



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101980711 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 31

(21) 申请号 200980110976. 1

(22) 申请日 2009. 03. 24

(30) 优先权数据

61/039, 961 2008. 03. 27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/038010 2009. 03. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02009/120650 EN 2009. 10. 01

(73) 专利权人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 约翰·A·本德 杨忠

约翰·F·卡多

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 陈桢

(51) Int. Cl.

C07D 487/14 (2006. 01)

A61K 31/551 (2006. 01)

A61P 31/14 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2006/020082 A1, 2006. 02. 23, 权利要求 1-38.

US 4897392 A, 1990. 01. 30, 权利要求 1-29.

W0 2007/029029 A2, 2007. 03. 15, 权利要求 1-20.

审查员 吕霖

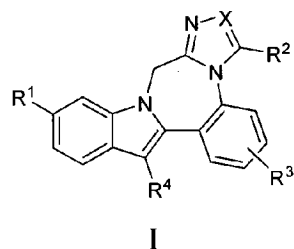
权利要求书 2 页 说明书 22 页

(54) 发明名称

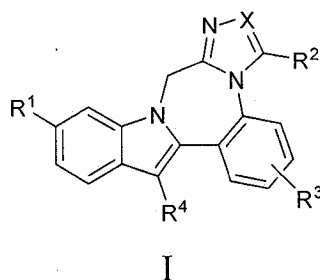
芳族杂环稠合的吡啶并苯并二氮杂萘 HCV NS5B 抑制剂

(57) 摘要

本发明披露了式 I 的化合物, 包括它们的盐, 以及组合物和使用所述化合物的方法。所述化合物具有抗丙型肝炎病毒 (HCV) 的活性, 并可用于治疗被 HCV 感染的那些患者。



1. 式 I 的化合物或其药用盐：



其中：

R^1 为 CO_2R^5 或 CONR^6R^7 ；

R^2 为氢或烷基；

R^3 为氢；

R^4 为环烷基；

R^5 为氢或烷基；

R^6 为氢、烷基或 $(R^8)(R^9)\text{NSO}_2-$ ；

R^7 为氢或烷基；

R^8 为氢或烷基；

R^9 为氢或烷基；

R^{11} 为氢或烷基；且

X 为 N 或 CR^{11} ；

其中所述烷基是指由 1 至 6 个碳所组成的直链或支链烷基；且

所述环烷基是指由 3 至 7 个碳所组成的单环环系。

2. 权利要求 1 的化合物或其药用盐，其中 R^1 为 CO_2R^5 或 CONR^6R^7 ； R^2 为氢或烷基； R^3 为氢； R^4 为环烷基； R^5 为氢； R^6 为 $(R^8)(R^9)\text{NSO}_2-$ ； R^7 为氢； R^8 为烷基； R^9 为烷基； R^{11} 为氢或烷基；且 X 为 N 或 CR^{11} 。

3. 权利要求 2 的化合物或其药用盐，其中 R^1 为 CO_2H 或 $\text{CONHSO}_2\text{NMe}_2$ ； R^2 为氢或甲基； R^3 为氢； R^4 为环己基；且 X 为 N、CH 或 CMe 。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 R^1 为 CONR^6R^7 ； R^6 为 $(R^8)(R^9)\text{NSO}_2-$ ；且 R^7 为氢。

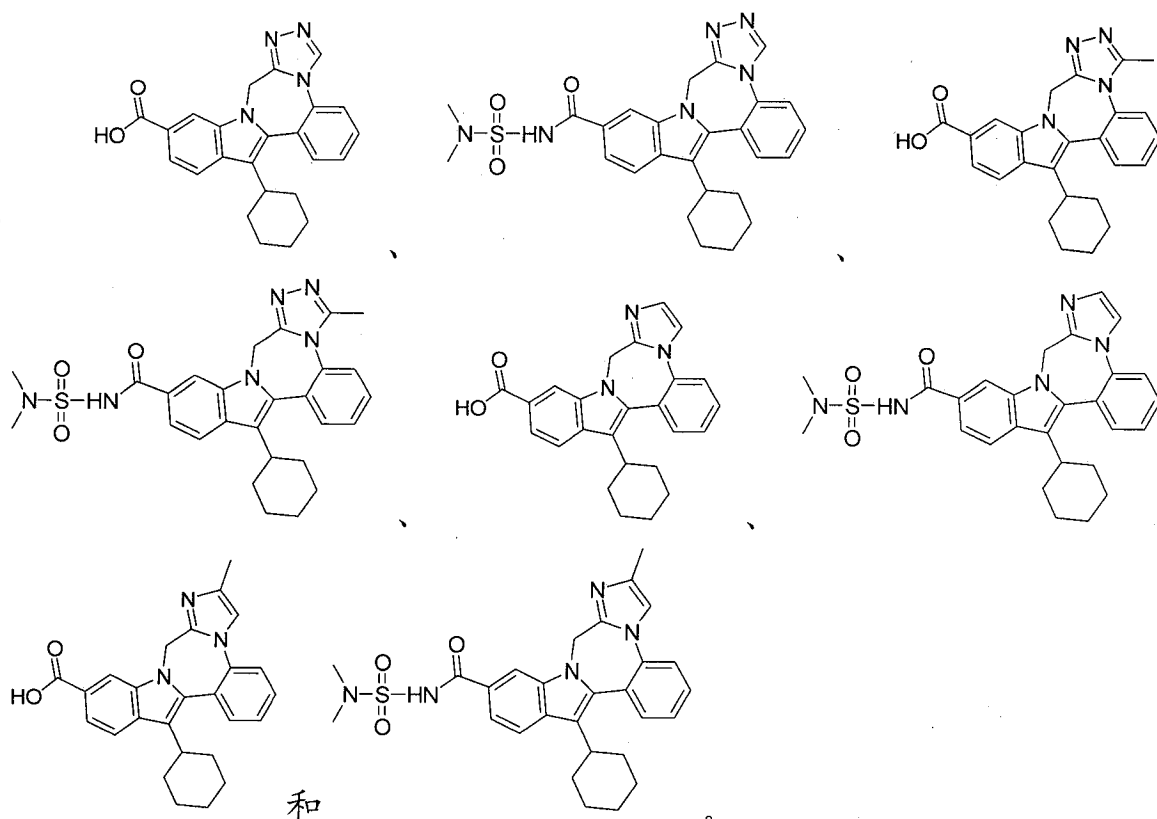
5. 权利要求 1 的化合物，其中 R^4 为环己基。

6. 权利要求 1 的化合物，其中 R^6 为 $(R^8)(R^9)\text{NSO}_2-$ 。

7. 权利要求 1 的化合物，其中 X 为 N。

8. 权利要求 1 的化合物，其中 X 为 CR^{11} 。

9. 权利要求 1 的化合物或其药用盐，所述化合物选自：



10. 一种组合物,其包含权利要求1的化合物或其药用盐和药用载体。

11. 权利要求10的组合物,其还包含至少一种额外的对HCV具有治疗益处的化合物,其中所述化合物选自干扰素、环孢菌素、白细胞介素、HCV金属蛋白酶抑制剂、HCV丝氨酸蛋白酶抑制剂、HCV聚合酶抑制剂、HCV解螺旋酶抑制剂、HCVNS4B蛋白抑制剂、HCV进入抑制剂、HCV组装抑制剂、HCV释放抑制剂、HCVNS5A蛋白抑制剂、HCVNS5B蛋白抑制剂和HCV复制子抑制剂。

12. 权利要求1的化合物在制备作为HCVNS5B抑制剂而用于治疗丙型肝炎感染的药物中的用途。

芳族杂环稠合的吡啶并苯并二氮杂萘 HCV NS5B 抑制剂

[0001] 对相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2008 年 3 月 27 日提交的美国临时专利申请 61/039961 的权益。

技术领域

[0003] 本申请一般性地涉及新式 I 化合物,包括它们的盐,所述化合物具有抗丙型肝炎病毒 (HCV) 的活性,并且可用于治疗感染有 HCV 的那些患者。本申请还涉及含有这些化合物的组合物以及使用这些化合物的方法。

背景技术

[0004] 丙型肝炎病毒 (HCV) 是主要的人类病原体,其在全球范围内感染估计一亿七千万人,大致是 1 型人类免疫缺陷病毒感染数量的 5 倍。这些 HCV 感染个体中相当大的部分发展成严重的进行性肝脏疾病,包括肝硬化和肝细胞癌 (Lauer, G. M. ;Walker, B. D. N. Engl. J. Med. 2001, 345, 41-52)。

[0005] HCV 是正链 RNA 病毒。基于对所推断氨基酸序列进行的比较和 5'-非翻译区的广泛相似性,已经把 HCV 归类为黄病毒科中独立的属。黄病毒科的所有成员都具有包封的病毒体,其含有的正链 RNA 基因组通过翻译单一的连续的可读框而编码所有已知的病毒专属性蛋白质。

[0006] 在整个 HCV 基因组的核苷酸和所编码的氨基酸序列中发现了相当程度的异质性。已经表征了至少 6 种主要的基因型,并且已经描述了多于 50 种的亚型。HCV 的主要基因型在世界范围内的分布是不同的,并且 HCV 遗传异质性的临床重要性仍然是难以确定的,尽管对基因型对发病和治疗的可能影响行了大量的研究。

[0007] 单链 HCV RNA 基因组的长度大约是 9500 个核苷酸,并且具有单一的可读框 (ORF),其编码由大约 3000 个氨基酸组成的单一的大多蛋白。在被感染的细胞中,这种多蛋白在多个位点被细胞蛋白酶和病毒蛋白酶裂解,从而产生结构蛋白和非结构 (NS) 蛋白。就 HCV 来说,成熟的非结构蛋白 (NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B) 的产生受到两种病毒蛋白酶的影响。认为第一种病毒蛋白酶是金属蛋白酶,并且在 NS2-NS3 接合处进行裂解;第二种病毒蛋白酶是包含在 NS3 的 N-末端区域内的丝氨酸蛋白酶 (也称为 NS3 蛋白酶),并且介导 NS3 下游的所有随后的裂解,既在 NS3-NS4A 裂解位点以顺式进行裂解,又在其余的 NS4A-NS4B、NS4B-NS5A、NS5A-NS5B 位点以反式进行裂解。NS4A 蛋白似乎具有多种功能,其充当 NS3 蛋白酶的辅因子,并且可能有助于 NS3 及其它病毒复制酶组分的膜定位。NS3 蛋白与 NS4A 形成复合物,这似乎是在所有位点进行加工活动由此提高蛋白质水解效率所必需的。NS3 蛋白还显示出三磷酸核苷酶和 RNA 解旋酶活性。NS5B (也称为 HCV 聚合酶) 是依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶,在 HCV 的复制中涉及所述酶。在 "Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides (Bressanelli; S. et al., Journal of Virology 2002, 3482-3492) 和 De Francesco and Rice, Clinics in Liver Disease 2003, 7, 211-242 中描述了 HCV NS5B 蛋白。

[0008] 目前,最有效的HCV疗法使用 α -干扰素和利巴韦林的组合,其在40%的患者中产生持续的效果 (Poynard, T. et al. Lancet 1998, 352, 1426-1432)。最新的临床结果证明,作为单一疗法,PEG化的 α -干扰素优于未修饰的 α -干扰素 (Zeuzem, S. et al. N. Engl. J. Med. 2000, 343, 1666-1672)。然而,即使就涉及PEG化 α -干扰素和利巴韦林组合的实验性治疗方案而言,相当多的患者也没有出现病毒载量的持续减少。因此,就开发用于治疗HCV感染的更有效的化合物而言,存在明显和重要的需要。

[0009] 本发明提供了下述技术益处,例如所述化合物是新化合物并且有效抗丙型肝炎。另外,所述化合物提供了对于药物用途的益处,例如在以下方面的一种或多种益处:它们的作用机理,结合效率、抑制效率、靶标选择性、溶解性、安全性能 (safety profiles) 或生物利用度。

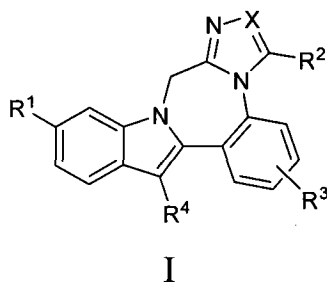
[0010] HCV NS5B 抑制剂已经在美国专利 7,456,165 中披露。

发明内容

[0011] 本发明包括式 I 的化合物,包括药用盐,以及组合物和使用这些化合物的方法。

[0012] 本发明一个方面为式 I 的化合物或其药用盐:

[0013]



[0014] 其中:

[0015] R^1 为 CO_2R^5 或 CONR^6R^7 ;

[0016] R^2 为氢或烷基;

[0017] R^3 为氢、卤素、烷基、烯基、羟基、苄基氧基或烷氧基;

[0018] R^4 为环烷基;

[0019] R^5 为氢或烷基;

[0020] R^6 为氢、烷基、烷基 SO_2 -、环烷基 SO_2 -、卤代烷基 SO_2 -、 $(R^8)(R^9)\text{NSO}_2$ - 或 $(R^{10})\text{SO}_2$ -;

[0021] R^7 为氢或烷基;

[0022] R^8 为氢或烷基;

[0023] R^9 为氢或烷基;

[0024] R^{10} 为氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、N-(烷基)哌嗪基、吗啉基、硫吗啉基 (thiomorpholinyl)、高哌啶基 (homopiperidinyl) 或高吗啉基 (homomorpholinyl);

[0025] R^{11} 为氢或烷基;且

[0026] X 为 N 或 CR^{11} 。

[0027] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物或其药用盐,其中 R^1 为 CO_2R^5 或 CONR^6R^7 ; R^2 为氢或烷基; R^3 为氢; R^4 为环烷基; R^5 为氢; R^6 为 $(R^8)(R^9)\text{NSO}_2$ -; R^7 为氢; R^8 为烷基; R^9 为烷基; R^{11} 为氢或烷基;且 X 为 N 或 CR^{11} 。

[0028] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物或其药用盐,其中 R^1 为 CO_2H 或 $CONHSO_2NMe_2$; R^2 为氢或甲基; R^3 为氢; R^4 为环己基;且 X 为 N、CH 或 CMe。

[0029] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物,其中 R^1 为 $CONR^6R^7$; R^6 为烷基 SO_2 -、环烷基 SO_2 -、卤代烷基 SO_2 -、 $(R^8)(R^9)NSO_2$ - 或 $(R^{10})SO_2$ -;且 R^7 为氢。

[0030] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物,其中 R^3 为氢。

[0031] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物,其中 R^3 为甲氧基。

[0032] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物,其中 R^4 为环己基。

[0033] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物,其中 R^6 为 $(R^8)(R^9)_2NSO_2$ - 或 $(R^{10})SO_2$ -

[0034] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物,其中 X 为 N。

[0035] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物,其中 X 为 CR^{11} 。

[0036] 对于式 I 化合物,取代基(包括 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 X)的任意实例的范围相对于取代基的其它实例的范围可以是独立使用的。如此,本发明包括这些不同方面的组合。

[0037] 除非另有说明,这些术语具有下述意义。“烷基”是指由 1 至 6 个碳所组成的直链或支链烷基。“烯基”是指由 2 至 6 个碳所组成且具有至少一个双键的直链或支链烷基。“炔基”是指由 2 至 6 个碳所组成且具有至少一个三键的直链或支链烷基。“环烷基”是指由 3 至 7 个碳所组成的单环环系。“卤代烷基”与“卤代烷氧基”包括所有卤代异构体,从单卤素取代至全卤素取代。涉及烃部分(例如,烷氧基)的术语包括烃部分的直链和支链异构体。括号与多重括号术语意在向本领域技术人员阐明键合关系。例如,如 $((R) \text{ 烷基})$ 那样的术语指进一步被取代基 R 取代的烷基取代基。

[0038] 本发明包括所述化合物的所有可药用盐形式。可药用盐为其中抗衡离子不会显著地助长化合物的生理活性或毒性且其本身作为药理等价物的那些可药用盐。这些盐可根据一般有机技术使用商购试剂来制备。一些阴离子盐形式包括醋酸盐、醋硬脂酸盐(acistrate)、苯磺酸盐、溴化物、氯化物、柠檬酸盐、富马酸盐、葡萄糖醛酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、碘化物、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐及昔萘酸盐(xinofate)。一些阳离子盐形式包括铵盐、铝盐、苺星(benzathine)盐、铋盐、钙盐、胆碱盐、二乙胺盐、二乙醇胺盐、锂盐、镁盐、葡甲胺盐、4-苯基环己胺盐、哌嗪盐、钾盐、钠盐、丁三醇胺(tromethamine)盐及锌盐。

[0039] 本发明的一些化合物存在立体异构形式。本发明包括所有立体异构形式,包括对映异构体和非对映异构体。制备和分离立体异构体的方法在本领域中已知。

[0040] 合成方法

[0041] 化合物可通过本领域已知的方法来制备,这些方法包括如下描述的那些方法以及包括本领域技术人员技能范围之内的那些变化形式。一些试剂和中间体是本领域已知的。其它试剂和中间体可通过本领域已知的方法使用容易获得的物质来制备。用于描述所述化合物合成的变量(例如,编号的 R 取代基)仅意在说明如何制备,而不应该与在权利要求书和说明书其它段落中使用的变量相混淆。下述方法仅用于示例的目的,而非意图限制本发明的范围。

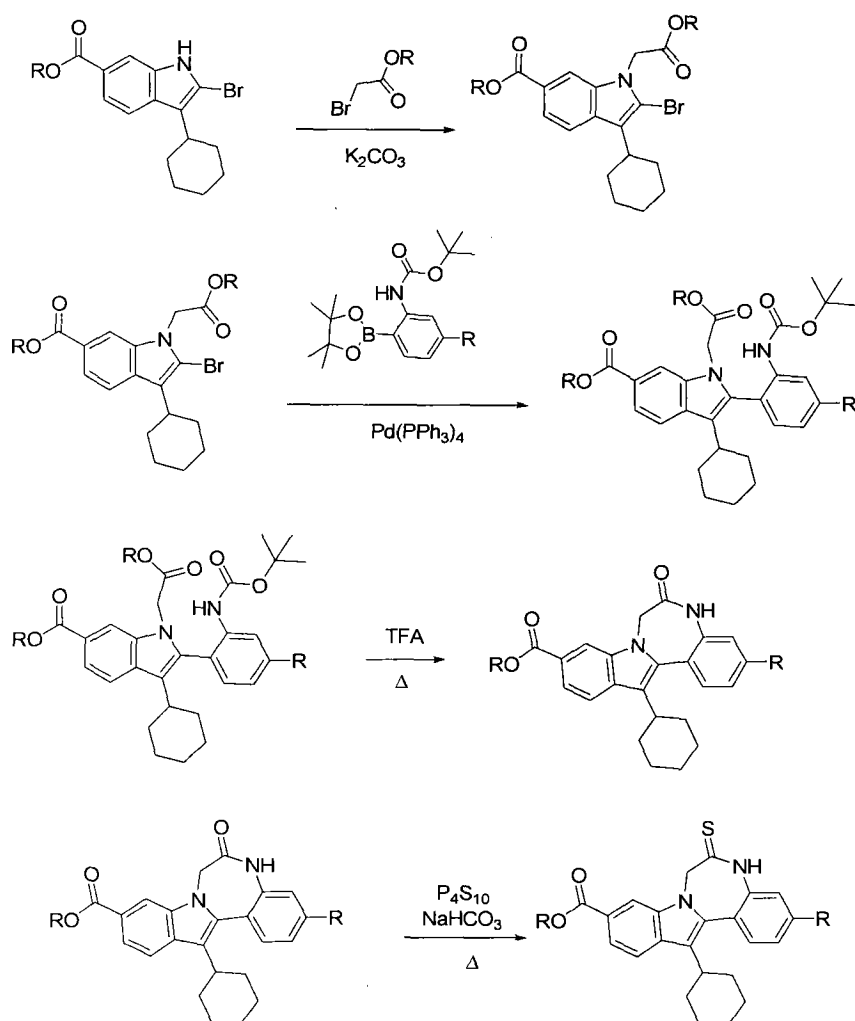
[0042] 方案中使用的缩写通常遵循本领域惯用的含义。说明书和实施例中使用的化学缩写的定义如下:“NaHMDS”表示二(三甲基甲硅基)氨基钠;“DMF”表示 N,N-二甲基甲

酰胺；“MeOH”表示甲醇；“NBS”表示N-溴代琥珀酰亚胺；“Ar”表示芳基；“TFA”表示三氟乙酸；“LAH”表示氢化铝锂；“BOC”表示叔丁氧基羰基；“DMSO”表示二甲基亚砜；“h”表示小时；“rt”表示室温或保留时间（由上下文决定）；“min”表示分钟；“EtOAc”表示乙酸乙酯；“THF”表示四氢呋喃；“EDTA”表示乙二胺四乙酸；“Et₂O”表示乙醚；“DMAP”表示4-二甲氨基吡啶；“DCE”表示1,2-二氯甲烷；“ACN”表示乙腈；“DME”表示1,2-二甲氧基乙烷；“HOBt”表示1-羟基苯并三唑水合物；“DIEA”表示二异丙基乙胺，“Nf”表示CF₃(CF₂)₃SO₂-；以及“TMOF”表示原甲酸三甲酯。

[0043] 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-羧酸烷基酯可在弱碱条件下与α-卤代乙酸酯进行N-烷基化，生成2-溴-1-(2-烷氧基-2-氧代乙基)-3-环己基-1H-吲哚-6-羧酸烷基酯（参见方案1）。可使这些化合物与2-BOC-保护的苯胺的硼酸或硼酸酯进行已知的偶联反应。所生成的二芳基化合物可在标准BOC脱保护条件下加热，进行环化，由此形成13-环己基-5H-吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-6(7H)-酮-10-羧酸烷基酯。二氮杂萘酮(diazepinone)内含有的酰胺可用P₄S₁₀在碱性条件下在高温转化为环状硫代酰胺(cyclic thioamide)。

[0044] 方案1

[0045]

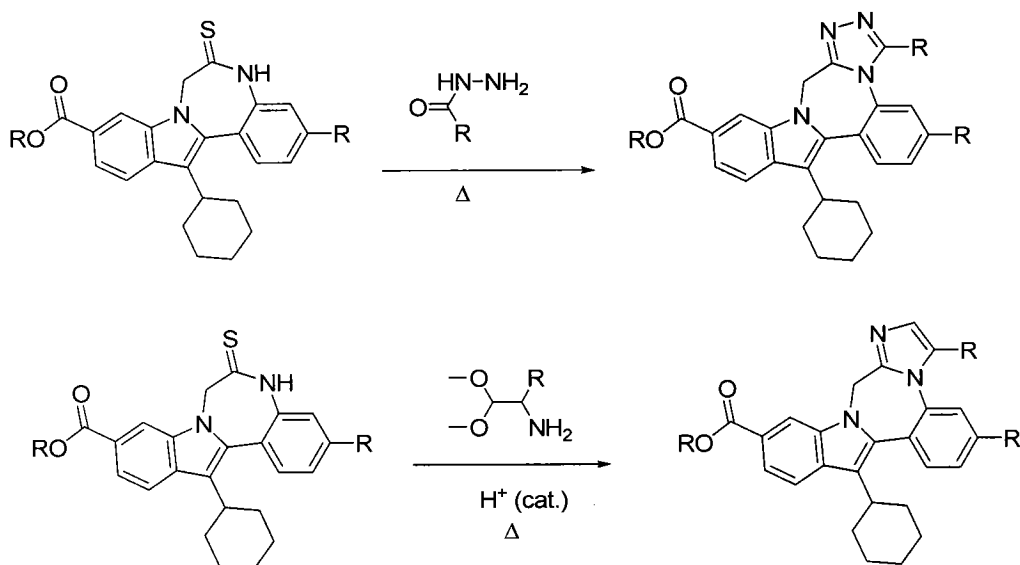


[0046] 环状硫代酰胺在制备某些本发明的化合物中是有用的中间体（参见方案2）。已知环状硫代酰胺与酰肼在高温反应形成稠合的1,2,4-三唑。稠合的咪唑可通过使1,2-缩醛

胺与硫代酰胺中间体在高温经酸催化进行反应来制备。

[0047] 方案 2

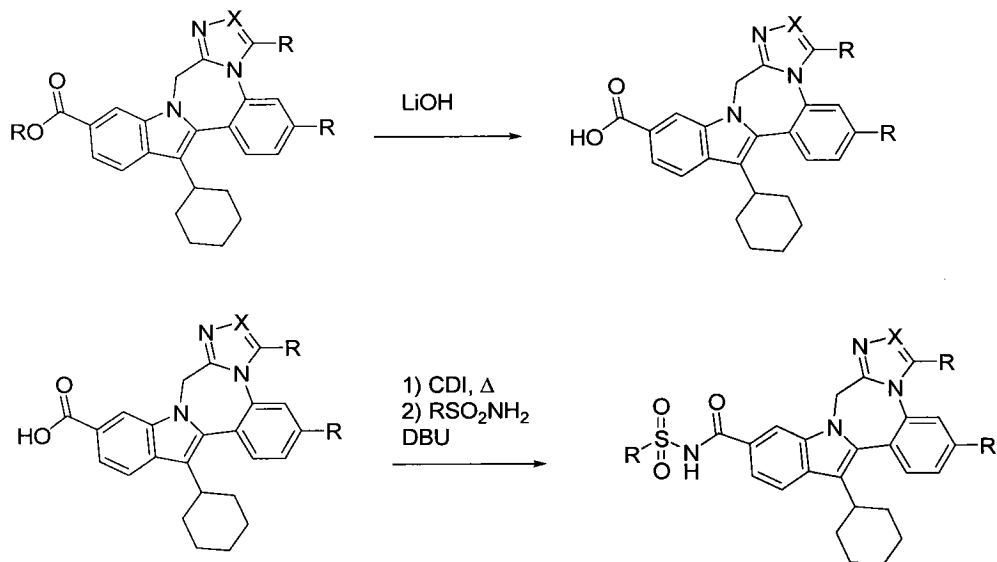
[0048]



[0049] 烷基酯中间体可水解为与已经在适当位置的稠合的五元环杂环的羧酸（参见方案 3）。这些化合物可与多种磺酰脲或磺酰胺进行缩合，使用例如与 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯组合的 1,1'-羰基二咪唑在无水 THF 中进行，形成酰基氨磺酰或酰基磺酰胺。

[0050] 方案 3

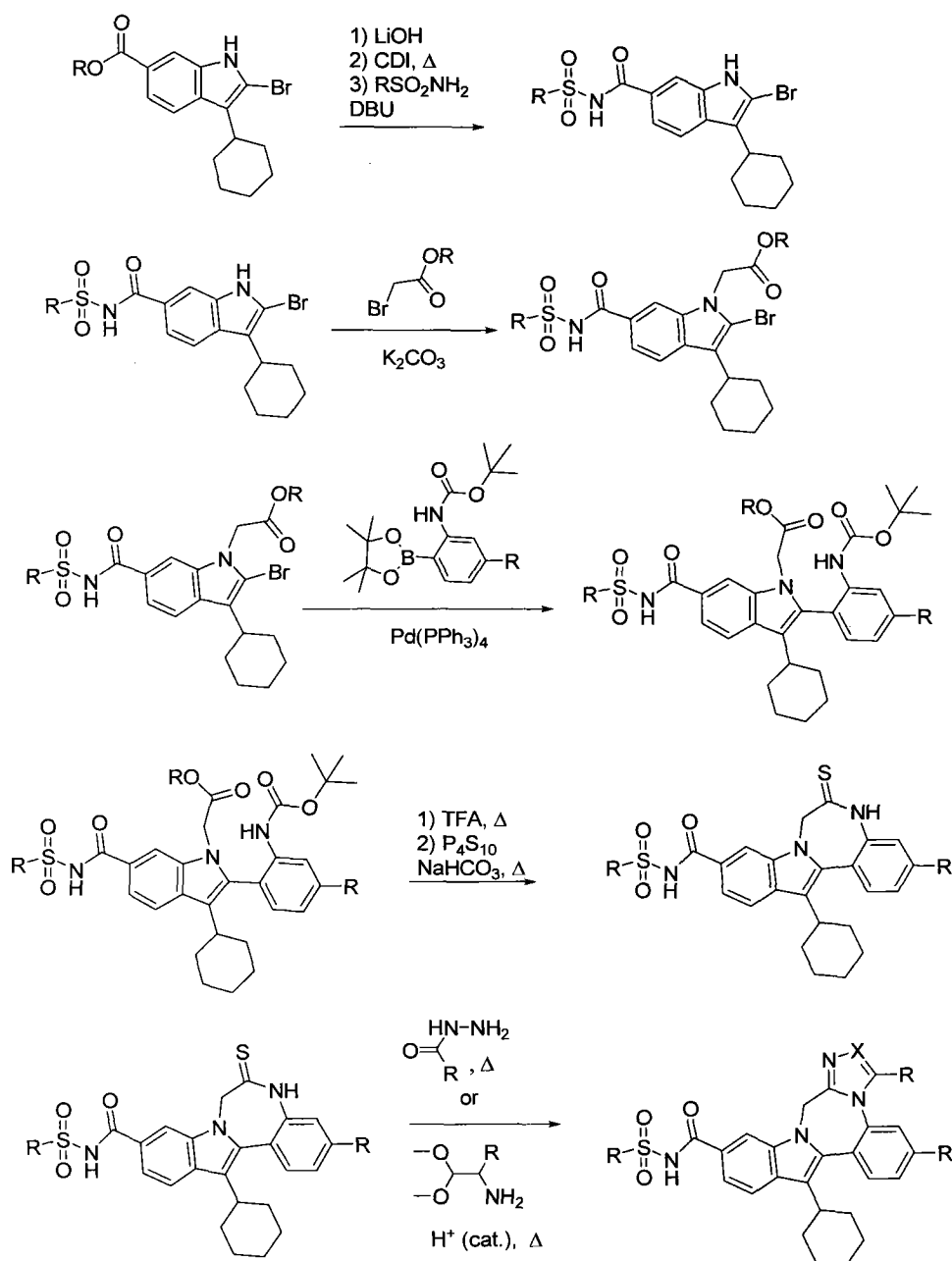
[0051]



[0052] 可以改变用于制备本发明的化合物的反应顺序（参见方案 4）。例如，2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-羧酸烷基酯的烷基酯可水解并转化为酰基氨磺酰和 / 或酰基磺酰胺，其可在二芳基偶联反应和二氮杂革酮环化反应之前进行。在本顺序的最终步骤涉及稠杂环的形成。

[0053] 方案 4

[0054]



[0055] 生物学方法

[0056] 当在以下 HCV RdRp 测定中测定时,本发明的化合物展现了对抗 HCV NS5B 的活性。

[0057] 对 HCV NS5B RdRp 进行克隆、表达和纯化

[0058] 将对 HCV 基因型 1b 的 NS5B 蛋白进行编码的 cDNA 克隆至 pET21a 表达载体中。为提高溶解度,对所述蛋白质进行表达,以使 18 氨基酸 C-末端截断 (18 amino acid C-terminal truncation)。大肠杆菌感受态细胞系 (E.coli competent cell line) BL21 (DE3) 用于所述蛋白质的表达。使培养物在 37°C 生长约 4 小时,直到培养物达到 600 纳米处的光密度为 2.0。使培养物冷却至 20°C,并用 1mM IPTG 进行诱导。加入新鲜的氨苄青霉素至最终浓度为 50 微克/毫升,并使细胞在 20°C 生长过夜。

[0059] 使细胞沉淀 (3 升) 溶解以供纯化,得到 15-24 毫克经纯化的 NS5B。溶胞缓冲液由 20mM Tris-HCl (pH 7.4)、500mM NaCl、0.5% Triton X-100、1mM DTT、1mM EDTA、20% 甘油、0.5 毫克/毫升溶菌酶、10mM MgCl_2 、15 微克/毫升脱氧核糖核酸酶 I 和完全 TM 蛋白酶抑制

剂药片 (Roche) 所组成。加入溶胞缓冲液后,使用组织匀浆器来使经冷冻的细胞沉淀重新悬浮。为了降低样品的粘度,使用与 Branson 超声波处理器相连的微尖头 (microtip) 来使溶胞产物的等分液在冰上接受超声波处理。经超声波处理的溶胞产物在 4℃ 以 100,000×g 离心 1 小时,并过滤经过 0.2 微米滤器单元 (Corning)。

[0060] 使用三个连续的色谱步骤来纯化蛋白质:肝素琼脂糖 CL-6B、PolyU 琼脂糖 4B 和 HiTrap SP 琼脂糖 (Pharmacia)。色谱缓冲液与溶胞缓冲液相同,但不含有溶菌酶、脱氧核糖核酸酶 I、MgCl₂ 或蛋白酶抑制剂,且缓冲液的 NaCl 浓度根据将蛋白质加载至色谱柱上的要求而调整。各色谱柱以 NaCl 梯度液洗脱,所述梯度液的长度在 5 至 50 个柱体积之间变化,这取决于色谱柱的类型。在最终色谱步骤后,所得到的酶纯度 > 90% (基于 SDS-PAGE 分析)。将酶分成等分液,并贮存在 -80℃。

[0061] 标准 HCV NS5B RdRp 酶测定

[0062] 在 96 孔板 (Costar 3912) 中在最终体积为 60 微升的情况下进行 HCVRdRp 基因型 1b 测定。测定缓冲液由 20mM Hepes (pH 7.5)、2.5mM KCl、2.5mM MgCl₂、1mM DTT、1.6 单位 RNase 抑制剂 (Promega N2515)、0.1 毫克 / 毫升 BSA (Promega R3961) 和 2% 甘油所组成。所有化合物在 DMSO 中连续稀释 (3 倍) 并在水中进一步稀释,以使 DMSO 在测定中的最终浓度为 2%。HCV RdRp 基因型 1b 酶以 28nM 的最终浓度使用。聚 A (polyA) 模板以 6nM 使用,且生物素化的寡 dT12 引物以 180nM 的最终浓度使用。模板是商购得到的 (Amersham 27-4110)。生物素化的引物由 Sigma Genosys 制备。3H-UTP 在 0.6 μCi (0.29 μM 总 UTP) 时使用。通过加入酶来引发反应,在 30℃ 孵育 60 分钟,并通过加入 25 微升含有 SPA 珠粒 (4 微克 / 微升,Amersham RPNQ 0007) 的 50mM EDTA 来停止。在室温孵育 > 1 小时后,将板在 Packard Top Count NXT 上读取。

[0063] 经修改的 HCV NS5B RdRp 酶测定

[0064] 经修改的酶测定基本上按照关于标准酶测定所描述的那样来进行,不同的是,将生物素化的寡 dT12 引物预捕获在链霉抗生物素 (streptavidin) 涂覆的 SPA 珠粒上,其方式是将引物与珠粒在测定缓冲液中混合,并在室温孵育一小时。离心除去未结合的引物。使与引物结合的珠粒重新悬浮在 20mM Hepes 缓冲液 (pH 7.5) 中,并在引物的最终浓度为 20nM 以及珠粒的最终浓度为 0.67 微克 / 微升时用于测定。测定中的加入顺序如下:将酶 (14nM) 加到经稀释的化合物中,接着加入模板 (0.2nM)、3H-UTP (0.6 μCi, 0.29 μM) 和与引物结合的珠粒的混合物,以引发反应,所给浓度为最终浓度。使反应在 30℃ 进行 4 小时。

[0065] 化合物的 IC₅₀ 值使用七种不同的 [I] ([I] 为抑制浓度) 来确定。使用方程式 $y = A + ((B-A) / (1 + ((C/x)^D)))$ 通过抑制作用来计算 IC₅₀ 值。

[0066] FRET 测定制剂

[0067] 为了进行 HCV FRET 筛选测定,使用 96 孔细胞培养板。FRET 肽 (Anaspec, Inc.) (Taliani et al., Anal. Biochem. 1996, 240, 60-67) 在其一端附近含有荧光供体即 EDANS,并且在另一端附近含有受体即 DABCYL。通过供体与受体之间的分子间共振能量转移 (RET) 来使所述肽的荧光淬灭,但当 NS3 蛋白酶使所述肽裂解时,产物不再发生 RET 淬灭,且供体的荧光变得显而易见。测定试剂如下制备:将得自 Promega (#E153A) 的 5× 细胞荧光素酶细胞培养物溶胞试剂 (cell Luciferase cell culture lysis reagent) 用 dH₂O 稀释至 1×,加入 NaCl 至最终为 150mM,并且将 FRET 肽自 2mM 储备液稀释至最终为 20 μM。

[0068] 为了制备板,带有或不带有海紫罗兰属荧光素酶 (Renilla luciferase) 报告子基因的 HCV 复制子细胞用胰蛋白酶处理,并置于 96 孔板的各孔中,其中将经滴定的测试化合物加到第 3 列至第 12 列中;第 1 列和第 2 列含有对照化合物 (HCV 蛋白酶抑制剂),且最底行含有不带有化合物的细胞。然后,将板置于 37℃ 的 CO₂ 培养箱中。

[0069] 测定

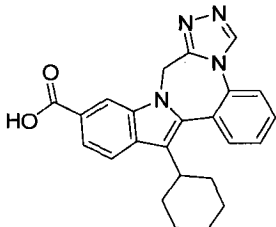
[0070] 加入上述测试化合物 (FRET 测定试剂) 后,在不同时间将板取出,且向每个孔中加入 Alamar 蓝色溶液 (Trek Diagnostics, #00-100),作为细胞毒性的测量方法。在 Cytoflour 4000 仪器 (PE Biosystems) 中读取后,将板以 PBS 冲洗,然后通过向每个孔中加入 30 微升上述 FRET 肽测定试剂 (FRET 测定试剂) 而用于 FRET 测定。接着,将板置于 Cytoflour 4000 仪器中,其已被设定成激发波长为 340nm/ 发射波长为 490nm,以自动模式历时 20 次循环,且板在动态模式中读取。典型地,在读取后使用终点分析的信号对噪声为至少三倍。或者,在 Alamar 蓝色读取后,将板以 PBS 冲洗,加入不带有酚红的 50 微升 DMEM (高葡萄糖),然后使用 Promega Dual-Glo Luciferase Assay System,将板用于荧光素酶测定。

[0071] 通过对相对的 HCV 复制子抑制作用和相对的细胞毒性值进行定量而对化合物进行分析。为了计算细胞毒性值,将得自对照孔的平均 Alamar 蓝色荧光信号设定为 100% 无毒性。接着,将各化合物测试孔中的各个信号除以平均对照信号并乘以 100%,以确定细胞毒性百分比。为了计算 HCV 复制子抑制值,平均背景值得自在测定结束时含有最高量 HCV 蛋白酶抑制剂的两个孔。这些值类似于得自天然 Huh-7 细胞的那些值。

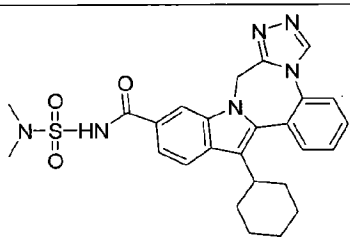
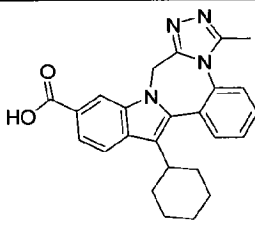
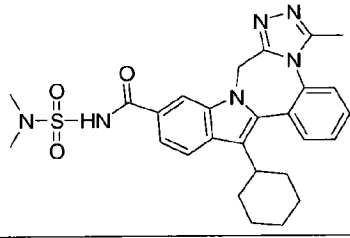
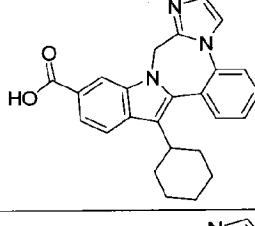
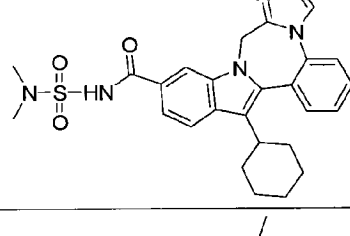
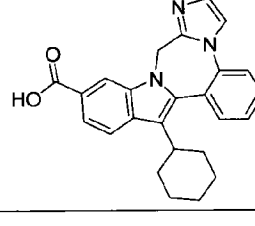
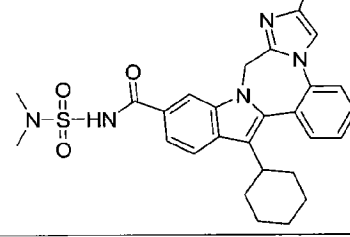
[0072] 然后,将背景值从得自对照孔的平均信号中扣除,且将此值用作 100% 活性。接着,将各化合物测试孔中的各个信号除以背景扣除后的平均对照值并乘以 100%,以确定活性百分比。将蛋白酶抑制剂滴定的 EC₅₀ 值计算成可使 FRET 或荧光素酶活性降低 50% 的浓度。针对化合物板所得到的两个值即细胞毒性百分比与活性百分比用于确定有待进一步分析的重要化合物。

[0073] 本发明化合物的代表性数据报道于表 1 中。

[0074] 表 1

	实施例	结构	IC ₅₀ (uM)	EC ₅₀ (uM)
[0075]	1		0.14	0.91

[0076]

实施例	结构	IC ₅₀ (uM)	EC ₅₀ (uM)
2		0.020	0.16
3		0.17	0.77
4		0.054	0.32
5		0.026	0.74
6		0.019	0.39
7		0.13	2.85
8		0.033	0.71

[0077] A > 0.5 μM; B 为 0.02 μM-0.5 μM; C < 0.02 μM, 但没有确定确切值; 使用预孵育方案来确定 IC₅₀ 值。使用 FRET 测定来确定 EC₅₀ 值。

[0078] 药物组合物 and 治疗方法

[0079] 所述化合物展现出抗 HCV NS5B 的活性,且可用于治疗 HCV 和 HCV 感染。因此,本发明的另一个方面为一种组合物,其包含式 I 的化合物或其药用盐以及药用载体。

[0080] 本发明的另一个方面为式 I 的化合物在制造用于治疗丙型肝炎的药物中的用途。

[0081] 本发明的另一个方面为一种组合物,其还包含具有抗 HCV 活性的化合物。

[0082] 本发明的另一个方面为一种组合物,其中具有抗 HCV 活性的化合物为干扰素。在本发明的另一个方面,其中所述干扰素选自干扰素 α 2B、PEG 化的 (pegylated) 干扰素 α 、同感干扰素 (consensus interferon)、干扰素 α 2A 和淋巴细胞样干扰素 τ 。

[0083] 本发明的另一个方面为一种组合物,其中具有抗 HCV 活性的化合物为环孢菌素。在本发明的另一个方面,其中所述环孢菌素为环孢菌素 A。

[0084] 本发明的另一个方面为一种组合物,其中具有抗 HCV 活性的化合物选自白细胞介素 2、白细胞介素 6、白细胞介素 12、可提高 1 型辅助 T 细胞应答发展的化合物、干扰 RNA、反义 RNA、Imiqimod、利巴韦林、5' - 单磷酸肌苷脱氢酶抑制剂、金刚烷胺和金刚乙胺。

[0085] 本发明的另一个方面为一种组合物,其中具有抗 HCV 活性的化合物有效地抑制靶标的功能以治疗 HCV 感染,所述靶标选自 HCV 金属蛋白酶 (HCV metalloprotease)、HCV 丝氨酸蛋白酶 (HCV serine protease)、HCV 聚合酶 (HCV polymerase)、HCV 解螺旋酶 (HCV helicase)、HCV NS4B 蛋白 (HCV NS4B protein)、HCV 进入 (HCV entry)、HCV 组装 (HCV assembly)、HCV 释出 (HCV egress)、HCV NS5A 蛋白 (HCV NS5A protein)、IMPDH 和核苷类似物 (nucleoside analog)。

[0086] 本发明的另一个方面为一种组合物,其包含式 I 的化合物或其药用盐、药用载体,以及干扰素和利巴韦林。

[0087] 本发明的另一个方面为一种抑制 HCV 复制子 (HCV replicon) 功能的方法,其包括使 HCV 复制子与式 I 的化合物或其药用盐接触。

[0088] 本发明的另一个方面为一种抑制 HCV NS5B 蛋白功能的方法,其包括使 HCV NS5B 蛋白与式 I 的化合物或其药用盐接触。

[0089] 本发明的另一个方面为治疗患者中 HCV 感染的方法,其包括给予所述患者治疗有效量的式 I 的化合物或其药用盐。在另一种实施方案中,化合物有效地抑制 HCV 复制子的功能。在另一种实施方案中,化合物有效地抑制 HCV NS5B 蛋白的功能。

[0090] 本发明的另一个方面为治疗患者中 HCV 感染的方法,其包括给予所述患者治疗有效量的式 I 的化合物或其药用盐,并且给予 (之前、之后或共同) 另一种具有抗 HCV 活性的化合物。

[0091] 本发明的另一个方面为其中其它具有抗 HCV 活性的化合物为干扰素的方法。

[0092] 本发明的另一个方面为其中所述干扰素选自干扰素 α 2B、PEG 化的干扰素 α 、同感干扰素、干扰素 α 2A 和淋巴细胞样干扰素 τ 的方法。

[0093] 本发明的另一个方面为其中其它具有抗 HCV 活性的化合物为环孢菌素的方法。

[0094] 本发明的另一个方面为其中所述环孢菌素为环孢菌素 A 的方法。

[0095] 本发明的另一个方面为其中其它具有抗 HCV 活性的化合物选自白细胞介素 2、白细胞介素 6、白细胞介素 12、可提高 1 型辅助 T 细胞应答发展的化合物、干扰 RNA、反义 RNA、Imiqimod、利巴韦林、5' - 单磷酸肌苷脱氢酶抑制剂、金刚烷胺和金刚乙胺的方法。

[0096] 本发明的另一个方面为其中其它具有抗 HCV 活性的化合物有效地抑制靶标功能以治疗 HCV 感染的方法,所述靶标选自 HCV 金属蛋白酶、HCV 丝氨酸蛋白酶、HCV 聚合酶、HCV 解螺旋酶、HCV NS4B 蛋白质、HCV 进入、HCV 组装、HCV 释出、HCVNS5A 蛋白质、IMPDH 和核苷类似物。

[0097] 本发明的另一个方面为其中其它具有抗 HCV 活性的化合物有效地抑制 HCV 生命循环中的靶标而非 HCV NS5B 蛋白的功能的方法。

[0098] “治疗有效”表示提供有意义的患者益处所需要的药物量,如在肝炎和 HCV 感染领域中的执业医师所理解的那样。

[0099] “患者”表示被 HCV 病毒感染且适于治疗的人们,如在肝炎和 HCV 感染领域中的执业医师所理解的那样。

[0100] “治疗”、“疗法”、“给药方案”、“HCV 感染”和相关术语如在肝炎和 HCV 感染领域中的执业医师所理解的那样来使用。

[0101] 本发明的化合物一般以药物组合物的形式来给予,所述组合物包含治疗有效量的化合物或其药用盐和药用载体,且可含有常规的赋形剂。治疗有效量为提供有意义的患者益处所需要的量。药用载体为具有可接受安全性的常规已知载体。组合物涵盖所有常见的固体形式与液体形式,包括胶囊剂、片剂、锭剂和粉末剂以及液体混悬剂、糖浆剂、酏剂和溶液剂。组合物使用一般制剂技术来制备,且常规的赋形剂(诸如粘合剂和润湿剂)和介质(诸如水和醇)通常用于组合物。

[0102] 固体组合物通常配制为剂量单位,且每份剂量提供约 1 至 1000mg 活性成份的组合物是优选的。剂量的一些实例为 1mg、10mg、100mg、250mg、500mg 和 1000mg。一般而言,其它药物将按与临床上所使用的经典药物的单位范围相似的单位范围存在。典型地,其为 0.25-1000 毫克/单位。

[0103] 液体组合物通常在剂量单位范围内。一般而言,液体组合物的单位剂量范围可以是 1-100mg/mL。剂量的一些实例为 1mg/mL、10mg/mL、25mg/mL、50mg/mL 和 100mg/mL。一般而言,其它药物将按与临床上所使用的经典药物的单位范围相似的单位范围存在。典型地,其为 1-100mg/mL。

[0104] 本发明涵盖所有常规的给药模式;口服方法与肠胃外方法是优选的。一般而言,给药方案将类似于临床上所使用的其它药物。典型地,每日剂量可以是每日 1-100 毫克/公斤体重。一般而言,口服方式需要较多的化合物,而肠胃外方式需要较少的化合物。然而,具体的给药方案将由医师使用合理的医药判断来确定。

[0105] 本发明也涵盖在组合疗法中给予所述化合物的方法。即所述化合物可与用于治疗肝炎和 HCV 感染的其它药物结合使用,但所述化合物与所述其它药物分开使用。在这些组合方法中,所述化合物通常将结合其它药物而以每日 1-100 毫克/公斤体重的每日剂量来给予。其它药物一般将按治疗上所使用的量来给予。然而,具体的给药方案将由医师通过合理的医药判断来确定。

[0106] 适于组合物和方法的化合物的一些实例列在表 2 中。

[0107] 表 2.

[0108]

商品名	抑制剂或靶标的类型	来源公司
Omega IFN	IFN- ω	BioMedicines Inc., Emeryville, CA
BILN-2061	丝氨酸蛋白酶抑制剂	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Germany
Summetrel	抗病毒	Endo Pharmaceuticals Holdings Inc., Chadds Ford, PA
Roferon A	IFN- α 2a	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Switzerland
Pegasys	PEG 化的 IFN- α 2a	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Switzerland
Pegasys and Ribavirin	PEG 化的 IFN- α 2a/利巴韦林	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Switzerland
CellCept	HCV IgG 免疫抑制剂	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basel, Switzerland
Wellferon	淋巴细胞样 IFN- α n1	GlaxoSmithKline plc, Uxbridge, UK
Albuzeron- α	白蛋白 IFN- α 2b	Human Genome Sciences Inc., Rockville, MD
Levovirin	利巴韦林	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA
IDN-6556	胱天蛋白酶(caspase)抑制剂	Idun Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
IP-501	抗纤维变性	Indevus Pharmaceuticals Inc., Lexington, MA
Actimmune	INF- γ	InterMune Inc., Brisbane, CA
Infergen A	IFN 干扰素 α -1(IFN alfacon-1)	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
ISIS 14803	反义	ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA/Elan Pharmaceuticals Inc., New York, NY
J1K-003	RdRp 抑制剂	Japan Tobacco Inc., Tokyo, Japan
Pegasys and Ceplene	PEG 化的 IFN- α 2a/免疫调节剂	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
Ceplene	免疫调节剂	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
Civacir	HCV IgG 免疫抑制剂	Nabi Biopharmaceuticals Inc., Boca Raton, FL
Intron A and Zadaxin	IFN- α 2b/ α 1-胸腺素	RegeneRx Biopharmaceuticals Inc., Bethesda, MD/SciClone Pharmaceuticals Inc, San Mateo, CA
Levovirin	IMPDH 抑制剂	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Viramidine	IMPDH 抑制剂	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Heptazyme	核酶	Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, CO
Intron A	IFN- α 2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intron	PEG 化的 IFN- α 2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Rebetron	IFN- α 2b/利巴韦林	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Ribavirin	利巴韦林	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intron/Rebavirin	PEG 化的 IFN- α 2b/利巴韦林	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ

[0109]

商品名	抑制剂或靶标的类型	来源公司
Zadazim	免疫调节剂	SciClone Pharmaceuticals Inc., San Mateo, CA
Rebif	IFN- β 1a	Serono, Geneva, Switzerland
IFN- β and EMZ701	IFN- β 和 EMZ701	Transition Therapeutics Inc., Ontario, Canada
T67	β -微管蛋白抑制剂	Tularik Inc., South San Francisco, CA
VX-497	IMPDH 抑制剂	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA
VX-950/LY-570310	丝氨酸蛋白酶抑制剂	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA/Eli Lilly and Co. Inc., Indianapolis, IN
Omniferon	天然 IFN- α	Viragen Inc., Plantation, FL
XTL-002	单克隆抗体	XTL Biopharmaceuticals Ltd., Rehovot, Isreal

具体实施方式

[0110] 在方案中使用的缩写通常按照在本领域使用的惯例。在本说明书和实施例中所使用的化学缩写如下定义：“NaHMDs”用于钠二（三甲基甲硅烷基）酰胺；“DMF”用于N,N-二甲基甲酰胺；“MeOH”用于甲醇；“NBS”用于N-溴代琥珀酰亚胺；“Ar”用于芳基；“TFA”用于三氟乙酸；“LAH”用于氢化锂铝；“BOC”、“DMSO”用于二甲基亚砷；“h”用于小时；“rt”用于室温或保留时间（下文将说明）；“min”用于分钟；“EtOAc”用于乙酸乙酯；“THF”用于四氢呋喃；“EDTA”用于乙二胺四乙酸；“Et₂O”用于二乙醚；“DMAP”用于4-二甲氨基吡啶；“DCE”用于1,2-二氯乙烷；“ACN”用于乙腈；“DME”用于1,2-二甲氧基乙烷；“HOBT”用于1-羟基苯并三唑水合物；“DIEA”用于二异丙基乙胺；“Nf”用于CF₃(CF₂)₃SO₂-；且“TMOF”用于原甲酸三甲酯。

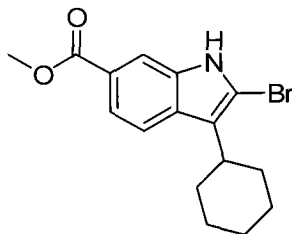
[0111] 在此使用的缩写如下定义：“1x”用于一次，“2x”用于两次，“3x”用于三次，“°C”用于摄氏度，“eq”用于当量（equivalent 或 equivalents），“g”用于克（gram 或 grams），“mg”用于毫克（milligram 或 milligrams），“L”用于升（liter 或 liters），“mL”用于毫升（milliliter 或 milliliters），“ μ L”用于微升（microliter 或 microliters），“N”用于标准量（normal），“M”用于摩尔浓度（molar），“mmol”用于毫摩尔（millimole 或 millimoles），“min”用于分钟（minute 或 minutes），“h”用于小时（hour 或 hours），“rt”用于室温，“RT”用于保留时间，“atm”用于大气压，“psi”用于磅/平方英寸（pounds per square inch），“conc.”用于浓缩的，“sat”或“sat’d”用于饱和的，“MW”用于分子量，“mp”用于熔点，“ee”用于对映体过量，“MS”或“Mass Spec”用于质谱法，“ESI”用于电喷射离子化质谱法，“HR”用于高分辨率，“HRMS”用于高分辨率质谱法，“LCMS”用于液相色谱质谱法，“HPLC”用于高效液相色谱法，“RP HPLC”用于反相 HPLC，“TLC”或“tlc”用于薄层色谱法，“NMR”用于核磁共振光谱法，“¹H”用于质子，“ δ ”用于 δ ，“s”用于单峰，“d”用于二重峰，“t”用于三重峰，“q”用于四重峰，“m”用于多重峰，“br”用于宽峰，“Hz”用于赫兹且“ α ”、“ β ”、“R”、“S”、“E”和“Z”为对在本领域的技术人员所熟悉的立体化学命名。

[0112] 除非另有说明，使用下述柱和条件得到下述中间体和实施例的分析性 LCMS 数据。停止时间：梯度时间+1 分钟；梯度时间：2 分钟（除非另作说明）。起始浓度：0% B，除非另有说明；结束浓度：100% B；洗脱剂 A：10% MeOH/90% H₂O 与 0.1% TFA；洗脱剂 B：90% MeOH/10% H₂O 与 0.1% TFA；柱：Phenomenex 10 μ 4.6×50mm C18。

[0113] 制备性 HPLC 数据。梯度：历时 20 分钟的线性梯度，除非另有说明；起始浓度：15% B，除非另有说明；结束浓度：100% B；洗脱剂 A：10% MeOH/90% H₂O 与 0.1% TFA；洗脱剂 B：90% MeOH/10% H₂O 与 0.1% TFA；柱：Phenomenex Luna C₁₈ 10 μ 30×100mm。

[0114] 中间体 1

[0115]

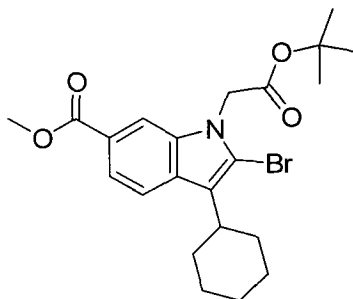


[0116] 2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯

[0117] 在 2℃，将刚刚重结晶的三溴化吡啶（由热的 AcOH (5mL/g) 重结晶，用冷的 AcOH 淋洗并在高真空经 KOH 干燥）按份加入（历时 10 分钟）至 3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯 (60g, 233mmol)（使用在 W02004/065367 中所述的操作制备）在 CHCl₃/THF (1 : 1, 1.25L) 中的搅拌溶液中。将反应溶液在 0-5℃ 搅拌 2.5 小时，并先后用饱和的 NaHSO₃ 水溶液 (1L)、1N HCl (1L) 和盐水 (1L) 洗涤。将有机层干燥 (MgSO₄) 并浓缩。将所得的红色油状物用 Et₂O 稀释并浓缩。将所得的粉色固体在 Et₂O (200mL) 中溶解、用己烷 (300mL) 处理并部分浓缩。经过滤收集固体并用己烷淋洗。将母液浓缩干燥并重复上述操作。将固体合并，得到 2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯 (64g, 190mmol, 82%)，其为松散的粉色固体，其没有进一步纯化就使用。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 1.50-1.27 (m, 3H), 1.98-1.72 (m, 7H), 2.82 (tt, J = 3.7, 11.7Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 7.69 (d, J = 8.8Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 1.4, 8.8Hz, 1H), 8.03 (d, J = 1.4Hz, 1H), 8.47 (宽单峰, 1H). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 26.1, 27.0 (2), 32.2 (2), 37.0, 52.1, 110.7, 112.8, 118.7, 120.3, 120.8, 123.1, 130.2, 135.6, 168.2. LCMS : m/e 334 (M-H)⁻, 保留时间 3.34 分钟, 4 分钟梯度。停止时间 : 5 分钟 ; 梯度时间 : 4 分钟 ; 起始浓度 : 0% B ; 结束浓度 : 100% B ; 洗脱剂 A : 5% CH₃CN/95% H₂O, 含有 10mM NH₄OAc ; 洗脱剂 B : 95% CH₃CN/5% H₂O, 含有 10mM NH₄OAc ; 柱 : Phenomenex 10 μ 4.6×50mm C18。

[0118] 中间体 2

[0119]



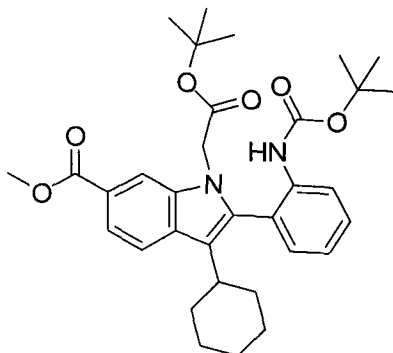
[0120] 2-溴-1-(2-叔丁氧基-2-氧代乙基)-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯

[0121] 向 2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯 (10g, 30mmol) 在 DMF (200mL) 中的溶液中，加入 2-溴乙酸叔丁酯 (29g, 150mmol)，然后加入 K₂CO₃ (25g, 180mmol)，并将反应混合物在室温搅拌 4 小时。将 H₂O (250mL) 加至该混合物中，并过滤收集所得的沉淀物，用 H₂O 洗涤，并在 N₂ 下干燥，得到 2-溴-1-(2-叔丁氧基-2-氧代乙基)-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸

甲酯 (14g, 30mmol, 定量), 其为白色固体, 其没有进一步纯化就使用。LCMS :m/e 450 (M+H)⁺, 保留时间 2.44 分钟。

[0122] 中间体 3

[0123]

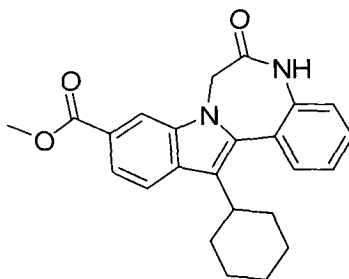


[0124] 1-(2-叔丁氧基-2-氧代乙基)-2-(2-(叔丁氧基羰基氨基)苯基)-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯

[0125] 向 2-溴-1-(2-叔丁氧基-2-氧代乙基)-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯 (5.0g, 11mmol)、(2-BOC-氨基苯基)硼酸频哪醇酯 (5.3g, 16mmol) 和四(三苯基膦)-钯 (0) (1.3g, 1.1mmol) 在甲苯/EtOH (1 : 1, 80mL) 中的溶液中, 加入 Na₂CO₃ (3.0g, 28mmol)、LiCl 水溶液 (2.0M, 22mL, 44mmol) 和 H₂O (5mL)。将混合物在 100℃ 回流 2 小时, 然后真空除去有机溶剂。将残留物在 EtOAc 和水之间分配并将有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并浓缩干燥。将残留物经硅胶色谱法纯化 (SiO₂, EtOAc/己烷, 5% ~ 40%), 得到 1-(2-叔丁氧基-2-氧代乙基)-2-(2-(叔丁氧基羰基氨基)苯基)-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯 (5.7g, 10mmol, 92%), 其为白色固体。LCMS :m/e 563 (M+H)⁺, 保留时间 2.52 分钟。

[0126] 中间体 4

[0127]

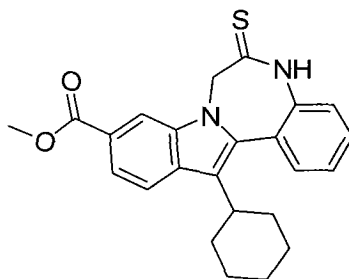


[0128] 13-环己基-5H-吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂䓬-6(7H)-酮-10-羧酸甲酯

[0129] 将 TFA (5mL) 加至 1-(2-叔丁氧基-2-氧代乙基)-2-(2-(叔丁氧基羰基氨基)苯基)-3-环己基-1H-吡啶-6-羧酸甲酯 (5.6g, 10mmol) 在甲苯 (90mL) 中的溶液中并在 100℃ 加热 1 小时。将反应混合物冷却, 然后小心地在搅拌的同时倒入至 NaHCO₃ (10g) 在 H₂O (200mL) 中的溶液中。过滤收集所得的白色沉淀物, 用水和 EtOAc 冲洗并在 N₂ 下干燥, 得到 13-环己基-5H-吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂䓬-6(7H)-酮-10-羧酸甲酯 (2.9g, 7.5mol, 75%), 其为白色固体。LCMS :m/e 389 (M+H)⁺, 保留时间 2.22 分钟。

[0130] 中间体 5

[0131]

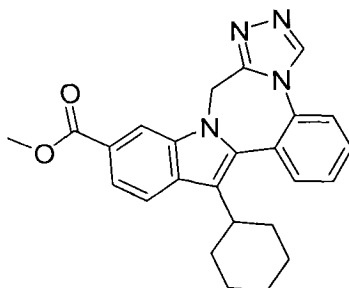


[0132] 13-环己基-5H-吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂~~革~~-6(7H)-硫酮-10-羧酸甲酯。

[0133] 将 P_4S_{10} (352mg, 0.791mmol) 和 $NaHCO_3$ (554mg, 6.60mmol) 加至 13-环己基-5H-吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂~~革~~-6(7H)-酮-10-羧酸甲酯 (511mg, 1.32mmol) 在二噁烷 (10mL) 中的溶液中。将反应混合物在 100°C 加热 1 小时, 冷却至室温, 并在搅拌的同时经逐滴加入 H_2O ($\sim 20\text{mL}$) 来稀释。将所得的黄色沉淀物放置 1 小时, 过滤收集, 用水冲洗并在 N_2 下干燥, 得到 13-环己基-5H-吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂~~革~~-6(7H)-硫酮-10-羧酸甲酯 (528mg, 1.31mmol, 99%), 其为黄色固体, 其没有进一步纯化就使用。LCMS: m/e 405 ($M+H$)⁺, 保留时间 2.26 分钟。

[0134] 中间体 6

[0135]

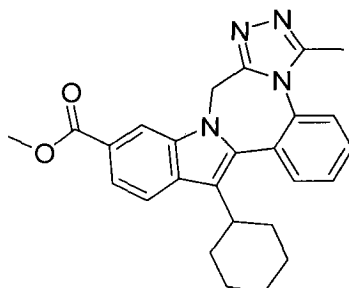


[0136] 10-环己基-4H-吲哚并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂~~革~~-7-羧酸甲酯

[0137] 将 13-环己基-5H-吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂~~革~~-6(7H)-硫酮-10-羧酸甲酯 (144mg, 0.356mmol) 和甲酰肼 (formic hydrazide) (108mg, 1.80mmol) 在 $n\text{-BuOH}$ (4mL) 中的混合物在 140°C 用微波辐射加热 2 小时, 冷却, 用 DMSO 和 MeOH 稀释并经制备性 HPLC 纯化 (MeOH/ H_2O , 含有 10mM TFA 缓冲液), 得到 10-环己基-4H-吲哚并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂~~革~~-7-羧酸甲酯 (66.2mg, 0.161mmol, 45%), 其为淡粉色固体。¹H NMR (500MHz, CD_3OD) δ 1.17-1.28 (m, 1H), 1.39-1.55 (m, 3H), 1.74-1.85 (m, 2H), 1.94-2.24 (m, 4H), 2.86-2.97 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 5.11 (d, $J = 15.9\text{Hz}$, 1H), 6.06 (d, $J = 15.9\text{Hz}$, 1H), 7.70-7.81 (m, 4H), 7.82-7.86 (m, 1H), 7.96 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 8.41 (s, 1H), 9.04 (s, 1H)。LCMS: m/e 413 ($M+H$)⁺, 保留时间 2.16 分钟。

[0138] 中间体 7

[0139]

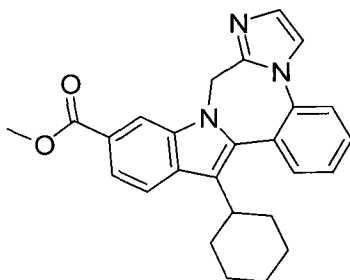


[0140] 10-环己基-1-甲基-4H-吲哚并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸甲酯

[0141] 将 13-环己基-5H-吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-6(7H)-硫酮-10-羧酸甲酯 (385mg, 0.953mmol) 和乙酰肼 (353mg, 4.77mmol) 在 n-BuOH (7mL) 中的混合物在 140℃ 用微波辐射加热 2 小时。将反应混合物用 DMSO 和 MeOH 稀释, 并经制备性 HPLC 纯化 (MeOH/H₂O, 含有 10mM TFA 缓冲液), 得到 10-环己基-1-甲基-4H-吲哚并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸甲酯 (180mg, 0.422mmol, 44%), 其为白色固体。¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ 1.20-1.32 (m, 1H), 1.36-1.60 (m, 3H), 1.73-1.85 (m, 2H), 1.94-2.20 (m, 4H), 2.65 (s, 3H), 2.90-3.01 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 5.02 (d, J = 15.6Hz, 1H), 5.99 (d, J = 15.9Hz, 1H), 7.72-7.84 (m, 5H), 7.96 (d, J = 8.6Hz, 1H), 8.39 (s, 1H)。LCMS: m/e 427 (M+H)⁺, 保留时间 2.15 分钟。

[0142] 中间体 8

[0143]

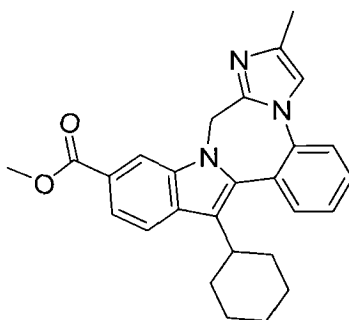


[0144] 10-环己基-4H-咪唑并[1,2-a]吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸甲酯

[0145] 将 2,2-二甲氧基乙胺 (260mg, 2.5mmol) 和对甲苯磺酸一水合物 (94mg, 0.5mmol) 加至 13-环己基-5H-吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-6(7H)-硫酮-10-羧酸甲酯 (200mg, 0.50mmol) 在 n-BuOH (4mL) 中的溶液中。将反应混合物在 130℃ 用微波辐射加热 1 小时, 然后加入额外的对甲苯磺酸一水合物 (380mg, 2.0mmol), 并将混合物在 130℃ 用微波辐射再加热 1 小时。将反应混合物用 MeOH 和 DMSO 稀释, 并经制备性 HPLC 纯化 (MeOH/H₂O, 含有 10mM TFA 缓冲液), 得到 10-环己基-4H-咪唑并[1,2-a]吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸甲酯 (37mg, 0.090mmol, 18%), 其为灰白色固体。¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ 1.15-1.32 (m, 1H), 1.35-1.59 (m, 3H), 1.73-1.84 (m, 2H), 1.94-2.22 (m, 4H), 2.84-3.00 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 5.16 (d, J = 16.1Hz, 1H), 6.02 (d, J = 16.1Hz, 1H), 7.44 (d, J = 1.8Hz, 1H), 7.75-7.90 (m, 5H), 7.92 (d, J = 1.8Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.8Hz, 1H), 8.39 (s, 1H)。LCMS: m/e 412 (M+H)⁺, 保留时间 2.00min。

[0146] 中间体 9

[0147]

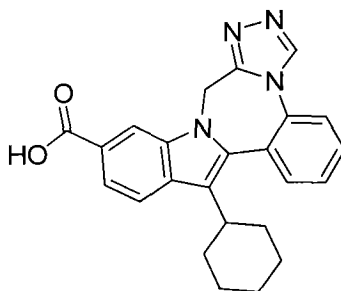


[0148] 10-环己基-2-甲基-4H-咪唑并[1,2-a]吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂草-7-羧酸甲酯

[0149] 将 1,1-二甲氧基丙-2-胺 (330mg, 2.8mmol) 和对甲苯磺酸一水合物 (590mg, 3.1mmol) 加至 13-环己基-5H-吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂草-6(7H)-硫酮-10-羧酸甲酯 (250mg, 0.62mmol) 在 n-BuOH (5mL) 中的溶液中。将反应混合物在 130℃ 用微波辐射加热 6 小时, 冷却至室温, 用 MeOH 和 DMSO 稀释并经制备性 HPLC 纯化 (MeOH/H₂O, 含有 10mM TFA 缓冲液), 得到 10-环己基-2-甲基-4H-咪唑并[1,2-a]吲哚并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂草-7-羧酸甲酯 (78mg, 0.18mmol, 30%), 其为浅橙色固体。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ 1.14-1.30 (m, 1H), 1.39-1.57 (m, 3H), 1.73-1.84 (m, 2H), 1.93-2.19 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 2.81-2.97 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 5.20 (d, J = 16.5Hz, 1H), 6.06 (d, J = 16.5Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.76-7.91 (m, 5H), 7.97 (d, J = 8.4Hz, 1H), 8.38 (s, 1H)。LCMS: m/e 426 (M+H)⁺, 保留时间 1.80 分钟。

[0150] 实施例 1

[0151]



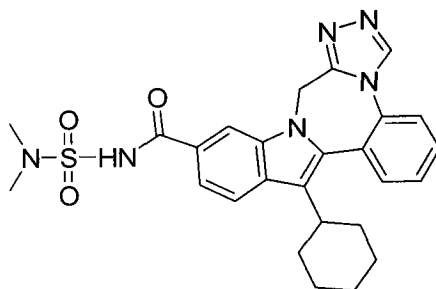
[0152] 10-环己基-4H-吲哚并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂草-7-羧酸

[0153] 向 10-环己基-4H-吲哚并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂草-7-羧酸甲酯 (66mg, 0.16mmol) 在 THF (6mL) 和 MeOH (3mL) 中的溶液中加入 NaOH 水溶液 (1.0N, 1.5mL, 1.5mmol), 并将混合物在 70℃ 加热 2 小时。除去溶剂, 并将白色固体残留物用水和 EtOAc 洗涤, 经离心机分离并在真空下干燥以得到粗品 10-环己基-4H-吲哚并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂草-7-羧酸 (54mg, 0.14mmol, 85%), 其为白色固体, 其没有进一步纯化就使用。¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO) δ 1.07-1.19 (m, 1H), 1.34-1.46 (m, 3H), 1.65-1.75 (m, 2H), 1.86-2.12 (m, 4H), 2.73-2.84 (m, 1H), 5.04 (d, J = 15.9Hz, 1H), 5.93 (d, J = 15.9Hz, 1H), 7.63-7.74 (m, 5H), 7.79-7.85 (m, 1H), 8.18 (s, 1H),

9.08 (s, 1H)。LCMS :m/e 399 (M+H)⁺, 保留时间 2.02 分钟。

[0154] 实施例 2

[0155]

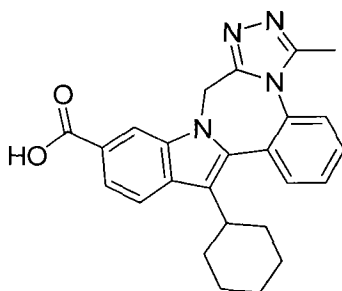


[0156] 10-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂萘-7-甲酰胺

[0157] 向 10-环己基-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸 (50mg, 0.13mmol) 和 N, N-二甲基氨基磺酰基 (78mg, 0.63mmol) 在 DMA (2mL) 中的溶液中加入 DMAP (77mg, 0.63mmol) 然后加入 EDCI-HCl (96mg, 0.50mmol)。将混合物在 45℃ 过夜, 用 DMSO 和 MeOH 稀释并经制备性 HPLC 纯化 (MeOH/H₂O, 含有 10mM TFA 缓冲液), 得到 10-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂萘-7-甲酰胺 (20mg, 0.040mmol, 31%), 其为淡粉色固体。¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ 1.16-1.26 (m, 1H), 1.39-1.55 (m, 3H), 1.73-1.83 (m, 2H), 1.93-2.22 (m, 4H), 2.86-2.96 (m, 1H), 3.04 (s, 6H), 5.14 (d, J = 15.9Hz, 1H), 6.05 (d, J = 15.9Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 8.55, 1.5Hz, 1H), 7.72-7.80 (m, 3H), 7.82-7.87 (m, 1H), 7.99 (d, J = 8.5, 1H), 8.34 (s, 1H), 9.08 (s, 1H)。LCMS :m/e 505 (M+H)⁺, 保留时间 1.94 分钟。

[0158] 实施例 3

[0159]



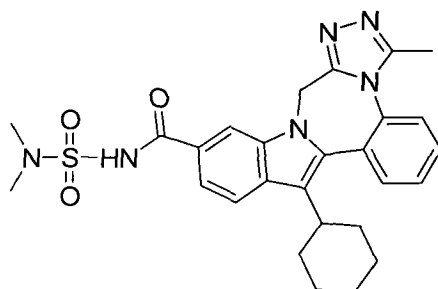
[0160] 10-环己基-1-甲基-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸

[0161] 向 10-环己基-1-甲基-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸甲酯 (173mg, 0.406mmol) 在 THF (7mL) 和 MeOH (3.5mL) 中的溶液中加入 NaOH 水溶液 (1.0N, 1.8mL, 1.8mmol)。将反应混合物在 70℃ 加热 2 小时, 然后除去溶剂。将所得的白色固体残留物用水洗涤, 经离心机分离后, 在 N₂ 下干燥, 得到 10-环己基-1-甲基-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸 (132mg, 0.320mmol, 79%), 其为白色固体, 其没有进一步纯化就使用。¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO) δ 1.13-1.24 (m, 1H), 1.35-1.51 (m, 3H), 1.66-1.75 (m, 2H), 1.85-2.08 (m, 4H), 2.48 (s, 3H),

2.79-2.89(m, 1H), 4.90(d, $J = 15.6\text{Hz}$, 1H), 5.80(d, $J = 15.6\text{Hz}$, 1H), 7.65-7.72(m, 5H), 7.78-7.83(m, 1H), 8.15(s, 1H)。LCMS :m/e 413 (M+H)⁺, 保留时间 2.01 分钟。

[0162] 实施例 4

[0163]

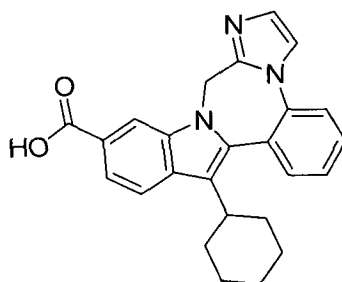


[0164] 10-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-1-甲基-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂䇇-7-甲酰胺

[0165] 向 10-环己基-1-甲基-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂䇇-7-羧酸 (54mg, 0.13mmol) 和 N,N-二甲基氨磺酰 (81mg, 0.65mmol) 在 DMA (2mL) 中的溶液中加入 DMAP (80mg, 0.65mmol) 和 EDCI-HCl (100mg, 0.52mmol)。将反应混合物在 60℃ 搅拌 2 小时, 冷却至室温, 用 DMSO 和 MeOH 稀释并经制备性 HPLC 纯化 (MeOH/H₂O, 含有 10mM TFA 缓冲液), 得到 10-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-1-甲基-4H-吡啶并[1,2-d][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]苯并二氮杂䇇-7-甲酰胺 (29mg, 0.056mmol, 43%), 其为亮黄色固体。¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ 1.22-1.34(m, 1H), 1.41-1.62(m, 3H), 1.77-1.85(m, 2H), 1.95-2.18(m, 4H), 2.71(s, 3H), 2.90-3.00(m, 1H), 3.05(s, 6H), 5.09(d, $J = 15.9\text{Hz}$, 1H), 6.03(d, $J = 15.9\text{Hz}$, 1H), 7.67(dd, $J = 8.2, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.79-7.87(m, 4H), 8.00(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 1H), 8.33(s, 1H)。LCMS :m/e 519 (M+H)⁺, 保留时间 1.96 分钟。

[0166] 实施例 5

[0167]



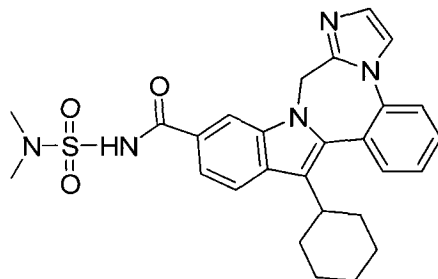
[0168] 10-环己基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂䇇-7-羧酸

[0169] 向 10-环己基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂䇇-7-羧酸甲酯 (34mg, 0.083mmol) 在 THF (1.5mL) 和 MeOH (1mL) 中的溶液中加入 NaOH 水溶液 (1.0N, 0.4mL, 0.4mmol)。将反应混合物在 70℃ 加热 2 小时, 冷却至室温, 用 HCl 水溶液 (1.0N, 0.4mL) 中和, 然后浓缩干燥。将固体残留物在 MeOH 中溶解, 过滤并浓缩, 然后在 N₂ 下干燥, 得到 10-环己基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂䇇-7-羧酸 (47mg, 0.12mmol), 其为灰白色固体, 其没有进一步纯化就使用。¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO) δ 1.04-1.22(m, 1H), 1.32-1.50(m, 3H), 1.61-1.77(m, 2H), 1.84-2.15(m, 4H),

2.74-2.90 (m, 1H), 5.05 (d, $J = 15.7\text{Hz}$, 1H), 6.00 (d, $J = 15.7\text{Hz}$, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.63-7.85 (m, 5H), 7.91-7.99 (m, 2H), 8.37 (s, 1H)。LCMS : m/e 398 (M+H)⁺, 保留时间 1.87 分钟。

[0170] 实施例 6

[0171]

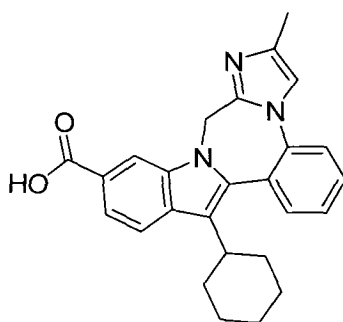


[0172] 10-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-甲酰胺

[0173] 向 10-环己基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸 (25mg, 0.063mmol) 和 N,N-二甲基氨磺酰 (41mg, 0.33mmol) 在 DMF (1.5mL) 中的溶液中, 加入 DMAP (40mg, 0.33mmol), 然后加入 EDCI-HCl (50mg, 0.26mmol)。将反应混合物在 60℃ 搅拌 2 小时, 冷却至室温, 用 DMSO 和 MeOH 稀释并经制备性 HPLC 纯化 (MeOH/H₂O, 含有 10mM TFA 缓冲液), 得到 10-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-甲酰胺 (5.4mg, 0.011mmol, 17%), 其为亮黄色固体。¹HNMR (500MHz, CD₃OD) δ 1.18-1.56 (m, 4H), 1.74-1.85 (m, 2H), 1.95-2.21 (m, 4H), 2.86-2.98 (m, 1H), 3.04 (s, 6H), 5.19 (d, $J = 16.1\text{Hz}$, 1H), 6.01 (d, $J = 16.1\text{Hz}$, 1H), 7.47 (d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 7.66 (dd, $J = 8.4, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.77-7.91 (m, 4H), 7.94 (d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 8.01 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 8.28 (s, 1H)。LCMS : m/e 504 (M+H)⁺, 保留时间 1.81 分钟。

[0174] 实施例 7

[0175]



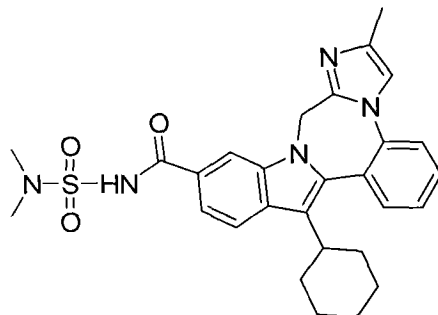
[0176] 10-环己基-2-甲基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸

[0177] 向 10-环己基-2-甲基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸甲酯 (74mg, 0.17mmol) 在 THF (3mL) 和 MeOH (1.5mL) 中的溶液中, 加入 NaOH 水溶液 (1.0N, 0.8mL, 0.8mmol)。将反应混合物在 70℃ 加热 2 小时, 冷却至室温, 用 HCl 水溶液中和 (1.0N, 0.8mL, 0.8mmol) 并浓缩干燥。将固体残留物在 MeOH/DCM 中溶解, 将不溶解的物质经过滤除去并将滤液浓缩, 然后在 N₂ 下干燥, 得到粗品 10-环己基-2-甲基-4H-咪唑并

[1,2-a] 吡啶并 [1,2-d] [1,4] 苯并二氮杂萘-7-羧酸 (60mg, 0.15mmol, 86%), 其为灰白色固体, 其没有进一步纯化就使用。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ 1.16-1.56 (m, 4H), 1.72-2.22 (m, 6H), 2.31 (s, 3H), 2.80-3.01 (m, 1H), 5.12 (d, J = 16.1Hz, 1H), 5.91 (d, J = 16.1Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.72-7.86 (m, 5H), 7.97 (d, J = 8.8Hz, 1H), 8.39 (s, 1H)。LCMS :m/e 412 (M+H)⁺, 保留时间 1.65 分钟。

[0178] 实施例 8

[0179]



[0180] 10-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-2-甲基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-甲酰胺

[0181] 向 10-环己基-2-甲基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-羧酸 (58g, 0.14mmol) 和 N,N-二甲基氨磺酰 (82g, 0.66mol) 在 DMF (2mL) 中的溶液中, 加入 DMAP (80mg, 0.66mmol), 然后加入 EDCI-HCl (100mg, 0.52mmol)。将反应混合物在 60℃ 搅拌 2 小时, 冷却至室温, 用 DMSO 和 MeOH 稀释并经制备性 HPLC 纯化 (MeOH/H₂O, 含有 10mM TFA 缓冲液), 得到 10-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-2-甲基-4H-咪唑并[1,2-a]吡啶并[1,2-d][1,4]苯并二氮杂萘-7-甲酰胺 (32mg, 0.062mmol, 44%), 其为粉色固体。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ 1.14-1.32 (m, 1H), 1.36-1.57 (m, 3H), 1.73-1.85 (m, 2H), 1.94-2.20 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.84-2.98 (m, 1H), 3.04 (s, 6H), 5.20 (d, J = 16.1Hz, 1H), 5.97 (d, J = 16.1Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 8.6, 1.7Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.77-7.90 (m, 4H), 8.01 (d, J = 8.8Hz, 1H), 8.27 (s, 1H)。LCMS :m/e 518 (M+H)⁺, 保留时间 1.80 分钟。

[0182] 对本领域的技术人员明显的是, 本发明不限于前面示例说明的实施例, 且其可具体化为其它具体形式, 而不偏离其本质属性。因此, 理想的是, 实施例从各方面将考虑为示例性的, 当提及权利要求书时而非将权利要求书限制至上述实施例。因而, 在权利要求书等价物的含义和范围内的各种变化也包括在本发明的范围内。