



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102307868 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 04

(21) 申请号 201080007001. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 02. 03

*C07D 401/12* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61K 31/435* (2006. 01)

09152089. 0 2009. 02. 04 EP

*A61K 31/44* (2006. 01)

*A61P 35/00* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/051316 2010. 02. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02010/089327 EN 2010. 08. 12

(71) 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时比尔斯

(72) 发明人 B·舍恩特杰斯 S·德康

N·C·I·安布拉尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 李进 刘健

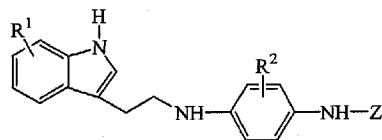
权利要求书 3 页 说明书 77 页

(54) 发明名称

作为抗癌剂的吲哚衍生物

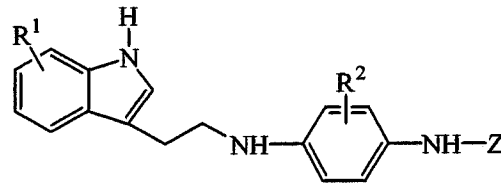
(57) 摘要

本发明提供式 (I) 化合物、其治疗癌症的用途以及包含所述式 (I) 化合物的药用组合物。



(I)

1. 式 (I) 化合物：



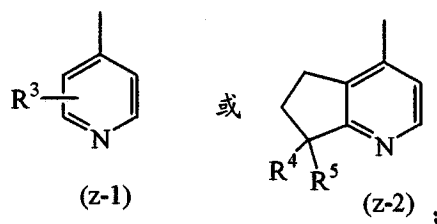
(I)

所述化合物包括其任何立体化学异构形式，其中

$R^1$  是羟基  $C_{1-6}$  烷基或  $C_{2-6}$  烯基；前提是该  $R^1$  取代基位于吲哚部分的 6 或 7 位上；

$R^2$  是氢或  $C_{1-4}$  烷基；

Z 是选自下列的基团：



$R^3$  是氢或羟基  $C_{1-4}$  烷基；

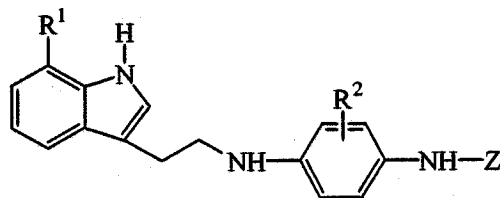
$R^4$  是羟基或  $C_{1-4}$  烷氧基；

$R^5$  是氢或  $C_{1-4}$  烷基；或

$R^4$  和  $R^5$  一起形成氧代基；

其药学可接受的盐或其溶剂化物。

2. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物具有下式：



(I-a)

3. 权利要求 1 或 2 的化合物，其中  $R^1$  为羟基  $C_{1-6}$  烷基。

4. 权利要求 1-3 中任一项的化合物，其中  $R^2$  为  $C_{1-4}$  烷基。

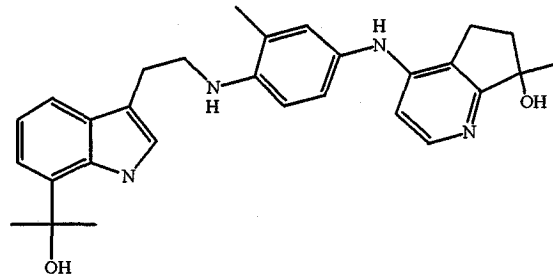
5. 权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 Z 为式 (z-1) 基团。

6. 权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 Z 为式 (z-2) 基团。

7. 权利要求 6 的化合物，其中  $R^4$  为羟基和  $R^5$  为氢。

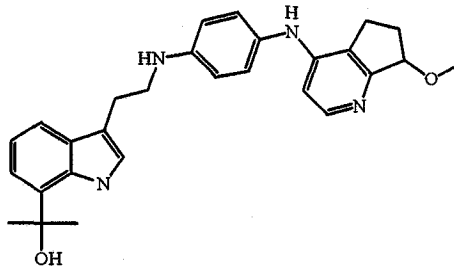
8. 权利要求 6 的化合物，其中  $R^4$  为羟基和  $R^5$  为  $C_{1-4}$  烷基。

9. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物是具有下式的对映体，



且所述对映体在温度 20°C 和 1dm 样品池光程下,以 8.59mg/ml 的浓度在氯仿中,用钠的 D 线的波长 (589nm) 的光测定,具有左旋性;或其药学可接受的盐或其溶剂化物。

10. 权利要求 1 的化合物,其中所述化合物是具有下式的对映体,



且所述对映体在温度 20°C 和 1dm 样品池光程下,以 10.33mg/ml 的浓度在甲醇中,用钠的 D 线的波长 (589nm) 的光测定,具有右旋性;或

其药学可接受的盐或其溶剂化物。

11. 用作药物的权利要求 1-10 中任一项的化合物。

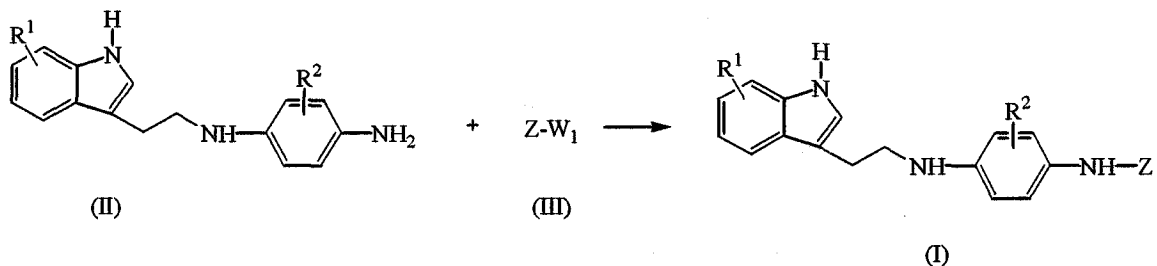
12. 药用组合物,其包含药学可接受的载体和作为活性成分的治疗有效量的权利要求 1-10 中任一项的化合物。

13. 权利要求 1-10 中任一项的化合物用于制备治疗癌症的药物的用途。

14. 一或多种抗癌剂和权利要求 1-10 中任一项的化合物的组合物。

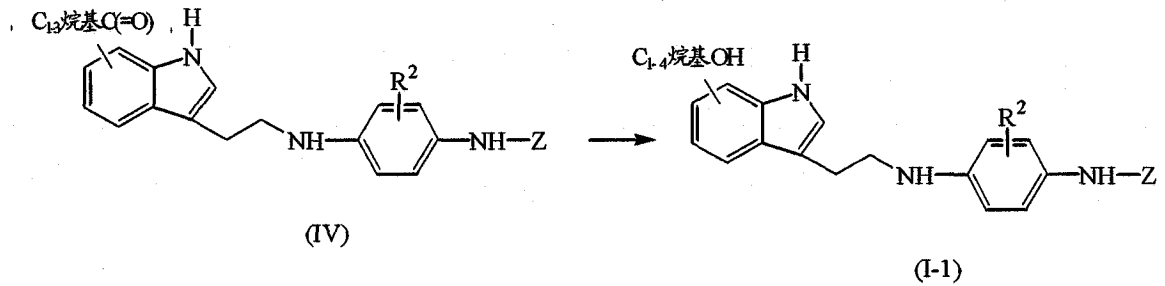
15. 制备权利要求 1 的化合物的方法,其特征为:

a) 在反应惰性溶剂中,任选在适当的碱存在下,使式 (II) 中间体与式 (III) 中间体反应,其中  $W_1$  为适当的离去基团,或者在适当的催化剂、适当的配体、适当的碱和适当的溶剂存在下,使式 (II) 中间体与式 (III) 中间体反应,其中  $W_1$  为适当的离去基团,

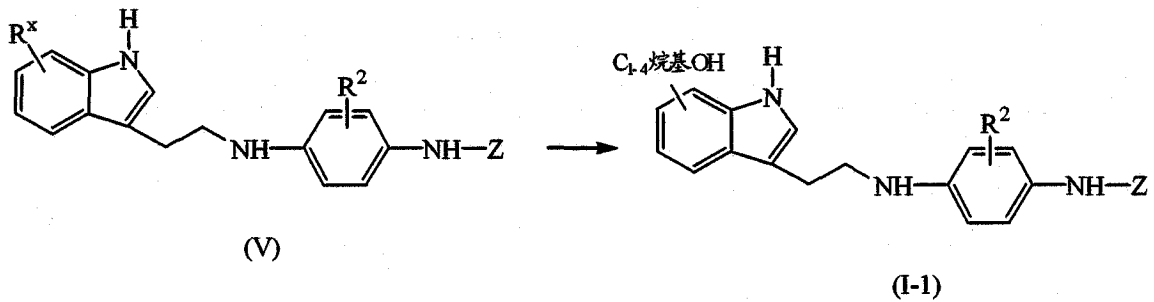


其中  $R^1$ 、 $R^2$  和 Z 按权利要求 1 中定义;

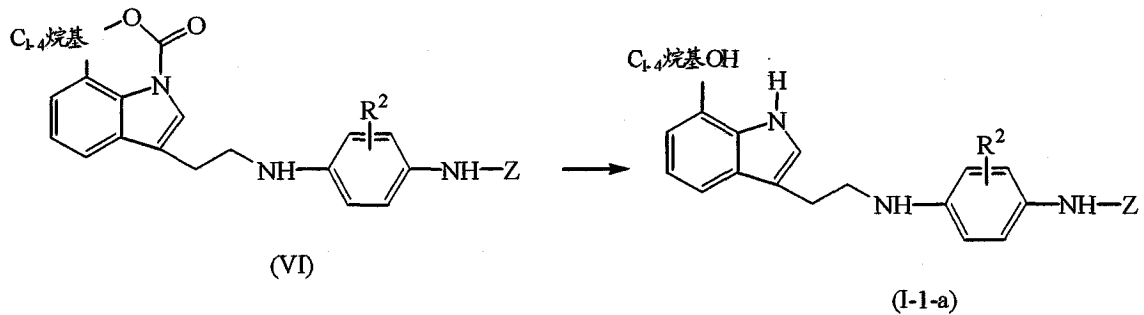
b) 在适当还原剂和适当溶剂存在下,还原对应的式 (IV) 羰基衍生物,



c) 在适当还原剂和适当溶剂存在下,还原对应的式 (V) 酯衍生物,其中  $R^x$  代表  $-C_{1-3}$  烷基  $C(=O)OC_{1-4}$  烷基,



d) 在适当溶剂存在下,将式 (VI) 中间体用适当的碱水解,



或者,如果要求,按文献已知的转换方法,将式 (I) 化合物彼此转化,并且如果要求,进一步通过用酸处理将式 (I) 化合物转化为治疗活性的无毒酸加成盐,或者通过用碱处理而转化为治疗活性的无毒碱加成盐,或者反之,通过用碱处理将酸加成盐形式转化为游离碱,或通过用酸处理将碱加成盐转化为游离酸;或者如果要求,制备其立体化学异构形式或其溶剂化物。

## 作为抗癌剂的吲哚衍生物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及吲哚类化合物和包含该化合物作为抗癌剂的组合物。此外,本发明提供所公开化合物的制备方法、含有它们的组合物以及使用它们的方法,例如作为药物,尤其是治疗癌症的药物。

[0002] 本申请要求欧洲专利申请第 09152089.0 号的优先权,该申请通过引用结合到本文中。不限制于任何理论,目前认为,尽管在肿瘤细胞生物学中,MDM2 和 p53 代表关键要素,且在对细胞损伤或应激的细胞应答中起主要作用,也尽管本化合物能增加 p53 的表达,但由本发明化合物诱出的已证实有效的临床前抗肿瘤活性,它们似乎不能代表主要的分子靶标。最初的观测指向在 DNA 合成和 / 或复制 - 应激响应上的直接或间接的效果,作为对所述化合物所观测到的临床前抗肿瘤活性的支持。本发明化合物还在缺乏 p53、缺乏功能性 p53 或具有突变型 p53 的肿瘤细胞中表现出抗增殖作用,此外,其可使致瘤细胞对化学疗法和放射疗法敏感。

[0003] p53 是一种肿瘤抑制蛋白,在细胞增殖和细胞生长抑制 / 凋亡平衡的调节中起关键作用。在正常条件下, p53 的半寿期非常短,因此在细胞中 p53 浓度为低的。然而,响应于细胞 DNA 损伤或细胞应激(例如致癌基因激活、端粒侵蚀、组织缺氧), p53 的浓度增加。这种 p53 浓度的增加导致推动细胞进入生长抑制或凋亡过程的许多基因的转录的活化。因此, p53 的重要功能是预防受损细胞不受控制地增殖,从而保护组织,避免癌的生长。本文所用术语“MDM2”(鼠双微体 2: Murine Double Minute 2)指的是经 mdm2 基因表达所得的蛋白。在此术语的意义内,MDM2 包含所有由 mdm2 编码的蛋白、其突变体、或者其片状蛋白(slice protein)、以及其磷酸化蛋白。此外,如本文所用的那样,术语“MDM2”包含 MDM2 同型物,例如 MDMX(也称为 MDM4)以及 MDM2 同系物和其它动物同型物,例如人同系物 HDM2 或人同型物 HDMX。MDM2 是一种关键的 p53 功能负调节物。它通过结合至 p53 的氨基端激活区形成负的自调节环,从而 MDM2 既能抑制 p53 活化转录的能力也能以 p53 为目标进行蛋白质水解降解。在正常条件下,这种调节环是维持 p53 低浓度的原因。

### [0004] 发明背景

[0005] JP 11130750 描述了取代的苯基胺基羰基吲哚衍生物等作为 5-HT 受体拮抗剂。

[0006] EP1129074 描述了邻氨基苯甲酸酰胺作为血管内皮生长因子受体(VEGFR)抑制剂,且用于治疗血管生成性疾病。W001/42224 提供了羧基酰胺基衍生物,用于治疗阿兹海默症。EP1317443 公开了三环叔胺衍生物,用作为趋化因子受体 CXCR4 或 CCR5 调质,用于治疗人免疫缺陷病毒和猫免疫缺陷病毒。

[0007] EP1379239 公开了 N-(2-芳基乙基)苄胺,作为 5-HT<sub>6</sub> 受体拮抗剂。W000/15357 提供了哌嗪-4-苯基衍生物,作为 MDM2 与 p53 之间的相互作用的抑制剂。EP1137418 提供了三环化合物,用于修复 p53 家族蛋白的构象稳定性。W003/040402 提供抑制蛋白质之间相互作用(如 MDM2 与 p53 之间相互作用)的化合物。EP1443937 描述了取代的 1,4-苯二氮草及其作为 MDM2-p53 相互作用抑制剂的用途。EP1458380 提供顺-2,4,5-三苯基-咪唑酮,其抑制 MDM2 蛋白与类 p53 肽之间相互作用,并具有抗增殖活性。

[0008] EP1519932 公开了双芳基磺酰胺化合物,其结合至 MDM2 并可用于癌症治疗。

[0009] W02006/032631、W02007/107543、W02007/107545、W02009/019274、W02009/037308 和 W02009/037343 公开了 MDM2 与 p53 之间相互作用的抑制剂。

[0010] 对于具有有效抑制肿瘤细胞生长效果、宽广的安全分布以及较少的不期望的副作用的有效小分子有着需求。

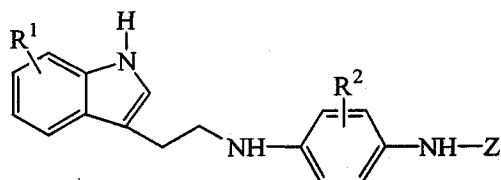
[0011] 本发明化合物显示出极好的体外活性以及极好的体内抗肿瘤效果。它们对 P450 酶具有低的亲和力,这降低不利的药-药相互作用风险,容许较宽广的安全限度。此外,本发明化合物具有低的药物诱导神经学作用,且具有改善的心血管分布,其可有利地改变化合物的剂量限制性毒性 (dose limiting toxicity)。

[0012] 发明描述

[0013] 本发明提供用于治疗癌症的化合物、组合物和治疗癌症的方法。此外,本发明的化合物和组合物有益于增强化学疗法和放射疗法的效力。

[0014] 本发明涉及式 (I) 化合物

[0015]



(I)

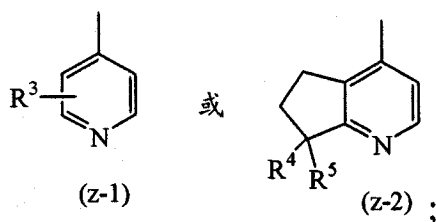
[0016] 所述化合物包括其任何立体化学异构形式,其中

[0017]  $R^1$  是羟基  $C_{1-6}$  烷基或  $C_{2-6}$  烯基;前提是该  $R^1$  取代基位于咪唑部分的 6 或 7 位上;

[0018]  $R^2$  是氢或  $C_{1-4}$  烷基;

[0019] Z 是选自下列的基团:

[0020]



[0021]  $R^3$  是氢或羟基  $C_{1-4}$  烷基;

[0022]  $R^4$  是羟基或  $C_{1-4}$  烷氧基;

[0023]  $R^5$  是氢或  $C_{1-4}$  烷基;或

[0024]  $R^4$  和  $R^5$  一起形成氧代基;

[0025] 其药学可接受的盐或其溶剂化物。

[0026] 式 (I) 化合物还可以其互变异构形式存在。虽然这些形式未在上式中明确指明,但意欲包括在本发明的范围之内。

[0027] 本发明还涉及式 (I) 化合物用于制备癌症治疗药物的用途以及涉及式 (I) 化合物在癌症治疗中的用途。

[0028] 以下解释以上定义和下文中使用的诸多术语。这些术语有时单独使用或在组合术

语中使用。

[0029] 作为基团或基团的一部分的  $C_{1-4}$  烷基限定为具有 1-4 个碳原子的直或支链饱和烃基,如甲基、乙基、丙基、1-甲基乙基、丁基;作为基团或基团的一部分的  $C_{1-6}$  烷基限定为具有 1-6 个碳原子的直或支链饱和烃基,如对  $C_{1-4}$  烷基所定义的基团和戊基、己基、2-甲基丁基等。 $C_{2-6}$  烯基限定为含有一个双键且具有 2-6 个碳原子的直或支链烃基,例如乙烯基、2-丙烯基、3-丁烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、3-甲基-2-丁烯基等。

[0030] 取代基至环体系内所画的线表示该键可与任何适当环原子连接。

[0031] 对于治疗用途,式 (I) 化合物的盐是其中抗衡离子为药学可接受的那些盐。但是,作为非药学可接受的酸和碱的盐也可发现其用于例如药学可接受化合物的制备或纯化中。所有的盐,无论是否是药学可接受的,都包括在本发明的范围内。

[0032] 上下文中所提及的药学可接受的盐意为包含式 (I) 化合物能够形成的治疗活性的无毒酸加成盐形式。后者通过将碱形式用诸如下列适当的酸处理可方便地得到:如无机酸,例如氢卤酸,如盐酸、氢溴酸等;硫酸;硝酸;磷酸等;或者有机酸,例如乙酸、丙酸、羟基乙酸、2-羟基丙酸、2-氧代丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、2-羟基-1,2,3-丙三羧酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、4-甲基苯磺酸、环己烷磺酸、2-羟基苯甲酸、4-氨基-2-羟基苯甲酸等酸。反之,通过用碱处理可将盐形式转化为游离碱形式。

[0033] 通过用适当的有机碱和无机碱处理,可将含酸性质子的式 (I) 化合物转化为其治疗活性的无毒金属或胺加成盐形式。上下文中所提及的药学可接受的盐也意为包含式 (I) 化合物能够形成的治疗活性的无毒金属或胺加成盐形式。适当的碱加成盐形式包含,例如铵盐,碱金属或碱土金属盐,例如锂盐、钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等,有机碱的盐,例如伯、仲、叔脂族和芳族胺,如甲胺、乙胺、丙胺、异丙胺、四种丁胺异构体、二甲胺、二乙胺、二乙醇胺、二丙胺、二异丙胺、二正丁基胺、吡咯烷、哌啶、吗啉、三甲胺、三乙胺、三丙胺、喹核碱、吡啶、喹啉和异喹啉,苜星 (benzathine)、N-甲基-D-葡萄糖胺、2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇、海巴明 (hydrabamine) 的盐,以及带有氨基酸的盐,如精氨酸、赖氨酸等的盐。反之,通过用酸处理可将盐形式转化为游离酸形式。

[0034] 术语盐也包含季铵盐(季胺),其通过式 (I) 化合物的碱性氮与适当的季铵化试剂之间的反应能够由式 (I) 化合物形成,季铵化试剂诸如,如任选取代的  $C_{1-6}$  烷基卤化物/芳基卤化物、 $C_{1-6}$  烷基羰基卤化物/芳基羰基卤化物或芳基  $C_{1-6}$  烷基卤化物(例如碘甲烷或苜基碘),其中芳基代表未取代的或取代的苯基。也可使用带有好的离去集团的其它反应物,如三氟甲磺酸  $C_{1-6}$  烷基酯、甲磺酸  $C_{1-6}$  烷基酯和对甲苯磺酸  $C_{1-6}$  烷基酯。季胺具有带正电荷的氮。药学可接受的抗衡离子包括氯、溴、碘、三氟乙酸根、乙酸根、三氟甲磺酸根、硫酸根、磺酸根。可采用离子交换树脂引入选择的抗衡离子。

[0035] 术语盐优选指药学可接受的酸加成盐形式和药学可接受的金属或胺加成盐形式。

[0036] 术语溶剂化物包含式 (I) 化合物能够形成的水合物和溶剂加成形式及其盐。这些形式的实例是,例如水合物、醇化物等。

[0037] 应理解的是某些式 (I) 化合物及其盐和溶剂化物可含有一或多个手性中心,并以立体化学异构形式存在。

[0038] 上文中所用的术语“式 (I) 化合物的立体化学异构形式”限定为:由通过键的相同顺序键合、但具有不可互换的不同三维结构的相同原子构成的所有可能化合物,所述式 (I)

化合物及它们的药学可接受的盐或生理学功能衍生物可具有该形式。

[0039] 除另外提及或指明外,化合物的化学名称指所有可能的立体化学异构形式的混合物,以及式(I)的各个单个异构形式及它们的盐或溶剂化物,其基本上不含其它异构体,即伴随的其它异构体少于50%,优选少于20%,更优选少于10%,甚至更优选少于5%,更优选少于2%,且最优选少于1%。因此,例如当式(I)化合物被指定为R时,其指该化合物基本上不含S异构体。或者如果例如当式(I)化合物被指定为E时,其指该化合物基本上不含Z异构体。

[0040] 尤其是,立体中心(stereogenic center)可具有R-或S-构型;二价环状(部分)饱和基团上的取代基可具有顺式(cis-)或反式(trans-)构型。含双键的化合物在所述双键上可具有E(异侧)或Z(同侧)-立体化学。术语顺、反、R、S、E和Z对于本领域技术人员是公知的。

[0041] 式(I)化合物的立体化学异构形式明显意欲包括在本发明范围内。

[0042] 最为关注的是那些为立体化学纯的式(I)化合物。

[0043] 按照CAS-命名法惯例,当已知绝对构型的两个立体中心存在于分子中时,R或S描述符被指定至(基于Cahn-Ingold-Prelog次序规则)最低编号的手性中心,参考中心。第二个立体中心的构型采用相对描述符[R\*,R\*]或[R\*,S\*]表示,其中R\*总是指定为参考中心,而[R\*,R\*]指具有相同手性的中心,[R\*,S\*]指不同手性的中心。例如,如果分子中最低编号的立体中心具有S构型而第二个中心为R,立体描述符将指定为S-[R\*,S\*]。如果使用“ $\alpha$ ”和“ $\beta$ ”:在具有最低环数目的环体系中,不对称碳原子上的最高优先级取代基的位置总是独断地在该环体系确定的平均平面(mean plane)的“ $\alpha$ ”位置中。相对于所述参考原子上最高优先级取代基的位置,该环体系中其它不对称碳原子上最高优先级取代基的位置,如果在所述环体系确定的平均平面的同侧,即被命名为“ $\alpha$ ”,或者如果在所述环体系确定的平均平面的另一侧,则被命名为“ $\beta$ ”。

[0044] 本文所用术语顺和反与Chemical Abstracts nomenclature(化学文摘命名法)(J. Org. Chem. 1970, 35(9), 2849-2867)一致,并指环部分上取代基的位置。

[0045] 式(I)化合物可被合成为对映体的外消旋混合物的形式,这些对映体可按照本领域已知的拆分方法彼此分离。可通过与适当的手性酸反应,将式(I)的外消旋化合物转化为对应的非立体异构盐形式。接着例如通过选择性或分步结晶分离所述非立体异构盐形式,然后用碱从中释放出所述对映体。另一种分离式(I)化合物的对映体形式的方法涉及使用手性固定相的液相色谱法。所述纯的立体化学异构形式还可源自适当原料的对应的纯立体化学异构形式,前提是该反应立体特异性地发生。优选如果要求特定的立体异构体,所述化合物将通过立体特异性制备方法合成。这些方法将有利地使用对映异构纯的原料。

[0046] 本发明还意欲包括本发明化合物中存在的原子的任何同位素。例如,氢的同位素包括氘和氚,碳的同位素包括C-13和C-14。

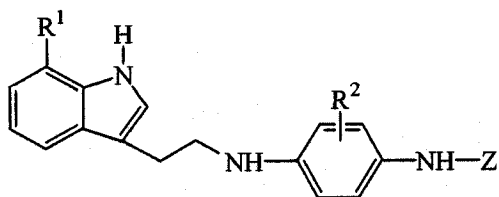
[0047] 每当下文使用时,术语“式(I)化合物”或“本发明化合物”意指还包括药学可接受的盐尤其是酸或碱(金属或胺)加成盐、所有立体异构形式、溶剂化物以及所有多晶结晶形式或无定型形式。

[0048] 每当上下文使用时,取代基可各自独立地选自一系列众多定义,所有可能的化学组合预期为化学可能的。



[0049] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I) 化合物, 其中  $R^1$  取代基位于吡啶部分的 7 位上。因此, 化合物具有下式。

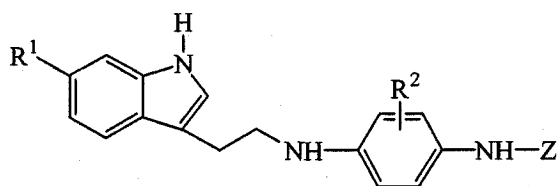
[0050]



(I-a)

[0051] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I) 化合物, 其中  $R^1$  取代基位于吡啶部分的 6 位上。因此, 化合物具有下式。

[0052]



(I-b)

[0053] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 化合物, 其中  $R^1$  是羟基  $C_{1-6}$  烷基, 尤其是  $-CH_2-OH$ 、 $-C(CH_3)_2-OH$ 、 $-CH(CH_3)-OH$ 、 $-CH_2-CH_2-OH$ 、 $-CH(CH_2CH_3)_2-OH$ 、 $-CH_2-CH_2-CHOH-CH_3$ , 更特别是  $-C(CH_3)_2-OH$ 。

[0054] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 化合物, 其中  $R^1$  是  $C_{2-6}$  烯基, 尤其是  $-CH=CH_2$ 、 $-C(CH_3)=CH_2$ 。

[0055] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 化合物或以上指明的其令人关注的实施方案, 其中  $R^2$  是氢。

[0056] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案, 其中  $R^2$  是  $C_{1-4}$  烷基, 尤其是甲基。

[0057] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案, 其中  $R^3$  代表氢。

[0058] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案, 其中  $R^3$  代表羟基  $C_{1-4}$  烷基, 尤其是  $-CH_2-OH$ 。优选该  $R^3$  取代基位于吡啶部分的 2 位上。

[0059] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案, 其中  $R^4$  代表羟基。

[0060] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案, 其中  $R^4$  代表  $C_{1-4}$  烷氧基, 尤其是甲氧基。

[0061] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案, 其中  $R^5$  代表氢。

[0062] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案, 其中  $R^5$  代表  $C_{1-4}$  烷基, 尤其是甲基。

[0063] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案,其中  $R^4$  和  $R^5$  一起形成氧代基。

[0064] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案,其中  $R^4$  是羟基和  $R^5$  是氢。

[0065] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案,其中  $R^4$  是羟基和  $R^5$  是  $C_{1-4}$  烷基尤其是甲基。

[0066] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案,其中  $R^4$  是  $C_{1-4}$  烷氧基和  $R^5$  是氢。

[0067] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案,其中 Z 是式 (z-1) 基团。

[0068] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 的化合物或可能时以上指明的其令人关注的实施方案,其中 Z 是式 (z-2) 基团。

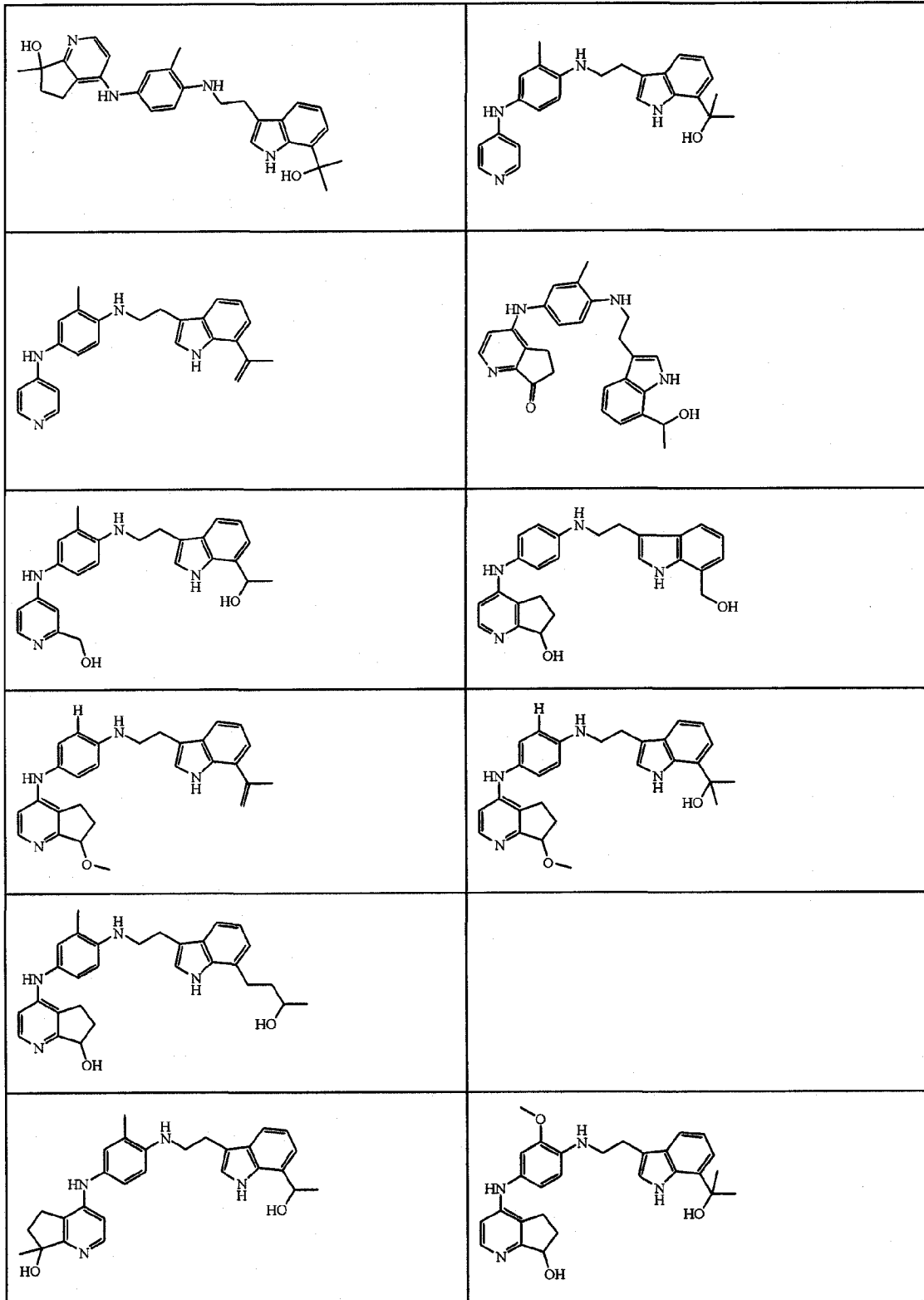
[0069] 以上指明的令人关注的实施方案的所有可能组合都被认为包括在本发明范围之内。

[0070] 本发明令人关注的一个实施方案是那些式 (I)、(I-a) 或 (I-b) 化合物,其中  $R^1$  是  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)\text{-OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHOH-CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$  或  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ;  $R^2$  是氢或甲基;  $R^3$  是氢或  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ;  $R^4$  是羟基或甲氧基;  $R^5$  是氢或甲基,或者  $R^4$  和  $R^5$  一起形成氧代基。

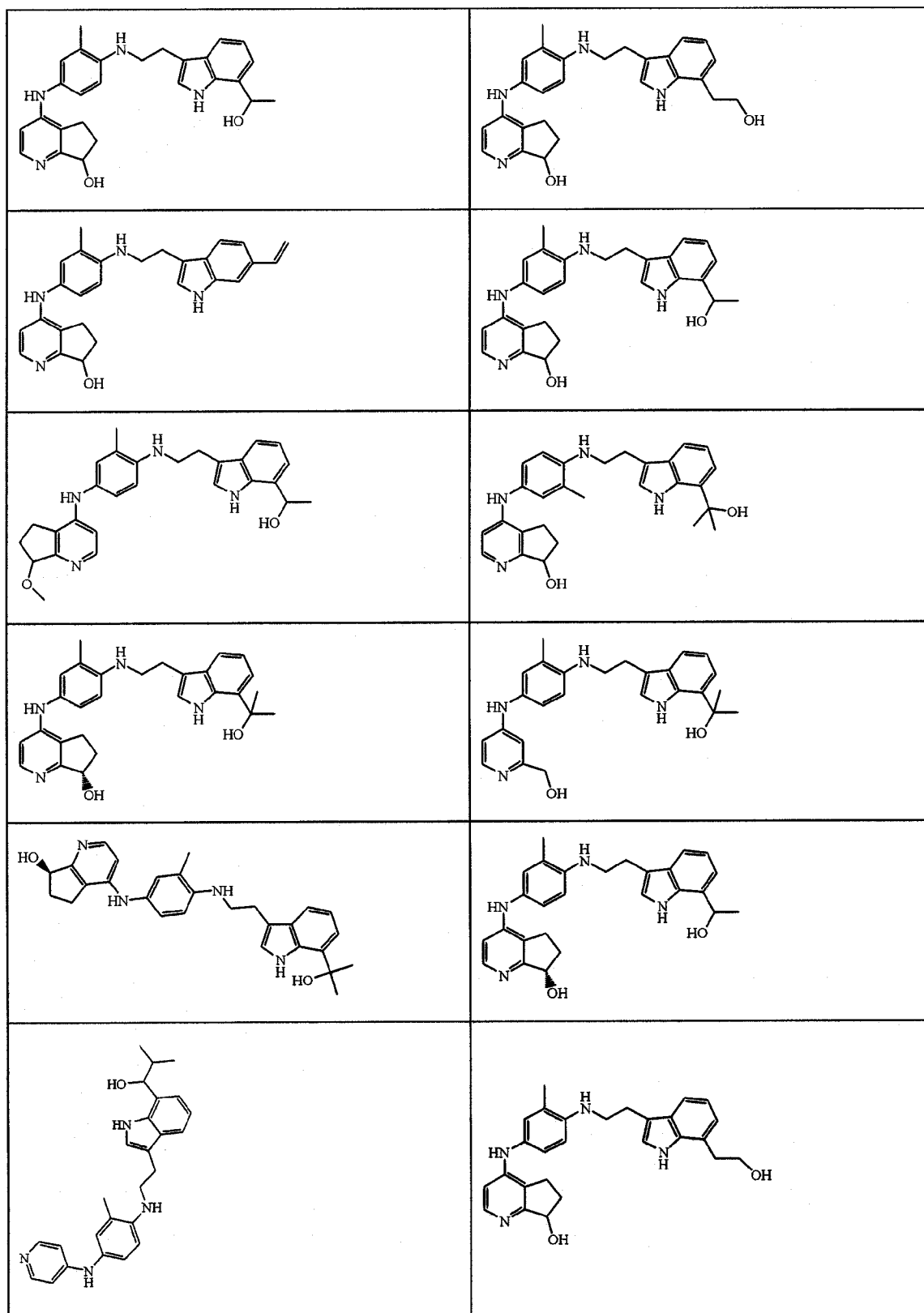
[0071] 以上指明的令人关注的实施方案的化合物优选为立体化学纯。

[0072] 本发明优选的化合物选自下列化合物,包括其任何立体化学异构形式;其药学可接受的盐或其溶剂化物:

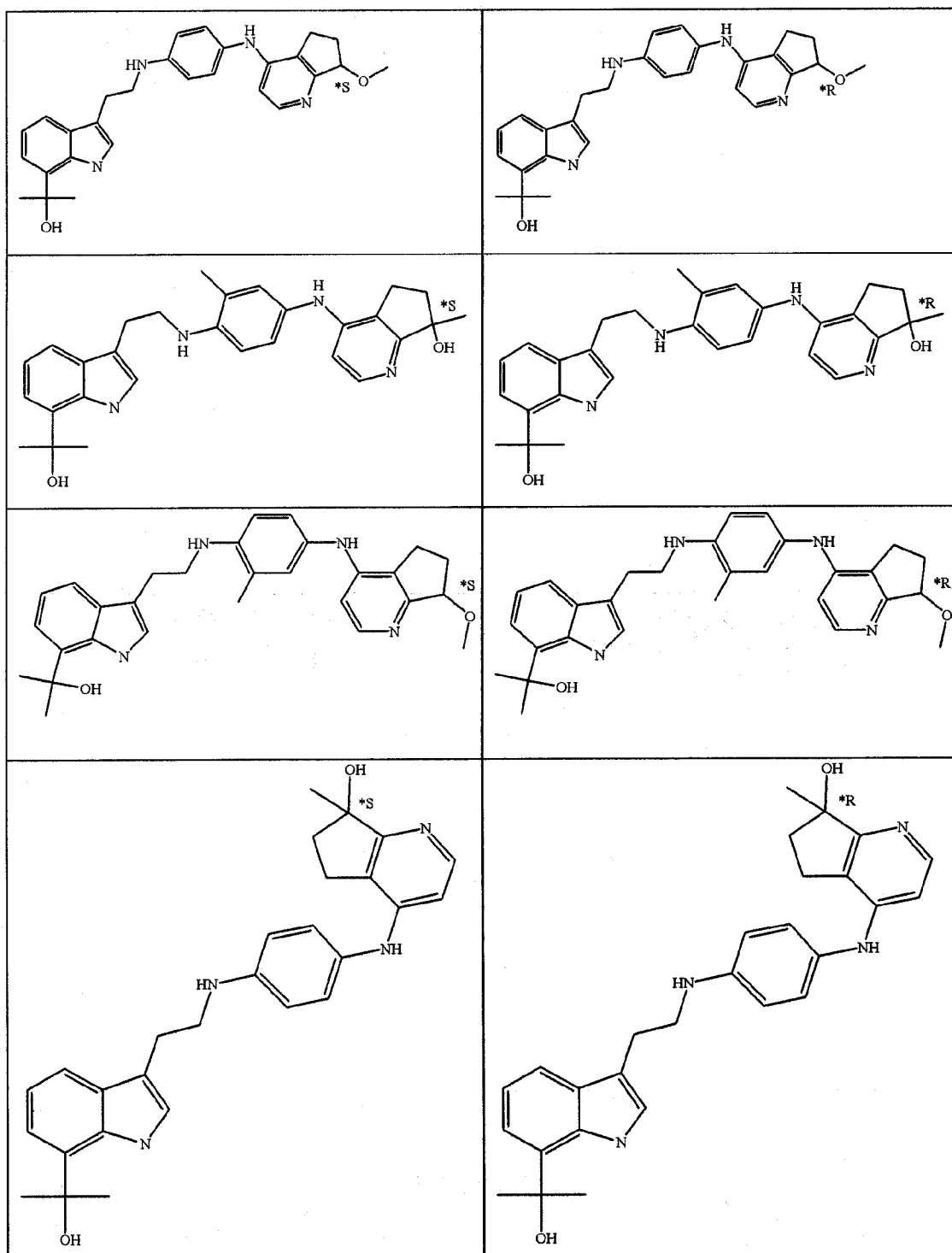
[0073]



[0074]



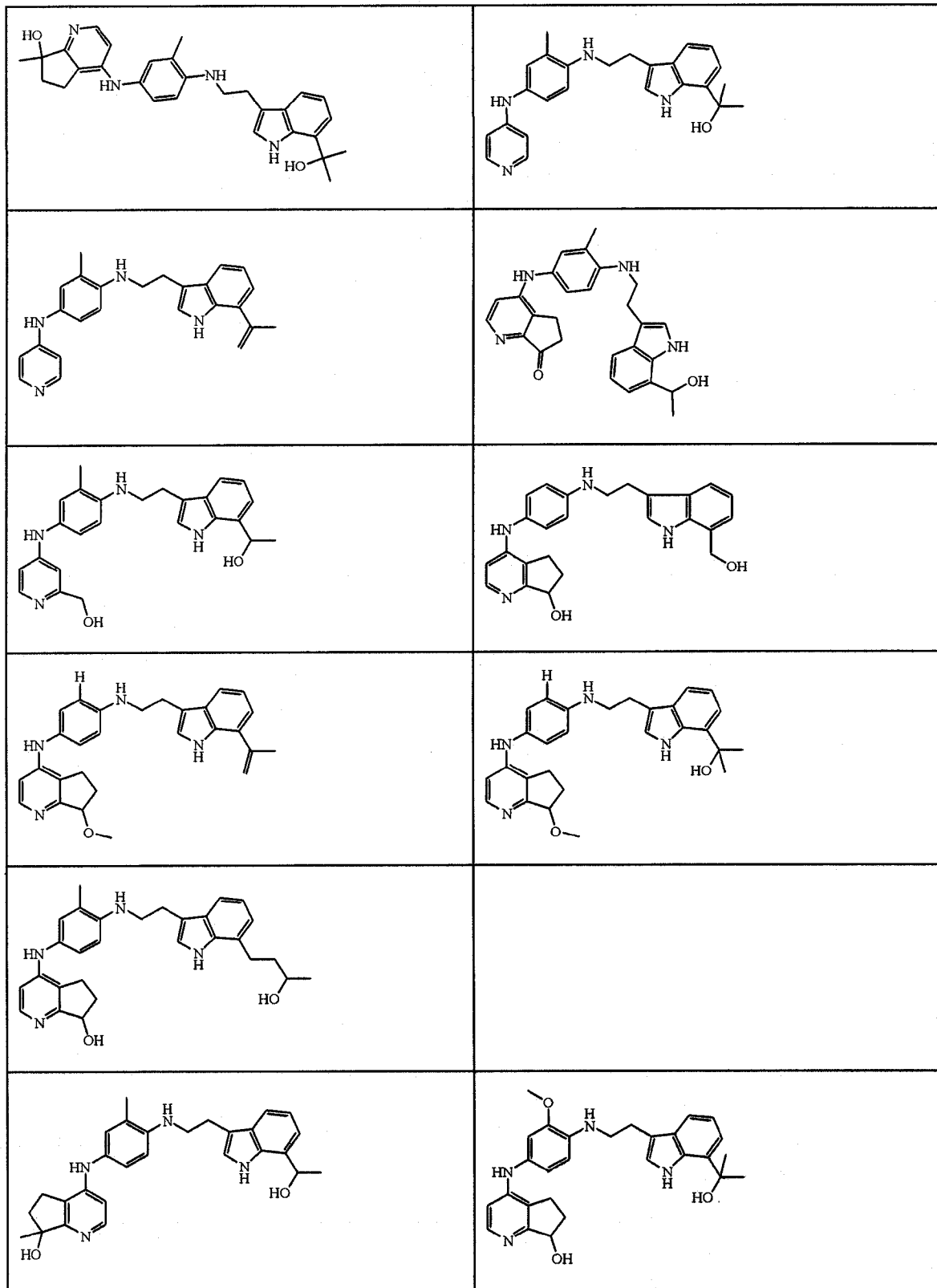
[0075]



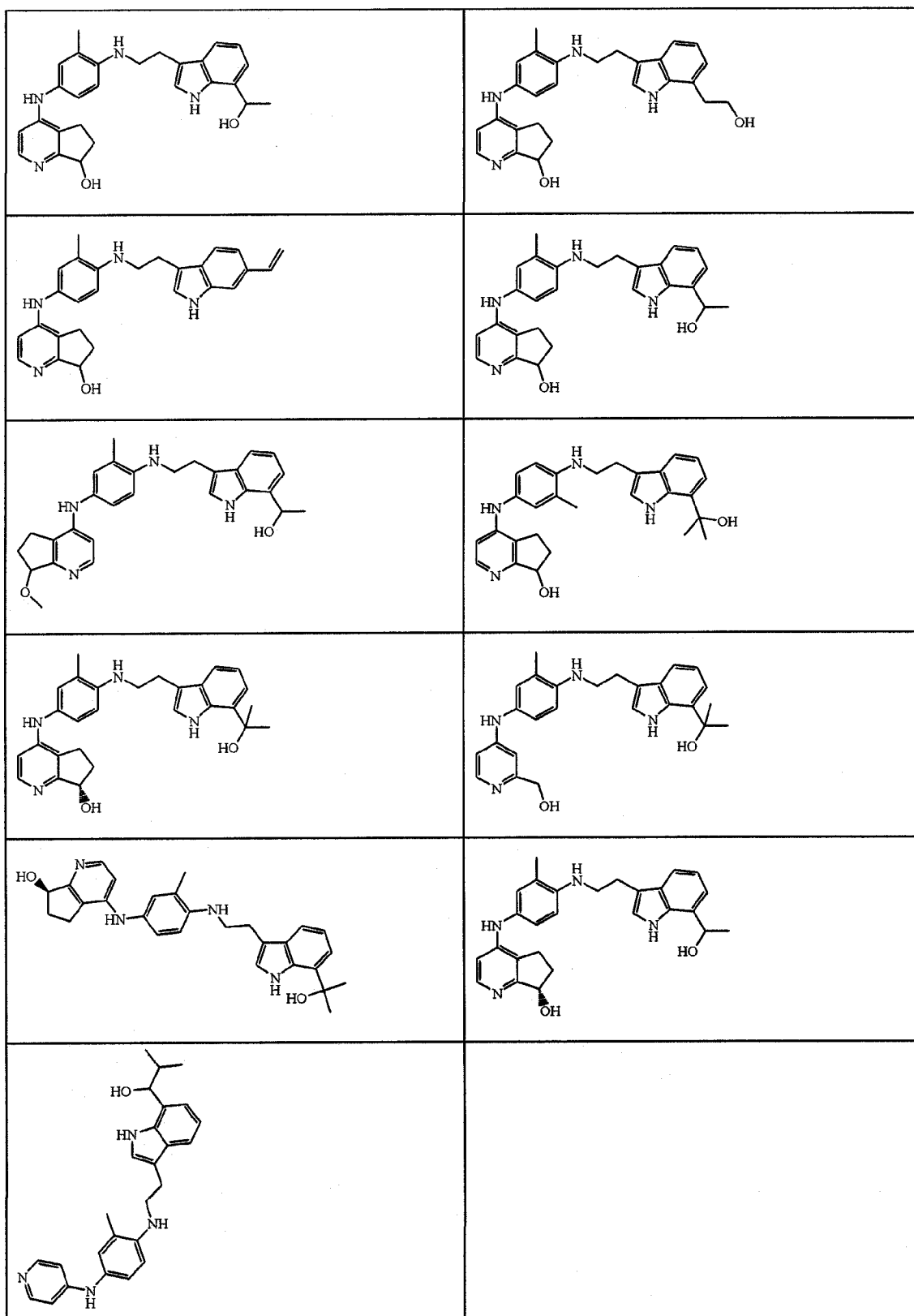
[0076] (\*指相对立体化学)。

[0077] 本发明优选的化合物选自下列化合物,包括其任何立体化学异构形式;其药学可接受的盐或其溶剂化物:

[0078]

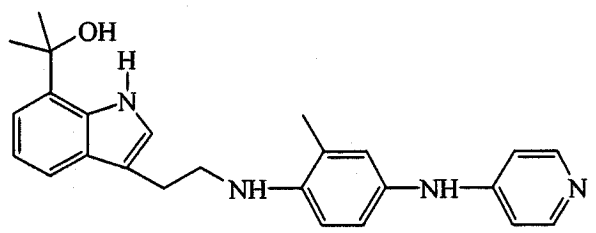


[0079]



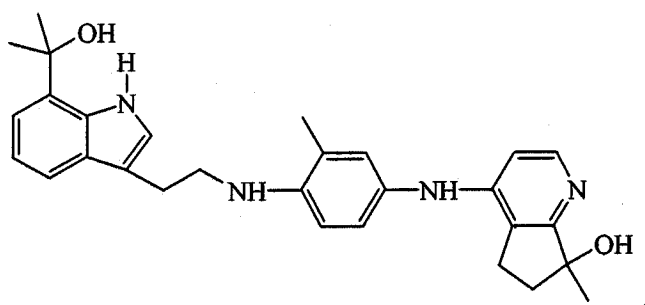
[0080] 本发明一优选的化合物为具有下式的化合物,其药学可接受的盐或其溶剂化物:

[0081]



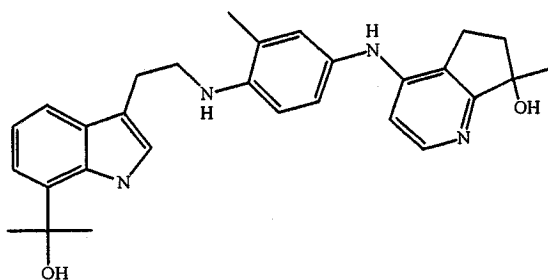
[0082] 本发明一优选的化合物为具有下式的化合物,包括其任何立体化学异构形式;其药学可接受的盐或其溶剂化物:

[0083]



[0084] 本发明一优选的化合物是具有下式的对映体,

[0085]

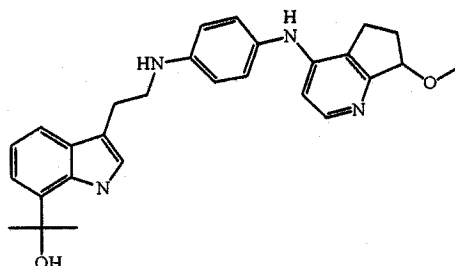


[0086] 且所述对映体在温度 20°C 和 1dm 样品池光程 (cell pathlength) 下,以 8.59mg/ml 的浓度在氯仿中,用钠的 D 线 (D-line) 的波长 (589nm) 的光测定,具有左旋性;或

[0087] 其药学可接受的盐或其溶剂化物。

[0088] 本发明一优选的化合物是具有下式的对映体,

[0089]

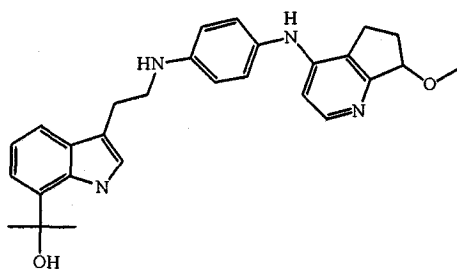


[0090] 且所述对映体在温度 20°C 和 1dm 样品池光程下,以 10.33mg/ml 的浓度在甲醇中,用钠的 D 线的波长 (589nm) 的光测定,具有右旋性;或其药学可接受的盐或其溶剂化物。

[0091] 本发明一优选的化合物是具有下式对映体,

[0092]





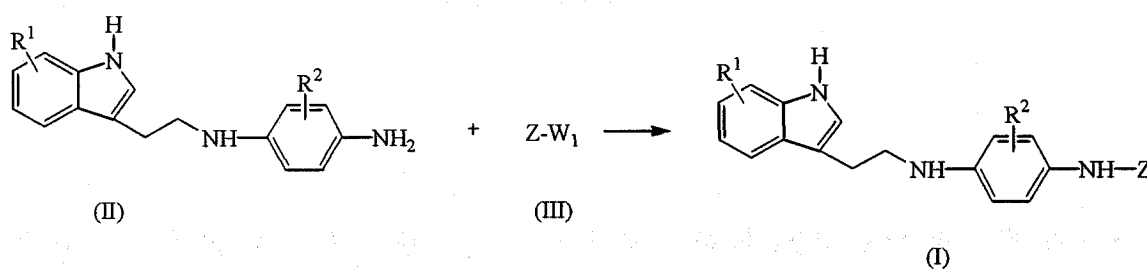
[0093] 且所述对映体在温度 20°C 和 1dm 样品池光程下,以 10.74mg/ml 的浓度在甲醇中,用钠的 D 线的波长 (589nm) 的光测定,具有左旋性;或其药学可接受的盐或其溶剂化物。

[0094] 式 (I) 化合物、它们的药学可接受的盐和立体化学异构形式可按常规方法制备。原料和某些中间体是已知的化合物及可由市售提供,或者可根据如本领域通常已知的常规反应程序制备。有关该方面内容还可参考 W02006/032631 中所述的合成方法。

[0095] 下文中将更详细地描述很多这类制备方法。在所述实例中描述获得最终的式 (I) 化合物的其它方法。

[0096] 通常,式 (I) 化合物可通过使式 (II) 中间体与式 (III) 中间体反应制备,其中  $W_1$  是适当的离去基团,如卤素,如氟、氯、溴或碘,或者磺酰氧基,如甲基磺酰氧基、4-甲基苯基磺酰氧基等。该反应可在反应-惰性溶剂中进行,这样的溶剂诸如,例如:醇,例如甲醇、乙醇、2-甲氧基-乙醇、丙醇、丁醇等;醚,如 1,4-二氧六环(其优选在适当的酸,如 HCl 存在下)、1,1'-氧基二丙烷等;酮,如 4-甲基-2-戊酮;或者 N,N-二甲基甲酰胺、硝基苯、乙腈等。为中和反应过程中释放的酸,可利用加入适当的碱,如碱金属或碱土金属盐的碳酸盐或碳酸氢盐或有机碱,如 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺、碳酸钠或碳酸钾。可加入少量适当的金属碘化物(例如碘化钠或钾)以促进反应。搅拌可增加反应速率。该反应可在室温至反应混合物的回流温度之间的温度范围内方便地进行,并且如果要求,该反应可在加压下进行。

[0097]

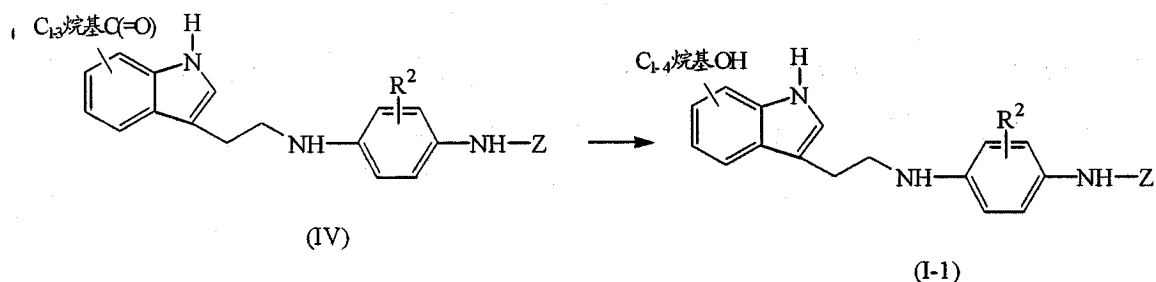


[0098] 在以上反应中,其中  $R^1$  是  $-C(OH)(CH_3)_2$  的式 (II) 中间体可生成对应的其中  $R^1$  是  $-C(CH_3)=CH_2$  的最终式 (I) 化合物。

[0099] 式 (III) 中间体与式 (II) 中间体的以上反应还可在适当催化剂,如  $Pd(dba)_2$  (双[(1,2,4,5-η)-1,5-二苯基-1,4-戊二烯-3-酮]-钯)、适当的配体,如 BINAP(2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘基)、适当的碱,如叔丁醇钠,以及适当的溶剂,如甲苯的存在下进行。

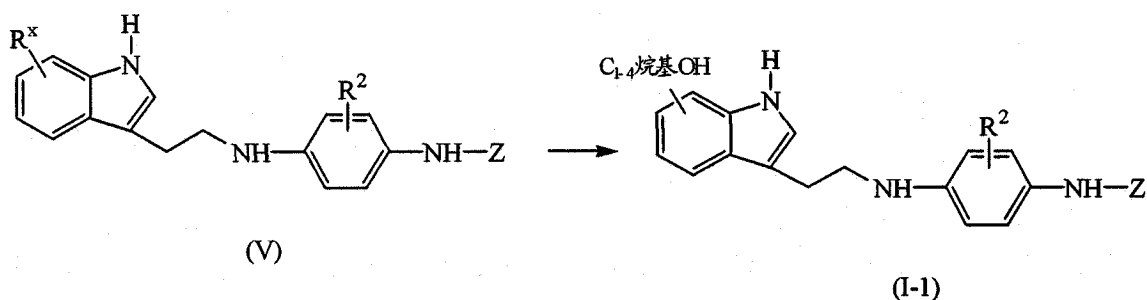
[0100] 其中  $R^1$  代表羟基  $C_{1-4}$  烷基的式 (I) 化合物,所述化合物用式 (I-1) 表示,也可通过在适当的还原剂(如  $NaBH_4$ )和适当的溶剂(诸如如甲醇等的醇)的存在下,还原对应的式 (IV) 的羰基衍生物而制备。

[0101]



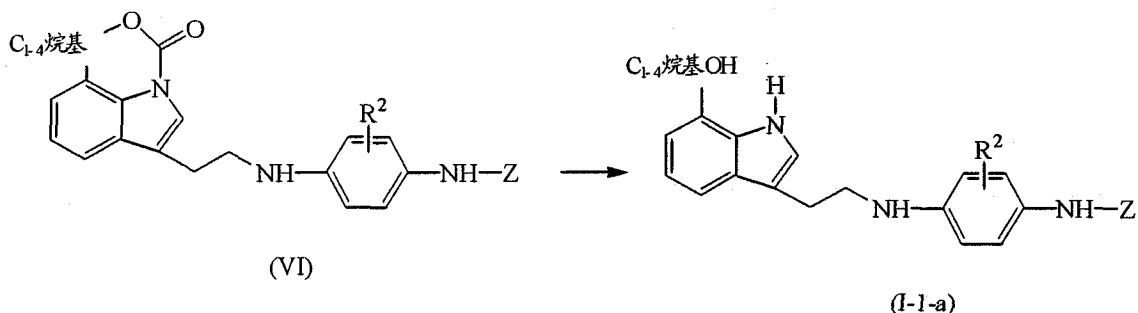
[0102] 式 (I-1) 化合物还可通过在适当的还原剂 (如  $\text{LiAlH}_4$ ) 和适当的溶剂 (如四氢呋喃) 的存在下, 还原对应的其中  $\text{R}^x$  代表  $-\text{C}_{1-3}$  烷基  $\text{C}(=\text{O})\text{OC}_{1-4}$  烷基的式 (V) 的酯衍生物而制备。

[0103]



[0104] 式 (I-1) 化合物, 其中  $\text{R}^1$  代表羟基  $\text{C}_{1-4}$  烷基且所述羟基  $\text{C}_{1-4}$  烷基位于吲哚部分的 7 位上, 所述化合物由式 (I-1-a) 表示, 其可通过将式 (VI) 中间体用适当的碱, 如氢氧化钠, 和适当的溶剂, 如四氢呋喃或醇, 如乙醇等, 进行水解而制备。

[0105]



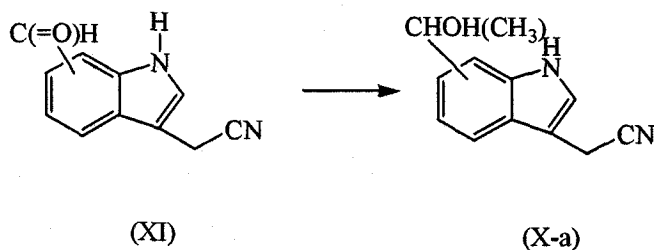
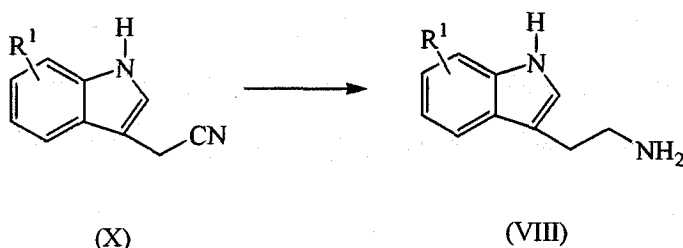
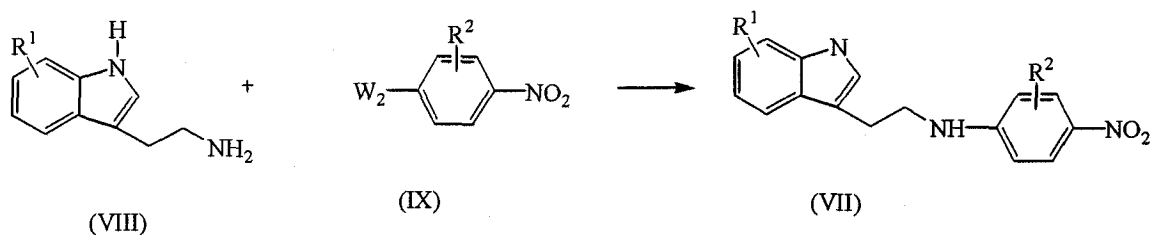
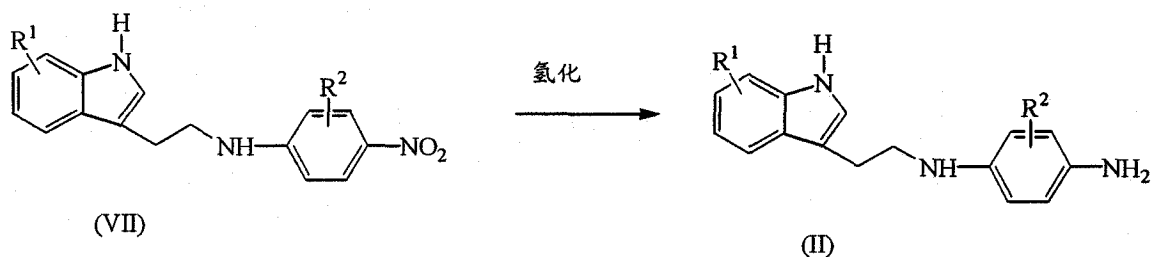
[0106] 还可通过本领域已知的反应或官能团转换, 将式 (I) 化合物彼此转化。

[0107] 还可在适当溶剂 (如醇, 如 2-丙醇、乙醚、二异丙基醚) 中, 通过与适当的酸 (如盐酸) 进行反应, 将式 (I) 化合物转化为药学可接受的酸加成盐。

[0108] 某些中间体和原料是已知的化合物并可由市售提供, 或者可根据本领域已知的程序制备。

[0109] 一般地, 式 (II) 中间体可通过氢化式 (VII) 中间体制备, 该反应在适当的金属催化剂存在下进行, 这样的催化剂如: 雷尼镍, 其在适当溶剂, 如醇例如甲醇或乙醇等存在下; 或者碳载铂, 在适当的催化剂毒物, 如噻吩溶液存在下; 和五氧化二钒, 在适当溶剂, 如四氢呋喃存在下。

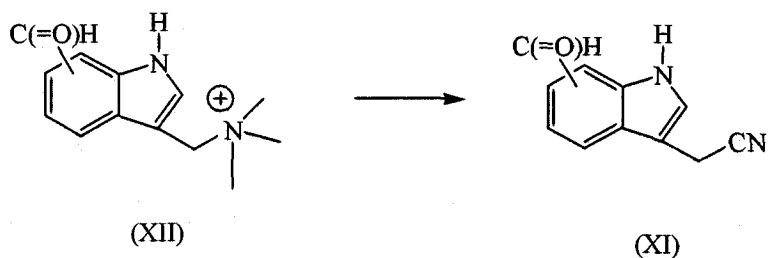
[0110]



[0117] 可使用相同的反应制备羟基  $C_{1-4}$  烷基的其它可替代化合物。例如, 其中  $R^1$  代表  $-C(OH)(CH_3)_2$  的中间体可由对应的带有  $-C(=O)-CH_3$  的中间体制备。

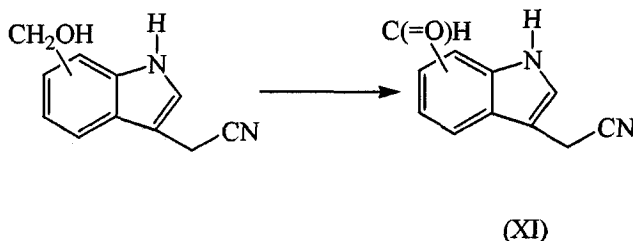
[0118] 式 (XI) 中间体可通过在适当的溶剂 (如 N, N-二甲基甲酰胺) 存在下, 使式 (XII) 中间体与氰化钠反应制备。

[0119]



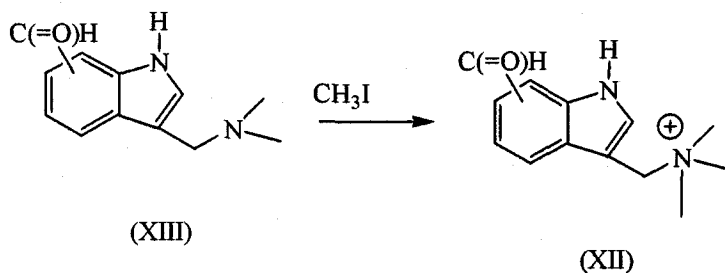
[0120] 或者,式 (XI) 中间体还可通过在戴斯-马丁过碘烷 (Dess-Martin periodinane) 和适当溶剂 (如二氯甲烷) 存在下,由对应的羟基类似物氧化而制备。

[0121]



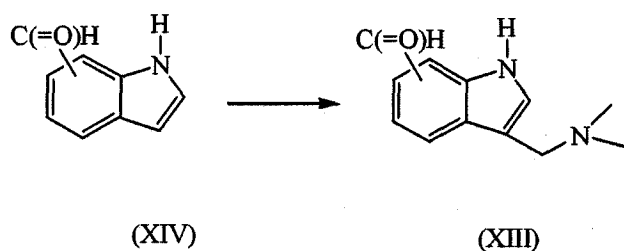
[0122] 式 (XII) 中间体可通过在适当的溶剂 (如醇例如乙醇) 的存在下,使式 (XIII) 中间体与  $\text{CH}_3\text{I}$  反应制备。

[0123]



[0124] 式 (XIII) 中间体可通过在乙酸存在下,使式 (XIV) 中间体与 Eschenmosser 盐反应制备。

[0125]



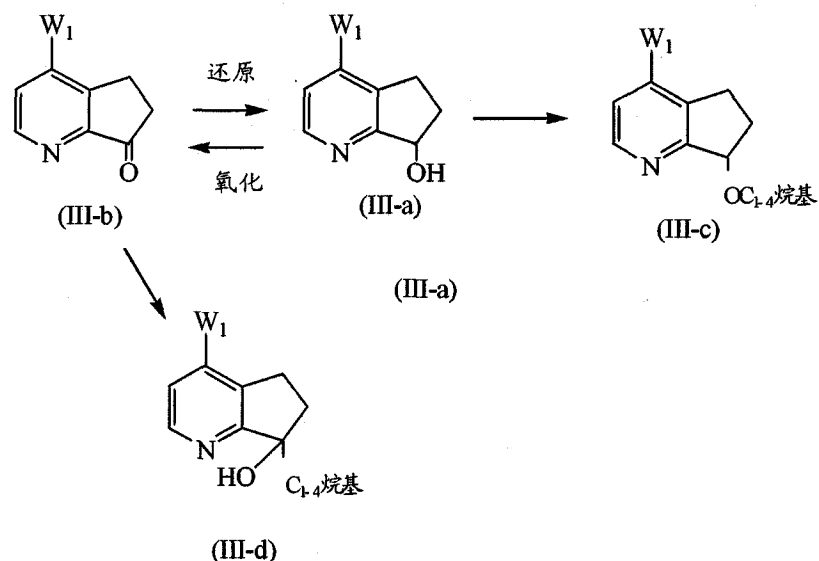
[0126] 式 (XIV) 中间体可通过在适当的氧化剂 (如  $\text{MnO}_2$ ) 存在下,在适当溶剂 (如二氯甲烷) 存在下,氧化对应的羟基类似物来制备。

[0127] 式 (III) 中间体,其中 Z 是式 (z-2) 基团而  $\text{R}^4$  是羟基,所述中间体由式 (III-a) 代表,其可通过在适当的溶剂 (如醇例如甲醇) 的存在下,将式 (III-b) 中间体用适当的还原剂 (如  $\text{NaBH}_4$ ) 还原而制备。

[0128] 式 (III-a) 中间体可通过在适当的碱 (如氢化钠) 和适当的溶剂 (如四氢呋喃) 存在下,与  $\text{C}_{1-4}$  烷基碘化物反应,而转化为式 (III-c) 中间体。式 (III-b) 中间体可通过在适当的溶剂 (如二氯甲烷) 存在下,由式 (III-a) 中间体与适当的氧化剂 (如  $\text{MnO}_2$ ) 反应

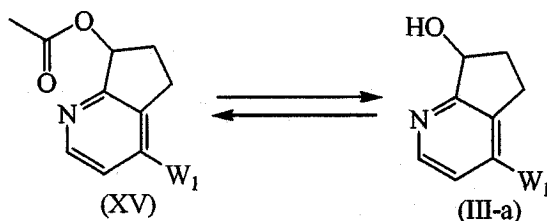
氧化而制备。式 (III-b) 中间体可通过在适当的溶剂 (如四氢呋喃) 存在下, 与  $C_{1-4}$  烷基 MgCl 反应, 转化为式 (III-d) 中间体。

[0129]



[0130] 式 (III-a) 中间体还可通过在甲醇/ $NH_3$  混合物中搅拌式 (XV) 中间体而制备。如果要求, 式 (III-a) 中间体可通过在乙酸酐和吡啶混合物中搅拌, 转化为式 (XV) 中间体。

[0131]



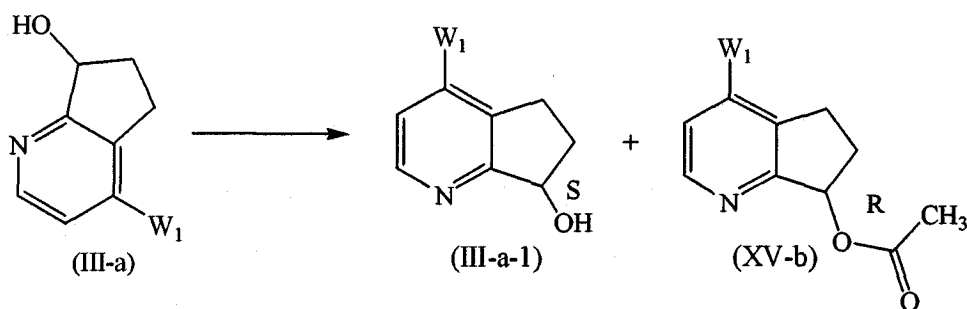
[0132] 中间体 (III-a) 的 S-对映体 (本文称为式 (III-a-1) 中间体) 和式 (XV) 中间体的 R-对映体 (本文称为式 (XV-b) 中间体), 可通过在适当的溶剂如乙酸乙烯酯中, 将南极假丝酵母脂肪酶 B (Lipase *Candida Antartica* B) 加入到式 (III-a) 中间体的外消旋混合物中制备 (参见流程 1)。当要求时, 可通过在 MeOH/ $NH_3$  中反应, 将式 (XV-b) 中间体转化为中间体 (III-a) 的 R 对映体 (本文称为式 (III-a-2) 中间体)。

[0133] 以该外消旋混合物为原料, 这一方法提供  $ee > 99\%$  及收率为 58% 的其中一种对映体乙酸盐的转化, 而分离的第二种对映体  $ee > 99\%$ , 收率为 42%。

[0134] 术语对映体过量 (ee) 对于立体化学领域技术人员来讲是公知的。对于 (+) 和 (-) 对映体混合物, 具有以摩尔或重量分数  $F(+)$  和  $F(-)$  (其中  $F(+)+F(-) = 1$ ) 给出的组成, 对于  $F^*$  的对映体过量被定义为  $F(+)-F(-)$ , 对映体过量百分数为  $100*[F(+)-F(-)]$ 。

[0135] 流程 1

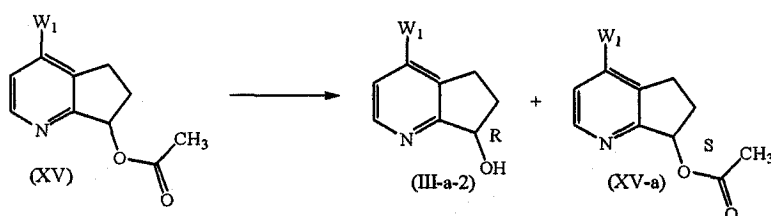
[0136]



[0137] 或者,中间体 (III-a) 的 R-对映体 (本文称为式 (III-a-2) 中间体) 和式 (XV) 的中间体的 S-对映体 (本文称为式 (XV-a) 中间体),可通过将南极假丝酵母脂肪酶 B 加入到在水中的式 (XV) 中间体的外消旋混合物中制备 (参见流程 2)。当要求时,可通过在 MeOH/ $\text{NH}_3$  中反应,将中间体 (XV-a) 转化为中间体 (III-a-1)。

[0138] 流程 2

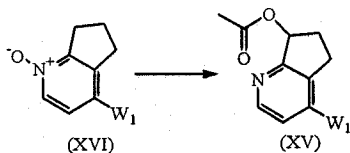
[0139]



[0140] 或者,还可通过手性柱色谱法,将式 (III-a) 中间体分离为其对映体。

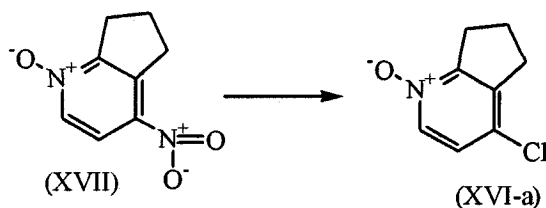
[0141] 式 (XV) 中间体可通过在乙酸酐中搅拌式 (XVI) 中间体而制备。

[0142]



[0143] 其中  $W_1$  是氯的式 (XVI) 中间体,本文称为式 (XVI-a) 中间体,可通过将氯化苄基三乙铵和氯化钠加入到式 (XVII) 中间体的乙腈溶液中,接着加入浓盐酸而制备。

[0144]

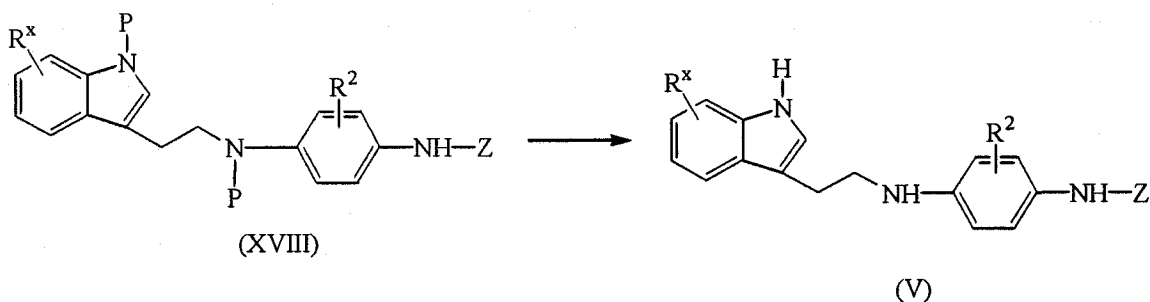


[0145] 式 (XVII) 中间体可通过将发烟硝酸加入到硫酸中,接着分次加入 6,7-二氢-5H-环戊二烯并 [b] 吡啶 1-氧化物来制备。

[0146] 式 (IV) 中间体可根据以上用于式 (II) 中间体的反应方案来制备。

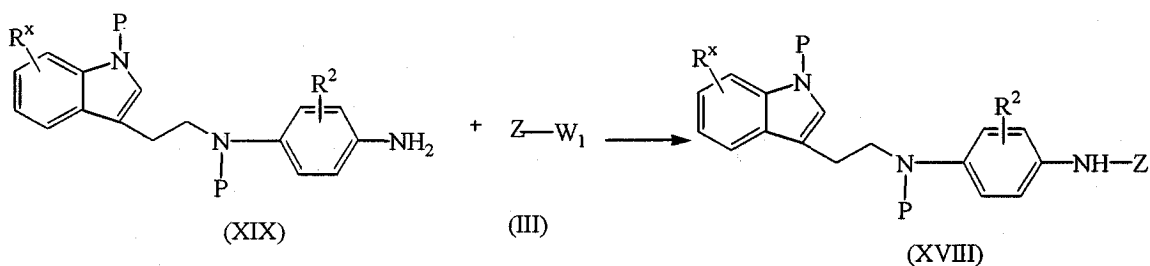
[0147] 式 (V) 中间体可通过在适当酸 (如盐酸) 和适当溶剂 (如乙腈) 存在下,将式 (XVIII) 中间体去保护而制备,其中 P 代表适当的保护基,如  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 。

[0148]



[0149] 式 (XVIII) 中间体可通过使式 (XIX) 中间体与式 (III) 中间体反应制备, 该反应在诸如以下反应惰性溶剂存在下进行: 醇, 如甲醇、乙醇、2-甲氧基-乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇等; 醚, 如 1,4-二氧六环 (其优选在适当酸, 如 HCl 存在下)、1,1'-氧基二丙烷等; 酮, 如 4-甲基-2-戊酮; 或者 N,N-二甲基甲酰胺、硝基苯、乙腈等。为中和反应过程中释放的酸, 可利用加入适当的碱, 如碱金属或碱土金属盐的碳酸盐或碳酸氢盐或有机碱, 如 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺、碳酸钠或碳酸钾。可加入少量适当的金属碘化物 (如碘化钠或钾), 以促进反应。搅拌可增加反应速率。该反应通常可在室温至反应混合物的回流温度之间的温度范围内方便地进行, 并且如果要求, 该反应可在加压下进行。

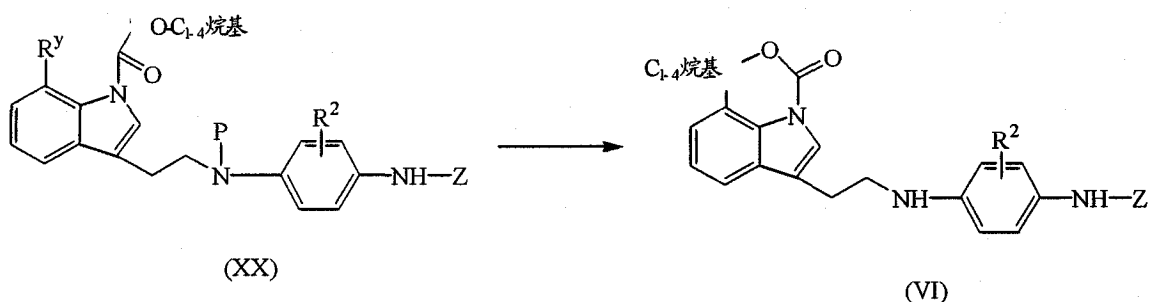
[0150]



[0151] 式 (XIX) 中间体可根据以上用于式 (II) 中间体的反应方案来制备。

[0152] 式 (VI) 中间体可通过在适当酸 (如三氟乙酸) 和适当溶剂 (如二氯甲烷) 存在下, 使式 (XX) 中间体反应来制备, 其中 P 代表如上定义的适当的保护基, 和  $R_y$  代表  $-C_{1-4}$  烷基  $-O-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ 。

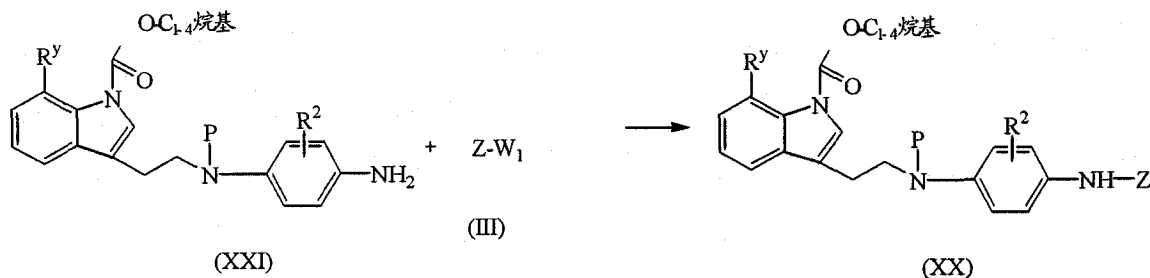
[0153]



[0154] 式 (XX) 中间体可通过使式 (XXI) 中间体与式 (III) 中间体反应制备, 该反应在诸如以下反应惰性溶剂存在下进行: 醇, 如甲醇、乙醇、2-甲氧基-乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇等; 醚, 如 1,4-二氧六环 (优选在适当酸, 如 HCl 存在下)、1'-氧基二丙烷等; 酮, 如 4-甲基-2-戊酮; 或者 N,N-二甲基甲酰胺、硝基苯、乙腈等。为中和反应过程中释放的酸, 可利用加入适当的碱, 如碱金属或碱土金属盐的碳酸盐或碳酸氢盐或有机碱, 如 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺、碳酸钠或碳酸钾。可加入少量适当的金属碘化物 (如碘化钠或钾) 以促进反

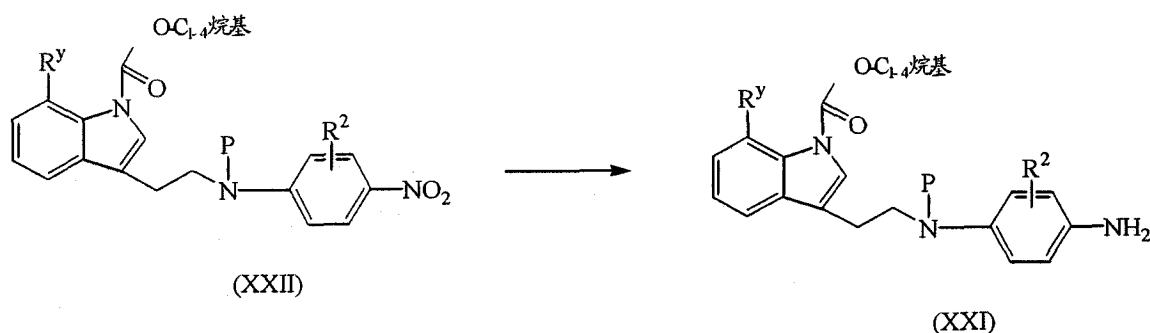
应。搅拌可增加反应速率。该反应可在室温至反应混合物的回流温度之间的温度范围内方便地进行,并且如果要求,该反应可在加压下进行。

[0155]



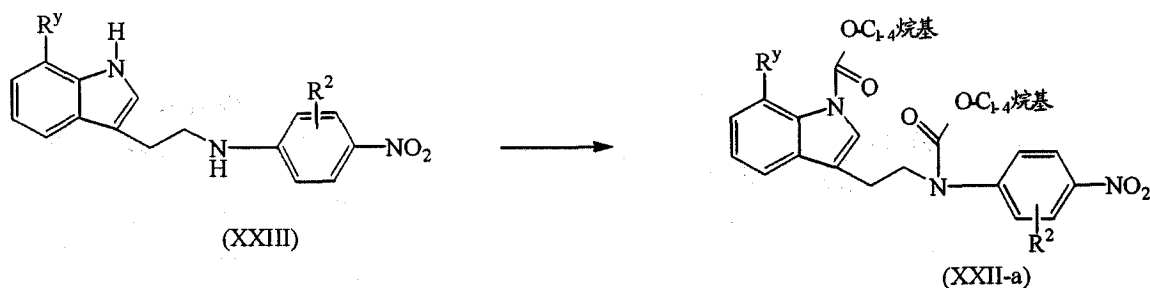
[0156] 式 (XXI) 中间体可通过在适当催化剂 (如雷尼镍) 存在下,和适当溶剂 (如醇例如甲醇等) 存在下,将对应的式 (XXII) 硝基中间体氢化来制备。

[0157]



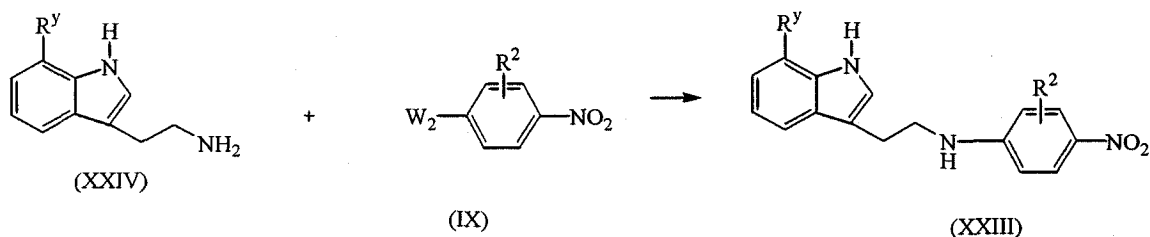
[0158] 其中 P 代表  $-C(=O)-O-C_{1-4}$  烷基的式 (XXII) 中间体,所述中间体本文被称为式 (XXII-a),其可通过在适当碱 (如三乙胺) 和适当溶剂 (如 4-(二甲基)氨基吡啶) 存在下,使式 (XXIII) 中间体与二碳酸二叔丁基酯反应制备。

[0159]



[0160] 式 (XXIII) 中间体可通过在适当碱 (如碳酸氢钠) 和适当溶剂 (如 N, N-二甲亚砜) 存在下,使式 (XXIV) 中间体与式 (IX) 中间体反应制备。

[0161]

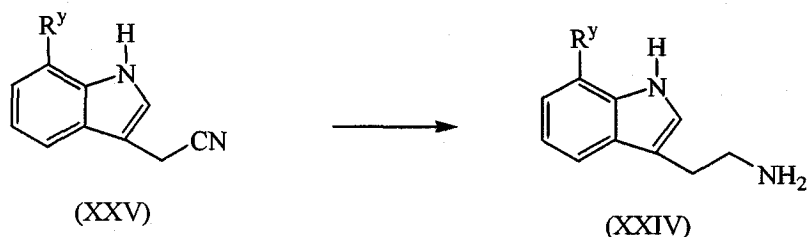


[0162] 式 (XXIV) 中间体可通过在适当催化剂 (如雷尼镍) 存在下,在适当溶剂 (如醇例如



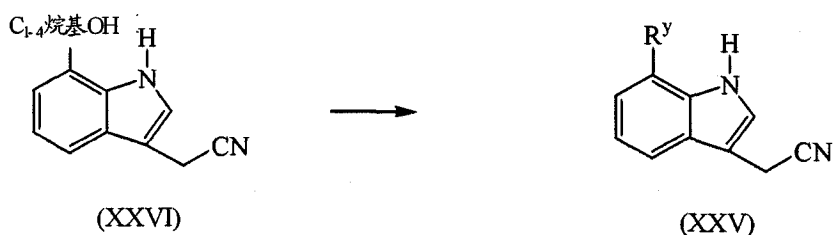
如甲醇等)存在下,使式 (XXV) 中间体与  $\text{NH}_3$  反应制备。

[0163]



[0164] 式 (XXV) 中间体可通过在适当碱 (如咪唑) 和适当溶剂 (如四氢呋喃) 存在下,使式 (XXVI) 中间体与叔丁基二甲基甲硅烷基氯化物反应制备。

[0165]



[0166] 式 (XXVI) 中间体可按以上对式 (XI) 中间体所述方法制备。

[0167] 本发明中的式 (I) 化合物及一些中间体可包含有不对称碳原子。所述化合物和所述中间体的纯立体化学异构形式可由应用本领域已知方法获得。例如,非对映异构体可通过物理方法如选择性结晶或色谱技术如反流分布法、液相色谱法等方法分离。对映异构体可如下由外消旋混合物获得:首先经适当的拆分剂(如手性酸),将所述外消旋混合物转化成非对映异构盐或化合物的混合物;然后,通过例如选择性结晶、超临界流体色谱法或色谱技术如液相色谱法等方法,物理分离所述非对映异构盐或化合物的混合物;且最后将所述已分离的非对映异构盐或化合物转化为相应的对映体。纯立体化学异构形式还可通过适当的中间体和原料的纯立体化学异构形式获得,前提是中间反应可立体选择性地发生。

[0168] 式 (I) 化合物,包括其任何立体化学异构形式、其药学可接受的盐或其溶剂化物,因其增加 p53 的表达而具有有价值的药理学特性,表现出有效的抗增殖活性,表现出有效的抗肿瘤活性。

[0169] 如前所示,本发明化合物在 C.1 所述检测法中增加 p53 的表达。此增加可归因于但不限于一种或多种下列作用机制:

[0170] - 与上游或下游靶标的相互作用,这样的靶标例如包括在遍在化作用或 SUMO 修饰中的激酶或酶活性,

[0171] - p53 蛋白的直接或间接稳定作用,例如通过保持其在功能性结构形式,或通过防止错折叠,

[0172] - 增强 p53 的表达或 p53 家族成员(如 p63 及 p73)的表达,

[0173] - 增加 p53 活性,如通过(但不限制于)增强其转录活性,和/或

[0174] - 增加 p53-信号通路(signalling pathway)的基因和蛋白的表达,例如(但不限制于)p21waf1、cip1、MIC-1(GDF-15)、PIG-3、Bax、Puma、Noxa 及 ATF-3。

[0175] 因此,本发明公开用作药物的式 (I) 化合物,其特别用于治疗癌症或相关疾病、抑制肿瘤生长、增加 p53 的表达。

[0176] 此外,本发明还涉及化合物用于药剂生产的用途,该药剂用于治疗由 p53 表达的降低所介导的疾病,特别是用于癌症的治疗,其中所述化合物为式 (I) 化合物。

[0177] 本文中 so 使用术语“治疗”涵盖动物中的(特别是人类的)疾病和/或病症的任何治疗,且包括:(i) 在可能易感染疾病和/或病症但尚未被诊断为患病的受试者中,预防发生疾病和/或病症;(ii) 抑制疾病和/或病症,即阻止其发展;(iii) 缓解疾病和/或病症,即引起疾病和/或病症的消退。

[0178] 关于术语“通过 p53 表达的降低所介导的疾病”指的是任何不期望或有害的病症,其可由细胞凋亡、细胞死亡诱导、或细胞周期调节而抑制、而阻止其发展、而缓解或引起其消退的。

[0179] 本发明还提供治疗由 p53 表达的降低所介导的疾病的方法,特别是治疗癌症的方法,其通过将有效量的本发明化合物给予需此治疗的受试者(如哺乳动物(且更具体为人类))而进行。

[0180] 本发明化合物可对肿瘤细胞具有抗增殖作用,即使此细胞缺乏功能性 p53。更特别地,本发明化合物对于具有野生型或突变型 p53 的肿瘤和/或对于过度表达 MDM2 的肿瘤具有抗增殖作用。所述化合物可影响血管生成作用、肿瘤细胞迁移、侵入或转移。

[0181] 因此,本发明还提供一种抑制肿瘤生长的方法,其通过将有效量的本发明化合物给予需此治疗的受试者(如哺乳动物(且更具体为人类))而进行。

[0182] 肿瘤的实例包括可被本发明化合物抑制的成人及小儿恶性肿瘤,包括但不限于:包含小细胞肺癌及非小细胞肺癌(例如腺癌)的肺癌、胰腺癌、结肠癌(如结直肠癌,例如结肠腺癌及结肠腺瘤)、食道癌、口腔鳞状癌、舌癌、胃癌、肝癌、鼻咽癌,淋巴系统的造血性肿瘤(如急性淋巴细胞白血病、B 细胞淋巴瘤、伯基特(Burkitt)淋巴瘤)、非霍奇金(non-Hodgkin)氏淋巴瘤(例如外套细胞淋巴瘤)、霍奇金氏症、髓细胞性白血病(例如急性髓细胞性白血病(AML)或慢性髓细胞性白血病(CML))、急性成淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、甲状腺滤泡癌、骨髓增生异常综合症(MDS),间质起源性肿瘤、软组织肉瘤、脂肪肉瘤、胃肠道间质肉瘤、恶性周围神经鞘瘤(MPNST)、尤因(Ewing)肉瘤、平滑肌肉瘤、间质软骨肉瘤、淋巴肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、黑色素瘤、畸胎瘤、神经母细胞瘤、脑肿瘤、成神经管细胞瘤、神经胶质瘤、良性皮肤肿瘤(例如角化棘皮瘤)、乳癌(例如后期乳癌)、肾癌、肾母细胞瘤、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、膀胱癌、前列腺癌(包括后期疾病和激素抗拒性前列腺癌)、睾丸癌、骨肉瘤、头颈癌、表皮细胞癌、多发性骨髓瘤(例如抗拒性多发性骨髓瘤)、间皮瘤。可以用本发明化合物治疗的特有癌症为乳癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、急性髓细胞性白血病(AML)。

[0183] 本发明化合物亦可用于治疗和预防炎症性疾病。

[0184] 因此,本发明还提供一种治疗和预防炎症性疾病的方法,其通过将有效量的本发明化合物给予需此治疗的受试者(如哺乳动物(且更具体为人类))而进行。

[0185] 本发明化合物还可用于治疗自体免疫疾病和病症。术语“自体免疫疾病”指的是动物的免疫系统对于自体抗原产生不利反应的任何疾病。术语“自体抗原”指的是在动物体中正常发现的任何抗原。代表性的自体免疫疾病包括但不限于:桥本(Hashimoto)氏甲状腺炎、格雷夫(Grave)氏病、多发性硬化症、恶性贫血,艾迪生(Addison)病、胰岛素依赖型糖尿病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE 或狼疮)、皮肌炎、克罗恩(Crohn)病、

韦格纳 (Wegener) 肉芽肿病, 抗肾小球基膜症、抗磷脂综合症、25 疱疹样皮炎、过敏性脑脊髓炎、肾小球肾炎、膜性肾小球肾炎、古德帕斯丘 (Goodpasture) 氏综合症、兰伯特 - 伊顿 (Lambert-Eaton) 综合症、肌无力综合症、重症肌无力症、大疱性天疱疮、多内分泌腺疾病 (Polyendocrinopathies)、赖特尔 (Reiter) 症, 和僵人 (Stiff-Man) 综合症。

[0186] 因此, 本发明还提供一种治疗自体免疫疾病和病症的方法, 其通过将有效量的本发明化合物给予需此治疗的受试者 (如哺乳动物 (且更具体为人类)) 而进行。

[0187] 本发明化合物还可用于治疗与结构不稳定或错折叠的蛋白质相关的疾病。

[0188] 与结构不稳定或错折叠的蛋白质相关的疾病实例包括但不限于: 囊性纤维化 (CFTR)、马凡 (Marfan) 综合症 (微纤维蛋白)、肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (超氧化物歧化酶)、坏血病 (胶原质)、枫糖尿病 ( $\alpha$ -酮酸脱氢酶复合物)、成骨不全症 (第 1 型溶胶原 pro- $\alpha$ )、克雅 (Creutzfeldt-Jakob) 氏症 (蛋白感染素)、阿兹海默 (Alzheimer) 氏症 ( $\beta$ -淀粉状蛋白)、家族性淀粉样变性 (溶菌酶)、白内障 (晶状体蛋白)、家族性高胆固醇血症 (LDL 受体)、 $\alpha$  I-抗胰蛋白酶缺乏症、泰 - 萨 (Tay-Sachs) 二氏症 ( $\beta$ -己糖胺酶)、色素性视网膜炎 (视紫红质) 和矮怪症 (胰岛素受体)。

[0189] 因此, 本发明还提供一种治疗与结构不稳定或错折叠的蛋白质相关的疾病的方法, 其通过将有效量的本发明化合物给予需此治疗的受试者 (如哺乳动物 (且更具体为人类)) 而进行。

[0190] 根据其有用的药理学特性, 目标化合物可配制成各种用于给药目的药物形式。

[0191] 为了制备本发明的药用组合物, 将作为活性成分的有效量的本发明化合物与药学可接受的载体直接混合而组合, 该载体可根据给药所需制剂形式而多样变化。这些药用组合物理想地以适当的单位剂型, 优选用于经口部给药、直肠给药、经皮给药、或通过肠胃外注射。例如, 将所述组合物制备为口服剂型时, 在口服液体制剂 (如悬浮液、糖浆、酏剂及溶液) 情况下, 任何常用的药物介质均可使用, 如水、二醇、油、醇等; 或在粉剂、丸剂、胶囊和片剂情况下, 可使用固体载体如淀粉、糖类、高岭土、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。

[0192] 因为易于给药, 片剂和胶囊代表最有利于口服的单位剂型, 在此情况中, 明显使用固体药物载体。对于肠胃外的组合物, 其载体通常应包含无菌水 (至少大部分), 然而可包括其他成分, 例如以帮助溶解。例如, 可制备可注射性溶液, 其中载体包含盐水溶液、葡萄糖溶液或盐水与葡萄糖的混合溶液。还可制备可注射性悬浮液, 在该情况中, 可使用适当的液体载体、悬浮剂等。在适合于经皮给药的组合物中, 其载体任选包含渗透增强剂和 / 或适当的湿润剂, 任选地以较少比例与适当的任何性质添加剂组合, 该添加剂对于皮肤不引起明显的有害作用。所述添加剂可促进皮肤给药和 / 或可有助于制备所需的组合物。这些组合物可以按不同方式给药, 例如作为透皮贴剂、滴剂 (spot-on)、软膏。特别有利的是调配上述药用组合物为易于给药和均匀剂量的单位剂型。用于本文说明书和权利要求书中的单位剂型指物理离散的单位, 其适合于作为单一剂量, 每个单位包含预定量的经计算以产生所需疗效的活性成分以及所需药用载体。这样的单位剂型的实例为片剂 (包括刻痕片或包衣片)、胶囊、丸剂、粉剂包装、糯米纸囊剂 (wafer)、可注射溶液或悬浮液、茶匙量、汤匙量等, 及其分离的倍数。

[0193] 特别有利的是调配上述药用组合物为易于给药和均匀剂量的单位剂型。用于本文说明书和权利要求书中的单位剂型指物理离散的单位, 其适合于作为单一剂量, 每个单位

包含预定量的经计算以产生所需疗效的活性成分以及所需药用载体。这样的单位剂型的实例为片剂（包括刻痕片或包衣片）、胶囊、丸剂、粉剂包装、糯米纸囊剂（wafer）、可注射溶液或悬浮液、茶匙量、汤匙量等，及其分离的倍数。

[0194] 本发明化合物以足以引起细胞凋亡、引起细胞死亡或调节细胞周期的量给药。

[0195] 因此，本发明化合物以足以增加 p53 的表达、或发挥其抗肿瘤活性的量给药。

[0196] 本领域技术人员可从下文给出的试验结果中容易地确定所述有效量。一般而言，认为治疗上有效量应为 0.005mg/kg-100mg/kg 体重，且特别是 0.005mg/kg-10mg/kg 体重。其可适当地以一整天的适当间隔给予所需的剂量，如一、二、三、四或更多个次剂量。可将该次剂量配成单位剂型，例如每单位剂型包含 0.5-500mg，特别是 1mg-500mg，更特别是 10mg-500mg 的活性成分。

[0197] 根据给药方式不同，该药用组合物将优选包含 0.05-99%（重量），更优选 0.1-70%（重量），甚至更优选 0.1-50%（重量）的本发明化合物，及 1-99.95%（重量），更优选 30-99.9%（重量），甚至更优选 50-99.9%（重量）的药学可接受的载体，所有百分比基于该组合物的总重。

[0198] 作为本发明另一方面，考虑本发明化合物与其他抗癌剂的组合，尤其是用作药物，更具体的，用在治疗癌症或相关疾病中。

[0199] 对于治疗上述病症，可将本发明化合物有利地用于与一种或多种其他药用试剂组合，更明确而言，在癌症治疗中组合其他抗癌剂或佐剂。抗癌剂或佐剂（治疗中的支持剂）的实例包括但不限于：

[0200] - 铂配位化合物，例如顺铂任选地结合氨磷汀、卡铂或奥沙利铂；

[0201] - 紫杉烷化合物，例如紫杉醇，紫杉醇蛋白质结合粒子（Abraxane™）或多西紫杉醇；

[0202] - 拓扑异构酶 I 抑制剂，如，喜树碱化合物，例如依立替康、SN-38、托泊替康、盐酸拓扑特肯；

[0203] - 拓扑异构酶 II 抑制剂，如，抗肿瘤表鬼臼毒素或鬼臼毒素衍生物例如依托泊苷、磷酸依托泊苷或替尼泊苷（teniposide）；

[0204] - 抗肿瘤长春花生物碱，例如长春碱、长春新碱或长春瑞滨；

[0205] - 抗肿瘤核苷衍生物，例如 5-氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸、吉西他滨、盐酸吉西他滨、卡培他滨、克拉屈滨、氟达拉滨、奈拉滨；

[0206] - 烷化剂，诸如氮芥或亚硝基脲，例如环磷酰胺、苯丁酸氮芥、卡莫司汀、塞替哌、马法兰（mephalan；melphalan）、洛莫司汀、六甲蜜胺、白消安、达卡巴嗪、雌氮芥、异环磷酰胺（ifosfamide）任选地结合美斯钠（mesna）、哌泊溴烷、丙卡巴肼、链脲菌素（streptozocin）、替莫唑胺（telozolomide）、尿嘧啶；

[0207] - 抗肿瘤蒽环类（anthracycline）衍生物，例如柔红霉素、多柔比星任选地结合右雷佐生、盐酸多柔比星脂质体、依达比星（idarubicin）、米托蒽醌、表柔比星、盐酸表柔比星、戊柔比星；

[0208] - 以 IGF-1 受体为靶标的分子，例如足叶苦素；

[0209] - 替曲卡星（tetrocarcin）衍生物，例如替曲卡星 A；

[0210] - 糖皮质激素（glucocorticoiden），例如泼尼松；

[0211] - 抗体, 例如曲妥珠单抗 (HER2 抗体)、利妥昔单抗 (CD20 抗体)、吉姆单抗、吉姆单抗奥佐米星、西妥昔单抗、帕妥珠单抗 (pertuzumab)、贝伐珠单抗、阿仑珠单抗、衣库珠单抗 (eculizumab)、替伊莫单抗、若莫单抗 (nofetumomab)、帕尼单抗 (panitumumab)、托西莫单抗、CNO 328 ;

[0212] - 雌激素受体拮抗剂或选择性雌激素受体调节剂或雌激素合成抑制剂, 例如它莫西芬、氟维司群、托瑞米芬、屈洛昔芬、faslodex、雷洛昔芬或来曲唑 ;

[0213] - 芳香酶抑制剂, 如依西美坦、阿那曲唑、来曲唑 (letrozole)、睾内酯和伏氯唑 ;

[0214] - 分化剂 (differentiating agent), 如类视黄醇、维生素 D 或维甲酸和维甲酸代谢阻断剂 (RAMBA), 例如异维甲酸 ;

[0215] -DNA 甲基转移酶抑制剂, 例如氮胞苷或地西他滨 ;

[0216] - 抗叶酸剂, 例如培美曲塞二钠 ;

[0217] - 抗生素, 例如放线菌素 D (antinomycin D)、博来霉素、丝裂霉素 C、更生霉素、洋红霉素、柔红霉素、左旋咪唑、普卡霉素 (plicamycin)、光神霉素 ;

[0218] - 抗代谢物, 例如氯法拉滨 (clofarabine)、氨基蝶呤、阿糖胞苷 (cytosine arabinoside) 或甲氨蝶呤、阿扎胞苷、阿糖胞苷 (cytarabine)、氟脲苷、喷司他丁、硫鸟嘌呤 ;

[0219] - 细胞凋亡诱导剂和抗血管生成剂, 诸如 Bcl-2 抑制剂, 例如 YC 137、BH 312、ABT 737、棉子酚, HA 14-1、TW 37 或癸酸 ;

[0220] - 微管蛋白 - 结合剂, 例如卡贝塔汀 (combrestatin)、秋水仙素或诺考达唑 ;

[0221] - 激酶抑制剂 (例如 EGFR (上皮生长因子受体) 抑制剂、MTKI (多靶标激酶抑制剂)、mTOR 抑制剂) 例如夫拉平度 (flavoperidol)、甲磺酸伊马替尼、埃罗替尼 (erlotinib)、吉非替尼 (gefitinib)、达沙替尼 (dasatinib)、拉帕替尼 (lapatinib)、二甲苯磺酸拉帕替尼、索拉非尼 (sorafenib)、舒尼替尼 (sunitinib)、马来酸舒尼替尼、替西罗莫司 (temsirrolimus) ;

[0222] - 法尼基转移酶抑制剂, 例如替吡法尼 (tipifarnib) ;

[0223] - 组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 抑制剂, 例如丁酸钠、辛二酰苯胺异羟肟酸 (suberoylanilide hydroxamide acid, SAHA)、缩酚酸肽 (FR 901228)、NVP-LAQ824、R306465、JNJ-26481585、曲古抑菌素 (trichostatin) A, 伏立诺他 (vorinostat) ;

[0224] - 泛素 - 蛋白酶体途径抑制剂, 例如 PS-341、MLN. 41 或硼替佐米 ;

[0225] - Yondelis ;

[0226] - 端粒末端转移酶抑制剂, 例如端粒抑素 (telomestatin) ;

[0227] - 基质金属蛋白酶抑制剂, 例如巴马司他、马立马司他 (marimastat)、普琳司他 (prinostat) 或美他司他 (metastat) ;

[0228] - 重组白介素类, 例如阿地白介素、地尼白介素 2、干扰素  $\alpha$  2a、干扰素  $\alpha$  2b、聚乙二醇干扰素 (peginterferon)  $\alpha$  2b ;

[0229] - MAPK 抑制剂 ;

[0230] - 类视黄醇, 例如阿利维 A 酸、贝沙罗汀、维 A 酸 ;

[0231] - 三氧化二砷 ;

[0232] - 门冬酰胺酶 ;

[0233] -类固醇,例如屈他雄酮丙酸酯、乙酸甲地孕酮、诺龙(癸酸酯,苯丙酸酯),地塞米松;

[0234] -促性腺激素释放激素激动剂或拮抗剂,例如阿巴瑞克、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、乙酸组胺瑞林、乙酸亮丙瑞林;

[0235] -沙立度胺、来那度胺(lenalidomide);

[0236] -巯基嘌呤、米托坦、帕米膦酸盐(pamidronate)、培加酶、培门冬酶(pegaspargase)、拉布立酶;

[0237] -BH3 模拟物,例如 ABT-737;

[0238] -MEK 抑制剂,例如 PD98059、AZD6244、CI-1040;

[0239] -集落刺激因子类似物,例如非格司亭、培非司亭(pegfilgrastim)、沙格司亭;促红细胞生成素或其类似物(例如达贝泊汀 $\alpha$ );白介素 11;奥普瑞白介素、唑来膦酸盐、唑来膦酸;芬太尼;二膦酸盐(bisphosphonate);帕利夫明(palifermin)。

[0240] -类固醇细胞色素 P450 17 $\alpha$ -羟化酶-17,20-裂解酶抑制剂(CYP17),例如阿比特龙、醋酸阿比特龙。

[0241] 如上所述,本发明化合物在使肿瘤细胞对放射疗法及化学疗法敏感上也具有治疗的应用。

[0242] 因此,本发明化合物可作为“放射增敏剂”和/或“化学增敏剂”或可与其他“放射增敏剂”和/或“化学增敏剂”联合给药。

[0243] 本文所使用的术语“放射增敏剂”指的是一种分子,优选低分子量分子,将其以治疗有效量给予动物,以增加细胞对于离子化辐射的敏感度,和/或促进可以离子化辐射治疗的疾病的治疗。

[0244] 本文所使用的术语“化学增敏剂”指的是一种分子,优选低分子量分子,将其以治疗有效量给予动物,以增加细胞对于化学疗法的敏感度,和/或促进可以化学疗法治病的疾病的治疗。

[0245] 对于放射增敏剂作用方式的几种机制在文献中已提出,包括:乏氧细胞放射增敏剂(例如 2-硝基咪唑化合物、及苯并三嗪二氧化物化合物),其仿效氧或者是在低氧下表现为类似生物还原剂;非乏氧细胞放射增敏剂(例如卤代嘧啶)可为 DNA 碱基的类似物,且优先地并入癌细胞的 DNA,从而促进辐射诱导的 DNA 分子破坏,和/或避免正常 DNA 修复机制;且在疾病治疗中,已假设了对于放射增敏剂的各种其他作用的潜在机制。

[0246] 现在许多癌症治疗方案中使用放射增敏剂结合 x 射线辐射。x 射线活化的放射增敏剂的实例包括但不限于下列:甲硝唑、米索硝唑、去甲基醚醇硝唑、哌莫硝唑、依他硝唑、尼莫唑、丝裂霉素 C、RSU 1069、SR 4233、E09、RB 6145、烟酰胺、5-溴去氧尿苷(BUdR)、5-碘去氧尿苷(IUdR)、溴去氧胞苷、氟去氧尿苷(FudR)、羟基脲、顺铂,和其治疗上有效的类似物和衍生物。

[0247] 癌症的光动力疗法(PDT)使用可见光作为增敏剂的辐射活化物。光动力放射增敏剂的实例包括但不限于下列:血卟啉衍生物、光卟啉(Photofrin),苯并卟啉衍生物、初卟啉、脱镁叶绿素-a(pheorbide-a)、细菌叶绿素-a、萘酞菁、酞菁、酞菁锌、和其治疗上有效的类似物和衍生物。

[0248] 可将放射增敏剂结合治疗有效量的一种或多种其他化合物一起给药,这样的化合

物包括但不限于：促进放射增敏剂结合到靶细胞的化合物；控制疗法流程、营养物和 / 或氧至靶细胞的化合物；作用于肿瘤的具有或不具额外辐射的化学治疗剂；或其他对于治疗癌症或其他疾病在治疗上有效的化合物。

[0249] 可将化学增敏剂结合治疗有效量的一种或多种其他化合物一起给药，这样的化合物包括但不限于：促进化学增敏剂结合到靶细胞的化合物；控制疗法流程、营养物和 / 或氧至靶细胞的化合物；作用于肿瘤的化学治疗剂，或其他对于治疗癌症或其他疾病在治疗上有效的化合物。发现钙拮抗剂例如维拉帕米有效于与抗肿瘤剂组合，以建立对于所接受化学治疗剂有抗药性的肿瘤细胞的化学敏感性，并实现此类化合物在药剂 - 敏感性恶性肿瘤中的效力。

[0250] 鉴于其有用的药理学性质，可将本发明组合物的成份，即一种或多种其他药剂和本发明化合物可调配成多种用于给药目的的药物形式。可将成份分别调配成个别药用组合物或包含所有成分的单一药用组合物。

[0251] 因此本发明还涉及一种药用组合物，其包含一或多种其它药剂和本发明化合物以及药用载体。

[0252] 本发明还涉及本发明组合物在制造用于抑制肿瘤细胞生长的药用组合物中的用途。

[0253] 本发明还涉及一种产品，其包含作为第一活性成分的本发明化合物及作为其它活性成分的一或多种抗癌剂，该产品作为一种组合制剂同时、分别或连续用于患有癌症的病患的治疗中。

[0254] 可将一或多种其它药剂及本发明化合物同时给予（例如分别或以单一组合物形式），或以任何顺序连续给予。在后者情况下，将二种或多种化合物在一期间内并以足以确保达成有益或协同效果的数量及方法给予。应理解的是，优选给药的方法及顺序及组合物的各成分的各剂量及给药方案，将取决于给予的特定的其它药剂及本发明化合物、其给药途径、所治疗的特定肿瘤及所治疗的特定宿主。最佳的给予方法和顺序以及剂量和给药方案可由本领域技术人员使用常规方法并考虑本文所列信息很容易地决定。

[0255] 当作为组合物给予时，本发明化合物与一或多种其它抗癌剂的重量比可由本领域技术人员决定。如本领域技术人员所熟知的那样，所述比例及准确的剂量及给予频率取决于所使用的特定本发明化合物及其它抗癌剂、所治疗的特定病症、所治疗的特定病患的病症严重性、年龄、体重、性别、饮食、给予时间及一般生理状况、给药方式及个体可能服用的其它药物。此外，显然地，每日有效量可依据受试者的反应和 / 或依据开具本发明化合物处方的医师评估而减少或增加。本发明式 (I) 化合物及其它抗癌剂的具体的重量比可在 1/10 至 10/1 的范围，更特别是 1/5 至 5/1，甚至更特别是 1/3 至 3/1。

[0256] 铂配位化合物有利地以 1-500mg 每平方米 ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) 体表面积的剂量给予，例如 50 至 400 $\text{mg}/\text{m}^2$ ，特别是，每一疗程，对于顺铂的剂量约 75 $\text{mg}/\text{m}^2$ ，而对于卡铂约 300 $\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0257] 紫杉烷化合物有利地以 50-400mg 每平方米 ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) 体表面积的剂量给予，例如 75-250 $\text{mg}/\text{m}^2$ ，特别是，每一疗程，对于紫杉醇的剂量约 175-250 $\text{mg}/\text{m}^2$ ，而对于多西紫杉醇约 75-150 $\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0258] 喜树碱化合物有利地以 0.1-400mg 每平方米 ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) 体表面积的剂量给予，例如 1-300 $\text{mg}/\text{m}^2$ ，特别是，每一疗程，对于依立替康的剂量约 100-350 $\text{mg}/\text{m}^2$ ，而拓泊替康约

1-2mg/m<sup>2</sup>。

[0259] 抗肿瘤鬼臼毒素衍生物有利地以 30-300mg 每平方米 (mg/m<sup>2</sup>) 体表面积的剂量给予,例如 50-250mg/m<sup>2</sup>,特别是,每一疗程,对于依托泊苷的剂量约 35-100mg/m<sup>2</sup>,而对于替尼泊约 50-250mg/m<sup>2</sup>。

[0260] 抗肿瘤长春花生物碱有利地以 2-30mg 每平方米 (mg/m<sup>2</sup>) 体表面积的剂量给予,特别是,每一疗程,对于长春碱的剂量约 3-12mg/m<sup>2</sup>,对于长春新碱的剂量约 1-2mg/m<sup>2</sup>,而对于长春瑞滨的剂量约 10-30mg/m<sup>2</sup>。

[0261] 抗肿瘤核苷衍生物有利地以 200-2500mg 每平方米 (mg/m<sup>2</sup>) 体表面积的剂量给予,例如 700-1500mg/m<sup>2</sup>,特别是,每一疗程,对于 5-FU 的剂量为 200-500mg/m<sup>2</sup>,对于吉西他滨的剂量约 800-1200mg/m<sup>2</sup>,而对于卡培他滨约 1000-2500mg/m<sup>2</sup>。

[0262] 烷化剂,例如氮芥或亚硝基脲,有利地以 100-500mg 每平方米 (mg/m<sup>2</sup>) 体表面积的剂量给予,例如 120-200mg/m<sup>2</sup>,特别是,每一疗程,对于环磷酰胺的剂量约 100-500mg/m<sup>2</sup>,对于苯丁酸氮芥的剂量约 0.1-0.2mg/kg,对于卡莫司汀的剂量约 150-200mg/m<sup>2</sup>,而对于洛莫司汀的剂量约 100-150mg/m<sup>2</sup>。

[0263] 抗肿瘤蒽环类衍生物有利地以 10-75mg 每平方米 (mg/m<sup>2</sup>) 体表面积的剂量给予,例如 15-60mg/m<sup>2</sup>,特别是,每一疗程,对于多柔比星的剂量约 40-75mg/m<sup>2</sup>,对于柔红霉素的剂量约 25-45mg/m<sup>2</sup>,而对于依达比星的剂量约 10-15mg/m<sup>2</sup>。

[0264] 根据特定的试剂及所治疗的病症,抗雌激素剂有利地以约 1-100mg 每天的剂量给予。他莫西芬有利地以 5-50mg 的剂量经口给予,优选为 10-20mg,每天二次,持续治疗足够时间以达到并维持治疗效果。托瑞米芬有利地以约 60mg 每日一次经口给予,持续治疗足够时间以达到并维持治疗效果。阿那曲唑有利地以约 1mg 每日一次经口给予。屈洛昔芬有利地以约 20-100mg 每日一次经口给予。雷洛昔芬有利地以 60mg 每日一次经口给予。依西美坦有利地以约 25mg 每日一次经口给予。

[0265] 抗体有利地以约 1-5mg 每平方米 (mg/m<sup>2</sup>) 体表面积的剂量给予,或如果不同,则按本领域已知地给予。曲妥单抗有利地以每一疗程 1-5mg 每平方米 (mg/m<sup>2</sup>) 体表面积的剂量给予,特别是,2-4mg/m<sup>2</sup>。

[0266] 这些剂量可例如以每一疗程一次、二次或更多次给予,例如每 7、14、21 或 28 天可重复该疗程。

[0267] 式 (I) 化合物、药学可接受的加成盐,特别是药学可接受酸加成盐及其立体异构形式可具有有价值的诊断性质,因为它们可用于检测或识别在经标记化合物与其它分子、肽、蛋白质、酶或受体之间的复合物的形成。

[0268] 该检测或识别方法可使用以诸如放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质等标记物标记的化合物。放射性同位素的实例包括 <sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H 及 <sup>14</sup>C。酶一般通过缀合适当的底物继而催化可检测的反应而成为可检测。其实例包括例如 β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶和苹果酸脱氢酶,优选辣根过氧化物酶。发光物质包括例如发光氨、发光氨衍生物、荧光素、水母素和荧光素酶。

[0269] 生物样本可被定义为体组织或体液。体液的实例为脑脊髓液、血液、血浆、血清、尿液、痰、唾液等。

[0270] 下列实施例举例说明本发明。



[0271] 实验部分

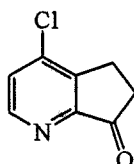
[0272] 下文中,“DMF”定义为 N,N-二甲基甲酰胺,“DCM”定义为二氯甲烷,“DIPE”定义为二异丙基醚,“DMSO”定义为二甲亚砜,“EtOAc”定义为乙酸乙酯,“EtOH”定义为乙醇,“MeOH”定义为甲醇和“THF”定义为四氢呋喃。

[0273] A. 中间体化合物的制备

[0274] 实施例 A1

[0275] a) 中间体 1 的制备

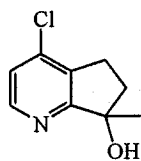
[0276]



[0277] 将氧化锰 (33.31g, 13Eq, 0.3832mol) 分次加入到 4-氯-6,7-二氢-5H-环戊二烯并 [b] 吡啶-7-醇 (中间体 3) [CAS 126053-15-4] (5g, 1Eq, 0.029mol) 的 DCM (50ml) 溶液中。将混合物在室温下搅拌 24 小时,然后经硅藻土 (celite) 过滤。蒸发溶剂,得到 3.25g (66%) 中间体 1。

[0278] b) 中间体 2 的制备

[0279]

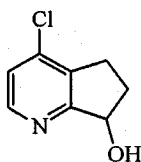


[0280] 于 -5-0°C,在氮气流下,将氯化甲基镁 (1.47ml, 3.2Eq, 0.004mol) 逐滴加到中间体 1 (0.220g, 1Eq, 0.0013mol) 的 THF (4ml) 溶液中。将反应在室温下搅拌 1.5 小时。在 0-10°C,加入氯化铵 (10%水溶液) 和 EtOAc。将混合物用 EtOAc 提取 3 次,然后分离有机层,经 MgSO<sub>4</sub> 干燥,过滤,蒸发溶剂。残留物 (0.215g) 经硅胶柱色谱法纯化 (洗脱剂:环己烷/EtOAc 50/50)。收集纯流分,蒸发溶剂,得到 0.120g (50%) 中间体 2。

[0281] 实施例 A2

[0282] a) 中间体 3 的制备

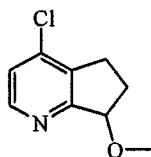
[0283]



[0284] 在 5°C 下,将四氢硼酸钠 (1.92g, 50.67mmol) 分次加入到中间体 1 (7.72g, 46.06mmol) 的 MeOH (80ml) 溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 1 夜,然后倒入水中。将混合物用 EtOAc 提取 3 次。将有机层用水和 NaCl 溶液洗涤,分离,经 MgSO<sub>4</sub> 干燥,过滤,蒸发溶剂,得到 6.38g (81.7%) 中间体 3 (50/50 混合物 RS)。该产物不经进一步纯化用于下一步骤中。

[0285] b) 中间体 4 的制备

[0286]



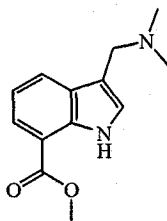
[0287] 在 0°C 和 N<sub>2</sub> 气氛下,将氢氧化钠 (1.06g, 44.22mmol) 分次加入到中间体 3 (3.00g, 17.70mmol) 的 THF (无水, 30ml) 溶液中。在 0°C 下,将反应搅拌 15 分钟。然后在 0°C 下,向混合物中滴加碘甲烷 (1.65ml, 26.53mmol)。将反应在室温下搅拌 1 夜。将混合物冷却至室温,逐滴加入冷水。将混合物搅拌 1 小时,然后用 EtOAc 提取 3 次。分离有机层,经 MgSO<sub>4</sub> 干燥,过滤,蒸发溶剂,得到 3.10g (95.4%) 中间体 4。

[0288] 该产物不经进一步纯化直接用于下一步骤中。

[0289] 实施例 A3

[0290] a) 中间体 5 的制备

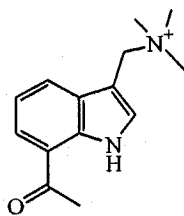
[0291]



[0292] 在 65°C 下,将含 1H-吲哚-7-羧酸甲酯 (0.091mol)、Eschenmoser 盐 (0.1mol) 的乙酸 (300ml) 加热 2 小时。过滤沉淀物,将其溶于 DCM 和碳酸钾 10% 中。加入碳酸钾 (固体),将混合物室温下搅拌 1 小时然后提取。分离有机层,经 MgSO<sub>4</sub> 干燥,过滤,并蒸发溶剂,得到 10g 中间体 5。

[0293] b) 中间体 6 的制备

[0294]

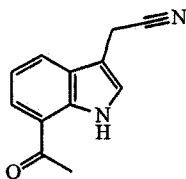


I

[0295] 室温下,将中间体 5 (0.043mol)、碘甲烷 (0.047mol) 在 EtOH (300ml) 中搅拌过夜。将沉淀物过滤,干燥,得到 8.3g 中间体 6。

[0296] c) 中间体 7 的制备

[0297]

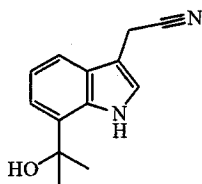


[0298] 在 110°C 下,将含中间体 6 (0.023mol)、氰化钠 (0.03mol) 的 DMF (100ml) 加热 2 小时。将反应混合物倒入冰水中,搅拌 1 小时。沉淀物过滤,然后吸收到 DCM 中。将该溶液提

取,分离有机层,经  $\text{MgSO}_4$  干燥,过滤,蒸发,得到 5.1g 中间体 7。

[0299] d) 中间体 8 的制备

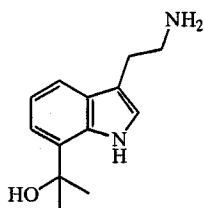
[0300]



[0301] 在氮气流下,于  $5^\circ\text{C}$  下将氯化甲基镁 (0.058mol) 逐滴加到中间体 7 (0.018mol) 的 THF (50ml) 溶液中。将反应混合物在  $5^\circ\text{C}$  下搅拌 1 小时。在  $5^\circ\text{C}$ , 逐滴加入氯化铵 10%。将反应混合物用 EtOAc 提取。分离有机层,经  $\text{MgSO}_4$  干燥,过滤,蒸发,得到 4g 中间体 8。

[0302] e) 中间体 9 的制备

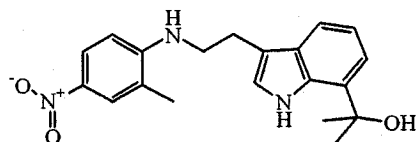
[0303]



[0304] 在 3 巴、室温下,将中间体 8 (0.019mol)、雷尼镍 (4g) 在  $\text{MeOH}/\text{NH}_3$  (50ml) 中氢化 2 小时。将反应混合物通过硅藻土过滤,用 DCM 洗涤,蒸发滤液,得到 3.5g 中间体 9。

[0305] f) 中间体 10 的制备

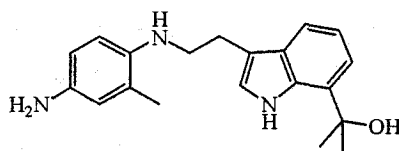
[0306]



[0307] 在  $60^\circ\text{C}$  下,将中间体 9 (0.016mol)、2-氟-5-硝基甲苯 (0.018mol)、碳酸氢钠负离子 (0.019mol) 在 DMSO (100ml) 中的混合物加热过夜。将混合物冷却至室温。加入冰水,加入 DCM。将反应混合物提取,分离有机层,经  $\text{MgSO}_4$  干燥,过滤并浓缩。残留物经硅胶柱色谱法纯化 (洗脱剂:环己烷/EtOAc 60/40)。收集纯流分,蒸发溶剂,得到 2.8g 中间体 10。

[0308] g) 中间体 11 的制备

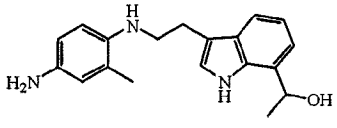
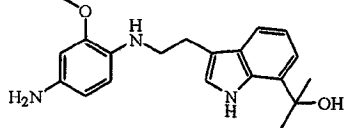
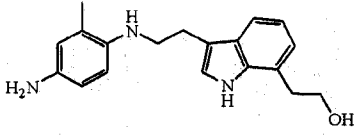
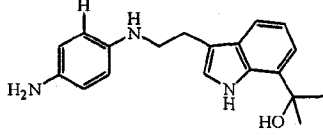
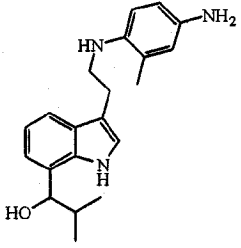
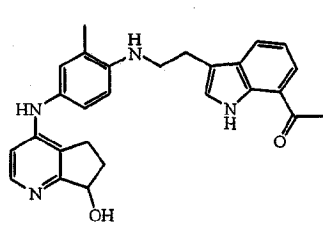
[0309]



[0310] 在室温、大气压力下,将中间体 10 (0.0079mol)、氧化钒 (0.05g)、含噻吩 (4%) 溶液的 DIPE (1ml)、Pt/C 5% (1.3g) 的 THF (50ml) 溶液氢化 1 夜。将反应过滤,蒸发溶剂,得到中间体 11。该产物不经进一步纯化用于下一步骤中。

[0311] 下列中间体根据方法 A3 制备。

[0312]

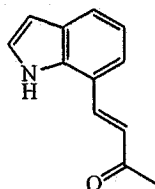
	
中间体 No. 44	中间体 No.45
	
中间体 No.46	中间体 No.47
	
中间体 No.48	中间体 No. 49

[0313] 实施例 A4

[0314] 中间体 7 也可另外按如下方法制备。

[0315] a) 中间体 12 的制备

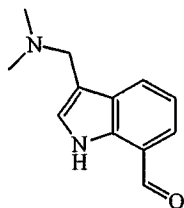
[0316]



[0317] 室温下, 将 1-(三苯基膦烯)-2-丙酮 (34.4mmol) 分次加入到 1H-吡啶-7-甲醛 (34.44mmol) 的甲基苯 (60ml) 溶液中。将反应混合物在 100 °C 加热 3 小时, 然后冷却至室温, 蒸发至干。残留物 (17.4g) 由 HPLC 经硅胶:20-45 μm (450g) 纯化 (洗脱剂: 99.5/0.5DCM/MeOH)。收集纯流分, 并蒸发溶剂, 得到 4.3g 中间体 12。

[0318] b) 中间体 13 的制备

[0319]

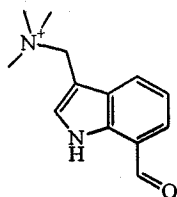


[0320] 在 65 °C 下, 将含中间体 12 (3.4mmol) 和 Eschenmoser 盐 (3.8mmol) 的乙酸 (10ml) 加热 2 小时。将沉淀物过滤, 溶于 DCM 和碳酸钾 10% 中。加入碳酸钾 (固体), 将混合物室温下搅拌 1 小时。将反应混合物提取, 分离有机层, 经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 蒸发溶剂, 得到 0.7g

中间体 13。

[0321] c) 中间体 14 的制备

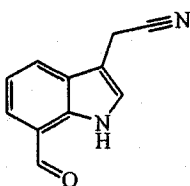
[0322]



[0323] 室温下,将含中间体 13(0.13mol)、碘甲烷(0.14mol)的 EtOH(300ml) 搅拌 2 天。将沉淀物过滤,干燥,得到 47g 中间体 14。

[0324] d) 中间体 15 的制备

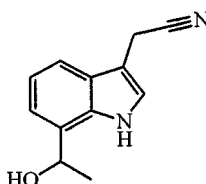
[0325]



[0326] 室温下,将含中间体 14(136.5mmol)、氰化钠(177.5mmol)的 DMF(400ml) 搅拌 2 小时。加入水,将反应混合物用 EtOAc 提取。分离有机层,经  $MgSO_4$  干燥,过滤,蒸发。残留物经高效液相色谱法纯化(Irregular SiOH 20-45  $\mu m$  1000g MATREX,流动相:环己烷 70% / EtOAc 30%)。收集纯流分,并蒸发溶剂,得到 11.8g 中间体 15。

[0327] e) 中间体 16 的制备

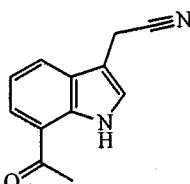
[0328]



[0329] 将氯化甲基镁(0.07mol) 逐滴加到中间体 15(0.022mol) 的 THF(50ml) 溶液中。加入氯化铵 10% 和 EtOAc。将反应混合物提取,分离有机层,经  $MgSO_4$  干燥,过滤,蒸发溶剂。残留物(2.9g) 经高效液相色谱法纯化(Irregular SiOH 20-45  $\mu m$  450g MATREX,流动相:环己烷 60% / EtOAc 40%)。收集纯流分,蒸发溶剂,得到 2g 中间体 16。

[0330] f) 中间体 7 的制备

[0331]



[0332] 室温下,将戴斯-马丁过碘烷(Dess-Martin periodinane)(24.9ml) 逐滴加到中间体 16(10mmol) 的 DCM(20ml) 溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 1 小时,然后倒入冰水中,经硅藻土过滤,将滤液用 DCM 提取。分离有机层,经  $MgSO_4$  干燥,过滤,浓缩溶剂。残留物(2.8g) 经硅胶柱色谱法纯化(洗脱剂:环己烷 / EtOAc 60/40)。收集纯流分,蒸发溶剂,

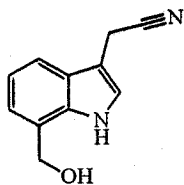
得到 0.8g 中间体 7。

[0333] 实施例 A5

[0334] 中间体 15 也可另外按如下方法制备。

[0335] a) 中间体 17 的制备

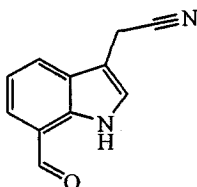
[0336]



[0337] 于 5℃、氮气流下,将四氢铝酸锂 (0.018mol,0.69g) 分次加入到 3-(氰基甲基)-1H-吲哚-7-羧酸甲酯 (0.012mol,2.6g) 的 THF (50ml) 溶液中。将反应混合物室温下搅拌 30 分钟。在 5℃下,逐滴加入水,然后将反应混合物经硅藻土过滤,用 EtOAc 洗涤并提取。分离有机层,经 MgSO<sub>4</sub> 干燥,过滤并浓缩,得到 2.4g 中间体 17。

[0338] b) 中间体 15 的制备

[0339]

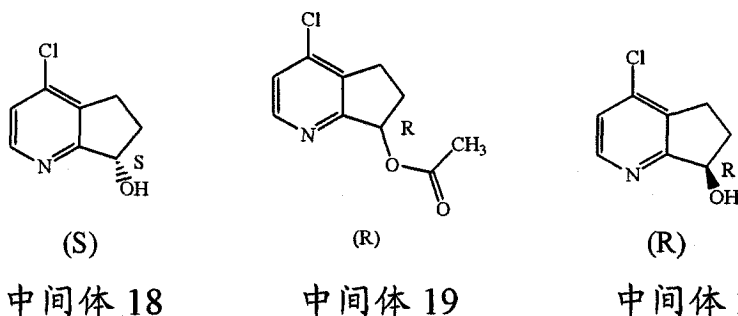


[0340] 5℃下,将戴斯-马丁过碘烷 (0.016mol) 逐滴加到中间体 17 (0.0081mol) 的 DCM (15ml) 溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。将反应混合物经硅藻土过滤,将滤液蒸发。残留物经硅胶柱色谱法纯化 (洗脱剂:环己烷/EtOAc 70/30)。收集纯流分,蒸发溶剂,得到 0.5g 中间体 15。

[0341] 实施例 A6

[0342] 中间体 18、19 和 20 的制备

[0343]



中间体 18

中间体 19

中间体 20

[0344] 室温下,将 4-氯-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[b]吡啶-7-醇 (5g,0.029mol) 和南极假丝酵母脂肪酶 B (2.5g) 在乙酸乙烯酯 (50ml) 中的混合物搅拌 4 小时。反应混合物经硅藻土过滤。将硅藻土用 DCM 洗涤。蒸发滤液的溶剂。残留物 (6.3g) 经硅胶柱色谱法纯化 (洗脱剂:DCM/MeOH, 100/0-98/2; 15-40 μm)。收集两种不同的产物流分,蒸发各产物流分的溶剂,得到 2.1g 中间体 18 (42%; S-对映体) 和 3.6g 中间体 19 (58%; R-对映体)。当要求时,可通过在 MeOH/NH<sub>3</sub> 中反应,将中间体 19 转化为中间体 18 的 R 对映体,得到中间

体 20。

[0345] 中间体 18 和 20 也可另外按如下方法制备。

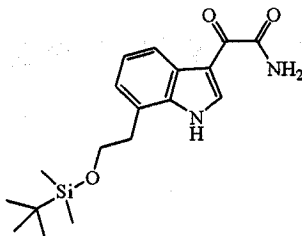
[0346] 在 5℃ 下, 将四氢硼酸钠 (1.37g, 36.10mmol) 分次加入到中间体 1 (5.50g, 32.82mmol) 的 MeOH (50ml) 溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 1 夜, 然后倒入水中, 将混合物用 EtOAc 提取 3 次。将有机层用水和 NaCl 水溶液洗涤, 分离, 经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 蒸发溶剂。残留物 (4.42g) 经手性超临界流体色谱法在 CHIRALPAK AD-H 5 μm 250x20mm 上纯化。流动相: 85% CO<sub>2</sub>, 15% MeOH。

[0347] 收集纯流分并蒸发溶剂, 得到 1.625g 的 (29.2%) 化合物 18 (S-对映体) (DMF, 20℃, 浓度 0.33w/v%, 589nm: -77.58°) 和 1.620g (29.1%) 化合物 20 (R-对映体) (DMF, 20℃, 浓度 0.33w/v%, 589nm: +76.74°)。

[0348] 实施例 A7

[0349] 中间体 21 的制备

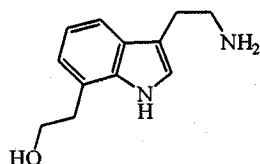
[0350]



[0351] 于 5℃ 下, 将草酰氯 (0.0079mol) 逐滴加入含 7-[2-[[[(1,1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]乙基]-1H-吲哚 (0.0047mol) 的乙醚 (20ml) 中。将反应混合物在 5℃ 下搅拌 2 小时。在 5℃ 下, 向该溶液中逐滴加入 NH<sub>4</sub>OH (浓, 20ml)。室温下, 将反应混合物搅拌过夜。加入水和 EtOAc。分离有机层, 经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩, 得到 1.8g 中间体 21。

[0352] 中间体 22 的制备

[0353]

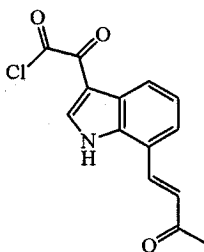


[0354] 5℃ 下, 将四氢铝酸锂 (0.021mol) 逐滴加到中间体 21 (0.0052mol) 的 THF (50ml) 溶液中。将混合物回流下搅拌过夜, 然后用冰浴冷却至 5℃。过量的四氢铝酸锂通过逐滴加入水小心地水解。混合物经硅藻土过滤, 用 DCM 洗涤并提取。分离有机层, 经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩, 得到 0.6g 中间体 22。

[0355] 实施例 A8

[0356] a) 中间体 23 的制备

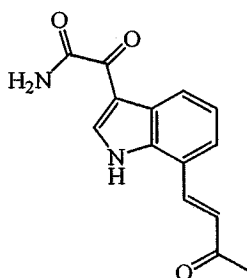
[0357]



[0358] 在 5℃ 下, 将草酰氯 (2.9mmol) 逐滴加到 4-(1H-吲哚-7-基)-3-丁-2-酮 (2.7mmol) 的乙醚 (10ml) 溶液中。移去冷浴, 并使反应温热至室温 (1.5 小时)。将沉淀物过滤, 干燥, 得到 0.49g 中间体 23。

[0359] b) 中间体 24 的制备

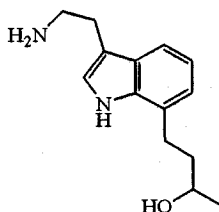
[0360]



[0361] 在 5℃ 下, 将氢氧化铵 (10ml) 逐滴加入中间体 23 (0.725mmol) 的乙醚 (10ml) 溶液中。将反应混合物室温下搅拌过夜。将沉淀物过滤, 干燥, 得到 0.11g 中间体 24。

[0362] c) 中间体 25 的制备

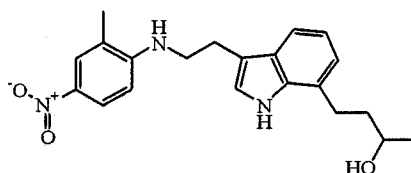
[0363]



[0364] 5℃ 下, 将四氢铝酸锂 (39.5mmol) 逐滴加到中间体 24 (7.9mmol) 的 THF (20ml) 溶液中。将混合物在 80℃ 下搅拌 2 小时, 然后用冰浴冷却至 5℃。过量的四氢铝酸锂通过逐滴加入水小心地水解。混合物经硅藻土过滤, 用 DCM 洗涤并提取。分离有机层, 经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩, 得到 1g 中间体 25。

[0365] d) 中间体 26 的制备

[0366]



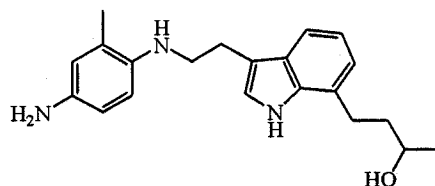
[0367] 将中间体 25 (4.3mmol)、2-氟-5-硝基甲苯 (4.7mmol)、碳酸氢钠阴离子 (5.1mmol) 在 DMSO (10ml) 中的混合物在 60℃ 加热过夜。将混合物冷却至室温。加入冰水, 加入 DCM。将反应混合物提取, 分离有机层, 经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并蒸发。残留物经柱色谱法纯化 (洗脱剂: DCM/MeOH 97/3)。收集纯流分, 并蒸发溶剂。残留物经高效液相色谱法纯化 (Irregular SiOH 15-40 μm 300g MERCK)。流动相 (NH<sub>4</sub>OH 0.1% - 二氯甲烷 99% - MeOH



1%)。收集纯流分并蒸发溶剂,得到 200mg 中间体 26。

[0368] e) 中间体 27 的制备

[0369]

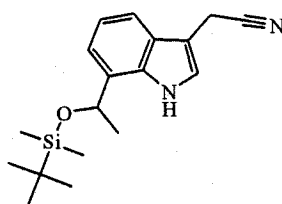


[0370] 在室温、大气压力下,将中间体 26 (0.35mmol)、雷尼镍 (200mg) 的 MeOH (5ml) 混合物氢化。残留物经硅藻土过滤,用 DCM 洗涤,蒸发残留物,得到 0.14g 中间体 27。

[0371] 实施例 A9

[0372] a) 中间体 28 的制备

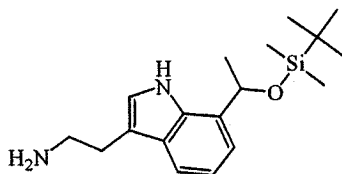
[0373]



[0374] 室温下,将叔丁基二甲基甲硅烷基氯化物 (195mg, 0.91mmol) 加入到中间体 16 (162mg, 0.81mmol)、咪唑 (143mg, 2.1mmol) 的 THF (5ml) 溶液中。将反应混合物室温下搅拌过夜。将沉淀物过滤,并用 DCM 洗涤。蒸发滤液。残留物 (365mg) 经硅胶快速色谱法纯化 (15-40  $\mu$ m, 30g, DCM/MeOH : 100/0-99/1)。收集纯流分,蒸发至干,得到 190mg 中间体 28。

[0375] b) 中间体 29 的制备

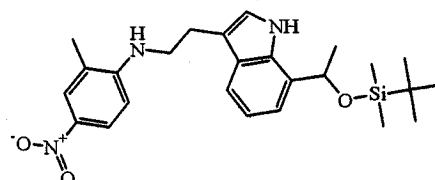
[0376]



[0377] 室温、3 巴的  $H_2$  下,将中间体 28 (190mg, 0.6mmol)、雷尼镍 (0.7g) 的含  $NH_3$  的 MeOH 7N (10ml) 溶液搅拌 4 小时。反应经硅藻土过滤,并将硅藻土用 DCM/MeOH (90/10) 洗涤 3 次。蒸发溶剂得到 147mg 中间体 29。

[0378] c) 中间体 30 的制备

[0379]

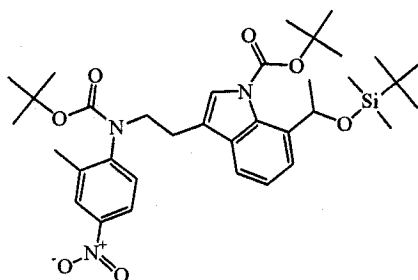


[0380] 将中间体 29 (147mg, 0.46mmol)、1-氟-2-甲基-4-硝基-苯 (78mg, 0.51mmol)、碳酸的钠盐 (1 : 1) (85mg, 1mmol) 在 DMSO (2ml) 中的混合物在 65°C 下加热 1 夜。将混合物倒入冰中,搅拌 10 分钟。加入 DCM,并将混合物用 DCM 提取 2 次。将有机层用水洗涤,然后经  $MgSO_4$  干燥,过滤,蒸发溶剂。残留物经硅胶快速色谱法纯化 (15-40  $\mu$ m, 30g, 环己烷 /EtOAc

85/15)。收集纯流分,蒸发至干,得到 200mg 中间体 30。

[0381] d) 中间体 31 的制备

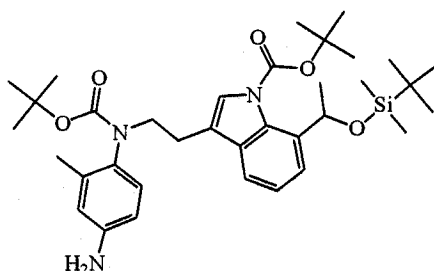
[0382]



[0383] 在 60℃下,将中间体 30 (2.8g, 6.17mmol)、二碳酸二叔丁基酯 (8g, 37mmol)、4-二甲氨基吡啶 (0.15g, 1.2mmol) 和三乙胺 (1.89ml, 13.6mmol) 在 THF (50ml) 中搅拌 24 小时。将混合物蒸发至干。残留物 (7.4g) 经高效液相色谱法在硅胶上 (Cartridge 15-40 μm, 90g) 纯化。流动相 (环己烷 50% : 二氯甲烷 50%)。收集纯流分并蒸发溶剂,得到 3.3g 中间体 31。

[0384] e) 中间体 32 的制备

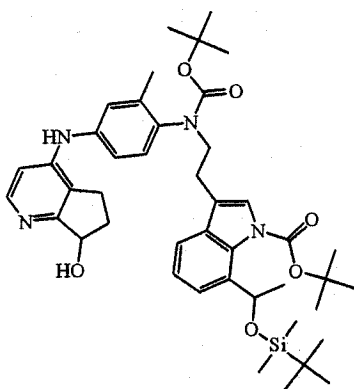
[0385]



[0386] 将中间体 31 (3.3g, 5mmol)、雷尼镍 (3g) 的 MeOH (100ml) 混合物在 2.5 巴下氢化 2 小时。残留物经硅藻土过滤,用 DCM 洗涤,并蒸发残留物,得到 2.7g 中间体 32。

[0387] f) 中间体 33 的制备

[0388]

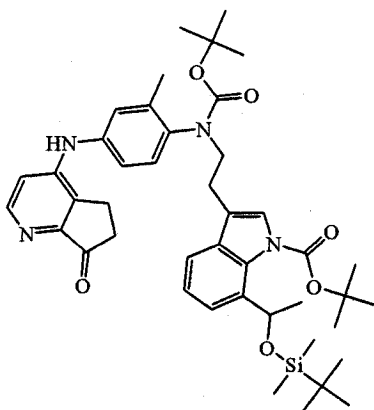


[0389] 将中间体 32 (2.6g, 4.2mmol)、4-氯-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[b]吡啶-7-醇 (0.78g, 4.6mmol)、含 HCl 4M 的二氧六环 (0.21ml, 0.8mmol) 在乙腈 (28ml) 和 EtOH (7ml) 中在 65℃下加热 72 小时。冷却至室温后,加入水和碳酸钾粉末,并将混合物用 EtOAc 提取 2 次。将有机层用水洗涤,经 MgSO<sub>4</sub> 干燥,过滤并蒸发。残留物经高效液相色谱法纯化 (Irregular SiOH 20-45 μm 450g MATREX)。流动相 (NH<sub>4</sub>OH 0.5% ; 二氯甲烷 95% ; MeOH

5%)。收集纯流分,蒸发溶剂,得到 2.35g 中间体 33。

[0390] g) 中间体 34 的制备

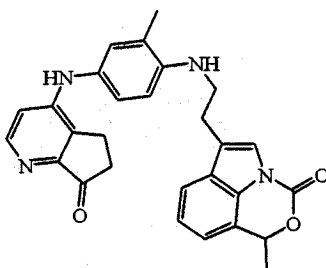
[0391]



[0392] 室温下,将氧化锰(IV)(4.3g)分次加入到中间体 33(2.2g, 2.9mmol) 和三(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)胺(47mg, 0.145mmol) 的 DCM(50ml) 溶液中。将混合物室温下搅拌 18 小时。将混合物经硅藻土过滤。将硅藻土用 DCM 冲洗,蒸发溶剂,得到 1.84g 中间体 34。

[0393] h) 中间体 35 的制备

[0394]

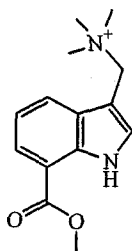


[0395] 室温下,将含中间体 34(1.2g, 1.6mmol) 的三氟乙酸(1.2ml, 15.9mmol) 和 DCM(10ml) 搅拌 2 天。加入碳酸钾 10%,将混合物用 DCM 提取 2 次。有机层经 MgSO4 干燥,过滤,蒸发得到 0.8g 中间体 35,不经进一步纯化用于下一步骤中。

[0396] 实施例 A10

[0397] a) 中间体 36 的制备

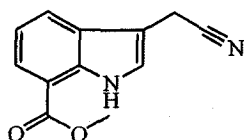
[0398]



[0399] 将碘甲烷(0.024mol)加入到 3-[(二甲氨基)甲基]-1H-吡啶-7-羧酸甲酯(0.022mol) 的 EtOH(50ml) 溶液中。将混合物室温下搅拌过夜,然后真空浓缩至干,得到 5.6g(68%) 中间体 36。

[0400] b) 中间体 37 的制备

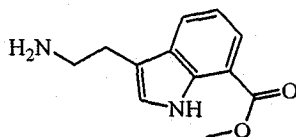
[0401]



[0402] 在 100℃下,将中间体 36(0.015mol) 和氰化钠(0.019mol) 在 DMF(60ml) 中的混合物搅拌 2 小时。加入水。过滤沉淀物。蒸发滤液,得到 3.5g(100%) 中间体 37。

[0403] c) 中间体 38 的制备

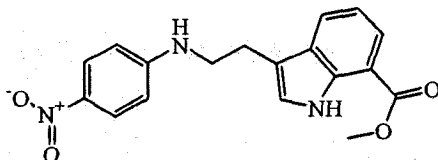
[0404]



[0405] 室温、3 巴压力下,将中间体 37(0.016mol) 和雷尼镍(3g) 在 MeOH/NH<sub>3</sub>(50ml) 中的混合物氢化,然后经硅藻土过滤。蒸发滤液,得到 3.2g(89%) 中间体 38。

[0406] d) 中间体 39 的制备

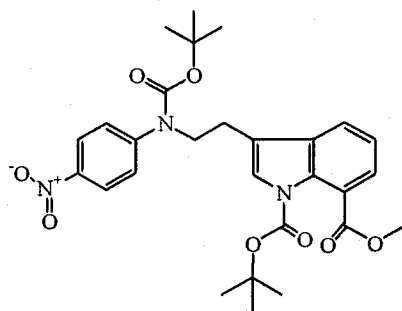
[0407]



[0408] 在 180℃下,将中间体 38(0.0092mol)、1-氟-4-硝基-苯(0.01mol) 和二异丙基乙胺(0.023mol) 的混合物搅拌 2 小时。加入水。将混合物用 DCM 提取。分离有机层,干燥(MgSO<sub>4</sub>),过滤,蒸发溶剂。残留物(2.6g) 经柱色谱法由 kromasil(洗脱剂:环己烷/EtOAc 60/40) 纯化。收集纯流分,蒸发溶剂,得到 1.4g(45%) 中间体 39。

[0409] e) 中间体 40 的制备

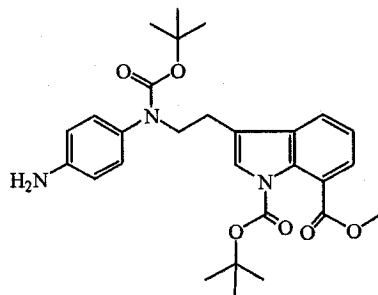
[0410]



[0411] 室温下,将叔丁氧基羰基酐(0.015mol) 加入到中间体 39(0.05mol) 和 4-(二甲氨基)吡啶(少量) 的 THF(50ml) 混合物中。将混合物室温下搅拌过夜。将混合物用 EtOAc 提取。将有机层用水洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>),过滤并蒸发溶剂。残留物(4g) 经硅胶柱色谱法纯化(洗脱剂:环己烷/EtOAc 60/40)。收集纯流分并蒸发溶剂,得到 3.3g(82%) 中间体 40。

[0412] f) 中间体 41 的制备

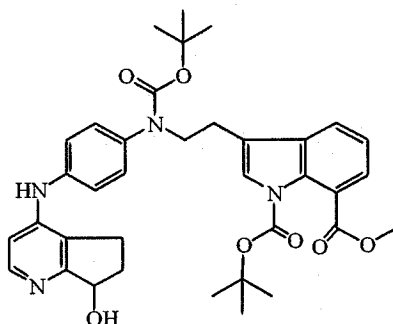
[0413]



[0414] 室温、3 巴压力下,将中间体 40(0.0061mol) 和雷尼镍 (3.3g) 在 MeOH(50ml) 中的混合物氢化,然后经硅藻土过滤。将硅藻土用 DCM/MeOH(98/2) 洗涤。蒸发滤液。残留物 (2.8g) 经硅胶柱色谱法纯化 (洗脱剂:环己烷/EtOAc 70/30)。收集纯流分并蒸发溶剂,得到 1.3g(42%) 中间体 41。

[0415] g) 中间体 42 的制备

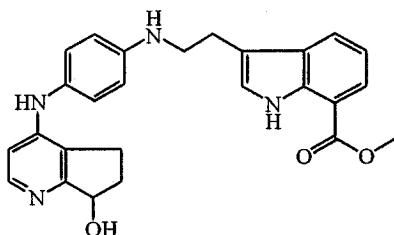
[0416]



[0417] 在 65°C 下,将中间体 41(0.0018mol)、4-氯-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[b]吡啶-7-醇 (0.33g) 和 HCl/异丙醇 (5 滴) 在乙腈 (20ml) 中的混合物搅拌 24 小时。加入碳酸钾 10%。将混合物用 EtOAc 提取。分离有机层,干燥 (MgSO<sub>4</sub>),过滤并蒸发溶剂。残留物 (1.1g) 经硅胶柱色谱法纯化 (洗脱剂:DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 95/5/0.1)。收集纯流分,蒸发溶剂,得到 0.054g 中间体 42。

[0418] h) 中间体 43 的制备

[0419]



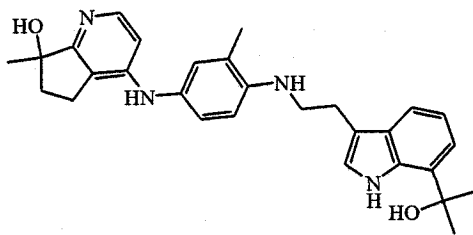
[0420] 在 65°C 下,将中间体 42(0.0009mol) 和 HCl 3N(0.0039mol) 在乙腈 (10ml) 中的混合物搅拌 3 小时。加入碳酸钾 10%。将混合物用 EtOAc 提取。分离有机层,干燥 (MgSO<sub>4</sub>),过滤并蒸发溶剂。残留物 (0.4g, 100%) 由乙醚/乙腈结晶。过滤沉淀物并干燥,得到 0.3g 中间体 43,熔点 164°C。

[0421] B. 终产物的制备

[0422] 实施例 B1

[0423] 化合物 1 的制备

[0424]

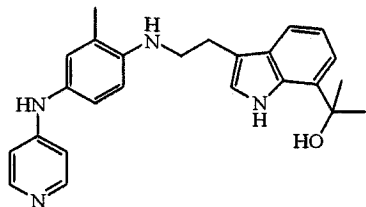


[0425] 在 65 °C 下, 将中间体 11 (1.00g, 3.092mmol)、中间体 2 (0.437g, 2.381mmol)、HCl (0.155ml, 0.618mmol) 在乙腈 (10ml) 中搅拌 5 小时。将反应冷却至室温, 然后用碳酸钾 (10% 水溶液) 碱化, 用 DCM 提取 3 次。将有机层用水洗涤, 经  $MgSO_4$  干燥, 过滤并蒸发溶剂。残留物 (1.37g) 经硅胶 ( $5\ \mu\text{m}\ 150\times 30.0\text{mm}$ ) 正相纯化。流动相为: 梯度从 0%  $NH_4OH$ , 100% DCM, 0% MeOH 至 0.8%  $NH_4OH$ , 92% DCM, 8% MeOH。收集纯流分, 蒸发溶剂。室温下, 将残留物 (0.350g) 吸收到乙腈中持续 1 周。产物结晶, 过滤并真空干燥, 得到 300mg (20.8%) 化合物 1, 熔点 209 °C。

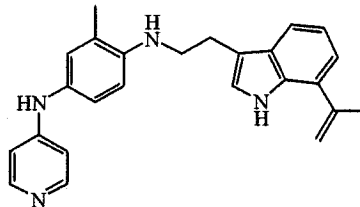
[0426] 实施例 B2

[0427] 化合物 2 和 3 的制备

[0428]



化合物 2



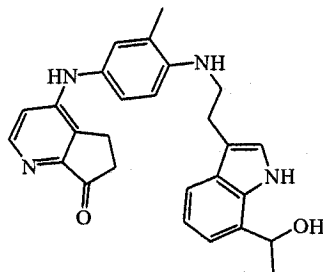
化合物 3

[0429] 在 65 °C 下, 将中间体 11 (0.0031mol)、N, N-二异丙基乙胺 (0.0028mol)、4-溴吡啶盐酸化物 (0.0034mol) 的乙腈 (20ml) 溶液加热 6 小时。加入碳酸钾 10% 和 EtOAc。将反应混合物提取, 分离有机层, 经  $MgSO_4$  干燥, 过滤并浓缩。残留物 (1.3g) 经硅胶柱色谱法纯化 (洗脱剂 95/5/0.5DCM/MeOH/ $NH_4OH$ )。收集两种流分, 蒸发溶剂得到 60mg 化合物 3 和 80mg 的 F2。将残留物 F2 (80mg) 经超临界流体色谱法纯化 (AMINO 柱  $150\times 21.2\text{mm}$ , 洗脱剂: MeOH/ $CO_2$  30/70)。收集纯流分并蒸发溶剂, 得到 43mg 化合物 2。

[0430] 实施例 B3

[0431] 化合物 4 的制备

[0432]



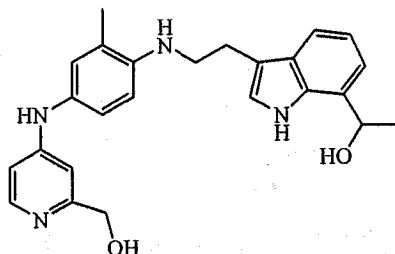
[0433] 室温下, 将中间体 35 (0.8g, 1.7mmol) 和氢氧化钠 3N (2.57ml, 2.57mmol) 在 EtOH (22ml) 和 THF (10ml) 中搅拌 30 分钟。加入  $NH_4Cl$  10% 和 DCM, 将混合物经硅藻土过滤。倾出有机层, 经  $MgSO_4$  干燥, 过滤并蒸发。残留物经 Spherical SiOH ( $10\ \mu\text{m}\ 60\text{g PharmPrep}$ )

MERCK) 正相纯化。流动相为  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.1%, 95% DCM, 5% MeOH。收集纯流分并蒸发溶剂, 得到 250mg 化合物 4。

[0434] 实施例 B4

[0435] 化合物 5 的制备

[0436]

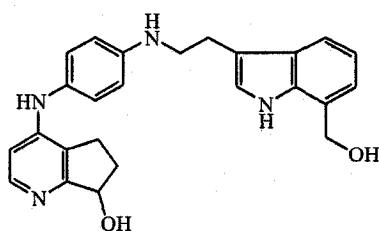


[0437] 在  $5^\circ\text{C}$  下, 将四氢硼酸钠 (0.69mmol) 加入到中间体 49 (0.46mmol) 的 MeOH (5ml) 溶液中。将反应混合物室温下搅拌过夜。加入水, 将反应混合物用 EtOAc 提取, 分离有机层, 经  $\text{MgSO}_4$  干燥, 过滤并蒸发。残留物 (0.14g) 在乙腈中结晶, 将沉淀物过滤并干燥, 得到 0.1g 化合物 5。

[0438] 实施例 B5

[0439] 化合物 6 的制备

[0440]

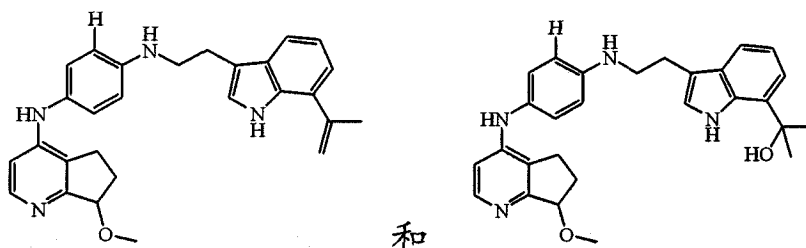


[0441] 在  $\text{N}_2$  气流下, 将四氢铝酸锂 (0.0003mol) 于  $5^\circ\text{C}$  逐滴加到中间体 43 (0.0002mol) 的 THF (4ml) 溶液中。将混合物室温下搅拌 2 小时。加入水。将混合物用 EtOAc 提取。分离有机层, 干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ), 过滤并蒸发溶剂。残留物 (0.18g) 经柱色谱法由 kromasil 纯化 (洗脱剂: DCM/MeOH/ $\text{NH}_4\text{OH}$  98/2/0.2-85/15/1;  $3.5\ \mu\text{m}$ )。收集纯流分并蒸发溶剂, 得到 0.066g (70%) 化合物 6。

[0442] 实施例 B6

[0443] 化合物 7 和 8 的制备

[0444]



化合物 7

化合物 8

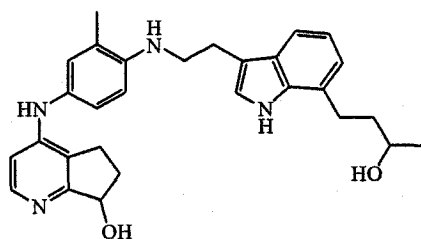
[0445] 在  $70^\circ\text{C}$  下, 将含中间体 47 ((1.00g, 3.23mmol)、中间体 4 (0.653g, 3.55mmol)、 $\text{HCl}$ /

二氧六环 (0.242ml, 0.97mmol) 的乙腈 (15ml) 搅拌 1 夜。将反应混合物冷却至室温。顺次加入水和碳酸钾 (10% 水溶液)。将混合物用 DCM 提取 3 次。分离有机层, 经  $MgSO_4$  干燥, 过滤并蒸发溶剂。残留物经硅胶正相纯化 (Cartridge 15-40  $\mu m$  30g), 流动相为 96% DCM, 4% MeOH。收集纯流分并蒸发溶剂, 得到 0.092g (6.5%) 化合物 7 和 0.030g (2.0%) 化合物 8。

[0446] 实施例 B7

[0447] 化合物 9 的制备

[0448]

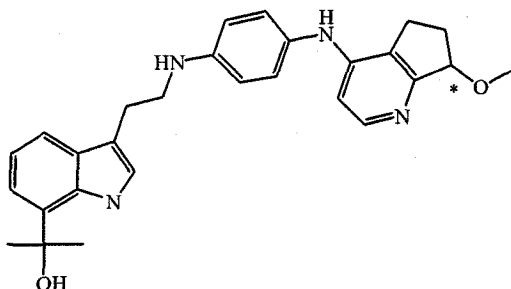


[0449] 将中间体 27 (0.41mmol) 和 4-氯-6,7-二氢-5H-环戊二烯并[b]吡啶-7-醇 (0.46mmol) 在 125°C 下加热 2 小时。残留物经硅胶柱色谱法纯化 (洗脱剂 90/10/0.1 DCM/MeOH/ $NH_4OH$ )。收集纯流分并蒸发溶剂, 得到 58mg 化合物 9。

[0450] 实施例 B8

[0451] 化合物 24 和 25 的制备

[0452]



[0453] 化合物 No. 24 : \*S

[0454] 化合物 No. 25 : \*R

[0455] \* 指相对立体化学 (绝对立体化学未知)。因此, 如果化合物 24 是 S 对映体, 则化合物 25 是 R 对映体, 或者化合物 24 是 R 对映体, 则化合物 25 是 S 对映体。

[0456] 该反应在  $N_2$  气氛下进行。

[0457] 回流下, 将中间体 47 (11.31mmol)、中间体 4 (12.44mmol)、 $Pd(dba)_2$  (1.13mmol)、BINAP (1.13mmol) 和  $tBuONa$  (22.62mmol) 在甲苯 (100ml) 中的混合物搅拌过夜。将混合物过滤, 用 MeOH 洗涤并经高效液相色谱法纯化 (柱 Synergi 50\*250mm, 10  $\mu m$ ; 洗脱剂:  $CH_3CN/H_2O$  (0.1% 三氟乙酸), 梯度为时间 0 分钟下 15%  $CH_3CN$  至时间 25 分钟下 40%  $CH_3CN$ )。收集所要求的流分, 真空蒸发溶剂。将残留物用 DCM 提取, 用  $NaHCO_3$  水溶液洗涤, 经  $Na_2SO_4$  干燥, 过滤并蒸发, 得到化合物 8 (3.8g, 98% 纯度, 65% 收率), 其经超临界流体色谱法 (Chiralcel OJ, 20  $\mu m$ , 250mm\*20mm; 超临界  $CO_2$ : 异丙醇 (0.05% 二乙胺), 40:60v/v, 70ml/min) 分离, 得到两种流分:

[0458] 1000.79mg (19%) 化合物 24, 熔点 110.5-111.6°C。



[0459] ( $ee\% = 99\%$ ,  $[\alpha]_D^{20} = +5.034^\circ$  (波长 = 589,  $20^\circ\text{C}$ , 甲醇中, 浓度 10.33mg/ml), 和

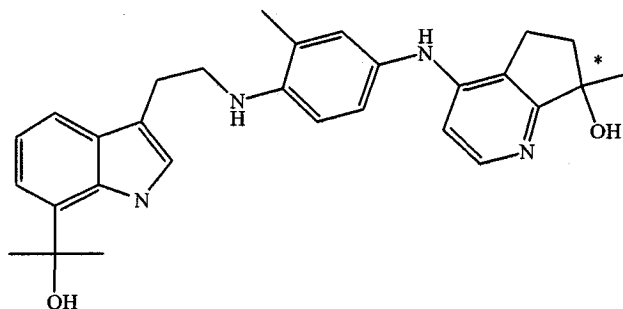
[0460] 939.19mg(18%) 化合物 25, 熔点  $111.4\text{--}113.3^\circ\text{C}$ 。

[0461] ( $ee\% = 99\%$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -3.443^\circ$  (波长 = 589,  $20^\circ\text{C}$ , 甲醇中, 浓度 10.74mg/ml)。

[0462] 实施例 B9

[0463] 化合物的制备

[0464]



[0465] 化合物 No. 26 : \*S

[0466] 化合物 No. 27 : \*R

[0467] \* 指相对立体化学 (绝对立体化学未知)。因此, 如果化合物 26 是 S 对映体, 则化合物 27 是 R 对映体, 或者化合物 26 是 R 对映体, 则化合物 27 是 S 对映体。

[0468] 该反应在  $\text{N}_2$  气氛下进行。

[0469] 回流下, 将中间体 11(9.25mmol)、中间体 2(9.25mmol)、 $\text{tBuONa}$ (18.5mmol)、 $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (0.93mmol) 和 BINAP(0.93mmol) 在甲苯 (40ml) 中的混合物搅拌 3 小时。将得到的混合物冷却至室温并过滤。真空蒸发滤液, 残留物经高效液相色谱法纯化 (柱 Synergi 50\*250mm,  $10\ \mu\text{m}$ ; 洗脱剂:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0.1% 三氟乙酸), 梯度为: 时间 0 分钟下 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  至时间 25 分钟下 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$ )。收集所要求的流分并调节至  $\text{pH} > 7$ 。浓缩溶剂, 用乙酸乙酯提取 (3x100ml), 将所要的有机层用盐水洗涤, 经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤并真空蒸发溶剂, 得到 2.5g(57%) 化合物 1, 其经超临界流体色谱法分离 (AD 250mm\*20mm,  $20\ \mu\text{m}$ ; 超临界  $\text{CO}_2$ : 异丙醇 (0.05% 二乙胺) 40 : 60v/v, 70ml/min), 得到两种流分。

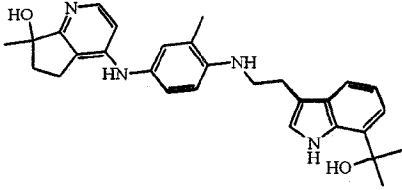
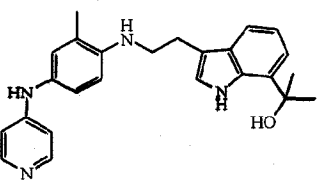
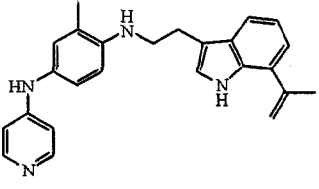
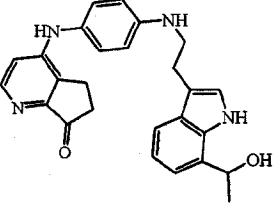
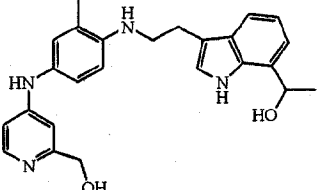
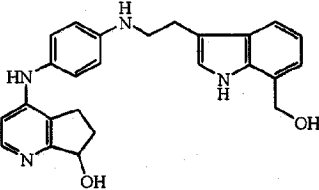
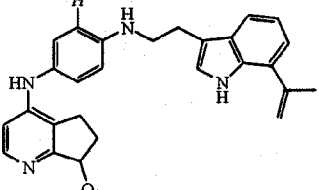
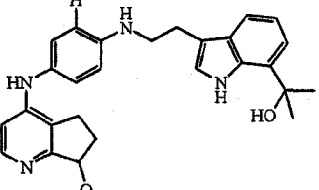
[0470] 流分 1(1g) 经高效液相色谱法进一步纯化 (柱 Synergi 50\*250mm,  $10\ \mu\text{m}$ ; 洗脱剂:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0.1% 三氟乙酸), 梯度为: 时间 0 分钟下 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  至时间 25 分钟下 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ), 得到 0.88g(20%) 化合物 26, 熔点  $122.3\text{--}124^\circ\text{C}$ , ( $ee = 100\%$ )。

[0471] 流分 2(1g) 经高效液相色谱法进一步纯化 (柱 Synergi 50\*250mm,  $10\ \mu\text{m}$ ; 洗脱剂:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0.1% 三氟乙酸), 梯度为: 时间 0 分钟下 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  至时间 25 分钟下 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ), 得到 0.96g(22%) 化合物 27, 熔点  $121.4\text{--}122.6^\circ\text{C}$ , ( $ee = 99\%$ )。

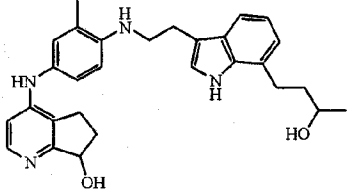
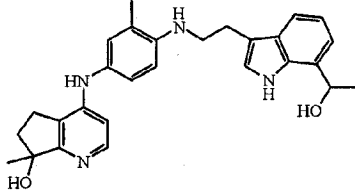
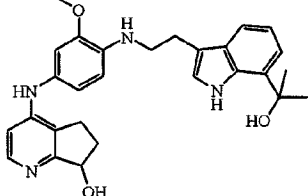
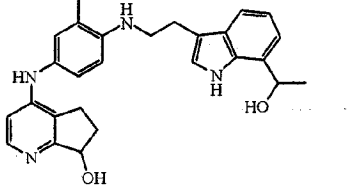
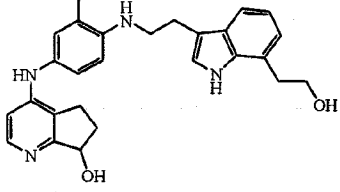
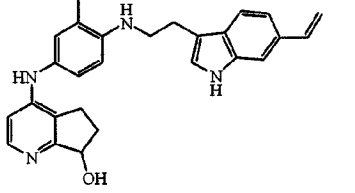
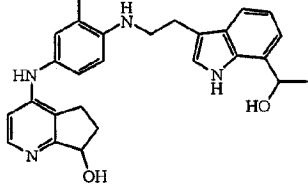
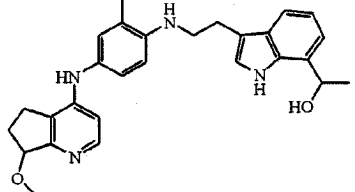
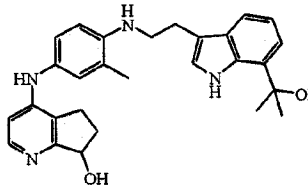
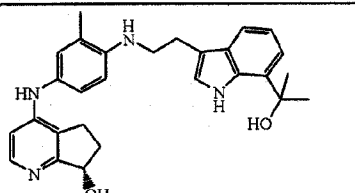
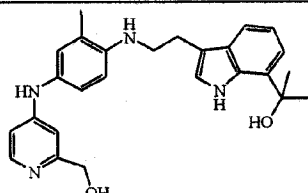
[0472] 表 1 列出根据以上实施例之一制备的化合物。

[0473] 表 1

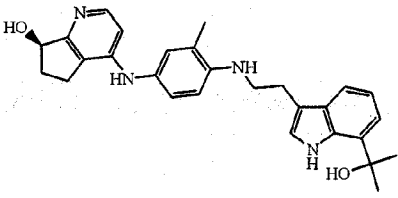
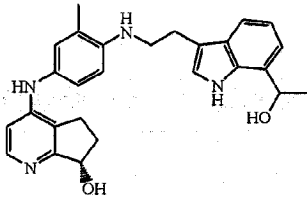
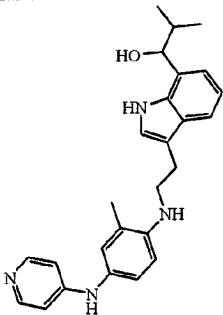
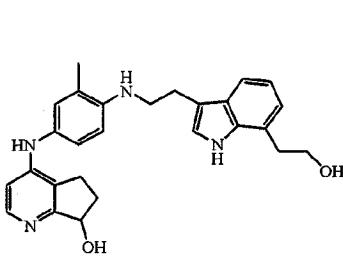
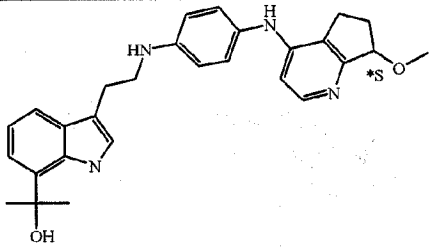
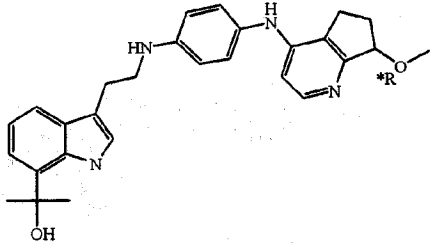
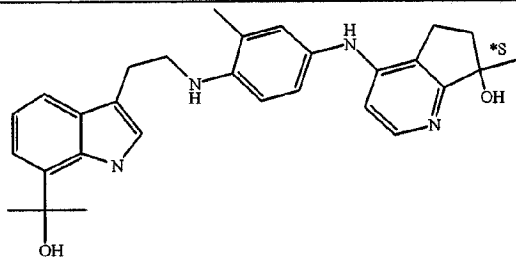
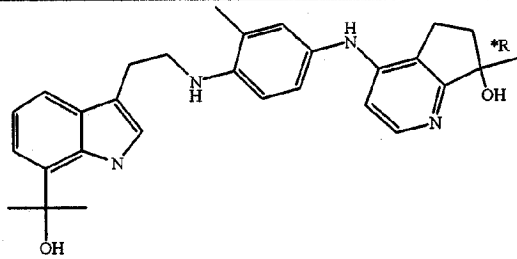
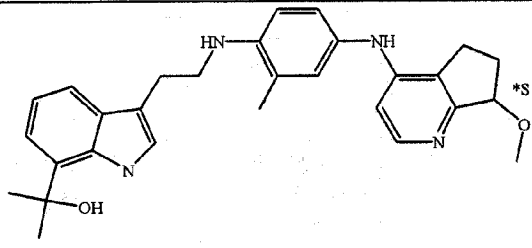
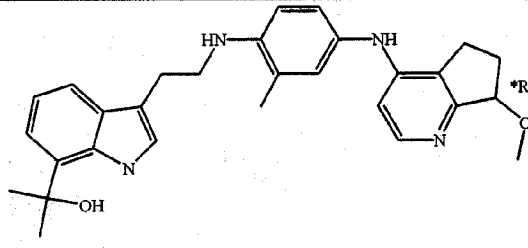
[0474]

	
化合物 No. 1; 实施例 [B1];	化合物 No. 2; 实施例 [B2];
	
化合物 No. 3; 实施例 [B2];	化合物 No. 4; 实施例 [B3];
	
化合物 No. 5; 实施例 [B4];	化合物 No. 6; 实施例 [B5];
	
化合物 No. 7; 实施例 [B6];	化合物 No. 8; 实施例 [B6];

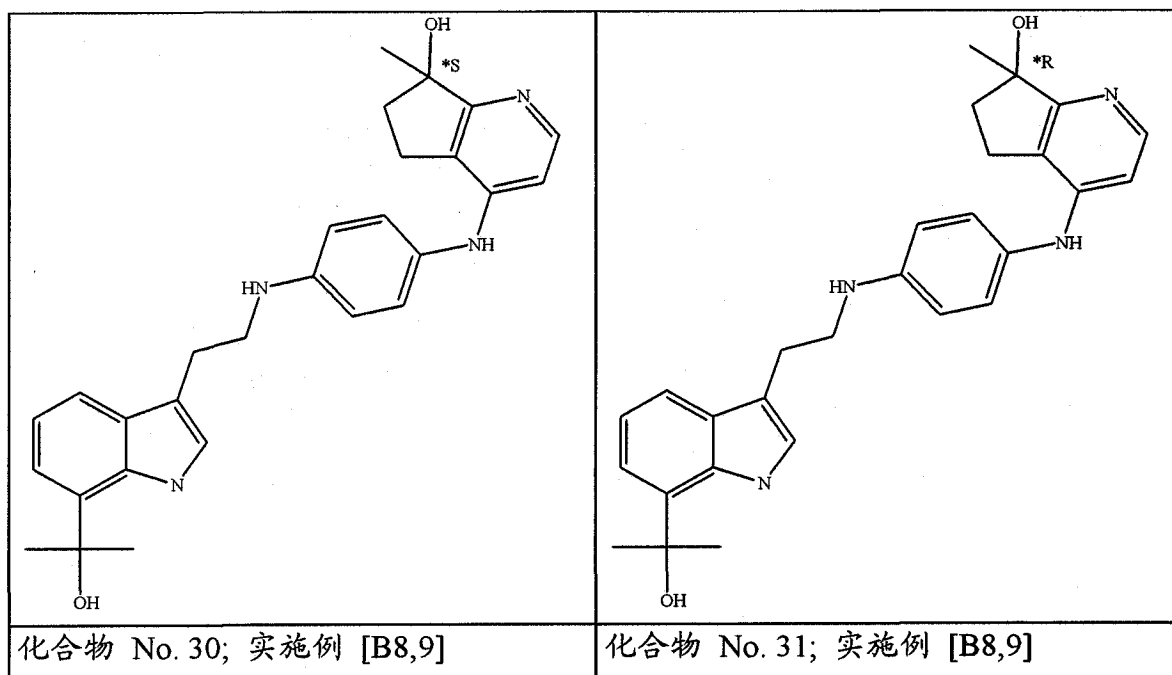
[0475]

	
化合物 No. 9; 实施例 [B7];	
	
化合物 No. 10; 实施例 [B1];	化合物 No. 11; 实施例 [B1];
	
化合物 No. 12; 实施例 [B1];	化合物 No. 13; 实施例 [B1];
	
化合物 No. 14; 实施例 [B1];	化合物 No. 15; 实施例 [B1];
	
化合物 No. 16; 实施例 [B1];	化合物 No. 17; 实施例 [B1];
	
化合物 No. 18; 实施例 [B1];	化合物 No. 19; 实施例 [B1];

[0476]

	
<p>化合物 No. 20; 实施例 [B1];</p>	<p>化合物 No. 21; 实施例 [B1];</p>
	
<p>化合物 No. 22; 实施例 [B2];</p>	<p>化合物 No. 23; 实施例 [B1];</p>
	
<p>化合物 No. 24; 实施例 [B8]</p>	<p>化合物 No. 25; 实施例 [B8]</p>
	
<p>化合物 No. 26; 实施例 [B9]</p>	<p>化合物 No. 27; 实施例 [B9]</p>
	
<p>化合物 No. 28; 实施例 [B8,9]</p>	<p>化合物 No. 29; 实施例 [B8,9]</p>

[0477]



[0478] \* 指相对立体化学

[0479] 化合物表征

[0480] 熔点：

[0481] 数值或者为峰值或者为熔化范围，得到的值具有通常与分析方法有关的实验不确定性。

[0482] Kofler

[0483] 化合物 4 的熔点采用 Kofler 热板 (hot bench) 测定，该设备由带有线性温度梯度的加热板、滑动指针和摄氏度温标组成。

[0484] WRS-2A

[0485] 对于化合物 11、24、25、26、27、28、29、30、31，其熔点采用 WRS-2A 熔点仪测定，该仪器购自上海精密科学仪器有限公司。熔点测定采用的线性加热速率为 0.2-5.0°C/min。报告的值均为熔化范围。最高温度为 300°C。

[0486] DSC

[0487] 化合物 1 的熔点采用 DSC (差示扫描量热法) 测定。熔点测定采用的温度梯度为 10°C/min。最高温度为 350°C。数值为峰值。

[0488] LCMS

[0489] 本发明化合物的 LCMS- 表征采用如下程序确定。

[0490] 一般程序 A

[0491] HPLC 测定采用 Alliance HT 2795 (Waters) 系统测定，该系统包括带脱气机的四元泵、自动进样器、二极管阵列检测器 (DAD) 和以下各方法中指定的柱，柱保持在 30°C 的温度。来自柱的分流进入 MS 光谱仪。MS 检测器配置电喷雾离子化源。毛细管针电压 (capillary needle Voltage) 3kV, LCT (Waters 飞行时间 Zspray™ 质谱仪) 上离子源温度 (source temperature) 保持在 100°C。使用氮气作为雾化气体。用 Waters-Micromass MassLynx-Openlynx 数据系统进行数据采集。

**[0492] 一般程序 B**

[0493] LC测定采用UPLC(超高效液相色谱法)Acquity(Waters)系统,该系统包括具有脱气机的二元泵、自动进样器、二极管阵列检测器(DAD)和以下各方法中指定的柱,柱保持在温度40℃。来自柱的液体进入MS检测器。MS检测器配置电喷雾离子化源。毛细管针电压3kV,Quattro(来自Waters的三重四级杆质谱仪)上离子源温度保持在130℃。使用氮气作为雾化气体。用Waters-Micromass MassLynx-Openlynx数据系统进行数据采集。

**[0494] 一般程序 C**

[0495] HPLC测定采用Agilent 1100模块进行,其包含泵、二极管阵列检测器(DAD)(使用波长220nm)、柱加热器和以下各方法中指定的柱。来自柱的分流进入Agilent MSD系列G1946C和G1956A中。MS检测器配置API-ES(大气压电喷雾离子化)。通过100-1000扫描获得质谱。毛细管针电压:正离子化模式2500V,负离子化模式3000V。碎裂电压50V。干燥气体温度保持在350℃,流速10l/min。

**[0496] 方法 1**

[0497] 除一般程序A外:反相HPLC采用Xterra-MS C18柱(5 μm, 4.6x150mm)上进行,流速1.0ml/min。使用两种流动相(流动相A:100% 7mM醋酸铵;流动相B:100%乙腈)进行梯度条件:85% A, 15% B(保持3分钟),5分钟内变为20% A, 80% B,在20% A和80% B保持6分钟,用初始条件再平衡3分钟。使用20 μl进样体积。正离子化模式锥孔电压(cone voltage)20V,负离子化模式20V。通过0.8秒内100-900扫描获得质谱,扫描间延迟(interscn delay)0.08秒进行。

**[0498] 方法 2**

[0499] 除一般程序B外:反相UPLC在Waters Acquity BEH(桥联乙基硅氧烷/硅胶杂化)C18柱(1.7 μm, 2.1x100mm)上进行,流速0.35ml/min。使用两种流动相(流动相A:95% 7mM醋酸铵/5%乙腈;流动相B:100%乙腈)进行梯度条件:90% A和10% B(保持0.5分钟),3.5分钟内变为8% A和92% B,保持2min,0.5分钟内返回初始条件,保持1.5分钟。使用2 μl进样体积。正离子化和负离子化模式锥孔电压20V。通过0.2秒内100-1000扫描获得质谱,扫描间延迟0.1秒进行。

**[0500] 方法 3**

[0501] 除一般程序C外:反相HPLC在YMC-Pack ODS-AQ, 50x2.0mm5 μm柱上进行,流速0.8ml/min。使用两种流动相(流动相A:带有0.1% TFA的水;流动相B:带有0.05% TFA的乙腈)。首先将90% A和10% B保持0.8分钟。然后进行梯度3.7分钟内至20% A和80% B,并保持3分钟。采用典型进样体积:2 μl。恒温箱温度50℃。(MS极性:正)。

**[0502] 表 2:LCMS 数据和熔点**

[0503] (保留时间  $R_t$  (min),  $(MH)^+$  峰, LCMS 程序指用于 LCMS 的方法)

化合物编号	LCMS			熔点
	$R_t$	$(MH)^+$	程序	
[0504] 1	3.39	471	2	209°C
2	3.35	401	2	
4	3.19	441	2	121°C

[0505]

化合物编号	LCMS			熔点
5	2.97	417	2	
6	7.47	415	1	
7	3.94	439	2	
8	3.45	457	2	
9	8.51	471	1	
10	3.05	457	2	
11	3.01	473	3	221.0-222.5°C
12	3.07	443	2	
13	3.00	443	2	
14	3.49	425	2	
15	8.22	443	1	
16	3.34	457	2	
17	3.32	457	2	
18	8.68	457	1	
20	8.62	457	1	
21	8.2	443	1	
22	8.95	415	1	
23	2.93	443	3	
24				110.5-111.6°C
25				111.4-113.3°C
26				122.3-124°C
27				121.4-122.6°C
28				98.3-100°C
29				96.8-99°C
30				111.5-112.3°C
31				112.7-113.6°C

[0506] 旋光度

[0507] 旋光度采用旋光计测定。 $[\alpha]_D^{20}$ 表示在20°C下,采用钠的D-线波长(589nm)的光测定的旋光度。样品池光程为1dm。实际值后,注明的是用于测定旋光度的溶液的浓度和溶剂。

[0508] 表3:旋光度

[0509]

化合物编号	$[\alpha]_D^{20}$	浓度	溶剂
18	-37.4°	0.516w/v%	DMF

20	+36.87°	0.575w/v%	DMF
21	-39.68°	0.378w/v%	DMF
24	+5.03°	10.30mg/ml	MeOH
25	-3.44°	10.70mg/ml	MeOH
26	-13.74	8.59mg/ml	氯仿
27	+11.89	9.00mg/ml	氯仿
30	-5.25	4.00mg/ml	MeOH
31	+7.99	4.00mg/ml	MeOH
28	-4.90	10.00mg/ml	MeOH
29	+5.69	9.89mg/ml	MeOH

[0510]

[0511] C. 药理学实施例

[0512] 采用 p53 酶联免疫吸附试验测定本发明化合物保护 A2780 细胞中 p53 的能力。p53 试验是一种应用两种多克隆抗体的“夹心”酶免疫分析。一种对 p53 蛋白的特异性多克隆抗体已被固定于塑料孔的表面上。待试验样本中存在的任何 p53 都将与捕获抗体 (capture antibody) 结合。该生物素化检测剂多克隆抗体还识别 p53 蛋白,并将与已被所述捕获抗体固定的任何 p53 结合。所述检测剂抗体继而被辣根过氧化物酶缀合的抗生蛋白链霉素结合。辣根过氧化物酶催化显色底物邻苯二胺的转化,其催化强度与板上结合的 p53 蛋白的量成比例。采用分光光度计对显色反应产物进行定量。通过用已知浓度的纯化重组 HIS 标记 p53 蛋白构建标准曲线实现定量 (参见实施例 C.1.)。

[0513] C.1. p53 ELISA

[0514] 在 37°C、有 5% CO<sub>2</sub> 的增湿培养箱中,将 A2780 细胞 (ATCC) 在添加 10% 胎牛血清 (FCS)、2mM L-谷氨酰胺和庆大霉素的 RPMI 1640 中培养。

[0515] 将 A2780 细胞以每孔 20000 个细胞接种于 96 孔板中,在 37°C 下增湿培养箱中培养 24 小时并用化合物处理 16 小时。培养后,将细胞用磷酸盐缓冲盐水洗涤一次,然后向各孔中加入 30 μl 低盐 RIPA 缓冲液 (20mM tris, pH7.0, 0.5mM EDTA, 1% Nonidet P40, 0.5% DOC, 0.05% SDS, 1mM PMSF, 1 μg/ml 抑肽酶和 0.5 μg/ml 亮肽素)。将板至于冰上 30 分钟完成溶胞。采用如下所述的夹心 ELISA 检测脱落溶胞产物 (de lysate) 中的 p53 蛋白。

[0516] 将高结合聚苯乙烯 EIA/RIA 96 孔板 (Costar 9018) 用在涂覆缓冲液 (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH8.2) 中浓度为 1 μg/ml 的捕获抗体 pAb1801 (Abcam ab28-100) 涂覆,每孔 50 μl。在 4°C 下使抗体粘附过夜。将涂覆板用磷酸盐缓冲盐水 (PBS)/0.05% Tween 20 洗涤一次,加入 300 μl 封闭缓冲液 (PBS, 1% 牛血清白蛋白 (BSA)), 室温下持续 2 小时的培养期。在封闭缓冲液中制备范围为 3-200ng/ml 的纯化的重组 HIS 标记 p53 蛋白稀释物,用作标准液。



[0517] 将各板用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 2 次,以 80  $\mu$  l/孔加入封闭缓冲液或标准液。向标准液中加入 20  $\mu$  l 裂解缓冲液。以 20  $\mu$  l 裂解物/孔的量,将样本加入到其它孔。在 4 $^{\circ}$ C 下培养过夜后,将各板用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 2 次。将等份的 100  $\mu$  l 二级多克隆抗体 p53 (FL-393) (Tebubio, sc-6243) 以在封闭缓冲液中 1  $\mu$  g/ml 的浓度加入到各孔中,然后在室温下使其粘附 2 小时。将各板用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 3 次。加入在 PBS/1% BSA 中浓度为 0.04  $\mu$  g/ml 的检测抗体抗-兔 HRP (sc-2004, Tebubio),并在室温下培养 1 小时。将各板用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 3 次,加入 100  $\mu$  l 底物缓冲液(底物缓冲液临用现配:将 1 片 10mg 邻苯二胺(OPD)(来自 Sigma)和 125  $\mu$  l 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入到 25ml OPD 缓冲液:35mM 柠檬酸,66mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH5.6 中)。5-10 分钟后,通过每孔加入 50  $\mu$  l 终止缓冲液(1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 停止显色反应。采用 Biorad 微板读数计在双波长 490/655nm 下测定吸光度,然后分析结果。

[0518] 对于每个实验,都平行进行对照(不含药物)和空白培养(不含细胞或药物)。从所有对照和样本值中减去空白值。对于每个样本, p53 值(吸光度单位)表示为对照中的 p53 值的百分率。百分率保持高于 140% 被定义为显著。因此,将试验化合物的作用表示为给出对照中存在的 p53 值的至少 140% 的最低剂量(LAD)(见表 4)。

[0519] 在一些实验中,于 384-孔培养板中适用该测定法。

[0520] 表 4:以上 p53 ELISA 方案(A2780 细胞)中试验的化合物的结果

[0521]

化合物编号	p53-elisa LAD [microM]
6	1.0
17	0.10
12	0.10
13	1.00
19	0.10
2	0.10
5	0.10
22	3.00
15	0.10
20	0.03
18	0.03
21	1.0
9	1.0
11	0.30
14	1.0
4	0.10
10	1.0
7	0.30
8	0.10
16	0.30
23	3.00
1	0.10
27	0.10
24	0.03
25	0.10
31	0.10
26	0.10
30	0.10
29	0.03
28	0.10

[0522] C. 2 增殖分析

[0523] 人 A2780 卵巢癌细胞由 Dr. T. C. Hamilton (Fox Chase Cancer Centre, Pennsylvania, U. S. A.) 馈赠。将细胞在添加 2mM L- 谷氨酰胺、50  $\mu$ g/ml 庆大霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。

[0524] 阿尔玛蓝 (Alamar Blue) 分析中所用的试剂

[0525] 刃天青购自 Aldrich (Prod. No. 199303)。亚铁氰化钾、铁氰化钾、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  购自 Sigma (分别为 Prod. No. P9387、P8131、P5655 和 P8281)。

[0526] 磷酸钾缓冲液 0.1M (PPB) 制备如下：将 2.72g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 13.86g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  溶解于

500ml milli-Q H<sub>2</sub>O 中,将 pH 调节至 pH 7.4,然后用 milli-Q H<sub>2</sub>O 将体积加至 1 升;将该缓冲液过滤除菌,然后在室温下贮存。刃天青储备液 (PPB-A) 通过将 45mg 刃天青溶解于 15ml PBS 中新鲜配制。30mM 铁氰化钾 (PPB-B) 通过将 0.987g 铁氰化钾溶解于 100ml PPB 中制备。将 1.266g 亚铁氰化钾溶解于 100ml PPB 中制备 30mM 亚铁氰化钾 (PPB-C)。

[0527] PPB-A、PPB-B 和 PPB-C 的混合物通过将等体积的各溶液混合制成。刃天青工作溶液 (本文称为“阿尔玛蓝”溶液) 通过将所述混合物在 PPB 中稀释 20× (vol/vol) 然后过滤除菌制备;阿尔玛蓝溶液可在 4°C 下保存最长 2 周。

[0528] 阿尔玛蓝分析程序

[0529] 对于 384 孔板中的实验,将细胞以密度  $5 \times 10^3$  细胞/ml 接种于有透明底的黑色 Falcon 384-孔培养板 (Life Technologies, Merelbeke, Belgium) 内的 45  $\mu$ l 培养基中。使细胞粘附于塑料上 24hr。将试验化合物预稀释 (1/50 于培养基中),然后将 5  $\mu$ l 预稀释化合物加入到各孔中。培养 4 天后,向各孔中加入 10  $\mu$ l 阿尔玛蓝溶液,在 37°C 下,将细胞进一步培养 5 小时 (A2780)。对每个孔的荧光强度采用荧光板读数计 (Fluorskan, Labsystems, 540nm 激发和 590nm 发射) 测定。

[0530] 抗增殖活性按相比对照 (未治疗细胞) 条件下,经治疗条件下保留的存活细胞的百分率计算。在实验中,各实验条件下的结果为 3 个平行试验孔的平均值。适当时,重复试验以确定完整的浓度-响应曲线。适当时,对分级数据运用概率分析 (Finney, D. J., Probit Analyses, 第二版第 10 章, Graded Responses (分级应答), Cambridge University Press, Cambridge 1962) 计算 IC<sub>50</sub>- 值 (降低细胞生长至对照的 50% 所需的药物浓度)。本文,将试验化合物的作用表示为 pIC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>- 值的负 log 值 (M)) (见表 5A)。

[0531] 表 5A: 以上细胞增殖方案中测定的化合物的结果 (A2780 细胞)

[0532]

化合物编号	A2780 细胞增殖抑制 pIC <sub>50</sub>
6	6.67
17	7.40
12	7.20
13	6.90
19	7.34
2	7.38
5	7.28
22	6.26
15	7.27

20	7.29
18	7.47
21	6.85
9	6.85
11	6.55
14	6.43
4	6.74
10	6.70
7	6.96
8	7.06
16	6.87
23	6.52
1	6.94
27	6.85
24	7.18
31	6.84
26	7.11
30	7.04
29	7.14
28	6.89

[0533] 还可根据以上方案,但使用其它细胞株测试化合物:结肠直肠癌细胞株 HCT116、非小细胞肺癌细胞株 H1299、人前列腺癌细胞株 DU145。结果报告于表 5B 中。

[0534] 表 5B

[0535]

化合物编号	HCT116 细胞增殖抑制 pIC <sub>50</sub>	H1299 细胞增殖抑制 pIC <sub>50</sub>	DU145 细胞增殖抑制 pIC <sub>50</sub>
6	5.39	5.03	
17	7.05	6.18	6.17
12	6.06	5.2	
13	5.61	<5	
19		5.46	5.74
2		5.94	6.16
5	6.46	5.23	5.56
22		5.09	5.07
15	6.69	5.82	
20		5.72	5.73
18	7.27	6.38	6.40
21	6.83	6.12	5.22
9	6.02	5.17	5.26
11	6.67	5.81	6.21
14	<5	5.40	5.14
4	6.00	5.43	5.29
10	6.47	5.68	5.65
7	7.00	6.39	6.60
8	7.06		
16	6.68	6.73	5.98
23	5.53	5.61	5
1	6.82	6.06	5.92
27	7.08	5.99	6.00
24	7.42	6.63	6.53
31	6.94	5.84	6.04
26	7.26	6.27	6.18
30	7.19	6.02	6.14
29	7.37	6.67	6.58
28	7.11	6.73	6.52

[0536] C. 3. . P450 分析

[0537] CYP P450(大肠杆菌 (E. coli) 表达) 蛋白 (3A4、2D6、2C9、1A2 & 2C19) 将其特异性底物转化为荧光分子<sup>1 2</sup>。该荧光分子采用荧光板读数计测定。抑制该酶促反应的化合物将使得荧光信号减弱。

[0538] 由各 cDN4 表达的细胞色素 P450 同工酶介导的转化

[0539]

底物	酶	荧光分子
CEC	CYP1A2	CHC
MFC	CYP2C9	7-HFC
CEC	CYP2C19	CHC
AMMC	CYP2D6	AHMC
BFC	CYP3A4	7-HFC
DBF	CYP3A4	荧光素
7-BQ	CYP3A4	羟基喹啉

[0540] 缩写：

[0541] CEC :7- 乙氧基 -3- 氰基香豆素 ;CHC :3- 氰基 -7- 羟基香豆素 ；

[0542] MFC :7- 甲氧基 -4- 三氟甲基香豆素 ;7-HFC :7- 羟基 - 三氟甲基香豆素，

[0543] CEC :7- 乙氧基 -3- 氰基香豆素 ;CHC :3- 氰基 -7- 羟基香豆素 ；

[0544] AMMC :3-[2-(N, N- 二乙基 -N- 甲氨基 ) 乙基 ]-7- 甲氧基 -4- 甲基香豆素 ；

[0545] AHMC :3-[2-(N, N- 二乙氨基 ) 乙基 ]-7- 羟基 -4- 甲基香豆素盐酸化物，

[0546] BFC :7- 苄氧基 - 三氟甲基香豆素 ；

[0547] DBF :二苄基荧光素,7-BQ :苄氧基喹啉。

[0548] 辅因子混合物 :( 对于除 CYP 2D6 外的所有 CYP 酶 )

[0549]

	工作溶液		终浓度
G-6-P	8.25 mM	25.10 mg	3.3 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14.29 $\mu$ l	0.4 U/ml
0.5M MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	8.25 mM	165.0 $\mu$ l	3.3 mM
NADP	3.25 mM	25.59 mg	1.3 mM
溶解于 0.1M Na-K-磷酸盐缓冲液中		10ml	

[0550] 缩写：

[0551] G-6-P :葡萄糖 -6- 磷酸 ;G-6-P-DH :葡萄糖 -6- 磷酸 - 脱氢酶

[0552] 辅因子混合物 :( 对于 CYP 2D6)

[0553]

	工作溶液		终浓度
G-6-P	1.025 mM	3.12 mg	0.41 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14.29 $\mu$ l	0.4 U/ml
0.5M MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.025 mM	20.5 $\mu$ l	0.41 mM
NADP	20.5 $\mu$ M	0.161 mg	8.2 $\mu$ M
溶解于 0.1M Na-K-磷酸盐缓冲液中		10ml	

[0554] CYP P450 酶溶液：

[0555]

<u>CYP1A2</u> :	(CEC)	终浓度	5 pmol P450/ml
<u>CYP2C9</u> :	(MFC)	终浓度	60 pmol P450/ml
<u>CYP2C19</u> :	(CEC)	终浓度	2.5 pmol P450/ml
<u>CYP2D6</u> :	(AMMC)	终浓度	42 pmol P450/ml
<u>CYP3A4</u> :	(BFC)	终浓度	83 pmol P450/ml
	(DBF)	终浓度	5 pmol P450/ml
	(7-BQ)	终浓度	20 pmol P450/ml

[0556] 将所有这些CYP酶溶解于0.01M Na-K-磷酸盐缓冲液+1.15% KCl中,冰上保存至使用。将CYP P450酶储存于-80℃。

[0557] 化合物及参考抑制剂稀释：

[0558] 将化合物及参考抑制剂以5mM的DMSO溶液形式递送至部门。经由使用乙腈的系列稀释制备 $5 \cdot 10^{-4}$ M的工作溶液。用于初级筛选的最终化合物浓度为 $10^{-5}$ M,且最终溶剂浓度为2%。在浓度 $10^{-5}$ M下初级筛选后,在 $3 \cdot 10^{-9}$ - $10^{-5}$ M的浓度范围测定所选择的有效抑制剂的IC<sub>50</sub>值。在初级筛选中,所有化合物测试三次。

[0559] 在 $10^{-9}$ - $10^{-4}$ M的浓度范围,测试参考抑制剂。

[0560] 参考抑制剂

[0561]

呋拉茶碱	(超细化学品)	用于CYP1A2
磺胺苯吡唑	内部	用于CYP2C9
反苯环丙胺	内部	用于CYP2C19
奎尼丁	内部	用于CYP2D6
酮康唑	内部	用于CYP3A4

[0562] 底物溶液：

[0563]

CEC (CYP1A 底物)	6.25 $\mu$ l 20 mM CEC 溶液/5ml 总体积	5 $\mu$ M
MFC (CYP2C9 底物)	200 $\mu$ l 25mM MFC 溶液/5ml 总体积	200 $\mu$ M
CEC (CYP2C19 底物)	31.25 $\mu$ l 20 mM CEC 溶液/5ml 总体积	25 $\mu$ M
AMMC(CYP2D6 底物)	150 $\mu$ l 0.5 mM AMMC 溶液/5ml 总体积	3 $\mu$ M
BFC (CYP3A4 底物)	750 $\mu$ l 5 mM BFC 溶液/5ml 总体积	150 $\mu$ M
DBF (CYP3A4 底物)	12.5 $\mu$ l 2 mM DBF 溶液/5ml 总体积	1 $\mu$ M
7-BQ (CYP3A4 底物)	60 $\mu$ l 25 mM 7-BQ 溶液/5ml 总体积	60 $\mu$ M

[0564] 将底物储备液溶于乙腈中,并储存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。将最终工作溶液溶于 0.1M Na-K-磷酸盐缓冲液 pH 7.4 中,且此溶液总是在开始该分析前新鲜制备。

#### [0565] 数据分析

[0566] 板的制备、数据传输、数据分析、结果验证及认可和数据上载均用 Lexis-Laplace 软件 (Laplace-DLM-RVAM) 半自动进行。

[0567] 计算所使用的方程式为：

[0568]  $\% \text{活性} = (100 / (\text{阳性对照平均值} - \text{阴性对照平均值})) \times (\text{样本平均值} - \text{阴性对照平均值})$

[0569]  $\% \text{抑制} = 100 - \% \text{活性}$

[0570] 当计算时,经由在 RVAM 中的图的外推法,基于与 50%对照轴的交点,自动产生  $\text{IC}_{50}$  值。

#### [0571] 方法

[0572] 该分析在黑色 96 孔 Costar 板中进行。每孔该分析包含:40  $\mu$ l CYP P450 酶溶液 (在阴性对照样本中,加入不含酶的 40  $\mu$ l 0.1M Na-K-磷酸盐缓冲液 pH 7.4);40  $\mu$ l 辅因子混合物;2  $\mu$ l 化合物或用于阴性对照样本的参考抑制剂或用于阳性对照样本的溶剂。在  $37^{\circ}\text{C}$  下的震荡培养箱中预培养 5 分钟后,加入 20  $\mu$ l 底物溶液。将各板在  $37^{\circ}\text{C}$  培养 10 分钟 (CYP3A4/DBF)、15 分钟 (CYP1A2)、30 分钟 (CYP2C9、CYP3A4/BFC 及 CYP3A4/7-BQ & CYP2C19) 和 45 分钟 (CYP2D6)。通过加入 200  $\mu$ l 乙腈终止反应。对于 CYP3A4/DBF,反应通过加入 200  $\mu$ l 2M NaOH 而终止。对于 CYP3A4/7-BQ,反应通过加入 40  $\mu$ l Tris/乙腈 (1 : 5) (V : V),接着在 2000rpm 下离心 10 分钟) 而终止。荧光信号通过荧光 Victor2(Wallac) 或 Fluoroskan(Labsystems) 读数计检测。对于不同酶及其特异性底物的激发及放射波长在表 6 中述及。

[0573] 表 6 :激发和发射波长

[0574]

酶	底物	激发波长	发射波长
CYP1A2	CEC	410nm	460nm
CYP3A4	BFC	405nm	535nm
CYP3A4	DBF	485nm	538nm



CYP3A4	7-BQ	405nm	535nm
CYP2C9	MFC	405nm	535nm
CYP2C19	CEC	410nm	460nm
CYP2D6	AMMC	390nm	460nm

[0575] 参考文献

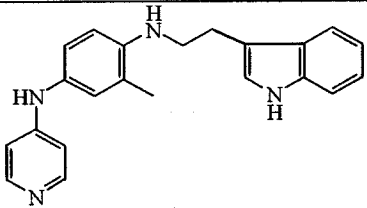
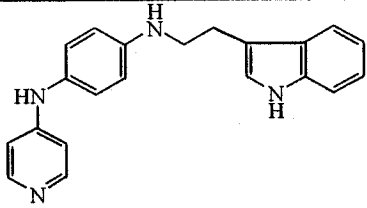
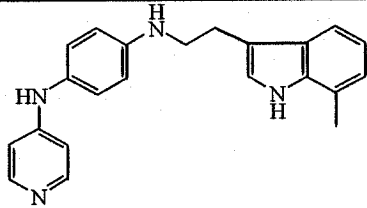
[0576] [1]Microtiter Plate Assays for Inhibition of Human, Drug-Metabolizing Cytochromes P450(用于人药物代谢细胞色素 P450 的微量滴定板分析)Charles L. Crespi, Vaughn P. Miller, Bruce W. Penman(Gentest)Analytical Biochemistry 248, 188-190(1997)Article n° AB972145

[0577] [2]Novel High Throughput fluorescent P450 assays(新型高通量荧光 P450 分析)V. P. Miller, J. Ackermann, D. M. Stresser, C. L. Crespi Gentest Internet site.

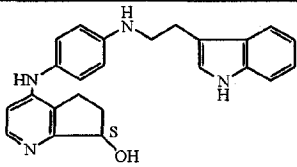
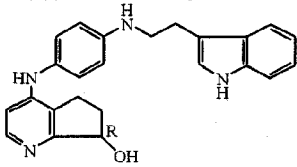
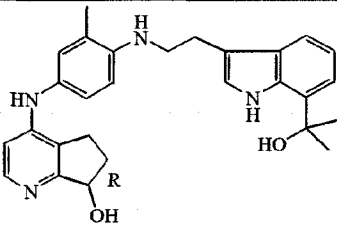
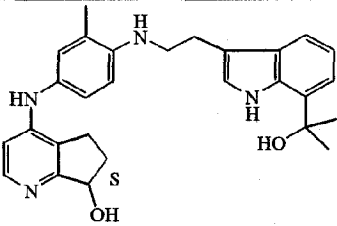
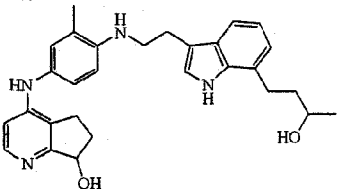
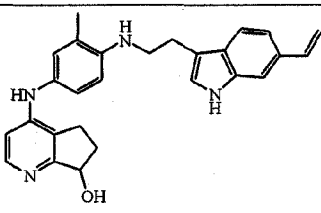
[0578] 表 7 提供与现有技术的化合物比较时的 7 个试验中所试验的本发明化合物(化合物编号 18、20、9、14 及 4)的数据。如上所述,测试了五种 P450 酶,其中之一在三种不同底物上测试(因此总计 7 个试验)。在表 7 中指出在多少 P450 试验中,化合物显示具有  $IC_{50} < 1.00E-06$  的抑制活性。

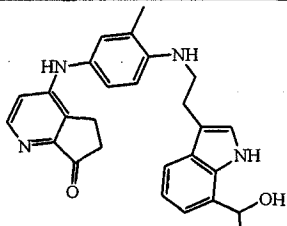
[0579] 表 7 :对 CYP 抑制作用的比较数据

[0580]

化合物	P450 作用 IC <sub>50</sub>
 EP1809622 的化合物 No.47	7 倍 < 1.00E-06
 EP1809622 的化合物 No.36	3 倍 < 1.00E-06
 EP1809622 的化合物 No.197	7 倍 < 1.00E-06

[0581]

化合物	P450 作用 IC <sub>50</sub>
 <p>EP1809622 的化合物 No.195</p>	0 倍 < 1.00E-06
 <p>EP1809622 的化合物 No.229</p>	0 倍 < 1.00E-06
 <p>化合物 No 20</p>	0 倍 < 1.00E-06
 <p>化合物 No 18</p>	0 倍 < 1.00E-06
 <p>化合物 No 9</p>	0 倍 < 1.00E-06
 <p>化合物 No 14</p>	1 倍 < 1.00E-06

化合物	P450 作用 IC <sub>50</sub>
<p>[0582]</p>  <p>化合物 No 4</p>	<p>0 倍 &lt; 1.00E-06</p>

[0583] C. 4. Ro-4-1284 在小鼠中的拮抗作用<sup>3,4,5</sup>

[0584] 本试验为 Colpaert 等 (1975)<sup>3</sup> 所述程序的变体。雄性 NMRI 小鼠 (22±3 克) 饲养于 macrolon 观察笼 (LxWxH:11x12x17cm; n = 3 只 / 笼) 中。在实验开始时, 紧接给予测试化合物之前, 通过插入电子温度计 (Comark) 的热敏探针 (直径 1.0mm) 至食道内 3 公分的固定深度, 直到获得稳定读数, 测量小鼠起始体温, 精确度 0.1°C。用刻度显微镜量测右眼瞳孔直径, 并以 1/24mm 单位表示。给予测试化合物 15 分钟后, 用 Ro-4-1284 (10mg/kg, s. c.) 激发小鼠。Ro-4-1284 是一种蛇根碱样囊泡单胺转运体 (VMAT-2) 抑制剂, 其快速地耗尽分泌小泡<sup>3,4</sup>。Ro-4-1284 在激发 15、30 及 60 分钟后, 评价小鼠的眼睑张开 (0、1、2、3、4、5) 及运动能力 (-1、0、1、2、3)。以 60 分钟间隔, 紧接在外显行为评分之后, 再次测量右眼瞳孔直径及食道温度。记录异常现象, 例如密集嗅闻、咀嚼、直立、充血、竖毛、流涎、颤抖、抽搐及死亡 (当发生在给予 Ro-4-1284 之前时, 亦记录随后的现象)。药物引发作用的判定标准: 反复上睑下垂: 在 15、30 或 60 分钟眼睑张开得分 > 1 (分别为 2.7、0.5 及 0% 伪阳性对照; n > 350); 诱发虚脱: 在 15、30 或 60 分钟的运动得分 -1 (未见于对照); 反复运动减弱: 在 15、30 及 60 分钟的运动得分 > 0 (各为 2.2、0.8 及 0% 伪阳性对照); 反复瞳孔缩小: 60 分钟瞳孔直径 > 5 单位 (0.8% 伪阳性); 体温降低增强: 温度降低 (在 1h 时间间隔内) > 9.0°C (1.4% 伪阳性); 反复体温降低: 温度降低 < 3.0°C (1.8% 伪阳性)。

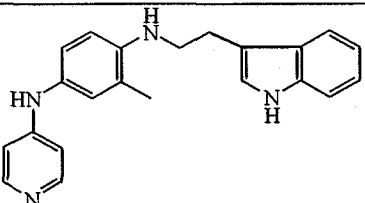
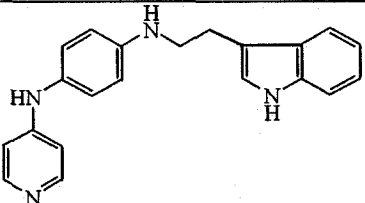
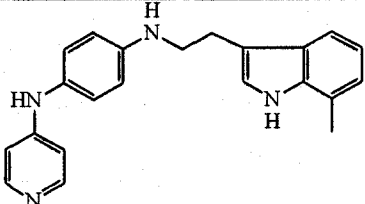
[0585] 根据标准程序, 在经皮下或口服给药后 15 分钟注射 Ro-4-1284, 并开始观察 15 分钟。剂量开始给予至 3 只动物, 当 3 只动物中至少 2 只对于至少一种观察显示活性时, 则化合物被认为是活性的。在其它情况下, 化合物在特定的时间-路径-剂量疗法下被认为是无活性的, 并归类为完成。

[0586] 将编号 20、18、1、27、24、25、31、30、7、29、28、26 及 17 的化合物以 80mg/kg 浓度口服给予后在 3 只动物上各自进行测试, 它们在反复瞳孔缩小、反复上睑下垂、反复体温降低上未显示出活性。化合物 4 仅以 40mg/kg 测试, 并在反复瞳孔缩小、反复上睑下垂、反复体温降低上未显示出活性。

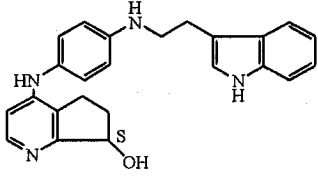
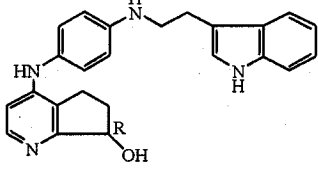
[0587] 也将 EP 1809622 的化合物在相同试验中进行测定, 结果显示于下表 8 中。

[0588] 表 8: 比较数据

[0589]

化合物	药物诱导的 神经学副作用
 <p>EP1809622 的化合物 No.47</p>	是
 <p>EP1809622 的化合物 No.36</p>	是
 <p>EP1809622 的化合物 No.187</p>	是

[0590]

化合物	药物诱导的 神经学副作用
 <p>EP1809622 的化合物 No.195</p>	是
 <p>EP1809622 的化合物 No.229</p>	是

[0591] 参考文献

[0592] [3] Colpaert, F. C., Lenaerts, F. M., Niemegeers, C. J. E., Janssen, P. A. J. : " A critical study on Ro-4-1284 antagonism in mice (小鼠中 Ro-4-1284 拮抗作用的临床研究). " , Arch. Int. Pharmacodyn. 215 40-90 (1975).

[0593] [4]Colzi, A., D'Agostini, R., Cesura, A. M., Borroni, E., Da Prada, M.: "Monoamine oxidase-A inhibitors and dopamine metabolism in rat caudatus: evidence that an increased cytosolic level of dopamine displaces reversible monoamine oxidase-A inhibitors in vivo(大鼠尾中的单胺氧化酶 A 抑制因子和多巴胺代谢:细胞溶质水平增加的多巴胺取代可逆单胺氧化酶 A 抑制因子的体内证据).", J. Pharmacol. Exp. Ther. 265 103-111(1993).

[0594] [5]Filingier, E. J.: "Effect of a reserpine-like agent on the release and metabolism of [3H]NA in cell bodies and terminals(蛇根碱样剂对细胞体和末端中 [3H]NA 的释放和代谢的影响).", Gen. Pharmacol. 25 1039-1043(1994).

[0595] C.5 膜片钳试验 (patch-clamp test)-HEK293 细胞中 HERG 介导的  $K^+$  电流的抑制

[0596] 使用稳定表达 HERG 钾通道的 HEK293 细胞进行实验。在 37°C 及 5%  $CO_2$  的培养瓶中,使细胞生长于补充 10% 热灭活胎牛血清、1% L-谷氨酰胺-青霉素-链霉素-溶液、1% 非必需氨基酸 (100x)、1% 丙酮酸钠 (100mM) 及 0.8% 遗传霉素 (Geneticin) (50mg/ml) 的 MEM 培养基。使用前,将细胞次培养于不含 5ml L-谷氨酰胺-青霉素-链霉素的 MEM 培养基中。为用于自动膜片钳系统 PatchXpress 7000A (Axon Instruments), 采集细胞获得单一细胞的细胞悬浮液。

[0597] 细胞外溶液包含 (mM): 150NaCl、4KCl、1MgCl<sub>2</sub>、1.8CaCl<sub>2</sub>、10HEPES、5 葡萄糖 (以 NaOH 调至 pH 7.4)。吸管溶液包含 (mM): 120KCl、10HEPES、5EGTA、4ATP-Mg<sub>2</sub>、2MgCl<sub>2</sub>、0.5CaCl<sub>2</sub> (以 KOH 调至 pH7.2)。

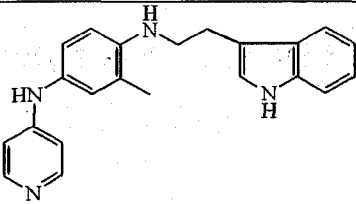
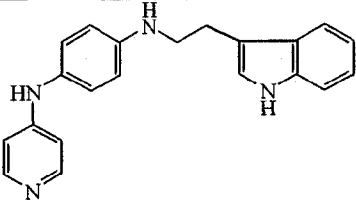
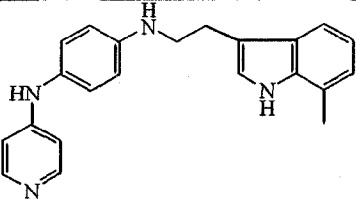
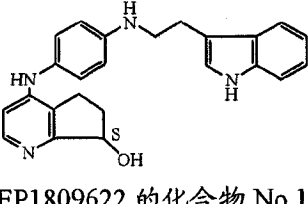
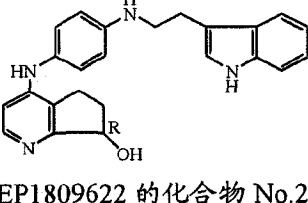
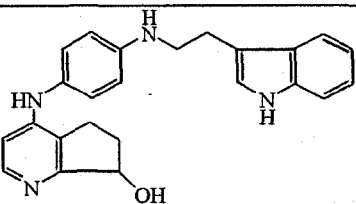
[0598] 膜片钳实验在电压-钳模式下进行,全细胞电流利用 PatchXpress 7000A 系统 (Axon Instruments) 由自动膜片钳测试法记录。电流信号经 Multiclamp 放大器放大及数字化,由 PatchXpress、DataXpress 软件及 Igor 5.0 (Wavemetrics) 储存及分析。

[0599] 控制电位 (holding potential) 为 -80mV。在去极化 2 秒至 +60mV 后,确定为最大尾电流的 HERG 电流 ( $K^+$ -选择性外向电流) 在 -40mV。脉冲循环率为 15 秒。在各试验脉冲前,给与由控制电位至 -60mV 的短暂脉冲 (0.5 秒),以确定 (线性) 漏电流。在建立全细胞模式 (whole-cell configuration) 及稳定期后,施用介质 5 分钟,接着以  $10^{-7}M$ 、 $3 \times 10^{-7}M$  及  $3 \times 10^{-6}M$  渐增浓度施用试验物质。各浓度测试物质施用二次。5 分钟后各浓度的效果作为 3 个连续电压脉冲的平均电流测定。为了确定阻断的程度,将剩余电流与预处理的介质相比较。数据 (表 9) 以相较于对照 (对照为 100%) 的抑制百分数的平均值呈现 (如果可得, ± 平均值的标准误差 (SEM))。

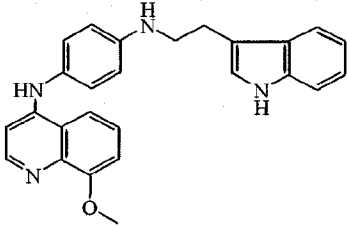
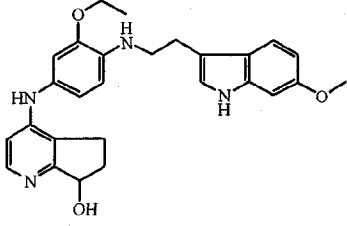
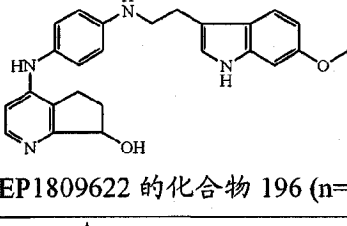
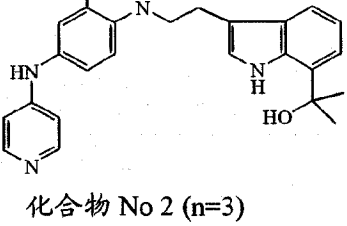
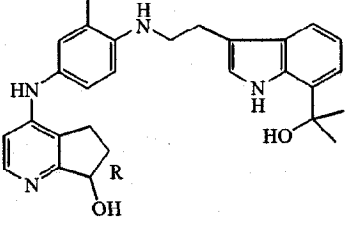
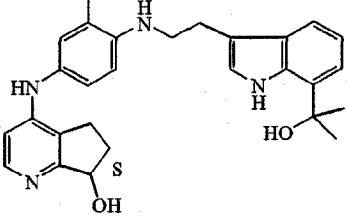
[0600] 表 9:对 HEK293 细胞中 HERG 介导的  $K^+$  电流的抑制

[0601]	化合物	$1.10^{-7} M$	$3.10^{-7} M$	$3.10^{-6} M$
--------	-----	---------------	---------------	---------------

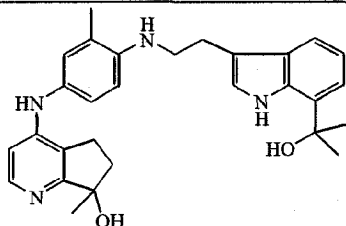
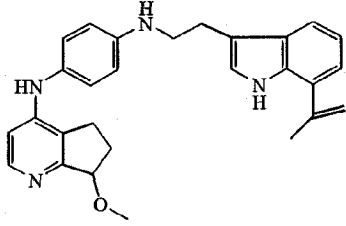
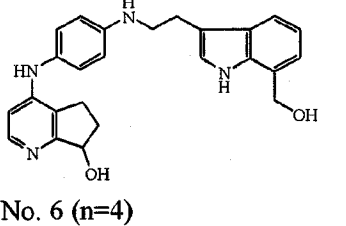
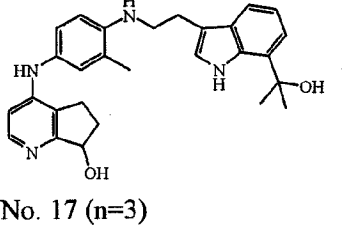
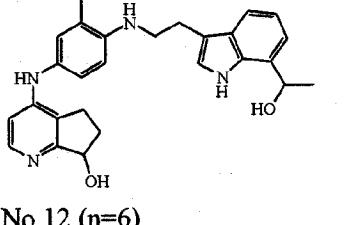
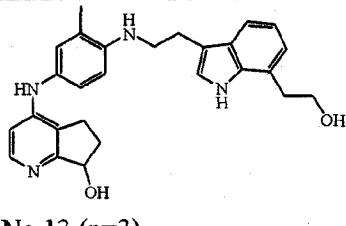
[0602]

化合物	$1.10^{-7}$ M	$3.10^{-7}$ M	$3.10^{-6}$ M
 EP1809622 的化合物 No.47 (n=3)	$76 \pm 1.6$	$58 \pm 2.7$	$13 \pm 3.1$
 EP1809622 的化合物 No.36 (n=3)	$68 \pm 3.5$	$41 \pm 2.9$	$5 \pm 0.33$
 EP1809622 的化合物 No.187 (n=3)	$68 \pm 3.2$	$36 \pm 6.1$	$5 \pm 1$
 EP1809622 的化合物 No.195 (n=3)	$80 \pm 3.7$	$65 \pm 2$	$19 \pm 0.4$
 EP1809622 的化合物 No.229 (n=3)	$81 \pm 4.8$	$63 \pm 5.5$	$18 \pm 1.1$
 EP1809622 的化合物 No.110 (n=4)	$86 \pm 4.6$	$66 \pm 5.2$	$22 \pm 4.6$

[0603]

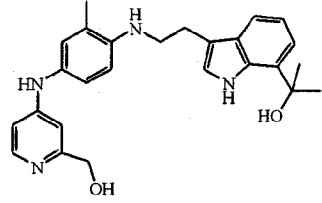
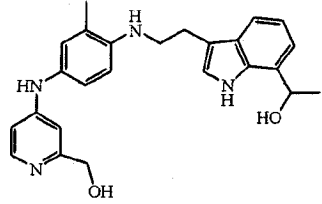
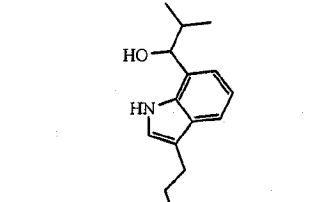
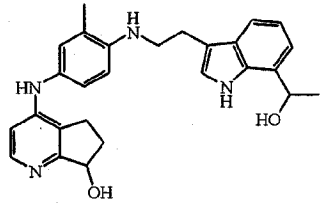
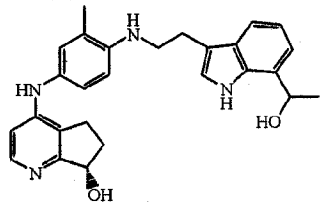
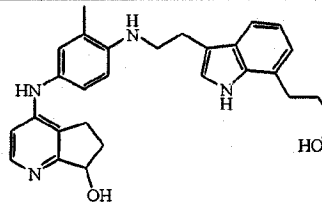
化合物	$1.10^{-7}$ M	$3.10^{-7}$ M	$3.10^{-6}$ M
 <p>EP1809622 的化合物 No.21 (n=3)</p>	$35 \pm 8.6$	$8 \pm 3.6$	$0 \pm 0$
 <p>EP1809622 的化合物 112 (n=3)</p>	$74 \pm 3.2$	$46 \pm 7.3$	$6 \pm 3.1$
 <p>EP1809622 的化合物 196 (n=3)</p>	$87 \pm 0.9$	$76 \pm 1.6$	$38 \pm 3.1$
 <p>化合物 No 2 (n=3)</p>	$89 \pm 3.9$	$75 \pm 0.8$	$18 \pm 4.6$
 <p>化合物 No. 20 (n=3)</p>	$88 \pm 5.1$	$76 \pm 1.8$	$26 \pm 7.1$
 <p>化合物 No. 20 (n=3)</p>	$90 \pm 1.8$	$82 \pm 3.8$	$41 \pm 4.3$

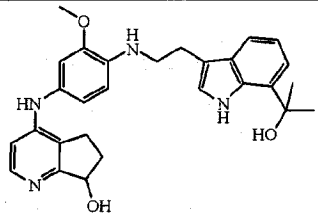
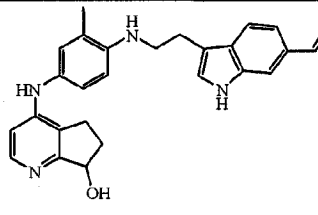
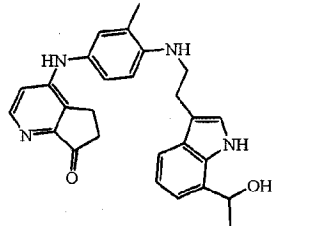
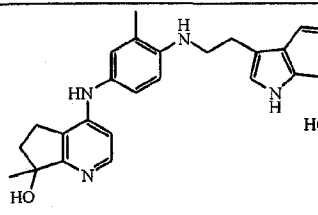
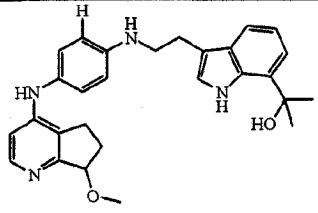
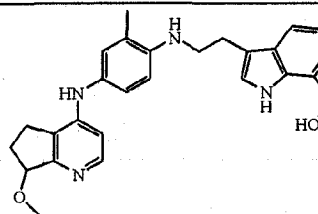


化合物	$1.10^{-7}$ M	$3.10^{-7}$ M	$3.10^{-6}$ M
化合物 No 18 (n=3)			
 化合物 No. 1 (n=4)	$86 \pm 2.5$	$82 \pm 1.1$	$69 \pm 5.1$
 化合物 No. 7 (n=3)	$86 \pm 2.9$	$53 \pm 6.8$	$2 \pm 0.3$
 No. 6 (n=4)	$89 \pm 2.9$	$87 \pm 4.8$	$69 \pm 3.4$
 No. 17 (n=3)	$84 \pm 3.9$	$70 \pm 4.7$	$21 \pm 3.3$
 No. 12 (n=6)	$87 \pm 0.9$	$78 \pm 2.8$	$58 \pm 2.9$
 No. 13 (n=3)	$91 \pm 2.8$	$85 \pm 4.2$	$75 \pm 1.8$

[0604]

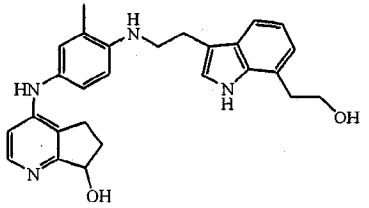
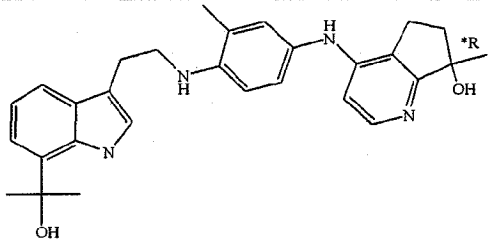
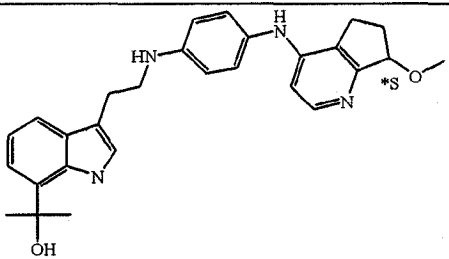
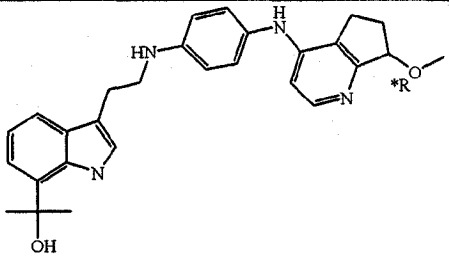
[0605]

化合物	$1.10^{-7}$ M	$3.10^{-7}$ M	$3.10^{-6}$ M
 No.19 (n=3)	$89 \pm 2.4$	$72 \pm 3.2$	$26 \pm 4.7$
 No.5 (n=3)	$88 \pm 1.9$	$74 \pm 6.1$	$33 \pm 10.5$
 No.22 (n=3)	$76 \pm 5.2$	$49 \pm 7.8$	$9 \pm 2.3$
 No.15 (n=3)	$93 \pm 1.2$	$88 \pm 0.8$	$66 \pm 4.4$
 No.21 (n=3)	$91 \pm 0.9$	$86 \pm 1.8$	$65 \pm 1.2$
 No.21 (n=3)	$87 \pm 2.1$	$72 \pm 3.4$	$47 \pm 3.2$

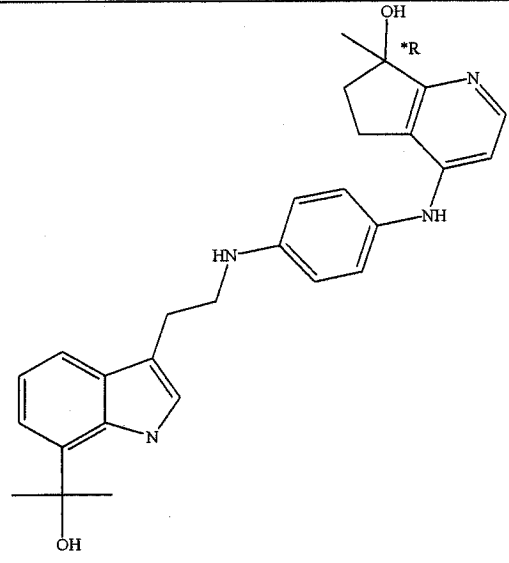
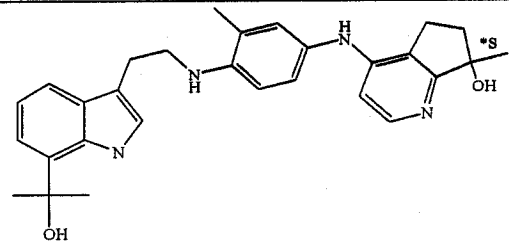
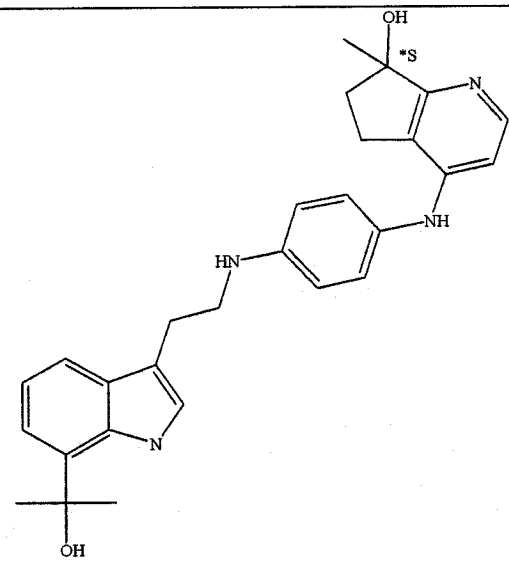
化合物	$1.10^{-7}$ M	$3.10^{-7}$ M	$3.10^{-6}$ M
No.9 (n=3)			
	$90 \pm 8.7$	$80 \pm 7.2$	$43 \pm 3.3$
No.11 (n=3)			
	$84 \pm 2.1$	$57 \pm 5.4$	$10 \pm 3.8$
No.14 (n=4)			
	$89 \pm 4.2$	$85 \pm 1.7$	$66 \pm 3.3$
No.4 (n=3)			
	$82 \pm 2.1$	$72 \pm 2.6$	$62 \pm 1.8$
No.10 (n=3)			
	$93 \pm 7.3$	$83 \pm 6.4$	$25 \pm 5.4$
No.8 (n=3)			
	$89 \pm 6.0$	$74 \pm 7.9$	$34 \pm 4.4$

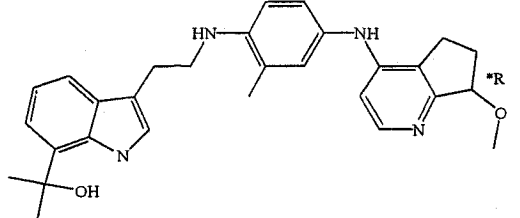
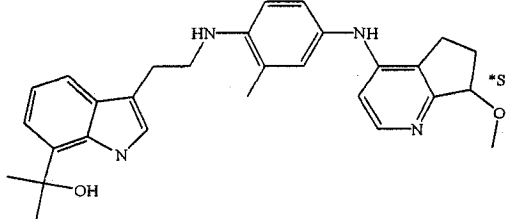
[0606]

[0607]

化合物	$1.10^{-7}$ M	$3.10^{-7}$ M	$3.10^{-6}$ M
No.16 (n=3)			
 No.23 (n=3)	$92 \pm 1.0$	$87 \pm 2.0$	$72 \pm 0.4$
 No.27 (n=3)	$90 \pm 1.8$	$75 \pm 3.3$	$53 \pm 8.1$
 No.24 (n=3)	$88 \pm 3.2$	$77 \pm 4.2$	$29 \pm 2.9$
 No.25 (n=3)	$82 \pm 1.7$	$65 \pm 2.8$	$27 \pm 2.7$

[0608]

化合物	$1.10^{-7}$ M	$3.10^{-7}$ M	$3.10^{-6}$ M
 <p>No.31 (n=3)</p>	$91 \pm 0.9$	$82 \pm 2.3$	$55 \pm 3.8$
 <p>No.26 (n=3)</p>	$87 \pm 1.7$	$78 \pm 1.8$	$51 \pm 5.9$
 <p>No.30 (n=3)</p>	$98 \pm 1.6$	$93 \pm 6.3$	$80 \pm 7.2$

化合物	$1.10^{-7}$ M	$3.10^{-7}$ M	$3.10^{-6}$ M
 <p>No.29 (n=3)</p>	$89 \pm 2.3$	$82 \pm 3.9$	$39 \pm 0.8$
 <p>No.28 (n=4)</p>	$84 \pm 4.4$	$79 \pm 8.8$	$60 \pm 6.4$

[0610] 令人惊讶地,本发明化合物显示出优异的体外活性,其结合了对 P450 酶的低亲和力、无体内药物诱导的神经学作用,以及低的心血管作用。

[0611] C. 6. 体内抗肿瘤作用

[0612] 体内抗肿瘤活性可如下检测:

[0613] NCI 标准参考资料:

[0614] Bissery, M-C., 和 Chabot, G. G. History and new development of screening and evaluation methods of anticancer drugs used in vivo and in vitro (体内和体外使用的抗癌药物的筛选和评估方法的历史与新进展). Bull. Cancer. 1991, 78 :587-602.

[0615] 动物模型:

[0616] 这些研究使用免疫缺陷的(无胸腺的)雄性 NMRI 裸 (Nu/Nu) 小鼠 (20-25 克, 获自 Janvier, France)。初始体重大约 23-34 克。所有动物保持在 SPF “完全隔离”条件下,可自由取用食物及饮水。将小鼠分组饲养于 Techniplast 第 3 型 IVC 笼中,条件:12 小时白天:黑夜循环(给光于 06:00 时)、19-22°C 温度以及湿度 35-40% 下。给小鼠喂养标准实验室食品。所有实验依据欧盟委员会导则 (European Communities Council Directives) (86/609/EEC) 进行,且必须经由地方伦理委员会批准。对已建立的肿瘤异体移植模型(肿瘤体积 ~ 200mm<sup>3</sup>),根据肿瘤体积,将小鼠随机分组,每治疗组 5 只小鼠。

[0617] 试验系统:

[0618] 人 U87 神经胶质瘤肿瘤细胞株源于 44 岁女性高加索人种患者。在 37°C、湿润气氛 (5% CO<sub>2</sub>, 95% 空气) 下,在添加 2mM L-谷氨酰胺、2.0mM 丙酮酸钠、25 单位 / 毫升青霉素 / 25 微克 / 毫升链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养细胞。将细胞维持为单层细胞培养,使用下列程序,以每 T175 瓶  $3 \times 10^6$  个细胞,每周传代二次。简言之,在添加胰蛋白酶-EDTA 至培养瓶之前,将细胞用 PBS (不含 Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>) 洗涤。细胞分离后,通过加入完全培养基将胰蛋白酶-EDTA 灭活。然后将细胞悬浮液转移至 50ml Falcon 试管中,并以 1200rpm

离心 3 分钟。吸出培养基,将细胞再悬浮于适当体积的完全培养基中。于血细胞计数器中计数细胞,并用 0.25% 台盼蓝 (trypan blue) 排除法评估其生存力。然后将适当体积的细胞悬浮液加入到含新鲜培养基的新的 T175 培养瓶或滚瓶中。为了 U87 肿瘤细胞的大规模生长,在接种于小鼠的 1 周前,将适当数量的滚瓶以  $0.5 \times 10^7 - 1 \times 10^7$  个细胞接种。在此期间更换培养基二次,且后一次更换在细胞注射之前的那天进行。除了离心后将细胞再悬浮于冷的 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 无血清培养基中之外,如上所述收集细胞。在小鼠的腹股沟区注射总计 200 微升体积的  $1 \times 10^7$  个细胞。

**[0619] 研究设计:**

**[0620]** 于第 0 天 (D0), 将人 U87 神经胶质瘤细胞直接注射于雄性 NMRI 裸小鼠的腹股沟区 ( $1 \times 10^7$  个细胞 / 200 微升 / 动物) 中。于第 7-10 天 (可随细胞批次之间肿瘤成活 / 生长而变化), 当肿瘤体积已达平均约  $200\text{mm}^3$  时, 根据肿瘤体积, 将小鼠随机分为每治疗组 5 只小鼠。然后, 经管饲法 (p. o.) 给予介质 (10% HP- $\beta$ -CD) 或含测试化合物 (20mg/kg) 的介质, 1 次每天 (QD) 地对小鼠进行治疗, 给予体积为 10ml/kg 体重, 持续 5 日。第六日 (第 5 次剂量 24 小时后), 对特定肿瘤进行测量, 第 10 日再测定一次。监视肿瘤再生长 (停止定量给药后), 使得可记录达到  $2000\text{mm}^3$  体积的时间 (TTR2000)。这就给出了药物作用于肿瘤生长期间的额外信息。通常, 每周 2 次测量肿瘤大小及体重, 并在治疗期间, 每日监视小鼠毒性的临床体征。毒性的临床体征包括 (但不限于) 持续食欲不振或脱水、卧姿 (posture)、垂死、昏睡、体温过低和 / 或呼吸吃力 (根据用于实验性肿瘤形成中动物福利的 UKCCCR (UK Coordinating Committee on Cancer Research (UK 肿瘤研究协调委员会)) 指南 (July 1997); 及 Workman, P. 等. UKCCCR guideline. Br. J. Cancer. 1998, 77 :1-10)。

**[0621] 数据分析:**

**[0622]** 对于每一动物个体, 整个研究期间每周 2 次监测其体重及肿瘤大小 [使用通常认可的方程式: 肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ ) =  $(a \times b^2 / 2)$ ; 其中“a”代表肿瘤长度, 而“b”代表肿瘤宽度, 经测径器测量]。持续体重减少大于起始体重 15% 时被认定为临床毒性, 并将该动物自研究中去除并予处死。肿瘤生长的时间进程以中值表示, 或可标准化为开始治疗之日的起始肿瘤体积, 并表示为平均值  $\pm$  平均值标准误差 (SEM) (每组 5 只动物)。关于预先建立的肿瘤, 可计算各小鼠的相对肿瘤体积 (经治疗肿瘤体积 / 第 0 日的肿瘤体积), 且对于每一治疗组表示为平均值  $\pm$  SEM。由 Wilcoxon-Mann-Whitney (威尔科克森秩和检验; Wilcoxon rank sum test) 分析的单边 p- 值表示统计显著性, 且  $p < 0.05$  被认为是统计学显著的。在第 6 和 10 日 (第 1 日 = 治疗开始, 小鼠被随机分至适当的治疗组起), 使用 NCI 标准, 根据最终相对肿瘤体积计算治疗 / 对照 (T/C) 比率。T/C 比率的有效标准为 42%。

**[0623]** 表 10 : 开始定量给药后第 6 日和第 10 日的 % T/C

**[0624]**

化合物编号	第 6 日 % T/C	第 10 日 % T/C
6	105	99
化合物编号	第 6 日 % T/C	第 10 日 % T/C

12	64	71
19	57	40
2	14	-0.23
5	103	67
22	40	55
15	53	88
18	9	-3
21	102	95
9	145	113
11	72	79
4	77	129
10	96	71
16	63	64
23	72	95
1	17	8
27	193	22
24	60	1
31	179	1
26	354	-11
30	-61	-10
29	-196	-13
28	-280	-10
25	330	-3

[0625]

[0626] D. 组合物实施例：膜衣片剂



**[0627] 片芯的制备**

**[0628]** 将 100g 式 (I) 化合物、570g 乳糖和 200g 淀粉的混合物混合均匀,然后用 5g 十二烷基硫酸钠和 10g 聚乙烯-吡咯烷酮在约 200ml 水中的溶液润湿。将该湿粉末混合物过筛,干燥,并再次过筛。然后,加入 100g 微晶纤维素和 15g 氢化植物油。全部混合均匀并压制成片剂,得到 10000 片,每片含 10mg 式 (I) 化合物。

**[0629] 包衣**

**[0630]** 向 10g 甲基纤维素的 75ml 变性乙醇溶液中加入 5g 乙基纤维素的 150ml 二氯甲烷溶液。然后加入 75ml 二氯甲烷和 2.5ml 1,2,3-丙三醇,将 10g 聚乙二醇熔化,然后溶解于 75ml 二氯甲烷中。将前一溶液加入到前一溶液中,然后加入 2.5g 硬脂酸镁、5g 聚乙烯-吡咯烷酮和 30ml 浓缩颜料悬浮液,将全部混合物匀浆。在包衣设备中,将片芯用如此得到的混合液包衣。