



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107074836 B

(45)授权公告日 2020.03.27

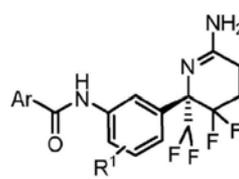
(21)申请号 201580060803.9
 (22)申请日 2015.11.09
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107074836 A
 (43)申请公布日 2017.08.18
 (30)优先权数据
 PA201400648 2014.11.10 DK
 PA201500447 2015.08.07 DK
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.05.09
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2015/076015 2015.11.09
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02016/075063 EN 2016.05.19
 (73)专利权人 H.隆德贝克有限公司
 地址 丹麦瓦尔比
 (72)发明人 K·朱尔 L·塔摩斯 M·马里戈
 (74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
 72003
 代理人 吴小瑛 常雨轩
 (51)Int.Cl.
 C07D 413/12(2006.01)
 C07D 401/12(2006.01)

C07D 417/12(2006.01)
 A61K 31/44(2006.01)
 A61K 31/506(2006.01)
 A61K 31/4418(2006.01)
 A61K 31/4439(2006.01)
 A61K 31/444(2006.01)
 A61K 31/497(2006.01)
 A61P 25/28(2006.01)
 (56)对比文件
 CN 103502227 A,2014.01.08,
 CN 102933564 A,2013.02.13,
 CN 103717592 A,2014.04.09,
 Hans Hilpert,等.β-Secretase (BACE1)
 Inhibitors with High In Vivo Efficacy
 Suitable for Clinical Evaluation in
 Alzheimer's Disease.《Journal of Medicinal
 Chemistry》.2013,第56卷(第10期),第3980-
 3995页.
 Daniel Oehlrich,等.The evolution of
 amidine-based brain penetrant BACE1
 inhibitors.《Bioorganic & Medicinal
 Chemistry Letters》.2014,第24卷第2033-2045
 页.
 审查员 严彤
 权利要求书2页 说明书27页

(54)发明名称
 作为BACE1抑制剂的2-氨基-6-(二氟甲基)-
 5,5-二氟-6-苯基-3,4,5,6-四氢吡啶

例如阿尔茨海默病的用途,对这些障碍而言Aβ
 沉积物的减少是有益的。

(57)摘要



本发明涉及 (I)

具有化学式(I)的化合物,这些化合物为BACE1酶
 的抑制剂。本发明的单独方面涉及包括所述化合
 物的药物组合物以及这些化合物治疗多种障碍,

CN 107074836 B

1. 一种具有化学式I的化合物

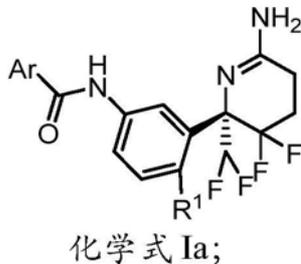


其中Ar选自下组,该组由以下各项组成:苯基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基,并且其中该Ar任选地被一个或多个选自卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₁-C₆氟烷基或C₁-C₆烷氧基的取代基取代;并且

R¹是氢、卤素、C₁-C₃氟烷基或C₁-C₃烷基;

或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中该化合物具有化学式Ia



或其药学上可接受的盐。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中R¹是F或H。

4. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中Ar任选地被一个或多个F、Cl、Br、CN、C₁-C₃烷基、C₁-C₃氟烷基或C₁-C₃烷氧基取代。

5. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中Ar是任选地被一个或多个选自卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₁-C₆氟烷基或C₁-C₆烷氧基取代的吡啶基。

6. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中Ar是任选地被一个或多个选自卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₁-C₆氟烷基或C₁-C₆烷氧基取代的嘧啶基。

7. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中Ar是任选地被一个或多个选自卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₁-C₆氟烷基或C₁-C₆烷氧基取代的吡嗪基。

8. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中Ar是任选地被一个或多个选自卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₁-C₆氟烷基或C₁-C₆烷氧基取代的噁唑基。

9. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中Ar是任选地被一个或多个选自卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₁-C₆氟烷基或C₁-C₆烷氧基取代的噻唑基。

10. 根据权利要求1所述的化合物,其中该化合物选自下组,该组由以下各项组成:

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氯吡啶酰胺,

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氟吡啶酰胺,

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-

5-甲氧基吡嗪-2-甲酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-2-甲基噁唑-4-甲酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基吡啶酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(二氟甲基)吡嗪-2-甲酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氰基吡啶酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-4-甲基噁唑-2-甲酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基嘧啶-2-甲酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基-3-甲基吡嗪-2-甲酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氰基-3-甲基吡啶酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-溴吡啶酰胺，

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(甲氧基-d3)吡啶酰胺，以及

(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(甲氧基-d3)吡嗪-2-甲酰胺；

或其药学上可接受的盐。

11. 一种化合物，其为(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(甲氧基-d3)吡啶酰胺或其药学上可接受的盐。

12. 一种药物组合物，包括根据权利要求1-11中任一项所述的化合物以及一种药学上可接受的载体。

13. 根据权利要求1-11中任一项所述的化合物在生产用于治疗疾病的药物中的用途，所述疾病选自阿尔茨海默病、轻度认知缺损、唐氏综合症和大脑淀粉样血管病。

14. 根据权利要求13所述的用途，其中所述阿尔茨海默病选自家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、临床前阿尔茨海默病和前驱阿尔茨海默病。

作为BACE1抑制剂的2-氨基-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-苯基-3,4,5,6-四氢吡啶

发明领域

[0001] 本发明提供了充当BACE1抑制剂的化合物。本发明的单独方面涉及包括所述化合物的药物组合物以及这些化合物治疗神经变性或认知障碍的用途。

背景技术

[0002] 痴呆是临床综合征,其特征在于无法通过正常衰老解释的多个认知区缺陷、功能显著下降和无谵妄。另外,经常存在神经精神症状和局灶性神经表现。基于病因学,将痴呆进一步分类。阿尔茨海默病(AD)是痴呆的最常见原因,其次是混合型AD和血管性痴呆、路易体痴呆(DLB)以及额颞叶痴呆。 β -淀粉样沉积物和神经原纤维缠结被认为是与AD相关的主要病理性表征,AD由记忆、认知、推理、判断以及定向丧失表征。随着疾病发展,还受影响的是运动、感觉和语言能力,直到出现多种认知功能的整体缺损。 β -淀粉样沉积物主要是A β 肽的凝集体,该凝集体进而作为 β -成淀粉样途径的一部分的淀粉样前体蛋白(APP)蛋白水解的产物,A β 肽产生自一种或多种 γ -分泌酶在C-末端裂解APP以及 β -分泌酶1(BACE1)在N-末端裂解APP,该 β -分泌酶1又称天冬氨酰蛋白酶2。BACE1活性与自APP生成A β 肽直接相关。

[0003] 研究表明BACE1的抑制妨碍A β 肽的产生。此外,BACE1与其底物APP共定位于高尔基体和胞吞区室中(Willem M(威廉M)等人Semin.Cell Dev.Biol.(细胞与发育生物学研讨会),2009,20,175-182)。小鼠敲除研究已经证实了不存在淀粉样蛋白肽形成,同时这些动物是健康且能育的(Ohno M(大野M)等人Neurobiol.Dis.(疾病神经生物学),2007,26,134-145)。过量表达APP的小鼠中BACE1遗传消除已经证实了斑块形成的不存在和认知缺陷的逆转(Ohno M(大野M)等人Neuron(神经元);2004,41,27-33)。在散发性AD患者的脑中评估BACE1水平(Hampel(汉佩尔)和Shen(沈),Scand.J.Clin.Lab.Invest.(临床与实验室研究斯堪的纳维亚杂志)2009,69,812)。

[0004] 这些汇聚的发现表明,BACE1的抑制可以作为用于治疗AD以及A β 沉积的减少对其而言有益的障碍的治疗靶标。

[0005] AstraZeneca(阿斯利康公司)于2012年10月通告了AZD3839的发现,AZD3839是一种用于治疗AD的有效的BACE1抑制剂临床候选物(Jeppsson,F.(杰普逊,F.)等人,J.Biol.Chem.(生物化学杂志),2012,287,41245-41257)。导致发现AZD3839的努力被进一步描述于Ginman,T.(吉恩曼,T.)等人J.Med.Chem.(药物化学杂志),2013,56,4181-4205中。Ginman(吉恩曼)公开物描述了克服与AZD3839的发现与鉴定相联系的问题。这些问题涉及这些化合物的弱的血脑屏障穿透性和P-糖蛋白介导的外排,从而导致缺乏脑暴露。

[0006] Ginman(吉恩曼)原稿假定脑暴露中的这些差异在很大程度上归因于核心结构并且提供了结构活性关系数据,其中根据核心亚型,将报道的化合物的体外特性给出于四个表中。在表4中,描述了一系列含脒化合物,这些化合物从活性视角被认为是令人感兴趣的。然而,数据暗示含脒核心未展示出有利的血脑屏障穿透曲线。

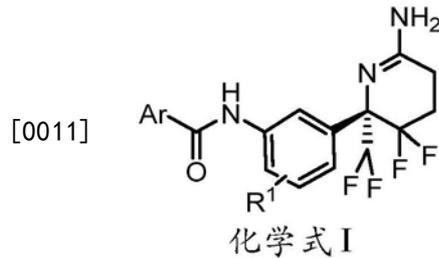
[0007] 来自Hoffmann-La Roche(豪夫迈·罗氏公司)和Siena Biotech(锡耶纳生物技术

公司)的研究人员也报道了含脘化合物的发现(Woltering, T.J. (沃尔特林, T.J) 等人, Bioorg. Med. Chem. Lett. (生物有机化学与医药化学通讯) 2013, 23, 4239-4243)。发现这些化合物(该文章中的化合物17和18)不具有任何体内作用(野生型小鼠脑中缺少AB40减少)。

[0008] 与Ginman(吉恩曼)等人和Woltering, T.J. (沃尔特林, T.J) 等人的教导相反, 本发明人已经发现了一系列脘化合物, 这些脘化合物是脑穿透物的。因此, 本发明涉及具有BACE1抑制活性的新颖化合物、涉及其制备、涉及其医学用途并且涉及包括它们的药物。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的目的在于提供抑制BACE1的化合物。因此, 本发明涉及具有化学式I的化合物。



[0012] 其中Ar选自下组, 该组由以下各项组成: 苯基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基, 并且其中该Ar任选地被一个或多个选自卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₁-C₆氟烷基或C₁-C₆烷氧基的取代基取代; 并且

[0013] R₁是氢、卤素、C₁-C₃氟烷基或C₁-C₃烷基;

[0014] 或其药学上可接受的盐。

[0015] 在一个实施例中, 本发明提供了用于在治疗中使用的具有化学式I的化合物及其药学上可接受的盐。

[0016] 本发明还提供了一种药物组合物, 包含一种具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐, 和一种药学上可接受的载体。

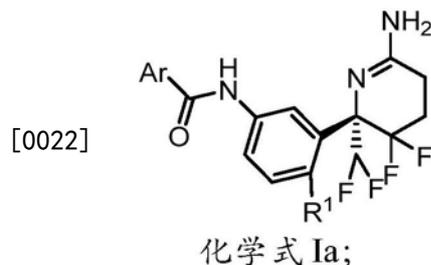
[0017] 在一个实施例中, 本发明提供了具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗神经变性或认知障碍的药物中的用途。

[0018] 在一个实施例中, 本发明提供了一种用于在一种治疗神经变性或认知障碍的方法中使用的具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0019] 在一个实施例中, 本发明提供了一种治疗神经变性或认知障碍的方法, 包括向对其有需要的患者给予治疗有效量的具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0020] 下文即提供本发明的另外的实施例:

[0021] 在一个实施例中, 该化合物具有化学式Ia



[0023] 或其药学上可接受的盐。

- [0024] 在一个实施例中, R¹是F或H, 特别是F。
- [0025] 在一个实施例中, Ar任选地被一个或多个F、Cl、Br、CN、C₁-C₃烷基、C₁-C₃氟烷基或C₁-C₃烷氧基取代。
- [0026] 在一个实施例中, Ar是任选取代的苯基。
- [0027] 在一个实施例中, Ar是任选取代的吡啶基。
- [0028] 在一个实施例中, Ar是任选取代的嘧啶基。
- [0029] 在一个实施例中, Ar是任选取代的吡嗪基。
- [0030] 在一个实施例中, Ar是任选取代的咪唑基。
- [0031] 在一个实施例中, Ar是任选取代的吡唑基。
- [0032] 在一个实施例中, Ar是任选取代的噻唑基。
- [0033] 在一个实施例中, Ar是任选取代的噁唑基。
- [0034] 在一个实施例中, Ar是任选取代的异噁唑基。
- [0035] 在一个实施例中, 该化合物选自下组, 该组由以下各项组成:
- [0036] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氯吡啶酰胺
- [0037] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氟吡啶酰胺
- [0038] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基吡嗪-2-甲酰胺
- [0039] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-2-甲基噁唑-4-甲酰胺
- [0040] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基吡啶酰胺
- [0041] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(二氟甲基)吡嗪-2-甲酰胺
- [0042] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氰基吡啶酰胺
- [0043] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-4-甲基噻唑-2-甲酰胺
- [0044] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基嘧啶-2-甲酰胺
- [0045] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基-3-甲基吡嗪-2-甲酰胺
- [0046] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氰基-3-甲基吡啶酰胺
- [0047] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-溴吡啶酰胺
- [0048] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(甲氧基-d₃)吡啶酰胺

[0049] (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(甲氧基-d3)吡嗪-2-甲酰胺

[0050] 或其药学上可接受的盐。

[0051] 一个单独实施例涉及一种药物组合物,该药物组合物包括来自上列表的一种化合物以及一种药学上可接受的载体。

[0052] 另一个实施例涉及治疗神经变性或认知障碍的方法,该方法包括给予治疗有效量的来自上列表的一种化合物。

[0053] 又一个实施例涉及来自上列表的一种化合物在生产用于治疗神经变性或认知障碍的药物中的用途。

[0054] 一个实施例是用于在疗法中使用的、来自上列表的一种化合物。

[0055] 又一个实施例涉及用于在治疗神经变性或认知障碍中使用的、来自上列表的一种化合物。

[0056] 发明的详细说明

[0057] 本发明是基于以下发现,具有化学式I的化合物是BACE1的抑制剂,并且正因为如此,有用于治疗相关障碍。下文更加详细地解释本发明的某些方面,但是本说明不旨在是可以实施本发明的所有不同方式的详细目录,或可以加入本发明中的所有特征的详细编录。因此,以下说明旨在阐明本发明的一些实施例,并不旨在完全详细说明其所有排列、组合以及变化。

[0058] 如在此所使用,术语“C₁-C₆烷基”是指具有从一个至六个(包含端值)碳原子的直链或支链饱和烃。C₁-C₆烷基的实例包括但不限于,甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、2-甲基-2-丙基、2-甲基-1-丙基、正戊基以及正己基。类似地,术语“C₁-C₃烷基”是指具有从一个至三个(包含端值)碳原子的直链或支链饱和烃。此类取代基的实例包括但不限于,甲基、乙基和正丙基。

[0059] 同样地,术语“C₁-C₆烷氧基”是指具有从一个至六个(包含端值)碳原子并且开放原子价在氧上的直链或支链饱和烷氧基。C₁-C₆烷氧基的实例包括但不限于,甲氧基、乙氧基、正丁氧基、叔丁氧基以及正己氧基。“C₁-C₆烷氧基”任选地被一个或多个氟原子取代。

[0060] 如在此所使用,术语“C₁-C₆氟烷基”是指具有从一个至六个(包含端值)碳原子的被一个或多个氟原子取代的直链或支链饱和烃。C₁-C₆氟烷基的实例包括但不限于,三氟甲基、五氟乙基、1-氟乙基、单氟甲基、二氟甲基、1,2-二氟乙基以及3,4-二氟己基。类似地,术语“C₁-C₃氟烷基”是指具有从一个至三个(包含端值)碳原子,每个碳原子被一个或多个氟原子取代的直链或支链饱和烃。

[0061] 术语“卤素”是指氟、氯、溴以及碘。

[0062] 术语“C₂-C₆烯基”是指具有从两个至六个碳原子和一个双键的支链或非支链烯基,包括但不限于乙烯基、丙烯基和丁烯基。

[0063] 术语“C₂-C₆炔基”应意指具有从两个至六个碳原子和一个三键的支链或非支链炔基,包括但不限于乙炔基、丙炔基和丁炔基。

[0064] 如在此所使用,当应用于本发明的化合物时,短语“有效量”是指表示足以引起预期的生物效应的量。当应用于本发明的化合物时,短语“治疗有效量”是指表示足以改善、减轻、稳定、逆转、减慢或延缓障碍或疾病状态的进展、或者该障碍或疾病的症状的进展的化

化合物的量。在实施例中,本发明的方法提供了化合物组合的给药。在此类情况下,“有效量”是足以引起预期的生物效应的该组合中本发明的一种化合物的量。

[0065] 如在此所使用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”意指改善或逆转疾病或障碍的进展或严重性、或者改善或逆转这种疾病或障碍的一种或多种症状或副作用。如在此所使用,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”还意指抑制或阻断,如延迟、阻止、限制、阻碍或妨碍疾病或障碍的系统、病症或状态的进展。出于本发明的目的,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”另外指的是一种用于获得有益的或希望的临床结果的方法,其中“有益的或希望的临床结果”包括但不限于症状的缓解、障碍或疾病程度的减小、稳定化的(即没有恶化的)疾病或障碍状态、疾病或障碍状态的延缓或减慢、疾病或障碍状态的改善或减轻、以及疾病或障碍的缓解,不论是否是部分地或全部地。

[0066] 本发明是基于以下发现,具有化学式I的化合物是BACE1的抑制剂,并且正因为如此,有用于治疗障碍,这些障碍的病理学特征包括 β -淀粉样沉积物和神经原纤维缠结,例如神经变性或认知障碍。

[0067] 如上所讨论,预期本发明的化合物有用于治疗阿尔茨海默病,这是由于它们对 β -淀粉样沉积物和神经原纤维缠结的作用。这包括家族性阿尔茨海默病,其中患者的特定基因上携带突变,这些基因与A β 肽的产生密切相关。然而,重要的是注意到,A β 肽的凝集体不限于家族性阿尔茨海默病,而是类似地,更普遍的散发性阿尔茨海默病的一个重要的病理生理特征[Mol Cell Neurosci,66,3-11,2015]。

[0068] 还认为本发明的化合物有用于治疗早期阿尔茨海默病,即生物学和结构改变已经开始,但是该疾病的临床表现还未变得明显或未很好地发展的疾病阶段。事实上,早期阿尔茨海默病可在该疾病的任何临床表现变得明显之前多年之前开始。早期阿尔茨海默病包括前驱阿尔茨海默病、临床前阿尔茨海默病和轻度认知缺损。尽管轻度认知缺损可能与阿尔茨海默病无关,但它通常是阿尔茨海默病的过渡阶段或是因阿尔茨海默病而产生的。临床前和前驱阿尔茨海默病是无症状期,并且典型地它们通过阿尔茨海默病相关的生物标志的存在而诊断出来。在此背景下,认为本发明的化合物有用于减缓早期阿尔茨海默病的进展(例如,轻度认知缺损到阿尔茨海默病)。还认为本发明的化合物有用于治疗记忆丧失、注意力不足以及与阿尔茨海默病相关的痴呆。

[0069] 除了阿尔茨海默病的连续体之外,其他疾病的特征在于 β -淀粉样沉积物和神经原纤维缠结。这包括例如21三体综合症,又称为唐氏综合症。罹患唐氏综合症的患者具有一条额外的21号染色体,该染色体包含用于淀粉样前体蛋白(APP)的基因。这条额外的21号染色体导致APP的过度表达,由此导致增高的A β 肽水平,最终引起发生阿尔茨海默病的风险显著增加(见于唐氏综合症患者中)[Alzheimer's & Dementia (阿尔茨海默病&痴呆),11,700-709,2015]。大脑淀粉样血管病的特征也在于中枢神经系统血管中 β -淀粉样沉积物和神经原纤维缠结[Pharmacol Reports (药理学报告),67,195-203,2015],并且正因为如此,预期也可用本发明的化合物进行治疗。

[0070] 在一个实施例中,本发明提供了一种治疗疾病的方法,所述疾病选自阿尔茨海默病(家族性或散发性)、临床前阿尔茨海默病、前驱阿尔茨海默病、轻度认知缺损、唐氏综合症和大脑淀粉样血管病,该方法包括向对其有需要的患者给予治疗有效量的具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0071] 本发明进一步提供了抑制患者的BACE1的方法,该方法包括向对其有需要的患者给予治疗有效量的具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0072] 本发明还提供了抑制淀粉样前体蛋白的 β -分泌酶介导的裂解的方法,该方法包括向对这样的治疗有需要的患者给予治疗有效量的具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0073] 在另外的实施例中,本发明提供了具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐在生产用于治疗疾病的药物中的用途,所述疾病选自阿尔茨海默病(家族性或散发性)、临床前阿尔茨海默病、前驱阿尔茨海默病、轻度认知缺损、唐氏综合症或大脑淀粉样血管病。

[0074] 本发明还提供了具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐在生产用于抑制BACE1的药物中的用途。本发明进一步提供了具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐在生产用于抑制A β 肽的产生或积累的药物中的用途。

[0075] 在一个实施例中,本发明提供了用于在一种治疗疾病的方法中使用的具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐,所述疾病选自阿尔茨海默病(家族性或散发性)、临床前阿尔茨海默病、前驱阿尔茨海默病、轻度认知缺损、唐氏综合症或大脑淀粉样血管病。

[0076] 在一个实施例中,本发明涉及用于在一种抑制BACE1的方法中或在一种抑制A β 肽的产生或积累的方法中使用的具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0077] 在另外的实施例中,本发明提供了适于以上治疗和用途中的任一种的药物制剂。

[0078] 在一个实施例中,该哺乳动物是人。

[0079] 在一个实施例中,该患者是人类患者。

[0080] 本发明还包括本发明化合物的盐,典型地是药学上可接受的盐。此类盐包括药学上可接受的酸加成盐。酸加成盐包括无机酸和有机酸的盐。

[0081] 适合的无机酸的代表性实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、氨基磺酸、硝酸以及类似物。适合的有机酸的代表性实例包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、反丁烯二酸、乙醇酸、衣康酸、乳酸、甲烷磺酸(methanesulfonic)、顺丁烯二酸、苹果酸、丙二酸、苯乙醇酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、丁二酸、甲烷磺酸(methane sulfonic)、乙烷磺酸、酒石酸、抗坏血酸、帕莫(pamoic)酸、双亚甲基水杨酸、乙烷二磺酸、葡萄糖酸、柠康酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、茶碱乙酸以及8-卤代茶碱(例如8-溴茶碱以及类似物)。药学上可接受的无机或有机酸加成盐的另外的实例包括在S.M.Berge (S.M.贝尔热)等人, J.Pharm.Sci. (药物科学杂志), 1977, 66, 2中列出的药学上可接受的盐。

[0082] 此外,本发明的化合物能以未溶剂化形式存在以及以与药学上可接受的溶剂如水、乙醇等的溶剂化形式存在。

[0083] 本发明的化合物可以具有一个或多个不对称中心并且意图在于,作为分离的、纯的或部分纯化的光学异构体的任何光学异构体(即对映异构体或非对映异构体)及其任何混合物(包括外消旋混合物)(即立体异构体的混合物)都被包括在本发明的范围内。

[0084] 在此背景下,应该理解的是,当指明对映异构体形式时,则该化合物处于对映异构体过量,例如基本处于纯的形式。因此,本发明的实施例涉及具有至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少96%、优选至少98%的对映异构体过量的本发明的化合物。

[0085] 可以通过已知方法将外消旋形式拆分为旋光对映体,例如通过用光学活性酸分离

其非对映异构盐并且通过用碱处理来离析光学活性胺化合物。可以例如通过分步结晶来实现此类非对映异构体盐的分离。适于此目的的光学活性酸可以包括但不限于d-或l-酒石酸、苯乙醇酸或樟脑磺酸。另一种用于将外消旋体拆分为旋光对映体的方法是基于在光学活性基质上的色谱法。本发明的化合物还可以通过由手性衍生化试剂(例如,手性烷基化或酰基化试剂)形成并色谱分离非对映异构体衍生物,随后裂解手性助剂来拆分。以上方法中的任一种都可以应用于拆分本发明的化合物的旋光对映体自身或应用于拆分合成的中间体的旋光对映体,然后可以通过在此描述的方法将其转化为作为本发明的化合物的光学活性拆分的终产物。

[0086] 可以使用本领域的普通技术人员已知的用于拆分光学异构体的另外的方法。此类方法包括由J. Jaques (J. 杰奎斯), A. Collet (A. 科勒特) 和S. Wilen (S. 维伦) 在“Enantiomers, Racemates, and Resolutions (对映异构体, 外消旋体与拆分)”, John Wiley and Sons (约翰威利父子), 纽约1981中讨论的那些。光学活性化合物还可以由光学活性起始材料制备。

[0087] 本发明还提供了一种药物组合物, 包含治疗有效量的一种具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐, 和一种药学上可接受的载体。本发明还提供了药物组合物, 该药物组合物包括治疗有效量的披露于实验部分中的具体化合物之一以及药学上可接受的载体。

[0088] 本发明的化合物能以单剂量或多剂量形式单独给予或与药学上可接受的载体或赋形剂组合给予。根据本发明的药物组合物可以用药学上可接受的载体或稀释剂以及任何其他已知的佐剂和赋形剂根据常规技术配制, 这些常规技术是例如在以下中披露的技术: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药学科学与实践), 第22版, Gennaro (热纳罗) 编, Mack Publishing Co. (马克出版公司), 伊斯顿, 宾夕法尼亚, 2013。

[0089] 用于经口给予的药物组合物包括固体剂型, 例如胶囊、片剂、糖衣丸、丸剂、锭剂、粉剂以及颗粒剂。适当时, 根据本领域中熟知的方法, 这些组合物可以制备为具有包衣, 例如肠溶衣, 或者它们可以被配制以提供活性成分的控制释放, 例如持续或长久释放。用于经口给予的液体剂型包括溶液、乳液、悬浮液、糖浆以及酏剂。用于非经肠给予的药物组合物包括无菌水性及非水性可注射溶液、分散液、悬浮液或乳液以及欲在使用之前在无茵可注射溶液或分散液中复水的无茵粉剂。其他适合的给予形式包括但不限于, 栓剂、喷雾剂、软膏剂、乳膏剂、凝胶剂、吸入剂、皮肤贴片以及植入物。

[0090] 典型的经口剂量范围从每日约0.001mg/kg体重至约100mg/kg体重。

[0091] 本发明的化合物通常以游离碱或以其药学上可接受的盐形式利用。一种具有化学式I的化合物的药学上可接受的盐例如以常规方式通过用一摩尔当量的药学上可接受的酸处理具有化学式I的游离碱的溶液或悬浮液来制备。适合的有机酸及无机酸的代表性实例描述于上文。

[0092] 适合的药物载体包括惰性固体稀释剂或填料、无茵水溶液以及不同有机溶剂。固体载体的实例包括乳糖、白土、蔗糖、环糊精、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁、硬脂酸以及纤维素的低级烷基醚。液体载体的实例包括但不限于, 糖浆、花生油、橄榄油、磷脂、脂肪酸、脂肪酸胺、聚氧化乙烯以及水。类似地, 该载体或稀释剂可以包括单独或与蜡混合的本领域中已知的任何持续释放物质, 例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。通过组合具有化学式I的化合物或其药学上可接受的盐与药学上可接受的载体而形成的药物组合

物以多种适于所披露的给予途径的剂型容易地给予。这些制剂可以方便地通过药学领域已知的方法以单位剂型呈现。

[0093] 若将固体载体用于经口给予,则该制剂可以被压片、以粉剂或丸粒形式置于硬明胶胶囊中或它可呈糖锭或锭剂形式。固体载体的量将广泛变化,但将在每剂量单位从约25mg至约1g的范围。若使用液体载体,则该制剂可以呈糖浆、乳液、软明胶胶囊或无菌可注射液体(例如水性或非水性液体悬浮液或溶液)形式。

[0094] 实验部分

[0095] 可以通过以下反应方案1-4和实例中所概述的方法制备本发明的具有通式I的化合物(其中 R^1 以及Ar如上所定义)。在所描述的方法中,能够使用其本身为本领域熟练的化学家已知或对本领域的普通技术人员而言可以是显而易见的变体或修饰。此外,根据以下反应方案和实例,用于制备本发明的化合物的其他方法对本领域的普通技术人员而言将是容易显而易见的。

[0096] 例如,方案2描述了在合成本发明的化合物的过程中使用选择性保护基。本领域的普通技术人员将能够选择用于具体反应的适当保护基。此外,在下文描述的合成方法中,对于例如氨基、酰氨基、酮基及羟基的取代基而言,掺入保护和脱保护策略可能是必要的,以合成具有化学式I的化合物。此类基团保护和脱保护的方法在本领域是熟知的,并且可以发现于T.Green(T.格林)等人,Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的保护基),1991,第2版,John Wiley&Sons(约翰·威利父子),纽约中。

[0097] 对于能以两种或更多种互变异构体的混合物或两种或更多种互变异构体的平衡状态存在的化合物而言,在方案中仅体现了一种互变异构体,尽管它可能不是最稳定的互变异构体。对于能以对映异构体,立体异构体或几何异构体形式存在的化合物而言,指明了其几何构型;否则的话,该结构表示立体异构体的混合物。

[0098] 使用以下方法获得分析性LC-MS数据。

[0099] 方法A:

[0100] 在沃特斯(Waters)Aquity UPLC-MS上运行LC-MS,其由以下各项组成:包括柱管理器的沃特斯Aquity、二元溶剂管理器、样品组织器、PDA检测器(在254nm下操作)、ELS检测器以及配备有以正离子模式操作的APPI源的SQ-MS。

[0101] LC-条件:该柱是Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m;2.1x 150mm,在60 $^{\circ}$ C下操作,二元梯度为0.6ml/分钟,该二元梯度由水+0.05%三氟乙酸(A)和乙腈+5%水+0.03%三氟乙酸(B)组成。梯度:0.00min:10%B;3.00min:99.9%B;3.01min:10%B;3.60min:10%B。总运行时间:3.60min。

[0102] 方法B:

[0103] 在沃特斯(Waters)Aquity UPLC-MS上运行LC-MS,其由以下各项组成:包括柱管理器的沃特斯Aquity、二元溶剂管理器、样品组织器、PDA检测器(在254nm下操作)、ELS检测器以及配备有以正离子模式操作的APPI源的TQ-MS。

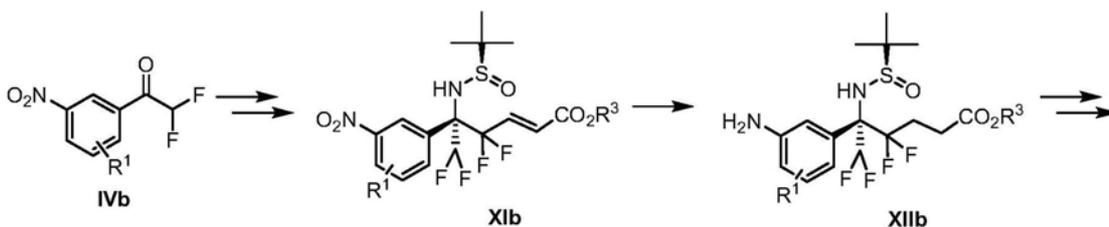
[0104] LC-条件:该柱是Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m;2.1x 50mm,在60 $^{\circ}$ C下操作,二元梯度为1.2ml/分钟,该二元梯度由水+0.05%三氟乙酸(A)和乙腈+5%水+0.05%三氟乙酸(B)组成。梯度:0.00min:10%B;1.00min:100%B;1.01min:10%B;1.15min:10%B。总运行时间:1.15min。

[0114] 其中R²和R³是烷基(例如甲基或乙基)。

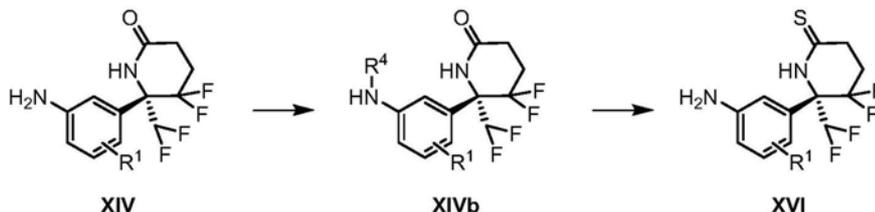
[0115] 具有通式VII的化合物(方案2)可以通过使具有通式IV的化合物与亚磺酰胺(例如VI)在路易斯酸(Lewis acid)/干燥剂(例如四乙氧基钛)的存在下反应来制备。在Zn粉的存在下或在二乙基锌和三(三苯基膦)镉(I)氯化物的存在下,用具有通式VIII的化合物(例如溴二氟乙酸乙酯)处理具有通式VII的化合物给出具有通式IX的化合物。具有通式X的化合物由具有通式IX的化合物通过用还原剂(例如氢化二异丁基铝)处理而获得。在一些情况下,化合物X可与水合物形式处于平衡。在氯化锂和碱(例如N,N-二异丙基乙胺)的存在下,用例如2-(二甲氧基磷酰基)-乙酸甲酯的条件处理具有通式X的化合物给出具有通式XI的化合物。通过在催化剂(例如钯碳)的存在下氢化具有通式XI的化合物获得具有通式XII的化合物。通过在甲醇中用酸(例如盐酸)处理具有通式XII的化合物,随后在甲醇中用碳酸钾处理或在溶剂(例如,甲苯)中加热来获得具有通式XIII的化合物。可以使用硝酸将具有通式XIII的化合物硝化,以给出具有通式XIV的化合物。用试剂(例如劳氏试剂(Lawesson's reagent, 2,4-双(4-甲氧基苯基)-1,3,2,4-二噻二磷杂环丁烷-2,4-二硫化物))处理具有通式XIV的化合物,以给出具有通式XV的化合物。将具有通式XV的化合物的硝基还原,以给出具有通式XVI的化合物。

[0116] 具有通式XIV的化合物还可以如方案3所示制备。起始于具有通式IVb的硝基取代的苯乙酮,具有通式XIb的化合物可以如方案2所述制备。通过在催化剂(例如钯碳)的存在下氢化具有通式XIb的化合物获得具有通式XIIb的化合物。具有通式XIV的化合物可以如方案2所述制备,用于从具有通式XII的化合物制备具有通式XIII的化合物。保护具有通式XIV的化合物的苯胺部分,以给出具有通式XIVb的化合物。用试剂(例如劳氏试剂, 2,4-双(4-甲氧基苯基)-1,3,2,4-二噻二磷杂环丁烷-2,4-二硫化物))处理具有通式XIVb的化合物,随后脱保护苯胺部分以给出具有通式XVI的化合物。

[0117] 方案3



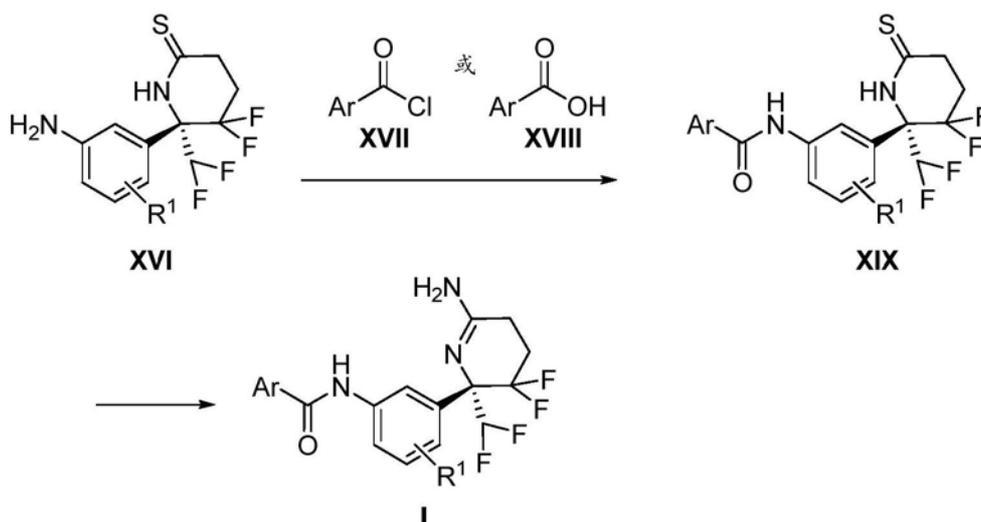
[0118]



[0119] 其中R¹如在化学式I下所定义,并且R³是烷基(例如甲基或乙基)。

[0120] 具有通式I的化合物可以如方案4所示制备。

[0121] 方案4

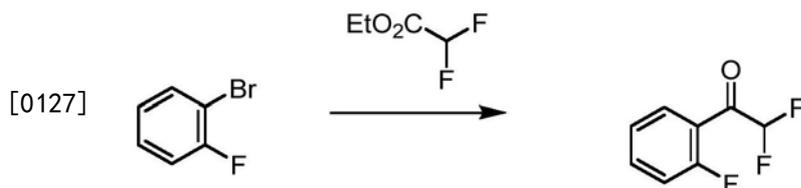


[0123] 其中R¹及Ar是如在化学式I下定义的。

[0124] 可以通过使用本领域的熟练化学师已知的程序,使具有通式XVI的化合物与具有通式XVII的羧酰氯反应或通过与具有通式XVIII的羧酸反应制备具有通式XIX的化合物。用氨处理具有通式XIX的化合物给出具有通式I的化合物。在一些情况下,添加氧化剂(例如叔丁基过氧化氢)对于协助反应而言可能是必要的。

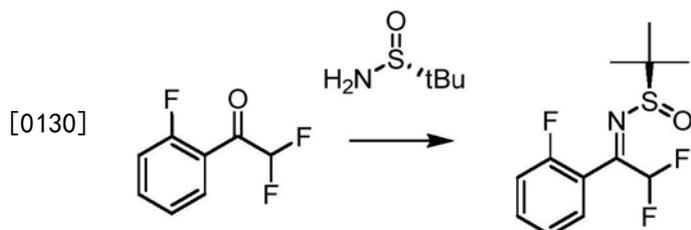
[0125] 中间体的制备

[0126] 中间体:2,2-二氟-1-(2-氟苯基)乙烷-1-酮



[0128] 在N₂下,经15分钟的时间,在-78℃下,向在THF (200mL)中的1-溴-2-氟苯(10.00g, 57.14mmol)的溶液中滴加正丁基锂(2.5M,24.00mL)。将混合物在-78℃下搅拌30min。在-78℃下滴加2,2-二氟乙酸乙酯(10.64g,85.71mmol)并在-78℃下搅拌2小时。TLC显示没有原料剩余。在-78℃下滴加饱和NH₄Cl水溶液(15mL)。将该反应混合物加温至25℃,用乙酸乙酯(100mL,三次)萃取。将合并的有机相用盐水(30mL)洗涤,用无水Na₂SO₄干燥,过滤,并在真空中浓缩。将残余物通过硅胶柱色谱纯化(石油醚:乙酸乙酯=95:5),以提供2,2-二氟-1-(2-氟苯基)乙烷-1-酮(5.60g,47.8%收率,85%纯度)。¹H NMR(CDCl₃,400MHz):δ7.99-7.95(m,1H),7.70-7.64(m,1H),7.33(t,J=7.6Hz,2H),7.24(dd,J=10.8,8.4Hz,1H),6.59-6.32(m,1H)。

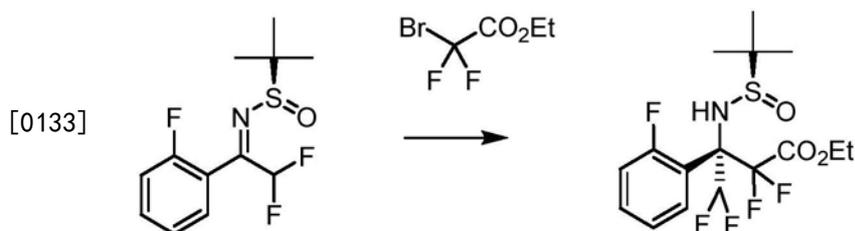
[0129] 中间体:(R)-N-(2,2-二氟-1-(2-氟苯基)亚乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺



[0131] 在26℃下向在THF(110mL)中的2,2-二氟-1-(2-氟苯基)乙烷-1-酮(5.60g,

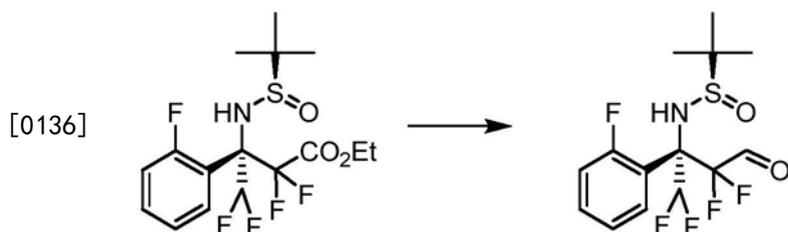
32.16mmol) 和 (R)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺 (5.07g, 41.81mmol) 的溶液中以一次加入的方式添加四乙氧基钛 (14.67g, 64.32mmol)。将黄色溶液在 80℃ 下搅拌 2.5hr。TLC (石油醚:乙酸乙酯=3:1) 显示没有原料剩余。将该混合物冷却至 26℃。将水 (10mL) 加入到混合物中, 并且将其过滤并用乙酸乙酯萃取 (60mL, 三次)。用盐水洗涤有机层, 经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并且浓缩, 然后通过硅胶柱色谱纯化 (石油醚:乙酸乙酯=91:9), 以提供 (R)-N-(2,2-二氟-1-(2-氟苯基)亚乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺 (5.60g, 61.6% 收率, 98.1% 纯度)。

[0132] 中间体: (S)-3-(((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-2,2,4,4-四氟-3-(2-氟苯基)丁酸乙酯



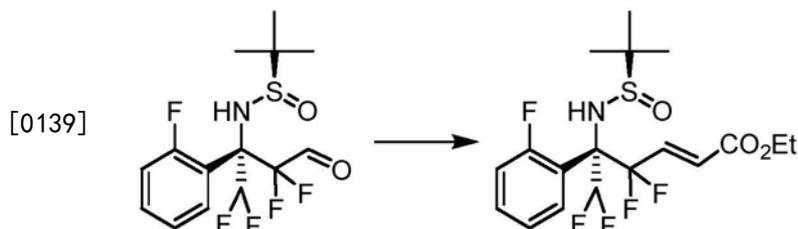
[0134] 在 Ar 下, 经 20 分钟的时间, 在 -78℃ 下向在 THF (90mL) 中的 (R)-N-(2,2-二氟-1-(2-氟苯基)亚乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺 (4.60g, 16.6mmol)、2-溴-2,2-二氟-乙酸乙酯 (6.73g, 33.18mmol) 以及 Rh(PPh₃)₃Cl (469mg, 498μmol) 的溶液中滴加二乙基锌的溶液 (1M 在 THF 中, 33mL), 其间保持温度低于 -65℃。经 10 分钟的时间将反应混合物加温至 0℃ 并在 0℃ 下搅拌 2 小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=3:1) 显示原料完全消耗掉。将深红色溶液用水 (40mL) 淬灭, 然后过滤。将滤液用乙酸乙酯 (100mL, 两次) 萃取。将合并的有机相用饱和盐水 (30mL) 洗涤, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 并在真空中浓缩。将粗产物通过硅胶柱色谱 (石油醚/乙酸乙酯=4:1) 进行纯化, 以给出 (S)-3-(((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-2,2,4,4-四氟-3-(2-氟苯基)丁酸乙酯 (4.26g, 62.1% 收率)。¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ 7.65-7.31 (m, 1H), 7.49-7.44 (m, 1H), 7.23-7.12 (m, 2H), 6.93-6.66 (m, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.39-4.29 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.32 (t, J=8.0Hz, 3H)。

[0135] 中间体: (R)-2-甲基-N-((S)-1,1,3,3-四氟-2-(2-氟苯基)-4-氧代丁-2-基)丙烷-2-亚磺酰胺



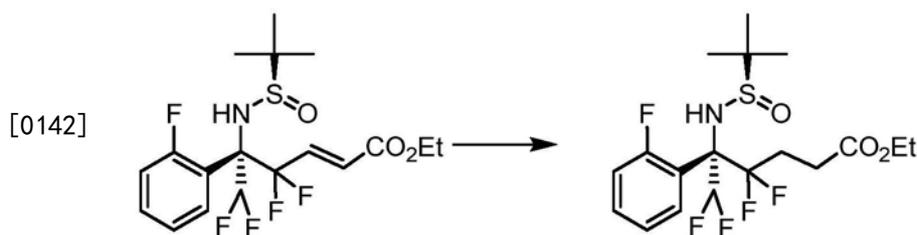
[0137] 在 N₂ 下在 -78℃ 下向在干 THF (35mL) 中的 (S)-3-(((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-2,2,4,4-四氟-3-(2-氟苯基)-丁酸乙酯 (3.20g, 7.97mmol) 的溶液中滴加在甲苯 (1.0M, 16mL, 16mmol) 中的 DIBAL-H (氢化二异丁基铝) 的溶液。将混合物在 -78℃ 搅拌 2 小时。在 -78℃ 下将反应小心用甲醇 (3mL) 淬灭。添加水 (20mL) 和乙酸乙酯 (200mL) 并将该混合物加温至 25℃。将混合物老化 30 分钟。将所得混合物通过硅藻土衬垫进行过滤。将有机层用盐水洗涤并且经 Na₂SO₄ 干燥。将有机层浓缩, 以给出粗产物 (R)-2-甲基-N-((S)-1,1,3,3-四氟-2-(2-氟苯基)-4-氧代丁-2-基)丙烷-2-亚磺酰胺, 将其不经进一步纯化而直接用于下一步。

[0138] 中间体: (S)-5-((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-4,4,6,6-四氟-5-(2-氟苯基)己-2-烯酸乙酯



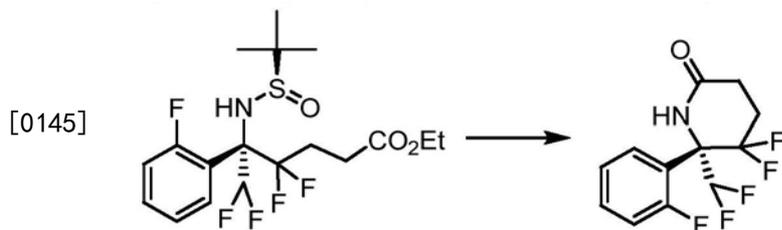
[0140] 在0℃下在N₂下,向在乙腈(30mL)中的LiCl(405mg,9.56mmol)的搅拌悬浮液中添加2-二乙氧基磷酰基乙酸乙酯(2.14g,9.56mmol)和DIPEA(N,N-二异丙基乙胺)(2.06g,15.94mmol)。20min之后,在0℃下将在乙腈(10mL)中的(R)-2-甲基-N-((S)-1,1,3,3-四氟-2-(2-氟苯基)-4-氧代-丁-2-基)丙烷-2-亚磺酰胺(2.85g,7.97mmol)滴加至混合物中并将该混合物在25℃下搅拌17.5小时。将反应混合物浓缩以除去乙腈,添加水(50mL),并且用乙酸乙酯(200mL)进行萃取。将有机层干燥并蒸发。将粗产物通过柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=5:1至4:1)进行纯化,以给出(S)-5-((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-4,4,6,6-四氟-5-(2-氟苯基)己-2-烯酸乙酯(1.77g,46.8%收率)。

[0141] 中间体: (S)-5-((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-4,4,6,6-四氟-5-(2-氟苯基)己酸乙酯



[0143] 向在乙酸乙酯(100mL)中的(S)-5-((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-4,4,6,6-四氟-5-(2-氟苯基)己-2-烯酸乙酯(1.77g,4.28mmol)的溶液中添加Pd/C(400mg,10%)。在45-50psi H₂下,将黑色悬浮液在25℃下搅拌18小时。将其过滤并浓缩以给出(S)-5-((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-4,4,6,6-四氟-5-(2-氟苯基)己酸乙酯(1.70g,95.5%收率),将其不经进一步纯化而直接用于下一步。

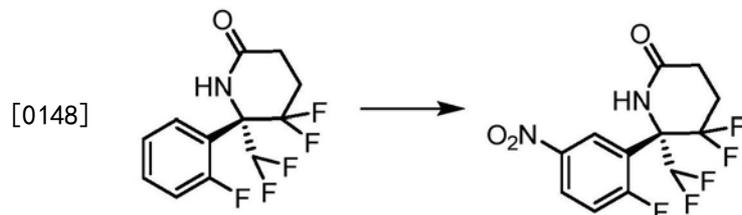
[0144] 中间体: (S)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟苯基)哌啶-2-酮



[0146] 向在二氯甲烷(15mL)中的(S)-5-((R)-叔丁基亚磺酰基)氨基)-4,4,6,6-四氟-5-(2-氟苯基)己酸乙酯(1.70g,4.09mmol)的溶液中添加HCl/MeOH(4M,17mL)。将无色溶液在25℃搅拌1小时。TLC分析显示没有原料剩余。将混合物浓缩并且将残余物溶解于甲苯中。将所得混合物再次浓缩,以给出1.5g的无色油。将该油溶解于甲苯(30mL)中并在100℃下搅拌18小时。在将混合物冷却至25℃之后,将其浓缩,以给出粗产物,将该粗产物通过硅胶快

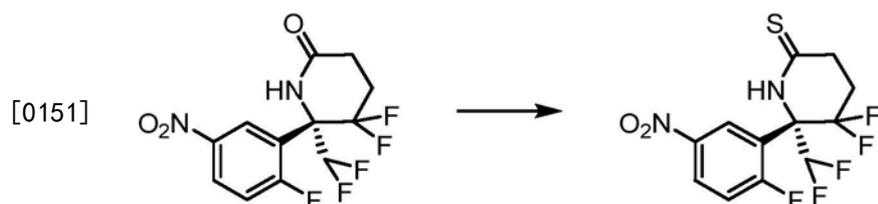
速色谱(石油醚:乙酸乙酯=2:1)进行纯化,以给出(S)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟苯基)哌啶-2-酮(880mg,3.15mmol,73%收率)。

[0147] 中间体:(S)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟-5-硝基苯基)哌啶-2-酮



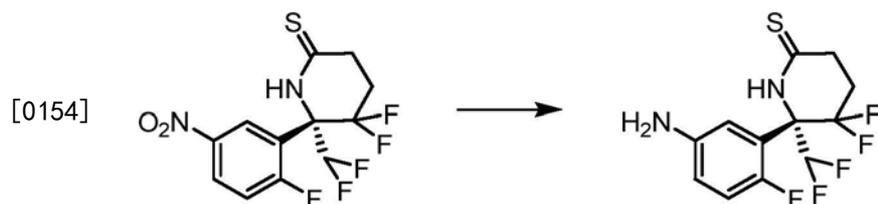
[0149] 将(S)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟苯基)哌啶-2-酮(880mg,3.15mmol)悬浮于三氟乙酸(2.55mL)中。将混合物冷却至0℃并添加浓H₂SO₄(2.46mL,24.3mmol)。接着,逐滴加入HNO₃(661.61mL,6.30mmol)。在25℃下搅拌2小时之后,将反应混合物倾倒在100g冰上并使用5M NaOH(水溶液)碱化至pH>11。将悬浮液用乙酸乙酯(150mL)萃取。将各相分离并且将水层用乙酸乙酯萃取(2x 70mL)。将合并的有机相用饱和NH₄Cl水溶液(30mL)和水(30mL)的溶液洗涤,用MgSO₄干燥,过滤,并在减压下浓缩,以提供(S)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟-5-硝基苯基)哌啶-2-酮(1.00g,粗品)。

[0150] 中间体:(S)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟-5-硝基苯基)哌啶-2-硫酮



[0152] 向在甲苯(5mL)中的(S)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟-5-硝基苯基)哌啶-2-酮(1.00g,3.08mmol)的溶液中添加劳氏试剂(2,4-双(4-甲氧基苯基)-1,3,2,4-二噻-二磷杂环丁烷-2,4-二硫化物)(686mg,1.70mmol)。将混合物在100℃搅拌2小时。TLC分析显示没有原料剩余。将混合物浓缩,并将粗产物通过硅胶快速色谱(石油醚:乙酸乙酯=5:1)进行纯化,以给出(S)-6-(二氟-甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟-5-硝基苯基)哌啶-2-硫酮(1.00g,2.94mmol,95.4%收率)。

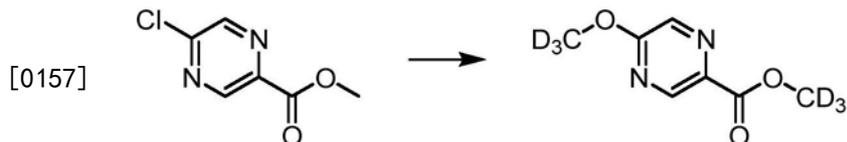
[0153] 中间体:(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮



[0155] 向在乙醇(15mL)和水(4mL)中的(S)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟-6-(2-氟-5-硝基苯基)哌啶-2-硫酮(1.00g,2.94mmol)的悬浮液中添加铁粉(821mg,145mmol)和NH₄Cl(786mg,14.7mmol,5.0当量)。将黑色混合物在60℃搅拌18小时。在将反应混合物冷却至25℃之后,过滤粗产物并用乙醇(100mL)洗涤残余物。将合并的滤液浓缩并将所得固体分散于乙酸乙酯(100mL)中。将混合物过滤并将滤液用水(30mL)、盐水(20mL)洗涤并浓缩。将粗产物通过硅胶快速色谱(石油醚:乙酸乙酯=3:1-2:1)进行纯化,以给出(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮(819mg,2.51mmol,85.3%收率)。¹H NMR(DMSO-d₆,

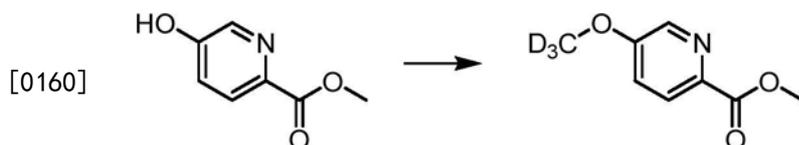
400MHz): δ 10.97 (s, 1H), 7.03-6.90 (m, 2H), 6.64-6.55 (m, 2H), 5.19 (s, 2H), 3.19-3.15 (m, 1H), 3.03-2.94 (m, 1H), 2.35-2.24 (m, 2H)。

[0156] 中间体: 甲基-d₃-5-(甲氧基-d₃)吡嗪-2-羧酸酯



[0158] 将钠(0.094g, 4.10mmol)分小部分地添加至甲醇-d₄(2.94ml), 并将反应混合物进行搅拌直到所有钠已经反应。将该溶液添加至在甲醇-d₄(0.98ml)中的甲基-5-氯吡嗪-2-羧酸酯(0.6g, 3.48mmol)的另一溶液中。将反应混合物在室温下搅拌1.5小时。将反应混合物在真空中浓缩。添加2ml的水。将混合物用乙酸乙酯萃取。将有机相用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 并在真空中浓缩, 以给出甲基-d₃-5-(甲氧基-d₃)吡嗪-2-羧酸酯。

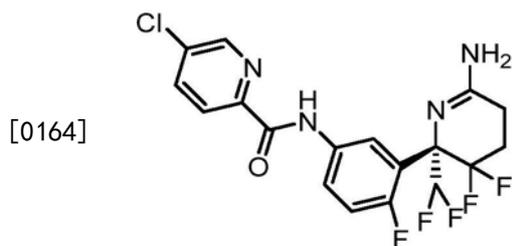
[0159] 中间体: 5-(甲氧基-d₃)吡啶甲酸甲酯



[0161] 在氩下, 将5-羟基吡啶甲酸甲酯(2.88g, 18.81mmol)溶解于二甲基甲酰胺(108mL)中。添加碳酸钾(7.20g, 52.1mmol)并将橙色悬浮液在室温下搅拌45分钟。添加碘代甲烷-d₃(1.41mL, 22.6mmol)。将该反应混合物搅拌2小时。添加水。将混合物用乙酸乙酯萃取。将有机相用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 并在真空中浓缩, 并通过硅胶柱色谱(庚烷: 乙酸乙酯)进行纯化, 以给出5-(甲氧基-d₃)吡啶甲酸甲酯。

[0162] 本发明化合物的制备

[0163] 实例1 (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氯吡啶酰胺(化合物1)

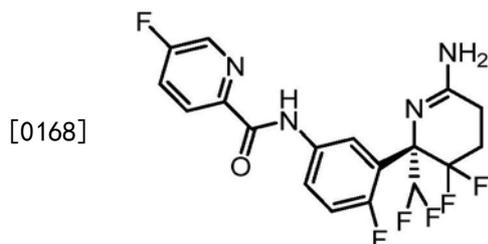


[0165] 将5-氯吡啶甲酸(19mg, 0.12mmol)和HATU(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸酯)(67.4mg, 0.177mmol)溶解于DMF(1mL)中。将反应混合物搅拌5分钟。然后添加(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟吡啶-2-硫脲(25mg, 0.081mmol)和DIPEA(N,N-二异丙基乙胺)(52mg, 0.07ml, 0.4mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时。添加饱和NH₄Cl水溶液, 并且将混合物用乙酸乙酯萃取。将合并的有机相用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤, 并在减压下浓缩。添加在甲醇(7M, 2mL)中的氨并且在密封小瓶中, 将反应混合物在55°C下搅拌过夜。将反应混合物在减压下进行浓缩。通过快速色谱在硅胶上纯化粗产物(庚烷: 乙酸乙酯)。将产物溶解于乙酸乙酯中并且用饱和NaHCO₃水溶液/水洗涤5次以除去硫脲副产物。将合并的有机相用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤, 并且在减压下浓缩, 以给出(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢

吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氯吡啶酰胺。¹H NMR (DMSO-d₆, 600MHz) : δ10.78 (s, 1H) , 8.79 (dt, J=2.4, 1.1Hz, 1H) , 8.20 (dd, J=8.4, 2.4Hz, 1H) , 8.16 (dd, J=8.4, 0.7Hz, 1H) , 7.96-7.90 (m, 1H) , 7.88 (dd, J=6.8, 2.7Hz, 1H) , 7.20 (dd, J=11.6, 8.8Hz, 1H) , 6.74 (t, J=55.2Hz, 1H) , 6.38 (s, 2H) , 2.51 (dt, J=3.7, 1.8Hz, 2H) , 2.19-1.98 (m, 2H) 。

[0166] LC-MS (m/z) 433 (MH⁺) ; t_R=0.53分钟 (方法A)

[0167] 实例2 (S) -N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氟吡啶酰胺 (化合物2)

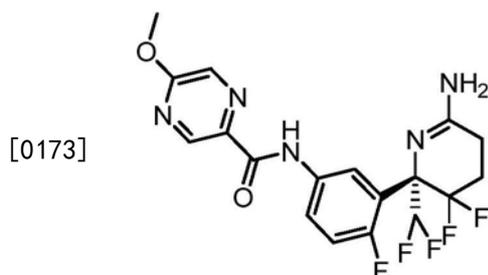


[0169] 如实例1中所述自 (S) -6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和5-氟吡啶甲酸进行制备。

[0170] ¹H NMR (600MHz, DMSO) δ10.72 (s, 1H) , 8.74 (d, J=2.8Hz, 1H) , 8.24 (dd, J=8.7, 4.6Hz, 1H) , 7.99 (td, J=8.7, 2.8Hz, 1H) , 7.95-7.91 (m, 1H) , 7.88 (dd, J=6.8, 2.7Hz, 1H) , 7.20 (dd, J=11.6, 8.8Hz, 1H) , 6.74 (t, J=55.2Hz, 1H) , 6.38 (s, 2H) , 2.56-2.50 (m, 2H) , 2.22-1.98 (m, 2H) 。

[0171] LC-MS (m/z) 417.1 (MH⁺) ; t_R=0.49分钟 (方法A)

[0172] 实例3 (S) -N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基吡啶-2-甲酰胺 (化合物3)

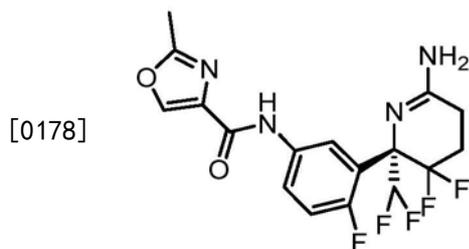


[0174] 如实例1中所述自 (S) -6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和5-甲氧基吡啶-2-羧酸进行制备。

[0175] ¹H NMR (600MHz, DMSO) δ10.61 (s, 1H) , 8.89 (d, J=1.3Hz, 1H) , 8.42 (d, J=1.3Hz, 1H) , 7.90 (m, 2H) , 7.20 (dd, J=11.6, 8.9Hz, 1H) , 6.86-6.62 (m, 1H) , 6.37 (s, 2H) , 4.02 (s, 3H) , 2.56-2.50 (m, 2H) , 2.19-1.96 (m, 2H) 。

[0176] LC-MS (m/z) 430.1 (MH⁺) ; t_R=0.48分钟 (方法A)

[0177] 实例4 (S) -N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-2-甲基噁唑-4-甲酰胺 (化合物4)

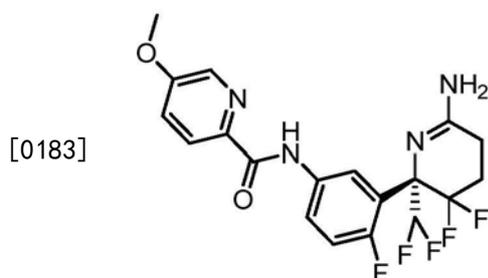


[0179] 如实例1中所述自(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟吡啶-2-硫酮和2-甲基噁唑-4-羧酸进行制备。

[0180] ^1H NMR (600MHz, DMSO) δ 10.25 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.82 (m, 2H), 7.16 (dd, $J=11.6, 8.7\text{Hz}$, 1H), 6.73 (t, $J=55.2\text{Hz}$, 1H), 6.36 (s, 2H), 3.01 (s, 1H), 2.59-2.41 (m, 5H), 2.19-1.96 (m, 2H)。

[0181] LC-MS (m/z) 403 (MH^+); $t_{\text{R}}=0.42$ 分钟(方法A)

[0182] 实例5 (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基吡啶酰胺(化合物5)

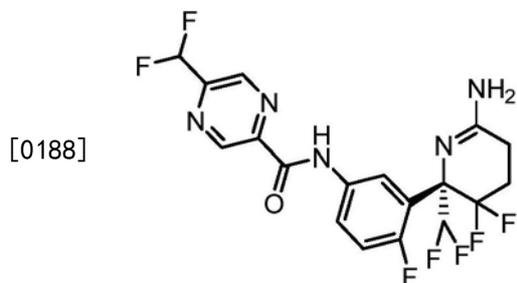


[0184] 如实例1中所述自(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟吡啶-2-硫酮和5-甲氧基吡啶甲酸进行制备。

[0185] ^1H NMR (600MHz, DMSO) δ 10.55 (s, 1H), 8.40 (d, $J=2.9\text{Hz}$, 1H), 8.13 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 7.94-7.90 (m, 1H), 7.84 (dd, $J=6.7, 2.7\text{Hz}$, 1H), 7.62 (dd, $J=8.7, 2.9\text{Hz}$, 1H), 7.18 (dd, $J=11.6, 8.8\text{Hz}$, 1H), 6.85-6.61 (m, 1H), 6.36 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.55-2.47 (m, 2H), 2.17-2.00 (m, 2H)。

[0186] LC-MS (m/z) 429.1 (MH^+); $t_{\text{R}}=0.5$ 分钟(方法A)

[0187] 实例6 (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(二氟甲基)吡啶-2-甲酰胺(化合物6)



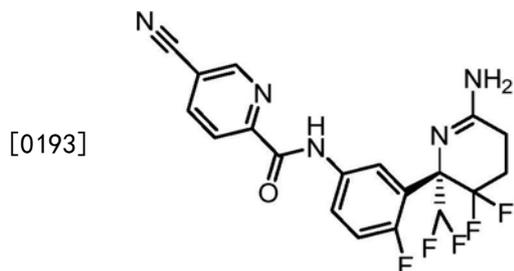
[0189] 如实例1中所述自(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟吡啶-2-硫酮和5-(二氟甲基)吡啶-2-羧酸进行制备。

[0190] ^1H NMR (600MHz, DMSO) δ 11.02 (s, 1H), 9.40 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H), 9.10 (s, 1H), 7.96-7.91 (m, 2H), 7.38-7.17 (m, 2H), 6.75 (t, $J=55.1\text{Hz}$, 1H), 6.38 (s, 2H), 2.56-2.50 (m, 2H),

2.20-1.98 (m, 2H)。

[0191] LC-MS (m/z) 450.1 (MH⁺) ; t_R=0.48分钟 (方法A)

[0192] 实例7 (S) -N- (3- (6-氨基-2- (二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氰基吡啶酰胺 (化合物7)

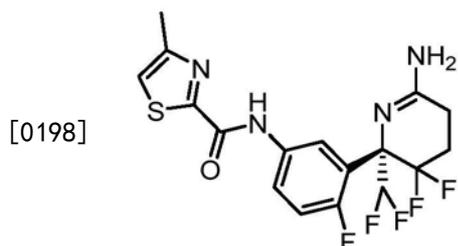


[0194] 如实例1中所述自 (S) -6- (5-氨基-2-氟苯基)-6- (二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和5-氰基吡啶甲酸进行制备。

[0195] ¹H NMR (600MHz, DMSO) δ10.94 (s, 1H), 9.21 (d, J=1.3Hz, 1H), 8.59 (dd, J=8.2, 1.9Hz, 1H), 8.29 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.96-7.88 (m, 2H), 7.22 (dd, J=11.5, 8.8Hz, 1H), 6.74 (t, J=55.0Hz, 1H), 6.37 (s, 2H), 2.57-2.48 (m, 2H), 2.07 (m, 2H)。

[0196] LC-MS (m/z) 424.5 (MH⁺) ; t_R=0.45分钟 (方法B)

[0197] 实例8 (S) -N- (3- (6-氨基-2- (二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-4-甲基噻唑-2-甲酰胺 (化合物8)

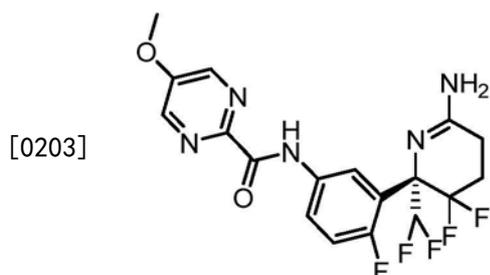


[0199] 如实例1中所述自 (S) -6- (5-氨基-2-氟苯基)-6- (二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和4-甲基噻唑-2-羧酸进行制备。

[0200] ¹H NMR (600MHz, DMSO) δ10.84 (s, 1H), 7.90 (dd, J=6.7, 2.5Hz, 1H), 7.88-7.83 (m, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.19 (dd, J=11.5, 8.9Hz, 1H), 6.74 (t, J=55.1Hz, 1H), 6.38 (s, 2H), 2.59-2.46 (m, 5H), 2.18-1.95 (m, 2H)。

[0201] LC-MS (m/z) 419.4 (MH⁺) ; t_R=0.47分钟 (方法B)

[0202] 实例9 (S) -N- (3- (6-氨基-2- (二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基嘧啶-2-甲酰胺 (化合物9)



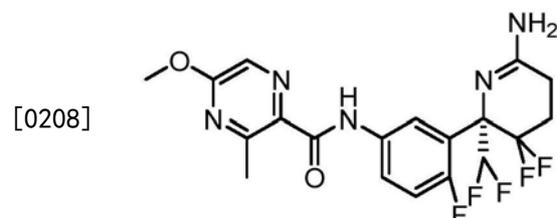
[0204] 如实例1中所述自 (S) -6- (5-氨基-2-氟苯基)-6- (二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫

酮和5-甲氧基嘧啶-2-羧酸进行制备。

[0205] ^1H NMR (600MHz, DMSO) δ 10.73 (s, 1H), 8.73 (s, 2H), 7.95-7.91 (m, 1H), 7.82 (dd, $J=6.7, 2.5\text{Hz}$, 1H), 7.22-7.18 (m, 1H), 6.74 (t, $J=55.2\text{Hz}$, 1H), 6.37 (s, 2H), 4.03 (s, 3H), 2.58-2.50 (m, 2H), 2.18-1.99 (m, 2H)。

[0206] LC-MS (m/z) 430.5 (MH^+); $t_{\text{R}}=0.39$ 分钟 (方法B)

[0207] 实例10 (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-甲氧基-3-甲基吡嗪-2-甲酰胺 (化合物10)

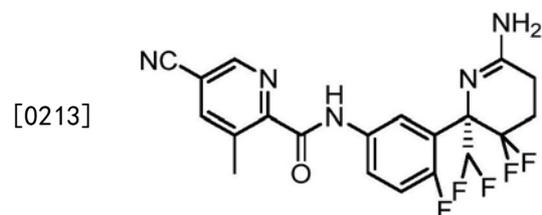


[0209] 如实例1中所述自 (S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和5-甲氧基-3-甲基吡嗪-2-羧酸进行制备。

[0210] ^1H NMR (600MHz, DMSO) δ 10.52 (s, 1H), 8.24 (d, $J=0.6\text{Hz}$, 1H), 7.91 (ddd, $J=8.8, 4.1, 2.8\text{Hz}$, 1H), 7.74 (dd, $J=6.8, 2.7\text{Hz}$, 1H), 7.18 (dd, $J=11.7, 8.8\text{Hz}$, 1H), 6.85-6.62 (m, 1H), 6.38 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 2.76 (d, $J=0.5\text{Hz}$, 3H), 2.55-2.49 (m, 2H), 2.18-1.99 (m, 2H)。

[0211] LC-MS (m/z) 444.5 (MH^+); $t_{\text{R}}=0.52$ 分钟 (方法B)

[0212] 实例11 (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-氰基-3-甲基吡啶酰胺 (化合物11)

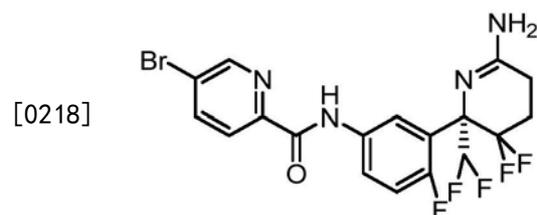


[0214] 如实例1中所述自 (S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和5-氰基-3-甲基吡啶甲酸进行制备。

[0215] ^1H NMR (600MHz, DMSO) δ 10.80 (s, $J=27.6\text{Hz}$, 1H), 8.99 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.99-7.87 (m, 1H), 7.82-7.69 (m, 1H), 7.36-7.13 (m, 1H), 6.73 (t, $J=55.0\text{Hz}$, 1H), 6.36 (s, 2H), 2.56-2.47 (m, 2H), 2.21-1.97 (m, 2H)。

[0216] LC-MS (m/z) 438.1 (MH^+); $t_{\text{R}}=0.49$ 分钟 (方法B)

[0217] 实例12 (S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-溴吡啶酰胺 (化合物12)

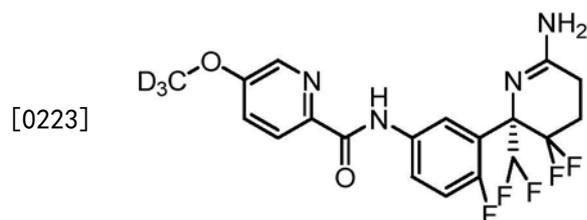


[0219] 如实例1中所述自(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和5-溴吡啶甲酸进行制备。

[0220] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, DMSO) δ 10.78 (s, 1H), 8.87 (dd, $J=2.3, 0.7\text{Hz}$, 1H), 8.33 (dd, $J=8.4, 2.3\text{Hz}$, 1H), 8.09 (dd, $J=8.4, 0.6\text{Hz}$, 1H), 7.94 (ddd, $J=8.8, 4.1, 2.8\text{Hz}$, 1H), 7.89 (dd, $J=6.8, 2.7\text{Hz}$, 1H), 7.21 (dd, $J=11.6, 8.8\text{Hz}$, 1H), 6.88-6.62 (m, 1H), 6.39 (s, 2H), 2.60-2.49 (m, 2H), 2.19-1.96 (m, 2H)。

[0221] LC-MS (m/z) 479.1 (MH^+); $t_{\text{R}}=0.53$ 分钟(方法B)

[0222] 实例13(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(甲氧基-d3)吡啶酰胺(化合物13)

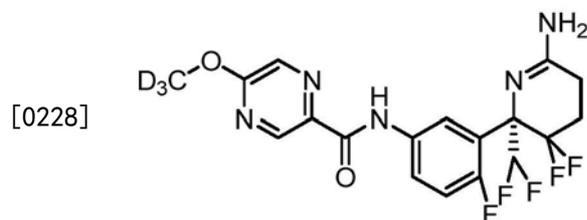


[0224] 在氩气气氛下,将(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮(25mg, 0.081mmol)溶解于二氯甲烷(1mL)中。缓慢添加三甲基铝(52 μ l, 0.105mmol, 2摩尔, 甲苯),然后添加在0.5mL二氯甲烷中的甲基-(甲氧基-d3)吡啶甲酸酯(18mg, 0.11mmol)。将反应混合物在室温下搅拌2小时。将反应混合物倾倒入冷却的4N HCl(水溶液)中。将混合物用乙酸乙酯萃取。将有机相用盐水洗涤,用硫酸镁干燥并在真空中浓缩。添加在甲醇(4mL)中的7M氨并且在密封小瓶中,将反应混合物在50 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜。将反应混合物在真空中浓缩,并通过硅胶快速色谱(庚烷/乙酸乙酯)纯化,随后通过制备型HPLC纯化,以得到呈三氟乙酸盐的标题化合物。

[0225] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, DMSO) δ 11.13 (s, 1H), 10.75 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.40 (dd, $J=2.9, 0.5\text{Hz}$, 1H), 8.21 (ddd, $J=8.9, 4.1, 2.6\text{Hz}$, 1H), 8.15 (dd, $J=8.7, 0.5\text{Hz}$, 1H), 8.09 (dd, $J=6.8, 2.6\text{Hz}$, 1H), 7.64 (dd, $J=8.7, 2.9\text{Hz}$, 1H), 7.40 (dd, $J=11.9, 9.0\text{Hz}$, 1H), 7.20 (t, $J=53.0\text{Hz}$, 1H), 3.17-3.01 (m, 2H), 2.48-2.38 (m, 2H)。

[0226] LC-MS (m/z) 432 (MH^+); $t_{\text{R}}=0.49$ 分钟(方法A)

[0227] 实例14(S)-N-(3-(6-氨基-2-(二氟甲基)-3,3-二氟-2,3,4,5-四氢吡啶-2-基)-4-氟苯基)-5-(甲氧基-d3)吡啶-2-甲酰胺(化合物14)



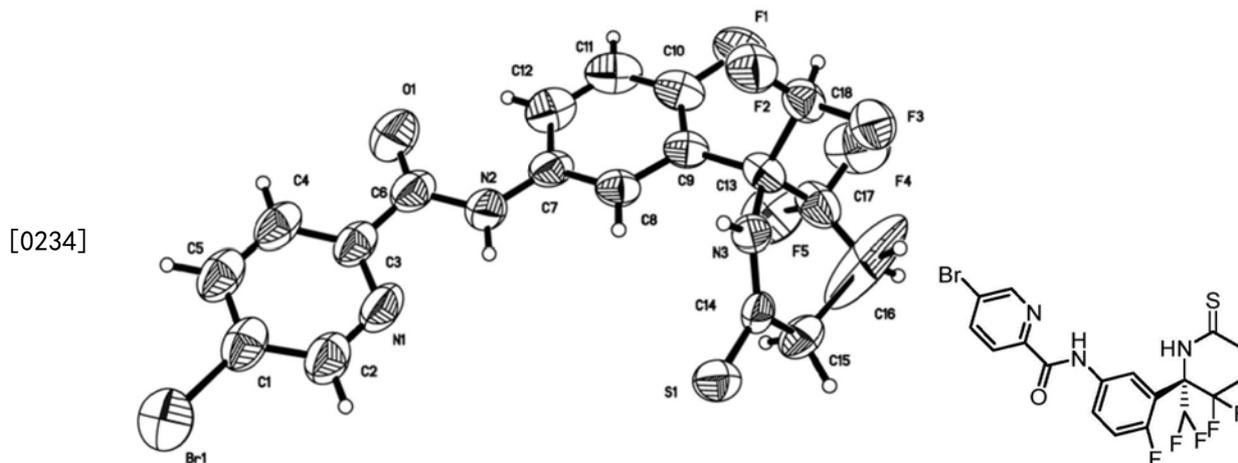
[0229] 如实例13中所述自(S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和5-(甲氧基-d3)吡啶甲酸甲酯进行制备。

[0230] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, DMSO) δ 10.61 (s, 1H), 8.89 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 8.42 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 7.91-7.86 (m, 2H), 7.19 (dd, $J=11.5, 8.9\text{Hz}$, 1H), 6.84-6.61 (m, 1H), 6.36 (s, 2H), 2.53-2.49 (m, 2H), 2.16-1.96 (m, 2H)。

[0231] LC-MS (m/z) 433.1 (MH⁺) ; t_R=0.49分钟 (方法A)

[0232] 立体化学

[0233] 通过从庚烷和乙酸乙酯的混合物中重结晶 (S)-5-溴-N-(3-(2-(二氟甲基)-3,3-二氟-6-硫代哌啶-2-基)-4-氟苯基) 吡啶酰胺获得晶体。通过所述晶体的X射线结晶学阐明 (S)-5-溴-N-(3-(2-(二氟甲基)-3,3-二氟-6-硫代哌啶-2-基)-4-氟苯基) 吡啶酰胺的结构。该结构显示 (S)-5-溴-N-(3-(2-(二氟甲基)-3,3-二氟-6-硫代哌啶-2-基)-4-氟苯基) 吡啶酰胺的绝对和相对构型。如实例1所述自 (S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮和5-溴吡啶甲酸制备 (S)-5-溴-N-(3-(2-(二氟甲基)-3,3-二氟-6-硫代哌啶-2-基)-4-氟苯基) 吡啶酰胺。



[0235] (S)-5-溴-N-(3-(2-(二氟甲基)-3,3-二氟-6-硫代哌啶-2-基)-4-氟苯基) 吡啶酰胺的X射线结构

[0236] 可以由此合理化本发明的例示化合物的绝对构型。自 (S)-6-(5-氨基-2-氟苯基)-6-(二氟甲基)-5,5-二氟哌啶-2-硫酮 (本发明所有示例性化合物的原料) 制备 (S)-5-溴-N-(3-(2-(二氟甲基)-3,3-二氟-6-硫代哌啶-2-基)-4-氟苯基) 吡啶酰胺。

[0237] 药理学测试

[0238] BACE1结合测定

[0239] 基于SPA的测定,使用从自由式HEK293细胞 (Freestyle HEK293 cell) 重组表达并且随后纯化的、生物素化形式的人类BACE1进行结合测定。在白色清底384板 (Corning (康宁公司) #3653) 中于50mM乙酸钠缓冲液 (pH4.5) 中运行结合测定,该缓冲液包含50mM NaCl和0.03% Tween-20。将10nM (终浓度) 放射性配体 (³H)-N-((1S,2R)-1-苄基-3-环丙基氨基-2-羟基-丙基)-5-(甲烷磺酰基-甲基-氨基)-N-((R)-1-苄基-乙基)-异酞酰胺 (购自GE医疗集团 (GE Healthcare) 的TRQ11569) 与给定浓度的测试化合物、6nM (终浓度) 人类BACE1和25μg链霉亲和素涂布的PVT核SPA珠粒 (RPNQ0007, GE医疗集团生命科学部 (GE Healthcare Life Sciences)) 混合,总体积为40μl。在测定中测试每种测试化合物的若干浓度,用于确定IC₅₀。将板在室温下孵育一小时并且在Wallac Trilux计数器中计数。分别使用缓冲液和1μM (终浓度) 的高亲和力BACE1参比抑制剂 (S)-6-[3-氯-5-(5-丙-1-炔基-吡啶-3-基)-噻吩-2-基]-2-亚氨基-3,6-二甲基-四氢-嘧啶-4-酮确定总的和非特异性的结合。对于每种测试化合物,IC₅₀值 (介导放射性配体的特异性结合的50%抑制的浓度) 确定自浓度-反应曲线并用于从等式 $K_i = IC_{50} / (1 + L/K_d)$ 计算K_i,其中L和K_d分别是用于测定的放射性配体的终浓

度和放射性配体的解离常数。放射性配体的 K_d 确定自饱和结合实验。

[0240] 表1:所选化合物的结合亲和力

[0241]

化合物编号	BACE1 K_i (nM)
1	18
2	23
3	8.5
4	20
5	6.7
6	20
7	7.4
8	71
9	6.9
10	16
11	7.8
12	6.1
13	14
14	18

[0242] BACE1有效性测定

[0243] 基于FRET的测定,使用可商购BACE1试剂盒 (Life Technologies (美国生命技术公司), P2985) 进行有效性测定。将2 μ l的10 μ M (终浓度) 测试化合物和来自试剂盒的15 μ l BACE1酶 (终浓度3nM) 在室温下预孵育15分钟,之后添加来自该试剂盒的15 μ l底物 (250nM终浓度),并且在室温下再孵育90分钟。随后在Pherastar (Ex540/Em590) 中对测定板进行读数。将存在测试化合物情况下观察到的酶活性标准化为分别存在缓冲液和10 μ M (终浓度) 的高亲和力BACE1参比抑制剂 (S)-6-[3-氯-5-(5-丙-1-炔基-吡啶-3-基)-噻吩-2-基]-2-亚氨基-3,6-二甲基-四-氢嘧啶-4-酮情况下观察到的酶活性。在10 μ M (终浓度) 下评估测试化合物的有效性并且使用等式%抑制=100%-以百分比计的标准化酶活性,将有效性定义为酶活性的百分比抑制。

[0244] 表2:所选化合物的BACE1活性

化合物编号	10 μ M 下的 BACE1 抑制 (%)
1	106
2	100
3	103
4	104
[0245] 5	101
6	103
8	102
9	103
10	106
13	103
14	108

[0246] BACE1抑制后,评价大鼠脑和血浆中的A β 水平。

[0247] 动物。

[0248] 根据丹麦议会,所有大鼠护理和实验程序都被灵北 (Lundbeck) 兽医人员批准。将大鼠以12/12-h光暗循环养护在障碍设施中并且任意给予食物和水。

[0249] 首试大鼠的处理。

[0250] 大约250g重的年轻成年雄性斯普拉-道来 (Sprague Dawley) 大鼠购自Charles River (查尔斯河公司) 并且仅通过口服强饲 (p.o) 接受0-30mg/kg的运载体 (10%HP β CD+1M MeSO₄, pH 2.5) 或测试化合物 (溶解于运载体中)。以5ml/kg的体积给予化合物。对于每种处理条件,建立5-10只动物的同类组。

[0251] 由兽医人员密切监测经历处理的动物的任何中毒症状。监测参数包括体重、体态、皮毛 (coat) 外观的变化、无端行为的出现以及对外界刺激的反应迟钝或夸大。

[0252] 组织收集。

[0253] 在初次给药后T=180分钟时,将动物打昏并用铡除刀断头。在将动物断头后,将主干血加样于EDTA包衣的试管中。将血液在4°C下以2200G离心15分钟并收集血浆并且将其冷冻在-80°C下。将血液等分用于ABELISA和DMPK分析。处死后立即提取脑并将其分为两等份。将右半脑在干冰上快速冷冻并储存在-80°C下。将左半部分解剖;其中额前脑 (front forebrain) 用于进行ABELISA并且剩余部分用于进行DMPK分析。也将这些样品在干冰上快速冷冻并储存在-80°C下,直到分析使用。

[0254] 组织加工。

[0255] 在将皮层样品用速度设定为5的小容量分散仪 (T10基础 (basic) ULTRA-TURRAX®) 均质化5-7sec之前,将其在湿冰上稍微解冻。将组织在其重量的10倍体积的缓冲液中加工,例如将100mg的组织在1000 μ L的均质化缓冲液中均质化。均质化缓冲液:50ml Milli Q水+50nM NaCl+0.2%二乙胺 (DEA) +1片完全蛋白酶 (Complete Protease) 抑制剂混合物+1nM 4- (2-氨基乙基) 苯磺酰氟盐酸化物不可逆丝氨酸蛋白酶抑制剂 (AEBSF)。

[0256] 均质化后,将样品的450 μ L等分部分收集在1.5ml埃彭道夫管 (Eppendorf tube) 中并放置在湿冰上,将0.5%NP-40 (50 μ l) 添加至所有样品中并且然后将其在冰上孵育30min。这之后使用具有20kHz匀声的超声匀浆器 (SONOPLUS HD2070,班德林电子 (Bandelin

Electronic)) (10脉冲设定在12%-13%功率) 超声处理所有样品以提取所有Aβ种类。然后, 将样品在4℃下以20000G离心 (Ole Dich 157MPRF微量离心机) 20分钟。离心后, 将285μL的上清液用移液管吸取进600μL微管中并用15μL的1M Tris-HCL缓冲液中和。

[0257] ELISA方案。

[0258] 使用WAKO 294-62501人类/大鼠Aβ淀粉样蛋白(40)试剂盒进行所有ELISA分析。将如以上所描述产生的30μL血浆样品或30μL的皮层上清液置于在湿冰上的600μL微管中。向其中添加30μL的8M脲(艾普利(AppliChem) A1049, 9025), 以产生2倍稀释。将血浆和皮层上清液两者都在冰上孵育30min。标准品列制备自提供于试剂盒中的标准肽储备物以及包含1.6M脲(200μL 8M脲+800μL的标准稀释物)和0.8M脲(400μL 8M脲+3600μL标准稀释物)的标准稀释物。制备从100pmol/ml至0pmol/L的Aβ40的连续2倍稀释用于进行测定。

[0259] 在用脲孵育之后, 通过添加5倍的来自试剂盒的标准稀释物进一步稀释所有样品。这通过将240μL标准稀释物添加至60μL样品/脲混合物中然后将其充分混合来进行。将100μL的每种稀释样品一式两份地用移液管吸取进ELISA板的指定孔中。然后将板覆盖并在4℃下孵育过夜。第二天, 在使用之前将ELISA试剂盒回到室温。将孵育板用稀释于Milli Q水中的20x洗涤溶液洗涤5次。将100μL HRP-偶联物施加至每个孔中, 并且将板覆盖且在4℃下孵育1hr。再次重复洗涤5次。将100μL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液施加至每个孔中并且将板覆盖并在室温下于黑暗中孵育30分钟。接下来, 将100μL终止溶液施加至每个孔中, 并且在将终止溶液添加至孔中的30min内, 将板在分光光度计(实验室系统酶标仪(Labsystems Multiscan Ascent))中于450nm波长下进行读数。

[0260] 基于生成自包含已知浓度的合成Aβ40的标准品的标准曲线来确定样品中的Aβ浓度。本领域的普通技术人员将意识到, 二乙胺(DEA)和脲萃取将分别释放可溶性Aβ和不可溶性Aβ。由于ELISA试剂盒是经过验证的且广泛使用, 所以可接受的是只要对于每种测试化合物而言处理条件和测定条件相同, 则测定应该针对测试的化合物产生一致的稳健数据并产生最小差异。

[0261] 数据分析

[0262] 为了确定样品中的Aβ40浓度, 将装载在板上的样品的内插值乘以20, 以将当DEA、脲和中和溶液的体积累加时产生的稀释考虑在内。将值计算为与运载体处理的动物相比的Aβ40的百分比变化。

[0263] 脑和血浆样品的生物分析

[0264] 使用UltraPerformance LC[®] (UPLC[®]) 色谱, 随后通过串联-MS (MS/MS) 检测确定血浆和脑组织匀浆中的TC。

[0265] 装置:

[0266] Tecan Genesis RSP 200; Biomek NXP, Beckman Coulter (贝克曼库尔特公司); Sigma 4K15离心机; Acquity UPLC, Waters (沃特斯公司); Sciex API4000 TQ, Applied Biosystems (应用生物系统公司); MS软件: 分析者版本1.4.1

[0267] 化学品

[0268] 乙腈, HPLC级, Fluka, No. 34967N; 甲醇, HPLC级, Sigma-Aldrich (西格玛-奥德里奇公司), 批次9003S; 甲酸, HPLC级, Riedel-de Haën, 批次51660; 净化水, Millipore Synergy

UV

[0269] 样品制备

[0270] 通过将脑1:4 (v/v) 与水:2-丙醇:DMSO (50:30:20v/v/v) 搅匀, 随后通过离心和收集上清液制备脑组织匀浆。使用Hamilton机器制备校准用标准品和QC样品。使用Biomek机器将在乙腈 (1ng/mL ISTD) 中的150μL ISTD添加至25μL的校准用标准品、QC样品和检测样品 (血浆和脑组织匀浆) 中。离心 (6200g, 4°C, 20min) 之后, 将来自每个样品的100μL上清液转移至一个新板并使用Biomek机器将其与100μL水和0.1%甲酸混合。在快速离心 (6200g, 4°C, 5min) 之后, 将这些样品置于自动取样器中。

[0271] UPLC-MS/MS分析

[0272] 用在正离子电喷射离子化模式中的Applied Biosystems Sciex API 4000仪器完成MS/MS检测。以亲代>子代质荷比 (m/z) 检测TC和ISTD。使用氮作为雾化器气体和碰撞气体。与血浆和脑分析物浓度线性相关的峰面积在1.00-1000ng/mL血浆以及5.00-5000ng/g脑的范围内 (针对稀释校正的)。如果血浆/脑样品药物浓度高于1000ng/mL或5000ng/g, 该样品在分析之前在空白血浆/空白脑组织匀浆中适当稀释。

[0273] 色谱系统

[0274] 分析柱:

[0275] 沃特斯Acquity UPLC HSS C18 SB (pH 2-8) 1.8μm, 2.1x 30mm。

[0276] 流动相A: 0.1%水性甲酸或0.1%水性氢氧化铵

[0277] 流动相B: 含0.1%水性甲酸或0.1%水性氢氧化铵的乙腈。

[0278] 弱洗剂: 甲醇

[0279] 强洗剂: 乙腈/异丙醇/甲酸 (50/50/2v/v/v)

[0280] 流量: 0.6mL/min

[0281] 运行时间: 3min。

[0282] 至废料: 0-0.5min

[0283] 温度: 40°C

[0284] 梯度:

	时间 (min)	% A	% B
	0	98	2
	0.01	98	2
[0285]	1.5	5	95
	2	5	95
	2.2	98	2
	3	98	2

[0286] 将化合物3和5以10mg/kg的剂量口服强饲给予并且在给药后3小时收集脑和血浆样品并且如以上所描述测量以下暴露。

[0287] 表3: 化合物3的结果

	剂 量 (mg/kg)	Exp (ng/g)	脑/血浆 比率	A β 40 减少 (%)	
[0288]	大鼠脑	10	511	0.30	24
	大鼠血浆		1682		39
	大鼠脑	30	2284	0.32	38
	大鼠血浆		7056		42

[0289] 表4:化合物5的结果

	剂 量 (mg/kg)	Exp (ng/g)	脑/血浆 比率	A β 40 减少 (%)	
[0290]	大鼠脑	10	187	0.28	5
	大鼠血浆		660		40
[0291]	大鼠脑	30	959	0.29	36
	大鼠血浆		3348		49

[0292] 如表3和4所示,本发明的化合物能够穿透血脑屏障并且显示在CNS中的有效性。

[0293] MDCK-MDR1测定

[0294] 在MDCK-MDR1细胞中评估测试化合物的透性,将这些细胞在96transwell板中培养至融合(4-6天)。用转运缓冲液(HBSS+1%BSA)将测试化合物稀释至0.5 μ M的浓度并应用于细胞单分子层的顶侧或基底外侧。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下,在95%的相对湿度,经60分钟的孵育时间,对从A到B方向或B到A方向的测试化合物的渗透一式三份进行确定。基于transwell板的受体和供体孔中分析物/IS的峰面积比,通过LC-MS/MS分析来量化测试化合物。

[0295] 使用以下等式计算表观透性系数P_{app}(cm/s):

$$[0296] \quad P_{app} = (dCr/dt) \times V_r / (A \times C_0)$$

[0297] 其中dCr/dt是受体室中化合物的累积浓度作为时间的函数(μ M/s);V_r是受体室中的溶液体积(顶侧上0.05mL;基底外侧上0.25mL);A是运输的表面面积,即单分子层的面积为0.0804cm²;C₀是供体室中的初始浓度(μ M)。

[0298] 当流出比(P_{app} BA/P_{app} AB) \geq 2时,将化合物归类为P_{gp}底物。

[0299] 表5:所选化合物的BACE1活性

化合物	MDCK-MDR1 流出比
1	1.16
2	1.75
3	1.22
4	4.01
[0300] 5	0.99
6	1.36
7	2.43
8	0.92
9	10.99
10	0.98
11	2.68
[0301] 12	1.31
13	0.83

[0302] 如表5中所示,本发明大部分示例性化合物具有低于2的MDCK-MDR1流出比并且因此可能穿透血脑屏障(E Kerns (E克恩斯), L Di (L迪), Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods (类药属性:概念,结构化设计和方法) (2008) Elsevier (爱思唯尔))。