



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112689638 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 08

(21) 申请号 201980060312.2

(22) 申请日 2019.09.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112689638 A

(43) 申请公布日 2021.04.20

(66) 本国优先权数据
201811070319.6 2018.09.13 CN
201910100629.6 2019.01.31 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.15

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2019/105683 2019.09.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/052649 ZH 2020.03.19

(73) 专利权人 南昌弘益药业有限公司

地址 330096 江西省南昌市高新区火炬大街789号

专利权人 南昌弘益科技有限公司

(72) 发明人 吴凌云 汪秋燕 黎健 陈曙辉

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 王卫彬 徐婕超

(51) Int.Cl.
C07D 491/107 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)
A61K 31/34 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

审查员 吴昊

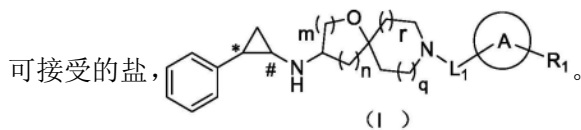
权利要求书4页 说明书51页

(54) 发明名称

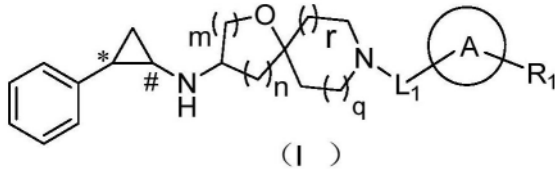
作为LSD1抑制剂的环丙胺类化合物及其应用

(57) 摘要

一类作为赖氨酸特异性去甲基化酶1 (LSD1) 抑制剂的环丙胺类化合物, 及其在制备治疗与LSD1相关疾病的药物中的应用。所述环丙胺类化合物是式 (I) 所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐,



1. 式 (I) 化合物、其异构体或其药学上可接受的盐,



其中,

L_1 选自 $-(CH_2)_g-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-C(=O)-$ 和 $-C(=O)-O-$;

R_1 选自 H、Cl、F、Br、I、OH、 NH_2 、CN、COOH、 $-C(=O)NH_2$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 5-6 元杂芳基, 其中所述 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 5-6 元杂芳基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代;

环 A 选自 C_{6-10} 芳基、5-6 元杂芳基、 C_{3-8} 环烷基和 3-6 元杂环烷基;

R_a 选自 F、Cl、Br、I、OH、 NH_2 、CN、COOH 和 C_{1-3} 烷基;

m 为 1 或 2;

n 为 1;

r 为 1;

q 为 1;

g 为 0、1、2 或 3;

所述 5-6 元杂芳基和 3-6 元杂环烷基分别包含 1、2、3 或 4 个独立选自 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 和 N 的杂原子或杂原子团;

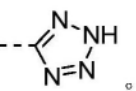
带“*”碳原子为手性碳原子, 以 (R) 或 (S) 单一对映体形式或富含一种对映体形式存在;

带“#”碳原子为手性碳原子, 以 (R) 或 (S) 单一对映体形式或富含一种对映体形式存在。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_a 选自 F、Cl、Br、I、OH、 NH_2 、CN、COOH 和 $-CH_3$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_1 选自 H、Cl、F、Br、I、OH、 NH_2 、CN、COOH、 $-C(=O)NH_2$ 、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基和 5 元杂芳基, 其中所述 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基和 5 元杂芳基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代。

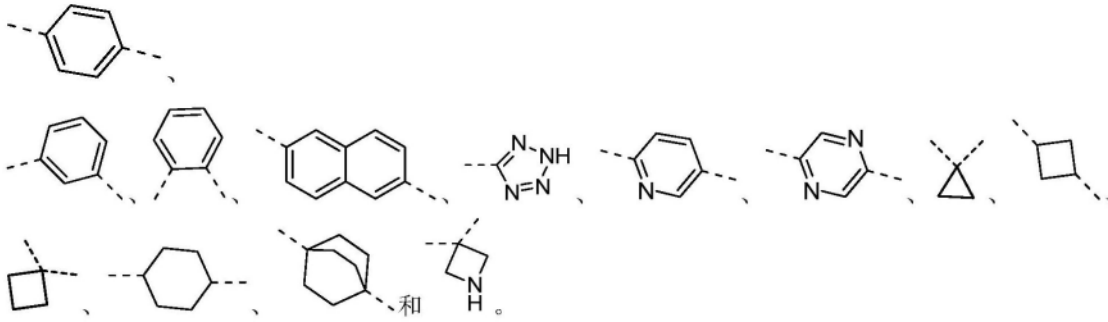
4. 根据权利要求 3 所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐, 其中, R_1 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、 NH_2 、CN、COOH、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-CH_3$ 、 $-OCH_3$ 和四氮唑基, 其中所述 $-CH_3$ 、 $-OCH_3$ 和四氮唑基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代。

5. 根据权利要求 4 所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐, 其中, R_1 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、 NH_2 、CN、COOH、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCH_3$ 、 $-CH_2-COOH$ 和 。

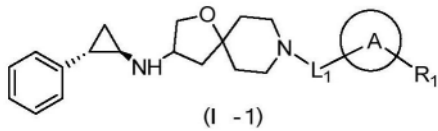
6. 根据权利要求 1 所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐, 其中, L_1 选自单键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-C(=O)-$ 和 $-C(=O)-O-$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐, 其中, 环 A 选自苯基、萘基、四氮唑基、吡啶基、吡嗪基、环丙基、环丁基、环己基、双环[2.2.2]辛烷基和杂氮环丁烷基。

8. 根据权利要求 7 所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐, 其中, 环 A 选自



9. 根据权利要求1-5或6-8任意一项所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐，其化合物选自



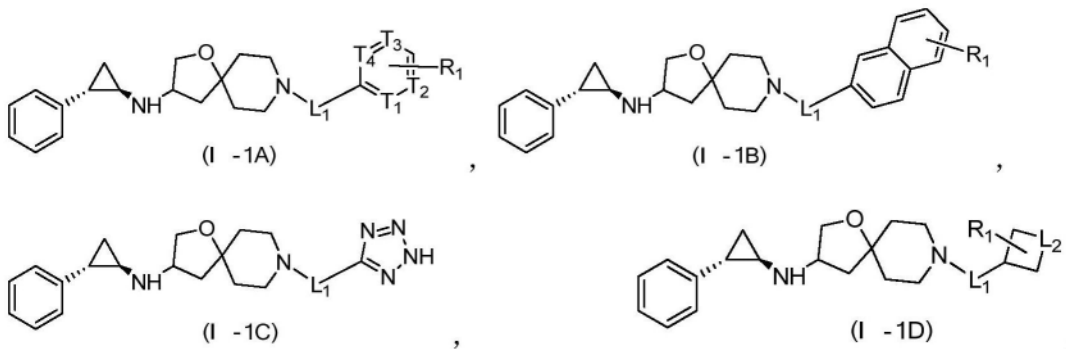
其中，

R₁如权利要求1-5中任一项所定义；

L₁如权利要求1或6所定义；

环A如权利要求1、7或8所定义。

10. 根据权利要求9所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐，其化合物选自



其中，

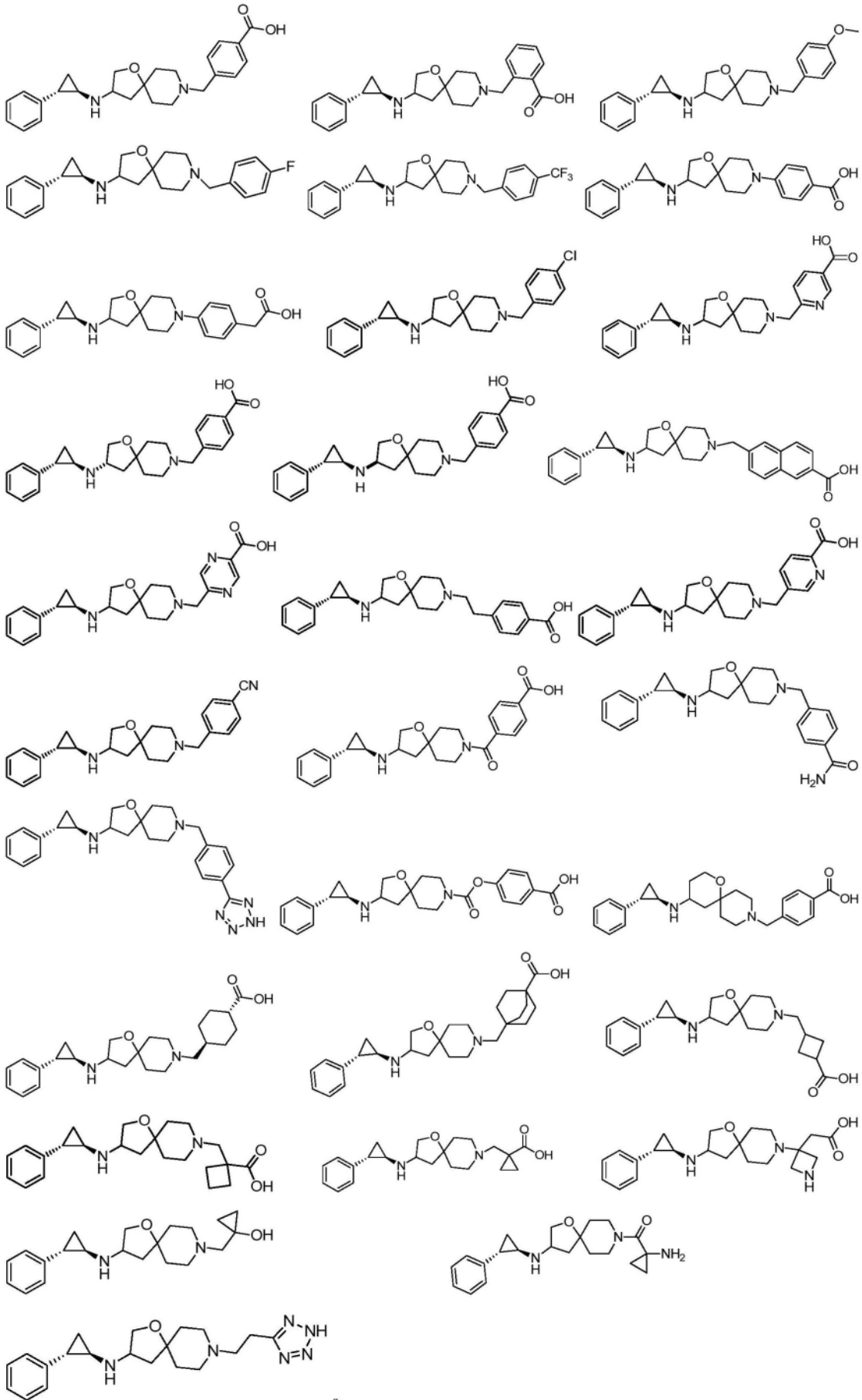
L₂选自单键、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-和-NH-；

R₁如权利要求1-5中任一项所定义；

L₁如权利要求1或6所定义。

11. 下式化合物、其异构体或其药学上可接受的盐，





12. 根据权利要求1-11任意一项所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐,其中所述的盐选自盐酸盐。

13. 根据权利要求1-12任意一项所述的化合物、其异构体或其药学上可接受的盐在制备治疗LSD1相关病症的药物上的应用。

作为LSD1抑制剂的环丙胺类化合物及其应用

- [0001] 本申请主张如下优先权：
[0002] CN201811070319.6, 申请日:2018.09.13;
[0003] CN201910100629.6, 申请日:2019.01.31。

技术领域

[0004] 本发明涉及一类作为赖氨酸特异性去甲基化酶1 (LSD1) 抑制剂的环丙胺类化合物,及其在制备治疗与LSD1相关疾病的药物中的应用。具体涉及式(I)所示化合物、其异构体及其药学上可接受的盐。

背景技术

[0005] 组蛋白翻译后修饰包括甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化等过程,是表观遗传学的重要调控手段,通过改变染色质结构影响基因表达[Xueshun Wang, Boshi Huang, Takayoshi Suzuki et al., Epigenomics, 2015, 1379-1396;]。尽管这些修饰并不改变DNA的基础序列,但这种表观遗传的变化可能通过细胞分裂在整个细胞生命周期或者细胞迭代过程持续存在[Adrian Bird, Nature, 2007, 396-398]。因此表观遗传学功能异常与各种疾病的病理过程密切相关[James T Lynch, William J Harris & Tim C P Somervaille, Expert Opin. Ther. Targets, 2012, 1239-1249],比如各种实体瘤,血液瘤,病毒感染,神经系统异常等疾病。因此,表观遗传学现在成为药物研发领域的研究热点。组蛋白的甲基化状态由组蛋白甲基转移酶和组蛋白去甲基化酶共同调控。赖氨酸特异性去甲基化酶(Lysine specific demethylase 1, LSD1, 又名KDM1A)是第一个被报道的组蛋白赖氨酸去甲基化酶,通过调控组蛋白赖氨酸的甲基化状态,广泛参与转录调控,影响细胞增殖和分化、胚胎干细胞多能性等诸多生理过程。[Yujiang Shi, Fei Lan, Caitlin Matson et al., Cell, 2004, 941-953] [Daniel P. Mould, Alison E. McGonagle, Daniel H. Wiseman et al., Medicinal Research Reviews, 2015, 35, 586-618]。LSD1结构包括三个主要部分:N-末端的SWIRM结构域,C-末端的氨基氧化酶结构域(AOL)和中央的Tower域。[Ruchi Anand, Ronen Marmorstein, Journal of Biological Chemistry, 2007, 35425-35429]。C-末端的氨基氧化酶结构域包括两个活性口袋,一个是FAD结合的位点,另一个是用于识别并与底物结合的位点[Pete Stavropoulos, Günter Blobel, André Hoelz, Nature Structural & Molecular Biology, 2006, 626-632]。SWIRM结构域的功能还没有明确的结论,它不直接参与FAD或者底物的结合,但是这个区域的突变或者是去除都会降低LSD1的活性,因此推测该区域可能是通过调整构象,影响活性区域的作用。[Yong Chen, Yuting Yang, Feng Wang et al., Biochemistry, 2006, 13956-13961]。Tower结构域是LSD1与其他蛋白因子的结合域。LSD1与不同蛋白因子相结合后,作用于不同底物,从而对组蛋白以及基因表达起到不同的调控作用。比如LSD1与CoREST相结合后,会优先作用于组蛋白H3K4,通过去甲基化,去除激活相关的组蛋白标记,抑制基因转录;而与雄激素受体蛋白结合后,重组的LSD1会优先作用于H3K9,通过去甲基化激活雄激素受体相关的基因转录[Ruchi Anand, Ronen Marmorstein,

Journal of Biological Chemistry,2007,35425-35429;Eric Metzger,Melanie Wissmann,Na Yin et al.,Nature,2005,436-439.].此外,LSD1还调控部分非组蛋白底物的甲基化状态,包括抑癌基因p53和DNA甲基转移酶1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 等 [Yi Chao Zheng,Jinlian Ma,Zhiru Wang,Medicinal Research Reviews,2015,1032-1071]。

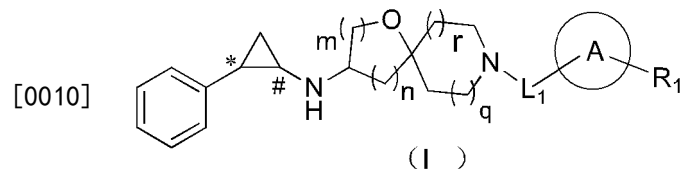
[0006] LSD1是FAD依赖的氨基氧化酶,其中质子转移被认为是其最可能的氧化机理 [Zheng Y C,Yu B,Chen Z S,et al.Epigenomics,2016,8,651-666.].首先通过质子转移,将底物的N-CH₃键转化成亚胺键,这个亚胺离子中间体发生水解反应,一边生成去甲基的胺,另一边生成甲醛。在这个催化循环过程中,FAD被还原成FADH₂,随后又被一分子的氧气氧化回到FAD,同时生成一分子H₂O₂ [Yujiang Shi,Fei Lan,Caitlin Matson,Cell,2004,941-953]。

[0007] LSD1在多种不同类型的肿瘤中异常表达。LSD1在急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 亚型中高表达,是维持白血病干细胞 (leukemia stem cell, LSC) 潜能的重要因素。LSD1在多种实体瘤如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌和胰腺癌中高表达,与肿瘤的预后不良密切相关。LSD1抑制钙粘蛋白的表达,与肿瘤的侵袭和上皮-间质转移 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 密切相关 [Hosseini A,Minucci S.Epigenomics,2017,9,1123-1142.]。

[0008] LSD1抑制剂目前没有药物获批上市,已有8个药物处于临床研究阶段,主要用于血液肿瘤、小细胞肺癌和尤文氏肉瘤等疾病的治疗。然而,面对巨大的未满足市场,该领域仍然需要活性更好,药代动力学参数更优的候选化合物推进临床试验,以满足治疗需求。

发明内容

[0009] 本发明提供了式 (I) 化合物、其异构体或其药学上可接受的盐,



[0011] 其中,

[0012] L₁选自 -(CH₂)_g-、-C(=O)-NH-、-C(=O)-和-C(=O)-O-;

[0013] R₁选自H、Cl、F、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH、-C(=O)NH₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-C(=O)NH-C₁₋₆烷基和5-6元杂芳基,其中所述C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-C(=O)NH-C₁₋₆烷基和5-6元杂芳基任选被1、2或3个R_a取代;

[0014] 环A选自C₆₋₁₀芳基、5-6元杂芳基、C₃₋₈环烷基和3-6元杂环烷基;

[0015] R_a选自F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH和C₁₋₃烷基;

[0016] m为0、1或2;

[0017] n为0、1或2,且m和n不能同时为0;

[0018] r为0或1;

[0019] q为0或1;

[0020] g为0、1、2或3;

[0021] 所述5-6元杂芳基和3-6元杂环烷基分别包含1、2、3或4个独立选自-NH-、-O-、-S-和N的杂原子或杂原子团；


[0022] 带“*”碳原子为手性碳原子，以(R)或(S)单一对映体形式或富含一种对映体形式存在；

[0023] 带“#”碳原子为手性碳原子，以(R)或(S)单一对映体形式或富含一种对映体形式存在。

[0024] 本发明的一些方案中，上述 R_a 选自F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH和-CH₃，其他变量如本发明所定义。

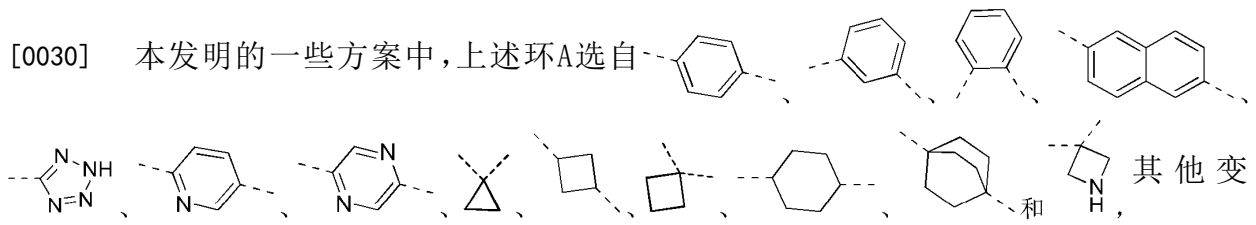
[0025] 本发明的一些方案中，上述 R_1 选自H、Cl、F、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH、-C(=O)NH₂、C₁₋₃烷基、C₁₋₃烷氧基、-C(=O)NH₂-C₁₋₃烷基和5元杂芳基，其中所述C₁₋₃烷基、C₁₋₃烷氧基、-C(=O)NH₂-C₁₋₃烷基和5元杂芳基任选被1、2或3个 R_a 取代，其他变量如本发明所定义。

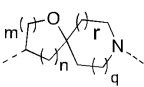

[0026] 本发明的一些方案中，上述 R_1 选自H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH、-C(=O)NH₂、-CH₃、-OCH₃和四氮唑基，其中所述-CH₃、-OCH₃和四氮唑基任选被1、2或3个 R_a 取代，其他变量如本发明所定义。

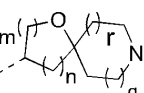
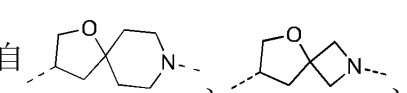
[0027] 本发明的一些方案中，上述 R_1 选自H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH、-C(=O)NH₂、-CF₃、-OCH₃、-CH₂-COOH和，其他变量如本发明所定义。

[0028] 本发明的一些方案中，上述 L_1 选自单键、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-C(=O)-NH-、-C(=O)-和-C(=O)-O-，其他变量如本发明所定义。

[0029] 本发明的一些方案中，上述环A选自苯基、萘基、四氮唑基、吡啶基、吡嗪基、环丙基、环丁基、环己基、双环[2.2.2]辛烷基和杂氮环丁烷基，其他变量如本发明所定义。

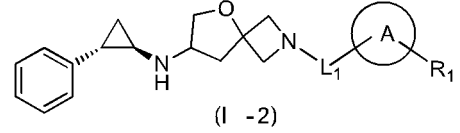
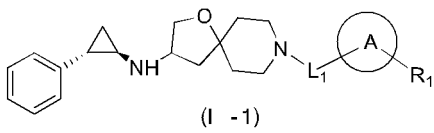
[0030] 本发明的一些方案中，上述环A选自，其他变量如本发明所定义。

[0031] 本发明的一些方案中，上述结构单元选自，其他变量如本发明所定义。

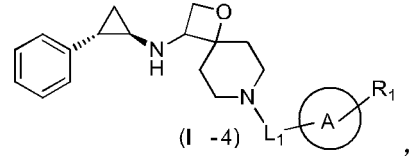
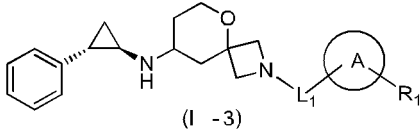
[0032] 本发明的一些方案中，上述结构单元选自，其他变量如本发明所定义。

[0033] 本发明还有一些方案是由上述各变量任意组合而来。

[0034] 本发明的一些方案中,上述化合物、其异构体或其药学上可接受的盐,其选自



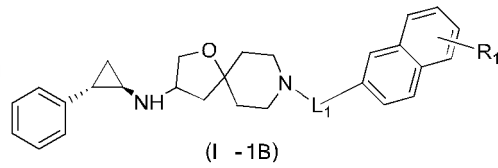
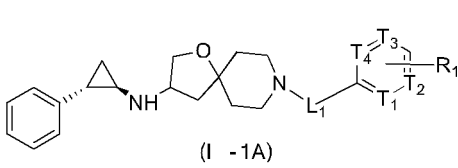
[0035]



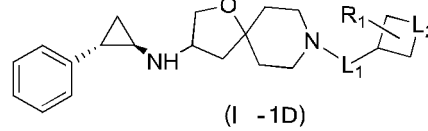
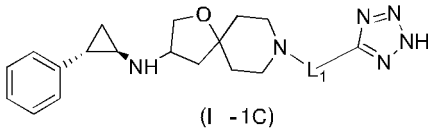
[0036] 其中,

[0037] R_1 、 L_1 和环A如本发明所定义。

[0038] 本发明的一些方案中,上述化合物、其异构体或其药学上可接受的盐,其选自



[0039]



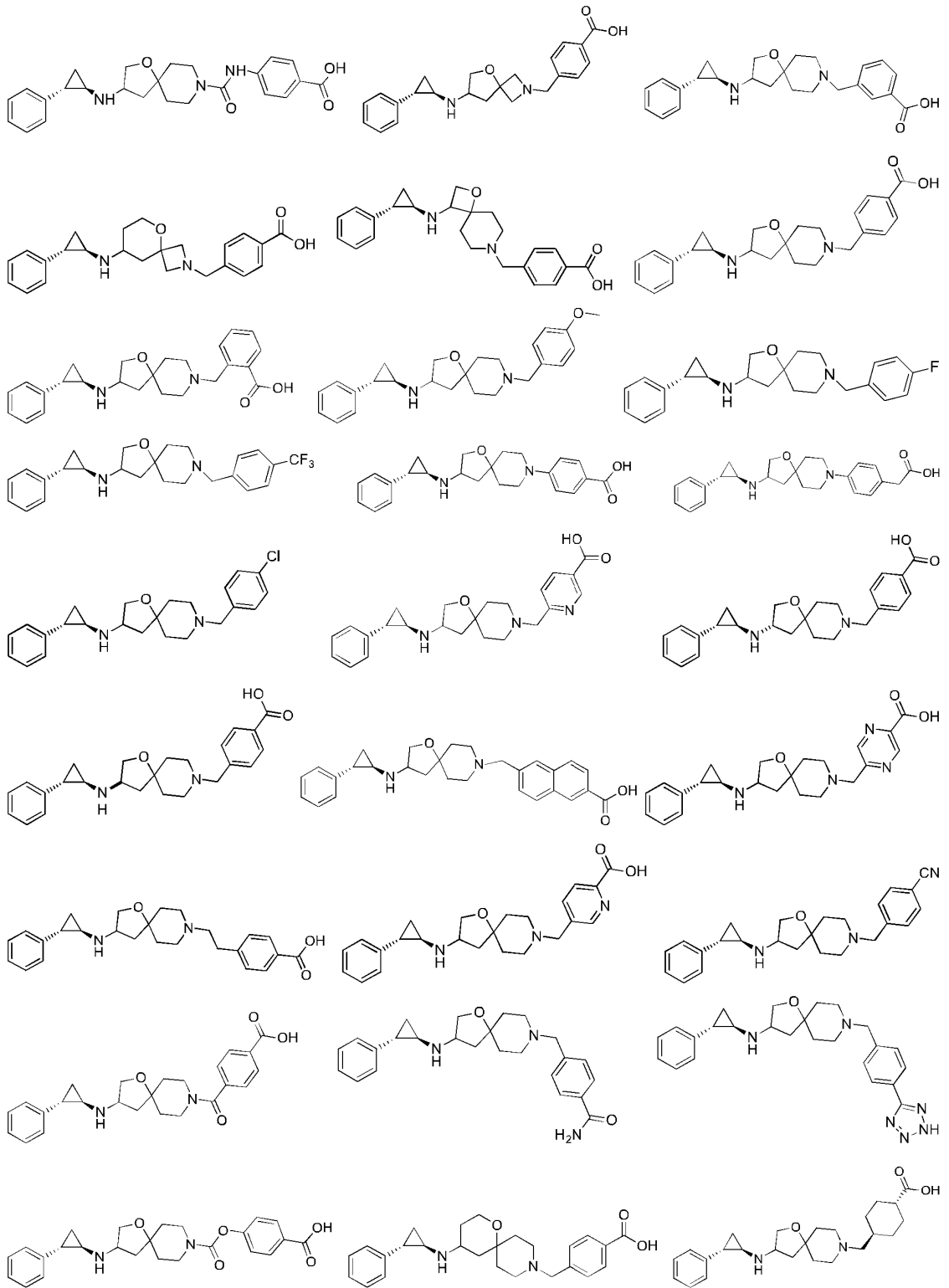
[0040] 其中,

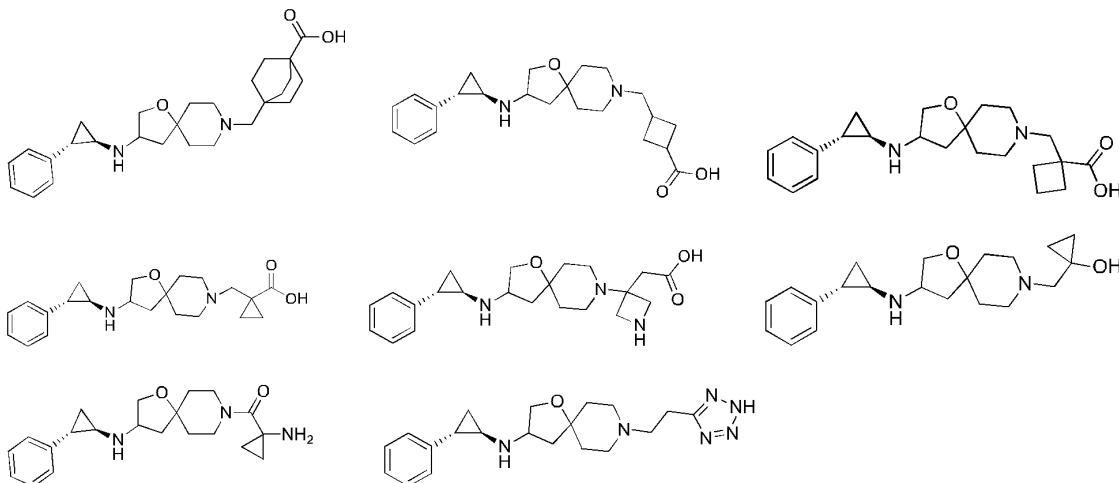
[0041] L_2 选自单键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 和 $-NH-$;

[0042] R_1 和 L_1 如本发明所定义。

[0043] 本发明还提供了下式化合物、其异构体或其药学上可接受的盐,

[0044]





[0045]

[0046] 本发明的一些方案中,上述的盐选自盐酸盐。

[0047] 本发明还提供了上述化合物、其异构体或其药学上可接受的盐在制备治疗LSD1相关病症的药物上的应用。

[0048] 技术效果

[0049] 作为新型的LSD1抑制剂,本发明的化合物对LSD1具有显著的抑制活性,对NCI-H1417、HL60和MV-4-11细胞增殖抑制活性明显;同时,具有良好的药代动力学性质;并且在人小细胞肺癌NCI-H1417异种移植瘤模型中与与化疗药物顺铂联用、在MC38小鼠结肠癌移植瘤模型中与PD-1单抗联用具有优异的抑瘤效果。

[0050] 定义和说明

[0051] 除非另有说明,本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的,而应该按照普通的含义去理解。当本文中出現商品名时,意在指代其对应的商品或其活性成分。

[0052] 这里所采用的术语“药学上可接受的”,是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言,它们在可靠的医学判断的范围之内,适用于与人类和动物的组织接触使用,而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

[0053] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的盐,由本发明发现的具有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时,可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物的中性形式接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、有机胺或镁盐或类似的盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时,可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物的中性形式接触的方式获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括无机酸盐,所述无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸,碳酸氢根,磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸等;以及有机酸盐,所述有机酸包括如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸和甲磺酸等类似的酸;还包括氨基酸(如精氨酸等)的盐,以及如葡萄糖醛酸等有机酸的盐。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团,从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

[0054] 本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下,这样的盐的制备方法是:在水或有机溶剂或两者的混合物中,经由游

离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。











[0055] 本发明的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本发明设想所有的这类化合物,包括顺式和反式异构体、(-) - 和 (+) - 对映体、(R) - 和 (S) - 对映体、非对映异构体、(D) - 异构体、(L) - 异构体,及其外消旋混合物和其他混合物,例如对映异构体或非对映体富集的混合物,所有这些混合物都属于本发明的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物,均包括在本发明的范围之内。


[0056] 除非另有说明,术语“对映异构体”或者“旋光异构体”是指互为镜像关系的立体异构体。

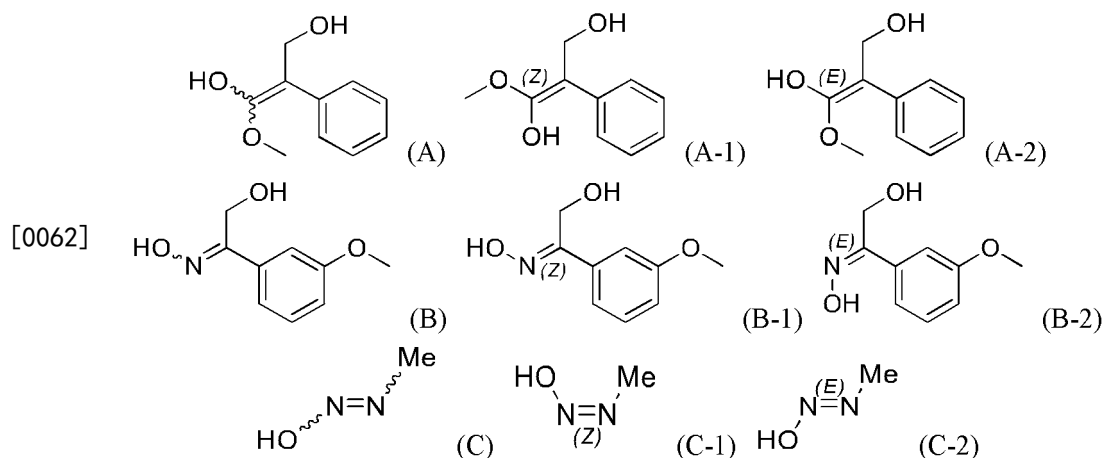
[0057] 除非另有说明,术语“顺反异构体”或者“几何异构体”系由因双键或者成环碳原子单键不能自由旋转而引起。

[0058] 除非另有说明,术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心,并且分子间为非镜像的关系的立体异构体。

[0059] 除非另有说明,“(D)”或者“(+)”表示右旋,“(L)”或者“(−)”表示左旋,“(DL)”或者“(±)”表示外消旋。

[0060] 除非另有说明,用楔形实线键()和楔形虚线键()表示一个立体中心的绝对构型,用直形实线键()和直形虚线键()表示立体中心的相对构型,用波浪线()表示楔形实线键()或楔形虚线键(),或用波浪线()表示直形实线键()和直形虚线键()。

[0061] 除非另有说明,当化合物中存在双键结构,如碳碳双键、碳氮双键和氮氮双键,且双键上的各个原子均连接有两个不同的取代基时(包含氮原子的双键中,氮原子上的一对孤对电子视为其连接的一个取代基),如果该化合物中双键上的原子与其取代基之间用波浪线()连接,则表示该化合物的(Z)型异构体、(E)型异构体或两种异构体的混合物。例如下式(A)表示该化合物以式(A-1)或式(A-2)的单一异构体形式存在或以式(A-1)和式(A-2)两种异构体的混合物形式存在;下式(B)表示该化合物以式(B-1)或式(B-2)的单一异构体形式存在或以式(B-1)和式(B-2)两种异构体的混合物形式存在。下式(C)表示该化合物以式(C-1)或式(C-2)的单一异构体形式存在或以式(C-1)和式(C-2)两种异构体的混合物形式存在。



[0063] 本发明的化合物可以存在特定的。除非另有说明,术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指在室温下,不同官能团异构体处于动态平衡,并能很快的相互转化。若互变异

构体是可能的(如在溶液中),则可以达到互变异构体的化学平衡。例如,质子互变异构体(proton tautomer)(也称质子转移互变异构体(prototropic tautomer))包括通过质子迁移来进行的互相转化,如酮-烯醇异构化和亚胺-烯胺异构化。价键异构体(valence tautomer)包括一些成键电子的重组来进行的相互转化。其中酮-烯醇互变异构化的具体实例是戊烷-2,4-二酮与4-羟基戊-3-烯-2-酮两个互变异构体之间的互变。

[0064] 除非另有说明,术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于100%,并且,该异构体或对映体的含量大于等于60%,或者大于等于70%,或者大于等于80%,或者大于等于90%,或者大于等于95%,或者大于等于96%,或者大于等于97%,或者大于等于98%,或者大于等于99%,或者大于等于99.5%,或者大于等于99.6%,或者大于等于99.7%,或者大于等于99.8%,或者大于等于99.9%。

[0065] 除非另有说明,术语“异构体过量”或“对映体过量”指两种异构体或两种对映体相对百分数之间的差值。例如,其中一种异构体或对映体的含量为90%,另一种异构体或对映体的含量为10%,则异构体或对映体过量(ee值)为80%。

[0066] 可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的(R)-和(S)-异构体以及D和L异构体。如果想得到本发明某化合物的一种对映体,可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备,其中将所得非对映体混合物分离,并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者,当分子中含有碱性官能团(如氨基)或酸性官能团(如羧基)时,与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐,然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分,然后回收得到纯的对映体。此外,对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的,所述色谱法采用手性固定相,并任选地与化学衍生法相结合(例如由胺生成氨基甲酸盐)。本发明的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如,可用放射性同位素标记化合物,比如氚(^3H),碘-125(^{125}I)或C-14(^{14}C)。又例如,可用重氢取代氢形成氘代药物,氘与碳构成的键比普通氢与碳构成的键更坚固,相比于未氘化药物,氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本发明的化合物的所有同位素组成的变换,无论放射性与否,都包括在本发明的范围之内。“任选”或“任选地”指的是随后描述的事件或状况可能但不是必需出现的,并且该描述包括其中所述事件或状况发生的情况以及所述事件或状况不发生的情况。

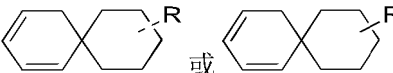

[0067] 术语“被取代的”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代,可以包括重氢和氢的变体,只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧(即=O)时,意味着两个氢原子被取代。氧取代不会发生在芳香基上。术语“任选被取代的”是指可以被取代,也可以不被取代,除非另有规定,取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

[0068] 当任何变量(例如R)在化合物的组成或结构中出现一次以上时,其在每一种情况下的定义都是独立的。因此,例如,如果一个基团被0-2个R所取代,则所述基团可以任选地至多被两个R所取代,并且每种情况下的R都有独立的选项。此外,取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

[0069] 当一个连接基团的数量为0时,比如 $-(\text{CRR})_0-$,表示该连接基团为单键。

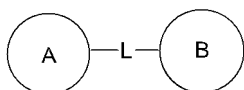
[0070] 当其中一个变量选自单键时,表示其连接的两个基团直接相连,比如A-L-Z中L代表单键时表示该结构实际上是A-Z。

[0071] 当一个取代基为空缺时,表示该取代基是不存在的,比如A-X中X为空缺时表示该结构实际上是A。当一个取代基的键可以交叉连接到一个环上的两个以上原子时,这种取代基可以与这个环上的任意原子相键合,例如,结构单元

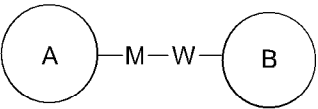
 或  表示

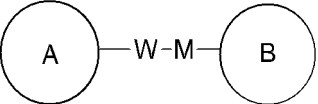
其取代基R可在环己基或者环己二烯上的任意一个位置发生取代。当所列举的取代基中没有指明其通过哪一个原子连接到被取代的基团上时,这种取代基可以通过其任何原子相键合,例如,吡啶基作为取代基可以通过吡啶环上任意一个碳原子连接到被取代的基团上。

[0072] 当所列举的连接基团没有指明其连接方向,其连接方向是任意的,例如,



中连接基团L为-M-W-,此时-M-W-既可以按与从左往右的读取顺序相同的

方向连接环A和环B构成  也可以按照与从左往右的读取顺序相反的

方向连接环A和环B构成  所述连接基团、取代基和/或其变体的组合

只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

[0073] 除非另有规定,环上原子的数目通常被定义为环的元数,例如,“5-7元环”是指环绕排列5-7个原子的“环”。

[0074] 除非另有规定,“3-12元环”表示由3至12个环原子组成的环烷基、杂环烷基、环烯基或杂环烯基。所述的环包括单环,也包括螺环、并环和桥环等双环或多环体系。除非另有规定,该环任选地包含1、2或3个独立选自O、S和N的杂原子。所述3-12元环包括3-10元、3-9元、3-8元、3-7元、3-6元、3-5元、4-10元、4-9元、4-8元、4-7元、4-6元、4-5元、5-10元、5-9元、5-8元、5-7元、5-6元、6-10元、6-9元、6-8元和6-7元环等。术语“5-7元杂环烷基”包括哌啶基等,但不包括苯基。术语“环”还包括含有至少一个环的环系,其中的每一个“环”均独立地符合上述定义。

[0075] 除非另有规定,术语“C₁₋₆烷基”用于表示直链或支链的由1至6个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述C₁₋₆烷基包括C₁₋₅、C₁₋₄、C₁₋₃、C₁₋₂、C₂₋₆、C₂₋₄、C₆和C₅烷基等;其可以是一价(如甲基)、二价(如亚甲基)或者多价(如次甲基)。C₁₋₆烷基的实例包括但不限于甲基(Me)、乙基(Et)、丙基(包括n-丙基和异丙基)、丁基(包括n-丁基,异丁基,s-丁基和t-丁基)、戊基(包括n-戊基,异戊基和新戊基)、己基等。

[0076] 除非另有规定,术语“C₁₋₃烷基”用于表示直链或支链的由1至3个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述C₁₋₃烷基包括C₁₋₂和C₂₋₃烷基等;其可以是一价(如甲基)、二价(如亚甲基)或者多价(如次甲基)。C₁₋₃烷基的实例包括但不限于甲基(Me)、乙基(Et)、丙基(包括n-丙基和异丙基)等。

[0077] 除非另有规定,术语“C₁₋₆烷氧基”表示通过一个氧原子连接到分子的其余部分的那些包含1至6个碳原子的烷基基团。所述C₁₋₆烷氧基包括C₁₋₄、C₁₋₃、C₁₋₂、C₂₋₆、C₂₋₄、C₆、C₅、C₄和C₃烷氧基等。C₁₋₆烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基(包括正丙氧基和异丙

氧基)、丁氧基(包括n-丁氧基、异丁氧基、s-丁氧基和t-丁氧基)、戊氧基(包括n-戊氧基、异戊氧基和新戊氧基)、己氧基等。

[0078] 除非另有规定,术语“C₁₋₃烷氧基”表示通过一个氧原子连接到分子的其余部分的那些包含1至3个碳原子的烷基基团。所述C₁₋₃烷氧基包括C₁₋₂、C₂₋₃、C₃和C₂烷氧基等。C₁₋₃烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基(包括正丙氧基和异丙氧基)等。

[0079] 除非另有规定,“C₃₋₈环烷基”表示由3至8个碳原子组成的饱和环状碳氢基团,其包括单环和双环体系,其中双环体系包括螺环、并环和桥环。所述C₃₋₈环烷基包括C₃₋₆、C₃₋₅、C₄₋₈、C₄₋₆、C₄₋₅、C₅₋₈或C₅₋₆环烷基等;其可以是一价、二价或者多价。C₃₋₈环烷基的实例包括,但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、降冰片烷基、[2.2.2]二环辛烷等。

[0080] 除非另有规定,术语“3-6元杂环烷基”本身或者与其他术语联合分别表示由3至6个环原子组成的饱和环状基团,其1、2、3或4个环原子为独立选自O、S和N的杂原子,其余为碳原子,其中氮原子任选地被季铵化,氮和硫杂原子可任选被氧化(即NO和S(O)_p,p是1或2)。其包括单环和双环体系,其中双环体系包括螺环、并环和桥环。此外,就该“3-6元杂环烷基”而言,杂原子可以占据杂环烷基与分子其余部分的连接位置。所述3-6元杂环烷基包括4-6元、5-6元、4元、5元和6元杂环烷基等。3-6元杂环烷基的实例包括但不限于氮杂环丁基、氧杂环丁基、硫杂环丁基、吡咯烷基、吡唑烷基、咪唑烷基、四氢噻吩基(包括四氢噻吩-2-基和四氢噻吩-3-基等)、四氢呋喃基(包括四氢呋喃-2-基等)、四氢吡喃基、哌啶基(包括1-哌啶基、2-哌啶基和3-哌啶基等)、哌嗪基(包括1-哌嗪基和2-哌嗪基等)、吗啉基(包括3-吗啉基和4-吗啉基等)、二噁烷基、二噻烷基、异噁唑烷基、异噻唑烷基、1,2-噁嗪基、1,2-噻嗪基、六氢哒嗪基、高哌嗪基或高哌啶基等。

[0081] 除非另有规定,本发明术语“C₆₋₁₀芳环”和“C₆₋₁₀芳基”可以互换使用,术语“C₆₋₁₀芳环”或“C₆₋₁₀芳基”表示由6至10个碳原子组成的具有共轭π电子体系的环状碳氢基团,它可以是单环、稠合双环或稠合三环体系,其中各个环均为芳香性的。其可以是一价、二价或者多价,C₆₋₁₀芳基包括C₆₋₉、C₉、C₁₀和C₆芳基等。C₆₋₁₀芳基的实例包括但不限于苯基、萘基(包括1-萘基和2-萘基等)。

[0082] 除非另有规定,本发明术语“5-6元杂芳环”和“5-6元杂芳基”可以互换使用,术语“5-6元杂芳基”表示由5至6个环原子组成的具有共轭π电子体系的单环基团,其1、2、3或4个环原子为独立选自O、S和N的杂原子,其余为碳原子。其中氮原子任选地被季铵化,氮和硫杂原子可任选被氧化(即NO和S(O)_p,p是1或2)。5-6元杂芳基可通过杂原子或碳原子连接到分子的其余部分。所述5-6元杂芳基包括5元和6元杂芳基。所述5-6元杂芳基的实例包括但不限于吡咯基(包括N-吡咯基、2-吡咯基和3-吡咯基等)、吡唑基(包括2-吡唑基和3-吡唑基等)、咪唑基(包括N-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基和5-咪唑基等)、噁唑基(包括2-噁唑基、4-噁唑基和5-噁唑基等)、三唑基(1H-1,2,3-三唑基、2H-1,2,3-三唑基、1H-1,2,4-三唑基和4H-1,2,4-三唑基等)、四唑基、异噁唑基(3-异噁唑基、4-异噁唑基和5-异噁唑基等)、噻唑基(包括2-噻唑基、4-噻唑基和5-噻唑基等)、呋喃基(包括2-呋喃基和3-呋喃基等)、噻吩基(包括2-噻吩基和3-噻吩基等)、吡啶基(包括2-吡啶基、3-吡啶基和4-吡啶基等)、吡嗪基或嘧啶基(包括2-嘧啶基和4-嘧啶基等)。

[0083] 除非另有规定,C_{n-n+m}或C_n-C_{n+m}包括n至n+m个碳的任何一种具体情况,例如C₁₋₁₂包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、和C₁₂,也包括n至n+m中的任何一个范围,例如C₁₋₁₂包

括 C_{1-3} 、 C_{1-6} 、 C_{1-9} 、 C_{3-6} 、 C_{3-9} 、 C_{3-12} 、 C_{6-9} 、 C_{6-12} 和 C_{9-12} 等；同理， n 元至 $n+m$ 元表示环上原子数为 n 至 $n+m$ 个，例如3-12元环包括3元环、4元环、5元环、6元环、7元环、8元环、9元环、10元环、11元环、和12元环，也包括 n 至 $n+m$ 中的任何一个范围，例如3-12元环包括3-6元环、3-9元环、5-6元环、5-7元环、6-7元环、6-8元环、和6-10元环等。

[0084] 术语“离去基团”是指可以被另一种官能团或原子通过取代反应(例如亲和取代反应)所取代的官能团或原子。例如，代表性的离去基团包括三氟甲磺酸酯；氯、溴、碘；磺酸酯基，如甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、对溴苯磺酸酯、对甲苯磺酸酯等；酰氧基，如乙酰氧基、三氟乙酰氧基等等。

[0085] 术语“保护基”包括但不限于“氨基保护基”、“羟基保护基”或“巯基保护基”。术语“氨基保护基”是指适合用于阻止氨基氮位上副反应的保护基团。代表性的氨基保护基包括但不限于：乙酰基；酰基，例如链烷酰基(如乙酰基、三氯乙酰基或三氟乙酰基)；烷氧羰基，如叔丁氧羰基(Boc)；芳基甲氧羰基，如苄氧羰基(Cbz)和9-苄基甲氧羰基(Fmoc)；芳基甲基，如苄基(Bn)、三苯甲基(Tr)、1,1-二-(4'-甲氧基苯基)甲基；甲硅烷基，如三甲基甲硅烷基(TMS)和叔丁基二甲基甲硅烷基(TBS)等等。术语“羟基保护基”是指适合用于阻止羟基副反应的保护基。代表性羟基保护基包括但不限于：烷基，如甲基、乙基和叔丁基；酰基，例如链烷酰基(如乙酰基)；芳基甲基，如苄基(Bn)，对甲氧基苄基(PMB)、9-苄基甲基(Fm)和二苯基甲基(二苯甲基，DPM)；甲硅烷基，如三甲基甲硅烷基(TMS)和叔丁基二甲基甲硅烷基(TBS)等等。

[0086] 本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备，包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式，优选的实施方式包括但不限于本发明的实施例。

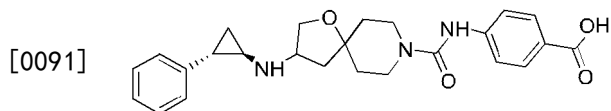
[0087] 本发明所使用的溶剂可经市售获得。本发明采用下述缩略词：aq代表水；HATU代表0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)- N,N,N',N' -四甲基脒六氟磷酸盐；EDC代表 N -(3-二甲氨基丙基)- N' -乙基碳二亚胺盐酸盐； m -CPBA代表3-氯过氧苯甲酸；eq代表当量、等量；CDI代表羰基二咪唑；DCM代表二氯甲烷；PE代表石油醚；DIAD代表偶氮二羧酸二异丙酯；DMF代表 N,N -二甲基甲酰胺；DMSO代表二甲亚砜；EtOAc代表乙酸乙酯；EtOH代表乙醇；MeOH代表甲醇；Cbz代表苄氧羰基，是一种胺保护基团；BOC代表叔丁氧羰基是一种胺保护基团；HOAc代表乙酸； $NaCNBH_3$ 代表氰基硼氢化钠； $r.t.$ 代表室温；0/N代表过夜；THF代表四氢呋喃； Boc_2O 代表二叔丁基二碳酸酯；TFA代表三氟乙酸；本发明化合物的盐酸盐加入饱和碳酸氢钠溶液调节pH到中性，经过高效液相色谱法分离(中性，碳酸氢铵体系)得到化合物的游离碱。

[0088] 化合物依据本领域常规命名原则或者使用ChemDraw®软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

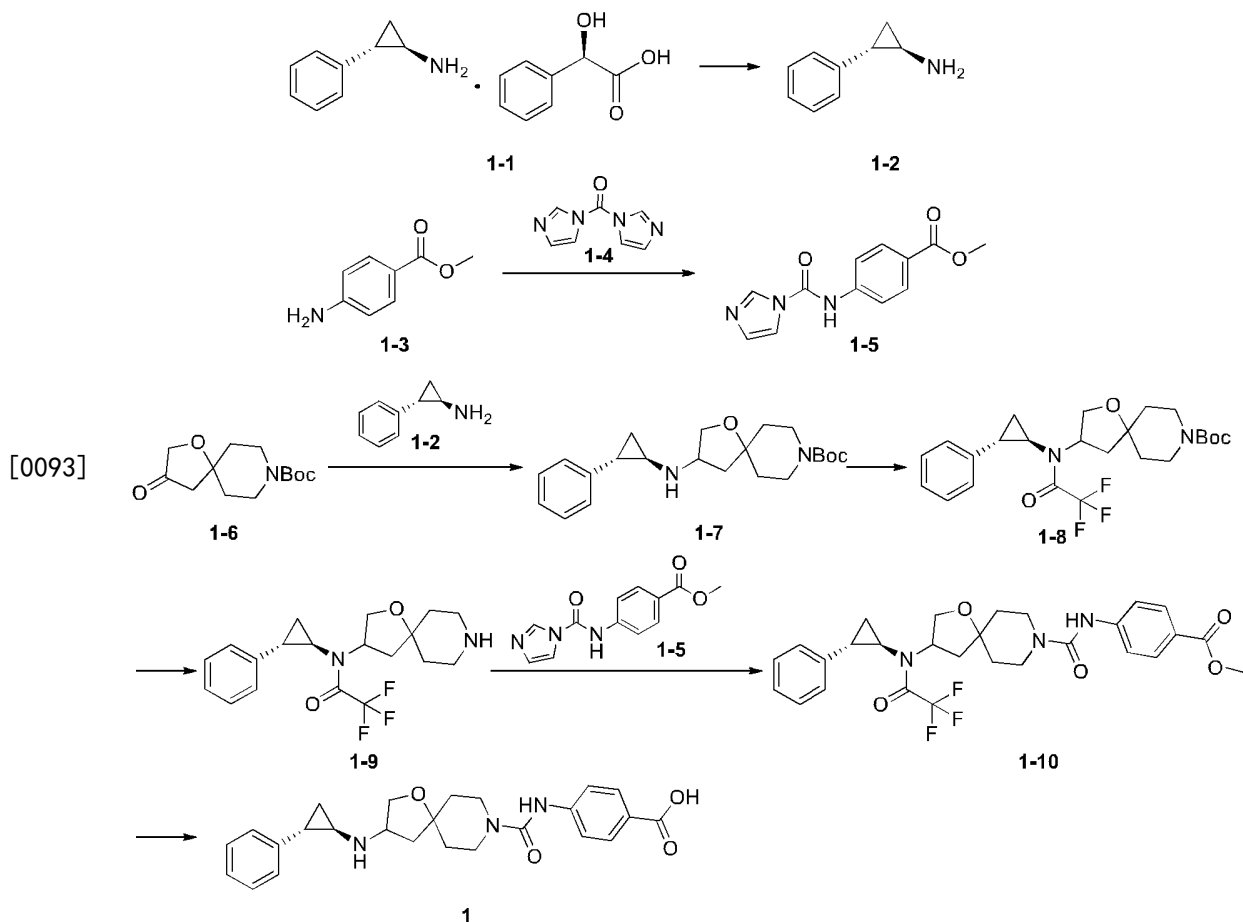
具体实施方式

[0089] 下面通过实施例对本发明进行详细描述，但并不意味着对本发明任何不利限制。本文已经详细地描述了本发明，其中也公开了其具体实施方式，对本领域的技术人员而言，在不脱离本发明精神和范围的情况下针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进将是显而易见的。

[0090] 实施例1



[0092] 合成路线:



[0094] 第一步

[0095] 将氢氧化钠(279g, 6.99mol)溶于水(3L)中,用冰水浴将反应液降温至10℃,将化合物1-1(997g, 3.49mol)分批加入至反应液,在10℃下搅拌反应2小时。向反应液中加入乙酸乙酯(2L x 1)萃取,乙酸乙酯(1.6L x 1)萃取。合并有机相用水(1.5L x 1)洗涤,再用饱和食盐水(1.5L x 1)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩除去溶剂后得到化合物1-2。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ7.18-7.14(m, 2H), 7.08-7.04(m, 1H), 6.95-6.92(m, 2H), 2.48-2.44(m, 1H), 1.80-1.76(m, 1H), 0.98-0.87(m, 2H)。

[0096] 第二步

[0097] 将化合物1-3(1.00g, 6.62mmol)和1-4(1.50g, 9.26mmol)溶于1,2-二氯乙烷(10mL)中。反应液在50℃下搅拌12小时。将反应液冷却到0℃搅拌1小时,过滤,滤饼用二氯甲烷(10mL x 2)洗涤,得到化合物1-5。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ8.43(s, 1H), 8.02-7.99(m, 2H), 7.82-7.80(m, 2H), 7.11(s, 1H), 7.04(s, 1H), 3.85(m, 3H)。

[0098] 第三步

[0099] 将化合物1-6(1.00g, 3.92mmol)和化合物1-2(522mg, 3.92mmol)溶于无水二氯甲烷(20mL)中,向反应液中加入冰醋酸(706mg, 11.8mmol)。反应液在20℃下搅拌1小时,加入醋酸硼氢化钠(2.49g, 11.8mmol),反应液在20℃下继续搅拌10小时。反应液用二氯甲烷

(80mL) 稀释后依次用饱和碳酸氢钠水溶液(100mL x 3), 水(100mL x 2), 饱和食盐水(100mL x 1) 洗涤, 再用无水硫酸钠干燥, 过滤, 所得母液浓缩得到化合物1-7。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.18-7.16 (m, 2H), 7.11-7.17 (m, 1H), 6.96-6.94 (m, 2H), 3.92-3.89 (m, 1H), 3.61-3.55 (m, 1H), 3.52-3.48 (m, 3H), 3.27-3.23 (m, 2H), 2.24-2.21 (m, 1H), 1.99-1.94 (m, 1H), 1.85-1.79 (m, 1H), 1.55-1.47 (m, 6H), 1.38 (s, 9H), 1.01-0.90 (m, 2H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺373, 实测值373。

[0100] 第四步

[0101] 将化合物1-7 (1.10g, 2.95mmol) 溶于无水二氯甲烷中 (20mL), 加入三乙胺 (448mg, 4.43mmol) 和三氟乙酸酐 (930mg, 4.43mmol)。反应液在15℃下搅拌反应12小时。向反应液中加入二氯甲烷 (50mL), 有机相用盐酸 (1M, 50mL x 1) 和饱和食盐水 (50mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过柱层析法分离 (5/1石油醚/乙酸乙酯, R_f=0.3) 得到化合物1-8。MS-ESI计算值[M-56+H]⁺413, [M-Boc+H]⁺369, 实测值413, 369。

[0102] 第五步

[0103] 将化合物1-8 (600mg, 1.28mmol) 溶于无水二氯甲烷 (6mL) 中, 在20℃下加入三氟乙酸 (4.62g, 40.5mmol)。反应液在20℃下搅拌反应2小时, 减压浓缩除去溶剂, 剩余物溶于二氯甲烷 (6mL) 中, 再向其中加入三乙胺 (250μL) 后在室温下搅拌半小时, 减压浓缩除去溶剂, 得到化合物1-9。MS-ESI计算值[M+H]⁺369, 实测值369。

[0104] 第六步

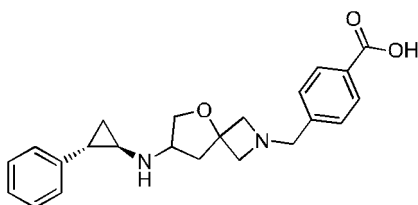
[0105] 将化合物1-9 (100mg, 0.271mmol) 和化合物1-5 (69.9mg, 0.285mmol) 溶于1,2-二氯乙烷 (10mL) 中。反应液在50℃下搅拌2小时, 减压浓缩除去溶剂, 剩余物用二氯甲烷 (50mL) 溶解, 有机相依次用水 (50mL x 1), 饱和食盐水 (50mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (1/1石油醚/乙酸乙酯, R_f=0.34) 得到化合物1-10。MS-ESI计算值[M+H]⁺546, 实测值546。

[0106] 第七步

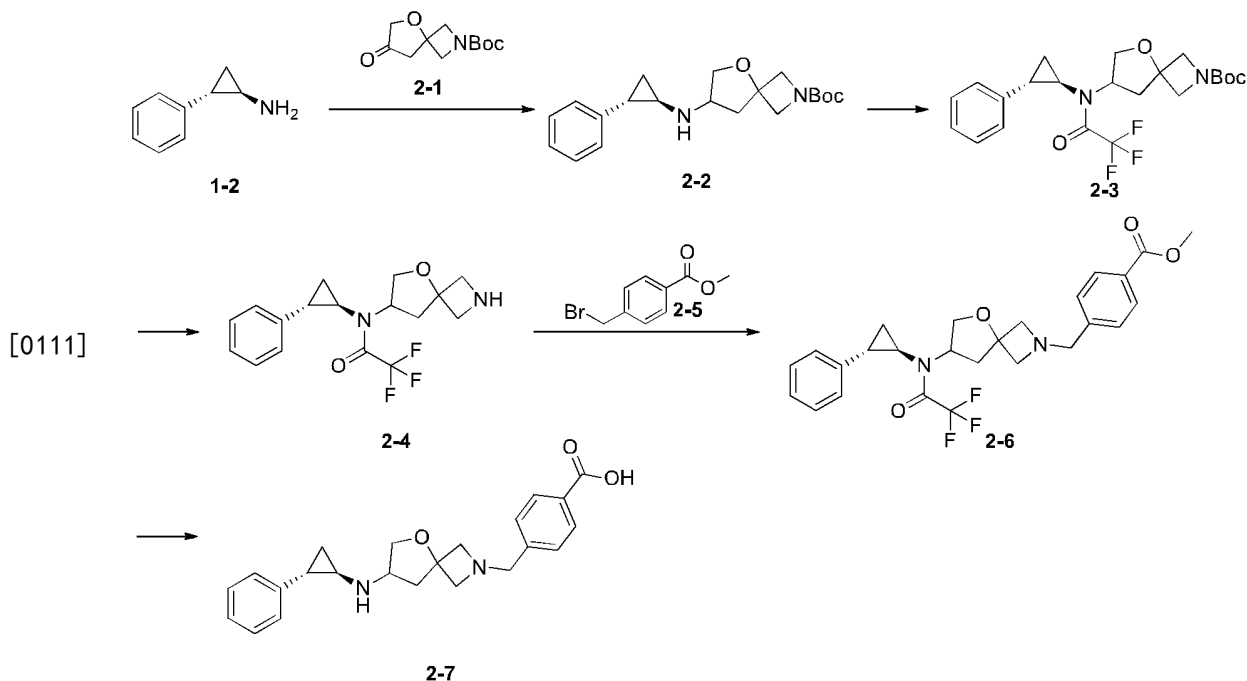
[0107] 将化合物1-10 (100mg, 0.183mmol) 溶于水 (3mL) 和四氢呋喃 (3mL), 加入氢氧化钠 (22.0mg, 0.549mmol)。反应液在50℃下搅拌12小时, 减压浓缩除去四氢呋喃, 剩余物用水 (3mL) 溶解, 用盐酸 (1mol/L) 调节pH值到4, 经过高效液相色谱法分离 (酸性, 盐酸体系) 得到化合物1的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ7.92 (d, J=8.8, 2H), 7.47 (d, J=8.8, 2H), 7.34-7.30 (m, 2H), 7.26-7.22 (m, 1H), 7.20-7.18 (m, 2H), 4.16-4.06 (m, 3H), 3.86-3.79 (m, 2H), 3.42-3.38 (m, 2H), 3.02-3.01 (m, 1H), 2.53-2.38 (m, 2H), 1.93-1.79 (m, 4H), 1.56-1.53 (m, 2H), 1.46-1.43 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺436, 实测值436。

[0108] 实施例2

[0109]



[0110] 合成路线:



[0112] 第一步

[0113] 将化合物2-1 (194mg, 0.856mmol) 和化合物1-2 (114mg, 0.856mmol) 溶于无水二氯甲烷 (1mL) 中, 向反应液中加入冰醋酸 (154mg, 2.57mmol)。反应液在26℃下搅拌2小时, 加入醋酸硼氢化钠 (544mg, 2.57mmol), 反应液在26℃下继续搅拌10小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠 (30mL), 用二氯甲烷萃取 (30mL x 3), 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (30mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (2:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f = 0.26$) 得到化合物2-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 345, 实测值345。

[0114] 第二步

[0115] 将化合物2-2 (154mg, 0.447mmol) 溶于无水二氯甲烷 (5mL) 中, 加入三乙胺 (67.9mg, 0.670mmol) 和三氟乙酸酐 (141mg, 0.670mmol)。反应液在25℃下搅拌反应12小时。向反应液中加入二氯甲烷 (50mL), 有机相用盐酸 (1M, 30mL) 和饱和食盐水 (50mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (3/1石油醚/乙酸乙酯, $R_f = 0.84$) 得到化合物2-3。¹H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.34-7.31 (m, 2H), 7.28-7.23 (m, 1H), 7.09-7.03 (m, 2H), 4.55-4.47 (m, 1H), 4.16-3.84 (m, 6H), 3.12-2.91 (m, 1H), 2.49-2.05 (m, 3H), 1.53-1.43 (m, 11H)。MS-ESI计算值 $[M-56+H]^+$ 385, $[M-Boc+H]^+$ 341, 实测值385, 341。

[0116] 第三步

[0117] 将化合物2-3 (160mg, 0.408mmol) 溶于无水二氯甲烷 (2mL) 中, 在0℃下滴加三氟乙酸 (1mL, 13.5 μ mol)。反应液在20℃下搅拌反应1小时, 减压浓缩除去溶剂, 得到化合物2-4。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 341, 实测值341。

[0118] 第四步

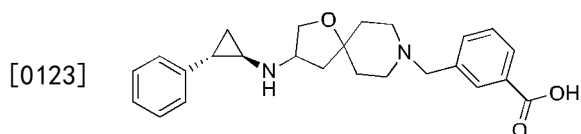
[0119] 将化合物2-4 (200mg, 0.587mmol), 化合物2-5 (137mg, 0.599mmol) 和三乙胺 (178mg, 1.76mmol) 溶于乙腈 (5mL) 中。反应液在50℃下搅拌2小时, 减压浓缩除去溶剂, 剩余物用二氯甲烷 (50mL) 溶解, 有机相依次用水 (50mL x 1), 饱和食盐水 (50mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (1/1石油醚/乙酸乙酯, $R_f = 0.34$) 得到化合物2-6。¹H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8.01-7.98 (m, 2H), 7.38-7.24 (m, 5H), 7.10-

7.04 (m, 2H), 4.62-4.51 (m, 1H), 4.04-3.98 (m, 1H), 3.92-3.84 (m, 4H), 3.73-3.70 (m, 2H), 3.54-3.18 (m, 4H), 3.08-2.89 (m, 1H), 2.60-2.34 (m, 3H), 1.59-1.42 (m, 2H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 489, 实测值489。

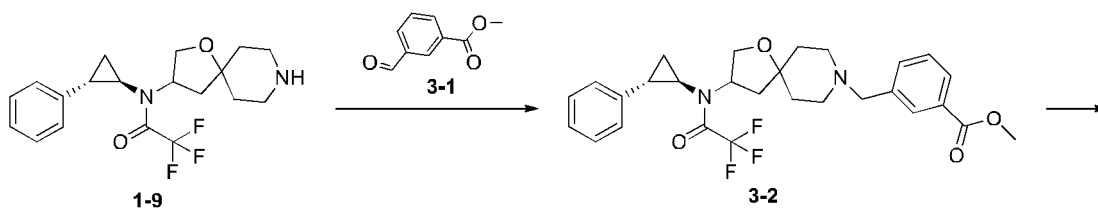
[0120] 第五步

[0121] 将化合物2-6 (140mg, 0.287mmol) 溶于水 (1mL) 和四氢呋喃 (4mL), 加入氢氧化钠 (34.4mg, 0.859mmol)。反应液在50℃下搅拌2小时, 减压浓缩除去四氢呋喃, 剩余物用水 (3mL) 溶解, 用盐酸 (1mol/L) 调节pH值到4, 经过高效液相色谱法分离 (酸性, 盐酸体系) 得到化合物2的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ8.12-8.10 (m, 2H), 7.61-7.59 (m, 2H), 7.33-7.29 (m, 2H), 7.25-7.17 (m, 3H), 4.65-4.45 (m, 3H), 4.36-4.08 (m, 6H), 3.03-2.99 (m, 1H), 2.90-2.80 (m, 1H), 2.60-2.53 (m, 2H), 1.61-1.55 (m, 1H), 1.45-1.40 (m, 1H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 379, 实测值379。

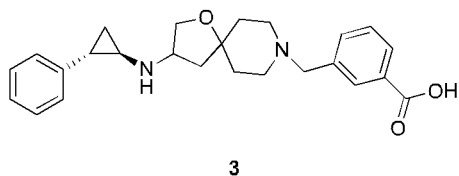
[0122] 实施例3



[0124] 合成路线:



[0125]



[0126] 第一步

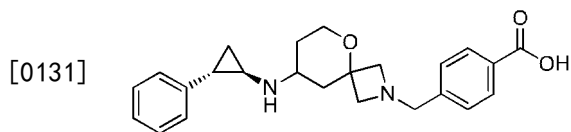
[0127] 将化合物3-1 (89.1mg, 0.543mmol) 和化合物1-9 (100mg, 0.271mmol) 溶于无水二氯甲烷 (2mL) 中, 向反应液中加入冰醋酸 (48.9mg, 0.814mmol)。反应液在0-30℃下搅拌12小时, 加入醋酸硼氢化钠 (173mg, 0.814mmol), 反应液在30℃下继续搅拌1小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠 (20mL), 用二氯甲烷萃取 (10mL x 3), 合并的有机相依次用水 (10mL x 1) 和饱和食盐水 (10mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (3:1石油醚/乙酸乙酯, R_f = 0.86) 得到化合物3-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 517, 实测值517。

[0128] 第二步

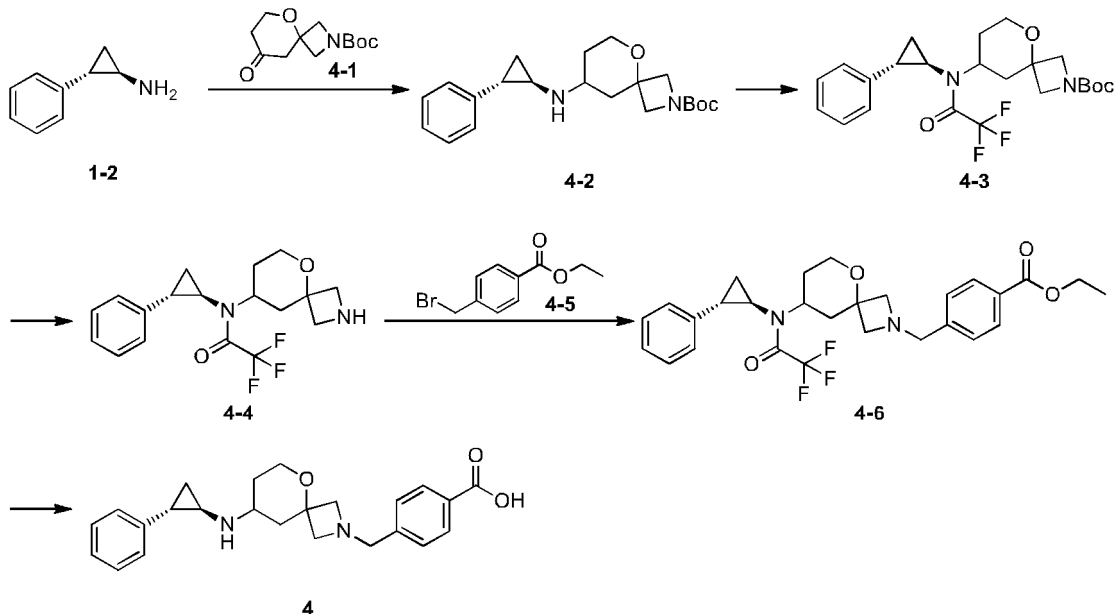
[0129] 将化合物3-2 (30.0mg, 0.580mmol) 溶于四氢呋喃 (1mL), 乙醇 (1mL) 和水 (1mL) 中, 向反应液中加氢氧化钠 (6.97mg, 0.174mmol)。反应液在60℃下搅拌反应3小时, 减压浓缩除去溶剂, 残渣用水稀释, 并用盐酸水溶液 (1mol/L) 调节pH到4左右。用高效液相色谱法 (盐酸体系) 制备得到化合物3的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ8.23 (s, 1H), 8.18-8.16 (m, 1H), 7.85-7.83 (m, 1H), 7.64-7.62 (m, 1H), 7.34-7.31 (m, 2H), 7.25-7.19 (m, 3H), 4.54 (s, 2H), 4.44-4.14 (m, 3H), 3.42-3.37 (m, 2H), 3.31-3.28 (m, 2H), 3.03-3.02 (m, 1H), 2.62-2.58 (m,

1H), 2.45-2.40 (m, 1H), 2.16-2.05 (m, 4H), 1.95-1.88 (m, 1H), 1.64-1.59 (m, 1H), 1.46-1.42 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺407, 实测值407。

[0130] 实施例4



[0132] 合成路线:



[0134] 第一步

[0135] 参照实施例2第一步得到化合物4-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺359, 实测值359。

[0136] 第二步

[0137] 参照实施例2第二步得到化合物4-3。MS-ESI计算值[M+Na]⁺477, 实测值477。

[0138] 第三步

[0139] 参照实施例2第三步得到化合物4-4。MS-ESI计算值[M+H]⁺355, 实测值355。

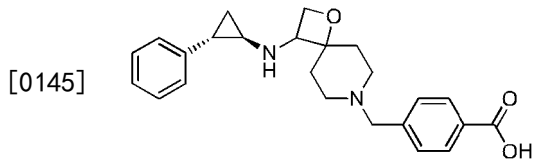
[0140] 第四步

[0141] 参照实施例2第四步得到化合物4-6。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.92-7.90 (m, 2H), 7.28-7.26 (m, 4H), 7.25-7.22 (m, 2H), 7.16-7.01 (m, 1H), 4.32-4.27 (m, 2H), 4.14-4.02 (m, 1H), 3.84-3.74 (m, 1H), 3.66-3.63 (m, 2H), 3.40-3.37 (m, 2H), 3.15-3.08 (m, 1H), 3.03-2.95 (m, 3H), 2.15-2.10 (m, 4H), 1.65-1.55 (m, 1H), 1.39-1.29 (m, 5H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺517, 实测值517。

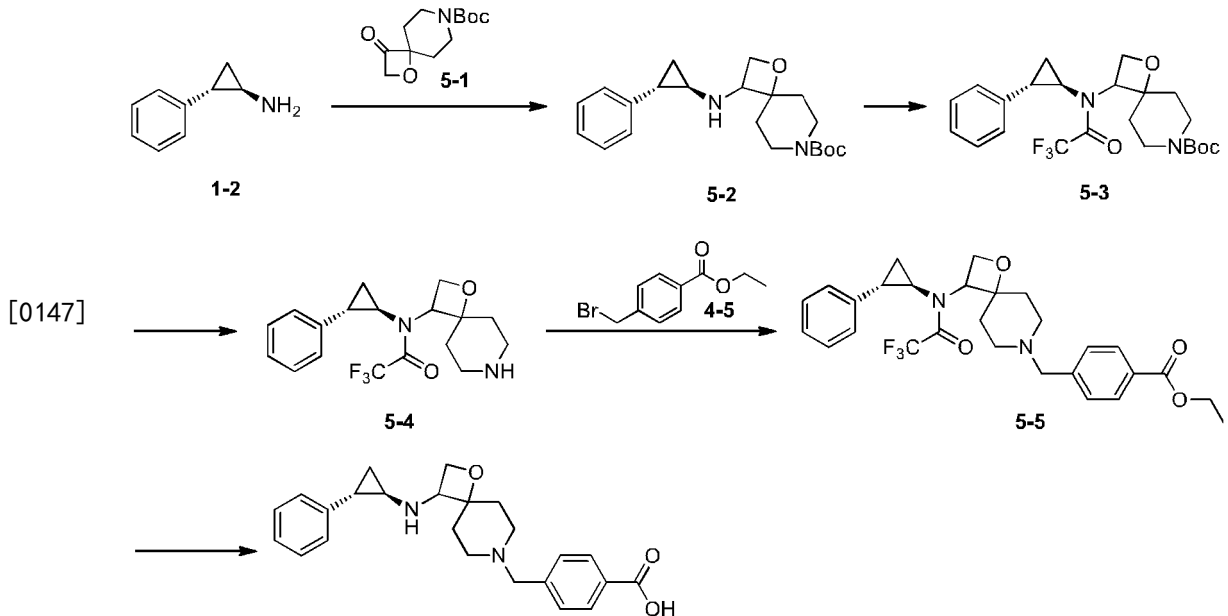
[0142] 第五步

[0143] 参照实施例2第五步得到化合物4的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.11 (d, J=8.0, 2H), 7.63 (dd, J=8.0, 2.8, 2H), 7.31-7.29 (m, 2H), 7.23-7.19 (m, 3H), 4.55 (s, 2H), 4.36-4.34 (m, 3H), 4.23-4.02 (m, 2H), 3.64-3.62 (m, 2H), 3.02-2.99 (m, 1H), 2.79-2.71 (m, 1H), 2.55-2.49 (m, 1H), 2.12-2.07 (m, 1H), 1.85-1.73 (m, 2H), 1.60-1.56 (m, 1H), 1.46-1.44 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺393, 实测值393。

[0144] 实施例5



[0146] 合成路线:



[0148] 第一步

[0149] 参照实施例2第一步得到化合物5-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 359, 实测值359。

[0150] 第二步

[0151] 参照实施例2第二步得到化合物5-3。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 455, 实测值455。

[0152] 第三步

[0153] 参照实施例2第三步得到化合物5-4。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 355, 实测值355。

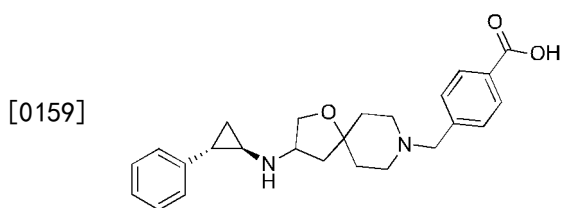
[0154] 第四步

[0155] 参照实施例2第四步得到化合物5-5。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.96-7.94 (m, 2H), 7.36-7.29 (m, 4H), 7.22-7.20 (m, 1H), 7.02-6.95 (m, 2H), 4.63-4.52 (m, 2H), 4.32-4.26 (m, 2H), 3.52 (s, 2H), 3.11-3.02 (m, 1H), 2.65-2.63 (m, 2H), 2.29-2.14 (m, 3H), 1.93-1.79 (m, 2H), 1.54-1.49 (m, 4H), 1.33-1.26 (m, 4H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 517, 实测值517。

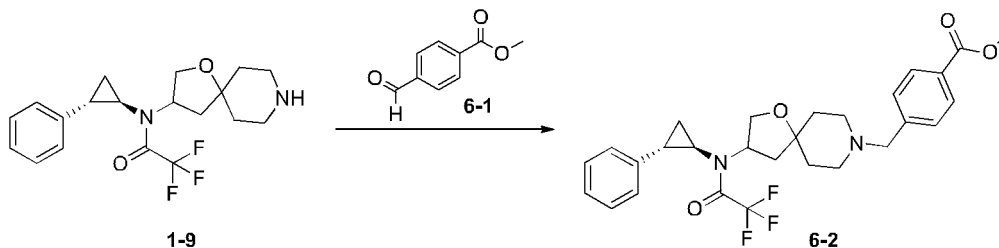
[0156] 第五步

[0157] 参照实施例2第五步得到化合物5的盐酸盐。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.13 (d, $J=8.0$, 2H), 7.68 (d, $J=8.0$, 2H), 7.31-7.28 (m, 2H), 7.24-7.15 (m, 3H), 4.70-4.64 (m, 1H), 4.45-4.37 (m, 3H), 3.53-3.34 (m, 2H), 3.27-3.21 (m, 2H), 2.91-2.88 (m, 1H), 2.60-2.20 (m, 6H), 1.63-1.58 (m, 1H), 1.38-1.32 (m, 1H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 393, 实测值393。

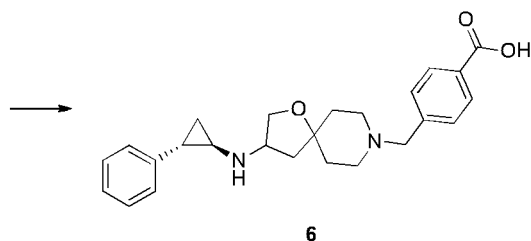
[0158] 实施例6



[0160] 合成路线:



[0161]



[0162] 第一步

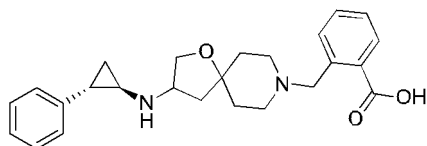
[0163] 将化合物1-9 (345mg, 0.936mmol) 和化合物6-1 (154mg, 0.937mmol) 溶于无水二氯甲烷 (10mL) 中, 向反应液中加入冰醋酸 (5.62mg, 93.6 μ mol)。反应液在20 $^{\circ}$ C下搅拌10小时, 加入醋酸硼氢化钠 (397mg, 1.87mmol), 反应液在20 $^{\circ}$ C下继续搅拌2小时。反应液用二氯甲烷 (50mL) 稀释后, 依次用饱和碳酸氢钠水溶液 (50mL x 3), 水 (50mL x 2), 饱和食盐水 (50mL x 1) 洗涤, 再用无水硫酸钠干燥, 过滤, 所得母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (1:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.24$) 得到化合物6-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 517, 实测值517。

[0164] 第二步

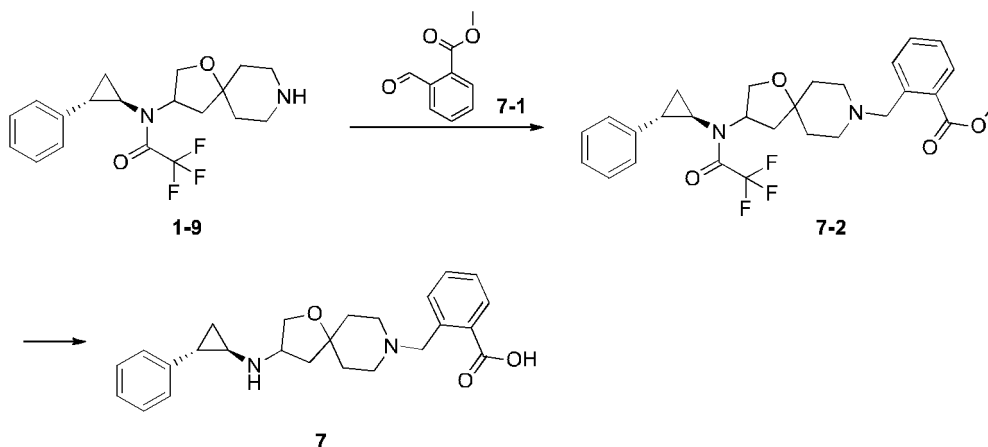
[0165] 将化合物6-2 (280mg, 0.542mmol) 溶于四氢呋喃 (3mL)、水 (3mL) 和乙醇 (3mL) 中, 加入氢氧化钠 (65.1mg, 1.63mmol)。反应液在60 $^{\circ}$ C下搅拌3小时, 减压浓缩除去四氢呋喃和乙醇, 剩余物用水 (10mL) 溶解, 用盐酸 (1M) 调节pH值到4, 减压浓缩后剩余物经过高效液相色谱法分离 (酸性, 盐酸体系) 得到化合物6的盐酸盐。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.13 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.34-7.30 (m, 2H), 7.26-7.19 (m, 3H), 4.43 (s, 2H), 4.22-4.19 (m, 1H), 4.7-4.11 (m, 2H), 3.53-3.37 (m, 2H), 3.32-3.24 (m, 2H), 3.03-3.00 (m, 1H), 2.64-2.60 (m, 1H), 2.45-2.40 (m, 1H), 2.24-2.05 (m, 4H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.64-1.61 (m, 1H), 1.45-1.40 (m, 1H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 407, 实测值407。将化合物6的盐酸盐溶解在水 (2mL) 和乙腈 (2mL) 中, 加入饱和碳酸氢钠溶液调节pH到中性。混合物经过高效液相色谱法分离 (中性, 碳酸氢铵体系) 得到化合物6。

[0166] 实施例7

[0167]



[0168] 合成路线:



[0170] 第一步

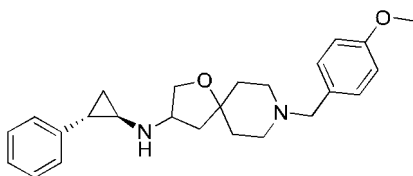
[0171] 参照实施例6第一步得到化合物7-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺517,实测值517。

[0172] 第二步

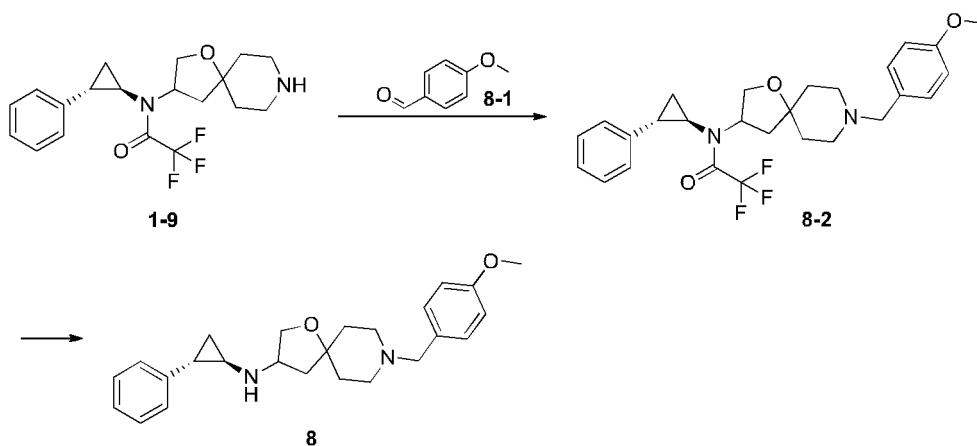
[0173] 参照实施例6第二步得到化合物7的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ8.25-8.23 (m, 1H), 7.74-7.65 (m, 3H), 7.34-7.31 (m, 2H), 7.26-7.21 (m, 3H), 4.61 (s, 2H), 4.23-4.21 (m, 3H), 3.52-3.37 (m, 4H), 3.03-3.00 (m, 1H), 2.67-2.63 (m, 1H), 2.44-2.40 (m, 1H), 2.16-2.09 (m, 4H), 1.96-1.87 (m, 1H), 1.69-1.66 (m, 1H), 1.45-1.39 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺407, 实测值407。

[0174] 实施例8

[0175]



[0176] 合成路线:



[0178] 第一步

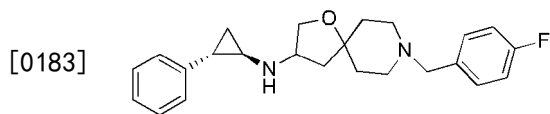
[0179] 参照实施例6第一步得到化合物8-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺489,实测值489。

[0180] 第二步

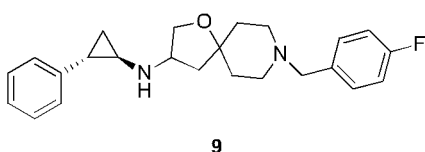
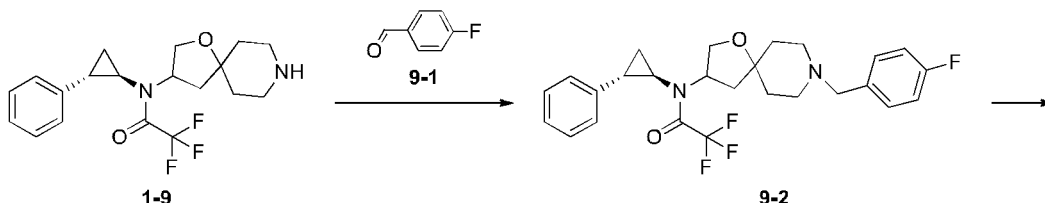
[0181] 参照实施例6第二步得到化合物8的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ7.50 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.34-7.31 (m, 2H), 7.26-7.20 (m, 3H), 7.03 (d, J=8.8Hz, 2H), 4.27 (s, 2H), 4.21-4.19 (m, 1H), 4.16-4.15 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.49-3.38 (m, 2H), 3.25-3.16 (m, 2H),

3.03-3.02 (m, 1H), 2.65-2.61 (m, 1H), 2.44-2.39 (m, 1H), 2.17-2.06 (m, 4H), 1.98-1.89 (m, 1H), 1.65-1.62 (m, 1H), 1.45-1.39 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺393, 实测值393。

[0182] 实施例9



[0184] 合成路线:



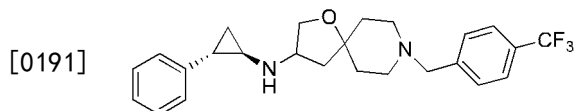
[0186] 第一步

[0187] 将化合物9-1 (50.5mg, 0.407mmol) 和化合物1-9 (100mg, 0.271mmol) 溶于无水二氯甲烷中 (6mL), 加入冰醋酸 (48.9mg, 0.814mmol)。反应液在0-30℃下搅拌12小时, 加入醋酸硼氢化钠 (172mg, 0.814mmol), 反应液在30℃下继续搅拌1小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠 (20mL), 用二氯甲烷萃取 (10mL x 3), 合并有机相, 有机相依次用水 (10mL x 1) 和饱和食盐水 (10mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (3:1石油醚/乙酸乙酯, R_f=0.86) 得到化合物9-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺477, 实测值477。

[0188] 第二步

[0189] 将化合物9-2 (40.0mg, 83.9μmol) 溶于四氢呋喃 (1mL), 乙醇 (1mL) 和水 (1mL) 中, 向反应液中加入氢氧化钠 (10.0mg, 0.252mmol)。反应液在60℃下搅拌反应2.5小时, 减压浓缩除去溶剂, 残渣用水稀释, 并用盐酸水溶液 (1mol/L) 调节pH到4左右。用高效液相色谱法 (酸性, 盐酸体系) 制备得到化合物9的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7.66-7.63 (dd, J=7.7, 5.5, 2H), 7.33-7.31 (m, 2H), 7.26-7.20 (m, 5H), 4.35 (s, 2H), 4.22-4.15 (m, 3H), 3.43-3.36 (m, 2H), 3.26-3.20 (m, 2H), 3.03 (s, 1H), 2.63-2.62 (m, 1H), 2.45-2.40 (m, 1H), 2.19-2.08 (m, 4H), 1.98-1.95 (m, 1H), 1.65-1.62 (m, 1H), 1.43-1.42 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺381, 实测值381。

[0190] 实施例10



[0192] 合成路线:

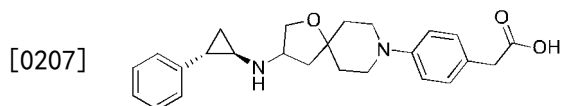
[0202] 第一步

[0203] 将化合物11-1 (87.6mg, 0.407mmol) 和化合物1-9 (100mg, 0.271mmol) 溶于无二氧六环 (5mL) 中, 向反应液中加入4,5-双(二叔丁基膦)-9,9-二甲基氧杂蒽 (31.4mg, 54.3 μ mol), 三(二亚苄基丙酮)二钯 (24.9mg, 27.1 μ mol) 和碳酸铯 (177mg, 0.543mmol)。反应液在100 $^{\circ}$ C下搅拌10小时。向反应液中加入水 (10mL), 用乙酸乙酯萃取 (10mL x 3), 合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (3:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.40$) 得到化合物11-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺503, 实测值503。

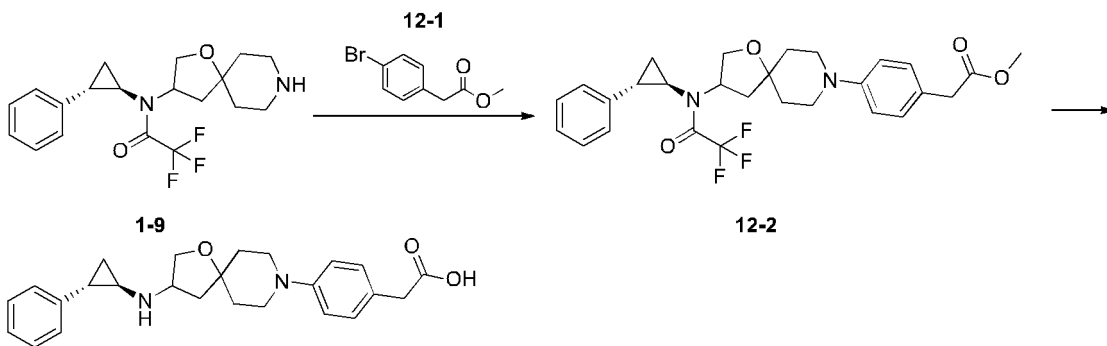
[0204] 第二步

[0205] 将化合物11-2 (35.0mg, 55.5 μ mol) 溶于四氢呋喃 (1mL), 乙醇 (1mL) 和水 (1mL) 中, 向反应液中加入氢氧化钠 (6.66mg, 0.166mmol)。反应液在60 $^{\circ}$ C下搅拌反应3小时, 减压浓缩除去溶剂, 残渣用水稀释, 并用盐酸水溶液 (1mol/L) 调节pH到4左右。用高效液相色谱法 (酸性, 盐酸体系) 制备得到化合物11的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.15-8.13 (d, J=8.8, 2H), 7.64-7.61 (d, J=8.56, 2H), 7.36-7.33 (m, 2H), 7.28-7.22 (m, 3H), 4.25-4.18 (m, 3H), 3.81-3.62 (m, 4H), 3.10-3.06 (m, 1H), 2.63-2.59 (m, 1H), 2.55-2.50 (m, 1H), 2.33-2.32 (m, 1H), 2.20-2.09 (m, 4H), 1.65-1.60 (m, 1H), 1.49-1.45 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺393, 实测值393。

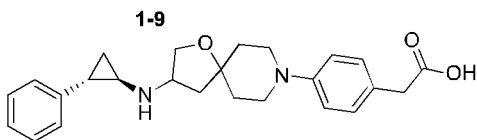
[0206] 实施例12



[0208] 合成路线:



[0209]



12

[0210] 第一步

[0211] 将化合物12-1 (219mg, 0.957mmol) 和化合物1-9 (235mg, 0.638mmol) 溶于无水二氧六环 (4mL) 中, 在氮气保护下向反应液中加入碳酸铯 (520mg, 1.59mmol) 和甲烷磺酸(2-二环己基膦)-3,6-二甲氧基-2,4,6-三异丙基-1,1-联苯)(2-氨基-1,1-联苯-2-基)钯(II) (57.8mg, 63.8 μ mol)。反应液在100 $^{\circ}$ C下搅拌14小时。向反应液中加入水 (10mL), 用乙酸乙酯萃取 (10mL x 3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (2:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.50$) 得到化合物12-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺517, 实测值517。

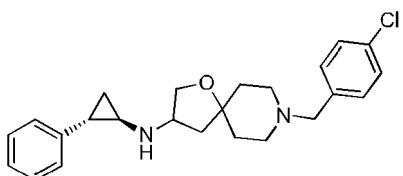
[0212] 第二步

[0213] 将化合物12-2 (140mg, 0.271mmol) 溶于四氢呋喃 (1mL), 乙醇 (1mL) 和水 (1mL) 中,

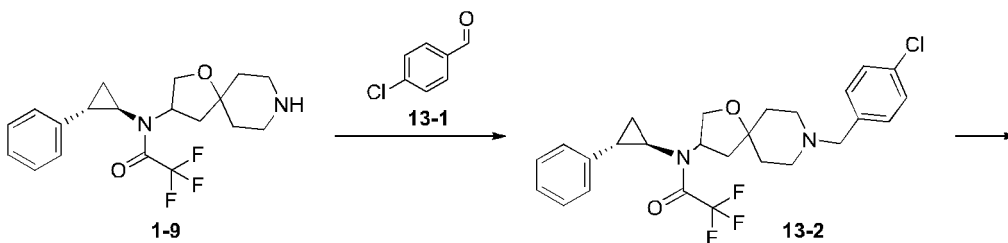
向反应液中加入氢氧化钠(32.5mg,0.813mmol)。反应液在60℃下搅拌反应3小时,减压浓缩除去溶剂,残渣用水稀释,并用盐酸水溶液(1mol/L)调节pH到4左右。用高效液相色谱法(酸性,盐酸体系)制备得到化合物12的盐酸盐。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ7.76-7.73(d,J=8.8,2H),7.56-7.54(d,J=8.31,2H),7.36-7.30(m,2H),7.28-7.22(m,3H),4.30-4.20(m,2H),3.91-3.82(m,2H),3.73(s,2H),3.66-3.59(m,2H),3.34-3.32(m,1H),3.09-3.05(m,1H),2.68-2.64(m,1H),2.58-2.46(m,2H),2.32-2.18(m,4H),1.70-1.64(m,1H),1.48-1.42(m,1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺407,实测值407。

[0214] 实施例13

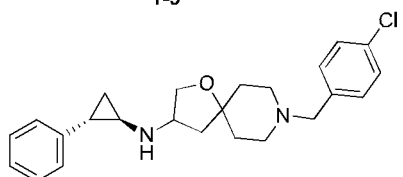
[0215]



[0216] 合成路线:



[0217]



13

[0218] 第一步

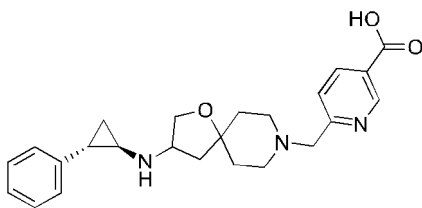
[0219] 将化合物1-9(200mg,0.513mmol)和化合物13-1(114mg,0.814mmol)溶解在无水二氯甲烷(5mL)中,加入醋酸(97.8mg,1.63mmol),30℃条件下反应12小时,加入三乙酰氧基硼氢化钠(345mg,1.63mmol),30℃条件下反应1小时。反应液先用二氯甲烷(10mL)稀释,再以饱和碳酸氢钠(15mL x 1),水(15mL x 1)和饱和食盐水(15mL x 1)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,母液浓缩。产物经过薄层层析法分离(1:2石油醚/乙酸乙酯,R_f=0.25)得到化合物13-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺493,实测值493。

[0220] 第二步

[0221] 将化合物13-2(67.0mg,0.136μmol)溶解在四氢呋喃(2mL)、乙醇(2mL)和水(2mL)的混合溶液中,加入氢氧化钠(16.3mg,0.408mmol)。50℃条件下反应2小时。减压浓缩除去有机相,剩余物用水(3mL)溶解,用盐酸(1mol/L)调节pH值到4,经过高效液相色谱法分离(酸性,盐酸体系)得到化合物13的盐酸盐。¹H NMR(400MHz,D₂O) δ7.48-7.46(m,2H),7.41-7.39(m,2H),7.35-7.31(m,2H),7.28-7.24(m,1H),7.16-7.14(m,2H),4.30-4.17(m,3H),4.12-4.03(m,2H),3.52-3.33(m,2H),3.18-3.00(m,2H),2.89-3.00(m,1H),2.54-2.48(m,1H),2.42-2.38(m,1H),2.07-1.93(m,4H),1.84-1.70(m,1H),1.55-1.46(m,1H),1.45-1.38(m,1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺397,实测值397。

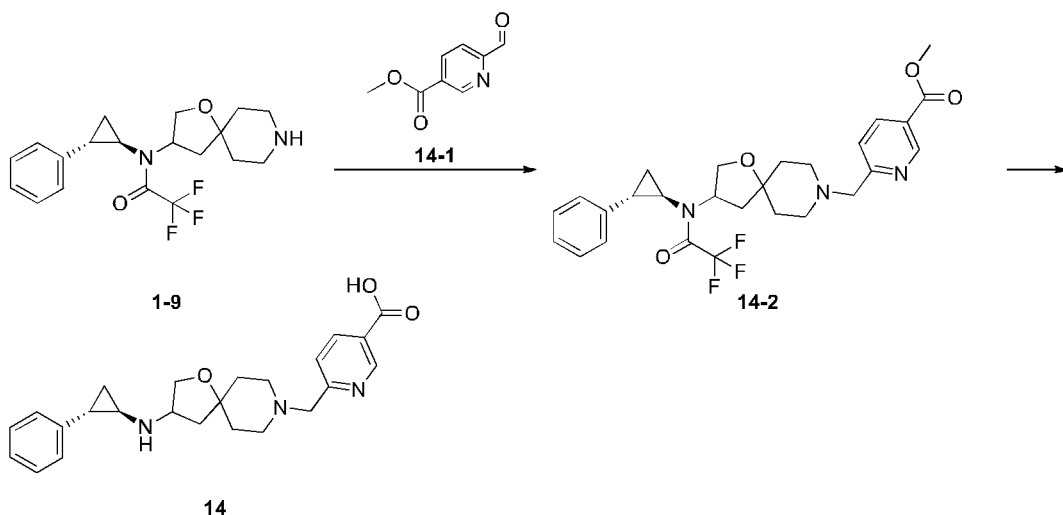
[0222] 实施例14

[0223]



[0224] 合成路线:

[0225]



[0226] 第一步

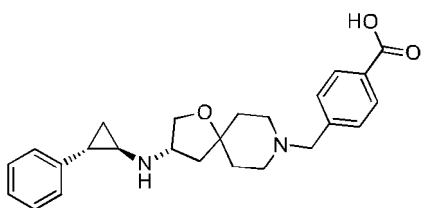
[0227] 将化合物1-9 (200mg, 0.543mmol) 和化合物14-1 (134mg, 0.814mmol) 溶解在无水二氯甲烷 (5mL) 中, 加入醋酸 (97.8mg, 1.63mmol), 30°C 条件下反应12小时, 加入三乙酰氧基硼氢化钠 (345mg, 1.63mmol), 30°C 条件下反应1小时。反应液先用二氯甲烷 (10mL) 稀释, 再以饱和碳酸氢钠 (15mL x 1), 水 (15mL x 1) 和饱和食盐水 (15mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩。粗产物经过薄层层析法分离 (1:2石油醚/乙酸乙酯, $R_f = 0.25$) 得到化合物14-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 518, 实测值518。

[0228] 第二步

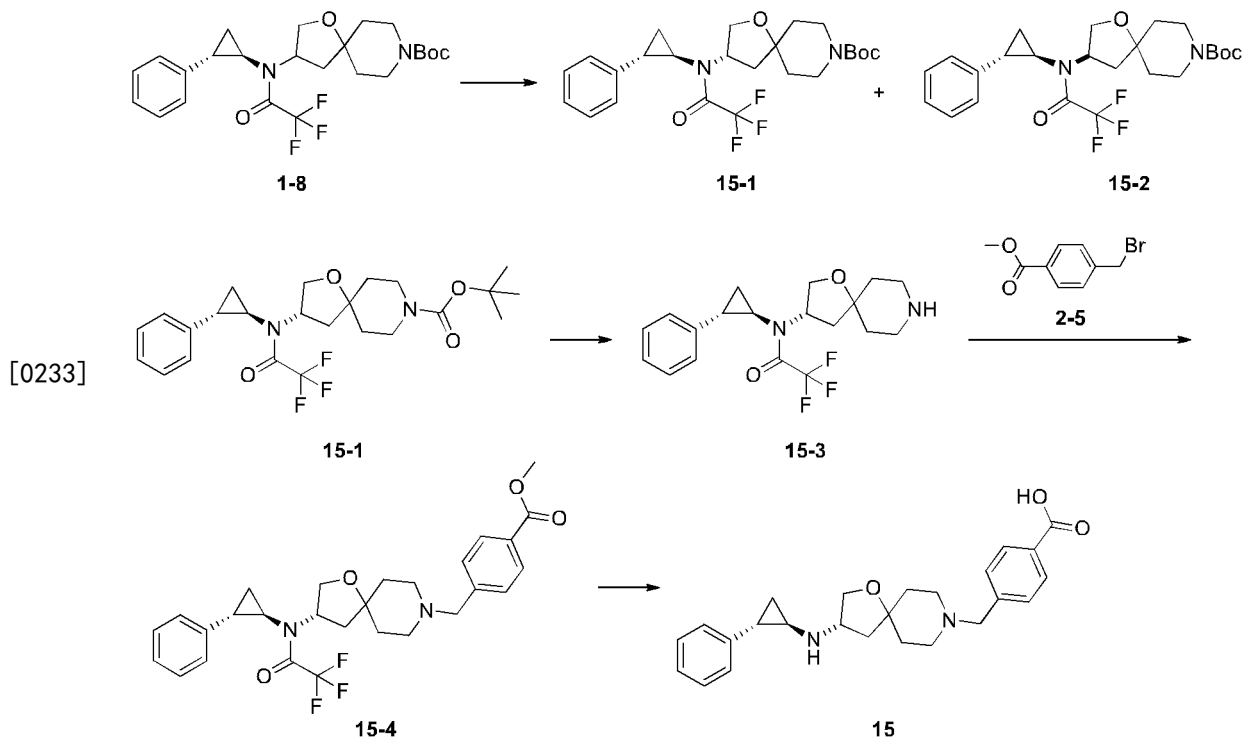
[0229] 将化合物14-2 (109mg, 0.210mmol) 溶解在四氢呋喃 (2mL)、乙醇 (2mL) 和水 (2mL) 的混合溶液中, 加入氢氧化钠 (25.3mg, 0.632mmol)。50°C 条件下反应2小时。减压浓缩除去有机相, 剩余物用水 (10mL) 溶解, 用盐酸 (1mol/L) 调节pH值到4, 经过高效液相色谱法分离 (酸性, 盐酸体系) 得到化合物14的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, D₂O) δ 9.07 (s, 1H), 8.38 (d, J = 8.0Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.0Hz, 1H), 7.29-7.10 (m, 5H), 4.48 (s, 2H), 4.19-4.07 (m, 3H), 3.38-3.28 (m, 4H), 2.89-2.88 (m, 1H), 2.49-2.42 (m, 2H), 2.15-1.86 (m, 5H), 1.36-1.48 (m, 2H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 408, 实测值408。

[0230] 实施例15

[0231]



[0232] 合成路线:



[0234] 第一步

[0235] 化合物1-8经超临界流体萃取法[柱:Chiralpak AD 250×25mm I.D., 10μm; 流动相:A:二氧化碳B:甲醇(0.1%氨水); 等度:B 30%; 流量:60g/min; 柱压:100bar]分离得到化合物15-1(保留时间=0.991min)和化合物15-2(保留时间=1.248min)。化合物15-1, MS-ESI计算值[M+H]⁺469, 实测值469; 化合物15-2, MS-ESI计算值[M+H]⁺469, 实测值469。

[0236] 第二步

[0237] 将化合物15-1(300mg, 0.640mmol)溶解在无水二氯甲烷(3mL)中, 冰水浴冷却至0℃, 在冰水浴条件下加入三氟乙酸(1.54g, 13.5mmol, 1.0mL), 升温至室温搅拌反应2小时, 减压浓缩除去溶剂, 得到化合物15-3。MS-ESI计算值[M+H]⁺369, 实测值369。

[0238] 第三步

[0239] 将化合物15-3(200mg, 0.543mmol)和三乙胺(164mg, 1.63mmol)溶解在乙腈(10mL)中, 加入化合物2-5(186mg, 0.814mmol), 反应液在50℃条件下反应12小时。减压浓缩除去溶剂, 产物先用二氯甲烷(30mL x 1)溶解, 再依次以稀盐酸(1mol/L, 10mL x 2)和食盐水(10mL x 1)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩。产物经过薄层层析法分离(1:1 石油醚/乙酸乙酯, R_f=0.55)得到化合物15-4。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.99-7.96(m, 2H), 7.39-7.37(m, 2H), 7.31-7.27(m, 2H), 7.24-7.20(m, 1H), 7.07-7.05(m, 2H), 3.92-3.91(m, 4H), 3.53(s, 2H), 2.43-2.35(m, 5H), 2.12-1.98(m, 2H), 1.74-1.71(m, 3H), 1.64-1.58(m, 6H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺517, 实测值517。

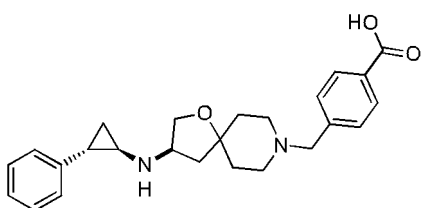
[0240] 第四步

[0241] 参照实施例14第二步得到化合物15的盐酸盐。¹H NMR(400MHz, D₂O) δ ppm 8.04-8.00(m, 2H), 7.55-7.53(m, 2H), 7.33-7.27(m, 2H), 7.26-7.23(m, 1H), 7.14-7.12(m, 2H), 4.37-4.32(m, 3H), 4.07-4.06(m, 2H), 3.51-3.33(m, 2H), 3.19-3.09(m, 2H), 2.92-2.88(m, 1H), 2.49-2.34(s, 2H), 2.03-1.95(m, 4H), 1.76-1.69(m, 1H), 1.47-1.37(m, 2H)。MS-ESI计

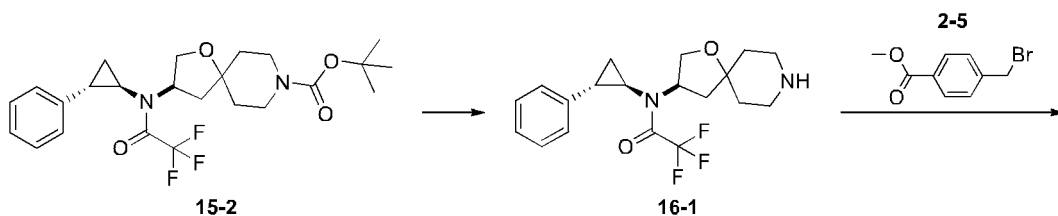
算值 $[M+H]^+$ 407, 实测值 407。

[0242] 实施例16

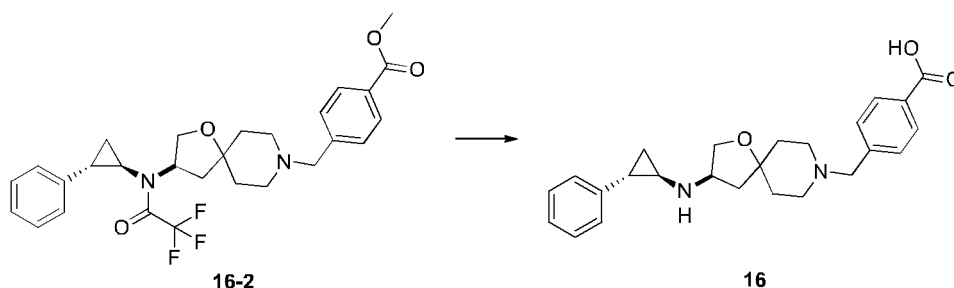
[0243]



[0244] 合成路线:



[0245]



[0246] 第一步

[0247] 参照实施例15第二步得到化合物16-1。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 369, 实测值 369。

[0248] 第二步

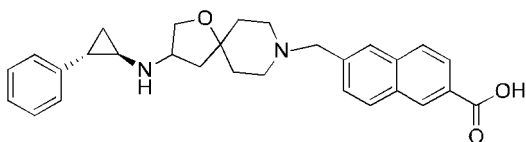
[0249] 参照实施例15第三步得到化合物16-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 517, 实测值 517。

[0250] 第三步

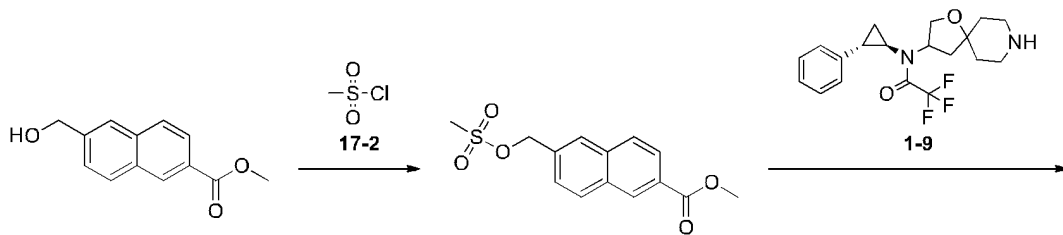
[0251] 参照实施例14第二步得到化合物16的盐酸盐。 ^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 8.04-8.02 (m, 2H), 7.55-7.53 (m, 2H), 7.32-7.23 (m, 3H), 7.14 (m, 2H), 4.37-4.32 (m, 2H), 4.19-4.03 (m, 3H), 3.49-3.33 (m, 2H), 3.22-3.04 (m, 2H), 2.90 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 2.40-2.34 (m, 1H), 2.03-1.92 (m, 4H), 1.77-1.70 (m, 1H), 1.50-1.37 (m, 2H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 407, 实测值 407。

[0252] 实施例17

[0253]



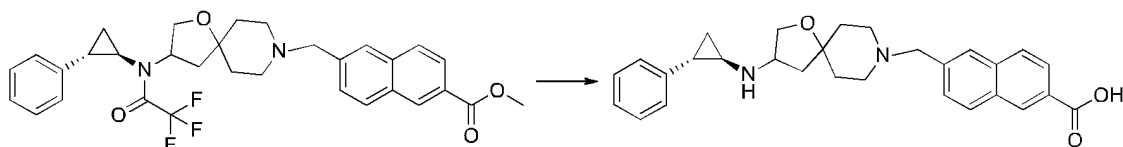
[0254] 合成路线:



[0255]

17-1

17-3



17-4

17

[0256] 第一步

[0257] 将化合物17-1 (100mg, 0.462mmol) 和三乙胺 (140mg, 1.39mmol) 溶解在二氯甲烷 (5mL) 中, 冰水浴冷却至0°C, 氮气下逐滴加入化合物17-2 (106mg, 0.925mmol), 20°C条件下反应12小时, 反应液中加入饱和碳酸氢钠 (10mL) 淬灭, 有机相用饱和食盐水 (10mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过薄层层析法分离 (1:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.53$) 得到化合物17-3。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1H), 8.10-8.07 (m, 1H), 7.97-7.95 (m, 1H), 7.88-7.86 (m, 2H), 7.59-7.56 (m, 1H), 4.76 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 1.59 (s, 3H)。

[0258] 第二步

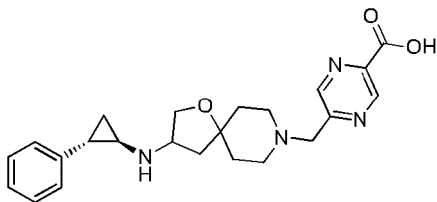
[0259] 参照实施例15第三步得到化合物17-4。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 567, $[M+Na]^+$ 589, 实测值 567, 589。

[0260] 第三步

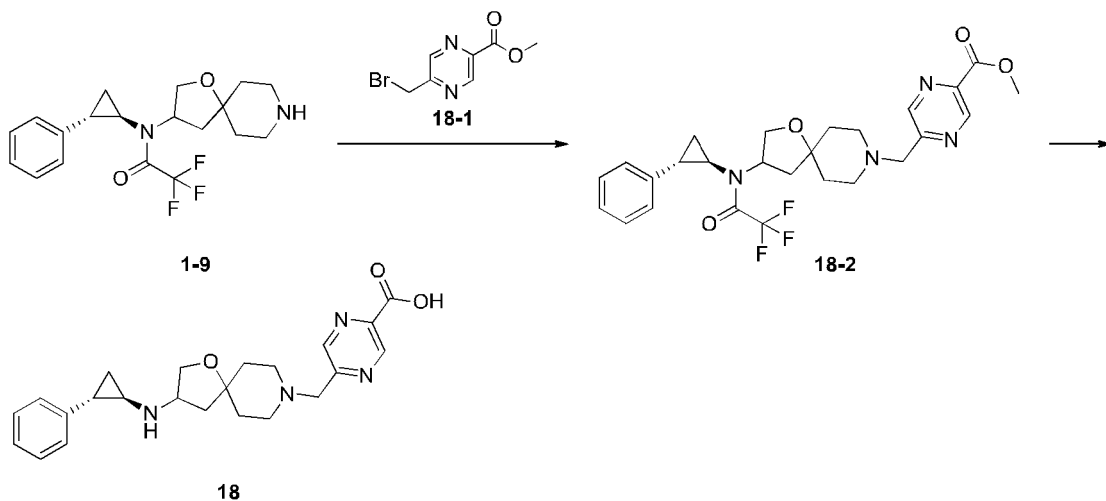
[0261] 参照实施例14第二步得到化合物17的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.20-8.16 (m, 3H), 8.08-8.05 (m, 1H), 7.77-7.74 (m, 1H), 7.37-7.27 (m, 2H), 8.71 (s, 1H), 7.29-7.27 (m, 1H), 7.22-7.20 (m, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.23-4.11 (m, 3H), 3.52-3.36 (m, 4H), 3.05-3.01 (m, 1H), 2.57 (s, 1H), 2.47-2.42 (m, 1H), 2.14-2.11 (m, 4H), 1.97-1.92 (m, 1H), 1.60-1.58 (m, 1H), 1.48-1.43 (m, 1H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 457, 实测值 457。

[0262] 实施例18

[0263]



[0264] 合成路线:



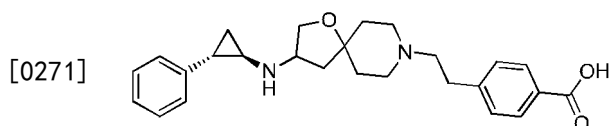
[0266] 第一步

[0267] 参照实施例15第三步得到化合物18-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 519, $[M+Na]^+$ 541, 实测值519, 541。

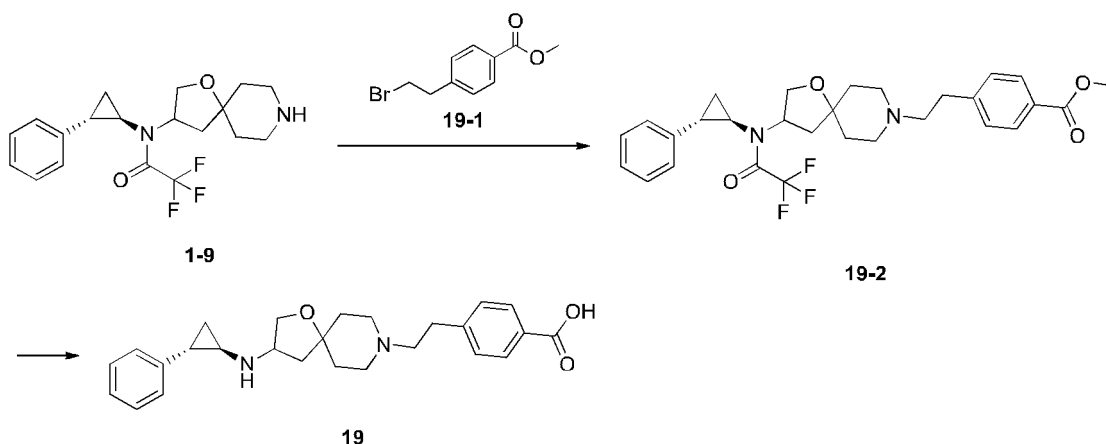
[0268] 第二步

[0269] 参照实施例14第二步得到化合物18的盐酸盐。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 9.36 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.27-7.23 (m, 1H), 7.21-7.19 (m, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.25-4.12 (m, 3H), 3.69-3.55 (m, 2H), 3.49-3.36 (m, 2H), 3.04-3.02 (m, 1H), 2.59-2.43 (m, 2H), 2.27-2.07 (m, 4H), 2.01-1.95 (m, 1H), 1.61-1.59 (m, 1H), 1.47-1.41 (m, 1H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 409, 实测值409。

[0270] 实施例19



[0272] 合成路线:



[0274] 第一步

[0275] 参照实施例15第三步得到化合物19-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 531, 实测值531。

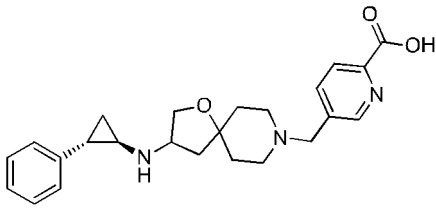
[0276] 第二步

[0277] 参照实施例14第二步得到化合物19的盐酸盐。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.04-8.00 (m, 2H), 7.46-7.44 (m, 2H), 7.36-7.32 (m, 2H), 7.30-7.25 (m, 1H), 7.22-7.20 (m, 2H), 4.27-

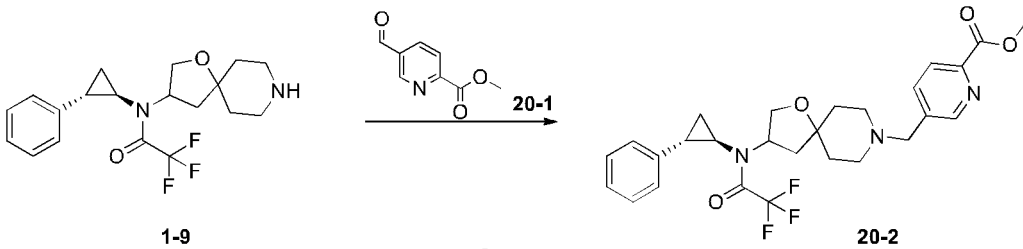
4.11 (m, 3H), 3.64-3.56 (m, 2H), 3.44-3.40 (m, 2H), 3.31-3.24 (m, 2H), 3.22-3.18 (m, 2H), 3.06-3.03 (m, 1H), 2.60-2.44 (m, 2H), 2.24-2.06 (m, 4H), 1.99-1.91 (m, 1H), 1.62-1.57 (m, 1H), 1.46 (m, 1H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 421, 实测值421。

[0278] 实施例20

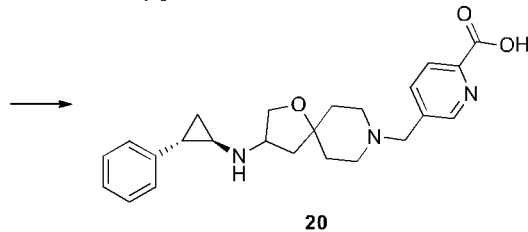
[0279]



[0280] 合成路线:



[0281]



[0282] 第一步

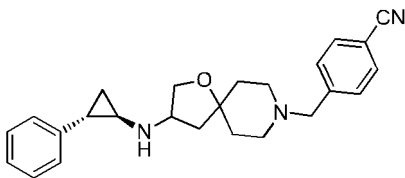
[0283] 参照实施例6第一步得到化合物20-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 518, 实测值518。

[0284] 第二步

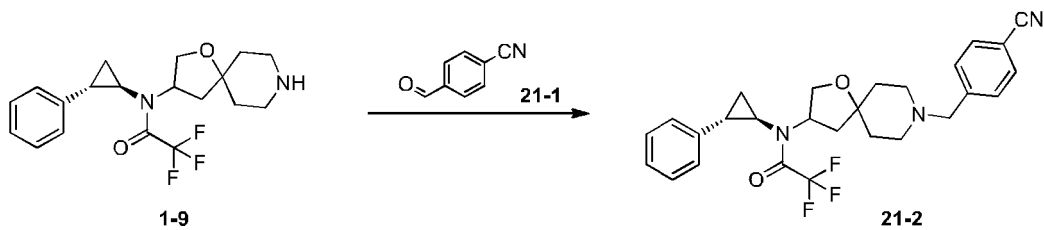
[0285] 参照实施例6第二步得到化合物20的盐酸盐。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 9.48-9.32 (m, 1H), 8.75-8.55 (m, 2H), 7.34-7.30 (m, 2H), 7.26-7.24 (m, 1H), 7.22-7.20 (m, 2H), 4.70 (brs, 2H), 4.25-4.18 (m, 3H), 3.42-3.37 (m, 4H), 3.05-3.03 (m, 1H), 2.64-2.62 (m, 1H), 2.45-2.43 (m, 1H), 2.36-2.24 (m, 1H), 2.12-2.06 (m, 4H), 1.65-1.61 (m, 1H), 1.43-1.40 (m, 1H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 408, 实测值408。

[0286] 实施例21

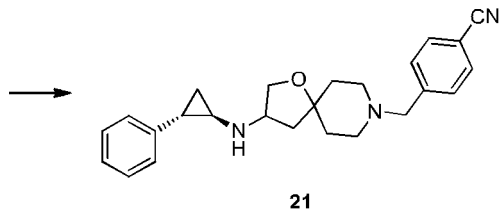
[0287]



[0288] 合成路线:



[0289]



[0290] 第一步

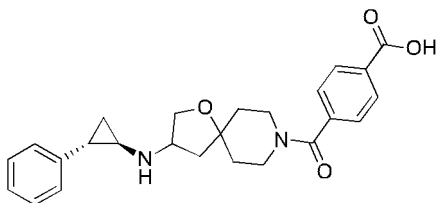
[0291] 参照实施例6第一步得到化合物21-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺484,实测值484。

[0292] 第二步

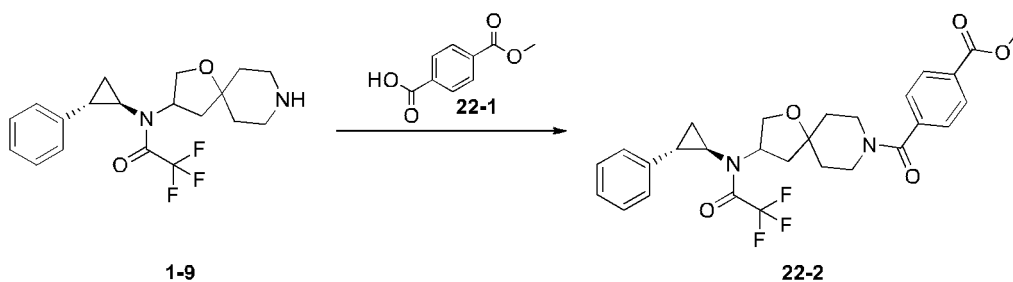
[0293] 参照实施例6第二步得到化合物21的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7.89-7.87 (m, 2H), 7.82-7.80 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.27-7.25 (m, 1H), 7.23-7.20 (m, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.22-4.19 (m, 1H), 4.17-4.15 (m, 2H), 3.50-3.33 (m, 3H), 3.28-3.25 (m, 1H), 3.04-3.02 (m, 1H), 2.63-2.59 (m, 1H), 2.46-2.40 (m, 1H), 2.25-2.17 (m, 1H), 2.14-2.06 (m, 3H), 2.00-1.94 (m, 1H), 1.63-1.61 (m, 1H), 1.47-1.40 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺388,实测值388。

[0294] 实施例22

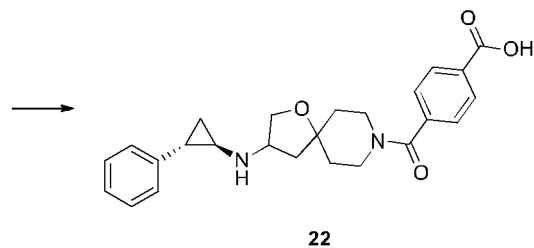
[0295]



[0296] 合成路线:



[0297]



[0298] 第一步

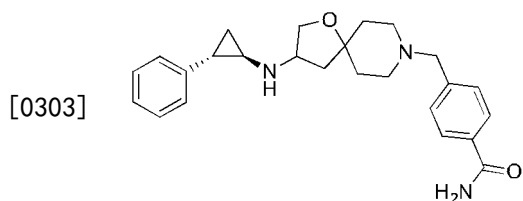
[0299] 将化合物22-1 (102mg, 0.567mmol), 0-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N,N-四甲基脲六

氟磷盐(294mg,0.773mmol)和N,N-二异丙基乙胺(133mg,1.03mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(8mL)中,反应液在27℃下搅拌0.5小时,之后向反应液中加入化合物1-9(190mg,0.515mmol),新的反应液在27℃下继续搅拌10小时,将其用乙酸乙酯(50mL)稀释,依次用水(50mL x 3)及饱和食盐水(50mL x 1)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,母液浓缩,粗产物经过薄层层析法分离(1:2石油醚/乙酸乙酯,Rf=0.6)得到化合物22-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺531,实测值531。

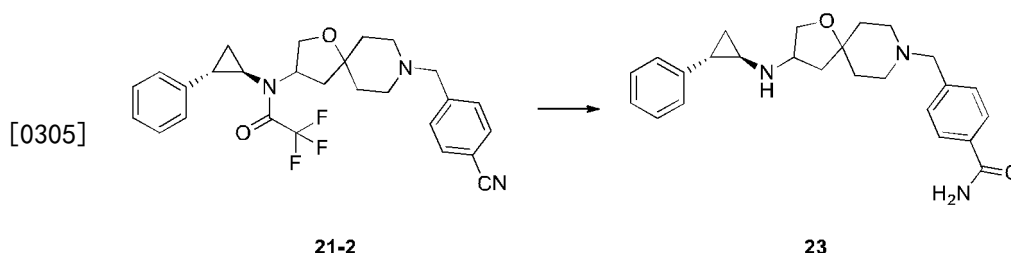
[0300] 第二步

[0301] 参照实施例6第二步得到化合物22的盐酸盐。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ8.12(d,J=8.0Hz,2H),7.53(d,J=8.0Hz,2H),7.35-7.29(m,2H),7.26-7.25(m,1H),7.23-7.20(m,2H),4.24-4.18(m,2H),4.13-4.09(m,2H),3.47-3.44(m,3H),3.03-3.02(m,1H),2.59-2.56(m,1H),2.42-2.38(m,1H),2.05-1.99(m,1H),1.93-1.89(m,2H),1.81-1.73(m,2H),1.62-1.58(m,1H),1.46-1.41(m,1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺421,实测值421。

[0302] 实施例23



[0304] 合成路线:

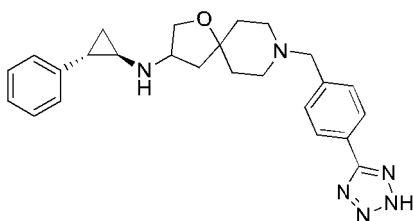


[0306] 第一步

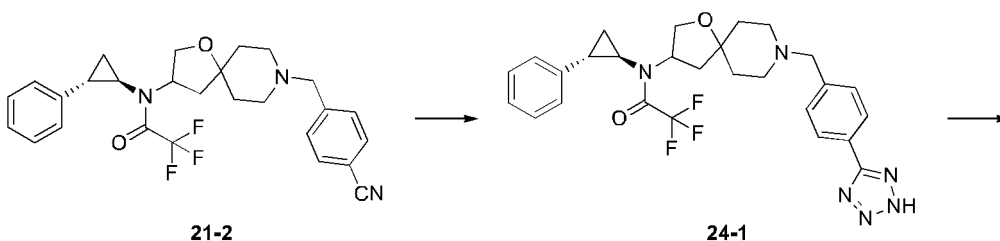
[0307] 将化合物21-2(100mg,0.207mmol)溶于二甲亚砜(2mL)中,在25℃氮气保护下加入无水碳酸钾(85.8mg,0.620mmol)和过氧化氢(30%水溶液,70.3mg,0.620mmol)至反应液并搅拌12小时。向反应液中加入饱和硫代硫酸钠溶液(10mL)将反应淬灭,并用水(10mL)将其稀释,用乙酸乙酯(10mL x 3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(15mL x 2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,其粗产物经过高效液相色谱(酸性,盐酸体系)分离纯化得到化合物23的盐酸盐。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ7.98(d,J=8.0Hz,2H),7.68(d,J=8.0Hz,2H),7.33-7.28(m,2H),7.25-7.17(m,3H),4.40(s,2H),4.22-4.08(m,3H),3.43-3.36(m,2H),3.28-3.14(m,2H),3.02-2.99(m,1H),2.61-2.54(m,1H),2.44-2.22(m,1H),2.20-2.01(m,4H),1.96-1.87(m,1H),1.63-1.56(m,1H),1.47-1.39(m,1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺406,实测值406。

[0308] 实施例24

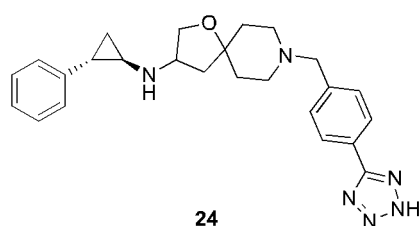
[0309]



[0310] 合成路线:



[0311]



[0312] 第一步

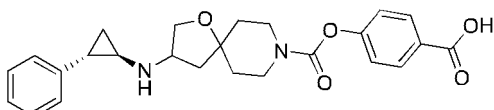
[0313] 将化合物21-2 (90.0mg, 0.160mmol) 溶于二氧六环 (3mL) 中, 向反应液中加入三甲基硅基叠氮 (73.7mg, 0.640mmol) 和氧化二丁基锡 (12.0mg, 48.0 μ mol) 反应液在120 $^{\circ}$ C搅拌12小时。室温下加水 (10mL), 再用乙酸乙酯 (10mL x 3) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液 (20mL x 1) 洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩得到粗品化合物24-1。MS-ESI计算值[M+H]⁺ 527, 实测值527。

[0314] 第二步

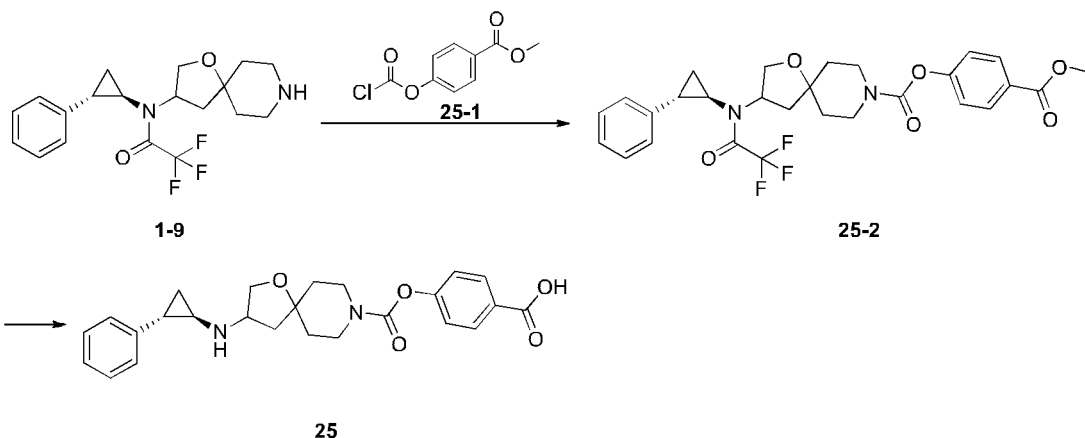
[0315] 将化合物24-1 (101mg, 0.172mmol) 溶于四氢呋喃 (2mL) 和无水乙醇 (2mL), 将氢氧化钠 (20.6mg, 0.515mmol) 溶于水 (2mL) 后滴加至溶液中, 在50 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。将反应液减压浓缩去除溶剂, 加水 (5mL) 稀释后用盐酸 (1mol/L) 调pH值到4后减压浓缩, 其粗产物经过高效液相色谱 (酸性, 盐酸体系) 分离纯化得到化合物24的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.19-8.17 (m, 2H), 7.80-7.75 (m, 2H), 7.32-7.17 (m, 5H), 4.40 (s, 2H), 4.20-4.11 (m, 3H), 3.49-3.40 (m, 4H), 3.07-2.94 (m, 1H), 2.68-2.47 (m, 1H), 2.45-2.29 (m, 1H), 2.20-1.99 (m, 4H), 1.94-1.82 (m, 1H), 1.67-1.50 (m, 1H), 1.48-1.33 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺ 431, 实测值431。

[0316] 实施例25

[0317]



[0318] 合成路线:



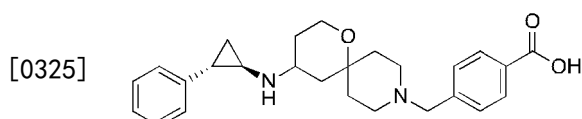
[0320] 第一步

[0321] 将化合物1-9 (150mg, 0.407mmol) 溶于乙腈 (5mL) 中, 将化合物25-1 (96.1mg, 0.448mmol) 和三乙胺 (124mg, 1.22mmol) 加入至反应液, 将体系升至50℃搅拌反应12小时。减压浓缩除去溶剂后粗产物经过薄层层析法 (2:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.4$) 分离纯化得到化合物25-2。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 547, 实测值547。

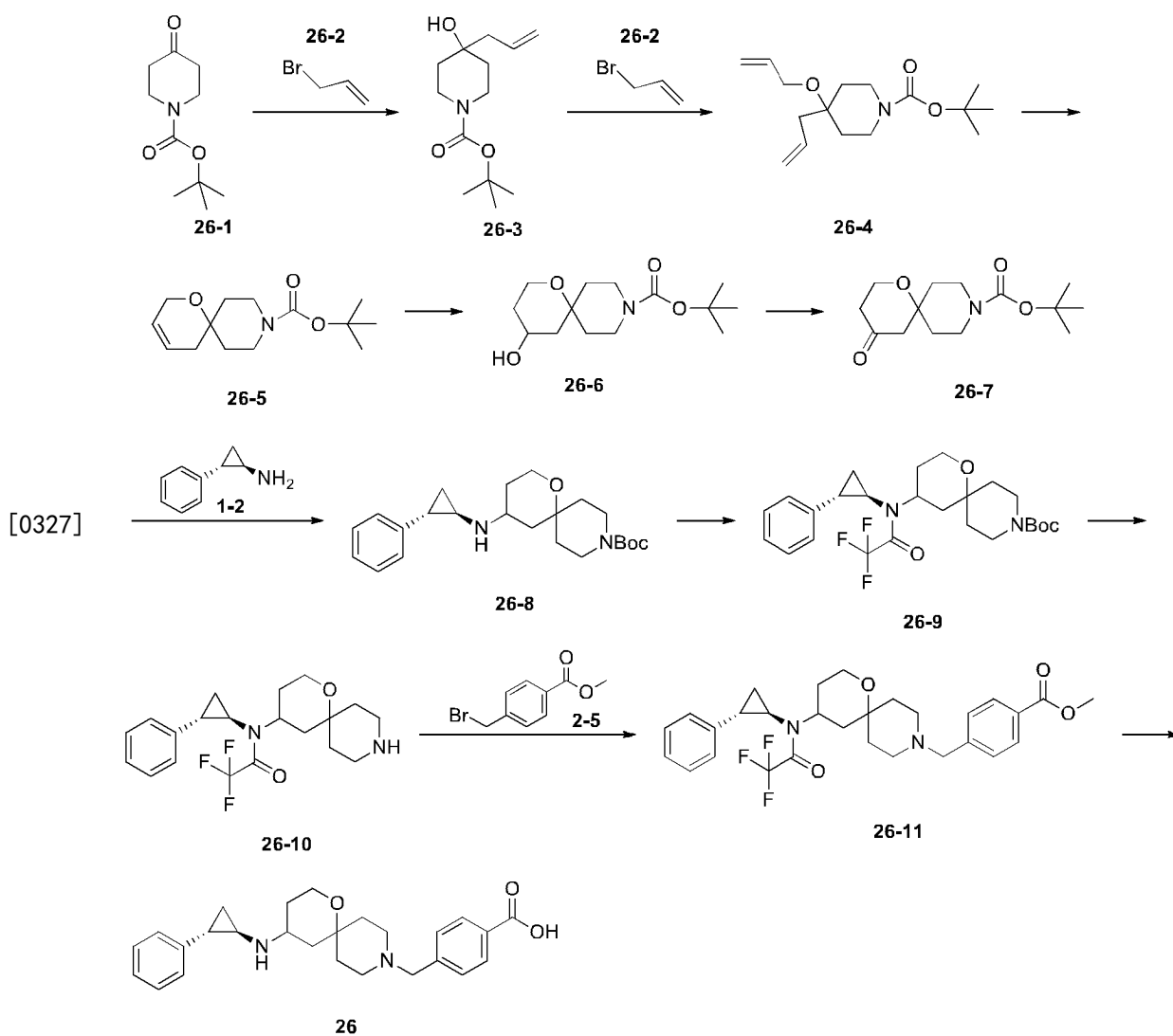
[0322] 第二步

[0323] 将化合物25-2 (191mg, 0.342mmol) 溶于四氢呋喃 (2mL) 和无水乙醇 (2mL), 将氢氧化钠 (68.4mg, 1.71mmol) 溶于水 (2mL) 后滴加至溶液中, 在50℃下搅拌2小时。将反应液用盐酸 (1mol/L) 调pH值到5后减压浓缩, 其粗产物经过高效液相色谱 (酸性, 盐酸体系) 分离纯化得到化合物25的盐酸盐。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.07-8.03 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.27-7.19 (m, 5H), 4.21-4.06 (m, 3H), 4.03-3.92 (m, 1H), 3.91-3.78 (m, 1H), 3.53-3.36 (m, 2H), 3.05-3.02 (m, 1H), 2.55-2.51 (m, 1H), 2.46-2.40 (m, 1H), 2.03-1.79 (m, 4H), 1.75-1.63 (m, 1H), 1.59-1.53 (m, 1H), 1.47-1.42 (m, 1H)。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 437, 实测值437。

[0324] 实施例26



[0326] 合成路线:



[0328] 第一步

[0329] 将化合物26-1 (50.0g, 0.251mol) 溶于无水四氢呋喃 (150mL) 和水 (150mL) 中, 0°C 下向反应液中加入氯化铵 (49.9g, 0.934mol) 和锌粉 (49.2g, 0.753mol)。再在0°C下缓慢滴加化合物26-2 (91.1g, 0.753mol)。反应液在20°C下搅拌12小时。过滤, 滤液用乙酸乙酯萃取 (100mL x 3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过柱层析法分离 (3:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.47$) 得到化合物26-3。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 5.88-5.80 (m, 1H), 5.18-5.10 (m, 2H), 3.95-3.64 (m, 2H), 3.28-3.02 (m, 2H), 2.23-2.21 (m, 2H), 1.58-1.48 (m, 4H), 1.45-1.44 (m, 9H)。

[0330] 第二步

[0331] 将化合物26-3 (2.00g, 8.29mmol) 溶于N,N-二甲基甲酰胺 (20mL) 中, 0°C下在氮气保护下向反应液中加入钠氢 (60%, 0.994mg, 24.9mmol), 再在氮气保护下向反应液中加入化合物26-2 (3.01g, 24.9mmol)。反应液在25°C下搅拌2小时。向反应液中加入饱和氯化铵 (200mL), 用乙酸乙酯萃取 (100mL x 3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过柱层析法分离 (10:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.60$) 得到化合物26-4。

[0332] 第三步

[0333] 将化合物26-4 (2.15g, 7.64mmol) 溶于二氯甲烷 (20mL) 中, 向反应液中加 (1,3-二

甲基咪唑烷-2-基亚基)(2-异丙氧基亚苄基)钌氯化钌(VI)(0.479g,0.764mmol)。反应液在25℃下搅拌反应3小时。加水(100mL)进行淬灭,用乙酸乙酯萃取(100mL x 3),合并有机相,用饱和食盐水(100mL)洗,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,粗产物经过柱层析法分离(10:1石油醚/乙酸乙酯,Rf=0.51)得到化合物26-5。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ5.68-5.61(m,2H),4.04-4.03(m,2H),3.71-3.60(m,2H),3.12-3.06(m,2H),1.93-1.90(m,2H),1.78-1.68(m,2H),1.62-1.61(m,1H),1.39(s,9H),1.37-1.36(m,1H)。

[0334] 第四步

[0335] 将化合物26-5(1.87g,7.38mmol)溶于无水四氢呋喃(10mL)中,0℃下在氮气保护下向反应液中加硼烷四氢呋喃(1M,22.1mL)。反应液在30℃下搅拌反应7小时。0℃下向反应液中加氢氧化钠(3.54g,88.6mmol),水(10mL)和双氧水(27.1g,0.295mol)。反应液在30℃下搅拌反应1小时。反应液用水(100mL)淬灭,乙酸乙酯萃取(100mL x 3),合并有机相,用饱和食盐水(100mL x 1)洗。无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,粗产物经过柱层析法分离(2:1石油醚/乙酸乙酯,Rf=0.20)得到化合物26-6。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ3.79-3.65(m,4H),3.15-2.94(m,2H),1.82-1.74(m,3H),1.67-1.53(m,6H),1.38(s,9H)。

[0336] 第五步

[0337] 将化合物26-6(1.65g,6.08mmol)溶于无水二氯甲烷(20mL)中,0℃下在氮气保护下向反应液中加入重铬酸吡啶鎓盐(4.58g,12.2mmol)。反应液在30℃下搅拌反应12小时。过滤,滤液用二氯甲烷萃取(80mL x 1),合并有机相,并用盐酸(1mol/L,50mL),饱和氯化钠(100mL x 1)洗。无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,粗产物经过柱层析法分离(2:1石油醚/乙酸乙酯,Rf=0.59)得到化合物26-7。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ4.03-4.00(m,2H),3.83-3.81(m,2H),3.22-3.16(m,2H),2.53-2.48(m,2H),1.93-1.77(m,4H),1.58-1.52(m,2H),1.48-1.47(m,9H)。MS-ESI计算值[M-Boc+H]⁺170,[M-56+H]⁺214,实测值170,214。

[0338] 第六步

[0339] 将化合物26-7(240mg,0.891mmol)和化合物1-2(142mg,1.07mmol)溶于二氯甲烷(3mL)中,将冰醋酸(53.5mg,0.891mol)加入至反应液,在25℃下搅拌反应10小时,然后向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠(378mg,1.78mmol)再继续反应2小时。在25℃下向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(20mL)淬灭反应,用二氯甲烷(20mL x 3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(30mL x 1)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩除去溶剂后粗产物经过薄层层析法(1:1石油醚/乙酸乙酯,Rf=0.3)分离纯化得到化合物26-8。MS-ESI计算值[M+H]⁺387,实测值387。

[0340] 第七步

[0341] 将化合物26-8(1.05g,2.72mmol)溶于二氯甲烷(10mL)中,加入三氟乙酸酐(856mg,4.07mmol)和N,N-二异丙基乙胺(527mg,4.07mmol)并在25℃搅拌12小时。向反应液中加入二氯甲烷(50mL),将反应液稀释,有机相分别用盐酸(1mol/L 30mL x 1)和饱和氯化钠溶液(30.0mL x 1)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩除去溶剂后粗产物经过薄层层析法(3:1石油醚/乙酸乙酯,Rf=0.5)分离纯化得到化合物26-9。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.34-7.30(m,2H),7.27-7.23(m,1H),7.15-7.02(m,2H),4.48-4.19(m,1H),3.90-3.62(m,4H),3.22-3.18(m,1H),3.10-2.96(m,1H),2.41-2.26(m,1H),2.25-2.10(m,2H),2.00-1.94(m,1H),1.83-1.69(m,3H),1.52-1.45(m,12H),1.41-1.37(m,1H),1.31-1.26(m,

1H)。MS-ESI计算值[M+Na]⁺505,实测值505。

[0342] 第八步

[0343] 将化合物26-9 (160mg, 0.305mmol) 溶于二氯甲烷 (2mL) 中, 在0℃下加入三氟乙酸 (104mg, 0.914mmol) 并在25℃搅拌1小时。反应液减压浓缩得到粗品化合物26-10。MS-ESI计算值[M+H]⁺383, 实测值383。

[0344] 第九步

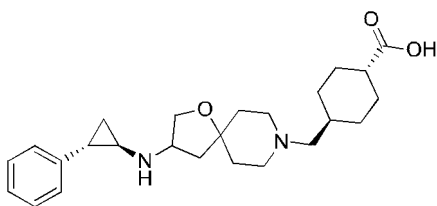
[0345] 将化合物26-10 (200mg, 0.403mmol) 溶于乙腈 (3mL) 中, 将三乙胺 (122mg, 1.21mmol) 加入至反应液, 在25℃下搅拌反应0.5小时, 然后将化合物2-5 (102mg, 0.443mmol) 加入至反应液, 将体系升至50℃搅拌反应12小时。减压浓缩除去溶剂后粗产物经过薄层层析法 (2:1石油醚/乙酸乙酯, R_f=0.5) 分离纯化得到化合物26-11。MS-ESI计算值[M+H]⁺531, 实测值531。

[0346] 第十步

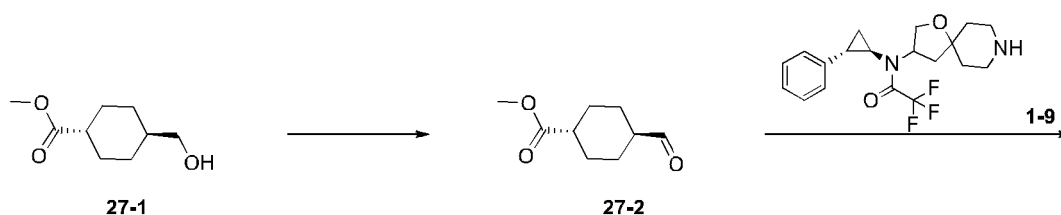
[0347] 将化合物26-11 (162mg, 0.301mmol) 溶于四氢呋喃 (2mL) 和无水乙醇 (2mL), 将氢氧化钠 (36.1mg, 0.902mmol) 溶于水 (2mL) 后滴加至溶液中, 在50℃下搅拌2小时。将反应液用盐酸 (1mol/L) 调pH值到5后减压浓缩, 其粗产物经过高效液相色谱 (酸性, 盐酸体系) 分离纯化得到化合物26的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.14-8.12 (m, 2H), 7.70-7.68 (m, 2H), 7.34-7.17 (m, 5H), 4.41 (s, 2H), 4.02-3.87 (m, 1H), 3.84-3.60 (m, 2H), 3.43-2.32 (m, 3H), 3.23-3.08 (m, 1H), 3.04-2.89 (m, 1H), 2.67-2.42 (m, 2H), 2.23-1.93 (m, 3H), 1.86-1.43 (m, 6H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺421, 实测值421。

[0348] 实施例27

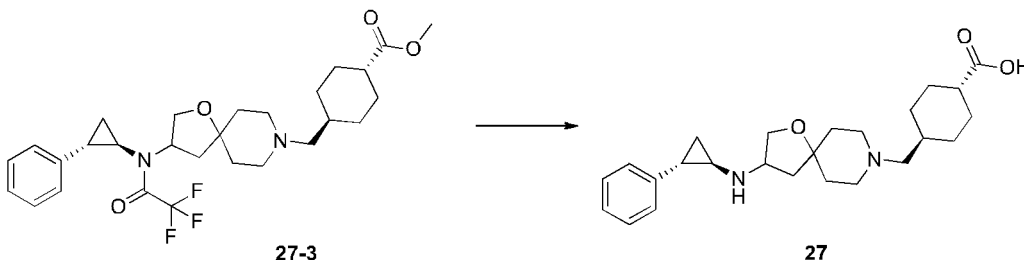
[0349]



[0350] 合成路线:



[0351]



[0352] 第一步

[0353] 将化合物27-1 (200mg, 1.16mmol) 溶于无水四氢呋喃 (6mL) 中, 将其冷却至0℃后向溶液中加入戴斯-马丁过碘烷 (532mg, 1.25mmol), 反应液在29℃下搅拌3小时。反应液用饱

和硫代硫酸钠(30mL)淬灭后,用乙酸乙酯(30mL x 2)萃取,合并有机相并用饱和氯化钠溶液(50mL x 1)洗涤,再用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,得到粗品化合物27-2。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.56 (s, 1H), 3.61 (s, 3H), 2.24-2.14 (m, 2H), 2.05-1.98 (m, 4H), 1.48-1.39 (m, 2H), 1.28-1.21 (m, 2H)。

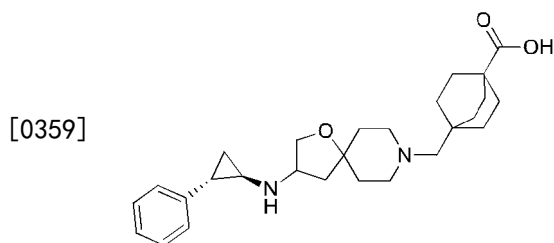
[0354] 第二步

[0355] 参照实施例6第一步得到化合物27-3。MS-ESI计算值[M+H]⁺523, 实测值523。

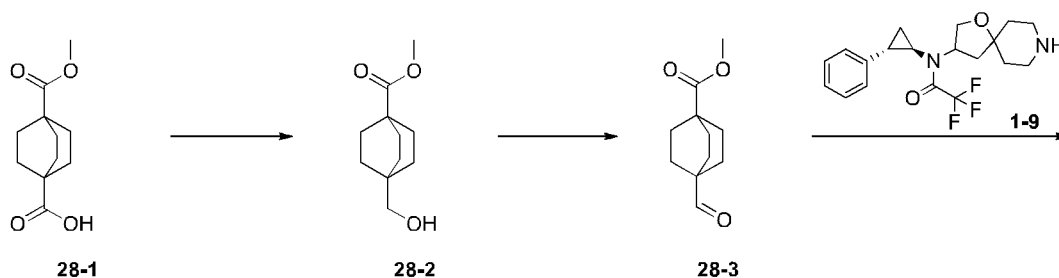
[0356] 第三步

[0357] 参照实施例6第二步得到化合物27的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, D₂O) δ 7.34-7.30 (m, 2H), 7.26-7.23 (m, 1H), 7.16-7.14 (m, 2H), 4.20-4.19 (m, 1H), 4.13-4.04 (m, 2H), 3.53-3.38 (m, 2H), 3.07-2.98 (m, 3H), 2.92-2.90 (m, 2H), 2.58-2.51 (m, 1H), 2.43-2.37 (m, 1H), 2.30-2.23 (m, 1H), 2.11-2.08 (m, 1H), 2.03-1.92 (m, 5H), 1.84-1.75 (m, 4H), 1.49-1.46 (m, 1H), 1.42-1.30 (m, 3H), 1.06-0.97 (m, 2H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺413, 实测值413。

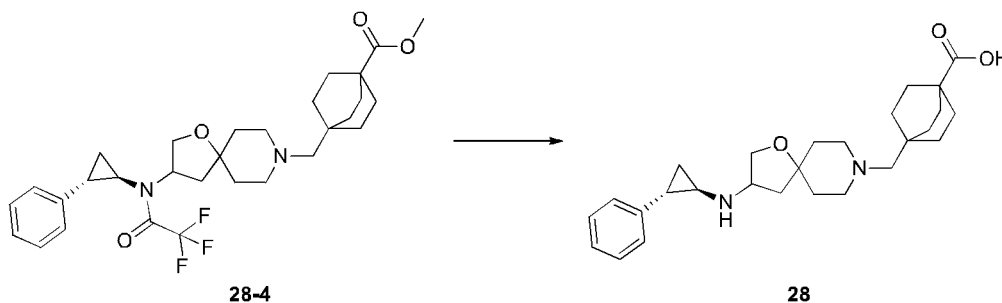
[0358] 实施例28



[0360] 合成路线:



[0361]



[0362] 第一步

[0363] 将化合物28-1(2.00g, 9.42mmol)溶于无水四氢呋喃(50mL)中,向其中加入N,N'-羰基二咪唑(1.53g, 9.42mmol),反应液在25℃下搅拌1小时。将其冷却至0℃后向其中加入硼氢化钠(357mg, 9.42mmol),反应液在25℃下继续搅拌1小时。反应液用饱和碳酸氢钠(30mL)淬灭,用乙酸乙酯(30mL x 3)萃取,合并有机相并用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,剩余物经过柱层析法分离(1:2石油醚/乙酸乙酯, R_f=0.68)得到化合物28-2。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 3.62 (s, 3H), 3.26 (s, 2H), 1.79-1.75 (m, 6H), 1.45-1.41 (m, 6H)。

[0364] 第二步

[0365] 参照实施例27第一步得到化合物28-3。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.39 (s, 1H), 3.59 (s, 3H), 1.80-1.76 (m, 6H), 1.63-1.59 (m, 6H)。

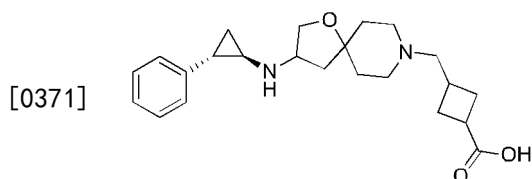
[0366] 第三步

[0367] 参照实施例6第一步得到化合物28-4。MS-ESI计算值[M+H]⁺549, 实测值549。

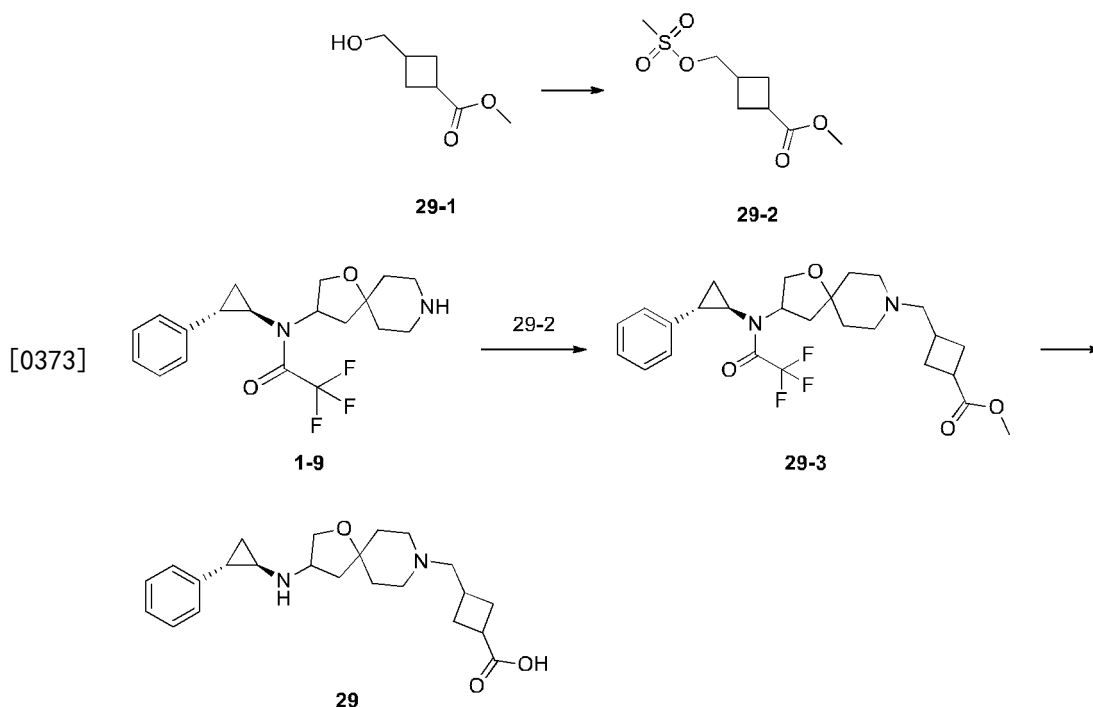
[0368] 第四步

[0369] 参照实施例6第二步得到化合物28的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, D₂O) δ 7.36-7.32 (m, 2H), 7.28-7.25 (m, 1H), 7.17-7.15 (m, 2H), 4.22-4.18 (m, 1H), 4.12-4.05 (m, 2H), 3.51-3.42 (m, 2H), 3.23-3.08 (m, 2H), 3.03-2.92 (m, 3H), 2.53-2.38 (m, 2H), 2.21-2.06 (m, 1H), 1.96-1.85 (m, 4H), 1.78-1.75 (m, 6H), 1.57-1.54 (m, 6H), 1.51-1.47 (m, 1H), 1.44-1.39 (m, 1H)。
MS-ESI计算值[M+H]⁺439, 实测值439。

[0370] 实施例29



[0372] 合成路线:



[0374] 第一步

[0375] 将化合物29-1 (100mg, 0.694mmol) 溶于二氯甲烷 (2mL) 中, 将其冷却至0℃向溶液中加入甲烷磺酰氯 (79.5mg, 0.694mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (179mg, 1.39mmol), 在25℃氮气保护下搅拌反应2小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液 (10mL) 淬灭反应, 用乙酸乙酯 (10mL x 3) 萃取, 有机相用饱和氯化钠溶液 (20mL x 1) 洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 得到粗品化合物29-2。

[0376] 第二步

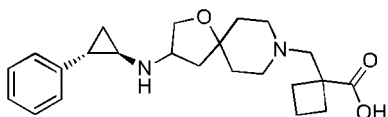
[0377] 将化合物29-2 (70.0mg, 0.315mmol) 和化合物1-9 (105mg, 0.286mmol) 溶于N,N-二甲基甲酰胺 (2mL) 中, 将N,N-二异丙基乙胺 (111mg, 0.859mmol) 和碘化钾 (9.51mg, 57.3 μ mol) 加入至反应液, 将体系升至50℃搅拌反应12小时。向反应液中加入水 (20mL) 将其稀释, 再用乙酸乙酯 (10mL x 3) 萃取, 有机相用饱和氯化钠溶液 (15mL x 1) 洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩除去溶剂后粗产物经过薄层层析法 (1:1石油醚/乙酸乙酯, R_f=0.2) 分离纯化得到化合物29-3。MS-ESI计算值[M+H]⁺495, 实测值495。

[0378] 第三步

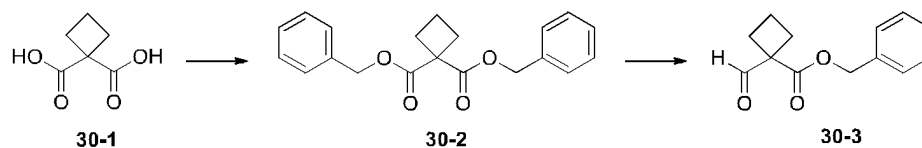
[0379] 将化合物29-3 (71.0mg, 0.123mmol) 溶于四氢呋喃 (2mL) 和无水乙醇 (2mL), 将氢氧化钠 (24.5mg, 0.613mmol) 溶于水 (2mL) 后滴加至溶液中, 在50℃下搅拌2小时。将反应液用盐酸 (1mol/L) 调pH值到5后减压浓缩, 其粗产物经过高效液相色谱 (酸性, 盐酸体系) 分离纯化得到化合物29的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, D₂O) δ 7.41-7.37 (m, 2H), 7.34-7.30 (m, 1H), 7.22-7.20 (m, 2H), 4.29-4.23 (m, 1H), 4.20-4.09 (m, 2H), 3.55-3.33 (m, 2H), 3.28-2.96 (m, 6H), 2.90-2.68 (m, 1H), 2.63-2.54 (m, 1H), 2.50-2.42 (m, 3H), 2.22-1.99 (m, 6H), 1.90-1.77 (m, 1H), 1.59-1.44 (m, 2H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺385, 实测值385。

[0380] 实施例30

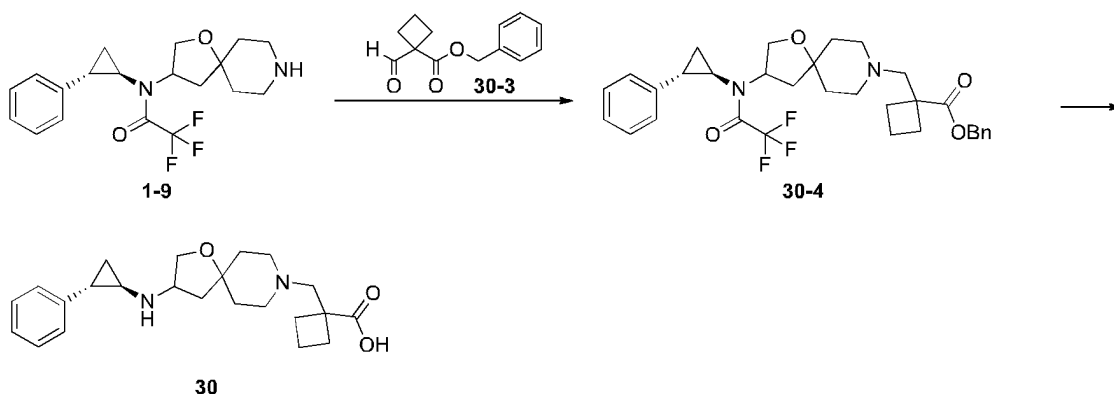
[0381]



[0382] 合成路线:



[0383]



[0384] 第一步

[0385] 将化合物30-1 (1.00g, 6.94mmol) 溶于无水N,N-二甲基甲酰胺 (10mL) 中, 在0℃下加入三乙胺 (2.81g, 27.8mmol), 并搅拌15分钟, 加入溴苄 (4.15g, 24.3mmol), 混合物在0℃搅拌反应15分钟后再升温到25℃搅拌反应11.5小时。反应液用水 (50mL) 淬灭, 用乙酸乙酯 (50mL x 3) 萃取, 有机相用饱和碳酸氢钠 (50mL x 1), 氯化钠溶液 (50mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 经制备薄层层析法 (10:1石油醚/乙酸乙酯, R_f=0.78) 分离纯化得到化合物30-2。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.28 (m, 10H), 5.18 (s, 4H), 2.63-2.59 (m, 4H), 2.07-1.98 (m, 2H)。

[0386] 第二步

[0387] 将化合物30-2 (6.00g, 18.5mmol) 溶于无水二氯甲烷 (120mL) 中, 在-78℃下滴加二异丁基氢化铝 (1.5M 甲苯溶液, 24.7mL, 36.9mmol), 反应液在-78℃下搅拌2小时。-78℃下加盐酸 (1mol/L, 36.9mL) 和水 (100mL) 淬灭反应, 混合物在25℃搅拌30分钟, 用乙酸乙酯 (100mL x 3) 萃取。有机相用饱和碳酸氢钠 (100mL), 饱和食盐水 (100mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 粗产物经过硅胶柱层析法 (10:1 石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.5$) 分离纯化得到化合物30-3。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.81 (s, 1H), 7.40-7.34 (m, 5H), 5.23 (s, 2H), 2.52-2.48 (m, 4H), 2.05-1.88 (m, 2H)。

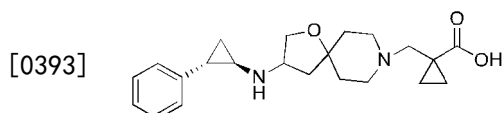
[0388] 第三步

[0389] 将化合物1-9 (500mg, 1.36mmol) 和化合物30-3 (594mg, 2.72mmol) 溶于无水二氯甲烷 (10mL) 中, 向反应液中加入冰醋酸 (245mg, 4.08mmol)。反应液在20℃下搅拌10小时, 加入醋酸硼氢化钠 (576mg, 2.72mmol), 反应液在20℃下继续搅拌2小时。反应液用二氯甲烷 (50mL) 稀释后, 依次用饱和碳酸氢钠水溶液 (50mL x 3) 洗涤, 水 (50mL x 2) 洗涤, 饱和食盐水 (50mL x 1) 洗一次, 再用无水硫酸钠干燥, 过滤, 所得母液浓缩后溶于无水二氯甲烷 (10mL) 中, 向其中加入化合物30-3 (297mg, 1.36mmol) 和冰醋酸 (8.17mg, 0.136mmol), 反应液在20℃下搅拌10小时, 加入醋酸硼氢化钠 (577mg, 2.72mmol), 反应液在20℃下继续搅拌2小时。反应液用二氯甲烷 (50mL) 稀释后, 依次用饱和碳酸氢钠水溶液 (50mL x 3) 和水 (50mL x 2) 洗涤, 饱和食盐水 (50mL x 1) 洗一次, 再用无水硫酸钠干燥, 过滤, 所得母液浓缩, 粗产物经过高效液相色谱法分离 (中性, 碳酸氢铵体系) 得到化合物30-4。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.42-7.31 (m, 7H), 7.28-7.24 (m, 1H), 7.15-7.09 (m, 2H), 5.19 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 4.65-4.61 (m, 1H), 4.09-4.01 (m, 1H), 3.94-3.87 (m, 1H), 3.00-2.97 (m, 1H), 2.73-7.71 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 2.51-2.34 (m, 7H), 2.04-1.88 (m, 6H), 1.71-1.67 (m, 1H), 1.64-1.61 (m, 2H), 1.50-1.41 (m, 2H) 少一个H。MS-ESI计算值[M+H]⁺571, 实测值571。

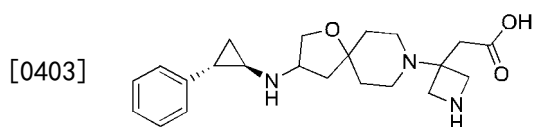
[0390] 第四步

[0391] 将化合物30-4 (220mg, 0.385mmol) 溶于四氢呋喃 (2mL)、水 (2mL) 和乙醇 (2mL) 中, 加入氢氧化钠 (46.3mg, 1.16mmol)。反应液在60℃下搅拌2小时, 减压浓缩除去四氢呋喃和乙醇, 剩余物用水 (6mL) 溶解, 用盐酸 (1mol/L) 调节pH值到4, 减压浓缩后剩余物经过高效液相色谱法分离 (酸性, 盐酸体系) 得到化合物30的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7.34-7.31 (m, 2H), 7.26-7.21 (m, 3H), 4.24-4.21 (m, 1H), 4.19-4.13 (m, 2H), 3.67-3.59 (m, 2H), 3.47-3.35 (m, 2H), 3.30-3.27 (m, 1H), 3.04-3.02 (m, 1H), 2.71-2.67 (m, 1H), 2.59-2.52 (m, 2H), 2.46-2.39 (m, 1H), 2.30-2.21 (m, 3H), 2.20-1.95 (m, 6H), 1.71-1.65 (m, 2H), 1.44-1.40 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺385, 实测值385。

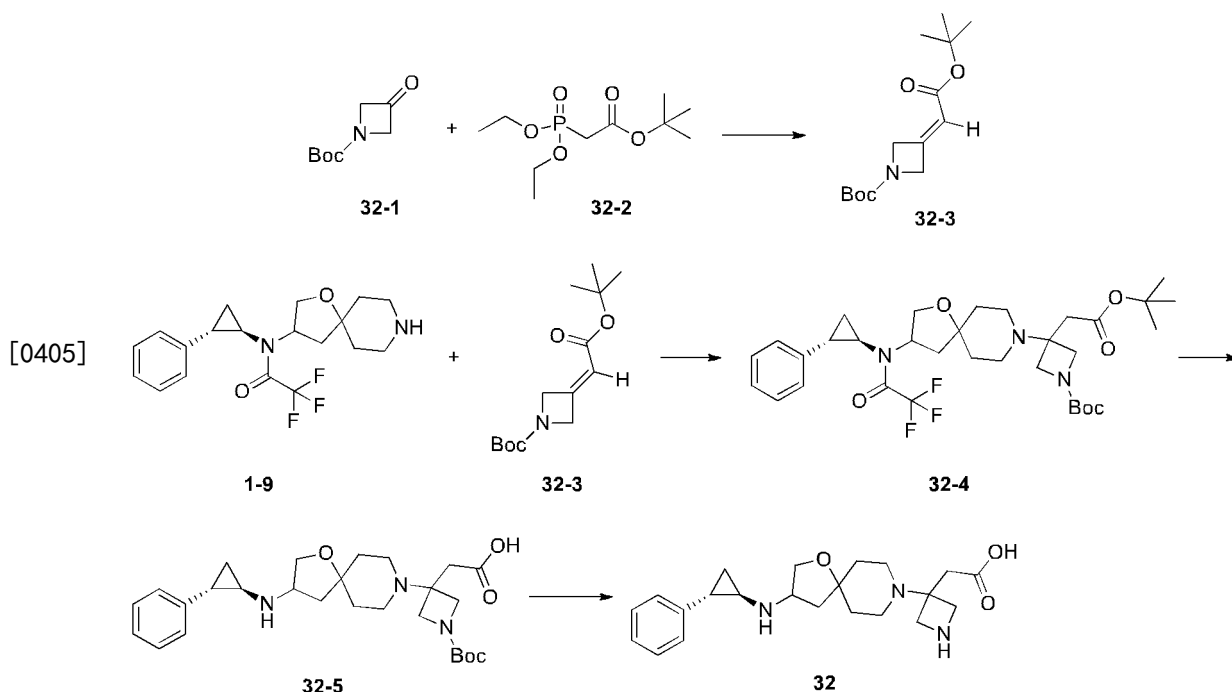
[0392] 实施例31



[0394] 合成路线:



[0404] 合成路线:



[0406] 第一步

[0407] 将化合物32-2 (1.92g, 7.59mmol) 溶于无水四氢呋喃 (20mL) 中, 0℃下在氮气保护下向反应液中加入叔丁醇钾 (852mg, 7.59mmol)。反应液在25℃下搅拌0.5小时。再在0℃下在氮气保护下向反应液中加入化合物32-1 (1g, 5.84mmol) 的四氢呋喃 (20mL) 溶液。反应液在25℃下搅拌11.5小时。向反应液中加入水 (100mL), 用乙酸乙酯萃取 (100mL x3), 合并有机相, 并用饱和氯化钠水溶液 (100mLx1) 洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过柱层析法分离 (5:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.80$) 得到化合物32-3。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 5.77-5.68 (m, 1H), 4.83-4.80 (m, 2H), 4.60-4.58 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.47 (s, 9H)。

[0408] 第二步

[0409] 将化合物32-3 (450mg, 1.67mmol) 和化合物1-9 (513mg, 1.39mmol) 溶于乙腈 (20mL) 中, 在氮气保护下向反应液中加入1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一烷-7-烯 (106mg, 0.696mmol)。反应液在65℃下搅拌12小时。向反应液中加入水 (80mL), 用乙酸乙酯萃取 (80mL x3), 合并有机相, 并用饱和氯化钠水溶液 (80mLx1) 洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 粗产物经过柱层析法分离 (2:1石油醚/乙酸乙酯, $R_f=0.20$) 得到化合物32-4。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7.35-7.31 (m, 2H), 7.28-7.24 (m, 1H), 7.09-7.07 (m, 2H), 4.66-4.62 (m, 1H), 3.96-3.92 (m, 3H), 3.80-3.76 (m, 2H), 2.57-2.50 (m, 4H), 2.40-2.34 (m, 3H), 2.07-2.04 (m, 3H), 1.85-1.83 (m, 1H), 1.76-1.74 (m, 3H), 1.51-1.44 (m, 21H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺ 638, 实测值638。

[0410] 第三步

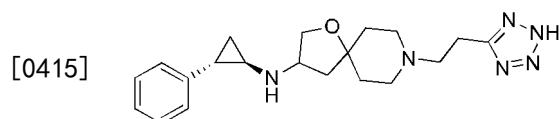
[0411] 将化合物32-4 (420mg, 0.659mmol) 溶于四氢呋喃 (4mL), 乙醇 (4mL) 和水 (4mL) 中, 向反应液中加入氢氧化钠 (79.0mg, 1.98mmol)。反应液在60℃下搅拌反应3小时, 减压浓缩除

去溶剂,残渣用水稀释,并用盐酸水溶液(1mol/L)调节pH到3左右。用乙酸乙酯萃取(20mL x3),无水硫酸钠干燥,过滤,母液浓缩,得到化合物32-5。MS-ESI计算值[M+H]⁺486,实测值486。

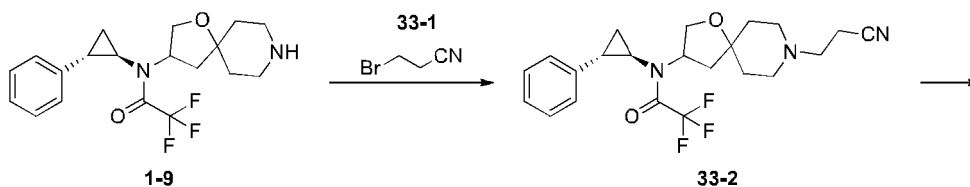
[0412] 第四步

[0413] 将化合物32-5(280mg,0.577mmol)溶于乙酸乙酯(2mL)中,向反应液中加入盐酸乙酸乙酯溶液(4M,2.88mL)。反应液在30℃下搅拌反应3小时,减压浓缩除去溶剂用高效液相色谱法(盐酸体系)制备得到化合物32的盐酸盐。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ7.37-7.33(m,2H),7.29-7.26(m,1H),7.18-7.16(m,2H),4.68-4.67(m,1H),4.47-4.41(m,3H),4.22-4.10(m,3H),3.17-3.06(m,6H),2.94-2.93(m,1H),2.52-2.43(m,2H),2.05-1.89(m,5H),1.51-1.50(m,1H),1.45-1.40(m,1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺386,实测值386。

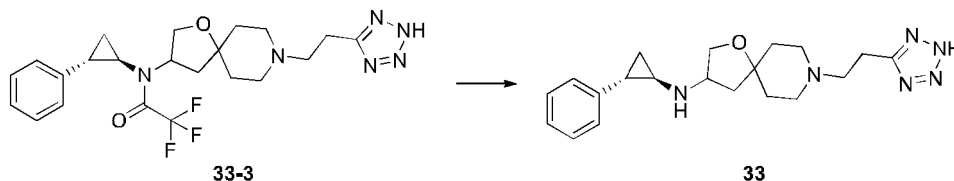
[0414] 实施例33



[0416] 合成路线:



[0417]



[0418] 第一步

[0419] 将化合物1-9(300mg,0.622mmol),化合物33-1(125mg,0.933mmol)和三乙胺(189mg,1.87mmol)溶于乙腈(5mL)中。反应液在50℃下搅拌10小时,减压浓缩除去溶剂,剩余物用二氯甲烷(50mL)溶解,有机相依次用水(50mL x 1)及饱和食盐水(50mL x 1)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,母液浓缩,粗产物经过薄层层析法分离(1:2石油醚/乙酸乙酯,Rf=0.24)得到化合物33-2。MS-ESI计算值[M+H]⁺422,实测值422。

[0420] 第二步

[0421] 将化合物33-2(100mg,0.237mmol)溶于二氧六环(3mL)中,向反应液中加入三甲基硅基叠氮(109mg,0.949mmol)和氧化二丁基锡(17.7mg,71.2μmol),反应液在120℃搅拌10小时。室温下加水(10mL),再用乙酸乙酯(10mL x 3)萃取,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(20mL x 1)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩得到粗品化合物33-3。MS-ESI计算值[M+H]⁺465,实测值465。

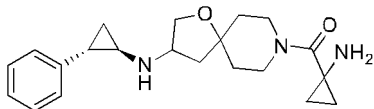
[0422] 第三步

[0423] 将化合物33-3(215mg,0.401mmol)溶于四氢呋喃(2mL)和无水乙醇(2mL),将氢氧化钠(80.3mg,2.01mmol)溶于水(2mL)后滴加至溶液中,在50℃下搅拌2小时。将反应液减压浓缩去除溶剂,用盐酸(1mol/L)调pH值到5后减压浓缩,其粗产物经过高效液相色谱(酸性,

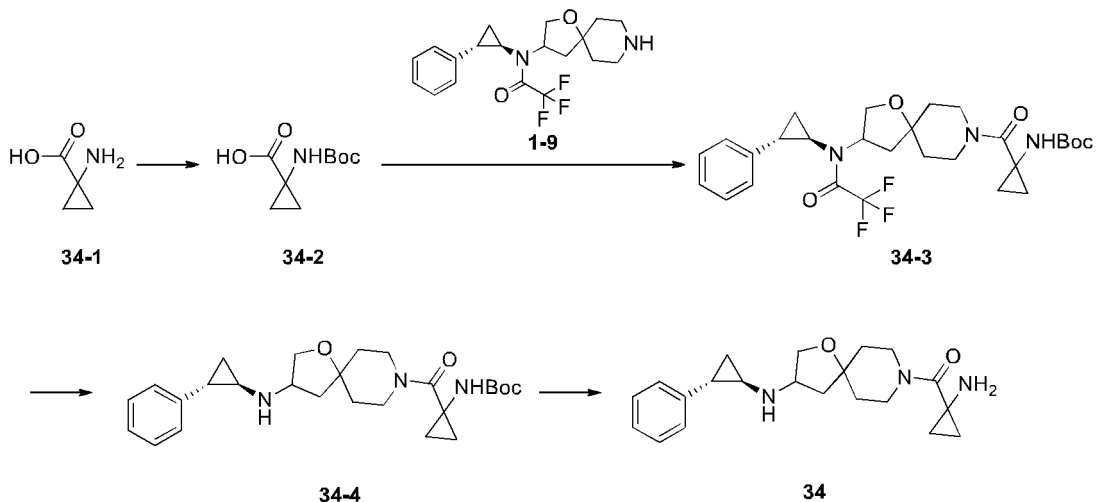
盐酸体系)分离纯化得到化合物33的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ7.33-7.28 (m, 2H), 7.25-7.19 (m, 3H), 4.24-4.16 (m, 3H), 3.66-3.52 (m, 6H), 3.02-3.30 (m, 2H), 3.01-3.00 (m, 1H), 2.70-2.55 (m, 1H), 2.49-2.35 (m, 1H), 2.78-2.06 (m, 4H), 2.05-1.93 (m, 1H), 1.71-1.56 (m, 1H), 1.47-1.37 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺369, 实测值369。

[0424] 实施例34

[0425]



[0426] 合成路线:



[0428] 第一步

[0429] 将一水合氢氧化锂 (830mg, 19.8mmol) 溶解于水 (3mL), 同二碳酸二叔丁酯 (2.37g, 10.9mmol) 加入至化合物34-1 (1.00g, 9.89mmol) 的四氢呋喃 (12mL) 溶液中, 反应液在15°C下搅拌12小时。用盐酸 (1N) 水溶液调节pH至6, 将其用水 (15mL) 稀释, 用乙酸乙酯 (15mL x 3) 萃取, 用饱和食盐水 (30mL x 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 母液浓缩, 得到粗品化合物34-2。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ9.56 (brs, 1H), 1.60-1.57 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.27-1.21 (m, 2H)。MS-ESI计算值[M+Na]⁺224, 实测值224。

[0430] 第二步

[0431] 参照实施例22第一步得到化合物34-3。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.34-7.23 (m, 3H), 7.07-7.06 (m, 2H), 5.23-5.07 (m, 1H), 4.70-4.58 (m, 1H), 4.08-3.97 (m, 3H), 3.49-3.41 (m, 2H), 3.11-2.89 (m, 1H), 2.43-2.32 (m, 1H), 2.16-2.07 (m, 2H), 1.71-1.59 (m, 6H), 1.49-1.41 (m, 12H), 1.16-0.98 (m, 1H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺552, 实测值552。

[0432] 第三步

[0433] 参照实施例6第二步得到化合物34-4。MS-ESI计算值[M+H]⁺456, 实测值456。

[0434] 第四步

[0435] 参照实施例32第四步得到化合物34的盐酸盐。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ7.33-7.29 (m, 2H), 7.24-7.18 (m, 3H), 4.18-3.93 (m, 5H), 3.48-3.39 (m, 2H), 3.28-3.21 (m, 1H), 3.02-3.00 (m, 1H), 2.65-2.56 (m, 1H), 2.47-2.37 (m, 1H), 2.05-1.92 (m, 4H), 1.66-1.53 (m, 2H), 1.39-1.30 (m, 4H)。MS-ESI计算值[M+H]⁺356, 实测值356。

[0436] 生物化学检测: 体外评价

[0437] 实验1:酶活性评价

[0438] 本试验目的是检测化合物对LSD1的体外抑制活性。本试验采用的酶为人源LSD1,标准底物为组蛋白H3K4me肽(20 μ M),采用酶荧光偶联法,通过辣根过氧化酶(HPR)和荧光试剂Amplex Red联合检测LSD1反应后生成的H₂O₂的方法测定化合物的活性。从10 μ M开始3倍稀释,检测化合物的10个浓度下IC₅₀值。化合物在加入底物开始反应前,酶和底物共孵化30分钟。荧光检测器:EnVision,激发波长:Ex/Em=530/590nm

[0439] 测试化合物对LSD1抑制活性,结果如表1所示。

[0440] 表1:本发明化合物体外酶活性筛选试验结果

| 化合物编号 | IC ₅₀ (nM) | 化合物编号 | IC ₅₀ (nM) |
|--------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| 化合物 1 的盐酸盐 | 1689 | 化合物 18 的盐酸盐 | 92.88 |
| 化合物 2 的盐酸盐 | 1578 | 化合物 19 的盐酸盐 | 208.3 |
| 化合物 3 的盐酸盐 | 96.66 | 化合物 20 的盐酸盐 | 241.7 |
| 化合物 4 的盐酸盐 | 939.7 | 化合物 21 的盐酸盐 | 92.19 |
| 化合物 5 的盐酸盐 | 3854 | 化合物 22 的盐酸盐 | 908.2 |
| [0441] 化合物 6 的盐酸盐 | 328.8 | 化合物 23 的盐酸盐 | 64.62 |
| 化合物 7 的盐酸盐 | 45.07 | 化合物 24 的盐酸盐 | 41.51 |
| 化合物 8 的盐酸盐 | 39.73 | 化合物 25 的盐酸盐 | 1723 |
| 化合物 9 的盐酸盐 | 37.76 | 化合物 26 的盐酸盐 | 271.4 |
| 化合物 10 的盐酸盐 | 78.44 | 化合物 27 的盐酸盐 | 1776 |
| 化合物 11 的盐酸盐 | 2879 | 化合物 28 的盐酸盐 | 1456 |
| 化合物 12 的盐酸盐 | 1377 | 化合物 29 的盐酸盐 | 1672 |
| 化合物 13 的盐酸盐 | 46.59 | 化合物 30 的盐酸盐 | 1137 |
| 化合物 14 的盐酸盐 | 117.7 | 化合物 31 的盐酸盐 | 2123 |
| [0442] 化合物 15 的盐酸盐 | 352.8 | 化合物 32 的盐酸盐 | 1162 |
| 化合物 16 的盐酸盐 | 261.8 | 化合物 33 的盐酸盐 | 48.24 |
| 化合物 17 的盐酸盐 | 70.63 | 化合物 34 的盐酸盐 | 38.4 |

[0443] 结论:本发明化合物对LSD1抑制活性明显。

[0444] 实验例2:对NCI-H1417细胞增殖抑制活性评价:

[0445] 实验目的:检测待测化合物对NCI-H1417细胞增殖抑制活性。

[0446] 实验材料:RPMI 1640培养基,胎牛血清,Promega CellTiter-Glo试剂。NCI-H1417细胞系购自ATCC。

[0447] Envision多标记分析仪(PerkinElmer)。

[0448] 实验方法:将化合物溶解到10mM,在化合物板里用DMSO 5倍稀释化合物,化合物起始为2mM,用Bravo进行三倍稀释,10个浓度,用Echo转板250nL到空白的384细胞板的上下双复孔,往转了250nL DMSO/化合物里面加入每孔/1000个细胞/50 μ L的细胞悬液,化合物稀释了200倍,即起始作用浓度是10 μ M。细胞板置于二氧化碳培养箱中培养10天。向细胞板中加入每孔25 μ L的Promega CellTiter-Glo试剂,室温振荡10分钟使发光信号稳定。采用PerkinElmer Envision多标记分析仪读数。

[0449] 数据分析:利用方程式(Max-Ratio)/(Max-Min)*100%将原始数据换算成抑制率,IC₅₀的值即可通过四参数进行曲线拟合得出(XLFIT5中205模式得出,iDBS)。

[0450] 测试化合物对NCI-H1417细胞增殖抑制活性,结果如表2所示。

[0451] 表2:本发明化合物对NCI-H1417细胞增殖抑制试验结果

| 化合物编号 | IC ₅₀ (nM) | 化合物编号 | IC ₅₀ (nM) |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 化合物6的盐酸盐 | 9.11 | 化合物21的盐酸盐 | 1.12 |
| 化合物15的盐酸盐 | 13.10 | 化合物23的盐酸盐 | 1.68 |
| 化合物16的盐酸盐 | 12.10 | 化合物30的盐酸盐 | 91.36 |
| 化合物17的盐酸盐 | 0.65 | 化合物32的盐酸盐 | 3.97 |
| 化合物19的盐酸盐 | 6.95 | 化合物34的盐酸盐 | 4.38 |
| 化合物20的盐酸盐 | 3.99 | | |

[0453] 结论:本发明化合物对NCI-H1417细胞增殖抑制活性明显。

[0454] 实验例3:对HL60细胞增殖抑制活性评价:

[0455] 实验目的:检测待测化合物对HL60细胞增殖抑制活性。

[0456] 实验材料:RPMI-1640培养基,胎牛血清,盘尼西林/链霉素抗生素购自维森特。CellTiter-Glo (细胞活率化学发光检测试剂) 试剂购自Promega。HL60细胞系购自南京科佰生命科技有限公司。Nivo多标记分析仪 (PerkinElmer)。

[0457] 实验方法:将HL60细胞种于白色384孔板中,40μL细胞悬液每孔,其中包含600个HL60细胞。细胞板置于二氧化碳培养箱中过夜培养。将待测化合物用排枪进行5倍稀释至第10个浓度,即从2mM稀释至1.024nM,设置双复孔实验。向中间板中加入78μL培养基,再按照对应位置,转移2μL每孔的梯度稀释化合物至中间板,混匀后转移10μL每孔到细胞板中。细胞板置于二氧化碳培养箱中培养6天。另准备一块细胞板,在加药当天读取信号值作为最大值(下面方程式中Max值)参与数据分析。向此细胞板每孔加入20μL细胞活率化学发光检测试剂,室温孵育10分钟使发光信号稳定。采用多标记分析仪读数。

[0458] 数据分析:利用方程式 $(\text{Sample} - \text{Min}) / (\text{Max} - \text{Min}) * 100\%$ 将原始数据换算成抑制率,IC₅₀的值即可通过四参数进行曲线拟合得出(GraphPad Prism中“log (inhibitor) vs. response--Variable slope”模式得出)。

[0459] 测试化合物对HL60细胞增殖抑制活性,结果如表3所示。

[0460] 表3:本发明化合物对HL60细胞增殖抑制试验结果

| 化合物编号 | IC ₅₀ (nM) | 化合物编号 | IC ₅₀ (nM) |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 化合物6的盐酸盐 | 14.74 | 化合物20的盐酸盐 | 8.99 |
| 化合物15的盐酸盐 | 13.8 | 化合物21的盐酸盐 | 1.17 |
| 化合物16的盐酸盐 | 8.46 | 化合物24的盐酸盐 | 39.1 |
| 化合物17的盐酸盐 | 0.78 | 化合物30的盐酸盐 | 337.2 |
| 化合物18的盐酸盐 | 20.44 | 化合物32的盐酸盐 | 0.55 |
| 化合物19的盐酸盐 | 1.46 | 化合物34的盐酸盐 | 1.92 |

[0462] 结论:本发明化合物对HL60细胞增殖抑制活性明显。

[0463] 实验例4:对MV-4-11细胞增殖抑制活性评价:

[0464] 实验目的:检测待测化合物对MV-4-11细胞增殖抑制活性。

[0465] 实验材料:IMDM培养基,胎牛血清,盘尼西林/链霉素抗生素购自维森特。CellTiter-Glo (细胞活率化学发光检测试剂) 试剂购自Promega。MV-4-11细胞系购自南京

科佰生命科技有限公司。Nivo多标记分析仪(PerkinElmer)。

[0466] 实验方法:将MV-4-11细胞种于白色96孔板中,80 μ L细胞悬液每孔,其中包含6000个MV-4-11细胞。细胞板置于二氧化碳培养箱中过夜培养。

[0467] 将待测化合物用排枪进行5倍稀释至第8个浓度,即从2mM稀释至25.6nM,设置双复孔实验。向中间板中加入78 μ L培养基,再按照对应位置,转移2 μ L每孔的梯度稀释化合物至中间板,混匀后转移20 μ L每孔到细胞板中。细胞板置于二氧化碳培养箱中培养6天。另准备一块细胞板,在加药当天读取信号值作为最大值(下面方程式中Max值)参与数据分析。向此细胞板每孔加入25 μ L细胞活率化学发光检测试剂,室温孵育10分钟使发光信号稳定。采用多标记分析仪读数。

[0468] 数据分析:利用方程式 $(\text{Sample}-\text{Min}) / (\text{Max}-\text{Min}) * 100\%$ 将原始数据换算成抑制率, IC_{50} 的值即可通过四参数进行曲线拟合得出(GraphPad Prism中“log(inhibitor) vs. response--Variable slope”模式得出)。

[0469] 测试化合物对MV-4-11细胞增殖抑制活性,结果如表4所示。

[0470] 表4:本发明化合物对MV-4-11细胞增殖抑制试验结果

| 化合物编号 | IC_{50} (nM) | 化合物编号 | IC_{50} (nM) |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 化合物6的盐酸盐 | 3.21 | 化合物20的盐酸盐 | 9.56 |
| 化合物15的盐酸盐 | 13.16 | 化合物21的盐酸盐 | 0.46 |
| 化合物16的盐酸盐 | 13.70 | 化合物24的盐酸盐 | 38.32 |
| 化合物17的盐酸盐 | 2.86 | 化合物30的盐酸盐 | 33.15 |
| 化合物18的盐酸盐 | 16.03 | 化合物32的盐酸盐 | 1.9 |
| 化合物19的盐酸盐 | 4.41 | 化合物34的盐酸盐 | 1.37 |

[0472] 结论:本发明化合物对MV-4-11细胞增殖抑制活性明显。

[0473] 实验例5:化合物药代动力学评价

[0474] 实验目的:测试化合物在CD-1小鼠体内的药代动力学

[0475] 实验材料:

[0476] CD-1小鼠(雄性,7~9周龄,上海斯莱克)

[0477] 实验操作:

[0478] 以标准方案测试化合物静脉注射及口服给药后的啮齿类动物药代特征,实验中候选化合物配成澄清溶液,给予小鼠单次静脉注射及口服给药。静注及口服溶媒为10%二甲基亚砜与90%的10%的羟丙基 β 环糊精配成的混合溶媒。该项目使用四只雄性CD-1小鼠,两只小鼠进行静脉注射给药,给药剂量为1mg/kg,收集0h(给药前)和给药后0.0833,0.25,0.5,1,2,4,8,24h的血浆样品,另外两只小鼠口服灌胃给药,给药剂量为2mg/kg,收集0h(给药前)和给药后0.25,0.5,1,2,4,8,24h的血浆样品,收集24小时内的全血样品,3000g离心15分钟,分离上清得血浆样品,加入4倍体积含内标的乙腈溶液沉淀蛋白,离心取上清液加入等倍体积的水再离心取上清进样,以LC-MS/MS分析方法定量分析血药浓度,并计算药代参数,如达峰浓度(C_{max}),清除率(CL),半衰期($T_{1/2}$),组织分布(V_{dss}),药时曲线下面积($\text{AUC}_{0-\text{last}}$),生物利用度(F)等。

[0479] 实验结果如表5:

[0480] 表5药代动力学测试结果

| 化合物 | 达峰浓度 C _{max} (nM) | 清除率 CL (mL/min/kg) | 组织分布 V _{dss} (L/kg) | 半衰期 T _{1/2} (IV, h) | 药时曲线下面积 AUC _{0-last} PO (nM.hr) | 生物利用度 F (%) |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|----------------|
| [0481] 化合物 6 的盐酸盐 | 718 | 40.2 | 1.19 | 1.54 | 691 | 33.2 |
| 化合物 14 的盐酸盐 | 629 | 16.9 | 0.551 | 0.874 | 1376 | 28.7 |
| 化合物 15 的盐酸盐 | 919 | 41.8 | 0.835 | 0.49 | 765 | 39.1 |
| 化合物 16 的盐酸盐 | 860 | 33.8 | 0.88 | 0.579 | 891 | 36.9 |
| 化合物 20 的盐酸盐 | 714 | 19.7 | 0.752 | 0.905 | 1342 | 29 |
| 化合物 23 的盐酸盐 | 144 | 68.7 | 18.6 | 4.32 | 360 | 37.2 |
| 化合物 34 的盐酸盐 | 1150 | 25.3 | 2.09 | 1.39 | 2141 | 58.3 |

[0482] 结论:本发明化合物具有良好的药代动力学性质,包括良好的口服生物利用度,口服暴露量,半衰期和清除率等。

[0483] 实验例6:hERG钾离子通道的抑制试验

[0484] 实验目的:用全自动膜片钳的方法检测待测实施例对hERG钾离子通道的影响。

[0485] 实验方法

[0486] 6.1.细胞培养

[0487] 6.1.1 CHO-hERG细胞培养于175cm²培养瓶中,待细胞密度生长到60~80%,移走培养液,用7mL PBS (Phosphate Buffered Saline磷酸盐缓冲液)洗一遍,然后加入3mL消化液消化。

[0488] 6.1.2待消化完全后加入7mL培养液中和,然后离心,吸走上清液,再加入5mL培养液重悬,以确保细胞密度为2~5×10⁶/mL。

[0489] 6.2溶液配制

[0490] 表6.1:细胞内液和外液的组成成分

| 试剂 | 细胞外液 (mM) | 细胞内液 (mM) |
|---------------------|---------------|--------------|
| CaCl ₂ | 2 | 5.374 |
| MgCl ₂ | 1 | 1.75 |
| KCl | 4 | 120 |
| NaCl | 145 | - |
| 葡萄糖 | 10 | - |
| 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 | 10 | 10 |
| 乙二醇双氨乙基醚四乙酸 | - | 5 |
| Na ₂ ATP | - | 4 |
| pH | 用NaOH调节pH至7.4 | 用KOH调节pH至7.4 |

[0492] 注:“-”表示无该试剂。

[0493] 6.3电生理记录过程

[0494] 单细胞高阻抗封接和全细胞模式形成过程全部由中国科学院上海药物研究所Qpatch仪器自动完成,在获得全细胞记录模式后,细胞钳制在-80毫伏,在给予一个5秒的+40毫伏去极化刺激前,先给予一个50毫秒的-50毫伏前置电压,然后复极化到-50毫伏维持5秒,再回到-80毫伏。每15秒施加此电压刺激,记录2分钟后给予细胞外液记录5分钟,然后开始给药过程,化合物浓度从最低测试浓度开始,每个测试浓度给予2.5分钟,连续给完所有

浓度后,给予阳性对照化合物3 μ M Cisapride (西沙必利)。每个浓度至少测试3个细胞 ($n \geq 3$)。

[0495] 6.4化合物准备

[0496] 6.4.1将20mM的化合物母液用细胞外液进行稀释,取5 μ L 20mM的化合物母液加入2495 μ L细胞外液,500倍稀释至40 μ M,然后在含0.2%DMSO的细胞外液中依次进行3倍连续稀释得到需要测试的最终浓度。

[0497] 6.4.2最高测试浓度为40 μ M,依次分别为40,13.33,4.44,1.48,0.49,0.16 μ M共6个浓度。

[0498] 6.5数据分析

[0499] 实验数据由XLfit软件进行分析。

[0500] 6.6测试结果

[0501] 实施例化合物hERG IC₅₀值结果见表6.2。

[0502] 表6.2:实施例化合物hERG IC₅₀值结果

| 供试样品 | hERGIC ₅₀ (μ M) | 测试次数 |
|----------|---------------------------------|------|
| 化合物6的盐酸盐 | >40 | N=2 |

[0504] 结论:本发明化合物对hERG钾离子通道无抑制作用。

[0505] 实验例7:本发明化合物对MC38小鼠结肠癌移植瘤模型的体内药效学研究

[0506] 7.1实验目的:

[0507] 本实验的目的是研究本发明化合物对MC38小鼠结肠癌移植瘤模型体内药效进行评估。

[0508] 7.2实验动物:

[0509] 种属:小鼠

[0510] 品系:C57BL/6小鼠

[0511] 周龄及体重:7周龄,体重18-23克

[0512] 性别:雌性

[0513] 供应商:上海斯莱克实验动物有限公司

[0514] 7.3实验方法与步骤

[0515] 7.3.1细胞培养

[0516] 名称:MC38 (小鼠结肠癌细胞)

[0517] 来源:和元生物技术(上海)有限公司。由辉源生物科技(上海)有限公司保种维持传代。

[0518] 细胞培养:培养液为含有10%胎牛血清的1640培养基,培养条件为37 $^{\circ}$ C,5%二氧化碳。传代比例为1:2~1:3,每周传代2~3次。

[0519] 7.3.2肿瘤细胞接种

[0520] 将0.1mL (2×10^5 个)细胞皮下接种于每只小鼠的右后背。同日将动物根据体重随机分组。

[0521] 7.3.3受试物的配制

[0522] 实验用溶媒为0.5%甲基纤维素溶液,配制方法为称取5g甲基纤维素,溶解于800mL超纯水中,搅拌均匀后用超纯水定容至1000mL。受试物用溶媒溶解,配制成一定浓度

均一溶液,于4℃保存。

[0523] 7.3.4肿瘤测量和实验指标

[0524] 实验指标是考察肿瘤生长是否被抑制、延缓或治愈。每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为: $V=0.5a \times b^2$,a和b分别表示肿瘤的长径和短径。

[0525] 化合物的抑瘤疗效用相对肿瘤增殖率T/C(%)评价。相对肿瘤增殖率T/C(%) :计算公式如下: $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ (T_{RTV} :治疗组RTV; C_{RTV} :阴性对照组RTV)。根据肿瘤测量的结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume,RTV),计算公式为 $RTV = V_t/V_0$,其中 V_0 是分组给药时(即 d_0)测量所得平均肿瘤体积, V_t 为某一次测量时的平均肿瘤体积, T_{RTV} 与 C_{RTV} 取同一天数据。

[0526] 7.4实验结果

[0527] 表7受试化合物对MC38小鼠结肠癌移植瘤模型的抑瘤药效评价

[0528] (基于给药后第28天肿瘤体积计算得出)

| | 组别 | 肿瘤体积 (mm ³) (第28天) | T/C (%) |
|--------|---|--------------------------------------|------------|
| [0529] | 溶媒组 (0.5%甲基纤维素溶液) | 1759±978 | / |
| | 化合物 6 的盐酸盐(1.5 mg/kg,口服一天一次) | 1653±893 | 92 |
| | PD-1 单抗 (5 mg/kg, 腹腔注射一周两次) | 1022±925 | 58 |
| | PD-1 单抗+化合物 6 的盐酸盐(5 mg/kg, 腹腔注射一周两次 +1.5 mg/kg, 口服一天一次) | 211±269 | 12 |

[0530] 注:PD-1单抗来源:BioXcell.PD-1单抗于分组后第7天开始给药,化合物6于分组当天开始给药。

[0531] 结论:本发明化合物与PD-1单抗联用对MC38小鼠结肠癌移植瘤模型具有优异的抑瘤效果。

[0532] 实施例8:本发明化合物对人小细胞肺癌NCI-H1417细胞皮下异种移植肿瘤CB-17SCID小鼠模型的体内药效学研究

[0533] 8.1实验目的:

[0534] 本实验的目的是研究本发明化合物对人小细胞肺癌NCI-H1417细胞皮下异种移植瘤在CB-17SCID小鼠模型体内药效进行评估。

[0535] 8.2实验动物:

[0536] 种属:小鼠

[0537] 品系:CB-17 SCID小鼠

[0538] 周龄及体重:6-8周龄,体重16-21克

[0539] 性别:雌性

[0540] 供应商:上海灵畅生物科技股份有限公司

[0541] 8.3实验方法与步骤

[0542] 8.3.1细胞培养

[0543] 人小细胞肺癌NCI-H1417细胞(ATCC)体外单层培养,培养条件为RPMI-1640培养基中加10%胎牛血清,37℃ 5%CO₂培养。当细胞饱和度为80%-90%时,收取细胞,计数,接

种。

[0544] 8.3.2肿瘤细胞接种

[0545] 将0.2mL 10×10^6 个NCI-H1417细胞皮下接种于每只小鼠的右后背(PBS:基质胶=1:1)。平均体积达到100-150mm³时开始分组给药。

[0546] 8.3.3受试物的配制

[0547] 实验用溶媒为0.5%甲基纤维素溶液,配制方法为称取5g甲基纤维素,溶解于800mL超纯水中,搅拌均匀后用超纯水定容至1000mL。受试物用溶媒溶解,配制成一定浓度均一溶液,于4℃保存。

[0548] 顺铂(Cisplatin,生产商齐鲁制药有限公司,10mg/瓶注射用冻干粉,批号7D011A8)加入10mL 0.9%NaCl配成1mg/mL母液,室温避光保存。0.63mL分装常温保存。取一支0.63mL母液,加入5.67mL0.9%NaCl配成0.1mg/mL溶液。

[0549] 8.3.4肿瘤测量和实验指标

[0550] 实验指标是考察肿瘤生长是否被抑制、延缓或治愈。每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为: $V=0.5a \times b^2$,a和b分别表示肿瘤的长径和短径。

[0551] 化合物的抑瘤疗效用TGI(%)评价。TGI(%),反映肿瘤生长抑制率。TGI(%)的计算: $TGI(\%) = \frac{1 - (\text{某处理组给药结束时肿瘤平均体积} - \text{该处理组开始给药时肿瘤平均体积})}{(\text{溶剂对照组治疗结束时肿瘤平均体积} - \text{溶剂对照组开始治疗时肿瘤平均体积})} \times 100\%$ 。

[0552] 8.4实验结果

[0553] 表8化合物对人小细胞肺癌NCI-H1417异种移植瘤模型的抑瘤药效评价

[0554] (基于给药后第28天肿瘤体积计算得出)

| [0555] | 组别 | 肿瘤体积平均值±SEM | TGI |
|--------|--------------------------------------|---------------------------|-------|
| | | (mm ³) (第28天) | (%) |
| | 溶媒组 (0.5%甲基纤维素溶液) | 446±36 | / |
| | 顺铂 (Cisplatin) (1mg/kg, 腹腔注射, 一周两次) | 165±22 | 85.9% |
| | 化合物6的盐酸盐(1.5 mg/kg,口服一天一次) | 187±14 | 79.2% |
| | 顺铂 (Cisplatin) (1mg/kg, 腹腔注射, 一周两次)+ | 33±13 | 126% |
| [0556] | 化合物6的盐酸盐(1.5 mg/kg,口服一天一次) | | |

[0557] 结论:本发明化合物单药或与化疗药物顺铂联用对人小细胞肺癌NCI-H1417异种移植瘤模型具有优异的抑瘤效果。