(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114008033 B
(45)授权公告日 2025.01.10

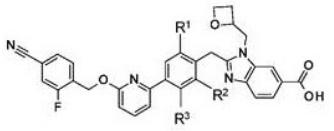
(21)申请号 202080046428.3
(22)申请日 2020.06.19
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114008033 A
(43)申请公布日 2022.02.01
(30)优先权数据
62/868117 2019.06.28 US
62/904906 2019.09.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/038617 2020.06.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/263695 EN 2020.12.30
(73)专利权人 伊莱利利公司
地址 美国印第安纳州
(72)发明人 D·A·科茨 T·菲尔兹
J·D·何 屈付成
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 郭慧 彭昶
(51)Int.Cl.
C07D 401/10(2006.01)
C07D 405/14(2006.01)
A61K 31/4439(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
(56)对比文件
WO 2018/109607 A1,2018.06.21
CN 103687856 A,2014.03.26
审查员 张英姝

权利要求书2页 说明书27页

(54)发明名称

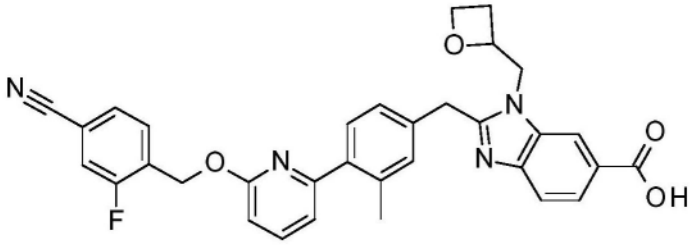
胰高血糖素样肽1受体激动剂

(57)摘要

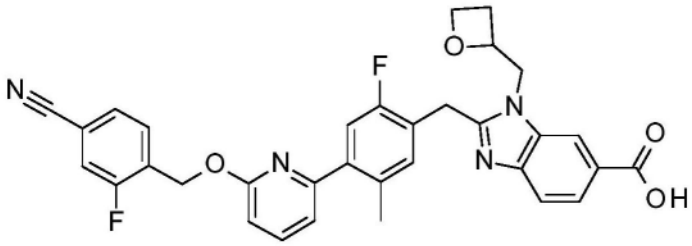
在一个实施方案中,本发明提供下式的化合物:(I)或其可药用盐,和使用这种化合物治疗II型糖尿病的方法。

CN 114008033 B

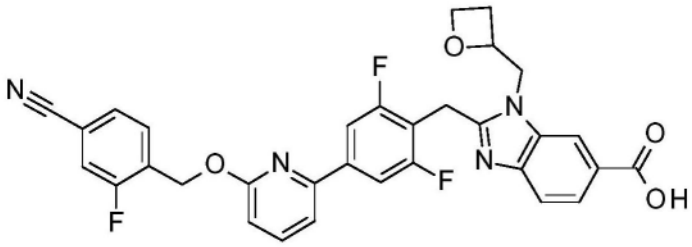
1.化合物或其可药用盐,所述化合物选自:



;

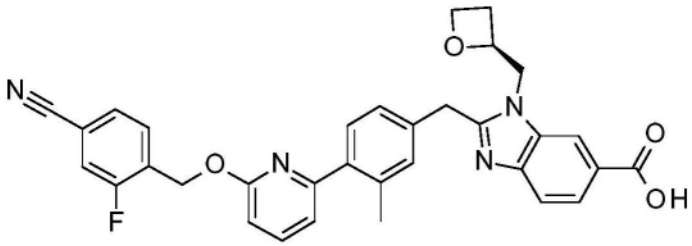


;和

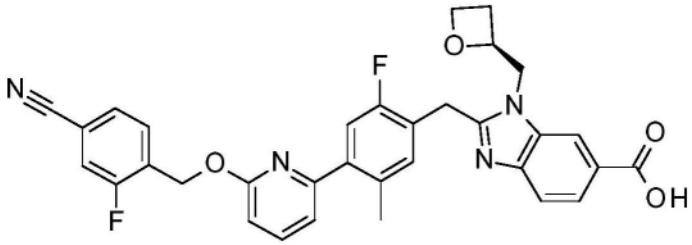


。

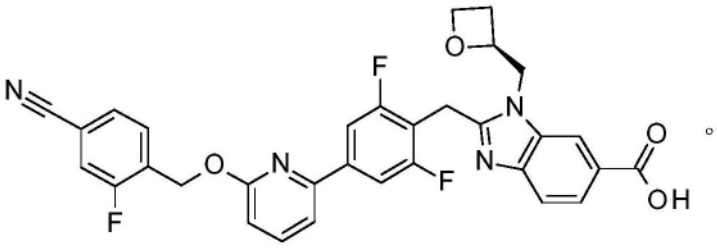
2.根据权利要求1的化合物或其可药用盐,所述化合物选自:



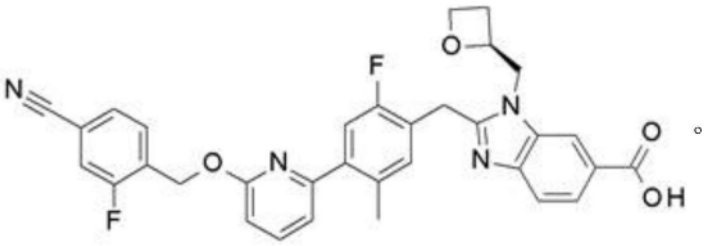
;



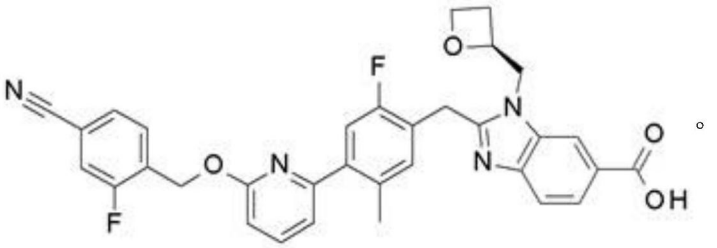
;和



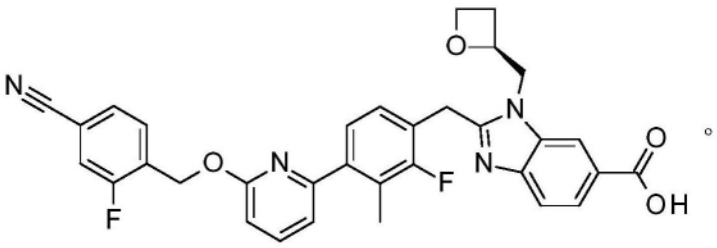
3.根据权利要求2的化合物或其可药用盐,其中所述化合物为:



4.根据权利要求3的化合物,其是下式化合物的叔丁胺盐:



5.化合物,其为:



6.药物组合物,其包含根据权利要求1至5任一项的化合物或其可药用盐和至少一种可药用载体、稀释剂或赋形剂。

7.根据权利要求1至5任一项的化合物或其可药用盐,其用于治疗。

8.根据权利要求1至5任一项的化合物或其可药用盐,其用于治疗II型糖尿病。

9.根据权利要求1至5任一项的化合物或其可药用盐,其用于降低血糖水平。

10.根据权利要求1至5任一项的化合物或其可药用盐,其用于治疗高血糖症。

11.根据权利要求7至10任一项的化合物或其可药用盐,其中所述化合物口服给药。

12.根据权利要求1至5任一项的化合物或其可药用盐在制备用于治疗II型糖尿病的药物中的用途。

13.根据权利要求1至5任一项的化合物或其可药用盐在制备用于降低血糖水平的药物中的用途。

14.根据权利要求1至5任一项的化合物或其可药用盐在制备用于治疗高血糖症的药物中的用途。

15.根据权利要求12至14任一项的用途,其中所述化合物口服给药。

胰高血糖素样肽1受体激动剂

[0001] 本发明涉及胰高血糖素样肽-1受体激动剂和所述化合物用于治疗II型糖尿病的治疗用途。

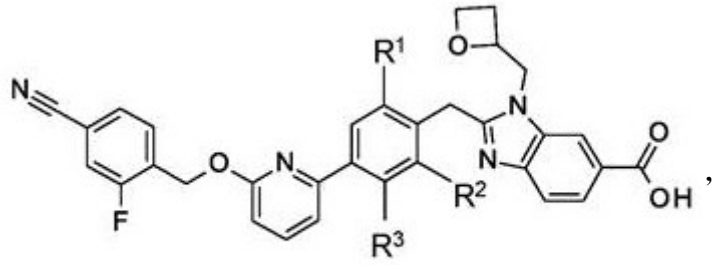
[0002] 胰高血糖素样肽-1(GLP-1)是由肠内分泌L-细胞分泌的肠促胰岛素家族的肽激素的一员。GLP-1诱发β细胞以葡萄糖依赖方式释放胰岛素。但是,GLP-1快速代谢以致只有小百分比的GLP-1可被利用于诱发胰岛素分泌。为了补偿这一点,已经开发出GLP-1受体(GLP-1R)激动剂以作为对II型糖尿病的治疗增强胰岛素分泌。

[0003] 已批准用于治疗II型糖尿病的大多数GLP-1R激动剂是注射剂。由于与注射相关的缺点,如不方便、疼痛和注射部位刺激的可能性,患者通常更喜欢口服药物。

[0004] WO2018/109607公开了被描述为GLP-1R激动剂的某些苯并咪唑衍生物。

[0005] 但是,需要替代性的GLP-1R激动剂。特别需要可口服给药的GLP-1R激动剂。尤其需要具有改进的效力、有利的毒理学状况和/或药代动力学状况以支持每日一次给药的GLP-1R激动剂。

[0006] 相应地,本发明提供下式的化合物或其可药用盐:

[0007] 

式I

[0008] 其中

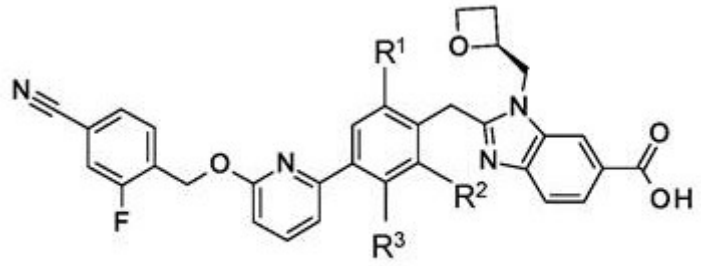
[0009] R^1是H或F;

[0010] R^2是H或F;且

[0011] R^3是H或CH_3。

[0012] 式I包括所有独立的对映异构体及其混合物,以及外消旋物,及其可药用盐。

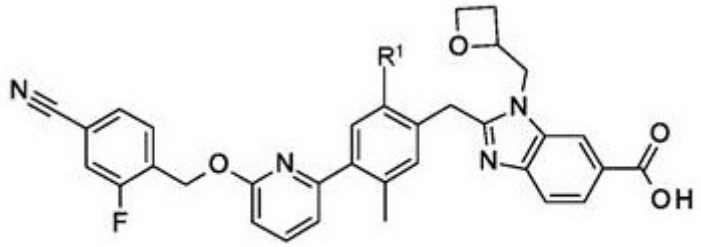
[0013] 在一个实施方案中,提供下式的化合物:

[0014] 

式Ia

[0015] 或其可药用盐。

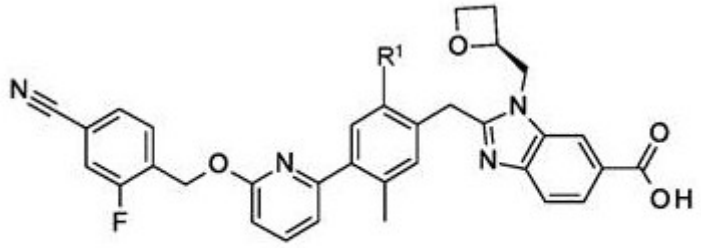
[0016] 在一个实施方案中,提供下式的化合物或其可药用盐:

[0017] 

式II

[0018] 其中R^1是H或F。

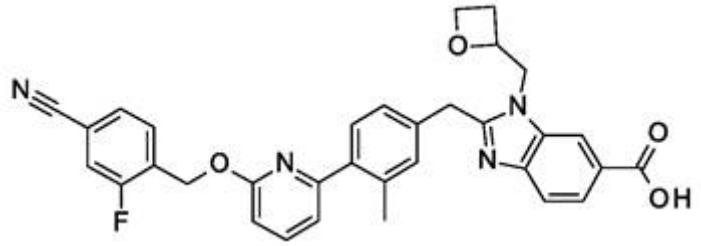
[0019] 在一个实施方案中,提供下式的化合物或其可药用盐:

[0020] 

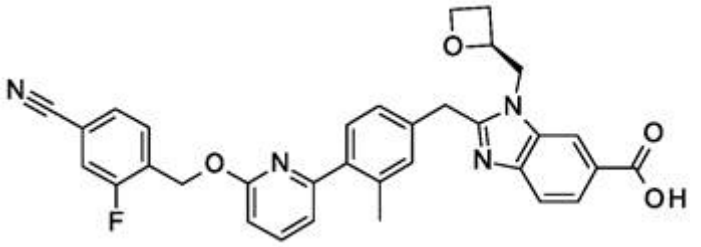
式IIa

[0021] 其中R^1是H或F。

[0022] 在一个实施方案中,所述化合物是下式的化合物:

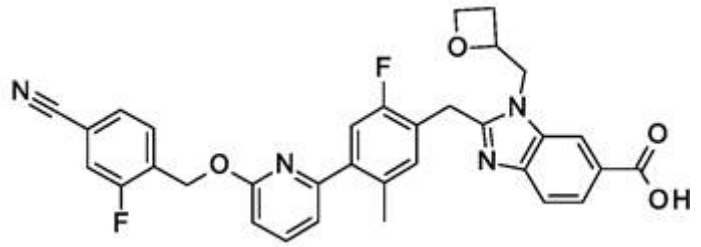
[0023] 

[0024] 或其可药用盐。在一个优选实施方案中,所述化合物是下式的化合物:

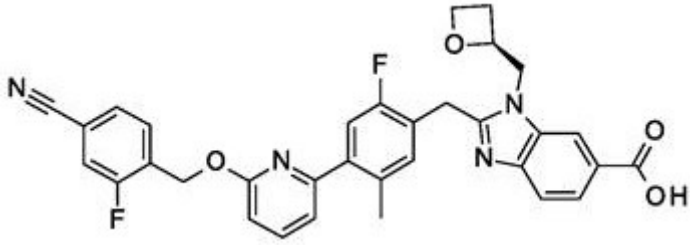
[0025] 

[0026] 或其可药用盐。

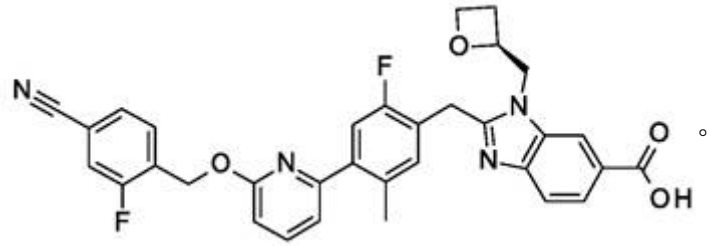
[0027] 在一个实施方案中,所述化合物是下式的化合物:

[0028] 

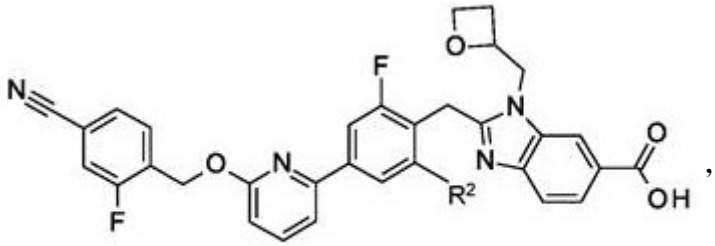
[0029] 或其可药用盐。在一个优选实施方案中,所述化合物是下式的化合物:

[0030] 

[0031] 或其可药用盐。在一个特别优选的实施方案中,提供下式化合物的叔丁胺盐(也称为erbumine盐):

[0032] 。

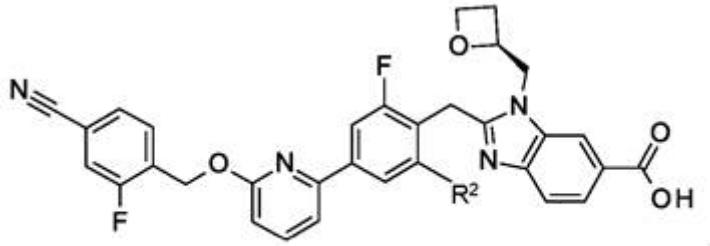
[0033] 在一个实施方案中,提供下式的化合物或其可药用盐:

[0034] ,

式III

[0035] 其中R^2是H或F。

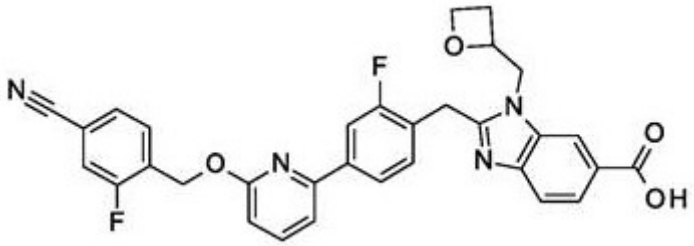
[0036] 在一个实施方案中,提供下式的化合物或其可药用盐:

[0037] ,

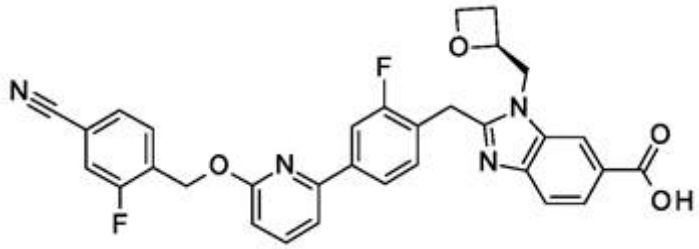
式 IIIa

[0038] 其中R^2是H或F。

[0039] 在一个实施方案中,所述化合物是下式的化合物:

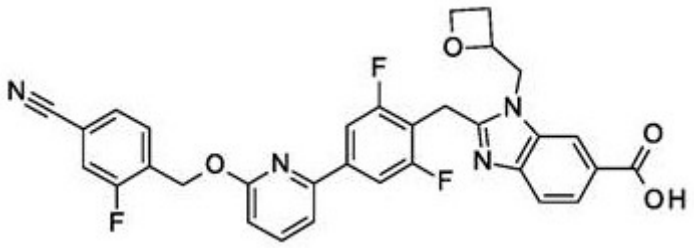
[0040] 

[0041] 或其可药用盐。在一个优选实施方案中,所述化合物是下式的化合物:

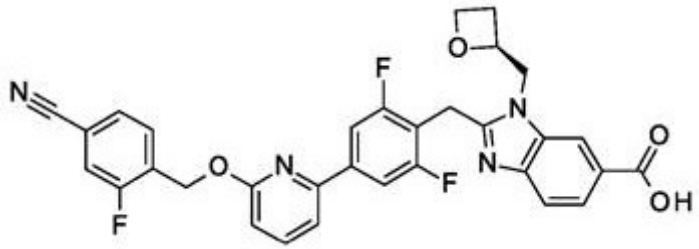
[0042] 

[0043] 或其可药用盐。

[0044] 在一个实施方案中,所述化合物是下式的化合物:

[0045] 

[0046] 或其可药用盐。在一个优选实施方案中,所述化合物是下式的化合物:

[0047] 

[0048] 或其可药用盐。

[0049] 式I包含式Ia、Ib、II、IIa、IIb、III、IIIa和IIIb,并且在下文中,例如在治疗方法和治疗用途中提到式I也被视为提到各个和所有这些子式。

[0050] 在另一实施方案中,提供一种可药用组合物,其包含式I的化合物或其可药用盐和至少一种可药用载体、稀释剂或赋形剂。在一个优选实施方案中,所述可药用组合物配制为口服给药。

[0051] 在另一实施方案中,提供一种治疗哺乳动物的II型糖尿病的方法,所述方法包括给予需要治疗的哺乳动物一种可药用组合物,所述可药用组合物包含有效量的式I的化合物或其可药用盐和至少一种可药用载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施方案中,所述可药用组合物配制为口服给药。优选地,哺乳动物是人类。

[0052] 在另一实施方案中,提供一种治疗哺乳动物的II型糖尿病的方法,所述方法包括给予需要治疗的哺乳动物有效量的式I的化合物或其可药用盐。在一个优选实施方案中,哺

乳动物是人类。

[0053] 在另一实施方案中,提供一种降低哺乳动物的血糖水平的方法,所述方法包括给予需要治疗的哺乳动物有效量的式I的化合物或其可药用盐。在一个优选实施方案中,哺乳动物是人类。

[0054] 在另一实施方案中,提供一种治疗哺乳动物的高血糖症的方法,所述方法包括给予需要治疗的哺乳动物有效量的式I的化合物或其可药用盐。在一个优选实施方案中,哺乳动物是人类。

[0055] 在一个实施方案中,提供用于治疗的式I的化合物或其可药用盐。

[0056] 在另一实施方案中,提供用于治疗II型糖尿病的式I的化合物或其可药用盐。

[0057] 在另一实施方案中,提供用于降低血糖水平的式I的化合物或其可药用盐。

[0058] 在另一实施方案中,还提供用于治疗高血糖症的式I的化合物或其可药用盐。

[0059] 在一个实施方案中,提供式I的化合物或其可药用盐用于制备用于治疗II型糖尿病的药物的用途。

[0060] 在一个实施方案中,提供式I的化合物或其可药用盐用于制备用于降低降低血糖水平的药物的用途。

[0061] 在一个实施方案中,提供式I的化合物或其可药用盐用于制备用于治疗高血糖症的药物的用途。

[0062] 在一个优选实施方案中,式I的化合物口服给药。在一个优选实施方案中,式I的化合物每日一次给药。在另一优选实施方案中,所述治疗用途是用于人类。

[0063] 本文所用的术语“可药用盐”是指被认为可接受用于临床使用和/或兽用的本发明的化合物的盐。可药用盐的实例和用于制备它们的常见方法可见于“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use” P. Stahl等人, 第二次修订版, Wiley-VCH, 2011和S.M. Berge等人, ″Pharmaceutical Salts″, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977, 66(1), 1-19。

[0064] 药物组合物的实例及其制备方法可见于“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, Loyd, V.等人编辑, 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012。在一个实施方案中,药物组合物可配制为口服给药。药物组合物优选配制为片剂、胶囊或溶液。片剂、胶囊或溶液可包括对治疗需要治疗的患者有效量的式I的化合物。

[0065] 术语“有效量”是指在单剂量或多剂量给药于患者时在被诊断或治疗的患者中提供所需作用的式I的化合物或其可药用盐的量或剂量。主治医师作为本领域技术人员通过使用常规技术和通过观察在类似情况下获得的结果容易确定有效量。在化合物的有效量或剂量的确定中考虑的因素包括:给予所述化合物还是其盐;如果使用,其它药剂的共同给药;治疗的哺乳动物的物种;其体型、年龄和一般健康状况;病症的涉入程度或严重程度;个体哺乳动物的响应;给药模式;给予的制剂的生物利用度特征;所选给药方案;和其它相关情况。本发明的化合物在落在大约0.01至大约15 mg/kg体重范围内的每日剂量下有效。

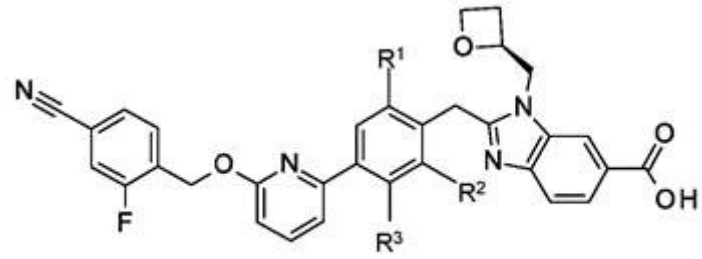
[0066] 本文所用的术语“治疗”是指降低、减轻或逆转已有症状、病症或病况,如高血糖症的进展或严重程度,其可包括增加胰岛素分泌。

[0067] 式I的化合物可配制为通过可生物利用该化合物的任何途径给药的药物组合物。这样的组合物优选用于口服给药。这样的药物组合物及其制备方法是本领域中公知的(参

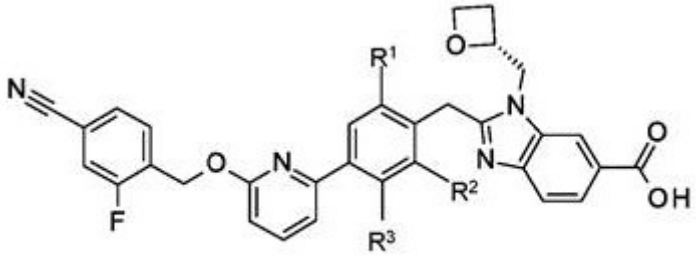
见例如Remington, J. P., “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, L.V. Allen编辑,第22版,Pharmaceutical Press, 2012)。

[0068] 式I的化合物及其可药用盐可用于本发明的治疗用途,某些构型是优选的。

[0069] 本发明的化合物包括:

[0070] 

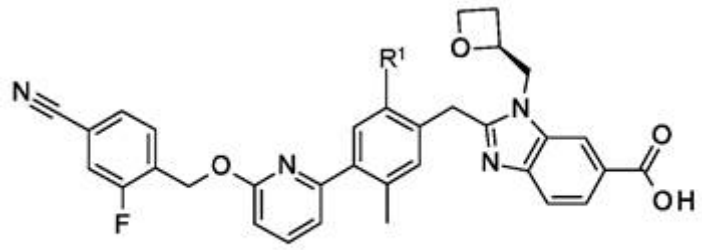
式 Ia; 和I

[0071] 

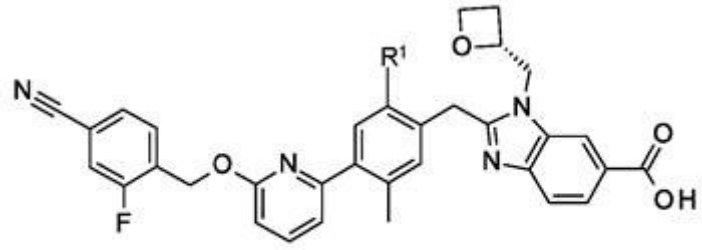
式 Ib

[0072] 或其可药用盐。

[0073] 本发明的另外的化合物包括:

[0074] 

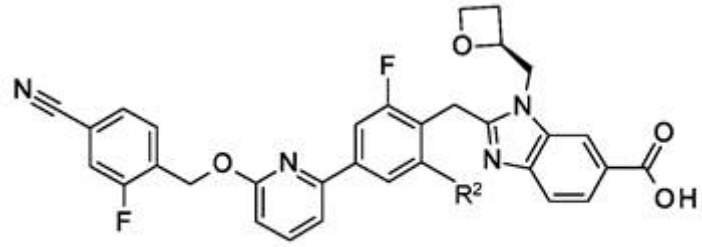
式 IIa; 和I

[0075] 

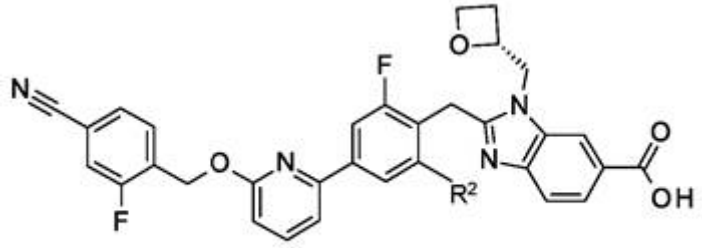
式 IIb

[0076] 或其可药用盐。

[0077] 本发明的另外的化合物包括:

[0078] 

式 IIIa; 和

[0079] 

式 IIIb

[0080] 或其可药用盐。

[0081] 尽管本发明设想了所有独立的对映异构体、其混合物和外消旋物,但式Ia、IIa和IIIa的化合物及其可药用盐特别优选。

[0082] 本领域普通技术人员可以在本发明的化合物的合成中的任何方便的点通过如选择性结晶技术、手性色谱法(参见例如J. Jacques等人, *"Enantiomers, Racemates, and Resolutions"*, John Wiley and Sons, Inc., 1981和E.L. Eliel和S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994)或超临界流体色谱法(SFC)(参见例如T. A. Berger;"*Supercritical Fluid Chromatography Primer*," Agilent Technologies, 2015年7月)之类的方法分离或拆分独立的对映异构体。

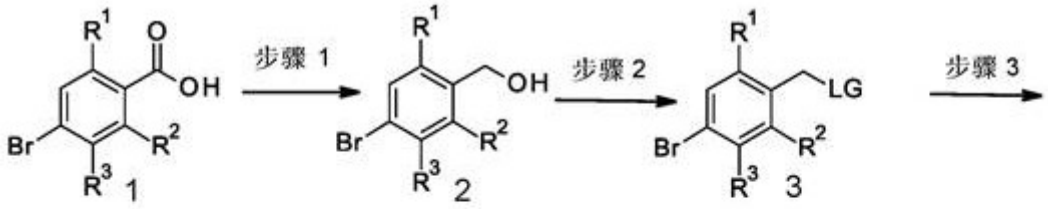
[0083] 本发明的化合物的可药用盐可以例如通过式I的化合物和适当的可药用碱在合适溶剂中在本领域中公知的标准条件下反应形成(参见例如Bastin, R.J.等人, *Org. Process. Res. Dev.*, 4、427-435, 2000;和Berge, S.M.等人, *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19, 1977)。优选的盐是叔丁胺(或erbumine)盐。

[0084] 本文使用的某些缩写根据Daub G.H.等人"The Use of Acronyms in Organic Chemistry" *Aldrichimica Acta*, 1984, 17(1), 6-23定义。某些缩写如下定义:"ACN"是指乙腈;"ATP"是指三磷酸腺苷;"BSA"是指牛血清白蛋白;"cAMP"是指环腺苷-3',5'-一磷酸;"DCM"是指二氯甲烷或亚甲基氯;"DIPEA"是指N,N-二异丙基乙基胺;"DMF"是指N,N-二甲基甲酰胺;"DMSO"是指二甲亚砜;"EC_{50}"是指与预定阳性对照化合物相比产生目标活性的50%响应的试剂浓度(绝对EC_{50});"ES/MS"是指电喷雾质谱法;"EtOAc"是指乙酸乙酯;"HATU"是指六氟磷酸1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1*H*-1,2,3-三唑并[4,5-*b*]吡啶鎓3-氧化物;"HEK"是指人胚肾;"HEPES"是指4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸;"h"是指小时;"MeOH"是指甲醇或甲基醇;"min"是指分钟;"Pd(dppf)Cl_2"是指[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(II);"RT"是指室温;且"THF"是指四氢呋喃。

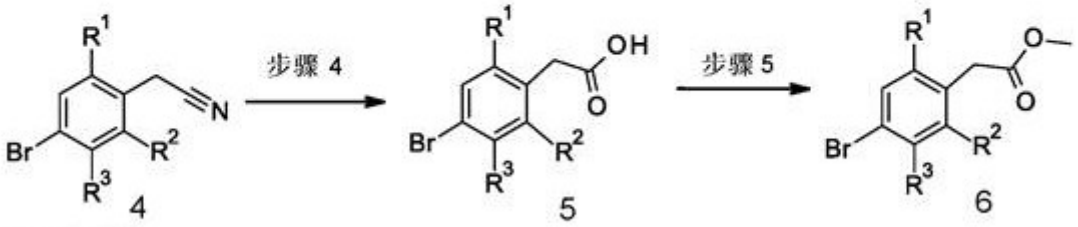
[0085] 本发明的化合物可通过各种程序制备,其中一些阐述在下面的制备和实施例中。所述各路线的具体合成步骤可以以不同方式组合,以制备本发明的化合物或其盐。以下各

步骤的产物可通过常规方法回收,包括萃取、蒸发、沉淀、色谱法、过滤、研制和结晶。试剂和原材料是本领域普通技术人员易得的。独立的异构体、对映异构体和非对映异构体可在合成中的任何方便的点通过如选择性结晶技术或手性色谱法之类的方法分离或拆分(参见例如J. Jacques等人,*"Enantiomers, Racemates, and Resolutions"*, John Wiley and Sons, Inc., 1981和E.L. Eliel和S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994)。提供下列制备和实施例以进一步例示本发明而不限制本发明的范围。

[0086] 方案1



[0087]



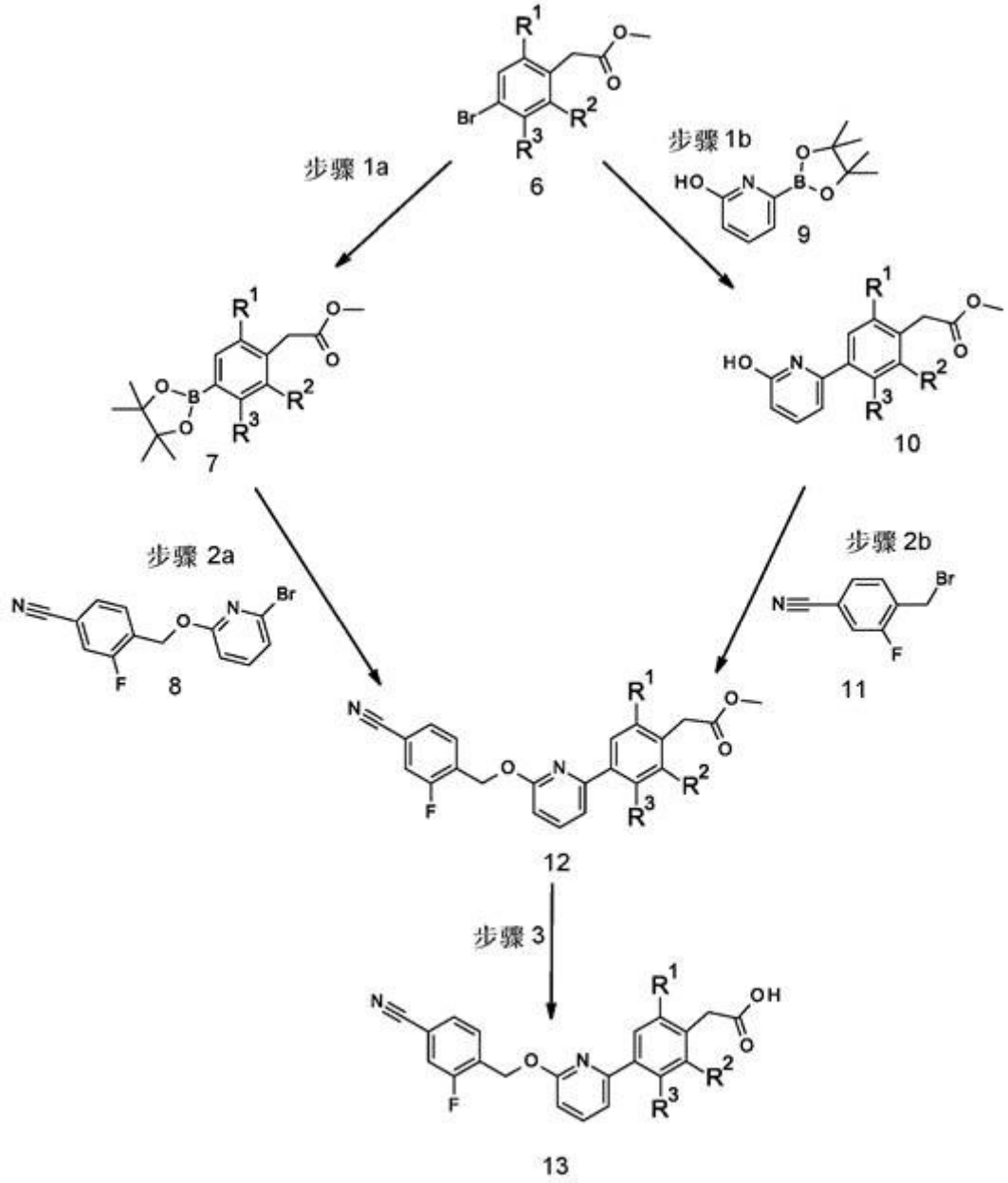
LG＝离去基

R^1, R^2, 和 R^3 如对式I所定义

[0088] 方案1显示用于制备式I的化合物的中间体6的合成。苯甲酸1首先在步骤1中用硼烷二甲硫醚络合物进行还原以产生醇2。将该醇转化成离去基(LG,中间体3)。例如,中间体2中的醇可在步骤2中在-15℃下使用甲磺酰氯转化成甲磺酸酯基团,或其可在0℃下使用三溴化磷转化成溴化物。中间体3在步骤3中与NaCN反应以产生腈4。腈4在步骤4中在升高的温度下用KOH转化以产生酸5,酸5随后在步骤5中使用草酰氯、DMF和甲醇酯化以产生中间体6。

[0089] 方案2

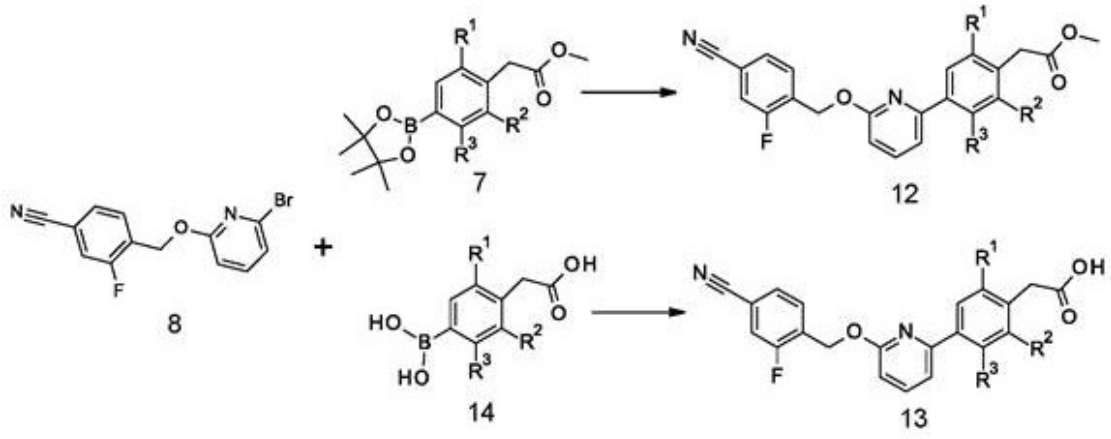
[0090]



R^1, R^2, 和 R^3 如对式I所定义

[0091] 方案2描绘了经由两种路线制备用于制备式I的化合物的关键中间体12。在第一种路线中,芳基卤6经过一锅法Miyura硼基化(borylation)/Suzuki偶联:在升高的温度下使用双(频哪醇合)二硼、Pd(dppf)Cl_2和乙酸钾,芳基卤6在步骤1a中转化成硼酸酯7,此后将溴吡啶8和K_2CO_3添加到反应中(步骤2a),以产生中间体12。在第二种路线中,使用两步法:在升高的温度下使用Pd(dppf)Cl_2和K_2CO_3的芳基卤6与6-羟基吡啶-2-硼酸频哪醇酯9的Suzuki偶联(步骤1b)提供中间体10,其随后在升高的温度下使用Ag_2CO_3用4-(溴甲基)-3-氟苯甲腈6烷基化(步骤2b)以产生中间体12。中间体12在步骤3中使用LiOH的酯水解产生酸中间体13。

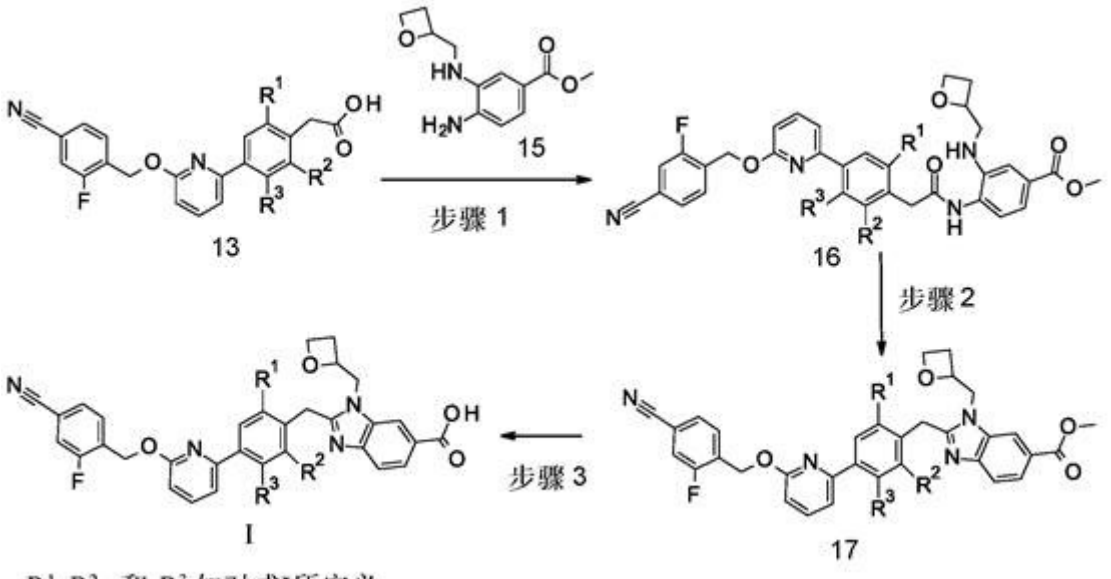
[0092] 方案3

[0093] 

R^1, R^2, 和 R^3 如对式I所定义

[0094] 或者,关键中间体12和13可根据方案3制备——在升高的温度下使用Pd(dppf)Cl_2和碳酸钾将溴吡啶8与硼酸酯7或硼酸14偶联。

[0095] 方案4

[0096] 

R^1, R^2, 和 R^3 如对式I所定义

[0097] 方案4显示关键中间体13转化成式I的化合物。在步骤1中使用HATU和二苯胺15的酰胺偶联产生中间体16。通过在乙酸中加热中间体16实现环化(步骤2)以产生苯并咪唑17。最后,在步骤3中,通过使用LiOH将17水解获得式I的化合物。

[0098] 制备和实施例

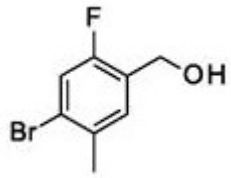
[0099] 在AGILENT® HP1200液相色谱系统上进行LC-ES/MS。在连接到HPLC的质量选择检测器四极质谱仪上进行电喷雾质谱测量(在正模式和/或负模式中获取),HPLC可具有或不具有ELSD。LC-ES/MS条件(低pH): 柱: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2.0 × 50 mm 3.0 μm,110 Å;梯度: 在1.5 min内5-95% B,然后95% B持续0.5 min,柱温: 50℃ +/-10℃;流速: 1.2 mL/min;1 μL注入体积;溶剂A: 含0.1% HCOOH的去离子水;溶剂B: 含0.1%甲酸的ACN;波长200-400 nm和212-216 nm。如果HPLC配备ELSD,设置为45℃蒸发器温度、40℃雾化器温度和1.6 SLM气体流速。替代性LC-MS条件(高pH): 柱: Waters xBridge® C18柱2.1×50 mm,3.5 μm;梯度: 在1.5 min内5-95% B,然后95% B持续0.50 min;柱温: 50℃ +/-10

℃;流速: 1.2 mL/min;1μL注入体积;溶剂A: 10 mM NH_4HCO_3 pH 9;溶剂B: ACN;波长: 200-400 nm和212-216nm;如果具有ELSD: 45℃蒸发器温度、40℃雾化器温度和1.60 SLM气体流速。

[0100] 在配有CuKα源和Vantec检测器、在35 kV和50 mA下运行的Bruker D4 Endeavor X-射线粉末衍射仪上获得结晶固体的X-射线粉末衍射(XRPD)图样。样品在4至40 2θ°之间以0.008 2θ°的步长和0.5秒/步的扫描速率和使用1.0 mm发散狭缝、6.6固定防散射(anti-scatter)狭缝和11.3 mm检测器狭缝扫描。将干粉装在石英样品架上并使用载玻片获得光滑表面。在环境温度和相对湿度下收集晶型衍射图样。基于具有在8.853和26.774 2θ°的峰的NIST 675内标,在全图样位移后在MDI-Jade中确定晶体峰位置。在晶体学领域中众所周知,对于任何给定晶型,由于由晶体形态和习性之类的因素造成的择优取向,衍射峰的相对强度可变。如果存在择优取向效应,峰强度改变,但多晶型物的特征峰位置不变。参见例如The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, 第1843-1844页, 1995。此外,在晶体学领域中也众所周知,对于任何给定晶型,角峰位置可能轻微改变。例如,峰位置可由于分析样品时的温度变化、样品位移或内标的存在与否而移动。在本情况下,假定± 0.2 2θ°的峰位置变异性以虑及这些潜在变化,而不阻碍所示晶型的明确识别。可基于特征峰的任何独特组合确认晶型。

[0101] 制备1

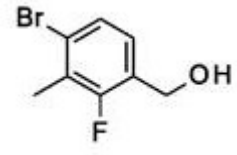
[0102] (4-溴-2-氟-5-甲基苯基)甲醇

[0103] 

[0104] 向烧瓶中加入:4-溴-2-氟-5-甲基苯甲酸(100 g, 421 mmol)、THF(200 mL)和硼烷(二甲硫醚络合物, 在THF中的2 mol/L溶液, 210 mL, 10 mmol)。将混合物在室温下搅拌整夜。用HCl(1.0 N水溶液, 50 mL)淬灭反应混合物并过滤该混合物。在真空中浓缩滤液并将残留物在EtOAc(400 mL)和水(400 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(400 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩以产生为固体的标题化合物(93.5 g, 99%)。^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.29 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 2.38 (s, 3H)。

[0105] 制备2

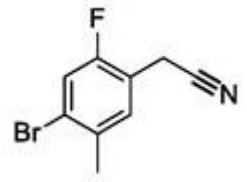
[0106] (4-溴-2-氟-3-甲基-苯基)甲醇

[0107] 

[0108] 使用4-溴-2-氟-3-甲基苯甲酸基本如制备1中所述制备标题化合物。通过使用10至35% EtOAc/己烷梯度的硅胶色谱法提纯产物。LC-ES/MS峰保留时间: 1.01 min。

[0109] 制备3

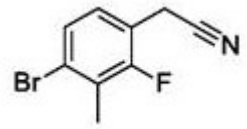
[0110] 2-(4-溴-2-氟-5-甲基苯基)乙腈

[0111] 

[0112] 将(4-溴-2-氟-5-甲基苯基)甲醇(92 g, 420 mmol)溶解在DCM(500 mL)中并加入三乙胺(120 mL, 861 mmol)。将混合物冷却到-15℃并将甲磺酰氯(40 mL, 517 mmol)在DCM(30 mL)中的溶液逐滴添加到反应混合物中。将混合物在室温下搅拌30分钟。反应混合物在DCM(500 mL)和水(500 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(500 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残留物溶解在DMF(400 mL)中并用冰浴冷却混合物。将NaCN(21.0 g, 429 mmol)一次性添加到反应混合物中并在室温下搅拌整夜。将混合物在EtOAc(400 mL)和水(500 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(500 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。通过使用10至30% EtOAc/己烷梯度的硅胶色谱法提纯残留物以产生为油状物的标题化合物(47.0 g, 48%)。^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 2.41 (s, 3H)。

[0113] 制备4

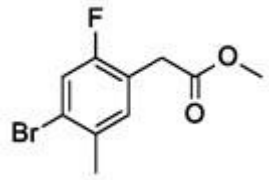
[0114] 2-(4-溴-2-氟-3-甲基-苯基)乙腈

[0115] 

[0116] 将(4-溴-2-氟-3-甲基-苯基)甲醇(1.90 g, 8.67 mmol)和DCM(20 mL)混合在一起。将混合物冷却到0℃,然后逐滴加入三溴化磷(1.0 mL, 11 mmol)。将混合物在0℃下搅拌15分钟,然后用饱和$NaHCO_3$水溶液(10 mL)碱化混合物。用DCM(40 mL)萃取混合物。用盐水(30mL)洗涤有机物,经(Na_2SO_4)干燥,过滤并浓缩以产生固体。将固体溶解在DMSO(10 mL)中,然后加入NaCN(0.60 g, 13.0 mmol)并搅拌1 h。将混合物在EtOAc(50 mL)和水(50 mL)之间分配。用盐水(50 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩以产生为固体的产物(1.3 g, 64%)。LC-ES/MS峰保留时间: 1.17 min。

[0117] 制备5

[0118] 2-(4-溴-2-氟-5-甲基-苯基)乙酸甲酯

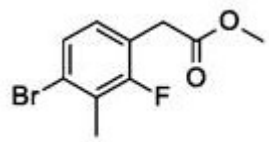
[0119] 

[0120] 向烧瓶中加入:2-(4-溴-2-氟-5-甲基苯基)乙腈(1.20 g, 5.10 mmol)、乙醇(5 mL)、水(3 mL)和氢氧化钾(0.90 g, 16 mmol)。将混合物在90℃下加热整夜。用冰浴冷却混合物并用1.0 M HCl酸化至pH 4-5,然后将混合物在EtOAc(30 mL)和水(30 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(30 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩以产生为固体的2-(4-溴-2-氟-5-甲基-苯基)乙酸。将其溶解在DCM(10 mL)中,然后在室温下加入DMF(0.05 mL, 0.6 mmol)和草酰氯(0.5 mL, 6 mmol)。将混合物在室温下搅拌30分钟,然后逐滴加入MeOH

(2 mL, 49.4 mmol)。在30分钟后,在真空中除去溶剂并将残留物在EtOAc(40 mL)和5% $NaHCO_3$(30 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(40 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩以产生为油状物的标题化合物(1.1 g, 80%)。ES/MS *m/z* (^{79}Br,^{81}Br) 278,280 ($M+NH_4^+$)。

[0121] 制备6

[0122] 2-(4-溴-2-氟-3-甲基-苯基)乙酸甲酯

[0123] 

[0124] 使用2-(4-溴-2-氟-3-甲基-苯基)乙腈基本如制备5中所述制备标题化合物。LC-ES/MS峰保留时间: 1.22 min。

[0125] 制备7

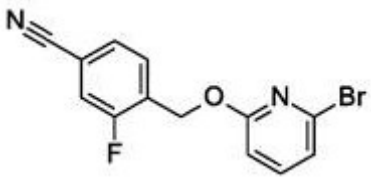
[0126] 2-(4-溴-2,6-二氟苯基)乙酸甲酯

[0127] 

[0128] 混合4-溴-2,6-二氟苯基乙酸(3.30 g, 12.5 mmol)、DCM(20 mL)、DMF(0.05 mL, 0.6 mmol)和草酰氯(1.3 mL, 15 mmol)。将混合物在室温下搅拌30分钟,然后逐滴加入MeOH(1.5 mL, 37 mmol, 100质量%)。浓缩混合物并在EtOAc(30 mL)和饱和$NaHCO_3$水溶液(15 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(30 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩以产生为油状物的标题化合物(3.41 g, 定量收率),其不经进一步提纯就用于制备10。ES/MS *m/z* (^{79}Br,^{81}Br) 265,267 (M+H)。

[0129] 制备8

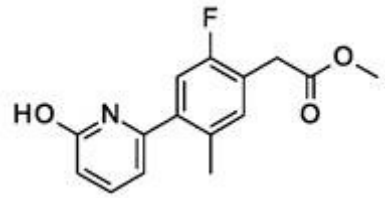
[0130] 4-[(6-溴-2-吡啶基)氧基甲基]-3-氟-苯甲腈

[0131] 

[0132] 将2-溴-6-氟吡啶(2.50 g, 13.8 mmol)和3-氟-4-(羟甲基)苯甲腈(2.15 g, 13.8 mmol)溶解在1,4-二氧杂环己烷(25 mL)中并在室温下经12小时逐滴加入叔丁醇钾的溶液(20重量%在THF中, 10.0 mL, 16.6 mmol)。将反应混合物在40℃下加热30分钟。将混合物倒入K_2CO_3水溶液(1M)中并用EtOAc萃取两次。用水和饱和NaCl水溶液洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。残留物在真空炉中在50℃下干燥以产生为浅黄色固体的标题化合物(4.23 g, 95%)。ES/MS *m/z* (^{79}Br,^{81}Br) 307,309 (M+H)。

[0133] 制备9

[0134] 2-[2-氟-4-(6-羟基-2-吡啶基)-5-甲基-苯基]乙酸甲酯

[0135] 

[0136] 向烧瓶中加入6-羟基吡啶-2-硼酸频哪醇酯(1.6 g, 6.9 mmol)、2-(4-溴-2-氟-5-甲基-苯基)乙酸甲酯(2.2 g, 8.4 mmol)、THF(15 mL)、水(1 mL)和碳酸钾(2.0 g, 14 mmol)。用氮气吹扫混合物10分钟,然后加入Pd(dppf)Cl_2(0.26 g, 0.35 mmol)并在75℃下加热2小时。将混合物在EtOAc(30 mL)和水(30 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(30 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩以产生为固体的标题化合物(1.4 g, 74%)。ES/MS *m/z* 276 (M+H), 274 (M-H)。

[0137] 制备10

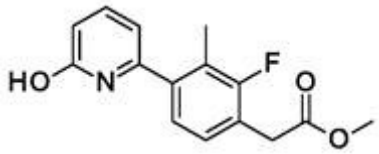
[0138] 2-[2,6-二氟-4-(6-羟基-2-吡啶基)苯基]乙酸甲酯

[0139] 

[0140] 使用2-(4-溴-2,6-二氟苯基)乙酸甲酯基本如制备9中所述制备标题化合物,反应在75℃下加热整夜。ES/MS *m/z* 280 (M+H)。

[0141] 制备11

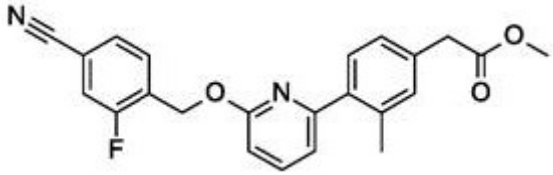
[0142] 2-[2-氟-4-(6-羟基-2-吡啶基)-3-甲基-苯基]乙酸甲酯

[0143] 

[0144] 使用2-(4-溴-2-氟-3-甲基-苯基)乙酸甲酯基本如制备9中所述制备标题化合物,反应在75℃下加热整夜(18 h)。ES/MS *m/z* 276 (M+H), 274 (M-H)。

[0145] 制备12

[0146] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-3-甲基-苯基]乙酸甲酯

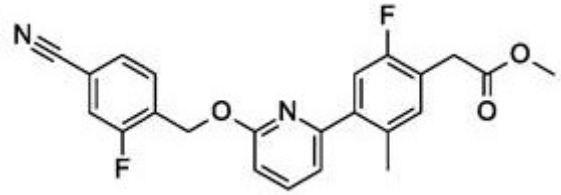
[0147] 

[0148] 将2-(4-溴-3-甲基苯基)乙酸(10.7 g, 45.8 mmol)溶解在DCM(50 mL)中。在冰/水浴中冷却混合物,然后加入草酰氯(4.8 mL, 55 mmol)和DMF(0.1 mL)。移除冰/水浴并在室温下搅拌2小时。经2分钟逐滴加入MeOH(6.0 mL)并在室温下搅拌1小时。在真空中浓缩反应混合物并将残留物溶解在EtOAc中。用饱和$NaHCO_3$水溶液和饱和NaCl水溶液洗涤有机物。有机物经Na_2SO_4干燥,然后过滤并浓缩。向残留物中加入双(频哪醇合)二硼(12.8 g, 50.4 mmol)和乙酸钾(13.6 g, 137 mmol)。将氮气鼓过反应混合物15分钟,然后加入Pd(dppf)

Cl_2(与DCM的络合物，1.13 g，1.37 mmol)。反应在油浴中在氮气下在85℃下加热15小时，然后从油浴中移出反应烧瓶。将碳酸钾(9.49 g，68.7 mmol)溶解在水(60 mL)中，将氮气鼓过溶液10分钟，然后将该溶液添加到反应混合物中，接着加入4-[(6-溴-2-吡啶基)氧基甲基]-3-氟-苯甲腈(14.1 g，45.8 mmol)。将氮气鼓过整个反应混合物5分钟并在氮气下在85℃下加热6小时。将反应冷却到室温附近并在真空中浓缩以除去大部分1,4-二氧杂环己烷。混合物用EtOAc(200 mL)稀释并用水和饱和NaCl水溶液洗涤。有机物经Na_2SO_4干燥，然后过滤并浓缩。通过使用5至50% EtOAc/己烷梯度的硅胶色谱法提纯粗产物以产生为浅黄色固体的标题化合物(13.3 g，70%)。ES/MS *m/z* 391 (M+H)。

[0149] 制备13

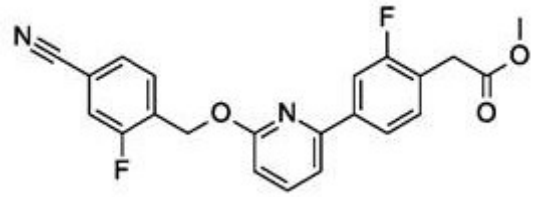
[0150] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]乙酸甲酯

[0151] 

[0152] 向烧瓶中加入2-[2-氟-4-(6-羟基-2-吡啶基)-5-甲基-苯基]乙酸甲酯(1.40 g，5.09 mmol)、1,4-二氧杂环己烷(35 mL)、碳酸银(1.7 g，6.2 mmol)和4-(溴甲基)-3-氟苯甲腈(1.4 g，6.2 mmol)。将混合物在60℃下加热整夜。滤出固体并浓缩滤液。通过使用12至55% EtOAc/己烷的硅胶色谱法提纯残留物以产生为固体的标题化合物(1.60 g，77%)。ES/MS *m/z* 409 (M+H)，407 (M-H)。

[0153] 制备14

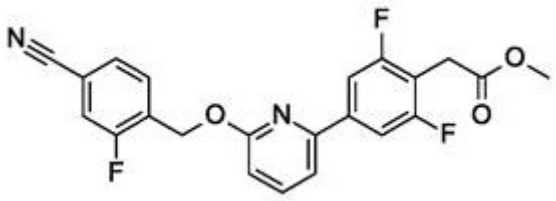
[0154] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-苯基]乙酸甲酯

[0155] 

[0156] 向烧瓶中装载4-[(6-溴-2-吡啶基)氧基甲基]-3-氟-苯甲腈(2.02 g，6.58 mmol)、2-(2-氟-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)苯基)乙酸甲酯(2.99 g，9.88 mmol)、K_2CO_3(2.30 g，16.5 mmol)、1,4-二氧杂环己烷(30 mL)和水(10 mL)。将氮气鼓过混合物10分钟。将Pd(dppf)Cl_2 DCM络合物(492 mg，0.658 mmol)添加到混合物中并在氮气下加热至80℃持续5小时。将反应混合物冷却，用EtOAc(75 mL)稀释并经Celite®垫过滤。用水和饱和NaCl水溶液洗涤滤液，经Na_2SO_4干燥，过滤并浓缩。通过使用5至90% EtOAc/己烷梯度的硅胶色谱法提纯所得残留物以获得标题化合物(2.68 g，94%)。ES/MS *m/z* 395 (M+H)。

[0157] 制备15

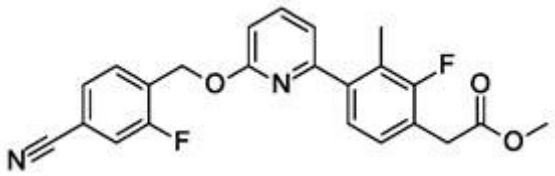
[0158] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2,6-二氟-苯基]乙酸甲酯

[0159] 

[0160] 使用2-[2,6-二氟-4-(6-羟基-2-吡啶基)苯基]乙酸甲酯基本如制备13中所述制备标题化合物,反应在80℃下加热整夜。ES/MS *m/z* 413 (M+H)。

[0161] 制备16

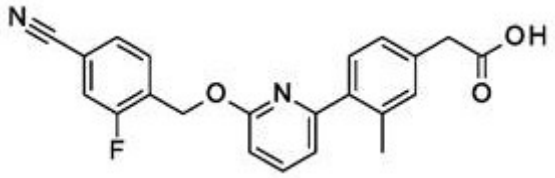
[0162] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-3-甲基-苯基]乙酸甲酯

[0163] 

[0164] 使用2-[2-氟-4-(6-羟基-2-吡啶基)-3-甲基-苯基]乙酸甲酯基本如制备13中所述制备标题化合物,反应在80℃下加热3小时。ES/MS *m/z* 409 (M+H)。

[0165] 制备17

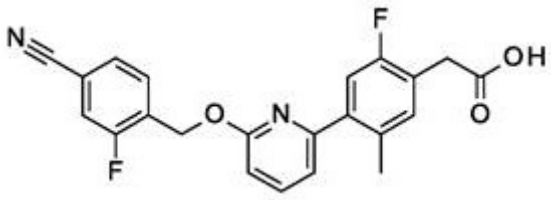
[0166] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-3-甲基-苯基]乙酸

[0167] 

[0168] 向烧瓶中加入2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-3-甲基-苯基]乙酸甲酯(1.20 g, 3.07 mmol)、ACN (20 mL)、水(10 mL)和氢氧化锂(0.35 g, 15 mmol)。将混合物在45℃下加热3小时。用冰浴冷却混合物并用1.0 M HCl酸化至pH = 4-5。将混合物在EtOAc(30 mL)和水(30 mL)之间分配。用盐水(30 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩以产生为固体的标题化合物(1.1g, 95%)。ES/MS *m/z* 377 (M+H)。

[0169] 制备18

[0170] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]乙酸

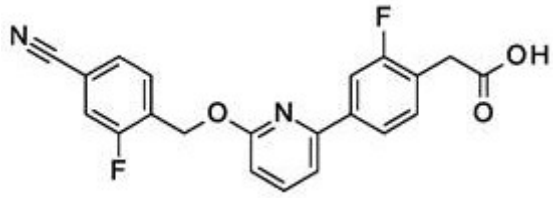
[0171] 

[0172] 向小瓶中加入2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]乙酸甲酯(1.6 g, 3.9 mmol)、ACN(20 mL)、水(6 mL)和氢氧化锂(0.45 g, 19 mmol)。将混合物在45℃下加热2小时,用冰浴冷却混合物并用1.0 M HCl酸化至pH = 4-5。将混合物在EtOAc(50 mL)和水(50 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(50 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩以产生为固体的标题化合物(1.55g, 100%)。ES/MS m/z 395 (M+

H)。

[0173] 制备19

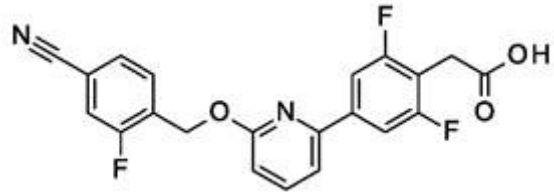
[0174] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-苯基]乙酸

[0175] 

[0176] 将2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-苯基]乙酸甲酯(2.68 g, 6.25 mmol)溶解在THF(50 mL)中,然后加入氢氧化锂(797 mg, 32.9 mmol)和水(20 mL)。在室温下搅拌5小时后,用HCl水溶液(1M)将反应混合物的pH调节至5。在真空中除去挥发性溶剂以产生水性浆料。过滤和干燥固体以获得标题化合物(2.24 g, 88%)。ES/MS *m/z* 381 (M+H)。

[0177] 制备20

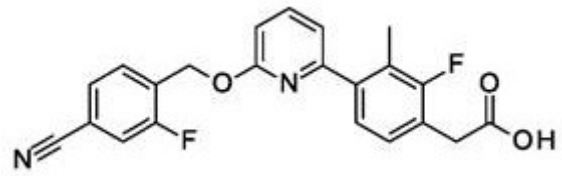
[0178] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2,6-二氟-苯基]乙酸

[0179] 

[0180] 使用2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2,6-二氟-苯基]乙酸甲酯基本如制备18中所述制备标题化合物。ES/MS *m/z* 399 (M+H)。

[0181] 制备21

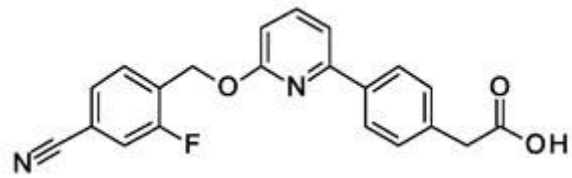
[0182] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-3-甲基-苯基]乙酸

[0183] 

[0184] 使用2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-3-甲基-苯基]乙酸甲酯基本如制备17中所述制备标题化合物。ES/MS m/z 395 (M+H)。

[0185] 制备22

[0186] 2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]苯基]乙酸

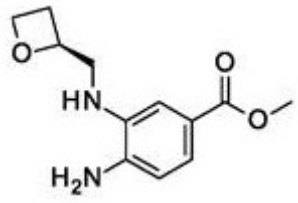
[0187] 

[0188] 将4-[(6-溴-2-吡啶基)氧基甲基]-3-氟-苯甲腈(0.70 g, 2.3 mmol)和2-(4-二羟硼基苯基)乙酸(0.64 g, 3.4 mmol)、THF(15 mL)、水(5 mL)和碳酸钾(0.63 g, 4.6 mmol)混合在一起。混合物用氮气吹扫10分钟,然后加入Pd(dppf)Cl_2(0.085 g, 0.11

mmol)并将混合物在75℃下加热8小时。用HCl水溶液(1 M)将混合物酸化至pH 4-5。将混合物在EtOAc(50 mL)和水(50 mL)之间分配。用盐水(50 mL)洗涤有机物,经(Na_2SO_4)干燥,然后过滤并浓缩。通过使用25至65% EtOAc/己烷梯度的硅胶色谱法提纯残留物以产生为固体的标题化合物(800 mg, 97%收率)。ES/MS *m/z* 363.0 (M+H)。

[0189] 制备23

[0190] 4-氨基-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯

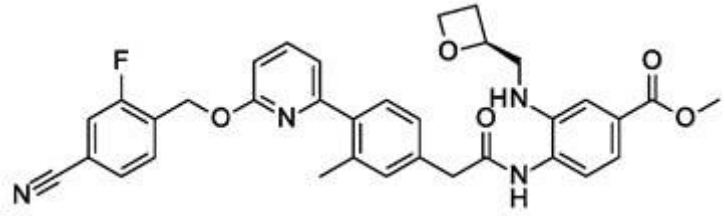
[0191] 

[0192] 在室温下向3-氟-4-硝基苯甲酸甲酯(2.0 g, 10 mmol)在THF(10 mL)和DMF(10 mL)中的溶液中加入三乙胺(3.1 mL, 22 mmol)。向浅黄色溶液中加入[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲胺(Austin Chemical Company, 1.0 g, 11 mmol)并将铁锈色溶液搅拌整夜。用EtOAc(100 mL)和水(50 mL)稀释反应。分离有机层,然后用EtOAc(2 × 50 mL)反萃取水层。合并有机物并用饱和NaCl水溶液洗涤。有机物经Na_2SO_4干燥,过滤,浓缩并将残留物在高真空下干燥。这产生为黄色固体的粗制4-硝基-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯(2.8 g, 10 mmol)(ES/MS *m/z* 267 (M+H))。

[0193] 接着,将4-硝基-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯(2.8 g, 10 mmol)溶解在THF(50 mL)中并加入碳载钯(用水5%预湿, 0.5 g)。用氢气真空吹扫反应混合物,然后在氢气球下在室温下搅拌2小时,在此期间黄色消失。经Celite®过滤混合物并浓缩以产生标题化合物(2.4g, 99%)。ES/MS *m/z* 237 (M+H)。

[0194] 制备24

[0195] 4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-3-甲基-苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯

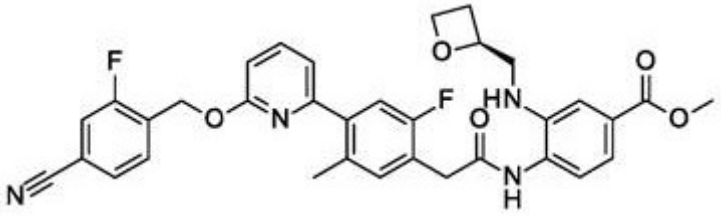
[0196] 

[0197] 向小瓶中加入2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-3-甲基-苯基]乙酸(1.10 g, 2.92 mmol)、DMF(10 mL)、HATU(1.4 g, 3.6 mmol)、4-氨基-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯(0.76 g, 3.2 mmol)和DIPEA(1.5 mL, 8.6 mmol)。将混合物在室温下搅拌30分钟,然后在EtOAc(30 mL)和水(30 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(30 mL)洗涤有机物,然后经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。通过使用10至35% EtOAc/DCM梯度的硅胶色谱法提纯残留物以产生为固体的标题化合物(1.2 g, 69%)。ES/MS *m/z* 595 (M+1), 593 (M-1)。

[0198] 制备25

[0199] 4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]乙

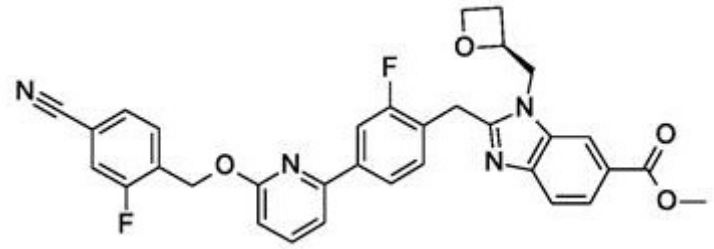
酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯

[0200] 

[0201] 向烧瓶中加入:2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]乙酸(1.20 g, 3.04 mmol)、DMF(15 mL)、HATU(1.2 g, 3.1 mmol)、4-氨基-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯(0.80 g, 3.4 mmol)和DIPEA(1.5 mL, 8.6 mmol)。将混合物在室温下搅拌30分钟,然后在EtOAc(30 mL)和水(30 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(30 mL)洗涤有机物,然后经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。通过使用10至35% EtOAc/DCM梯度的硅胶色谱法提纯残留物以产生为固体的标题化合物(1.20 g, 64%)。ES/MS *m/z* 613 (M+1), 611 (M-H)。

[0202] 制备26

[0203] 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸甲酯

[0204] 

[0205] 向圆底烧瓶中加入2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-苯基]乙酸(205 mg, 0.540 mmol)、4-氨基-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯(116 mg, 0.490 mmol)、HATU(224 mg, 0.589 mmol)、DIPEA(0.26 mL, 1.5 mmol)和DMF(5 mL)。在室温下搅拌3.5小时后,反应混合物用EtOAc(30 mL)稀释并用水和饱和NaCl水溶液洗涤。有机物经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。通过使用0至10% MeOH/DCM梯度的硅胶色谱法提纯残留物以获得中间体酰胺(326 mg)。ES/MS *m/z* 599 (M+H)。

[0206] 将中间体酰胺与乙酸(5 mL)一起在50℃下加热15小时。在真空中浓缩反应混合物并将剩余残留物溶解在EtOAc(25 mL)中。用饱和$NaHCO_3$水溶液和饱和NaCl水溶液洗涤有机物。有机物经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。通过使用20至100% EtOAc/己烷梯度的硅胶色谱法提纯所得物以获得标题化合物(152 mg, 52%)。ES/MS *m/z* 581 (M+H)。

[0207] 制备27

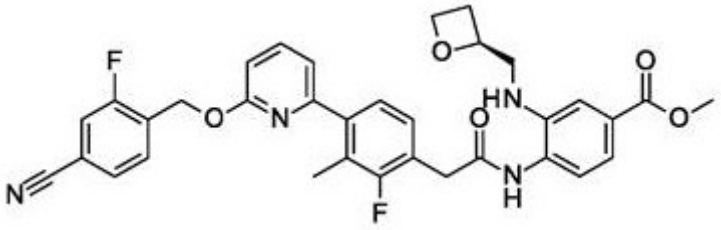
[0208] 4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2,6-二氟-苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯

[0209] 

[0210] 使用2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2,6-二氟-苯基]乙酸基本如制备24中所述制备标题化合物。通过过滤收集在水性后处理过程中沉淀的产物并且不经进一步提纯就使用。ES/MS *m/z* 617 (M+H), 615 (M-H)。

[0211] 制备28

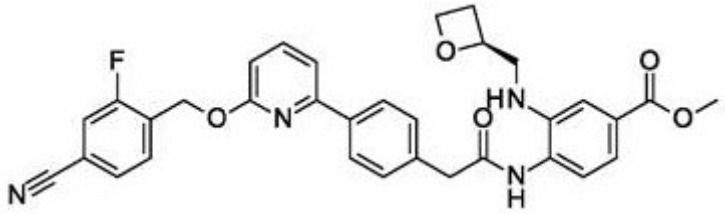
[0212] 4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-3-甲基-苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯

[0213] 

[0214] 使用2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-3-甲基-苯基]乙酸基本如制备24中所述制备标题化合物。ES/MS *m/z* 613 (M+H), 611 (M-H)。

[0215] 制备29

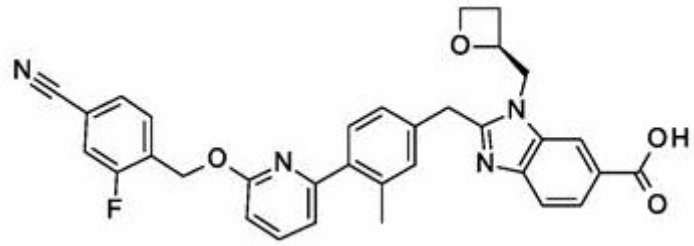
[0216] 4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯

[0217] 

[0218] 使用2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]苯基]乙酸基本如制备25中所述制备标题化合物。ES/MS *m/z* 581.0 (M+H), 579.0 (M-H)。

[0219] 实施例1

[0220] 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-3-甲基-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸

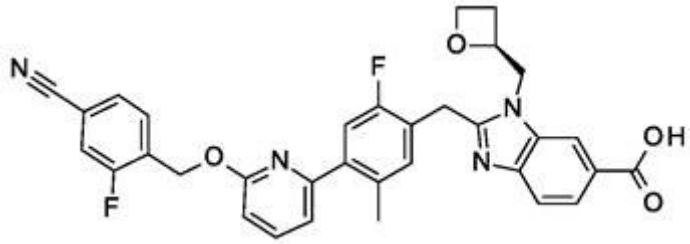
[0221] 

[0222] 向小瓶中加入4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-3-甲基-

苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯(1.2 g, 2.0 mmol)和乙酸(6 mL)。将混合物在80℃下加热2小时,然后在真空中除去溶剂。将残留物在EtOAc(30 mL)和$NaHCO_3$水溶液(5%, 20 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(30 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残留物溶解在ACN(5 mL)和水(3 mL)中,然后向混合物中加入LiOH(0.22 g, 9.2 mmol)并在50℃下搅拌2小时。在真空中除去溶剂。通过使用20至35% ACN/5% NH_4HCO_3水溶液梯度的反相快速色谱法提纯残留物以产生为固体的标题化合物(900 mg, 79%)。ES/MS *m/z* 563 (M+H), 561 (M-H)。

[0223] 实施例2

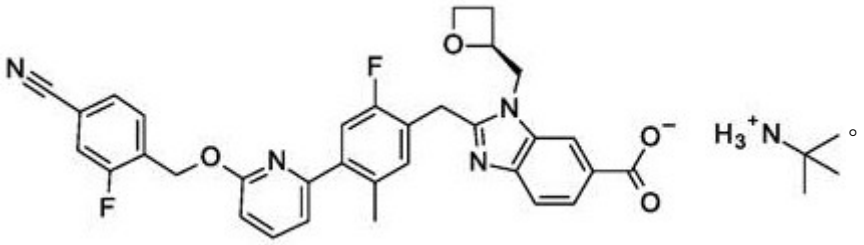
[0224] 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸

[0225] 

[0226] 向小瓶中加入4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯(1.20 g, 1.96 mmol)和乙酸(15 mL),然后将混合物在80℃下加热2小时。在真空中除去溶剂。将残留物在EtOAc(30 mL)和$NaHCO_3$水溶液(5%, 20 mL)之间分配。用饱和NaCl水溶液(30 mL)洗涤有机物,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残留物溶解在ACN(10 mL)和水(4 mL)中,然后向混合物中加入LiOH(0.24 g, 10 mmol)并在50℃下搅拌2小时。用饱和柠檬酸水溶液将混合物酸化至pH = 4-5。在真空中除去溶剂。通过使用20至35% ACN/5% NH_4HCO_3水溶液梯度的反相快速色谱法提纯残留物以产生为固体的标题化合物(745 mg, 66%)。ES/MS *m/z* 581 (M+H), 579 (M-H)。

[0227] 实施例2a

[0228] 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸叔丁基铵

[0229] 

[0230] 方法1 -无晶种的制备

[0231] 将2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸(555 mg, 0.96 mmol)在50℃下在以800 rpm搅拌的同时悬浮在丙酮(6 mL)中,以产生白色固体的浆料。加入叔丁胺(115 μL, 1.09 mmol, 1.14 eq),观察到混合物的短暂澄清化,接着沉淀白色固体。将该浆料在50

℃下搅拌1小时,然后停止加热并在其达到室温的过程中搅拌样品。通过真空过滤滤出固体并在氮气流下就地干燥15分钟,然后在真空中在50℃下干燥1小时以产生标题化合物(612 mg, 98%)。

[0232] 方法2 -使用晶种的制备

[0233] 将2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸(50 g, 86.1 mmol)、丙酮(658 mL)和水(42 mL)混合在一起,并将混合物50℃加热。经GF/F纸过滤混合物并用94:6 v:v丙酮:水(25 mL)冲洗。所得溶液在50℃下加热。制备叔丁胺(10 mL, 94.7 mmol, 1.1 eq)和94:6 v:v丙酮:水(25 mL)的溶液。加入一部分叔丁胺溶液(7 mL),接着加入2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸叔丁基铵的晶种(50 mg)。经由注射器泵以0.47 mL/min的速率经大约1小时加入剩余叔丁胺溶液。将所得悬浮液在50℃下加热2小时,然后将混合物冷却到环境温度整夜。过滤浆料并用丙酮(2 × 100 mL)冲洗。湿滤饼在真空中在50℃下干燥至恒重以产生为浅黄色固体的标题化合物(51.8 g, 92%)。

[0234] 制成的标题化合物的样品通过使用CuKα辐射的XRD图样表征为具有如下表1中所述的衍射峰(2-θ值),特别是具有在6.9的峰以及选自16.3和22.5的一个或多个峰;衍射角的公差为0.2度。

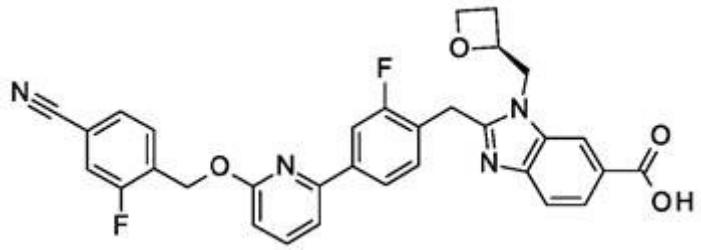
[0235] 表1. 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-5-甲基-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸叔丁基铵的X-射线粉末衍射峰

[0236]

峰	角度 (°2- θ) +/- 0.2°	相对强度 (最强峰的%)
1	5.5	26.20%
2	6.9	64.90%
3	11.2	49.20%
4	16.3	100.00%
5	17.1	34.70%
6	19.6	53.00%
7	21.8	43.10%
8	22.5	93.80%
9	27.3	41.10%
10	28.0	37.90%

[0237] 实施例3

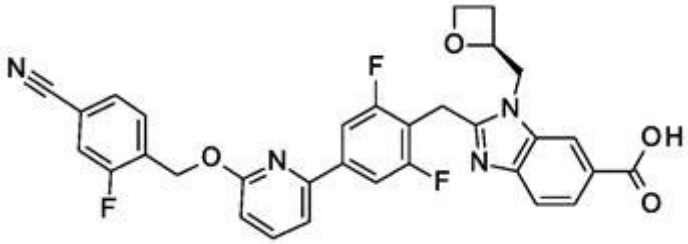
[0238] 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-苯基]甲基]-3-[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]苯并咪唑-5-甲酸

[0239] 

[0240] 将2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸甲酯(152 mg, 0.256 mmol)溶解在THF(6 mL)中,然后加入氢氧化锂(31 mg , 1.26 mmol)和水(2 mL)。将混合物在室温下搅拌16小时,然后用HCl水溶液(1N)调节pH至6。在真空中除去THF并通过过滤收集剩余固体。通过使用10至40% ACN/NH_4HCO_3水溶液(10 mM, pH 10)梯度的反相快速色谱法提纯以获得标题化合物(60 mg, 41%)。ES/MS *m/z* 567 (M+H)。

[0241] 实施例4

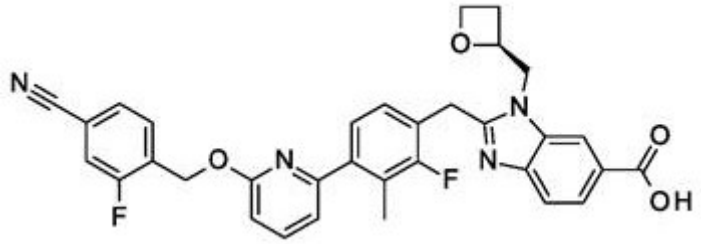
[0242] 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2,6-二氟-苯基]甲基]-3-[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]苯并咪唑-5-甲酸

[0243] 

[0244] 使用4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2,6-二氟-苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯基本如实施例1中所述制备标题化合物。通过使用30至50% ACN/NH_4HCO_3水溶液(10 mM, pH 10)梯度的反相快速色谱法提纯该产物。ES/MS *m/z* 585 (M+H), 583 (M-H)。

[0245] 实施例5

[0246] 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-3-甲基-苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸

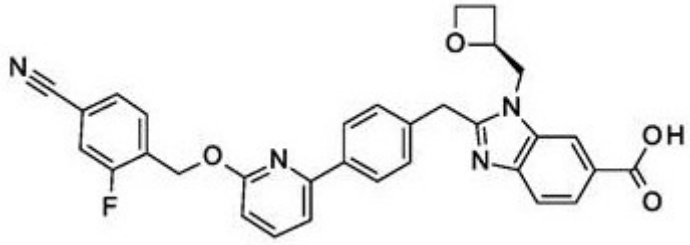
[0247] 

[0248] 使用4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]-2-氟-3-甲基-苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯基本如实施例2中所述制备标题化合物。通过使用5至40% ACN/5% NH_4HCO_3水溶液梯度的反相快速色谱法提纯该产物。ES/MS *m/z* 581 (M+H), 579 (M-H)。

[0249] 实施例6

[0250] 2-[[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]苯基]甲基]-3-[[(2S)-氧杂

环丁烷-2-基]甲基]苯并咪唑-5-甲酸

[0251] 

[0252] 使用4-[[2-[4-[6-[(4-氰基-2-氟-苯基)甲氧基]-2-吡啶基]苯基]乙酰基]氨基]-3-[[(2S)-氧杂环丁烷-2-基甲基]氨基]苯甲酸甲酯基本如实施例1中所述制备标题化合物。通过使用20至35% ACN/5% NH_4HCO_3水溶液梯度的反相快速色谱法提纯粗产物。ES/MS *m/z* 549.0 (M+H), 547.1 (M-H)。

[0253] 生物检测

[0254] 人GLP-1受体HEK293细胞cAMP检测

[0255] 在以581 ± 94 (n=6)和104 ± 12 (n=5) fmol/mg蛋白的表达密度表达人GLP-1R(NCBI登录号NP_002053)的HEK293克隆细胞系中使用cAMP形成测定GLP-1受体功能活性(使用[^{125}I]GLP-1(7-36)NH_2同源竞争结合分析测定)。在20 µl检测体积中(最终DMSO浓度为0.5%),在补充了1X GlutaMAX™(Gibco Cat# 35050)、0.1%牛酪蛋白(Sigma C4765-10ML)、250 µM IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤,Acros Cat# 228420010)和20 mM HEPES(Gibco Cat# 15630)的DMEM(Gibco Cat# 31053)中用化合物(在DMSO中20点浓度响应曲线,2.75倍Labcyte Echo直接稀释,384孔板Corning Cat# 3570)处理hGLP-1R受体表达细胞。在37℃下孵育30分钟后,使用CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF检测试剂盒(62AM4PEJ)定量测定所造成的细胞内cAMP的增加。简言之,通过加入在细胞裂解缓冲液中的cAMP-d2缀合物(10 µL),接着加入抗体抗-cAMP-Eu^{3+}-穴状化合物(也在细胞裂解缓冲液中)(10 µL),检测细胞内的cAMP水平。所得竞争性检测(competitive assay)在室温下孵育至少60分钟,然后使用PerkinElmer Envision®仪器在320 nm的激发和在665 nm和620 nm的发射下检测。Envision单位(在665nm/620nm的发射*10,000)与存在的cAMP的量成反比并使用cAMP标准曲线换算成每孔的nM cAMP。将在每个孔中生成的cAMP量(nM)换算成用人GLP-1(7-36)NH_2观察到的最大响应的百分比。使用最大响应百分比 vs. 添加的化合物浓度,通过非线性回归分析推导出相对EC_{50}值和最高百分比(percent top)(E_{max}),拟合到四参数逻辑方程。在使用表达581和104 fmol/mg GLP-1R的HEK293细胞的上述cAMP检测中测试实施例1-6的化合物时的EC_{50}和E_{max}数据分别显示在表2和3中。这些数据表明实施例1-6的化合物是人GLP-1受体的激动剂。

[0256] 表2. 具有581 fmol/mg的GLP-1R表达密度的HEK293细胞系,细胞内cAMP响应

[0257]

实施例	EC_{50} (nM) ± SEM (n)	E_{max} (%) ± SEM (n)
1	9.33 ± 1.36 (n = 6)	99.5 ± 2.53 (n = 6)
2	1.14 ± 0.315 (n = 6)	104 ± 4.35 (n = 6)
3	3.08 ± 0.379 (n = 5)	99 ± 3.69 (n = 5)
4	3.99 ± 0.378 (n = 3)	99.2 ± 4 (n = 3)
5	6.45 ± 0.934 (n = 3)	105 ± 2.43 (n = 3)
6	20 ± 6.51 (n = 4)	101 ± 3.42 (n = 4)

[0258] 表3. 具有104 fmol/mg的GLP-1R表达密度的HEK293细胞系,细胞内cAMP响应

[0259]

实施例	EC_{50} (nM) ± SEM (n)	E_{max} (%) ± SEM (n)
1	20 ± 3.25 (n = 6)	71.4 ± 2.26 (n = 6)
2	3.97 ± 0.61 (n = 6)	79.2 ± 3.2 (n = 6)
3	10 ± 2.3 (n = 5)	81.7 ± 3.86 (n = 5)
4	9.59 ± 2.36 (n = 3)	78.3 ± 5.1 (n = 3)
5	23.6 ± 5.43 (n = 3)	76.7 ± 3.88 (n = 3)
6	47.7 ± 17.9 (n = 4)	80.3 ± 3.1 (n = 4)

[0260] 在人GLP-1R敲入小鼠中的体内腹腔内葡萄糖耐量试验

[0261] 使用从小鼠*Glp-1r*基因座表达人GLP-1R(NCBI登录号NP_002053)的小鼠测定实施例化合物体内降低血糖浓度的效力(Jun, L.S.等人, PLoS One. 2014 9:e93746)。禁食整夜的小鼠口服给予溶解在10% Kolliphor®(HS15)/聚乙二醇400(PEG400)中的受试化合物。给药后1小时,通过腹腔内注射(2g/kg)给予动物葡萄糖,并在接下来的两小时内使用血糖仪间歇性地测量血糖水平。递送一定剂量范围的受试化合物,确定每个剂量组的曲线下面积计算值,并拟合到四参数逻辑模型,以作为具有95%置信区间的ED_{50}计算体内效力。当在上述体内腹腔内葡萄糖耐量试验中测试时,实施例1-3的化合物在表达人GLP-1R的小鼠中表现出降低血糖浓度的效力,ED_{50}(和95%置信区间)值如表4中所示,这表明这些化合物是小鼠中口服可利用的强效GLP-1R激动剂。

[0262] 表4. 在表达人GLP-1R的小鼠中的降血糖效力

[0263]

实施例	降血糖ED_{50} (mg/kg)	95%置信区间
1	0.09	0.0301-0.2592
2	0.07	0.0246-0.1808
3	0.06	0.013-0.246

[0264] 非人灵长类(NHP)药代动力学:

[0265] 将受试化合物以0.5 mg/kg(使用1 mL/kg的剂量体积)静脉(IV)给药于禁食的雄性食蟹猴。在静脉推注给药后0.08、0.25、0.5、1、2、4、8、12和24小时收集连续血液样本。在用EDTA凝结剂处理后,通过离心获得血浆并储存在-70℃直至通过LC-MS/MS分析。测定血浆中的受试品浓度。使用非房室模型分析计算血浆清除率和稳态分布体积。表5显示实施例1-

3的化合物在这种检测中的药代动力学数据。这些数据部分用于报告人机械学PK预测(human mechanistic PK projections),其提示人药代动力学状况支持每日一次给药。

[0266] 表5. 食蟹猴药代动力学数据

[0267]

实施例	血浆清除率(mL/min/kg)	分布体积(L/kg)	媒介物*
1	13	1.2	A
2	11	1.1	A
3	6	1.1	B

[0268] *媒介物A - 5% DMSO和95% (20% CAPTISOL® (w/v)在水中);媒介物B - 20% captisol (w/v)在水中 + 1摩尔当量NaOH。

[0269] 磷酸二酯酶10 (PDE10)酶活性检测

[0270] 为了生成磷酸二酯酶10A1(PDE10A1)蛋白,将对应于GenBank ID AAD32595.1的全长PDE10A1克隆克隆到pFastBac1(Invitrogen)中。通过昆虫细胞的杆状病毒感染表达具有C-末端FLAG-标签的PDE10A1蛋白,使用抗FLAG M2-琼脂糖(Sigma)和在Superdex 200柱(GE Healthcare)上的尺寸排阻色谱法纯化,并以小等分试样(20 mM Tris-HCl,Ph 7.5,150 mM NaCl,10%甘油)储存在-80℃。

[0271] 用检测放射性一磷酸核苷酸而非环一磷酸的基于硅酸钇的闪烁迫近检测法(SPA)测量PDE10A1酶活性。检测缓冲液由50 mM Tris-HCl pH 7.5、8 mM $MgCl_2$、3.4 mM EDTA和0.1% BSA组成(Sigma)。在384孔板(3706,Corning)中以50 μl的总体积进行检测:由24 μl PDE10A1酶、1 μl受试化合物和25 μl环核苷酸组成。受试化合物在纯DMSO中使用10点浓度响应曲线以3倍稀释系数稀释并使用Echo555(LabCyte)将1 μl声学分配到检测板中。24 μl PDE10A1蛋白用1 μl化合物孵育30分钟,然后通过加入[8-^{3}H]-cGMP底物(6.5 Ci/mmol,Perkin Elmer)引发反应。在检测缓冲液中,组分的最终浓度为70 pM PDE10A1、80 nM(^{3}H - cGMP)和2% DMSO。反应混合物中的最大化合物浓度为10 μM。反应在室温下孵育60分钟,然后淬灭并加入每孔400 mg SPA珠粒(bead)(RPNQ0150,Perkin Elmer)。12小时后用Microbeta计数器(Perkin Elmer)量化珠粒结合放射性(产物(product))。将数据归一化为%抑制并使用如描述的4参数逻辑方程计算IC_{50}值(Campbell, R.M.;Dymshitz, J.;Eastwood, B.J.;等人"Data Standardization for Results Management.":Sittampalam, G.S.;Grossman, A.;Brimacombe, K.;等人编辑. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company和the National Center for Advancing Translational Sciences;2004.)。表6显示实施例1-4的化合物在该检测中的活性。这些数据表明实施例1至4的化合物对PDE10A具有弱结合亲和力,这表明毒性风险降低。

[0272] 表6. PDE10A1抑制的体外效力

[0273]

实施例	IC_{50} (μM),n = 1
1	>10
2	7.43
3	>10
4	5.41

[0274] 人hERG K^+通道亲和力放射性配体结合检测

[0275] 在如本文所述的放射性配体结合检测中评估化合物对转染HEK-293细胞中的人

hERG K^+通道的亲和力。细胞膜匀浆(大约40 μg蛋白)在含有50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM KCl和1 mM $MgCl_2$的缓冲液中在不存在或存在受试化合物的情况下在22℃下用3 nM [^{3}H]多非利特孵育60分钟。该检测以96孔板格式以200 μL的体积进行,含有最多1%来自受试化合物的初次增溶的DMSO。在孵育后,样品在真空下经由0.3% PEI预浸玻璃纤维过滤器(GF/B,Packard)快速过滤并使用96-样品细胞采集器(Unifilter,Packard)用冰冷的50 mM Tris-HCl、10 mM KCl和1 mM $MgCl_2$冲洗几次。将过滤器干燥,然后在闪烁计数器(Topcount,Packard)中使用闪烁混合液(scintillation cocktail)(Microscint 0,Packard)计数放射性。表7显示实施例1-3在该检测中的活性,表示为对照放射性配体特异性结合的抑制百分比。这些数据表明实施例1至3的化合物具有弱hERG抑制活性,这表明毒性风险降低。

[0276] 表7. 人hERG K^+通道亲和力放射性配体抑制百分比

[0277]

实施例	在100 μM化合物浓度下的抑制百分比(%),n = 1
1	0
2	54
3	37