



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101631790 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 18

(21) 申请号 200880008065. 3

A61K 31/4995 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 01. 10

A61P 31/14 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/884, 459 2007. 01. 11 US

(56) 对比文件

WO 2006/020082 A1, 2006. 02. 23,

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 刘杰

2009. 09. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/050715 2008. 01. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02008/089027 EN 2008. 07. 24

(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 丁敏

罗伯特·G·金特尔斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C07D 487/08 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 43 页

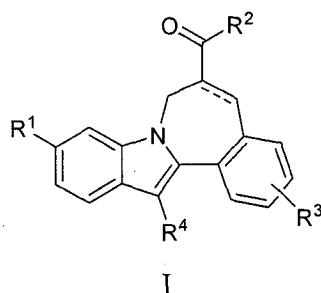
(54) 发明名称

用于治疗丙型肝炎的化合物

(57) 摘要

本发明披露了式 I 化合物及使用所述化合物的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 化合物或其可药用盐：



其中

R^1 为 $-\text{CO}_2R^5$ 或 $-\text{CONR}^6R^7$ ；

R^2 为 ；

R^3 为氢、卤素、烷基、烷氧基或卤代烷氧基；

R^4 为环烷基；

R^5 为氢或烷基；

R^6 为烷基 SO_2- 、环烷基 SO_2- 、卤代烷基 SO_2- 或 $(R^9)_2\text{NSO}_2-$ ；

R^7 为氢；

R^8 为氢、烷基、环烷基、(环烷基)烷基、烷基羰基或烷氧基羰基；

R^9 为氢或烷基；以及

虚线表示单键或双键；

其中

“烷基及“烷氧基”、“卤代烷基”和“卤代烷氧基”中的烷基部份是指由 1 至 6 个碳所组成的直链或支链烷基；和

“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，其中 R^1 为 $-\text{CONR}^6R^7$ ； R^6 为烷基 SO_2- 、环烷基 SO_2- 、卤代烷基 SO_2- 或 $(R^9)_2\text{NSO}_2-$ ；以及 R^7 为氢。

3. 权利要求 1 的化合物，其中 R^3 为氢。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 R^3 为甲氧基。

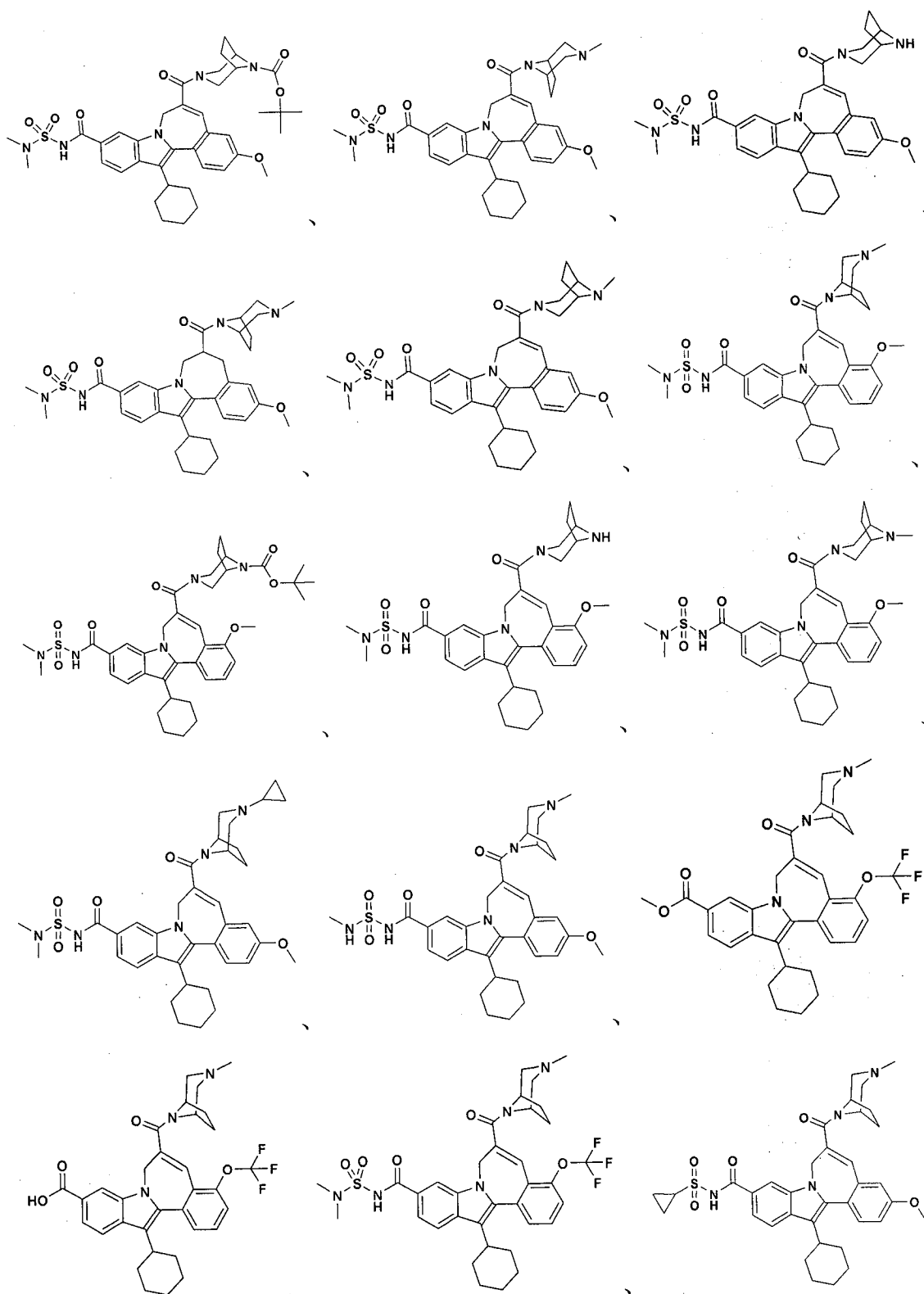
5. 权利要求 1 的化合物，其中 R^4 为环己基。

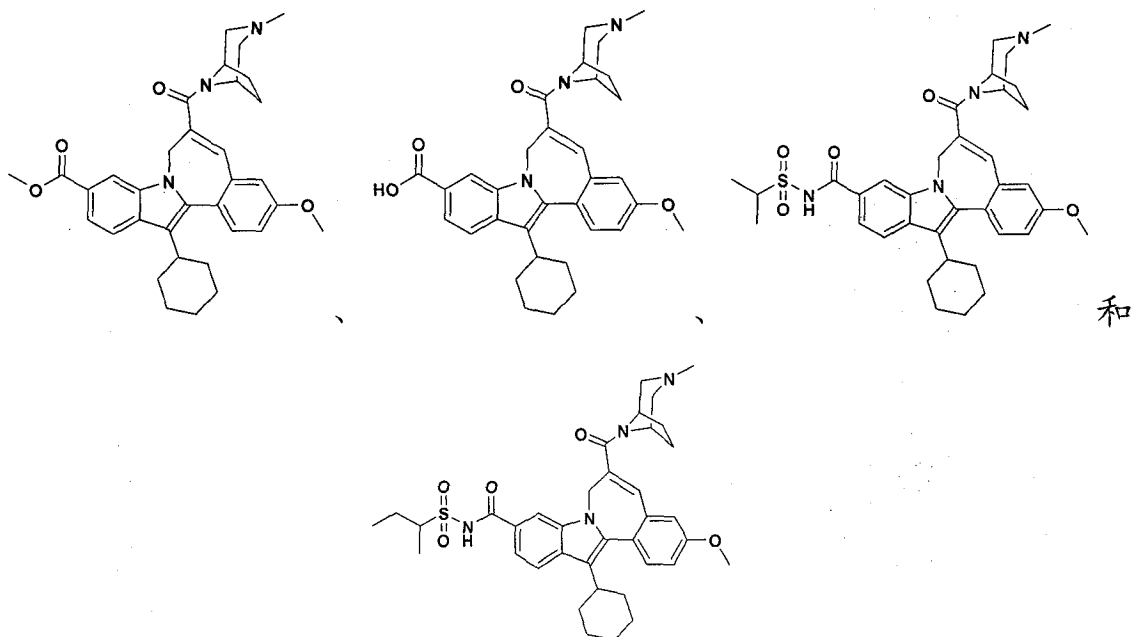
6. 权利要求 1 的化合物，其中 R^6 为 $(R^9)_2\text{NSO}_2-$

7. 权利要求 1 的化合物，其中虚线表示单键。

8. 权利要求 1 的化合物，其中虚线表示双键。

9. 权利要求 1 的化合物，其选自如下化合物或其可药用盐：





10. 一种组合物,其包含权利要求1的化合物或其可药用盐和可药用载体。

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、HCV NS4B 蛋白抑制剂、HCV 进入抑制剂、HCV 组装抑制剂、HCV 释放抑制剂、HCV NS5A 蛋白抑制剂、HCV NS5B 蛋白抑制剂和 HCV 复制子抑制剂。

12. 权利要求1的化合物在制备用于治疗丙型肝炎感染的药物中的用途。

13. 权利要求12的用途,其中所述化合物与至少一种额外的对 HCV 具有治疗益处的化合物联合,其中所述额外的对 HCV 具有治疗益处的化合物选自干扰素、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、HCV NS4B 蛋白抑制剂、HCV 进入抑制剂、HCV 组装抑制剂、HCV 释放抑制剂、HCV NS5A 蛋白抑制剂、HCV NS5B 蛋白抑制剂和 HCV 复制子抑制剂。

用于治疗丙型肝炎的化合物

[0001] 对相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2007 年 1 月 11 日提交的美国临时申请 60/884,459 的优先权。

背景技术

[0003] 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)。

[0004] 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可读框而编码所有已知的病毒专属性蛋白质。

[0005] 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。

[0006] 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。

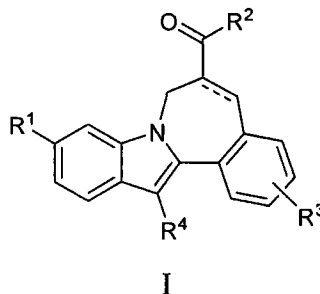
[0007] 目前,最有效的 HCV 疗法使用 α -干扰素和利巴韦林的组合,其在 40% 的患者中产生持续的效果 (Poynard, T. et al. Lancet 1998, 352, 1426-1432)。最新的临床结果证明,作为单一疗法,PEG 化的 α -干扰素优于未修饰的 α -干扰素 (Zeuzem, S. et al. N. Engl. J. Med. 2000, 343, 1666-1672)。然而,即使就涉及 PEG 化 α -干扰素和利巴韦林组合的实验性治疗方案而言,相当多的患者也没有出现病毒载量的持续减少。因此,就开发用于治疗

HCV 感染的有效疗法而言,存在明显和迫切的需要。

发明内容

[0008] 本发明一方面是式 I 化合物或其可药用盐:

[0009]



[0010] 其中

[0011] R^1 为 $-\text{CO}_2R^5$ 或 $-\text{CONR}^6R^7$;

[0012] R^2 为  或  ;

[0013] R^3 为氢、卤素、烷基、烯基、羟基、苄基氧基、烷氧基或卤代烷氧基;

[0014] R^4 为环烷基;

[0015] R^5 为氢或烷基;

[0016] R^6 为氢、烷基、烷基 SO_2- 、环烷基 SO_2- 、卤代烷基 SO_2- 、 $(R^9)_2\text{NSO}_2-$ 或 $(R^{10})\text{SO}_2-$;

[0017] R^7 为氢或烷基;

[0018] R^8 为氢、烷基、环烷基、(环烷基)烷基、烷基羰基、烷氧基羰基、苄基、苄基氧基羰基或吡啶基;

[0019] R^9 为氢或烷基;

[0020] R^{10} 为氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、N-(R^{11}) 哌嗪基 (N-(R^{11}) piperazinyl, N 上取代有 R^{11} 的哌嗪基)、吗啉基、硫吗啉基 (thiomorpholinyl)、高哌啶基 (homopiperidinyl) 或高吗啉基 (homomorpholinyl);

[0021] R^{11} 为氢或烷基;以及

[0022] 虚线表示单键或双键。

[0023] 本发明另一方面是式 I 化合物,其中 R^1 为 $-\text{CONR}^6R^7$; R^6 为烷基 SO_2- 、环烷基 SO_2- 、卤代烷基 SO_2- 、 $(R^9)_2\text{NSO}_2-$ 或 $(R^{10})\text{SO}_2-$;以及 R^7 为氢。

[0024] 本发明另一方面是式 I 化合物,其中 R^3 为氢。

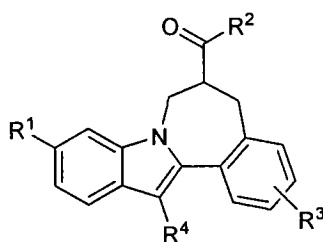
[0025] 本发明另一方面是式 I 化合物,其中 R^3 为甲氧基。

[0026] 本发明另一方面是式 I 化合物,其中 R^4 为环己基。

[0027] 本发明另一方面是式 I 化合物,其中 R^6 为 $(R^9)_2\text{NSO}_2-$ 或 $(R^{10})\text{SO}_2-$ 。

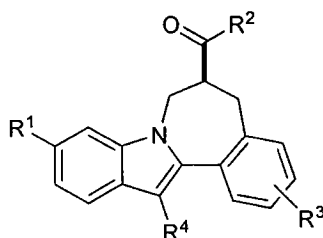
[0028] 本发明另一方面是式 I 化合物,其中如在下面结构式中那样,虚线表示单键。

[0029]



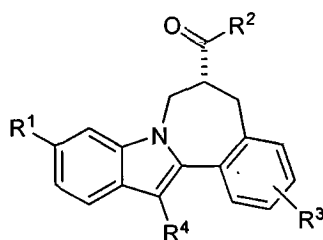
[0030] 本发明另一方面是式 I 化合物,其具有如下立体化学。

[0031]



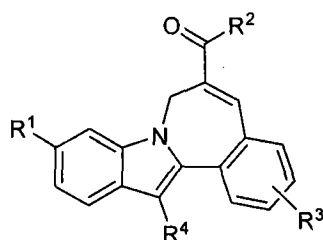
[0032] 本发明另一方面是式 I 化合物,其具有如下立体化合物。

[0033]



[0034] 本发明另一方面是式 I 化合物,其中如在下面结构式中那样,虚线表示双键。

[0035]



[0036] 任何变量 (包括 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和虚线) 的任何范围可独立与任何其它变量的范围一起使用。

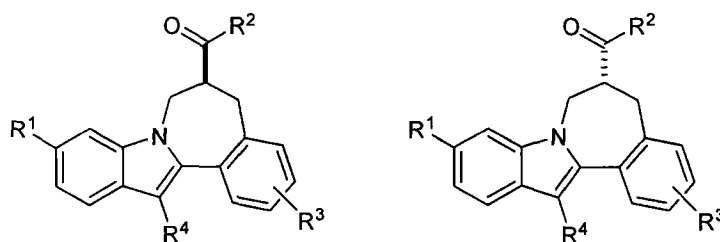
[0037] 除非另有说明,这些术语具有下述意义。“烷基”的意思是由 1 至 6 个碳所组成的直链或支链烷基。“烯基”的意思是由 2 至 6 个碳所组成且具有至少一个双键的直链或支链烷基。“环烷基”的意思是由 3 至 7 个碳所组成的单环环系。“羟基烷基”、“烷氧基”及具有经取代烷基部份的其它术语包括由针对所述烷基部份的 1 至 6 个碳原子所组成的直链与支链异构体。“卤代烷基”与“卤代烷氧基”包括所有卤化异构体,从单卤素取代的烷基至全卤素取代的烷基。“芳基”包括碳环芳族取代基与杂环芳族取代基。括号与多重括号术语意在向本领域技术人员阐明键合关系。例如,如 ((R) 烷基) 那样的术语指进一步被取代基 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 (xinofoate)。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具有不对称碳原子 (例如下文结构)。本发明包括所有立体异构形式, 包括对映异构体与非对映异构体以及立体异构体的混合物如外消旋体。一些立体异构体可使用本领域中已知的方法来制备。所述化合物的立体异构混合物与相关中间体的立体异构混合物可根据本领域中已知的方法来分离成单独的异构体。

[0040]



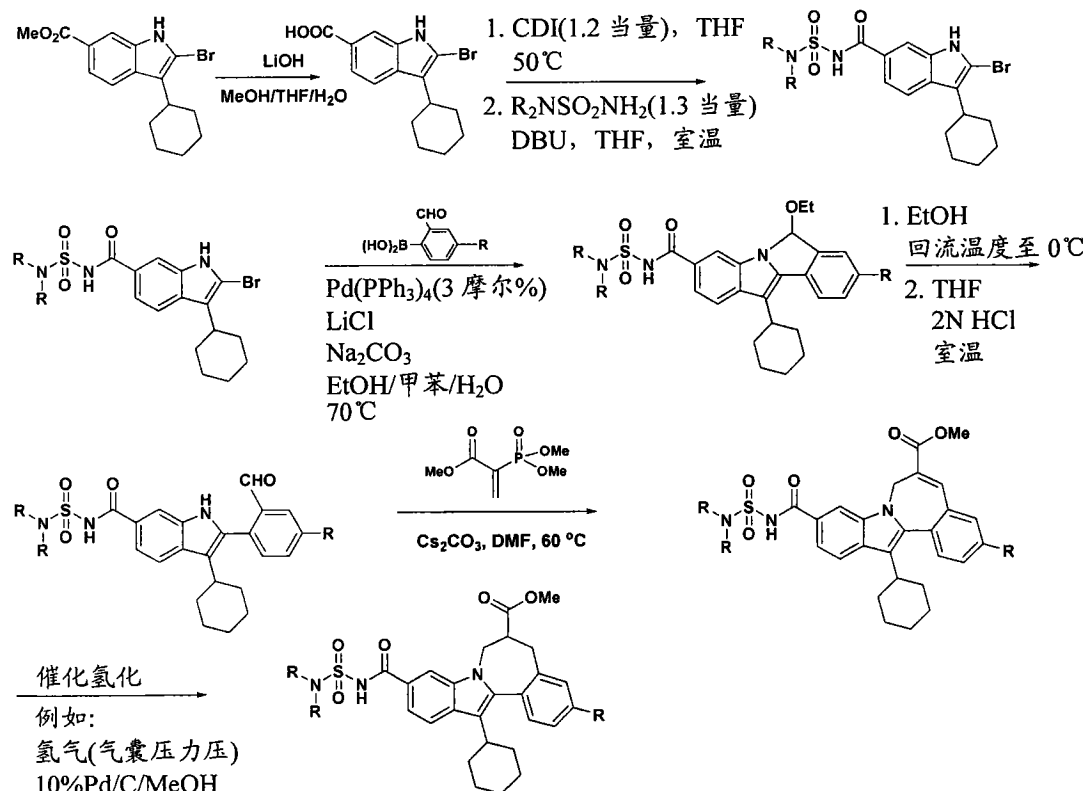
[0041] 合成方法

[0042] 所述化合物可通过本领域已知的方法 (包括如下所述的那些方法) 来制备。一些试剂和中间体在本领域中是已知的。其它试剂和中间体可通过本领域已知的方法使用商购原料来制备。用于描述化合物合成的变量 (例如所编号的“R”取代基) 仅意在说明如何制备, 而不应该与权利要求书中或本说明书其它段落中所使用的变量相混淆。方案中所使用的缩写通常符合本领域中所使用的惯用意义。

[0043] 可将 2- 溴 -3- 环己基 -1H- 咪唑 -6- 甲酸甲酯水解成 2- 溴 -3- 环己基 -1H- 咪唑 -6- 甲酸 (参见方案 1)。该化合物可使用例如 1,1'- 羰基二咪唑 (CDI) 及 1,8- 二氮杂二环 [5.4.0] 十一碳 -7- 烯 (DBU) 而在无水 THF (四氢呋喃) 中与各种磺酰脲 (sulfonyl urea) 缩合。所得到的酰基磺酰胺 (acyl sulfamide) 可使用例如苏楚基 (Suzuki) 偶联反应条件而与各种 2- 甲酰基苯基硼酸或 2- 甲酰基苯基硼酸酯进行已知的偶联反应, 从而得到所绘类型的环状半缩醛胺中间体 (cyclic hemiaminal intermediate)。可通过如下方式将这些化合物转化为咪唑并苯并氮杂萘衍生物: 这些化合物在 DMF (二甲基甲酰胺) 中用 2- (二甲氧基磷酰基) 丙烯酸甲酯在碳酸铯的影响下通过连续的迈克尔 (Michael) 反应和 HornerEmmons 反应进行处理。

[0044] 方案 1

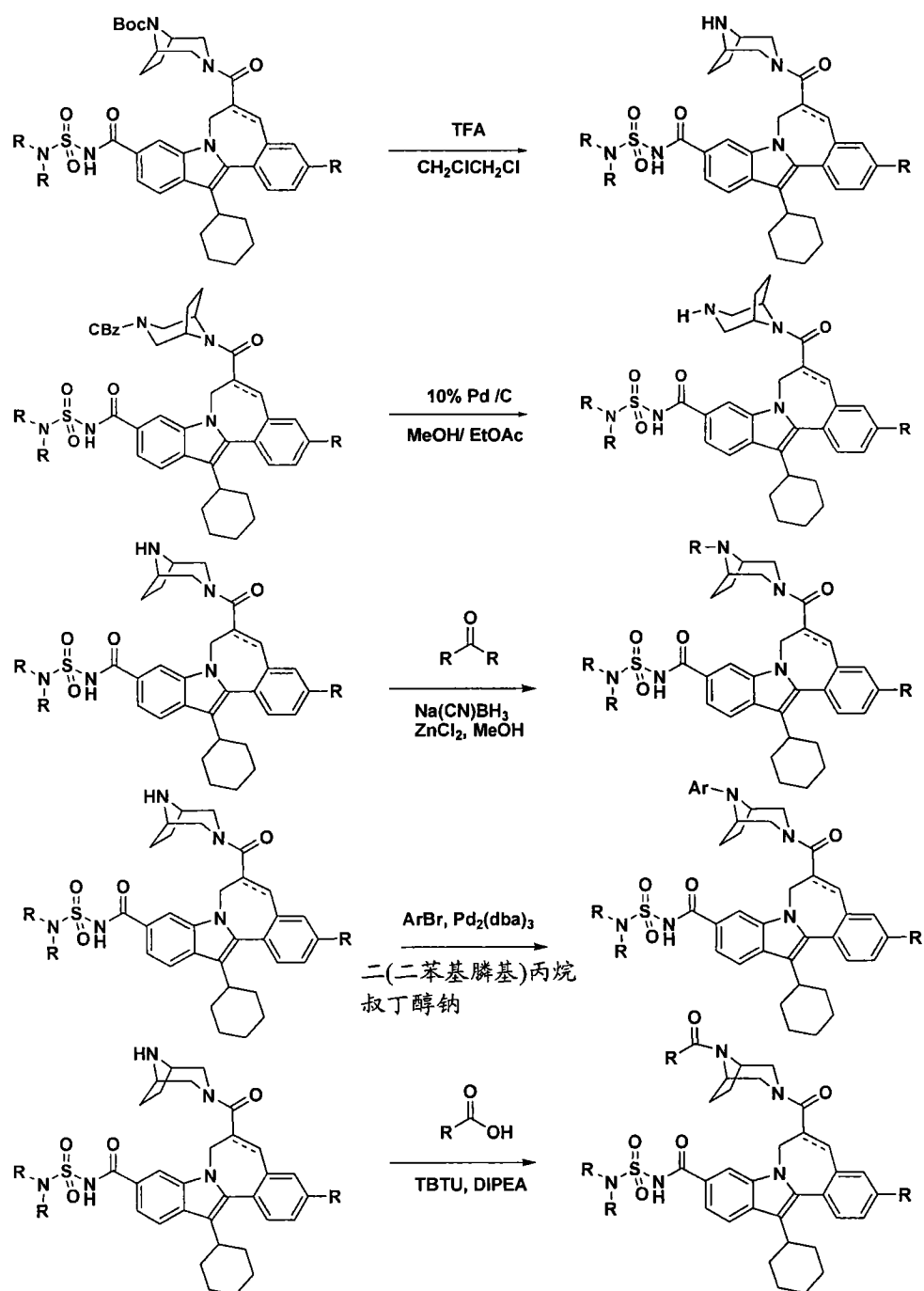
[0045]



[0046] 也可使 N 经保护的哌嗪与中间体吲哚并苯并氮杂萘酸偶联, 并且所得到的哌嗪甲酰胺可使用本领域已知的方法来进行脱保护和使用各种合成方案来进行衍生, 其中一些示例性实例如下所示 (参见方案 2)。

[0047] 方案 2

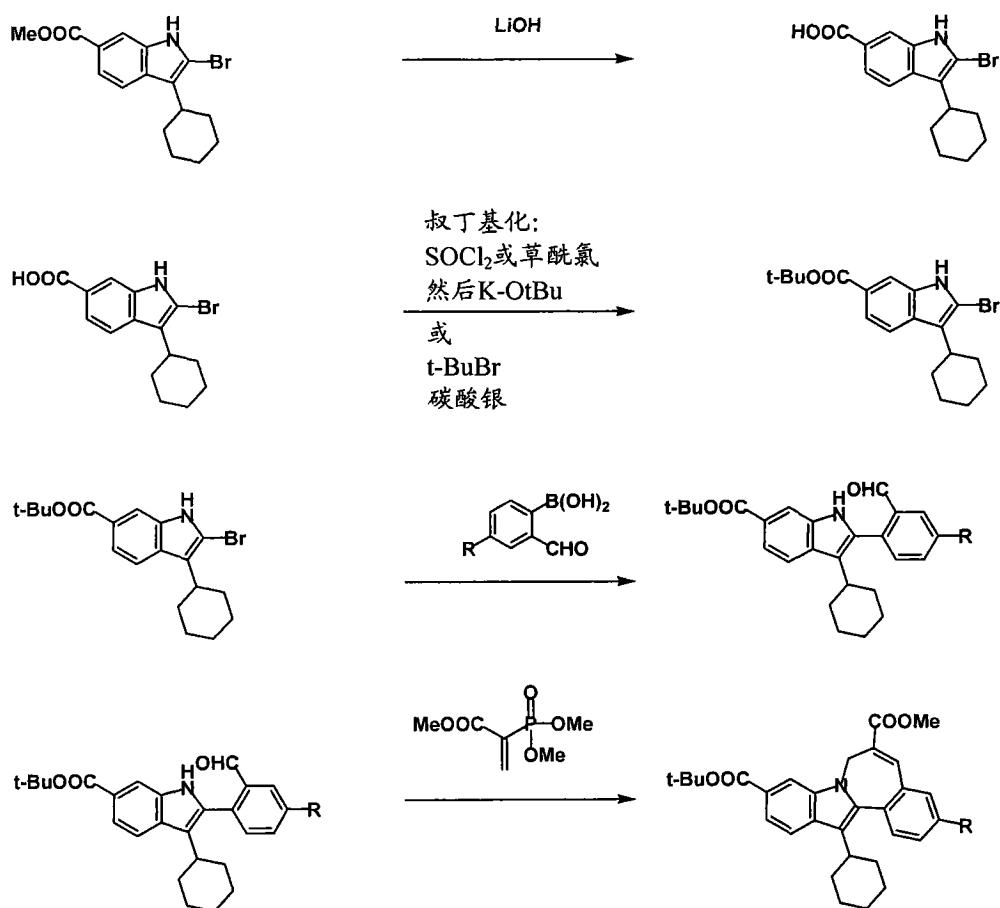
[0048]



[0049] 可用于合成本发明一些化合物的中间体涉及方案3所示的吡啶并苯并氮杂萘叔丁酯的制备。

[0050] 方案3

[0051]

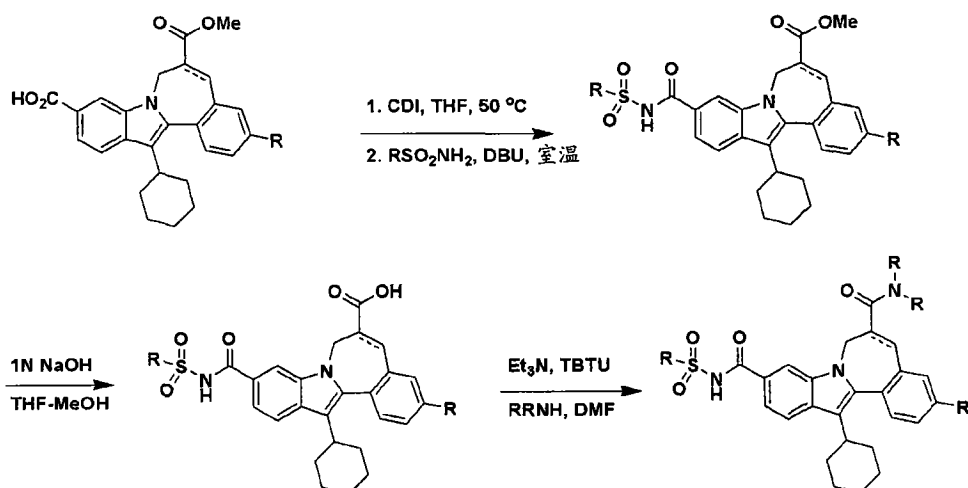


[0052] 该方法学涉及对所示吲哚甲酯进行碱催化水解,然后形成叔丁酯(例如与亚硫酸氯和叔丁醇钾反应或用碳酸银和叔丁基溴进行烷基化)。所得到的化合物使用与先前所概述相似的化学方法来进行转化,得到如上所示的吲哚并苯并氮杂萘的混合酯。

[0053] 这些中间体可用于如下可选择的方法,所述可选择的方法可如方案4所示用于制备酰基磺酰胺烷基桥接的哌嗪和酰基磺酰胺烷基桥接的哌嗪。叔丁酯基的断裂可产生酸,所述酸可与各种磺酰胺和磺酰脲偶联。随后进行水解,得到相关的脂肪酸,所述脂肪酸可与各种烷基桥接的哌嗪(alkyl-bridged piperazine)偶联。例如,0-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲-四氟硼酸盐和二异丙基乙胺于DMSO(二甲基亚砜)中的溶液可得到烷基桥接的哌嗪甲酰胺。

[0054] 方案4

[0055]



[0056] 生物学方法

[0057] 当在以下 HCV RdRp 检测中测定时,所述化合物展现了对抗 HCV NS5B 的活性。

[0058] 对 HCV NS5B RdRp 进行克隆、表达及纯化

[0059] 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。将所述蛋白质表达成截掉 C 末端的 18 个氨基酸 (the protein was expressed with an 18 amino acid C-terminal truncation) 以提高溶解度。大肠杆菌活力细胞系 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。

[0060] 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 MgCl₂、15 微克 / 毫升脱氧核糖核酸酶 I 及完全 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来使溶胞产物的等分液在冰上接受超声波处理。经超声处理的溶胞产物在 4°C 以 100,000 × g 离心 1 小时,并过滤经过 0.2 微米滤器单元 (Corning)。

[0061] 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 及 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需要而调整。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°C。

[0062] 标准 HCV NS5B RdRp 酶检测

[0063] 在 96 孔板 (Costar 3912) 中在最终体积为 60 微升的情况下进行 HCV RdRp 基因型 1b 检测。检测缓冲液由 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) 及 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 在检测中的最终浓度为 2%。HCV RdRp 基因型 1b 酶在最终浓度为 28nM 时使用。聚 A (polyA) 模板在 6nM 时使用,且生物素化的寡 dT12 引物在最终浓度为 180nM 时使用。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 μ Ci (0.29 μ M 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 RNQ 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。

[0064] 经修改的 HCV NS5B RdRp 酶检测

[0065] 经修改的酶检测基本上按照关于标准酶检测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检测缓冲液中混合,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 / 微升时用于检测。检测中的加入顺序如下: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 μ Ci, 0.29 μ M) 及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。

[0066] 化合物的 IC_{50} 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 IC_{50} 值。

[0067] FRET 检测制剂

[0068] 为了进行 HCV FRET 筛选检测,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。检测试剂如下制备:将得自 Promega (#E153A) 的 5 $\times$ 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 $\times$,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 μ M。

[0069] 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。

[0070] 检测

[0071] 加入上述测试化合物 (FRET 检测制剂) 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 肽检测试剂 (FRET 检测制剂) 而用于 FRET 检测。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,将板用于荧光素酶检测。

[0072] 通过对相对的 HCV 复制子抑制作用及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

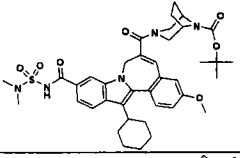
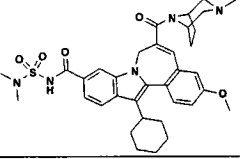
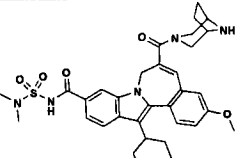
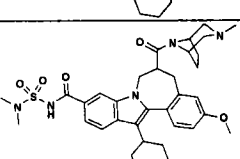
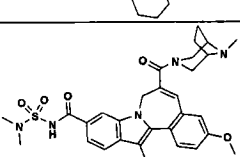
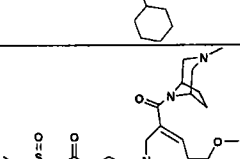
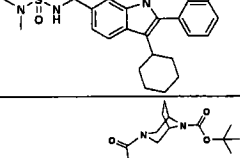
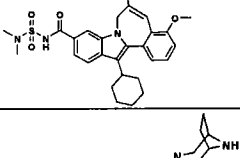
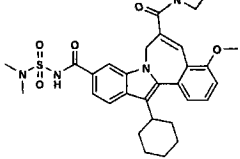
毒性百分比。为了计算 HCV 复制子抑制值,平均背景值得自在检测结束时含有最高量 HCV 蛋白酶抑制剂的两个孔。这些值类似于得自天然 Huh-7 细胞的那些值。

[0073] 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 EC_{50} 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。

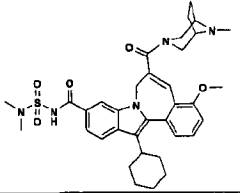
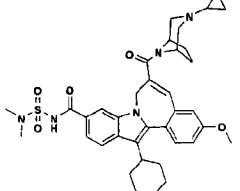
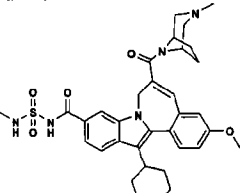
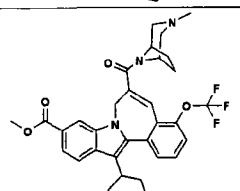
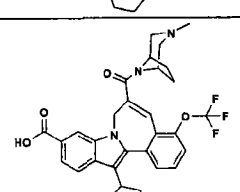
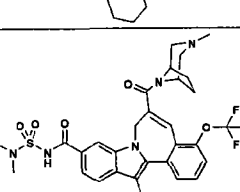
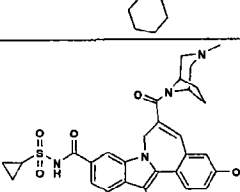
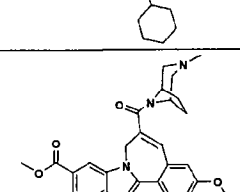
[0074] 化合物的代表性数据报道在表 1 中。

[0075] 表 1

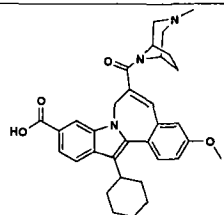
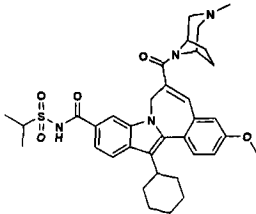
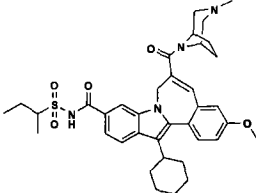
[0076]

结构	IC ₅₀	EC ₅₀
	B	B
	B	B
	B	B
	B	B
	B	B
	B	B
	B	B
	B	B
	B	B

[0077]

结构	IC ₅₀	EC ₅₀
	B	B
	C	B
	B	B
	A	A
	ND	ND
	A	A
	B	B
	A	A

[0078]

结构	IC ₅₀	EC ₅₀
	B	B
	B	B
	B	B

[0079] A > 0.5 μM; B 为 0.001 μM–0.5 μM; C < 0.02 μM, 但没有确定确切值。

[0080] 使用预孵育方案来确定 IC₅₀ 值; 使用 FRET 检测来确定 EC₅₀ 值。

[0081] 药物组合物和治疗方法

[0082] 所述化合物展现出对抗 HCV NS5B 的活性, 且可用于治疗 HCV 与 HCV 感染。因此, 本发明的另一个方面为一种组合物, 其包含本发明的化合物或其可药用盐及可药用载体。

[0083] 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。

[0084] 本发明的另一个方面为一种组合物, 其中具有抗 HCV 活性的化合物为干扰素。在本发明的另一个方面, 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 及淋巴细胞样干扰素 τ。

[0085] 本发明的另一个方面为一种组合物, 其中具有抗 HCV 活性的化合物为环孢菌素。在本发明的另一个方面, 所述环孢菌素为环孢菌素 A。

[0086] 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、金刚烷胺及金刚乙胺。

[0087] 本发明的另一个方面为一种组合物, 其中具有抗 HCV 活性的化合物可有效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)、IMPDPH 及核苷类似物 (nucleoside analog)。

[0088] 本发明的另一个方面为一种组合物, 其包含本发明的化合物或其可药用盐、可药用载体、干扰素及利巴韦林。

[0089] 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 化合物或其可药用盐接触。

[0090] 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 化合物或其可药用盐接触。

[0091] 本发明的另一个方面为治疗患者中 HCV 感染的方法,其包括向所述患者给予治疗有效量的本发明化合物或其可药用盐。本发明的另一个方面是抑制 HCV 复制子功能的方法。本发明的另一个方面是抑制 HCV NS5B 蛋白功能的方法。

[0092] 本发明的另一个方面为治疗患者中 HCV 感染的方法,其包括向所述患者给予治疗有效量的本发明化合物或其可药用盐,并且给予(之前、之后或同时)另一种具有抗 HCV 活性的化合物。

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

[0094] 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 及淋巴细胞样干扰素 τ 的方法。

[0095] 本发明的另一个方面为其中其它具有抗 HCV 活性的化合物为环孢菌素的方法。

[0096] 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。

[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、金刚烷胺及金刚乙胺的方法。

[0098] 本发明的另一个方面为其中其它具有抗 HCV 活性的化合物可有效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、HCV NS5A 蛋白质、IMPDH 及核苷类似物。

[0099] 本发明的另一个方面为其中其它具有抗 HCV 活性的化合物可有效抑制 HCV 生命循环中的靶标而非 HCV NS5B 蛋白的功能的方法。

[0100] “治疗有效”的意思是提供有意义的患者益处所需要的药物量,如肝炎与 HCV 感染领域中的执业医师所理解的那样。

[0101] “患者”的意思是被 HCV 病毒感染且适于治疗的人们,如肝炎与 HCV 感染领域中的执业医师所理解的那样。

[0102] “治疗”、“疗法”、“给药方案”、“HCV 感染”及相关术语如肝炎与 HCV 感染领域中的执业医师所理解的那样来使用。

[0103] 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本发明化合物或其可药用盐及可药用载体,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。可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、锭剂与粉末剂以及液体混悬剂、糖浆剂、酏剂及溶液剂。组合物使用一般制剂技术来制备,且常规的赋形剂(诸如粘合剂与润湿剂)与介质(诸如水与醇)通常用于组合物。

[0104] 固体组合物通常被配制成药量单位,且每份剂量提供约 1 至 1000 毫克活性成份的组合物是优选的。剂量的一些实例为 1 毫克、10 毫克、100 毫克、250 毫克、500 毫克及 1000 毫克。一般而言,其它药物可按与临床上所使用的经典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。

[0105] 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 1-100 毫克 / 毫升。剂量的一些实例为 1 毫克 / 毫升、10 毫克 / 毫升、25 毫克 / 毫升、50 毫克 / 毫升及 100 毫克 / 毫升。一般而言,其它药物可按与临床上所使用的经典单位范围相似的单位范围存在。典型地,其为 1-100 毫克 / 毫升。

[0106] 本发明涵盖所有常规的给药模式,且口服方法与肠胃外方法是优选的。一般而言,给药方案可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,具体的给药方案可由医师通过合理的医药判断来确定。

[0107] 本发明也涵盖在组合疗法中给予所述化合物的方法。即所述化合物可与可用于治疗肝炎及 HCV 感染的其它药物一起使用,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,所述化合物通常可搭配其它药物而以每日 1-100 毫克 / 公斤体重的每日剂量来给予。其它药物一般可按治疗上所使用的量来给予。然而,具体的给药方案可由医师通过合理的医药判断来确定。

[0108] 适于组合物及方法的化合物的一些实例列在表 2 中。

[0109] 表 2

[0110]

商品名	抑制剂的类型或靶标的类型	来源公司
Omega IFN	IFN- ω	Intarcia Therapeutics
BILN-2061	丝氨酸蛋白酶抑制剂	BoehringerIngelheim 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
Albuferon- 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
JTK-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

[0111]

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	利巴韦林前药	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Heptazyme	核酶	Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, CO

商品名	抑制剂的类型或靶标的类型	来源公司
IntronA	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
Rebavirin	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
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
Batabulin(T67)	β - 微管蛋白抑制剂	Tularik Inc., South San Francisco, CA
Merimepodib (VX-497)	IMPDH 抑制剂	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA
Telaprevir (VX-950, LY-570310)	NS3 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-6865 (XTL-002)	单克隆抗体	XTL Biopharmaceuticals Ltd., Rehovot, Isreal
HCV-796	NS5B 复制酶抑制剂	Wyeth/Viropharma
NM-283	NS5B 复制酶抑制剂	Idenix/Novartis
GL-59728	NS5B 复制酶抑制剂	Gene Labs/Novartis
GL-60667	NS5B 复制酶抑制剂	Gene Labs/Novartis
2' C MeA	NS5B 复制酶抑制剂	Gilead
PSI 6130	NS5B 复制酶抑制剂	Roche
R1626	NS5B 复制酶抑制剂	Roche

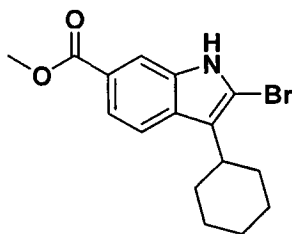
SCH 503034	丝氨酸蛋白酶抑制剂	Schering Plough
NIM811	亲环蛋白抑制剂	Novartis
Suvus	亚甲基蓝	Bioenvision
Multiferon	长效 (long lasting) IFN	Viragen/Valentis
Actilon (CPG10101)	TLR9 激动剂	Coley
Interferon- β	干扰素 - β - la	Serono
Zadaxin	免疫调节剂	Sciclone
来自 W0 2005047288 的吡啶并嘧啶化合物 和盐	HCV 抑制剂	Arrow Therapeutics Ltd.
2' C 甲基腺苷	NS5B 复制酶抑制剂	Merck
GS-9132 (ACH-806)	HCV 抑制剂	Achillion/Gilead

具体实施方式

[0112] 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；起始浓度：0% B，除非另有说明；洗脱剂 A：5% CH₃CN/95% H₂O（含有 10mM NH₄OAc（乙酸铵））（对于柱 A、D 和 E），10% MeOH/90% H₂O（含有 0.1% TFA（三氟乙酸））（对于柱 B 和 C）；洗脱剂 B：95% CH₃CN/5% H₂O（含有 10mM NH₄OAc）（对于柱 A、D 和 E），90% MeOH/10% H₂O（含有 0.1% TFA）（对于柱 B 和 C）；柱 A：Phenomenex 10 μ 4.6 $\times$ 50mm C18；柱 B：Phenomenex C18 10 μ 3.0 $\times$ 50mm；柱 C：Phenomenex 4.6 $\times$ 50mm C18 10 μ ；柱 D：Phenomenex Lina C18 5 μ 3.0 $\times$ 50mm；柱 E：Phenomenex 5 μ 4.6 $\times$ 50mm C18。制备性 HPLC 数据。梯度：历时 20 分钟线性变化，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：5% CH₃CN/95% H₂O（含有 10mM NH₄OAc）；洗脱剂 B：95% CH₃CN/5% H₂O（含有 10mM NH₄OAc）；柱：Sunfire Prep C₁₈ OBD 5 μ 30 $\times$ 100mm。

[0113] 中间体 1

[0114]

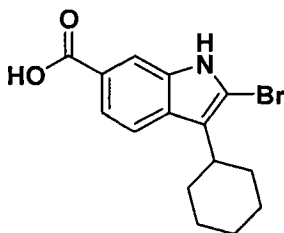


[0115] 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯

[0116] 在 2℃ 将新重结晶的三溴化吡啶鎓 (pyridinium tribromide)（在热 AcOH（乙酸）（5mL/1g）中重结晶，用冷 AcOH 冲洗，并在高真空下用 KOH 干燥）逐份（历时 10 分钟）加到搅拌的 3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯（60g, 233mmol）（使用在 W02004/065367 中描述的方法来制备）于 CHCl₃/THF（四氢呋喃）（1 : 1, 1.25L）中的溶液中。将反应溶液在 0–5℃ 搅拌 2.5 小时，并用饱和 NaHSO₃ 水溶液（1L）、1N HCl（1L）和盐水（1L）洗涤。干燥（MgSO₄）有机层并浓缩。将所得红色油状物用 Et₂O（乙醚）稀释并浓缩。将所得粉色固体溶解在 Et₂O（200mL）中，用己烷（300mL）处理并部分浓缩。过滤收集固体，用己烷冲洗。将母液浓缩至干，并重复上述操作。合并固体，得到 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯（64g, 190mmol, 82%），其为蓬松粉色固体，所述固体不经进一步纯化即使用。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.47 (宽单峰, 1H), 8.03 (d, J = 1.4Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 1.4, 8.8Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.8Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.82 (tt, J = 3.7, 11.7Hz, 1H), 1.98–1.72 (m, 7H), 1.50–1.27 (m, 3H)。¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 168.2, 135.6, 130.2, 123.1, 120.8, 120.3, 118.7, 112.8, 110.7, 52.1, 37.0, 32.2 (2), 27.0 (2), 26.1。LCMS : m/e 334 (M-H)⁺, 保留时间：3.34 分钟，柱 A, 4 分钟梯度。

[0117] 中间体 2

[0118]



[0119] 2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-甲酸

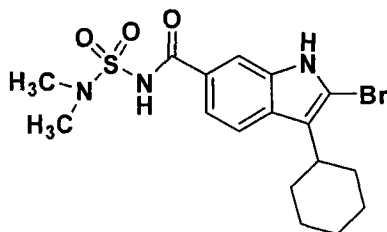
[0120] 将2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-甲酸甲酯(20g, 60mmol)和LiOH(3.8g, 160mmol)于MeOH/THF/H₂O(1 : 1 : 1, 300mL)中的溶液在90℃加热2小时。反应混合物在冰/水浴中冷却,用浓度为1M的HCl溶液(约160mL)中和,用水(250mL)稀释,并在室温搅拌1小时。过滤收集沉淀物,用水冲洗,干燥,得到2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-甲酸(定量),其不经进一步纯化即使用。

[0121] 可用来提供2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-甲酸的可选择方法如下所述。

[0122] 将2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-甲酸甲酯(117g, 349mmol)和LiOH·H₂O(26.4g, 629mmol)于MeOH/THF/H₂O(1 : 1 : 1, 1.8L)中的溶液回流加热3小时。将反应混合物在冰/水浴中冷却至约2℃,用1M HCl(约650mL)中和(加入速度使温度不超过5℃),用水(1L)稀释,并搅拌,同时温热至环境温度。过滤收集沉淀物,用水冲洗,干燥,得到2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-甲酸的单THF溶剂化物(135.5g, 345mmol, 99%),其为黄色固体,所述固体不经进一步纯化即使用。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 11.01(宽单峰, 1H), 8.77(s, 1H), 8.07(d, J = 1.5Hz, 1H), 7.82(dd, J = 1.5, 8.8Hz, 1H), 7.72(d, J = 8.8Hz, 1H), 3.84-3.74(m, 4H), 2.89(m, 1H), 1.98-1.72(m, 11H), 1.50-1.24(m, 3H)。¹³CNMR(75MHz, CDCl₃) δ 172.7, 135.5, 130.7, 122.3, 120.9(2), 118.8, 113.3, 111.1, 67.9(2), 37.0, 32.2(2), 27.0(2), 26.1, 25.5(2)。LCMS :m/e 320 (M-H)⁻, 保留时间 :2.21 分钟, 柱A, 4 分钟梯度。

[0123] 中间体 3

[0124]



[0125] 2-溴-3-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-1H-吡啶-6-甲酰胺

[0126] 在22℃将1,1'-羰基二咪唑(1.17g, 7.2mmol)加到搅拌的2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-甲酸(2.03g, 6.3mmol)于THF(6mL)中的溶液中。立即有CO₂放出,当放出减慢时,将溶液在50℃加热1小时,然后冷却到22℃。加入N,N-二甲基硫酰胺(0.94g, 7.56mmol),然后滴加DBU(1.34g, 8.8mmol)于THF(4mL)中的溶液。继续搅拌24小时。将混合物在乙酸乙酯和稀HCl之间分配。乙酸乙酯层先后用水和盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥。将萃取物浓缩至干,留下标题化合物,其为浅黄色易碎泡沫状物(2.0g, 74%, 通过NMR估计纯度>90%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-D₆) δ ppm 1.28-1.49(m, 3H) 1.59-2.04(m, 7H) 2.74-2.82(m, 1H) 2.88(s, 6H) 7.57(dd, J = 8.42, 1.46Hz, 1H) 7.74(d, J = 8.78Hz, 1H) 7.91(s, 1H) 11.71(s, 1H) 12.08(s, 1H)。

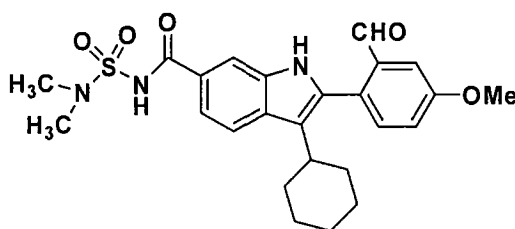
[0127] 制备2-溴-3-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-1H-吡啶-6-甲酰胺的可选择方法描述如下。

[0128] 在氮气气氛下向配备有机械搅拌器、温度控制器、氮气进口和冷凝器的1L四颈圆底烧瓶中加入2-溴-3-环己基-1H-吡啶-6-甲酸(102.0g, 0.259摩尔)和无水THF(300mL)。搅拌10分钟后,逐份加入CDI(50.3g, 0.31摩尔)。然后将反应混合物加热

至 50℃ 并保持 2 小时。冷却到 30℃ 后,一次性加入 N,N-二甲基氨基磺酰胺 (41.7g, 0.336 摩尔),然后历时 1 小时滴加 DBU (54.1mL, 0.362 摩尔)。然后将反应混合物在室温搅拌 20 小时。真空除去溶剂,将残余物在 EtOAc (乙酸乙酯) 和 1N HCl (1 : 1, 2L) 之间分配。分离有机层,水层用 EtOAc (500mL) 萃取。合并的有机层用盐水 (1.5L) 洗涤并用 MgSO₄ 干燥。过滤溶液,真空浓缩,得到粗产物 (111.0g)。在 60℃ 将粗产物悬浮在 EtOAc (400mL) 中。向悬浮液中缓慢加入庚烷 (2L)。搅拌所得悬浮液并冷却到 0℃。然后对其进行过滤。滤饼用少量庚烷冲洗,并真空风干 (house vacuum air dried) 2 天。收集产物,其为白色固体 (92.0g, 83%)。¹H NMR (MeOD, 300MHz) δ 7.89 (s, H), 7.77 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 8.4 和 1.8Hz, 1H), 3.01 (s, 6H), 2.73-2.95 (m, 1H), 1.81-2.05 (m, 8H), 1.39-1.50 (m, 2H); m/z 429 (M+H)⁺。

[0129] 中间体 4

[0130]



[0131] 3-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-2-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)-1H-吲哚-6-甲酰胺

[0132] 将 2-溴-3-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-1H-吲哚-6-甲酰胺 (4.28g, 0.01 摩尔)、4-甲氧基-2-甲酰基苯基硼酸 (2.7g, 0.015 摩尔)、2-二环己基膦基-2',6'-二甲氧基-联苯 (41mg, 0.0001 摩尔)、乙酸钯 (11.2mg) 和微细研磨的碳酸钾 (4.24g, 0.02 摩尔) 于甲苯 (30mL) 中的混合物在氮气气氛下回流搅拌 30 分钟,此时 LC/MS 分析显示反应完成。然后反应混合物用乙酸乙酯和水稀释,然后用过量稀 HCl 酸化。然后收集乙酸乙酯层,用稀 HCl、水和盐水洗涤。然后干燥 (硫酸镁) 有机溶液,过滤并浓缩,得到胶状物。胶状物用己烷 (250mL) 和乙酸乙酯 (25mL) 稀释,并将混合物在 22℃ 搅拌 20 小时,在此期间产物转化成亮黄色颗粒状固体 (4.8g),所述固体不经进一步纯化即使用。

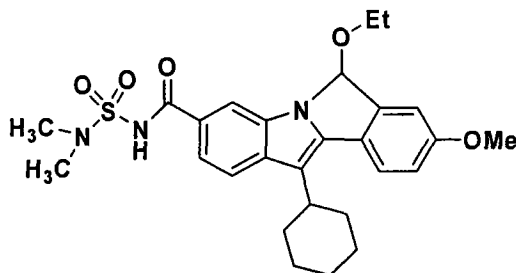
[0133] 制备 3-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-2-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)-1H-吲哚-6-甲酰胺的可选择方法如下提供。

[0134] 向浆化的 2-溴-3-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-吲哚-6-甲酰胺 (54.0g, 126mmol)、4-甲氧基-2-甲酰基苯基硼酸 (29.5g, 164mmol) 和 LiCl (13.3g, 315mmol) 于 EtOH (乙醇)/甲苯 (1 : 1, 1L) 中的溶液中加入 Na₂CO₃ (40.1g, 379mmol) 的水 (380mL) 溶液。将反应混合物搅拌 10 分钟,然后加入 Pd(PPh₃)₄ (四(三苯基膦)钯) (11.3g, 10.0mmol)。反应溶液用氮气冲洗,并在 70℃ (内部监测) 加热过夜,然后冷却至室温。反应混合物用 EtOAc (1L) 和 EtOH (100mL) 稀释,用 1N HCl 水溶液 (1L) 和盐水 (500mL) 小心洗涤,干燥 (MgSO₄),过滤并浓缩。将残余固体与 Et₂O (乙醚) (600mL) 一起搅拌 1 小时,过滤收集,得到 3-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-2-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)-1H-吲哚-6-甲酰胺 (52.8g, 109mmol, 87%),其为黄色粉末,所述粉末不经进一步纯化即使用。¹H NMR (300MHz, d6-DMSO) δ 11.66 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.75 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.74 (d, J = 8.4Hz, 1H),

7.59 (dd, $J = 1.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.23–7.16 (m, 2H), 7.08 (dd, $J = 2.6, 8.4$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.22–3.08 (m, 1H), 2.91 (s, 6H), 2.00–1.74 (m, 7H), 1.60–1.38 (m, 3H)。 ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 165.7, 158.8, 147.2, 139.1, 134.3, 132.0, 123.4, 122.0, 119.2, 118.2, 114.8, 112.3, 110.4, 109.8, 79.6, 45.9, 37.2 (2), 34.7, 32.0 (2), 25.9 (2), 24.9。LCMS: m/e 482 ($\text{M}-\text{H}$)⁻, 保留时间: 2.56 分钟, 柱 A, 4 分钟梯度。

[0135] 中间体 5

[0136]



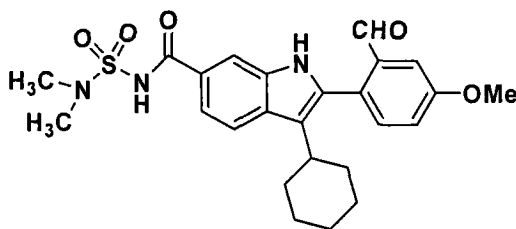
[0137] 11-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-6-乙氧基-8-甲氧基-6H-异吲哚并[2,1-a]吲哚-3-甲酰胺

[0138] 向配备有温度控制器、冷凝器、氮气进口和机械搅拌器的 5L 四颈圆底烧瓶中加入甲苯 (900mL)、EtOH (900mL)、2-溴-3-环己基-N-(N,N-二甲基氨磺酰基)-1H-吲哚-6-甲酰胺 (90g, 0.21 摩尔)、2-甲酰基-4-甲氧基苯基硼酸 (49.2g, 0.273 摩尔) 和 LiCl (22.1g, 0.525 摩尔)。所得溶液用氮气鼓泡 15 分钟。加入 Na_2CO_3 (66.8g, 0.63 摩尔) 的水 (675mL) 溶液, 并且反应混合物用氮气再鼓泡 10 分钟。加入 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.0g, 6.3mmol), 将反应混合物加热至 70℃ 并保持 20 小时。冷却至 35℃ 后, 缓慢加入 1N HCl 溶液 (1.5L)。将所得混合物转移到 6L 分液漏斗中, 用 EtOAc (2×1.5L) 萃取。合并的有机萃取物用盐水 (2L) 洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 过滤并真空浓缩, 得到黄色固体, 所述黄色固体用 20% EtOAc/己烷 (450mL, 50℃ 至 0℃) 研磨, 得到 3-环己基-N-(N,N-二甲基氨磺酰基)-2-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)-1H-吲哚-6-甲酰胺 (65.9g), 其为黄色固体。HPLC 纯度为 98%。

[0139] 将来自研磨的母液真空浓缩。残余物与 EtOH (50mL) 回流 3 小时。然后将溶液冷却至 0℃。过滤沉淀物, 用经冷却的 TBME (叔丁基甲基醚) (5℃) (20mL) 洗涤。将滤饼真空风干, 得到额外量的标题化合物, 其为白色固体 (16.0g)。HPLC 纯度为 99%。 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ 8.75 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 8.4$ 和 1.4 Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 8.4$ 和 2.2 Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.05 (s, 6H), 2.92–3.13 (m, 3H), 1.85–1.93 (m, 7H), 1.40–1.42 (m, 3H), 1.05 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)。 m/z 512 ($\text{M}+\text{H}$)⁺。

[0140] 中间体 6

[0141]

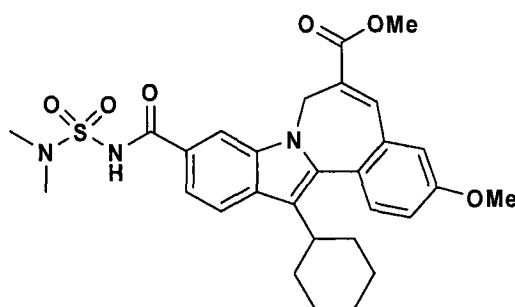


[0142] 3-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-2-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)-1H-吡啶-6-甲酰胺

[0143] 将 11-环己基-N-(N,N-二甲基氨基磺酰基)-6-乙氧基-8-甲氧基-6H-异吡啶并[2,1-a]吡啶-3-甲酰胺溶解在 THF (75mL) 中。向溶液中加入 2N HCl 溶液 (300mL)。在室温将混合物在氮气气氛下剧烈搅拌 16 小时。过滤所得悬浮液,用经冷却的 TBME (2×30mL) 洗涤。将滤饼真空风干 (vacuum dry) 过夜,得到标题化合物,其为黄色固体。HPLC 纯度为 99%。¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz) δ 11.65 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.76 (d, J = 5.9Hz, 1H), 7.73 (d, J = 5.9Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 8.5 和 1.5Hz, 1H), 7.17-7.20 (m, 2H), 7.08 (dd, J = 8.5 和 1.4Hz, 1H), 6.55 (d, J = 8.6Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.14-3.18 (m, 1H), 2.91 (s, 6H), 1.75-1.99 (m, 7H), 1.48-1.60 (m, 3H); m/z 484 (M+H)⁺。

[0144] 中间体 7

[0145]



[0146] 13-环己基-10-[[[(二甲基氨基)磺酰基]氨基]羰基]-3-甲氧基-7H-吡啶并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-6-甲酸甲酯

[0147] 将 3-环己基-N-(N,N-二甲基氨基磺酰基)-2-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)-1H-吡啶-6-甲酰胺 (4.8g, 0.01 摩尔)、2-(二甲氧基磷酰基)丙烯酸甲酯 (9.7g, 0.02 摩尔) 和碳酸铯 (7.1g, 0.02 摩尔) 于 DMF (28mL) 中的混合物在油浴温度 55℃ 搅拌 20 小时。将混合物倒入冰-水中并用稀 HCl 酸化,从而使粗产物沉淀。收集固体,干燥并进行硅胶 (110g) 快速色谱 (使用含有 2% 乙酸的乙酸乙酯和二氯甲烷 (1 : 10) 溶液)。合并均一的馏分 (homogeneous fraction) 并蒸发,得到标题化合物,其为浅黄色固体 (3.9g, 71% 收率)。MS : 552 (M = H⁺)。

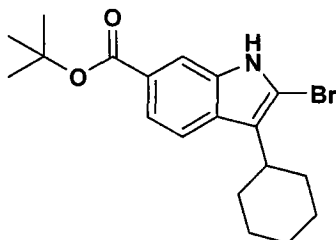
[0148] 制备 13-环己基-10-[[[(二甲基氨基)磺酰基]氨基]羰基]-3-甲氧基-7H-吡啶并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-6-甲酸甲酯的可选择方法如下提供。

[0149] 将 11-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-6-羟基-8-甲氧基-6H-异吡啶并[2,1-a]吡啶-3-甲酰胺 (环状半缩醛胺) (63.0g, 130mmol)、2-(二甲氧基磷酰基)丙烯酸甲酯 (60g, 261mmol)、碳酸铯 (106g, 326mmol) 于 DMF (400mL) 中的溶液在 60℃ (浴温) 加热 4.5 小时。加入额外的 2-(二甲氧基磷酰基)丙烯酸甲酯 (15g, 65mmol) 和碳酸铯 (21.2g, 65mmol), 将反应混合物在 60℃ 加热过夜, 然后冷却至室温。搅拌的反应混合物用 H₂O (1L) 稀释, 用 1N HCl 水溶液 (800mL) 缓慢中和, 搅拌 3 小时, 然后过滤收集沉淀物。固体用 Et₂O (800mL) 研磨, 干燥, 得到 13-环己基-10-[[[(二甲基氨基)磺酰基]氨基]羰基]-3-甲氧基-7H-吡啶并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-6-甲酸甲酯 (70.2g, 127mmol, 98%), 其为黄色固体, 所述固体不经进一步纯化即使用。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.67 (s,

1H), 8.09 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.08 (dd, $J = 2.6, 8.8$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.75–5.51 (m, 1H), 4.29–4.01 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.05 (s, 6H), 2.87–2.73 (m, 1H), 2.11–1.12 (m, 10H)。LCMS :m/e 550 (M-H)⁻, 保留时间 :3.21 分钟, 柱 A, 4 分钟梯度。

[0150] 中间体 8

[0151]

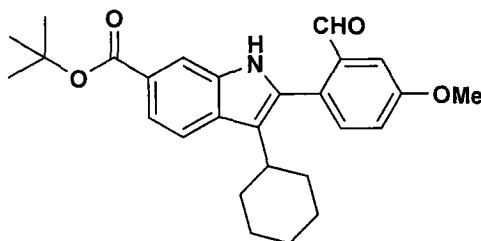


[0152] 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸(1,1-二甲基乙基)酯

[0153] 向机械搅拌的 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸(80g, 0.24mmol) 于无水二氯甲烷(1.2L) 和 THF(100mL) 中的溶液中加入活化的分子筛(4Å, 80g) 和碳酸银(275g, 0.99mmol)。将反应混合物冷却至 0℃, 滴加叔丁基溴(142g, 1.04mmol)。将混合物在室温搅拌过夜, 通过 TLC(己烷-乙酸乙酯 80 : 20, R_f (产物) = 0.7) 进行监测。如果留有任何溴代酸未发生转化, 则加入额外的 10% 碳酸银, 并再继续机械搅拌 2-4 小时。结束后, 将反应混合物过滤通过薄的硅藻土床。过滤介质(filtrand) 用二氯甲烷(500mL) 洗涤。真空浓缩合并的滤液, 由此得到的粗产物通过硅胶色谱(230-400 目)(用 0-2% 乙酸乙酯/石油醚的梯度进行洗脱) 进行纯化。合并均一的馏分, 减压蒸发, 得到 80g(85%) 标题化合物。HPLC :90.1% (RT = 6.56 分钟), 柱 :C18BDS, (50×4.6mm), 流动相 :0.1% TFA/ 水 :ACN(30 → 100 → 30) 的梯度, 流速 :0.8mL/ 分钟。LCMS :99.8% (RT = 4.44min), 柱 :Geneis, C1850×4.6mm, 流动相 :0.1% 甲酸/ 水 :ACN(70 → 95 → 70) 的梯度, 流速 :0.8mL/ 分钟, $M-1 = 376.5$ 。¹HNMR(CDCl₃) (400MHz) δ 1.37–1.40 (m, 3H, 环己基), 1.62 (s, 9H, 叔丁基), 1.80–1.94 (两组多重峰, 分别是 3H 和 4H, 环己基部分), 2.81 (m, 1H, 环己基-苯甲酰基的 CH(CH of cyc. Hexyl-benzylic)), 7.70–7.75 (m, 2H, 吲哚-H₄ 和 H₅), 8.04 (s, 1H, 吲哚-H₇), 8.52 (s, 1H, 吲哚-NH)。

[0154] 中间体 9

[0155]



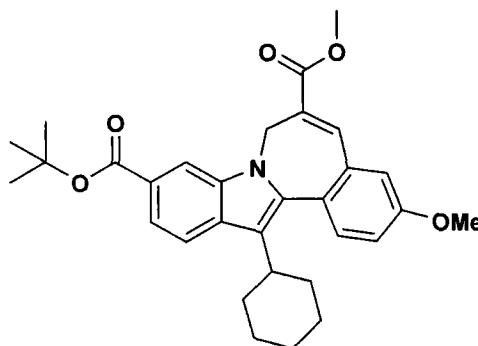
[0156] 3-环己基-2-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)-1H-吲哚-6-甲酸(1,1-二甲基乙基)酯

[0157] 将 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸叔丁酯(72g, 0.19mmol) 溶解在甲苯和乙醇的 1 : 1 混合物(720mL) 中并脱气。然后加入 LiCl(23.9g, 0.51mmol), 接着加入碳酸钠(720mL, 经单独脱气的浓度为 1.0M 的溶液) 和 Pd-tetrakis(13.1g, 0.011mmol)。搅拌 0.25

小时后,加入 2-甲酰基-4-甲氧基苯基硼酸(41.1g,0.22mmol),将反应混合物加热至 85℃ 并保持 4 小时。然后通过 TLC(己烷-乙酸乙酯 80 : 20, R_f (产物) = 0.55) 监测反应。结束后,将反应混合物冷却至室温,加入水(1.0L),然后加入乙酸乙酯(1.0L)。有机层用盐水洗涤,干燥并真空浓缩,得到标题化合物,其为黄色固体。收率:75g(74%)。HPLC:99.7% (RT = 6.30min),柱:C18BDS(4.6×50mm),SC-307,流动相:0.1% TFA/水:ACN(30 → 100 → 30) 的梯度,流速:0.8mL/分钟。LCMS:98.0% (RT = 5.28min),柱:Geneis, C18(50×4.6mm), 流动相:0.1% 甲酸/水:ACN(70 → 95 → 70) 的梯度,流速:0.8mL/分钟, $M-1 = 432.2$ 。¹HNMR(DMSO- d_6)(400MHz) δ 1.40-1.48(m, 3H, 环己基), 1.57(s, 9H, 叔丁基), 1.84-1.90(m, 7H, 环己基部分), 3.09(m, 1H, 环己基-苯甲酰基的CH), 3.84(s, 3H, OCH₃), 6.55(d, J = 4Hz, 1H, 芳基 H₂), 7.06(d, 1H, 芳基 H₃), 7.08(s, 1H, 芳基 H₆), 7.23(d, 1H, 吡啶-H₅), 7.53(d, J = 8Hz, 1H, 吡啶-H₄), 7.70-7.75(m, 2H, NH+ 吡啶-H₇), 8.06(s, 1H, CHO)。

[0158] 中间体 10

[0159]

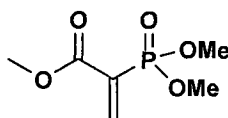


[0160] 13-环己基-3-甲氧基 7H-吡啶并[2,1-a][2] 苯并氮杂萘-6,10-二甲酸 10-(1, 1-二甲基乙基)酯·6-甲酯

[0161] 将 3-环己基-2-(2-甲酰基-4-甲氧基苯基)-1H-吡啶-6-甲酸叔丁酯(62.5g, 0.144mmol) 溶解在无水 DMF(1.2L) 中并机械搅拌。然后加入碳酸铯(84g, 0.17mmol) 和 2-(二甲氧基磷酰基)丙烯酸甲酯(GC 纯度为 65-70%, 56.2g, 0.18mmol), 将反应混合物加热至 65℃ 并保持 4 小时, 并且通过 TLC(己烷-乙酸乙酯 80 : 20, R_f (产物) = 0.7) 监测反应。结束后,将混合物冷却至室温,然后用水(1.0L)淬灭。黄色固体沉淀出来,过滤收集所述固体并风干。然后将该物质在甲醇中浆化,过滤,真空干燥,得到产物,其为黄色粉末(70g, 90%)。HPLC:99.1% (RT = 6.45 分钟),柱:C18BDS(4.6×50mm),流动相:0.1% TFA/水:ACN(30 → 100 → 30) 的梯度,流速:0.8 毫升/分钟。LCMS:100% (RT = 7.00 分钟),柱:Geneis, C18(50×4.6mm),流动相:0.1% 甲酸/水:ACN(70 → 95 → 70) 的梯度,流速:0.8 毫升/分钟, $M+1 = 502.2$ 。¹HNMR(CDCl₃)(400MHz) δ 1.10-1.30(m, 3H, 环己基), 1.64(s, 9H, 叔丁基), 1.77-2.07(m, 7H, 环己基部分), 2.80(m, 1H, 环己基-苯甲酰基的CH), 3.84(s, 3H, OCH₃), 3.93(s, 3H, COOCH₃), 4.15 和 5.65(两个宽峰,各为 1H, 烯丙基的CH₂(allylic CH₂)), 6.95(s, 1H, 芳基 H₆), 7.01(d, 1H, 芳基 H₂), 7.53(d, J = 8Hz, 1H, 芳基 H₃), 7.70(d, J = 4Hz, 1H, 吡啶-H₅), 7.84(s+d, 2H, 烯基的H+ 吡啶-H₄), 8.24(s, 1H, 吡啶-H₇); ¹³C NMR(CDCl₃)(100.0MHz) δ 166.92, 165.71, 158.96, 142.28, 136.47, 13.50, 134.61, 132.43, 132.01, 129.73, 124.78, 124.68, 120.33, 119.39, 119.04, 115.62, 115.05, 111.27, 80.27, 55.49, 52.50, 39.09, 36.81, 33.40, 28.38, 27.15, 26.28。

[0162] 中间体 11

[0163]

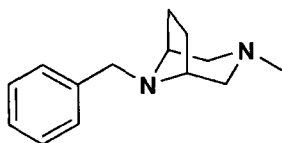


[0164] 2-(二甲氧基氧磷基)-2-丙烯酸甲酯

[0165] 向配备有机械搅拌器、冷凝器、温度控制器和氮气进口的 5L 四颈圆底烧瓶中加入低聚甲醛 (40.5g, 1.35 摩尔)、MeOH (甲醇) (2L) 和哌啶 (2mL)。将反应混合物在氮气气氛下加热至回流并保持 3 小时。冷却到 50℃ 后, 一次性加入 2-(二甲氧基磷酰基) 乙酸甲酯 (150g, 0.824 摩尔)。将反应混合物继续回流 18 小时。冷却到室温后, 真空浓缩反应溶液, 得到透明无色油状物。在配备有温度控制器、氮气进口、磁力搅拌器和迪安-斯托克分水器 (Dean-Stark apparatus) 的 3L 四颈圆底烧瓶中将上述油状物溶解在无水甲苯 (1L) 中。向溶液中加入 TsOH·H₂O (甲磺酸水合物) (5.2g)。然后将反应混合物共沸回流 18 小时, 从而除去甲醇。冷却到室温后, 将溶液真空浓缩, 得到黄色油状物, 将其在 150-155℃ / 0.2mmHg 的条件下真空蒸馏, 得到产物, 其为无色油状物 (135.0g)。根据 ¹H NMR 确定纯度为 90%。¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ 7.0 (dd, J = 42.4 和 1.5Hz, 1H), 6.73 (dd, J = 20.5 和 1.8Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.76 (s, 3H)。

[0166] 中间体 12

[0167]



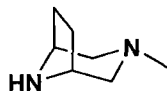
[0168] 3-甲基-8-(苯基甲基)-3,8-二氮杂二环 [3.2.1] 辛烷

[0169] 在安装有机械搅拌器、回流冷凝器和温度计的 5L 三颈圆底烧瓶中将顺式-1-苄基-2,5-二(氯甲基)吡咯烷盐酸盐 (37.5g, 0.13 摩尔) (如在公开的 PCT 专利申请 W0200232902 中所描述的那样来制备) 悬浮在 CH₃CN (900mL) 中。将搅拌的悬浮液温热至 50℃, 加入 NaHCO₃ (97g, 1.1 摩尔), 并将悬浮液温热至 70℃。加入 NaI (50g, 0.33 摩尔) 并在 70℃ 搅拌 5 分钟, 此时将加料漏斗固定在冷凝器的顶部。向加料漏斗中加入 48mL 40% 含水 MeNH₂ (甲胺) (0.55 摩尔) 于 850mL CH₃CN 中的溶液, 并且将该溶液逐滴加入 (加入速率保持在 10-15mL/分钟)。75 分钟后, 加入完成, 此时将反应混合物冷却到室温, 过滤出固体, 并将溶剂浓缩至约 800mL。将反应混合物倒入 EtOAc (800mL) 中, 用 1N NaOH (2×100mL) 洗涤。水相用 EtOAc (2×100mL) 再次萃取, 合并的有机相用 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。将所得残余物加载到硅胶 (620g) 上, 用 2.8% MeOH/0.4% 浓 NH₄OH/CHCl₃ (总共 6L) 洗脱。收集纯的馏分 (从 2L 至 4L)。浓缩, 得到 8.76g (32% 收率) 标题化合物, 其为棕色油状物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm 1.79-1.87 (m, 2H) 1.92-1.99 (m, 2H) 2.23 (s, 3H) 2.27-2.37 (m, 2H) 2.54-2.63 (m, 2H) 3.10 (s, 2H) 3.52 (s, 2H) 7.20-7.26 (m, 1H) 7.30 (t, J = 7.30Hz, 2H) 7.36-7.42 (m, 2H)。LC 方法: 溶剂 A = 10% MeOH/90% H₂O/0.1% TFA, 溶剂 B = 90% MeOH/10% H₂O/0.1% TFA, 起始 % B = 0%, 最终 % B = 100, 流速 = 4 毫升 / 分钟, 梯度时间 = 2 分钟, 运行时间 = 3 分钟, 柱: Phenomenex-Luna 10 μm C 18 50mm×3.0mm, Rt = 0.23min; MS: (ES+) m/z (M+H)⁺ =

217.3。通过柱还得到 6.1g 混合馏分（通过 ^1H NMR 积分确定纯度为 $> 80\%$ ）。

[0170] 中间体 13

[0171]



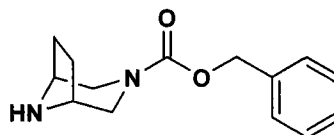
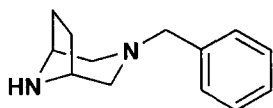
*2HCl

[0172] 3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛烷二盐酸盐

[0173] 将 N-甲基-N-苄基二环二胺 (14.22g, 65.7mmol) 溶解在 650ml 甲醇中, 加入 17ml 浓度为 12M 的盐酸水溶液。在氮气气氛下将溶液置于 2L 帕尔瓶 (Parrbottle) 中, 并向反应混合物中加入 3.66g 20% 氢氧化钡 / 炭。将混合物置于帕尔振荡器 (Parr shaker) 上在 60psig 的氢气下保持 17 小时。通过 TLC 分析 (硅胶板, 用 10 体积份 2M 氨 / 甲醇的 90 体积份氯仿溶液洗脱) 判断反应完成。将反应混合物过滤通过硅藻土塞, 然后先后用水和甲醇对所述塞进行冲洗。将合并的滤液真空浓缩, 加入甲醇和苯直到得到均一的溶液。然后加入 75mL 浓度为 2.0M 的盐酸 / 乙醚。从产物溶液中真空除去挥发物。使用甲醇 / 苯混合物在产物溶液中反复对水进行共沸, 由此最终得到浅黄色固体。将固体产物即 3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛烷真空干燥过夜, 得到 11.98g (91%) 吸湿性固体。将产物从烧瓶中取出并由于其吸湿性而将其装在氮气气氛下的手套式袋子 (glove bag) 中。 ^1H NMR (500MHz, DMSO- D_6) δ ppm 1.96-2.14 (m, 2H) 2.34 (d, $J = 8.24\text{Hz}$, 2H) 2.66 (s, 3H) 3.46 (d, $J = 11.90\text{Hz}$, 2H) 3.58 (s, 3H, 含有 H_2O) 4.17 (s, 2H) 9.92 (s, 1H) 10.21 (s, 1H) 11.39 (s, 1H); ^{13}C NMR (126MHz, DMSO- D_6) δ ppm 24.04 (s, 1C) 43.49 (s, 1C) 52.50 (s, 1C) 54.47 (s, 1C)。

[0174] 中间体 14 和 15

[0175]

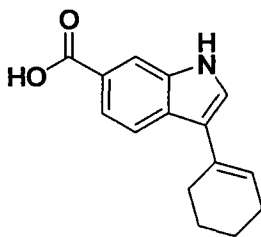


[0176] 3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-3-甲酸苯基甲酯和 3-(苯基甲基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛烷

[0177] 将三乙胺 (1.44mL, 10.363mmol) 加到 8-叔丁氧羰基-3,8-二氮杂-二环[3.2.1]辛烷 (2.0g, 9.421mmol) 于 CH_2Cl_2 (20mL) 中的溶液中, 在 0°C 滴加氯甲酸苄酯 (1.46mL, 10.363mmol), 并将反应混合物在 0°C 搅拌 0.5 小时, 然后使其温热至室温, 继续搅拌 3 天。然后用水将反应混合物淬灭, 并用 1N HCl 溶液酸化。分离有机层, 用盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4) 并浓缩, 得到无色稠厚油状物, 其为粗产物。然后将 70mg 该物质溶解在 1,2-二氯乙烷 (2mL) 和 TFA (0.5mL) 中。将反应混合物在室温搅拌 2 小时。然后蒸发溶剂和 TFA, 得到两种标题化合物的混合物, 其为无色稠厚油状物。

[0178] 中间体 16

[0179]

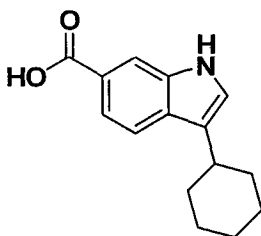


[0180] 3-环己烯基-1H-吲哚-6-甲酸

[0181] 在 22℃ 将环己酮 (96mL, 0.926 摩尔) 加到搅拌的吲哚-6-甲酸甲酯 (50.0g, 0.335 摩尔) 于甲醇 (920mL) 中的溶液中。历时 10 分钟逐份加入甲醇钠的甲醇溶液 (methanolic sodium methoxide) (416mL, 浓度为 25% w/w, 1.82 摩尔)。将混合物回流搅拌 18 小时, 冷却到室温, 浓缩, 用冷水稀释和用 36% HCl 溶液酸化。过滤收集所得沉淀物, 用冷水洗涤, 并用五氧化二磷 (0.1mm) 干燥, 得到标题化合物, 其为褐色固体 (80.9g, 97.5% 收率)。

[0182] 中间体 17

[0183]

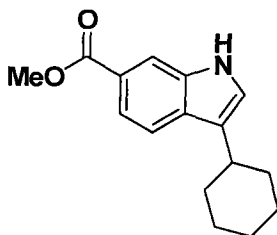


[0184] 3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸

[0185] 将 3-环己烯基-1H-吲哚-6-甲酸 (38g) 加到帕尔瓶中, 然后加入甲醇 (100mL) 和 THF (100mL)。瓶用氩气冲洗, 并加入 10% 钯 / 炭 (1.2g)。然后将烧瓶抽空, 随后再次充入氢气至压力为 55psi, 将所得混合物在室温振荡 18 小时。然后通过过滤经过硅藻土来除去催化剂。浓缩滤液, 得到所期望的产物, 其为浅紫色固体 (30.6g, 79%)。ESI-MS m/z 244 (MH⁺)。

[0186] 中间体 18

[0187]

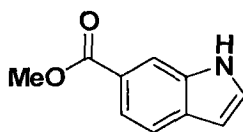


[0188] 3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯

[0189] 将亚硫酸氯 (1mL) 加到搅拌的 3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸 (30.4g, 0.125 摩尔) 于甲醇 (300mL) 中的混合物中。将混合物回流搅拌 18 小时, 用脱色炭处理并过滤。将滤液浓缩至约 150mL, 此时发生结晶。将滤液冷却至室温, 并过滤。固体先后用冷甲醇和乙醚洗涤, 得到所期望的产物, 其为浅紫色固体 (22.2g, 69% 收率)。ESI-MS m/z 258 (MH⁺); ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 1.35 (m, 4H), 1.63 (s, 1H), 1.78 (m, 3H), 2.06 (d, J = 8.05Hz, 2H), 3.90 (m, 1H), 7.08 (d, J = 1.83Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.74 (d, J = 1.46Hz, 1H), 7.77 (d, J = 1.46Hz, 1H), 8.08 (s, 1H)。

[0190] 中间体 19

[0191]

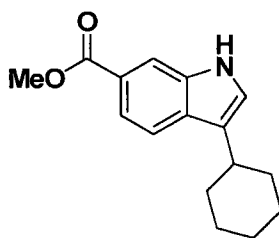


[0192] 1H-吲哚-6-甲酸甲酯

[0193] 将重氮甲烷的乙醚溶液 (620mL) 缓慢加到经冷却的 (-15°C) 搅拌的吲哚-6-甲酸 (45g, 0.27 摩尔) 于乙醚 (250mL) 中的悬浮液中。加入后, 将反应混合物在 -15°C 再搅拌 1 小时, 之后通过缓慢加入乙酸 (50mL) 将反应淬灭。然后将所得混合物减压浓缩, 并使用硅胶 (60-120) 快速色谱 (使用 MDC (二氯甲烷) 作为洗脱剂) 对残余物进行纯化。

[0194] 中间体 20

[0195]

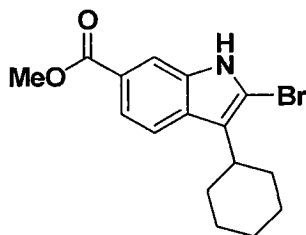


[0196] 3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯

[0197] 将环己酮 (42.46mL, 0.40 摩尔) 一次性加到搅拌的吲哚-6-甲酸甲酯 (47.8g, 0.27mmol) 于无水二氯甲烷 (500mL) 中的溶液中。然后将反应混合物冷却至 10°C , 滴加三氟乙酸 (63.13mL, 0.8mmol), 然后加入三乙基甲硅烷 (174.5mL, 1.09mmol)。加入后, 使温度升至室温, 之后将其再搅拌 12 小时。然后加入二氯甲烷 (200mL), 反应混合物先后用 10% 碳酸氢钠溶液和盐水洗涤。有机层用硫酸钠干燥, 过滤并真空浓缩。通过硅胶 (60-120) 快速色谱 (使用己烷-乙酸乙酯 (9.5 : 0.5) 混合物作为洗脱剂) 对所得残余物进行纯化。合并均一的馏分, 蒸发, 得到 60g 所期望的产物 (85%)。有关该物质的分析性数据与通过上面描述的可选择路线制备的样品的分析性数据相一致。

[0198] 中间体 21

[0199]



[0200] 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯

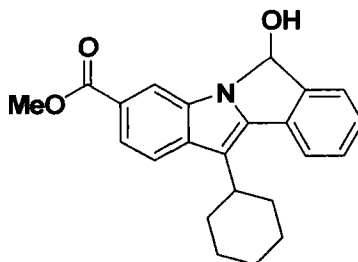
[0201] 将无水三溴化吡啶鎓 (12.0g, 38mmol) 一次性加到搅拌的经冷却的 (冰/水浴) 3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯 (7.71g, 30mmol) 于 THF (80mL) 和氯仿 (80mL) 的混合物中的溶液中。从冷却浴移开烧瓶, 在室温继续搅拌 2 小时。混合物先后用 1M NaHSO_3 溶液 ($2 \times 50\text{mL}$) 和 1N HCl 溶液 (50mL) 洗涤。然后其用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。浓缩物用己烷处理, 过滤收集所得沉淀物, 得到所期望的产物, 其为灰白色固体 (5.8g, 58%)。

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 1.38 (m, 3H), 1.85 (m, 7H), 2.81 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 8.03 (s, 1H), 8.47 (s, 1H)。

[0202] 将己烷母液浓缩,将残余物溶解在己烷/乙酸乙酯 (5 : 1) 中。使溶液通过硅胶垫 (用相同的溶剂)。浓缩洗脱液,然后加入己烷 (10mL),使额外的产物沉淀出来,过滤收集所述额外的产物,得到 2.8g (28%) 所期望的产物。

[0203] 中间体 22

[0204]

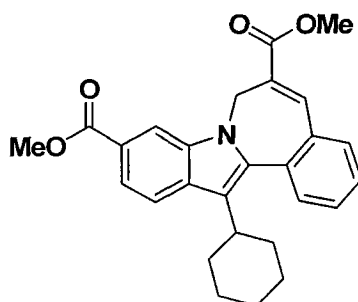


[0205] 11-环己基-6-羟基-6H-异吲哚并[2,1-a]吲哚-3-甲酸甲酯

[0206] 在氮气气氛下将搅拌的 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯 (10.1g, 30mmol)、2-甲酰基苯基硼酸 (5.4g, 36mmol)、LiCl (3.8g, 90mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1.6g, 1.38mmol) 于浓度为 1M 的 Na_2CO_3 溶液 (40mL) 和 1 : 1EtOH-甲苯 (180mL) 中的混合物在 85℃ 加热 3 小时。然后将反应混合物冷却至室温,并用 EtOAc (2×100mL) 萃取。萃取物先后用水和盐水洗涤,然后干燥 (MgSO_4),过滤并真空浓缩,得到 13.3g 粗产物。该物质用 DCM (二氯甲烷) 和己烷研磨,得到纯的所期望的产物 (7.52g, 70%)。LC-MS :m/e 360 (M-H); 344 (M-17)⁺。 ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 1.33-1.60 (m, 4H) 1.77-2.01 (m, 6H) 2.80 (d, J = 11.83Hz, 1H) 3.02-3.18 (m, 1H) 3.89 (s, 3H) 6.49 (d, J = 11.33Hz, 1H) 7.34 (t, J = 7.55Hz, 1H) 7.46 (t, J = 7.55Hz, 1H) 7.62 (d, J = 7.30Hz, 1H) 7.66-7.74 (m, 2H) 7.77 (d, J = 7.81Hz, 1H) 8.21 (s, 1H)。

[0207] 中间体 23

[0208]



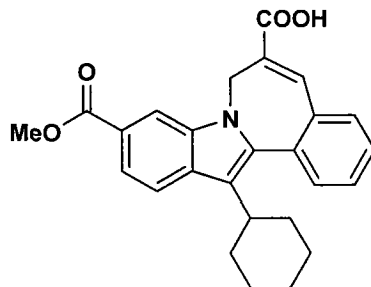
[0209] 13-环己基-6-(甲氧基羰基)-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-10-甲酸甲酯

[0210] 在氮气气氛下将搅拌的 11-环己基-6-羟基-6H-异吲哚并[2,1-a]吲哚-3-甲酸甲酯 (3.61g, 10mmol)、 Cs_2CO_3 (3.91g, 12mmol) 和 2-膦酰基乙酸三甲酯 (trimethyl 2-phosphonoacetate) (2.86g, 14mmol) 于无水 DMF (40mL) 中的悬浮液在 60℃ 加热 3 小时。将所得黄色悬浮液冷却至室温,并在剧烈搅拌下加入水。形成黄色沉淀物,过滤收集所述沉淀物。固体用水洗涤,然后风干过夜,得到标题化合物,其为黄色粉末 (4.124g, 96%)。LC/MS :m/e 430 (MH⁺); ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 1.30-1.46 (m, J = 14.86Hz, 2H) 1.55 (s,

2H) 1.77 (s, 2H) 1.85-2.18 (m, 4H) 2.76-2.89 (m, 1H) 3.84 (s, 3H) 3.95 (s, 3H) 4.19 (s, 1H) 5.68 (s, 1H) 7.38-7.63 (m, 4H) 7.74 (dd, $J = 8.44, 1.39\text{Hz}$, 1H) 7.81-7.98 (m, 2H) 8.29 (d, $J = 1.01\text{Hz}$, 1H)。

[0211] 中间体 24

[0212]



[0213] 13-环己基-6-(羧基)-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂~~草~~-10-甲酸甲酯

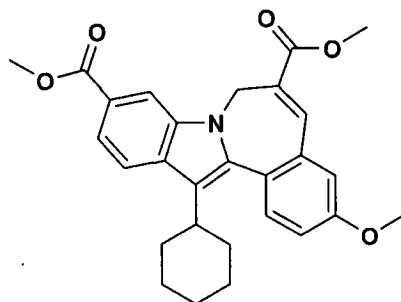
[0214] 将 13-环己基-6-(甲氧基羰基)-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂~~草~~-10-甲酸甲酯 (308mg, 0.72mmol) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (5mL) 中, 用 LiOH (173mg, 7.2mmol) 处理。将混合物在 50℃ 加热 4 小时, 之后真空除去溶剂。将残余物溶解在 H₂O (5mL) 中, 通过加入 10% HCl 水溶液对所得混合物进行酸化。形成沉淀物, 过滤收集所述沉淀物, 风干, 得到标题化合物, 其为亮黄色固体 (290mg, 97%)。ESI-MS m/z [M+1] = 415。

[0215] 除非另有说明, 以下一般方法与下述实验操作一起使用: LCMS 数据: 停止时间: 梯度时间 +1 分钟; 起始浓度: 除非另有说明, 0% B; 洗脱剂 A: 5% CH₃CN/95% H₂O (含有 10mM NH₄OAc (乙酸铵)) (对于柱 A 和 D), 10% MeOH/90% H₂O (含有 0.1% TFA (三氟乙酸)) (对于柱 B 和 C); 洗脱剂 B: 95% CH₃CN/5% H₂O (含有 10mM NH₄OAc) (对于柱 A 和 D), 90% MeOH/10% H₂O (含有 0.1% TFA) (对于柱 B 和 C); 柱 A: Phenomenex 10 μ 4.6 $\times$ 50mm C18; 柱 B: Phenomenex C18 10 μ 3.0 $\times$ 50mm; 柱 C: Phenomenex 4.6 $\times$ 50mm C18 10 μ ; 柱 D: Phenomenex Lina C18 5 μ 3.0 $\times$ 50mm; 柱 E: Phenomenex 5 μ 4.6 $\times$ 5.0mm C18。

[0216] 向浆化的 2-溴-3-环己基-1H-吲哚-6-甲酸甲酯 (4.3g, 13mmol)、4-甲氧基-2-甲酰基苯基硼酸 (3.0g, 17mmol) 和 LiCl (2.2g, 51mmol) 于 EtOH (乙醇)/甲苯 (1:1, 100mL) 中的溶液中加入 Pd(PPh₃)₄ (1.4g, 1.3mmol), 然后加入浓度为 1M 的 Na₂CO₃ (水溶液) (32mL, 32mmol)。反应溶液用氮气冲洗, 并在 100℃ 加热 3 小时, 冷却至室温。浓缩反应混合物, 从而除去 EtOH, 用 H₂O (200mL) 稀释, 并用 EtOAc (2 $\times$ 150mL) 萃取。合并的有机物用盐水 (100mL) 洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并浓缩至干。残余物用 CH₂Cl₂ 研磨, 过滤收集固体, 并用 Et₂O 和 CH₂Cl₂ 洗涤, 得到 11-环己基-6-羟基-8-甲氧基-6H-异吲哚并[2,1-a]吲哚-3-甲酸甲酯 (3.0g, 8.0mmol, 63%), 其为黄色固体, 所述固体不经进一步纯化即使用。LCMS: m/e 374 (M+H)⁺, 保留时间: 3.09 分钟, 柱 B, 3 分钟梯度。

[0217] 中间体 25

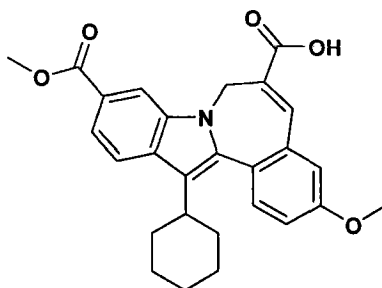
[0218]



[0219] 将 11-环己基-6-羟基-8-甲氧基-6H-异吲哚并[2,1-a]吲哚-3-甲酸甲酯 (2.9g, 7.4mmol)、2-(二甲氧基磷酰基)丙烯酸甲酯 (2.6g, 11mmol)、碳酸铯 (3.6g, 11mmol) 于 DMF (20mL) 中的溶液在 60℃ 加热 2 小时, 冷却至室温。搅拌的反应混合物用 H₂O (50mL) 稀释, 过滤收集沉淀物, 得到 13-环己基-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萆-6,10-二甲酸二甲酯 (3.3g, 7.1mmol, 97%), 其为黄色固体, 所述固体不经进一步纯化即使用。LCMS :m/e 460 (M+H)⁺, 保留时间 :3.35 分钟, 柱 B, 3 分钟梯度。

[0220] 中间体 26

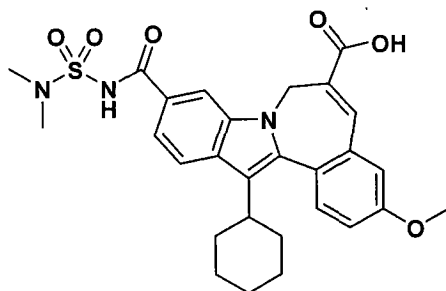
[0221]



[0222] 将四丁基氢氧化铵溶液 (浓度为 1M 的 MeOH 溶液, 2.2mL, 2.2mmol) 加到搅拌的 13-环己基-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萆-6,10-二甲酸二甲酯 (1.0g, 2.2mmol) 于 THF (75mL) 中的溶液中, 在室温搅拌过夜。将反应混合物浓缩至约 30mL, 用 EtOAc (120mL) 稀释, 用浓度为 0.5M 的 HCl (水溶液) (2×50mL) 和盐水 (40mL) 洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并浓缩至干, 得到 13-环己基-3-甲氧基-6-羧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萆-10-甲酸甲酯 (1.0g, 2.2mmol, 定量), 其为黄色固体, 所述固体不经进一步纯化即使用。LCMS :m/e 446 (M+H)⁺, 保留时间 :1.54 分钟, 柱 A, 2 分钟梯度。

[0223] 中间体 27

[0224]



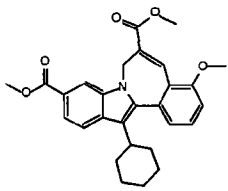
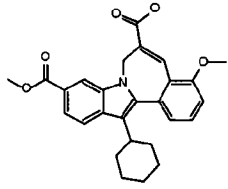
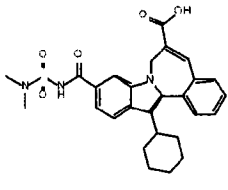
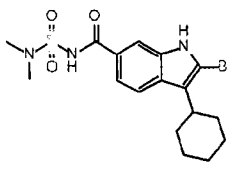
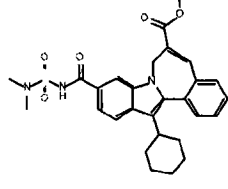
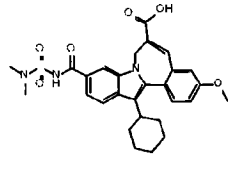
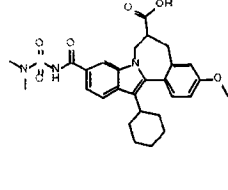
[0225] 将浓度为 1M 的 NaOH (水溶液) (5mL, 5mmol) 加到 13-环己基-N-((二甲基氨基)磺酰基)-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萆-6-甲酸甲酯·10-甲酰胺 (900mg, 1.6mmol) 于 THF/MeOH (1 : 1, 14mL) 中的溶液中, 将反应混合物在封闭的管中用微波辐射在

85℃加热 30 分钟。将反应混合物冷却,用 1M HCl (水溶液) (5mL, 5.0mmol) 中和,浓缩除去有机溶剂。残余物用 H₂O 浆化,过滤收集固体,用 H₂O 冲洗,干燥,得到 13- 环己基 -N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3- 甲氧基 -7H- 吡啶并 [2,1-a] [2] 苯并氮杂萘 -10- 甲酰胺 • 6- 甲酸 (807mg, 1.5mmol, 92%), 其为黄色固体。LCMS :m/e 536 (M-H)⁻, 保留时间 :2.18 分钟, 柱 A, 4 分钟梯度。

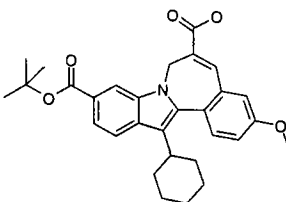
[0226] 下面描述的一般方法涉及表 3 中化合物的实验数据。LCMS 数据 :梯度时间 :2 分钟 ;流速 :4 毫升 / 分钟 ;停止时间 :梯度时间 +2 分钟 ;起始浓度 :0 % B ;洗脱剂 A :10 % MeOH/90 % H₂O (含有 0.1 % TFA) ;洗脱剂 B :90 % MeOH/10 % H₂O (含有 0.1 % TFA) ;柱 1 : Phenomenex 10 μ C18 4.6 × 50mm。

[0227] 表 3

[0228]

化合物	分析性数据
	LCMS: m/z 460(MH ⁺), 保留时间: 3.05 分钟
	LCMS: m/z 446(MH ⁺), 保留时间: 2.89 分钟
	LCMS: m/z 508(MH ⁺), 保留时间: 2.08 分钟
	LCMS: m/z 429(MH ⁺), 保留时间: 2.34 分钟
	LCMS: m/z 522(MH ⁺), 保留时间: 2.49 分钟
	LCMS: m/z 538(MH ⁺), 保留时间: 2.13 分钟
	LCMS: m/z 540(MH ⁺), 保留时间: 2.12 分钟

[0229]

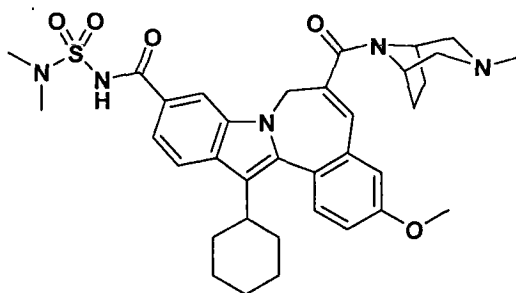


[0230] 10-(叔丁氧基羰基)-13-环己基-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-6-甲酸

[0231] 将四丁基氢氧化铵(40%的水溶液, 14.4mL, 22mmol) 加到 13-环己基-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-6,10-二甲酸 10-叔丁酯·6-甲酯(5.0g, 10mmol) 于 MeOH(40mL) 和 THF(40mL) 中的浆液中, 将反应混合物在室温搅拌过夜(通过 LCMS 确定完成)。反应混合物用 1N HCl(水溶液)(24mL) 中和, 浓缩, 从而除去有机溶剂。淤渣(sludge) 用水稀释, 搅拌, 并过滤收集固体。将湿的固体溶解在 EtOAc(约 250mL) 中, 用盐水(100mL) 洗涤, 干燥(MgSO₄), 过滤并浓缩, 得到 10-(叔丁氧基羰基)-13-环己基-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-6-甲酸(5.73g, 11.8mmol, 118% 收率), 其为亮黄色固体。产物似乎混合有四丁基铵副产物。所述物质不经进一步纯化即使用。¹HNMR(300MHz, CDCl₃) δ ppm 1.14-2.13(m, 10H), 1.60(s, 9H), 2.73-2.86(m, 1H), 3.89(s, 3H), 4.03-4.26(m, 1H), 5.49-5.80(m, 1H), 6.98(d, J = 2.6Hz, 1H), 7.07(dd, J = 8.4, 2.6Hz, 1H), 7.56(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.64(dd, J = 8.4, 1.1Hz, 1H), 7.79(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.89(宽单峰, 1H), 8.19(s, 1H)。LC-MS: 保留时间为 4.32 分钟; 488m/z(MH⁺)。在 Shimadzu LC-10AS 液相色谱上记录 LC 数据, 所述色谱配备有 Phenomenex-Luna 10 μ C18 3.0×50mm 柱, 使用检测器波长为 220nm 的 SPD-10AV UV-Vis 检测器。使用以下洗脱条件: 流速为 5 毫升/分钟, 梯度为 100% 溶剂 A/0% 溶剂 B 至 0% 溶剂 A/100% 溶剂 B, 梯度时间为 4 分钟, 保持时间(hold time) 为 1 分钟, 以及分析时间为 5 分钟, 其中溶剂 A 为 10% MeOH/90% H₂O/0.1% 三氟乙酸, 溶剂 B 为 10% H₂O/90% MeOH/0.1% 三氟乙酸。使用 Micromass Platform 用于 LC 以电喷雾模式确定 MS 数据。

[0232] 实施例 1

[0233]



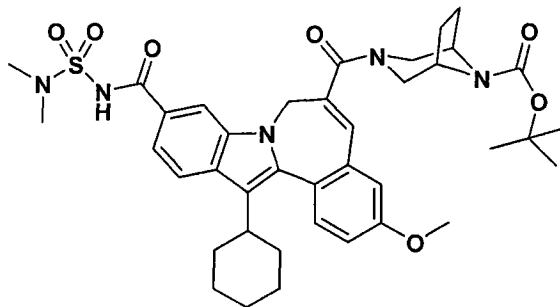
[0234] 13-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3-甲氧基-6-[(3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)羰基]-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-10-甲酰胺

[0235] 向搅拌的 13-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-10-甲酰胺·6-甲酸(51mg, 0.095mmol)、3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛烷二盐酸盐(34mg, 0.17mmol) 和三乙胺(0.06mL) 于 DMF(1.0mL) 中的溶液中加入 HATU(50mg, 0.13mmol)。将反应混合物在室温搅拌 2 小时, 用 MeOH(约 1mL) 稀释, 并通

过制备性 HPLC(CH₃CN/H₂O(含有 10mM NH₄OAc)) 纯化,得到 13- 环己基 -N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3- 甲氧基 -6-[(3- 甲基 -3,8- 二氮杂二环 [3.2.1] 辛 -8- 基)羰基]-7H- 吡啶并 [2,1-a][2] 苯并氮杂萘 -10- 甲酰胺 (52mg, 0.08mmol, 85%), 其为黄色固体。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 8.31(s, 1H), 7.83(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.59(br d, J = 8.4Hz, 1H), 7.45(d, J = 8.8Hz, 1H), 7.02(dd, J = 2.6, 8.8Hz, 1H), 6.91-6.86(m, 2H), 5.35-5.16(m, 1H), 4.34-4.16(m, 1H), 3.87(s, 3H), 3.01(s, 6H), 2.85-1.03(m, 24H)。LCMS :m/e 644 (M-H)⁻, 保留时间为 2.89 分钟, 柱 A, 4 分钟梯度。

[0236] 实施例 2

[0237]

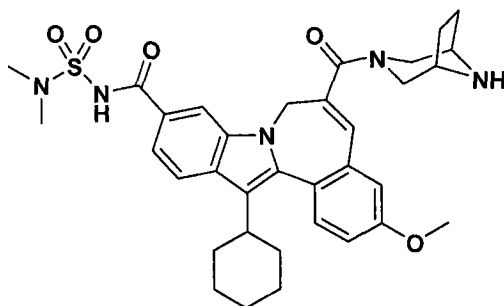


[0238] 3-[[13- 环己基 -10-[[[(二甲基氨基)磺酰基]氨基]羰基]-3- 甲氧基 -7H- 吡啶并 [2,1-a][2] 苯并氮杂萘 -6- 基]羰基]-3,8- 二氮杂二环 [3.2.1] 辛烷 -8- 甲酸 (1,1- 二甲基乙基) 酯

[0239] 向搅拌的 13- 环己基 -N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3- 甲氧基 -7H- 吡啶并 [2,1-a][2] 苯并氮杂萘 -10- 甲酰胺 • 6- 甲酸 (300mg, 0.56mmol)、3,8- 二氮杂二环 [3.2.1] 辛烷 -8- 甲酸叔丁酯 (150mg, 0.71mmol) 和三乙胺 (0.25mL) 于 DMF (2.5mL) 中的溶液中加入 HATU (2-(7- 氮杂 -1H- 苯并三唑 -1- 基)-1,1,3,3- 四甲基脲六氟磷酸盐) (250mg, 0.66mmol)。将反应混合物在室温搅拌 1 小时,用 H₂O (约 10mL) 稀释,用浓度为 1M 的 HCl (水溶液) (约 0.5mL) 酸化,过滤收集沉淀物并用 H₂O 冲洗。将固体溶解在 MeOH/DMF (1 : 1) 中,通过制备性 HPLC(CH₃CN/H₂O(含有 10mM NH₄OAc)) 进行纯化,得到 3-[[13- 环己基 -10-[[[(二甲基氨基)磺酰基]氨基]羰基]-3- 甲氧基 -7H- 吡啶并 [2,1-a][2] 苯并氮杂萘 -6- 基]羰基]-3,8- 二氮杂二环 [3.2.1] 辛烷 -8- 甲酸 (1,1- 二甲基乙基) 酯 (130mg, 0.18mmol, 32%), 其为黄色固体。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 8.85(宽单峰, 1H), 8.08(s, 1H), 7.85(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.47(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.44(d, J = 8.8Hz, 1H), 7.03(dd, J = 2.6, 8.8Hz, 1H), 6.86(d, J = 2.6Hz, 1H), 6.75(s, 1H), 5.25-5.00(m, 1H), 4.49-4.01(m, 3H), 3.88(s, 3H), 3.35-2.90(m, 2H), 3.03(s, 6H), 2.86-2.72(m, 1H), 2.12-1.12(m, 16H), 1.41(s, 9H)。LCMS :m/e 730 (M-H)⁻, 保留时间为 3.41 分钟, 柱 A, 4 分钟梯度。

[0240] 实施例 3

[0241]

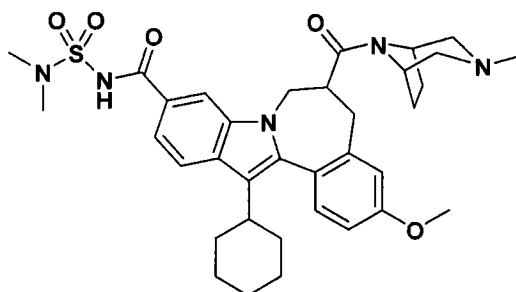


[0242] 13-环己基-6-(3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-3-基羰基)-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-10-甲酰胺

[0243] 向 3-[[13-环己基-10-[[[(二甲基氨基)磺酰基]氨基]羰基]-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-6-基]羰基]-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛烷-8-甲酸(1,1-二甲基乙基)酯(103mg, 0.14mmol)于CH₂Cl₂(2mL)中的溶液中加入三氟乙酸(2mL)。将反应混合物在室温搅拌2小时,浓缩,溶解在MeOH(2mL)中,并通过制备性HPLC(CH₃CN/H₂O(含有10mM NH₄OAc))进行纯化,得到13-环己基-6-(3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-3-基羰基)-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-10-甲酰胺(77mg, 0.12mmol, 87%),其为浅黄色固体。¹H NMR(300MHz, d₆-DMSO) δ 8.24(s, 1H), 7.78(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.67(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.50(d, J = 8.4Hz, 1H), 7.22-7.14(m, 2H), 6.95(s, 1H), 5.19-4.95(m, 1H), 4.42-4.20(m, 1H), 3.87(s, 3H), 3.82-2.98(m, 7H), 2.82-2.68(m, 1H), 2.75(s, 6H), 2.14-0.93(m, 14H), 1.41(s, 9H)。LCMS :m/e 630 (M-H)⁻, 保留时间:2.54 分钟,柱A,4 分钟梯度。

[0244] 实施例 4

[0245]



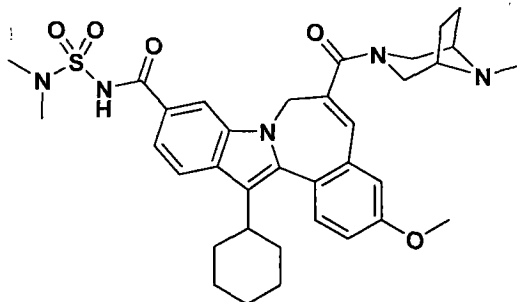
[0246] 13-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-6,7-二氢-3-甲氧基-6-[(3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)羰基]-5H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-10-甲酰胺

[0247] 将 10% 钯/炭(47mg, 0.05mmol) 加到 13-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3-甲氧基-6-[(3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)羰基]-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^葎-10-甲酰胺(52mg, 0.086mmol)于MeOH(3mL)中的溶液中,反应混合物用氮气(3×)真空冲洗,然后用氢气(4×)冲洗。将反应混合物在氢气气囊下搅拌过夜。反应混合物用CH₂Cl₂(1mL)稀释,加入额外的10%钯/炭(30mg, 0.03mmol),反应混合物用氮气(3×)真空冲洗,然后用氢气(4×)冲洗。将反应混合物在氢气气囊下搅拌2天,过滤通过硅藻土垫并浓缩。将残余物溶解在MeOH中,通过制备性HPLC(CH₃CN/H₂O(含有10mM NH₄OAc))纯化,得到13-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-6,7-二氢-3-甲氧基-6-[(3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)羰基]-5H-吲哚并[2,1-a][2]苯并

氮杂萘-10-甲酰胺 (17mg, 0.026mmol, 40%), 其为黄色固体。阻转非对映异构体 (atropo diastereomer) 的混合物。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.16-7.77 (m, 2H), 7.51-7.41 (m, 1H), 7.37-7.27 (m, 1H), 7.07-6.74 (m, 2H), 4.77-4.05 (m, 3H), 3.91-3.81 (m, 3H), 3.77-3.17 (m, 1H), 3.07-2.99 (m, 6H), 2.95-1.09 (m, 25H)。LCMS : m/e 648 (M-H)⁻, 保留时间 : 2.93 分钟, 柱 A, 4 分钟梯度。

[0248] 实施例 5

[0249]

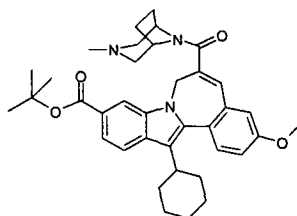


[0250] 13-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3-甲氧基-6-[(8-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-3-基)羰基]-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-10-甲酰胺

[0251] 在室温向搅拌的 13-环己基-6-(3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-3-基羰基)-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-10-甲酰胺 (44mg, 0.070mmol) 于 MeOH/CH₂Cl₂ (1 : 1, 4mL) 中的溶液中加入 NaCNBH₃ (氰基硼氢化钠) (30mg 0.48mmol), 然后加入甲醛 (37wt% 的 H₂O 溶液, 0.10mL, 3.6mmol)。将反应混合物搅拌 30 分钟, 然后浓缩至干。将残余物溶解在 MeOH 中, 通过制备性 HPLC (CH₃CN/H₂O (含有 10mM NH₄OAc)) 进行纯化, 得到 13-环己基-N-[(二甲基氨基)磺酰基]-3-甲氧基-6-[(8-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-3-基)羰基]-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-10-甲酰胺 (31mg, 0.047mmol, 68%), 其为黄色固体。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.11 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.66-7.60 (m, 2H), 7.52 (d, J = 8.8Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 2.6, 8.8Hz, 1H), 7.00 (d, J = 2.6Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 5.23-5.04 (m, 1H), 4.48-4.26 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.38-2.77 (m, 7H), 3.03 (s, 6H), 2.25 (宽单峰, 3H), 2.16-1.15 (m, 14H)。LCMS : m/e 644 (M-H)⁻, 保留时间 : 2.69 分钟, 柱 A, 4 分钟梯度。

[0252] 实施例 6

[0253]



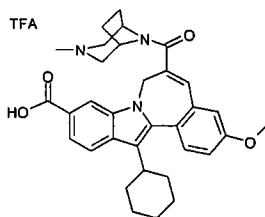
[0254] 13-环己基-3-甲氧基-6-((3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)羰基)-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-10-甲酸叔丁酯

[0255] 将 HATU (680mg, 1.8mmol) 加到搅拌的 10-(叔丁氧基羰基)-13-环己基-3-甲氧基-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂萘-6-甲酸 (670mg, 1.37mmol) 和 3-甲基-3,8-二氮

杂二环 [3.2.1] 辛烷二盐酸盐 (560mg, 2.81mmol) 于 DMF (6mL) 和 TEA (1.2mL, 8.2mmol) 中的溶液中, 将反应混合物搅拌 30 分钟 (通过 LCMS 确定完成)。反应混合物用水 (约 35mL) 稀释 (形成沉淀物) 并搅拌过夜。过滤收集沉淀物, 用水冲洗, 在 55℃ 高真空干燥, 得到 13-环己基-3-甲氧基-6-((3-甲基-3,8-二氮杂二环 [3.2.1] 辛-8-基) 羰基)-7H-吡啶并 [2,1-a] [2] 苯并氮杂萘-10-甲酸叔丁酯 (775mg, 1.30mmol, 95% 收率), 其为浅黄色固体。该物质不经进一步纯化即使用。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ ppm 1.14-3.95 (m, 24H), 1.59 (s, 9H), 3.86 (s, 3H), 4.21-5.26 (m, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.88 (d, J = 2.6Hz, 1H), 7.01 (dd, J = 8.8, 2.6Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.8Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 8.4, 1.1Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.4Hz, 1H), 8.02 (宽单峰, 1H)。LC-MS: 保留时间为 3.72 分钟; m/z 596 (MH⁺)。在 Shimadzu LC-10AS 液相色谱上记录 LC 数据, 所述色谱配备有 Phenomenex-Luna 10 μ C 183.0×50mm 柱, 使用检测器波长为 220nm 的 SPD-10AV UV-Vis 检测器。使用如下洗脱条件: 流速为 5 毫升/分钟, 梯度为 100% 溶剂 A/0% 溶剂 B 至 0% 溶剂 A/100% 溶剂 B, 梯度时间为 4 分钟, 保持时间为 1 分钟, 以及分析时间为 5 分钟, 其中溶剂 A 为 10% MeOH/90% H₂O/0.1% 三氟乙酸, 溶剂 B 为 10% H₂O/90% MeOH/0.1% 三氟乙酸。使用 Micromass Platform 用于 LC 以电喷雾模式确定 MS 数据。

[0256] 实施例 7

[0257]



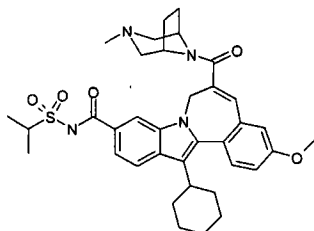
[0258] 13-环己基-3-甲氧基-6-((3-甲基-3,8-二氮杂二环 [3.2.1] 辛-8-基) 羰基)-7H-吡啶并 [2,1-a] [2] 苯并氮杂萘-10-甲酸三氟乙酸盐

[0259] 将 13-环己基-3-甲氧基-6-((3-甲基-3,8-二氮杂二环 [3.2.1] 辛-8-基) 羰基)-7H-吡啶并 [2,1-a] [2] 苯并氮杂萘-10-甲酸叔丁酯 (300mg, 0.504mmol) 溶解在 DCE (5mL) 中, 然后加入 TFA (700 μ l, 9.09mmol) (反应混合物变为绿色), 将反应混合物在室温搅拌 1 小时 (通过 LCMS 确定约 70% 转化)。加入更多的 TFA (700 μ l, 9.09mmol) 并将反应混合物搅拌 1 小时 (通过 LCMS 确定完成)。将反应混合物在旋转蒸发仪上浓缩, 用乙醚稀释并再次浓缩, 如此重复两次, 得到 13-环己基-3-甲氧基-6-((3-甲基-3,8-二氮杂二环 [3.2.1] 辛-8-基) 羰基)-7H-吡啶并 [2,1-a] [2] 苯并氮杂萘-10-甲酸三氟乙酸盐 (362mg, 0.55mmol, 定量), 其为深黄色固体。该物质不经进一步纯化即使用。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.06-2.13 (m, 21H), 2.68-2.86 (m, 1H), 3.36-3.50 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 4.11-5.35 (m, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.18-7.28 (m, 2H), 7.53 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 8.4, 1.1Hz, 1H), 7.87 (d, J = 8.4Hz, 1H), 8.21 (宽单峰, 1H), 9.55 (宽单峰, 1H)。LC-MS: 保留时间为 3.72 分钟; m/z 596 (MH⁺)。LC-MS: 保留时间为 2.50 分钟; 538m/z (MH⁻)。在 Shimadzu LC-10AS 液相色谱上记录 LC 数据, 所述色谱配备有 Phenomenex-Luna 10 μ C184.6×50mm 柱, 使用检测器波长为 220nm 的 SPD-10AV UV-Vis 检测器。使用如下洗脱条件: 流速为 5 毫升/分钟, 梯度为 100% 溶剂 A/0% 溶剂 B 至 0% 溶剂 A/100% 溶剂 B, 梯

度时间为 4 分钟,保持时间为 1 分钟,以及分析时间为 5 分钟,其中溶剂 A 为 5% 乙腈 /95% H_2O /10mM 乙酸铵,溶剂 B 为 5% H_2O /95% 乙腈 /10mM 乙酸铵。使用 Micromass Platform 用于 LC 以电喷雾模式确定 MS 数据。

[0260] 实施例 8

[0261]



[0262] 13-环己基-N-(异丙基磺酰基)-3-甲氧基-6-((3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)羰基)-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^草-10-甲酰胺

[0263] 将 CDI (80mg, 0.49mmol) 加到 13-环己基-3-甲氧基-6-((3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)羰基)-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^草-10-甲酸叔丁酯三氟乙酸盐 (200mg, 0.30mmol) 于 THF (1.5mL) 中的溶液中,将反应混合物在 60℃ 搅拌 2 小时。将反应混合物冷却至室温,然后将反应溶液的 1/3 (约 0.55mL) 加到搅拌的丙-2-磺酰胺 (40mg, 0.33mmol) 于 DBU (0.20mL, 1.3mmol) 和 THF (0.20mL) 中的溶液中。将反应混合物在室温搅拌过夜 (通过 LCMS 确定完成),浓缩成油状物,用 1N HCl 溶液 (约 1mL) 淬灭 (形成沉淀物),并用 EtOAc (2×1mL) 萃取。将合并的有机物浓缩至干,溶解在 MeOH (1.5mL) 中,并通过制备性 HPLC (CH_3CN/H_2O (含有 10mM NH_4OAc)) 进行纯化,得到 13-环己基-N-(异丙基磺酰基)-3-甲氧基-6-((3-甲基-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)羰基)-7H-吲哚并[2,1-a][2]苯并氮杂^草-10-甲酰胺 (28.5mg, 0.044mmol, 43% 收率),其为黄色固体。¹H NMR (300MHz, CD_3OD) δ ppm 1.13-2.77 (m, 28H), 2.80-2.93 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.90-4.02 (m, 1H), 4.27-4.65 (m, 2H), 5.11-5.31 (m, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.11 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 8.4, 2.6$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.18 (宽单峰, 1H)。LC-MS:保留时间为 2.55 分钟; m/z 643 (MH⁻)。在 Shimadzu LC-10AS 液相色谱上记录 LC 数据,所述色谱配备有 Phenomenex-Luna 10 μ C 184.6×50mm 柱,使用检测器波长为 220nm 的 SPD-10AV UV-Vis 检测器。使用如下洗脱条件:流速为 5 毫升/分钟,梯度为 100% 溶剂 A/0% 溶剂 B 至 0% 溶剂 A/100% 溶剂 B,梯度时间为 4 分钟,保持时间为 1 分钟,以及分析时间为 5 分钟,其中溶剂 A 为 5% 乙腈 /95% H_2O /10mM 乙酸铵,溶剂 B 为 5% H_2O /95% 乙腈 /10mM 乙酸铵。使用 Micromass Platform 用于 LC 以电喷雾模式确定 MS 数据。