



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113248472 A

(43)申请公布日 2021.08.13

(21)申请号 202010087950.8

A61K 31/404(2006.01)

(22)申请日 2020.02.12

A61K 31/4545(2006.01)

(71)申请人 中国药科大学

A61P 19/10(2006.01)

地址 210009 江苏省南京市鼓楼区童家巷24号

A61P 19/02(2006.01)

A61P 19/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(72)发明人 焦宇 陆涛 陈亚东

A61P 29/00(2006.01)

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所(普通合伙) 32204

A61P 1/02(2006.01)

代理人 柏尚春

(51)Int.Cl.

C07D 401/14(2006.01)

C07D 401/04(2006.01)

C07D 417/04(2006.01)

A61K 31/4439(2006.01)

A61K 31/427(2006.01)

权利要求书5页 说明书19页 附图5页

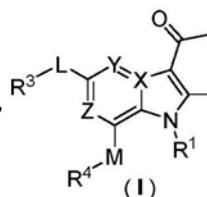
(54)发明名称

抗骨质疏松化合物及其衍生物,药物组合物、制备方法和应用

(57)摘要

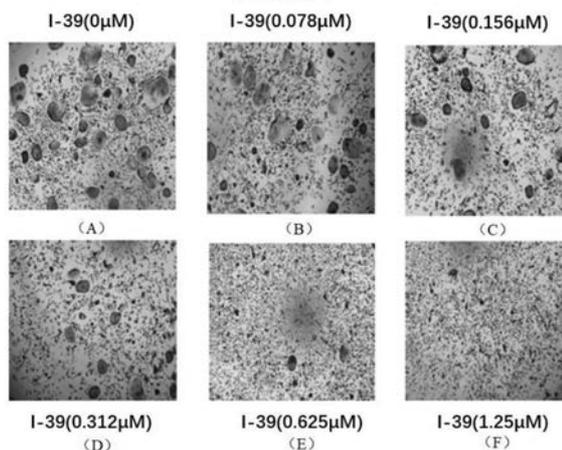
本发明公开了一种抗骨质疏松化合物及其衍生物,药物组合物、制备方法和应用。该化合物

结构如式(I), 该化合物衍生

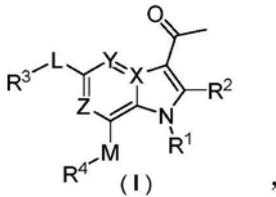


物涉及所述化合物的异构体、非对映异构体、对映异构体、互变异构体、溶剂化物、药学上可接受的盐或它们的混合物,该化合物及其衍生物可以抑制抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性及影响破骨细胞特异性mRNATRAP、NFATC1、C-FOS和CTSK表达,从而影响破骨细胞形成,具有抗骨质疏松活性,可用于制备治疗抗骨质疏松类药物,并且该类化合物合成方法简便,易操作。

TRAP染色



1. 一种抗骨质疏松化合物及其衍生物,其特征在于,所述化合物及其衍生物具有式(I)的结构,所述衍生物为所述化合物的异构体、非对映异构体、对映异构体、互变异构体、溶剂化物、药学上可接受的盐或它们的混合物:



其中:

X、Y、Z为N或C;

L、M为-CONH-、-CONHCO-、-NHCONH-、-NHCO-、-NHCOCH₂-、-CONHCH₂-、-SO-、-SO₂-、-SO₂NH-、-CO-、-CO₂-、-NHCH₂-或化学键;

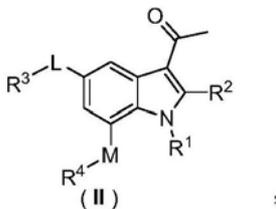
R¹为氢或烷基;

R²为氢或烷基;

R³、R⁴为C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR³、-SOR³、-COR³、-CO₂R³、NCOR³、-NR⁵R⁶、3-7元的含氮脂肪杂环、芳基或杂芳基,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代基,芳基或杂芳基为五元芳杂环、六元芳杂环、苯并五元杂环或五元杂环并六元杂环,芳基或杂芳基环上可含一个或多个相同或不同的下列取代基:氢、卤素、羟基、硝基、氰基、C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR³、-SOR³、-COR³、-CO₂R³、NCOR³、-NR⁵R⁶或3-7元的含氮脂肪杂环,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或含氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代基;

R⁵、R⁶为氢、C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR⁴、-SOR⁵、-COR³、-CO₂R³、-NR¹R²、或3-7元的含氮脂肪杂环,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代。

2. 根据权利要求1所述的抗骨质疏松化合物及其衍生物,其特征在于,所述化合物及其衍生物具有式(II)的结构:



其中:

L、M为-CONH-、-CONHCO-、-NHCONH-、-NHCO-、-NHCOCH₂-、-SO-、-SO₂-、-SO₂NH-、-CO-、-CO₂-、-NHCH₂-或化学键;

R¹为氢、C₁-C₆-烷基、C₃-C₈-环烷基或卤代-C₁-C₆-烷基;

R²为氢、C₁-C₆-烷基、C₃-C₈-环烷基或卤代-C₁-C₆-烷基;

R^3 、 R^4 为氢、 C_1 - C_{12} -烷基、 C_3 - C_8 -环烷基、 C_2 - C_6 -烯基、 C_2 - C_6 -炔基、芳烷氧基、 C_1 - C_{12} -烷氧基、卤代- C_1 - C_6 -烷基、氰基- C_1 - C_6 -烷基、 $-SO_2R^3$ 、 $-OR^3$ 、 $-SOR^3$ 、 $-COR^3$ 、 $-CO_2R^3$ 、 $NCOR^3$ 、 $-NR^5R^6$ 、3-7元的含氮脂肪杂环、芳基或杂芳基，3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或 C_1 - C_6 -烷基取代，芳基或杂芳基为五元芳杂环、六元芳杂环、苯并五元杂环或五元杂环并六元杂环，芳基或杂芳基环上可含一个或多个相同或不同的下列取代基：氢、卤素、羟基、硝基、氰基、 C_1 - C_{12} -烷基、 C_3 - C_8 -环烷基、 C_2 - C_6 -烯基、 C_2 - C_6 -炔基、芳烷氧基、 C_1 - C_{12} -烷氧基、卤代- C_1 - C_6 -烷基、氰基- C_1 - C_6 -烷基、 $-SO_2R^3$ 、 $-OR^3$ 、 $-SOR^3$ 、 $-COR^3$ 、 $-CO_2R^3$ 、 $NCOR^3$ 、 $-NR^5R^6$ 或3-7元的含氮脂肪杂环，3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或 C_1 - C_6 -烷基取代；

R^5 、 R^6 为氢、 C_1 - C_{12} -烷基、 C_3 - C_8 -环烷基、 C_2 - C_6 -烯基、 C_2 - C_6 -炔基、芳烷氧基、 C_1 - C_{12} -烷氧基、卤代- C_1 - C_6 -烷基、氰基- C_1 - C_6 -烷基、 $-SO_2R^3$ 、 $-OR^4$ 、 $-SOR^5$ 、 $-COR^3$ 、 $-CO_2R^3$ 、 $-NR^1R^2$ 或3-7元的含氮脂肪杂环，3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或 C_1 - C_6 -烷基取代。

3. 根据权利要求1所述的抗骨质疏松化合物及其衍生物，其特征在于，所述化合物及其衍生物结构中：

R^1 为氢或甲基；

R^2 为氢或甲基；

R^3 为2-甲氧基苯磺酰氨基、4-甲氧基苯磺酰氨基、甲氧甲酰基、苯氨甲酰基、2-甲氧基苯氨甲酰基、2-噻唑氨甲酰基、环戊氨甲酰基、苯基、3-吡啶基；

R^4 为乙氧甲酰氨基、苯磺酰氨基、2-甲氧基苯磺酰氨基、N-(丙磺酰基)乙酰氨基、N-(苯磺酰基)苯磺酰氨基、苯甲酰氨基、2-甲氧基苯甲酰氨基、丁酰氨基、苯脲基、2-甲氧基苯脲基、3-三氟甲基苯脲基、乙脲基、N-(乙酰基)乙氧甲酰氨基、氨基、吡咯烷基。

4. 根据权利要求1所述的抗骨质疏松化合物及其衍生物，其特征在于，所述化合物为以下任一化合物：

1-(7-(氮杂环丁烷-3-基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-30)，

N-(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)-2-甲氧基苯磺酰胺(I-31)，

1-(2-甲基-5-(吡啶-3-基)-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-32)，

1-(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)-3-乙基脲(I-33)，

(3-乙酰基-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-34)，

1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-35)，

1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-36)，

(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-37)，

1-(7-氨基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-38)，

(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-4-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-39)，

1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-4-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-40)，

1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-41)。

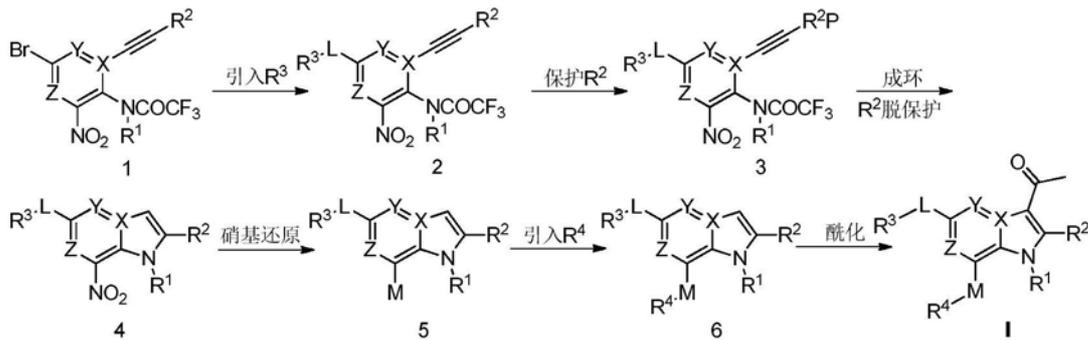
5. 根据权利要求1~4任一所述的抗骨质疏松化合物及其衍生物，其特征在于，所述药学上可接受的盐为所述化合物与酸或碱形成的盐，所述酸为盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺

酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘磺酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、马来酸或琥珀酸、富马酸、水杨酸、苯基乙酸或杏仁酸,所述碱为碱金属碱、碱土金属碱或铵离子碱。

6. 一种权利要求1~5任一所述的抗骨质疏松化合物及其衍生物的制备方法,其特征在于,所述制备方法为以下任一方法:

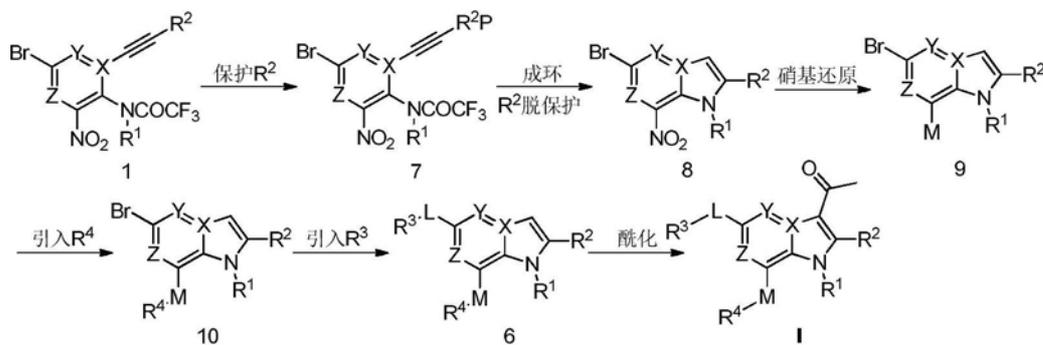
方法一:

溴代化合物1经偶联反应引入 R^3 得到化合物2,化合物2经 R^2 保护、环合和 R^2 脱保护反应得到化合物4,化合物4经还原和酰化反应引入 R^4 得到化合物6,化合物6再经酰化反应得到化合物I;



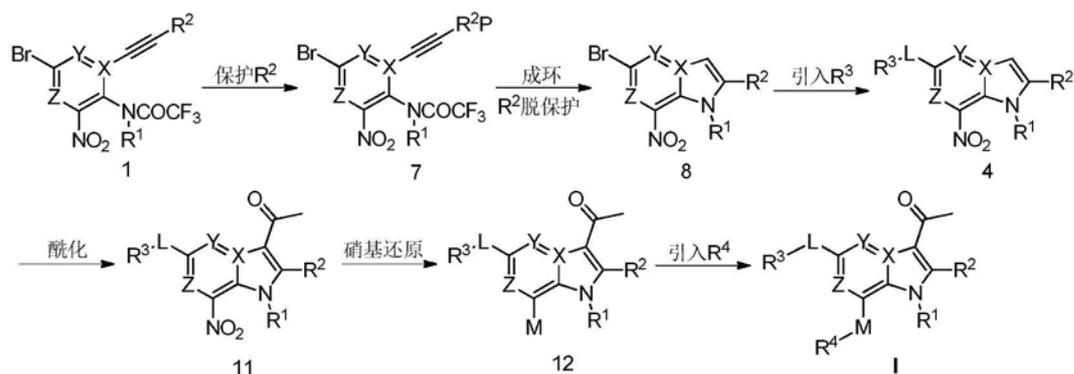
方法二:

溴代化合物1经 R^2 保护、环合和 R^2 脱保护反应得到化合物8,化合物8经还原和酰化反应引入 R^4 得到化合物10,化合物10经偶联反应引入 R^3 得到化合物6,化合物6再经酰化反应得到化合物I;



方法三:

溴代化合物1经 R^2 保护、环合和 R^2 脱保护反应得到化合物8,化合物8经偶联反应引入 R^3 得到化合物4,化合物4经酰化反应得到化合物11,化合物11再经还原和酰化反应引入 R^4 得到化合物I;



其中, X、Y、Z、L、M、R¹、R²、R³、R⁴的定义如权利要求1~3任一所述;

将相应的酸或碱的溶液加入到以上任一方法制备的具有式(I)结构的化合物的溶液中,成盐完全后减压除去溶剂,即得所述化合物药学上可接受的盐。

7. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含权利要求1~6任一所述化合物和/或其衍生物以及药学上可接受的载体。

8. 一种权利要求1~6任一所述的抗骨质疏松化合物及其衍生物在制备治疗RANKL/骨流失疾病药物中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述化合物为以下任一化合物:

N-(3-乙酰基-2-甲基-1H-吡啶-5-基)-2-甲氧基苯磺酰胺(I-1),

N-(3-乙酰基-2-甲基-1H-吡啶-5-基)-4-甲氧基苯磺酰胺(I-2),

3-乙酰基-2-甲基-7-(苯基磺酰氨基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-3),

3-乙酰基-7-((2-甲氧基苯基)磺酰氨基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-4),

3-乙酰基-2-甲基-7-(N-(丙基磺酰基)乙酰氨基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-5),

3-乙酰基-2-甲基-7-(N-(苯基磺酰基)苯基磺酰氨基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-6),

2-甲基-3-乙酰基-7-苯甲酰氨基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-7),

3-乙酰基-7-(2-甲氧基苯甲酰氨基)-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-8),

3-乙酰基-7-丁酰氨基-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-9),

3-乙酰基-2-甲基-7-(3-苯基脲基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-10),

3-乙酰基-7-(3-(2-甲氧基苯基)脲基)-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-11),

3-乙酰基-2-甲基-7-(3-(3-(三氟甲基)苯基)脲基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-12),

3-乙酰基-7-(3-乙脲基)-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-13),

3-乙酰基-7-((乙氧羰基)氨基)-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-14),

3-乙酰基-7-((乙氧羰基)氨基)-1,2-二甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-15),

3-乙酰基-7-(N-(乙氧羰基)乙酰氨基)-1,2-二甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-16),

3-乙酰基-7-((乙氧羰基)氨基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-17),

(3-乙酰基-2-甲基-5-(苯基氨基甲酰基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-18),

(3-乙酰基-5-((2-甲氧基苯基)氨基甲酰基)-2-甲基-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-19),

(3-乙酰基-2-甲基-5-((噻唑-2-基)氨基甲酰基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-20),

(3-乙酰基-5-(环戊基氨基甲酰基)-2-甲基-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-21),

(3-乙酰基-2-甲基-5-(甲氨基甲酰基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-22),

(3-乙酰基-5-苯甲酰基-2-甲基-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-23),

(3-乙酰基-2-甲基-5-苯基-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-24),

(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸叔丁酯(I-25),

3-乙酰基-2-甲基-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(I-26),

3-乙酰基-N-(2-甲氧基苯基)-2-甲基-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-5-甲酰胺(I-27),

1-(7-氨基-5-苯甲酰基-2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基-1-酮(I-28),

2-甲基-3-乙酰基-N-(哌啶-4-基)-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-胺(I-29),

1-(7-(氮杂环丁烷-3-基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-30),

N-(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)-2-甲氧基苯磺酰胺(I-31),

1-(2-甲基-5-(吡啶-3-基)-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-32),

1-(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)-3-乙基脲(I-33),

(3-乙酰基-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-34),

1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-35),

1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-36),

(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-37),

1-(7-氨基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-38),

(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-4-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-39),

1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-4-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-40),

1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-41)。

10. 根据权利要求8所述的应用,其特征在於,所述疾病为破骨细胞活性异常导致的疾病。

抗骨质疏松化合物及其衍生物, 药物组合物、制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗骨质疏松化合物及其衍生物, 药物组合物、制备方法和应用, 尤其涉及一种可制备为治疗RANKL/骨流失疾病药物的抗骨质疏松化合物及其衍生物, 药物组合物、制备方法和应用。

背景技术

[0002] 骨质疏松是导致骨折风险增加的骨病。在骨质疏松中, 骨矿物质密度(BMD)降低, 骨微结构被破坏, 并且骨中的非胶原蛋白的量和多样性改变。世界卫生组织将(女性中的)骨质疏松定义为比骨量峰值(30岁健康女性的平均值)低2.5个标准差的骨矿物质密度。骨质疏松在绝经后女性中最为常见(这种情况下被称作绝经后骨质疏松), 但是也可能发生在男性中, 并且可能发生在患有特定的激素紊乱和其他慢性疾病的任何人中, 或者由药物治疗特别是糖皮质激素引起(这种情况下该疾病被称作类固醇或糖皮质激素诱发的骨质疏松), 以及由营养缺乏状态或包括但不限于低钠血症的其他代谢紊乱引起, 或者为癌症的继发后果。考虑到骨质疏松对脆性骨折(fragility fracture)风险的影响, 骨质疏松可显著影响预期寿命和生活质量。

[0003] 骨质减少是骨矿物质密度低于正常值的病状。许多医生认为其是骨质疏松的前兆。更具体而言, 骨质减少被定义为-1.0至-2.5的骨矿物质密度T评分。另外, 在特定的条件下可诱发骨质减少, 例如长期卧床或者在微重力环境例如近地轨道或太空飞行中停留较长的时间。

[0004] 所有骨质疏松病例的潜在机制是骨质吸收和骨形成之间失衡。正常的骨中存在持续的骨基质重塑; 所有骨量的多达10%可能在任意时间点经历重塑。骨被破骨细胞(其来自骨髓前体细胞)再吸收。在重塑过程中, 成骨细胞沉积新骨。

[0005] 形成骨质疏松的三种主要机制为: 骨量峰值不足(骨骼在生长过程中产生质量和力量不足)、过量的骨质吸收以及重塑过程中新骨形成不足。这三种机制的相互作用导致形成脆弱的骨组织。激素因素在很大程度上决定骨质吸收的速率, (例如由绝经引起的)雌激素缺乏增加骨质吸收并减少正常出现在承重骨中的新骨沉积, 其中, α 型雌激素受体在调节骨转换方面最为重要。除雌激素外, 钙代谢在骨转换中具有重要作用, 并且钙和维生素D的缺乏导致骨沉积受损; 另外, 甲状旁腺通过分泌甲状旁腺素对低钙水平作出反应, 这增加骨质吸收以确保血液中足够的钙。

[0006] 在患有骨质疏松的人群中, 可以通过改变生活方式和用药来限制骨质疏松的进程。生活方式的改变包括足够的均衡营养、防止跌倒以及体格锻炼。现有的药物包括钙、维生素D、维生素K、二膦酸盐、降钙素、特立帕肽、雷尼酸锶、激素替代剂以及选择性雌激素受体调节剂。

[0007] 在确诊的骨质疏松中, 二膦酸盐药物常常是一线治疗剂。目前最常用的二膦酸盐为口服阿仑膦酸盐(FosamaxTM)、口服利塞膦酸盐(ActonelTM)或口服羟乙膦酸盐(DidronelTM)、或每日一次或每月一次口服的伊班膦酸盐(BonivaTM)、或每月一次或每年一

次静脉内给药的唑来膦酸盐(zolendronate)或每月一次或每3-6个月一次静脉内给药的帕米膦酸盐(Aredia™)。口服二膦酸盐的吸收相对较差,并且因此必须在进食/饮水前至少30分钟空腹服用。它们可引发食道炎,因此耐受性差;可每周一次或每月给药一次,以减少食管炎发生的可能性。然而,静脉注射制剂例如唑来膦酸盐进行间歇性给药可引发一种罕见的颌骨坏死(osteonecrosis of jaw)口腔疾病。

[0008] 特立帕肽用于治疗骨质疏松的功效的时程有限,在许多国家只有在二膦酸盐无效或存在禁忌症时才批准将其用于治疗,并且年轻患者、之前接受放射疗法的患者或佩吉特病患者应避免使用该药物。

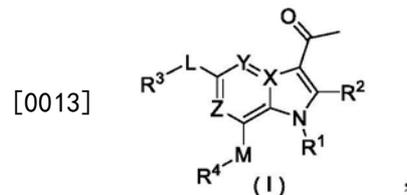
[0009] 雷尼酸锶(strontium ranelate)是备选的口服治疗剂,其可以刺激成骨细胞增殖并抑制破骨细胞增殖,但是,它会增加静脉血栓栓塞的风险,因此不适合患有不同原因引起的血栓的患者,而且,由于在吸收过程中钙与锶竞争,锶不能与食物或含钙制剂一起服用。此外,在治疗过程中,需要每日服用治疗量的钙、镁和维生素D,不应与锶在同一时间服用。

[0010] 雌激素替代疗法是预防骨质疏松的有效方法,但是还未普及推广,除非患者还存在符合其用途的其他病症。关于女性在绝经后的第一个十年服用雌激素还存在不确定性和争议。

发明内容

[0011] 发明目的:本发明的第一目的是提供一种具有抗骨质疏松活性的化合物及其衍生物,第二目的是提供所述化合物及其衍生物的制备方法,第三目的是提供所述化合物及其衍生物在制备治疗RANKL/骨流失疾病药物中的应用。

[0012] 技术方案:本发明的抗骨质疏松化合物及其衍生物具有式(I)的结构,所述衍生物为所述化合物的异构体、非对映异构体、对映异构体、互变异构体、溶剂化物、药学上可接受的盐或它们的混合物:



[0014] 其中:

[0015] X、Y、Z为N或C;

[0016] L、M为-CONH-、-CONHCO-、-NHCONH-、-NHCO-、-NHCOCH₂-、-CONHCH₂-、-SO-、-SO₂-、-SO₂NH-、-CO-、-CO₂-、-NHCH₂-或化学键;

[0017] R¹为氢或烷基;

[0018] R²为氢或烷基;

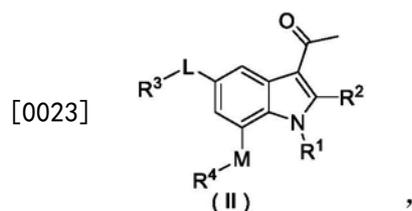
[0019] R³、R⁴为C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR³、-SOR³、-COR³、-CO₂R³、NCOR³、-NR⁵R⁶、3-7元的含氮脂肪杂环、芳基或杂芳基,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代基,芳基或杂芳基为五元芳杂环、六元芳杂环、苯并五元杂环或五元杂环并六元杂环,芳基或杂芳基环上可含一个或多个相同或不同的下列取代基:氢、卤素、羟基、硝基、氰基、C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-

烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR³、-SOR³、-COR³、-CO₂R³、NCOR³、-NR⁵R⁶或3-7元的含氮脂肪杂环,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代基;

[0020] 五元芳杂环、六元芳杂环、苯并五元杂环或五元杂环并六元杂环为吡啶、嘧啶、吡嗪、哒嗪、吡咯、吡唑、咪唑、吡啶、喹啉或嘌呤;

[0021] R⁵、R⁶为氢、C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR⁴、-SOR⁵、-COR³、-CO₂R³、-NR¹R²、或3-7元的含氮脂肪杂环,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代。

[0022] 优选,所述化合物及其衍生物具有式(II)的结构:



[0024] 其中:

[0025] L、M是-CONH-、-CONHCO-、-NHCONH-、-NHCO-、-NHCOCH₂-、-SO-、-SO₂-、-SO₂NH-、-CO-、-CO₂-、-NHCH₂-或化学键;

[0026] R¹表示氢、C₁-C₆-烷基、C₃-C₈-环烷基或卤代-C₁-C₆-烷基;

[0027] R²表示氢、C₁-C₆-烷基、C₃-C₈-环烷基或卤代-C₁-C₆-烷基;

[0028] R³、R⁴是氢、C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR³、-SOR³、-COR³、-CO₂R³、NCOR³、-NR⁵R⁶、3-7元的含氮脂肪杂环、芳基或杂芳基,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代,芳基或杂芳基为五元芳杂环、六元芳杂环、苯并五元杂环或五元杂环并六元杂环,芳基或杂芳基环上可含一个或多个相同或不同的下列取代基:氢、卤素、羟基、硝基、氰基、C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR³、-SOR³、-COR³、-CO₂R³、NCOR³、-NR⁵R⁶或3-7元的含氮脂肪杂环,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代;

[0029] R⁵、R⁶为氢、C₁-C₁₂-烷基、C₃-C₈-环烷基、C₂-C₆-烯基、C₂-C₆-炔基、芳烷氧基、C₁-C₁₂-烷氧基、卤代-C₁-C₆-烷基、氰基-C₁-C₆-烷基、-SO₂R³、-OR⁴、-SOR⁵、-COR³、-CO₂R³、-NR¹R²或3-7元的含氮脂肪杂环,3-7元的含氮脂肪杂环环上含0-2根不饱和键和/或氢、卤素、羟基或C₁-C₆-烷基取代。

[0030] 进一步优选,所述化合物及其衍生物结构中:

[0031] R¹为氢或甲基;

[0032] R²为氢或甲基;

[0033] R³为2-甲氧基苯磺酰氨基、4-甲氧基苯磺酰氨基、甲氧甲酰基、苯氨甲酰基、2-甲氧基苯氨甲酰基、2-噻唑氨甲酰基、环戊氨甲酰基、苯基、3-吡啶基;

[0034] R⁴为乙氧甲酰氨基、苯磺酰氨基、2-甲氧基苯磺酰氨基、N-(丙磺酰基)乙酰氨基、

N-(苯磺酰基)苯磺酰氨基、苯甲酰氨基、2-甲氧基苯甲酰氨基、丁酰氨基、苯脲基、2-甲氧基苯脲基、3-三氟甲基苯脲基、乙脲基、N-(乙酰基)乙氧甲酰氨基、氨基、吡咯烷基。

[0035] 更进一步优选,所述化合物为以下任一化合物:

[0036] 1-(7-(氮杂环丁烷-3-基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-30),

[0037] N-(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)-2-甲氧基苯磺酰胺(I-31),

[0038] 1-(2-甲基-5-(吡啶-3-基)-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-32),

[0039] 1-(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)-3-乙基脲(I-33),

[0040] (3-乙酰基-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-34),

[0041] 1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-35),

[0042] 1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-36),

[0043] (3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-37),

[0044] 1-(7-氨基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-38),

[0045] (3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-4-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(I-39),

[0046] 1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-4-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-40),

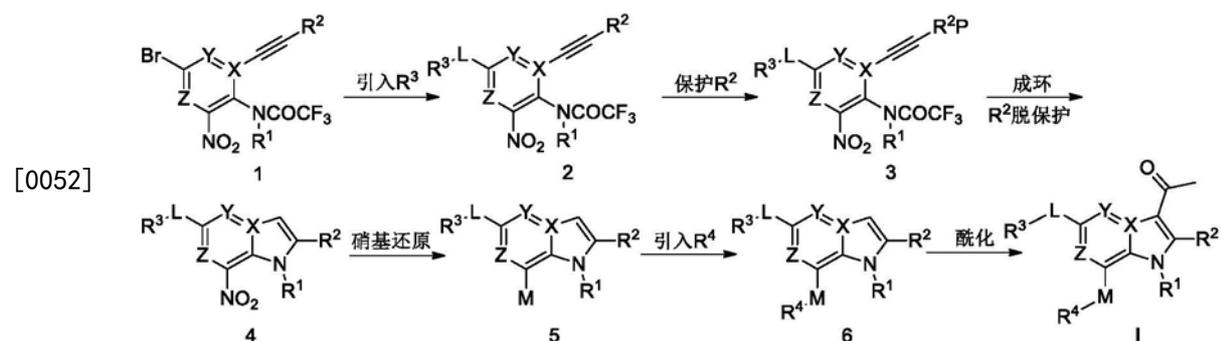
[0047] 1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-41)。

[0048] 本发明的抗骨质疏松化合物及其衍生物,所述药学上可接受的盐为所述化合物与酸或碱形成的盐,所述酸为盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘磺酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、马来酸或琥珀酸、富马酸、水杨酸、苯基乙酸或杏仁酸,所述碱为碱金属碱、碱土金属碱或铵离子碱。

[0049] 本发明的抗骨质疏松化合物及其衍生物的制备方法,所述方法为以下任一方法:

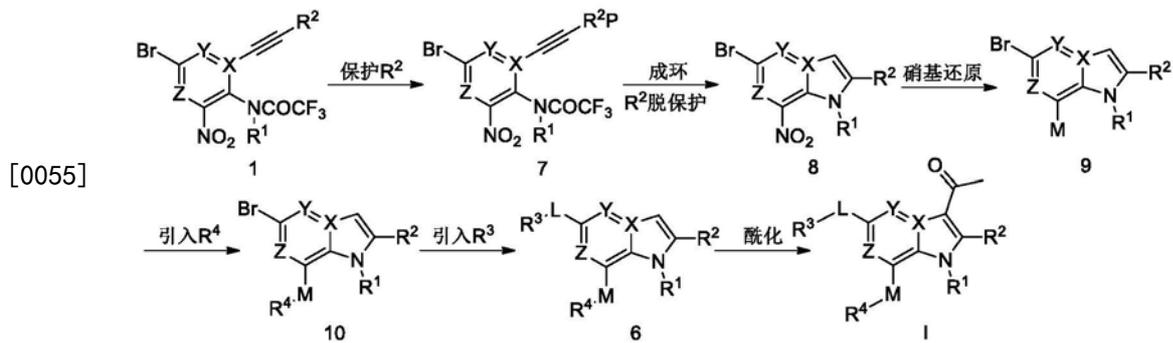
[0050] 方法一:

[0051] 溴代化合物1经偶联反应引入 R^3 得到化合物2,化合物2经 R^2 保护、环合和 R^2 脱保护反应得到化合物4,化合物4经还原和酰化反应引入 R^4 得到化合物6,化合物6再经酰化反应得到化合物I;



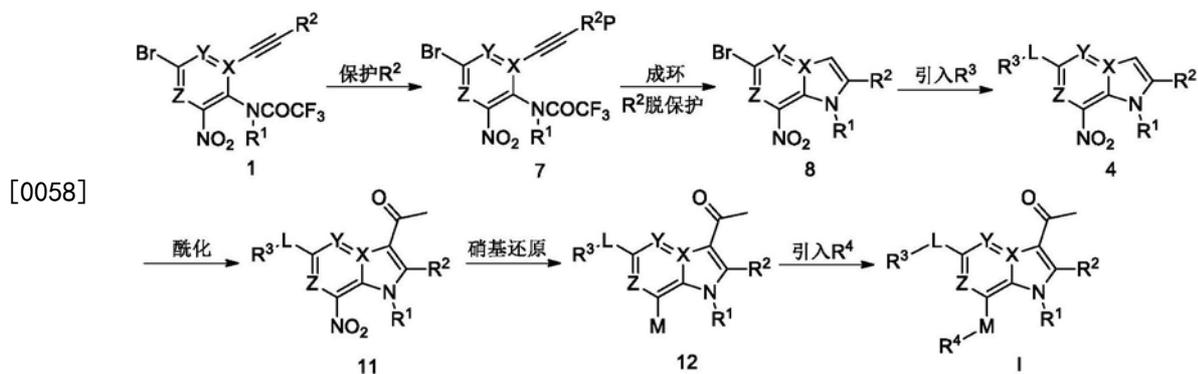
[0053] 方法二:

[0054] 溴代化合物1经 R^2 保护、环合和 R^2 脱保护反应得到化合物8,化合物8经还原和酰化反应引入 R^4 得到化合物10,化合物10经偶联反应引入 R^3 得到化合物6,化合物6再经酰化反应得到化合物I;



[0056] 方法三:

[0057] 溴代化合物1经 R^2 保护、环合和 R^2 脱保护反应得到化合物8,化合物8经偶联反应引入 R^3 得到化合物4,化合物4经酰化反应得到化合物11,化合物11再经还原和酰化反应引入 R^4 得到化合物I;



[0059] 其中,X、Y、Z、L、M、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 的定义如权利要求1~3任一所述;

[0060] 将相应的酸或碱的溶液加入到以上任一方法制备的具有式(I)结构的化合物的溶液中,成盐完全后减压除去溶剂,即得所述化合物药学上可接受的盐。

[0061] 本发明的药物组合物包含所述化合物和/或其衍生物以及药学上可接受的载体。

[0062] 所述化合物及其衍生物可以添加药学上可接受的载体制成常见的药用制剂,如片剂、胶囊、糖浆、悬浮剂、注射剂,可以加入香料、甜味剂、液体或固体填料或稀释剂等常用药用辅料。

[0063] 本发明的抗骨质疏松化合物及其衍生物在制备治疗RANKL/骨流失疾病药物中的应用。

[0064] 优选,所述化合物为以下任一化合物:

[0065] N-(3-乙酰基-2-甲基-1H-吡咯-5-基)-2-甲氧基苯磺酰胺(I-1),

[0066] N-(3-乙酰基-2-甲基-1H-吡咯-5-基)-4-甲氧基苯磺酰胺(I-2),

[0067] 3-乙酰基-2-甲基-7-(苯基磺酰氨基)-1H-吡咯-5-羧酸甲酯(I-3),

[0068] 3-乙酰基-7-((2-甲氧基苯基)磺酰氨基)-1H-吡咯-5-羧酸甲酯(I-4),

[0069] 3-乙酰基-2-甲基-7-(N-(丙基磺酰基)乙酰氨基)-1H-吡咯-5-羧酸甲酯(I-5),

[0070] 3-乙酰基-2-甲基-7-(N-(苯基磺酰基)苯基磺酰氨基)-1H-吡咯-5-羧酸甲酯(I-6),

[0071] 2-甲基-3-乙酰基-7-苯甲酰氨基-1H-吡咯-5-羧酸甲酯(I-7),

[0072] 3-乙酰基-7-(2-甲氧基苯甲酰氨基)-2-甲基-1H-吡咯-5-羧酸甲酯(I-8),

- [0073] 3-乙酰基-7-丁酰氨基-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-9),
- [0074] 3-乙酰基-2-甲基-7-(3-苯基脲基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-10),
- [0075] 3-乙酰基-7-(3-(2-甲氧基苯基)脲基)-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-11),
- [0076] 3-乙酰基-2-甲基-7-(3-(3-(三氟甲基)苯基)脲基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-12),
- [0077] 3-乙酰基-7-(3-乙脲基)-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-13),
- [0078] 3-乙酰基-7-((乙氧羰基)氨基)-2-甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-14),
- [0079] 3-乙酰基-7-((乙氧羰基)氨基)-1,2-二甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-15),
- [0080] 3-乙酰基-7-(N-(乙氧羰基)乙酰氨基)-1,2-二甲基-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-16),
- [0081] 3-乙酰基-7-((乙氧羰基)氨基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-17),
- [0082] (3-乙酰基-2-甲基-5-(苯基氨基甲酰基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-18),
- [0083] (3-乙酰基-5-((2-甲氧基苯基)氨基甲酰基)-2-甲基-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-19),
- [0084] (3-乙酰基-2-甲基-5-((噻唑-2-基)氨基甲酰基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-20),
- [0085] (3-乙酰基-5-(环戊基氨基甲酰基)-2-甲基-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-21),
- [0086] (3-乙酰基-2-甲基-5-(甲氨基甲酰基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-22),
- [0087] (3-乙酰基-5-苯甲酰基-2-甲基-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-23),
- [0088] (3-乙酰基-2-甲基-5-苯基-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-24),
- [0089] (3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸叔丁酯 (I-25),
- [0090] 3-乙酰基-2-甲基-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯 (I-26),
- [0091] 3-乙酰基-N-(2-甲氧基苯基)-2-甲基-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-5-甲酰胺 (I-27),
- [0092] 1-(7-氨基-5-苯甲酰基-2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮 (I-28),
- [0093] 2-甲基-3-乙酰基-N-(哌啶-4-基)-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-胺 (I-29),
- [0094] 1-(7-(氮杂环丁烷-3-基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮 (I-30),
- [0095] N-(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)-2-甲氧基苯磺酰胺 (I-31),
- [0096] 1-(2-甲基-5-(吡啶-3-基)-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮 (I-32),
- [0097] 1-(3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)-3-乙基脲 (I-33),
- [0098] (3-乙酰基-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-34),
- [0099] 1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮 (I-35),
- [0100] 1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮 (I-36),
- [0101] (3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-37),
- [0102] 1-(7-氨基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮 (I-38),
- [0103] (3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-4-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯 (I-39),
- [0104] 1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-4-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮 (I-40),

- [0105] 1-(7-(二甲基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(I-41)。
- [0106] 其中,化合物(I-1)~(I-29)及其制备方法已公开在CN2018109378714中,本发明涉及该类化合物在制备治疗RANKL/骨流失疾病药物中的应用。
- [0107] 优选,所述疾病为破骨细胞活性异常导致的疾病。
- [0108] 该类疾病包含骨质疏松症、类风湿性关节炎、牙周炎、牙齿脱落、佩吉特病、佝偻病、骨巨细胞瘤、骨髓瘤骨病、癌症骨转移造成的骨破坏等。
- [0109] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下显著优点:
- [0110] (1) 该类化合物及其衍生物和药物组合物可有效抑制抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性,给药浓度为5 μ M时酶抑制率大于20%;还可以影响破骨细胞特异性mRNA TRAP、NFATC1、C-FOS和CTSK表达,当给药浓度为1 μ M时即可产生影响,在酶水平和基因水平均可影响破骨细胞形成,具有抗骨质疏松活性;
- [0111] (2) 所制备的药物作用靶点广泛,可从酶水平和基因水平发挥药效,效果更优异;
- [0112] (3) 制备方法简便、易操作。

附图说明

- [0113] 图1为化合物1-1的¹H NMR谱图;
- [0114] 图2为化合物I-31的¹H NMR谱图;
- [0115] 图3为化合物I-31的质谱图;
- [0116] 图4为化合物I-39对破骨细胞分化的TRAP活性的抑制作用图;
- [0117] 图5为化合物I-39对破骨细胞形成的影响(TRAP染色)图,其中图5(A)为化合物施用浓度为0 μ M时的影响图,图5(B)为化合物施用浓度为0.078 μ M时的影响图,图5(C)为化合物施用浓度为0.156 μ M时的影响图,图5(D)为化合物施用浓度为0.312 μ M时的影响图,图5(E)为化合物施用浓度为0.625 μ M时的影响图,图5(F)为化合物施用浓度为1.25 μ M时的影响图;
- [0118] 图6为化合物I-39对破骨细胞特异性mRNA TRAP表达的影响图;
- [0119] 图7为化合物I-39对破骨细胞特异性mRNA CTSK表达的影响图;
- [0120] 图8为化合物I-39对破骨细胞特异性mRNA NFATC1表达的影响图;
- [0121] 图9为化合物I-39对破骨细胞特异性mRNA C-FOS表达的影响图。

具体实施方式

- [0122] 下面结合实施例对本发明的技术方案作进一步说明。
- [0123] 试剂与材料:
- [0124] (1) 4-溴-2-硝基苯胺购自萨恩化学技术(上海)有限公司,3-吡啶硼酸和无水吡啶购自北京乐研科技有限公司,碳酸铯和四三苯基磷钾购自上海迈瑞尔化学技术有限公司,双三苯基磷二氯化钾和碘化亚铜购自上海毕得医药科技有限公司。
- [0125] (2) 胎牛血清、 α -MEM培养基、0.25%胰酶和青霉素/链霉素购自Gibco,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)酶活性检测试剂盒与总蛋白测定试剂盒购自碧云天,17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)、DMSO、甲苯胺蓝,MTT,TRAP染色试剂盒购自sigma,细胞因子如M-CSF和mRANKL购自peprotech,细胞裂解液购自promega,PBS购自WISSENT公司,地塞米松、 β -甘油磷

酸和抗坏血酸购自CAYMAN公司, RNAiso Reagent、反转录和PCR试剂盒购自TaKaRa公司, 4周龄C57BL/6小鼠购自斯莱克。

[0126] (3) 细胞株: 骨髓破骨前体细胞取自C57BL/6小鼠股骨与胫骨髓腔; 骨髓间充质干细胞mMSC购自赛业生物科技有限公司、成骨细胞细胞株MC3T3-E1购自上海中科院细胞库, 细胞正常传代培养时采用完全培养基, 即 α -MEM+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素。

[0127] 仪器:

[0128] (1) 熔点采用RY-1G熔点仪(天津市新天光仪器公司)测定。 ^1H NMR和 ^{13}C NMR采用BRUKER AVANCE-300型核磁共振仪(瑞士Brucker公司)测定, 以TMS为内标, 位移值(δ)单位为ppm; 低分辨质谱采用Nicolet 2000型傅里叶变换质谱仪和MAT-212型质谱仪(ESI离子源)测定;

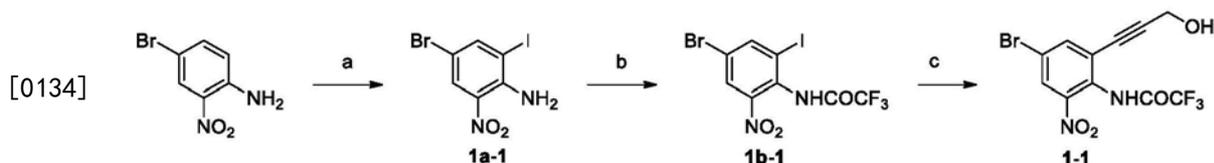
[0129] (2) Thermo scientific公司CO₂培养箱; LEICA SP 1600锯式切片机(德国); Olympus倒置显微镜; 上海新芝生物技术研究所以超声波清洗机, Tecan公司酶标仪。

[0130] 受试细胞的制备:

[0131] C57BL/6小鼠断颈处死, 75%酒精浸泡消毒, 无菌条件下剥离后肢长骨(股骨、胫骨), 去除附着的软组织, 用完全培养基反复冲洗骨髓腔内表面, 将骨髓腔内细胞彻底冲出, 细胞悬液用细胞筛过滤, 细胞定量后接种于直径10cm培养板内, 于5%CO₂和饱和湿度条件下培养过夜, 次日离心取上清未贴壁细胞, 换新鲜完全的培养基(含30ng/mL M-CSF)继续培养两天得到骨髓破骨前体细胞。

[0132] 抑制率(PR%) = [酶活力(阴性对照组) - 酶活力(实验组)] / [酶活力(阴性对照组) - 酶活力(空白对照组)] × 100%。

[0133] 实施例1: N-(4-溴-2-(3-羟基丙-1-炔-1-基)-6-硝基苯基)-2,2,2-三氟乙酰胺(化合物1-1)的合成



[0135] 其中: (a) Ag₂SO₄, I₂, CH₃OH, r. t., overnight; (b) (CF₃CO)₂O, anhydrous Et₃N, anhydrous DCM, 0°C, 5min; r. t., 2h; (c) propargyl alcohol, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, Et₃N, DMF, N₂, r. t., 12h.

[0136] (1) 4-溴-2-碘-6-硝基苯胺(化合物1a-1)的合成

[0137] 将碘(9.70g, 38.23mmol)加到500mL茄形瓶中, 再向瓶中加入250mL甲醇使碘溶解, 然后依次加入硫酸银(11.92g, 38.23mmol)和4-溴-2-硝基苯胺(5.00g, 25.49mmol), 室温搅拌过夜。TLC检测反应完全后, 过滤, 蒸出反应溶剂。残留物用二氯甲烷(100mL)稀释后, 加入饱和硫代硫酸钠溶液(100mL), 然后用二氯甲烷(100mL × 3)萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤干燥剂, 浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析(二氯甲烷为洗脱剂)分离得到橙黄色固体7.12g, 收率89%。mp: 140-141°C; ^1H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 8.24-8.12 (m, 2H), 7.17 (s, 2H); ESI-MS m/z: 340.9[M-H]⁺, 342.9[M+H]⁺。

[0138] (2) N-(4-溴-2-碘-6-硝基苯基)-2,2,2-三氟乙酰胺(化合物1b-1)的合成

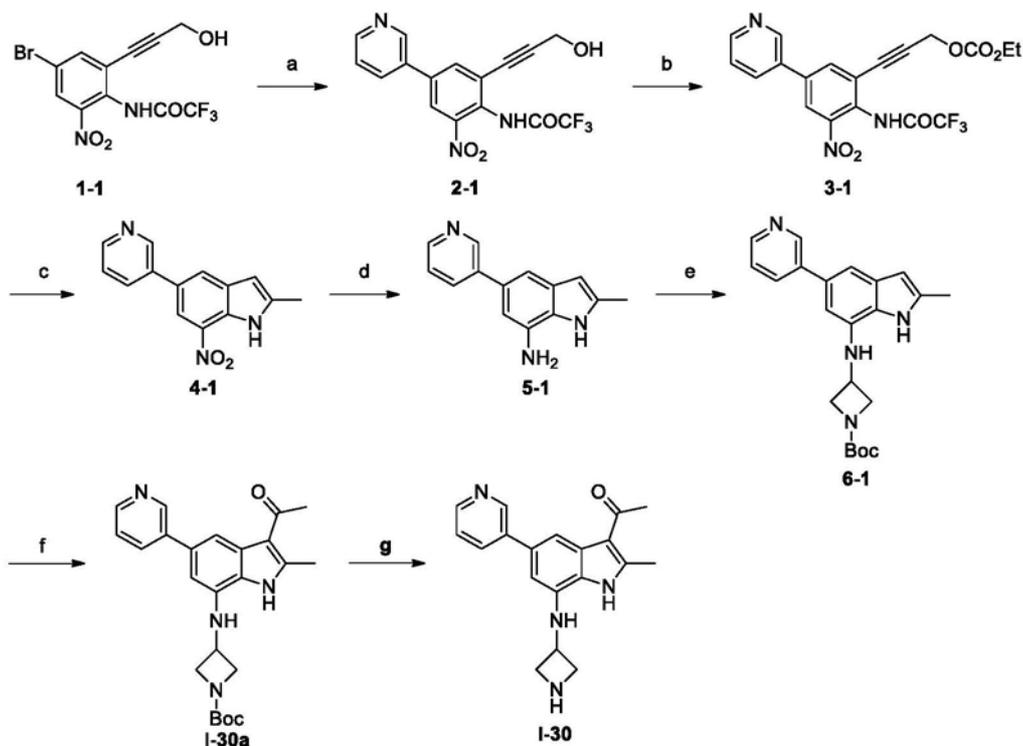
[0139] 将化合物1a-1(6.44g, 20.00mmol)加到500mL茄形瓶中, 再向瓶中加入200mL无水

二氯甲烷使化合物1a溶解,然后加入无水三乙胺(5.54mL,40.00mmol),最后在0℃下缓慢滴加三氟乙酸酐(5.07mL,36.00mmol)。滴毕,0℃继续搅拌5分钟,接着室温搅拌2小时。TLC检测反应完全后,蒸出反应溶剂,加入稀盐酸(1mol/L,100mL),用乙酸乙酯(100mL×3)萃取,饱和氯化钠溶液(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤干燥剂,浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯,体积比为1:1)分离得到淡黄色固体5.50g,收率84%。mp:150-151℃;¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ11.85(s,1H),8.61(d,J=2.1Hz,1H),8.37(d,J=2.0Hz,1H);ESI-MS m/z:436.8[M-H]⁺。

[0140] (3)-N-(4-溴-2-(3-羟基丙-1-炔-1-基)-6-硝基苯基)-2,2,2-三氟乙酰胺(化合物1-1)的合成

[0141] 将化合物1b-1(624mg,1.49mmol)、双三苯基磷二氯化钯(52.4mg,74.63μmol)和碘化亚铜(28.4mg,149.26μmol)加到25mL二口圆底烧瓶中,用氮气置换瓶中的空气5分钟后,加入无水N,N-二甲基甲酰胺(1.5mL)、N,N-二异丙基乙胺(6mL)和二异丙胺(3mL),边搅拌边用氮气置换反应体系中的空气30分钟。然后,缓慢滴加由丙炔醇(104μL,1.79mmol)与二异丙胺(3mL)组成的混合溶液,反应液室温搅拌12小时。TLC检测反应完全后,垫硅藻土滤除不溶性杂质,用乙酸乙酯洗涤滤饼,滤液用饱和氯化铵水溶液(15mL×2)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤干燥剂,减压浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯,体积比为1:1)分离得到黄色固体4.92g,收率53%。mp:181-183℃;¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ11.87(s,1H),8.22(d,J=1.5Hz,1H),8.11(d,J=1.7Hz,1H),6.64-6.56(m,1H),4.69(d,J=6.0Hz,2H)。

[0142] 实施例2:1-(7-(氮杂环丁烷-3-基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡咯-3-基)乙烷-1-酮(化合物I-30)的合成



[0144] 其中:(a) 3-pyridylboronic acid, Pd(Ph₃P)₄, K₂CO₃, 1,4-dioxane, H₂O, 100℃, 12h; (b) ethyl chloroformate, anhydrous pyridine, 0℃, 5min; r. t., 2h; (c) Pd(PPh₃)₄,

anhydrous Et_3N , HCO_2H , CH_3CN , N_2 , 80°C , 2h; (d) Pd/C , H_2 , $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}$ (v/v, 1/1), r.t., 5h; (e) EtOH , NaBH_4 , rt, 2h; (f) acetyl chloride, Et_2AlCl , AlCl_3 , N_2 , anhydrous DCM, 0°C , 5min; r.t., 5h; (g) CF_3COOH , DCM, r.t., 1h.

[0145] (1) 2,2,2-三氟-N-(2-(3-羟基丙-1-炔-1-基)-6-硝基-4-(吡啶-3-基)苯基)乙酰胺(化合物2-1)的合成

[0146] 将化合物1-1 (100mg, 272.42 μmol)、3-吡啶硼酸 (49.8mg, 408.63 μmol)、四(三苯基磷)钯 (31.5mg, 27.24 μmol) 和碳酸钾 (113.0mg, 817.26 μmol) 加至25mL三口圆底烧瓶中,用氮气置换反应体系中的空气后,加入新蒸过的二氧六环 (6mL) 和去离子水 (2mL)。反应液在 100°C 下反应12小时。TLC检测反应完全后,加入乙酸乙酯 (5mL) 稀释,过滤除去不溶性杂质,用水 (10mL \times 3) 萃取,无水硫酸钠干燥,过滤干燥剂,浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯, 体积比为2:1) 得到黄绿色固体237.0mg, 收率80%。mp: $225\text{--}227^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 11.77 (s, 1H), 9.00 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 8.59 (dd, $J=4.7, 1.5\text{Hz}$, 1H), 8.40 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H), 8.33 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 8.25-8.16 (m, 1H), 6.68 (d, $J=1.9\text{Hz}$, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.72 (s, 2H)。ESI-MS m/z : 448.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0147] (2) (3-(3-硝基-5-(吡啶-3-基)-2-(2,2,2-三氟乙酰氨基)苯基)丙-2-炔-1-基)碳酸乙酯(化合物3-1)的合成

[0148] 将化合物2-1 (2.49g, 7.19mmol) 和无水吡啶 (87.8 μL , 719.20 μmol) 加到250mL茄形瓶中, 0°C 下缓慢滴加氯甲酸乙酯 (1.37mL, 14.38mmol)。滴毕, 0°C 下搅拌5分钟后, 室温搅拌2小时。TLC检测反应完全后, 反应液依次用1mol/L稀盐酸 (50mL \times 2)、饱和氯化钠水溶液 (50mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤干燥剂, 减压浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯, 体积比为1:1) 分离得到黄色固体429.5mg, 收率98%。mp: $166\text{--}168^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 12.19 (s, 1H), 9.05-8.96 (m, 1H), 8.60 (d, $J=4.6\text{Hz}$, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.26-8.16 (m, 1H), 6.86 (s, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.18 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 1.25 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H)。

[0149] (3) 2-甲基-7-硝基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶(化合物4-1)的合成

[0150] 将化合物3-1 (2.33g, 5.57mmol) 和四(三苯基磷)钯 (321.9mg, 278.52mmol) 加到100mL三口圆底烧瓶中, 加入无水乙腈后, 用氮气置换反应体系中的空气, 接着依次注入无水三乙胺 (2.31mL, 16.68mmol)、甲酸 (88%, 477 μL , 11.12mmol), 80°C 搅拌2小时。TLC检测反应完全后, 待冷却后浓缩反应液得到残留物。残留物经硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯, 体积比为8:1) 分离得到黄色固体153.8mg, 收率62%。mp: $208\text{--}210^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 11.88 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.59 (d, $J=4.6\text{Hz}$, 1H), 8.29 (d, $J=11.2\text{Hz}$, 2H), 8.19 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.51 (dd, $J=7.7, 4.9\text{Hz}$, 1H), 6.50 (s, 1H), 2.50 (s, 3H); ESI-MS m/z : 254.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0151] (4) 2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-胺(化合物5-1)的合成

[0152] 将化合物4-1 (100.0mg, 426.97 μmol)、钯炭 (10%, 10mg)、四氢呋喃与甲醇的混合溶剂 (体积比1:1, 5mL) 加至25mL二口圆底烧瓶中, 用氢气置换反应瓶中的空气后, 在氢气作用下室温反应5h。TLC检测反应完全后, 垫硅藻土过滤, 用甲醇洗涤滤饼, 浓缩得灰色固体44.1mg, 收率99%。无需纯化直接投下一步反应。ESI-MS m/z : 224.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0153] (5) 3-(((2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)氨基)氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁

酯(化合物6-1)的合成

[0154] 将1-Boc-3-氮杂环丁酮(38.72mg, 226 μ mol)溶于甲苯中,加入化合物5-1(50mg, 188 μ mol), 115 $^{\circ}$ C下回流5小时,冷却至室温,将甲苯旋干,立刻投下一步,将上述准备好的亚胺溶于5mL甲醇,氩气保护下加入硼氢化钠(42.74mg, 1.13mmol),室温下反应3小时,TLC确定反应完全。加入1mol/L的NaOH溶液搅拌0.5小时,DCM萃取三次,收集有机相,无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,经薄层色谱大板纯化得淡黄色固体5mg,收率10%。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 13.04(s, 1H), 8.86(s, 1H), 8.51(s, 1H), 8.03(s, 1H), 7.19(s, 1H), 6.33(d, J=5.9Hz, 1H), 4.29(s, 2H), 3.85(d, J=7.2Hz, 2H), 2.70(s, 3H), 1.41(d, J=6.6Hz, 9H)。ESI-MS m/z: 378.2[M+H]⁺

[0155] (6) 3-((3-乙酰基-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-7-基)氨基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯(化合物I-30a)的合成

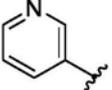
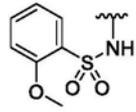
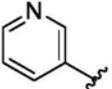
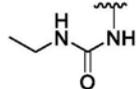
[0156] 将化合物6-1(51.0mg, 148.09 μ mol)、无水氯化铝(29.62mg, 222.14 μ mol)加到10mL二口圆底烧瓶中,加入无水二氯甲烷(2mL)后,用氮气置换反应体系中的空气5分钟,然后0 $^{\circ}$ C下依次加入二乙基氯化铝的己烷溶液(1M, 222 μ L, 222.14 μ mol)、乙酰氯(16 μ L, 222.14 μ mol)。加毕,0 $^{\circ}$ C继续搅拌5分钟后,室温反应5小时。TLC检测反应完成后,加入冰水(5mL),分离出有机层,水层用乙酸乙酯(5mL \times 2)萃取,合并有机相,用饱和食盐水(10mL)洗涤后加无水硫酸钠干燥,减压浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯,体积比为1:1)分离得到淡黄色固体20mg,收率40%。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 13.04(s, 1H), 8.86(s, 1H), 8.51(s, 1H), 8.03(s, 1H), 7.19(s, 1H), 6.33(d, J=5.9Hz, 1H), 4.29(s, 2H), 3.85(d, J=7.2Hz, 2H), 3.18(d, J=5.1Hz, 3H), 2.70(s, 3H), 1.41(d, J=6.6Hz, 9H)。ESI-MS m/z: 420.3[M+H]⁺。

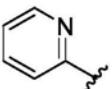
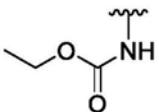
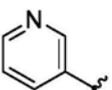
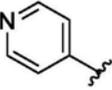
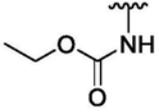
[0157] (7) 1-(7-(氮杂环丁烷-3-基氨基)-2-甲基-5-(吡啶-3-基)-1H-吡啶-3-基)乙烷-1-酮(化合物I-30)的合成

[0158] 将化合物I-30a(20.0mg, 44.6 μ mol)加入10mL茄形瓶中,加入3mL DCM溶解,加入三氟乙酸(0.2mL),室温下搅拌反应1小时。TLC检测反应完成后,用饱和NaHCO₃溶液调节PH至中性,DCM萃取三遍,收集有机相,浓缩,经薄层色谱大板纯化得到淡黄色固体3mg,收率50%。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 13.04(s, 1H), 8.70(d, J=12.2Hz, 2H), 7.94(s, 2H), 7.59(s, 1H), 4.71(s, 1H), 4.60(s, 1H), 3.12(d, 2H), 2.89(d, J=9.9Hz, 3H), 2.84(d, J=2.6Hz, 3H), 2.59(d, J=2.3Hz, 3H)。ESI-MS m/z: 320.1[M+H]⁺。

[0159] 采用与实施例2相似的操作,制得下列化合物:

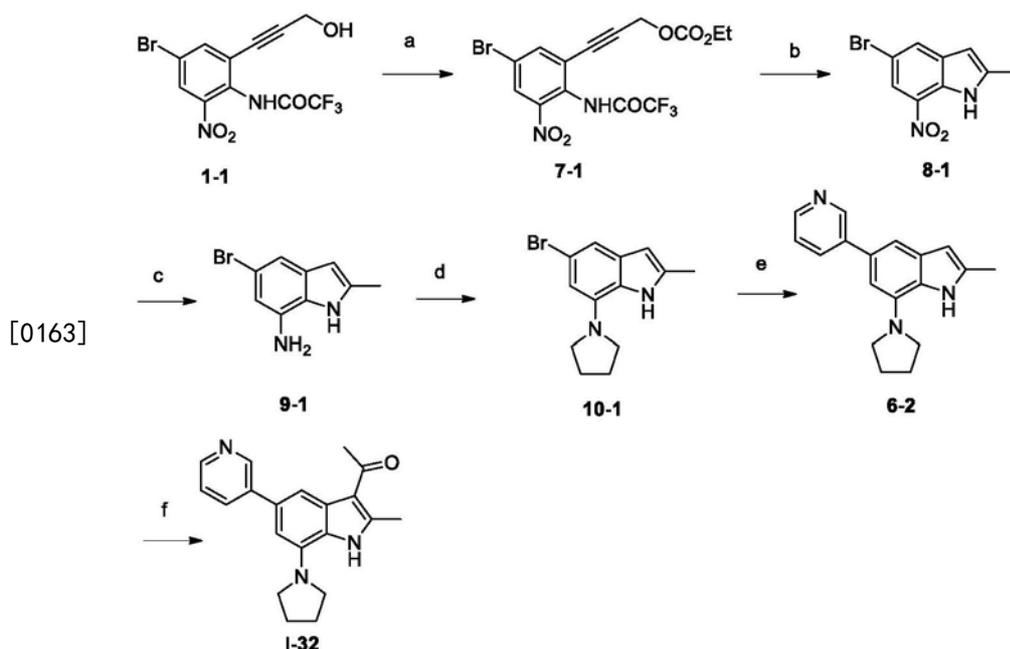
[0160]

化合物编号	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	ESI-MS m/z
I-31	H	CH ₃			8.60 – 8.55 (m, 1H), 8.44 (dd, <i>J</i> = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 7.84 (dd, <i>J</i> = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.75 (dt, <i>J</i> = 7.9, 1.9 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.39 (dd, <i>J</i> = 7.9, 5.1 Hz, 2H), 7.07 - 7.00 (m, 2H), 6.94 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 2.70 (s, 3H).	ESI-MS m/z: 435.1[M+H] ⁺ .
I-33	H	CH ₃			11.44 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 8.81 (dd, <i>J</i> = 2.5, 0.8 Hz, 1H), 8.47 (dd, <i>J</i> = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 7.96 (ddd, <i>J</i> = 7.9, 2.5, 1.7 Hz, 1H), 7.81 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H), 7.43 (ddd, <i>J</i> = 8.0, 4.7, 0.8 Hz, 1H), 7.32 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz,	ESI-MS m/z: 336.2[M+H] ⁺ .

化合物编号	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	ESI-MS m/z
					1H), 7.11 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 6.15 (dd, <i>J</i> = 2.1, 1.1 Hz, 1H), 3.15 (qd, <i>J</i> = 7.1, 5.4 Hz, 2H), 2.40 (d, <i>J</i> = 0.9 Hz, 3H), 1.09 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).	
I-37	H	CH ₃			¹ H NMR (400 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) δ 8.54 – 8.47 (m, 1H), 8.34 (q, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 7.79 (dq, <i>J</i> = 6.4, 1.6 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 4.22 – 4.12 (m, 2H), 2.67 (q, <i>J</i> = 2.4 Hz, 3H), 2.57 (q, <i>J</i> = 2.4 Hz, 3H), 1.25 (s, 3H).	ESI-MS m/z: 337.1[M+H] ⁺ .
I-38	H	CH ₃		NH ₂	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.52 (s, 1H), 8.80 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 8.50 (dd, <i>J</i> = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 7.96 (dt, <i>J</i> = 7.9, 2.0 Hz, 1H), 7.52 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 1H), 7.44 (dd, <i>J</i> = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 6.70 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.53 (s, 3H).	ESI-MS m/z: 265.1[M+H] ⁺ .
I-39	H	CH ₃			¹ H NMR (300 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) δ 8.47 – 8.40 (m, 2H), 8.17 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H), 7.67 – 7.61 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 4.17 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 1.25 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 4H).	ESI-MS m/z: 337.1[M+H] ⁺ .

[0161]

[0162] 实施例3:1-(2-甲基-5-(吡啶-3-基)-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-3-基)乙-1-酮(化合物I-32)的合成



[0164] 其中：(a) ethyl chloroformate, anhydrous pyridine, 0°C, 5min; r. t., 2h; (b) Pd(PPh₃)₄, HCOOH, TEA, MeCN, N₂, 80°C, 1h; (c) Fe, AcOH, 75% EtOH, 85°C, 4h; (d) 1,4-diodobutane, potassium carbonate, DMF, 55°C, 3.5h; (e) 3-pyridylboronic acid, PdCl₂(dppf)₂, Cs₂CO₃, dioxane:H₂O=6:1, 100°C, 5h; (f) acetyl chloride, Et₂AlCl, AlCl₃, N₂, anhydrous DCM, 0°C, 5min; r. t., 5h.

[0165] (1) 3-(5-溴-3-硝基-2-(2,2,2-三氟乙酰氨基)苯基)丙-2-炔-1-基碳酸乙酯(化合物7-1)的合成

[0166] 将化合物1-1 (2.49g, 7.19mmol) 和无水吡啶 (87.8μL, 719.20μmol) 加到250mL茄形瓶中, 0°C下缓慢滴加氯甲酸乙酯 (1.37mL, 14.38mmol)。滴毕, 0°C下搅拌5分钟后, 室温搅拌2小时。TLC检测反应完全后, 反应液依次用1mol/L稀盐酸 (50mL×2)、饱和氯化钠水溶液 (50mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤干燥剂, 减压浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯, 体积比为1:1) 分离得到黄色固体2g, 收率96%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 11.94 (s, 1H), 8.87 (d, J=6.1Hz, 1H), 8.52 (d, J=7.2Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.50 (dd, J=29.0, 6.5Hz, 2H), 6.67 (d, J=6.1Hz, 1H), 5.63 (s, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.17 (d, J=4.5Hz, 2H), 2.93 (s, 2H), 2.70 (d, J=6.2Hz, 3H), 2.14 (t, J=8.4Hz, 2H), 1.58 (s, 2H)。ESI-MS m/z: 438.1 [M+H]⁺。

[0167] (2) 5-溴-2-甲基-7-硝基-1H-吡咯(化合物8-1)的合成

[0168] 将化合物7-1 (2g, 4.55mmol)、80mL乙腈、三乙胺 (13.5mmol, 1.88mL)、甲酸 (9.1mmol, 344μL) 加入100mL二口烧瓶中, 除氧0.5小时后, 打开方口塞, 加入四三苯基膦钯, N₂抽排三次, 80°C下搅拌1小时, TLC确定反应完全后, 直接浓缩, 柱层析(石油醚/乙酸乙酯, 体积比为40:1) 纯化得到黄色固体620mg, 收率41.3%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 11.94 (s, 1H), 8.18-7.99 (m, 2H), 6.43 (d, J=5.5Hz, 1H)。ESI-MS m/z: 255.9 [M+H]⁺。

[0169] (3) 5-溴-2-甲基-7-氨基-1H-吡咯(化合物9-1)的合成

[0170] 将化合物8-1 (620mg, 2.43mmol) 溶于75%乙醇中, 加入铁粉 (408mg, 7.3mmol) 和乙酸 (418μL, 7.3mmol), 85°C下回流4小时, TLC确定反应完全后, 饱和NaHCO₃调节PH至中性, 垫

硅藻土过滤铁粉,浓缩滤液,柱层析(石油醚/乙酸乙酯=5:1)纯化得到灰色固体500mg,收率83.3%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ10.60 (s, 1H), 6.78 (d, J=1.8Hz, 1H), 6.36 (d, J=1.8Hz, 1H), 5.97 (dd, J=2.2, 1.0Hz, 1H), 5.19 (s, 2H), 2.36 (d, J=0.9Hz, 3H)。ESI-MS m/z: 223.9[M+H]⁺。

[0171] (4) 5-溴-2-甲基-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶(化合物10-1)的合成

[0172] 将化合物9-1 (220mg, 0.977mmol)、1,4-二碘代丁烷(155μL, 1.46mmol)、碳酸钾(271mg, 1.96mmol)加入100mL茄形瓶中,加入6mL DMF溶解,55℃下搅拌3.5小时,TLC确定反应完全后,冷却至室温,加水35mL洗涤,乙酸乙酯萃取(20mL×3),收集有机相,无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,柱层析(石油醚/乙酸乙酯=10:1)纯化得到灰色固体200mg,收率80%。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ10.77 (s, 1H), 7.42-7.00 (m, 2H), 6.34 (s, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.19-1.84 (m, 4H)。ESI-MS m/z: 278.1[M+H]⁺。

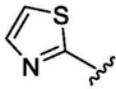
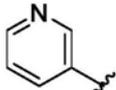
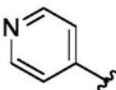
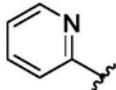
[0173] (5) 2-甲基-5-(吡啶-3-基)-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶(化合物6-2)的合成

[0174] 将化合物10-1 (100mg, 272.42μmol)、3-吡啶硼酸(49.8mg, 408.63μmol)、PdCl₂(dppf)₂(3.5mg, 27.24μmol)和碳酸铯(113.0mg, 817.26μmol)加至25mL三口圆底烧瓶中,用氮气置换反应体系中的空气后,加入新蒸过的二氧六环(6mL)和去离子水(1mL)。反应液在100℃下反应5小时。TLC检测反应完全后,加入乙酸乙酯(5mL)稀释,过滤除去不溶性杂质,用水(10mL×3)萃取,无水硫酸钠干燥,过滤干燥剂,浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯,体积比为2:1)得到白色固体50mg,收率42%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ10.40 (s, 1H), 8.85 (d, J=2.3Hz, 1H), 8.46 (d, J=4.7Hz, 1H), 8.01 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.41 (dd, J=8.0, 4.8Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.06-1.89 (m, 4H)。ESI-MS m/z: 277.2[M+H]⁺。

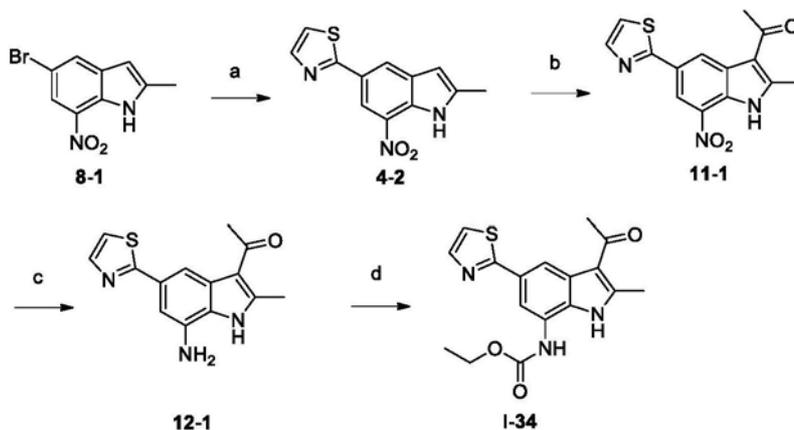
[0175] (6) 1-(2-甲基-5-(吡啶-3-基)-7-(吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-3-基)乙-1-酮(化合物I-32)的合成

[0176] 将化合物6-2 (51.0mg, 148.09μmol)、无水氯化铝(29.62mg, 222.14μmol)加到10mL二口圆底烧瓶中,加入无水二氯甲烷(2mL)后,用氮气置换反应体系中的空气5分钟,然后0℃下依次加入二乙基氯化铝的己烷溶液(1M, 222μL, 222.14μmol)、乙酰氯(16μL, 222.14μmol)。加毕,0℃继续搅拌5分钟后,室温反应5小时。TLC检测反应完成后,加入冰水(5mL),分离出有机层,水层用乙酸乙酯(5mL×2)萃取,合并有机相,用饱和食盐水(10mL)洗涤后加无水硫酸钠干燥,减压浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯,体积比为1:1)分离得到白色固体25mg,收率72%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ11.12 (s, 1H), 8.87 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.52 (d, J=4.7Hz, 1H), 8.04 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.46 (dd, J=8.0, 4.8Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 3.46 (d, J=6.1Hz, 4H), 2.74 (s, 3H), 2.00 (d, J=6.2Hz, 4H)。ESI-MS m/z: 319.2[M+H]⁺。

[0177] 采用与实施例3相似的操作,制得下列化合物:

化合物编号	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	ESI-MS m/z
I-35	H	CH ₃			11.78 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 2.85 (s, 6H), 2.74 (s, 3H).	299.1[M+H] ⁺ .
[0178] I-36	H	CH ₃			11.71 (s, 1H), 8.89 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 8.53 (d, <i>J</i> = 4.7 Hz, 1H), 8.06 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.96 (s, 2H), 7.47 (dd, <i>J</i> = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 2.89 (s, 3H), 2.73 (s, 6H), 2.55 (s, 3H).	293.2[M+H] ⁺ .
I-40	H	CH ₃			11.74 (s, 1H), 8.65 – 8.55 (m, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.75 – 7.65 (m, 2H), 7.06 (s, 1H), 2.86 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 6H), 2.73 (s, 3H), 2.55 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 4H).	293.2[M+H] ⁺ .
化合物编号	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ	ESI-MS m/z
[0179] I-41	H	CH ₃			11.67 (s, 1H), 8.64 (d, <i>J</i> = 4.5 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.89 (dd, <i>J</i> = 19.8, 7.8 Hz, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.28 (t, <i>J</i> = 6.1 Hz, 1H), 2.85 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 6H), 2.73 (s, 3H), 2.55 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 3H).	293.2[M+H] ⁺ .

[0180] 实施例4: (3-乙酰基-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吲哚-7-基)氨基甲酸乙酯(化合物I-34)的合成



[0182] 其中: (a) bis (pinacolato) diboron, PdCl₂ (dppf)₂, KOAc, 2-bromothiazole,

Na₂CO₃, N₂, dioxane, 100 °C, overnight; 100 °C, 3h; (b) acetyl chloride, Et₂AlCl, AlCl₃, N₂, anhydrous DCM, 0 °C, 5min; r.t., 5h; (c) Fe, AcOH, 75% EtOH, 85 °C, 4h; (d) ethyl chloroformate, Sat. K₂CO₃ (aq), DCM, r.t., 1h.

[0183] (1) 2-(2-甲基-7-硝基-1H-吡啶-5-基)噻唑(化合物4-2)的合成

[0184] 将化合物8-1 (200mg, 784μmol)、联硼酸频那醇酯 (299mg, 1.176mmol)、PdCl₂(dppf)₂ (46mg, 62.72mmol) 依次加入100mL茄形瓶中, 加入30mL无水二氧六环, 迅速加入乙酸钾 (308mg, 3.136mmol), 氮气抽排三次, 100 °C下回流过夜, TLC确定反应完全后, 加水洗涤, 乙酸乙酯 (50mL×3) 萃取, 收集有机相, 无水Na₂SO₄干燥, 过滤, 浓缩后直接投下一步。将上述制备的240mg硼酸粗品、2-溴噻唑 (48μL, 53mmol)、PdCl₂(dppf)₂ (19.2mg, 2.65mmol)、碳酸钠 (224.5mg, 212mmol) 依次加入100mL茄形瓶中, 加入3mL去离子水溶解碳酸钠, 再加入18mL无水二氧六环, 氮气抽排三次, 100 °C下回流3小时, TLC确定反应完全后, 加水洗涤, 乙酸乙酯 (50mL×3) 萃取, 收集有机相, 无水Na₂SO₄干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析(石油醚/乙酸乙酯=10:1) 纯化得到黄色固体50mg, 收率25%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ12.03 (s, 1H), 8.55 (dd, J=17.4, 4.3Hz, 2H), 8.10-7.79 (m, 2H), 6.61 (d, J=4.9Hz, 1H), 2.50 (s, 3H)。ESI-MS m/z: 259.0 [M+H]⁺。

[0185] (2) 1-(2-甲基-7-硝基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙-1-酮(化合物11-1)的合成

[0186] 将化合物4-2 (51.0mg, 148.09μmol)、无水氯化铝 (29.62mg, 222.14μmol) 加到10mL二口圆底烧瓶中, 加入无水二氯甲烷 (2mL) 后, 用氮气置换反应体系中的空气5分钟, 然后0 °C下依次加入二乙基氯化铝的己烷溶液 (1M, 222μL, 222.14μmol)、乙酰氯 (16μL, 222.14μmol)。加毕, 0 °C继续搅拌5分钟后, 室温反应5小时。TLC检测反应完成后, 加入冰水 (5mL), 分离出有机层, 水层用乙酸乙酯 (5mL×2) 萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水 (10mL) 洗涤后加无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得粗产物。粗产物经硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯, 体积比为1:1) 分离得到黄色固体61.2mg, 收率90%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ12.45 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.57 (d, J=6.3Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.83 (d, J=6.5Hz, 1H), 2.91-2.79 (m, 3H), 2.64-2.54 (m, 3H)。ESI-MS m/z: 301.1 [M+H]⁺。

[0187] (3) 1-(2-甲基-7-氨基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-3-基)乙-1-酮(化合物12-1)的合成

[0188] 将化合物11-1 (620mg, 2.43mmol) 溶于75%乙醇中, 加入铁粉 (408mg, 7.3mmol) 和乙酸 (418μL, 7.3mmol), 85 °C下回流4小时, TLC确定反应完全后, 饱和NaHCO₃调节PH至中性, 垫硅藻土过滤铁粉, 浓缩滤液, 柱层析(石油醚/乙酸乙酯=5:1) 纯化得到淡黄色固体51.7mg, 收率80%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ12.45 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.57 (d, J=6.3Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.83 (d, J=6.5Hz, 1H), 4.29 (s, 2H), 2.91-2.79 (m, 3H), 2.64-2.54 (m, 3H)。ESI-MS m/z: 271.1 [M+H]⁺。

[0189] (4) (3-乙酰基-2-甲基-5-(噻唑-2-基)-1H-吡啶-7-基)氨基甲酸乙酯(化合物I-34)的合成

[0190] 将氯甲酸乙酯 (85μL, 396.36μmol) 和饱和碳酸钾溶液 (109μL, 788.72μmol) 和2mL二氯甲烷加到10mL茄形瓶中, 室温搅拌1小时。向反应瓶中加入化合物12-1 (30.0mg, 146.89μmol) 的二氯甲烷溶液 (1mL)。加毕, 室温反应1小时。TLC检测反应完全后, 浓缩反应液, 得到

的残留物经硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯,体积比为2:1)分离得到黄色固体25mg,收率50%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 11.67 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 8.46 (d, J=1.6Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.87 (d, J=3.3Hz, 1H), 7.70 (d, J=3.3Hz, 1H), 4.20 (q, J=7.1Hz, 2H), 2.72 (s, 4H), 2.54 (s, 3H), 1.29 (t, J=7.1Hz, 3H). ESI-MS m/z: 343.1 [M+H]⁺.

[0191] 实施例5:对破骨细胞分化的TRAP活性的抑制作用

[0192] 骨髓破骨细胞前体细胞以每孔5000个的浓度接种到96孔板,每孔100μL,培养过夜。将化合物分别用培养基(含30ng/mL M-CSF和50ng/mL RANKL)配制成浓度5μM,每孔加入100μL,阴性对照组每孔加入等量培养基(含30ng/mL M-CSF和50ng/mL RANKL),空白对照组每孔加入含有与实验组相同浓度DMSO的培养基(含30ng/mL M-CSF)。骨髓破骨前体细胞培养3天后弃培养液,PBS轻洗3次,然后按照TRAP酶活性检测试剂盒说明书进行操作,在405nm处测定吸光度值,最后换算出酶活力。以96孔培养板的1孔细胞在37℃与底物作用,1min产生1nmol的游离酚表示1个酶活力单位,计算供试化合物对TARP的抑制率。

[0193] 表1对破骨细胞分化的TRAP的抑制率

化合物	抑制率 (PR%) (5μM)
I-23	66.8±0.6
I-22	36.7±1.5
I-26	62.1±0.9
I-25	66.5±0.6
I-39	71.6±0.1
I-37	38.8±1.5
I-34	41.3±0.4
I-36	26.2±1.2
I-32	40±1.9
I-40	67.1±0.3
I-41	105.1
I-35	44.1±0.7

[0195] 如表1所示,化合物I-23、I-22、I-26、I-25、I-39、I-37、I-34、I-36、I-32、I-40、I-41和I-35对破骨细胞分化的TRAP活性均有抑制作用。

[0196] 如图4所示,化合物I-39对破骨细胞分化的TRAP活性有抑制作用,减弱破骨细胞的骨吸收作用,减少破骨细胞的骨吸收量,从而减少骨流失。

[0197] 实施例6:化合物对破骨细胞形成的影响 (TRAP染色法)

[0198] 将骨髓破骨前体细胞以每孔5000个/孔的浓度接种到96孔板,每孔100μL,培养过夜。次日,将化合物用含有M-CSF和mRANKL的完全培养基稀释药物并加入细胞,使其终浓度均为5μmol/L,每孔加入100μL,对照孔加入等量培养基和对应比例的DMSO。细胞培养2天后,更换一次含有药物的新鲜培养液。4天后破骨细胞融合并形泡状结构,用PBS清洗细胞后,4%的多聚甲醛固定细胞10分钟,再用PBS清洗。按照TRAP染色试剂盒配制TRAP染色液,将染色液加入已固定好的细胞内,置于37℃反应1h左右,倒置显微镜观察并拍照,并以≥3个细胞核的破骨细胞样细胞计数。

[0199] 如图5所示,化合物I-39可以影响破骨细胞的形成,降低破骨细胞数量,减少破骨

细胞的骨吸收量,从而减少骨流失。

[0200] 实施例7:对破骨细胞分化过程相关基因的影响(实时荧光定量PCR法(RT-PCR))

[0201] 将骨髓破骨前体细胞接种至6孔板,培养过夜。次日,将化合物用含有M-CSF和mRANKL的完全培养基稀释并加入细胞,使其终浓度均为5 μ M,对照孔加入等量培养基和对应比例的DMSO。于药物培养3天后提取总RNA,RT-PCR法检测TRAP、NFATC1、C-FOS和CTSK的表达水平。总RNA的提取采用Trizol一步法进行,紫外分光光度计检测纯度和浓度,反转录体系、PCR扩增体系及反应条件均参照试剂盒说明书设定,经内参校正,求得目的基因的相对表达量。

[0202] 如图6~9所示,化合物I-39分别对破骨细胞特异性mRNA TRAP、NFATC1、C-FOS和CTSK的表达产生了影响,减弱破骨细胞的骨吸收作用,减少破骨细胞的骨吸收量,从而减少骨流失。

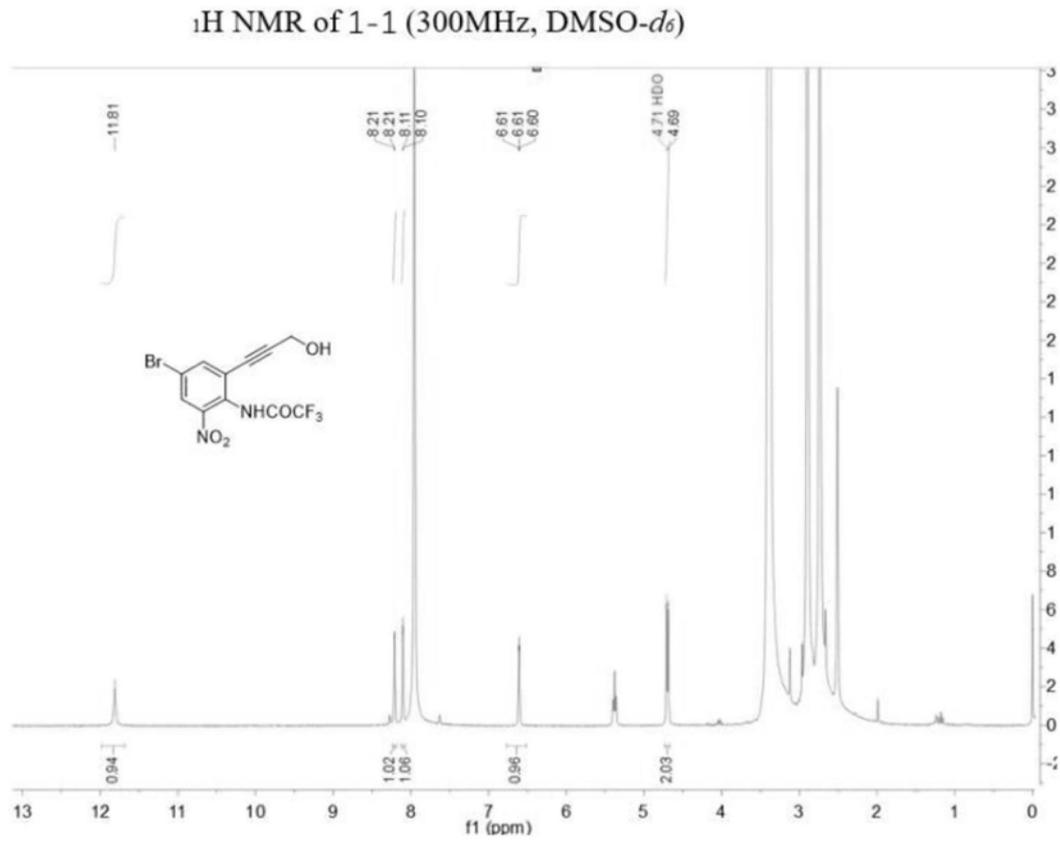


图1

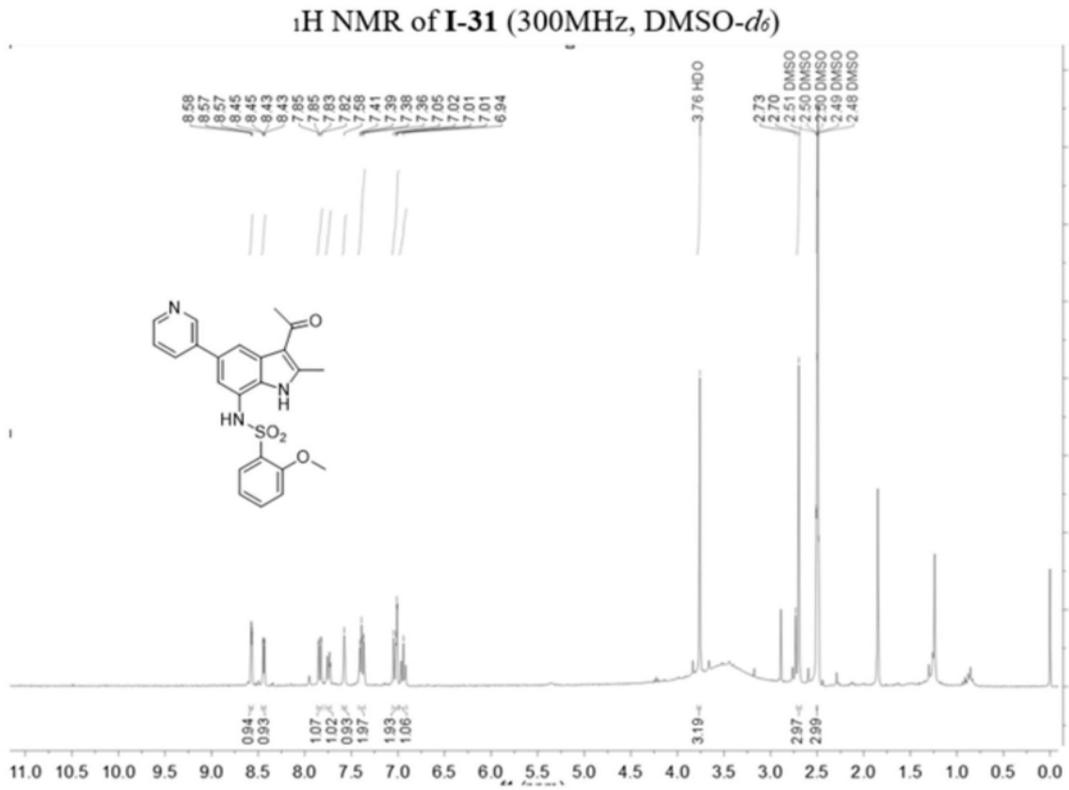


图2

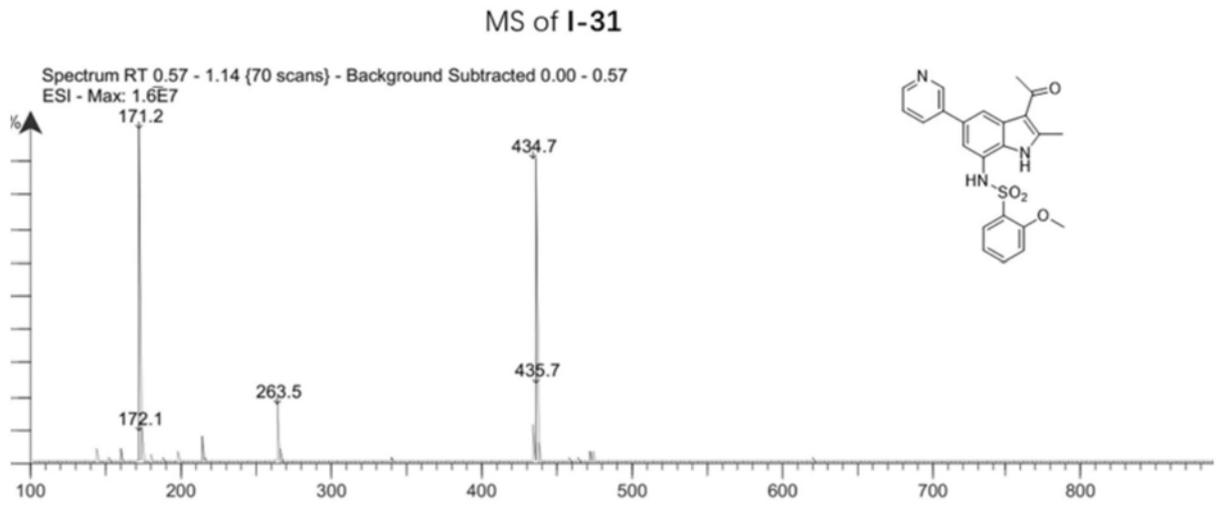


图3

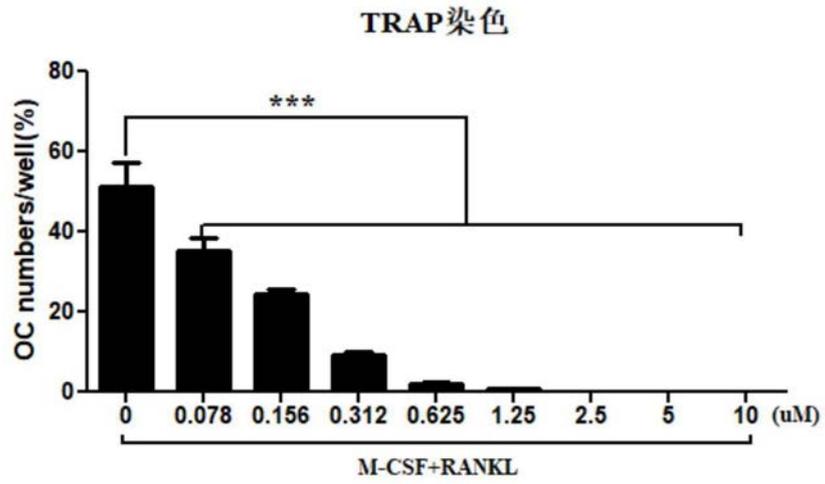


图4

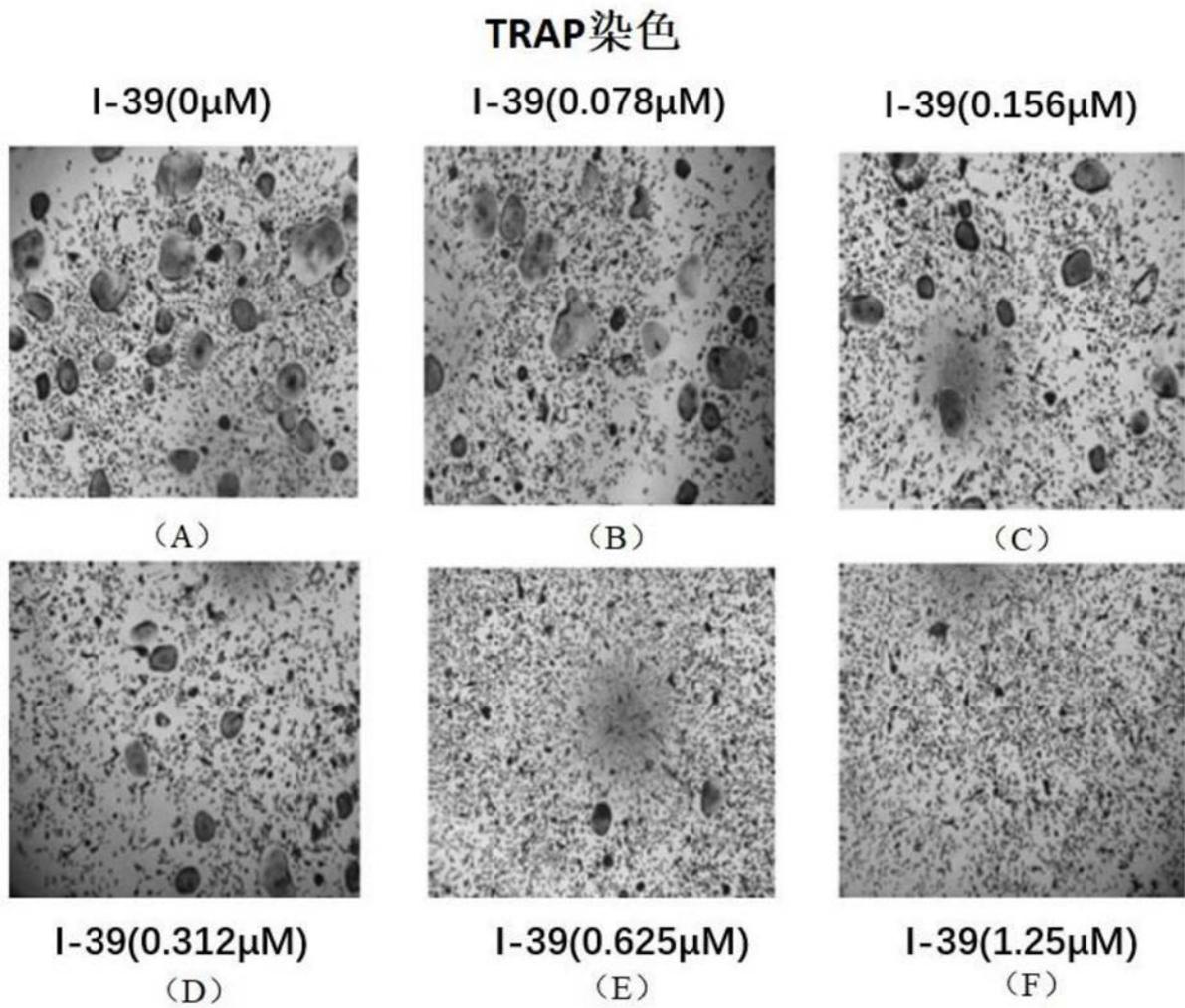


图5

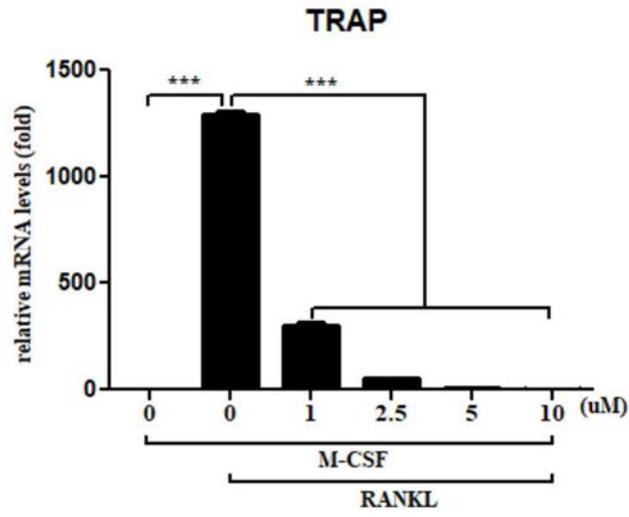


图6

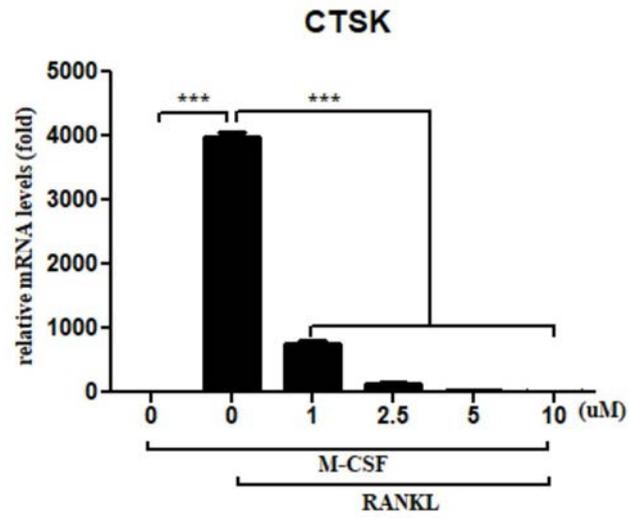


图7

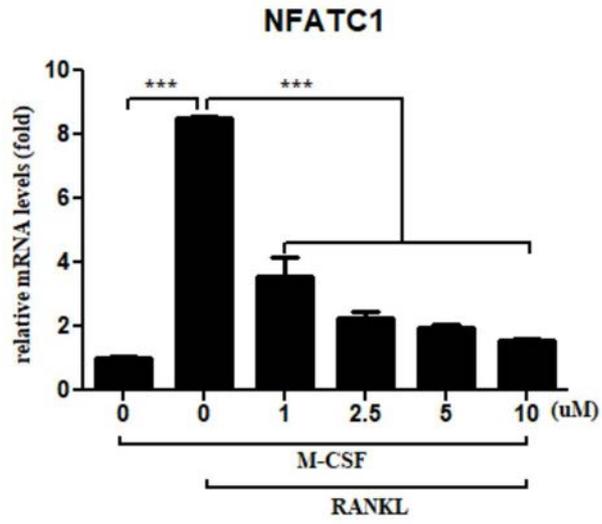


图8

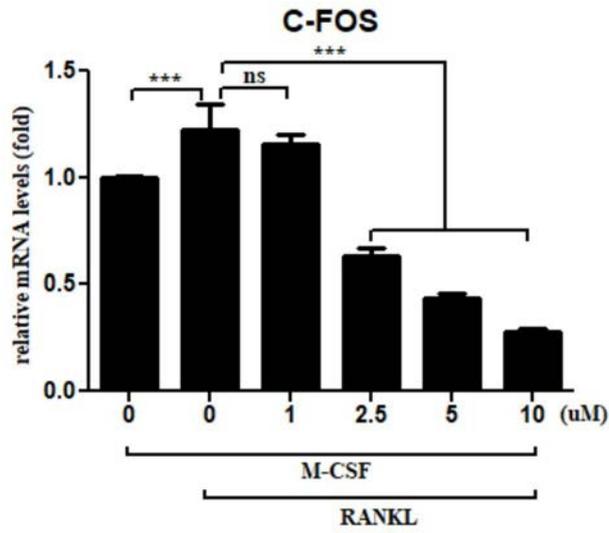


图9