



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107849072 B

(45) 授权公告日 2020.12.15

(21) 申请号 201680038591.9  
 (22) 申请日 2016.06.13  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107849072 A  
 (43) 申请公布日 2018.03.27  
 (30) 优先权数据  
 62/175,118 2015.06.12 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2017.12.29  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/IB2016/053482 2016.06.13  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02016/199111 EN 2016.12.15  
 (73) 专利权人 西蒙弗雷泽大学  
 地址 加拿大不列颠哥伦比亚省本拿比市学  
 院路8888  
 (72) 发明人 马里恩·戴维南 罗本特·N·扬  
 陈刚  
 (74) 专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务  
 所(普通合伙) 31257  
 代理人 董红曼

(51) Int.Cl.  
 C07F 9/572 (2006.01)  
 C07F 9/38 (2006.01)  
 A61K 31/675 (2006.01)  
 A61K 31/663 (2006.01)  
 A61P 19/08 (2006.01)  
 A61P 19/10 (2006.01)  
 A61K 47/54 (2017.01)  
 (56) 对比文件  
 WO 94/06750 A1,1994.03.31  
 Steve Arns,et al..“Design and  
 synthesis of novel bone-targeting dual-  
 action pro-drugs for the treatment and  
 reversal of osteoporosis”.《Bioorganic &  
 Medicinal Chemistry》.2012,第20卷第2131-  
 2140页.  
 Gang Chen,et al..“Determination of  
 the Rat in Vivo Pharmacokinetic Profile  
 of a Bone-Targeting Dual-Action Pro-Drug  
 for Treatment of Osteoporosis”.  
 《Bioconjugate Chem.》.2015,第26卷第1095-  
 1103页.

审查员 王超

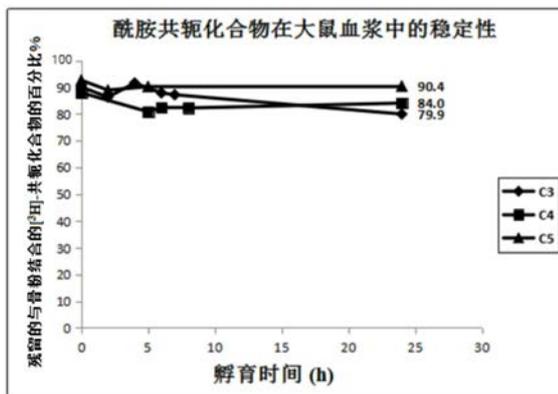
权利要求书2页 说明书34页 附图7页

(54) 发明名称

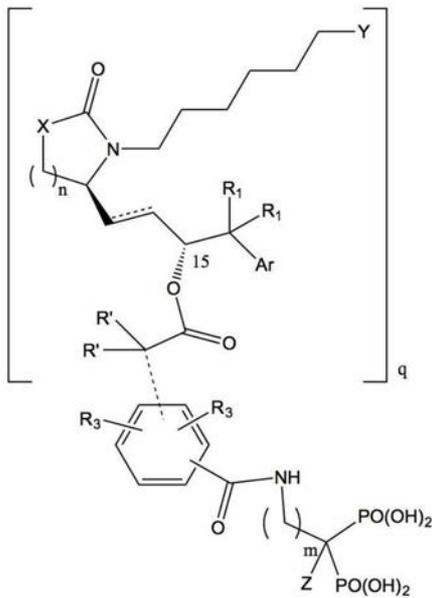
酰胺连接的EP4激动剂-二膦酸盐化合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物或相关化合物及其用途。所述共轭化合物或相关化合物可用于将EP4激动剂或相关化合物递送至期望的作用部位,例如骨。通过酰胺连接子与EP4激动剂连接的二膦酸盐部分与抑制骨吸收和骨定位有关。



1. 一种如式I所示的化合物或其药学上可接受的盐:



式 I

其中:

X是 $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-$ , 或 $-\text{NH}-$ ;

Y是 $\text{COOR}'$ , 四唑或 $\text{C}(\text{O})\text{NHSO}_2\text{R}$ ;

Z是OH或H;

R是 $\text{C}_{1-10}$ 烷基或芳基;

n是1, 2或3;

m是0, 1, 2, 3, 4, 5或6;

q是1或2;

$\text{R}_1$ 独立地为H或卤素;

Ar是芳基, 卤素或 $\text{C}_{1-10}$ 烷基取代的芳基, 或杂芳基;

$\text{R}_3$ 各自独立地为H, OR', 卤素, CN或 $\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ;

$\text{R}'$ 各自独立地为H或 $\text{C}_{1-10}$ 烷基, 或者两个 $\text{R}'$ 可以形成多达6个碳的环; 以及

$\text{---}$ 是双键或单键。

2. 一种化合物, 其选自:

(4-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丁烷-1,1-二基)双(磷酸氢钠);

(3-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二基)双(磷酸氢钠); 或

(6-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-

二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基) 氧基)-2-氧代乙基) 苯甲酰氨基)-1-羟基己烷-1,1-二基) 双(磷酸氢钠)。

3. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物在体内是可水解的。

4. 如权利要求3所述的化合物,其中所述化合物在水解前是无活性的。

5. 如权利要求1所述的化合物,其中酰胺键在体内是耐水解的。

6. 一种组合物,其包含如权利要求1至5之任一项所述的化合物与载体的组合。

7. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至5之任一项所述的化合物以及药学上可接受的载体。

8. 如权利要求1至5之任一项所述的化合物在制备在有需要的个体中选择性地递送至骨的药物中的应用。

9. 如权利要求8所述的应用,其中所述骨是需要治疗的骨。

10. 如权利要求9所述的应用,其中所述需要治疗的骨选自以下组:青枝骨折,开放性骨折,侧向骨折,由侵入性肿瘤导致的病理性骨折,压缩性骨折,以及需要外科手术重新对骨进行复位的骨折。

11. 如权利要求1至5之任一项所述的化合物在制备在有需要的个体中治疗或预防与异常的或过度的骨流失有关的,或与异常的或降低的骨吸收有关的,或与钙代谢异常有关的病症的药物中的应用。

12. 如权利要求11所述的应用,其中所述化合物与骨结合。

13. 如权利要求12所述的应用,其中所述化合物在与骨结合后被水解。

14. 如权利要求13所述的应用,其中所述化合物在水解之前是无活性的。

15. 如权利要求13所述的应用,其中所述化合物在水解后释放活性剂。

16. 如权利要求14所述的应用,其中所述化合物在水解后释放活性剂。

17. 如权利要求15所述的应用,其中所述活性剂是EP4激动剂。

18. 如权利要求8所述的应用,其中所述化合物的酰胺键在体内是耐水解的。

19. 如权利要求13所述的应用,其中二磷酸盐部分保持附着于所述骨。

20. 如权利要求11所述的应用,其中所述病症选自以下组:骨质疏松症,佩吉特氏病,异常增加的骨转换,骨移植,牙周病,牙槽骨损失,牙齿脱落,骨折,假体周围骨溶解,成骨不全症,转移性骨疾病或肠易激综合症。

21. 如权利要求8所述的应用,其中所述个体是人。

22. 如权利要求11所述的应用,其中所述个体是人。

## 酰胺连接的EP4激动剂-二膦酸盐化合物及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及共轭化合物(conjugate compounds)及其制备和应用方法。

### 背景技术

[0002] 前列腺素是在身体大多数组织中发现的类花生酸的一种亚类,其涉及动物的多种生理功能,包括平滑肌收缩,繁殖,自身免疫,炎症,眼内压降低等。已发现前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)与多种生理和/或病理状态相关,例如骨形成的刺激,骨量增加,关节炎,疼痛,炎症,癌症,多发性硬化症,炎症性肠病等。

[0003] PGE<sub>2</sub>与四种受体(EP1,EP2,EP3和EP4)结合。EP4受体与细胞内环磷酸腺苷(cAMP)的产生有关,分布在各种类型的组织中,表明其在PGE<sub>2</sub>介导的生物学事件中起到重要作用,如平滑肌松弛,眼内压,疼痛(特别是炎症性疼痛,神经性疼痛和内脏疼痛),炎症,神经保护,淋巴细胞分化,骨代谢过程,过敏性反应,睡眠促进,肾脏的调节,胃或肠粘液分泌以及十二指肠碳酸氢盐分泌。

[0004] 多种EP4激动剂(EP4 agonists)和相关化合物已被报道,包括但不限于以下所列出的,例如WO 02/24647,WO 02/42268,EP 1132086,EP 855389,EP 1114816,EP 2465506,WO 01/46140,WO 01/72268,WO 05/116010,WO 03/047417,WO2008076703,WO 2014078446或US 7,238,710。然而,许多EP4激动剂与全身的副作用有关。

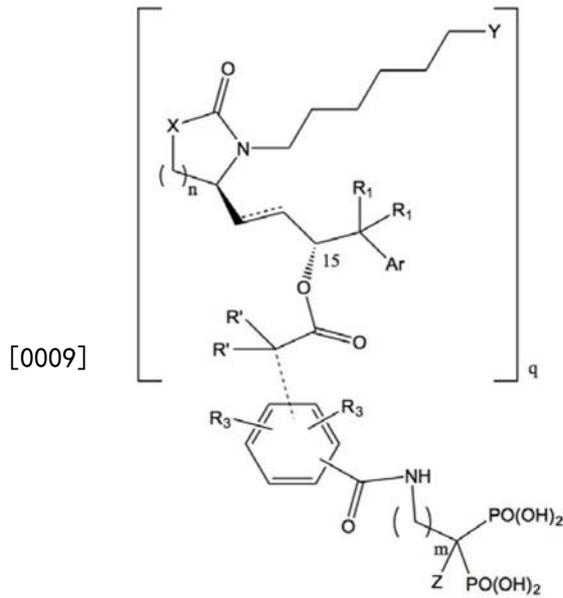
[0005] 二膦酸盐(Bisphosphonates)是用于强化骨骼的药物,并且与抑制骨吸收和骨靶向有关。

[0006] 在例如US 5,409,911,US 6,121,253或WO 2011/147034中已经描述了前列腺素-二膦酸盐共轭化合物(Prostaglandin-bisphosphonate conjugate)。

### 发明内容

[0007] 本发明部分地提供了一类共轭化合物。本发明还提供了这些化合物的合成方法及其用途。

[0008] 在一方面,本发明提供了如式I所示的化合物或其药学上可接受的盐:



式 I

[0010] 其中，

[0011] X可以是-CH<sub>2</sub>-, -S-, -O-, 或-NH-;

[0012] Y可以是COOR', 任选取代的四唑(tetrazole), 或C(O)NHSO<sub>2</sub>R;

[0013] Z可以是OH或H;

[0014] R可以是任选取代的低级烷基或任选取代的芳基;

[0015] n可以是1, 2, 或3;

[0016] m可以是0, 1, 2, 3, 4, 5, 或6;

[0017] q可以是1, 或2;

[0018] R<sub>1</sub>可以独立地为H或卤素;

[0019] Ar可以是芳基, 取代芳基, 或杂芳基;

[0020] R<sub>3</sub>可以各自独立地为H, OR', 卤素, CN, 或C(O)R';

[0021] R'可以各自独立地为H或低级烷基, 或者两个R'可形成多达6个碳的环; 以及

[0022] == 可以是双键或单键。

[0023] 在一些实施方式中, 所述化合物可以是: (4-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丁烷-1,1-二基)双(磷酸氢钠) (sodium (4-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxybutane-1,1-diyl)bis(hydrogen phosphonate)); (3-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二基)双(磷酸氢钠) (sodium (3-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxypropane-1,1-diyl)bis(hydrogen phosphonate)); 或(6-(4-(2-

((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基己烷-1,1-二基)双(磷酸氢钠(sodium(6-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxyhexane-1,1-diyl)bis(hydrogen phosphonate))。

[0024] 在可替代的方面,本发明提供了一种化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物包括至少一个通过酯键连接至酰胺连接子(amide linker)的EP4激动剂或相关部分(related moiety),以及一个通过酰胺键(amide bond)连接至所述酰胺连接子的氨基二膦酸盐(amino bisphosphonate moiety)部分。所述酰胺连接子可以包含多达三个羧酸基团,两个EP4激动剂或相关部分的羟基可以连接至所述酰胺连接子的两个羧酸基团以形成酯键,所述酰胺连接子的另一羧酸基团可以与二膦酸盐的氨基连接以形成酰胺键。

[0025] 在可替代的方面,本发明提供了一种化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物包括至少一个通过C-15位酯键(或等同物)连接至酰胺连接子的EP4激动剂或相关部分,以及一个通过酰胺键与所述酰胺连接子连接的氨基二膦酸盐部分。

[0026] 在一些实施方式中,所述化合物在体内是可水解的。在一些实施方式中,所述化合物在水解之前可以是无活性的。在一些实施方式中,所述化合物的酰胺键在体内可以是耐水解的。

[0027] 所述酰胺连接子可以是4-(羧甲基)苯甲酸(4-(carboxymethyl)benzoic acid)或3,5-二-(羧甲基)苯甲酸(3,5-bis-(carboxymethyl)benzoic acid)。

[0028] 在可替代的方面,本发明提供了一种组合物,其包含本发明所述的化合物和载体。

[0029] 在可替代的方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本发明所述的化合物以及药学上可接受的载体。

[0030] 在可替代的方面,本发明提供了选择性地将化合物递送至骨或相关位点(associated site)的方法,所述方法通过将有效量的本发明所述化合物或组合物给予有需要的个体来实现。

[0031] 在可替代的实施方式中,所述相关位点可以是与需要治疗的骨的相邻部位。在可替代的实施方式中,所述需要治疗的骨可以是青枝骨折,开放性骨折(compound fracture),侧向骨折,由侵入性肿瘤导致的病理性骨折,压缩性骨折,或需要外科手术重新对骨进行复位(realignment)的骨折。

[0032] 在可替代的方面,本发明提供了选择性将共轭化合物递送至骨或相关位点的方法,所述方法通过将有效量的本发明所述的化合物或其药学上可接受的盐给予有需要的个体来实现。

[0033] 在可替代的方面,本发明提供了一种治疗或预防病症(condition)的方法,所述病症与异常的或过度的骨流失,或与异常的或降低的骨吸收有关,或与钙代谢异常有关,或所述病症能从施用EP4激动剂或相关化合物中受益,所述方法通过将有效量的本发明所述的共轭化合物或其药学上可接受的盐给予有需要的个体来实现。

[0034] 在一些实施方式中,所述化合物可以与骨结合。在一些实施方式中,所述化合物与骨结合后可以被水解。在一些实施方式中,所述化合物在水解之前可以是无活性的。在一些实施方式中,所述化合物在水解后可以释放活性剂,例如EP4激动剂相关化合物。在一些实

施方式中,所述化合物的酰胺键在体内可以是耐水解的。在一些实施方式中,所述化合物的二膦酸盐部分可以保持附着于骨。

[0035] 在可替代的方面,本发明提供了将有效量的本发明所述的共轭化合物或其药学上可接受的盐用于治疗或预防病症的用途,所述病症与异常的或过度的骨流失,或与异常的或降低的骨吸收,或与异常的钙代谢相关,或所述病症能从施用EP4激动剂相关化合物中受益。

[0036] 在可替代的实施方式中,所述病症可以是骨质疏松症,佩吉特氏病,异常增加的骨转换,骨移植,牙周病,牙槽骨损失,牙齿脱落,骨折,假体周围骨溶解,成骨不全症,转移性骨疾病或肠易激综合症。

[0037] 在可替代的实施方式中,所述个体可以是人。

[0038] 在可替代的方面,本发明提供了一种制备共轭化合物的方法,其提供至少一种包含一个羟基的EP4激动剂或相关部分,一个包含至少两个羧酸基团的酰胺连接子,以及一个包含一个氨基的二膦酸盐部分;使所述酰胺连接子的其中一个羧酸基团与EP4激动剂或相关部分的羟基反应形成酯键,并使酰胺连接子的另一羧酸基团与二膦酸盐的氨基反应形成酰胺键。在一些实施方式中,所述酰胺连接子可以包含多达三个羧酸基团,两个EP4激动剂或相关部分的羟基可以与酰胺连接子的两个羧酸基团反应形成酯键,而酰胺连接子的另一个羧酸基团可以与二膦酸盐的氨基反应形成酰胺键。

[0039] 该概要并不一定描述了本发明的所有特征。

## 附图说明

[0040] 参考所附的附图,以下描述对这些和其他特征进一步进行详细的描述:

[0041] 图1显示氙标记的C3-,C4-和C5-共轭化合物在大鼠血浆中的稳定性。

[0042] 图2显示在6h内标记的共轭化合物释放入大鼠血流中的情况。

[0043] 图3显示给药后6h,标记的C3,C4和C5-共轭化合物在大鼠器官中的分布。

[0044] 图4显示给药后6h氙标记的共轭化合物摄入大鼠长骨的情况。

[0045] 图5显示在28天内氙标记的C3-共轭化合物释放入大鼠血流中的情况。

[0046] 图6显示在28天内氙标记的C3-共轭化合物在大鼠脾脏和肝脏中的分布情况。

[0047] 图7显示在28天内氙标记的C3-共轭化合物从大鼠长骨中的释放情况。

[0048] 图8A显示在24h内双标记的C3-共轭化合物释放入大鼠血流中的情况。

[0049] 图8B显示在28天内双标记的C3-共轭化合物释放入大鼠血流中的情况。

[0050] 图9显示给药24h后,双标记的C3-共轭化合物在大鼠器官中的分布情况。

[0051] 图10显示在给与双标记的C3-共轭化合物后的28天内,大鼠脾脏和肝脏中的放射性分布情况。

[0052] 图11显示在28天内氙标记的C3-共轭化合物从大鼠长骨中的释放情况。

[0053] 图12显示在28天内,氙标记的和C-14标记的C3-共轭化合物从大鼠长骨中的释放情况。

[0054] 图13显示与EP4激动剂和二膦酸盐相比,C3和C4-共轭化合物及其相应片段的嗜中性粒细胞功能效应(neutrophil function effects)。

[0055] 详细说明

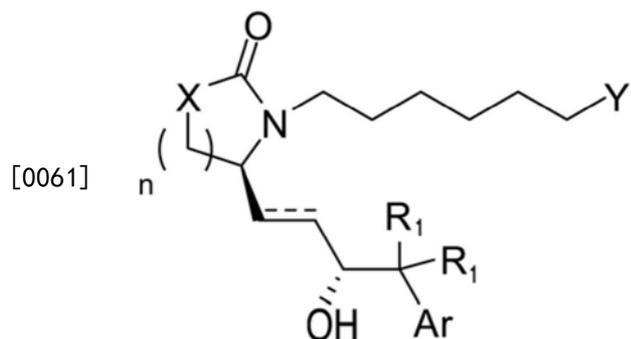
[0056] 本发明部分地提供了EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物或相关化合物及其用途。在一些实施方式中,所述EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物或相关化合物可以将EP4激动剂或相关化合物递送至作用位点,如骨。

[0057] 本发明所述“EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物”(EP4 agonist-bisphosphonate conjugate compound)或“共轭化合物”或简称“共轭物”是指包括通过酰胺连接子连接至二膦酸盐的EP4激动剂或相关化合物。因此,“共轭”(conjugated)是指通过本发明所述的或本领域已知的酰胺连接子连接二膦酸盐和另一种化合物(如EP4激动剂相关化合物)的接头。不受任何具体理论的束缚,所述酰胺键(amide linkage)在体内可以是耐水解的,并因此可以为所述共轭化合物提供更高的化学稳定性。应该理解的是,多于一种的EP4激动剂或相关化合物可以与所述酰胺连接子共轭。在一些实施方式中,多于一种的EP4激动剂或相关化合物可以共轭至酰胺连接子,所述酰胺连接子与单一的二膦酸盐共轭。

[0058] EP4激动剂和相关化合物描述于以下文献中,例如WO 02/24647,WO 02/42268,EP 1132086,EP 855389,EP 1114816,EP 2465506,WO 01/46140,WO 01/72268,WO 05/116010,WO 03/047417,WO2008076703,WO 2014078446,US 7,238,710等。EP4激动剂和相关化合物包括但不限于,包含至少一个如本发明所述的或本领域已知的能够与另一种化合物形成酯键的羟基的化合物。在一些实施方式中,可以使用“C-15”位具有羟基的EP4激动剂(基于前列腺素E<sub>2</sub>的相应编号的命名法)来制备本发明所述的共轭化合物。在一些实施方式中,EP4激动剂包括在前列腺素E<sub>2</sub>的C-15位具有羟基的化合物(例如,本发明所述的或本领域已知的ONO激动剂或其他化合物),其可用于制备本发明所述的共轭化合物。

[0059] 本发明所述的“EP4激动剂”部分是指,在共轭化合物中通过羟基(例如C-15位的,或等同的羟基基团)与另一化合物(例如酰胺连接子)共轭连接形成酯键的EP4激动剂或相关化合物(“相关部分”)的一部分。

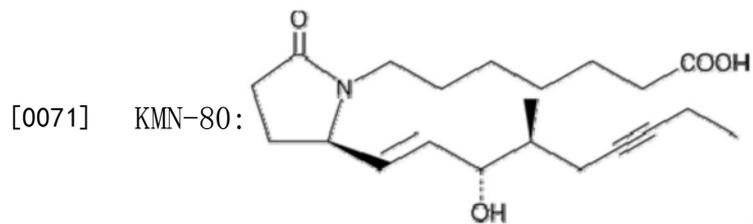
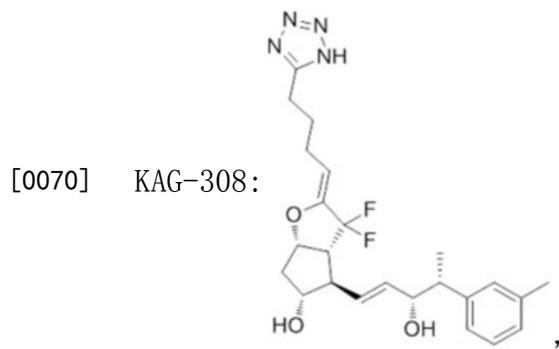
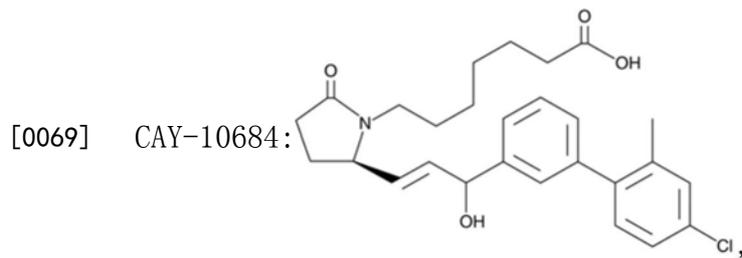
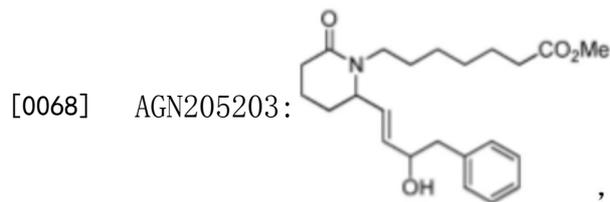
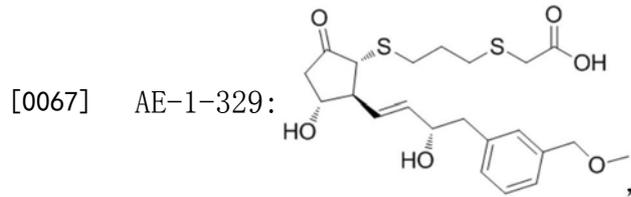
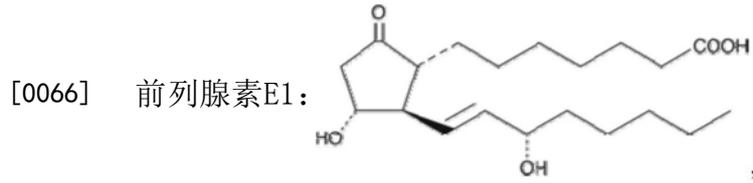
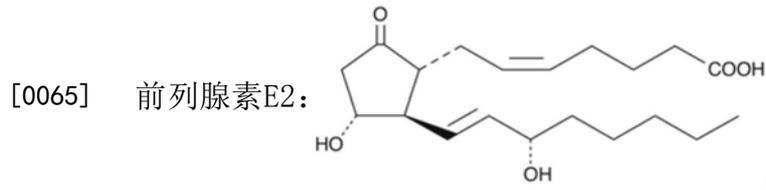
[0060] 在一些实施方式中,EP4激动剂可以具有以下通式结构:



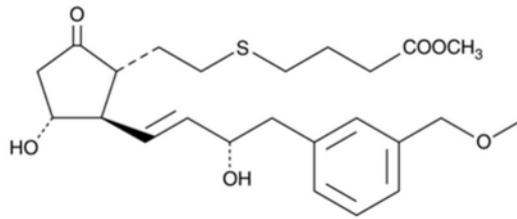
[0062] 其中:X可以是-CH<sub>2</sub>-, -S-, -O-或-NH-;Y可以是COOR',任选取代的四唑,或C(O)NHSO<sub>2</sub>R;R可以是任选取代的低级烷基或任选取代的芳基;n可以是1,2,或3;R<sub>1</sub>可以独立地为H或卤素;Ar可以是芳基,取代的芳基,或杂芳基;R'可以是H或低级烷基;以及==可以是双键或单键。

[0063] 在一些实施方式中,EP4激动剂相关化合物可以在烷基链中任意被取代。在一些实施方式中,EP4激动剂相关化合物的烷基链可以是饱和的或不饱和的。在一些实施方式中,EP4激动剂相关化合物可以在烷基链中具有如在ONO激动剂中发现的杂原子(例如硫)。

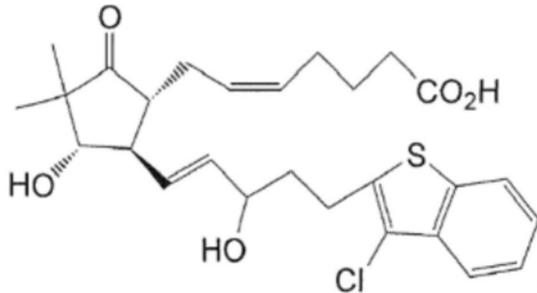
[0064] 在一些实施方式中,EP4激动剂相关化合物可以包括但不限于:



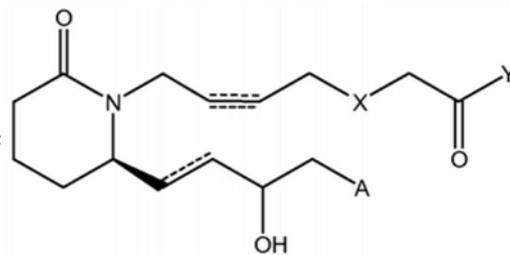
[0072] ONO-4819 (Rivenprost):



[0073] 化合物A:



[0074] 化合物B:

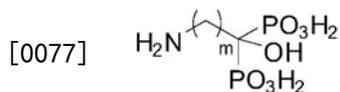


其中,虚线表示存在或者不存在

的键,A为任选取代的苯基,X为CH<sub>2</sub>,O或S,Y为OR<sup>1</sup>或NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>,R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为H或者C<sub>1-6</sub>烷基,CP-536,745-01,CP-043,305-02,CP-044,519-02或ONO-4232。

[0075] 本发明所述的“二膦酸盐”是指氨基-二膦酸盐化合物。任何已知的具有能与EP4激动剂或相关化合物或其他化合物(例如连接子)偶联的仲胺或伯胺官能团,并且在体内能够靶向骨且无论该特定的二膦酸盐是否具有骨吸收抑制活性的二膦酸盐都可以用于本发明。在一些实施方式中,适宜的二膦酸盐可表现出很差的骨吸收抑制活性或无骨吸收抑制活性。

[0076] 在一些实施方式中,二膦酸盐可以具有以下通式结构,其中m可以是1,2,3,4,5或6。

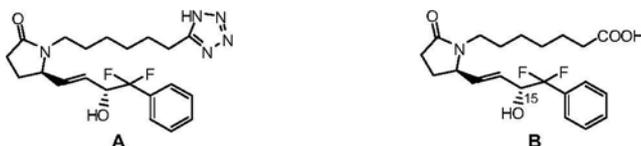


[0078] 本发明所述的“二膦酸盐部分”是在本发明所述共轭化合物中,通过氨基与另一种化合物(例如酰胺连接子)共轭以形成酰胺键的二膦酸盐的部分。

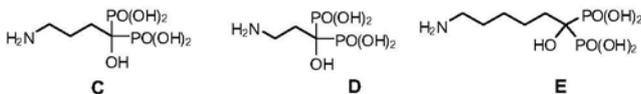
[0079] 二膦酸盐包括但不限于,阿仑膦酸(alendronic acid),4-氨基-1-羟基丁叉-1,1-二膦酸(4-amino-1-hydroxybutylidene-1,1-bisphosphonic acid);阿仑膦酸盐(也称为阿仑膦酸钠或阿仑膦酸钠三水合物),4-氨基-1-羟基丁叉-1,1-二膦酸单钠盐三水合物(4-amino-1-hydroxybutylidene-1,1-bisphosphonic acid monosodium trihydrate);阿仑膦酸和阿仑膦酸钠描述于1990年5月1日授予Kieczkowski等人的美国专利4,922,007;1991年5月28日授予Kieczkowski等人的美国专利5,019,651;于1996年4月23日授予Dauer等人的美国专利5,510,517;1997年7月15日授予Dauer等人的美国专利5,648,491;6-氨基-1-羟基亚己基-1,1-二膦酸(奈立膦酸)(6-amino-1-hydroxyhexylidene-1,1-

bisphosphonic acid (neridronate)); 3-氨基-1-羟基亚丙基-1,1-二膦酸 (帕米膦酸盐) (3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonic acid (pamidronate)); 或其药学上可接受的盐, 或其混合物。

[0080] EP4激动剂的例子包括化合物A和B, 临床活性二膦酸盐 (BPs) 的例子包括阿仑膦酸盐/阿仑膦酸 (C), 帕米膦酸盐 (D) 或奈立膦酸 (E)。



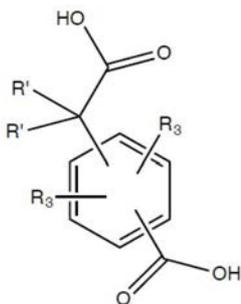
[0081]



[0082] 本发明所述“酰胺连接子”是指本发明所述的或本领域已知的分子, 其可用于连接EP4激动剂或相关化合物的羟基 (例如C-15位的或等同的羟基) 与二膦酸盐的氨基。在一些实施方式中, 合适的酰胺连接子可以通过酯单元 (ester unit) 与EP4激动剂或相关化合物的羟基 (例如C-15位的或等同的羟基) 共轭。在一些实施方式中, 合适的酰胺连接子可以与二膦酸盐的氨基共轭以形成酰胺键。在一些实施方式中, 合适的酰胺连接子可以通过酯单元与EP4激动剂或相关化合物的羟基 (例如C-15位的或等同的羟基) 共轭, 以及与二膦酸盐的氨基共轭形成酰胺键 (即双功能连接子)。在一些实施方式中, 合适的酰胺连接子可以通过酯单元与多个EP4激动剂或相关化合物的羟基 (例如C-15位的或等同的羟基), 以及单个二膦酸盐的氨基共轭。

[0083] 在一些实施方式中, 适宜的酰胺连接子可含有能够与EP4激动剂或相关化合物的羟基 (例如C-15位的或等同的羟基) 反应以形成酯键的羧酸基团。在一些实施方式中, 适宜的酰胺连接子可含有能够与二膦酸盐的氨基反应的羧酸基团。在一些实施方式中, 适宜的酰胺连接子可含有能够与EP4激动剂或相关化合物的羟基 (例如C-15位的或等同的羟基) 反应以形成酯键, 并且与二膦酸盐的氨基形成酰胺键的羧酸基团。在一些实施方式中, 适宜的酰胺连接子可以是长达约12个碳的双官能团的二羧酸链 (dicarboxylic acid), 任选地包括芳基和/或杂原子 (例如O, S或N), 其中一个羧酸基团可以与EP4激动剂或相关化合物的羟基 (例如C-15位的或等同的羟基) 反应以形成酯键, 另一个羧酸基团可以与二膦酸盐的氨基反应形成酰胺键。

[0084] 在一些实施方式中, 适宜的酰胺连接子可具有以下通式结构:

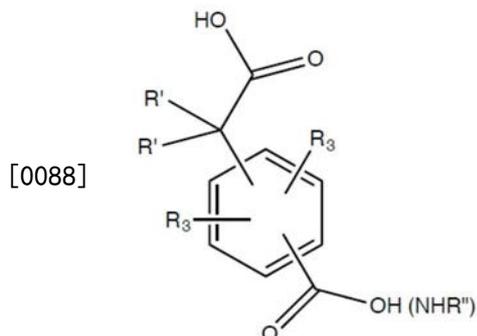


[0085]

[0086] 其中R<sub>3</sub>可以各自独立地为H, OR', 卤素, CN或者C(O)R'; R'可以各自独立地为H或者低级烷基, 或者两个R'可以形成多达6个碳的环; 其中一个羧酸基团可以与EP4激动剂或相

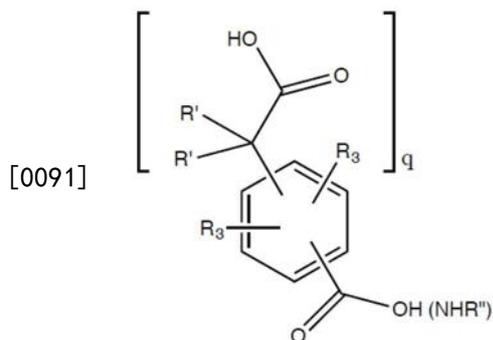
关化合物的羟基(例如C-15位的或等同的羟基)反应以形成酯键,另一个羧酸基团(例如,苯甲酸部分)可以与二磷酸盐的氨基反应形成酰胺键。

[0087] 在一些实施方式中,适宜的酰胺连接子可具有以下通式结构:



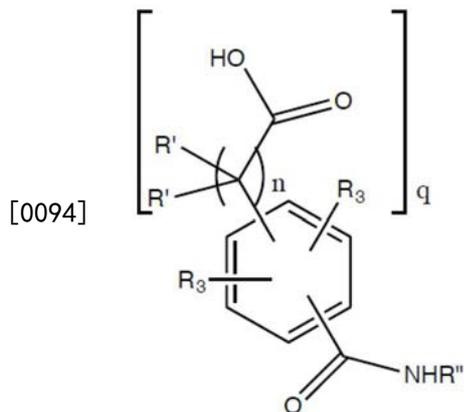
[0089] 其中 $R_3$ 可以各自独立地为H,OR',卤素,CN或C(O)R'; $R'$ 可以各自独立地为H或低级烷基,或者两个 $R'$ 可以形成多达6个碳的环;其中羧酸基团可以与EP4激动剂或相关化合物的羟基(例如C-15位的或等同的羟基)反应以形成酯键,另一个羧酸基团(例如苯甲酸部分)可以与二磷酸盐(NHR'')的氨基反应以形成酰胺键。

[0090] 在一些实施方式中,适宜的酰胺连接子可具有以下通式结构:



[0092] 其中 $q$ 可以是1或2, $R_3$ 可以各自独立地是H,OR',卤素,CN或者C(O)R'; $R'$ 可以各自独立地为H或低级烷基,或者两个 $R'$ 可以形成多达6个碳的环;其中一个或多个羧酸基团可以与EP4激动剂或相关化合物的羟基(例如C-15位的或等同的羟基)反应形成酯键,其余的羧酸基团(例如苯甲酸部分)可以与二磷酸盐(NHR'')的氨基反应以形成酰胺键。

[0093] 在一些实施方式中,适宜的酰胺连接子可具有以下通式结构:



[0095] 其中 $n$ 可以是1,2或3; $q$ 可以是1或2; $R_3$ 可以各自独立地为H,OR',卤素,CN或C(O)R'; $R'$ 可以各自独立地为H或低级烷基,或者两个 $R'$ 可以形成多达6个碳的环;其中一个或多



包括但不限于甲基,三氟甲基,乙基,1-丙基,2-丙基,1-丁基,2-丁基,2-甲基-1-丙基,2-甲基-2-丙基,1-戊基,2-戊基,3-戊基,2-甲基-1-丁基,3-甲基-1-丁基,2-甲基-3-丁基,2,2-二甲基-1-丙基,1-己基,2-己基,3-己基,2-甲基-1-戊基,3-甲基-1-戊基,4-甲基-1-戊基,2-甲基-2-戊基,3-甲基-2-戊基,4-甲基-2-戊基,2,2-二甲基-1-丁基,3,3-二甲基-1-丁基,2-乙基-1-丁基,1-庚基或者1-辛基。

[0113] “环状结构”是指可任意被取代的环烷基,芳基,杂芳基或任何环状结构。

[0114] 本发明所述的“芳基”是指单环(monocyclic)或双环(bicycled)的环状结构,其中所有的环是芳香族的且由碳原子组成,例如苯基或萘基。除非另有具体说明,术语“芳基”是指包括任意地被一个或多个如本发明所述的取代基取代的芳基。因此,在一些实施方式中,术语“芳基”可以指杂芳基,所述杂芳基包含如含有一个或两个杂原子(如N,S或O)的5、6或更多个原子的环。

[0115] “卤素(Halo)”是指卤素基团,例如溴代,氯代,氟代,碘代等。在一些实施方式中,适宜的卤素包括氟。

[0116] 本发明所述的任何基团,例如烷基,芳基,四唑等可以是可被取代的或未被取代的。当被取代时,基团可以被任何期望的取代基或如下基团中的一个或多个基团取代:H,烷基(C<sub>1-10</sub>),烯基(C<sub>2-10</sub>),炔基(C<sub>2-10</sub>),芳基(5-12元),芳烷基,芳基烯基或者芳基炔基,其各自可以任意地含有一个或多个选自O,S,P,N,F,Cl,Br,I或B的杂原子,并且其各自可以进一步被例如O取代;或任选取代形式的酰基,芳基酰基,烷基-烯基-,炔基-或芳基磺酰基,及其在烷基,烯基,炔基或芳基部分含有杂原子的形式;卤素(例如氯代,碘代,溴代或氟代);羟基;C<sub>1-10</sub>烷氧基;氨基(伯,仲,叔);硝基;巯基;硫醚;亚胺;氰基;酰胺基(amido);氨基甲酰基;膦酸;二膦酸盐;磷化氢;羧基;硫代羧基;磺酰基;磺酰胺;酮;醛;酯;氧;卤代烷基(例如三氟甲基);环烷基,其可为单环或稠合或非稠合的多环(例如环丙基,环丁基,环戊基或环己基),或可为单环或稠合或非稠合多环(例如吡咯烷基,哌啶基,哌嗪基,吗啉基或噻嗪基)的非芳香族杂环;以及芳族碳环或杂环,单环或稠合或非稠合多环(例如苯基,萘基,吡咯基,吡啶基,呋喃基,咪唑基,噻吩基,咪唑基,恶唑基,异恶唑基,噻唑基,三唑基,四唑基,吡唑基,吡啶基,喹啉基,异喹啉基,吡啶基,吡嗪基,哒嗪基,嘧啶基,苯并咪唑基,苯并噻吩基或苯并呋喃基)。具体的取代基包括苄氧基;O-烷基;O-芳基;芳基;芳基-低级烷基等。取代的基团可具有1,2,3,4,5,6,7,8,9或10个取代基。在一些实施方式中,这些取代基可任意被本发明所列出的取代基进一步取代。取代基还可以任意被桥结构(bridge structure)取代,例如-OC(O)-或-OC(O)NH-。在一些实施方式中,取代基不被进一步取代。

[0117] “任选”或“任选地”是指随后描述的情况可能发生或不发生,并且所描述的包括发生所述情况的例子以及不发生所述情况的例子。例如,“任选取代的烷基”是指该烷基可以被取代或不被取代,并且所描述的包括取代的烷基和未被取代的烷基。任选取代的烷基的例子包括但不限于甲基,乙基,丙基等。类似地,“任选取代的四唑”是指四唑基可以被取代或不被取代,并且所描述的包括取代的四唑和未被取代的四唑。

[0118] 化合物可以是酸,碱或者盐的形式。

[0119] 整个申请中,可以预见的是,单数术语“化合物(compound)”或者复数术语“化合物(compounds)”是指本发明所述的化合物和共轭化合物,并且包括化合物的前体,中间体和衍生物(包括酰基保护的衍生物)以及化合物,前体和衍生物的药学上可接受的盐。本发明

还包括所述化合物的前药,包含所述化合物和药学上可接受的载体的药物组合物,以及包含所述化合物的前药和药学上可接受的载体的药物组合物。

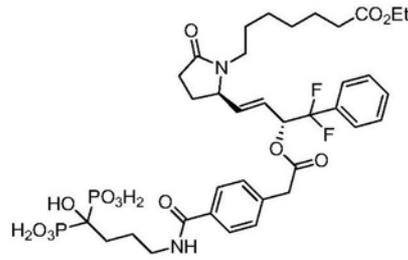
[0120] 在一些实施方式中,本发明的所有化合物至少含有一个手性中心。在一些实施方式中,本发明的化合物可以具有一个或多个手性中心和/或双键。在一些实施方式中,包含本发明化合物的剂型,制剂和组合物可以包括立体异构体的混合物,单独的立体异构体,和对映异构体混合物,多种立体异构体的混合物,双键异构体(即几何E/Z异构体)或非对映异构体(例如对映异构体(即(+))或(-))或顺式/反式异构体)。在一些实施方式中,本发明所描述的化学结构以及本发明的化合物包括所有相应的立体异构体,即纯的立体异构形式(例如几何纯,光学纯或非对映异构纯),以及对映异构体和立体异构体混合物,例如外消旋体。通常地,所述化合物可以以任何期望的手性纯度来提供。

[0121] 可以采用通常的已知方法(如手性相气相色谱法,手性相高效液相色谱法)将本发明化合物结晶为手性盐混合物,或在手性溶剂中使化合物结晶,从而将化合物的对映异构体和立体异构体混合物拆分为其组分的对映异构体或立体异构体。对映异构体和立体异构体还可以通过公知的不对称合成方法由立体异构纯或光学纯的中间体,试剂和催化剂获得。

[0122] 在一些实施方式中,所述EP4激动剂或其他药剂-二膦酸盐共轭化合物可以直接递送至骨。

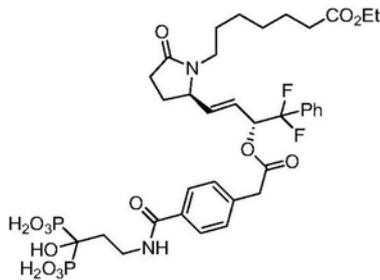
[0123] 在一些实施方式中,本发明所述的EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物或相关化合物可以有效摄入骨。本发明所述的“有效摄入”是指与骨结合的共轭化合物的量占初始剂量的百分比。在可替代的实施方式中,本发明所述的“有效摄入”是指摄入至少约5%初始剂量的EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物。在可替代的实施方式中,至少约5%,6%,7%,8%,9%,10%,11%,12%,13%,14%,15%,16%,17%,18%,19%,20%,21%,22%,23%,24%,25%,或者更多的本发明所述的EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物可以在施用初始剂量的共轭化合物后并在开始水解前的合适的时间段内,例如5至24小时,结合到骨上。

[0124] 共轭化合物在体内可以是可水解的,以释放与二膦酸盐共轭的EP4激动剂或其他化合物。在一些实施方式中,EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物在体内可以是可水解的,以仅释放一种或多种EP4激动剂或相关化合物(具有游离醇,例如C-15位或等同位置),而不释放二膦酸盐,其可以通过酰胺键保持与酰胺连接体共轭。不受任何具体理论的束缚,所述酰胺键可以导致共轭化合物的稳定性增加。在一些实施方式中,一旦附着到骨上,共轭化合物可能不能释放可检测的或大量的活性二膦酸盐。例如,含有通过C-15位羟基以酯连接子与二膦酸盐部分连接的EP4激动剂的共轭化合物<sub>1</sub>(阿仑膦酸盐共轭化合物),<sub>2</sub>(帕米膦酸盐共轭化合物),或<sub>3</sub>(奈立膦酸共轭化合物)可以在体内水解,释放EP4激动剂,并形成包含通过酰胺基团连接到二膦酸盐部分的连接子的片段<sub>4</sub>,<sub>5</sub>或<sub>6</sub>。

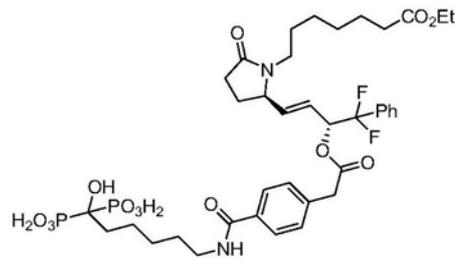


Conjugate (1)

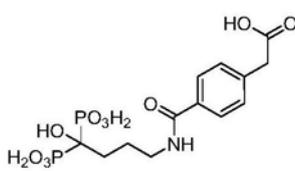
[0125]



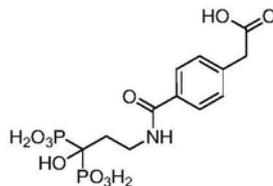
Conjugate (2)



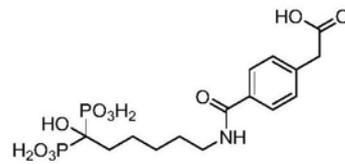
Conjugate (3)



Fragment (4)



Fragment (5)



Fragment (6)

[0126] 在一些实施方式中,在阿仑膦酸盐类似物(alendronate analog)存在的情况下,在释放EP4激动剂(即,2-(4-((4-羟基-4,4-二膦酰基丁基)氨基甲酰基)苯基)乙酸(2-(4-((4-hydroxy-4,4-diphosphonobutyl) carbamoyl) phenyl) acetic acid)之后,所述片段(如4,5或6)可能仍然附着于骨,且其作为骨吸收的抑制剂可能具有很小的生物学活性或没有生物学活性。

[0127] 在可替代的实施方式中,所述共轭化合物可以是直到水解并且共轭到二膦酸盐上的药剂被释放都是无活性的。例如,EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物可以是直到水解都是无活性的,仅释放EP4激动剂或相关化合物部分。在一些实施方式中,EP4激动剂或相关化合物通过C-15羟基形成酯键的连接可以允许EP4激动剂或相关化合物的缓慢释放。含有游离醇(例如在C-15位)的EP4激动剂部分或相关化合物可以是有活性的。在一些实施方式中,共轭化合物可以是直到附着于骨前都是无活性的,之后它们可以被水解,并且与二膦酸盐部分和酰胺连接子共轭的药剂被释放。例如,EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物可以是直到附着到骨上都是无活性的,之后它们可以被水解,并且与二膦酸盐部分和酰胺连接子共轭的EP4激动剂部分或相关化合物被释放。

[0128] 在一些实施方式中,二膦酸盐部分可以保持附着于骨,并且可以是无生物活性的(例如几乎没有,或没有可检测到的骨吸收活性)。本发明所述的“释放”是指,通过例如水解或酶的作用,将共轭到二膦酸盐上的药剂从共轭化合物中释放出来。在可替代的实施方式

中,本发明所述的“释放”是指,通过例如水解或酶的作用,从本发明所述的EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物中释放一种或多种EP4激动剂部分或相关化合物。在可替代的实施方式中,至少约5%至约100%,例如约5%,6%,7%,8%,9%,10%,11%,12%,13%,14%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,或100%,或其间的任何值的EP4激动剂或相关化合物,可以在适当的时间段内从本发明所述的EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物中释放出来。在共轭化合物已经在体内结合到骨上之后,可以在例如血液或血浆中,采用本发明所述的或本领域已知的任何合适的系统或分析来测量释放量。也可以通过与更早的时间相比,通过来自骨中不同时间段EP4激动剂或相关化合物的放射性标记的损失来测定释放量。在可替代的实施方式中,释放可以花费一段时间,例如约1天至约30天,或在该范围之间的任何值或任何一组值,例如约7天至约14天,诸如约7,8,9,10,11,12,13或14天。在一些实施方式中,来自血浆和骨中的释放可以不同。因此,在一些实施方式中,在血浆中能够稳定或表现出缓慢释放特性的共轭化合物可以是有用的,因为它可以允许在释放EP4部分或相关化合物之前与骨结合。在可替代的实施方式中,共轭化合物靶向骨并从骨中释放EP4部分或相关化合物的能力可以是鉴定特征。

[0129] 在可替代的实施方式中,水解和释放EP4激动剂之后保留的片段(例如片段4,5或6,或包含双膦酸盐(bisphosphate)部分和任选的酰胺连接子的任何片段)可能具有很小的生物学活性或没有生物学活性。例如,EP4激动剂或相关化合物从递送到骨中的共轭化合物中水解和释放出来后,保留的片段可能作为骨吸收抑制剂具有很小的生物学活性或没有生物学活性。在一些实施方式中,不受任何具体理论的束缚,递送至骨的共轭化合物可以增强骨形成,但对骨吸收几乎没有影响,完全地(intactto)例如只允许在骨中的自然骨重塑。

[0130] EP4激动剂-二膦酸盐共轭化合物或相关化合物可以采用如本发明所述的或其他文献所述的方法来制备。应该理解的是,本发明涵盖了当使用标准技术执行或通过常规实验操作时,对本发明所述方法和方案所做的任何变型。

[0131] 在一些实施方式中,合适的共轭化合物可以通过例如以下方式制备:采用本发明所述的技术或本领域已知的变型,将化合物(例如EP4激动剂或相关化合物)的羟基部分通过酰胺连接子与含有游离伯氨基或仲氨基部分的二膦酸盐共轭连接。

#### [0132] 治疗适应症

[0133] 人和其他哺乳动物中的多种病症或紊乱与异常的或过度的骨流失,或与异常的或减少的骨吸收,或与异常的钙代谢相关。这些病症或紊乱包括但不限于骨质疏松症—其可包括骨组织的低骨量和微结构恶化并伴随随之而来的骨脆性增加和对骨折的易感性,糖皮质激素诱导的骨质疏松症,佩吉特氏病,异常增加的骨转换,骨移植,牙周病,牙槽骨损失,牙齿脱落,骨折,假体周围骨溶解,成骨不全症,转移性骨疾病等。此外,人和其它哺乳动物的各种病症或紊乱可能受益于施用EP4激动剂或相关化合物,例如肠易激综合症(IBD),关节炎,疼痛,癌症,多发性硬化症,平滑肌松弛,眼内压,疼痛(特别是炎症性疼痛,神经性疼痛和内脏疼痛),炎症,神经保护,淋巴细胞分化,过敏性反应,睡眠促进,肾脏的调节,胃或肠粘液分泌和十二指肠碳酸氢盐分泌等。

[0134] 因此,本发明所述的共轭化合物可以用于治疗或预防与异常的或过度的骨流失有关的,或与异常的或减少的骨吸收有关的,或与钙代谢异常有关的病症或紊乱,或可以用于治疗能够从将靶向治疗剂至骨或施用EP4激动剂或相关化合物中获益的任何病症或紊乱。

在一些实施方式中,包含多个EP4激动剂部分或相关化合物的共轭化合物可能是特别有用的。

[0135] 在可替代的实施方式中,本发明提供了在动物个体,例如兽类个体和人增强或提高骨刺激水平的方法。所述骨刺激水平的升高可用于预防或治疗与异常的或过度的骨丢失有关的,或与异常的或减少的骨吸收有关的,或与钙代谢异常有关的病症或紊乱。

[0136] 所述共轭化合物在预防或治疗病症或紊乱的效力,可以通过使用标准技术测定所述共轭化合物增强或提高骨刺激的能力,或通过测定共轭化合物对各种器官或组织的靶向能力或保留在各种器官或组织中的量来确定,其中,所述病症或紊乱与异常的或过度的骨流失有关,或与异常的或减少的骨吸收有关,或与钙代谢异常有关,或可能从靶向治疗剂至骨或施用EP4激动剂或相关化合物中受益。

[0137] 例如,首先可以评估所述共轭化合物在体外血浆中的稳定性,然后评估其在标准动物(例如大鼠)中选择性吸收入骨或其他器官或组织,以及治疗分子(例如游离EP4激动剂或相关化合物)的缓慢释放情况。当确定出合适的共轭化合物时,可以在骨质疏松症动物模型中或在例如是骨生成的体外模型(即新生大鼠原代细胞培养物(neonatal rat calvaria cell cultures))中评估优化的化合物。然后,所述化合物可以用于例如体内或其他测定,以显示其适于进一步开发为治疗本发明所述的或本领域中已经发现的紊乱和病症的新型疗法所具有的效力和耐受性。

[0138] 通常地,本发明所述方法受以下方式影响,将本发明所述的共轭化合物给予有需要的个体,或使细胞或样品与本发明所述的化合物(例如,包含治疗有效量所述化合物的药物组合物)接触。

[0139] 药物组合物和兽用组合物(Pharmaceutical&VeterinaryCompositions),剂量和管理

[0140] 本发明的保护范围包括本发明所述的或用于本发明所公开内容的共轭化合物的药物组合物。在一些实施方式中,本发明提供了包含有效量的如本发明所述共轭化合物的药物组合物。

[0141] 在一些实施方式中,本发明所述的共轭化合物靶向骨或需要骨生长刺激的位点。这样的位点既包括在有需要的个体中需要治疗的一段骨或一组骨的紧邻区域,也包括骨内的区域,包括在一根骨或一组骨中自然发生的或有意制造的骨折或开口部位。需要治疗的骨可包括青枝骨折,开放性骨折,侧向骨折,由侵入性肿瘤导致的病理性骨折,压缩性骨折,或需要外科手术重新对骨进行复位的骨折。

[0142] 所述共轭化合物及其药学上可接受的盐,立体异构体,溶剂化物以及衍生物可能是有用的,因为它们包括人在内的动物中具有药理学活性。在一些实施方式中,当将本发明所述的共轭化合物施用于个体时,其在血浆中可以是稳定的。在可替代的实施方式中,与每个单独的组分相比,EP4激动剂或其他药剂-二磷酸盐共轭化合物可以以较低剂量施用。在一些实施方式中,EP4激动剂或其他药剂-二磷酸盐共轭化合物可以降低与EP4激动剂相关的全身副作用。

[0143] 在一些实施方式中,本发明所述的或用于本发明所公开内容的共轭化合物,可以与任何其他活性剂或药物组合物组合提供,其中这样的组合疗法可用于治疗或预防与异常的或过度的骨流失有关的,或与异常的或减少的骨吸收有关的,或与钙代谢异常有关的病

症或紊乱,例如,用于治疗本发明所述的或能够从靶向治疗剂于骨或施用EP4激动剂或相关化合物中受益的任何病症或紊乱。

[0144] 在一些实施方式中,本发明所述的或用于本发明所公开内容的共轭化合物,可以与一种或多种药剂共同使用,所述药剂用于预防或治疗与异常的或过度的骨流失有关的,或与异常的或减少的骨吸收有关的,或与异常的钙代谢异常有关的病症或紊乱,来治疗本发明所述的或能从靶向治疗剂于骨中受益的任何病症或紊乱。

[0145] 本发明所述的或用于本发明所公开内容的共轭化合物与其他疗法的组合,可以分开或联合施用,其中所述其他疗法用于预防或治疗与异常的或过度的骨流失有关的,与钙代谢异常有关的病症或紊乱,癌症,或任何与骨有关的或能够从将治疗剂靶向骨中受益的紊乱。一种药剂或共轭化合物的施用可以在施用其它药剂或共轭化合物之前,同时或之后进行。

[0146] 在可替代的实施方式中,尽管本发明所述的共轭化合物本身可以被认为是“前药”(“prodrugs”),但所述共轭化合物可以以更进一步的在施予个体后释放所述化合物的前药或保护形式来提供。例如,所述化合物可带有保护基团,该保护基团在体液中(例如血流中)通过水解裂解(splitoff)出来并由此释放活性化合物,或在体液中或被氧化或还原以释放所述化合物。因此,“前药”是指可以在生理条件下(例如酶促条件下)或通过溶剂分解作用转化为本发明所述生物活性化合物的化合物。因此,术语“前药”是指本发明化合物药学上可接受的代谢前体。前药在施用于有需要的个体时可以是无活性的,但在体内转化为本发明所述的活性化合物。前药通常在体内快速转化,例如通过在血液中的水解作用产生本发明的母体化合物。前药化合物通常在个体中具有可溶性,组织相容性或延迟释放的优点。

[0147] 术语“前药”也包括任何共价键合的载体,当将这种前药给予个体时,其在体内释放本发明所述的活性化合物。本发明所述化合物的前药可通过以下方式来制备:对本发明化合物中存在的官能团进行修饰,以使所述修饰在常规操作或在体内时断开,形成本发明的母体化合物。前药包括本发明所述的化合物,其中羟基,氨基或巯基与任何在该本发明所述化合物的前药给予哺乳动物个体时,能断开并分别形成游离的羟基,游离的氨基或游离的巯基。前药的实例包括但不限于本发明化合物或类似物中的胺官能团(amine functional groups)的乙醇和乙酰胺、甲酰胺和苯甲酰胺衍生物的乙酸盐,甲酸盐和苯甲酸盐衍生物等。

[0148] 对前药的讨论可见于Smith和Williams'的“Introduction to the Principles of Drug Design”,H.J.Smith,Wright,Second Edition,London(1988);Bundgard,H.,Design of Prodrugs(1985),pp.7-9,21-24(Elsevier,Amsterdam);“药物化学实践”,Camille G.Wermuth等,第31章,(Academic Press,1996);药物设计和开发教科书,P.Krogsgaard-Larson 和H.Bundgaard,eds.Ch5,pgs113191(Harwood Academic Publishers,1991);Higuchi,T.,et al.,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems,”A.C.S.Symposium Series,Vol.14;或Bioreversible Carriers in Drug Design,ed.Edward B.Roche,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987;所有这些都通过参考的方式全部纳入本文。

[0149] 本发明化合物的合适的前药形式包括其中一个羟基被C(O)OR取代的实施方式,其中R为任选取代的烷基,烯基,炔基,芳基,或杂芳基。在这些情况下,酯基在体内(例如在体

液中)可水解并释放活性化合物。

[0150] 本发明所述的或用于本发明所公开内容的共轭化合物可以单独提供,或在脂质体,佐剂或任何药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂的存在下,以适于施用于个体,例如哺乳动物(如人,牛,绵羊等)的形式与其他化合物一起提供。如果需要,采用本发明所述的化合物进行的治疗可以与更传统的和现有的治疗方法相结合用于本文所述的治疗适应症。本发明所述的化合物可以长期或间歇性地提供。“长期”给药是指与急性的方式相对的以连续的方式给予所述化合物,以维持最初的治疗效果(活性)至很长一段时间。“间歇性”给药是指治疗并非连续不间断地进行,而是在本质上是循环进行的。本发明所述的术语“给药”,“可给药的”或“施用”应理解为,是指将本发明所述的化合物提供给需要治疗的个体。

[0151] “药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂”包括但不限于,任何已经被例如美国食品和药物管理局或其他政府机构批准的可用于人或家畜的佐剂,载体,赋形剂,助滑剂,甜味剂,稀释剂,防腐剂,染料/着色剂,增味剂,表面活性剂,润湿剂,分散剂,悬浮剂,稳定剂,等张剂(isotonic agent),溶剂或乳化剂。

[0152] 本发明的化合物可以以药学上可接受的盐的形式给药。在这种情况下,本发明的药物组合物可以包含本领域已知的该化合物的盐,优选为生理上可接受的盐。在一些实施方式中,本发明所述的术语“药学上可接受的盐”是指包含共轭化合物盐形式的活性成分,尤其是与活性成分的游离形式或其他之前公开的形式相比,该盐的形式能够提高该活性成分的药代动力学性质。

[0153] “药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐。“药学上可接受的酸加成盐”是指保留游离碱的生物有效性和特性的盐,其在生物学上或其它方面是令人满意的,并且由无机酸以及有机酸形成,所述无机酸包括盐酸,氢溴酸,硫酸,硝酸,磷酸等,所述有机酸包括乙酸,三氟乙酸,丙酸,乙醇酸,丙酮酸,草酸,马来酸,丙二酸,琥珀酸,富马酸,酒石酸,柠檬酸,苯甲酸,肉桂酸,扁桃酸,甲磺酸,乙磺酸,对甲苯磺酸,水杨酸等。

[0154] “药学上可接受的碱加成盐”是指保留游离酸的生物有效性和特性的盐,其在生物学或其它方面是令人满意的。通过向游离酸中加入无机碱或有机碱来制备所述“药学上可接受的碱加成盐”。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐,钾盐,锂盐,铵盐,钙盐,镁盐,铁盐,锌盐,铜盐,锰盐,铝盐等。优选的无机盐为铵盐,钠盐,钾盐,钙盐和镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于伯胺,仲胺和叔胺的盐,取代的胺(包括天然存在的取代胺)的盐,环胺盐和碱性离子交换树脂的盐,如异丙胺,三甲胺,二乙胺,三乙胺,三丙胺,乙醇胺,2-二甲基乙醇胺(2-dimethylaminoethanol),2-二乙氨基乙醇(2-diethylaminoethanol),二环己胺,赖氨酸,精氨酸,组氨酸,咖啡因,普鲁卡因,海巴(hydrabamine),胆碱,甜菜碱,乙二胺,葡萄糖胺,甲基葡萄糖胺,可可碱,嘌呤,哌嗪,哌啶,N-乙基哌啶(N-ethylpiperidine),聚胺树脂等。特别优选的有机碱为异丙胺,二乙胺,乙醇胺,三甲胺,二环己胺,胆碱和咖啡因。

[0155] 因此,术语“药学上可接受的盐”涵盖所有可接受的盐,包括但不限于乙酸盐,乳糖醛酸盐,苯磺酸盐,月桂酸盐,苯甲酸盐,苹果酸盐,碳酸氢盐,马来酸盐,硫酸氢盐,扁桃酸盐,酒石酸氢盐,甲磺酸盐,硼酸盐,溴甲烷,溴化物,亚硝酸甲酯,依地酸钙,硫酸甲酯,右旋樟脑磺酸(camsylate),粘酸盐,碳酸盐,萘磺酸盐,氯化物,硝酸盐,克拉维酸盐,N-甲基葡萄糖胺,柠檬酸盐,铵盐,二盐酸盐,油酸盐,乙二胺四乙酸盐,草酸盐,乙二磺酸盐,双羟萘酸盐,丙酸酯月桂硫酸酯,棕榈酸盐,酚磺乙胺,泛酸盐,富马酸盐,磷酸盐/二磷酸盐,葡庚糖

酸盐,聚半乳糖醛酸盐,葡萄糖酸盐,水杨酸盐,谷氨酰胺(glutame),硬脂酸盐,甘苯肿盐(glycollylarsanilate),硫酸盐,己基间苯二酚盐(hexylresorcinate),碱式乙酸盐,hydradamine,琥珀酸盐,氢溴酸盐,丹宁酸盐,盐酸盐,酒石酸盐,羟萘甲酸盐(hydroxynaphthoate),茶氯酸盐(teoclalte),碘化物,甲苯磺酸盐,异硫代硫酸盐(isothionate),三乙基碘,乳酸盐,泮酸盐(panoate),戊酸盐等。

[0156] 本发明化合物的药学上可接受的盐可以以能够改变溶解度或水解特性的剂量使用,或者可以用于缓释药或前药制剂中。另外,本发明化合物的药学上可接受的盐可以由阳离子以及碱形成,所述阳离子包括钠,钾,铝,钙,锂,镁,锌,所述碱包括氨,乙二胺,N-甲基-谷氨酰胺,赖氨酸,精氨酸,鸟氨酸,胆碱,N,N'-二苄基乙二胺,氯普鲁卡因,二乙醇胺,普鲁卡因,N'-苄基苯乙基胺,二乙胺,哌嗪,三(羟甲基)氨基甲烷和四甲基氢氧化铵。

[0157] 药物制剂通常包括一种或多种适用于制剂通过注射,吸入,局部给药,灌洗给药的施用方式,或适用于所选治疗方法的其它施用方式的载体。适宜的载体是本领域已知的用于这种给药方式的载体。

[0158] 合适的药物组合物可以通过本领域已知的方法配制,其给药方式和剂量由熟练的从业人员来确定。对于肠胃外给药,可将化合物溶于无菌水或生理盐水或用于给予非水溶性化合物(例如用于维生素K)的药学上可接受的载体中。对于肠内给药,化合物可以以片剂,胶囊或液体形式施用。片剂或胶囊可以肠溶包衣,或制成缓释制剂。许多已知的合适制剂,包括包封待释放化合物的聚合物或蛋白质微粒,软膏,凝胶,水凝胶,或可局部施用化合物的溶液。缓释贴剂或植入物可用于长时间释放化合物。许多技术人员已知的技术在Alfonso Gennaro的Remington:the Science&Practice of Pharmacy,第20版,Williams&Wilkins,(2000)中有描述。用于肠胃外给药的制剂可以例如含有赋形剂,聚亚烷基二醇如聚乙二醇,植物来源的油脂或氢化萘。可以使用生物可相容的,可生物降解的丙交酯聚合物,丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物来控制化合物的释放。用于调节化合物的其它可能有用的肠胃外递送系统包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物颗粒,渗透泵,可植入的输注系统和脂质体。用于吸入的制剂可以含有赋形剂例如乳糖,或者可以是含有例如聚氧乙烯-9-十二烷基醚,甘胆酸盐和脱氧胆酸盐的水溶液,或者可以是用于以滴鼻剂形式给药的油性溶液,或者可以是凝胶。

[0159] 本发明所述的共轭化合物或药物组合物可以通过口服或非口服的方式给药,例如肌肉内的,腹膜内的,静脉内的,脑池内的注射或输注,皮下注射,经皮的或透粘膜的途径。在一些实施方式中,本发明所述的或用于本发明的共轭化合物或药物组合物可以通过医疗装置或器械如植入物,移植物,假体,支架等方式施用。植入物可以设计为旨在包含和释放这类化合物或组合物。由聚合物材料制成的植入物适于在一段时间内释放共轭化合物或其单个组分。共轭化合物可以单独给药或与药学上可接受的载体以固体形式(如片剂,胶囊剂,颗粒剂,散剂等),液体制剂(如糖浆,注射剂等),注射剂,滴剂,栓剂,阴道栓剂一同给药。在一些实施方式中,本发明所述的或用于本发明的共轭化合物或药物组合物可以通过吸入喷雾,鼻腔,阴道,直肠,舌下或局部途径给药,并且可以单独或以含有常规无毒的药学上可接受的载体,佐剂和赋形剂的合适的剂量单位配制,以适合于各种给药途径。

[0160] 本发明的共轭化合物可用于治疗动物,包括小鼠,大鼠,马,牛,绵羊,狗,猫和猴。而且,本发明的化合物也可以用于其他生物,例如禽类(例如鸡)。本发明的化合物也可有效

用于人类。术语“个体 (subject)”或者在本文中可替代地称为“患者”，意指治疗，观察或实验的对象，优选为哺乳动物，更优选为人。另外，本发明的共轭化合物，方法和药物组合物可以用于治疗动物。因此，本文所述的“个体”可以是人，非人灵长类动物，大鼠，小鼠，牛，马，猪，绵羊，山羊，狗，猫等。所述个体可以是疑似患有与异常的或过度的骨流失有关的，与异常的或降低的骨吸收有关的，或与钙代谢异常有关的病症或紊乱，癌症，与骨有关的紊乱，或能从靶向治疗剂于骨中受益的紊乱，或面临患有所述病症或紊乱的风险。

[0161] 本发明化合物的有效量包括治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是指在必需的剂量和时间段内有效达到所需治疗结果的量，例如抑制骨吸收，刺激骨生长，或治疗本发明所述的任何病症。化合物的治疗有效量可以根据多种因素而变化，诸如个体的疾病状态，年龄，性别和体重，以及化合物在个体中引起期望反应的能力。

[0162] 可以调整给药方案以提供最佳的治疗效果。治疗有效量也指化合物治疗的有益效果超过任何毒性或有害作用。“预防有效量”是指在必需的剂量和时间内有效达到期望预防效果的量，如抑制骨吸收，刺激骨生长或预防本发明所述的任何病症。通常地，在疾病发病之前或疾病的早期阶段，在个体中使用预防的剂量，可以使得预防有效量小于治疗有效量。化合物治疗或预防有效量的合适范围可以是0.1nM-0.1M, 0.1nM-0.05M, 0.05nM-15 $\mu$ M或0.01nM-10 $\mu$ M之间的任意值。

[0163] 在可替代的实施方式中，在治疗或预防需要调节骨生长或骨吸收或钙代谢的病症中，合适的剂量水平通常为每天每kg个体体重约0.01至1000mg，并且可以以单剂量或多剂量的方式进行施用。在一些实施方式中，剂量水平可以是每天约0.1至约250mg/kg。在一些实施方式中，剂量水平可以是每天约5mg/kg。在一些实施方式中，剂量水平可以导致EP4激动剂或其他药剂以一定的速率持续释放，所述速率为每天约5 $\mu$ g/kg至每天约50 $\mu$ g/kg，或每天约15 $\mu$ g/kg至约25 $\mu$ g/kg，或者在这些范围之间或包括这些范围的任意值，诸如每天约5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45或40 $\mu$ g/kg。应该理解的是，对于任何特定患者的具体剂量水平和给药频率可以根据多种因素进行调整，包括所使用的具体化合物的活性，该化合物的代谢稳定性和作用时间长度，年龄，体重，总体健康状况，性别，饮食，给药的方式和时间，排泄速率，药物组合，特定病症的严重程度，以及该患者正在接受的治疗。

[0164] 需要注意的是，剂量水平可以随待缓解病症的严重程度进行调整。对于任何特定的个体，可根据个体需要以及施用组合物或监督组合物施用的人员的专业判断，随时间调整具体的给药方案。本发明所述的剂量范围仅是示例性的，并不限制医师可能选择的剂量范围。组合物中活性化合物的量可以根据不同因素进行调整，诸如疾病状态，年龄，性别和个体体重。可以调整给药方案以提供最佳的治疗效果。例如，可以施用单次推注，可以随着时间的推移施用数个分剂量，或者可以根据治疗情况的紧急程度成比例地减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物可能利于给药的便利性和一致性。一般而言，使用本发明的化合物应不引起显著的毒性，并且如本发明所述，所述化合物表现出用于治疗用途的合适的安全性。本发明化合物的毒性可以采用标准技术来确定，例如通过在细胞培养物或实验动物中进行测定并确定其治疗指数，即LD50 (群体50%致死的剂量) 和LD100 (群体100%致死的剂量) 的比例值。然而，在某些情况下，例如在严重的疾病状况下，可能需要施用大量过量的所述组合物。

[0165] 在一些实施方式中，本发明所述的共轭化合物以允许每周给药多次的速率进行水

解。

[0166] 在一些实施方式中,本发明所述的共轭化合物以允许每周给药一次的速率进行水解。

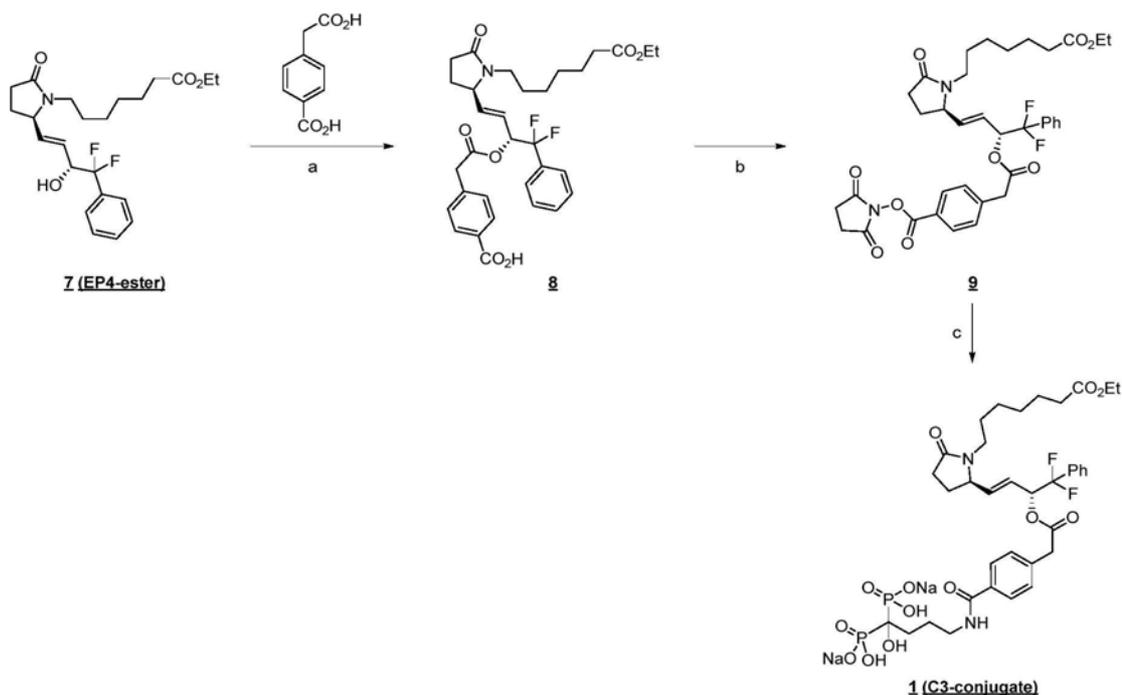
[0167] 在一些实施方式中,本发明所述的共轭化合物以允许两周给药一次的速率进行水解。

[0168] 本文描述了本发明的各种可替代的实施方式和例子。这些实施方式和例子是说明性的,不应被解释为限制本发明的保护范围。

[0169] 通过以下实施例对本发明进行进一步的说明。

## 实施例

[0170] C3-共轭化合物1的合成



[0171]

[0172] a) 4-(羧甲基)苯甲酸(4-(carboxymethyl)benzoic acid) (1.6当量), DCC (1.5当量), DMAP (0.02当量), 吡啶 (2.4当量),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 室温, 2h; b) N-羟基丁二酰亚胺 (2.7当量), EDC1 (2.7当量), DMF, 室温, 7h, 两步反应完成后的产率为80%; c) 阿仑膦酸 (4当量), 三乙胺 (11.3当量), DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (v/v) 2:1, 室温, 10min, 80%。

[0173] 2,5-二氧吡咯烷基-1-基4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酸盐(9) (2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzoate (9))

[0174] 将EP4-酯7 (0.200g, 0.47mmol, 1当量) 溶解在干燥的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.4mL) 中, 然后向溶液中加入4-(羧甲基)苯甲酸 (0.134g, 0.75mmol, 1.6当量), DMAP (0.001g, 0.01mmol, 0.02当量), 吡啶 (0.089mL, 1.11mmol, 2.4当量) 和DCC (0.150g, 0.73mmol, 1.5当量)。将反应混合液在氩气气氛下室温搅拌2h, 然后过滤。将得到的滤渣用MTBE洗涤。滤液用0.5M柠檬酸/水1:1

(v/v)的混合溶液洗涤。所得水层用MTBE萃取3次,合并的有机相用饱和硫酸钠干燥后,经减压浓缩得到酸8。HRMSm/z计算 $C_{32}H_{36}F_2NO_7$  [M-H]<sup>-</sup>584.2465,实测值584.2469。然后将残渣溶解在DMF (10mL)中,并向其中加入N-羟基丁二酰亚胺(0.147g,1.28mmol,2.7当量),N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(N-(3-dimethylamino-propyl)-N'-ethylcarbodiimidehydrochloride) (EDC1) (0.245g,1.28mmol,2.7当量)。将反应混合溶液在氩气气氛下室温搅拌7h,然后向混合溶液中加入乙酸乙酯(EtOAc)和水进行稀释。所得水层用MTBE萃取3次,合并的有机相用饱和NaCl溶液洗涤四次,然后用饱和硫酸钠进行干燥浓缩。然后将所得的粗产物经快速色谱(12gBioTageHPSi1柱,50%至100%梯度变化的EtOAc/己烷)纯化,得到无色油状的NHS-酯9(0.364g,80%)。<sup>1</sup>HNMR(CDC1<sub>3</sub>,500MHz) δ8.03(d,2H,J=8.0Hz),7.45-7.32(m,5H),7.27(d,2H,J=8.0Hz),5.74-5.68(m,1H),5.64-5.54(m,2H),4.09(q,2H,J=7.0Hz),4.03-3.98(m,1H),3.72-3.63(m,2H),3.46-3.40(m,1H),2.93-2.82(m,4H),2.65-2.58(m,1H),2.38-2.25(m,4H),2.19-2.12(m,1H),1.65-1.56(m,3H),1.42-1.20(m,9H);<sup>13</sup>CNMR(CDC1<sub>3</sub>,126MHz) δ174.7,173.7,169.3,168.4,161.5,140.5,138.1,133.3(t,J<sub>C-F</sub>=31.7Hz),130.8,130.6,129.8,128.4,125.6(t,J<sub>C-F</sub>=7.6Hz),124.2,123.7,119.3(t,J<sub>C-F</sub>=299.0Hz),74.6(t,J<sub>C-F</sub>=40.8Hz),60.2,59.6,41.1,40.4,34.2,29.8,28.7,27.0,26.4,25.7,25.1,24.8,14.2;HRMSm/z calcd for  $C_{36}H_{41}F_2N_2O_9$  [M+H]<sup>+</sup>683.2775, found 683.2796; HPLC purity: 100%, t<sub>R</sub>=3.0min(方法1)。

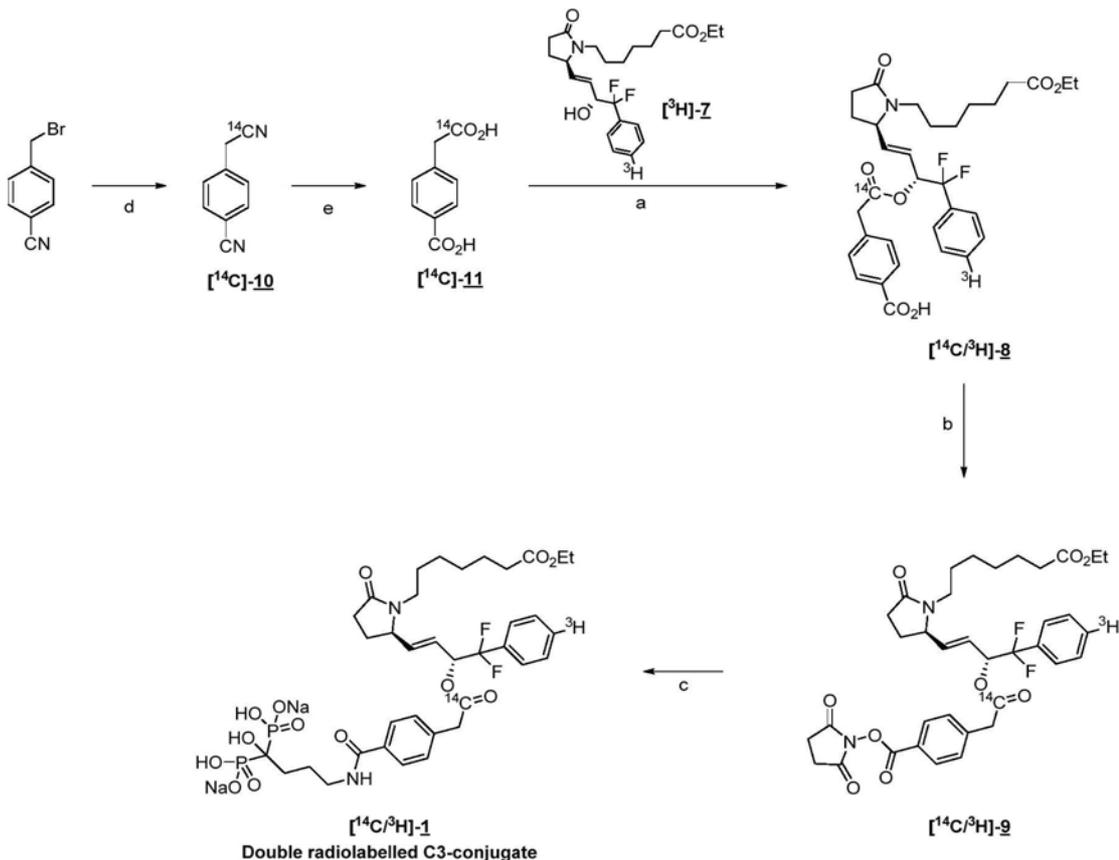
[0175] (4-(4-(2-((R,E)-4-(R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丁烷-1,1-二基)双(磷酸氢钠)(C3-共轭化合物1)(Sodium(4-(4-(2-((R,E)-4-(R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxybutane-1,1-diyl)bis(hydrogenphosphonate)(C3-conjugate1))

[0176] 通过混合阿仑膦酸(0.500g,2.01mmol,1当量),水(3mL),DMF(5mL)和三乙胺(0.8mL,5.74mmol,2.85当量)得到阿仑膦酸三乙基铵盐的储备溶液(pH10)。

[0177] 将NHS-酯9(0.100g,0.15mmol,1当量)溶解在DMF(0.5mL)中,然后向溶液中加入预先制备的阿仑膦酸/三乙胺(Et<sub>3</sub>N)溶液(2.6mL;阿仑膦酸:0.59mmol,4当量,三乙胺:1.69mmol,11.3当量)。然后将反应混合液在室温下搅拌并通过HPLC监测。搅拌10min后,反应完全。然后用0.1%甲酸水溶液猝灭,用2%的甲酸水溶液调节pH=6-7。然后将溶液上样至阴离子交换柱上(1gSi-TMA醋酸酯Silicycle,上样:0.94mmol/g,装入SPE柱中,通过先通入0.1M HCl/甲醇1:1(v/v),然后0.1%甲酸的水溶液进行活化)。用0.1%甲酸(3CV),甲醇/0.1%甲酸1:1(v/v)(3CV),甲醇(2CV)和甲醇/0.1M HCl(5CV)依次洗脱。然后用1M NaOH中和最后的酸性组分,真空浓缩除去甲醇。将剩余的溶液上样至12g C18反向色谱柱(RP-chromatography column)(先用甲醇,再用水活化),然后进行梯度洗脱:1.5CV的水,12CV梯度变化的0%至100%的甲醇/水,3CV 100%甲醇和3CV 甲醇/水1:1(v/v),然后冷冻干燥,得到白色固体二钠盐C3-共轭化合物1(0.103g,80%)。<sup>1</sup>HNMR(D<sub>2</sub>O,600MHz) δ7.65(d,2H,J=9.0Hz),7.48(t,1H,J=7.2Hz),7.42-7.37(m,4H),7.27(d,2H,J=7.8Hz),5.77-5.68(m,2H),5.19-5.10(m,1H),4.06(m,3H),3.80(d,1H,J=15.0Hz),3.71(d,1H,J=15.0Hz),3.37(t,2H,J=7.2Hz),3.11-3.05(m,1H),2.55-2.51(m,1H),2.31-2.19(m,4H),2.11-2.05(m,

1H), 2.02-1.94 (m, 2H), 1.91-1.86 (m, 2H), 1.58-1.05 (m, 12H);  $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 151MHz)  $\delta$ 177.3, 176.7, 171.1, 169.4, 136.8, 132.4, 131.9 (t,  $J_{\text{C-F}}=25.7\text{Hz}$ ), 130.4, 129.2, 128.0, 127.0, 125.5 (t,  $J_{\text{C-F}}=6.0\text{Hz}$ ), 123.6, 119.4 (t,  $J_{\text{C-F}}=249\text{Hz}$ ), 73.8 (t,  $J_{\text{C-F}}=33.2\text{Hz}$ ), 73.4, 61.1, 60.3, 40.3, 40.3, 40.2, 33.4, 30.6, 29.4, 27.1, 25.5, 25.0, 23.8, 23.6, 23.5, 23.1, 12.9; HRMSm/z calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  817.2672, found 817.2692; HPLC purity: 100%,  $t_{\text{R}}=2.0\text{min}$  (方法1).

[0178] 双放射性标记的C3-共轭化合物 $[\text{C}^{14}/\text{H}^3]$ -1的合成



[0179]

[0180] d)  $\text{Na}^{14}\text{CN}$  (0.33当量), TBAB (0.17当量),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  1:1 (v/v), 室温, 过夜; e) i)  $2\text{MNaOH}$  (2.8当量), ii)  $\text{HCl}_{\text{conc}}$ .

[0181] 双放射性标记的C3-共轭化合物的合成方法与未标记的共轭化合物的合成方法相同。

[0182] 4-(氰甲基)苯甲腈(4-(cyanomethyl)benzonitrile) (10)

[0183] 将四丁基溴化铵 (14mg, 0.043mmol, 0.5当量) 和氰化钠 (4.2mg, 0.085mmol, 1当量) 加入一个4mL的小瓶中, 然后加入二氯甲烷 (1.5mL), 水 (1.5mL) 和4-(溴甲基)苯甲腈(4-(bromomethyl)benzonitrile) (0.050g, 0.26mmol, 3当量)。所得到的相-转移反应体系在室温下进行剧烈搅拌过夜。将水相从有机层分离并用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 萃取两次。合并有机相并干燥。将粗产物通过装有二氧化硅的巴斯德移液管, 并用70%EtOAc/己烷洗脱, 产生无色油状的4-(氰甲基)苯甲腈 (9.2mg, 76%), 4-(氰甲基)苯甲腈凝固后为白色的固体。实验所得数据与文献 (Velcicky, J.; Soicke, A.; Steiner, R.; Schmalz, H.-G. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 6948-6951) 中描述的相似。 $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz)  $\delta$ 7.70 (d, 2H,  $J=8.5\text{Hz}$ ), 7.48 (d, 2H,  $J=$

8.5Hz), 3.84 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$ NMR (CDCl<sub>3</sub>, 151MHz)  $\delta$ 135.3, 133.0, 128.9, 118.2, 116.6, 112.5, 23.9; HPLCpurity: 91%,  $t_{\text{R}}=1.9\text{min}$  (方法1)。

[0184] 4-(羧甲基)苯甲酸(4-(Carboxymethyl)benzoic acid) (11)

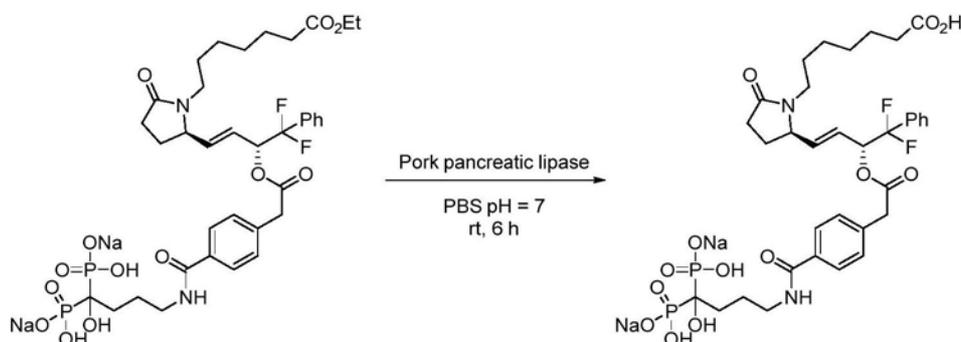
[0185] 将4-(氰甲基)苯甲腈(9.2mg, 0.065mmol)溶解在2M氢氧化钠水溶液(0.9mL, 2.8当量)中得到的混合液置于密封管中, 95°C下搅拌2h。然后室温冷却, 转移到1.5mLEppendorf®中, 并使用浓盐酸酸化至pH为2。在4°C(冰箱)冷却过夜后, 形成晶体。然后将混合物进行离心分离(8000rpm, 1min), 除去上清液。再次离心, 并除去水层。对沉淀物重复洗涤3次。对所得的湿固体进行真空干燥, 得到白色固体4-(羧甲基)苯甲酸(5.3mg, 46%)。由实验所得的数据同已经发表文章(Huh, D. H.; Jeong, J. S.; Lee, H. B.; Ryu, H.; Kim, Y. G. Tetrahedron 2002, 58, 9925-9932)相似。 $^1\text{H}$ NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 500MHz)  $\delta$ 8.00 (d, 2H, J=8.5Hz), 7.46 (d, 2H, J=8.5Hz), 3.74 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$ NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 151MHz)  $\delta$ 172.2, 167.5, 141.2, 130.5, 130.5, 130.1, 41.2; HRMSm/z calcd for C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 181.0495, found 181.0494.

[0186] 步骤a)到步骤c)同上述合成冷C3-共轭化合物1(coldC3-conjugate1)的步骤。

[0187] 酸C3-共轭化合物的合成

[0188] (4-(4-(2-(((R,E)-4-(R)-1-(6-羧基己基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丁烷-1,1-二基)双(磷酸氢钠) (Sodium(4-(4-(2-(((R,E)-4-(R)-1-(6-carboxyhexyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxybutane-1,1-diyl)bis(hydrogenphosphonate))

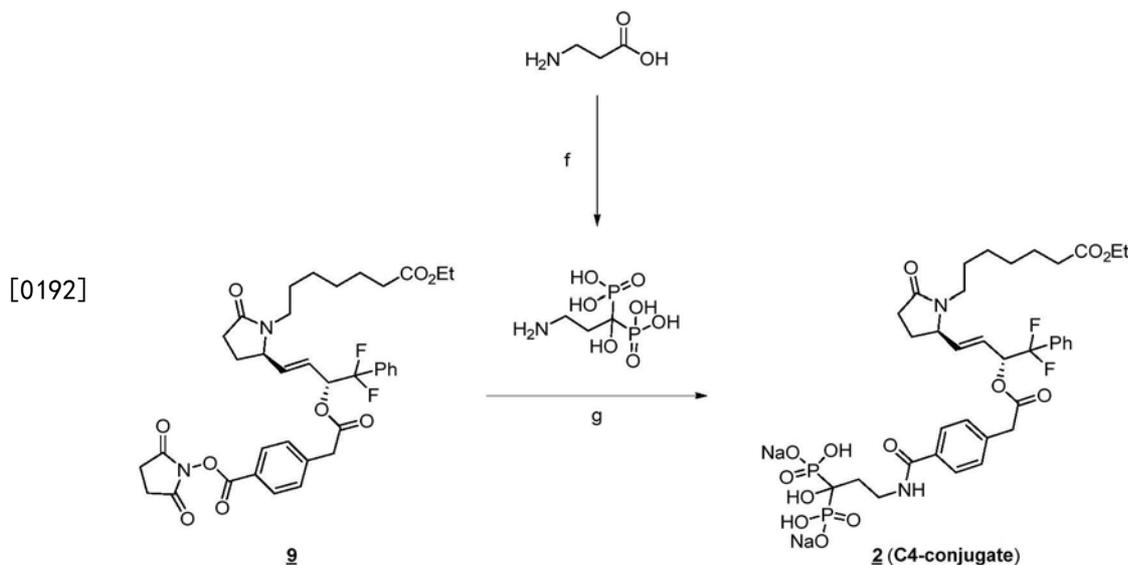
[0189]



[0190] 将C3-共轭钠盐(0.189g, 0.22mmol)溶解在磷酸缓冲溶液(pH=7)中, 然后向其中加入猪胰脂肪酶(事先用丙酮洗涤)(0.567g)。然后在室温条件下搅拌6h后直接上样至12gC18反相色谱柱(先用甲醇, 然后用水进行活化), 然后进行梯度洗脱: 1.5CV水, 12CV0%到100%梯度变化的甲醇/水, 3CV100%甲醇和3CV甲醇/水1:1(v/v)。色谱分析可以观察到4个峰。收集第3个和更大的峰的溶液, 浓缩得到几毫升无色溶液。经过连续3天冷冻干燥得到白色固体(4-(4-(2-(((R,E)-4-(R)-1-(6-羧基己基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丁烷-1,1-二基)双(磷酸氢钠) (sodium(4-(4-(2-(((R,E)-4-(R)-1-(6-carboxyhexyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxybutane-1,1-diyl)bis(hydrogen phosphonate)) (0.037g, 20%)。 $^1\text{H}$ NMR (D<sub>2</sub>O, 500MHz)  $\delta$ 7.71 (d, 2H, J=8.1Hz), 7.54 (t, 1H, J=6.8Hz), 7.48-7.43 (m, 4H), 7.34 (d, 2H, J=8.1Hz), 5.88-5.74 (m,

2H), 5.14 (dd, 1H, J=14.9, 8.9Hz), 4.19-4.14 (m, 1H), 3.87 (d, 1H, J=15.0Hz), 3.78 (d, 1H, J=15.1Hz), 3.44-3.41 (m, 2H), 3.26-3.16 (m, 1H), 2.56-2.47 (m, 1H), 2.39-2.21 (m, 2H), 2.16 (t, 2H, J=7.5Hz), 2.06-1.98 (m, 4H), 1.56-1.07 (m, 10H);  $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 151MHz)  $\delta$ 183.5, 177.3, 171.2, 169.6, 136.8, 135.7, 132.4, 131.9 (t,  $J_{\text{C-F}}=24.8\text{Hz}$ ), 130.3, 129.3, 128.0, 127.0, 125.5 (t,  $J_{\text{C-F}}=5.59\text{Hz}$ ), 123.5, 119.4 (t,  $J_{\text{C-F}}=247\text{Hz}$ ), 73.9 (t,  $J_{\text{C-F}}=32.6\text{Hz}$ ), 60.0, 40.3, 40.3, 37.0, 30.8, 29.4, 27.9, 27.1, 25.6, 25.3, 23.7, 23.4, 23.2; HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_2$  [M+H] $^+$  798.2359, found 798.2367; HPLC purity: 96%,  $t_{\text{R}}=1.7\text{min}$  (方法1).

[0191] C4-共轭化合物2的合成



[0193] f) i) 磷酸 (1当量),  $\text{PCl}_3$  (2.1当量),  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ ,  $65^\circ\text{C}$ - $70^\circ\text{C}$ , 过夜, 99%, ii)  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$  回流, 5h后加入1NNaOH水溶液, iii) 硅-对甲苯磺酸交换柱; g) 帕米膦酸 (Pamidronic acid) (4当量), 三乙胺 (11当量),  $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$  (v/v) 2:1, 室温, 30min, 60%。

[0194] (3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二基) 双(膦酸) (帕米膦酸) ((3-Amino-1-hydroxypropane-1,1-diyl) bis(phosphonic acid) (pamidronic acid))

[0195] 将3-氨基丙酸 (1.00g, 11.2mmol, 1当量) 和磷酸 (0.920g, 11.2mmol, 1当量) 溶于甲基磺酸 (4.7mL), 所得混合物在 $65^\circ\text{C}$ 下加热。在搅拌下缓慢加入三氯化磷 (2.06mL, 23.6mmol, 2.1当量)。待加入完全后, 升温至 $70^\circ\text{C}$ , 在氩气氛下, 保持相同温度搅拌过夜。将得到的澄清无色的溶液冷却至 $25^\circ\text{C}$ , 并在剧烈搅拌下在 $0-5^\circ\text{C}$ 用水 (4mL) 猝灭。然后将所得的混合溶液进行回流5h。将溶液冷却至 $20^\circ\text{C}$ , 用1N氢氧化钠溶液调节溶液pH为2。然后向混合溶液中加入甲醇, 形成沉淀。在 $4^\circ\text{C}$ 下老化过夜。将沉淀滤出, 并用甲醇洗涤。然后将白色固体溶于水中, 并装载至预先用100%甲醇和100%水冲洗的阳离子交换柱(硅-对甲苯磺酸 $40-63\mu\text{m}$ ,  $0.55\text{mmol/g}$ )。用水洗脱。将最终溶液冷冻干燥, 得到白色固体状游离酸形式的帕米膦酸 (2.619g, 99%)。  $^1\text{H}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz)  $\delta$ 3.30 (t, 2H, J=6.9Hz), 2.33-2.22 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 151MHz)  $\delta$ 71.7 (t,  $J_{\text{C-P}}=140\text{Hz}$ ), 35.3 (t,  $J_{\text{C-P}}=7.40\text{Hz}$ ), 30.0;  $^{31}\text{P}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 162MHz)  $\delta$ 17.6; HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_7\text{P}_2$  [M+H] $^+$  236.0084, found 236.0081.

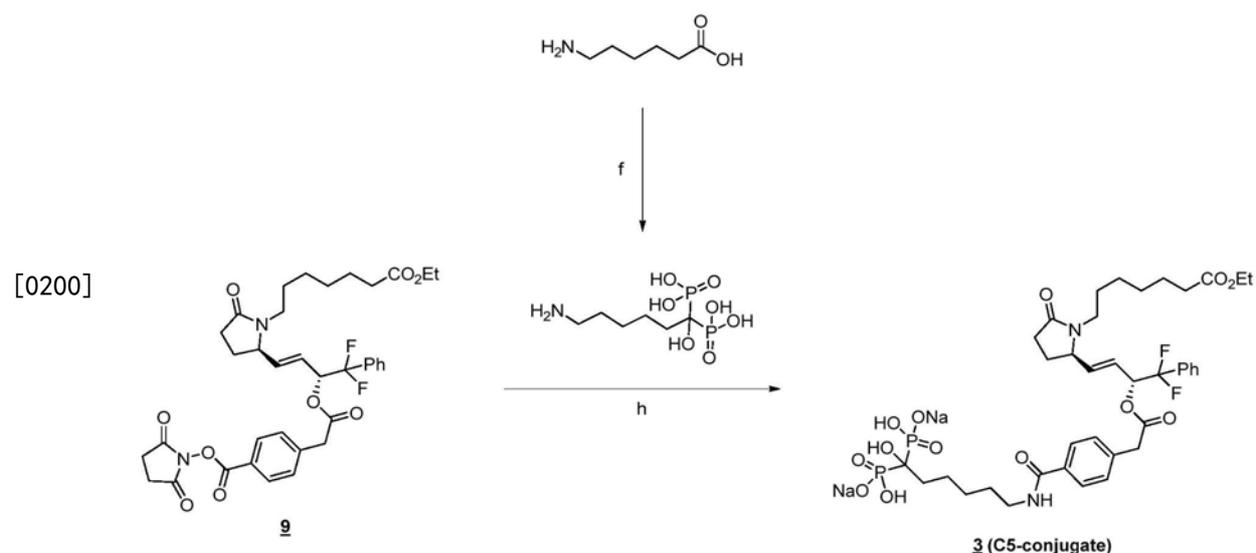
[0196] (3-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二基)

双(磷酸氢钠)(C4-共轭化合物2)(Sodium(3-(4-(2-(((R,E)-4-((R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxypropane-1,1-diyl)bis(hydrogenphosphonate)(C4-conjugate2))

[0197] 混合帕米磷酸(0.500g, 2.13mmol, 1当量), 水(3mL), DMF(5mL)和三乙胺(0.8mL, 5.74mmol, 2.70当量), 得到帕米磷酸三乙基铵盐的储备溶液(pH10)。

[0198] 将NHS-酯9(0.050g, 0.07mmol, 1当量)溶解在DMF(0.25mL)中, 然后向其中加入预先配好的储备溶液帕米磷酸/Et<sub>3</sub>N(1.3mL; 帕米磷酸:0.30mmol, 4当量, 三乙胺:0.81mmol, 11当量)。将反应混合溶液直接装载至12g的C18反相色谱柱上(先用甲醇, 然后用水进行活化), 然后进行梯度洗脱:1.5CV的水, 10CV0%至100%梯度变化的甲醇/水, 3CV100%甲醇和3CV甲醇/水1:1(v/v), 得到C4-共轭化合物三乙基铵盐。然后将后者上样至事先用100%甲醇, 100%水和5%NaCl水溶液冲洗的阳离子交换柱(0.32g硅-对甲苯磺酸40-63μm, 0.68mmol/g)。然后用甲醇/水1:1(v/v)洗脱。收集pH7的溶液, 并真空浓缩除去甲醇, 然后装载至12g的C18反相色谱柱上(先用甲醇, 然后用水进行活化), 然后进行梯度洗脱:1.5CV水, 10CV0%到100%梯度变化的甲醇/水, 3CV100%甲醇和3CV甲醇/水1:1(v/v), 冷冻干燥后得到白色固体状C4-共轭化合物2二钠盐(0.040g, 60%)。<sup>1</sup>HNMR(D<sub>2</sub>O, 600MHz) δ7.75(d, 2H, J=7.8Hz), 7.57-7.55(m, 1H), 7.48-7.43(m, 4H), 7.33(d, 2H, J=7.8Hz), 5.84-5.80(m, 1H), 5.77(dd, 1H, J=15.0, 6.0Hz), 5.28(dd, 1H, J=15.0, 9.0Hz), 4.15-4.11(m, 3H), 3.86(d, 1H, J=15.0Hz), 3.79-3.74(m, 2H), 3.19-3.14(m, 1H), 2.65-2.61(m, 1H), 2.38-2.26(m, 6H), 2.19-2.13(m, 1H), 1.58-1.46(m, 3H), 1.36-1.15(m, 10H); <sup>13</sup>CNMR(D<sub>2</sub>O, 151MHz) δ177.3, 176.6, 171.0, 168.9, 136.7, 136.0, 132.4, 131.9(t, J<sub>C-F</sub>=25.1Hz), 130.4, 129.2, 128.0, 127.0, 125.4(t, J<sub>C-F</sub>=5.9Hz), 123.6, 119.4(t, J<sub>C-F</sub>=248Hz), 73.9(t, J<sub>C-F</sub>=32.6Hz), 72.6(t, J<sub>C-F</sub>=132Hz), 61.0, 60.3, 40.3, 40.2, 35.8(t, J<sub>C-F</sub>=7.9Hz), 33.4, 32.4, 29.4, 27.2, 25.5, 25.0, 23.8, 23.6, 12.9; HRMSm/z calcd for C<sub>35</sub>H<sub>47</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>P<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>803.2514, found 803.2516; HPLCpurity:100%, t<sub>R</sub>=2.1min(方法1)。

[0199] C5-共轭化合物3的合成



f) i) 磷酸(1当量), PCl<sub>3</sub>(2.1当量), CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, 65°C-70°C, 过夜, 47%, ii) H<sub>2</sub>O, 0°C回流, 5h后

加入1NNaOH水溶液,iii) 硅-对甲苯磺酸交换柱;h) 帕米膦酸(4当量),三乙胺(13当量),DMF/H<sub>2</sub>O(v/v) 2:1,室温,30min,60%。

[0201] (6-氨基-1-羟基己烷-1,1-二基)双(膦酸)(奈立膦酸)((6-Amino-1-hydroxyhexane-1,1-diyl)bis(phosphonic acid)(neridronic acid))

[0202] 将3-氨基己酸(0.500g,3.81mmol,1当量)和磷酸(0.313g,3.81mmol,1当量)溶于甲磺酸(1.6mL),将所得混合液在惰性气氛下65℃加热。搅拌下缓慢加入三氯化磷(0.67mL,8.00mmol,2.1当量)。待加入完全后,升温至70℃,在氩气保护下,在相同温度下搅拌过夜。将得到的澄清无色的溶液冷却至25℃,并在剧烈搅拌下在0-5℃用水(4mL)猝灭。然后将所得的溶液进行回流5h。将溶液冷却至20℃,然后加入1N氢氧化钠溶液调节溶液pH为2。然后向混合溶液中加入甲醇,形成沉淀。在4℃下老化过夜。将沉淀滤出,用甲醇洗涤得。然后将白色固体溶解在水中,并上样至事先用100%甲醇和100%水冲洗的阳离子交换柱(硅-对甲苯磺酸40-63μm,0.55mmol/g)。用水洗脱,将最终溶液冷冻干燥,得到白色固体状游离酸形式的奈立膦酸(0.500g,47%)。<sup>1</sup>HNMR(D<sub>2</sub>O,500MHz) δ3.00(t,2H,J=7.4Hz),1.93(m,2H),1.72-1.66(m,2H),1.64-1.58(m,2H),1.43-1.37(m,2H);<sup>13</sup>CNMR(D<sub>2</sub>O,126MHz) δ74.1(t,J<sub>C-P</sub>=134.8Hz),39.3,33.4,26.3,26.2,22.9(t,J<sub>C-P</sub>=6.3Hz);<sup>31</sup>PNMR(D<sub>2</sub>O,162MHz) δ19.3;HRMSm/zcalcdforC<sub>6</sub>H<sub>18</sub>N<sub>0</sub>P<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>278.0553,found278.0566.

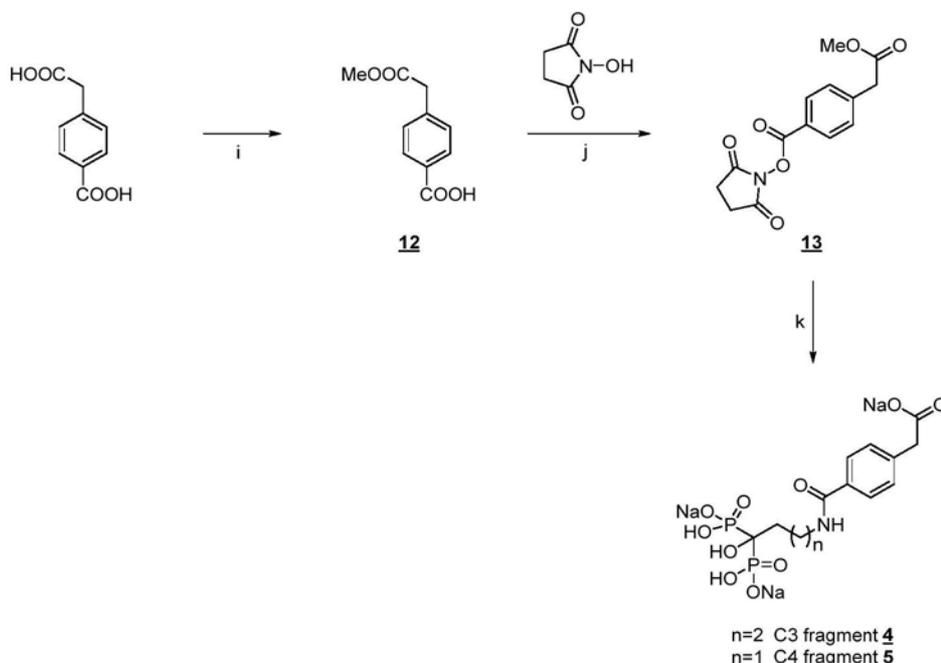
[0203] (6-(4-(2-((R,E)-4-(R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基己烷-1,1-二基)双(膦酸氢钠)(C5-共轭化合物3)((Sodium(6-(4-(2-((R,E)-4-(R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxyhexane-1,1-diyl)bis(hydrogen phosphonate)(C5-conjugate3))

[0204] 混合奈立膦酸(0.500g,1.80mmol,1当量),水(3mL),DMF(5mL)和三乙胺(0.8mL,5.74mmol,3.19当量),得到奈立膦酸三乙基铵盐的储备溶液(pH10)。

[0205] 将NHS-酯9(0.050g,0.07mmol,1当量)溶解在DMF(0.25mL)中,然后向溶液中加入预先配好的储备溶液奈立膦酸/Et<sub>3</sub>N(1.4mL;帕米膦酸:0.29mmol,4当量,三乙胺:0.91mmol,13当量)。将反应混合液直接上样至12g的C18反相色谱柱(先用甲醇,然后用水进行活化,然后进行梯度洗脱:1.5CV水,10CV0%至100%梯度变化的甲醇/水,3CV100%甲醇和3CV甲醇/水1:1(v/v)),得到C4-共轭化合物三乙基铵盐。然后将后者上样至事先用100%甲醇,100%水和5%NaCl水溶液冲洗的阳离子交换柱上(0.32g硅-对甲苯磺酸(Tosicacid)40-63μm,0.68mmol/g)。然后用体积比1:1的甲醇/水洗脱。收集pH7的溶液,真空浓缩除去甲醇,然后上样至12g的C18反相色谱柱(先用甲醇,然后用水进行活化,然后进行梯度洗脱:1.5CV水,10CV0%至100%梯度变化的甲醇/水,3CV100%甲醇和3CV甲醇/水1:1(v/v),冷冻干燥,得到白色固体状C5-共轭化合物3的二钠盐(0.034g,55%)。<sup>1</sup>HNMR(D<sub>2</sub>O,500MHz) δ7.68(d,2H,J=8.0Hz),7.55-7.52(m,1H),7.48-7.42(m,4H),7.33(d,2H,J=8.0Hz),5.82-5.73(m,2H),5.13-5.08(m,1H),4.14-4.10(m,3H),3.87(d,1H,J=15.0Hz),3.76(d,1H,J=15.0Hz),3.45-3.35(m,2H),3.15-3.10(m,1H),2.59-2.54(m,1H),2.37-2.10(m,5H),1.99-1.91(m,2H),1.70-1.62(m,4H),1.56-1.51(m,2H),1.44-1.40(m,3H),1.34-1.28(m,1H),1.24-1.10(m,8H);<sup>13</sup>CNMR(D<sub>2</sub>O,151MHz) δ176.9,175.8,170.3,168.6,136.6,136.5,132.4,

132.2 (t,  $J_{C-F}=25.2\text{Hz}$ ), 130.3, 129.1, 128.0, 126.9, 125.3 (t,  $J_{C-F}=5.6\text{Hz}$ ), 123.6, 119.3 (t,  $J_{C-F}=248\text{Hz}$ ), 73.8 (t,  $J_{C-F}=33.0\text{Hz}$ ), 73.8 (t,  $J_{C-F}=134\text{Hz}$ ), 60.8, 60.2, 40.2, 40.0, 39.6, 33.4, 33.1, 29.4, 28.0, 27.4, 26.7, 25.7, 25.2, 23.9, 23.7, 22.8, 13.0; HRMSm/z calcd for  $C_{38}H_{53}F_2N_2O_{13}P_2$   $[M+H]^+$  845.2985, found 845.2971; Purity: 100%,  $t_R=2.1\text{min}$  (方法 1)。

[0206] C3片段4和C4片段5的合成



[0207]

[0208] i)  $\text{SOCl}_2$  (5mol%), 甲醇, 室温, 过夜 91%; j) NHS (2.7当量), EDC1 (2.7当量), DMF, 室温, 3.5h, 97%; k) i) 阿仑膦酸或帕米膦酸 (4当量),  $\text{Et}_3\text{N}$  (11.8当量), DMF/ $\text{H}_2\text{O}$ :1 (v/v), 室温, 30min, 71%, ii)  $1\text{MNaOH}$  (4当量/ $\text{H}_2\text{O}$ :1 (v/v)), 室温, 过夜, 55%。

[0209] 4-(2-甲氧基-2-氧代乙基)苯甲酸 (4-(2-Methoxy-2-oxoethyl)benzoic acid (12))

[0210] 将4-(羧甲基)苯甲酸 (1.00g, 5.55mmol, 1当量) 溶解在甲醇 (11mL) 中, 然后加入亚硫酸氯 (0.020mL, 0.28mmol, 5mol%)。将反应混合液在室温下搅拌过夜。然后减压蒸发除去溶剂, 将剩余物质放入甲基叔丁基醚 (MTBE) 中, 用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤三次, 用水洗涤 1次。将合并的碳酸氢盐和水提物用  $1\text{NHCl}$  酸化, 直至沉淀出单甲酯。混合物用甲基叔丁基醚萃取 3次, 合并有机相。用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 减压浓缩, 得到白色固体 4-(2-甲氧基-2-氧代乙基)苯甲酸 12 (0.985g, 91%)。 $^1\text{HNMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  8.08 (d, 2H,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 7.40 (d, 2H,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 3.72 (s, 5H)。The data were similar to that described in W02005/12220。

[0211] 2,5-二氧代吡咯烷-1-基-4-(2-甲氧基-2-氧代乙基)苯甲酸盐 (13) (2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-(2-methoxy-2-oxoethyl)benzoate (13))

[0212] 将一元酸 12 (0.917g, 4.72mmol, 1当量) 溶于 DMF (107mL) 中, 然后加入  $N$ -羟基丁二酰亚胺 (1.47g, 12.8mmol, 2.7当量) 和  $N$ -(3-二甲氨基氨基-丙基)- $N'$ -乙基碳二亚胺盐酸盐 ( $N$ -(3-dimethylamino-propyl)- $N'$ -ethylcarbodiimidehydrochloride) (2.44g, 12.8mmol, 2.7当量)。将反应混合液在氩气气氛下, 室温搅拌 3.5h。得到的无色混合溶液, 用  $\text{EtOAc}$  和水稀释。然后用  $\text{EtOAc}$  萃取 3次。合并的有机相用水洗三次, 经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 减压浓缩,

得到淡黄色油状NHS-酯13 (1.329g, 97%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz) δ 8.10 (d, 2H, J=8.1Hz), 7.44 (d, 2H, J=8.1Hz), 3.72 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.90 (s, 4H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 151MHz) δ 169.9, 168.3, 160.8, 140.5, 130.0, 129.0, 123.2, 51.5, 40.4, 24.8; C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 292.0816, found 292.0824; C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 309.1081, found 309.1084; Purity: 100%, t<sub>R</sub> = 2.4min.

[0213] 2-(4-((4-羟基-4,4-双(羟基氧基磷酰基)丁基)氨基甲酰基)苯基)乙酸钠(C3片段4) (Sodium 2-(4-((4-hydroxy-4,4-bis(hydroxyoxidophosphoryl)butyl)carbamoyl)phenyl)acetate (C3 fragment 4))

[0214] 混合阿仑膦酸 (1.00g, 4.02mmol, 1当量), 水 (6mL), DMF (10mL) 和三乙胺 (1.6mL, 11.5mmol, 2.85当量), 得到阿仑膦酸三乙基铵盐的储备溶液 (pH10)。

[0215] 将NHS-酯13 (0.200g, 0.69mmol, 1当量) 溶解在DMF (1mL) 中, 然后向溶液中加入预先配好的阿仑膦酸/Et<sub>3</sub>N溶液 (12.5mL; 阿仑膦酸: 2.86mmol, 4当量, 三乙胺: 8.17mmol, 11.8当量)。反应混合液在室温下搅拌并通过HPLC监测。搅拌30min后, 反应完全。然后用0.1%甲酸水溶液猝灭。用2%甲酸水溶液调节pH=6-7。然后将溶液上样至阴离子交换柱 (6.2g Si-TMA醋酸酯 Silicycle, 负载量: 1.16mmol/g, 装入SPE柱中, 先通过0.1M HCl/甲醇1:1 (v/v) 然后用0.1%甲酸水溶液活化)。然后进行梯度洗脱: 0.1%甲酸 (3CV), 甲醇/0.1%甲酸1:1 (v/v) (3CV), 甲醇 (2CV) 和甲醇/0.1M HCl (5CV)。然后用1M NaOH中和最后的酸性组分, 真空浓缩除去甲醇。将剩余溶液上样至12g C18反向色谱柱 (先用甲醇, 再用水活化), 然后进行梯度洗脱: 1.5CV水, 12CV 0%到100%梯度变化的甲醇/水, 3CV 100%甲醇和3CV 甲醇/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v), 得到中间体甲酯C3片段。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 600MHz) δ 7.77 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.44 (d, 2H, J=8.4Hz), 3.85 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.45 (t, 2H, J=6.0Hz), 2.06-2.05 (m, 2H); 1.99-1.95 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 151MHz) δ 174.4, 170.2, 137.3, 132.4, 129.2, 127.0, 126.8, 52.2, 40.2, 39.7, 30.6, 23.1; C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 426.0713, found 426.0701.

[0216] 将中间体甲酯C3片段溶解在水 (大约3mL) 中, 加入1M NaOH水溶液 (2.7mL, 2.74mmol, 4当量)。室温搅拌过夜。然后加入1M HCl使pH呈中性。然后将混合液上样至25g的C18反向色谱柱 (先用甲醇, 然后用水活化), 然后进行梯度洗脱: 1.5CV水, 12CV 0%至100%梯度变化的甲醇/水, 3CV 100%甲醇和3CV 甲醇/水1:1 (v/v), 冷冻干燥, 得到白色固体状C3片段4的三钠盐 (0.310g, 95%)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 600MHz) δ 7.74 (d, 2H, J=8.1Hz), 7.40 (d, 2H, J=8.1Hz), 3.62 (s, 2H), 3.44 (t, 2H, J=6.7Hz), 2.19-1.79 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 151MHz) δ 179.8, 170.4, 140.9, 131.5, 128.9, 126.8, 73.4 (t, J<sub>C-P</sub>=132Hz), 43.9, 40.3, 30.9, 23.2 (t, J<sub>C-P</sub>=6.1Hz); C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 412.0557, found 412.0568; purity: 100%.

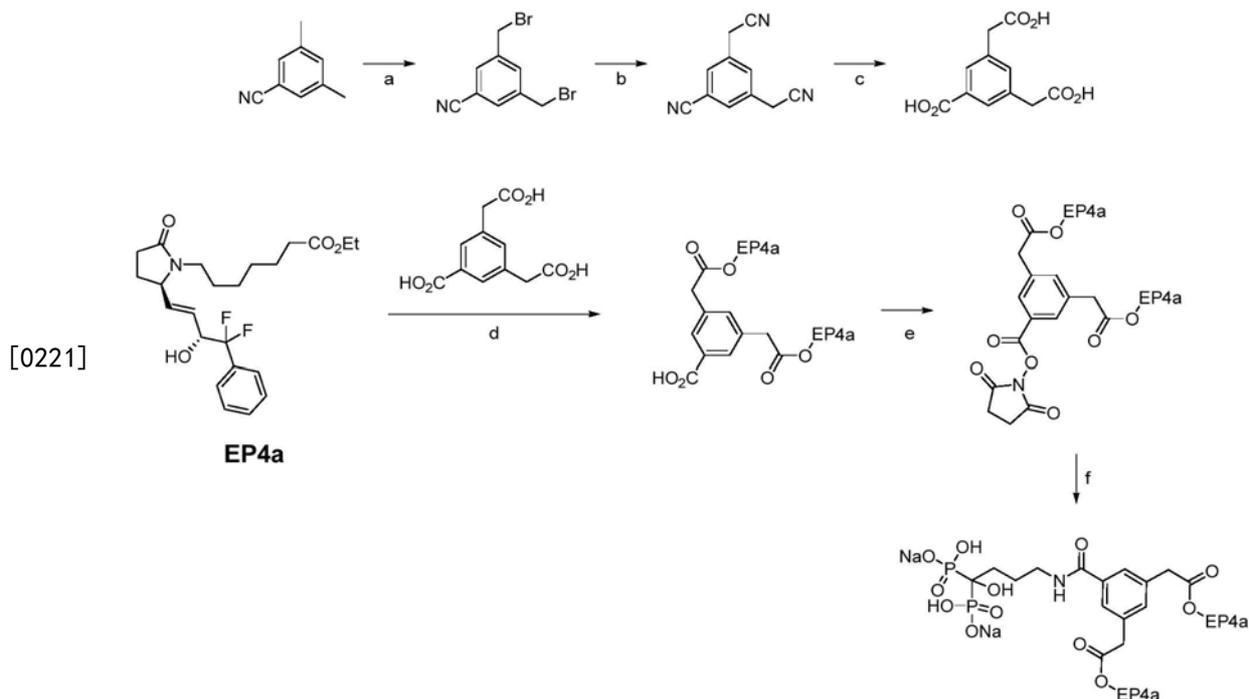
[0217] 2-(4-((3-羟基-3,3-双(羟基氧基磷酰基)丙基)氨基甲酰基)苯基)乙酸钠(C4片段5) (Sodium 2-(4-((3-hydroxy-3,3-bis(hydroxyoxidophosphoryl)propyl)carbamoyl)phenyl)acetate (C4 fragment 5))

[0218] 混合帕米膦酸 (0.500g, 2.13mmol, 1当量), 水 (3mL), DMF (5mL) 和三乙胺 (0.8mL, 5.74mmol, 2.70当量), 得到帕米膦酸三乙基铵盐的储备溶液 (pH10)。

[0219] 将NHS-酯13 (0.050g, 0.17mmol, 1当量) 溶解在DMF (0.25mL) 中, 然后加入预先配好的阿仑膦酸/Et<sub>3</sub>N溶液 (2.9mL; 阿仑膦酸: 0.70mmol, 4当量, 三乙胺: 2.00mmol, 11.8当量)。然后在室温下搅拌并通过HPLC监测。搅拌30min后, 反应完全。用0.1%甲酸水溶液猝灭。然

后用2%甲酸水溶液调节pH=6-7。然后将溶液装载至阴离子交换柱上(1.22gSi-TMA醋酸酯 Silicycle,负载量:1.16mmol/g,装入SPE柱中,先通过0.1MHC1/甲醇1:1(v/v)然后用0.1%甲酸水溶液活化)。然后进行梯度洗脱:0.1%甲酸(3CV),甲醇/0.1%甲酸1:1(v/v)(3CV),甲醇(2CV)和甲醇/0.1MHC1(5CV)。然后用1MNaOH中和最后的酸性组分,真空浓缩除去甲醇。将剩余溶液上样至12gC18反向色谱柱(先用甲醇,再用水活化),然后进行梯度洗脱:1.5CV水,12CV0%至100%梯度变化的甲醇/水,3CV100%甲醇和3CV甲醇/水1:1(v/v),得到中间体甲酯C4片段。<sup>1</sup>HNMR(D<sub>2</sub>O,400MHz)δ7.75(d,2H,J=8.1Hz),7.41(d,2H,J=8.1Hz),3.82(s,2H),3.74-3.67(m,5H),2.41-2.21(m,2H);C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>10</sub>P<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>412.0557,found412.0566。将酯C4片段溶解在水(大约1mL)中,并加入1MNaOH水溶液(0.7mL,0.68mmol,4当量)。室温搅拌过夜。然后加入1MHC1使pH呈中性。然后将混合液上样至4g的C18反相色谱柱(先用甲醇,然后用水活化),然后进行梯度洗脱:1.5CV水,12CV0%至100%梯度变化的甲醇/水,3CV100%甲醇和3CV甲醇/水1:1(v/v),冷冻干燥,得到C4片段5的三钠盐(0.056g,71%)。<sup>1</sup>HNMR(D<sub>2</sub>O,600MHz)δ7.77(d,2H,J=8.0Hz),7.41(d,2H,J=8.0Hz),3.73(t,2H,J=7.5Hz),3.62(s,2H),2.35-2.16(m,2H);<sup>13</sup>CNMR(D<sub>2</sub>O,151MHz)δ179.8,169.8,140.9,131.5,128.9,126.8,72.6(t,J<sub>C-P</sub>=128Hz),43.9,36.0(t,J<sub>C-P</sub>=8.1Hz),32.5;C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>10</sub>P<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>398.0400,found398.0407;purity:100%。

[0220] 带有两个EP4激动剂的酰胺连接的C3共轭化合物的合成



[0222] 3,5-双(溴甲基)苯甲腈(3,5-Bis(bromomethyl)benzonitrile)

[0223] 将3,5-二甲基苯腈(1.00g,7.62mmol,1当量)溶解在1,2-二氯乙烷(76mL)中,加入N-溴代丁二酰亚胺(2.98g,16.8mmol,2.2当量)和偶氮二异丁腈(0.250g,1.52mmol,0.2当量)。将反应混合物在氩气氛围下80℃搅拌9小时。将H<sub>2</sub>O加入到用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>萃取三次的介质中。用盐水(brine)洗涤合并的有机层,然后用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,减压浓缩。残渣通过快速色谱(25gBioTageHPSil柱,2%至15%梯度变化的EtOAc/己烷,20CV)纯化,产生白色晶体状3,5-二(溴甲基)苯甲腈(0.618g,28%)。类似的数据已在文献中记载。高相液相色谱法纯度:

99%,  $t_R=2.9\text{min}$  (方法1)。如文献 (Easson, M.W.; Fronczek, F.R.; Jensen, T.; Vicente, M.G.H. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 3191-3208) 中记载了类似数据。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz)  $\delta$  7.64 (s, 1H), 7.61 (d, 2H,  $J=1.2\text{Hz}$ ), 4.45 (s, 4H); HPLC purity: 99%,  $t_R=2.9\text{min}$  (方法1)。Similar data as described in literature (Easson, M.W.; Fronczek, F.R.; Jensen, T.; Vicente, M.G.H. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 3191-3208)。

[0224] 2,2'-(5-氰基-1,3-亚苯基)二乙腈 (2,2'-(5-Cyano-1,3-phenylene) diacetonitrile)

[0225] 将3,5-二(溴甲基)苄腈 (0.581g, 2.01mmol, 1当量) 溶解在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  1:1 (v/v) (30mL) 混合液中, 加入四丁基溴化铵 (0.648g, 2.01mmol, 1当量) 和氰化钠 (0.207g, 4.22mmol, 2.1当量)。相转移反应体系在室温下剧烈搅拌过夜。将水相从有机层分离, 并用 DCM 萃取三次。将合并的有机层 (包括来自反应混合物的) 在减压下浓缩。通过快速色谱法 (12g BioTage HPSil 柱, 15% 至 50% 梯度变化的 EtOAc/己烷) 纯化粗产物, 产生白色晶体状 2,2'-(5-氰基-1,3-亚苯基)二乙腈 (2,2'-(5-cyano-1,3-phenylene) diacetonitrile) (0.215g, 59%)。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  7.65-7.64 (m, 2H), 7.60-7.59 (m, 1H), 3.85 (s, 4H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 101MHz)  $\delta$  133.0, 132.0, 131.3, 117.2, 116.4, 114.5, 23.4; HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_3\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$  204.0532, found 204.0542; HPLC purity: 100%,  $t_R=1.6\text{min}$  (方法1)。

[0226] 2,2'-(5-羧基-1,3-亚苯基)二乙酸 (2,2'-(5-Carboxy-1,3-phenylene) diacetic acid)

[0227] 将 2,2'-(5-氰基-1,3-亚苯基)二乙腈 (2,2'-(5-cyano-1,3-phenylene) diacetonitrile) (0.215g, 1.19mmol, 1当量) 溶于 2M 氢氧化钠水溶液 (15mL, 30.0mmol, 25当量) 中, 加热回流 4 小时。冷却后, 使用浓盐酸将溶液酸化至 pH 2。然后用 EtOAc 萃取三次。合并有机层用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 并减压浓缩, 产生白色固体 2,2'-(5-羧基-1,3-亚苯基)二乙酸 (0.283g, 定量)。 $^1\text{H NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 400MHz)  $\delta$  7.92 (d, 2H,  $J=1.6\text{Hz}$ ), 7.52 (t, 1H,  $J=1.6\text{Hz}$ ), 3.74 (s, 4H);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO, 101MHz)  $\delta$  172.5, 167.2, 135.5, 135.0, 130.8, 128.8, 21.1; HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_6 [\text{M}+\text{H}]^+$  237.0405, found 204.0536。

[0228] 二乙基 7,7'-((5R,5'R)-((1E,1'E,3R,3'R)-((2,2'-(5-((2,5-二氧代吡咯烷基-1-基)氧基)羰基)-1,3-亚苯基)双(乙酰基))双(氧基))双(4,4-二氟-4-苯基丁-1-烯-3,1-二基))双(2-氧代吡咯烷基-5,1-二基))二庚酸酯 (Diethyl 7,7'-((5R,5'R)-((1E,1'E,3R,3'R)-((2,2'-(5-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy) carbonyl)-1,3-phenylene) bis(acetyl)) bis(oxy)) bis(4,4-difluoro-4-phenylbut-1-ene-3,1-diyl)) bis(2-oxopyrrolidine-5,1-diyl)) diheptanoate)

[0229] 将 EP4 激动剂 乙基 7-((R)-2-((R,E)-4,4-二氟-3-羟基-4-苯基丁-1-烯-1-基)-5-氧代吡咯烷基-1-基)庚酸酯 (ethyl 7-((R)-2-((R,E)-4,4-difluoro-3-hydroxy-4-phenylbut-1-en-1-yl)-5-oxopyrrolidin-1-yl) heptanoate) (0.356g, 0.84mmol, 2当量) 和 2,2'-(5-羧基-1,3-亚苯基)二乙酸 (2,2'-(5-carboxy-1,3-phenylene) diacetic acid) (0.100g, 0.42mmol, 1当量) 加入蒸馏的二氯甲烷 (2mL) 中, 并依次加入吡啶 (0.159mL, 1.97mmol, 4.7当量), DMAP (0.002g, 0.02mmol, 0.04当量), 然后加入 DCC (0.260g, 1.26mmol, 3当量)。将反应混合物在氮气气氛下室温搅拌 3h, 然后浓缩至干燥。将残渣用 MTBE 溶解, 并将混合物通过 Celite<sup>®</sup> 过滤。滤渣用 MTBE 洗涤。滤液用 0.5M 柠檬酸/水 1:1 (v/v) 的溶液洗涤。

将水层用MTBE萃取两次。合并的有机层用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,并减压浓缩,产生无色油状3,5-双(2-((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基))-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酸(3,5-bis(2-((R,E)-4-((R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzoic acid),无需进一步纯化,直接用于下一步骤。

[0230] 将粗产物(0.440g,0.42mmol,1当量)溶于DMF(9mL)中。向该溶液中加入N-羟基丁二酰亚胺(0.386g,3.36mmol,8当量)和N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI)(0.643g,3.36mmol,8当量)。将反应混合物在室温下在氩气氛下搅拌过夜。所得红色溶液用水和EtOAc稀释。水层用EtOAc萃取四次。将合并的有机层用饱和NaCl水溶液洗涤四次,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,并浓缩至干燥。然后通过快速色谱法(12g BioTage HP Sil柱,0%至15%梯度变化的MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,20CV)纯化粗产物,然后进行第二次快速色谱法(12gBioTageHPSil柱,90%至100%梯度变化的AcOEt/己烷,20CV,然后1%至15%梯度变化的MeOH/EtOAc,20CV),得到浅粉色油状二乙基7,7'-((5R,5'R)-((1E,1'E,3R,3'R)-((2,2'-(5-((2,5-二氧代吡咯烷基-1-基)氧基)羰基)-1,3-亚苯基)双(乙酰基))双(氧基))双(4,4-二氟-4-苯基丁-1-烯-3,1-二基))双(2-氧代吡咯烷基-5,1-二基))二庚酸酯(diethyl7,7'-((5R,5'R)-((1E,1'E,3R,3'R)-((2,2'-(5-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-1,3-phenylene)bis(acetyl))bis(oxy))bis(4,4-difluoro-4-phenylbut-1-ene-3,1-diyl))bis(2-oxopyrrolidine-5,1-diyl))diheptanoate)(0.265g,55%)。<sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>,400MHz)δ 7.80(s,2H),7.45-7.25(m,11H),5.80-5.46(m,6H),4.07(q,4H,J=7.1Hz),4.00-3.95(m,2H),3.73-3.55(m,4H),3.46-3.30(m,2H),2.88(s,4H),2.58-2.51(m,2H),2.33-2.21(m,8H),2.17-2.05(m,2H),1.65-1.52(m,6H),1.40-1.16(m,18H);<sup>13</sup>CNMR(CDCl<sub>3</sub>,101MHz)δ 174.7,173.6,169.2,168.5,161.2,138.0,136.7,134.5,133.2(t,J<sub>C-F</sub>=37.9Hz),130.5,130.1,128.3,125.9,125.5(t,J<sub>C-F</sub>=9.5Hz),123.7,119.2(t,J<sub>C-F</sub>=373Hz),74.5(t,J<sub>C-F</sub>=47.1Hz),60.1,59.6,40.3,40.3,34.1,29.7,28.6,26.9,26.3,25.6,25.0,24.7,14.1;HRMSm/zcalcdforC<sub>61</sub>H<sub>72</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>[M+H]<sup>+</sup>1146.4945,found1146.4918;HPLCpurity:97%,t<sub>R</sub>=1.7min(方法2)。

[0231] (4-((3,5-双(2-((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基))-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丁烷-1,1-二基)双(膦酸氢钠)(Sodium(4-(3,5-bis(2-((R,E)-4-((R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxybutane-1,1-diyl)bis(hydrogen phosphonate))

[0232] 混合阿仑膦酸(0.500g,2.01mmol,1当量),水(3mL),DMF(5mL)和三乙胺(0.8mL,5.74mmol,2.85当量),得到阿仑膦酸三乙基铵盐的储备溶液(pH10)。

[0233] 向含有二乙基7,7'-((5R,5'R)-((1E,1'E,3R,3'R)-((2,2'-(5-((2,5-二氧代吡咯烷基-1-基)氧基)羰基)-1,3-亚苯基)双(乙酰基))双(氧基))双(4,4-二氟-4-苯基丁-1-烯-3,1-二基))双(2-氧代吡咯烷基-5,1-二基))二庚酸酯(diethyl7,7'-((5R,5'R)-((1E,1'E,3R,3'R)-((2,2'-(5-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-1,3-phenylene)bis(acetyl))bis(oxy))bis(4,4-difluoro-4-phenylbut-1-ene-3,1-diyl))bis(2-oxopyrrolidine-5,1-diyl))diheptanoate)(0.025g,0.022mmol,1当量)的DMF

(0.25mL) 溶液中,加入预先制备的阿仑膦酸/ $\text{Et}_3\text{N}$ (0.78mL;阿仑膦酸:0.18mmol,8当量,三乙胺:0.51mmol,23当量)。将反应混合物在室温下搅拌并通过HPLC监测。1.5h后,用0.1%甲酸水溶液将该溶液稀释6-8倍,最后用2%甲酸溶液中和,得到中性pH值,将其上样至阴离子交换柱上(0.6gSi-TMA乙酸酯Silicycle,负载:0.94mmol/g,通过通入甲醇,0.1M $\text{HCl}$ /甲醇1:1(v/v),然后0.1%甲酸水溶液活化)。用0.1%甲酸(5CV),甲醇/0.1%甲酸1:1(v/v)(5CV),甲醇(3CV)和甲醇/0.1M $\text{HCl}$ (7CV)依次洗脱。向最后一个酸相的组分中加入1M $\text{NaOH}$ ,使pH升高至7。将混合物减压浓缩以除去甲醇,并获得体积较小的溶液,将其加载至12gC18反相色谱柱(先用甲醇,然后用水活化),进行梯度洗脱:1.5CV水,12CV0%至100%梯度变化的甲醇/水,3CV100%甲醇和3CV甲醇/水1:1(v/v)。观察到一个峰,收集并浓缩,得到几毫升的无色溶液,将其冷冻干燥48h,以得到白色固体(4-((3,5-双(2-((R,E)-4-((R)-1-(7-乙氧基-7-氧代庚基)-5-氧代吡咯烷基-2-基)-1,1-二氟-1-苯基丁-3-烯-2-基)氧基)-2-氧代乙基)苯甲酰氨基)-1-羟基丁烷-1,1-二基)双(膦酸氢钠)(sodium(4-(3,5-bis(2-((R,E)-4-((R)-1-(7-ethoxy-7-oxoheptyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl)-1,1-difluoro-1-phenylbut-3-en-2-yl)oxy)-2-oxoethyl)benzamido)-1-hydroxybutane-1,1-diyl)bis(hydrogenphosphonate))(0.013g,46%)。 $^1\text{H}$ NMR( $\text{D}_2\text{O}$ ,500MHz) $\delta$ 7.57(s,2H),7.39-7.30(m,10H),6.95(s,1H),5.78-5.73(m,2H),5.59(dd,2H, $J=14.7,6.8\text{Hz}$ ),5.48(dd,2H, $J=14.7,9.0\text{Hz}$ ),4.01(q,4H, $J=6.7\text{Hz}$ ),3.92-3.91(m,2H),3.67(d,2H, $J=15.5\text{Hz}$ ),3.60(d,2H, $J=15.5\text{Hz}$ ),3.37(s,2H),3.10(s,2H),2.49(s,2H),2.29(s,4H),2.20-2.18(m,4H),2.04-1.92(m,6H),1.54-1.39(m,6H),1.27-1.01(m,18H); $^{13}\text{C}$ NMR( $\text{D}_2\text{O}$ ,151MHz) $\delta$ 176.7,174.9,169.8,167.8,137.6,134.4,133.6,132.6(t, $J_{\text{C-F}}=27.2\text{Hz}$ ),132.4,130.2,128.0,126.8,125.2,123.5,119.3(t, $J_{\text{C-F}}=247.6\text{Hz}$ ),74.0(t, $J_{\text{C-F}}=31.7\text{Hz}$ ),60.4,60.2,40.3,40.1,39.8,33.4,30.6,29.3,27.6,25.8,25.4,24.0,23.8,23.2,13.1);HRMS $m/z$ calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{78}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_{18}\text{P}_2[\text{M-H}]^-$ 1278.4697,found 1278.4692;HPLCpurity:98%, $t_{\text{R}}=2.5\text{min}$ (方法1)。

[0234] 生物学评价

[0235] 共轭化合物在大鼠血浆中的稳定性

[0236] 在大鼠血浆中测定酰胺连接(amide-linked)的共轭化合物的稳定性。将每个分别对应于共轭化合物 $\underline{1}$ , $\underline{2}$ 和 $\underline{3}$ (分别为C3,C4和C5)的 $[\text{}^3\text{H}]$ -标记的分子(氚标记分子中的EP4激动剂(来自化合物8)部分)加入到新鲜大鼠血浆未标记的共轭化合物中,以获得活性为500,000dpm和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度。然后将混合物在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育24h。在0,2,4,6,7和24h时取出10 $\mu\text{L}$ 的等分试样,并将其混合到10mg骨粉中,然后在0.6mLEppendorf管中用水稀释10倍。温和搅拌20min。然后使用50 $\mu\text{L}$ 来测定活性。

[0237] 结果表明最初每种共轭化合物约90%被吸收到骨粉中(图1)。孵育24h后,观察到约10%的C3-共轭化合物被水解;而少于5%的另外两种共轭化合物(C4或C5)被水解。因此,确定酰胺连接的共轭化合物在24h内是相对稳定的。

[0238] 研究给药6h后C3,C4和C5-共轭化合物在体内的摄取情况

[0239] 用氚对C3,C4和C5三种共轭化合物的EP4激动剂部分进行放射性标记,并在静脉给药后监测其在体内在大鼠器官中的分布和摄入骨中的情况。在一组3只大鼠上测试的所有三种共轭化合物均耐受良好(以1-5 $\mu\text{Ci}/5\text{mg}/\text{kg}$ 给药),放射性测定结果显示三种共轭化合

物能从血浆中快速清除(图2)。

[0240] 在给药后6h对器官(心脏,肾脏,脑,肌肉,附着于骨的一块肌肉,脾脏和肝脏)中的放射性进行测定(图3)。对于C3-共轭化合物,基于从两只大鼠获得的结果进行计算。给药6h后,大部分标记的共轭化合物被摄入肝脏(65-74%),而所有标记的共轭化合物的约1%和约0.2%被摄入脾脏和肾脏。在肌肉中发现约0.2%初始剂量的C4和C5-共轭化合物和约2%的C3-共轭化合物。所有其他器官中含有 $\geq 0.05\%$ 初始剂量的共轭化合物。

[0241] 最后,计算氚标记的C3,C4和C5-共轭化合物摄入骨中的量(图4)。所有三种共轭化合物均被很好地吸收入骨中。显示约10%分别包含帕米膦酸盐(pamidronate)和奈立膦酸(neridronate)部分的C4和C5-共轭化合物吸收到长骨中。在注射后6h,约20%的包含阿仑膦酸盐(alendronate)部分的C3-共轭化合物附着于骨(基于从两只大鼠中获得的结果)。

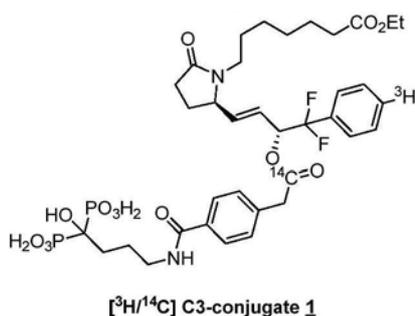
[0242] 研究氚标记的C3-共轭化合物在28天内的体内摄取和释放情况

[0243] 由于发现C3-共轭化合物能够很好地附着于骨,因此将其用于28天的长期研究中。使用氚标记的C3-共轭化合物进行体内摄取和释放研究。给15只大鼠静脉注射1~5 $\mu\text{Ci}/5\text{mg}/\text{kg}$ 的 $^3\text{H}$ -C3后,每3只大鼠一组,在每个时间点(即 $t=6\text{h}, 24\text{h}, 7\text{d}, 14\text{d}, 28\text{d}$ )对大鼠实施安乐死)。计算每组大鼠的血液样品,脾脏,肝脏和长骨中的放射性。在血流中检测到非常低的活性,表明氚标记的C3-共轭化合物能从血浆中快速清除(图5)。注射后6h,在肝脏中检测到大部分氚标记的C3-共轭化合物(69%),并且在注射24h后仍保持高比例。一周后,53%的标记被清除,28天后仅检测到痕量(图6)。在脾脏中,放射性从给药后6h的1%下降到第28天的0.4%(图6)。给药6h后,约12%氚标记的C3-共轭化合物被骨吸收(图7)。7天后,5.5%氚标记的C3-共轭化合物保持附着在骨上,而在研究结束时在骨中观察到初始剂量的1.4%。基于这些结果,计算出其半衰期约为8天。

[0244] 研究双放射性标记的C3-共轭化合物在28天内的体内摄取和释放情况

[0245] 在EP4激动剂部分用氚标记,在连接于二膦酸盐部分的连接子中用 $^{14}\text{C}$ 标记的双放射性标记分子,并监测该分子在大鼠模型体内吸收入骨以及随后释放两种元素的情况。

[0246]



[0247] 双标记的C3-共轭化合物(以1-5 $\mu\text{Ci}$ 每个标记物/5mg/kg给药)的耐受性良好,并观察28天内其放射性从血浆中的清除情况(图8A和8B)。在给药后24h,对器官(脂肪,心脏,肾脏,脑,肌肉,附着于骨骼的一块肌肉,脾脏和肝脏)中的放射性进行测定(图9)。给药24h后,半数标记的共轭化合物被摄入肝脏(分别为氚标记的57%和 $^{14}\text{C}$ 标记的43%),约1%和0.2%的两种标记物分布摄入脾脏和肾脏。本研究中分析的所有其他器官含有 $\geq 0.004\%$ 初始剂量的双标记的共轭化合物。

[0248] 脾脏和肝脏中放射性的量如图10和表1所示。

[0249] 表1:28天内大鼠脾脏和肝脏中双标记的C3-共轭化合物放射性的分布数据

	时间 (d)	占共轭化合物中氘初始剂量百分比 (%)				占共轭化合物中C-14初始剂量百分比 (%)			
		脾脏		肝脏		脾脏		肝脏	
		Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD
[0250]	1	1.2	0.25	57	10.1	0.91	0.2	42.7	8.6
	7	0.66	0.11	14.8	2	0.65	0.1	16.8	2.6
	14	0.58	0.17	4.3	0.71	0.69	0.2	6.4	1.7
	28	0.34	0.21	0.78	0.53	0.4	0.25	1.3	0.85

[0251] 氘标记的C3-共轭化合物的体内摄取的短期研究显示,注射后6h,20%初始剂量的共轭化合物与骨结合。然而,第二项长达28天的研究显示,在6h时约12%的共轭化合物被摄入骨(图11)。

[0252] 研究双放射性标记的化合物在28天内的体内摄取和释放情况,证实了后面的这些结果(图12)。事实上,图11和12均显示了氘标记(EP4-激动剂)的缓慢释放,其在7天内的损失约为50%。28天后,只有1.4%初始剂量的标记物附着在骨上。给药后24h,观察到约11%的两种标记物被摄取。与缓慢释放的氘标记的EP4-激动剂不同,在28天后约9-12%的<sup>14</sup>C-二磷酸盐-连接子部分仍保持与骨结合,表明酰胺键不能显著水解。在28天时观察到一个很少但有统计学意义的标记损失,其可能归因于实验性变化或可能反映实际固有的骨转换率(阿仑膦酸盐转换(turnover)的半衰期约为300天)[Lin JH, Russell G, Gertz B. Pharmacokinetics of alendronate: an overview. Int J Clin Pract Suppl 1999;101:18-26.]。

[0253] 嗜中性粒细胞功能效应

[0254] 本发明评估了片段4和5与它们单独的二磷酸盐部分(分别为阿仑膦酸盐和帕米膦酸盐)相比的嗜中性粒细胞功能效应。本发明还分析了化合物C3(阿仑膦酸盐共轭化合物)和C4(帕米膦酸盐共轭化合物)以及EP4激动剂。图13显示在白细胞中,片段4和5均不表现出显著的活性,而阿仑膦酸盐和帕米膦酸盐是有活性的。此外,EP4激动剂和C3-共轭化合物表现出低的嗜中性粒细胞速度(neutrophil speed),而C4-共轭化合物在白细胞中是有活性的。与氨基甲酸酯连接的共轭化合物相比,酰胺连接的共轭化合物在体内的结果显示出更高的骨结合效率,以及对EP4激动剂的较慢释放速率。此外,与单独的阿仑膦酸盐相比,包含连接于阿仑膦酸盐的连接子的C3的片段4是无生物活性的。

[0255] 本发明所使用的单数形式的“一”(a)，“和”(and)和“该”(the)包括复数的指代对象,除非上下文另有明确说明。例如,“化合物”(a compound)是指一种或多种这样的化合物及其本领域技术人员已知的等同物。

[0256] 所有引文通过引用的方式纳入本文。

[0257] 本发明已经对一个或多个实施例进行了描述。然而,对于本领域技术人员来说,显而易见的是,在不脱离如本发明权利要求所限定的范围的情况下,可以做出许多变型和修改。

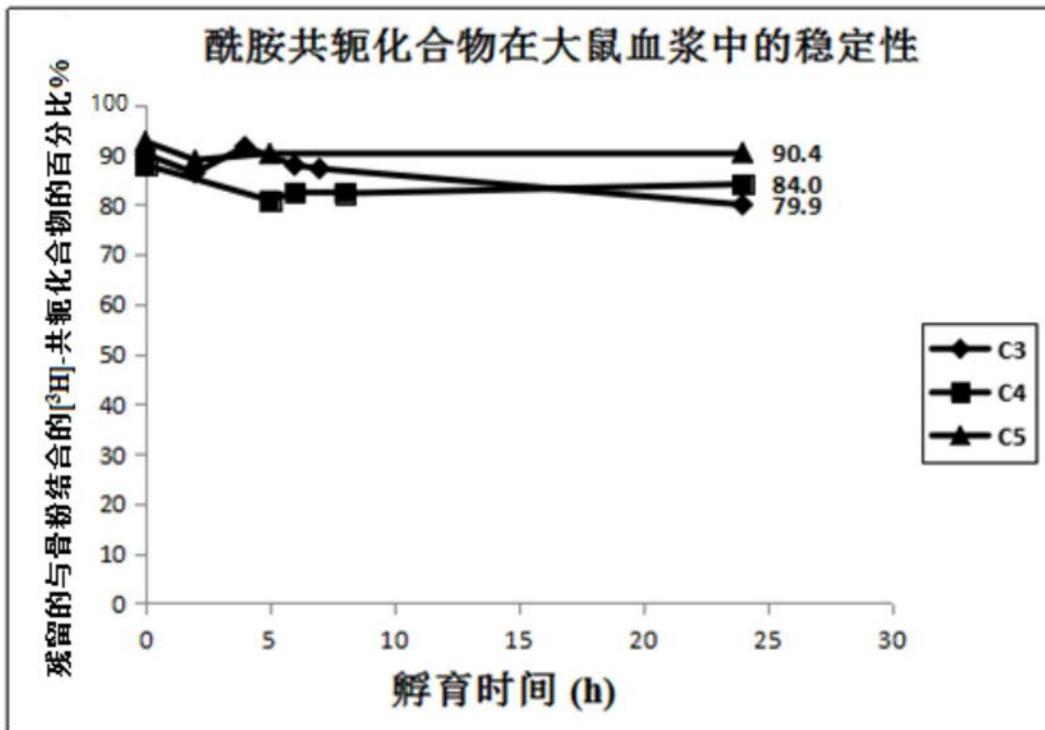


图1

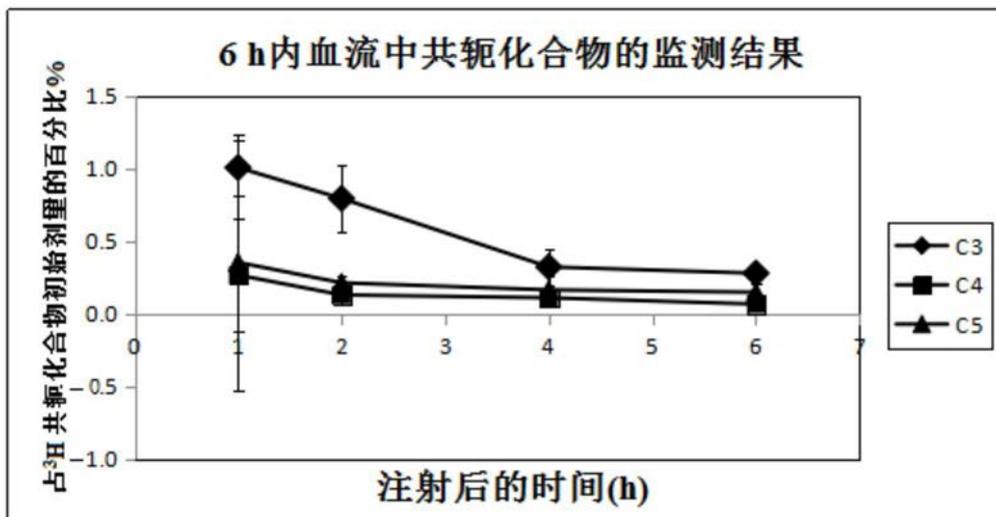


图2

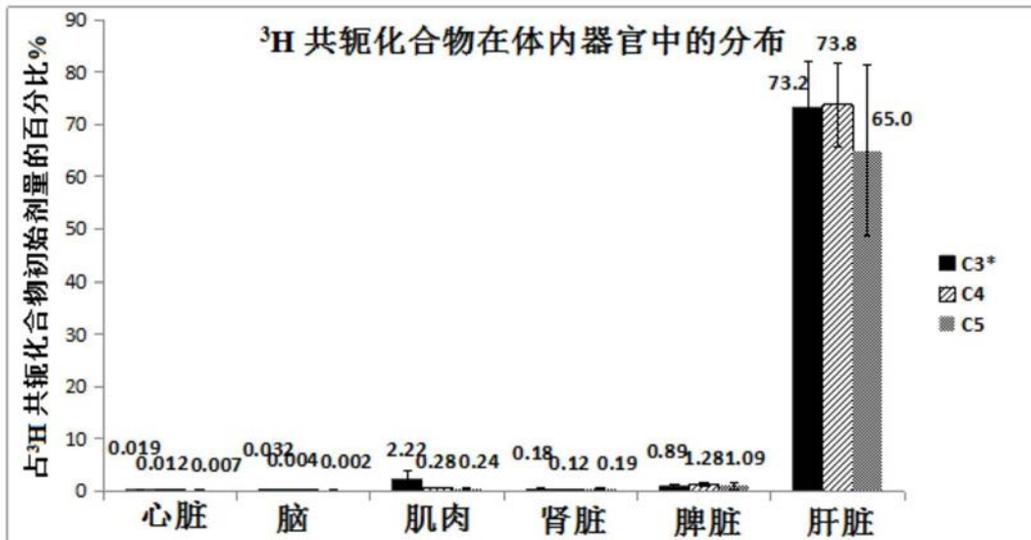


图3

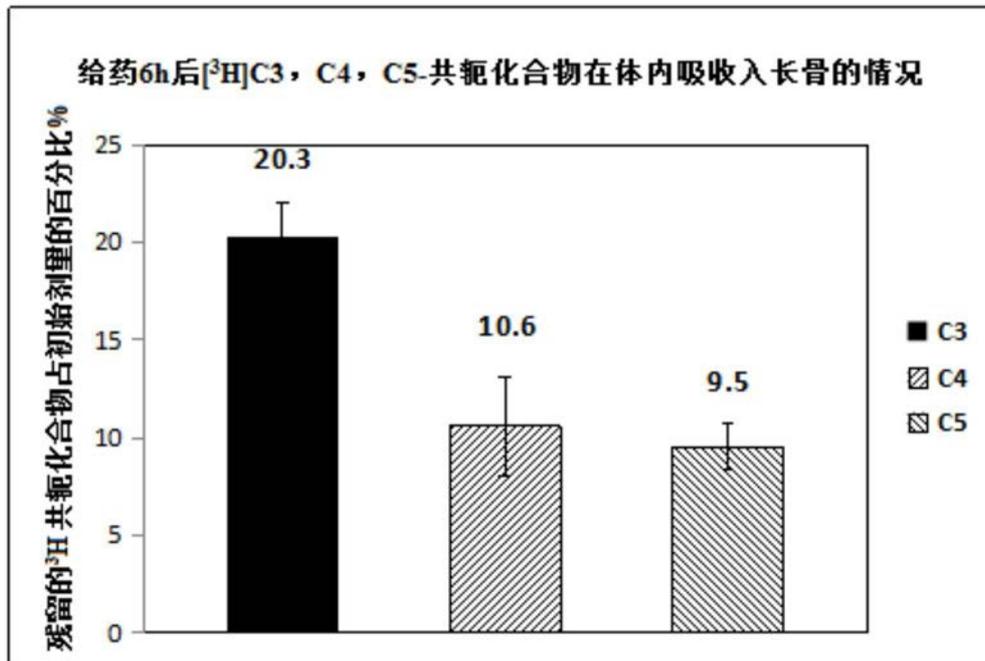


图4

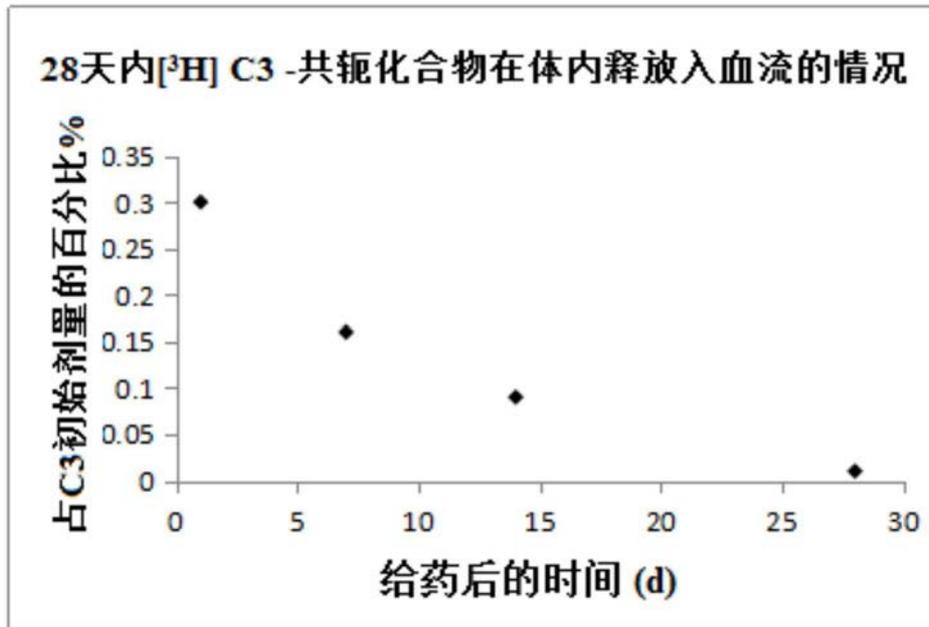


图5

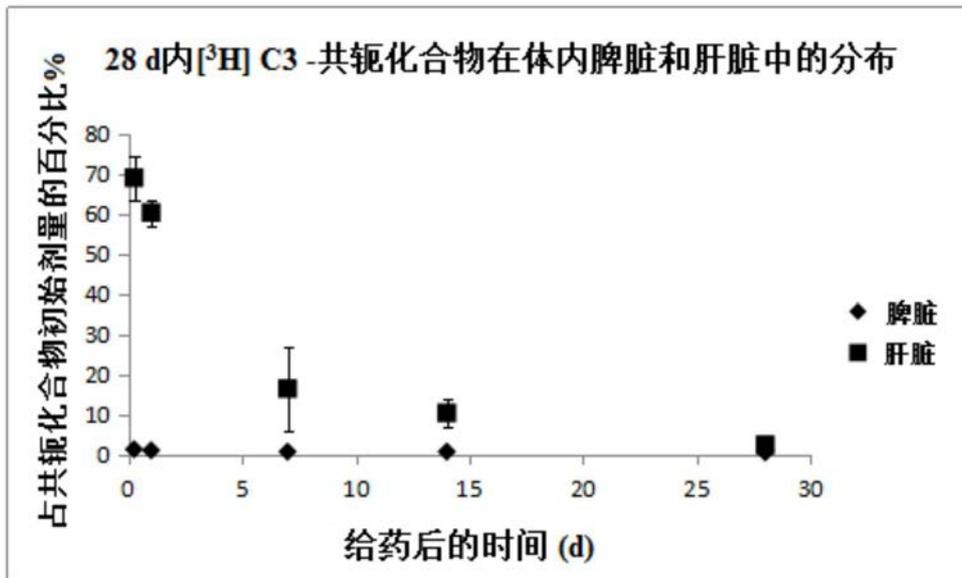


图6

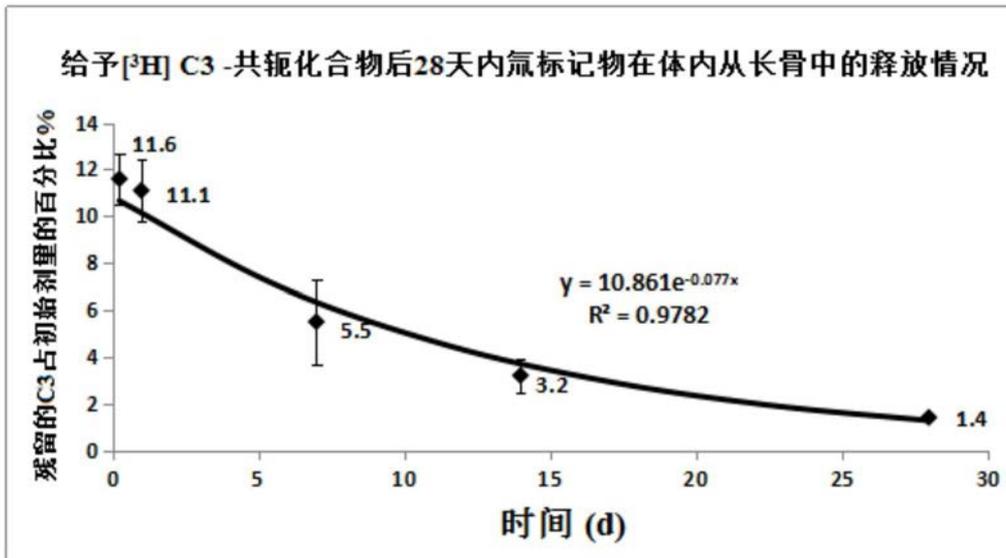


图7

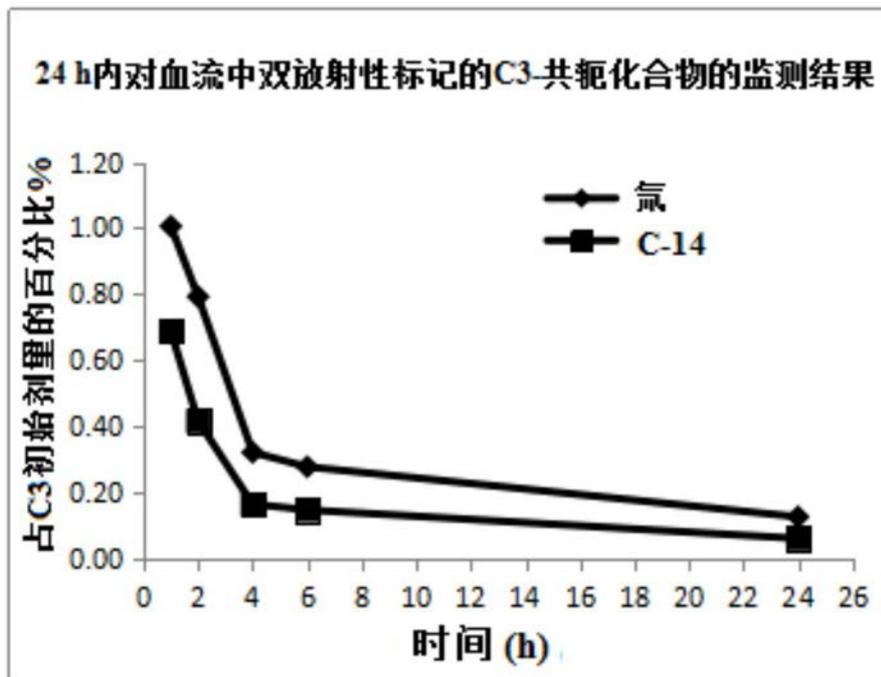


图8A

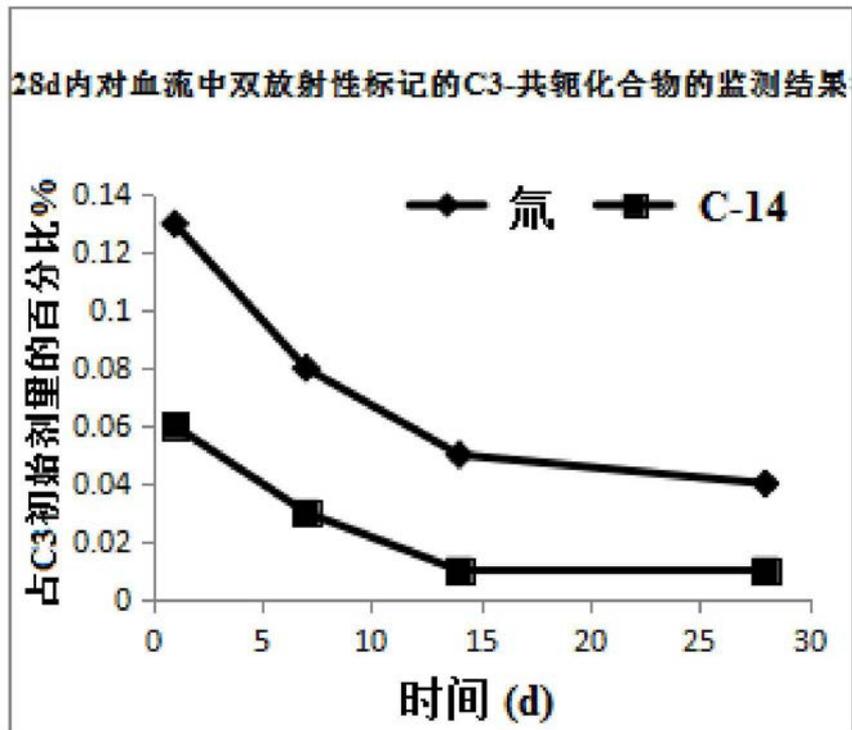


图8B

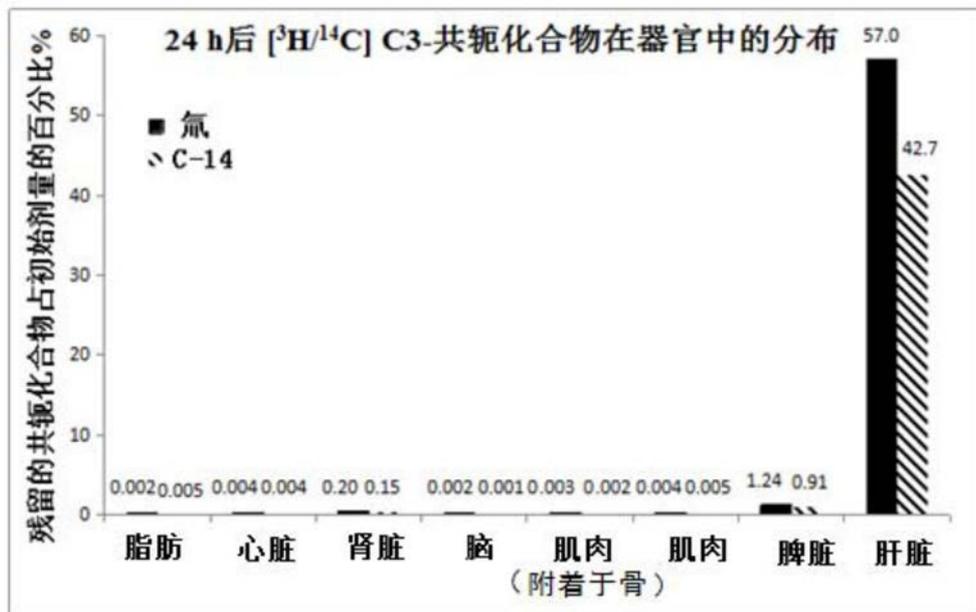


图9

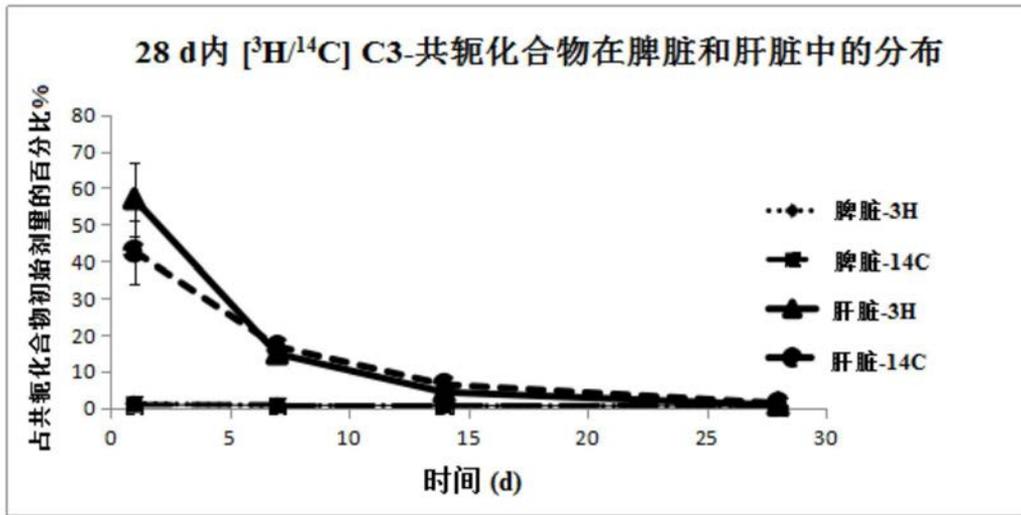


图10

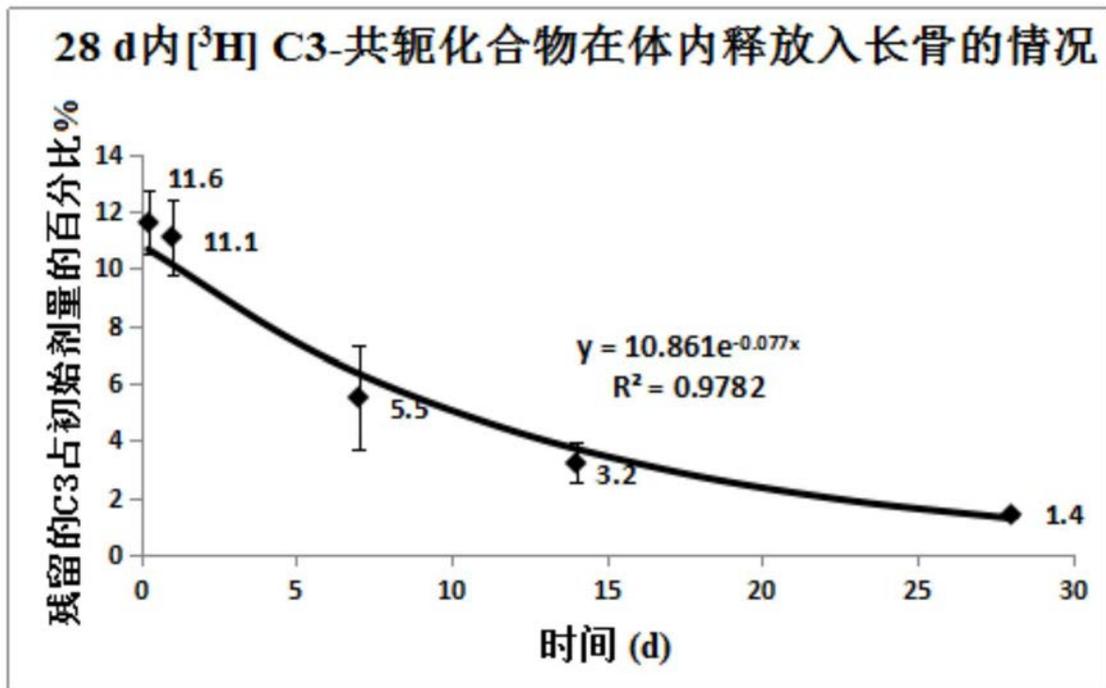


图11

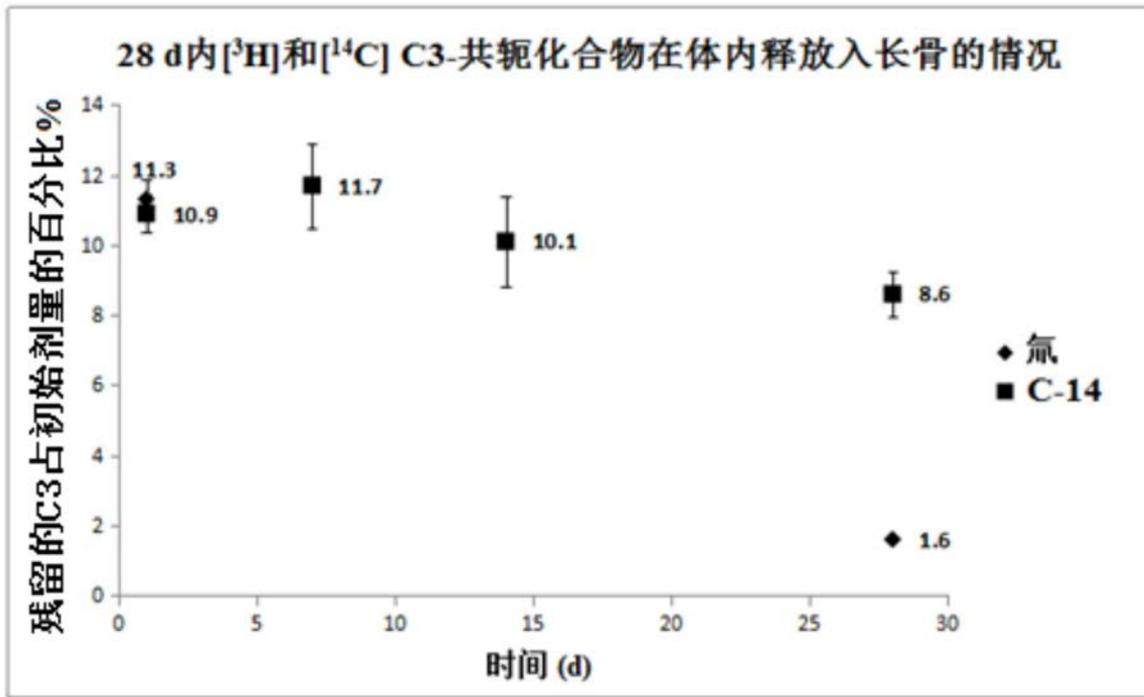
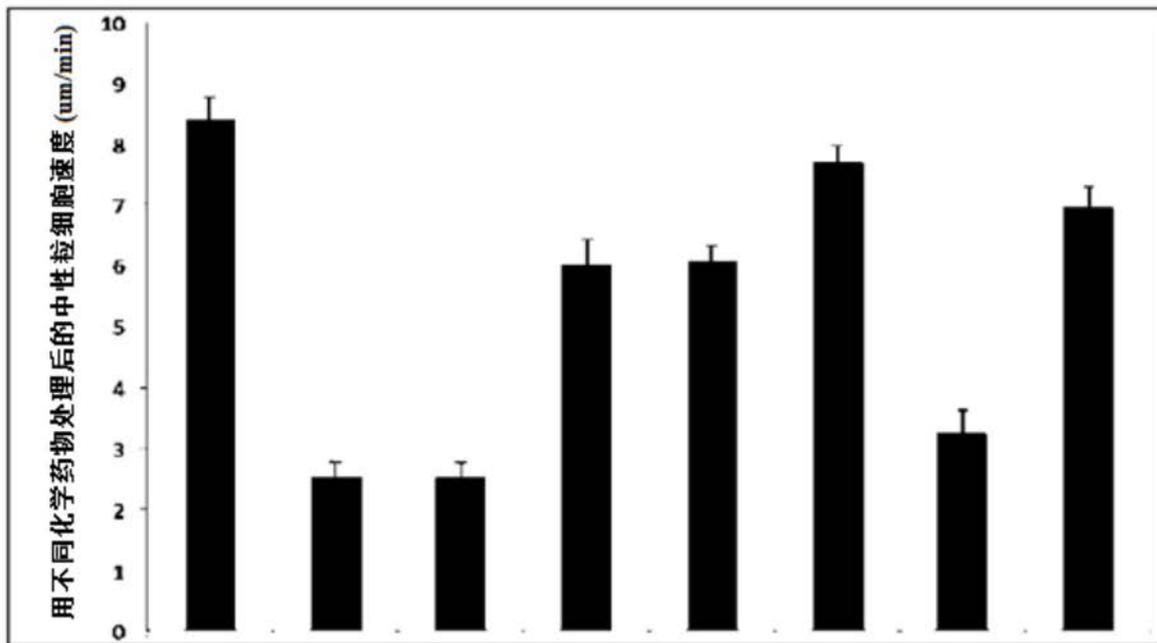


图12



Mip 帕米磷酸盐 阿仑磷酸盐 EP4激动剂 C4片段 C3片段 C4共轭化合物 C3共轭化合物

图13