



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116322700 B

(45) 授权公告日 2024.08.20

(21) 申请号 202280006505.1

(22) 申请日 2022.08.10

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 116322700 A

(43) 申请公布日 2023.06.23

(30) 优先权数据

- 10-2021-0105358 2021.08.10 KR
- 10-2021-0106488 2021.08.12 KR
- 10-2021-0117389 2021.09.03 KR
- 10-2021-0126757 2021.09.24 KR
- 10-2022-0008456 2022.01.20 KR
- 10-2022-0020996 2022.02.17 KR
- 10-2022-0054880 2022.05.03 KR
- 10-2022-0075838 2022.06.21 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2023.03.17

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/KR2022/011963 2022.08.10

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02023/018238 EN 2023.02.16

(73) 专利权人 厄普特拉株式会社

地址 韩国仁川

(72) 发明人 柳秀熙 闵任淑 李汉奎 金成勋  
柳惠国 姜锦泳 金相润 郑韶炫  
李濬揆 李喜悦

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

专利代理师 关旭颖 吴小明

(51) Int.Cl.

- C07D 487/04 (2006.01)
- A61P 25/00 (2006.01)
- A61K 47/55 (2006.01)
- A61K 31/551 (2006.01)
- A61P 35/00 (2006.01)
- A61K 31/55 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106543185 A, 2017.03.29

CN 109879877 A, 2019.06.14

审查员 魏永燕

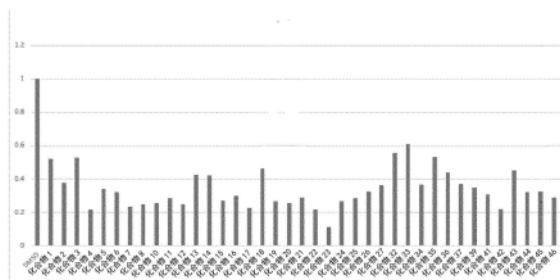
权利要求书10页 说明书126页 附图1页

(54) 发明名称

新型PLK1降解诱导化合物

(57) 摘要

本公开涉及一种新型PLK1降解诱导化合物、其制备方法及其用途。本公开的化合物展现出诱导PLK1降解的作用。因此,本公开的化合物可以有效地用于预防或治疗PLK1相关疾病。



1. 一种由下式I表示的化合物或其药用盐:

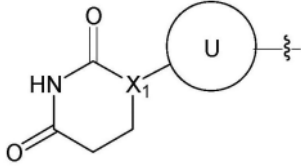
[式I]

ULM-连接基团-PTM

在以上式I中,

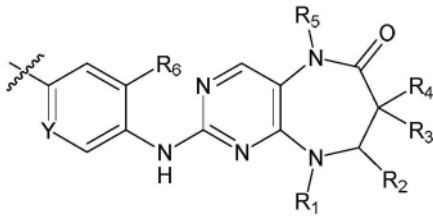
ULM为由下式1表示的部分;

[式1]



PTM为由下式2表示的部分;

[式2]



连接基团为化学连接ULM和PTM的基团;

$X_1$ 为CH或N;

环U为苯基或吡啶基,其中所述苯基或吡啶基的环的至少一个H可被 $R_U$ 取代;

$R_U$ 为 $-C_{1-4}$ 烷基或-卤素;

Y为 $CR_7$ ;

$R_1$ 为3至7元环烷基;

$R_2$ 为-H,

$R_3$ 和 $R_4$ 为-F;

$R_5$ 为 $-C_{1-4}$ 烷基;

$R_6$ 为 $-C_{1-4}$ 烷氧基;

$R_7$ 为-H或-卤素;

连接基团为 $-L_U-L_1-L_2-L_3-L_P-$ ;

$L_U$ 为 $-(CH_2)_x-NH-$ 、 $-(CH_2)_x-O-$ 或不存在;

其中 $L_U$ 与ULM连接;并且

其中当 $L_U$ 不存在时, $L_1$ 直接与ULM连接;

$L_1$ 为4至12元杂环烷基或不存在;

其中当 $L_1$ 不存在时, $L_U$ 和 $L_2$ 直接连接;

其中所述4至12元杂环烷基为单环或螺环;

其中所述4至12元杂环烷基在环中含有至少一个N原子;

其中所述N原子与 $L_U$ 或ULM直接连接;并且

其中所述杂环烷基的至少一个H可被 $-C_{1-4}$ 烷基取代;

$L_2$ 为 $-(CH_2)_{y_1}-$ 、 $-(CH_2)_{y_2}-C(=O)-$ 、 $-(CH_2)_{y_3}-$ 、 $-(CH_2)_{y_2}-N(C_{1-4}烷$

基) - (CH<sub>2</sub>)<sub>y<sub>3</sub></sub>-、- (CH<sub>2</sub>)<sub>y<sub>1</sub></sub>- (O-C<sub>1-4</sub>烷基) z-O-C<sub>1-4</sub>烷基或不存在；

L<sub>3</sub>为4至6元环烷基或4至12元杂环烷基；

其中所述4至12元杂环烷基为单环或螺环；并且

其中所述4至12元杂环烷基在环中含有至少一个N原子；

L<sub>p</sub>为- (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH-C(=O)-或- (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-O-，其中L<sub>p</sub>的-C(=O)-或-O与PTM连接；

p为0、1或2；

x为0；

y<sub>1</sub>为0、1、2、3、4、5或6；

y<sub>2</sub>为0、1、2、3、4、5或6；

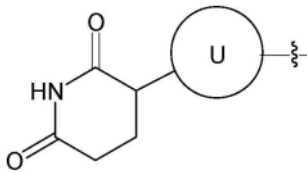
y<sub>3</sub>为0、1、2、3、4、5或6；并且

z为0、1、2、3、4、5或6。

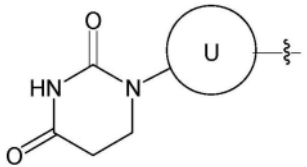
2. 根据权利要求1所述的化合物或其药用盐，其中，

ULM为由下式1-1或者1-2表示的部分；

[式1-1]



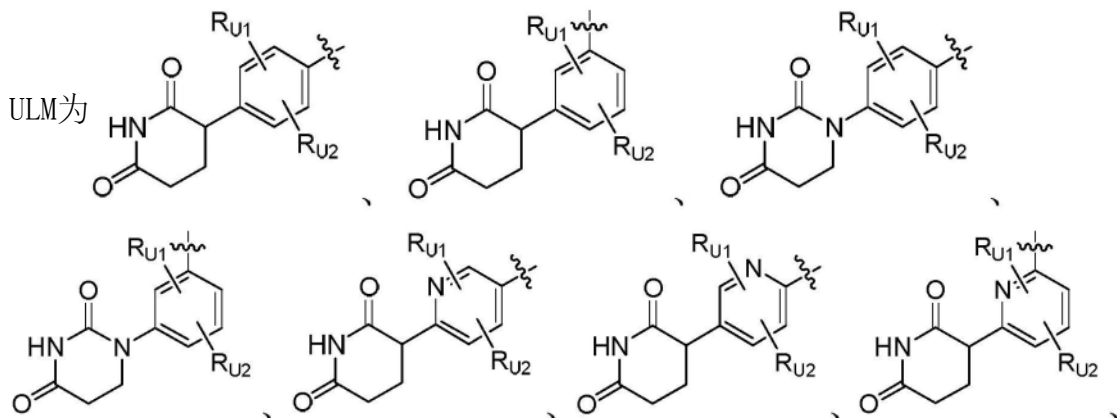
[式1-2]

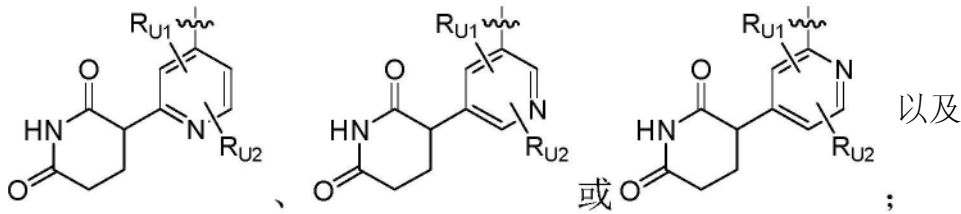


环U为苯基或吡啶基，其中所述苯基或吡啶基的环的至少一个H可被R<sub>U</sub>取代；以及

R<sub>U</sub>为-甲基或-F；

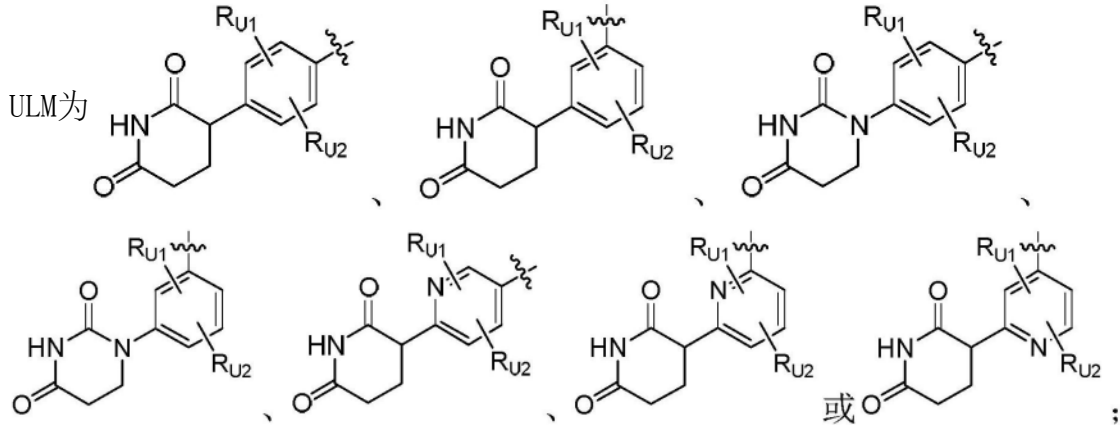
3. 根据权利要求1所述的化合物或其药用盐，其中，





$R_{U1}$ 和 $R_{U2}$ 各自独立地为 $-C_{1-4}$ 烷基或-卤素。

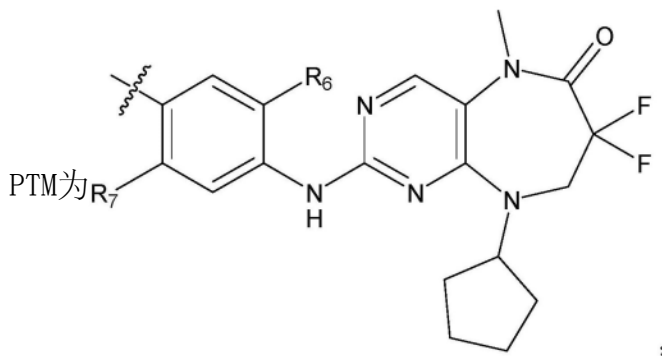
4. 根据权利要求3所述的化合物或其药用盐,其中,



以及

$R_{U1}$ 和 $R_{U2}$ 各自独立地为 $-C_{1-4}$ 烷基或-卤素。

5. 根据权利要求1所述的化合物或其药用盐,其中,



$R_6$ 为 $-C_{1-4}$ 烷氧基;以及

$R_7$ 为-H或-卤素。

6. 根据权利要求1所述的化合物或其药用盐,其中,

$L_U$ 为 $-(CH_2)_x-NH-$ 或 $-(CH_2)_x-O-$ ,其中 $L_U$ 与ULM连接;

$L_1$ 为4至12元杂环烷基或不存在,

其中,当 $L_1$ 不存在时, $L_U$ 和 $L_2$ 直接连接;

其中所述4至12元杂环烷基为单环或螺环;

其中所述4至12元杂环烷基在环中含有至少一个N原子;

其中所述N原子与 $L_U$ 或ULM直接连接;并且

其中所述杂环烷基环的至少一个H可被 $-C_{1-4}$ 烷基取代;

$L_2$ 为 $-(CH_2)_{y_1}-$ 、 $-(CH_2)_{y_2}-C(=O)-$ 、 $-(CH_2)_{y_3}-$ 、 $-(CH_2)_{y_2}-N(C_{1-4}$ 烷基) $-$ 、 $-(CH_2)_{y_3}-$ 、 $-(CH_2)_{y_1}-(O-C_{1-4}$ 烷基) $-z-O-C_{1-4}$ 烷基或不存在;

$L_3$ 为4至6元环烷基或4至12元杂环烷基；

其中所述4至12元杂环烷基为单环或螺环；并且

其中所述4至12元杂环烷基在环中含有至少一个N原子；

$L_p$ 为 $-(CH_2)_p-NH-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_p-O-$ ，其中 $L_p$ 的 $-C(=O)-$ 或 $-O-$ 与PTM连接；

$p$ 为0或1；

$x$ 为0；

$y_1$ 为0、1、2或3；

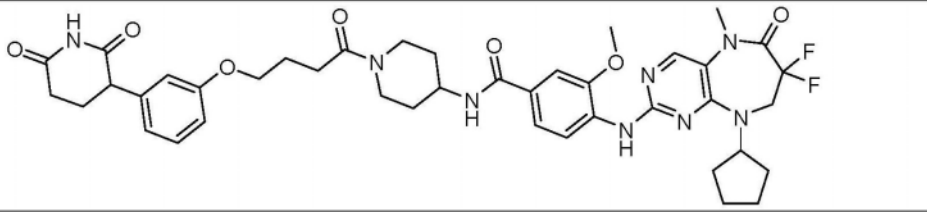
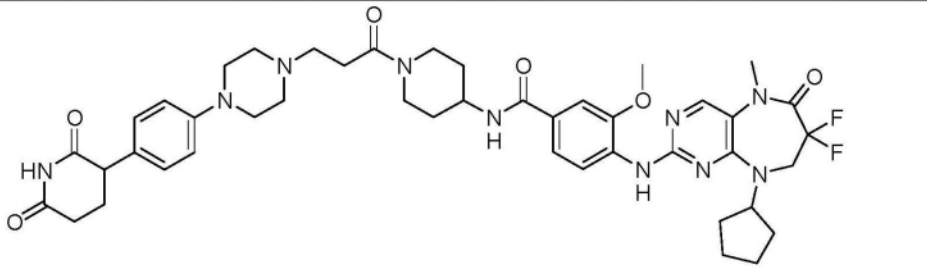
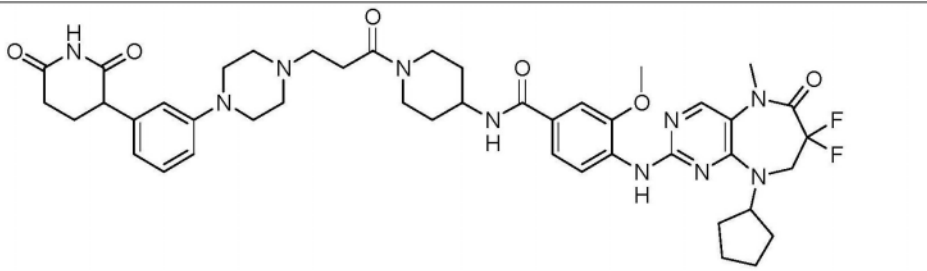
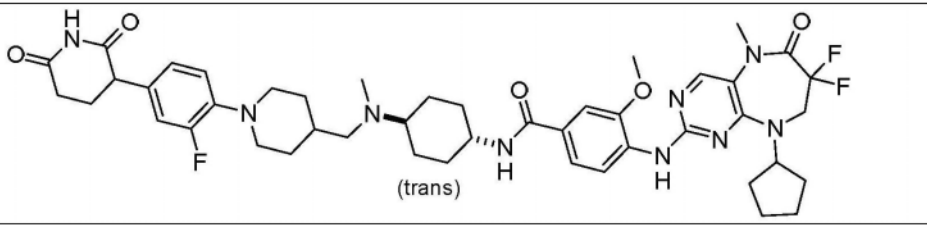
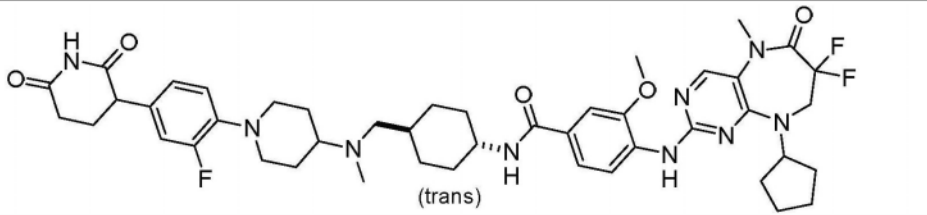
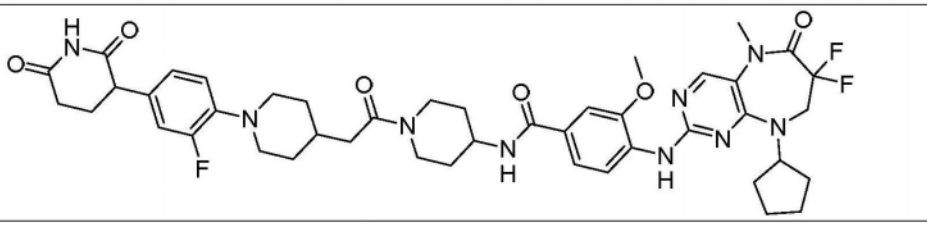
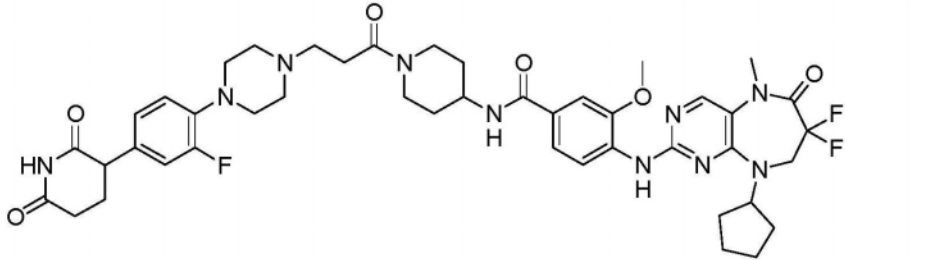
$y_2$ 为0、1、2或3；

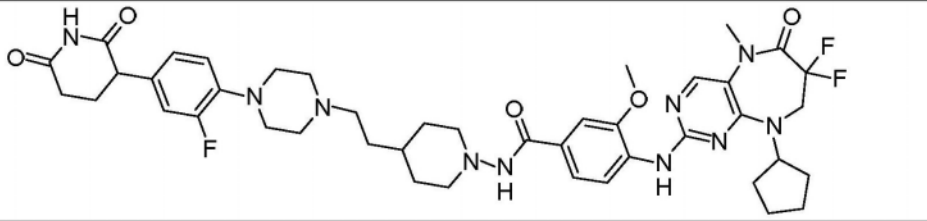
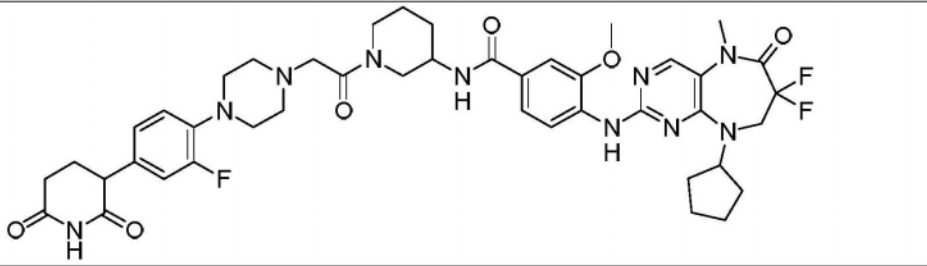
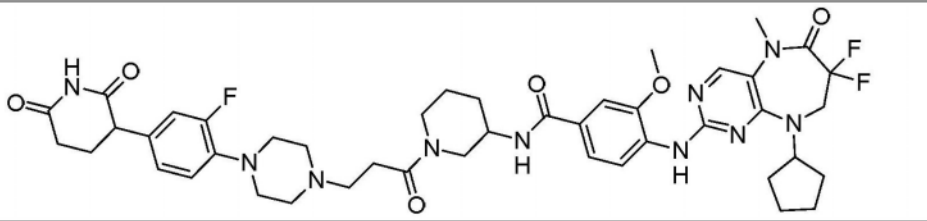
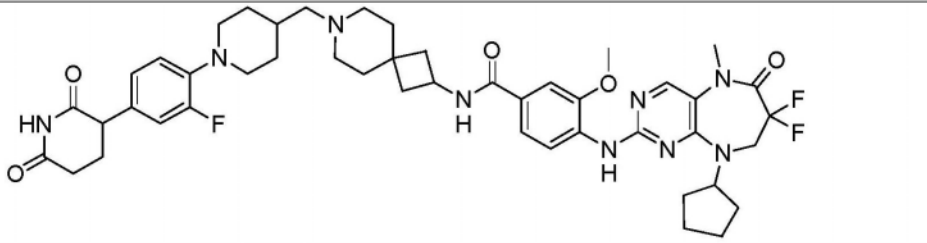
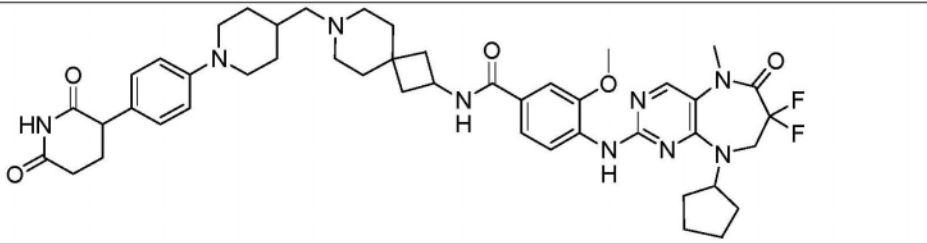
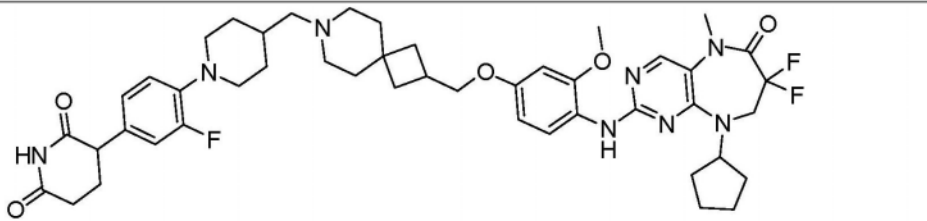
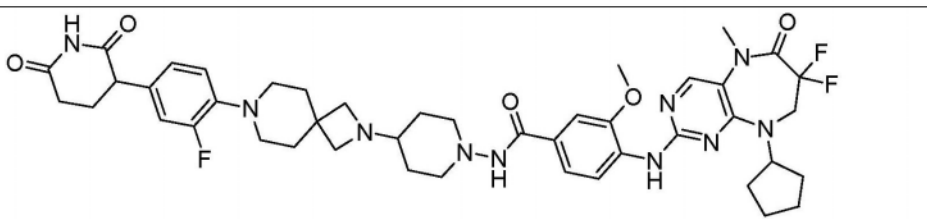
$y_3$ 为0、1、2或3；并且

$z$ 为0、1、2或3。

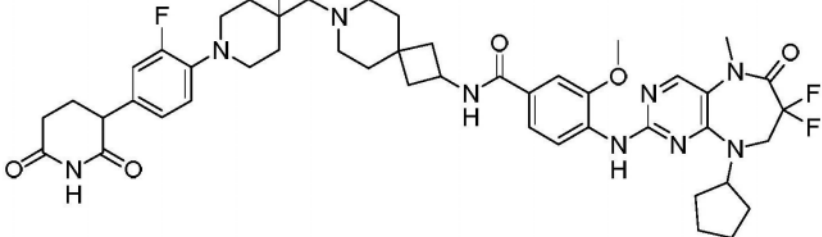
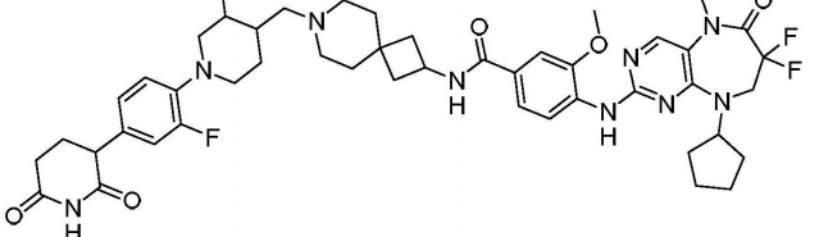
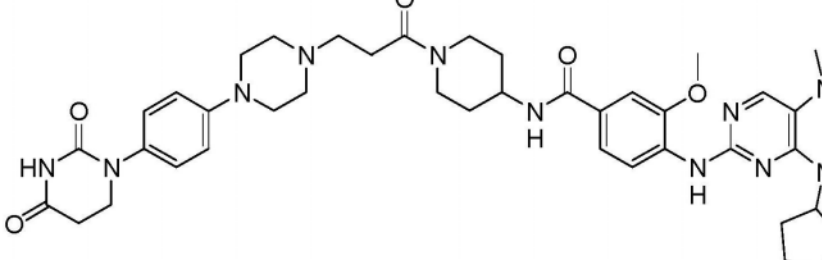
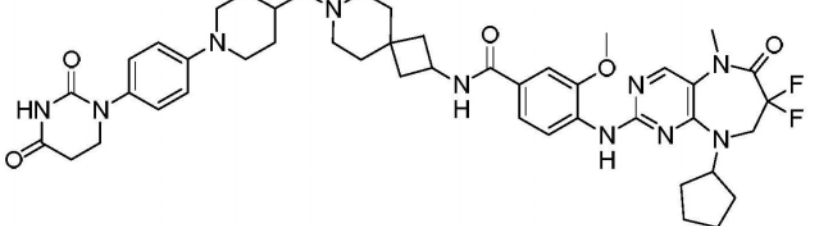
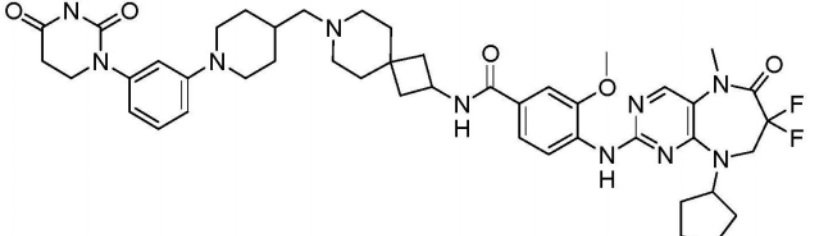
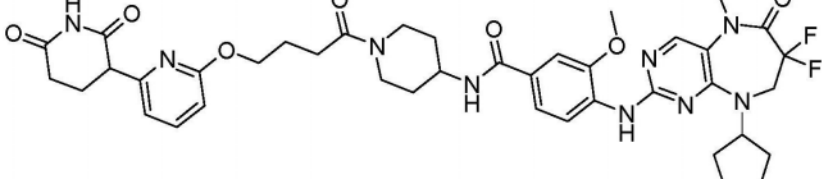
7. 根据权利要求1所述的化合物或其药用盐，其中由式I表示的所述化合物选自自由以下化合物组成的组：

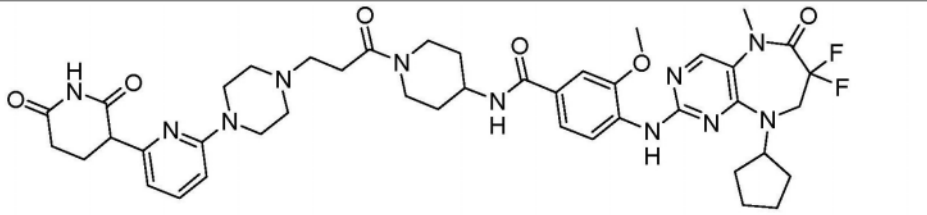
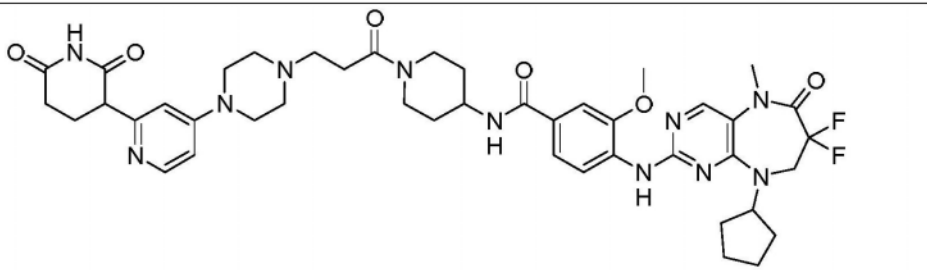
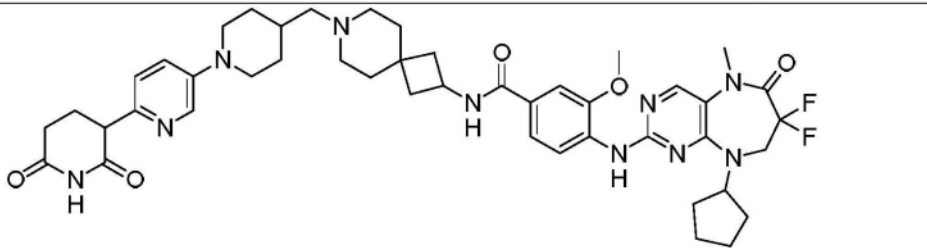
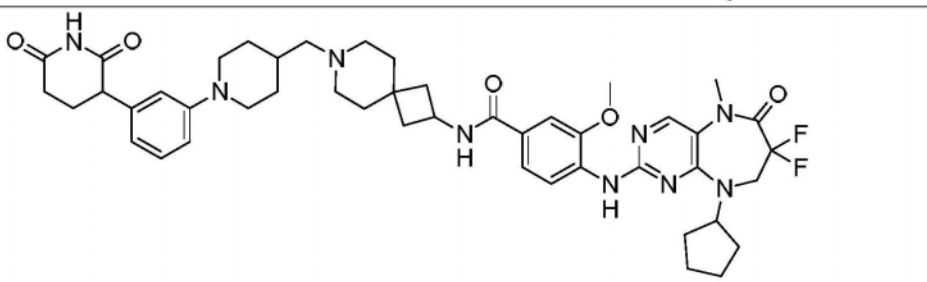
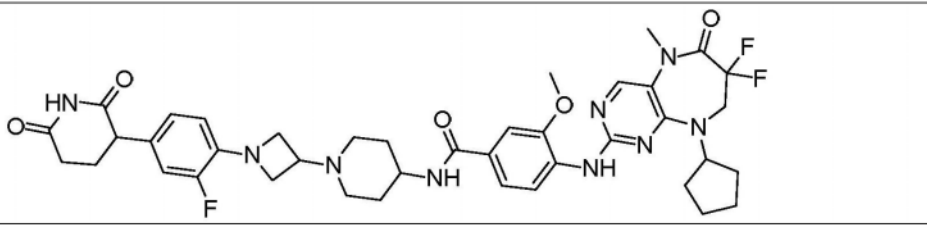
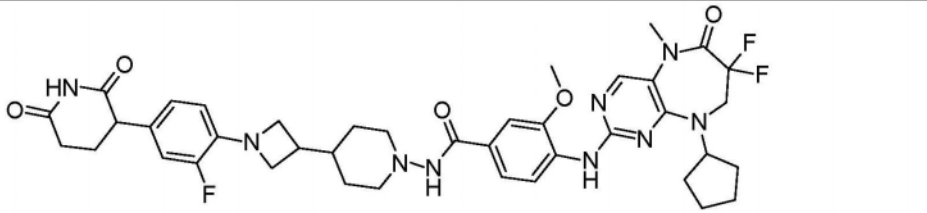
化合物	结构
1	
2	
3	

4	
5	
6	
7	
8	
10	
11	

12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	

19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	

26	
27	
32	
33	
34	
35	

36	
37	
39	
41	
42	
43	



## 新型PLK1降解诱导化合物

### 技术领域

[0001] 本公开涉及一种新型PLK1降解诱导化合物、其制备方法及其用途。其可以特异性地作用于异常细胞等,并且可以通过有效降解PLK1有用地用于治疗各种疾病。

### 背景技术

[0002] Polo样激酶1 (PLK1) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,其参与细胞生长和分裂期间的G2/M期的转换。PLK1从S期到G2/M期以脉冲形式表达和激活,并且随着有丝分裂结束而迅速降解。

[0003] PLK1在多种癌(诸如结肠癌、肺癌、膀胱癌和黑素瘤等)中过表达,并且过表达PLK1的癌细胞往往对多种类型的抗癌药物表现出耐药性。由于如上所述揭示了各种癌中的PLK1依赖性,因此已经尝试开发PLK1抑制剂化合物,诸如volasertib(也称为BI6727)等。

[0004] 然而,常规的PLK1抑制剂在临床安全的浓度下不能充分抑制PLK1活性。因此,存在这样一个问题:即使癌细胞的细胞周期暂时延迟,一些癌细胞最终也会重新启动细胞周期,这可能不会获得足够的临床效果(参见Gheghiani等人,Cell Reports,2017等)。事实上,许多制药公司(诸如Boehringer Ingelheim、GlaxoSmithKline等)已经尝试开发基于小分子化合物的PLK1抑制剂,但是它们中的大多数在临床试验阶段失败或停止,并且因此迄今为止还没有可商购获得的PLK1抑制剂。这表明,依照通过与PLK1的活性位点结合来抑制酶活性的方法的药理机制(如小分子化合物抑制剂)在开发意图通过抑制癌细胞的PLK1活性来产生抗癌效果的新药时不是足够有效的。

[0005] 近来,已经提出蛋白水解靶向嵌合体 (PROTAC) 作为一种能够诱导体内靶蛋白的蛋白水解的基于小分子的平台技术。PROTAC是一种双官能化合物,其中与疾病相关靶蛋白结合的配体分子和E3泛素连接酶结合部分通过化学连接基团连接。理论上,PROTAC化合物能够通过将疾病相关靶蛋白置于E3泛素连接酶附近来诱导靶蛋白的降解。基于不同于现有抑制剂的这种新机制,已经开发了许多PROTAC化合物作为癌症和炎性疾病等的治疗剂,并且正在进行各种可扩展性研究(例如,作为ADC(抗体-药物缀合物)的有效负载)。然而,其在所有范围的结合部分或连接基团中均不显示活性,并且为了使PROTAC表现出所需水平的功效,通过若干研究已知每种结合部分和连接基团必须具有适当连接的结构(参见US2020-0325130A)。特别地,在CRBN(Cereblon)E3连接酶靶向部分的情况下,取决于结合部分的类型或与其连接的化合物的结构,存在降解CRBN新底物(GSPT1, IKZF1/3等)或相应地显示脱靶毒性的风险。因此,重要的是,选择适当的结合部分并且优化整个化合物的结构,以便在PROTAC药物开发期间不会表现出意想不到的毒性。

[0006] 在使用PLK1作为靶蛋白的PROTAC化合物的情况中,中国专利公开号106543185A公开了一些双官能化合物,其中volasertib衍生化合物和用于E3泛素连接酶CRBN的结合部分通过化学连接基团连接。然而,相关技术文献仅描述了一些有限形式的PROTAC化合物的合成实例,其中一般而言,PROTAC的目标降解活性和选择性可能根据靶蛋白部分、E3泛素连接酶结合部分等的选择而显著变化(参见Burslem和Crews,2017等)。

[0007] 此外,上述文献中描述的PROTAC化合物的特征在于这样的化合物,其同时降解PLK1和BRD4,并且降解多种蛋白(诸如其他PLK家族蛋白和BRD4等),这在药物开发时可能由于脱靶毒性而引起副作用。特别地,已知BRD4活性的强抑制不可避免地伴随着中靶(on-target)毒性(诸如血液毒性和胃肠毒性)连同药理作用。因此,随着更多BRD4蛋白降解,上述文献中描述的PROTAC化合物将预期面临更大的临床副作用(参见Bolden等人,Cell Reports,2014)。

[0008] 此外,根据上述文献的发明人所发表的文献(参见Mu等人,BBRC,2019),可以确认的是同时降解PLK1和BRD4的PROTAC化合物在细胞水平上具有比PLK1降解能力强得多的BRD4降解能力,并且其细胞周期几乎停止在G1期等,即,不管常规PLK1抑制剂发挥药理作用的方式如何,PROTAC化合物实际上仅充当BRD4抑制剂。

[0009] 因此,对于没有副作用或具有最小副作用(即脱靶毒性)的有效PLK1降解诱导化合物的需求未得到满足。

## 发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本公开的一个目的是提供新型PLK1降解诱导化合物。

[0012] 本公开的另一个目的是提供一种用于制备所述化合物的方法。

[0013] 本公开的又一个目的是提供所述化合物的用途。

[0014] 问题的解决方案

[0015] 为了实现上述目的,本发明人努力研究,结果发现本发明的新型PROTAC化合物通过E3连接酶结合剂、靶结合部分和连接基团的适当结构组合和优化而特异性地作用于过表达PLK1的异常细胞,以诱导有效的PLK1降解并且使副作用最小化,并且完成了本发明。

[0016] 选择性PLK1降解诱导化合物

[0017] 本公开提供了诱导有效的polo样激酶1(PLK1)降解的新型化合物。具体地,本公开提供了一种双官能化合物,其中PLK1结合部分和E3泛素连接酶结合部分通过化学连接基团连接。

[0018] 在一个一般方面,提供了一种由下式I表示的化合物、其立体异构体或其药用盐:

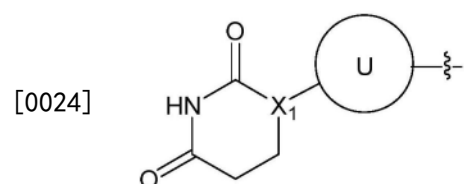
[0019] [式I]

[0020] ULM-连接基团-PTM

[0021] 在上式I中,

[0022] ULM为由下式1表示的部分;

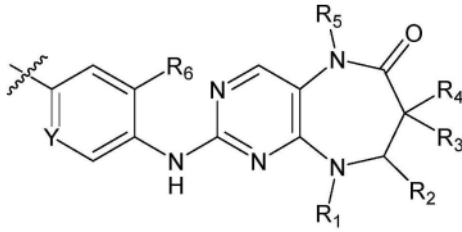
[0023] [式1]



[0025] PTM为由下式2表示的部分;

[0026] [式2]

[0027]



[0028] 连接基团为化学连接ULM和PTM的基团；

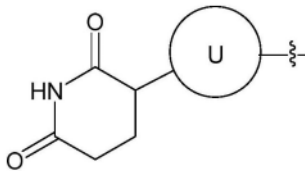
[0029]  $X_1$ 为CH或N；[0030] 环U为苯基或5至6元杂芳基{其中苯基或5至6元杂芳基环的至少一个H可被 $R_U$ 取代}；[0031]  $R_U$ 为 $-C_{1-4}$ 烷基、 $-C_{1-4}$ 羟基烷基、 $-C_{1-4}$ 氨基烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 烷氧基或-卤素；[0032] Y为 $CR_7$ ；[0033]  $R_1$ 为3至7元环烷基；[0034]  $R_2$ 为-H或 $-C_{1-4}$ 烷基，[0035]  $R_3$ 和 $R_4$ 各自独立地为-H、 $-C_{1-4}$ 烷基或-卤素；[0036]  $R_5$ 为 $-C_{1-4}$ 烷基；[0037]  $R_6$ 为 $-C_{1-4}$ 烷基或 $-C_{1-4}$ 烷氧基；以及[0038]  $R_7$ 为-H或-卤素。

[0039] 在本公开的一个实施方案中，

[0040] ULM为由下式1-1或者1-2表示的部分；

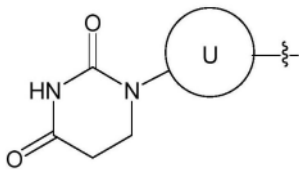
[0041] [式1-1]

[0042]



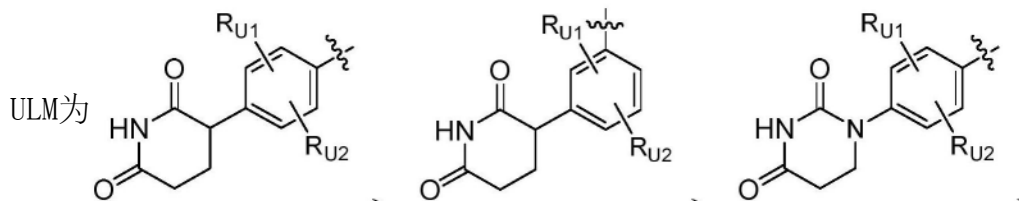
[0043] [式1-2]

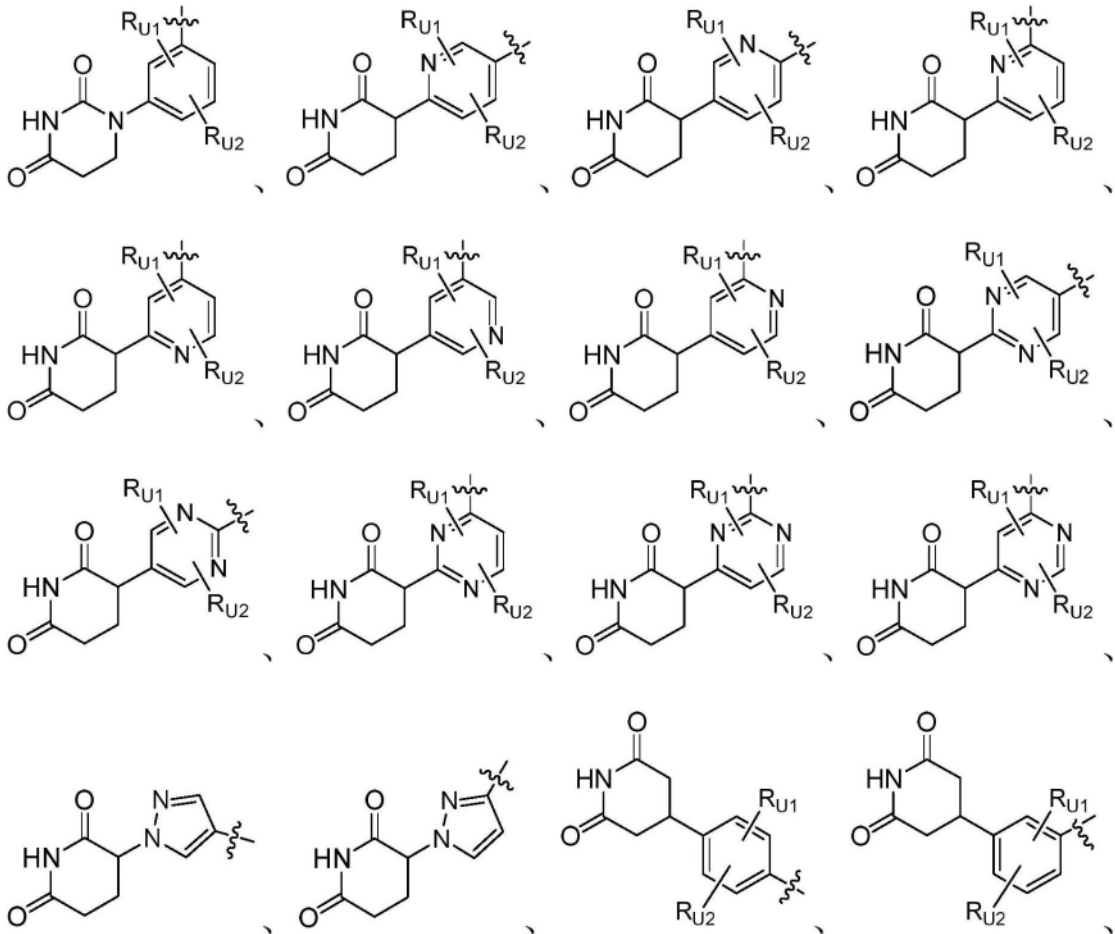
[0044]

[0045] 环U为苯基、吡啶基、嘧啶基或吡唑基{其中苯基、吡啶基、嘧啶基或吡唑基环的至少一个H可被 $R_U$ 取代}；以及[0046]  $R_U$ 为 $-C_{1-4}$ 烷基、 $-C_{1-4}$ 卤代烷基、 $-C_{1-4}$ 烷氧基或-卤素。

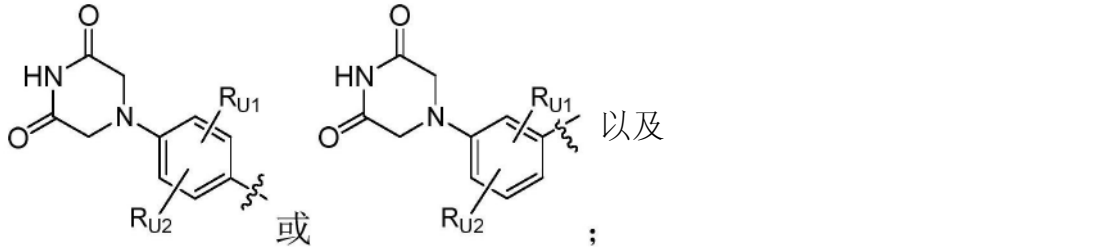
[0047] 在本公开的一个实施方案中，

[0048]





[0049]



[0050]

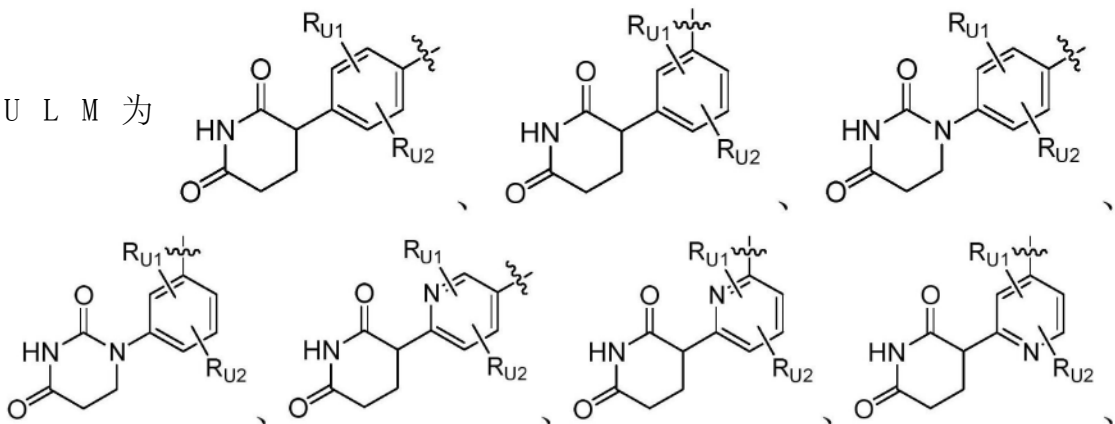
$R_{U1}$  和  $R_{U2}$  各自独立地为  $-C_{1-4}$  烷基、 $-C_{1-4}$  卤代烷基、 $-C_{1-4}$  烷氧基或 - 卤素。

[0051]

在本公开的一个实施方案中，

[0052]

U L M 为





[0071]  $L_3$ 为4至6元环烷基或4至12元杂环烷基{其中4至12元杂环烷基为单环、桥接双环或螺环、4至12元杂环烷基在环中含有至少一个N原子,并且4至6元环烷基或4至12元杂环烷基环的至少一个H可被-卤素取代};以及

[0072]  $L_p$ 为 $-(CH_2)_p-NH-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_p-O-$ {其中 $L_p$ 的 $-C(=O)-$ 或 $-O-$ 与PTM连接,并且 $p$ 为0或1}。

[0073] 在本公开的特定实施方案中,由式I表示的化合物是选自由化合物1至46组成的组的化合物。

[0074] 在本公开中,药用盐是指具有相对无毒、无害且对患者具有有效作用的浓度的任何有机或无机酸加成盐,其中由该盐引起的副作用不损害由式I表示的化合物的有益功效。例如,药用盐可以是无机酸诸如盐酸、磷酸、硫酸、硝酸等,或有机酸诸如甲磺酸、对甲苯磺酸、乙酸、三氟乙酸、马来酸、琥珀酸、草酸、苯甲酸、酒石酸、富马酸、扁桃酸、丙酸、柠檬酸、乳酸、乙醇酸、葡萄糖酸、半乳糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、葡萄糖醛酸、天冬氨酸、抗坏血酸、碳酸、香草酸或氢碘酸,但是不限于此。

[0075] 选择性PLK1降解诱导化合物的用途

[0076] 本公开的一个实施方案是一种用于诱导PLK1降解的组合物,所述组合物包含由式I表示的化合物或其药用盐。式I与上文所定义的相同。

[0077] 在本公开的实验例中,证实了本公开的化合物有效地诱导PLK1的蛋白质降解。

[0078] 鉴于作用机制,本公开的PLK1降解诱导PROTAC化合物能够从根本上降解靶蛋白PLK1,从而与抑制PLK1的简单活性的常规PLK1小分子抑制剂相比实现优异的PLK1抑制作用。

[0079] 因此,包含本公开的由式I表示的化合物或其药用盐的组合物可以有效地用于选择性降解PLK1。

[0080] 本公开的一个实施方案是一种用于预防或治疗PLK1相关疾病的组合物,所述组合物包含由式I表示的化合物或其药用盐。本公开的另一个实施方案是一种用于预防或治疗PLK相关疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用所述组合物。式I与上文所定义的相同。

[0081] 在本公开中,PLK1相关疾病是指能够基于诱导PLK1降解或抑制PLK1活性而被治疗、缓解、延迟、抑制或预防的任何疾病或病况。在一个实施方案中,PLK1相关疾病可以是癌症(恶性肿瘤)、良性肿瘤、神经疾病或由过度细胞分裂引起的其它遗传或非遗传疾病。

[0082] 癌症包括由于抑制PLK1活性而能够表现出预防或治疗功效的所有癌症,并且可以是实体癌或血癌。例如,癌症可以是选自由以下各项组成的组的一种或多种:鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma)、小细胞肺癌(small cell lung cancer)、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer)、肺腺癌(lung adenocarcinoma)、肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma)、腹膜癌(peritoneal cancer)、皮肤癌(skin cancer)、皮肤或眼内黑素瘤(skin or intraocular melanoma)、直肠癌(rectal cancer)、肛门肌肉癌(anal muscle cancer)、食道癌(esophageal cancer)、小肠癌(small intestine cancer)、内分泌癌(endocrine cancer)、甲状旁腺癌(parathyroid cancer)、肾上腺癌(adrenal cancer)、软组织肉瘤(soft tissue sarcoma)、尿道癌(urethral cancer)、慢性或急性白血病(chronic or acute leukemia)、淋巴细胞性淋巴瘤(lymphocytic

lymphoma)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)、胃肠癌(gastrointestinal cancer)、胃癌(gastric cancer)、胰腺癌(pancreatic cancer)、成胶质细胞瘤(glioblastoma)、宫颈癌(cervical cancer)、卵巢癌(ovarian cancer)、肝癌(liver cancer)、膀胱癌(bladder cancer)、肝肿瘤(liver tumor)、乳腺癌(breast cancer)、结肠癌(colon cancer)、结肠直肠癌(colorectal cancer)、子宫内膜癌或子宫癌(endometrial or uterine cancer)、唾液腺癌(salivary gland cancer)、肾癌(kidney cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、外阴癌(vulvar cancer)、甲状腺癌(thyroid cancer)、头颈癌(head and neck cancer)、脑癌(brain cancer)、骨肉瘤(osteosarcoma)、实体瘤(solid tumor)、血癌(blood cancer)、骨癌(bone cancer)、大细胞淋巴瘤(large cell lymphoma)、肾上腺类皮质激素肿瘤(adrenocorticoid tumor)、T细胞淋巴瘤/白血病(t cell lymphoma/leukemia)、神经内分泌癌(neuroendocrine cancer)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor)、胆管癌(cholangiocarcinoma)、成神经细胞瘤(neuroblastoma)、成胶质细胞瘤(glioblastoma)、神经胶质瘤(glioma)等,但是不限于此。癌症不仅包括原发癌,而且还包括转移癌。

[0083] 良性肿瘤包括由于抑制PLK1活性而能够表现出预防或治疗功效的所有良性肿瘤,诸如处于癌前阶段的良性肿瘤,并且可以是实体瘤或血液肿瘤。例如,肿瘤可以是选自以下各项组成的组的一种或多种:巴雷特食管(Barrett's esophagus)、结肠腺瘤和息肉(colon adenoma and polyp)、乳腺纤维腺瘤和囊肿(breast fibroadenoma and cyst)、意义未明的单克隆丙种球蛋白病(monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)、单克隆淋巴细胞增多症(monoclonal lymphocytosis)等,但是不限于此。

[0084] 神经疾病包括由于抑制PLK1活性而能够表现出预防或治疗功效的所有神经疾病,并且具体地可以是选自以下各项组成的组的一种或多种:中枢神经系统疾病(central nervous system disease)、神经变性疾病(neurodegenerative disease)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、帕金森病(Parkinson's disease)、多发性硬化(multiple sclerosis)、亨廷顿病(Huntington's disease)、老年性痴呆(senile dementia)、癫痫(epilepsy)、卢·格里克病(Lou Gehrig)、卒中(stroke)以及脑或脊髓损伤后的神经损伤和轴索变性相关障碍(nerve damage and axonal degeneration-related disorders following brain or spinal cord injury),但是不限于此。

[0085] 除了由上式I表示的化合物或其药用盐以外,本公开的药物组合物还可以包含一种或多种表现出相同或相似药效的活性成分。

[0086] 本公开的一个实施方案是一种通过向哺乳动物(包括人)施用由式I表示的化合物或其药用盐来降解PLK1的方法。

[0087] 本公开的另一个实施方案是一种通过在体外向样品施用由式I表示的化合物或其药用盐来降解PLK1的方法。样品可以是哺乳动物(包括人)的细胞、细胞培养物、体液或组织,但是不限于此。

[0088] 本发明的有利效果

[0089] 本公开的化合物展现出诱导PLK1降解的作用。因此,本公开的化合物可以有效地用于预防或治疗PLK1相关疾病。

## 附图说明

[0090] 图1示出了通过处理本公开的化合物1至化合物46的荧光素酶测定结果。

## 具体实施方式

[0091] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解相同含义。本说明书中使用的术语仅用于描述特定实施方案,并且不旨在限制本公开。

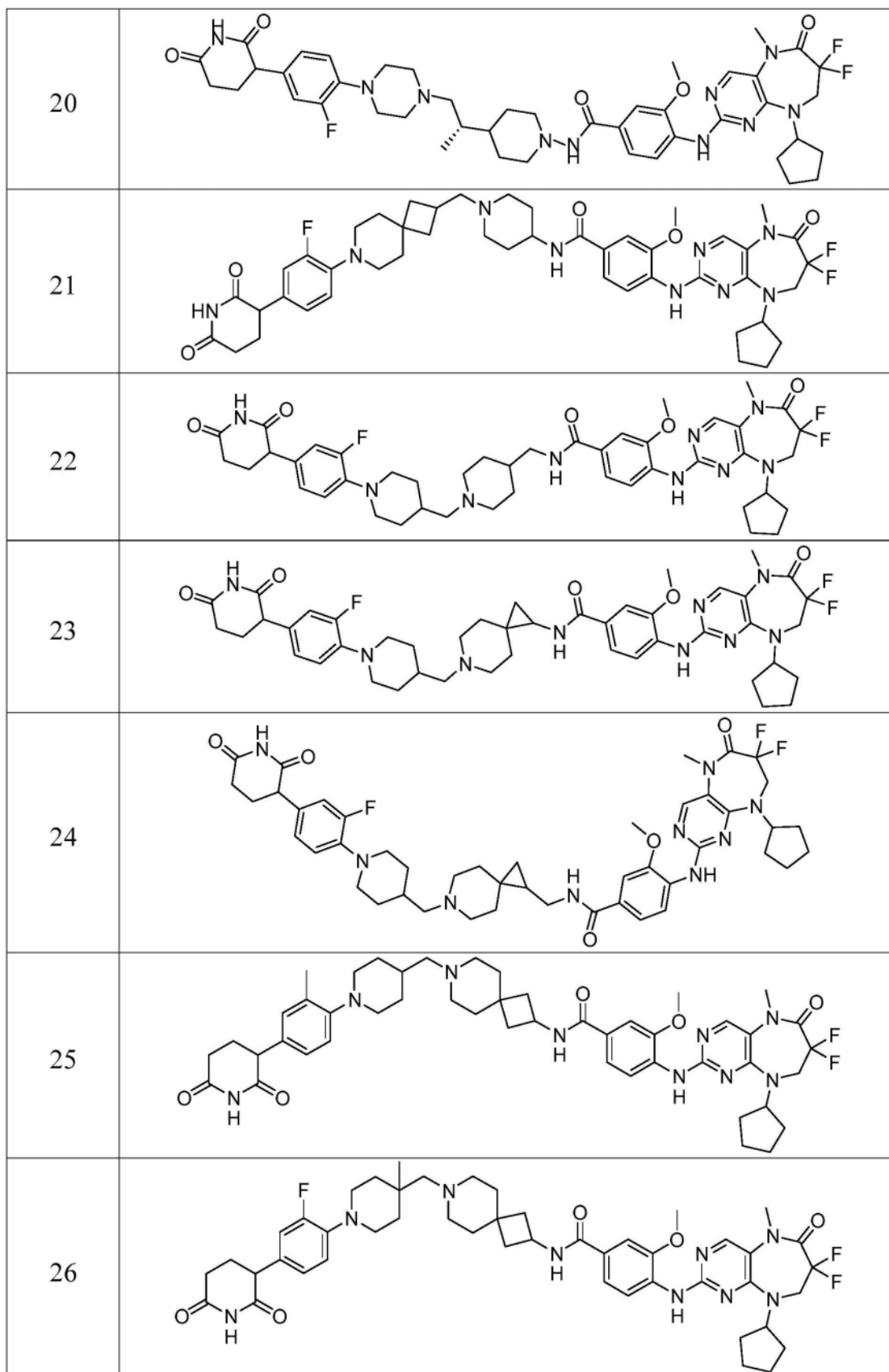
[0092] 本公开提供了下表所示的化合物1至46的合成方法。

[0093] [表1]

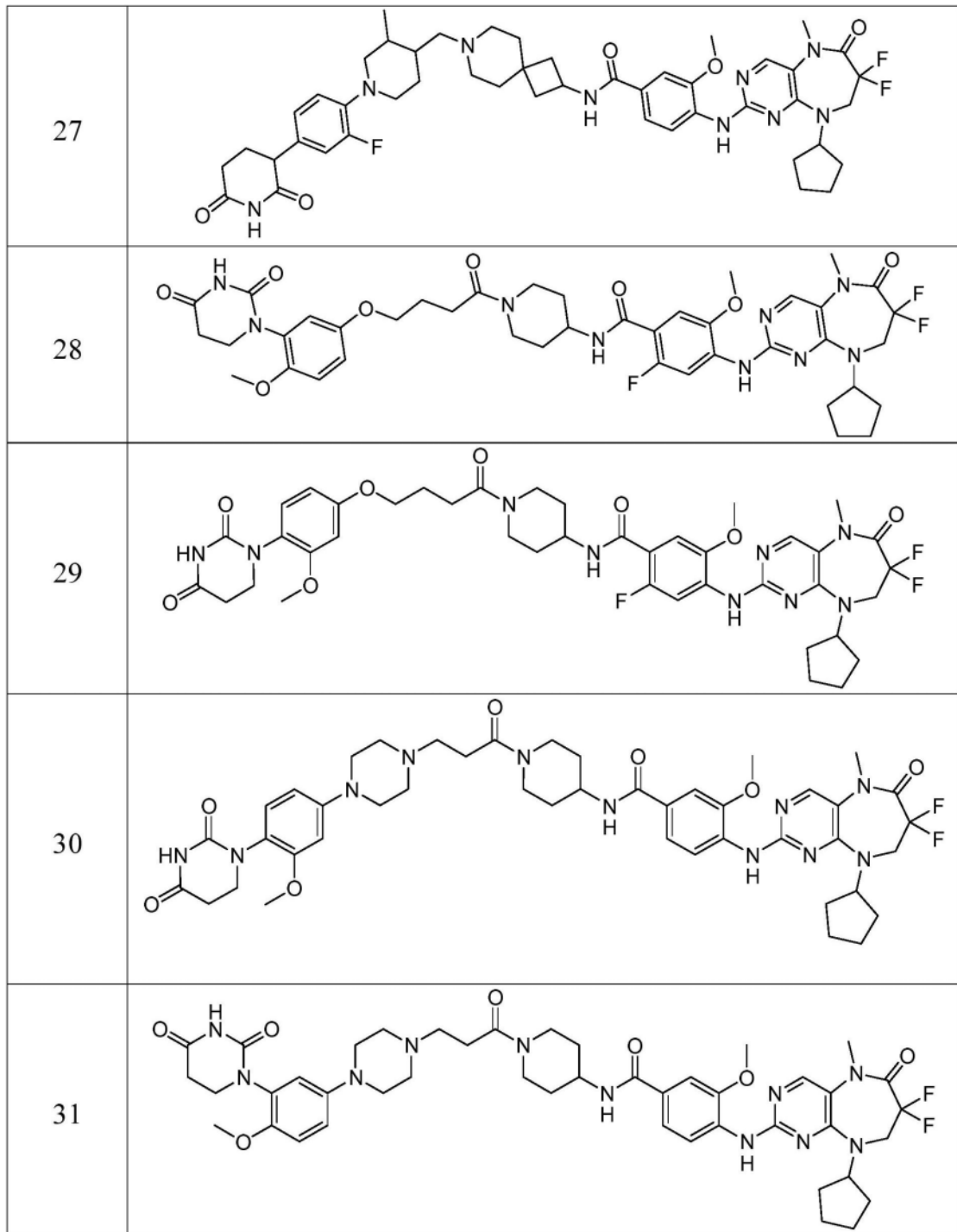
化合物	结构
1	
2	
[0094] 3	
4	
5	



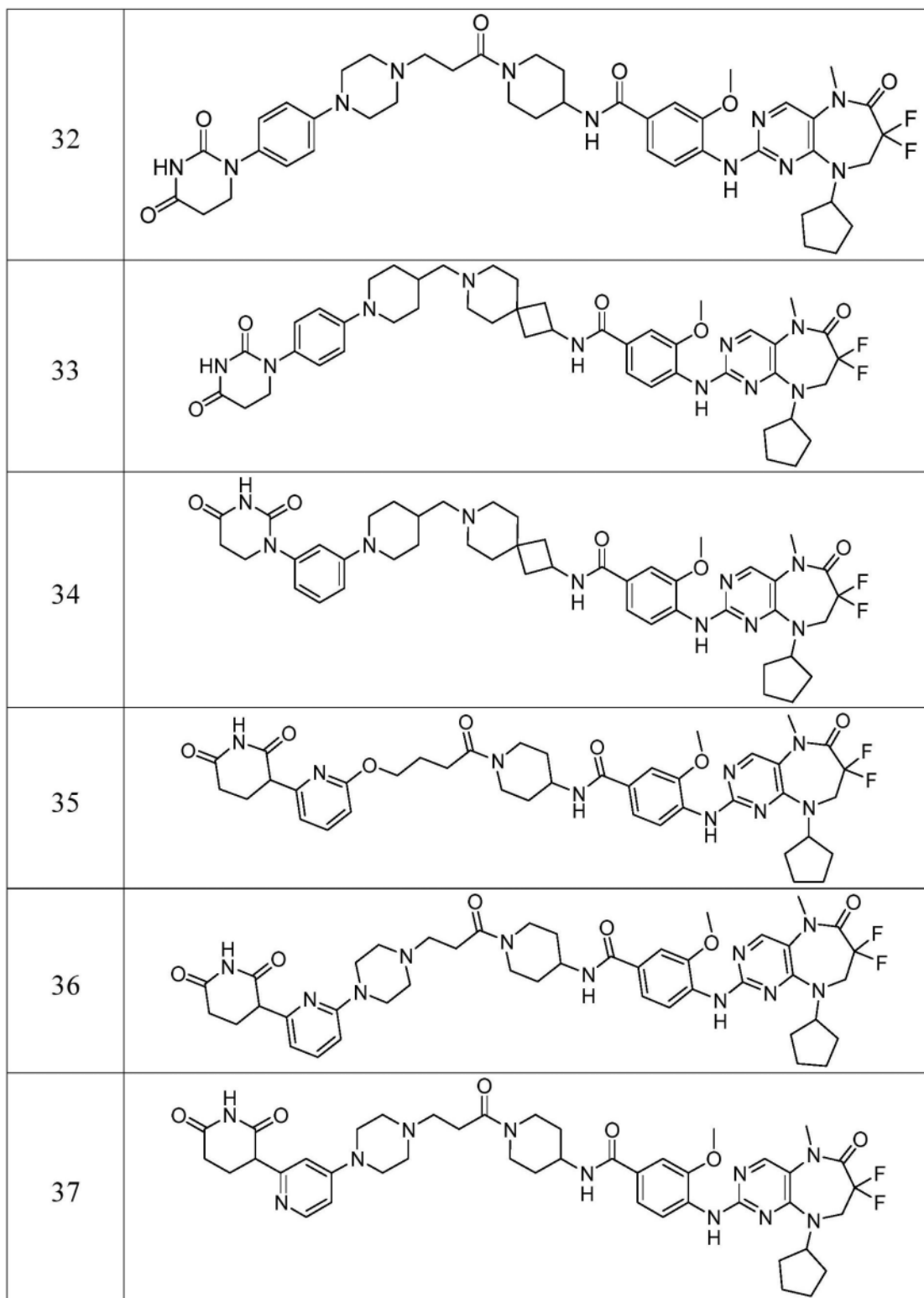




[0097]

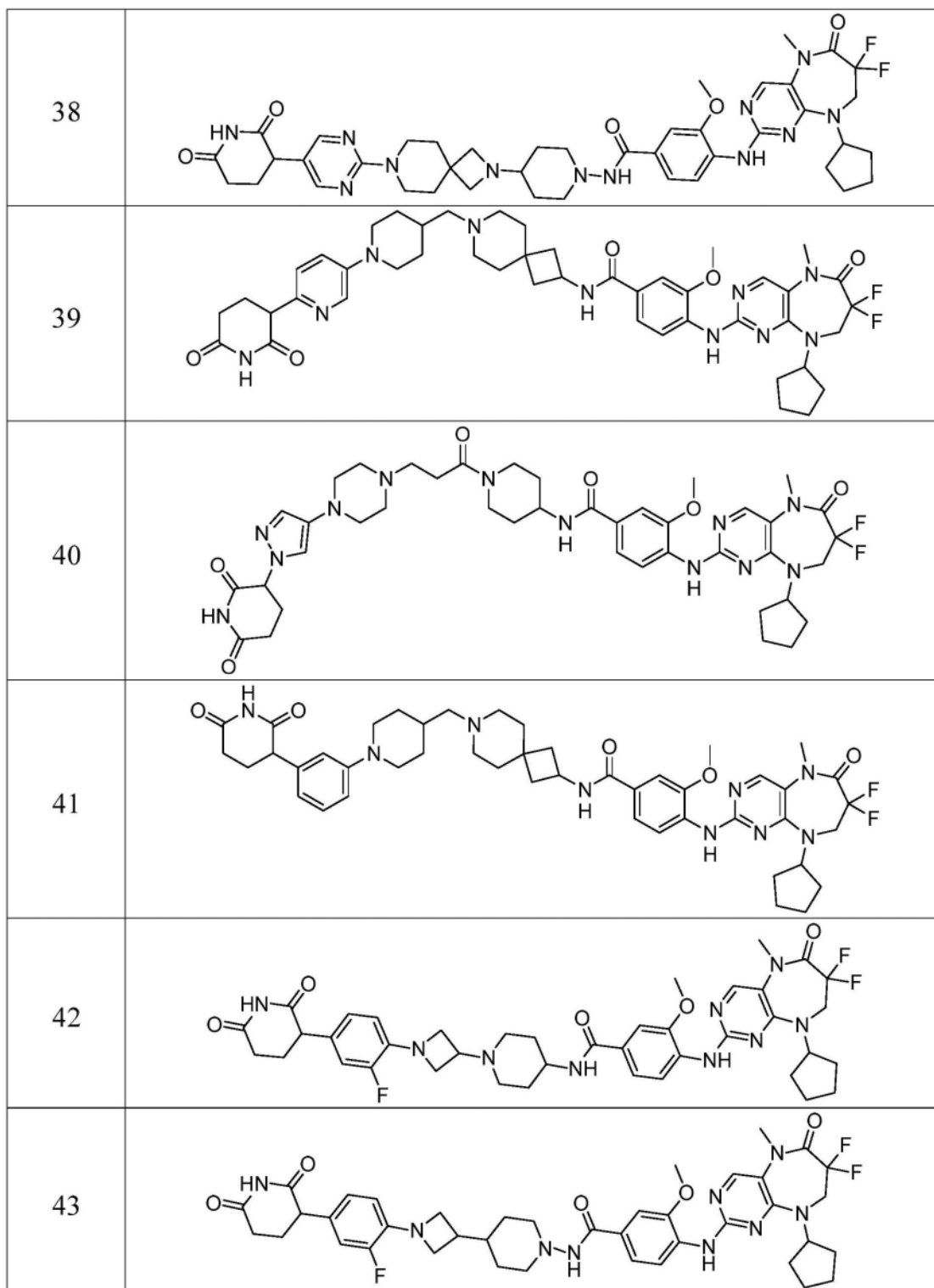


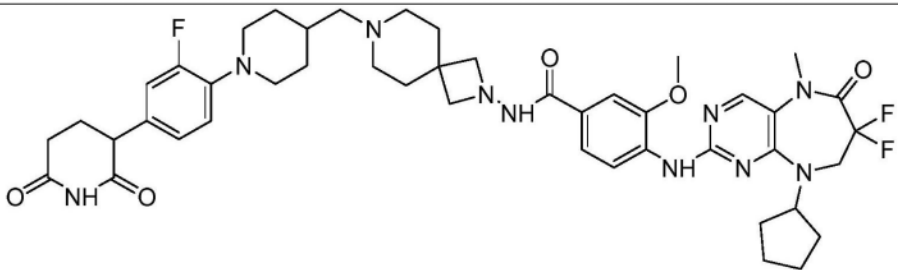
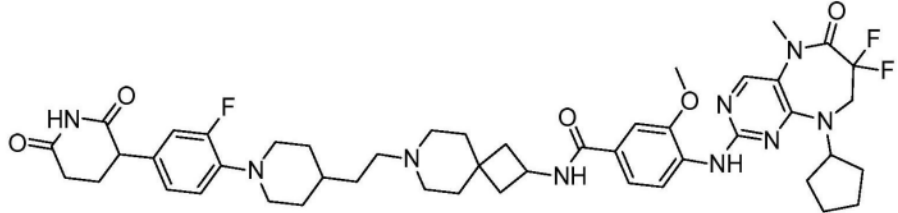
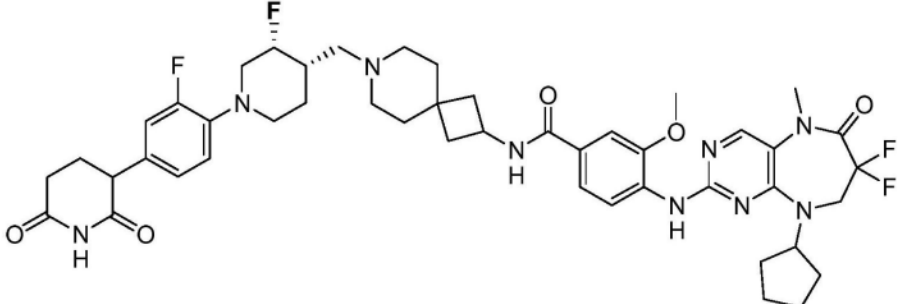
[0098]



[0099]

[0100]



44	
[0101] 45	
46	

[0102] 根据以下方法纯化本公开的化合物并且对结构进行分析。

[0103] 仪器

[0104] LCMS: Shimadzu LCMS-2020, Agilent 1200/G6110A, Agilent 1200/G1956A

[0105] HPLC: Agilent 1260II LC, Agilent 1200/G6410B

[0106] NMR: BRUKER AVANCE/400MHZ

[0107] SFC: SHIMADZU LC-30ADsf, Agilent 1260

[0108] LCMS分析

[0109] 使用配备有ESI(电喷雾电离)装置的Shimadzu LCMS-2020或Agilent 1200/G6110A或Agilent 1200/G1956A记录LCMS数据。使用在水中的0.0375% TFA(溶剂A)和在ACN中的0.01875% TFA(溶剂B)或者在水中的0.025%  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (溶剂A)和ACN(溶剂B)作为流动相。使用Kinetex EVO C18(2.1×30mm, 5 $\mu\text{m}$ )或HALO C18(3.0×30mm, 2.7 $\mu\text{m}$ )作为柱。

[0110] HPLC分析

[0111] 在HPLC分析中,使用Agilent 1260II LC或Agilent 1200/G6410B。使用在水中的0.0375% TFA(溶剂A)和在ACN中的0.01875% TFA(溶剂B)作为流动相。使用Zobrax Eclipse Plus C18(4.6×150mm, 3.5 $\mu\text{m}$ )或YMC ODS A(4.6×150mm, 3 $\mu\text{m}$ )作为柱。

[0112] NMR分析

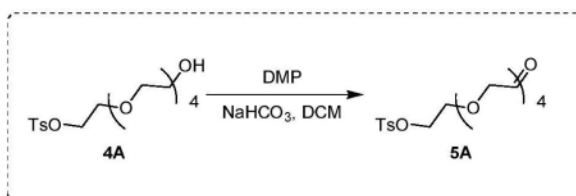
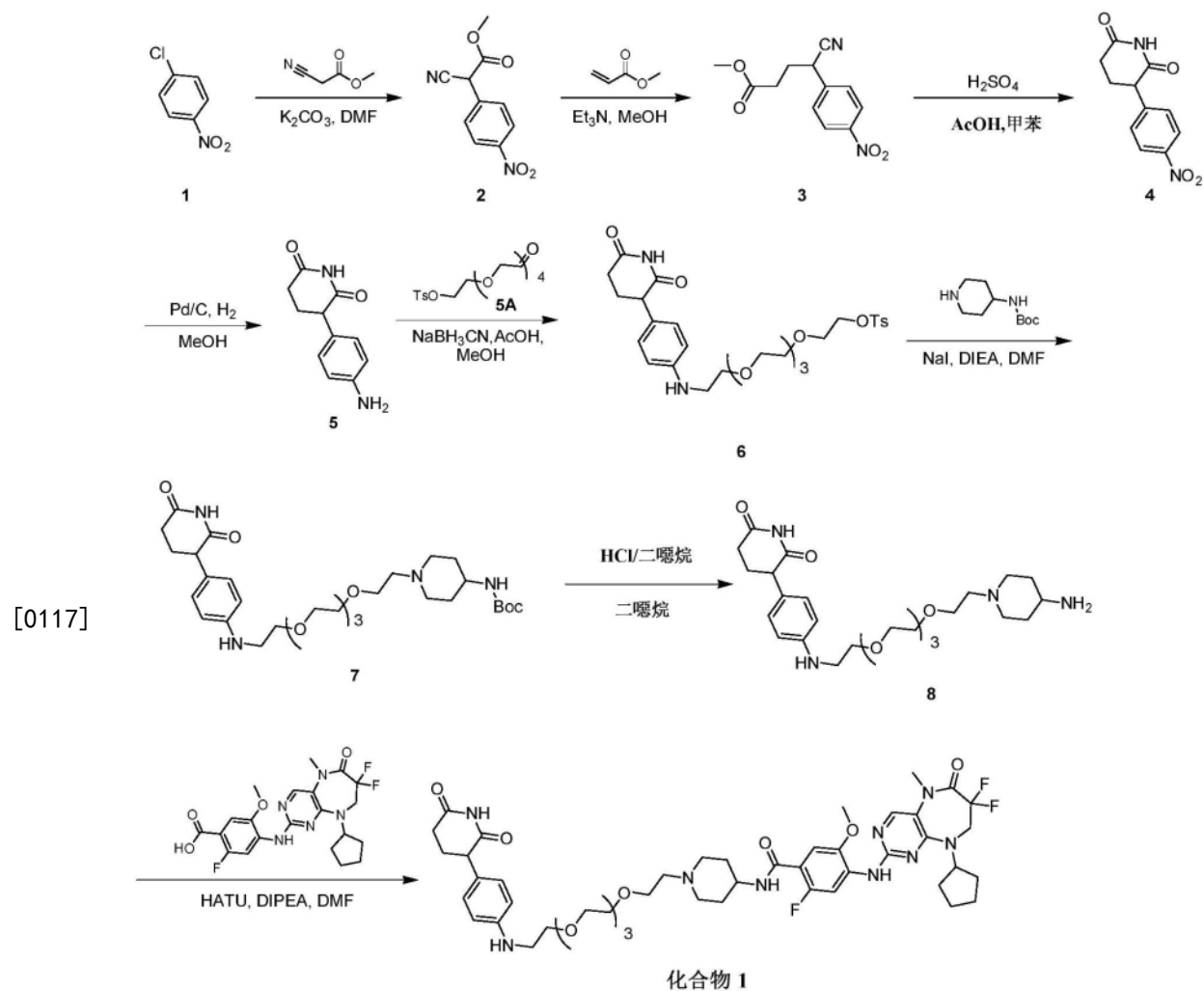
[0113] 使用Bruker AVANCE III 400MHz/5mm探针(BBO)记录 $^1\text{H}$  NMR谱。

[0114] SFC分析

[0115] 在SFC分析中,使用SHIMADZU LC-30ADsf或Agilent 1260。使用 $\text{CO}_2$ (溶剂A)和在IPA+ACN中的0.05% DEA(溶剂B)或者 $\text{CO}_2$ (溶剂A)和在MeOH+ACN中的0.05% DEA(溶剂B)或者在ACN中的0.05% DEA(溶剂A)和在EtOH中的0.05% DEA(溶剂B)作为流动相。使用Chiralpak

AD-3 (50×4.6mm, 3 $\mu$ m) 或 Chiralpak AS-3 (50×4.6mm, 3 $\mu$ m) 或 Chiralpak OJ-3 (50×4.6mm, 3 $\mu$ m) 或 Chiralpak IA-3 (50×4.6mm, 3 $\mu$ m) 或 Chiralpak OD (50×4.6mm, 3 $\mu$ m) 或 Chiralpak IC-3 (50×4.6mm, 3 $\mu$ m) 或 (S,S)WHELK-01 (100×4.6mm, 3.5 $\mu$ m) 作为柱。

[0116] 实施例1. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(1-(14-((4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物1)的合成



[0118] 步骤1. 2-氰基-2-(4-硝基苯基)乙酸甲酯(2)的合成

[0119] 在120℃下,向1-氯-4-硝基-苯(15g, 95.21mmol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(26.32g, 190.41mmol)在DMF(150mL)中的混合物中加入2-氰基乙酸甲酯(18.87g, 190.41mmol),并且将所得混合物在120℃下搅拌12小时。TLC(石油醚/EtOAc=3/1)显示反应完成,将反应混合物用H<sub>2</sub>O(1000mL)稀释,并且用EtOAc(300mL×3)萃取。将有机层用盐水(800mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(120g SepaFlash®硅胶快速柱,0-20%

EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到2-氰基-2-(4-硝基苯基)乙酸甲酯(27g,粗品),为黄色固体。 $MS(M+H)^+ = 221.2$

[0120]  $^1H$  NMR(400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 8.33-8.31(m, 2H)$ ,  $7.72-7.69(m, 2H)$ ,  $4.90(s, 1H)$ ,  $3.87(s, 3H)$ .

[0121] 步骤2. 4-氰基-4-(4-硝基苯基)丁酸甲酯(3)的合成

[0122] 向2-氰基-2-(4-硝基苯基)乙酸甲酯(10g, 45.42mmol)在MeOH(100mL)中的溶液中加入 $Et_3N$ (9.19g, 90.83mmol, 12.64mL)和丙-2-烯酸甲酯(3.91g, 45.42mmol, 4.09mL),并且将所得混合物在60℃下搅拌12小时。TLC(石油醚/EtOAc=1/1)显示反应完成,将反应混合物用水(200mL)稀释,然后在真空下蒸馏以除去MeOH,将水层用EtOAc(100mL×3)萃取,将合并的有机物用水(200mL×2)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(80g SepaFlash®硅胶快速柱,0-50%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到4-氰基-4-(4-硝基苯基)丁酸甲酯(10g,粗品),为红色液体。 $MS(M+H)^+ = 249.2$

[0123] 步骤3. 3-(4-硝基苯基)哌啶-2,6-二酮(4)的合成

[0124] 向4-氰基-4-(4-硝基苯基)丁酸甲酯(10g, 40.28mmol)在甲苯(100mL)中的溶液中加入 $H_2SO_4$ (9.87g, 100.63mmol, 5.36mL)和AcOH(6.04g, 100.58mmol, 5.75mL),并且将所得混合物在110℃下搅拌12小时。TLC(EtOAc/石油醚=2/1)显示反应完成,将反应混合物用 $H_2O$ (10mL)稀释,并且用EtOAc(10mL×3)萃取。将有机层用盐水(30mL×3)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®;80g SepaFlash®硅胶快速柱,0-50%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到3-(4-硝基苯基)哌啶-2,6-二酮(1.6g, 6.83mmol, 收率16.96%),为红色固体。 $MS(M+H)^+ = 235.2$

[0125]  $^1H$  NMR(400MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta = 8.21-8.06(m, 2H)$ ,  $7.57-7.38(m, 2H)$ ,  $3.70(t, J = 7.3Hz, 1H)$ ,  $2.27-1.99(m, 3H)$ ,  $1.90-1.73(m, 1H)$ .

[0126] 步骤4. 3-(4-氨基苯基)哌啶-2,6-二酮(5)的合成

[0127] 在 $N_2$ 气氛下,向3-(4-硝基苯基)哌啶-2,6-二酮(1.6g, 6.83mmol)在MeOH(20mL)中的溶液中加入Pd/C(200mg, 纯度10%),并且将所得混合物在 $H_2$ (15psi)下于20℃下搅拌12小时。TLC(石油醚/EtOAc=1/2)显示反应完成,过滤混合物并且浓缩滤液。将残余物通过快速硅胶层析(12g SepaFlash®硅胶快速柱,0-60%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到3-(4-氨基苯基)哌啶-2,6-二酮(0.6g, 2.94mmol, 收率43.01%),为白色固体。 $MS(M+H)^+ = 205.2$

[0128] 步骤5. 4-甲基苯磺酸14-氧代-3,6,9,12-四氧杂十四烷基酯(5A)的合成

[0129] 向4-甲基苯磺酸14-羟基-3,6,9,12-四氧杂十四烷基酯(1g, 2.55mmol)在DCM(20mL)中的溶液中加入DMP(1.40g, 3.31mmol)和 $NaHCO_3$ (2.14g, 25.48mmol),并且将所得混合物在20℃下搅拌2小时。LCMS显示反应完成,过滤混合物并且浓缩滤液。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®;20g SepaFlash®硅胶快速柱,0-10%甲醇/EtOAc梯度的洗脱液,50mL/min)纯化,得到4-甲基苯磺酸14-氧代-3,6,9,12-四氧杂十四烷基酯(0.65g, 1.66mmol, 收率65.34%),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+ = 391.1$

[0130] 步骤6. 4-甲基苯磺酸14-((4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基酯(6)的合成

[0131] 向3-(4-氨基苯基)哌啶-2,6-二酮(250mg,1.22mmol)和4-甲基苯磺酸14-氧代-3,6,9,12-四氧杂十四烷基酯(621.35mg,1.59mmol)在MeOH(5mL)中的溶液中加入 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ (230.78mg,3.67mmol)和AcOH(7.35mg,122.41 $\mu\text{mol}$ ),并且将所得混合物在20℃下搅拌12小时。LCMS显示反应完成。将混合物倒入水(50mL)中,并且用EtOAc(20mL $\times$ 3)萃取,将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®;20gSepaFlash®硅胶快速柱,0-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到4-甲基苯磺酸14-((4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基酯(0.55g,741.35 $\mu\text{mol}$ ,收率60.56%,纯度78%),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=579.1$

[0132] 步骤7. (1-(14-((4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(7)的合成

[0133] 向4-甲基苯磺酸14-((4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基酯(0.45g,777.64 $\mu\text{mol}$ )和N-(4-哌啶基)氨基甲酸叔丁酯(233.62mg,1.17mmol)在DMF(5mL)中的溶液中加入NaI(11.66mg,77.76 $\mu\text{mol}$ )和DIPEA(201.01mg,1.56mmol),并且将所得混合物在100℃下搅拌12小时。LCMS显示反应消耗,将混合物倒入水(20mL)中,并且用EtOAc(20mL $\times$ 3)萃取,将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩,将残余物通过制备型TLC(EtOAc)纯化,得到(1-(14-((4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(260mg,407.09 $\mu\text{mol}$ ,收率52.35%,纯度95%),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=607.4$

[0134] 步骤8. 3-(4-((14-(4-氨基哌啶-1-基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基)氨基)苯基)哌啶-2,6-二酮(8)的合成

[0135] 向(1-(14-((4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(130mg,214.26 $\mu\text{mol}$ )在二噁烷(2mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,2mL),并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示反应完成,将反应浓缩,得到3-(4-((14-(4-氨基哌啶-1-基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基)氨基)苯基)哌啶-2,6-二酮(120mg,粗品,HCl),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=507.3$

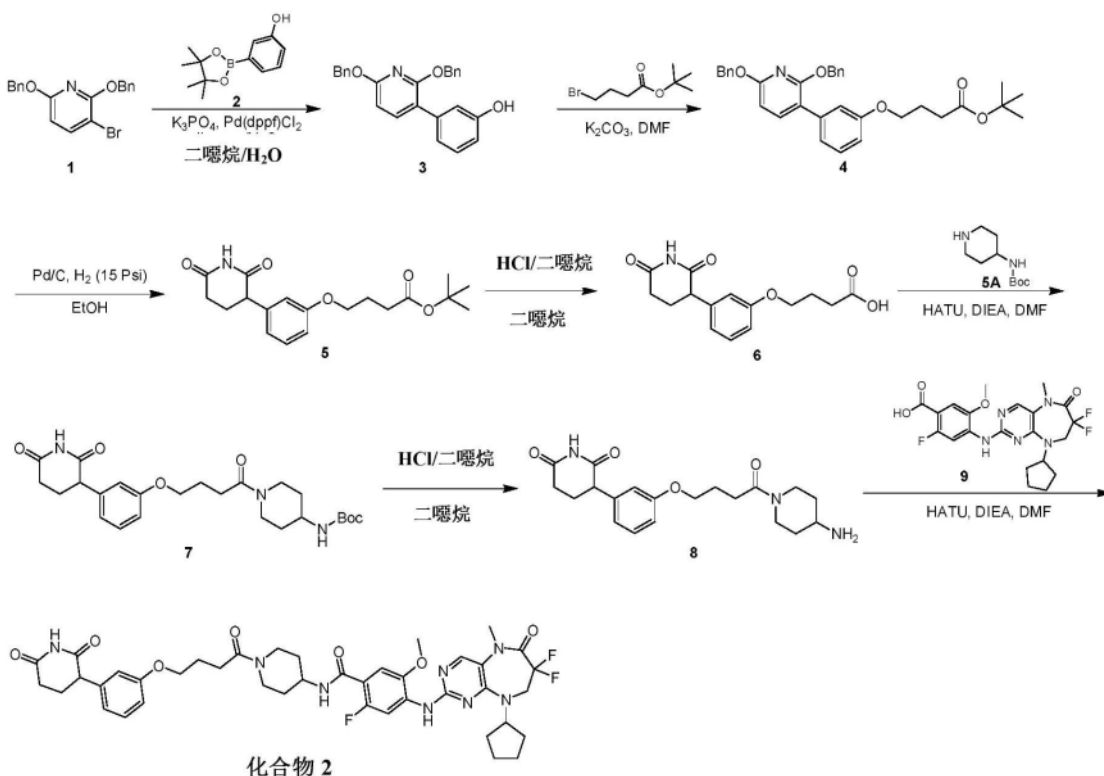
[0136] 步骤9. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂 $\text{草}$ -2-基)氨基)-N-(1-(14-((4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物1)的合成

[0137] 向3-(4-((14-(4-氨基哌啶-1-基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷基)氨基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.12g,220.96 $\mu\text{mol}$ ,HCl)和4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂 $\text{草}$ -2-基)氨基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酸(113.12mg,243.05 $\mu\text{mol}$ )在DMF(2mL)中的溶液中加入HATU(126.02mg,331.43 $\mu\text{mol}$ )和DIPEA(114.23mg,883.82 $\mu\text{mol}$ ),并且将所得混合物在20℃下搅拌12小时。LCMS显示反应完成,将混合物倒入水(20mL)中,并且用EtOAc(20mL $\times$ 3)萃取,将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩,将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi  $\text{C}_{18}$  150 $\times$ 25mm $\times$ 10 $\mu\text{m}$ ;流动相:[水(0.225%FA)-ACN];B%:16%-46%,10min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂 $\text{草}$ -2-基)氨基)-N-(1-(14-((4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)氨基)-3,6,9,12-四氧杂十四烷

基)吡啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺 (52.9mg, 52.68 $\mu$ mol, 收率23.84%, 纯度95%), 为白色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 954.5

[0138] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 10.74 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.25 (d, J = 13.3Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.93-7.86 (m, 1H), 7.20 (d, J = 6.6Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.5Hz, 2H), 6.55 (d, J = 8.5Hz, 2H), 5.48 (s, 1H), 4.83 (t, J = 7.9Hz, 1H), 4.08 (t, J = 13.8Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.76-3.74 (m, 2H), 3.64 (dd, J = 5.1, 10.4Hz, 2H), 3.59-3.55 (m, 6H), 3.53-3.52 (m, 10H), 3.18 (s, 2H), 2.90-2.87 (m, 2H), 2.61-2.55 (m, 2H), 2.47-2.43 (m, 1H), 2.18-2.05 (m, 4H), 2.03-1.91 (m, 4H), 1.83-1.72 (m, 3H), 1.63-1.47 (m, 6H).

[0139] 实施例2. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(4-(3-(2,6-二氧代吡啶-3-基)苯氧基)丁酰基)吡啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺 (化合物2) 的合成



[0141] 步骤1. 3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯酚 (3) 的合成

[0142] 向3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊)-2-基)苯酚 (1g, 4.54mmol)、2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶 (1.68g, 4.54mmol) 和K<sub>3</sub>P<sub>4</sub> (2.89g, 13.63mmol) 在H<sub>2</sub>O (4mL) 和二噁烷 (20mL) 中的混合物中加入Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (332.48mg, 454.40 $\mu$ mol), 并且将所得混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫三次, 并且加热至110 $^{\circ}$ C并且搅拌14小时。LCMS显示起始材料消耗, 并且显示具有期望质量的峰 (85%)。将混合物倒入水 (100mL) 中, 并且用EtOAc (50mL  $\times$  3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (100mL) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析 (ISCO<sup>®</sup>; 20g SepaFlash<sup>®</sup> 硅胶快速柱, 0-30% EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 80mL/min) 纯化, 得到3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯酚 (1.8g, 粗品), 为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 384.1

[0143] 步骤2. 4-(3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯 (4) 的合成

[0144] 向3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯酚(1.8g,4.69mmol)和4-溴丁酸叔丁酯(1.15g,5.16mmol)在DMF(30mL)中的溶液中加入 $K_2CO_3$ (1.95g,14.08mmol),并且将所得混合物在60℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗,并且显示具有期望质量的峰(97%)。将混合物倒入水(100mL)中,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并真空浓缩,得到4-(3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(2.5g,粗品),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+=526.2$

[0145] 步骤3. 4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(5)的合成

[0146] 在 $N_2$ 气氛下,向4-(3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(2g,3.80mmol)在EtOH(40mL)中的溶液中加入Pd/C(200mg,纯度10%),并且将所得混合物在 $H_2$ (15psi)下于20℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗,并且检测到期望质量(77%)。将反应过滤并且将滤液浓缩,得到4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(1g,2.88mmol,收率75.65%),为黄色油状物。 $MS(M+Na)^+=370.2$

[0147] 步骤4. 4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸(6)的合成

[0148] 向4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(1g,2.88mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,10mL),并且将所得混合物在25℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗,将反应混合物真空浓缩,得到4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸(1.0g,粗品),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+=293.3$

[0149] 步骤5. (1-(4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(7)的合成

[0150] 向4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸(500mg,1.72mmol)和哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯(343.77mg,1.72mmol)在DMF(5mL)中的溶液中加入HATU(978.97mg,2.57mmol)和DIPEA(665.52mg,5.15mmol,896.93 $\mu$ L),并且将所得混合物在20℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗,并且显示具有期望质量的峰(29%)。将混合物倒入水(100mL)中,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,0-90%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到(1-(4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(0.3g,633.50 $\mu$ mol,收率36.91%),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+=474.1$

[0151] 步骤6. 3-(3-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)苯基)哌啶-2,6-二酮(8)的合成

[0152] 向(1-(4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(0.3g,633.50 $\mu$ mol)的二噁烷(5mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,5mL),并且将所得混合物在25℃下搅拌0.5小时。LCMS显示起始材料消耗,并且显示具有期望质量的峰(81%)。将反应过滤并且浓缩滤液,得到3-(3-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.3g,粗品,HCl盐),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+=374.1$

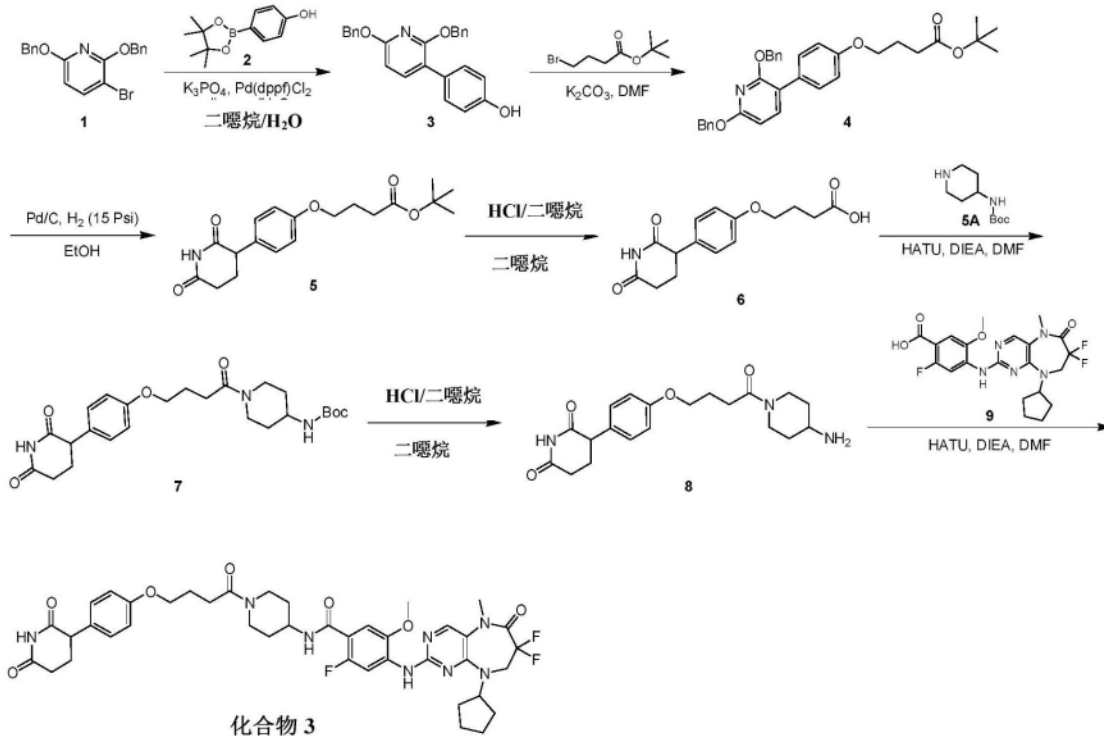
[0153] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(1-(4-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物2)的合成

[0154] 向3-(3-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)苯基)哌啶-2,6-二酮(260mg,

634.29 $\mu$ mol, HCl盐)和4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酸(295.22mg, 634.29 $\mu$ mol)在DMF(5mL)中的溶液中加入HATU(361.77mg, 951.44 $\mu$ mol)和DIPEA(245.93mg, 1.90mmol, 331.45 $\mu$ L),并且将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗,并且显示具有期望质量的峰(59%)。将混合物倒入水(20mL)中,并且用EtOAc(20mL $\times$ 3)萃取,将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将所得混合物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge C18 150 $\times$ 50mm $\times$ 10 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:36%-66%,11min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(66.3mg, 79.15 $\mu$ mol, 收率12.48%, 纯度98%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=821.4

[0155] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.88(s, 1H), 8.36(s, 1H), 8.31(d, J=13.4Hz, 1H), 8.10(s, 1H), 8.02(dd, J=2.9, 7.6Hz, 1H), 7.34-7.23(m, 2H), 6.90(dd, J=2.1, 8.1Hz, 1H), 6.87-6.82(m, 2H), 4.94-4.83(m, 1H), 4.39(br d, J=12.9Hz, 1H), 4.19-4.08(m, 3H), 4.04(br t, J=6.4Hz, 3H), 3.98(s, 3H), 3.95-3.85(m, 2H), 3.39(s, 3H), 3.20(br t, J=11.6Hz, 1H), 2.84-2.66(m, 2H), 2.54-2.50(m, 2H), 2.33-2.20(m, 1H), 2.11-1.99(m, 4H), 1.94-1.90(m, 2H), 1.82-1.96(m, 2H), 1.74-1.61(m, 4H), 1.57-1.37(m, 2H).

[0156] 实施例3. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物3)的合成



[0158] 步骤1. 4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯酚(3)的合成

[0159] 向4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)苯酚(594.40mg, 2.70mmol)、2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶(1g, 2.70mmol)和K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(1.72g, 8.10mmol)在二噁烷

(15mL)和H<sub>2</sub>O(3mL)中的混合物中加入Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(197.63mg,270.10μmol),并且将所得混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫三次,并且加热至110℃并且搅拌14小时。LCMS显示起始材料消耗,并且检测到期望质量(89%)。将混合物倒入水(100mL)中,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,0-30%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯酚(1g,2.61mmol,收率96.56%),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=384.1

[0160] 步骤2. 4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(4)的合成

[0161] 向4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯酚(1g,2.61mmol)和4-溴丁酸叔丁酯(640.04mg,2.87mmol)在DMF(20mL)中的溶液中加入K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.08g,7.82mmol),并且将所得混合物在60℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗,并且显示具有期望质量的主峰(98%)。将混合物倒入水(100mL)中,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(1.5g,粗品),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=526.2

[0162] 步骤3. 4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(5)的合成

[0163] 在N<sub>2</sub>气氛下,向4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(1.5g,2.85mmol)在EtOH(20mL)中的溶液中加入Pd/C(150mg,纯度10%),并且将所得混合物在H<sub>2</sub>(15psi)下于20℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗,并且显示具有期望质量的峰(81%)。过滤反应混合物并且浓缩滤液,得到4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(0.8g,2.30mmol,收率80.69%),为黄色油状物。MS(M+Na)<sup>+</sup>=370.2

[0164] 步骤4. 4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸(6)的合成

[0165] 向4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸叔丁酯(0.8g,2.30mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,8.00mL),并且将所得混合物在25℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗。将反应过滤并且将滤液浓缩,得到4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸(1g,粗品),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=292.3

[0166] 步骤5. (1-(4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(7)的合成

[0167] 向4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酸(500.00mg,1.72mmol)和哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯(343.77mg,1.72mmol)在DMF(5mL)中的溶液中加入HATU(978.97mg,2.57mmol)和DIPEA(665.50mg,5.15mmol,896.90μL),并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料消耗,并且显示具有期望质量的峰(63%)。将混合物倒入水(100mL)中,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,0-90%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到(1-(4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(0.3g,589.15μmol,收率34.32%,纯度93%),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=474.3

[0168] 步骤6. 3-(4-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)苯基)哌啶-2,6-二酮(8)的合成

[0169] 向(1-(4-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁

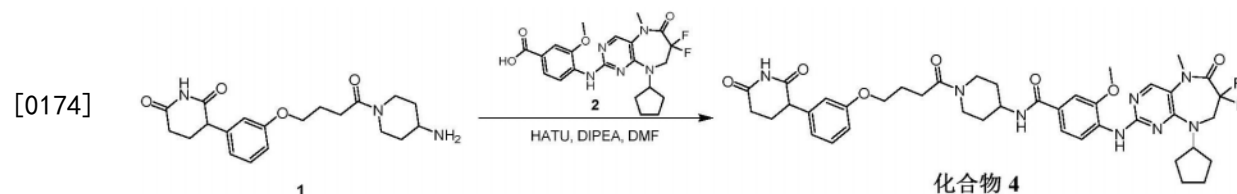
酯(300.00mg, 633.50 $\mu$ mol)在二噁烷(5mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M, 5mL), 并且将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌0.5小时。LCMS显示起始材料消耗, 并且检测到期望质量。将反应过滤并且浓缩滤液, 得到3-(4-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.3g, 粗品, HCl盐), 为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=374.2

[0170] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物3)的合成

[0171] 向3-(4-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)苯基)哌啶-2,6-二酮(150.00mg, 365.94 $\mu$ mol, HCl盐)和4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酸(170.32mg, 365.94 $\mu$ mol)在DMF(5mL)中的溶液中加入HATU(208.71mg, 548.91 $\mu$ mol)和DIPEA(141.88mg, 1.10mmol, 191.22 $\mu$ L), 并且将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌12小时。LCMS显示起始材料消耗, 并且显示具有期望质量的峰(73%)。将混合物倒入水(20mL)中, 并且用EtOAc(20mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。将所得混合物通过制备型HPLC(柱: Waters Xbridge C18 150 $\times$ 50mm $\times$ 10 $\mu$ m; 流动相: [水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 35%-65%, 11min)纯化, 并且将洗脱液冻干, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(69mg, 82.38 $\mu$ mol, 收率22.51%, 纯度98%), 为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=821.4

[0172] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.79(s, 1H), 8.30(s, 1H), 8.25(d, J=13.4Hz, 1H), 8.04(s, 1H), 7.96(dd, J=3.1, 7.6Hz, 1H), 7.20(d, J=6.6Hz, 1H), 7.12(d, J=8.6Hz, 2H), 6.89(d, J=8.8Hz, 2H), 4.90-4.75(m, 1H), 4.32(br d, J=12.9Hz, 1H), 4.15-4.01(m, 3H), 4.07-3.96(m, 3H), 3.91(s, 3H), 3.89-3.81(m, 1H), 3.78-3.76(m, 1H), 3.33(br s, 3H), 3.13(br t, J=11.7Hz, 1H), 2.77-2.60(m, 2H), 2.52-2.46(m, 2H), 2.47-2.43(m, 1H), 2.22-2.09(m, 1H), 2.01-1.92(m, 4H), 1.85-1.80(m, 2H), 1.75-1.71(m, 2H), 1.64-1.60(m, 4H), 1.52-1.30(m, 2H).

[0173] 实施例4. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物4)的合成



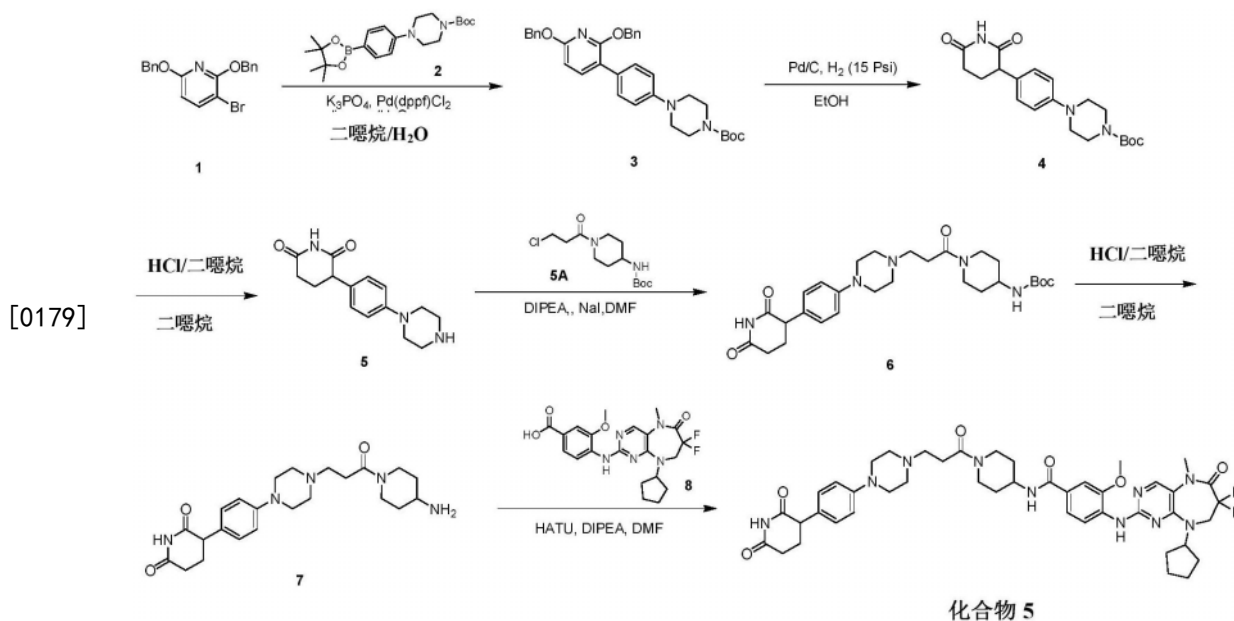
[0175] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(800mg, 1.79mmol)在DMF(6mL)中的溶液中加入HATU(747.82mg, 1.97mmol)和DIPEA(462.17mg, 3.58mmol, 622.86 $\mu$ L), 将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌10分钟, 并且加入3-(3-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)苯基)哌啶-2,6-二酮(952.77mg, 2.32mmol, HCl)在DMF(6mL)中的溶液和DIPEA(462.17mg, 3.58mmol, 622.86 $\mu$ L),

并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示所有起始材料消耗,并且显示具有期望质量的峰(74%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(60mL)稀释,并且用EtOAc(60mL×5)萃取。将有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna C18 150×40mm×15μm;流动相:[水(FA)-ACN];B%:38%-68%,10min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到两个批次的标题化合物,批次1:(438.5mg,543.98μmol,收率30.42%,纯度97.7%),为白色固体;批次2:(302mg,纯度92%),将批次2通过制备型HPLC(柱:Unisil 3-100C18 Ultra 150×50mm×3μm;流动相:[水(FA)-ACN];B%:35%-65%,10min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(3-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(184.3mg,229.09μmol,收率12.81%,纯度99.8%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=803.1

[0176] 批次1(438.5mg):<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.82(s,1H),8.30-8.23(m,2H),8.14(d,J=7.4Hz,1H),8.01(s,1H),7.51-7.44(m,2H),7.23(t,J=7.9Hz,1H),6.84(dd,J=2.1,7.9Hz,1H),6.81-6.75(m,2H),4.77(quin,J=8.1Hz,1H),4.41(br d,J=13.1Hz,1H),4.13-3.86(m,10H),3.81(dd,J=4.9,11.4Hz,1H),3.32(s,3H),3.12(br t,J=12.1Hz,1H),2.72-2.60(m,2H),2.53-2.51(m,1H),2.45(br t,J=4.3Hz,1H),2.27-2.14(m,1H),2.06-1.99(m,1H),1.99-1.90(m,4H),1.89-1.78(m,2H),1.76-1.66(m,2H),1.66-1.55(m,4H),1.52-1.33(m,2H)。

[0177] 批次2(184mg):<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.82(s,1H),8.30-8.24(m,2H),8.14(br d,J=7.8Hz,1H),7.97(s,1H),7.50-7.46(m,2H),7.23(t,J=7.8Hz,1H),6.84(dd,J=2.1,8.0Hz,1H),6.81-6.75(m,2H),4.82-4.70(m,1H),4.40(br d,J=14.0Hz,1H),4.14-3.85(m,10H),3.81(dd,J=4.9,11.4Hz,1H),3.32(br s,3H),3.17-3.07(m,1H),2.69-2.60(m,2H),2.48-2.40(m,2H),2.21(dq,J=4.3,12.1Hz,1H),2.06-1.99(m,1H),1.99-1.90(m,4H),1.89-1.78(m,2H),1.75-1.66(m,2H),1.65-1.54(m,4H),1.52-1.33(m,2H)。

[0178] 实施例5. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)苯基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物5)的合成



[0180] 步骤1. 4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(3)的合成

[0181] 在25℃下,向2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶(500mg,1.35mmol)、4-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧化硼杂环戊-2-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(524.40mg,1.35mmol)和 $K_3PO_4$ (859.98mg,4.05mmol)在二噁烷(12mL)和 $H_2O$ (2mL)中的混合物中加入Pd(dppf) $Cl_2$ (98.82mg,135.05 $\mu$ mol)。将所得混合物用 $N_2$ 吹扫并脱气三次,加热至100℃并且搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将反应混合物用EtOAc(40mL)稀释,经 $Na_2SO_4$ 干燥并过滤。将滤液浓缩,得到粗产物,将粗产物通过快速硅胶层析(4g硅胶柱,EtOAc/石油醚=0-5%,40mL/min)纯化,得到4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(700mg,1.27mmol,收率93.96%,纯度100%),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=552.3

[0182] 步骤2. 4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0183] 将4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(700mg,1.27mmol)和Pd/C(200mg,纯度10%)在EtOH(20mL)中的混合物用 $H_2$ 搅拌吹扫并脱气三次,然后在 $H_2$ (15psi)下于25℃下搅拌14小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。将反应混合物过滤,并且用EtOH(20mL)洗涤。将滤液浓缩,得到4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(250mg,669.44 $\mu$ mol,收率52.76%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=374.5

[0184] 步骤3. 3-(4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(5)的合成

[0185] 将4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(250mg,669.44 $\mu$ mol)和HCl/二噁烷(4M,5mL)在二噁烷(5mL)中的溶液在25℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物浓缩,得到3-(4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(200mg,645.60 $\mu$ mol,收率96.44%,HCl),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=274.1

[0186] 步骤4. (1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(6)的合成

[0187] 在25℃下,向3-(4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(200mg,645.60 $\mu$ mol,HCl)和N-[1-(3-氯丙酰基)-4-哌啶基]氨基甲酸叔丁酯(244.05mg,839.28 $\mu$ mol)在DMF(6mL)中的溶液中加入DIPEA(250.32mg,1.94mmol,337.35 $\mu$ L)和NaI(9.68mg,64.56 $\mu$ mol)。将所得混合

物在80℃下搅拌14小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物倒入盐水(50mL)中。将混合物用EtOAc(20mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(10mL×2)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩,得到粗产物。将粗产物通过快速硅胶层析(4g硅胶柱,EtOAc/石油醚=10-100%,然后EtOAc/甲醇=10/1,40mL/min)纯化,得到(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(130mg,246.37μmol,收率38.16%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=528.4

[0188] 步骤5. 3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(7)的合成

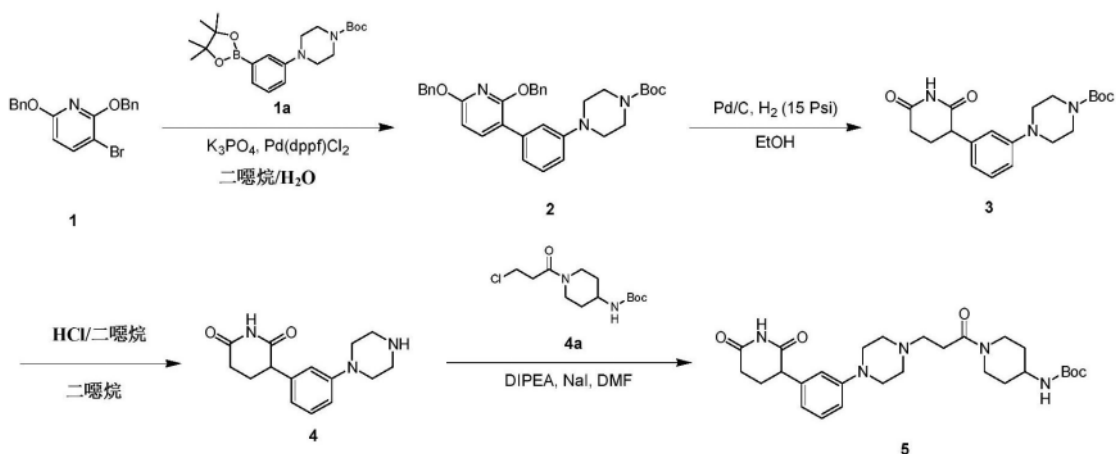
[0189] 将(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(120mg,227.42μmol)和HCl/二噁烷(4M,3mL)在二噁烷(1mL)中的溶液在25℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物浓缩,得到3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(100mg,粗品,HCl),为黄色固体。将粗产物直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=428.1

[0190] 步骤6. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物5)的合成

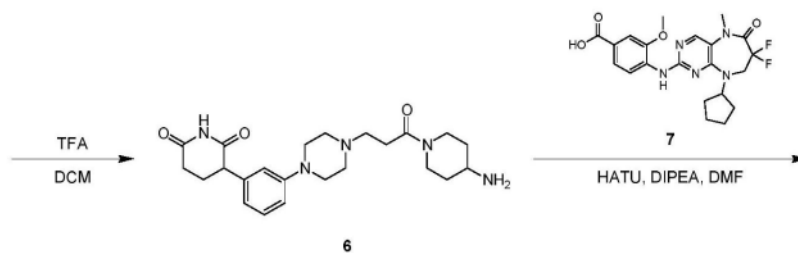
[0191] 在25℃下,向3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(100mg,215.52μmol,HCl)、4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(96.43mg,215.52μmol)和DIPEA(111.42mg,862.07μmol,150.16μL)在DMF(3mL)中的溶液中加入HATU(106.53mg,280.17μmol)。将所得混合物在25℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物倒入盐水(30mL)中,并且用EtOAc(10mL×4)萃取。将合并的有机层用盐水(10mL×2)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩,得到粗产物。将粗产物通过快速硅胶层析(4g硅胶柱,EtOAc/石油醚=20-100%,然后甲醇/EtOAc=10-30%,40mL/min)纯化,得到产物(70mg)。将粗产物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150×25mm×5μm;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:38%-68%,10min)进一步纯化并冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(13.8mg,15.59μmol,收率7.23%,纯度96.8%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=857.0

[0192] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.77(s,1H),8.28-8.26(m,2H),8.16(d,J=8.0Hz,1H),7.97(s,1H),7.49-7.47(m,2H),7.04(d,J=8.0Hz,2H),6.89(d,J=8.0Hz,2H),4.78-4.74(m,1H),4.40-4.37(m,1H),4.07-3.96(m,4H),3.93(s,3H),3.73-3.70(m,1H),3.32(s,3H),3.15-3.10(m,5H),2.70-2.62(m,3H),2.60-2.54(m,7H),2.44-2.42(m,1H),2.13-2.10(m,1H),2.01-1.79(m,5H),1.74-1.68(m,2H),1.64-1.52(m,4H),1.50-1.37(m,2H)。

[0193] 实施例6. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物6)的合成



[0194]



化合物 6

[0195] 步骤1. 4-(3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(2)的合成

[0196] 在25℃下,向2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶(0.5g,1.35mmol)、4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧化杂硼杂环戊-2-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(524.40mg,1.35mmol)和 $K_3PO_4$ (859.98mg,4.05mmol)在二噁烷(10mL)和 $H_2O$ (2mL)中的混合物中加入Pd(dppf) $Cl_2$ (98.82mg,135.05 $\mu$ mol)。将所得混合物用 $N_2$ 吹扫并脱气三次,加热至100℃并搅拌14小时。LCMS显示2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。将混合物用EtOAc(30mL)稀释,经 $Na_2SO_4$ 干燥并浓缩,得到残余物。将残余物通过快速硅胶层析层析(10g SepaFlash®硅胶快速柱,0-50%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,50mL/min)纯化,得到4-(3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.7g,1.17mmol,收率86.44%,纯度92%),为黄色固体。 $MS(M+H)^+=552.1$

[0197] 步骤2. 4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(3)的合成

[0198] 向4-(3-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.7g,1.27mmol)在EtOH(20mL)中的溶液中加入Pd/C(0.5g,1.27mmol,纯度10%)。将混合物在 $H_2$ (15psi)下于30℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。将反应混合物通过硅藻土垫过滤并将滤液真空浓缩,得到4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.5g,粗品),为黄色油状物,将其直接用于下一个步骤。 $MS(M+H)^+=374.2$

[0199] 步骤3. 3-(3-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(4)的合成

[0200] 在25℃下,向4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.5g, 1.34mmol)在二噁烷(2mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M, 10mL)。将所得混合物在25℃下搅拌0.5小时。TLC(石油醚:EtOAc=1:1;Rf=0)显示起始材料完全消耗,并且发现新的斑点。将混合物溶液减压浓缩,得到3-(3-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.5g,粗品, HCl),为黄色固体,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=274.1

[0201] 步骤4. (1-(3-(4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(5)的合成

[0202] 在25℃下,向(1-(3-氯丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(844.79mg, 2.91mmol)和3-(3-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(450mg, 1.45mmol, HCl)在DMF(5mL)中的溶液中加入NaI(21.77mg, 145.26μmol)和DIEA(563.20mg, 4.36mmol, 759.03μL),将混合物在80℃下搅拌16小时。LCMS显示3-(3-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(27%)。将混合物溶液减压浓缩,得到粗产物。将粗产物通过快速硅胶层析(5g SepaFlash®硅胶快速柱, 0-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 60mL/min; 0-50%甲醇/EtOAc的洗脱液, 60mL/min)纯化,得到(1-(3-(4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(0.8g,粗品),为棕色油状物,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=528.3

[0203] 步骤5. 3-(3-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(6)的合成

[0204] 在25℃下,向(1-(3-(4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(0.8g, 1.52mmol)在DCM(10mL)中的溶液中加入TFA(3.08g, 27.01mmol, 2mL)。将所得混合物在25℃下搅拌0.5小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(41%)。将混合物溶液减压浓缩,得到3-(3-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.8g,粗品, TFA),为棕色油状物,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=428.2

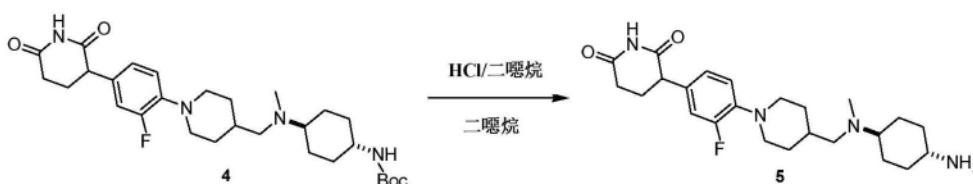
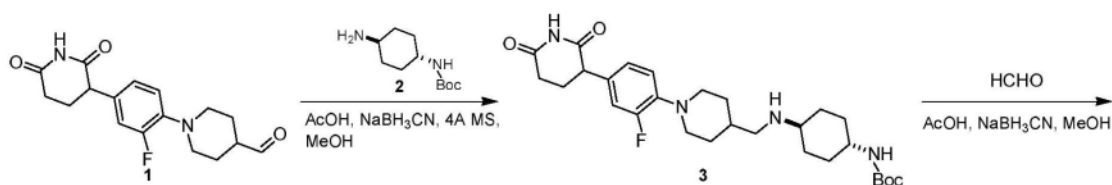
[0205] 步骤6. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物6)的合成

[0206] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(90mg, 201.15μmol)在DMF(3mL)中的溶液中加入HATU(91.78mg, 241.38μmol)和DIPEA(155.98mg, 1.21mmol, 210.21μL)。将混合物在25℃下搅拌10分钟。向混合物中加入3-(3-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(217.87mg, 402.30μmol, TFA)。将混合物在25℃下搅拌2小时。LCMS显示3-(3-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(62%)。将混合物减压浓缩,得到残余物。将残余物通过快速硅胶层析(5g SepaFlash®硅胶快速柱, 0-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 60mL/min; 0-50%甲醇/EtOH的洗脱液, 60mL/min)纯化,得到粗产物。将粗产物通过制备型TLC(二氯甲烷:甲醇=10:1;Rf=0.4)和制备型HPLC(柱:Waters Xridge 150×25mm×5μm;流动

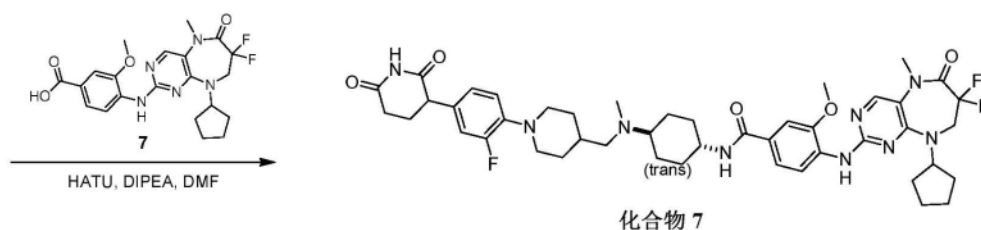
相: [水 (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) - ACN]; B% : 36% - 66%, 8分钟) 纯化并冻干, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (26.5mg, 30.30 $\mu$ mol, 收率15.07%, 纯度98%), 为白色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 857.3

[0207] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 10.79 (s, 1H), 8.31-8.23 (m, 2H), 8.15 (d, J = 7.6Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.53-7.43 (m, 2H), 7.15 (t, J = 7.8Hz, 1H), 6.87-6.74 (m, 2H), 6.61 (d, J = 7.6Hz, 1H), 4.76 (q, J = 8.3Hz, 1H), 4.39 (d, J = 13.1Hz, 1H), 4.12-3.94 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 3.75 (dd, J = 4.9, 11.2Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.19-3.05 (m, 5H), 2.75-2.53 (m, 10H), 2.46-2.39 (m, 1H), 2.25-2.12 (m, 1H), 2.06-1.78 (m, 5H), 1.73-1.34 (m, 8H).

[0208] 实施例7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)(甲基)氨基)环己基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (反式) (化合物7) 的合成



[0209]



[0210] 步骤1. ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)氨基)环己基)氨基甲酸叔丁酯 (反式) (3) 的合成

[0211] 向1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲醛 (1g, 3.14mmol) 和 ((1r,4r)-4-氨基环己基)氨基甲酸叔丁酯 (反式) (673.19mg, 3.14mmol) 在 MeOH (10mL) 中的溶液中加入 AcOH (188.64mg, 3.14mmol, 179.66 $\mu$ L) 和 4AMS (100mg)。然后在 20 $^{\circ}$ C 下缓慢加入 NaBH<sub>3</sub>CN (592.21mg, 9.42mmol), 并且将所得混合物在 20 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时。LCMS 显示起始材料完全消耗, 并且显示具有期望质量的峰 (76%)。过滤反应混合物并浓缩滤液, 得到 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)氨基)环己基)氨基甲酸叔丁酯 (反式) (1.6g, 粗品), 为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 517.3

[0212] 步骤2. ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)(甲基)氨基)环己基)氨基甲酸叔丁酯(反式)(4)的合成

[0213] 向((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)氨基)环己基)氨基甲酸叔丁酯(反式)(1.6g,3.10mmol)和HCHO(502.63mg,6.19mmol,461.13μL,纯度37%) 在MeOH(20mL)中的溶液中加入AcOH(185.97mg,3.10mmol,177.12μL)。然后在20℃下缓慢加入NaBH<sub>3</sub>CN(583.85mg,9.29mmol),并且将所得混合物在20℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(82%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(60mL)稀释,并且用EtOAc(60mL×3)萃取。将有机层用饱和NaHCO<sub>3</sub>(60mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,0-100% EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)(甲基)氨基)环己基)氨基甲酸叔丁酯(反式)(0.5g,942.20μmol,收率30.42%,纯度100%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=531.3

[0214] 步骤3. 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-氨基环己基)(甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(反式)(5)的合成

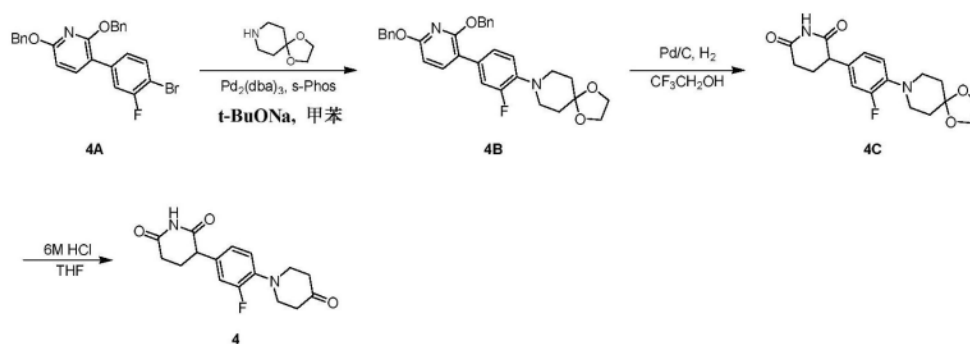
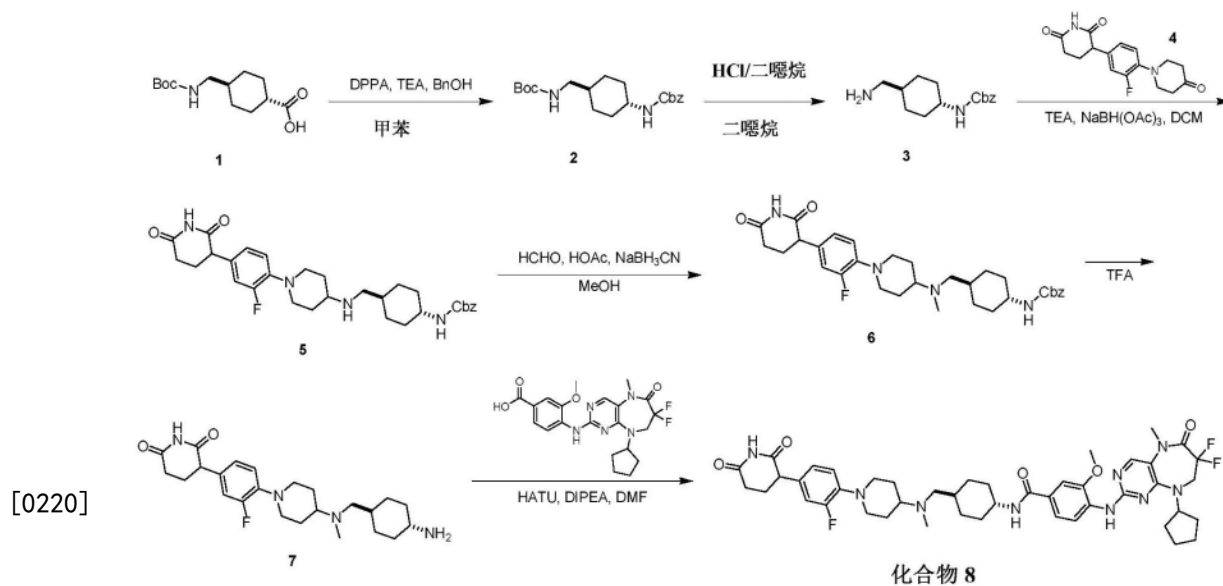
[0215] 在20℃下,向((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)(甲基)氨基)环己基)氨基甲酸叔丁酯(反式)(0.5g,942.20μmol)在二噁烷(5mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,10mL),并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(91%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-(4-(4-(((1r,4r)-4-氨基环己基)(甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(反式)(451mg,粗品,HCl),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=431.3

[0216] 步骤4. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)(甲基)氨基)环己基)-3-甲氧基苯甲酰胺(反式)(化合物7)的合成

[0217] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(90mg,201.15μmol)在DMF(2mL)中的溶液中加入HATU(84.13mg,221.26μmol)和DIPEA(51.99mg,402.29μmol,70.07μL)。将混合物在20℃下搅拌10分钟,并且加入3-(4-(4-(((1r,4r)-4-氨基环己基)(甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(反式)(103.33mg,221.26μmol,HCl)在DMF(2mL)中的溶液和DIPEA(51.99mg,402.29μmol,70.07μL),并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示所有起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(50%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(15mL)稀释,并且用EtOAc(15mL×3)萃取。将有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(4g SepaFlash®硅胶快速柱,0-100%EtOAc/石油醚0-10%二氯甲烷/甲醇梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,并且通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150×25mm×5μm;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:49%-79%,8min)再纯化并冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)(甲基)氨基)环己基)-3-甲氧基苯甲酰胺(反式)(31.3mg,35.30μmol,收率17.55%,纯度97%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=860.4

[0218]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.80 (s, 1H), 8.29-8.23 (m, 2H), 8.06 (d,  $J$  = 7.8Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.52-7.44 (m, 2H), 7.04-6.90 (m, 3H), 4.83-4.70 (m, 1H), 4.04 (t,  $J$  = 14.0Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.83-3.68 (m, 2H), 3.38 (s, 2H), 3.30 (s, 3H), 2.65-2.53 (m, 4H), 2.47-2.46 (m, 1H), 2.28 (d,  $J$  = 6.4Hz, 2H), 2.25-2.13 (m, 4H), 2.05-1.88 (m, 5H), 1.83-1.67 (m, 6H), 1.65-1.49 (m, 5H), 1.44-1.31 (m, 4H), 1.30-1.19 (m, 2H)

[0219] 实施例8. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)(甲基)氨基)甲基)环己基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物8)的合成



[0221] 步骤1. (((1r,4r)-4-(((苄氧基)羰基)氨基)环己基)甲基)氨基甲酸叔丁酯(2)的合成

[0222] 在干冰浴中,在 $-10^\circ\text{C}$ 下,向(1r,4r)-4-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸(2g,7.77mmol)在甲苯(40mL)中的溶液中加入TEA(1.18g,11.66mmol,1.62mL),接着在10分钟内逐滴加入DPPA(2.14g,7.77mmol,1.68mL)。将混合物温热至 $10^\circ\text{C}$ ,然后缓慢加热至 $70^\circ\text{C}$ 。16小时后,将混合物冷却至 $47^\circ\text{C}$ 并且加入BnOH(2.52g,23.32mmol,2.42mL),将所得混合物再加热至 $110^\circ\text{C}$ 达16小时。LCMS显示(1r,4r)-4-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸完全消耗,并且显示期望质量(11%)。将混合物用 $\text{H}_2\text{O}$ (80mL)稀释,加入HCl溶液(1N)直至 $\text{pH}=5-6$ ,将所得混合物用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取,将合并的有机层用 $\text{NaHCO}_3$ 溶液(50mL $\times$ 2)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并真空浓缩。将残余物用MTBE(7mL)和石油醚(15mL)的混合物

研磨5分钟,将悬浮液过滤并且将滤饼用MTBE (5mL) 和石油醚 (20mL) 洗涤,收集滤饼并且在真空下干燥,得到(((1r,4r)-4-(((苄氧基)羰基)氨基)环己基)甲基)氨基甲酸叔丁酯 (1.94g,5.35mmol,收率68.86%),为浅棕色固体。MS (M-Boc+H)<sup>+</sup>=263.2

[0223] 步骤2. ((1r,4r)-4-(氨基甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (3) 的合成

[0224] 向(((1r,4r)-4-(((苄氧基)羰基)氨基)环己基)甲基)氨基甲酸叔丁酯 (300mg,827.67 $\mu$ mol) 在二噁烷 (6mL) 中的溶液中加入HCl/二噁烷 (4M,6mL)。将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰 (68%)。将反应混合物浓缩,得到((1r,4r)-4-(氨基甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (240mg,粗品,HCl),为浅黄色固体。MS (M+H)<sup>+</sup>=263.0

[0225] 步骤3. 8-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷 (4B) 的合成

[0226] 将2,6-双(苄氧基)-3-(4-溴-3-氟苯基)吡啶 (1g,2.15mmol)、1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷 (1g,6.98mmol,892.86 $\mu$ L)、Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (200.00mg,218.41 $\mu$ mol)、s-Phos (80.00mg,194.87 $\mu$ mol) 和t-BuONa (1M,6.00mL) 在甲苯 (30mL) 中的混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫3次,然后将混合物在N<sub>2</sub>气氛在100 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰 (34%)。将反应混合物过滤并且将滤液用H<sub>2</sub>O (30mL) 稀释,将混合物用EtOAc (50mL $\times$ 2) 萃取,将合并的有机层用盐水 (25mL $\times$ 2) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析 (Biotage;20g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱,2%-20%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,60mL/min) 纯化,得到8-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷 (320mg,607.68 $\mu$ mol,收率28.22%),为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup>=527.1

[0227] 步骤4. 3-(3-氟-4-(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-基)苯基)哌啶-2,6-二酮 (4C) 的合成

[0228] 在N<sub>2</sub>气氛下,向8-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷 (320mg,607.68 $\mu$ mol) 在CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (10mL) 中的溶液中加入Pd/C (100mg,纯度10%),然后将混合物在H<sub>2</sub>气氛 (15psi) 下于20 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰 (48%)。过滤反应混合物,并且将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析 (Biotage;10gSepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱,20%-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,60mL/min) 纯化,得到3-(3-氟-4-(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-基)苯基)哌啶-2,6-二酮 (130mg,373.17 $\mu$ mol,收率61.41%),为浅黄色固体。MS (M+H)<sup>+</sup>=349.0

[0229] 步骤5. 3-(3-氟-4-(4-氧代哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮 (4) 的合成

[0230] 向3-(3-氟-4-(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-基)苯基)哌啶-2,6-二酮 (150mg,430.58 $\mu$ mol) 在THF (3mL) 中的溶液中加入HCl (6M,3.00mL)。将所得混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰 (51%)。将反应混合物用EtOAc (15mL) 稀释,然后在0 $^{\circ}$ C下将饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液加入至混合物直至pH=8-9,将所得混合物用EtOAc (20mL $\times$ 3) 萃取,然后将合并的有机层用盐水 (25mL $\times$ 2) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并将滤液减压浓缩,得到3-(3-氟-4-(4-氧代哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮 (130mg,粗品),为白色固体。MS (M+H)<sup>+</sup>=305.0

[0231] 步骤6. ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)氨基)甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (5) 的合成

[0232] 向3-(3-氟-4-(4-氧代哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮 (130mg,427.19 $\mu$ mol) 在

DCM (10mL) 中的溶液中加入 ((1r,4r)-4-(氨基甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (130.00mg, 435.06 $\mu$ mol, HCl) 和 TEA (436.20mg, 4.31mmol, 600 $\mu$ L)。将混合物在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时。然后在 25 $^{\circ}$ C 下将 NaBH(OAc)<sub>3</sub> (350mg, 1.65mmol) 加入到混合物中, 将所得混合物在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 15 小时。LCMS 显示 3-(3-氟-4-(4-氧代哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮完全消耗, 并且显示具有期望质量的峰 (70%)。将反应混合物过滤并且将滤液在 0 $^{\circ}$ C 下用 H<sub>2</sub>O (2mL) 稀释, 然后在 0 $^{\circ}$ C 下将饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液加入到混合物中直至 pH=8-9。将所得混合物用 EtOAc (15mL $\times$ 3) 萃取, 然后将合并的有机层用盐水 (10mL $\times$ 2) 洗涤, 经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析 (Biotage; 4g SepaFlash<sup>®</sup> 硅胶快速柱, 2%-20% 甲醇: 二氯甲烷醚梯度的洗脱液, 50mL/min) 纯化, 得到 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)氨基)甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (80mg, 145.28 $\mu$ mol, 收率 34.01%), 为浅黄色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 551.1

[0233] 步骤 7. ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)(甲基)氨基)甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (6) 的合成

[0234] 向 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)氨基)甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (100mg, 181.60 $\mu$ mol) 在 MeOH (10mL) 中的溶液中加入 HOAc (10.91mg, 181.60 $\mu$ mol, 10.39 $\mu$ L) 和 HCHO (136.32mg, 1.82mmol, 125.06 $\mu$ L, 纯度 40%)。将混合物在 20 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时。然后在 0 $^{\circ}$ C 下向混合物中加入 NaBH<sub>3</sub>CN (100.00mg, 1.59mmol), 将所得混合物在 20 $^{\circ}$ C 下搅拌 15 小时。LCMS 显示检测到具有期望质量的一个主峰。将反应混合物用 H<sub>2</sub>O (10mL) 稀释, 然后将其浓缩以除去 MeOH, 将混合物用 EtOAc (30mL) 稀释, 然后在 0 $^{\circ}$ C 下将饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液加入到混合物中直至 pH=8-9, 将所得混合物用 EtOAc (30mL $\times$ 2) 萃取, 然后将合并的有机层用盐水 (30mL $\times$ 2) 洗涤, 经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并且将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析 (Biotage; 10g SepaFlash<sup>®</sup> 硅胶快速柱, 0-20% 甲醇: 二氯甲烷梯度的洗脱液, 60mL/min) 纯化, 得到 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)(甲基)氨基)甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (102mg, 180.63 $\mu$ mol, 收率 99.47%), 为浅黄色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 565.1

[0235] 步骤 8. 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-氨基环己基)甲基)(甲基)氨基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮 (7) 的合成

[0236] 将 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)(甲基)氨基)甲基)环己基)氨基甲酸苄酯 (80mg, 141.67 $\mu$ mol) 在 TFA (2.46g, 21.61mmol, 1.60mL) 中的溶液在 N<sub>2</sub> 气氛下于 40 $^{\circ}$ C 下搅拌 2.5 小时。LCMS 显示具有期望质量的峰 (43%)。将反应混合物减压浓缩, 得到 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-氨基环己基)甲基)(甲基)氨基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮 (77mg, 粗品, TFA), 为浅黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 431.1

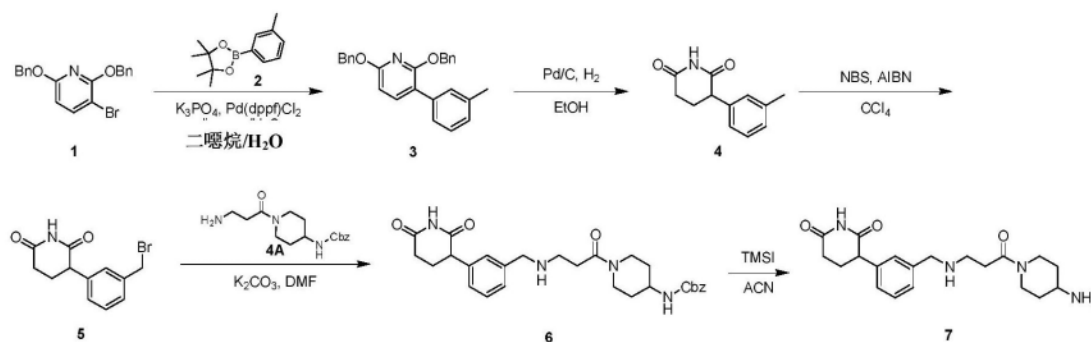
[0237] 步骤 9. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)(甲基)氨基)甲基)环己基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (化合物 8) 的合成

[0238] 在 20 $^{\circ}$ C 下, 向 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸 (80mg, 178.80 $\mu$ mol) 在 DMF (3mL) 中的溶液中加入 HATU (120.00mg, 315.60 $\mu$ mol)、DIPEA (178.08mg, 1.38mmol, 240.00 $\mu$ L) 和 3-(4-

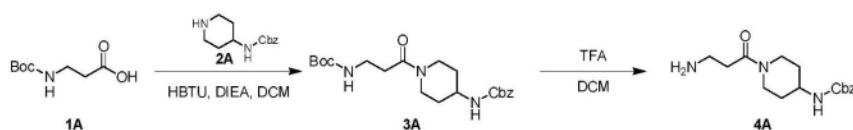
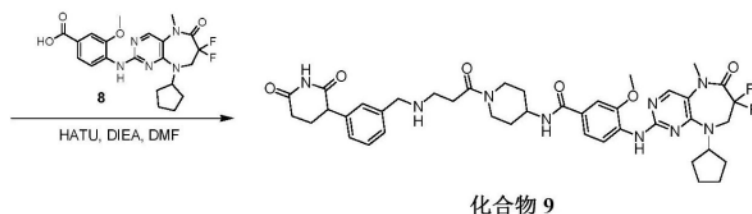
(4-(((1r,4r)-4-氨基环己基)甲基)(甲基)氨基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(80.00mg,粗品,TFA)。将所得混合物在N<sub>2</sub>气氛下于20℃下搅拌16小时。LCMS显示4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(61%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(8mL)稀释,将混合物用EtOAc(25mL×2)萃取,将合并的有机层用盐水(20mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(Biotage;10g SepaFlash®硅胶快速柱,0-25%甲醇:二氯甲烷梯度的洗脱液,60mL/min)纯化,并且用过制备型HPLC(柱:3\_Phenomenex Luna C18 75×30mm×3μm;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:28%-48%,10min,7min;柱温:30℃)再纯化,然后冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)(甲基)氨基)甲基)环己基)-3-甲氧基苯甲酰胺(62.3mg,54.97μmol,收率30.74%,纯度96%,2TFA),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=860.2

[0239] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.83(s,1H),8.97-8.75(m,1H),8.28-8.22(m,2H),8.17-8.13(m,1H),7.54-7.44(m,2H),7.12-6.94(m,3H),4.83-4.73(m,1H),4.11-4.05(m,2H),3.94(s,3H),3.53-3.37(m,4H),3.33(s,3H),3.20-3.12(m,1H),2.94-2.87(m,1H),2.86-2.79(m,3H),2.78-2.68(m,2H),2.44-2.38(m,1H),2.25-2.08(m,3H),2.07-1.79(m,11H),1.77-1.68(m,3H),1.66-1.54(m,4H),1.47-1.35(m,2H),1.24-1.10(m,2H)。

[0240] 实施例9. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(3-((3-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)苄基)氨基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物9)的合成



[0241]



[0242] 步骤1. 2,6-双(苄氧基)-3-(间甲苯基)吡啶(3)的合成

[0243] 向2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶(5g, 13.50mmol)和4,4,5,5-四甲基-2-(间甲苯基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷(3.09g, 14.18mmol)在二噁烷(100mL)和H<sub>2</sub>O(20mL)中的溶液中加入K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(8.60g, 40.51mmol)和Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(494mg, 675.14μmol),并且将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于100℃下搅拌14小时。TLC(石油醚:EtOAc=20:1)显示形成新的斑点。将混合物经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,然后过滤,将滤饼用EtOAc(100mL)洗涤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(40g SepaFlash®硅胶快速柱,0%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,60mL/min)纯化,得到2,6-双(苄氧基)-3-(间甲苯基)吡啶(5.3g, 13.48mmol, 收率99.79%, 纯度97%),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=382.1

[0244] 步骤2. 3-(间甲苯基)哌啶-2,6-二酮(4)的合成

[0245] 在N<sub>2</sub>气氛下,向2,6-双(苄氧基)-3-(间甲苯基)吡啶(5.3g, 13.89mmol)在EtOH(70mL)中的溶液中加入Pd/C(0.7g, 纯度10%),将悬浮液脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫3次,将所得混合物在H<sub>2</sub>(15psi)下于25℃下搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的峰(60%)。将混合物用THF(50mL)稀释,过滤并且将滤饼用THF(60mL)和MeOH(80mL)洗涤。将滤液减压浓缩,得到3-(间甲苯基)哌啶-2,6-二酮(2.7g, 12.62mmol, 收率90.86%, 纯度95%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=204.0

[0246] 步骤3. 3-(3-(溴甲基)苯基)哌啶-2,6-二酮(5)的合成

[0247] 向3-(间甲苯基)哌啶-2,6-二酮(0.5g, 2.46mmol)和NBS(482mg, 2.71mmol)在CCl<sub>4</sub>(8mL)中的溶液中加入AIBN(40.40mg, 246.02μmol),并且将混合物在80℃下搅拌14小时。LCMS显示检测到期望质量。将混合物减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(5g SepaFlash®硅胶快速柱,30-50%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,50mL/min)纯化,得到3-(3-(溴甲基)苯基)哌啶-2,6-二酮(650mg, 2.30mmol, 收率93.65%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=281.8

[0248] 步骤4. (3-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)哌啶-1-基)-3-氧代丙基)氨基甲酸叔丁酯(3A)的合成

[0249] 将3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸(2g, 10.57mmol)、哌啶-4-基氨基甲酸苄酯(2.48g, 10.57mmol)、HBTU(4.81g, 12.68mmol)和DIPEA(4.10g, 31.71mmol, 5.52mL)在DCM(30mL)中的混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫3次,然后将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于25℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(70%)。将反应混合物用水(200mL)稀释,并且用EtOAc(200mL)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL×2)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(40g SepaFlash®硅胶快速柱,20-60%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,60mL/min)纯化,得到(3-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)哌啶-1-基)-3-氧代丙基)氨基甲酸叔丁酯(4.5g, 粗品),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=406.3

[0250] 步骤5. (1-(3-氨基丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸苄酯(4A)的合成

[0251] 向(3-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)哌啶-1-基)-3-氧代丙基)氨基甲酸叔丁酯(4.5g, 11.10mmol)在DCM(40mL)中的溶液中加入TFA(7.59g, 66.59mmol, 4.93mL),并且将混合物在25℃下搅拌14小时。LCMS显示检测到期望质量。将混合物减压浓缩,得到(1-(3-氨基丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸苄酯(10g, 粗品, TFA),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=306.2

[0252] 步骤6. (1-(3-((3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苄基)氨基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸苄酯(6)的合成

[0253] 向(1-(3-氨基丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸苄酯(1.78g, 4.25mmol, TFA盐)在DMF(8mL)中的溶液中加入 $K_2CO_3$ (1.37g, 9.93mmol)和3-(3-(溴甲基)苄基)哌啶-2,6-二酮(0.4g, 1.42mmol),并且将混合物在80℃下搅拌14小时。LCMS显示检测到期望质量(31%)。将混合物用 $H_2O$ (10mL)稀释,并且用EtOAc(10mL×3)萃取,将合并的有机层用盐水(10mL×3)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将粗产物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna C18 150×40mm×15 $\mu$ m;流动相:[水(FA)-ACN];B%:12%-42%,10min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到2个批次的(1-(3-((3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苄基)氨基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸苄酯。批次1:(39mg, 70.57 $\mu$ mol, 收率4.98%, 纯度100%, FA盐),为黄色固体,以及批次2:(45mg, 粗品, FA盐),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=507.1

[0254] 步骤7. 3-(3-(((3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)氨基)甲基)苄基)哌啶-2,6-二酮(7)的合成

[0255] 向(1-(3-((3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苄基)氨基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸苄酯(39mg, 76.99 $\mu$ mol)在 $can$ (0.4mL)中的溶液中加入TMSI(58.80mg, 293.87 $\mu$ mol, 40 $\mu$ L),并且将混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料消耗。将混合物用 $H_2O$ (10mL)淬灭,然后用MTBE(10mL×3)洗涤,将合并的有机层用 $H_2O$ (10mL)萃取。将合并的水相冻干,得到3-(3-(((3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)氨基)甲基)苄基)哌啶-2,6-二酮(50mg, 粗品, 2HI盐),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=373.2

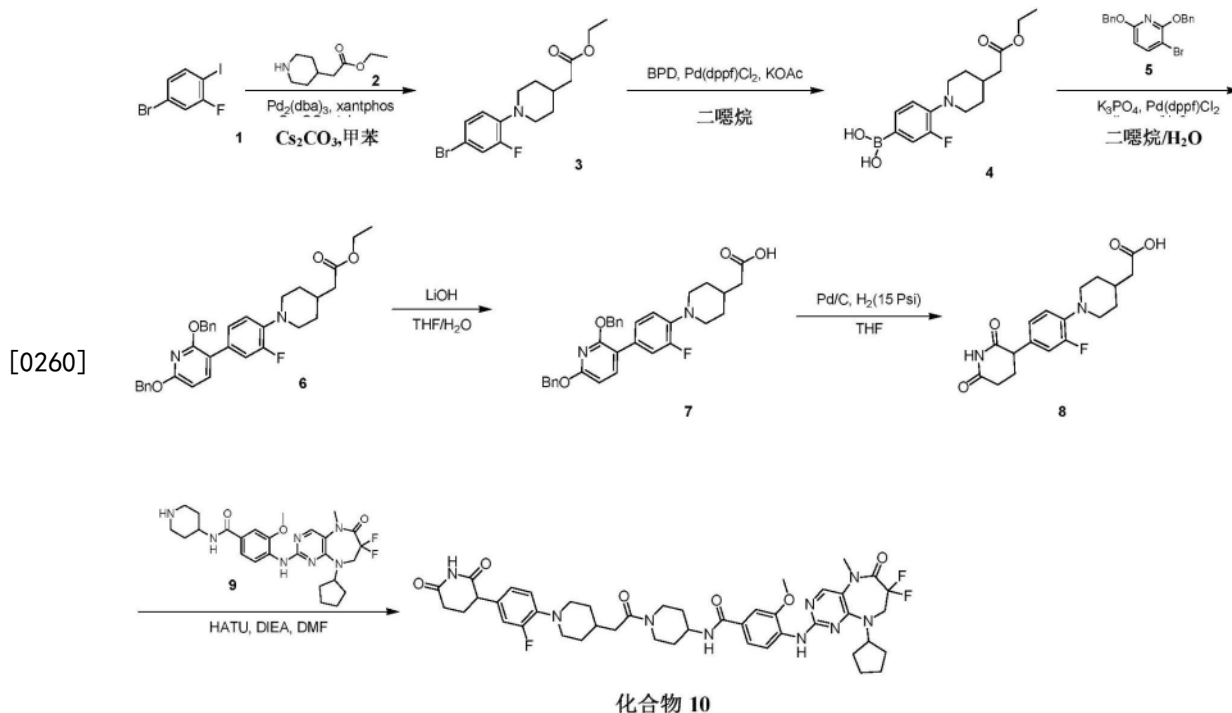
[0256] 步骤8. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂 $\text{草}$ -2-基)氨基)-N-(1-(3-((3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苄基)氨基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物9)的合成

[0257] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂 $\text{草}$ -2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(37mg, 82.69 $\mu$ mol)在DMF(0.5mL)中的溶液中加入HATU(37.73mg, 99.23 $\mu$ mol)和DIPEA(7.42mg, 57.41 $\mu$ mol, 10 $\mu$ L),并且将混合物在20℃下搅拌15分钟。然后加入3-(3-(((3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)氨基)甲基)苄基)哌啶-2,6-二酮(60mg, 95.50 $\mu$ mol, 2HI盐)和DIPEA(59.36mg, 459.29 $\mu$ mol, 80 $\mu$ L)在DMF(1.5mL)中的溶液,并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示具有期望质量的峰(80%)。将混合物用 $H_2O$ (10mL)稀释,并且用EtOAc(10mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(10mL×3)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将粗产物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge150×25mm×5 $\mu$ m;流动相:[水( $NH_4HCO_3$ )-ACN];B%:38%-68%,8min)、然后制备型HPLC(柱:Phenomenex C18 75×30mm×3 $\mu$ m;流动相:[水(FA)-ACN];B%:15%-45%,7min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂 $\text{草}$ -2-基)氨基)-N-(1-(3-((3-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苄基)氨基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(11.4mg, 13.36 $\mu$ mol, 收率16.16%, 纯度94%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=802.5

[0258] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ =10.84(s, 1H), 8.30-8.24(m, 2H), 8.17-8.12(m, 1H), 7.97(s, 1H), 7.51-7.45(m, 2H), 7.30-7.20(m, 2H), 7.18(s, 1H), 7.08(br d, J=7.6Hz, 1H),

4.79-4.74 (m, 1H), 4.44-4.33 (m, 1H), 4.10-3.99 (m, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.91-3.81 (m, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.33-3.32 (m, 3H), 3.14-3.05 (m, 1H), 2.76-2.61 (m, 8H), 2.22-2.11 (m, 1H), 2.09-2.00 (m, 1H), 1.99-1.89 (m, 2H), 1.88-1.76 (m, 2H), 1.74-1.66 (m, 2H), 1.65-1.54 (m, 3H), 1.50-1.34 (m, 2H).

[0259] 实施例10. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(2-(1-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基))-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物10)的合成



[0261] 步骤1. 2-(1-(4-溴-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸乙酯(3)的合成

[0262] 向4-溴-2-氟-1-碘苯(1g, 3.32mmol)和2-(哌啶-4-基)乙酸乙酯(682.91mg, 3.99mmol)在甲苯(10mL)中的溶液中加入 $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (3.25g, 9.97mmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (61mg, 66.61 $\mu\text{mol}$ )和Xantphos(58mg, 100.24 $\mu\text{mol}$ ),并且将混合物在100 $^\circ\text{C}$ 下搅拌14小时。LCMS显示起始材料消耗,并且检测到期望质量。过滤混合物并且用EtOAc(30mL)洗涤滤饼。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(12g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱,2-3%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,50mL/min)纯化,得到2-(1-(4-溴-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸乙酯(670mg, 1.83mmol,收率55.05%,纯度94%),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=344.2$

[0263] 步骤2. 4-(4-(2-乙氧基-2-氧代乙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)硼酸(4)的合成

[0264] 向2-(1-(4-溴-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸乙酯(670mg, 1.95mmol)和BPD(643mg, 2.53mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入KOAc(573.08mg, 5.84mmol)和Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(28.48mg, 38.93 $\mu\text{mol}$ ),并且将所得混合物在80 $^\circ\text{C}$ 下搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的峰(60%)。过滤混合物并且用EtOAc(20mL)洗涤滤饼。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(5g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱,2-3%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,50mL/min)纯化,得到4-(4-(2-乙氧基-2-氧代乙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)硼酸(690mg,粗品),为白色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=309.9$

[0265] 步骤3. 2-(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸乙酯(6)的合成

[0266] 在N<sub>2</sub>气氛下,向(4-(4-(2-乙氧基-2-氧代乙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)硼酸(640mg, 2.07mmol)、2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶(1.54g, 4.15mmol)和K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(1.32g, 6.21mmol)在二噁烷(15mL)和H<sub>2</sub>O(3mL)中的溶液中加入Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(46mg, 62.87μmol),并且将混合物在N<sub>2</sub>气氛于80℃下搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的峰(68%)。将混合物经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。用EtOAc(30mL)洗涤滤饼。将滤液减压浓缩。将残余物通过柱层析(SiO<sub>2</sub>,石油醚/EtOAc=50/1至30/1)纯化,得到2-(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸乙酯(730mg, 1.20mmol, 收率57.85%, 纯度91%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=555.4

[0267] 步骤4. 2-(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸(7)的合成

[0268] 向2-(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸乙酯(730mg, 1.32mmol)在THF(10mL)中的溶液中加入LiOH·H<sub>2</sub>O(3M, 880μL),并且将混合物在20℃下搅拌14小时。LCMS显示期望质量(29%)和剩余起始材料(65%)。加入另外的LiOH·H<sub>2</sub>O(3M, 880μL),并且将混合物在60℃下搅拌14小时。LCMS显示起始材料消耗,并且显示具有期望质量的主峰(91%)。将混合物用1N HCl调节pH=3并且用H<sub>2</sub>O(10mL)稀释,然后用EtOAc(10mL×3)萃取,将合并的有机层用H<sub>2</sub>O(10mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩,得到2-(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸(660mg, 粗品),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=527.3

[0269] 步骤5. 2-(1-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸(8)的合成

[0270] 在N<sub>2</sub>气氛下,向2-(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸(0.2g, 379.80μmol)在THF(5mL)中的溶液中加入Pd/C(30mg, 纯度10%),将反应混合物脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫3次。将混合物在H<sub>2</sub>(15psi)下于20℃下搅拌18小时。LCMS显示起始材料消耗,并且检测到期望质量。过滤混合物,并且用THF(20mL)洗涤滤饼。将滤液减压浓缩,得到2-(1-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸(110mg, 粗品),为棕色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=348.9

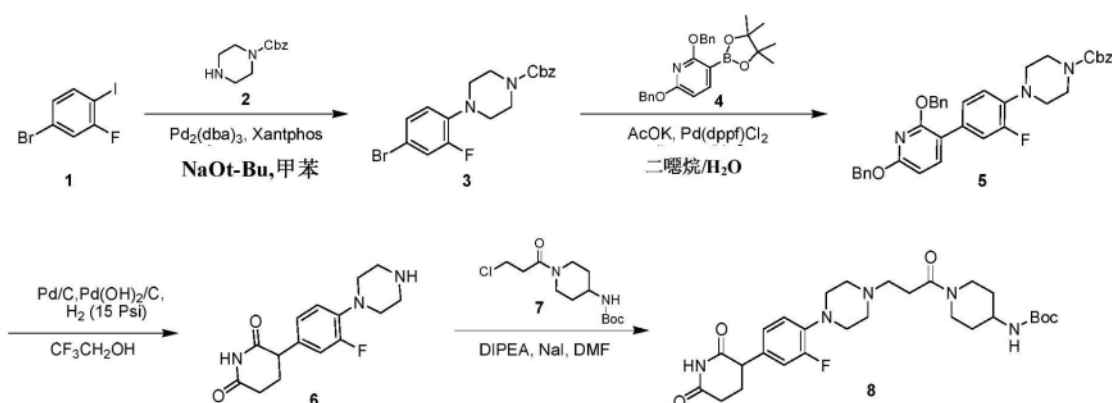
[0271] 步骤6. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(2-(1-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物10)的合成

[0272] 向2-(1-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酸(50mg, 143.53μmol)在DMF(0.8mL)中的溶液中加入HATU(66mg, 173.58μmol)和DIPEA(22.26mg, 172.23μmol, 30μL),并且将混合物在20℃下搅拌15分钟。然后加入4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺(50.00mg, 88.33μmol, HCl盐)和DIPEA(37.10mg, 287.05μmol, 50.00μL)在DMF(0.7mL)中的溶液,并且将混合物在20℃下搅拌0.5小时。LCMS显示具有期望质量的峰(66%)。将混合物用H<sub>2</sub>O(10mL)稀释,并且用EtOAc(10mL×3)萃取,将合并的有机层用盐水(10mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将粗产物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150×25mm×5μm;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:41%-71%, 8min)和制

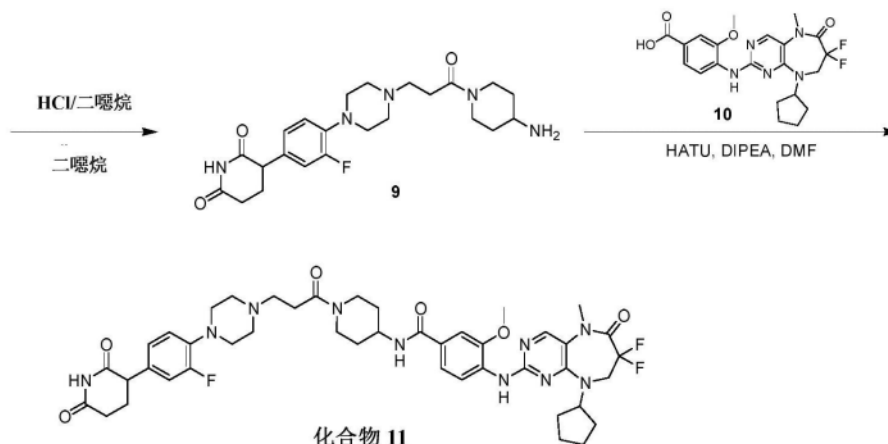
备型HPLC(柱:Phenomenex Luna C18 150×25mm×10μm;流动相:[水(FA)-ACN];B%:37%-67%,10min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(2-(1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基))-2-氟苯基)哌啶-4-基)乙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(26.8mg,29.92μmol,收率20.85%,纯度96%),为棕色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=860.5

[0273] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.81(s,1H),8.30-8.25(m,2H),8.16(br d,J=7.9Hz,1H),7.97(s,1H),7.51-7.46(m,2H),7.03-6.92(m,3H),4.85-4.69(m,1H),4.49-4.37(m,1H),4.12-3.89(m,7H),3.83-3.73(m,1H),3.32-3.28(m,5H),3.18-3.08(m,1H),2.72-2.61(m,5H),2.35-2.31(m,2H),2.25-2.11(m,1H),2.03-1.88(m,4H),1.86-1.67(m,6H),1.65-1.53(m,4H),1.50-1.31(m,4H)。

[0274] 实施例11. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基))-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物11)的合成



[0275]



[0276] 步骤1. 4-(4-溴-2-氟苯基)哌啶-1-甲酸苄酯(3)的合成

[0277] 在25℃下,向4-溴-2-氟-1-碘-苯(5g,16.62mmol)、哌啶-1-甲酸苄酯(4.39g,19.94mmol,3.85mL)和t-BuONa(2M,于THF中,24.93mL)在甲苯(100mL)中的混合物中加入Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>(760.83mg,830.86μmol)和Xantphos(961.50mg,1.66mmol)。将所得混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫三次,然后加热至80℃并且在N<sub>2</sub>气氛下搅拌2小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(40g硅胶柱,EtOAc/石油醚=0-5%,100mL/min)纯化,得到4-(4-溴-2-氟苯基)哌啶-1-甲酸苄酯(4g,10.17mmol,

收率61.21%),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+ = 394.3$

[0278] 步骤2. 4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-甲酸苄酯(5)的合成

[0279] 将4-(4-溴-2-氟苯基)哌嗪-1-甲酸苄酯(3.5g, 8.90mmol)、2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(4.46g, 10.68mmol)、K<sub>2</sub>OAc(2.62g, 26.70mmol)和Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(325.62mg, 445.01 $\mu$ mol)在二噁烷(40mL)和H<sub>2</sub>O(7mL)中的混合物在N<sub>2</sub>保护下于100℃下搅拌14小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物用EtOAc(100mL)稀释。将所得混合物经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(40g硅胶柱, EtOAc/石油醚=0-10%, 100mL/min)纯化,得到4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-甲酸苄酯(2.9g, 4.80mmol, 收率53.97%),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+ = 604.7$

[0280] 步骤3. 3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(6)的合成

[0281] 在N<sub>2</sub>保护下,于25℃向4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-甲酸苄酯(2.9g, 4.80mmol)在CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH(50mL)中的溶液中加入Pd/C(300mg, 纯度10%)。将所得混合物用H<sub>2</sub>吹扫并脱气三次,然后在H<sub>2</sub>(15psi)下于25℃下搅拌14小时。LCMS显示具有中间体(3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)吡啶-2,6-二醇)的质量的主峰。然后加入Pd(OH)<sub>2</sub>/C(400mg, 纯度20%),并且将所得混合物在H<sub>2</sub>(15psi)下于45℃下再搅拌4小时。LCMS显示期望质量。将反应混合物过滤,并且用EtOH(50mL)洗涤。浓缩滤液,得到3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(1.2g, 粗品),为白色固体。将粗产物直接用于下一个步骤。 $MS(M+H)^+ = 292.3$

[0282] 步骤4. (1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(8)的合成

[0283] 在25℃下,向3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(1.2g, 4.12mmol)和(1-(3-氯丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(1.92g, 6.59mmol)在DMF(20mL)中的混合物中加入DIPEA(1.60g, 12.36mmol, 2.15mL)和NaI(61.74mg, 411.92 $\mu$ mol)。将所得混合物在25℃下搅拌1小时,然后加热至80℃并且在80℃下搅拌13小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。在冷却至25℃后,将反应混合物倒入H<sub>2</sub>O(60mL)中。将所得混合物用EtOAc(20mL $\times$ 5)萃取。将合并的有机层用盐水(15mL $\times$ 3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。将粗产物用石油醚/EtOAc(30mL, 3:1)研磨,得到(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(2g, 粗品),为白色固体。 $MS(M+H)^+ = 546.7$

[0284] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.81(s, 1H), 7.08-6.91(m, 2H), 6.90-6.84(m, 1H), 6.07(dd, J=2.4, 16.7Hz, 1H), 4.23-4.19(m, 1H), 3.88-3.72(m, 3H), 3.58-3.37(m, 2H), 3.12-2.94(m, 4H), 2.71-2.61(m, 2H), 2.59-2.52(m, 7H), 2.06-1.94(m, 1H), 1.77-1.68(m, 2H), 1.38(s, 9H), 1.28-1.15(m, 2H)。

[0285] 步骤5. 3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(9)的合成

[0286] 在20℃下,向(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(2g, 3.67mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入HCl/二噁

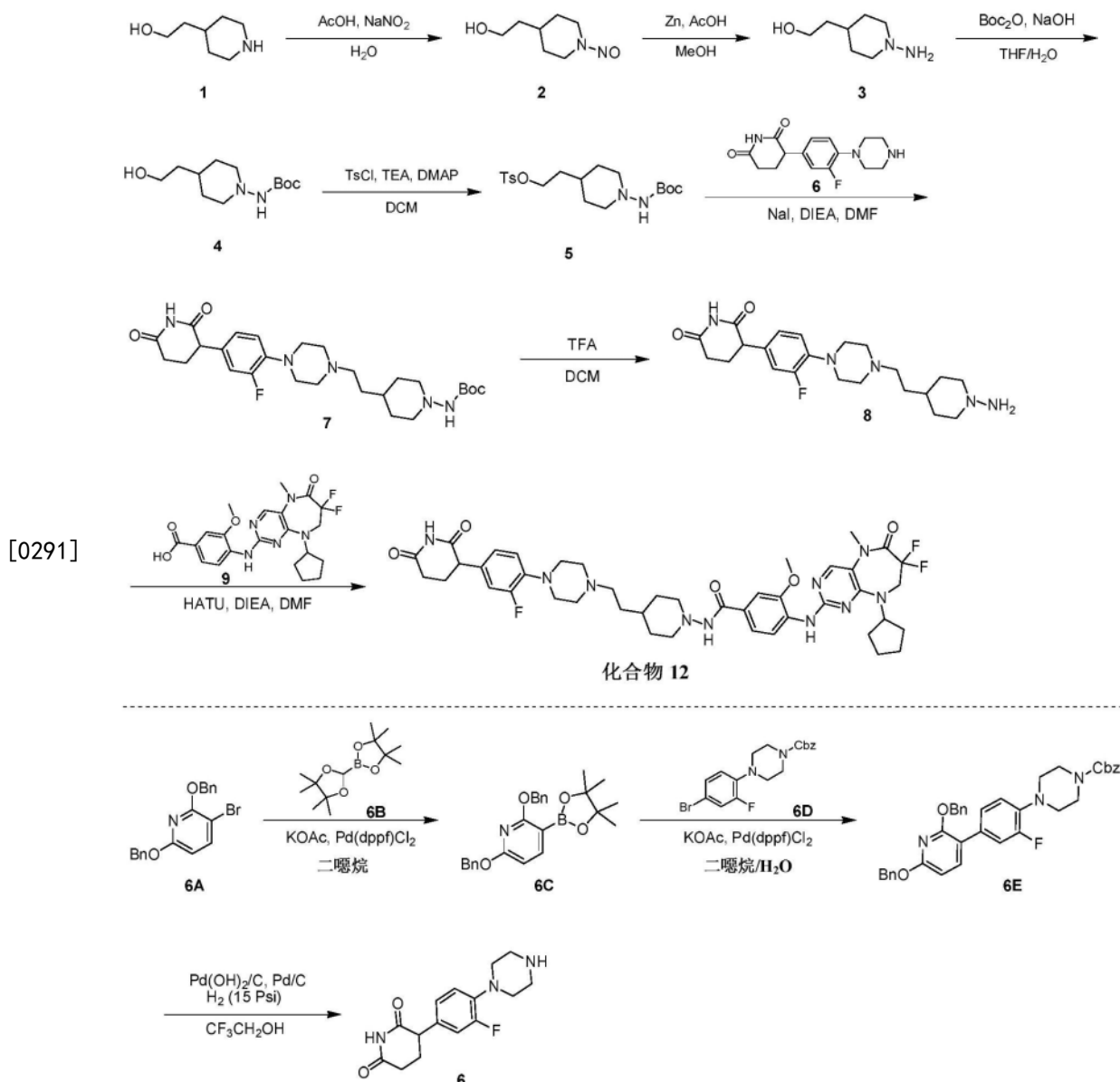
烷(4M, 10mL)。将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示反应完成。将反应混合物浓缩, 得到3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(1.9g, 粗品, 2HCl盐), 为黄色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 446.0

[0287] 步骤6. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物11)的合成

[0288] 在20℃下, 向3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(1.4g, 2.70mmol, 2HCl盐)、4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(1.03g, 2.30mmol)和DIPEA(1.40g, 10.80mmol)在DMF(8mL)中的混合物中加入HATU(1.13g, 2.97mmol)。将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗, 并且显示期望质量。将反应混合物用AcOH中和至pH=6。将所得混合物通过制备型HPLC(柱: Phenomenex Luna C18(250×70mm, 10μm); 流动相: [水(TFA)-ACN]; B%: 15%-45%, 20min)、然后通过制备型HPLC(柱: Waters Xbridge C18150×50mm×10μm; 流动相: [水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 30%-60%, 10min)纯化, 并且将洗脱液冻干, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(543.2mg, 607.80μmol, 22.51%, 纯度97.9%), 为白色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 875.5

[0289] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 10.80(s, 1H), 8.30-8.24(m, 2H), 8.14(br d, J = 7.5Hz, 1H), 7.96(s, 1H), 7.53-7.46(m, 2H), 7.06-6.92(m, 3H), 4.80-4.70(m, 1H), 4.46-4.33(m, 1H), 4.10-3.94(m, 4H), 3.93(s, 3H), 3.79(br dd, J = 4.8, 11.4Hz, 1H), 3.32-3.31(m, 3H), 3.18-3.09(m, 1H), 3.05-2.91(m, 4H), 2.65-2.53(m, 10H), 2.26-2.14(m, 1H), 2.04-1.73(m, 6H), 1.71-1.65(m, 2H), 1.65-1.55(m, 4H), 1.50-1.35(m, 2H)。

[0290] 实施例12. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(4-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物12)的合成



[0292] 步骤1. 2-(1-亚硝基哌啶-4-基)乙-1-醇 (2) 的合成

[0293] 在0℃下,向2-(哌啶-4-基)乙-1-醇 (6g, 46.44mmol) 在H<sub>2</sub>O (120mL) 中的溶液中分批加入NaNO<sub>2</sub> (6.41g, 92.88mmol)。然后在0℃下滴加AcOH (8.37g, 139.32mmol, 7.97mL)。将所得混合物缓慢升温至15℃,并且在15℃下搅拌16小时。LCMS显示剩余起始材料 (23%),并且检测到期望质量 (75%)。将反应混合物在15℃下再搅拌16小时,LCMS显示剩余起始材料 (12%),并且检测到期望质量 (81%)。向反应混合物中加入饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液以调节pH>7,将所得混合物用溶液 (EtOAc:MeOH=10:1, 250mL×11) 萃取,将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到2-(1-亚硝基哌啶-4-基)乙-1-醇 (7.98g),为黄色油状物,将其直接用于下一个步骤。MS (M+H)<sup>+</sup>=159.2

[0294] 步骤2. 2-(1-氨基哌啶-4-基)乙-1-醇 (3) 的合成

[0295] 在0℃下,向2-(1-亚硝基哌啶-4-基)乙-1-醇 (7.98g, 50.44mmol) 在MeOH (70mL) 中的溶液中加入Zn (16.49g, 252.22mmol),然后在0℃下滴加AcOH (45.44g, 756.65mmol, 43.27mL)。将所得混合物缓慢升温至15℃,并且在15℃下搅拌2小时。LCMS显示起始材料完

全消耗,并且显示具有期望质量的主峰(92%)。过滤混合物,并且将滤饼用MeOH(200mL)洗涤。将滤液真空浓缩。将黄色固体用MeOH(80mL)处理并且搅拌10分钟,过滤,弃去滤饼。将滤液真空浓缩,得到2-(1-氨基哌啶-4-基)乙-1-醇(29.7g),为黄色胶状物,将其直接用于下一个步骤。 $MS(M+H)^+ = 145.2$

[0296] 步骤3. (4-(2-羟基乙基)哌啶-1-基)氨基甲酸叔丁酯(4)的合成

[0297] 向2-(1-氨基哌啶-4-基)乙-1-醇(29.7g, 205.94mmol)在THF(80mL)中的溶液中加入NaOH(24.71g, 617.83mmol)在H<sub>2</sub>O(40mL)中的溶液,接着加入Boc<sub>2</sub>O(44.95g, 205.94mmol, 47.31mL),将所得混合物在15℃下搅拌16小时。TLC显示起始材料完全消耗。过滤反应混合物并且用EtOAc(100mL)洗涤滤饼,将滤液用H<sub>2</sub>O(200mL)稀释并且用EtOAc(150mL×3)萃取。合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(40g SepaFlash®硅胶快速柱,14%-40%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到(4-(2-羟基乙基)哌啶-1-基)氨基甲酸叔丁酯(3.58g, 14.65mmol, 收率7.11%),为灰白色固体。 $MS(M-56+H)^+ = 189.1$

[0298] 步骤4. 4-甲基苯磺酸2-(1-((叔丁氧基羰基)氨基)哌啶-4-基)乙酯合成

[0299] 向(4-(2-羟基乙基)哌啶-1-基)氨基甲酸叔丁酯(3.58g, 14.65mmol)在DCM(50mL)中的溶液中加入TEA(2.97g, 29.30mmol, 4.08mL)、DMAP(17.90mg, 146.52μmol)和TosCl(4.19g, 21.98mmol),将混合物在15℃下搅拌16小时。TLC(SiO<sub>2</sub>, 石油醚:EtOAc=3:1)指示反应物完全消耗,并且检测到具有较低极性的一个主要的新斑点。将反应真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,16%-50%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到4-甲基苯磺酸2-(1-((叔丁氧基羰基)氨基)哌啶-4-基)乙酯(5.05g, 12.67mmol, 收率86.48%),为白色固体。 $MS(M+H)^+ = 399.1$

[0300] 步骤5. 2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(6C)的合成

[0301] 将2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶(20g, 54.02mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3-二氧杂环戊-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷(17.99g, 70.22mmol)、KOAc(10.60g, 108.04mmol)、Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(1.98g, 2.70mmol)在二噁烷(300mL)中的混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫3次,然后将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于100℃下搅拌16小时。LCMS显示2,6-双(苄氧基)-3-溴吡啶完全消耗,并且检测到期望质量(26%)。过滤反应混合物,并且用EtOAc(30mL)洗涤滤饼。将滤液真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(330g SepaFlash®硅胶快速柱,0%-90%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(14.05g, 33.67mmol, 收率62.33%),为棕色胶状物。 $MS(M+H)^+ = 417.9$

[0302] 步骤6. 4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-甲酸苄酯(6E)的合成

[0303] 将2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(6g, 14.38mmol)、4-(4-溴-2-氟苯基)哌嗪-1-甲酸苄酯(3.96g, 10.06mmol)、KOAc(4.23g, 43.13mmol)和Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(526.02mg, 718.90μmol)在二噁烷(90mL)和H<sub>2</sub>O(15mL)中的混合物在N<sub>2</sub>保护下于100℃下搅拌16小时。LCMS显示剩余2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-

1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(10%),并且检测到期望质量(53%)。将反应混合物浓缩。将残余物用H<sub>2</sub>O(100mL)稀释,并且用EtOAc(80mL×3)萃取。合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(80g SepaFlash®硅胶快速柱,4%-5% EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-甲酸苄酯(3.98g,6.59mmol,收率45.85%),为浅黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=604.1

[0304] 步骤7. 3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(6)的合成

[0305] 在N<sub>2</sub>保护下,于15°C向4-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-甲酸苄酯(3.95g,6.54mmol)在CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH(100mL)中的溶液中加入Pd/C(1g,纯度10%) and Pd(OH)<sub>2</sub>/C(1g,纯度10%)。将所得混合物脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫三次,然后在H<sub>2</sub>(15psi)气氛下于45°C下搅拌16小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且检测到期望质量(63%)。将反应混合物过滤,并且用CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH(100mL)洗涤。将滤液浓缩,得到3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(2.53g),为浅棕色胶状物,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=292.1

[0306] 步骤8. (4-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙基)哌啶-1-基)氨基甲酸叔丁酯(7)的合成

[0307] 向3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(300mg,1.03mmol)和4-甲基苯磺酸2-(1-((叔丁氧基羰基)氨基)哌啶-4-基)乙酯(615.58mg,1.54mmol)在DMF(7mL)中的溶液中加入DIPEA(399.28mg,3.09mmol,538.12μL)和NaI(15.44mg,102.98μmol),将混合物在60°C下搅拌16小时。LCMS显示3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮完全消耗,并且在254nm下检测到期望质量(63%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(100mL)稀释,并且用DCM(60mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL×4)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤。将滤液真空浓缩。将残余物用混合物(MTBE:EtOAc=10Ml:10mL)研磨10分钟,过滤悬浮液并且用MTBE(20mL)洗涤滤饼。收集滤饼并且真空干燥,得到(4-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙基)哌啶-1-基)氨基甲酸叔丁酯(250mg,482.97μmol,收率46.90%),为棕色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=518.2

[0308] 步骤9. 3-(4-(4-(2-(1-氨基哌啶-4-基)乙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(8)的合成

[0309] 向(4-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙基)哌啶-1-基)氨基甲酸叔丁酯(100mg,193.19μmol)的DCM溶液(3mL)中加入TFA(220.28mg,1.93mmol,143.04μL),并且将所得混合物在15°C下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且检测到期望质量(77%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-(4-(4-(2-(1-氨基哌啶-4-基)乙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(105mg,TFA盐),为棕色胶状物,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=418.2

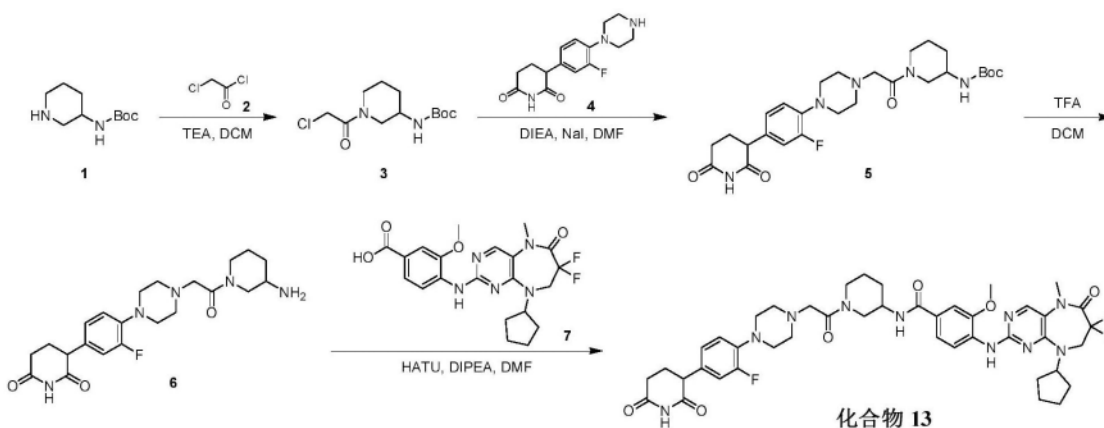
[0310] 步骤10. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(4-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物12)的合成

[0311] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(90mg,201.15μmol)在DMF(2mL)中的溶液中

加入HATU(114.72mg, 301.72 $\mu$ mol)和DIPEA(259.97mg, 2.01mmol, 350.36 $\mu$ L),将混合物在15 $^{\circ}$ C下搅拌15分钟,然后加入3-(4-(4-(2-(1-氨基哌啶-4-基)乙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(100.45mg, 221.26 $\mu$ mol, HCl盐),并且将所得混合物在15 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且检测到期望质量(47%)。向混合物中加入CH<sub>3</sub>COOH以调节pH<7,并且通过制备型HPLC(柱:Phenomenex C18 75 $\times$ 30mm $\times$ 3 $\mu$ m;流动相:[水(FA)-ACN];B%:15%-45%,7min)、然后通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:43%-73%,8min)纯化,将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(4-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(12.6mg, 14.58 $\mu$ mol, 收率7.25%, 纯度98%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=847.3

[0312] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.81(s, 1H), 9.27(s, 1H), 8.36-8.18(m, 2H), 7.96(s, 1H), 7.54-7.34(m, 2H), 7.11-6.83(m, 3H), 4.85-4.69(m, 1H), 4.04(br t, J=14.0Hz, 2H), 3.93(s, 3H), 3.80(br dd, J=4.6, 11.8Hz, 1H), 3.30(br s, 3H), 3.00(br s, 6H), 2.79-2.73(m, 2H), 2.70-2.57(m, 6H), 2.39-2.33(m, 2H), 2.24-2.15(m, 1H), 2.04-1.98(m, 1H), 1.94(br s, 2H), 1.71(br s, 4H), 1.59(br s, 4H), 1.43(br d, J=2.8Hz, 2H), 1.30(br s, 3H)。

[0313] 实施例13. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙酰基)哌啶-3-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物13)的合成



[0314]

[0315] 步骤1. (1-(2-氯乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(3)的合成

[0316] 在0 $^{\circ}$ C下,向哌啶-3-基氨基甲酸叔丁酯(4g, 19.97mmol)和TEA(4.04g, 39.94mmol, 5.56mL)在DCM(50mL)中的溶液中逐滴加入2-氯乙酰氯(2.26g, 19.97mmol, 1.59mL),在添加后,将所得物质在15 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。TLC(SiO<sub>2</sub>, 石油醚:EtOAc=1:2)显示剩余痕量的哌啶-3-基氨基甲酸叔丁酯,并且检测到一个极性较低的主要斑点。将混合物真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱, 12%-18% EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 100mL/min)纯化,得到(1-(2-氯乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(3.15g, 11.38mmol, 收率56.99%),为棕色固体。MS(M-100+H)<sup>+</sup>=177.1

[0317] 步骤2. (1-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(5)的合成

[0318] 向3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(300mg,1.03mmol)和(1-(2-氯乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(228.00mg,823.84 $\mu$ mol)在DMF(10mL)中的溶液中加入DIPEA(399.28mg,3.09mmol,538.12 $\mu$ L)和NaI(15.44mg,102.98 $\mu$ mol),将混合物在60 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示在254nm下具有期望质量的峰(79%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(100mL)稀释,并且用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL $\times$ 3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna C18 150 $\times$ 40mm $\times$ 15 $\mu$ m;流动相:[水(FA)-ACN];B%:10%-40%,10min)纯化,将洗脱液冷冻干燥,得到(1-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(150mg,282.16 $\mu$ mol,收率27.40%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=532.2

[0319] 步骤3. 3-(4-(4-(2-(3-氨基哌啶-1-基)-2-氧代乙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(6)的合成

[0320] 向(1-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(150mg,282.16 $\mu$ mol)在DCM(3mL)中的溶液中加入TFA(308.00mg,2.70mmol,200 $\mu$ L),将混合物在15 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰(100%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-(4-(4-(2-(3-氨基哌啶-1-基)-2-氧代乙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(155mg,TFA盐),为棕色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=432.2

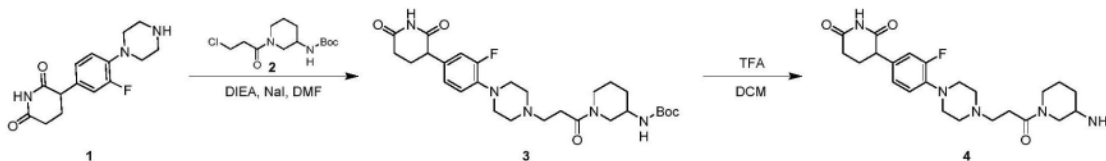
[0321] 步骤4. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙酰基)哌啶-3-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物13)的合成

[0322] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(120mg,268.20 $\mu$ mol)在DMF(3mL)中的溶液中加入HATU(132.57mg,348.65 $\mu$ mol)和DIPEA(207.97mg,1.61mmol,280.29 $\mu$ L),将混合物在15 $^{\circ}$ C下搅拌15分钟,然后加入3-(4-(4-(2-(3-氨基哌啶-1-基)-2-氧代乙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(146.31mg,268.20 $\mu$ mol,TFA盐),并且将所得混合物在15 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LCMS显示具有期望质量的主峰(94%)。向混合物中加入CH<sub>3</sub>COOH以调节pH<7,并且将所得混合物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna C18 150 $\times$ 25mm $\times$ 10 $\mu$ m;流动相:[水(FA)-ACN];B%:26%-56%,10min)、然后制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:40%-70%,8min)纯化,将洗脱液冷冻干燥,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(2-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)乙酰基)哌啶-3-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(56.7mg,64.54 $\mu$ mol,收率24.07%,纯度98%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=861.3

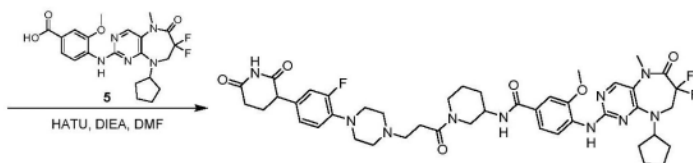
[0323] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ =10.81(s,1H),8.32-8.23(m,2H),8.17(br t,J=8.6Hz,1H),7.98(s,1H),7.54-7.43(m,2H),7.08-6.87(m,3H),4.83-4.68(m,1H),4.44-4.11(m,1H),4.04(br t,J=14.0Hz,3H),3.93(d,J=8.6Hz,3H),3.80(br dd,J=5.4,11.1Hz,2H),3.36-3.25(m,5H),3.21-2.92(m,6H),2.77-2.55(m,6H),2.27-2.12(m,1H),2.06-1.86(m,4H),1.84-1.67(m,3H),1.66-1.45(m,6H)。

[0324] 实施例14. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并

[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-3-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物14)的合成



[0325]



化合物 14

[0326] 步骤1. (1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(3)的合成

[0327] 向3-(3-氟-4-(哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(300mg, 1.03mmol)和(1-(3-氯丙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(449.17mg, 1.54mmol)在DMF(10mL)中的溶液中加入DIPEA(399.28mg, 3.09mmol, 538.12 $\mu$ L)和NaI(15.44mg, 102.98 $\mu$ mol),将混合物在60 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示3-(3-氟-4-(哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮完全消耗,并且在254nm下检测到期望质量(65%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(100mL)稀释,并且用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL $\times$ 3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna C18150 $\times$ 40mm $\times$ 15 $\mu$ m;流动相:[水(FA)-ACN];B%:10%-40%,10min),将洗脱液冷冻干燥,得到(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(100mg, 183.27 $\mu$ mol, 收率17.80%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=546.2

[0328] 步骤2. 3-(4-(4-(3-(3-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(4)的合成

[0329] 向(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(100mg, 183.27 $\mu$ mol)在DCM(4mL)中的溶液中加入TFA(150 $\mu$ L),将混合物在15 $^{\circ}$ C下搅拌4小时。LCMS显示剩余起始材料(3%),并且检测到期望质量(86%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-(4-(4-(3-(3-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(105mg, TFA盐),为棕色油状物,将其直接使用。MS(M+H)<sup>+</sup>=446.2

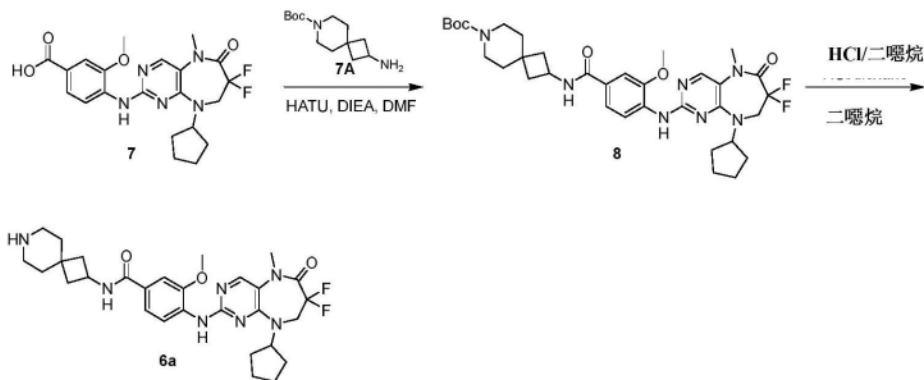
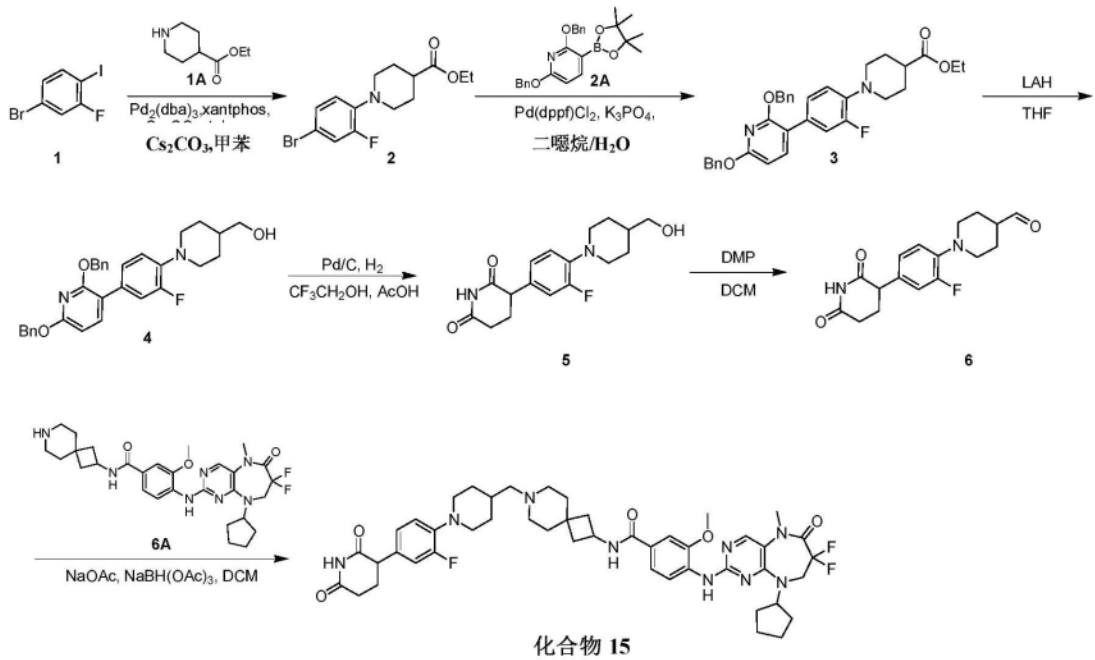
[0330] 步骤3. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-3-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物14)的合成

[0331] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(80mg, 178.80 $\mu$ mol)在DMF(2mL)中的溶液中加入HATU(88.38mg, 232.44 $\mu$ mol)和DIPEA(138.65mg, 1.07mmol, 186.86 $\mu$ L),将混合物在15 $^{\circ}$ C下搅拌15分钟,然后加入3-(4-(4-(3-(3-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(100.05mg, 178.80 $\mu$ mol, TFA盐),并且将所得混合物在15 $^{\circ}$ C下搅拌1

小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且检测到期望质量(95%)。向混合物中加入 $\text{CH}_3\text{COOH}$ 以调节 $\text{pH}<7$ 。将所得混合物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex luna C18  $150\times 25\text{mm}\times 10\mu\text{m}$ ;流动相:[水(FA)-ACN];B%:26%-56%,10min)、然后通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge  $150\times 25\text{mm}\times 5\mu\text{m}$ ;流动相:[水( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN];B%:38%-68%,8min),将洗脱液冷冻干燥,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-3-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(35.7mg,39.99 $\mu\text{mol}$ ,收率22.36%,纯度98%),为白色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=875.8$

[0332]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta=10.93-10.75(\text{m}, 1\text{H}), 8.43-8.11(\text{m}, 3\text{H}), 7.98(\text{s}, 1\text{H}), 7.67-7.44(\text{m}, 2\text{H}), 7.17-6.85(\text{m}, 3\text{H}), 4.88-4.69(\text{m}, 1\text{H}), 4.48-4.10(\text{m}, 1\text{H}), 4.04(\text{br t}, \text{J}=13.9\text{Hz}, 3\text{H}), 3.94(\text{s}, 3\text{H}), 3.85-3.74(\text{m}, 2\text{H}), 3.53-3.36(\text{m}, 5\text{H}), 3.11-2.89(\text{m}, 5\text{H}), 2.79-2.57(\text{m}, 9\text{H}), 2.28-2.11(\text{m}, 1\text{H}), 2.06-1.87(\text{m}, 4\text{H}), 1.85-1.49(\text{m}, 9\text{H})$ 。

[0333] 实施例15. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物15)的合成



[0335] 步骤1. 1-(4-溴-2-氟苯基)哌啶-4-甲酸乙酯(2)的合成

[0336] 向4-溴-2-氟-1-碘苯(10g, 33.23mmol)和哌啶-4-甲酸乙酯(5.22g, 33.23mmol, 5.12mL)在甲苯(200mL)中的溶液中加入 $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (32.49g, 99.70mmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (608.66mg, 664.69 $\mu\text{mol}$ )和Xantphos(576.90mg, 997.03 $\mu\text{mol}$ ),并且将混合物在 $\text{N}_2$ 下于100 $^\circ\text{C}$ 下搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的峰(17%)。将反应混合物用 $\text{H}_2\text{O}$ (500mL)稀释,用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL $\times$ 2)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash $^\text{®}$ 硅胶快速柱,0-15%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,40mL/min)纯化,得到1-(4-溴-2-氟苯基)哌啶-4-甲酸乙酯(2.6g, 7.40mmol, 收率22.27%, 纯度94%),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=330.0$

[0337] 步骤2. 1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲酸乙酯(3)的合成

[0338] 向1-(4-溴-2-氟苯基)哌啶-4-甲酸乙酯(2.1g, 6.36mmol)和2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(5.31g, 12.72mmol)在二噁烷(40mL)和 $\text{H}_2\text{O}$ (8mL)中的溶液中加入 $\text{K}_3\text{PO}_4$ (4.05g, 19.08mmol)和 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (465.36mg, 635.99 $\mu\text{mol}$ ),并且将所得混合物在90 $^\circ\text{C}$ 下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(58%),将混合物真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(40g SepaFlash $^\text{®}$ 硅胶快速柱,0-10%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲酸乙酯(1.5g, 2.77mmol, 收率43.63%, 纯度100%),为白色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=541.2$

[0339] 步骤3. (1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲醇(4)的合成

[0340] 在20 $^\circ\text{C}$ 下,向LAH(315.92mg, 8.32mmol)在THF(30mL)中的悬浮液中加入在THF(20mL)中的1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲酸乙酯(3g, 5.55mmol),并且将所得混合物在20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰(97%)。在0 $^\circ\text{C}$ 下,将反应混合物用 $\text{H}_2\text{O}$ (0.3mL)、NaOH溶液(15%, 0.3mL)和 $\text{H}_2\text{O}$ (0.9mL)淬灭,然后将混合物过滤并且将滤液减压浓缩,得到(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲醇(2.9g, 粗品),为白色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=499.3$

[0341] 步骤4. 3-(3-氟-4-(4-(羟甲基)哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(5)的合成

[0342] 在 $\text{N}_2$ 气氛下,向(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲醇(2.9g, 5.82mmol)在 $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (100mL)中的溶液中加入AcOH(349.29mg, 5.82mmol, 332.66 $\mu\text{L}$ )和Pd/C(0.3g, 纯度10%),将混合物脱气并且用 $\text{H}_2$ 吹扫3次,并且在 $\text{H}_2$ 气氛(15psi)下于20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(80%),将混合物过滤并浓缩,得到3-(3-氟-4-(4-(羟甲基)哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(1.8g, 4.94mmol, 收率85.01%, 纯度88%),为白色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=321.2$

[0343] 步骤5. 1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲醛(6)的合成

[0344] 向3-(3-氟-4-(4-(羟甲基)哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.8g, 2.50mmol)在DCM(30mL)中的溶液中加入DMP(1.59g, 3.75mmol, 1.16mL),并且将混合物在20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌2小时。LCMS显示3-(3-氟-4-(4-(羟甲基)哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮完全消耗,并且检测到期望质量,过滤混合物,并且将滤液减压浓缩,得到1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟

苯基)哌啶-4-甲醛(0.8g,粗品),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+ = 319.0$

[0345] 步骤6. 2-(4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(8)的合成

[0346] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(2g,4.47mmol)和2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(1.07g,4.47mmol)在DMF(20mL)中的溶液中加入HATU(2.04g,5.36mmol)和DIPEA(1.73g,13.41mmol,2.34mL),并且将所得混合物在20℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰(72%)。将混合物倒入水(100mL)中,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,0-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到2-(4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(1.7g,2.51mmol,收率56.22%,纯度99%),为黄色固体。 $MS(M+H)^+ = 670.6$

[0347] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)苯甲酰胺(6a)的合成

[0348] 向2-(4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(1.7g,2.54mmol)在二噁烷(20mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,17.00mL),并且将所得混合物在20℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰(100%)。将混合物减压浓缩,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)苯甲酰胺(1.5g,2.47mmol,收率97.50%,HCl),为黄色固体。 $MS(M+H)^+ = 570.3$

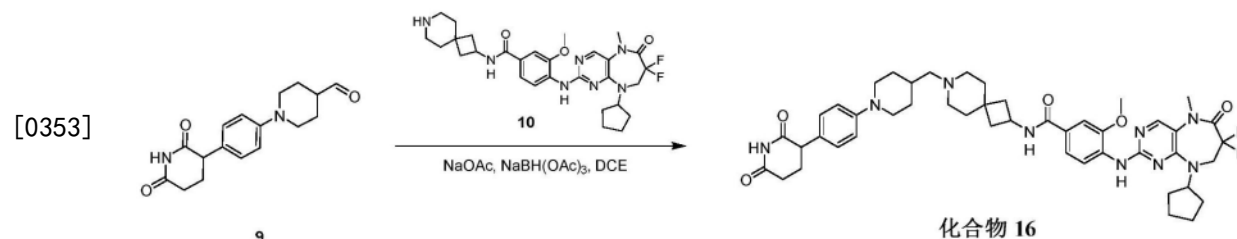
[0349] 步骤8. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物15)的合成

[0350] 向1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲醛(0.8g,2.51mmol)在DCM(50mL)中的溶液中加入4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)苯甲酰胺(1.22g,2.01mmol,HCl盐)和NaOAc(309.23mg,3.77mmol),将混合物在20℃下搅拌1小时。然后,在20℃下,将 $NaBH(OAc)_3$ (2.66g,12.57mmol)加入到混合物中,并且将所得混合物在20℃下搅拌15小时。LCMS显示具有期望质量的峰(38%)。将混合物倒入水(100mL)中,并且用DCM(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,0-30%MeOH/EtOAc梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到0.7g粗产物,将粗产物与EtOAc(20mL)一起研磨,得到0.6g所需产物(纯度95%),将所需产物与can(10mL)和MeOH(10mL)一起研磨,得到560mg所需产物(纯度

96%)，将560mg所需产物与DMF(5mL)和MeOH(2mL)一起研磨，得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,4,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(230mg, 258.49 $\mu$ mol, 收率10.29%, 纯度98%)，为白色固体。将所有母液浓缩并且通过制备型HPLC(柱: Waters Xbridge C18 150 $\times$ 50mm $\times$ 10 $\mu$ m; 流动相: [水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 45%-75%, 10min)再纯化，并且将洗脱液冻干，得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(281.4mg, 316.26 $\mu$ mol, 收率12.58%, 纯度98%)，为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=872.5

[0351] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.80(s, 1H), 8.43(br d, J=7.3Hz, 1H), 8.29-8.24(m, 2H), 7.96(s, 1H), 7.50-7.46(m, 2H), 7.02-6.92(m, 3H), 4.83-4.71(m, 1H), 4.45-4.33(m, 1H), 4.04(br t, J=14.1Hz, 2H), 3.94(s, 3H), 3.79(dd, J=4.9, 11.6Hz, 1H), 3.31(br s, 5H), 2.68-2.59(m, 3H), 2.33-2.12(m, 9H), 2.04-1.92(m, 3H), 1.85-1.70(m, 6H), 1.65-1.51(m, 10H), 1.31-1.20(m, 2H).

[0352] 实施例16. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物16)的合成

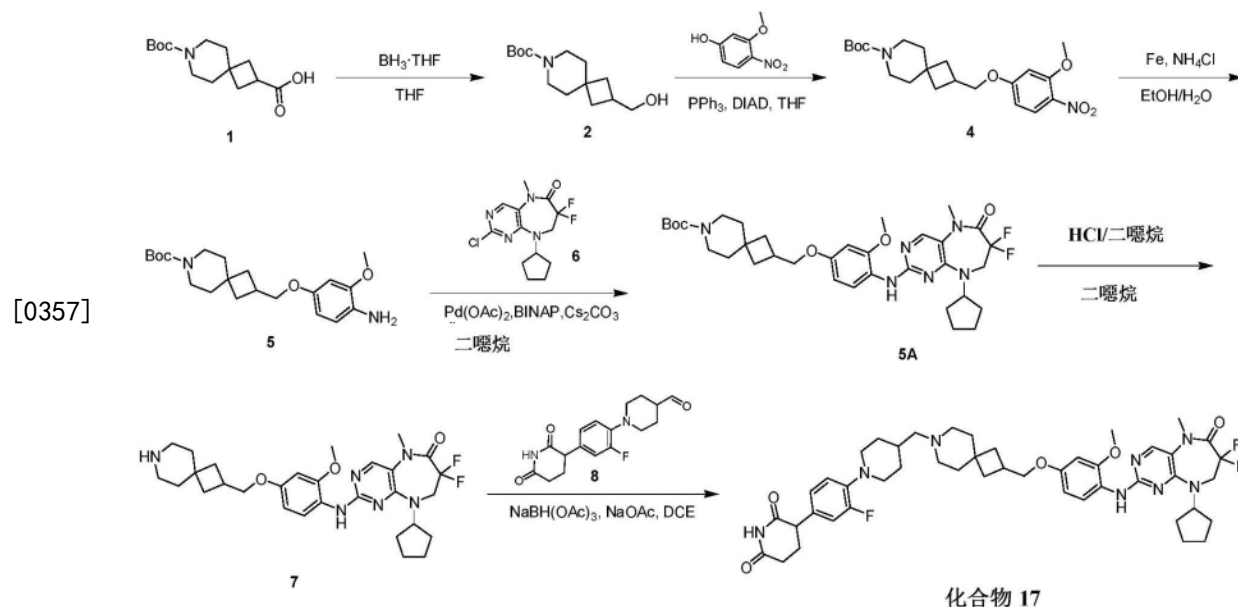


[0354] 向1-[4-(2,6-二氧代-3-哌啶基)苯基]哌啶-4-甲醛(94.15mg, 313.48 $\mu$ mol)在DCE(5mL)中的溶液中加入4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)苯甲酰胺(190mg, 313.48 $\mu$ mol, HCl盐)和NaOAc(38.57mg, 470.22 $\mu$ mol)。将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。然后在20 $^{\circ}$ C下加入NaBH(OAc)<sub>3</sub>(332.19mg, 1.57mmol)，并且将所得混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示期望质量。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(15mL $\times$ 3)洗涤。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥，过滤并减压浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱: 3\_Phenomenex Luna C18 75 $\times$ 30mm $\times$ 3 $\mu$ m; 流动相: [水(TFA)-ACN]; B%: 20%-40%, 9min)、然后是制备型TLC(SiO<sub>2</sub>, 二氯甲烷: 甲醇=10:1)纯化，得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(28.7mg, 32.60 $\mu$ mol, 收率10.40%, 纯度97%)，为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=854.7

[0355] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.76(s, 1H), 8.42(d, J=7.5Hz, 1H), 8.31-8.23(m, 2H), 7.96(s, 1H), 7.52-7.45(m, 2H), 7.02(d, J=8.7Hz, 2H), 6.87(d, J=8.8Hz, 2H), 4.82-4.71(m, 1H), 4.39(sxt, J=7.6Hz, 1H), 4.04(br t, J=14.1Hz, 2H), 3.94(s, 3H), 3.71(dd, J

=5.0, 10.8Hz, 1H), 3.64 (br d, J=12.1Hz, 2H), 3.32 (br s, 3H), 2.65-2.57 (m, 3H), 2.48-2.41 (m, 2H), 2.32-2.20 (m, 3H), 2.18-2.09 (m, 5H), 2.04-1.91 (m, 3H), 1.85-1.68 (m, 6H), 1.66-1.51 (m, 9H), 1.23-1.11 (m, 2H).

[0356] 实施例17. 3-(4-(4-((2-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯氧基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(化合物17)的合成



[0358] 步骤1. 2-(羟甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-甲酸叔丁酯(2)的合成

[0359] 在0℃下,向7-(叔丁氧基羰基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸(1g, 3.71mmol)在THF(20mL)中的溶液中加入BH<sub>3</sub>·THF(1M, 10mL)。将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于20℃下搅拌2小时。TLC(石油醚:EtOAc=1:1; I<sub>2</sub>)指示反应物1完全消耗并且形成一个新的斑点(R<sub>f</sub>=0.28)。在0℃下,将混合物用甲醇(30mL)淬灭。然后将混合物减压浓缩。将残余物用水(100mL)稀释,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到2-(羟甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(940mg, 粗品),为浅黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=256.4

[0360] 步骤2. 2-((3-甲氧基-4-硝基苯氧基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0361] 在0℃下,向2-(羟甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(740mg, 2.90mmol)在THF(6mL)中的溶液中加入PPh<sub>3</sub>(1.15g, 4.37mmol)、3-甲氧基-4-硝基苯酚(500mg, 2.96mmol)和DIAD(936.00mg, 4.63mmol, 900μL)。将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于20℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(31%)。将反应混合物减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(Biotage; 20g SepaFlash®硅胶快速柱, 10%-33%EtOAc:石油醚梯度的洗脱液, 60mL/min)纯化,得到2-((3-甲氧基-4-硝基苯氧基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(1.16g, 2.85mmol, 收率98.48%),为浅黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=429.3

[0362] 步骤3. 2-((4-氨基-3-甲氧基苯氧基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯(5)的合成

[0363] 向2-((3-甲氧基-4-硝基苯氧基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯

(700mg, 1.72mmol) 在EtOH (10mL) 和H<sub>2</sub>O (10mL) 中的溶液中加入Fe (700mg, 12.53mmol) 和NH<sub>4</sub>Cl (700mg, 13.09mmol)。将混合物在80℃下搅拌2小时。TLC (石油醚:EtOAc=1:1) 表明起始材料完全消耗, 并且形成一个新的斑点。过滤反应混合物, 浓缩滤液以除去EtOH。然后加入Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (饱和水溶液, 8mL) 以调节pH=9, 并且用EtOAc (40mL×3) 萃取。将合并的有机层用盐水100mL (50mL×2) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析 (Biotage; 20g **SepaFlash**® 硅胶快速柱, 20% - 50% EtOAc: 石油醚梯度的洗脱液, 60mL/min) 纯化, 得到2-((4-氨基-3-甲氧基苯氧基) 甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯 (630mg, 1.67mmol, 收率97.17%), 为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 377.3

[0364] 步骤4. 2-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基) 氨基)-3-甲氧基苯氧基) 甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯 (5A) 的合成

[0365] 将2-氯-9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-5,7,8,9-四氢-6H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-6-酮 (350mg, 1.11mmol)、2-((4-氨基-3-甲氧基苯氧基) 甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯 (420mg, 1.12mmol)、Pd(OAc)<sub>2</sub> (56.00mg, 249.43μmol)、BINAP (140.00mg, 224.84μmol) 和Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.40g, 4.30mmol) 在二噁烷 (30mL) 中的混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫3次, 然后将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于100℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰 (21%)。将反应混合物减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析 (Biotage; 10g **SepaFlash**® 硅胶快速柱, 20-50% EtOAc: 石油醚梯度的洗脱液, 60mL/min) 纯化, 并且通过制备型HPLC (柱: Unisil 3-100C18 Ultra 150×50mm×3μm; 流动相: [水 (FA) - ACN]; B%: 59% - 89%, 7min; 柱温: 30℃) 再纯化, 将洗脱液冻干, 得到2-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基) 氨基)-3-甲氧基苯氧基) 甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯 (240mg, 365.43μmol, 收率33.07%), 为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 657.6

[0366] 步骤5. 2-((4-((7-氮杂螺[3.5]壬-2-基) 甲氧基)-2-甲氧基苯基) 氨基)-9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-5,7,8,9-四氢-6H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-6-酮 (7) 的合成

[0367] 向2-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基) 氨基)-3-甲氧基苯氧基) 甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-7-甲酸叔丁酯 (240mg, 365.43μmol) 在二噁烷 (3mL) 中的溶液中加入HCl/二噁烷 (4M, 12.00mL), 将混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗, 并且显示具有期望质量的峰 (81%)。将反应混合物减压浓缩, 得到2-((4-((7-氮杂螺[3.5]壬-2-基) 甲氧基)-2-甲氧基苯基) 氨基)-9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-5,7,8,9-四氢-6H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-6-酮 (210mg, 粗品, HCl盐), 为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 557.5

[0368] 步骤6. 3-(4-(4-((2-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基) 氨基)-3-甲氧基苯氧基) 甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基) 甲基) 哌啶-1-基)-3-氟苯基) 哌啶-2,6-二酮 (化合物17) 的合成

[0369] 向1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基) 哌啶-4-甲醛 (128mg, 402.08μmol) 在DCE (8mL) 中的溶液中加入2-((4-((7-氮杂螺[3.5]壬-2-基) 甲氧基)-2-甲氧基苯基) 氨



7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(804.22mg, 3.55mmol)在甲苯(50mL)中的溶液中加入 $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (3.16g, 9.69mmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (147.91mg, 161.52 $\mu\text{mol}$ )和RuPhos(150.75mg, 323.05 $\mu\text{mol}$ ),并且将所得混合物在100 $^\circ\text{C}$ 下搅拌12小时。LCMS显示所有起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(28%)。将反应混合物与另一批(0.5g规模)合用于后处理。将反应混合物过滤,并且将滤液真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱, 0%-15%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 100mL/min)纯化,得到7-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(1.5g, 1.48mmol, 收率52.69%, 纯度90%),为白色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=610.3$

[0375] 步骤2. 7-(4-(2,6-二氧化吡啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0376] 在 $\text{N}_2$ 气氛下,向7-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(1.5g, 2.46mmol)在THF(20mL)中的溶液中加入Pd/C(1g, 纯度10%)。将悬浮液脱气,并且用 $\text{H}_2$ 吹扫3次。将混合物在 $\text{H}_2$ (15psi)下于20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌12小时。LCMS显示剩余起始材料(46%),并且显示具有期望质量的峰,并且在 $\text{N}_2$ 气氛下将Pd/C(1g, 纯度10%)加入至该反应混合物。将反应混合物在 $\text{H}_2$ (15psi)下于20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌24小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(67%)。将反应混合物用THF(15mL)稀释,并且过滤。将滤液真空浓缩,得到7-(4-(2,6-二氧化吡啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(917mg, 2.13mmol, 收率86.38%),为黄色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=432.2$

[0377] 步骤3. 3-(3-氟-4-(2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)苯基)吡啶-2,6-二酮(5)的合成

[0378] 在20 $^\circ\text{C}$ 下,向7-(4-(2,6-二氧化吡啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(917mg, 2.13mmol)在二噁烷(6mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M, 12mL),并且将所得混合物在20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(58%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-(3-氟-4-(2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)苯基)吡啶-2,6-二酮(782mg, 粗品, HCl),为灰白色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=332.4$

[0379] 步骤4. 8-亚硝基-1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷(10B)的合成

[0380] 在0 $^\circ\text{C}$ 下,向1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷(26g, 181.59mmol, 23.21mL)在 $\text{H}_2\text{O}$ (300mL)中的溶液中加入 $\text{NaNO}_2$ (37.59g, 544.76mmol)。然后在0 $^\circ\text{C}$ 下滴加AcOH(43.62g, 726.34mmol, 41.54mL),并且将所得混合物在20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(98%)。TLC( $\text{SiO}_2$ , 石油醚:EtOAc=3:1)指示起始材料完全消耗并且检测到一个新斑点。在20 $^\circ\text{C}$ 下,将饱和 $\text{NaHCO}_3$ (400mL)加入到该反应混合物中,以调节pH=7,并且用EtOAc(400mL $\times$ 4)萃取。将有机层用饱和 $\text{NaHCO}_3$ (200mL $\times$ 3)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩,得到8-亚硝基-1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷(25.5g, 148.10mmol, 收率81.56%),为黄色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=173.3$

[0381] 步骤5. 4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-胺(10C)的合成

[0382] 向8-亚硝基-1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷(25.5g, 148.10mmol)在THF(200mL)和 $\text{H}_2\text{O}$ (100mL)中的溶液中加入 $\text{NH}_4\text{Cl}$ (23.77g, 444.30mmol),然后在0 $^\circ\text{C}$ 下分批加入Zn(29.05g, 444.30mmol),并且将所得混合物在20 $^\circ\text{C}$ 下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消

耗,并且显示具有期望质量的峰。将反应混合物用THF (500mL) 稀释,并且过滤。真空浓缩滤液,得到粗产物。在20℃下将粗产物用THF:EtOAc=1:1 (200mL×4) 研磨15分钟并过滤。将滤液真空浓缩,得到1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-胺(9.8g,61.95mmol,收率41.83%),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+=159.1$

[0383] 步骤6. (1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-基) 氨基甲酸苄酯(10D)的合成在0℃下,向1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-胺(7g,44.25mmol)在THF(80mL)中的溶液中加入TEA(22.26g,220.03mmol,30.63mL)和CbzCl(7.56g,44.32mmol,6.30mL),并且将混合物在20℃下搅拌14小时。LCMS显示检测到期望质量。将混合物用H<sub>2</sub>O(100mL)稀释,并且用EtOAc(30mL×3)萃取,将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(80g SepaFlash®硅胶快速柱,40%-50%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到粗产物。将粗产物通过快速硅胶层析(12g SepaFlash®硅胶快速柱,40%-50%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,70mL/min)再纯化,得到(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-基)氨基甲酸苄酯(850mg,2.38mmol,收率5.39%,纯度82%),为黄色固体。 $MS(M+H)^+=293.1$

[0384] 步骤7.N-(4-氧代-1-哌啶基)氨基甲酸苄酯(10)的合成

[0385] 向N-(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸-8-基)氨基甲酸苄酯(930mg,3.18mmol)在THF(20mL)中的溶液中加入HCl(1M,12mL),并且将混合物在50℃下搅拌1小时。LCMS显示剩余起始材料(38%) and 期望质量(50%)。将混合物在50℃下搅拌1小时。LCMS显示剩余起始材料(18%),并且检测到期望质量(70%)。将混合物在50℃下搅拌1小时。将混合物用NaHCO<sub>3</sub>(60mL)淬灭,然后用EtOAc(20mL×3)萃取,将合并的有机层用水(10mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩,得到N-(4-氧代-1-哌啶基)氨基甲酸苄酯(740mg,粗品),为黄色固体。 $MS(M+H)^+=249.2$

[0386] 步骤8.(4-(7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)氨基甲酸苄酯(6)的合成

[0387] 在20℃下,向3-(3-氟-4-(2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(355.58mg,966.66μmol,HCl)在DCE(10mL)中的溶液中加入TEA(815.13mg,8.06mmol,1.12mL)、4AMS(300mg)和N-(4-氧代-1-哌啶基)氨基甲酸苄酯(200mg,805.55μmol)。然后在20℃下缓慢加入NaBH(OAc)<sub>3</sub>(512.19mg,2.42mmol),并且将所得混合物在20℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且检测到具有期望质量的峰(67%)。将反应混合物过滤,并将滤液真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(10g SepaFlash®硅胶快速柱,0%-100%EtOAc/石油醚至0-10%二氯甲烷/甲醇梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到(4-(7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)氨基甲酸苄酯(342mg,582.48μmol,收率72.31%,纯度96%),为浅黄色固体。 $MS(M+H)^+=564.3$

[0388] 步骤9. 3-(4-(2-(1-氨基哌啶-4-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(7)的合成

[0389] 将(4-(7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)氨基甲酸苄酯(325mg,576.59μmol)在TFA(3mL)中的混合物在20℃下,并且将所得混合物在60℃下搅拌3小时。LCMS显示剩余起始材料(26%),并且检测到具有期望质量的

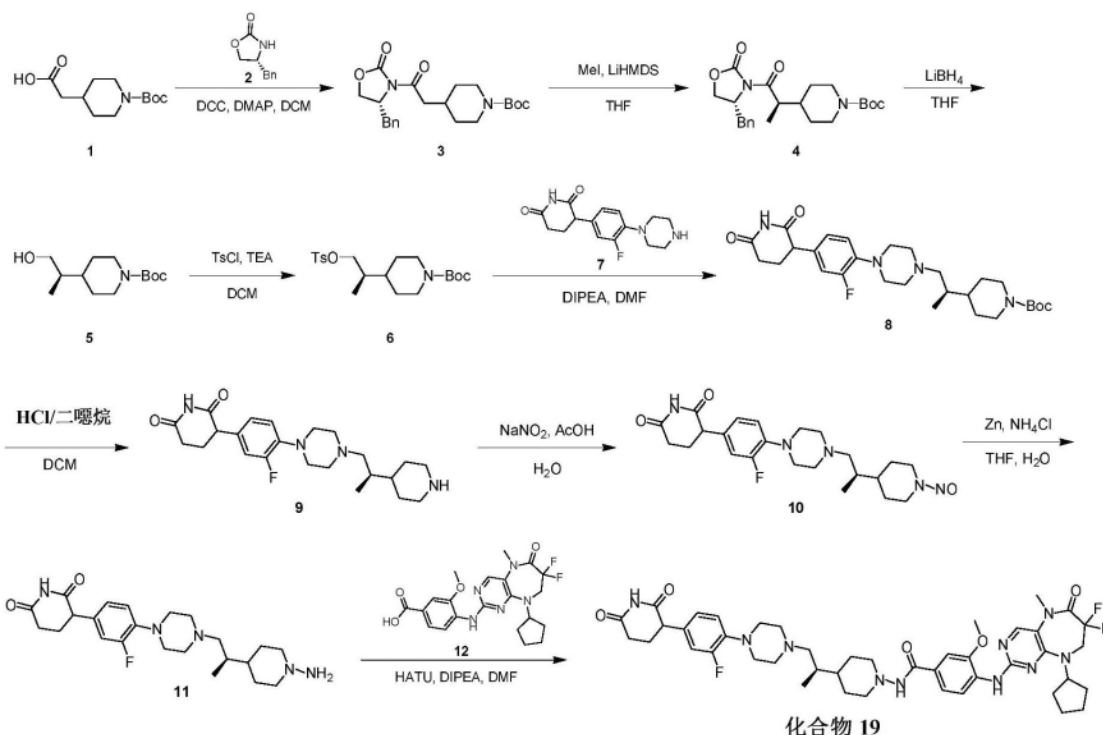
峰(35%),并且将混合物在60℃下搅拌1小时。LCMS显示剩余起始材料(5%),并且检测到具有期望质量的峰(47%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-(4-(2-(1-氨基哌啶-4-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(314mg,粗品,TFA),为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup>=430.3

[0390] 步骤10. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基)氨基)-N-(4-(7-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物18)的合成

[0391] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(100mg,223.50μmol)在DMF(3mL)中的溶液中加入HATU(93.48mg,245.85μmol)和DIPEA(57.77mg,446.99μmol,77.86μL)。将混合物在20℃下搅拌10分钟,并且加入3-(4-(2-(1-氨基哌啶-4-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(182.22mg,335.24μmol,TFA)在DMF(3mL)中的溶液和DIPEA(86.66mg,670.49μmol,116.79μL),并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(93%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(12mL)稀释,并且用EtOAc(12mL×3)萃取。将有机层用盐水(12mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi Polar 100×25mm×4μm;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:31%-51%,7min)纯化并冻干,得到产物(160mg)。将产物溶解在混合溶液CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=1:1(10mL)中。向该混合物溶液中加入饱和NaHCO<sub>3</sub>(2mL)以调节pH=7。将反应混合物用DCM(10mL×3)萃取,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到残余物。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex C18 75×30mm×3μm;流动相:[水(FA)-ACN];B%:15%-45%,7min)再纯化并且冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基)氨基)-N-(4-(7-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(68.6mg,73.89μmol,收率33.06%,纯度95%,0.5FA),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=859.4

[0392] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.82(s,1H),9.34(s,1H),8.30-8.20(m,2H),7.96(s,1H),7.47-7.38(m,2H),7.06-6.90(m,3H),4.82-4.70(m,1H),4.11-3.98(m,2H),3.92(s,3H),3.79(dd,J=4.7,11.7Hz,1H),3.34-3.28(m,4H),3.07-2.96(m,6H),2.95-2.84(m,4H),2.79(t,J=9.1Hz,2H),2.70-2.58(m,1H),2.25-2.12(m,2H),2.04-1.88(m,3H),1.86-1.76(m,4H),1.76-1.65(m,4H),1.65-1.54(m,4H),1.39-1.26(m,2H)。

[0393] 实施例19. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基)氨基)-N-(4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物19)的合成



[0394]

[0395] 步骤1. (R)-4-(2-(4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-2-氧代乙基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(3)的合成

[0396] 向2-(1-(叔丁氧基羰基)哌啶-4-基)乙酸(6g, 24.66mmol)和(R)-4-苄基噁唑烷-2-酮(4.4g, 24.83mmol)在DCM(60mL)中的溶液中加入DMAP(1.51g, 12.33mmol)和DCC(5.09g, 24.66mmol, 4.99mL),并且将混合物在20℃下搅拌14小时。LCMS显示检测到期望质量。将混合物过滤,并且将滤饼用MTBE(30mL)洗涤。将滤液用H<sub>2</sub>O(50mL×3)洗涤,将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将粗产物用石油醚(50mL)稀释并且在20℃下搅拌0.5小时。过滤混合物并且用石油醚(20mL)洗涤滤饼。将滤液减压浓缩。将产物通过快速硅胶层析(120g SepaFlash®硅胶快速柱, 50%-80% EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 100mL/min)纯化,得到(R)-4-(2-(4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-2-氧代乙基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(10g, 24.10mmol, 收率97.73%, 纯度97%),为黄色油状物。MS (M-56+H)<sup>+</sup>=347.4

[0397] 步骤2. 4-((R)-1-((R)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-1-氧代丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0398] 在0℃下,向(R)-4-(2-(4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-2-氧代乙基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(10g, 24.85mmol)在THF(200mL)中的溶液中缓慢加入LiHMDS(2M, 25.00mL),并且将混合物在0℃下搅拌30分钟。然后在-40℃下加入MeI(7.07g, 49.80mmol, 3.10mL),并且将混合物在-40℃下搅拌2小时,然后将反应混合物温热至20℃并且在20℃下搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的峰(52%)。将混合物用NH<sub>4</sub>Cl(100mL)淬灭,并且用EtOAc(100mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(120g SepaFlash®硅胶快速柱, 20% EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 50mL/min)纯化,得到4-((R)-1-((R)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-1-氧代丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(5.42g, 13.01mmol, 收率52.36%),为黄色油状物。MS (M-56+H)<sup>+</sup>=361.1

[0399] 步骤3. (R)-4-(1-羟基丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(5)的合成

[0400] 在20℃下,向4-((R)-1-((R)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-1-氧代丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(5.42g,13.01mmol)在THF(100mL)中的溶液中缓慢加入LiBH<sub>4</sub>(460mg,21.12mmol),并且将混合物在20℃下搅拌30小时。LCMS显示剩余痕量的起始材料。将混合物用NH<sub>4</sub>Cl(50mL)淬灭,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用水(50mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩,得到(R)-4-(1-羟基丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(5g,粗品),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=244.4

[0401] 步骤4. (R)-4-(1-(甲苯磺酰氧基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(6)的合成

[0402] 向(R)-4-(1-羟基丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(5g,20.55mmol)在DCM(80mL)中的溶液中加入TEA(6.25g,61.79mmol,8.6mL)和TosCl(3.92g,20.55mmol),并且将混合物在20℃下搅拌14小时。LCMS显示期望质量。将混合物用水(50mL)稀释,用EtOAc(20mL×2)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,17%-20%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到(R)-4-(1-(甲苯磺酰氧基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(2.19g,3.75mmol,收率18.23%,纯度68%),为黄色油状物。MS(M-100+H)<sup>+</sup>=298.3

[0403] 步骤5. 4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(8)的合成

[0404] 向3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.5g,1.23mmol,TFA盐)和(R)-4-(1-(甲苯磺酰氧基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.08g,1.85mmol,纯度68%)在DMF(8mL)中的溶液中加入DIPEA(797.10mg,6.17mmol,1.07mL)和NaI(18.49mg,123.35μmol),并且将混合物在60℃下搅拌14小时。LCMS显示检测到期望质量。将反应混合物用水(20mL)稀释,并且用EtOAc(10mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(10mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(12g SepaFlash®硅胶快速柱,60% EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(330mg,606.80μmol,收率49.19%,纯度95%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=517.5

[0405] SFC:方法细节:“柱:(S.S)Whe1k-O<sub>1</sub> 50×4.6mm I.D.,3.5μm流动相:相A用于CO<sub>2</sub>,相B用于MeOH+ACN=4:1(0.05%DEA);梯度洗脱:CO<sub>2</sub>中40%MeOH+ACN=4:1(0.05%DEA);流速:3mL/min;检测器:PDA;柱温:35℃;背压:100巴”。

[0406] 步骤6. 3-(3-氟-4-(4-((R)-2-(哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(9)的合成

[0407] 向4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(330mg,638.73μmol)在DCM(5mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,6mL),并且将混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示后处理后具有期望质量的主峰(100%)。将混合物减压浓缩,得到3-(3-氟-4-(4-((R)-2-(哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(290mg,粗品,HCl盐),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=417.4

[0408] 步骤7. 3-(3-氟-4-(4-((R)-2-(1-亚硝基哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(10)的合成

[0409] 向3-(3-氟-4-(4-((R)-2-(哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(290mg,640.19μmol,HCl盐)在H<sub>2</sub>O(6mL)中的溶液中加入NaNO<sub>2</sub>(132.51mg,1.92mmol),然后

缓慢加入AcOH(147.00mg, 2.45mmol, 140 $\mu$ L), 并且将所得混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的峰(21%)和剩余起始材料(70%)。加入另外的NaNO<sub>2</sub>(132.51mg, 1.92mmol)和AcOH(147.00mg, 2.45mmol, 140 $\mu$ L), 并且将混合物在20 $^{\circ}$ C下再搅拌1小时。LCMS显示期望质量(43%)和剩余起始材料(43%)。加入另一批NaNO<sub>2</sub>(132.51mg, 1.92mmol)并且将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌12.5小时。LCMS显示期望质量(75%)和剩余起始材料(23%)。将混合物用NaHCO<sub>3</sub>(20mL)淬灭, 并且用EtOAc(10mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用NaHCO<sub>3</sub>(10mL)和水(10mL)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩, 得到3-(3-氟-4-(4-((R)-2-(1-亚硝基哌啶-4-基)丙基)哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(250mg, 粗品), 为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=446.5。

[0410] 步骤8. 3-(4-(4-((R)-2-(1-氨基哌啶-4-基)丙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(11)的合成

[0411] 在0 $^{\circ}$ C下, 向3-(3-氟-4-(4-((R)-2-(1-亚硝基哌啶-4-基)丙基)哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(250mg, 561.13 $\mu$ mol)和NH<sub>4</sub>Cl(92mg, 1.72mmol)在THF(5mL)和H<sub>2</sub>O(2.5mL)中的溶液中加入Zn(111mg, 1.70mmol), 并且将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌4小时。LCMS显示剩余起始材料(17%) and 期望质量(79%)。过滤混合物, 滤饼用THF(30mL)洗涤。将滤液减压浓缩, 得到3-(4-(4-((R)-2-(1-氨基哌啶-4-基)丙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(250mg, 粗品), 为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=432.1。

[0412] 步骤9. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物19)的合成

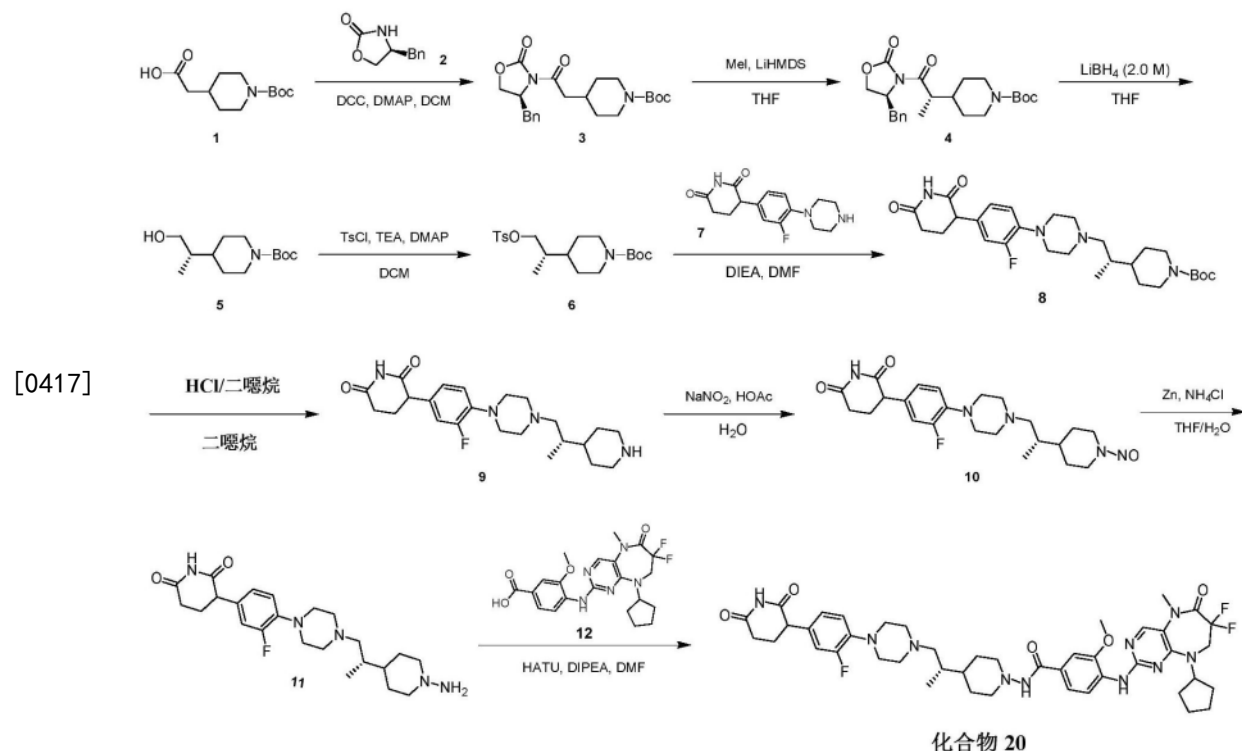
[0413] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(0.2g, 446.99 $\mu$ mol)在DMF(3mL)中的溶液中加入HATU(203mg, 533.89 $\mu$ mol)和DIPEA(371.00mg, 2.87mmol, 0.5mL), 并且将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌15分钟。然后加入3-(4-(4-((R)-2-(1-氨基哌啶-4-基)丙基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(250mg, 579.31 $\mu$ mol)在DMF(3mL)中的溶液, 并且将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌45分钟。LCMS显示期望质量(64%)。将反应混合物用水(15mL)稀释, 并且用EtOAc(10mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(15mL $\times$ 2)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(12g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱, 8%-15%MeOH/EtOAc梯度的洗脱液, 80mL/min)纯化, 并且通过制备型TLC(EtOAc:二氯甲烷:甲醇=5:5:1)再纯化。将产物冻干, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(95.5mg, 104.82 $\mu$ mol, 收率23.45%, 纯度94.5%), 为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=861.0

[0414] SFC方法细节:“柱:(S,S)Whe1k-0<sub>1</sub> 100 $\times$ 4.6mm I.D., 3.5 $\mu$ m流动相:相A用于CO<sub>2</sub>, 相B用于MeOH+can(0.05%DEA);梯度洗脱:CO<sub>2</sub>中60%MeOH+ACN(0.05%DEA);流速:3mL/min;检测器:PDA;柱温:35 $^{\circ}$ C;背压:100巴”。

[0415] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.81(s, 1H), 9.26(s, 1H), 8.29-8.24(m, 2H), 7.95(s, 1H), 7.45-7.38(m, 2H), 7.06-6.93(m, 3H), 4.81-4.71(m, 1H), 4.04(br t, J=14.1Hz,

2H), 3.93 (s, 3H), 3.80 (dd, J=4.9, 12.0Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.07-2.96 (m, 5H), 2.81-2.71 (m, 2H), 2.64-2.59 (m, 1H), 2.56-2.52 (m, 6H), 2.31-2.08 (m, 3H), 2.03-1.89 (m, 3H), 1.75-1.54 (m, 9H), 1.50-1.29 (m, 3H), 0.86 (br d, J=6.6Hz, 3H).

[0416] 实施例20. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-1-基)丙-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物20)的合成



[0418] 步骤1. (S)-4-(2-(4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-2-氧代乙基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(3)的合成

[0419] 向2-(1-(叔丁氧基羰基)哌啶-4-基)乙酸(4g, 16.44mmol)在DCM(40mL)中的溶液中加入DCC(3.73g, 18.08mmol, 3.66mL)和DMAP(1.00g, 8.22mmol),并且在搅拌0.5小时后,加入(S)-4-苄基噁唑烷-2-酮(3.20g, 18.08mmol),并且将所得混合物在25℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(约57%)。过滤混合物以除去固体。将滤液用水(100mL)稀释,并且用DCM(50mLx3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®; 40g SepaFlash®硅胶快速柱, 0-40%石油醚:EtOAc梯度的洗脱液, 80mL/min)纯化,得到(S)-4-(2-(4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-2-氧代乙基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(7g, 13.22mmol, 收率80.40%, 纯度76%),为黄色油状物。MS(M-56+H)<sup>+</sup>=347.1

[0420] 步骤2. 4-((S)-1-((S)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-1-氧代丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0421] 在0℃下,向(S)-4-(2-(4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-2-氧代乙基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(7g, 17.39mmol)在THF(30mL)中的溶液中加入LiHMDS(1M, 26.09mL),并且在搅拌0.5小时后,在-40℃下加入MeI(4.94g, 34.78mmol, 2.17mL),并且将所得混合物在25℃下搅拌

12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(57%)。将混合物用 $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50mL)淬灭,并且用EtOAc (30mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®;80g SepaFlash®硅胶快速柱,0-40%石油醚:EtOAc梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到4-((S)-1-((S)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-1-氧代丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(3.3g,7.46mmol,收率42.91%,纯度94.2%),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}-56+\text{H})^+=361.2$

[0422] 步骤3. (S)-4-(1-羟基丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(5)的合成

[0423] 在0℃下,向4-((S)-1-((S)-4-苄基-2-氧代噁唑烷-3-基)-1-氧代丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(3.3g,7.92mmol)在THF(20mL)中的溶液中加入 $\text{LiBH}_4$ (2M,5.94mL)。将混合物在25℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗。将混合物用 $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50mL)淬灭,并且用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并过滤。将滤液减压浓缩,得到(S)-4-(1-羟基丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(2.7g,粗品),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=244.4$

[0424] 步骤4. (S)-4-(1-(甲苯磺酰氧基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(6)的合成

[0425] 向(S)-4-(1-羟基丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(2.7g,11.10mmol)在DCM(20mL)中的溶液中加入TosCl(2.12g,11.10mmol)、DMAP(271.10mg,2.22mmol)和TEA(2.25g,22.19mmol,3.09mL)。将混合物在25℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(15%)。将反应混合物用水(50mL)稀释,并且用DCM(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用饱和盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过硅胶层析法( $\text{SiO}_2$ ,1000目,石油醚:EtOAc=1:0,然后20:1)纯化,得到(S)-4-(1-(甲苯磺酰氧基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.8g,4.53mmol,收率40.81%),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}-56+\text{H})^+=342.0$

[0426] 步骤5. 4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(8)的合成

[0427] 向(S)-4-(1-(甲苯磺酰氧基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.8g,4.53mmol)在DMF(10mL)中的溶液中加入DIEA(877.82mg,6.79mmol,1.18mL)和3-(3-氟-4-(哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(1.06g,3.62mmol)。将混合物在50℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(10%)。将反应混合物用水(50mL)稀释,并且用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®;40g SepaFlash®硅胶快速柱,0-30%石油醚/EtOAc:乙醇(v:v=3:1)梯度的洗脱液,60mL/min)纯化,得到4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.2g,2.32mmol,收率51.30%),为黄色固体。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=517.5$

[0428] 步骤6. 3-(3-氟-4-(4-((S)-2-(哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(9)的合成

[0429] 向4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.2g,2.32mmol)在二噁烷(5mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,10mL)。将混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示具有期望质量的峰(40%)。将混合物减压浓缩,得到3-(3-氟-4-(4-((S)-2-(哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(1g,粗品,HCl盐),为黄色油状物。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=417.2$

[0430] 步骤7. 3-(3-氟-4-(4-((S)-2-(1-亚硝基哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(10)的合成

[0431] 向3-(3-氟-4-(4-((S)-2-(哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.8g, 1.77mmol, HCl盐)在H<sub>2</sub>O(15mL)中的溶液中加入NaNO<sub>2</sub>(609.24mg, 8.83mmol)。然后在0℃下,将HOAc(530.27mg, 8.83mmol, 505.02μL)滴加到混合物中。将混合物在20℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将反应混合物用饱和碳酸氢钠溶液(50mL)淬灭,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到3-(3-氟-4-(4-((S)-2-(1-亚硝基哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.3g, 粗品),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=446.2。

[0432] 步骤8. 3-(4-(4-((S)-2-(1-氨基哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(11)的合成

[0433] 在0℃下,向3-(3-氟-4-(4-((S)-2-(1-亚硝基哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(0.3g, 673.36μmol)在THF(10mL)中的溶液中加入Zn(220.15mg, 3.37mmol)。然后,在0℃下,向混合物中加入NH<sub>4</sub>Cl(108.05mg, 2.02mmol)在H<sub>2</sub>O(5mL)中的溶液。将混合物在20℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰(60%)。过滤混合物以除去固体。将滤饼用THF(50mL)洗涤。将滤液减压浓缩,得到3-(4-(4-((S)-2-(1-氨基哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(240mg, 粗品),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=432.2

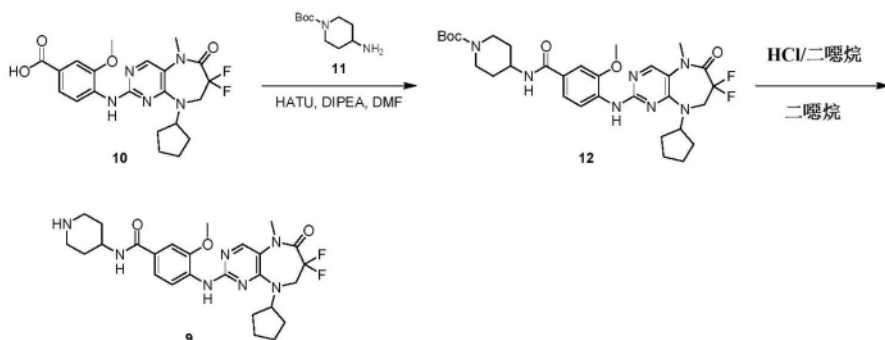
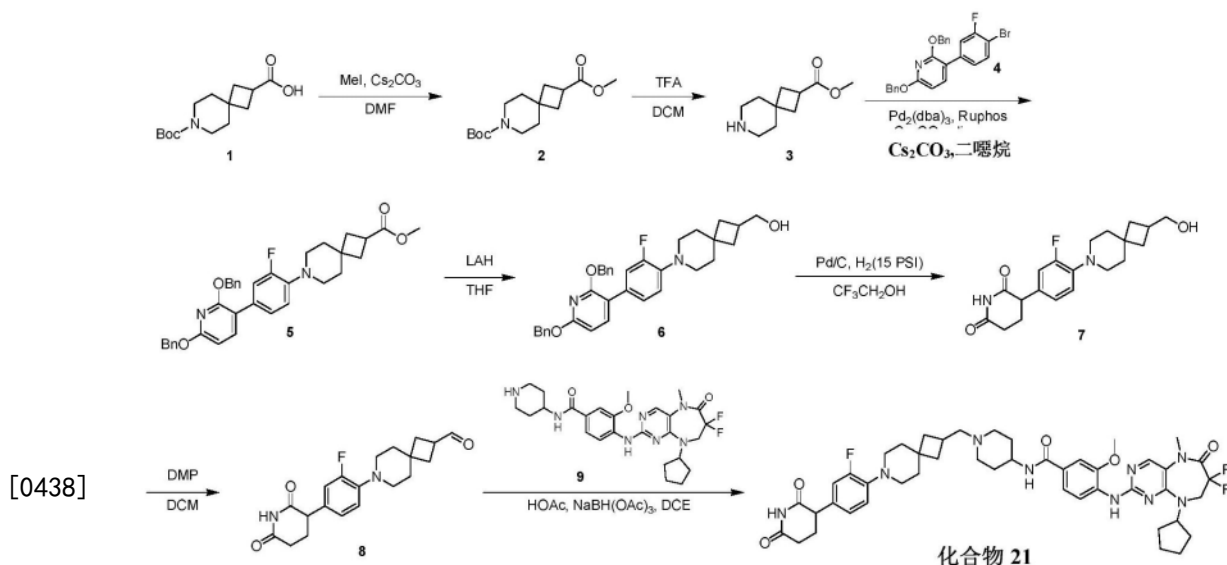
[0434] 步骤9. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物20)的合成

[0435] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(150mg, 335.24μmol)在DMF(2mL)中的溶液中加入HATU(152.96mg, 402.29μmol)和DIEA(216.64mg, 1.68mmol, 291.97μL),将混合物搅拌0.5小时,然后向混合物中加入3-(4-(4-((S)-2-(1-氨基哌啶-4-基)丙基)哌嗪-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(144.67mg, 335.24μmol)在DMF(2mL)中的溶液,并且将所得混合物在20℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(36%)。将反应混合物用水(20mL)稀释,并且用EtOAc(30mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®; 20g SepaFlash®硅胶快速柱, 0%-60%石油醚:EtOAc/乙醇(v/v=2/1)梯度的洗脱液, 60mL/min)和制备型HPLC(柱:Welch Ultimate C18 150×25mm×5μm; 流动相:[水(FA)-ACN]; B%:15%-45%, 10min)纯化,将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌嗪-1-基)丙-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(13.1mg, 14.79μmol, 收率4.35%, 纯度96.3%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=861.4

[0436] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.81(s, 1H), 9.25(s, 1H), 8.41-8.17(m, 2H), 7.96(s, 1H), 7.47-7.36(m, 2H), 7.08-6.82(m, 3H), 4.84-4.67(m, 1H), 4.12-3.97(m, 2H), 3.93(s, 3H), 3.80(dd, J=4.8, 11.8Hz, 1H), 3.32(s, 3H), 3.06-2.93(m, 6H), 2.81-2.61(m, 8H), 2.28-2.08(m, 3H), 2.05-1.88(m, 3H), 1.80-1.54(m, 9H), 1.51-1.27(m, 3H), 0.86(d, J=

6.8Hz, 3H) .

[0437] 实施例21. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂萘-2-基)氨基)-N-(1-((7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)甲基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物21)的合成



[0439] 步骤1. 7-氮杂螺[3.5]壬烷-2,7-二甲酸7-(叔丁酯)2-甲酯(2)的合成

[0440] 向7-(叔丁氧基羰基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸(3g, 11.14mmol)在DMF(20mL)中的溶液中加入MeI(2.37g, 16.71mmol, 1.04mL)和Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(5.44g, 16.71mmol)。将混合物在25℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将反应混合物用水(50mL)稀释,并且用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用饱和盐水(50mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到7-氮杂螺[3.5]壬烷-2,7-二甲酸7-(叔丁酯)2-甲酯(5.1g, 粗品),为黄色油状物。

[0441] MS(M-56+H)<sup>+</sup>=228.1

[0442] 步骤2. 7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸甲酯(3)的合成

[0443] 在0℃下,向7-氮杂螺[3.5]壬烷-2,7-二甲酸7-(叔丁酯)2-甲酯(4.6g, 16.23mmol)在DCM(20mL)中的溶液中加入TFA(7.70g, 67.53mmol, 5mL)。将混合物在20℃下搅拌2小时。LCMS显示剩余7-氮杂螺[3.5]壬烷-2,7-二甲酸7-(叔丁酯)2-甲酯。加入另外的TFA(7.70g, 67.53mmol, 5mL),并且将所得混合物在20℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将混合物减压浓缩,得到7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸甲酯(5g, 粗品, TFA盐),

为黄色油状物。 $MS(M+H)^+ = 184.1$

[0444] 步骤3. 7-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸甲酯(5)的合成

[0445] 向7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸甲酯(3g, 10.09mmol, TFA盐)在二噁烷(20mL)中的溶液中加入2,6-双(苄氧基)-3-(4-溴-3-氟苯基)吡啶(3.75g, 8.07mmol)、 $Cs_2CO_3$ (9.86g, 30.28mmol)、 $Pd_2(dba)_3$ (462.06mg, 504.59 $\mu$ mol)和RuPhos(470.92mg, 1.01mmol)。将混合物在100℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(约16%)。过滤反应混合物以除去固体。将滤液用水(100mL)稀释,并且用EtOAc(60mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®; 120g SepaFlash®硅胶快速柱, 0%-10%石油醚:EtOAc梯度的洗脱液, 80mL/min)纯化,得到7-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸甲酯(1g, 1.45mmol, 收率14.34%, 纯度82%),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+ = 567.3$

[0446] 步骤4. (7-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)甲醇(6)的合成

[0447] 向 $LiAlH_4$ (133.96mg, 3.53mmol)在THF(5mL)中的悬浮液中滴加7-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸甲酯(1g, 1.76mmol)在THF(5mL)中的溶液。将混合物在 $N_2$ 下于20℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的主峰(100%)。将反应混合物用 $H_2O$ (0.15mL)、NaOH(15%水溶液, 0.15mL)和 $H_2O$ (0.4mL)淬灭。将反应混合物经 $Na_2SO_4$ 干燥并过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®; 20g SepaFlash®硅胶快速柱, 0%-30%石油醚:EtOAc梯度的洗脱液, 80mL/min)纯化,得到(7-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)甲醇(0.7g, 1.22mmol, 收率69.37%, 纯度94.2%),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+ = 539.6$

[0448] 步骤5. 3-(3-氟-4-(2-(羟甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(7)的合成

[0449] 在 $N_2$ 气氛下,向(7-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)甲醇(0.6g, 1.11mmol)在 $CF_3CH_2OH$ (10mL)中的溶液中加入Pd/C(0.2g, 556.95 $\mu$ mol, 纯度10%)在 $CF_3CH_2OH$ (10mL)中的溶液。将混合物脱气并且用 $H_2$ 吹扫数次,然后将悬浮液在 $H_2$ (15psi)气氛下于20℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。过滤混合物以除去催化剂。将滤液减压浓缩,得到3-(3-氟-4-(2-(羟甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(380mg, 992.12 $\mu$ mol, 收率89.07%, 纯度94.1%),为灰色固体。 $MS(M+H)^+ = 361.4$ 。

[0450] 步骤6. 7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲醛(8)的合成

[0451] 向3-(3-氟-4-(2-(羟甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(150mg, 416.18 $\mu$ mol)在DCM(10mL)中的溶液中加入DMP(211.82mg, 499.42 $\mu$ mol, 154.62 $\mu$ L)。将混合物在25℃下搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将反应混合物用水(10mL)稀释,并且用DCM(10mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-

甲醛 (0.2g, 粗品), 为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 359.0

[0452] 步骤7. 4-(4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(12)的合成

[0453] 向4-(4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸 (0.5g, 1.12mmol) 在DMF (5mL) 中的溶液中加入HATU (509.88mg, 1.34mmol) 和DIPEA (288.85mg, 2.23mmol, 389.29 $\mu$ L), 将混合物搅拌0.5小时, 然后加入4-氨基哌啶-1-甲酸叔丁酯 (235.00mg, 1.17mmol), 并且将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(约62%)。将反应混合物用水(20mL)稀释, 并且用EtOAc (30mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析 (ISCO<sup>®</sup>; 40g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱, 0%-80%石油醚:EtOAc梯度的洗脱液, 80mL/min) 纯化, 得到4-(4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (0.64g, 990.95 $\mu$ mol, 收率88.68%, 纯度97.5%), 为黄色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 630.3

[0454] 步骤8. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺(9)的合成

[0455] 向4-(4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (0.64g, 1.02mmol) 在二噁烷 (5mL) 中的溶液中加入HCl/二噁烷 (4M, 10mL)。将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。TLC (石油醚:EtOAc=0:1) 表明形成一个新的斑点。将混合物减压浓缩, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺 (0.8g, 粗品, HCl盐), 为白色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 530.3

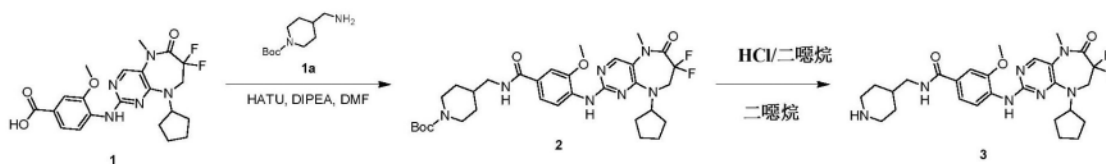
[0456] 步骤9. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-((7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)甲基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物21)的合成

[0457] 向7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲醛 (0.2g, 558.03 $\mu$ mol) 在DCE (10mL) 中的溶液中加入4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺 (252.69mg, 446.42 $\mu$ mol, HCl盐) 和HOAc (100.53mg, 1.67mmol, 95.74 $\mu$ L), 将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌0.5小时, 然后加入NaBH(OAc)<sub>3</sub> (354.81mg, 1.67mmol), 并且将所得混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(约24%)。将反应混合物用饱和碳酸氢钠溶液 (50mL) 稀释, 并且用DCM (30mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水 (50mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。将残余物通过制备型HPLC (柱: Phenomenex Luna C18 150 $\times$ 25mm $\times$ 10 $\mu$ m; 流动相: [水 (FA) -ACN]; B%: 15%-45%, 8min) 纯化, 将洗脱液冻干, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)

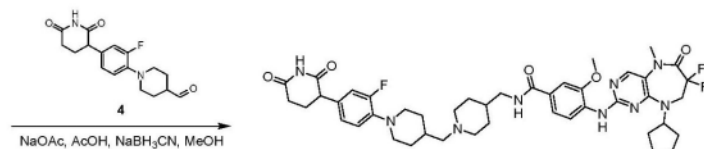
基)-N-(1-((7-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)甲基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (29.9mg, 31.16 $\mu$ mol, 收率5.58%, 纯度91.6%), 为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=872.3

[0458] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.80 (s, 1H), 8.30-8.21 (m, 2H), 8.09 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.53-7.45 (m, 2H), 7.04-6.89 (m, 3H), 4.81-4.72 (m, 1H), 4.05 (t, J=14.1Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.80-3.76 (m, 2H), 3.30-3.27 (m, 3H), 2.95-2.91 (m, 2H), 2.88-2.80 (m, 4H), 2.68-2.59 (m, 3H), 2.48-2.33 (m, 4H), 2.22-2.13 (m, 1H), 2.03-1.91 (m, 7H), 1.80-1.69 (m, 6H), 1.64-1.56 (m, 6H), 1.50-1.38 (m, 2H).

[0459] 实施例22. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-((1-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)哌啶-4-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (化合物22) 的合成



[0460]



化合物 22

[0461] 步骤1. 4-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (2) 的合成

[0462] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸 (0.3g, 670.49 $\mu$ mol) 在DMF (5mL) 中的溶液中加入HATU (305.93mg, 804.59 $\mu$ mol) 和DIPEA (259.96mg, 2.01mmol, 350.35 $\mu$ L)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌10分钟。向混合物中加入4-(氨基甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (143.69mg, 670.49 $\mu$ mol)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗, 并且显示具有期望质量的主峰。将混合物倒入水 (30mL) 中, 并且用EtOAc (15mL $\times$ 4) 萃取。将合并的有机相用盐水 (15mL $\times$ 3) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并减压浓缩, 得到残余物。将残余物通过快速硅胶层析 (4g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱, 0%-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 100mL/min) 纯化, 得到4-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (0.6g, 粗品), 为棕色固体, 将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=644.4

[0463] 步骤2. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基甲基)苯甲酰胺 (3) 的合成

[0464] 在25 $^{\circ}$ C下, 向4-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯

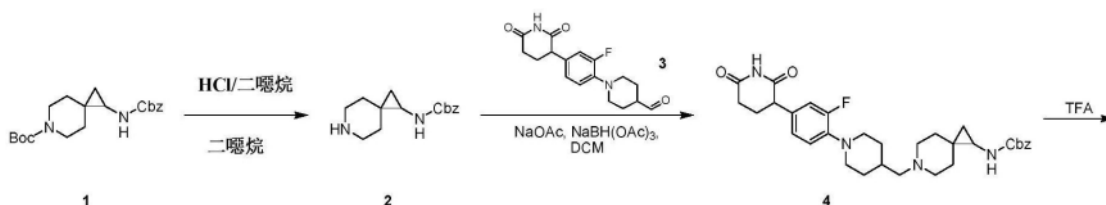
(0.6g,粗品)在二噁烷(2mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,15mL)。将所得混合物在25℃下搅拌0.5小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。将混合物溶液减压浓缩,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基甲基)苯甲酰胺(0.5g,粗品),为棕色固体,将其直接用于下一个步骤。 $MS(M+H)^+=544.3$

[0465] 步骤3. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-((1-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)哌啶-4-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物22)的合成

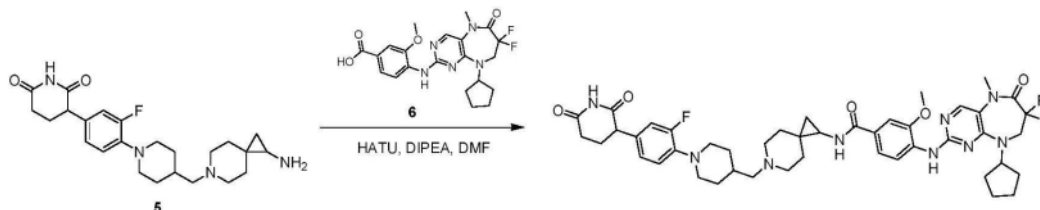
[0466] 将4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基甲基)苯甲酰胺(160mg,275.83 $\mu$ mol,HCl)和NaOAc(22.63mg,275.83 $\mu$ mol)在MeOH(2mL)中的混合物在25℃下搅拌20分钟。在25℃下,向上述混合物中加入1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲醛(131.71mg,413.74 $\mu$ mol)和AcOH(16.56mg,275.83 $\mu$ mol,15.77 $\mu$ L)。将所得混合物在25℃下搅拌30分钟。在25℃下,向反应混合物中加入NaBH<sub>3</sub>CN(52.00mg,827.49 $\mu$ mol)。将混合物在25℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。浓缩反应溶液以除去有机溶剂。将粗产物用EtOAc(30mL)溶解,用饱和NaHCO<sub>3</sub>(10mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将残余物通过快速硅胶层析(4g SepaFlash®硅胶快速柱,0%-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min;0-50%甲醇/EtOAc的洗脱液,100mL/min)纯化,并且通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150×25mm×5 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:45%-75%,8min)再纯化,并且冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-((1-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)哌啶-4-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酰胺(27.5mg,31.21 $\mu$ mol,收率11.31%,纯度96%),为白色固体。 $MS(M+H)^+=846.5$

[0467] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ =10.81(s,1H),8.38(t,J=4.9Hz,1H),8.32-8.19(m,2H),7.97(s,1H),7.60-7.44(m,2H),7.08-6.87(m,3H),4.89-4.67(m,1H),4.14-3.98(m,2H),3.92(s,3H),3.85-3.72(m,1H),3.32(s,3H),3.31-3.25(m,2H),3.18-3.15(m,2H),2.91-2.79(m,2H),2.72-2.57(m,4H),2.26-2.11(m,3H),2.04-1.89(m,3H),1.88-1.44(m,14H),1.34-1.10(m,4H)。

[0468] 实施例23. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物23)的合成



[0469]



化合物 23

[0470] 步骤1. (6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)氨基甲酸苄酯(2)的合成

[0471] 向1-(((苄氧基)羰基)氨基)-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯(200mg, 554.87 $\mu$ mol)在二噁烷(1mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M, 1mL)。将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LC-MS显示1-(((苄氧基)羰基)氨基)-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯完全消耗,并且检测到具有期望质量的一个峰(89%)。将反应混合物减压浓缩以除去溶剂,得到(6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)氨基甲酸苄酯(164mg, 552.58 $\mu$ mol, 收率99.59%, HCl),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=261.1

[0472] 步骤2. (6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)氨基甲酸苄酯(4)的合成

[0473] 向(6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)氨基甲酸苄酯(164mg, 552.58 $\mu$ mol, HCl)和1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲醛(175.91mg, 552.58 $\mu$ mol)在DCM(3mL)中的溶液中加入NaOAc(90.66mg, 1.11mmol)。将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时,然后加入NaBH(OAc)<sub>3</sub>(585.57mg, 2.76mmol),将混合物再搅拌16小时。LC-MS显示1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲醛完全消耗,并且检测到具有期望质量的一个峰(34%)。将反应混合物在25 $^{\circ}$ C下用水(20mL)淬灭,然后用EtOAc(50mL $\times$ 2)萃取。将合并的有机层用盐水(30mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®; 12g SepaFlash®硅胶快速柱,0%-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,50mL/min)纯化,得到(6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)氨基甲酸苄酯(125mg, 199.94 $\mu$ mol, 收率36.18%, 纯度90%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=563.3

[0474] 步骤3. 3-(4-(4-((1-氨基-6-氮杂螺[2.5]辛-6-基)甲基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(5)的合成

[0475] 将(6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)氨基甲酸苄酯(105mg, 186.61 $\mu$ mol)在TFA(3mL)中的溶液在60 $^{\circ}$ C下搅拌5小时。LC-MS显示(6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)氨基甲酸苄酯完全消耗,并且检测到具有期望质量的一个峰(60%)。将反应混合物减压浓缩以除去溶剂,得到3-(4-(4-((1-氨基-6-氮杂螺[2.5]辛-6-基)甲基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(100mg, 粗品, TFA),为黄色固体,将其不经进一步纯化用

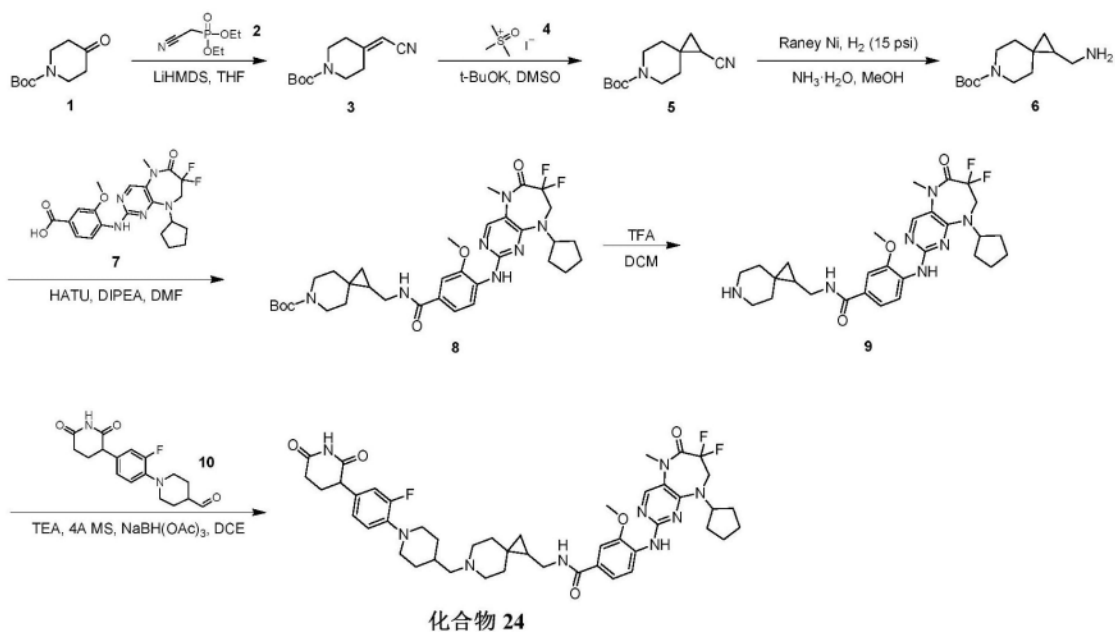
于下一个步骤。 $MS(M+H)^+ = 429.2$

[0476] 步骤4. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基)氨基)-N-(6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物23)的合成

[0477] 将3-(4-(4-((1-氨基-6-氮杂螺[2.5]辛-6-基)甲基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(100mg, 184.31 $\mu$ mol, TFA)、4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(82.47mg, 184.31 $\mu$ mol)、DIPEA(119.10mg, 921.55 $\mu$ mol, 160.52 $\mu$ L)、HATU(105.12mg, 276.46 $\mu$ mol)在DMF(3mL)中的混合物在20℃下搅拌16小时。LC-MS显示3-(4-(4-((1-氨基-6-氮杂螺[2.5]辛-6-基)甲基)哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮完全消耗,并且检测到具有期望质量的一个峰(63%)。将反应混合物在0℃下用饱和 $NaHCO_3$ 水溶液(20mL)淬灭,然后用EtOAc(40mL $\times$ 2)萃取。将合并的有机层用盐水(30mL)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi Polar-RP 100 $\times$ 25mm $\times$ 4 $\mu$ m;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:33%-53%,7min)纯化,并且通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m;流动相:[水( $NH_4HCO_3$ )-ACN];B%:47%-77%,8min)再纯化,然后冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基)氨基)-N-(6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(18.2mg, 20.79 $\mu$ mol, 收率11.28%, 纯度98%),为白色固体。 $MS(M+H)^+ = 858.3$

[0478]  $^1H$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 10.80$ (s, 1H), 8.29-8.22(m, 2H), 8.18(d, J=4.3Hz, 1H), 7.98(s, 1H), 7.53-7.43(m, 2H), 7.03-6.90(m, 3H), 4.77-4.73(m, 1H), 4.04(t, J=13.9Hz, 2H), 3.93(s, 3H), 3.80-3.76(m, 1H), 3.30-3.28(m, 6H), 2.73-2.58(m, 5H), 2.45-2.43(m, 2H), 2.37-2.36(m, 1H), 2.30-2.25(m, 1H), 2.17-2.14(m, 2H), 2.02-1.90(m, 3H), 1.83-1.68(m, 4H), 1.65-1.54(m, 5H), 1.50-1.33(m, 4H), 1.29-1.19(m, 2H), 0.74-0.63(m, 2H).

[0479] 实施例24. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂**草**-2-基)氨基)-N-((6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物24)的合成



[0481] 步骤1. 4-(氰基亚甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (3) 的合成

[0482] 在 $N_2$ 下,于 $-70^\circ C$ 向(氰基甲基)磷酸二乙酯(933.49mg,5.27mmol,848.63 $\mu L$ )在THF(15mL)中的溶液中逐滴加入LiHMDS(1M,5.52mL)。然后,在0.5小时后,在 $-70^\circ C$ 下将4-氧代哌啶-1-甲酸叔丁酯(1g,5.02mmol)加入到混合物中。将混合物在 $N_2$ 下于 $-70^\circ C$ 下搅拌1小时。LCMS显示期望质量(约85%)。将反应混合物用饱和氯化铵溶液(50mL)淬灭,并且用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用饱和盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO®;40g SepaFlash®硅胶快速柱,0%-25%石油醚:EtOAc梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到4-(氰基亚甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(0.8g,3.60mmol,收率71.71%),为白色固体。MS(M-t-Bu+H)<sup>+</sup>=167.1

[0483] 步骤2. 1-氰基-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯 (5) 的合成

[0484] 在 $20^\circ C$ 下,向t-BuOK(222.12mg,1.98mmol)在DMSO(4mL)中的溶液中缓慢加入碘化三甲基氧化铈(435.62mg,1.98mmol)。然后,在 $0^\circ C$ 下,于1.5小时后将4-(氰基亚甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(0.4g,1.80mmol)在DMSO(4mL)中的溶液加入到混合物中。将混合物在 $N_2$ 下于 $50^\circ C$ 下搅拌16小时。LCMS显示4-(氰基亚甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯完全消耗。将反应混合物用饱和氯化铵溶液(50mL)淬灭,并且用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到1-氰基-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯(0.56g,粗品),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=237.3

[0485] 步骤3. 1-(氨基甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯 (6) 的合成

[0486] 在 $N_2$ 下,向1-氰基-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯(0.56g,2.37mmol)在MeOH(20mL)和 $NH_3 \cdot H_2O$ (2mL)中的溶液中加入雷尼镍(101.52mg,1.18mmol)。将混合物在 $H_2$ (15psi)下于 $25^\circ C$ 下搅拌12小时。LCMS显示期望质量(约67%)。过滤混合物以除去催化剂。将滤液减压浓缩,得到残余物。将残余物用水(60mL)稀释,并且用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到1-(氨基甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯(0.4g,粗品),为黄色油状物。MS(M-t-Bu+H)<sup>+</sup>=185.1

[0487] 步骤4. 1-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯(8)的合成

[0488] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(595.73mg,1.33mmol)在DMF(5mL)中的溶液中加入HATU(949.23mg,2.50mmol)和DIEA(430.20mg,3.33mmol,579.78 $\mu$ L)。然后,于0.5小时后,将1-(氨基甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯(0.4g,1.66mmol)加入到混合物中。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。LCMS显示期望质量(约36%)。将反应混合物用水(50mL)稀释,并且用EtOAc(50mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将残余物通过快速硅胶层析(ISCO $^{\circledR}$ ;20g SepaFlash $^{\circledR}$ 硅胶快速柱,0%-70%石油醚:EtOAc梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到1-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯(0.83g,1.14mmol,收率68.73%,纯度92.3%),为黄色油状物。MS(M+H) $^{+}$ =670.3

[0489] 步骤5.N-((6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)甲基)-4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺(9)的合成

[0490] 在0 $^{\circ}$ C下,向1-((4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛烷-6-甲酸叔丁酯(0.7g,1.05mmol)在DCM(15mL)中的溶液中加入TFA(4.62g,40.52mmol,3mL)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LCMS显示期望质量(约84%)。将混合物减压浓缩,得到N-((6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)甲基)-4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺(1g,粗品,TFA),为黄色油状物。MS(M+H) $^{+}$ =570.1

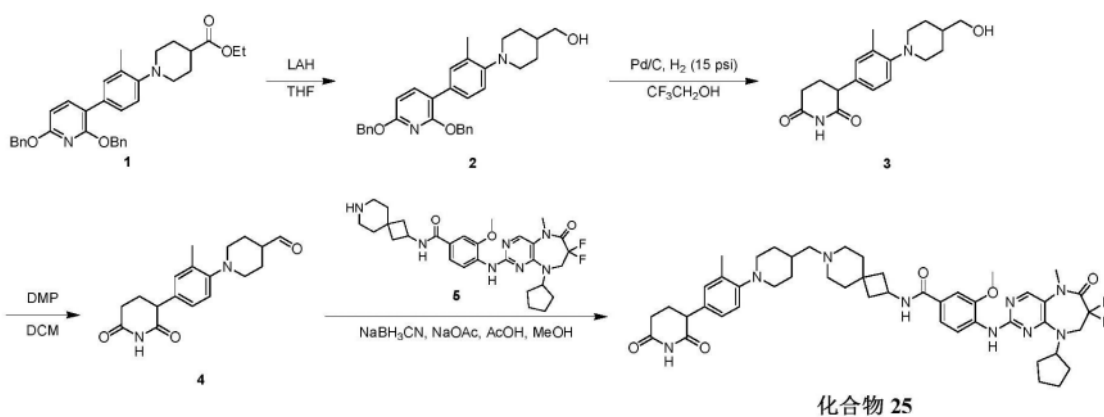
[0491] 步骤6. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-((6-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物24)的合成

[0492] 向1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-甲醛(140mg,439.78 $\mu$ mol)和N-((6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)甲基)-4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺(250.52mg,粗品,TFA)在DCE(5mL)中的溶液中加入TEA(267.00mg,2.64mmol,367.27 $\mu$ L)和4AMS(50mg),将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌0.5小时。然后加入NaBH(OAc) $_3$ (279.62mg,1.32mmol),将所得混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌15小时。LCMS显示具有期望质量的峰(25%)。通过加入NaHCO $_3$ (10mL)淬灭反应混合物,并且用EtOAc(15mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(30mL $\times$ 2)洗涤,经Na $_2$ SO $_4$ 干燥,过滤。真空浓缩滤液,得到残余物。将残余物通过制备型TLC(SiO $_2$ ,DCM:MeOH=10:1)纯化,并且通过反相HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m;流动相:[水(NH $_4$ HCO $_3$ )-ACN];B%:45%-75%,8min)再纯化。将洗脱液冻干,得到残余物。将残余物通过制备型TLC(SiO $_2$ ,

DCM:MeOH=10:1)再纯化,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-((6-((1-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-2-氟苯基)哌啶-4-基)甲基)-6-氮杂螺[2.5]辛-1-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酰胺(29.5mg, 31.80 $\mu$ mol, 收率8.47%, 纯度94%), 为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=872.5

[0493] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.80(s, 1H), 8.47-8.38(m, 1H), 8.31-8.24(m, 2H), 7.97(s, 1H), 7.55-7.46(m, 2H), 7.04-6.89(m, 3H), 4.83-4.70(m, 1H), 4.04(t, J=14.0Hz, 2H), 3.94(s, 3H), 3.83-3.75(m, 1H), 3.47-3.35(m, 2H), 3.30-3.15(m, 5H), 2.65-2.55(m, 4H), 2.48-2.37(m, 3H), 2.32-2.26(m, 1H), 2.25-2.09(m, 3H), 2.03-1.91(m, 3H), 1.83-1.68(m, 4H), 1.68-1.51(m, 6H), 1.51-1.33(m, 2H), 1.29-1.18(m, 3H), 1.06-0.89(m, 1H), 0.50-0.40(m, 1H), 0.25-0.15(m, 1H).

[0494] 实施例25. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物25)的合成



[0495]

[0496] 步骤1. (1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-基)甲醇(2)的合成

[0497] 在N<sub>2</sub>气氛下,于0℃向LiAlH<sub>4</sub>(25.46mg, 670.82 $\mu$ mol)在THF(3mL)中的溶液中逐滴加入在THF(2mL)中的1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-甲酸乙酯(0.3g, 559.01 $\mu$ mol)。然后将混合物温热至25℃并且搅拌2小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。在N<sub>2</sub>气氛下,于0℃通过逐滴加入EtOAc(5mL)将反应淬灭。将混合物用THF(20mL)稀释,通过硅藻土垫过滤并将滤液浓缩,得到(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-基)甲醇(0.3g, 粗品),为白色固体,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=495.2

[0498] 步骤2. 3-(4-(4-(羟甲基)哌啶-1-基)-3-甲基苯基)哌啶-2,6-二酮(3)的合成

[0499] 在25℃下,向(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-基)甲醇(0.3g, 粗品)在CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH(10mL)中的溶液中加入Pd/C(0.1g, 纯度10%)。将混合物在H<sub>2</sub>(1.23mg, 606.52 $\mu$ mol)(15psi)下于25℃下搅拌24小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。将反应混合物通过硅藻土垫过滤并将滤液浓缩,得到3-(4-(4-(羟甲基)哌啶-1-基)-3-甲基苯基)哌啶-2,6-二酮(150mg, 粗品),为黑褐色固体,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=317.1

[0500] 步骤3. 1-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-甲醛(4)的合成

[0501] 将3-(4-(4-(羟甲基)哌啶-1-基)-3-甲基苯基)哌啶-2,6-二酮(150mg, 474.09 $\mu$ mol)和DMP(301.62mg, 711.14 $\mu$ mol, 220.16 $\mu$ L)在DCM(3mL)中的混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。LCMS显示起始材料完全消耗。将反应混合物通过硅藻土垫过滤并将滤液浓缩,得到1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-甲醛(150mg, 粗品),为黑褐色固体,将其直接用于下一个步骤。 $MS(M+H)^+ = 315.1$

[0502] 步骤4. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物25)的合成

[0503] 将1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-甲醛(150mg, 粗品)和NaOAc(17.59mg, 214.48 $\mu$ mol)在MeOH(2mL)中的混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌20分钟。在25 $^{\circ}$ C下,向上述混合物中加入4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)苯甲酰胺(130mg, 214.48 $\mu$ mol, HCl)和AcOH(12.88mg, 214.48 $\mu$ mol, 12.27 $\mu$ L)。将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌30分钟。在25 $^{\circ}$ C下,向反应混合物中加入NaBH<sub>3</sub>CN(40.43mg, 643.45 $\mu$ mol),将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(28%)。将反应溶液浓缩,用EtOAc(30mL)溶解,用饱和NaHCO<sub>3</sub>(10mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将残余物通过快速硅胶层析(4g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱,0%-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min;0%-50%甲醇/EtOAc的洗脱液,100mL/min)纯化,得到粗产物。将粗产物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:57%-87%,8min)纯化并冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-甲基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(25.3mg, 27.40 $\mu$ mol, 收率12.77%, 纯度94%),为白色固体。 $MS(M+H)^+ = 868.3$

[0504] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 10.78(s, 1H), 8.43(d, J=7.4Hz, 1H), 8.30-8.23(m, 2H), 7.96(s, 1H), 7.52-7.45(m, 2H), 7.02-6.89(m, 3H), 4.84-4.69(m, 1H), 4.48-4.30(m, 1H), 4.14-4.00(m, 2H), 3.94(s, 3H), 3.73(dd, J=4.9, 11.1Hz, 1H), 3.30(s, 3H), 3.02(d, J=11.8Hz, 2H), 2.65-2.60(m, 2H), 2.36-2.23(m, 4H), 2.20(s, 3H), 2.19-2.08(m, 5H), 2.03-1.90(m, 3H), 1.86-1.50(m, 16H), 1.41-1.09(m, 3H)。

[0505] 实施例26. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物26)的合成



(1.12g, 5.28mmol), 将混合物在20℃下搅拌14小时。LCMS显示期望质量, 将混合物用水(15mL)稀释, 用EtOAc(15mL×3)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并真空浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(Biotage, 4g SepaFlash®硅胶快速柱, 4%-90%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 40mL/min)纯化, 得到4-((2-((苄氧基)羰基)氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.05g, 1.88mmol, 收率35.63%, 纯度87%), 为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=486.3

[0513] 步骤4. (7-((4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(5)的合成

[0514] 向4-((2-((苄氧基)羰基)氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.05g, 2.16mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M, 10mL), 将混合物在20℃下搅拌1小时。TLC(石油醚:EtOAc)显示期望产物和消耗的起始材料。将混合物真空浓缩, 得到(7-((4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(1g, 粗品, HCl盐), 为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=386.6

[0515] 步骤5. (7-((1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(6)的合成

[0516] 在N<sub>2</sub>气氛下, 向(7-((4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(1g, 粗品, HCl盐)和2,6-双(苄氧基)-3-(4-溴-3-氟苯基)吡啶(1.10g, 2.37mmol)在二噁烷(30mL)中的溶液中加入Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.54g, 4.74mmol)和Pd-PEPSI-IHeptCl(115.26mg, 118.48μmol), 将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于100℃下搅拌16小时。LCMS显示期望质量, 将混合物用水(30mL)稀释, 用EtOAc(15mL×3)萃取。将有机层经硫酸钠干燥, 过滤并真空浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(Biotage, 4g SepaFlash®硅胶快速柱, 4%-98%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 35mL/min)纯化, 得到(7-((1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(260mg, 324.60μmol, 收率13.70%, 纯度96%), 为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=769.3

[0517] 步骤6. 3-(4-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(7)的合成

[0518] 在N<sub>2</sub>气氛下, 向(7-((1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(260mg, 338.12μmol)在CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH(10mL)中的溶液中加入TFA(3.86mg, 33.81μmol, 2.50μL)和Pd/C(200mg, 纯度10%)。将混合物脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫3次, 将反应混合物在15psi的H<sub>2</sub>下于20℃下搅拌16小时。LCMS显示期望质量。将混合物过滤, 将滤液真空浓缩, 得到3-(4-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(180mg, 粗品), 为棕色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=457.2

[0519] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物26)的合成

[0520] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(200mg, 446.99μmol)在DMF(6mL)中的溶液中

加入HATU (254.94mg, 670.49 $\mu$ mol) 和DIPEA (173.31mg, 1.34mmol, 233.57 $\mu$ L), 然后加入3-(4-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-3-氟苯基)哌啶-2,6-二酮(163.28mg, 357.59 $\mu$ mol), 将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示期望质量, 将混合物用水(3mL)稀释, 用EtOAc(5mL $\times$ 3)萃取。将有机层经硫酸钠干燥, 过滤并真空浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(Biotage, 4g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱, 4%-20%MeOH/EtOAc梯度的洗脱液, 30mL/min)纯化, 并且通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge BEH C18 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m; 流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%:65%-95%, 10min)再纯化, 并且将洗脱液冷冻干燥, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(5.5mg, 6.05 $\mu$ mol, 收率1.35%, 纯度97.5%), 为白色粉末。MS(M+H)<sup>+</sup>=886.3

[0521] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.81 (s, 1H), 8.43 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.32-8.23 (m, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.52-7.45 (m, 2H), 7.05-6.90 (m, 3H), 4.84-4.71 (m, 1H), 4.47-4.32 (m, 1H), 4.05 (t, J=13.8Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.80 (dd, J=4.7, 11.7Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.12-3.01 (m, 2H), 2.92-2.83 (m, 2H), 2.41-2.36 (m, 2H), 2.18-2.12 (m, 4H), 2.10-1.89 (m, 4H), 1.81 (dd, J=9.1, 10.5Hz, 2H), 1.75-1.68 (m, 2H), 1.66-1.52 (m, 11H), 1.42-1.20 (m, 4H), 0.93 (s, 3H), 0.89-0.85 (m, 1H).

[0522] 实施例27. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物27)的合成



洗脱液, 200mL/min) 纯化, 得到3-甲基哌啶-1, 4-二甲酸1-(叔丁酯) 4-甲酯 (10.5g, 40.80mmol, 收率83.35%), 为无色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 258.3

[0528] 步骤3. 3-甲基哌啶-4-甲酸甲酯 (4) 的合成

[0529] 向3-甲基哌啶-1, 4-二甲酸1-(叔丁酯) 4-甲酯 (3g, 11.66mmol) 在二噁烷 (6mL) 中的溶液中加入HCl/二噁烷 (4M, 30mL), 将混合物在15℃下搅拌4小时。LCMS显示起始材料完全消耗, 并且显示期望质量。将混合物真空浓缩, 得到3-甲基哌啶-4-甲酸甲酯 (2.85g, HCl盐), 为灰白色固体, 将其直接使用。MS (M+H)<sup>+</sup> = 157.8

[0530] 步骤4. 1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-甲酸甲酯 (6和6A) 的合成

[0531] 在N<sub>2</sub>气氛下, 向3-甲基哌啶-4-甲酸甲酯 (2g, 10.33mmol, HCl盐) 和2,6-二苄氧基-3-(4-溴-3-氟-苯基)吡啶 (5.1g, 10.98mmol) 在甲苯 (80mL) 中的溶液中加入Ruphos-Pd-G3 (863.70mg, 1.03mmol) 和Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10.09g, 30.98mmol), 在N<sub>2</sub>气氛下于100℃下将悬浮液搅拌16小时。LCMS显示2,6-双(苄氧基)-3-(4-溴-3-氟苯基)吡啶完全消耗, 并且显示具有期望质量的峰 (30%)。将混合物减压浓缩并且通过快速硅胶层析 (80g SepaFlash® 硅胶快速柱, 5%-15% EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 200mL/min) 纯化, 并且通过制备型HPLC (柱: Phenomenex Luna C18 200×40mm×10μm; 流动相: [水 (TFA) - ACN]; B%: 80%-100%, 10min) 再纯化, 得到A (峰1)、B (峰2) 和360mg的A和B的混合物, 将其通过制备型HPLC (柱: Welch Ultimate C18 150×25mm×5μm; 流动相: [水 (TFA) - ACN]; B%: 80%-100%, 10min) 再纯化, 得到C (峰1) 和D (峰2)。将A和C合并并且真空浓缩, 得到1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-甲酸甲酯 (350mg, 647.40μmol, 收率6.27%), 为棕色油状物; 将B和D合并并且真空浓缩, 得到1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-甲酸甲酯 (690mg, 1.28mmol, 收率12.36%), 为棕色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 541.3

[0532] 步骤5. (1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-基) 甲醇 (7) 的合成

[0533] 在0℃下, 向LAH (50mg, 1.32mmol) 在THF (3mL) 中的溶液中逐滴加入1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-甲酸甲酯 (350mg, 647.40μmol) 在THF (7mL) 中的混合物, 在N<sub>2</sub>气氛下于20℃下将混合物搅拌4小时。LCMS显示起始材料完全消耗, 并且显示具有期望质量的主峰 (95%)。将混合物用THF (20mL) 稀释, 然后通过加入H<sub>2</sub>O (0.1mL) 淬灭, 然后加入15% NaOH溶液 (0.1mL) 和H<sub>2</sub>O (0.3mL), 并且将悬浮液经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并真空浓缩, 得到(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-基) 甲醇 (330mg), 为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 513.5

[0534] 步骤6. 3-(3-氟-4-(4-(羟甲基)-3-甲基哌啶-1-基) 苯基) 哌啶-2,6-二酮 (8) 的合成

[0535] 将(1-(4-(2,6-双(苄氧基)吡啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-基) 甲醇 (330mg, 643.76μmol) 和Pd/C (50mg, 纯度10%) 在CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (10mL) 中的混合物脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫3次, 将所得混合物在H<sub>2</sub> (15psi) 气氛下于20℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰 (50%)。将混合物通过硅藻土垫过滤。将滤饼用CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (20mL) 洗涤, 将滤液真空浓缩, 得到3-(3-氟-4-(4-(羟甲基)-3-甲基哌啶-1-基) 苯基) 哌啶-2,6-二酮 (200mg, 粗品), 为棕色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 335.1

[0536] 步骤7. 1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-甲醛(9)的合成

[0537] 向3-(3-氟-4-(4-(羟甲基)-3-甲基哌啶-1-基)苯基)哌啶-2,6-二酮(100mg, 299.06 $\mu$ mol)在DCM(1mL)中的溶液中加入DMP(152.21mg, 358.87 $\mu$ mol, 111.10 $\mu$ L),将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。TLC显示起始材料完全消耗,并且检测到一个主要的新斑点。过滤混合物。将滤液真空浓缩,得到1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-甲醛(99g,粗品),为棕色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=333.1

[0538] 步骤8. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物27)的合成

[0539] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)苯甲酰胺(164.12mg, 270.78 $\mu$ mol, HCl盐)、1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-甲醛(90mg, 270.78 $\mu$ mol)在MeOH(2mL)中的溶液中加入NaOAc(44.43mg, 541.57 $\mu$ mol),将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌0.5小时,加入NaBH<sub>3</sub>CN(51.05mg, 812.35 $\mu$ mol),将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(11%)。通过加入NaHCO<sub>3</sub>(饱和水溶液, 5mL)淬灭反应混合物,并且用EtOAc(10mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(20mL $\times$ 3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤。真空浓缩滤液。将残余物通过制备型TLC(SiO<sub>2</sub>, DCM:MeOH=10:1)纯化,并且通过反相HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:50%-80%, 8min)再纯化。将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)-3-甲基哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(7.1mg, 7.29 $\mu$ mol, 收率2.69%, 纯度91%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=886.7

[0540] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.81(s, 1H), 8.42(d, J=7.1Hz, 1H), 8.31-8.23(m, 2H), 7.96(s, 1H), 7.52-7.44(m, 2H), 7.04-6.90(m, 3H), 4.84-4.69(m, 1H), 4.45-4.35(m, 1H), 4.05(t, J=14.2Hz, 2H), 3.94(s, 3H), 3.82-3.75(m, 1H), 3.30-3.29(m, 4H), 3.26-3.19(m, 1H), 2.66-2.54(m, 2H), 2.45-2.37(m, 2H), 2.32-2.27(m, 2H), 2.25-2.05(m, 6H), 2.03-1.90(m, 4H), 1.85-1.77(m, 2H), 1.76-1.41(m, 12H), 1.30-1.19(m, 2H), 0.92(d, J=6.5Hz, 3H).

[0541] 实施例28. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物28)的合成



(40mL)中的溶液中加入丙烯酸(1.90g, 26.30mmol, 1.81mL),并且在120℃下将所得混合物搅拌4小时。LCMS显示剩余4-(3-氨基-4-甲氧基苯氧基)丁酸叔丁酯(9%),并且检测到具有期望质量的峰(82%),并且将反应混合物在120℃下再搅拌8小时。LCMS显示4-(3-氨基-4-甲氧基苯氧基)丁酸叔丁酯完全消耗,并且检测到具有期望质量的峰(88%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-((5-(4-(叔丁氧基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(4.7g,粗品),为黄色油状物。 $MS(M+H)^+ = 354.4$

[0549] 步骤4. 4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯氧基)丁酸(8)的合成

[0550] 在20℃下,向3-((5-(4-(叔丁氧基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(4.7g, 13.30mmol)在AcOH(50mL)中的溶液中加入脲(3.99g, 66.50mmol, 3.57mL),并且将所得混合物在120℃下搅拌12小时。LCMS显示3-((5-(4-(叔丁氧基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸完全消耗,并且检测到具有期望质量的峰(74%)。将反应混合物真空浓缩。将粗产物通过反相HPLC(0.1% HCl, 方法:柱330g快速柱Welch Ultimate XB\_C1820-40 $\mu$ m; 120A; 用于样品溶解的溶剂约6.00克样品溶解在mL DMF中; 流速100mL/min; 流动相MeCN/H<sub>2</sub>O; 梯度B% 5-40% 20min; 40-100% 20min; 仪器TELEDYNE ISCO CombiFlashRf150)纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯氧基)丁酸(1.8g, 5.58mmol, 收率41.99%),为灰白色固体。 $MS(M+H)^+ = 323.3$

[0551] 步骤5. (1-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(9)的合成

[0552] 向4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯氧基)丁酸(0.6g, 1.86mmol)在DMF(6mL)中的溶液中加入HATU(778.60mg, 2.05mmol)和DIPEA(721.78mg, 5.58mmol, 972.74 $\mu$ L)。将反应混合物在20℃下搅拌10分钟,并且加入N-(4-哌啶基)氨基甲酸叔丁酯(447.39mg, 2.23mmol)在DMF(6mL)中的溶液,并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示所有起始材料完全消耗,并且检测到具有期望质量的峰(81%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(20mL)稀释,并且用EtOAc(20mL $\times$ 3)萃取。将有机层用盐水(20mL $\times$ 3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将粗产物用EtOAc(6mL)在20℃下研磨0.5小时并过滤。将滤饼真空干燥,得到(1-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(453mg, 852.90 $\mu$ mol, 收率45.82%, 纯度95%),为白色固体。 $MS(M-100+H)^+ = 405.3$

[0553] 步骤6. 1-(5-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(10)的合成

[0554] 在20℃下,向(1-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(450mg, 891.84 $\mu$ mol)在二噁烷(5mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M, 15mL),并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且检测到具有期望质量的峰(95%)。将反应混合物真空浓缩,得到1-(5-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(396mg,粗品,HCl盐),为灰白色固体。 $MS(M+H)^+ = 405.3$

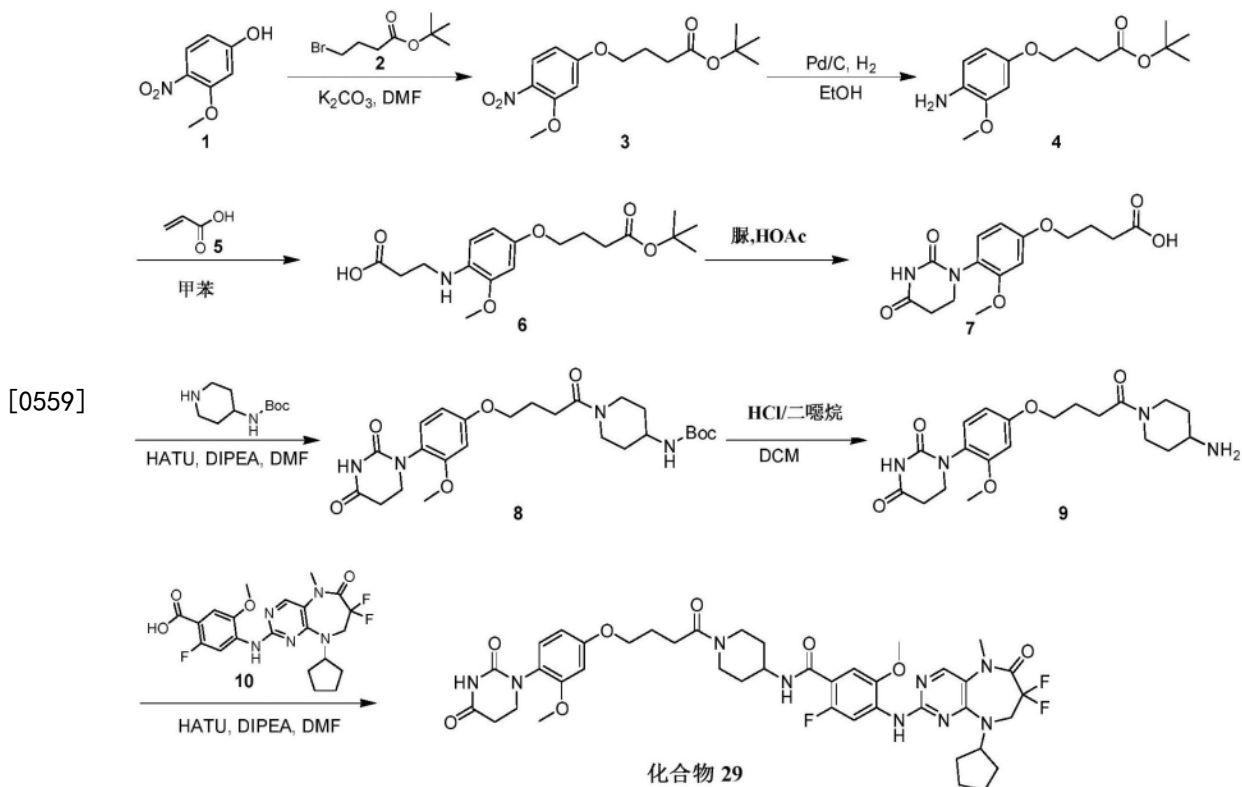
[0555] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(1-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧

基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物28)的合成

[0556] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酸(80mg,171.89 $\mu$ mol)在DMF(4mL)中的溶液中加入HATU(71.89mg,189.07 $\mu$ mol)和DIPEA(44.43mg,343.77 $\mu$ mol,59.88 $\mu$ L)。将反应混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌10分钟,并且加入1-(5-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(83.37mg,189.07 $\mu$ mol,HCl盐)在DMF(4mL)中的溶液和DIPEA(44.43mg,343.77 $\mu$ mol,59.88 $\mu$ L),并且将所得混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且检测到具有期望质量的峰(93%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(15mL)稀释,并且用EtOAc(15mL $\times$ 3)萃取。将有机层用盐水(15mL $\times$ 3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Unisil 3-100C18 Ultra 150 $\times$ 50mm $\times$ 3 $\mu$ m;流动相:[水(FA)-ACN];B%:32%-62%,10min),并且将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(61.8mg,71.10 $\mu$ mol,收率41.36%,纯度98%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=852.0

[0557] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ =10.28(s,1H),8.27(s,1H),8.16(d,J=12.1Hz,1H),8.04(s,1H),7.89(br d,J=7.2Hz,1H),7.03-6.98(m,1H),6.96(d,J=6.1Hz,1H),6.89-6.84(m,2H),4.83-4.72(m,1H),4.32(br d,J=12.2Hz,1H),4.05(br t,J=13.9Hz,2H),3.92-3.80(m,6H),3.73(s,3H),3.60-3.50(m,3H),3.32(s,3H),3.19-3.07(m,1H),3.03-2.91(m,1H),2.65(t,J=6.6Hz,2H),2.22(br t,J=7.3Hz,2H),1.98-1.86(m,4H),1.85-1.78(m,1H),1.76-1.65(m,3H),1.65-1.51(m,4H),1.40-1.22(m,2H)

[0558] 实施例29. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物29)的合成



[0560] 步骤1. 4-(3-甲氧基-4-硝基苯氧基)丁酸叔丁酯(3)的合成

[0561] 向3-甲氧基-4-硝基苯酚(2g, 11.82mmol)在DMF(25mL)中的溶液中加入 $K_2CO_3$ (4.90g, 35.47mmol)和4-溴丁酸叔丁酯(3.96g, 17.74mmol)。将混合物在90℃下搅拌3小时。LC-MS显示3-甲氧基-4-硝基苯酚完全消耗,并且显示具有期望质量的一个主峰。将反应混合物用水300mL稀释,并且用EtOAc(70mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水70mL洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将粗产物通过反相HPLC(0.1% $NH_3 \cdot H_2O$ )纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-(3-甲氧基-4-硝基苯氧基)丁酸叔丁酯(3.5g, 11.13mmol, 收率94.12%, 纯度99%),为无色油状物。MS(M+H-56)<sup>+</sup>=256.2。

[0562] 步骤2. 4-(4-氨基-3-甲氧基苯氧基)丁酸叔丁酯(4)的合成

[0563] 在 $N_2$ 气氛下,向4-(3-甲氧基-4-硝基苯氧基)丁酸叔丁酯(500mg, 1.61mmol)在EtOH(8mL)中的溶液中加入Pd/C(10%, 50mg)。将悬浮液脱气,并且用 $H_2$ 吹扫3次。将混合物在 $H_2$ (15psi)下于25℃下搅拌2小时。LC-MS显示4-(3-甲氧基-4-硝基苯氧基)丁酸叔丁酯完全消耗,并且显示具有期望质量的一个主峰。过滤反应混合物,并且用EtOAc(50mL)洗涤滤饼,在真空中浓缩滤液,得到4-(4-氨基-3-甲氧基苯氧基)丁酸叔丁酯(450mg, 1.60mmol, 收率99.59%),为黑棕色油状物,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H-56)<sup>+</sup>=226.2

[0564] 步骤3. 3-((4-(4-(叔丁氧基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(6)的合成

[0565] 将4-(4-氨基-3-甲氧基苯氧基)丁酸叔丁酯(450mg, 1.60mmol)、丙烯酸(230.52mg, 3.20mmol, 219.54 $\mu$ L)在甲苯(5mL)中的混合物在110℃下搅拌16小时。将反应混合物减压浓缩以除去溶剂,得到3-((4-(4-(叔丁氧基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(530mg, 粗品),为黑褐色油状物,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=354.4

[0566] 步骤4. 4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酸(7)的合

成

[0567] 将3-((4-(4-(叔丁氧基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(530mg, 1.50mmol)和脲(450.32mg, 7.50mmol, 402.07 $\mu$ L)在AcOH(6mL)中的混合物在120 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LC-MS显示3-((4-(4-(叔丁氧基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物用水100mL稀释,并且用EtOAc(30mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水30mL洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。通过反相HPLC(0.1%FA条件:仪器:Agela HP1000;柱:Welch Ultimate XB<sub>C<sub>18</sub></sub> 150 $\times$ 400mm 20/40 $\mu$ m;洗脱液A:水,洗脱剂B:乙腈;梯度:0-40min 0-65%B;流量:50mL/min;温度:室温;检测器:UV220/254nm),并且将洗脱液冻干,得到4-(4-(2,4-二氧化四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酸(350mg, 912.16 $\mu$ mol, 收率60.82%, 纯度84%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=323.2

[0568] 步骤5. (1-(4-(4-(2,4-二氧化四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(8)的合成

[0569] 向4-(4-(2,4-二氧化四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酸(300mg, 930.77 $\mu$ mol)和哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯(186.41mg, 930.77 $\mu$ mol)在DMF(1.5mL)中的溶液中加入HATU(530.86mg, 1.40mmol)和DIPEA(360.89mg, 2.79mmol, 486.37 $\mu$ L)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌1.5小时。LC-MS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物用水100mL稀释,并且用EtOAc(30mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水30mL洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将残余物通过柱层析(SiO<sub>2</sub>, MeOH/EtOAc=0-10%)纯化,得到(1-(4-(4-(2,4-二氧化四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(380mg, 722.99 $\mu$ mol, 收率77.68%, 纯度96%),为浅黄色固体。MS(M+H-100)<sup>+</sup>=405.3

[0570] 步骤6. 1-(4-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(9)的合成

[0571] 将(1-(4-(4-(2,4-二氧化四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(100mg, 198.19 $\mu$ mol)和HCl/二噁烷(4M, 1.5mL)在DCM(1.5mL)中的混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌0.5小时。LC-MS显示检测到具有期望质量的一个主峰。将反应混合物减压浓缩以除去溶剂,得到1-(4-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(300mg, 粗品, HCl盐),为浅黄色固体,将其直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=404.9

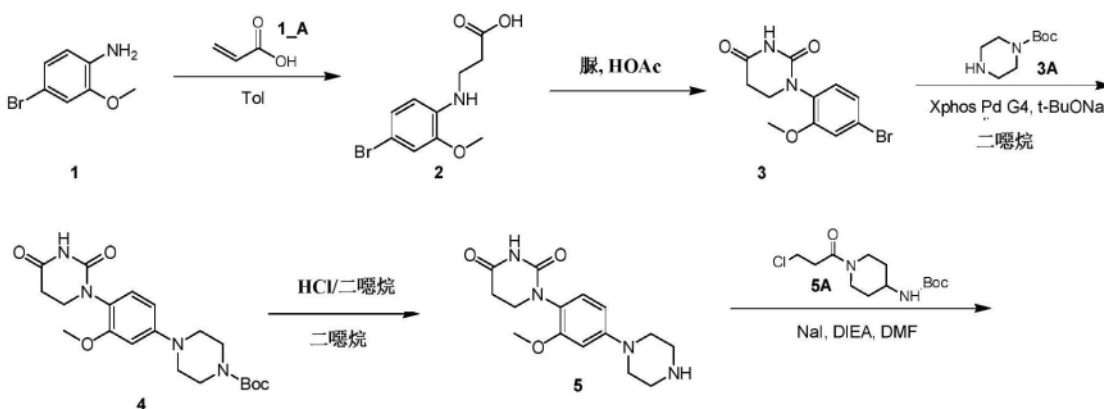
[0572] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(4-(4-(2,4-二氧化四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺(化合物29)的合成

[0573] 向1-(4-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(100mg, 226.80 $\mu$ mol, HCl盐)和4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酸(105.56mg, 226.80 $\mu$ mol)在DMF(3mL)中的溶液中加入HATU(129.35mg, 340.20 $\mu$ mol)和DIPEA(87.94mg, 680.40 $\mu$ mol, 118.51 $\mu$ L)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。LC-MS显示1-(4-(4-(4-氨基哌啶-1-基)-4-氧代丁氧基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮完全消耗,并

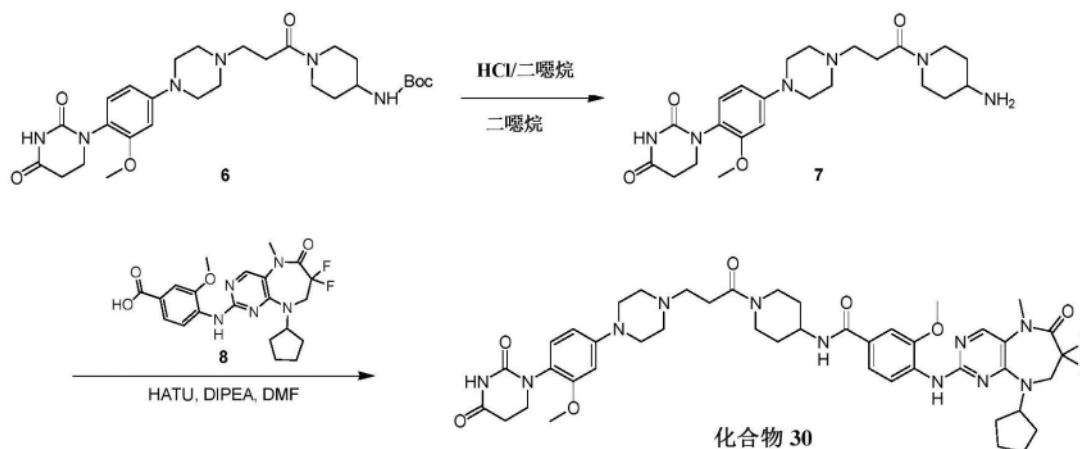
且显示期望质量。将反应混合物用水50mL稀释,并且用EtOAc (20mL×3) 萃取。将合并的有机层用盐水20mL洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。将残余物通过柱层析 (SiO<sub>2</sub>, MeOH/EtOAc=0-10%) 纯化。然后,将残余物通过制备型HPLC (中性条件:柱: Waters Xbridge BEH C18 150×25mm×5μm;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:38%-68%, min) 纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-2-氟-5-甲氧基苯甲酰胺 (37.9mg, 43.16μmol, 收率19.03%, 纯度97%), 为白色固体。MS (M+H)<sup>+</sup>=852.5

[0574] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.23 (s, 1H), 8.34-8.20 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 8.01-7.94 (m, 1H), 7.20 (d, J=6.7Hz, 1H), 7.13 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.66 (d, J=2.4Hz, 1H), 6.53 (dd, J=2.6, 8.6Hz, 1H), 4.89-4.77 (m, 1H), 4.36-4.32 (m, 1H), 4.12-4.01 (m, 5H), 3.95 (s, 3H), 3.94-3.80 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.57-3.52 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.23-3.16 (m, 1H), 2.80-2.73 (m, 1H), 2.68-2.63 (m, 2H), 2.49-2.45 (m, 2H), 2.01-1.93 (m, 4H), 1.92-1.80 (m, 2H), 1.79-1.74 (m, 2H), 1.68-1.57 (m, 4H), 1.55-1.40 (m, 2H) .

[0575] 实施例30. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (化合物30) 的合成



[0576]



[0577] 步骤1. 3-((4-溴-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸 (2) 的合成

[0578] 将4-溴-2-甲氧基苯胺 (2g, 9.90mmol) 和丙烯酸 (1.07g, 14.85mmol, 1.02mL) 在Tol

(30mL)中的混合物在100℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将混合物真空浓缩,得到3-((4-溴-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(2.71g,6.82mmol,收率68.92%,纯度69%),为棕色粉末。 $MS(M+H)^+ = 273.9$

[0579] 步骤2. 1-(4-溴-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(3)的合成

[0580] 向3-((4-溴-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(2.71g,9.89mmol)在AcOH(15mL)中的溶液中加入脲(2.97g,49.43mmol,2.65mL),将混合物在120℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(64%)。将混合物用水50mL稀释,用EtOAc(20mL×3)萃取。将有机层经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并真空浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(Biotage,4g SepaFlash®硅胶快速柱,4%-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,35mL/min)纯化,得到1-(4-溴-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(2.1g,7.02mmol,收率71.01%),为灰色粉末。 $MS(M+H)^+ = 300.9$

[0581]  $^1H$  NMR(400MHz,DMSO- $d_6$ )  $\delta = 10.36$ (s,1H),7.31(s,1H),7.25-7.15(m,2H),3.83(s,3H),3.56(t,J=6.5Hz,2H),2.67(t,J=6.4Hz,2H).

[0582] 步骤3. 4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0583] 向1-(4-溴-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(1g,3.34mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入t-BuONa(2M,5.01mL)和Xphos Pd G4(287.67mg,334.31 $\mu$ mol),然后加入哌嗪-1-甲酸叔丁酯(933.99mg,5.01mmol),将混合物在90℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(54%)。将混合物用盐水(10mL)稀释,用EtOAc(5mL×3)萃取。将有机层经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并真空浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(Biotage,4g SepaFlash®硅胶快速柱,4%-60%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,20mL/min)纯化,得到4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(830mg,1.81mmol,收率54.02%,纯度88%),为棕色粉末。 $MS(M+H)^+ = 405.0$

[0584] 步骤4. 1-(2-甲氧基-4-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(5)的合成

[0585] 向4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(300mg,741.73 $\mu$ mol)在二噁烷(6mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,1.85mL),将混合物在25℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰。将混合物真空浓缩,得到1-(2-甲氧基-4-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(252mg,739.43 $\mu$ mol,收率99.69%,HCl盐),为黄色油状物,将其直接使用。 $MS(M+H)^+ = 305.0$

[0586] 步骤5. (1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(6)的合成

[0587] 向1-(2-甲氧基-4-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(446.59mg,1.31mmol,1.66 $\mu$ L,HCl盐)和(1-(3-氯丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(457.25mg,1.57mmol)在DMF(20mL)中的溶液中加入DIEA(677.44mg,5.24mmol,912.99 $\mu$ L)和NaI(39.28mg,262.08 $\mu$ mol),并且将所得混合物在70℃下搅拌16小时。LCMS显示期望质量。将混合物用盐水(10mL)稀释,用EtOAc(5mL×3)萃取。将合并的有机层经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤并真空浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(Biotage,4g SepaFlash®硅胶快速柱,4%-60%MeOH/石油醚梯度的洗脱液,30mL/min)纯化,得到(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-

基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(370mg, 602.68 $\mu$ mol, 收率45.99%, 纯度91%), 为黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup>=559.1

[0588] 步骤6. 1-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(7)的合成

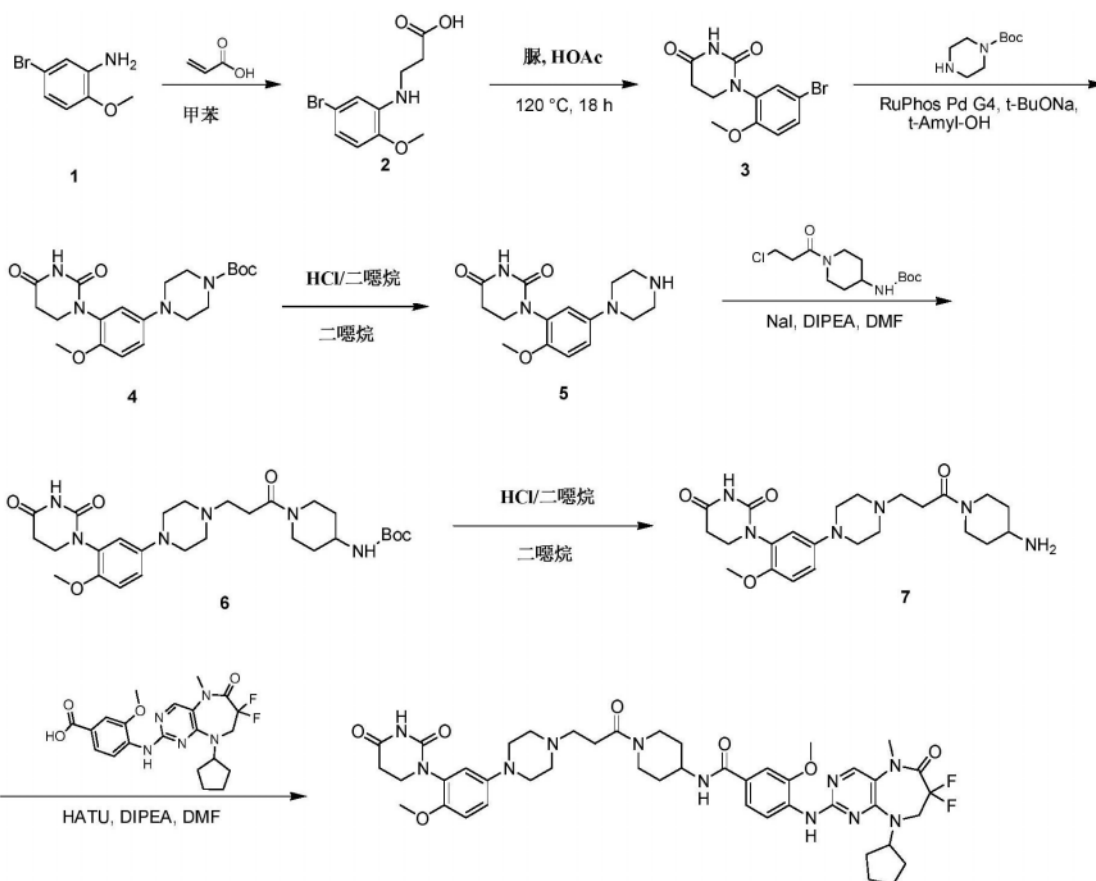
[0589] 向(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(370mg, 662.29 $\mu$ mol)在二噁烷(1mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M, 7.40mL), 将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。LCMS显示期望质量。将混合物真空浓缩, 得到1-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(350mg, 636.35 $\mu$ mol, 收率96.08%, 纯度90%, HCl盐), 为黄色固体, 将其直接使用。MS (M+H)<sup>+</sup>=459.0

[0590] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物30)的合成

[0591] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(100mg, 223.50 $\mu$ mol)在DMF(2mL)中的溶液中加入HATU(127.47mg, 335.24 $\mu$ mol)和DIEA(86.66mg, 670.49 $\mu$ mol, 116.79 $\mu$ L), 在搅拌0.5小时后, 然后加入1-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(110.63mg, 223.50 $\mu$ mol, HCl盐), 并且将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(50%)。将混合物用水(3mL)稀释, 用EtOAc(5mL $\times$ 5)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(Biotage, 4g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱, 4%-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液, 20mL/min)、然后通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m; 流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%:35%-65%, 9min)纯化, 并且将洗脱液冷冻干燥, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-3-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(31.2mg, 34.40 $\mu$ mol, 收率15.39%, 纯度97.9%), 为白色粉末。MS (M+H)<sup>+</sup>=888.0

[0592] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.20 (s, 1H), 8.33-8.25 (m, 2H), 8.16 (br d, J=7.7Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.53-7.46 (m, 2H), 7.03 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.61 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.49 (dd, J=2.3, 8.6Hz, 1H), 4.85-4.71 (m, 1H), 4.40 (d, J=12.6Hz, 1H), 4.15-3.88 (m, 7H), 3.78 (s, 3H), 3.51 (t, J=6.5Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.27-3.05 (m, 5H), 2.74-2.55 (m, 11H), 2.02-1.33 (m, 12H) .

[0593] 实施例31. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物31)的合成



[0595] 步骤1. 3-((5-溴-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(2)的合成

[0596] 将5-溴-2-甲氧基-苯胺(4g, 19.80mmol)和丙烯酸(2.14g, 29.70mmol)在甲苯(50mL)在100℃下搅拌3小时。LCMS显示期望质量。将反应溶液浓缩,得到3-((5-溴-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(5.4g,粗品),为黑褐色固体。将粗产物直接用于下一个步骤。MS(M-H)<sup>+</sup>=271.9

[0597] 步骤2. 1-(5-溴-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(3)的合成

[0598] 将3-((5-溴-2-甲氧基苯基)氨基)丙酸(5.4g, 19.70mmol)在AcOH(50mL)中的溶液在120℃下搅拌10分钟。然后加入脲(5.92g, 98.50mmol),并且将所得混合物在120℃下搅拌18小时。LCMS显示起始材料完全消耗并且显示期望质量。将反应混合物倒入冰水(100mL)中,并且用EtOAc(50mL×4)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩,得到粗产物,将其通过快速硅胶层析(40g硅胶柱,EtOAc/石油醚=5%-100%,100mL/min)纯化,得到1-(5-溴-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(3.5g, 11.23mmol,收率57.02%,纯度96%),为灰色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=301.3

[0599] 步骤3. 4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0600] 在25℃下,向1-(5-溴-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(600mg, 2.01mmol)、哌嗪-1-甲酸叔丁酯(448.32mg, 2.41mmol)和t-BuONa(2M, 2.01mL)在2-甲基-2-丁醇(10mL)中的混合物中加入RuPhos Pd G<sub>4</sub>(85.29mg, 100.29μmol)。将所得混合物用N<sub>2</sub>吹扫并脱气3次,加热至90℃并搅拌14小时(注意:两个批次)。LCMS显示起始材料完全消耗,并

且显示期望质量。合并两个批次的反应混合物并过滤。将滤液浓缩,得到粗产物,将其通过快速(10g硅胶柱,EtOAc/石油醚=10%-50%,60mL/min)纯化,得到4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(160mg,300.65 $\mu$ mol,收率7.49%,纯度76%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=405.2

[0601] 步骤4. 1-(2-甲氧基-5-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(5)的合成

[0602] 将4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(160mg,395.59 $\mu$ mol)和HCl/二噁烷(4M,3mL)在二噁烷(1mL)中的溶液在25℃下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物浓缩,得到1-(2-甲氧基-5-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(130mg,粗品,HCl),为黄色固体。将粗产物直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=305.0

[0603] 步骤5. (1-(3-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(6)的合成

[0604] 在25℃下,向1-(2-甲氧基-5-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(130mg,381.45 $\mu$ mol,HCl)和N-[1-(3-氯丙酰基)-4-哌啶基]氨基甲酸叔丁酯(133.10mg,457.74 $\mu$ mol)在DMF(3mL)中的溶液中加入DIPEA(147.90mg,1.14mmol)和NaI(5.72mg,38.15 $\mu$ mol)。将所得混合物在70℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示期望质量。将反应混合物倒入盐水(30mL)中,并且用EtOAc(10mL $\times$ 4)萃取。将合并的有机层用盐水(10mL $\times$ 2)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩,得到粗产物,将粗产物通过快速硅胶层析(4g硅胶柱,EtOAc/石油醚=20%-100%,然后甲醇/乙酸乙酯=10%,40mL/min)纯化,得到(1-(3-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(50mg,89.50 $\mu$ mol,收率23.46%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=559.3

[0605] 步骤6. 1-(5-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(7)的合成

[0606] 将(1-(3-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(50mg,89.50 $\mu$ mol)和HCl/二噁烷(4M,2mL)在二噁烷(2mL)中的溶液在25℃下搅拌1小时。LCMS显示剩余痕量的起始材料,并且显示期望质量。将反应混合物在25℃下再搅拌1小时。将反应混合物浓缩,得到1-(5-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(45mg,粗品,HCl),为棕色固体。将粗产物直接用于下一个步骤。MS(M+H)<sup>+</sup>=459.3

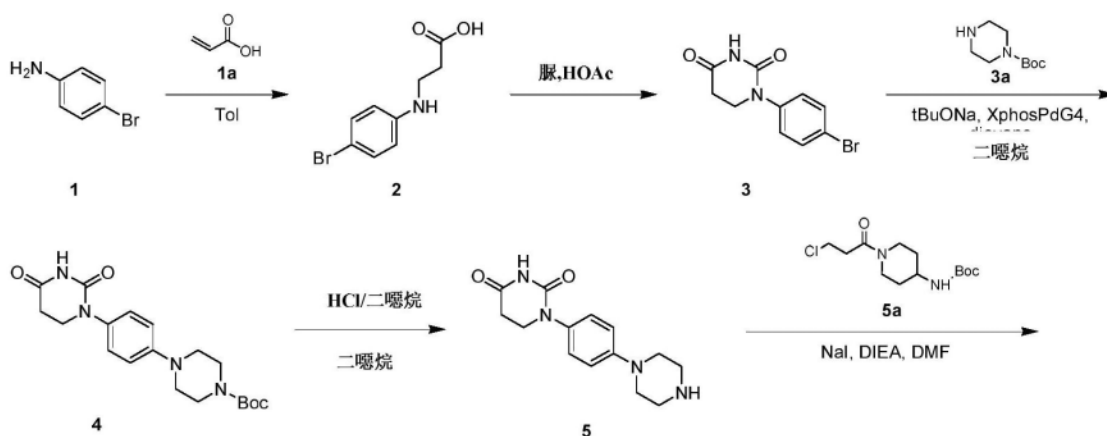
[0607] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物31)的合成

[0608] 在25℃下,向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(39.77mg,88.89 $\mu$ mol)、DIPEA(52.22mg,404.03 $\mu$ mol)和HATU(39.94mg,105.05 $\mu$ mol)在DMF(2mL)中的混合物中加入1-(5-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-2-甲氧基苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(40mg,80.81 $\mu$ mol,HCl)。将所得混合物在25℃下搅拌1小时。LCMS显示反应完成。将反应混合物倒入盐水(30mL)中,并且用EtOAc(10mL $\times$ 4)萃取。将合并的有机层用盐水

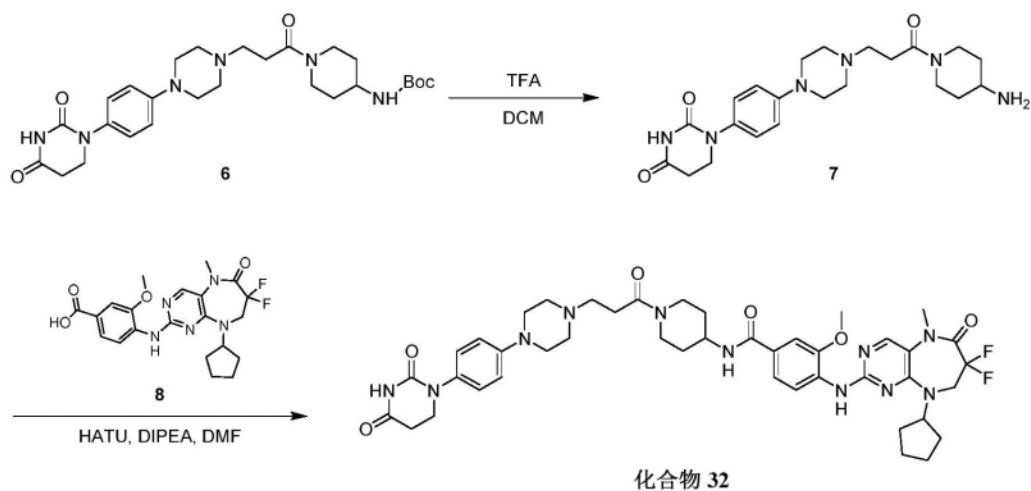
(10mL×2)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩,得到粗产物。将粗产物通过快速硅胶层析(4g硅胶柱, EtOAc/石油醚=20%-100%,然后甲醇/EtOAc=10%-30%,40mL/min)纯化,得到产物(50mg)。将粗产物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150×25mm×5μm;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:36%-66%,10min)进一步纯化并冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(10.8mg,11.34μmol,收率14.03%,纯度93.2%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=888.6

[0609] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.24(s,1H),8.27-8.25(m,2H),8.14(d,J=8.0Hz,1H),7.95(s,1H),7.48-7.46(m,2H),6.95(d,J=8.0Hz,1H),6.87-6.84(m,2H),4.79-4.70(m,1H),4.41-4.35(m,1H),4.06-3.99(m,4H),3.92(s,3H),3.70(s,3H),3.54(t,J=8.0Hz,2H),3.31(s,3H),3.13-3.08(m,1H),3.04-2.99(m,4H),2.68-2.62(m,3H),2.59-2.53(m,8H),1.97-1.83(m,4H),1.73-1.66(m,2H),1.61-1.53(m,4H),1.48-1.37(m,2H)。

[0610] 实施例32. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物32)的合成



[0611]



[0612] 步骤1. 3-((4-溴苯基)氨基)丙酸(2)的合成

[0613] 将4-溴苯胺(2g,11.63mmol)和丙烯酸(1.26g,17.44mmol,1.20mL)在甲苯(30mL)

中的混合物在100℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(60%)。将反应混合物减压浓缩。将粗产物溶解在石油醚:EtOAc=10:1(20mL)中并搅拌20分钟,过滤。收集滤饼并干燥,得到3-((4-溴苯基)氨基)丙酸(3g,粗品),为棕色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=244.0

[0614] 步骤2. 1-(4-溴苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(3)的合成

[0615] 向3-((4-溴苯基)氨基)丙酸(3g,5.35mmol)在AcOH(20mL)中的溶液中加入UREA(3.22g,53.55mmol,2.87mL),将混合物在120℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。将反应混合物减压浓缩。将粗产物溶解在EtOAc(20mL)中并搅拌20分钟,过滤。收集滤饼并干燥,得到1-(4-溴苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(1.6g,粗品),为灰色固体,MS(M+H)<sup>+</sup>=269。

[0616] 步骤3. 4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0617] 向1-(4-溴苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(1.3g,4.83mmol)在二噁烷(100mL)中的溶液中加入tBuONa(2M,7.25mL)和哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.08g,4.83mmol),然后在25℃下加入XphosPd<sub>4</sub>(415.70mg,483.10μmol)。将混合物在N<sub>2</sub>下于90℃下搅拌12小时。LCMS显示1-(4-溴苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(53%)。将混合物用EtOAc(50mL)和H<sub>2</sub>O(100mL)稀释,过滤。用EtOAc(40mL×3)萃取滤液。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤。浓缩滤液。用石油醚:EtOAc=1:1(60mL)研磨粗产物,并且搅拌0.5小时。然后过滤混合物。收集滤饼并且干燥,得到4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.5g,粗品),为灰色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=375.1

[0618] 步骤4. 1-(4-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(5)的合成

[0619] 在25℃下,向4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.5g,1.34mmol)在二噁烷(2mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,15mL)。将所得混合物在25℃下搅拌0.5小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。将混合物溶液减压浓缩,得到1-(4-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(420mg,粗品,HCl盐),为棕色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=275.1

[0620] 步骤5. (1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(6)的合成

[0621] 在25℃下,向(1-(3-氯丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(785.96mg,2.70mmol)和1-(4-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(420mg,1.35mmol,HCl盐)在DMF(3mL)中的溶液中加入NaI(20.26mg,135.14μmol)和DIPEA(523.98mg,4.05mmol,706.18μL),将混合物在80℃下搅拌16小时。LCMS显示1-(4-(哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(30%)。将混合物用DCM(30mL)稀释并且浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(4g SepaFlash®硅胶快速柱,0-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,70mL/min;0-50%甲醇/EtOAc的洗脱液,70mL/min)纯化,得到(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(0.5g,粗品),为棕色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=529.3

[0622] 步骤6. 1-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(7)的合成

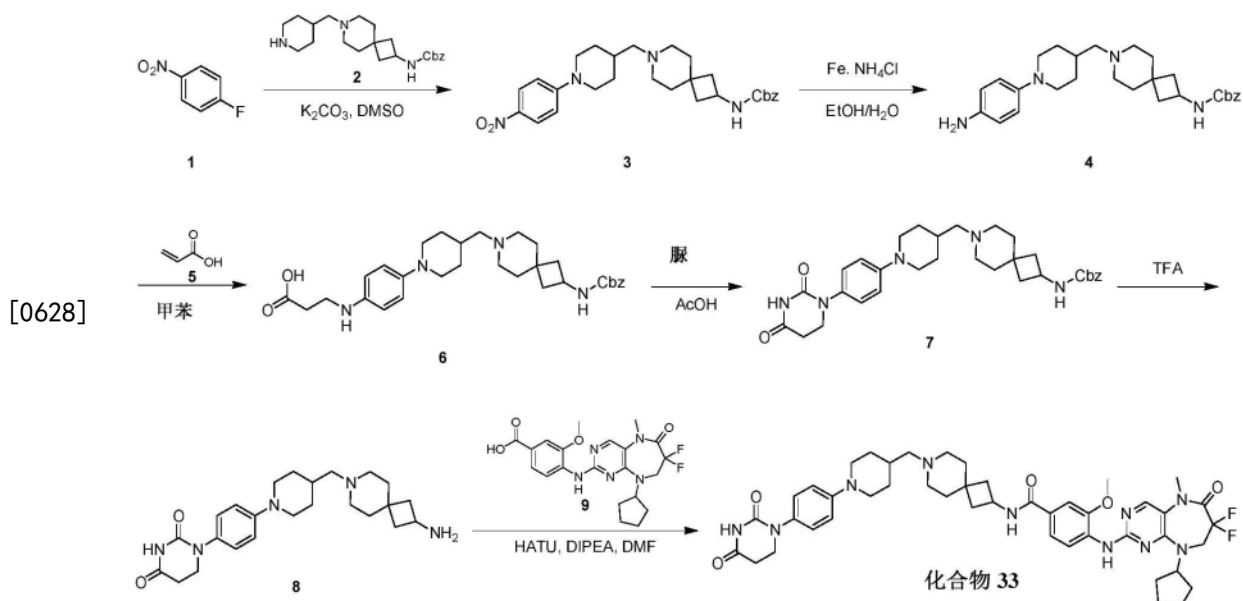
[0623] 在25℃下,向(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(180mg,340.50 $\mu$ mol)在DCM(5mL)中的溶液中加入TFA(1.54g,13.51mmol,1mL)。将所得混合物在25℃下搅拌0.5小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰。将反应混合物减压浓缩,得到1-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(180mg,粗品,TFA盐),为棕色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=429.2

[0624] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物32)的合成

[0625] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(70mg,156.45 $\mu$ mol)在DMF(2mL)中的溶液中加入HATU(89.23mg,234.68 $\mu$ mol)和DIPEA(60.66mg,469.35 $\mu$ mol,81.75 $\mu$ L),搅拌10分钟后,然后加入1-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(118.83mg,219.03 $\mu$ mol,TFA盐),并且将所得混合物在25℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的峰(48%)。将反应混合物减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(4g SepaFlash<sup>®</sup>硅胶快速柱,0-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,60mL/min;0-50%甲醇/EtOAc的洗脱液,60mL/min)纯化,并且通过制备型TLC(二氯甲烷:甲醇=10:1;Rf=0.5)和制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:26%-59,8min)再纯化,将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(23.6mg,26.96 $\mu$ mol,收率17.23%,纯度98%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=858.5

[0626] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ =10.25(s,1H),8.30-8.24(m,2H),8.15(d,J=7.8Hz,1H),7.96(s,1H),7.53-7.44(m,2H),7.14(d,J=9.0Hz,2H),6.93(d,J=9.1Hz,2H),4.83-4.70(m,1H),4.39(br d,J=12.5Hz,1H),4.04(br t,J=14.0Hz,3H),3.93(s,4H),3.69(t,J=6.7Hz,2H),3.32-3.28(m,3H),3.19-3.06(m,5H),2.72-2.64(m,3H),2.63-2.53(m,8H),1.98-1.78(m,4H),1.73-1.36(m,8H)。

[0627] 实施例33. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物33)的合成



[0629] 步骤1. (7-((1-(4-硝基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(3)的合成

[0630] 在20℃下,向1-氟-4-硝基-苯(0.2g,1.42mmol,150.38μL)在DMSO(4mL)中的溶液中加入K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(587.70mg,4.25mmol)和(7-(哌啶-4-基甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(636.11mg,1.56mmol,HCl盐),并且将所得混合物在40℃下搅拌1小时。LCMS显示(7-(哌啶-4-基甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(50%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(15mL)稀释,并且用EtOAc(15mL×3)萃取。将有机层用盐水(15mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(10g SepaFlash®硅胶快速柱,0-100%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到(7-((1-(4-硝基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(431mg,874.93μmol,收率61.73%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=493.3

[0631] 步骤2. (7-((1-(4-氨基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(4)的合成

[0632] 在20℃下,向(7-((1-(4-硝基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(431mg,874.93μmol)在EtOH(10mL)和H<sub>2</sub>O(2mL)中的溶液中加入Fe(244.30mg,4.37mmol)和NH<sub>4</sub>Cl(234.01mg,4.37mmol),并且将所得混合物在80℃下搅拌6小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的主峰(91%)。使用饱和NaHCO<sub>3</sub>(15mL)将反应混合物调节至pH=10,然后用EtOAc(15mL×3)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到(7-((1-(4-氨基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(485mg,粗品),为紫色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=463.4

[0633] 步骤3. 3-((4-(4-((2-(((苄氧基)羰基)氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)氨基)丙酸(6)的合成

[0634] 在20℃下,向(7-((1-(4-氨基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(485mg,1.05mmol)在甲苯(6mL)中的溶液中加入丙烯酸(75.55mg,1.05mmol,71.95μL),并且将所得混合物在100℃下搅拌15小时。LCMS显示剩余起始材料,并且显示具有期望质量的峰。在20℃下,加入另外的丙烯酸(37.77mg,524.18μmol,35.98μL),并且将反

应混合物在100℃下再搅拌12小时。LCMS显示剩余少量起始材料,并且显示具有期望质量的峰(43%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-((4-(4-((2-((苄氧基)羰基)氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)氨基)丙酸(560mg,粗品),为黑褐色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=535.3

[0635] 步骤4. (7-((1-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(7)的合成

[0636] 在20℃下,向3-((4-(4-((2-((苄氧基)羰基)氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)氨基)丙酸(560mg,1.05mmol)在AcOH(10mL)中的溶液中加入脲(628.98mg,10.47mmol,561.59μL),并且将所得混合物在120℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(37%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(20mL)稀释,并且用EtOAc(20mL×3)萃取。LCMS显示期望产物为水相。真空浓缩水相。将粗产物通过快速硅胶层析(10g SepaFlash®硅胶快速柱,0-100%EtOAc/石油醚至0-10%二氯甲烷/甲醇梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到(7-((1-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(156mg,262.00μmol,收率25.02%,纯度94%),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=560.3

[0637] 步骤5. 1-(4-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(8)的合成

[0638] 将(7-((1-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(56mg,100.05μmol)在TFA(2mL)中的混合物在20℃下,并且将所得混合物在40℃下搅拌4小时。LCMS显示剩余少量起始材料,并且显示具有期望质量的峰。将反应混合物真空浓缩,得到1-(4-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(54mg,粗品,TFA盐),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=426.4

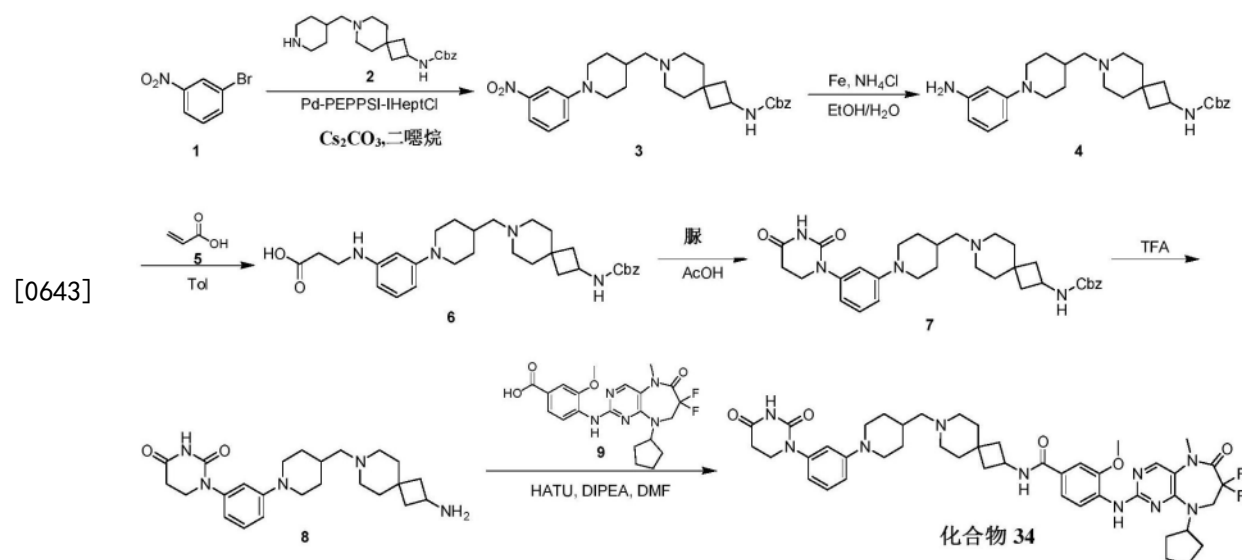
[0639] 步骤6. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物33)的合成

[0640] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(40mg,89.40μmol)在DMF(1mL)中的溶液中加入HATU(37.39mg,98.34μmol)和DIPEA(23.11mg,178.80μmol,31.14μL)。将混合物在20℃下搅拌10分钟,并且加入1-(4-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(53.06mg,98.34μmol,TFA盐)在DMF(1mL)中的溶液和DIPEA(69.32mg,536.39μmol,93.43μL),并且将所得混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示所有起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(33%)。将反应混合物与另一批次(60mg规模)合并以用于后处理。将合并的反应混合物用H<sub>2</sub>O(12mL)稀释,并且用EtOAc(12mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(12mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过制备型TLC(SiO<sub>2</sub>,二氯甲烷:甲醇=8:1)纯化,并且通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi Polar-RP 100×25mm×4μm;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:25%-45%,7min)再纯化,将洗脱液冻干,得到纯产物B和不纯的产物C。将不纯的产物C通过制备型HPLC(柱:

Phenomenex Synergi Polar-RP 100×25mm×4μm;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:26%-46%,7min)再纯化,将洗脱液冻干,得到产物D。将产物B和产物D合并以冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(4-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(16.9mg,15.14μmol,收率16.93%,纯度97%,2TFA),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=855.2

[0641] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,CD<sub>3</sub>CN) δ=9.34-9.23(m,1H),8.22-8.10(m,2H),7.98(s,1H),7.48-7.40(m,2H),7.29-7.20(m,3H),7.11(d,J=8.9Hz,2H),4.95-4.83(m,1H),4.57-4.44(m,1H),4.01(t,J=12.8Hz,2H),3.95(s,3H),3.75(t,J=6.7Hz,2H),3.70(br d,J=12.0Hz,2H),3.52-3.39(m,2H),3.32(s,3H),3.00-2.94(m,2H),2.90(dt,J=1.8,12.2Hz,3H),2.73-2.70(m,2H),2.49-2.45(m,1H),2.31-2.24(m,1H),2.14-1.95(m,8H),1.91-1.70(m,6H),1.65-1.46(m,6H)。

[0642] 实施例34. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-基)氨基)-N-(7-((1-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物34)的合成



[0644] 步骤1. (7-((1-(3-硝基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(3)的合成

[0645] 在N<sub>2</sub>气氛下,于20℃向1-溴-3-硝基苯(500mg,2.48mmol)和(7-(哌啶-4-基甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(1.11g,2.72mmol,HCl盐)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(2.42g,7.43mmol)和Pd-PEPSSI-IHeptCl(24.08mg,24.75μmol),并且将所得混合物在100℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰。将反应混合物真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(10g SepaFlash®硅胶快速柱,0-60%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,100mL/min)纯化,得到(7-((1-(3-硝基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(1g,2.03mmol,收率82.01%),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=493.2

[0646] 步骤2. (7-((1-(3-氨基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲

## 酸苄酯(4)的合成

[0647] 在20℃下,向(7-((1-(3-硝基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(1g, 2.03mmol)在EtOH(20mL)和H<sub>2</sub>O(4mL)中的溶液中加入Fe(566.83mg, 10.15mmol)和NH<sub>4</sub>Cl(542.94mg, 10.15mmol),并且将所得混合物在80℃下搅拌6小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(77%)。使用饱和NaHCO<sub>3</sub>(15mL)将反应混合物调节至pH=10,然后用EtOAc(15mL×3)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到(7-((1-(3-氨基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(862mg,粗品),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=463.4

[0648] 步骤3. 3-((3-(4-((2-((苄氧基)羰基)氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)氨基)丙酸(6)的合成

[0649] 在20℃下,向(7-((1-(3-氨基苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(862mg, 1.86mmol)在甲苯(10mL)中的溶液中加入丙烯酸(134.27mg, 1.86mmol, 127.88μL),并且将所得混合物在100℃下搅拌18小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(33%)。将反应混合物真空浓缩,得到3-((3-(4-((2-((苄氧基)羰基)氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)氨基)丙酸(997mg,粗品),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=535.4

[0650] 步骤4. (7-((1-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(7)的合成

[0651] 在20℃下,向3-((3-(4-((2-((苄氧基)羰基)氨基)-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)氨基)丙酸(997mg, 1.86mmol)在AcOH(10mL)中的溶液中加入脲(1.12g, 18.65mmol, 999.83μL),并且将所得混合物在120℃下搅拌12小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(21%)。将反应混合物真空浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash® 硅胶快速柱, 0-100% EtOAc/石油醚至0-10% 二氯甲烷:甲醇梯度的洗脱液, 100mL/min)、随后通过制备型TLC(SiO<sub>2</sub>, 二氯甲烷:甲醇=10:1)纯化,得到(7-((1-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(325mg, 557.44μmol, 收率29.90%, 纯度96%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=560.3

[0652] 步骤5. 1-(3-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(8)的合成

[0653] 将(7-((1-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(100mg, 178.67μmol)在TFA(4mL)中的混合物在40℃下搅拌18小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰。将反应混合物真空浓缩,得到1-(3-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(98mg,粗品,TFA盐),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=426.4

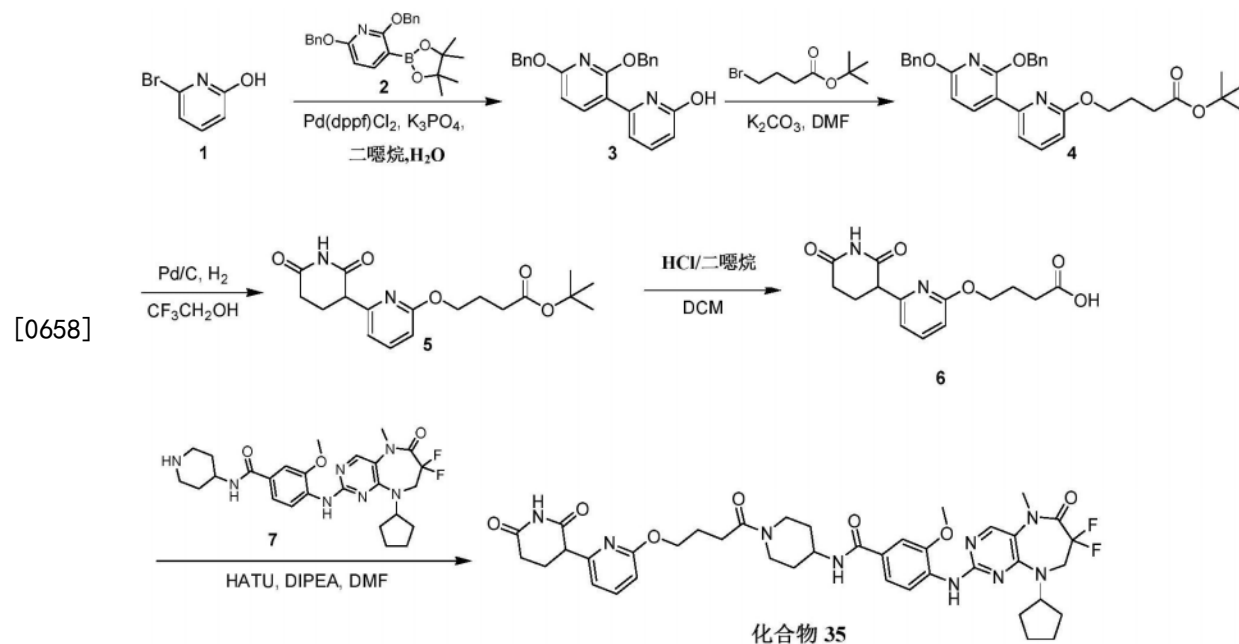
[0654] 步骤6. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(3-(2,4-二氧代四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物34)的合成

[0655] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b]

[1,4]二氮杂草-2-(基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸 (60mg, 134.10 $\mu$ mol) 在DMF (1mL) 中的溶液中加入HATU (56.09mg, 147.51 $\mu$ mol) 和DIPEA (51.99mg, 402.29 $\mu$ mol, 70.07 $\mu$ L)。将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌10分钟, 并且加入1-(3-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)苯基)二氢嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮 (94.07mg, 174.33 $\mu$ mol, TFA盐) 在DMF (1mL) 中的溶液和DIPEA (51.99mg, 402.29 $\mu$ mol, 70.07 $\mu$ L), 并且将所得混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LCMS显示起始材料完全消耗, 并且显示具有期望质量的峰 (64%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O (12mL) 稀释, 并且用EtOAc (12mL $\times$ 3) 萃取。将有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过制备型HPLC (柱: Phenomenex Synergi Polar-RP 100 $\times$ 25mm $\times$ 4 $\mu$ m; 流动相: [水 (TFA) -ACN]; B%: 24%-44%, 7min) 纯化, 并且通过制备型HPLC (柱: Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m; 流动相: [水 (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) -ACN]; B%: 52%-82%, 8min) 再纯化, 并且将洗脱液冻干, 得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-(基)氨基)-N-(7-((1-(3-(2,4-二氧化四氢嘧啶-1(2H)-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (13mg, 14.75 $\mu$ mol, 收率11.00%, 纯度97%), 为白色固体。MS (M+H)<sup>+</sup>=855.2

[0656] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ =10.29 (s, 1H), 8.43 (br d, J=7.3Hz, 1H), 8.31-8.24 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.51-7.45 (m, 2H), 7.18 (t, J=8.1Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.80 (br d, J=8.3Hz, 1H), 6.67 (d, J=7.9Hz, 1H), 4.76 (quin, J=8.0Hz, 1H), 4.45-4.33 (m, 1H), 4.04 (br t, J=14.1Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.74 (t, J=6.7Hz, 2H), 3.66 (br d, J=12.1Hz, 2H), 3.51-3.32 (m, 5H), 2.71-2.63 (m, 4H), 2.31-2.22 (m, 2H), 2.18-2.09 (m, 4H), 1.98-1.89 (m, 2H), 1.85-1.66 (m, 7H), 1.64-1.53 (m, 8H), 1.24-1.12 (m, 2H) .

[0657] 实施例35. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂草-2-(基)氨基)-N-(1-(4-((6-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (化合物35) 的合成



[0659] 步骤1. 2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-醇 (3) 的合成

[0660] 向6-溴吡啶-2-醇 (400mg, 2.30mmol) 和2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,

3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(959.35mg,2.30mmol)在二噁烷(8mL)和H<sub>2</sub>O(0.8mL)中的溶液中加入Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(168.21mg,229.89μmol)和K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(1.46g,6.90mmol)。将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于90℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰(40%)。将反应混合物减压浓缩。将残余物通过柱层析(SiO<sub>2</sub>,石油醚/EtOAc=3/4至0/1)纯化,得到2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-醇(420mg,852.18μmol,收率37.07%,纯度78%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=385.3

[0661] 步骤2. 4-((2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-基)氧基)丁酸叔丁酯(4)的合成

[0662] 向2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-醇(390mg,1.01mmol)在DMF(8mL)中的溶液中加入K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(420.63mg,3.04mmol)和4-溴丁酸叔丁酯(226.34mg,1.01mmol)。将混合物在70℃下搅拌5小时。LCMS显示2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-醇完全消耗,并且显示具有期望质量的一个主峰。将反应混合物用水(100mL)稀释,并且用EtOAc(30mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(30mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过柱层析(SiO<sub>2</sub>,石油醚/EtOAc=1/0至100/3)纯化,得到4-((2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-基)氧基)丁酸叔丁酯(420mg,765.64μmol,收率75.47%,纯度96%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=527.9

[0663] 步骤3. 4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酸叔丁酯(5)的合成

[0664] 在N<sub>2</sub>气氛下,向4-((2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-基)氧基)丁酸叔丁酯(370mg,702.59μmol)在CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH(20mL)中的溶液中加入Pd/C(10%,50mg)。将悬浮液脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫3次。将混合物在H<sub>2</sub>(15psi)下于25℃下搅拌4小时。LCMS显示4-((2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-基)氧基)丁酸叔丁酯完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(74%)。将反应混合物过滤并将滤饼用EtOAc(100mL)洗涤,将滤液真空浓缩,得到4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酸叔丁酯(260mg,粗品),为无色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=349.2

[0665] 步骤4. 4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酸(6)的合成

[0666] 将4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酸叔丁酯(230mg,660.17μmol)在HCl/二噁烷(4M,2mL)和DCM(2mL)中的混合物在25℃下搅拌0.5小时。LCMS显示4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酸叔丁酯完全消耗,并且显示具有期望质量的一个主峰。将反应混合物减压浓缩,得到4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酸(190mg,粗品),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=292.8

[0667] 步骤5. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物35)的合成

[0668] 向4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酸(80mg,273.70μmol)和4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺(144.95mg,273.70μmol)在DMF(3mL)中的溶液中加入HATU(156.11mg,410.56μmol)和DIPEA(106.12mg,821.11μmol,143.02μL)。将混合物在25℃下搅拌2小时。LCMS显示4-((6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)氧基)丁酸完全消耗,显示具有期望质量的峰(73%)。将反应混合物用水(50mL)稀释,并且用EtOAc



取。将合并的有机层用盐水(50mL×4)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(40g硅胶柱,EtOAc/石油醚=10%-20%,60mL/min)纯化,得到4-(6-溴吡啶-2-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(3g,8.77mmol,收率69.22%,纯度100%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=342.1

[0674] 步骤2. 4-(2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(3)的合成

[0675] 将2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(1.5g,3.59mmol)、4-(6-溴吡啶-2-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.23g,3.59mmol)、CataCXium A Pd G<sub>2</sub>(120.02mg,179.50μmol)和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(761.01mg,7.18mmol)在二噁烷(20mL)和H<sub>2</sub>O(5mL)中的混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫3次,然后将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于60℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰。将反应混合物用水(100mL)稀释,并且用EtOAc(100mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL×4)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(40g硅胶柱,EtOAc/石油醚=0-10%,60mL/min)纯化,并且通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge C18150×50mm×10μm;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:68%-98%,11min)再纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-(2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.5g,624.25μmol,收率17.39%,纯度69%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=553.5

[0676] 步骤3. 2'-(苄氧基)-6-(哌嗪-1-基)-[2,3'-联吡啶]-6'-醇(4)的合成

[0677] 向4-(2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-6-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.5g,904.71μmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,226.18μL)。将混合物在25℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰。将反应溶液浓缩,得到2'-(苄氧基)-6-(哌嗪-1-基)-[2,3'-联吡啶]-6'-醇(400mg,粗品,HCl),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=363.3

[0678] 步骤4. (1-(3-(4-(2'-(苄氧基)-6'-羟基-[2,3'-联吡啶]-6-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(5)的合成

[0679] 向2'-(苄氧基)-6-(哌嗪-1-基)-[2,3'-联吡啶]-6'-醇(200mg,501.40μmol,HCl盐)和(1-(3-氯丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(437.40mg,1.50mmol)在DMF(4mL)中的溶液中加入NaI(7.52mg,50.14μmol)和DIPEA(259.20mg,2.01mmol,349.33μL)。将混合物在80℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰。将反应混合物用水(50mL)稀释,并且用EtOAc(10mL×2)萃取。将合并的有机层用盐水(20mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(10g硅胶柱,EtOAc/石油醚=0-10%,20mL/min)纯化,得到(1-(3-(4-(2'-(苄氧基)-6'-羟基-[2,3'-联吡啶]-6-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(230mg,372.92μmol,收率74.38%),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=617.5

[0680] 步骤5. (1-(3-(4-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(6)的合成

[0681] 在N<sub>2</sub>气氛下,向(1-(3-(4-(2'-(苄氧基)-6'-羟基-[2,3'-联吡啶]-6-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(200mg,324.28μmol)在2,2,2-三氟乙醇(30mL)中的溶液中加入Pd/C(149.74mg,纯度10%)。将混合物脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫3次,然后将所得混合物在H<sub>2</sub>(15psi)气氛下于25℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰。过滤反应混合物,并且将滤液减压浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150×25mm×5μ

m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:23%-53%,8min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到(1-(3-(4-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(60mg,110.09μmol,收率33.95%,纯度97%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=529.4

[0682] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDC1<sub>3</sub>) δ=8.03(br s,1H),7.53-7.45(m,1H),6.66-6.52(m,2H),4.60-4.43(m,2H),3.92-3.79(m,2H),3.75-3.47(m,5H),3.20-3.08(m,1H),300-2.53(m,11H),2.40-2.25(m,2H),2.10-1.90(m,3H),1.45(s,9H),1.40-1.23(m,3H)。

[0683] 步骤6. 3-(6-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(7)的合成

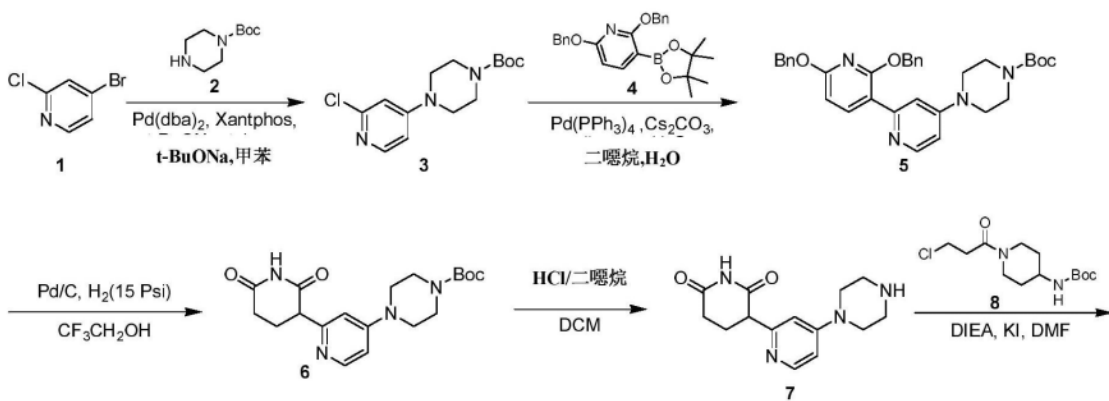
[0684] 向(1-(3-(4-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(60mg,113.50μmol)在二噁烷(5mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,15.00mL)。将混合物在25℃下搅拌1小时。LCMS显示具有期望质量的峰。将反应混合物减压浓缩,得到3-(6-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(60mg,粗品,HCl盐),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=429.3

[0685] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物36)的合成

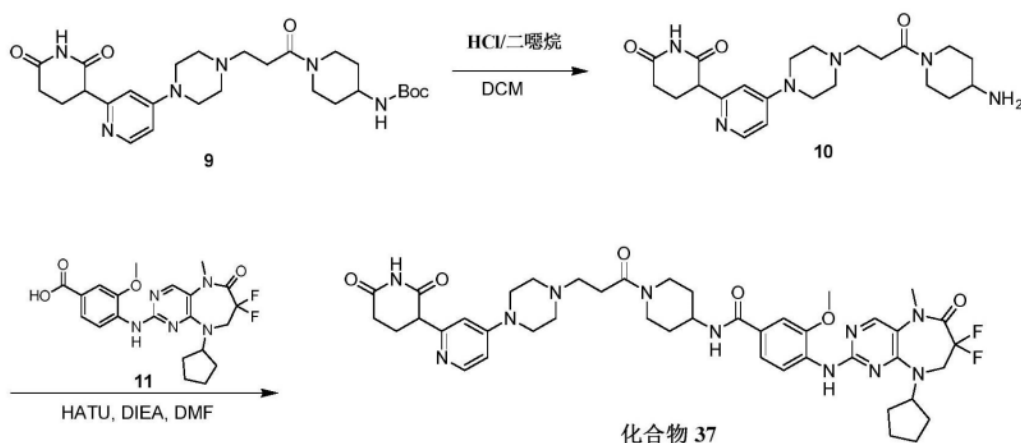
[0686] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(52.21mg,116.68μmol)在DMF(1mL)中的溶液中加入HATU(53.24mg,140.01μmol)和DIPEA(30.16mg,233.36μmol,40.65μL),将混合物在25℃下搅拌10分钟,然后在25℃下滴加3-(6-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(50mg,116.68μmol,HCl盐水)和DIPEA(45.24mg,350.04μmol,60.97μL)在DMF(2mL)中的溶液,并且将所得混合物在25℃下搅拌1小时。LCMS显示具有期望质量的峰。将反应混合物用水(20mL)稀释,并且用EtOAc(10mL×2)萃取。将合并的有机层用盐水(5mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150×25mm×5μm;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:33%-63%,9min)纯化,并且将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-2-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(30.5mg,34.48μmol,收率29.55%,纯度97%),为黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=858.5

[0687] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.79(s,1H),8.31-8.23(m,2H),8.15(d,J=7.70Hz,1H),7.96(s,1H),7.57-7.43(m,3H),6.72(d,J=8.56Hz,1H),6.60(d,J=7.21Hz,1H),4.83-4.70(m,1H),4.46-4.34(m,1H),4.13-4.00(m,3H),4.00-3.89(m,4H),3.81(t,J=6.36Hz,1H),3.50-3.38(m,4H),3.28(br d,J=3.55Hz,3H),3.18-3.07(m,1H),2.72-2.52(m,10H),2.48-2.46(m,1H),2.19-2.08(m,2H),1.99-1.79(m,4H),1.75-1.33(m,8H)。

[0688] 实施例37. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物37)的合成



[0689]



[0690] 步骤1. 4-(2-氯吡啶-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (3) 的合成

[0691] 在 $N_2$ 气氛下,向4-溴-2-氯吡啶(1g,5.20mmol)和哌嗪-1-甲酸叔丁酯(967.83mg,5.20mmol)在甲苯(10mL)中的溶液中加入 $Pd(dba)_2$ (298.80mg,519.64 $\mu$ mol)、Xantphos(601.35mg,1.04mmol)和 $t-BuONa$ (1.50g,15.59mmol)。将混合物在 $N_2$ 气氛下于 $90^\circ C$ 下搅拌5小时。LCMS显示具有期望质量的峰(16%)。将反应混合物减压浓缩。将残余物通过柱层析( $SiO_2$ ,石油醚/EtOAc=3/1至2/1)、随后通过反相HPLC(0.1%FA条件:柱:120g快速柱Welch Ultimate XB\_C<sub>18</sub> 20-40 $\mu$ m;流速:85mL/min;流动相:MeCN/ $H_2O$ ;梯度B%:5%-40%10min;40%-100%30min;仪器:TELEDYNE ISCO CombiFlashRf<sub>150</sub>),并且将洗脱液冻干,得到4-(2-氯吡啶-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(650mg,1.96mmol,收率37.81%,纯度90%),为白色固体。 $MS(M+H)^+=298.2$

[0692] 步骤2. 4-(2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(5)的合成

[0693] 在 $N_2$ 气氛下,向4-(2-氯吡啶-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(600mg,2.01mmol)和2,6-双(苄氧基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)吡啶(840.83mg,2.01mmol)在二噁烷(10mL)和 $H_2O$ (1mL)中的溶液中加入 $Pd(PPh_3)_4$ (232.84mg,201.49 $\mu$ mol)和 $Cs_2CO_3$ (1.97g,6.04mmol)。将混合物在微波下于 $125^\circ C$ 下搅拌1小时。LCMS显示剩余4-(2-氯吡啶-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(14%),并且显示具有期望质量的峰(60%)。将反应混合物减压浓缩。将残余物通过柱层析( $SiO_2$ ,石油醚/EtOAc=4/1至3/1)纯化,得到4-(2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(450mg,781.67 $\mu$ mol,收率38.79%,纯度96%),为白色固体。 $MS(M+H)^+=553.3$

[0694] 步骤3. 4-(2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(6)的合成

[0695] 在 $N_2$ 气氛下,向4-(2',6'-双(苄氧基)-[2,3'-联吡啶]-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(450mg,814.24 $\mu$ mol)在 $CF_3CH_2OH$ (10mL)中的溶液中加入Pd/C(10%,50mg)。将悬浮液脱气并且用 $H_2$ 吹扫3次。将混合物在 $H_2$ (15psi)下于25 $^{\circ}C$ 下搅拌4小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(74%)。将反应混合物过滤并且将滤饼用EtOAc(100mL)洗涤,将滤液真空浓缩。将残余物通过柱层析( $SiO_2$ ,石油醚/EtOAc=4/5至0/1)纯化,得到4-(2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(170mg,431.32 $\mu$ mol,收率52.97%,纯度95%),为浅绿色固体。MS(M+H) $^+$ =375.3

[0696] 步骤4. 3-(4-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(7)的合成

[0697] 将4-(2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(140mg,373.90 $\mu$ mol)、HCl/二噁烷在DCM(1mL)中的混合物在25 $^{\circ}C$ 下搅拌0.5小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的一个主峰。将反应混合物减压浓缩,得到3-(4-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(140mg,粗品,HCl盐),为白色固体。MS(M+H) $^+$ =275.2

[0698] 步骤5. (1-(3-(4-(2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(9)的合成

[0699] 向3-(4-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(140mg,450.48 $\mu$ mol,HCl盐)和(1-(3-氯丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(130.99mg,450.48 $\mu$ mol)在DMF(4mL)中的溶液中加入KI(74.78mg,450.48 $\mu$ mol)和DIPEA(174.66mg,1.35mmol,235.40 $\mu$ L)。将混合物在80 $^{\circ}C$ 下搅拌3小时。LCMS显示3-(4-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(59%)。将反应混合物用水(50mL)稀释,并且用EtOAc(20mL $\times$ 3)萃取。将合并的有机层用盐水(20mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过柱层析( $SiO_2$ ,MeOH/EtOAc=0/1至1/10)纯化,得到(1-(3-(4-(2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(50mg,91.74 $\mu$ mol,收率20.37%,纯度97%),为浅黄色固体。MS(M+H) $^+$ =529.3

[0700] 步骤6. 3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(10)的合成

[0701] 将(1-(3-(4-(2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(50mg,94.58 $\mu$ mol)在HCl/二噁烷(4M,0.5mL)和DCM(0.5mL)中的混合物在25 $^{\circ}C$ 下搅拌0.5小时。LCMS显示起始材料完全消耗,并且显示具有期望质量的峰(46%)。将反应混合物减压浓缩,得到3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(50mg,粗品,HCl盐),为黄色固体。MS(M+H) $^+$ =429.4

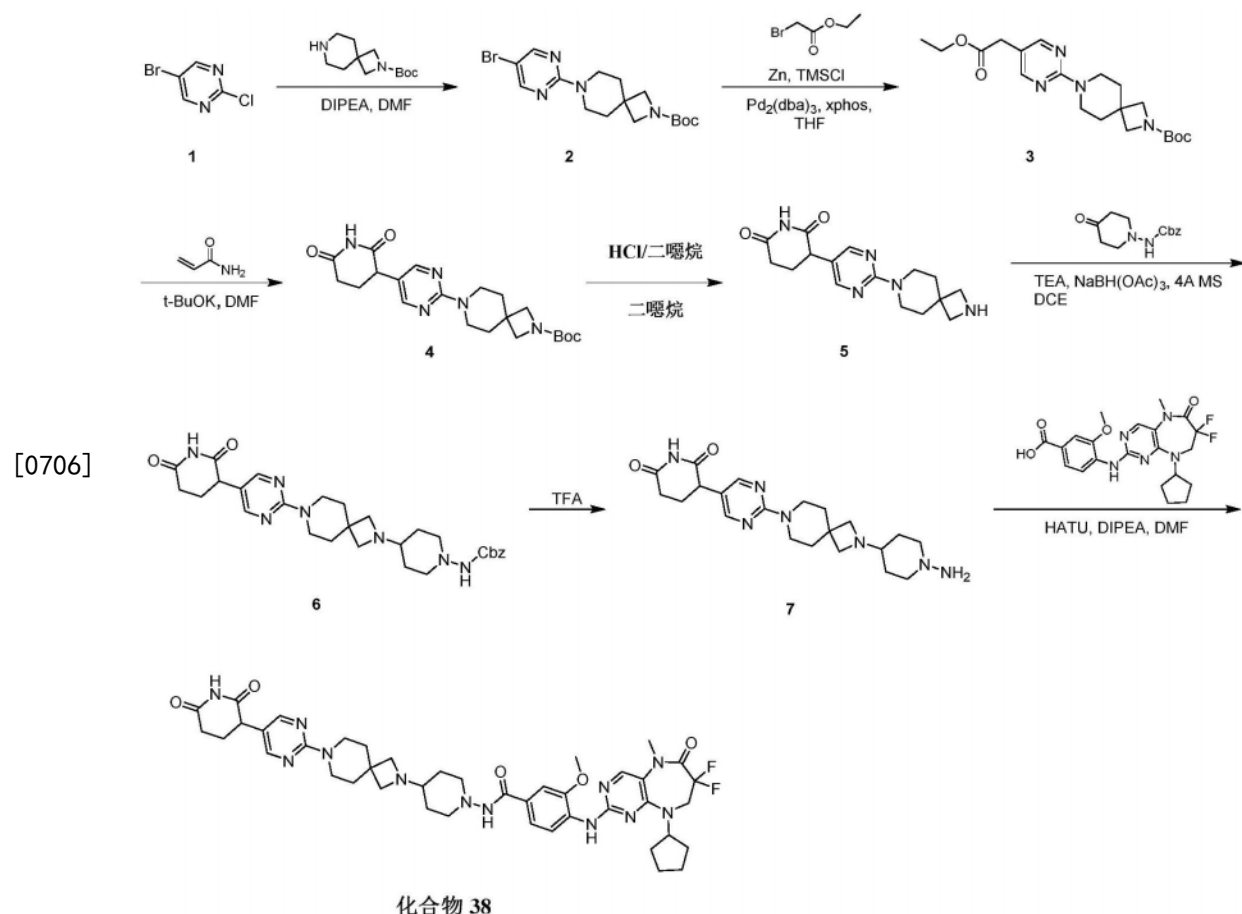
[0702] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂 $\text{草}$ -2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物37)的合成

[0703] 向3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(50mg,107.53 $\mu$ mol,HCl盐)和4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂 $\text{草}$ -2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(48.11mg,107.53 $\mu$ mol)在DMF(1.5mL)中的溶液中加入HATU(61.33mg,161.29 $\mu$ mol)和DIPEA(41.69mg,322.59 $\mu$ mol,56.19 $\mu$ L)。将混合物在25 $^{\circ}C$ 下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰(42%)。将反应

混合物用水 (50mL) 稀释, 并且用 EtOAc (20mL × 3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。将残余物通过制备型 HPLC (中性条件: 柱: Waters Xbridge 150 × 25mm × 5μm; 流动相: [水 (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) - ACN]; B%: 28% - 58%, 8min) 纯化, 并且将洗脱液冻干, 得到 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂萆-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-4-基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (12.6mg, 22.27μmol, 收率 20.71%, 纯度 96%), 为白色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 858.1

[0704] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 10.77 (s, 1H), 8.30-8.26 (m, 2H), 8.16 (br d, J = 7.8Hz, 1H), 8.07 (d, J = 6.0Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.51-7.48 (m, 2H), 6.82 (d, J = 2.3Hz, 1H), 6.74 (dd, J = 2.4, 6.0Hz, 1H), 4.81-4.75 (m, 1H), 4.43-4.36 (m, 1H), 4.11-3.97 (m, 4H), 3.94 (s, 3H), 3.85-3.80 (m, 1H), 3.33 (br s, 3H), 3.31 (br s, 4H), 3.17-3.12 (m, 1H), 2.68-2.54 (m, 9H), 2.23-2.10 (m, 2H), 1.99-1.79 (m, 5H), 1.75-1.68 (m, 2H), 1.66-1.55 (m, 5H), 1.51-1.36 (m, 2H).

[0705] 实施例 38. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂萆-2-基)氨基)-N-(4-(7-(5-(2,6-二氧代哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺 (化合物 38) 的合成



[0707] 步骤 1. 7-(5-溴嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-甲酸叔丁酯 (2) 的合成

[0708] 向 5-溴-2-氯嘧啶 (5g, 25.85mmol) 和 2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯 (6.44g, 28.43mmol) 在 DMF (25mL) 中的溶液中加入 DIPEA (6.68g, 51.70mmol, 9.00mL), 将混

合物在100℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将混合物过滤,将滤液用水(50mL)稀释,用EtOAc(30mL×3)萃取。将有机层用盐水(50mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩,得到7-(5-溴嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(10g,粗品),为棕色粉末。MS(M+H)<sup>+</sup>=383.0

[0709] 步骤2. 7-(5-(2-乙氧基-2-氧代乙基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(3)的合成

[0710] 将Zn(4.78g,73.05mmol)和TMSCl(396.83mg,3.65mmol,463.59μL)在THF(20mL)中的溶液加热至40℃并搅拌10分钟,然后在20℃下在20分钟内逐滴加入2-溴乙酸乙酯(6.10g,36.53mmol,4.04mL),将混合物冷却至20℃,然后加入7-(5-溴嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(7g,18.26mmol)在THF(60mL)中的溶液,随后在N<sub>2</sub>气氛下加入Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>(2.51g,2.74mmol)和XPhos(2.61g,5.48mmol),将混合物在60℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将混合物冷却至20℃,用EtOAc(50mL)稀释,然后用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(10mL)淬灭。将有机层用盐水(10mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩,将粗产物通过快速硅胶层析法(Biotage,25g SepaFlash®硅胶快速柱,4%-35%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,40mL/min)纯化,得到7-(5-(2-乙氧基-2-氧代乙基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(5.4g,12.58mmol,收率68.91%,纯度91%),为棕色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=391.2

[0711] 步骤3. 7-(5-(2,6-二氧化哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0712] 向7-(5-(2-乙氧基-2-氧代乙基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(1g,2.56mmol)在DMF(10mL)中的溶液中加入t-BuOK(287.37mg,2.56mmol)和丙-2-烯酰胺(182.03mg,2.56mmol,176.73μL),并且将混合物在0℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的主峰,将混合物用水(10mL)稀释,用EtOAc(15mL×3)萃取。将有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(Biotage,4g SepaFlash®硅胶快速柱,4%-98%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,20mL/min)纯化,得到7-(5-(2,6-二氧化哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(1g,2.41mmol,收率93.98%,纯度100%),为黄色粉末。MS(M+H)<sup>+</sup>=416.2

[0713] 步骤4. 3-(2-(2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)嘧啶-5-基)哌啶-2,6-二酮(5)的合成

[0714] 向7-(5-(2,6-二氧化哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-甲酸叔丁酯(0.5g,1.20mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,300.85μL),将混合物在20℃下搅拌1小时。LCMS显示期望质量。将混合物真空浓缩,得到3-(2-(2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)嘧啶-5-基)哌啶-2,6-二酮(480mg,粗品,HCl),为棕色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=316.1

[0715] 步骤5. (4-(7-(5-(2,6-二氧化哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)氨基甲酸苄酯(6)的合成

[0716] 向3-(2-(2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)嘧啶-5-基)哌啶-2,6-二酮(200mg,粗品,HCl盐)在DCE(8mL)中的溶液中加入(4-氧代哌啶-1-基)氨基甲酸苄酯(173.20mg,697.59μmol)、4AMS(10mg,634.18μmol)和TEA(641.72mg,6.34mmol,882.69μL),将混合物在20℃下

搅拌1小时,然后加入 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (201.61mg, 951.27 $\mu\text{mol}$ ),将混合物在20℃下搅拌15小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将混合物用水(3mL)稀释,用EtOAc(5mL $\times$ 3)萃取,将有机层经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并真空浓缩。将粗产物通过快速硅胶层析(Biotage, 4g SepaFlash®硅胶快速柱, 4%-50%甲醇/EtOAc梯度的洗脱液, 20mL/min)纯化,得到(4-(7-(5-(2,6-二氧代哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)氨基甲酸苄酯(190mg, 322.65 $\mu\text{mol}$ , 收率50.88%, 纯度93%), 为白色粉末。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=548.3$

[0717] 步骤6. 3-(2-(2-(1-氨基哌啶-4-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)嘧啶-5-基)哌啶-2,6-二酮(7)的合成

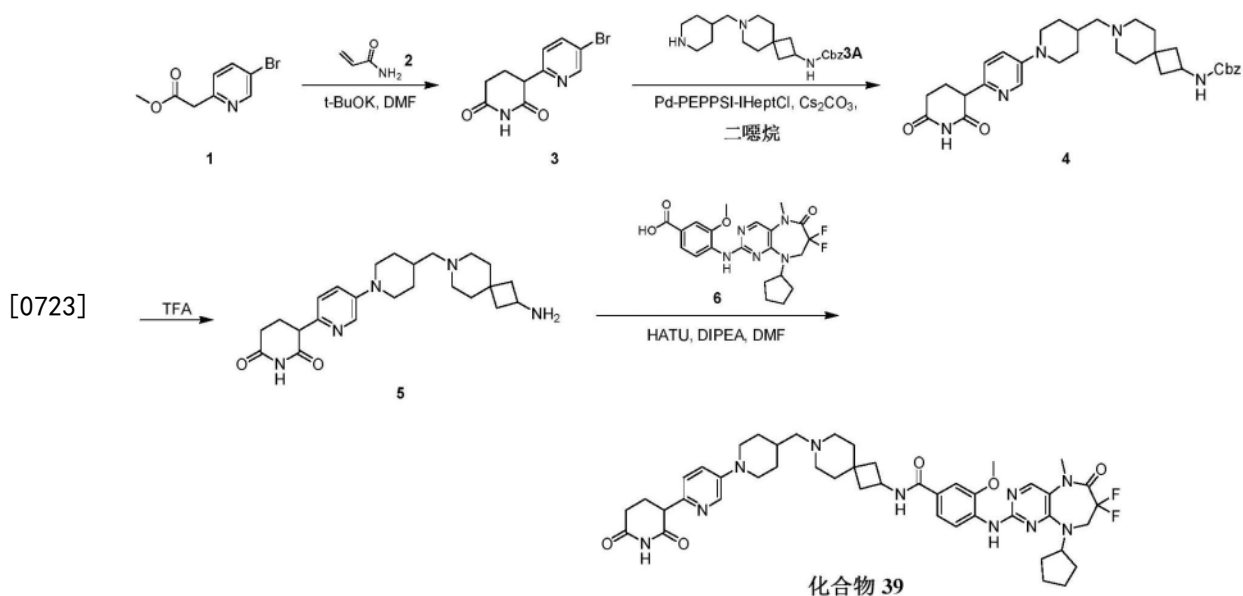
[0718] 将(4-(7-(5-(2,6-二氧代哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)氨基甲酸苄酯(190mg, 346.94 $\mu\text{mol}$ ) 在TFA(1.5mL)中的溶液在60℃下搅拌5小时。LCMS显示期望质量,将混合物真空浓缩,得到3-(2-(2-(1-氨基哌啶-4-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)嘧啶-5-基)哌啶-2,6-二酮(200mg, 粗品, TFA), 为棕色油状物。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=414.3$

[0719] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(4-(7-(5-(2,6-二氧代哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物38)的合成

[0720] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(140mg, 312.90 $\mu\text{mol}$ ) 在DMF(2mL)中的溶液中加入HATU(178.46mg, 469.34 $\mu\text{mol}$ ) 和DIPEA(121.32mg, 938.69 $\mu\text{mol}$ , 163.50 $\mu\text{L}$ ), 然后加入3-(2-(2-(1-氨基哌啶-4-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-7-基)嘧啶-5-基)哌啶-2,6-二酮(200mg, 粗品, TFA), 将混合物在20℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的主峰,将混合物用水(3mL)稀释,用EtOAc(5mL $\times$ 3)萃取,将有机层经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并真空浓缩。将粗产物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi Polar-RP 100 $\times$ 25mm $\times$ 4 $\mu\text{m}$ ; 流动相:[水(TFA)-ACN]; B%:29%-49%, 7min)和制备型HPLC(柱:Waters Xbridge C18 150 $\times$ 50mm $\times$ 10 $\mu\text{m}$ ; 流动相:[水( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN]; B%:26%-56%, 10min)纯化,将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(4-(7-(5-(2,6-二氧代哌啶-3-基)嘧啶-2-基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬-2-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(37.5mg, 43.20 $\mu\text{mol}$ , 收率13.81%, 纯度97.1%), 为白色粉末。 $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=843.5$

[0721]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta=10.88(\text{s}, 1\text{H}), 9.35(\text{s}, 1\text{H}), 8.29-8.24(\text{m}, 2\text{H}), 8.23-8.18(\text{m}, 2\text{H}), 7.97(\text{s}, 1\text{H}), 7.49-7.37(\text{m}, 2\text{H}), 4.83-4.69(\text{m}, 1\text{H}), 4.05(\text{t}, J=14.0\text{Hz}, 2\text{H}), 3.93(\text{s}, 3\text{H}), 3.77-3.66(\text{m}, 5\text{H}), 3.33(\text{s}, 3\text{H}), 3.07-2.91(\text{m}, 6\text{H}), 2.79(\text{t}, J=8.7\text{Hz}, 2\text{H}), 2.71-2.56(\text{m}, 2\text{H}), 2.28-2.09(\text{m}, 2\text{H}), 2.02-1.91(\text{m}, 3\text{H}), 1.74-1.56(\text{m}, 12\text{H}), 1.38-1.25(\text{m}, 2\text{H})$ .

[0722] 实施例39. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂~~草~~-2-基)氨基)-N-(7-((1-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-3-基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物39)的合成



[0724] 步骤1. 3-(5-溴吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮 (3) 的合成

[0725] 在0℃下,向2-(5-溴吡啶-2-基)乙酸甲酯(1g,4.35mmol)在DMF(10mL)中的溶液中加入丙-2-烯酰胺(308.96mg,4.35mmol,299.96μL)和t-BuOK(2M,2.17mL),并且将混合物在0℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰(55%)。将混合物倒入水(50mL)中并且用EtOAc(50mL×3)萃取,将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(20g SepaFlash®硅胶快速柱,0-20%EtOAc/石油醚梯度的洗脱液,80mL/min)纯化,得到3-(5-溴吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(0.5g,1.86mmol,收率42.75%,纯度100%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=269.1

[0726] 步骤2. (7-((1-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-3-基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(4)的合成

[0727] 平行的两个批次:向3-(5-溴吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(100mg,371.62μmol)和(7-(哌啶-4-基甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(165.16mg,404.83μmol,HCl)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入Pd-PEPPSI-IHeptCl(36.15mg,37.16μmol)和Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(605.40mg,1.86mmol),并且将所得混合物在N<sub>2</sub>下于100℃下搅拌12小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将混合物倒入水(50mL)中并且用EtOAc(50mL×3)萃取,将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过制备型TLC(EtOAc/甲醇=10/1)纯化,得到(7-((1-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-3-基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(250mg,281.40μmol,收率37.86%,纯度63%),为黄色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=560.4

[0728] 步骤3. 3-(5-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(5)的合成

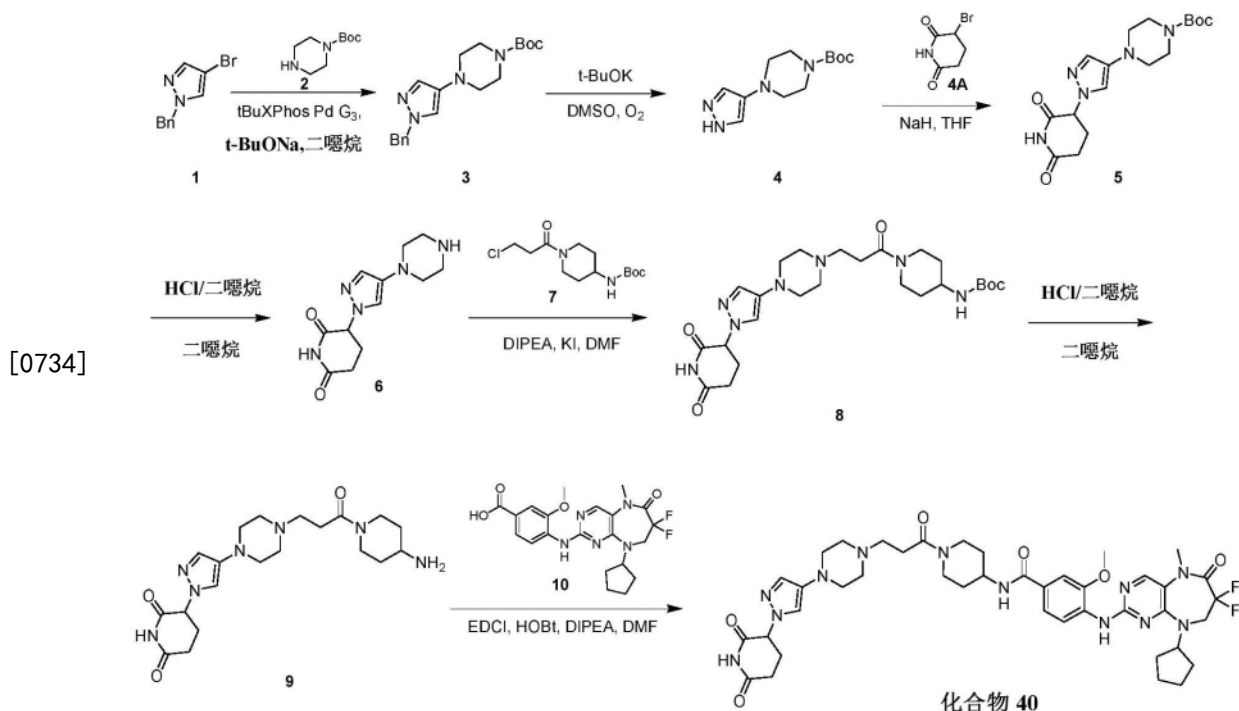
[0729] 将(7-((1-(6-(2,6-二氧代哌啶-3-基)吡啶-3-基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)氨基甲酸苄酯(0.2g,357.34μmol)在TFA(2mL)中的混合物在20℃下搅拌14小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将混合物浓缩,得到3-(5-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(190mg,352.12μmol,收率98.54%,TFA),为红色油状物。MS(M+H)<sup>+</sup>=426.2

[0730] 步骤4. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(6-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-3-基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物39)的合成

[0731] 向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(157.55mg, 352.12 $\mu$ mol)在DMF(5mL)中的溶液中加入HATU(160.66mg, 422.54 $\mu$ mol)和DIPEA(182.04mg, 1.41mmol, 245.33 $\mu$ L),并且将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。加入3-(5-(4-((2-氨基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)甲基)哌啶-1-基)吡啶-2-基)哌啶-2,6-二酮(190mg, 352.12 $\mu$ mol, TFA),并且将所得混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将混合物倒入水(20mL)中,并且用EtOAc(20mL $\times$ 3)萃取,将合并的有机层用(50mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge C18 150 $\times$ 50mm $\times$ 10 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:38%-68%, 10min)纯化,并且通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna C18 150 $\times$ 25mm $\times$ 10 $\mu$ m;流动相:[水(FA)-ACN];B%:14%-44%, 11min)再纯化,并且将洗脱液冻干,得到65mg的粗产物。将粗产物用DMF(2mL)研磨并过滤,将滤饼冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(6-(2,6-二氧化哌啶-3-基)吡啶-3-基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(25.1mg, 26.72 $\mu$ mol, 收率7.59%, 纯度91%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=855.4

[0732] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ =10.78(s, 1H), 8.44(d, J=7.1Hz, 1H), 8.30-8.26(m, 2H), 8.19(d, J=2.6Hz, 1H), 7.97(s, 1H), 7.51-7.47(m, 2H), 7.31(dd, J=2.9, 8.7Hz, 1H), 7.16(d, J=8.6Hz, 1H), 4.82-4.73(m, 1H), 4.45-4.35(m, 1H), 4.05(t, J=14.2Hz, 2H), 3.95(s, 3H), 3.91-3.86(m, 1H), 3.76-3.70(m, 2H), 3.31(s, 3H), 2.73-2.61(m, 4H), 2.29-2.06(m, 10H), 1.99-1.93(m, 2H), 1.86-1.74(m, 6H), 1.72-1.55(m, 9H), 1.25-1.17(m, 2H)。

[0733] 实施例40. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(1-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1H-吡啶-4-基)哌啶-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物40)的合成



[0735] 步骤1. 4-(1-苄基-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(3)的合成

[0736] 将1-苄基-4-溴-1H-吡唑(2g, 8.44mmol)、哌嗪-1-甲酸叔丁酯(3.00g, 13.47mmol, HCl)、tBuXPhos Pd G<sub>3</sub>(600.00mg, 755.31μmol)和t-BuONa(2M, 10.00mL)在二噁烷(40mL)中的混合物脱气并且用N<sub>2</sub>吹扫3次,然后将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于100℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(45%)。过滤反应混合物,将滤液减压浓缩。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(40mL)稀释,并且用EtOAc(80mL×2)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(Biotage; 40g SepaFlash®硅胶快速柱, 0-20%EtOAc:石油醚梯度的洗脱液, 60mL/min)纯化,得到4-(1-苄基-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.9g, 5.55mmol, 收率65.78%),为浅黄色油状物。MS (M+H)<sup>+</sup> = 343.3

[0737] 步骤2. 4-(1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(4)的合成

[0738] 向4-(1-苄基-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(600mg, 1.75mmol)在DMSO(1.5mL)中的溶液中加入t-BuOK(1M, 24.00mL),将混合物在O<sub>2</sub>气氛(15psi)下于20℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的峰(6%)。在0℃下,将反应混合物用NH<sub>4</sub>Cl(25mL)稀释,然后用EtOAc(30mL×2)萃取。将合并的有机层用盐水(20mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤。将滤液减压浓缩。将残余物与另一批次(500mg规模)合并,并且通过快速硅胶层析(Biotage; 40g SepaFlash®硅胶快速柱, 0-10%甲醇:EtOAc梯度的洗脱液, 60mL/min)纯化,得到4-(1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(440mg, 1.74mmol, 收率99.53%),为浅黄色固体。MS (M+H)<sup>+</sup> = 253.1

[0739] 步骤3. 4-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(5)的合成

[0740] 在0℃下,向4-(1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(500mg, 1.98mmol)在THF(8mL)中的溶液中加入NaH(160mg, 4.00mmol, 纯度60%),将混合物在0℃下搅拌0.5小时,然后在0℃下加入3-溴哌啶-2,6-二酮(420mg, 2.19mmol)在THF(6mL)中的溶液,将所得混合物在25

℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。在0℃下,用NH<sub>4</sub>Cl(饱和水溶液,15mL)稀释反应混合物,并且用EtOAc(30mL×2)萃取。将合并的有机层用盐水60mL(20mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(Biotage;20g **SepaFlash**®硅胶快速柱,0-10%甲醇:EtOAc梯度的洗脱液,60mL/min)纯化,得到4-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(710mg,1.95mmol,收率98.59%),为灰色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=364.1

[0741] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ10.99(s,1H),7.36(s,1H),7.26(s,1H),5.24-5.15(m,1H),3.47-3.37(m,4H),2.84-2.78(m,4H),2.78-2.71(m,1H),2.66-2.57(m,1H),2.47-2.42(m,1H),2.19-2.11(m,1H),1.45-1.37(m,9H)

[0742] 步骤4. 3-(4-(哌嗪-1-基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-2,6-二酮(6)的合成

[0743] 向4-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(500mg,1.38mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,18.75mL),将混合物在20℃下搅拌小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将反应混合物减压浓缩,得到3-(4-(哌嗪-1-基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-2,6-二酮(410mg,粗品,HCl盐),为浅黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=264.1

[0744] 步骤5. (1-(3-(4-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(8)的合成

[0745] 在25℃下,向3-(4-(哌嗪-1-基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-2,6-二酮(270mg,900.73μmol,HCl)在DMF(8mL)中的溶液中加入KI(94.86mg,571.46μmol)、(1-(3-氯丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(400mg,1.38mmol)和DIPEA(667.80mg,5.17mmol,900μL)。将混合物在80℃下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(41%)。将反应混合物用H<sub>2</sub>O(10mL)稀释,并且用EtOAc(40mL×2)萃取。将合并的有机层用盐水(30mL×3)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤。将滤液减压浓缩。将残余物通过快速硅胶层析(Biotage;20g **SepaFlash**®硅胶快速柱,5%-25%甲醇:DCM梯度的洗脱液,60mL/min)纯化,得到(1-(3-(4-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(200mg,386.38μmol,收率42.90%),为浅黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=518.3

[0746] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ11.00(s,1H),7.31(s,1H),7.24-7.18(m,1H),6.93-6.78(m,1H),5.25-5.13(m,1H),4.27-4.19(m,1H),3.88-3.79(m,1H),3.48-3.41(m,1H),3.37-3.26(m,4H),3.09-3.01(m,1H),2.88-2.80(m,4H),2.79-2.72(m,1H),2.68-2.54(m,5H),2.20-2.11(m,1H),1.78-1.66(m,2H),1.38(s,9H),1.30-1.15(m,4H)。

[0747] 步骤6. 3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-2,6-二酮(9)的合成

[0748] 向(1-(3-(4-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(180mg,347.75μmol)在二噁烷(10mL)中的溶液中加入HCl/二噁烷(4M,10mL),将混合物在20℃下搅拌2小时。LCMS显示具有期望质量的主峰。将反应混合物减压浓缩,得到3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-2,6-二酮(120mg,粗品,HCl盐),为浅黄色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=418.2

[0749] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ11.23-11.09(m,1H),11.03(s,1H),8.43-8.29(s,3H),7.47(s,1H),7.33(s,1H),5.30-5.17(m,1H),4.41-4.32(m,1H),4.02-3.90(m,1H),3.63-3.58(m,1H),3.47-3.40(m,2H),3.36-3.25(m,3H),3.20-3.09(m,3H),3.04-2.93(m,4H),

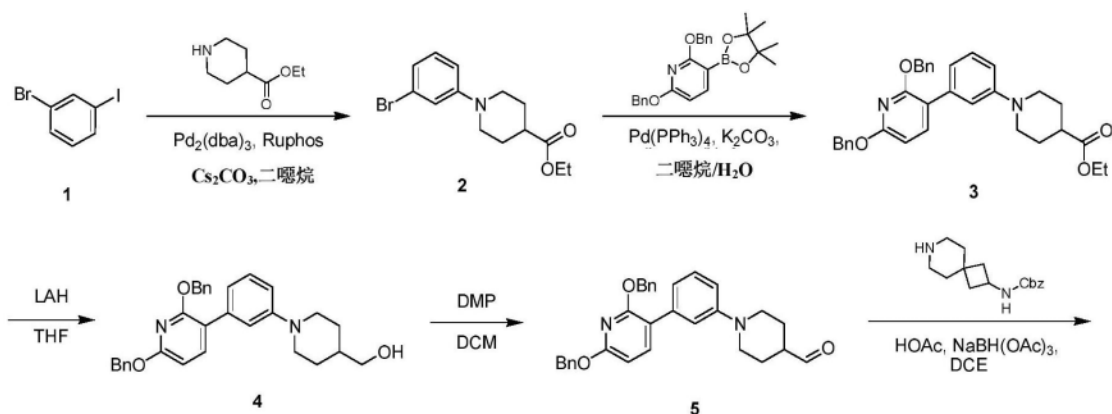
2.81-2.60(m, 3H), 2.23-2.14(m, 1H), 2.00-1.91(m, 2H), 1.54-1.37(m, 2H), 1.32-1.25(m, 2H)

[0750] 步骤7. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(1-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物40)的合成

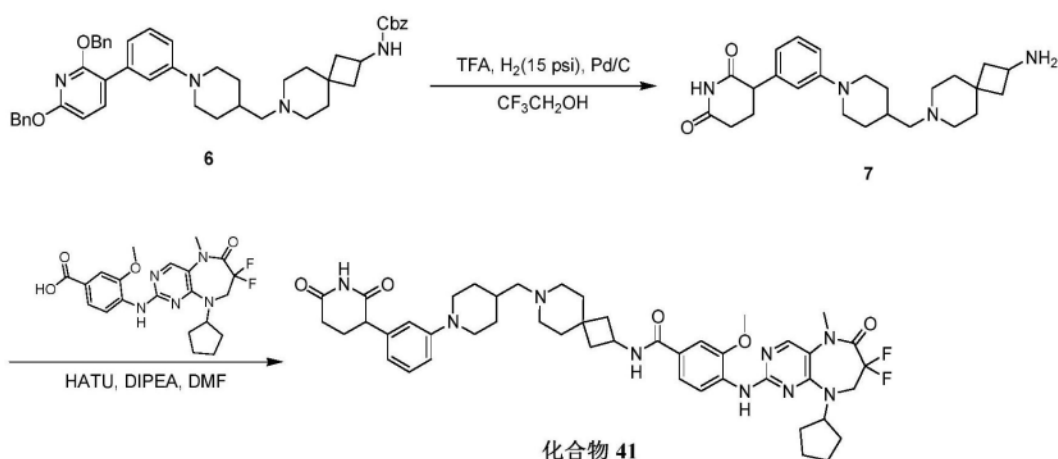
[0751] 在25°C下,向4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酸(60mg, 134.10 $\mu$ mol)在DMF(3mL)中的溶液中加入EDCI(60mg, 312.99 $\mu$ mol)、HOBt(30mg, 222.02 $\mu$ mol)、DIPEA(148.40mg, 1.15mmol, 200 $\mu$ L)和3-(4-(4-(3-(4-氨基哌啶-1-基)-3-氧代丙基)哌嗪-1-基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-2,6-二酮(80mg, 163.12 $\mu$ mol, HCl盐)。将混合物在N<sub>2</sub>气氛下于25°C下搅拌16小时。LCMS显示具有期望质量的峰(85%)。将混合物过滤,并且将滤液通过制备型HPLC(柱: Phenomenex Synergi Polar-RP 100 $\times$ 25mm $\times$ 4 $\mu$ m;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:28%-48%,7min;柱温:30°C)、然后通过制备型HPLC(柱:Waters Xbridge 150 $\times$ 25mm $\times$ 5 $\mu$ m;流动相:[水(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:29%-59%,9min;柱温:30°C)纯化,将洗脱液冻干,得到4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(3-(4-(1-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1H-吡唑-4-基)哌嗪-1-基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(75.5mg, 88.25 $\mu$ mol, 收率65.81%, 纯度99%),为白色固体。MS(M+H)<sup>+</sup>=847.4

[0752] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ =11.00(s, 1H), 8.35-8.24(m, 2H), 8.19-8.08(m, 1H), 7.97(s, 1H), 7.52-7.44(m, 2H), 7.32(s, 1H), 7.23(s, 1H), 5.24-5.14(m, 1H), 4.83-4.71(m, 1H), 4.46-4.35(m, 1H), 4.10-3.96(m, 4H), 3.94(s, 3H), 3.30(s, 3H), 3.17-3.09(m, 1H), 2.90-2.83(m, 4H), 2.78-2.56(m, 10H), 2.22-2.14(m, 1H), 2.00-1.78(m, 5H), 1.77-1.69(m, 2H), 1.68-1.53(m, 5H), 1.52-1.38(m, 2H)。

[0753] 实施例41. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(7-((1-(3-(2,6-二氧化哌啶-3-基)苯基)哌啶-4-基)甲基)-7-氮杂螺[3.5]壬-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物41)的合成



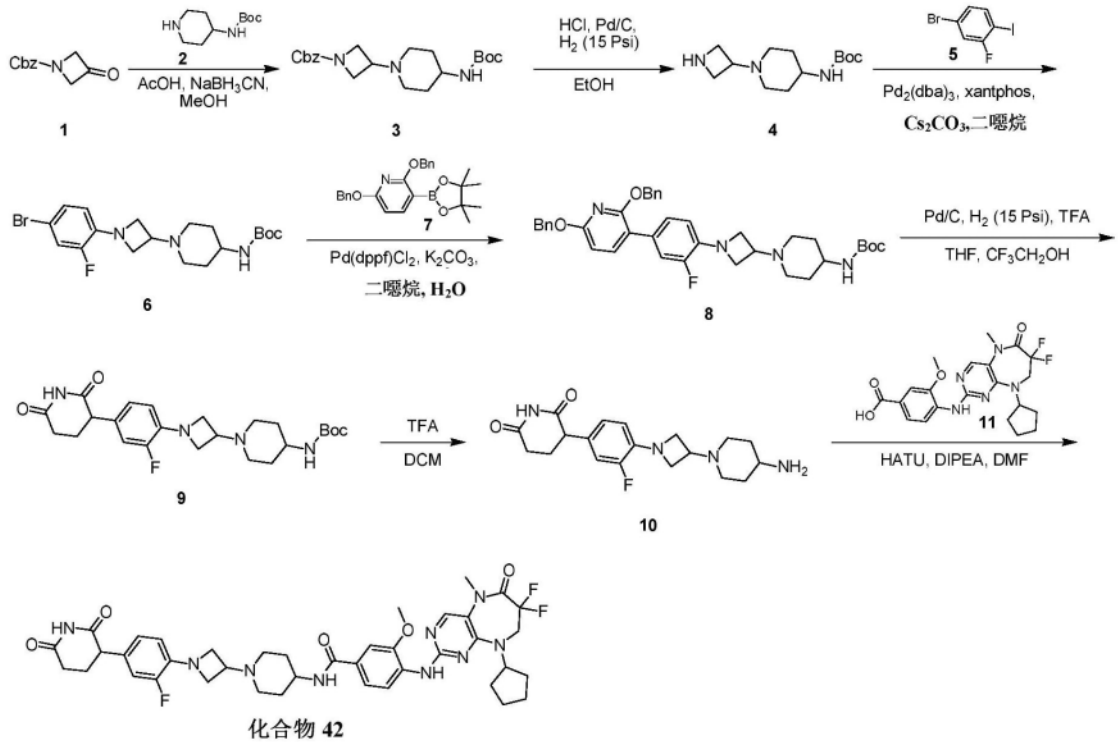
[0754]



[0755] 通过与前述实施例中描述的方法类似的方案中描述的方法合成化合物41。

[0756] MS(M+H)<sup>+</sup>=854.0, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.79 (s, 1H), 8.43 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.30-8.25 (m, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.52-7.46 (m, 2H), 7.14 (t, J=7.9Hz, 1H), 6.84-6.76 (m, 2H), 6.58 (d, J=7.2Hz, 1H), 4.83-4.70 (m, 1H), 4.46-4.34 (m, 1H), 4.05 (br t, J=14.3Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.76 (dd, J=4.7, 11.3Hz, 1H), 3.66 (d, J=10.9Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.69-2.61 (m, 4H), 2.38-2.28 (m, 3H), 2.21-2.10 (m, 5H), 2.06-1.87 (m, 4H), 1.85-1.69 (m, 6H), 1.67-1.51 (m, 9H), 1.24-1.11 (m, 2H) .

[0757] 实施例42. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(1-(1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)氮杂环丁-3-基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物42)的合成

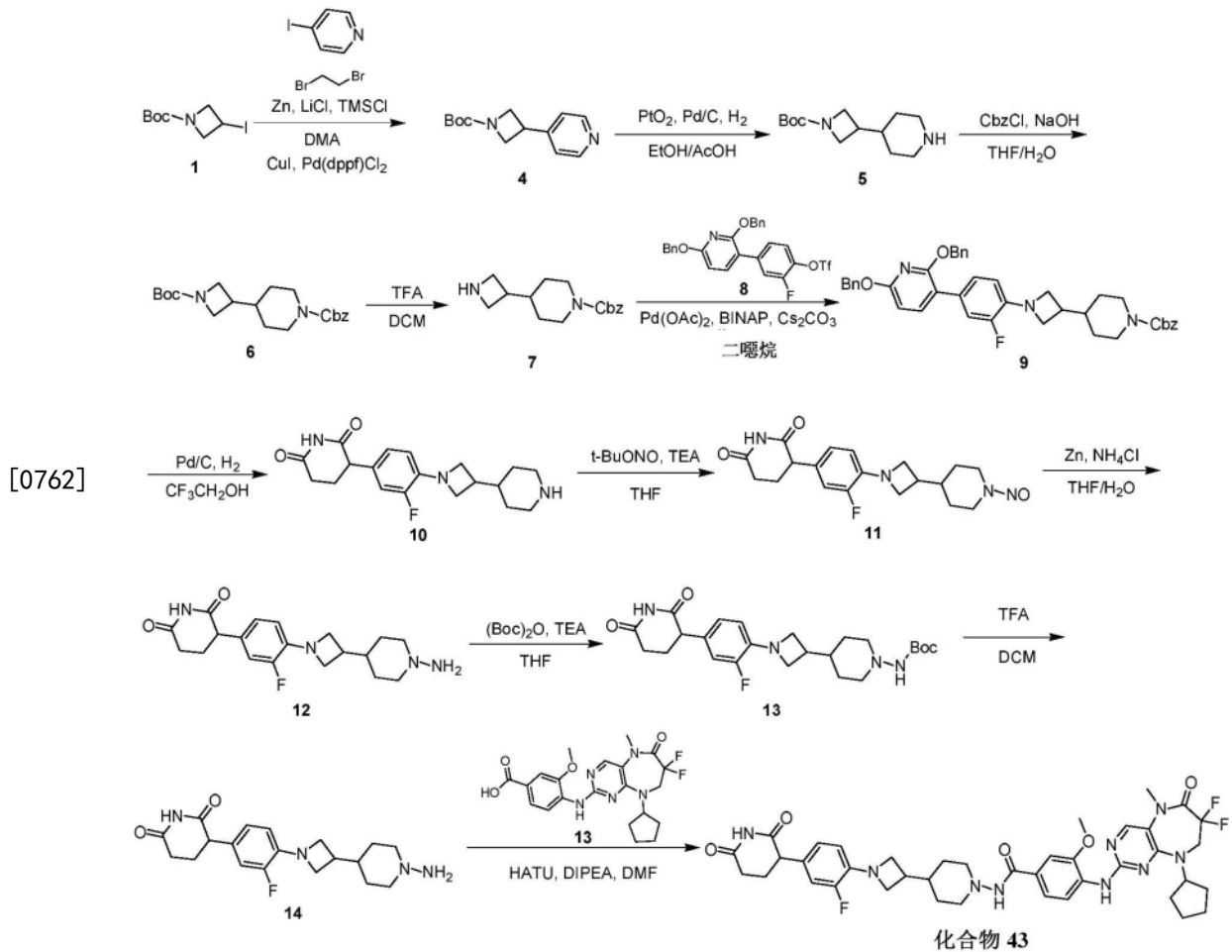


[0758]

[0759] 通过与前述实施例中描述的方法类似的方案中描述的方法合成化合物42。

[0760] MS (M+H)<sup>+</sup> = 790.9, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.48 (d, J = 8.4Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.00-7.95 (m, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.44-7.42 (m, 1H), 7.26-7.22 (m, 1H), 6.86-6.79 (m, 2H), 6.47 (t, J = 8.9Hz, 1H), 5.96 (br d, J = 7.9Hz, 1H), 4.87-4.77 (m, 1H), 4.15-4.03 (m, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.94-3.80 (m, 4H), 3.68 (dd, J = 4.9, 9.8Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.37-3.30 (m, 1H), 2.93-2.85 (m, 2H), 2.78-2.58 (m, 2H), 2.30-2.05 (m, 8H), 1.84-1.68 (m, 8H).

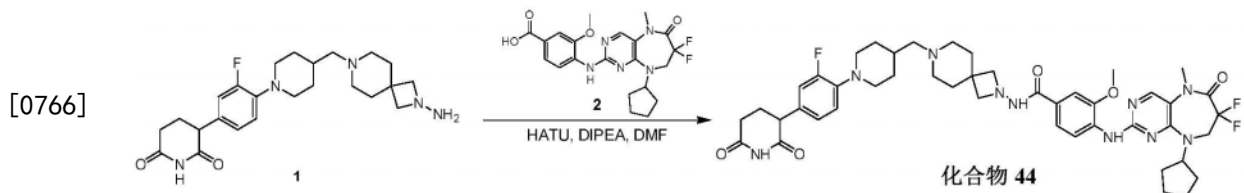
[0761] 实施例43. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(4-(1-(4-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-2-氟苯基)氮杂环丁-3-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物43)的合成



[0763] 通过与前述实施例中描述的方法类似的方案中描述的方法合成化合物43。

[0764] MS(M+H)<sup>+</sup>=790.9, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.78 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.31-8.22 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.46-7.38 (m, 2H), 6.97-6.82 (m, 2H), 6.49 (t, J=9.0Hz, 1H), 4.82-4.70 (m, 1H), 4.04 (br t, J=14.1Hz, 2H), 3.97 (br t, J=6.7Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.74 (dd, J=4.9, 11.5Hz, 1H), 3.66-3.56 (m, 2H), 3.32 (br s, 3H), 3.02 (br d, J=10.3Hz, 2H), 2.76 (br t, J=10.3Hz, 2H), 2.67-2.59 (m, 1H), 2.49-2.42 (m, 2H), 2.23-2.10 (m, 1H), 2.03-1.87 (m, 3H), 1.70 (br d, J=9.4Hz, 4H), 1.65-1.54 (m, 4H), 1.53-1.44 (m, 1H), 1.29-1.19 (m, 2H).

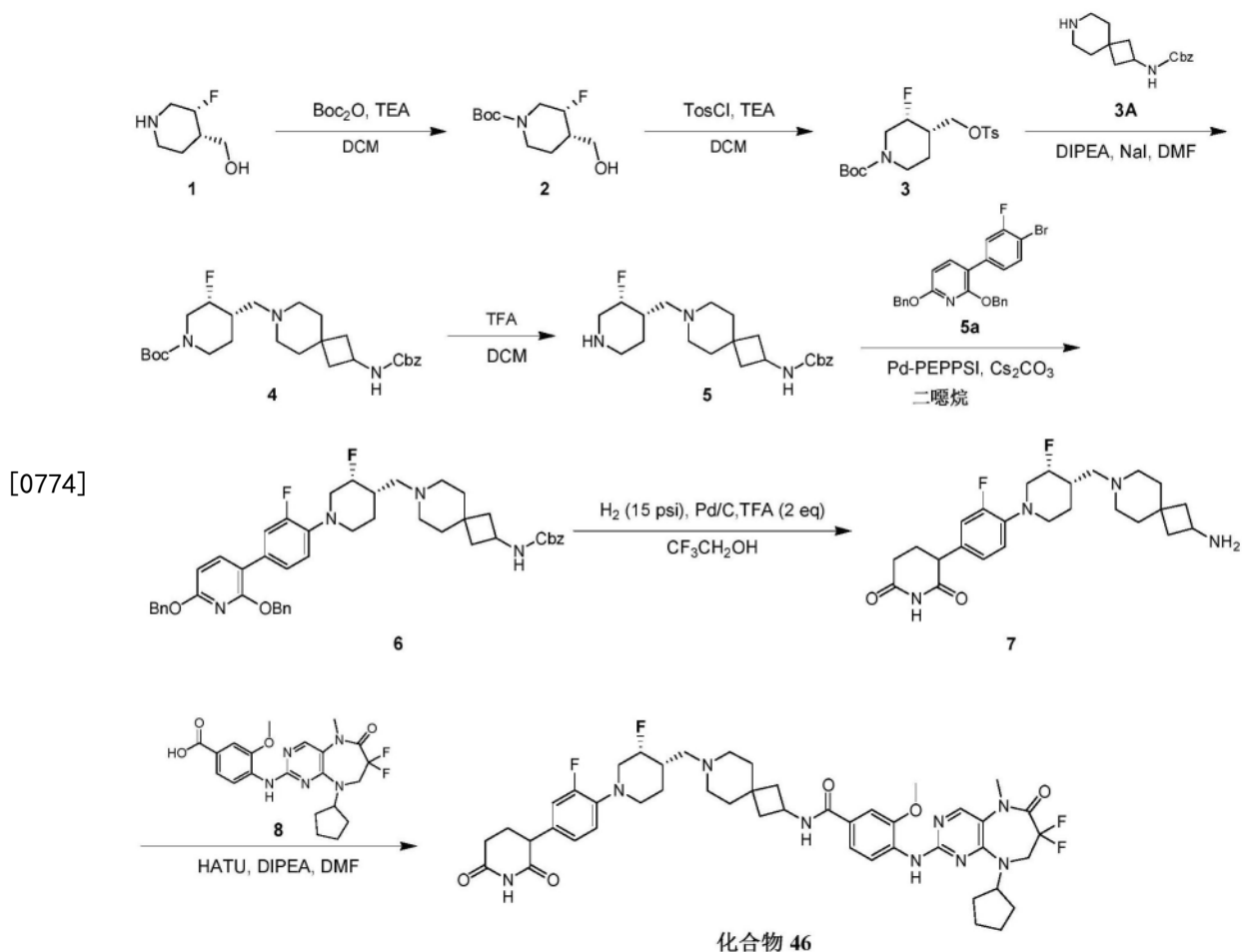
[0765] 实施例44. 4-((9-环戊基-7,7-二氟-5-甲基-6-氧代-6,7,8,9-四氢-5H-嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂<sup>草</sup>-2-基)氨基)-N-(4-(1-(4-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-2-氟苯基)氮杂环丁-3-基)哌啶-1-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(化合物44)的合成



[0767] 通过与前述实施例中描述的方法类似的方案中描述的方法合成化合物44。

[0768] MS(M+H)<sup>+</sup>=873.0, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ=10.81 (br s, 1H), 9.65-9.46 (m, 1H), 8.38-8.17 (m, 2H), 8.08-7.90 (m, 1H), 7.50-7.30 (m, 2H), 7.11-6.84 (m, 3H), 4.87-4.67





[0775] 通过与前述实施例中描述的方法类似的方案中描述的方法合成化合物46。

[0776] MS(M+H)<sup>+</sup> = 890.0, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 10.81 (s, 1H), 8.43 (d, J = 7.5Hz, 1H), 8.32-8.23 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.56-7.43 (m, 2H), 7.07-6.89 (m, 3H), 4.92-4.71 (m, 2H), 4.47-4.33 (m, 1H), 4.04 (br t, J = 14.0Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.79 (dd, J = 4.8, 11.7Hz, 1H), 3.67-3.54 (m, 1H), 3.39-3.34 (m, 1H), 3.33 (br s, 3H), 2.96-2.59 (m, 3H), 2.49-2.11 (m, 11H), 2.02-1.90 (m, 3H), 1.85-1.78 (m, 2H), 1.77-1.67 (m, 2H), 1.67-1.50 (m, 10H) .

[0777] <实验例>

[0778] 1. PLK1的蛋白质印迹分析

[0779] (1) HeLa细胞系的培养

[0780] HeLa细胞系购自韩国首尔的韩国细胞系库(Korea Cell Line Bank, KCLB)。细胞培养中的传代维持在P115至P125。

[0781] 对于细胞计数,使用细胞计数器(Thermo Fisher Scientific Inc., 目录号AMQAX1000)和0.4%台盼蓝溶液。

[0782] 对于细胞培养,使用DMEM(Gibco, 目录号1195-65; 批号2085318), FBS(Gibco, 目录号16000-044; 批号2097593), 青霉素/链霉素(PS)(Gibco, 目录号15140-122; 批号2058855), 100mm<sup>2</sup>细胞培养皿(SPL, 目录号20100), 150mm<sup>2</sup>细胞培养皿(SPL, 目录号20150), 12孔培养板(SPL, 目录号30012), PBS pH 7.4(Gibco, 目录号10010-023; 批号2085080), TrypLE™ Express(Gibco, 目录号12605-010; 批号2070638), 计数室(血细胞计数器(Hemocytometer))(Hirschmann, 目录号8100204), 以及0.4%台盼蓝溶液(DYNEBIO, 目录

号CBT3710;批号20190723)。

[0783] (2) 本公开的化合物的处理

[0784] 在12孔板(SPL)的每个孔中接种 $2 \times 10^5$ 个细胞,并且在培养基中培养细胞,总体积为2mL。

[0785] 将实施例的化合物完全溶于DMSO并且用于实验,并且将胸苷完全溶于DW并且用于实验。对于胸苷阻断,将产物用2mM的胸苷(Sigma-Aldrich,目录号T9250-5G)处理,然后温育24小时。

[0786] 对于释放和化学处理,吸出培养基并且用 $1 \times$  PBS洗涤3次。加入完全培养基,然后在CO<sub>2</sub>培养箱中温育4小时。将每种化合物从 $3 \mu\text{M}$ 的最高浓度3倍稀释至最低浓度,然后再温育6小时。

[0787] (3) 蛋白质印迹

[0788] 对于SDS-PAGE和蛋白质印迹,使用1X RIPA裂解缓冲液(Rockland,目录号MB-030-0050;批号39751),100X蛋白酶抑制剂混合物(Quartett,目录号PPI1015;批号PC050038424),Pierce™BCA蛋白测定试剂盒(ThermoScientific,目录号23225;批号UC276876),白蛋白标准品(ThermoScientific,目录号23209;批号UB269561),4%-15% Mini-PROTEAN TGX无染色凝胶(Bio-rad,目录号4568085;批号L007041B),10X Tris/甘氨酸/SDS缓冲液(Bio-rad,目录号1610732;批号10000044375B);10X TBS(Bio-rad,目录号1706435;批号1000045140B),10% Tween 20(目录号1610781;批号L004152B),彩色蛋白标准宽范围(NEB,目录号P7719S;批号10040349),4X Laemmler样品缓冲液(Bio-rad,目录号1610747;批号L004133B), $\beta$ -巯基乙醇(Sigma-Aldrich,目录号M3148;批号60-24-2),SuperBlock™T20(TBS)封闭缓冲液(ThermoScientific,目录号37536;批号UC282578),1M叠氮化钠溶液(Sigma-Aldrich,目录号08591-1mL-F;批号BCBV4989), $\alpha$ -兔pAb抗Ms IgG(abcam,目录号ab97046;批号GR3252115-1), $\alpha$ -山羊pAb抗Rb IgG(CST,目录号7074S;批号28), $\alpha$ -GAPDH(abcam,目录号ab8245;批号GR3275542-2), $\alpha$ -PLK1(CST,目录号208G4), $\alpha$ -BRD4(CST,目录号13440S),ECL™Prime蛋白质印迹试剂(GE Healthcare,目录号RPN2232;批号17001655),丽春红S溶液(Sigma-Aldrich,目录号P7170;批号SLBV4112),Difco™脱脂牛奶(BD,目录号232100;批号8346795),和iBlot® 2NC常规堆(Regular stacks)(Invitrogen,目录号IB23001;批号2NR110619-02)。

[0789] 对于细胞收获,首先使用胰蛋白酶从板分离细胞,然后用培养基和PBS洗涤。具体地,吸出培养基并且用1mL的PBS洗涤,并且吸出PBS。将细胞用0.5mL TrypLE™Express在37℃处理分钟以分离细胞,然后加入0.5mL的完全培养基以收集1mL的细胞培养液。然后,将1mL的细胞收集液以8,000rpm离心120秒,并且除去上清液。在用0.2mL的PBS洗涤后,除去PBS。

[0790] 对于细胞裂解,加入裂解缓冲液并且除去细胞碎片以获得细胞裂解物。具体地,用70 $\mu\text{L}$ 的含有蛋白酶抑制剂的1X RIPA缓冲液处理细胞并且在冰上温育30分钟。然后,将细胞在4℃、5,000rpm下离心10分钟以获得细胞裂解物。

[0791] 然后,使用BCA测定获得标准曲线,并且通过代入曲线方程定量裂解物中的蛋白质质量。使用20 $\mu\text{L}$ 的标准或样品溶液和200 $\mu\text{L}$ 的BCA或Bradford溶液将混合物在37℃下温育30分钟,并且在562nm下测量吸光度。通过加入4X样品缓冲液制备样品,使得加入到每个孔中

的蛋白质的量为15 $\mu$ g。

[0792] 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 通过在120V下在4-15%Mini-PROTEAN TGX无染色凝胶 (15孔) 上设置100分钟的运行时间来进行。在干印迹系统的P0模式下在iBlot®2NC Mini堆上进行转移。用丽春红S溶液染色后,用封闭缓冲液 (Thermo) 封闭1小时。用含有0.05%Tween 20的1X TBS洗涤后,产物在4°C下与作为一抗的1X TBS-T中的抗PLK1 (CST) 抗体 (1:500)、抗BRD4 (细胞信号传导) 抗体 (1:1000) 或抗GAPDH (abcam) 抗体 (1:10,000) 反应16小时。用含0.05%Tween 20的1XTBS洗涤3次 (10分钟) 后,产物在室温下与作为二抗的1X TBS-T中的抗小鼠抗体 (abcam) (1:10000) 或抗兔抗体 (CST) (1:5000) 反应1小时。然后,用含有0.05%Tween 20的1X TBS洗涤三次 (10分钟) 后,用ECL工作溶液 (1:1) 检测产物。

[0793] 为了分析结果,使用图像分析仪 (GE) 获得最终印迹数据。结果证实,本发明的所有化合物均显著降解PLK1蛋白。

## [0794] 2. 针对PLK1的荧光素酶测定

[0795] (1) HeLa LgBit (Plk1-HiBit KI) 细胞系的制备和培养

[0796] 制备其中LgBit载体被转染并稳定表达的HeLa细胞系。然后,在构建gRNA和供体以在细胞中固有的Plk1基因的C末端后表HiBit氨基酸序列后,将其与能够表达CRISPR/Cas9的载体一起插入细胞中。仅选择、传代培养和使用完成插入和敲入的细胞。

[0797] 对于细胞培养,使用DMEM (Gibco, 目录号11995-065; 批号2467189), FBS (Gibco, 目录号16000-044; 批号2420173P), 青霉素/链霉素 (PS) (Gibco, 目录号15140-122; 批号2321114), 100mm<sup>2</sup>细胞培养皿 (SPL, 目录号20100), 150mm<sup>2</sup>细胞培养皿 (SPL, 目录号20150), 96孔培养板 (SPL, 目录号30196), PBS pH 7.4 (Gibco, 目录号10010-023; 批号2085080), TrypLE™ Express (Gibco, 目录号12605-010; 批号2323417), 计数室 (血细胞计数器 (Hemocytometer) (Marienfeld Superior, 目录号0650010) 和0.4%台盼蓝溶液 (DYNEBIO, 目录号CBT3710; 批号20211201)。

[0798] (2) 本发明的化合物的处理和荧光素酶测定的方法

[0799] 将实施例的化合物完全溶于DMSO (Sigma-Aldrich, 目录号D2438, 批号RNBJS66), 并且在实验中使用。

[0800] 在HeLa LgBit (Plk1-HiBit KI) 的情况下,在胸苷阻断后释放后处理化合物,并且方法如下。胸苷 (Sigma-Aldrich, 目录号T9250-5G) 完全溶解在DW中,并且用于实验。对于胸苷阻断,用2mM的胸苷处理产物,然后温育24小时。对于释放和化学处理,吸出培养基并且用1 $\times$ PBS洗涤。加入TrypLE™并且在37°C CO<sub>2</sub>培养箱中温育5分钟。通过加入完全培养基中和的细胞通过计数器计数。对于96孔培养板 (SPL) 的每个孔,接种 $3.3 \times 10^4$ 个细胞和150 $\mu$ L的总培养基体积并且在CO<sub>2</sub>培养箱中温育。

[0801] 将每种细胞系在CO<sub>2</sub>培养箱中温育18小时,并且将Endurazine加入到每个孔中以补足总体积的4%。在96孔白色板 (SPL) 中加入本发明的化合物至浓度为300nM后,将读板仪 (BMG Labtech, CLARIOstar Plus) 的波长设定为470-480nM,然后实时跟踪发光。9小时后,获得发光值,并且通过Excel程序显示为条形图。

[0802] 结果如下表2和图1所示。

[0803] 表2

	示例性化合物	活性
[0804]	化合物 1	++
	化合物 2	++
	化合物 3	++
	化合物 4	+++
	化合物 5	++
[0805]	化合物 6	++
	化合物 7	+++
	化合物 8	+++
	化合物 10	+++
	化合物 11	+++
	化合物 12	+++
	化合物 13	++
	化合物 14	++
	化合物 15	+++
	化合物 16	+++
	化合物 17	+++
	化合物 18	++
	化合物 19	+++
	化合物 20	+++
	化合物 21	+++
	化合物 22	+++
	化合物 23	+++
	化合物 24	+++
	化合物 25	+++
	化合物 26	++
	化合物 27	++
	化合物 32	++
	化合物 33	+
	化合物 34	++
化合物 35	++	
化合物 36	++	
化合物 37	++	
化合物 39	++	
化合物 41	++	

[0806]	化合物 42	+++
	化合物 43	++
	化合物 44	++
	化合物 45	++
	化合物 46	+++

[0807] 在表2中,活性表示各示例性化合物处理组与DMSO处理组的发光值的比率(+++: < 0.3, ++ < 0.6, + < 0.7)。

### [0808] 3.H526细胞系的细胞活力测定

#### [0809] (1)NCI-H526细胞系的培养

[0810] NCI-H526(下文称为H526)细胞系购自韩国细胞系库(KCLB,韩国,首尔)。对于细胞培养,使用RPMI 1640(Gibco,目录号22400-089;批号2277021),FBS(Gibco,目录号16000-044;批号2351176P),青霉素/链霉素(PS)(Gibco,目录号15140-122;批号2321114),75T细胞培养瓶(SPL,目录号71075),175T细胞培养瓶(SPL,目录号71175),96孔细胞培养板(SPL,目录号30096),PBS pH 7.4(Gibco,目录号10010-023;批号2085080),TrypLE™ Express(Gibco,目录号12605-010;批号2323417),计数室(血细胞计数器(Hematocytometer))(Marienfeld Superior,目录号0650010),0.4%台盼蓝溶液(DYNEBIO,目录号CBT3710;批号20211201)。

#### [0811] (2)本发明的化合物的处理和细胞活力测定法

[0812] 将实施例的化合物完全溶于DMSO(Sigma-AldrichCat,目录号D2440,批号RNB566),并且在实验中使用。

[0813] 在96孔板(SPL)的每个孔中接种 $3 \times 10^4$ 个细胞,并且以150 $\mu$ L的总体积培养细胞。

[0814] 将每种化合物从3000nM的最高浓度3倍稀释至0.46nM的最低浓度。在将化合物处理至各孔以使总体积为200 $\mu$ L后,将其在CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo Fisher Science,目录号4111)中培养5天。

[0815] 然后,在处理EZ-Cytox(DOGEN,目录号EZ-3000,批号DLS2109)(每孔20 $\mu$ L)后,在CO<sub>2</sub>培养箱中培养4小时。通过将读板器(BMG Labtech,CLARIOstarPlus)的波长设定为450nm来测量完全培养的样品的吸光度,并且在测量前在读板器中振荡3分钟后进行测量。用Excel程序整理最终测量值,通过Prism-GraphPad程序显示图表,并且测量IC<sub>50</sub>值。

[0816] 结果示于下表3中。

#### [0817] H526细胞系的细胞活力测定

[0818] 表3

[0819]

示例性化合物	活性
化合物 1	B
化合物 2	B
化合物 3	C
化合物 4	B
化合物 5	A
化合物 6	A
化合物 7	A
化合物 8	A
化合物 10	B
化合物 11	A
化合物 12	A
化合物 13	B
化合物 14	C
化合物 15	A
化合物 16	A
化合物 17	D
化合物 18	A
化合物 19	A
化合物 20	B
化合物 21	B
化合物 22	A
化合物 23	A
化合物 24	B
化合物 25	A

[0820]	化合物 26	B
	化合物 27	A
	化合物 32	A
	化合物 33	A
	化合物 34	A
	化合物 35	B
	化合物 36	A
	化合物 37	B
	化合物 39	A
	化合物 41	A
	化合物 42	A
	化合物 43	B
	化合物 44	A
	化合物 45	A

[0821] 在表3中,活性表示各示例性化合物处理组对H526细胞系的IC<sub>50</sub>指值(A:<30nM,B:<50nM,C:<100nM,D:<200nM,E:<400nM)。

[0822] 4.MRC-5细胞系的细胞活力测定

[0823] (1)MRC-5细胞系的培养

[0824] MRC-5细胞系购自韩国首尔的韩国细胞系库(KCLB)。培养细胞的传代保持在P15内。

[0825] 对于细胞培养,使用MEM/EBSS(Hyclone,目录号SH30024.01;批号AG29697698),FBS(Gibco,目录号16000-044;批号2234018P),青霉素/链霉素(PS)(Gibco,目录号15140-122;批号2211099),175T细胞培养瓶(SPL,目录号71175),96孔细胞培养板(SPL,目录号30096),PBS pH 7.4(Gibco,目录号10010-023;批号2085080),TrypLE™ Express(Gibco,目录号12605-010;批号2070638),计数室(血细胞计数器(Hematocytometer))(Hirschmann,目录号8100204),以及0.4%台盼蓝溶液(DYNEBIO,目录号CBT3710;批号20190723)。

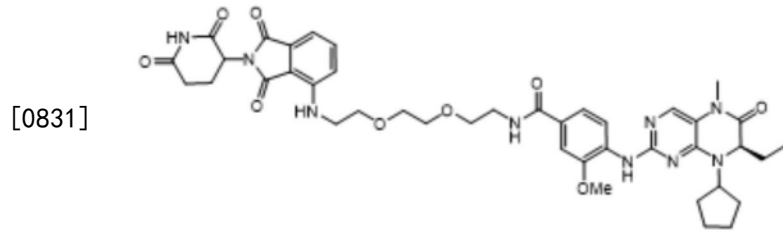
[0826] (2)本发明的化合物的处理

[0827] 使用TrypLE™ Express分离在175T细胞培养瓶中培养的MRC-5细胞系。在96孔板(SPL)的每个孔中接种 $6 \times 10^3$ 个细胞,并且以150 $\mu$ L的总体积培养细胞。

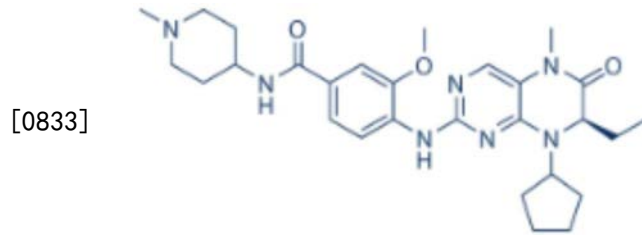
[0828] 将实施例的化合物完全溶解在DMSO(sigma-aldrich,目录号D2438-50ML,批号RNBK6387)中,并且在实验中使用。将每种化合物从10000nM的最高浓度3倍稀释至1.52nM的最低浓度。将各孔与培养基混合并处理,并且将体积设定为50 $\mu$ L,使得各孔的总体积为200 $\mu$ L。然后,将其在37°C CO<sub>2</sub>培养箱(thermofisher science,目录号4111,批号300512709)中培养5天。

[0829] 使用以下化合物作为比较例,并且以与实施例的化合物相同的方式进行细胞活力测定。

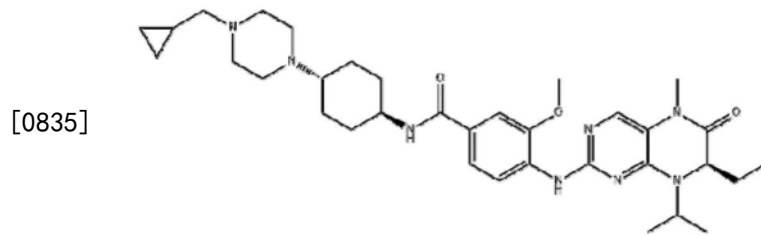
[0830] 比较例1.Mu等人BBRC,2020,521(4):833中描述的示例性化合物(比较化合物1)



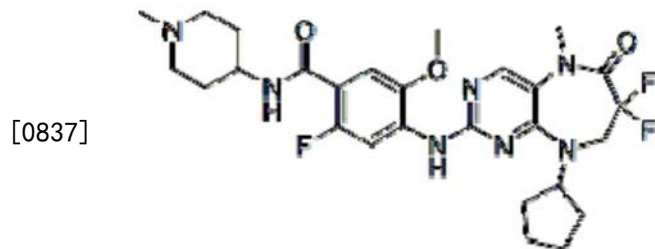
[0832] 比较例2.BI2536(比较化合物2)



[0834] 比较例3.Volasertib(比较化合物3)



[0836] 比较例4.TAK960(比较化合物4)



[0838] (3) 细胞毒性实验

[0839] 在处理EZ-Cytox(DOGEN,目录号EZ-3000,批号DLS2112)(完全培养板的每孔20 $\mu$ L)后,将其37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub>培养箱中培养4小时。将96孔板置于读板器(BMG Labtech,Clariostar Plus)中,混合2分钟,并且在450nm波长下测量吸光度。使用Prism(ver.9)程序将数据转化成图表。

[0840] 结果示于下表4和表5中。

[0841] MRC-5细胞系的细胞活力测定

[0842] 表4

[0843]

示例性化合物	活性
化合物 1	25557
化合物 2	N.D.
化合物 3	N.D.
化合物 4	N.D.
化合物 5	N.D.
化合物 6	N.D.
化合物 7	N.D.
化合物 8	N.D.
化合物 10	N.D.
化合物 11	N.D.
化合物 12	20028
化合物 13	N.D.
化合物 14	N.D.
化合物 15	N.D.
化合物 16	9119
化合物 19	N.D.

[0844]	化合物 20	N.D.
	化合物 21	N.D.
	化合物 22	N.D.
	化合物 24	N.D.
	化合物 25	N.D.
	化合物 26	5590
	化合物 27	N.D.
	化合物 32	N.D.
	化合物 33	N.D.
	化合物 35	N.D.
	化合物 36	N.D.
	化合物 37	N.D.
	化合物 39	N.D.
	化合物 45	8675

[0845] 在表4中,活性代表各示例性化合物处理组对MRC-5细胞系的IC<sub>50</sub>值(nM)。N.D.(未测定)意指细胞毒性直到10μM才出现。结果证实,本发明的所有化合物在癌细胞系(而不是正常细胞系中)特异性地表现出高水平的细胞毒性。

[0846] MRC-5细胞系的细胞活力测定

[0847] 表5

[0848]	比较化合物	活性
	比较化合物1	106.6
	比较化合物2	3085.4
	比较化合物3	2939.3
	比较化合物4	9152.5

[0849] 在表5中,活性表示各比较化合物处理组对MRC-5细胞系的IC<sub>50</sub>值(nM)。特别地,发现与本发明的示例性化合物不同,比较化合物1(已知的PROTAC化合物)在正常细胞系中表现出高水平的细胞毒性。

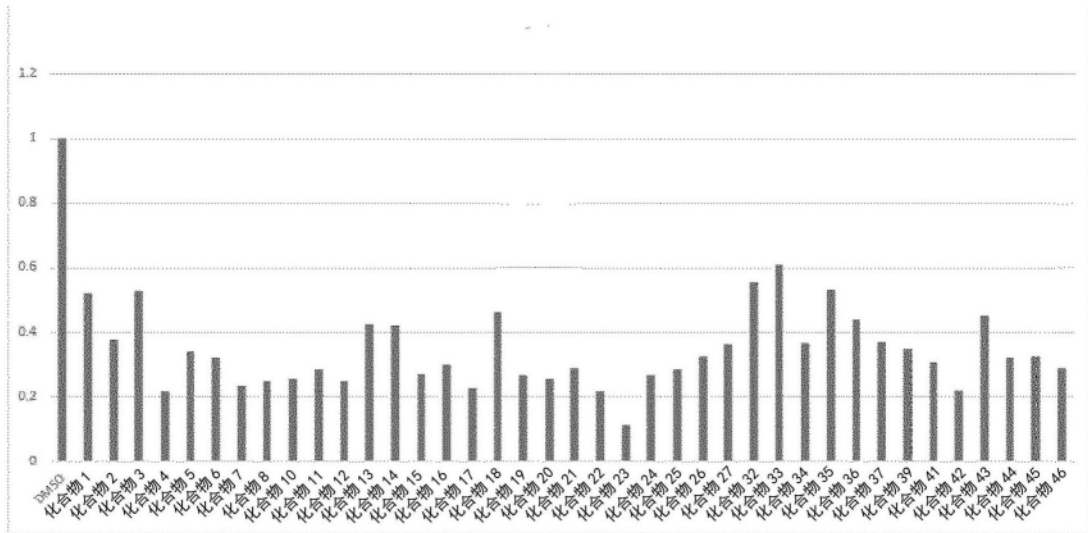


图1