

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C07K 5/065

C07K 5/075 A61K 38/06



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96197386.2

[43]公开日 1998年11月11日

[11] 公开号 CN 1198748A

[22]申请日 96.9.6

[30]优先权

[32]95.10.2 [33]US[31]60/004,755

[32]95.12.4 [33]US[31]08/566,615

[32]96.8.26 [33]US[31]08/698,931

[86]国际申请 PCT/US96/14363 96.9.6

[87]国际公布 WO97/12904 英 97.4.10

[85]进入国家阶段日期 98.4.2

[71]申请人 赫彻斯特马里恩鲁斯公司

地址 美国俄亥俄州

[72]发明人 J·A·马利凯尔 J·P·伯克哈特

R·J·布罗斯玛

N·P·皮特

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标

事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 50 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 多氟烷基色氨酸三肽凝血酶抑制剂

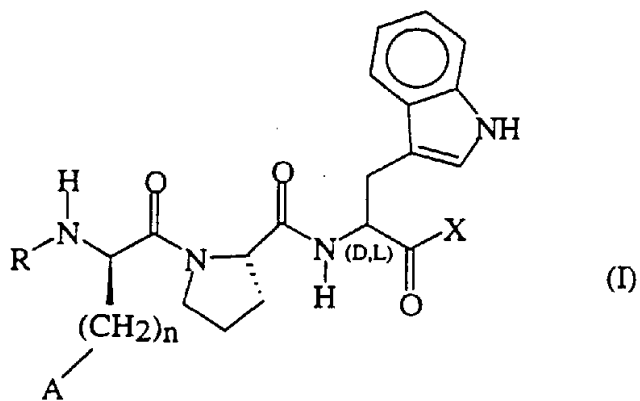
[57]摘要

本发明涉及多氟烷基色氨酸三肽以及含有它们的组合物。该化合物是具有抗凝作用的高选择性凝血酶抑制剂，可用于治疗凝血酶类的疾病，以及防止血液和血液产品储存时凝固。

权利要求书

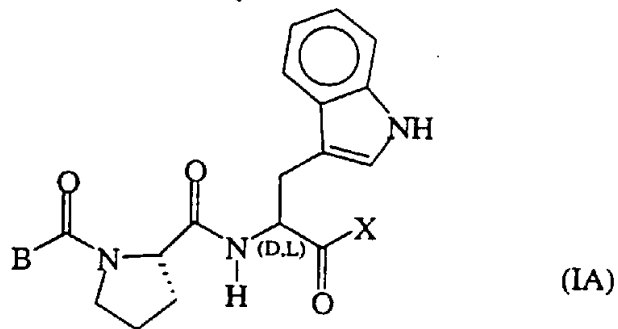
1. 式 (I) 或 (IA) 化合物或其立体异构体或混合物, 或其水合物或可药用盐,

5



10

或



15

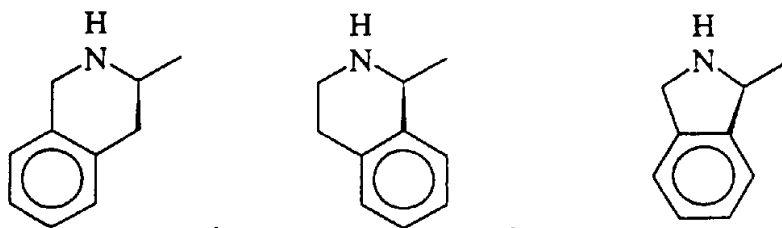
(IA)

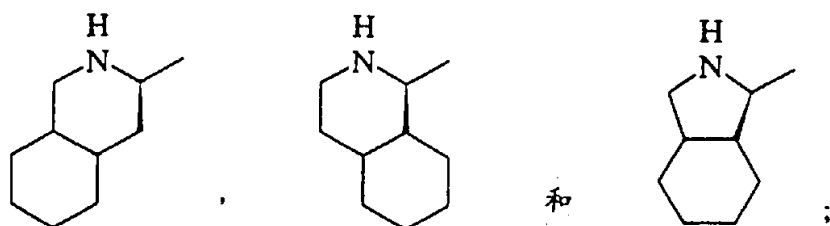
20 其中

A 是苯基或环己基;

B 是下列基团:

25





5 X 是 $-\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CH}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{COOR}_1$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CONHR}_1$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CH}_2\text{OR}_1$ 或 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_v\text{CH}=\text{CH}_2$;

R 是 H 或 $-\text{CH}_3$;

R_1 是 H 或 $\text{C}_1 - 6$ 烷基;

n 是 0 或 1;

10 t 是整数 2, 3 或 4;

v 是整数 1, 2 或 3.

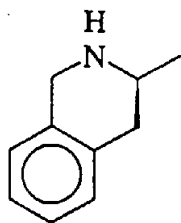
2. 权利要求 1 的化合物, 其中 X 选自 $-\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_3$ 和 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_4\text{CONHCH}_3$.

15 3. 具有式 I 结构的权利要求 2 化合物, 其中 A 是苯基, n 是 1 及 R 是 $-\text{CH}_3$.

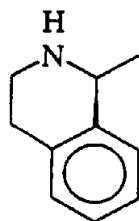
4. 具有式 I 结构的权利要求 2 化合物, 其中 A 是环己基及 n 是 1.

5. 具有式 IA 结构的权利要求 1 化合物, 其中 X 选自 $-\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_3$ 和 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_4\text{CONHCH}_3$.

6. 具有式 IA 结构的权利要求 5 化合物, 其中 B 是



7. 具有式 IA 结构的权利要求 5 化合物, 其中 B 是



8. 权利要求 3 的化合物, 其中 X 是 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ 。
9. 权利要求 4 的化合物, 其中 X 是 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ 。
- 5 10. 权利要求 5 的化合物, 其中 X 是 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ 。
11. 权利要求 3 的化合物, 其中 X 是 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 。
12. 权利要求 4 的化合物, 其中 X 是 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 。
13. 权利要求 5 的化合物, 其中 X 是 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 。
14. 权利要求 1 的化合物, 其中化合物是 L - 脯氨酸, N - 甲基 -
10 D - 苯丙氨酸基 - N - [3,3,4,4,4 - 五氟 - 1 - (1H - 咪唑 - 3 - 基甲基) -
- 2 - 氧丁基] - , 单 (三氟乙酸盐)。
15. 含有权利要求 1 的化合物和载体的组合物。
16. 含有权利要求 1 的化合物和可药用载体的药物组合物。
17. 一种对需要抑制凝血酶的患者抑制凝血酶的方法, 所说方法包括给
15 所说患者使用治疗有效量的权利要求 1 的化合物。
18. 一种治疗患有凝血酶类病症患者的方法, 所说方法包括给所说患者
使用治疗有效量的权利要求 1 的化合物。
19. 根据权利要求 12 的方法, 其中所说凝血酶类病症是深度静脉血栓
形成。
- 20 20. 根据权利要求 12 的方法, 其中所说凝血酶类病症是血管形成术之
后的冠状血栓形成。
21. 一种抑制血液中凝血酶的方法, 包括在血液中添加权利要求 7 的组
合物。
22. 一种抑制血液中血栓形成的方法, 包括在血液中添加权利要求 7
25 的组合物。

说明书

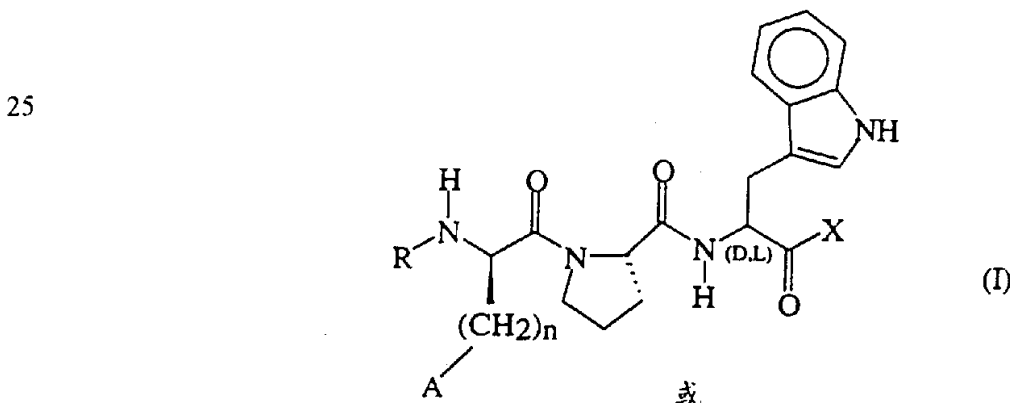
多氟烷基色氨酸三肽凝血酶抑制剂

5 在药物治疗中，例如，急性深度静脉血栓形成，肺栓塞形成，末端急性动脉栓塞形成，心肌梗塞形成，中风，心瓣再狭窄和播散型血管内凝固，抗凝剂是有用的治疗剂。进行抗凝剂的预防性给药被认为可以预防患有风湿性或动脉硬化心脏病的患者栓塞复发，并预防外科手术产生的某些血栓栓塞并发症。给予抗凝剂还被用于治疗冠状动脉和脑血管疾病。动脉血栓
10 形成，特别是在给心肌和脑供血的动脉中的血栓是导致死亡的原因。

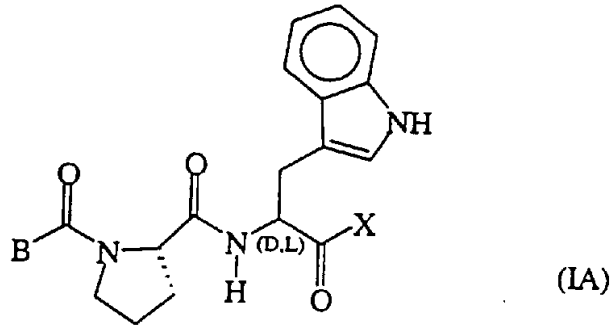
目前用于治疗 and 预防血栓形成疾病的方法包括抑制凝血酶活性或抑制凝血酶形成，进而防止凝血块的形成。在现有技术中已知(D)-Phe-Pro-Arg三肽是凝血酶催化部位的抑制剂。美国专利 5,391,705 描述了既抑制凝血酶又抑制胰蛋白酶的多氟化三肽。此外，PCT 专利申请公开 WO 94/25051
15 描述了凝血酶抑制剂，其中的精氨酸被氨基环己基部分替代。但是，现有技术没有明确说明当色氨酸在酶识别部位的 P₁ 位置被精氨酸取代时，这些三肽将保留抗凝血酶活性。

申请人已经发现，当色氨酸在已知的五氟乙基取代的三肽的 P₁ 位置被精氨酸或精氨酸衍生物取代时，不仅观察到抗凝血酶活性，而且得到对其
20 它蛋白酶如胰蛋白高选择性地抑制凝血酶的抑制剂。这类新化合物可作为有用的替代品或作为已知凝血酶抑制剂的辅助治疗药物而用于血液储存期间防止血液凝固和防止其它生物样品在试验和储存时凝固。

本发明涉及下式新化合物，



5



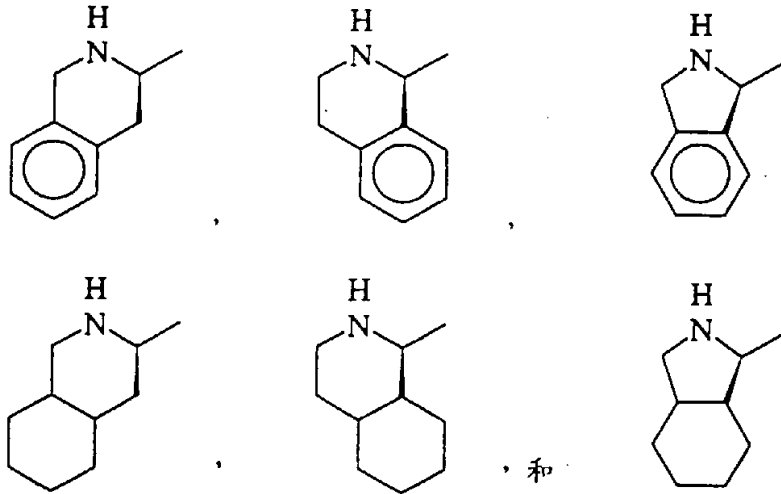
10

其中

A 是苯基或环己基;

B 是下列基团:

15



20

X 是 $-\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CH}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{COOR}_1$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CONHR}_1$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CH}_2\text{OR}_1$ 或 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_v\text{CH}=\text{CH}_2$;

R 是 H 或 $-\text{CH}_3$;

25 R_1 是 H 或 $\text{C}_1 - 6$ 烷基;

n 是 0 或 1;

t 是整数 2, 3 或 4;

v 是整数 1, 2 或 3;

或其立体异构体或混合物, 或其水合物或可药用盐; 以及作为凝血酶抑制剂在治疗或预防冠状动脉和脑血管疾病, 深度静脉血栓形成, 肺栓塞形成,

30

中风（起因于血栓或栓塞形成），心肌梗塞形成，不稳定或难以治愈的心绞痛，血管形成术之后的冠状血栓形成，心瓣再狭窄，以及防止储存的血液凝固等方面的用途。

5 用于本申请书的

a) 符号 “ — ” 指伸向纸面外面的键；

b) 符号 “ ” 指伸向纸面背面的键；

c) 符号 “ ~~~~~ ” 或符号 “(D,L)” 指立体化学结构没有确定的键。

10 术语 “ C_{1-6} 烷基” 指由 1 - 6 个碳原子构成的直链，支链或环状饱和烃基，包括甲基，乙基，正丙基，异丙基，正丁基，异丁基，仲丁基，叔丁基，正戊基，正己基，环己基等。

术语 “立体异构体” 一般指仅原子的空间方位有所不同的所有异构体，包括镜像异构体（对映体），几何（顺/反）异构体，以及多于一个手性中心且彼此不成镜像的化合物的异构体（非对映体）。

15 术语 “水合物” 指可以二羟基亚甲基形式存在的本发明化合物的酮。

术语 “可药用盐” 表示可以使用的式 (I) 或 (IA) 化合物的任何无毒的有机或无机盐。可以形成适当盐的无机酸例子包括盐酸，氢溴酸，硫酸和磷酸，酸金属盐，如正磷酸一氢钠和硫酸氢钾。可以形成适当盐的有机酸例子包括一，二或三羧酸。这些酸的实例包括，例如，乙酸，三氟乙酸，乙醇酸，乳酸，丙酮酸，丙二酸，琥珀酸，戊二酸，富马酸，苹果酸，酒石酸，柠檬酸，抗坏血酸，马来酸，羟基马来酸，苯甲酸，羟基苯甲酸，苯基乙酸，肉桂酸，水杨酸，2 - 苯氧基苯甲酸和磺酸如甲磺酸和 2 - 羟基乙磺酸。这些盐既可以水合物形式也可以基本无水的形式存在。

25 在整个说明书中使用了下列氨基酸，氨基和羧基末端基团的缩写，如表 1 所示。

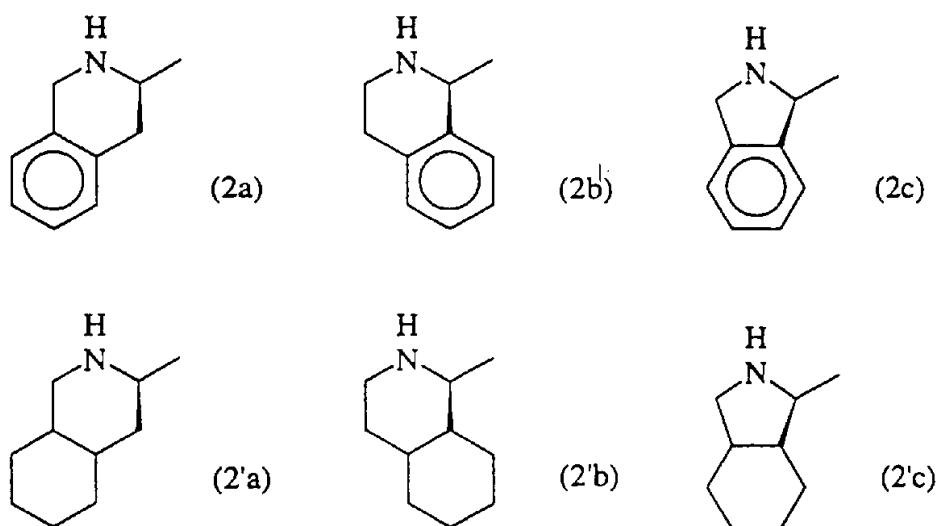
表 1

Gly (或 G)	-	甘氨酸
Ala (或 A)	-	丙氨酸
30 Val (或 V)	-	缬氨酸

	Leu (或 L)	-	亮氨酸
	Ile (或 I)	-	异亮氨酸
	Pro (或 P)	-	脯氨酸
	Phe (或 F)	-	苯丙氨酸
5	Trp (或 W)	-	色氨酸
	Ser (或 S)	-	丝氨酸
	Met (或 M)	-	甲硫氨酸
	Thr (或 T)	-	苏氨酸
	Cys (或 C)	-	半胱氨酸
10	Tyr (或 Y)	-	酪氨酸
	Gln (或 Q)	-	谷氨酰胺
	Asn (或 N)	-	天冬酰胺
	Asp (或 D)	-	天冬氨酸
	Glu (或 E)	-	谷氨酸
15	Lys (或 K)	-	赖氨酸
	Arg (或 R)	-	精氨酸
	His (或 H)	-	组氨酸
	Cha	-	环己基丙氨酸
	Phg	-	苯基甘氨酸
20	Chg	-	环己基甘氨酸
	Tic	-	四氢异喹啉羧酸
	Pip	-	2-哌啶酸
	Orn	-	鸟氨酸
	Boc	-	叔丁氧羰基
25	Bzl	-	苄基
	Cbz	-	苄氧羰基
	Ac	-	乙酰基
	Suc	-	琥珀酰基
	PAM	-	苄基乙酰氨基甲基

除了甘氨酸，天然氨基酸都有手性碳原子。除非另有特别说明，优选化合物 L 构型的光学活性氨基酸，除非另有说明，优选 P₃ 部分，如式 I 中的 Phe, Cha, Phg 或 Chg 部分，是 D 构型的化合物。

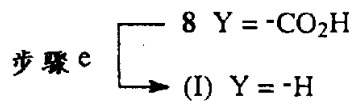
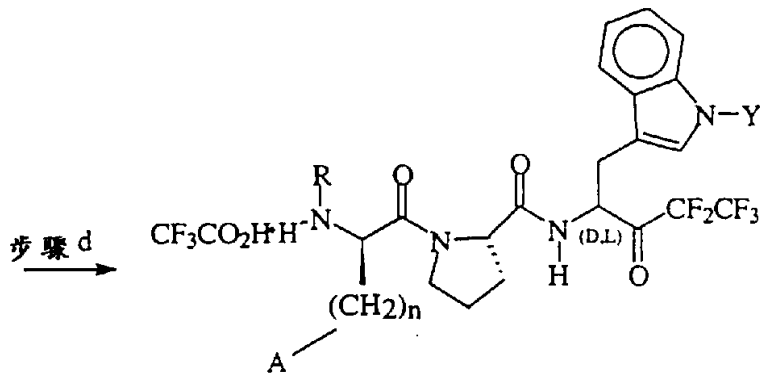
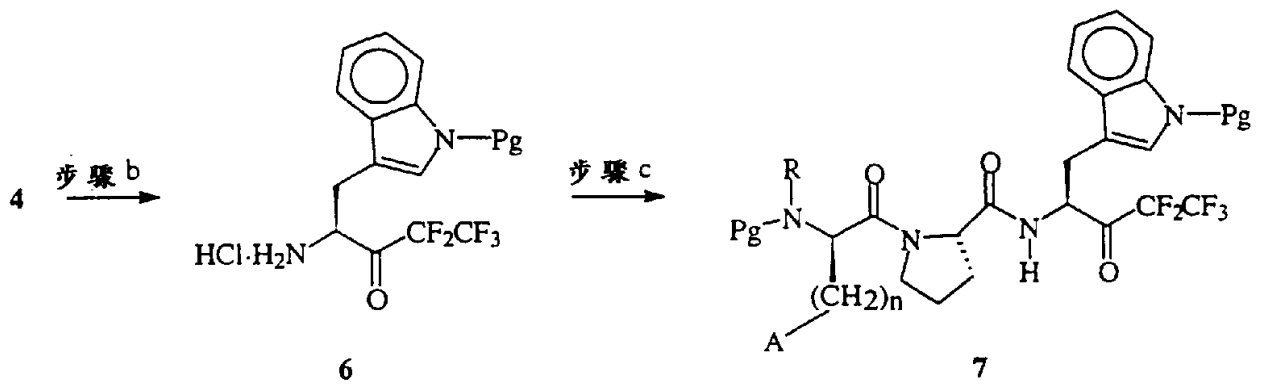
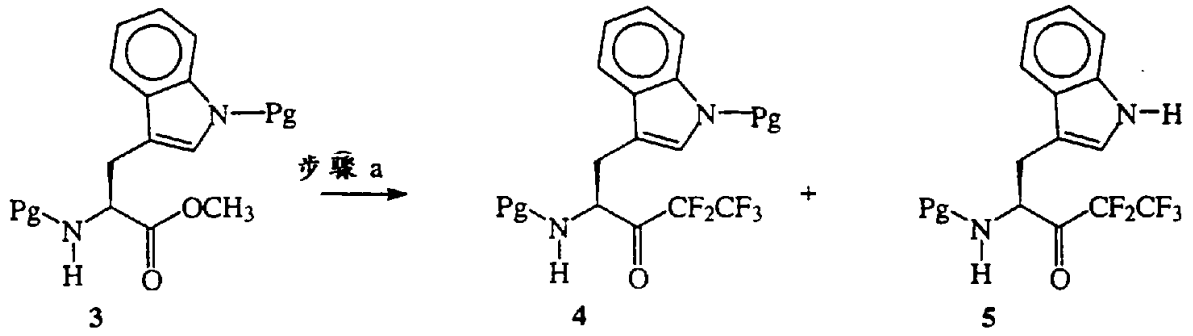
关于式 I 和 IA 化合物，P₁ - α - 氨基酸残基（色氨酸）可以是 D - 或 L - 构型，或它们的混合物，P₂ - α - 氨基酸残基（脯氨酸）优选为 L - 构型。类似地，P₃ 部分的 α - 氨基酸残基（即苯基丙氨酸，环己基丙氨酸等）优选为 D - 构型，优选的残基是 Phe 或 Cha，最优选的取代基是 Phe。在式 IA 化合物中，P₃ 部分（取代基“B”）是被称作“TIC”或“类 TIC”衍生物（表达“TIC”是从四氢异喹啉羧酸衍生的）。在这种情况下，P₃ 氮原子和 P₃ - α - 碳原子形成的双环 TIC 部分有下列结构：



其中(2a)和(2b)代表 1,2,3,4 - 四氢异喹啉部分，(2'a)和(2'b) 代表 1,2,3,4 - 十氢异喹啉部分，(2c)和(2'c) 分别代表 2,3 - 二氢 - 1H - 异吲哚基和八氢 - 1H - 异吲哚基部分。为方便起见，这里所说部分也可以指“类 TIC 修饰”。

总之，式 (I) 和 (IA) 化合物可以用现有技术中已知的类似标准化学反应制备。例如，其中 X 是 -CF₂CF₃ 的式 (I) 化合物可以按路线 A 所述制备，路线 A 中所用起始原料，试剂，技术和方法都是众所周知的，并且对于本领域任何普通技术人员是可以理解的。

路线 A



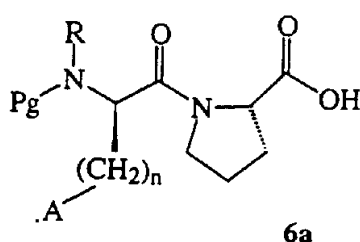
路线 A 提供了制备其中 X 是 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 的式 (I) 化合物的一般合成方法, 其中 A 和 n 定义如上, Pg 是指适宜的 N - 保护基, 包括叔丁氧羰基 (Boc), 苄氧羰基 (Cbz), 叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS), 叔丁基二苯基甲硅烷基 (TBDPS) 等等, 其中优选叔丁氧羰基 (Boc)。

5 在路线 A 步骤 a 中, 保护的氨基酸酯 3 被转化成保护的五氟乙基酮 4 并形成副产物 5。例如, 通过保护的氨基酸酯 3 与 3 - 6 摩尔当量五氟乙基锂 (可用类似 P.G. Gassman 和 N.J. O'Reilly, 《有机化学杂志》(J. Org. Chem.), 52, 2481 - 2490 (1987) 公开的方法由五氟乙基碘和甲基锂·溴化锂复合物当场制备) 反应。该反应通常在适当的无水溶剂如乙醚, 或混合无水溶剂混合物如乙醚 - 甲苯 (9: 1) 中进行。反应在 $-30 - -80\text{ }^\circ\text{C}$ 温度, 10 优选 $-50 - -65\text{ }^\circ\text{C}$ 进行。可用本领域熟知的萃取和蒸发方法从反应物中分离出保护的五氟乙基酮 4。可用本领域熟知的技术纯化产物, 如色谱法和重结晶法。

或者, 用 M.R. Angelastro, J.P. Burkhart, P. Bey, N.P. Peet, 15 《四面体通讯》(Tetrahedron Letters), 33, 3265 - 3268 (1992) 所述典型方法将保护的异羟肟盐类物质 3 转化成保护的五氟乙基酮 4。

在路线 A 步骤 b 中, 在本领域已知的, 如 T.H. Green 的《有机合成中的保护基》(Protection Groups in Organic Synthesis), John Wiley and Sons, 第 7 章 (1981) 中所述的条件下, 将保护的五氟乙基酮 4 的 α - 胺部 20 分脱保护, 并保留 4 的氨基酸侧链功能团的保护, 得到 α - 胺脱保护的五氟乙基酮 6。例如, 可以将双 - Boc - 保护的五氟乙基酮 4 与适当的酸如盐酸在适当醚溶剂如二噁烷等存在下反应, 得到 α - 胺脱保护的五氟乙基酮 6。然后用本领域已知技术将产物 6 分离和纯化。

在路线 A 步骤 c 中, 采用标准肽偶合技术将 α - 胺脱保护的五氟乙基 25 酮 6 与下式化合物偶合,



其中所有取代基定义如上。例如，在普通肽合成中，通过 N - 端残基的 α - 胺脱保护和用所述方法通过肽链偶合下一个适当 N - 保护的氨基酸使肽被加长。重复脱保护和偶合过程直到得到所需的系列。该偶合过程可以用组分氨基酸分步或片断缩合的形式进行，也可以结合两种方法进行，或者
5 用最初由 Merrifield, 《美国化学会志》(J. Am. Chem. Soc.), 1963, 85, 2149 - 2154 所述的方法进行固相肽合成法进行, 该文献在此全部引作参考。如果采用固相合成法, C - 端羧酸被连接到不溶性载体 (通常是聚苯乙烯) 上。这些不溶性载体形成一个可以起稳定加长作用但以后又很容易裂解的键。这种载体的实例有氯 - 或溴甲基树脂, 羟甲基树脂和氨基甲基
10 树脂。这些树脂中很多是商品, 并且带有所要的 C - 端氨基酸。

除了上述方法之外, 在下列文献中也有关于肽合成的描述, 这些文献在此一并引作参考: Stewart 和 Young, 《固相肽合成》(Solid Phase Peptide Synthesis), 第二版, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984); Gross, Meienhofer, Udenfriend, Eds., 《肽: 分析, 合成, 生物学》(The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology), 第 1, 2, 3, 5 和 9 卷, Academic Press,
15 New York, 1980 - 1987; Bodanszky, 《肽化学: 实践课本》(Peptide Chemistry: A Practical Textbook), Springer-Verlag, New York (1988); 及 Bodanszky 等人, 《肽合成应用》(Practice of Peptide Synthesis), Springer-Verlag, New York (1984)。

20 两个氨基酸, 氨基酸和肽或两个肽片断之间的偶合可用标准偶合方法进行如叠氮化方法, 混合的碳 - 羧酸酐 (氯甲酸异丁酯) 方法, 碳化二亚胺 (二环己基碳化二亚胺, 二异丙基碳化二亚胺或水溶性碳化二亚胺) 方法, 活性酯 (对 - 硝基苯基酯, N - 羟基 - 琥珀亚氨酸酯) 方法, Woodward 试剂 K 方法, 羧基二咪唑方法, 磷试剂如 BOP-Cl 或氧化还原
25 方法进行。这些方法中有些方法 (尤其是碳化二亚胺方法) 可以通过加入 1 - 羟基苯并三唑被改进。这些偶合反应可以用溶液 (液相) 或固相技术实现。

在偶合反应期间组成氨基酸的功能团通常必须加以保护以避免形成不需要的键。可用的保护基列于下列文献: Green, 《有机化学中的保护基》
30 (Protective Groups in Organic Chemistry), John Wiley & Sons, New York

(1981)和,《肽: 分析, 合成, 生物学》(The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology), 第3卷, Academic Press, New York, 1981, 所说文献在此一并引作参考。

5 C - 端残基的 α - 羧基通常用酯保护, 将该酯裂解可以得到羧酸。可用的保护基包括:

- 1) 烷基酯如甲基和叔丁基酯;
- 2) 芳基酯如苄基和取代的苄基酯; 或
- 3) 可以通过中等强度的碱处理或中度还原方法裂解的酯如三氯乙基和苯甲酰甲基酯。

10 每个要偶合成更长肽链的 α - 氨基必须被保护。任何本领域已知的保护基都可以使用。这些保护基的实例包括:

- 1) 酰基类, 如甲酰基, 三氯乙酰基, 邻苯二甲酰基和对 - 甲苯磺酰基;
- 2) 芳族氨基甲酸酯类, 如苄氧羰基 (Cbz 或 Z) 和取代的苄氧羰基, 1 - (对 - 二苯基) - 1 - 甲基乙氧基 - 羰基和 9 - 芴基甲氧羰基 (Fmoc);
- 15 3) 脂族氨基甲酸酯类, 如叔丁氧羰基 (Boc), 乙氧羰基, 二异丙基 - 甲氧羰基和烯丙氧羰基;
- 4) 环烷基氨基甲酸酯类, 如环戊氧羰基和金刚烷氧基羰基;
- 5) 烷基类, 如三苯基甲基和苄基;
- 6) 三烷基甲硅烷, 如三甲基甲硅烷; 及
- 20 7) 含硫醇类, 苯基硫代羰基和二噻 (dithia) 琥珀酰基。

优选的 α - 氨基保护基是 Boc, Cbz 或 Fmoc, 更优选 Boc。在肽合成中许多适合于保护的氨基酸衍生物都是商品。

新加的氨基酸残基的 α - 氨基保护基在下一个氨基酸偶合之前被裂解, 这些保护基被裂解的条件如 Green,《有机化学中的保护基》(Protective
25 Groups in Organic Chemistry), 第7章, John Wiley & Sons, New York (1981)所述。如果使用 Boc, 所选方法是纯三氯乙酸, 或在二氯甲烷中, 或选择 HCl 在二噁烷或乙酸乙酯中。然后, 将所得铵盐在偶合之前或当场用碱溶液如缓冲水溶液, 或叔胺的二氯甲烷或叔胺的二甲基甲酰胺中和。如果使用 Fmoc, 所选的试剂是哌啶或取代的哌啶的二甲基甲酰胺, 但任何
30 仲胺或碱性水溶液也可以使用。脱保护反应在 0℃ 至室温进行。

在用任何上述基团制备肽期间任何带侧链功能团的氨基酸都必须进行保护。本领域的技术人员都能理解适于这些侧链功能团的保护基的选择和使用取决于氨基酸和肽中是否存在其它保护基。这种保护基的选择的重要性在于它们必须在脱保护时和 α -氨基偶合时不被除去。

5 例如，当用 Boc 作为 α -氨基保护基时，可用苄基(Bn)醚保护含有羟基的氨基酸侧链如 Tyr, Ser 或 Thr。

如果采用固相合成，肽从树脂上裂解通常与除去保护基同时发生。如果合成中采用 Boc 保护方案，从树脂裂解肽的优选方法是在 0 °C 用含有添加剂如二甲硫醚，茴香醚，茴香硫醚或对-甲苯酚的无水 HF 处理。肽的
10 裂解也可以用其它酸试剂如三氟甲磺酸/三氟乙酸混合物实现。如果使用 Fmoc 保护方案，N-端 Fmoc 基团可用前面所述试剂裂解。从树脂裂解其它保护基和肽可用三氟乙酸溶液和多种添加剂如茴香醚等。

更具体地，在路线 A 步骤 c 中，将结构 6a 的适当保护的二肽在惰性气体如氮气下溶解于适当有机溶剂。乙酸乙酯是这种偶合反应的优选溶剂。
15 然后，用 1 - 4 当量的适当的胺处理该溶液。适当的胺的实例是有机叔胺如三-(低级烷基)胺，例如，三乙胺；或芳族胺如甲基吡啶，可力丁和吡啶。如果使用吡啶，甲基吡啶或可力丁，可大大过量使用它们，并将它们用作反应溶剂。特别适合偶合反应的是 N-甲基吗啉(NMM)。然后，将溶液冷却至约-20 °C 并加入一当量氯甲酸异丁酯。将反应物搅拌约 10 - 30
20 分钟并加入 1 - 1.1 当量 α -胺脱保护五氟乙基丙酮 6。在约-20 °C 搅拌 30 分钟至 2 小时，然后升至室温，再搅拌 1 - 3 小时。然后用本领域已知技术如萃取和快速色谱技术分离并纯化结构 7 偶合产物。例如，用适当有机溶剂如二氯甲烷稀释反应，用水漂洗，无水硫酸镁干燥，过滤并真空浓缩。剩余物在硅胶上经快速色谱纯化，用适当洗脱剂如乙酸乙酯/己烷洗脱，得
25 到结构 7 偶合产物。

在路线 A 步骤 d 中，偶合产物 7 上的 α -胺保护基(Pg)和 P₁ 氨基酸侧链功能团上的保护基(Pg)在本领域已知条件下(如 T.W. Green, 《有机化学中的保护基》(Protective Groups in Organic Chemistry), 第 7 章, 1981, John Wiley & Sons, Inc. 所述)被除去，得到脱保护的肽 8。例如，
30 如果偶合产物 7 上的两个 Pg 都是氨基甲酸叔丁酯(BOC)，可将化合物

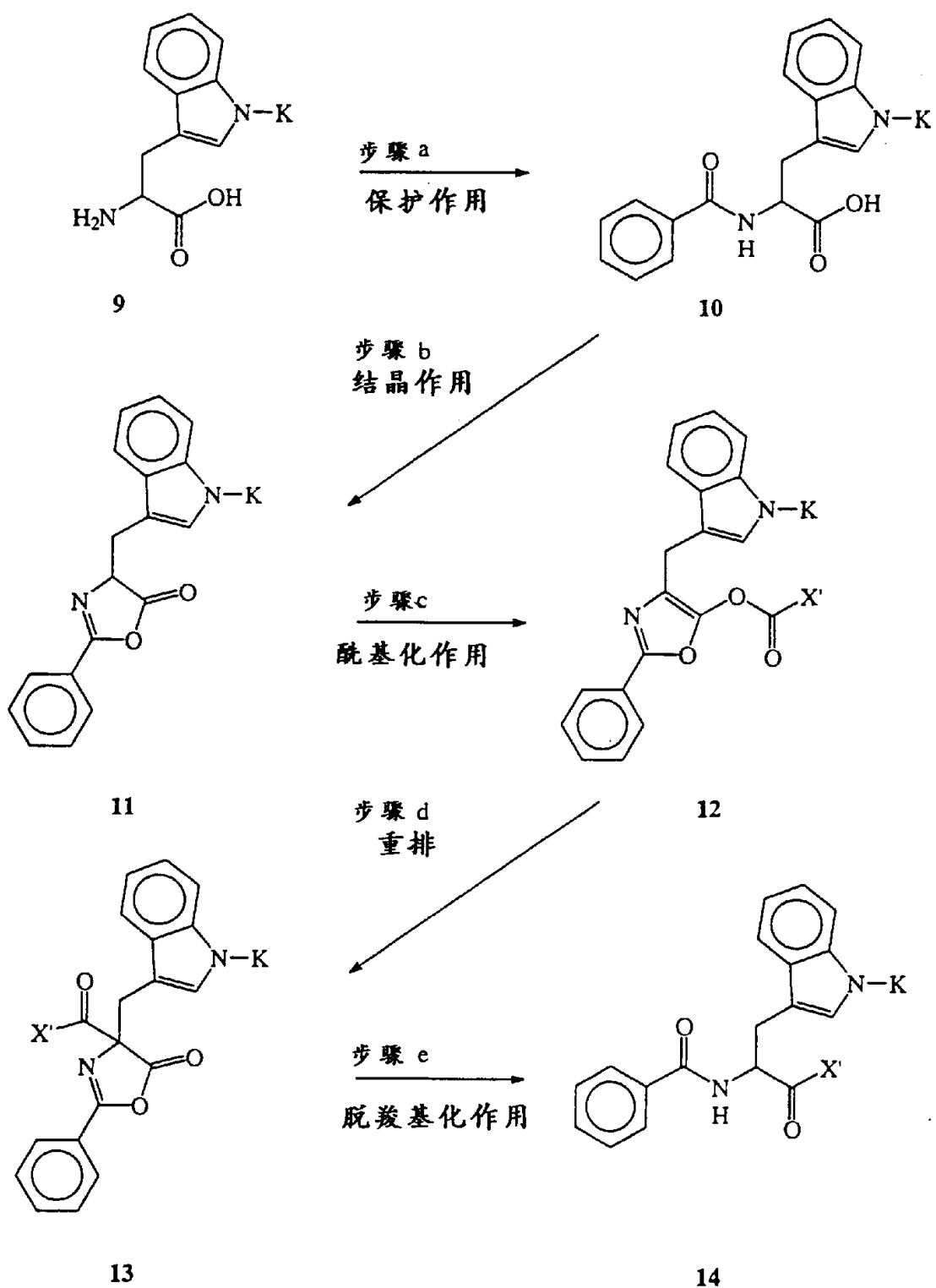
溶解于三氟乙酸，搅拌几分钟后真空浓缩。将剩余物溶解于 Et₂O 并用己烷沉淀，得到脱保护的三肽 8。

色氨酸化合物的脱保护方法是本领域已知的，如 Franzen 等人，《化学会志》(J. Chem. Soc.), 1699 - 1700 (1984)所述。

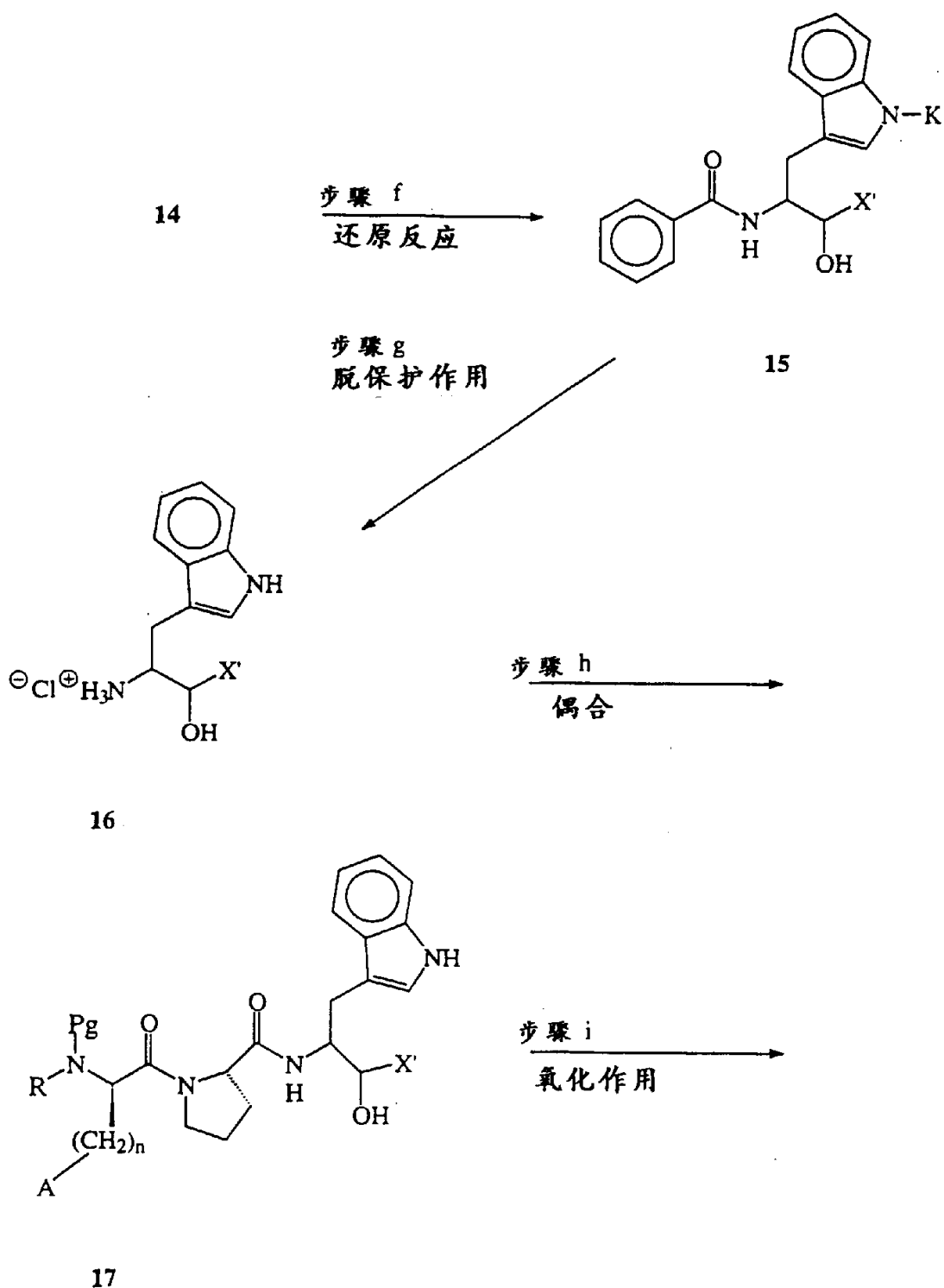
5 在路线 A 步骤 e 中，脱保护的三肽 8 经过脱羧基化反应得到式 (I) 化合物。例如，将脱保护的三肽 8 溶解于适当的氯代烃溶剂如四氯化碳，二氯乙烷，二氯甲烷，氯仿，1,2,4 - 三氯苯，并搅拌足够长时间如 24 - 72 小时以使脱羧基化反应完成。可用本领域已知技术分离得到产物 (I)。

10 进而，可用本领域已知的类似方法，如美国专利 5,391,705 (授权日：1995 年 2 月 21 日) 所述，制备 X 为 X' 的本发明化合物，其中 X' 是 -CF₃，-CF₂CF₃，-CF₂(CH₂)_tCH₃，-CF₂(CH₂)_tC(O)NHR，-CF₂(CH₂)_tCH₂OR 或 -CF₂(CH₂)_vCH=CH₂。本质上说，式 (I) 和 (IA) 氟化烷基三肽的合成依赖于 2 - 苯基 - 5(4H) - 咪唑酮与三氟乙酸，五氟丙酸或二氟戊酸 (取决于所要的 X' 部分) 的酸酐或酰卤的改进 Dakin-West 反应，得到所要的被
15 用作关键中间体的多氟烷基酮氨基酸衍生物。然后，经过进一步反应将这些氨基酸类转变成所需的式 (I) 和 (IA) 肽。制备 X 为 -CF₃，-CF₂CF₃，-CF₂(CH₂)_tCH₃，-CF₂(CH₂)_tC(O)NHR，-CF₂(CH₂)_tCH₂OR 或 -CF₂(CH₂)_vCH=CH₂ 的本发明化合物的通用合成方法示于路线 B。除非另有说明，在本申请中，在路线 B 中所用起始原料和试剂都是本领域普通技术
20 人员熟知的和理解的。

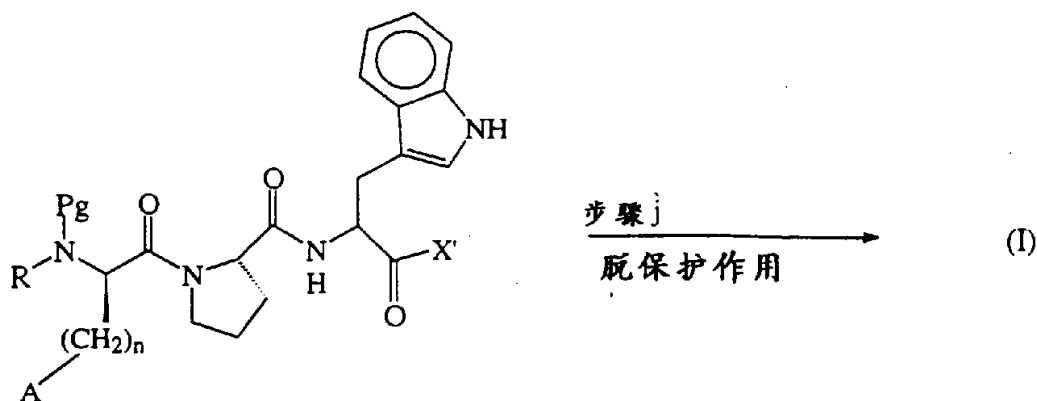
路线 B



路线 B (续)



路线 B (续)



18

15

路线 B 提供了制备 X' 为 $-\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CH}_3$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{C}(\text{O})\text{NHR}$, $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CH}_2\text{OR}_1$ 或 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_v\text{CH}=\text{CH}_2$ 的本发明化合物的通用合成方法。除非另有具体说明, 路线 B 中的所有取代基定义如上。

20

在路线 B 步骤 a 中, 根据本领域普通技术人员熟知的和理解的标准 N^α-保护技术将 δ-K-色氨酸 9 的 N^α-保护, 得到 N^α-K-N^δ-苄氧羰基-色氨酸 10, 其中 K 为适当的保护基, 包括苄氧羰基(Cbz), 叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS), 叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)等, 其中优选苄氧羰基(Cbz)。

25

例如, δ-Cbz-L-色氨酸 9 是用苯甲酰氯在标准 Schotten-Baumann 条件下进行 N^α-保护的。具体地说, 是将苯甲酰氯的醚如乙醚溶液附带氢氧化钠用约 0.5 - 1 小时加到 δ-Cbz-L-色氨酸 9 的氢氧化钠溶液中, 同时保持温度在 0 - 约 5 °C 之间。然后, 将反应混合物在室温搅拌近 4 小时, 用醚溶剂如乙醚萃取, 并用浓盐酸溶液酸化至约 pH 1。加水并将混合物放置约 48 小时。收集固体并用本领域普通技术人员熟知的技术纯化, 得到 N^α-苄甲酰基-N^δ-苄氧羰基-色氨酸 10。

30

在路线 B 步骤 b 中， N^{α} -苯甲酰基- N^{δ} -苄氧羰基-色氨酸 10 被环化，得到 2-苯基-5(4H)-咪唑酮 11。

例如，将 N^{α} -苯甲酰基- N^{δ} -苄氧羰基-色氨酸 10 的适当有机溶剂如二氯甲烷的浆液与约 0.1 - 1.0 摩尔当量的二环己基碳化二亚胺接触。然后，将反应混合物搅拌约 2 - 5 小时，将所得沉淀的二环己基脲副产物滤出并用适当有机溶剂如二氯甲烷洗涤。浓缩滤液，用适当醚溶剂如乙醚稀释，可任意重复该过程。然后用本领域普通技术人员熟知的技术如沉淀和结晶法分离和纯化环化产物 2-苯基-5(4H)-咪唑酮 11。

在路线 B 步骤 c 中，根据标准酰化技术酰化 2-苯基-5(4H)-咪唑酮 11，得到相应的结构 12 的 O-酰基化合物。

例如，在约 -10°C 至约 10°C 的温度范围内和惰性气体，优选氮气中，将适当叔胺如三乙胺加到在适当溶剂如四氢呋喃或四氢呋喃/庚烷混合物中的 2-苯基-5(4H)-咪唑酮 11 溶液中。将在适当有机溶剂如庚烷中的适当酰卤或相应的酸酐，如 α,α -二氟戊酰氯，三氟乙酸酐，五氟丙酸酐等溶液缓慢加到反应混合物中，同时保持反应温度在约 $-10 - 10^{\circ}\text{C}$ 。约 30 - 60 分钟后让反应混合物升至室温并再搅拌约 30 分钟。用本领域熟知的萃取技术如过滤除去三乙胺盐酸盐，浓缩滤液，得到相应的结构 12 的 O-酰基化合物。

在路线 B 步骤 d 中，相应的结构 12 的 O-酰基化合物任意与酰基化催化剂反应，得到相应的结构 13 的 C-酰基化合物。

例如，将相应的结构 12 的 O-酰基化合物溶解于适当有机溶剂如四氢呋喃中，并与酰基化催化剂如二烷基氨基吡啶，优选 4-二甲基氨基吡啶 (DMAP) 接触。将反应混合物在室温搅拌约 2 - 4 小时，得到无需进一步分离或纯化即可使用的结构 13 的 C-酰基化合物。

在路线 B 步骤 e 中，结构 13 的 C-酰基化合物与脱羧基化剂如草酸和琥珀酸等，优选草酸进行脱羧基化，得到所需的结构 14 的脱羧基化氟化合物，为酮和其水合物形式的混合物。

例如，将在适当有机溶剂如四氢呋喃中含有 1 - 5 摩尔当量无水草酸溶液加到路线 B 步骤 d 得到的含有结构 13 的 C-酰基化合物的反应混合物中，并保持搅拌 16 - 32 小时。然后，将反应混合物浓缩并用适当酸如

盐酸处理，乙酸乙酯萃取。分离两相，有机相用适当碱如碳酸钠，碳酸氢钠或氢氧化钠洗涤，任意用盐水洗涤，用适当干燥剂如硫酸镁干燥并浓缩。最后，用本领域熟知的技术如沉淀和结晶法分离和纯化脱羧基化产物 14。

5 在路线 B 步骤 f 中，结构 14 的脱羧基化氟化产物与适当还原剂接触，得到结构 15 的醇。

正如本领域所熟知的和理解的，这种还原反应得到的衍生物是立体异构体的混合物。

10 适当的还原剂是本领域熟知的，包括但不限于三-叔丁氧基氢化铝锂，硼氢化钾，三-仲丁基硼氢化锂，硼氢化锂，硼氢化钠和三乙基硼氢化锂，其中优选硼氢化钠。

15 例如，将结构 14 的脱羧基化氟化产物与摩尔过量的适当还原剂反应。该反应在适当溶剂中进行。进行氢化还原反应的适当溶剂是本领域已知的，如甲苯，乙醚，甲基叔丁醚，四氢呋喃 (THF) 和四氢呋喃/乙醇混合物。该反应在 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至约 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内进行。还原产物结构 15 的醇可以通过萃取从反应物中分离，然后用本领域已知方法如色谱和重结晶法纯化。

在路线 B 步骤 g 中，结构 15 的醇与适当脱保护基如浓盐酸接触，并加热到约 $100 - 110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，得到结构 16 的脱保护醇。

20 例如，将结构 15 的醇的 6N 盐酸水溶液加热回流 (约 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$) 约 15 - 20 小时。然后，将反应混合物冷却并滤除苯甲酸晶体。用乙醚萃取滤液，然后分离两相。水相用活性炭处理并加热，然后过滤，浓缩和干燥，得到结构 16 的脱保护醇产物。

25 在需要制备其中 X 是 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ 的化合物的具体实例中，用来制备结构 12 化合物的酸酐或酰卤反应物会带有 $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 部分。因此，结构 15 的醇也会带有 $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 部分，它可以在脱保护反应之前与亚烷基还原剂反应得到结构 16 的脱保护醇。适当的亚烷基还原剂包括二甲硼烷，二异烷基甲硼烷，甲硼烷/叔胺复合物和在氢化催化剂中存在的氢。最优选的亚烷基还原剂是在氢化催化剂中存在的氢。氢化催化剂的实例包括铂，钯，铑，钌和镍。精细分散的固体或吸附在惰性载体如炭或氧化铝上的金属和这些金属的某些可溶性复合物都表现出催化活性。

30

例如，将其中 X 是 $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 的结构 15 的醇溶解于适当醇如异丙醇和适当酸如盐酸中，然后用亚烷基还原剂如吸附在惰性炭载体上的二氯化钨处理溶液，并在氢气（40 - 60psi）中摇动约 20 - 30 小时。过滤反应混合物并浓缩，得到 N^α - 苯甲酰基 - 二氟醇，盐酸盐。将 N^α - 苯甲酰基 - 二氟醇，盐酸盐与适当脱保护剂如盐酸反应并加热回流。将反应混合物冷却至室温并过滤，用乙醚萃取滤液并分离各相。水相用活性炭处理，加热，过滤及浓缩，得到结构 16 的适当脱保护醇。

在其中 R_3 是 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{CH}_3$ （t 是整数 3 或 4）的具体实例中相应的烯烃（如 $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ）会被还原。为了制备后面那些烯烃，起始原料酰卤或酸酐可用 R.W. Lang 等人，《四面体通讯》(Tetrahedron Letters), 29, 3291 (1988) 所述方法制备。

在路线 B 步骤 h 中，根据上述路线 A 步骤 c 中的标准肽偶合技术，结构 16 的适当脱保护醇与 6a 化合物偶合，得到结构 17 的三肽醇。

在路线 B 步骤 i 中，结构 17 的三肽醇与适当氧化剂反应，得到结构 18 的 N - 端保护的三肽。

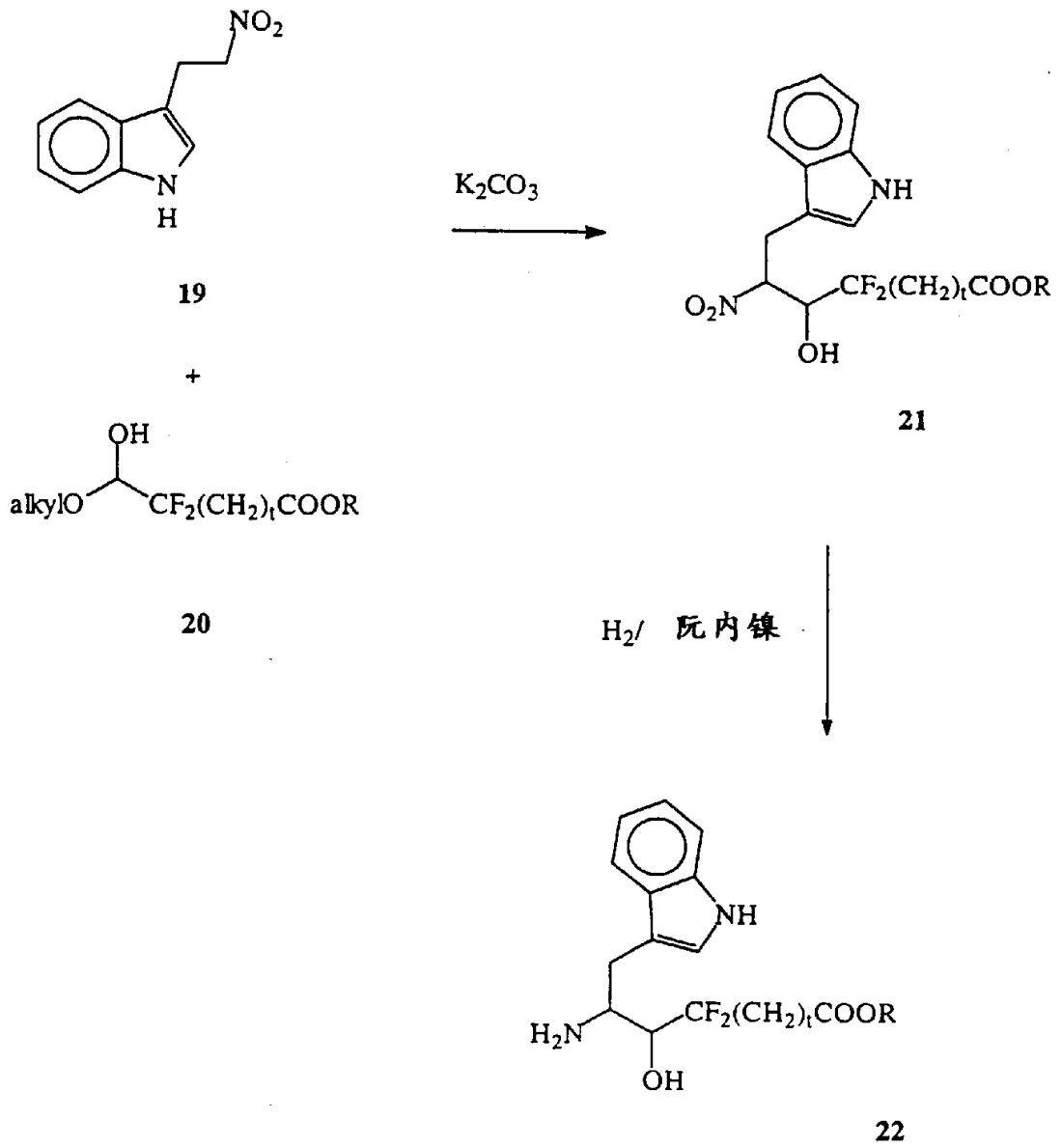
例如，将结构 17 的三肽醇与适当氧化剂如 Dess-Martin periodinane，铬酐吡啶复合物，二铬酸吡啶鎓，或二甲亚砜复合物如 $\text{DMSO}-(\text{COCl})_2$ 反应（Swern 条件），用本领域普通技术人员熟悉和理解的标准氧化技术得到结构 18 的 N - 端保护的三肽。标准氧化技术包括如 Swern 氧化方法，《合成》(Synthesis), 165 (1981); Dess-Martin periodinane 的用途, Dess-Martin, 《有机化学杂志》(J. Org. Chem.), 48, 4155 (1983); 以及 Johns 氧化方法（见美国专利 5,391,705）；其中 Swern 氧化方法是最优选的。例如，将约 1.5 当量草酰氯溶解于适当无水有机溶剂如二氯甲烷，并冷却到约 -55°C 至约 -78°C 。向溶液中滴加约 3 - 8 当量甲基亚砷，保持温度在约 -55°C 以下。将 1 当量结构 17 的三肽醇溶解于适量无水有机溶剂如二氯甲烷，并在搅拌的同时慢慢加到反应中。添加完成后将反应物在约 -55°C 至约 -78°C 搅拌约 30 分钟，加入过量的适当有机碱如三乙胺或 N - 甲基吗啉，并让反应升至室温。然后，用本领域技术人员熟知的技术如萃取，沉淀，结晶和色谱技术分离和纯化氧化产物结构 18 的 N - 端保护的三肽。

在路线 B 步骤 j 中，根据路线 B 步骤 g 所述方法将结构 18 的 N - 端保

护的三肽脱保护，得到所要的式 (I) 化合物。

在其中 X 是 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{COOR}_1$ 的具体情况下，可以使用路线 C 反应制备必要的中间体（对应于结构 16 化合物，但其中所要的 X 部分是 $-\text{CF}_2(\text{CH}_2)_t\text{COOR}_1$ ）。

路线 C

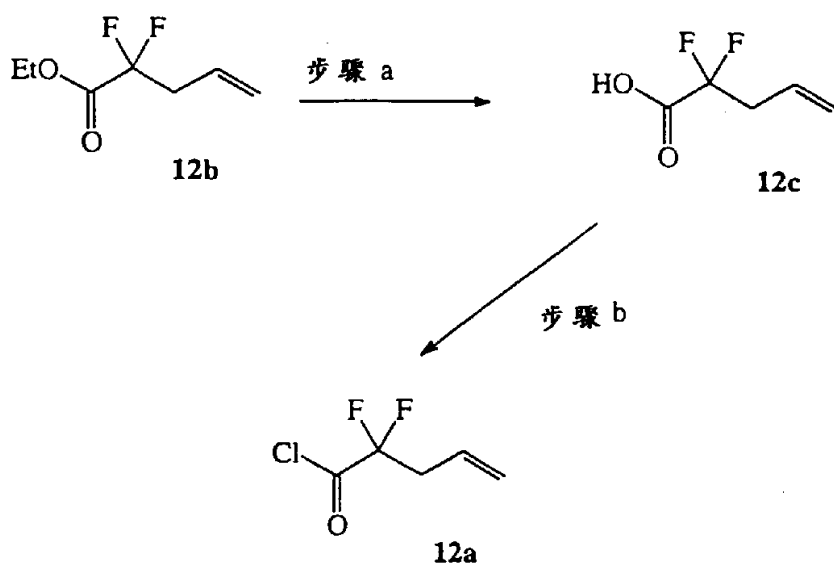


中间体 19 在 D. Ranganathan 等人, 《化学研究摘要》(J. Chem. Res. Synop.), 3, 78 (1983)和 D. Ranganathan 等人, 《有机化学杂志》(J. Org. Chem.), 45, 1185 (1980)中公开。可通过乙酸溴二氟乙酯[见 R.H. Abeles 和 C.P. Govardham, 《生物化学和生物物理学纪要》(Archives of Biochemistry and Biophysics), 280, 137 (1990)]与适当醛在 Reformatsky 条件下反应生成相应的二氟醇来制备反应物 20。将二氟醇 20 和结构 19 的中间体与碳酸钾在适当有机溶剂如四氢呋喃中, 用本领域熟知的技术和条件缩合, 生成结构 21 的硝基醇中间体。然后, 用催化氢化反应还原结构 21 的硝基醇中间体, 得到结构 22 中间体。然后用路线 B 步骤 i 和 j 所述方法处理与结构 16 结合的结构 22 中间体, 得到所要的 X 是 -CF₂(CH₂)_tCOOR₁ 的式 (I) 化合物。

或者, 用标准的和熟知的方法和技术, 如 Sham 等人, 《生物化学和生物物理学研究通讯》(Biochem. and Biophys. Res. Comm.), 175, 914 (1991)和美国专利 5,391,705 所述, 对结构 19 和 20 化合物进行甲磺酰基化, 消去化和氢化作用, 得到结构 22 中间体。

如果 X 是 -CF₂(CH₂)₂CH₃, 制备结构 12 的 O - 硝基化合物所需要的中间体 12a α,α - 二氟戊酰氯可用美国专利 5,391,705 和路线 D 所述方法得到。本领域普通技术人员可以很容易得到用于该方法的试剂, 起始原料和技术。

路线 D



在路线 D 步骤 a 中，可用本领域熟知的技术和方法如碱水解方法（美国专利 5,391,705，授权日：1995 年 2 月 21 日），通过 α,α -二氟戊酸乙酯 12b 的水解制备 2,2-二氟-4-戊酸 12c。

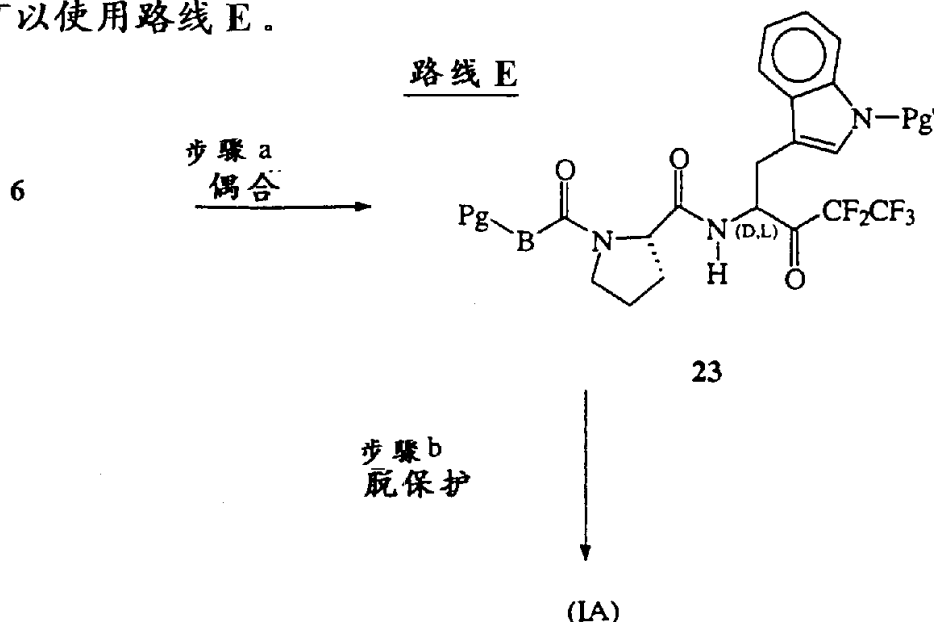
例如，在约 $-10 - 10\text{ }^\circ\text{C}$ 将约 1.0 - 1.5 摩尔当量的适当碱如氢氧化锂加到 α,α -二氟戊酸乙酯 12b，也已知称为 2,2-二氟-4-戊酸乙酯（美国专利 4,847,401，授权日：1989 年 7 月 11 日），水溶液中。用 2 - 4 小时时间让反应混合物升至室温，然后在约 $40 - 55\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 2 - 4 小时。从反应混合物中除去乙醇和水，并通过萃取从反应物中分离出 2,2-二氟-4-戊酸 12c，然后用本领域已知方法纯化。

在路线 D 步骤 b 中，将 2,2-二氟-4-戊酸 12c 与适当氯化剂反应，得到 2,2-二氟-4-戊酰氯 12a。

合适的氯化剂是可以将羟基转化成氯基团，并且不会使起始原料或产物降解的氯化剂。合适的氯化剂包括三氯化磷，亚硫酸氯，草酰氯等。

例如，将 2,2-二氟-4-戊酸 12c 与约 1.0 - 1.5 摩尔当量的适当氯化剂反应。反应在适当溶剂如二氯甲烷，甲苯或二甲基甲酰胺中进行。反应在约 $20 - 35\text{ }^\circ\text{C}$ 通常需要进行约 4 - 24 小时。产物 2,2-二氟-4-戊酰氯 12a 可以通过部分蒸馏分离，并经过本领域已知技术如色谱法纯化。

为了制备其中 X 是 $-\text{CF}_2\text{CH}_3$ ，其余所有取代基定义如上的式 (IA) 化合物，可以使用路线 E。

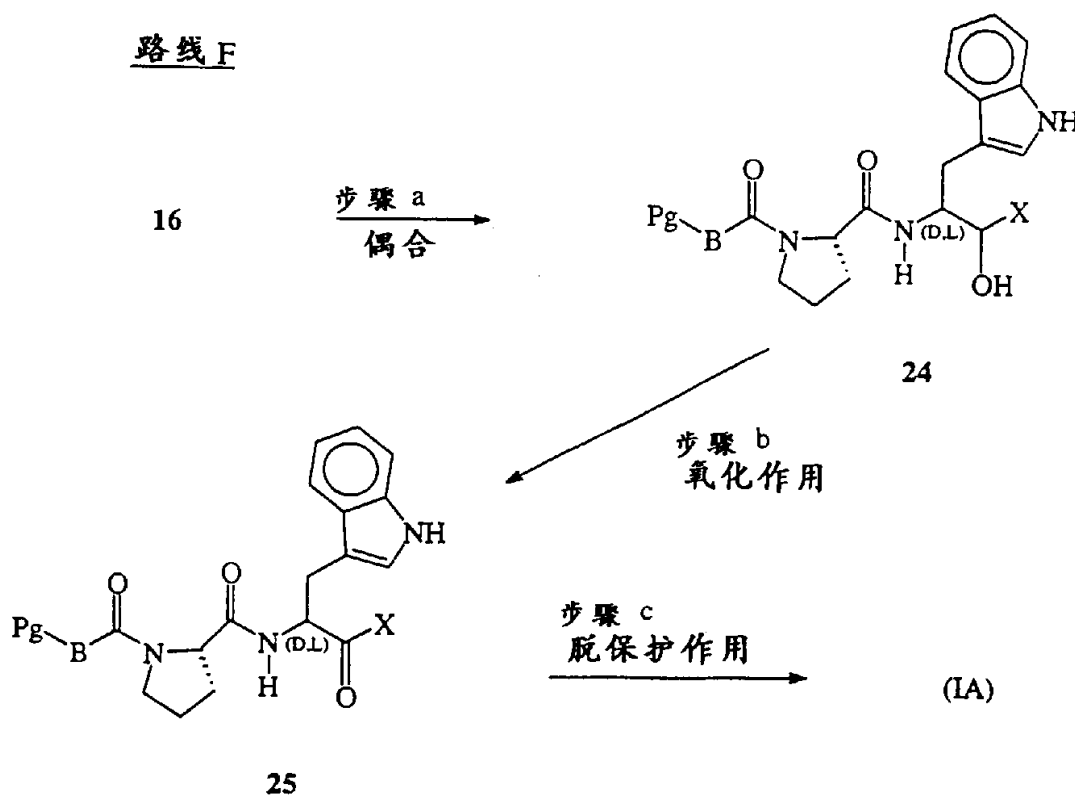


5 路线 E 提供了制备其中 X 是 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ ，其余的所有取代基定义如上的式 (IA) 化合物的一般合成方法。

在路线 E 步骤 a 中，路线 A 中制备的 α -胺脱保护的五氟乙基酮 6 与 Pg-T-C(O)Pro-OH 偶合，其中 T 是定义如上的类 TIC 部分并代表 (2a), (2b), (2c), (2'a), (2'b) 和 (2'c)，形成偶合产物 23。类 TIC 部分公开于美国专利
10 5,391,705 (授权日: 1995 年 2 月 21 日) 和 Shuman 等人, 《药物化学杂志》(J. Med. Chem.), 36, 314 - 319 (1993), 所说专利和文献在此全部引作参考。该偶合反应以完全类似于前面路线 A 步骤 c 所述的方式进行。

在路线 E 步骤 b 中，在现有技术已知的条件下如前面路线 A 步骤 d 和 e 所述条件下，偶合产物 23 被脱保护或从固相裂解出来，得到式 (IA) 三肽。
15 肽。

为了制备式 (IA) 化合物，其中所有取代基定义如上，可以使用路线 F。



5

路线 F 提供了制备所有取代基定义如上的式 (IA) 化合物的方法。

在路线 F 步骤 a 中, 路线 B 中制备的 α - 胺脱保护的醇 16 与 Pg-T-C(O)Pro-OH 偶合, 其中 T 是定义如上的类 TIC 部分并代表(2a), (2b), (2c), (2'a), (2'b)和(2'c), 形成偶合产物 24。该偶合反应以完全类似于前面路线 A 步骤 c 所述的方式进行。

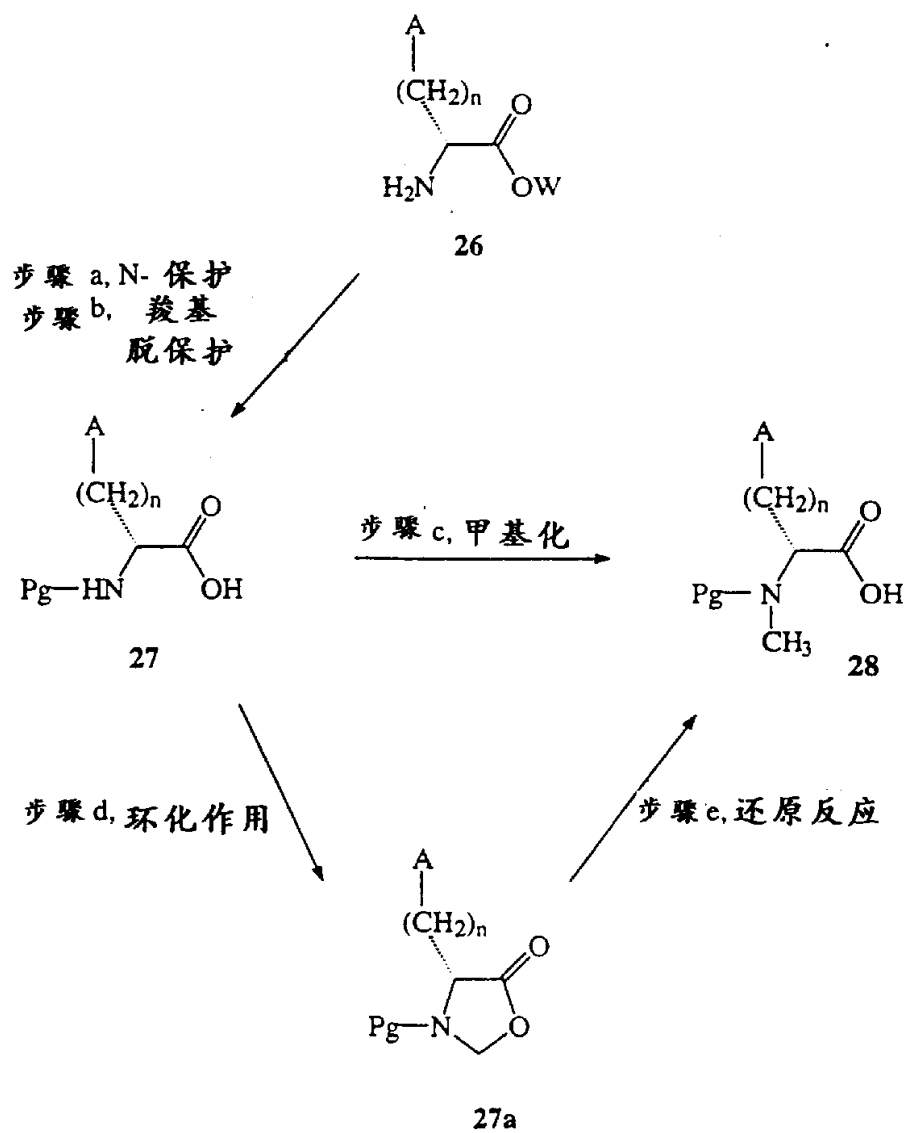
在路线 F 步骤 b 中, 根据路线 B 步骤 i 方法将偶合产物 24 氧化, 得到结构 25 的 N - 保护的三肽。

在路线 F 步骤 c 中, 根据路线 B 步骤 j 方法将结构 25 的 N - 保护的三肽脱保护, 得到所要的式 (IA) 化合物。

15 N - 甲基化的 α - 氨基酸可以按路线 G 和 Pitzele, B.S.等人, 《药物化学杂志》(J. Med. Chem.), 37, 888 - 896 (1994) (该文献在此全部引作参考) 所述制备。除非另有说明, 所有取代基定义如上。试剂和起始原料都是本领域普通技术人员容易得到的。

20

路线G



在路线 G 步骤 a 中，其中 W 是适当 α - 羧基保护基如甲酯或固相树脂的结构 26 的 α - 氨基酸与 Pg 以类似上述路线 A 步骤 c 所述方式偶合，得到偶合产物。

5 在路线 G 步骤 b 中，在现有技术已知的条件下，偶合产物被脱保护或从固相裂解出来，得到结构 27 的酸。例如，如果 W 是结构 26 上的甲基或乙基，将该化合物溶解于有机溶剂如乙醇，并用约等体积的水处理。搅拌的同时向该溶液中加入 1 - 2 当量氢氧化锂，并搅拌 1 - 6 小时。然后，用本领域已知技术分离和纯化所得酸。例如，真空除去有机溶剂，剩余的水溶液用稀盐酸酸化，然后用适当有机溶剂如乙酸乙酯萃取水相。合并的
10 有机萃取液用无水硫酸镁干燥，过滤并真空浓缩。剩余物在硅胶上经快速色谱纯化，用适当洗脱剂如甲醇/氯仿洗脱，得到结构 27 的酸。

在路线 G 步骤 c 中，酸 27 被 N - 甲基化，得到结构 28 的 N - 保护的 N - 甲基化化合物。例如，将酸 27 溶解于适当有机溶剂如四氢呋喃，然后冷却至约 0 °C，并用过量甲基碘处理。在溶液中加入 1 - 3 当量氢化钠，
15 并在 0 °C 搅拌约 10 分钟，然后升至室温并搅拌 24 - 48 小时。用本领域已知技术如萃取法分离产物。例如，加入稀盐酸水溶液并用适当有机溶剂如乙酸乙酯萃取反应物。合并有机萃取液，分别用 5 % 硫代硫酸钠，盐水洗涤，无水硫酸镁干燥，用硅胶垫过滤，真空浓缩，得到 N - 保护的 N - 甲基化化合物 28。

20 或者，采用下面路线 G 步骤 d 和 e 所述方法从结构 27 的酸制备 N - 保护的 N - 甲基化化合物 28。

在路线 G 步骤 d 中，酸 27 被环化，得到由结构 27a 表达的噁唑烷。例如，将酸 27 溶解于适当有机溶剂如苯，用过量多甲醛处理。往其中加入约 0.2 - 0.4 当量对 - 甲苯甲磺酸，并将反应加热回流约 23 小时，同时用
25 Dean-Stark 分水器不断地除去水。将反应冷却至室温，用本领域已知技术分离和纯化产物。例如，将冷却的反应物真空浓缩，将剩余物置于适当有机溶剂如乙酸乙酯中，用饱和碳酸氢钠漂洗，用无水硫酸镁干燥有机相，过滤及真空浓缩。剩余物在硅胶上进行快速色谱纯化，用适当洗脱剂如乙酸乙酯/己烷洗脱，得到噁唑烷 27a。

30 在路线 G 步骤 e 中，在本领域已知的条件下噁唑烷 27a 被还原，得到

N - 保护的 N - 甲基化化合物 28。例如，将咪唑烷 27a 溶解于适当有机溶剂如氯仿，用过量三氟乙酸处理。在室温和搅拌条件下向该溶液中加入过量三乙基甲硅烷。将反应搅拌 1 - 7 小时，然后真空浓缩，得到 N - 保护的 N - 甲基化化合物 28。

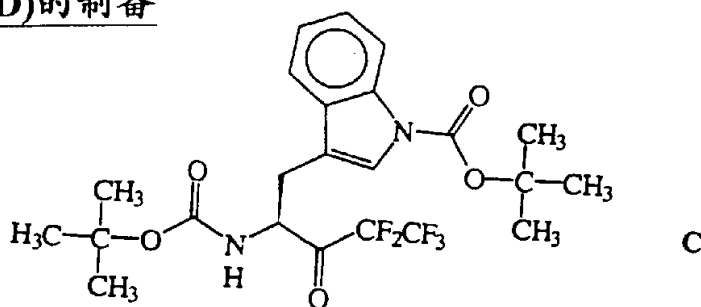
5 下列实施例代表了路线 A - G 所述的具体合成方法。这些实施例应被理解为仅用来说明而不是要以任何方式限制本发明范围。在 75MHz 记录 ^{13}C 的 NMR 谱图，在 282MHz 记录 ^{19}F 的 NMR 谱图，在 300MHz 处记录 ^1H 的 NMR 谱图； ^{19}F NMR 信号是由 CFCl_3 以 ppm 报告的。MS 和 HRMS 数据是在 70eV 记录的数据，用计算机计算的峰与作为 HRMS 参考的全氟煤油匹配。TLC 分析用 Merck DC-F₂₅₄ 或 Analtech GHLF 硅胶板操作，同时用碱性高锰酸盐显色和 UV 照射。快速色谱用 Merck 硅胶 60 (0.040-0.063mm) 进行。CF₃CF₂Li 用从 Richmond Chemical Company 得到的 CF₃CF₂I 按 Gassman & O'Reilly, 《有机化学杂志》(J. Org. Chem.), 52, 2481 - 2490 (1987) 所述方法产生。色氨酸化合物的脱保护反应可用类似前面 Franzen 等人, 《化学会志》(J. Chem. Soc.), 1699 - 1700 (1984) 所述方法进行。

本文所用术语有以下涵义：“g”代表克；“mmol”代表毫摩尔；“mL”代表毫升；“bp”代表沸点；“mp”代表熔点；“°C”代表摄氏度；“mm Hg”代表毫米汞柱；“μL”代表微升；“μg”代表微克；及“μM”代表微摩尔。

实施例 1

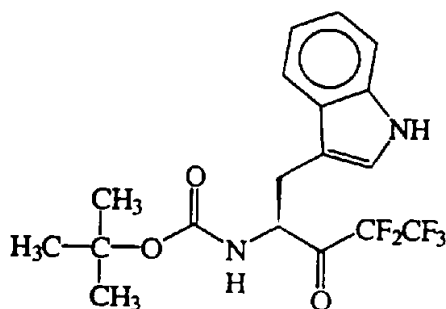
1H - 咪唑 - 1 - 羧酸, 3 - [2 - [(1,1 - 二甲氧基)羰基]氨基] - 4,4,5,5,5 - 五氟 - 3 - 氧戊基] - , 1,1 - 二甲基乙酯, (S)-, (C) 和氨基甲酸, [3,3,4,4,4 - 五氟 - 1 - (1H - 咪唑 - 3 - 基甲基) - 2 - 氧丁基] - , 1,1 - 二甲

25 基乙酯, (S)-, (D) 的制备



C

30



D

10

路线 A 步骤 a; 氮气下向冷却到 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (内部温度计) 并搅拌的 Boc-Trp(Boc)-OCH₃ (Franzen 等人, 《化学会志》(J. Chem. Soc.), 1699 - 1700, 1984) (7.15g, 17.08mmol) 的无水 Et₂O (60mL) 溶液中加入浓 CF₃CF₂I (6.85mL, 58.09mmol)。以保持反应内部温度在 $-52 - -62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间的速率加入 MeLi · LiBr (37.6mL 1.5M 的 Et₂O 溶液, 56.36mmol)。添加完毕后在 $-52 - -62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应混合物 1 小时。以保持反应内部温度在 $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的速率加入异丙醇(4.31mL, 56.3mmol)淬灭反应。允许反应混合物温度升至 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 然后将反应混合物倒入 10% KHSO₄ (100mL) 水溶液。分离各相, 有机相用 10% KHSO₄ (50mL) 水溶液和盐水 (25ml) 洗涤, MgSO₄ 干燥, 过滤并浓缩, 得到粗产物 C 和 D。快速色谱 (7.5 × 19cm 硅胶柱) 纯化, 梯度洗脱 (15 - 25% EtOAc 的己烷), 得到 C (5.43g, 63%) 为黄色泡沫和 D (1.50g, 22%) 为浅黄色固体。

20

化合物 C:

TLC R_f 0.37(25: 75 EtOAc: 己烷); ¹H NMR(CDCl₃, 3 天, 只有酮, 主要的旋转异构体) δ 8.14 (br d, 1H, J=7.9Hz, H₇), 7.50 (ddd, 1H, J=0.8, 1.1, 7.8Hz, H₄), 7.42 (br s, 1H, H₂), 7.35 (ddd, J=1.3, 7.4, 8.4Hz, H₆), 7.27 (dt, J=1.0, 7.8Hz, H₅), 5.15-5.05 (m, 1H, CH), 4.99 (br d, 1H, J=7.6Hz, NH), 3.36 (dd, 1H, 4.7, 15.0Hz, 1/2CH₂), 3.04 (dd, 1H, J=7.5, 15.0Hz, 1/2 CH₂), 1.67 (s, 9H, Nⁱⁿ-Boc), 1.38 (s, 9H, Boc); ¹⁹F NMR(CDCl₃, 3 天, 只有酮, 主要的旋转异构体) δ - 82.06 (s, CF₃), -120.85 和 -122.48 (pr d, J=297Hz, CF₂);

30

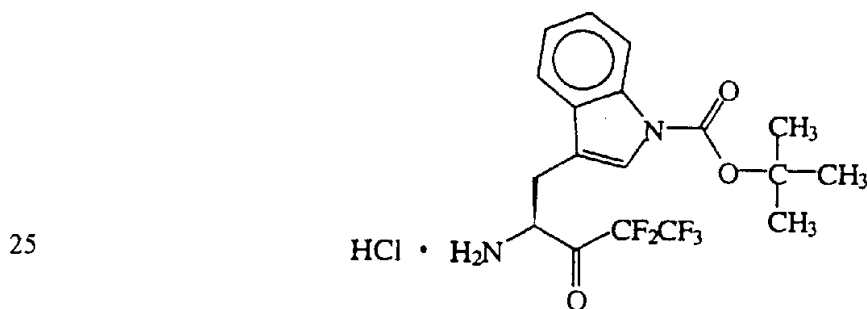
MS(Cl, NH₃)m/z (相对强度) 524 (100, M+NH₄⁺), 507(3, M+), 468(30), 412(17), 230(32), 130(54). 分析(C₂₃H₂₇F₅N₂O₅ · 0.34H₂O) C, H, N.

化合物 D:

5 mp=135-141 °C; TLC Rf 0.15(25:75 EtOAc:己烷); ¹H NMR (DMSO-d₆+D₂O, 只存在水合物类) δ 7.44-7.50(m, 1H), 7.32-7.26(m, 1H), 7.06-6.90(m, 3H), 4.15-4.08(m, 0.3H, 旋转异构体 A 的 CH), 3.98-3.91(m, 0.7H, 旋转异构体 B 的 CH), 3.16(dd, 0.3H, J=1.8, 14.2Hz, 旋转异构体 A 的 1/2 CH₂), 3.12(dd, 0.7H, J=1.6, 14.5Hz, 旋转异构体 B 的 1/2 CH₂), 2.75(dd, 10 0.7H, J=11.7, 14.6Hz, 旋转异构体 A 的 1/2 CH₂), 1.10(s, 6.3H, 旋转异构体 B 的 Boc), 0.67(s, 2.7H, 旋转异构体 A 的 Boc); ¹⁹F NMR(DMSO-d₆+D₂O, 只存在水合物类) δ -77.54(s, 旋转异构体 B 的 CF₃), -77.63(s, 旋转异构体 A 的 CF₃), -121.46 和 -123.59(pr d, J=276Hz, 旋转异构体 B 的 CF₂), -121.46 和 -123.35(pr d, J=276Hz, 旋转异构体 A 的 CF₂); MS(Cl, NH₃)m/z(相对强度) 424(37, M+NH₄⁺), 368(100), 130(40); 15 分析.(C₁₈H₁₉F₅N₂O₃ · 0.34H₂O)C, H, N.

实施例 2

20 1H - 吲哚 - 1 - 羧酸, 3 - (2 - 氨基 - 4,4,5,5,5 - 五氟 - 3 - 氧戊基) - 1,1 - 二甲基乙酯, 一盐酸盐, (S)-的制备



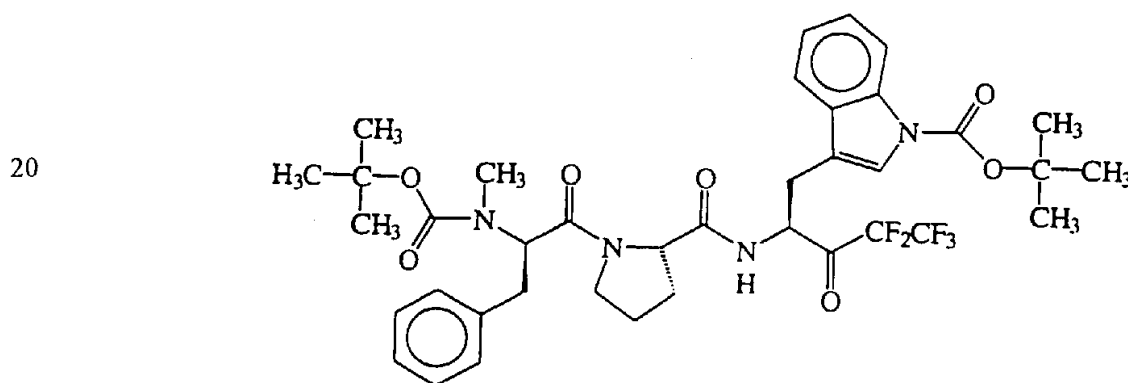
30 路线 A 步骤 b; 氮气下向搅拌的实施例 1 得到的化合物 C (1.04g, 2.00mmol) 的二噁烷 (2.4mL) 溶液中慢慢加入 4.0N 氯化氢的二噁烷 (5.0mL). 1 小时后吸滤所得悬浮液并用 Et₂O (3 × 10mL) 洗涤收集的固

体。高真空下用 KOH 粒干燥乳白色固体，得到 195mg (22%) 标题化合物为酮和水合物的混合物（比例为 2 : 3）。由于标题化合物的不稳定性，须将标题化合物立即用于下一步。合并及稀释上面所得滤液，冷冻后得到额外的标题化合物(571mg, 64%)。

5 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ 8.79(br s), 7.99(br d, 1H, $J=6.6\text{Hz}$), 7.88-7.66(m), 7.51(d, 0.4H, $J=7.4\text{Hz}$, 酮的 Ar-H), 7.41(d, 0.6H, $J=7.4\text{Hz}$, 水合物的 Ar-H), 7.28-7.12(m, 2H), 6.48(br s, 水合物 OH), 5.10-4.96(m, 0.4H, 酮的 CH), 3.75-3.93(m, 0.6H, 水合物的 CH), 3.63-3.10(m, 2H, CH_2), 1.55(s, 9H, Boc); $^{19}\text{F NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ -79.48(s, 水合物的 CF_3), -81.77(s, 酮的 CF_3), -119.56 和-10 122.40(pr d, $J=297\text{Hz}$, 酮的 CF_2), -123.38(br s, 水合物的 CF_2); MS (CI, NH_3)m/z (相对强度)424(21, $\text{M}+\text{NH}_4^+$), 407(42, MH^+), 387(100).

实施例 3

15 L - 脯氨酸酰胺(Prolinamide), N - [(1,1 - 二甲基乙氧基)羰基] - N - 甲基 - D - 苯丙氨酸基 - N - [1 - [[1 - [(1,1 - 二甲基乙氧基)羰基] - 1H - 吲哚 - 3 - 基]甲基] - 3,3,4,4,4 - 五氟 - 2 - 氧丁基] - , (S)-的制备



25 路线 A 步骤 c; 氮气下向冷却到 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 并搅拌的 N - Boc - N - 甲基 - D - Phe - L - Pro - OH (Veber 等人, PCT 专利申请公开 WO 94/25051, 公开于 1994 年 11 月 10 日) (0.15g, 0.41mmol) 的 EtOAc (3mL) 溶液中加入 N - 甲基吗啉(45 μL , 0.41mmol), 接着加入氯甲酸异丁酯 (53 μL , 0.41mmol). 15 分钟后再加入 N - 甲基吗啉(45 μL , 0.41mmol),

30

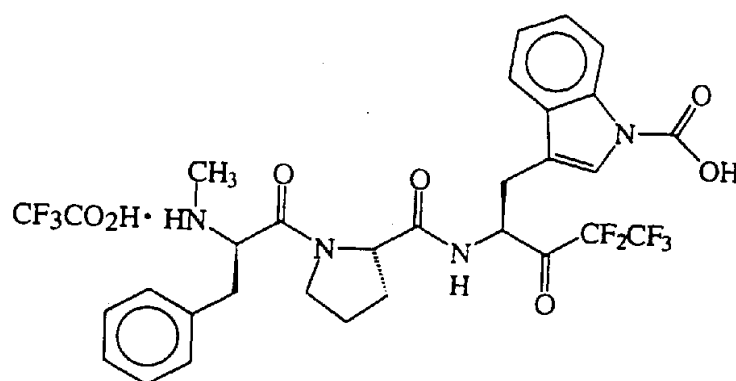
接着加入实施例 2 的产物(0.18g, 0.41mmol)。在-15 - -20 ℃搅拌反应混合物 4 小时, 用 EtOAc (50mL)稀释, 用 10 % 柠檬酸水溶液 (2 × 25mL), 半饱和 NaHCO₃ 水溶液 (2 × 15mL) 和盐水(25mL)洗涤。用 MgSO₄ 干燥后过滤并浓缩, 得到粗产物。经快速色谱 (2.5 × 12cm 硅胶柱) 纯化, EtOAc - 己烷(45: 55)洗脱后, 得到标题化合物(0.16g, 52%, 酮和水合物的混合物)为浅黄色泡沫。

TLC R_f 0.34 (45:55 EtOAc:己烷); ¹⁹F NMR(CDCl₃) δ-79.27 (s, 水合物的 CF₃), -82.09 (s, 酮的 CF₃), -122.81 和-124.74(pr d, J=275Hz,水合物的 CF₂), -121.75 至-121.90(m, 酮的 CF₂), 酮:水合物≈2:3; MS(Cl, NH₃)m/z(相对强度)782(30, M+NH₄⁺), 765(45, MH⁺), 205(92), 122(100);

HRMS C₃₈H₄₆F₅N₄O₇(MH⁺)计算值 765.3287, 实测值 765.3281.

实施例 4

L - 脯氨酸酰胺, N - 甲基 - D - 苯丙氨酸酰基 - N - [1 - [(1 - 羧基 - 1H - 吲哚 - 3 - 基)甲基] - 3,3,4,4,4 - 五氟 - 2 - 氧丁基] - , (S)-, 单(三氟乙酸盐)的制备



路线 A 步骤 d: 氮气下向实施例 3 的产物 (150mg, 0.2mmol)中加入 CF₃CO₂H (2mL), 并将所得溶液搅拌 3 分钟。除去溶剂, 将剩余物溶解于 Et₂O (3mL), 边搅拌边慢慢加入己烷(20mL)。在氮气下吸滤, 得到标题化合物(117mg, 82%)为乳白色固体。该标题化合物对脱羧基化反应不稳定。

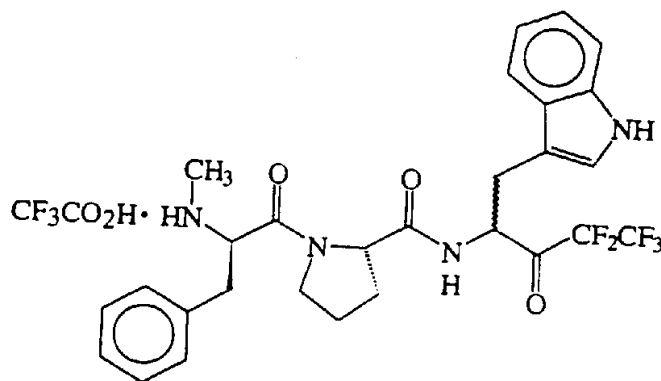
$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{仅有 NCH}_3 \text{ 信号})\delta 2.44 (\text{s}, 3\text{H}, \text{NCH}_3)$; $^{19}\text{F NMR}(\text{CDCl}_3)\delta -82.11(\text{s}, \text{酮的 CF}_3), -121.60 \text{ to } -122.91(\text{m}, \text{酮的 CF}_2)$; MS(FAB, MNBA)m/z (相对强度)609.2(MH⁺, 46), 565.2(MH-CO₂⁺, 81), 448.2(6), 404.2(38), 134.1(100).

5

实施例 5

L-脯氨酸酰胺, N-甲基-D-苯丙氨酸酰基-N-[3,3,4,4,4-五氟-1-(1H-吲哚-3-基甲基)-2-氧丁基]-, 单(三氟乙酸盐)的制备

10



15

路线 A 步骤 e; 将实施例 4 的产物 (82mg, 0.1mmol) 溶解于 CHCl_3 , 并搅拌 48 小时。除去溶剂, 将剩余物溶解于 CH_2Cl_2 - 己烷, 然后浓缩, 得到标题化合物 (76mg, 100%, DLL 和 DLD 非对映体的 1: 1 混合物) 为浅黄色固体。

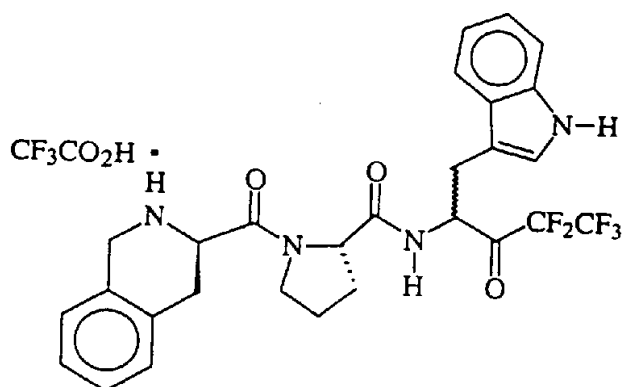
TLC R_f 0.66(5:95 Et₃ N:CH₃CN); TLC R_f 0.12(5:95 Et₃N: EtOAc); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ 9.69(s, 0.5H, DLL 非对映体的 Nⁱⁿ-H.), 9.26(s, 0.5H, DLD 非对映体的 Nⁱⁿ-H.), 8.18(br d, 0.5H, J=6.4Hz, DLD 非对映体.), 7.61-7.02(m), 5.11(dd, 0.5H, J=5.8, 11.8Hz, DLD 非对映体的 Trp 的 CH.), 5.04(dt, 0.5H, J=3.6, 10.9Hz, DLL 非对映体的 Trp 的 CH.), 4.54(dd, 0.5H, J=2.0, 7.7Hz, DLD 非对映体的 Pro 的 CH.), 4.42(dd, 0.5H, J=1.9, 7.8Hz, DLL 非对映体的 Pro 的 CH.), 4.03(dd, 0.5H, J=4.2, 11.2Hz, DLD 非对映体的 Phe 的 CH.), 3.97(dd, 0.5H, J=4.4, 11.3Hz, DLL 非对映体的 Phe 的 CH.), 3.5-2.9(m), 2.23(s, 1.5H, DLD 非对映体的 NCH₃.), 2.10-1.90(m), 1.93(s,

30

1.5H, DLL 非对映体的 NCH₃), 1.70-1.65(m), 1.50-1.22(m); ¹⁹F NMR(CDCl₃)δ-82.11(s, DLL 非对映体的 CF₃), -82.34(s, DLD 非对映体的 CF₃), -120.22 和-123.54(pr d, J=294Hz, DLD 非对映体的 CF₂), -121.92(s, DLL 非对映体的 CF₂), DLD: DLL=1:1; MS(CI, NH₃)m/z (相对强度) 565(MH⁺, 100), 547(39), 436(15), 276(12), 259(8); HRMS C₂₈H₃₀F₅N₄O₃ (MH⁺)计算值 565.2238, 实测值 565.2253.

实施例 6

2 - 吡咯烷甲酰胺, N - [3,3,4,4,4 - 五氟 - 1 - (1H - 吲哚 - 3 - 基甲基) - 2 - 氧丁基] - 1 - [(1,2,3,4 - 四氢 - 3 - 异喹啉基)羰基] - , -[2S-[1(S*), 2R*]]-, 单(三氟乙酸盐)的制备



a) Boc-D-3-Tiq-Pro-Trp(Boc)-CF₂CF₃ 的制备

路线 E 步骤 a; 氮气下将冷却到-18 °C 并搅拌的 Boc - D - 3 - Tiq - Pro - OH (Neises 等人, 美国专利 5,391,705, 授权于 1995 年 2 月 21 日) (0.15g, 0.41mmol) 的 EtOAc (3mL) 溶液与 N - 甲基吗啉(45μL, 0.41mmol)接触, 接着加入氯甲酸异丁酯(53μL, 0.41mmol), 然后用类似于实施例 3 所述方式与实施例 2 的产物(0.18g, 0.41mmol)偶合, 得到标题化合物。

b) D-3-Tiq-Pro-Trp(COOH)-CF₂CF₃, 单(三氟乙酸盐)的制备

路线 E 步骤 b; 采用类似实施例 4 所述方法用 CF₃CO₂H (2mL), Et₂O

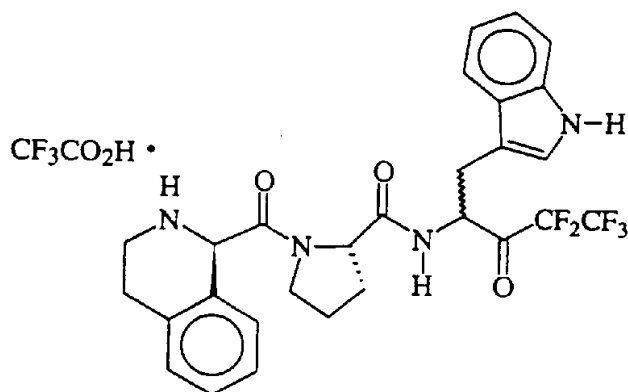
(3mL)和己烷(20mL)将实施例 6(a)的产物(150mg, 0.2mmol)脱保护, 得到标题化合物。

c) 2 - 吡咯烷甲酰胺, N - [3,3,4,4,4 - 五氟 - 1 - (1H - 吲哚 - 3 - 基甲基) - 2 - 氧丁基] - 1 - [(1,2,3,4 - 四氢 - 3 - 异喹啉基)羧基] -, -[2S-[1(S*), 2R*]]-, 单(三氟乙酸盐)的制备

路线 A 步骤 e; 采用类似实施例 5 所述方法用 CHCl_3 (2mL)和 CH_2Cl_2 - 己烷将实施例 6(b)的产物(82mg, 0.1mmol)脱羧基化, 得到标题化合物。

实施例 7

2 - 吡咯烷甲酰胺, N - [3,3,4,4,4 - 五氟 - 1 - (1H - 吲哚 - 3 - 基甲基) - 2 - 氧丁基] - 1 - [(1,2,3,4 - 四氢 - 1 - 异喹啉基)羧基] -, -[2S-[1(S*), 2R*]]-, 单(三氟乙酸盐)的制备



a) Boc-D-1-Tiq-Pro-Trp(Boc)- CF_2CF_3 的制备

路线 E 步骤 a; 氮气下将冷却到 -18°C 并搅拌的 Boc - D - 3 - Tiq - Pro - OH (Neises 等人, 美国专利 5,391,705, 授权于 1995 年 2 月 21 日) (0.15g, 0.41mmol)的 EtOAc (3mL)溶液与 N - 甲基吗啉($45\mu\text{L}$, 0.41mmol)接触, 接着加入氯甲酸异丁酯($53\mu\text{L}$, 0.41mmol), 然后用类似于实施例 3 所述方式与实施例 2 的产物(0.18g, 0.41mmol)偶合, 得到标题化合物。

b) D-1-Tiq-Pro-Trp(COOH)- CF_2CF_3 , 单(三氟乙酸盐)的制备

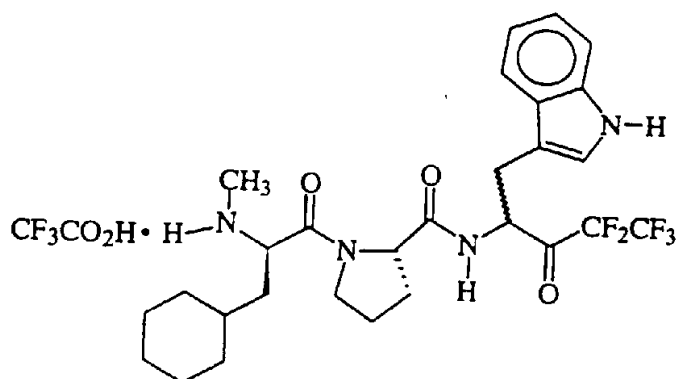
路线 E 步骤 b; 采用类似实施例 4 所述方法用 $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (2mL), Et_2O (3mL) 和己烷(20mL) 将实施例 7(a) 的产物(150mg, 0.2mmol) 脱保护, 得到标题化合物。

5 c) 2 - 吡咯烷甲酰胺, N - [3,3,4,4,4 - 五氟 - 1 - (1H - 吲哚 - 3 - 基甲基) - 2 - 氧丁基] - 1 - [(1,2,3,4 - 四氢 - 1 - 异喹啉基) 羰基] - , -[2S - [1(S*), 2R*]] - , 单 (三氟乙酸盐) 的制备

路线 A 步骤 e; 采用类似实施例 5 所述方法用 CHCl_3 (2mL) 和 CH_2Cl_2 - 己烷将实施例 7(b) 的产物(82mg, 0.1mmol) 脱羧基化, 得到标题化合物。

实施例 8

10 L - 脯氨酸酰胺, 3 - 环己基 - N - 甲基 - D - 丙氨酸 - N - [3,3,4,4,4 - 五氟 - 1 - (1H - 吲哚 - 3 - 基甲基) - 2 - 氧丁基] - , 单 (三氟乙酸盐) 的制备



a) N - Boc - N - 甲基 - D - Cha - OH 的制备

25 路线 G 步骤 c; 将 Boc - D - Cha - OH (10.8g, 40mmol) 溶解于 THF (200mL), 并将溶液冷却到 0 °C。用 1 小时时间分批加入氢化钠(4.8g, 120mmol, 分散于油中占 60%), 然后搅拌 20 分钟。加入甲基碘(19.7mL, 316mmol), 将反应在 0 °C 搅拌 3 小时, 在室温搅拌过夜。将反应重新冷却到 0 °C 并慢慢加水(100mL)。浓缩除去 THF, 用乙醚 (2 × 150mL) 洗涤混合物。用 6N HCl 将水相酸化至约 pH 3, 然后用乙酸乙酯 (4 ×

30

100mL) 萃取。合并有机萃取液, 先后用 5% 硫代硫酸钠(100mL)和盐水(100mL)洗涤, 硫酸镁干燥, 真空浓缩, 得到标题化合物。

b) N - Boc - N - 甲基 - D - Cha - Pro - OCH₃ 的制备

路线 A 步骤 c; 将 HCl · Pro - OCH₃ (0.33g, 2.0mmol) 溶解于 DMF (20mL), 并将溶液冷却到 0 °C。加入三乙胺(0.31mL, 2.2mmol)并搅拌 10 分钟。之后, 加入实施例 8(a) (2.0mmol, 溶解于 100mL THF), 接着加入 HOBt · 1H₂O (0.27g, 2.0mmol)。将反应在 0 °C 搅拌 3 小时, 在室温搅拌过夜。真空浓缩反应物, 将剩余物放入 1N HCl (100mL), 然后用乙酸乙酯 (3 × 100mL) 萃取。合并有机萃取液, 先后用饱和碳酸氢钠(100mL)和盐水(100mL)漂洗, 经过硅胶短垫后真空浓缩。剩余物经快速色谱纯化, 得到标题化合物。

c) N - Boc - N - 甲基 - D - Cha - Pro - OH 的制备

路线 G 步骤 b; 将实施例 8(b)的产物(4.0g, 10.2mmol)溶解于 THF (100mL)和水(50mL)。加入氢氧化锂一水合物(900mg, 21.5mmol), 并将反应在室温搅拌过夜。浓缩除去 THF, 然后用乙醚 (2 × 100mL) 洗涤混合物, 并用 6N HCl 将水相酸化至约 pH 3。用乙酸乙酯 (3 × 100mL) 萃取酸化的水相。合并有机萃取液, 用无水硫酸镁干燥, 真空浓缩滤液, 得到标题羧酸。

d) N - Boc - N - 甲基 - D - Cha - L - Pro - Trp(Boc) - CF₂CF₃ 的制备

路线 A 步骤 c; 氮气下将冷却到 -18 °C 并搅拌的实施例 8(c)的产物 (0.16g, 0.41mmol)的 EtOAc (3mL)溶液与 N - 甲基吗啉(45μL, 0.41mmol)接触, 接着加入氯甲酸异丁酯(53μL, 0.41mmol), 然后用类似于实施例 3 所述方式与实施例 2 的产物(0.18g, 0.41mmol)偶合, 得到标题化合物。

e) N - 甲基 - D - Cha - L - Pro - Trp(COOH) - CF₂CF₃, 单 (三氟乙酸盐) 的制备

路线 A 步骤 d; 采用类似实施例 4 所述方法用 CF₃CO₂H (2mL), Et₂O (3mL)和己烷(20mL)将实施例 8(d)的产物(154mg, 2.0mmol)脱保护, 得到标题化合物。

f) L - 脯氨酸, 3 - 环己基 - N - 甲基 - D - 丙氨酸 - N - [3,3,4,4,4

- 五氟 - 1 - (1H - 吡啶 - 3 - 基甲基) - 2 - 氧丁基] - , 单(三氟乙酸盐)
的制备

路线 A 步骤 e; 采用类似实施例 5 所述方法用 CHCl_3 (2mL) 和 CH_2Cl_2 - 己烷将实施例 8(e) 的产物 (73mg, 0.1mmol) 脱羧基化, 得到标题化合物。

5

在另一个实施方案中, 本发明为需要的患者提供了抑制凝血酶或治疗或预防凝血酶症状的方法, 包括给他们使用治疗有效量的式 (I) 或 (IA) 化合物。术语“凝血酶症状”指以血栓或栓塞形成为特征的疾病或症状, 包括但不限于冠状动脉和脑血管疾病, 深度静脉血栓, 肺栓塞形成, 中风 (起因于血栓或栓塞形成), 心肌梗塞形成, 不稳定或难以治愈的心绞痛, 血管形成术之后的冠状血栓形成, 心瓣再狭窄等。在这一领域的有经验人员很容易知道需要凝血酶抑制剂和/或抗凝剂治疗的情况。

10

特别被优选用于治疗凝血酶症状的式 (I) 和 (IA) 化合物包括下面表 5 和 6 中公开的那些化合物。治疗凝血酶症状最优选的化合物是 L - 脯氨酸, N - 甲基 - D - 苯丙氨酸基 - N - [3,3,4,4,4 - 五氟 - 1 - (1H - 吡啶 - 3 - 基甲基) - 2 - 氧丁基] - , 单(三氟乙酸盐)。

15

这里所用术语“患者”指温血动物如哺乳动物, 可以理解, 豚鼠, 狗, 猫, 大鼠, 小鼠, 马, 牛, 羊和人类都是属于该术语范围的哺乳动物的代表。

20

术语“治疗有效量”指给患者进行有效的持续灌注或单或多剂量给药的量, 以缩小血栓或栓塞的尺寸, 或降低凝血酶症状造成危害的程度, 与没有治疗预期达到的结果比较, 改善了疾病和/或延缓或预防疾病的发展。术语“治疗有效量”并不是指必须消除或治愈疾病。在确定治疗有效量或剂量时诊断者要考虑一系列因素, 包括但不限于: 哺乳动物的种类; 身体大小, 年龄和健康状况; 所涉及的疾病种类; 疾病所涉及的程度或严重程度; 各患者的反应; 所给药的具体化合物; 给药方式; 给药制剂的生物利用度特性; 所选择的剂量方案; 所用的辅助治疗方法; 及其它相关情况。

25

式 (I) 或 (IA) 化合物的治疗有效量预计在约 25 毫克每公斤体重每天 (mg/kg/day) 到约 200mg/kg/day 范围内变化。优选的量预计约为 40 - 70 mg/kg/day。对于静脉注射, 以匀速灌注时的最优选剂量约为 0.1 - 20

30

mg/kg/分钟。

本发明化合物是凝血酶的选择性抑制剂。相信，本发明化合物是通过抑制凝血酶表现药理学效果，因此延缓或防止凝血酶症状。所说症状包括冠状动脉和脑血管疾病，深度静脉血栓形成，肺栓塞形成，中风（起因于血栓或栓塞形成），心肌梗塞形成，不稳定或难以治愈的心绞痛，血管形成术之后的冠状血栓形成，心瓣再狭窄等。但是，应该理解，任何具体理论或建议性机理都不能限制本发明对其在最终实际应用中有效性的解释。

在对患有上述病症的患者进行有效治疗时，式（I）化合物可以各种能使有效量的化合物发挥其生物利用度的形式或方式给药，包括口服和非肠道途径。例如，式（I）化合物可以口服，皮下，肌肉内，静脉内，透皮，鼻内，直肠，局部等方式给药。一般优选口服或静脉内给药。制剂领域普通技术人员都可以根据针对所要治疗的病症所选择的化合物的特性，疾病的阶段和其它相关因素很容易地选择合适的给药形式和方式。
Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (1990).

本发明化合物可以独自或与可药用载体或赋形剂结合构成药物组合物形式给药，所用载体或赋形剂的比例和性质取决于所用化合物的溶解性和化学性质，所选择的给药途径和标准药物实践。有效量的本发明化合物也可以它们的可药用盐形式制剂和给药，例如，酸加成盐。为了稳定常采用结晶形式，以增加其溶解性等。

在另一实施方案中，本发明提供了含有一种或多种式（I）或（IA）化合物或与一种或多种惰性载体混合形成的组合物。这些组合物被用作，例如，测定标准，集装箱运输，或无论是需要抑制血液凝固如在储存整个血液时防止凝固，或在试验或储存时防止其它生物样品的凝固的常用物质。因此，这些凝血酶抑制剂可加到或用到含有或怀疑含有凝血酶并需要抑制血液凝固的任何介质中，例如，当哺乳动物的血液与下列物质接触时需要用到：血管移植物，斯坦特印模，整形外科修复替代物，心脏修复替代物和体外循环系统。

式（I）或（IA）化合物抗凝剂的用量是维持血液为液体状态的量。式（I）或（IA）化合物抗凝剂的用量一般约为 45 - 1000 μ M，优选的

式 (I) 或 (IA) 化合物抗凝剂的用量约为 90 - 300 μ M。惰性载体可以是不降解并且不与式 (I) 或 (IA) 化合物发生共价反应的任何物质。合适的情性载体的实例有水；水性缓冲液，如通常用于高效液相色谱 (HPLC) 分析的缓冲液；有机溶剂，如乙腈，乙酸乙酯，己烷等；以及可药用载体或赋形剂。

更具体地，本发明提供了含有治疗有效量的一种或多种式 (I) 或 (IA) 化合物或与其混合的一种或多种可药用载体或赋形剂的组合物。

这些药物组合物是用药物领域熟知的方法制备的。载体或赋形剂可以是固体，半固体或液体材料，它们被用作活性成分的载基或介质。合适的载体或赋形剂是本领域熟知的。药物组合物可被用于口服，非肠道或表面给药，并可以片剂，胶囊剂，栓剂，溶液，悬浮液等形式给药。

本发明化合物可以口服给药，例如，与惰性稀释剂或可食用载体一起给药。它们可以被封装在明胶胶囊中或被压缩成片剂。为了进行口服给药，本化合物可与赋形剂混合并以片剂，锭剂，囊剂，酏剂，悬浮剂，糖浆，糯米纸囊剂，咀嚼胶等形式给药。这些制剂至少含有 4 % 作为活性成分的本发明化合物，但也可以根据具体情况变化，一般占单位重量的 4 - 70 %。组合物中本化合物的量是要得到合适剂量的量。本发明优选的组合物和制剂是口服剂量单位形式含有 5.0 - 300 毫克本发明化合物。

片剂，丸剂，囊剂，锭剂等也可以含有一种或多种下列辅剂：粘合剂如微晶纤维素，黄耆胶或明胶；赋形剂如淀粉或乳糖；崩解剂如藻酸，预凝胶淀粉(Primogel)，玉米淀粉等；润滑剂如硬脂酸镁或 Sterotex；滑动剂 (glidant) 如胶态二氧化硅；及甜味剂如蔗糖或糖精，或调味剂如薄荷，水杨酸甲酯或柑橘调味剂。如果剂量单位形式是胶囊剂，除了含有上述成分之外，它还可以含有液体载体如聚乙二醇或油酸。其它剂量单位形式可以含有可以改善剂量单位物理形式的其它各种物质，例如，包衣物质。因此，片剂或丸剂可以被糖，紫胶或其它肠衣剂包裹。糖浆除了含有本化合物之外，还可以含有作为甜味剂的蔗糖，以及某些防腐剂，染色剂，色素和味素。用于制备这些各种组合物的材料应该是药物纯的，并且使用的量是无毒的。

为了进行非肠道治疗给药，本发明化合物可以被制成溶液或悬浮液。

这些制剂应该至少含有 0.1% 本发明化合物,但也可以在约 0.1 - 50 % 重量范围变化。在这种组合物中本化合物的量是能得到合适剂量的量。本发明优选的组合物和制剂是非肠道剂量单位形式含有 5.0 - 100 毫克本发明化合物的制剂。

5 本发明式 (I) 或 (IA) 化合物也可以局部给药。如果采用这种方式,载体中可以含有适当溶液,软膏或胶体。该胶体可以包括下列一种或多种物质: 软石脂,羊毛脂,聚乙二醇,蜂蜡,矿物油,稀释剂如水和醇,以及乳化剂和稳定剂。局部制剂可以含有式 (I) 或 (IA) 化合物或其可药用盐的浓度约为 0.1 - 10 % w/v (每单位体积的重量)。

10 溶液或悬浮液中可以包含一种或多种下列辅剂: 灭菌稀释剂如注射水,盐水溶液,不挥发性油,聚乙二醇,甘油,丙二醇或其它合成溶剂; 抗菌剂如苧醇或对苯甲酸(paraben)甲酯; 抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂如亚乙基二胺四乙酸; 缓冲剂如乙酸盐,柠檬酸盐或磷酸盐类物质,和用来调节毒性的化学剂如氯化钠或葡萄糖。这些非肠道制剂可以
15 被封装在玻璃或塑料制成的安瓿,一次性注射器或多剂量小瓶中。

体外抑制测定

本发明化合物对其它丝氨酸蛋白酶如胰蛋白酶是高选择性凝血酶抑制剂。例如,可根据 Tuppy 等人, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **329**,
20 p.278 (1962)所述方法,用分光光度测定法测定式 (I) 和 (IA) 化合物的凝血酶抑制活性,其中,通过测量在 405nm ($\epsilon = 10800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)吸收的增加测定对 - 硝基苯胺的释放。从 Sigma Chemical Co.购进的凝血酶得自人血浆,其活性用 NIH 为单位表示。一小瓶内含有 290 单位(具体活性 = 每 mg 蛋白质 3000 单位)冷冻粉末,使用时用 1mL 水重组。底物是十二烷基
25 肌氨酸钠 - 脯氨酸 - 精氨酸 - 对 - 硝基酰苯胺发色肽($K_M = 0.9\text{mM}$),缓冲剂是 0.1M Tris, pH 7.4 (最终体积为 1mL)。测定在约 30 °C 温度进行,每次测定需要 0.029NIH 单位酶。快速抑制剂的动力学特性用 Dixon 图描述,而慢 - 和/或紧密结合抑制剂特性用 Williams 和 Morrison 提出的数据分析技术测定。抑制剂的时间动力学特性用 Kitz & Wilson 图 (Kitz R.和
30 Wilson I.B.,《生物化学杂志》(J. Biol. Chem.), 237, 3245 - 3249

(1962) 描述。

式 (I) 和 (IA) 化合物对胰蛋白酶的抑制活性, 可根据上述 Tuppy 等人, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 329, p.278 (1962) 所述方法, 用分光光度测定法测定。从 Sigma Chemical Co. 购进的胰蛋白酶得自猪胰腺, 其活性用 Sigma 单位表示。胰蛋白酶源的具体活性是每 mg 蛋白质 15900Sigma 单位, 其中 1 单位被定义为经过苯甲酰-精氨酸-乙酯水解 (pH 7.6, 25 °C) 酶在 253nm 的吸收每分钟增加 0.001 的量。底物是苯甲酰-精氨酸-对-硝基酰苯胺肽 ($K_M = 1.7\text{mM}$), 缓冲剂是 0.05M Tris, 0.05M CaCl_2 , pH 7.8 (最终体积为 1mL)。测定在约 30 °C 温度进行, 每次测定需要 8 Sigma 单位酶。快速抑制剂的动力学特性用 Dixon 图描述, 而慢-和/或紧密结合抑制剂特性用 Williams 和 Morrison 提出的数据分析技术测定。抑制剂的时间动力学特性用 Kitz & Wilson 图描述。

表 2 汇总了所选本发明化合物对凝血酶相对于胰蛋白酶的选择性抑制能力。其中所用“TFA”指三氟乙酸。

表 2

化合物	Ki(nM)	Ki(nM)
	凝血酶	胰蛋白酶
TFA•HNMe-D-Phe-L-Pro-D, L-Trp-CF ₂ CF ₃	450	-100,000

抗凝血活性的测定

实验动物

用于研究的动物是购于 Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN 46229) 的雄性 Sprague-Dawley 鼠 (200 - 450 克)。

凝血测定

活化的部分血栓形成时间(aPTT)的测定采用试剂和 Dade Diagnostics, Inc. (Aguada, Puerto Rico 00602) 的方法进行。全部凝结时间用 MLA-Electra 750, MLA, Inc. (Pleasantville, NY 10570) 测量。加倍凝结时间 (ID2) 所需的浓度用直线 (简单的线性) 回归计算。表 3 说明了所选本发明化合物的抗凝血活性。

表 3

化合物	ID ₂ (μM)
TFA•HNMe-D-Phe-L-Pro-D, L-Trp-CF ₂ CF ₃	44.9

鼠血浆中活化的部分血栓形成时间(aPTT)的体内测量

5 在给动物注射了 TFA · HNMe-D-Phe-L-Pro-D,L-Trp-CF₂CF₃之后几个时间段对鼠血浆的活化的部分血栓形成时间(aPTT)进行测量。用于研究的动物是购于 Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN 46229) 的雄性 Sprague-Dawley 鼠 (200 - 450 克)。采用静脉注射 5mg/kg, 静脉注射 10mg/kg, 和静脉注射 30mg/kg 剂量的结果列于表 4。

10

表 4

TFA•HNMe-D-Phe-L-Pro-D, L-Trp-CF₂CF₃

对鼠 aPTT 的作用(n=2)

剂量(mg/kg)	途径*	aPTT [@] (秒)				
		给药之后的时间(min.)				
		0min.	5min.	15min.	30min.	60min.
5	i.v.	21.2	19.0	22.7	18.6	17.6
10	i.v.	18.8	17.4	18.0	15.7	12.6
30	i.p.	19.2	20.8	19.2	19.4	18.7

* i.v. = 静脉内; i.p. = 腹腔内。[@]aPTT = 活化的部分血栓形成时间。

15 特别令人感兴趣的本发明优选化合物 (I 和 IA) 是表 5 和 6 中具体指出的那些化合物。表 5 中公开的是优选的式 I 化合物。

表 5

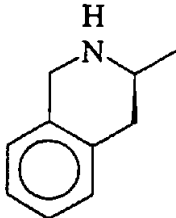
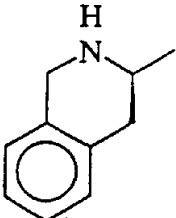
式 I 化合物

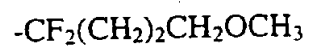
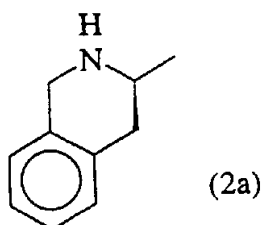
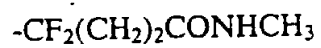
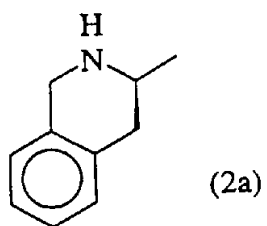
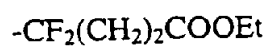
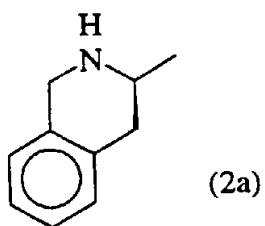
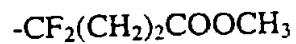
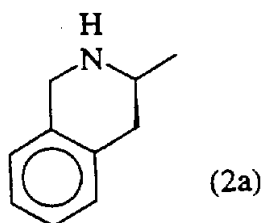
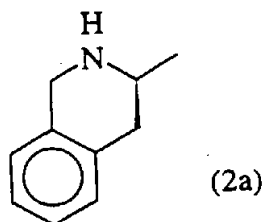
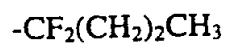
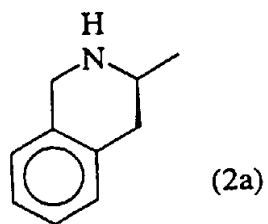
<i>R</i>	<i>A</i>	<i>n</i>	<i>X</i>
-CH ₃	苯基	1	-CF ₃
-CH ₃	苯基	0	-CF ₃
-CH ₃	环己基	1	-CF ₃
-CH ₃	环己基	0	-CF ₃
-H	苯基	1	-CF ₃
-H	苯基	0	-CF ₃
-H	环己基	1	-CF ₃
-H	环己基	0	-CF ₃
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ CF ₃
-CH ₃	苯基	0	-CF ₂ CF ₃
-CH ₃	环己基	1	-CF ₂ CF ₃
-CH ₃	环己基	0	-CF ₂ CF ₃
-H	苯基	1	-CF ₂ CF ₃
-H	苯基	0	-CF ₂ CF ₃
-H	环己基	1	-CF ₂ CF ₃
-H	环己基	0	-CF ₂ CF ₃
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
-CH ₃	苯基	0	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
-CH ₃	环己基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
-CH ₃	环己基	0	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
-H	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
-H	苯基	0	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
-H	环己基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
-H	环己基	0	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃
-CH ₃	苯基	0	-CF ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃
-CH ₃	环己基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃
-CH ₃	环己基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃

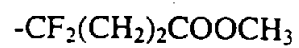
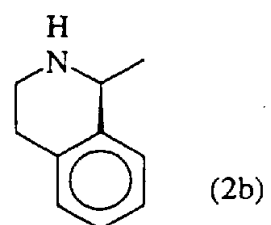
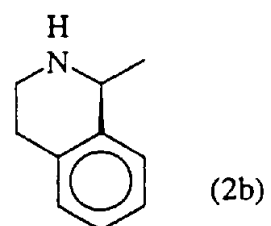
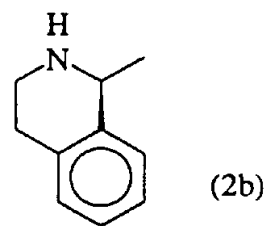
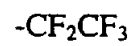
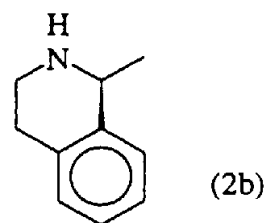
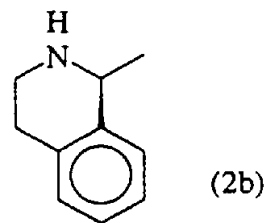
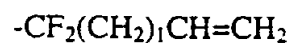
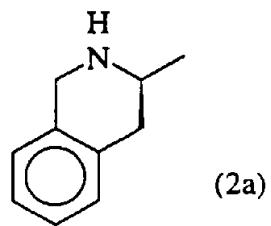
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ COOCH ₃
-CH ₃	环己基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₄ COOCH ₃
-H	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ COOEt
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ COOEt
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CONHCH ₃
-CH ₃	环己基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₄ CONHCH ₃
-H	苯基	0	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CONHCH ₃
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ OCH ₃
-H	苯基	0	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ OCH ₃
-H	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ OCH ₃
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ OCH ₃
-CH ₃	环己基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ OCH ₃
-CH ₃	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₁ CH=CH ₂
-H	苯基	0	-CF ₂ (CH ₂) ₁ CH=CH ₂
-H	苯基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₁ CH=CH ₂
-CH ₃	环己基	1	-CF ₂ (CH ₂) ₁ CH=CH ₂

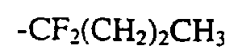
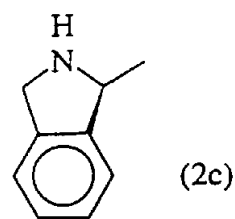
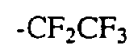
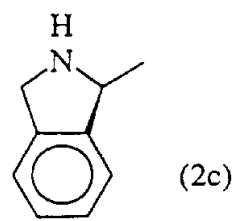
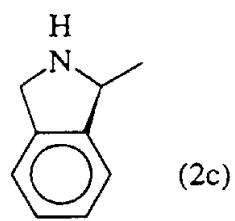
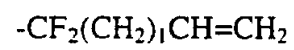
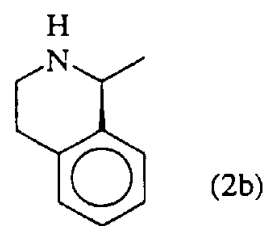
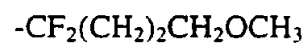
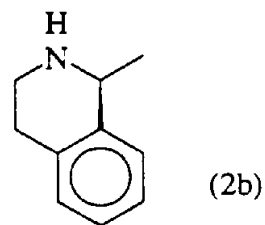
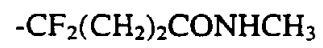
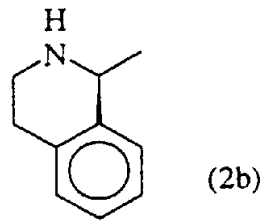
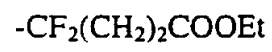
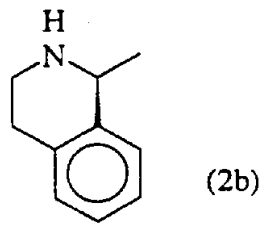
类似地，表 6 公开了优选的式 IA 化合物。

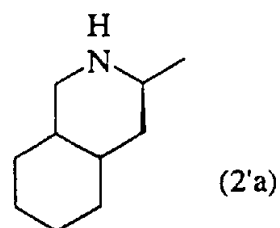
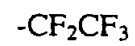
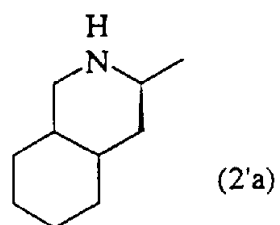
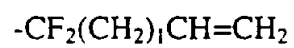
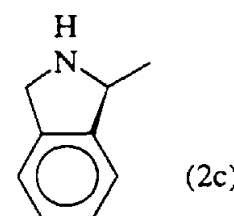
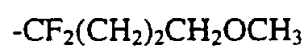
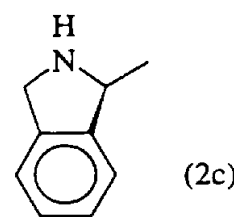
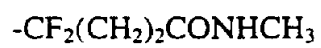
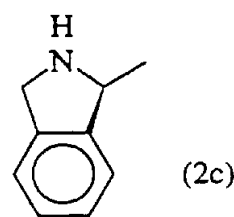
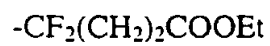
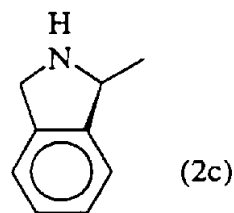
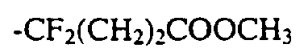
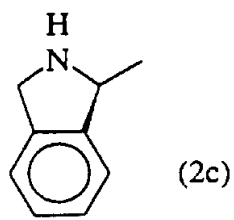
表 6
式 IA 化合物

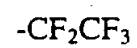
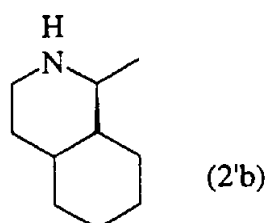
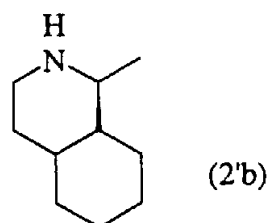
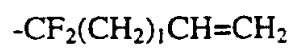
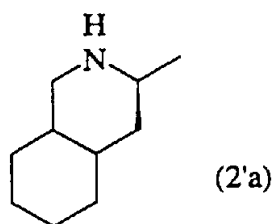
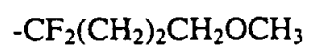
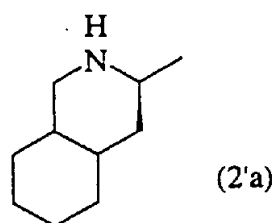
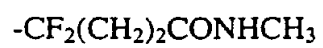
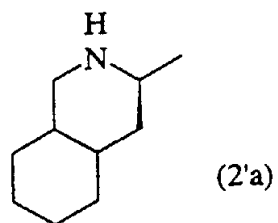
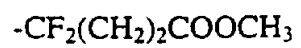
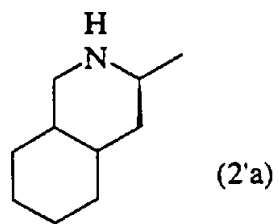
B	X
 (2a)	-CF ₃
 (2a)	-CF ₂ CF ₃

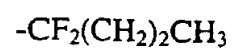
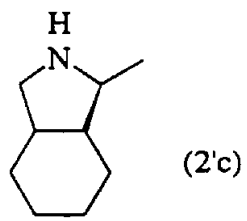
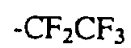
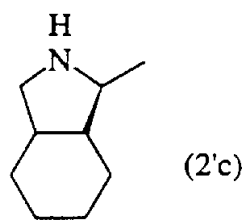
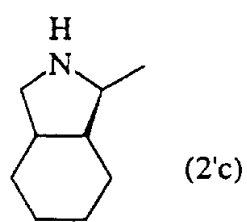
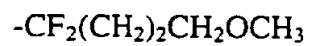
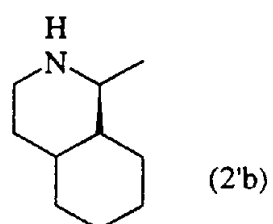
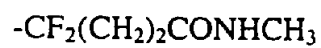
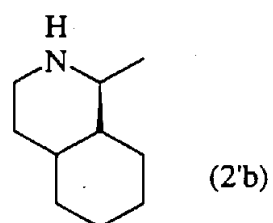
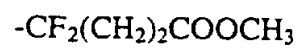
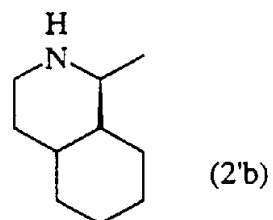
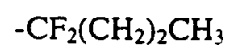
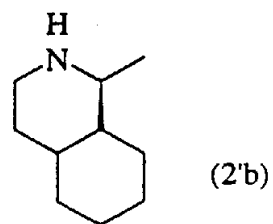




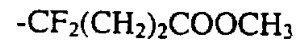
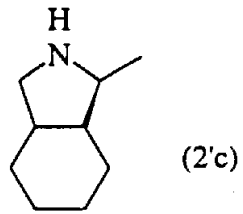




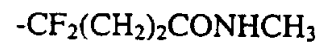
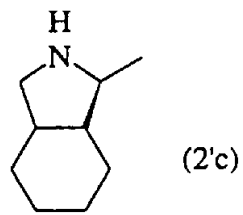




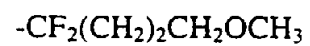
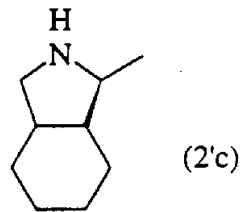
5



10



15



20

尽管本发明已经用具体实例加以说明，但仍应该理解它可以被进一步改进。本申请将包括任何变化，用途，或遵循本发明一般原理并且包括背离本公开但属于本发明领域已知或常规应用，并且同样适用于前面所说的基本特征，而且包括在所附权利要求书范围内。