的全荧光产额。荧光的增加与蛋白水解速率线性相关。

[0360] 简言之, 在384孔规格中, 在化合物不存在或存在下, 将0.4 μ g/ml最终浓度的重组BACE2蛋白在室温下与10 μ M底物一起在孵育缓冲液 (pH 5.0的50mM柠檬酸盐缓冲液, 0.05% PEG, 无DMSO) 中孵育450分钟。接下来, 通过在T=0和T=450处的荧光测量 (在320nm处激发并且在405nm处发射) 而直接测量蛋白水解的量。结果以RFU (相对荧光单位) 表示为T450与T0之间的差异。

[0361] 通过最小二乘法根据对照最小%对化合物浓度图拟合最佳拟合曲线。由此可以获得IC₅₀值 (引起50%活性抑制的抑制浓度)。

[0362] LC=低对照值的中值

[0363] =低对照: 没有酶的情况下的反应

[0364] HC=高对照值的中值

[0365] =高对照: 有酶的情况下的反应

[0366] 作用% = $100 - [(样品 - LC) / (HC - LC) * 100]$

[0367] 对照% = (样品/HC) * 100

[0368] 对照最小% = (样品-LC) / (HC-LC) * 100

[0369] 以下示例性化合物基本上如以上所述地进行测试并且展现以下活性：

[0370] 表8.

[0371]

化合物 编号	基于生物化学 FRET 的测定 pIC ₅₀
1	6.77
1a	6.78

[0372]

化合物 编号	基于生物化学 FRET 的测定 pIC ₅₀
2	5.82
2a	5.84
3	6.55
22	5.96
28	6.01
30	6.45
30a	6.16
31	6.98
31a	6.9
32	6.51
32a	6.23
48	6.7

[0373] 生化测定-自动的

[0374] 通用方法

[0375] 除非另外指明, 否则所有生物化学品均购自英国多塞特郡普尔的西格玛-奥德里奇化学公司 (Sigma-Aldrich Chemical Company, Poole, Dorset, U.K.) 并且分析级或更高级的非水性溶剂均购自英国拉夫堡的赛默飞世尔科技公司 (ThermoFisher Scientific, Loughborough, U.K.)。将MilliQ水 (Elix 5&MilliQ梯度; 默克密理博公司 (Merck Millipore)) 用作碱性水性溶剂以构成生物缓冲液。通过将50mM柠檬酸溶液 (1.00244; 默克生物科学公司 (Merck Biosciences)) 添加到50mM柠檬酸三钠 (1.06448; 默克生物科学公司) 的搅拌溶液中直至达到5.0的最终pH来制备碱测定缓冲液。向其中加入40%的聚乙二醇 (“PEG”) 溶液 (P1458; 西格玛-奥德里奇公司) 至最终浓度为0.05%; 因此, 碱缓冲液包含50mM柠檬酸钠 (pH 5.0, 含有0.05% PEG)。所有测定通常在384孔测定板 (科斯塔尔4514; 康宁生命科学公司 (Corning Life Sciences)) 中进行, 并在37°C ± 1°C下孵育60min, 然后读取终点荧光强度。将基于 (7-甲氧基香豆素-4-基) 乙酸的底物β-分泌酶底物VI (M2465;

Bachem公司)制备为在100%DMSO(D/4121/PB08;赛默飞世尔公司)中的1mM储备液。通过将DMSO添加到碱缓冲液中至最终浓度为1%(vol./vol.)来制备测定缓冲液。 β -分泌酶I(18.64 μ M;“BACE1”)和 β -分泌酶II(4.65 μ M;“BACE2”)获得自比利时比尔斯的杨森制药有限公司(Janssen Pharmaceutica,Beerse,Belgium),并且以冷冻等分试样(约20 μ l)储存并根据需要解冻。

[0376] 手动测定

[0377] 典型地,将12.5 μ l的测定缓冲液分配到测定板的行B至P。向行A中添加18.75 μ l的适当稀释在测定缓冲液中的测试化合物。将6.25 μ l等分试样的样品从行A转移至行B,并且通过移液管将样品混合三次。向下沿着板重复该过程,并在混合后丢弃在行N的6.25 μ l的溶液。行O和P被指定为阳性和阴性对照。向行P中添加6.25 μ l碱缓冲液。向行A至O中添加在碱缓冲液中稀释的6.25 μ l酶(新鲜制备的40nM BACE1或40nM BACE2)。为了开始测定,将6.25 μ l新鲜制备的80 μ M底物(通过将在100%DMSO中的1mM溶液稀释到HPLC级水(Optima W6-212;赛默飞世尔公司)中来制备)添加到所有孔中。将测定板覆盖并在37 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C下孵育60min。使用每孔九个读数方案(50ms积分;密度为3mm、0.25mm间距;SpectraMAX范例读板器;TUNE筒柱;SoftMax Pro v 6.3软件;英国分子设备有限公司(Molecular Devices UK Ltd.),沃金厄姆,伯克郡,英国)在360/405nm(激发/发射)处读取孔的荧光强度,并输出九个读数的中值作为文本文件。使用供应商提供的非线性回归分析模型,使用Prism软件v 6.3(GraphPad公司,圣地亚哥,加利福尼亚州,美国)进行数据分析。对于IC₅₀测定,使用四参数逻辑可变斜率模型来拟合原始荧光强度数据,其中“底部”固定到阴性对照。

[0378] 自动生物测定硬件

[0379] Cycl0ps生物测定模块由级分收集站、试剂站、液体处理机器人、板存储器和集成读板器(SpectraMAX范例,TUNE筒柱,SoftMax Pro v 6.3;分子设备公司)组成。级分收集站由安装在H型门架(费斯托有限公司(Festo AG&Co.KG),埃斯林根,德国)上的384孔收集板(P-384-240SQ-C;爱思进公司(Axygen),联合市,加利福尼亚州,美国)、注射器驱动器和安装有200 μ l环(VICI AG国际公司,申克市,瑞士)的双向六端口进样阀组成。进样阀的输出可以对384孔收集板的所有位置进行寻址。试剂站由液压冷却的(10 $^{\circ}$ C–12 $^{\circ}$ C)铝段组成;每个试剂站被制造用于容纳SBS微量滴定板的足迹。独立的可寻址试剂站被容纳在这些部分内。如果需要,将定制铝壳用于容纳标准实验室塑料器皿(例如埃彭道夫管、猎鹰管(Falcon tubes)等)。当需要时,将试剂储存器覆盖并且盖子含有孔,通过这些孔包被有特氟龙(Teflon)的探针可以进入溶液。液体处理系统中存在的试剂是:

[0380] • 包含在有盖试剂储存器(390007;波富尔科学有限公司(Porvair Sciences Ltd.),莱瑟黑德,英国)中的探针洗涤溶液(约150ml;33.3:33.3:33.3水:丙-2-醇(P/7508/17;赛默飞世尔公司):甲醇(M/4058/17;赛默飞世尔公司)。

[0381] • 测定缓冲溶液

[0382] • HPLC级水

[0383] • 将40nM BACE1稀释在5ml埃彭道夫管(0030 119.401;埃彭道夫)中所含的碱缓冲液中

[0384] • 将400nM BACE2稀释在1.5ml埃彭道夫管(0030 000.919;埃彭道夫)中所含的25mM tris(648311;默克生物科学公司,诺丁汉,英国,pH 7.5,含有100mM氯化钠和20%甘

油(16374;USB公司,克利夫兰,俄亥俄州,美国))中

[0385] • 在1.5ml埃彭道夫管中含有在100%DMSO中的1mM底物(保持在环境温度下)

[0386] • 两个空的1.5ml埃彭道夫管

[0387] 液体处理系统由LISSY系统(Zinsser分析股份有限公司(Zinsser Analytik GmbH),法兰克福,德国)组成,配备有夹臂和单个特氟龙包被的不锈钢探针。在每个液体处理步骤之间,用探针洗涤溶液洗涤特氟龙包被的不锈钢探针,随后用系统液体(水)洗涤。使用WinLISSY软件(Zinsser分析股份有限公司)和SoftMax Pro(其在WinLISSY自动化命令控制下)实现生物测定系统的控制。板存储器容纳有一叠测定板(科斯塔尔4514)。输入和输出继电器实现了生物测定模块和Cycl0ps控制软件之间的触点闭合控制和反馈。板存储器是容纳有一叠测定板的铝架,其可以通过液体处理系统进入。

[0388] 自动生物测定方法

[0389] 稀释模块的输出流过设置在“负载”位置的收集站进样阀。将WinLISSY设置为输入轮询模式,通过Cycl0ps控制软件的触点闭合启动了生物测定方案。第一个动作将进样阀触发到“进样”位置,隔离了环内容物,并且级分收集系统将环内容物分配到收集板上的可寻址孔中。同时,液体处理系统将测定板递送到液体处理床上的测定站。向下沿着从行B到行P的两列测定板,液体处理系统将12.5 μ l测定缓冲液分配到测定板的柱上。向行A中添加18.75 μ l的来自收集板各孔的测试化合物。将来自行A的6.25 μ l等分试样的样品转移到行B。向下沿着板对这两个柱重复该过程,并且丢弃在行N的6.25 μ l试剂。行O和P被指定为阳性和阴性对照。向行P中添加6.25 μ l测定缓冲液。向第一列的行A至O中添加储存在碱缓冲液中的6.25 μ l 40nM BACE1。对于BACE2酶添加,用157.5 μ l碱缓冲液稀释17.5 μ l的400nM BACE2。通过在指定的接收埃彭道夫管中移取175 μ l的溶液五次来进行混合,然后将6.25 μ l稀释的BACE2添加到各自的柱中。对于MCA底物,用385 μ l HPLC水稀释在100%DMSO中的30.8 μ l的1mM MCA底物。通过在指定的接收埃彭道夫管中移取400 μ l五次来进行混合,然后将6.25 μ l添加到各自的柱中。然后将测定板转移到读板器架,关闭抽屉并启动测定孵育。在60min后,WinLISSY执行了子程序,该子程序指示读板器加载并执行读取荧光强度的方案文件。该方案文件包含读取微量滴定板并将相应的数据写为文本文件所需的参数。使用每孔九个读数方案(50ms积分;密度为3mm、0.25mm间距)在360/405nm(激发/发射)处读取荧光强度,并输出九个读数的中值作为文本文件。

[0390] Cycl0ps生物测定数据分析

[0391] 将Cycl0ps软件设置为轮询生物测定共享数据文件夹。在保存数据时,WinLISSY发送了输出触点闭合信号,通知Cycl0ps软件该生物测定已经完成。Cycl0ps软件打开、处理并分析数据。数据处理的组成:将各自浓度的测试物品附加到相应的行(其中数据接收自稀释模块)。此后,通过采用四参数逻辑模型的非线性回归分析来分析数据(MATLAB;迈斯沃克公司(MathWorks),剑桥,英国)以确定IC₅₀。跨度固定在基线(即行P)和最大观察到的阳性对照率(即行O)之间。为了保持数据质量,建立了规则来管理自动生物测定数据分析。在第一种情况下,如果观察到不低于百分之七十五的活性或不高于百分之二十五的活性,则拒绝数据。这确保了有足够的滴定数据用于进行良好的分析。此后,通过R平方值判断拟合的质量。如果该值低于0.85,则数据被拒绝。在所有情况下,拒绝导致向系统报告的生物测定失败标签。如前所述(Motulsky,H.J.和Brown,R.E.,(2006),BMC Bioinformatics[BMC生物

信息学], 7, 123) 进行异常值分析, 其中Q值为10%。对于自动IC₅₀分析, 在生成拟合标记错误之前, 最多可以排除三个异常值。生物测定数据的交叉验证通过使用Prism软件v 6.3 (GraphPad公司) 对其进行分析来实现, 其采用非线性回归分析四参数逻辑可变斜率模型来拟合原始荧光强度数据, 其中“底部”固定到阴性对照。

[0392] 表9.

[0393]

化合物 编号 (Co. No.)	自动测定 BACE1 pIC ₅₀	自动测定 BACE2 pIC ₅₀
1a	7.4	7.14
2a	7.24	6.49
5	6.84	6.49
6	7.25	6.55
7	6.49	6.06
8	6	5.45
9	6.44	5.67
10	6.31	5.84
11	6.81	6.11
12	6.3	6.08
13	7.16	6.51
14	7.96	7.41
16	7.27	6.86
17	6.8	5.625
18	8.07	7.52
19	7.73	6.93
20	7.3	6.71
21	6.95	6.49
22	7.46	6.45
23	7.21	6.49
24	7.21	7.2
25	7.83	7.055
26	7.805	6.295
27	6.02	5.38
30a	7.38	6.33
31a	7.15	7.06
32a	7.2	6.76
33	7.24	6.75
34	6.66	6.27
35	6.86	6.14

[0394]

化合物 编号 (Co. No.)	自动测定 BACE1 pIC ₅₀	自动测定 BACE2 pIC ₅₀
36	7.66	7.44
37	7.6	7.15
38	7.72	6.94
39	6.74	6.41
40	6.95	6.73
41	7.1	6.29
42	7.13	6.86
43	7.68	7.01
44	7.38	7.1
45	8.07	7.53
46	7.44	6.39
47	7.59	6.68
48	7.915	7.14
49	7.46	6.75
50	6.94	6.51