



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105130948 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201510526116. 3

(22) 申请日 2011. 04. 21

(30) 优先权数据

61/327099 2010. 04. 22 US

61/327091 2010. 04. 22 US

61/327057 2010. 04. 22 US

61/327095 2010. 04. 22 US

61/329500 2010. 04. 29 US

61/329510 2010. 04. 29 US

61/329493 2010. 04. 29 US

61/333870 2010. 05. 12 US

(62) 分案原申请数据

201180031319. 5 2011. 04. 21

(71) 申请人 弗特克斯药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G. J. 塔诺里 C. 哈里森

B. J. 利特勒 P. J. 罗斯 R. M. 休斯

Y. C. 庸 D. A. 西塞尔 E. C. 李

D. T. 贝尔蒙

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 段菊兰 李炳爱

(51) Int. Cl.

C07D 317/46(2006. 01)

权利要求书2页 说明书49页

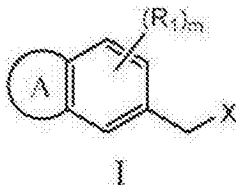
(54) 发明名称

制备环烷基甲酰胺基-咪唑化合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及制备可用于治疗 CFTR 介导的疾病如囊性纤维化的化合物如 (*R*)-1-(2, 2-二氟苯并[d][1, 3] 二氧杂环戊烯-5-基)-N-(1-(2, 3-二羟丙基)-6-氟-2-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)-1H-咪唑-5-基) 环丙烷甲酰胺(化合物 1) 的方法。

1. 一种用于制备式 I 化合物的方法：



其中,对于每次出现而言独立地：

环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环；

R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$ ；

R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

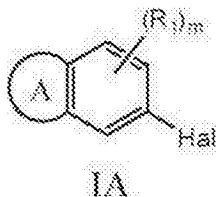
X 是 CN 或 CO_2R ；

R 是 C_{1-6} 脂族基团或芳基；并且

m 是 0 至 3 的整数,包括端点；

所述方法包括以下步骤：

a) 在第一有机溶剂中使式 IA 的化合物



其中,对于每次出现而言独立地：

环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环；

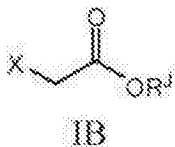
R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$ ；

R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

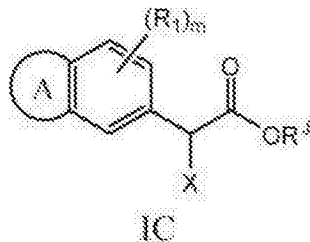
m 是 0 至 3 的整数,包括端点；并且

Hal 是卤素；

与式 IB 的化合物反应：



其中 R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团,以形成式 IC 的化合物：



其中,对于每次出现而言独立地:

环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$;

R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

X 是 CN 或 CO_2R ;

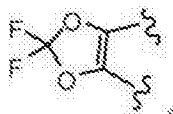
R 是 C_{1-6} 脂族基团或芳基;并且

m 是 0 至 3 的整数,包括端点;和

b) 在第二有机溶剂中从化合物 IC 除去 $-CO_2R^J$ 基团以形成式 I 的化合物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中环 A 是稠合的杂环烷基或杂芳基。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中环 A 是



4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中 X 是 CN。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中 X 是 CO_2Et 。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法,其中 R^J 是 C_{1-6} 脂族基团。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法,其中 Hal 是 Br。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法,其中所述第一有机溶剂是疏质子溶剂。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,其中所述第一有机溶剂是甲苯。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其中步骤 a) 是在钯催化剂存在下进行。

制备环烷基甲酰胺基 - 吡啶化合物的方法

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 04 月 21 日、发明名称为“制备环烷基甲酰胺基 - 吡啶化合物的方法”、申请号为 2011800313195 的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求美国临时专利申请系列号 61/333,870(2010 年 5 月 12 日提交);61/327,095(2010 年 4 月 22 日提交);61/327,057(2010 年 4 月 22 日提交);61/329,493(2010 年 4 月 29 日提交);61/327,091(2010 年 4 月 22 日提交);61/329,510(2010 年 4 月 29 日提交);61/327,099(2010 年 4 月 22 日提交);和 61/329,500(2010 年 4 月 29 日提交)的优先权,所有申请的全部内容通过引用方式并入本文中。

技术领域

[0004] 本发明的特征是制备可用于治疗 CFTR 介导的疾病如囊性纤维化的化合物的方法。

背景技术

[0005] CFTR 是在多种细胞类型(包括吸收性和分泌性上皮细胞)中表达的 cAMP/ATP- 介导的阴离子通道,其中它调节跨膜阴离子流以及其它离子通道和蛋白质的活性。在上皮细胞中,CFTR 的正常有功能对维持电解质在整个身体(包括呼吸道和消化道组织)中的输送是关键。CFTR 由编码蛋白质的大约 1480 个氨基酸组成,所述蛋白质由跨膜结构域的串联重复序列构成,每个串联重复序列含有 6 个跨膜螺旋和一个核苷酸结合结构域。这两种跨膜结构域由一个大的极性调节性 (R)- 结构域连接,所述大的极性调节性 (R)- 结构域带有调节通道活动性和细胞转运的多个磷酸化位点。

[0006] 已经鉴定和测序编码 CFTR 的基因(参见 Gregory, R. J. 等人, (1990) Nature 347 : 382-386 ;Rich, D. P. 等人, (1990) Nature 347 :358-362)、(Riordan, J. R. 等人, (1989) Science 245 :1066-1073)。这种基因中的缺陷引起 CFTR 中的突变,所述突变导致囊性纤维化 (“CF”),人类中最常见的致命性遗传疾病。在美国,每 2,500 个婴儿中的大约 1 个婴儿患有囊性纤维化。在美国总体人口中,高达一千万人携带单拷贝的这种有缺陷的基因,但无明显疾病效应。相反,带有 2 拷贝 CF 相关基因的个体遭受 CF 的使人虚弱和致命的影响,包括慢性肺病。

[0007] 在罹患囊性纤维化的患者中,在呼吸道上皮中内源表达的 CFTR 中的突变导致减少的顶端阴离子分泌,造成离子和流体输送的不平衡。所导致的阴离子输送的减少促进肺中增强的粘液积累和伴随而来的最终引起 CF 患者死亡的微生物感染。除呼吸道疾病之外,CF 患者通常患有胃肠道问题和胰功能不全,这些病症如果不进行治疗,则导致死亡。此外,大部分患有囊性纤维化的男性不育并且在患有囊性纤维化的女性当中生育力下降。与两个拷贝的 CF 相关基因的严重影响相反,带有单拷贝 CF 相关基因的个体显示对霍乱和因腹泻引起的脱水的抵抗力增强 - 这可能解释 CF 基因在人口中较高的频率。

[0008] CF 染色体的 CFTR 基因的序列分析已经揭示多种造成疾病的突变 (Cutting, G. R. 等人, (1990) *Nature* 346 :366-369 ;Dean, M. 等人, (1990) *Cell* 61 :863 :870 ;和 Kerem, B-S. 等人, (1989) *Science* 245 :1073-1080 ;Kerem, B-S 等人, (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87 :8447-8451)。迄今,已经鉴定造成疾病的多于 1000 种 CF 基因突变 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)。最流行的突变是苯丙氨酸在 CFTR 氨基酸序列的位置 508 处的缺失并且常称作 $\Delta F508$ -CFTR。这种突变在大约 70% 的囊性纤维化病例中出现并且与严重疾病相关。其他突变包括 R117H 和 G551D。

[0009] 残基 508 在 $\Delta F508$ -CFTR 中的缺失阻止新生蛋白质正确折叠。这导致突变体蛋白质不能离开 ER 并输送至质膜。因此,膜中存在的通道的数目远少于在表达野生型 CFTR 的细胞中所观察到的通道数目。除减少的转运之外,突变还导致有缺陷的通道门控。再者,膜中减少的通道数目和有缺陷的通道门控导致减少的跨上皮阴离子转运,这导致缺损的离子和流体转运。(Quinton, P. M. (1990), *FASEB J.* 4 :2709-2727)。然而,研究已经显示,膜中数目减少的 $\Delta F508$ -CFTR 是有功能的,尽管小于野生型 CFTR。(Dalemans 等人, (1991), *Nature Lond.* 354 :526-528 ;Denning 等人, 上文 ;Pasyk 和 Foskett (1995), *J. Cell. Biochem.* 270 :12347-50)。除 $\Delta F508$ -CFTR 之外,导致有缺陷的转运、合成和 / 或通道门控的其他造成疾病的 CFTR 突变可能被上调或下调以改变阴离子分泌并改变病情进展和 / 或严重性。

[0010] 虽然除阴离子之外 CFTR 还转运多种分子,但是,清楚的是,这种作用 (转运阴离子) 代表跨上皮转运离子和水的重要机制中的一种要素。其他要素包括上皮 Na^+ 通道、ENaC、 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共转运蛋白、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和基底侧膜 K^+ 通道,它们负责将氯离子摄入细胞。

[0011] 这些要素一起作用以通过它们在细胞内的选择性表达和定位实现跨上皮定向转运。氯离子吸收通过存在于顶端膜上的 ENaC 和 CFTR 和细胞基底侧表面上表达的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和 Cl^- 通道的协调活动进行。氯离子从细胞腔侧的继发主动转运导致细胞内氯离子的积累,所述氯离子随后可以通过 Cl^- 通道被动地离开细胞,导致向量转运 (vectorial transport)。基底侧表面上的 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共转运蛋白、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和基底侧膜 K^+ 通道以及细胞腔侧上的 CFTR 的安排通过细胞腔侧上的 CFTR 来协调氯离子的分泌。因为水绝不可能自身主动转运,所它的跨上皮流动依赖于由大流量钠和氯离子流产生的微小跨上皮渗透梯度。

[0012] 如上文讨论,认为 $\Delta F508$ -CFTR 中残基 508 的缺失阻止新生蛋白质正确地折叠,导致这种突变体蛋白质不能离开 ER 并且运输至质膜。因此,不足量的成熟蛋白质存在于质膜上并且上皮组织内的氯离子转运显著地减少。实际上,由 ER 组织对 ABC 转运蛋白的缺陷性 ER 加工的这种细胞现象已经显示不仅是 CF 疾病而且还是广泛范围的其他独立和遗传疾病的潜在基础。ER 组织可能功能异常的两种方式是或者与蛋白质的 ER 输出的偶联的丧失 (从而导致降解),或者这些缺陷型 / 错误折叠的蛋白质的 ER 积累 [Aridor M 等人, *Nature Med.*, 5(7), 第 745-751 页 (1999) ;Shastry, B. S. 等人, *Neurochem. International*, 43, 第 1-7 页 (2003) ;Rutishauser, J. 等人, *Swiss Med Wkly*, 132, 第 211-222 页 (2002) ;Morello, JP 等人, *TIPS*, 21, 第 466-469 页 (2000) ;Bross P. 等人, *Human Mut.*, 14, 第 186-198 页 (1999)]。

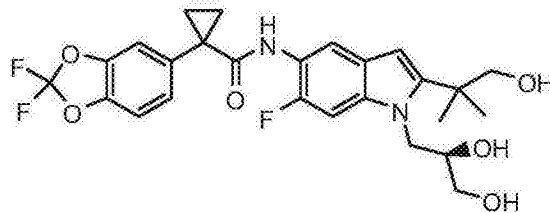
[0013] (R)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-N-(1-(2,3-二羟丙

基)-6-氟-2-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)-1H-吡啶-5-基)环丙烷甲酰胺在美国公开的专利申请US20090131492(所述公开通过引用方式完整地并入本文)中公开,该化合物作为CFTR活性的调节剂并且因此用于治疗CFTR介导的疾病例如囊性纤维化。然而,仍需要用于制备本文所述的环烷基甲酰胺基-吡啶化合物的经济的方法。

发明内容

[0014] 如本文中所述,本发明提供制备可用于治疗CFTR介导的疾病例如囊性纤维化的CFTR矫正剂(corrector)的方法。此类化合物包括(R)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-N-(1-(2,3-二羟丙基)-6-氟-2-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)-1H-吡啶-5-基)环丙烷甲酰胺(下文“化合物1”),其具有以下结构:

[0015]



化合物 1。

[0016] 化合物 1 及其药学上可接受的组合物可用于治疗 CFTR 介导的疾病例如囊性纤维化或减轻其严重性。化合物 1 可以几种不同的固体形式例如基本上晶状的形式或无定形式存在。

具体实施方式

[0017] 定义

[0018] 如本文中所述的,除非另外说明,否则以下定义应当适用。

[0019] 如本文中所述的,术语“CFTR”意指囊性纤维化跨膜传导调节剂或能够具有调节剂活性的其突变体,包括但不限于 $\Delta F508$ CFTR 和 G551D CFTR(对于 CFTR 突变,参见例如,<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)。

[0020] 如本文中所述的,术语“调节”意指以可测量的量增加或减少例如活性。

[0021] 如本文中所述的,术语“化学稳定的”意指固体形式的化合物 1 在特定的时间段内经历特定的条件时不分解成一种或更多种不同的化合物,所述特定的条件例如 40°C /75% 相对湿度,特定的时间段例如 1 天、2 天、3 天、1 周、2 周或更长时间。在一些实施方案中,少于 25% 的固体形式的化合物 1 分解,在一些实施方案中,少于约 20%、少于约 15%、少于约 10%、少于约 5%、少于约 3%、少于约 1%、少于约 0.5% 的该形式的化合物 1 在特定的条件下分解。在一些实施方案中,没有可检测量的固体形式的化合物 1 分解。

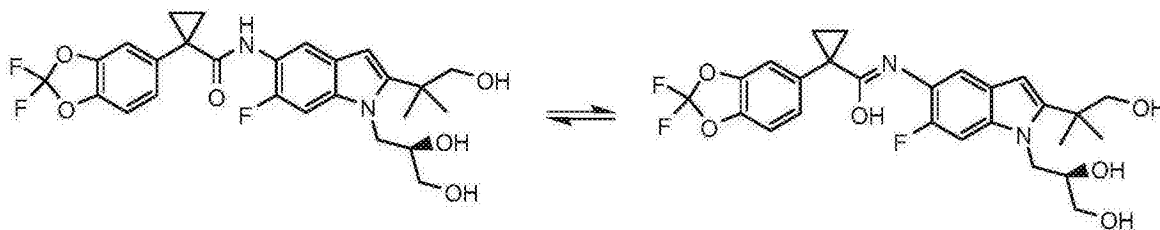
[0022] 如本文所用的,术语“物理稳定的”意指固体形式的化合物 1 在特定时间段内经历特定条件时不变成一种或更多种不同物理形式的化合物 1(例如,如通过 XRPD、DSC 等测定),所述特定条件例如 40°C /75% 相对湿度,所述特定时间段例如 1 天、2 天、3 天、1 周、2 周或更长时间。在一些实施方案中,少于 25% 的固体形式的化合物 1 在经历特定的条件时变成一种或更多种不同的物理形式。在一些实施方案中,少于约 20%、少于约 15%、少于约

10%、少于约 5%、少于约 3%、少于约 1%、少于约 0.5% 的固体形式的化合物 1 在经历特定的条件时变成一种或更多种不同的物理形式的化合物 1。在一些实施方案中,没有可检测量的固体形式的化合物 1 变成一种或更多种物理上不同的固体形式的化合物 1。

[0023] 如本文中所述的,术语“约”和“大约”在与组合物或剂型的剂量、量或成分的重量百分比结合使用时意指本领域普通技术人员可确认的剂量、量或重量百分比,以提供等同于从指定剂量、量或重量百分比获得的药理学效果的药理学效果。具体而言,术语“约”或“大约”意指由本领域普通技术人员所测定的特定值的可接受的误差,这部分地取决于该值是如何测量或测定的。在某些实施方案中,术语“约”或“大约”意指在 1、2、3 或 4 标准偏差范围内。在某些实施方案中,术语“约”或“大约”意指在给定值或范围的 30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1% 或 0.05% 的范围内。

[0024] 除非另外声明,否则本文中所述的结构还意在包括该结构的所有异构体(例如,对映异构形式、非对映异构形式和几何异构(或构象异构))形式;例如,每个不对称中心的 R 和 S 构型、(Z) 和 (E) 双键异构体以及 (Z) 和 (E) 构象异构体。因此,本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映异构体、非对映异构体和几何异构体(或构象异构体)的混合物属于本发明的范围内。本文中包括化合物 1 的所有互变异构形式。例如,化合物 1 可以作为互变异构体存在,二者均包括于本文中:

[0025]



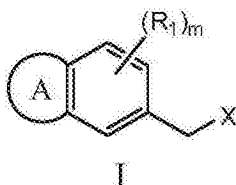
[0026] 另外,除非另外声明,否则,本文中所述的结构还意在包括仅在一个或多个同位素富集的原子存在方面不同的化合物。例如,化合物 1,其中一个或多个氢原子由氘或氚替换,或一个或多个碳原子由 ^{13}C - 或 ^{14}C 富集的碳替换,属于本发明的范围内。此类化合物例如可用作生物学分析中的分析工具、探针或具有改进的治疗性能 (therapeutic profile) 的化合物。

[0027] 如本文所用的,术语“保护基”(缩写为 P) 指为了在后续化学反应中获得化学选择性而通过官能团的化学改性而引入分子中的任何化学基团。醇保护基的非限制性实例包括乙酰基 (Ac)、苯甲酰基 (Bz)、苄基 (Bn)、 β - 甲氧基乙氧基甲基醚 (MEM)、二甲氧基三苯甲基 (DMT)、甲氧基甲基醚 (MOM)、甲氧基三苯甲基 (MMT)、对甲氧基苄基醚 (PMB)、新戊酰基 (Piv)、四氢吡喃基 (THP)、三苯甲基 (Tr) 和三甲基甲硅烷基 (TMS)。在一个实施方案中,保护基是具有结构 $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 的 Bn。

[0028] 缩写“DCM”代表二氯甲烷。缩写“IPA”代表异丙醇。缩写“DMSO”代表二甲基亚砜。缩写“MTBE”代表甲基叔丁基醚。缩写“THF”代表四氢呋喃。缩写“TEA”代表三乙胺。如 $\text{Pd}(\text{dba})_2$ 中的缩写“dba”代表二亚苄基丙酮。如 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 中的缩写“dppf”代表 1, 1'- 双(二苯基膦)二茂铁。

[0029] 在一个方面,本发明的特征是一种用于制备式 I 化合物的方法:

[0030]



[0031] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0032] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

[0033] R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$;

[0034] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

[0035] X 是 CN 或 CO_2R ;

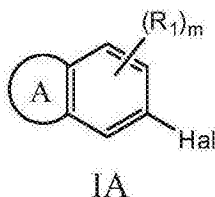
[0036] R 是 C_{1-6} 脂族基团或芳基;并且

[0037] m 是 0 至 3 的整数(包括端点);

[0038] 所述方法包括以下步骤:

[0039] a) 在第一有机溶剂中使式 IA 的化合物

[0040]



[0041] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0042] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

[0043] R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$;

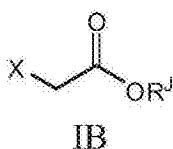
[0044] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

[0045] m 是 0 至 3 的整数(包括端点);并且

[0046] Hal 是卤素;

[0047] 与式 IB 的化合物反应:

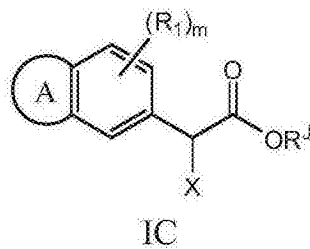
[0048]



[0049] 其中, R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团,

[0050] 以形成式 IC 的化合物:

[0051]



[0052] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0053] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

[0054] R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$;

[0055] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

[0056] X 是 CN 或 CO_2R ;

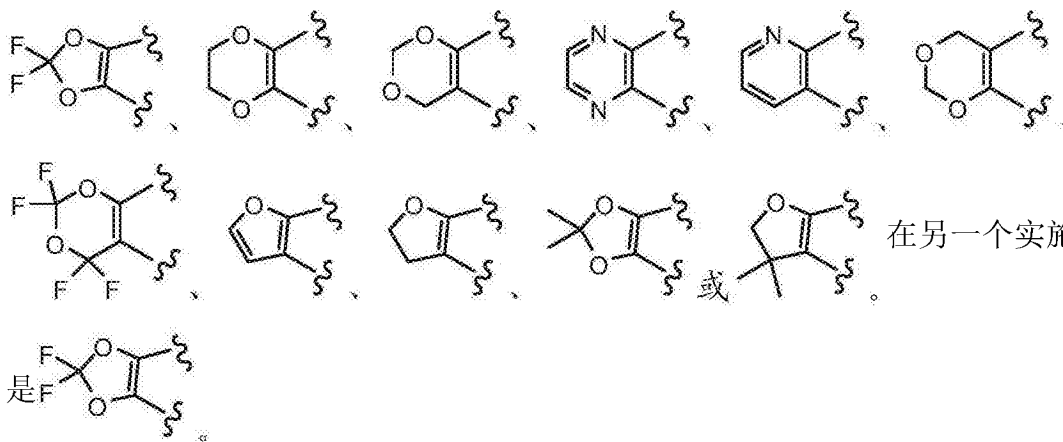
[0057] R 是 C_{1-6} 脂族基团或芳基;并且

[0058] m 是 0 至 3 的整数(包括端点);并且

[0059] b) 在第二有机溶剂中从化合物 IC 除去 $-CO_2R^J$ 基团以形成式 I 的化合物。

[0060] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中环 A 是稠合的杂环烷基或

杂芳基。在另一个实施方案中,环 A 选自



[0061] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中 X 是 CN。在另一个实施方案中, X 是 CO_2Et 。

[0062] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中 m 是 0。

[0063] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中 R^J 是 C_{1-6} 脂族基团。在另一个实施方案中, R^J 是 $-CH_2CH_3$ 。

[0064] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中 Hal 是 Br。

[0065] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中第一有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中,第一有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中,第一

有机溶剂选自乙腈、甲苯、苯或二甲苯。在另一个实施方案中，第一有机溶剂是甲苯。

[0066] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以以上方法，其中步骤 a) 在过渡金属催化剂存在下进行。在另一个实施方案中，步骤 a) 在钯催化剂存在下进行。在另一个实施方案中，步骤 a) 在选自乙酸钯 (II)、Pd(dppf)Cl₂、Pd(dba)₂、四(三苯基膦)合钯(0) 或三(二亚苄基丙酮)合二钯(0) 的钯催化剂存在下进行。在另一个实施方案中，步骤 a) 在 Pd(dba)₂ 存在下进行。

[0067] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以以上方法，其中步骤 a) 在约 50°C 至 90°C 进行。在另一个实施方案中，步骤 a) 在约 60°C 至 80°C 下进行。在另一个实施方案中，步骤 a) 在约 70°C 下进行。

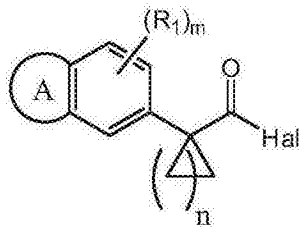
[0068] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以以上方法，其中第二有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中，第二有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中，第二有机溶剂是二甲基亚砷。

[0069] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以以上方法，其中步骤 b) 在无机酸存在下进行。在另一个实施方案中，步骤 b) 在选自盐酸、硫酸、硝酸、磷酸或硼酸的无机酸存在下进行。在另一个实施方案中，步骤 b) 在盐酸存在下进行。

[0070] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以以上方法，其中步骤 b) 在约 55°C 至 95°C 进行。在另一个实施方案中，步骤 b) 在约 65°C 至 85°C 进行。在另一个实施方案中，步骤 b) 在约 75°C 进行。

[0071] 在另一个方面，本发明的特征是一种用于制备式 II 化合物的方法：

[0072]



II

[0073] 其中，对于每次出现而言独立地：

[0074] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环；

[0075] Hal 是卤素；

[0076] R₁ 独立地选自 -R^J、-OR^J、-N(R^J)₂、-NO₂、卤素、-CN、-C₁₋₄ 卤代烷基、-C₁₋₄ 卤代烷氧基、-C(O)N(R^J)₂、-NR^JC(O)R^J、-SOR^J、-SO₂R^J、-SO₂N(R^J)₂、-NR^JSO₂R^J、-COR^J、-CO₂R^J、-NR^JSO₂N(R^J)₂、-COCOR^J；

[0077] R^J 是氢或 C₁₋₆ 脂族基团；

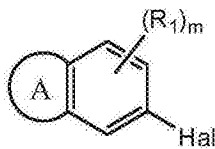
[0078] m 是 0 至 3 的整数（包括端点）；并且

[0079] n 是 1 至 4 的整数（包括端点）；

[0080] 所述方法包括以下步骤：

[0081] a) 在第一有机溶剂中使式 IIA 的化合物

[0082]



IIA

[0083] 其中,对于每次出现而言独立地:

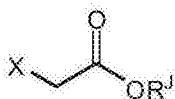
[0084] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

[0085] R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$;[0086] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;[0087] m 是 0 至 3 的整数(包括端点);并且

[0088] Hal 是卤素;

[0089] 与式 IIB 的化合物反应:

[0090]



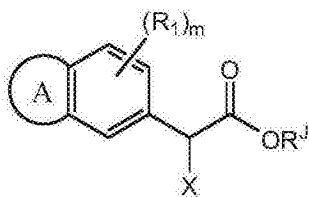
IIB

[0091] 其中

[0092] X 是 CN 或 CO_2R ;[0093] R 是 C_{1-6} 脂族基团或芳基;并且[0094] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团,

[0095] 以形成式 IIC 的化合物:

[0096]



IIC

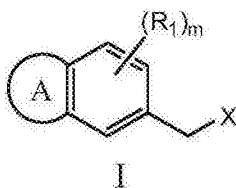
[0097] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0098] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

[0099] R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$;[0100] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;[0101] X 是 CN 或 CO_2R ;[0102] R 是 C_{1-6} 脂族基团或芳基;并且[0103] m 是 0 至 3 的整数(包括端点);

[0104] b) 在第二有机溶剂中从化合物 IIC 除去 $-CO_2R^J$ 基团以形成式 I 的化合物：

[0105]



[0106] 其中,对于每次出现而言独立地：

[0107] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环；

[0108] R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$ ；

[0109] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

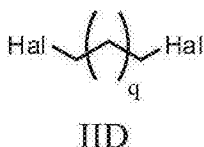
[0110] X 是 CN 或 CO_2R ；

[0111] R 是 C_{1-6} 脂族基团或芳基；并且

[0112] m 是 0 至 3 的整数（包括端点）；

[0113] c) 在以下碱存在下使式 I 化合物与式 IID 的化合物反应：

[0114]



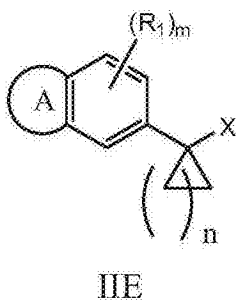
[0115] 其中,对于每次出现而言独立地：

[0116] Hal 是卤素；和

[0117] q 是 0 至 3 的整数（包括端点）；

[0118] 以产生式 IIE 的化合物：

[0119]



[0120] 其中,对于每次出现而言独立地：

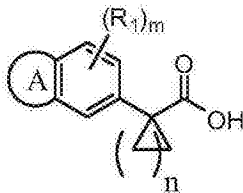
[0121] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环；

[0122] R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$ ；

[0123] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

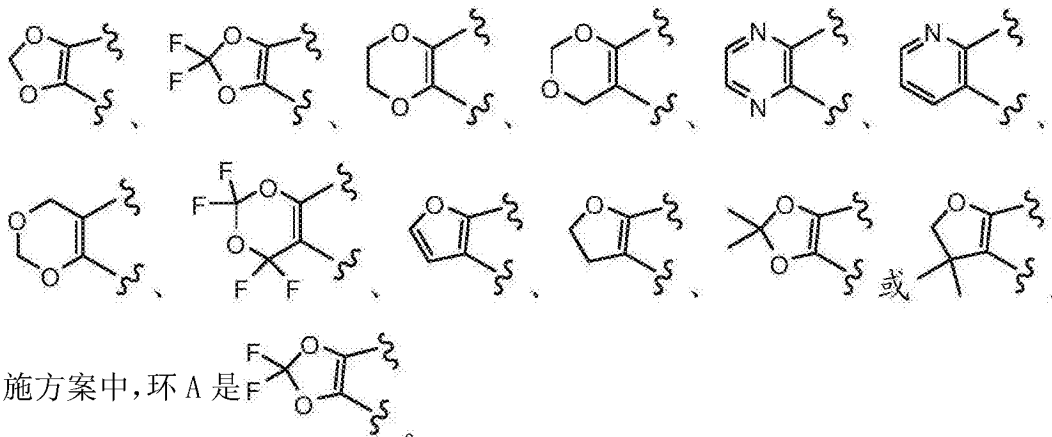
[0124] m 是 0 至 3 的整数（包括端点）；

- [0125] X 是 CN 或 CO₂R ;
- [0126] R 是 C₁₋₆脂族基团或芳基 ;并且
- [0127] n 是 1 至 4 的整数 (包括端点) ;
- [0128] d) 使式 IIE 的化合物与氢氧化物碱和酸依次反应以形成式 IIF 的化合物 ;
- [0129]



IIF

- [0130] 其中,对于每次出现而言独立地 :
- [0131] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环 ;
- [0132] R₁独立地选自 -R^J、-OR^J、-N(R^J)₂、-NO₂、卤素、-CN、-C₁₋₄卤代烷基、-C₁₋₄卤代烷氧基、-C(O)N(R^J)₂、-NR^JC(O)R^J、-SOR^J、-SO₂R^J、-SO₂N(R^J)₂、-NR^JSO₂R^J、-COR^J、-CO₂R^J、-NR^JSO₂N(R^J)₂、-COCOR^J ;
- [0133] R^J是氢或 C₁₋₆脂族基团 ;
- [0134] m 是 0 至 3 的整数 (包括端点) ;并且
- [0135] n 是 1 至 4 的整数 (包括端点) ;并且
- [0136] e) 在第三有机溶剂中使式 IIF 的化合物与卤化剂反应以形成式 II 的化合物。
- [0137] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 a) 中,第一有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中,第一有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中,第一有机溶剂是甲苯。
- [0138] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 a) 中,m 是 0。
- [0139] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 a) 中,Ha1 是 Br。
- [0140] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 a) 中,环 A 是稠合的杂环或杂芳基环。在另一个实施方案中,环 A 选自

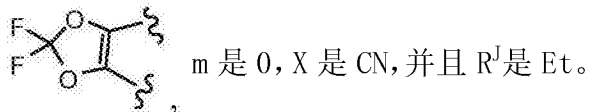


- [0141] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 a) 中,X 是 CN。在另

一个实施方案中, X 是 CO_2Et 。

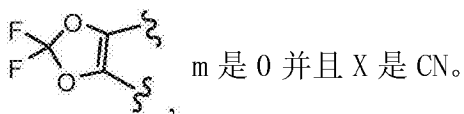
[0142] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在步骤 a) 中, R^1 是 Et。

[0143] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在式 IIC 中, 环 A 是



[0144] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在步骤 b) 中, 第二溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中, 第二溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中, 第二溶剂是二甲基亚砷。

[0145] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在式 I 中, 环 A 是



[0146] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在步骤 c) 中, 碱是无机碱。在另一个实施方案中, 碱是氢氧化物。在另一个实施方案中, 碱是 NaOH。

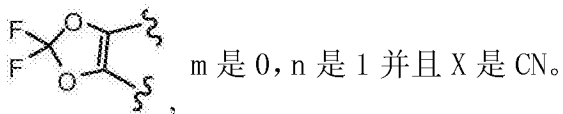
[0147] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在式 IID 中, q 是 1。

[0148] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在式 IID 中, 一个 Hal 是 Cl 并且另一个 Hal 是 Br。

[0149] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在步骤 d) 中, 碱是 NaOH。在另一个实施方案中, 在步骤 d) 中, 酸是 HCl。

[0150] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在步骤 d) 中, 与氢氧化物碱的反应在约 60°C 至 100°C 发生。在另一个实施方案中, 与氢氧化物的反应在约 70°C 至 90°C 发生。在另一个实施方案中, 与氢氧化物的反应在约 80°C 发生。

[0151] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在式 IIE 中, 环 A 是

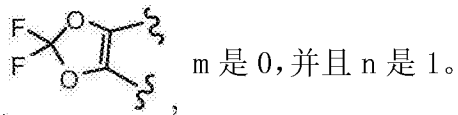


[0152] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在步骤 e) 中, 第三有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中, 在步骤 e) 中, 第三有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中, 在步骤 e) 中, 第三有机溶剂是甲苯。

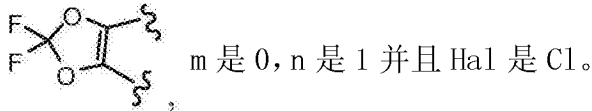
[0153] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中在步骤 e) 中, 卤化剂是 SOCl_2 。

[0154] 在另一个实施方案中, 本发明的特征是以以上方法, 其中步骤 e) 在约 40°C 至 80°C 发生。在另一个实施方案中, 步骤 e) 在约 50°C 至 70°C 发生。在另一个实施方案中, 步骤 e) 在约 60°C 发生。

[0155] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在式 IIF 中,环 A 是

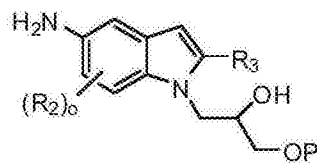


[0156] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在式 II 中,环 A 是



[0157] 在另一个方面,本发明的特征是一种制备式 III 的化合物的方法:

[0158]



III

[0159] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0160] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCO R^J$;

[0161] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

[0162] R_3 是任选地被 OH、OP、 $-O-C_{1-6}$ 脂族基团、芳基、杂芳基、 $-O-$ 芳基或 $-O-$ 杂芳基取代的 C_{1-6} 脂族基团;

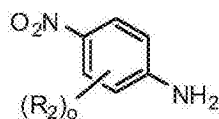
[0163] P 是保护基;并且

[0164] o 是 0 至 3 的整数;

[0165] 所述方法包括以下步骤:

[0166] a) 在第一有机溶剂中使式 IIIA 的化合物:

[0167]



IIIA

[0168] 其中,对于每次出现而言独立地:

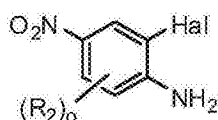
[0169] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCO R^J$;

[0170] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;并且

[0171] o 是 0 至 3 的整数;

[0172] 与卤化试剂反应以形成式 IIIB 的化合物:

[0173]



III B

[0174] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0175] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCO R^J$;

[0176] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

[0177] o 是 0 至 3 的整数;并且

[0178] Hal 是卤素;

[0179] b) 在第二有机溶剂中使式 III B 的化合物与式 III C 的化合物反应:

[0180]



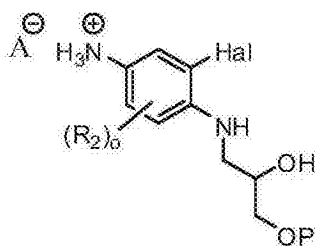
III C

[0181] 其中:

[0182] P 是保护基;

[0183] 随后还原并用酸处理以形成式 III D 的化合物:

[0184]



III D

[0185] 其中:

[0186] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCO R^J$;

[0187] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

[0188] o 是 0 至 3 的整数;

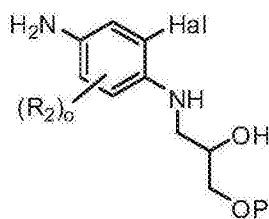
[0189] Hal 是卤素;

[0190] P 是保护基;并且

[0191] A^\ominus 是阴离子;

[0192] c) 在碱存在下中和式 III D 的化合物以形成式 III D-a 的化合物:

[0193]



IIIID-a

[0194] 其中：

[0195] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCO R^J$ ；

[0196] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

[0197] o 是 0 至 3 的整数；

[0198] Hal 是卤素；和

[0199] P 是保护基；

[0200] d) 在第三有机溶剂中使式 IIIID-a 的化合物与式 IIIE 的化合物在催化剂存在下反应以形成式 III 的化合物：

[0201]



III E

[0202] 其中，对于每次出现而言独立地：

[0203] R_3 是任选地被 OH、OP、 $-O-C_{1-6}$ 脂族基团、芳基、杂芳基、 $-O-$ 芳基或 $-O-$ 杂芳基取代的 C_{1-6} 脂族基团。

[0204] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以上方法，其中在式 IIIA 中， o 是 1。在另一个实施方案中， o 是 1 和 R_2 是 F。

[0205] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以上方法，其中在步骤 a) 中，卤化试剂是 N- 溴代琥珀酰亚胺。

[0206] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以上方法，其中在步骤 a) 中，第一有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中，第一有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中，第一有机溶剂是乙酸乙酯。

[0207] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以上方法，其中步骤 a) 在约 2°C 至 42°C 发生。在另一个实施方案中，步骤 a) 在约 12°C 至 32°C 发生。在另一个实施方案中，步骤 a) 在约 22°C 发生。

[0208] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以上方法，其中在式 IIIB 中， o 是 1， R_2 是 F 并且 Hal 是 Br。

[0209] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以上方法，其中在式 IIIC 中，P 是苄基。

[0210] 在另一个实施方案中，本发明的特征是以上方法，其中在步骤 b) 中，第二有机溶

剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中,在步骤 b) 中,第二有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中,在步骤 b) 中,第二有机溶剂是甲苯。

[0211] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,与式 IIIC 的化合物的反应在约 60°C 至 100°C 发生。在另一个实施方案中,在步骤 b) 中,与式 IIIC 的化合物的反应在约 70°C 至 90°C 发生。在另一个实施方案中,在步骤 b) 中,与式 IIIC 的化合物的反应在约 80°C 发生。

[0212] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,用氢进行还原。

[0213] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,酸是对甲苯磺酸。

[0214] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在式 IIID 中, o 是 1, R₂ 是 F, Hal 是 Br, A 是 Tos 并且 P 是苄基。

[0215] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在式 IIIE 中, R₃ 是 C(CH₃)₂CH₂O(苄基)。

[0216] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 c) 中,碱是无机碱。

[0217] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 c) 中,碱是 NaHCO₃。

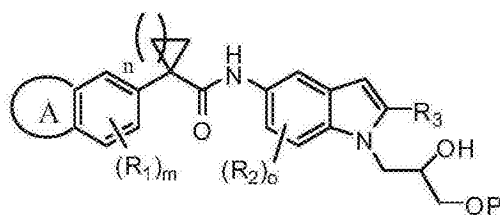
[0218] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 d) 中,第三有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中,在步骤 d) 中,第三有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中,在步骤 d) 中,第三有机溶剂是乙腈。

[0219] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中步骤 d) 在约 60°C 至 100°C 发生。在另一个实施方案中,步骤 d) 在约 70°C 至 90°C 发生。在另一个实施方案中,步骤 d) 在约 80°C 发生。

[0220] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 d) 中,催化剂是钯催化剂。在另一个实施方案中,在步骤 d) 中,催化剂选自乙酸钯 (II)、Pd(dppf)Cl₂、Pd(dba)₂、(MeCN)₂PdCl₂、四(三苯基膦)合钯 (0) 或三(二亚苄基丙酮)合二钯 (0)。在另一个实施方案中,在步骤 d) 中,催化剂是乙酸钯 (II)。

[0221] 在另一个方面,本发明的特征是一种制备式 IV 的化合物的方法:

[0222]



IV

[0223] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0224] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环；

[0225] R_1 和 R_2 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$ ；

[0226] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

[0227] R_3 是任选地被 OH、OP、 $-O-C_{1-6}$ 脂族基团、芳基、杂芳基、 $-O-$ 芳基或 $-O-$ 杂芳基取代的 C_{1-6} 脂族基团；

[0228] P 是保护基；

[0229] m 是 0 至 3 的整数（包括端点）；

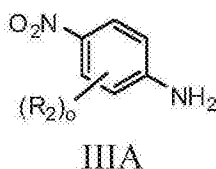
[0230] n 是 1 至 4 的整数（包括端点）；并且

[0231] o 是 1 至 3 的整数（包括端点）；

[0232] 所述方法包括以下步骤：

[0233] a) 在第一有机溶剂中使式 IIIA 的化合物：

[0234]



[0235] 其中，对于每次出现而言独立地：

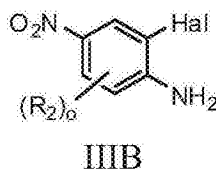
[0236] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$ ；

[0237] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；并且

[0238] o 是 0 至 3 的整数；

[0239] 与卤化试剂反应以形成式 IIIB 的化合物：

[0240]



[0241] 其中，对于每次出现而言独立地：

[0242] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$ ；

[0243] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

[0244] o 是 0 至 3 的整数；并且

[0245] Hal 是卤素；

[0246] b) 在第二有机溶剂中使式 IIIB 的化合物与式 IIIC 的化合物反应：

[0247]

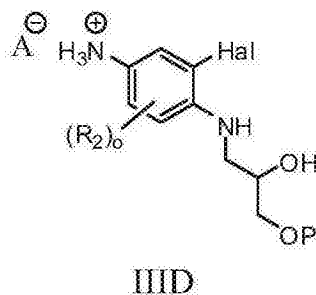


[0248] 其中：

[0249] P 是保护基；

[0250] 随后还原并用酸处理以形成式 IIID 的化合物：

[0251]



[0252] 其中：

[0253] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCO R^J$ ；

[0254] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

[0255] o 是 0 至 3 的整数；

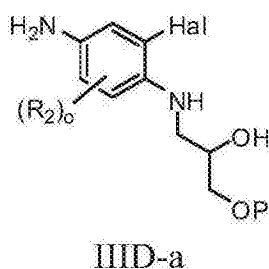
[0256] Hal 是卤素；

[0257] P 是保护基；并且

[0258] A^- 是阴离子；

[0259] c) 在碱存在下中和式 IIID 的化合物以形成式 IIID-a 的化合物：

[0260]



[0261] 其中：

[0262] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCO R^J$ ；

[0263] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团；

[0264] o 是 0 至 3 的整数；

[0265] Hal 是卤素；和

[0266] P 是保护基；

[0267] d) 在第三有机溶剂中使式 IIID 的化合物与式 IIIE 的化合物：

[0268]

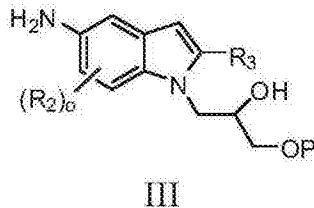


[0269] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0270] R_3 是任选地被 OH、OP、-O- C_{1-6} 脂族基团、芳基、杂芳基、-O-芳基或 -O-杂芳基取代的 C_{1-6} 脂族基团;

[0271] 在催化剂存在下反应以形成式 III 的化合物:

[0272]



[0273] 其中,对于每次出现而言独立地:

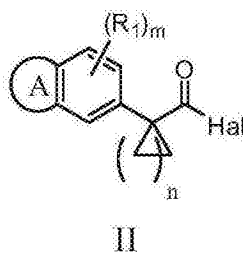
[0274] R_2 是 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$;[0275] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;[0276] R_3 是任选地被 OH、OP、-O- C_{1-6} 脂族基团、芳基、杂芳基、-O-芳基或 -O-杂芳基取代的 C_{1-6} 脂族基团;

[0277] P 是保护基;并且

[0278] o 是 0 至 3 的整数;

[0279] e) 在第四有机溶剂中使式 III 的化合物与式 II 的化合物反应以形成式 IV 的化合物:

[0280]



[0281] 其中,对于每次出现而言独立地:

[0282] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

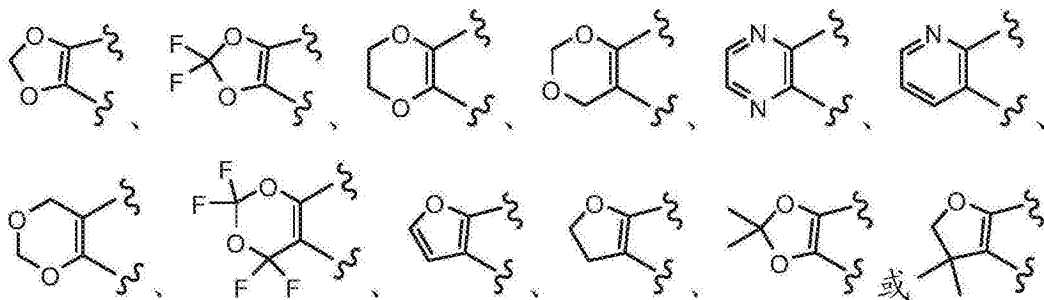
[0283] Hal 是卤素;

[0284] R_1 独立地选自 $-R^J$ 、 $-OR^J$ 、 $-N(R^J)_2$ 、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-C(O)N(R^J)_2$ 、 $-NR^J C(O)R^J$ 、 $-SOR^J$ 、 $-SO_2R^J$ 、 $-SO_2N(R^J)_2$ 、 $-NR^J SO_2R^J$ 、 $-COR^J$ 、 $-CO_2R^J$ 、 $-NR^J SO_2N(R^J)_2$ 、 $-COCOR^J$;[0285] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

[0286] m 是 0 至 3 的整数(包括端点);并且

[0287] n 是 1 至 4 的整数 (包括端点)。

[0288] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在式 IV 中,环 A 选自



在另一个实

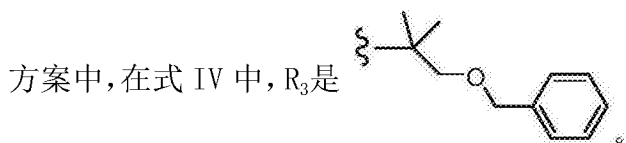


[0289] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在式 IV 中, m 是 0。在另一个实施方案中,在式 IV 中, n 是 1。在另一个实施方案中,在式 IV 中, o 是 1 和 R₂ 是 F。

[0290] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在式 IV 中, P 是苄基。

[0291] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在式 IV 中, R₃ 是任选地被

OP 取代的 C₄脂族基团。在另一个实施方案中,在式 IV 中, R₃ 是



[0292] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在式 IV 中,环 A 是



[0293] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在步骤 a) 中, 卤化试剂是 N- 溴代琥珀酰亚胺。

[0294] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在步骤 a) 中, 第一有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中,在步骤 a) 中, 第一有机溶剂选自 1,2- 二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N, N- 二甲基甲酰胺、N, N- 二甲基乙酰胺、N- 甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中,在步骤 a) 中, 第一有机溶剂是乙酸乙酯。

[0295] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中步骤 a) 在约 2°C 至 42°C 发生。在另一个实施方案中,步骤 a) 在约 12°C 至 32°C 发生。在另一个实施方案中,步骤 a) 在约 22°C 发生。

[0296] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在式 IIIB 中, o 是 1, R₂ 是 F 并且 Hal 是 Br。

[0297] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以上方法,其中在式 IIIC 中, P 是苄基。

[0298] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,第二有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中,在步骤 b) 中,第二有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中,在步骤 b) 中,第二有机溶剂是甲苯。

[0299] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,与式 IIIC 的化合物的反应在约 60°C 至 100°C 发生。在另一个实施方案中,在步骤 b) 中,与式 IIIC 的化合物的反应在约 70°C 至 90°C 发生。在另一个实施方案中,在步骤 b) 中,与式 IIIC 的化合物的反应在约 80°C 发生。

[0300] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,用氢进行还原。

[0301] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,酸是对甲苯磺酸。

[0302] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在式 IIID 中, o 是 1, R₂ 是 F, Hal 是 Br, A 是 Tos 并且 P 是苄基。

[0303] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在式 IIIE 中, R₃ 是 C(CH₃)₂CH₂O(苄基)。

[0304] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 c) 中,碱是无机碱。

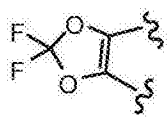
[0305] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 c) 中,碱是 NaHCO₃。

[0306] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 d) 中,第三有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中,在步骤 d) 中,第三有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚砷。在另一个实施方案中,在步骤 d) 中,第三有机溶剂是乙腈。

[0307] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中步骤 d) 在约 60°C 至 100°C 发生。在另一个实施方案中,步骤 d) 在约 70°C 至 90°C 发生。在另一个实施方案中,步骤 d) 在约 80°C 发生。

[0308] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 d) 中,催化剂是钯催化剂。在另一个实施方案中,在步骤 d) 中,催化剂选自乙酸钯 (II)、Pd(dppf)Cl₂、Pd(dba)₂、四(三苯基膦)合钯 (0) 或三(二亚苄基丙酮)合二钯 (0)。在另一个实施方案中,在步骤 d) 中,催化剂是乙酸钯 (II)。

[0309] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 e) 中,环 A 是



m 是 0, n 是 1 并且 Hal 是 Cl。

[0310] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 e) 中,第四有机溶剂是疏质子溶剂。在另一个实施方案中,在步骤 e) 中,第四有机溶剂选自 1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、乙腈、甲苯、苯、二甲苯、甲基叔丁基醚、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二甲基亚

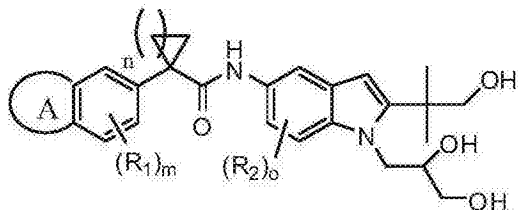
砒。在另一个实施方案中,在步骤 e) 中,第四有机溶剂是二氯甲烷。

[0311] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中步骤 e) 在约 -20°C 至 20°C 发生。在另一个实施方案中,步骤 e) 在约 -10°C 至 10°C 发生。在另一个实施方案中,步骤 e) 在约 0°C 发生。

[0312] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 e) 中,式 II 的化合物通过将酸前体卤化来原位地制备并且在不进行分离的情况下与式 III 的化合物反应。

[0313] 在另一个实施方案中,本发明的特征是上述方法,所述方法还包括从式 IV 的化合物中去除两个保护基以形成式 IVA 的化合物:

[0314]

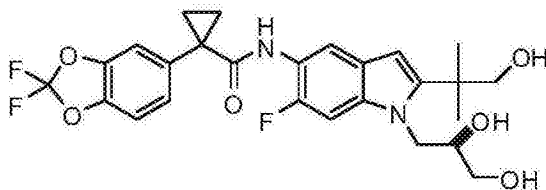


IVa.

[0315] 在另一个实施方案中,通过氢化除去保护基。

[0316] 在另一个方面,本发明的特征是一种制备化合物 1 的方法:

[0317]

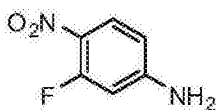


1

[0318] 所述方法包括以下步骤:

[0319] a) 使化合物 2:

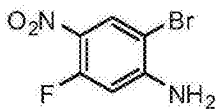
[0320]



2

[0321] 与溴化试剂反应以形成化合物 3:

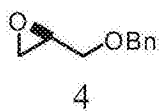
[0322]



3

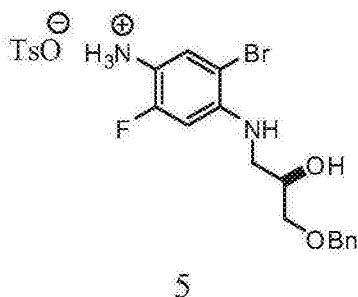
[0323] b) 使化合物 3 与化合物 4 反应:

[0324]



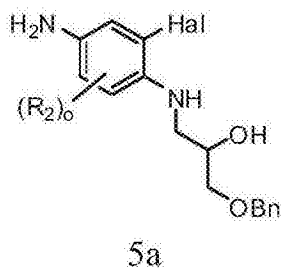
[0325] 随后还原以形成化合物 5 :

[0326]



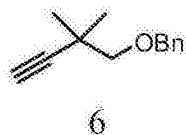
[0327] 随后用碱中和化合物 5 以产生化合物 5a :

[0328]



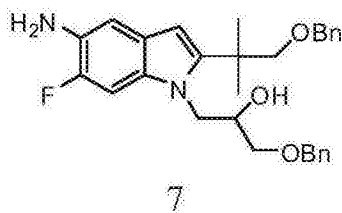
[0329] c) 使化合物 5a 与化合物 6 :

[0330]



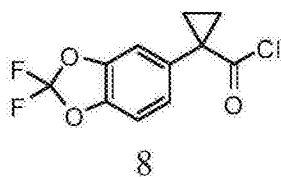
[0331] 在催化剂存在下反应以形成化合物 7 :

[0332]



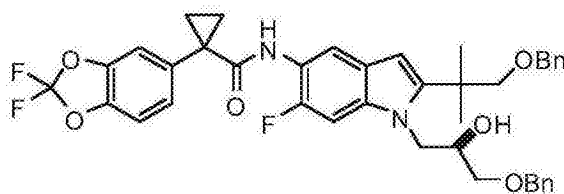
[0333] d) 使化合物 7 与化合物 8 反应 :

[0334]



[0335] 以形成化合物 9 :

[0336]



9

[0337] 和

[0338] e) 除去两个 Bn 保护基以形成化合物 1。

[0339] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 a) 中,溴化剂是 N-溴代琥珀酰亚胺。

[0340] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,用氢进行还原。

[0341] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,碱是无机碱。

[0342] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 b) 中,碱是 NaHCO_3 。

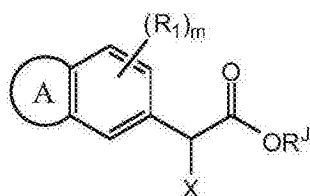
[0343] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 c) 中,催化剂是钯催化剂。在另一个实施方案中,在步骤 c) 中,催化剂选自乙酸钯 (II)、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 、 $\text{Pd}(\text{dba})_2$ 、四(三苯基膦)合钯(0)或三(二亚苄基丙酮)合二钯(0)。在另一个实施方案中,在步骤 c) 中,催化剂是乙酸钯 (II)。

[0344] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 d) 中,化合物 8 在不分离的情况下通过将酸前体卤化来原位地制备。

[0345] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以以上方法,其中在步骤 e) 中,通过氢化除去 Bn 保护基。

[0346] 在另一个方面,本发明的特征是式 23 的化合物:

[0347]



23

[0348] 其中:

[0349] 环 A 是稠合的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

[0350] R_1 独立地选自 $-\text{R}^J$ 、 $-\text{OR}^J$ 、 $-\text{N}(\text{R}^J)_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}_{1-4}$ 卤代烷基、 $-\text{C}_{1-4}$ 卤代烷氧基、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^J)_2$ 、 $-\text{NR}^J\text{C}(\text{O})\text{R}^J$ 、 $-\text{SOR}^J$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^J$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^J)_2$ 、 $-\text{NR}^J\text{SO}_2\text{R}^J$ 、 $-\text{COR}^J$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^J$ 、 $-\text{NR}^J\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^J)_2$ 、 $-\text{COCOR}^J$;

[0351] R^J 是氢或 C_{1-6} 脂族基团;

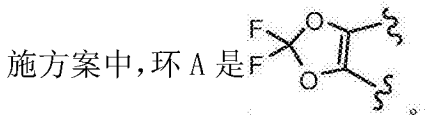
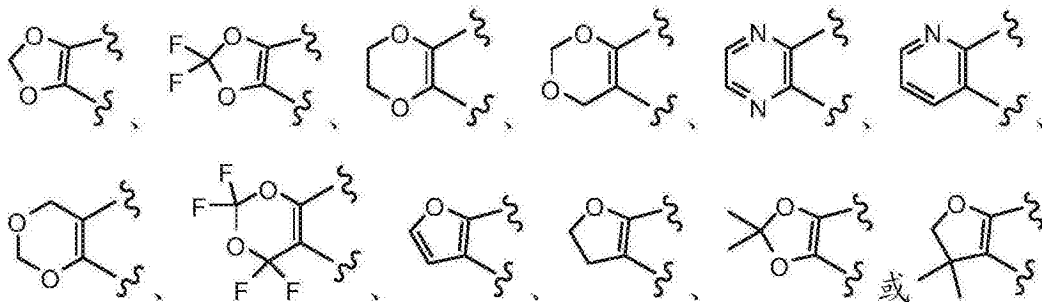
[0352] X 是 CN 或 CO_2R ;

[0353] R 是 C_{1-6} 脂族基团或芳基;并且

[0354] m 是 0 至 3 的整数(包括端点)。

[0355] 在另一个实施方案中,本发明的特征是以式 23 的化合物和伴随的定

义,其中环A是稠合的杂环烷基或杂芳基。在另一个实施方案中,环A选自



在另一个实

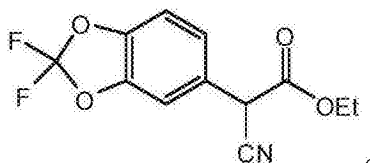
[0356] 在另一个实施方案中,本发明的特征是式 23 的化合物和伴随的定义,其中 X 是 CN。在另一个实施方案中, X 是 CO₂Et。

[0357] 在另一个实施方案中,本发明的特征是式 23 的化合物和伴随的定义,其中 m 是 0。

[0358] 在另一个实施方案中,本发明的特征是式 23 的化合物和伴随的定义,其中 R^J是 C₁₋₆脂族基团。在另一个实施方案中, R^J是 -CH₂CH₃。

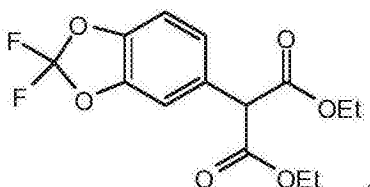
[0359] 在另一个方面,本发明的特征是以下化合物

[0360]



[0361] 在另一个方面,本发明的特征是以下化合物

[0362]

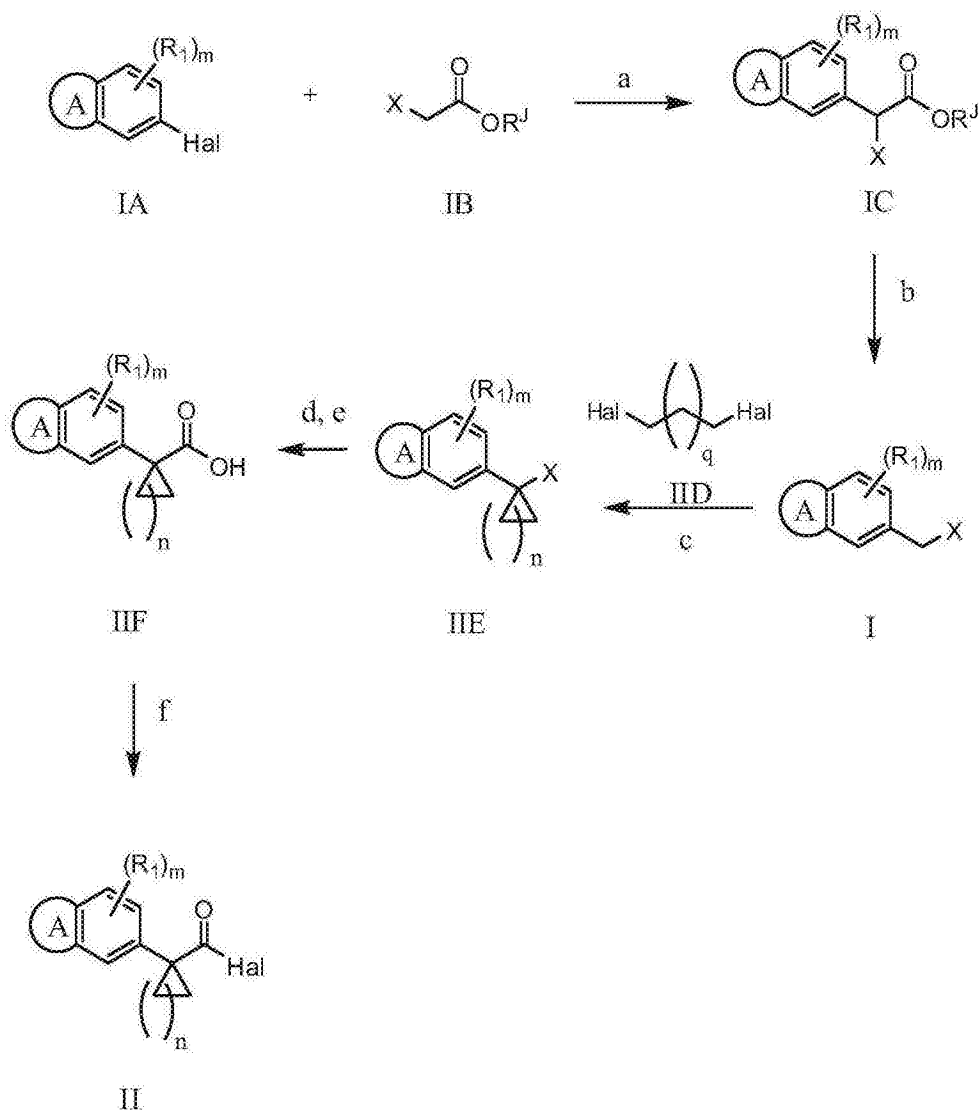


[0363] 制备式 I、II、III 和 IV 的化合物的方法

[0364] 式 I、II、III 和 IV 的化合物可以通过方案 1-3 的方法制备。

[0365] 方案 1. 式 I 和式 II 的化合物。

[0366]



[0367] a = Pd(0) 催化剂 ; b = 酸 ; c = 碱 ; d = 氢氧化物碱 ; e = 酸 ; f = 卤化剂 ;

[0368] 其中环 A、 R_1 、m、X、 R^J 、Hal、q 和 n 如上文定义。

[0369] 在方案 1 中, 芳基卤 IA 在过渡金属催化剂存在下在合适的溶剂 (例如, 甲苯) 中与酯 IB 反应以产生酯 IC。在酯 IB 和 IC 中, X 可以是 CN 或 CO_2R 。在合适的溶剂 (例如, 二甲基亚砷 (DMSO)) 中用酸处理 IC 产生 I。在碱存在下 I 与二卤化物 IID 的反应产生环烯烃 (cycloalkylidene) IIE。取决于 X 的属性 (identity), 氰化物或剩余酯基的水解产生羧酸 IIF, 后者经卤化以产生酰卤 II。

[0370] 在一个实施方案中, IA 是可商业获得的。在一个实施方案中, 环 A 是 5 元二氧环 (dioxyl ring)。在一个实施方案中, IA 中的 Hal 是 Br。在一个实施方案中, IA 和 IIB 的反应在甲苯中在 Pd(0) 催化剂 (例如, $Pd(dba)_2$) 存在下发生。在另一个实施方案中, 反应在烷基膦 (例如, $t-Bu_3P$ 和磷酸盐, 例如, Na_3PO_4) 存在下发生。在另一个实施方案中, IA 和 IIB 的反应在约 $70^\circ C$ 发生。在另一个实施方案中, R^J 是 Et。

[0371] 在一个实施方案中, IC 的去酯化成为 I 用无机酸进行。在另一个实施方案中, 无机酸是 HCl。转化在适宜的疏质子溶剂 (例如, DMSO) 中在约 $75^\circ C$ 发生。

[0372] 在一个实施方案中, I 在合适的溶剂 (例如, MTBE) 中与 NaOH 和烷基二卤化物反应以产生环烯烃。通过选择适宜的烷基二卤化物, 所述方法可适用于几种螺环。例如, 螺环状

丁烷环可以通过使 I 与例如 1-溴-3-氯丙烷反应来产生。已经发现混合的溴二卤化物和氯二卤化物在经济规模上最好地发挥作用,因为据信这个反应的热动力学是更有利的。

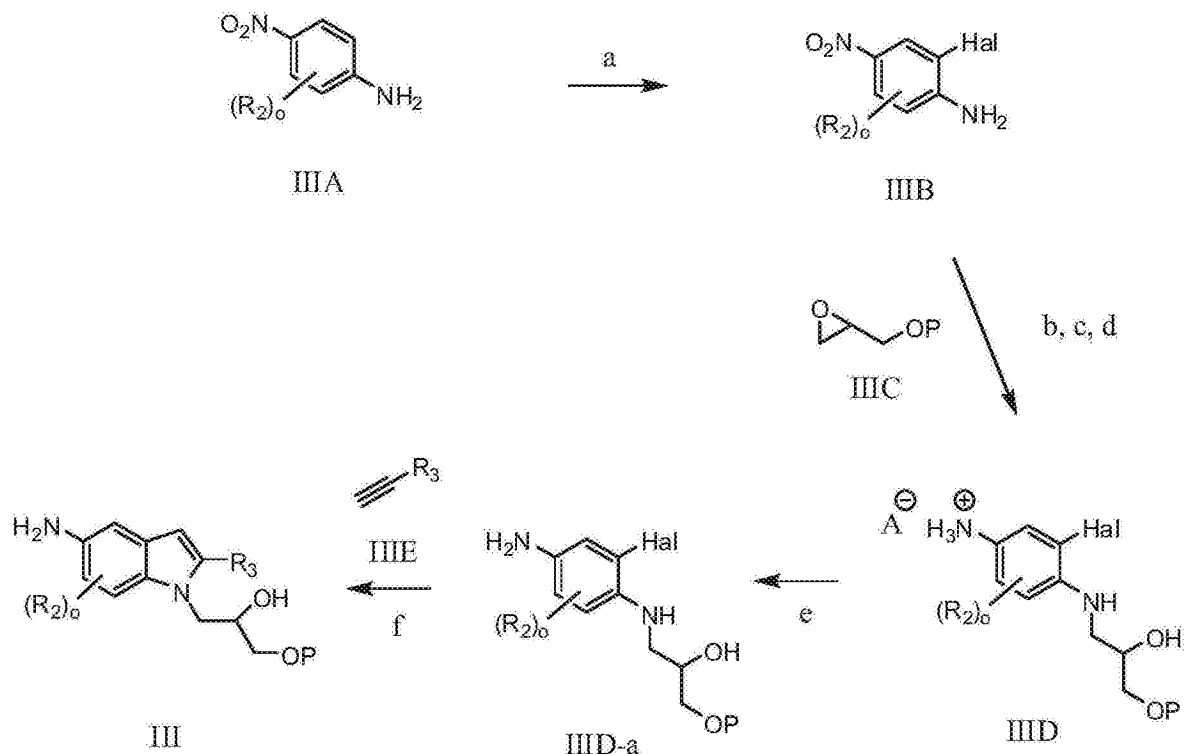
[0373] 在一个实施方案中, IIE 在水和碱(例如, NaOH)存在下在合适的溶剂(例如, 乙醇)中水解成羧酸 IIF。后续用酸如 HCl 处理产生 IIF。在另一个实施方案中, 通过使 IIF 从甲苯重结晶来后处理 IIF。

[0374] 在一个实施方案中, 使 IIF 转化成 II 的卤化剂是亚硫酸氯。在另一个实施方案中, 将亚硫酸氯在约 60°C 添加至甲苯中的 IIF 中。在一个实施方案中, 这个步骤直接进行 II 和胺 III 之间的偶联(见下文)并且在相同的反应容器中进行。

[0375] 在根据上文和本申请中其他地方描述的方案 1 和实施方案形成 II 存在几个非限制性优点。这些优点是明显的, 甚至在以经济规模制造 II 时更是如此, 并且包括以下优点。总反应仅需要 5 个步骤, 这少于先前所报道的反应(即, 从芳基羧酸开始, 所述芳基羧酸还原成甲醇, 甲醇转化成氯甲烷, 后者与 NaCN 反应)。这条合成途径在没有单独氯化反应的情况下引入 CN 或酯基(即, X)。在将 IIE 水解成 IIF 时使用乙醇作为共溶剂产生均相反应混合物, 这使得采样和监测反应更容易。如先前所报道那样, 从甲苯中重结晶 IIF 消除了形成二环己胺(DCA)盐的需要。

[0376] 方案 2. 式 III 的化合物。

[0377]



[0378] a = 卤化剂 ; b = Zn(II) 催化剂 ; c = H₂, Pt ; d = 酸 ; e = 碱 ; f = Pd(II) 催化剂 ;

[0379] 其中 R₂、o、Hal、A[⊖] 和 P 如上文定义。

[0380] 在一个实施方案中, 在 IIIA 中, R₂ 是 F 并且相对于胺基是间位的。在另一个实施方案中, IIIA 在合适的溶剂(例如, 乙酸乙酯)中在约 22°C 用 N-溴代琥珀酰亚胺溴化。

[0381] 在另一个实施方案中, IIIB 与环氧化物 IIIC 反应, 用 IIIB 的胺基实现开环反应以

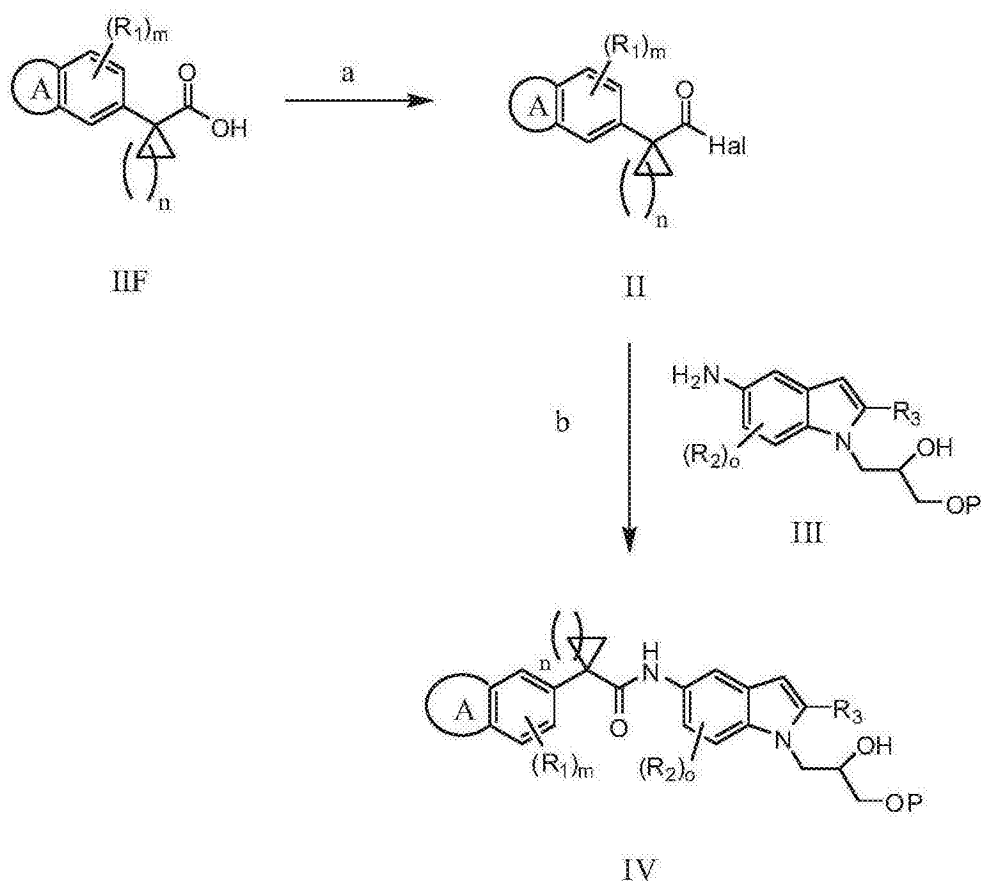
形成 IIID。在一个实施方案中, IIIC 中的保护基 P 是苄基 (Bn)。在另一个实施方案中, 环氧化物 IIIC 是手性的。在一个实施方案中, IIIC 是 (R) IIIC。在另一个实施方案中, IIIC 是 (S) IIIC。在一个实施方案中, 开环反应在合适的溶剂 (例如, 甲苯) 中在约 80°C 进行。在另一个实施方案中, 开环反应在 Zn(II) 催化剂 (例如, $Zn(ClO_4)_2$) 存在下发生。在另一个实施方案中, 从 IIIB 转化至 IIID 包括采用环氧化物 IIIC 的开环反应, 随后氢化, 并且随后用酸处理以形成 IIID。在另一个实施方案中, 氢化用 $H_2/Pt(S)/C$ 进行。在另一个实施方案中, 酸是甲苯磺酸, 从而 A^{\ominus} 是甲苯磺酸根阴离子。

[0382] 在另一个实施方案中, 炔 IIIIE 在合适的溶剂 (例如, 乙腈) 中在约 80°C 与 IIID 偶联。在另一个实施方案中, 偶联反应在 Pd(II) 催化剂如 $Pd(OAc)_2$ 存在下发生。初始反应不导致环闭合, 仅替换 IIID 上的卤素。环闭合通过在合适的溶剂 (例如, 乙腈) 中与另一种 Pd(II) 催化剂如 $(MeCN)_2PdCl_2$ 的反应而完成。在一个实施方案中, 环闭合在约 80°C 发生。在一个实施方案中, 炔 IIIIE 中的 R_3 是 $-C(CH_3)_2CH_2OBn$ 。在一个实施方案中, 不分离偶联反应的产物但是溶解于乙腈中并且与 $(MeCN)_2PdCl_2$ 反应。

[0383] 在根据上文和本申请中其他地方描述的方案 2 和实施方案形成化合物 III 存在几个非限制性优点。这些优点是明显的, 甚至在以经济规模制造 III 时更是如此, 并且包括以下优点。与先前所公开相比, 总步骤数已经缩减至仅 3 个步骤。其它优点包括取消层析和来自保护基的副产物。

[0384] 方案 3. 式 IV 的化合物。

[0385]



[0386] a = 卤化剂 ; b = 疏质子溶剂 ;

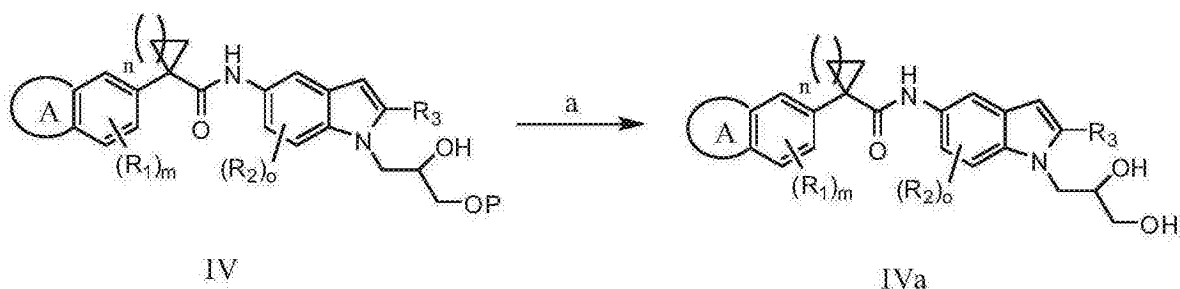
[0387] 其中环 A、 R_1 、 m 、 n 、 hal 、 R_2 、 o 、 P 和 R_3 如上文定义。

[0388] II 和 III 之间在合适溶剂（例如，二氯甲烷 (DCM)）中的酸-碱反应产生化合物 1 的受保护的类似物。在一个实施方案中，如方案 1 中所述那样在相同的反应容器中从 IIF 制备酰卤 II 并且不进行分离。在另一个实施方案中，基于酸的反应在碱如三乙胺 (TEA) 存在下进行。在一个实施方案中，TEA 的量相对于 II 是 2 当量。在一个实施方案中，在约 0°C 约 4 小时反应时间并且加温至室温过夜后，将水添加至混合物中并且搅拌额外 30 分钟。分离有机相并且通过蒸馏掉反应溶剂来分离 IV。在一个实施方案中，通过硅胶垫过滤收集 IV。

[0389] 在另一个实施方案中，可以将式 IV 的化合物去保护以形成根据方案 4 的式 IVa 的化合物。

[0390] 方案 4. 式 IV 的化合物的去保护。

[0391]



[0392] $a = H_2/Pd/C$;

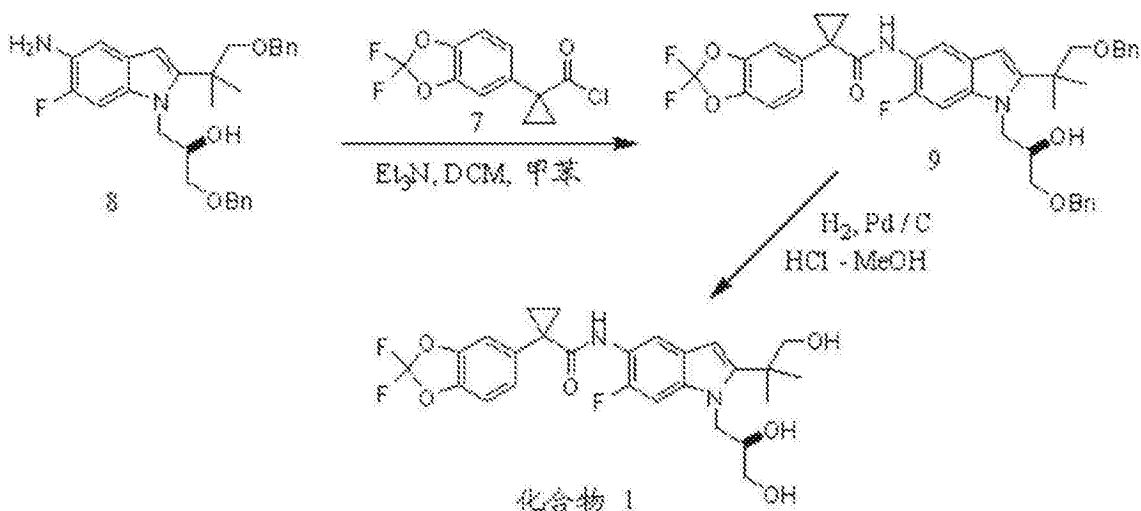
[0393] 其中环 A、 R_1 、 m 、 n 、 R_2 、 o 、 R_3 和 P 如上文定义。

[0394] 在一个实施方案中，氢气压是 3 巴。在另一个实施方案中，增加氢化搅拌速率至 800 转/分钟。在另一个实施方案中，在快速氢摄入停息后，将氢化容器加热至约 50°C 持续 2 天。在另一个实施方案中，在 2 天后，添加更多催化剂并且氢化继续另外 4 天。在另一个实施方案中，IV 溶解于合适的溶剂（例如，THF）中。

[0395] 在另一个实施方案中，可以通过使酰卤部分 7 与胺部分 8 偶联以形成化合物 9，随后根据方案 5 去保护而制备化合物 1。

[0396] 方案 5. 化合物 1 的制备。

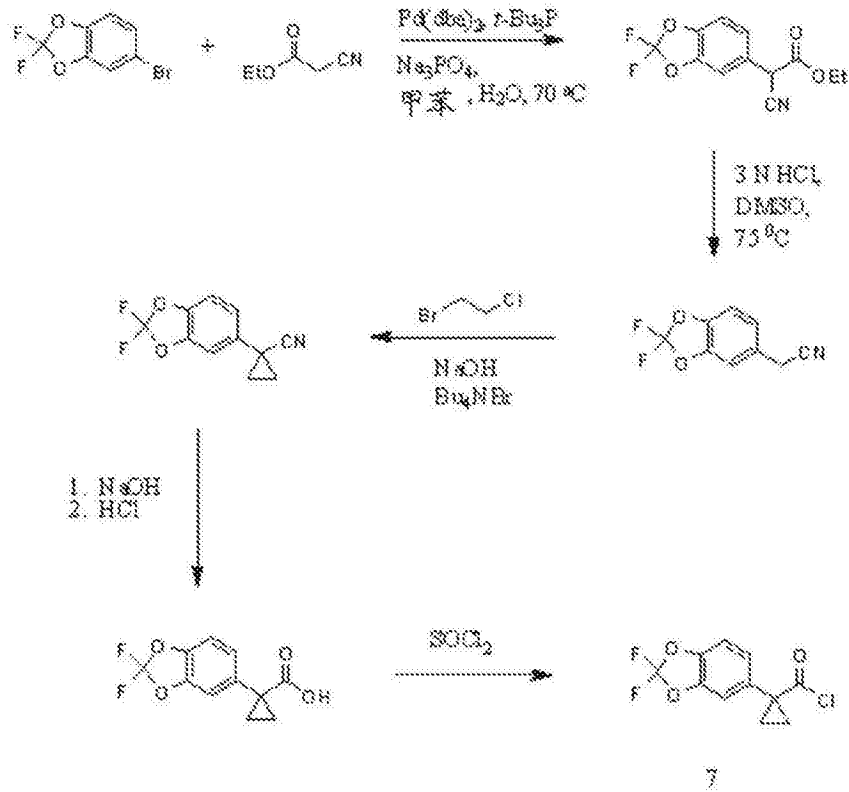
[0397]



[0398] 其中根据方案 6 制备化合物 7。

[0399] 方案 6。

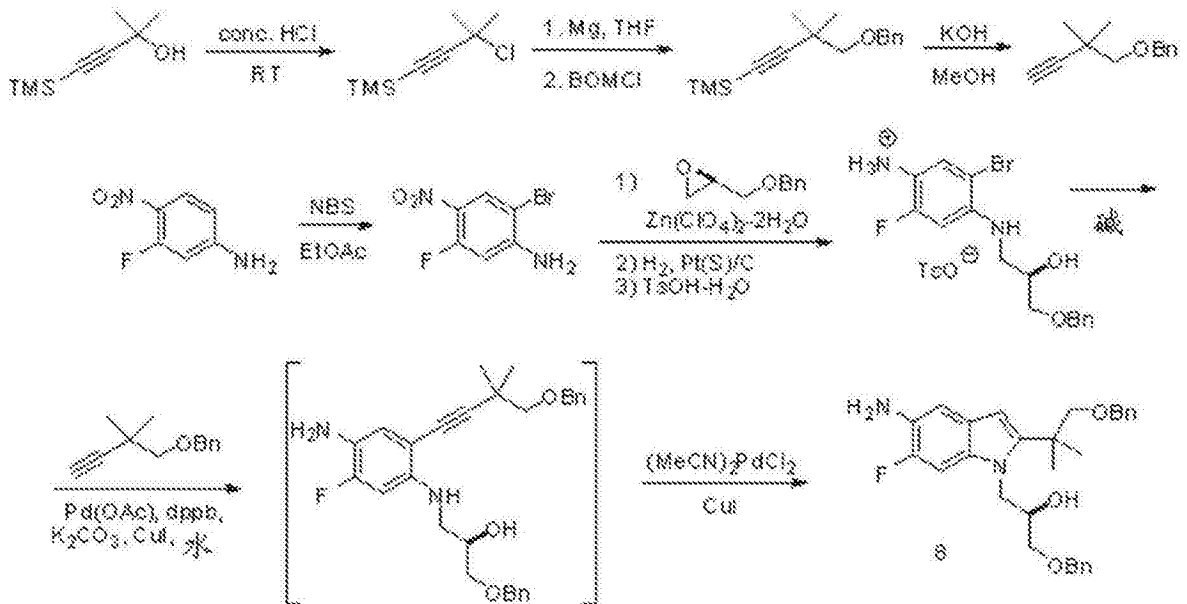
[0400]



[0401] 其中根据方案 7 制备化合物 8。

[0402] 方案 7。

[0403]



[0404] 用途、制剂和给药

[0405] 药学上可接受的组合物

[0406] 在本发明的另一个方面,提供药学上可接受的组合物,其中这些组合物包含如本文所述的化合物 1 形式 A 或非晶态化合物 1,并且任选地包含药学上可接受的载体、辅助剂

或溶媒。在某些实施方案中,这些组合物任选地进一步包含一种或多种其它治疗药。

[0407] 如上文所述,本发明的药学上可接受的组合物额外地包含药学上可接受的载体、辅助剂或溶媒,如本文所用,它们包括任何和全部溶剂、稀释剂或其它液体溶媒、分散助剂或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠或乳化剂、防腐剂、固态粘合剂、润滑剂等,如适合于所需的特定剂型。Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,E.W.Martin(Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 公开在配制药学上可接受的组合物时所用的多种载体和用于制备它们的已知技术。除了任何常规载体介质与本发明化合物不相容的情况下(如通过产生任何不想要的生物学效应或另外以有害方式与药学上可接受的组合物的任何其它组分相互作用),考虑其用途属于本发明的范围内。可以充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白、如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、或山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质,如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧化丙烯嵌段聚合物、羊毛脂、糖如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉状西黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂如可可脂和栓剂蜡;油如花生油、棉籽油;红花油;芝麻油;橄榄油;玉米油和大豆油;二醇;如丙二醇或聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏液;乙醇和磷酸盐缓冲液溶液,以及其它无毒相容性的润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁、以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和香味剂、防腐剂且抗氧化剂也可以根据制剂师的判断存在于组合物中。

[0408] 化合物和药学上可接受的组合物的用途

[0409] 在又一个方面,本发明提供一种治疗因 CFTR 所致的病状、疾病或病症的方法。在某些实施方案中,本发明提供一种治疗因缺乏 CFTR 活性所致的病状、疾病或病症的方法。所述方法包括给予需要它的受试者优选地哺乳动物包含本文所述的化合物 1 的组合物。

[0410] 如本文所用的“CFTR 介导的疾病”是选自以下的疾病:囊性纤维化、哮喘、吸烟引起的 COPD、慢性支气管炎、鼻窦炎、便秘、胰腺炎、胰功能不全、由先天性双侧输精管缺如引起的男性不育(CBAVD)、轻度肺病、特发性胰腺炎、变应性支气管肺曲霉病(ABPA)、肝脏疾病、遗传性气肿、遗传性血色素沉着症、凝血-纤维蛋白溶解缺陷、如蛋白 C 缺乏、I 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷、如家族性高胆固醇血症、I 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积疾病,如 I- 细胞病/假-Hurler 病、粘多糖病、Sandhof/Tay-Sachs 病、II 型 Crigler-Najjar、多内分泌腺病/高胰岛素血症、糖尿病、Laron 侏儒症、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺功能减退、黑色素瘤、I 型 glycanosis CDG、先天性甲状腺功能亢进症、成骨不全症、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 缺陷、尿崩症(DI)、神经生理性 DI、肾性 DI、Charcot-Marie Tooth 综合征、Perliaeus-Merzbacher 病、神经变性疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、皮克病、几种多谷氨酰胺神经病症,如亨廷顿病、I 型脊髓小脑共济失调、脊髓和延髓性肌萎缩、齿状核红核苍白球丘脑下部萎缩和肌强直性营养不良,以及海绵状脑病,如遗传性克-雅氏病(归因于朊蛋白加工缺陷)、法布里病、Straussler-Scheinker 综合征、COPD、干眼病或 Sjogren 病、骨质疏松症、骨质减少、骨愈合和骨生长(包括骨修复、骨再生、减少骨吸收并且增加骨沉积)、Gorham 综合征、

氯离子通道病如先天性肌强直 (Thomson 形式和 Becker 形式)、III 型 Bartter 综合征、Dent 病、惊跳症、癫痫、惊跳症、溶酶体贮积疾病、Angelman 综合征和原发纤毛运动异常 (PCD)，用于纤毛结构和 / 或功能的遗传性病症的术语，包括伴有逆位的 PCD (也称作 Kartagener 综合征)、无逆位的 PCD 和纤毛不发育 (ciliaryaplasia)。在另一个实施方案中，CFTR 介导的疾病是囊性纤维化、气肿、COPD 或骨质疏松症。在另一个实施方案中，CFTR 介导的疾病是囊性纤维化。

[0411] 在某些实施方案中，本发明提供一种在人中治疗 CFTR 介导的疾病的方法，所述方法包括给予所述人有效量的包含本文所述的化合物 1 的组合物的步骤。

[0412] 根据本发明，“有效量”的化合物 1 形式 A 或非晶态的化合物 1 或其药学上可接受的组合物是有效治疗上文提及的任何疾病或减轻其严重性的量。

[0413] 可以使用有效治疗上文提及的一种或多种疾病或减轻其严重性的任何量和任何给药途径给予化合物 1 或其药学上可接受的组合物。

[0414] 在某些实施方案中，本文所述的化合物 1 或其药学上可接受的组合物用于患者中治疗囊性纤维化或减轻其严重性，所述患者在呼吸道和非呼吸道上皮的顶端膜中显示残余 CFTR 活性。可以使用本领域已知的方法，例如，标准电生理技术、生物化学技术或组织化学技术，轻易地检测到残余 CFTR 活性在上皮表面的存在。这类方法使用体内或离体电生理技术、汗液或唾液 Cl 浓度的测量或监测细胞表面密度的离体生物化学或组织化学技术确定 CFTR 活性。使用这类方法，可以在对多种不同突变的杂合或纯合的患者 (包括对最常见突变 $\Delta F508$ 纯合或杂合的患者) 中轻易地检测到残余 CFTR 活性。

[0415] 在一个实施方案中，本文所述的化合物 1 或其药学上可接受的组合物用于治疗患者中囊性纤维化或减轻其严重性，所述患者带有显示残余 CFTR 活性，例如，III 类突变 (受损的调节或门控作用)、IV 类突变 (改变的导率) 或 V 类突变 (减少的合成) 的某些基因型 (Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and Vcystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy (I, II, III, IV 和 V 类囊性纤维化跨膜导率调节剂缺陷和治疗机会) ;Current Opinion in Pulmonary Medicine 6 :521-529, 2000)。显示残余 CFTR 活性的其它患者基因型包括对这些类型突变之一纯合或对任何其它类别突变 (包括 I 类突变、II 类突变或缺少分类的突变) 杂合的患者。

[0416] 在一个实施方案中，本文所述的化合物 1 或其药学上可接受的组合物可用于治疗患者中的囊性纤维化或减轻其严重性，所述患者具有某些临床表型，例如，通常与残余 CFTR 活性在上皮顶端膜中的量相关的中度至轻度临床表型。这类表型包括显示胰功能不全的患者或经诊断患有特发性胰腺炎和先天性双侧输精管缺如或轻度肺病的患者。

[0417] 所要求的确切量将在受试者之间不同，这取决于受试者的物种、年龄和总体状况、感染的严重性、具体药物、其给药方式等。本发明的化合物优选地以易于给药和剂量均匀的剂量单位形式配制。如本文所用的表述“剂量单位形式”指物理上分立的药物单元，其适用于待治疗的患者。然而，将理解，本发明的化合物和组合物的每日总用量将由主治医师在正确医学判断的能力范围内决定。任何特定患者或生物的具体有效剂量水平将取决于多种因素，包括正在治疗的病症和病症的严重性；所用特定化合物的活性；所用的特定组合物；患者的年龄、体重、总体健康、性别和膳食；所用特定化合物的给药时间、给药方式和排泄

速率；治疗持续期；与所用特定化合物联合或同时使用的药物和医学领域中熟知的类似因素。如本文所用，术语“患者”或“受试者”意在包括动物，优选地包括哺乳动物，并且最优选地包括人。

[0418] 根据正在治疗的感染的严重性，本发明的药学上可接受的组合物可以经口、直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹内、局部（如通过散剂、油膏剂或滴剂）、颊部（作为口腔或鼻喷雾剂等）给予人和其它动物。在某些实施方案中，本发明的化合物可以是经口或肠胃外地以约 0.01mg/kg 至约 50mg/kg 并且优选地约 1mg/kg 至约 25mg/kg 受试者体重的剂量水平每日、每日一次或多次给药，以获得所需的治疗效果。

[0419] 在某些实施方案中，在剂量单位形式中化合物 1 的剂量是 100mg 至 1,000mg。在另一个实施方案中，化合物 1 的剂量是 200mg 至 900mg。在另一个实施方案中，化合物 1 的剂量是 300mg 至 800mg。在另一个实施方案中，化合物 1 的剂量是 400mg 至 700mg。在另一个实施方案中，化合物 1 的剂量是 500mg 至 600mg。

[0420] 可以根据已知技术，使用合适的分散剂或润湿剂和助悬剂配制可注射的制品，例如，无菌可注射的水性或油性混悬剂。无菌可注射的制剂也可以是在肠胃外可接受的无毒稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液剂、混悬剂或乳剂，例如，作为在 1,3-丁二醇中的溶液剂。在可以使用的可接受溶媒和溶剂中有水、林格氏液、U. S. P. 和等渗氯化钠溶液。此外，无菌的固定油常规地用作溶剂或助悬介质。出于该目的，可以使用任何温和的固定油，包括合成的单酸甘油酯或二酸甘油酯。此外，在注射剂的制备中使用脂肪酸，如油酸。

[0421] 可注射制剂可以例如通过截留细菌的过滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的消毒剂来灭菌，所述的消毒剂可以在使用之前溶解或分散于无菌水或其它无菌的可注射介质中。

[0422] 用于直肠或阴道给药的组合物优选地是栓剂，所述栓剂可以通过将本发明的化合物与无刺激性的合适赋形剂或载体如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡混合来制备，其中所述赋形剂或载体在室温是固体，但是在体温下为液体，并且因此在直肠或阴道腔中融化并且释放活性化合物。

[0423] 用于口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这类固体剂型中，活性化合物与以下至少一种惰性、药学上可接受的赋形剂或载体混合，如柠檬酸钠或磷酸二钙和 / 或 a) 填料或增量剂如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸，b) 粘合剂例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿位伯树胶，c) 湿润剂如甘油，d) 崩解剂如琼脂 - 琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠，e) 溶液阻滞剂如石蜡，f) 吸收加速剂如季铵化合物，g) 润湿剂例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯，h) 吸收剂如高岭土和膨润土和 i) 润滑剂如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下，该剂型也可以包含缓冲剂。

[0424] 也可以使用相似类型的固体组合物作为使用这类赋形剂如乳糖或乳糖 (milk sugar) 以及高分子量聚乙二醇等的软质和硬质填充明胶胶囊剂中的填料。片剂、锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以用包衣和壳（如肠衣和药物配制领域中熟知的其它包衣）进行制备。它们可以任选地含有遮光剂并且也可以是这样的组合物：它们仅释放有效成分或优选地在肠道的某些部分中任选地以延迟方式释放有效成分。可以使用的包埋型组合物的实例包含聚合物和蜡。也可以使用相似类型的固体组合物作为使用这类赋形剂如

乳糖或乳糖 (milk sugar) 以及高分子量聚乙二醇等的软质和硬质填充明胶胶囊剂中的填料。

[0425] 活性化合物也可以为具有上文所述的一种或多种赋形剂的微胶囊化形式。片剂、糖衣丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以用包衣和壳 (如肠衣、释放控制包衣和药物配制领域中熟知的其它包衣) 进行制备。在此类固体剂型中, 活性化合物可以与至少一种惰性稀释剂如蔗糖、乳糖或淀粉混合。如作为正常惯例, 这类剂型也可以包含不是惰性稀释剂的其它物质, 例如, 造片润滑剂和其它造片助剂如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下, 该剂型也可以包含缓冲剂。它们可以任选地含有遮光剂并且也可以这样的组合: 它们仅释放有效成分或优选地在肠道的某些部分中任选地以延迟方式释放有效成分。可以使用的包埋型组合物的实例包含聚合物物质和蜡。

[0426] 还将理解, 本文所述的化合物 1 或其药学上可接受的组合物可以在联合疗法中使用, 即, 化合物 1 可以与一种或多种其它所需的治疗药或医疗方法同时、在其之前或之后给药。在联合方案中待采用的疗法 (治疗药或方法) 的特定组合将考虑所需治疗药和 / 或方法的相容性和待实现的所需治疗效果。还将理解, 所用的疗法可以对相同病症实现所需的效果 (例如, 本发明的化合物可以与用来治疗相同病症的另一个药物同时给药), 或它们可以实现不同的效果 (例如, 控制任何副作用)。如本文所用, 已知通常给药以治疗或预防特定疾病或病状的其它治疗药“适用于正在治疗的疾病或病状”。

[0427] 在一个实施方案中, 其它药物选自粘液溶解药、支气管扩张药、抗生素、抗感染药、抗炎药、除本发明化合物之外的 CFTR 调节剂或营养剂。

[0428] 在一个实施方案中, 其它治疗药是抗生素。本文中所述的示例性抗生素包括妥布霉素, 包括妥布霉素吸入型散剂 (TIP)、阿奇霉素、氨曲南, 包括气溶胶化形式的氨曲南、阿米卡星, 包括其脂质体制剂、环丙沙星, 包括其适于通过吸入给药的制剂、左氧氟沙星, 包括其气溶胶化制剂和两种抗生素的组合, 例如, 磷霉素和妥布霉素。

[0429] 在另一个实施方案中, 其它药物是粘液溶解药。本文中有用的示例性粘液溶解药包括 Pulmozyme®。

[0430] 在另一个实施方案中, 其它药物是支气管扩张药。示例性支气管扩张药包括沙丁胺醇、硫酸奥西那林 (metaprotenerol)、醋酸吡布特罗、沙美特罗或硫酸 tetrabuline。

[0431] 在另一个实施方案中, 其它药物有效恢复肺部气道表面液体。这种药物改善盐进入和离开细胞的移动, 使肺部气道中的粘液更为水合并因此更容易清除。示例性的这种药物包括低渗盐水、地纽福索 (denufosol) 四钠 ([[(3S, 5R) -5-(4-氨基 -2-氧代嘧啶 -1-基) -3-羟基环氧丁 -2-基] 甲氧基 -羟基磷酰基 [[[(2R, 3S, 4R, 5R) -5-(2, 4-二氧代嘧啶 -1-基) -3, 4-二羟基环氧丁 -2-基] 甲氧基 -羟基磷酰基] 氧 -羟基磷酰基] 磷酸氢盐或 bronchitol (甘露醇的吸入型制剂)。

[0432] 在另一个实施方案中, 其它药物是抗炎药, 即, 可以减少肺中炎症的药物。本文中有用的示例性这种药物包括布洛芬、二十二碳六烯酸 (DHA)、西地那非、吸入型谷胱甘肽、吡格列酮、羟氯喹或斯伐他汀。

[0433] 在另一个实施方案中, 其它药物是除化合物 1 之外的 CFTR 调节剂, 即, 具有调节 CFTR 活性的作用的药物。示例性的这种药物包括阿他卢仑 (“PTC124®”; 3-[5-(2-氟苯基 -1, 2, 4-噁二唑 -3-基] 苯甲酸)、西那普肽 (sinapultide)、兰考韦泰 (lancovutide)、

地来司他 (depelestate, 一种人重组中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂)、考前列酮 (cobiprostone, 7-((2R,4aR,5R,7aR)-2-[(3S)-1,1-二氟-3-甲基戊基]-2-羟基-6-氧八氢环戊并[b]吡喃-5-基)庚酸) 和 N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧-1H-喹啉-3-甲酰胺。

[0434] 在另一个实施方案中,其它药物是营养剂。示例性营养剂包括胰脂肪酶(胰腺酶替换物),包括 Pancrease®、Pancreacarb®、Ultrase®或 Creon®、Liprotomase®(先前的 Trizyte®)、Aquadeks®或谷胱甘肽吸入剂。在一个实施方案中,其它营养剂是胰脂肪酶。

[0435] 在另一个实施方案中,其它药物是化合物选自庆大霉素(gentamicin)、姜黄素(curcumin)、环磷酰胺、4-苯基丁酸酯、美格鲁特(miglustat)、非洛地平(felodipine)、尼莫地平(nimodipine)、PhiloxinB、染料木素(geniestein)、芹菜素(Apigenin)、cAMP/cGMP 调节剂如咯利普兰(rolipram)、西地那非(sildenafil)、米力农(milrinone)、他达拉非(tadalafil)、氨力农(amrinone)、异丙肾上腺素、沙丁胺醇(albuterol) 和沙美特罗(almeterol)、去氧精胍啉(deoxyspergualin)、HSP90 抑制剂、HSP70 抑制剂、蛋白酶体抑制剂如 epoxomicin、乳胞素(lactacystin) 等。

[0436] 在另一个实施方案中,其它药物是在 WO 2004028480、WO 2004110352、WO 2005094374、WO 2005120497 或 WO 2006101740 中公开的化合物。

[0437] 在另一个实施方案中,其它药物是显示 CFTR 调节活性的苯并(c) 喹啉鎓衍生物或显示 CFTR 调节活性的苯并吡喃衍生物。

[0438] 在另一个实施方案中,其它药物是在 US7202262、US6992096、US20060148864、US20060148863、US20060035943、US20050164973、WO2006110483、WO2006044456、WO2006044682、WO2006044505、WO2006044503、WO2006044502 或 WO2004091502 中公开的化合物。

[0439] 在另一个实施方案中,其它药物是在 WO2004080972、WO2004111014、WO2005035514、WO2005049018、WO2006099256、WO2006127588 或 WO2007044560 中公开的化合物。

[0440] 这些组合可用于治疗本文所述的疾病,包括囊性纤维化。这些组合还可用于本文所述的试剂盒中。

[0441] 本发明组合中存在的其它治疗药的量将不多于在包含这种治疗药作为唯一有效药物的组合中正常施用的量。优选地,在目前公开的组合中存在的其它治疗药的量将是包含这种药物作为唯一治疗有效药物的组合中正常存在的量的约 50% 至 100%。

[0442] 为了可以更充分地理解本文所述的发明,描述以下实施例。应当理解这些实施例仅起到说明目的并且不得解释为以任何方式限制本发明。

[0443] 实施例

[0444] 方法与材料

[0445] Vitride® (双(2-甲氧基乙氧基)氢化铝钠 [或 $\text{NaAlH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$], 甲苯中的 65wt% 溶液) 从 Aldrich Chemicals 购买。3-氟-4-硝基苯胺从 Capot Chemicals 购买。5-溴-2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯从 Alfa Aesar 购买。2,2-二氟-1,3-苯并

二氧杂环戊烯-5-甲酸从 Saltigo (Lanxess 公司的子公司) 购买。

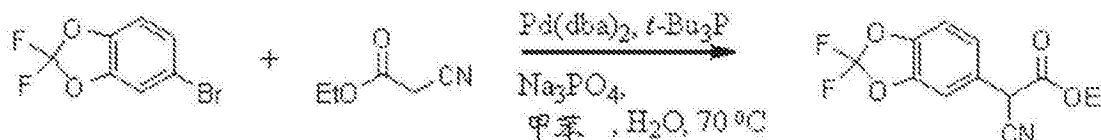
[0446] 本申请中其中化合物名称可能没有正确描述化合物结构的情况下, 结构优先于名称并且起决定作用。

[0447] 化合物 1 的合成

[0448] 酸部分

[0449] 乙酸 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-1-乙酯-乙腈的合成

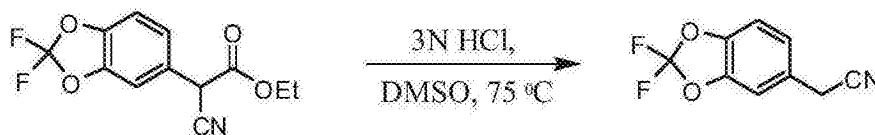
[0450]



[0451] 反应器用氮吹扫并且投入 900mL 甲苯。溶剂通过充氮脱气不小于 16 小时。随后向反应器投入 Na₃PO₄ (155.7g, 949.5mmol), 随后投入双(二亚苄基丙酮)合钯(0) (7.28g, 12.66mmol)。在 23°C 经 10 分钟从氮吹扫的添加漏斗中加入叔丁基膦在己烷 (51.23g, 25.32mmol) 中的 10% w/w 溶液。搅拌混合物 50 分钟, 在此时间经 1 分钟添加 5-溴-2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯 (75g, 316.5mmol)。在搅拌额外 50 分钟后, 经 5 分钟向混合物加入氰乙酸乙酯 (71.6g, 633.0mmol), 随后将水 (4.5mL) 一次加入。将混合物经 40 分钟加热至 70°C 并且每隔 1-2 小时通过 HPLC 分析反应物至产物的转化百分比。在观察到完全转化 (一般在 5-8 小时后 100% 转化) 后, 将混合物冷却至 20-25°C 并且经 Celite 垫过滤。将 Celite 垫用甲苯 (2×450mL) 淋洗并且将合并的有机相在真空下在 60-65°C 浓缩至 300mL。向浓缩物加入 225mL DMSO 并且在真空下在 70-80°C 浓缩直至溶剂的有效蒸馏 (active distillation) 停止。将溶液冷却至 20-25°C 并且用 DMSO 稀释至 900mL, 准备用于步骤 2。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.16-7.10 (m, 2H), 7.03 (d, J = 8.2Hz, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.19 (m, 2H), 1.23 (t, J = 7.1Hz, 3H)。

[0452] (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈的合成

[0453]

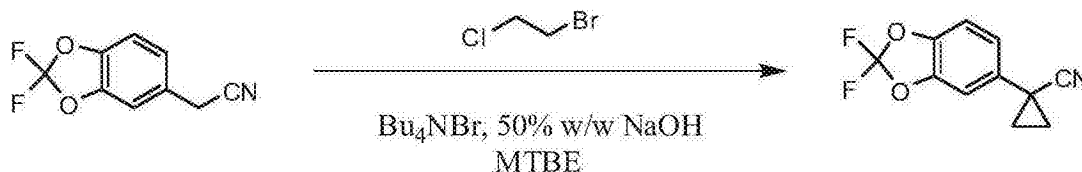


[0454] 向来自上文的乙酸 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-1-乙酯-乙腈的 DMSO 溶液经 20 分钟加入 3N HCl (617.3mL, 1.85 摩尔), 同时维持内部温度小于 40°C。随后将混合物经 1 小时加热至 75°C 并且每隔 1-2 小时通过 HPLC 分析转化%。当观察到 > 99% 的转化率 (一般在 5-6 小时后) 时, 将反应冷却至 20-25°C 并且用 MTBE (2×525mL) 提取充足时间以在提取期间实现完全相分离。合并的有机提取物用 5% NaCl (2×375mL) 洗涤。随后将溶液转移至适于 1.5-2.5Torr 真空蒸馏的设备, 所述设备配有冷却的接收瓶。将溶液在真空下在低于 60°C 浓缩以除去溶剂。随后将 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈在 125-130°C (炉温) 和 1.5-2.0Torr. 从所得到的油中蒸馏出来。将 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈作为清澈油以 66% 产率和 HPLC 纯度 91.5% AUC (对应于 w/w 测定法的 95%) 从 5-溴-2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯中分离出来 (2 个步骤)。¹H NMR (500MHz, DMSO) δ 7.44 (br s, 1H), 7.43 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.22 (dd, J

= 8.2, 1.8Hz, 1H), 4.07 (s, 2H)。

[0455] (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲腈的合成

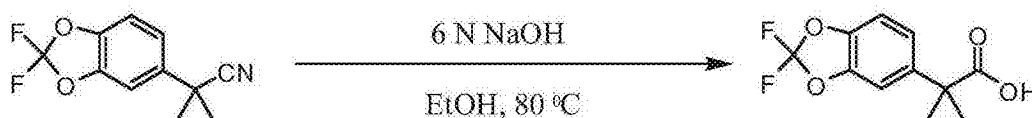
[0456]



[0457] 50% w/w 的 NaOH 母液通过充氮脱气不小于 16 小时。将适宜量的 MTBE 类似地脱气几小时。向用氮冲洗的反应器加入脱气的 MTBE (143mL), 随后加入 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈 (40.95g, 207.7mmol) 和四丁基溴化铵 (2.25g, 10.38mmol)。记录混合物的体积并且将混合物通过充氮脱气 30 分钟。将足量的脱气 MTBE 加入以便使混合物恢复到脱气之前的原始体积。在 23.0°C 向搅拌的混合物经 10 分钟加入脱气的 50% w/w NaOH (143mL), 随后经 30 分钟加入 1-溴-2-氯乙烷 (44.7g, 311.6mmol)。通过 HPLC 以 1 小时间隔期对反应物分析 % 转化。在采样之前, 停止搅拌并且允许各相分离。对顶层有机相采样用于分析。当观察到 % 转化大于 99% 时 (一般在 2.5-3 小时后), 将反应混合物冷却至 10°C 并且以这样的速率加入水 (461mL) 以维持小于 25°C 的温度。将温度调节至 20-25°C 并且分离各相。注意: 应当分配足够的时间用于完全的相分离。水相用 MTBE (123mL) 提取, 并且合并的有机相用 1N HCl (163mL) 和 5% NaCl (163mL) 洗涤。将 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲腈在 MTBE 中的溶液在真空下在 40-50°C 浓缩至 164mL。向溶液加入乙醇 (256mL) 并且再次在真空下在 50-60°C 浓缩至 164mL。加入乙醇 (256mL) 并且将混合物在真空下在 50-60°C 浓缩至 164mL。将所得到的混合物冷却至 20-25°C 并且用乙醇稀释至 266, 准备用于下一个步骤。¹H NMR (500MHz, DMSO) δ 7.43 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.40 (d, J = 1.9Hz, 1H), 7.30 (dd, J = 8.4, 1.9Hz, 1H), 1.75 (m, 2H), 1.53 (m, 2H)。

[0458] 1-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷羧酸的合成

[0459]

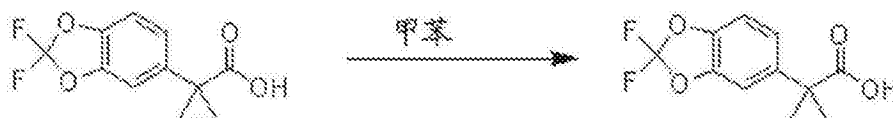


[0460] 向源自先前步骤的 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲腈在乙醇中的溶液经 20 分钟加入 6N NaOH (277mL) 并且经 45 分钟加热至内部温度 77-78°C。在 16 小时后通过 HPLC 监测反应进程。注意: 监测 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲腈和 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲腈的部分水解产生的伯酰胺的消耗量。当观察到 % 转化大于 99% 时 (一般在 16 小时后 100% 转化), 将反应混合物冷却至 25°C 并且充入乙醇 (41mL) 和 DCM (164mL)。将溶液冷却至 10°C 并且以这样的速率加入 6N HCl (290mL) 以维持小于 25°C 的温度。在升温至 20-25°C 后, 让各相分离。收集底部有机相并且顶部水相再次用 DCM (164mL) 提取。注意: 水相在提取之前和之后因高浓度的无机盐而有点呈云雾状。将有机相合并并且在真空下浓缩至 164mL。加入甲苯 (328mL) 并且将混合物在 70-75°C 浓缩至 164mL。将混合物冷却至 45°C, 加入 MTBE (364mL) 并且在 60°C 搅拌 20 分钟。将溶液冷却至 25°C 并且精过滤 (polish filter) 以除去残余的

无机盐。使用 MTBE (123mL) 来淋洗反应器和收集的固体。将合并的有机相转移至一个清洁的反应器,准备用于下一个步骤。

[0461] 1-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸的分离

[0462]

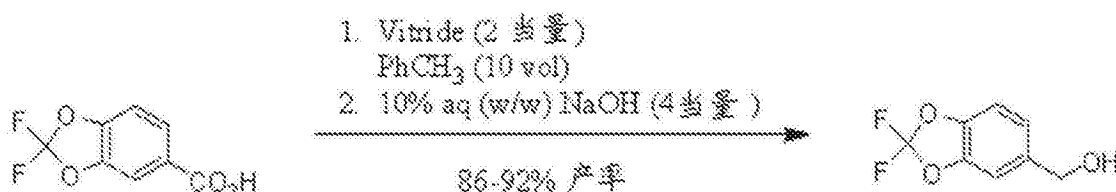


[0463] 将源自先前步骤的 1-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸溶液在真空下浓缩至 164mL,加入甲苯 (328mL) 并且在 70-75°C 浓缩至 164mL。随后将混合物加热至 100-105°C 以产生均质溶液。在这个温度搅拌 30 分钟后,将溶液冷经 2 小时却至 5°C 并且在 5°C 维持 3 小时。随后过滤混合物并且将反应器和收集的固体用冷的 1 : 1 甲苯 / 正庚烷 (2×123mL) 洗涤。物料在真空下在 55°C 干燥 17 小时以提供作为米白色晶状固体的 1-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸。将 1-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸以 79% 产率和 HPLC 纯度 99.0% AUC 从 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈中分离出来 (3 个步骤,包括分离)。ESI-MS m/z 计算值 242.04,测定值 241.58 ($M+1$)⁺; ¹H NMR (500MHz, DMSO) δ 12.40 (s, 1H), 7.40 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H), 1.46 (m, 2H), 1.17 (m, 2H)。

[0464] 酸部分的备选合成

[0465] (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇

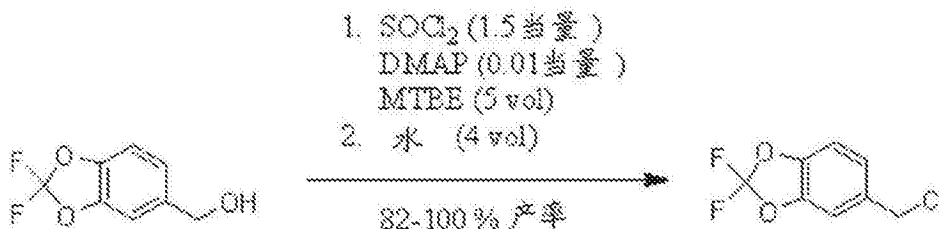
[0466]



[0467] 将市售 2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-甲酸 (1.0 当量) 在甲苯 (10 体积) 中形成浆液。通过添加漏斗以维持温度在 15-25°C 的速率添加 Vitride® (2 当量)。在添加结束时,将温度增加至 40°C 持续 2 小时,随后通过添加漏斗小心地添加 10% (w/w) NaOH 水溶液 (4.0 当量),同时维持温度在 40-50°C。在搅拌额外 30 分钟后,让各层在 40°C 分离。将有机相冷却至 20°C,随后用水 (2×1.5 体积) 洗涤,干燥 (Na_2SO_4),过滤和浓缩以提供在下一个步骤中直接使用的粗制物 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇。

[0468] 5-氯甲基-2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯的合成

[0469]

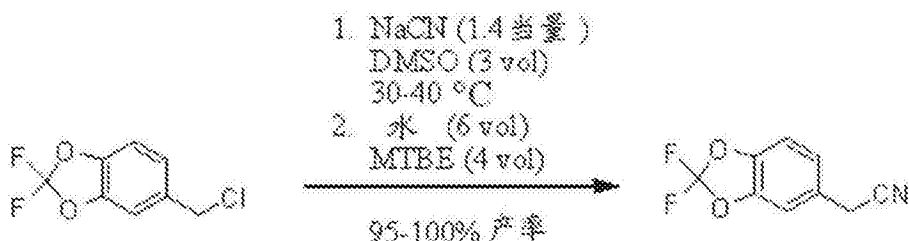


[0470] 将 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇 (1.0 当量) 溶解于 MTBE (5 体积) 中。添加催化量的 DMAP (1 摩尔%) 并且通过添加漏斗添加 SOCl_2 (1.2 当量)。以维

持反应器中温度在 15-25℃ 的速率添加 SOCl_2 。将温度提高至 30℃ 持续 1 小时, 随后冷却至 20℃, 然后通过添加漏斗添加水 (4 体积), 同时维持温度低于 30℃。在搅拌额外 30 分钟后, 让各层分离。搅拌有机层并且添加 20% (w/v) NaOH 水溶液 (4.4 体积)。在搅拌 5 至 20 分钟后, 让各层分离。随后将有机相干燥 (Na_2SO_4) 并且浓缩以提供在下一个步骤中直接使用的粗制物 5-氯甲基-2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯。

[0471] (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈的合成

[0472]



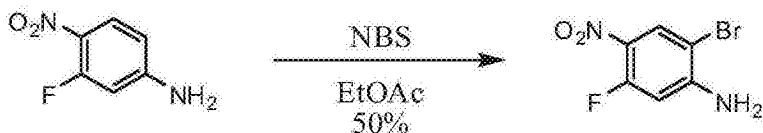
[0473] 将 5-氯甲基-2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯 (1 当量) 在 DMSO (1.25 体积) 中的溶液添加至 NaCN (1.4 当量) 在 DMSO (3 体积) 中的浆液中, 维持温度在 30-40℃ 之间。将混合物搅拌 1 小时, 随后添加水 (6 体积), 然后添加 MTBE (4 体积)。在搅拌 30 分钟后, 使各层分离。水层用 MTBE (1.8 体积) 提取。将合并的有机层用水 (1.8 体积) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并且浓缩以提供在下一个步骤中直接使用的粗制物 (2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈 (95%)。

[0474] 剩余步骤与上文针对酸部分的合成所述的那样相同。

[0475] 胺部分

[0476] 2-溴-5-氟-4-硝基苯胺的合成

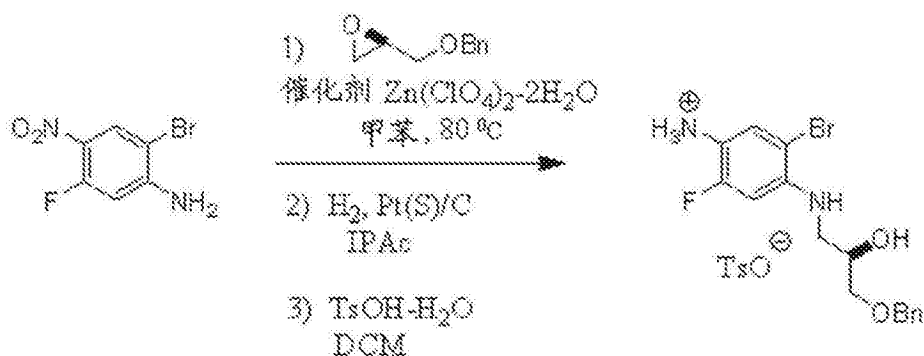
[0477]



[0478] 向烧瓶加入 3-氟-4-硝基苯胺 (1.0 当量), 随后加入乙酸乙酯 (10 体积), 并且搅拌以溶解全部固体。将 N -溴代琥珀酰亚胺 (1.0 当量) 逐份添加以维持 22℃ 内部温度。在反应结束时, 将反应混合物在真空下在旋转蒸发器中浓缩。将残余物在蒸馏水 (5 体积) 中形成浆液以溶解和除去琥珀酰亚胺。(琥珀酰亚胺也可以通过水后处理步骤除去) 将水滗析并且使固体在 2-丙醇 (5 体积) 中形成浆液过夜。过滤所得到的浆液并且将湿滤饼用 2-丙醇洗涤, 在真空烘箱中在 50℃ 干燥过夜, 伴以 N_2 吹扫, 直至达到恒定重量。分离出黄褐色固体 (50% 产率, 97.5% AUC)。其它杂质是溴-位置异构体 (1.4% AUC) 和二溴加合物 (1.1% AUC)。 ^1H NMR (500MHz, DMSO) δ 8.19 (1H, d, $J = 8.1\text{Hz}$), 7.06 (br. s, 2H), 6.64 (d, 1H, $J = 14.3\text{Hz}$)。

[0479] (R)-1-((4-氨基-2-溴-5-氟苯基)氨基)-3-(苄氧基)丙-2-醇的对甲苯磺酸盐的合成

[0480]



[0481] 向 N_2 下彻底干燥的烧瓶加入以下组分:活化的粉状 4A 分子筛(基于 2-溴-5-氟-4-硝基苯胺, 50wt%)、2-溴-5-氟-4-硝基苯胺(1.0 当量)、二水合高氯酸锌(20 摩尔%) 和甲苯(8 体积)。将混合物在室温搅拌 NMT30 分钟。最后,以稳定流添加在甲苯(2 体积)中的 (R)-苄基缩水甘油醚(2.0 当量)。将反应加热至 80°C (内部温度) 并且搅拌大约 7 小时或直至 2-溴-5-氟-4-硝基苯胺 $< 5\%$ AUC。

[0482] 将反应物冷却至室温并且添加 Celite(50wt%), 随后添加乙酸乙酯(10 体积)。过滤所得到的混合物以除去 Celite 和分子筛并且用乙酸乙酯(2 体积)洗涤。滤液用氯化铵溶液(4 体积, 20% w/v) 洗涤。有机层用碳酸氢钠溶液(4 体积 \times 2.5% w/v) 洗涤。有机层在真空下在旋转蒸发器中浓缩。将所得到的浆液溶解于乙酸异丙酯(10 体积)中并且将此溶液转移至 Buchi 氢化器。

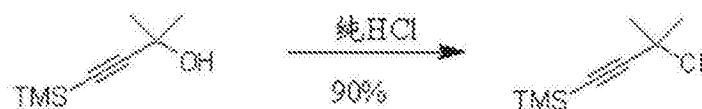
[0483] 向氢化器加入 5wt% Pt(S)/C(1.5 摩尔%) 并且将混合物在 N_2 下在 30°C (内部温度) 搅拌。反应物先后用 N_2 和氢冲洗。将氢压力是调节至 1Bar 氢并且将混合物快速搅拌(> 1200 转/分钟)。在反应结束时,将催化剂通过 Celite 垫过滤并且用二氯甲烷(10 体积)洗涤。滤液在真空下浓缩。任何剩余的乙酸异丙酯接着用二氯甲烷(2 体积)提取(chase) 并且在旋转蒸发器上浓缩至干燥。

[0484] 所得到的残余物溶解于二氯甲烷(10 体积)中。添加一水合对甲苯磺酸(1.2 当量) 并且搅拌过夜。将产物过滤并且用二氯甲烷(2 体积)洗涤并抽吸干燥。将湿滤饼转移至干燥托盘并转移至真空烘箱并且在 45°C 伴随 N_2 吹扫的情况下干燥直至达到恒定重量。将 (R)-1-((4-氨基-2-溴-5-氟苯基)氨基)-3-(苄氧基)丙-2-醇的对甲苯磺酸盐作为米白色固体分离。

[0485] 测定手性纯度 $> 97\%$ ee。

[0486] (3-氯-3-甲基丁-1-炔基)三甲基硅烷的合成

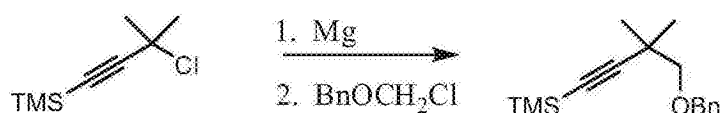
[0487]



[0488] 将丙炔醇(1.0 当量)加入容器。添加盐酸水溶液(37%, 3.75 体积) 并且开始搅拌。在这种固体醇的溶解期间,观潮到适中的吸热($5-6^\circ\text{C}$)。将所得到的混合物搅拌过夜(16 小时),缓慢变成暗红色。向 30L 带夹套的容器加入水(5 体积),随后将水冷却至 10°C 。通过真空将反应混合物缓慢转移至水中,维持混合物的内部温度低于 25°C 。添加己烷(3 体积) 并且将所得到的混合物搅拌 0.5 小时。使各相稳定并且将水相($\text{pH} < 1$) 引出并弃去。将有机相在真空下使用旋转蒸发器浓缩,产生作为红色油的产物。

[0489] (4-(苄氧基)-3,3-二甲基丁-1-炔基)三甲基硅烷的合成

[0490]



[0491] 方法 A

[0492] 这个部分中的全部当量和体积描述符基于 250g 反应物。将镁屑 (magnesium turnings, 69.5g, 2.86 摩尔, 2.0 当量) 加入 3L 4-颈反应器并且用磁力搅拌器在氮气下搅拌 0.5 小时。将反应器浸没在冰水浴中。将氯丙炔 (250g, 1.43 摩尔, 1.0 当量) 在 THF (1.8L, 7.2 体积) 中的溶液缓慢添加至反应器, 伴随搅拌, 直至观察到初始放热 (约 10°C)。使用 ¹H-NMR 光谱学, 通过 IPC 证实 Grignard 试剂形成。一旦放热平息下来, 缓慢添加溶液的剩余部分, 维持批料温度小于 15°C。添加需要 ~ 3.5 小时。将所得到的深绿色混合物滗析至 2L 带盖瓶中。

[0493] 这个部分中的全部当量和体积描述符基于 500g 反应物。向 22L 反应器加入苄基氯甲醚 (95%, 375g, 2.31 摩尔, 0.8 当量) 在 THF (1.5L, 3 体积) 中的溶液。将反应器在冰水浴中冷却。将如上文所述制备的两批 Grignard 试剂合并, 并且随后通过添加漏斗缓慢添加至苄基氯甲醚溶液, 维持批料温度低于 25°C。添加需要 1.5 小时。将反应混合物搅拌过夜 (16 小时)。

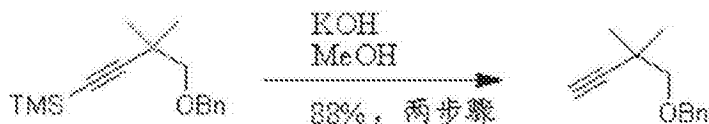
[0494] 这个部分中的全部当量和体积描述符基于 1kg 反应物。在 30L 带夹套的反应器中制备 15% 氯化铵溶液 (8.5kg 水中的 1.5kg, 10 体积)。将溶液冷却至 5°C。将如上文所述制备的两批 Grignard 反应混合物合并并且随后经带头容器 (header vessel) 转移至氯化铵溶液中。在这种猝灭中观察到放热, 所述猝灭以这样的速率进行, 从而保持内部温度低于 25°C。一旦转移完成, 将容器夹套温度设定至 25°C。添加己烷 (8L, 8 体积), 并且将混合物搅拌 0.5 小时。在使各相稳定后, 将水相 (pH 9) 引出并弃去。剩余的有机相用水 (2L, 2 体积) 洗涤。将有机相使用 22L 旋转蒸发器在真空下浓缩, 产生作为橙色油的粗产物。

[0495] 方法 B

[0496] 将镁屑 (106g, 4.35 摩尔, 1.0 当量) 加入 22L 反应器并且随后悬浮于 THF (760mL, 1 体积) 中。将容器在冰水浴中冷却, 从而批料温度达到 2°C。将氯丙炔 (760g, 4.35 摩尔, 1.0 当量) 在 THF (4.5L, 6 体积) 中的溶液缓慢添加至反应器。在添加 100mL 后, 停止添加并且搅拌混合物直至观察到 13°C 放热, 表示 Grignard 试剂起始。一旦放热平息下来, 缓慢添加另一份的 500mL 氯丙炔溶液, 维持批料温度小于 20°C。使用 ¹H-NMR 光谱学, 通过 IPC 证实 Grignard 试剂形成。一旦放热平息下来, 缓慢添加剩余部分的氯丙炔溶液, 维持批料温度小于 20°C。添加需要 ~ 1.5 小时。将所得到的深绿色溶液搅拌 0.5 小时。使用 ¹H-NMR 光谱学, 通过 IPC 证实 Grignard 试剂形成。将净苄基氯甲醚加入反应器添加漏斗并且随后逐滴添加至反应器中, 维持批料温度低于 25°C。添加需要 1 小时。将反应混合物搅拌过夜。使用与方法 A 中相同的步骤和物料相对量进行水后处理和浓缩, 以产生作为橙色油的产物。

[0497] 4-苄氧基-3,3-二甲基丁-1-炔的合成

[0498]



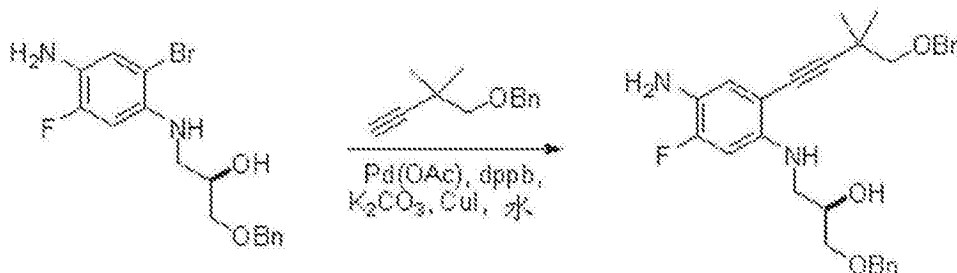
[0499] 向 30L 带夹套的反应器加入甲醇 (6 体积), 随后将甲醇冷却至 5°C。将氢氧化钾 (85%, 1.3 当量) 添加至反应器。当氢氧化钾溶解时, 观察到 15-20°C 放热。将夹套温度设定至 25°C。添加 4-苄氧基-3,3-二甲基-1-三甲基甲硅烷基丁-1-炔 (1.0 当量) 在甲醇 (2 体积) 中的溶液, 并且搅拌所得到的混合物直至反应完成, 如通过 HPLC 所监测的。在 25°C 的通常反应时间是 3-4 小时。将反应混合物是用水 (8 体积) 稀释并且随后搅拌 0.5 小时。添加己烷 (6 体积), 并且将所得到的混合物搅拌 0.5 小时。使各相稳定并且随后将水相 (pH 10-11) 引出并弃去。将有机相用 KOH (85%, 0.4 当量) 在水 (8 体积) 中的溶液洗涤, 随后用水 (8 体积) 洗涤。随后使用旋转蒸发器浓缩有机相, 产生作为黄橙色油的标题物质。这种物质的通常纯度是在 80% 范围内, 主要存在一种杂质。¹H NMR (400MHz, C₆D₆) δ 7.28 (d, 2H, J = 7.4Hz), 7.18 (t, 2H, J = 7.2Hz), 7.10 (d, 1H, J = 7.2Hz), 4.35 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 1.91 (s, 1H), 1.25 (s, 6H)。

[0500] N-苄基乙醇酸化-5-氨基-2-(2-苄氧基-1,1-二甲基乙基)-6-氟吡啶的合成

[0501] 方法 A

[0502] (R)-1-((4-氨基-2-(4-(苄氧基)-3,3-二甲基丁-1-炔-1-基)-5-氟苯基)氨基)-3-(苄氧基)丙-2-醇的合成

[0503]

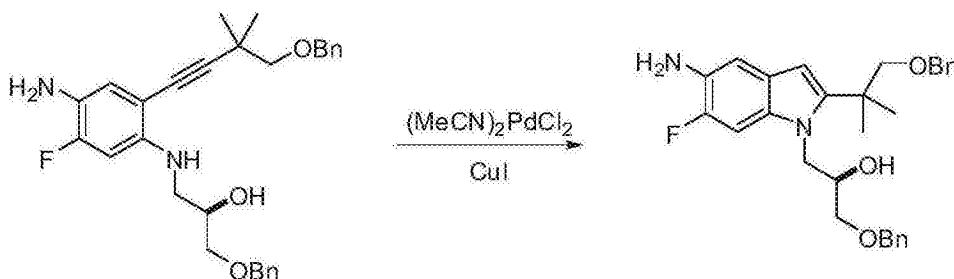


[0504] 通过在二氯甲烷 (5 体积) 和饱和 NaHCO₃ 溶液 (5 体积) 中搅拌 (R)-1-((4-氨基-2-溴-5-氟苯基)氨基)-3-(苄氧基)丙-2-醇的对甲苯磺酸盐固体直至获得透明有机层, 使这种固体形成游离碱。分离所得到的层并且将有机层用饱和 NaHCO₃ 溶液 (5 体积) 洗涤, 随后用盐水洗涤并且在真空下浓缩以获得作为油的 (R)-1-((4-氨基-2-溴-5-氟苯基)氨基)-3-(苄氧基)丙-2-醇游离碱。

[0505] 将乙酸钡 (0.01 当量)、dppb (0.015 当量)、CuI (0.015 当量) 和碳酸钾 (3 当量) 悬浮在乙腈 (1.2 体积) 中。在搅拌 15 分钟后, 添加 4-苄氧基-3,3-二甲基丁-1-炔 (1.1 当量) 在乙腈 (0.2 体积) 中的溶液。混合物用氮气鼓泡 1 小时并且随后添加 (R)-1-((4-氨基-2-溴-5-氟苯基)氨基)-3-(苄氧基)丙-2-醇游离碱 (1 当量) 在乙腈 (4.1 体积) 中的溶液。将混合物用氮气鼓泡另外 1 小时并且随后加热至 80°C。通过 HPLC 监测反应进程并且反应通常在 3-5 小时内完成。将混合物冷却至室温并且随后经 Celite 过滤。滤饼用乙腈 (4 体积) 洗涤。将合并的滤液共沸至干燥, 并且随后将混合物精过滤至下一个反应器。如此获得的 (R)-1-((4-氨基-2-(4-(苄氧基)-3,3-二甲基丁-1-炔-1-基)-5-氟苯基)氨基)-3-(苄氧基)丙-2-醇的乙腈溶液在下一个步骤 (环化) 中直接使用, 无需

进一步操作。

[0506] N-苄基乙醇酸化-5-氨基-2-(2-苄氧基-1,1-二甲基乙基)-6-氟吲哚的合成
[0507]

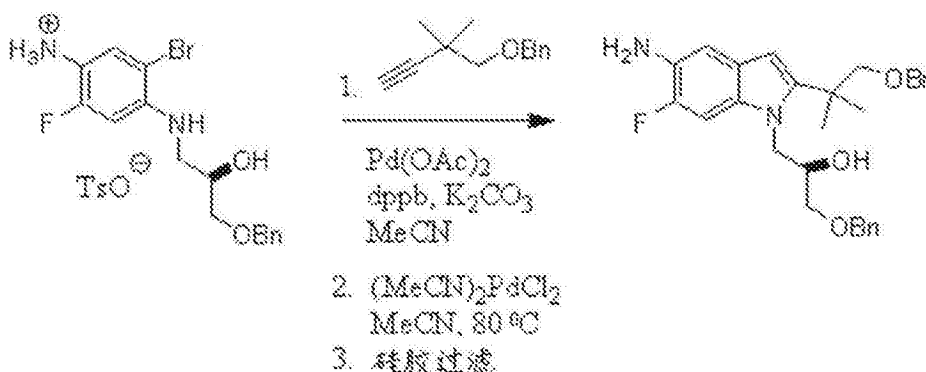


[0508] 将双乙腈二氯合钯 (0.1 当量) 和 CuI (0.1 当量) 加入反应器并且随后悬浮于上文获得的 (R)-1-((4-氨基-2-(4-(苄氧基)-3,3-二甲基丁-1-炔-1-基)-5-氟苯基)氨基)-3-(苄氧基)丙-2-醇 (1 当量) 在乙腈 (总计 9.5 体积) 中的溶液中。将混合物用氮气鼓泡 1 小时并且随后加热至 80°C。通过 HPLC 监测反应进程并且反应一般在 1-3 小时内完成。混合物经 Celite 过滤并且滤饼用乙腈洗涤。将溶剂交换成乙酸乙酯 (7.5 体积)。乙酸乙酯溶液用 NH₃-NH₄Cl 水溶液 (2×2.5 体积) 洗涤, 随后用 10% 盐水 (2.5 体积) 洗涤。将乙酸乙酯溶液随后随硅胶 (1.8wt 当量) 和 Si-TMT (0.1wt 当量) 一起搅拌 6 小时。在过滤后, 将所得到的溶液浓缩。残余的油溶解于 DCM/庚烷 (4 体积) 中并且随后由柱层析纯化。如此获得的油随后从 25% EtOAc/庚烷 (4 体积) 中结晶。晶状 (R)-1-(5-氨基-2-(1-(苄氧基)-2-甲基丙-2-基)-6-氟-1H-吲哚-1-基)-3-(苄氧基)丙-2-醇一般以 27-38% 产率获得。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 7.38-7.34 (m, 4H), 7.32-7.23 (m, 6H), 7.21 (d, 1H, J = 12.8Hz), 6.77 (d, 1H, J = 9.0Hz), 6.06 (s, 1H), 5.13 (d, 1H, J = 4.9Hz), 4.54 (s, 2H), 4.46 (br. s, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.33 (d, 1H, J = 12.4Hz), 4.09-4.04 (m, 2H), 3.63 (d, 1H, J = 9.2Hz), 3.56 (d, 1H, J = 9.2Hz), 3.49 (dd, 1H, J = 9.8, 4.4Hz), 3.43 (dd, 1H, J = 9.8, 5.7Hz), 1.40 (s, 6H)。

[0509] N-苄基乙醇酸化-5-氨基-2-(2-苄氧基-1,1-二甲基乙基)-6-氟吲哚的合成

[0510] 方法 B

[0511]



[0512] 将乙酸钯 (33g, 0.04 当量)、dppb (94g, 0.06 当量)、碳酸钾 (1.5kg, 3.0 当量) 加入反应器。将游离碱化的油-苄基乙醇酸化 4-铵-2-溴-5-氟苯胺 (1.5kg, 1.0 当量) 溶解于乙腈 (8.2L, 4.1 体积) 中并且随后添加至反应器。将混合物用氮气鼓泡 NLT 1 小时。将 4-苄氧基-3,3-二甲基丁-1-炔 (70%, 1.1kg, 1.05 当量) 在乙腈中的溶液添加至这种

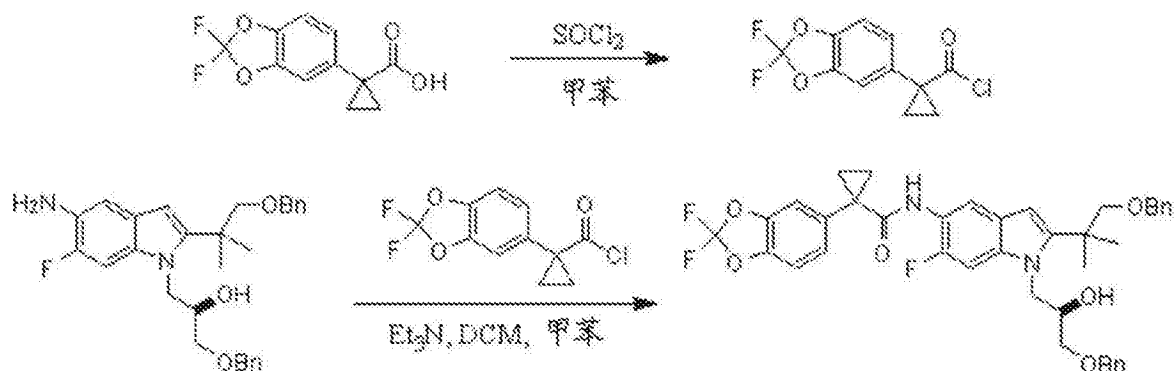
混合物,所述混合物用氮气鼓泡 NLT 1 小时。将混合物加热至 80°C 并且随后搅拌过夜。通过 HPLC 进行 IPC 并且在 16 小时后确定反应完成。将混合物冷却至室温并且随后经 Celite 垫 (228g) 过滤。反应器和 Celite 垫用乙腈 (2×2L, 2 体积) 洗涤。合并的相在 22L 旋转蒸发器上浓缩直至已经收集 8L 溶剂,留下在 7L (3.5 体积) 乙腈中的粗产物。

[0513] 将双乙腈二氯合钯 (144g, 0.15 当量) 加入反应器。将粗制物溶液返回转移至反应器中并且旋转蒸发器 (roto-vap bulb) 用乙腈 (4L, 2 体积) 洗涤。将合并的溶液用氮气鼓泡 NLT 1 小时。将反应混合物加热至 80°C 持续 NLT 16 小时。在工艺控制方面,通过 HPLC 显示原料的完全消耗。反应混合物经 Celite (300g) 过滤。反应器和过滤器滤饼用乙腈 (3L, 1.5 体积) 洗涤。通过旋转蒸发将合并的滤液浓缩成油。将这种油溶解于乙酸乙酯 (8.8L, 4.4 体积) 中。溶液用 20% 氯化铵 (5L, 2.5 体积) 洗涤,随后用 5% 盐水 (5L, 2.5 体积) 洗涤。将硅凝胶 (3.5kg, 1.8wt 当量) 添加至有机相,将所述有机相搅拌过夜。添加 Deloxan THP II 金属清除剂 (358g) 和庚烷 (17.6L) 并且将所得到的混合物搅拌 NLT 3 小时。这种混合物经烧结的玻璃漏斗过滤。过滤器滤饼用庚烷 (25L) 中的 30% 乙酸乙酯洗涤。在减压下浓缩合并的滤液以产生作为棕色糊状物的 N-苄基乙醇酸化-5-氨基-2-(2-苄氧基-1,1-二甲基乙基)-6-氟吡啶 (1.4kg)。

[0514] 化合物 1 的合成

[0515] 苄基受保护的化合物 1 的合成

[0516]



[0517] 将 1-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸 (1.3 当量) 在甲苯中形成浆液 (2.5 体积, 基于 1-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸)。经添加漏斗添加亚硫酸氯 (SOCl_2 , 1.7 当量) 并且将混合物加热至 60°C。将所得到的混合物搅拌 2 小时。使用旋转蒸发器 (rotavap) 蒸馏掉甲苯和过量的 SOCl_2 。添加额外的甲苯 (2.5 体积, 基于 1-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸), 并且将混合物蒸馏缩减至 1 体积的甲苯。将 (R)-1-(5-氨基-2-(1-(苄氧基)-2-甲基丙-2-基)-6-氟-1H-吡啶-1-基)-3-(苄氧基)丙-2-醇 (1 当量) 和三乙胺 (3 当量) 在 DCM (4 体积) 中的溶液冷却至 0°C。添加甲苯 (1 体积) 中的酰氯溶液, 同时维持批料温度低于 10°C。通过 HPLC 监测反应进程, 并且反应通常在数分钟内完成。在升温至 25°C 后, 将反应混合物用 5% NaHCO_3 (3.5 体积)、1M NaOH (3.5 体积) 和 1M HCl (5 体积) 洗涤。将溶剂交换成甲醇 (2 体积), 所得到的 (R)-N-(1-(3-(苄氧基)-2-羟丙基)-2-(1-(苄氧基)-2-甲基丙-2-基)-6-氟-1H-吡啶-5-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂戊二烯-5-基)环丙烷甲酰胺在甲醇中的溶液在无需进一步操作的情况下用于下一个步骤 (氢

解) 中。

[0518] 化合物 1 的合成

[0519]



[0520] 将 5% 钯炭 (约 50% 湿重, 0.01 当量) 加入适宜的氢化容器。小心添加上文获得的 (R)-N-(1-(3-(苄氧基)-2-羟丙基)-2-(1-(苄氧基)-2-甲基丙-2-基)-6-氟-1H-吡啶-5-基)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰胺在甲醇 (2 体积) 中的溶液, 随后小心加入 HCl 在甲醇中的 3M 溶液。容器用氮气并随后用氢气冲洗。激烈地搅拌混合物直至反应完成, 如通过 HPLC 分析所确定的。通常反应时间是 3-5 小时。将反应混合物经 Celite 过滤并且滤饼用甲醇 (2 体积) 洗涤。将溶剂交换成异丙醇 (3 体积)。使粗产物 1 从 75% IPA-庚烷 (4 体积, 即, 将 1 体积庚烷添加至 3 体积 IPA) 中结晶出来, 并且将所得到的晶体在 50% IPA-庚烷中成熟 (即, 将 2 体积庚烷添加至这种混合物)。来自这个两步骤乙酰化 / 氢解步骤的化合物 4 的通常产率是 68% 至 84%。化合物 4 可以按照刚才描述的相同过程从 IPA-庚烷中重结晶出来。

[0521] 也可以通过在美国公布的专利申请 US20090131492 中公开的几种合成途径之一制备化合物 1, 所述专利通过引用方式并入本文。

[0522] 下表 10 列举化合物 1 的分析数据。

[0523] 表 10。

[0524]

化合物 编号	LC/MS M+1	LC/RT min	NMR
I	521.5	1.69	¹ H NMR (400.0 MHz, CD ₃ CN) δ 7.69 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 1.7, 8.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.27 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.32 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.15 - 4.09 (m, 1H), 3.89 (dd, J = 6.0, 11.5 Hz, 1H), 3.63 - 3.52 (m, 3H), 3.42 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 6.2, 7.2 Hz, 1H), 3.04 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 1.59 (dd, J = 3.8, 6.8 Hz, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.33 (s, 3H) 和 1.18 (dd, J = 3.7, 6.8 Hz, 2H) ppm.

[0525] 测定

[0526] 用于检测和测量化合物的 $\Delta F508$ -CFTR 矫正性能的测定

[0527] 用于测定化合物的 $\Delta F508$ -CFTR 调节性能的膜电位光学方法

[0528] 膜电位光学测定使用由 Gonzalez 和 Tsien (见, Gonzalez, J.E. 和 R. Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells (单个细胞中借助荧光共振能量转移的电压感知)" *Biophys J* 69(4): 1272-80, 和 Gonzalez, J.E. 和 R. Y. Tsien (1997) "Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer (使用荧光共振能量转

移的细胞膜电位改良指示剂) ”Chem Biol 4(4) :269-77) 描述的电压敏感性 FRET 传感器, 所述传感器与用于测量荧光变化的仪器如电压 / 离子探针读数仪 (VIPR) 组合 (见, Gonzalez, J.E., K.Oades 等人. (1999) “Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets (基于细胞的测定和用于筛选离子通道靶的仪器) ” Drug Discov Today 4(9) :431-439)。

[0529] 这些电压敏感性测定基于膜可溶性电压敏感性染料 DiSBAC₂(3) 和与质膜外层 (outer leaflet) 连接并充当 FRET 供体的荧光磷脂 CC2-DMPE 之间的荧光共振能量转移 (FRET) 变化。膜电位变化 (V_m) 引起带负电荷的 DiSBAC₂(3) 跨质膜再分布, 并且来自 CC2-DMPE 的能量转移的量相应地变化。使用 VIPRTMII 监测荧光发射的变化, 所述 VIPRTM II 是一种设计成在 96 孔或 384 孔微量滴定板中进行基于细胞的筛选的集成式液体处理装置和荧光检测器。

[0530] 1. 矫正化合物的鉴定

[0531] 为了鉴定矫正与 Δ F508-CFTR 相关的转运缺陷的小分子, 开发了单次添加 HTS 测定模式。将细胞在无血清培养基中在 37°C 在测试化合物存在或不存在 (阴性对照) 的情况下培育 16 小时。作为阳性对照, 将铺种在 384 孔板中的细胞在 27°C 培育 16 小时成“温度矫正 Δ F508-CFT”。细胞随后用 Krebs Ringers 溶液淋洗 3X, 并且载以电压敏感性染料。为了激活 Δ F508-CFTR, 将 10 μ M 毛喉素和 CFTR 增效剂异黄酮 (genistein, 20 μ M) 随不含 Cl 的培养基一起添加至每个孔。添加不含 Cl 的培养基引发响应 Δ F508-CFTR 激活的 Cl 外流, 并且使用基于 FRET 的电压传感器染料光学地监测所得到的膜去极化。

[0532] 2. 增效剂化合物的鉴定

[0533] 为了鉴定 Δ F508-CFTR 的增效剂, 开发了一种两次添加 HTS 测定模式。在第一次添加期间, 将不含 Cl 的培养基随测试化合物一起或不随之一起添加至每个孔。在 22 秒后, 第二次添加含有 2-10 μ M 毛喉素的不含 Cl 培养基以激活 Δ F508-CFTR。在两次添加后的胞外 Cl 浓度是 28mM, 这引发响应 Δ F508-CFTR 激活的 Cl 外流, 并且使用基于 FRET 的电压传感器染料光学地监测所得到的膜去极化。

[0534] 3. 溶液

[0535]

浴溶液#1: (以 mM 为单位) NaCl 160, KCl 4.5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, pH 7.4, 含 NaOH。

无氯离子浴溶液(bath solution): 浴溶液#1 中的氯化物盐替换为葡萄糖酸盐。

CC2-DMPE: 制备成 DMSO 中的 10 mM 母液并且在 -20°C 贮存。

DiSBAC₂(3): 制备成 DMSO 中的 10 mM 母液并且在 -20°C 贮存。

[0536] 4. 细胞培养

[0537] 稳定表达 Δ F508-CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于膜电位的光学测量。将细

胞在 37°C 在 5% CO₂ 和 90% 湿度下在 175cm² 培养瓶中在含有 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1×NEAA、β-ME、1×青霉素/链霉素和 25mM HEPES 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中维持。对于全部光学测定,将细胞以 30,000/孔在 384 孔 matrigel 涂布板中接种并且在 37°C 培养 2 小时,之后在 27°C 培养 24 小时,用于增效剂测定。对于矫正测定,将细胞在 27°C 或 37°C 随化合物一起或不随之一起培养 16-24 小时。

[0538] 用于鉴定化合物的 ΔF508-CFTR 调节性能的电生理测定

[0539] 1. 尤斯室 (Ussing Chamber) 测定

[0540] 使用腔室,对表达 ΔF508-CFTR 的极化上皮细胞进行实验以进一步表征光学测定中所鉴定的 ΔF508-CFTR 调节剂。将 Costar Snapwell 细胞培养物插入物上所培育的 FRT^{ΔF508 CFTR} 上皮细胞安置在尤斯室中 (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), 并且使用电压钳系统 (生物工程系, 艾奥瓦大学, IA 和 Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), 使单层连续地短路。通过施加 2-mV 脉冲测量跨上皮电阻。在这些条件下, FRT 上皮显示 4KΩ/cm² 或更大的电阻。将溶液维持在 27°C 并通入空气。使用无细胞插入物, 校正电极偏移电位和流体电阻。在下这些条件, 电流反映穿过顶端膜中所表达的 ΔF508-CFTR 的 Cl 流。使用 MP100A-CE 界面和 AcqKnowledge 软件 (v3.2.6; BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA) 以数字方式获得 I_{sc}。

[0541] 2. 矫正化合物的鉴定

[0542] 通常操作方案使用基底侧至顶端膜 Cl 浓度梯度。为建立这种梯度, 对基底侧膜使用正常套环, 而顶端 NaCl 替换为等摩尔的葡萄糖酸钠 (用 NaOH 滴定至 pH 7.4) 以产生跨上皮的巨大 Cl 浓度梯度。全部实验均用完整的细胞单层进行。为了充分激活 ΔF508-CFTR, 施加毛喉素 (10 μM) 和 PDE 抑制剂 IBMX (100 μM), 随后添加 CFTR 增效剂异黄酮 (50 μM)。

[0543] 如在其它细胞类型中观察到那样, 在低温培育稳定表达 ΔF508-CFTR 的 FRT 细胞增加了质膜中 CFTR 的功能密度。为测定矫正化合物的活性, 将这些细胞在 37°C 与 10 μM 测试化合物培育 24 小时并且随后在记录之前洗涤 3 次。化合物处理的细胞中 cAMP 介导和异黄酮介导的 I_{sc} 相对于 27°C 和 37°C 对照进行归一化并且表述为活性百分比。与 37°C 对照相比, 细胞与矫正化合物的预培育显著地增加 cAMP 介导和异黄酮介导的 I_{sc}。

[0544] 3. 增效剂化合物的鉴定

[0545] 通常操作方案使用基底侧至顶端膜 Cl 浓度梯度。为建立这种梯度, 对基底侧膜使用正常套环并且将它用制霉菌素 (nystatin, 360 μg/ml) 透化, 而顶端 NaCl 替换为等摩尔的葡萄糖酸钠 (用 NaOH 滴定至 pH 7.4) 以产生跨上皮的巨大 Cl 浓度梯度。全部实验在制霉菌素透化 30 分钟后进行。将毛喉素 (10 μM) 和全部测试化合物添加细胞培养插入物的两侧。将推定的 ΔF508-CFTR 增效剂的功效与已知的增效剂异黄酮比较。

[0546] 4. 溶液

[0547]

基底侧溶液(以 mM 为单位): NaCl (135), CaCl₂ (1.2), MgCl₂ (1.2), K₂HPO₄ (2.4), KH₂PO₄ (0.6), N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES)(10)和右旋糖(10)。溶液用 NaOH 滴定至 pH 7.4。

顶端溶液(以 mM 为单位): 与基底侧溶液相同, NaCl 替换为葡萄糖酸钠(135)。

[0548] 5. 细胞培养

[0549] 表达 $\Delta F508$ -CFTR (FRT ^{$\Delta F508$ CFTR}) 的 Fisher 大鼠上皮 (FRT) 细胞用于从光学测定中鉴定的推定的 $\Delta F508$ -CFTR 调节剂的尤斯室实验。细胞在 Costar Snapwell 细胞培养物插入物上培养并且在 37°C 和 5% CO₂ 在含有 5% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 Coon 改良 Ham F-12 培养基中培养 5 天。在用于表征化合物的增效剂活性之前, 细胞在 27°C 培育 16-48 小时以针对 $\Delta F508$ -CFTR 校正。为测定矫正化合物的活性, 将这些细胞在 27°C 或 37°C 随化合物一起或不随之一起培育 24 小时。

[0550] 6. 完整细胞记录

[0551] 使用穿孔膜片 (perforated-patch) 完整细胞记录法, 监测稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的温度校正和测试化合物校正的 NIH3T3 细胞中的宏观 $\Delta F508$ -CFTR 电流 ($I_{\Delta F508}$)。简而言之, 使用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA), 在室温进行 $I_{\Delta F508}$ 的电压钳记录。全部记录以 10kHz 的采样频率获得并且以 1kHz 低通过滤。吸管在填充有胞内溶液时具有 5-6M Ω 的电阻。在这些记录条件下, 在室温 Cl 的计算反转电位 (E_{Cl}) 是 -28mV。全部记录具有大于 20G Ω 的紧密电阻和小于 15M Ω 的串联抗性。使用 PC 进行脉冲发生、数据获取和分析, 所述 PC 配备了与 Clampex 8 (Axon 仪器 Inc.) 结合的 Digidata 1320A/D 界面。浴液含有少于 250 μ l 盐水并且使用重力驱动灌注系统, 将浴液以 2ml/ 分钟的速率连续地灌注。

[0552] 7. 矫正化合物的鉴定

[0553] 为测定矫正化合物增加质膜中功能性 $\Delta F508$ -CFTR 密度的活性, 我们使用上述的穿孔膜片记录技术来测量在用矫正化合物处理 24 小时后的电流密度。为充分激活 $\Delta F508$ -CFTR, 将 10 μ M 毛喉素和 20 μ M 异黄酮添加至细胞。在我们的记录条件下, 在 27°C 培育 24 小时后的电流密度高于在 37°C 培育 24 小时后的电流密度。这些结果与低温培育对质膜中 $\Delta F508$ -CFTR 密度的已知影响一致。为测定矫正化合物对 CFTR 电流密度的影响, 将这些细胞在 37°C 与 10 μ M 测试化合物培育 24 小时, 并且将电流密度与 27°C 对照和 37°C 对照 (% 活性) 比较。在记录之前, 细胞用胞外记录介质洗涤 3 次以除去任何剩余的测试化合物。与 37°C 对照相比, 与 10 μ M 矫正化合物的预培育显著地增加 cAMP 依赖性和异黄酮依赖性电流。

[0554] 8. 增效剂化合物的鉴定

[0555] 也使用穿孔膜片记录技术研究 $\Delta F508$ -CFTR 增效剂提高稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 细胞中宏观 $\Delta F508$ -CFTR Cl 电流 ($I_{\Delta F508}$) 的能力。从光学测定中鉴定的增效剂以光学测定中观察到的相似效力和功效激发 $I_{\Delta F508}$ 的剂量依赖性提高。在检验的全部细胞中,

在增效剂施加之前和期间的反转电位是约 -30mV , 这是计算的 E_{Cl} (-28mV)。

[0556] 9. 溶液

[0557]

胞内溶液(以 Cs-天冬氨酸(90), CsCl (50), MgCl_2 (1), HEPES (10)和 mM 为单位): 240 $\mu\text{g/ml}$ 两性霉素-B(用 CsOH 调节 pH 至 7.35)。

胞外溶液(以 N-甲基-D-葡糖胺(NMDG)-Cl (150), MgCl_2 (2), CaCl_2 mM 为单位): (2), HEPES (10)(用 HCl 调节 pH 至 7.35)。

[0558] 10. 细胞培养

[0559] 稳定表达 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于完整细胞记录。将细胞在 37°C 在 5% CO_2 和 90% 湿度下在 175cm^2 培养瓶中在含有 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、 $1\times\text{NEAA}$ 、 $\beta\text{-ME}$ 、 $1\times$ 青霉素 / 链霉素和 25mM HEPES 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中维持。对于完整细胞记录, 将 2,500-5,000 个细胞接种在聚-L-赖氨酸涂布的玻璃盖玻片上并且在用来测试增效剂的活性之前在 27°C 培养 24-48 小时; 并且在 37°C 随矫正化合物一起或不随之一起培育以测量矫正剂的活性。

[0560] 11. 单通道记录

[0561] 使用切除内侧的外膜膜片观察在 NIH3T3 细胞中稳定表达的温度校正的 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 的单通道活动性和增效剂化合物的活性。简而言之, 用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc.), 在室温进行单通道活动性的电压钳记录。全部记录以 10kHz 的采样频率获得并且以 400Hz 低通过滤。膜片吸管由 Corning Kovar Sealing#7052 玻璃 (World 精度仪器, Inc., Sarasota, FL) 制成并且在填充有胞外溶液时具有 5-8M Ω 的电阻。在切除后, 通过添加 1mM Mg-ATP 和 75nM cAMP 依赖性蛋白激酶、催化亚基 (PKA; Promega Corp. Madison, WI), 激活 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 。在通道活动性稳定后, 使用重力驱动微灌注系统灌注膜片。靠近膜片布置入流, 这在 1-2 秒内产生完全溶液交换。为了在快速灌注期间维持 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 活性, 将非特异性磷酸酶抑制剂 F (10mM NaF) 添加至浴溶液。在这些记录件下, 通道活动性在膜片记录的整个持续期期间 (达到 60 分钟) 保持恒定。由从细胞内液向细胞外液移动的正电荷产生的电流 (阴离子以相反方向移动) 显示为正电流。吸管电位 (V_p) 维持在 80mV。

[0562] 从含有 ≤ 2 个活动通道的膜片中分析通道活动性。最大同时开口数决定实验过程期间的活动通道数目。为测定单通道电流幅度, 将从 120 秒 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 活性所记录的数据以 100Hz “离线”过滤并且随后用来构建全点幅度柱状图, 其使用 Bio-Patch 分析软件 (Bio-Logic Comp. France), 用多元高斯函数 (multigaussian function) 拟合。从 120 秒通道活性确定总微观电流和开放概率 (P_o)。使用 Bio-Patch 软件或从关系 $P_o = I/i(N)$ 中确定 P_o , 其中 I = 平均电流, i = 单通道电流幅度, 和 N = 膜片中活动通道的数目。

[0563] 12. 溶液

[0564]

胞外溶液(以 mM 为单位): NMDG (150), 天冬氨酸(150), CaCl₂ (5), MgCl₂ (2)和 HEPES (10)(用 Tris 碱调节 pH 至 7.35)。

胞外溶液(以 mM 为单位): NMDG-Cl (150), MgCl₂ (2), EGTA (5), TES (10)和 Tris 碱(14)(用 HCl 调节 pH 至 7.35)。

[0565] 13. 细胞培养

[0566] 稳定表达 ΔF508-CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于切除膜片钳记录。将细胞在 37°C 在 5% CO₂ 和 90% 湿度下在 175cm² 培养瓶中在含有 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1×NEAA、β-ME、1×青霉素 / 链霉素和 25mM HEPES 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中维持。对于单通道记录, 将 2,500-5,000 个细胞接种在聚-L-赖氨酸涂布的玻璃盖玻片上并且在使用之前在 27°C 培养 24-48 小时。

[0567] 使用上文描述的方法, 已经测量化合物 1 的活性即 EC₅₀ 并且在表 11 中显示。

[0568] 表 11 :

[0569]

EC ₅₀ Bins: +++ ≤ 2.0 < ++ ≤ 5.0 < +		
活性百分比 Bin: + ≤ 25.0 < ++ ≤ 100.0 < +++		
化合物编号	处理后的(Binned)EC ₅₀	处理后的(Binned)最大效力
1	+++	+++