



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117479934 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202280014176.5

K • 李

(22) 申请日 2022.02.09

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30) 优先权数据

63/147,859 2021.02.10 US

专利代理师 刘香宜

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.09

(51) Int.Cl.

A61K 31/4245 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/015767 2022.02.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/173795 EN 2022.08.18

(71) 申请人 西奈山伊坎医学院

地址 美国纽约州

申请人 由退伍军人事务部为代表的美利坚
合众国

(72) 发明人 R • T • 贝雷西斯 J • C • 何

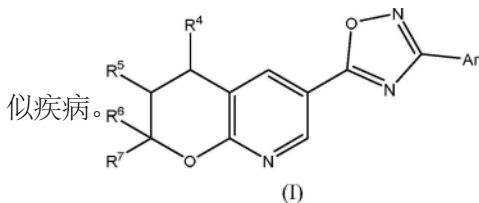
权利要求书2页 说明书52页

(54) 发明名称

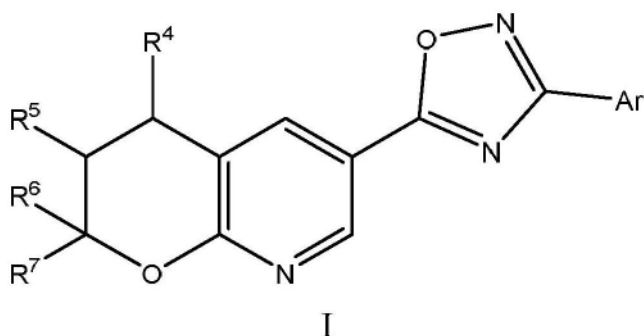
用于治疗肾纤维化的噁二唑基二氢吡喃并
[2,3-b]吡啶的HIPK2抑制剂

(57) 摘要

公开了作为Smad3激活的选择性抑制剂的化合物。这些化合物是具有以下结构(I)的(3-芳基-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶,其中Ar为芳基或杂芳基。本发明化合物可用于治疗纤维化疾病,特别是肾纤维化,以及与HIPK2/Smad3信号传导途径失调相关的类



1. 式I化合物



其中

Ar为

(a) 在间位和/或对位被一个或多个独立地选自以下的取代基取代的苯基: 氢、- (C₁-C₈) 烷基、OH、-O (C₁-C₈) 烷基、卤素、硝基、氨基、(C₁-C₃) 烷基氨基、(C₁-C₃) 二烷基氨基、(C₁-C₃) 酰氨基、(C₁-C₃) 烷基磺酰基、(C₁-C₃) 卤代烷基、(C₁-C₃) 卤代烷氧基、5元或6元杂环基和B(OH)₂; 或者

(b) 被一个选自以下取代基取代的5元杂芳基: 氢、- (C₁-C₃) 烷基、OH、-O (C₁-C₃) 烷基、卤素、氨基、(C₁-C₃) 烷基氨基、(C₁-C₃) 二烷基氨基、(C₁-C₃) 卤代烷基和(C₁-C₃) 卤代烷氧基;

R⁴选自氢、羟基、(C₁-C₃) 烷基、(C₁-C₃) 烷氧基、氨基、(C₁-C₃) 烷基氨基和(C₁-C₃) 二烷基氨基;

R⁵选自氢、羟基、(C₁-C₃) 烷基、(C₁-C₃) 烷氧基、氨基、(C₁-C₃) 烷基氨基和(C₁-C₃) 二烷基氨基;

R⁶选自氢和(C₁-C₆) 烷基; 和

R⁷选自氢和(C₁-C₃) 烷基; 和

条件是并非所有R⁴、R⁵、R⁶和R⁷都是氢。

2. 根据权利要求1的化合物, 其中Ar是苯基。

3. 根据权利要求2的化合物, 其中苯基被选自溴、氯、氟、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基和甲基的取代基对位取代。

4. 根据权利要求1的化合物, 其中Ar是5元杂芳基。

5. 根据权利要求4的化合物, 其中Ar选自噻吩、吡唑、噁唑和噻唑。

6. 根据权利要求5的化合物, 其中Ar是未取代的或被选自- (C₁-C₃) 烷基、溴、氯、氟、氟甲基、二氟甲基和三氟甲基的取代基取代。

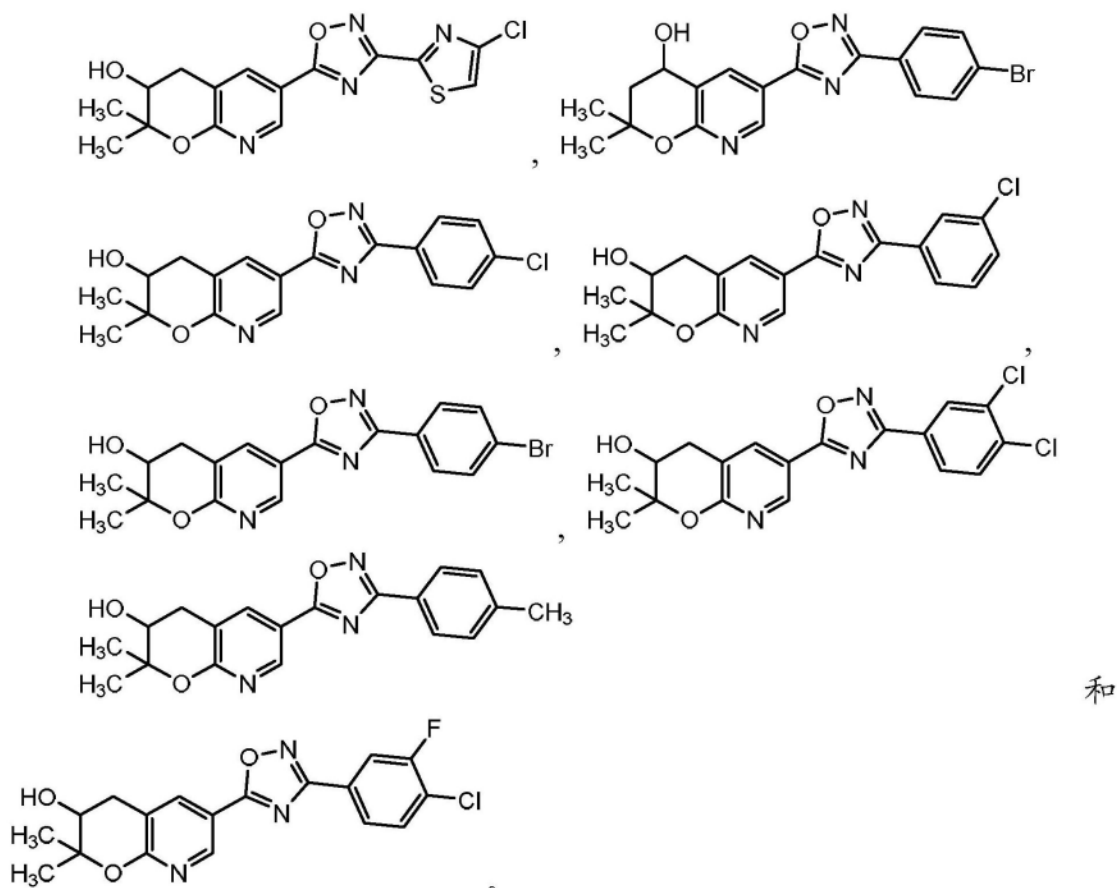
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 其中R⁴选自氢、羟基和氨基。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 其中R⁵选自氢、羟基、甲氧基和氨基。

9. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 其中R⁶和R⁷独立地选自氢和甲基。

10. 根据权利要求9的化合物, 其中R⁶和R⁷是甲基并且R⁴和R⁵之一是羟基。

11. 根据权利要求1所述的化合物, 选自:



12. 根据权利要求9的化合物,其中Ar是在3-或4-位被氯或甲基取代的噻唑-2-基。

13. 药物组合物,其包含药学上可接受的载体和根据权利要求1-6或11中任一项所述的化合物。

14. 一种抑制同源结构域相互作用蛋白激酶2(HIPK2)与Smad3相互作用的方法,所述方法包括使HIPK2与根据权利要求1-6或11中任一项所述的化合物接触。

15. 一种用于抑制Smad3活化的方法,所述方法包括使Smad3与根据权利要求1-6或11中任一项所述的化合物接触。

16. 根据权利要求14所述的体外方法。

17. 根据权利要求14所述的体内方法。

18. 根据权利要求15所述的体外方法。

19. 根据权利要求15所述的体内方法。

20. 一种治疗纤维化疾病的方法,包括向患有纤维化疾病的受试者给药根据权利要求1-6或11中任一项所述的化合物。

21. 根据权利要求20的方法,其中所述疾病是肾纤维化。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述疾病是心脏纤维化。

23. 根据权利要求20的方法,其中所述疾病是肝纤维化。

24. 根据权利要求20的方法,其中所述疾病是肺纤维化。

用于治疗肾纤维化的噁二唑基二氢吡喃并[2,3-b]吡啶的 HIPK2抑制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年2月10日提交的美国临时申请63/147,859的优先权,其全部公开内容通过引用结合于此。

发明领域

[0003] 本发明涉及同源结构域相互作用蛋白激酶2 (HIPK2) 的噁二唑基二氢吡喃并[2,3-b]吡啶抑制剂。所公开的化合物可用于治疗纤维化疾病,特别是肾纤维化。

背景技术

[0004] 纤维化的特征是细胞外基质蛋白的过度产生和积累,这导致组织功能的进行性丧失和最终器官衰竭。慢性肾脏疾病,无论原发损伤如何,通常都伴有肾间质纤维化。为了阻止肾功能的下降,慢性肾病的治疗策略不仅需要去除致病因素,如高血糖症、高血压和HIV感染,还需要抗纤维化治疗以恢复正常的肾脏结构和功能。除了肾纤维化之外,已知许多其他器官特异性纤维化疾病,包括肝、心脏和肺纤维化。

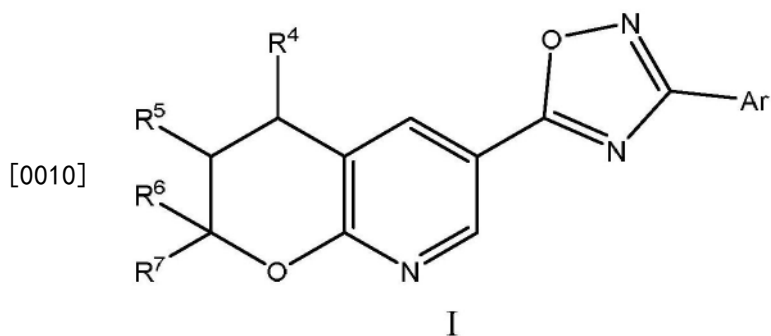
[0005] 肾纤维化被认为是进行性慢性肾脏疾病的最终会聚途径,不管该疾病的最初病因如何。尽管已经了解了肾纤维化形成的分子机制,但是在将这些知识转化为临床应用方面仍然缺乏成功。已经证明HIPK2是TGF- β /Smad3、NF- κ B和p53通路的多功能激活剂,并且在小鼠中HIPK2的全面敲除减轻了体内肾纤维化。美国专利10,669,266公开了HIPK2的小分子抑制剂,其特异性阻断TGF- β /Smad3途径以减轻肾纤维化,而不引起不利的全身效应。然而,‘266专利中公开的化合物仍然存在溶解度和效力问题。

[0006] 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 被认为是肾脏疾病最重要的促纤维化因子。TGF- β 1结合II型TGF- β 受体,允许其与I型TGF- β 受体二聚化,并导致Smad2和Smad3磷酸化。磷酸化的Smad3重新定位到细胞核中,从而结合启动子中的Smad结合元件,并激活靶基因的转录,包括促纤维化基因,如I型胶原、纤连蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)。已知Smad3在纤维化肾脏中高度活化,并且Smad3的敲除在肾脏疾病的动物模型中减弱了肾脏纤维化。因此,阻断TGF- β 1/Smad3通路为肾纤维化提供了一种治疗策略。

[0007] 发明概述

[0008] 现已发现下文描述的某些化合物选择性抑制Smad3激活。

[0009] 一方面,本发明涉及通式I的化合物



[0011] 其中

[0012] Ar为

[0013] (a) 在间位和/或对位被一个或多个取代基取代的苯基,所述取代基独立地选自氢、-(C₁-C₈) 烷基、OH、-O(C₁-C₈) 烷基、卤素、硝基、氨基、(C₁-C₃) 烷基氨基、(C₁-C₃) 二烷基氨基、(C₁-C₃) 酰基氨基、(C₁-C₃) 烷基磺酰基、(C₁-C₃) 卤代烷基、(C₁-C₃) 卤代烷氧基、5或6元杂环基和B(OH)₂或者

[0014] (b) 被一个选自以下的取代基取代的5元杂芳基:氢、(C₁-C₃) 烷基、OH、-O(C₁-C₃) 烷基、卤素、氨基、(C₁-C₃) 烷基氨基、(C₁-C₃) 二烷基氨基、(C₁-C₃) 卤代烷基和(C₁-C₃) 卤代烷氧基;

[0015] R⁴选自氢、羟基、(C₁-C₃) 烷基、(C₁-C₃) 烷氧基、氨基、(C₁-C₃) 烷基氨基和(C₁-C₃) 二烷基氨基;

[0016] R⁵选自氢、羟基、(C₁-C₃) 烷基、(C₁-C₃) 烷氧基、氨基、(C₁-C₃) 烷基氨基和(C₁-C₃) 二烷基氨基;

[0017] R⁶选自氢和(C₁-C₆) 烷基;和

[0018] R⁷选自氢和(C₁-C₃) 烷基;

[0019] 条件为不是所有的R⁴、R⁵、R⁶和R⁷都是氢。

[0020] 另一方面,本发明涉及包含药学上可接受的载体和式I化合物的药物组合物。

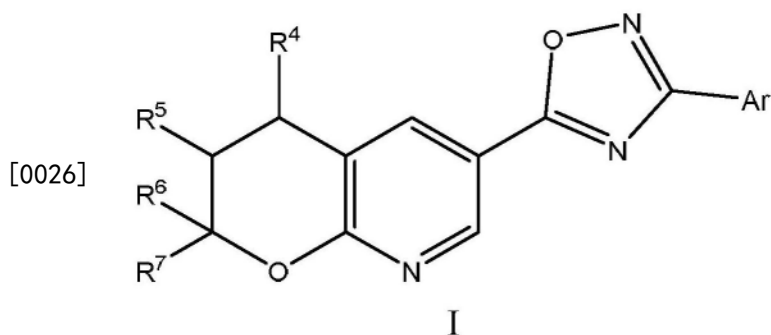
[0021] 另一方面,本发明涉及抑制同源结构域相互作用蛋白激酶2(HIPK2)与Smad3相互作用的方法。该方法包括使HIPK2与式I化合物接触。

[0022] 另一方面,本发明涉及抑制Smad3激活的方法。该方法包括使Smad3与式I化合物接触。

[0023] 另一方面,本发明涉及一种治疗纤维变性疾病的方法,包括施用式I化合物。

[0024] 发明详述

[0025] 一方面,本发明涉及具有如上所述的通式I的化合物:



[0027] 在式I的一些实施方案中,Ar是苯基。在一些实施方案中,苯基可以被选自溴、氯、氟、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、甲基、氧杂环丁烷基和-B(OH)₂的取代基对位取代。除了对位的取代基之外,苯基还可以被其它取代基取代。

[0028] 在一些实施例中,Ar是5元杂芳基。在一些实施方案中,5元杂芳基选自噁唑、噻吩、吡唑和噻唑,其可以是未取代的或被选自-(C₁-C₃) 烷基、溴、氯、氟、氟甲基、二氟甲基和三氟甲基的取代基取代。在一些实施方案中,Ar是在3位或4位被氯或甲基取代的噻唑-2-基。

[0029] 在式I的一些实施方案中,R⁴选自氢、羟基和氨基。在一些实施例中,R⁵选自氢、羟基和氨基。在一些实施方案中,R⁶和R⁷独立地选自氢和甲基。在一个具体实施方案中,Ar是氯苯基,R⁴是氢,R⁵是羟基,R⁶和R⁷都是甲基。在另一个具体实施方案中,Ar是氯苯基,R⁴是羟基,R⁵是氢,并且R⁶和R⁷都是甲基。

[0030] 为了方便和清楚起见,本文描述了说明书、实例和权利要求中使用的某些术语。取代基Rⁿ通常在引入时定义,并在整个说明书和所有独立权利要求中保留该定义。

[0031] 除非另有说明,烷基(或亚烷基)旨在包括直链或支链饱和烃结构及其组合。烷基是指1至20个碳原子,优选1至10个碳原子,更优选1至6个碳原子的烷基。烷基的例子包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基等。

[0032] 环烷基是烃的一个子集,包括3-8个碳原子的环状烃基。环烷基的实例包括正丙基、正丁基、正戊基、降冰片烯基等。

[0033] 烃或烃基包括烷基、环烷基、多环烷基、烯基、炔基、芳基及其组合。实例包括苄基、苄乙基、环己基甲基、金刚烷基、樟脑烯基和萘乙基。烃或烃基是指由氢和碳作为仅有的元素成分组成的任何取代基。脂肪族烃或烃基是非芳香族的烃或烃基;它们可以是饱和或不饱和的、环状的、线性的或支化的。脂肪族烃或烃基的实例包括异丙基、2-丁烯基、2-丁炔基、环戊基、降冰片烯基等。芳香族烃或烃基包括苯(苯基)、萘(萘基)、蒽等。

[0034] 氧杂烷基是指其中一个或多个碳(及其相关的氢)被氧取代的烷基残基。实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、甲氧基丙氧基、3,6,9-三癸基等。术语氧杂烷基是本领域所理解的[参见Naming and Indexing of Chemical Substances for Chemical Abstracts,由美国化学学会出版,196,但没有127(a)的限制],即,它是指其中氧通过单键与其相邻原子结合(形成醚键)的化合物;它不是指双键氧,如羰基中的氧。烷氧基是氧杂烷基的子集,包括直链或支链构型的基团。例子包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基等。低级烷氧基是指含有一到四个碳的基团。

[0035] 在一些实施方案中,1、2或3个氢原子被特定的基团取代。在烷基和环烷基的情况下,三个以上的氢原子可以被氟取代;事实上,所有可用的氢原子都可以被氟取代。这类化合物(如全氟烷基)属于“卤代烃”和“卤代烷基”的范畴。

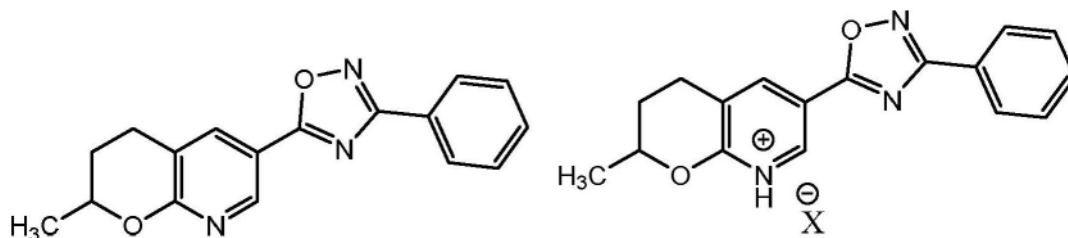
[0036] 术语“卤素”是指氟、氯、溴或碘原子。

[0037] 除非另有说明,酰基是指甲酰基和通过羰基官能团连接到母体结构的直链、支链、环状构型、饱和、不饱和和芳族及其组合的、具有1、2、3、4、5、6、7和8个碳原子的基团。实例包括乙酰基、苯甲酰基、丙酰基、异丁酰基等。低级酰基是指含有一到四个碳的基团。双键氧,当被称为取代基本身时,被称为“氧代”。

[0038] 如本文所用,并且如本领域技术人员所理解的,除非明确进一步限定,否则“化合物”的叙述旨在包括该化合物的盐。因此,例如,如上所述的叙述“式I化合物”将包括(3-芳

基-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶的盐:

[0039]



[0040] 其中X是抗衡离子,优选药学上可接受的阴离子。在一个具体的实施方案中,术语“式I化合物”是指该化合物或其药学上可接受的盐。

[0041] 术语“药学上可接受的盐”是指其抗衡离子来自药学上可接受的无毒酸和碱的盐。适用于本发明化合物盐的药学上可接受的酸包括例如乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸(苯磺酸盐)、苯甲酸、硼酸、丁酸、樟脑酸、樟脑磺酸、碳酸、柠檬酸、乙二磺酸、乙磺酸、乙二胺四乙酸,甲酸、富马酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、氢碘酸、羟基萘酸、羟乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂基磺酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘磺酸、硝酸、油酸、棕榈酸、泛酸、磷酸、新戊酸、聚半乳糖醛酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、鞣酸、酒石酸、teoclastic、对甲苯磺酸等。适用于本发明化合物的药学上可接受的碱加成盐包括但不限于由铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌制成的金属盐或由赖氨酸、精氨酸、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺(N-甲基葡萄糖胺)和普鲁卡因制成的有机盐。适当时,其它药学上可接受的盐包括连接到具有1-20个碳原子的烷基上的无毒铵阳离子和羧酸根、磺酸根和膦酸根阴离子。

[0042] “治疗有效量”是指当给予受试者用于治疗疾病或病症时,足以实现这种治疗的量。

[0043] 应该认识到,本发明的化合物可以以放射性标记的形式存在,即化合物可以含有一个或多个原子,这些原子含有的原子质量或质量数不同于通常在自然界中发现的原子质量或质量数。或者,单一结构的多个分子可以包括至少一个原子,该原子的同位素比率不同于自然界中发现的同位素比率。氢、碳、磷、氟、氯和碘的放射性同位素分别包括²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、¹⁸F、³⁶Cl、¹²⁵I、¹²⁴I和¹³¹I。包含这些放射性同位素和/或其他原子的其他放射性同位素的化合物在本发明的范围内。氚化(即³H)和碳-14(即¹⁴C)放射性同位素特别优选,因为它们易于制备和检测。含有同位素¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹²⁴I和¹⁸F的化合物非常适合进行正电子发射断层扫描。本发明的式I的放射性标记的化合物通常可以通过本领域技术人员熟知的方法制备。方便地,这种放射性标记的化合物可以通过实施实施例和方案中公开的程序,用容易获得的放射性标记的试剂代替非放射性标记的试剂来制备。

[0044] 技术人员将容易理解,当如上所述适当标记时,本文所述的化合物可用于鉴定(即标记)HIPK2的方法中。使用本领域技术人员熟知的方法,HIPK2可以定位在组织、细胞和细胞器中。

[0045] 虽然式I化合物可以作为化学原料给药,但优选以药物组合物的形式存在。根据另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含式I化合物,以及一种或多种其药学上可接受的载体和任选的一种或多种其他治疗成分。载体必须是“可接受的”,即与制剂的其它成分相容,并且对接受者无害。

[0046] 制剂包括适于口服、肠胃外(包括皮下、皮内、肌内、静脉内和关节内)、直肠和局部

(包括皮肤、口腔、舌下和眼内)给药的制剂。该化合物优选口服或注射(静脉内或皮下)给药。给予患者的化合物的精确量将由主治医师负责。然而,所采用的剂量将取决于许多因素,包括患者的年龄和性别、所治疗的确切疾病及其严重程度。此外,给药途径可以根据病情及其严重程度而变化。该制剂可以方便地以单位剂量形式存在,并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。通常,制剂的制备是通过将活性成分与液体载体或细分的固体载体或两者均匀紧密地结合,然后,如果需要,将产品成型为所需的制剂。

[0047] 适于口服给药的本发明制剂可以离散单位的形式存在,例如胶囊、扁囊剂或片剂,每种含有预定量的活性成分;作为粉末或颗粒;作为在水性液体或非水性液体中的溶液或悬浮液;或水包油液体乳液或油包水液体乳液。活性成分也可以以丸剂、冲服剂或糊剂的形式存在。

[0048] 应该理解的是,除了上面特别提到的成分之外,本发明的制剂可以包括与所讨论的制剂类型相关的本领域常规的其它试剂,例如那些适于口服给药的制剂可以包括调味剂。

[0049] 如本文所用,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”,或“减轻(palliating)”或“改善(ameliorating)”在本文中可互换使用。这些术语是指以根除或改善被治疗的潜在疾病的形式获得治疗益处的方法。此外,通过根除或改善一种或多种与潜在疾病相关的生理症状来实现治疗益处,从而在患者中观察到改善,尽管患者可能仍然患有潜在疾病。所述组合物可以给药于具有患特定疾病风险的患者,或者给药于报告了一种或多种疾病生理症状的患者,即使该疾病的诊断可能尚未做出。

[0050] 与“保护”、“去保护”和“被保护的”官能团相关的术语可能出现在本申请中。这种术语是本领域技术人员熟知的,并且用于涉及用一系列试剂进行顺序处理的过程中。在这种情况下,保护基团是指在工艺步骤中用于掩盖官能团的基团,否则该官能团会发生反应,但该反应是不希望的。保护基团阻止该步骤中的反应,但是随后可以被除去以暴露原始的官能团。移除或“去保护”发生在官能团会干扰的一个或多个反应完成之后。因此,当指定一系列试剂时,如在本文所述的方法中,普通技术人员可以容易地想到适合作为“保护基团”的那些基团。在化学领域的标准教科书中讨论了用于该目的合适基团,例如T.W.Greene的Protective Groups in Organic Synthesis[John Wiley&Sons,New York,1991]该文献在此引入作为参考。

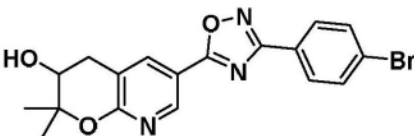
[0051] 有机化学家使用的缩写的综合列表出现在有机化学杂志(Journal of Organic Chemistry)每卷的第一期。该列表通常在标题为“缩写的标准列表”的表格中给出,在此引入作为参考。

[0052] 一般而言,本发明的化合物可以通过例如如下所述的一般反应方案中说明的方法,或通过其改进,使用容易获得的原料、试剂和常规合成程序来制备。在这些反应中,也可以利用本身已知的变体,但这里没有提到。原料可以是市售的,如实施例中所合成的,或者可以通过本领域技术人员熟知的方法获得。

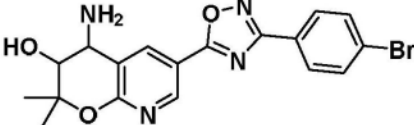
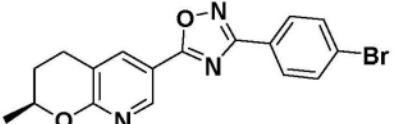
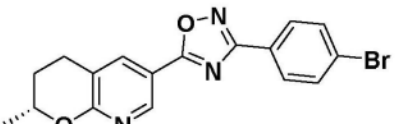
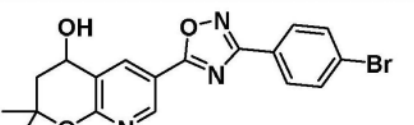
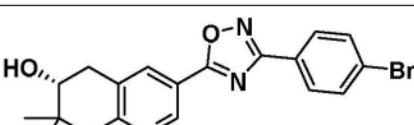
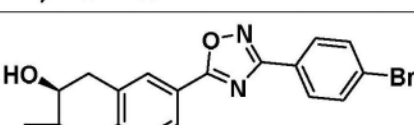
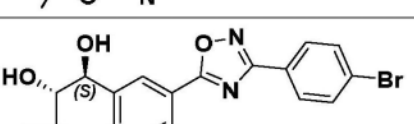
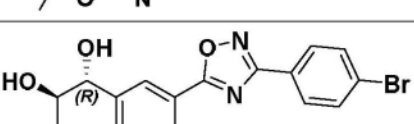
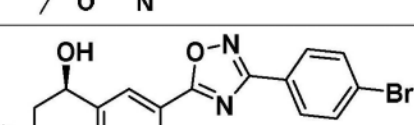
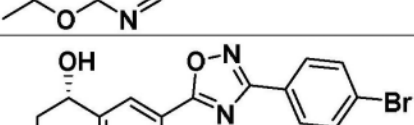
[0053] 通过上述方案制备的本发明化合物的具体实例及其在下述荧光素酶筛选中的测试结果如表1所示:

[0054] 表1

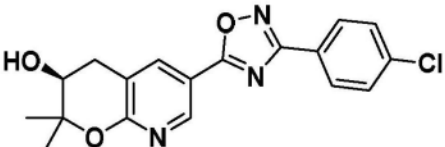
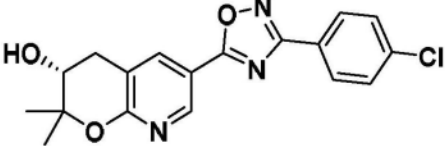
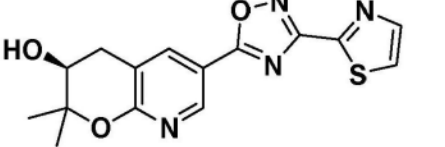
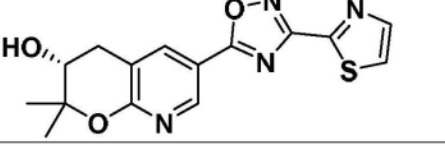
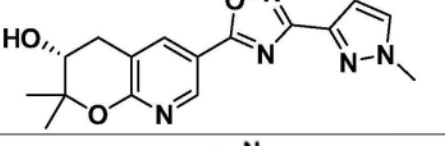
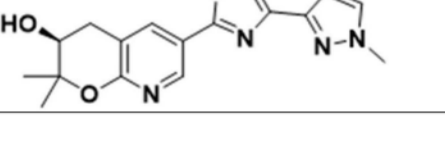
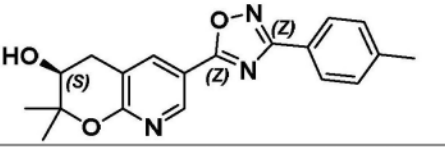
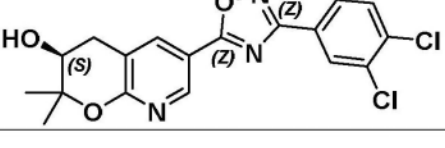
[0055]

实施例#	结构	荧光素酶 IC50 nM	ID 编 号 SMS21032-0
1		43	097

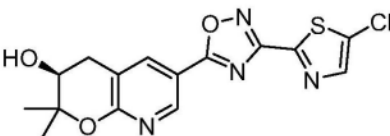
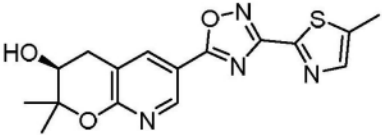
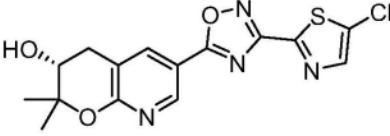
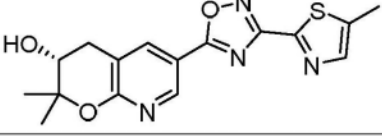
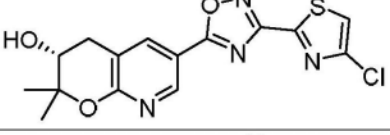
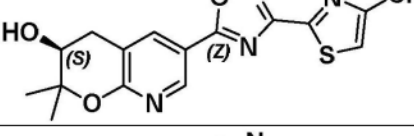
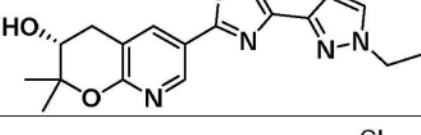
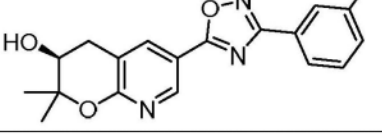
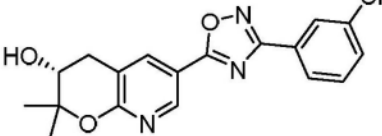
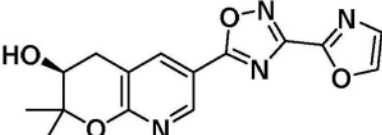
[0056]

实施例#	结构	荧光素酶 IC50 nM	ID 编 号 SMS21032-0
2		8147	098
3		234	130
4		126	131
5		86	143
6		27	151
7		37	152
8		11298	164
9		2421	165
10		233	171
11		57	172

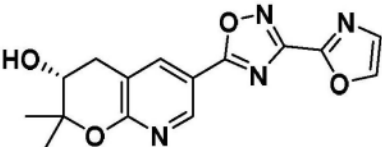
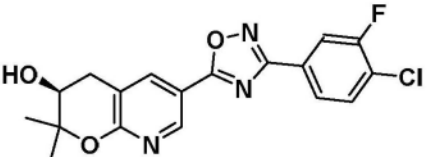
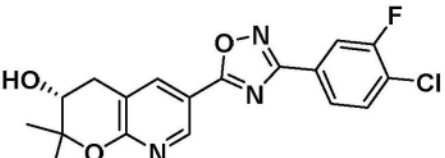
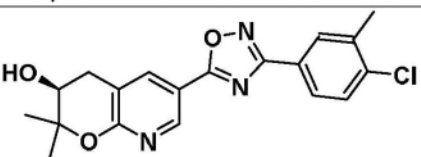
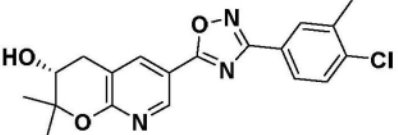
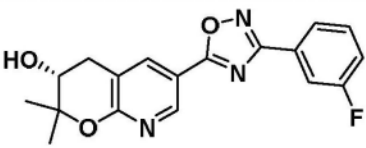
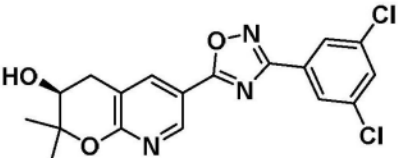
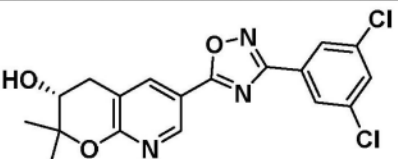
[0057]

实施例#	结构	荧光素酶 IC50 nM	ID 编 号 SMS21032-0
12		89	173
13		156	174
14		1374	182
16		1112	183
17		18	184
18		28	185
19		340	187
20		223	190
21		17	191
22		43	192

[0058]

实施例#	结构	荧光素酶 IC50 nM	ID 编 号 SMS21032-0
23		242	193
24		822	194
25		206	197
26		708	198
27		705	199
28		13	200
29		56	201
30		136	211
31		152	212
32		65	213

[0059]

实施例#	结构	荧光素酶 IC50 nM	ID 编 号 SMS21032-0
33		76	214
34		39	215
35		22	216
36		52	217
37		50	218
38		148	259
39		1253	260
40		843	261

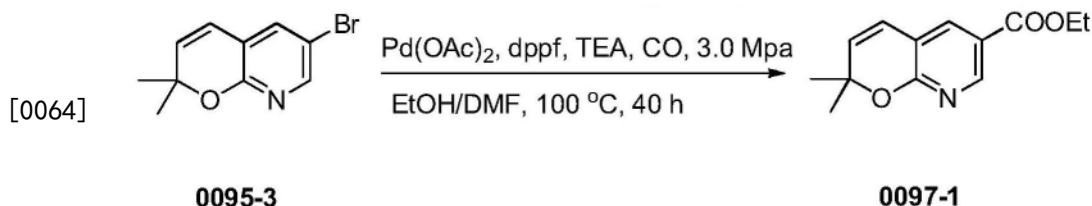
[0060] 代表性合成如下:

[0061] 实验部分

[0062] 一般信息:所有的蒸发都是用旋转蒸发器在真空中进行的。室温下真空干燥分析样品(1-5mmHg)。在硅胶板上进行薄层色谱(TLC),通过紫外光(214和254nm)观察斑点。使用硅胶(200-300目)通过柱和快速色谱法进行纯化。溶剂系统以混合物的体积报告。所有的NMR光谱都记录在Bruker 400(400MHz)光谱仪上。¹H化学位移以δ值报告,单位为ppm,氘代溶剂为内标。数据报告如下:化学位移,多重性(s=单峰,d=双峰,t=三重峰,q=四重峰,br=宽峰,m=多重峰),耦合常数(Hz),积分。LCMS光谱在具有电喷雾电离的Agilent 1200

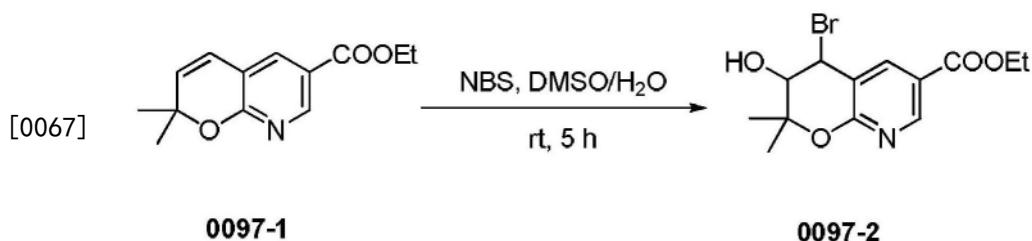
系列6110或6120质谱仪上获得,除非另有说明,一般的LCMS条件如下:Waters X Bridge C18柱(50mm x 4.6mm x 3.5um),流速:2.0ml/min,柱温:40℃

[0063] 实施例1:2,2-二甲基-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸乙酯(0097-1)的合成.



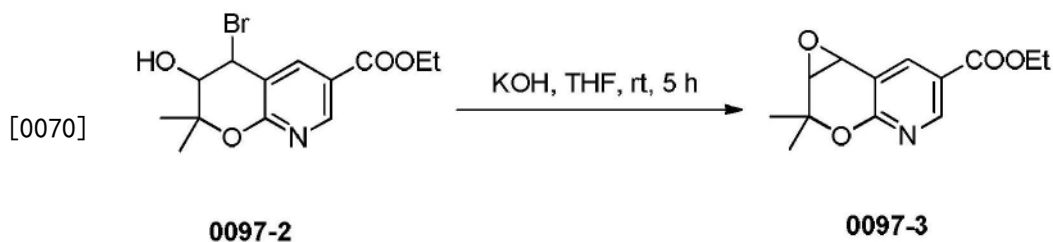
[0065] 将0095-3 (2g, 8.4mmol), Pd(OAc)₂ (190mg, 0.84mmol), dppf (932mg, 1.68mmol), TEA (3.4g, 33.6mmol) 的乙醇/DMF (1/1v/v, 20mL) 溶液, 在100℃, CO气氛 (3Mpa) 下搅拌40h。在消耗起始原料(通过LCMS)后, 真空浓缩溶液, 通过柱 (PE:EA=15:1) 纯化, 得到产物0097-1 (1g, 51%产率), 为白色固体。

[0066] 4-溴-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸乙酯(0097-2)的合成.



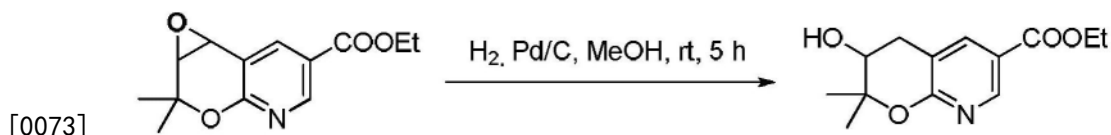
[0068] 向化合物0097-1 (700mg, 3mmol) 在DMSO/H₂O (10mL) 中的搅拌溶液中添加NBS (1.6g, 9mmol)。将混合物在室温下搅拌5小时。起始物质消耗后(通过LCMS), 将反应溶液用乙酸乙酯萃取, 合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 通过柱 (PE:EA=3:1) 纯化至得到0097-2 (750mg, 76%产率), 为白色固体。

[0069] 2,2-二甲基-2,7b-二氢-1aH-环氧并[2',3':4,5]吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸乙酯(0097-3)的合成.



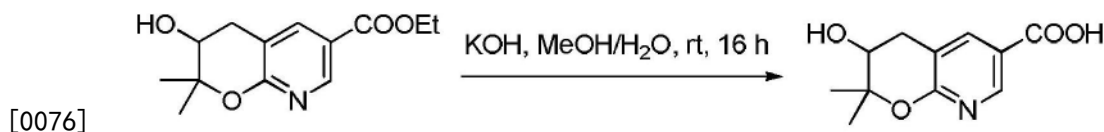
[0071] 将0097-2 (750mg, 2.28mmol) 和KOH (255mg, 4.56mmol) 在THF (10mL) 中的溶液在室温下搅拌5h。消耗起始物质(通过LCMS)后, 将溶液真空浓缩, 通过柱 (PE:EA=3:1) 纯化, 得到呈白色固体状的产物0097-3 (500mg, 88%产率)。

[0072] 3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸乙酯(0097-4)的合成.



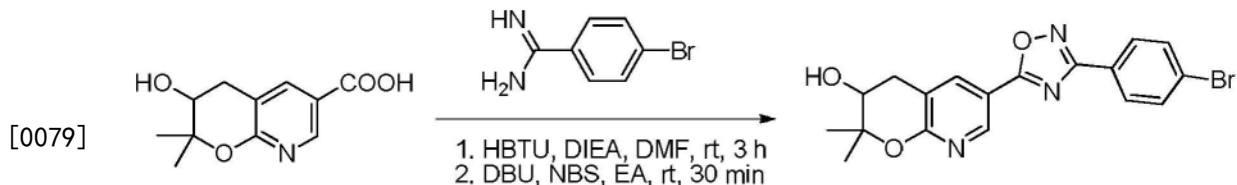
[0074] 向化合物0097-3 (300mg, 1.2mmol) 在MeOH (10mL) 中的搅拌溶液中添加Pd/C (30mg, 10% w/w)。将混合物在H₂气氛 (1.0atm) 下于室温搅拌5小时。起始物质消耗后 (通过LCMS), 过滤反应混合物, 用MeOH洗涤, 真空浓缩滤液, 通过柱 (PE:EA=2:1) 纯化, 得到产物0097-4 (280mg, 93% 收率), 为无色油状物。

[0075] 3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (0097-5) 的合成。



[0077] 将0097-4 (280mg, 1.12mmol) 和KOH (314mg, 5.6mmol) 在MeOH/H₂O (4/1, 10mL) 中的混合物在室温下搅拌过夜。然后用1M HCl中和反应混合物直至pH达到6.0。将所得混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体的产物0097-5 (200mg, 80% 收率)。

[0078] 6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0097-01) 的合成。



[0080] 向化合物0097-5 (150mg, 0.67mmol)、4-溴-N'-羟基苯甲脒 (160mg, 0.81mmol) 和HBTU (384mg, 1.01mmol) 在DMF (5mL) 中的搅拌溶液中添加DIEA (173mg, 1.34mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。消耗起始物质 (通过LCMS) 后, 将反应溶液用乙酸乙酯萃取, 将合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。向粗品的乙酸乙酯 (5mL) 溶液中添加DBU (204mg, 1.34mmol) 和NBS (240mg, 1.34mmol)。将混合物溶液在室温下搅拌30分钟。消耗起始物质后 (通过LCMS), 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的所需产物SMS21032-0097-01 (30mg, 11% 产率)。

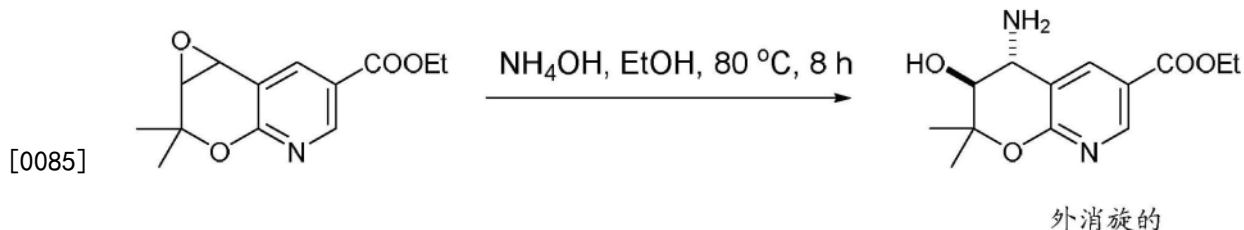
[0081] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min。纯度: 100%, Rt=2.197min; MS计算值: 402.24; MS实测值: 402.2 [M+H]⁺。

[0082] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40

℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:99.59%, $R_t=10.582\text{min}$.

[0083] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.94 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.01 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.64 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 3.97 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 3.17-3.23 (m, 1H), 2.94-2.99 (m, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H).

[0084] 实施例2:4-氨基-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸乙酯(0098-2)的合成.

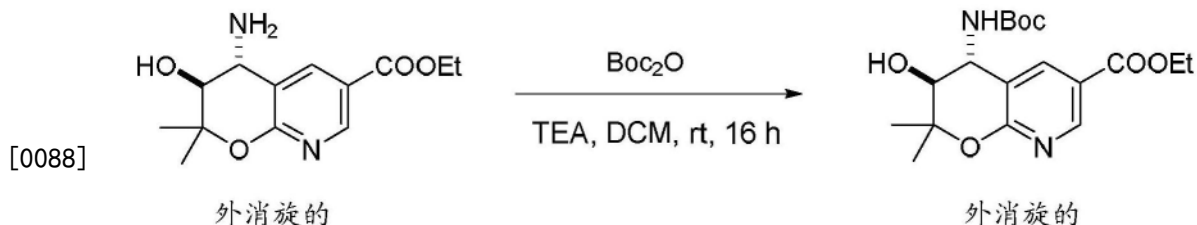


0097-3

0098-2

[0086] 向化合物0097-3 (330mg, 1.33mmol) 在EtOH (10ml) 中的搅拌溶液中添加 NH_4OH (12mL)。将混合物在80℃搅拌8小时。消耗起始原料后(通过LCMS),将反应溶液真空浓缩,得到粗产物0098-2 (350mg, 98.9%收率),为黄色固体。

[0087] 4-(叔丁氧基羰基氨基)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸乙酯(0098-3)的合成.

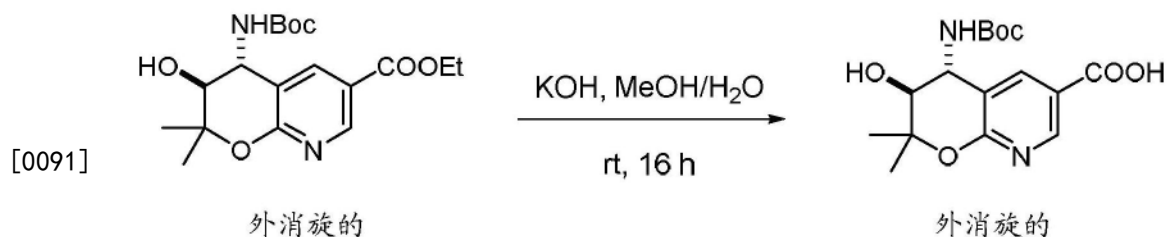


0098-2

0098-3

[0089] 向化合物0098-2 (350mg, 1.32mmol) 和TEA (267mg, 2.64mmol) 在DCM (10ml) 中的搅拌溶液中添加 Boc_2O (432mg, 1.98mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。消耗起始物质(通过LCMS)后,将反应溶液真空浓缩,通过柱(PE:EA=3:1)纯化,得到呈无色油状的产物0098-3 (170mg, 35.2%产率)。

[0090] 4-(叔丁氧基羰基氨基)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸(0098-4)的合成.

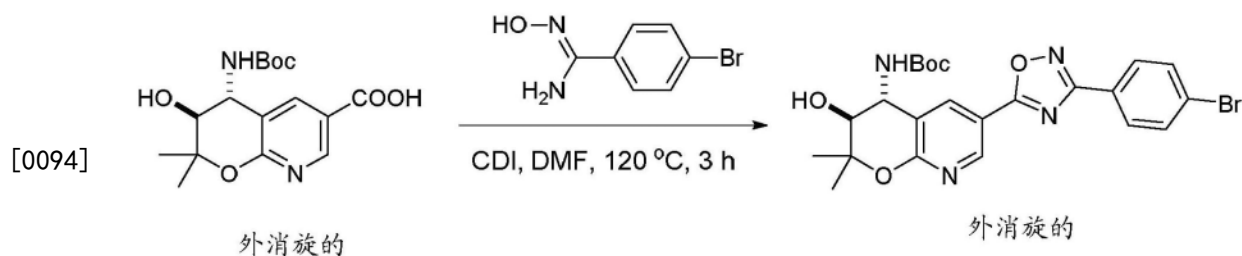


0098-3

0098-4

[0092] 将0098-3(170mg, 0.46mmol)和KOH(130mg, 2.3mmol)在MeOH/H₂O(4/1, 5mL)中的溶液在室温下搅拌过夜。起始物质消耗后(通过LCMS),用1M HCl中和反应混合物直至pH达到6。将溶液真空浓缩,通过制备型HPLC纯化,得到产物0098-4(120mg, 77%产率),为白色固体。

[0093] 6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-4-基氨基甲酸叔丁酯(0098-5)的合成。

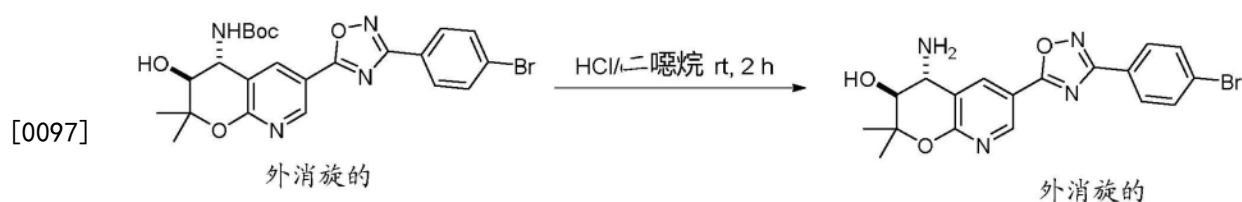


0098-4

0098-5

[0095] 向化合物0098-4(120mg, 0.36mmol)在DMF(10mL)中的搅拌溶液中添加CDI(121mg, 0.72mmol)。在室温下搅拌30分钟,然后添加4-溴-N'-羟基苯甲脒(154mg, 0.72mmol)。将混合物在120℃搅拌3小时。消耗起始物质(通过LCMS)后,将反应混合物真空浓缩,通过柱(DCM:MeOH=50:1)纯化,得到呈白色固体状的产物0098-5(150mg, 80.6%产率)。

[0096] 4-氨基-6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0098-01)的合成。



0098-5

SMS21032-0098-01

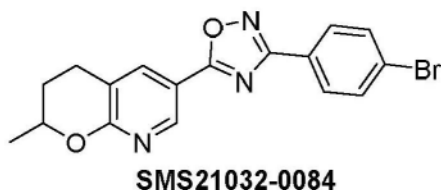
[0098] 将化合物0098-5(100mg, 0.2mmol)在HCl/二噁烷(4M, 5mL)中的溶液在室温下搅拌2小时。消耗起始物质(通过LCMS)后,将反应溶液真空浓缩,通过制备型HPLC纯化,得到呈白色固体状的所需产物SMS21032-0098-01(21mg, 25.3%产率)。

[0099] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm*4.6mm*3.5μm);柱温:40℃;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH₄HCO₃]和5% [CH₃CN]至0% [水+10mM NH₄HCO₃]和100% [CH₃CN]进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃]和5% [CH₃CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度:96.20%, Rt=2.061min;MS计算值:417.26;MS实测值:417.2[M+H]⁺。

[0100] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:98.49%, R_t =9.810min.

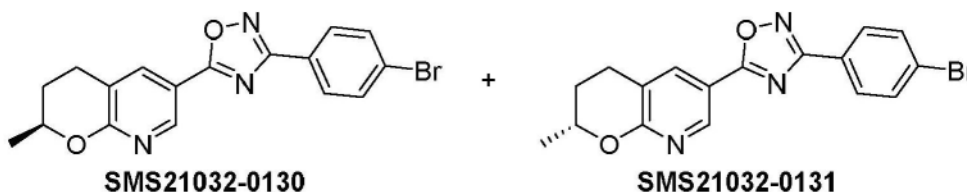
[0101] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.98 (d, J =2.0Hz, 1H), 8.55-8.56 (m, 1H), 8.02-8.04 (m, 2H), 7.64-7.66 (m, 2H), 3.79 (d, J =10Hz, 1H), 3.43 (d, J =10Hz, 1H), 3.02 (br., 1H), 1.64 (s, 3H), 1.35 (s, 3H)

[0102] 实施例3和4:乙基 (S) -6- (3- (4-溴苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基) -2-甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶 (SMS21032-0130) 和乙基 (R) -6- (3- (4-溴苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基) -2-甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶 (SMS21032-0131) 的合成



SFC 拆分

[0103]



[0104] SMS21032-0130:

[0105] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度为99.3%. R_t =2.496min;MS计算值:371.0;MS实测值:371.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0106] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度为98.0%. R_t =11.975min.

[0107] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.93 (d, J =2.0Hz, 1H), 8.18 (d, J =2.0Hz, 1H), 8.04 (d, J =8.8Hz, 2H), 7.66 (d, J =8.8Hz, 2H), 4.53-4.44 (m, 1H), 3.03-2.88 (m, 2H), 2.17-2.09 (m, 1H), 1.87-1.75 (m, 1H), 1.54 (d, J =6.4Hz, 3H).

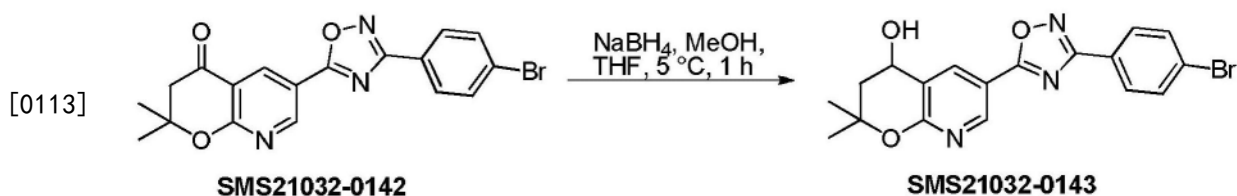
[0108] SMS21032-0131:

[0109] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度为99.4%. $R_t=2.491\text{min}$;MS计算值:371.0;MS实测值:372.2[M+H] $^{+}$.

[0110] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18(150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度为97.0%. $R_t=11.972\text{min}$.

[0111] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 8.93(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 8.17(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 8.03(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.65(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 4.52-4.43(m, 1H), 3.02-2.87(m, 2H), 2.16-2.08(m, 1H), 1.87-1.75(m, 1H), 1.53(d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H).

[0112] 实施例5:6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-4-醇(SMS21032-0143)的合成



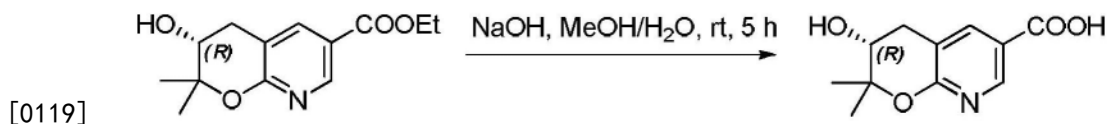
[0114] 在5 $^{\circ}$ C向SMS21032-0142(40mg, 0.1mmol)在MeOH(1mL)/THF(2mL)中的溶液中添加 NaBH_4 (4mg, 0.1mmol),然后将混合物在5 $^{\circ}$ C搅拌1小时.浓缩成油,将其通过制备型HPLC纯化,得到SMS21032-0143(8mg, 产率:20%),为白色固体.

[0115] LC-MS(Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min).纯度100%, $R_t=2.245\text{min}$;MS计算值:401.0;MS实测值:402.2[M+H] $^{+}$.

[0116] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18(150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度99.3%, $R_t=10.808\text{min}$;MS计算值:401.0;MS实测值:402.2[M+H] $^{+}$.

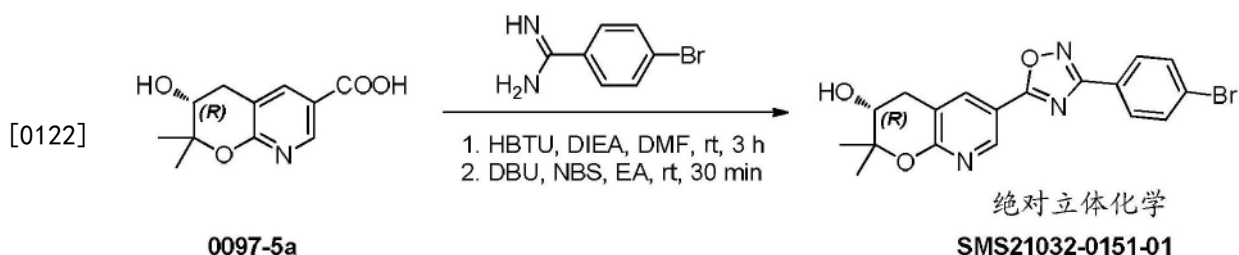
[0117] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 9.01(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.63(d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 8.04(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.66(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 4.98-5.06(m, 1H), 2.33(dd, $J=13.6, 6.0\text{Hz}$, 1H), 2.10(d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 1.96(dd, $J=13.4, 10.2\text{Hz}$, 1H), 1.60(s, 3H), 1.44(s, 3H).

[0118] 实施例6: (R)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸(0097-5a)的合成.



[0120] 将0097-4a (180mg, 0.72mmol) 和NaOH (144mg, 3.6mmol) 在MeOH/H₂O (4/1, 10mL) 中的溶液在室温下搅拌5小时。起始物质消耗后 (通过LCMS), 用1M HCl中和反应混合物直至pH达到6。将溶液真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到产物0097-5a (130mg, 81%产率), 为白色固体。

[0121] (R)-6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇的合成(SMS21032-0151-01)。



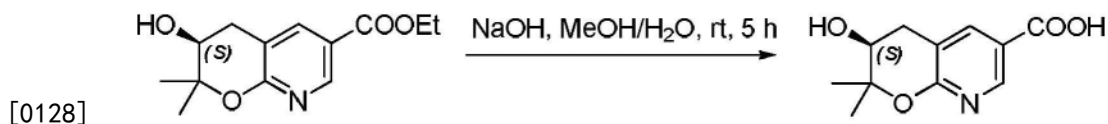
[0123] 向化合物0097-5a (70mg, 0.32mmol)、4-溴苯甲脒 (77mg, 0.39mmol) 和HBTU (183mg, 0.48mmol) 在DMF (5mL) 中的搅拌溶液中添加DIEA (83mg, 0.64mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。将混合物在室温下搅拌3小时。消耗起始物质 (通过LCMS) 后, 将反应溶液用乙酸乙酯萃取, 将合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。向粗品的乙酸乙酯 (5mL) 中添加DBU (98mg, 0.64mmol) 和NBS (114mg, 0.64mmol)。将混合物溶液在室温下搅拌30分钟。消耗起始物质 (通过LCMS) 后, 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的所需产物SMS21032-0151-01 (27mg, 21%产率)。

[0124] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min. 纯度: 96.88%, Rt = 2.212min; MS计算值: 402.24; MS实测值: 401.8[M+H]⁺。

[0125] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 96.03%, Rt = 10.749min。

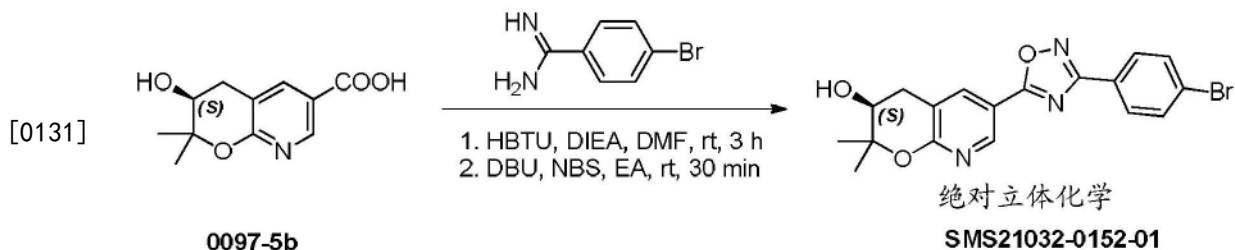
[0126] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.94 (d, J = 2.0Hz, 1H), 8.26 (d, J = 1.2Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.4Hz, 2H), 3.98 (t, J = 4.8Hz, 1H), 3.17-3.23 (m, 1H), 2.97-3.03 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.46 (s, 3H)。

[0127] 实施例7: (S)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (0097-5b) 的合成。



[0129] 将0097-4b(190mg, 0.76mmol)和NaOH(152mg, 3.8mmol)在MeOH/H₂O(4/1, 10mL)中的溶液在室温下搅拌过夜。起始原料消耗后(通过LCMS),用1M HCl中和反应混合物直至pH达到6。将溶液真空浓缩,通过制备型HPLC纯化,得到产物0097-5b(140mg, 82.3%产率),为白色固体。

[0130] (S)-6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0152-01)的合成。



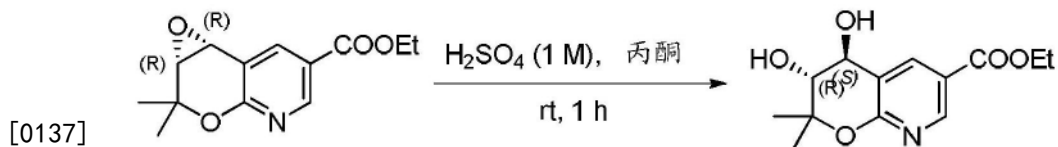
[0132] 向化合物0097-5b(70mg, 0.32mmol)、4-溴苯甲脒(77mg, 0.39mmol)和HBTU(183mg, 0.48mmol)在DMF(5mL)中的搅拌溶液中添加DIEA(83mg, 0.64mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。消耗起始物质(通过LCMS)后,将反应溶液用乙酸乙酯萃取,将合并的有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩。向粗品的乙酸乙酯(5mL)中添加DBU(98mg, 0.64mmol)和NBS(114mg, 0.64mmol)。将混合物溶液在室温下搅拌30分钟。消耗起始物质(通过LCMS)后,将反应混合物真空浓缩,通过制备型HPLC纯化,得到呈白色固体状的所需产物SMS21032-0152-01(25mg, 19.5%产率)。

[0133] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH₄HCO₃]和5% [CH₃CN]至0% [水+10mM NH₄HCO₃]和100% [CH₃CN]进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃]和5% [CH₃CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度:100%, Rt=2.214min;MS计算值:402.24;MS实测值:401.8[M+H]⁺。

[0134] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18(150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH₄HCO₃]和5% [CH₃CN]至0% [水+10mM NH₄HCO₃]和100% [CH₃CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃]和5% [CH₃CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:99.30%, Rt=10.750min。

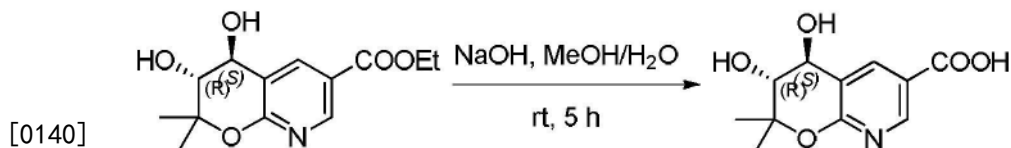
[0135] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 8.93(d, J=1.6Hz, 1H), 8.24(d, J=0.8Hz, 1H), 8.00(d, J=8.4Hz, 2H), 7.63(d, J=8.4Hz, 2H), 3.97(t, J=4.8Hz, 1H), 3.17-3.23(m, 1H), 2.96-3.02(m, 1H), 1.51(s, 3H), 1.45(s, 3H)。

[0136] 实施例8: (3R, 4S)-3,4-二羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸乙酯(0164-2)的合成。



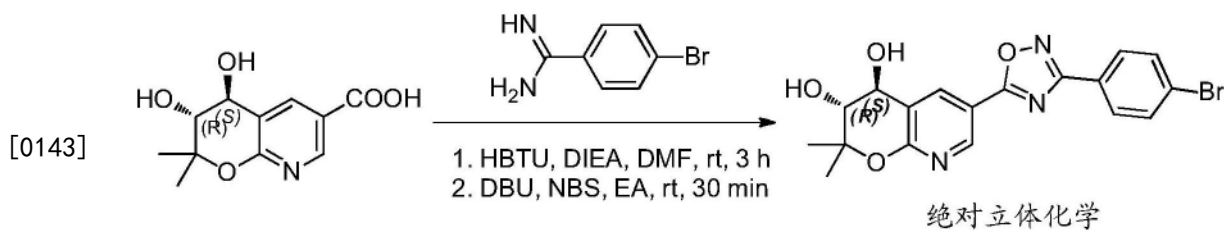
[0138] 向化合物0164-1 (120mg, 0.48mmol) 在丙酮中的搅拌溶液中添加 H_2SO_4 (1M, 3mL)。将混合物在室温下搅拌1小时。使用 NaHCO_3 将反应混合物中和至 $\text{pH}=7$ 。将二氯甲烷加入到反应混合物中,并分离有机相。用二氯甲烷萃取水层,合并有机层并经 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂,并将残余物通过柱 (PE/EA=2:1) 纯化,得到呈黄色油状的产物0164-2 (80mg, 62.5%产率)。

[0139] (3R,4S)-3,4-二羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸的合成 (0164-3)。



[0141] 将0164-2 (80mg, 0.3mmol) 和NaOH (60mg, 1.5mmol) 在MeOH/ H_2O (4/1, 5mL) 中的溶液在室温搅拌5h。起始物质消耗后 (通过LCMS), 用1M HCl中和反应混合物直至 pH 达到6。将溶液真空浓缩,通过制备型HPLC纯化,得到产物0164-3 (55mg, 76.7%产率), 为白色固体。

[0142] (3R,4S)-6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3,4-二醇 (SMS21032-0164-01) 的合成。



[0144] 向化合物0164-3 (55mg, 0.23mmol)、4-溴苯甲脒 (56mg, 0.28mmol) 和HBTU (133mg, 0.35mmol) 在DMF (5mL) 中的搅拌溶液中添加DIEA (60mg, 0.46mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。消耗起始物质 (通过LCMS) 后,将反应溶液用乙酸乙酯萃取,将合并的有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩。向粗品的乙酸乙酯 (5mL) 中添加DBU (70mg, 0.46mmol) 和NBS (82mg, 0.34mmol)。将混合物溶液在室温下搅拌30分钟。消耗起始物质 (通过LCMS) 后,将反应混合物真空浓缩,通过制备型HPLC纯化,得到呈白色固体状的所需产物SMS21032-0164-01 (28mg, 29.2%产率)。

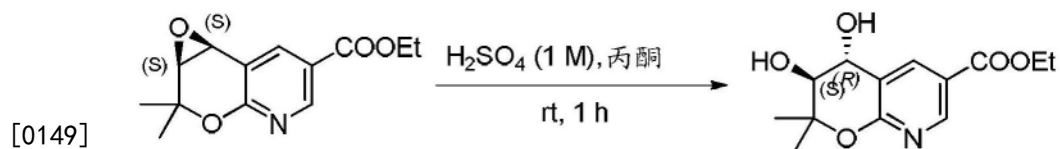
[0145] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μm);柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM

NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度:96.88%, $R_t=2.078\text{min}$;MS计算值:418.24;MS实测值:418.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0146] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μm);柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:99.50%, $R_t=9.860\text{min}$.

[0147] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.03 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.04 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.66 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 4.76 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 3.73 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.38 (s, 3H).

[0148] 实施例9: (3S,4R)-3,4-二羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸乙酯(0165-2)的合成.

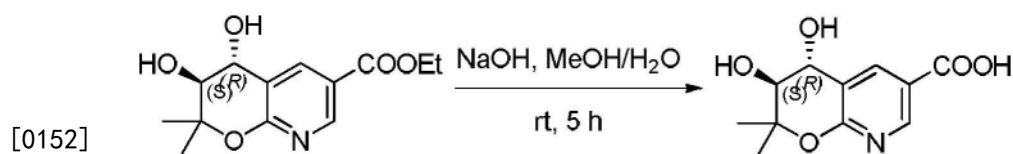


0165-1

0165-2

[0150] 向化合物0165-1 (130mg, 0.52mmol) 在丙酮中的搅拌溶液中添加 H_2SO_4 (1M, 3mL)。将混合物在室温下搅拌1小时。使用 NaHCO_3 将反应混合物中和至 $\text{pH}=7$ 。将二氯甲烷加入到反应混合物中,并分离有机相。用二氯甲烷萃取水层,合并有机层并经 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂,并通过柱(PE:EA=2:1)纯化残余物,得到呈黄色油状的产物0165-2 (90mg, 64.7%产率)。

[0151] (3S,4R)-3,4-二羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸的合成(0165-3)。

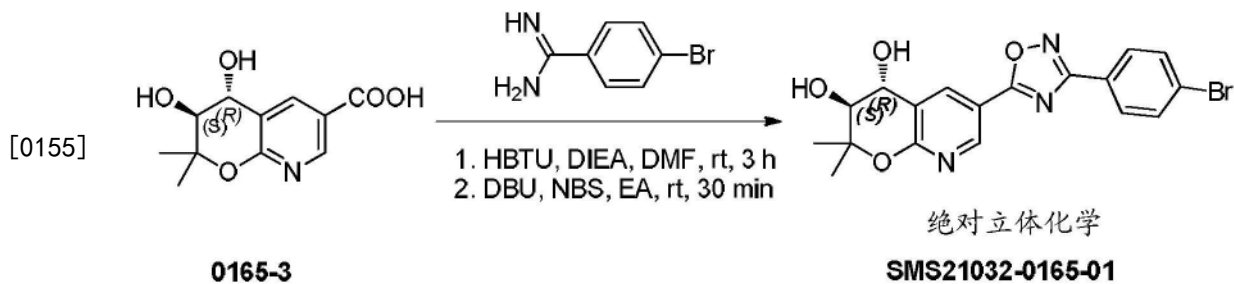


0165-2

0165-3

[0153] 将0165-2 (90mg, 0.34mmol) 和NaOH (68mg, 1.7mmol) 在MeOH/ H_2O (4/1, 5mL) 中的溶液在室温下搅拌5小时。起始物质消耗后(通过LCMS),用1M HCl中和反应混合物直至 pH 达到6。将溶液真空浓缩,通过制备型HPLC纯化,得到产物0165-3 (60mg, 73.8%产率),为白色固体。

[0154] (3S,4R)-6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3,4-二醇(SMS21032-0165-01)的合成。



[0156] 向化合物0165-3 (60mg, 0.25mmol)、4-溴苯甲脒 (60mg, 0.3mmol) 和HBTU (143mg, 0.38mmol) 在DMF (5mL) 中的搅拌溶液中添加DIEA (65mg, 0.5mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。消耗起始物质 (通过LCMS) 后, 将反应溶液用乙酸乙酯萃取, 将合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。向粗品的乙酸乙酯 (5mL) 中添加DBU (76mg, 0.5mmol) 和NBS (89mg, 0.5mmol)。将混合物溶液在室温下搅拌30分钟。消耗起始材料 (通过LCMS) 后, 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的所需产物SMS21032-0165-01 (27mg, 26%产率)。

[0157] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min. 纯度: 97.44%, $R_t = 2.076\text{min}$; MS计算值: 418.24; MS实测值: 418.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

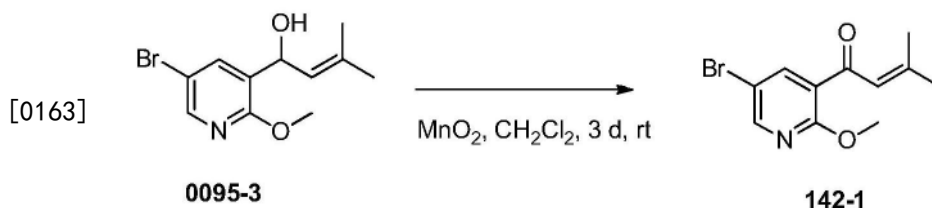
[0158] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 100%, $R_t = 9.858\text{min}$ 。

[0159] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.03 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 8.63 (d, $J = 1.2\text{Hz}$, 1H), 8.04 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.66 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 4.75 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 3.73 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.38 (s, 3H)。

[0160] 实施例10和11: (R) -6- (3- (4-溴苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基) -2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-4-醇 (SMS21032-0171) 和 (S) -6- (3- (4-溴苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基) -2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-4-醇 (SMS21032-0172) 的合成

[0161] 6- (3- (4-溴苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基) -2,2-二甲基-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-4- (3H) -酮 (SMS21032-0142) 的合成

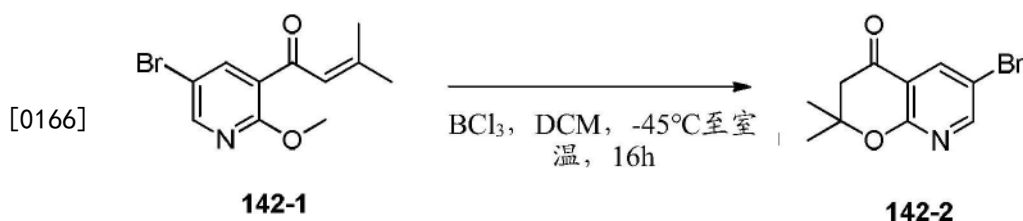
[0162] 1- (5-溴-2-甲氧基吡啶-3-基) -3-甲基丁-2-烯-1-酮的合成 (142-1)



[0164] 在室温下向0095-3 (1g, 3.67mmol) 在DCM (160mL) 中的溶液中添加 MnO_2 (6.71g, 77.17mmol), 然后将混合物在室温下搅拌3天。过滤并浓缩成油, 通过cc. (EA:PE = 1:30) 纯

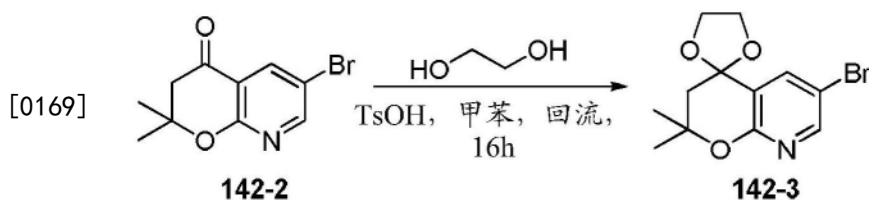
化得到142-1(0.71g,产率:72%),为黄色液体。

[0165] 6-溴-2,2-二甲基-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-4(3H)-酮(142-2)的合成



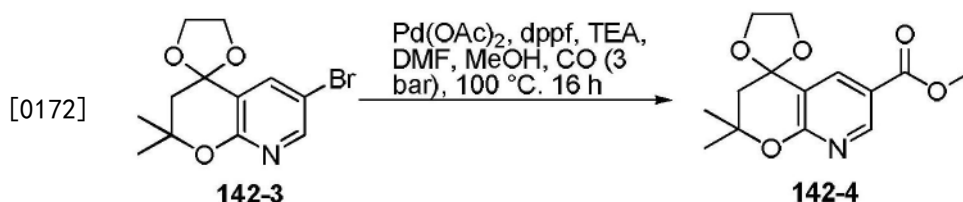
[0167] 在-45℃向142-1(2.9g,10.74mmol)的DCM(150mL)溶液中滴加BCl₃(55mL),当添加完成时,将混合物在室温下搅拌16小时。然后用饱和NaHCO₃猝灭反应,用DCM(20mL)稀释,用盐水(50mL)洗涤,在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩成油,通过cc.(EA:PE=1:3)纯化得到142-2(1.3g,产率:47%),为黄色固体。

[0168] 6'-溴-2',2'-二甲基-2',3'-二氢螺[[1,3]二氧戊环-2,4'-吡喃[2,3-b]吡啶](142-3)的合成



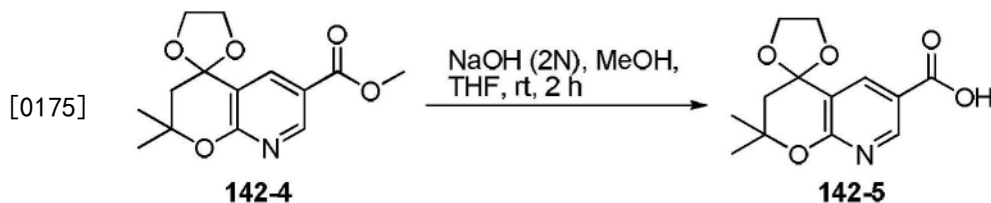
[0170] 向142-2(200mg,0.78mmol)的甲苯(10mL)溶液中加入乙二醇(97mg,1.56mmol)、TsOH(8mg,0.16mmol),然后将混合物回流16小时。将混合物用饱和NaHCO₃(20mL)洗涤,在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩成固体,得到142-3(100mg,收率:43%),为黄色固体。

[0171] 2',2'-二甲基-2',3'-二氢螺[[1,3]二氧戊环-2,4'-吡喃并[2,3-b]吡啶]-6'-甲酸甲酯(142-4)的合成



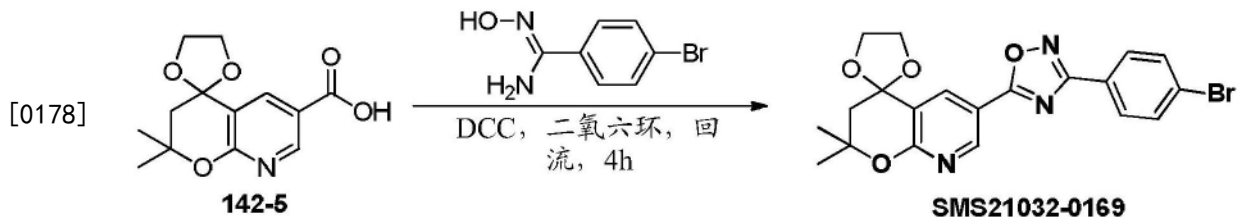
[0173] 向142-3(400mg,1.33mmol)在DMF(6mL)/MeOH(6mL)中的溶液中添加TEA(674mg,6.66mmol)、dppf(111mg,0.20mmol)、Pd(OAc)₂(45mg,0.20mmol),然后将混合物在CO(3bar)中加热至100℃持续16小时。过滤并浓缩滤液,将残余物用EA(50mL)稀释,用盐水(30mL)洗涤,在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液至油状物,将其通过cc.(EA:PE=1:4)纯化。得到黄色油状的142-4(330mg,收率:89%)。

[0174] 2',2'-二甲基-2',3'-二氢螺[[1,3]二氧戊环-2,4'-吡喃并[2,3-b]吡啶]-6'-甲酸(142-5)的合成



[0176] 向142-4 (110mg, 0.4mmol) 在MeOH (2mL) / THF (1mL) 中的溶液中添加NaOH (40mg, 0.99mmol) 在H₂O (0.5mL) 中的溶液, 然后将混合物在室温下搅拌2小时。浓缩成固体, 用HCl (2N) 酸化至pH=5, 然后浓缩得到142-5, 为粗固体。

[0177] 6'- (3- (4-溴苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基) -2',2'-二甲基-2',3'-二氢螺[[1,3]二氧戊环-2,4'-吡喃并[2,3-b]吡啶] (SMS21032-0169) 的合成

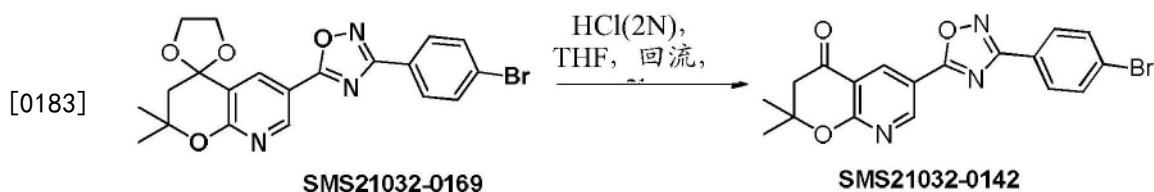


[0179] 在室温下向142-5 (粗品)、4-溴-N'-羟基-苯甲脒 (105mg, 0.50mmol) 在二噁烷 (15mL) 中的溶液中添加DCC (131mg, 0.64mmol), 然后将混合物回流4小时。浓缩至油状物, 通过制备型HPLC进一步纯化残余物, 得到白色固体状的SMS21032-0169 (10mg, 两步产率5.6%)。

[0180] LC-MS (Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min), 纯度: 96.6%, Rt=2.481min; MS计算值: 399.0; MS实测值: 400.2[M+H]⁺。

[0181] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min。纯度: 97.0%, Rt=11.932min。MS计算值: 399.0; MS实测值: 400.2[M+H]⁺。

[0182] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.07 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.50 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.03-8.07 (m, 2H), 7.63-7.68 (m, 2H), 4.30-4.36 (m, 2H), 4.12-4.20 (m, 2H), 2.23 (s, 2H), 1.56 (s, 6H)。



[0184] 向SMS21032-0169 (粗品) 在THF (3mL) 中的溶液中添加HCl (2N, 0.2mL), 然后将混合物回流2小时。浓缩至油状物, 用DCM (10mL) 稀释, 用饱和NaHCO₃洗涤, 经Na₂SO₄干燥。过滤并浓缩滤液至固体。将粗品用MeOH洗涤, 得到SMS21032-0142 (25mg, 收率: 16%), 为白色固体。

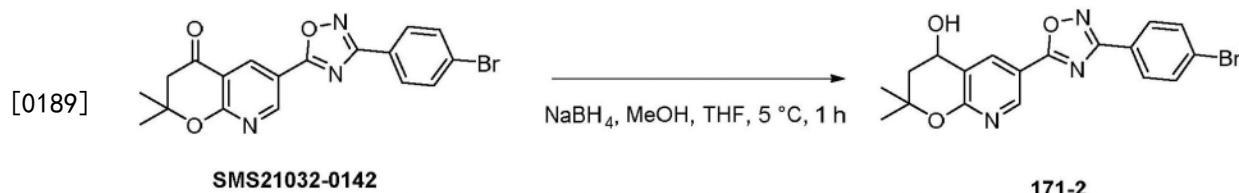
[0185] LC-MS (Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min), 纯度: 96.6%, Rt=2.481min; MS计算值: 399.0; MS实测值: 400.2[M+H]⁺。

[0186] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40

℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度为96.4%. $R_t=7.558\text{min}$.纯度:97.0%, $R_t=11.932\text{min}$.MS计算值:399.0;MS实测值:400.2[M+H]⁺.

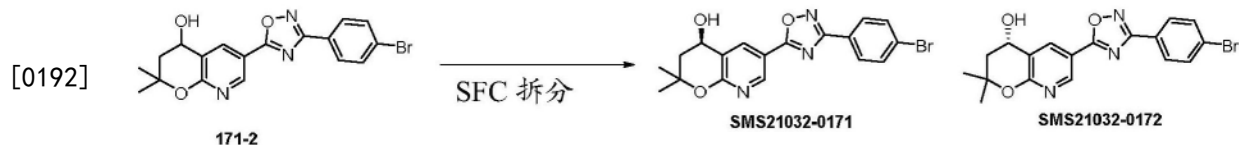
[0187] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.28 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.96 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.04 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.65 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 2.87 (s, 2H), 1.59 (s, 6H).

[0188] 6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-4-醇(171-2)的合成



[0190] 在0℃,向SMS21032-0142(70mg,0.17mmol)的MeOH/THF(2mL/2mL)溶液中添加 NaBH_4 (13.2mg,0.35mmol),然后将反应混合物在5℃下再搅拌1h.反应完成后(通过LCMS),将水(10mL)和二氯甲烷(10mL)加入到溶液中,分离有机相,用二氯甲烷(2×10mL)萃取水相,合并有机相.用水然后盐水洗涤溶液,经无水 Na_2SO_4 干燥,浓缩并通过制备型HPLC纯化,得到171-2(30mg,产率:43%),为白色固体。

[0191] (R)-6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-4-醇(SMS21032-0171)和(S)-6-(3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-4-醇(SMS21032-0172)的合成



[0193] SMS21032-0171和SMS21032-0172使用CHIRALCEL OX-10柱(30x250mm,10 μm)通过手性HPLC分离,以MeOH作为流动相.SMS21032-0171(10mg)是第一个洗脱化合物,SMS21032-0172(10mg)是第二个洗脱化合物。

[0194] SMS21032-0171

[0195] LC-MS(Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm×4.6mm×3.5 μm);柱温:40℃;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min).纯度100%, $R_t=2.200\text{min}$;MS计算值:401.0;MS实测值:402.0[M+H]⁺.

[0196] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18(150mm×4.6mm×3.5 μm);柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度100%, $R_t=10.607\text{min}$;MS计算值:401.0;MS实测值:402.2[M+H]⁺.

[0197] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.92 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.55 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 7.95 (d, J

=8.4Hz, 2H), 7.57 (d, J=8.4Hz, 2H), 4.90-4.99 (m, 1H), 2.33-2.48 (m, 1H), 2.25 (dd, J=13.6, 6.0Hz, 1H), 1.86-1.92 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.36 (s, 3H).

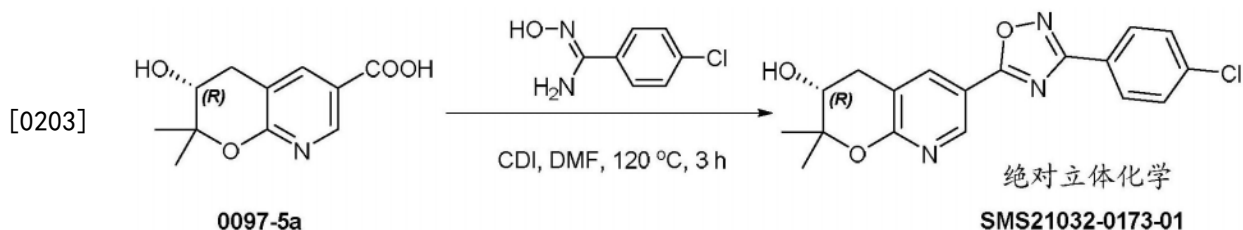
[0198] SMS21032-0172

[0199] LC-MS (Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min). 纯度100%, R_t =2.206min; MS计算值: 401.0; MS实测值: 402.0[M+H] $^{+}$.

[0200] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度100%, R_t =10.599min; MS计算值: 401.0; MS实测值: 402.2[M+H] $^{+}$.

[0201] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.00 (d, J=2.0Hz, 1H), 8.62 (d, J=1.2Hz, 1H), 8.02 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.65 (d, J=8.4Hz, 2H), 4.97-5.07 (m, 1H), 2.39-2.48 (m, 1H), 2.32 (dd, J=13.2, 6.0Hz, 1H), 1.93-1.99 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.44 (s, 3H).

[0202] 实施例12: (R)-6-(3-(4-氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0173-01) 的合成.



[0204] 向化合物0097-5a (50mg, 0.22mmol) 在DMF (5ml) 中的搅拌溶液中添加CDI (72mg, 0.44mmol)。在室温下搅拌30分钟, 然后添加4-氯-N'-羟基苯甲脒 (88mg, 0.44mmol)。将混合物在120 $^{\circ}$ C搅拌3小时。消耗起始物质 (通过LCMS) 后, 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的产物SMS21032-0173-01 (14mg, 17.8%产率)。

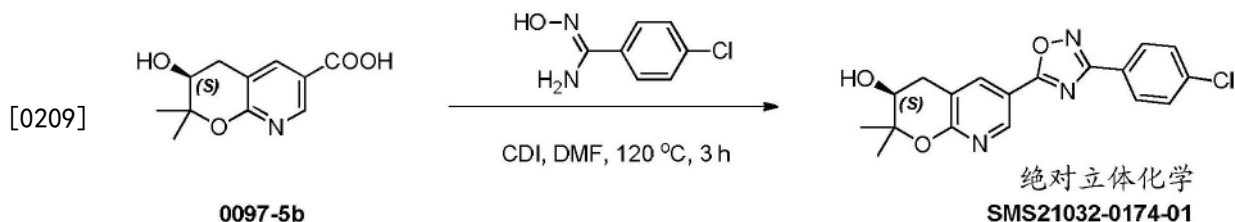
[0205] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min. 纯度: 98.55%, R_t =2.191min; MS计算值: 357.79; MS实测值: 358.4[M+H] $^{+}$.

[0206] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 99.77%, R_t =10.470min.

[0207] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.91 (d, J=2.0Hz, 1H), 8.21 (d, J=1.6Hz, 1H), 8.07 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.47 (d, J=8.4Hz, 2H), 3.97 (t, J=4.4Hz, 1H), 3.18-3.23 (m, 1H), 2.93-2.99

(m, 1H), 2.23 (s, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.46 (s, 3H) .

[0208] 实施例13: (S)-6-(3-(4-氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0174-01)的合成.



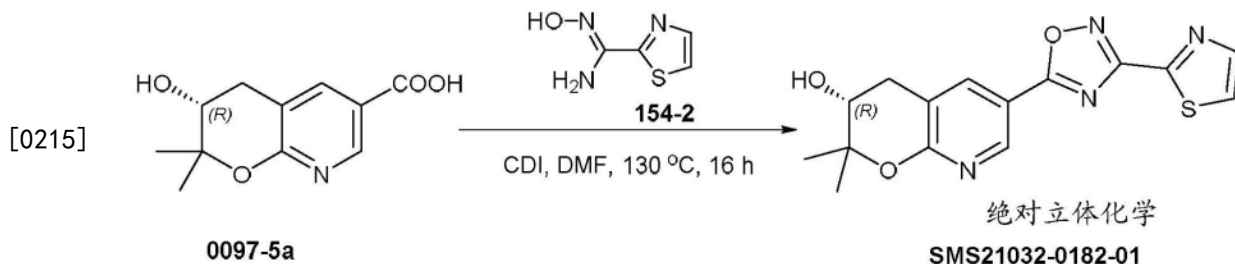
[0210] 向化合物0097-5b (60mg, 0.27mmol) 在DMF (5ml) 中的搅拌溶液中添加CDI (88mg, 0.54mmol)。在室温下搅拌30分钟, 然后添加4-氯-N'-羟基苯甲脒 (96mg, 0.54mmol)。将混合物在120℃搅拌3小时。消耗起始物质(通过LCMS)后, 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的产物SMS21032-0174-01 (21mg, 21.8%产率)。

[0211] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min. 纯度: 98.47%, Rt = 2.191min; MS计算值: 357.79; MS实测值: 358.3 [M+H]⁺.

[0212] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 99.79%, Rt = 10.470min.

[0213] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.95 (d, J = 1.6Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.09 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.49 (d, J = 8.4Hz, 2H), 3.97 (t, J = 5.2Hz, 1H), 3.18-3.23 (m, 1H), 2.93-2.99 (m, 1H), 1.97 (br, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H) .

[0214] 实施例14: (R)-2,2-二甲基-6-(3-(噻唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0182-01)的合成.



[0216] 向化合物0097-5a (40mg, 0.18mmol) 在DMF (5ml) 中的搅拌溶液中添加CDI (59mg, 0.36mmol)。在室温下搅拌30分钟, 然后添加154-2 (52mg, 0.36mmol)。将混合物在130℃搅拌16小时。消耗起始物质(通过LCMS)后, 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的产物SMS21032-0182-01 (7.2mg, 12%产率)。

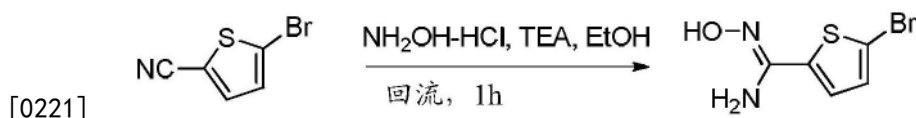
[0217] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM

NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度:98.63%, $R_t = 1.598\text{min}$;MS计算值:330.36;MS实测值:331.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0218] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μm);柱温:40 $^\circ\text{C}$;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:96.44%, $R_t = 7.244\text{min}$.

[0219] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.03 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 8.31-8.32 (m, 1H), 8.10 (d, $J = 3.2\text{Hz}$, 1H), 7.62 (d, $J = 3.2\text{Hz}$, 1H), 3.97 (t, $J = 5.2\text{Hz}$, 1H), 3.17-3.23 (m, 1H), 2.93-2.98 (m, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.47 (s, 3H).

[0220] 实施例15:5-溴-N'-羟基噻吩-2-甲脒的合成

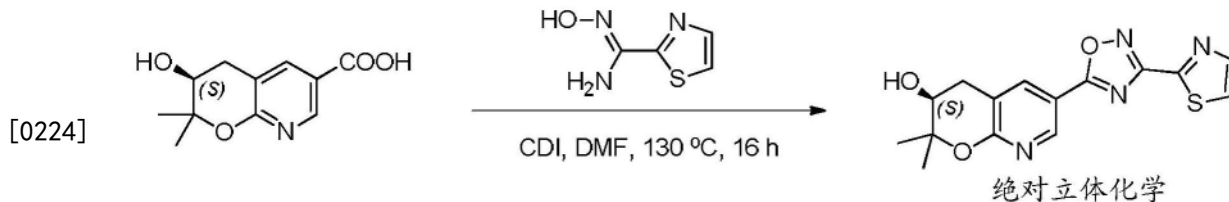


0123-1

0123-2

[0222] 向化合物0123-1 (200mg, 1.07mmol) 和盐酸羟胺 (150mg, 2.14mmol) 在EtOH (10ml) 中的搅拌溶液中添加TEA (325mg, 3.21mmol)。将混合物回流1小时。起始物质消耗后 (通过LCMS), 将反应溶液真空浓缩。用乙酸乙酯萃取残余物, 将合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 得到呈白色固体状的产物0123-2 (200mg, 85%产率)。

[0223] 实施例16: (S)-2,2-二甲基-6-(3-(噻唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0183-01) 的合成。



0097-5b

SMS21032-0183-01

[0225] 向化合物0097-5b (40mg, 0.18mmol) 在DMF (5ml) 中的搅拌溶液中添加CDI (59mg, 0.36mmol)。在室温下搅拌30分钟, 然后添加N'-羟基噻唑-2-甲脒 (52mg, 0.36mmol)。将混合物在130 $^\circ\text{C}$ 搅拌16小时。消耗起始物质 (通过LCMS) 后, 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的产物SMS21032-0183-01 (22mg, 37%产率)。

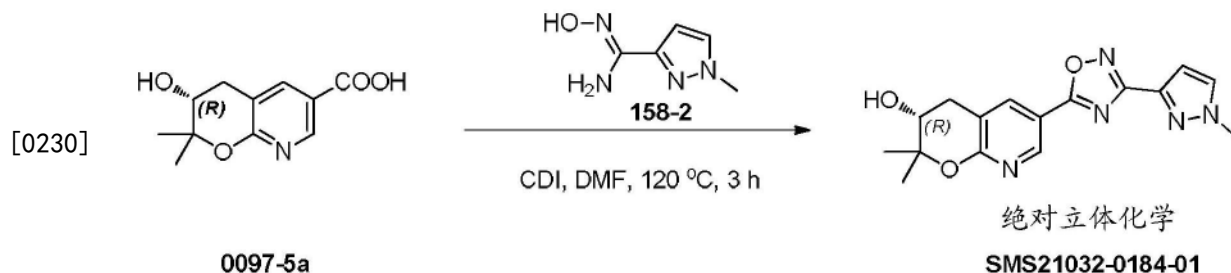
[0226] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μm);柱温:40 $^\circ\text{C}$;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度:99.02%, $R_t = 1.597\text{min}$;MS计算值:330.36;MS实测值:331.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0227] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μm);柱温:40 $^\circ\text{C}$;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM

NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:94.10%, $R_t=7.258\text{min}$.

[0228] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.03 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.30-8.31 (m, 1H), 8.10 (d, $J=3.2\text{Hz}$, 1H), 7.62 (d, $J=3.2\text{Hz}$, 1H), 3.97 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 3.17-3.23 (m, 1H), 2.92-2.98 (m, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.47 (s, 3H)

[0229] 实施例17: (R)-2,2-二甲基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0184-01)的合成.



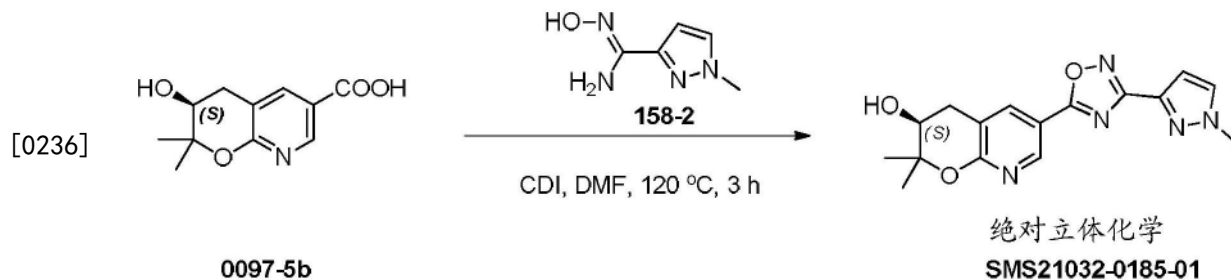
[0231] 向化合物0097-5a (40mg, 0.18mmol) 在DMF (5ml) 中的搅拌溶液中添加CDI (59mg, 0.36mmol)。在室温下搅拌30分钟,然后添加158-2 (51mg, 0.36mmol)。将混合物在120℃搅拌3小时。消耗起始材料(通过LCMS)后,将反应混合物真空浓缩,通过制备型HPLC纯化,得到呈白色固体状的产物SMS21032-0184-01 (16mg, 27%产率)。

[0232] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μm);柱温:40℃;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度:97.38%, $R_t=1.492\text{min}$;MS计算值:327.34;MS实测值:328.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0233] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μm);柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:100%, $R_t=6.715\text{min}$.

[0234] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.03 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.31-8.32 (m, 1H), 7.49 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.90 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.96 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 3.15-3.21 (m, 1H), 2.90-2.96 (m, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.46 (s, 3H).

[0235] 实施例18: (S)-2,2-二甲基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0185-01)的合成.



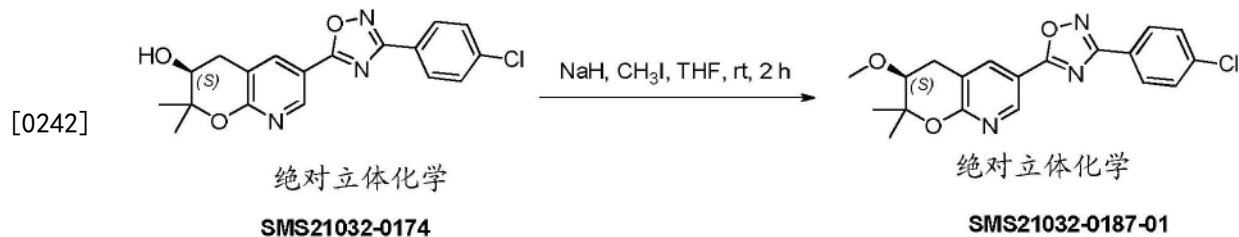
[0237] 向化合物0097-5b (40mg, 0.18mmol) 在DMF (5ml) 中的搅拌溶液中添加CDI (59mg, 0.36mmol)。在室温下搅拌30分钟, 然后添加158-2 (51mg, 0.36mmol)。将混合物在120℃搅拌3小时。消耗起始物质 (通过LCMS) 后, 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的产物SMS21032-0185-01 (11mg, 18.6% 产率)。

[0238] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:2.0mL/min;流动相:从95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0%[水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度:97.12%, R_t =1.492min;MS计算值:327.34;MS实测值:328.4[M+H] $^{+}$.

[0239] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:100%,Rt=6.701min.

[0240] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.03 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H) , 8.30-8.31 (m, 1H) , 7.49 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H) , 6.90 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H) , 4.05 (s, 3H) , 3.93-3.98 (m, 1H) , 3.15-3.21 (m, 1H) , 2.90-2.96 (m, 1H) , 1.90 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H) , 1.49 (s, 3H) , 1.46 (s, 3H) .

[0241] 实施例19: (S)-6-(3-(4-氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3-甲氧基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶 (SMS21032-0187-01) 的合成.



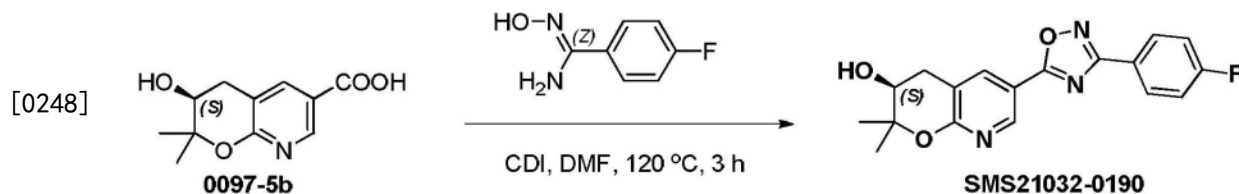
[0243] 向化合物SMS21032-0174 (60mg, 0.17mmol) 和CH₃I (121mg, 0.85mmol) 在THF中的搅拌溶液中缓慢添加NaH (13mg, 0.51mmol)。将混合物在室温下搅拌2小时。消耗起始原料 (通过LCMS) 后, 加入水, 将反应溶液用乙酸乙酯萃取, 合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到产物SMS21032 -0187-01 (37mg, 59% 收率), 为白色固体。

[0244] Agilent LCMS1200-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:2.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min.纯度:100%,Rt=2.461min;MS计算值:371.82;MS实测值:372.2[M+H] $^{+}$.

[0245] Agilent HPLC 1200,柱:Waters X-Bridge C18(150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:100%,Rt=11.848min.

[0246] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.97 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.23-8.24 (m, 1H), 8.09-8.11 (m, 2H), 7.48-7.51 (m, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.44-3.45 (m, 1H), 3.14-3.19 (m, 1H), 2.93-2.99 (m, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.45 (s, 3H).

[0247] 实施例20: (S)-6-(3-(4-氟苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0190) 的合成



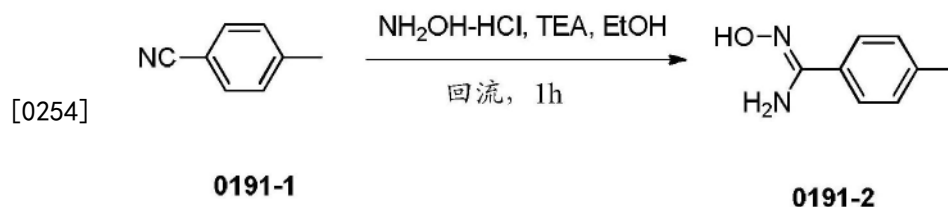
[0249] 向0097-5b (120mg, 0.54mmol) 在DMF (5mL) 中的溶液中添加CDI (174.39mg, 1.08mmol)。将所得溶液在室温下搅拌30分钟,然后将(Z)-4-氟-N'-羟基苯甲脒 (124.29mg, 0.81mmol) 添加至该混合物中。将该混合物加热至120℃并保持3小时。起始原料消耗后,过滤混合物并浓缩。通过制备型HPLC纯化残余物,得到SMS21032-0190 (43mg, 产率23.41%), 为白色固体。

[0250] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min, 纯度: 99.10%, $R_t=2.041\text{min}$; MS实测值: 342.3[M+H] $^+$ 。

[0251] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μm); 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min, 纯度: 99.14%, $R_t=9.643\text{min}$ 。

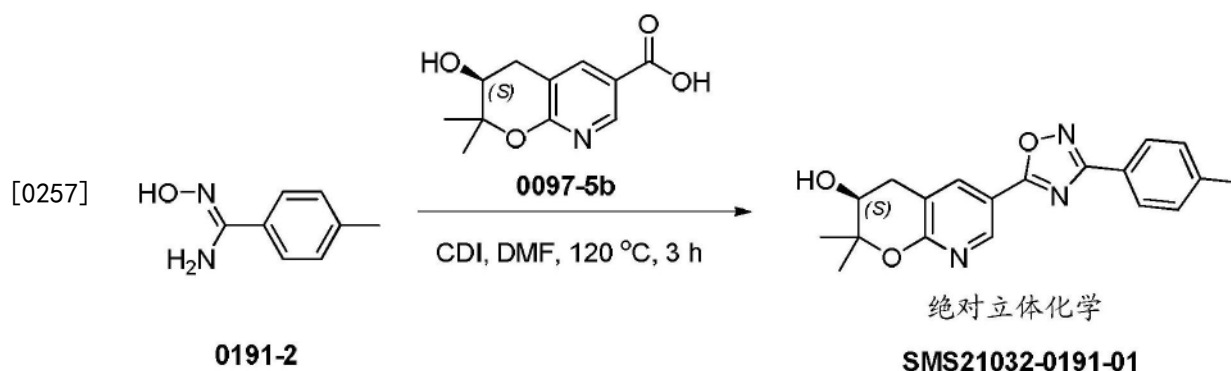
[0252] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.95 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.21-8.22 (m, 1H), 8.13-8.17 (m, 2H), 7.17-7.22 (m, 2H), 3.97 (s, 1H), 3.18-3.23 (m, 1H), 2.93-2.99 (m, 1H), 2.08 (s, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H)。

[0253] 实施例21: N'-羟基-4-甲基苯甲脒 (0191-2) 的合成。



[0255] 向化合物0191-1 (500mg, 4.27mmol) 和盐酸羟胺 (594mg, 8.54mmol) 在EtOH (10ml) 中的搅拌溶液中添加TEA (1.3g, 12.81mmol)。将混合物回流1小时。起始物质消耗后 (通过LCMS), 将反应溶液真空浓缩。用乙酸乙酯萃取残余物, 将合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 得到浅黄色液体状的产物0191-2 (510mg, 79.7%产率)。

[0256] (S)-2,2-二甲基-6-(3-对甲苯基-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0191-01) 的合成。



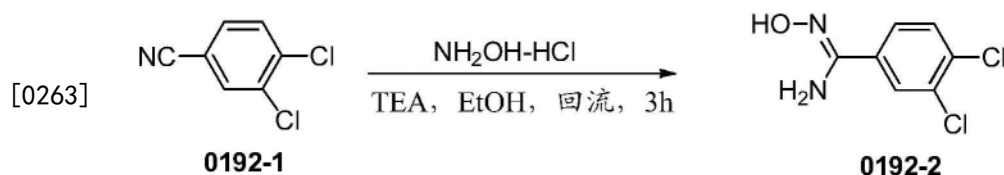
[0258] 向化合物0097-5b (50mg, 0.23mmol) 在DMF (5mL) 中的搅拌溶液中添加CDI (75mg, 0.46mmol)。在室温下搅拌30分钟, 然后添加0191-2 (69mg, 0.46mmol)。将混合物在120℃搅拌3小时。消耗起始物质(通过LCMS)后, 将反应混合物真空浓缩, 通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的产物SMS21032-0191-01 (45mg, 58%产率)。

[0259] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min. 纯度: 100%, Rt = 2.155min; MS计算值: 337.37; MS实测值: 338.1 [M+H]⁺。

[0260] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 99.74%, Rt = 10.194min。

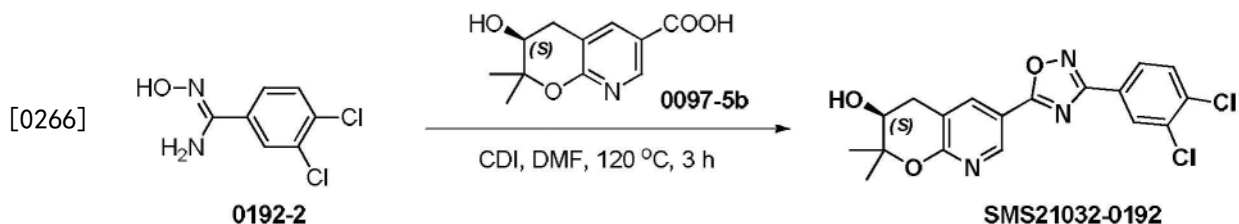
[0261] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.95 (d, J = 2.0Hz, 1H), 8.21-8.22 (m, 1H), 8.02 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.0Hz, 2H), 3.95 (t, J = 5.2Hz, 1H), 3.16-3.22 (m, 1H), 2.92-2.98 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.45 (s, 3H)。

[0262] 实施例22: (Z)-3,4-二氯-N'-羟基苯甲脒 (0192-2) 的合成。



[0264] 向0192-1 (1g, 5.81mmol) 在乙醇 (15mL) 中的溶液中添加NH₂OH-HCl (808mg, 11.63mmol) 和TEA (3.2mL)。将混合物加热回流3小时。起始物质消耗后(通过LCMS), 除去溶剂, 加入水 (100mL), 然后用二氯甲烷萃取, 合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 并真空浓缩, 得到0192-2 (600mg, 收率: 50%), 为白色固体。

[0265] (S)-6-(3-(3,4-二氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0192-01) 的合成



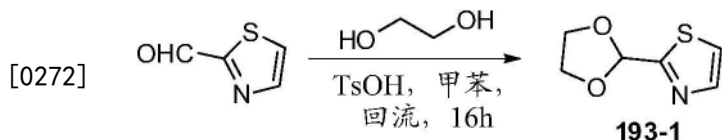
[0267] 向化合物0097-5b (22mg, 97.54 μ mol) 在DMF (4mL) 中的溶液中添加CDI (800mg, 4.93mmol)。将混合物搅拌约30分钟, 然后添加0192-2 (40mg, 185.08 μ mol)。将混合物加热至120 $^{\circ}$ C并保持3小时。冷却至室温后, 将混合物萃取并通过制备型HPLC纯化, 得到呈白色固体状的所需产物SMS21032-0192-01 (13mg, 产率: 33.8%)。

[0268] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min。纯度: 99.18%, $R_t = 2.359\text{min}$; MS计算值: 391.1; MS实测值: 392.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^{+}$ 。

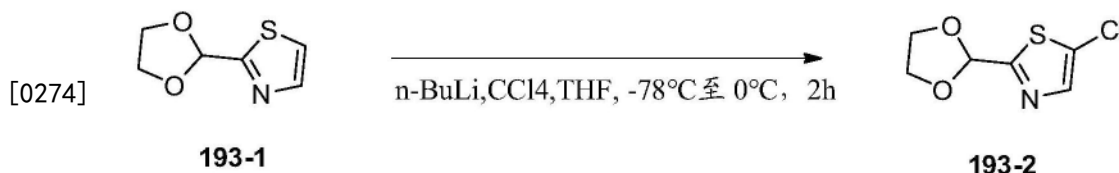
[0269] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min。纯度: 99.38%, $R_t = 11.393\text{min}$ 。

[0270] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.83 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 8.33 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 8.26 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 8.06 (dd, $J = 8.4\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 5.40 (d, $J = 4.8\text{Hz}$, 1H), 3.76-3.80 (m, 1H), 3.13 (dd, $J = 16.8\text{Hz}$, 4.8Hz, 1H), 2.83 (dd, $J = 17.2\text{Hz}$, 6.0Hz, 1H), 1.34 (s, 6H)。

[0271] 实施例23: (S)-6-(3-(5-氯噻唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇的合成(SMS21032-0193)

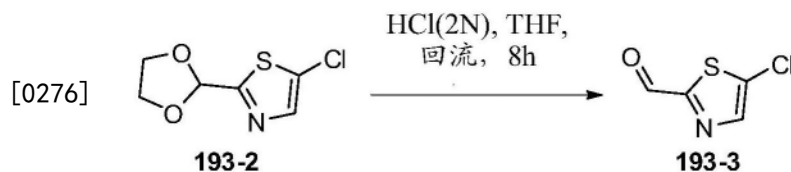


[0273] 向乙二醇 (2.2g, 35.36mmol)、噻唑-2-甲醛 (2.0g, 17.68mmol) 的甲苯 (20mL) 溶液中加入TsOH (92.08mg, 1.77mmol), 然后将混合物回流16h。用EA (50mL) 稀释, 用盐水 (50mL) 洗涤, 在 Na_2SO_4 中干燥。过滤并浓缩滤液, 得到黄色液体193-1 (2.5g, 收率: 90%)。

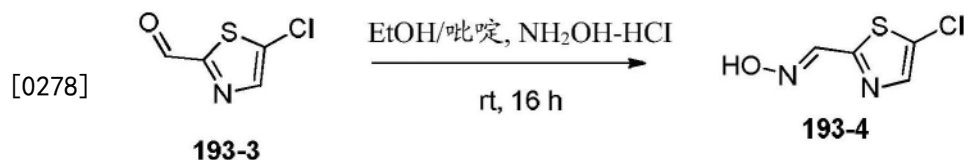


[0275] 在-78 $^{\circ}$ C向193-1 (1g, 6.36mmol) 在THF (20mL) 中的溶液中滴加n-BuLi (3.1mL, 2.5M 在己烷中), 当添加完成时, 搅拌混合物-78 $^{\circ}$ C搅拌30分钟, 然后在5分钟内滴加 CCl_4 (3.1mL), 然后将混合物在0 $^{\circ}$ C搅拌2小时。用水 (20mL) 淬灭, 用EA (35mL*2) 萃取, EA相在 Na_2SO_4 中干燥。过滤并浓缩滤液为油状物, 通过CC (EA:PE = 1:4) 纯化以得到呈黄色液体的

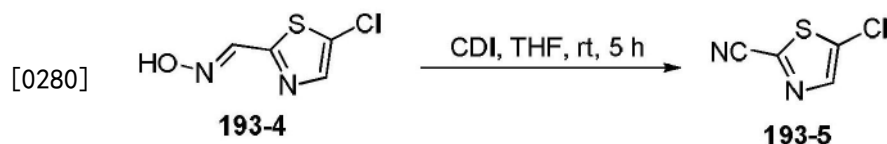
193-2 (0.9g, 收率: 75%)。



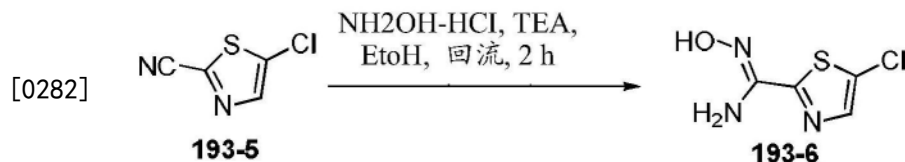
[0277] 向193-2 (0.91g, 4.75mmol) 的THF (10mL) 溶液中添加HCl (2N, 5mL), 然后将混合物回流8h。添加EA (40mL), 用水 (30mL)、饱和NaHCO₃ (40mL*2) 洗涤, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液为油状物, 通过CC (EA:PE = 1:10) 纯化以得到呈黄色液体的193-3 (0.35g, 产率: 50%)。



[0279] 在室温向193-3 (350mg, 2.37mmol) 的EtOH (10mL) 溶液中加入盐酸羟胺 (247mg, 3.56mmol)、吡啶 (1.88g, 23.72mmol), 然后将混合物在0℃搅拌。室温放置16h。浓缩至油状物, 用EA (20mL) 稀释, 然后用盐水 (15mL) 洗涤, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液, 得到193-4 (371mg, 收率: 96%), 为棕色固体。

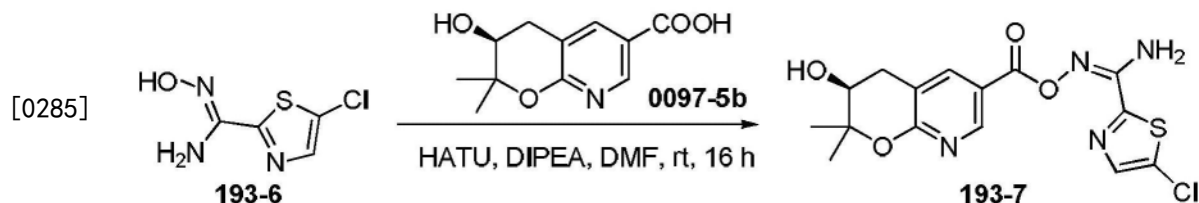


[0281] 在室温向193-4 (340mg, 2.09mmol) 在THF (3mL) 中的溶液中添加CDI (452mg, 3.14mmol), 然后将混合物在室温下搅拌5h。用EA (40mL) 稀释, 用盐水 (20mL) 洗涤, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液, 得到黄色油状的193-5 (250mg, 收率: 83%)。

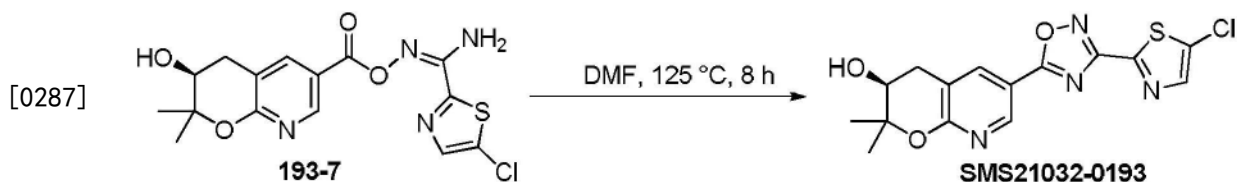


[0283] 向193-5 (250mg, 1.73mmol) 的EtOH (15mL) 溶液中加入盐酸羟胺 (144mg, 2.07mmol)、TEA (700mg, 6.92mmol, 964.02μL), 然后将混合物回流2小时。浓缩至固体, 用EA (80mL) 稀释, 用水 (10mL) 洗涤, 在Na₂SO₄中干燥。

[0284] 过滤并浓缩滤液, 得到193-6 (235mg, 收率: 77%), 为棕色固体。



[0286] 在室温向0097-5b (60mg, 269μmol) 在DMF (3mL) 中的溶液中添加HATU (112mg, 296μmol), 然后添加193-6 (53mg, 296μmol) 和DIPEA (52mg, 添加403μmol), 将混合物在室温下搅拌16小时。用水 (20mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩, 得到黄色油状的193-7 (70mg, 收率: 68%)。



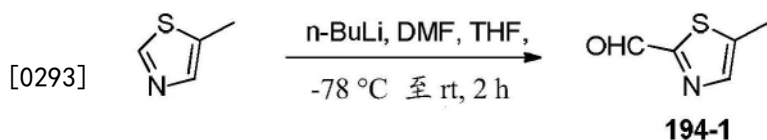
[0288] 将193-7 (24mg, 62.69 μ mol) 在DMF (3mL) 中的溶液加热至125 $^{\circ}$ C持续8h。用水 (10mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩至油状物, 通过制备型HPLC纯化, 得到SMS21032-0193 (8mg, 产率: 35%), 为白色固体。

[0289] LC-MS (Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min), 纯度: 100%, Rt=1.866min; MS计算值: 364.0; MS实测值: 365.0 [M+H]⁺。

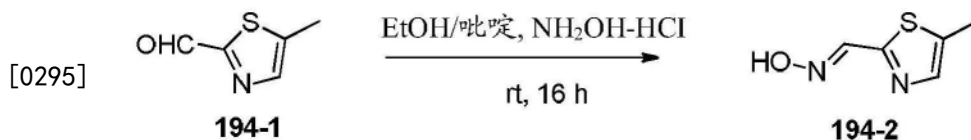
[0290] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 100%, Rt=8.528min. MS计算值: 364.0; MS实测值: 365.2 [M+H]⁺。

[0291] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.00 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.26-8.29 (m, 1H), 7.88 (s, 1H), 3.94-3.99 (m, 1H), 3.19 (dd, J=16.8, 4.8Hz, 1H), 2.95 (dd, J=17.0, 5.8Hz, 1H), 1.92 (d, J=6.0Hz, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.47 (s, 3H)。

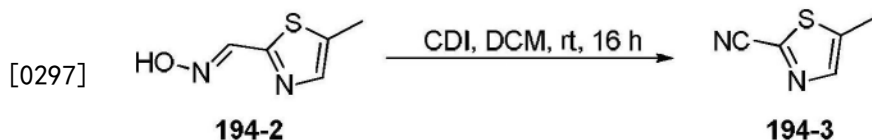
[0292] 实施例24: (S)-2,2-二甲基-6-(3-(5-甲基噻唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0194) 的合成



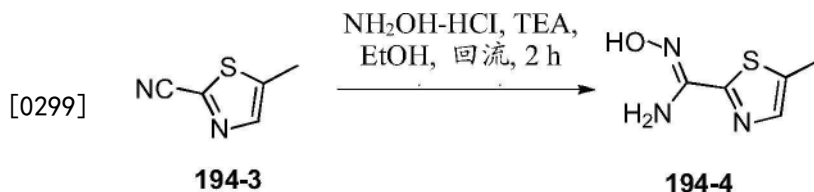
[0294] 在-78 $^{\circ}$ C向5-甲基噻唑 (500mg, 5.0mmol) 的THF (5mL) 溶液中滴加n-BuLi (2mL), 然后将混合物在-78 $^{\circ}$ C下搅拌10分钟, 添加DMF (553mg, 7.6mmol), 将混合物在-78 $^{\circ}$ C搅拌10分钟, 然后温热至室温并搅拌2小时。用饱和NH₄Cl淬灭, 用EA (30mL) 萃取, EA相在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液至油状物, 通过CC (EA:PE=1:8) 纯化以得到呈黄色油状物的194-1 (32mg, 产率: 50%)。



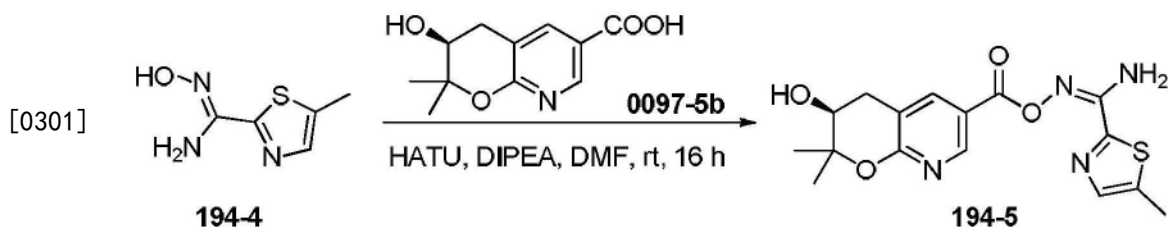
[0296] 在室温向194-1 (50mg, 393 μ mol) 的EtOH (1mL) 溶液中加入吡啶 (0.2mL)、盐酸羟胺 (55mg, 786 μ mol), 然后将混合物在室温下搅拌16小时。用水 (10mL) 稀释, 用EA (15mL*2) 萃取, EA相在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液, 得到194-2 (51mg, 收率: 91%), 为白色固体。



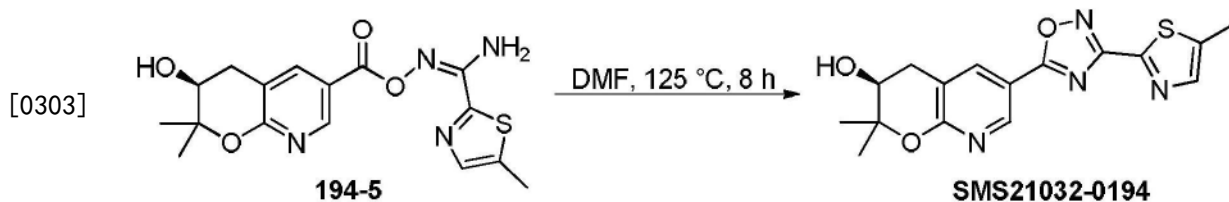
[0298] 向194-2 (50mg, 352 μ mol) 在DCM (3mL) 中的溶液中添加CDI (68mg, 422 μ mol), 然后将混合物在室温下搅拌16h。用水 (10mL) 稀释, 用DCM (20mL) 萃取, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩, 得到194-3 (30mg, 收率: 69%), 为黄色液体。



[0300] 向194-3 (40mg, 322 μ mol) 的EtOH (5mL) 溶液中加入盐酸羟胺 (45mg, 644 μ mol)、TEA (33mg, 322 μ mol), 然后将混合物回流2h。浓缩成固体, 用EA (10mL) 稀释, 然后过滤并用EA洗涤固体, 浓缩滤液以得到呈白色固体的194-4 (25mg, 收率: 49%)。



[0302] 在室温下向0097-5b (60mg, 269 μ mol) 在DMF (1mL) 中的溶液中添加HATU (112mg, 296 μ mol), 然后添加194-4 (47mg, 296 μ mol)、DIPEA (52mg, 添加403 μ mol), 将混合物在室温下搅拌16小时。用水 (10mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩, 得到黄色油状的194-5 (80mg, 收率: 82%)。



[0304] 将194-5 (80mg, 221 μ mol) 在DMF (2mL) 中的溶液加热至125 $^{\circ}$ C持续8h。用水 (10mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩至油状物, 通过制备型HPLC纯化, 得到SMS21032-0194 (10mg, 产率: 13%), 为白色固体。

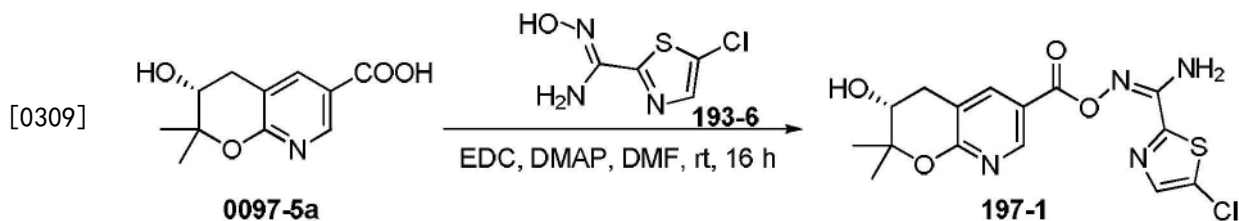
[0305] LC-MS (Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min), 纯度: 100%, Rt=1.705min; MS计算值: 344.1; MS实测值: 345.1 [M+H]⁺。

[0306] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 100%, Rt=

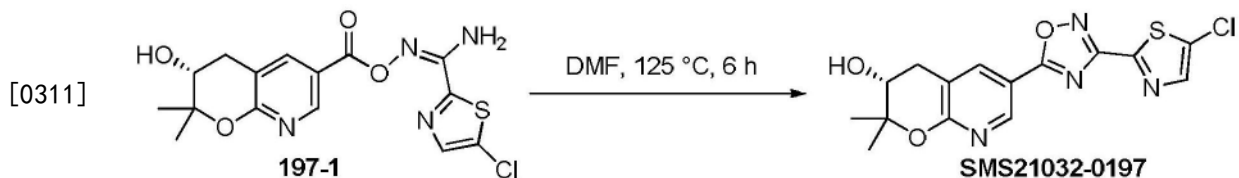
7.587min.MS计算值:344.1;MS实测值:345.2[M+H]⁺.

[0307] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ9.01 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.28-8.30 (m, 1H), 7.74 (d, J=1.2Hz, 1H), 3.93-3.99 (m, 1H), 3.19 (dd, J=17.2, 4.8Hz, 1H), 2.94 (dd, J=17.0, 5.8Hz, 1H), 2.60 (d, J=1.2Hz, 3H), 1.95 (d, J=6.0Hz, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.46 (s, 3H).

[0308] 实施例25: (R)-6-(3-(5-氯噻唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0197)的合成



[0310] 在室温向0097-5a (50mg, 224μmol) 的DMF (3mL) 溶液中添加EDC (56mg, 291μmol) DMAP (3mg, 22μmol), 然后将193-6 (44mg, 246μmol) 加入其中。添加后, 将混合物在室温下搅拌16小时。用水 (20mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩, 得到197-1 (55mg, 收率: 64%), 为黄色油状物。



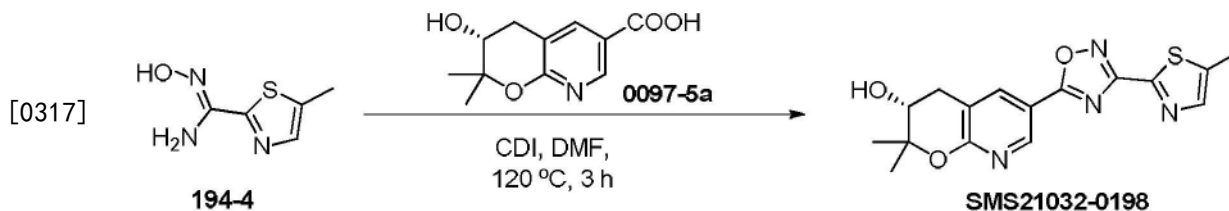
[0312] 将197-1 (55mg, 144μmol) 在DMF (2mL) 中的溶液加热至125℃持续6小时。用水 (10mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩至油状物, 通过制备型HPLC纯化以得到黄色固体状的SMS21032-0197 (10mg, 产率: 19%)。

[0313] LC-MS (Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min), 纯度: 100%, Rt=1.909min; MS计算值: 364.0; MS实测值: 365.1[M+H]⁺.

[0314] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 100%, Rt=8.516min. MS计算值: 364.0; MS实测值: 365.2[M+H]⁺.

[0315] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.92 (d, J=2.0Hz, 1H), 8.19-8.22 (m, 1H), 7.81 (s, 1H), 3.87-3.92 (m, 1H), 3.12 (dd, J=17.0, 4.6Hz, 1H), 2.88 (dd, J=17.2, 6.0Hz, 1H), 1.90 (d, J=6.0Hz, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.40 (s, 3H).

[0316] 实施例26: (R)-2,2-二甲基-6-(3-(5-甲基噻唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0198)的合成



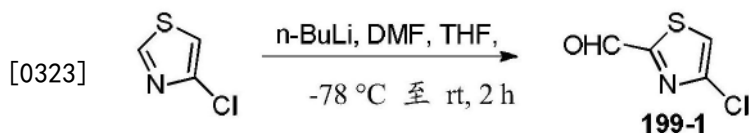
[0318] 向0097-5a (50mg, 224 μ mol) 的DMF (5mL) 溶液中添加CDI (44mg, 269 μ mol), 然后添加194-4 (35mg, 224 μ mol), 将混合物加热至120 $^{\circ}$ C保持3小时。用水 (10mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩至油状物, 通过制备型HPLC纯化以得到呈白色固体状的SMS21032-0198 (7mg, 产率: 9%)。

[0319] Agilent LCMS1200-6110, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+0.05% TFA] 和5% [CH₃CN+0.05% TFA] 至0% [水+0.05% TFA] 和100% [CH₃CN+0.05% TFA] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+0.05% TFA] 和5% [CH₃CN+0.05% TFA] 进行0.05min, 然后在这种条件下进行0.7min. 纯度: 99.6%, Rt=1.583min; MS计算值: 344.1; MS实测值: 345.3 [M+H]⁺.

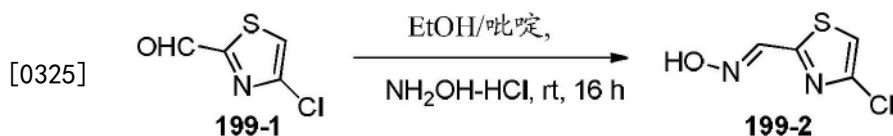
[0320] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min. 纯度: 100%, Rt=7.548min. MS计算值: 344.1; MS实测值: 345.2 [M+H]⁺.

[0321] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.01 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.28-8.31 (m, 1H), 7.74 (d, J=1.2Hz, 1H), 3.94-3.99 (m, 1H), 3.19 (dd, J=17.2, 4.8Hz, 1H), 2.94 (dd, J=17.0, 5.8Hz, 1H), 2.60 (d, J=0.8Hz, 3H), 1.92 (d, J=6.0Hz, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.46 (s, 3H).

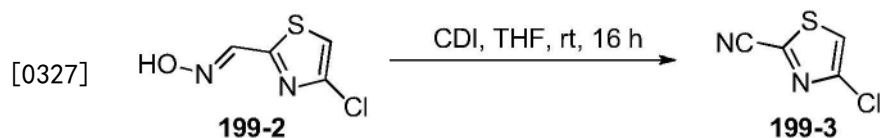
[0322] 实施例27: (R)-6-(3-(4-氯噻唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0199) 的合成



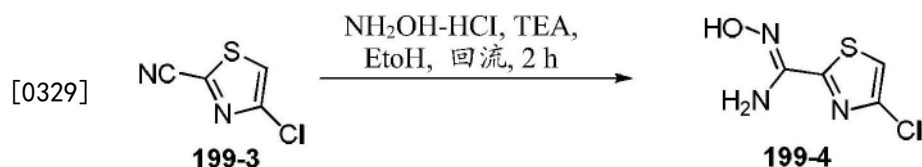
[0324] 在-78 $^{\circ}$ C向4-氯噻唑 (1.0g, 8.36mmol) 的THF (15mL) 溶液中滴加n-BuLi (4mL), 然后将混合物在-78 $^{\circ}$ C搅拌10分钟, 添加DMF (673mg, 9.20mmol), 将混合物在-78 $^{\circ}$ C搅拌10分钟, 然后温热至室温并搅拌2小时。用水 (20mL) 淬灭, 用EA (35mL*2) 萃取, EA相在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液至油状物, 通过CC (EA:PE=1:10) 纯化以得到呈白色固体的199-1 (371mg, 收率: 30%)。



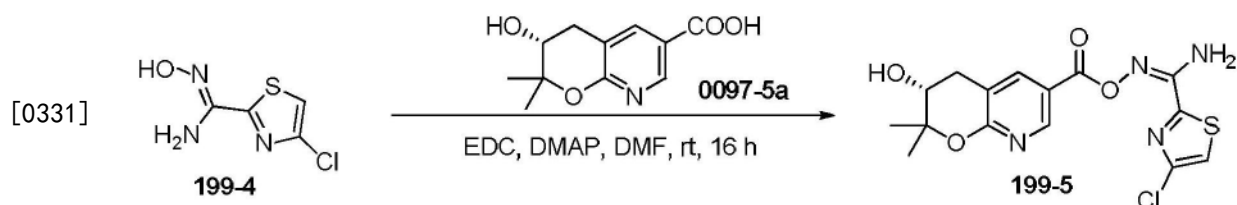
[0326] 在室温向199-1 (370mg, 2.51mmol) 的EtOH (10mL) 溶液中加入盐酸羟胺 (261mg, 3.76mmol)、吡啶 (1.98g, 25.07mmol), 然后将混合物在0 $^{\circ}$ C搅拌。室温放置16小时。浓缩至油状物, 用EA (50mL) 稀释, 然后用盐水 (25mL) 洗涤, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液, 得到199-2 (270mg, 收率: 66%), 为白色固体。



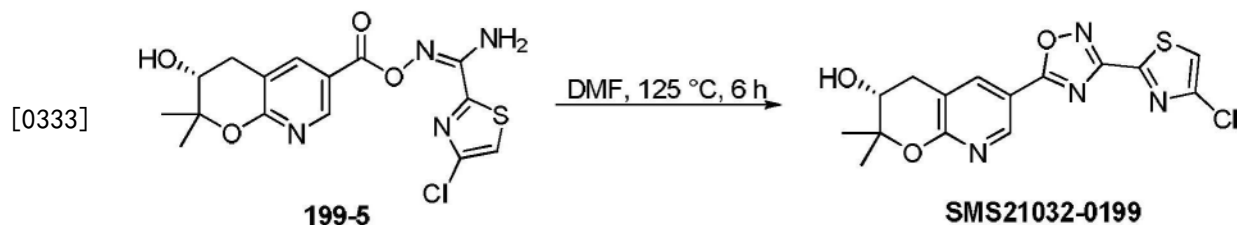
[0328] 向199-2 (240mg, 1.48mmol) 在THF (10mL) 中的溶液中添加CDI (359mg, 2.21mmol), 然后将混合物在室温下搅拌16小时。用EA (35mL) 稀释, 用盐水 (20mL) 洗涤, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液, 得到为黄色液体的199-3 (200mg, 收率: 94%)。



[0330] 向199-3 (200mg, 1.38mmol) 的EtOH (10mL) 溶液中加入盐酸羟胺 (115mg, 1.66mmol)、TEA (560mg, 5.53mmol), 然后将混合物回流2h。浓缩成固体, 用EA (80mL) 稀释, 用水 (10mL) 洗涤, EA相在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩滤液, 得到199-4 (210mg, 收率: 85%), 为黄色固体。



[0332] 在室温向0097-5a (60mg, 269μmol) 的DMF (1mL) 溶液中添加EDC (62mg, 323μmol)、DMAP (3mg, 27μmol), 将混合物在室温搅拌15分钟, 然后加入199-4 (46mg, 296μmol), 将混合物在室温下搅拌16小时。用水 (10mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩, 得到黄色油状的199-5 (65mg, 收率: 67%)。



[0334] 将199-5 (65mg, 179μmol) 在DMF (3mL) 中的溶液加热至125℃持续6小时。用水 (10mL) 稀释, 用EA (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤EA相, 在Na₂SO₄中干燥。过滤并浓缩至油状物, 通过制备型HPLC纯化, 得到SMS21032-0199 (10mg, 产率: 16%), 为白色固体。

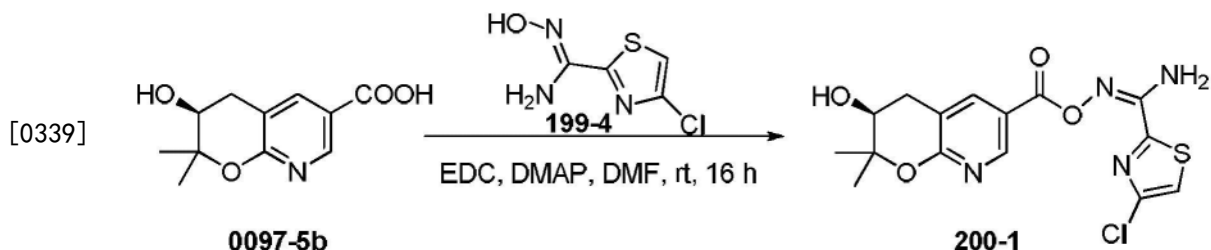
[0335] LC-MS (Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min), 纯度: 100%, Rt=1.826min; MS计算值: 364.0; MS实测值: 365.0 [M+H]⁺。

[0336] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+

10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:100%, $R_t=8.140\text{min}$.MS计算值:364.0;MS实测值:365.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

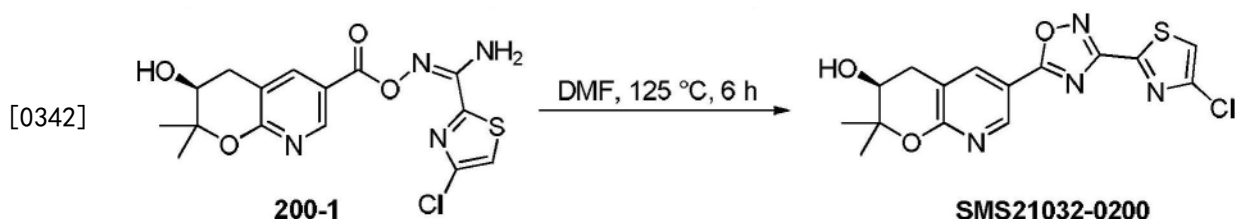
[0337] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.93 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.20-8.23 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 3.86-3.93 (m, 1H), 3.13 (dd, $J=17.0, 4.6\text{Hz}$, 1H), 2.88 (dd, $J=17.0, 5.8\text{Hz}$, 1H), 1.89 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 1.44 (s, 3H), 1.40 (s, 3H).

[0338] 实施例28: (S,E)-4-氯-N'-(3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-羰基)噻唑-2-甲脒(200-1)的合成



[0340] 在室温向0097-5b (60mg, 269 μmol)的DMF (1mL)溶液中添加EDC (62mg, 323 μmol)、DMAP (3mg, 27 μmol),在室温搅拌混合物搅拌15分钟,然后加入199-4 (46mg, 296 μmol),将混合物在室温下搅拌16小时.用水 (10mL) 稀释,用EA (20mL) 萃取,用盐水 (20mL) 洗涤EA相,在 Na_2SO_4 中干燥.过滤并浓缩,得到200-1 (60mg, 收率:62%),为黄色油状物.

[0341] (S)-6-(3-(4-氯噻唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇的合成(SMS21032-0200)



[0343] 将199-5 (60mg, 165 μmol)在DMF (3mL)中的溶液加热至125 $^{\circ}\text{C}$ 持续6小时.用水 (10mL) 稀释,用EA (20mL) 萃取,用盐水 (20mL) 洗涤EA相,在 Na_2SO_4 中干燥.过滤并浓缩至油状物,通过制备型HPLC纯化,得到SMS21032-0200 (9mg, 产率:16%),为白色固体.

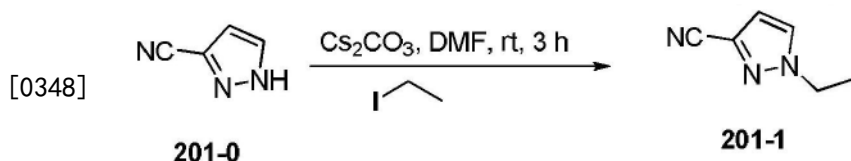
[0344] LC-MS (Agilent LCMS1200-6120, 柱:Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μm); 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$; 流率:2.0mL/min; 流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行1.6min,然后在这种条件下进行1.4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行0.7min),纯度:100%, $R_t=1.833\text{min}$;MS计算值:364.0;MS实测值:365.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0345] Agilent HPLC 1200, 柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μm); 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$; 流率:1.0mL/min; 流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行10min,然后在这种条件下进行5min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行5min.纯度:100%, $R_t=8.135\text{min}$.MS计算值:364.0;MS实测值:365.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0346] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.00 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 8.27-8.30 (m, 1H), 7.38 (s, 1H), 3.94-3.99 (m, 1H), 3.20 (dd, $J=17.0, 4.6\text{Hz}$, 1H), 2.95 (dd, $J=17.0, 5.8\text{Hz}$, 1H), 1.91 (d, J

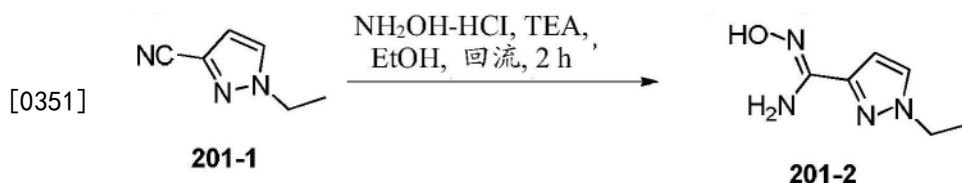
=5.6Hz, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.47 (s, 3H) .

[0347] 实施例29: 1-乙基-1H-吡唑-3-甲腈(201-1)的合成



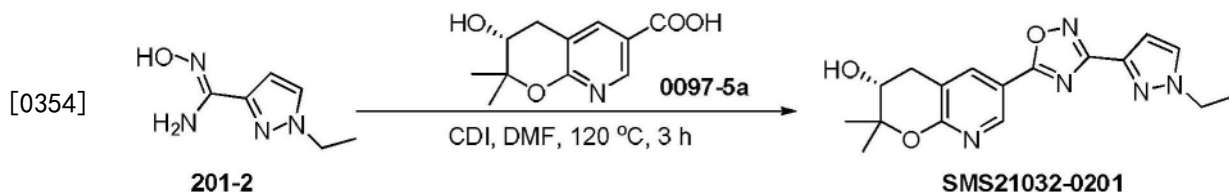
[0349] 向201-0 (1.0g, 10.74mmol) 在DMF (10mL) 中的搅拌溶液中添加碘乙烷 (2.01g, 12.89mmol) 和Cs₂CO₃ (6.99g, 21.48mmol)。将混合物在室温搅拌3小时。反应完成后, 用水淬灭混合物, 然后用EA (30mL×3) 萃取。分离有机层, 经Na₂SO₄干燥并真空浓缩。将残余物通过柱色谱法(石油醚/EtOAc=1/1) 纯化, 得到201-1 (1.1g, 收率84.62%), 为白色固体。

[0350] (Z)-1-乙基-N'-羟基-1H-吡唑-3-甲脒(201-2)的合成



[0352] 向201-1 (1.1g, 9.08mmol) 在EtOH (10mL) 中的溶液中添加NH₂OH·HCl (946.45mg, 13.62mmol) 和TEA (2.76g, 27.24mmol)。将所得反应混合物在80℃搅拌2小时。然后加入水 (30mL), 水相用乙酸乙酯 (40mL×3) 萃取, 合并的有机相用水 (50mL×3) 洗涤并经无水硫酸钠干燥, 过滤并真空浓缩得到201-2 (1.3g, 产率92.92%), 为白色固体。

[0353] (R)-6-(3-(1-乙基-1H-吡唑-3-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0201)的合成



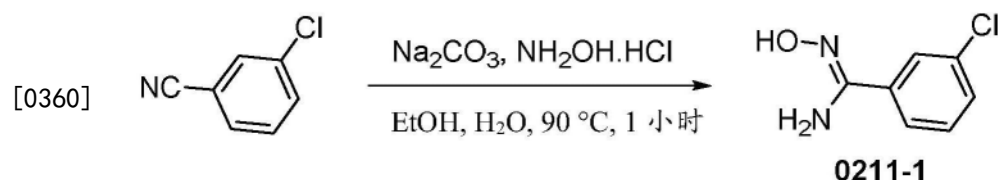
[0355] 向0097-5a (50mg, 223.98μmol) 在DMF (5mL) 中的溶液中添加CDI (72.63mg, 447.96μmol) 和201-2 (51.80mg, 335.97μmol)。将所得溶液在室温下搅拌30分钟, 然后将该混合物加热至120℃持续3小时。起始材料消耗后, 过滤混合物。通过制备型HPLC纯化残余物, 得到SMS21032-0201 (20.5mg, 26.81%产率), 为白色固体。

[0356] Agilent LCMS1200-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm×4.6mm×3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 2.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行1.6min, 然后在这种条件下进行1.4min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行0.7min, 纯度: 99.62%, Rt=1.660min; MS实测值: 342.3[M+H]⁺。

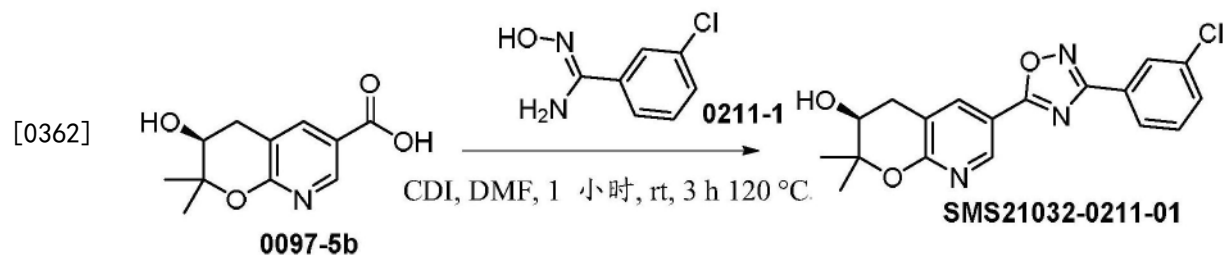
[0357] Agilent HPLC 1200, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm×4.6mm×3.5μm); 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 至0% [水+10mM NH₄HCO₃] 和100% [CH₃CN] 进行10min, 然后在这种条件下进行5min, 最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃] 和5% [CH₃CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行5min, 纯度: 100%, Rt=7.583min。

[0358] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.01 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.29-8.30 (m, 1H), 7.51 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.89 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 4.32 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.94 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 3.17 (dd, $J=11.6\text{Hz}$, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 2.92 (dd, $J=16.8\text{Hz}$, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 2.00 (br, 1H), 1.54 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.47 (d, $J=12.8\text{Hz}$, 6H).

[0359] 实施例30: (S)-6-[3-(3-氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0211-01) 的合成



[0361] 向3-氯苯甲腈 (500.0mg, 3.63mmol, 438.60uL) 和 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (1.00g, 14.54mmol) 在 EtOH (10mL) 和 H_2O (5mL) 中的混合物中添加 Na_2CO_3 (847.59mg, 8.00mmol)。将混合物在 90°C 搅拌1小时。LCMS表明NBK0071-2-R1完全被消耗。LCMS纯度为约87%。过滤混合物并真空浓缩滤液。得到3-氯-N'-羟基-苯甲脒 (1.65g, 3.63mmol, 产率99.79%, 纯度37.5%), 为浅黄色固体。里面还残留着一些盐。产物无需任何纯化即可用于下一步反应。



[0363] 添加 (3S)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (60.0mg, 268.79umol) 在 DMF (3mL) 中的混合物 CDI (77.38mg, 537.57umol)。将混合物在 20°C 搅拌1小时。然后将3-氯-N'-羟基-苯甲脒 (244.56mg, 537.57umol) 添加至上述混合物中。将温度升温至 120°C 并在此温度搅拌3小时。LCMS (NBK0071-6-P1-1) 显示生成了所需产物。将混合物与NBK0071-4合并。过滤混合物并通过制备型HPLC纯化过滤物。获得淡黄色固体状的 (3S)-6-[3-(3-氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (38mg, 106.21umol, 100%纯度)。收率: 29.6%

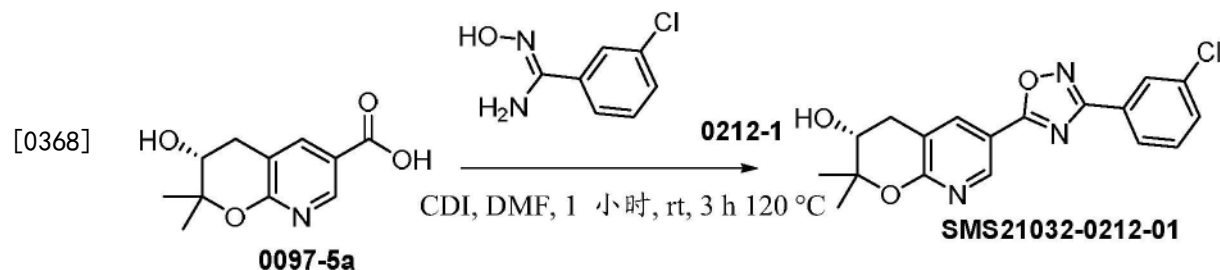
[0364] Agilent LCMS21500-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μm); 柱温: 40°C ; 流率: 1.5mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和95% [CH_3CN] 进行2min, 然后在这种条件下进行4min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行2min, 然后在这种条件下进行2min, 纯度: 96.35%, $R_t=1.942\text{min}$; MS实测值: 357.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0365] Agilent HPLC 1260-03, 柱: Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5 μm ; 柱温: 40°C ; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行14min, 然后在这种条件下进行8min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行6min, 纯度: 99.85%, $R_t=10.279\text{min}$.

[0366] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.95 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 8.26-8.19 (m, 1H), 8.15 (t, $J=$

1.7Hz, 1H), 8.04 (dt, $J=7.5, 1.3$ Hz, 1H), 7.53-7.40 (m, 2H), 3.97 (dd, $J=10.9, 5.8$ Hz, 1H), 3.21 (dd, $J=17.0, 4.8$ Hz, 1H), 2.96 (dd, $J=17.0, 5.7$ Hz, 1H), 2.01 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H). ESI-MS ($M+H$): 357.8

[0367] 实施例31: (R)-6-(3-(3-氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0212-01) 的合成



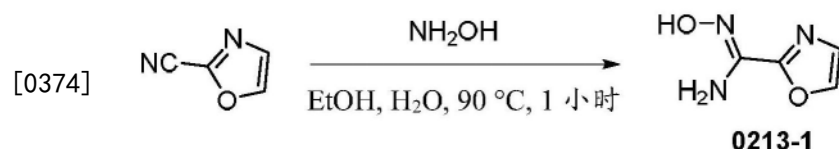
[0369] 将 (3R)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (80mg, 358.38 μ mol) 然后 CDI (103.18mg, 716.77 μ mol) 溶解在 DMF (1.5mL) 中。将混合物在 25℃ 搅拌 1 小时。之后, 添加 3-氯-N'-羟基-苯甲脒 (326.07mg, 716.77 μ mol)。将混合物在 120℃ 搅拌 3 小时。之后, 通过 LC-MS 测试反应。结果表明原料反应充分。然后过滤混合物。通过制备型 HPLC 纯化粗产物。获得 (3R)-6-[3-(3-氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (50mg, 139.75 μ mol, 38.99% 产率)。

[0370] Agilent LCMS21500-6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40℃; 流率: 1.5mL/min; 流动相: 从 95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和 5% [CH_3CN] 至 0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和 95% [CH_3CN] 进行 2min, 然后在这种条件下进行 4min, 最后改变为 95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和 5% [CH_3CN] 进行 2min, 然后在这种条件下进行 2min, 纯度: 98.42%, $R_t=1.970$ min; MS 实测值: 357.8 [$M+H$] $^+$ 。

[0371] Agilent HPLC 1260-03, 柱: Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5 μ m; 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从 95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和 5% [CH_3CN] 至 0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和 100% [CH_3CN] 进行 14min, 然后在这种条件下进行 8min, 最后改变为 95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和 5% [CH_3CN] 进行 0.1min, 然后在这种条件下进行 6min, 纯度: 99.85%, $R_t=10.279$ min。

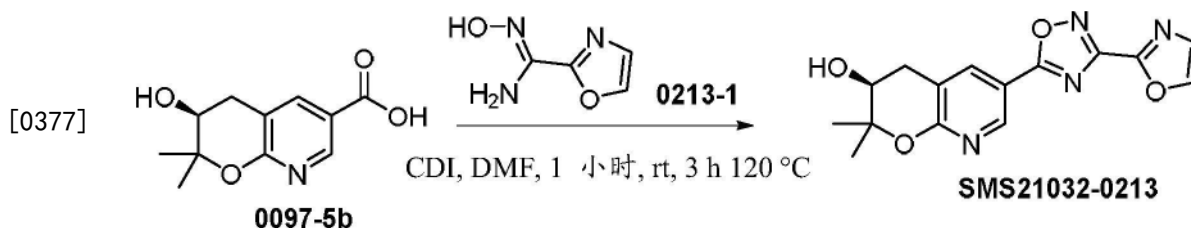
[0372] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.94 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 8.25-8.20 (m, 1H), 8.15 (t, $J=1.7$ Hz, 1H), 8.03 (dt, $J=7.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.54-7.47 (m, 1H), 7.44 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 3.96 (q, $J=5.2$ Hz, 1H), 3.21 (dd, $J=17.0, 4.8$ Hz, 1H), 2.96 (dd, $J=17.0, 5.7$ Hz, 1H), 2.14 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H)。

[0373] 实施例32: (Z)-N'-羟基噁唑-2-甲脒 (0213-1) 的合成



[0375] 向噁唑-2-甲脒 (0.2g, 2.13mmol) 在 EtOH (5mL) 中的混合物中添加 NH_2OH (561.28mg, 8.50mmol, 50% 纯度)。将混合物在密封管中于 90℃ 搅拌 1 小时。LCMS (NBK0071-52-P1-1) 显示生成了所需产物且纯度为 100%。将混合物真空浓缩。得到白色固体状的 N'-羟基噁唑-2-甲脒 (260mg, 2.05mmol, 产率 96.22%, 纯度 100%)。

[0376] (S)-2,2-二甲基-6-(3-(噁唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0213-01)的合成



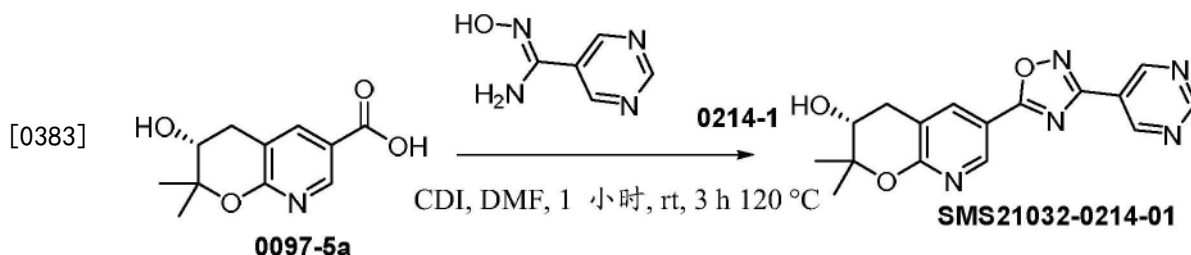
[0378] 将二(咪唑-1-基)甲酮(87.17mg, 537.57 μ mol)添加至(3S)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸(60mg, 268.79 μ mol)在DMF(3mL)中的混合物中。将混合物在25℃搅拌1小时。然后将N'-羟基噁唑-2-甲脒(47.83mg, 376.30 μ mol)添加至上述混合物中并在120℃下搅拌3小时。LCMS显示生成了所需产物。产物通过制备型HPLC(碱性)纯化。获得白色固体状的(3S)-2,2-二甲基-6-(3-(噁唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(35mg, 106.91 μ mol, 96%纯度)。产率:41.4%。

[0379] Agilent LCMS290520-6120,柱:Waters X-Bridge C18(150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40℃;流率:1.5mL/min;流动相:从95%[水+0.05FA]和5%[CH₃CN]至0%[水+0.05%FA]和95%[CH₃CN]进行2min,然后在这种条件下进行4min,最后改变为95%[水+0.05FA]和5%[CH₃CN]进行2min然后在这种条件下进行2min,纯度:100%,R_t=1.901min;MS实测值:314.9[M+H]⁺。

[0380] Agilent HPLC 1260-03,柱:Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5 μ m;柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95%[水+10mM NH₄HCO₃]和5%[CH₃CN]至0%[水+10mM NH₄HCO₃]和100%[CH₃CN]进行14min,然后在这种条件下进行8min,最后改变为95%[水+10mM NH₄HCO₃]和5%[CH₃CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行6min,纯度:96.35%,R_t=8.279min

[0381] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 9.02(d, J=2.1Hz, 1H), 8.30(d, J=1.1Hz, 1H), 7.91(s, 1H), 7.45(s, 1H), 3.97(s, 1H), 3.19(dd, J=17.0, 4.7Hz, 1H), 2.94(dd, J=17.0, 5.8Hz, 1H), 2.01(s, 1H), 1.50(s, 3H), 1.47(s, 3H)。

[0382] 实施例33:(R)-2,2-二甲基-6-(3-(嘧啶-5-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(0214)的合成



[0384] 将(R)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸(80mg, 446.39 μ mol)和CDI(128.52mg, 892.78 μ mol)溶解在DMF(2mL)中。将混合物在25℃搅拌1小时。添加N'-羟基噁唑-2-甲脒(113.47mg, 892.78 μ mol)。将混合物在120℃搅拌3小时。之后,通过LC-MS测试反应。结果表明,起始原料反应充分,生成了目标化合物。

[0385] 通过制备型HPLC纯化(3R)-2,2-二甲基-6-(3-(噁唑-2-基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-

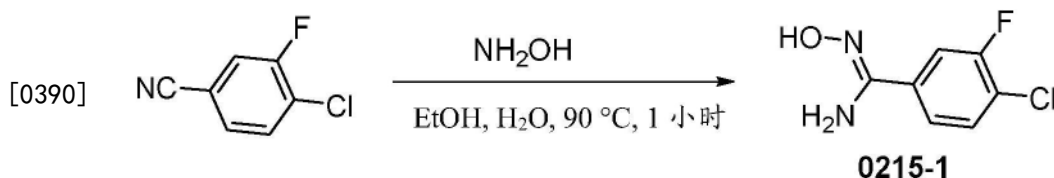
3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(35mg,111.36 μ mol,24.95%产率)。

[0386] Agilent LCMS21500-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40℃;流率:1.5mL/min;流动相:从95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5%[CH_3CN]至0%[水+10mM NH_4HCO_3]和95%[CH_3CN]进行2min,然后在这种条件下进行4min,最后改变为95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5%[CH_3CN]进行2min,然后在这种条件下进行2min,纯度:98.85%, R_t =1.804min;MS实测值:314.9[M+H]⁺。

[0387] Agilent HPLC 1260-03,柱:Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5 μ m;柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5%[CH_3CN]至0%[水+10mM NH_4HCO_3]和100%[CH_3CN]进行14min,然后在这种条件下进行8min,最后改变为95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5%[CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行6min,纯度:98.58%, R_t =8.283min。

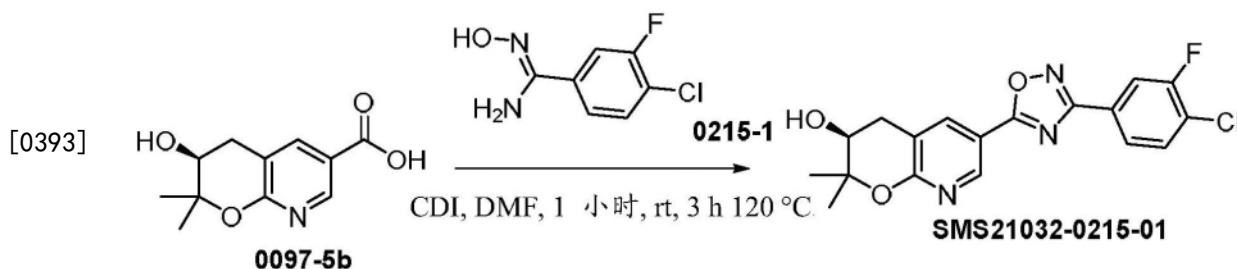
[0388] ¹H-NMR的分析:¹H NMR(400MHz,DMSO) δ 8.82(d,J=2.4Hz,1H),8.50(d,J=0.7Hz,1H),8.35-8.31(m,1H),7.64(d,J=0.7Hz,1H),5.38(d,J=4.1Hz,1H),3.78(dd,J=9.5,4.8Hz,1H),3.13(dd,J=17.2,4.6Hz,1H),2.83(dd,J=17.2,6.1Hz,1H),1.34(s,6H)。

[0389] 实施例34:(Z)-4-氯-3-氟-N'-羟基苯甲脒(0215-1)的合成



[0391] 将4-氯-3-氟-苯甲腈(200mg,1.29mmol)溶解在EtOH(5mL)中,然后添加 NH_2OH (339.73mg,5.14mmol,50%纯度)。将混合物在90℃搅拌1小时。之后,通过LC-MS测试反应。结果发现原料消失了。然后将混合物真空过滤。得到粗产物4-氯-3-氟-N'-羟基-苯甲脒(230mg,1.16mmol,纯度95%)。产物无需任何纯化即可用于下一步反应。

[0392] (S)-6-[3-(4-氯-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇(0215-1)的合成



[0394] 将(3S)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸(60mg,268.79 μ mol)和CDI(38.69mg,268.79 μ mol)溶解溶于DMF(1.5mL)。将混合物在25℃搅拌1小时。然后添加4-氯-3-氟-N'-羟基-苯甲脒(60.83mg,322.54 μ mol)。将混合物在120℃搅拌3小时。之后,通过LC-MS测试反应。结果表明起始原料已充分反应。然后将混合物真空过滤。通过制备型HPLC纯化粗产物。获得(3S)-6-[3-(4-氯-3-氟-苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇(25mg,66.53 μ mol,产率24.75%)。

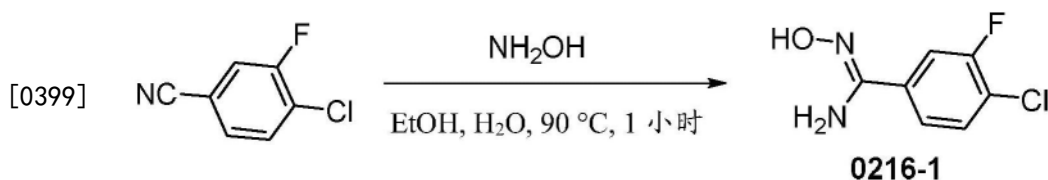
[0395] Agilent LCMS21500-6120,柱:Waters X-Bridge C18(50mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40℃;流率:1.5mL/min;流动相:从95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5%[CH_3CN]至0%[水+10mM

NH_4HCO_3]和95% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行2min,然后在这种条件下进行4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行2min,然后在这种条件下进行2min,纯度:100%, $R_t=2.839\text{min}$; MS实测值:375.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0396] Agilent HPLC 1260-03,柱:Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5 μm ;柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行14min,然后在这种条件下进行8min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行6min,纯度:97.68%, $R_t=10.378\text{min}$.

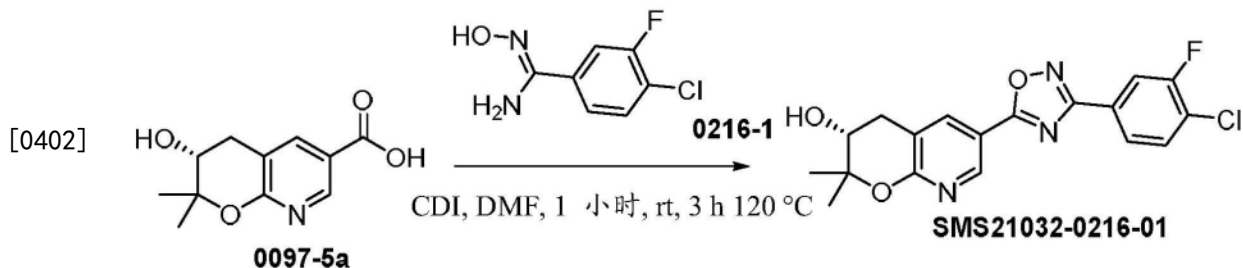
[0397] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.92 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 8.24-8.17 (m, 1H), 7.93 (dd, $J=9.5, 1.8\text{Hz}$, 1H), 7.91-7.87 (m, 1H), 7.56-7.51 (m, 1H), 3.97 (dd, $J=10.8, 5.6\text{Hz}$, 1H), 3.21 (dd, $J=17.0, 4.8\text{Hz}$, 1H), 2.96 (dd, $J=17.0, 5.7\text{Hz}$, 1H), 2.14 (d, $J=6.2\text{Hz}$, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H).

[0398] 实施例35: (Z)-4-氯-3-氟-N'-羟基苯甲脒 (0216-1)的合成



[0400] 将4-氯-3-氟-苯甲腈 (200mg, 1.29mmol) 溶解在EtOH (5mL) 中。添加 NH_2OH (339.73mg, 5.14mmol, 50%纯度)。将混合物在90℃搅拌1小时。之后,通过LC-MS测试反应。结果表明起始原料已充分反应。然后过滤混合物,得到粗产物4-氯-3-氟-N'-羟基-苯甲脒 (230mg, 1.16mmol, 纯度95%)。产物无需任何纯化即可用于下一步反应。

[0401] (S)-6-[3-(4-氯-3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0216-01)的合成



[0403] 将(3S)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (60mg, 268.79 μmol)和CDI (38.69mg, 268.79 μmol)溶解溶于DMF (1.5mL)。将混合物在25℃搅拌1小时。然后添加4-氯-3-氟-N'-羟基-苯甲脒 (60.83mg, 322.54 μmol)。将混合物在120℃搅拌3小时。之后,通过LC-MS测试反应。结果表明起始原料已充分反应。然后浓缩混合物并通过制备型HPLC纯化粗产物,得到(3S)-6-[3-(4-氯-3-氟-苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (25mg, 66.53 μmol , 收率24.75%)。

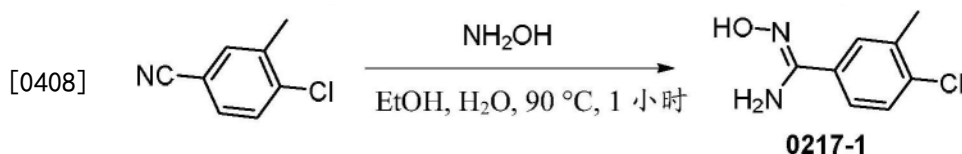
[0404] Agilent LCMS21500-6120,柱:Waters X-Bridge C18 (50mm*4.6mm*3.5 μm);柱温:40℃;流率:1.5mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和95% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行2min,然后在这种条件下进行4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行2min,然后在这种条件下进行2min,纯度:100%, $R_t=2.839\text{min}$;

MS实测值:375.8[M+H]⁺.

[0405] Agilent HPLC 1260-03,柱:Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5um;柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH₄HCO₃]和5% [CH₃CN]至0% [水+10mM NH₄HCO₃]和100% [CH₃CN]进行14min,然后在这种条件下进行8min,最后改变为95% [水+10mM NH₄HCO₃]和5% [CH₃CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行6min,纯度:96.39%,Rt=10.364min.

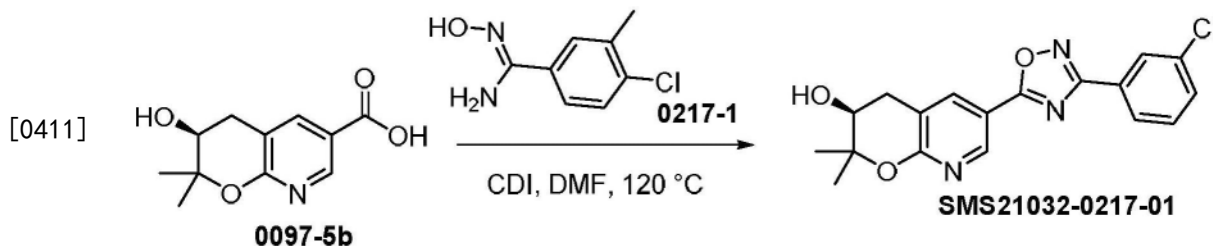
[0406] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.92 (d, J=2.3Hz, 1H), 8.24-8.17 (m, 1H), 7.93 (dd, J=9.5, 1.8Hz, 1H), 7.91-7.87 (m, 1H), 7.56-7.51 (m, 1H), 3.97 (dd, J=10.8, 5.6Hz, 1H), 3.21 (dd, J=17.0, 4.8Hz, 1H), 2.96 (dd, J=17.0, 5.7Hz, 1H), 2.14 (d, J=6.2Hz, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H).

[0407] 实施例36: (Z)-4-氯-N'-羟基-3-甲基苯甲脒 (0217-1)的合成



[0409] 向4-氯-3-甲基-苯甲脒 (200.0mg, 1.32mmol) 在EtOH (5mL) 中的混合物中添加NH₂OH (348.62mg, 5.28mmol, 480.19uL, 50%纯度)。将混合物在90℃搅拌1小时。LCMS显示产生了所需产物并检测到一个主峰。将混合物真空浓缩。得到4-氯-N'-羟基-3-甲基-苯甲脒 (240.0mg, 1.27mmol, 纯度98%), 为白色固体。

[0410] (S)-6-(3-(3-氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基)-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0217-01)的合成



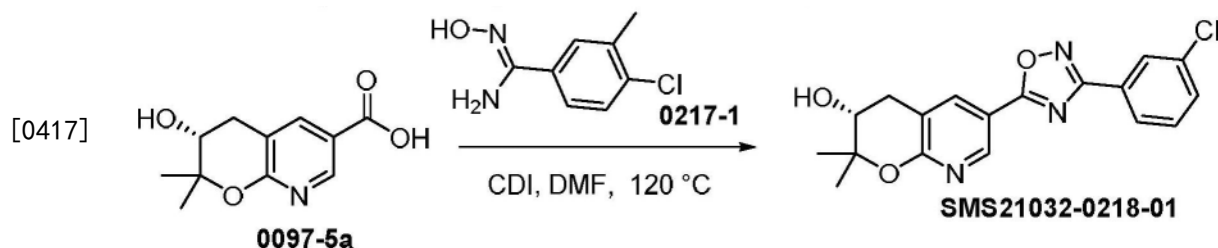
[0412] 将二(咪唑-1-基)甲酮 (58.11mg, 358.38umol) 添加至 (3S)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (40.0mg, 179.19umol) 在DMF (2mL) 中的混合物。将混合物在25℃搅拌1小时。然后将4-氯-N'-羟基-3-甲基-苯甲脒 (39.70mg, 215.03umol) 添加到混合物中并在120℃搅拌3小时。LCMS (NBK0071-39-P1-1) 显示生成了所需产物。将混合物与NBK0071-034合并。通过制备型HPLC (碱性) 纯化产物。通过冻干法干燥洗脱液。获得呈白色固体的 (3S)-6-[3-(4-氯-3-甲基-苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇 (34mg, 90.53umol, 纯度99%)。QC (NBK0071-39-P1-2) 显示合格可发货。收率:38.3%。

[0413] Agilent LCMS200520-6120,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5μm);柱温:40℃;流率:1.5mL/min;流动相:从95% [水+0.05FA]和5% [CH₃CN]至0% [水+0.05%FA]和95% [CH₃CN]进行2min,然后在这种条件下进行4min,最后改变为95% [水+0.05FA]和5% [CH₃CN]进行2min,然后在这种条件下进行2min,纯度:100%,Rt=2.803min;MS实测值:372.8[M+H]⁺.

[0414] Agilent HPLC 1260-03,柱:Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5um;柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行14min,然后在这种条件下进行8min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行6min,纯度:98.54%, $R_t=10.702\text{min}$.

[0415] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.92 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 8.24-8.18 (m, 1H), 8.01 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 7.90 (dd, $J=8.3, 1.9\text{Hz}$, 1H), 7.46 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 3.96 (q, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 3.20 (dd, $J=17.0, 4.7\text{Hz}$, 1H), 2.96 (dd, $J=17.0, 5.7\text{Hz}$, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.15 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H). ESI (M+H) $^+=372.8$.

[0416] 实施例37: (R) -6- (3- (3-氯苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基) -2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0218-01) 的合成



[0418] 将二(咪唑-1-基)甲酮 (87.17mg, 537.57umol) 添加至 (3R) -3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (60.00mg, 268.79umol) 在DMF (3mL) 中的混合物中。将混合物在25℃搅拌1小时。然后将4-氯-N'-羟基-3-甲基-苯甲脒 (59.55mg, 322.54umol) 添加到混合物中并在120℃搅拌3小时。LCMS (NBK0071-40-P1-1) 显示生成了所需产物。通过制备型HPLC (碱性) 纯化产物。通过冻干法干燥洗脱液。获得呈白色固体的 (3R) -6- [3- (4-氯-3-甲基-苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基] -2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃[2,3-b]吡啶-3-醇 (33mg, 87.87umol, 32.69% 产率, 纯度99%)。收率:32.69%

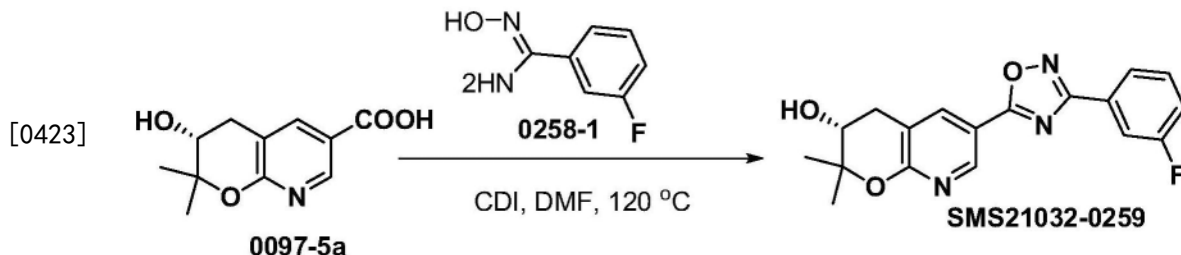
[0419] Agilent LCMS200520-6120,柱:Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5um);柱温:40℃;流率:1.5mL/min;流动相:从95% [水+0.05FA]和5% [CH_3CN]至0% [水+0.05%FA]和95% [CH_3CN]进行2min,然后在这种条件下进行4min,最后改变为95% [水+0.05FA]和5% [CH_3CN]进行2min,然后在这种条件下进行2min,纯度:100%, $R_t=2.802\text{min}$;MS实测值:373.8[M+H] $^+$.

[0420] Agilent HPLC 1260-03,柱:Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5um;柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行14min,然后在这种条件下进行8min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行6min,纯度:99.22%, $R_t=10.701\text{min}$.

[0421] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.92 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 8.21 (d, $J=0.9\text{Hz}$, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.89 (dd, $J=8.3, 1.7\text{Hz}$, 1H), 7.46 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 4.01-3.90 (m, 1H), 3.20 (dd, $J=17.0, 4.7\text{Hz}$, 1H), 2.96 (dd, $J=17.0, 5.6\text{Hz}$, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.18 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H). ESI (M+H) $^+=372.8$.

[0422] 实施例38: (R) -6- (3- (3-氟苯基) -1,2,4-噁二唑-5-基) -2,2-二甲基-3,4-二氢-

2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0259)的合成



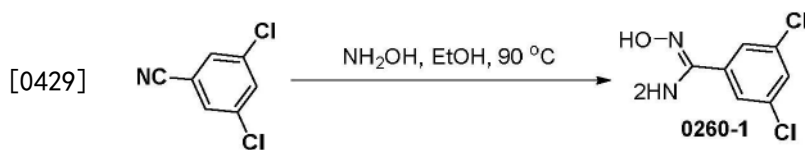
[0424] 将N,N'-羰基二咪唑(116.12mg,716.77 μ mol)添加至(3R)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸(80mg,358.38 μ mol)在DMF(3mL)中的混合物中。将混合物在25℃搅拌1小时。然后将3-氟-N'-羟基-苯甲脒(55.24mg,358.38 μ mol)添加至上述混合物中并在120℃搅拌4小时。LCMS(NBK0071-184-P1-1)显示生成了所需产物。产物通过制备型HPLC(碱性)纯化。得到白色固体状的(3R)-6-[3-(3-氟苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(23mg,67.38 μ mol)。

[0425] Agilent LCMS 6120,柱:Waters X-Bridge C18(150mm*4.6mm*3.5 μ m);柱温:40℃;流率:1.5mL/min;流动相:从95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0%[水+10mM NH_4HCO_3]和95% [CH_3CN]进行2min,然后在这种条件下进行4min,最后改变为95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行2min,然后在这种条件下进行2min,纯度:99.10%, R_t =2.406min;MS实测值:341.9[M+H]⁺。

[0426] Agilent HPLC 1260,柱:Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5 μ m;柱温:40℃;流率:1.0mL/min;流动相:从95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]至0%[水+10mM NH_4HCO_3]和100% [CH_3CN]进行14min,然后在这种条件下进行8min,最后改变为95%[水+10mM NH_4HCO_3]和5% [CH_3CN]进行0.1min,然后在这种条件下进行6min,纯度:97.65%, R_t =9.849min。

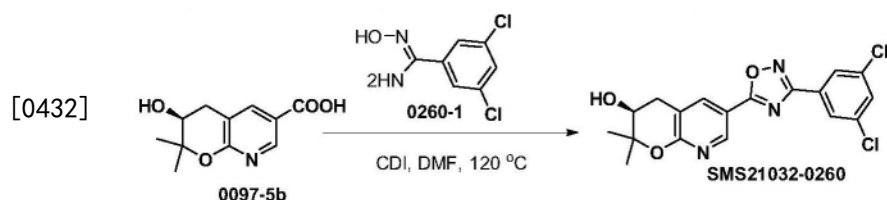
[0427] ¹H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 8.96(d,J=2.2Hz,1H),8.25-8.20(m,1H),7.98-7.92(m,1H),7.85(ddd,J=9.5,2.5,1.5Hz,1H),7.48(td,J=8.0,5.7Hz,1H),7.23(tdd,J=8.4,2.6,0.9Hz,1H),3.97(dd,J=5.6,4.9Hz,1H),3.21(dd,J=17.0,4.8Hz,1H),2.96(dd,J=17.0,5.7Hz,1H),1.51(s,3H),1.47(s,3H).¹⁹FNMR(376MHz, CDCl_3) δ -111.86(s)。

[0428] 实施例39:(Z)-3,5-二氯-N'-羟基苯甲脒(0260-1)的合成



[0430] 向3,5-二氯苯甲腈(0.5g,2.91mmol,882.61 μ L)在EtOH(10mL)中的混合物中添加羟胺(768.09mg,11.63mmol)。将混合物在90℃搅拌2小时。LCMS(NBK0071-180-P1-1)显示生成了所需产物。将混合物真空浓缩并将产物通过冻干干燥。获得白色固体状的3,5-二氯-N'-羟基-苯甲脒(590mg,2.88mmol)。

[0431] (S)-6-[3-(3,5-二氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇(SMS21032-0260-01)的合成



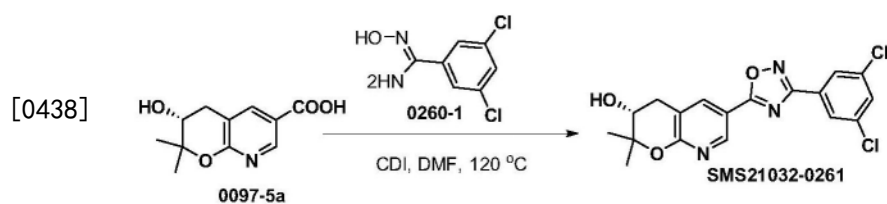
[0433] 将N,N'-羰基二咪唑 (116.12mg, 716.77 μ mol) 添加至 (3S)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (80mg, 358.38 μ mol) 在DMF (3mL) 中的混合物中。将混合物在25℃搅拌1小时。然后将3,5-二氯-N'-羟基-苯甲脒 (110.22mg, 537.57 μ mol) 添加至上述混合物中并在120℃搅拌4小时。LCMS (NBK0071-185-P1-1) 显示生成了所需产物。产物通过制备型HPLC (碱性) 纯化。获得白色固体状的 (3S)-6-[3-(3,5-二氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (9mg, 22.95 μ mol)。

[0434] Agilent LCMS 6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40℃; 流率: 1.5mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和95% [CH_3CN] 进行2min, 然后在这种条件下进行4min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行2min, 然后在这种条件下进行2min, 纯度: 98.79%, R_t = 2.874min; MS Found: 393.8M+H $^+$ 。

[0435] Agilent HPLC 1260, 柱: Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5 μ m; 柱温: 40℃; 流率: 1.0mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM NH_4HCO_3] 和100% [CH_3CN] 进行14min, 然后在这种条件下进行8min, 最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 进行0.1min, 然后在这种条件下进行6min, 纯度: 96.01%, R_t = 11.281min。

[0436] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.94 (d, J = 2.3Hz, 1H), 8.24-8.19 (m, 1H), 8.05 (d, J = 1.9Hz, 2H), 7.51 (t, J = 1.9Hz, 1H), 3.97 (d, J = 5.1Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 17.0, 4.8Hz, 1H), 2.96 (dd, J = 17.0, 5.7Hz, 1H), 2.07 (d, J = 6.2Hz, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H)。

[0437] 实施例40: (R)-6-[3-(3,5-二氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢-2H-吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (SMS21032-0261-01) 的合成



[0439] 将N,N'-羰基二咪唑 (116.12mg, 716.77 μ mol) 添加至 (3R)-3-羟基-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-6-甲酸 (80mg, 358.38 μ mol) 在DMF (3mL) 中的混合物中。将混合物在25℃搅拌1小时。然后将3,5-二氯-N'-羟基-苯甲脒 (110.22mg, 537.57 μ mol) 添加至混合物中并在120℃搅拌4小时。LCMS (NBK0071-186-P1-1) 显示生成了所需产物。产物通过制备型HPLC (碱性) 纯化。获得白色固体状的 (3R)-6-[3-(3,5-二氯苯基)-1,2,4-噁二唑-5-基]-2,2-二甲基-3,4-二氢吡喃并[2,3-b]吡啶-3-醇 (32mg, 81.58 μ mol)。QC显示合格, 可以发货。

[0440] Agilent LCMS 6120, 柱: Waters X-Bridge C18 (150mm*4.6mm*3.5 μ m); 柱温: 40℃; 流率: 1.5mL/min; 流动相: 从95% [水+10mM NH_4HCO_3] 和5% [CH_3CN] 至0% [水+10mM

NH_4HCO_3]和95% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行2min,然后在这种条件下进行4min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行2min,然后在这种条件下进行2min,纯度:97.45%, $R_t = 2.877\text{min}$;MS实测值:393.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0441] Agilent HPLC 1260,柱:Agilent Eclipse C18 Plus 4.6X100mm 3.5 μm ;柱温:40 $^\circ\text{C}$;流率:1.0mL/min;流动相:从95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 至0% [水+10mM NH_4HCO_3]和100% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行14min,然后在这种条件下进行8min,最后改变为95% [水+10mM NH_4HCO_3]和5% $[\text{CH}_3\text{CN}]$ 进行0.1min,然后在这种条件下进行6min,纯度:96.92%, $R_t = 11.233\text{min}$.

[0442] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.89 (d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 8.23-8.18 (m, 1H), 8.02 (d, $J = 1.9\text{Hz}$, 2H), 7.50 (t, $J = 1.9\text{Hz}$, 1H), 3.97 (t, $J = 5.0\text{Hz}$, 1H), 3.21 (dd, $J = 17.0, 4.7\text{Hz}$, 1H), 2.97 (dd, $J = 17.0, 5.5\text{Hz}$, 1H), 2.34 (s, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.46 (s, 3H).

[0443] 上面未具体描述的其他示例类似地进行。

[0444] 利用系统生物学和实验相结合的方法,我们之前已确定同源域相互作用蛋白激酶2 (HIPK2) 是多种促纤维化途径 (包括TGF- β 1/Smad3途径) 的关键调节因子。HIPK2通过与Smad3的物理关联来调节该通路,从而调节其活性。人原代肾小管细胞中HIPK2的敲低可抑制TGF- β 1诱导的TGF- β 1/Smad3通路的激活。在体内, HIPK2敲除可抑制HIV1转基因小鼠 (Tg26) 和单侧输尿管梗阻 (UUO) 小鼠的TGF- β 1/Smad3活性和肾纤维化。通过抑制HIPK2来抑制TGF- β 1/Smad3通路,为肾脏疾病的抗纤维化治疗提供了一种方法。

[0445] HIPK2抑制剂尚未得到很好的开发,也没有商业化。最近,Cozza等人 [PLoS One, 9: e89176, 2014] 描述了一种选择性HIPK2抑制剂,可竞争激酶结构域中的ATP结合。然而,由于HIPK2调节多种信号通路,包括p53的调节,因此人们担心广泛抑制HIPK2可能并不在所有细胞环境中都有益。在这里,我们描述了可能通过中断HIPK2-Smad3蛋白-蛋白相互作用来抑制TGF- β 1/Smad3通路的化合物,而不显著抑制HIPK2激酶活性或抑制p53激活。在下面所示的测试中,本发明的化合物的实例在体外培养的人肾小管上皮细胞 (RTEC) 中和体内在肾纤维化的小鼠模型 (Tg26和UUO小鼠) 中抑制促纤维化途径。

[0446] HEK 293T (293T) 细胞 (ATCC) 在含有10%胎牛血清 (FBS)、0.5%青霉素和链霉素的Dulbecco's Modified Eagle's培养基 (Invitrogen) 中于37 $^\circ\text{C}$ 和5% CO_2 湿润环境下培养。人原代肾小管细胞 (PromoCell GmbH, 海德堡, 德国) 在肾上皮细胞生长培养基-2 (Promocell GmbH) 中培养,并根据制造商的方案添加补充剂。所有研究均使用传代次数<5次的人原代肾小管上皮细胞。对于hRTEC的HIV感染,使用pNL4-3: $\Delta\text{G/P-EGFP}$ (一种gag/pol删除的HIV-1构建体,在gag开放阅读框中包含EGFP) 和pHR-IRES-EGFP (一种对照EGFP构建体) 生成VSV-G假型病毒。在用测试化合物处理之前,用HIV假型病毒或对照病毒感染细胞2天。

[0447] 4X Smad结合元件驱动的萤火虫荧光素酶 (SBE4-Luc) 质粒和海肾荧光素酶报告质粒 (pRL) 可商售购得。Jin等人 [Nat Med, 18:580-588] 先前描述了活性域缺失的HIPK2。His₆-HIPK2构建体是通过使用含有人HIPK2基因的质粒 (GeneCopoeia™) 作为模板对编码区进行PCR扩增而生成的。

[0448] 根据制造商的说明 (SignaGen Laboratories, MD), 使用PolyJet转染试剂盒,将接种在12孔板中的293T细胞 (约60%汇合) 与SBE4-Luc (0.5 μg) 和pRL质粒 (0.2 μg) 共转染。转

染后48小时,用指定浓度的测试化合物连同或不连同10ng/ml TGF- β 1处理细胞16小时。使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega, #E1910)测量荧光素酶活性。数据表示为萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比率。对于HIPK2显性阴性实验,将pcDNA 3.1空载体(0.5 μ g)或HIPK2 KD质粒(0.5 μ g)与SBE4-萤火虫荧光素酶和pRL(海肾荧光素酶)质粒一起共转染到293T细胞中。转染后48小时,测量荧光素酶活性。

[0449] 对于表1中的数据,将来自Promega的Bright-GloTM荧光素酶检测系统与来自BPSbioscience的TGF/SMAD信号通路SBE报告基因-HEK293细胞系一起使用。第1天,将SBE报告基因-HEK293细胞以每孔25,000个细胞的密度接种到装有100 μ l不含遗传霉素的生长培养基的白色透明底96孔微孔板中。将板在CO₂培养箱中37℃培养24小时。用60 μ L测定培养基更新孔,并通过在培养基中添加5 μ L化合物来用测试化合物处理。调整培养基中测试化合物的浓度,以便5 μ L将提供所需的溶液摩尔浓度。例如,如果所需的测试浓度为30 μ M,则添加5 μ L的660 μ M化合物。4小时后,添加TGF β 至10ng/mL。将板在CO₂培养箱中37℃培养过夜(18小时)。测定前一小时更换所有培养基。使用ONE-StepTM荧光素酶检测系统进行荧光素酶检测,每孔添加100 μ l ONE-StepTM荧光素酶试剂,在室温摇动约15至30分钟,并使用光度计测量发光。将信号归一化为抑制百分比,将非TGF处理的细胞视为100%抑制,并通过Graphpad Prism处理数据。

[0450] 本发明化合物的活性在体内得到证实。采用两种慢性肾病模型:(1) Tg26小鼠,一种HIV相关肾病模型;(2) Col4a3缺失小鼠,一种Alport综合征模型。两种CKD模型的特征都是晚期肾小球硬化和肾小管间质纤维化,导致肾衰竭和大约12至20周龄之间的死亡。

[0451] Feng等人[J Am Soc Nephrol 2009;20:2138-2146]描述了具有FVB/N遗传背景的Tg26小鼠,其携带缺乏gag-pol的有缺陷的HIV-1原病毒。使用六周大的杂合Tg26小鼠。野生型同窝小鼠用作对照。治疗组中的小鼠通过口服管饲法接受溶解在20%NMP、60%PEG400和20%H₂O中的测试化合物,剂量为每天30、60或90mg/kg体重。对照组的小鼠接受相同体积的载体。小鼠总共治疗4周并在10周龄时处死。用实施例13的化合物治疗Tg26小鼠四周导致存活率改善(媒介物组[n=25只小鼠]存活率为64%vs.实施例13治疗组[n=20只小鼠]存活率为100%;载体与用实施例13治疗相比的风险比=7.2;p值:0.003(通过Log-rank Mantel-Cox检验);尿白蛋白与肌酐比值的平均倍数变化减少约65%(赋形剂组[n=9只小鼠]从第0周到第4周的平均倍数变化为1.057,而实施例13组[n=8只小鼠]中的平均倍数变化为0.352;通过Welch的t检验得出p值=0.0001),肾纤维化面积减少约43%(赋形剂组[n=9只小鼠]的平均%面积为4.492vs.实施例13组[n=8只小鼠]中的%面积为2.540,p值=0.008)。在另一项试验中,用实施例13(每日90mg/kg,PO)或媒介物治疗5至6周龄的Tg26小鼠4周:实验持续时间内对照组中38%(8/21小鼠)死于肾衰竭;HIPK2i-174组死亡0%(0/18小鼠)。作为衡量肾小球功能的指标,尿白蛋白与肌酐比值(UACR)的比较显示,载体组较基线值增加约16%(倍数变化:1.16 $\pm$ 0.47,n=15),但HIPK2i-174组中减少约57%(倍数变化:0.43 $\pm$ 0.28,n=17,p=0.0001,通过带有Welch校正的未配对双尾t检验)。[由于5-6周龄Tg26小鼠的基线UACR存在显著的相互变异性,因此根据每只小鼠相对于基线的倍数变化来计算治疗效果。]通过天狼星红组织学染色评估的肾纤维化比较显示,与媒介物组(4.44 $\pm$ 1.2%,n=16)相比,用实施例13治疗的组(2.8 $\pm$ 1.2%,n=18,p=0.008)纤维化减少约37%。

[0452] 用实施例13 (每天60mg/kg, PO) 或媒介物治疗三周大的Co14a3缺陷型小鼠6周。载体组的中位生存期为56天, 治疗组中延长至68天 (增加21%)。治疗6周后, 尿白蛋白与肌酐比值 (UCAR) 的比较显示, 治疗组中尿白蛋白与肌酐比值降低了约45% (73.9 ± 34.9 vs. 41.4 ± 14.2 mg/mg)。通过天狼星红组织学染色评估的肾纤维化比较显示, 与载体组 ($28.3 \pm 4.4\%$, $n=8$) 相比, 治疗组 ($13.7 \pm 6.3\%$, $n=9$, $p=0.0001$) 纤维化减少约51%。

[0453] 鉴于本发明化合物的作用机制, 技术人员将认识到除肾脏之外的器官中的纤维化疾病的治疗也会同样成功。本发明的化合物目前正在用于治疗肺、心脏和肝纤维化的模型中进行试验。

[0454] 虽然出于说明的目的阐述了典型的实施例, 但是前面的描述和示例不应被视为对本发明的范围的限制。因此, 在不脱离本发明的精神和范围的情况下, 本领域技术人员可以想到各种修改、适应和替代。