



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115466260 B

(45) 授权公告日 2023. 10. 13

(21) 申请号 202211083509.8

A61K 31/4545 (2006.01)

(22) 申请日 2022.09.06

A61P 1/16 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115466260 A

(56) 对比文件

CN 1404478 A, 2003.03.19

CN 1681805 A, 2005.10.12

(43) 申请公布日 2022.12.13

CN 1681810 A, 2005.10.12

WO 2019195278 A1, 2019.10.10

(73) 专利权人 延边大学

地址 133002 吉林省延边朝鲜族自治州延吉市公园路977号

审查员 陈文瑞

(72) 发明人 金成华 廉丽花 南极星 孟雨晴

(74) 专利代理机构 北京知艺互联知识产权代理有限公司 16137

专利代理师 余青

(51) Int. Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

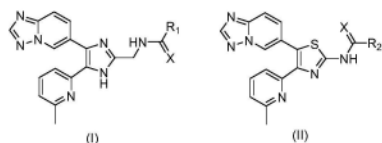
权利要求书2页 说明书21页 附图3页

(54) 发明名称

含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物及其制备方法和应用

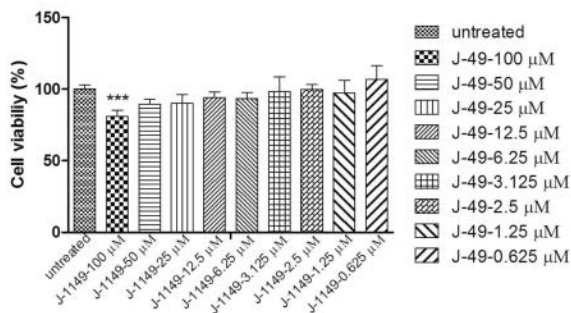
(57) 摘要

本发明公开了含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物,两种具有如下通式I和II所示结构的含氨基酸结构的咪唑和噻唑类化合物,及其在药学上可接受的盐或水合物:



为6元杂环, C₂或C₅烷基胺, C₂苯基胺; R₂为6元杂环, C₂或C₅烷基胺, C₂苯基胺; X为O或S。

J-1149-MTT



1. 一种含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物,其特征在于,所述咪唑和噻唑类衍生物选自:

(S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)哌啶-2-羧酰胺;

(R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)哌啶-2-羧酰胺;

(S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

(S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

(R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

(S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基丙酰胺;

(S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

(R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

(R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

(S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙硫酰胺;

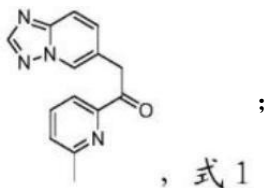
(R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙硫酰胺;

(S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊硫酰胺;

(R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊硫酰胺及其药学上可接受的盐。

2. 一种权利要求1所述的含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物的制备方法,其特征在于,所述咪唑类衍生物的制备方法包括以下步骤:

S1将式1所示化合物与氢溴酸在二甲基亚砷中发生氧化反应,得到1-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)乙烷-1,2-二酮(式2);



S2将式2与2-(1,3-二氧异吲哚-2-基)乙醛进行发生环合反应,得到2-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)二氢吲哚-1,3-二酮(式4);

S3将式4与水合肼发生脱保护反应,得到4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲胺(式5);

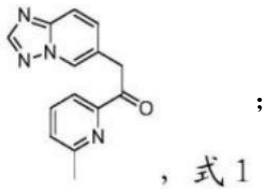
S4将式5与式6或式7在六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷PyBOP和二异丙基乙胺DIPEA存在下发生缩合反应,得到权利要求1所述的含酰胺结构的咪唑类化合物;



示。

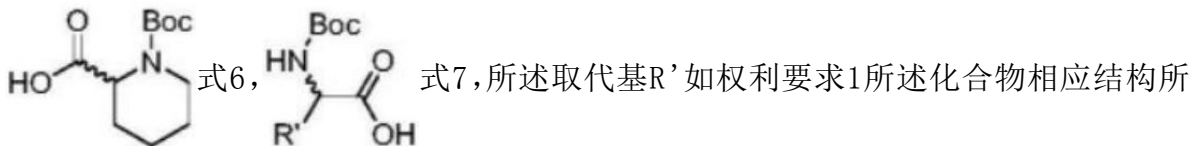
3. 一种权利要求1所述的含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物的制备方法,其特征在于,所述噻唑类衍生物的制备方法包括以下步骤:

S1将式1所示的化合物与溴水发生卤代反应,得到2-溴-1-(6-甲基吡啶-2-基)-2-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)乙烷-酮(式8);



S2将式8与硫脲发生环合反应,得到4-(6-甲基吡啶-2-基)-5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-噻唑-2胺(式9);

S3将式9与式6或式7在六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷PyBOP和二异丙基乙胺DIPEA存在下发生缩合反应,得到权利要求1所述的含酰胺结构的噻唑类化合物;



示。

4. 一种ALK5激酶抑制剂,其特征在于,所述抑制剂包括权利要求1所述的含氨基酸结构的咪唑和噻唑类化合物。

含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物合成的技术领域,具体涉及一种含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 转化生长因子(TGF- β)是具有多种功能、多向调节的蛋白质,属于一类细胞因子超家族,其中包括TGF- β s (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3)、活化素(activins)、抑制素(inhibins)和骨形态发生蛋白(BMPs)。

[0003] TGF- β 的信号传导需要通过两种类型的单跨膜丝氨酸(serine)/苏氨酸(threonine)受体激酶,这两种受体激酶分别为type I受体和type II受体(简称,T β R-I和T β R-II)。首先TGF- β 与type II受体结合成二聚体,接着募集两个type I(或活化素受体样激酶5,简称,ALK5)受体。被TGF- β 活化的type II受体使ALK5在GS区域的丝氨酸和苏氨酸残留物过磷酸化,产生Smad蛋白并活化ALK5。被活化的ALK5使Smad2和Smad3蛋白磷酸化,从而与受体分离,接着与共同调节剂Smad4接合成异聚物。这种Smad复合物转移到核内,与特异性DNA结合来调节细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的基因转录因子的表达,促进ECM的过量生成及沉积。TGF- β 信号的激活导致多种人类疾病的发生,如乳腺癌、血液系统恶性肿瘤及纤维化等。由此可见,抑制ALK5与底物Smad2和Smad3的结合或抑制ALK5对Smad2和Smad3的磷酸化作用,进而阻断TGF- β 信号通路的非常有效的方法。

[0004] 肝纤维化(hepatic fibrosis)是一个可逆性的病理生理过程,又是各种慢性致病因素引起炎症后的肝损伤和组织修复过程中的代偿反应。肝纤维化也是慢性肝病向肝硬化发展的必要阶段,其特点是肝内ECM成分过度、异常沉积。(M Parola, M Pinzani. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues, Mol. Asp. Med. 2019, 65, 37-55.)根据最新的数据,全球范围内乙肝癌和肝硬化死亡的人数在不断增加,而且由于肝癌通常要到晚期才被诊断出来,因此死亡率很高。此外,我国是病毒性肝炎的高发国家,约有1.2亿乙型肝炎感染者。因此,在肝纤维化发展为肝硬化甚至肝癌之前进行治疗就显得尤为重要和紧迫。

[0005] 近年的研究表明,急、慢性肝损伤都会导致肝纤维化,进一步发展会导致肝硬化、肝功能衰竭及门脉高压或肝癌,最终导致死亡。目前只有肝移植来延续肝癌晚期患者的生命(W Chen, R Zheng, PD Baade, et al. Cancer statistics in China, CA Cancer J Clin. 2016, 66, 115-132.)。但是由于捐献器官的数目有限,只有很少一部分人适用。

[0006] 近几十年来,抗肝纤维化药物的研究取得了一定的进展,目前临床上多用中药或中成药进行抗肝纤维化的治疗,这些药物存在毒性大、选择性低、易产生耐药性等缺点。

[0007] 从上述内容可知,TGF- β 在组织纤维化中起重要作用,如ECM合成、活性氧(Reactive oxygen species, ROS)生成、肌成纤维细胞激活等。胶原蛋白(Collagen)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的分泌是判断纤维化程度的主要标志,它们会通过纤维化细胞因子和其细胞内信号通路,调节TGF- β 诱导的Smad激活和ROS信号。

[0008] TGF- β 1是促进肝纤维化最有效的细胞因子,通过促进肝星状细胞中ECM的产生及沉积,而引起肝纤维化,其中TGF- β /Smad信号传导通路介导的ECM生成是促进肝脏内胶原沉积的重要途径。

[0009] 人体内存在多种氨基酸,这些氨基酸都是人体必须的,它们是组成蛋白质的重要部分。因此,所设计的化合物结构中,引入氨基酸可以降低毒性,也可以提高生物活性。

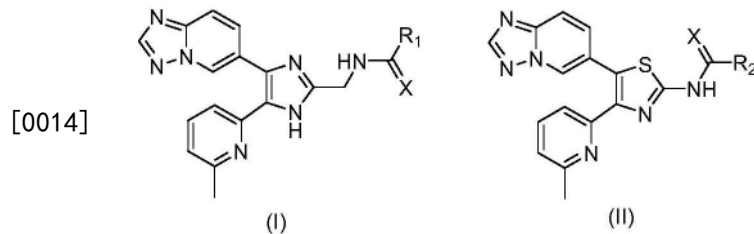
[0010] 由于肝纤维化的主要特征是I型胶原蛋白为主的ECM成分过度沉积,故抑制I型胶原蛋白表达是目前抗纤维化治疗的重要策略之一。因此,开发低毒、强效地抑制ALK5激酶和胶原沉积的药物,必将在临床上有着良好的应用前景。

发明内容

[0011] 针对现有技术的不足,本发明旨在提供一种含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物及其制备方法和应用。

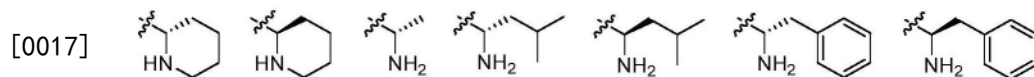
[0012] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0013] 含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物,两种具有如下通式I和II所示结构的含氨基酸结构的咪唑和噻唑类化合物,及其在药学上可接受的盐或水合物:

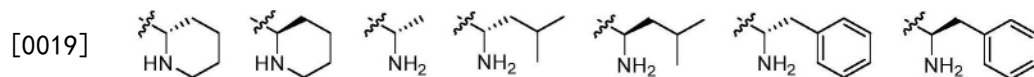


[0015] 以上通式中: R_1 为6元杂环, C_2 或 C_5 烷基胺, C_2 苯基胺; R_2 为6元杂环, C_2 或 C_5 烷基胺, C_2 苯基胺; X 为O或S。

[0016] 需要说明的是,所述 R_1 为下列之一:



[0018] 需要说明的是,所述 R_2 为下列之一:



[0020] 需要说明的是,所述咪唑和噻唑类衍生物包括:

[0021] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)哌啶-2-羧酰胺;

[0022] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)哌啶-2-羧酰胺;

[0023] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基丙酰胺;

[0024] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

[0025] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

[0026] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

[0027] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

[0028] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)哌啶-2-羧酰胺;

[0029] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)哌啶-2-羧酰胺;

[0030] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基丙酰胺;

[0031] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

[0032] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

[0033] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

[0034] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

[0035] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙硫酰胺;

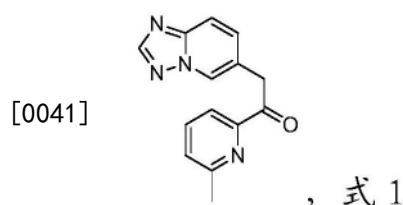
[0036] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙硫酰胺;

[0037] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊硫酰胺;

[0038] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊硫酰胺及其药学上可接受的盐或水合物。

[0039] 本发明提供一种含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物的制备方法,咪唑类衍生物的制备方法包括以下步骤:

[0040] S1将式1所示化合物与氢溴酸在二甲基亚砜中发生氧化反应,得到1-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)乙烷-1,2-二酮(式2);



[0042] S2将式2与2-(1,3-二氧异吲哚-2-基)乙醛进行发生环合反应,得到2-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)二氢吲哚-1,3-二酮(式4);

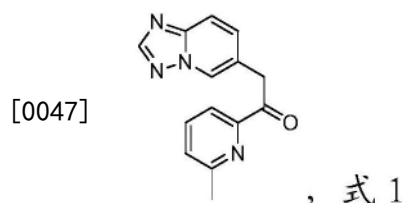
[0043] S3将式4与水合肼发生脱保护反应,得到4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-

基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲胺(式5)；

[0044] S4将式5与式6或式7在六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)和二异丙基乙胺(DIPEA)存在下发生缩合反应,得到结构式如通式I所示的含酰胺结构的咪唑类化合物。

[0045] 本发明提供一种含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物的制备方法,噻唑类衍生物的制备方法包括以下步骤:

[0046] S1将式1所示的化合物与溴水发生卤代反应,得到2-溴-1-(6-甲基吡啶-2-基)-2-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)乙烷-酮(式8)；



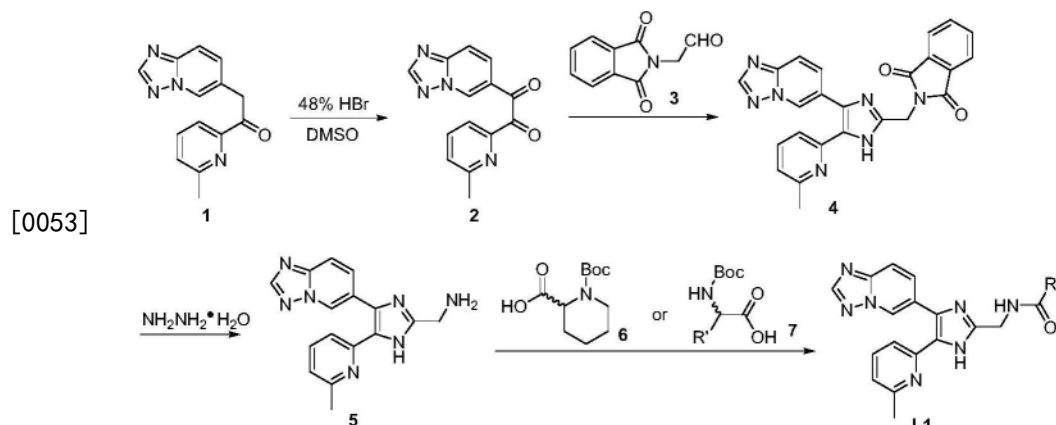
[0048] S2将式8与硫脲发生环合反应,得到4-(6-甲基吡啶-2-基)-5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-噻唑-2-胺(式9)；

[0049] S3将式9与式6或式7在六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)和二异丙基乙胺(DIPEA)存在下发生缩合反应,得到结构式如通式II所示的含酰胺结构的噻唑类化合物。

[0050] 根据以上本发明的技术方案,本发明还提供一种ALK5激酶抑制剂,所述抑制剂包括含氨基酸结构的咪唑和噻唑类化合物。

[0051] 进一步的,一种ALK5激酶抑制剂的用途,所述抑制剂在抑制肝纤维化药物中的应用。

[0052] 发明人发现,利用本发明上述实施例的方法快速有效地制备式I所示化合物,且合成路线短、环境友好、目标产物的收率和纯度较高,原料易得、操作及后处理简单、适合工业化生产。在本发明的实施例中,式I-1所示化合物的合成路线为:



下面对在本发明的实施例中所采用的制备式I-1所示化合物的一般方法进行描述:

[0054] 步骤(1):所述化合物为1-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)乙烷-1,2-二酮(式2所示化合物)的制备。

[0055] 根据本发明的具体实施例,在步骤(1)中,所述1-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-

6-基)-2-(6-甲基-2-吡啶基)乙酮(式1所示化合物1)与所述式2所示化合物在二甲基亚砜(DMSO)中进行反应,所述二甲基亚砜中含有HBr。

[0056] 根据本发明的具体示例,在步骤(1)中,在70°C时,使所述式1所示化合物与HBr接触1.5小时,由此可以提高反应效率的同时,使二者充分反应,进而最终提高式2化合物的产率。根据本发明的具体实施例,在步骤(1)中,所述式1化合物和48%HBr之间的摩尔比为1:2-5。根据发明的具体实施例,优选为1:3.4。进而可以提高式2所示化合物产率的同时,节省原料成本。

[0057] 根据本发明的一个具体实施例,式2所示化合物的制备,具体可以按照下列步骤进行:将式1所示化合物溶于DMSO中,向其中滴加48%HBr,将混合物在70°C下,搅拌反应1.5小时。薄层层析法(TLC)检测反应完毕后,移入室温中,待其冷却到室温后,将其移至冰浴中,并进行饱和碳酸氢钠溶液进行中和。将混合物用二氯甲烷进行萃取几次,合并有机层。有机层依次用蒸馏水和饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,减压浓缩得粗产品,为式2所示化合物。

[0058] 步骤(2):所述化合物为2-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)二氢吡啶-1,3-二酮(式4所示化合物)的制备。

[0059] 根据本发明的具体实施例,在步骤(2)中,在有机溶剂中存在醋酸铵时,使所述式2所示化合物与2-(1,3-二氧异吡啶-2-基)乙醛(式3所示化合物3)反应。根据本发明的具体示例,有机溶剂可以为选自甲醇、乙醇、二甲基亚砜、四氢呋喃、甲基叔丁基醚(MTBE)中的至少一种。优选MTBE和甲醇的混合溶剂。由此可以为式2所示化合物和式3所示化合物提供良好的反应环境,进而提高式4所示化合物的收率。

[0060] 根据本发明的具体示例,在50°C时,使所述式2所示化合物与所述式3所示化合物接触。通过选择适宜的反应温度,可以进一步提高制备式4所示化合物的收率。根据本发明的另一个具体示例,在步骤(2)中,式2所示化合物、式3所示化合物和醋酸铵的摩尔比可以为1:1-3:5-20。根据发明的具体实施例,优选为1:1.5:10。进而可以提高式2所示化合物产率的同时,节省原料成本。

[0061] 根据本发明的一个具体实施例,式4所示化合物的制备,具体可以按照下列步骤进行:在室温下,将式2所示化合物溶于甲醇中,向其中依次加入醋酸铵、式3所示化合物和MTBE。将混合物在50°C条件下加热10小时,然后冷却至室温。用饱和碳酸氢钠溶液将反应混合物的pH调节至8。将反应混合物用乙酸乙酯进行萃取,并将合并后的有机层用水和饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,减压浓缩得到粗产品,为式4所示化合物。

[0062] 步骤(3):所述化合物为4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲胺(式5所示化合物)的制备。

[0063] 根据本发明的具体实施例,在步骤(3)中,有机溶剂存在下,使所述式4和水合肼反应。根据本发明的具体示例,有机溶剂可以为选自甲醇、乙醇、丙醇、丁醇中的至少一种。优选乙醇。由此可以为式4和水合肼提供良好的反应环境,进而提高式5所示化合物的收率。

[0064] 根据本发明的具体示例,在回流时,使所述式4所示化合物与水合肼反应。通过选择适宜的反应温度,可以进一步提高制备式5所示化合物的收率。根据本发明的另一个具体示例,在步骤(2)中,式4所示化合物和水合肼的摩尔比可以为1:20。根据发明的具体实施例,优选为1:10。进而可以提高式5所示化合物产率的同时,节省原料成本。

[0065] 根据本发明的一个具体实施例,式5所示化合物的制备,具体可以按照下列步骤进行:在室温下,向搅拌的式5所示化合物中加入乙醇和水合肼。将混合物加热回流5小时后,冷却至室温。用丙酮淬灭反应混合物中的过量水合肼,并减压浓缩,经柱层析分离得到产物,为式5所示化合物。

[0066] 步骤(4):所述化合物为N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)乙酰胺(式I-1)的制备。

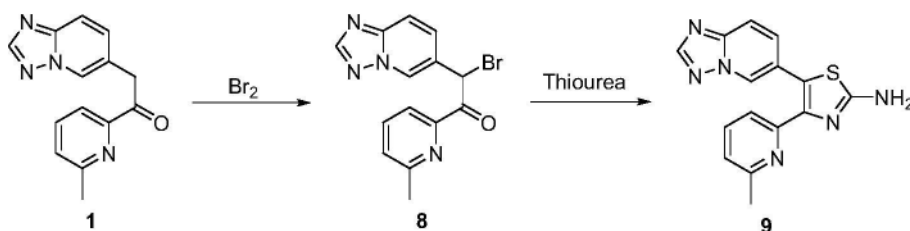
[0067] 根据本发明的具体实施例,在步骤(4)中,有机溶剂、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)、二异丙基乙胺(DIPEA)存在下,使所述式5与所述式6所示化合物或所述式7所示化合物反应。根据本发明的具体示例,有机溶剂可以选自二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、四氢呋喃,二氯甲烷中的至少一种。优选二甲基甲酰胺。由此可以为式5与式6或式7提供良好的反应环境,进而提高式I-1所示化合物的收率。

[0068] 根据本发明的具体示例,在室温下,使所述式5所示化合物与所述式6所示化合物或所述式7所示化合物反应。通过选择适宜的反应温度,可以进一步提高制备式I-1化合物的收率。根据本发明的另一个具体示例,在步骤(4)中,式5所示化合物、所述式6所示化合物或所述式7所示化合物、PyBOP和DIPEA的摩尔比可以为1:1-3:1-3:1-3。根据发明的具体实施例,优选为1:1:1.1:2。进而可以提高式I-1所示化合物产率的同时,节省原料成本。

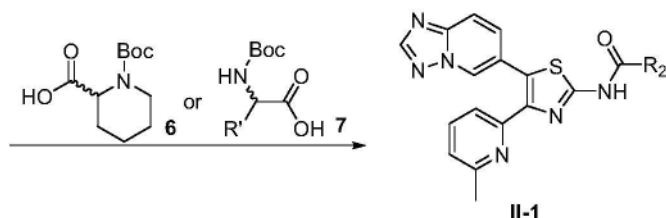
[0069] 根据本发明的一个具体实施例,式I-1所示化合物的制备,具体可以按照下列步骤进行:在室温下,将式5所示化合物溶于二甲基甲酰胺,向其中依次加入所述式6所示化合物或所述式7所示化合物、PyBOP和DIPEA,加完后搅拌6小时。将反应混合物用乙酸乙酯溶解后,依次用饱和碳酸氢钠、水和饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,减压浓缩,经柱层析分离得到含有Boc保护的中间体。

[0070] 将中间体溶于二氯甲烷后,向其中滴加三氟乙酸,搅拌1小时。将反应混合物浓缩后,用饱和碳酸氢钠中和。将混合物用乙酸乙酯萃取,并将合并后的有机溶剂依次用水和饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,减压浓缩得产品,为I-1所示化合物。

[0071] 在本发明的实施例中,式II-1所示化合物的合成路线为:



[0072]



[0073] 下面对在本发明的实施例中所采用的制备式II-1所示化合物的一般方法进行描述:

[0074] 步骤(1):所述化合物为2-溴-1-(6-甲基吡啶-2-基)-2-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)乙烷-酮(式8所示化合物)的制备。

[0075] 根据本发明的具体实施例,在步骤(1)中,式1所示化合物与溴水在1,4-二氧六环中反应。根据本发明的具体示例,有机溶剂可以选自二甲基甲酰胺、1,4-二氧六环、四氢呋喃、乙醚中的至少一种。优选1,4-二氧六环。由此可以为式1提供良好的反应环境,进而提高式8所示化合物的收率。

[0076] 根据本发明的具体示例,在步骤(1)中,在常温下,使所述式1所示化合物与溴水反应。通过选择适宜的反应温度,可以进一步提高制备式8所示化合物的收率。根据本发明的另一个具体示例,在步骤(1)中,式1所示化合物与溴水的摩尔比可以为1:0.9-1.3。根据本发明的具体实施例,优选为1:1.1。进而可以提高式8所示化合物产率的同时,节省原料成本。

[0077] 根据本发明的具体实施例,式8所示化合物的制备,具体可以按照下列步骤进行:将式1所示化合物溶于1,4-二氧六环中,向其中滴加溴水,将混合物保持常温下搅拌1小时。将反应混合物用饱和碳酸氢钠溶液进行中和,用乙酸乙酯萃取。合并的有机层依次用水、饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,减压浓缩,经柱层析分离得到产物,为式8所示化合物。

[0078] 步骤(2):所述化合物为4-(6-甲基吡啶-2-基)-5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-噻唑-2-胺(式9所示化合物)的制备。

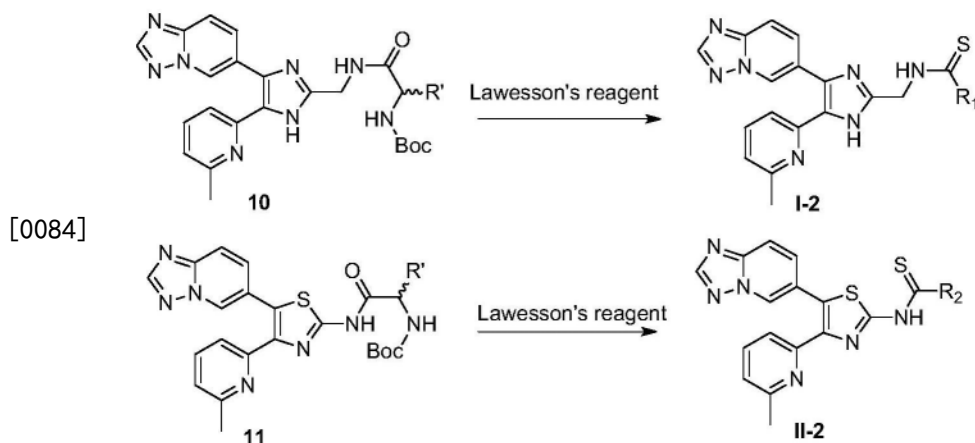
[0079] 根据本发明的具体实施例,在步骤(2)中,式8所示化合物与硫脲在二甲基甲酰胺中反应。根据本发明的具体示例,有机溶剂可以选自二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、1,4-二氧六环、四氢呋喃中的一种。优选二甲基甲酰胺。由此可以为式8提供良好的反应环境,进而提高式9所示化合物的收率。

[0080] 根据本发明的具体示例,在步骤(2)中,在120℃时,使所述式8所示化合物与硫脲反应。通过选择适宜的反应温度,可以进一步提高制备式9所示化合物的收率。根据本发明的另一个具体示例,在步骤(2)中,式8所示化合物与硫脲的摩尔比可以为1:1-4。根据本发明的具体实施例,优选为1:2.1。进而可以提高式9所示化合物产率的同时,节省原料成本。

[0081] 根据本发明的一个具体实施例,式9所示化合物的制备,具体可以按照下列步骤进行:将式8所示化合物溶于二甲基甲酰胺中,向其中加入硫脲,将混合物在120℃下,搅拌2个小时。将反应液冷却至0℃后,向混合物中加入冰水,固体析出,过滤,水洗,得到棕红色的产物,为式9所示化合物。

[0082] 步骤(3):所述化合物为N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)噻唑-2-基)乙酰胺(式II-1)的制备。此化合物的制备方法与式I-1所示化合物的方法相同。

[0083] 在本发明的实施例中,式I-2和II-2所示化合物的合成路线为:



[0085] 步骤(1):所述化合物为N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)硫代乙酰胺(式I-2所示化合物)的制备。

[0086] 根据本发明的实施例,在步骤(1)中,叔-丁基((1-(((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基甲酸酯(式10)与劳森试剂反应。根据本发明的具体示例,有机溶剂可以选自1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、乙醚中的至少一种。优选1,2-二甲氧基乙烷。由此可以为式10所示化合物提供良好的反应环境,进而提高式I-2所示化合物的收率。

[0087] 根据本发明的具体示例,在步骤(1)中,在85°C下,加压瓶中使式10所示化合物与劳森试剂反应。通过选择适宜的反应温度,可以进一步提高制备式I-2所示化合物的收率。根据本发明的另一个具体示例,在步骤(1)中,式10所示化合物与劳森试剂的摩尔比可以为1:0.9-1.3。根据发明的具体实施例,优选为1:1。进而可以提高式I-2所示化合物产率的同时,节省原料成本。

[0088] 根据本发明的一个具体实施例,I-2所示化合物的制备,具体可以按照下列步骤进行:在室温下,将置于加压瓶中的式10所示化合物溶于1,2-二甲氧基乙烷中,向其中加入劳森试剂,将混合物在85°C下,搅拌反应12小时。冷却至室温后,减压浓缩,并将得到的经柱层析分离得到含有Boc保护的中间体。

[0089] 将中间体溶于二氯甲烷后,向其中滴加三氟乙酸,搅拌1小时。将反应混合物浓缩后,用饱和碳酸氢钠中和。将混合物用乙酸乙酯萃取,并将合并后的有机溶剂依次用水和饱和食盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,减压浓缩得产品,为I-2所示化合物。

[0090] 步骤(2):所述化合物为N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)硫代乙酰胺(式II-2所示化合物)的制备此化合物的制备方法与式I-1所示化合物的方法相同。

[0091] 本发明有益效果在于,本发明所述含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物具有转化生长因子 β 1受体(ALK5)激酶抑制活性,能够抑制TGF- β 诱导的肝星状细胞中胶原沉积,其可用于治疗肝纤维化,有良好的医学前景。

附图说明

[0092] 图1为MTT法观察不同浓度下化合物J-1149对LX-2细胞存活率的影响。

[0093] 图2为MTT法观察不同浓度下化合物J-1155对LX-2细胞存活率的影响。

[0094] 图3为MTT法观察不同浓度下化合物J-1156对LX-2细胞存活率的影响。

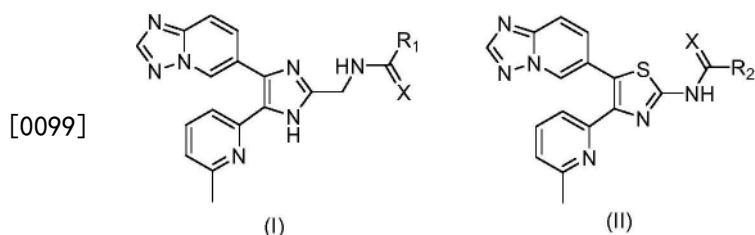
[0095] 图4为免疫荧光法观察不同浓度下化合物J-1149对TGF- β 诱导的肝纤维化标志物 α -SMA表达的影响。

[0096] 图5为免疫荧光法观察不同浓度下化合物J-1155和J-1156对TGF- β 诱导的肝纤维化标志物 α -SMA表达的影响。

具体实施方式

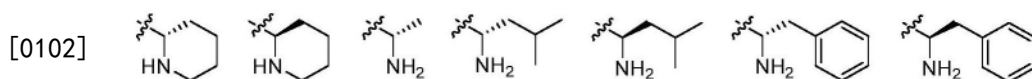
[0097] 以下将对本发明作进一步的描述,需要说明的是,以下实施例以本技术方案为前提,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围并不限于本实施例。

[0098] 本发明为含氨基酸结构的咪唑和噻唑类衍生物,两种具有如下通式I和II所示结构的含氨基酸结构的咪唑和噻唑类化合物,及其在药学上可接受的盐或水合物:

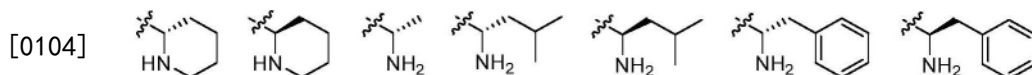


[0100] 以上通式中: R_1 为6元杂环, C_2 或 C_3 烷基胺, C_2 苯基胺; R_2 为6元杂环, C_2 或 C_3 烷基胺, C_2 苯基胺; X 为O或S。

[0101] 需要说明的是,所述 R_1 为下列之一:



[0103] 需要说明的是,所述 R_2 为下列之一:



[0105] 需要说明的是,所述咪唑和噻唑类衍生物包括:

[0106] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)哌啶-2-羧酰胺;

[0107] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)哌啶-2-羧酰胺;

[0108] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基丙酰胺;

[0109] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

[0110] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

[0111] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

[0112] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

[0113] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)哌啶-2-羧酰胺;

[0114] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)哌啶-2-羧酰胺;

[0115] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基丙酰胺;

[0116] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

[0117] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺;

[0118] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

[0119] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺;

[0120] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙硫酰胺;

[0121] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙硫酰胺;

[0122] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊硫酰胺;

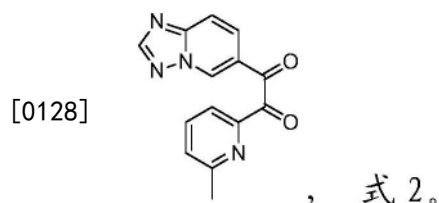
[0123] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊硫酰胺及其药学上可接受的盐或水合物。

[0124] 实施例1:化合物2的制备

[0125] 将化合物1 (6.00g, 23.80mmol) 溶于二甲基亚砜 (216mL) 中, 向其中滴加48% HBr (13.7mL), 将混合物在70℃下, 搅拌反应1.5小时。薄层层析法检测反应完毕后, 将反应液冷却至室温, 在冰浴中用饱和碳酸氢钠溶液进行中和。将混合物用二氯甲烷 (3X250mL) 萃取, 合并有机溶剂。有机溶剂依次用水 (2X250mL) 和食盐水 (250mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得黄色固体化合物2 (5.19g)。

[0126] 化合物2 1-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)乙烷-1,2-二酮

[0127] 收率: 82%; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.14 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.16 (dd, J=9.0Hz, 1H), 8.06 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.94-7.81 (m, 2H), 7.44 (d, J=7.8Hz, 1H), 2.52 (s, 3H)。



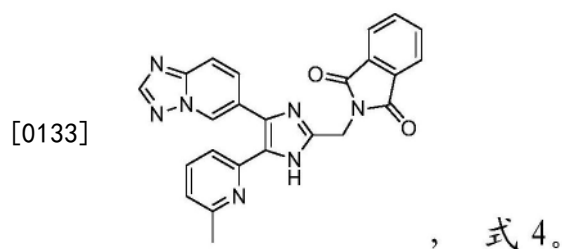
[0129] 实施例2: 化合物4的制备

[0130] 在室温下, 将化合物2 (5.99g, 22.50mmol) 和甲醇 (120mL) 置于500mL圆底烧瓶中,

依次加入醋酸铵(17.16g, 222.63mmol)、化合物3(6.27g, 33.16mmol)和MTBE(120mL)。将混合物在50℃下加热10小时,然后冷却至室温。用饱和碳酸氢钠溶液将反应混合物的pH调节至8。将混合物用乙酸乙酯(2X300mL)进行萃取,并将合并后的有机层用水(150mL)和饱和食盐水(150mL)各洗涤一次,用无水硫酸钠干燥,过滤,减压干燥后得粗品。将其使用甲醇和二氯甲烷(1:50)作为洗脱剂通过柱层析得到黄色固体化合物4(6.17g)。

[0131] 2-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)二氢吲哚-1,3-二酮

[0132] 收率63%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 9.63 (br s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.95 (d, J=6.0Hz, 2H), 7.89 (br s, 2H), 7.79 (br s, 2H), 7.73-7.63 (m, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.33 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.20 (d, J=9.0Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 2.51 (s, 3H) .

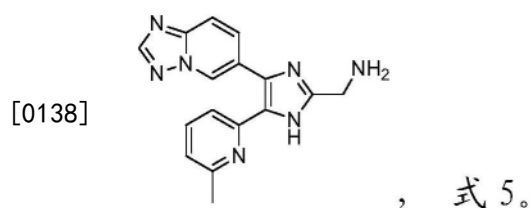


[0134] 实施例3:化合物5的制备

[0135] 在室温下,将化合物4(3.50g, 11.46mmol)溶于乙醇(210mL)中,加入90%水合肼(114.6mmol),回流5小时。将反应混合物冷却至室温,用丙酮(51mL)处理淬灭过量的水合肼,减压浓缩,得粗品。将其使用甲醇、二氯甲烷和氨水(1:100:0.1)作为洗脱剂通过柱层析得到黄色固体化合物5(1.57g)。

[0136] 4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲胺

[0137] 收率:64%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 9.54 (br s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.08 (dd, J=9.0, 3.0Hz, 2H), 7.88 (dd, J=9.0, 3.0Hz, 2H), 7.75-7.66 (m, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.17 (d, J=9.0Hz, 1H), 3.96 (s, 2H), 2.51 (s, 3H) .

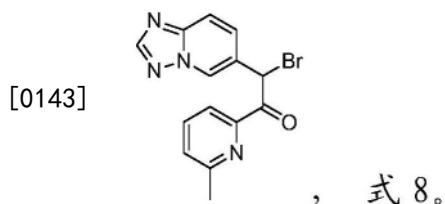


[0139] 实施例4:化合物8的制备

[0140] 将化合物1(8.54g, 25.8mmol)溶于1,4-二氧六环(33mL)中,向其中滴加溴水(28.45mmol, 1.46mL),搅拌1个小时。将反应混合物用饱和碳酸氢钠溶液进行中和,用乙酸乙酯(2X250mL)萃取。合并的有机层依次用水(100mL)和饱和食盐水(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得粗品。将其使用乙酸乙酯和石油醚(1:2)作为洗脱剂通过柱层析得到棕色固体化合物8(7.49g)。因化合物8不稳定,干燥后直接进行化合物9的合成。

[0141] 2-溴-1-(6-甲基吡啶-2-基)-2-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)乙烷-酮

[0142] 收率:67%

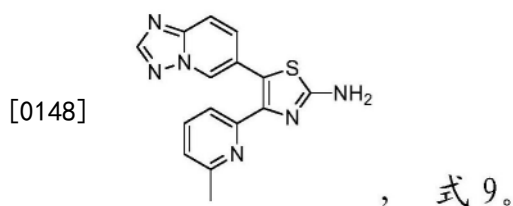


[0144] 实施例5:化合物9的制备

[0145] 将化合物8 (5.73g, 17.30mmol) 溶于二甲基甲酰胺 (46mL) 中, 向其中加入硫脲 (2.76g, 36.30mmol), 将混合物在120℃下搅拌2小时。将反应混合物冷却至0℃后, 向混合物中加入冰水, 固体析出, 过滤, 水洗, 得到红棕色的固体化合物9 (5.08g)。

[0146] 4-(6-甲基吡啶-2-基)-5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-噻唑-2-胺

[0147] 收率: 95%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 8.51 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.64 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.51-7.47 (m, 2H), 7.31 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.06 (d, J=6.0Hz, 1H), 2.35 (s, 3H)。



[0149] 实施例6: 式I-1和II-1所示化合物的制备

[0150] 以式I-1和式II-1为例介绍N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)乙酰胺(式I-1-1-I-1-7)和N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)噻唑-2-基)乙酰胺(式II-1-1-II-1-7)化合物的合成通法。

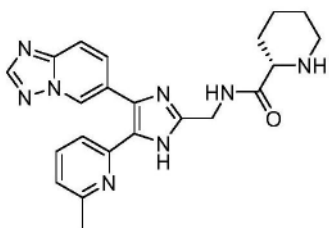
[0151] 将化合物5或9 (0.24mmol) 溶于二甲基甲酰胺 (3mL) 中, 向其中依次加入所述式6或7所示化合物 (0.24mmol)、PyBOP (0.14g, 0.27mmol)、DIPEA (0.49mmol, 0.09mL), 搅拌6小时。将反应混合物溶于乙酸乙酯 (30mL) 后, 依次用饱和碳酸氢钠 (10mL)、水 (5X5mL) 和饱和食盐水 (5mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 经柱层析 (二氯甲烷: 甲醇=60:1) 分离得到含有Boc保护的中间体。

[0152] 将中间体溶于二氯甲烷 (1mL) 后, 向其中滴加三氟乙酸 (1.42mmol, 0.10mL), 搅拌1小时。将反应混合物浓缩后, 用饱和碳酸氢钠水溶液进行中和。将混合物用乙酸乙酯 (2X10mL) 萃取, 并将合并后的有机层依次用水 (5mL) 和饱和食盐水 (5mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得式I-1或II-1所示化合物。

[0153] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)哌啶-2-羧酰胺(化合物I-1-1)

[0154] 黄色固体, 收率: 80%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 9.01 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.78 (dd, J=9.0, 3.0Hz, 1H), 7.68 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.47 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.21 (d, J=6.0Hz, 1H), 7.02 (d, J=9.0Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.26-3.23 (m, 1H), 3.12-3.03 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 1.80-1.75 (m, 4H); MS-ESI: m/z 417 [M+1]⁺。

[0155]

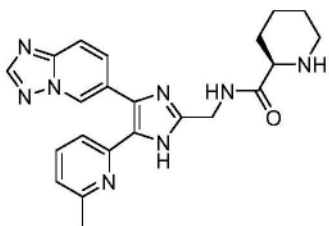


, 式 I-1-1。

[0156] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)吡咯啉-2-羧酰胺(化合物I-1-2)

[0157] 黄色固体,82%;¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ 9.02(s,1H),8.32(s,1H),8.04(s,1H),7.79(d,J=9.2Hz,1H),7.67(d,J=9.2Hz,1H),7.46(t,J=7.5Hz,1H),7.23(d,J=6.0Hz,1H),7.02(d,J=9.0Hz,1H),4.55(s,2H),3.37-3.34(m,1H),3.17-3.05(m,4H),2.55(s,3H),1.82-1.79(m,4H);MS-ESI:m/z 417[M+1]⁺。

[0158]

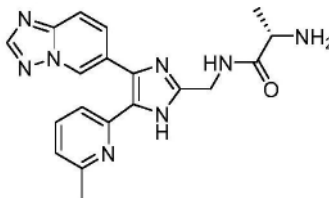


, 式 I-1-2。

[0159] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基丙酰胺(化合物I-1-3)

[0160] 黄色固体,收率:79%;¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ 8.99(s,1H),8.33(s,1H),8.27(s,1H),7.79(d,J=9.0Hz,1H),7.70(d,J=9.0Hz,1H),7.46(t,J=9.0Hz,1H),7.22(d,J=9.0Hz,1H),7.02(d,J=9.0Hz,1H),4.55(s,2H),3.58(q,J=6.0Hz,1H),2.55(s,3H),1.37(d,J=6.0Hz,3H);MS-ESI:m/z 377[M+1]⁺。

[0161]

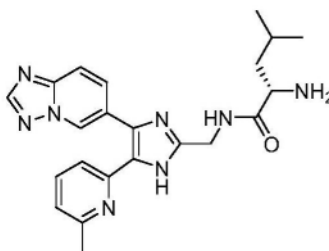


, 式 I-1-3。

[0162] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺(化合物I-1-4)

[0163] 黄色固体,收率:85%;¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ 8.98(s,1H),8.31(s,1H),7.76(dd,J=9.0,3.0Hz,1H),7.71(d,J=9.0Hz,1H),7.49(t,J=7.5Hz,1H),7.19(d,J=9.0Hz,1H),7.04(d,J=9.0Hz,1H),4.49(s,2H),3.61-3.56(m,1H),2.53(s,3H),1.66-1.59(m,2H),1.48-1.43(m,1H),0.92(d,J=6.0Hz,3H),0.90(d,J=6.0Hz,3H);MS-ESI:m/z 419[M+1]⁺。

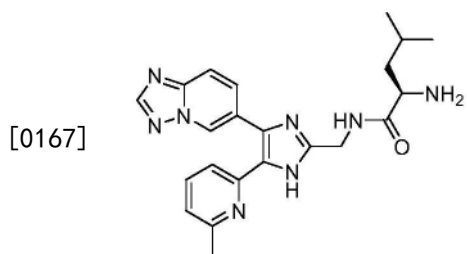
[0164]



, 式 I-1-4。

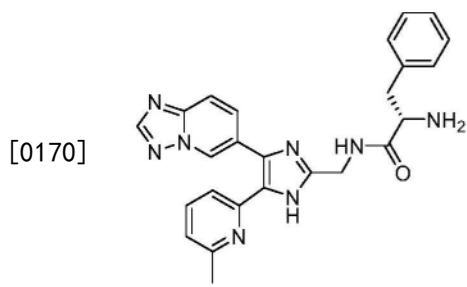
[0165] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺(化合物I-1-5)

[0166] 黄色固体, 收率: 89%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 9.06 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.84 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.75 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.57 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.28 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 7.11 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.47-3.42 (m, 1H), 2.57 (s, 3H), 1.86-1.80 (m, 2H), 1.77-1.58 (m, 1H), 0.96 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H), 0.94 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H); MS-ESI: m/z 419 $[\text{M}+1]^+$.



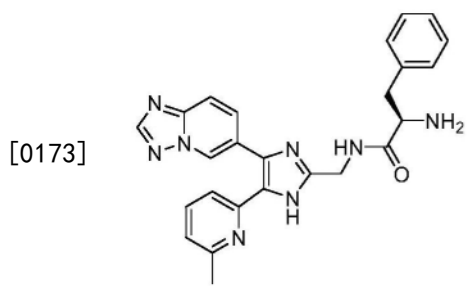
[0168] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺(化合物I-1-6)

[0169] 黄色固体, 收率: 62%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.99 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.74 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.70 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.49 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.22-7.12 (m, 6H), 7.05 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 4.47 (m, 2H), 4.01 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 3.19-3.12 (m, 1H), 2.99-2.92 (m, 1H), 2.52 (s, 3H); MS-ESI: m/z 453 $[\text{M}+1]^+$.



[0171] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺(化合物I-1-7, J-1149)

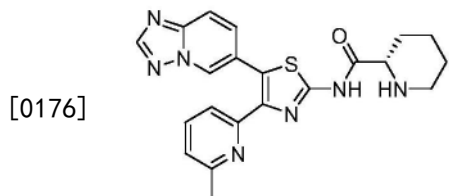
[0172] 黄色固体, 收率: 50%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 8.98 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.75 (dd, $J=9.0, 3.0\text{Hz}$, 1H), 7.69 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.50 (t, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.21-7.12 (m, 6H), 7.05 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.94 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 3.15-3.08 (m, 1H), 2.98-2.91 (m, 1H), 2.52 (s, 3H); MS-ESI: m/z 453 $[\text{M}+1]^+$.



[0174] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5-a]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-

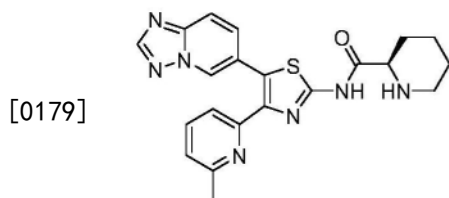
2-基)哌啶-2-羧酰胺(化合物II-1-1)

[0175] 黄色固体, 收率: 22%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.89-8.81 (m, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.70-7.51 (m, 4H), 7.42 (s, 1H), 7.07 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 3.67-3.54 (m, 1H), 3.06-3.02 (m, 1H), 2.89-2.69 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.38-2.29 (m, 2H), 2.03-1.98 (s, 2H), 1.62-1.50 (m, 2H); MS-ESI: m/z 420 $[\text{M}+1]^+$.



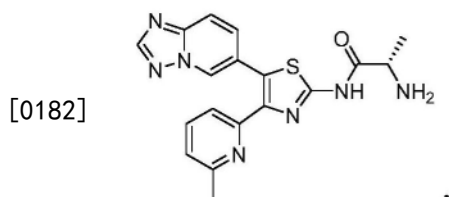
[0177] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基哌啶-2-基)-噻唑-2-基)哌啶-2-羧酰胺(化合物II-1-2)

[0178] 黄色固体, 收率: 53%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.90-8.78 (m, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.72-7.51 (m, 4H), 7.36 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 7.08 (dd, $J=9.0, 3.0\text{Hz}$, 1H), 3.68-3.64 (m, 1H), 3.13-3.08 (m, 1H), 2.90-2.70 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.34-2.29 (m, 2H), 2.07-1.96 (m, 2H), 1.88-1.81 (m, 2H); MS-ESI: m/z 420 $[\text{M}+1]^+$.



[0180] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基哌啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基丙酰胺(化合物II-1-3)

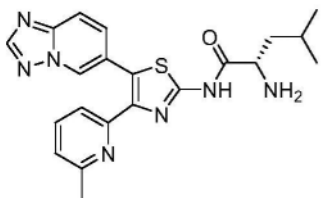
[0181] 黄色固体, 收率: 42%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.81 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.67 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.55 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.44 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.06 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 3.77 (br s, 1H), 2.41 (s, 3H), 1.47 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H); MS-ESI: m/z 380 $[\text{M}+1]^+$.



[0183] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基哌啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺(化合物II-1-4, J-1155)

[0184] 黄色固体, 收率: 37%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.81 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.69 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.55 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 2H), 7.43 (d, $J=6.0\text{Hz}$), 7.07 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 3.69-3.66 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 1.86-1.78 (m, 2H), 1.51-1.41 (m, 1H), 0.99 (br s, 6H); MS-ESI: m/z 422 $[\text{M}+1]^+$.

[0185]

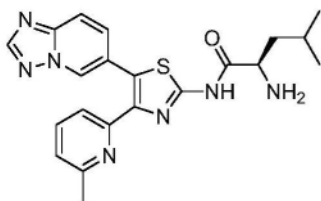


, 式 II-1-4。

[0186] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊酰胺(化合物II-1-5, J-1156)

[0187] 黄色固体, 收率: 31%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.81 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.68 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.55 (d, J=6.0Hz, 1H), 7.43 (d, J=6.0Hz, 1H), 7.06 (d, J=6.0Hz, 1H), 3.69-3.66 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 1.81 (br s, 2H), 1.51-1.44 (m, 1H), 0.98 (br s, 6H); MS-ESI: m/z 422[M+1] $^+$ 。

[0188]

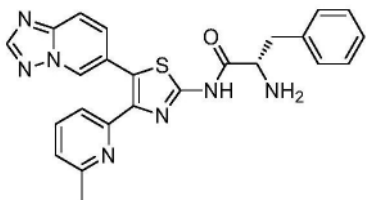


, 式 II-1-5。

[0189] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺(化合物II-1-6)

[0190] 黄色固体, 收率: 61%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.91-8.84 (m, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.71-7.53 (m, 5H), 7.35-7.25 (m, 4H), 7.08 (d, J=9.0Hz, 1H), 3.92-3.89 (m, 1H), 3.42-3.36 (m, 1H), 2.92-2.87 (m, 1H), 2.43 (s, 3H); MS-ESI: m/z 456[M+1] $^+$ 。

[0191]

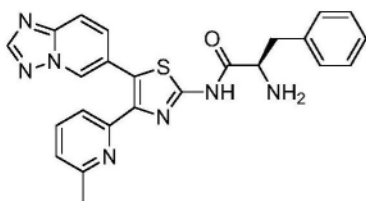


, 式 II-1-6。

[0192] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-3-苯基丙酰胺(化合物II-1-7)

[0193] 黄色固体, 收率: 68%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.83 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.68 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.58-7.51 (m, 2H), 7.44 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.33-7.21 (m, 5H), 7.06 (d, J=9.0Hz, 1H), 3.91-3.87 (m, 1H), 3.40-3.34 (m, 1H), 2.91-2.86 (m, 1H), 2.41 (s, 3H); MS-ESI: m/z 456[M+1] $^+$ 。

[0194]



, 式 II-1-7。

[0195] 实施例7: 式I-2和II-2所示化合物的制备

[0196] N-((4-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)硫代乙酰胺(式I-2)和N-(5-([1,2,4]三氮唑并[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-

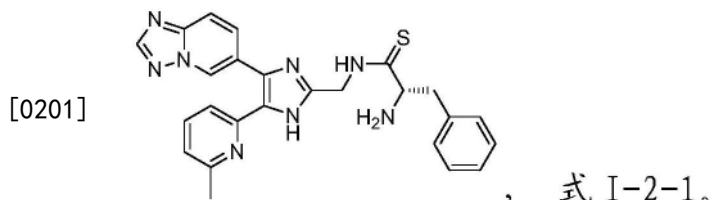
2-基)噻唑-2-基)硫代乙酰胺(式II-2)化合物的合成通法。

[0197] 在室温下,将置于加压瓶中的式10或式11所示化合物(0.14mmol)溶于1,2-二甲氧基乙烷(5mL)中,向其中加入劳森试剂(0.057g,0.14mmol),将混合物在85℃下,搅拌12个小时。冷却至室温后,减压浓缩,经柱层析(二氯甲烷:甲醇=20:1)分离得到含有Boc保护的中间体。

[0198] 将中间体溶于二氯甲烷(1mL)后,向其中滴加三氟乙酸(1.42mmol,0.10mL),搅拌1小时。将反应混合物浓缩后,用饱和碳酸氢钠水溶液进行中和。将混合物用乙酸乙酯(2X20mL)萃取,并将合并后的有机层依次用水(10mL)和饱和食盐水(10mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压浓缩得式I-2或II-2所示化合物。

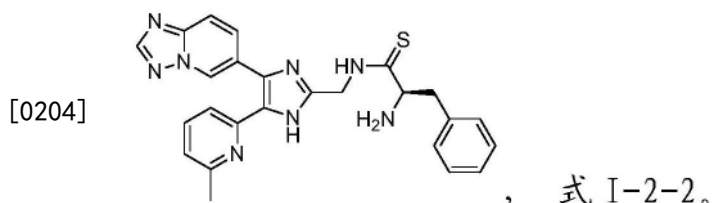
[0199] (S)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙硫酰胺(化合物I-2-1)

[0200] 黄色固体,收率:46%;¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ9.01(s,1H),8.36(s,1H),7.82(d,J=9.0Hz,1H),7.77(d,J=9.0Hz,1H),7.49(t,J=7.5Hz,1H),7.26-7.20(m,6H),7.05(d,J=6.0Hz,1H),5.03(s,2H),4.15(dd,J=9.0,3.0Hz,1H),3.57(dd,J=15.0,3.0Hz,1H),2.74(dd,J=15.0,9.0Hz,1H),2.58(s,3H);MS-ESI:m/z 469[M+1]⁺。



[0202] (R)-N-((4-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-2-氨基-3-苯基丙硫酰胺(化合物I-2-2)

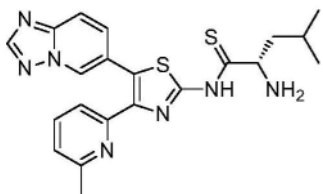
[0203] 黄色固体,收率:22%;¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ9.00(s,1H),8.36(s,1H),7.81(d,J=9.0Hz,1H),7.75(d,J=9.0Hz,1H),7.49(t,J=7.5Hz,1H),7.26-7.19(m,6H),7.05(d,J=9.0Hz,1H),5.02(s,2H),4.13(dd,J=9.0,3.0Hz,1H),3.56(dd,J=15.0,3.0Hz,1H),2.73(dd,J=15.0,9.0Hz,1H),2.56(s,3H);MS-ESI:m/z 469[M+1]⁺。



[0205] (S)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5-a]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊硫酰胺(化合物II-2-1)

[0206] 黄色固体,收率:11%;¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ8.89-8.72(m,1H),8.39-8.29(m,1H),7.74-7.47(m,4H),7.12(d,J=6.0Hz,1H),3.13(d,J=6.0Hz,1H),2.44(s,3H),1.76-1.67(m,2H),1.53-1.25(m,1H),1.01-0.89(m,6H);MS-ESI:m/z 438[M+1]⁺。

[0207]

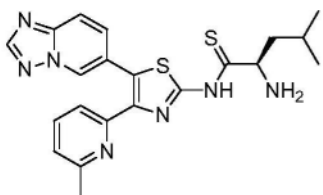


, 式 II-2-1。

[0208] (R)-N-(5-([1,2,4]三氮唑[1,5- α]吡啶-6-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-噻唑-2-基)-2-氨基-4-甲基戊硫酰胺(化合物II-2-2)

[0209] 色固体, 收率: 15%; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.77 (br s, 1H), 8.36 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 7.69 (br s, 2H), 7.51 (br s, 2H), 7.10 (br s, 1H), 4.34 (br s, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.07 (br s, 2H), 1.41 (br s, 1H), 0.98 (br s, 6H); MS-ESI: m/z 438 $[\text{M}+1]^+$ 。

[0210]



, 式 II-2-2。

[0211] 生物学数据

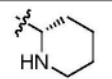
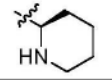
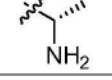
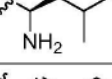
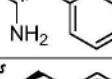
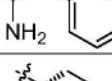
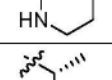
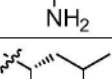
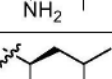
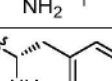
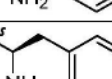
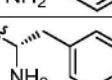
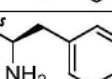
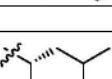
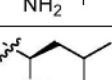
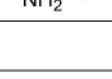
[0212] 利用下列测定法可以评估本发明化合物的生物学活性:

[0213] 实施例8: 含吡唑结构的咪唑类衍生物的ALK5激酶抑制活性研究

[0214] ALK5激酶磷酸化抑制活性测定方法

[0215] ALK5蛋白来源于Sf9昆虫细胞中表达的人类重组GST-融合蛋白。激酶分析使用微孔容积为50微升的珀金埃尔默的96孔板。将依次加入20 μL 实验缓冲液(标准缓冲液), 5 μL ATP溶液(在 H_2O 中), 5 μL 测试化合物(溶解于10%DMSO中), 20 μL 酶/底物来配制反应混合物。已配制的反应混合物在30 $^\circ\text{C}$ 孵育60min后, 放置于50微升2% (V/V) H_3PO_4 溶液中, 除去测定缓冲液, 用200微升0.9% (W/V) 氯化钠溶液洗涤2次。采用微平板闪烁计数器建立了 ^{33}Pi 的掺入。激酶活性分析利用Beckman Coulter/SAGIANTMCore系统来检测。

[0216] 表1式I和II化合物ALK5激酶抑制活性

化合物	X	R ₁ or R ₂	IC ₅₀ (μM)
实施例 I-1-1	0		0.036
实施例 I-1-2	0		0.040
实施例 I-1-3	0		0.317
实施例 I-1-4	0		0.073
实施例 I-1-5	0		0.377
实施例 I-1-6	0		0.092
实施例 I-1-7	0		0.017
[0217] 实施例 II-1-1	0		N. D
实施例 II-1-2	0		N. D
实施例 II-1-3	0		0.087
实施例 II-1-4	0		0.061
实施例 II-1-5	0		0.025
实施例 II-1-6	0		N. D
实施例 II-1-7	0		0.066
实施例 I-2-1	S		0.084
实施例 I-2-2	S		0.023
[0218] 实施例 II-2-1	S		0.023
实施例 II-2-2	S		0.014
LY-2157299			0.129

[0219] 式I和II化合物ALK5激酶半数抑制活性 (IC₅₀) 测定结果如表1所示,合成的所有目标化合物中13个化合物(I-1-1、I-1-2、I-1-4、I-1-6、I-1-7、II-1-3、II-1-4、II-1-5、I-2-1、I-2-2、II-2-1和II-2-2)的活性远高于阳性对照化合物LY-2157299(III期临床),其中化合物I-1-7和II-2-2的抑制活性最强。

[0220] 为了证明该类化合物的有效性,选择了代表性的化合物I-1-7(J-1149)、II-1-4(J-1155)和II-1-5(J-1156)做了细胞毒性实验和抗肝纤维化活性实验。

[0221] 实施例9:细胞培养和处理

[0222] 人肝星状细胞系LX-2(RRID:CVCL_5792)细胞在37℃、含5%二氧化碳、饱和湿度的培养箱中,加入含有10%胎牛血清(FBS)、100U/ml青霉素和100g/ml链霉素的DMEM培养基后进行培养。每隔3天用胰蛋白酶将细胞传代,去除瓶内培养液后,加入1-2mL胰蛋白酶液(0.25%),37℃静止2-3分钟,移去蛋白酶液,加入培养液反复吹打瓶壁细胞,离心后将细胞沉淀用培养液制成细胞悬液。接种于含有适量新鲜培养液的新培养瓶中进行培养。直至传代至体外实验研究时使用的第4代到第7代细胞进行实验。将LX-2细胞播种在6孔板中24小时,用含有TGF- β (10ng/mL)的新鲜培养基替换24小时,在TGF- β 刺激前1小时分别向LX-2细胞加入TGF- β 抑制剂-LY-2157299和代表性化合物。

[0223] 实施例10:MTT检测

[0224] 收集对数期LX-2细胞,调整细胞悬液浓度,种于96孔板,1x10⁴/孔。放置于37℃、5%二氧化碳培养箱使细胞贴壁。加入指定浓度的代表化合物(0 μ M、0.625 μ M、1.25 μ M、2.5 μ M、3.125 μ M、6.25 μ M、12.5 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M)孵育LX-2细胞24小时,吸去上清液,用PBS轻轻洗涤后每孔加入180 μ L新鲜培养液,再加入20 μ L MTT溶液(5mg/mL)继续培养4小时。终止培养,小心的吸去孔内培养液。每孔加入150 μ L二甲基亚砷,置摇床上低速震荡10分钟,使结晶充分溶解。通过酶标仪在540nm波长处测定吸光度。

[0225] 如图1所示,用MTT法证实了化合物J-1149在100 μ M下显示一定毒性之外,其他浓度(0-50 μ M)下不显示毒性。

[0226] 如图2所示,用MTT法证实了化合物J-1155在0-100 μ M下不显示毒性。

[0227] 如图3所示,用MTT法证实了化合物J-1156在100 μ M下显示一定毒性之外,其他浓度(0-50 μ M)下显示较弱或不显示毒性。

[0228] 实施例11:免疫荧光染色法

[0229] 细胞荧光染色

[0230] 吸除荧光dish细胞上清液;PBS浸洗(3次,5min);室温加入多聚甲醛(4%,30min);PBS浸洗(3次,5min)、室温滴加Trion-x(0.1%,15min);PBS浸洗(3次,5min);滴加Goat Serum(10%,1h);滴加一抗孵育(4℃,12h);取出室温静止(30min);PBS浸洗(3次,5min);滴加二抗孵育(1h);PBS浸洗(10次,5min);滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片;注意避光。通过荧光显微镜收集图片信息。

[0231] 组织荧光染色

[0232] -80℃冰箱取出冷冻切片(5 μ m);室温干燥(20min);浸入丙酮:甲醇(1:1,10min);室温晾干(20min);放入层析缸中PBS浸洗(2次,5min);孵育山羊血清(5%,30min);滴加一抗孵育(4℃,12h);取出室温静止(30min);PBS浸洗(3次,5min);滴加二抗孵育(1h);PBS浸洗(10次,5min);滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片;注意避光。通过荧光显微镜收集图片信息。

[0233] 如图4所示,用免疫荧光染色法证实了化合物J-1149随着浓度的增加明显地抑制TGF- β 诱导的 α -SMA表达。

[0234] 如图5所示,用免疫荧光染色法证实了化合物J-1155和J-1156随着浓度的增加明

显地抑制TGF- β 诱导的 α -SMA表达

[0235] 对于本领域的技术人员来说,可以根据以上的技术方案和构思,给出各种相应的改变和变形,而所有的这些改变和变形,都应该包括在本发明权利要求的保护范围之内。

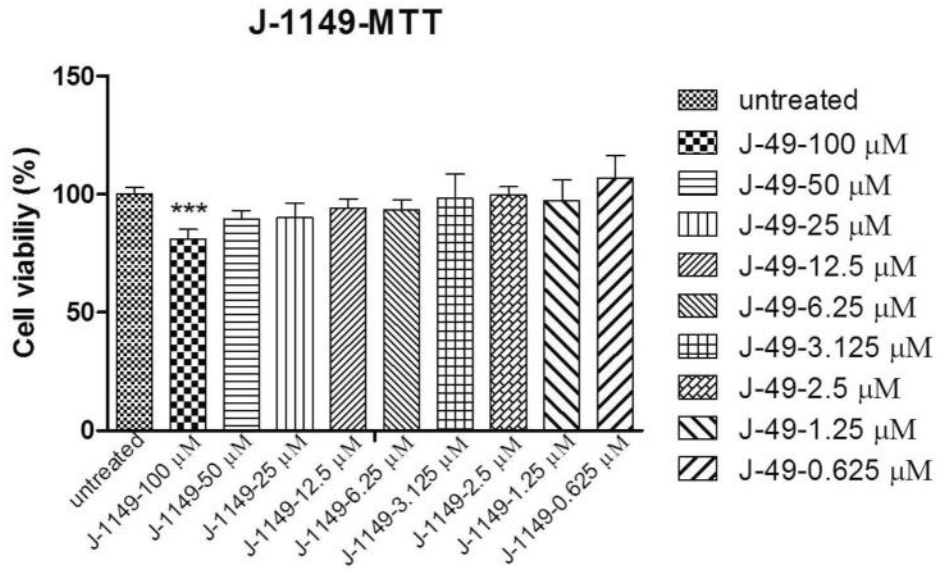


图1

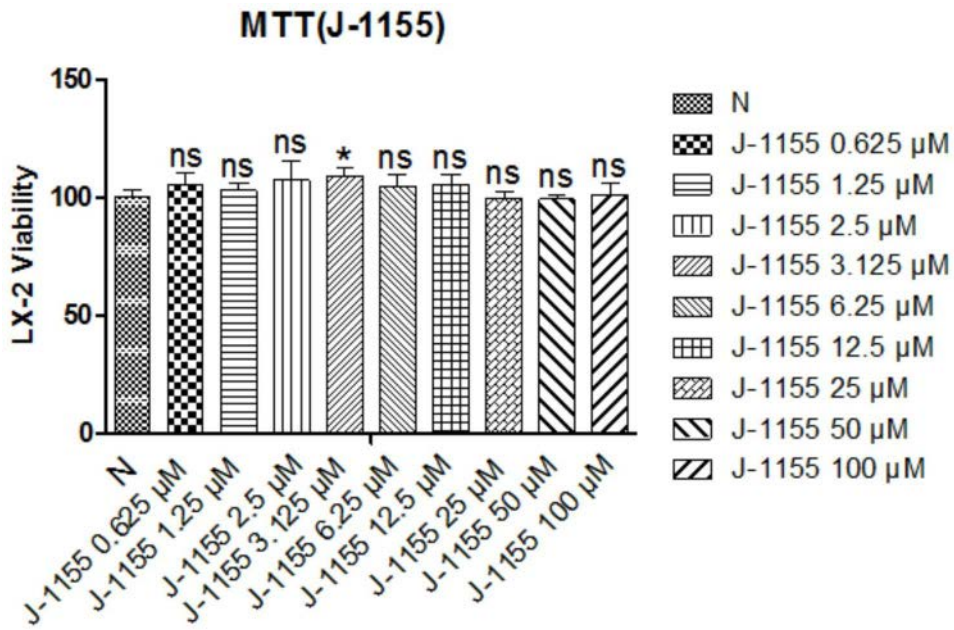


图2

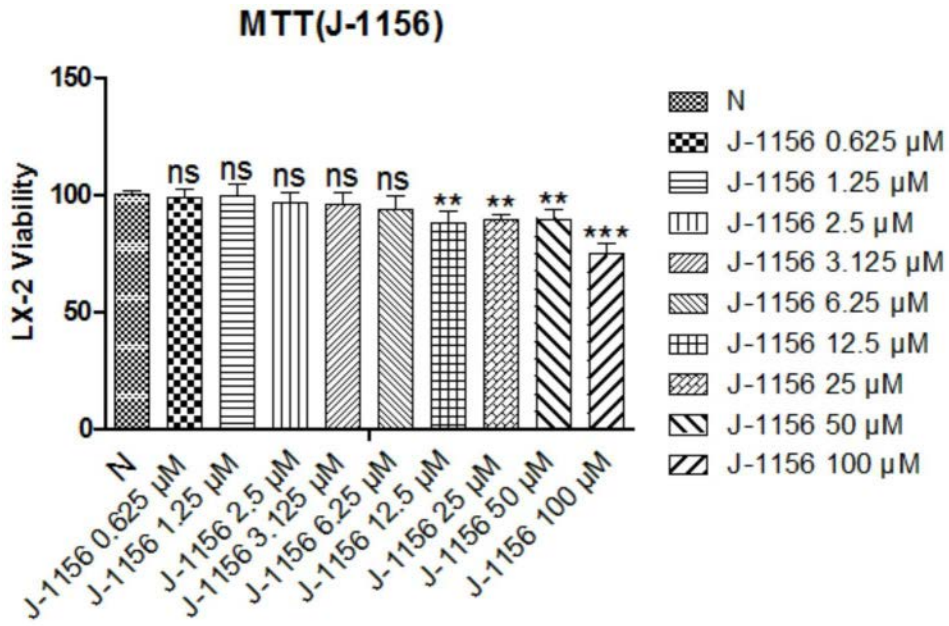


图3

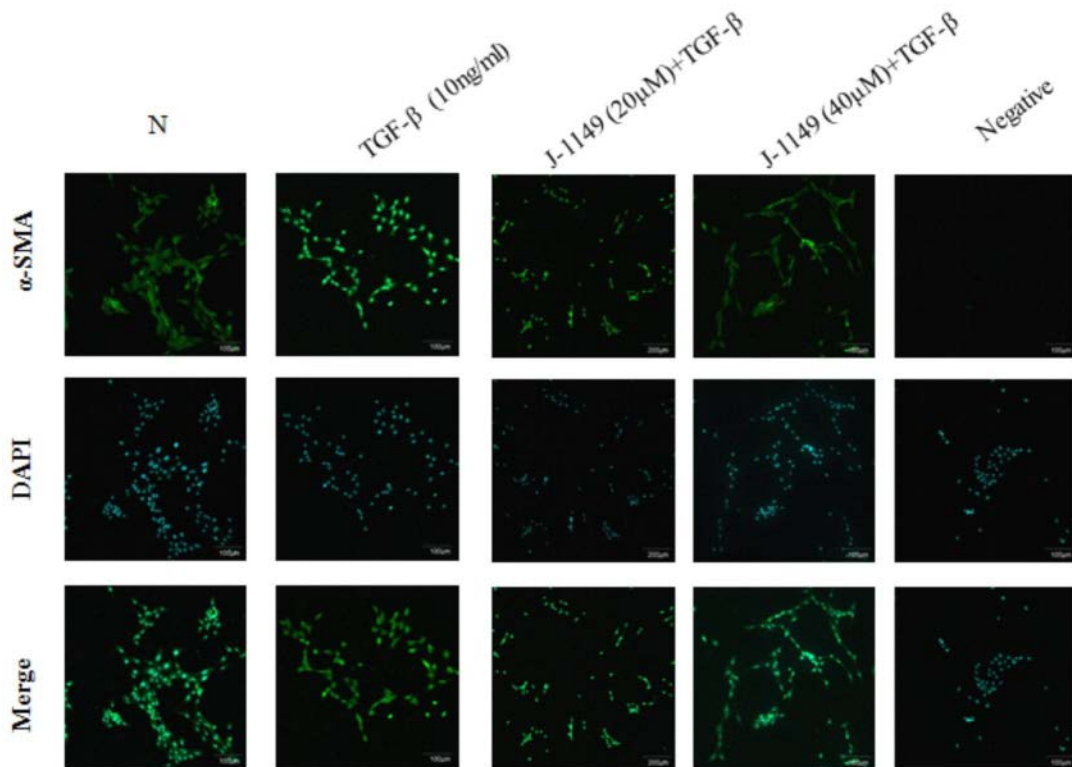


图4

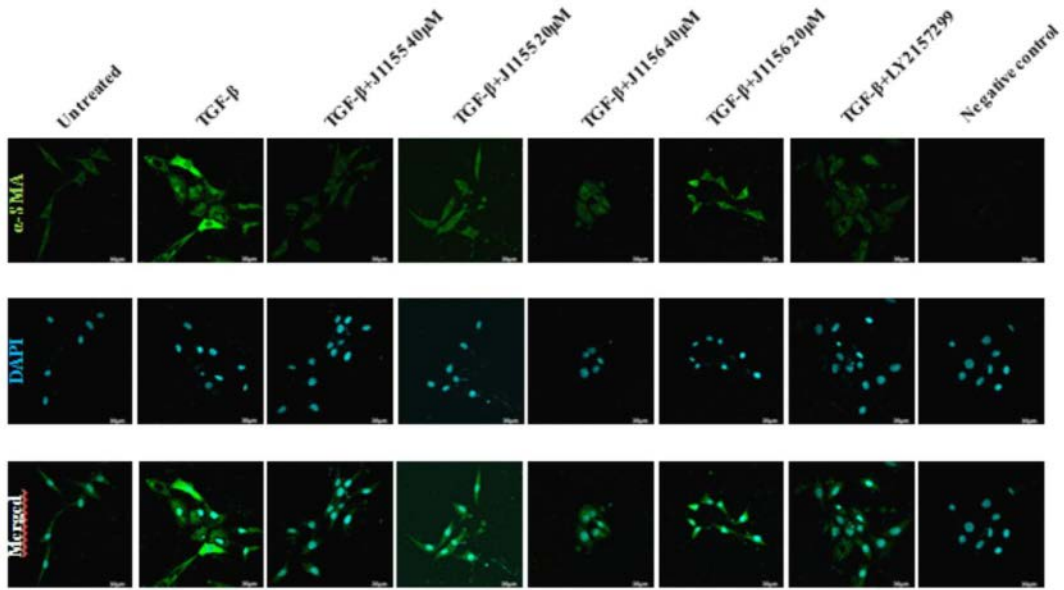


图5