



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107922431 B

(45) 授权公告日 2021.06.04

(21) 申请号 201680048058.0

(22) 申请日 2016.06.23

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107922431 A

(43) 申请公布日 2018.04.17

(30) 优先权数据  
62/184,348 2015.06.25 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.02.13(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/CA2016/050734 2016.06.23(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/205942 EN 2016.12.29(73) 专利权人 大学健康网络  
地址 加拿大多伦多(72) 发明人 P·B·桑普森 N·K·B·帕特爾  
H·W·鲍尔斯 李诗韵 G·恩格

(续)

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

代理人 陈文平 侯宝光

(51) Int.Cl.  
C07D 495/04 (2006.01) (续)(56) 对比文件  
WO 0218383 A2, 2002.03.07  
WO 0218383 A2, 2002.03.07  
Pinrao Song et al..Design, synthesis and biological evaluation of thienopyridinones as Chk1 inhibitors.《Bioorganic & Medicinal Chemistry》.2014, 第22卷第4882-4892页.

Pinrao Song et al..Design, synthesis and biological evaluation of thienopyridinones as Chk1 inhibitors.《Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry》.2014, 第22卷第4882-4892页. (续)

审查员 陈曦

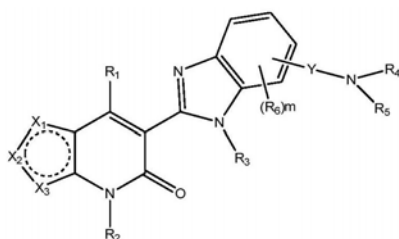
权利要求书5页 说明书63页 附图1页

## (54) 发明名称

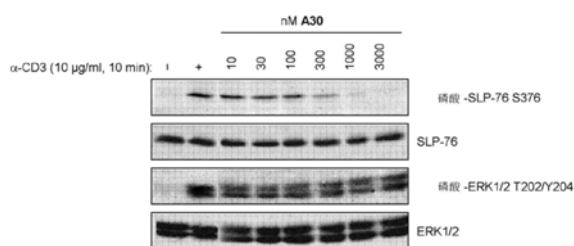
HPK1抑制剂及其使用方法

## (57) 摘要

描述了式(I)的噻吩并吡啶酮化合物和其药学上可接受的盐。在这些化合物中,  $X_1$ 、 $X_2$ 和 $X_3$ 中的一个为S, 另两个均独立地为CR, 其中R和所有其它变量如本文限定。这些化合物显示抑制HPK1激酶活性并且具有体内抗肿瘤活性。这些化合物可有效组合药学上可接受的载体, 而且也有有效组合其它免疫调节方法, 如检查点抑制或色氨酸氧化抑制剂。



式(I)。



[接上页]

(72) 发明人 R·劳弗 刘勇 郎云辉

(51) Int.Cl.

A61K 31/4436 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/4545 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

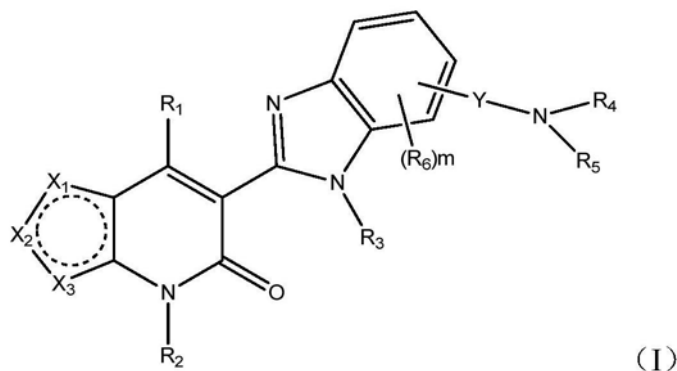
(56) 对比文件

Kelly Frazier et al..Design and structure-activity relationship of

heterocyclic analogs of 4-amino-3-benzimidazol-2-ylhydroquinolin-2-ones as inhibitors of receptor tyrosine kinases.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2006,第16卷第2247-2251页.

Kelly Frazier et al..Design and structure-activity relationship of heterocyclic analogs of 4-amino-3-benzimidazol-2-ylhydroquinolin-2-ones as inhibitors of receptor tyrosine kinases.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2006,第16卷第2247-2251页.

1. 由式 (I) 表示的化合物:



或其药学上可接受的盐, 其中:

$X_1$ 、 $X_2$ 和 $X_3$ 中的一个为S, 另两个均独立地为CR, 其中R为H、-F、-Cl、-Br、-OH、-( $C_1$ - $C_4$ )烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )卤烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )烷氧基、-( $C_1$ - $C_4$ )亚烷基-OH或4-7元单环杂环基, 所述-( $C_1$ - $C_4$ )烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )卤烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )烷氧基、-( $C_1$ - $C_4$ )亚烷基-OH或4-7元单环杂环基任选地用选自-F、-Cl、-Br、-OH、-( $C_1$ - $C_4$ )烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )卤烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )烷氧基或-CO<sub>2</sub>-( $C_1$ - $C_4$ )烷基的1-3个基团取代;

Y是键;

$R_1$ 是-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>或-OR<sup>a1</sup>;

每次出现的R<sup>a</sup>独立地为-H、-( $C_1$ - $C_6$ )烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-( $C_3$ - $C_7$ )环烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-3-7元单环杂环基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-桥接( $C_6$ - $C_{12}$ )环烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-5-10元杂芳基、或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-6-12元桥接杂环基, 其中-( $C_1$ - $C_6$ )烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-( $C_3$ - $C_7$ )环烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-3-7元单环杂环基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-桥接( $C_6$ - $C_{12}$ )环烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-5-10元杂芳基、或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-6-12元桥接杂环基任选地用选自-F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、氧、-( $C_1$ - $C_4$ )烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )卤烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )烷氧基、-( $C_1$ - $C_4$ )卤烷氧基、-( $C_1$ - $C_4$ )亚烷基-OH、或-( $C_1$ - $C_4$ )亚烷基-NH<sub>2</sub>的1-3个基团取代;

每次出现的R<sup>b</sup>独立地为-H或-( $C_1$ - $C_6$ )烷基; 或

R<sup>a</sup>和R<sup>b</sup>与其所附接的氮一起形成-( $C_3$ - $C_{10}$ )杂环基;

每次出现的R<sup>a1</sup>独立地为-H、( $C_1$ - $C_6$ )烷基、( $C_3$ - $C_{10}$ )环烷基、3-10元杂环基、( $C_6$ - $C_{10}$ )芳基、或3-10元杂芳基;

$R_2$ 和 $R_3$ 均独立地为-H或-( $C_1$ - $C_6$ )烷基;

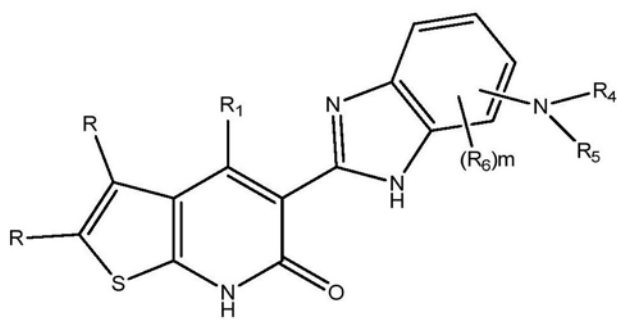
$R_4$ 和 $R_5$ 与其所附接的氮一起形成4-7元单环杂环基或6-12元桥接杂环基, 其中所述4-7元单环杂环基或6-12元桥接杂环基任选地用选自-F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、氧、-( $C_1$ - $C_4$ )烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )卤烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )烷氧基、-( $C_1$ - $C_4$ )卤烷氧基、-( $C_1$ - $C_4$ )亚烷基-OH、或-( $C_1$ - $C_4$ )亚烷基-NH<sub>2</sub>的1-3个基团取代;

每次出现的R<sub>6</sub>独立地为-F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、-( $C_1$ - $C_6$ )烷基、-( $C_1$ - $C_6$ )卤烷基、-( $C_2$ - $C_6$ )烯基、-( $C_2$ - $C_6$ )炔基、( $C_3$ - $C_6$ )环烷基、-( $C_1$ - $C_6$ )烷氧基、-( $C_1$ - $C_6$ )卤烷氧基、-( $C_1$ - $C_6$ )亚烷基-OH、或-( $C_1$ - $C_6$ )亚烷基-NH<sub>2</sub>;

m是0、1、2、或3; 和

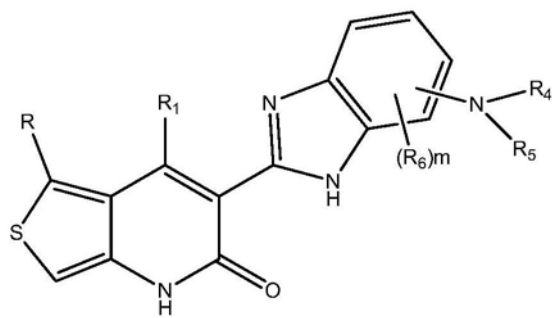
n是0、1、或2。

2. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物由式 (I-A) 表示:



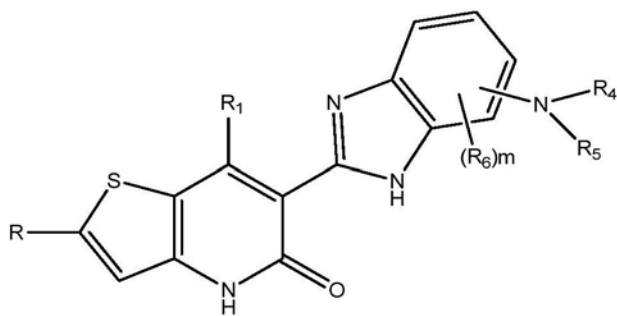
(I-A)。

3. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物由式(I-B)表示:



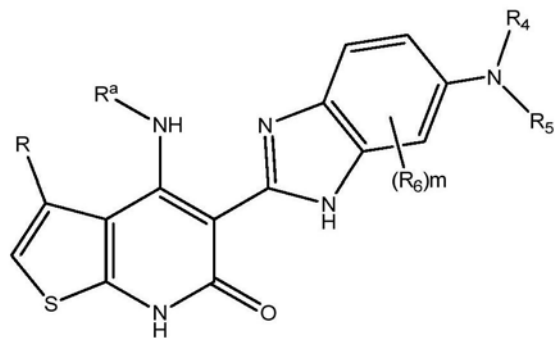
(I-B)。

4. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物由式(I-C)表示:



(I-C)。

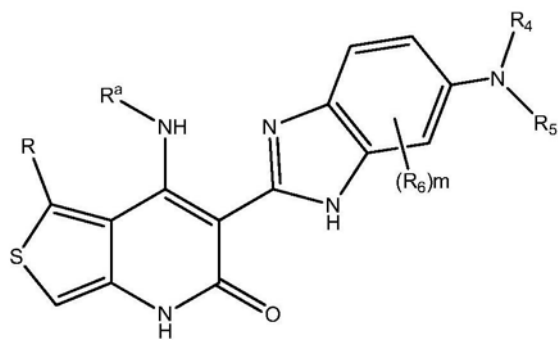
5. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物由式(II-A)表示:



(II-A)。

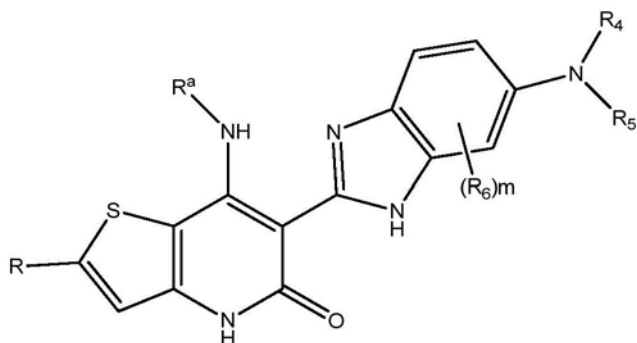
6. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物由式(II-B)表示:





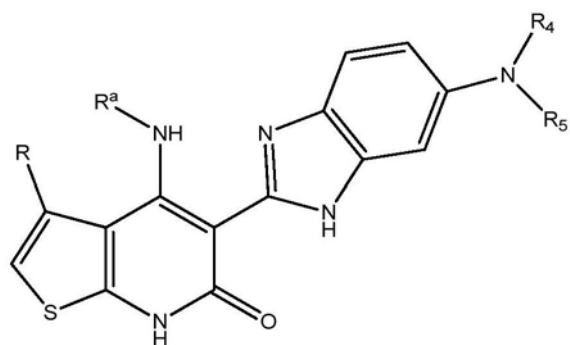
(II-B)。

7. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物由式(II-C)表示:



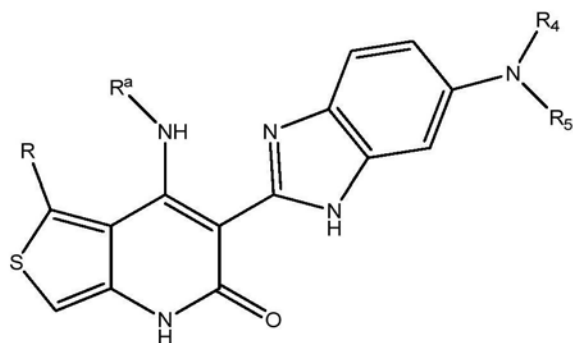
(II-C)。

8. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物由式(III-A)表示:



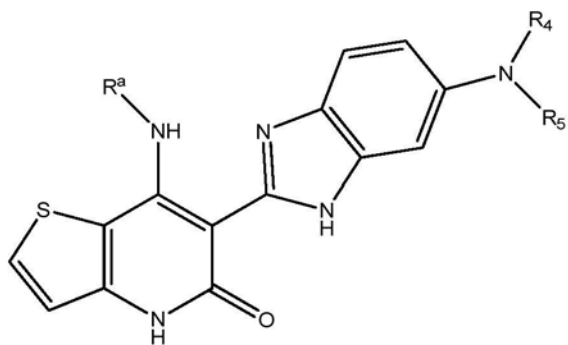
(III-A)。

9. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物由式(III-B)表示:



(III-B)。

10. 权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物由式(III-C)表示:



(III-C)。

11. 权利要求1-10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中 $R_4$ 和 $R_5$ 与其所附接的氮一起形成-N-烷基-哌嗪基或吗啉基,其中所述哌嗪基或吗啉基任选地用选自-F、-Cl、-Br、-OH、-( $C_1$ - $C_4$ )烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )卤烷基、或-( $C_1$ - $C_4$ )烷氧基的1-2个基团取代。

12. 权利要求1-10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中每次出现的 $R^a$ 独立地是-H、-( $CH_2$ )<sub>n</sub>-( $C_3$ - $C_6$ )环烷基、-( $CH_2$ )<sub>n</sub>-3-6元单环杂环基,其中所述-( $CH_2$ )<sub>n</sub>-( $C_3$ - $C_6$ )环烷基或-( $CH_2$ )<sub>n</sub>-3-6元杂环基任选地用选自-F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、-( $C_1$ - $C_4$ )烷基、或-( $C_1$ - $C_4$ )烷氧基的1-3个基团取代;和n是0或1。

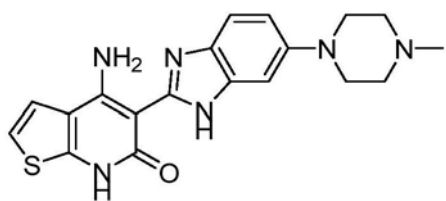
13. 权利要求1-10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R是H、-( $C_1$ - $C_4$ )烷基、-( $C_1$ - $C_4$ )烷氧基、或N-哌嗪基。

14. 权利要求1-9中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R是H。

15. 权利要求1-10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中 $R_4$ 和 $R_5$ 与其所附接的氮一起形成-N-甲基-哌嗪基或吗啉基,二者均任选地用一个或两个甲基取代。

16. 权利要求1-10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中每次出现的 $R^a$ 独立地是-H;-( $C_3$ - $C_6$ )环烷基,所述-( $C_3$ - $C_6$ )环烷基任选地用-OH取代;-( $CH_2$ )<sub>n</sub>-四氢-2H-吡喃;吗啉基;哌啶基,所述哌啶基任选地用-F、-OH或甲基取代;或四氢呋喃;和n是0或1。

17. 化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物为:



18. 药物组合物,其包括权利要求1-10和17中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体或稀释剂。

19. 权利要求1-10和17中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或权利要求18所述的药物组合物在制备用于治疗患癌对象的药物中的用途。

20. 权利要求1-10和17中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或权利要求18所述的药物组合物和第二抗癌治疗联合在制备用于治疗患癌对象的药物中的用途、。

21. 权利要求20所述的用途,其中所述第二抗癌治疗是化疗剂、靶向治疗剂、放射或手术。

22. 权利要求1-10和17中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或权利要求18所述的药物组合物和免疫调节剂联合在制备用于治疗患癌对象的药物中的用途。

23. 权利要求22所述的用途,其中所述免疫调节剂是检验点抑制剂。

24. 权利要求22所述的用途,其中所述免疫调节剂是色氨酸氧化抑制剂。

## HPK1抑制剂及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年6月25日提交的美国临时申请号62/184,348的权益。上述申请的全部教导通过引用被并入本文。

### 背景技术

[0003] 造血祖细胞激酶1 (HPK1) 是造血细胞限制的Ste20丝氨酸/苏氨酸激酶。HPK1激酶活性可在配体接合后由在造血细胞中发现的各种不同细胞表面受体生成的激活信号诱导。T细胞受体 (TCR)、B细胞抗原受体 (BCR) (Liou et al., 2000, Immunity 12:399)、转化生长因子 $\beta$ 受体 (TGF- $\beta$ R) (Wang et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:22771; Zhou et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:13133)、促红细胞生成素受体 (EPOR) (Nagata et al., 1999, Blood 93:3347)、和Fas (Chen et al., 1999, Oncogene 18:7370) 的配体接合或抗体介导型交联可诱导HPK1激酶活性。各受体利用独特的但有时重叠的信号传导机制激活HPK1。HPK1通过AP-1、NF $\kappa$ B、Erk2和Fos途径充当T和B细胞功能的下调因子;例如,已表明HPK1是T细胞中信号转导的负调节因子——通过磷酸化和激活T细胞受体接头蛋白SLP-76 (Di Bartolo et al., 2007, J. Exp. Med. 204:681), 这导致随后AP-1和Erk2途径下调。在B细胞中,HPK1通过磷酸化SLP-76平行同源体 (paralog) BLINK来下调B细胞受体 (BCR) 信号传导 (Wang et al., 2012, J. Biol. Chem. 287:11037)。

[0004] 因此,HPK1现被认为是治疗干预的可能靶标。例如,已报道,HPK1可以是癌症免疫治疗的新靶标 (Sawasdikosol et al., Immunol Res. 2012Dec;54(1-3):262-5)。具体地,HPK1等位基因的靶向破坏 (disruption) 赋予T细胞以响应于TCR接合的升高的Th1细胞因子产生。HPK1 (-/-) T细胞增殖快于单倍型匹配的野生型配对物 (counterpart), 并且抵抗前列腺素E2 (PGE (2)) 介导的抑制。最引起注意地,接受HPK1 (-/-) T细胞过继转移的小鼠变得抵抗肺肿瘤生长。而且,树突状细胞 (DC) 的HPK1损失赋予其较优的抗原呈递能力,使HPK1 (-/-) DC能够在用作癌症疫苗时引起更有效的抗肿瘤免疫响应。

[0005] 在评价HPK1的小分子抑制剂是否捕获具有基因靶向破坏的小鼠表型时,重要的是考虑蛋白质的非催化性作用。具体地,虽然全长HPK1可促进核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 途径的TCR介导型激活,但无催化活性的裂解产物HPK1-C可在TCR再刺激后抑制NF- $\kappa$ B激活,导致激活诱导的细胞死亡 (AICD) (Brenner et al., EMBO J. 2005, 24:4279)。结合HPK1的催化性和非催化性作用,以下是可能的:利用小分子抑制剂阻断HPK1激酶活性可促进B和T细胞激活,导致较优抗肿瘤免疫性,同时还促进AICD,有助于保持外周免疫耐受。HPK1抑制剂的确切效果通过在癌症小鼠模型 (如,同系肿瘤异种移植) 中测试证实。如果HPK1不在任何主要器官中,在造血系统外表达,HPK1激酶活性抑制剂不太可能引起任何严重副作用。

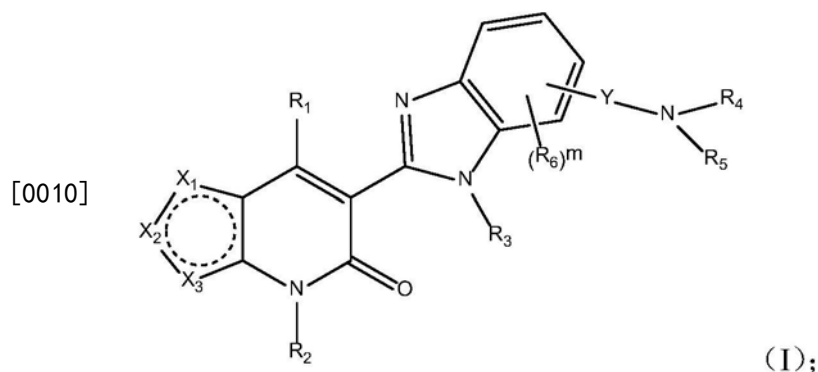
[0006] 基于以上,本领域需要可抑制HPK1的新型化合物。

[0007] 发明概述

[0008] 申请人现已发现,某些噻吩并吡啶酮化合物是HPK1抑制剂 (参见实施例B)。其还具

有针对FLT3和LCK的抑制活性(参见实施例C)。另外,已证实,某些噻吩并吡啶酮化合物单独和组合抗PD-1抗体作为HPK1抑制剂在具有某些癌症细胞类型的临床前模型中是有效的(参见实施例E)。本文公开的具体组合治疗证实了具有显著抗癌效果的惊人的生物学活性。具体地,通过HPK1抑制剂和抗PD-1抗体的组合,PD-1/PD-L1阻断后的显著响应现已在CT26.WT结肠癌中被证实。基于这些发现,本文公开了噻吩并吡啶酮化合物、其药物组合物、和其使用方法。

[0009] 本发明的一个实施方式是结构式(I)表示的化合物:



[0011] 或其药学上可接受的盐。下文提供各变量的数值。

[0012] 本发明的另一实施方式是药物组合物,其包括药学上可接受的载体或稀释剂和上述结构式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0013] 本发明的另一实施方式是治疗患有可通过HPK1调节的疾病的对象的方法,包括给予对象有效量的结构式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

[0014] 本发明的另一实施方式是在需要HPK1活性抑制的对象中抑制HPK1活性的方法,包括给予对象有效量的结构式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0015] 本发明的另一实施方式是用于治疗的结构式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中,治疗是用于治疗患癌对象。可选地,治疗是用于在需要HPK1活性抑制的对象中抑制HPK1活性。

[0016] 本发明的另一实施方式是结构式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐对于制备用于治疗患癌对象的药物的应用。

[0017] 本发明的另一实施方式是结构式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐对于制备用于在需要HPK1活性抑制的对象中抑制HPK1活性的药物的应用。

[0018] 本发明还涉及治疗患癌对象的方法,包括给予对象有效量的HPK1抑制剂(例如,结构式(I)表示的化合物)或其药学上可接受的盐、和有效的第二抗癌治疗(例如,化疗剂、靶向治疗剂、放射或手术)。在一个实例中,第二抗癌治疗是PD-1抑制剂。

[0019] 本发明还涉及治疗患癌对象的方法,包括给予对象有效量的HPK1抑制剂(例如,结构式(I)表示的化合物)或其药学上可接受的盐、和有效量的免疫调节剂如检验点(checkpoint)抑制剂(例如,抗PD-1抗体、抗CTLA4抗体或抗PD-L1抗体)或色氨酸氧化抑制剂(例如,ID01、ID02或TD02抑制剂)。在一个实例中,免疫调节剂是抗PD-1抗体。

[0020] 在实施方式中,本发明进一步提供HPK1抑制剂(例如,结构式(I)表示的化合物、或其药学上可接受的盐)组合PD-1抑制剂如纳武单抗(nivolumab)、帕母单抗(pembrolizumab)、皮地利珠单抗(pidilizumab)、BMS 936559、MPDL3280A、MSB0010718C或

MEDI4736对于制备用于治疗患癌对象的药物的应用。优选地,PD-1抑制剂是纳武单抗。可选地,PD-1抑制剂是帕母单抗。在一个实施方式中,PD-1抑制剂是抗PD1抗体。

[0021] 在一个可选方式中,HPK1抑制剂与有效量的一种或多种其它抗癌治疗一起和优选地与PD-1抑制剂组合被给予。

[0022] 附图简述

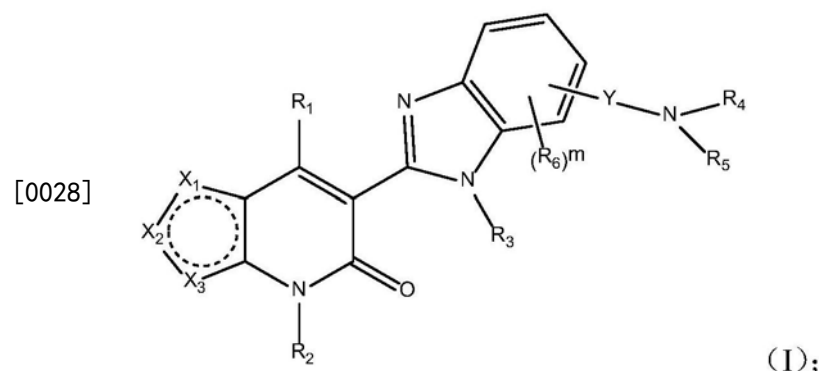
[0023] 图1显示在 $\alpha$ -CD3刺激的Jurkat E6.1细胞中化合物实施例A30对SLP-76丝氨酸376磷酸化的抑制效果。

[0024] 图2是示例单独和组合抗PD1抗体给予化合物A1后肿瘤生长抑制百分比的图。

[0025] 图3显示化合物实施例A30在EAE疾病进展模型中的效果。

[0026] 发明详述

[0027] 在第一实施方式中,本发明涉及式(I)表示的化合物:



[0029] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0030]  $X_1$ 、 $X_2$ 和 $X_3$ 中的一个S,另两个均独立地是CR,其中R是-H、-F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、任选地取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基、任选地取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷氧基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)环烷基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-3-7元单环杂环基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>苯基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-5-7元单环杂芳基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-桥接(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)环烷基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-6-12元桥接杂环基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-7-12元双环杂芳基、或任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-7-12元双环杂芳基;

[0031] Y是键、-CH<sub>2</sub>-、-C(=O)-;

[0032] R<sub>1</sub>是-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>或-OR<sup>a1</sup>;

[0033] 每次出现的R<sup>a</sup>独立地是-H、任选地取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)环烷基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-3-10元杂环基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)芳基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-5-10元杂芳基、任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-桥接(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)环烷基、或任选地取代的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-6-12元桥接杂环基;

[0034] 每次出现的R<sup>b</sup>独立地是-H或-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基;或

[0035] R<sup>a</sup>和R<sup>b</sup>与其所附接的氮一起形成任选地取代的-(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)杂环基;

[0036] 每次出现的R<sup>a1</sup>独立地是-H、任选地取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基、任选地取代的(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)环烷基、任选地取代的3-10元杂环基、任选地取代的(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)芳基、或任选地取代的3-10元杂芳基;或

[0037] R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>均独立地是-H或-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基;

[0038] R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>均独立地是-H、任选地取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基、任选地取代的(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)环烷基、

任选地取代的3-10元杂环基、任选地取代的(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)芳基、任选地取代的5-10元杂芳基、任选地取代的桥接(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)环烷基、或任选地取代的6-12元桥接杂环基；或

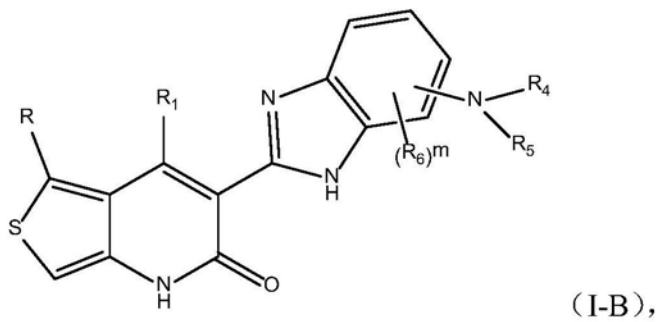
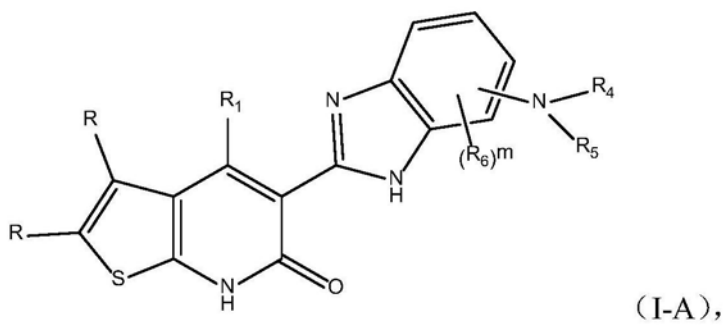
[0039] R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>与其所附接的氮一起形成任选地取代的4-10元杂环基、任选地取代的5-10元杂芳基、或任选地取代的6-12元桥接杂环基；

[0040] 每次出现的R<sub>6</sub>独立地是-F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基、-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)卤烷基、-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)烯基、-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)炔基、(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)环烷基、-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷氧基、-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)卤烷氧基、-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)亚烷基-OH、或-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)亚烷基-NH<sub>2</sub>；

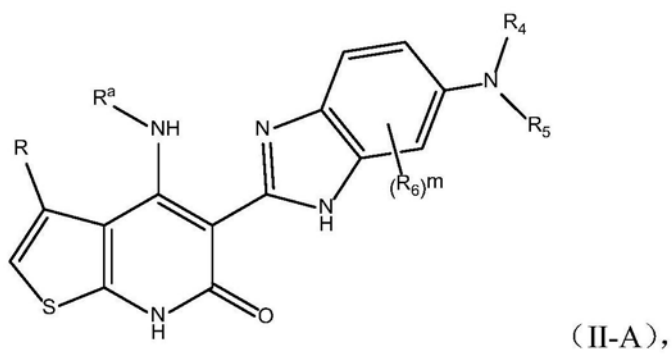
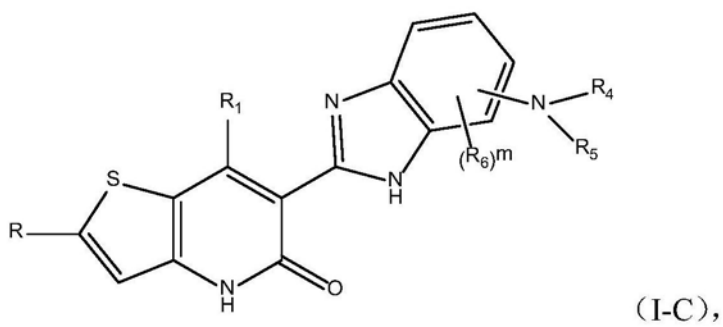
[0041] m是0、1、2、或3；和

[0042] n是0、1、或2。

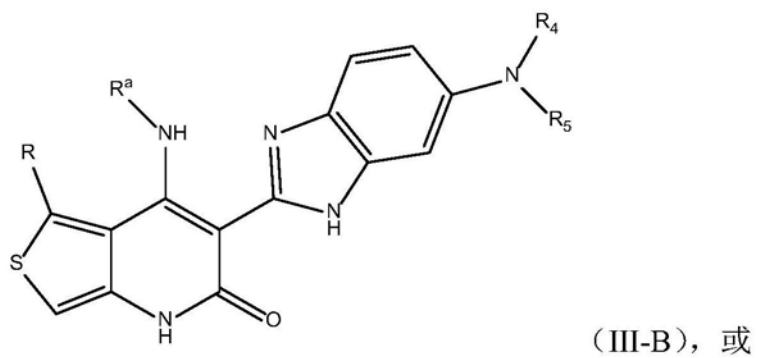
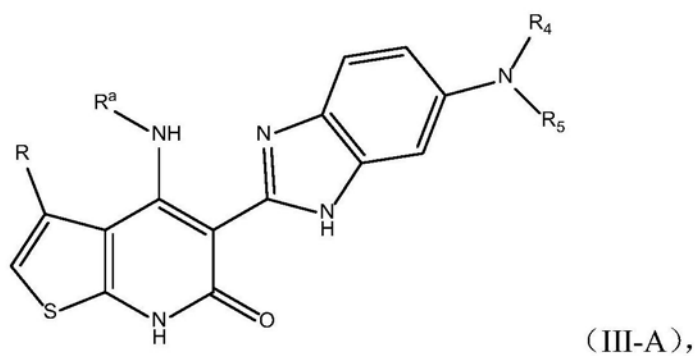
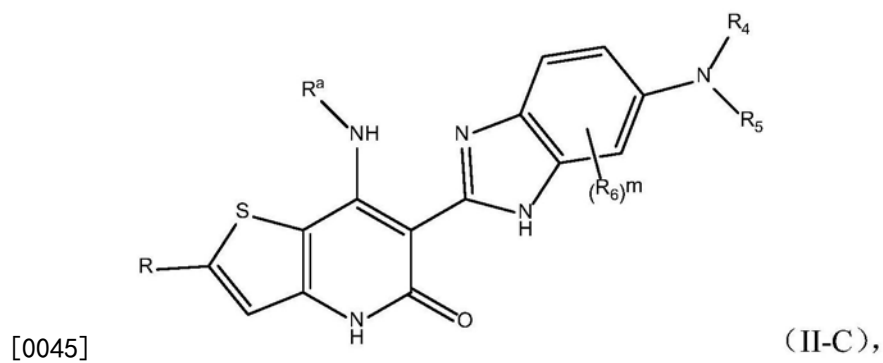
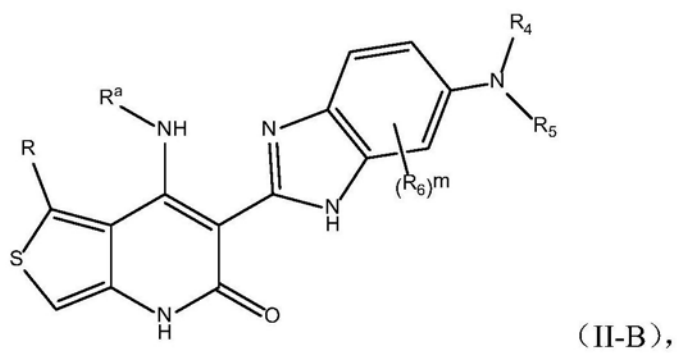
[0043] 在第二实施方式中，本发明提供结构式(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或(III-A) - (III-C)表示的化合物：



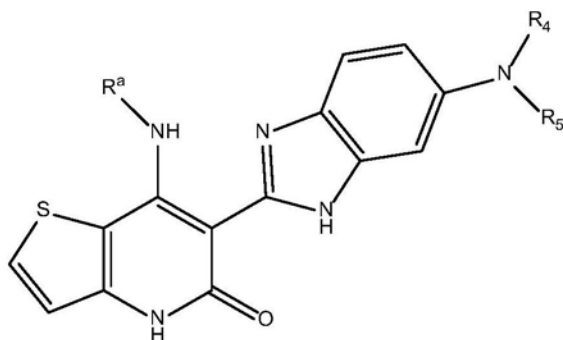
[0044]







[0046]



(III-C),

[0047] 或其药学上可接受的盐。结构式 (I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C) 和 (III-A) - (III-C) 中的变量的数值如关于结构式 (I) 所述。

[0048] 在第三实施方式中, 本发明提供结构式 (I)、(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或 (III-A) - (III-C) 表示的化合物, 其中  $R_4$  和  $R_5$  与其所附接的氮一起形成 4-7 元单环杂环基或 6-12 元桥接杂环基, 其中 4-7 元单环杂环基或 6-12 元桥接杂环基任选地用 1-3 个选自 -F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、氧、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 卤烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷氧基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 卤烷氧基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 亚烷基-OH、或 - (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 亚烷基-NH<sub>2</sub> 的基团取代。其余变量的数值如关于结构式 (I) 所述。

[0049] 在第四实施方式中, 本发明提供结构式 (I)、(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或 (III-A) - (III-C) 表示的化合物, 其中每次出现的  $R^a$  独立地是 -H、- (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) 环烷基、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 4-7 元单环杂环基、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 桥接 (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) 环烷基、任选地取代的 - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 5-10 元杂芳基; 或 - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 6-12 元桥接杂环基, 其中 - (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) 环烷基、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 4-7 元单环杂环基、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 桥接 (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) 环烷基、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 5-10 元杂芳基、或 - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 6-12 元桥接杂环基任选地用 1-3 个选自 -F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、氧、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 卤烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷氧基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 卤烷氧基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 亚烷基-OH、或 - (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 亚烷基-NH<sub>2</sub> 的基团取代, 并且其余变量的数值如上文关于结构式 (I) 或在第三实施方式中所述。

[0050] 在第五实施方式中, 本发明提供结构式 (I)、(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或 (III-A) - (III-C) 表示的化合物, 其中 R 是 H、-F、-Cl、-Br、-OH、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 卤烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷氧基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 亚烷基-OH 或 4-7 元单环杂环基, 任选地用 1-3 个选自 -F、-Cl、-Br、-OH、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 卤烷基、或 - (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷氧基的基团取代, 并且其余变量的数值如上文关于结构式 (I) 或在第三或第四实施方式中所述。

[0051] 在第六实施方式中, 本发明提供结构式 (I)、(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或 (III-A) - (III-C) 表示的化合物, 其中  $R_4$  和  $R_5$  与其所附接的氮一起形成 -N-烷基-哌嗪基或吗啉基, 其中哌嗪基或吗啉基任选地用 1-2 个选自 -F、-Cl、-Br、-OH、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 卤烷基、或 - (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷氧基的基团取代, 并且其余变量的数值如上文关于结构式 (I) 或在第三、第四或第五实施方式中所述。

[0052] 在第七实施方式中, 本发明提供结构式 (I)、(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或 (III-A) - (III-C) 表示的化合物, 其中每次出现的  $R^a$  独立地是 -H、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) 环烷基、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 3-6 元杂环基, 其中 - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) 环烷基或 - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 3-6 元杂环基任选地用 1-3 个选自 -F、-Cl、-Br、-CN、-NH<sub>2</sub>、-OH、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基、或 - (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷氧基的基团取代; 以及 n 是 0 或 1,

并且其余变量的数值如上文关于结构式 (I) 或在第三、第四、第五、或第六实施方式中所述。

[0053] 在第八实施方式中, 本发明提供结构式 (I)、(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或 (III-A) - (III-C) 表示的化合物, 其中 R 是 H、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基、- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷氧基、N-哌嗪基, 任选地用 -CO<sub>2</sub>- (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基取代, 并且其余变量的数值如上文关于结构式 (I) 或在第三、第四、第五、第六、或第七实施方式中所述。可选地, R 是 H。

[0054] 在第九实施方式中, 本发明提供结构式 (I)、(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或 (III-A) - (III-C) 表示的化合物, 其中 R<sub>4</sub> 和 R<sub>5</sub> 与其所附接的氮一起形成 -N-甲基-哌嗪基或吗啉基, 二者均任选地用一个或两个甲基取代, 并且其余变量的数值如上文关于结构式 (I) 或在第三、第四、第五、第六、第七、或第八实施方式中所述。

[0055] 在第十实施方式中, 本发明提供结构式 (I)、(I-A) - (I-C)、(II-A) - (II-C)、或 (III-A) - (III-C) 表示的化合物, 其中每次出现的 R<sup>a</sup> 独立地是 -H; - (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) 环烷基, 任选地用 -OH 取代; - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 四氢-2H-吡喃; 吗啉基; 哌啶基, 任选地用 -F、-OH 或甲基取代; 或四氢呋喃; 和 n 是 0 或 1, 并且其余变量的数值如上文关于结构式 (I) 或在第三、第四、第五、第六、第七、第八或第九实施方式中所述。

[0056] 本发明还包括在示例中通过结构显示和/或通过名称描述的化合物。本发明包括这些化合物的中性形式 (游离碱) 以及其药学上可接受的盐。这些化合物进行的治疗和/或这些化合物的应用包括这些化合物的中性形式以及其药学上可接受的盐。

[0057] 单独或作为较大基团的部分使用的术语“烷基”, 如“烷氧基”或“卤烷基”及类似术语, 意为饱和脂肪族直链或分支单价烃自由基。除非另外指定, 烷基一般具有 1-6 个碳原子, 即 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基。如本文所用, “(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基”意为具有 1 至 6 个线性或分支排列的碳原子的自由基。实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基等。

[0058] “烷氧基”意为通过氧连接原子附接的烷基自由基, 由 -O-烷基表示。例如, “(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷氧基”包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、和丁氧基。

[0059] 术语“卤烷基”和“卤烷氧基”意为视情况而定用一个或多个卤素原子取代的烷基或烷氧基。术语“卤素”意为 F、Cl、Br 或 I。优选地, 卤烷基或卤烷氧基中的卤素是 F。

[0060] “烯基”意为包含至少一个双键的分支或直链单价烃自由基。烯基可以是单不饱和或多不饱和的, 并且可以 E 或 Z 构型存在。除非另外指定, 烯基一般具有 2-6 个碳原子, 即 (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) 烯基。例如, “(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) 烯基”意为具有 2-6 个线性或分支排列的碳原子的自由基。

[0061] “炔基”意为包含至少一个三键的分支或直链单价烃自由基。除非另外指定, 炔基一般具有 2-6 个碳原子, 即 (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) 炔基。例如, “(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) 炔基”意为具有 2-6 个线性或分支排列的碳原子的自由基。

[0062] “环烷基”意为饱和脂肪族环状烃自由基, 一般包含 3-8 个环碳原子, 即, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) 环烷基。(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) 环烷基包括, 但不限于, 环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0063] 如本文所用, 如在“桥接环烷基”或“桥接杂环基”中单独或作为较大基团的部分使用的术语“桥接”指代包括共享至少三个相邻环原子的两个环的环系统。桥接环烷基一般包含 6-12 个环碳原子。桥接杂环基一般具有选自碳和至少一个 (一般 1 至 4 个, 更一般 1 或 2 个) 杂原子 (例如, 氧、氮或硫) 的 6-12 个环原子。

[0064] 如在“芳基烷基”、“芳基烷氧基”、或“芳氧基烷基”中单独或作为较大基团的部分使用的术语“芳基”意为碳环芳香族环。其还包括与环烷基稠合的苯基环。术语“芳基”可与

术语“芳基环”、“碳环芳香族环”、“芳基基团”和“碳环芳香族基团”互换使用。芳基一般具有6至14个环原子。实例包括苯基、萘基、蒽基、1,2-二氢萘基、1,2,3,4-四氢萘基、茛基、茛满基、茛基及类似基团。“取代芳基”是在任何一个或多个可取代的环原子(键合氢的环碳原子)处被取代。

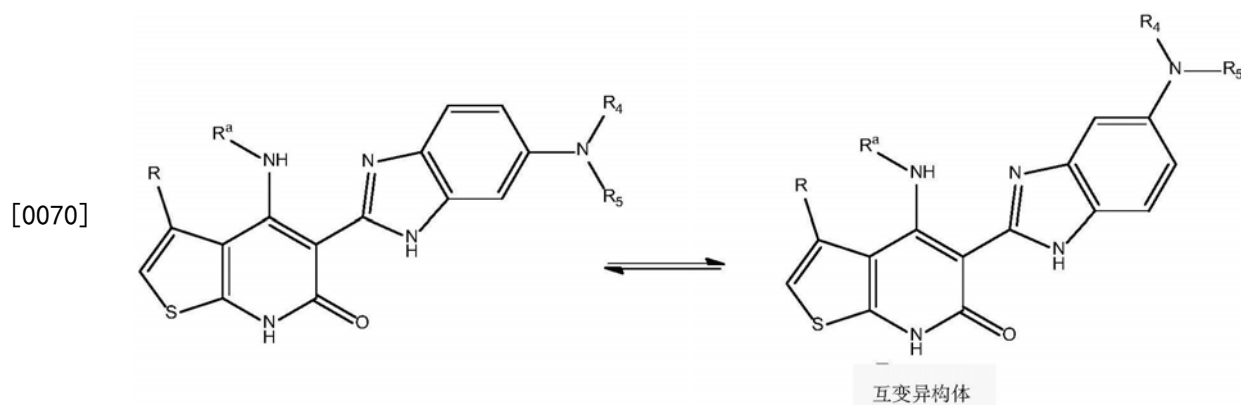
[0065] 术语“杂芳基”、“杂芳香族”、“杂芳基环”、“杂芳基基团”、“杂芳香族环”和“杂芳香族基团”在本文中互换使用。“杂芳基”,在如在“杂芳基烷基”或“杂芳基烷氧基”中单独或作为较大基团的部分使用时,指代具有选自碳和至少一个(一般1至4个,更一般1或2个)杂原子(例如,氧、氮或硫)的5至14个环原子的芳香族环基团。“杂芳基”包括单环状环和多环状环,其中单环杂芳香族环稠合至一个或多个其它芳基、杂环基或杂芳香族环。如此,“5-14元杂芳基”包括单环的、双环的或三环的环系统。

[0066] 单环5-6元杂芳基的实例包括呋喃基(例如,2-呋喃基、3-呋喃基)、咪唑基(例如,N-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、5-咪唑基)、异噁唑基(例如,3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基)、噁二唑基(例如,2-噁二唑基、5-噁二唑基)、噻唑基(例如,2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基)、吡唑基(例如,3-吡唑基、4-吡唑基)、吡咯基(例如,1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基)、吡啶基(例如,2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基)、嘧啶基(例如,2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基)、哒嗪基(例如,3-哒嗪基)、噻唑基(例如,2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基)、异噻唑基、三唑基(例如,2-三唑基、5-三唑基)、四唑基(例如,四唑基)、和噻吩基(例如,2-噻吩基、3-噻吩基)。多环芳香族杂芳基的实例包括呋喃基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、吲哚基、苯并三唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹啉基、异喹啉基、吲唑基、异吲唑基、吡啶基、或苯并异噁唑基。“取代杂芳基”是在任何一个或多个可取代的环原子(键合氢的环碳或环氮原子)处被取代。

[0067] “杂环基”意为饱和或不饱和的非芳香族3-12元环自由基,任选地包含一个或多个双键。其可以是单环的、双环的、三环的、或稠合的。杂环烷基包含1至4个杂原子,该杂原子可相同或不同,选自N、O或S。杂环基环任选地包含一个或多个双键,和/或任选地与一个或多个芳香族环(例如,苯基环)稠合。术语“杂环基”意图包括所有可能的异构体形式。杂环烷基的实例包括,但不限于,吡啶基、吗啉基、硫吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、乙内酰脲基、戊内酰胺基、环氧乙烷基、环氧丙烷基、二氢咪唑基、二氢呋喃基、二氢吡喃基、二氢吡啶基、二氢嘧啶基、二氢噻吩基、二氢苯硫基、二氢噻喃基、四氢咪唑基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢噻吩基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢苯硫基、和四氢噻喃基。多环杂环烷基的实例包括二氢吲哚基、二氢异吲哚基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并噻吩基、二氢苯并呋喃基、二氢异苯并呋喃基、二氢苯并三唑基、二氢苯并噻唑基、二氢苯并噁唑基、二氢喹啉基、四氢喹啉基、二氢异喹啉基、四氢异喹啉基、二氢吲唑基、二氢吡啶基、四氢吡啶基、二氢苯并异噁唑基、色原烷基(chroman)、色原烯基(chromene)、异色原烷基和异色原烯基。

[0068] 某些本文描述的化合物可以各种立体异构体或互变异构体形式存在。立体异构体是仅在其空间排列有区别的化合物。当本公开化合物通过结构被命名或显示而没有指明立体化学时,要理解,该名称或结构包括所有可能的立体异构体、几何异构体,包括基本上纯的立体或几何异构体及其组合。

[0069] 在某些情况下,存在本公开化合物的互变异构体形式,如以下显示的互变异构体结构:



[0071] 将理解,当本文的化合物在本文中通过结构式表示或通过化学名称命名时,该结构式包括对于该化合物而言可能存在的所有其它互变异构体形式。

[0072] 某些本公开化合物可以各种立体异构体形式存在。立体异构体是仅在其空间排列有区别的化合物。对映体是镜像不可重叠的立体异构体对,最常见的是因为其包含不对称取代的碳原子充当手性中心。“对映体”意为彼此镜像并且不可重叠的一对分子中的一个。非对映体是包含两个或更多个不对称取代的碳原子的立体异构体。“几何异构体”是取代基原子相对于碳-碳双键、碳环基环、或桥接双环系统的取向有区别的立体异构体。

[0073] 当几何异构体通过名称或结构显示时,将理解,该命名或显示的几何异构体的几何异构体纯度为至少按重量计60%、70%、80%、90%、99%或99.9%纯。几何异构体纯度通过混合物中该命名或显示的几何异构体的重量除以混合物中所有几何异构体的总重量来确定。

[0074] 当本公开化合物的立体化学被通过结构命名或显示时,该命名或显示的立体异构体为相对于所有其它立体异构体至少按重量计60%、70%、80%、90%、99%或99.9%纯。相对于所有其它立体异构体的重量百分比纯度是一种立体异构体的重量与其它立体异构体的重量的比。当一种对映体通过结构来命名或显示时,该显示或命名的对映体为至少按重量计60%、70%、80%、90%、99%或99.9%光学纯(也被称为“对映体纯”)。光学纯度重量百分比是对映体重量与对映体重量加其光学异构体重量的比。

[0075] 当本公开化合物的立体化学通过结构来命名或显示并且命名或显示的结构包括多于一种立体异构体(例如,如非对映体对)时,将理解,所包括的立体异构体中的一个或所包括的立体异构体的任何混合物被包括在内。将进一步理解,命名或显示的立体异构体的立体异构体纯度为相对于所有其它立体异构体至少按重量计60%、70%、80%、90%、99%或99.9%纯。在这种情况下,立体异构体纯度通过该名称或结构所包括的立体异构体的混合物的总重量除以所有立体异构体的混合物的总重量来确定。

[0076] 当本公开化合物通过结构命名或显示而没有指明立体化学并且该化合物具有一个手性中心时,将理解,该名称或结构包括化合物的一种对映体——无相应的光学异构体、该化合物的消旋混合物和在一种对映体中(相对于其相应光学异构体)富集的混合物。

[0077] 当本公开化合物通过结构命名或显示而没有指明立体化学并且例如该化合物具有至少两个手性中心时,将理解,该名称或结构包括一种立体异构体——无其它立体异构

体、立体异构体混合物、和其中一种或多种立体异构体相对于其它立体异构体(一种或多种)富集的立体异构混合物。例如,该名称或结构可包括一种立体异构体——无其它非对映体、立体异构体混合物、和其中一种或多种非对映体相对于其它非对映体(一种或多种)的立体异构体混合物。

[0078] 对映体和非对映体混合物可通过公知方法分解成其组分对映体或立体异构体,如手性相气相色谱、手性相高效液相色谱、使化合物结晶为手性盐复合物、或使化合物在手性溶剂中结晶。对映体和非对映体还可通过公知的不对称合成方法由非对映体纯或对映体纯的中间体、试剂、和催化剂获得。

[0079] 本教导包括本文公开的化合物的药学上可接受的盐。本公开的化合物具有碱性胺基团,因此可与药学上可接受的酸(一种或多种)一起形成药学上可接受的盐。本文描述的化合物的适当的药学上可接受的酸加成盐包括无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸、和硫酸)和有机酸(如乙酸、苯磺酸、苯甲酸、乙磺酸、甲磺酸、琥珀酸、和三氟乙酸)的盐。具有酸性基团如羧酸的本教导的化合物可与药学上可接受的碱(一种或多种)一起形成药学上可接受的盐。适当的药学上可接受的碱式盐包括铵盐、碱金属盐(如钠盐和钾盐)和碱土金属盐(如镁盐和钙盐)。具有季铵基团的化合物还包含反阴离子,如氯离子、溴离子、碘离子、乙酸根、高氯酸根及类似反阴离子。这种盐的其它实例包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐和具有氨基酸如谷氨酸的盐。

[0080] 本文描述的化合物可抑制HPK1。因此,总体上,本文描述的化合物可用于治疗与这种激酶相关的疾病或状况。

[0081] 在一个实施方式中,本文描述的化合物是HPK1抑制剂,并且可用于治疗与这种激酶(一种或多种)相关的疾病,如癌症。

[0082] 本教导的另一方面涉及治疗患癌对象的方法,包括给予对象有效量的本文描述的化合物。在一个实施方式中,本文描述的化合物抑制肿瘤生长。

[0083] 可通过本教导的方法治疗(包括降低复发可能性)的癌症包括乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤、脑癌(包括多形性成胶质细胞瘤和成神经细胞瘤)、头颈癌、胰腺癌、黑素瘤、肝细胞癌、肾癌、和软组织肉瘤。在一个实施方式中,癌症是乳腺癌、结肠癌、和卵巢癌。在一个实施方式中,癌症选自白血病、急性髓性白血病、慢性骨髓性白血病、乳腺癌、脑癌、结肠癌、结肠直肠癌、头颈癌、肝细胞癌、肺腺癌、转移性黑素瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌和肾癌。在一个实施方式中,癌症是肺癌、结肠癌、脑癌、成神经细胞瘤、前列腺癌、黑素瘤、多形性成胶质细胞瘤或卵巢癌。在另一实施方式中,癌症是肺癌、乳腺癌、结肠癌、脑癌、成神经细胞瘤、前列腺癌、黑素瘤、多形性成胶质细胞瘤或卵巢癌。在再另一实施方式中,癌症是乳腺癌、结肠癌和肺癌。在另一实施方式中,癌症是乳腺癌。在再另一实施方式中,癌症是基底细胞亚型(basal sub-type breast cancer)乳腺癌或管腔B亚型乳腺癌(luminal B sub-type breast cancer)。在再另一实施方式中,癌症是基底细胞亚型乳腺癌。在再另一实施方式中,基底细胞亚型乳腺癌是ER(雌激素受体)、HER2和PR(孕酮受体)阴性乳腺癌。在再另一实施方式中,癌症是软组织癌。“软组织癌”是本领域公知的术语,包括衍生自身体任何软组织的肿瘤。这种软组织连接、支撑或包围身体各种结构和器官,包括但不限于,平滑肌、骨骼肌、腱、纤维组织、脂肪组织、血管和淋巴管、脉管周围组织、神经、间质细胞和滑膜组织。因此,软组织癌可以是脂肪组织、肌肉组织、神经组织、

关节组织、血管、淋巴管、和纤维组织的。软组织癌可以是良性或恶性的。总体上，恶性软组织癌被称为肉瘤、或软组织肉瘤。存在多种类型的软组织肿瘤，包括脂瘤、成脂细胞瘤、冬眠瘤(hibernoma)、脂肉瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌瘤、横纹肌肉瘤、神经纤维瘤、神经鞘瘤(schwannoma/neurilemoma)、神经瘤、恶性神经鞘瘤、神经纤维肉瘤、神经源性肉瘤、结节性腱鞘炎、滑膜肉瘤、血管瘤、血管球瘤(glomus tumor)、血管外皮细胞瘤、血管内皮瘤、血管肉瘤、Kaposi肉瘤、淋巴管瘤、纤维瘤、弹力纤维瘤、浅表性纤维瘤病、纤维组织细胞瘤、纤维肉瘤、纤维瘤病、隆凸性皮肤纤维肉瘤(DFSP)、恶性纤维组织细胞瘤(MFH)、粘液瘤、颗粒细胞瘤、恶性间质瘤、蜂窝状软部肉瘤(alveolar soft-part sarcoma)、上皮样肉瘤、透明细胞肉瘤、和促结缔组织增生性小细胞瘤。在具体实施方式中，软组织癌是选自纤维肉瘤、胃肠道肉瘤、平滑肌肉瘤、去分化脂肉瘤、多形性脂肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、圆细胞肉瘤、和滑膜肉瘤的肉瘤。

[0084] 本教导还提供治疗患病对象的方法，包括给予对象有效量的结构式(I)表示的化合物与有效的免疫调节治疗(也被称为免疫治疗)的组合。免疫治疗是利用免疫调节剂诱导、增强或抑制免疫响应的疾病治疗。被设计以引起或扩大免疫响应的免疫治疗被归类为激活免疫治疗，而减少或抑制免疫响应的免疫治疗被归类为抑制免疫治疗。本文描述的疾病是癌症。

[0085] 免疫调节治疗——单独或以组合方式应用——包括i)免疫检验点阻断抑制剂，包括但不限于，抗CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)抗体(例如，伊匹单抗(Ipilimumab))；破坏PD-1/PD-L1和PD-L2相互作用的剂，例如，纳武单抗(Opdivo-Bristol Myers Squibb)、帕母单抗(Keytruda, KM-3475, Merck)、皮地利珠单抗(CT-011, Cure Tech)、BMS 936559(BMS)和MPDL3280A(Roche)；和其它免疫响应抑制受体，例如，抗CD47；ii)基于细胞的治疗(包括，但不限于，树突状细胞治疗(例如，Sipuleucel T(Provenge)和过继性T细胞治疗；iii)疫苗接种策略；iv)过继性T细胞治疗；v)防止免疫响应的代谢抑制的剂，包括吡啶胺2,3-双加氧酶(例如，INCB024360(Incyte)、1-甲基-D-色氨酸、indoximod(NewLink Genetics))或精氨酸酶的抑制剂；和vi)基于细胞因子的治疗，例如，干扰素(具体地，I型干扰素)和白介素(例如，白介素-2)。

[0086] 在一个实施方式中，用于免疫调节治疗的免疫调节剂是PD-1抑制剂，例如，抗PD1抗体。

[0087] 程序性细胞死亡蛋白1，也被称为PD-1和CD279(分化簇279)，是人体中由PDCD1基因编码的蛋白质。PD-1是属于免疫球蛋白超家族并且在T细胞和祖B细胞上表达的细胞表面受体。PD-1结合两个配体，PD-L1和PD-L2，二者均是B7家族的成员。

[0088] PD-1和其配体通过阻止T细胞激活(进而降低自身免疫性和促进自身耐受)在下调免疫系统方面具有重要作用。PD-1的抑制效果通过促进淋巴结中的抗原特异性T细胞的凋亡(程序性细胞死亡)同时减少调节性T细胞(抑制性T细胞)的凋亡的双重机制来实现。

[0089] 本发明使用的PD-1抑制剂包括，但不限于，纳武单抗、帕母单抗、皮地利珠单抗、BMS 936559、MPDL3280A、MSB0010718C或MEDI4736。其中，BMS 936559、MPDL3280A、MSB0010718C、和MEDI4736结合配体PD-L1，其全部都是抗体。纳武单抗和帕母单抗均被食品和药物管理局(Food and Drug Administration)批准用于治疗对其它药物不再有响应的不可切除性或转移性黑素瘤。

[0090] 疫苗接种策略包括抗微生物免疫治疗,其包括疫苗接种,涉及激活免疫系统以响应感染剂。

[0091] 过继性T细胞治疗利用基于T细胞的细胞毒性响应攻击癌症细胞。在体外生成对患者癌症具有天然的或遗传改造的反应性的T细胞,然后将其转移回到癌症患者中。一项利用自体肿瘤浸润性淋巴细胞的研究是转移性黑素瘤患者的有效治疗。这可通过如下实现:采集随患者肿瘤发现的T细胞,将其进行训练以攻击癌细胞。然后利用高浓度IL-2、抗CD3和同种反应性饲养细胞,促使这些T细胞——被称为肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)——体外繁殖。然后将这些T细胞连同IL-2的外源给予一起(以进一步增加其抗癌症活性)转移回到患者中。

[0092] 本教导还提供治疗患有癌症的对象的方法,包括给予对象有效量的结构式(I)表示的化合物与有效的抗癌治疗的组合。在一个实施方式中,癌症是转移性癌症。“转移性癌症”是已从其原发性位点扩散至身体其它部分的癌症。

[0093] 本文描述的抗癌治疗包括共同给予有效量的第二抗癌剂和本公开的HPK-1抑制剂。“抗癌剂”是在以有效量被给予至患癌对象时可部分或基本上实现下列一项或多项的化合物:制止癌症生长、降低癌症程度(例如,减少肿瘤尺寸)、抑制癌症生长速率、和减轻或改善癌症相关临床症状或指标(如组织或血清组分)或增加对象寿命。

[0094] 适用于本文描述的方法的抗癌剂包括已被批准用于治疗癌症的任何抗癌剂。在一个实施方式中,抗癌剂包括,但不限于,靶向抗体、血管生成抑制剂、烷基化剂、抗代谢物、长春花生物碱、紫杉烷、鬼臼素、拓扑异构酶抑制剂、激素抗肿瘤剂和其它抗肿瘤剂。在一个实施方式中,抗癌剂是PD-1抑制剂,例如,抗PD1抗体。

[0095] 在一个实施方式中,可用于本文描述的方法的抗癌剂包括,但不限于,紫杉醇(paclitaxel)、多西紫杉醇(docetaxel)、5-氟尿嘧啶、曲妥珠单抗(trastuzumab)、拉帕替尼(lapatinib)、贝伐单抗(bevacizumab)、来曲唑(letrozole)、戈舍瑞林(goserelin)、他莫昔芬(tamoxifen)、西妥昔单抗(cetuximab)、帕尼单抗(panitumumab)、吉西他滨(gemcitabine)、卡培他滨(capecitabine)、伊立替康(irinotecan)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡铂、顺铂、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、环磷酰胺、氨甲喋呤、长春碱、长春新碱、美法仑(melphalan)、阿糖胞苷、依托泊苷(etoposide)、柔红霉素、博来霉素(bleomycin)、丝裂霉素和阿霉素(adriamycin)及其组合。

[0096] 在一个实施方式中,抗癌剂和结构式(I)表示的化合物被同时期给予。在被同时期给予时,抗癌剂和化合物可在相同制剂中或不同制剂中被给予。可选地,化合物和另外的抗癌剂在不同时间被分开给予。

[0097] 如本文所用,“治疗患癌对象”包括部分或基本上实现下列一项或多项:制止癌症生长、降低癌症程度(例如,减少肿瘤尺寸)、抑制癌症生长速率、减轻或改善癌症相关临床症状或指标(如组织或血清组分)或增加对象寿命;和降低癌症复发可能性。

[0098] 术语“有效量”意为在被给予对象时产生有益或期望的效果的量,包括临床效果,例如,与对照相比,抑制、压抑或减轻对象的癌症(例如,通过临床症状或癌细胞量确定的)。

[0099] 总体上,本文教导的化合物的有效量根据不同因素而相异,如给定药物或化合物、药物制剂、给药途径、疾病或病症类型、被治疗对象或宿主的身份、及类似因素,但可被本领域技术人员常规地确定。本教导的化合物的有效量可容易通过本领域已知的常规方法由普



通技术人员确定。

[0100] 在实施方式中,本文教导的化合物的有效量在约0.1至约1000mg/kg体重范围内,可选地约1至约500mg/kg体重。在另一实施方式中,本文教导的化合物的有效量在约0.5至约5000mg/m<sup>2</sup>范围内,可选地约5至约2500mg/m<sup>2</sup>,以及在另一可选方式中,约50至约1000mg/m<sup>2</sup>。技术人员将理解,某些因素可影响有效治疗患癌对象或降低癌症复发可能性所需的剂量。这些因素包括,但不限于,疾病或病症严重程度、在前治疗、一般健康状况和/或对象年龄和存在的其它疾病。

[0101] “对象”是哺乳动物,优选人,但也可以是需兽医治疗的动物,例如,伴生动物(例如,狗、猫、及类似动物)、农场动物(例如,牛、绵羊、猪、马、及类似动物)和实验室动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠、及类似动物)。

[0102] 本领域技术人员将理解,根据选择的给予途径,本文教导的化合物可以各种形式被给予患者。可例如通过口服、胃肠外、颊部、舌下、鼻部、直肠、贴剂、泵送或透皮给药来给予本教导的化合物,并相应地配制药物组合物。胃肠外给予包括静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、经上皮、鼻部、肺内、鞘内、直肠和局部给予模式。胃肠外给予可通过在选定时期内连续灌注来进行。

[0103] 本文教导的化合物可被适当地配制成药物组合物以给予对象。本教导的药物组合物任选地包括一种或多种其药学上可接受的载体和/或稀释剂,如乳糖、淀粉、纤维素和右旋糖。其它赋形剂,如调味剂;增甜剂;和防腐剂,如甲基、乙基、丙基和丁基对羟基苯甲酸酯,也可被包括在内。适当的赋形剂的更完全列举可在药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients (5<sup>th</sup> Ed., Pharmaceutical Press (2005)))中找到。本领域技术人员知道如何制备适于各种类型给药途径的制剂。选择和制备适当制剂的常规程序和成分被描述于例如雷明登氏药学全书(Remington's Pharmaceutical Sciences) (2003-20th版)和1999出版的美国药典:国家处方集(The United States Pharmacopeia: The National Formulary) (USP 24NF19)中。载体、稀释剂和/或赋形剂是“可接受的”,意义在于与药物组合物其它成分是可相容的并且对其接受者不是有害的。

[0104] 一般,对于口服治疗性给予而言,本教导的化合物可掺并赋形剂,并且以可摄入式片剂、颊部片剂、含片、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、糯米纸囊剂(wafers)、及类似物的形式应用。

[0105] 一般,对于胃肠外给予,本教导的化合物的溶液可总体上在水中制备,适当地与表面活性剂如羟基丙基纤维素混合。也可在甘油、液体聚乙二醇、DMSO和其混合物(有醇或无醇)中以及在油中制备分散液。在普通储存和应用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

[0106] 一般,对于可注射应用,用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的本文描述的化合物的无菌含水溶液或分散液以及无菌粉末是适当的。

[0107] 对于鼻部给予,本教导的化合物可被配制为气溶胶、滴剂、凝胶和粉末。气溶胶制剂一般包括活性物质在生理可接受的含水或不含水溶剂中的溶液或精细悬浮液,并且通常以单剂或多剂的量以无菌形式呈现在密封容器中,该密封容器可采取筒(cartridge)的形式或再填充以与雾化装置联用。可选地,密封容器可以是单一分配装置(如单剂鼻部吸入器)或配备以计量阀的气溶胶分配器——意图在使用后弃置。在剂型包括气溶胶分配器的

情况下,其将包含喷射剂,该喷射剂可以是压缩气体如压缩空气或有机喷射剂如氟氯烃。气溶胶剂型也可采取泵-雾化器的形式。

[0108] 对于颊部或舌下给予,本教导的化合物可与载体如糖、阿卡胶、黄蓍胶、或明胶和甘油一起配制为片剂、锭剂或糖锭。

[0109] 对于直肠给予,本文描述的化合物可以包含常规栓剂基质如可可脂的栓剂的形式配制。

[0110] 本发明的化合物可通过本领域技术人员已知的方法制备,如下文一般方案和程序和后续制备实施例所示。所有起始材料是市售的或通过本领域技术人员已知的方法和下文描述的程序制备的。

[0111] 下文示例提供了权利要求化合物的一般合成方法,如方案1和2所示。

[0112] 示例

[0113] 实施例A:合成

[0114] 一般方法

[0115] 市售的起始材料、试剂、和溶剂在收到的状态下使用。总体上,无水反应在惰性气氛如氮气或氩气下进行。**PoraPak<sup>®</sup>** Rxn CX指代可购自Waters的市售阳离子交换树脂。

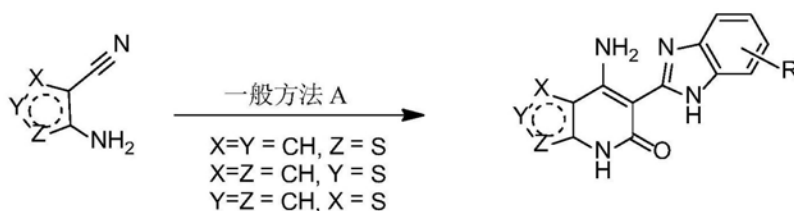
[0116] 微波反应利用Biotage Initiator微波反应器进行。反应进程总体上通过LCMS (Bruker Exquire 4000或Waters Acquity UPLC系统) 来监测。中间体或最终产物的快速柱层析纯化利用带有KP-SIL或HP-SIL二氧化硅筒、或KP-NH碱性改性二氧化硅和相应的进样器(samplers)的Biotage Isolera进行。反相HPLC纯化在带有Varian Monochrom 10 $\mu$ C-18反相柱的Varian PrepStar SD-1型HPLC系统上,利用从10%MeOH/0.05%TFA-H<sub>2</sub>O到H<sub>2</sub>O中90%MeOH/0.05%TFA的梯度,在40mL/min的流速下,经40-min时间进行。反相纯化也利用配备以KP-C18-H柱的Biotage Isolera进行——利用H<sub>2</sub>O中10-95%之间MeOH或CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA。质子NMR被记录在Bruker 400MHz光谱仪上,并且质谱利用Bruker Esquire 4000光谱仪或Waters Acquity UPLC系统获得。

[0117] 化合物名称用内置到CambridgeSoft-PerkinElmer's ChemBioDraw Ultra版本12.0中的软件生成。

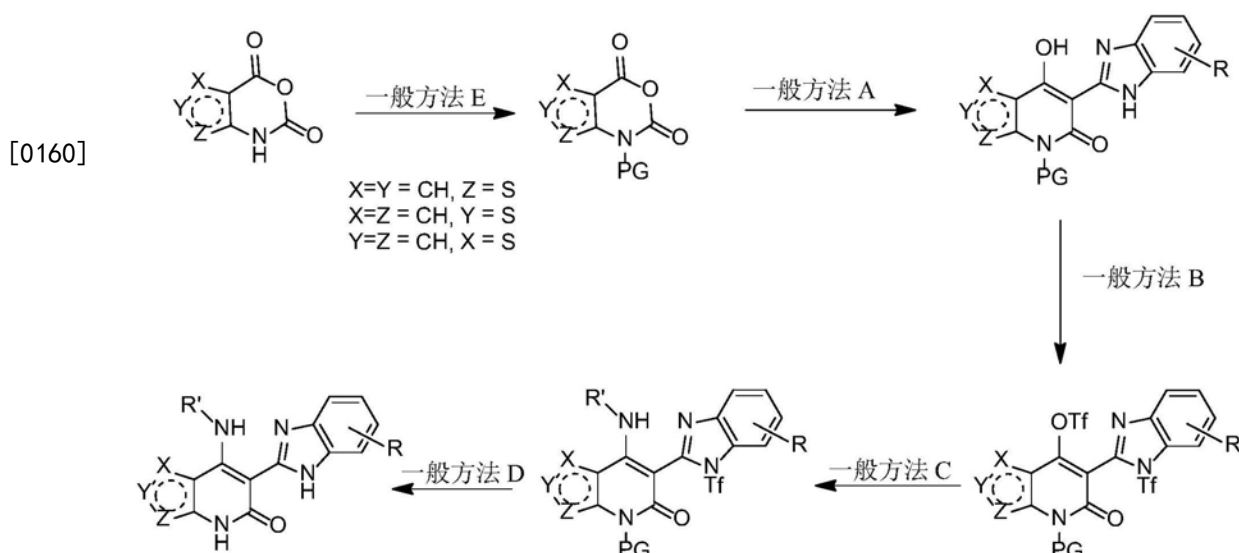
[0118] 简称:

[0119]	aq	含水/水性
[0120]	anh	无水
[0121]	Ar	氩气
[0122]	Boc	叔丁氧基羰基
[0123]	br.	宽
[0124]	calcd	计算
[0125]	d	双重(仅在 <sup>1</sup> H NMR光谱中使用)
[0126]	DCM	二氯甲烷
[0127]	de	非对映体过量
[0128]	DIPEA	二异丙基乙基胺
[0129]	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
[0130]	DMSO	二甲基亚砷

[0131]	dppf	1,1'-双(二苯基膦)二茂铁
[0132]	equiv	当量
[0133]	Flt3	fms相关酪氨酸激酶3
[0134]	h	小时
[0135]	HPK1	造血祖细胞激酶1
[0136]	HPLC	高效液相色谱
[0137]	IPA	异丙醇
[0138]	KHMDS	六甲基二硅叠氮钾(potassium hexamethyldisilazide)
[0139]	Lck	淋巴细胞特异性蛋白质酪氨酸激酶
[0140]	LC-MS	液相色谱偶联质谱
[0141]	LDA	二异丙基酰胺锂
[0142]	LiHMDS	六甲基二硅叠氮锂
[0143]	min	分钟
[0144]	m	多重
[0145]	MeCN	乙腈
[0146]	MS ESI	质谱,电喷雾电离
[0147]	NMR	核磁共振
[0148]	O/N	过夜
[0149]	PMB	对甲氧基苄基
[0150]	prep	制备型
[0151]	rt	室温
[0152]	Rt	保留时间
[0153]	RP	反相
[0154]	s	单重
[0155]	satd	饱和
[0156]	t	三重
[0157]	temp.	温度
[0158]	TFA	三氟乙酸
[0159]	THF	四氢呋喃



方案 1



方案 2

[0161] 起始材料的制备

[0162] 一般方法A1 (利用苯并咪唑酯的碱诱导型环化)

[0163] 用KHMDs、LiHMDs、或LDA (3-5当量) 处理芳基咪唑-2,4-二酮 (1当量) 或氨基芳基脒和取代1H-苯并[d]咪唑-2-基) 乙酸酯 (1-1.2当量) 的THF溶液。将反应在45℃下搅拌4-24h。然后使反应冷却至rt,并通过饱和aq  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 猝灭。用EtOAc或DCM萃取含水层,并将组合的有机萃取在 $\text{MgSO}_4$ 上干燥,过滤和浓缩。通过柱层析或制备型HPLC纯化粗产物,以给出期望的产物。

[0164] 一般方法A2 (两步式,利用苯并咪唑酯的碱诱导型环化)

[0165] 将芳基咪唑-2,4-二酮 (1当量) 或氨基芳基脒和取代1H-苯并[d]咪唑-2-基) 乙酸酯 (1-1.2当量) 的溶液用KHMDs、LiHMDs、 $\text{KO}^t\text{Bu}$ 或LDA (3-5当量) 在45℃下处理2-4h。然后使反应冷却至rt,并通过饱和aq  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 猝灭。用EtOAc或DCM萃取含水层,并将组合的有机萃取在 $\text{MgSO}_4$ 上干燥,过滤和浓缩。将未环化的加成加合物通过柱层析分离,溶解于THF中,和用KHMDs、LiHMDs、或LDA (3-5当量) 处理。将反应在45℃下搅拌1-4h。然后使反应冷却至rt,并通过饱和aq  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 猝灭。用EtOAc或DCM萃取含水层,并将组合的有机萃取在 $\text{MgSO}_4$ 上干燥,过滤和浓缩。通过柱层析或制备型HPLC纯化粗产物,以给出期望的产物。

[0166] 一般方法A3 (两步式,利用苯并咪唑酯的碱诱导型环化)

[0167] 用LiHMDs、或LDA (5当量) 处理氨基芳基脒和取代1H-苯并[d]咪唑-2-基) 乙酸酯 (1

当量)的THF溶液(步骤1)。将反应在35-40℃下搅拌1-1.5h。然后使反应冷却至rt,通过饱和aq  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 猝灭,和浓缩。通过制备型HPLC纯化粗产物,以给出未环化的中间体,将该中间体中和,干燥和利用LiHMDS经受在一般方法A1中描述的条件(步骤2)。

[0168] 一般方法B(三氟甲磺酸酯形成)

[0169] 用 $\text{Tf}_2\text{O}$  (8当量) 处理苯并咪唑-2-基芳基吡啶酮衍生物(1当量) 和吡啶(20当量) 的DCM溶液。将反应在0℃下搅拌2-8h。然后通过饱和aq  $\text{NaHCO}_3$ 使反应猝灭。用DCM萃取含水层,并将组合的有机萃取在 $\text{MgSO}_4$ 上干燥,过滤和浓缩。粗产物不经进一步纯化用于下一个步骤。

[0170] 一般方法C(胺取代)

[0171] 用胺(1.2-3当量) 处理苯并咪唑-2-基芳基吡啶酮双三氟甲磺酸酯衍生物(1当量) 的MeCN、DCM、或DMF溶液。在该胺是盐(例如, $\text{HCl}$ ) 的情况下,将该胺盐溶解于MeOH或DMF中,并使其经过PoraPak Rxn CX离子交换柱,以产生游离碱,该游离碱被加入反应混合物。将该反应混合物在rt或上至45℃下搅拌1-48h。去除溶剂,并通过柱层析或制备型HPLC纯化粗产物,以给出期望的产物。

[0172] 一般方法D(全面去保护)

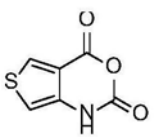
[0173] 将受保护苯并咪唑-2-基芳基吡啶酮衍生物(1当量) 的TFA/浓 $\text{HCl}$  (7:1v/v) 溶液在80-100℃下加热3-24h。去除溶剂,并通过柱层析(游离碱) 或制备型HPLC(TFA盐) 纯化粗产物,以给出期望的产物。为生成 $\text{HCl}$ 盐形式的期望的产物,将游离碱溶解于MeOH中,并在rt下添加1M  $\text{HCl-Et}_2\text{O}$  (2-4当量)。将溶液搅拌5min并与MeOH一起共沸两次。

[0174] 一般方法E(PMB-保护)

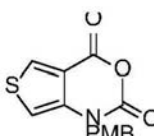
[0175] 将硫依托酸酐(thiaisatoic anhydride) (1当量)、1-(氯甲基)-4-甲氧基苯(1-1.2当量)、 $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1-1.2当量) 和/或KI (1-1.2当量) 的DMF溶液在rt下搅拌4-24h。然后将反应混合物缓慢加入 $\text{H}_2\text{O}$ 中,通过真空过滤收集沉淀,以给出期望物。

[0176] 中间体:

[0177] 1H-噻吩并[3,4-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮

[0178]  在rt下向4-叔丁氧基羰基氨基-噻吩-3-羧酸(2.5 g, 10.2 mmol) 的PhMe (25 mL) 溶液添加草酰氯 (1.29 mL, 15.3 mmol)。将反应混合物逐渐加热至95℃,并在95℃下搅拌1 h。在反应完成后,使反应冷却至rt,和过滤。将固体用己烷(2x 5mL) 洗涤,和在真空下干燥,以提供标题化合物,为乳膏状固体(1.61g, 93%)。  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  11.57 (s, 1H), 8.64 (d,  $J=3.2\text{Hz}$ , 1H), 6.89 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H); MS ESI  $[\text{M}+\text{H}]^+$  170.0, 计算的  $[\text{C}_6\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}+\text{H}]^+$  169.9。

[0179] 1-(4-甲氧基苄基)-1H-噻吩并[3,4-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮

[0180]  按照一般方法 E, 在rt下,在搅拌下,向1H-噻吩并[3,4-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮 (1.6 g, 9.45 mmol) 的anh DMF (20 mL) 溶液添加  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.56 g, 11.3 mmol), 然后KI (0.62 g, 3.78 mmol)。经10 min滴加PMBCl (1.54mL, 11.3mmol), 并将反应混合物再搅拌2h。在反应完成后,将反应混合物倒入 $\text{H}_2\text{O}$  (200mL) 中,以沉淀产物,将产物过滤,用 $\text{H}_2\text{O}$ 洗涤,和干燥,以提供标题化合物,为

灰白色固体 (2.3g, 84%)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.35 (d,  $J=3.2\text{Hz}$ , 1H), 7.31 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 6.89 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 6.62 (d,  $J=3.2\text{Hz}$ , 1H), 5.08 (s, 2H), 3.80 (s, 3H); MS ESI  $[\text{M}+\text{H}]^+ 291.2$ , 计算的  $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{S}+\text{H}]^+ 290.0$ 。

[0181] 7-羟基-4-(4-甲氧基苄基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩



并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮

按照一般方法A1, 利用1-(4-甲氧基苄基)-1H-噻吩并[3,2-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮 [Tetrahedron (1999) 55

6167-6174] (2.89g, 10mmol)、2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 [J. Med. Chem. (2009), 52, 278-292] (3.02g, 10mmol)、LiHMDS (1M, 在THF中, 4mL, 4mmol) 的溶液生成标题化合物, 为橙色固体 (2.65g, 51%)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.68 (br. s., 1H), 12.57 (s, 1H), 7.55 (dd,  $J=5.2, 2.0\text{Hz}$ , 1H), 7.40-7.32 (m, 1H), 7.23 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 7.04-6.93 (m, 3H), 6.85 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 5.37 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.30-3.19 (m, 4H), 2.69-2.58 (m, 4H), 2.39 (s, 3H); MS ESI  $[\text{M}+\text{H}]^+ 502.1$ , 计算的  $[\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}+\text{H}]^+ 502.2$ 。

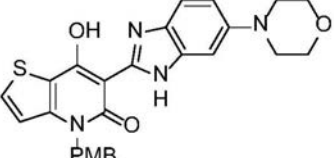
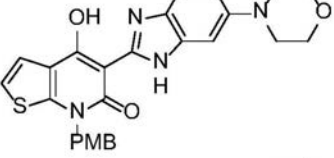
[0183] 4-羟基-7-(4-甲氧基苄基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮



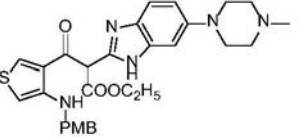
按照一般方法A2, 利用1-(4-甲氧基苄基)-1H-噻吩并[2,3-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮 (0.40 g, 1.4 mmol)、2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.46 g,

1.5mmol) 和LDA (1M, 在THF中, 6.2mL, 4.5mmol) 的溶液生成标题化合物, 为褐色固体 (0.220g, 32%)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.87 (br. s., 1H), 12.52 (s, 1H), 7.49 (dd,  $J=14.9\text{Hz}$ , 1H), 7.40-7.24 (m, 3H), 7.03-6.64 (m, 5H), 5.28 (d,  $J=13.8\text{Hz}$ , 2H), 3.76 (s, 3H), 3.21 (d,  $J=18.8\text{Hz}$ , 4H), 2.65 (m, d,  $J=19.1\text{Hz}$ , 4H), 2.41 (s, 3H); MS ESI  $[\text{M}+\text{H}]^+ 502.3$ , 计算的  $[\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}+\text{H}]^+ 502.2$ 。



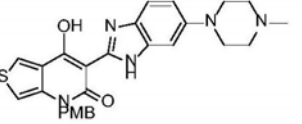
	7-羟基-4-(4-甲氧基苄基)-6-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		325 mg (48%) 褐色固体; 游离碱
[0185]	试剂 (一般方法 A1): 1-(4-甲氧基苄基)-1H-噻吩并[3,2-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮 [Tetrahedron (1999) 55 6167-6174] (0.4 g, 1.4 mmol)、2-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 [J.Med.Chem. (2009), 52, 278-292] (0.4 g, 1.4 mmol)、LiHMDS (5.5 mL, 5.5 mmol)	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 13.73-13.60 (m, 1H), 12.64-12.52 (m, 1H), 7.54 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 7.42-7.29 (m, 2H), 7.21 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.03-6.89 (m, 2H), 6.85 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 5.37 (br. s, 2H), 3.83-3.98 (m, 4H), 3.77 (s, 3H), 3.23-3.09 (m, 4H); MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ 489.2, 计算的 $[\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$ 489.2.	
	4-羟基-7-(4-甲氧基苄基)-5-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		445 mg (24%) 褐色固体; 游离碱
	试剂 (一般方法 A1): 1-(4-甲氧基苄基)-1H-噻吩并[2,3-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮 (0.40 g, 1.4 mmol)、2-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.4 g, 1.4 mmol)、LDA (17 mL, 17 mmol)。MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ 489.2, 计算的 $[\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$ 489.1.		

[0186] 3-(4-((4-甲氧基苄基)氨基)噻吩-3-基)-2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-3-氧丙酸乙酯

[0187]  在 40℃ 下, 在 Ar 下, 向 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (2.58 g, 8.55 mmol) 和 1-(4-甲氧基苄基)-1H-噻吩并[3,4-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮 (2.46 g, 8.55 mmol) 的 anH THF (48 mL) 溶液滴加 1

M LDA (34mL, 1M, 在 THF/己烷中, 34mmol)。所得褐色溶液在 40℃ 下搅拌 1h, 然后在 rt 下通过 aq  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50mL) 猝灭。将反应混合物用  $\text{H}_2\text{O}$  (50mL) 稀释, 并用 DCM (2x 200mL) 萃取。将组合的有机层用  $\text{H}_2\text{O}$  洗涤一次, 在  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上干燥, 和浓缩, 以给出粗酯。通过快速色谱法 (梯度: EtOAc/hex 0-40%, 然后 MeOH/DCM 0-25%) 纯化粗产物, 以给出标题化合物, 为淡褐色固体 (3.05g, 65%)。MS ESI  $[\text{M}+\text{H}]^+$  548.2, 计算的  $[\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$  548.2。

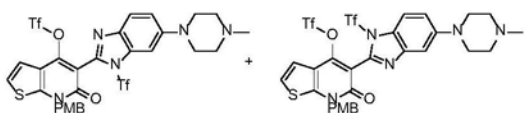
[0188] 4-羟基-1-(4-甲氧基苄基)-3-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮

[0189]  在 rt 下, 在 Ar 下, 将上述 3-(4-((4-甲氧基苄基)氨基)噻吩-3-基)-2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-3-氧丙酸乙酯 (3.05 g, 5.57 mmol) 溶解于 anH THF

(30mL) 中。在 40℃ 下滴加 LDA 溶液 (16.8mL, 1M, 在 THF/己烷中, 16.71mmol)。将所得褐色溶液在 40℃ 下搅拌 1h, 然后在 rt 下通过 aq  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (25mL) 猝灭。将混合物用  $\text{H}_2\text{O}$  (25mL) 稀释, 和用 DCM (2x250mL) 萃取。将组合的有机层用  $\text{H}_2\text{O}$  洗涤一次, 在  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上干燥, 和浓缩, 以给出粗产物。通过快速色谱法纯化粗产物 (梯度: MeOH/DCM 0-20%), 以给出标题化合物, 为淡褐色固体 (1.81g, 65%)。  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13.8-13.25 (m, 1H), 8.13 (d,  $J=3.6$  Hz, 1H), 7.58 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 7.36-7.29 (m, 3H), 7.06-7.02 (m, 1H), 6.97 (d,  $J=3.6$  Hz, 1H), 6.86

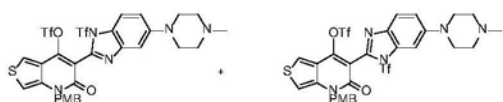
(d, J=8.4Hz, 2H), 5.19 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.16 (br. s, 4H), 2.60 (br. s, 4H), 2.31 (s, 3H); a signal due to OH group cannot be readily detected. MS ESI 502.1 [M+H]<sup>+</sup>, 计算的 [C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S+H]<sup>+</sup> 502.2。

[0190] 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6)-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯

[0191]  利用 4-羟基-7-(4-甲氧基苄基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮

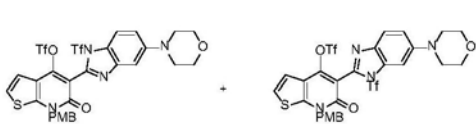
(0.22g, 0.44mmol)、Tf<sub>2</sub>O (0.60mL, 3.5mmol)、和吡啶 (0.72mL, 8.8mmol) 按照一般方法B合成。将作为不明确的区域异构体混合物获得的标题化合物不经纯化用于下一个步骤。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 766.1, 计算的 [C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 766.1。

[0192] 1-(4-甲氧基苄基)-3-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]-咪唑-2-基)-2-氧-1,2-二氢噻吩并[3,4-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯

[0193]  按照一般方法 B, 将 4-羟基-1-(4-甲氧基苄基)-3-(6-(4-甲基哌嗪-1-

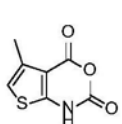
基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮 (220mg, 0.43mmol) 和吡啶 (708mL, 8.76mmol) 的 DCM (12mL) 溶液加入 -5℃ 的 Tf<sub>2</sub>O (558mL, 3.50mmol)。将反应在 -5 和 0℃ 之间搅拌 1h。通过饱和 aq NaHCO<sub>3</sub> 使反应猝灭。用 DCM 萃取含水层, 并将组合的有机萃取物在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥, 和在真空下浓缩, 以给出深褐色油。作为不明确的区域异构体混合物获得的粗产物不经进一步纯化直接用于下一个步骤。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 766.0, 计算的 [C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 766.1。

[0194] 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-吗啉基-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯

[0195]  按照一般方法 B, 将 4-羟基-7-(4-甲氧基苄基)-5-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (200 mg,

0.41mmol) 和吡啶 (0.66mL, 8.2mmol) 的 DCM (20mL) 溶液加入 0℃ 的 Tf<sub>2</sub>O (0.55mL, 3.28mmol)。将反应混合物在 0℃ 下搅拌 2h, 然后使其通过饱和 aq NaHCO<sub>3</sub> 猝灭。用 DCM 萃取含水层。将组合的有机萃取物在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥, 和浓缩, 以给出粗制标题化合物 (两种区域异构体的混合物), 为褐色油, 考虑到定量产率, 将该粗制标题化合物不经进一步纯化直接用于后续步骤。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 753.0, 计算的 [C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 752.9。

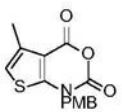
[0196] 5-甲基-1H-噻吩并[2,3-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮

[0197]  在 rt 下向 KOH (0.49 g, 8.76 mmol) 的 H<sub>2</sub>O (20 mL) 溶液添加 2-氨基-4-甲基-3-噻吩羧酸甲酯 (1.0 g, 5.84 mmol)。将所得反应加热至 90℃ 达 2 h, 然后冷却至 0℃。经 10 min 滴加三光气 (0.866 g, 2.92mmol) 的 PhMe (12mL) 溶液。使所得溶液逐渐升温至 rt, 并搅拌 2h。将所得固体过滤, 用 H<sub>2</sub>O 洗涤和干燥, 以提供标题化合物, 为淡粉色固体 (0.65g, 61%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ

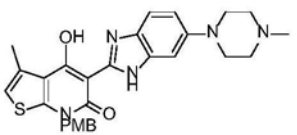


6.65 (d,  $J=1.2\text{Hz}$ , 1H), 2.42 (d,  $J=1.2\text{Hz}$ , 3H); MS ESI  $[M+H]^+$  184.0, 计算的  $[C_7H_5NO_3S+H]^+$  184.0。

[0198] 1-(4-甲氧基苄基)-5-甲基-1H-噻吩并[2,3-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮

[0199]  在 rt 下, 在搅拌下, 向 5-甲基-1H-噻吩并[2,3-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮 (0.625 g, 3.41 mmol) 的 anhydrous DMF (9 mL) 溶液添加  $K_2CO_3$  (0.566 g, 4.09 mmol), 然后 KI (0.142 g, 0.85 mmol)。将 PMB-Cl (0.56 mL, 4.06 mmol) 经 10 min 滴加至反应, 并再搅拌 2 h。将反应混合物倒入  $H_2O$  (100 mL) 中以沉淀产物, 将该产物过滤, 用  $H_2O$  洗涤, 和干燥, 以提供标题化合物, 为淡褐色固体 (0.935 g, 91%)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.38 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 6.90-6.88 (m, 2H), 6.46 (d,  $J=1.2\text{Hz}$ , 1H), 5.05 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.42 (d,  $J=1.2\text{Hz}$ , 3H); MS ESI  $[M+H]^+$  304.2, 计算的  $[C_{15}H_{13}NO_4S+H]^+$  304.1。

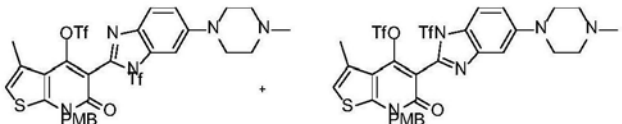
[0200] 4-羟基-7-(4-甲氧基苄基)-3-甲基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮

[0201]  在  $40^\circ\text{C}$  下, 在 Ar 下, 将 LDA (34 mL, 1 M, 在 THF/己烷中, 34 mmol) 的溶液滴加至 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (922 mg, 3.04 mmol)

和 1-(4-甲氧基苄基)-5-甲基-1H-噻吩并[2,3-d][1,3]噁嗪-2,4-二酮 (925 mg, 3.04 mmol) 的 anhydrous THF (28 mL) 溶液。将所得褐色溶液在  $40^\circ\text{C}$  下搅拌 2 h, 然后在 rt 下通过 aq.  $NH_4Cl$  (25 mL) 猝灭。将反应混合物用  $H_2O$  (25 mL) 稀释, 和用 DCM (2x 100 mL) 萃取。将组合的有机层用  $H_2O$  洗涤一次, 在  $Na_2SO_4$  上干燥, 和浓缩, 以给出产物和未环化的酯的混合物。通过快速色谱法 (梯度: EtOAc/hex 0-40%、然后 MeOH/DCM 0-25%) 纯化粗制物, 以给出产物和未环化的酯的混合物 (900 mg)。

[0202] 在 rt 下, 在 Ar 下, 将上述产物和未环化的酯的混合物 (900 mg) 溶解于 anhydrous THF (9 mL) 中。在  $40^\circ\text{C}$  下滴加 LDA (5 mL, 1 M, 在 THF/己烷中) 溶液。将所得褐色溶液在  $40^\circ\text{C}$  下搅拌 1 h, 并按照以上方法对其进行处理, 以给出粗产物。通过快速色谱法 (梯度: MeOH/DCM 0-20%) 纯化粗产物, 以给出标题化合物, 为乳膏状固体 (325 mg, 21%)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  12.54 (s, 1H), 7.38 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 7.33 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 2H), 7.01-6.98 (m, 2H), 6.85 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 6.40 (s, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.80-3.61 (m, 6H), 3.60-3.51 (m, 4H), 2.89-2.88 (m, 4H), 2.63 (s, 3H); OH 基团导致的信号无法容易被检测到。MS ESI  $[M+H]^+$  516.2, 计算的  $[C_{28}H_{29}N_5O_3S+H]^+$  516.2。

[0203] 7-(4-甲氧基苄基)-3-甲基-5-(5和/或6)-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯

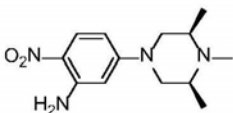
[0204]  利用 DCM (12 mL) 中的 4-羟基-7-(4-甲氧基苄基)-3-甲基

-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (320 mg, 0.62 mmol)、吡啶 (1.0 mL, 12.4 mmol)、 $Tf_2O$  (0.833 mL, 4.96 mmol), 按照一般方法 B 制备标题化

合物,以给出深褐色油。将作为2种区域异构体的不明确混合物获得的粗产物不经进一步纯化直接用于下一个步骤。MS ESI  $[M+H]^+$ 780.0,计算的  $[C_{30}H_{27}F_6N_5O_7S_3+H]^+$ 780.1。

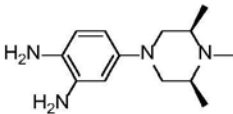
[0205] 2-(6-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0206] A.2-硝基-5-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)苯胺

[0207]  将 5-氯-2-硝基苯胺 (1.73 g, 10 mmol)、(3r,5s)-rel-1,2,6-三甲基哌嗪 (1.41 g, 11 mmol) 和  $K_2CO_3$  (2.72 g, 20 mmol) 的混合物在微波中在 140°C 下照射 4 h。然后添加  $H_2O$  (150 mL)

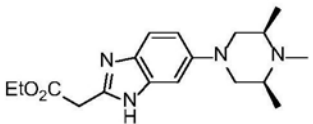
并伴随搅拌,抽吸过滤,用 $H_2O$ 漂洗,和干燥,以给出标题化合物,为褐色固体 (2.47g, 94%)。  $^1H$  NMR (400MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ 7.79 (d,  $J=10.0$ Hz, 1H), 7.23 (s, 2H,  $NH_2$ ), 6.41 (dd,  $J=9.6$ , 1.6Hz, 1H), 6.20 (d,  $J=2.4$ Hz, 1H), 3.77 (d,  $J=12.4$ Hz, 2H), 2.59 (t,  $J=11.8$ Hz, 2H), 2.19-2.11 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.05 (d,  $J=6.0$ Hz, 6H); MS ESI  $[M+H]^+$ 265.3, 计算的  $[C_{13}H_{20}N_4O_2+H]^+$ 265.2。

[0208] B.4-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)苯-1,2-二胺

[0209]  向 2-硝基-5-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)苯胺 (2.47 g, 9.4 mmol) 的 MeOH (30 mL) 悬浮液添加 10% Pd/C (247 mg, 10% wt.)。将所得混合物在  $H_2$  球囊 O/N 下氢化。在添加

另外的10%Pd/C (124mg, 5%wt.) 后,将其在 $H_2$ 球囊O/N下氢化,过滤,浓缩和干燥,以给出标题化合物,为深褐色固体 (2.25g, 定量)。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ 6.66 (d,  $J=8.4$ Hz, 1H), 6.47 (d,  $J=2.4$ Hz, 1H), 6.31 (dd,  $J=8.4$ , 2.8Hz, 1H), 3.35-3.25 (m, 2H), 2.47-2.40 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 1.18 (d,  $J=5.6$ Hz, 6H); MS ESI  $[M+H]^+$ 235.3, 计算的  $[C_{13}H_{22}N_4+H]^+$ 235.2。

[0210] C.2-(6-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0211]  向 4-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)苯-1,2-二胺 (2.25g, 9.4 mmol) 的 EtOH (40 mL) 溶液添加 3-乙氧基-3-亚氨基丙酸盐酸乙酯 (2.93 g, 15 mmol)。将所得

混合物在 80°C 下加热 2h。在去除溶剂后,将其用 DCM/MeOH (100mL/10mL) 稀释,用饱和 aq  $NaHCO_3$  (30mL) 碱化,和分离。用 DCM (60mLx2) 萃取含水层,并将组合的萃取物浓缩和通过快速色谱法(梯度:100%EtOAc,然后 MeOH/DCM 0-20%) 纯化,以给出标题化合物,为深橙色固体 (2.32g, 73%)。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ 10.13 (br s, 1H, NH), 7.53-6.88 (m, 3H), 4.25 (q,  $J=7.2$ Hz, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.43 (d,  $J=11.2$ Hz, 2H), 2.61 (t,  $J=11.2$ Hz, 2H), 2.50-2.41 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.32 (t,  $J=7.2$ Hz, 3H), 1.19 (d,  $J=6.0$ Hz, 6H); MS ESI  $[M+H]^+$ 331.3, 计算的  $[C_{18}H_{26}N_4O_2+H]^+$ 331.2。

[0212] 7-羟基-4-(4-甲氧基苄基)-6-(6-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮

[0213]

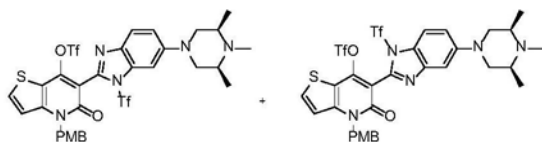


在 rt 下向 1-(4-甲氧基苄基)-1H-噻吩并[3,2-d][1,3] 嘧啶-2,4-二酮 (1.16g, 4 mmol) 和 2-(6-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (990 mg, 3 mmol) 在 THF (20 mL) 中的混合物滴加 LDA

(1.0M, 在 THF/hex 中, 10mL, 10mmol)。在加入后, 将所得混合物在 40℃ 下搅拌 1h, 用 DCM 稀释, 用饱和 aq  $\text{NH}_4\text{Cl}$  猝灭, 和用 DCM 萃取。将组合的萃取物浓缩和通过快速色谱法 (梯度: 20-100% EtOAc/hex, 然后 MeOH (0.5%  $\text{NH}_3$ ) /DCM 0-20%) 纯化, 以给出环化的和未环化的产物的混合物, 为褐色泡沫 (1.10g)。将混合物重新溶解于 THF (15mL) 中, 并在 rt 下滴加 LDA (1.0M, 在 THF/hex 中, 6mL, 6mmol)。方法和处理均同上。获得标题化合物, 为作为橙色固体 (630mg, 40%)。MS ESI  $[\text{M}+\text{H}]^+ 530.3$ , 计算的  $[\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}+\text{H}]^+ 530.2$ 。

[0214] 4-(4-甲氧基苄基)-5-氧-6-(1-((三氟甲基)磺酰基)-(5和/或6)-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯

[0215]

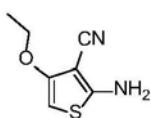


按照一般方法 B, 向 0℃ 的 7-羟基-4-(4-甲氧基苄基)-6-(6-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基-哌嗪

-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (106mg, 0.2mmol) 的 DCM (15mL) 溶液添加吡啶 (0.32mL, 4mmol), 然后  $\text{Tf}_2\text{O}$  (0.27mL, 1.2mmol)。将所得混合物在 0℃ 下搅拌 1h, 用 DCM (10mL) 稀释, 通过饱和 aq  $\text{NaHCO}_3$  (15mL) 猝灭, 用 DCM (20mLx2) 萃取, 和浓缩, 以给出粗制标题化合物 (两种区域异构体的不明确混合物), 为褐色油, 该粗制标题化合物直接用于后续步骤。MS ESI  $[\text{M}+\text{H}]^+ 794.1$ , 计算的  $[\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{F}_6\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_3+\text{H}]^+ 794.11$ 。

[0216] 2-氨基-4-乙氧基噻吩-3-腈的合成

[0217]

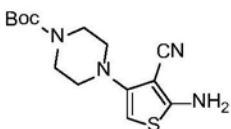


将  $\text{MeC(OMe)}_3$  (2.26 mL, 12.3 mmol) 和  $\text{CH}_2(\text{CN})_2$  (0.78 mL, 12.3 mmol) 的混合物在 65℃ 下搅拌 3 h, 然后冷却降至 rt。添加 THF (10 mL) 和硫 (395 mg), 然后滴加  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.72 mL, 12.3 mmol)。

将所得反应混合物在 60℃ 下搅拌 15min, 和在减压下浓缩。将残留物在 EtOAc 和  $\text{H}_2\text{O}$  之间分配, 用 EtOAc 萃取, 在  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上干燥, 过滤, 和浓缩至干燥。将残留物与 DCM 一起研制和过滤, 以给出标题化合物, 为褐色固体 (1.23g, 60%)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  5.27 (s, 1H), 3.99 (q,  $J=7.0\text{Hz}$ , 2H), 1.38 (t,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H); MS ESI  $[\text{M}+\text{H}]^+ 169.0$ , 计算的  $[\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{OS}+\text{H}]^+ 169.0$ 。

[0218] 4-(5-氨基-4-氰基噻吩-3-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0219]

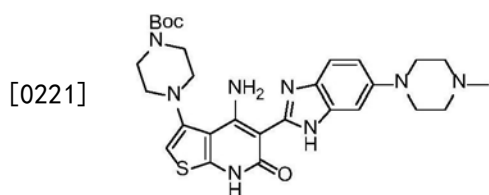


将  $\text{MeC(OMe)}_3$  (1.3 mL, 10 mmol) 和  $\text{CH}_2(\text{CN})_2$  (0.66 g, 10 mmol) 的混合物在封闭小瓶中在 80℃ 下加热 17 h。使反应冷却至 rt, 并添加哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (2.79 g, 15.0 mmol)。

加热伴随搅拌在 65℃ 下持续 5h。然后将反应混合物在真空中浓缩。添加  $\text{S}_8$  (0.34g) 和 anhydrous THF (10mL)。将悬浮液在 40℃ 下加热, 伴随搅拌。经 15min 滴加  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.3mL, 9.3mmol)。将油浴温度增加至 60℃, 并持续搅拌 11h。然后使反应在减压下浓缩和通过快速色谱法 ( $\text{SiO}_2$ , 己烷:EtOAc 5-50%) 纯化, 提供 4-(5-氨基-4-氰基噻吩-3-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯, 为淡橙色

固体 (0.71g, 23%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.12 (s, 2H), 5.46 (s, 1H), 3.45-3.37 (m, 4H), 2.90-2.81 (m, 4H), 1.40 (s, 9H)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup>309.3, 计算的 [C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup>309.1。

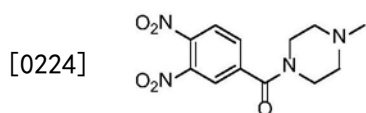
[0220] 4-(4-氨基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并-[2,3-b]吡啶-3-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯



在 Ar 下将 LiHMDS (1.0 M, 在 THF 中, 2.8 mL, 2.8 mmol) 在 rt 下滴加至搅拌中的 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.170 g, 0.56 mmol) 和 4-(5-氨基-4-氰基噻吩-3-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (0.175g, 0.56mmol) 的 THF (10mL) 悬浮液。将反应在 rt 下再搅拌 5min, 然后在 40℃ 的油浴中加热 1h。使反应冷却至 rt, 通过饱和 aq. NH<sub>4</sub>Cl 猝灭, 在减压下浓缩, 和通过快速色谱法 (MeOH/DCM 0-20%) 纯化, 以给出标题化合物, 为淡棕色 (light tan) 固体 (83mg, 26%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ7.45 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.10 (d, J=2.3Hz, 1H), 7.03 (dd, J=8.8, 2.3Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 3.62-3.50 (m, 4H), 3.24-3.18 (m, 4H), 3.05-2.98 (m, 4H), 2.75-2.67 (m, 4H), 2.41 (s, 3H), 1.49 (s, 9H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup>565.3, 计算的 [C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S+H]<sup>+</sup>565.4。

[0222] 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

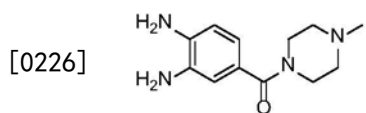
[0223] A. (3,4-二硝基苯基)(4-甲基哌嗪-1-基)甲酮



向 rt 下的 3,4-二硝基苯甲酸 (1.23 g, 5.8 mmol) 的 anhydrous DCM (20 mL) 悬浮液滴加草酰氯 (1.0 mL, 11.7 mmol), 然后 anhydrous DMF (2滴)。

使反应搅拌过夜, 然后在 rt 下浓缩。在 Ar 下, 在 0℃ 下, 将残留物溶解于 anhydrous THF (40mL) 中。滴加 1-甲基哌嗪 (1.3mL, 11.7mmol) (通过间歇振荡搅拌浓稠白色悬浮液)。在添加后, 持续冷却 10min, 然后移除冷却浴。在将反应在 rt 下搅拌 3h 后, 添加 H<sub>2</sub>O。在减压下去除 THF, 并萃取含水残留物 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中 2% 的 MeOH, 2x)。将组合的有机萃取物在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥和在减压下浓缩, 以提供 (3,4-二硝基苯基)(4-甲基哌嗪-1-基)甲酮, 为淡橙色固体 (1.77g, quant)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.29 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.27 (d, J=1.5Hz, 1H), 7.97 (dd, J=8.3, 1.8Hz, 1H), 3.59-3.68 (m, 2H), 3.24-2.53 (m, 2H), 2.42-2.35 (m, 2H), 2.21-2.32 (m, 2H), 2.20 (s, 3H)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup>295.2, 计算的 [C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>+H]<sup>+</sup>295.1。

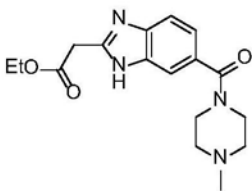
[0225] B. (3,4-二氨基苯基)(4-甲基哌嗪-1-基)甲酮



用 N<sub>2</sub> 使 (3,4-二硝基苯基)(4-甲基哌嗪-1-基)甲酮 (0.53 g, 1.8 mmol) 的 THF (25 mL) 和 EtOH (50 mL) 溶液脱气。添加 Pd/C (191mg, 0.18mmol), 并将反应在 rt 下在 H<sub>2</sub> (1atm) 下搅拌过夜。然后使反应混合物通过 C 盐过滤和在减压下浓缩, 以提供 (3,4-二氨基苯基)(4-甲基哌嗪-1-基)甲酮, 为紫色固体 (0.44g, quant)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ6.61-6.55 (m, 1H), 6.47-6.45 (m, 2H), 4.81 (br. s, 2H), 4.58 (br. s, 2H), 3.50-3.39 (m, 4H), 2.34-2.22 (m, 4H), 2.18 (s, 3H)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup>235.1, 计算的 [C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O+H]<sup>+</sup>235.1。

[0227] C. 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0228]



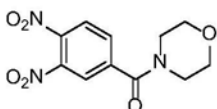
将在 Ar 下 anh EtOH (100 mL) 中的(3,4-二氨基苯基)(4-甲基哌嗪-1-基)甲酮 (0.44 g, 1.8 mmol) 和 3-乙氧基-3-亚氨基丙酸盐盐酸酯 (1.07 g, 5.5 mmol) 加热并在 65°C 下搅拌过夜。然后将反应混合物在减压下浓缩。将残留物置于 H<sub>2</sub>O

(15mL) 中,用10%aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>中和,用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x) 萃取,洗涤(盐水)和在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥。通过快速色谱法(0-50%MeOH,在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中)的纯化提供了标题化合物,为黄色泡沫(0.31g,52%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ7.71-7.57 (m, 2H), 7.33 (d, J=8.2Hz, 1H), 4.23 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.91-3.40 (m, 4H), 2.62-2.38 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 1.28 (t, J=7.1Hz, 3H); CH<sub>2</sub>-酯导致的信号于CD<sub>3</sub>OD中不存在。MS ESI [M+H]<sup>+</sup>331.2, 计算的[C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>331.2。

[0229] 2-(6-(吗啉-4-羰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0230] A. (3,4-二硝基苯基)(吗啉基)甲酮

[0231]

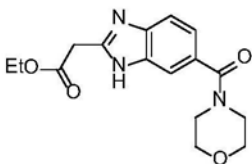


向rt下的3,4-二硝基苯甲酸 (1.30 g, 6.1 mmol) 的anh DCM (50 mL) 悬浮液滴加(COCl)<sub>2</sub> (1.0 mL, 11.7 mmol), 然后anh

DMF (2滴)。将反应搅拌过夜,然后在rt下浓缩。在Ar下,将残留物溶解于0°C的anh THF (24mL) 中。滴加吗啉 (1.0mL, 11.6mmol) (通过间歇振荡,搅拌浓稠白色悬浮液)。在添加后,持续冷却10min,然后移除冷却浴。在将反应在rt下搅拌3h后,添加H<sub>2</sub>O。在减压下去除THF,并萃取含水残留物(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>·2x)。将组合的有机萃取物干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)和在减压下浓缩,以提供(3,4-二硝基苯基)(吗啉基)甲酮,为淡橙色固体(1.8g, quant)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.28-8.31 (m, 2H), 8.00 (dd, J=8.28, 1.76Hz, 1H), 3.39-3.80 (m, 8H)。

[0232] B. 2-(6-(吗啉-4-羰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0233]



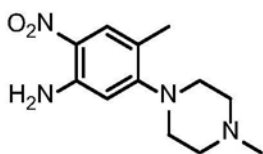
用 N<sub>2</sub> 使(3,4-二硝基苯基)(吗啉基)甲酮 (0.83 g, 2.9 mmol) 的 THF (30 mL) 和 EtOH (60 mL) 溶液脱气。添加 Pd/C (0.31 mg, 0.29 mmol), 并将反应在 H<sub>2</sub> (1 atm) 下在 rt 下搅拌过夜。然后将反应混合物通过 C 盐过滤和在减压下浓缩,以提供(3,4-二氨基苯基)(吗啉基)甲酮,为紫色泡沫。LCMS (ESI) m/z 计算的

[C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>222.1;实际222.2。将该材料和3-乙氧基-3-亚氨基丙酸盐盐酸酯(1.2g, 6.2mmol)在anh EtOH(100mL)中在Ar下加热并在65°C下搅拌过夜。然后将反应混合物在减压下浓缩。通过快速色谱法(0-20%MeOH,在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中)的纯化提供了标题化合物,为淡红色泡沫(0.43g,47%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ7.52-7.76 (m, 2H), 7.33 (dd, J=8.28, 1.51Hz, 1H), 4.22 (q, J=7.19Hz, 2H), 4.00-4.05 (m, 2H), 3.70 (br. s., 8H), 1.28 (t, J=7.15Hz, 3H); CH<sub>2</sub>-酯导致的信号于CD<sub>3</sub>OD中不存在;MS ESI [M+H]<sup>+</sup>318.2, 计算的[C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>318.1。

[0234] 2-(5-甲基-6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0235] A. 4-甲基-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺

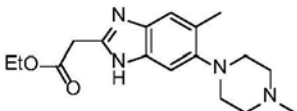
[0236]



将5-氯-4-甲基-2-硝基苯胺 (0.32 g, 1.7 mmol) 和1-甲基哌嗪 (1.5 mL, 13.5 mmol) 在密封管中在80°C下加热 30 min, 然后在105°C下加热1 d, 和在120°C下加热2 d。然后使反应冷却,用H<sub>2</sub>O稀释,和过滤。将收集的固体用H<sub>2</sub>O

漂洗和在真空中干燥,以提供标题化合物,为黄色固体(0.36g,84%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.72(s,1H),7.27(s,2H),6.44(s,1H),2.97-2.86(m,4H),2.49-2.39(m,4H), 2.22(s,3H),2.11(s,3H)。LCMS(ESI)m/z计算的[C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>251.1;实际235.3。

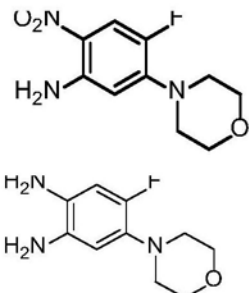
[0237] B.2-(5-甲基-6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0238]  将 EtOH (50 mL)、THF (25 mL) 中的 4-甲基-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺 (0.36 g, 1.4 mmol) 和 Pd/C

(10%、81mg,0.08mmol)用N<sub>2</sub>脱气,然后在H<sub>2</sub>(1atm)下搅拌5d。将反应混合物通过C盐过滤,滤饼用EtOH漂洗。将滤液在减压下浓缩,以提供4-甲基-5-(4-甲基哌嗪-1-基)苯-1,2-二胺,为黄褐色固体(0.35g,quant)。将在Ar下anh EtOH(70mL)中的该材料(0.35g)和3-乙氧基-3-亚氨基丙酸盐乙酯(0.81g,4.1mmol)加热并在65℃下搅拌过夜。然后将反应混合物在减压下浓缩,置于H<sub>2</sub>O(20mL)中,和用2M aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>碱化至pH 9。用DCM(2x)萃取混合物;将有机萃取物干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)和在减压下浓缩。通过快速色谱法(0-30%MeOH,在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中)的纯化提供了标题化合物,为黄色泡沫(0.36g,82%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CD<sub>3</sub>OD) δ7.35(s,1H),7.25(s,1H),4.22(q,J=7.09Hz,2H),2.95-3.03(m,4H),2.88-2.58(m,4H),2.43(s,3H),2.41(s,3H),1.28(t,J=7.09Hz,3H);CH<sub>2</sub>-酯导致的信号于CD<sub>3</sub>OD中不存在;LCMS(ESI)m/z计算的[C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>317.2;实际317.3。

[0239] 2-(5-氟-6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0240] A.4-氟-5-吗啉基-2-硝基苯胺

[0241]  将 5-氯-4-氟-2-硝基苯胺(1.0 g, 5.24 mmol)、吗啉(1.37 mL, 15.7 mmol)和 DMSO(5 mL)的混合物在油浴 140℃ 中加热 3 h。然后添加 H<sub>2</sub>O(50 mL),并在 80℃ 下搅拌以沉淀产物,使悬浮液达到 rt,抽吸过滤,用 H<sub>2</sub>O 洗涤,和干燥,以给出标题化合物,为黄色固体(1.25 g, 94%)。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.17(d,J=14.0 Hz,1H),6.37(d,J=8.0 Hz,1H),

3.83(t,J=4.4Hz,4H),3.22(t,J=4.8Hz,4H);MS ESI[M+H]<sup>+</sup>242.1,计算的[C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>242.1。

[0242] B.4-氟-5-吗啉基苯-1,2-二胺

[0243] 在Ar覆盖下在rt下向100mL圆底烧瓶装填4-氟-5-吗啉基-2-硝基苯胺(1.23g)和 MeOH(37mL)。在rt下,在搅拌下小心添加雷尼镍(0.123g)。将反应物质缓慢加热至60-65°,并将胂水合物(0.86mL)在约5min内滴加至反应物质。将反应在65-70℃下搅拌2hrs。在反应完成后,使其冷却至rt,并将催化剂在Ar下通过C盐滤饼过滤,和用MeOH(5mL\*2)洗涤C盐滤饼。将组合的滤液浓缩和通过快速色谱法(梯度:MeOH/DCM 0-25%)纯化,以给出标题化合物,为淡褐色固体(0.615g,57%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CD<sub>3</sub>OD) δ6.51-6.47(m,2H),3.81(t,J=4.8Hz,4H),2.93(t,J=4.8Hz,4H);MS ESI[M+H]<sup>+</sup>212.0,计算的[C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O+H]<sup>+</sup>212.1。

[0244] C.2-(5-氟-6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

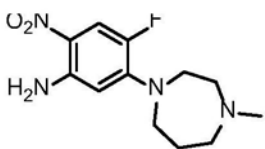
[0245] 向65℃的4-氟-5-吗啉基苯-1,2-二胺(0.615g,2.91mmol)的EtOH(30mL)溶液添加两等份的3-乙氧基-3-亚氨基丙酸盐乙酯(1.14g,5.82mmol),各以5min间隔。然后将反应

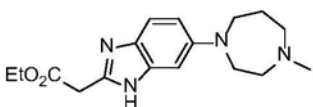


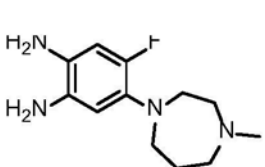
物质在65℃下搅拌2hrs。在反应完成后,在减压下浓缩反应物质,留下浓稠褐色油。向所得油H<sub>2</sub>O (25mL)添加2M aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>并利用2M aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节pH~10。用DCM (30mL\*2)萃取所得混合物,并将组合的萃取物浓缩和通过快速色谱法(梯度:Hex/EtOAc 0-40%,然后MeOH/DCM 0-20%)纯化,以给出标题化合物,为褐色固体(0.786g,88%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.26 (d, J=12.4Hz, 1H), 7.19 (d, J=7.6Hz, 1H), 4.25-4.20 (m, 2H), 3.88 (t, J=4.4Hz, 4H), 3.08 (t, J=4.8Hz, 4H), 1.28 (t, J=7.2Hz, 3H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 308.1.0, 计算的[C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 308.1。

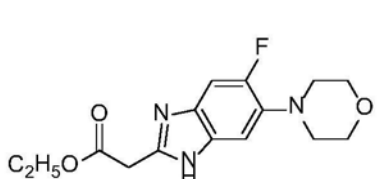
[0246] 2-(6-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0247] A. 5-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-硝基苯胺

[0248]  将5-氯-2-硝基苯胺(8.63 g, 50 mmol)、1-甲基-1,4-二氮杂环庚烷(6.85 g, 60 mmol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(8.28 g, 60 mmol)的混合物在90℃下加热20 h。在用H<sub>2</sub>O (500 mL)稀释后,将其用EtOAc (60mL x 3)萃取,浓缩和干燥,以给出粗制5-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-硝基苯胺,为深红色油(12.50g)。NMR指示产物和5-氯-2-硝基苯胺(2:1)的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.72 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.26 (dd, J=9.8, 2.6Hz, 1H), 6.02 (d, J=2.4Hz, 1H),

[0249]  3.66-3.63 (m, 2H), 3.58 (t, J=6.4 Hz, 2H), 2.77-2.74 (m, 2H), 2.62-2.59 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.07-2.00 (m, 2H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 251.3, 计算的[C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 251.15。

[0250]  B. 4-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯-1,2-二胺  
向65℃下的粗制5-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-硝基苯胺(12.50 g)和雷尼镍(1.25 g)在MeOH (150 mL)中的混合物经10 min添加N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (12.0 mL)。在添加后,将所得混合物在70℃下搅拌30min。在冷却至rt后,将其通过C盐过滤和用

[0251]  MeOH漂洗。将滤液浓缩和干燥,以给出粗制4-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯-1,2-二胺,为深红褐色油(10.57 g)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6.63 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.53 (dd, J=8.4, 2.4 Hz, 1H), 6.26 (d, J=2.4Hz, 1H), 3.60-3.40 (m, 4H), 2.75-2.71 (m, 2H), 2.62-2.58 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.04-1.97 (m, 2H)。

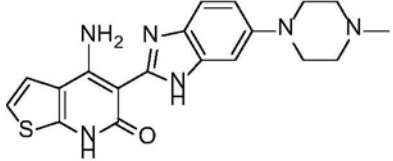
[0252] C. 2-(6-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯

[0253] 将粗制4-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯-1,2-二胺(10.57g)和3-乙氧基-3-亚氨基丙酸盐(19.50g, 100mmol)在EtOH (200mL)中的混合物在90℃下加热2h。在去除溶剂后,将其用H<sub>2</sub>O (50mL)稀释,用2M aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40mL)碱化,和用DCM (60mL x 3)萃取。将组合的萃取物浓缩和通过快速色谱法(梯度:0-100% EtOAc/己烷,然后MeOH/DCM 0-25%)纯化,以给出标题化合物,为深褐色油(7.31g, 46%, 经3步)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.38 (d, J=8.8Hz, 1H), 6.82-6.77 (m, 2H), 4.22 (q, J=6.8Hz, 2H), 3.66-3.61 (m, 2H), 3.54

(t, J=6.4Hz, 2H), 2.85-2.80 (m, 2H), 2.68-2.64 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.12-2.05 (m, 2H), 1.29 (t, J=7.0Hz, 3H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup>317.3, 计算的 [C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>317.20。

[0254] 代表性实施例:

[0255] A1: 4-氨基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮

[0256]  在 Ar 下向 40℃ 的 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (2.42 g, 8.05 mmol) 和 2-氨基噻吩-3-腈 (1.0 g, 8.05 mmol) 的 anhyd THF (40 mL) 溶液经 15 min 滴加 LDA (40 mL, 1 M,

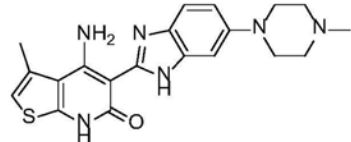
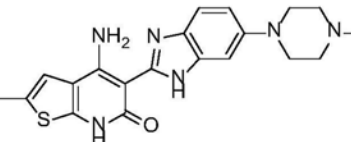
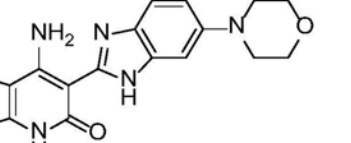
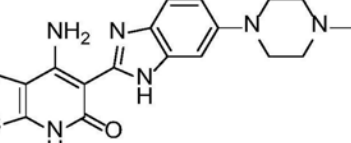
在 THF/己烷中, 40 mmol)。将所得褐色溶液在 40℃ 下搅拌 2h, 然后在 rt 下通过 aq. NH<sub>4</sub>Cl (50 mL) 猝灭。将混合物用 H<sub>2</sub>O (125 mL) 稀释, 并用乙酸乙酯 (2x 200 mL) 萃取。将组合的有机层用 H<sub>2</sub>O 洗涤一次, 在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥, 并浓缩, 以给出粗产物。将粗产物与 DCM (20 mL) 然后 MeOH (25 mL) 一起研制, 以给出标题化合物, 为淡褐色固体 (1.95 g, 64%)。

[0257] 将游离碱 (1.95 g) 悬浮于 MeOH (50 mL) 中, 并在 rt 下添加 1M HCl-Et<sub>2</sub>O (13 mL)。将悬浮液在 rt 下搅拌 15 min, 并在真空下浓缩以及用 MeOH (2x 25 mL) 一起共沸, 以给出 HCl 盐, 为深褐色固体 (2.28 g, 62%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.69 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.52 (d, J=5.6 Hz, 1H), 7.36 (dd, J=8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.30 (d, J=2.4 Hz, 1H), 7.19 (d, J=5.6 Hz, 1H), 3.97-3.93 (m, 2H), 3.70-3.67 (m, 2H), 3.39-3.35 (m, 2H), 3.34-3.18 (m, 2H), 3.01 (s, 3H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup>381.2, 计算的 [C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>OS+H]<sup>+</sup>381.1。

[0258]

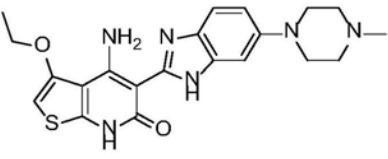
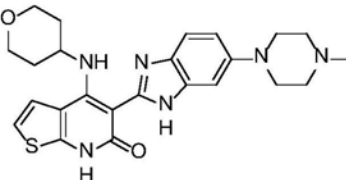
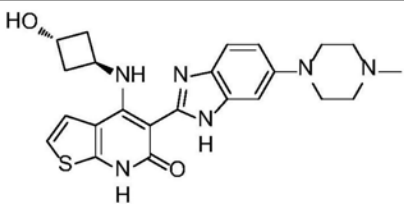
实施例/ IUPAC 名称	结构	产率; 描述; 盐
---------------	----	-----------

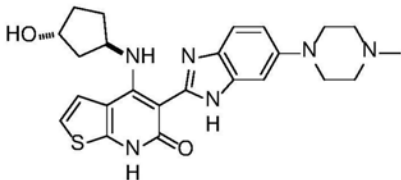
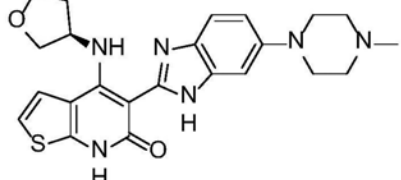
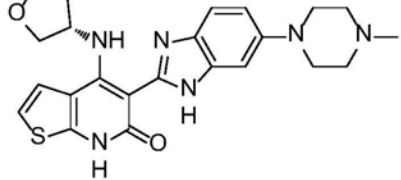


<b>A2:</b> 4-氨基-3-甲基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		64 mg (38%); 灰色固体 2HCl
试剂 (一般方法 A1): 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (110 mg, 0.36 mmol)、2-氨基-4-甲基噻吩-3-腈 (50 mg, 0.36 mmol)、LDA (1.62 mL, 1 M, 在 THF/己烷中, 1.62 mmol)、anh THF (5.0 mL)		
<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.72 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.41(dd, J=8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.33 (d, J=2.0 Hz, 1H), 6.76 (d, J=0.8 Hz, 1H), 3.98-3.94 (m, 2H), 3.70-3.67 (m, 2H), 3.38-3.35 (m, 2H), 3.27-3.21 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.30 (s, 3H); MS 计算; MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 395.3, 计算的[C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> OS+H] <sup>+</sup> 395.1		
<b>A3:</b> 4-氨基-2-甲基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		18 mg (10%); 淡褐色固体 2HCl
试剂 (一般方法 A1): 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (110 mg, 0.36 mmol)、2-氨基-5-甲基噻吩-3-腈 (50 mg, 0.36 mmol)、LDA (1.80 mL, 1 M, 在 THF/己烷中, 1.80 mmol)、anh THF (5.0 mL)		
<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.68 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.38-7.31 (m, 2H), 7.18 (s, 1H), 3.96-3.93 (m, 2H), 3.70-3.67 (m, 2H), 3.40-3.34 (m, 2H), 3.25-3.19 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.52 (s, 3H); MS 计算; MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 395.3, 计算的[C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> OS+H] <sup>+</sup> 395.1		
<b>A4:</b> 4-氨基-5-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		0.51 g (51%); 淡棕色固体; 游离碱
试剂 (一般方法 A1): 在 rt 下在 Ar 下将 LiHMDS (1.0 M, 在 THF 中, 14.3 mL, 14.3 mmol) 经 20 min 滴加至搅拌中的 2-氨基噻吩-3-腈 (0.340 g, 2.73 mmol)、2-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.829 g, 2.86 mmol) 的 anh THF (20 mL) 溶液。将反应在 40℃ 下加热 1 h, 然后冷却至 rt, 通过饱和 aq NH <sub>4</sub> Cl 猝灭, 在减压下浓缩和通过快速色谱法 (MeOH-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0-7 %) 纯化。将小样品通过制备型 HPLC 再次纯化, 以提供 TFA 盐 (淡黄色固体)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 12.18 (s, 1H), 7.59 (d, J=5.7 Hz, 1H), 7.56 (br s, 1H), 7.36-7.24 (br.s, 1H), 7.20 (d, J=5.7 Hz, 1H), 7.17-7.08 (m, 1H), 3.86-3.79 (m, 4H), 3.30-3.18 (m, 4H); 三个可交换的质子可归属于两个非常宽的峰 13.47-12.46 (brs, 1H) 和 9.30-7.67 (brs, 2H), MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 368.2, 计算的[C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 368.1。		
<b>A5:</b> 4-氨基-3-甲氧基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		55 mg (11%); 褐色固体; TFA
试剂 (一般方法 A1): 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (302 mg, 1 mmol)、2-氨基-4-甲氧基噻吩-3-腈 (154 mg, 1 mmol)、LDA (1.0 M, 在 THF/hex 中, 5 mL, 5 mmol)、THF (10 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.70 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.39 (dd, J=9.2, 2.4 Hz, 1H), 7.31 (d,		

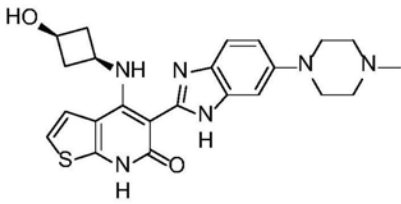
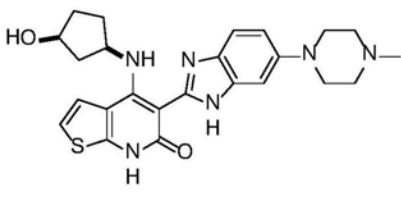
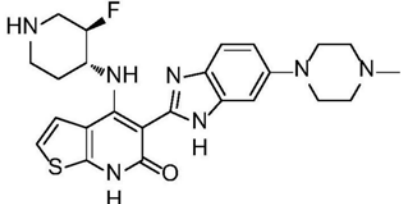
[0259]

[0260]

J=1.6 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 3.98-3.88 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.72-3.64 (m, 2H), 3.38-3.28 (m, 2H), 3.25-3.14 (m, 2H), 2.87 (s, 3H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 411.3, 计算的[C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 411.2。		
<b>A6:</b> 4-氨基-3-乙氧基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		200 mg (61%); 深褐色固体; 2HCl 盐
试剂 (一般方法 A1): 2-氨基-4-乙氧基噻吩-3-腈 (111 mg, 0.66 mmol)、2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (200 mg, 0.66 mmol)、LiHMDS (1 M, 在 THF 中, 2.65 mL, 2.65 mmol)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.72 (d, J=8.7 Hz, 1H), 7.42 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 4.08 (q, J=6.8 Hz, 2H), 3.96 (d, J=11.5 Hz, 2H), 3.68 (d, J=11.8 Hz, 2H), 3.41-3.26 (m, 2H), 3.27-3.16 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 1.42 (t, J=6.8 Hz, 3H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 425.3, 计算的[C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 425.2。		
<b>A7:</b> 5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		35 mg (43%); 褐色固体; TFA
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.11 g, 0.14 mmol)、四氢-2H-吡喃-4-胺 (0.035 g, 0.35 mmol)、DCM (15 mL) 的混合物。MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 717.2, 计算的[C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 717.21。		
步骤2: 试剂 (一般方法D): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (0.10 g, 0.14 mmol)、TFA (7 mL) 和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.65 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.58 (d, J=5.8 Hz, 1H), 7.29 (s, 2H), 7.19 (d, J=6.0 Hz, 1H), 4.02-3.83 (m, 4H), 3.74-3.60 (m, 2H), 3.58-3.46 (m, 1H), 3.43-3.33 (m, 2H), 3.29-3.09 (m, 4H), 3.01 (s, 3H), 2.03-1.90 (m, 2H), 1.85-1.69 (m, 2H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 465.3, 计算的[C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 465.2。		
<b>A8:</b> 4-(((1r,3r)-3-羟基环丁基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		18 mg (16%); 黄色固体; 2 HCl
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.17 g, 0.22 mmol)、(1r,3r)-3-氨基环丁醇 HCl 盐 (0.068 g, 0.55 mmol)、DCM (10 mL) 的混合物。MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 703.2, 计算的[C <sub>32</sub> H <sub>33</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 703.19。		
步骤2: 试剂 (一般方法D): 4-(((1r,3r)-3-羟基环丁基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (0.16 g, 0.22 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.69 (d, J=9.3 Hz, 1H), 7.61 (d, J=6.0 Hz, 1H), 7.37 (dd, J=9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.34-7.29 (m, 1H), 7.20 (d, J=6.0 Hz, 1H), 4.45-4.33 (m, 1H), 4.03-3.90 (m, 3H), 3.76-3.61 (m, 2H), 3.42-3.36 (m, 2H), 3.30-3.18 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.54-2.42 (m, 2H), 2.14-2.03 (m, 2H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 451.3, 计算的[C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 451.2。		

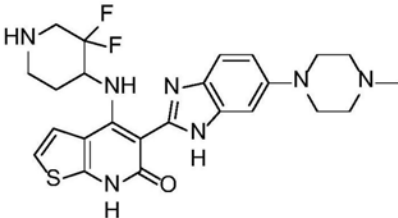
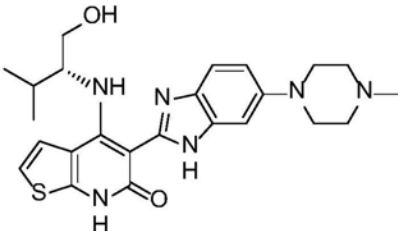
<b>A9:</b> 4-(((1R*,3R*)-3-羟基环戊基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		15 mg (11%); 黄色固体; 2 HCl
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.17 g, 0.22 mmol)、(1R*,3R*)-3-氨基环戊醇 HCl 盐 (0.076 g, 0.55 mmol)、DCM (10 mL) 的混合物。MS ESI $[M+H]^+$ 717.2, 计算的 $[C_{33}H_{35}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 717.21。		
步骤2: 试剂 (一般方法D): 4-(((1R*,3R*)-3-羟基环戊基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (0.16 g, 0.22 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.68 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J=8.8, 2.3$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 4.32-4.24 (m, 1H), 4.01-3.91 (m, 2H), 3.86-3.75 (m, 1H), 3.73-3.64 (m, 2H), 3.41-3.36 (m, 2H), 3.30-3.19 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.06-1.94 (m, 2H), 1.91-1.84 (m, 2H), 1.74-1.62 (m, 1H), 1.47-1.40 (m, 1H); MS ESI $[M+H]^+$ 465.2, 计算的 $[C_{24}H_{28}N_6O_2S+H]^+$ 465.2。		
<b>A10:</b> (R)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢呋喃-3-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		87 mg (53%); 黄色固体; TFA
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.23 g, 0.30 mmol)、(R)-四氢呋喃-3-胺 (0.11 g, 0.90 mmol)、DCM (12 mL) 的混合物。MS ESI $[M+H]^+$ 703.2, 计算的 $[C_{32}H_{33}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 703.19。		
步骤2: 试剂 (一般方法D): (R)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢呋喃-3-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (0.21 g, 0.30 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.61 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 7.28-7.22 (m, 2H), 7.17 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 4.30-4.22 (m, 1H), 4.05-3.97 (m, 1H), 3.92-3.75 (m, 5H), 3.65 (br.s., 2H), 3.38-3.26 (m, 2H), 3.24-3.08 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.28-2.16 (m, 1H), 2.14-2.05 (m, 1H); MS ESI $[M+H]^+$ 451.2, 计算的 $[C_{23}H_{26}N_6O_2S+H]^+$ 451.2。		
<b>A11:</b> (S)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢呋喃-3-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		61 mg (36%); 褐色固体; TFA
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.23 g, 0.30 mmol)、(S)-四氢呋喃-3-胺 (0.11 g, 0.90 mmol)、DCM (12 mL) 的混合物。MS ESI $[M+H]^+$ 703.2, 计算的 $[C_{32}H_{33}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 703.19。		
步骤2: 试剂 (一般方法D): (S)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢呋喃-3-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (0.21 g, 0.30 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。		

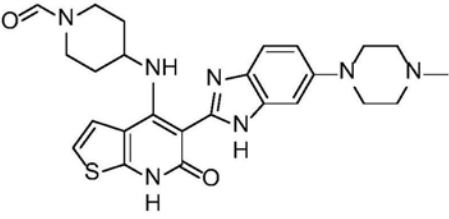
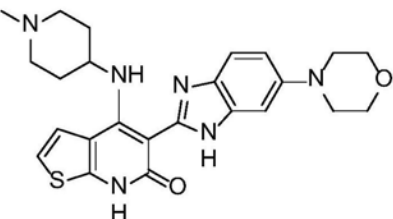
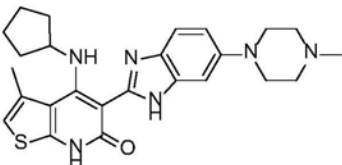
[0261]

基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢呋喃-3-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (0.21 g, 0.30 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, <i>CD</i> <sub>3</sub> <i>OD</i> ) δ 7.63 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.61 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 7.29-7.23 (m, 2H), 7.19 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 4.33-4.22 (m, 1H), 4.06-3.97 (m, 1H), 3.95-3.76 (m, 5H), 3.66 (br.s., 2H), 3.41-3.32 (m, 2H), 3.24-3.08 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.29-2.16 (m, 1H), 2.14-2.02 (m, 1H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 451.2, 计算的[C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 451.18。		
<b>A12:</b> 4-(((1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3-羟基环丁基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		101 mg (60%); 黄色固体; TFA
步骤1: 试剂(一般方法C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢-噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.23 g, 0.30 mmol)、(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3-氨基环丁醇 HCl 盐 (0.11 g, 0.90 mmol)、DMF (8 mL) 的混合物。MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 703.1, 计算的[C <sub>32</sub> H <sub>33</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 703.19。		
步骤2: 试剂(一般方法D): 4-(((1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3-羟基环丁基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (0.21 g, 0.30 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, <i>CD</i> <sub>3</sub> <i>OD</i> ) δ 7.62 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 7.57 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 7.30-7.21 (m, 2H), 7.16 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 3.97-3.79 (m, 3H), 3.73-3.50 (m, 3H), 3.40-3.26 (m, 2H), 3.17 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.69-2.56 (m, 2H), 2.16-2.00 (m, 2H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 451.2, 计算的[C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 451.2。		
<b>A13:</b> 4-(((1 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *)-3-羟基环戊基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		96 mg (57%); 黄色固体; TFA
步骤1: 试剂(一般方法C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢-噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基 (0.23 g, 0.30 mmol)、(1 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *)-3-氨基环戊醇 HCl 盐 (0.12 g, 0.90 mmol)、DMF (8 mL) 的混合物。MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 717.2, 计算的[C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 717.21。		
步骤2: 试剂(一般方法D): 4-(((1 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *)-3-羟基环戊基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (0.21 g, 0.30 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, <i>CD</i> <sub>3</sub> <i>OD</i> ) δ 7.62 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.53 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 7.28 (dd, <i>J</i> = 2.1, 8.9 Hz, 1H), 7.24 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 7.19 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 4.47-4.39 (m, 1H), 4.23-4.12 (m, 1H), 3.96-3.81 (m, 2H), 3.73-3.60 (m, 2H), 3.39-3.26 (m, 2H), 3.25-3.11 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.09-1.82 (m, 6H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 465.2, 计算的[C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 465.2。		
<b>A14:</b> 4-(((3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-3-氟哌啶-4-基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		126 mg (58%); 橙色固体; 2 TFA

[0262]

[0263]

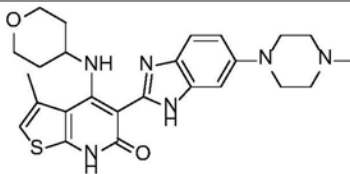
<p>步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.24 g, 0.31 mmol)、(3R,4R)-4-氨基-3-氟哌啶-1-羧酸叔丁酯 (0.20 g, 0.93 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI <math>[M-CF_3O_2S+2H]^+</math> 702.2, 计算的<math>[C_{37}H_{44}FN_7O_4S+H]^+</math> 702.3。</p>		
<p>步骤2: 试剂 (一般方法D): (3R,4R)-3-氟-4-((7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)哌啶-1-羧酸叔丁酯 (0.26 g, 0.31 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, <math>CD_3OD</math>) <math>\delta</math> 7.57 (d, <math>J = 8.8</math> Hz, 1H), 7.51 (d, <math>J = 6.0</math> Hz, 1H), 7.23 (d, <math>J = 1.8</math> Hz, 1H), 7.19 (d, <math>J = 6.0</math> Hz, 1H), 7.15 (dd, <math>J = 1.8, 8.8</math> Hz, 1H), 5.13-4.87 (m, 2H), 4.33-4.21 (m, 1H), 3.94-3.50 (m, 6H), 3.44-3.34 (m, 2H), 3.28-3.07 (m, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.49-2.37 (m, 1H), 2.19-2.05 (m, 1H); MS ESI <math>[M+H]^+</math> 482.2, 计算的<math>[C_{24}H_{28}FN_7OS+H]^+</math> 482.2。</p>		
<p><b>A15:</b> 4-((3,3-二氟哌啶-4-基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮</p>		<p>134 mg (59%); 黄色固体; 2 TFA</p>
<p>步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.24 g, 0.31 mmol)、4-氨基-3,3-二氟哌啶-1-羧酸叔丁酯 (0.22 g, 0.93 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI <math>[M-CF_3O_2S+H]^+</math> 719.2, 计算的<math>[C_{37}H_{43}F_2N_7O_4S]^+</math> 719.31。</p>		
<p>步骤2: 试剂 (一般方法D): 3,3-二氟-4-((7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)哌啶-1-羧酸叔丁酯 (0.26 g, 0.31 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, <math>CD_3OD</math>) <math>\delta</math> 7.60-7.50 (m, 2H), 7.26-7.17 (m, 2H), 7.13 (dd, <math>J = 1.8, 9.0</math> Hz, 1H), 4.65-4.48 (m, 1H), 3.96-3.45 (m, 8H), 3.29-3.04 (m, 4H), 2.98 (s, 3H), 2.59-2.41 (m, 1H), 2.40-2.22 (m, 1H); MS ESI <math>[M+H]^+</math> 500.2, 计算的<math>[C_{24}H_{27}F_2N_7OS+H]^+</math> 500.2。</p>		
<p><b>A16:</b> (R)-4-((1-羟基-3-甲基丁-2-基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮</p>		<p>40 mg (29%), 黄色固体; 游离碱</p>
<p>步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.30 mmol)、(R)-2-氨基-3-甲基丁-1-醇 (0.12 g, 1.2 mmol)、DMF (7 mL)。ESI <math>[M+H]^+</math> 719.2, 计算的<math>[C_{33}H_{37}F_3N_6O_5S_2+H]^+</math> 719.2</p>		
<p>步骤 2: 试剂 (一般方法 D): (R)-4-((1-羟基-3-甲基丁-2-基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (粗制, 0.30 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, <math>CD_3OD</math>) <math>\delta</math> 7.65 (d, <math>J = 6.0</math> Hz, 1H), 7.47-7.42 (m, 1H), 7.19-7.13 (m, 1H), 7.10 (d, <math>J = 5.7</math> Hz, 1H), 7.02-6.94 (m, 1H), 4.27-4.19 (m, 1H), 3.92-3.82 (m, 2H), 3.21 (br s, 4H), 2.69 (br s, 4H), 2.38 (s, 3H), 2.32-2.22 (m, 1H), 1.23 (d, <math>J = 7.0</math> Hz, 3H), 1.02 (d, <math>J = 7.0</math></p>		

Hz, 3H); ESI [M+H] <sup>+</sup> 467.3, 计算的[C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S + H] <sup>+</sup> 467.2		
<b>A17</b> : 4-((5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)哌啶-1-甲醛		40 mg (27%), 黄色固体; 游离碱
步骤 1: 试剂(一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.30 mmol)、4-氨基哌啶-1-甲醛(0.15 g, 1.2 mmol)、DMF (7 mL)。ESI [M+H] <sup>+</sup> 744.1, 计算的[C <sub>34</sub> H <sub>36</sub> F <sub>3</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup> 744.2		
步骤 2: 试剂(一般方法 D): 4-((7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)哌啶-1-甲醛(粗制, 0.30 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 8.06 (s, 1H), 7.45 (s, 2H), 7.18-7.06 (m, 2H), 7.00-6.91 (m, 1H), 4.52-4.40 (m, 1H), 4.09-3.95 (m, 1H), 3.84-3.73 (m, 1H), 3.52-3.38 (m, 2H), 3.20 (br s, 4H), 2.66 (br s, 4H), 2.36 (s, 3H), 2.14 (br s, 2H), 1.91-1.69 (m, 2H); ESI [M+H] <sup>+</sup> 492.2, 计算的[C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> S + H] <sup>+</sup> 492.2		
<b>A18</b> : 4-((1-甲基哌啶-4-基)氨基)-5-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		15 mg (8%), 黄色固体; 游离碱
步骤 1: 试剂: (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-吗啉基-1-((三氟-甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.41 mmol)、4-氨基哌啶-1-羧酸叔丁酯(0.19 g, 1.6 mmol)、DMF (7 mL)。ESI [M+H] <sup>+</sup> 717.1, 计算的[C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup> 717.2		
步骤 2: 试剂(一般方法 D): 7-(4-甲氧基苄基)-4-((1-甲基哌啶-4-基)氨基)-5-(5 和/或 6-吗啉基-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮(粗制, 0.30 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.52-7.43 (m, 2H), 7.19-7.10 (m, 2H), 7.03-6.95 (m, 1H), 4.38-4.23 (m, 1H), 3.92-3.82 (m, 4H), 3.19-3.10 (m, 4H), 2.98-2.87 (m, 2H), 2.59-2.44 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.26-2.14 (m, 2H), 2.00-1.87 (m, 2H); ESI [M+H] <sup>+</sup> 465.2, 计算的[C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S + H] <sup>+</sup> 465.2		
<b>A19</b> : 4-(环戊基氨基)-3-甲基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		59 mg (36%); 黄色固体 2HCl
步骤-01: 试剂(一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-3-甲基-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯(242 mg, 0.31 mmol)、环戊基胺(80 mg, 0.93 mmol)、DMF (4 mL); MS 计算; MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 715.2, 计算的[C <sub>34</sub> H <sub>37</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 715.2		
步骤-02: 试剂(一般方法 D): 4-(环戊基氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-3-甲基-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮(245 mg)、TFA (6 mL)、		

[0264]

浓 HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.72 (d,  $J=9.2$  Hz, 1H), 7.44-7.41 (m, 1H), 7.32 (d,  $J=1.6$  Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 3.99-3.96 (m, 2H), 3.71-3.68 (m, 2H), 3.40-3.34 (m, 2H), 3.28-3.23 (m, 2H), 3.18-3.15 (m, 1H), 3.01 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 1.68-1.61 (m, 6H), 1.46-1.44 (m, 2H); MS ESI  $[M+H]^+$  463.2, 计算的 $[C_{25}H_{30}N_6OS+H]^+$  463.2

**A20:** 3-甲基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮

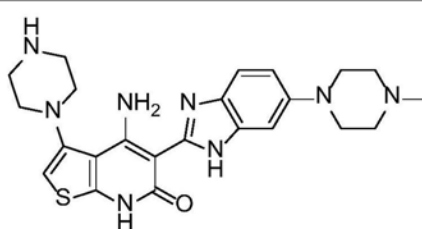


60 mg (35%);  
黄色固体  
2HCl

步骤-01: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-3-甲基-5-(5 和/或 6-(4-methyl-1 哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (242 mg, 0.31 mmol)、四氢-2H-吡喃-4-胺 (95 mg, 0.93 mmol)、DMF (4 mL)。MS 计算; MS ESI  $[M+H]^+$  731.2, 计算的 $[C_{34}H_{37}F_3N_6O_5S_2+H]^+$  731.2

步骤-02: 试剂 (一般方法 D): 7-(4-甲氧基苄基)-3-甲基-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (250 mg)、TFA (4 mL)、浓 HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.75 (d,  $J=9.2$  Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J=9.2, 2.0$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 4.01-3.98 (m, 2H), 3.81-3.78 (m, 2H), 3.71-3.68 (m, 2H), 3.40-3.35 (m, 2H), 3.31-3.23 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.86-2.80 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.62-2.56 (m, 1H), 1.83-1.80 (m, 2H), 1.65-1.55 (m, 2H); MS ESI  $[M+H]^+$  479.1, 计算的 $[C_{25}H_{30}N_6O_2S+H]^+$  479.2

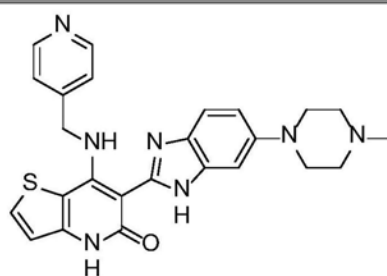
**A21:** 4-氨基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-3-(哌嗪-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮



74 mg (82%);  
tan 固体;  
2TFA

在 rt 下用 TFA (2 mL) 处理 DCM (20 mL) 中的 4-(4-氨基-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (77.8 mg, 0.13 mmol)。将反应搅拌 2.5 h, 然后在减压下浓缩和通过制备型 HPLC 纯化。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.71 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H), 7.40 (dd,  $J=9.0, 2.3$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.02-3.85 (m, 2H), 3.74-3.61 (br m, 2H), 3.46-3.38 (m, 4H), 3.37-3.28 (m, 6H), 3.26-3.11 (m, 2H), 3.00 (s, 3H); MS ESI  $[M+H]^+$  465.4, 计算的 $[C_{23}H_{28}N_8OS+H]^+$  465.2。

**A22:** 6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-((吡啶-4-基甲基)氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮



16 mg (9%);  
黄色固体;  
TFA 盐

步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.3 mmol)、吡啶-4-基甲胺 (0.09 mL, 0.89 mmol) 的混合物。MS ESI  $[M+H]^+$  724.2, 计算的 $[C_{34}H_{32}F_3N_7O_4S_2+H]^+$  724.2。

步骤 2: 试剂 (一般方法 D): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-

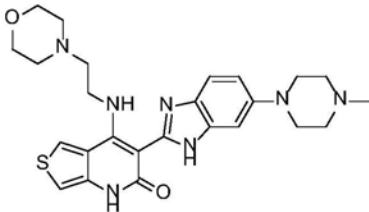
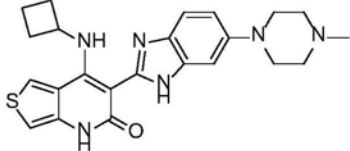
[0265]



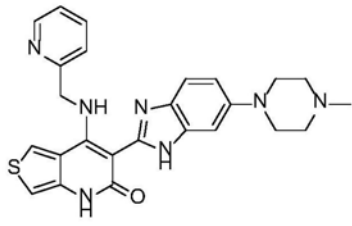




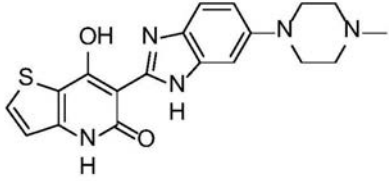
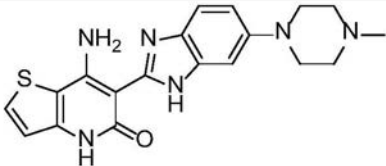
[0268]

基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-2-氧-1,2-二氢噻吩并[3,4-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (380 mg, 0.49 mmol)、四氢-2H-吡喃-4-胺 (125 mg, 1.23 mmol)、DCM (10 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 717.2, 计算的 $[C_{33}H_{35}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 717.2		
步骤-02: 试剂 (一般方法 D): 1-(4-甲氧基苄基)-3-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮 (110 mg, 0.15 mmol)、TFA (4 mL)、浓 HCl (0.5 mL)。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 8.50 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J=9.2$ Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.34 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 4.02-3.99 (m, 2H), 3.84-3.81 (m, 2 H), 3.71-3.68 (m, 2H), 3.50-3.37 (m, 2H), 3.27-3.21 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.80-2.77 (m, 2H), 2.75-2.64 (m, 1H), 1.80-1.66 (m, 4H); MS ESI $[M+H]^+$ 465.2, 计算的 $[C_{24}H_{28}N_6O_2S+H]^+$ 465.2		
<b>A26</b> : 3-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((2-吗啉基乙基)氨基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮		38 mg (26%); 黄色固体 游离碱
步骤-01: 试剂 (一般方法 C): 1-(4-甲氧基苄基)-3-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-2-氧-1,2-二氢噻吩并[3,4-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (229 mg, 0.30 mmol)、2-吗啉基乙胺 (97 mg, 0.75 mmol)、DCM (6 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 746.2, 计算的 $[C_{34}H_{38}F_3N_7O_5S_2+H]^+$ 746.2		
步骤-02: 试剂 (一般方法 D): 1-(4-甲氧基苄基)-3-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((2-吗啉基乙基)氨基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮 (210 mg, 0.28 mmol)、TFA (4 mL)、浓 HCl (0.5 mL)。 $^1H$ NMR (游离碱, 400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 8.37 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.98 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 4.05 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.75 (br.s, 4H), 3.21 (br.s, 4H), 2.85 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.68-2.64 (m, 8 H), 2.38 (s, 3H); MS ESI $[M+H]^+$ 494.2, 计算的 $[C_{25}H_{31}N_7O_2S+H]^+$ 494.2		
<b>A27</b> : 4-(环丁基氨基)-3-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮		30 mg (20%); 黄色固体 2HCl
步骤-01: 试剂 (一般方法 C): 1-(4-甲氧基苄基)-3-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-2-氧-1,2-二氢噻吩并[3,4-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (229 mg, 0.30 mmol)、环丁基胺 (53 mg, 0.75 mmol)、DCM (6 mL) MS ESI $[M+H]^+$ 687.1, 计算的 $[C_{32}H_{33}F_3N_6O_4S_2+H]^+$ 687.2		
步骤-02: 试剂 (一般方法 D): 4-(环丁基氨基)-1-(4-甲氧基苄基)-3-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮 (210 mg, 0.28 mmol)、TFA (4 mL)、浓 HCl (0.5 mL)。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 8.51 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J=9.2$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.31 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 3.99-3.96 (m, 2H), 3.71-3.68 (m, 2H), 3.63-3.59 (m, 1H), 3.39-3.35 (m, 2H), 3.28-3.22 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.23-2.21 (m, 2H), 2.06-2.00 (m, 2H), 1.74-1.66 (m, 1H), 1.49-1.38 (m, 1H); MS ESI $[M+H]^+$ 435.2, 计算的 $[C_{23}H_{26}N_6OS+H]^+$ 435.1		

[0269]

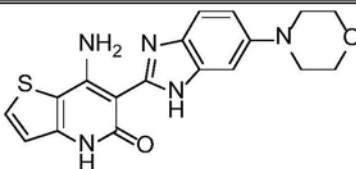
<b>A28</b> : 3-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((吡啶-2-基甲基)氨基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮		15 mg (13%); 淡黄色固体 2HCl
步骤-01: 试剂 (一般方法 C): 1-(4-甲氧基苄基)-3-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-2-氧-1,2-二氢噻吩并[3,4-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (168 mg, 0.22 mmol)、2-皮考林基胺 (60 mg, 0.55 mmol)、DCM (4 mL) MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 724.1, 计算的[C <sub>34</sub> H <sub>32</sub> F <sub>3</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 724.2		
步骤-02: 试剂 (一般方法 D): 1-(4-甲氧基苄基)-3-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((吡啶-2-基甲基)氨基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮 (65 mg, 0.09 mmol)、TFA (3 mL)、浓 HCl (0.5 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 8.62 (d, J=5.6 Hz, 1H), 8.49-8.43 (m, 2H), 7.97-7.93 (m, 1H), 7.85 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.62 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.40 (dd, J=9.2 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.23 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.04 (d, J=3.2 Hz, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.00-3.96 (m, 2H), 3.70-3.67 (m, 2H), 3.40-3.37 (m, 2H), 3.28-3.22 (m, 2H), 3.02 (s, 3H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 472.2, 计算的[C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> OS+H] <sup>+</sup> 472.2		

[0270]

实施例/ IUPAC 名称	结构	产率; 描述; 盐
<b>A29</b> : 7-羟基-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		6.6 mg (10%); 淡黄色固体; TFA
步骤 1: 试剂 (一般方法 A1): 1-(4-甲氧基苄基)-1H-噻吩并[3,2-d][1,3]噻嗪-2,4-二酮 (0.75 g, 2.6 mmol)、2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.79 g, 2.6 mmol)、KHMDS (13 mL, 13 mmol)、THF (30 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 13.64 (br. s, 1H), 12.64 (br.s., 1H), 7.52 (br. s., 1H), 7.40-7.29 (m, 1H), 7.21 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.04-6.88 (m, 3H), 6.84 (d, J=8.0 Hz, 2H), 5.35 (br. s., 2H), 3.76 (s, 3H), 3.20 (br.s., 4H), 2.62 (br. s., 4H), 2.39 (br.s., 3 H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 502.4, 计算的[C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S+H] <sup>+</sup> 502.18.		
步骤2: 试剂 (一般方法D): 7-羟基-4-(4-甲氧基苄基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (0.090 g, 0.18 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ 13.52-13.14 (m, 2 H), 11.25 (s, 1H), 9.79 (br. s, 1H), 7.81 (d, J=5.3 Hz, 1H), 7.64 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.37 (d, J=2.3 Hz, 1H), 7.10 (dd, J=9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.92 (d, J=5.0 Hz, 1H), 3.85-3.66 (m, 2H), 3.64-3.46 (m, 2H), 3.29-3.13 (m, 2H), 3.09-2.92 (m, 2H), 2.87 (s, 3H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 382.3, 计算的[C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 382.45.		
<b>A30</b> : 7-氨基-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		1.5 g (79%) 黄色固体 游离碱

将 3-氨基噻吩-2-腈 (951 mg, 7.67 mmol) 和 2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (2.316 g, 7.67 mmol) 的无水 THF (55 mL) 溶液在油浴中加热至 40℃, 并经 30 分钟滴加 LiHMDS (30.7 mL, 1.0 M, 在 THF 中, 30.7 mmol)。将所得反应混合物在 40℃ 下搅拌 2 h, 然后冷却降至 rt, 并在冰浴中通过饱和 aq NH<sub>4</sub>Cl 猝灭。用 EtOAc 萃取含水层。将组合的有机层在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥和在减压下浓缩。将残留物与 DCM 一起研制和过滤。将滤饼再与 MeOH 一起研制, 然后过滤, 以给出标题化合物, 为鲜黄色固体 (1.495 g, 79%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.34 (s, 1H), 11.81 (s, 1H), 10.73-10.47 (m, 1H), 7.96-7.91 (m, 1H), 7.90-7.78 (m, 1H), 7.52-7.43 (m, 1H), 7.09-7.25 (m, 1H), 7.00 (d, *J*=5.3 Hz, 1H), 6.93-6.86 (m, 1H), 3.18-3.14 (m, 4H), 2.65-2.54 (m, 4H), 2.30 (s, 3H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 381.5, 计算的[C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>OS + H]<sup>+</sup> 381.1。

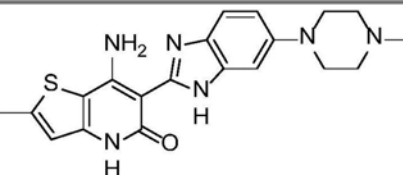
**A31:** 7-氨基-6-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮



16 mg (13%);  
白色固体;  
HCl

在 rt 下在 Ar 下将 LiHMDS (1.0 M, 在 THF 中, 1.7 mL, 1.7 mmol) 经 10 min 滴加至搅拌中的 3-氨基噻吩-2-腈 (0.425 g, 0.34 mmol)、2-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.103 g, 0.36 mmol) 的 anhyd THF (10 mL) 溶液。将反应在 40℃ 下加热 1 h, 并直接通过快速色谱法 (MeOH, 在 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中, 0-10%) 然后制备型 HPLC 纯化。将该材料进一步从 EtOAc/己烷重结晶, 并与 MeOH 一起研制。将所得灰色固体 (25 mg) 悬浮于 MeOH 中, 并在 rt 下用 HCl (1.0 M, 在 Et<sub>2</sub>O 中, 0.14 mL) 处理。将反应在减压下浓缩。游离碱: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>) δ 11.94 (s, 1H), 8.18 (m, 1H), 7.78 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.35 (d, *J*=5.2 Hz, 1H), 7.25 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 4.06-4.00 (m, 4H), 3.40 (br s, 4H)。\* 三个可交换质子可能被 H<sub>2</sub>O 和 DMF-*d*<sub>7</sub> 导致的峰掩盖; MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 368.2, 计算的[C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 368.1。

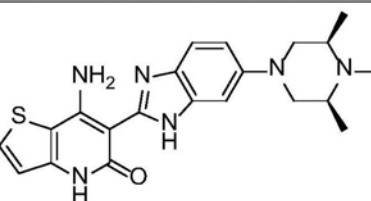
**A32:** 7-氨基-2-甲基-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮



124 mg (44%);  
褐色固体;  
TFA

试剂 (一般方法 A1): 3-氨基-5-甲基噻吩-2-腈 (0.080 g, 0.58 mmol)、2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.18 g, 0.58 mmol)、LDA (2.6 mL, 2.6 mmol)、THF (5 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.75 (br. s., 1H), 9.84 (br. s., 1H), 7.53 (br.s., 1H), 7.24 (br.s., 1H), 6.98 (br.s., 1H), 6.77 (br. s., 1H), 3.82-3.39 (m, 7H), 3.22 (br. s., 2H), 3.08-2.76 (m, 5H), 2.56 (br.s., 3H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 395.3, 计算的[C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>OS+H]<sup>+</sup> 395.5。

**A33:** 7-氨基-6-(6-(3*r*,5*s*)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮

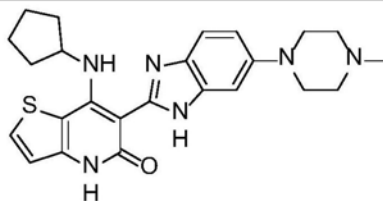


43 mg (18%);  
黄色固体;  
2HCl

试剂 (一般方法 A1): 2-(6-((3*r*,5*s*)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (165 mg, 0.5 mmol)、3-氨基噻吩-2-腈 (124 mg, 1 mmol)、LDA (1.0 M, 在 THF/hex 中, 2.5 mL, 2.5 mmol)、THF (8 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.99 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 7.68 (d, *J*=9.2 Hz, 1H), 7.38 (dd,

$J=9.0, 2.2$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.11 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 4.03-3.95 (m, 2H), 3.65-3.55 (m, 2H), 3.10-3.04 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 1.56 (d,  $J=6.4$  Hz, 6H); MS ESI  $[M+H]^+$  409.3, 计算的 $[C_{21}H_{24}N_6OS+H]^+$  409.17.

**A34:** 7-(环戊基氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮

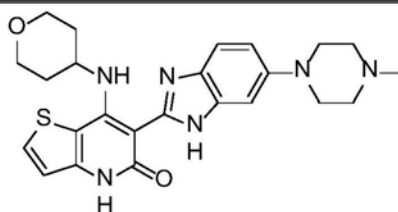


77 mg (26%);  
褐色固体;  
TFA

步骤1: 试剂(一般方法C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢-噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (0.41 g, 0.54 mmol)、环戊基胺 (0.13 mL, 1.3 mmol)、MeCN (10 mL) 的混合物。MS ESI  $[M+H]^+$  701.3, 计算的 $[C_{33}H_{35}F_3N_6O_4S_2+H]^+$  701.2.

步骤2: 试剂(一般方法D): 7-(环戊基氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (0.38 g, 0.54 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  12.99 (br.s, 1H), 12.11 (br.s, 1H), 11.87 (s, 1H), 9.65 (br.s, 1H), 8.04 (d,  $J=5.5$  Hz, 1H), 7.61-7.40 (m, 1H), 7.32-7.13 (m, 1H), 7.04 (d,  $J=5.5$  Hz, 1H), 6.93 (dd,  $J=8.5, 2.5$  Hz, 1H), 4.72-4.60 (m, 1H), 3.80-3.69 (m, 2H), 3.59-3.52 (m, 2H), 3.29-3.15 (m, 2H), 3.02-2.90 (m, 2H), 2.88 (d,  $J=3.5$  Hz, 3H), 2.21-2.06 (m, 2H), 1.93-1.67 (m, 6H); MS ESI  $[M+H]^+$  449.3, 计算的 $[C_{24}H_{28}N_6OS+H]^+$  449.2.

**A35:** 6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮

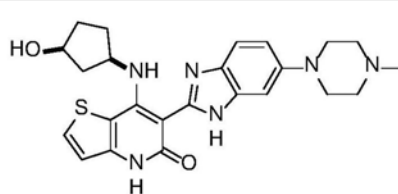


69 mg (52%);  
黄色固体;  
TFA

步骤1: 试剂(一般方法C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢-噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (0.18 g, 0.23 mmol)、四氢-2H-吡喃-4-胺 (0.058 mL, 0.58 mmol)、MeCN (5 mL) 的混合物。MS ESI  $[M+H]^+$  717.3, 计算的 $[C_{33}H_{35}F_3N_6O_5S_2+H]^+$  717.2.

步骤2: 试剂(一般方法D): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (0.17 g, 0.23 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  13.02 (br.s, 1H), 12.18 (br.s, 1H), 11.92 (s, 1H), 9.63 (br.s, 1H), 8.04 (d,  $J=5.5$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.30-7.14 (m, 1H), 7.04 (d,  $J=5.5$  Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J=8.3, 2.3$  Hz, 1H), 4.49-4.34 (m, 1H), 4.02-3.93 (m, 2H), 3.81-3.74 (m, 2H), 3.57 (d,  $J=9.0$  Hz, 4H), 3.31-3.15 (m, 2H), 3.02-2.91 (m, 2H), 2.88 (d,  $J=3.8$  Hz, 3H), 2.13 (d,  $J=3.3$  Hz, 2H), 1.81-1.64 (m, 2H); MS ESI  $[M+H]^+$  465.3, 计算的 $[C_{24}H_{28}N_6O_2S+H]^+$  465.2.

**A36:** 7-(((1R\*,3S\*)-3-羟基环戊基)氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮

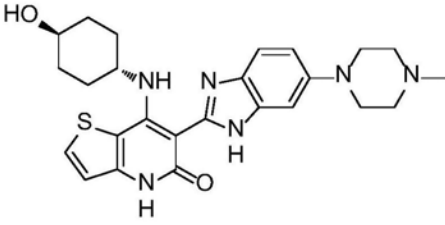
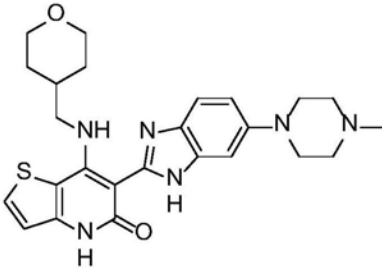


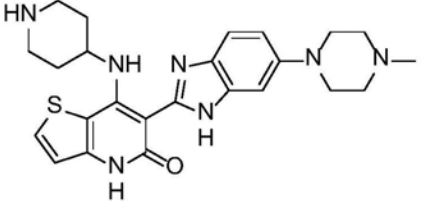
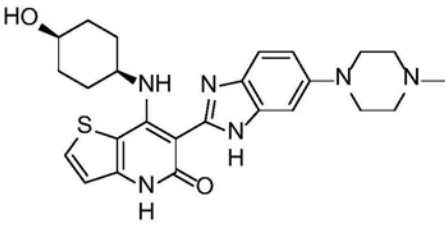
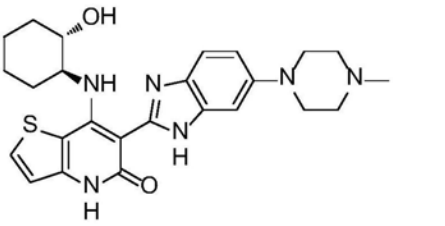
33 mg (28%);  
黄色固体;  
TFA

步骤1: 试剂(一般方法C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-

[0272]

[0273]

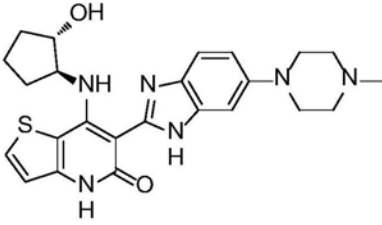
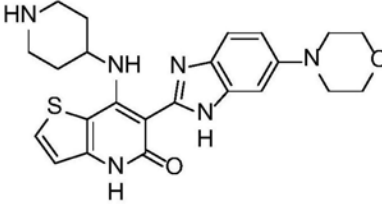
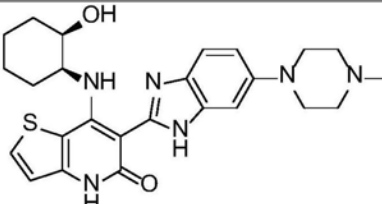
苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (0.15 g, 0.20 mmol)、(1S*,3R*)-3-氨基环戊醇 (0.070 g, 0.50 mmol)、DCM (10 mL) 的混合物。MS ESI $[M+H]^+$ 717.3, 计算的 $[C_{33}H_{35}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 717.2。		
步骤2: 试剂 (一般方法D): 7-(((1R*,3S*)-3-羟基环戊基)氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (0.14 g, 0.20 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 8.04 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.29-7.20 (m, 2H), 7.11 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 4.82-4.73 (m, 1H), 4.57-4.47 (m, 1H), 3.96-3.79 (m, 2H), 3.74-3.58 (m, 2H), 3.42-3.33 (m, 2H), 3.22-3.08 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.33-2.19 (m, 2H), 2.16-2.02 (m, 3H), 2.02-1.88 (m, 1H); MS ESI $[M+H]^+$ 465.2, 计算的 $[C_{24}H_{28}N_6O_2S+H]^+$ 465.2。		
<b>A37:</b> 7-(((1r,4r)-4-羟基环己基)氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		10 mg (9%), 黄色固体; 游离碱
步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.24 mmol)、反式-4-氨基环己醇 (0.11 g, 0.96 mmol)、MeCN (10 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 731.2 计算的 $[C_{34}H_{37}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 731.2。		
步骤 2: (一般方法 D): 7-(((1r,4r)-4-羟基环己基)氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (粗制, 0.24 mmol)、TFA (7 mL)、HCl (1 mL); <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.88 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.51-7.41 (m, 1H), 7.24-7.14 (m, 1H), 7.08 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.03-6.95 (m, 1H), 4.32-4.21 (m, 1H), 3.82-3.71 (m, 1H), 3.28-3.20 (m, 4H), 2.86-2.74 (m, 4H), 2.47 (s, 3H), 2.24-2.36 (m, 2H), 2.17-2.06 (m, 2H), 1.78-1.63 (m, 2H), 1.62-1.49 (m, 2H); MS ESI $[M+H]^+$ 479.2, 计算的 $[C_{25}H_{30}N_6O_2S+H]^+$ 479.3。		
<b>A38:</b> 6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-(((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		24 mg (32%) 黄色固体 游离碱
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.16 mmol)、4-氨基甲基四氢吡喃 (0.074 g, 0.64 mmol)、MeCN (10 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 731.3, 计算的 $[C_{34}H_{37}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 731.2。		
步骤 2: 试剂(一般方法 D): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-(((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (粗制, 0.16 mmol)、TFA (7 mL)、HCl (1 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.93-7.83 (m, 1H), 7.49-7.40 (m, 1H), 7.21-7.13 (m, 1H), 7.12-7.06 (m, 1H), 7.05-6.96 (m, 1H), 4.10-3.97 (m, 2H), 3.89-3.79 (m, 2H), 3.56-3.44 (m, 2H), 3.26-3.16 (m, 4H), 2.77-2.65 (m, 4H), 2.40 (s, 3H), 2.19-2.07 (m, 1H), 1.99-1.88 (m, 2H), 1.65-1.50 (m, 2H); MS ESI $[M+H]^+$ 479.3, 计算的 $[C_{25}H_{30}N_6O_2S+H]^+$ 479.2。		

<b>A39:</b> 6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-(哌啶-4-基氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		17 mg (19%) 褐色固体 游离碱
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.20 mmol)、4-氨基哌啶-1-羧酸叔丁酯 (0.16 g, 0.80 mmol)、MeCN (10 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 816.2, 计算的 $[C_{38}H_{44}F_3N_7O_6S_2 + H]^+$ 816.2		
步骤 2: 试剂 (一般方法 D): 4-((4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)氨基)哌啶-1-羧酸叔丁酯 (粗制, 0.20 mmol)、TFA (6 mL)、HCl (1 mL)。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.90-7.83 (m, 1H), 7.52-7.42 (m, 1H), 7.25-7.11 (m, 1H), 7.10-7.05 (m, 1H), 7.04-6.96 (m, 1H), 4.50-4.42 (m, 1H), 3.27-3.16 (m, 6H), 2.91-2.79 (m, 2H), 2.73-2.61 (m, 4H), 2.37 (s, 3H), 2.26-2.17 (m, 2H), 1.89-1.73 (m, 2H); MS ESI $[M+H]^+$ 464.2, 计算的 $[C_{24}H_{29}N_7OS + H]^+$ 464.2.		
<b>A40:</b> 7-(((1S,4S)-4-羟基环己基)氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		35 mg (30%), 黄色固体; 游离碱
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.24 mmol)、顺式-4-氨基环己醇 (0.11 g, 0.96 mmol)、MeCN (10 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 731.2, 计算的 $[C_{34}H_{37}F_3N_6O_5S_2 + H]^+$ 731.2		
步骤 2: (一般方法 D): 7-(((1S,4S)-4-羟基环己基)氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (粗制, 0.24 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.88-7.82 (m, 1H), 7.56-7.41 (m, 1H), 7.29-7.14 (m, 1H), 7.08 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.04-6.96 (m, 1H), 4.50-4.40 (m, 1H), 3.90-3.80 (m, 1H), 3.26-3.17 (m, 4H), 2.73-2.63 (m, 4H), 2.38 (s, 3H), 2.13-1.81 (m, 8H); MS ESI $[M+H]^+$ 479.2, 计算的 $[C_{25}H_{30}N_6O_2S + H]^+$ 479.2		
<b>A41:</b> 7-(((1S,2S)-2-羟基环己基)氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		16 mg (23%), 黄色固体; 游离碱
步骤 1: (一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.20 mmol)、(1S, 2S)-2-氨基环己醇 (0.091 g, 0.80 mmol)、DMF (7 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 731.2, 计算的 $[C_{34}H_{37}F_3N_6O_5S_2 + H]^+$ 731.2		

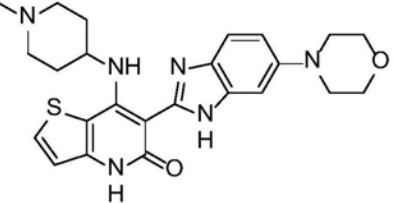
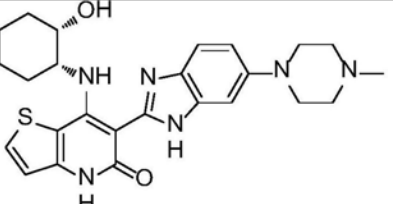
[0274]



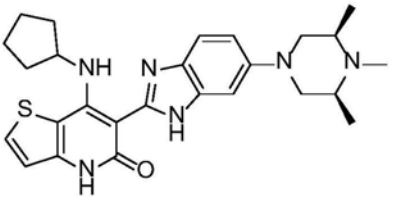
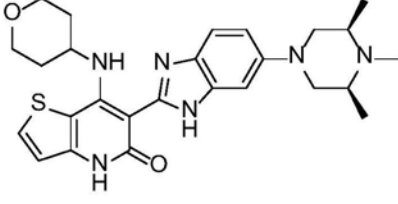
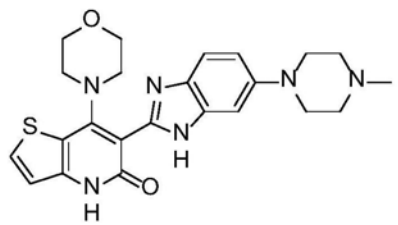
[0275]

步骤 2: 试剂 (一般方法 D): 7-(((1S,2S)-2-羟基环己基)氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并-[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (粗制, 0.14 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.84 (d, J=5.5 Hz, 1H), 7.55-7.40 (m, 1H), 7.18-7.12 (m, 1H), 7.06 (d, J=5.5 Hz, 1H), 7.03-6.94 (m, 1H), 4.24-4.14 (m, 1H), 3.88-3.77 (m, 1H), 3.27-3.18 (m, 4H), 2.81-2.70 (m, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.33 - 2.23 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 1H), 1.91-1.78 (m, 2H), 1.65-1.42 (m, 4H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 479.3, 计算的[C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S + H] <sup>+</sup> 479.3		
<b>A42:</b> 7-(((1S,2S)-2-羟基环戊基)氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		20 mg (13%), 黄色固体; 游离碱
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.32 mmol)、(1S,2S)-2-氨基环戊醇 (0.13 g, 1.3 mmol)、DMF (7 mL)。MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 717.2 计算的[C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup> 717.2		
步骤 2: 试剂 (一般方法 D): 7-(((1S,2S)-2-羟基环戊基)氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并-[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (粗制, 0.32 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (5 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.90-7.84 (m, 1H), 7.48-7.40 (m, 1H), 7.20-7.11 (m, 1H), 7.07 (d, J=5.2 Hz, 1H), 7.03-6.93 (m, 1H), 4.61-4.53 (m, 1H), 4.42-4.34 (m, 1H), 3.27-3.15 (m, 4H), 2.76-2.64 (m, 4H), 2.45-2.32 (m, 4H), 2.30-2.17 (m, 1H), 2.06-1.94 (m, 2H), 1.93-1.82 (m, 1H), 1.82-1.70 (m, 1H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 465.2, 计算的[C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S + H] <sup>+</sup> 465.2		
<b>A43:</b> 6-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-(哌啶-4-基氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		11 mg (12%), 褐色固体; 游离碱
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-吗啉基-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.20 mmol)、4-氨基哌啶-1-羧酸叔丁酯 (0.16 g, 0.8 mmol)、DMF (7 mL)。MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 803.2, 计算的[C <sub>37</sub> H <sub>41</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup> 803.2.		
步骤 2: 试剂 (一般方法 D): 4-((4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-吗啉基-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)-氨基)哌啶-1-羧酸叔丁酯 (粗制, 0.20 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.90-7.84 (m, 1H), 7.52-7.42 (m, 1H), 7.23-7.13 (m, 1H), 7.08 (d, J=5.2 Hz, 1H), 7.04-6.95 (m, 1H), 4.54-4.43 (m, 1H), 3.93-3.83 (m, 4H), 3.29-3.24 (m, 2H), 3.20-3.10 (m, 4H), 2.98-2.86 (m, 2H), 2.29-2.18 (m, 2H), 1.90-1.78 (m, 2H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 451.3, 计算的[C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 451.2.		
<b>A44:</b> 7-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		20 mg (21%), 黄色固体; 游离碱

[0276]

<p>步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.20 mmol)、(1R,2S)-2-氨基环己醇 (0.091 g, 0.80 mmol)、DMF (7 mL)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 731.2, 计算的[C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> 731.2。</p>		
<p>步骤 2: 试剂(一般方法 D): 7-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并-[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮(粗制, 0.20 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.84 (d, J=5.8 Hz, 1H), 7.56-7.40 (m, 1H), 7.29-7.13 (m, 1H), 7.07 (d, J=5.5 Hz, 1H), 7.03-6.94 (m, 1H), 4.56-4.46 (m, 1H), 4.15-4.04 (m, 1H), 3.27-3.13 (m, 4H), 2.79-2.64 (m, 4H), 2.41 (s, 3H), 2.14-1.95 (m, 2H), 1.91-1.74 (m, 4H), 1.60-1.44 (m, 2H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 479.2, 计算的[C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S + H]<sup>+</sup> 479.2。</p>		
<p><b>A45:</b> 7-((1-甲基哌啶-4-基)氨基)-6-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮</p>		<p>33 mg (30%), 褐色固体; 游离碱</p>
<p>步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-吗啉基-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.20 mmol)、4-氨基哌啶-1-羧酸叔丁酯(0.16 g, 0.8 mmol)、DMF(7 mL)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 717.2, 计算的[C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> 717.2。</p>		
<p>步骤 2: 试剂(一般方法 D): 4-(4-甲氧基苄基)-7-((1-甲基哌啶-4-基)氨基)-6-(5 和/或 6-吗啉基-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮(粗制, 0.24 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.91-7.84 (m, 1H), 7.53-7.43 (m, 1H), 7.22-7.13 (m, 1H), 7.08 (d, J=5.5 Hz, 1H), 7.05-6.94 (m, 1H), 4.48-4.33 (m, 1H), 3.93-3.83 (m, 4H), 3.20-3.10 (m, 4H), 3.02-2.87 (m, 2H), 2.61-2.43 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.31-2.16 (m, 2H), 2.01-1.87 (m, 2H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 465.2, 计算的[C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S + H]<sup>+</sup> 465.2。</p>		
<p><b>A46:</b> 7-(((1R,2S)-2-羟基环己基)氨基)-6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮</p>		<p>12 mg (4%), 黄色固体; 游离碱</p>
<p>步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.20 mmol)、(1S,2R)-2-氨基环己醇 (0.091 g, 0.80 mmol)、DMF (7 mL)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 731.2, 计算的[C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> 731.2。</p>		
<p>步骤 2: 试剂(一般方法 D): 7-(((1R,2S)-2-羟基环己基)氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并-[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮(粗制, 0.20 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.82 (d, J=5.2 Hz, 1H), 7.55-7.38 (m, 1H), 7.29-7.10 (m, 1H), 7.05 (d, J=5.5 Hz, 1H), 7.01-6.93 (m, 1H), 4.55-4.43 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 1H), 3.22 (br s, 4H), 2.70 (br s, 4H), 2.39 (s, 3H), 2.14-1.96 (m, 3H), 1.92-1.73 (m, 5H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 479.2, 计算的[C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S + H]<sup>+</sup> 479.2。</p>		

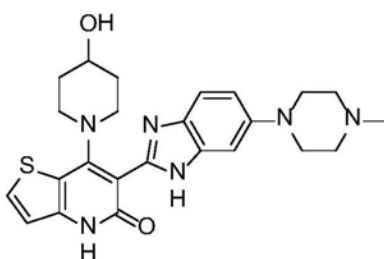


<b>A47</b> : 7-(环戊基氨基)-6-(6-(3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		21 mg (18%); 褐色固体; TFA
步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-5-氧-6-(1-((三氟甲基)磺酰基)-5 和/或 6-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.2 mmol)、环戊基胺(0.1 mL)、DMF(6 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 729.2, 计算的 $[C_{35}H_{39}F_3N_6O_4S_2+H]^+$ 729.2.		
步骤2: 试剂(一般方法D): 7-(环戊基氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(1-((三氟-甲基)磺酰基)-(5和/或 6-((3s,5r)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮(粗制, 0.2 mmol)、TFA(6 mL)、和浓HCl(0.5 mL)。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.94 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.26-7.23 (m, 1H), 7.18-7.14 (m, 1H), 7.09 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.67-4.60 (m, 1H), 3.92-3.85 (m, 2H), 3.60-3.50 (m, 2H), 3.05-2.88 (m, 5H), 2.22-2.13 (m, 2H), 1.94-1.70 (m, 6H), 5.10 (d, $J=6.0$ Hz, 6H); MS ESI $[M+H]^+$ 477.3, 计算的 $[C_{26}H_{32}N_6OS+H]^+$ 477.2.		
<b>A48</b> : 7-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-6-(6-(3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		19 mg (16%); 黄色固体; TFA
步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-5-氧-5 和/或 6-(1-((三氟甲基)-磺酰基)-6-((3r,5s)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.2 mmol)、四氢-2H-吡喃-4-胺(0.1 mL)、DMF(6 mL)。MS ESI $[M+H]^+$ 745.1, 计算的 $[C_{35}H_{39}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 745.2.		
步骤2: 试剂(一般方法D): 4-(4-甲氧基苄基)-7-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-5和/或6-(1-((三氟甲基)磺酰基)-6-((3s,5r)-rel-3,4,5-三甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮(粗制, 0.2 mmol) TFA(6 mL)、和浓HCl(0.5 mL)。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.95 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.21 (dd, $J=8.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.40-4.30 (m, 1H), 4.08-4.02 (m, 2H), 3.95-3.87 (m, 2H), 3.63-3.53 (m, 4H), 3.03 (s, 3H), 3.02-2.93 (m, 2H), 2.18-2.11 (m, 2H), 1.86-1.76 (m, 2H), 1.52 (d, $J=6.4$ Hz, 6H); MS ESI $[M+H]^+$ 493.3, 计算的 $[C_{26}H_{32}N_6O_2S+H]^+$ 493.2.		
<b>A49</b> : 6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-吗啉基噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		134 mg (79%); 黄色固体; TFA 盐
步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.3 mmol)、吗啉(0.08 mL, 0.897 mmol)。MS ESI $[M+H]^+$ 703.2, 计算的 $[C_{32}H_{33}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 703.2.		
步骤 2: 试剂(一般方法 D): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-		

[0277]

苯并[d]咪唑-2-基)-7-吗啉基噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (粗制, 0.3 mmol)、TFA (5 mL)、浓 HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.46 (s, 1H), 9.98 (br. s, 1H), 8.17 (d, *J*=5.6 Hz, 1H), 7.71 (d, *J*=9.2 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J*=9.2, 1.2 Hz, 1H), 7.24 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.08 (d, *J*=5.6 Hz, 1H), 3.92–3.84 (m, 2H), 3.70–3.62 (m, 4H), 3.62–3.57 (m, 2H), 3.35–3.28 (m, 4H), 3.28–3.13 (m, 2H), 3.11–2.99 (m, 2H), 2.89 (s, 3H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 451.3, 计算的[C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 451.2.

**A50** : 7-(4-羟基哌啶-1-基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮



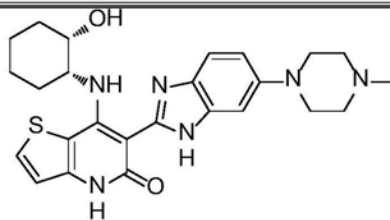
126 mg (73%);  
黄色固体;  
TFA 盐

步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.30 mmol)、哌啶-4-醇 (91 mg, 0.897 mmol)、TFA (4 mL)、浓 HCl (1 mL)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 717.2, 计算的[C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 717.2.

[0278]

步骤 2: 试剂(一般方法 D): 7-(4-羟基哌啶-1-基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (粗制, 0.3 mmol)、TFA (5 mL)、浓 HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 14.26 (br.s, 1H), 12.33 (s, 1H), 10.04 (br.s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.70 (d, *J*=7.28 Hz, 1H), 7.36–7.28 (m, 1H), 7.23 (br.s., 1H), 7.06 (s, 1H), 3.98–3.83 (m, 2H), 3.75–3.66 (m, 2H), 3.66–3.39 (m, 3H), 3.25–3.10 (m, 4H), 3.10–2.97 (m, 2H), 2.73 (s, 3H), 1.86–1.72 (m, 2H), 1.54–1.39 (m, 2H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 465.3, 计算的[C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 465.2.

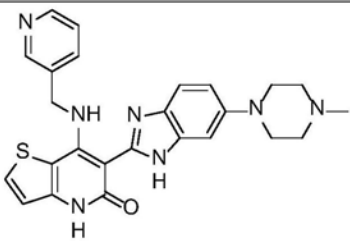
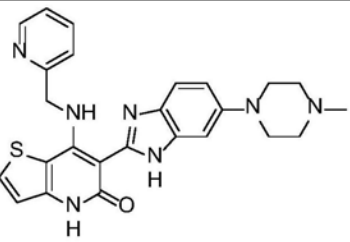
**A51**: 7-(((1R,2S)-2-羟基环己基)氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮

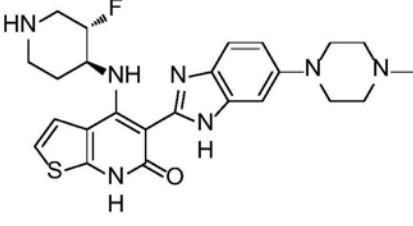
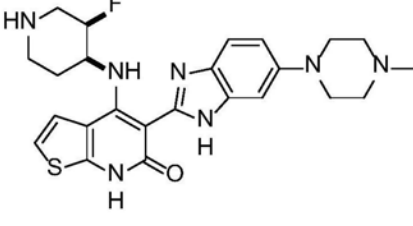


15 mg (15%),  
黄色固体;  
游离碱

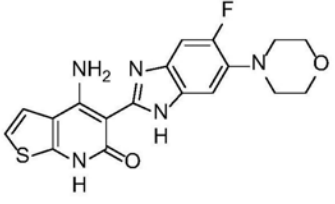
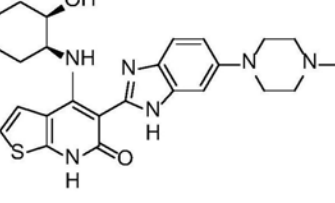
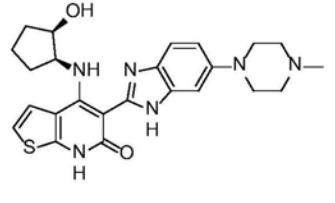
步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.20 mmol)、(1S,2R)-2-氨基环己醇 (0.091 g, 0.80 mmol)、DMF (7 mL)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 731.2; 计算的[C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 731.2.

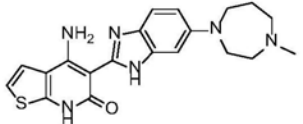
[0279]

<p>步骤 2: 试剂 (一般方法 D): 7-(((1R,2S)-2-羟基环己基)氨基)-4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并-[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮 (粗制, 0.20 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, <i>MeOD-d</i><sub>4</sub>) δ 7.82 (d, <i>J</i>=5.2 Hz, 1H), 7.55-7.38 (m, 1H), 7.29-7.10 (m, 1H), 7.05 (d, <i>J</i>=5.5 Hz, 1H), 7.01-6.93 (m, 1H), 4.55-4.43 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 1H), 3.22 (br s, 4H), 2.70 (br s, 4H), 2.39 (s, 3H), 2.14-1.96 (m, 3H), 1.92-1.73 (m, 5H); MS ESI [<i>M</i>+H]<sup>+</sup> 479.2; 计算的[C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 479.2.</p>		
<p><b>A52:</b> 6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-((吡啶-3-基甲基)氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮</p>		<p>57mg (27%); 黄色固体; TFA 盐</p>
<p>步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.3 mmol)、吡啶-3-基甲胺 (0.09 mL, 0.90 mmol)。MS ESI [<i>M</i>+H]<sup>+</sup> 724.2, 计算的[C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 724.2.</p>		
<p>步骤2: 试剂 (一般方法D): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-((吡啶-3-基甲基)氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮(粗制, 0.3 mmol)、TFA (4 mL)、浓HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, <i>CD</i><sub>3</sub><i>OD</i>) δ 8.92-8.81 (m, 1H), 8.78-8.67 (m, 1H), 8.56-8.45 (m, 1H), 8.00-7.85 (m, 2H), 7.62-7.50 (m, 1H), 7.30-7.21 (m, 1H), 7.20-7.13 (m, 1H), 7.12-7.03 (m, 1H), 5.31 (s, 2H), 3.91-3.77 (m, 2H), 3.73-3.57 (m, 2H), 3.41-3.22 (m, 2H), 3.20-3.07 (m, 2H), 3.01 (s, 3H); MS ESI [<i>M</i>+H]<sup>+</sup> 472.3, 计算的[C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>OS+H]<sup>+</sup> 472.2.</p>		
<p><b>A53:</b> 6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-((吡啶-2-基甲基)氨基)-噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮</p>		<p>100 mg (48%); 黄色固体; TFA 盐</p>
<p>步骤 1: 试剂(一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.3 mmol)、吡啶-2-基甲胺 (0.09 mL, 0.897 mmol)。MS ESI [<i>M</i>+H]<sup>+</sup> 724.2, 计算的[C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 724.2.</p>		
<p>步骤2: 试剂 (一般方法D): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-((吡啶-2-基甲基)氨基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮(粗制, 0.3 mmol)、TFA (4 mL)、浓HCl (1 mL)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, <i>CD</i><sub>3</sub><i>OD</i>) δ 8.67 (d, <i>J</i>=5.5 Hz, 1H), 8.05 (t, <i>J</i>=7.4 Hz, 1H), 7.94 (d, <i>J</i>=5.5 Hz, 1H), 7.68 (d, <i>J</i>=7.5 Hz, 1H), 7.63 (d, <i>J</i>=8.8 Hz, 1H), 7.58-7.51 (m, 1H), 7.25-7.21 (m, 2H), 7.08 (d, <i>J</i>=5.5 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.95-3.84 (m, 2H), 3.72-3.62 (m, 2H), 3.41-3.33 (m, 2H), 3.21-3.10 (m, 2H), 3.01 (m, 3H). MS ESI [<i>M</i>+H]<sup>+</sup> 472.3, 计算的[C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>OS+H]<sup>+</sup> 472.2.</p>		

实施例/ IUPAC 名称	结构	产率; 描述; 盐
<b>A54:</b> 4-(((3S,4S)-3-氟哌啶-4-基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		113 mg (53%); 黄色固体; 2 TFA
<p>步骤1: 试剂(一般方法C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.23 g, 0.30 mmol)、4-氨基-3-氟哌啶-1-羧酸(3S,4S)-叔丁酯 (0.20 g, 0.90 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI <math>[M-CF_3O_2S+2H]^+</math> 702.2, 计算的<math>[C_{37}H_{44}FN_7O_4S+H]^+</math> 702.32.</p> <p>步骤2: 试剂 (一般方法D): 3-氟-4-((7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)哌啶-1-羧酸(3S,4S)-叔丁酯 (0.23 g, 0.30 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, <math>CD_3OD</math>) <math>\delta</math> 7.55 (d, <math>J=8.8</math> Hz, 1H), 7.48 (d, <math>J=6.0</math> Hz, 1H), 7.24-7.16 (m, 2H), 7.10 (d, <math>J=8.4</math> Hz, 1H), 5.12-5.07 (m, 1H), 5.03-4.99 (m, 2H), 4.41 (br.s, 1H), 3.90-3.56 (m, 6H), 3.52-3.43 (m, 1H), 3.32-3.27 (m, 1H), 3.23-3.09 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.52-2.41 (m, 1H), 2.21-2.09 (m, 1H); MS ESI <math>[M+H]^+</math> 482.2, 计算的<math>[C_{24}H_{28}FN_7OS+H]^+</math> 482.2.</p>		
<b>A55:</b> 4-(((3R*,4S*)-3-氟哌啶-4-基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		114 mg (54%); 褐色固体; 2 TFA
<p>步骤1: 试剂(一般方法C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.23 g, 0.30 mmol)、4-氨基-3-氟哌啶-1-羧酸(3R*,4S*)-叔丁酯 (0.20 g, 0.90 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI <math>[M-CF_3O_2S+2H]^+</math> 702.2, 计算的<math>[C_{37}H_{44}FN_7O_4S+H]^+</math> 702.32.</p> <p>步骤2: 试剂 (一般方法D): 3-氟-4-((7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)哌啶-1-羧酸(3R*,4S*)-叔丁酯 (0.23 g, 0.30 mmol)、TFA (7 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, <math>CD_3OD</math>) <math>\delta</math> 7.57 (d, <math>J=8.8</math> Hz, 1H), 7.52 (d, <math>J=6.0</math> Hz, 1H), 7.24 (d, <math>J=2.1</math> Hz, 1H), 7.21 (d, <math>J=5.9</math> Hz, 1H), 7.15 (dd, <math>J=2.1</math>, 8.9 Hz, 1H), 5.19 (d, <math>J=46.7</math> Hz, 1H), 4.43-4.27 (m, 1H), 3.78 (d, <math>J=12.6</math> Hz, 3H), 3.72-3.57 (m, 2H), 3.49 (d, <math>J=13.9</math> Hz, 2 H), 3.41 (d, <math>J=14.2</math> Hz, 1H), 3.23 (d, <math>J=3.5</math> Hz, 4H), 3.00 (s, 3H), 2.42-2.23 (m, 2H); MS ESI <math>[M+H]^+</math> 482.2, 计算的<math>[C_{24}H_{28}FN_7OS+H]^+</math> 482.2.</p>		

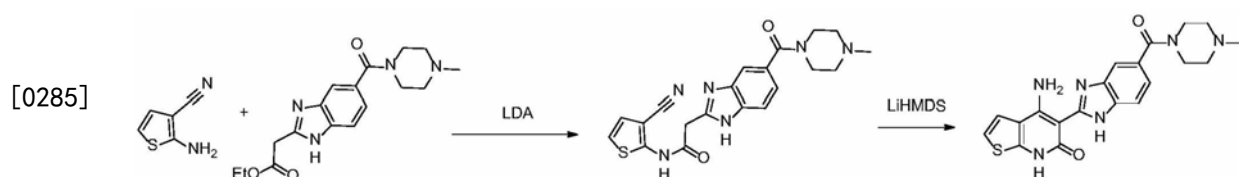
[0280]

<b>A56:</b> 4-氨基-5-(5-氟-6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		40 mg (16%); 淡褐色固体 HCl
试剂 (general 方法-A1): 2-(5-氟-6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (186 mg, 0.60 mmol)、2-氨基-2-氧基噻吩 (75 mg, 0.60 mmol)、LDA (3.0 mL, 1 M, 在 THF/hex 中, 3.0 mmol)、anh THF (6.0 mL); <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.58 (d, J=11.6 Hz, 1H), 7.55 - 7.51 (m, 2H), 7.21 (d, J=6.0 Hz, 1H), 3.97 - 3.94 (m, 4H), 3.30 - 3.27 (m, 4H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 386.2, 计算的[C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 386.1.		
<b>A57:</b> 4-(((1S,2R)-2-羟基-环己基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		36 mg (25%), 黄色固体; 游离碱
步骤 1: (一般方法 C) 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.30 mmol)、(1R,2S)-2-氨基环己醇 (0.14 g, 1.2 mmol)、DMF (7 mL)。MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 731.2, 计算的[C <sub>34</sub> H <sub>37</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 计算 731.2		
[0281] 步骤 2: (一般方法 D) 4-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (粗制, 0.30 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL); <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD-d <sub>4</sub> ) δ ppm 7.53 (d, J=5.99 Hz, 1 H), 7.48 (br. s, 1 H), 7.20 (br. s, 1 H), 7.12 (d, J=5.99 Hz, 1 H), 6.97 - 7.04 (m, 1 H), 4.38 - 4.47 (m, 1 H), 4.04 - 4.11 (m, 1 H), 3.19 - 3.28 (m, 4 H), 2.65 - 2.75 (m, 4 H), 2.40 (s, 3 H), 2.08 - 2.17 (m, 1 H), 2.00 - 2.08 (m, 1 H), 1.75 - 1.90 (m, 4 H), 1.46 - 1.61 (m, 2 H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 479.2, 计算的[C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 479.2.		
<b>A58:</b> 4-(((1S,2R)-2-羟基-环戊基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		23 mg (17%), 黄色 固体; 游离碱
步骤 1: (一般方法 C) 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.30 mmol)、(1R,2S)-2-氨基环戊醇 (0.10 g, 1.2 mmol)、DMF (7 mL)。MS ESI [C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 计算 717.2, 观测 717.2		
步骤 2: (一般方法 D) 4-(((1S,2R)-2-羟基环戊基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (粗制, 0.30 mmol)、TFA (5 mL)、HCl (1 mL); <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD-d <sub>4</sub> ) δ ppm 7.55 (d, J=5.99 Hz, 1 H), 7.42 - 7.51 (m, 1 H), 7.12 - 7.25 (m, 1 H), 7.09 (d, J=5.87 Hz, 1 H), 6.94 - 7.01 (m, 1 H), 4.43 - 4.51 (m, 1 H), 4.32 - 4.39 (m, 1 H), 3.16 - 3.26 (m, 4 H), 2.62 - 2.74 (m, 4 H), 2.38 (s, 3 H), 2.17 - 2.26 (m, 1 H), 1.89 - 2.15 (m, 4 H), 1.69 - 1.81 (m, 1 H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 465.2, 计算的[C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S+H] <sup>+</sup> 465.2		

<b>A59:</b> 4-氨基-5-(6-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		28 mg (7%); 褐色固体; TFA
[0282]	试剂 (一般方法 A2): 2-(6-(4-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (255 mg, 0.8 mmol)、2-氨基噻吩-3-腈 (100 mg, 0.8 mmol)、LDA (1.0 M, 在 THF/hex 中, 4 mL, 4 mmol)、THF (10 mL), 45°C, 2 h。获得 82 mg 未环化的和环化的混合物, 将其用 THF (10 mL) 中的 KOBu <sup>t</sup> (1.0 M, 在 THF 中, 1.0 mL, 1 mmol) 再环化, 在 rt 下 30 min, 然后在 35°C 下 1 h; <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 6.23 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.52 (d, J=5.6 Hz, 1H), 7.19 (d, J=5.6 Hz, 1H), 7.14 (dd, J=9.0, 2.2 Hz, 1H), 7.03 (d, J=2.0 Hz, 1H), 4.00-3.30 (m, 8H), 3.00 (s, 3H), 2.40-2.30 (m, 2H); MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 395.5, 计算的[C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> OS+H] <sup>+</sup> 395.2	

[0283] 按照一般方法A3制备下列化合物。

[0284] A60: 4-氨基-5-(5-(4-甲基哌嗪-1-羰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]-吡啶-6(7H)-酮

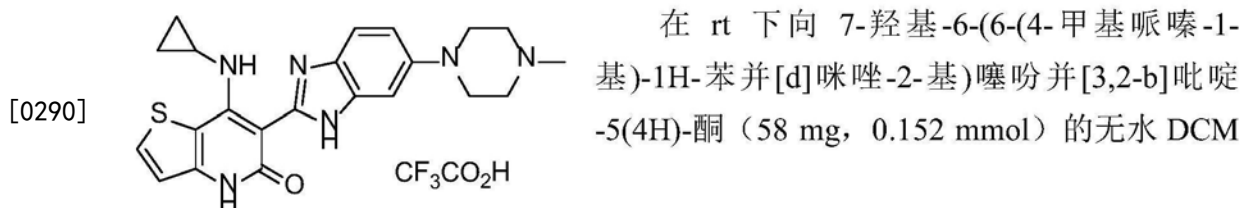


[0286] 在Ar下将LDA (1.0M in THF/己烷, 2.3mL, 2.3mmol) 在rt下经15min滴加至搅拌中的2-(6-(4-甲基哌嗪-1-羰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.150g, 0.45mmol) 和2-氨基噻吩-3-腈 (0.056g, 0.45mmol) 的anh. THF (20mL) 悬浮液。添加最初在rt下进行, 并且5分钟后在35°C下进行。在35°C下持续加热1h, 然后将反应混合物冷却至rt, 通过aq. NH<sub>4</sub>Cl猝灭, 和在减压下浓缩。通过RP HPLC的纯化提供了N-(3-氰基噻吩-2-基)-2-(5-(4-甲基哌嗪-1-羰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酰胺\*TFA, 为淡褐色固体 (82mg, 35%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.96 (s, 1H), 7.89 (d, J=8.5Hz, 1H), 7.68 (dd, J=8.4, 1.4Hz, 1H), 7.09-7.14 (m, 2H), 3.25-3.81 (m, 8H), 2.97 (s, 3H)。

[0287] 步骤2. 将前反应的产物通过PoraPak (2g, 利用MeOH, 然后MeOH中的2MNH<sub>3</sub>) 过滤和干燥。将在Ar下该材料 (0.055g, 0.13mmol) 的anh. THF (12mL) 溶液用LiHMDS (1.0M, 在THF中, 0.7mL, 0.7mmol) 在rt下经3min处理, 搅拌10min, 和在45°C下加热95min。然后使反应冷却至rt, 通过aq. NH<sub>4</sub>Cl猝灭, 在减压下浓缩, 和通过制备型HPLC纯化。通过PoraPak (2g) 过滤和与CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>一起研制提供了标题化合物, 为淡黄色固体3.6mg (3%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.58-7.77 (m, 2H), 7.51 (d, J=5.80Hz, 1H), 7.30 (dd, J=8.30, 1.30Hz, 1H), 7.14 (d, J=5.80Hz, 1H), 3.53-3.92 (m, 4H), 2.48-2.70 (m, 4H), 2.43 (s, 3H)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 409.2, 计算的[C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 409.2。

实施例/IUPAC 名称	结构	产率; 描述; 盐
<b>A61:</b> 4-氨基-5-(6-甲基-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		19 mg (7%); 橙棕色固体; TFA
试剂 (方法 A3): 步骤 1: 在 anH THF (12 mL) 中 2-(5-甲基-6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.17 g, 0.53 mmol)、2-氨基噻吩-3-腈 (72 mg, 0.53 mmol)、LDA (1.0 M, 在 THF/己烷中, 1.7 mL, 1.7 mmol)。步骤 2: 在 anH THF (20 mL) 中 LiHMDS (1.0 M, 在 THF 中, 1.7 mL, 1.7 mmol)。		
[0288]	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.48 (d, J=5.77 Hz, 1 H), 7.44 (s, 1 H), 7.38 (s, 1 H), 7.12 (d, J=5.77 Hz, 1 H), 3.58 - 3.59 (m, 2 H), 3.43-3.23 (m, 4 H), 3.07 - 3.22 (m, 2 H), 3.01 (s, 3 H), 2.45 (s, 3 H). MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 395.1, 计算的[C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> OS +H] <sup>+</sup> 395.2.	
<b>A62:</b> 4-氨基-5-(5-(吗啉-4-羰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		6.5 mg (2%); 白色固体; 游离碱
试剂 (方法 A3): 步骤 1: 在 anH. THF (24 mL) 中 2-(6-(吗啉-4-羰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.22 g, 0.70 mmol) 和 2-氨基噻吩-3-腈 (84 mg, 0.70 mmol)、LiHMDS (1.0 M, 在 THF 中, 3.5 mL, 3.5 mmol)。步骤 2: 在 anH THF (20 mL) 中 LiHMDS (1.0 M, 在 THF 中, 1.2 mL, 1.2 mmol)。		
<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.63 - 7.76 (m, 2 H), 7.48 - 7.52 (m, 1 H), 7.31 (dd, J=8.30, 1.50 Hz, 1 H), 7.14 (d, J=5.77 Hz, 1 H), 3.58 - 3.88 (m, 8 H). MS ESI [M+H] <sup>+</sup> 396.2, 计算的[C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S +H] <sup>+</sup> 396.1		

[0289] A63: 7-(环丙基氨基)-6-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]-吡啶-5(4H)-酮 2,2,2-三氟乙酸酯

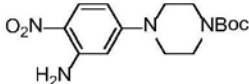


(1mL) 悬浮液滴加 Tf<sub>2</sub>O (0.55mL, 0.916mmol)。将所得反应混合物在 rt 下搅拌过夜, 然后在 0℃ 下滴加环丙胺 (100mg, 1.83mmol)。将所得反应混合物在 40℃ 下搅拌过夜, 并用 DCM 稀释, 然后用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 洗涤。将有机层在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥, 过滤, 和浓缩至干燥。将残留物溶解于 MeOH 中, 并使其通过 PoraPak, 然后在减压下去除溶剂。将粗产物通过制备型 HPLC 纯化, 以给出标题化合物, 为黄色固体 (5mg, 6% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.98 (d, J=5.5Hz, 1H), 7.61 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.26 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.21 (dd, J=8.4, 2.0Hz, 1H), 7.10 (d, J=5.5Hz, 1H), 3.92-3.84 (m, 2H), 3.71-3.62 (m, 2H), 3.41-3.36 (m, 2H), 3.20-3.10 (m, 2H),

3.09-3.03 (m, 1H), 3.01 (s, 3H), 1.04-0.96 (m, 2H), 0.93-0.89 (m, 2H); MS ESI  $[M+H]^+$  421.2, 计算的  $[C_{22}H_{24}N_6OS+H]^+$  421.2。

[0291] A64: 4-氨基-5-(6-(哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮

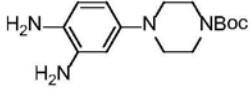
[0292] 4-(3-氨基-4-硝基苯基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0293]  将 5-氯-2-硝基苯胺 (2.5 g, 14.48 mmol)、哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (3.24 g, 17.38 mmol) 和  $K_2CO_3$  (4.0 g, 28.96 mmol)

在 DMSO (100 mL) 中的混合物在 100°C 下搅拌 3 天。然后添加  $H_2O$  (150 mL) 并搅拌, 抽吸过滤, 用  $H_2O$  漂洗, 和干燥, 以给出标题化合物, 为褐色固体 (2.6 g, 57%)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.04 (d,  $J=9.79$  Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J=9.66, 2.64$  Hz, 1H), 6.21-6.11 (m, 2H), 5.95 (d,  $J=2.51$  Hz, 1H), 3.61-3.54 (m, 4H), 3.40-3.34 (m, 4H), 1.50 (s, 9H); MS ESI  $[M+H]^+$  323.2, 计算的  $[C_{15}H_{22}N_4O_4+H]^+$  323.2。

[0294] 4-(3,4-二氨基苯基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0295] 向 4-(3-氨基-4-硝基苯基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (2.6 g, 8.04

 mmol) 的 MeOH (150 mL) 悬浮液添加 10% Pd/C (130 mg, 混合物过 5% wt.)。将所得混合物在  $H_2$  球囊 O/N 下氢化。将所得反应

滤, 浓缩和干燥, 以给出标题化合物, 为深褐色固体 (2.29 g, 97%)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.66 (d,  $J=8.28$  Hz, 1H), 6.39 (d,  $J=2.51$  Hz, 1H), 6.34 (dd,  $J=8.28, 2.51$  Hz, 1H), 3.60-3.53 (m, 4H), 3.46-3.23 (m, 4H), 3.02-2.95 (m, 4H), 1.49 (s, 9H); MS ESI  $[M+H]^+$  293.1, 计算的  $[C_{15}H_{24}N_4O_2+H]^+$  293.2。

[0296] 4-(2-(2-乙氧基-2-oxo乙基)-1H-苯并[d]咪唑-6-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0297] 向 4-(3,4-二氨基苯基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (100 mg, 0.34 mmol) 的 EtOH (3 mL) 溶液添加 3-乙氧基-3-亚氨基丙酸盐乙酯 (190 mg, 0.68 mmol)。将所得混合物在 60°C 下加热 3 h。在去除溶剂后, 将其用 DCM (10 mL) 稀释, 用饱和  $NaHCO_3$  调节 pH  $\approx 8$ , 和分离。将含水物 (the aqueous) 用 DCM (10 mL  $\times 2$ ) 萃取, 并将组合的萃取物在  $NaSO_4$  上干燥, 然后浓缩和通过快速色谱法 (梯度: 100% EtOAc, 然后 MeOH/DCM 0-20%) 纯化, 以给出标题化合物, 为深橙色固体 (116 mg, 87%)。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.49-7.40 (m, 1H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.22 (q,  $J=7.11$  Hz, 2H), 3.95 (s, 1H), 3.61 (br. s., 4H), 3.11 (br. s., 4H), 1.50 (s, 9H), 1.28 (t,  $J=7.15$  Hz, 3H); MS ESI  $[M+H]^+$  389.2, 计算的  $[C_{20}H_{28}N_4O_4+H]^+$  389.2。

[0298] 4-(2-(4-氨基-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-5-基)-1H-苯并[d]咪唑-6-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯



按照一般方法 A, 利用 2-氨基-4-乙氧基噻吩-3-腈

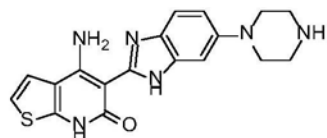
(64 mg, 0.52 mmol)、4-(2-(2-乙氧基-2-oxo乙基)-1H-苯并[d]咪唑-6-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (200 mg, 0.52 mmol)、LiHMDS (1M, 在 THF 中, 2.0 mL, 2.06 mmol) 的溶液生成标题化合物, 为淡褐色固体 (88 mg, 35%)。 $^1H$  NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  12.72-12.61 (m, 1H), 12.13-12.02 (m,



1H), 10.72-10.55 (m, 1H), 8.01-7.93 (m, 1H), 7.57 (d, J=5.62Hz, 1H), 7.52-7.43 (m, 1H), 7.24-7.10 (m, 2H), 6.93-6.87 (m, 1H), 3.52-3.44 (m, 4H), 3.07-3.00 (m, 4H), 1.45-1.40 (m, 9H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup>467.2, 计算的 [C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S+H]<sup>+</sup>467.2。

[0300] 4-氨基-5-(6-(哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮

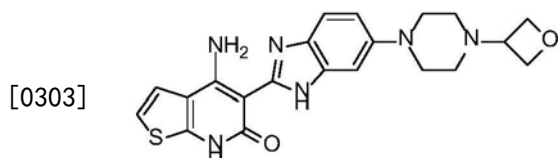
[0301] 将4-(2-(4-氨基-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-5-



基)-1H-苯并[d]咪唑-6-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (83 mg, 0.178 mmol) 在 TFA (1 mL) 中的混合物在 rt 下搅拌 2 使其通过 h, 然后浓缩。将残留物溶解于 MeOH (20 mL) 中, 并

PoraPak, 然后浓缩, 以给出标题化合物, 为黄色固体 (45mg, 69%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.65-12.58 (m, 1H), 10.77-10.61 (m, 1H), 8.03-7.94 (m, 1H), 7.59 (d, J=5.77Hz, 1H), 7.54-7.42 (m, 1H), 7.19-7.10 (m, 2H), 6.92-6.86 (m, 1H), 3.09-3.01 (m, 4H), 2.94-2.88 (m, 4H); the signal due to NH<sub>2</sub> cannot be readily detected. MS ESI [M+H]<sup>+</sup>367.2, 计算的 [C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>OS+H]<sup>+</sup>367.1。

[0302] A65:4-氨基-5-(6-(4-(氧杂环丁烷-3-基)哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮

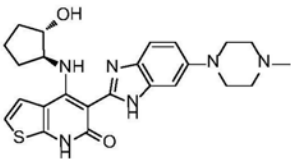
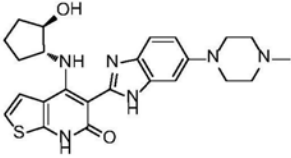


[0303]

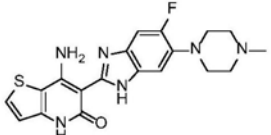
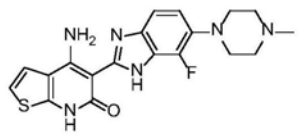
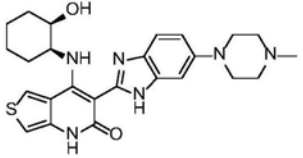
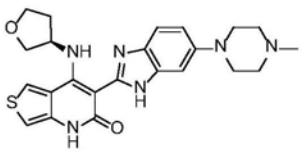
将 4-氨基-5-(6-(哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮 (45 mg, 0.123 mmol)、氧杂环丁烷-3-酮 (8.8 mg, 0.123 mmol)、和 NaBH(OAc)<sub>3</sub> (120 mg, 0.552 mmol) 在 DCE

(2mL) 中的混合物在 rt 下搅拌过夜, 然后过滤。将滤液浓缩和通过制备型 HPLC 纯化, 以给出作为 TFA 盐的标题化合物, 为黄色固体 (50mg, 76%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.66 (d, J=9.03Hz, 1H), 7.51 (d, J=5.77Hz, 1H), 7.29 (t, J=8.91Hz, 2H), 7.18 (d, J=6.02Hz, 1H), 4.98-4.87 (m, 4H), 4.54-4.45 (m, 1H), 3.63-3.40 (m, 8H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup>423.2, 计算的 [C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup>423.2。

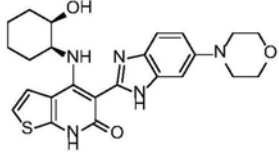
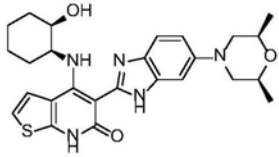
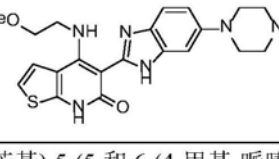
[0304]

实施例/ IUPAC 名称	结构	产率; 描述; 盐
<b>A66:</b> 4-(((1S,2S)-2-羟基环戊基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		35 mg (23%); 褐色固体; 2 HCl
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.22 g, 0.29 mmol)、(1S,2S)-2-氨基环戊-1-醇 (0.12 g, 1.2 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI $[M-CF_3O_2S+2H]^+$ 585.4, 计算的 $[C_{32}H_{36}N_6O_3S+H]^+$ 585.3.		
步骤2: 试剂 (一般方法D): 2-(4-(((1S,2S)-2-羟基环戊基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-5-基)-5-和6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.28 mmol)、TFA (5 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ = 7.75 - 7.60 (m, 2 H), 7.41 (br. s, 1 H), 7.30 (s, 1 H), 7.19 (d, J = 5.0 Hz, 1 H), 4.15 - 4.04 (m, 1 H), 4.02 - 3.89 (m, 2 H), 3.73 - 3.61 (m, 2 H), 3.28 - 3.14 (m, 5 H), 3.00 (br. s., 3 H), 1.99 - 1.84 (m, 2 H), 1.76 - 1.46 (m, 3 H), 1.43 - 1.31 (m, 1 H); MS ESI $[M+H]^+$ 465.3, 计算的 $[C_{24}H_{28}N_6O_2S+H]^+$ 465.2.		
<b>A67:</b> 4-(((1R,2R)-2-羟基环戊基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		45 mg (29%); 褐色固体; 2 HCl
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.22 g, 0.29 mmol)、(1R,2R)-2-氨基环戊-1-醇 (0.12 g, 1.2 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI $[M-CF_3O_2S+2H]^+$ 585.4, 计算的 $[C_{32}H_{36}N_6O_3S+H]^+$ 585.3.		
步骤2: 试剂 (一般方法D): 2-(4-(((1R,2R)-2-羟基环戊基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-5-基)-5-和6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.28 mmol)、TFA (5 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。 <sup>1</sup> H NMR (400MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ = 7.76 - 7.62 (m, 2 H), 7.45 - 7.36 (m, 1 H), 7.35 - 7.26 (m, 1 H), 7.22 - 7.15 (m, 1 H), 4.14 - 4.05 (m, 1 H), 4.02 - 3.89 (m, 2 H), 3.74 - 3.62 (m, 2 H), 3.27 - 3.17 (m, 5 H), 3.00 (br. s., 3 H), 2.00 - 1.83 (m, 2 H), 1.74 - 1.47 (m, 3 H), 1.45 - 1.32		

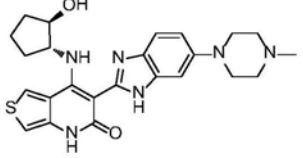
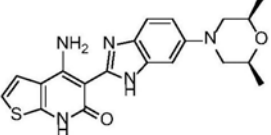
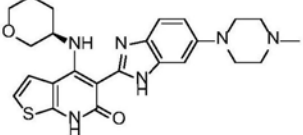
[0305]

(m, 1 H); MS ESI $[M+H]^+$ 465.3, 计算的 $[C_{24}H_{28}N_6O_2S+H]^+$ 465.2.		
<b>A68:</b> 7-氨基-6-(5-氟-6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-5(4H)-酮		91 mg (32%); 褐色固体; 2 HCl
试剂 (一般方法 A1): 3-氨基-2-氰基噻吩 (75 mg, 0.6 mmol)、2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (193 mg, 0.6 mmol)、LDA (3 mL, 3 mmol)、THF (8 mL)。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 8.01 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=11.0$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 3.71-3.68 (m, 4H), 3.46-3.41 (m, 2H), 3.23-3.31 (m, 2H), 3.03 (s, 3H); MS ESI $[M+H]^+$ 399.2, 计算的 $[C_{19}H_{19}FN_6OS+H]^+$ 399.4.		
<b>A69:</b> 4-氨基-5-(7-氟-6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮		49 mg (13%); 褐色固体; 2 HCl
试剂 (一般方法 A1): 2-氨基-3-氰基噻吩 (100 mg, 0.8 mmol)、2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (258 mg, 0.8 mmol)、LDA (4 mL, 4 mmol)、THF (10 mL)。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 7.57-7.51 (m, 2H), 7.39-7.35 (m, 1H), 7.20 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 3.69-3.36 (m, 4H), 3.47 - 3.37 (m, 4H), 3.35 (s, 2H), 3.03 (s, 3H); MS ESI $[M+H]^+$ 399.2, 计算的 $[C_{19}H_{19}FN_6OS+H]^+$ 399.4.		
<b>A70:</b> 4-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-3-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮		40 mg (22%); 黄色固体; 2 HCl
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.26 g, 0.34 mmol)、(1R,2S)-2-氨基环己-1-醇 (0.1 g, 0.85 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI $[M+H]^+$ 731.3, 计算的 $[C_{34}H_{37}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 731.2.		
步骤 2: 试剂 (一般方法 D): 4-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-1-(4-甲氧基苄基)-3-(5-和 (6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮 (220 mg 粗制)、TFA (5 mL)、和浓 HCl (2 mL) 的混合物。 $^1H$ NMR (400 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ 8.43 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J=9.0, 2.2$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 4.03-3.94 (m, 3H), 3.74-3.65 (m, 2H), 3.42-3.35 (m, 3H), 3.31-3.19 (m, 3H), 3.03 (s, 3H), 1.87-1.57 (m, 5H), 1.35-1.17 (m, 2H); MS ESI $[M+H]^+$ 479.4, 计算的 $[C_{25}H_{30}N_6O_2S+H]^+$ 479.2.		
<b>A71:</b> (R)-3-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢呋喃-3-基)氨基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮		6 mg (3%); 黄色固体; 2 HCl
步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.19 g, 0.26 mmol)、(R)-3-氨基四氢呋喃 (0.06 g, 0.64 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI $[M+H]^+$ 703.3, 计算的 $[C_{32}H_{33}F_3N_6O_5S_2+H]^+$ 703.2.		

[0306]

<p>步骤 2: 试剂 (一般方法 D): (R)-3-(5-和 (6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢呋喃-3-基)氨基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮 (粗制, 165 mg)、TFA (4 mL)、和浓 HCl (1.5 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.54 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.74 (d, J=9.5 Hz, 1H), 7.45 (dd, J=9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.34 (d, J=2.01 Hz, 1H), 7.00 (d, J=3.3 Hz, 1H), 4.02-3.91 (m, 3H), 3.85 (dd, J=9.5, 3.3 Hz, 1H), 3.78-3.54 (m, 5H), 3.43-3.35 (m, 2H), 3.28-3.19 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.11-1.94 (m, 2H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 451.3, 计算的[C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 451.2.</p>		
<p><b>A72:</b> 4-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-5-(6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮</p>		<p>19 mg (7%); 褐色固体; 2 HCl</p>
<p>步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 4-(4-甲氧基苄基)-6-(5-和 6-吗啉基-1-((三氟-甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-5-氧-4,5-二氢噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.51 mmol)、(1R,2S)-2-氨基环己醇 (0.23 g, 2.1 mmol)、DMF (6 mL)。MS ESI [M-CF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S+2H]<sup>+</sup> 586.5, 计算的[C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S+H]<sup>+</sup> 586.2.</p>		
<p>步骤2: 试剂 (一般方法D): 2-(4-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-5-基)-5-和6-吗啉基-1H-苯并[d]咪唑-1-基三氟甲磺酸酯 (0.38, 0.51 mmol)、TFA (5 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ = 7.77 - 7.69 (m, 1 H), 7.64 - 7.57 (m, 1 H), 7.54 - 7.45 (m, 2 H), 7.24 - 7.15 (m, 1 H), 4.09 - 3.96 (m, 5 H), 3.60 - 3.44 (m, 5 H), 1.98 - 1.52 (m, 6 H), 1.48 - 1.22 (m, 2 H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 466.4, 计算的[C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S+H]<sup>+</sup> 466.2.</p>		
<p><b>A73:</b> 5-(6-((2S,6R)-2,6-二甲基吗啉基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮</p>		<p>8 mg (6%); 褐色固体; TFA</p>
<p>步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 5-(5 和 (6-((2S,6R)-2,6-二甲基吗啉基)-1-(((三氟甲基)磺酰基)氧)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-7-(4-甲氧基苄基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.23 mmol)、(1R,2S)-2-氨基环己醇 (0.26 g, 0.23 mmol)、DMF (1 mL)。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 746.5, 计算的[C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 746.2.</p>		
<p>步骤2: 试剂 (一般方法D): 5-(6-((2S,6R)-2,6-二甲基吗啉基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮和5-((2S,6R)-2,6-二甲基吗啉基)-2-(4-(((1S,2R)-2-羟基环己基)氨基)-7-(4-甲氧基苄基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-5-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基三氟甲磺酸酯 (0.094 g, 0.13 mmol)、TFA (3 mL)、和浓HCl (1 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.69 (d, J=9.0 Hz, 1 H), 7.56 - 7.48 (m, 2 H), 7.40 (d, J=10.0 Hz, 1 H), 7.20 (d, J=6.0 Hz, 1 H), 4.10 - 4.04 (m, 1 H), 4.04 - 3.89 (m, 3 H), 3.67 (d, J=11.3 Hz, 2 H), 2.98 - 2.86 (m, 2 H), 2.02 - 1.89 (m, 2 H), 1.86 - 1.68 (m, 3 H), 1.68 - 1.58 (m, 1 H), 1.52 - 1.40 (m, 1 H), 1.39 - 1.33 (m, 1 H), 1.31 (d, J=6.3 Hz, 6 H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 494.5, 计算的[C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S+H]<sup>+</sup> 494.2.</p>		
<p><b>A74:</b> 4-(2-甲氧基乙基)氨基)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮</p>		<p>55 mg (33%); 深黄色固体; TFA</p>
<p>步骤 1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5 和 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.30 mmol)、2-甲氧基乙胺 (0.10 mL, 1.2 mmol)、DMF (4 mL) 的混合物。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 691.4, 计算的[C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 691.2.</p>		

[0307]

<p>步骤2: 试剂 (一般方法D): 2-(7-(4-甲氧基苄基)-4-((2-甲氧基乙基)氨基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-5-基)-5-和6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.30 mmol)、TFA (5 mL)、和浓HCl (0.5 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.68 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.62 - 7.56 (m, 1 H), 7.34 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 7.29 (d, J = 1.8 Hz, 1 H), 7.20 (d, J = 6.0 Hz, 1 H), 3.99 - 3.86 (m, 2 H), 3.76 - 3.64 (m, 2 H), 3.58 (d, J = 5.3 Hz, 2 H), 3.42 - 3.34 (m, 7 H), 3.25 - 3.12 (m, 2 H), 3.02 (s, 3 H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 439.5, 计算的[C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 439.2.</p>		
<p><b>A75:</b> 4-(((1R,2R)-2-羟基环戊基)氨基)-3-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮</p>		<p>22 mg (16%); 黄色固体; 2 HCl</p>
<p>步骤1: 试剂(一般方法C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和/或6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (0.19 g, 0.26 mmol)、(1R,2R)-2-氨基环戊醇 (0.06 g, 0.64 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 717.2, 计算的[C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 717.2.</p>		
<p>步骤2: 试剂 (一般方法 D): 4-(((1R,2R)-2-羟基环戊基)氨基)-1-(4-甲氧基苄基)-3-(5-和(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[3,4-b]吡啶-2(1H)-酮 (粗制, 165 mg)、TFA (4 mL)、和浓 HCl (1 mL) 的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.59 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.72 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 9.0, 2.3Hz, 1H), 7.33 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.00 (d, J=3.3 Hz, 1H), 4.19-4.12 (m, 1H), 4.00-3.97 (m, 2H), 3.74-3.65 (m, 2H), 3.43-3.35 (m, 2H), 3.30-3.21 (m, 2H), 3.19-3.10 (m, 1H), 3.03 (s, 3H), 1.99-1.87 (m, 2H), 1.76-1.65 (m, 2H), 1.57-1.44 (m, 1H), 1.44-1.28 (m, 1H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 465.4, 计算的[C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 465.2.</p>		
<p><b>A76:</b> 4-氨基-5-(6-((2S,6R)-2,6-二甲基吗啉基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮</p>		<p>49 mg (31%); 黄绿色固体; TFA</p>
<p>试剂 (一般方法 A2): 2-(6-((2S,6R)-2,6-二甲基吗啉基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙酸乙酯 (0.10 g, 0.32 mmol)、2-氨基噻吩-3-腈 (0.32 g, 0.32 mmol)、LDA (1.0 M, 在 THF/hex 中, 1.1 mL, 1.1 mmol)、THF (1 mL), 45°C, 1.5 h. 获得 50 mg 未环化的和环化的混合物, 将其用 THF (10 mL) 中的 KOBu<sup>t</sup> (1.0 M, 在 THF 中, 1.3 mL, 1.3 mmol) 再环化, 45°C, 2 h; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.69 (d, J = 9.5 Hz, 1 H), 7.52 (d, J = 6.0 Hz, 1 H), 7.49 - 7.45 (m, 1 H), 7.37 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 7.19 (d, J = 5.8 Hz, 1 H), 4.03 - 3.92 (m, 2 H), 3.71 - 3.61 (m, 2 H), 2.92 - 2.77 (m, 2 H), 1.31 (d, J = 6.3 Hz, 6 H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 396.3, 计算的[C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 396.1.</p>		
<p><b>A77:</b> (R)-5-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-4-((四氢-2H-吡喃-3-基)氨基)噻吩并[2,3-b]吡啶-6(7H)-酮</p>		<p>66 mg (38%); 黄色固体; TFA</p>
<p>步骤1: 试剂 (一般方法 C): 7-(4-甲氧基苄基)-5-(5和6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1-((三氟甲基)磺酰基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-6-氧-6,7-二氢噻吩并[2,3-b]吡啶-4-基三氟甲磺酸酯 (粗制, 0.30 mmol)、(R)-四氢-2H-吡喃-3-胺 (粗制, 在 DCM 中, 1.5 mmol)、DMF (5 mL) 的混合物。MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 717.4, 计算的[C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 717.2.</p>		
<p>步骤2: 试剂 (一般方法D): (R)-2-(7-(4-甲氧基苄基)-6-氧-4-((四氢-2H-吡喃-3-基)氨基)-6,7-二氢噻吩</p>		

[0308]

并[2,3-b]吡啶-5-基)-5-和6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基三氟甲磺酸酯(粗制, 0.30 mmol)、TFA、和浓HCl的混合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.67 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.56 (d, J = 5.8 Hz, 1 H), 7.37 - 7.26 (m, 2 H), 7.21 (d, J = 6.0 Hz, 1 H), 4.00 - 3.80 (m, 3 H), 3.75 - 3.59 (m, 3 H), 3.53 - 3.41 (m, 2 H), 3.40 - 3.34 (m, 2 H), 3.29 - 3.11 (m, 3 H), 3.01 (s, 3 H), 2.14 - 1.96 (m, 1 H), 1.83 - 1.66 (m, 2 H), 1.42 - 1.25 (m, 1 H); MS ESI [M+H]<sup>+</sup> 465.3, 计算的[C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S+H]<sup>+</sup> 465.2.

[0309] 实施例B:HPK1抑制测定

[0310] 活性HPK1 (MAP4K1), 作为人HPK1 (aa 1-346) 的N端GST融合, 购自Invitrogen (cat# PV6355)。利用间接ELISA检测系统测量HPK1活性。将GST-HPK1 (0.6nM) 在存在12μM ATP (Sigma cat#A7699)、5mM MOPS (pH 7.2)、2.5mM β-甘油-磷酸酯、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.4mM EDTA、1mM EGTA、0.05mM DTT的情况下在预涂有0.5μg/孔牛髓鞘碱性蛋白 (MBP) (Millipore, cat# 13-110) 的96孔微量滴定板中培育。使反应进行30min, 然后用洗涤缓冲液(补充有0.2%吐温20的磷酸缓冲盐水)将板洗涤5次, 并与抗磷酸-苏氨酸兔多克隆抗体(Cell Signaling cat#9381)的1:3000稀释液一起培育30min。用洗涤缓冲液将板洗涤5次, 在存在山羊抗兔辣根过氧化物酶缀合物(BioRad cat#1721019, 1:3000浓度)的情况下培育30min, 用洗涤缓冲液再洗涤5次, 并在存在TMB底物(Sigma cat#T0440)的情况下培育。使比色反应持续5min, 然后添加终止液(0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 并通过利用单色板读取器(Molecular Devices M5)在450nm下的检测来定量。

[0311] 在固定浓度(10μM)或可变抑制剂浓度(一般50μM至0.1μM, 10点剂量响应滴定)下确定化合物抑制。将化合物在酶存在的情况下预培育15min, 然后添加ATP, 并利用上述活性测定来定量保留的活性。化合物的%抑制用下列公式确定; %抑制 = 100x (1 - (实验值 - 背景值) / (高活性对照 - 背景值))。IC<sub>50</sub>值用非线性4点逻辑曲线拟合(XLfit4, IDBS)确定, 公式为: (A + (B / (1 + ((x/C) ^ D)))) , 其中A = 背景值, B = 范围, C = 拐点, D = 曲线拟合参数。

[0312] 实施例C:FLT3抑制测定

[0313] FLT3和LCK化合物抑制利用基于FRET的Z'-LYTE激酶测定试剂盒, 以酪氨酸2肽作为底物(Invitrogen cat#PV3191)来确定。FLT3激酶测定按照制造商建议的说明, 以940μM ATP浓度和1nM FLT3(Invitrogen cat#PV3182)进行, 并且180μM ATP和25nM LCK(Invitrogen cat#P3043)用于LCK激酶反应。%抑制值按照制造商的指导来确定, 并且IC<sub>50</sub>值利用非线性4点逻辑曲线拟合(XLfit4, IDBS)获得。

[0314] 在下表1中, 给出了示例性化合物的IC<sub>50</sub>值范围。IC<sub>50</sub>范围分别以“A”、“B”和“C”表示小于或等于0.05μM的值; 大于0.05μM且小于或等于0.5μM的值; 和大于0.5μM的值。

[0315] 表1:HPK1、Lck和Flt3的抑制数据

[0316]

实施例	IC <sub>50</sub> 范围		
	HPK1	Lck	Flt3
A1	A	B	A
A2	A	B	A
A3	C	-	-
A4	A	B	A
A5	C	C	-
A6	B	-	-
A7	A	B	A
A8	A	B	A
A9	A	A	A
A10	A	B	A
A11	A		
A12	A	-	-
A13	A	B	A
A14	A	A	A
A15	A	A	A
A16	A	-	-
A17	A	A	A
A18	A	B	A
A19	B		
A20	C		
A21	A	C	B
A22	A	B	A
A23	A	A	A
A24	A	A	A
A25	A	-	-
A26	A	-	-
A27	A	A	A
A28	A	-	-
A29	A	B	-
A30	A	A	A
A31	A	B	A
A32	C	A	-
A33	A	B	A
A34	A	A	A
A35	A	A	A
A36	A	A	A
A37	A	A	A
A38	A	A	A

[0317]

A39	A	A	A
A40	A	A	A
A41	A	A	A
A42	A	A	A
A43	A	B	A
A44	A	A	A
A45	A	A	A
A46	A	B	A
A47	A	-	-
A48	A	A	A
A49	C	-	-
A50	C	C	-
A51	A	-	-
A52	A	A	A
A53	A	A	A
A54	A	B	A
A55	A	B	A
A56	A	-	-
A57	A	B	A
A58	A	B	A
A59	-	-	-
A60	B	B	-
A61	A	B	A
A62	B	-	-
A63	A	-	-
A64	A	B	A
A65	A	B	A
A66	A	A	A
A67	A	B	A
A68	A	A	A
A69	-	B	A
A70	-	A	A
A71	A	A	A
A72	A	C	A
A73	B	-	-
A74	A	-	-
A75	A	-	-
A76	A	-	-
A77	A	-	-

[0318] 实施例D:体外磷酸化测定

[0319] Jurkat E6.1细胞得自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection)(ATCC,Manassas,VA),并且按照供应者的指示保存。将细胞洗涤三次,并在补充有0.5%胎牛血清的RPMI 1640培养基中在37℃下饥饿18h。血清饥饿细胞用指示浓度的抑制剂预处理4小时,然后在37℃下用10μg/ml $\alpha$ -CD3抗体(BioLegend,Inc.,San Diego,CA)



刺激10min。将细胞在包含10mm焦磷酸钠、10mm氯化钠、10mm EDTA、和1mm原钒酸钠的磷酸缓冲盐水(pH 7.4)中洗涤一次。利用冰冷放射免疫沉淀测定(RIPA)溶解缓冲剂制备蛋白质溶解物。将总共100μg细胞溶解物加载到Bis-Tris凝胶(Life Technologies, Carlsbad, CA)上,以全范围分子量标记作为大小参考,和通过SDS-PAGE电泳分离(resolved)。将蛋白质转移至PVDF膜(Millipore, Billerica, MA),阻断,和用磷酸-SLP-76(Ser376)(兔多克隆#13177;Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA)、SLP-76(兔多克隆#4958;Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA)、磷酸-ERK(小鼠单克隆sc-7383;Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)和ERK1/2(兔多克隆06-182;Millipore, Billerica, MA)的抗体探测。将二级抗体以1:15,000稀释,并在rt下培育1h。利用Odyssey近红外成像仪(LI-COR, Lincoln, NE)可视化和定量蛋白质带。

[0320] 下表2列出了在α-CD3刺激的Jurkat E6.1细胞中本发明的代表性化合物对SLP-76丝氨酸376磷酸化和ERK1/2 T202/Y204磷酸化的效果。

[0321] 表2. 在α-CD3刺激的Jurkat E6.1细胞中HPK1抑制剂对SLP-76丝氨酸376磷酸化和ERK1/2 T202/Y204磷酸化的效果。

化合物实施例	SLP76 S376 磷酸化	ERK1/2 T202/Y204 磷酸化
	开始(onset) -实质性* 抑制(μM)	开始抑制(μM)
A1	0.3-1.0	> 3.0
A30	0.3-1.0	> 3.0
A43	0.1-0.3	> 3.0
A18	0.3-1.0	> 3.0
A10	1.0-3.0	> 3.0
A57	0.3-1.0	> 3.0
A23	0.3-1.0	> 3.0
A58	0.1-0.3	> 3.0
A34	1.0-3.0	3.0
A21	>3.0	>3.0
A37	0.1-0.3	1.0-3.0

[0323] \*通过免疫印迹分析估测, >75%抑制

[0324] 实施例E: 同系CT26细胞系异种移植物模型。

[0325] CT26WT细胞系, 一种N-亚硝基-N-甲基尿烷(NNMU)诱导的、小鼠源性的、未分化的结肠癌细胞系, 得自美国模式培养物保藏所(ATCC CRL-2638, Manassas, VA, DC, USA)。使细胞在包含4.5g/L葡萄糖、0.11g/L丙酮酸钠、1.5g/L碳酸氢钠、L-谷氨酰胺&2.385g/L HEPES加10%胎牛血清的洛斯维帕克纪念研究所(Roswell Park memorial Institute)培养基(常被称为RPMI 1640培养基)中生长。6至8周龄雌性BALB/c小鼠购自Jackson Laboratories, 并且在MaRS-TMDT动物资源中心被接收和适应1周, 然后开始实验。小鼠随意以高压灭菌水和由19%粗蛋白、5%粗脂肪和5%粗纤维组成的啮齿动物实验室饮食(Harlan Teklad LM-485)饲养。小鼠居于微型隔离笼中, 并保持20-22℃和40-60%湿度以及12h光照周期的环境中。在植入当天, 采集CT26细胞, 并将其重悬浮于无血清RPMI1640至 $1 \times 10^7$ /mL浓度, 并且对每只小鼠在右后侧皮下注射包含 $1 \times 10^6$ CT26细胞的0.1mL体积。6d后, 形成平均体积~65mm<sup>3</sup>(利用下列公式计算: 肿瘤体积=宽度<sup>2</sup>×长度/2)的可触知的肿瘤。此时, 将动物分成五组, 每组八只动物, 使得每组均包含负载平均尺寸相似的肿瘤的动物,

并开始治疗。关于给药,将实施例A1在水中溶解至7.5mg/mL或15mg/mL的浓度,分别用于75mg/kg和150mg/kg剂量的用药。作为阳性对照和为考察实施例A1的组合活性,大鼠IgG2b抗PD1抗体(BioX细胞(NH,USA))被给药使用。将五组用下列进行治疗:i) 10mL/kg水,QD,21d,通过口服灌胃(PO)给予,外加在第0、3、6和10天(对照小组)通过腹膜内(IP)注射给药的150μg大鼠IgG2b同种型对照抗体;ii) 150μg抗PD-1抗体,在第0、3、6和10天通过腹膜内(IP)注射;iii) 75mg/kg实施例A1,QD,21天,通过PO给予;iv) 150mg/kg实施例A1,QD,21天,PO给予;v) 150mg/kg实施例A1,QD,21天,PO给予,外加在第0、3、6和10天通过腹膜内(IP)注射给药的150μg抗PD-1抗体。通过体重测量和临床观察评价毒性。肿瘤测量和体重每周进行三次。肿瘤生长抑制(TGI)百分比通过下列公式计算: $\%TGI = 100 \times [1 - (TV_{f,treated} - TV_{i,treated}) / (TV_{f,control} - TV_{i,control})]$

[0326] 第21天的肿瘤生长抑制显示在图2中。观察响应于用实施例A1治疗的剂量依赖性效果,75mg/kg和150mg/kg QD分别使肿瘤生长抑制44%和64%。当抗PD-1抗体独自导致平均TGI为34%时,与150mg/kg QD实施例A1组合时TGI增加至86%。

[0327] 按照大学健康网络(University Health Network) (UHN) 的动物使用协议(AUPs),功效实验中的小鼠应在肿瘤尺寸为1500mm<sup>3</sup>以上时或在动物体重减少时或在动物显示因人道原因需要终结的临床征兆时被处死。在本研究中,研究过程中化合物被所有增重动物良好地耐受,并且没有动物因临床征兆被终结。在第21天<1500mm<sup>3</sup>的肿瘤尺寸用作表示存活的截止线(cutoff)。利用此截止线,在第21天,对照小组中没有动物存活,抗PD-1小组中1/8的动物(12.5%)存活,75mg/kg/天实施例A1小组中2/8的动物(25%)存活,150mg/kg/天实施例A1小组中3/8的动物(37.5%)存活,和150mg/kg/天实施例A1和抗PD-1小组中7/8的动物(87.5%)存活。这些结果证实,通过化合物A1示例的本发明化合物具有体内抗肿瘤活性,并且可有效组合其它免疫调节方法。

[0328] 实施例F:EAE疾病进展模型

[0329] C57/BL6小鼠得自杰克逊实验室(Jackson Laboratories)。大学健康网络的机构动物护理和使用委员会(The Institutional Animal Care and Use Committee of the University Health Network)批准了所有动物程序。以在补充有结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)的弗氏完全佐剂(Complete Freund Adjuvant) (CFA) 中乳化的MOG35-55肽对小鼠进行皮下(SC)免疫。在免疫后第0和2天,对小鼠腹膜内(IP)注射百日咳毒素。每日监测EAE临床征兆,根据下列标准:0,无疾病;1,尾音降低;2,后肢无力或部分麻痹;3,完全后肢麻痹;4,前肢和后肢麻痹;5,死亡、或因濒死状态而处死。关于在EAE诱导期间用化合物治疗,每日(QD)对小鼠口服施用(PO) 50mg/kg A30 (n=4) 或水(载体对照;n=5)。数据为平均评分±SEM。测试结果显示在图3中。

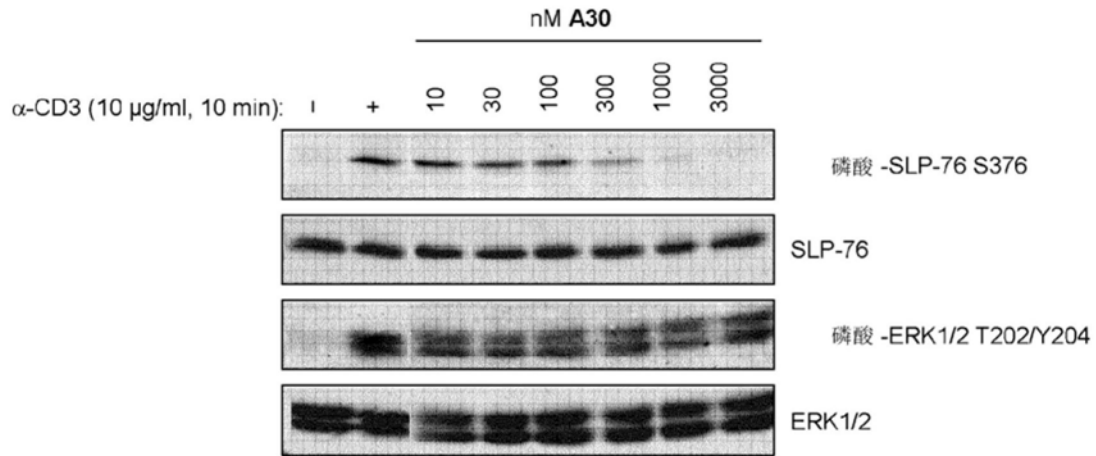


图1

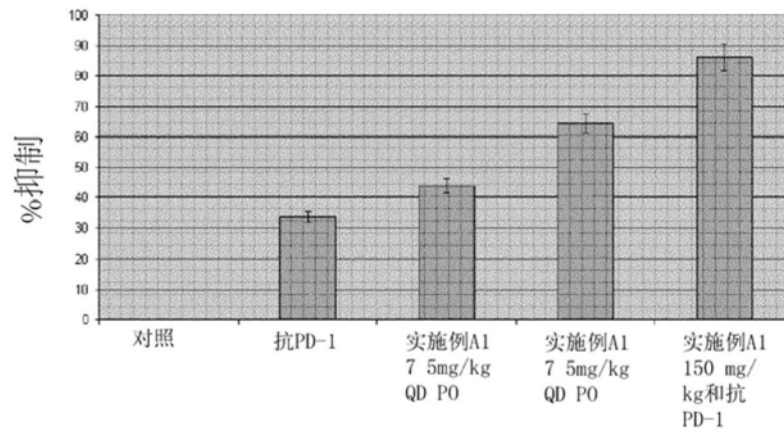


图2

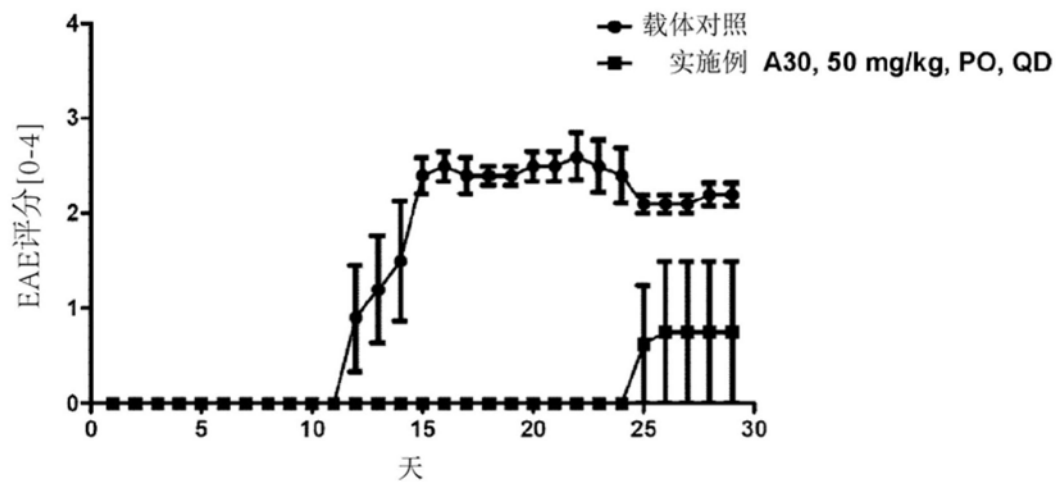


图3