(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113272304 B
(45)授权公告日 2024.03.29

(21)申请号 202080005749.9
(22)申请日 2020.01.22
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113272304 A
(43)申请公布日 2021.08.17
(66)本国优先权数据
201910084801.3 2019.01.29 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2020/073798 2020.01.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/156437 ZH 2020.08.06
(73)专利权人 南京正大天晴制药有限公司
地址 210046 江苏省南京市南京经济技术开发区恒广路99号
(72)发明人 马昌友 田禾 安杰 赵建良 陈东晖 吴舰 徐丹 朱春霞 田舟山
(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
专利代理师 邱俊霞 王庆艳
(51)Int.Cl.
C07D 471/04(2006.01)
C07D 519/00(2006.01)
C07D 475/06(2006.01)
C07D 498/04(2006.01)
A61K 31/519(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 101578273 A,2009.11.11
CN 105051043 A,2015.11.11
CN 109020957 A,2018.12.18
CN 1882347 A,2006.12.20
US 2013065908 A1,2013.03.14
WO 2009089462 A1,2009.07.16
审查员 江笑丹

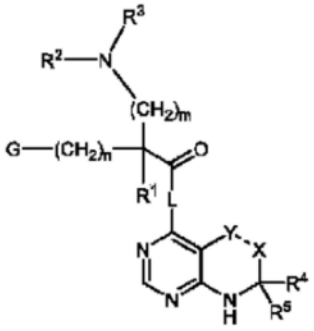
权利要求书9页 说明书83页 附图3页

(54)发明名称

AKT抑制剂

(57)摘要

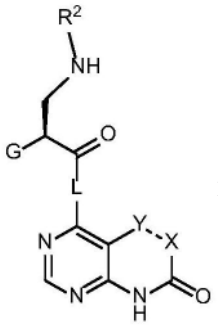
本发明公开了AKT抑制剂,具体地,涉及式I所示的化合物或其药学上可接受的盐。本发明还提供了其制备方法,以及用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病的用途。



I

CN 113272304 B

1.一种化合物或其药学上可接受的盐,其中所述的化合物具有式IV所示结构:

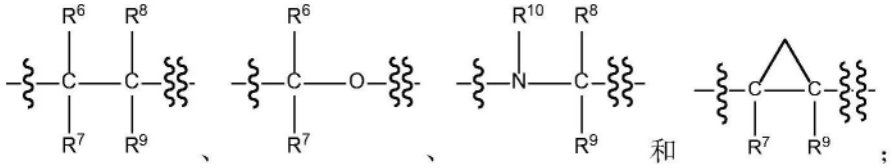


并且其中

IV ,

R^2是C1-C6烷基或C3-C6环烷基;

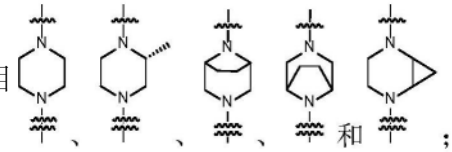
-选自:



;

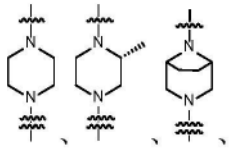
R^6、R^7、R^8、R^9各自独立地为H或C1-C6烷基,其中所述的C1-C6烷基任选地被卤素取代;

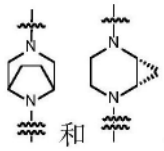
R^{10}为C1-C6烷基;

L选自;

G是任选被1个R^{11}取代的苯基;和

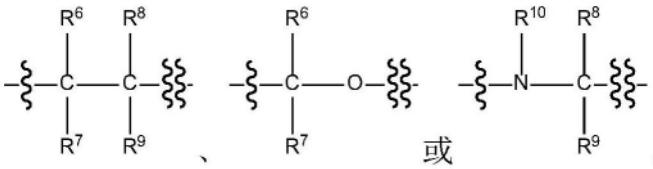
R^{11}为卤素。

2.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,L选自

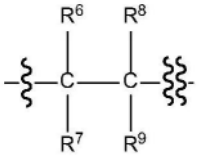
。

3.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^2选自异丙基或环丙基。

4.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中-选自:

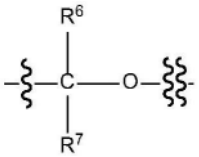
。

5.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中-为



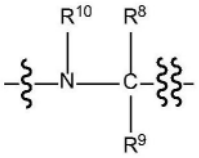
。

6.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中–Y----X–为



。

7.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中–Y----X–为



。

8.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^6为甲基或CF_3。

9.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^7为H。

10.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^8为H。

11.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^9为H。

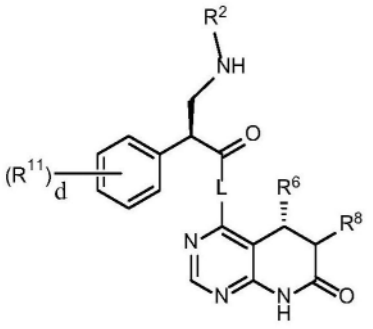
12.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^{10}为甲基或乙基。

13.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^{10}为甲基。

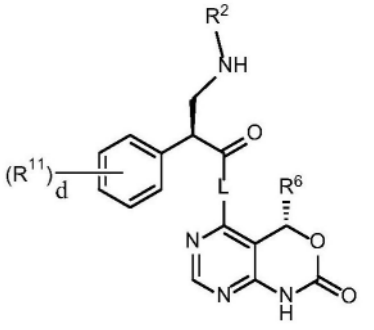
14.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^{11}为Cl。

15.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,G是4-氯苯基。

16.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述的化合物具有式VII或XII所示结构:



VII,

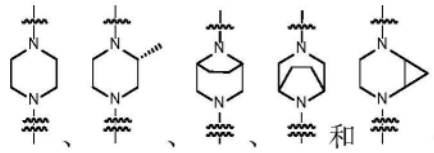


XII,

并且其中

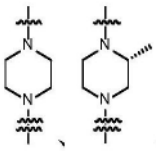
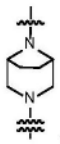
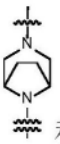
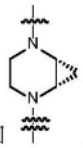
R^2是C1-C6烷基或C3-C6环烷基;

R^6和R^8各自独立地为H或C1-C6烷基,其中所述的C1-C6烷基任选地被卤素取代;

L选自;

R^{11}为卤素;和

d为1。

17.根据权利要求16所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,L选自、、、和。

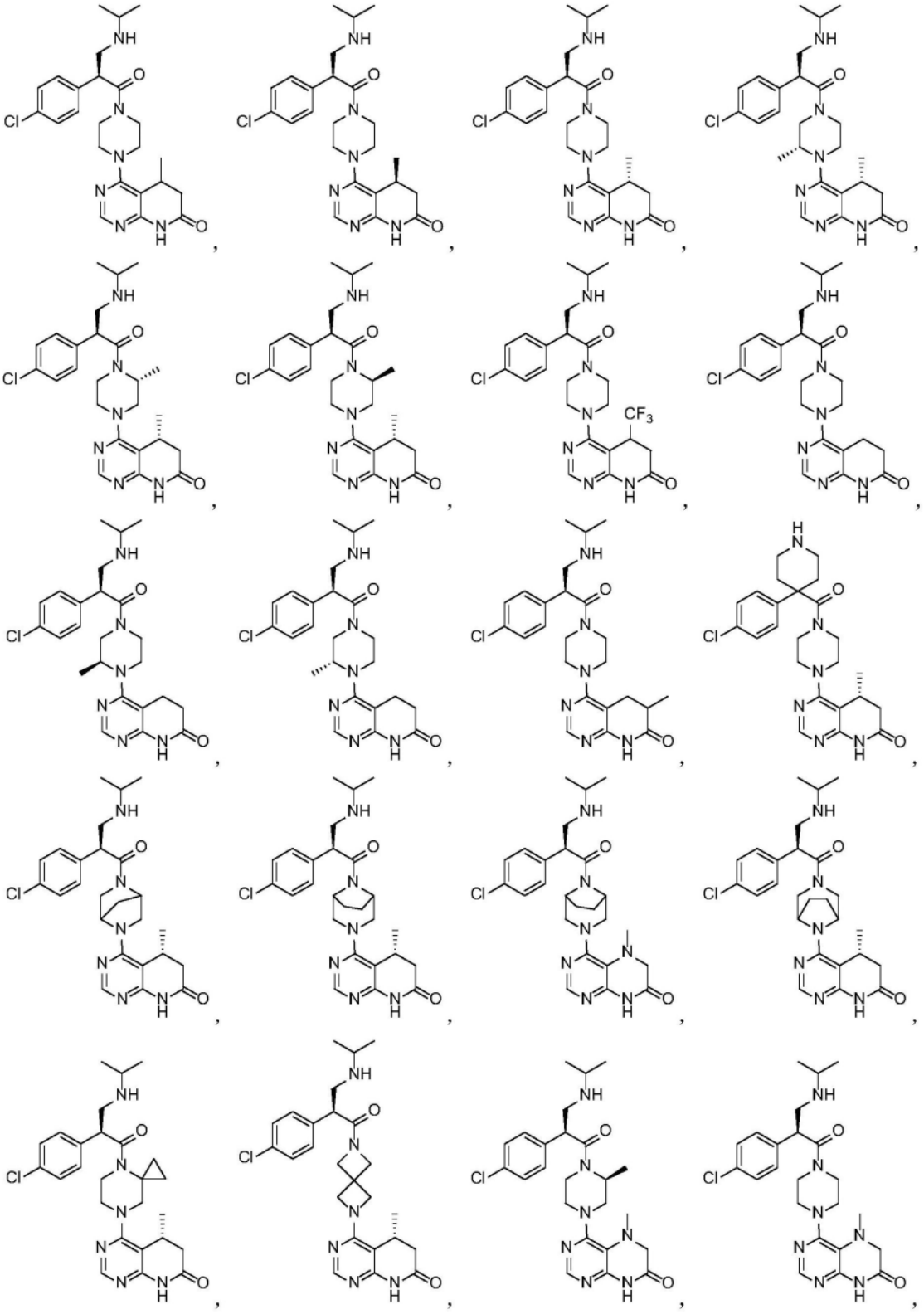
18.根据权利要求16所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^2选自异丙基或环丙基。

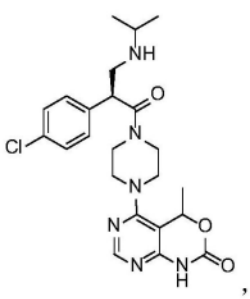
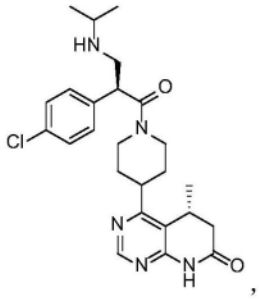
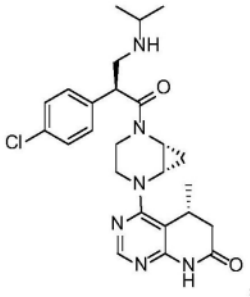
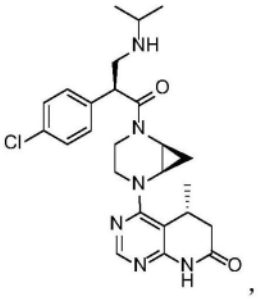
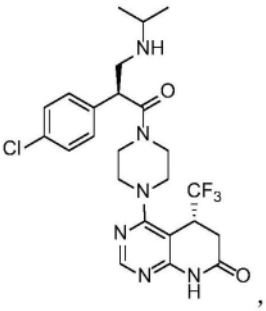
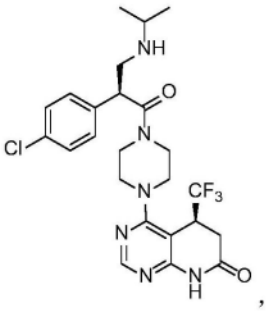
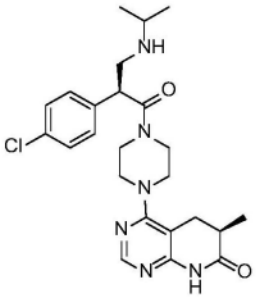
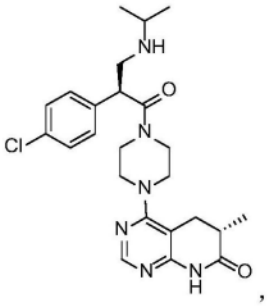
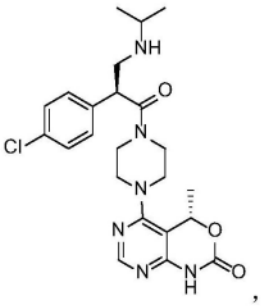
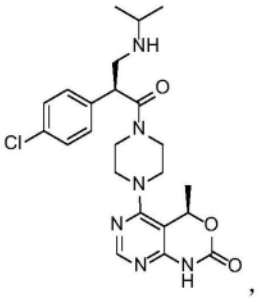
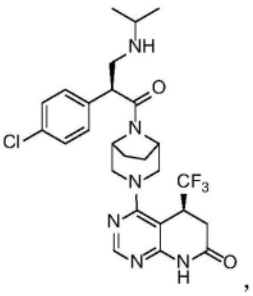
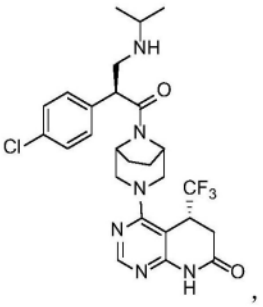
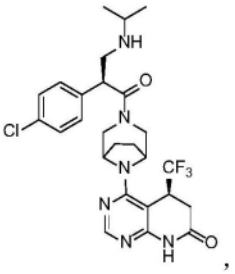
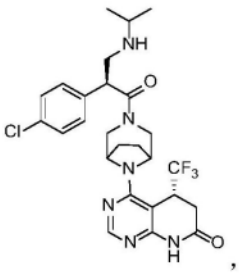
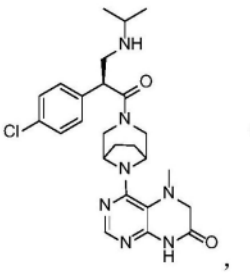
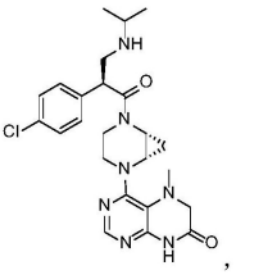
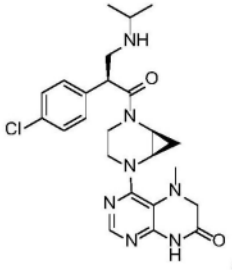
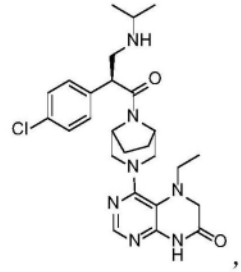
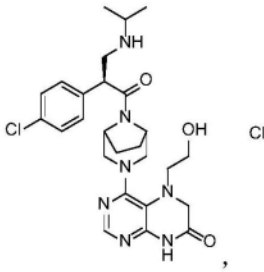
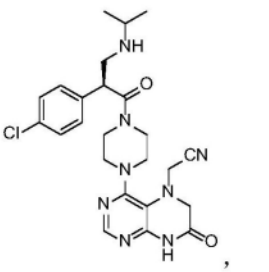
19.根据权利要求16所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^6为甲基或CF_3。

20.根据权利要求16所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^8为H。

21.根据权利要求16所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中,R^{11}为Cl。

22.一种下列化合物或其药学上可接受的盐,



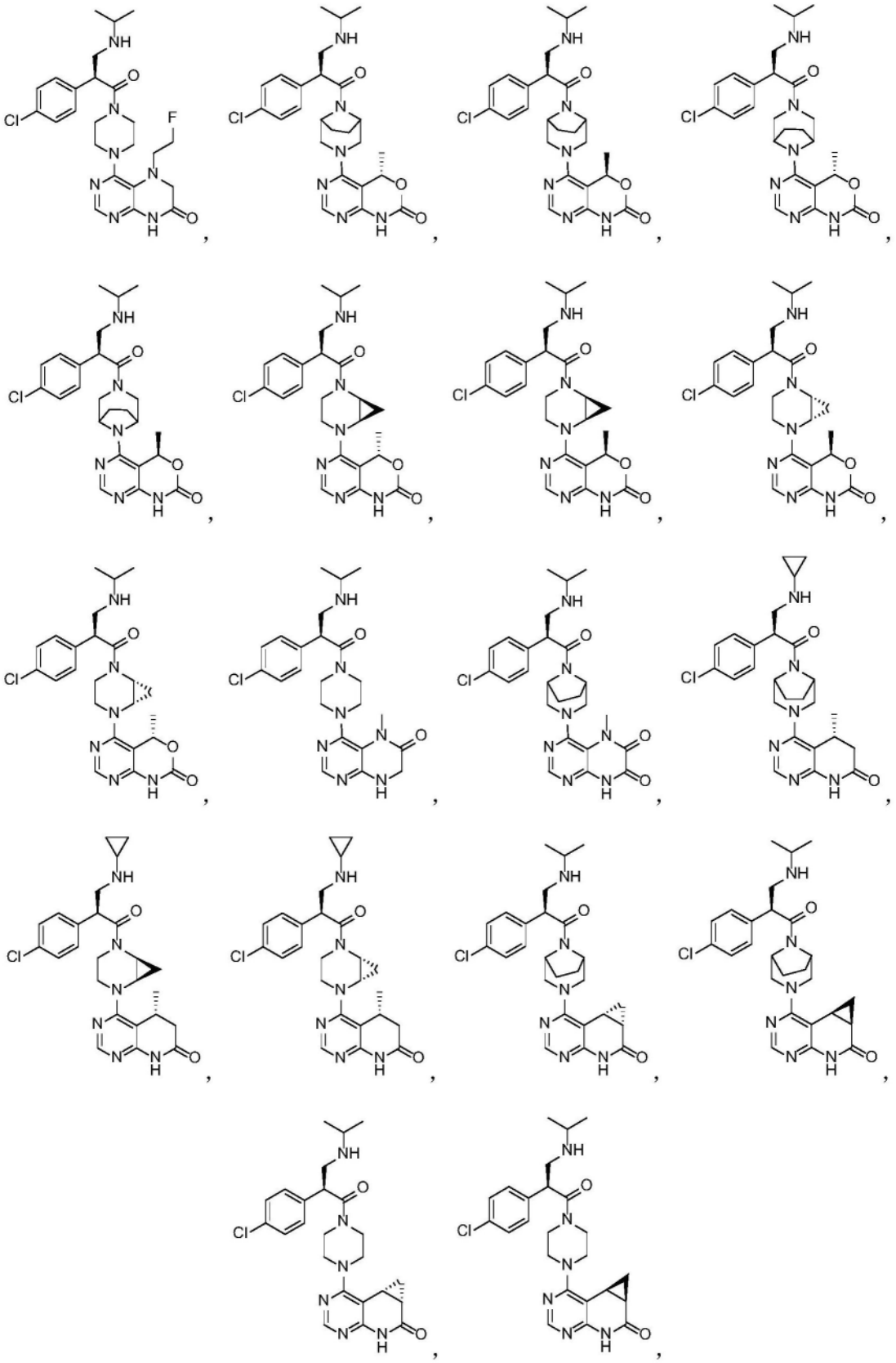

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

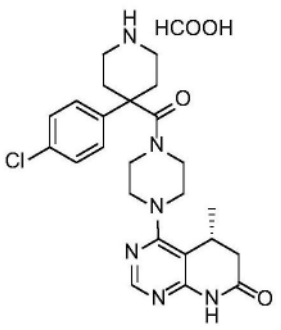


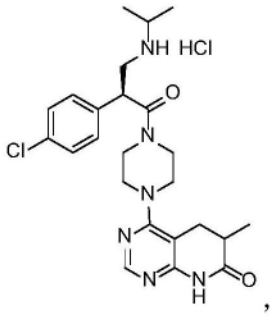
顺-(5R)-4-(5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)六氢吡咯[3,4-c]吡咯-2(1H)-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮,或

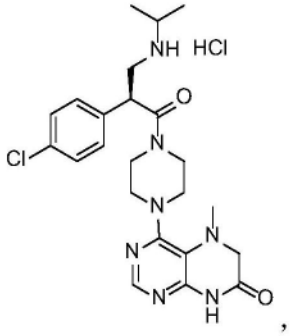
反-(5R)-4-(5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)六氢吡咯[3,4-c]吡咯-2

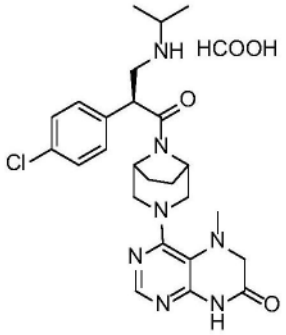
(1H)-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮。

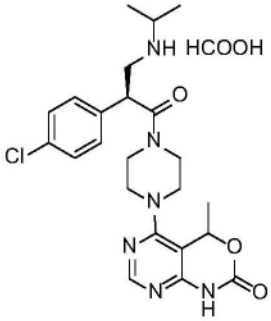
23.一种下列化合物的盐的形式：



，


，


，


或


。

24.一种药物组合物,其包含权利要求1-23任一项所述化合物或其药学上可接受的盐。

25.根据权利要求24所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含权利要求1-23任一项所述化合物或其药学上可接受的盐以及一种或多种药学上可接受的载体。

26.权利要求1-23任一项所述化合物或其药学上可接受的盐或权利要求24或25所述药物组合物在制备用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的药物中的用途。

27.根据权利要求26所述的用途,其中,所述疾病或疾病状态为癌症。

28.根据权利要求26所述的用途,其中,所述疾病或疾病状态为乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌。

29.一种制备式I所示的化合物或其药学上可接受的盐的方法,其中所述的式I所示的化合物是式12-3的化合物,所述方法包括：

1)在碱和溶剂的存在下将式1-1化合物制备为式1-2化合物；

2)在碱和溶剂的存在下使式1-2化合物与乙酸甲脒反应制备式1-3化合物；

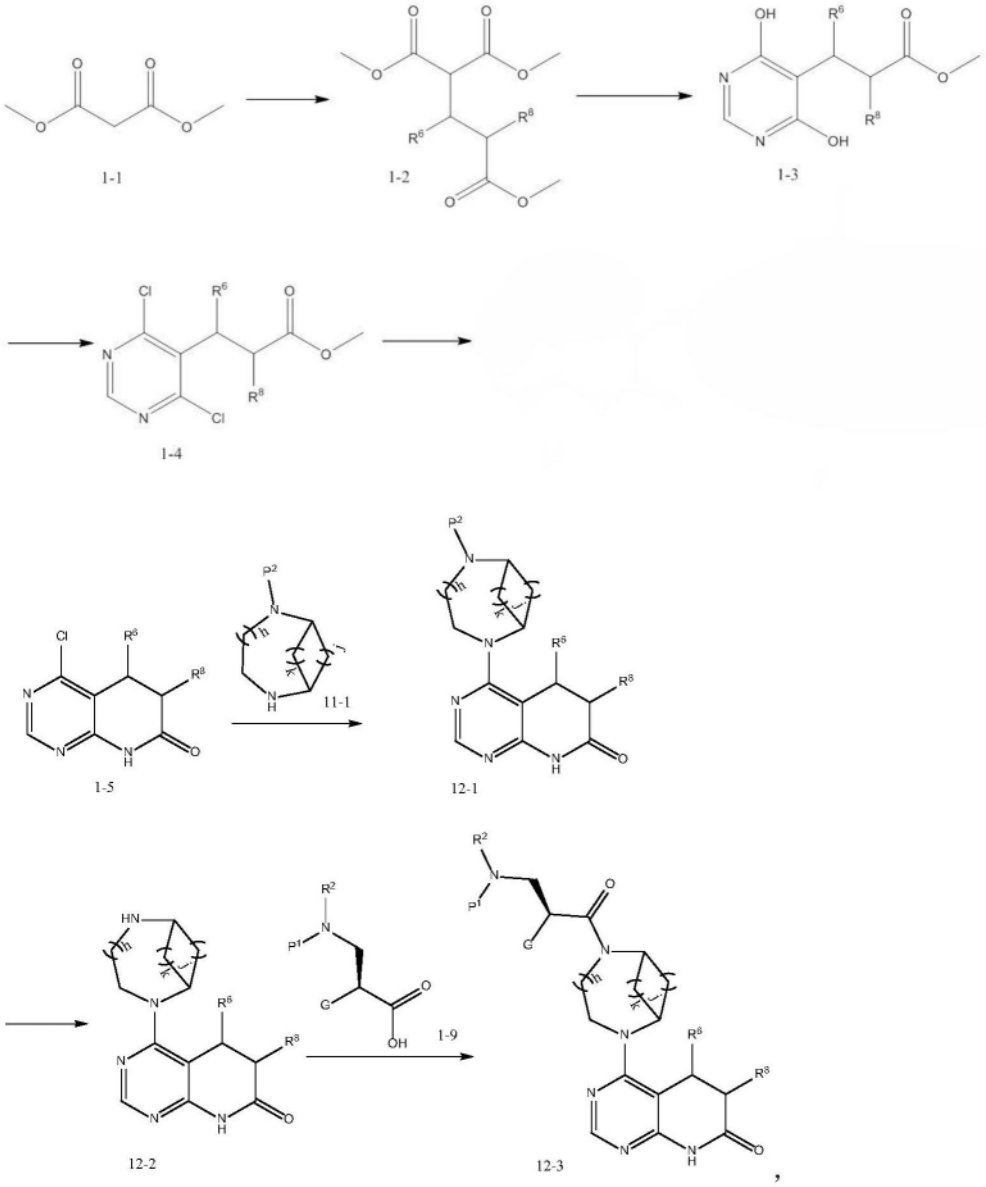
3)在碱和溶剂存在下将式1-3化合物制备为式1-4化合物；

4)进一步使式1-4化合物反应以生成式1-5化合物；

5)使式1-5化合物与式11-1化合物反应制备式12-1化合物；

6)使式12-1化合物脱去保护基以制备式12-2化合物;和

7)使式12-2化合物与式1-9化合物反应制备式12-3化合物,



其中,R^2选自C1-C6烷基或C3-C6环烷基;

R^6和R^8各自独立地选自H或C1-C6烷基,其中所述的C1-C6烷基任选地被卤素取代;

h选自1;

j选自0;

k选自1;

G是任选被1个R^{11}取代的苯基;

R^{11}选自卤素;

P^1为H或胺基保护基,且P^2为胺基保护基;

当P^1为胺基保护基时,所述方法还包括脱除胺基保护基的步骤。

30.根据权利要求29所述的方法,其中,步骤1)中的所述碱为甲醇钠。

31.根据权利要求29所述的方法,其中,步骤1)中的所述溶剂为甲醇。

32.根据权利要求29所述的方法,其中,步骤2)中的所述碱为甲醇钠。

33.根据权利要求29所述的方法,其中,步骤2)中的所述溶剂为甲醇。

34.根据权利要求29所述的方法,其中,步骤3)中的所述碱为二异丙基乙胺。

35.根据权利要求29所述的方法,其中,步骤3)中的所述溶剂为乙腈。

AKT抑制剂

[0001] 本申请要求于2019年01月29日向中华人民共和国知识产权局提交的申请号为201910084801.3的中国发明专利申请的优先权。在此通过引用方式将其全部内容以其整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明属于药物化学领域,具体涉及AKT抑制剂、其制备方法以及医药用途。

背景技术

[0003] 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)及其下游蛋白AKT(又称蛋白激酶B,PKB)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)组成的PI3K/AKT/mTOR通路作为细胞内非常重要的信号转导途径,在细胞的生长、存活、增殖、凋亡、血管生成、自吞噬等过程中发挥着极其重要的生物学功能。该通路的异常激活会引起一系列的疾病,包括癌症、神经病变、自身免疫性疾病和血液淋巴系统疾病。

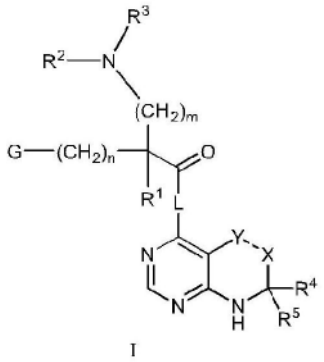
[0004] AKT,是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,通过下游众多效应器影响细胞存活、生长、代谢、增殖、迁移和分化。超过50%的人类肿瘤存在AKT过度活化的现象,尤以前列腺癌、胰腺癌、膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌为主。AKT过活化可导致肿瘤发生、转移以及耐药性产生。

[0005] AKT具有三种亚型:AKT1、AKT2和AKT3。作为典型的蛋白激酶,每种亚型均由氨基末端的PH结构域(Pleckstrin homology domain)、中部结合ATP的激酶结构域以及羧基末端的调节结构域组成。3种亚型约80%的氨基酸序列同源,仅在PH结构域和激酶结构域连接区变化较大。

[0006] 目前,针对PI3K/AKT/mTOR信号通路的靶向药物主要是PI3K抑制剂和mTOR抑制剂,而AKT处于该信号转导通路的核心部位。抑制AKT活性既可避免抑制上游PI3K造成的严重副作用,也可避免抑制下游mTOR引起的负反馈机制影响药效。因此,寻找有效和选择性的AKT抑制剂是当前肿瘤靶向药物研发的重要方向。CN101631778A公开了一类环戊二烯并[D]嘧啶衍生物,CN101578273A公开了一类羟基化和甲氧基化的环戊二烯并[D]嘧啶衍生物,CN101511842A公开了一类二氢呋喃并嘧啶衍生物,CN101970415A公开了一类5H-环戊二烯并[d]嘧啶衍生物,这些化合物具有小于10μM的抑制AKT1的IC_{50}。

发明内容

[0007] 一方面,本发明提供了式I所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0008] 

I

[0009] 其中：

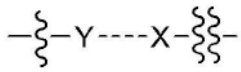
[0010] R^1选自H、OH、卤素、CN、NH_2、NO_2或任选地被卤素或OH取代的C1-C6烷基；

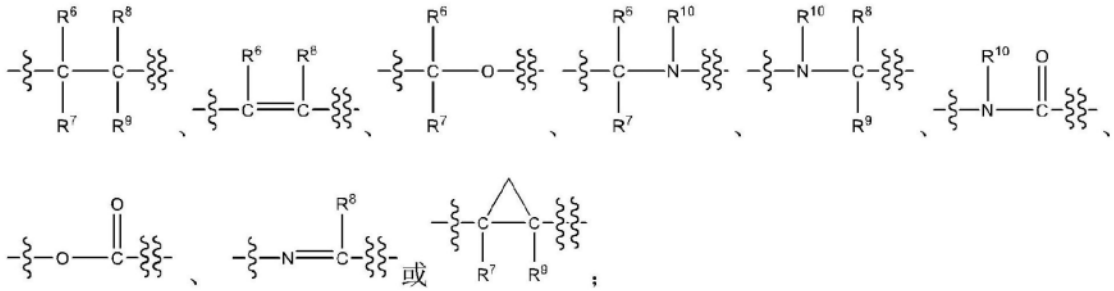
[0011] R^2、R^3各自独立地选自H、C_1-C_6烷基、C_3-C_6环烷基、(C_3-C_6环烷基)-(CH_2)-、(C_3-C_6环烷基)-(CH_2CH_2)-、苯甲基、苯乙基、吡咯烷基、四氢呋喃基或四氢吡喃基，其中所述的C_1-C_6烷基、C_3-C_6环烷基、(C_3-C_6环烷基)-(CH_2)-或(C_3-C_6环烷基)-(CH_2CH_2)-任选地被卤素、OH、CN、NH_2或C_1-C_3烷氧基取代，所述的苯甲基或苯乙基任选地被卤素、OH、CN、NO_2、NH_2、C_1-C_3烷氧基、卤代C_1-C_3烷氧基、C_1-C_3烷基或卤代C_1-C_3烷基取代，所述的吡咯烷基、四氢呋喃基或四氢吡喃基任选地被卤素、OH、C_1-C_3烷基、环丙基甲基或C_1-C_4烷酰基取代；

[0012] 或R^1、R^2和与它们相连的原子一起形成4-7元含氮杂环；

[0013] m、n各自独立地选自0、1、2或3；

[0014] R^4、R^5均为氢或R^4、R^5一起形成=O；

[0015] 选自：

[0016] 

[0017] R^6、R^7、R^8、R^9各自独立地选自H、CN、C_1-C_6烷基或C_1-C_6烷氧基，其中所述的C_1-C_6烷基或C_1-C_6烷氧基任选地被卤素、OH、CN或C_1-C_3烷氧基取代；

[0018] R^{10}选自H或C_1-C_6烷基，其中所述的C_1-C_6烷基任选地被卤素、OH、CN或C_1-C_3烷氧基取代；

[0019] L为任选被取代的包含1-2个氮原子的5-12元饱和杂环；

[0020] G是任选被1-5个R^{11}取代的6-10元芳基或5-10元杂芳基；

[0021] R^{11}独立地选自卤素、OH、CN、NH_2、NO_2、苄氧基、-NH(C_1-C_6烷基)、-N(C_1-C_6烷基)$_2$、-C(=O)NH_2、-C(=O)NH(C_1-C_6烷基)、-C(=O)N(C_1-C_6烷基)$_2$、-SO_2(C_1-C_6烷基)、C_1-C_6烷基或C_1-C_6烷氧基，其中所述的C_1-C_6烷基或C_1-C_6烷氧基任选地被卤素取代；

[0022] 条件是：当R^1、R^2和与它们相连的原子一起形成4-7元含氮杂环时，R^1、R^2均不为H。

[0023] 在一些实施方案中，R^1选自H、OH或任选地被卤素或OH取代的C_1-C_6烷基；在一些典型的实施方案中，R^1选自H、OH、Me、CF_3或CH_2OH；在一些更典型的实施方案中，R^1选自H或OH；

在一些最典型的实施方案中,R^1选自H。

[0024] 在一些实施方案中,R^2和R^3各自独立地选自H、C1-C6烷基、C_3-C_6环烷基、(C_3-C_6环烷基)-(CH_2)-、(C_3-C_6环烷基)-(CH_2CH_2)-、苯甲基、苯乙基、吡咯烷基或四氢吡喃基,其中所述的C_1-C_6烷基、C_3-C_6环烷基、(C_3-C_6环烷基)-(CH_2)-或(C_3-C_6环烷基)-(CH_2CH_2)-任选地被F、Cl、Br、I、OH、CN、NH_2或C1-C3烷氧基取代,所述的苯甲基或苯乙基任选地被F、Cl、Br、I、OH、OMe、CF_3或Me取代,所述的吡咯烷基或四氢吡喃基任选地被F、Cl、Br、I、OH、C1-C3烷基、环丙基甲基或C1-C4烷酰基取代。

[0025] 在一些实施方案中,R^2和R^3各自独立地选自H、甲基、乙基、异丙基、异丁基、叔丁基、3-戊基、CH_2OH、CH_2CH_2OH、CH_2CH_2OMe、CF_3、CH_2CF_3、CH_2CHF_2、CH_2CH_2F、环丙基、环戊基、环己基、环丙基-(CH_2)-、环戊基-(CH_2)-、环己基-(CH_2)-、环丙基-(CH_2CH_2)-、环戊基-(CH_2CH_2)-、苯甲基、4-氟苯甲基、4-氯苯甲基、4-氟苯乙基、4-氯苯乙基或四氢吡喃-4-基。

[0026] 在一些典型的实施方案中,R^2和R^3各自独立地选自H、甲基、乙基、异丙基、环丙基、环己基、环丙基-(CH_2)-、环己基-(CH_2)-或四氢吡喃-4-基。

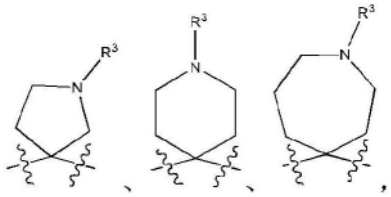
[0027] 在一些更为典型的实施方案中,R^2和R^3各自独立地选自H、异丙基或环丙基。

[0028] 在一些实施方案中,R^2为H。

[0029] 在一些实施方案中,R^3为异丙基或环丙基。

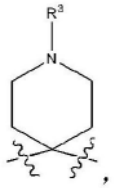
[0030] 在一些实施方案中,R^2为H且R^3为异丙基或环丙基

[0031] 在一些实施方案中,R^1、R^2和与它们相连的原子一起形成:

[0032] 

[0033] 其中,R^3的定义如上文。

[0034] 在一些典型的实施方案中,R^1、R^2和与它们相连的原子一起形成:

[0035] 

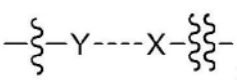
[0036] 其中,R^3的定义如上文。

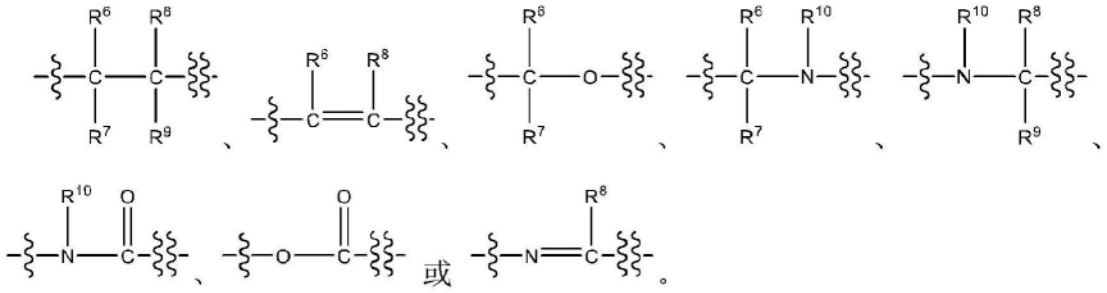
[0037] 在一些实施方案中,m为0、1或2;在一些典型的实施方案中,m为0或1;在一些更典型的实施方案中,m为1。

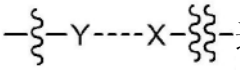
[0038] 在一些实施方案中,n为0、1或2;在一些典型的实施方案中,n为0或1;在一些更典型的实施方案中,n为0。

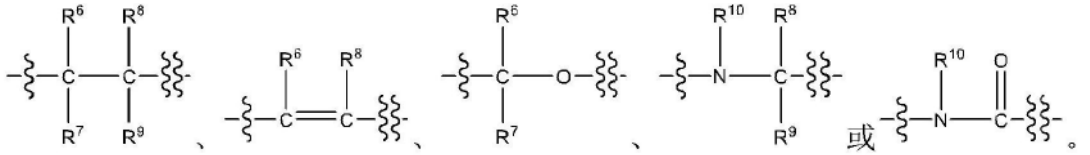
[0039] 在一些实施方案中,R^4、R^5均为氢。

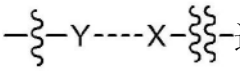
[0040] 在一些实施方案中,R^4、R^5一起形成=O。

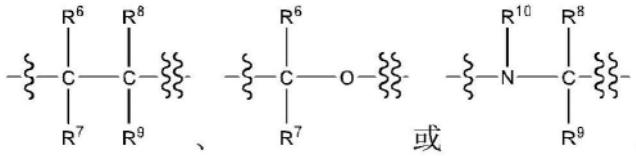
[0041] 在一些实施方案中,选自:

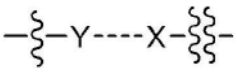
[0042] 

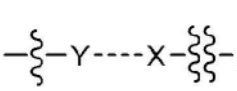
[0043] 在一些实施方案中，选自：

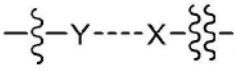
[0044] 

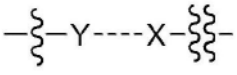
[0045] 在一些实施方案中，选自：

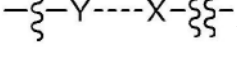
[0046] 

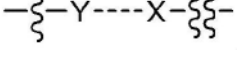
[0047] 在一些实施方案中，为，且R^4和R^5一起形成=O。

[0048] 在一些实施方案中，为，且R^4和R^5一起形成=O。

[0049] 在一些实施方案中，为，且R^4和R^5一起形成=O。

[0050] 在一些实施方案中，为，且R^4和R^5一起形成=O。

[0051] 在一些实施方案中，为，且R^4和R^5均为H。

[0052] 在一些实施方案中，为，且R^4和R^5一起形成=O。

[0053] 在一些实施方案中，R^6、R^7、R^8、R^9各自独立地选自H、CN、C1-C6烷基或C1-C6烷氧基，其中所述的C1-C6烷基或C1-C6烷氧基任选地被F、Cl、Br、I、OH、CN或OMe取代。

[0054] 在一些实施方案中,R^6、R^7、R^8、R^9各自独立地选自H、CN、C1-C6烷基或C1-C6烷氧基,其中所述的C1-C6烷基或C1-C6烷氧基任选地被F、CN或OH取代。

[0055] 在一些实施方案中,R^6、R^7、R^8、R^9各自独立地选自H、CN、甲基、乙基、丙基、异丙基、CF_3、CH_2CF_3、CH_2CHF_2、CH_2CH_2F、CH_2CN、CH_2CH_2CN、CH_2OH、CH_2CH_2OH、OMe、OEt、$OCH_2CH_2CH_3$或异丙氧基。

[0056] 在一些实施方案中,R^6为H、CN、甲基、乙基、丙基、异丙基、CF_3、CH_2CF_3、CH_2CHF_2、CH_2CH_2F、CH_2CN、CH_2CH_2CN、CH_2OH、CH_2CH_2OH、OMe、OEt、$OCH_2CH_2CH_3$或异丙氧基;在一些典型的实施方案中,R^6为H、CN、甲基、乙基、异丙基、CF_3、CH_2CH_2OH、OMe或OEt;在一些更典型的实施方案中,R^6为H、CN、甲基、CF_3或OMe;在一些更为典型的实施方案中,R^6为CN、甲基、CF_3或OMe;在一些更为典型的实施方案中,R^6为H、CN或甲基;在一些更为典型的实施方案中,R^6为H、CF_3或甲基;在一些更为典型的实施方案中,R^6为甲基或CF_3。

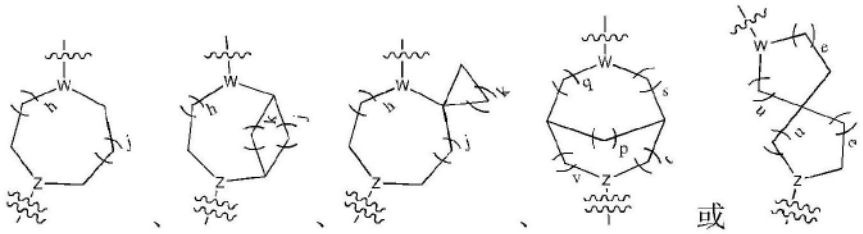
[0057] 在一些实施方案中,R^7为H。

[0058] 在一些实施方案中,R^8为H、CN、甲基、乙基、丙基、异丙基、CF_3、CH_2CF_3、CH_2CHF_2、CH_2CH_2F、CH_2CN、CH_2CH_2CN、CH_2OH、CH_2CH_2OH、OMe、OEt、$OCH_2CH_2CH_3$或异丙氧基;在一些典型的实施方案中,R^8为H、CN、甲基、乙基、异丙基、CF_3、CH_2CH_2OH、OMe或OEt;在一些更为典型的实施方案中,R^8为H、CN或甲基;在一些更典型的实施方案中,R^8为H或CN;在一些更典型的实施方案中,R^8为H或甲基;在一些更为典型的实施方案中,R^8为H。

[0059] 在一些实施方案中,R^9为H。

[0060] 在一些实施方案中,R^{10}选自H或C1-C6烷基,其中所述的C1-C6烷基任选地被卤素、OH或CN取代;在一些实施方案中,R^{10}为H、甲基、乙基、丙基、异丙基、CF_3、CH_2CF_3、CH_2CHF_2、CH_2CH_2F、CH_2CN、CH_2CH_2CN、CH_2OH或CH_2CH_2OH;在一些典型的实施方案中,R^{10}为甲基、乙基、异丙基、CH_2CF_3、CH_2CHF_2、CH_2CN或CH_2CH_2OH;在一些更为典型的实施方案中,R^{10}为甲基、乙基、CH_2CN、或CH_2CH_2OH;在一些更为典型的实施方案中,R^{10}为甲基。

[0061] 在一些实施方案中,L是任选被一个或多个R^{12}取代的下列基团:

[0062] 

[0063] 其中:

[0064] 单波线是L连接至羰基的位置,且双波线是L连接至嘧啶的位置;

[0065] R^{12}选自卤素、OH、CN、乙烯基、C1-C6烷基或C1-C6烷氧基,其中所述的C1-C6烷基或C1-C6烷氧基任选地被卤素或OH取代;

[0066] h选自0、1、2、3或4;

[0067] j选自0、1、2或3;

[0068] k选自1、2、3或4;

[0069] q、s、v、t各自独立地选自0、1或2,且q、s、v、t不同时为0;

[0070] p选自0、1、2或3;

[0071] e选自0、1或2;

[0072] u选自1、2或3;

[0073] W、Z各自独立地选自N或C,且W、Z至少一个为N。

[0074] 在一些实施方案中,R^{12}选自F、Cl、Br、I、OH、CN、乙烯基、甲基、乙基、丙基、异丙基、CF_3、CH_2CF_3、CH_2CHF_2、CH_2CH_2F、OMe、OEt、CH_2OH、CH_2CH_2OH、OCH_2OH或OCH_2CH_2OH;在一些典型的实施方案中,R^{12}选自甲基、乙基、异丙基、CF_3、CH_2CF_3、OMe、OEt、CH_2OH或OCH_2OH;在一些更为典型的实施方案中,R^{12}选自甲基、乙基或CF_3;在一些更为典型的实施方案中,R^{12}选自甲基。

[0075] 在一些实施方案中,h为0、1、2或3且j为0、1或2;在一些典型的实施方案中,h为0、1或2且j为0或1;在一些更典型的实施方案中,h为0或1且j为0;在一些更典型的实施方案中,h为1且j为0。

[0076] 在一些实施方案中,k为1、2或3;在一些典型的实施方案中,k为1或3;在一些更为典型的实施方案中,k为1。

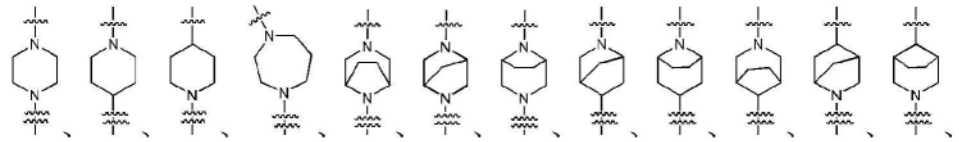
[0077] 在一些实施方案中,q、s、v、t各自独立地为0或1,且q、s、v、t不同时为0;在一些典型的实施方案中,q、s、v、t均为1;在一些更典型的实施方案中,q、s均为0,且v、t均为1;在一些更典型的实施方案中,q、s均为1,且v、t均为0;在一些更典型的实施方案中,s、v均为0,且q、t均为1。

[0078] 在一些实施方案中,p为0、1或2;在一些典型的实施方案中,p为0或2;在一些更为典型的实施方案中,p为2。

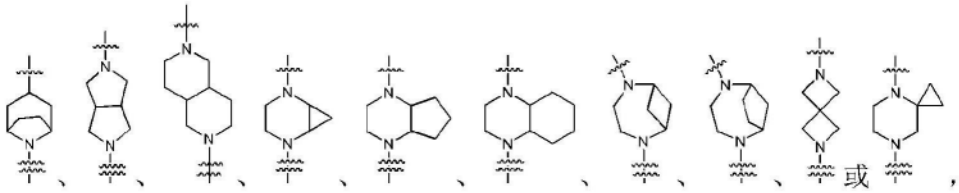
[0079] 在一些实施方案中,e为0或1,且u为1或2;在一些典型的实施方案中,e为0或1,且u为1;在一些更为典型的实施方案中,e为0,且u为1。

[0080] 在一些实施方案中,W为C,且Z为N;在一些典型的实施方案中,W为N,且Z为C;在一些更典型的实施方案中,W、Z均为N。

[0081] 在一些更为典型的实施方案中,L是任选被一个或多个R^{12}取代的下列基团:



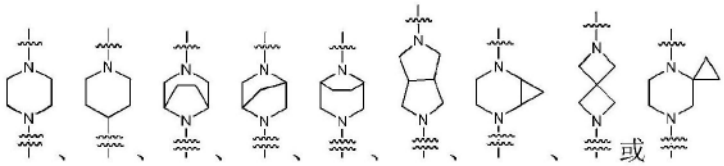
[0082]



[0083] 其中,R^{12}的定义同上文。

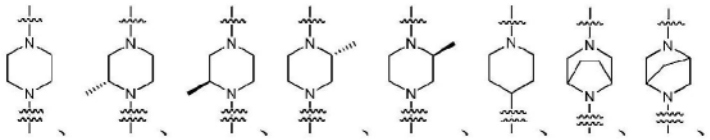
[0084] 在一些更为典型的实施方案中,L是任选被一个或多个R^{12}取代的下列基团:

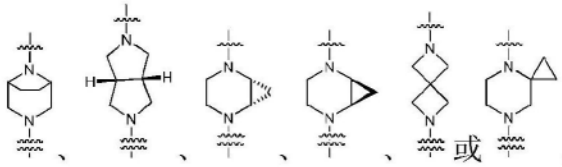
[0085]



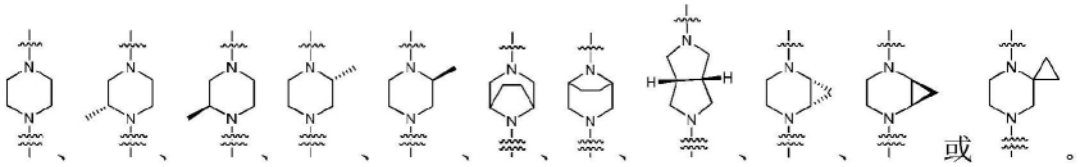
[0086] 其中,R^{12}的定义同上文。

[0087] 在一些更为典型的实施方案中,L选自下列基团:

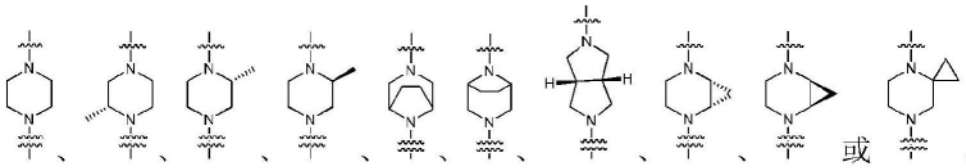


[0088] 

[0089] 在一些更为典型的实施方案中,L选自下列基团:

[0090] 

[0091] 在一些更为典型的实施方案中,L选自下列基团:

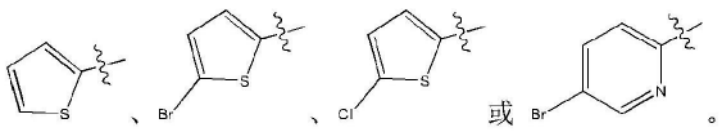
[0092] 

[0093] 在一些实施方案中,G是任选被1-5个R^{11}取代的苯基或任选被1个或多个R^{11}取代的噻吩基或吡啶基。

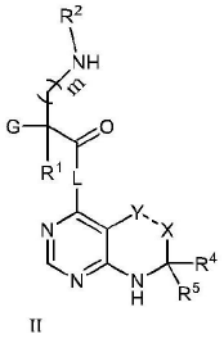
[0094] 在一些实施方案中,R^{11}独立地选自F、Cl、Br、I、OH、CN、NH_2、NO_2、苄氧基、甲基、乙基、异丙基、CH_2CF_3、CF_3、SMe、OMe、OCF_3、OEt或异丙氧基;在一些典型的实施方案中,R^{11}独立地选自F、Cl、Br、CN、苄氧基、甲基、乙基、异丙基、CF_3、OMe、SMe或OCF_3;在一些更为典型的实施方案中,R^{11}独立地选自F、Cl或CF_3;在一些更为典型的实施方案中,R^{11}为Cl。

[0095] 在一些实施方案中,G是苯基、2-氯苯基、3-氯苯基、4-氯苯基、4-氟苯基、4-溴苯基、4-甲基苯基、4-乙基苯基、4-异丙基苯基、4-三氟甲基苯基、4-氰基苯基、4-甲氧基苯基、4-甲硫基苯基、4-三氟甲氧基苯基、4-氯-3-氟苯基、3,4-二氟苯基、2,4-二氯苯基或4-苄氧基苯基;在一些典型的实施方案中,G是4-氯苯基、4-氯-3-氟苯基、4-三氟甲基苯基或3,4-二氟苯基;在一些更为典型的实施方案中,G是4-氯苯基。

[0096] 在一些实施方案中,G是任选被一个或多个卤素取代的噻吩基或吡啶基;在一些更典型的实施方案中,G是任选被一个或多个F、Cl、Br或I取代的噻吩或吡啶基;在一些更典型的实施方案中,G是:

[0097] 

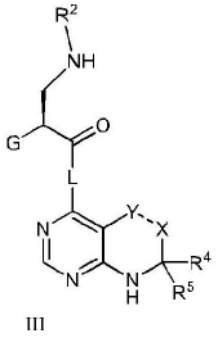
[0098] 另一方面,本发明提供了式II所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0099] 

II

[0100] 其中,R^1、R^2、R^4、R^5、G、L、m和的定义同式I化合物。

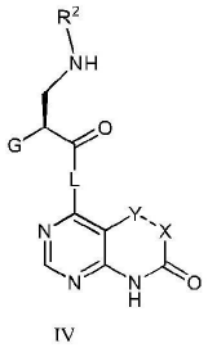
[0101] 另一方面,本发明提供了式III所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0102] 

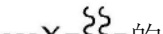
III

[0103] 其中,R^2、R^4、R^5、G、L和的定义同式I化合物。

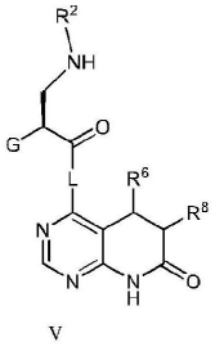
[0104] 另一方面,本发明提供了式IV所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0105] 

IV

[0106] 其中,R^2、G、L和的定义同式I化合物。

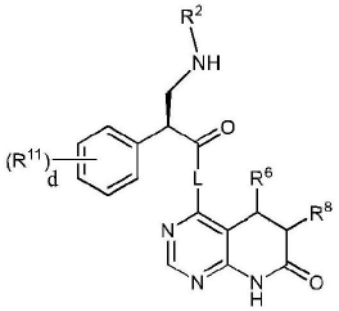
[0107] 另一方面,本发明提供了式V所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0108] 

V

[0109] 其中,R^2、R^6、R^8、G和L的定义同式I化合物。

[0110] 另一方面,本发明提供了式VI所示的化合物或其药学上可接受的盐,

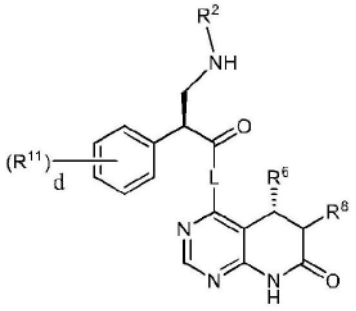
[0111] 

VI

[0112] 其中,R^2、R^6、R^8、R^{11}和L的定义同式I化合物,d选自0、1、2、3、4或5。

[0113] 在一些实施方案中,d选自0、1、2或5;在一些典型的实施方案中,d选自0、1或2;在一些更为典型的实施方案中,d选自1或2;在一些更为典型的实施方案中,d为1。

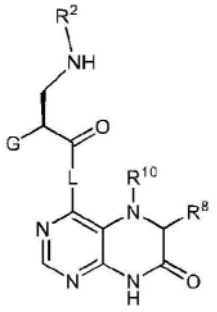
[0114] 另一方面,本发明提供了式VII所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0115] 

VII

[0116] 其中,R^2、R^6、R^8、R^{11}和L的定义同式I化合物,d的定义同式VI化合物。

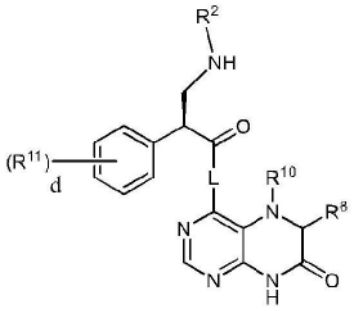
[0117] 另一方面,本发明提供了式VIII所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0118] 

VIII

[0119] 其中,R^2、R^8、R^{10}、G、L的定义同式I化合物。

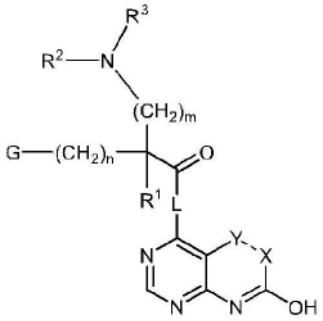
[0120] 另一方面,本发明提供了式IX所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0121] 

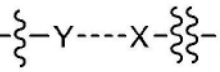
IX

[0122] 其中,R^2、R^8、R^{10}、R^{11}和L的定义同式I化合物,d的定义同式VI化合物。

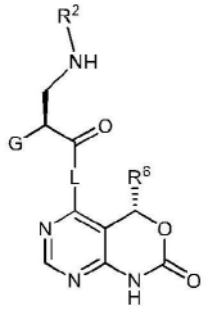
[0123] 另一方面,本发明的化合物还包括式X所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0124] 

X

[0125] 其中,R^1、R^2、R^3、G、L、m、n和的定义同式I化合物。

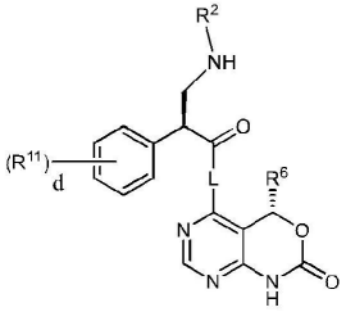
[0126] 另一方面,本发明还提供了式XI所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0127] 

XI

[0128] 其中,R^2、R^6、G和L的定义同式I化合物。

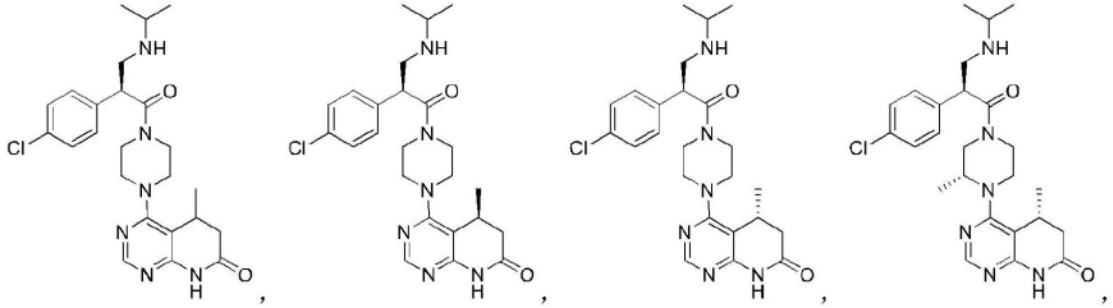
[0129] 另一方面,本发明还提供了式XII所示的化合物或其药学上可接受的盐,

[0130] 

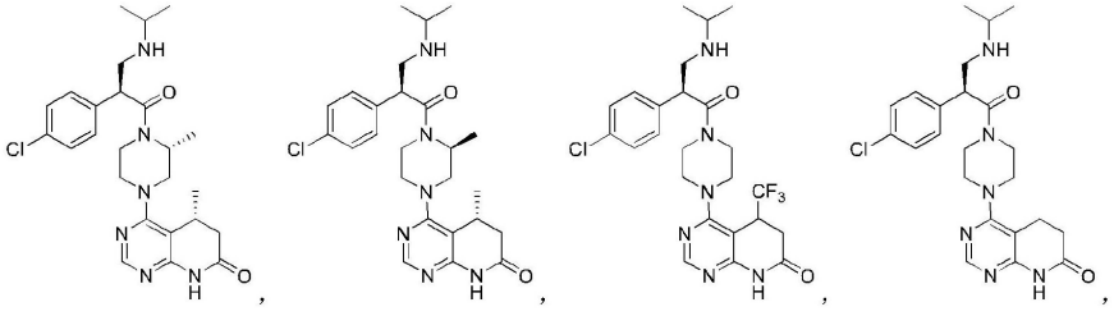
XII

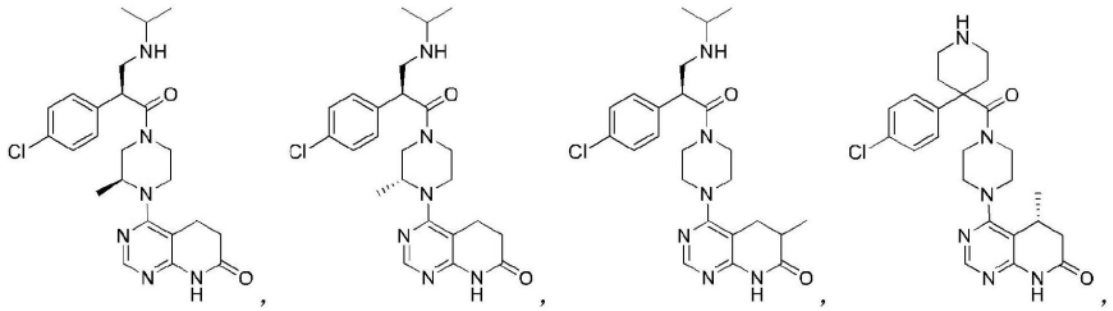
[0131] 其中,R^2、R^6、R^{11}和L的定义同式I化合物,d的定义同式VI化合物。

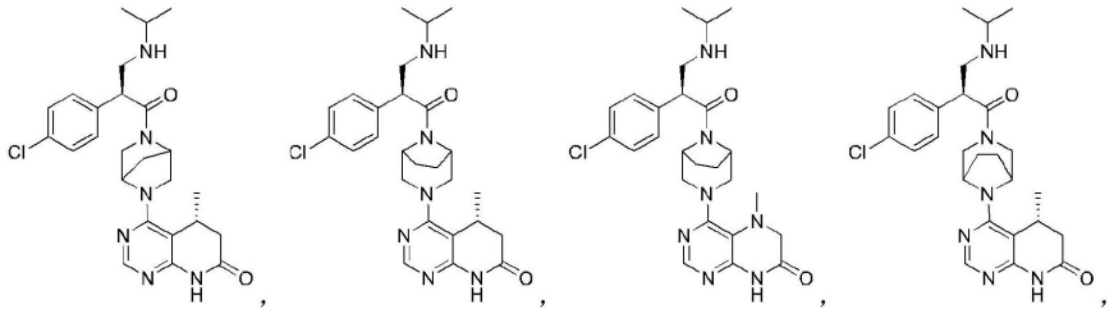
[0132] 另一方面,本发明提供下列所示的化合物或其药学上可接受的盐:

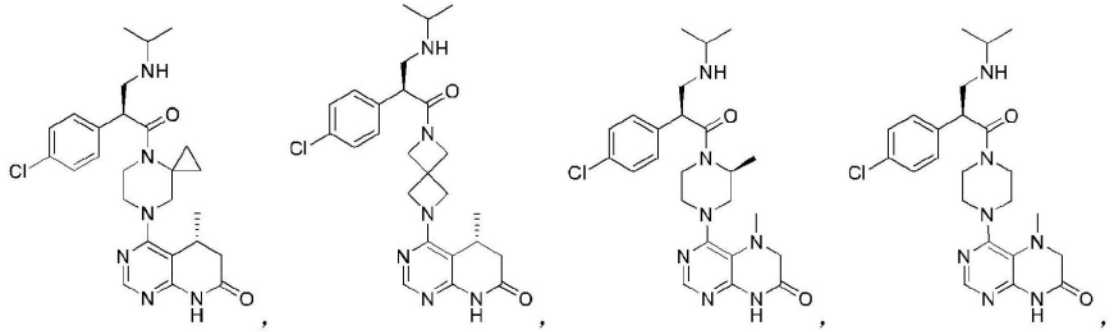


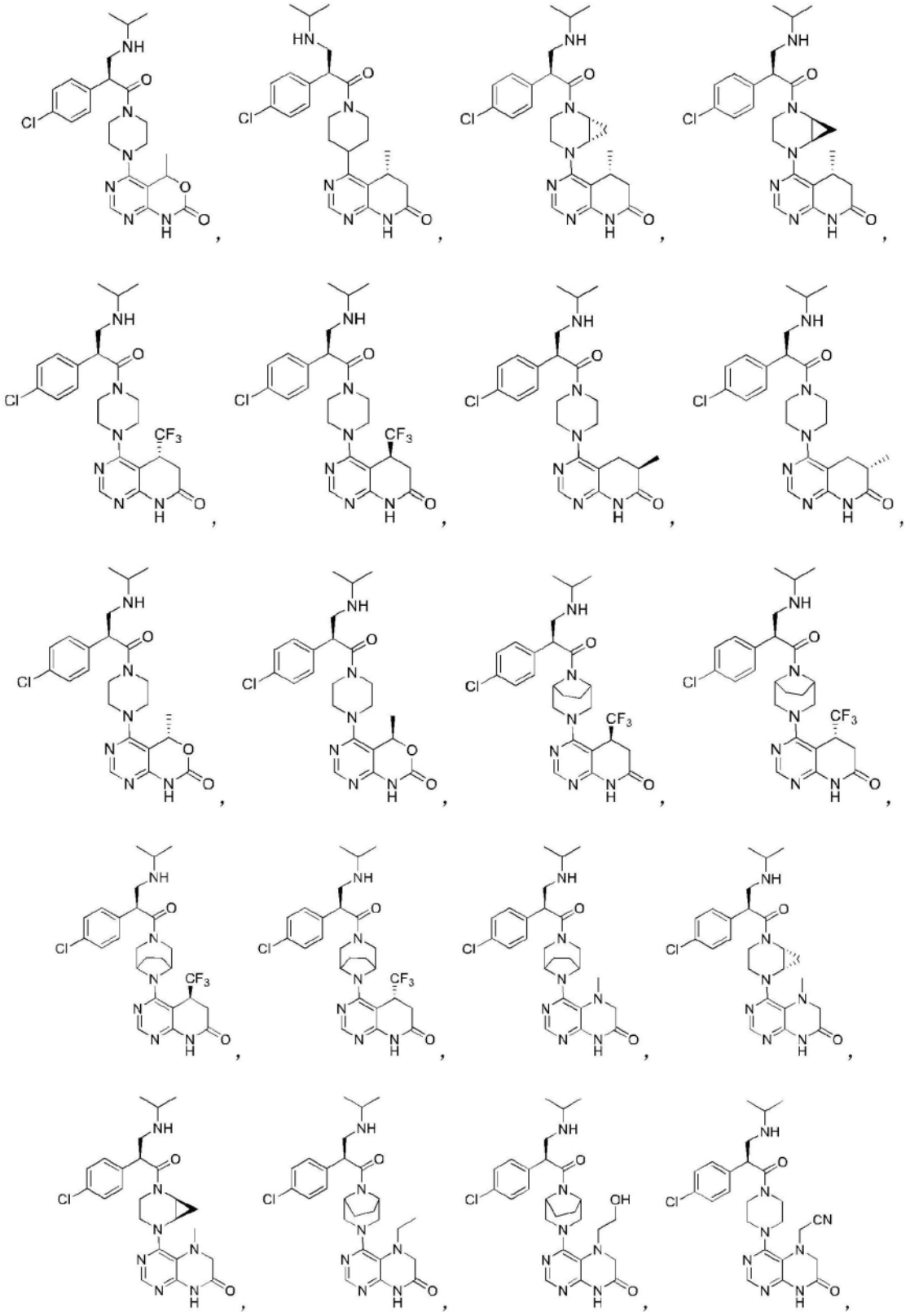
[0133]

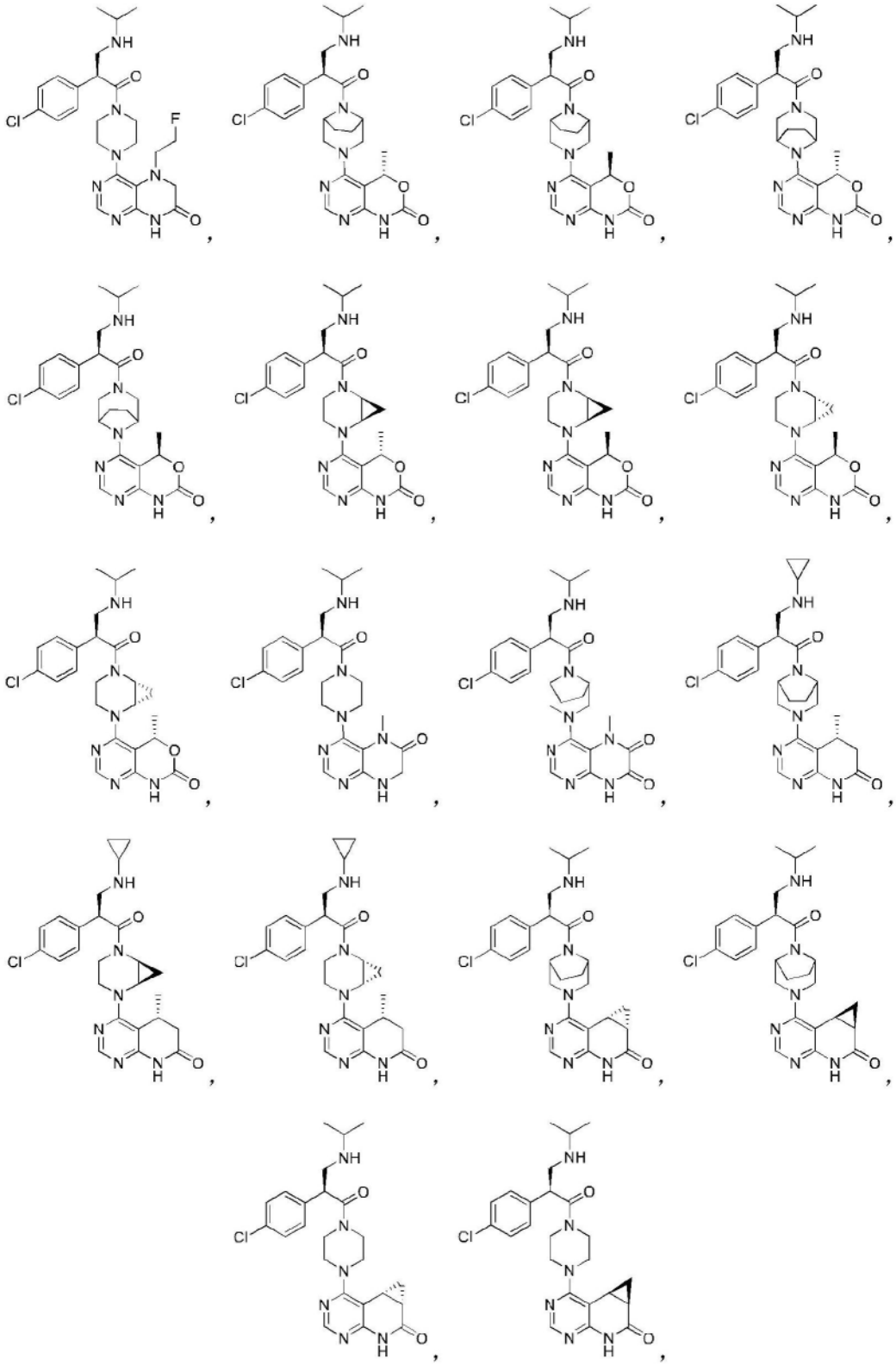








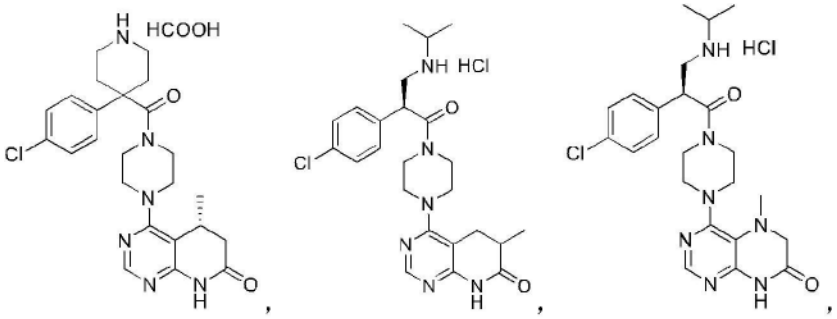
[0134] 

[0135] 

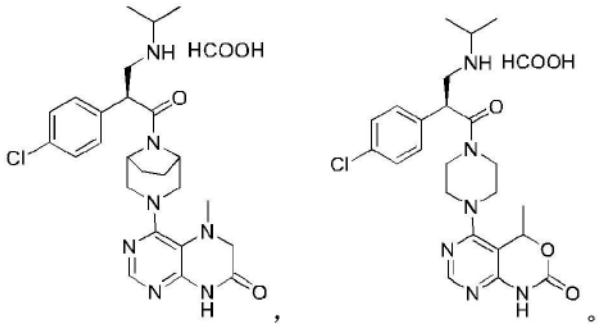
[0136] 顺-(5R)-4-(5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)六氢吡咯[3,4-c]吡咯-2(1H)-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮,或

[0137] 反-(5R)-4-(5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)六氢吡咯[3,4-c]吡咯-2(1H)-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮。

[0138] 另一方面,本发明提供了下列所示的化合物:



[0139]



[0140] 另一方面,本发明还提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI或XII化合物或其药学上可接受的盐。

[0141] 在一些实施方案中,本发明还提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI或XII化合物或其药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的载体。

[0142] 本发明所述的药物组合物可以通过任何适用的途径或方法给药,例如通过口服或肠胃外(例如,静脉内)给药。式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI或XII化合物的治疗有效量为从约0001mg到20mg/Kg体重/天,优选从0.01mg到10mg/Kg体重/天。

[0143] 对于口服途径给药,本发明的药物组合物通常以片剂、胶囊剂或溶液的形式提供。片剂可以包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体。所述载体包括但不限于稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、着色剂或防腐剂。胶囊剂包括硬胶囊剂和软胶囊剂。

[0144] 对于胃肠道外途径给药,本发明的药物组合物可以通过静脉内注射、肌内注射或皮下注射给药。其通常以无菌水溶液或混悬液或冻干粉末提供,并调节合适的pH和等渗性。

[0145] 另一方面,本发明还提供了式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI或XII化合物在制备用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的药物中的用途。

[0146] 另一方面,本发明还提供了用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的方法,其包括向有需要的个体给予本发明的式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI或XII化合物或本发明的药物组合物。

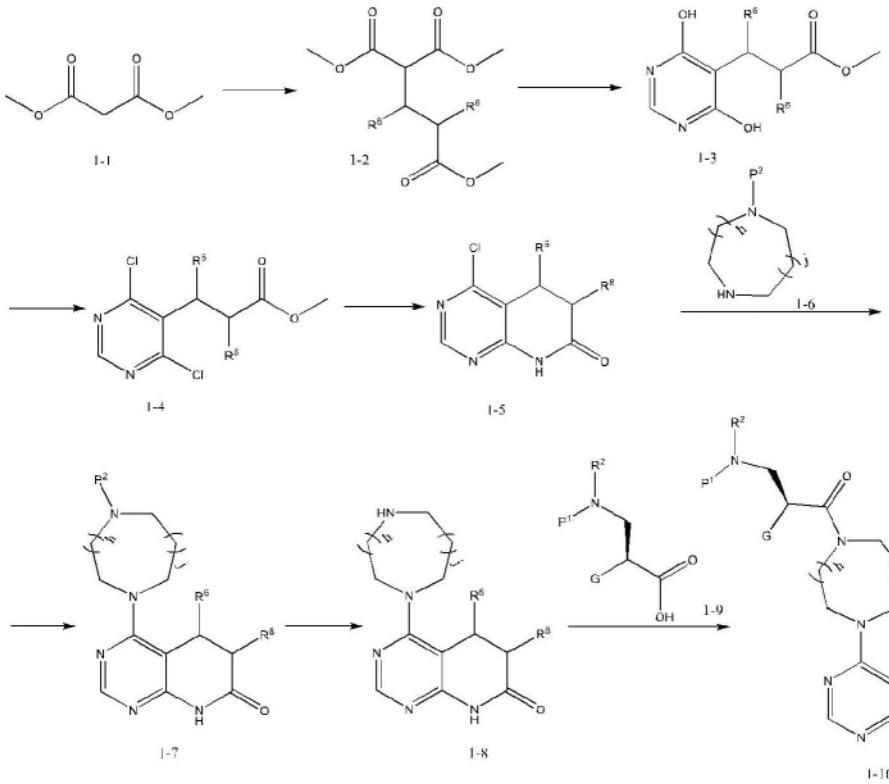
[0147] 另一方面,本发明还提供了用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的本发明的式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI或XII化合物或本发明的药物组合物。

[0148] 所述AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌。

[0149] 本发明化合物对AKT1、AKT2、AKT3具有抑制作用,尤其对于AKT3具有明显的抑制作用,对癌细胞有明显的增殖抑制作用,且药代吸收良好,具有明显较优的口服吸收效果。

[0150] 另一方面,本发明提供一种制备式V化合物的方法,包括但不限于以下合成方案:

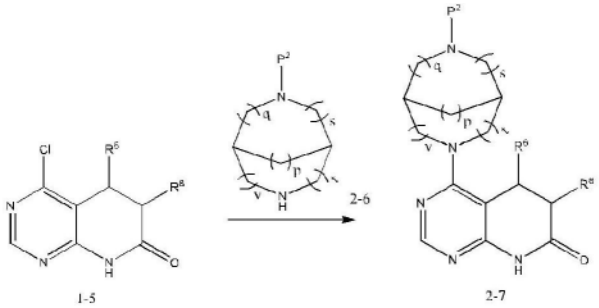
[0151] 合成方案1:

[0152] 

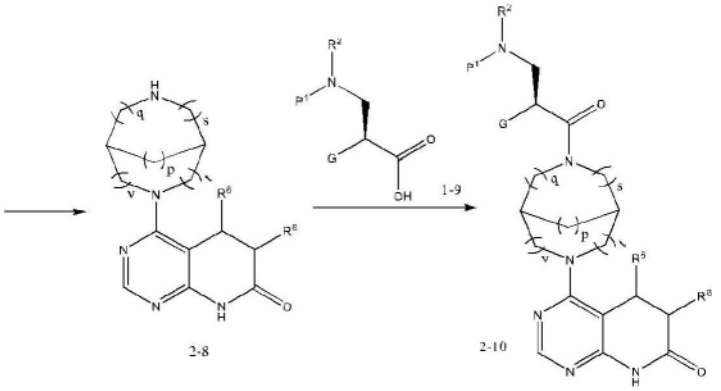
[0153] 其中,R^2、R^6、R^8、G、h、j的定义如前所述,P^1为H或胺基保护基,P^2为胺基保护基;

[0154] 式1-1化合物在碱(例如甲醇钠)和溶剂(例如甲醇)的存在下制备式1-2化合物,式1-2化合物与乙酸甲脒在碱(例如甲醇钠)和溶剂(例如甲醇)的存在下制备式1-3化合物,式1-3在碱(例如二异丙基乙胺)和溶剂(例如乙腈)存在下制备式1-4化合物,式1-4化合物进一步生成式1-5化合物,式1-5化合物与式1-6化合物反应制备式1-7化合物,式1-7化合物脱除保护基制备式1-8化合物,式1-8化合物与式1-9化合物反应制备式1-10化合物,当P^1为胺基保护基时,合成方案1进一步包括将胺基保护基脱除。

[0155] 合成方案2:



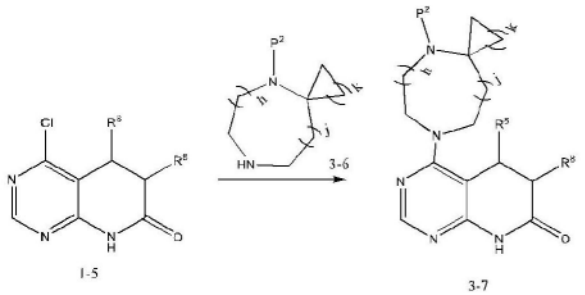
[0156]



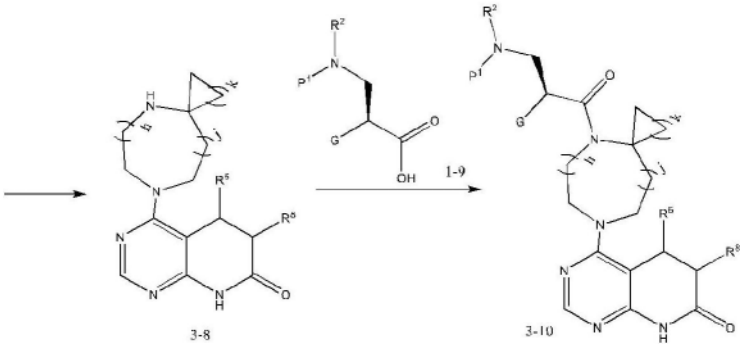
[0157] 其中,R^2、R^6、R^8、G、q、v、s、t、p的定义如前所述,P^1为H或胺基保护基,P^2为胺基保护基;

[0158] 式1-5化合物按照合成方案1制备,式1-5化合物与式2-6化合物反应制备式2-7化合物,式2-7化合物脱除保护基制备式2-8化合物,式2-8化合物与式1-9化合物反应制备式2-10化合物,当P^1为胺基保护基时,合成方案2进一步包括将胺基保护基脱除。

[0159] 合成方案3:



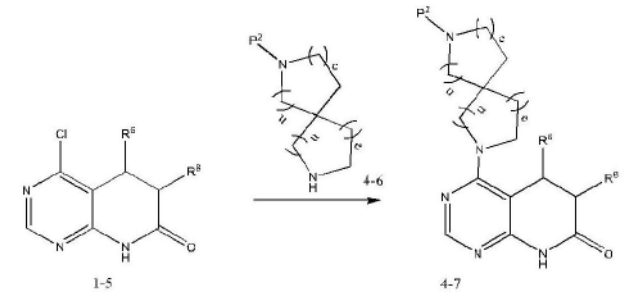
[0160]



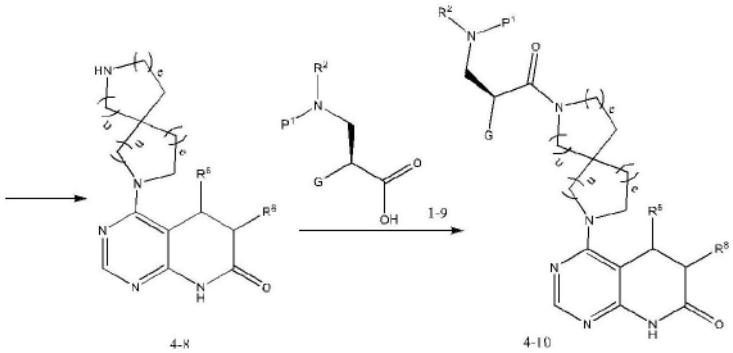
[0161] 其中,R^2、R^6、R^8、G、h、j、k的定义如前所述,P^1为H或胺基保护基,P^2为胺基保护基;

[0162] 式1-5化合物按照合成方案1制备,式1-5化合物与式3-6化合物反应制备式3-7化合物,式3-7化合物脱除保护基制备式3-8化合物,式3-8化合物与式1-9化合物反应制备式3-10化合物,当P^1为胺基保护基时,合成方案3进一步包括将胺基保护基脱除。

[0163] 合成方案4：



[0164]

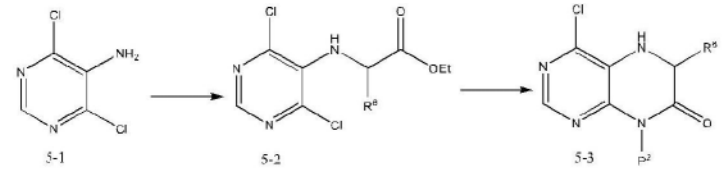


[0165] 其中，R^2、R^6、R^8、e、u的定义如前所述，P^1为H或胺基保护基，P^2为胺基保护基；

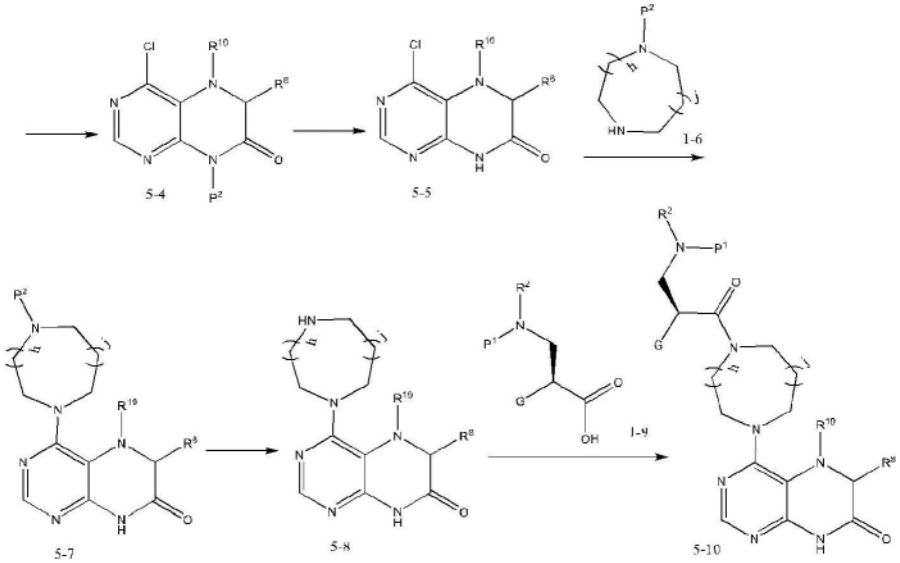
[0166] 式1-5化合物合成方案1制备，式1-5化合物与式4-6化合物反应制备式4-7化合物，式4-7化合物脱除保护基制备式4-8化合物，式4-8化合物与式1-9化合物反应制备式4-10化合物，当P^1为胺基保护基时，合成方案4进一步包括将胺基保护基脱除。

[0167] 另一方面，本发明提供一种制备式VIII化合物的方法，包括但不限于以下方案：

[0168] 合成方案5：



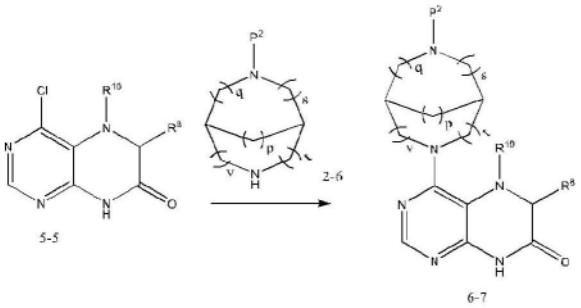
[0169]



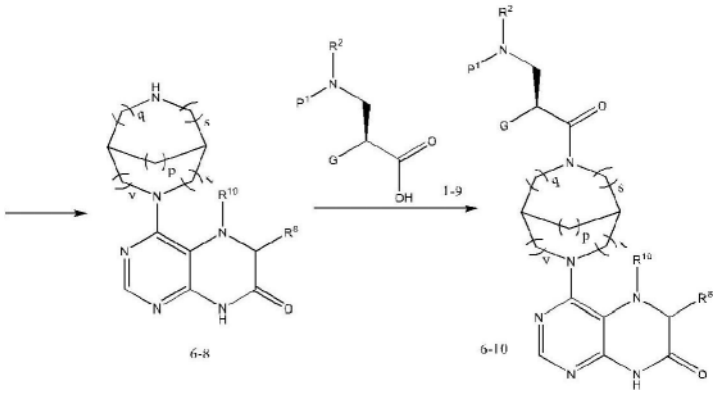
[0170] 其中，R^2、R^{10}、R^8、G、h、j的定义如前所述，P^1为H或胺基保护基，P^2为胺基保护基；

[0171] 式5-1化合物在碱(例如氢化钠)和溶剂(例如四氢呋喃)存在下制备式5-2化合物,式5-2化合物与NH_2P^2在碱(例如三乙胺)和溶剂(例如异丙醇)存在下制备式5-3化合物,式5-3化合物在碱(例如氢化钠)和溶剂(例如DMF)存在下制备式5-4化合物,式5-4化合物脱除保护基制备式5-5化合物,式5-5化合物与式1-6化合物反应制备式5-7化合物,式5-7化合物脱除保护基制备式5-8化合物,式5-8化合物与式1-9化合物反应制备式5-10化合物;当P^1为胺基保护基时,合成方案5进一步包括脱除保护基步骤。

[0172] 合成方案6:



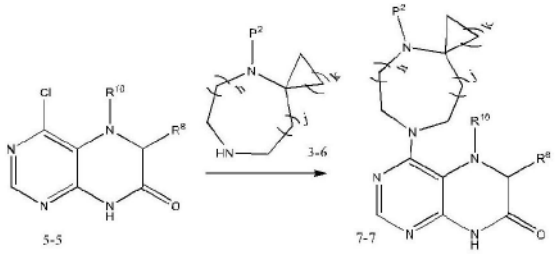
[0173]



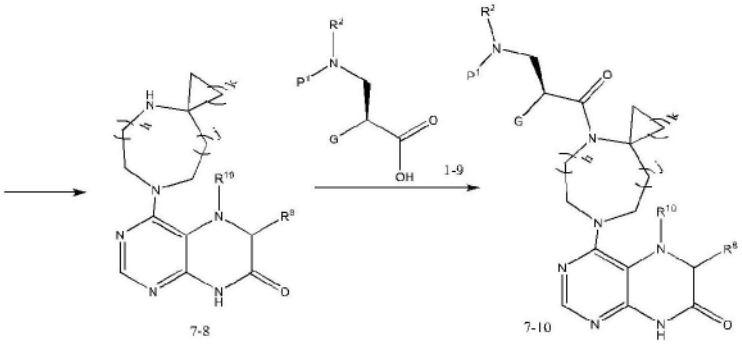
[0174] 其中,R^2、R^{10}、R^8、G、q、s、v、t、p的定义如前所述,P^1为H或胺基保护基,P^2为胺基保护基;

[0175] 式5-5化合物按照合成方案5制备,式5-5化合物与式2-6化合物反应制备式6-7化合物,式6-7化合物脱除保护基制备式6-8化合物,式6-8化合物与式1-9化合物反应制备式6-10化合物;当P^1为胺基保护基时,合成方案6进一步包括脱除保护基步骤。

[0176] 合成方案7:



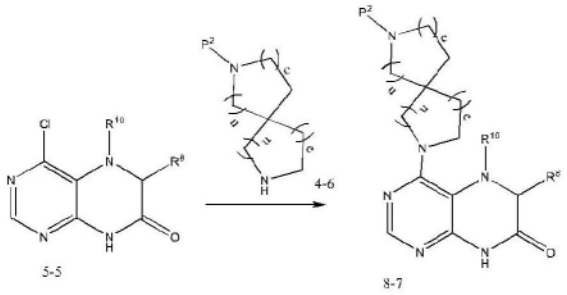
[0177]



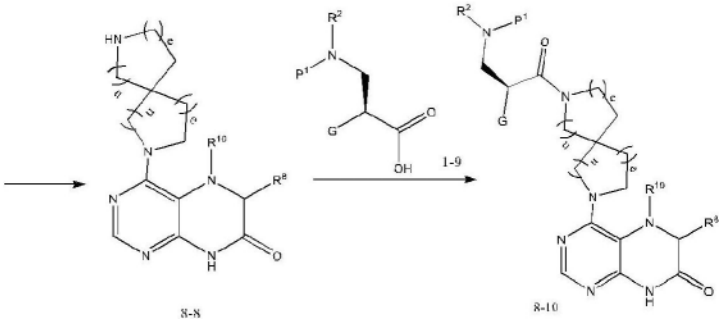
[0178] 其中,R^2、R^{10}、R^8、G、h、j、k的定义如前所述,P^1为H或胺基保护基,P^2为胺基保护基;

[0179] 式5-5化合物按照合成方案5制备,式5-5化合物与式3-6化合物反应制备式7-7化合物,式7-7化合物脱除保护基制备式7-8化合物,式7-8化合物与式1-9化合物反应制备式7-10化合物;当P^1为胺基保护基时,合成方案7进一步包括脱除保护基步骤。

[0180] 合成方案8:



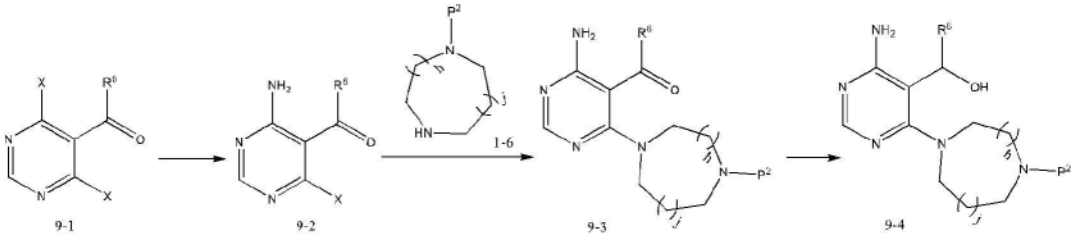
[0181]



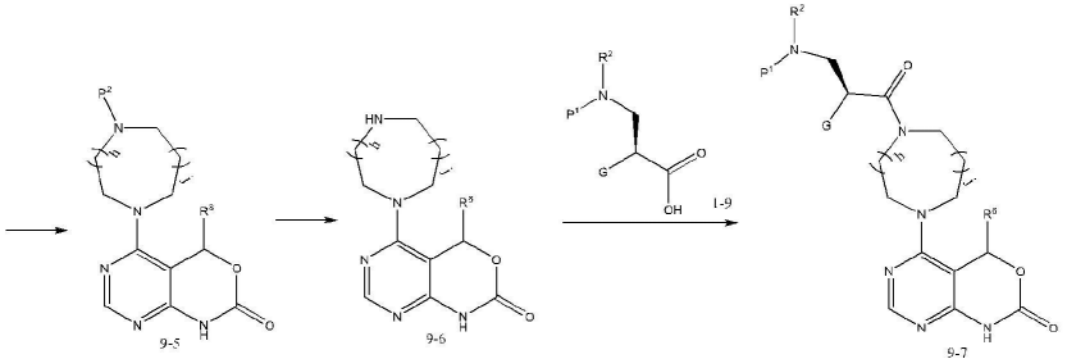
[0182] 其中,R^2、R^{10}、R^8、G、e、u的定义如前所述,P^1为H或胺基保护基,P^2为胺基保护基;

[0183] 式5-5化合物按照合成方案5制备,式5-5化合物与式4-6化合物反应制备式8-7化合物,式8-7化合物脱除保护基制备式8-8化合物,式8-8化合物与式1-9化合物反应制备式8-10化合物;当P^1为胺基保护基时,合成方案8进一步包括脱除保护基步骤。

[0184] 合成方案9:



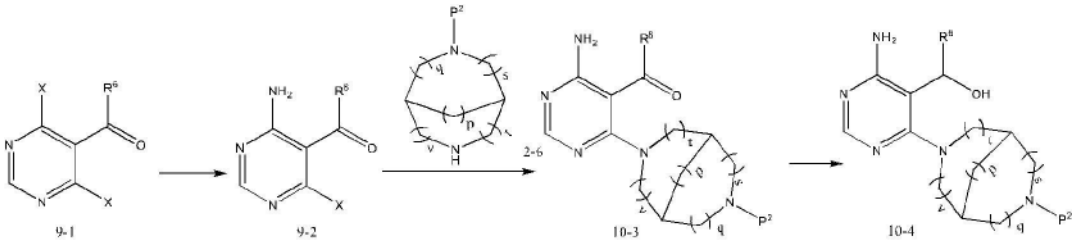
[0185]



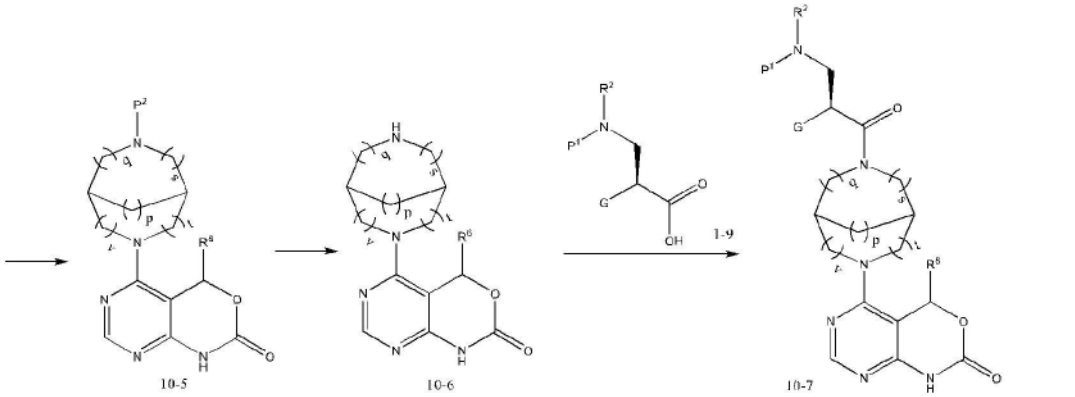
[0186] 其中X为卤素,R^6、h、j、G的定义如前所述,P^1为H或胺基保护基,P^2为胺基保护基。

[0187] 由化合物式9-1制备化合物式9-2,式9-2与化合物式1-6反应制备化合物式9-3,式9-3被还原生成化合物式9-4,式9-4发生成环反应制备化合物式9-5,式9-5脱去保护基生成化合物式9-6或其盐,再进一步与化合物式1-9反应制备得到化合物式9-7;当P^1为胺基保护基时,合成方案9进一步包括脱除保护基步骤。

[0188] 合成方案10:



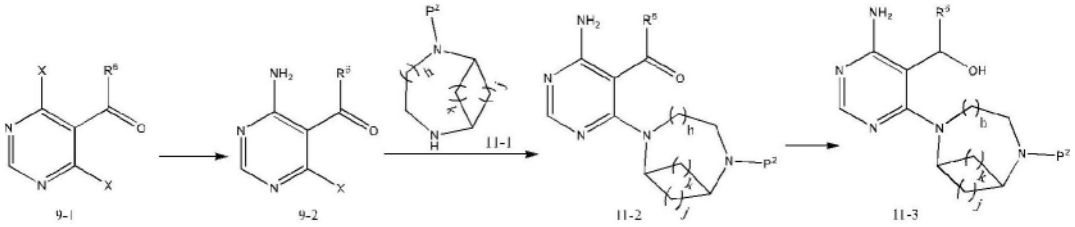
[0189]



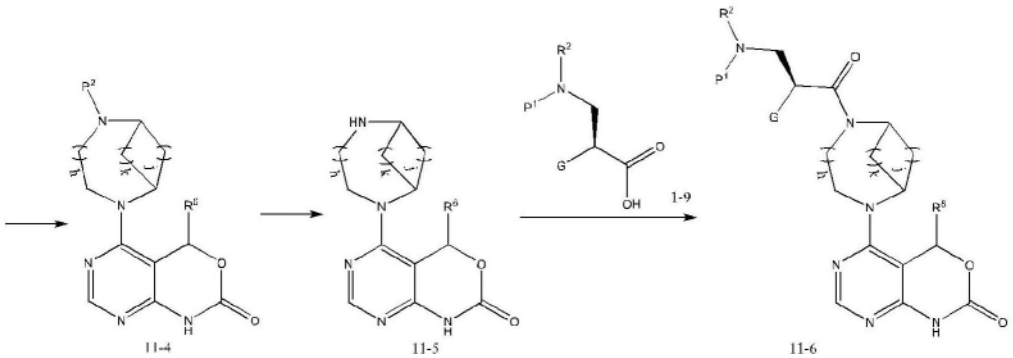
[0190] 其中X为卤素,R^6、q、v、s、t、p、G的定义如前所述,P^1为H或胺基保护基,P^2为胺基保护基。

[0191] 由化合物式9-1制备化合物式9-2,式9-2与化合物式2-6反应制备化合物式10-3,式10-3被还原生成化合物式10-4,式10-4发生成环反应制备化合物式10-5,式10-5脱去保护基生成化合物式10-6或其盐,再进一步与化合物式1-9反应制备得到化合物式10-7;当P^1为胺基保护基时,合成方案10进一步包括脱除保护基步骤。

[0192] 合成方案11：



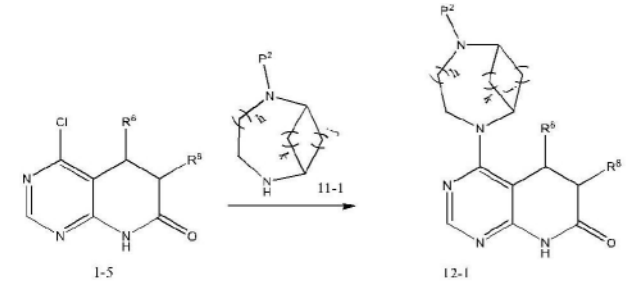
[0193]



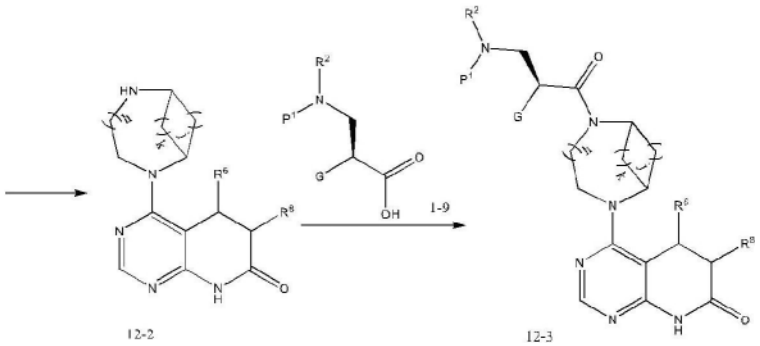
[0194] 其中X为卤素，R^6、h、k、j、G的定义如前所述，P^1为H或胺基保护基，P^2为胺基保护基。

[0195] 由化合物式9-1制备化合物式9-2，式9-2与化合物式11-1反应制备化合物式11-2，式11-2被还原生成化合物式11-3，式11-3发生成环反应制备化合物式11-4，式11-4脱去保护基生成化合物式11-5或其盐，再进一步与化合物式1-9反应制备得到化合物式11-6；当P^1为胺基保护基时，合成方案11进一步包括脱除保护基步骤。

[0196] 合成方案12：



[0197]



[0198] 其中，R^6、R^8、h、k、j、G的定义如前所述，P^1为H或胺基保护基，P^2为胺基保护基。

[0199] 由化合物式1-5与化合物11-1反应制备化合物式12-1，式12-1脱去保护基制备化合物式12-2，式12-2与化合物式1-9反应制备化合物式12-3；当P^1为胺基保护基时，合成方案12进一步包括脱除保护基步骤。

[0200] 本领域技术人员可以理解，当L为R^{12}取代时，本发明的化合物可以参照上述合成方

案制备。

附图说明

[0201] 图1为实施例15异构体2的单分子示意图；

[0202] 图2为实施例15异构体2单晶的不对称结构单元示意图；

[0203] 图3为实施例34异构体1的单分子示意图；

[0204] 图4为实施例34异构体1单晶的不对称结构单元示意图；

[0205] 图5为实施例34异构体3的单分子示意图；

[0206] 图6为实施例34异构体3单晶的不对称结构单元示意图。

具体实施方式

[0207] 相关定义

[0208] 除非有特定说明,下列用在说明书和权利要求书中的术语具有下述含义：

[0209] 本发明所述的“化合物”包括所有的立体异构体和互变异构体。

[0210] 本发明化合物可以是不对称的,例如,具有一个或多个立体异构体。除非另有说明,所有立体异构体都包括,如对映异构体和非对映异构体。本发明的含有不对称碳原子的化合物可以以光学活性纯的形式或外消旋形式被分离出来。光学活性纯的形式可以从外消旋混合物拆分,或通过使用手性原料或手性试剂合成。外消旋体、非对映异构体、对映异构体都包括在本发明的范围之内。

[0211] 本发明化合物还包括互变异构体形式。互变异构体形式来源于一个单键与相邻的双键交换并一起伴随一个质子的迁移。

[0212] 术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。

[0213] 本文中的数字范围,是指给定范围中的各个整数。例如,“C1-C6”是指该基团可具有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子;“C3-C6”是指该基团可具有3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子。

[0214] 术语“被取代的”是指特定原子或基团上的任意一个或多个氢原子被取代基取代,只要特定原子或基团的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为酮基(即=O)时,意味着两个氢原子被取代。除非另有规定,取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

[0215] 当任何变量(例如R)在化合物的组成或结构中出现一次以上时,其在每一种情况下的定义都是独立的。因此,例如,如果一个基团被1-5个R所取代,则所述基团可以任选地至多被5个R所取代,并且每种情况下的R都有独立的选项。此外,取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

[0216] 术语“烷基”指饱和的脂族烃基团,包括直链的或支链的饱和烃基,所述烃基具有所示出的碳原子数。如术语“C1-C6烷基”包括C1烷基、C2烷基、C3烷基、C4烷基、C5烷基、C6烷基,实例包括,但不限于,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、2-戊基、3-戊基、正己基、2-己基、3-己基等。其可以是二价的,例如亚甲基、亚乙基。

[0217] 术语“烷氧基”指具有烷基-O-结构的基团,烷基为包括直链的或支链的饱和一价

烃基。如“C1-C3烷氧基”包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基。

[0218] 术语“烷酰基”指具有RC(=O)-结构的基团,R为H或饱和的脂族烃基团,包括直链或支链的饱和一价烃基。如“C1-C4烷酰基”包括C1烷酰基、C2烷酰基、C3烷酰基、C4烷酰基,合适的烷酰基基团包括甲酰基、乙酰基、正丙酰基、异丙酰基、正丁酰基、异丁酰基、叔丁酰基。

[0219] 术语“卤代”指被一个或多个卤素原子取代,卤素原子的实例包括氟原子、氯原子、溴原子、碘原子。如术语“卤代C1-C3烷氧基”指被一个或多个卤素原子取代的C1-C3烷氧基,实例包括,但不限于,OCF_3、$OCHF_2$、OCH_2F、OCH_2CF_3、OCH_2CHF_2或OCF_2CF_3。如术语“卤代C1-C3烷基”指被一个或多个卤素原子取代的C1-C3烷基,实例包括,但不限于,CF_3、CHF_2、CH_2F、CH_2CF_3、CH_2CHF_2或CF_2CF_3。

[0220] 术语“环烷基”指单环饱和烃体系,无杂原子,无双键。术语“C3-C6环烷基”的实例包括,但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基。

[0221] 术语“芳基”是指具有共轭的π电子体系的全碳单环或稠合多环的芳香环基团,其通过从母体芳香环体系的单一碳原子上除去一个氢原子而得到。例如,芳基可以具有6-20个碳原子、6-14个碳原子或6-10个碳原子。包括包含与饱和、部分不饱和的环,或芳香碳环稠合的芳环的双环基团。实例包括,但不限于,苯基、萘基、蒽基、茚、茚满、1,2-二氢萘、1,2,3,4-四氢萘。

[0222] 术语“杂芳基”指包含至少一个独立地选自氮、氧和硫杂原子的5-、6-、7-元环的一价芳基,并且包括5-10个原子的稠环体系(其中至少一个是芳香性的)。杂芳基的实例包括,但不限于,吡啶基、噻吩基、咪唑基、嘧啶基、吡啶基、呋喃基、吡嗪基、噻唑基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、咪唑并吡啶基、苯并呋喃基、哒嗪基、异吲哚基。

[0223] 术语“元”是指组成环的骨架原子的数目。例如,“5-10元”是指组成环的骨架原子的数目为5个、6个、7个、8个、9个或10个。因此,举例而言,吡啶、哌啶、哌嗪和苯为六元环,而噻吩、吡咯为五元环。

[0224] 术语“杂环”是指具有环碳原子和1至2个环杂原子的5-12元饱和非芳香体系,其中杂原子独立地选自氮、硫或氧原子。在含有一或多个氮原子的杂环基团中,连接点可为碳或氮原子,只要原子价容许。杂环可为单环或多环体系,例如二环,其中两个或两个以上的环以并环、桥环或螺环形式存在,其中至少一个环含有一个或多个杂原子。

[0225] 取代基R^{12}可以与环上的任意原子相键合,只要原子价容许。取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。本领域技术人员可以理解,对于包含一个或多个R^{12}取代基的任何基团,不会引入任何在空间上不可能存在和/或不能合成的取代或取代模式。

[0226] 单波线“”与双波线“”均是指化学键连接处,两者具有相同的化学意义,如无特殊说明,“”与“”的区别仅在于区分连接的位置或顺序。

[0227] 术语“胺基保护基”是指适合用于阻止胺基氮位上副反应的保护基团。胺基保护基的实例包括但不限于:Boc、DMB、苄氧羰基、9-芴甲氧羰基、苄基、甲酰基或乙酰基。

[0228] 术语“药学上可接受的盐”是指保留了特定化合物的游离酸和碱的生物学效力而没有生物学不良作用的盐。例如酸(包括有机酸和无机酸)加成盐或碱加成盐(包括有机碱

和无机碱)。

[0229] 本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下,这样的盐的制备方法是:在水或有机溶剂或两者的混合物中,经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。

[0230] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指无毒的但能达到预期效果的药物或药剂的足够用量。

[0231] 术语“药学上可接受的载体”是指对机体无明显刺激作用,而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些载体。包括但不限于国家食品药品监督管理局许可的可用于人或动物的任何稀释剂、崩解剂、粘合剂、助流剂、润湿剂。

[0232] 权利要求书和说明书中所使用的简称其含义如下:

[0233] M:mol/L

[0234] mM:mmol/L

[0235] nM:nmol/L

[0236] Boc:叔丁氧羰基

[0237] DMB:2,4-二甲氧基苄基

[0238] NMP:N-甲基吡咯烷酮

[0239] DMAP:对二甲氨基吡啶

[0240] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[0241] DEA:二乙胺

[0242] PE:石油醚

[0243] EA:乙酸乙酯

[0244] HATU:(2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N’,N’-四甲基脲六氟磷酸酯)

[0245] RT:保留时间

[0246] SFC:超临界流体色谱

[0247] h:小时

[0248] min:分

[0249] TK:酪氨酸激酶

[0250] SEB:荧光信号增强剂

[0251] HTRF:均相时间分辨荧光

[0252] DTT:二硫苏糖醇

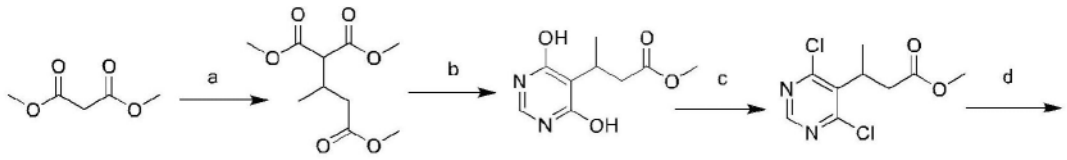
[0253] NR:未计算

[0254] 制备方法:

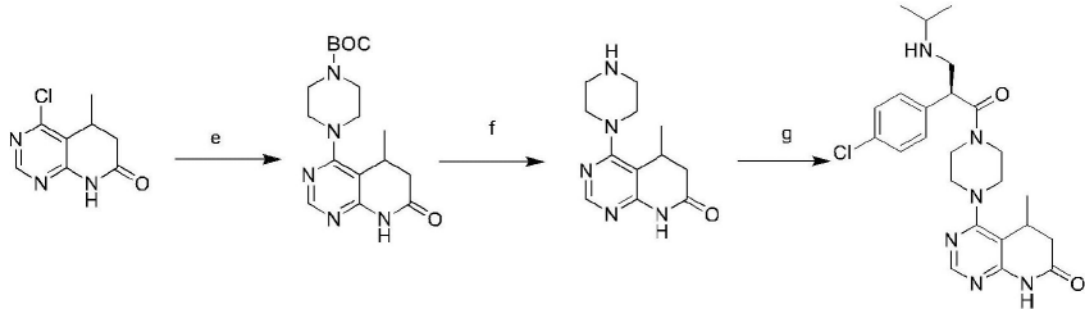
[0255] 下面更具体地描述本发明的化合物的制备方法,但这些具体的制备方法不对本发明的范围构成任何限制。此外,反应条件如反应物、溶剂、碱、所用化合物的量、反应温度、反应时间等不限于下面的实例。

[0256] 本发明的化合物还可以任选地将在本说明书中描述的或本领域已知的各种合成方法组合起来而方便制得,这样的组合可由本领域的技术人员容易地进行。

[0257] 流程A:

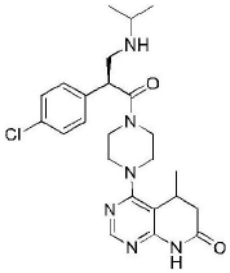


[0258]



[0259] 反应条件:a)巴豆酸乙酯,甲醇钠甲醇溶液(30%wt),甲醇;b)乙酸甲脒,甲醇钠甲醇溶液(30%wt);c)三氯氧磷,二异丙基乙胺,乙腈;d)氨水(25-28%wt);e)叔丁基哌嗪-1-羧酸酯;f)三氟乙酸,二氯甲烷;g)(S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酸,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,二异丙基乙胺,二氯甲烷。

[0260] 实施例1 4-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0261] 

[0262] a)2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯

[0263] 在氮气保护下,20℃时将甲醇钠甲醇溶液(30%wt)(8.16g)加入到甲醇中(400mL),随后升温至70℃,将丙二酸二甲酯(24.64g)和巴豆酸乙酯(21.08g)混合均匀,滴加到上述甲醇钠甲醇溶液中,70℃反应3小时。反应完全后,减压蒸去溶剂,加入乙酸乙酯(100mL)并用4M盐酸调节pH=7,然后加入100mL水,分液,浓缩有机相,得到黄色液体45.48g,,无须纯化直接用于下一步。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)0.93(d,J=6.8Hz,3H),2.26(q,J=12.0Hz,2H),2.52-2.58(m,1H),3.56(d,J=6.8Hz,1H),3.59(s,3H),3.65(s,3H),3.67(s,3H)。

[0264] b)3-(4,6-二羟基嘧啶-5-基)丁酸甲酯

[0265] 氮气保护下,20℃时将甲醇钠甲醇溶液(30%wt)(97.55g)加入到甲醇中(400mL),随后冷却至-15℃,加入乙酸甲脒(22.98g),反应30min,随后滴加2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯(45.72g),缓慢升温至20℃,继续反应12小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,加入4M的盐酸调节pH=2,减压蒸去溶剂,之后于0℃下加入100mL水,有固体析出,抽滤收集固体,滤饼经水洗涤(50mL)后,真空干燥,得到黄色固体29.60g,无须纯化直接用于下一步。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)11.62(s,2H),7.86(s,1H),3.53(s,3H),3.34-3.42(m,

1H),2.58-2.70(m,2H),1.11(d,J=6.8Hz,3H)。

[0266] c)3-(4,6-二氯嘧啶-5-基)丁酸甲酯

[0267] 在氮气保护下,22℃时将3-(4,6-二羟基嘧啶-5-基)丁酸甲酯(9.1g)分散在乙腈中(100mL),先后滴加三氯氧磷(16.03g)及二异丙基乙胺(7.79g),体系放热明显,固体逐渐溶清,随后升温至60℃,反应18小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,倾入200mL冰水中,用饱和碳酸氢钠溶液调节pH至7-8,用乙酸乙酯(50mL×3)萃取,合并有机相,减压蒸去溶剂,硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯=4:1,体积比)分离,得到棕色液体8.36g。

[0268] d)4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0269] 于20℃时将3-(4,6-二氯嘧啶-5-基)丁酸甲酯(4.12g)和氨水(25-28%wt,25mL)加入到100mL高压釜中,升温至60℃,反应18小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,抽滤,滤饼用(石油醚:乙酸乙酯=10:1,体积比)30mL打浆,得到淡黄色固体1.51g ^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)1.09-1.12(d,J=7.2Hz,3H),2.36-2.49(m,1H),2.92-3.00(m,1H),3.27-3.36(m,1H),8.54(s,1H)。

[0270] e)4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0271] 在氮气保护下,于22℃时将4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(0.42g)和叔丁基哌嗪-1-羧酸酯(10.76g)直接加热至140℃搅拌6小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,倒入30mL冰水中,用加入4M的盐酸调节pH=7,二氯甲烷(20mL×2)萃取,减压蒸去溶剂,硅胶柱层析(二氯甲烷:甲醇=30:1,体积比)分离,得到淡黄色固体0.67g,。LC-MS(ESI)m/z:348,(M+H)。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)8.47(s,1H),8.42(s,1H),3.24-3.61(m,9H),2.56-2.83(m,2H),1.48(s,9H),1.23-1.26(d,J=6.9Hz,3H)。

[0272] f)5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

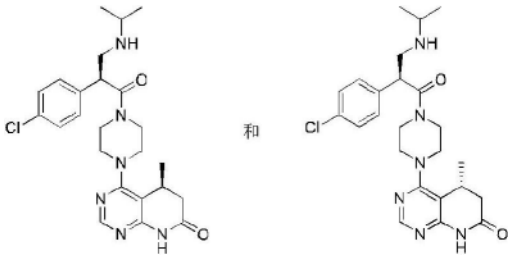
[0273] 于25℃时将4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(0.67g)溶解于二氯甲烷(10mL),加入三氟乙酸(1.31g)反应16小时。反应完全后,减压蒸去溶剂,冷却至0℃,用20%氢氧化钠溶液调节pH=12,二氯甲烷(20mL×6)萃取,合并有机相,减压蒸去溶剂,硅胶柱层析(二氯甲烷:甲醇=20:1,体积比)分离,得到黄色固体0.39g直接用于下一步。

[0274] g)4-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0275] 在氮气保护下,于20℃时将5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(0.10g)和(S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酸(0.107g)溶解于二氯甲烷(5mL),然后分别加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(0.184g)和二异丙基乙胺(0.078g),25℃反应16小时。反应完全后,向反应液加入10mL水,分液,有机相用饱和食盐水(2mL)洗涤,减压蒸去溶剂柱层析(二氯甲烷:甲醇=25:1,体积比)分离,得到白色固体0.12g。LC-MS(ESI)m/z:471(M+H)。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)1.06-1.28(m,6H),1.30-1.38(m,3H),2.57(d,J=15.0Hz,1H),2.70-2.78(m,4H),2.80-3.25(m,2H),3.28-3.69(m,7H),3.86-4.09(m,2H),7.22-7.36(m,4H),8.38(s,1H),8.61(s,1H)。

[0276] 实施例2:(S)-4-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮及(R)-4-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基

氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0277]  和

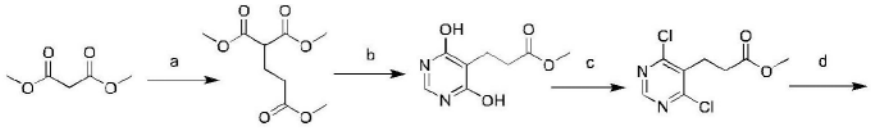
[0278] 在氮气保护下,20℃时将5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(0.49g)和(S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酸(0.53g)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(20mL),随后分别加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(1.50g)和二异丙基乙胺(0.51g),25℃反应4小时。反应完全后,向反应液加入100mL水,分液,有机相用饱和食盐水(40mL)洗涤,减压蒸去溶剂,硅胶柱层析(二氯甲烷:甲醇=25:1,体积比)分离,得到白色固体0.59g。经手性拆分,得到(S)构型产物0.21g(de%=100%)和(R)构型产物0.19g(de%=99%)。

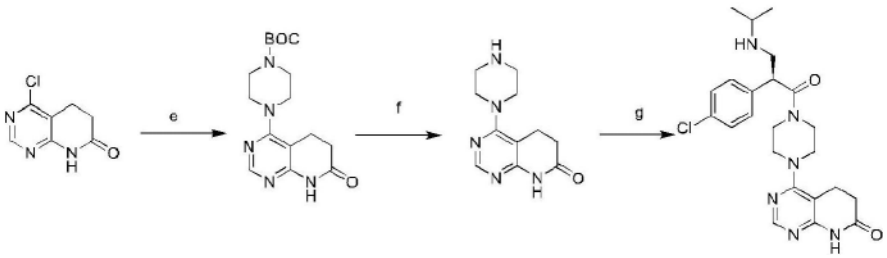
[0279] 拆分仪器:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel OD,250×30mm I.D.,5μm;流动相A:CO_2,流动相B:异丙醇(含0.1%$NH_3 \cdot H_2O$),A:B=70:30(体积比)。

[0280] (S)构型产物:LC-MS(ESI)m/z:471(M+H).^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)0.93-0.96(m,6H),1.30(d,J=3.0Hz,3H),2.23-2.36(m,1H),2.61-2.84(m,4H),3.12-3.31(m,5H),3.35-3.49(m,2H),3.65-3.78(m,3H),4.21-4.29(m,1H),7.33(d,J=6.6Hz,2H),7.40(d,J=6.6Hz,2H),8.38(s,1H),10.66(s,1H);

[0281] (R)构型产物:LC-MS(ESI)m/z:471(M+1).^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)0.95-1.03(m,9H),2.26-2.30(m,1H),2.66-2.79(m,1H),2.82-2.96(m,3H),3.11-3.20(m,4H),3.34-3.47(m,3H),3.62-3.69(m,3H),4.18-4.22(m,1H),7.34(d,J=6.6Hz,2H),7.42(d,J=6.6Hz,2H),8.28(s,1H),10.62(s,1H)。

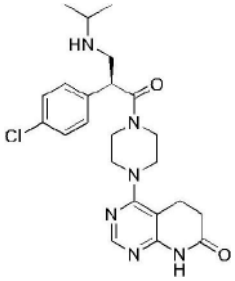
[0282] 流程B:



[0283] 

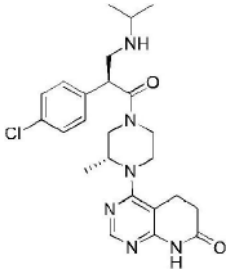
[0284] 反应条件:a)丙烯酸甲酯,甲醇钠甲醇溶液(30%wt),甲醇;b)乙酸甲脒,甲醇钠,甲醇;c)三氯氧磷,二异丙基乙胺,乙腈;d)氨水(25-28%wt);e)叔丁基哌嗪-1-羧酸酯;f)三氟乙酸,二氯甲烷;g)(S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酸,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,二异丙基乙胺,二氯甲烷。

[0285] 实施例3:(S)-4-(4-(2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0286] 

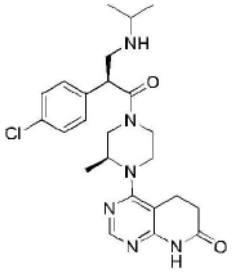
[0287] 如实施例1描述的方法制备:采用丙烯酸甲酯替换巴豆酸乙酯。LC-MS(ESI)m/z:457(M+H).^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)0.92-0.96(m,6H),2.42-2.49(m,2H),2.62-2.78(m,5H),3.08-3.29(m,4H),3.38-3.43(m,2H),3.57-3.65(m,3H),4.21-4.29(m,1H)7.31-7.34(m,2H),7.38-7.40(m,2H),8.27(s,1H),10.53(s,1H)。

[0288] 实施例4 4-((R)-4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2-甲基哌嗪-1-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0289] 

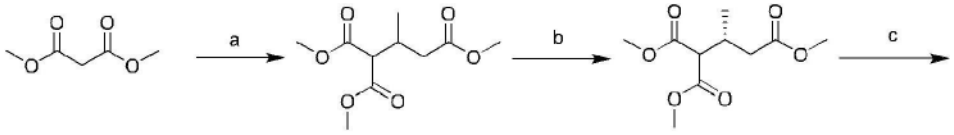
[0290] 如实施例3描述的方法制备:采用(R)-3-甲基哌嗪-1-羧酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。LC-MS(ESI)m/z:471(M+H).^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)0.75-0.95(m,9H),2.40-2.49(m,3H),2.51-2.61(m,4H),2.85-3.36(m,5H),3.62-3.76(m,1H),3.91-3.96(m,1H),4.14-4.19(m,2H)7.29-7.42(m,4H),8.26(d,J=7.2Hz,1H),10.54(s,1H)。

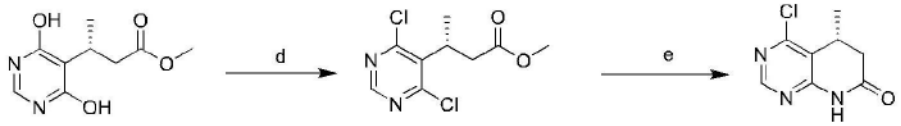
[0291] 实施例5 4-((S)-4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2-甲基哌嗪-1-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0292] 

[0293] 如实施例3描述的方法制备:采用(S)-3-甲基哌嗪-1-羧酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。LC-MS(ESI)m/z:471(M+H)^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)1.10-1.33(m,9H),2.42-2.49(m,2H),2.67-2.76((m,4H),2.84-3.05(m,4H),3.51-3.58(m,3H),3.91-4.19(m,2H),4.28-4.54(m,1H)7.32-7.45(m,4H),8.27(s,1H),10.53(s,1H)。

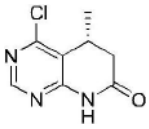
[0294] 流程C:

[0295] 



[0296] 反应条件:a)巴豆酸乙酯,甲醇钠甲醇溶液(30％wt),甲醇;b)磷酸氢二钠,去离子水,盐酸,脂肪水解酶(皱褶假丝酵母菌),氢氧化钠;c)乙酸甲脒,甲醇钠,甲醇;d)三氯氧磷,二异丙基乙胺,乙腈;e)氨水(25-28％wt)。

[0297] 中间体(R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0298] 

[0299] a)2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯

[0300] 氮气保护下,于20℃将甲醇钠甲醇溶液(30％wt,50.32g)加入到甲醇中(900mL),然后升温至70℃,将丙二酸二甲酯(461.12g)和巴豆酸乙酯(349.46g)混合均匀,滴加到上述甲醇钠甲醇溶液中,70℃反应3小时。反应完全后,减压蒸去溶剂,加入乙酸乙酯(1L),用4M盐酸调节pH至7-8,随后加入500mL水,分液,减压蒸去有机相,得到黄色液体777.68g。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)3.67(s,3H),3.65(s,3H),3.59(s,3H),3.56(d,J＝6.8Hz,1H),2.45-2.58(m,2H),2.23-2.29(m,1H),0.93(d,J＝6.8Hz,3H)。

[0301] b)(R)-2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯

[0302] 25℃时,将磷酸氢二钠(4.5g)溶解在1.5L去离子水中,用2N盐酸调节pH＝7.05,加入2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯(150.46g)和脂肪水解酶(皱褶假丝酵母菌,40g分6天加入),用2N的氢氧化钠溶液调节pH至7.0-7.6之间,35℃反应6天,手性检测ee％＞98％,手性检测条件(Chiralpak IC,4.6×250mm,5μm,正己烷:乙醇＝9:1,体积比)。将反应液冷却至10℃,用3M的盐酸调节pH至3-4,加入500mL乙酸乙酯,抽滤,滤饼用乙酸乙酯洗涤(600mL),分液,加入饱和碳酸氢钠水溶液(100mL)洗涤,分液,浓缩有机相,得到淡黄色液体26.89g。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)3.74(s,6H),3.68(s,3H),3.46(d,J＝7.2Hz,1H),2.71-2.79(m,1H),2.54(dd,J＝15.6、4.8Hz,1H),2.32(dd,J＝16.0、8.4Hz,1H),1.06(d,J＝6.8Hz,3H)。

[0303] c)(R)-3-(4,6-二羟基嘧啶-5-基)丁酸甲酯

[0304] 在氮气保护下,于20℃将乙酸甲脒(11.33g)溶解在甲醇中(200mL),冷却至0℃,滴加甲醇钠甲醇溶液(30％,55.62g),0℃反应60min,滴加(R)-2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯(24.07g)的甲醇(60mL)溶液,自然升温至20℃,反应10小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,加入3N的盐酸调节pH至5-6,减压蒸去溶剂,随后冷却至0℃,加入3N的盐酸调节pH＝3,有固体析出,抽滤收集固体,滤饼用冰水洗涤(100mL),真空干燥滤饼,得到白色固体18.79g,直接用于下一步。

[0305] d)(R)-3-(4,6-二氯嘧啶-5-基)丁酸甲酯

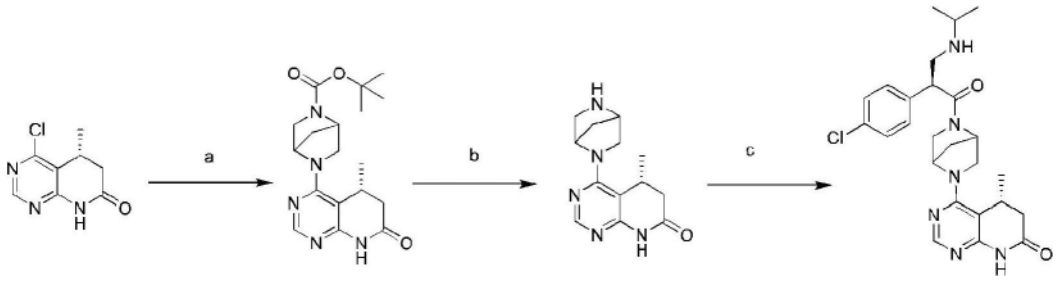
[0306] 在氮气保护下,22℃时将(R)-3-(4,6-二羟基嘧啶-5-基)丁酸甲酯(14.63g)分散

在乙腈中(70mL),先后滴加三氯氧磷(26.42g)及二异丙基乙胺(12.51g),体系放热明显,随后升温至60℃,固体逐渐溶清,继续反应18小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,加入100mL乙酸乙酯,用饱和碳酸氢钠溶液调节pH至7-8,以乙酸乙酯(50mL×3)萃取,减压蒸去有机相,得到黄色固体13.89g,直接用于下一步。

[0307] e)(R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

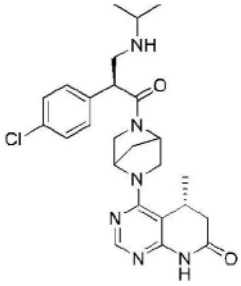
[0308] 20℃时将(R)-3-(4,6-二氯嘧啶-5-基)丁酸甲酯(13.89g)和氨水(25-28%wt,70mL)加入到100mL高压釜中,升温至50℃,反应18小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,抽滤,滤饼用(石油醚:乙酸乙酯=10:1,体积比)30mL打浆,得到淡黄色固体7.32g。LC-MS(ESI)m/z:198(M+H).^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)1.30(d,J=7.2Hz,3H),2.65-2.69(m,1H),2.86-2.92(m,1H),3.47-3.54(m,1H),8.64(s,1H),10.10(s,1H)。

[0309] 流程D:

[0310] 

[0311] 反应条件:a)2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯,4-二甲氨基吡啶,N-甲基吡咯烷酮;b)氯化氢/1,4-二氧六环(4.0M),二氧六环;c)(S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酸,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,二异丙基乙胺,N,N-二甲基甲酰胺。

[0312] 实施例6(5R)-4-(5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0313] 

[0314] a)4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0315] 在氮气保护下,22℃时将(R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(0.30g)、2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯(1.21g)和4-二甲氨基吡啶(0.58g)溶于N-甲基吡咯烷酮中,加热至140℃,反应6小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,倒入30mL冰水中,加入4M盐酸调节pH至4-5,以乙酸乙酯(20mL×2)萃取,饱和食盐水洗涤有机相(10mL×3),减压蒸去有机相,硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:1,体积比),得到淡黄色固体0.33g。LC-MS(ESI)m/z:360(M+H)。

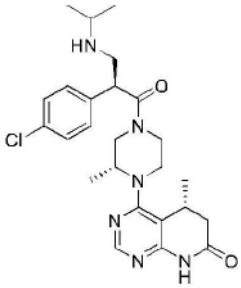
[0316] b)(5R)-4-(2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0317] 25℃时将4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(0.28g)溶解于二氧六环(3mL),加入氯化氢/1,4-二氧六环(4.0M)1.91g反应16小时。反应完全后,将反应液浓缩去溶剂,冷却至0℃,加入20%氢氧化钠溶液调节pH=12,以二氯甲烷(20mL×8)萃取,减压蒸去有机相,得到棕色固体0.15g,直接用于下一步。

[0318] c)(5R)-4-(5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

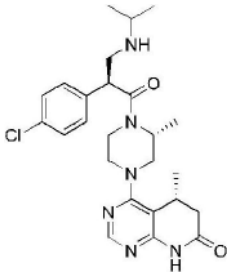
[0319] 在氮气保护下,20℃时将4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(0.15g)和(S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酸(0.157g)溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中,分别加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(0.26g)和二异丙基乙胺(0.29g),25℃反应16小时。反应完全后,向反应液加入10mL水,分液,有机相用饱和食盐水(2mL)洗涤,减压蒸去有机相,硅胶柱层析(二氯甲烷:甲醇=20:1,体积比),得到小麦色固体0.037g。LC-MS(ESI)m/z:483(M+H).^{1}H NMR(300MHz,DMSO d_6)δ(ppm)0.68-1.24(m,10H),1.75-2.38(m,3H),2.54-2.61(m,4H),3.08-3.28(m,2H),3.59-3.61(m,2H),3.87-4.16(m,2H),4.72-4.97(m,2H)7.31-7.38(m,4H),8.10(d,J=23.1Hz,1H),10.36(d,J=11.4Hz,1H)。

[0320] 实施例7(R)-4-((R)-4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2-甲基哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8--二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0321] 

[0322] 如实施例6描述的方法制备,采用(R)-4-Boc-2-甲基哌嗪替换2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯。LC-MS(ESI)m/z:485(M+H).^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)0.94-1.04(m,12H),2.24-2.29(m,1H),2.67-2.93(m,5H),3.06-3.19(m,5H),3.57-3.62(m,3H),4.21-4.24(m,1H),7.32-7.44(m,4H),8.26(s,1H),10.61(s,1H)。

[0323] 实施例8(R)-4-((R)-4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-3-甲基哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

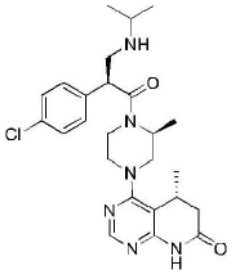
[0324] 

[0325] 如实施例6描述的方法制备,采用(R)-1-N-Boc-2-甲基哌嗪替换2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯。

[0326] LC-MS(ESI)m/z:485(M+H).^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)8.37(d,J=12.0Hz,1H),8.28(s,1H),7.36(d,J=6.0Hz,2H),7.26(d,J=6.0Hz,2H),4.59-4.95(m,1H),4.08-4.31

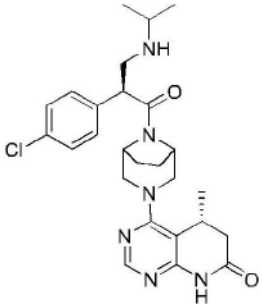
(m,2H),3.15-3.82(m,6H),2.72-3.09(m,4H),2.52-2.58(m,1H),2.32-2.39(m,1H),1.10-1.38(m,12H)。

[0327] 实施例9(R)-4-((S)-4-((R)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙氨基)丙酰基)-3-甲基哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0328] 

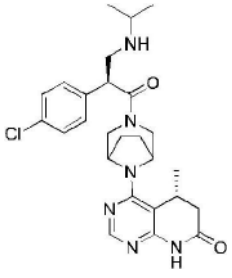
[0329] 如实施例6描述的方法制备,采用(S)-1-N-Boc-2-甲基哌嗪替换2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯。LC-MS(ESI)m/z:485(M+H).^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)8.35(d,J=16.0Hz,1H),7.41-7.28(m,3H),7.26-7.21(m,1H),4.89(d,J=6.8Hz,1H),4.76-4.49(m,1H),3.75-3.65(m,1H),3.64-3.54(m,1H),3.51-3.49(m,1H),3.44-3.34(m,1H),3.34-3.17(m,3H),3.17-3.09(m,1H),3.06-2.96(m,1H),2.89-2.49(m,3H),1.44-1.29(m,7H),1.25-1.06(m,5H)。

[0330] 实施例10(R)-4-(8-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙氨基)丙酰基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0331] 

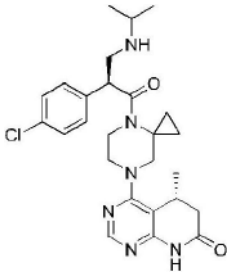
[0332] 如实施例6描述的方法制备,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯替换2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯。LC-MS(ESI)m/z:497(M+H).^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)8.35(d,J=16.0Hz,1H),7.41-7.28(m,3H),7.26-7.21(m,1H),4.83(s,1H),4.51-4.30(m,2H),4.25-4.22(m,1H),4.10-4.03(m,1H),3.92-3.84(m,1H),3.73-3.62(m,1H),3.50-3.26(m,3H),3.24-3.21(m,1H),3.20-2.85(m,2H),2.75-2.62(m,1H),2.49-2.41(m,1H),2.20-1.90(m,1H),1.88-1.60(m,3H),1.44-1.29(m,6H),1.25-1.06(m,3H)。

[0333] 实施例11(R)-4-(3-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0334] 

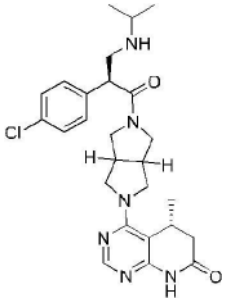
[0335] 如实施例6描述的方法制备,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-甲酸叔丁酯替换2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯。LC-MS(ESI)m/z:497(M+H).^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)8.66(s,1H),8.28(d,J=5.2Hz,1H),7.15-7.38(m,4H),4.31-4.56(m,3H),3.93(s,1H),3.49-3.66(m,2H),3.15-3.31(m,2H),2.70-3.01(m,4H),2.26-2.50(m,1H),1.74-2.03(m,3H),1.57-1.67(m,1H),1.43-1.50(m,1H),1.03-1.26(m,9H)。

[0336] 实施例12(R)-4-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-7-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0337] 

[0338] 如实施例6描述的方法制备,采用4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-4-甲酸叔丁酯替换2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯。LC-MS(ESI)m/z=497(M+H).^{1}H NMR(400MHz,$DMSO\text{-}d_6$)δ10.58(s,1H),8.22(s,1H),7.33-7.38(m,4H),4.37(s,1H),3.40-4.15(m,4H),2.97-3.09(m,3H),2.57-2.90(m,4H),2.24-2.32(m,1H),0.44-1.13(m,13H)。

[0339] 实施例13(5R)-4-(5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)六氢吡咯[3,4-c]吡咯-2(1H)-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

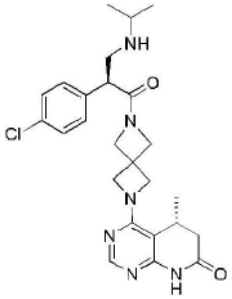
[0340] 

[0341] 如实施例6描述的方法制备,采用六氢吡咯并[3,4-c]吡咯-2(1H)-甲酸叔丁酯替换2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯。制备得终产品后经拆分得到顺式异构体和反式异构体。手性拆分条件:拆分仪器:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel AD,250×30mm I.D.,5μm;流动相A:CO_2,流动相B:乙醇(含0.1%氨水),A:B=65:35(体积比)。收集保留时间8-10min的产物,为顺式异构体,收集保留时间11-13min的产物,为反式异构体。

[0342] 顺式异构体:LC-MS(ESI)m/z:497.(M+H).^{1}H NMR(300MHz,$DMSO\text{-}d_6$)δ(ppm)10.31(d,J=6.9Hz,1H),8.08(d,J=13.5Hz,1H),7.28-7.38(m,4H),3.76-3.93(m,3H),3.56-3.72(m,2H),3.45-3.52(m,2H),3.38-3.40(m,2H),3.13-3.24(m,2H),3.03-3.07(m,1H),2.84-2.90(m,2H),2.57-2.78(m,3H),2.17-2.26(m,1H),1.04(d,J=5.1Hz,2H),0.87-0.93(m,7H)。

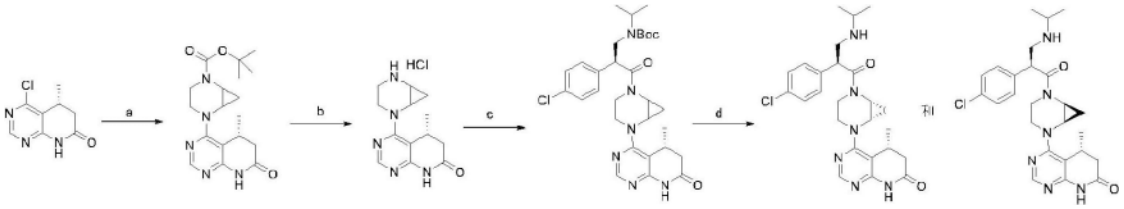
[0343] 反式异构体:LC-MS(ESI)m/z:497.(M+H).^{1}H NMR(300MHz,$DMSO\text{-}d_6$)δ(ppm)10.31(d,J=7.8Hz,1H),8.08(d,J=13.2Hz,1H),7.28-7.40(m,4H),3.82-3.94(m,2H),3.68-3.79(m,1H),3.47-3.63(m,2H),3.07-3.22(m,3H),2.62-3.02(m,5H),2.18-2.27(m,1H),1.20-1.29(m,3H),1.05(d,J=5.4Hz,1H),0.90-0.96(m,6H),0.81-0.86(m,3H)。

[0344] 实施例14(R)-4-(6-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,6-二氮杂螺[3.3]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0345] 

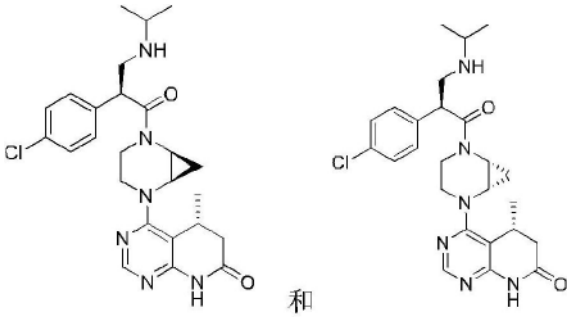
[0346] 如实施例6描述的方法制备,采用2,6-二氮杂螺[3.3]庚烷-2-甲酸叔丁酯替换2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯。LC-MS(ESI)m/z:483(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)10.38(s,1H),8.09(s,1H),7.36-7.38(m,2H),7.30-7.32(m,2H),4.48(d,J=9.6Hz,1H),4.35(s,2H),4.26(s,2H),3.98-4.08(m,3H),3.63-3.67(m,1H),3.00-3.10(m,2H),2.61-2.73(m,4H),2.23(d,J=16.0Hz,1H),1.02(d,J=7.2Hz,3H),0.91-0.93(m,6H)。

[0347] 流程E:

[0348] 

[0349] 反应条件:a)2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯,N-甲基吡咯烷酮,4-二甲氨基吡啶;b)氯化氢/1,4-二氧六环(4.0M),二氯甲烷;c)(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)-丙酸,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,4-二甲氨基吡啶,N,N-二甲基甲酰胺;d)三氟乙酸,二氯甲烷。

[0350] 实施例15(R)-4-((1S,6R)-5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮或(R)-4-((1R,6S)-5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0351] 

异构体1 和 异构体2

[0352] a)5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯

[0353] 氮气保护下,于22℃将(R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

(0.21g),2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯(0.31g)和4-二甲氨基吡啶(0.39g)溶解在N-甲基吡咯烷酮(5mL),然后加热至140℃,反应3小时。反应完全后,将反应液冷却至20℃,倒入20mL冰水中,乙酸乙酯(20mL×2)萃取,饱和食盐水洗涤(10mL×3),减压蒸除溶剂,硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯=3:1~1:1)分离,得到淡黄色液体0.28g。LC-MS(ESI)m/z:360(M+H)。

[0354] b)(5R)-4-(2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮盐酸盐

[0355] 20℃将5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯(0.28g)溶解于二氯甲烷(5mL),加入氯化氢/1,4-二氧六环(4.0mL)反应1小时。反应完全后,反应液减压蒸除溶剂,得到黄色固体0.23g,直接用于下一步。

[0356] c)(2S)-2-(4-氯苯基)-3-(5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-3-氧代丙基)(异丙基)氨基甲酸叔丁酯

[0357] 在氮气保护下,于20℃将(5R)-4-(2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮盐酸盐(0.20g)和(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)-丙酸(0.22g)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(5mL),加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(0.59g)和4-二甲氨基吡啶(0.48g),25℃反应4小时。反应完全后,向反应液中加入20ml水,以乙酸乙酯(10mL×3)萃取,有机相用饱和食盐水洗涤(10mL×2),减压蒸除有机相,柱层析(二氯甲烷:甲醇=50:1)分离,得到黄色固体0.18g。LC-MS(ESI)m/z:583(M+H)。

[0358] d)(R)-4-((1S,6R)-5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮或(R)-4-((1R,6S)-5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0359] 20℃将(2S)-2-(4-氯苯基)-3-(5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-3-氧代丙基)(异丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.18g)溶解于二氯甲烷(2mL),加入三氟乙酸(0.86mL),反应3小时。反应完全后,向反应液中加入二氯甲烷(10mL),于0℃滴加2M的氢氧化钠溶液,调节pH=12,分液,饱和食盐水洗涤(5mL)有机相,无水硫酸钠干燥,减压蒸除有机相,得到黄色固体0.10g。经高效制备液相拆分,得到异构体1(3mg),异构体2(12mg)。

[0360] 高效制备液相条件:色谱柱:Aglient 5μm prep-C18 50×21.2mm,流动相A:水(含0.1%氨水);流动相B:甲醇。梯度:时间0-10min,B相60-70%(体积比)。

[0361] 异构体1:RT_1=5.3min,LC-MS(ESI)m/z:483(M+H)。

[0362] 异构体2:RT_2=5.9min;LC-MS(ESI)m/z:483(M+H);^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)8.27(d,J=7.6Hz,1H),7.92(s,1H),7.27-7.30(m,4H),4.23-4.29(m,1H),3.90-3.95(m,1H),3.81-3.85(m,1H),3.69-3.72(m,1H),3.44-3.59(m,1H),3.20-3.38(m,3H),3.01-3.05(m,1H),2.70-2.85(m,3H),2.47-2.57(m,1H),2.21-2.25(m,1H),1.25-1.28(m,3H),1.03-1.11(m,6H),0.82-0.90(m,2H)。

[0363] 单晶衍射测定构型:

[0364] 单晶制备:将30.0mg异构体2化合物、2.0mL异丙醇加入5mL螺口玻璃瓶中,搅拌5min,固体溶清。称取3.9mg二水合草酸加入上述玻璃瓶中,玻璃瓶中逐渐有白色固体析出,室温搅拌3h,玻璃瓶中析出大量白色固体。向玻璃瓶中加入1.0mL甲醇,白色固体逐渐消失,溶液变澄清,继续搅拌1h。溶液经0.22μm微孔滤膜滤至3mL螺口玻璃瓶中,玻璃瓶口用保鲜膜覆盖。用针头在瓶口处扎8个小孔,室温放置7天,制得异构体2化合物的草酸盐单晶。

[0365] 单晶衍射实验:

[0366] 单晶X射线衍射仪:BRUKER D8 VENTURE PHOTON II

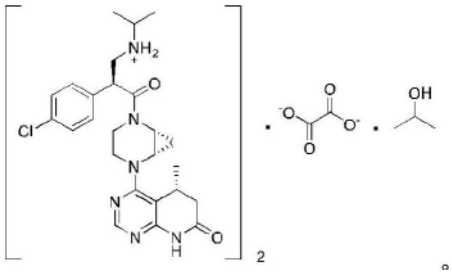
[0367] 波长:Ga Kα(λ=1.34139Å)

[0368] 测试温度:190K

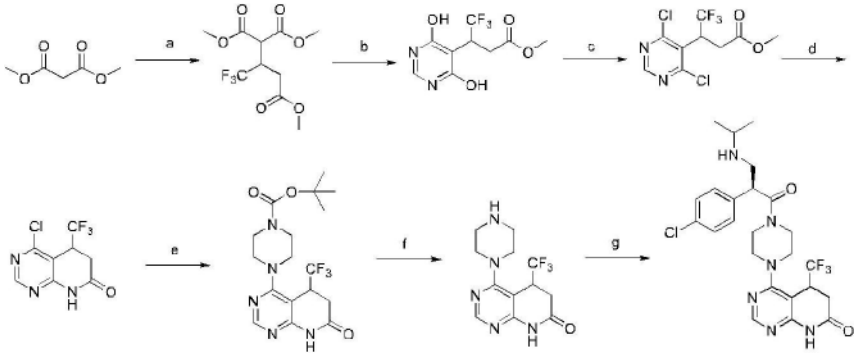
[0369] 用于结构解析的计算机程序:SHELXL-2018

[0370] 单晶数据:分子式:$C_{55}H_{72}Cl_2N_{12}O_9$;分子量:1116.14;晶系:六方晶系;空间群:P 61;晶胞参数:a=25.8406(15)Å,b=25.8406(15)Å,c=45.916(3)Å,α=90°,β=90°,γ=120°;单位晶胞体积:V=26552(4)Å^3;单位晶胞中包含的分子式个数:Z=12;计算密度:D_{calc}=0.838g/cm^3;$R(F_o)$:0.0730;$R_W(F_o^2)$:0.2069;拟合优度(S):1.034;Flack参数:0.066(9)。

[0371] 结构描述:单晶X射线衍射及结构解析表明,所制得的单晶为异构体2的草酸盐异丙醇合物。晶体的不对称结构单元中包含四个异构体2分子、两个草酸分子及两个异丙醇分子,其中异构体2和草酸形成草酸盐。化合物异构体2的单分子示意图如图1所示,草酸盐单晶的不对称结构单元如图2所示。结构式表示如下:

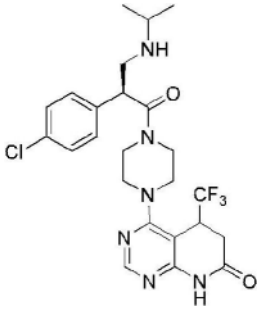
[0372] 

[0373] 流程F:

[0374] 

[0375] 反应条件:a)4,4,4-三氟丁-2-烯酸甲酯,甲醇钠甲醇溶液(30%wt);b)乙酸甲脒,甲醇钠甲醇溶液(30%wt);c)三氯氧磷,二异丙基乙胺,乙腈;d)氨水(25-28%wt);e)叔丁基哌嗪-1-羧酸酯;f)三氟乙酸,二氯甲烷;g)(S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酸,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,二异丙基乙胺,二氯甲烷。

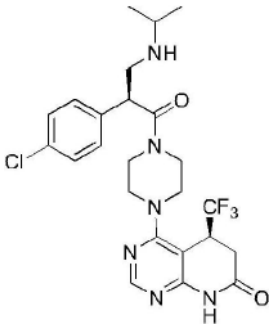
[0376] 实施例16:4-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5-(三氟甲基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0377] 

[0378] 按照流程F,如实施例1描述的方法制备。LC-MS(ESI)m/z:525(M+H).

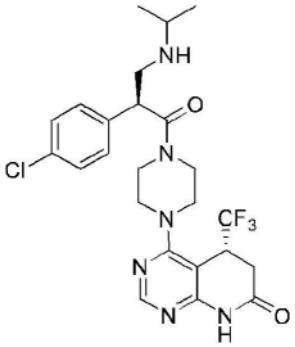
[0379] 异构体分离:采用超临界流体色谱法对上述标题化合物进行手性拆分得到异构体1和异构体2。拆分仪器及条件:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel AS,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO_2,B为乙醇(0.1%NH_3H_2O);A:B=85:15(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0380] 异构体1:

[0381] 

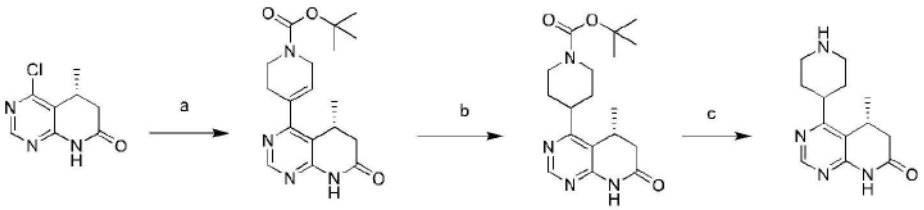
[0382] LCMS(ESI)m/z:525(M+H).^{1}HNMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm):0.91-0.95,(m,6H),2.59-2.78(m,4H),3.07-3.12(m,1H),3.20-3.31(m,4H),3.37-3.50(m,3H),3.69-3.75(m,2H),4.08-4.19(m,2H),7.35(dd,J=25.2、8.0Hz,4H),8.36(s,1H),10.90(s,1H)。

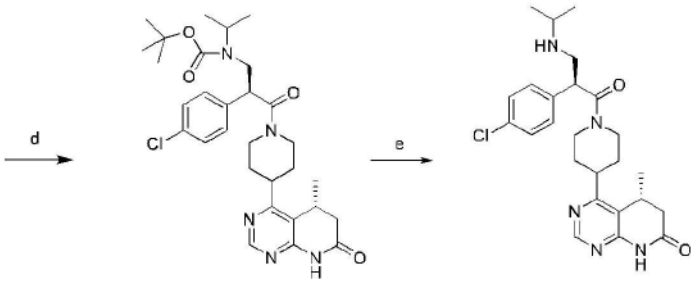
[0383] 异构体2:

[0384] 

[0385] LCMS(ESI)m/z:525(M+H).^{1}HNMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)0.93-1.06(m,6H),2.58-2.72(m,4H),3.06-3.31(m,4H),3.45-3.68(m,6H),4.11-4.20(m,2H)7.31-7.43(m,4H),8.34(d,J=6.0Hz,1H),10.92(s,1H)。

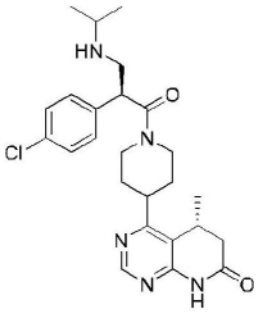
[0386] 流程G:



[0387] 

[0388] 反应条件:a)4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-3,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸叔丁酯,二氧六环,碳酸铯,水,四(三苯基膦)钯;b)甲醇,甲酸,钯碳(5%),氢气;c)二氯甲烷,氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M);d)(S)-3-((叔丁氧基羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸,N,N-二甲基甲酰胺,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,二异丙基乙胺;e)二氯甲烷,氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M)。

[0389] 实施例17:

[0390] 

[0391] a)(R)-4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-3,6-二氢吡啶-1(2H))-甲酸叔丁酯

[0392] 在氮气保护下,22℃时将(R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(060g)和4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-3,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸叔丁酯(1.03g)溶解在二氧六环(20mL)中,加入碳酸铯和水(5mL)最后加入四(三苯基膦)钯(0.35g),100℃反应7小时。反应完全后,将反应液冷却至20℃,倾入10mL冰水中,以乙酸乙酯(20mL)萃取,减压蒸去有机相,硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯=4:1,体积比)分离,得到淡黄色固体0.81g。MS(ESI)m/z:345(M+H)。

[0393] b)(R)-4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯

[0394] 20℃时,将(R)-4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-3,6-二氢吡啶-1(2H))-甲酸叔丁酯(0.75g)溶于甲醇(50mL)中,加入甲酸(0.11g)和钯碳(5%)0.30g,氮气置换3次,充入氢气,60℃反应16小时。反应完全后,冷却至10℃,抽滤钯碳,滤液减压蒸去溶剂,得到无色油状物0.66g,MS(ESI)m/z:347(M+H)。

[0395] c)(R)-5-甲基-4-(哌啶-4-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0396] 25℃时将(R)-4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯(0.63g)溶解于二氯甲烷(10mL),加入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M)(10mL)反应2小时。反应完全后,浓缩去溶剂,冷却至0℃,加入20%氢氧化钠溶液调节pH=12,乙酸乙酯(10mL×3)萃取,饱和食盐水(15mL)洗涤,减压蒸去有机相,得到黄色固体0.346g,直接用于下一步。

[0397] d)(S)-2-(4-氯苯基)-3-(4-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-1-基)-3-氧代丙基)(异丙基)氨基甲酸叔丁酯

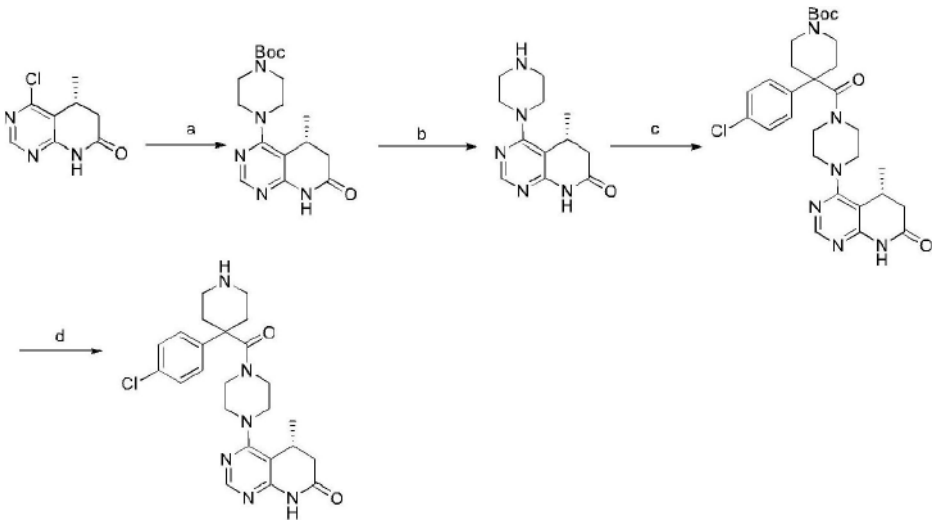
[0398] 在氮气保护下,20℃时将(R)-5-甲基-4-(哌啶-4-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(0.302g)和(S)-3-((叔丁氧基羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(0.308g)溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL),随后加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(0.86g)和二异丙基乙胺(0.76g),20℃反应3小时。反应完全后,向反应液加入30mL水,以乙酸乙酯(50mL)萃取,分液,有机相用饱和食盐水(10mL×2)洗涤,减压蒸去有机相,硅胶柱层析(二氯甲烷:甲醇=25:1,体积比)分离,得到白色固体0.339g,直接用于下一步。

[0399] e)(R)-4-(1-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌啶-4-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0400] 25℃将(S)-2-(4-氯苯基)-3-(4-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-1-基)-3-氧代丙基)(异丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.320g)溶解于二氯甲烷(3mL)中,加入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M)(2.9mL)反应2小时。反应完全后,将反应液减压蒸去溶剂,然后冷却至0℃,加入20%氢氧化钠溶液调节pH=12,乙酸乙酯(10mL×3)萃取,饱和食盐水(15mL)洗涤,减压蒸去有机相,得到白色固体0.176g。

[0401] LC-MS(ESI)m/z:470(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)0.83-0.97(m,6H),1.03-1.10(m,3H),1.24-1.43(m,2H),1.57-1.95(m,2H),2.29-2.35(m,1H),2.51-2.87(m,5H),3.01-3.19(m,3H),3.35-3.41(m,1H),4.02-4.21(m,2H),4.51-4.62(m,1H)7.32-7.43(m,4H),8.50-8.61(m,1H),10.85(s,1H)。

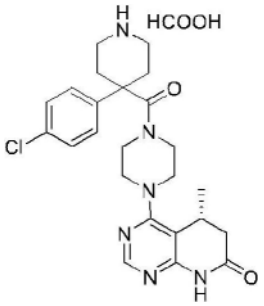
[0402] 流程H:

[0403] 

[0404] 反应条件:a)叔丁基哌嗪-1-羧酸酯,N-甲基吡咯烷酮,4-二甲氨基吡啶;b)二氯甲烷,氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M);c)二异丙基乙胺,N,N-二甲基甲酰胺,2-(7-氧化苯

并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,1-(叔丁氧基羰基)-4-(4-氯苯基)哌啶-4-羧酸;d)二氯甲烷,氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M)。

[0405] 实施例18(R)-4-(4-(4-(4-氯苯基)哌啶-4-羰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-5,6-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮甲酸盐

[0406] 

[0407] a)(R)-4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0408] 20℃时将(R)-4-氯-5-甲基-5,6-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(400mg)、叔丁基哌嗪-1-羧酸酯(1.8g)和4-二甲氨基吡啶(494mg)溶于N-甲基吡咯烷酮(10mL),反应液用氮气置换三次,并在氮气保护下升温至150℃,反应4小时。反应完全后,将反应液倒入20mL乙酸乙酯中,用水洗涤(2mL*2),再以0.5M稀盐酸洗涤pH至5-6。分液,有机相用无水硫酸钠干燥,浓缩得到粗品。粗品通过快速过柱仪柱分离纯化(洗脱剂:石油醚/乙酸乙酯=2:1,体积比)得到白色固体0.6g。LC-MS(ESI)m/z:348(M+H)。

[0409] b)(R)-5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,6-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮

[0410] 18℃时将(R)-4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)叔丁基哌嗪-1-羧酸酯(0.6g)溶于二氯甲烷(2mL),并滴入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M,5mL),于18℃反应2小时。反应完全后,将反应液减压蒸去溶剂得到油状目标产物,产物用二氯甲烷溶解,并加入氢氧化钠固体,搅拌至油状物溶解,过滤除去固体,剩余物浓缩得到白色固体(0.3g),直接用于下一步。

[0411] c)(R)-4-(4-氯苯基)-4-(4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基))哌嗪-1-羰基)哌啶-1-羧酸叔丁酯

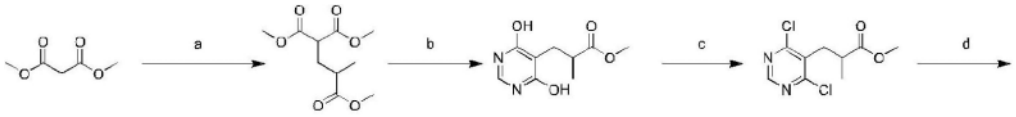
[0412] 18℃时将(R)-5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,6-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(150mg),(1-(叔丁氧基羰基)-4-(4-氯苯基)哌啶-4-羧酸(247mg),二异丙基乙胺(235mg)和2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(346mL)溶于无水N,N-二甲基甲酰胺(3mL),于18℃反应12小时。反应完全后,将反应液倒入乙酸乙酯中(20mL)并用水(5mL*3)洗涤,减压蒸去有机相得到粗品。粗品通过硅胶柱分离(洗脱剂:石油醚/乙酸乙酯=1:2,体积比)纯化后得到无色油状目标产物280mg,直接用于下一步。

[0413] d)(R)-4-(4-(4-(4-氯苯基)哌啶-4-羰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮甲酸盐

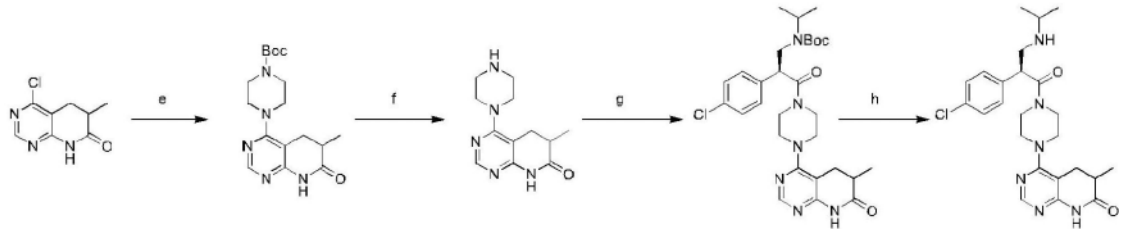
[0414] 15℃将(R)-4-(4-氯苯基)-4-(4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基))哌嗪-1-羰基)哌啶-1-羧酸叔丁酯(280mg)溶于二氯甲烷(5mL)然后滴入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M,5mL),于15℃反应1.5小时。反应完全后,将反应液浓缩得到白色粗品。粗品通过高效液相制备分离得到60mg目标产物。制备条件:色谱柱:Kromasil 10μm

C18 50×250mm,流动相A:水(含0.1%甲酸),流动相B:甲醇。梯度:时间0-10min,B相20%;10-30min,B相20-50%;30-40min,B相50%(体积比),RT=31.4min。LC-MS(ESI)m/z=469[M+H].^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)10.62(s,1H),8.41(s,1H),8.26(s,1H),7.48(d,J=8.3Hz,2H),7.29(d,J=8.3Hz,2H),2.74-3.74(m,12H),2.49-2.50(m,2H),2.22-2.26(m,3H),1.96-2.00(m,2H),0.97-0.99(m,3H)。

[0415] 流程I:



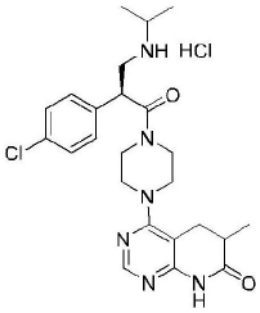
[0416]



[0417] 反应条件:a)甲基丙烯酸甲酯,甲醇钠,甲醇;b)乙酸甲脒,甲醇钠,甲醇;c)三氯氧磷,二异丙基乙胺,乙腈;d)氨水(25-28%wt);e)叔丁基哌嗪-1-羧酸酯,N,N-二甲基吡啶-4-胺,N-甲基吡咯烷酮;f)氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M);g)(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸,二异丙基乙胺,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,N,N-二甲基甲酰胺;h)氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M)。

[0418] 实施例19 4-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙氨基)丙基)哌嗪-1-基)-6-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮盐酸盐

[0419]



[0420] a)1,1,3-三羧酸三甲基丁烷

[0421] 在氮气保护下,20℃时将甲醇钠(2.45g)分散在甲醇中(50mL),加入丙二酸二甲酯(5g)和甲基丙烯酸甲酯(3.75g),升温至60℃,反应16小时。反应完全后,将反应液减压蒸去溶剂,得到黄色液体5g,直接用于下一步。

[0422] b)3-(4,6-二羟基嘧啶-5-基)-2-甲基丙酸甲酯

[0423] 在氮气保护下,20℃时将甲醇钠(11.67g)溶解在甲醇中(30mL),冷却至0℃搅拌下加入乙酸甲脒(2.44g),反应30min,然后滴加1,1,3-三羧酸三甲基丁烷(5g),于20℃反应16小时。反应完全后,向反应液中加入盐酸异丙醇(4.0M)调节pH=5,减压蒸去溶剂,冷却至0℃,析出固体,抽滤,滤饼用水洗涤(50mL),烘干滤饼,得到淡黄色固体3.7g,直接用于下一步。

[0424] c)3-(4,6-二氯嘧啶-5-基)-2-甲基丙酸甲酯

[0425] 在氮气保护下,22℃将3-(4,6-二羟基嘧啶-5-基)-2-甲基丙酸甲酯(3g)分散在乙腈中(60mL),先后滴加三氯氧磷(2.91mL)和二异丙基乙胺(1.18mL),体系放热明显,固体逐渐溶清,随即升温至90℃,反应16小时。反应完全后,将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经硅胶层析柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=10:1,体积比)得到白色固体1.50g,直接用于下一步。

[0426] d)4-氯-6-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0427] 20℃时将3-(4,6-二氯嘧啶-5-基)-2-甲基丙酸甲酯(1.5g)加入氨水(3mL)中,20℃反应16小时。反应完全后,将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经硅胶层析柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=4:1,体积比)得到白色固体0.30g。LC-MS(ESI)m/z:199(M+H).

[0428] e)4-(6-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0429] 20℃下向溶有4-氯-6-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(0.1g)的N-甲基吡咯烷酮溶液(3mL)中加入叔丁基哌嗪-1-羧酸酯(0.28g)和N,N-二甲基吡啶-4-胺(0.31g),将反应混合物在150℃下搅拌3小时。反应完全后,将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1,体积比)得到白色固体0.31g。LC-MS(ESI)m/z:348.2(M+H).

[0430] f)6-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0431] 20℃下向4-(6-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(0.1g)中加入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M 10mL),将反应混合物在20℃下搅拌3小时。反应完全后,减压蒸去溶剂得到近白色固体(0.1g)。LC-MS(ESI)m/z:248.2(M+H).

[0432] g)(2S)-2-(4-氯苯基)-3-(4-(6-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-氧丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯

[0433] 在20℃下向溶有6-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(0.1g)的N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中加入(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(0.17g),二异丙基乙胺(0.16g)。将反应混合物搅拌2min。再20℃加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(0.23g)将反应混合物在20℃下搅拌1小时。反应完全后,将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:2,体积比)得到白色固体0.08g,直接用于下一步。

[0434] h)4-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙氨基)丙酰基)-哌嗪-1-基)-6-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮盐酸盐

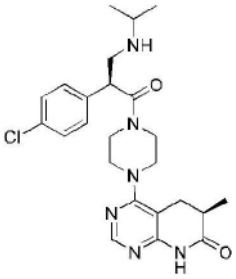
[0435] 20℃下向(2R)-2-(4-氯苯基)-3-(4-(6-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶[2,3-d]嘧啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-氧丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.2g)中加入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M,3mL)。将反应混合物在20℃下搅拌3小时。反应完全后,反应液减压蒸去溶剂经制备分离得到近白色固体0.06g。LC-MS(ESI)m/z:471(M+H).^{1}H NMR(400MHz,MeOD)δ8.42(d,J=4.5Hz,1H),7.54-7.33(m,4H),4.64-4.52(m,1H),3.96-3.81(m,2H),3.79-3.73

(m,2H),3.70-3.66(m,2H),3.63-3.56(m,1H),3.51-3.40(m,2H),3.24-3.16(m,1H),3.09-2.94(m,1H),2.84(s,1H),2.79-2.66(m,2H),1.44-1.35(m,6H),1.33-1.25(m,3H)。

[0436] 异构体分离:

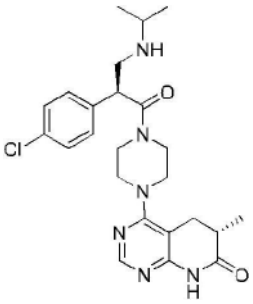
[0437] 采用超临界流体色谱法对上述标题化合物进行手性拆分。拆分仪器及条件:WatersSFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel AS,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO_2,B为甲醇(0.1%NH_3H_2O),A:B=90:10(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0438] 异构体1:

[0439] 

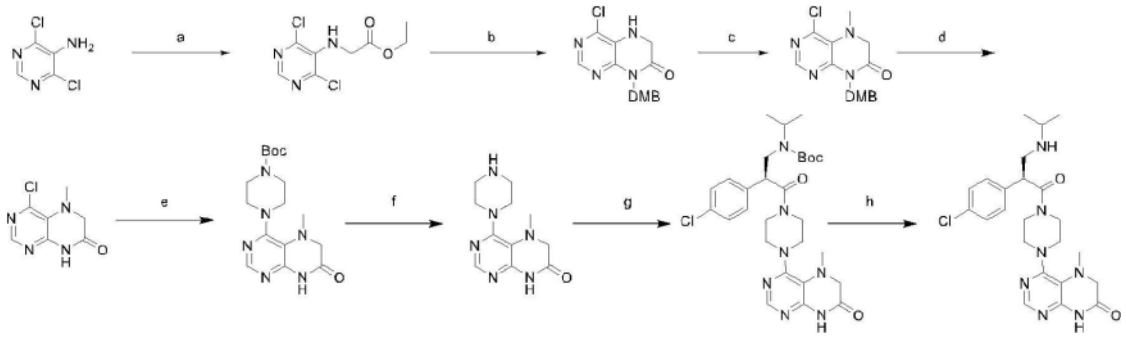
[0440] LCMS(ESI)m/z:471(M+H).^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.36(s,1H),7.86(s,1H),7.32-7.37(m,2H),7.21-7.27(m,2H),4.18(s,1H),3.89-4.00(m,1H),3.65-3.74(m,1H),3.53-3.64(m,2H),3.44-3.52(m,1H),3.35-3.42(m,2H),3.27-3.34(m,2H),2.87-2.94(m,1H),2.74-2.82(m,2H),2.57-2.64(m,1H),2.47-2.54(m,1H),1.32(d,J=6.6Hz,3H),1.07-1.19(m,6H)。

[0441] 异构体2:

[0442] 

[0443] LCMS(ESI)m/z:471(M+H).^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.37(s,1H),7.33-7.38(m,2H),7.21-7.27(m,2H),4.09(s,1H),3.83-3.91(m,1H),3.62-3.72(m,1H),3.47(s,3H),3.26-3.34(m,2H),3.12-3.21(m,1H),2.69-2.98(m,5H),2.50-2.66(m,2H),1.32(d,J=6.7Hz,3H),1.11(dd,J=14.8,6.2Hz,6H)。

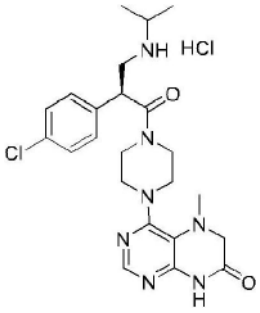
[0444] 流程J:

[0445] 

[0446] 反应条件:a)溴乙酸乙酯,氢化钠,四丁基碘化铵,四氢呋喃;b)2,4二甲氧基苯甲

胺,三乙胺,异丙醇;c)碘甲烷,氢化钠,N,N二甲基甲酰胺;d)三氟乙酸;e)叔丁基哌嗪-1-羧酸酯,4-二甲氨基吡啶,N-甲基吡咯烷酮;f)氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M);g)(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸,二异丙基乙胺,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,N,N二甲基甲酰胺;h)氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M)。

[0447] 实施例20(S)-4-(4-(2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮盐酸盐

[0448] 

[0449] a)2-((4,6-二氯嘧啶-5-基)氨基)乙酸乙酯

[0450] 0℃下向溶有4,6-二氯-5-氨基嘧啶(10.0g)的四氢呋喃溶液(100mL)中加入氢化钠(2.93g)。将反应混合物搅拌2min。自然升温至20℃后加入溴乙酸乙酯(12.22g),再加入四丁基碘化铵(27.03g)。将反应混合物在20℃下搅拌16小时。反应完全后,将反应液倾入水(100mL)中,搅拌30min,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相以饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂。产品经硅胶层析柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=20:1,体积比)得到无色油状物6.5g,直接用于下一步。

[0451] b)4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮

[0452] 20℃下向溶有2-((4,6-二氯嘧啶-5-基)氨基)乙酸乙酯(5g)的异丙醇溶液(150mL)中加入2,4-二甲氧基苯甲胺(3.67g),然后加入三乙胺(4.45g)。将反应混合物在80℃下搅拌18小时。反应完全后,反应液过滤,滤饼用乙醇洗涤后减压干燥得到近白色固体5.0g,直接用于下一步。

[0453] c)4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮

[0454] 0℃下向溶有4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5,6-二氢蝶啶-7(8H)-酮(3.3g)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(30mL)中加入碘甲烷(1.68g),将反应混合物搅拌20min。保持0℃并加入氢化钠(0.47g)。将反应混合物继续在0℃下搅拌3小时。反应完全后,将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂。产品经硅胶层析柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=5:1,体积比)得到产品白色固体1.5g,直接用于下一步。

[0455] d)4-氯-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮

[0456] 在20℃下向4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-5,6-二氢蝶啶-7(8H)-酮(5g)中加入三氟乙酸(20mL)。将反应混合物在60℃下搅拌16小时。反应完全后,减压蒸去溶剂得到近紫色固体(1.0g)。LC-MS(ESI)m/z:199.1(M+H)。^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)11.60(s,1H),8.35(s,1H),3.77(s,2H),2.85(s,3H)。

[0457] e)4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0458] 20℃下向溶有4-氯-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮(0.3g)的N-甲基吡咯烷酮溶液(5mL)中加入叔丁基哌嗪-1-羧酸酯(0.85g),4-二甲氨基吡啶(0.93g)。将反应混合物在150℃下搅拌3小时。反应完全后,将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1,体系比)得到白色固体0.27g,直接用于下一步。

[0459] f)5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮

[0460] 在20℃下向4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(0.1g)中加入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M,3mL),将反应混合物在20℃下搅拌3小时。反应完全后,减压蒸去溶剂得到近白色固体(0.1g)。

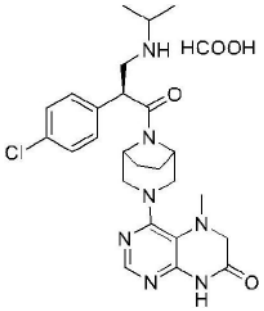
[0461] g)(S)-(2-(4-氯苯基)-3-(4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-氧丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯

[0462] 20℃下向溶有5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-5,6-二氢蝶啶-7(8H)-酮(0.1g)的N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中加入(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(0.17g),二异丙基乙胺(0.16g),将反应混合物搅拌2min,再于20℃加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(0.23g),随后将反应混合物在20℃下搅拌1小时。反应完全后,将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1.5,体积比)得到产品白色固体0.08g。LC-MS(ESI)m/z:572(M+H)。

[0463] h)(S)-4-(4-(2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮盐酸盐

[0464] 20℃下向(S)-(2-(4-氯苯基)-3-(4-(5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-氧代丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.08g)中加入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M,3mL),将反应混合物在20℃下搅拌3小时。反应完全后,反应液减压蒸去溶剂经制备分离得到近白色固体0.02g。LC-MS(ESI)m/z:472(M+H).^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)10.94(s,1H),8.12(s,1H),7.46-7.51(m,2H),7.37-7.43(m,2H),4.68-4.74(m,1H),3.81-3.91(m,2H),3.64-3.74(m,2H),3.59-3.63(m,2H),3.52-3.59(m,4H),3.25-3.34(m,2H),2.95-3.03(m,1H),2.48(s,3H),1.20-1.28(m,6H)。

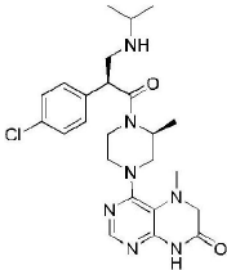
[0465] 实施例21 4-(8-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮甲酸盐

[0466] 

[0467] 如实施例20描述的方法制备,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯,目标产物高效制备液相条件:色谱柱:Aglient 5μm prep-C18 50×21.2mm,流动相A:水(含0.1%甲酸);流动相B:乙腈。梯度:时间0-10min,B相5-75%(体积

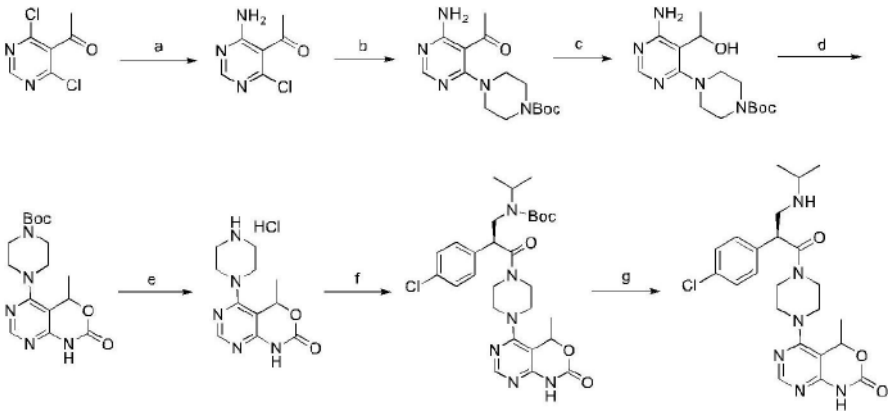
比),RT=3.4min。LC-MS(ESI)m/z:498(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)10.89(s,1H),8.27(s,1H),8.10(d,J=25.6Hz,1H),7.31-7.48(m,4H),4.48-4.68(m,3H),4.09-4.30(m,2H),3.50-3.60(m,3H),3.11-3.24(m,2H),2.62-2.84(m,3H),2.37-2.47(m,3H),1.49-1.88(m,4H),0.89-1.02(m,6H)。

[0468] 实施例22 4-((S)-4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-3-甲基哌嗪-1-基)-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮

[0469] 

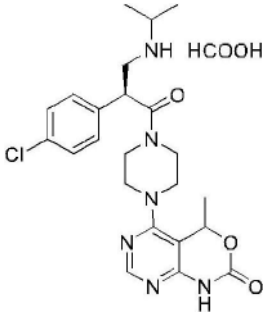
[0470] 如实施例20描述的方法制备,采用(S)-1-N-Boc-2-甲基哌嗪替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯,最终产物在0℃下加入10%氢氧化钠溶液调节pH=9,二氯甲烷(10mL×3)萃取,饱和食盐水(15mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去有机相得白色固体70mg。LC-MS(ESI)m/z:486(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)10.88(s,1H),8.09(d,J=5.6Hz,1H),7.35-7.42(m,3H),7.27(d,J=8.4Hz,1H),4.55-4.74(m,3H),4.44-4.53(m,1H),4.31-4.39(m,1H),4.16-4.26(m,1H),4.00-4.10(m,1H),3.87-3.96(m,1H),3.04-3.16(m,2H),2.87-2.96(m,1H),2.77-2.85(m,1H),2.56-2.63(m,2H),2.42-2.47(m,3H),1.18-1.29(m,3H),0.90-0.96(m,6H)。

[0471] 流程K:

[0472] 

[0473] 反应试剂:a)氨水(25%-28%wt),四氢呋喃;b)乙腈,叔丁基哌嗪-1-羧酸酯,N,N-二异丙基乙胺;c)硼氢化钠,甲醇,饱和氯化铵水溶液;d)碳酸三氯甲基酯,N,N-二异丙基乙胺,四氢呋喃;e)二氯甲烷,氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M);f)(S)-3-((叔丁氧基羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸,N,N-二异丙基乙胺,N,N-二甲基甲酰胺,2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯;g)二氯甲烷,氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M)。

[0474] 实施例23 5-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-4-甲基-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]恶嗪-2-酮甲酸盐

[0475] 

[0476] a)1-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)乙酮

[0477] 20℃时将1-(4,6-二氯嘧啶-5-基)乙酮(2.5g),溶于四氢呋喃(15mL)然后加入氨水(9g),反应液在20℃搅拌5小时,然后浓缩并加少量水稀释,抽滤得到白色固体,真空干燥后得到白色固体2g,直接用于下一步。

[0478] b)4-(5-乙酰基-6-氨基嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0479] 20℃时将(1-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)乙酮(2g),N,N-二异丙基乙胺(3g)溶于乙腈(20mL),然后加入1-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)乙酮,反应液在40℃搅拌5小时。反应完全后,减压蒸去溶剂得到粗产品,粗产品通过硅胶层析柱分离纯化(乙酸乙酯:石油醚=1:1,体积比)得到淡黄色固体3.2g,直接用于下一步。

[0480] c)4-(6-氨基-5-(1-羟乙基)嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0481] 20℃时将4-(5-乙酰基-6-氨基嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(1.5g)溶于甲醇(15mL)并冷却至-10℃,再分批加入硼氢化钠(1g),完毕后反应液缓慢升温至20℃继续搅拌3小时。反应完全后,将反应液用饱和氯化铵水溶液淬灭。然后将反应液浓缩并用乙酸乙酯(20m L*2)打浆。母液浓缩得到油状粗产品。粗产品通过硅胶层析柱分离纯化(二氯甲烷:甲醇=1:30,体积比)得到白色油状产物400mg。LC-MS(ESI):m/z=324[M+H]。

[0482] d)4-(4-甲基-2-氧代-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]恶嗪-5-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0483] 20℃时将4-(6-氨基-5-(1-羟乙基)嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(300mg)N,N-二异丙基乙胺(282mg)溶于四氢呋喃(3mL),然后降温至-5℃并缓慢加入碳酸三氯甲基酯,并在-5℃搅拌0.5小时。随后缓慢升温至18℃搅拌1.5小时。反应完全后,用碳酸氢钠水溶液淬灭反应,并用乙酸乙酯(10mL*3)萃取,合并有机相并以无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到油状粗品。粗产品通过硅胶层析柱分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1,体积比)得到白色固体108mg)。LC-MS(ESI)m/z=350[M+H]。

[0484] e)4-甲基-5-(哌嗪-1-基)-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]恶嗪-2-酮盐酸盐

[0485] 20℃时将4-(4-甲基-2-氧代-2,4-二氢-1H-嘧啶并[4,5-d][1,3]恶嗪-5-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(100mg)溶于二氯甲烷(3mL)并搅拌状态下加入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M,3mL),反应液在20℃搅拌1小时,有白色固体析出。将反应液减压蒸去溶剂得到白色固体目标产物80mg,直接用于下一步。

[0486] f)(2S)-2-(4-氯苯基)-3-(4-(4-甲基-2-氧代-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]恶嗪-5-基)哌嗪-1-基)-3-氧代丙基)(异丙基)氨基甲酸叔丁酯

[0487] 20℃时将4-甲基-5-(哌嗪-1-基)-1H-嘧啶并[4,5-d][1,3]恶嗪-2(4H)-酮(80mg),(S)-3-((叔丁氧基羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(100mg),N,N-二异丙

基乙胺(113mg)和2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(167mg)溶于无水N,N-二甲基甲酰胺(2.5mL),反应液在20℃搅拌12小时。反应完全后,将反应液倒入乙酸乙酯(20mL)中,并用水洗涤两次,氯化钠水溶液洗涤一次,有机相浓缩得到粗产品。粗产品通过硅胶层析柱分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1,体积比)得到白色固体130mg。LC-MS(ESI)m/z=573[M+H]。

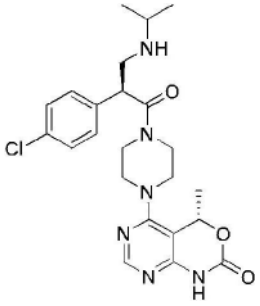
[0488] g)5-(4-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-4-甲基-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]恶嗪-2-酮甲酸盐

[0489] 20℃时将(2S)-2-(4-氯苯基)-3-(4-(4-甲基-2-氧代-2,4-二氢-1H-嘧啶并[4,5-d][1,3]叔丁基]恶嗪-5-基)哌嗪-1-基)-3-氧代丙基)(异丙基)氨基甲酸叔丁酯(130mg)溶于二氯甲烷(2mL)并搅拌状态下加入氯化氢/1,4-二氧六环溶液(4.0M,2mL),反应液在20℃搅拌2小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,加入10%氢氧化钠溶液调节pH=9,二氯甲烷(10mL×3)萃取,饱和食盐水(15mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去有机相,残留物通过高效制备液相分离纯化得到白色固体32mg。制备条件:色谱柱:Aglient 5μm prep-C18 50×21.2mm,流动相A:水(含0.1%甲酸);流动相B:乙腈,梯度:时间0-10min,B相5-45%(体积比),RT=3.7min。LC-MS(ESI):m/z=473[M+H]。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm)8.22-8.31(m,2H),7.37-7.45(m,2H),7.28-7.36(m,2H),5.68-5.81(m,1H),4.18-4.28(m,1H),3.41-3.78(m,8H),3.03-3.26(m,3H),2.89-3.01(m,1H),2.74-2.83(m,1H).2.64-2.72(m,1H).1.33-2.49(m,3H).0.89-1.04(m,6H)。

[0490] 异构体分离:

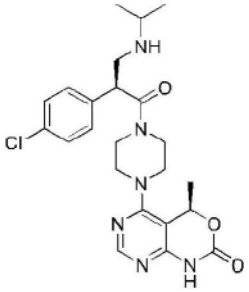
[0491] 采用超临界流体色谱法对上述标题化合物进行手性拆分。拆分仪器及条件:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel AD,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO_2,B为甲醇(0.1%NH_3H_2O),A:B=65:35(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0492] 异构体1:

[0493] 

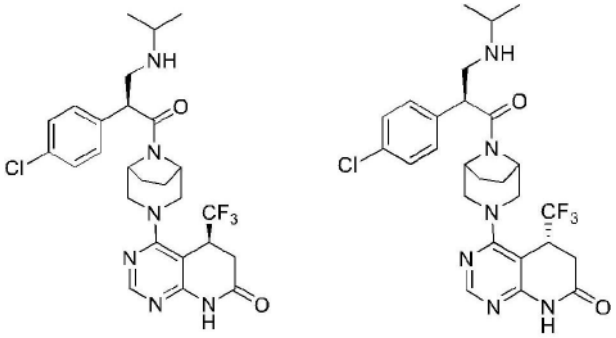
[0494] LCMS(ESI):m/z=473(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.28(s,1H),7.47-7.23(m,4H),5.76(d,J=6.3Hz,1H),4.15(s,1H),3.75-3.44(m,6H),3.28-3.20(m,2H),3.15-3.04(m,2H),2.74-2.58(m,2H),1.41(d,J=6.2Hz,3H),0.93(t,J=6.9Hz,6H)。

[0495] 异构体2:

[0496] 

[0497] LCMS(ESI):M/Z=473(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.85(s,1H),8.29(s,1H),7.43(dd,J=42.1,8.2Hz,4H),5.75(q,J=6.2Hz,1H),4.76-4.54(m,1H),3.79-3.39(m,8H),3.32-3.20(m,2H),3.10-2.85(m,2H),1.43(d,J=6.4Hz,3H),1.25(t,J=5.6Hz,6H)。

[0498] 实施例24

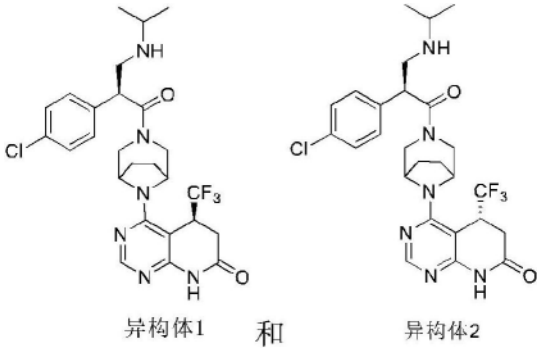
[0499] 

[0500] 按照流程F描述的方法,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。终产物经超临界流体色谱法分离得到异构体1和异构体2。拆分仪器及条件:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel OD,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO_2,B为乙醇(0.1%NH_3H_2O),A:B=70:30(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0501] 异构体1:LCMS(ESI)m/z:551(M+H).^{1}HNMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm):1.28-1.11(m,6H),2.10-1.47(m,6H),3.18-2.75(m,7H),4.28-3.65(m,5H),4.85-4.83(m,1H),7.41-7.25(m,4H),8.42-8.33(m,1H)。

[0502] 异构体2:LCMS(ESI)m/z:551(M+H).^{1}HNMR(300MHz,DMSO-d_6)δ(ppm):2.28-1.20(m,13H),3.43-2.89(m,6H),4.37-3.71(m,5H),4.86-4.81(m,1H),7.39-7.27(m,4H),8.36(s,1H)。

[0503] 实施例25

[0504] 

[0505] 按照流程F描述的方法,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-甲酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。终产物经超临界流体色谱法分离得到异构体1和异构体2。拆分仪器及

条件:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel OZ,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO_2,B为乙醇(0.1%NH_3H_2O),A:B=60:40(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

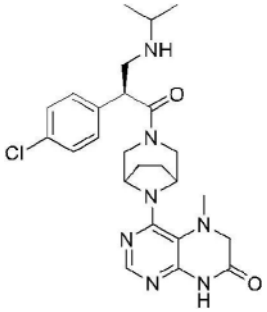
[0506] 异构体1:

[0507] LCMS(ESI)m/z:551(M+H).^{1}HNMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm):0.98-0.92(m,6H),1.96-1.57(m,3H),2.87-2.59(m,5H),3.29-3.12(m,2H),3.63-3.42(m,2H),3.99(s,1H),4.67-4.24(m,5H),7.46-7.27(m,4H),8.30(d,J=3.6Hz,1H),10.84(s,1H)。

[0508] 异构体2:

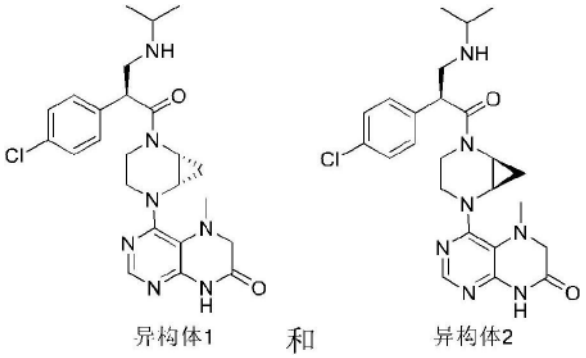
[0509] LCMS(ESI)m/z:551(M+H).^{1}HNMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm):0.98-0.89(m,6H),2.03-1.54(m,4H),2.76-2.57(m,4H),3.27-2.95(m,4H),3.70-3.67(m,1H),3.99-3.95(m,1H),4.67-4.20(m,4H),7.45-7.27(m,4H),8.28(s,1H),10.83(s,1H)。

[0510] 实施例26

[0511] 

[0512] 按照流程J描述的方法,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-甲酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。LCMS(ESI):m/z=498(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.86(s,1H),8.06-8.15(m,1H),7.23-7.47(m,4H),4.85-5.09(m,2H),4.11-4.31(m,2H),3.92-4.04(m,1H),3.54-3.62(m,2H),3.05-3.17(m,1H),2.84-2.95(m,1H),2.72-2.82(m,1H),2.55-2.63(m,1H),2.41(s,3H),1.91(s,1H),1.61-1.77(m,1H),1.40-1.55(m,1H),1.22-1.33(m,1H),0.84-1.01(m,6H),0.40-0.53(m,1H)。

[0513] 实施例27

[0514] 

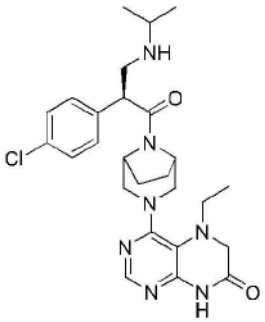
[0515] 按照流程J描述的方法,采用2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。终产物采用超临界流体色谱法分离得到异构体1和异构体2。拆分仪器及条件:Waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel OZ,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO_2,B为乙醇(0.1%NH_3H_2O),A:B=60:40(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0516] 超高效合相色谱条件:色谱柱:Daicel Chiralcel AD,2.1×150mm I.D.,3μm,流动相A:CO_2,流动相B:乙醇(0.1%DEA),梯度:时间0-8min,B相5-40%(体积比);流速:1mL/min;柱温40℃。异构体1:RT=4.0min;异构体2:RT=4.8min。

[0517] 异构体1:LCMS(ESI):m/z=484(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.97(s,1H),8.17-8.25(m,1H),7.38-7.52(m,4H),4.44-4.51(m,1H),4.20-4.38(m,1H),3.65-3.78(m,1H),3.50-3.63(m,4H),3.13-3.33(m,3H),2.69-2.86(m,2H),2.49-2.58(m,3H),1.44-1.51(m,1H),0.93-1.06(m,7H),0.51(d,J=5.6Hz,1H)。

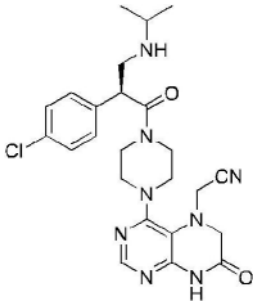
[0518] 异构体2:LCMS(ESI):m/z=484(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.89(s,1H),7.99-8.19(m,1H),7.16-7.47(m,4H),4.07-4.36(m,2H),3.56-3.69(m,2H),3.39-3.54(m,3H),3.03-3.25(m,3H),2.71-2.79(m,1H),2.57-2.69(m,2H),2.27-2.32(m,3H),1.23-1.35(m,1H),0.80-1.02(m,6H),0.66(q,J=4.9Hz,1H)。

[0519] 实施例28

[0520] 

[0521] 按照流程J描述的方法,采用碘乙烷替换碘甲烷,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。LCMS(ESI):m/z=512(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.88(s,1H),8.15(d,J=26.0Hz,1H),7.54-7.39(m,4H),4.71-4.52(m,4H),4.26-4.19(m,1H),4.15-4.06(m,1H),3.75-3.57(m,2H),3.29-3.11(m,2H),3.01-2.93(m,1H),2.85-2.78(m,1H),2.72-2.64(m,4H),2.09-1.98(m,1H),1.96-1.86(m,1H),1.88-1.59(m,3H),1.04-0.87(m,7H)。

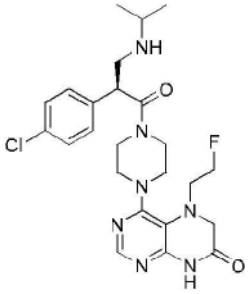
[0522] 实施例29

[0523] 

[0524] 按照流程J描述的方法,采用溴乙腈替换碘甲烷。

[0525] LCMS(ESI):m/z:523(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.02(s,1H),8.16(d,J=22.9Hz,1H),7.38(dd,J=11.8、2.4Hz,4H),4.61-4.44(m,2H),4.34-4.08(m,3H),4.05-3.94(m,2H),3.85-3.80(m,2H),3.23-3.01(m,2H),2.77-2.66(m,2H),1.90-1.53(m,4H),0.94(t,J=5.6Hz,6H)。

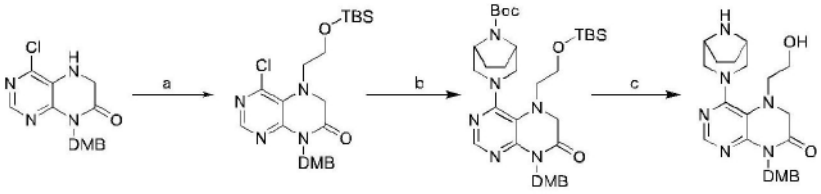
[0526] 实施例30

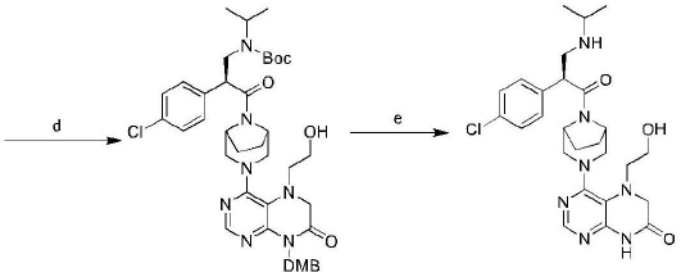
[0527] 

[0528] 按照流程J描述的方法,采用1-氟-2-碘乙烷替换碘甲烷。

[0529] LCMS(ESI)m/z:530(M+H)^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.28(d,J=5.3Hz,1H),8.05-8.15(m,1H),7.33-7.49(m,4H),4.22-4.70(m,8H),3.48-3.74(m,1H),3.21-3.43(m,2H),2.88-3.16(m,3H),2.74-2.86(m,1H),1.44-2.02(m,4H),0.97-1.11(m,6H)。

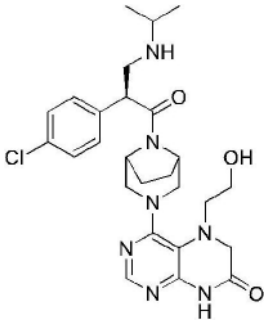
[0530] 流程J-1:



[0531] 

[0532] 反应条件:a)二甲基叔丁基(2-碘乙氧基)硅烷,氢化钠,N,N-二甲基甲酰胺;b)3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯,4-二甲氨基吡啶,N-甲基吡咯烷酮;c)氯化氢二氧六环溶液;d)(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸,二异丙基乙胺,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯,N,N二甲基甲酰胺;e)三氟乙酸,二氯甲烷。

[0533] 实施例31

[0534] 

[0535] a)5-(2-((叔丁基二甲基硅基)氧乙基)-4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮

[0536] 在0℃下向溶有4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮(2.2g)的N,N二甲基甲酰胺溶液(30mL)中加入氢化钠(0.53g)。将反应混合物搅拌20分钟。在0℃加入

二甲基叔丁基(2-碘乙氧基)硅烷(2.82g)。将反应混合物在0℃下搅拌3小时。将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=5:1)得到产品白色固体0.8g。

[0537] b)5-(2-((叔丁基二甲基硅基)氧乙基)-4-(8-叔丁基氧基羰基-3,8-二氮杂双环[3,2,1]辛烷-3-基)-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮

[0538] 在20℃下向溶有步骤a)产物(0.2g)的N-甲基吡咯烷酮溶液(5mL)中加入3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯(0.85g),4-二甲氨基吡啶(0.17g)。将反应混合物在150℃下搅拌3小时。将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1)得到产品白色固体0.08g。

[0539] c)4-(3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-(2-羟乙基)-5,8-二氢蝶啶-7(6H)-酮

[0540] 在20℃下向步骤b)产物(0.08g)中加入氯化氢二氧六环溶液(3mL)。将反应混合物在20℃下搅拌3小时。反应液旋干得到近白色固体(0.06g)。

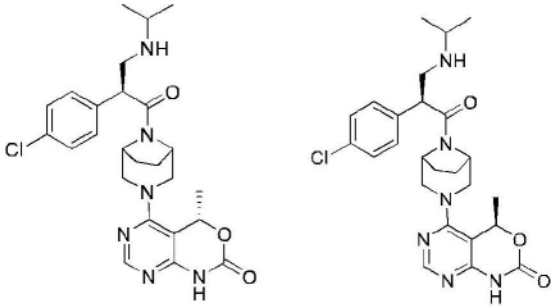
[0541] d)叔丁基((S)-2-(4-氯苯基)-3-3-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-(2-羟乙基)-7-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-氨基甲酸基)-3-氧代丙基(异丙基)酯

[0542] 在20℃下向溶有步骤c)产物(0.06g)的N,N二甲基甲酰胺(10mL)中加入(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(0.04g),二异丙基乙胺(0.03g)。将反应混合物搅拌2分钟。再20℃加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸盐(0.04g)将反应混合物在20℃下搅拌1小时。将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:2)得到产品白色固体0.04g。

[0543] e)4-8-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙氨基)丙酰基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-5-(2-羟乙基)-5,6-二氢蝶啶-7(8H)-酮

[0544] 在20℃下向步骤d)产物(40mg)中加入三氟乙酸(3mL)。将反应混合物在60℃下搅拌3小时。反应液旋干,加入NaHCO3搅拌20min,过滤得到近白色固体(10mg)。LCMS(ESI)m/z:528(M+H).^{1}H NMR:(400MHz,DMSO-d_6)δ10.78(d,J=19.6Hz,1H),8.07(d,J=29.4Hz,1H),7.30-7.51(m,4H),4.61-4.70(m,1H),4.384-4.54(m,1H),4.26-4.36(m,1H),4.04-4.25(m,1H),3.49-3.78(m,6H),2.97-3.23(m,4H),2.82-2.91(m,1H),2.63-2.80(m,1H),1.62-2.02(m,4H),1.27-1.17(m,8H)。

[0545] 实施例32

[0546] 

[0547] 按照流程K描述的方法,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。终产物采用超临界流体色谱法进行分离得到异构体1和异构体2。拆分仪器和条件:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel OZ,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO_2,B为异丙醇(0.1%NH_3H_2O);A:B=60:40(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0548] 超高效合相色谱条件:色谱柱:Daicel Chiralcel AD,2.1×150mm I.D.,3μm;流动相A:CO_2,流动相B:异丙醇(0.1%DEA),梯度:时间0-8min,B相5-40%(体积比);流速:1mL/min;柱温40℃。异构体1:RT=4.3min;异构体2:RT=4.5min。

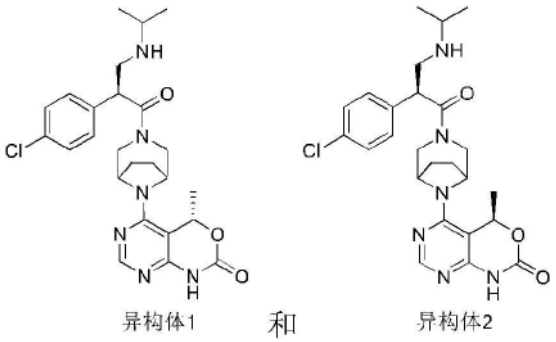
[0549] 异构体1:

[0550] LCMS(ESI)m/z:499(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.23(d,J=11.7Hz,1H),7.50-7.21(m,4H),5.79-5.59(m,1H),4.64-4.47(m,2H),4.08-3.94(m,2H),3.70-3.40(m,2H),3.31-3.20(m,2H),3.16-3.06(m,1H),2.82(d,J=9.2Hz,0.5H),2.75-2.62(m,2H),2.17(d,J=8.7Hz,0.5H)1.96-1.49(m,4H),1.46-1.28(m,3H),0.98-0.87(m,6H)。

[0551] 异构体2:

[0552] LCMS(ESI)m/z:499(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.24(d,J=16.4Hz,1H),7.53-7.21(m,4H),5.81-5.65(m,1H),4.73-4.60(m,2H),4.46(d,J=4.9Hz,0.5H),4.19(d,J=5.1Hz,0.5H),4.03(d,J=9.3Hz,0.5H),3.76(d,J=9.3Hz,0.5H),3.70-3.49(m,3H),3.21-3.16(m,1H),3.06-2.92(m,2H),2.11-1.86(m,1.5H),1.84-1.52(m,4H),1.48-1.33(m,3.5H),1.30-1.22(m,6H)。

[0553] 实施例33

[0554] 

[0555] 按照流程K描述的方法,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-甲酸叔丁酯替换叔丁基哌嗪-1-羧酸酯。终产物采用超临界流体色谱法分离得到异构体1和异构体2。拆分仪器和条件:Waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel OZ,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO_2,B为乙醇(0.1%NH3H2O);A:B=60:40(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0556] 超高效合相色谱条件:色谱柱:Daicel Chiralcel AD,2.1×150mm I.D.,3μm,流

动相A:CO_2,流动相B:乙醇(0.1%DEA),梯度:时间0-8min,B相5-40%(体积比),流速:1mL/min;柱温40℃。异构体1:RT=4.6min;异构体2:RT=5.0min。

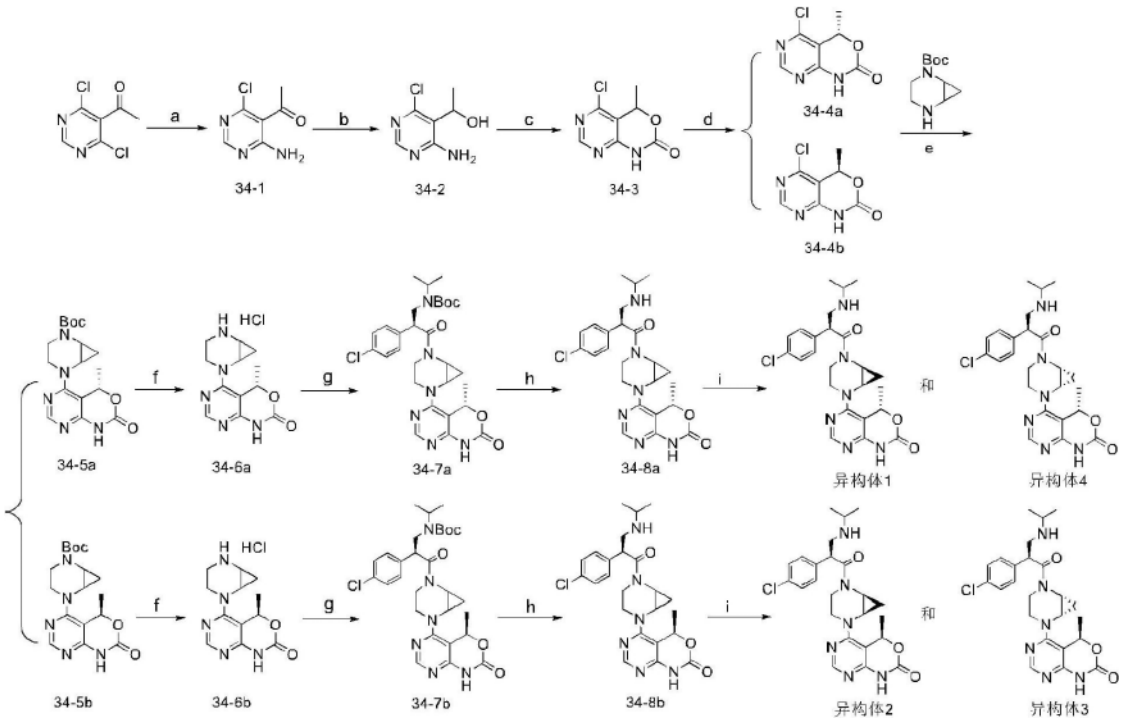
[0557] 异构体1:

[0558] LCMS(ESI)m/z:499(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.87(s,1H),8.23(d,J=11.7Hz,1H),7.50-7.21(m,4H),5.80-5.76(m,1H),4.68-4.64(m,1H),4.44-4.39(m,1H),4.33-4.14(m,2H),4.07-3.88(m,2H),3.66-3.62(m,1H),3.16-2.88(m,2H),2.79-2.55(m,4H),2.01-1.77(m,1H),1.72-1.49(m,2H),1.48-1.36(m,2H),1.31-1.18(m,1H),1.04-0.85(m,4H),0.54-0.44(m,1H)。

[0559] 异构体2:

[0560] LCMS(ESI)m/z:499(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.69(s,1H),8.24(d,J=3.8Hz,1H),7.53-7.21(m,4H),5.80-5.76(m,1H),4.64-4.48(m,1H),4.43-4.42(m,1H),4.27-4.18(m,1H),4.02-3.92(m,1H),3.68-3.60(m,1H),3.21-3.02(m,1H),2.95-2.64(m,4H),2.02-1.70(m,2H),1.60-1.22(m,5H),1.04-0.83(m,6H),0.43-0.40(m,1H)。

[0561] 实施例34

[0562] 

[0563] a)1-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)乙酮(化合物34-1)

[0564] 20℃下将1-(4,6-二氯嘧啶-5-基)乙酮(2.5g)溶于四氢呋喃(15mL),然后加入氨水(9g),反应液在20℃搅拌5小时,然后浓缩并加少量水稀释,抽滤得到白色固体,真空干燥后得到白色固体2g,直接用于下一步。

[0565] b)1-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)乙烷-1-醇(化合物34-2)

[0566] 20℃时将1-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)乙酮(1.5g)溶于甲醇(15mL)并冷却至-10℃,再分批加入硼氢化钠(1g),完毕后反应液缓慢升温至20℃继续搅拌3小时。反应完全后,将反应液用饱和氯化铵水溶液淬灭。然后将反应液浓缩并用乙酸乙酯(20mL*2)打浆。母液浓缩得到油状粗产品。粗品经层析柱分离得到白色油状产物400mg。LC-MS(ESI)m/z:174(M+H)。

[0567] c)5-氯-4-甲基-1,4-二氢-2H-嘧啶[4,5-d][1,3]恶嗪-2-酮(化合物34-3)

[0568] 20℃时将1-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)乙烷-1-醇(300mg)、N,N-二异丙基乙胺(282mg)溶于四氢呋喃(3mL),然后降温至-5℃并缓慢加入二(三氯甲基)碳酸酯(300mg),并在-5℃搅拌0.5小时。随后缓慢升温至18℃搅拌1.5小时。反应完全后,用碳酸氢钠水溶液淬灭反应,并用乙酸乙酯(10mL*3)萃取,合并有机相并以无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到油状粗品。粗品经柱层析柱分离纯化得到白色固体108mg。LC/MS(ESI)m/z:200(M+H)。

[0569] d)(S)-5-氯-4-甲基-1,4-二氢-2H-嘧啶[4,5-d][1,3]恶嗪-2-酮(化合物34-4a)及(R)-5-氯-4-甲基-1,4-二氢-2H-嘧啶[4,5-d][1,3]恶嗪-2-酮(化合物34-4b)

[0570] 将化合物34-3通过SFC手性柱拆分得到所需目标产物化合物34-4a和化合物34-4b。

[0571] SFC手性拆分条件如下:仪器:waters SFC200;分离柱:Daicel Chiralcel AD,250×50mm I.D.,10μm;流动相:A:CO_2,B:甲醇(0.1%NH_3H_2O),A:B=65:35(体积比);流速:150mL/min;压力:100bar;柱温:38℃;检测波长:220nm;循环时间:14min;样品预处理:10g溶于300ml MeOH;进样量:16ml。

[0572] 后处理:将样品40℃浓缩后冻干分别得到标题化合物34-4a和化合物34-4b。

[0573] 路线一:异构体1和异构体4的制备

[0574] e)5-((S)4-甲基-2-氧代-1,4-二氢-2H-嘧啶基[4,5-d][1,3]恶嗪-5-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯(化合物34-5a)

[0575] 将化合物34-4a(2g)、2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯(3.58g)溶于无水MeCN(20mL),并加入DIEA(3.89g),反应液用氮气吹扫后,封管95℃搅拌6小时,反应完毕后,浓缩得到目标产物粗品。粗品再溶于DCM,水洗后浓缩得到粗品,通过柱层析分离纯化(EA:PE=1:1)得到淡棕色固体3.2g。

[0576] f)(4S)-5-(2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-4-甲基-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]恶嗪-2-酮盐酸盐(化合物34-6a)

[0577] 将步骤e)产物(3.2g)溶于HCl/i-PrOH(10mL),并室温搅拌2h,反应完毕后,浓缩得到粗品,无需纯化直接用于下一步。

[0578] g)化合物34-7a

[0579] 将步骤f)产物(3.3g)、(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(4.9g)、HATU(6.32g)、DIPEA(4.3g)溶于无水DMF(50mL),反应液在室温搅拌12小时,反应完毕后,将反应液倒入100mL乙酸乙酯中,并用水(20mL*3)和饱和食盐水10mL洗涤,有机相干燥,浓缩得到粗品。粗品通过柱层析分离纯化(PE:EA=1:1)得到褐色固体7.2g。MS(ESI)m/z:585(M+H)。

[0580] h)化合物34-8a

[0581] 将步骤g)产物(7.2g)溶于MeOH(25mL),然后加入HCl/二氧六环(70mL),反应液在室温搅拌2h,然后将反应液浓缩得到红色油状粗品,再溶于MeOH(20mL)并用Na_2CO_3游离后浓缩得到粗品6g。

[0582] i)异构体1和异构体4

[0583] 将化合物34-8a通过SFC手性柱拆分制备得到异构体1和异构体4。

[0584] SFC拆分条件:仪器:waters SFC200;分离柱:Daicel Chiralcel AD,250×50mm

I.D.,10μm;流动相:A:CO_2,B:MeOH(0.1%NH_3H_2O),A:B=75:25;流速:70mL/min;压力:100bar;柱温:38℃;检测波长:254nm;循环时间:5min;样品预处理:10g溶于200ml MeOH;进样量:16ml。

[0585] 后处理:样品40℃浓缩后冻干分别得到标题化合物异构体1和异构体4。

[0586] 路线二:异构体2和异构体3的制备

[0587] 以化合物34-4b为原料,按照路线一描述的方法,分别制备得到异构体2和异构体3。

[0588] 异构体1:LCMS m/z:485(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.70(s,1H),8.23(s,1H),7.46(d,J=8.5Hz,2H),7.39(d,J=8.6Hz,2H),6.13(q,J=6.6Hz,1H),4.51(s,1H),4.42-4.30(m,1H),3.53-3.45(m,1H),3.28-3.06(m,5H),3.01-2.59(m,3H),1.52-1.34(m,4H),1.08-0.97(m,6H),0.93-0.84(m,1H)。

[0589] 异构体4:LCMS m/z:485(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.73(s,1H),8.23(s,1H),7.41-7.32(m,4H),6.14(q,J=8.0Hz,1H),4.40-4.36(m,1H),4.19-4.11(m,1H),3.62-3.51(m,2H),3.49-3.35(m,1H),3.24-3.05(m,4H),2.73-2.63(m,2H),145(d,J=8.0Hz,1H),1.33(d,J=8.0Hz,2H),1.12(q,J=4.0Hz,1H),0.95-0.88(m,6H),0.26(q,J=4.0Hz,1H)。

[0590] 异构体2:LCMS m/z:485(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.86(s,1H),8.27(s,1H),7.54-7.27(m,4H),6.32-6.18(m,1H),4.69-4.52(m,1H),4.27-3.97(m,2H),3.66-3.43(m,2H),3.29-2.92(m,6H),2.61-2.55(m,1H),1.63-1.58(m,1H),1.53-1.28(m,3H),1.28-1.12(m,6H)。

[0591] 异构体3:LCMS m/z:485(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.71(s,1H),8.18(s,1H),7.46-7.39(m,1H),7.36-7.28(m,3H),6.00(q,J=6.4Hz,1H),4.53(s,1H),4.46-4.33(m,1H),3.56-3.44(m,2H),3.26-3.09(m,5H),3.00-2.71(m,2H),1.43-1.38(m,3H),1.10-0.93(m,7H),-0.07- -0.11(m,1H)。

[0592] 单晶衍射测定构型:

[0593] (1)异构体1构型测定

[0594] 单晶制备:称取化合物异构体1(50.0mg)、异丙醇3.0ml加入5ml螺口玻璃瓶中,搅拌5min固体溶清。称取二水合草酸13.0mg加入上述玻璃瓶中,玻璃瓶中逐渐有白色固体析出,室温搅拌3h,玻璃瓶中析出大量白色固体。向玻璃瓶中加入1.5ml甲醇,0.2ml纯化水后白色固体逐渐消失,溶液变澄清,继续搅拌1h。溶液经0.22μm微孔滤膜滤至20ml螺口玻璃瓶中,玻璃瓶口用保鲜膜覆盖。用针头在瓶口处扎8个小孔,室温放置10天,制得异构体1化合物的草酸盐单晶。

[0595] 单晶衍射实验:

[0596] 单晶X射线衍射仪:BRUKER KAPPA APEX-II CCD

[0597] 波长:Cu Kα(λ=1.54178 Å)

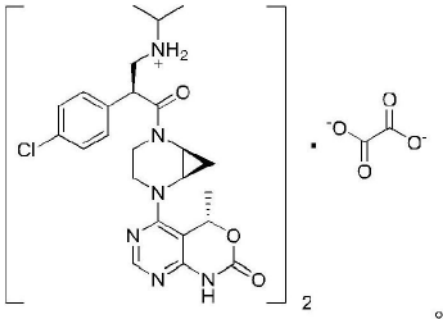
[0598] 测试温度:296K

[0599] 用于结构解析的计算机程序:SHELXL-2018

[0600] 单晶数据:分子式:$C_{50}H_{60}Cl_2N_{12}O_{10}$;分子量:1060.00;晶系:正交晶系;空间群:C 2 2 2;晶胞参数:a=15.719(2)Å,b=17.411(2)Å,c=48.335(6)Å,α=90°,β=90°,γ=

90°;单位晶胞体积:V=13228(3)Å³;单位晶胞中包含的分子式个数:Z=8;计算密度:D_{calc}=1.064g/cm³;R(F_o):0.0612;R_W(F_o^2):0.1856;拟合优度(S):1.023;Flack参数:0.040(11)。

[0601] 结构描述:单晶X射线衍射及结构解析表明,所制得的单晶为异构体1的草酸盐。晶体的不对称结构单元中包含两分子异构体及一分子草酸。化合物异构体1的单分子示意图如图3所示,草酸盐单晶如图4所示。结构式表示如下:

[0602] 

[0603] (2)异构体3构型测定

[0604] 单晶制备:按照上述异构体1单晶制备描述的方法制备异构体3的草酸盐单晶。

[0605] 单晶衍射实验:

[0606] 单晶X射线衍射仪:BRUKER D8 VENTURE PHOTON II

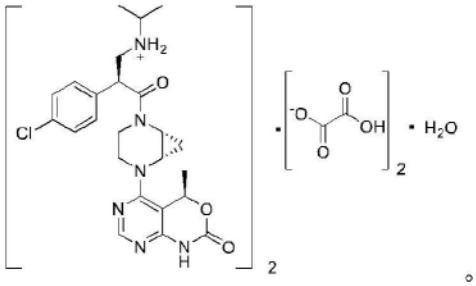
[0607] 波长:Ga Kα(λ=1.34139Å)

[0608] 测试温度:173K

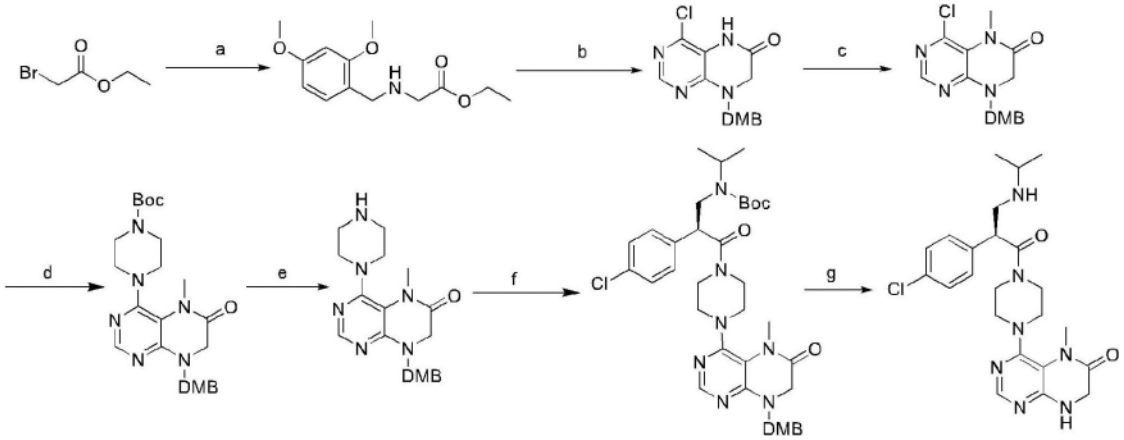
[0609] 用于结构解析的计算机程序:SHELXL-2018

[0610] 单晶数据:分子式:$C_{52}H_{64}Cl_2N_{12}O_{15}$;分子量:1168.05;晶系:单斜晶系;空间群:$P2_1/c$;晶胞参数:a=20.1588(13)Å,b=21.4744(14)Å,c=14.4055(9)Å,α=90°,β=98.259(3)°,γ=90°;单位晶胞体积:V=6171.4(7)Å³;单位晶胞中包含的分子式个数:Z=4;计算密度:D_{calc}=1.257g/cm³;R(F_o):0.0634;R_W(F_o^2):0.2016;拟合优度(S):1.053。

[0611] 结构描述:单晶X射线衍射及结构解析表明,所制得的单晶为异构体3的草酸盐水合物。晶体的不对称结构单元中包含两分子异构体3、两分子草酸以及一分子水,其中异构体3和草酸形成草酸盐。化合物异构体3的单分子示意图如图5所示,草酸盐单晶的不对称结构单元如图6所示。结构式表示如下:

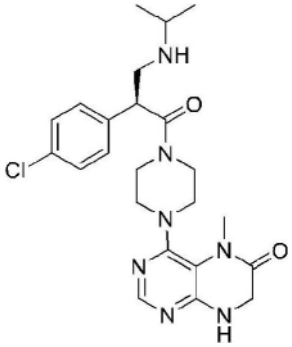
[0612] 

[0613] 流程L:

[0614] 

[0615] 反应条件:a)(2,4-二甲氧基苯基)甲胺,三乙胺,四氢呋喃;b)4,6-二氯嘧啶-5-胺,三乙胺,异丙醇;c)碘甲烷,氢化钠,N,N-二甲基甲酰胺;d)叔丁基哌嗪-1-羧酸酯,4-二甲氨基吡啶,N-甲基吡咯烷酮;e)氯化氢二氧六环溶液;f)(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸,二异丙基乙胺,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸盐,N,N二甲基甲酰胺;g)三氟乙酸。

[0616] 实施例35

[0617] 

[0618] a)2-(2,4-二甲氧基苄基)氨基乙酸乙酯

[0619] 在0℃下向溶有溴乙酸乙酯(1.0g)的THF溶液(10mL)中加入三乙胺(0.6g)和(2,4-二甲氧基苯基)甲胺(1.0g)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=3:1)得到产品白色固体1.3g。

[0620] b)4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮

[0621] 在0℃下向溶有2-(2,4-二甲氧基苄基)氨基乙酸乙酯(1.3g)的异丙醇(10mL)中加入三乙胺(1.56g)和4,6-二氯嘧啶-5-胺(0.84g)。将反应混合物在90℃下搅拌3小时。反应液过滤,得到产品白色固体0.7g。

[0622] c)4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮

[0623] 在0℃下向溶有4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮(0.5g)的N,N二甲基甲酰胺溶液(5mL)中加入氢化钠(76.7mg)。将反应混合物搅拌20分钟。在0℃加入碘甲烷(255mg)。将反应混合物在0℃下搅拌3小时。将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=5:1)得到产品白色固体0.5g。

[0624] d)4-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-6-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)哌嗪-1-

羧酸酯

[0625] 在20℃下向溶有4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮(0.5g)的N-甲基吡咯烷酮溶液(10mL)中加入叔丁基哌嗪-1-羧酸盐(0.53g),4-二甲氨基吡啶(0.52g)。将反应混合物在150℃下搅拌3小时。将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1)得到产品白色固体0.5g。

[0626] e)8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮

[0627] 在20℃下向4-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-6-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)哌嗪-1-羧酸酯(0.1g)中加入盐酸、二氧六环溶液(5mL)。将反应混合物在20℃下搅拌3小时。反应液旋干得到近白色固体(0.1g)。

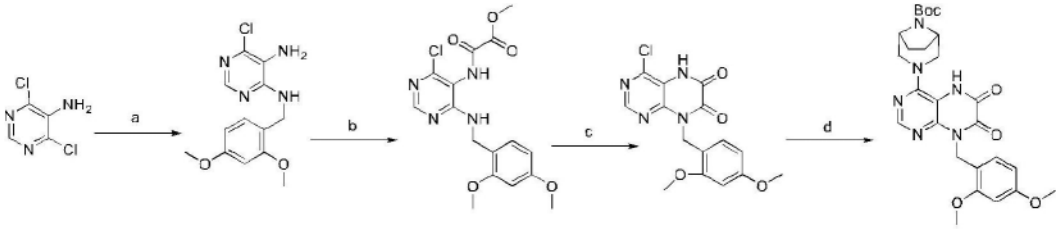
[0628] f)(s)-叔丁基(2-(4-氯苯基)-3-(4-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-6-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-氧代丙基)(异丙基)氨基甲酸酯

[0629] 在20℃下向溶有8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-4-(哌嗪-1-基)-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮(0.1g)的N,N二甲基甲酰胺(10mL)中加入(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(0.12g),二异丙基乙胺(0.10g)。将反应混合物搅拌2分钟。再20℃加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N,N′-四甲基脲六氟磷酸盐(0.12g)将反应混合物在20℃下搅拌1小时。将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:2)得到产品白色固体0.1g。

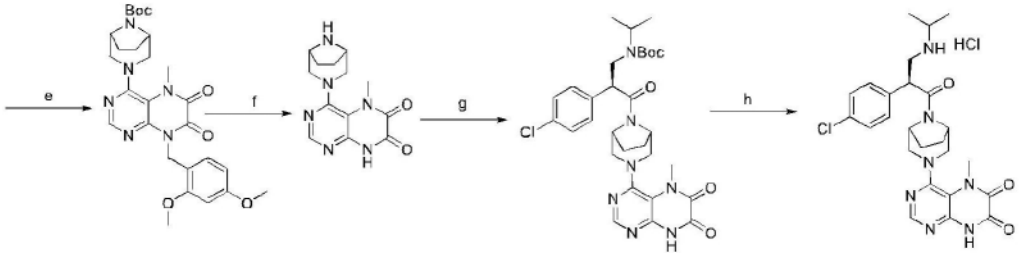
[0630] g)(S)-4-(4-(2-(4-氯苯基)-3-(异丙氨基)丙酰基)哌嗪-1-基)-5-甲基-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮

[0631] 在20℃下向(S)-叔丁基(2-(4-氯苯基)-3-(4-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-6-氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)哌嗪-1-基)-3-氧代丙基)(异丙基)氨基甲酸酯(100mg)中加入三氟乙酸(5mL)。将反应混合物在60℃下搅拌3小时。反应液旋干,得到近白色固体(20mg)。LCMS(ESI)m/z:472(M+H)^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.89(s,1H),7.22-7.29(m,2H),7.10-7.18(m,2H),4.08-4.17(m,1H),3.86(s,2H),3.32-3.45(m,2H),3.15-3.30(m,3H),3.08(s,3H),2.82-2.93(m,2H),2.51-2.78(m,4H),1.21-1.31(m,2H),1.03-1.12(m,6H)。

[0632] 流程M:

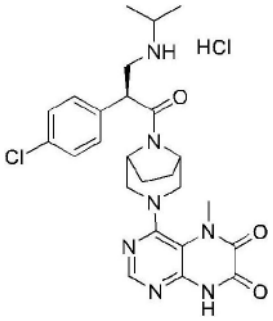


[0633]



[0634] 反应条件:a)2,4-二甲氧基苄胺,N,N-二异丙基乙胺,乙腈;b)四氢呋喃,碳酸钾,2-氯-2-氧代乙酸甲酯;c)N,N-二异丙基乙胺,乙醇;d)3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯,N,N-二异丙基乙胺,乙腈;e)N,N-二甲基甲酰胺,碳酸钾,碘甲烷;f)三氟乙酸;g)(S)-3-((叔丁氧基羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸,N,N-二异丙基乙胺,N,N-二甲基甲酰胺,HATU;h)二氯甲烷,氯化氢/异丙醇溶液。

[0635] 实施例36

[0636] 

[0637] a)6-氯-N-(2,4-二甲氧基苄基)嘧啶-4,5-二胺

[0638] 将4,6-二氯嘧啶-5-胺(2g),N,N-二异丙基乙胺(4.7g)和2,4-二甲氧基苄胺(2.45g)溶于乙腈(20mL),反应液在90℃搅拌5小时,然后浓缩得到粗品,然后溶于二氯甲烷并加少量水洗涤,有机相旋蒸干燥后得到粗品,粗品通过柱层析分离(PE:EA=1:1)纯化,浓缩得到淡黄色固体目标产物(3.5g)。

[0639] b)2-((4-氯-6-(((2,4-二甲氧基苄基)氨基)嘧啶-5-基)氨基)-2-氧代乙酸甲酯

[0640] 将6-氯-N-(2,4-二甲氧基苄基)嘧啶-4,5-二胺(1.5g),碳酸钾(1.1g)和2-氯-2-氧代乙酸甲酯(623mg)溶于无水乙醇(20mL),反应液在20℃搅拌3小时。将反应液倒入30mL乙酸乙酯并用水(10mL*2)洗涤,有机相浓缩至恒重得到粗产品,粗产品通过(PE:EA=3:1)打浆纯化得到白色固体产物(1.6g)。

[0641] c)4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5,8-二氢蝶啶-6,7-二酮

[0642] 将2-((4-氯-6-(((2,4-二甲氧基苄基)氨基)嘧啶-5-基)氨基)-2-氧代乙酸甲酯(1g)溶于无水乙醇(10mL)并加入N,N-二异丙基乙胺(1.02g,反应液在氮气保护下90℃-110℃搅拌拌2小时。然后将液反应液浓缩得到粗品,再溶于二氯甲烷,并用稀盐酸调至弱酸性,用水洗去盐。有机相浓缩得到粗产品,粗产品通过(PE:EA=3:1)打浆纯化得到白色油状产物(800mg)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ12.15(s,1H),8.47(s,1H),6.88(d,J=8.4Hz,1H),6.59(d,J=2.3Hz,1H),6.32(dd,J=8.4,2.3Hz,1H),5.21(s,2H),3.84(s,3H),3.72(s,3H)。

[0643] d)叔丁基-3-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-6,7-二氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸酯

[0644] 将4-氯-8-(2,4-二甲氧基苄基)-5,8-二氢蝶啶-6,7-二酮(250mg),(1R,5S)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯(456mg)和N,N-二异丙基乙胺(278mg)溶于无水乙腈(5mL),反应液在氮气保护下,封管90℃搅拌,3小时。然后将浓缩得到油状粗品。粗产品再溶于乙酸乙酯(30mL),并用稀盐酸调至pH 3-4,并用水洗涤至pH 5-6,再浓缩得到粗品。粗品通过柱层析分离纯化(PE:EA=1:1)得到白色固体200mg,m/z=525(M+H)。

[0645] e)(叔丁基-3-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-6,7-二氧代-5,6,7,8-四氢碟啶-

4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸酯

[0646] 将叔丁基-3-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-6,7-二氧代-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸盐(180mg),碘甲烷(146mg),碳酸钾(142mg)溶于无水DMF(3mL),反应液在20℃搅拌1h,然后将反应液倒入30mL EA并用水(10mL*2)和饱和食盐水(10mL)洗涤,有机相浓缩得到粗品。粗品通过柱层析分离纯化(PE:EA=3:1)得到淡黄色固体180mg。

[0647] f)4-((1R,5S)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛-3-基)-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-6,7-二酮

[0648] 将叔丁基-3-(8-(2,4-二甲氧基苄基)-5-甲基-6,7-二氧代-5,6,7,8-四氢吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸盐(120mg),溶于无水DCM(1mL),并滴入TFA(2mL)反应液在室温搅拌3小时,反应液呈红色将反应液直接浓缩得到粗产品,并用碳酸氢钠溶液调至pH 8-9,再浓缩,并用THF溶解,过滤除盐,剩余物通过柱层析分离(DCM:MeOH=10:1),得到油状产物60mg。

[0649] g)叔丁基((s)-2-(4-氯苯基)-3-3-(5-甲基-6,7-二氧-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]八烷基-8-基)-3-氧代丙基氨基甲酸酯(异丙基)

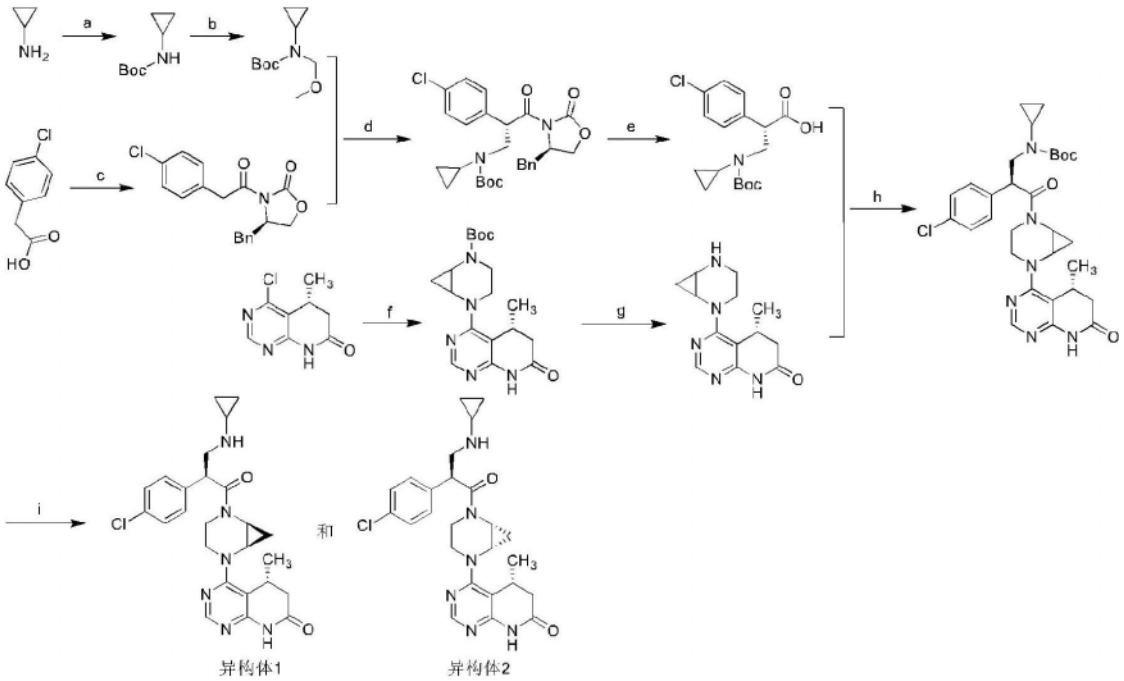
[0650] 将化合物4-(3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛-3-基)-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-6,7-二酮(60mg),(S)-3-((叔丁氧基羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(90mg),(2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(130mg),N,N-二异丙基乙胺(102mg)溶于无水DMF(2mL),反应液在室温搅拌3小时,然后将反应液倒入20mL乙酸乙酯中,并用水(50mL*2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,浓缩得到粗品。粗品通过硅胶柱层析分离纯化(DCM;MeOH=10:1)得到油状产物120mg。

[0651] h)4-(8-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙氨基)丙酰基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛-3-基)-5-甲基-5,8-二氢蝶啶-6,7-二酮

[0652] 将叔丁基((s)-2-(4-氯苯基)-3-3-(5-甲基-6,7-二氧-5,6,7,8-四氢蝶啶-4-基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]八烷基-8-基)-3-氧代丙基氨基甲酸酯(异丙基)溶于DCM(2mL)并滴入HCl/i-PrOH(2mL),反应液在室温搅拌3h,然后将反应液浓缩得到粗品,粗品通过制备分离冻干得到白色固体14mg.m/z:499(M+H).^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δ8.32(d,J=25.7Hz,1H),7.68-7.32(m,4H),5.14(m,1H),4.71-4.28(m,3H),4.12-3.92(m,3H),3.80-3.40(m,3H),3.23-3.15(m,2H),2.24-2.16(m,1H),1.92-1.82(m,2H),1.80-1.70(m,1H),1.48-1.16(m,8H)。

[0653] 实施例37

[0654] 流程N:

[0655] 

[0656] 反应条件:a)三乙胺,二碳酸二叔丁酯,二氯甲烷;b)双(三甲基硅基)氨基钠(2.0mol/L四氢呋喃溶液),溴甲基甲基醚,2-甲基四氢呋喃;c)(R)-4-苄基恶唑烷-2-酮,二异丙基乙胺,三甲基乙酰氯,甲苯;d)四氯化钛(1mol/L甲苯溶液),二异丙基乙胺,二氯甲烷;e)过氧化氢溶液(30%),一水合氢氧化锂,四氢呋喃,水;f)2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯,4-二甲氨基吡啶,N-甲基吡咯烷酮;g)氯化氢二氧六环(4.0M);h)2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯,二异丙基乙胺,N,N-二甲基甲酰胺;i)氯化氢二氧六环(4.0M)。

[0657] a)环丙基氨基甲酸叔丁酯

[0658] 在氮气保护下,20℃将环丙胺(9.3g)和三乙胺(19.7g)溶于二氯甲烷(100mL),0℃滴加二碳酸二叔丁酯(35.48g),20℃反应16h,反应结束,脱溶,得到无色液体24.3g。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ(ppm)0.47-0.50(m,2H),0.66-0.72(m,2H),1.44(s,9H),2.53(m,1H),4.79(s,1H)。

[0659] b)环丙基(甲氧基甲基)氨基甲酸叔丁酯

[0660] 在氮气保护下,将环丙基氨基甲酸叔丁酯(24.3g),溶于2-甲基四氢呋喃(100mL),0℃滴入双(三甲基硅基)氨基钠(120mL),反应液在0℃搅拌1小时,0℃滴入溴甲基甲基醚(35.7g),反应液在0℃搅拌6小时,将反应液倒入50g冰水中,分液,乙酸乙酯萃取(100mL*2),将反应液直接浓缩得到产品为无色液体29.1g,直接用于下一步,无须纯化。

[0661] c)(R)-4-苄基-3-(2-(4-(氯苯基)乙酰基)恶唑烷-2-酮

[0662] 在氮气保护下,将2-(4-氯苯基)乙酸(50g),(R)-4-苄基恶唑烷-2-酮(45.5g)和二异丙基乙胺(1273g)溶于甲苯(600mL),15℃,滴加三甲基乙酰氯(38.4g)反应液回流搅拌16小时,然后将反应液倒入200mL水中,分液,并用饱和食盐水120mL洗涤,有机相干燥,浓缩得到粗品。粗品通过柱层析分离纯化(PE:EA=5:1)得到白色固体32g。^{1}H NMR(400MHz,$DMSO-d_6$)δ(ppm)2.88-3.02(m,2H),4.12-4.37(m,4H),4.64-4.70(m,1H),7.13-7.16(m,2H),7.23-7.32(m,5H),7.39-7.42(m,2H)。

[0663] d)((S)-3-((R)-4-苄基-2-氧杂恶唑烷-3-基)-2-(4-氯苯基)-3-氧丙基)(环丙

基)氨基甲酸叔丁酯

[0664] 在氮气保护下,将(R)-4-苄基-3-(2-(4-(氯苯基)乙酰基)恶唑烷-2-酮(3.48g)溶于二氯甲烷(60mL),0℃滴入四氯化钛甲苯溶液(13mL),反应液在0℃搅拌2h,滴加DIPEA(1.49g)反应液在0℃搅拌1.5h,滴加环丙基(甲氧基甲基)氨基甲酸叔丁酯(2.77g)反应液在0℃搅拌6h,反应结束。然后将反应液倒入30mL饱和氯化铵溶液中,分液,并用饱和食盐水120mL洗涤,有机相干燥,浓缩得到粗品。粗品通过硅胶柱层析分离纯化(PE:EA=10:1)得到无色油状物2.50g。

[0665] e)(S)-3-((叔丁氧羰基)(环丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸

[0666] 将一水合氢氧化锂(0.63g)溶于水(18mL)加入四氢呋喃(20mL)0℃滴入双氧水(1.6mL),在0℃加入((S)-3-((R)-4-苄基-2-氧杂恶唑烷-3-基)-2-(4-氯苯基)-3-氧丙基)(环丙基)氨基甲酸叔丁酯(2.50g),反应液在0℃搅拌3h,向反应液中加入亚硫酸钠饱和溶液(15mL),反应1.5h,用硫酸氢钾饱和溶液调节pH=3~4,乙酸乙酯萃取(30mL*2)分液,有机相干燥,浓缩得到粗品。粗品通过柱层析分离纯化(PE:EA=1:1)得到无色固体1.26g。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm):0.45-0.48(m,2H),0.60-0.64(m,2H),1.30(s,9H),2.19(s,1H),3.61(d,J=7.6Hz,1H),3.95(t,J=8.0Hz,1H),7.37(dd,J=26.8、8.8Hz,4H),12.7(s,1H)。

[0667] f)5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸酯

[0668] 在氮气保护下,将(R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(300mg),2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯(455mg),4-二甲氨基吡啶(600mg)溶于N-甲基吡咯烷酮(5mL),120℃搅拌12h,然后将反应液倒入50mL水中,乙酸乙酯萃取(20mL*2),并用饱和食盐水15mL洗涤,有机相干燥,脱溶得到粗品。粗品通过硅胶柱层析分离纯化(PE:EA=1:1~1:2)得到黄色固体400mg。

[0669] g)(5R)-4-(2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0670] 将5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸酯(400mg),溶于二氧六环(5mL),并滴入氯化氢二氧六环溶液(5mL),在25℃搅拌2小时,反应结束,将反应液直接浓缩得到粗品黄色固体,直接用于下一步。

[0671] h)叔丁基((S)-2-(4-氯苯基)-3-((1R,6S)-5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚-2-基)-3-氧丙基)(环丙基)氨基甲酸酯

[0672] 在氮气保护下,将(5R)-4-(2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(270mg),化合物5(389mg),2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(474mg)和二异丙基乙胺(671mg)溶于N,N-二甲基甲酰胺(10mL),反应液在25℃搅拌3小时,反应结束。然后将反应液倒入50mL水中,乙酸乙酯萃取(20mL*2),并用饱和食盐水(10mL*3)洗涤,有机相干燥,浓缩得到粗品。粗品通过柱层析分离纯化(PE:EA=1:2)得到黄色固体320mg。

[0673] i)(R)-4-((1R,6S)-5-((S)-2-(4-氯苯基)-3(环丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂

双环[4.1.0]庚-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮及(R)-4-((1S,6R)-5-((S)-2-(4-氯苯基)-3(环丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0674] 将叔丁基((S)-2-(4-氯苯基)-3-((1R,6S)-5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶基[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚-2-基)-3-氧丙基)(环丙基)氨基甲酸酯(320mg)溶于二氧六环(2.5mL)并滴入氯化氢二氧六环(2.7mL),反应液在25℃搅拌14h,反应结束,然后将反应液浓缩得到粗品,用碳酸钾饱和溶液调节pH=13~14,DCM萃取(10mL*2),水洗(10mL),脱溶,产品通过超临界流体色谱法拆分得到异构体1(61.2mg)和异构体2(31.2mg)。

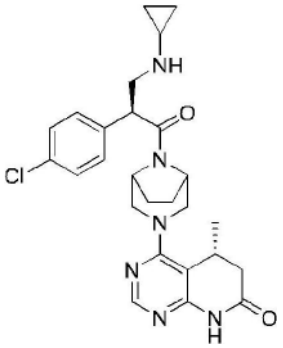
[0675] 拆分仪器及条件:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel AS,250×30mm I.D.,5μm;流动相:A为CO2,B为异丙醇(0.1%NH_3H_2O),A:B=70:30(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0676] 超高效合相色谱条件:色谱柱:Daicel Chiralcel AD,2.1×150mm I.D.,3μm,流动相A:CO_2;流动相B:异丙醇(0.1%DEA),梯度:时间0-8min,B相5-40%(体积比);流速:1mL/min;柱温:40℃。异构体1:RT=3.7min;异构体2:RT=4.6min。

[0677] 异构体1:LCMS(ESI)m/z:481(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm):0.03-0.12(m,2H),0.25-0.30(m,2H),0.66-0.70(m,1H),0.96-1.05(m,3H),1.35-1.40(m,1H),1.93-2.11(m,2H),2.29-2.35(m,1H),2.67-2.77(m,2H),2.80-2.86(m,1H),3.03-3.25(m,4H),3.39-3.48(m,1H),3.69-3.79(m,1H),4.24-4.34(m,2H),7.34-7.41(m,4H),8.17(s,1H),10.52(s,1H)。

[0678] 异构体2:LCMS(ESI)m/z:481(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ(ppm):0.14-0.21(m,2H),0.30-0.37(m,2H),0.93-1.07(m,4H),2.03-2.34(m,3H),2.66-2.86(m,2H),3.10-3.25(m,4H),3.36-3.94(m,4H),4.07-4.15(m,1H),4.41-4.45(m,1H),7.32-7.42(m,4H),8.19(s,1H),10.48(s,1H)。

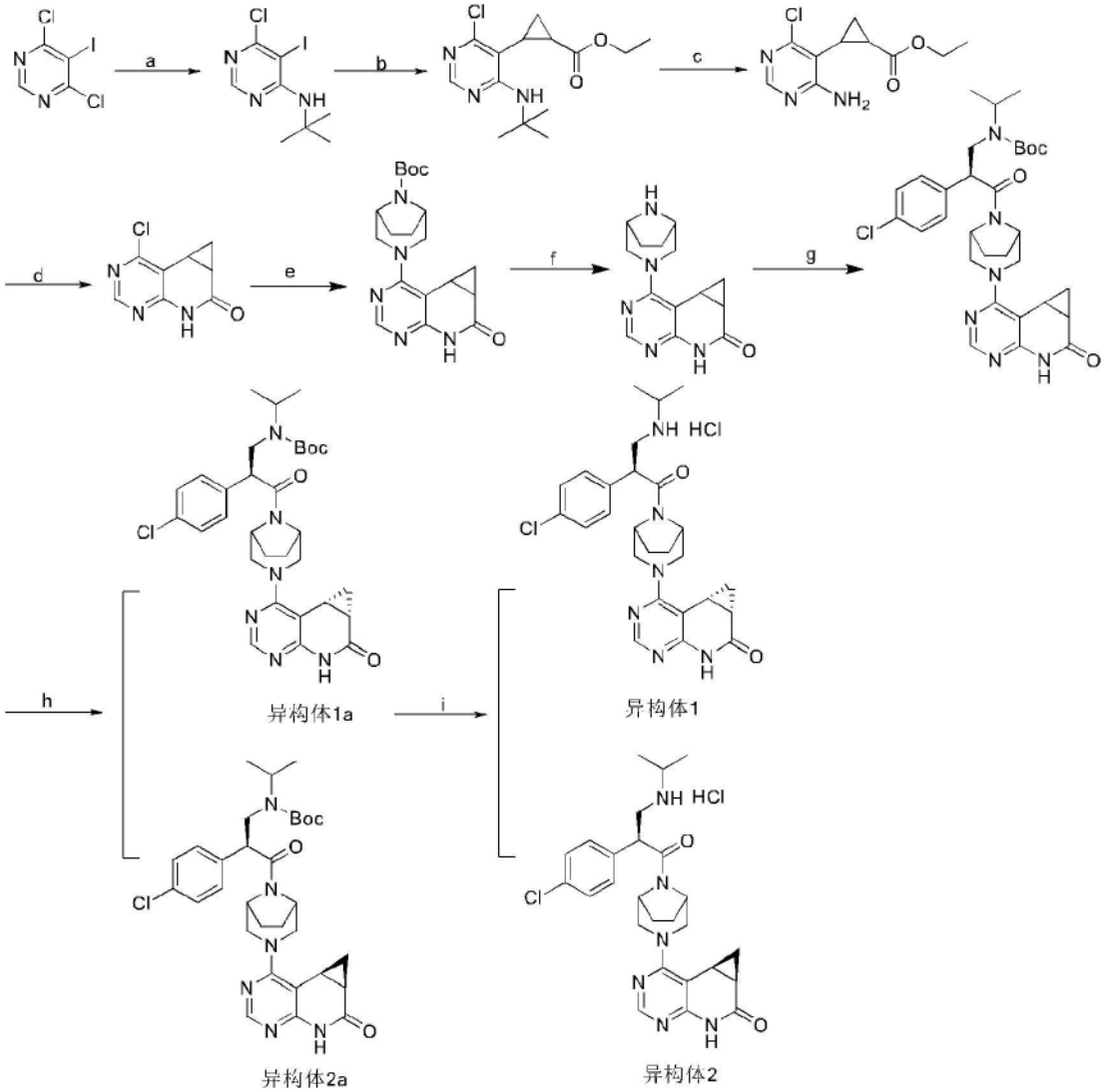
[0679] 实施例38

[0680] 

[0681] 按照流程N描述的方法,采用3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-甲酸叔丁酯替换2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯制备得到目标化合物。LCMS(ESI)m/z:495(M+H).^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ(ppm):0.11-0.22(m,2H),0.29-0.37(m,2H),1.01(dd,J=30.8、6.8Hz,3H),1.52-1.69(m,1H),1.72-1.93(m,3H),2.04-2.14(m,1H),2.25(d,J=16Hz,1H),2.32(d,J=13.2Hz,1H),2.66-2.83(m,3H),3.11-3.26(m,3H),3.52(d,J=16Hz,1H),3.75-3.83(m,1H),4.09-4.15(m,1H),4.45-4.63(m,2H),7.33-7.41(m,4H),8.14(d,J=32Hz,1H),10.57(d,J=9.6Hz,1H)。

[0682] 实施例39

[0683] 流程P:

[0684] 

[0685] 反应条件:a)叔丁胺,N,N-二甲基甲酰胺;b)2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)环丙烷甲酸乙酯,醋酸钯,三环已基膦,碳酸钾,甲苯,水;c)硫酸,二氯甲烷;d)三乙胺,乙醇;e)3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯,N,N-二异丙基乙胺,N,N-二甲基甲酰胺;f)氯化氢二氧六环溶液;g)(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸,二异丙基乙胺,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸盐,N,N-二甲基甲酰胺;h)SFC;i)氯化氢二氧六环溶液。

[0686] a)N-(叔丁基)-6-氯-5-碘嘧啶-4-胺

[0687] 将4,6-二氯-5-碘嘧啶(4.00g)在N,N-二甲基甲酰胺(60ml)中搅拌混合,在氮气保护下,室温加入叔丁胺(5.32g)。混合物在室温下搅拌过夜。随后将混合物倒入水中(300mL),用乙酸乙酯(2×50mL)萃取。合并有机相,以无水硫酸钠干燥。过滤,滤液减压浓缩,得到浅黄色固体(4.1g)。

[0688] b)2-(4-(叔丁基)-6-氯嘧啶-5-基)环丙基甲酸乙酯

[0689] 将N-叔丁基-6-氯-5-碘嘧啶-4-胺(4.10g)和2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼-2-基)环丙烷-1-羧酸酯(6.32g)溶于甲苯(64.00mL)和水(16.00mL)中,分别加入三环已

基膦(1.475g)和醋酸钯(1.475g),碳酸钾(0.59g)在氮气保护下,90℃下搅拌过夜。随后将混合物冷却到室温,用水(100mL)稀释,并加入乙酸乙酯(2×100mL)萃取。合并有机相,以无水硫酸钠干燥。过滤,滤液减压浓缩,产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=10:1)得到暗黄色固体2.50g。

[0690] c)2-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)环丙基甲酸乙酯

[0691] 在二氯甲烷(40.00mL)中加入2-(4-(叔丁基)-6-氯嘧啶-5-基)环丙基甲酸乙酯(2.50g)。在0-5℃氮气保护下,滴入硫酸(4.94g)。反应液在室温下搅拌1小时,随后冷却到0℃,用饱和碳酸氢钠溶液将混合物中和至pH=8。以二氯甲烷(2×50ml)萃取。合并有机相,以无水硫酸镁干燥。过滤,滤液减压浓缩,得到黄色液体2.4g。

[0692] d)1-氯-7,7a-二氢-5H-环丙烷[4,5]吡啶[2,3-d]嘧啶-6(6aH)-酮

[0693] 在室温氮气保护下,将2-(4-氨基-6-氯嘧啶-5-基)环丙基甲酸乙酯(2.40g),三乙胺(6.03g)加入200.00mL乙醇溶液中。反应混合物在80℃下搅拌过夜。随后把混合物冷却到室温。,真空浓缩。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1)得到产品淡黄色固体1.05g。

[0694] e)叔丁基3-(6-氧代-6,6a,7,7a-四氢-5H-环丙烷吡啶[4,5]嘧啶-1-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸酯

[0695] 在20℃下向溶有1-氯-7,7a-二氢-5H-环丙烷[4,5]吡啶[2,3-d]嘧啶-6(6aH)-酮(0.20g)的N,N二甲基甲酰胺(5mL)中加入3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯(0.43g),N,N-二异丙基乙胺(0.39g)。将反应混合物在110℃下搅拌24小时。随后将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1)得到产品白色固体0.30g。

[0696] f)1-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛坦-3-基)-7,7-二氢-5H-环丙烷[4,5]吡啶[2,3-d]嘧啶-6(6aH)-酮

[0697] 在20℃下向叔丁基3-(6-氧代-6,6a,7,7a-四氢-5H-环丙烷吡啶[4,5]嘧啶-1-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸酯(0.15g)中加入4M氯化氢二氧六环溶液(2mL)。将反应混合物在20℃下搅拌3小时。反应液旋干得到近白色固体(0.12g)。

[0698] g)叔丁基((2R)-2-(4-氯苯基)-3-氧代-3-3-(6-氧代-6,6-a,7,7a-四氢-5H-环丙基-4,5]吡啶多[2,3-d]嘧啶-1-基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛坦-8-基)丙基氨基甲酸酯(异丙基)酯

[0699] 在20℃下向溶有1-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛坦-3-基)-7,7-二氢-5H-环丙烷[4,5]吡啶[2,3-d]嘧啶-6(6aH)-酮(0.12g)的N,N二甲基甲酰胺(5mL)中加入(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)丙酸(0.18g),二异丙基乙胺(0.17g)。将反应混合物搅拌2分钟。再20℃加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸盐(0.20g)将反应混合物在20℃下搅拌1小时。将反应液倾入水(100mL)中,再加入乙酸乙酯(100mL)萃取。有机相加入饱和氯化钠溶液(100mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干。产品经层析硅胶板纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:1.5)得到产品白色固体0.20g。

[0700] h)手性拆分

[0701] 拆分仪器及条件:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel AS,250×50mm

I.D.,10μm;流动相:A为CO_2,B为甲醇(0.1%NH_3H_2O);A:B=60:40(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0702] i)异构体1和异构体2的制备

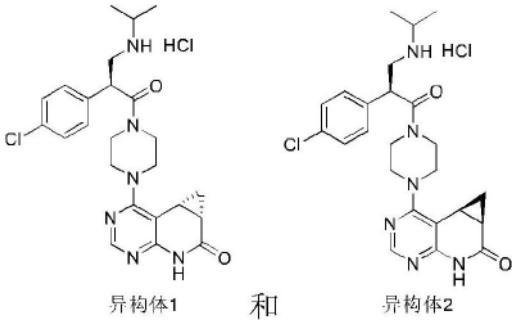
[0703] 在20℃下向异构体1a(20mg)中加入4M氯化氢二氧六环溶液(1mL)。将反应混合物在20℃下搅拌3小时。反应液旋干经制备分离得到近白色固体(10mg)。

[0704] 同样的方法以异构体2a为原料制备异构体2。

[0705] 异构体1:LCMS(ESI)m/z:495(M+H)^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.69-8.59(m,1H),7.34-7.52(m,4H),5.39-5.53(m,1H),4.69-4.81(m,3H),4.52-4.67(m,1H),4.09-4.38(m,2H),3.75-3.81(m,1H),3.64-3.73(m,2H),3.45-3.53(m,2H),3.26-3.36(m,1H),2.95-3.06(m,1H),1.96-2.07(m,1H),1.50-1.66(m,2H),1.21-1.30(m,8H),1.01-1.11(m,1H),0.83-0.90(m,1H).

[0706] 异构体2:LCMS(ESI)m/z:495(M+H)^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.43(d,J=15.9Hz,1H),8.20(d,J=26.6Hz,1H),7.37-7.51(m,4H),4.64-4.74(m,1H),4.46-4.61(m,2H),4.19-4.23(m,2H),4.09-4.14(m,2H),3.67-3.73(m,2H),3.56-3.62(m,2H),2.97-3.13(m,2H),2.17-2.28(m,1H),1.96-2.10(m,2H),1.75-1.84(m,1H),1.62-1.68(m,1H),1.20-1.30(m,6H),0.67-0.77(m,1H).

[0707] 实施例40

[0708] 

异构体1 和 异构体2

[0709] 按照实施例39流程P描述的方法,采用叔丁基哌嗪-1-羧酸酯替换3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸叔丁酯制备,经超临界流体色谱法分离,再分别脱Boc保护基得到异构体1和异构体2。拆分仪器及条件:waters SFC200;色谱柱:Daicel Chiralcel AS,250×50mm I.D.,10μm;流动相:A为CO_2,B为异丙醇(0.1%NH_3H_2O);A:B=60:40(体积比);流速60mL/min,柱温38℃。

[0710] 异构体1:

[0711] LCMS(ESI)m/z:469(M+H)^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.49(s,1H),8.24(s,1H),7.34-7.52(m,4H),4.66-4.74(m,1H),3.77-3.85(m,1H),3.60-3.73(m,4H),3.49-3.51(m,1H),3.43-3.48(m,2H),3.24-3.35(m,2H),2.95-3.04(m,1H),2.80-2.92(m,1H),2.62-2.73(m,1H),2.21-2.29(m,1H),2.01-2.11(m,1H),1.66-1.76(m,1H),1.21-1.27(m,6H),0.72(q,J=4.9Hz,1H).

[0712] 异构体2:

[0713] LCMS(ESI)m/z:469(M+H)^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ10.48(s,1H),8.22(s,1H),7.33-7.57(m,4H),4.59-4.68(m,1H),3.64-3.72(m,4H),3.45-3.53(m,3H),3.27-3.36(m,2H),3.16-3.24(m,1H),3.04-3.12(m,1H),2.93-3.03(m,1H),2.17-2.28(m,1H),1.99-2.09

(m,1H),1.67-1.76(m,1H),1.19-1.31(m,6H),0.72(q,J＝4.4Hz,1H).

[0714] 实验例1体外酶活性测试

[0715] 1.材料和试剂

[0716] Envision型号读板仪(Molecular Devices)

[0717] 白色384孔板(货号#264706,Thermo)

[0718] HTRF kinEASE TK试剂盒包含的主要试剂(货号#62TKOPEC,Cisbio)

[0719] TK-生物素底物

[0720] 链霉亲和素-XL665

[0721] 铕标记的酪氨酸激酶底物抗体

[0722] 5x酶反应缓冲液

[0723] SEB

[0724] HTRF检测缓冲液

[0725] AKT1(货号#01-101,Carna)

[0726] AKT2(货号#01-102,Carna)

[0727] AKT3(货号#PV3185,Invitrogen)

[0728] ATP 10mM(货号#PV3227,Invitrogen)

[0729] DTT 1M(货号#D5545,Sigma)

[0730] $MgCl_2$ 1M(货号#M8266,Sigma)

[0731] 本发明化合物

[0732] 阳性对照物:GDC-0068

[0733] 2.实验步骤

[0734] 2.1试剂配制

[0735] 表1激酶的反应体系各组分及浓度表

[0736]

反应试剂		AKT1	AKT2	AKT3
酶浓度	在酶反应步骤的终浓度（10 μL）	0.6 ng/孔	0.1 ng/孔	0.3 ng/孔
ATP 浓度		2μM	20μM	10 nM
TK-生物素底物浓度		2μM	2μM	2μM
酶反应时间		50 min	50 min	50 min
链霉亲和素-XL665 浓度	在总反应中的终浓度（20 μL）	125 nM	125 nM	125 nM
铕标记的酪氨酸激酶底物抗体浓度		1:100 稀释	1:100 稀释	1:100 稀释

[0737] 1x激酶反应缓冲液

[0738] 1mL激酶AKT1,2,3的1x激酶反应缓冲液中含有200μL 5x激酶反应缓冲液、5μL 1M $MgCl_2$、1μL 1M DTT、794μL超纯水。

[0739] 5x TK-生物素底物和ATP工作液

[0740] TK-生物素底物和ATP的具体浓度见表1。

[0741] 用1x激酶反应缓冲液稀释底物和ATP至反应浓度的5倍。

[0742] 5x激酶工作液

[0743] 酶筛选时所用的浓度见表1。用1x激酶反应缓冲液配制5x酶工作液。

[0744] 4x链霉亲和素-XL665工作液

[0745] 链霉亲和素-XL665在反应中的浓度参见表1。用检测缓冲液配制4x链霉亲和素-XL665工作液。

[0746] 4x铕标记的酪氨酸激酶底物抗体工作液

[0747] 用检测反应缓冲液将铕标记的酪氨酸激酶底物抗体稀释100倍作为工作液。

[0748] 2.2实验流程

[0749] 所有试剂按照上述方法配好后,除酶外,平衡到室温以后,开始进行加样。

[0750] a)首先用DMSO将化合物储液(10mM的DMSO溶液)稀释至100μM化合物溶液,然后用1倍激酶反应缓冲液稀释至2.5μM化合物工作液(含2.5%的DMSO)。使用1x激酶反应缓冲液配制2.5%的DMSO溶液,然后用2.5%的DMSO溶液稀释2.5μM化合物工作液,4倍倍比梯度稀释7次,共8个浓度(2500nM,625nM,156nM,39nM,9.8nM,2.4nM,0.6nM,0.15nM)的化合物工作液。除对照孔外,向所有反应孔中加入4μL的稀释好的化合物工作液,向对照孔中加入4μL先前配制的2.5%DMSO/激酶缓冲溶液。

[0751] b)向所有反应孔中加入2μL先前配制好的TK-生物素底物溶液(酶筛选时底物的用量见表1)。

[0752] c)向除阴性孔外的所有反应孔中加入2μL先前配制好的酶溶液(酶的用量见表1),阴性孔用2μL酶对应1x激酶反应缓冲液补足体积。用封板膜封板,混匀后室温孵育10分钟,让化合物和酶充分作用结合。

[0753] d)向所有反应孔中加入2μL的ATP溶液来启动激酶反应(酶筛选时的ATP浓度和反应时间见表1)。

[0754] e)在激酶反应结束前5分钟开始配制检测液。使用试剂盒中的检测缓冲液配制链霉亲和素-XL665和铕标记的酪氨酸激酶底物抗体(1:100)检测液(酶筛选时检测试剂浓度见表1)。

[0755] f)待激酶反应结束后,向所有反应孔中加入5μL稀释好的链霉亲和素-XL665,混匀后立即加入稀释好的铕标记的酪氨酸激酶底物抗体检测液。

[0756] g)封板混匀,室温反应1h后,用ENVISION(Perkinelmer)仪器检测荧光信号(320nm刺激,665nm,615nm发射)。通过全活性孔和背景信号孔计算出每个孔的抑制率,复孔取平均值,同时用专业的画图分析软件PRISM 6.0对每个待测化合物进行半数抑制活性(IC50)的拟合。

[0757] 表2:实验加样流程表

[0758]

	激酶反应体系	对照组	
酶反应步骤(10 μL)	样品组	阴性对照	阳性对照
化合物	4 μL	4 μL 2.5%DMSO/激酶缓冲液	4 μL 2.5%DMSO/激酶缓冲液
TK-生物素标记底物	2 μL	2 μL	2 μL
激酶	2 μL	2 μL 激酶缓冲液	2 μL
封膜室温孵育 10min			
ATP	2 μL	2 μL	2 μL
封膜室温孵育 50min			
检测步骤(10 μL)			
链霉亲和素-XL665	5 μL	5 μL	5 μL
铕标记的酪氨酸激酶底物抗体	5 μL	5 μL	5 μL
封膜室温孵育 1h			
检测光：320nm, 发射光：665nm, 615nm			

[0759] 2.3数据分析

[0760] ER＝665nm荧光值/615nm荧光值

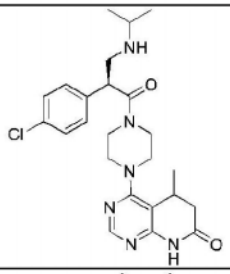
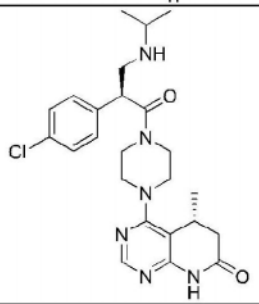
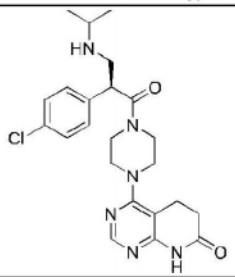
[0761] 抑制率＝$(ER_{阳性对照}-ER_{样品})/(ER_{阳性对照}-ER_{阴性对照})*100\%$

[0762] 3.实验结果

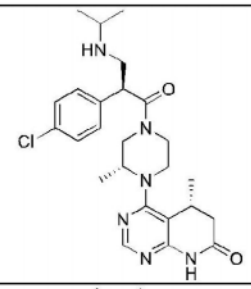
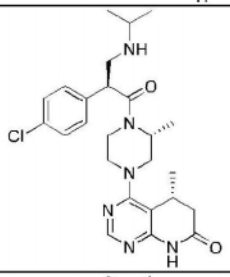
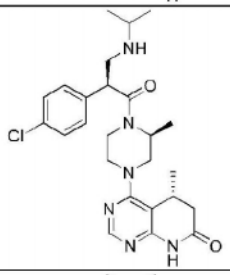
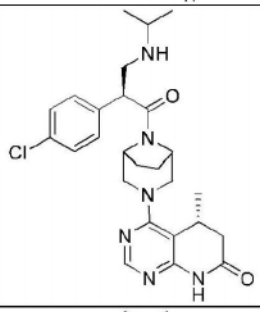
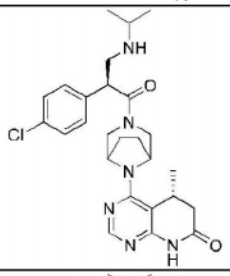
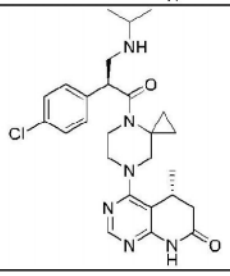
[0763] 实验结果如表3所示：

[0764] 表3:AKT抑制活性

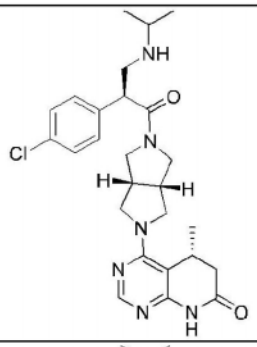
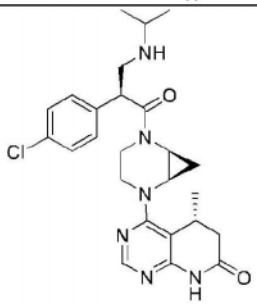
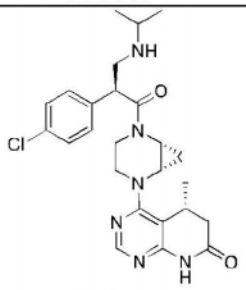
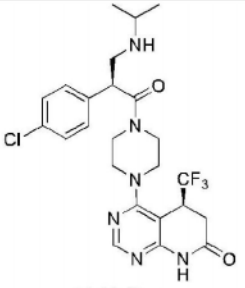
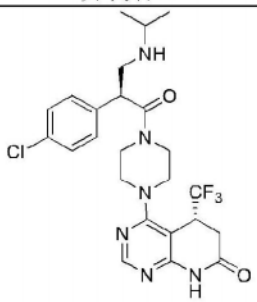
[0765]

实施例标题化合物	化学结构	AKT1 酶活性 IC_{50}（nM）	AKT2 酶活性 IC_{50}（nM）	AKT3 酶活性 IC_{50}（nM）
实施例 1		2.4	6.0	1.6
实施例 2（R）构型产物		2.4	4.3	0.4
实施例 3		52.4	21.2	7.5

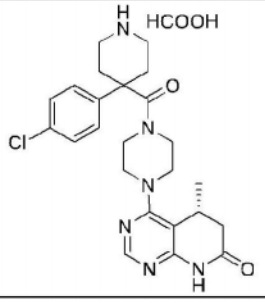
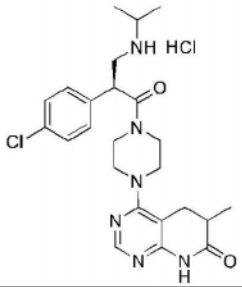
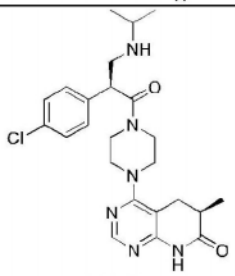
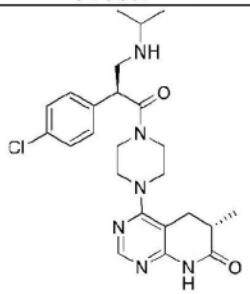
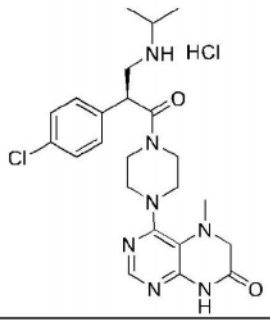
[0766]

实施例 7		26.4	292.9	7.4
实施例 8		28.7	15.5	2.7
实施例 9		166.6	206.2	3.3
实施例 10		2.8	63	0.21
实施例 11		3.5	71.0	0.25
实施例 12		55.1	40.4	4.8

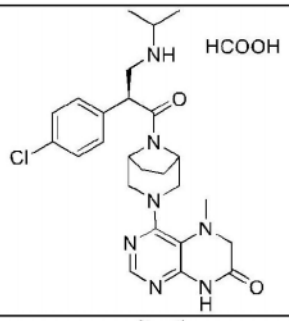
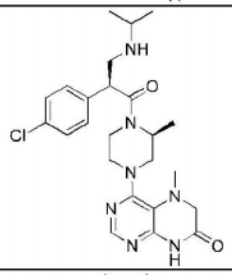
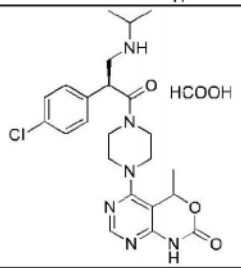
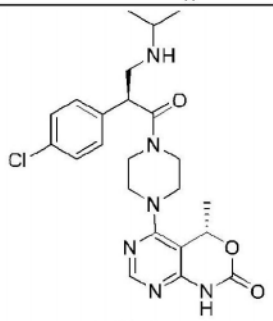
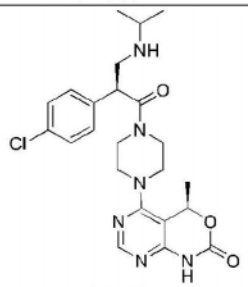
[0767]

实施例 13 顺式异构体		285.0	166.6	6.6
实施例 15	 异构体 1	62	542	13
实施例 15	 异构体 2	0.35	6.3	0.09
实施例 16	 异构体 1	776	1000	139
实施例 16	 异构体 2	12	15	1

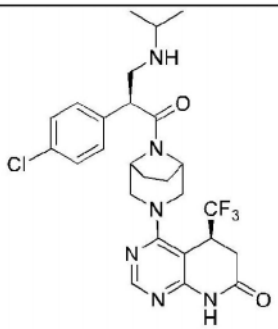
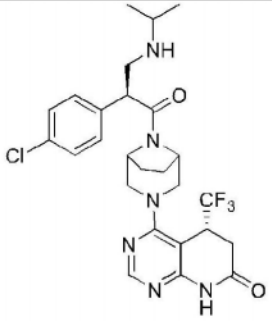
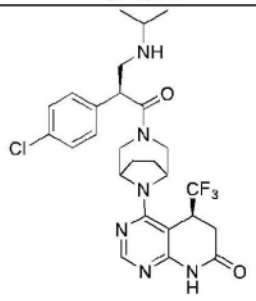
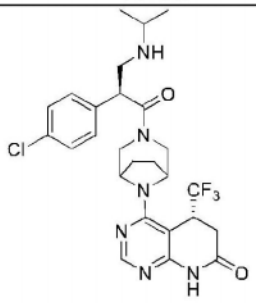
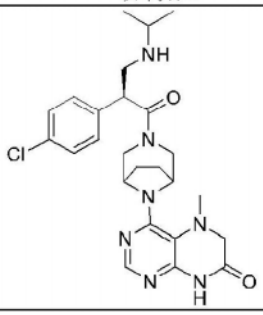
[0768]

实施例 18		590.0	256.5	20.1
实施例 19		58.5	29.4	7.4
实施例 19	 异构体 1	82	504	18
实施例 19	 异构体 2	25	314	9.1
实施例 20		1.1	23	0.4

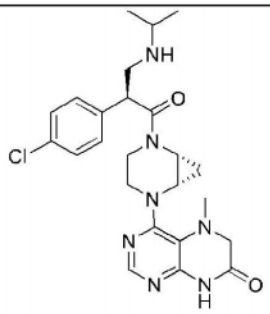
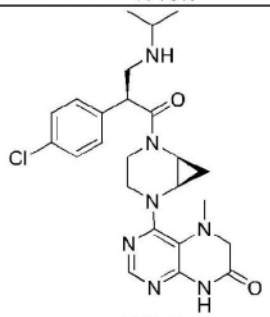
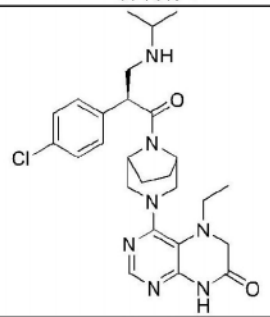
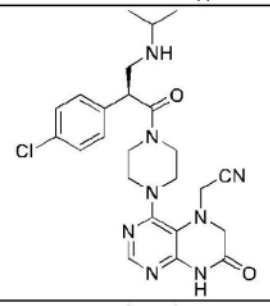
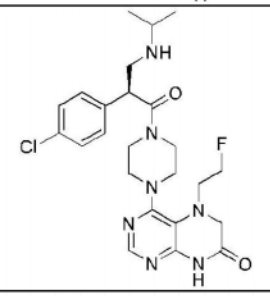
[0769]

实施例 21		1.9	46.0	0.2
实施例 22		39	334	0.56
实施例 23		6.0	10.9	1.2
实施例 23	 异构体 1	1.5	11	0.19
实施例 23	 异构体 2	201	1000	42

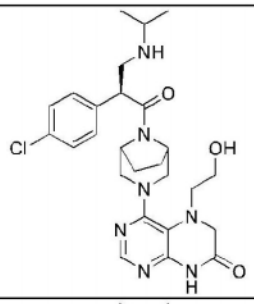
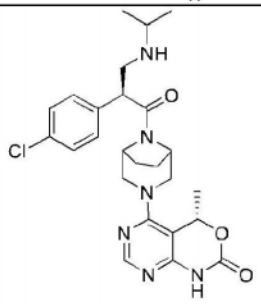
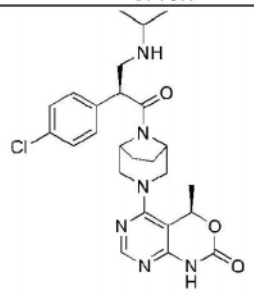
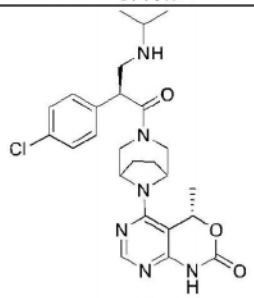
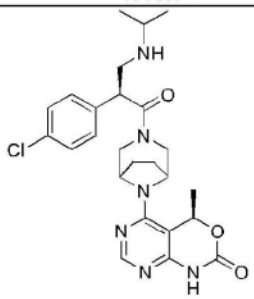
[0770]

实施例 24	 异构体1	354	1000	61
实施例 24	 异构体2	116	1000	19
实施例 25	 异构体1	218	1000	20
实施例 25	 异构体2	0.59	20	0.19
实施例 26		30	221	0.52

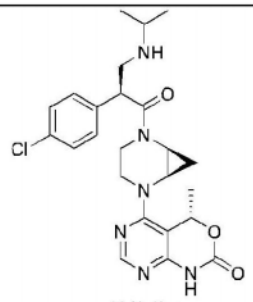
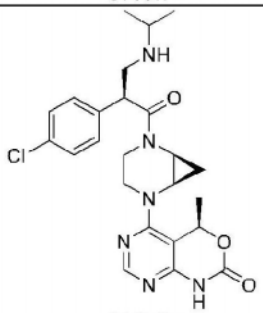
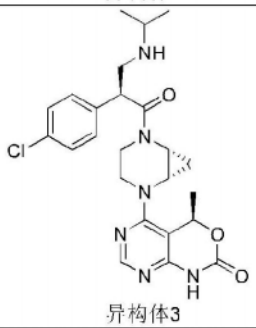
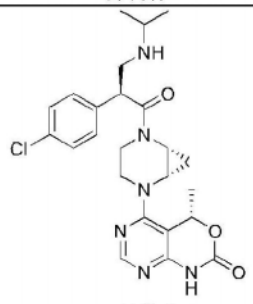
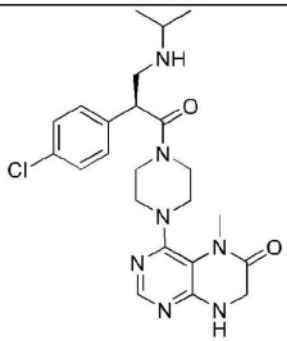
[0771]

实施例 27	 异构体1	22	169	0.48
实施例 27	 异构体2	147	1000	7.4
实施例 28		2.1	89	0.19
实施例 29		40	227	1.1
实施例 30		55	339	2.1

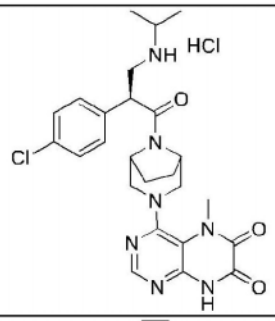
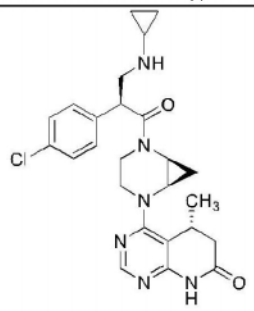
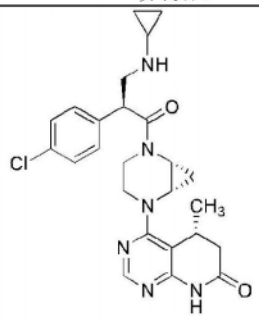
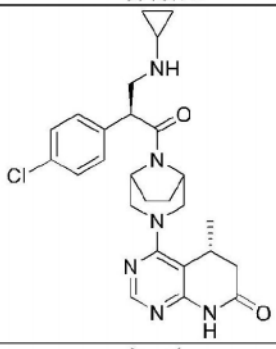
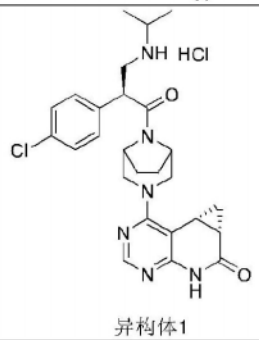
[0772]

实施例 31		210	1000	1.8
实施例 32	 异构体1	0.63	4.9	0.41
实施例 32	 异构体2	25	155	9.8
实施例 33	 异构体1	1.6	33	0.2
实施例 33	 异构体2	260	1000	55

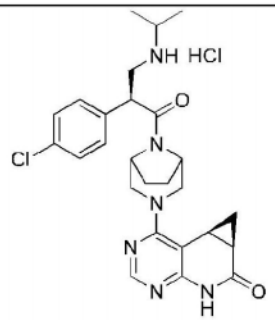
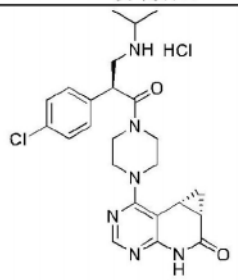
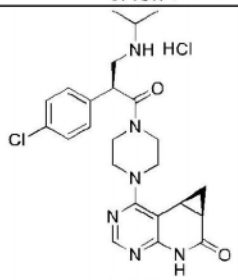
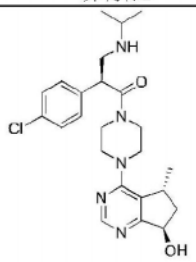
[0773]

实施例 34	 异构体1	186	771	45
实施例 34	 异构体2	613	1000	89
实施例 34	 异构体3	429	1000	232
实施例 34	 异构体4	0.6	1.2	0.12
实施例 35		146	1000	212

[0774]

实施例 36		77	800	22
实施例 37	 异构体1	442	1000	59
实施例 37	 异构体2	0.65	5.7	0.12
实施例 38		2.4	23	0.28
实施例 39	 异构体1	13	75	7.6

[0775]

实施例 39	 异构体2	151	756	43
实施例 40	 异构体1	14	95	12
实施例 40	 异构体2	82	475	61
阳性对照 GDC-0068		3.2	1.7	2.5

[0776] 实验例2 药代动力学评价

[0777] 实施例10、实施例21、GDC-0068、实施例34异构体4化合物的处方配制：

[0778] 混合溶媒:Tween 80:PEG400:水＝1:9:90(v/v/v)

[0779] 将化合物用DMSO配制成10mg/mL的储备液。

[0780] 分别准确吸取浓度为10mg/mL的储备液400μl至玻璃瓶,加入3.6mL混合溶媒,最终制剂中溶媒的比例为DMSO:混合溶媒(v/v)＝10:90,涡旋(或超声),分散均匀,得每个化合物浓度为1mg·mL^{-1}的4mL给药溶液。

[0781] 实施例15异构体2化合物的处方配制：

[0782] 溶媒:DMSO:PEG400:超纯水＝5:20:75(v/v/v)

[0783] 称取供试品实施例15异构体2化合物5.37mg至玻璃瓶中;加入0.269mL的DMSO,涡旋振荡,使固体物质完全溶解;加入1.074mL的PEG400,涡旋振荡,混匀;加入4.028mL的超纯水,涡旋振荡,混匀,得浓度为1mg·mL^{-1}无色溶液。

[0784] 实验动物:小鼠,品系ICR,来源:维通利华实验动物技术有限公司,周龄:6～10周,雄性。

[0785] 实验方案:

[0786] 表4:动物实验方案表

[0787]

化合物	组别	动物编号	剂量 ($mg \cdot kg^{-1}$)	体积 ($mL \cdot kg^{-1}$)	给药途径	疗程	是否禁食	样品采集时间点
实施例10	A	A1~A3	10	10	灌胃	单次	是	药前、药后1和8 h
		A4~A6						药后15 min、2和24 h
		A7~A9						药后30 min和4 h
实施例21	B	B1~B3	10	10	灌胃	单次	是	药前、药后1和8 h
		B4~B6						药后15 min、2和24 h
		B7~B9						药后30 min和4 h
实施例15异构体2	D	D1~D3	10	10	灌胃	单次	是	药前、药后1和8 h
		D4~D6						药后15 min、2和24 h
		D7~D9						药后30 min和4 h
实施例34异构体4	E	E1~E3	10	10	灌胃	单次	是	药前、药后1和8 h
		E4~E6						药后15 min、2和24 h
		E7~E9						药后30 min和4 h
GDC-0068	C	C1~C3	10	10	灌胃	单次	是	药前、药后1和8 h
		C4~C6						药后15 min、2和24 h
		C7~C9						药后30 min和4 h

[0788] 实验动物饲养在苏州圣苏新药开发有限公司动物房内。动物房通风良好,装备空调,温度保持在20～25℃,湿度保持在40％～70％。明暗照明各12小时,实验动物自由进食和饮水。正常喂养至少5天后,经兽医检验,体征状况良好小鼠可入选本实验。每只小鼠使用尾部编号标记。动物实验方案详见表4。

[0789] 称量体重后按以下公式计算每只小鼠的理论给药体积。

[0790] $$\text{理论给药体积}(mL)=\left(\frac{\text{剂量}(mg\cdot kg^{-1})}{\text{试液浓度}(mg\cdot mL^{-1})}\right)\times\text{动物体重}(kg)$$

[0791] 实验前一天,小鼠禁食过夜,可自由饮水,给药后4小时喂食。

[0792] 实验当天,A～E组小鼠分别灌胃给予10mg·kg^{-1}实施例10、实施例21、GDC-0068、实施例15异构体2、实施例34异构体4的给药溶液。给药后小鼠在各时间点,由眼眶采血约100μL,置于EDTA-K_2抗凝管中。将全血样品于5,500rpm离心10min,将分离得到的血浆保存于-40～-20℃冰箱中,用于生物样品分析。建立测定小鼠血浆中化合物浓度的LC-MS/MS分析方法,并用于测定本实验获得的生物样品中化合物的浓度。采用Pharsight Phoenix 7.0中的非房室模型计算药代动力学参数。

[0793] 实验结果:实验结果如表5所示:

[0794] 表5:本发明化合物的药代动力学参数

[0795]

药代动力学参数	GDC-0068	实施例 10	实施例 21	实施例 15 异构体 2	实施例 34 异构体 4
$T_{1/2}$（h）	2.59	1.67	NR	3.16	NR
Tmax (h)	2	0.5	1	1.00	4.00
Cmax (ng/mL)	75.3	321	681	583	497
AUC (ng•h/mL)	320	911	2290	2170	2580

[0796] NR:未计算

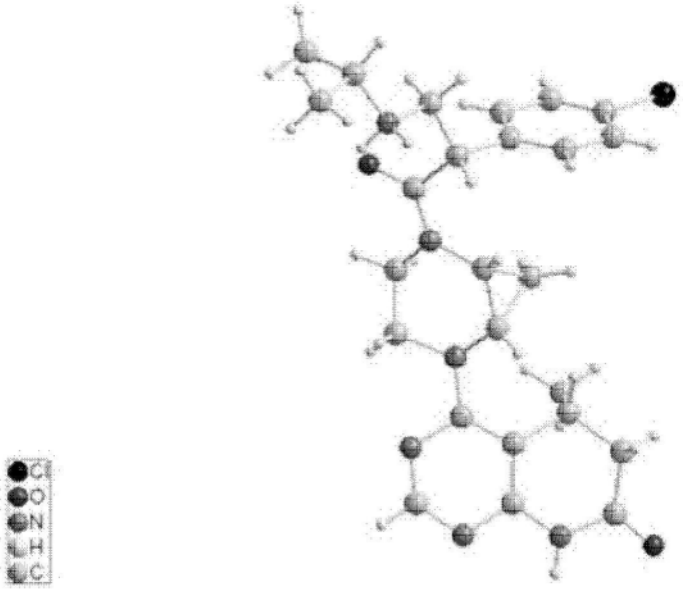


图1

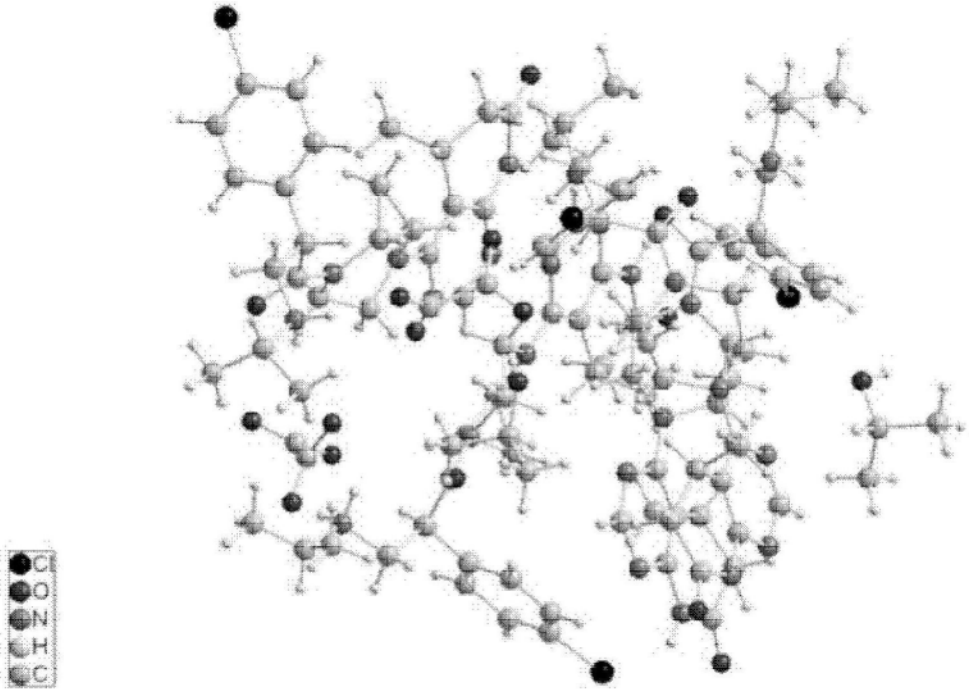


图2

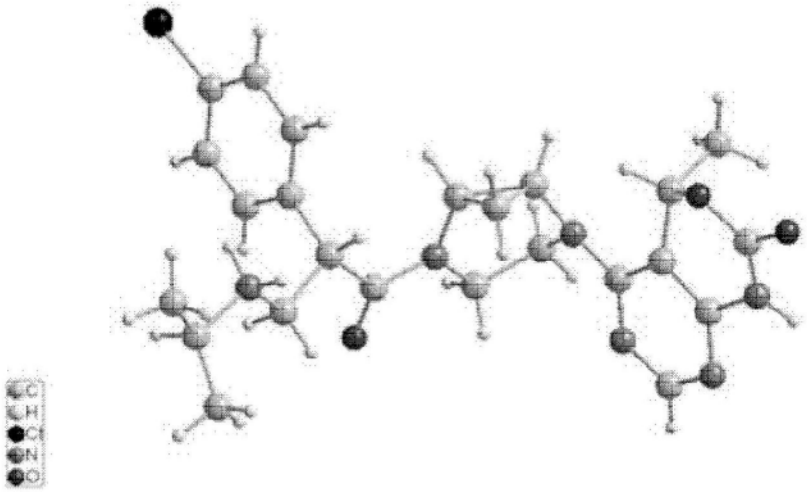


图3

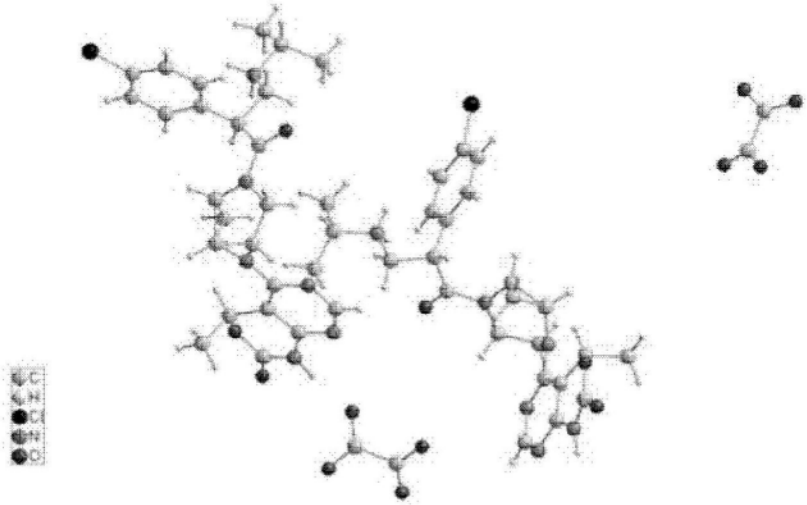


图4

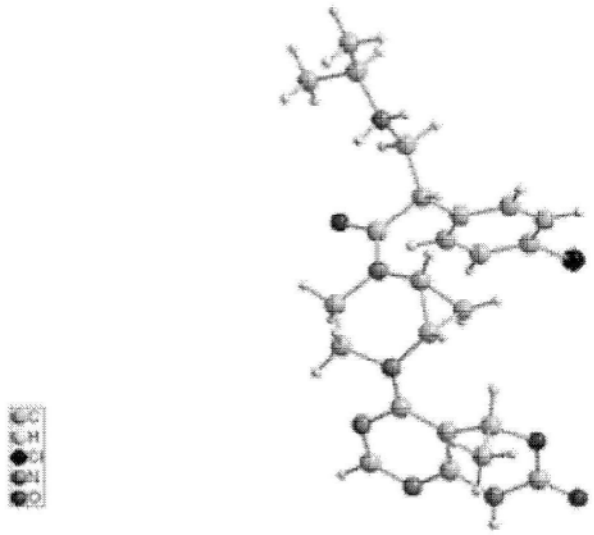


图5

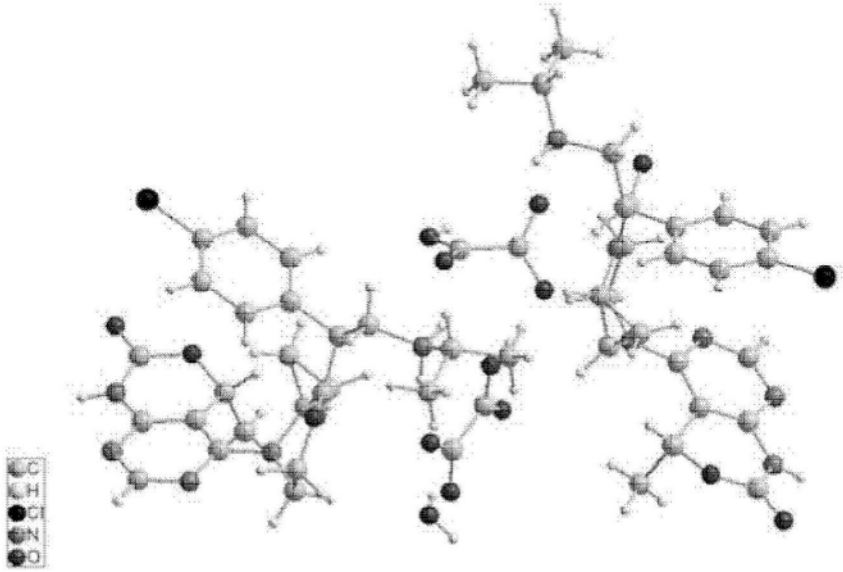


图6