



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107922428 B

(45) 授权公告日 2021.02.05

(21) 申请号 201680044238.1

(22) 申请日 2016.06.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107922428 A

(43) 申请公布日 2018.04.17

(30) 优先权数据
62/184,714 2015.06.25 US
62/206,525 2015.08.18 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.01.26(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/039307 2016.06.24(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/210294 EN 2016.12.29(73) 专利权人 普洛麦格公司
地址 美国威斯康辛州(72) 发明人 S·迪尤尔曼 M·B·罗贝斯
J·R·沃克 W·周
C·齐姆普里克(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有
限公司 11270
代理人 景鹏 姚开丽

(51) Int. Cl.

C07D 493/04 (2006.01)

C07D 495/04 (2006.01)

C07D 209/42 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 03044014 A1, 2003.05.30

US 4981975 A, 1991.01.01

WO 2010118208 A1, 2010.10.14

WO 2005110410 A2, 2005.11.24

WO 2007088277 A1, 2007.08.09

WO 9320099 A3, 1993.11.25

WO 2006055951 A2, 2006.05.26

US 5340801 A, 1994.08.23

WO 2009000878 A1, 2008.12.31

WO 2008118445 A1, 2008.10.02

WO 2007054453 A2, 2007.05.18

Marc Nazar et al., "Fragment

Deconstruction of Small, Potent Factor Xa
Inhibitors: Exploring the Superadditivity
Energetics of Fragment Linking in
Protein-Ligand Complexes".《Angew. Chem.
Int. Ed.》.2011,第51卷第906页表1.美国化学会.STN Registry数据库.《美国化
学会》.2013,第1-7页.

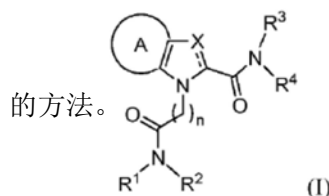
审查员 申俊杰

权利要求书9页 说明书128页
序列表2页 附图36页

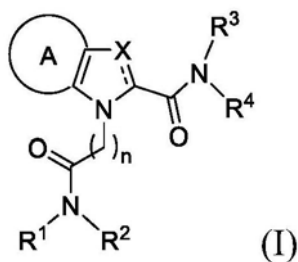
(54) 发明名称

噻吩并吡咯化合物及其作为刺虾源性荧光
素酶的抑制剂的用途

(57) 摘要

公开了可抑制刺虾源性荧光素酶的噻吩并
吡咯化合物,以及包含所述噻吩并吡咯化合物的
组合物和试剂盒,和使用所述噻吩并吡咯化合物

1. 一种式 (I) 化合物或其盐：



其中：

虚线表示存在键；

n是1或2；

X是CH或N；

A是苯基环、噻吩基环或呋喃基环；

R¹选自由以下各项组成的组：C₁-C₈烷基、卤代-C₁-C₈-烷基、芳烷基和烷氧基烷氧基烷基；

R²是任选取代的苯基；并且

R³和R⁴各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₅-C₆环烷基、任选取代的C₅-C₆环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、具有1或2个氮原子的任选取代的5-或6-元杂芳基、和任选取代的杂芳烷基，其中所述杂芳基是具有1或2个氮原子的5-或6-元杂芳基；或者R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成具有选自N, O和S的1或2个杂原子的任选取代的5-或6-元单环杂环。

2. 如权利要求1所述的化合物，其中n是1。

3. 如权利要求1所述的化合物，其中X是CH。

4. 如权利要求1所述的化合物，其中A是噻吩基环或呋喃基环。

5. 如权利要求1所述的化合物，其中A是苯基环。

6. 如权利要求1所述的化合物，其中R¹选自由以下各项组成的组：乙基、正己基、2-(2-甲氧基乙氧基)乙基和苄基。

7. 如权利要求1所述的化合物，其中R¹是乙基。

8. 如权利要求1所述的化合物，其中R²是取代的苯基。

9. 如权利要求8所述的化合物，其中R²是被一个选自由以下各项组成的组的取代基取代的苯基：C₁-C₄烷基、氰基、酰氨基、C₁-C₄烷氧基和C₁-C₄羟烷基。

10. 如权利要求9所述的化合物，其中R²是被一个甲基取代的苯基。

11. 如权利要求1所述的化合物，其中R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的具有选自N和O的1或2个杂原子的任选取代的5-或6-元单环杂环。

12. 如权利要求11所述的化合物，其中所述任选取代的5-或6-元单环杂环选自由以下各项组成的组：任选取代的吡咯烷、哌啶和哌嗪。

13. 如权利要求11所述的化合物，其中所述任选取代的5-或6-元单环杂环选自由以下各项组成的组：未取代的吡咯烷、未取代的哌啶、被一个取代基取代的哌啶和被一个取代基取代的哌嗪。

14. 如权利要求1所述的化合物，其中R³是氢。

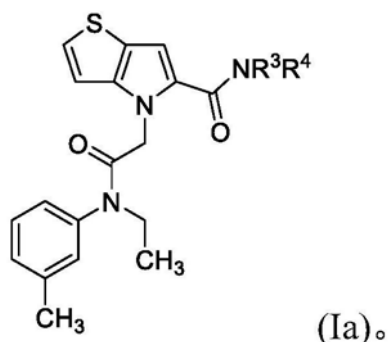
15. 如权利要求1所述的化合物,其中 R^4 选自由以下各项组成的组:未取代的 C_1 - C_8 烷基、卤代- C_1 - C_8 -烷基、羧基- C_1 - C_8 -烷基、 C_1 - C_4 -烷氧基羰基- C_1 - C_8 -烷基、任选取代的苯基、任选取代的 C_5 - C_6 环烷基、任选取代的 C_5 - C_6 -环烷基烷基和任选取代的杂芳烷基。

16. 如权利要求15所述的化合物,其中 R^4 是未取代的或被一个取代基取代的苯基。

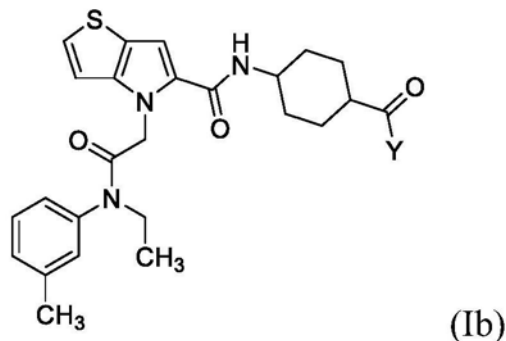
17. 如权利要求16所述的化合物,其中所述取代基选自由以下各项组成的组: C_1 - C_4 -烷氧基羰基和 C_1 - C_4 -烷氧基羰基- C_1 - C_4 -烷基。

18. 如权利要求1所述的化合物,其中 R^4 是被一个选自由以下各项组成的组的取代基取代的环己基:羧基、 C_1 - C_4 -烷氧基羰基、 C_1 - C_8 -烷基酰氨基、羟基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基、酰氨基、任选取代的氨基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基、 C_1 - C_4 -二烷基氨基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基、羧基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基、磺酸- C_1 - C_8 -烷基酰氨基、磺酸盐- C_1 - C_8 -烷基酰氨基、 C_1 - C_4 -烷基羰基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基、任选取代的 C_3 - C_6 -环烷基酰氨基以及任选取代的杂环基酰氨基。

19. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物具有式(Ia):



20. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物具有式(Ib):



其中:

Y选自由以下各项组成的组: $-NR^aR^b$ 和 $-OR^c$;

R^a 和 R^b 各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 -环烷基和任选取代的5-或6-元单环杂环基;或者 R^a 和 R^b 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的5-或6-元单环杂环基;并且

R^c 选自由以下各项组成的组:氢和任选取代的 C_1 - C_4 烷基。

21. 如权利要求20所述的化合物,其中Y是 $-OR^c$ 。

22. 如权利要求21所述的化合物,其中 R^c 选自由以下各项组成的组:氢和甲基。

23. 如权利要求20所述的化合物,其中Y是 $-NR^aR^b$ 。

24. 如权利要求23所述的化合物,其中 R^a 和 R^b 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

25. 如权利要求24所述的化合物,其中 R^a 和 R^b 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的5-或6-元单环杂环。

26. 如权利要求25所述的化合物,其中所述任选取代的单环杂环是任选取代的哌啶。

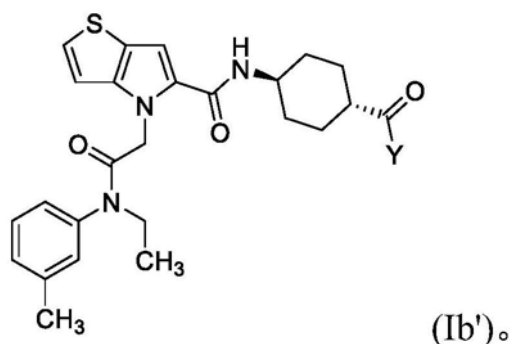
27. 如权利要求26所述的化合物,其中所述任选取代的单环杂环选自由以下各项组成的组:未取代的哌啶和被一个取代基取代的哌啶。

28. 如权利要求23所述的化合物,其中 R^a 是氢。

29. 如权利要求28所述的化合物,其中 R^b 选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 -环烷基和任选取代的杂环基。

30. 如权利要求28所述的化合物,其中 R^b 选自由以下各项组成的组:氢、 C_1 - C_6 烷基、羟烷基、任选取代的氨基烷基、羧基烷基、磺酸-烷基、磺酸盐-烷基、烷基羰基烷基、任选取代的 C_3 - C_6 -环烷基和任选取代的六元杂环基。

31. 如权利要求20所述的化合物,其中所述化合物具有下式(Ib'):



32. 化合物,其中所述化合物选自由以下组成的组:

N-环己基-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

N-乙基-2-(5-(吡咯烷-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;

N-乙基-2-(5-(哌啶-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;

1-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-羰基)哌啶-4-甲酸乙酯;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-苯基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

2-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)苯基)乙酸乙酯;

3-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)苯甲酸甲酯;

顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

8-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)辛酸;

6-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基

基)哌啶-1-基)-6-氧代己酸;

反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸;

N-(反式-4-(丁基氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((2-羟乙基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

N-(反式-4-((2-(二甲氨基)乙基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)丁酸;

N-(反式-4-氨基甲酰基环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(己基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸乙酯;

6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯;

6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸;

1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸;

8-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)辛酸;

N-(反式-4-(环己基氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((1-甲基哌啶-4-基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(哌啶-4-基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

N-(反式-4-((1-乙酰基哌啶-4-基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

(6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己基)氨基甲酸叔丁酯;

N-(反式-4-((6-(3',6'-二羟基-3-氧代-3H-螺[异苯并呋喃-1,9'-咕吨]-5(6)-甲酰氨基)己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

N-(反式-4-((6-氨基己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺盐酸盐;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸;

(11S,14S,17S)-17-乙酰氨基-11,14-双(羧甲基)-1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己基)-1,10,13,16-四氧代-2,9,12,15-四氮杂十九烷-19-酸;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

N-环戊基-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(吡啶-4-基甲基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(3-吗啉代丙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

N-乙基-2-(5-(4-甲基哌嗪-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;

4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;

N-环己基-4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

N-环己基-4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

反式-4-(4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;

N-环己基-4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

4-(2-(苄基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;

6-(顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸;

6-(反式-4-((4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-

甲酰氨基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯;

6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸;

6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠;

6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钾;

反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸;

反式-4-(4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-((3-氨基甲酰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(4-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

6-(反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠;

反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(3-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-((3-(溴甲基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-1H-吡啶-2-甲酰胺;

6-(反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠;

反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;以及

反式-4-(6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯。

33. 一种抑制刺虾源性荧光素酶的方法,所述方法包括使所述刺虾源性荧光素酶与如权利要求1-32中任一项所述的化合物接触。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述刺虾源性荧光素酶包含SEQ ID NO:2的多肽序列。

35. 一种用于调节样品中的刺虾源性荧光素酶的发光的方法,所述方法包括:

- (a) 使所述样品与腔肠素底物和如权利要求1-32中任一项所述的化合物接触;以及
- (b) 检测所述样品中的发光,

其中如权利要求1-32中任一项所述的化合物引起来自所述刺虾源性荧光素酶的所述发光的减少。

36. 如权利要求35所述的方法,包括在将所述样品与如权利要求1-32中任一项所述的化合物接触之前使所述样品与所述腔肠素底物接触。

37. 如权利要求35所述的方法,其中所述样品包含细胞。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述细胞包含刺虾源性荧光素酶。

39. 如权利要求37所述的方法,其中所述细胞表达刺虾源性荧光素酶。

40. 如权利要求35所述的方法,其中所述腔肠素底物是腔肠素、腔肠素衍生物、腔肠素类似物、前腔肠素或醌掩蔽的腔肠素。

41. 一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法,所述方法包括:

(a) 使样品与腔肠素底物和如权利要求1-32中任一项所述的化合物接触,其中所述样品包含:

(xvii) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸,其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光

素酶的第一片段以及第一蛋白质;以及

(xviii) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸,其中所述第二融合蛋白包含所述刺虾源性荧光素酶的第二片段以及第二蛋白质;以及

(b) 检测所述样品中的发光,

其中检测到发光指示所述第一蛋白质与所述第二蛋白质之间的相互作用。

42. 如权利要求41所述的方法,其包括在使所述样品与如权利要求1-32中任一项所述的化合物接触之前,使所述样品与所述腔肠素底物接触。

43. 如权利要求41所述的方法,其中当所述第一蛋白质和所述第二蛋白质相互作用时,所述刺虾源性荧光素酶的所述第一片段和所述刺虾源性荧光素酶的所述第二片段重构能够稳定地结合所述腔肠素底物的全长酶。

44. 如权利要求41所述的方法,其中所述样品包含细胞。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述细胞包含刺虾源性荧光素酶。

46. 如权利要求44所述的方法,其中所述细胞表达刺虾源性荧光素酶。

47. 如权利要求41所述的方法,其中所述腔肠素底物是腔肠素、腔肠素衍生物、腔肠素类似物、前腔肠素或醌掩蔽的腔肠素。

48. 一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法,所述方法包括:

(a) 使样品与腔肠素底物和如权利要求1-32中任一项所述的化合物接触,其中所述样品包含:

(xix) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸,其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶以及第一蛋白质,其中所述刺虾源性荧光素酶是生物发光供体;以及

(xx) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸,其中所述第二融合蛋白包含荧光受体分子以及第二蛋白质;

(b) 检测所述样品中的生物发光共振能量转移(BRET),从而指示所述生物发光供体和所述荧光受体的相互作用或紧密邻近。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述样品包含细胞。

50. 如权利要求49所述的方法,其中所述细胞包含所述刺虾源性荧光素酶。

51. 如权利要求49所述的方法,其中所述细胞表达所述刺虾源性荧光素酶。

52. 如权利要求48所述的方法,其中所述腔肠素底物是腔肠素、腔肠素衍生物、腔肠素类似物、前腔肠素或醌掩蔽的腔肠素。

53. 一种生物发光共振能量转移(BRET)系统,其包括:第一融合蛋白,所述第一融合蛋白包含第一靶蛋白和生物发光供体分子,其中所述生物发光供体分子是刺虾源性荧光素酶;第二融合蛋白,所述第二融合蛋白包含第二靶蛋白和荧光受体分子;腔肠素底物,以及如权利要求1-32中任一项所述的化合物。

54. 一种试剂盒,其包括:

(a) 如权利要求1-32中任一项所述的化合物;以及

(b) 刺虾源性荧光素酶。

55. 如权利要求54所述的试剂盒,其中所述刺虾源性荧光素酶包含SEQ ID NO:2的多肽序列。

-
56. 如权利要求54所述的试剂盒,其还包括腔肠素底物。
57. 如权利要求54所述的试剂盒,其还包括用于进行发光测定的说明书。

噻吩并吡咯化合物及其作为刺虾源性荧光素酶的抑制剂的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年6月25日提交的美国临时申请号62/184,714和2015年8月18日提交的美国临时申请号62/206,525的优先权,所述临时申请各自的全部内容以引用的方式并入本文。

技术领域

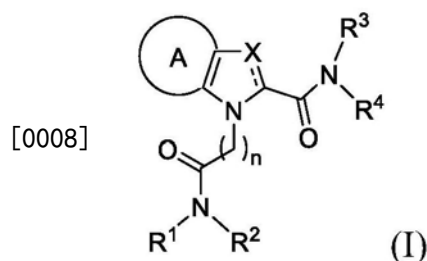
[0003] 本公开涉及可抑制刺虾 (Oplophorus) 源性荧光素酶的噻吩并吡咯化合物。

[0004] 背景

[0005] 报告分子通常用于监测生物学、生物化学、免疫学、细胞生物学和分子生物学领域中的分子事件。基于从深海虾细角刺虾分泌的荧光素酶的荧光素酶可用作报告分子,并且已经显示具有包括广泛底物特异性、高活性和高量子产率的可利特征。在某些应用中,可能进一步有利地是控制来自刺虾荧光素酶的发光信号。

[0006] 概述

[0007] 在一方面,本公开提供一种式 (I) 化合物,或其盐:



[0009] 其中:

[0010] 虚线表示存在或不存在键;

[0011] n是0、1、2、3、4或5;

[0012] X是CH、N、O或S;

[0013] 其中,当虚线表示存在键时,X是CH或N,并且当虚线表示不存在键时,X是O或S;

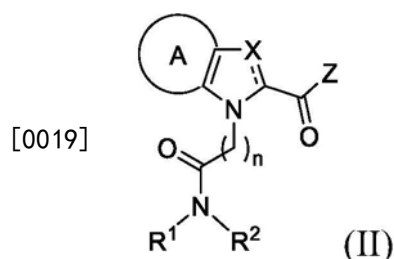
[0014] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环;

[0015] R¹和R²各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基;并且

[0016] R³和R⁴各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基;或者R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[0017] 在一方面,本公开提供一种抑制刺虾源性荧光素酶的方法,所述方法包括使刺虾源性荧光素酶与本文所述的化合物,如式 (I)、(Ia)、(Ib)、(Ib') 或 (II) 化合物接触。

[0018] 在一方面,本公开提供一种抑制刺虾源性荧光素酶的方法,所述方法包括使所述刺虾源性荧光素酶与式(II)化合物接触:



[0020] 其中:

[0021] 虚线表示存在或不存在键;

[0022] n是0、1、2、3、4或5;

[0023] X是CH、N、O或S;

[0024] 其中,当虚线表示存在键时,X是CH或N,并且当虚线表示不存在键时,X是O或S;

[0025] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环;

[0026] R¹和R²各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基;

[0027] Z选自由以下各项组成的组:-NR³R⁴和-OR⁵;并且

[0028] R³、R⁴和R⁵各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基;或者R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[0029] 在一方面,本公开提供一种用于调节样品中的刺虾源性荧光素酶的发光的方法,所述方法包括,

[0030] (a) 使所述样品与腔肠素底物和本文所述的化合物,如式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ib')或(II)化合物接触;以及

[0031] (b) 检测所述样品中的发光,

[0032] 其中所述化合物引起来自所述刺虾源性荧光素酶的发光的减少。

[0033] 在一方面,本公开提供一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法,所述方法包括:

[0034] (a) 使样品与腔肠素底物和本文所述的化合物,如式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ib')或(II)化合物接触,其中所述样品包含:

[0035] (i) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸,其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶的第一片段以及第一蛋白质;以及

[0036] (ii) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸,其中所述第二融合蛋白包含所述刺虾源性荧光素酶的第二片段以及第二蛋白质;以及

[0037] (b) 检测所述样品中的发光,

[0038] 其中检测到发光指示所述第一蛋白质与所述第二蛋白质之间的相互作用。

[0039] 在一方面,本公开提供一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作

用的方法,所述方法包括:

[0040] (a) 使样品与腔肠素底物和本文所述的化合物,如式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ib')或(II)化合物接触,其中所述样品包含:

[0041] (iii) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸,其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶以及第一蛋白质,其中所述刺虾源性荧光素酶是生物发光供体;以及

[0042] (iv) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸,其中所述第二融合蛋白包含荧光受体分子以及第二蛋白质;

[0043] (b) 检测所述样品中的生物发光共振能量转移(BRET),从而指示所述生物发光供体和所述荧光受体的相互作用或紧密邻近。

[0044] 在一方面,本公开提供一种生物发光共振能量转移(BRET)系统,其包括:第一融合蛋白,所述第一融合蛋白包含第一靶蛋白和生物发光供体分子,其中所述生物发光供体分子是刺虾源性荧光素酶;第二融合蛋白,所述第二融合蛋白包含第二靶蛋白和荧光受体分子;腔肠素底物,以及本文所述的化合物,如式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ib')或(II)化合物。

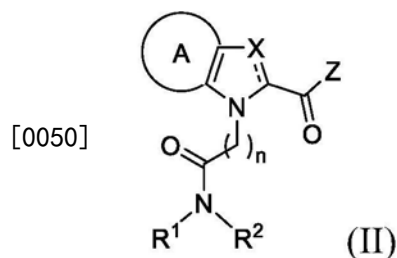
[0045] 在一方面,本公开提供一种试剂盒,所述试剂盒包括:

[0046] (a) 本文所述的化合物,如式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ib')或(II)化合物;以及

[0047] (b) 刺虾源性荧光素酶。

[0048] 在一方面,本公开提供一种用于调节样品中的刺虾源性荧光素酶的发光的方法,所述方法包括:

[0049] (a) 使所述样品与腔肠素底物和式(II)化合物接触:



[0051] 其中:

[0052] 虚线表示存在或不存在键;

[0053] n是0、1、2、3、4或5;

[0054] X是CH、N、O或S;

[0055] 其中,当虚线表示存在键时,X是CH或N,并且当虚线表示不存在键时,X是O或S;

[0056] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环;

[0057] R¹和R²各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基;

[0058] Z选自由以下各项组成的组:-NR³R⁴和-OR⁵;并且

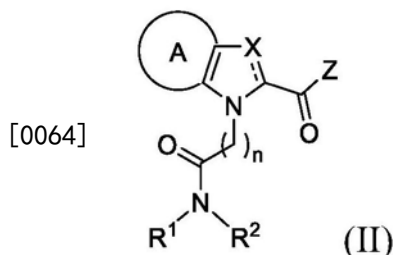
[0059] R³、R⁴和R⁵各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基;或者R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环;以及

[0060] (b) 检测所述样品中的发光，

[0061] 其中所述式 (II) 化合物引起来自所述刺虾源性荧光素酶的发光减少。

[0062] 在一方面，本公开提供一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法，所述方法包括：

[0063] (a) 使样品与腔肠素底物和式 (II) 化合物接触：



[0065] 其中：

[0066] 虚线表示存在或不存在键；

[0067] n是0、1、2、3、4或5；

[0068] X是CH、N、O或S；

[0069] 其中，当虚线表示存在键时，X是CH或N，并且当虚线表示不存在键时，X是O或S；

[0070] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环；

[0071] R¹和R²各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基；

[0072] Z选自由以下各项组成的组：-NR³R⁴和-OR⁵；并且

[0073] R³、R⁴和R⁵各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环，

[0074] 其中所述样品包含：

[0075] (v) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸，其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶的第一片段以及第一蛋白质；以及

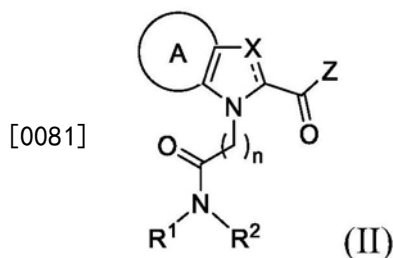
[0076] (vi) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸，其中所述第二融合蛋白包含所述刺虾源性荧光素酶的第二片段以及第二蛋白质；以及

[0077] (b) 检测所述样品中的发光，

[0078] 其中检测到发光指示所述第一蛋白质与所述第二蛋白质之间的相互作用。

[0079] 在一方面，本公开提供一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法，所述方法包括：

[0080] (a) 使样品与腔肠素底物和式 (II) 化合物接触：



[0082] 其中：

[0083] 虚线表示存在或不存在键；

[0084] n 是0、1、2、3、4或5；

[0085] X 是CH、N、O或S；

[0086] 其中，当虚线表示存在键时， X 是CH或N，并且当虚线表示不存在键时， X 是O或S；

[0087] A 是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环；

[0088] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基；

[0089] Z 选自由以下各项组成的组： $-NR^3R^4$ 和 $-OR^5$ ；并且

[0090] R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环，

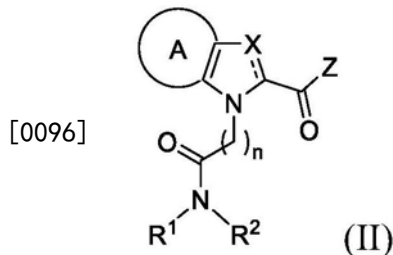
[0091] 其中所述样品包含：

[0092] (vii) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸，其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶以及第一蛋白质，其中所述刺虾源性荧光素酶是生物发光供体；以及

[0093] (viii) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸，其中所述第二融合蛋白包含荧光受体分子以及第二蛋白质；

[0094] (b) 检测所述样品中的生物发光共振能量转移(BRET)，从而指示所述生物发光供体和所述荧光受体的相互作用或紧密邻近。

[0095] 在一方面，本公开提供一种生物发光共振能量转移(BRET)系统，其包括：第一融合蛋白，所述第一融合蛋白包含第一靶蛋白和生物发光供体分子，其中所述生物发光供体分子是刺虾源性荧光素酶；第二融合蛋白，所述第二融合蛋白包含第二靶蛋白和荧光受体分子；腔肠素底物，以及式(II)化合物：



[0097] 其中：

[0098] 虚线表示存在或不存在键；

[0099] n是0、1、2、3、4或5；

[0100] X是CH、N、O或S；

[0101] 其中，当虚线表示存在键时，X是CH或N，并且当虚线表示不存在键时，X是O或S；

[0102] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环；

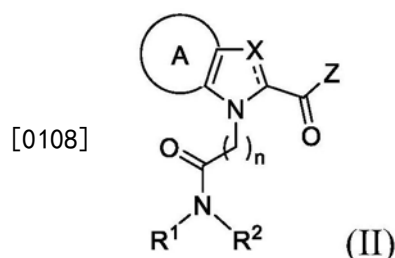
[0103] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基；

[0104] Z选自由以下各项组成的组： $-NR^3R^4$ 和 $-OR^5$ ；并且

[0105] R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[0106] 在一方面，本公开提供一种试剂盒，所述试剂盒包括：

[0107] (a) 式(II)化合物：



[0109] 其中：

[0110] 虚线表示存在或不存在键；

[0111] n是0、1、2、3、4或5；

[0112] X是CH、N、O或S；

[0113] 其中，当虚线表示存在键时，X是CH或N，并且当虚线表示不存在键时，X是O或S；

[0114] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环；

[0115] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基；

[0116] Z选自由以下各项组成的组： $-NR^3R^4$ 和 $-OR^5$ ；并且

[0117] R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环；以及

[0118] (b) 刺虾源性荧光素酶。

[0119] 附图简述

[0120] 图1示出在组合实时-Glo和CASPASE-GLO®测定系统的多重测定中JRW-0004对NANOLUC® (Nluc) 酶的抑制。

[0121] 图2示出噻吩并吡咯化合物JRW-0004、JRW-0013、JRW-0006、JRW-0042、JRW-0138和

JRW-0147对Nluc的抑制。

[0122] 图3示出噻吩并吡咯化合物JRW-0004、JRW-0013、JRW-0006、JRW-0042、JRW-0138和JRW-0147不抑制萤火虫荧光素酶活性。

[0123] 图4A-4D示出噻吩并吡咯化合物JRW-0004 (图4A和4B) 和WZ141-88 (图4C和4D) 以剂量和时间依赖性方式抑制Nluc。

[0124] 图5A-5D示出噻吩并吡咯化合物WZ141-86 (图5A和5B)、WZ141-74 (图5C) 和WZ141-84 (图5D) 以剂量和时间依赖性方式抑制Nluc。

[0125] 图6A-6C示出噻吩并吡咯化合物WZ141-89 (图6A)、WZ141-90 (图6B) 和WZ141-91 (图6C) 以剂量和时间依赖性方式抑制Nluc。

[0126] 图7A-7F示出使用用 β -2肾上腺素能受体-Nluc融合蛋白瞬时转染的HEK293或HeLa细胞,噻吩并吡咯化合物JRW-0138 (图7A)、JRW-0140 (图7B)、JRW-0142 (图7C)、JRW-0143 (图7D)、JRW-0145 (图7E) 和JRW-0147 (图7F) 的渗透性。

[0127] 图8A-8F示出使用用 β -2肾上腺素能受体-Nluc融合蛋白瞬时转染的HEK293或HeLa细胞,噻吩并吡咯化合物JRW-0148 (图8A)、JRW-0149 (图8B)、JRW-0151 (图8C)、JRW-0152 (图8D)、JRW-0051 (图8E) 和JRW-0043 (图8F) 的渗透性。

[0128] 图9A-9F示出使用用 β -2肾上腺素能受体-Nluc融合蛋白瞬时转染的HEK293或HeLa细胞,噻吩并吡咯化合物JRW-0044 (图9A)、JRW-0013 (图9B)、JRW-0034 (图9C)、JRW-0052 (图9D)、JRW-0110 (图9E) 和JRW-0187 (图9F) 的渗透性。

[0129] 图10A-10F示出使用用 β -2肾上腺素能受体-Nluc融合蛋白瞬时转染的HEK293或HeLa细胞,噻吩并吡咯化合物JRW-0188 (图10A)、JRW-0190 (图10B)、JRW-0191 (图10C)、JRW-0192 (图10D)、JRW-0195 (图10E) 和JRW-0197 (图10F) 的渗透性。

[0130] 图11A-11C示出使用用 β -2肾上腺素能受体-Nluc融合蛋白瞬时转染的HEK293或HeLa细胞,噻吩并吡咯化合物JRW-0198 (图11A)、JRW-0200 (图11B) 和JRW-0208 (图11C) 的渗透性。

[0131] 图12A-12E示出噻吩并吡咯化合物抑制细胞外BRET的能力。图12A示出伪细胞外BRET测定设计的示意图。图12B-12E示出使用细胞外BRET测定,噻吩并吡咯化合物JRW-0013 (图12B)、JRW-0051 (图12C)、JRW-0147 (图12D) 和JRW-0187 (图12E) 的化合物反应曲线。

[0132] 图13A-13E示出噻吩并吡咯化合物抑制细胞外荧光素酶活性并增强细胞内BRET的能力。图13A示出伪细胞外Nluc测定设计的示意图。图13B-13E示出使用细胞外Nluc测定,噻吩并吡咯化合物JRW-0013 (图13B)、JRW-0051 (图13C)、JRW-0147 (图13D) 和JRW-0187 (图13E) 的化合物反应曲线。

[0133] 图14示出噻吩并吡咯化合物JRW-0147、JRW-0051和JRW-0138的细胞渗透性。

[0134] 图15A-15C示出噻吩并吡咯化合物JRW-0147在目标接合模型中的细胞不可渗透性。图15A示出SRC-Nluc测定设计的示意图。图15B-15C示出达沙替尼-DY607 (图15B) 和JRW-0147 (图15C) 的化合物反应曲线。

[0135] 图16示出噻吩并吡咯化合物JRW-0147和JRW-0013的渗透性。

[0136] 图17A-17C示出使用用 β -2肾上腺素能受体-Nluc融合蛋白瞬时转染的HEK293细胞,噻吩并吡咯化合物JRW-0013 (图17A)、JRW-0147 (图17B) 和JRW-0344 (图17C) 的渗透性。

[0137] 图18A-18C示出与毛地黄皂苷 (图18B) 和DMSO (图18C) 相比, JRW-0344 (图18A) 的细

胞活力和毒性。

[0138] 图19示出噻吩并吡咯化合物JRW-0147、JRW-0344和JRW-0013的细胞渗透性。

[0139] 图20A-20C示出噻吩并吡咯化合物JRW-0344抑制细胞外荧光素酶活性的能力。图20A示出SRC-Nluc测定设计的示意图。图20B和20C示出使用SRC-Nluc测定(图20B)或细胞外Nluc测定(图20C),噻吩并吡咯化合物JRW-0344的化合物反应曲线。

[0140] 详述

[0141] 本文公开了可选择性地抑制刺虾源性荧光素酶,如SEQ ID NO:2的荧光素酶(本文还可互换地称为“NanoLuc”、“Nluc”、“Nluc荧光素酶”和“Nluc酶”)的噻吩并吡咯化合物。由于它们的稳定性和它们从细胞中分泌的潜力,在某些应用中使用选择性抑制剂来抑制来自刺虾源性荧光素酶的发光可能是有利的。例如,在涉及多个发光系统的时间复用的应用中,对于每个系统具有选择性抑制剂以允许一次仅测量和/或检测一个发光信号可能是有益的。另外,在一些基于平板的测定中,一定量的荧光素酶可从细胞中分泌。细胞外抑制剂化合物将允许选择性地抑制来自分泌的荧光素酶的发光,并且因此可有助于在某些测定中提高信噪比。

[0142] 已经发现本文所述的噻吩并吡咯化合物是刺虾荧光素酶的选择性抑制剂。噻吩并吡咯化合物可竞争荧光素酶的腔肠素底物的结合,并且可进行修饰以产生细胞可渗透抑制剂和细胞不可渗透抑制剂两者。

[0143] 1. 定义

[0144] 除非另外定义,否则本文所用的全部技术和科学术语都具有与本领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。当发生冲突时,以本文件(包括定义)为准。虽然在本发明的实践或测试中可使用与本文所描述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料,但以下描述了优选的方法和材料。本文提及的所有公布、专利申请、专利以及其它参考文献以引用的方式整体并入。本文公开的材料、方法和实施例仅是说明性的,并且不意图是限制性的。

[0145] 如本文所用,术语“包含(comprise)”、“包括(include)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“可(can)”、“含有(contain)”以及其变化形式意图是不排除另外行为或结构的可能性的开放式连接词、术语、或词语。除非上下文另外清楚地说明,否则单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”以及“所述”包括复数引用。本公开还涵盖“包括本文所呈现的实施方案或要素”、“由本文所呈现的实施方案或要素组成”以及“主要由本文所呈现的实施方案或要素组成”的其它实施方案,无论是否明确地提出。

[0146] 如本文所用,术语“取代基”或“合适的取代基”意图是指化学上可接受的官能团,例如不否定本发明化合物的活性的部分。合适取代基的说明性实例包括但不限于卤代基、全氟烷基、全氟烷氧基、烷基、烯基、炔基、羟基、卤代基、氧代基、巯基、烷硫基、烷氧基、硝基、叠氮烷基、磺酸基、芳基或杂芳基、芳氧基或杂芳氧基、芳烷基或杂芳烷基、芳烷氧基或杂芳烷氧基、HO-(C=O)-基、杂环基、环烷基、氨基、烷基-和二烷基-氨基、氨基甲酰基、烷基羰基、烷基羰基氧基、烷氧基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、芳基羰基、芳氧基羰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基等。取代基可被另外的取代基取代。取代基也可呈盐形式(例如,磺酸基可呈磺酸盐基团的形式)。

[0147] 如本文所用,术语“烯基”是指含有2至10个碳且含有至少一个通过除去两个氢而形成的碳-碳双键的直链或支链烃链。烯基的代表性实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、

2-甲基-2-丙烯基、3-丁烯基、4-戊烯基、5-己烯基、2-庚烯基、2-甲基-1-庚烯基以及3-癸烯基。本发明的烯基可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基，优选1至3个如上文所定义的合适的取代基取代。

[0148] 如本文所用，术语“烷氧基”是指通过氧原子附接至母体分子部分的如本文所定义的烷基。烷氧基的代表性实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基以及己氧基。

[0149] 如本文所用，术语“烷氧基烷氧基”是指通过如本文所定义的另一个烷氧基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷氧基。烷氧基烷氧基的代表性实例包括但不限于叔丁氧基甲氧基、2-乙氧基乙氧基、2-甲氧基乙氧基和甲氧基甲氧基。

[0150] 如本文所用的术语“烷氧基烷氧基烷基”是指通过如本文所定义的亚烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷氧基烷氧基。烷氧基烷氧基烷基的代表性实例包括但不限于叔丁氧基甲氧基甲基、乙氧基甲氧基甲基、(2-甲氧基乙氧基)甲基和2-(2-甲氧基乙氧基)乙基。

[0151] 如本文所用，术语“烷氧基烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷氧基。烷氧基烷基的代表性实例包括但不限于叔丁氧基甲基、2-乙氧基乙基、2-甲氧基乙基和甲氧基甲基。

[0152] 如本文所用，术语“烷氧基羰基”是指通过如本文所定义的羰基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷氧基。烷氧基羰基的代表性实例包括但不限于甲氧基羰基、乙氧基羰基和叔丁氧基羰基。

[0153] 如本文所用的术语“烷氧基羰基烷基”是指通过如本文所定义的亚烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷氧基羰基。烷氧基羰基烷基的代表性实例包括但不限于乙氧基羰基甲基、3-甲氧基羰基丙基、4-乙氧基羰基丁基和2-叔丁氧基羰基乙基。

[0154] 如本文所用，术语“烷基”是指适宜地具有1至30个碳原子、1至12个碳原子、1至10个碳原子、1至8个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子的直链或支链烃基。术语“C₁-C₈-烷基”被定义为包括具有以直链或支链排列的1、2、3、4、5、6、7或8个碳的烷基。例如，“C₁-C₈-烷基”具体地包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基（例如，正戊基）、己基（例如，正己基）、庚基（例如，正庚基）和辛基（例如，正辛基）。术语“C₁-C₆-烷基”被定义为包括具有以直链或支链排列的1、2、3、4、5或6个碳的烷基。例如，“C₁-C₆-烷基”具体地包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基（例如，正戊基）以己基（例如，正己基）。术语“C₁-C₄-烷基”被定义为包括具有以直链或支链排列的1、2、3或4个碳的烷基。例如，“C₁-C₄-烷基”具体地包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基。本发明的烷基可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基，如1至3个如上文所定义的合适的取代基取代。例如，烷基可被一个或多个卤代取代基取代以形成卤代烷基，或被一个或多个羟基取代基取代以形成羟烷基，或被一个或多个烷氧基取代以形成烷氧基烷基。

[0155] 如本文所用，术语“烷基氨基”是指通过如本文所定义的氨基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷基。烷基氨基的代表性实例包括但不限于甲氨基、乙基氨基、异丙基氨基、丁基氨基和仲丁基氨基。

[0156] 如本文所用，术语“烷基氨基烷基”是指通过如本文所定义的氨基烷基附接至母体

分子部分的如本文所定义的烷基。烷基氨基烷基的代表性实例包括但不限于甲氨基乙基和甲氨基-2-丙基。

[0157] 如本文所用,术语“烷基羰基”是指通过如本文所定义的羰基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷基。烷基羰基的代表性实例包括但不限于乙酰基、1-氧代丙基、2,2-二甲基-1-氧代丙基、1-氧代丁基和1-氧代戊基。

[0158] 如本文所用,术语“烷基羰基烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷基羰基。

[0159] 如本文所用,术语“烷基羰基烷基酰氨基”是指通过如本文所定义的烷基酰氨基附接至母体分子部分的如本文所定义的烷基羰基。

[0160] 术语“亚烷基”是指衍生自1至10个碳原子的饱和直链或支链烃的二价基团。亚烷基的代表性实例包括但不限于 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 以及 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 。

[0161] 如本文所用,术语“炔基”是指具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳且具有一个或多个碳-碳三键的直链或支链烃基。本发明的炔基包括但不限于乙炔基、丙炔基和丁炔基。本发明的炔基可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基,优选1至3个如上文所定义的合适的取代基取代。

[0162] 如本文所用,术语“酰氨基”是指通过如本文所定义的羰基(即, $-\text{CONH}_2$)附接至母体分子部分的氨基。如本文所用,术语“烷基酰氨基”是指通过如本文所定义的羰基附接至母体分子部分的烷基氨基或二烷基氨基。烷基酰氨基的代表性实例包括但不限于甲氨基羰基、二甲氨基羰基、乙基甲氨基羰基和正己基氨基羰基。

[0163] 如本文所用,术语“氨基”是指 $-\text{NH}_2$ 基团。

[0164] 如本文所用,术语“氨基烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的至少一个如本文所定义的氨基。氨基烷基的代表性实例包括但不限于氨基甲基、2-氨基乙基、3-氨基丙基、4-氨基丁基、5-氨基戊基和6-氨基己基。

[0165] 如本文所用,术语“氨基烷基酰氨基”是指通过如本文所定义的烷基酰氨基附接至母体分子部分的至少一个如本文所定义的氨基。

[0166] 如本文所用,术语“氨基保护基团”是指防止化学反应在所述保护基团所连接的氮原子上发生的部分。氨基保护基团也必须可通过化学反应除去。此类基团是本领域中熟知的并且包括在Protecting Groups in Organic Synthesis, T.W. Greene和P.G.M. Wuts, 第3版, John Wiley & Sons, 1999中详细描述的那些基团, 所述文献的全部以引用的方式并入本文。合适的氨基保护基包括但不限于苄氧羰基($-\text{NHCO}-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 或 $-\text{NH}-\text{Cbz}$); 叔丁氧羰基($-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ 或 $-\text{NH}-\text{Boc}$); 9-芴基甲基氧羰基($-\text{NH}-\text{Fmoc}$)、2,2,2-三氯乙基氧羰基($-\text{NH}-\text{Troc}$)和烯丙氧羰基($-\text{NH}-\text{Alloc}$)。(在上文中的每一个中, $-\text{NH}-$ 代表来自受保护的氨基的氮。)

[0167] 如本文所用,术语“氨基荧光素”是指(4S)-2-(6-氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)-4,5-二氢噻唑-4-甲酸或这一分子的取代的类似物。

[0168] 如本文所用,术语“芳基”是指单环、双环或三环芳族基团。芳基的代表性实例包括但不限于苯基、二氢茛基、茛基、萘基、二氢萘基和四氢萘基。本发明的芳基可任选地被一个或多个合适的取代基,优选1至5个如上文所定义的合适的取代基取代。

[0169] 如本文所用,术语“芳烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的芳基。芳烷基的代表性实例包括但不限于苯基甲基(即苄基)和苯基乙基。

[0170] 如本文所用,术语“芳基羰基”是指通过如本文所定义的羰基附接至母体分子部分的如本文所定义的芳基。

[0171] 如本文所用,术语“生物发光”或“发光”可指作为酶与产生光的底物之间的反应的结果而产生的光。此类酶(生物发光酶)的实例包括刺虾荧光素酶(例如细角刺虾)、萤火虫荧光素酶(例如北美萤火虫(*Photinus pyralis*)或宾夕法尼亚萤火虫(*Photuris pennsylvanica*))、叩头虫荧光素酶、海肾荧光素酶、海萤荧光素酶、水母发光蛋白、水螅发光蛋白等。

[0172] 如本文所用,术语“羰基”或“(C=O)”(如在短语如烷基羰基、烷基-(C=O)-或烷氧基羰基中所用)是指>C=O部分与第二部分如烷基或氨基(即酰氨基)的连接。烷氧基羰基氨基(即烷氧基(C=O)-NH-)是指氨基甲酸烷基酯基团。羰基也在本文中同等地定义为(C=O)。烷基羰基氨基是指诸如乙酰胺的基团。

[0173] 如本文所用,术语“羧基”是指-C(O)OH基团。

[0174] 如本文所用,术语“羧基烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的羧基。

[0175] 如本文所用,术语“羧基烷基酰氨基”是指通过如本文所定义的酰氨基附接至母体分子部分的如本文所定义的羧基烷基。

[0176] 如本文所用,术语“腔肠素底物”是指当收到广泛范围的生物发光蛋白如荧光素酶(例如海洋荧光素酶)作用时发光的一类报告分子。腔肠素底物包括腔肠素以及其类似物和衍生物。

[0177] 如本文所用,术语“环烷基”是指单环、双环或三环碳环基团(例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基、环戊烯基、环己烯基、双环[2.2.1]庚烷基、双环[3.2.1]辛烷基和双环[5.2.0]壬烷基等);任选地含有1或2个双键。本发明的环烷基可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基,优选1至5个如上文所定义的合适的取代基取代。

[0178] 如本文所用,术语“环烷基烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的环烷基。环烷基烷基的代表性实例包括但不限于环己基甲基。

[0179] 如本文所用,术语“环烷基酰氨基”是指通过如本文所定义的酰氨基附接至母体分子部分的如本文所定义的环烷基。

[0180] 如本文所用,术语“二烷基氨基”是指通过如本文所定义的氨基附接至母体分子部分的如本文所定义的两个独立选择的烷基。二烷基氨基的代表性实例包括但不限于N,N-二甲氨基、N-乙基-N-甲氨基和N-异丙基-N-甲氨基。

[0181] 如本文所用,术语“二烷基氨基烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的二烷基氨基。二烷基氨基烷基的代表性实例包括但不限于N,N-二甲氨基乙基和N,N-甲基(2-丙基)氨基乙基。

[0182] 如本文所用,术语“二烷基氨基烷基酰氨基”是指通过如本文所定义的烷基酰氨基附接至母体分子部分的如本文所定义的二烷基氨基。

[0183] 如本文所用,术语“卤素”或“卤代”是指氟、氯、溴或碘基团。

[0184] 如本文所用,术语“卤代烷氧基”是指被一个、两个、三个或四个卤素原子取代的如

本文所定义的烷氧基。卤代烷氧基的代表性实例包括但不限于氯甲氧基、2-氟乙氧基、三氟甲氧基和五氟乙氧基。

[0185] 如本文所用,术语“卤代烷基”是指被一个、两个、三个或四个卤素原子取代的如本文所定义的烷基。卤代烷基的代表性实例包括但不限于氯甲基、2-氟乙基、三氟甲基、五氟乙基、2-氯-3-氟戊基和4,4,4,-三氟丁基。

[0186] 如本文所用,术语“杂芳基”是指单环杂芳基或双环杂芳基。单环杂芳基是五元或六元环。五元环含有两个双键。五元环可含有一个选自O或S的杂原子;或一个、两个、三个或四个氮原子和任选的一个氧或硫原子。六元环含有三个双键和一个、两个、三个或四个氮原子。单环杂芳基的代表性实例包括但不限于呋喃基、咪唑基、异噁唑基、异噻唑基、噁二唑基、1,3-噁唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、吡唑基、吡咯基、四唑基、噻二唑基、1,3-噻唑基、噻吩基、三唑基以及三嗪基。双环杂芳基包括与苯基稠合的单环杂芳基、或与单环环烷基稠合的单环杂芳基、或与单环环烯基稠合的单环杂芳基、或与单环杂芳基稠合的单环杂芳基、或与单环杂环稠合的单环杂芳基。双环杂芳基的代表性实例包括但不限于苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并咪唑基、苯并噻二唑基、6,7-二氢-1,3-苯并噻唑基、咪唑并[1,2-a]吡啶基、吲唑基、吲哚基、异吲哚基、异喹啉基、萘啶基、吡啶并咪唑基、喹啉基、喹啉基、噻唑并[5,4-b]吡啶-2-基、噻唑并[5,4-d]嘧啶-2-基和5,6,7,8-四氢喹啉-5-基。本发明的杂芳基可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基,优选1至5个如上文所定义的合适的取代基取代。

[0187] 如本文所用,术语“杂芳烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的杂芳基。杂芳烷基的代表性实例包括但不限于呋喃-3-基甲基、1H-咪唑-2-基甲基、1H-咪唑-4-基甲基、1-(吡啶-4-基)乙基、吡啶-3-基甲基、6-氯吡啶-3-基甲基、吡啶-4-基甲基、(6-(三氟甲基)吡啶-3-基)甲基、(6-(氰基)吡啶-3-基)甲基、(2-(氰基)吡啶-4-基)甲基、(5-(氰基)吡啶-2-基)甲基、(2-(氯)吡啶-4-基)甲基、嘧啶-5-基甲基、2-(嘧啶-2-基)丙基、噻吩-2-基甲基以及噻吩-3-基甲基。

[0188] 如本文所用,术语“杂环”或“杂环基”是指单环杂环、双环杂环或三环杂环。单环杂环是含有至少一个独立地选自由氧、氮、磷和硫组成的组的杂原子的三元、四元、五元、六元、七元或八元环。三元或四元环含有零个或一个双键和一个选自由氧、氮、磷和硫组成的组的杂原子。五元环含有零个或一个双键和一个、两个或三个选自由氧、氮、磷和硫组成的组的杂原子。六元环含有零个、一个或两个双键和一个、两个或三个选自由氧、氮、磷和硫组成的组的杂原子。七元和八元环含有零个、一个、两个或三个双键和一个、两个或三个选自由氧、氮、磷和硫组成的组的杂原子。单环杂环的代表性实例包括但不限于氮杂环丁烷基、氮杂环庚烷基、氮丙啶基、二氮杂环庚烷基、1,3-二噁烷基、1,3-二氧戊环基、1,3-二硫戊环基、1,3-二噻烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑啉基、异噻唑烷基、异噁唑啉基、异噁唑烷基、吗啉基、噁二唑啉基、噁二唑烷基、噁唑啉基、噁唑烷基、膦烷(phosphinane)、哌嗪基、哌啶基、吡喃基、吡唑啉基、吡唑烷基、吡咯啉基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、噻二唑啉基、噻二唑烷基、噻唑啉基、噻唑烷基、硫代吗啉基、1,1-二氧化硫代吗啉基(硫代吗啉砜)、噻喃基、三噻烷基以及2,5-二氧代-吡咯烷基。双环杂环是与苯基稠合的单环杂环、或与单环环烷基稠合的单环杂环、或与单环环烯基稠合的单环杂环、或与单环杂环稠合的单环杂环、或桥连单环杂环体系,其中所述环的两个不

相邻的原子通过1、2、3或4个碳原子的亚烷基桥或2、3或4个碳原子的亚烯基桥连接。双环杂环的代表性实例包括但不限于苯并吡喃基、苯并噻喃基、苯并二氢吡喃基、2,3-二氢苯并呋喃基、2,3-二氢苯并噻吩基、氮杂双环[2.2.1]庚基(包括2-氮杂双环[2.2.1]庚-2-基)、2,3-二氢-1H-吡咯基、异二氢吡咯基、八氢环戊[c]吡咯基、八氢吡咯并吡啶基、9-磷杂双环[3.3.1]壬烷、8-磷杂双环[3.2.1]辛烷和四氢异喹啉基。三环杂环由以下各项例示:与苯基稠合的双环杂环、或与单环环烷基稠合的双环杂环、或与单环环烯基稠合的双环杂环、或与单环杂环稠合的双环杂环、或双环杂环双环,所述双环的两个不相邻原子通过1、2、3或4个碳原子的亚烷基桥或2、3或4个碳原子的亚烯基桥连接。三环杂环的实例包括但不限于八氢-2,5-环氧并环戊二烯、六氢-2H-2,5-桥亚甲基环戊[b]呋喃、六氢-1H-1,4-桥亚甲基环戊[c]呋喃、氮杂-金刚烷(1-氮杂三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷)、氧杂-金刚烷(2-氧杂三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷)以及2,4,6-三氧杂-8-磷杂三环[3.3.1.13,7]癸烷。本发明的杂环基团可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基,优选1至3个如上文所定义的合适的取代基取代。本发明的杂环基团可含有一个或多个连接至环的氧代基团(=O)或硫代(=S)基团。

[0189] 如本文所用,术语“杂环基烷基”是指通过如本文所定义的烷基附接至母体分子部分的如本文所定义的杂环基。杂环基烷基的代表性实例包括但不限于哌啶-4-基甲基、哌嗪-1-基甲基、3-甲基-1-吡咯烷-1-基丁基、(1R)-3-甲基-1-吡咯烷-1-基甲基、(1S)-3-甲基-1-吡咯烷-1-基丁基和3-吗啉代丙基。

[0190] 如本文所用,术语“杂环基酰氨基”是指通过如本文所定义的酰氨基附接至母体分子部分的如本文所定义的杂环基。

[0191] 如本文所用,术语“羟基”是指-OH基团。

[0192] 如本文所用,术语“羟基烷氧基”是指被至少一个羟基取代的如本文所定义的烷氧基。羟基烷氧基的代表性实例包括但不限于羟基乙氧基和2-羟基丙氧基。

[0193] 如本文所用,术语“羟烷基”是指被至少一个羟基取代的如本文所定义的烷基。羟烷基的代表性实例包括但不限于羟甲基、2-羟乙基、3-羟丙基、2,3-二羟丙基、2,3-二羟戊基、4-羟丁基、2-乙基-4-羟庚基、3,4-二羟丁基和5-羟戊基。

[0194] 如本文所用的术语“羟烷基酰氨基”是指连接至酰氨基的羟烷基,例如-酰氨基-烷基-OH。

[0195] 如本文所用,术语“羟基羰基”是指通过如本文所定义的羰基附接至母体分子部分的如本文所定义的羟基。

[0196] 如本文可互换使用的术语“发光酶”、“生物发光酶”或“荧光素酶”是指在生物发光中使用的一类氧化酶,其中当给予底物时,所述酶产生光并发光。荧光素酶可以是使用荧光素酶底物的天然存在的、重组的或突变的荧光素酶。荧光素酶底物可以是荧光素、荧光素衍生物或类似物、前荧光素衍生物或类似物、腔肠素或腔肠素衍生物或类似物。如果天然存在,则发光酶可由技术人员从生物体容易地获得。如果发光酶是天然存在的发光酶或者是重组或突变的发光酶,例如一种保留天然存在的发光酶的荧光素酶-腔肠素或荧光素酶-荧光素反应中的活性的发光酶,所述发光酶可容易地从细菌、酵母、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等的培养物中获得,进行转化以表达编码发光酶的核酸。此外,重组或突变的发光酶可使用编码荧光素酶的核酸从体外无细胞系统获得。合适的发光酶包括源自生物发光十足类动物(decapod)的荧光素酶,如源自刺虾科(Oplophoroidea)(例如刺虾源性荧光素

酶)、甲虫荧光素酶(例如北美萤火虫、宾夕法尼亚萤火虫等)、海洋生物体如刺胞动物(cnidarians)(例如海肾荧光素酶)、须虾科(Aristeidae)、管鞭虾科(管鞭虾科)、萤火虫科(Luciferidae)、樱虾科(Sergestidae)、玻璃虾科(Pasipheidae)和海真虾科(Thalassocarididae decapoda families)、桡足动物荧光素酶如高斯荧光素酶(如桡脚虫荧光素酶)、长腹水蚤荧光素酶如细长长腹水蚤(Metridia longa)和太平洋长腹水蚤(Metridia pacifica)荧光素酶、介形亚纲动物(Vargula)荧光素酶如希氏弯喉海萤(Vargula hilgendorffii)、剑乳点水蚤(Pleuromamma xiphias)荧光素酶和发光蛋白如水母发光蛋白、以及它们的变体、重组体和突变体。

[0197] “发光反应混合物”含有将允许发光酶产生光信号(即发光)的材料。所述混合物也可含有酶,例如荧光素酶(luciferase enzyme)或荧光素酶(luciferase)。产生发光信号所需的材料和特定的浓度和/或量将取决于所使用的发光酶以及正在进行的测定的类型而变化。通常其它材料将被添加至溶液,包括:缓冲剂以使反应维持在适当pH下、添加剂如PRIONEX或牛血清白蛋白(BSA)以帮助维持酶活性、还原剂、洗涤剂。

[0198] 如本文所用,术语“亚甲基二氧基”是指 $-OCH_2O-$ 基团,其中所述亚甲基二氧基的氧原子通过两个相邻的碳原子连接母体分子部分。

[0199] 如本文所用,术语“刺虾荧光素酶”和“刺虾源性荧光素酶”可互换使用并且是指从深海虾细角刺虾分泌的荧光素酶(例如SEQ ID NO:1),包括其野生型、变体和突变体。例如,合适的刺虾荧光素酶变体在美国专利号8,557,970和8,669,103中进行了描述,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。示例性刺虾源性荧光素酶包括例如SEQ ID NO:2的荧光素酶(在本文中也可互换地称为“NanoLuc”、“Nluc”、“Nluc荧光素酶”和“Nluc酶”)。

[0200] 如本文所用,术语“氧代”是指双键氧($=O$)基团,其中键配偶体是碳原子。这种基团也可被认为是羰基。

[0201] 术语“肽”或“多肽”是指至少两个氨基酸的序列。在一些实施方案中,肽可含有不超过80个氨基酸、或不超过35个氨基酸、不超过10个氨基酸或不超过5个氨基酸。

[0202] 如本文所用,术语“报告子部分”可指在适当条件下直接或间接地产生可检测信号的部分。示例性报告子部分包括但不限于荧光团、发光分子、染料、放射性标记和酶如荧光素酶的底物。在一些实施方案中,例如,当报告子部分是酶的底物时,所述报告子部分可间接地产生可检测的信号。酶与底物的反应然后产生可检测的信号,如荧光或发光。如本文所用,术语“生物发光报告子部分”可指为荧光素酶的底物的部分。例如,生物发光报告子部分可以是荧光素、荧光素衍生物,例如前荧光素、氨基荧光素、喹啉基(quionolyl)-荧光素、萘基荧光素、氟荧光素、氯荧光素、荧光素衍生物的前体、腔肠素或腔肠素衍生物或类似物(例如,复立玛津(furimazine))。所产生的发光信号可使用光度计进行检测。如本文所用,术语“荧光报告子部分”可指发荧光的部分。例如,荧光报告子部分可以是荧光团,如香豆素、R110、荧光素、DDAO、试卤灵、甲酚紫、甲硅烷基咕吨或carbopyronine。可使用荧光计检测荧光。

[0203] 连接至多组分取代基的前缀仅适用于其前面的第一组分。为了说明,术语“环烷基烷基”包含两种组分:烷基和环烷基。因此, C_1-C_6 -环烷基烷基上的 C_1-C_6 -前缀是指环烷基烷基的烷基组分含有1至6个碳原子; C_1-C_6 -前缀不描述环烷基组分。为了进一步说明,术语“卤代- C_1-C_6 -烷基”是指卤代甲基、卤代乙基、卤代丙基、卤代丁基、卤代戊基和卤代己基。为了

进一步说明, 卤代烷氧基烷基上的前缀“卤代”表示烷氧基烷基取代基的仅烷氧基组分被一个或多个卤素基团取代。如果卤素取代可仅发生在烷基组分上, 则所述取代基将替代地描述为“烷氧基卤代烷基”。

[0204] 如果取代基包含至少一个与一个或多个氢原子键合的碳或氮原子, 则所述取代基是“可取代的”。因此, 例如, 氢、卤素和氰基不属于此定义。此外, 含有这种原子的杂环基中的硫原子可被一个或两个氧代取代基取代。

[0205] 如果取代基被描述为“取代的”, 则非氢基团代替所述取代基的碳或氮上的氢基团。因此, 例如, 取代的烷基取代基是其中至少一个非氢基团代替烷基取代基上的氢基团的烷基取代基。为了说明, 单氟烷基是被氟基团取代的烷基, 并且二氟烷基是被两个氟基团取代的烷基。应认识到, 如果在取代基上存在多于一种取代, 则每个非氢基团可以是相同的或不同的 (除非另外说明)。

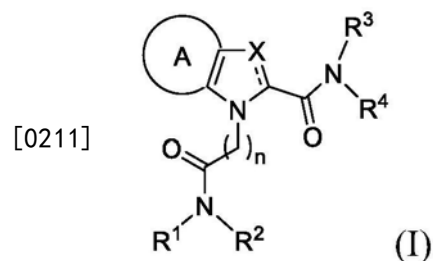
[0206] 当取代基被称为“未取代的”或不被称为“取代的”或“任选取代”时, 其意味着所述取代基不具有任何取代基。如果取代基被描述为“任选取代的”, 则所述取代基可以是 (1) 未取代的或 (2) 取代的。如果取代基被描述为任选地被至多特定数目的非氢基团取代, 则所述取代基可以是 (1) 未取代的; 或 (2) 被至多所述特定数目的非氢基团或被至多所述取代基上的最大数目的可取代位置 (取其中较小者) 取代的。因此, 例如, 如果取代基被描述为任选地被至多3个非氢基团取代的杂芳基, 则具有少于3个可取代位置的任何杂芳基将任选地被至多仅仅与杂芳基具有可取代的位置一样多的非氢基团取代。为了说明, 四唑基 (其仅具有一个可取代的位置) 将任选地被至多一个非氢基团取代。为了进一步说明, 如果氨基氮被描述为任选地被至多2个非氢基团取代, 则伯氨基氮将任选地被至多2个非氢基团取代, 而仲氨基氮将任选地被至多仅1个非氢基团取代。

[0207] 如果取代基被描述为“独立地选自”基团, 则各取代基彼此独立地选择。因此, 每个取代基可与其它取代基相同或不同。

[0208] 对于本文的数值范围的叙述来说, 明确地涵盖具有相同精确度的介于其间的每个中间数字。例如, 对于6-9的范围来说, 除6和9之外, 还涵盖数字7和8, 并且对于范围6.0-7.0来说, 明确地涵盖数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0209] 2. 噻吩并吡咯化合物

[0210] 本文提供噻吩并吡咯化合物, 其可抑制刺虾源性荧光素酶和/或刺虾源性荧光素酶活性。所述噻吩并吡咯化合物包括式 (I) 化合物及其盐:



[0212] 其中:

[0213] 虚线表示存在或不存在键;

[0214] n是0、1、2、3、4或5;

[0215] X是CH、N、O或S;

[0216] 其中,当虚线表示存在键时,X是CH或N,并且当虚线表示不存在键时,X是O或S;

[0217] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环;

[0218] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基;并且

[0219] R^3 和 R^4 各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基;或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[0220] 在一些实施方案中,虚线表示键的存在,并且X是CH。

[0221] 在一些实施方案中,n是1。

[0222] 在一些实施方案中,A是苯基环。在一些实施方案中,A是5元杂芳基环。在一些实施方案中,A是噻吩基环。在一些实施方案中,A是呋喃基环。

[0223] 在一些实施方案中, R^1 选自由以下各项组成的组:氢、 C_1 - C_8 烷基、卤代- C_1 - C_8 -烷基、烷氧基烷氧基烷基和芳烷基。例如,在一些实施方案中, R^1 选自由以下各项组成的组:氢、乙基、正己基、2-(2-甲氧基乙氧基)乙基和苄基。在一些实施方案中, R^1 是乙基。

[0224] 在一些实施方案中, R^2 是任选取代的芳基。例如,在一些实施方案中, R^2 是取代的苯基。 R^2 是被一个选自由以下各项组成的组的取代基取代的苯基: C_1 - C_4 烷基、氰基、酰氨基、 C_1 - C_4 烷氧基和羟烷基。在一些实施方案中, R^2 是被一个甲基取代的苯基(例如间甲苯基)。

[0225] 在一些实施方案中, R^1 是 C_1 - C_4 烷基并且 R^2 是任选取代的苯基。在一些实施方案中, R^1 是乙基并且 R^2 是间甲苯基。

[0226] 在一些实施方案中, R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。在一些实施方案中, R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的单环杂环。在一些实施方案中,任选取代的单环杂环选自由以下各项组成的组:任选取代的吡咯烷、哌啶和哌嗪。在一些实施方案中,任选取代的单环杂环选自由以下各项组成的组:未取代的吡咯烷、未取代的哌啶、被一个取代基(例如烷氧基羰基如乙氧基羰基)取代的哌啶或被一个取代基(例如, C_1 - C_4 烷基如甲基)的哌嗪。

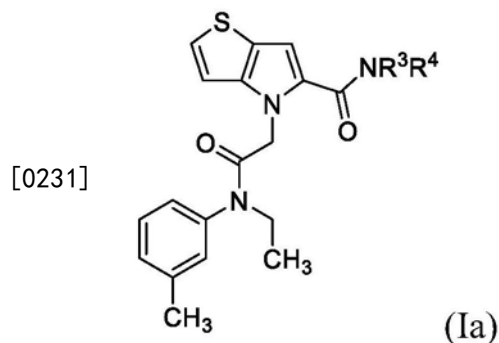
[0227] 在一些实施方案中, R^3 是氢。

[0228] 在一些实施方案中, R^4 选自由以下各项组成的组:未取代的 C_1 - C_8 烷基(例如甲基)、卤代- C_1 - C_8 -烷基、羧基- C_1 - C_8 -烷基(例如, $-(CH_2)_7-COOH$)、 C_1 - C_4 -烷氧基羰基- C_1 - C_8 -烷基(例如, $-(CH_2)_7-COOCH_3$)、任选取代的苯基(下文)、任选取代的 C_5 - C_6 环烷基(例如,未取代的环戊基、未取代的环己基或取代的环己基)、任选取代的杂环基(例如,未取代的哌啶基,被叔丁氧基羰基取代的哌啶基,烷氧基羰基烷基羰基如 $-CO-(CH_2)_4-COOCH_3$),或羧基烷基羰基如 $-CO-(CH_2)_4-COOH$)、任选取代的杂芳烷基(例如,吡啶基- C_1 - C_4 -烷基如 $-CH_2$ -吡啶基)以及任选取代的杂环基烷基(例如,吗啉代- C_1 - C_4 -烷基如 $-(CH_2)_3$ -吗啉代)。例如,在一些实施方案中, R^4 是未取代的或被一个取代基取代的苯基,所述取代基是如选自由以下各项组成的组的取代基: C_1 - C_4 -烷氧基羰基(例如, $-C(O)OCH_3$)和 C_1 - C_4 -烷氧基羰基- C_1 - C_4 -烷基(例如, $-CH_2-C(O)CH_2CH_3$)。

[0229] 在一些实施方案中, R^4 是被一个选自由以下各项组成的组的取代基取代的环己

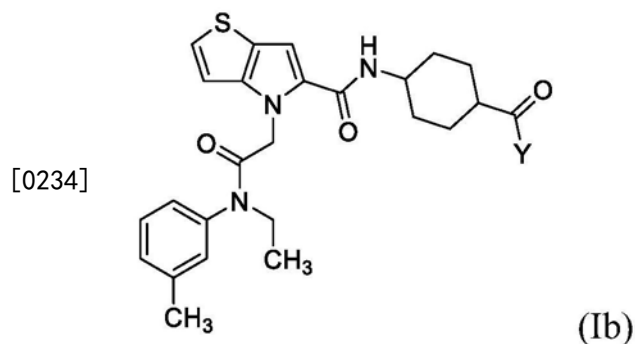
基:羧基、C₁-C₄-烷氧基羰基(例如,-C(O)OCH₃)、C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₃CH₃或-C(O)NH-(CH₂)₅CH₃)、羟基-C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₂OH或-C(O)NH-(CH₂)₆OH)、酰氨基(即-CONH₂)、任选取代的氨基-C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₆NH₂)、C₁-C₄-二烷基氨基-C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₂N(CH₃)₂)、羧基-C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₃COOH、-C(O)NH-(CH₂)₅COOH或-C(O)NH-(CH₂)₇COOH)、磺酸-C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₆SO₃H)、磺酸盐-C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₆SO₃⁻)、C₁-C₄-烷基羰基-C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₃COOCH₃、-C(O)NH-(CH₂)₅COOCH₃或-C(O)NH-(CH₂)₇COOCH₃)、任选取代的C₃-C₆-环烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-环己基、-C(O)NH-环己基-COOH或-C(O)NH-环己基-COOCH₃)以及杂环基酰氨基(例如,-C(O)NH-哌啶基,其是未取代的或被甲基、叔丁氧基羰基或乙酰基取代的)。例如,在一些实施方案中,R⁴是任选取代的氨基-C₁-C₈-烷基酰氨基(例如,-C(O)NH-(CH₂)₆NH₂),其中氨基被氨基保护基(例如,叔丁氧基羰基)保护,或其中氨基被质子化以形成盐(例如盐酸盐),或其中氨基被荧光团(例如,荧光素)或多肽(例如-Asp-Asp-Asp肽,其可在末端被乙酰化)进一步功能化。

[0230] 在一些实施方案中,所述化合物具有式(Ia):



[0232] 其中R³和R⁴是如以上针对式(I)所描述实施方案中的任一个中所定义。

[0233] 在一些实施方案中,化合物具有式(Ib):



[0235] 其中:

[0236] Y选自由以下各项组成的组:-NR^aR^b和-OR^c;

[0237] R^a和R^b各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈-环烷基和任选取代的杂环基;或者R^a和R^b与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环;并且

[0238] R^c选自由以下各项组成的组:氢和任选取代的C₁-C₄烷基。

[0239] 在一些实施方案中,Y是-OR^c。在一些实施方案中,R^c选自由以下各项组成的组:氢

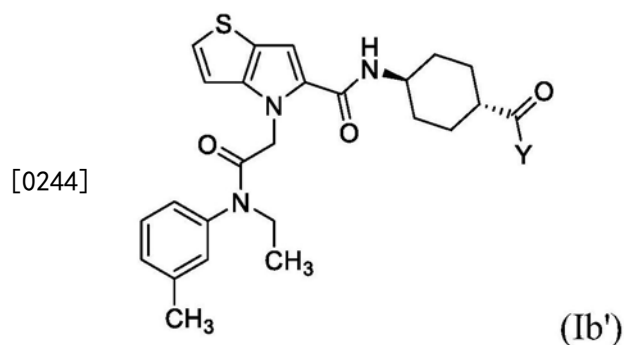
和甲基。

[0240] 在一些实施方案中, Y是 $-NR^aR^b$ 。

[0241] 在一些实施方案中, R^a 是氢。在一些实施方案中, R^b 选自自由以下各项组成的组: 氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 -环烷基和任选取代的杂环基。在一些实施方案中, R^b 选自自由以下各种组成的组: 氢、未取代的 C_1 - C_6 烷基 (例如, 正丁基或正己基)、羟基烷基 (例如, 羟基- C_1 - C_6 -烷基, 如 $(CH_2)_2OH$ 或 $-(CH_2)_6OH$)、任选取代的氨基烷基 (例如, 氨基- C_1 - C_6 -烷基, 如 $-(CH_2)_6NH_2$)、二烷基氨基烷基 (例如, C_1 - C_4 -二烷基氨基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基, 如 $-C(O)NH-(CH_2)_2N(CH_3)_2$)、羧基烷基 (例如, 羧基- C_1 - C_8 -烷基, 如 $-(CH_2)_3COOH$ 、 $-(CH_2)_5COOH$ 或 $-(CH_2)_7COOH$)、磺酸- C_1 - C_8 -烷基 (例如, $-(CH_2)_6SO_3H$)、磺酸盐- C_1 - C_8 -烷基 (例如, $-(CH_2)_6SO_3^-$)、烷基羰基烷基 (例如, C_1 - C_4 -烷基羰基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基, 如 $-(CH_2)_3COOCH_3$ 、 $-(CH_2)_5COOCH_3$ 或 $-(CH_2)_7COOCH_3$)、任选取代的 C_3 - C_6 -环烷基 (例如, -环己基、-环己基- $COOH$ 或-环己基- $COOCH_3$) 以及任选取代的六元杂环基 (例如, 未取代的或被甲基、叔丁氧基羰基或乙酰基取代的)。例如, 在一些实施方案中, R^b 是任选取代的氨基- C_1 - C_8 -烷基 (例如, $-(CH_2)_6NH_2$), 其中氨基被氨基保护基 (例如, 叔丁氧基羰基) 保护, 或其中氨基被质子化以形成盐 (例如盐酸盐), 或其中氨基被荧光团 (例如, 荧光素) 或多肽 (例如-Asp-Asp-Asp肽, 其可在末端被乙酰化) 进一步功能化。

[0242] 在一些实施方案中, R^a 和 R^b 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。在一些实施方案中, R^a 和 R^b 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的单环杂环。在一些实施方案中, 任选取代的单环杂环是任选取代的哌啶。在一些实施方案中, 单环杂环选自自由以下各项组成的组: 未取代的哌啶和被一个取代基 (例如, 羧基或烷氧基羰基如 $-C(O)OCH_2CH_3$) 取代的哌啶。

[0243] 在一些实施方案中, 所述化合物具有下式 (Ib')



[0245] 其中Y是如以上针对式 (Ib) 所描述实施方案中的任一个中所定义。

[0246] 合适的化合物包括以下各项:

[0247] N-环己基-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[0248] N-乙基-2-(5-(吡咯烷-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;

[0249] N-乙基-2-(5-(哌啶-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;

[0250] 1-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-羰基)

哌啶-4-甲酸乙酯；

[0251] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-苯基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺；

[0252] 2-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)苯基)乙酸乙酯；

[0253] 3-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)苯甲酸甲酯；

[0254] 顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯；

[0255] 8-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)辛酸；

[0256] 6-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)哌啶-1-基)-6-氧代己酸；

[0257] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯；

[0258] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸；

[0259] N-(反式-4-(丁基氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺；

[0260] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((2-羟乙基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺；

[0261] N-(反式-4-((2-(二甲氨基)乙基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺；

[0262] 4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)丁酸；

[0263] N-(反式-4-氨基甲酰基环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺；

[0264] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(己基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺；

[0265] 1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸乙酯；

[0266] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯；

[0267] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸；

[0268] 1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸；

[0269] 8-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)辛酸；

- [0270] N-(反式-4-(环己基氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0271] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((1-甲基哌啶-4-基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0272] 4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯;
- [0273] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(哌啶-4-基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0274] N-(反式-4-((1-乙酰基哌啶-4-基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0275] (6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己基)氨基甲酸叔丁酯;
- [0276] N-(反式-4-((6-(3',6'-二羟基-3-氧代-3H-螺[异苯并呋喃-1,9'-咕吨]-5(6)-甲酰氨基)己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0277] N-(反式-4-((6-氨基己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺盐酸盐;
- [0278] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0279] 反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;
- [0280] 反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸;
- [0281] (11S,14S,17S)-17-乙酰氨基-11,14-双(羧甲基)-1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己基)-1,10,13,16-四氧代-2,9,12,15-四氮杂十九烷-19-酸;
- [0282] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0283] N-环戊基-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0284] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(吡啶-4-基甲基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0285] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(3-吗啉代丙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;
- [0286] N-乙基-2-(5-(4-甲基哌嗪-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;
- [0287] 4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;
- [0288] N-环己基-4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[0289] N-环己基-4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[0290] 反式-4-(4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0291] 4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;

[0292] N-环己基-4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[0293] 反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0294] 4-(2-(苄基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;

[0295] 6-(顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸;

[0296] 6-(反式-4-((4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯;

[0297] 6-(反式-4-((4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸;

[0298] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠;

[0299] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钾;

[0300] 反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸;

[0301] 反式-4-(4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0302] 反式-4-(4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0303] 反式-4-(4-(2-((3-氨基甲酰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0304] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0305] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0306] 反式-4-(4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0307] 反式-4-(4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[0308] 反式-4-(4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-

甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0309] 反式-4-(4-(2-(乙基(4-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0310] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0311] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0312] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0313] 4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基) 环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[0314] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酰氨基) 己烷-1-磺酸钠;

[0315] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0316] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0317] 反式-4-(4-(2-((3-(溴甲基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0318] 反式-4-(4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0319] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0320] 反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[0321] 1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基) 环己基)-1H-吡啶-2-甲酰胺;

[0322] 6-(反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酰氨基) 己烷-1-磺酸钠;

[0323] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;以及

[0324] 反式-4-(6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯。

[0325] (1) 盐形式

[0326] 本文所描述的噻吩并吡咯化合物可呈盐形式。所述化合物的中性形式可通过使盐与碱或酸接触并且以常规方式分离母体化合物而再生。化合物的母体形式在某些物理性质(如在极性溶剂中的溶解度)方面不同于各种盐形式,但在其它方面,盐出于本公开的目的等效于化合物的母体形式。

[0327] 例如,如果化合物为阴离子或具有可为阴离子的官能团(例如,-COOH可为-COO⁻),

则盐可用合适的阳离子形成。合适的无机阳离子的实例包括但不限于碱金属离子,如 Na^+ 和 K^+ ;碱土金属阳离子,如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ;以及其它阳离子。合适的有机阳离子的实例包括但不限于铵离子(即 NH_4^+)和取代的铵离子(例如 NH_3R_1^+ 、 NH_2R_2^+ 、 NHR_3^+ 、 NR_4^+)。一些合适的取代的铵离子的实例是衍生自以下的那些:乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺和氨丁三醇以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。

[0328] 如果化合物为阳离子或具有可为阳离子的官能团(例如, $-\text{NH}_2$ 可为 $-\text{NH}_3^+$),则盐可用合适的阴离子形成。合适的无机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下无机酸的那些:盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、亚硝酸、磷酸以及亚磷酸。

[0329] 合适的有机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下有机酸的那些:2-乙酰氧基苯甲酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、依地酸、乙二磺酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、谷氨酸、乙醇酸、羟基马来酸、羟基萘羧酸、羧基磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、粘液酸、油酸、草酸、棕榈酸、扑酸、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、对氨基苯磺酸、酒石酸、甲苯磺酸以及戊酸。合适的聚合有机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下聚合酸的那些:鞣酸、羧甲基纤维素。

[0330] 除非另有规定,否则在本文中提及特定噻吩并吡咯化合物也包括其盐形式。

[0331] (2) 异构体

[0332] 某些噻吩并吡咯化合物可以一种或多种特定几何、光学、对映异构体、非对映异构体、差向异构、阻转异构、立体异构、互变异构、构象或端基异构形式存在,包括但不限于:顺式-(cis-)和反式-(trans-)形式;E-形式和Z-形式;c-、t-和r-形式;内向形式和外向形式;R-、S-和内消旋形式;D-形式和L-形式;d-形式和l-形式;(+)和(-)形式;酮基-形式、烯醇-形式和烯醇化物-形式;顺式(syn-)和反式(anti-)形式;向斜形式和背斜形式; α -形式和 β -形式;轴向形式和赤道形式;舟式、椅式、扭曲式、封套式和半椅式;及其组合,在下文中通称为“异构体”(或“异构形式”)。

[0333] 在一些实施方案中,本文所述的化合物可以是本文所述的立体异构体的对映异构富集的异构体。例如,所述化合物可具有至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的对映异构体过量。当在本文中使用,对映异构体是指分子结构彼此具有镜像关系的一对化学化合物中的任一种。

[0334] 在一些实施方案中,对应于所选立体中心,本文公开的化合物的制剂富集具有所选立体化学(例如R或S)的异构体。例如,所述化合物具有对应于具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的所选立体中心的所选立体化学的化合物的纯度。

[0335] 在一些实施方案中,本文公开的组合物包括本文公开的化合物的制剂,所述化合物富集在所选立体中心具有所选立体化学(例如R或S)的结构。示例性的R/S构象可以在本文所述的实施例中提供的那些。

[0336] 如本文所使用的“富集制剂”是在主题化合物内富集一种、两种、三种或更多种所选立体中心的所选立体构象。示例性的所选立体中心和其示例性的立体构象可选自在本文中(例如,在本文所述的实施例中)提供的那些。富集是指所述制剂中例如至少60%的化合

物分子具有所选立体中心的所选立体化学。在一个实施方案中,其为至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。富集是指主题分子的水平,且除非指定,否则不暗含方法局限性。

[0337] 噻吩并吡咯化合物可通过立体特异性合成或通过拆分以外消旋形式或作为单独的对映异构体或非对映异构体来制备。例如,可通过标准技术将所述化合物拆分为其组分对映异构体或非对映异构体,如通过与光学活性碱形成盐而形成立体异构体对,然后分级结晶并再生游离酸。还可通过形成立体异构酯或酰胺来拆分所述化合物,随后色谱分离并除去手性助剂。或者,可使用手性HPLC柱拆分化合物。对映体也可使用脂肪酶从相应酯的外消旋体的动力学拆分中获得。

[0338] 除如下文对于互变异构形式所论述之外,特别排除在本文使用的术语“异构体”之外的为结构(或构成)异构体(即,在原子之间的连接不同,而不是仅仅原子的空间位置不同的异构体)。例如,提及甲氧基-OCH₃不解释为提及其结构异构体羟甲基-CH₂OH。类似地,提及邻-氯苯基不解释为提及其结构异构体间-氯苯基。然而,提及一类结构很可能包括属于这类的结构异构形式(例如,C₃-烷基或丙基包括正丙基和异丙基;C₄-烷基或丁基包括正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基;甲氧基苯基包括邻甲氧基苯基、间甲氧基苯基和对甲氧基苯基)。

[0339] 上述排除并不涉及互变异构形式,例如酮基形式、烯醇形式和烯醇化物形式,如在例如以下互变异构对中:酮基/烯醇、亚胺/烯胺、酰胺/亚氨基醇、脒/脒、亚硝基/肟、硫酮/烯硫醇、N-亚硝基/羟基偶氮基和硝基/酸式硝基。

[0340] 应注意到,特别包括在术语“异构体”中的是具有一个或多个同位素取代的化合物。例如,H可处于任何同位素形式,包括¹H、²H(D)和³H(T);C可处于任何同位素形式,包括¹²C、¹³C和¹⁴C;O可处于任何同位素形式,包括¹⁶O和¹⁸O等。

[0341] 3. 刺虾荧光素酶

[0342] 本发明的噻吩并吡咯化合物可用于抑制刺虾源性荧光素酶。所述噻吩并吡咯化合物可抑制刺虾源性荧光素酶的荧光素酶活性。刺虾源性荧光素酶可以是野生型刺虾荧光素酶或刺虾荧光素酶的变体,如SEQ ID NO:2的荧光素酶。刺虾荧光素酶变体在美国专利号8,557,970和8,669,103中进行了描述,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0343] 细角刺虾荧光素酶的天然存在形式的成熟19kDa亚基的多肽序列提供于SEQ ID NO:1中。合成的刺虾源性荧光素酶的示例性多肽序列(其可用于本文所述的方法中)提供于SEQ ID NO:2(在本文中也可互换地称为“NanoLuc”、“Nluc”、“Nluc荧光素酶”和“Nluc酶”)中。

[0344] 4. 腔肠素底物

[0345] 本发明的噻吩并吡咯化合物可用于通过竞争或干扰腔肠素或腔肠素衍生物底物与荧光素酶的结合来抑制荧光素酶活性。腔肠素底物是一类当受到荧光素酶和其它生物发光蛋白作用时发光的报告分子。腔肠素底物的实例包括但不限于:腔肠素;腔肠素衍生物和/或类似物如2-呋喃基甲基-脱氧-腔肠素(复立玛津)、腔肠素-n、腔肠素-f、腔肠素-h、腔肠素-hcp、腔肠素-cp、腔肠素-c、腔肠素-e、腔肠素-fcp、双-脱氧腔肠素(“腔肠素-hh”)、腔肠素-i、腔肠素-icp、腔肠素-v和2-甲基-腔肠素,以及在WO 2003/040100、美国专利公布号2008/0248511和美国专利公布号US 2012/0117667中公开的那些;前-腔肠素(即不是非发光酶的底物的化合物,其将化合物转化为荧光素酶的底物)、醌掩蔽的腔肠素等。腔肠素底

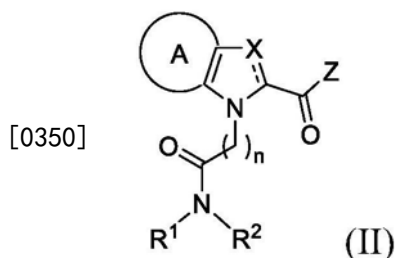
物的其它实例描述于例如美国公布号2012/0107849、美国公布号2013/0130289、美国专利申请号14/608,910和美国专利申请号14/609,372中,其各自以引用的方式并入本文。

[0346] 5.抑制刺虾荧光素酶活性的方法

[0347] 所公开的噻吩并吡咯化合物可用于抑制刺虾荧光素酶活性的方法中。所述方法可包括使本文公开的噻吩并吡咯化合物(例如,式(I)、(Ia)、(Ib)或(Ib'))化合物与表达或含有刺虾源性荧光素酶的细胞接触,其中所公开的化合物可选择性地抑制刺虾源性荧光素酶。所公开的噻吩并吡咯化合物可用于使用刺虾荧光素酶检测酶的存在或活性的测定中,以选择性地抑制来自刺虾荧光素酶的信号。例如,它们可用于采用刺虾荧光素酶和腔肠素或腔肠素-衍生物底物的生物发光方法中以检测样品中的一种或多种分子,例如目标蛋白质(例如,酶、结合配偶体、配体等)、用于酶反应的辅因子、酶底物、酶抑制剂、酶活化剂或OH自由基;或检测一种或多种条件,例如氧化还原条件。当腔肠素底物用作刺虾荧光素酶的底物时,所要求保护的噻吩并吡咯化合物可用于抑制荧光素酶以选择性地遏制在可能需要这种遏制的实施方案中的发光信号,如涉及多个生物发光体系的时间复用的应用中或者在一些基于板的发光测定中。例如,噻吩并吡咯化合物可用于抑制细胞内和/或细胞外刺虾荧光素酶活性。

[0348] (1)噻吩并吡咯化合物

[0349] 如上文所论述,所述方法可包括使本文公开的噻吩并吡咯化合物(例如,式(I)、(Ia)、(Ib)或(Ib'))化合物与表达刺虾源性荧光素酶的细胞接触,其中所公开的化合物可选择性地抑制刺虾源性荧光素酶。除了式(I)、(Ia)、(Ib)和(Ib')化合物之外,可用于本文所述的方法中的化合物还包括式(II)化合物或其盐:



[0351] 其中:

[0352] 虚线表示存在或不存在键;

[0353] n是0、1、2、3、4或5;

[0354] X是CH、N、O或S;

[0355] 其中,当虚线表示存在键时,X是CH或N,并且当虚线表示不存在键时,X是O或S;

[0356] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环;

[0357] R¹和R²各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基;

[0358] Z选自由以下各项组成的组:-NR³R⁴和-OR⁵;并且

[0359] R³、R⁴和R⁵各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基;或者R³

和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[0360] 在一些实施方案中, n 是1。

[0361] 在一些实施方案中,虚线表示键的存在,并且 X 是 CH 。

[0362] 在一些实施方案中, A 是苯基环。在一些实施方案中, A 是5元杂芳基环。在一些实施方案中, A 是噻吩基环。在一些实施方案中, A 是呋喃基环。

[0363] 在一些实施方案中, R^1 选自由以下各项组成的组:氢、 C_1 - C_8 烷基、卤代- C_1 - C_8 -烷基、烷氧基烷氧基烷基和芳烷基。例如,在一些实施方案中, R^1 选自由以下各项组成的组:氢、乙基、正己基、2-(2-甲氧基乙氧基)乙基和苄基。在一些实施方案中, R^1 是乙基。

[0364] 在一些实施方案中, R^2 是任选取代的芳基。例如,在一些实施方案中, R^2 是取代的苯基。 R^2 是被一个选自由以下各项组成的组的取代基取代的苯基: C_1 - C_4 烷基、氰基、酰氨基、 C_1 - C_4 烷氧基和羟烷基。在一些实施方案中, R^2 是被一个甲基取代的苯基(例如间甲苯基)。

[0365] 在一些实施方案中, R^1 是 C_1 - C_4 烷基并且 R^2 是任选取代的苯基。在一些实施方案中, R^1 是乙基并且 R^2 是间甲苯基。

[0366] 在一些实施方案中, Z 是 $-NR^3R^4$ 。

[0367] 在一些实施方案中, R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。在一些实施方案中, R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的单环杂环。在一些实施方案中,任选取代的单环杂环选自由以下各项组成的组:任选取代的吡咯烷、哌啶和哌嗪。在一些实施方案中,任选取代的单环杂环选自由以下各项组成的组:未取代的吡咯烷、未取代的哌啶、被一个取代基(例如烷氧基羰基如乙氧基羰基)取代的哌啶或被一个取代基(例如, C_1 - C_4 烷基如甲基)的哌嗪。

[0368] 在一些实施方案中, R^3 是氢。

[0369] 在一些实施方案中, R^4 选自由以下各项组成的组:未取代的 C_1 - C_8 烷基(例如甲基)、羧基- C_1 - C_8 -烷基(例如, $-(CH_2)_7-COOH$)、 C_1 - C_4 -烷氧基羰基- C_1 - C_8 -烷基(例如, $-(CH_2)_7-COOCH_3$)、任选取代的苯基(下文)、任选取代的 C_5 - C_6 环烷基(例如,未取代的环戊基、未取代的环己基或取代的环己基)、任选取代的杂环基(例如,未取代的哌啶基,被叔丁氧基羰基取代的哌啶基,烷氧基羰基烷基羰基如 $-CO-(CH_2)_4-COOCH_3$),或羧基烷基羰基如 $-CO-(CH_2)_4-COOH$)、任选取代的杂芳烷基(例如,吡啶基- C_1 - C_4 -烷基如 $-CH_2$ -吡啶基)以及任选取代的杂环基烷基(例如,吗啉代- C_1 - C_4 -烷基如 $-(CH_2)_3$ -吗啉代)。例如,在一些实施方案中, R^4 是未取代的或被一个取代基取代的苯基,所述取代基是如选自由以下各项组成的组的取代基: C_1 - C_4 -烷氧基羰基(例如, $-C(O)OCH_3$)和 C_1 - C_4 -烷氧基羰基- C_1 - C_4 -烷基(例如, $-CH_2-C(O)CH_2CH_3$)。

[0370] 在一些实施方案中, R^4 是被一个选自由以下各项组成的组的取代基取代的环己基:羧基、 C_1 - C_4 -烷氧基羰基(例如, $-C(O)OCH_3$)、 C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-C(O)NH-(CH_2)_3CH_3$ 或 $-C(O)NH-(CH_2)_5CH_3$)、羟基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-C(O)NH-(CH_2)_2OH$ 或 $-C(O)NH-(CH_2)_6OH$)、酰氨基(即 $-CONH_2$)、任选取代的氨基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-C(O)NH-(CH_2)_6NH_2$)、 C_1 - C_4 -二烷基氨基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-C(O)NH-(CH_2)_2N(CH_3)_2$)、羧基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-C(O)NH-(CH_2)_3COOH$ 、 $-C(O)NH-(CH_2)_5COOH$ 或 $-C(O)NH-(CH_2)_7COOH$)、磺酸- C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-C(O)NH-(CH_2)_6SO_3H$)、磺酸盐- C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-C(O)NH-(CH_2)_6SO_3^-$)、 C_1 - C_4 -烷基羰基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-C(O)NH-(CH_2)_3COOCH_3$ 、 $-C(O)NH-(CH_2)$

${}^5\text{COOCH}_3$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$ 、任选取代的 C_3 - C_6 -环烷基酰氨基(例如, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$ -环己基、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$ -环己基- COOH 或 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$ -环己基- COOCH_3)以及杂环基酰氨基(例如, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$ -哌啶基,其是未取代的或被甲基、叔丁氧基羰基或乙酰基取代的)。例如,在一些实施方案中, R^4 是任选取代的氨基- C_1 - C_8 -烷基酰氨基(例如, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$),其中氨基被氨基保护基(例如,叔丁氧基羰基)保护,或其中氨基被质子化以形成盐(例如盐酸盐),或其中氨基被荧光团(例如,荧光素)或多肽(例如-Asp-Asp-Asp肽,其可在末端被乙酰化)进一步功能化。

[0371] 在一些实施方案中, Z 是 $-\text{OR}^5$ 。在一些实施方案中, R^5 是 H 。在一些实施方案中, R^5 是任选取代的 C_1 - C_4 烷基(例如甲基)。

[0372] (2) 细胞不可渗透的噻吩并吡咯化合物的用途

[0373] 在某些实施方案中,本文公开的方法包括使样品(例如,细胞)与细胞可渗透腔肠素底物和本文所述化合物的混合物接触,所述化合物被修饰成使得其是细胞不可渗透的。在此类实施方案中,所公开的噻吩并吡咯化合物和方法可用于建立高通量筛选操作测定形式的初始亮度,并且然后选择性地抑制可从细胞分泌的任何荧光素酶以选择性地抑制可能发生在细胞外部的发光。此类方法可在细胞内提供更多的选择性信号。细胞不可渗透的噻吩并吡咯化合物的实例包括JRW-0051、JRW-0147和JRW-0187。

[0374] (3) 细胞可渗透的噻吩并吡咯化合物的用途

[0375] 在某些实施方案中,本文公开的方法包括使样品(例如,细胞)与细胞可渗透腔肠素底物和本文所述化合物的混合物接触,所述化合物是细胞可渗透的。在此类实施方案中,所公开的噻吩并吡咯化合物可进入细胞并选择性地抑制其中的刺虾荧光素酶。此类方法在涉及使用两种或更多种荧光素酶的复用测定中可以有利的,并且可允许抑制来自刺虾荧光素酶的发光,以便选择性地观察来自细胞内部的另一种荧光素酶的发光。细胞可渗透噻吩并吡咯化合物的实例包括JRW-0013和JRW-0138。

[0376] (4) 与转录报告子一起使用

[0377] 所公开的噻吩并吡咯化合物可与遗传转录报告子系统一起使用。在某些实施方案中,提供一种用于测量样品中的启动子的活性的方法,其中所述启动子可操作地连接至编码刺虾源性荧光素酶或其变体的基因。所述方法包括(a)使所述样品与腔肠素底物接触;(b)通过测量所述样品的发光来确定所述启动子的活性,其中所述样品包含所述启动子。所述方法还可包括使所述样品与本文所述的噻吩并吡咯化合物接触以选择性地抑制发光的步骤。所述启动子可经由翻译或转录融合可操作地连接至所述基因。例如,目标生物学途径可通过用所述途径的诱导剂处理包含所述启动子的细胞来检查,所述启动子可操作地连接至编码荧光素酶的基因。然后可测量并监测所述启动子活性,以研究所述启动子的活性与目标途径之间的任何相关性,以及获得与基因表达有关的动力学测量值(例如诱导性、抑制和活化)。本文所述的噻吩并吡咯化合物可用于选择性地抑制发光。

[0378] (5) 复用

[0379] 所公开的噻吩并吡咯化合物可用于抑制刺虾荧光素酶,如与其它荧光素酶和测定一起应用于时间复用。在一些实施方案中,可将刺虾源性荧光素酶或其变体与另一种发射不同波长的光的酶(例如荧光素酶)复用,所述酶是例如绿色萤火虫荧光素酶,例如北美萤火虫(例如Luc2;Promega Corp)或红色叩头虫荧光素酶(CHROMA-LUCTM荧光素酶;Promega

Corp.)。例如,如果使用刺虾荧光素酶作为功能性报告子,则可使用绿色萤火虫荧光素酶或红色CHROMA-LUCTM荧光素酶来控制对遗传调控的非特异性作用或针对转染效率标准化。在一些实施方案中,可使用具有波长区分滤光器的光度计容易地解析从刺虾荧光素酶(大约460nm)和红色CHROMA-LUC(大约610nm)产生的发光,从而使得能够测量来自同一样品的两种信号。在此类实施方案中,本文所述的噻吩并吡咯化合物可用于选择性地抑制刺虾荧光素酶,以使得可选择性地观察来自其它荧光素酶的信号。

[0380] 在另一个实例中,可使用刺虾荧光素酶作为转录报告子,并与测定试剂中包含的发射不同波长的光的荧光素酶配对。在另一个实例中,刺虾荧光素酶可与一种或多种另外的荧光素酶一起使用,其中可通过使用选择性酶抑制剂分别测量每种荧光素酶的发光。例如,可在添加适当的底物和缓冲剂后测量刺虾荧光素酶的发光,随后测量在后续添加适当的底物和缓冲剂以及一种或多种本文所述的噻吩并吡咯化合物后的第二荧光素酶,所述化合物对刺虾荧光素酶具有选择性。在另一个实例中,测定试剂中所含的刺虾荧光素酶可用于测量细胞生理学的特定方面(例如ATP)以估计细胞活力或半胱天冬酶活性以估计细胞凋亡。

[0381] (6) 生物发光共振能量转移(BRET)

[0382] 所公开的噻吩并吡咯化合物可用于任何方法中,其中刺虾荧光素酶用于检测配体-蛋白质和/或蛋白质-蛋白质相互作用。在各种实施方案中,可使用刺虾荧光素酶来将能量转移至能量受体。一种这样的方法是生物发光共振能量转移(BRET)。关于BRET,从生物发光供体至荧光受体的能量转移导致光发射的光谱分布的改变。这种能量转移可实现体外或体内实时监测蛋白质-蛋白质或配体-蛋白质相互作用。在一些实施方案中,所述BRET方法可以是用于配体-蛋白质和蛋白质-蛋白质相互作用的Nluc介导的生物发光共振能量转移(如NanoBRET)测定。NANO BRET包括两种不同的方法:1)使用基于HALOTAG和Nluc的技术,生物发光共振能量转移(BRET)来检测蛋白质-蛋白质和/或配体-蛋白质相互作用可通过增加的信号和减少的光谱重叠来实现;和2)使用与目标蛋白质融合的Nluc荧光素酶和荧光示踪剂来检测活细胞中的配体-受体相互作用。

[0383] 在一些实施方案中,用于BRET分析中的发光酶(即刺虾荧光素酶)可用于确定两种分子是否能够彼此结合或共定位于细胞中。例如,发光酶可用作生物发光供体分子,其与目标分子或蛋白质组合以产生第一融合蛋白。在各种实施方案中,所述第一融合蛋白含有发光酶和目标蛋白质。在各种实施方案中,含有发光酶的第一融合蛋白可用于BRET分析中以检测系统中的蛋白质/蛋白质相互作用,所述系统包括但不限于细胞溶解产物、完整细胞和活动物。在各种实施方案中,HALOTAG可用作荧光受体分子。在一些实施方案中,HALOTAG可融合至第二目标蛋白质或发光酶。例如,发光酶可融合至HALOTAG,在细胞或动物中表达,并用荧光HALOTAG配体如HALOTAG TMR配体标记。所述融合物可随后在存在细胞渗透性发光酶底物的情况下激发以发荧光。在一些实施方案中,可使用与荧光蛋白组合的发光酶来进行BRET,所述荧光蛋白包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)或红色荧光蛋白(RFP)或荧光标记,包括荧光素、若丹明绿、俄勒冈绿或Alexa 488,仅举几个非限制性实例。

[0384] 在一些实施方案中,当使用NanoBRET板测定时,淬灭来自分泌的Nluc的信号可提高信噪比。

[0385] 在某些实施方案中,可使用细胞可渗透噻吩并吡咯化合物来抑制细胞内BRET。在

某些实施方案中,可使用细胞不可渗透的噻吩并吡咯化合物来抑制细胞外BRET。在某些实施方案中,细胞不可渗透的噻吩并吡咯化合物可用于目标接合模型。

[0386] (7) 用于活细胞或溶解形式的蛋白质亲近测定

[0387] 在一些实施方案中,刺虾荧光素酶可用于循环置换型(CP)或直接分裂(SS)发光酶融合蛋白以测量蛋白质接近性。经由插入蛋白酶底物氨基酸序列(例如,TEV)来置换或分裂刺虾荧光素酶以产生低生物发光。无活性荧光素酶被栓系(例如,经由基因融合)至监测蛋白。潜在相互作用蛋白质被栓系(例如,经由基因融合)至蛋白酶(例如,TEV)。当两种监测蛋白质(例如,经由组成型相互作用、药物刺激或途径反应)相互作用或足够接近时,发光酶被裂解以产生增加的生物发光活性。所述实例可应用于细胞中或生物化学测定中的蛋白质接近性的测量。

[0388] (8) 蛋白质互补测定

[0389] 在一些实施方案中,当这种荧光素酶用于检测配体-蛋白质和蛋白质-蛋白质相互作用或接近性的其它方法,如蛋白质互补测定(PCA)或酶片段化测定时,所公开的噻吩并吡咯化合物可用于抑制刺虾荧光素酶。蛋白质互补测定(PCA)提供一种用于检测两种生物分子(例如多肽)的相互作用的手段。PCA利用同一蛋白质(例如酶)的两个片段,所述两个片段当彼此紧密邻近时可重构功能性的活性蛋白质。在一些实施方案中,可使用NANOBIT®技术(Promega公司)来经由酶组分或亚基的结合相互作用凭借重构发光酶来检测分子接近性。NANOBIT利用源自刺虾荧光素酶变体Nluc荧光素酶的非发光肽(NLPep)和非发光多肽(NLPoly)。NLPep和NLPoly与目标蛋白质融合。如果目标蛋白质相互作用,NLPep和NLPoly相互作用以重构全长刺虾荧光素酶。

[0390] 例如,可在耐受分离的位点将发光酶分离成两个片段,并且可将分离的发光酶的每个片段融合至据信相互作用的一对目标多肽(例如FKBP和FRB)中的一个。如果两种目标多肽事实上相互作用,则发光酶片段例如彼此接近以重构功能性活性发光酶。在一些实施方案中,然后可检测和测量重构的发光酶的活性。在一些实施方案中,分裂的发光酶可用于类似于lac-Z(Langley等人,PNAS72:1254-1257(1975))或核糖核酸酶S(Levit和Berger, J.Biol.Chem.251:1333-1339(1976))的更一般的互补系统中。在一些实施方案中,已知与另一个发光酶片段(“B”)互补的发光酶片段(称为“A”)可与目标蛋白质融合,并且可经由含有片段B的细胞或细胞溶解产物中的发光来监测所得到的融合物。在一些实施方案中,片段B的来源可以是相同的细胞(例如,如果片段B的基因被整合至所述细胞的基因组中或包含在所述细胞内的另一个质粒上),或者它可以是源自另一种细胞的溶解产物或纯化的蛋白质。在一些实施方案中,可使用片段B与能够附着于固体支持物的多肽如HALOTAG之间的融合来捕获或固定此相同的融合蛋白(片段A)。在一些实施方案中,可使用发光来证明成功捕获或量化所捕获的材料量。

[0391] (9) 二聚化测定

[0392] 在一些实施方案中,所公开的噻吩并吡咯化合物可与全长循环置换型发光酶一起使用,所述发光酶与相应的结合配偶体(例如FRB和FKBP)融合并用于蛋白质互补型测定中。本文公开的方法与传统的蛋白质互补之间的关键差异是不存在互补,而是存在两种全长酶(例如循环置换型发光酶)的二聚化。

[0393] 简言之,针对低活性类似地构造的循环置换型报告子蛋白与两种融合蛋白配偶体

融合。例如,每种融合配偶体可连接至相同结构的置换型报告子上。融合配偶体的相互作用使得置换型报告分子紧密邻近,从而允许重构具有较高活性的杂合报告子。

[0394] 6. 样品

[0395] 所公开的噻吩并吡咯化合物可与含有生物组分的样品一起使用。所述样品可包含细胞。所述样品可包含组分(包括完整细胞、细胞提取物、细胞溶解产物、细菌、病毒、细胞器、外来体及其混合物)的异质混合物或单一组分或组分(例如,天然或合成氨基酸、核酸或碳水化合物聚合物或脂质膜复合物)的均质组。所述噻吩并吡咯化合物对使用浓度范围内的活细胞和其它生物组分可以是通常无毒的。

[0396] 样品可包括动物(例如脊椎动物)、植物、真菌、生理流体(例如血液、血浆、尿液、粘液分泌物等)、细胞、细胞溶解产物、细胞上清液或细胞的纯化级分(例如,亚细胞级分)。在某些实施方案中,样品可以是细胞。在一些实施方案中,样品可以是活细胞。细胞可以是真核细胞,例如酵母、禽类、植物、昆虫或哺乳动物细胞,包括但不限于人、猿、鼠科动物、犬科动物、牛科动物、马科动物、猫科动物、绵羊、山羊或猪细胞,或原核细胞,或来自两种或更多种不同生物体的细胞,或其细胞溶解产物或上清液。所述细胞可能尚未经由重组技术进行遗传修饰(非重组细胞),或可以用重组DNA瞬时转染的重组细胞和/或用重组DNA稳定地扩增的基因组,或已进行修饰以破坏基因(例如破坏启动子、内含子或开放阅读框)或用另一个DNA片段置换一个DNA片段的基因组。重组DNA或置换DNA片段可编码待通过本发明的方法检测的分子,改变待检测分子的水平或活性的部分,和/或与改变所述分子的水平或活性的分子或部分无关的基因产物。所述细胞可表达或不表达荧光素酶。所述细胞可能已经经由重组技术进行了遗传修饰。

[0397] 7. 试剂盒

[0398] 公开了用于测定一种或多种酶(例如刺虾或刺虾变体荧光素酶)的存在或活性的试剂盒。所述试剂盒可包括以下中的一项或多项:可抑制刺虾或刺虾变体荧光素酶的本发明化合物或组合物、腔肠素或腔肠素衍生物底物、刺虾或刺虾变体荧光素酶、用于进行发光测定的说明书、以及反应缓冲液。所述反应缓冲液可存在于用于非荧光素酶反应和发光酶反应的单独制剂中,或者存在于用于单步测定的单一制剂中。所述试剂盒还可含有非荧光素酶的其它抑制剂、活化剂和/或增强剂。所述试剂盒也可含有用于测定的阳性和/或阴性对照。

[0399] 8. 实施例

[0400] 通用合成程序A:向酯中间体(1当量)于二噁烷/水(4:1)中的溶液添加氢氧化锂(5当量)。将悬浮液加热至60°C直到起始材料被消耗(通过LCMS或TLC分析监测)。将反应混合物冷却并用HCl(2M)酸化直至pH 3。将悬浮液分配在乙酸乙酯与水之间。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅、二氯甲烷/甲醇)纯化残余物,以得到所需产物。

[0401] 通用合成程序B:向羧酸酯中间体(1当量)于二甲基甲酰胺中的溶液添加所需的胺(或胺盐酸盐)、羟基苯并三唑(2当量)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(2当量)和二异丙基乙胺(3当量)。将混合物加热至60°C直到起始材料被消耗(通过LCMS或TLC分析监测)。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅、二氯甲烷/甲醇或庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物,以

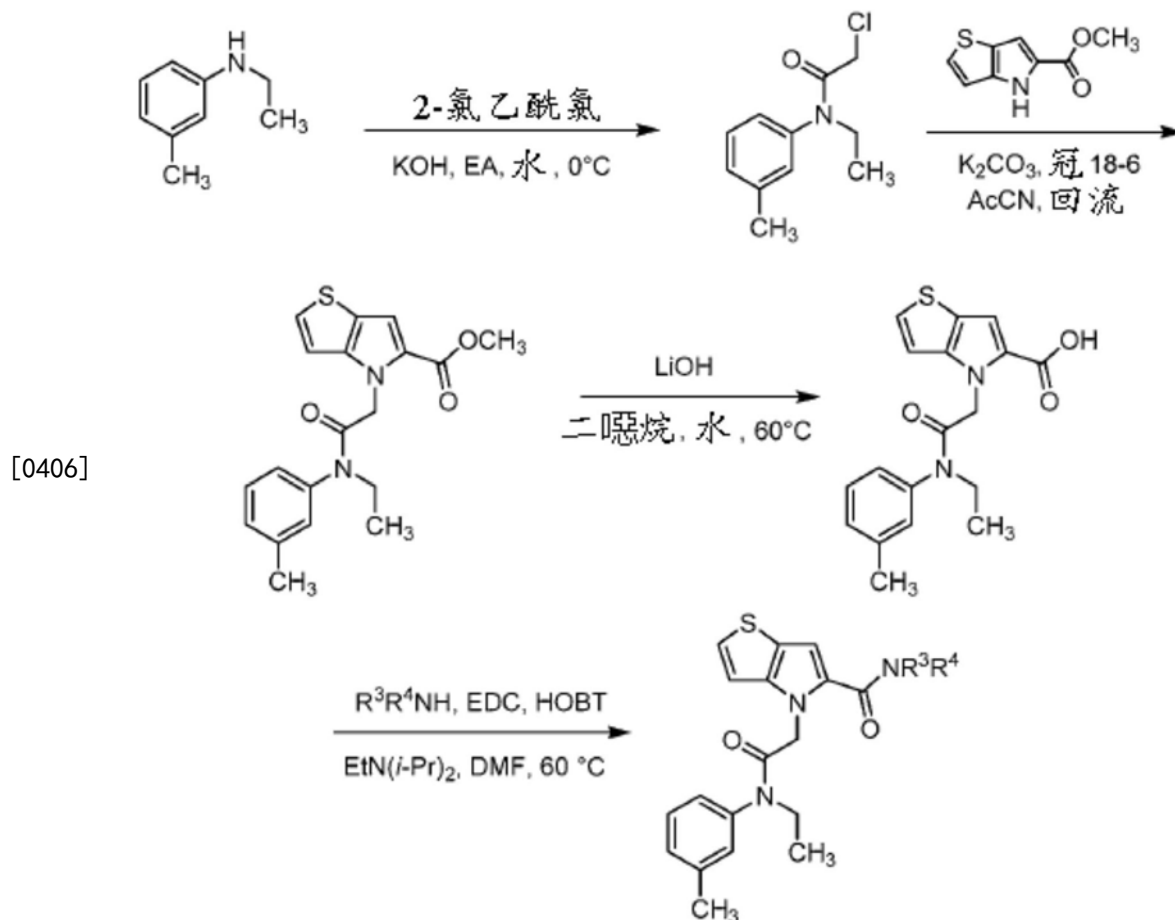
得到所需产物。

[0402] 实施例1

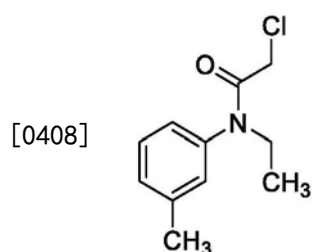
[0403] 式 (Ia) 化合物的通用合成

[0404] 式 (Ia) 化合物通常可根据方案1来合成。

[0405] 方案1.



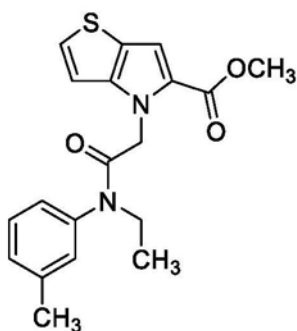
[0407] 2-氯-N-乙基-N-(间甲苯基)乙酰胺 (JRW-0003)



[0409] 向N-乙基-3-甲基苯胺 (2.0g, 14.8mmol) 于乙酸乙酯 (25mL) 中的溶液添加水 (12mL)。将双相溶液冷却至0°C, 并且一次性添加氢氧化钾 (2.49g, 44.4mmol)。在10分钟内逐滴添加2-氯乙酰氯 (2.5g, 1.8mL, 22.2mmol)。将所述混合物搅拌1小时, 用水稀释, 并用乙酸乙酯萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液以得到呈可流动油的粗产物 (3.2g)。ESI MS m/z 212 [M+H]⁺。

[0410] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯 (JRW-0004)

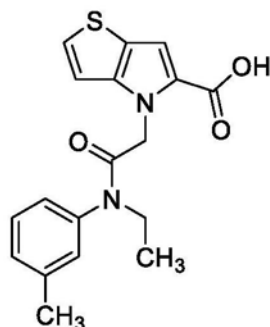
[0411]



[0412] 向2-氯-N-乙基-N-(间甲苯基)乙酰胺(14.8mmol)于乙腈(100mL)中的溶液添加4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(2.28g,12.6mmol)、碳酸钾(2.09g,15.1mmol)和18-冠-6(166mg,0.63mmol)。将混合物加热至回流5小时,并将反应在真空下浓缩至约20mL体积。将悬浮液用水稀释,过滤,并用水洗涤。将固体在真空下干燥以得到呈浅褐色固体的粗产物(4.6g)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.53(d,J=5.4,1H),7.46-7.36(m,1H),7.35-7.11(m,5H),4.92(s,2H),3.74(s,3H),3.67-3.53(m,2H),2.37(s,3H),1.00(t,J=6.6,3H);ESI MS m/z 357[M+H]⁺。

[0413] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(WZ-141-74)

[0414]

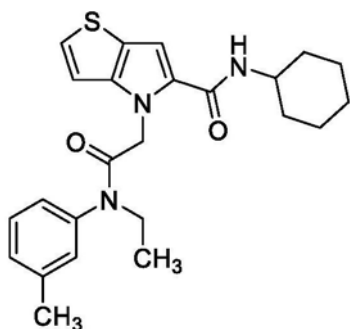


[0415] 按照通用程序A,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(2.0g,5.6mmol)与氢氧化锂(671mg,28.0mmol)反应以得到呈淡黄色固体的所需产物(1.8g,93%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ12.45(s,1H),7.49(d,J=5.4,1H),7.44-7.37(m,1H),7.33-7.12(m,4H),7.09(s,1H),4.91(s,2H),3.71-3.54(m,2H),2.36(s,3H),1.08-0.94(s,3H);ESI MS m/z 343[M+H]⁺。

[0416] 实施例2

[0417] N-环己基-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0006)

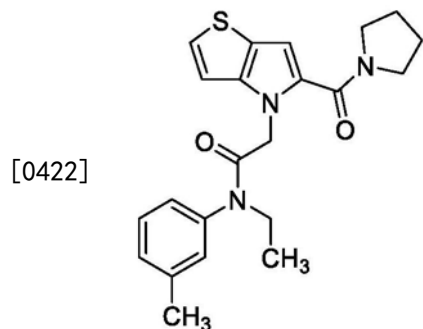
[0418]



[0419] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(75mg,0.22mmol)与环己胺(43mg,0.44mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(50mg,54%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.83(d,J=8.1,1H),7.44-7.16(m,5H),7.13-7.06(m,2H),4.96(s,2H),3.75-3.52(m,2H),2.36(s,3H),1.84-1.51(m,5H),1.37-1.17(m,6H),1.05-0.93(m,3H);ESI MS m/z 424[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 7.02min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm,ε25,200。

[0420] 实施例3

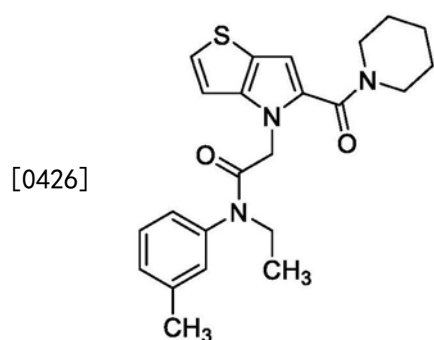
[0421] N-乙基-2-(5-(吡咯烷-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺(JRW-0008)



[0423] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(75mg,0.22mmol)与吡咯烷(43mg,0.44mmol)反应以得到呈灰白色固体的所需产物(70mg,81%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.45-7.16(m,5H),7.06(d,J=5.2,1H),6.83(s,1H),4.83(s,2H),3.77-3.32(m,6H),2.36(s,3H),1.91-1.75(m,4H),1.06-0.92(m,3H);ESI MS m/z 396[M+H]⁺;HPLC 97.3%(AUC),T_R 6.24min;UV(MeOH) λ_{max} 288nm,ε21,773。

[0424] 实施例4

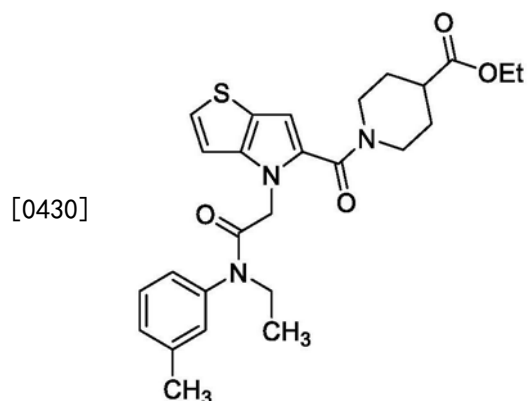
[0425] N-乙基-2-(5-(哌啶-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺(JRW-0009)



[0427] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(80mg,0.23mmol)与哌啶(40mg,0.47mmol)反应以得到呈橙色胶状物的所需产物(90mg,94%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.52-7.13(m,5H),7.05(d,J=5.2,1H),6.58(s,1H),4.75(s,2H),3.68-3.45(m,6H),2.37(s,3H),1.69-1.42(m,6H),1.00(t,J=6.9,3H);ESI MS m/z 410[M+H]⁺;HPLC 98.8%(AUC),T_R 5.91min;UV(MeOH) λ_{max} 284nm,ε24,598。

[0428] 实施例5

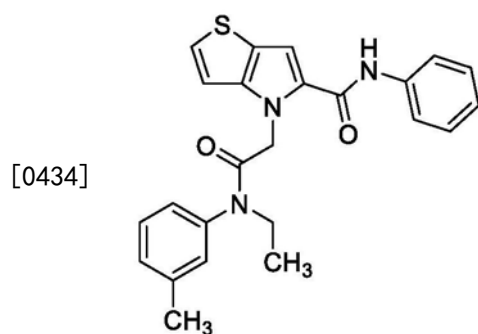
[0429] 1-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-羰基)哌啶-4-甲酸乙酯(JRW-0012)



[0431] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(120mg,0.35mmol)与哌啶-4-甲酸乙酯(110mg,0.70mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(160mg,94%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.47-7.36(m,1H),7.32(d,J=5.3,1H),7.29-7.14(m,3H),7.07(d,J=5.3,1H),6.61(s,1H),4.75(s,2H),4.22(d,J=13.2,2H),4.06(q,J=7.1,2H),3.68-3.52(m,2H),3.18-2.94(m,2H),2.70-2.55(m,1H),2.37(s,3H),1.90-1.78(m,2H),1.62-1.48(m,2H),1.17(t,J=7.1,3H),0.98(t,J=6.8,3H);ESI MS m/z 482[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 7.25min;UV(MeOH) λ_{max} 286nm,ε20,009

[0432] 实施例6

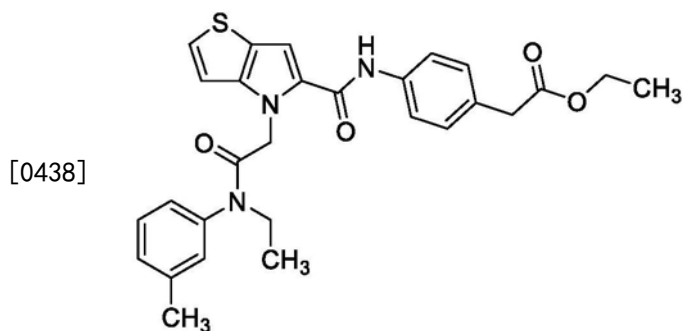
[0433] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-苯基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0143)



[0435] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(50mg,0.15mmol)与苯胺(16mg,0.18mmol)反应以得到呈泡沫的所需产物(30mg,49%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ9.93(s,1H),7.74-7.68(m,2H),7.49-7.19(m,9H),7.16(d,J=5.3,1H),7.05(t,J=7.4,1H),4.99(s,2H),3.67-3.52(m,2H),2.37(s,3H),1.06-0.92(m,3H);ESI MS m/z 418[M+H]⁺;HPLC 85.4%(AUC),T_R 6.04min;UV(EtOH) λ_{max} 306nm,ε27,330。

[0436] 实施例7

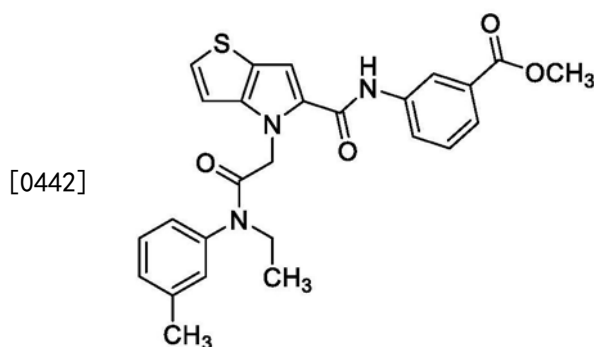
[0437] 2-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)苯基)乙酸乙酯(JRW-0152)



[0439] 向4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(50mg, 0.15mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加2-(4-氨基苯基)乙酸乙酯(31mg, 0.18mmol)、HATU(111mg, 0.29mmol)和二异丙基乙胺(56mg, 0.44mmol)。将反应加热至60℃持续18小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈橙色固体的所需产物(28mg, 38%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 9.93(s, 1H), 7.64(d, J=7.6, 2H), 7.50-7.11(m, 9H), 4.99(s, 2H), 4.06(q, J=6.4Hz, 2H), 3.60(s, 4H), 2.37(s, 3H), 1.17(t, J=7.2, 3H), 0.98(t, J=6.4, 3H); ESI MS m/z 476[M+H]⁺; HPLC 97.2% (AUC), T_R 7.61min; UV (EtOH) λ_{max} 308nm, ε₃₄, 350。

[0440] 实施例8

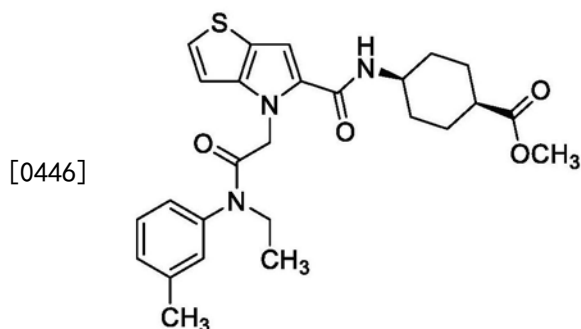
[0441] 3-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)苯甲酸甲酯(JRW-0151)



[0443] 向4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(50mg, 0.15mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加3-氨基苯甲酸甲酯(33mg, 0.22mmol)、HATU(111mg, 0.29mmol)和二异丙基乙胺(56mg, 0.44mmol)。将反应加热至60℃持续18小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈淡黄色固体的所需产物(30mg, 43%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 10.15(s, 1H), 8.42-8.38(m, 1H), 8.00(d, J=8.2, 1H), 7.67-7.63(m, 1H), 7.56-7.10(m, 8H), 5.00(s, 2H), 3.86(s, 3H), 3.67-3.55(m, 2H), 2.38(s, 3H), 0.99(t, J=6.7, 3H); ESI MS m/z 476[M+H]⁺; HPLC 98.3% (AUC), T_R 7.52min; UV (EtOH) λ_{max} 309nm, ε₃₇, 302。

[0444] 实施例9

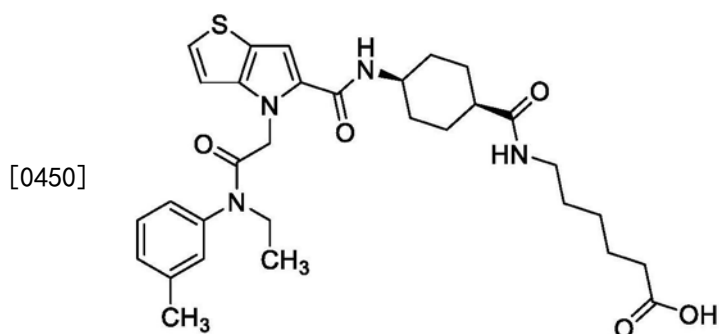
[0445] 顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0041)



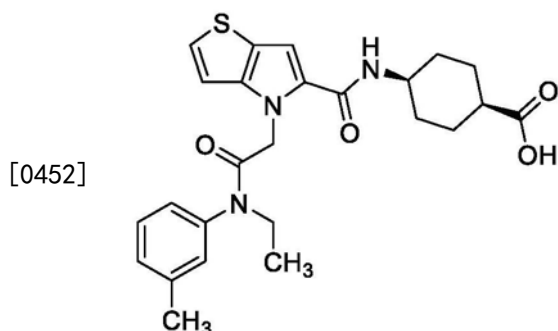
[0447] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(150mg,0.44mmol)与顺式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯盐酸盐(127mg,0.66mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(186mg,88%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.82(d,J=7.8,1H),7.45-7.33(m,2H),7.32-7.16(m,3H),7.12(s,1H),7.08(d,J=5.3,1H),4.95(s,2H),3.85-3.70(m,1H),3.68-3.53(m,5H),2.63-2.56(m,1H),2.36(s,3H),2.08-1.92(m,2H),1.69-1.43(m,6H),1.08-0.95(m,3H);ESI MS m/z 482[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R7.16min;UV(MeOH) λ_{max} 288nm,ε24,998。

[0448] 实施例10

[0449] 6-(顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸(JRW-0264)



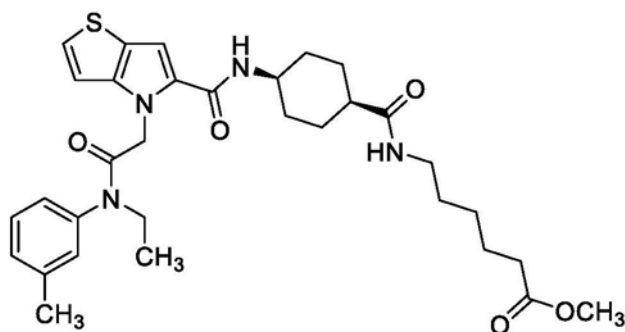
[0451] 步骤1.顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(JRW-0261)



[0453] 按照通用程序A,使顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(160mg,0.33mmol)与氢氧化锂(40mg,1.66mmol)反应以得到呈浅褐色固体的粗产物。ESI MS m/z 468[M+H]⁺。

[0454] 步骤2. 6-(顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯(JRW-0262)

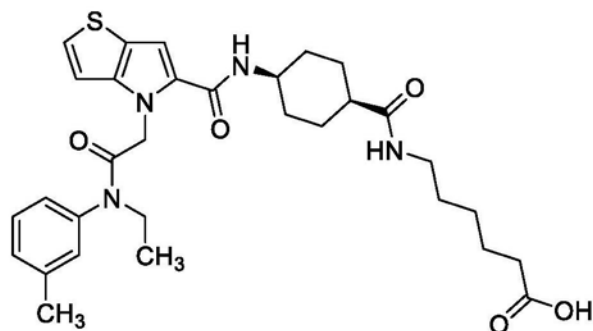
[0455]



[0456] 按照通用程序B,使顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(68mg,0.15mmol)与6-氨基己酸甲酯盐酸盐(40mg,0.22mmol)反应以得到呈淡红色泡沫的所需产物(63mg,72%)。ESI MS m/z 595 $[M+H]^+$ 。

[0457] 步骤3. 6-(顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸(JRW-0264)

[0458]

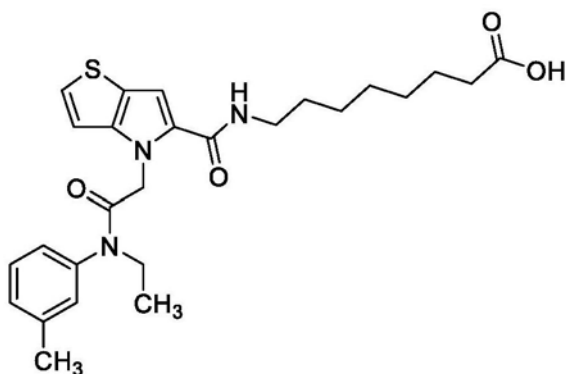


[0459] 按照通用程序A,使6-(顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯(60mg,0.10mmol)与氢氧化锂(12mg,0.50mmol)反应以得到呈淡红色泡沫的所需产物(56mg,95%)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 11.96 (s, 1H), 7.77 (d, $J=7.2$, 1H), 7.61 (t, $J=5.5$, 1H), 7.45-7.33 (m, 2H), 7.33-7.14 (m, 4H), 7.08 (d, $J=5.5$, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.92-3.74 (m, 1H), 3.67-3.56 (m, 2H), 3.01 (dd, $J=6.8, 12.6$, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.27-2.10 (m, 3H), 1.94-1.79 (m, 2H), 1.78-1.64 (m, 2H), 1.60-1.31 (m, 8H), 1.30-1.18 (m, 2H), 1.06-0.94 (m, 3H); ESI MS m/z 581 $[M+H]^+$; HPLC 97.8% (AUC), T_R 5.50min; UV (EtOH) λ_{max} 289nm, ϵ 18,873。

[0460] 实施例11

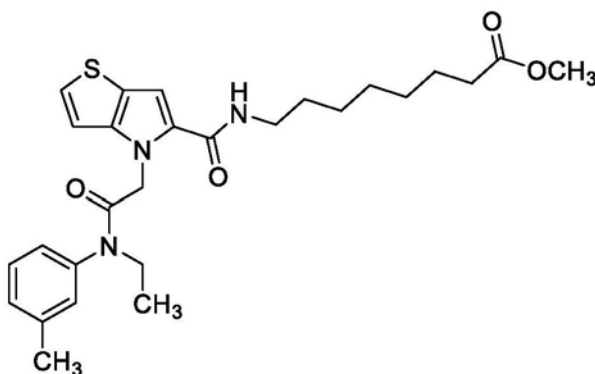
[0461] 8-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)辛酸(JRW-0198)

[0462]



[0463] 步骤1. 8-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)辛酸甲酯(JRW-0196)

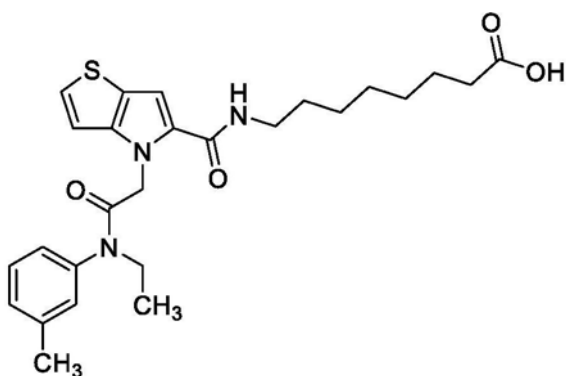
[0464]



[0465] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(50mg,0.15mmol)与8-氨基辛酸甲酯盐酸盐(46mg,0.22mmol)反应以得到呈油状物的所需产物(72mg,99%)。ESI MS m/z 498 $[M+H]^+$ 。

[0466] 步骤2. 8-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)辛酸(JRW-0198)

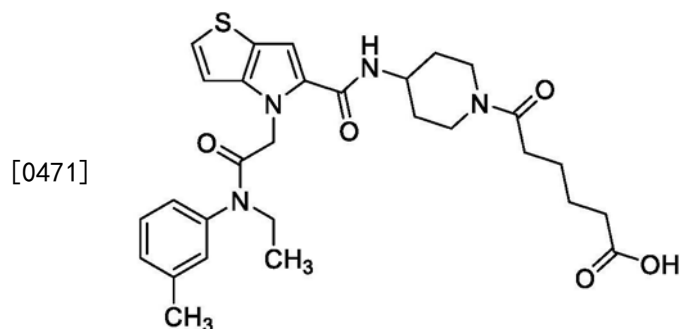
[0467]



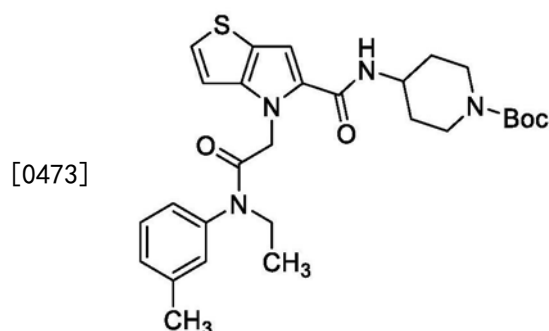
[0468] 按照通用程序A,使8-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)辛酸甲酯(72mg,0.14mmol)与氢氧化锂(17mg,0.72mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(47mg,67%)。 ^1H NMR (300MHz,DMSO- d_6) δ 11.91 (s,1H), 8.09 (t, $J=5.3$,1H), 7.47-7.16 (m,5H), 7.09 (d, $J=5.3$,1H), 7.03 (s,1H), 4.96 (s,2H), 3.72-3.52 (m,2H), 3.16 (dd, $J=6.4,12.8$,2H), 2.36 (s,3H), 2.17 (t, $J=7.3$,2H), 1.60-1.40 (m,4H), 1.36-1.18 (m,6H), 1.08-0.93 (m,3H); ESI MS m/z 484 $[M+H]^+$; HPLC 99.4% (AUC), T_R 5.43min; UV (EtOH) λ_{max} 288nm, ϵ 24,627。

[0469] 实施例12

[0470] 6-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)哌啶-1-基)-6-氧代己酸(JRW-0208)

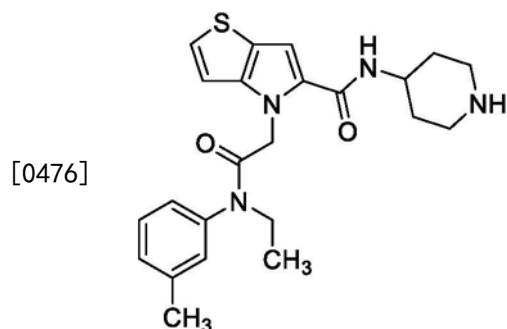


[0472] 步骤1. 4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(JRW-0203)



[0474] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(75mg,0.22mmol)与4-氨基哌啶-1-甲酸叔丁酯(66mg,0.33mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(120mg,定量)。ESI MS m/z 525[M+H]⁺。

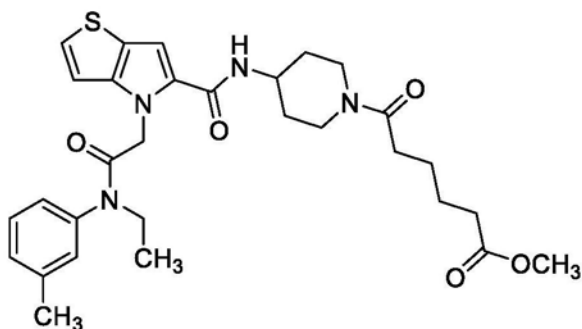
[0475] 步骤2. 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(哌啶-4-基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0204)



[0477] 向4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(120mg,0.22mmol)于二氯甲烷(5mL)中的溶液添加三氟乙酸(1mL)。将反应在室温下搅拌1小时。将混合物用甲苯稀释并在真空下浓缩(3X)以得到浅褐色油状物的粗产物(170mg)。ESI MS m/z 425[M+H]⁺。

[0478] 步骤3. 6-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)哌啶-1-基)-6-氧代己酸甲酯(JRW-0206)

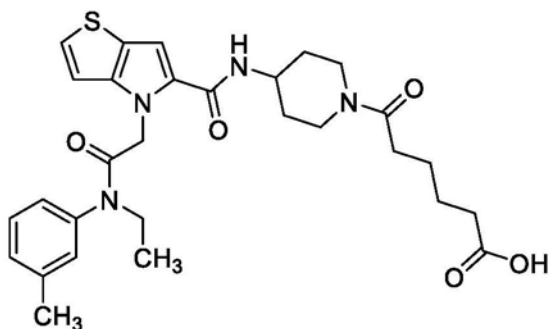
[0479]



[0480] 向4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(哌啶-4-基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(0.22mmol)于二氯甲烷(5mL)中的冷却至0℃的溶液添加6-氯-6-氧代己酸甲酯(49mg, 0.27mmol)和二异丙基乙胺(147mg, 1.1mmol)。将反应在0℃下搅拌30分钟。用二氯甲烷和水稀释混合物,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)纯化残余物以得到呈白色泡沫的所需产物(100mg, 77%)。ESI MS m/z 567 $[M+H]^+$ 。

[0481] 步骤4. 6-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)哌啶-1-基)-6-氧代己酸(JRW-0208)

[0482]

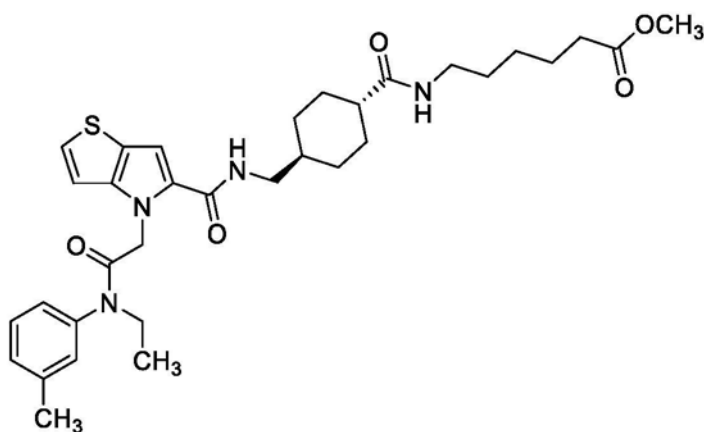


[0483] 按照通用程序A,使6-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)哌啶-1-基)-6-氧代己酸甲酯(100mg, 0.18mmol)与氢氧化锂(21mg, 0.88mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(98mg, 定量)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 11.96 (s, 1H), 7.93 (d, $J=7.9$, 1H), 7.46-7.34 (m, 2H), 7.33-7.17 (m, 3H), 7.12-7.06 (m, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.39-4.26 (m, 1H), 4.05-3.75 (m, 2H), 3.68-3.54 (m, 2H), 3.17-3.00 (m, 1H), 2.73-2.57 (m, 1H), 2.42-2.25 (m, 5H), 2.24-2.12 (m, 2H), 1.86-1.67 (m, 2H), 1.55-1.11 (m, 6H), 1.07-0.93 (m, 3H); ESI MS m/z 553 $[M+H]^+$; HPLC 98.8% (AUC), T_R 5.30min; UV (MeOH) λ_{max} 289nm, ϵ 23,015。

[0484] 实施例13

[0485] 6-(反式-4-((4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯(JRW-0267)

[0486]

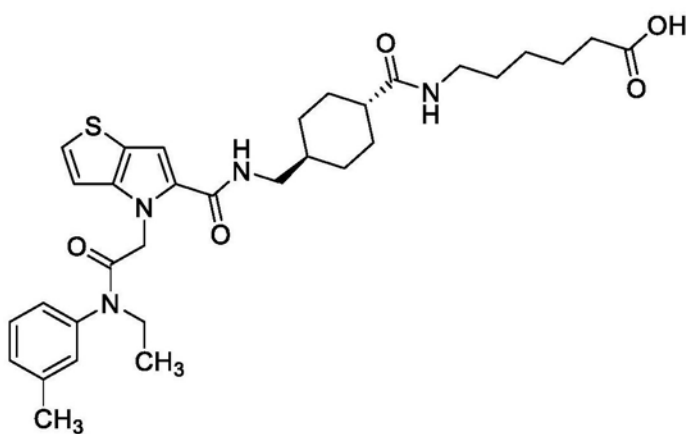


[0487] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(133mg,0.39mmol)与6-(反式-4-(氨基甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯(111mg,0.39mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(180mg,76%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ8.09(t,J=5.6,1H),7.61(t,J=5.5,1H),7.66-7.56(m,2H),7.32-7.16(m,3H),7.14-6.99(m,2H),4.96(s,2H),3.67-3.46(m,5H),3.07-2.92(m,4H),2.37(s,3H),2.25(t,J=7.4,2H),2.08-1.93(m,1H),1.83-1.60(m,4H),1.56-1.12(m,10H),1.08-0.80(m,5H);ESI MS m/z 609[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 5.95min;UV(EtOH) λ_{max}288nm,ε20,078。

[0488] 实施例14

[0489] 6-(反式-4-((4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸(JRW-0268)

[0490]



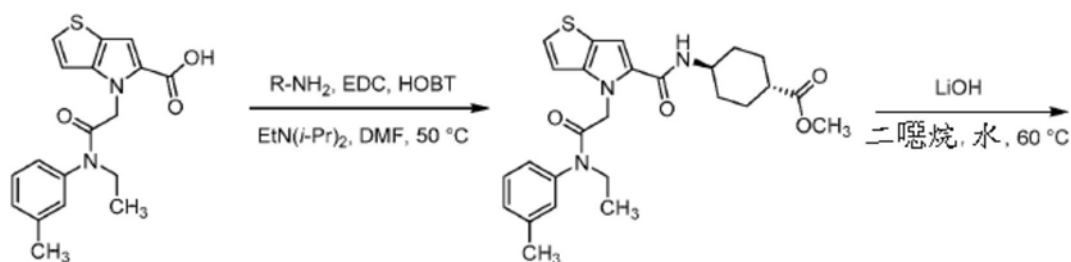
[0491] 按照通用程序A,使6-(反式-4-((4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯(165mg,0.27mmol)与氢氧化锂(32mg,3.4mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(115mg,71%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ11.93(s,1H),8.14-8.04(m,1H),7.61(t,J=5.3,1H),7.46-7.16(m,5H),7.13-6.98(m,2H),4.96(s,2H),3.68-3.53(m,2H),3.08-2.92(m,4H),2.36(s,3H),2.15(t,J=7.2,2H),2.07-1.92(m,1H),1.80-1.63(m,4H),1.54-1.14(m,10H),1.08-0.79(m,5H);ESI MS m/z 595[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 5.44min;UV(EtOH) λ_{max} 289nm,ε25,604。

[0492] 实施例15

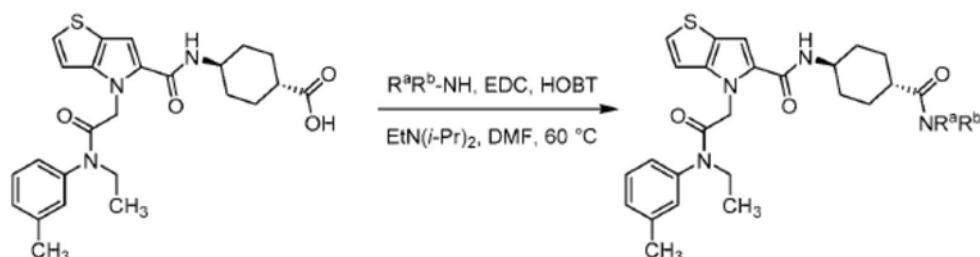
[0493] 式(Ib)化合物的通用合成

[0494] 式 (Ib) 化合物通常可根据方案2来合成。

[0495] 方案2.



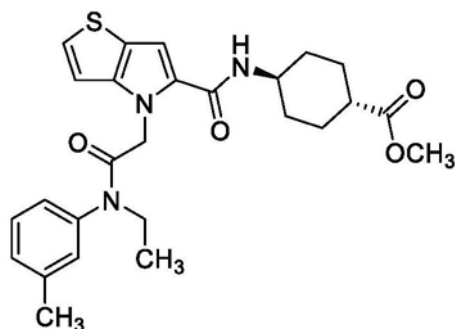
[0496]



[0497] 实施例16

[0498] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0013)

[0499]

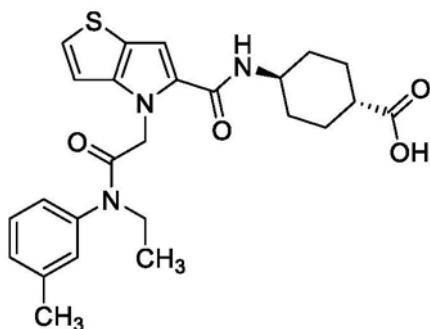


[0500] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(100mg,0.29mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(84mg,0.44mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(103mg,73%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 7.89 (d, J=7.9, 1H), 7.46-7.36 (m, 2H), 7.34-7.15 (m, 3H), 7.12-7.04 (m, 2H), 4.96 (s, 2H), 3.72-3.46 (s, 6H), 2.36 (s, 3H), 2.32-2.18 (m, 1H), 2.03-1.77 (m, 4H), 1.52-1.20 (m, 4H), 1.06-0.95 (m, 3H); ESI MS m/z 482 [M+H]⁺; HPLC 99.0% (AUC), T_R 7.75min; UV (MeOH) λ_{max} 289nm, ε 26, 100。

[0501] 实施例17

[0502] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(JRW-0034)

[0503]

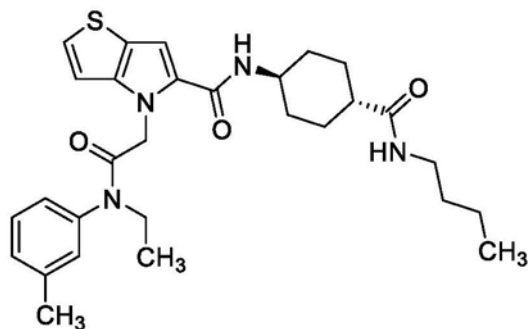


[0504] 按照通用程序A,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(55mg,0.11mmol)与氢氧化锂(14mg,0.57mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(50mg,93%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 11.99(s,1H),7.92-7.84(m,1H),7.44-7.19(m,5H),7.12-7.04(m,2H),4.97(s,2H),3.73-3.52(m,3H),2.36(s,3H),2.22-2.06(m,1H),1.98-1.76(m,4H),1.47-1.21(m,4H),1.08-0.93(m,3H);ESI MS m/z 468[M+H]⁺;HPLC 99.4%(AUC),T_R 5.81min;UV(MeOH) λ_{max} 290nm, ε26,502。

[0505] 实施例18

[0506] N-(反式-4-(丁基氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0042)

[0507]

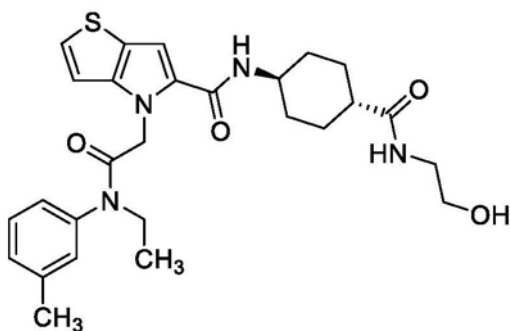


[0508] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与丁胺(9mg,0.13mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(50mg,89%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.82(d,J=8.1,1H),7.65-7.57(m,1H),7.46-7.11(m,5H),7.06-6.98(m,2H),4.91(s,2H),3.66-3.45(m,3H),2.96(q,J=6.0Hz,2H),2.32(s,3H),2.05-1.92(m,1H),1.85-1.60(m,4H),1.50-1.10(m,9H),1.02-0.90(m,3H),0.80(t,J=7.2,3H);ESI MS m/z 523[M+H]⁺;HPLC 99.6%(AUC),T_R 6.52min;UV(MeOH) λ_{max} 288nm, ε28,364。

[0509] 实施例19

[0510] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((2-羟乙基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0043)

[0511]

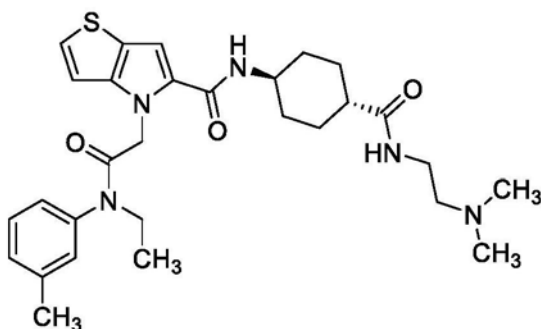


[0512] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与乙醇胺(7mg,0.13mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(48mg,88%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 7.86 (d, J=7.8, 1H), 7.69 (t, J=5.4, 1H), 7.45-7.18 (m, 5H), 7.13-7.04 (m, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.60 (t, J=5.5, 1H), 3.75-3.54 (m, 3H), 3.36 (q, J=5.9, 2H), 3.08 (q, J=5.9, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.14-2.00 (m, 1H), 1.90-1.69 (m, 4H), 1.52-1.10 (m, 4H), 1.08-0.94 (m, 3H); ESI MS m/z 511 [M+H]⁺; HPLC 99.7% (AUC), T_R 6.52min; UV (MeOH) λ_{max} 289nm, ε₂₄, 966。

[0513] 实施例20

[0514] N-(反式-4-((2-(二甲氨基)乙基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺 (JRW-0044)

[0515]

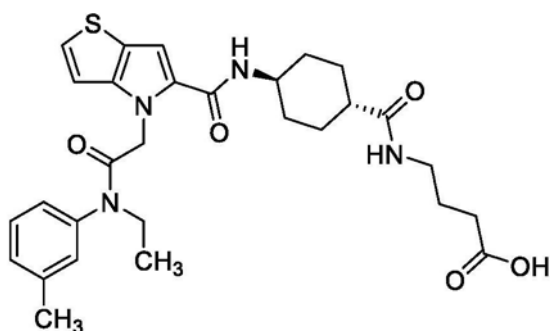


[0516] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与乙醇胺(18mg,0.21mmol)反应以得到呈淡红色固体的所需产物(45mg,78%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 7.87 (d, J=8.1, 1H), 7.62 (t, J=5.5, 1H), 7.45-7.35 (m, 2H), 7.33-7.17 (m, 3H), 7.12-7.05 (m, 2H), 4.97 (s, 2H), 3.73-3.54 (m, 3H), 3.10 (q, J=6.4, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.24 (t, J=6.4, 2H), 2.15-2.00 (m, 7H), 1.88-1.69 (m, 4H), 1.53-1.19 (m, 4H), 1.08-0.94 (m, 3H); ESI MS m/z 538 [M+H]⁺; HPLC 99.4% (AUC), T_R 4.31min; UV (MeOH) λ_{max} 289nm, ε₂₉, 980。

[0517] 实施例21

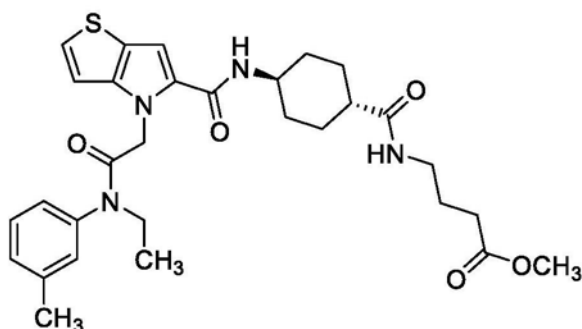
[0518] 4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)丁酸 (JRW-0051)

[0519]



[0520] 步骤1. 4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)丁酸甲酯(JRW-0050)

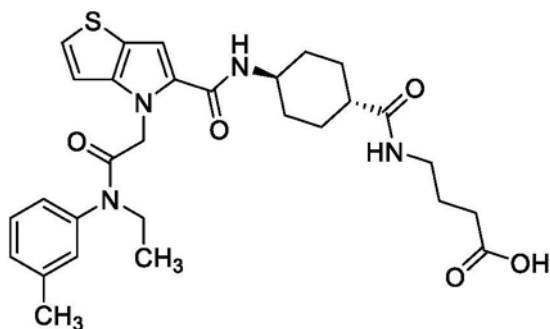
[0521]



[0522] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与4-氨基丁酸甲酯(15mg,0.13mmol)反应以得到呈白色玻璃的粗产物(80mg)。ESI MS m/z 567[M+H]⁺。

[0523] 步骤2. 4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)丁酸(JRW-0051)

[0524]

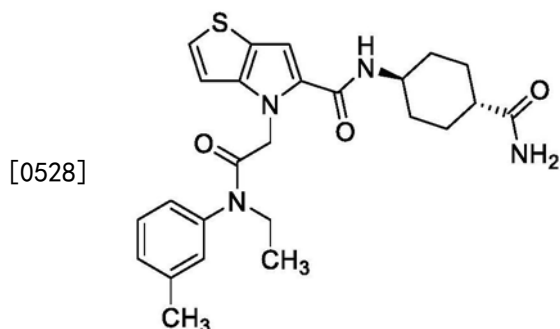


[0525] 按照通用程序A,使4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)丁酸甲酯(60mg,0.10mmol)与氢氧化锂(13mg,0.53mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(55mg,93%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 11.97(s,1H), 7.82(d, J=7.7,1H), 7.66(t, J=5.4,1H), 7.40-7.29(m,2H), 7.27-7.13(m,3H), 7.07-7.00(m,2H), 4.92(s,2H), 3.68-3.48(m,3H), 3.03-2.92(m,2H), 2.32(s,3H), 2.14(t, J=7.3,2H), 2.06-1.93(m,1H), 1.85-1.64(m,4H), 1.62-1.47(m,2H), 1.47-1.15(m,4H), 1.05-0.88(m,3H); ESI MS m/z 553[M+H]⁺; HPLC>99% (AUC), T_R 5.17min; UV(MeOH) λ_{max} 289nm, ε₂₄,710。

[0526] 实施例22

[0527] N-(反式-4-氨基甲酰基环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-

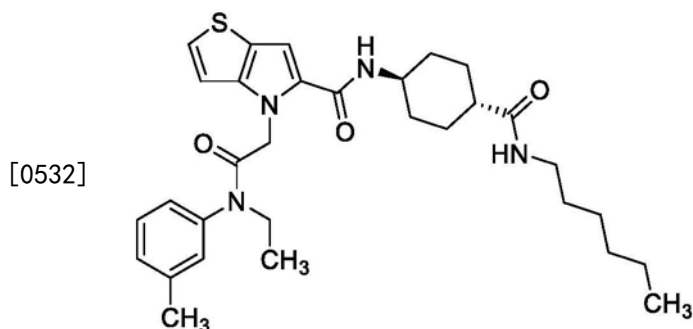
噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0052)



[0529] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与氨(1.1mL,0.5M,0.21mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(45mg,90%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.82(d,J=8.2,1H),7.40-7.29(m,2H),7.28-7.08(m,4H),7.06-6.98(m,2H),6.61(s,1H),4.91(s,2H),3.67-3.49(m,3H),2.31(s,3H),2.03-1.91(m,1H),1.82-1.68(m,4H),1.47-1.14(m,4H),1.03-0.88(s,3H);ESI MS m/z 467[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 5.11min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm,ε25,213。

[0530] 实施例23

[0531] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(己基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0138)

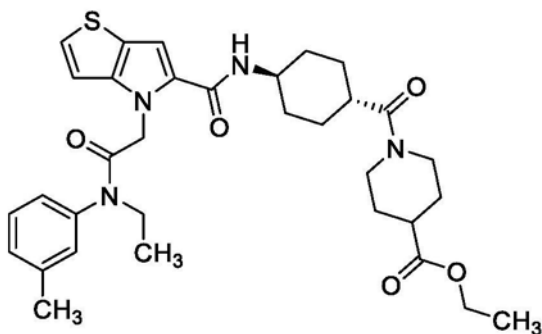


[0533] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与己胺(13mg,0.13mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(50mg,85%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.88(d,J=8.1,1H),7.67(t,J=5.6,1H),7.45-7.34(m,2H),7.33-7.18(m,3H),7.12-7.04(m,2H),4.96(s,2H),3.72-3.52(m,3H),2.99(dd,J=6.5,12.6,2H),2.36(s,3H),2.10-1.96(m,1H),1.88-1.68(m,4H),1.52-1.16(m,12H),1.08-0.92(m,3H),0.88-0.78(m,3H);ESI MS m/z 551[M+H]⁺;HPLC 99.4%(AUC),T_R 6.54min;UV(EtOH) λ_{max} 292nm,ε29,535。

[0534] 实施例24

[0535] 1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸乙酯(JRW-0140)

[0536]

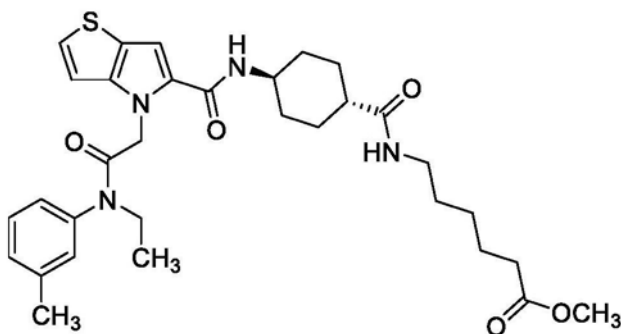


[0537] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与哌啶-4-甲酸乙酯(20mg,0.13mmol)反应以得到呈透明半固体的所需产物(60mg,92%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.92(d,J=7.8,1H),7.45-7.34(m,2H),7.32-7.18(m,3H),7.12-7.05(m,2H),4.96(s,2H),4.23(d,J=12.7,1H),4.05(q,J=7.1,2H),3.87(d,J=12.7,1H),3.72-3.52(m,3H),3.18-3.02(m,1H),2.76-2.51(m,3H),2.36(s,3H),1.93-1.63(m,6H),1.56-1.26(m,6H),1.16(t,J=6.0Hz,3H),1.07-0.93(m,3H);ESI MS m/z 607[M+H]⁺;HPLC 99.5%(AUC),T_R 6.01min;UV(EtOH) λ_{max} 290nm,ε29,325。

[0538] 实施例25

[0539] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯(JRW-0145)

[0540]

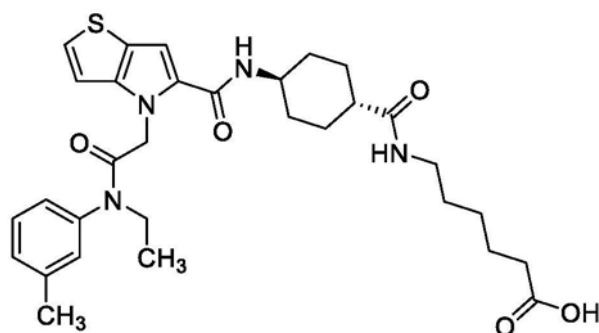


[0541] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与6-氨基己酸甲酯(23mg,0.13mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(60mg,94%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.88(d,J=8.1,1H),7.68(t,J=5.6,1H),7.44-7.34(m,2H),7.32-7.17(m,3H),7.12-7.03(m,2H),4.95(s,2H),3.73-3.50(m,6H),2.98(dd,J=6.6,12.5,2H),2.36(s,3H),2.26(t,J=7.4,2H),2.08-1.95(m,1H),1.87-1.67(m,4H),1.57-1.15(m,10H),1.05-0.93(m,3H);ESI MS m/z 595[M+H]⁺;HPLC 99.4%(AUC),T_R 6.24min;UV(EtOH) λ_{max} 288nm,ε26,555。

[0542] 实施例26

[0543] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸(JRW-0147)

[0544]

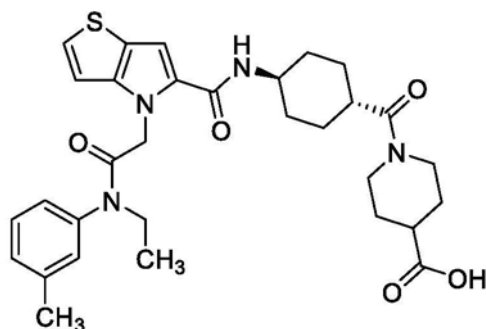


[0545] 按照通用程序A,使6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯(53mg,0.089mmol)与氢氧化锂(10mg,0.44mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(50mg,96%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ11.98(s,1H),7.88(d,J=7.6,1H),7.72-7.63(m,1H),7.44-7.33(m,2H),7.32-7.18(m,3H),7.12-7.04(m,2H),4.95(s,2H),3.72-3.52(m,3H),3.04-2.93(m,2H),2.36(s,3H),2.16(t,J=7.1,2H),2.10-1.93(m,1H),1.88-1.67(m,4H),1.55-1.10(m,10H),1.08-0.92(m,3H);ESI MS m/z 581[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 5.49min;UV(EtOH) λ_{max} 288nm,ε 23,738。

[0546] 实施例27

[0547] 1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸(JRW-0187)

[0548]

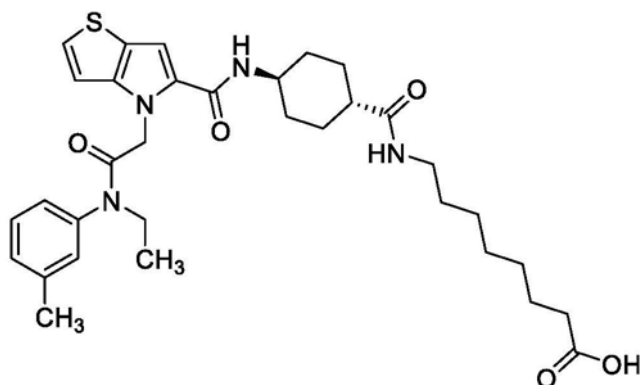


[0549] 按照通用程序A,使1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸乙酯(60mg,0.099mmol)与氢氧化锂(12mg,0.49mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(45mg,78%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ12.20(s,1H),7.90(d,J=7.5,1H),7.45-7.33(m,2H),7.32-7.18(m,3H),7.08(s,2H),4.96(s,2H),4.28-4.15(m,1H),3.92-3.79(m,1H),3.70-3.52(m,3H),3.15-3.00(m,1H),2.75-2.60(m,1H),2.36(s,3H),1.92-1.63(m,7H),1.56-1.25(m,7H),1.08-0.95(m,3H);ESI MS m/z 579[M+H]⁺;HPLC 99.5%(AUC),T_R 4.45min;UV(EtOH) λ_{max} 289nm,ε23,470。

[0550] 实施例28

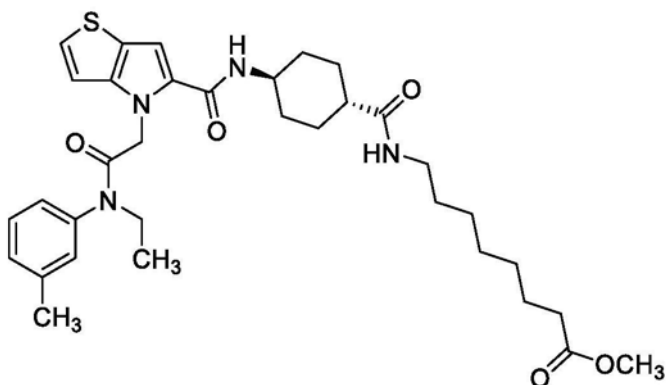
[0551] 8-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)辛酸(JRW-0188)

[0552]



[0553] 步骤1. 8-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)辛酸甲酯(JRW-0186)

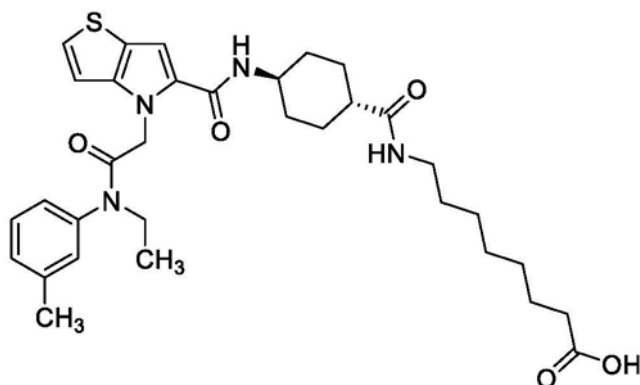
[0554]



[0555] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与8-氨基辛酸甲酯(27mg,0.13mmol)反应以得到呈油状物的所需产物(55mg,82%)。ESI MS m/z 623 $[M+H]^+$ 。

[0556] 步骤2. 8-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)辛酸(JRW-0188)

[0557]

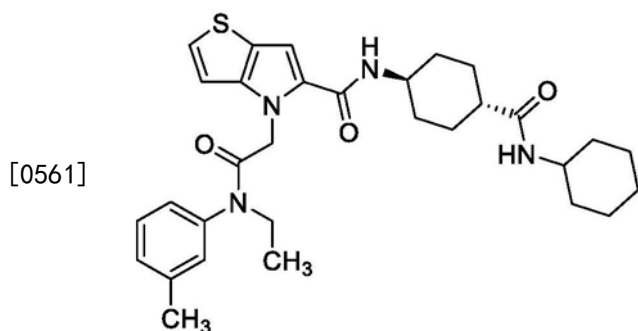


[0558] 按照通用程序A,使8-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)辛酸甲酯(50mg,0.080mmol)与氢氧化锂(9mg,0.40mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(45mg,92%)。 ^1H NMR(300MHz, DMSO- d_6) δ 11.92(s,1H),7.87(d,J=7.8,1H),7.70-7.61(m,1H),7.45-7.14(m,5H),7.10-7.03(m,2H),4.96(s,2H),3.72-3.54(m,3H),3.05-2.93(m,2H),2.37(s,3H),2.22-2.12(m,2H),2.10-1.98(m,1H),1.91-1.66(m,4H),1.55-1.10(m,14H),1.08-0.93(m,3H);ESI MS

m/z 609 [M+H]⁺; HPLC 96.9% (AUC), T_R 4.97min; UV (EtOH) λ_{max} 289nm, ε₂₅, 824。

[0559] 实施例29

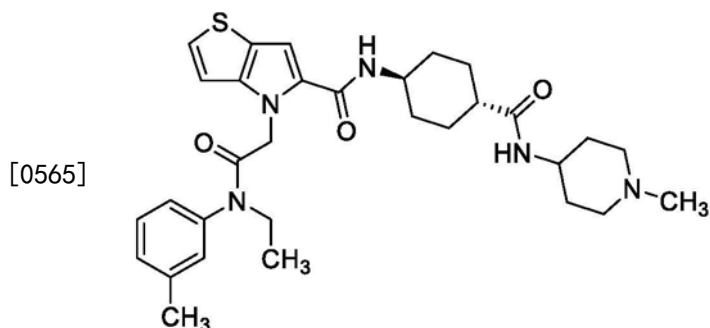
[0560] N-(反式-4-(环己基氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0190)



[0562] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与环己胺(16mg,0.16mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(55mg,94%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.95-7.82(m,1H),7.66-7.16(m,6H),7.12-7.04(m,2H),4.97(s,2H),3.76-3.40(m,4H),2.36(s,3H),2.11-1.96(m,1H),1.90-1.60(m,8H),1.59-0.91(m,13H);ESI MS m/z 549[M+H]⁺;HPLC 99.5% (AUC), T_R5.98min;UV (EtOH) λ_{max} 288nm, ε₂₅, 407。

[0563] 实施例30

[0564] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((1-甲基哌啶-4-基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0191)

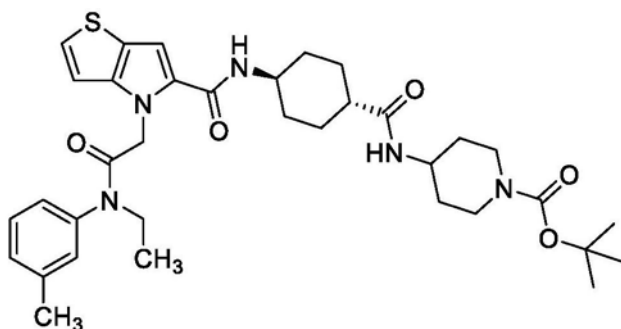


[0566] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(50mg,0.11mmol)与1-甲基哌啶-4-胺(18mg,0.16mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(47mg,78%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.87(d,J=8.1,1H),7.58(d,J=7.6,1H),7.50-7.16(m,5H),7.13-7.04(m,2H),4.96(s,2H),3.75-3.38(m,4H),2.73-2.61(m,2H),2.36(s,3H),2.22-1.96(m,5H),1.96-1.58(m,8H),1.53-1.19(m,6H),1.08-0.97(s,3H);ESI MS m/z 564[M+H]⁺;HPLC 98.8% (AUC), T_R 3.35min;UV (EtOH) λ_{max} 289nm, ε₃₀, 051。

[0567] 实施例31

[0568] 4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(JRW-0192)

[0569]

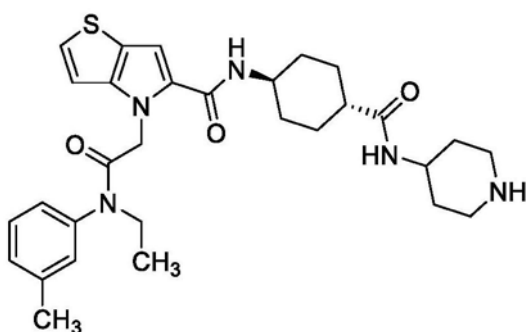


[0570] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(84mg,0.18mmol)与4-氨基哌啶-1-甲酸叔丁酯(54mg,0.27mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(115mg,99%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ7.93-7.83 (m, 1H), 7.68-7.58 (m, 1H), 7.45-7.16 (m, 5H), 7.13-7.03 (m, 2H), 4.96 (s, 2H), 3.96-3.46 (m, 6H), 2.93-2.70 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.09-1.95 (m, 1H), 1.88-1.60 (m, 6H), 1.55-1.08 (m, 15H), 1.06-0.93 (m, 3H); ESI MS m/z 650 [M+H]⁺; HPLC 99.6% (AUC), T_R 5.87min; UV (EtOH) λ_{max} 288nm, ε 31,128。

[0571] 实施例32

[0572] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(哌啶-4-基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0194)

[0573]

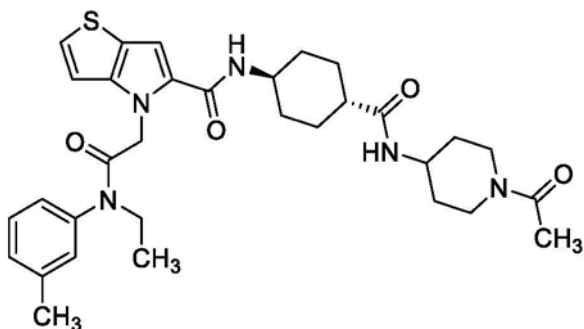


[0574] 向4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(105mg,0.16mmol)于二氯甲烷(5mL)中的溶液添加三氟乙酸(1mL)。将反应在室温下搅拌2小时。将混合物用甲苯稀释并在真空下浓缩(3X)以得到白色泡沫的粗产物(150mg)。ESI MS m/z 550 [M+H]⁺。

[0575] 实施例33

[0576] N-(反式-4-((1-乙酰基哌啶-4-基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0195)

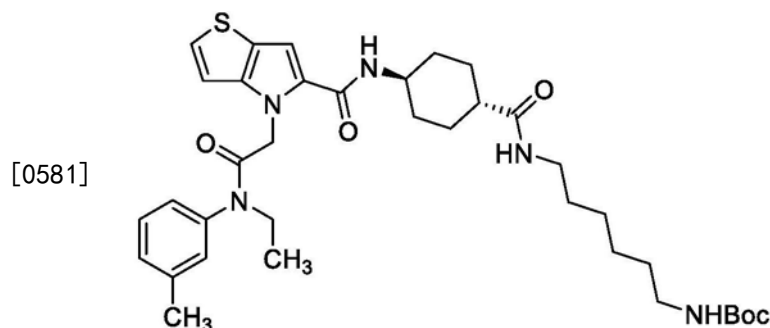
[0577]



[0578] 向4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(哌啶-4-基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(0.16mmol)于二氯甲烷(5mL)中的冷却至0℃的溶液添加乙酰氯(25mg,0.32mmol)和二异丙基乙胺(104mg,0.81mmol)。将反应搅拌并温热至室温过夜。用二氯甲烷和水稀释混合物,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(84mg,88%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.87(d,J=7.6,1H),7.67(d,J=7.6,1H),7.46-7.32(m,2H),7.33-7.17(m,3H),7.13-7.03(m,2H),4.96(s,2H),4.22-4.08(m,1H),3.81-3.52(m,5H),3.15-3.00(m,1H),2.70(t,J=11.9,1H),2.36(s,3H),2.11-1.94(m,4H),1.91-1.59(m,6H),1.52-1.09(m,6H),1.06-0.91(m,3H);ESI MS m/z 592[M+H]⁺;HPLC99.8%(AUC),T_R 4.09min;UV(EtOH) λ_{max} 288nm,ε26,034。

[0579] 实施例34

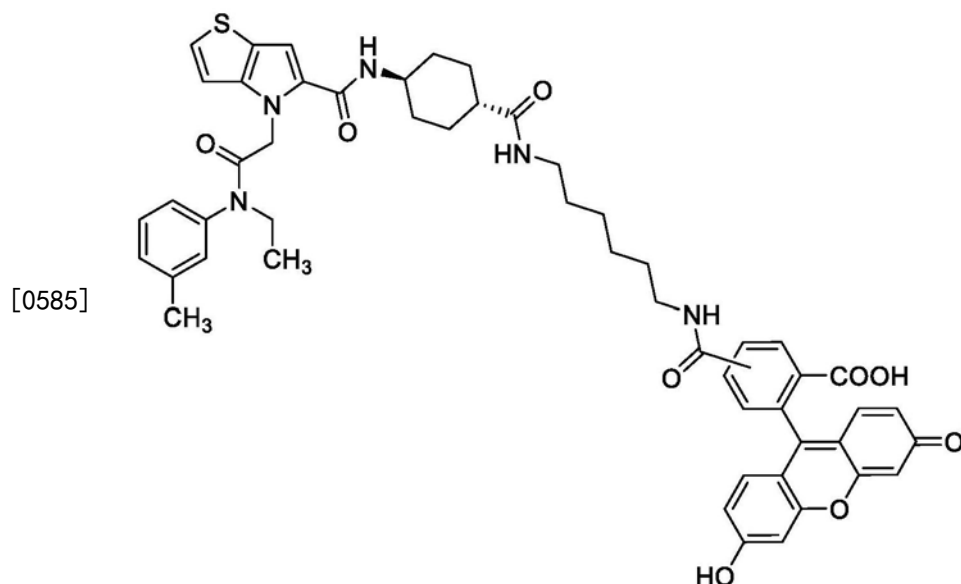
[0580] (6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己基)氨基甲酸叔丁酯(JRW-0197)



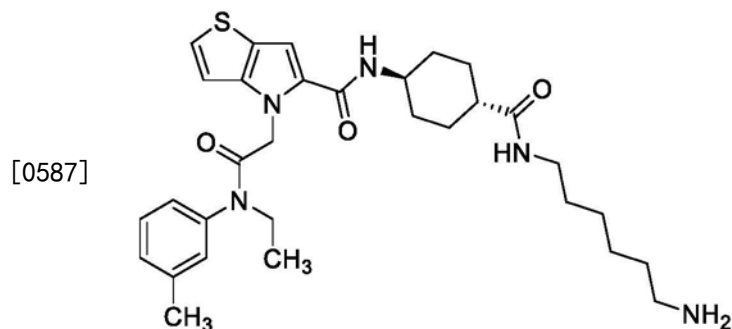
[0582] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(115mg,0.25mmol)与(6-氨基己基)氨基甲酸叔丁酯(80mg,0.37mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(150mg,91%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.87(d,J=8.0,1H),7.65(t,J=5.1,1H),7.45-7.33(m,2H),7.32-7.17(m,3H),7.12-7.06(m,2H),6.77-6.68(m,1H),4.96(s,2H),3.72-3.53(m,3H),3.03-2.93(m,2H),2.87(dd,J=6.0,12.6,2H),2.36(s,3H),2.12-1.96(m,1H),1.88-1.68(m,4H),1.51-1.16(m,21H),1.06-0.93(m,3H);ESI MS m/z 666[M+H]⁺;HPLC 99.7%(AUC),T_R 4.11min;UV(EtOH) λ_{max} 288nm,ε21,608。

[0583] 实施例35

[0584] N-(反式-4-((6-(3',6'-二羟基-3-氧代-3H-螺[异苯并呋喃-1,9'-咕吨]-5(6)-甲酰氨基)己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0200)

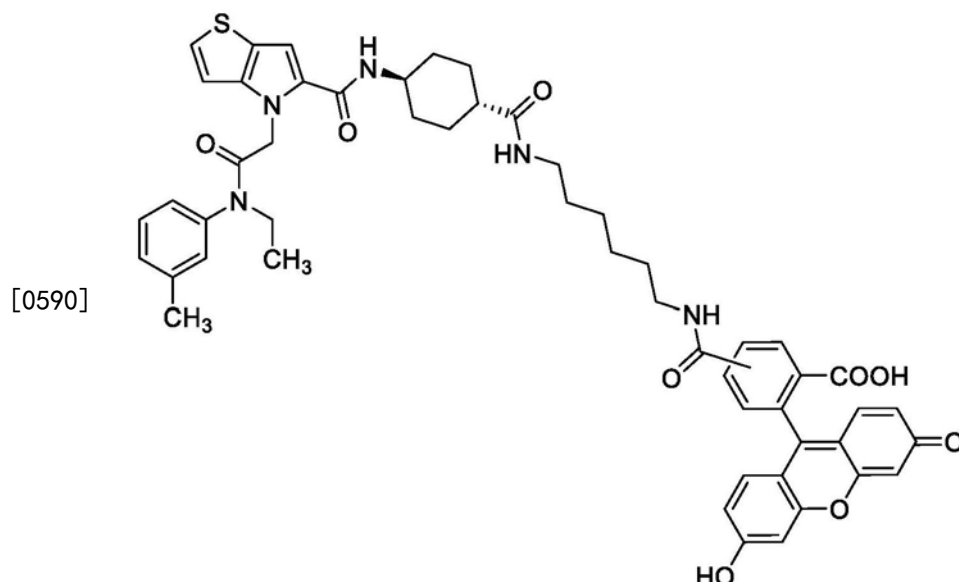


[0586] 步骤1.N-(反式-4-((6-氨基己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0199)



[0588] 向(6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己基)氨基甲酸叔丁酯(150mg,0.22mmol)于二氯甲烷(5mL)中的溶液添加三氟乙酸(1mL)。将反应在室温下搅拌5小时。将混合物用甲苯稀释并在真空下浓缩(3X)以得到透明油状物的粗产物(150mg)。ESI MS m/z 566[M+H]⁺。

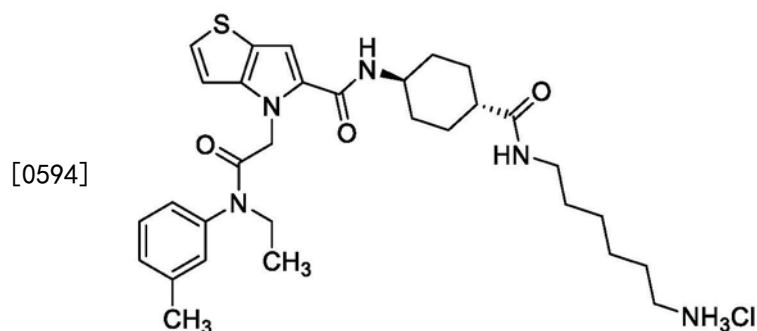
[0589] 步骤2.N-(反式-4-((6-(3',6'-二羟基-3-氧代-3H-螺[异苯并呋喃-1,9'-咕吨])-5(6)-甲酰氨基)己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0200)



[0591] 向N-(反式-4-((6-氨基己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(0.22mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加3',6'-二羟基-3-氧代-3H-螺[异苯并呋喃-1,9'-咕吨]-5(6)-甲酸2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯[5(6)-FAM-SE](106mg,0.22mmol)和二异丙基乙胺(145mg,1.1mmol)。将反应在室温下搅拌1小时。将反应混合物酸化(0.1M HCl),用水稀释,并用3:1CHCl₃/异丙醇萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)纯化残余物以得到呈橙色固体的所需产物(145mg,69%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ10.12(s,2H),8.78(t,J=5.5,1H,异构体A),8.64(t,J=5.7,1H,异构体B),8.44(s,1H,异构体A),8.23(dd,J=1.5,8.1,1H,异构体A),8.15(dd,J=1.3,8.1,1H,异构体B),8.05(d,J=8.1,1H,异构体B),7.87(d,J=8.0,1H),7.72-7.60(m,1H),7.44-7.32(m,3H),7.32-7.17(m,3H),7.12-7.04(m,2H),6.70-6.65(m,2H),6.61-6.49(m,4H),4.96(s,2H),3.70-3.52(m,3H),3.32-3.23(m,2H),3.22-3.12(m,1H),3.08-2.91(m,2H),2.36(s,3H),2.11-1.95(m,1H),1.89-1.65(m,4H),1.61-1.16(m,11H),1.06-0.92(m,3H);ESI MS m/z925[M+H]⁺;HPLC 97.1%(AUC),T_R 6.16,6.26min;UV(MeOH) λ_{max} 284nm,ε31,419。

[0592] 实施例36

[0593] N-(反式-4-((6-氨基己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺盐酸盐(JRW-0241)

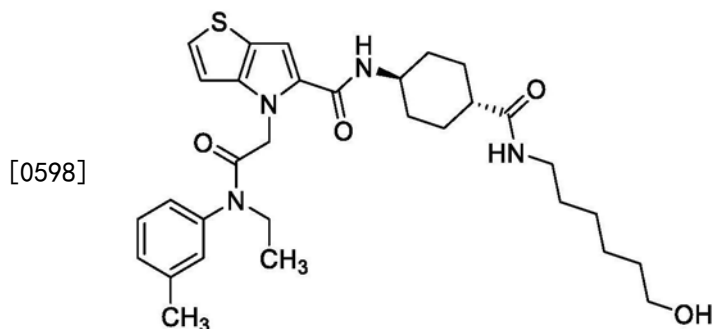


[0595] 向(6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己基)氨基甲酸叔丁酯(100mg,0.15mmol)于二氯甲

烷 (5mL) 中的溶液添加三氟乙酸 (1mL)。将反应在室温下搅拌 1 小时。将混合物用甲苯稀释并在真空下浓缩 (3X)。将残余物溶解于甲醇中并添加 HCl (2mL, 在乙醚中 1M)。将溶液蒸发以得到白色固体的所需产物 (95mg, 定量)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 8.02–7.68 (m, 5H), 7.45–7.34 (m, 2H), 7.33–7.15 (m, 3H), 7.12–7.05 (m, 2H), 4.97 (s, 2H), 3.74–3.51 (m, 3H), 3.01 (dd, J=6.5, 12.5, 2H), 2.79–2.66 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.11–1.97 (m, 1H), 1.88–1.68 (m, 4H), 1.59–1.17 (m, 12H), 1.02–0.94 (m, 3H); ESI MS m/z 566 [M+H]⁺; HPLC 99.0% (AUC), T_R 4.47min; UV (MeOH) λ_{max} 289nm, ε 23,213。

[0596] 实施例37

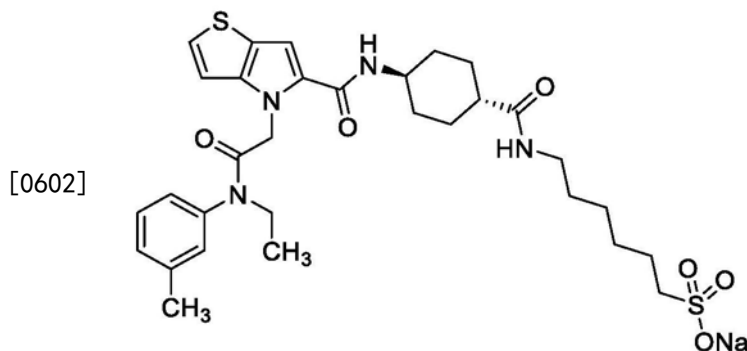
[0597] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺 (IRW-0242)



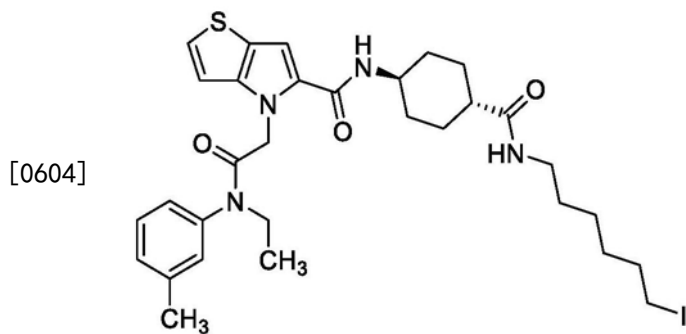
[0599] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(150mg,0.32mmol)与6-氨基己-1-醇(56mg,0.48mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(160mg,88%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.87(d,J=7.4,1H),7.73-7.59(s,1H),7.48-7.15(m,5H),7.13-7.02(m,2H),4.96(s,2H),4.35-4.23(m,1H),3.73-3.50(m,3H),3.43-3.30(m,2H),3.05-2.94(m,2H),2.37(s,3H),2.10-1.95(m,1H),1.90-1.65(m,4H),1.55-1.13(m,12H),1.09-0.90(s,3H);ESI MS m/z 567[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 5.48min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm,ε26,356。

[0600] 实施例38

[0601] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠(JRW-0344)

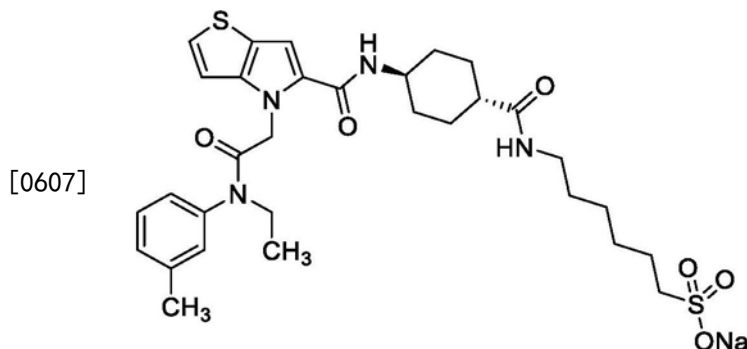


[0603] 步骤1. 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-碘己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺 (IRW-0342)



[0605] 向咪唑(36mg, 0.53mmol)、三苯基膦(138mg, 0.53mmol)和碘(134mg, 0.53mmol)的溶液添加溶解于THF(5mL)中的4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟基己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(100mg, 0.18mmol)。将溶液在室温下搅拌1小时。将反应用乙酸乙酯稀释并用10%Na₂S₂O₃溶液淬灭。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层用10%Na₂S₂O₃溶液和盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)部分纯化残余物以得到呈白色固体的粗产物。ESI MS m/z 677[M+H]⁺。

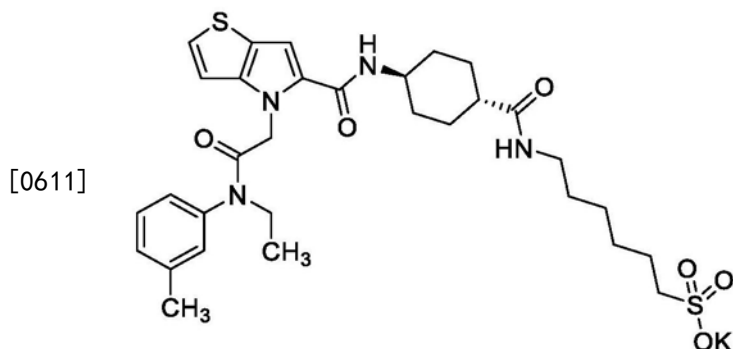
[0606] 步骤2. 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠(JRW-0344)



[0608] 向4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-碘己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(0.18mmol)于乙醇(5mL)中的溶液添加亚硫酸钠(66mg, 0.53mmol)和水(3mL)。将混合物加热至75℃持续2小时。将反应浓缩,并且通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(100mg, 90%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ7.87(d, J=8.0, 1H), 7.67(t, J=5.5, 1H), 7.49-7.17(m, 5H), 7.13-7.05(m, 2H), 4.97(s, 2H), 3.72-3.54(m, 3H), 3.05-2.93(m, 2H), 2.40-2.28(m, 5H), 2.12-1.96(m, 1H), 1.88-1.68(m, 4H), 1.62-1.14(m, 12H), 1.05-0.93(m, 3H); ESI MS m/z 631[M+H]⁺; HPLC>99% (AUC), T_R 4.56min; UV (MeOH) λ_{max} 288nm, ε 21,072。

[0609] 实施例39

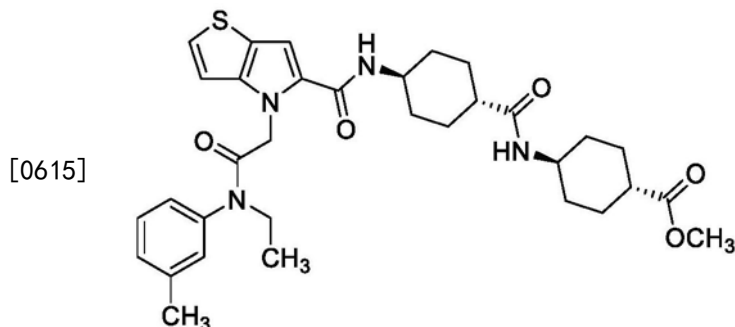
[0610] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钾(JRW-0348)



[0612] 向6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸(50mg,0.08mmol)于水(25mL)中的溶液添加DowEx 50WX4(加入钾)。将悬浮液在室温下搅拌10分钟。过滤混合物,并且通过冻干浓缩滤液以得到呈白色固体的所需产物(48mg,90%)。¹H NMR (300MHz,DMSO-d₆) δ7.83(d,J=8.1,1H),7.62(t,J=5.5,1H),7.47-7.15(m,5H),7.10-7.04(m,2H),4.97(s,2H),3.71-3.54(m,3H),3.05-2.94(m,2H),2.41-2.31(m,5H),2.15-1.96(m,1H),1.90-1.70(m,4H),1.61-1.16(m,12H),1.06-0.95(m,3H);ESI MS m/z 631[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 4.55min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm,ε19,812。

[0613] 实施例40

[0614] 反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0243)

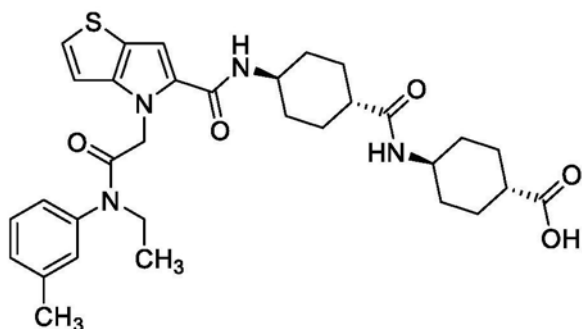


[0616] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(75mg,0.16mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯盐酸盐(46mg,0.24mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(89mg,91%)。¹H NMR (300MHz,DMSO-d₆) δ7.86(d,J=8.5,1H),7.58(d,J=7.8,1H),7.47-7.33(m,2H),7.32-7.18(m,3H),7.11-7.04(m,2H),4.96(s,2H),3.72-3.53(m,6H),3.52-3.35(m,1H),2.36(s,3H),2.29-2.16(m,1H),2.08-1.95(m,1H),1.95-1.65(m,8H),1.53-1.06(m,8H),1.05-0.93(m,3H);ESI MS m/z 607[M+H]⁺;HPLC 99.7%(AUC),T_R 6.27min;UV(MeOH) λ_{max} 288nm,ε24,192。

[0617] 实施例41

[0618] 反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(JRW-0245)

[0619]

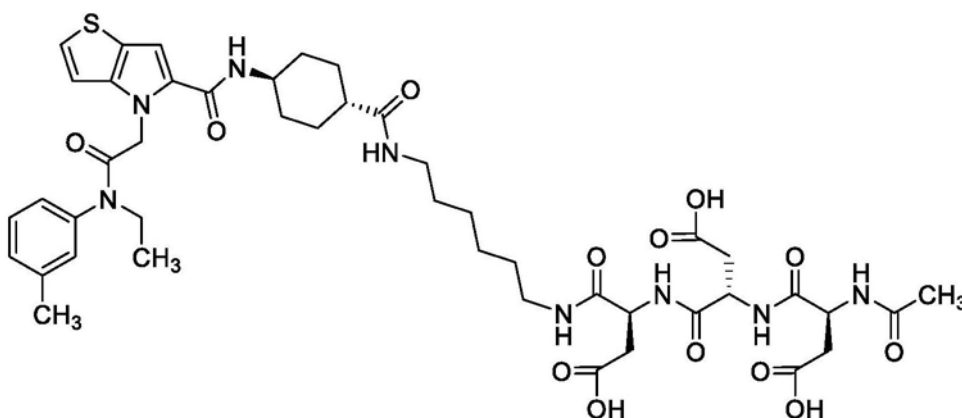


[0620] 按照通用程序A,使反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(80mg, 0.13mmol)与氢氧化锂(16mg,0.66mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(66mg,84%)。¹H NMR (300MHz,DMSO-d₆) δ12.00 (s,1H),7.86 (d,J=8.1,1H),7.57 (d,J=7.6,1H),7.45-7.33 (m,2H),7.32-7.15 (m,3H),7.12-7.03 (m,2H),4.97 (s,2H),3.73-3.52 (m,3H),3.52-3.35 (m,1H),2.36 (s,3H),2.19-1.95 (m,2H),1.94-1.65 (m,8H),1.51-1.05 (m,8H),1.05-0.94 (m,3H);ESI MS m/z 593[M+H]⁺;HPLC 98.4% (AUC),T_R 5.51min;UV (MeOH) λ_{max} 288nm, ε24,976。

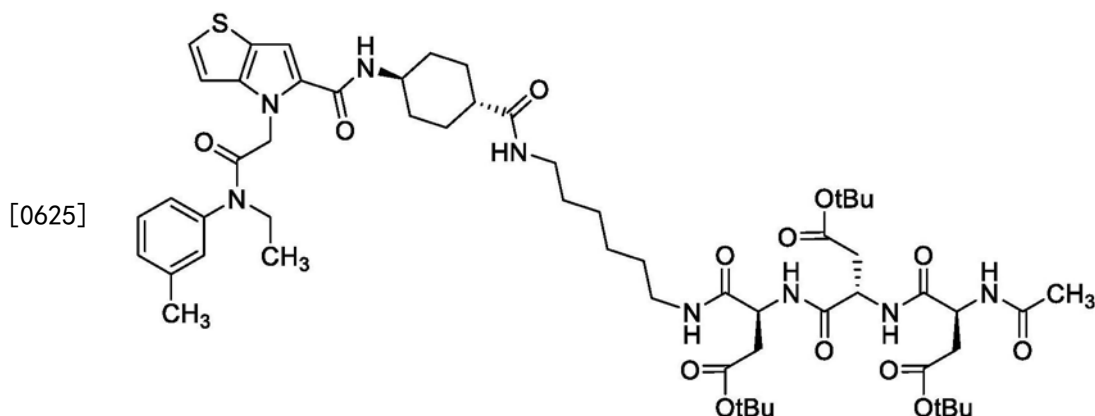
[0621] 实施例42

[0622] (11S,14S,17S)-17-乙酰氨基-11,14-双(羧甲基)-1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己基)-1,10,13,16-四氧代-2,9,12,15-四氮杂十九烷-19-酸(JRW-0251)

[0623]

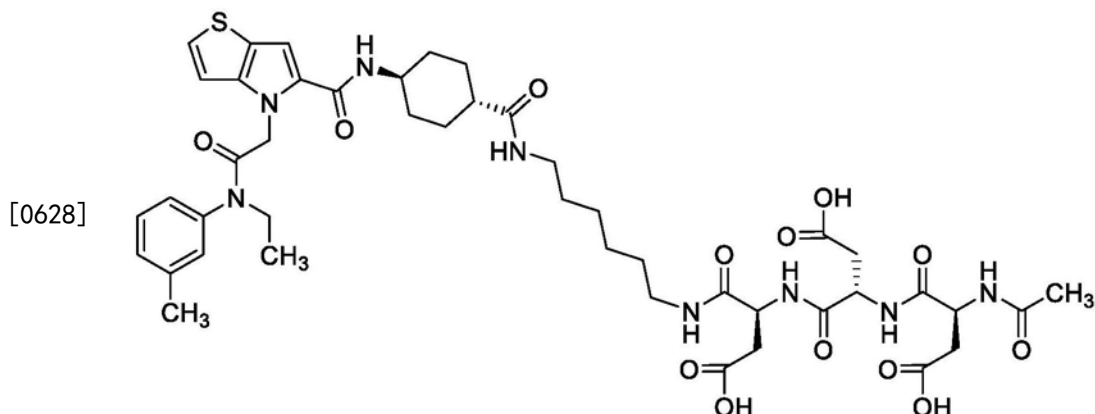


[0624] 步骤1. (11S,14S,17S)-17-乙酰氨基-11,14-双(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己基)-1,10,13,16-四氧代-2,9,12,15-四氮杂十九烷-19-酸叔丁酯(JRW-0249)



[0626] 按照通用程序B,使(S)-2-((S)-2-((S)-2-乙酰氨基-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酰氨基)-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酰氨基)-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酸(81mg,0.14mmol)与N-(反式-4-((6-氨基己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺盐酸盐(85mg,0.14mmol)反应以得到呈浅黄色固体的所需产物(125mg,78%)。ESI MS m/z 1122[M+H]⁺。

[0627] 步骤2. (11S,14S,17S)-17-乙酰氨基-11,14-双(羧甲基)-1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己基)-1,10,13,16-四氧代-2,9,12,15-四氮杂十九烷-19-酸(JRW-0251)



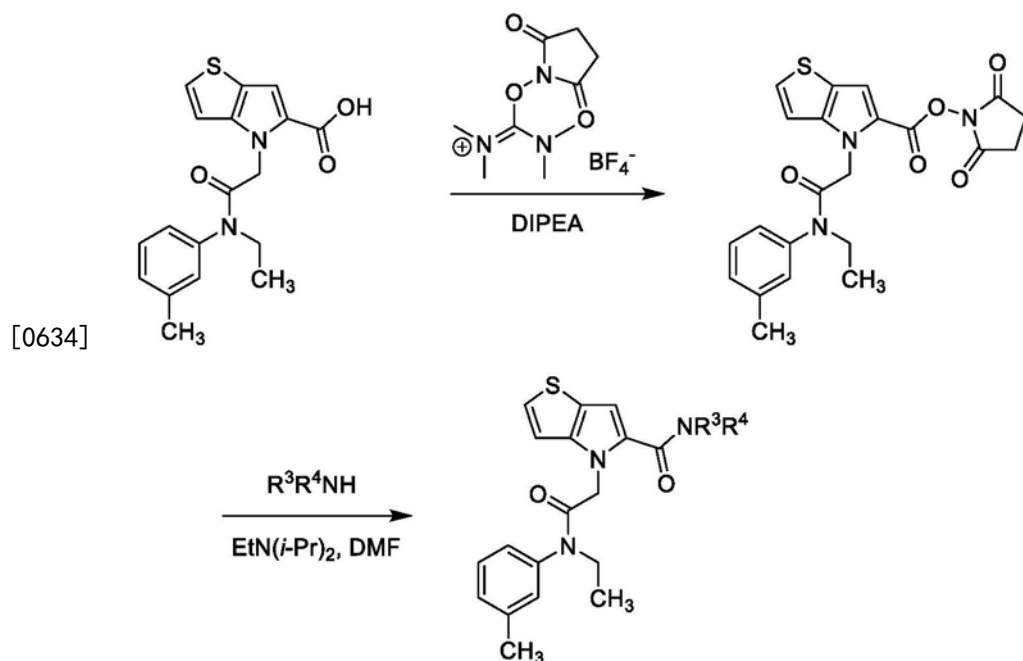
[0629] 向(11S,14S,17S)-17-乙酰氨基-11,14-双(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己基)-1,10,13,16-四氧代-2,9,12,15-四氮杂十九烷-19-酸叔丁酯(120mg,0.11mmol)于二氯甲烷(10mL)中的溶液添加三氟乙酸(1mL)。将反应在室温下搅拌18小时。将混合物用甲苯稀释并在真空下浓缩(3X)。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(68mg,66%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ12.31(s,3H),8.45-8.18(m,2H),7.95-7.83(m,2H),7.66(t,J=5.5,1H),7.52-7.17(m,6H),7.11-7.04(m,2H),4.96(s,2H),4.55-4.35(m,3H),3.71-3.52(m,2H),3.06-2.90(m,4H),2.75-2.60(m,3H),2.60-2.42(m,4H),2.36(s,3H),2.09-1.96(m,1H),1.89-1.66(m,7H),1.53-1.13(m,12H),1.06-0.93(m,3H);ESI MS m/z 953[M+H]⁺;HPLC 93.8%(AUC),T_R 4.74min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm, ε₂₄,417。

[0630] 实施例43

[0631] 式(Ia)化合物的替代合成

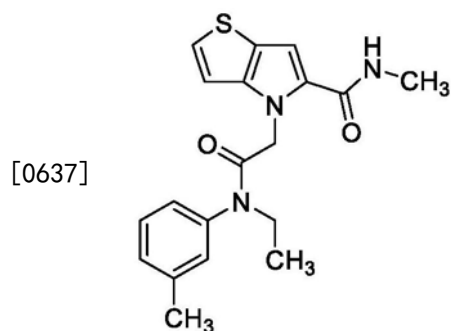
[0632] 式 (Ia) 化合物通常还可根据方案3来合成。

[0633] 方案3.

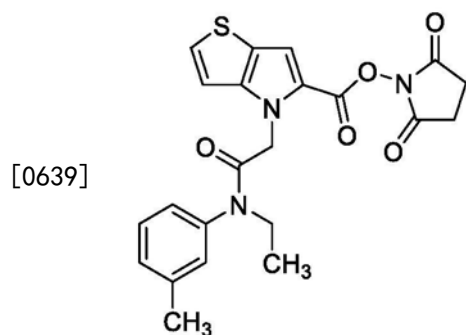


[0635] 实施例44

[0636] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺 (WZ-141-84)



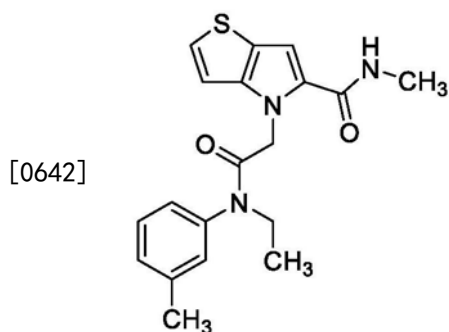
[0638] 步骤1. 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯 (WZ-141-82)



[0640] 将4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸 (0.44g, 1.28mmol) 和TSTU (1.16g, 3.85mmol) 溶解于15ml二氯甲烷和15ml乙腈中。在室温下缓慢添加DIPEA (0.996g, 7.71mmol), 并将所得混合物在室温下搅拌30分钟。将反应混合物

用100ml二氯甲烷稀释,用30%柠檬酸洗涤两次,且用水洗涤两次,并且经Na₂SO₄干燥。将有机溶剂浓缩至30ml溶液。不经进一步纯化,一部分溶液直接用于下一步骤。

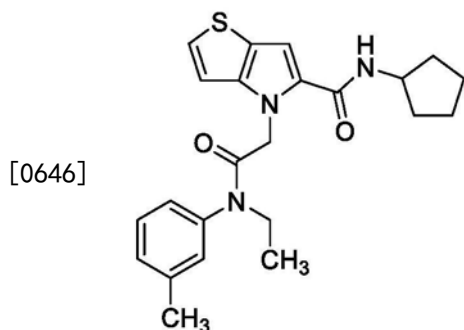
[0641] 步骤2. 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(WZ-141-84)



[0643] 向上述10ml的4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯(WZ141-82)(150mg,0.34mmol)的粗产物添加甲胺(40%)(0.53g,6.83mmol),并将所得混合物在室温下搅拌30分钟。在除去溶剂后,使用庚烷/乙酸乙酯作为洗脱剂通过快速柱纯化所述化合物,以得到定量产率的所需产物。¹H NMR(300MHz,CD₂Cl₂) δ7.5-6.8(m,7H),4.95(s,2H),3.76(m,2H),2.91(d,3H),2.43(s,3H),1.10(t,3H);ESI MS m/z 356[M+H]⁺;HPLC在254nm下99.6%。

[0644] 实施例45

[0645] N-环戊基-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(WZ-141-88)

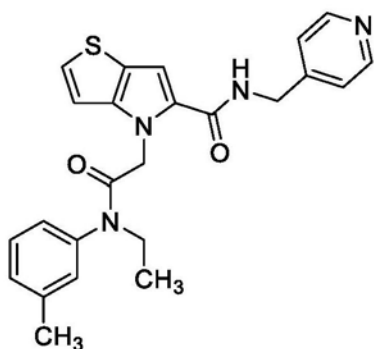


[0647] 通过使用用于制备4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(WZ141-84)的类似方法来合成化合物WZ141-88。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.96(d,1H),7.5-7.1(m,6H),6.8(d,1H),4.90(s,2H),4.61(m,1H),3.63(m,2H),2.38(s,br,3H),1.9-1.4(m,8H),1.00(t,3H);ESI MS m/z 410[M+H]⁺;HPLC纯度在254nm下99.1%。

[0648] 实施例46

[0649] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(吡啶-4-基甲基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(WZ-141-89)

[0650]

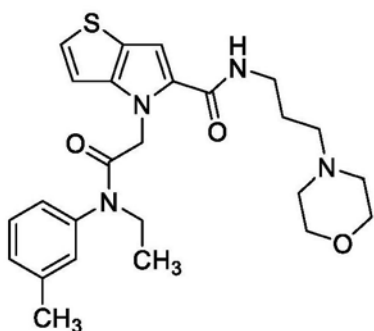


[0651] 通过使用用于制备4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(WZ141-84)的以上类似方法来合成化合物WZ141-89。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ8.79 (t, 1H), 8.46 (d, 2H), 7.45-7.05 (m, 8H), 4.92 (s, 2H), 4.41 (d, 2H), 3.58 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.10 (t, 3H); ESI MS m/z 433 [M+H]⁺; HPLC纯度在254nm下 94.2%。

[0652] 实施例47

[0653] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(3-吗啉代丙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(WZ-141-90)

[0654]

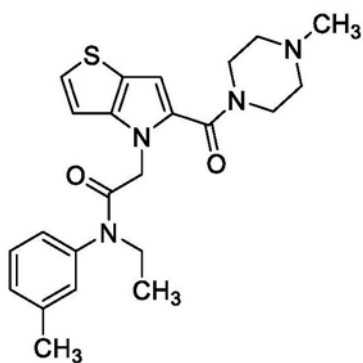


[0655] 通过使用用于制备4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(WZ141-84)的类似方法来合成化合物WZ141-90。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ8.12 (d, 2H), 7.4-7.0 (m, 6H), 4.93 (s, 2H), 3.7-3.4 (m, 6H), 3.4-3.2 (m, 2H), 2.4-2.2 (s, 9H), 1.7-1.5 (m, 2H), 1.10 (t, 3H); ESI MS m/z 469 [M+H]⁺; HPLC纯度在254nm下 98.0%。

[0656] 实施例48

[0657] N-乙基-2-(5-(4-甲基哌嗪-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺(WZ-141-91)

[0658]



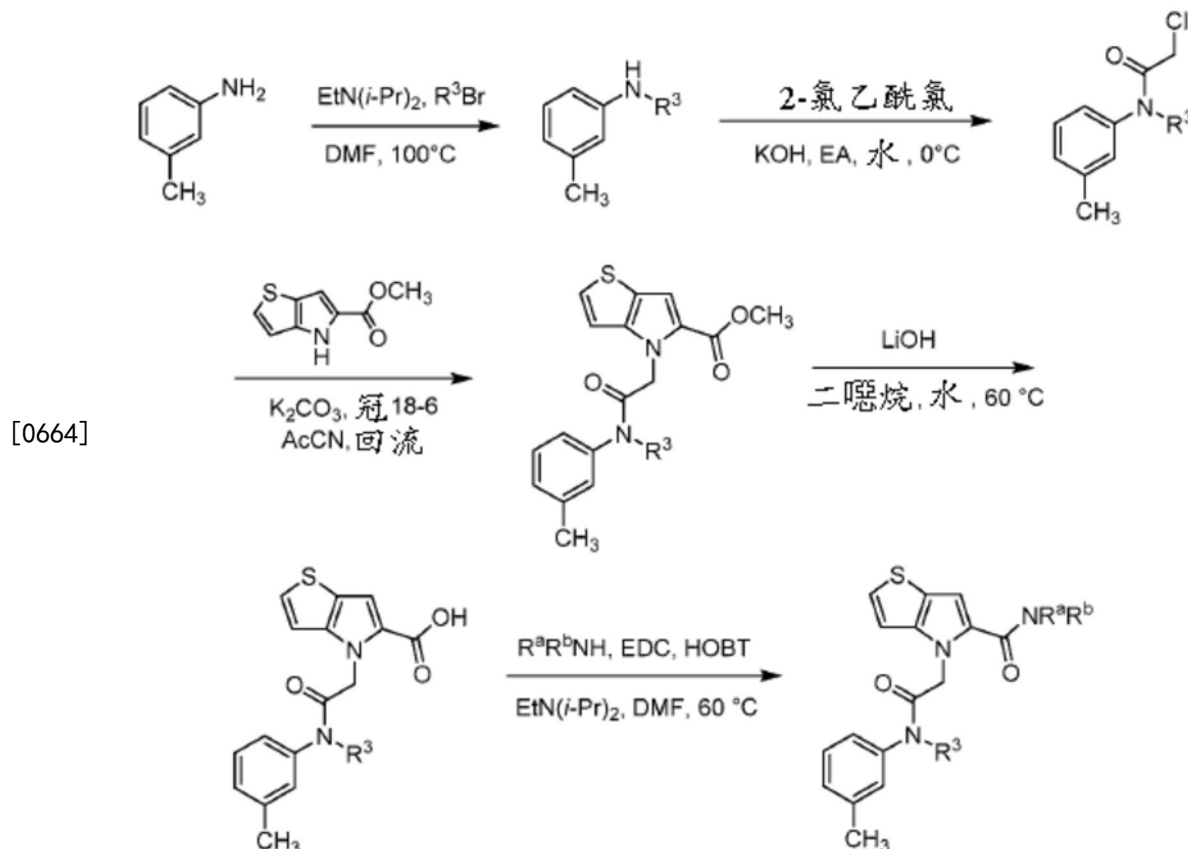
[0659] 通过使用用于制备4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(WZ141-84)的类似方法来合成化合物WZ141-91。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ7.44 (d, 1H), 7.3-7.1 (m, 3H), 7.03 (d, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.7-3.5 (m, 6H), 2.35 (s, 3H), 2.32 (m, 4H), 2.18 (s, 3H), 1.10 (t, 3H); ESI MS m/z 425 [M+H]⁺; HPLC纯度在254nm下96.0%。

[0660] 实施例49

[0661] 式(Ic)化合物的合成

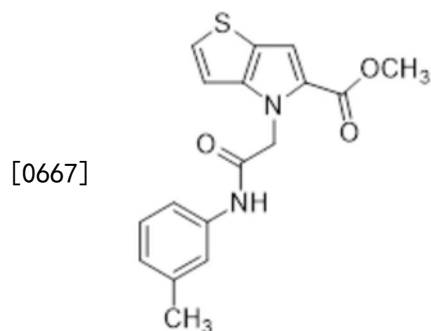
[0662] 式(Ic)化合物通常可根据方案4来合成。

[0663] 方案4.



[0665] 实施例50

[0666] 4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0077)

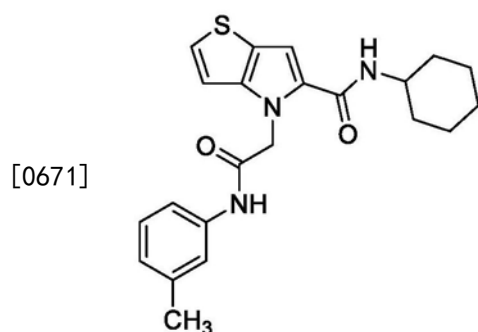


[0668] 向2-氯-N-(间甲苯基)乙酰胺(500mg, 2.7mmol)于乙腈(20mL)中的溶液添加4H-噻

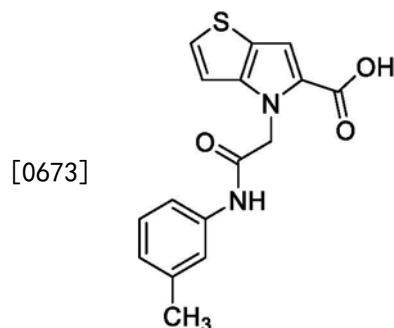
吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(411mg,2.3mmol)、碳酸钾(376mg,2.7mmol)和18-冠-6(30mg,0.11mmol)。将反应加热至回流持续1.5小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈淡褐色固体的所需产物(530mg,71%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ10.21(s,1H),7.57(d,J=5.4,1H),7.42(s,1H),7.37-7.30(m,1H),7.27(d,J=5.4,1H),7.23(s,1H),7.16(t,J=7.8,1H),6.85(d,J=7.8,1H),5.31(s,2H),3.73(s,3H),2.24(s,3H);ESI MS m/z 329[M+H]⁺;HPLC 99.6%(AUC),T_R 6.32min;UV(MeOH) λ_{max} 288nm, ε29,177。

[0669] 实施例51

[0670] N-环己基-4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0081)

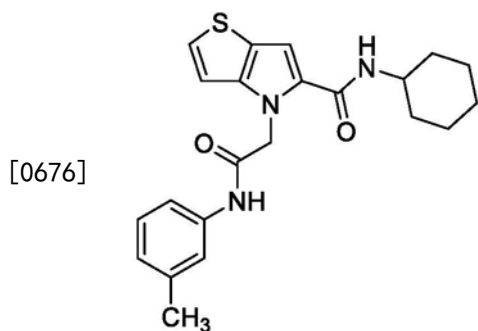


[0672] 步骤1. 4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0080)



[0674] 按照通用程序A,使4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(130mg,0.39mmol)与氢氧化锂(47mg,2.0mmol)反应以得到呈浅褐色固体的粗产物。

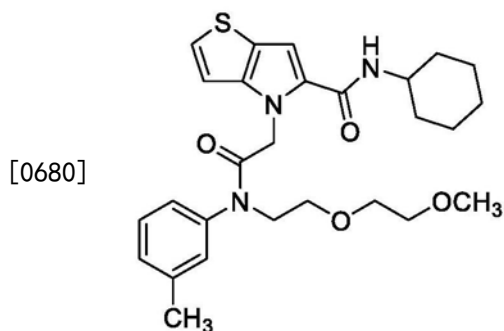
[0675] 步骤2.N-环己基-4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0081)



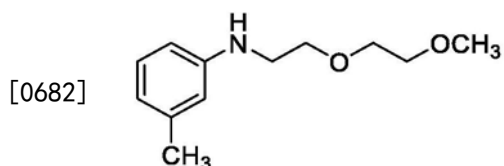
[0677] 按照通用程序B,使4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(120mg,0.38mmol)与环己胺(56mg,0.57mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(47mg,31%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ10.13(s,1H),7.95(d,J=8.1,1H),7.43-7.38(m,2H),7.33(d,J=8.1,1H),7.23-7.10(m,3H),6.84(d,J=7.5,1H),5.30(s,2H),3.75-3.58(m,1H),2.24(s,3H),1.85-1.53(m,5H),1.35-1.00(m,5H);ESI MS m/z 396[M+H]⁺;HPLC 94.7%(AUC),T_R7.34min;UV(MeOH) λ_{max} 285nm,ε28,066。

[0678] 实施例52

[0679] N-环己基-4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0109)

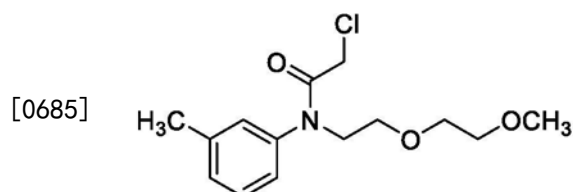


[0681] 步骤1.N-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-3-甲基苯胺(JRW-0101)



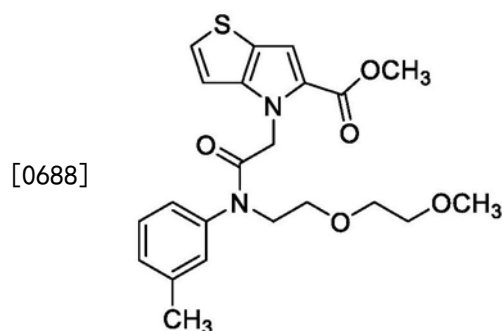
[0683] 向间甲苯胺(1.0g,9.3mmol)于DMF(10mL)中的溶液添加1-溴-2-(2-甲氧基乙氧基)乙烷(0.85g,4.6mmol)和二异丙胺(1.2g,0.93mmol)。将混合物加热至100℃持续4小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈油状物的所需产物(650mg,66%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.07(t,J=7.5,1H),6.56(d,J=7.5,1H),6.52-6.45(m,2H),3.71(t,J=5.3,2H),3.67-3.62(m,2H),3.60-3.52(m,2H),3.31(t,J=5.3,2H),2.28(s,3H);ESI MS m/z 210[M+H]⁺。

[0684] 步骤2. 2-氯-N-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-N-(间甲苯基)乙酰胺(JRW-0104)



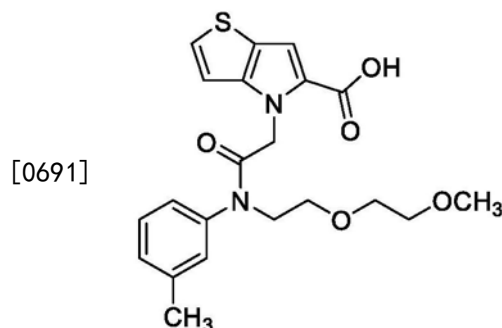
[0686] 向N-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-3-甲基苯胺(650mg, 3.1mmol)于乙酸乙酯(15mL)中的溶液添加水(5mL)。将双相溶液冷却至0℃,并且一次性添加氢氧化钾(522mg, 9.3mmol)。在10分钟内逐滴添加2-氯乙酰氯(526mg, 4.7mmol)。将所述混合物搅拌2.5小时,用水稀释,并用乙酸乙酯萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液以得到呈浅红色油状物的粗产物(830mg)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.34-7.25 (m, 1H), 7.18 (d, J = 7.7, 1H), 7.15-7.03 (m, 2H), 3.89 (t, J = 5.8, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.65 (t, J = 5.8, 2H), 3.62-3.55 (m, 2H), 3.54-3.46 (m, 2H), 2.37 (s, 3H); ESI MS m/z 286 [M+H]⁺。

[0687] 步骤3. 4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0105)



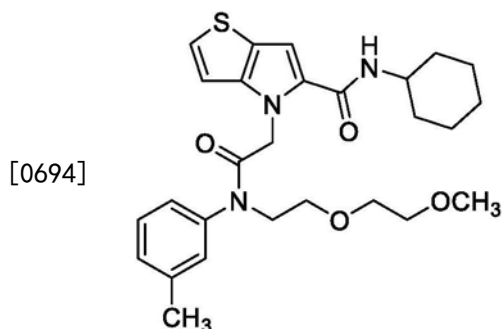
[0689] 向2-氯-N-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-N-(间甲苯基)乙酰胺(830mg, 2.9mmol)于乙腈(20mL)中的溶液添加4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(438mg, 2.4mmol)、碳酸钾(400mg, 2.9mmol)和18-冠-6(32mg, 0.12mmol)。将混合物加热至回流持续18小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈粘稠油状物的粗产物(1.3g)。ESI MS m/z 430 [M+H]⁺。

[0690] 步骤4. 4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0107)



[0692] 按照通用程序A,使4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(2.4mmol)与氢氧化锂(287mg, 12.0mmol)反应以得到呈淡黄色固体的粗产物(1.0g, 定量)。ESI MS m/z 417 [M+H]⁺。

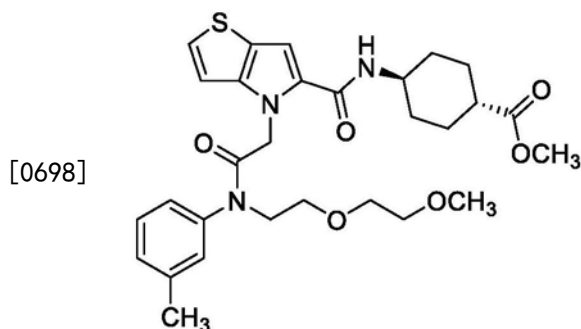
[0693] 步骤5.N-环己基-4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0109)



[0695] 按照通用程序B,使4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(120mg,0.28mmol)与环己胺(42mg,0.43mmol)反应以得到呈白色胶状物的所需产物(120mg,83%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.96-7.85(m,1H),7.48-7.30(m,4H),7.30-7.20(m,1H),7.17-7.07(m,2H),5.01(s,2H),3.82-3.62(m,3H),3.56-3.35(m,6H),3.25(s,3H),2.38(s,3H),1.90-1.54(m,5H),1.41-1.04(m,5H);ESI MS m/z 498[M+H]⁺;HPLC 96.0%(AUC),T_R 7.38min;UV(EtOH) $\lambda_{\max}$ 289nm, ϵ 25,434。

[0696] 实施例53

[0697] 反式-4-(4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0110)

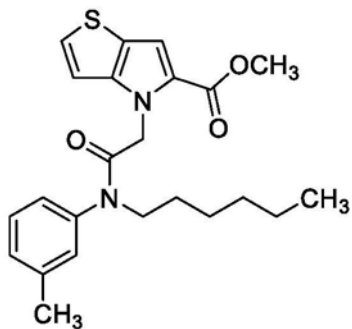


[0699] 按照通用程序B,使4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(120mg,0.28mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(68mg,0.43mmol)反应以得到呈白色胶状物的所需产物(140mg,87%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.94(d,J=7.8,1H),7.46-7.20(m,5H),7.15-7.04(m,2H),5.00(s,2H),3.78-3.65(m,3H),3.60(s,3H),3.52-3.35(m,6H),3.23(s,3H),2.38(s,3H),2.34-2.20(m,1H),2.02-1.81(m,4H),1.53-1.22(m,4H);ESI MS m/z 556[M+H]⁺;HPLC 98.7%(AUC),T_R 6.60min;UV(MeOH) $\lambda_{\max}$ 289nm, ϵ 23,567。

[0700] 实施例54

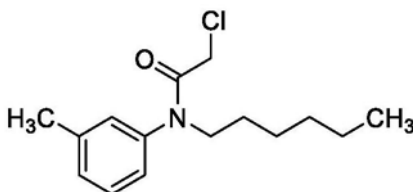
[0701] 4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0142)

[0702]



[0703] 步骤1. 2-氯-N-己基-N-(间甲苯基)乙酰胺(JRW-0141)

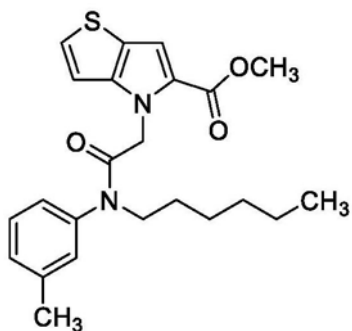
[0704]



[0705] 向N-己基-3-甲基苯胺(500mg, 2.6mmol)于乙酸乙酯(15mL)中的溶液添加水(5mL)。将双相溶液冷却至0℃,并且一次性添加氢氧化钾(440mg, 7.8mmol)。在10分钟内逐滴添加2-氯乙酰氯(442mg, 3.9mmol)。将所述混合物搅拌1小时,用水稀释,并用乙酸乙酯萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液以得到呈浅红色油状物的粗产物(730mg)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.32 (t, J=8.0, 1H), 7.24-7.17 (m, 1H), 7.04-6.97 (m, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.74-3.61 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.59-1.41 (m, 2H), 1.37-1.16 (m, 6H), 0.92-0.80 (m, 3H); ESI MS m/z 268 [M+H]⁺。

[0706] 步骤2. 4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0142)

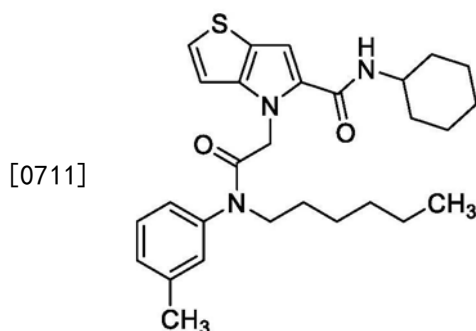
[0707]



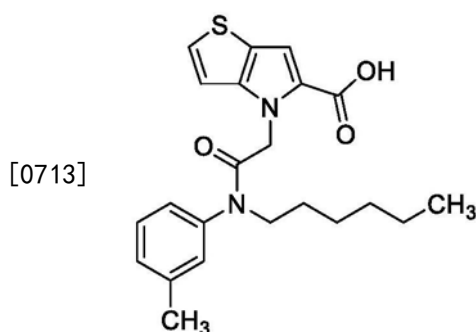
[0708] 向2-氯-N-己基-N-(间甲苯基)乙酰胺(700mg, 2.6mmol)于乙腈(20mL)中的溶液添加4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(394mg, 2.2mmol)、碳酸钾(361mg, 2.6mmol)和18-冠-6(29mg, 0.11mmol)。将混合物加热至回流持续18小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(780mg, 86%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 7.53 (d, J=5.4, 1H), 7.41 (t, J=7.7, 1H), 7.33-7.11 (m, 5H), 4.93 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.58 (t, J=6.0Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.48-1.30 (m, 2H), 1.28-1.15 (m, 6H), 0.81 (t, J=6.7, 3H); ESI MS m/z 413 [M+H]⁺; HPLC 97.1% (AUC), T_R 7.18min; UV (EtOH) λ_{max} 289nm, ε 26,840。

[0709] 实施例55

[0710] N-环己基-4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0148)

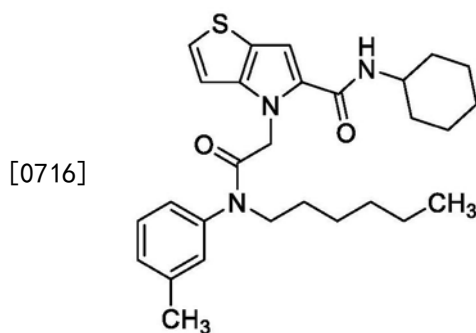


[0712] 步骤1. 4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0149)



[0714] 按照通用程序A,使4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(300mg,0.73mmol)与氢氧化锂(87mg,3.6mmol)反应以得到呈淡黄色固体的粗产物(300mg)。ESI MS m/z 399 $[M+H]^+$ 。

[0715] 步骤2.N-环己基-4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0148)

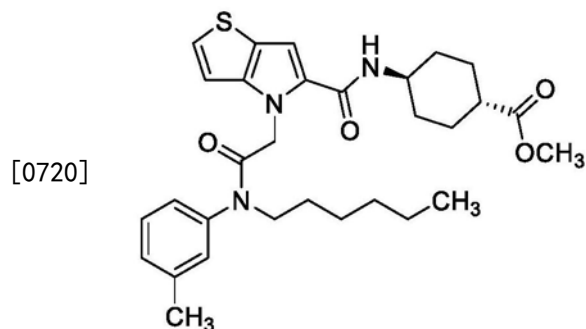


[0717] 按照通用程序B,使4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(50mg,0.12mmol)与环己胺(15mg,0.15mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(60mg,99%)。 ^1H NMR(300MHz,DMSO- d_6) δ 7.85(d,J=8.2,1H),7.46-7.16(m,5H),7.12-7.06(m,2H),4.96(s,2H),3.75-3.60(m,1H),3.56(t,J=6.7,2H),2.36(s,3H),1.84-1.52(m,5H),1.43-1.04(m,13H),0.81(t,J=6.9,3H);ESI MS m/z 480 $[M+H]^+$;HPLC 98.1%(AUC), T_R 8.62min;UV(EtOH) λ_{max} 288nm, ϵ 24,544。

[0718] 实施例56

[0719] 反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-

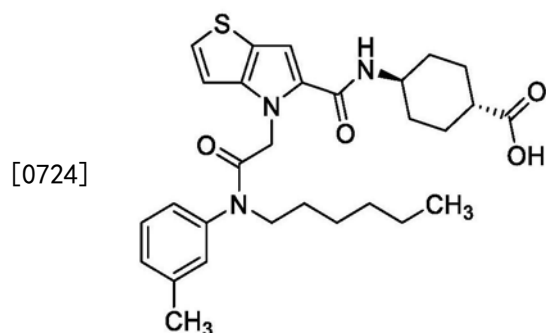
甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯 (JRW-0149)



[0721] 按照通用程序B,使4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(50mg,0.12mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(24mg,0.15mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(65mg,96%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.91(d,J=8.0,1H),7.44-7.33(m,2H),7.33-7.17(m,3H),7.12-7.06(m,2H),4.96(s,2H),3.75-3.47(m,6H),2.36(s,3H),2.31-2.20(m,1H),1.99-1.78(m,4H),1.51-1.10(m,12H),0.81(t,J=6.9,3H);ESI MS m/z 538[M+H]⁺;HPLC 99.8%(AUC),T_R 8.17min;UV(EtOH) λ_{max} 289nm,ε 26,509。

[0722] 实施例57

[0723] 反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(JRW-0260)

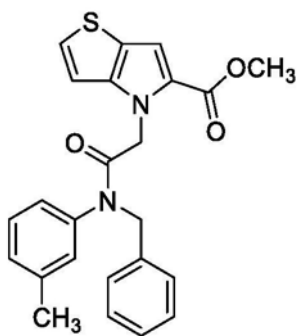


[0725] 按照通用程序A,使反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(58mg,0.11mmol)与氢氧化锂(13mg,0.54mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(55mg,97%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 12.03(s,1H),7.88(d,J=7.8,1H),7.46-7.17(m,5H),7.12-7.06(m,2H),4.97(s,2H),3.74-3.48(m,3H),2.36(s,3H),2.19-2.05(m,1H),2.00-1.77(m,4H),1.48-1.09(m,12H),0.88-0.77(m,3H);ESI MS m/z 524[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 7.42min;UV(EtOH) λ_{max} 288nm,ε 24,240。

[0726] 实施例58

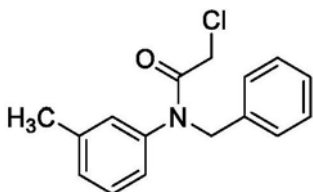
[0727] 4-(2-(苄基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(WZ-141-86)

[0728]



[0729] 步骤1.N-苄基-2-氯-N-(间甲苯基)乙酰胺(WZ-141-85)

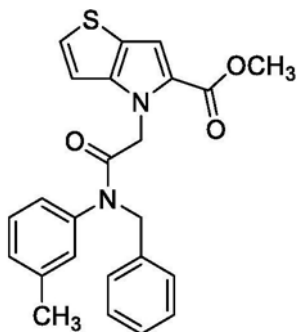
[0730]



[0731] 在0℃下向N-苄基-3-甲基苯胺(1.35g,6.84mmol)和TEA(0.761g,7.53mmol)于50ml二氯甲烷中的溶液缓慢添加2-氯乙酰氯(0.772g,0.772mmol)。将所得混合物在0℃下搅拌30分钟,且然后在室温下过夜。将所述混合物稀释至100ml二氯甲烷中,并用水洗涤三次,且将有机层经Na₂SO₄干燥。在除去溶剂后,使用庚烷和乙酸乙酯作为溶剂通过快速柱色谱法纯化化合物以得到74%产率的淡黄色产物。¹H NMR(300MHz,CD₂Cl₂) δ7.6-6.7(m,9H),4.89(s,2H),3.71(s,2H),2.31(s,3H);ESI MS m/z 274[M+H]⁺。

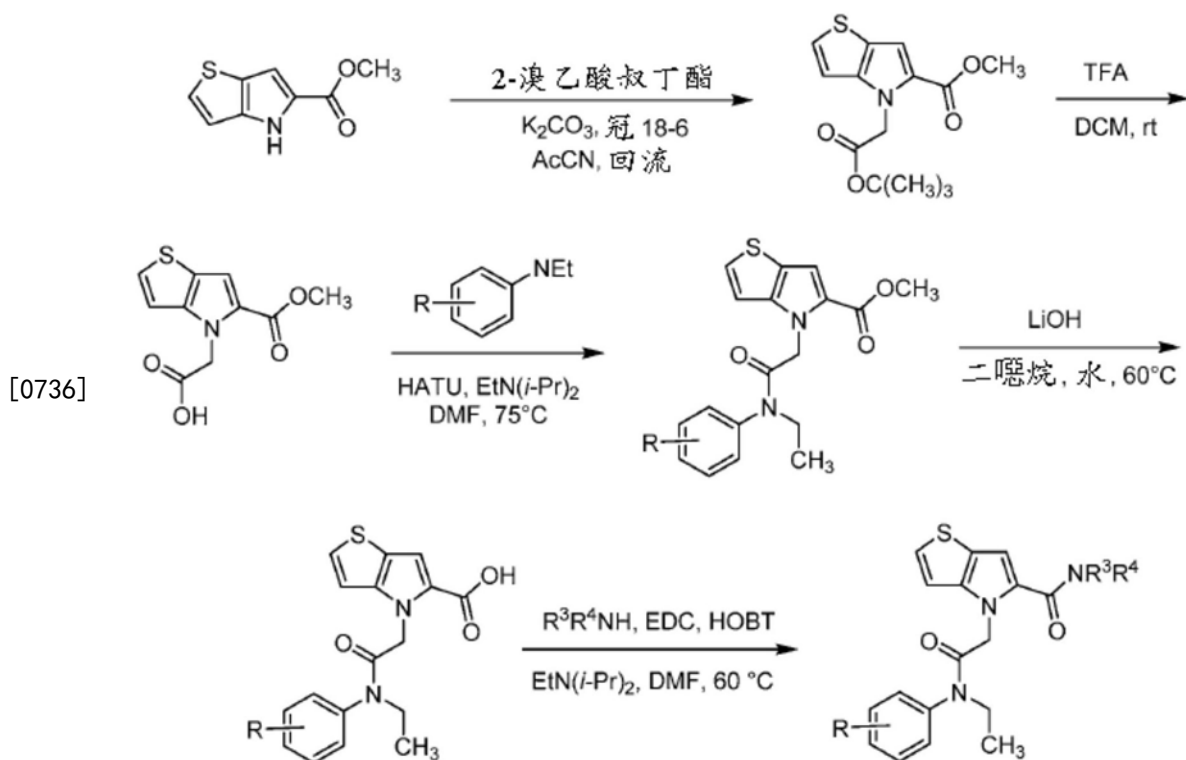
[0732] 步骤2. 4-(2-(苄基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(WZ-141-86)

[0733]



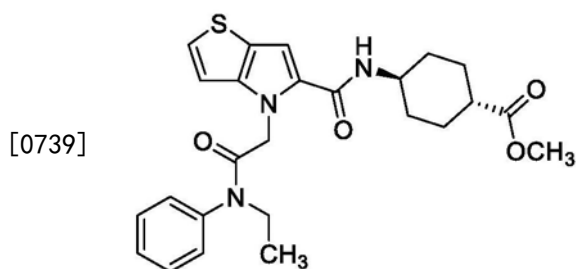
[0734] 将N-苄基-2-氯-N-(间甲苯基)乙酰胺(1.36g,4.97mmol)、4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(0.6g,3.31mmol)、18-冠-6醚(0.262g,0.993mmol)和K₂CO₃(0.915g,6.62mmol)于50ml乙腈中的混合物加热至回流过夜。在冷却后,在真空下除去大部分溶剂,并将残余物溶解于二氯甲烷(100ml)中并用水洗涤。将有机层经Na₂SO₄干燥。在除去溶剂后,使用庚烷和乙酸乙酯作为溶剂,通过快速柱纯化化合物以得到95%产率的浅白色产物。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.57(s,1H),7.4-7.1(m,11H),5.06(s,2H),4.83(s,2H),3.79(s,3H),2.31(s,3H);ESI MS m/z 419[M+H]⁺;HPLC纯度在254nm下94.3%。

[0735] 方案5.

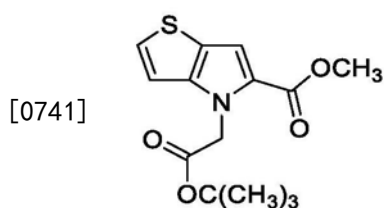


[0737] 实施例59

[0738] 反式-4-(4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0318)

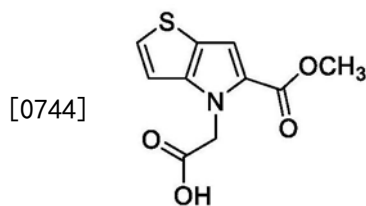


[0740] 步骤1. 4-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0277)



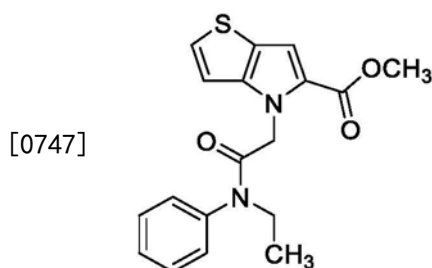
[0742] 向4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(1.4g, 7.73mmol)于乙腈(30mL)中的溶液添加碳酸钾(1.28g, 9.28mmol)、18-冠-6醚(102mg, 0.38mmol)和2-溴乙酸叔丁酯(1.81g, 9.28mmol)。将悬浮液加热至75°C持续18小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈淡黄色固体的所需产物(2.1g, 91%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 7.34(d, J=5.4, 1H), 7.22(d, J=0.7, 1H), 6.87(dd, J=0.7, 5.4, 1H), 5.11(s, 2H), 3.84(s, 3H), 1.46(s, 9H); ESI MS m/z 296[M+H]⁺。

[0743] 步骤2. 2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(JRW-0288)



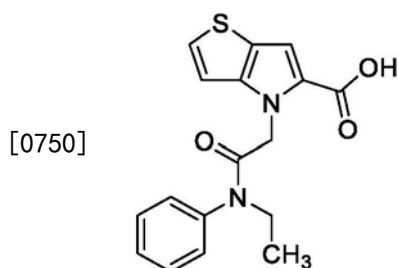
[0745] 向4-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(1.92g, 6.50mmol)于DCM(20mL)中的溶液添加三氟乙酸(2mL)。将溶液在室温下搅拌4小时,然后浓缩混合物。将甲苯添加至残余物中并浓缩以得到呈白色固体的粗产物。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ7.38(d, J=5.4, 1H), 7.24(s, 1H), 6.89(d, J=5.4, 1H), 5.24(s, 2H), 3.86(s, 3H); ESI MS m/z 240[M+H]⁺。

[0746] 步骤3. 4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0294)



[0748] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(100mg, 0.42mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加N-乙基苯胺(101mg, 0.84mmol)、HATU(318mg, 0.84mmol)和二异丙基乙胺(108mg, 0.84mmol)。将反应加热至75℃持续18小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(86mg, 60%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ7.57-7.21(m, 6H), 7.16(s, 1H), 6.80(d, J=5.5, 1H), 4.95(s, 2H), 3.87-3.68(m, 5H), 1.13(t, J=7.2, 3H); ESI MS m/z 343[M+H]⁺。

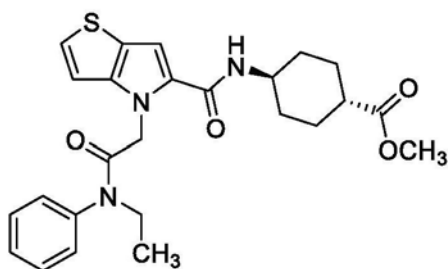
[0749] 步骤4. 4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-309)



[0751] 按照通用程序A,使4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(86mg, 0.25mmol)与氢氧化锂(30mg, 1.3mmol)反应以得到呈淡褐色固体的粗产物(82mg)。ESI MS m/z 329[M+H]⁺。

[0752] 步骤5. 反式-4-(4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0318)

[0753]

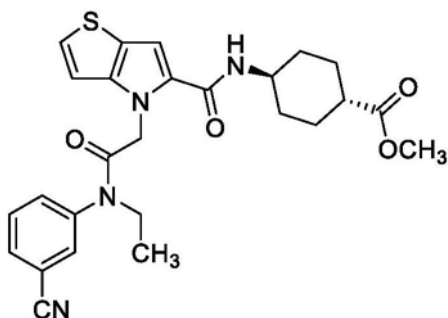


[0754] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(80mg,0.24mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(56mg,0.29mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(81mg,71%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.89(d,J=7.9,1H),7.60-7.28(m,6H),7.04-7.13(m,2H),4.95(s,2H),3.73-3.52(m,5H),2.31-2.18(m,1H),2.03-1.78(m,4H),1.50-1.20(m,4H),1.07-0.93(s,3H);ESI MS m/z 468[M+H]⁺;HPLC 97.7%(AUC),T_R 6.51min;UV(EtOH) λ_{max} 289nm,ε₂₈,274。

[0755] 实施例60

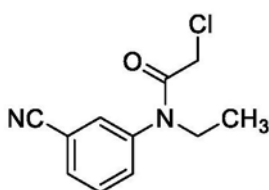
[0756] 反式-4-(4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0321)

[0757]



[0758] 步骤1. 2-氯-N-(3-氰基苯基)-N-乙基乙酰胺(JRW-0313)

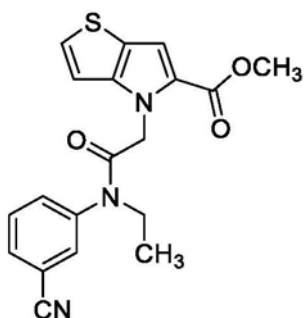
[0759]



[0760] 向3-(乙基氨基)苄腈(60mg,0.41mmol)于乙酸乙酯(7mL)中的溶液添加水(3mL)。将双相溶液冷却至0℃,并且一次性添加氢氧化钾(69mg,1.2mmol)。在10分钟内逐滴添加2-氯乙酰氯(69mg,0.62mmol)。将所述混合物搅拌2小时,用水稀释,并用乙酸乙酯萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液以得到呈油状物的粗产物(98mg)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.81-7.42(m,4H),3.84-3.70(m,4H),1.15(t,J=7.2,3H);ESI MS m/z 223[M+H]⁺。

[0761] 步骤2. 4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0316)

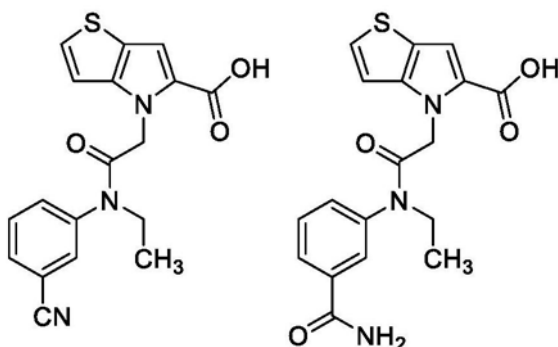
[0762]



[0763] 向4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(68mg,0.37mmol)于乙腈(5mL)中的溶液添加碳酸钾(62mg,0.45mmol)、18-冠-6醚(5mg,0.019mmol)和2-氯-N-(3-氰基苯基)-N-乙基乙酰胺(98mg,0.45mmol)。将悬浮液加热至75℃持续18小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色泡沫的所需产物(94mg,68%)。¹H NMR (300MHz,CDCl₃) δ7.71-7.62 (m,1H),7.61-7.49 (m,3H),7.33 (d,J=5.4,1H),7.12 (s,1H),6.82 (d,J=5.4,1H),4.98 (s,2H),3.87-3.70 (m,5H),1.14 (t,J=7.1,3H);ESI MS m/z 368 [M+H]⁺。

[0764] 步骤3. 4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0319-1)和4-(2-((3-氨基甲酰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0319-2)

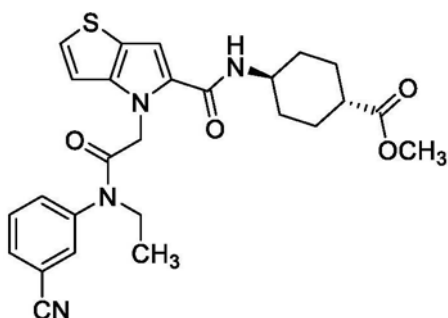
[0765]



[0766] 按照通用程序A,使4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(90mg,0.24mmol)与氢氧化锂(12mg,0.49mmol)反应。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)分离两种产物以得到呈白色固体的腈(61mg)和酰胺(31mg)。ESI MS m/z 354 [M+H]⁺和m/z 372 [M+H]⁺。

[0767] 步骤4.反式-4-(4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0321)

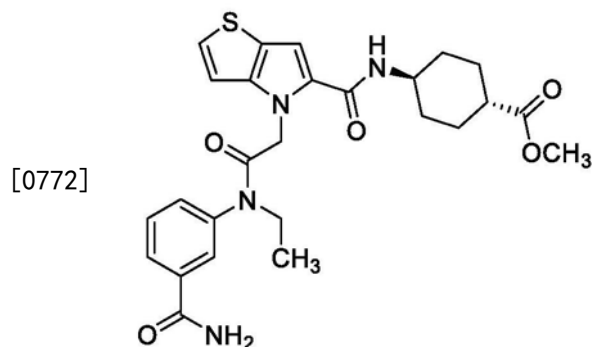
[0768]



[0769] 按照通用程序B,使4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(60mg,0.17mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(56mg,0.29mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(68mg,81%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 8.02-7.59(m,5H),7.38(d,J=5.3,1H),7.17-7.03(m,2H),5.02(s,2H),3.77-3.55(m,6H),2.32-2.18(m,1H),1.99-1.79(m,4H),1.54-1.20(m,4H),1.10-0.95(m,3H);ESI MS m/z 493[M+H]⁺;HPLC 98.3%(AUC),T_R 6.12min;UV(EtOH) λ_{max} 289nm,ε 26,802。

[0770] 实施例61

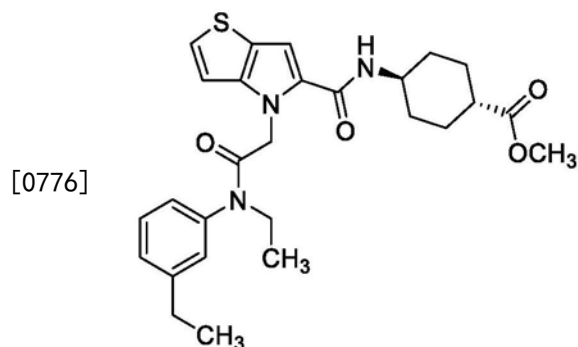
[0771] 反式-4-(4-(2-((3-氨基甲酰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0322)



[0773] 按照通用程序B,使4-(2-((3-氨基甲酰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(30mg,0.08mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(19mg,0.10mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(33mg,80%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 8.05(s,1H),7.97-7.83(m,3H),7.72-7.43(m,3H),7.37(d,J=5.4,1H),7.12-7.05(m,2H),4.98(s,2H),3.75-3.54(m,6H),2.32-2.18(m,1H),1.99-1.79(m,4H),1.53-1.22(m,4H),1.10-0.95(m,3H);ESI MS m/z 511[M+H]⁺;HPLC 98.2%(AUC),T_R 4.81min;UV(EtOH) λ_{max} 289nm,ε 28,223。

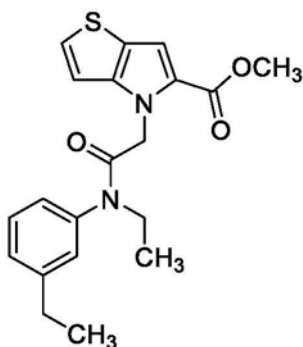
[0774] 实施例62

[0775] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0326)



[0777] 步骤1. 4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0298)

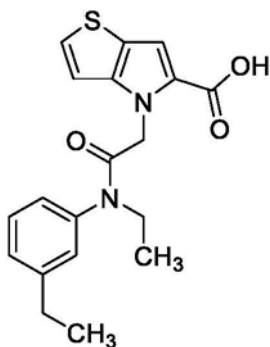
[0778]



[0779] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(100mg,0.42mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加N,3-二乙基苯胺(94mg,0.63mmol)、HATU(318mg,0.84mmol)和二异丙基乙胺(162mg,1.25mmol)。将反应加热至85℃持续18小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈橙色泡沫的所需产物(107mg,69%)。¹H NMR(300MHz,CDC1₃) δ7.38(t,J=7.9,1H),7.31-7.20(m,2H),7.17-7.10(m,3H),6.81(d,J=5.4,1H),4.98(s,2H),3.84-3.67(m,5H),2.71(q,J=7.6,2H),1.29(t,J=7.6,3H),1.13(t,J=7.2,3H);ESI MS m/z 371[M+H]⁺。

[0780] 步骤2. 4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0323)

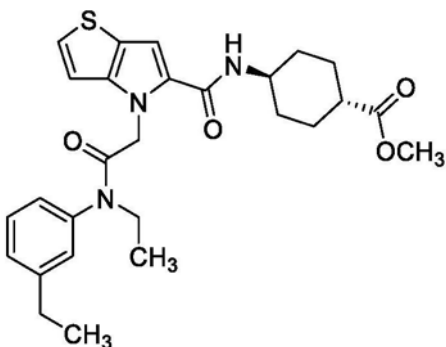
[0781]



[0782] 按照通用程序A,使4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(100mg,0.27mmol)与氢氧化锂(19mg,0.81mmol)反应以得到呈淡黄色固体的粗产物(100mg)。ESI MS m/z 357[M+H]⁺。

[0783] 步骤3.反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0326)

[0784]

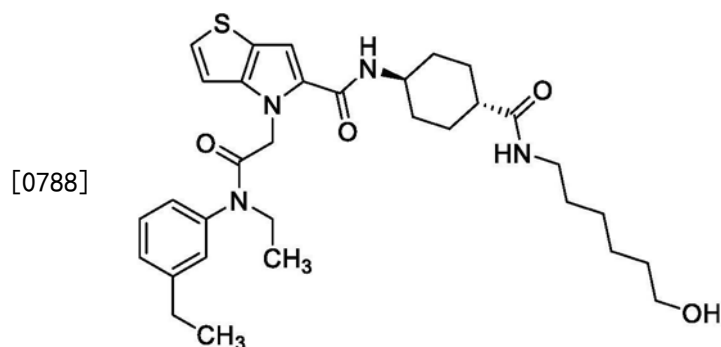


[0785] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,

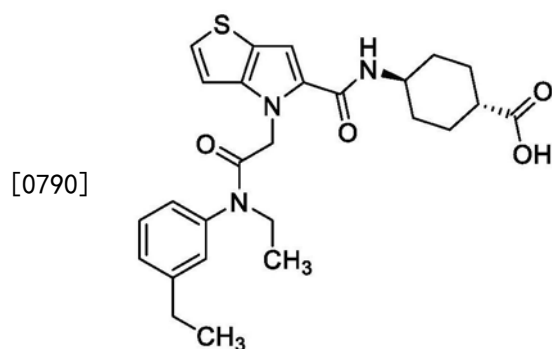
2-b]吡咯-5-甲酸(100mg,0.28mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(65mg,0.34mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(105mg,75%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.90(d,J=7.9,1H),7.51-7.19(m,5H),7.13-7.04(m,2H),4.95(s,2H),3.74-3.54(m,5H),2.73-2.61(m,2H),2.32-2.18(m,1H),2.01-1.78(m,4H),1.51-1.14(m,7H),1.08-0.95(s,3H);ESI MS m/z 496[M+H]⁺;HPLC 97.6%(AUC),T_R 7.37min;UV(MeOH) λ_{max} 288nm,ε27,343。

[0786] 实施例63

[0787] 4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0429)

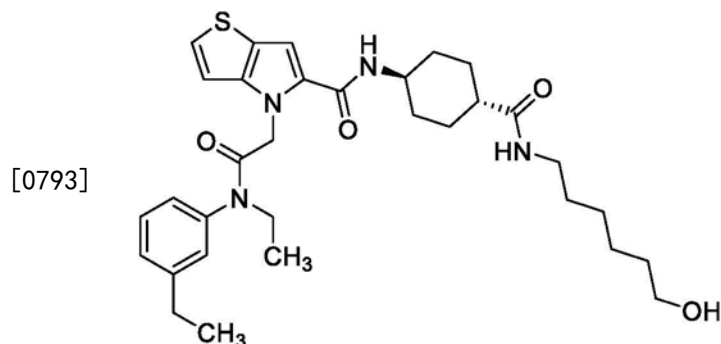


[0789] 步骤1.反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(JRW-0427)



[0791] 按照通用程序A,使反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(980mg,1.98mmol)与氢氧化锂(142mg,5.93mmol)反应以得到呈淡黄色固体的粗产物(1.0g)。ESI MS m/z 482[M+H]⁺。

[0792] 步骤2. 4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0429)

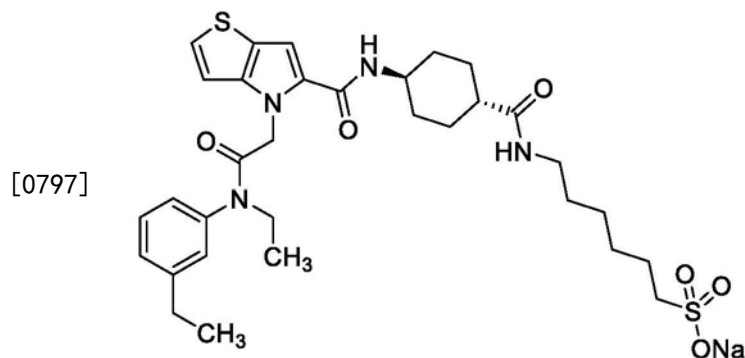


[0794] 按照通用程序B,使反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻

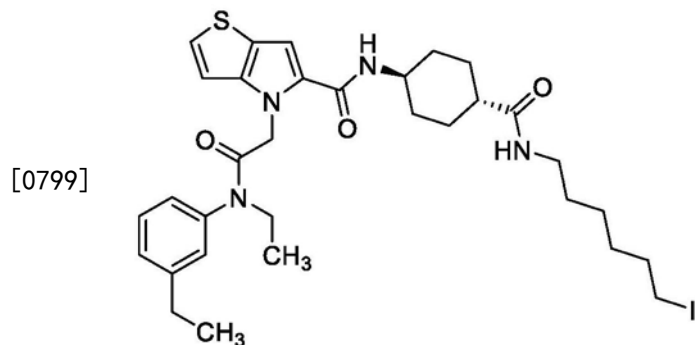
吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸(200mg,0.42mmol)与6-氨基己-1-醇(73mg,0.62mmol)反应以得到呈淡黄色泡沫的所需产物(200mg,83%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.85(d,J=8.0,1H),7.63(t,J=5.6,1H),7.46-7.18(m,5H),7.11-7.04(m,2H),4.96(s,2H),4.27(t,J=5.2,1H),3.72-3.55(m,3H),3.40-3.32(m,2H),3.05-2.95(m,2H),2.72-2.62(m,2H),2.10-1.97(m,1H),1.89-1.68(m,4H),1.53-1.14(m,15H),1.01(t,J=6.9,3H);ESI MS m/z 581[M+H]⁺;HPLC>99%(AUC),T_R 5.85min;UV(MeOH) $\lambda_{\max}$ 288nm, ϵ 25,165。

[0795] 实施例64

[0796] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠(JRW-0432)



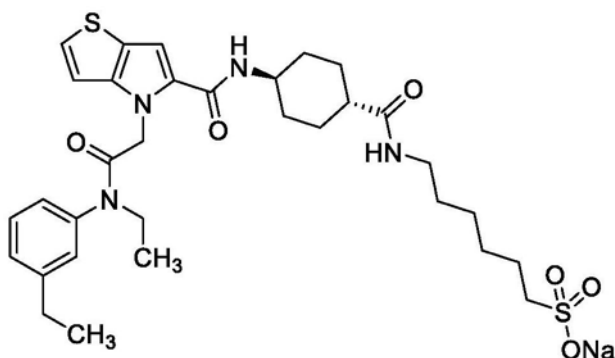
[0798] 步骤1. 4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-碘己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(JRW-0431)



[0800] 将咪唑(60mg,0.88mmol)、三苯基膦(230mg,0.88mmol)和碘(223mg,0.88mmol)于THF(10mL)中的溶液在室温下搅拌10分钟。添加溶解于THF(5mL)中的4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(170mg,0.29mmol)。将溶液在室温下搅拌1小时。将反应用乙酸乙酯稀释并用10%Na₂S₂O₃溶液淬灭。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层用10%Na₂S₂O₃溶液和盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)部分纯化残余物以得到呈白色固体的粗产物。ESI MS m/z 691[M+H]⁺。

[0801] 步骤2. 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠(JRW-0432)

[0802]

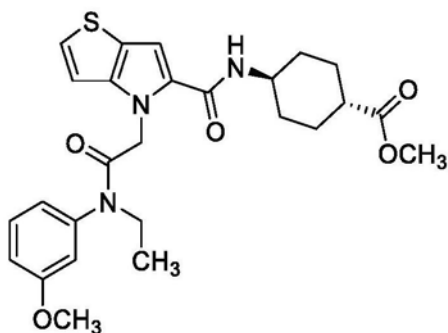


[0803] 向4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-碘己基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺(0.29mmol)于乙醇(10mL)中的溶液添加亚硫酸钠(184mg, 1.46mmol)和水(10mL)。将混合物加热至75℃持续3.5小时。将反应浓缩,并且通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(205mg, 定量)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ7.88 (d, J=8.3, 1H), 7.68 (t, J=5.4, 1H), 7.48-7.19 (m, 5H), 7.12-7.04 (m, 2H), 4.95 (s, 2H), 3.71-3.55 (m, 3H), 3.04-2.94 (m, 2H), 2.74-2.61 (m, 2H), 2.40-2.32 (m, 2H), 2.11-1.97 (m, 1H), 1.88-1.68 (m, 4H), 1.62-1.14 (m, 15H), 1.00 (t, J=6.7, 3H); ESI MS m/z 645 [M+H]⁺; HPLC >99% (AUC), T_R 5.07min; UV (MeOH) λ_{max} 288nm, ε 18,276。

[0804] 实施例65

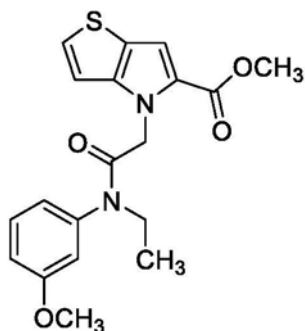
[0805] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0327)

[0806]



[0807] 步骤1. 4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0299)

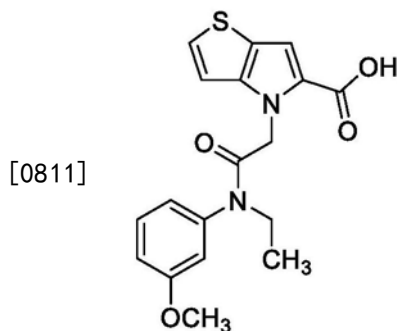
[0808]



[0809] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(100mg, 0.42mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加N-乙基-3-甲氧基苯胺(94mg, 0.63mmol)、HATU(318mg, 0.84mmol)和

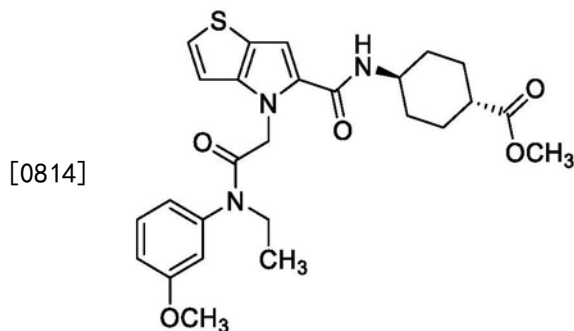
二异丙基乙胺(162mg, 1.25mmol)。将反应加热至85℃持续18小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈橙色泡沫的所需产物(97mg, 62%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.37 (t, J=8.0, 1H), 7.29 (d, J=5.4, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.99–6.84 (m, 3H), 6.81 (d, J=5.4, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83–3.69 (m, 5H), 1.14 (t, J=7.2, 3H); ESI MS m/z 373 [M+H]⁺。

[0810] 步骤2. 4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0324)



[0812] 按照通用程序A,使4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(95mg, 0.26mmol)与氢氧化锂(18mg, 0.77mmol)反应以得到呈淡黄色固体的粗产物(88mg)。ESI MS m/z 359 [M+H]⁺。

[0813] 步骤3. 反式-4-(4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0327)

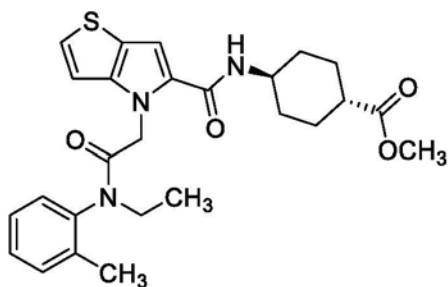


[0815] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(88mg, 0.25mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(48mg, 0.34mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(78mg, 63%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 7.90 (d, J=8.3, 1H), 7.50–7.31 (m, 2H), 7.16–6.91 (m, 5H), 5.00 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.75–3.53 (m, 6H), 2.33–2.18 (m, 1H), 2.01–1.77 (m, 4H), 1.50–1.22 (m, 4H), 1.08–0.95 (m, 3H); ESI MS m/z 498 [M+H]⁺; HPLC 96.4% (AUC), T_R 6.69min; UV (MeOH) λ_{max} 289nm, ε 28,671

[0816] 实施例66

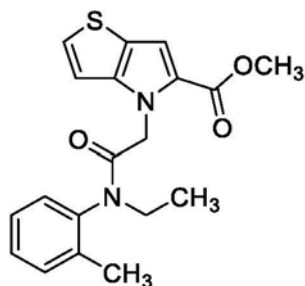
[0817] 反式-4-(4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0330)

[0818]



[0819] 步骤1. 4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0300)

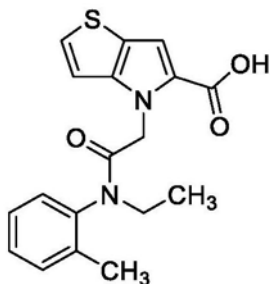
[0820]



[0821] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(100mg,0.42mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加N-乙基-2-甲基苯胺(84mg,0.63mmol)、HATU(318mg,0.84mmol)和二异丙基乙胺(162mg,1.25mmol)。将反应加热至85℃持续18小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色泡沫的所需产物(72mg,48%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.43-7.21(m,5H),7.16(s,1H),6.78(d,J=5.4,1H),5.02(d,J=16.9,1H),4.74(d,J=16.9,1H),4.15(dq,J=7.1,14.2,1H),3.81(s,3H),3.24(dq,J=7.1,14.2,1H),1.14(t,J=7.1,4H);ESI MS m/z 357[M+H]⁺。

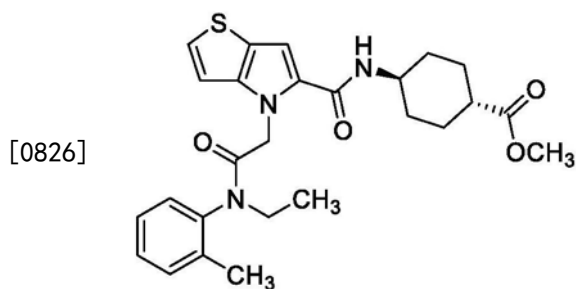
[0822] 步骤2. 4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0328)

[0823]



[0824] 按照通用程序A,使4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(70mg,0.20mmol)与氢氧化锂(23mg,0.98mmol)反应以得到呈淡黄色固体的粗产物(69mg)。ESI MS m/z 343[M+H]⁺。

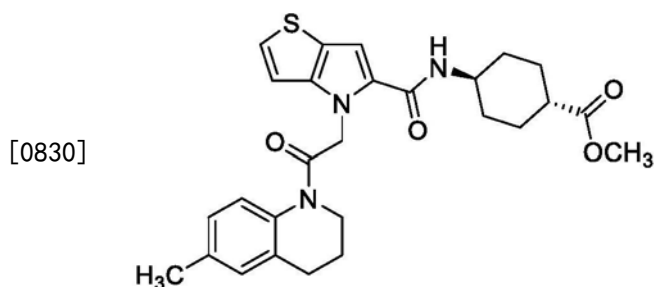
[0825] 步骤3. 反式-4-(4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0330)



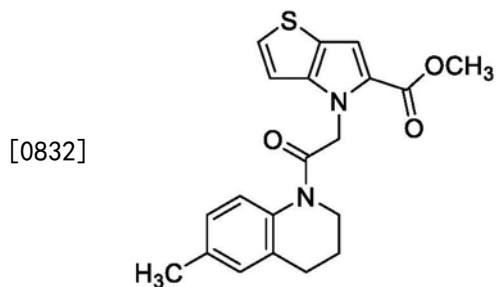
[0827] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(69mg,0.25mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(46mg,0.24mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(77mg,79%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.91(d,J=7.9,1H),7.49-7.29(m,5H),7.11-6.98(m,2H),4.91(d,J=16.7,1H),4.79(d,J=16.7,1H),4.06-3.90(m,1H),3.72-3.53(m,4H),3.14-2.99(m,1H),2.34(s,3H),2.31-2.18(m,1H),2.00-1.78(m,4H),1.51-1.14(m,4H),0.99(t,J=7.1,3H);ESI MS m/z 482[M+H]⁺;HPLC 92.3%(AUC),T_R 6.97min;UV(MeOH) λ_{max} 288nm,ε₂₉,468

[0828] 实施例67

[0829] 反式-4-(4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0331)

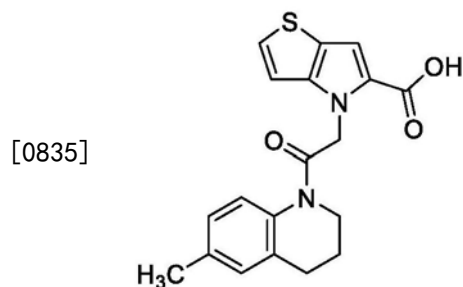


[0831] 步骤1. 4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0301)



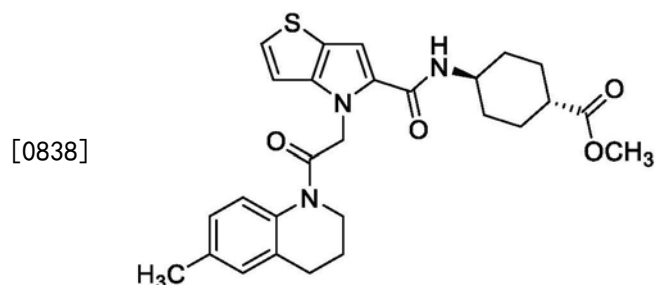
[0833] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(100mg,0.42mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加6-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉(92mg,0.63mmol)、HATU(318mg,0.84mmol)和二异丙基乙胺(162mg,1.25mmol)。将反应加热至85℃持续18小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色泡沫的所需产物(140mg,90%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.31(d,J=5.4,1H),7.18(s,1H),7.08-6.96(m,3H),6.82(d,J=5.4,1H),5.39(s,2H),3.86-3.74(m,5H),2.82-2.66(m,2H),2.31(s,3H),2.05-1.89(m,2H);ESI MS m/z 367[M+H]⁺。

[0834] 步骤2. 4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0329)



[0836] 按照通用程序A,使4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(130mg,0.35mmol)与氢氧化锂(42mg,1.76mmol)反应以得到呈橙色固体的粗产物(120mg)。ESI MS m/z 355 $[M+H]^+$ 。

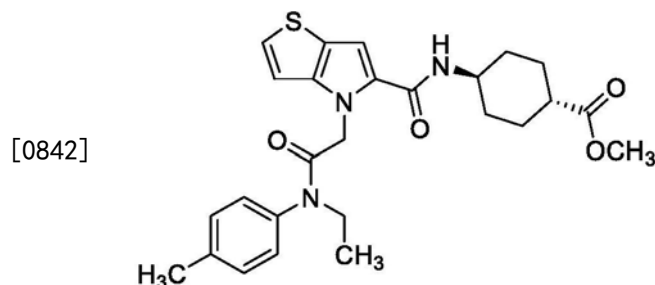
[0837] 步骤3. 反式-4-(4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0331)



[0839] 按照通用程序B,使4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(140mg,0.40mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(92mg,0.47mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(130mg,67%)。 ^1H NMR(300MHz,DMSO- d_6) δ 7.89(d, $J=7.7$,1H),7.47(d, $J=7.7$,1H),7.39(d, $J=5.3$,1H),7.19(d, $J=5.3$,1H),7.12(s,1H),7.08-6.88(m,2H),5.44(s,2H),3.73-3.53(m,6H),2.72(t, $J=6.6$,2H),2.33-2.16(m,4H),2.00-1.74(m,6H),1.50-1.20(m,4H);ESI MS m/z 494 $[M+H]^+$;HPLC 98.9%(AUC), T_R 7.16min;UV(MeOH) λ_{max} 287nm, ϵ 26,027。

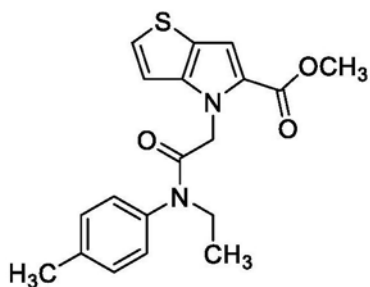
[0840] 实施例68

[0841] 反式-4-(4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0334)



[0843] 步骤1. 4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0314)

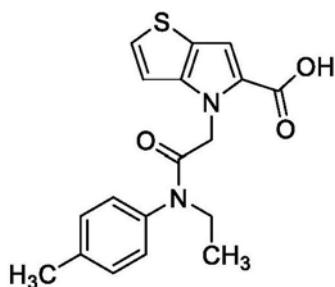
[0844]



[0845] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(100mg,0.42mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加N-乙基-4-甲基苯胺(68mg,0.50mmol)、HATU(318mg,0.84mmol)和二异丙基乙胺(162mg,1.25mmol)。将反应加热至85℃持续18小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色泡沫的所需产物(120mg,80%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.33-7.18(m,5H),7.16(s,1H),6.80(d,J=5.4,1H),4.95(s,2H),3.84(s,3H),3.74(q,J=7.2,3H),2.40(s,3H),1.12(t,J=7.2,3H);ESI MS m/z 357[M+H]⁺。

[0846] 步骤2. 4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0332)

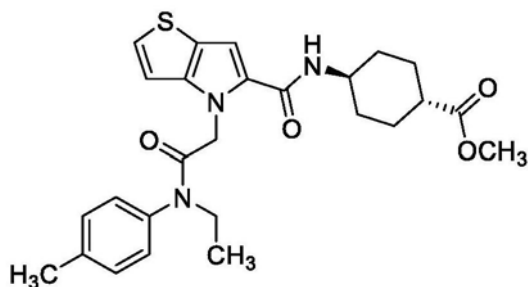
[0847]



[0848] 按照通用程序A,使4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(120mg,0.34mmol)与氢氧化锂(40mg,1.68mmol)反应以得到呈白色固体的粗产物(109mg)。ESI MS m/z 343[M+H]⁺。

[0849] 步骤3. 反式-4-(4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0334)

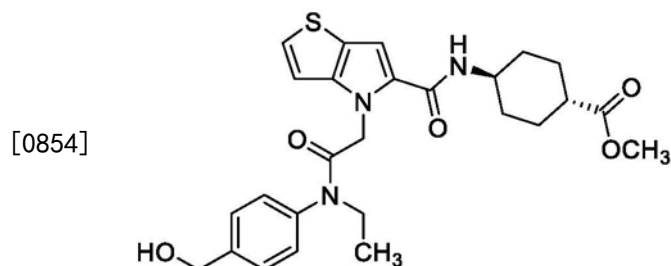
[0850]



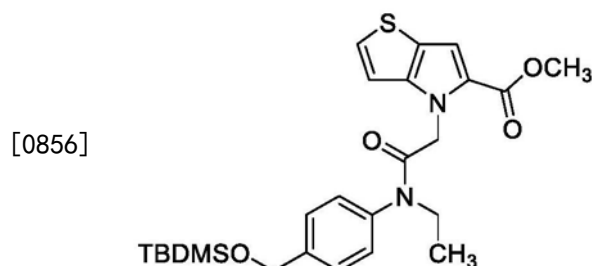
[0851] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(109mg,0.32mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(74mg,0.38mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(131mg,85%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.88(d,J=7.9,1H),7.41-7.25(m,5H),7.12-7.03(m,2H),4.95(s,2H),3.72-3.48(s,6H),2.35(s,3H),2.31-2.19(s,1H),2.01-1.77(m,4H),1.52-1.19(m,4H),1.05-0.94(m,3H);ESI MS m/z 482[M+H]⁺;HPLC 98.0%(AUC),T_R 7.04min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm,ε₂₇,490。

[0852] 实施例69

[0853] 反式-4-(4-(2-(乙基(4-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0335)

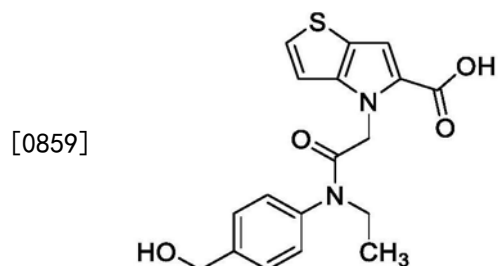


[0855] 步骤1. 4-(2-((4-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0320)



[0857] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(150mg, 0.63mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加4-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-N-乙基苯胺(166mg, 0.63mmol)、HATU(477mg, 1.25mmol)和二异丙基乙胺(243mg, 1.88mmol)。将反应加热至85℃持续30分钟。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈淡黄色泡沫的所需产物(165mg, 54%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 7.31(d, J=8.1, 2H), 7.23-7.11(m, 3H), 7.03(s, 1H), 6.66(d, J=5.3, 1H), 4.82(s, 2H), 4.66(s, 2H), 3.73-3.55(m, 5H), 0.99(t, J=7.2, 3H), 0.83(s, 9H), 0.00(s, 6H); ESI MS m/z 487[M+H]⁺。

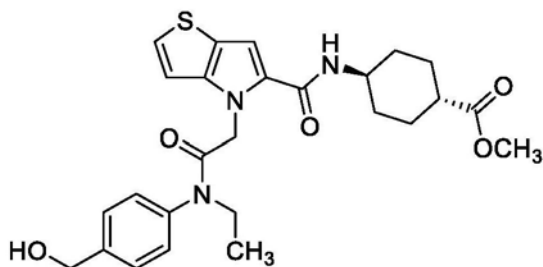
[0858] 步骤2. 4-(2-(乙基(4-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0333)



[0860] 按照通用程序A,使4-(2-((4-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(165mg, 0.34mmol)与氢氧化锂(40mg, 1.68mmol)反应以得到呈白色固体的粗产物(110mg)。ESI MS m/z 359[M+H]⁺。

[0861] 步骤3. 反式-4-(4-(2-(乙基(4-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0335)

[0862]

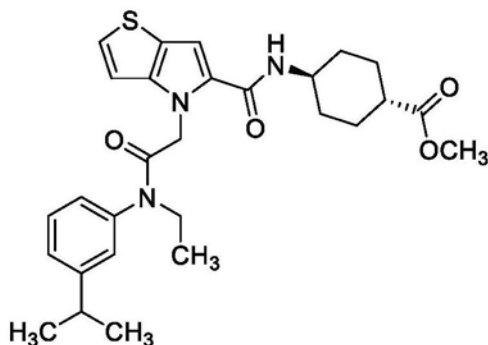


[0863] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(4-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(110mg,0.31mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(71mg,0.37mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(169mg,91%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.89(d,J=7.8,1H),7.52-7.31(m,5H),7.12-7.05(m,2H),5.30-5.21(m,1H),4.95(s,2H),4.54(d,J=5.6,2H),3.74-3.51(m,6H),2.32-2.18(m,1H),2.00-1.78(m,4H),1.52-1.21(m,4H),1.05-0.94(m,3H);ESI MS m/z 498[M+H]⁺;HPLC 98.7%(AUC),T_R 5.13min;UV(MeOH) λ_{max} 288nm,ε24,103。

[0864] 实施例70

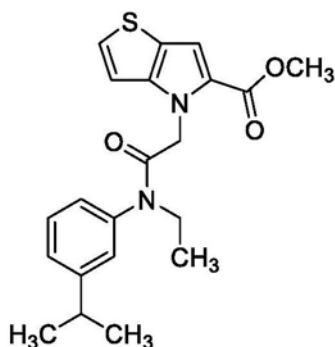
[0865] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0460)

[0866]



[0867] 步骤1. 4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0454)

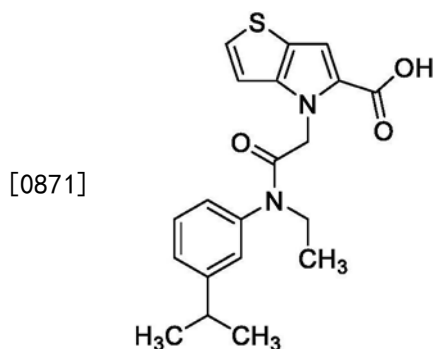
[0868]



[0869] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(110mg,0.46mmol)于DMF(5mL)中的溶液添加N-乙基-3-异丙基苯胺(112mg,0.69mmol)、HATU(350mg,0.92mmol)和二异丙基乙胺(178mg,1.38mmol)。将反应加热至85℃持续1.5小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈橙色油状物的所需产物(147mg,83%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ 7.45-7.34(m,1H),7.31-7.23(m,2H),7.20-7.11(m,3H),

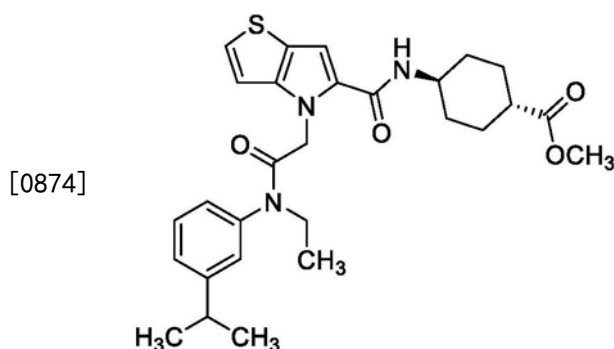
6.80 (d, $J=5.4$, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.83-3.71 (m, 5H), 3.05-2.87 (m, 1H), 1.35-1.25 (m, 6H), 1.18-1.09 (m, 3H); ESI MS m/z 385 $[M+H]^+$ 。

[0870] 步骤2. 4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0457)



[0872] 按照通用程序A,使4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(145mg,0.38mmol)与氢氧化锂(45mg,1.89mmol)反应以得到呈淡褐色固体的粗产物(134mg)。ESI MS m/z 371 $[M+H]^+$ 。

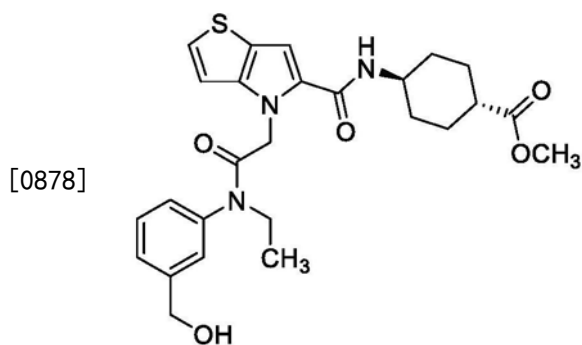
[0873] 步骤3. 反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0460)



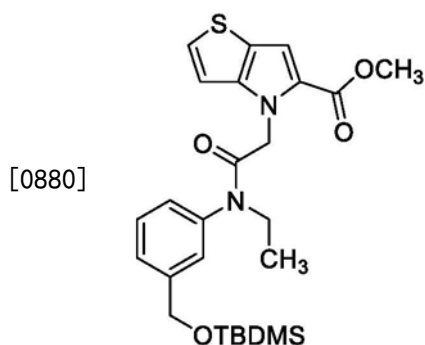
[0875] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(130mg,0.35mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(102mg,0.53mmol)反应以得到呈白色固体的所需产物(135mg,75%)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 7.91 (d, $J=7.9$, 1H), 7.48-7.33 (m, 3H), 7.32-7.19 (m, 2H), 7.12-7.03 (m, 2H), 4.93 (s, 2H), 3.73-3.52 (m, 6H), 3.04-2.87 (m, 1H), 2.33-2.18 (m, 1H), 2.00-1.78 (m, 4H), 1.51-1.18 (m, 10H), 1.08-0.95 (m, 3H); ESI MS m/z 510 $[M+H]^+$; HPLC 98.8% (AUC), T_R 7.61min; UV (MeOH) λ_{max} 289nm, ϵ 23,933。

[0876] 实施例71

[0877] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0461)

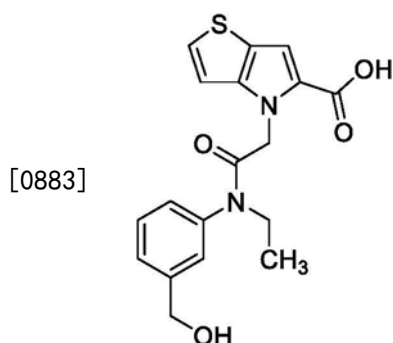


[0879] 步骤1: 4-(2-((3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯 (JRW-0455)



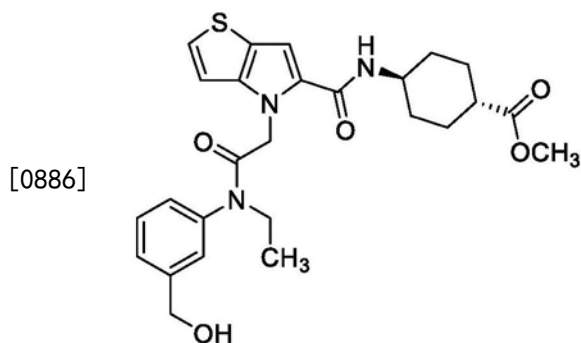
[0881] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸 (120mg, 0.50mmol) 于 DMF (5mL) 中的溶液添加3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-N-乙基苯胺 (200mg, 0.75mmol)、HATU (381mg, 1.0mmol) 和二异丙基乙胺 (194mg, 1.50mmol)。将反应加热至85℃持续1.5小时。将反应混合物冷却, 用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法 (二氧化硅, 庚烷/乙酸乙酯) 纯化残余物以得到呈无色油状物的所需产物 (156mg, 63%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.31 (t, J=7.8, 1H), 7.24-7.17 (m, 1H), 7.18-7.06 (m, 3H), 7.02 (s, 1H), 6.66 (d, J=5.2, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 3.71-3.54 (m, 5H), 0.99 (t, J=6.9, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.00 (s, 6H); ESI MS m/z 487 [M+H]⁺。

[0882] 步骤2. 4-(2-(乙基(3-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸 (JRW-0458)



[0884] 按照通用程序A, 使4-(2-((3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯 (156mg, 0.32mmol) 与氢氧化锂 (38mg, 1.60mmol) 反应以得到呈白色固体的粗产物 (150mg)。ESI MS m/z 359 [M+H]⁺。

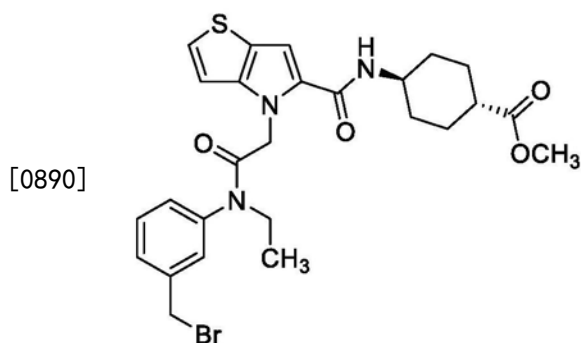
[0885] 步骤3.反式-4-(4-(2-(乙基(3-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0461)



[0887] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(3-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(150mg,0.42mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(121mg,0.63mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(126mg,60%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.90(d,J=8.0,1H),7.54-7.27(m,5H),7.13-7.03(m,2H),5.33-5.24(s,1H),4.96(s,2H),4.56(d,J=5.5,2H),3.73-3.52(m,6H),2.31-2.18(m,1H),1.99-1.78(m,4H),1.53-1.21(m,4H),1.07-0.94(m,3H);ESI MS m/z 498[M+H]⁺;HPLC 97.2%(AUC),T_R 5.23min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm,ε25,856。

[0888] 实施例72

[0889] 反式-4-(4-(2-((3-(溴甲基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0466)

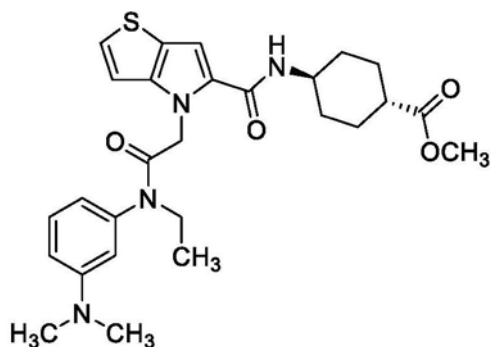


[0891] 向四溴化碳(333mg,1.0mmol)和三苯基膦(263mg,1.0mmol)于THF(5mL)中的溶液添加THF(5mL)中的反式-4-(4-(2-(乙基(3-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(50mg,0.10mmol)。将反应在室温下搅拌48小时。将混合物用DCM稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(11mg,20%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.94-7.86(m,1H),7.72-7.30(m,5H),7.19-6.97(m,2H),4.96(s,2H),4.74(s,2H),3.76-3.49(m,6H),2.37-2.17(m,1H),2.05-1.75(m,4H),1.55-1.19(m,4H),1.10-0.95(m,3H);ESI MS m/z 562[M+H]⁺;HPLC 87.2%(AUC),T_R 6.96min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm,ε20,648。

[0892] 实施例73

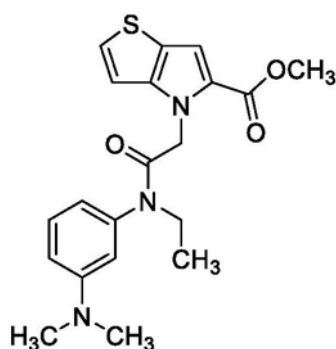
[0893] 反式-4-(4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0478)

[0894]



[0895] 步骤1: 4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0475)

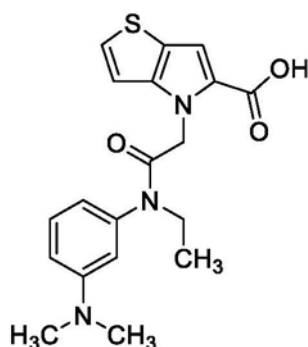
[0896]



[0897] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(115mg, 0.48mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加N1-乙基-N3,N3-二甲基苯-1,3-二胺(118mg, 0.72mmol)、HATU(365mg, 0.96mmol)和二异丙基乙胺(186mg, 1.44mmol)。将反应加热至85℃持续1小时。将反应混合物冷却,用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈黄色固体的所需产物(152mg, 82%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.23(m, 2H), 7.14(s, 1H), 6.85-6.60(m, 4H), 5.05(s, 3H), 3.89-3.61(m, 5H), 3.02(s, 6H), 1.29-0.97(m, 3H); ESI MS m/z 386[M+H]⁺。

[0898] 步骤2. 4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0476)

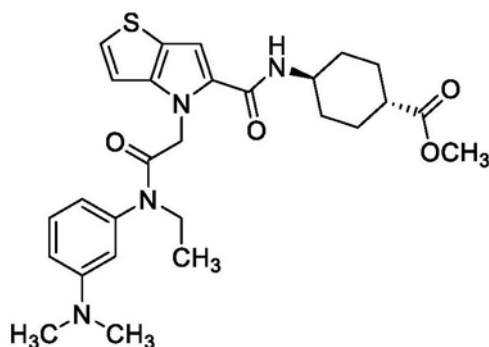
[0899]



[0900] 按照通用程序A,使4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(160mg, 0.42mmol)与氢氧化锂(50mg, 2.1mmol)反应以得到呈淡绿色固体的粗产物(130mg)。ESI MS m/z 372[M+H]⁺。

[0901] 步骤3. 反式-4-(4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0478)

[0902]

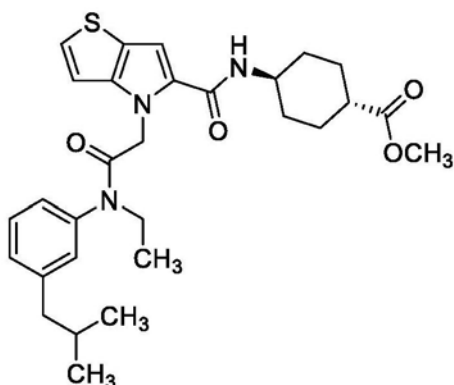


[0903] 按照通用程序B,使4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(130mg,0.35mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(102mg,0.53mmol)反应以得到呈灰白色固体的所需产物(132mg,74%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 7.91(d,J=7.9,1H),7.35(d,J=5.4,1H),7.28(t,J=7.9,1H),7.11-7.04(m,2H),6.86-6.65(m,3H),5.01(s,2H),3.74-3.51(m,6H),2.95(s,6H),2.32-2.19(s,1H),2.01-1.79(m,4H),1.49-1.25(m,4H),1.00(t,J=7.1,3H);ESI MS m/z 511[M+H]⁺;HPLC 97.8%(AUC),T_R 5.21min;UV(MeOH) λ_{max} 289nm,ε29,909。

[0904] 实施例74

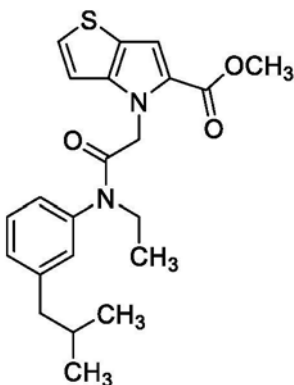
[0905] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0508)

[0906]



[0907] 步骤1. 4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0502)

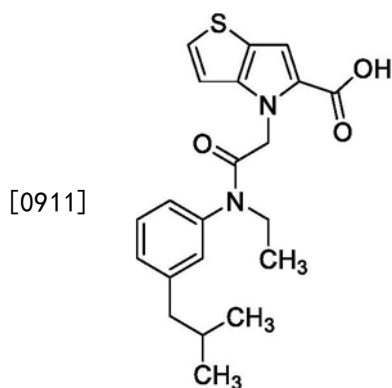
[0908]



[0909] 向2-(5-(甲氧基羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)乙酸(100mg,0.42mmol)于DMF(3mL)中的溶液添加N-乙基-3-异丁基苯胺(89mg,0.50mmol)、HATU(318mg,0.84mmol)和

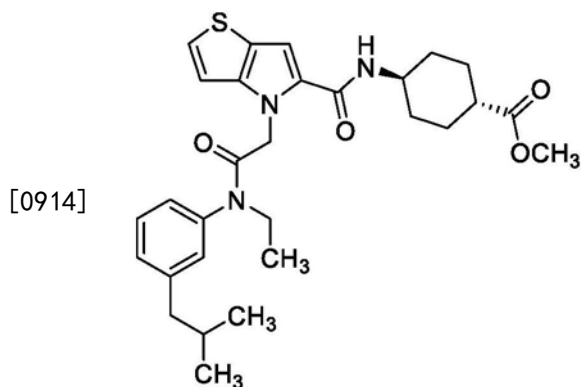
二异丙基乙胺 (162mg, 1.25mmol)。将反应加热至85℃持续4小时。将反应混合物冷却, 用乙酸乙酯稀释并用水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法 (二氧化硅, 庚烷/乙酸乙酯) 纯化残余物以得到呈粘稠油状物的所需产物 (128mg, 77%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.38 (t, J=7.7, 1H), 7.28 (d, J=5.4, 1H), 7.21-7.13 (m, 3H), 7.13-7.09 (m, 1H), 6.79 (d, J=4.8, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.84-3.69 (m, 5H), 2.54 (d, J=7.2, 2H), 1.98-1.82 (m, 1H), 1.13 (t, J=7.2, 3H), 0.92 (t, J=6.1, 6H); ESI MS m/z 399[M+H]⁺。

[0910] 步骤2. 4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸 (JRW-0505)



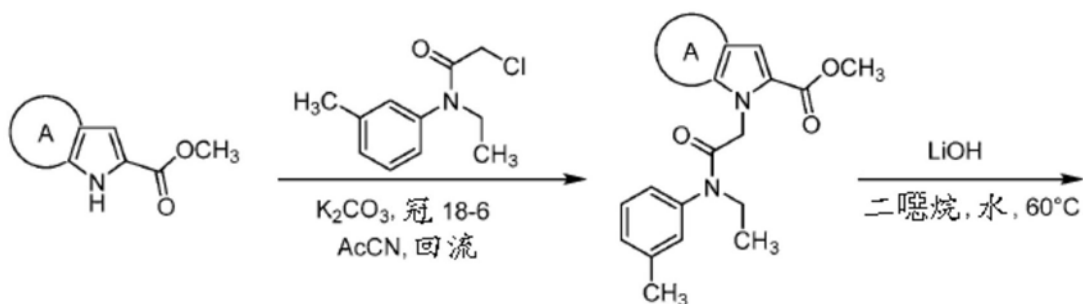
[0912] 按照通用程序A, 使4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯 (120mg, 0.30mmol) 与氢氧化锂 (36mg, 1.5mmol) 反应以得到呈淡黄色固体的粗产物 (125mg)。ESI MS m/z 385[M+H]⁺。

[0913] 步骤3. 反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯 (JRW-0508)

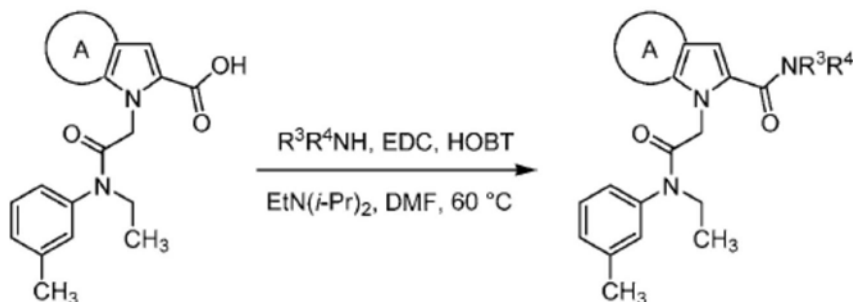


[0915] 按照通用程序B, 使4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸 (120mg, 0.42mmol) 与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯 (90mg, 0.47mmol) 反应以得到呈白色固体的所需产物 (130mg, 80%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 7.90 (d, J=7.9, 1H), 7.47-7.13 (m, 5H), 7.12-7.04 (m, 2H), 4.93 (s, 2H), 3.72-3.52 (m, 6H), 2.57-2.46 (m, 2H), 2.32-2.19 (m, 1H), 2.00-1.79 (m, 5H), 1.50-1.20 (m, 4H), 1.06-0.94 (m, 3H), 0.86 (d, J=6.6, 6H); ESI MS m/z 524[M+H]⁺; HPLC >99% (AUC), T_R 6.73min; UV (MeOH) λ_{max} 289nm, ε 19,115。

[0916] 方案6.



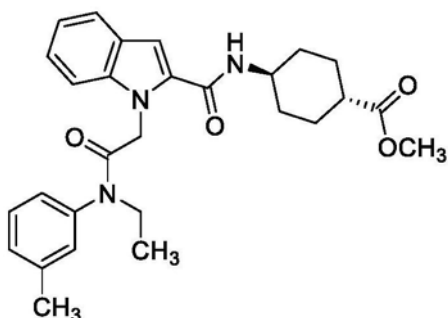
[0917]



[0918] 实施例75

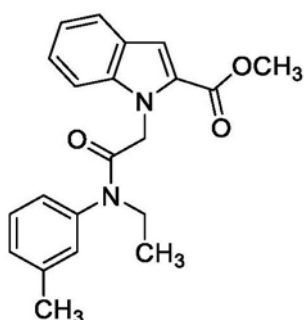
[0919] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0355)

[0920]



[0921] 步骤1. 1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酸甲酯(JRW-0349)

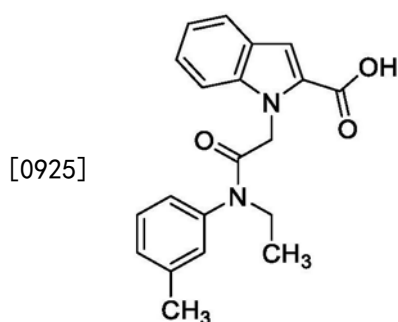
[0922]



[0923] 向1H-吡咯-2-甲酸甲酯(100mg, 0.57mmol)于乙腈(5mL)中的溶液添加碳酸钾(94mg, 0.68mmol)、18-冠-6醚(7mg, 0.03mmol)和2-氯-N-乙基-N-(间甲苯基)乙酰胺(120mg, 0.57mmol)。将悬浮液加热至75°C持续18小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(108mg, 54%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.65 (d, J=8.0, 1H), 7.44-7.07 (m, 8H), 5.05 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.78-3.68 (m,

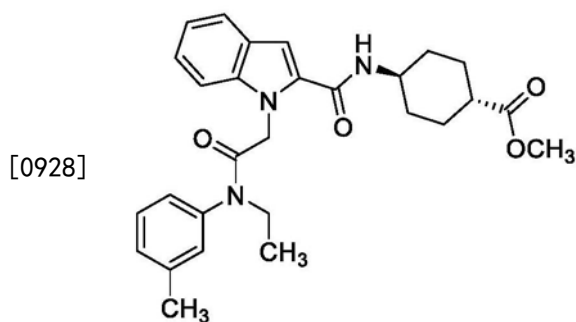
2H), 2.43 (s, 3H), 1.12 (t, J=7.2, 3H); ESI MS m/z 351 [M+H]⁺。

[0924] 步骤2. 1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸 (JRW-0353)



[0926] 按照通用程序A, 使1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸甲酯 (108mg, 0.31mmol) 与氢氧化锂 (37mg, 1.54mmol) 反应以得到呈白色固体的粗产物 (103mg)。ESI MS m/z 337 [M+H]⁺。

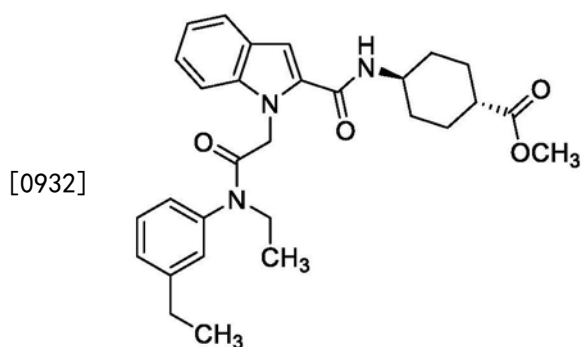
[0927] 步骤3. 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯 (JRW-0355)



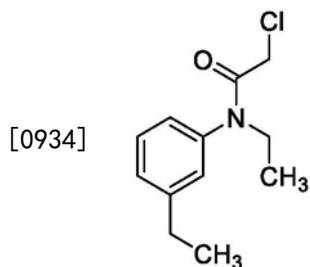
[0929] 按照通用程序B, 使1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸 (103mg, 0.31mmol) 与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯 (71mg, 0.37mmol) 反应以得到呈白色泡沫的所需产物 (133mg, 91%)。ESI MS m/z 476 [M+H]⁺。

[0930] 实施例76

[0931] 反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯 (JRW-0424)

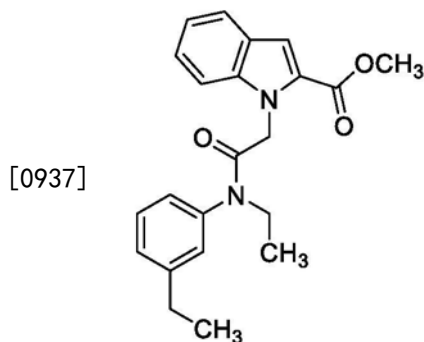


[0933] 步骤1. 2-氯-N-乙基-N-(3-乙基苯基)乙酰胺 (JRW-0413)



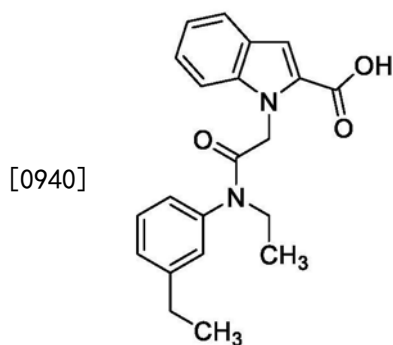
[0935] 向N-乙基-3-乙基苯胺(0.97g,6.50mmol)于乙酸乙酯(30mL)中的溶液添加水(10mL)。将双相溶液冷却至0℃,并且一次性添加氢氧化钾(1.09g,19.5mmol)。在10分钟内逐滴添加2-氯乙酰氯(1.10g,0.76mL,9.75mmol)。将所述混合物搅拌1小时,用水稀释,并用乙酸乙酯萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液以得到呈可流动油的粗产物(1.54g)。ESI MS m/z 226[M+H]⁺。

[0936] 步骤2. 1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸甲酯(JRW-0416)



[0938] 向1H-吡啶-2-甲酸甲酯(582mg,3.3mmol)于乙腈(20mL)中的溶液添加碳酸钾(551mg,4.0mmol)、18-冠-6醚(44mg,0.17mmol)、2-氯-N-乙基-N-(3-乙基苯基)乙酰胺(750mg,3.3mmol)。将悬浮液加热至75℃持续18小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈淡褐色固体的所需产物(0.74g,61%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ7.65(d, J=8.1, 1H), 7.50-7.07(m, 8H), 5.06(s, 2H), 3.87(s, 3H), 3.82-3.69(m, 4H), 2.78-2.63(m, 2H), 1.35-1.24(m, 3H), 1.18-1.06(m, 3H); ESI MS m/z 365[M+H]⁺。

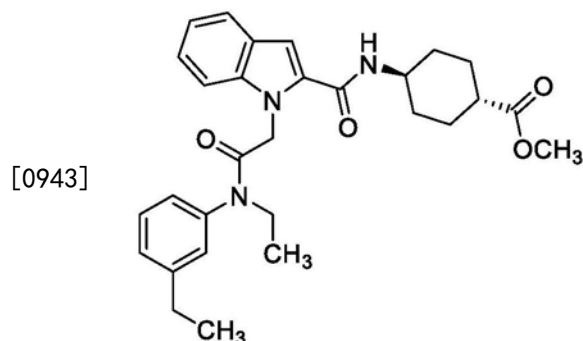
[0939] 步骤3. 1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸(JRW-0419)



[0941] 按照通用程序A,使1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸甲酯(740mg,2.0mmol)与氢氧化锂(243mg,10.1mmol)反应以得到呈白色固体的粗产物

(690mg)。ESI MS m/z 350 $[M+H]^+$ 。

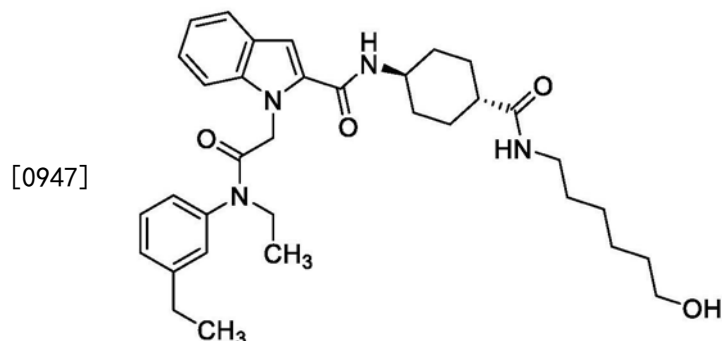
[0942] 步骤4. 反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰胺基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0424)



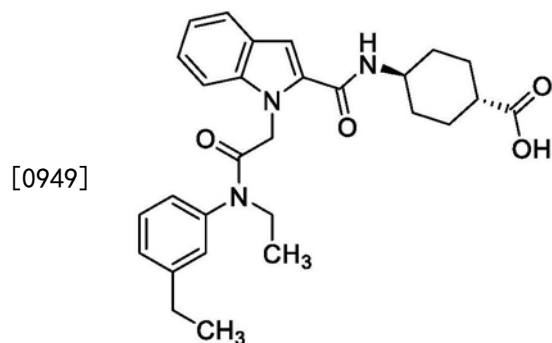
[0944] 按照通用程序B,使1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸(690mg,1.97mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(457mg,2.36mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(760mg,79%)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 8.20 (d, $J=7.9$, 1H), 7.58 (d, $J=7.9$, 1H), 7.51-7.13 (m, 6H), 7.13-7.02 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 3.77-3.54 (m, 6H), 2.69 (d, $J=7.6$, 2H), 2.33-2.21 (m, 1H), 2.02-1.81 (m, 4H), 1.52-1.30 (m, 4H), 1.23 (t, $J=7.6$, 3H), 1.08-0.95 (m, 3H); ESI MS m/z 490 $[M+H]^+$; HPLC >99% (AUC), T_R 7.56min; UV (MeOH) λ_{max} 291nm, ϵ 15,737

[0945] 实施例77

[0946] 1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-1H-吡啶-2-甲酰胺(JRW-0430)



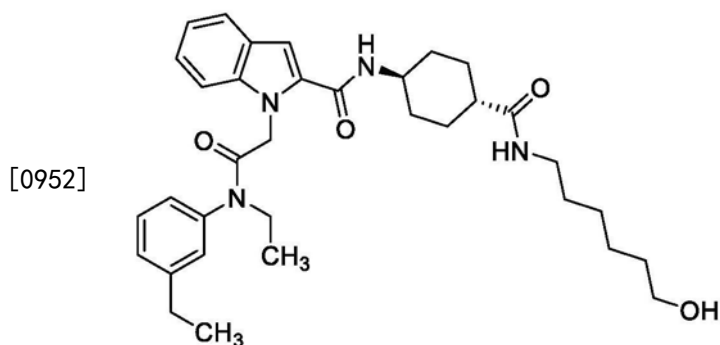
[0948] 步骤1. 反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰胺基)环己烷-1-甲酸(JRW-0428)



[0950] 按照通用程序A,使反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡

哌-2-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯 (720mg, 1.47mmol) 与氢氧化锂 (105mg, 4.4mmol) 反应以得到呈白色固体的粗产物 (680mg)。ESI MS m/z 476 $[M+H]^+$ 。

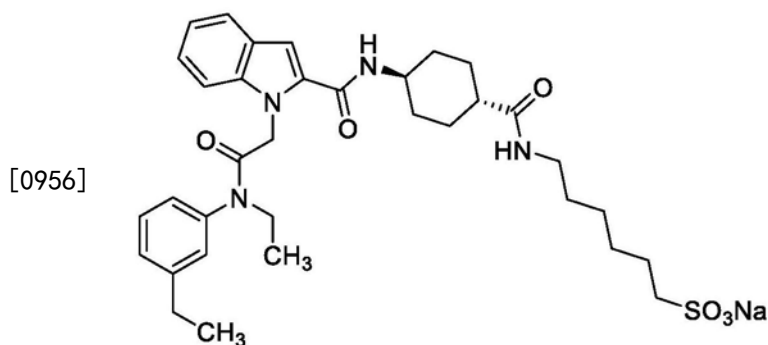
[0951] 步骤2. 1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-1H-吡啶-2-甲酰胺 (JRW-0430)



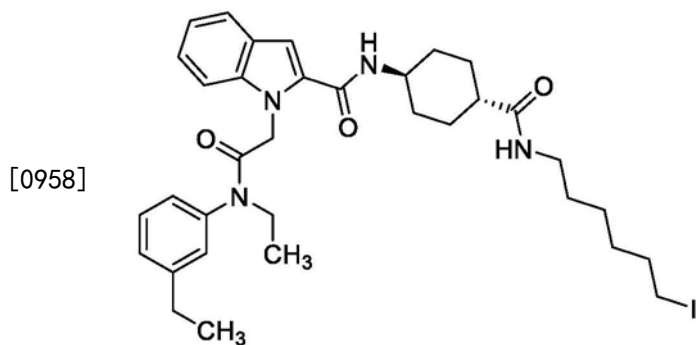
[0953] 按照通用程序B,使反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸 (200mg, 0.42mmol) 与6-氨基己-1-醇 (74mg, 0.63mmol) 反应以得到呈淡黄色泡沫的所需产物 (218mg, 79%)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 8.17 (d, $J=8.0$, 1H), 7.69-7.54 (m, 2H), 7.50-7.14 (m, 6H), 7.13-7.02 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.27 (t, $J=5.2$, 1H), 3.77-3.52 (s, 3H), 3.36 (dd, $J=6.4, 11.7$, 2H), 3.05-2.95 (m, 2H), 2.74-2.63 (m, 2H), 2.13-1.97 (m, 1H), 1.91-1.69 (m, 4H), 1.54-1.15 (m, 15H), 1.09-0.93 (m, 3H); ESI MS m/z 575 $[M+H]^+$; HPLC >99% (AUC), T_R 6.12min; UV (MeOH) λ_{max} 291nm, ϵ 17,243。

[0954] 实施例78

[0955] 6-(反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠 (JRW-0434)

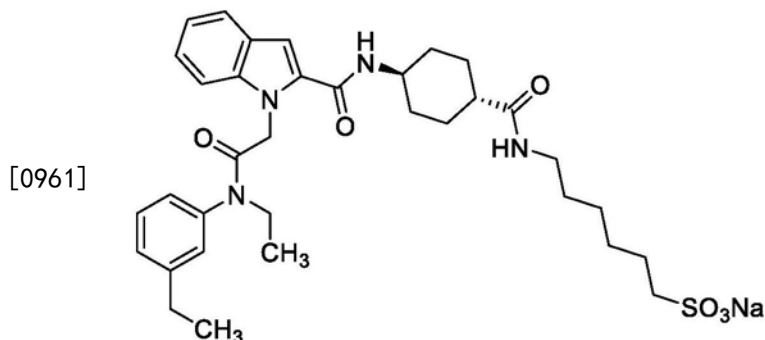


[0957] 步骤1. 1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-碘己基)氨基甲酰基)环己基)-1H-吡啶-2-甲酰胺 (JRW-0433)



[0959] 将咪唑 (66mg, 0.97mmol)、三苯基膦 (254mg, 0.97mmol) 和碘 (246mg, 0.97mmol) 于 THF (10mL) 中的溶液在室温下搅拌10分钟。添加溶解于THF (5mL) 中的1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-1H-吡啶-2-甲酰胺 (186mg, 0.32mmol)。将溶液在室温下搅拌1小时。将反应用乙酸乙酯稀释并用10%Na₂S₂O₃溶液淬灭。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层用10%Na₂S₂O₃溶液和盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)部分纯化残余物以得到呈白色固体的粗产物。ESI MS m/z 685 [M+H]⁺。

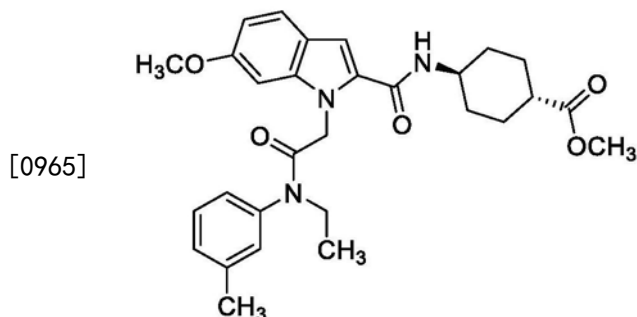
[0960] 步骤2. 6-(反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己基)-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠(JRW-0434)



[0962] 向1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-碘己基)氨基甲酰基)环己基)-1H-吡啶-2-甲酰胺 (0.32mmol) 于乙醇 (10mL) 中的溶液添加亚硫酸钠 (203mg, 1.6mmol) 和水 (10mL)。将混合物加热至75℃持续2小时。将反应浓缩,并且通过柱色谱法(二氧化硅,二氯甲烷/甲醇)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物 (190mg, 89%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 8.21 (d, J=8.2, 1H), 7.69 (t, J=5.6, 1H), 7.58 (d, J=7.8, 1H), 7.51-7.14 (m, 6H), 7.12-7.03 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 3.76-3.53 (m, 3H), 3.00 (dd, J=6.6, 12.7, 2H), 2.76-2.61 (m, 2H), 2.39-2.32 (m, 2H), 2.12-1.99 (m, 1H), 1.90-1.70 (m, 4H), 1.61-1.14 (m, 15H), 1.08-0.95 (s, 3H); ESI MS m/z 639 [M+H]⁺; HPLC >99% (AUC), T_R 5.07min; UV (MeOH) λ_{max} 291nm, ε 15,800。

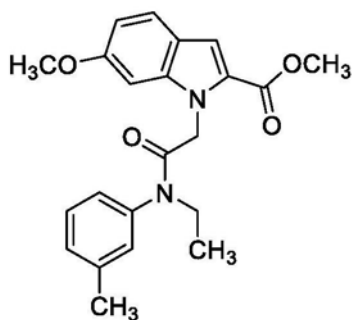
[0963] 实施例79

[0964] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己基)-1-甲酸甲酯(JRW-0359)



[0966] 步骤1. 1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酸甲酯(JRW-0351)

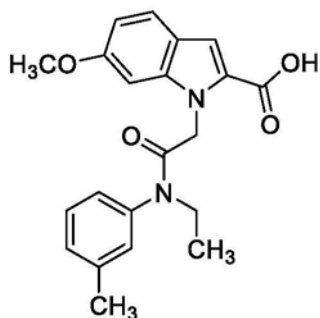
[0967]



[0968] 向6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酸甲酯(116mg, 0.57mmol)于乙腈(5mL)中的溶液添加碳酸钾(94mg, 0.68mmol)、18-冠-6醚(7mg, 0.03mmol)和2-氯-N-乙基-N-(间甲苯基)乙酰胺(120mg, 0.57mmol)。将悬浮液加热至70℃持续2天。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(155mg, 72%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.51 (d, J=8.7, 1H), 7.41-7.31 (m, 1H), 7.24-7.08 (m, 4H), 6.79 (dd, J=2.2, 8.7, 1H), 6.62-6.55 (m, 1H), 5.01 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.81-3.68 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.18-1.09 (m, 3H); ESI MS m/z 381 [M+H]⁺。

[0969] 步骤2. 1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酸(JRW-0357)

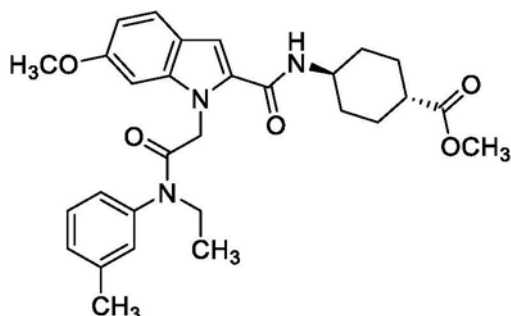
[0970]



[0971] 按照通用程序A,使1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酸甲酯(150mg, 0.39mmol)与氢氧化锂(47mg, 1.97mmol)反应以得到呈白色固体的粗产物(150mg)。ESI MS m/z 367 [M+H]⁺。

[0972] 步骤3. 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0359)

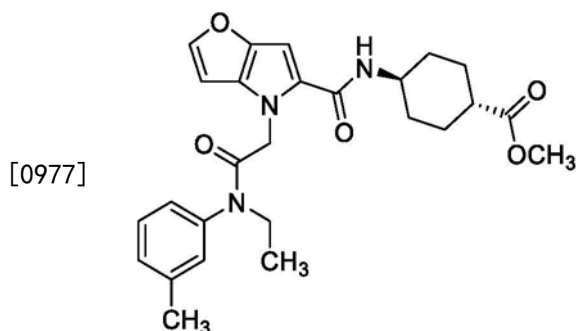
[0973]



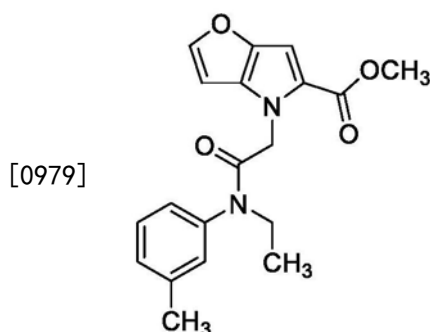
[0974] 按照通用程序B,使1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酸(150mg, 0.41mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(95mg, 0.49mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(163mg, 78%)。ESI MS m/z 506 [M+H]⁺。

[0975] 实施例80

[0976] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-360)

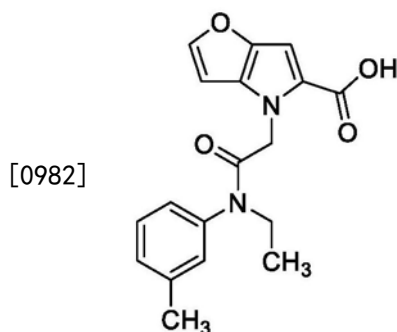


[0978] 步骤1. 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0352)



[0980] 向4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(94mg, 0.57mmol)于乙腈(5mL)中的溶液添加碳酸钾(94mg, 0.68mmol)、18-冠-6醚(7mg, 0.03mmol)和2-氯-N-乙基-N-(间甲苯基)乙酰胺(120mg, 0.57mmol)。将悬浮液加热至70℃持续2天。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(166mg, 86%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, J=2.2, 1H), 7.35 (t, J=7.7, 1H), 7.24-7.17 (m, 1H), 7.16-7.07 (m, 2H), 6.81-6.78 (m, 1H), 6.38-6.36 (m, 1H), 4.86 (s, 2H), 3.85-3.67 (m, 5H), 2.40 (s, 3H), 1.12 (t, J=7.2, 3H); ESI MS m/z 341 [M+H]⁺。

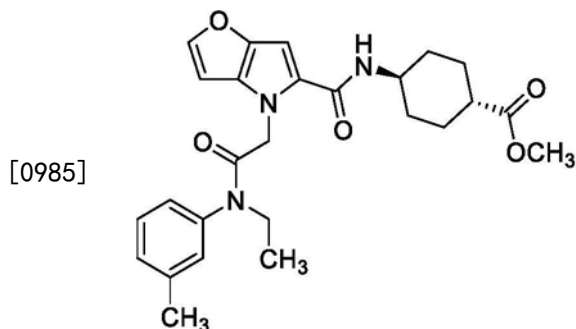
[0981] 步骤2. 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(JRW-358)



[0983] 按照通用程序A,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯(160mg, 0.47mmol)与氢氧化锂(56mg, 2.35mmol)反应以得到呈白色固

体的粗产物(150mg)。ESI MS m/z 327 $[M+H]^+$ 。

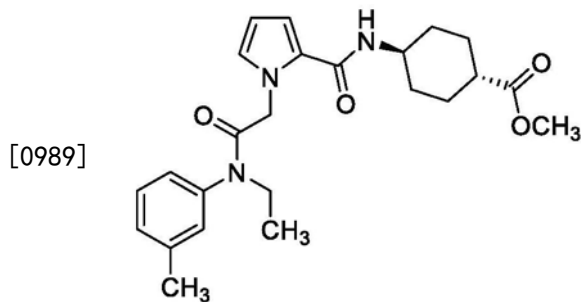
[0984] 步骤3. 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-360)



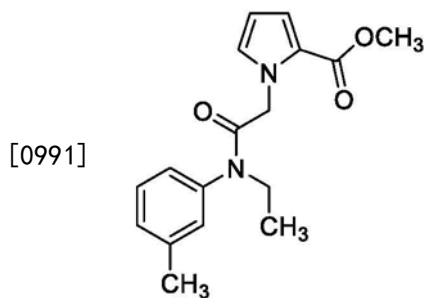
[0986] 按照通用程序B,使4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酸(150mg,0.46mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(106mg,0.55mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(178mg,83%)。ESI MS m/z 466 $[M+H]^+$ 。

[0987] 实施例81

[0988] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0456)



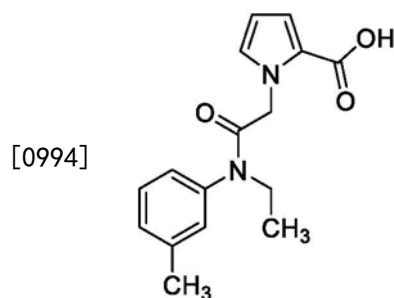
[0990] 步骤1. 1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酸甲酯(JRW-0450)



[0992] 向1H-吡咯-2-甲酸甲酯(295mg,2.36mmol)于乙腈(20mL)中的溶液添加碳酸钾(391mg,2.83mmol)、18-冠-6醚(31mg,0.12mmol)和2-氯-N-乙基-N-(间甲苯基)乙酰胺(500mg,2.36mmol)。将悬浮液加热至75℃持续18小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈透明油状物的所需产物(530mg,75%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 7.35(t, J=7.5, 1H), 7.24-7.10(m, 3H), 6.93(dd, J=1.8, 3.9, 1H), 6.78-6.70(m, 1H), 6.13(dd, J=2.6, 3.9, 1H), 4.77(s, 2H), 3.85-3.61(m, 6H), 2.41(s, 3H), 1.13(t, J=

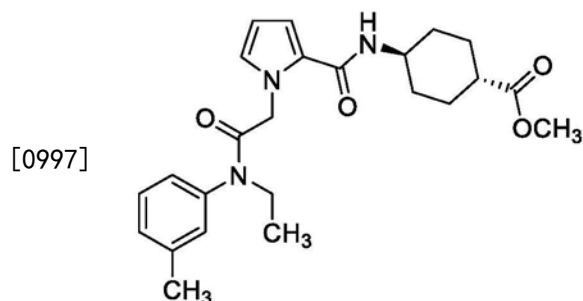
7.2, 3H); ESI MS m/z 301 $[M+H]^+$ 。

[0993] 步骤2. 1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酸(JRW-0453)



[0995] 按照通用程序A, 使1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酸甲酯(530mg, 1.76mmol)与氢氧化锂(211mg, 8.82mmol)反应以得到呈白色固体的粗产物(475mg)。ESI MS m/z 287 $[M+H]^+$ 。

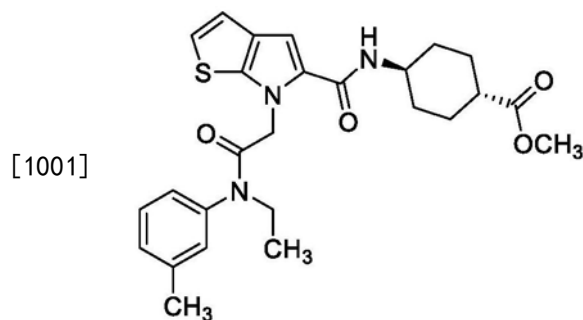
[0996] 步骤3. 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0456)



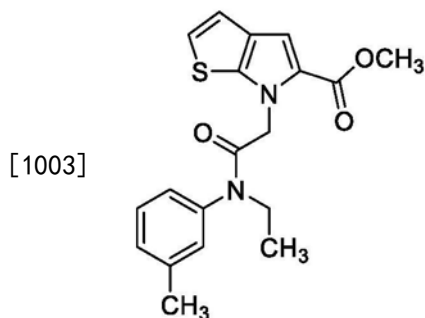
[0998] 按照通用程序B, 使1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酸(475mg, 1.66mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(482mg, 2.49mmol)反应以得到呈白色泡沫的所需产物(505mg, 71%)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 7.62 (d, $J=8.0$, 1H), 7.41-7.30 (m, 1H), 7.26-7.12 (m, 3H), 6.82-6.67 (m, 2H), 5.94 (dd, $J=2.6, 3.8$, 1H), 4.77 (s, 2H), 3.67-3.54 (m, 6H), 2.34 (s, 3H), 2.29-2.18 (s, 1H), 1.98-1.74 (m, 4H), 1.48-1.26 (m, 4H), 1.09-0.92 (m, 3H); ESI MS m/z 426 $[M+H]^+$; HPLC 97.5% (AUC), T_R 6.05min; UV (MeOH) λ_{max} 264nm, ϵ 11,978。

[0999] 实施例82

[1000] 反式-4-(6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0463)

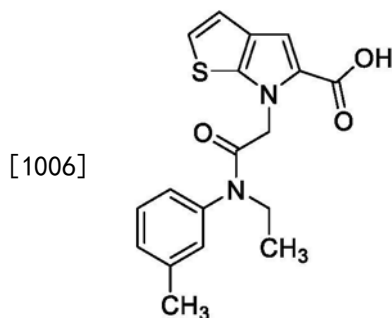


[1002] 步骤1: 6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酸甲酯(JRW-0459)



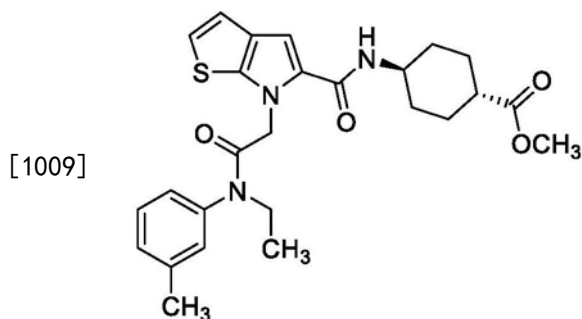
[1004] 向6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酸甲酯(171mg,0.94mmol)于乙腈(10mL)中的溶液添加碳酸钾(157mg,1.1mmol)、18-冠-6醚(13mg,0.047mmol)和2-氯-N-乙基-N-(间甲苯基)乙酰胺(200mg,0.94mmol)。将悬浮液加热至75℃持续18小时。将混合物用乙酸乙酯和水稀释,并分离各层。将有机层经无水硫酸钠干燥并过滤。然后浓缩滤液。通过柱色谱法(二氧化硅,庚烷/乙酸乙酯)纯化残余物以得到呈白色固体的所需产物(260mg,77%)。¹H NMR (300MHz,CDCl₃) δ7.37 (t,J=7.6,1H),7.25-7.09 (m,4H),6.99-6.95 (m,1H),6.91-6.85 (m,1H),4.93 (s,2H),3.92-3.64 (m,5H),2.43 (s,3H),1.14 (t,J=7.2,4H);ESI MS m/z 357[M+H]⁺。

[1005] 步骤2. 6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酸(JRW-0462)



[1007] 按照通用程序A,使6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酸甲酯(260mg,0.73mmol)与氢氧化锂(87mg,3.6mmol)反应以得到呈白色固体的粗产物(240mg)。ESI MS m/z 342[M+H]⁺。

[1008] 步骤3.反式-4-(6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯(JRW-0463)



[1010] 按照通用程序B,使6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酸(240mg,0.70mmol)与反式-4-氨基环己烷-1-甲酸甲酯(203mg,1.05mmol)反应以得到呈淡黄色泡沫的所需产物(320mg,95%)。¹H NMR (300MHz,DMSO-d₆) δ7.88 (d,J=

8.0, 1H), 7.44-7.33 (m, 1H), 7.28-7.14 (m, 3H), 7.11-6.95 (m, 3H), 4.90 (s, 2H), 3.72-3.52 (m, 6H), 2.36 (s, 3H), 2.25 (s, 1H), 2.02-1.76 (m, 4H), 1.51-1.20 (m, 4H), 1.00 (t, J=6.9, 3H); ESI MS m/z 482 $[M+H]^+$; HPLC >99% (AUC), T_R 7.01min; UV (MeOH) λ_{max} 287nm, ϵ 12,894。

[1011] 实施例83

[1012] 对Nluc荧光素酶的抑制

[1013] 将K562以2000个细胞/孔接种至20 μ L RPMI培养基中的Corning 3707测定板的孔中并孵育过夜。在10 μ L RPMI培养基中制备移迹滴定并添加至细胞。然后将10 μ L 4x REALTIME-GLOTM MT细胞活力试剂 (RTCV; Promega公司) 或培养基 (对照) 添加至每个孔。将反应在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下在不同时间点孵育, 并在Tecan M1000Pro板读取器上测量发光。在5小时时, 在有或无200 μ M JRW-0004的情况下添加40 μ L **CASPASE-GLO[®]3/7**检测试剂 (Promega公司)。将反应在室温 (RT) 下孵育2小时, 并在Tecan M1000Pro板读取器上测量发光。图1展示JRW-0004能够抑制REALTIME-GLOTM MT细胞活力试剂中的Nluc酶, 且因此在组合REALTIME-GLOTM测定和**CASPASE-GLO[®]**测定的多重中恢复**CASPASE-GLO[®]**测定窗口。

[1014] 实施例84

[1015] 对纯化的Nluc荧光素酶的抑制

[1016] 在Corning 3570测定板中, 添加纯化的Nluc酶 (Promega公司)、20mM DTT和Nluc前-底物 (PBI-4442, 其描述于美国专利公布号2013/0130289中), 所述Nluc前-底物在被DTT还原时转化为Nluc底物。然后制备JRW-0004、JRW-0013、JRW-0006、JRW-0042、JRW-0138和JRW-0147的化合物滴定 (在PBS中1:2连续稀释, 11点加无抑制剂对照, 以200 μ M开始; 在反应中100 μ M最终浓度)。将化合物滴定以相等体积添加至测定板的孔中。将反应在室温下孵育2小时, 并在Tecan M1000Pro板读取器上测量发光。使用GraphPad Prism 6.03测定半最大抑制剂 (噻吩并吡咯化合物) 浓度 (IC₅₀)。图2展示所有化合物都能够抑制纯化的Nluc酶。

[1017] 实施例85

[1018] 抑制Nluc荧光素酶的特异性

[1019] 以下实施例描述了公开的噻吩并吡咯化合物JRW-0004、JRW-0013、JRW-0006、JRW-0042、JRW-0138和JRW-0147抑制Nluc荧光素酶活性对比萤火虫荧光素酶活性 (例如, **ULTRAGLO[®]** 荧光素酶) 的特异性。在Corning 3570测定板中, 将荧光素酶检测试剂 (Promega公司V865/859) 中的含有1 μ M荧光素的溶液添加至测定孔。然后将相等体积的滴定, 噻吩并吡咯化合物JRW-0004、JRW-0013、JRW-0006、JRW-0042、JRW-0138和JRW-0147添加至所述孔。将反应在室温下孵育2小时, 并在Tecan M1000Pro板读取器上测量发光。图3展示噻吩并吡咯化合物不抑制萤火虫荧光素酶活性。

[1020] 实施例86

[1021] 噻吩并吡咯化合物实现复用

[1022] 以下实施例描述了本发明的噻吩并吡咯化合物允许利用Nluc荧光素酶和另一种荧光素酶 (例如萤火虫荧光素酶) 的测定的复用的用途。

[1023] A) 在Corning 3570测定板中, 将MCF7细胞以1,000个细胞/孔接种于20 μ L细胞培养基 (补充有0.01mg/mL人重组胰岛素和10%胎牛血清的EMEM) 中并孵育过夜。将10 μ L的培养

基中的4x REALTIME-GLO™ MT细胞活力试剂(Promega公司)或仅10μL培养基添加至细胞。将10μL的培养基中的40μM星形孢菌素或仅10μL培养基(对照)添加至细胞。孵育细胞,并在试剂添加后5.5小时监测半胱天冬酶活化。为了监测半胱天冬酶活化,添加40μL **CASPASE-GLO®3/7**测定试剂(Promega公司),独自(半胱天冬酶)或与200μM的JRW-0004、JRW-0013或JRW-0042一起。在室温下孵育反应,并在试剂添加后1小时10分钟在Tecan M1000Pro板读取器上测量发光。

[1024] 表1显示所述化合物与**CASPASE-GLO®**(含有REALTIME-GLO™的培养基)复用来抑制来自REALTIME-GLO™的背景发光。当比较从仅培养基中的**CASPASE-GLO®**试剂产生的信号与在含有REALTIME-GLO™试剂的培养基中产生的信号时,信号在多重反应中较高。所述化合物抑制Nluc酶并减少来自REALTIME-GLO™试剂的背景发光。

[1025] 表1

[1026]

	MCF7							
	仅培养基				含有实时-Glo 的培养基			
	对照		10 μM Stauro		对照		10 μM Stauro	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
半胱天冬酶	7448	1076	51670	7299	38144	3853	85801	6888
倍数对照			6.94				2.25	
JRW-0004	9261	1017	54589	9231	9090	161	50266	3766
倍数对照			5.89				5.53	
JRW-0013	8069	2461	55282	13491	8636	1777	54338	6157
倍数对照			6.85				6.29	
JRW-0042	10718	1269	62280	6594	10679	1747	53956	4432
倍数对照			5.81				5.05	

[1027] B) 将A549细胞以1,000个细胞/孔接在20μL F12K培养基中接种至Corning 3570板(n=4)的孔中并孵育过夜。然后,将REALTIME-GLO™ MT细胞活力测定试剂(Promega公司)作为20μL培养基中的2x溶液添加至孔。将反应孵育1小时。添加40μL的在2倍浓度下的**CASPASE-GLO®3/7**测定试剂(Promega公司)中的JRW-0013或JRW-0147的滴定。将反应在室温下孵育,并在1小时时测定发光。

[1028] 表2展示这些化合物可以剂量依赖性方式在与**CASPASE-GLO®**测定复用的REALTIME-GLO™ MT细胞活力测定中抑制Nluc酶。

[1029] 表2

[1030]	抑制 剂	半胱天冬酶, JRW-0013			半胱天冬酶, JRW-0147		
	μM, 最终	平均 值	SD	残余%	平均值	SD	残余%
	100	3619	454	6.10%	3389	177	5.71%
	66.67	4017	450	6.77%	3427	51	5.78%
	44.44	4419	35	7.45%	4367	189	7.36%
	29.63	5132	145	8.65%	4394	331	7.41%
	19.75	5095	330	8.59%	5302	223	8.94%
	13.17	6014	591	10.14%	5545	401	9.35%
	8.78	6703	406	11.30%	7125	533	12.01%
	5.85	8059	801	13.59%	8013	375	13.51%
	3.90	9148	271	15.42%	9790	1213	16.51%
	2.60	11813	679	19.92%	11677	189	19.69%
	1.73	12879	1093	21.71%	15580	1288	26.27%
0	59313	1970	100.00%	59313	1970	100.00%	

[1031] 实施例87

[1032] 以下实施例证明化合物JRW-0004、WZ141-88、WZ141-86、WZ141-74、WZ141-84、WZ141-89、WZ141-90和WZ141-91抑制Nluc荧光素酶。在pH7.5的PBS缓冲液中制备纯化的Nluc和Nluc前-底物(PBI-4442,其在US 2013/0130289中进行了描述)的溶液,所述前-底物在用DTT还原时转化为Nluc底物。还制备了含有1%TERGITOL的PBS (pH 7.5)中DTT的40mM溶液。然后制备了含有DTT和TERGITOL的缓冲液中的噻吩并吡咯化合物JRW-0004、WZ141-88、WZ141-86、WZ141-74、WZ141-84、WZ141-89、WZ141-90和WZ141-91的滴定。将相等体积的Nluc/前-底物溶液添加至测定板的孔中的噻吩并吡咯化合物滴定中。将反应在室温下孵育,并在Tecan M100Pro板读取器上在不同时间点测量发光(积分时间200ms)。使用GraphPad Prism 6.03测定IC₅₀值。图4-6展示所有测试的化合物以剂量和时间依赖性方式抑制Nluc荧光素酶。

[1033] 实施例88

[1034] 细胞渗透性

[1035] 以下实施例证明本文所述的噻吩并吡咯化合物的渗透性。用 β -2肾上腺素能受体-Nluc (B2AR-Nluc) 融合蛋白瞬时转染HEK293或HeLa细胞以在胞质中锚定和定向Nluc。在转染后24小时,用-/ +50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毛地黄皂苷处理细胞以分别模拟活的和溶解的情形。然后,将完整细胞和透化细胞暴露于噻吩并吡咯化合物的化合物反应曲线达2小时。添加10 μM 复立玛津(Promega Corp.)并测量发光。如果噻吩并吡咯化合物(抑制剂)是可渗透的,则活细胞和透化细胞的剂量-反应曲线重叠。然而,如果噻吩并吡咯化合物是不可渗透的,则相对于透化细胞,EC₅₀在活细胞中向右移位。参见图7-11。

[1036] 实施例89

[1037] 对细胞外BRET的抑制

[1038] 以下实施例证明本文所述的噻吩并吡咯化合物抑制细胞外BRET的能力。参见图

12A。用Nluc-HDAC6融合蛋白瞬时转染HEK293以使Nluc-HDAC6在细胞内定向。在转染后24小时,用经NANOBRET618配体标记的10ng/mL纯化的Nluc-HALOTAG处理细胞以模拟假细胞外BRET。然后将细胞暴露于噻吩并吡咯化合物JRW-0013、JRW-0051、JRW-0147和JRW-0187的化合物反应曲线2小时。然后添加10 μ M复立玛津,并测量BRET比率610/450nm。如果噻吩并吡咯化合物如JRW-0013是可渗透的,则BRET比率在化合物剂量-反应曲线上保持恒定。如果噻吩并吡咯化合物如JRW-0051、JRW-0147或JRW-0187是不可渗透的,则BRET比率跨化合物剂量-反应曲线下降,并增强细胞内Nluc信号、同时抑制细胞外BRET。参见图12B-12E。

[1039] 实施例90

[1040] 对细胞外荧光素酶活性的抑制和细胞内BRET的增强

[1041] 以下实施例证明本文描述的噻吩并吡咯化合物抑制细胞外荧光素酶活性、同时增强细胞内BRET的能力。参见图13A。用Nluc-HALOTAG融合蛋白瞬时转染HEK293以使Nluc-HALOTAG在细胞内定向。转染后24小时,用NANOBRET618配体标记细胞以模拟特异性细胞内BRET。然后将细胞用10ng/mL纯化的Nluc处理以模拟假细胞外发光。将细胞暴露于噻吩并吡咯化合物JRW-0013、JRW-0051、JRW-0147和JRW-0187的化合物反应曲线2小时。添加10 μ M复立玛津,并测量BRET比率610/450nm。如果抑制剂如JRW-0013是可渗透的,则BRET比率在化合物剂量-反应曲线上保持恒定。如果抑制剂如JRW-0051、JRW-0147或JRW-0187是不可渗透的,则细胞内BRET比率跨化合物剂量-反应曲线增加,同时抑制假细胞外Nluc信号。参见图13B-13F。

[1042] 实施例91

[1043] 细胞渗透性与生物发光成像

[1044] 将HeLa细胞用 β -2肾上腺素能受体-Nluc (B2AR-Nluc;C-末端Nluc) 或Nluc- β -2肾上腺素能受体 (Nluc-B2AR;N-末端Nluc) 融合蛋白瞬时转染以分别在细胞内或细胞外锚定和定向Nluc。转染后24小时,用-/ +30 μ M的噻吩并吡咯化合物JRW-0147、JRW-0051和JRW-0138处理细胞。添加10 μ M的复立玛津,并通过在Olympus LV200上成像来检测发光。噻吩并吡咯化合物JRW-0147和JRW-0051是不可渗透的并抑制细胞外Nluc且增强细胞内Nluc。化合物JRW-0138是细胞可渗透的并抑制细胞内和细胞外Nluc。参见图14

[1045] 实施例92

[1046] 目标参与模型中不可渗透的噻吩并吡咯化合物的表征

[1047] 用Src-Nluc融合蛋白瞬时转染HEK293细胞。参见图15A。在转染后24小时,用-/ +50 μ g/mL毛地黄皂苷处理细胞以分别模拟活的和溶解的情形。用1 μ M达沙替尼-DY605示踪剂(不可渗透的)标记完整细胞和透化细胞,并用细胞不可渗透的噻吩并吡咯化合物JRW-0147反应曲线处理2小时。添加10 μ M复立玛津,并记录BRET比率610/450nm。图15B-15C证明JRW-0147抑制细胞碎片中的BRET,但不抑制细胞内的BRET。

[1048] 实施例93

[1049] 细胞渗透性时程

[1050] 以下实施例证明本文所述的噻吩并吡咯化合物的渗透性。用Nluc荧光素酶瞬时转染HEK293细胞以使其在胞质中表达。转染后24小时,将细胞暴露于噻吩并吡咯化合物JRW-0147或JRW-0013的化合物反应曲线10分钟、30分钟或120分钟。然后添加10 μ M复立玛津并测量发光。

[1051] 如果噻吩并吡咯化合物(抑制剂)是可渗透的,则化合物将被动地进入细胞并且以与时间无关的剂量依赖性方式减少来自Nluc的RLU,如通过JRW-0013所观察到(图16)。如果噻吩并吡咯化合物(抑制剂)是不可渗透的,则化合物不会主动或被动地进入细胞,并且以与时间无关的剂量依赖性方式,未观察到来自Nluc的RLU的显著变化,如通过JRW-0147所观察到(图16)。

[1052] 实施例94

[1053] 通过与Nluc化学缀合或分子融合来测定内吞作用

[1054] 抗体、蛋白质、受体、药物、药物载体、肽、糖、脂肪酸、纳米颗粒或其它生物分子可与Nluc化学缀合或融合以与本文所述的细胞不可渗透的噻吩并吡咯化合物(抑制剂)组合来测量内吞作用。

[1055] 例如,单克隆抗体(例如Nluc-曲妥珠单抗)可化学缀合并结合至SKBR3细胞表面上表达的HER2受体。细胞不可渗透的Nluc抑制剂可用于抑制细胞外Nluc-曲妥珠单抗。在添加腔肠素底物时,信号测定的增益可用于动力学地测量主动/被动内化的曲妥珠单抗-Nluc-HER2受体,其可延伸至其它抗体、蛋白质、受体、药物、药物载体、肽、糖、脂肪酸、纳米颗粒或与Nluc化学缀合的其它生物分子。

[1056] 在另一个实例中,Nluc-GPCR(例如,Nluc-B2AR)可遗传地融合并在哺乳动物细胞中表达。如本文所述的细胞不可渗透的噻吩并吡咯化合物(抑制剂)可用于抑制细胞外或膜结合的Nluc-B2AR。在添加腔肠素底物时,信号测定的增益可用于动力学地测量主动/被动内化或再循环的Nluc-GPCR,其可延伸至与Nluc基因融合的有关蛋白质或受体。

[1057] 实施例95

[1058] 抑制Nluc荧光素酶的特异性

[1059] 以下实施例描述了公开的噻吩并吡咯化合物JRW-0251、JRW-0344和JRW-0147抑制Nluc荧光素酶活性对比萤火虫荧光素酶活性(例如,ULTRAGLO®荧光素酶)的特异性。在Corning 3570测定板中,将荧光素酶检测试剂(Promega公司V865/859)中的含有1 μ M荧光素的溶液添加至测定孔。然后将相等体积的滴定,噻吩并吡咯化合物JRW-0251、JRW-0344和JRW-0147添加至所述孔。将反应在室温下孵育2小时,并在Tecan M1000Pro板读取器上测量发光。表3展示噻吩并吡咯化合物不抑制萤火虫荧光素酶活性。

[1060] 表3

[1061]

[化合物], μM	Nluc								
	JRW-0147			JRW-0251			JRW-0344		
	平均值	SD	S/B	平均值	SD	S/B	平均值	SD	S/B
200	2372 2	4826	0.2 0	2331 1	208	0.2 0	16291	559	0.1 5
100	3270 2	7220	0.2 7	3438 9	977	0.3 0	23445	193 0	0.2 1
50	4263 0	9430	0.3 6	4421 9	809	0.3 9	32113	321 5	0.2 9
25	5449 8	1339 8	0.4 6	5521 0	175 7	0.4 8	40392	325 0	0.3 6
12.5	6648 0	1730 1	0.5 6	6866 4	271 0	0.6 0	52627	530 2	0.4 7
6.25	7919 1	1907 0	0.6 7	8119 3	176 2	0.7 1	65136	474 2	0.5 9
3.125	9625 6	5190	0.8 1	8655 5	162 5	0.7 6	71976	473 0	0.6 5
1.5625	1033 99	1432	0.8 7	9660 2	228 0	0.8 4	83141	600 7	0.7 5
0.78125	1116 03	2902	0.9 4	1058 81	466 4	0.9 2	95060	645 7	0.8 6
0.390625	1132 78	2111	0.9 5	1060 75	788	0.9 3	99851	532 7	0.9 0
0.1953125	1154 42	1723	0.9 7	1086 34	436	0.9 5	102409	637 5	0.9 2
0	1190 61	5586	1.0 0	1144 94	120 3	1.0 0	110876	634 7	1.0 0
[化合物], μM	UltraGlo 荧光素酶								
	JRW-0147			JRW-0251			JRW-0344		
	平均值	SD	S/B	平均值	SD	S/B	平均值	SD	S/B
200	7803 5	4010	0.9 0	7778 8	618	0.9 2	77230. 33	132 6	0.9 3
100	8063 6	3824	0.9 3	7955 6	842	0.9 4	79847. 67	842	0.9 6

[1062]

50	8110 6	3963	0.9 4	8193 0	632	0.9 7	81805. 00	791	0.9 8
25	8403 3	3435	0.9 7	8338 2	780	0.9 9	83084. 00	711	1.0 0
12.5	8329 1	2687	0.9 7	8356 9	583	0.9 9	82454. 67	723	0.9 9
6.25	8328 2	2956	0.9 7	8366 5	969	0.9 9	83064. 33	805	1.0 0
3.125	8225 2	1230	0.9 5	8112 5	240	0.9 6	80134. 33	350	0.9 6
1.5625	8366 8	949	0.9 7	8237 0	308	0.9 8	81368. 33	812	0.9 8
0.78125	8407 2	1686	0.9 7	8281 2	745	0.9 8	82135. 67	120 3	0.9 9
0.39062 5	8408 7	1748	0.9 7	8272 3	175 2	0.9 8	82945. 67	115 4	1.0 0
0.19531 25	8556 1	2108	0.9 9	8305 9	102 4	0.9 8	83526. 33	832	1.0 0
0	8630 0	1882	1.0 0	8442 6	128 9	1.0 0	83352. 67	178 1	1.0 0

[1063] 实施例96

[1064] 噻吩并吡咯化合物实现复用

[1065] 以下实施例描述了本发明的噻吩并吡咯化合物允许利用Nluc荧光素酶和另一种荧光素酶(例如萤火虫荧光素酶)的测定的复用的用途。

[1066] 在Corning 3570测定板中,在40 μ L DMEM培养基(n=3)中制备1x REAL-TIME-GLOTM MT细胞活力测定试剂,并孵育过夜。接下来,添加40 μ L的JRW-0147或JRW-0344的滴定(在CASPASE-GLO[®] 3/7测定试剂(Promega公司)中2倍浓度)。将反应在室温下孵育,并在1小时时测定发光。

[1067] 表4显示所述化合物与CASPASE-GLO[®] 测定(含有REALTIME-GLOTM试剂的培养基)复用来抑制来自REALTIME-GLOTM测定的背景发光。所述化合物抑制Nluc酶并减少来自REALTIME-GLOTM试剂的背景发光。

[1068] 表4

[1069]

1 小时	JRW-0147			JRW-0344		
[化合物], 最终 μM	平均值	SD	S/B	平均值	SD	S/B
100	6568	1159	0.05	5523	956	0.03
50	8136	700	0.06	6790	802	0.04
25	10699	1130	0.08	9761	674	0.06
12.5	17293	2129	0.12	15547	3856	0.10
6.25	27817	3812	0.20	19560	3555	0.12
3.125	45167	579	0.32	33523	3740	0.21
1.5625	65173	1320	0.47	65097	6521	0.41
0.78125	106867	8866	0.77	95993	7772	0.61
0.390625	117833	5829	0.85	138900	31425	0.88
0.1953125	124500	7192	0.89	126333	20215	0.80
0.09765625	117067	8214	0.84	112533	14372	0.71
0	139367	11254	1.00	158067	13180	1.00

[1070] 实施例97

[1071] 细胞渗透性

[1072] 以下实施例证明本文所述的噻吩并吡咯化合物的渗透性。用 β -2肾上腺素能受体-Nluc (B2AR-Nluc) 融合蛋白瞬时转染HEK293以在胞质中锚定和定向Nluc和pGEM-3z载体DNA (1:100)。在转染后24小时,用-/+50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毛地黄皂苷处理细胞以分别模拟活的和溶解的情形。然后,将完整细胞和透化细胞暴露于噻吩并吡咯化合物的化合物反应曲线达2小时。添加10 μM 复立玛津 (Promega Corp.) 并测量发光。如果噻吩并吡咯化合物(抑制剂)是可渗透的,则活细胞和透化细胞的剂量-反应曲线重叠。然而,如果噻吩并吡咯化合物是不可渗透的,则相对于透化细胞,EC50在活细胞中向右移位。图17A-17C证明JRW-0147和JRW-0344是细胞不可渗透的,其特征在于在或细胞对比溶解细胞中的向右移位的EC50。JRW-0013充当细胞可渗透的对照,其特征在于在活细胞对比溶解细胞中的类似EC50。

[1073] 实施例98

[1074] 细胞活力和毒性

[1075] 以下实施例证明JRW-0344的细胞活力和毒性。将HEK293细胞以20k个细胞/孔接种并暴露于媒介物(DMSO)、毛地黄皂苷(针对细胞死亡的阳性对照)或JRW-0344持续10分钟/30分钟/120分钟/240分钟/或18小时。添加CellTiter-Glo (Promega Corp.) 并测量发光。图18A-18C证明在18小时后,达100 μM 的媒介物或JRW-0344没有明显毒性。在大于2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下,毛地黄皂苷处理的细胞几乎完全经历死亡。

[1076] 实施例99

[1077] 细胞渗透性与生物发光成像

[1078] 用Nluc-ADRB2 (细胞外Nluc) 或ADRB2-Nluc (细胞内Nluc) 瞬时转染HeLa细胞以分别在细胞外或细胞内锚定和定向Nluc。转染后24小时,用-/ +30 μ M的噻吩并吡咯化合物JRW-0147、JRW-0013和JRW-0344处理细胞。添加10 μ M的复立玛津,并通过在Olympus LV200上成像来检测发光。DMSO (未处理的) 用作阴性对照并且不抑制任一取向的Nluc。JRW-0013是细胞可渗透的阳性对照并抑制任一取向的Nluc。然而,当Nluc在细胞外定向时,JRW-0344或JRW-0147抑制经典环状结构,但是当Nluc在细胞内定向时不抑制。参见图19。

[1079] 实施例100

[1080] 对细胞外荧光素酶活性的抑制

[1081] 以下实施例证明本文描述的噻吩并吡咯化合物抑制细胞外荧光素酶活性、同时增强细胞内BRET的能力。参见图20A。用SRC-Nluc或Nluc-HaloTag瞬时转染HEK293。转染后24小时,将20k/细胞接种到96孔板 (Costar 3600) 的孔中。将1 μ M的细胞不可渗透的示踪剂达沙替尼-DY605添加至表达HEK293SRC-Nluc的细胞中,并且将100nM的细胞可渗透的示踪剂NanoBRET-618添加至表达Nluc-HaloTag的细胞中。将HEK293SRC-Nluc细胞和Nluc-HaloTag细胞暴露于JRW-0344的剂量-反应曲线。图20A-20C证明JRW-0344在表达HEK293SRC-Nluc的细胞中抑制细胞碎片中的BRET,但在表达HEK293Nluc-HaloTag的细胞中不抑制。

[1082] 实施例101

[1083] 抑制剂IC₅₀测定

[1084] 以下实施例提供本文公开的化合物的IC₅₀值。参见表5。将 **NANOLUC®** 酶在不依赖于CO₂的培养基+10%FBS中稀释至0.4ng/ml以制备检测试剂。然后在检测试剂中制备每种抑制剂的3倍稀释系列。对每个样品还制备“无抑制剂”对照。将50 μ l的每种抑制剂稀释液与50 μ l的含有20 μ M复立玛津的NanoGlo缓冲液混合。(最终复立玛津浓度是10 μ M,其是在K_m下),并测量发光。将每个样品标准化至“无抑制剂”对照。然后使用GraphPad Prism (log [抑制剂] 对比标准化的反应) 测定IC₅₀值。

[1085] 表5

[1086]	抑制剂	IC ₅₀ (μ M)
	jrw-0004	1.1
	wz-141-74	16.4
	wz-141-84	5.5
	wz-141-88	0.54
	jrw-0013	0.14

[1087]

jrw-0009	2.7
jrw-0008	1.1
jrw-0006	0.26
jrw-0034	0.059
jrw-0041	0.2
jrw-0042	0.31
jrw-0043	0.84
jrw-0044	16.8
jrw-0051	0.74
jrw-0052	1.3
jrw-0081	19.4
jrw-0109	10.1
jrw-0110	3
jrw-0138	0.13
jrw-0143	2.8
jrw-0143	2.6
jrw-0145	0.12
jrw-0147	0.094
jrw-0148	5.3
jrw-0149	2.5
jrw-0151	7
jrw-0152	4.3
jrw-0188	0.022
jrw-0195	0.48
jrw-0198	1
jrw-0200	0.078
jrw-0208	0.82
jrw-0241	0.063
jrw-0242	0.035
jrw-0243	0.21
jrw-0251	0.077
jrw-0344	0.077
jrw-0264	0.24
jrw-0268	4.3
jrw-0318	0.11
jrw-0321	0.16
jrw-0322	0.2
jrw-0326	0.0039
jrw-0327	0.11
jrw-0330	0.7
jrw-0331	16.9
jrw-0334	1.3

代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[1102] 条款2.如条款1所述的化合物，其中n是1。

[1103] 条款3.如条款1-2中任一项所述的化合物，其中所述虚线表示存在键，并且X是CH。

[1104] 条款4.如条款1-3中任一项所述的化合物，其中A是5元杂芳基环。

[1105] 条款5.如条款1-4中任一项所述的化合物，其中A是噻吩基环或呋喃基环。

[1106] 条款6.如条款1-4中任一项所述的化合物，其中A是苯基环。

[1107] 条款7.如条款1-6中任一项所述的化合物，其中R¹选自由以下各项组成的组：氢、C₁-C₈烷基、卤代-C₁-C₈-烷基、烷氧基烷氧基烷基和芳烷基。

[1108] 条款8.如条款1-7中任一项所述的化合物，其中R¹选自由以下各项组成的组：氢、乙基、正己基、2-(2-甲氧基乙氧基)乙基和苄基。

[1109] 条款9.如条款1-8中任一项所述的化合物，其中R¹是乙基。

[1110] 条款10.如条款1-9中任一项所述的化合物，其中R²是任选取代的芳基。

[1111] 条款11.如条款1-10中任一项所述的化合物，其中R²是取代的苯基。

[1112] 条款12.如条款11所述的化合物，其中R²是被一个选自由以下各项组成的组的取代基取代的苯基：C₁-C₄烷基、氰基、酰氨基、C₁-C₄烷氧基和羟烷基。

[1113] 条款13.如条款1-12中任一项所述的化合物，其中R²是被一个甲基取代的苯基。

[1114] 条款14.如条款1-13中任一项所述的化合物，其中R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[1115] 条款15.如条款1-14中任一项所述的化合物，其中R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的单环杂环。

[1116] 条款16.如条款1-15中任一项所述的化合物，其中所述任选取代的单环杂环选自由以下各项组成的组：任选取代的吡咯烷、哌啶和哌嗪。

[1117] 条款17.如条款1-16中任一项所述的化合物，其中所述任选取代的单环杂环选自由以下各项组成的组：未取代的吡咯烷、未取代的哌啶、被一个取代基取代的哌啶或被一个取代基取代的哌嗪。

[1118] 条款18.如条款1-17中任一项所述的化合物，其中R³是氢。

[1119] 条款19.如条款1-18中任一项所述的化合物，其中R⁴选自由以下各项组成的组：未取代的C₁-C₈烷基、羧基-C₁-C₈-烷基、C₁-C₄-烷氧基羰基-C₁-C₈-烷基、任选取代的苯基、任选取代的C₅-C₆环烷基、任选取代的杂环基、任选取代的杂芳烷基和任选取代的杂环基烷基。

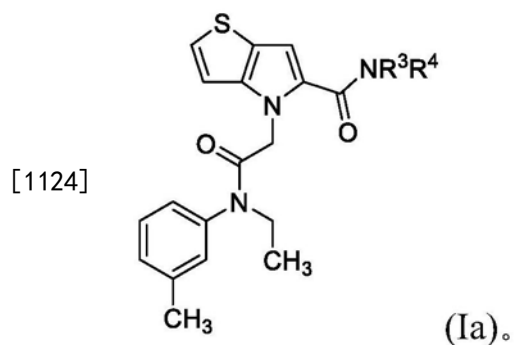
[1120] 条款20.如条款1-19中任一项所述的化合物，其中R⁴是未取代的或被一个取代基取代的苯基。

[1121] 条款21.如条款20所述的化合物，其中所述取代基选自由以下各项组成的组：C₁-C₄-烷氧基羰基和C₁-C₄-烷氧基羰基-C₁-C₄-烷基。

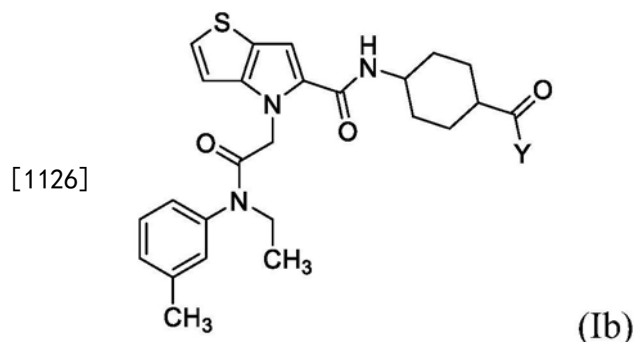
[1122] 条款22.如条款1-18中任一项所述的化合物，其中R⁴是被一个选自由以下各项组成的组的取代基取代的环己基：羧基、C₁-C₄-烷氧基羰基、C₁-C₈-烷基酰氨基、羟基-C₁-C₈-烷基酰氨基、酰氨基、任选取代的氨基-C₁-C₈-烷基酰氨基、C₁-C₄-二烷基氨基-C₁-C₈-烷基酰氨基、羧基-C₁-C₈-烷基酰氨基、磺酸-C₁-C₈-烷基酰氨基、磺酸盐-C₁-C₈-烷基酰氨基、C₁-C₄-烷氧基羰基-C₁-C₈-烷基酰氨基、任选取代的C₃-C₆-环烷基酰氨基以及任选取代的杂环基酰氨基。

基。

[1123] 条款23. 如条款1-22中任一项所述的化合物, 其中所述化合物具有式 (Ia) :



[1125] 条款24. 如条款1-23中任一项所述的化合物, 其中所述化合物具有式 (Ib) :



[1127] 其中:

[1128] Y选自由以下各项组成的组: -NR^aR^b和-OR^c;

[1129] R^a和R^b各自独立地选自由以下各项组成的组: 氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈-环烷基和任选取代的杂环基; 或者R^a和R^b与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环; 并且

[1130] R^c选自由以下各项组成的组: 氢和任选取代的C₁-C₄烷基。

[1131] 条款25. 如条款24所述的化合物, 其中Y是-OR^c。

[1132] 条款26. 如条款24-25中任一项所述的化合物, 其中R^c选自由以下各项组成的组: 氢和甲基。

[1133] 条款27. 如条款24所述的化合物, 其中Y是-NR^aR^b。

[1134] 条款28. 如条款27所述的化合物, 其中R^a和R^b与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[1135] 条款29. 如条款27-28中任一项所述的化合物, 其中R^a和R^b与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的单环杂环。

[1136] 条款30. 如条款29所述的化合物, 其中所述任选取代的单环杂环是任选取代的哌啶。

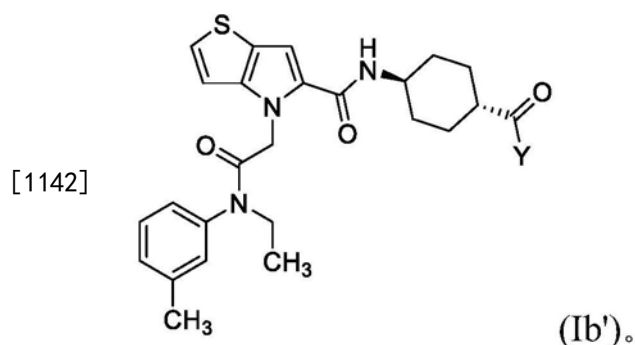
[1137] 条款31. 如条款29-30中任一项所述的化合物, 其中所述任选取代的单环杂环选自由以下各项组成的组: 未取代的哌啶和被一个取代基取代的哌啶。

[1138] 条款32. 如条款27所述的化合物, 其中R^a是氢。

[1139] 条款33. 如条款32所述的化合物, 其中R^b选自由以下各项组成的组: 氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈-环烷基和任选取代的杂环基。

[1140] 条款34.如条款31-32中任一项所述的化合物,其中R^b选自由以下各项组成的组:氢、C₁-C₆烷基、羟烷基、任选取代的氨基烷基、羧基烷基、磺酸-烷基、磺酸盐-烷基、烷基羰基烷基、任选取代的C₃-C₆-环烷基和任选取代的六元杂环基。

[1141] 条款35.如条款1-34中任一项所述的化合物,其中所述化合物具有下式(Ib'):



[1143] 条款36.如条款1-35中任一项所述的化合物,其中所述化合物选自由以下组成的组:

[1144] N-环己基-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1145] N-乙基-2-(5-(吡咯烷-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;

[1146] N-乙基-2-(5-(哌啶-1-羰基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;

[1147] 1-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-羰基)哌啶-4-甲酸乙酯;

[1148] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-苯基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1149] 2-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)苯基)乙酸乙酯;

[1150] 3-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)苯甲酸甲酯;

[1151] 顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[1152] 8-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)辛酸;

[1153] 6-(4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)哌啶-1-基)-6-氧代己酸;

[1154] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[1155] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸;

[1156] N-(反式-4-(丁基氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙

基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1157] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((2-羟乙基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1158] N-(反式-4-((2-(二甲氨基)乙基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1159] 4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)丁酸;

[1160] N-(反式-4-氨基甲酰基环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1161] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(己基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1162] 1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸乙酯;

[1163] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯;

[1164] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸;

[1165] 1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-羰基)哌啶-4-甲酸;

[1166] 8-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)辛酸;

[1167] N-(反式-4-(环己基氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1168] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((1-甲基哌啶-4-基)氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1169] 4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯;

[1170] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-(哌啶-4-基氨基甲酰基)环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1171] N-(反式-4-((1-乙酰基哌啶-4-基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1172] (6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己基)氨基甲酸叔丁酯;

[1173] N-(反式-4-((6-(3',6'-二羟基-3-氧代-3H-螺[异苯并呋喃-1,9'-咕吨]-5(6)-甲酰氨基)己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1174] N-(反式-4-((6-氨基己基)氨基甲酰基)环己基)-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺盐酸盐;

[1175] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰

基) 环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1176] 反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[1177] 反式-4-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸;

[1178] (11S,14S,17S)-17-乙酰氨基-11,14-双(羧甲基)-1-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己基)-1,10,13,16-四氧代-2,9,12,15-四氮杂十九烷-19-酸;

[1179] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-甲基-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1180] N-环戊基-4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1181] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(吡啶-4-基甲基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1182] 4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(3-吗啉代丙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1183] N-乙基-2-(5-(4-甲基哌嗪-1-羧基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-4-基)-N-(间甲苯基)乙酰胺;

[1184] 4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;

[1185] N-环己基-4-(2-氧代-2-(间甲苯基氨基)乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1186] N-环己基-4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1187] 反式-4-(4-(2-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[1188] 4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;

[1189] N-环己基-4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1190] 反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)

[1191] -环己烷-1-甲酸甲酯;

[1192] 4-(2-(苄基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酸甲酯;

[1193] 6-(顺式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸;

[1194] 6-(反式-4-((4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酸甲酯;

[1195] 6-(反式-4-((4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡

咯-5-甲酰氨基) 甲基) 环己烷-1-甲酰氨基) 己酸;

[1196] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酰氨基) 己烷-1-磺酸钠;

[1197] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酰氨基) 己烷-1-磺酸钾;

[1198] 反式-4-(4-(2-(己基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸;

[1199] 反式-4-(4-(2-(乙基(苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1200] 反式-4-(4-(2-((3-氰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1201] 反式-4-(4-(2-((3-氨基甲酰基苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1202] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1203] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-甲氧基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1204] 反式-4-(4-(2-(乙基(邻甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1205] 反式-4-(4-(2-(6-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1206] 反式-4-(4-(2-(乙基(对甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1207] 反式-4-(4-(2-(乙基(4-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1208] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1209] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6-甲氧基-1H-吡啶-2-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1210] 反式-4-(4-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1211] 4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基) 环己基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰胺;

[1212] 6-(反式-4-(4-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酰氨基) 己烷-1-磺酸钠;

[1213] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1214] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-(羟甲基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基) 环己烷-1-甲酸甲酯;

[1215] 反式-4-(4-(2-((3-(溴甲基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[1216] 反式-4-(4-(2-((3-(二甲氨基)苯基)(乙基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[1217] 反式-4-(4-(2-(乙基(3-异丁基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-4H-噻吩并[3,2-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[1218] 反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;

[1219] 1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-N-(反式-4-((6-羟己基)氨基甲酰基)环己基)-1H-吡啶-2-甲酰胺;

[1220] 6-(反式-4-(1-(2-(乙基(3-乙基苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酰氨基)己烷-1-磺酸钠;

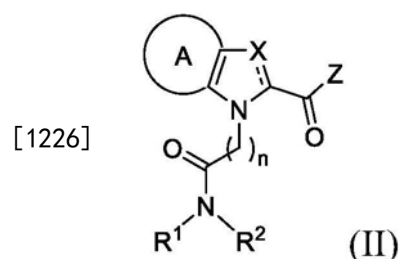
[1221] 反式-4-(1-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯-2-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯;以及

[1222] 反式-4-(6-(2-(乙基(间甲苯基)氨基)-2-氧代乙基)-6H-噻吩并[2,3-b]吡咯-5-甲酰氨基)环己烷-1-甲酸甲酯。

[1223] 条款37.一种抑制刺虾源性荧光素酶的方法,所述方法包括使所述刺虾源性荧光素酶与如条款1-36中任一项所述的化合物接触。

[1224] 条款38.如条款37所述的方法,其中所述刺虾源性荧光素酶包含SEQ ID NO:2的多肽序列。

[1225] 条款39.一种抑制刺虾源性荧光素酶的方法,所述方法包括使所述刺虾源性荧光素酶与式(II)化合物接触:



[1227] 其中:

[1228] 虚线表示存在或不存在键;

[1229] n是0、1、2、3、4或5;

[1230] X是CH、N、O或S;

[1231] 其中,当所述虚线表示存在键时,X是CH或N,并且当所述虚线表示不存在键时,X是O或S;

[1232] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环;

[1233] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基;

[1234] Z选自由以下各项组成的组: $-NR^3R^4$ 和 $-OR^5$;并且

[1235] R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[1236] 条款40.如条款39所述的方法，其中所述刺虾源性荧光素酶包含SEQ ID NO:2的多肽序列。

[1237] 条款41.一种用于调节样品中的刺虾源性荧光素酶的发光的方法，所述方法包括：

[1238] (a) 使所述样品与腔肠素底物和如条款1-36中任一项所述的化合物接触；以及

[1239] (b) 检测所述样品中的发光，

[1240] 其中如条款1-36中任一项所述的化合物引起来自所述刺虾源性荧光素酶的所述发光的减少。

[1241] 条款42.一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法，所述方法包括：

[1242] (a) 使样品与腔肠素底物和如条款1-36中任一项所述的化合物接触，其中所述样品包含：

[1243] (ix) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸，其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶的第一片段以及第一蛋白质；以及

[1244] (x) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸，其中所述第二融合蛋白包含所述刺虾源性荧光素酶的第二片段以及第二蛋白质；以及

[1245] (b) 检测所述样品中的发光，

[1246] 其中检测到发光指示所述第一蛋白质与所述第二蛋白质之间的相互作用。

[1247] 条款43.如条款41-42中任一项所述的方法，其包括在使所述样品与如条款1-36中任一项所述的化合物接触之前，使所述样品与所述腔肠素底物接触。

[1248] 条款44.如条款42所述的方法，其中当所述第一蛋白质和所述第二蛋白质相互作用时，所述刺虾源性荧光素酶的所述第一片段和所述刺虾源性荧光素酶的所述第二片段重构能够稳定地结合所述腔肠素底物的全长酶。

[1249] 条款45.一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法，所述方法包括：

[1250] (a) 使样品与腔肠素底物和如条款1-36中任一项所述的化合物接触，其中所述样品包含：

[1251] (xi) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸，其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶以及第一蛋白质，其中所述刺虾源性荧光素酶是生物发光供体；以及

[1252] (xii) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸，其中所述第二融合蛋白包含荧光受体分子以及第二蛋白质；

[1253] (b) 检测所述样品中的生物发光共振能量转移(BRET)，从而指示所述生物发光供体和所述荧光受体的相互作用或紧密邻近。

[1254] 条款46.如条款41-45中任一项所述的方法，其中所述样品包含细胞。

[1255] 条款47.如条款46所述的方法，其中所述细胞包含所述刺虾源性荧光素酶。

[1256] 条款48.如条款46所述的方法，其中所述细胞表达所述刺虾源性荧光素酶。

[1257] 条款49.如条款41-48中任一项所述的方法,其中所述腔肠素底物是腔肠素、腔肠素衍生物、腔肠素类似物、前腔肠素或醌掩蔽的腔肠素。

[1258] 条款50.一种生物发光共振能量转移(BRET)系统,其包括:第一融合蛋白,所述第一融合蛋白包含第一靶蛋白和生物发光供体分子,其中所述生物发光供体分子是刺虾源性荧光素酶;第二融合蛋白,所述第二融合蛋白包含第二靶蛋白和荧光受体分子;腔肠素底物,以及如条款1-36中任一项所述的化合物。

[1259] 条款51.一种试剂盒,其包括:

[1260] (a) 如条款1-36中任一项所述的化合物;以及

[1261] (b) 刺虾源性荧光素酶。

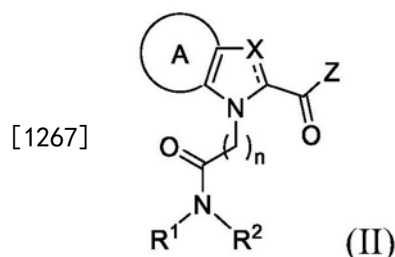
[1262] 条款52.如条款51所述的试剂盒,其中所述刺虾源性荧光素酶包含SEQ ID NO:2的多肽序列。

[1263] 条款53.如条款51-52中任一项所述的试剂盒,其还包括腔肠素底物。

[1264] 条款54.如条款51-53中任一项所述的试剂盒,其还包括用于进行发光测定的说明书。

[1265] 条款55.一种用于调节样品中的刺虾源性荧光素酶的发光的方法,所述方法包括:

[1266] (a) 使所述样品与腔肠素底物和式(II)化合物接触:



[1268] 其中:

[1269] 虚线表示存在或不存在键;

[1270] n是0、1、2、3、4或5;

[1271] X是CH、N、O或S;

[1272] 其中,当所述虚线表示存在键时,X是CH或N,并且当所述虚线表示不存在键时,X是O或S;

[1273] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环;

[1274] R¹和R²各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基;

[1275] Z选自由以下各项组成的组:-NR³R⁴和-OR⁵;并且

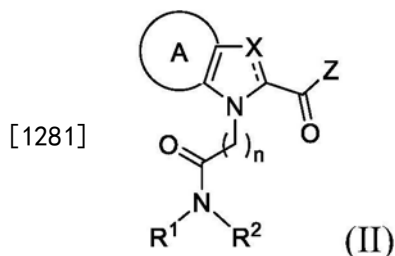
[1276] R³、R⁴和R⁵各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、任选取代的C₁-C₈烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基、任选取代的C₃-C₈环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基;或者R³和R⁴与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环;以及

[1277] (b) 检测所述样品中的发光,

[1278] 其中所述式(II)化合物引起来自所述刺虾源性荧光素酶的发光减少。

[1279] 条款56. 一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法, 所述方法包括:

[1280] (a) 使样品与腔肠素底物和式 (II) 化合物接触:



[1282] 其中:

[1283] 虚线表示存在或不存在键;

[1284] n是0、1、2、3、4或5;

[1285] X是CH、N、O或S;

[1286] 其中, 当所述虚线表示存在键时, X是CH或N, 并且当所述虚线表示不存在键时, X是O或S;

[1287] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环;

[1288] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组: 氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基;

[1289] Z选自由以下各项组成的组: $-NR^3R^4$ 和 $-OR^5$; 并且

[1290] R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自由以下各项组成的组: 氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基; 或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环,

[1291] 其中所述样品包含:

[1292] (xiii) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸, 其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶的第一片段以及第一蛋白质; 以及

[1293] (xiv) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸, 其中所述第二融合蛋白包含所述刺虾源性荧光素酶的第二片段以及第二蛋白质; 以及

[1294] (b) 检测所述样品中的发光,

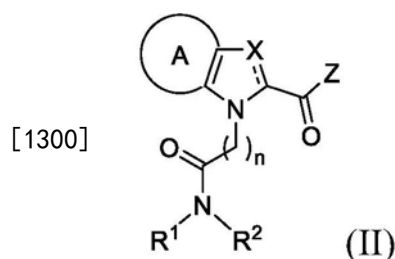
[1295] 其中检测到发光指示所述第一蛋白质与所述第二蛋白质之间的相互作用。

[1296] 条款57. 如条款55-56中任一项所述的方法, 其包括在使所述样品与所述式 (II) 化合物接触之前, 使所述样品与所述腔肠素底物接触。

[1297] 条款58. 如条款57所述的方法, 其中当所述第一蛋白质和所述第二蛋白质相互作用时, 所述刺虾源性荧光素酶的所述第一片段和所述刺虾源性荧光素酶的所述第二片段重构能够稳定地结合所述腔肠素底物的全长酶。

[1298] 条款59. 一种检测样品中的第一蛋白质与第二蛋白质之间的相互作用的方法, 所述方法包括:

[1299] (a) 使样品与腔肠素底物和式 (II) 化合物接触:



[1301] 其中：

[1302] 虚线表示存在或不存在键；

[1303] n 是0、1、2、3、4或5；

[1304] X 是CH、N、O或S；

[1305] 其中，当所述虚线表示存在键时， X 是CH或N，并且当所述虚线表示不存在键时， X 是O或S；

[1306] A 是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环；

[1307] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基；

[1308] Z 选自由以下各项组成的组： $-NR^3R^4$ 和 $-OR^5$ ；并且

[1309] R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环，

[1310] 其中所述样品包含：

[1311] (xv) 编码第一融合蛋白的第一多核苷酸，其中所述第一融合蛋白包含刺虾源性荧光素酶以及第一蛋白质，其中所述刺虾源性荧光素酶是生物发光供体；以及

[1312] (xvi) 编码第二融合蛋白的第二多核苷酸，其中所述第二融合蛋白包含荧光受体分子以及第二蛋白质；

[1313] (b) 检测所述样品中的生物发光共振能量转移 (BRET)，从而指示所述生物发光供体和所述荧光受体的相互作用或紧密邻近。

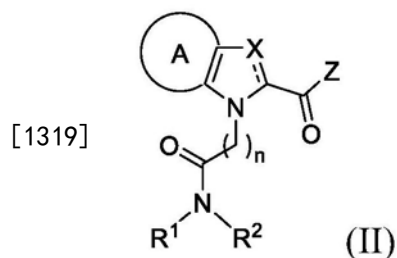
[1314] 条款60. 如条款55-59中任一项所述的方法，其中所述样品包含细胞。

[1315] 条款61. 如条款60所述的方法，其中所述细胞包含所述刺虾源性荧光素酶。

[1316] 条款62. 如条款60所述的方法，其中所述细胞表达所述刺虾源性荧光素酶。

[1317] 条款63. 如条款54-62中任一项所述的方法，其中所述腔肠素底物是腔肠素、腔肠素衍生物、腔肠素类似物、前腔肠素或醌掩蔽的腔肠素。

[1318] 条款64. 一种生物发光共振能量转移 (BRET) 系统，其包括：第一融合蛋白，所述第一融合蛋白包含第一靶蛋白和生物发光供体分子，其中所述生物发光供体分子是刺虾源性荧光素酶；第二融合蛋白，所述第二融合蛋白包含第二靶蛋白和荧光受体分子；腔肠素底物，以及式 (II) 化合物：



[1320] 其中：

[1321] 虚线表示存在或不存在键；

[1322] n是0、1、2、3、4或5；

[1323] X是CH、N、O或S；

[1324] 其中，当所述虚线表示存在键时，X是CH或N，并且当所述虚线表示不存在键时，X是O或S；

[1325] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环；

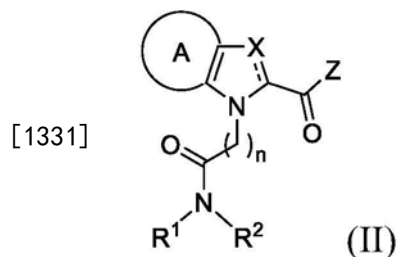
[1326] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基；

[1327] Z选自由以下各项组成的组： $-NR^3R^4$ 和 $-OR^5$ ；并且

[1328] R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环。

[1329] 条款65. 一种试剂盒，其包括：

[1330] (a) 式 (II) 化合物：



[1332] 其中：

[1333] 虚线表示存在或不存在键；

[1334] n是0、1、2、3、4或5；

[1335] X是CH、N、O或S；

[1336] 其中，当所述虚线表示存在键时，X是CH或N，并且当所述虚线表示不存在键时，X是O或S；

[1337] A是任选取代的苯基环或任选取代的5或6元杂芳基环；

[1338] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的烷氧基烷基和任选取代的烷氧基烷氧基烷基；

[1339] Z选自自由以下各项组成的组： $-\text{NR}^3\text{R}^4$ 和 $-\text{OR}^5$ ；并且

[1340] R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自自由以下各项组成的组：氢、任选取代的 C_1 - C_8 烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基、任选取代的 C_3 - C_8 环烷基烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、任选取代的杂环基和任选取代的杂环基烷基；或者 R^3 和 R^4 与它们所连接的氮原子一起形成任选取代的环；以及

[1341] (b) 刺虾源性荧光素酶。

[1342] 条款66. 如条款65所述的试剂盒，其中所述刺虾源性荧光素酶包含SEQ ID NO:2的多肽序列。

[1343] 条款67. 如条款65-66中任一项所述的试剂盒，其还包括腔肠素底物。

[1344] 条款68. 如条款65-67中任一项所述的试剂盒，其还包括用于进行发光测定的说明书。

[1345] 附录

[1346] SEQ ID NO:1-天然的成熟刺虾荧光素酶氨基酸序列FTLADFVGDWQQTAGYNQDQVLEQ
GGLSSLFQALGVSVTPIQKVVLSGENGLKADIHVIIPYEGLSGFQMGLIEMIFKVVYPVDDHHFKIILHYGTLVID
GVTPNMIDYFGRPYPGIAVFDGKQITVTGTLWNGNKIYDERLINPDGSLLFR-VTIN GVTGWRLCENILA

[1347] SEQ ID NO:2-Nluc氨基酸序列MVFTLEDFVGDWQRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTP
IQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGIKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGI
AVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILA

[0001]	序列表
[0002]	<110> 普洛麦格公司
[0003]	<120> 噻吩并吡咯化合物及其用途
[0004]	<130> 016026-9573-W000
[0005]	<140> 新PCT国际专利申请
[0006]	<141> 2016-06-24
[0007]	<150> US 62/206,525
[0008]	<151> 2015-08-18
[0009]	<150> US 62/184,714
[0010]	<151> 2015-06-25
[0011]	<160> 2
[0012]	<170> PatentIn 3.5版
[0013]	<210> 1
[0014]	<211> 169
[0015]	<212> PRT
[0016]	<213> 人工序列
[0017]	<220>
[0018]	<223> 合成肽 - 天然的成熟刺虾荧光素酶
[0019]	<400> 1
[0020]	Phe Thr Leu Ala Asp Phe Val Gly Asp Trp Gln Gln Thr Ala Gly Tyr
[0021]	1 5 10 15
[0022]	Asn Gln Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Leu Ser Ser Leu Phe Gln
[0023]	20 25 30
[0024]	Ala Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Lys Val Val Leu Ser Gly
[0025]	35 40 45
[0026]	Glu Asn Gly Leu Lys Ala Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr Glu Gly
[0027]	50 55 60
[0028]	Leu Ser Gly Phe Gln Met Gly Leu Ile Glu Met Ile Phe Lys Val Val
[0029]	65 70 75 80
[0030]	Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Ile Ile Leu His Tyr Gly Thr
[0031]	85 90 95
[0032]	Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe Gly Arg
[0033]	100 105 110
[0034]	Pro Tyr Pro Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Gln Ile Thr Val Thr
[0035]	115 120 125
[0036]	Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Tyr Asp Glu Arg Leu Ile Asn
[0037]	130 135 140
[0038]	Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val Thr Gly

[0039]	145	150	155	160
[0040]	Trp Arg Leu Cys Glu Asn Ile Leu Ala			
[0041]	165			
[0042]	<210> 2			
[0043]	<211> 171			
[0044]	<212> PRT			
[0045]	<213> 人工序列			
[0046]	<220>			
[0047]	<223> 合成肽 - Nluc			
[0048]	<400> 2			
[0049]	Met Val Phe Thr Leu Glu Asp Phe Val Gly Asp Trp Arg Gln Thr Ala			
[0050]	1	5	10	15
[0051]	Gly Tyr Asn Leu Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Val Ser Ser Leu			
[0052]	20 25 30			
[0053]	Phe Gln Asn Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Arg Ile Val Leu			
[0054]	35 40 45			
[0055]	Ser Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ile Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr			
[0056]	50 55 60			
[0057]	Glu Gly Leu Ser Gly Asp Gln Met Gly Gln Ile Glu Lys Ile Phe Lys			
[0058]	65 70 75 80			
[0059]	Val Val Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Val Ile Leu His Tyr			
[0060]	85 90 95			
[0061]	Gly Thr Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe			
[0062]	100 105 110			
[0063]	Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Lys Ile Thr			
[0064]	115 120 125			
[0065]	Val Thr Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Ile Asp Glu Arg Leu			
[0066]	130 135 140			
[0067]	Ile Asn Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val			
[0068]	145	150	155	160
[0069]	Thr Gly Trp Arg Leu Cys Glu Arg Ile Leu Ala			
[0070]	165 170			

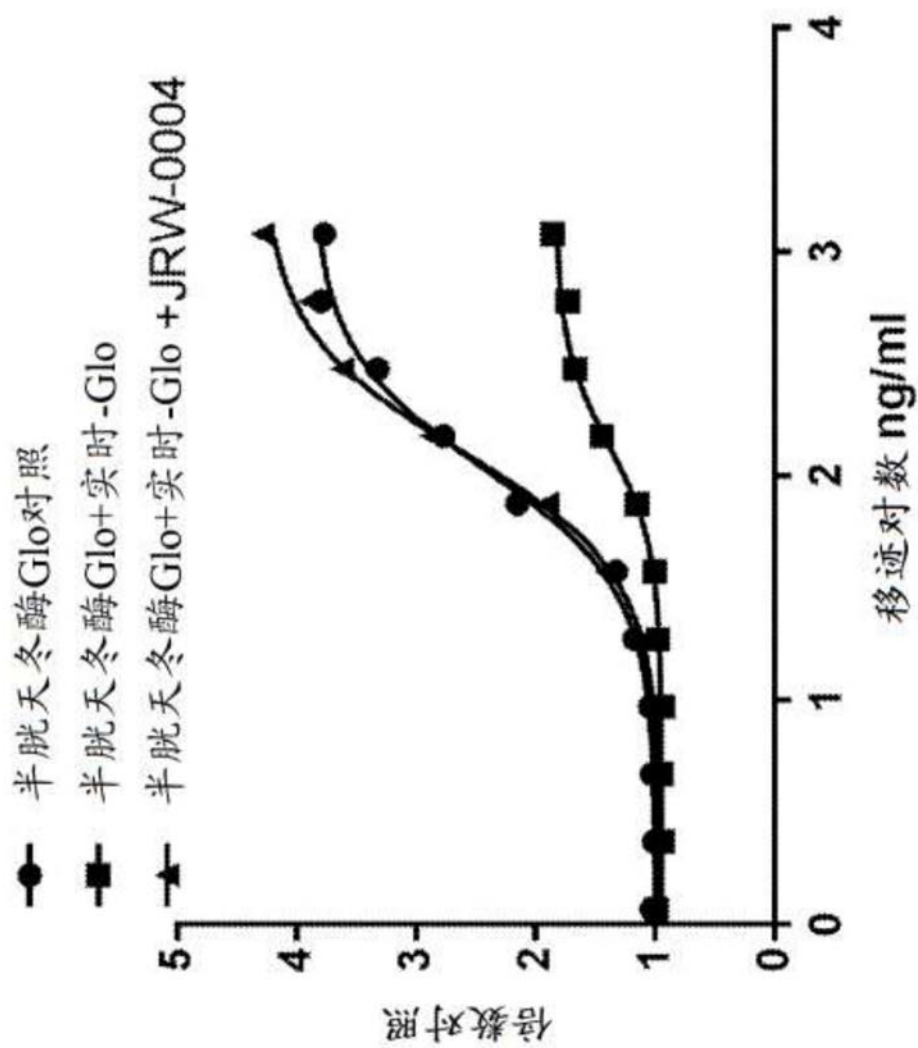
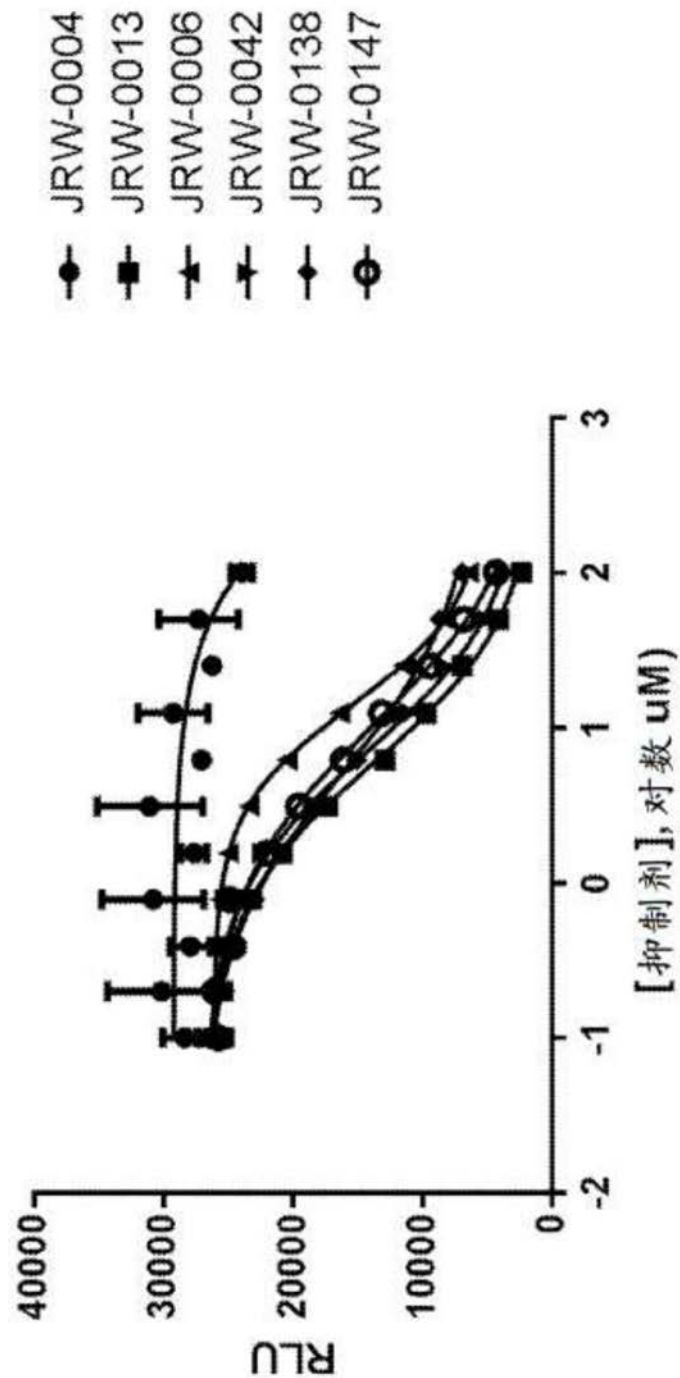


图1



IC50s (uM)						
抑制剂	JRW-0004	JRW-0013	JRW-0006	JRW-0042	JRW-0138	JRW-0147
2 h	~ 38284	5.98	13.81	7.00	5.06	10.39

图2

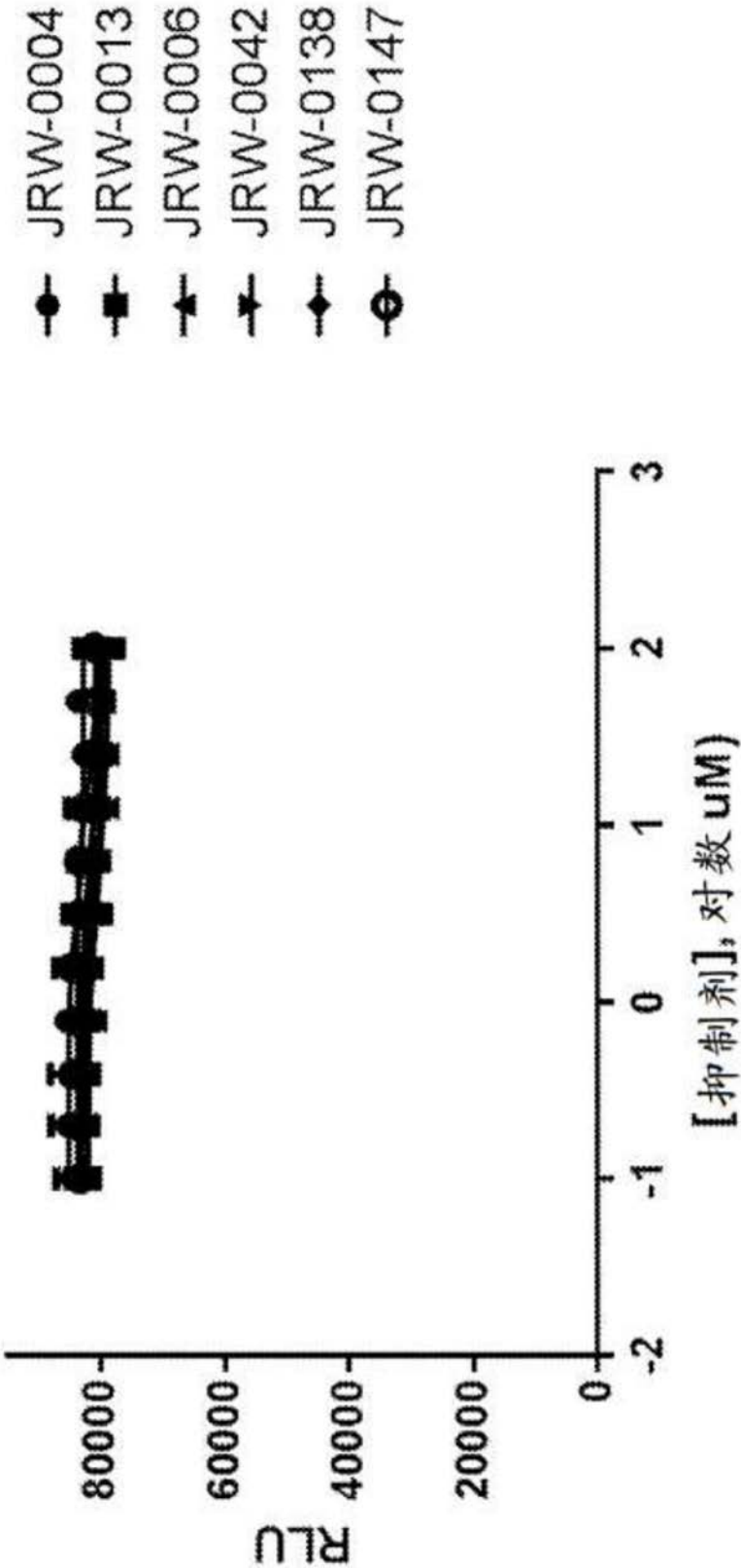


图3

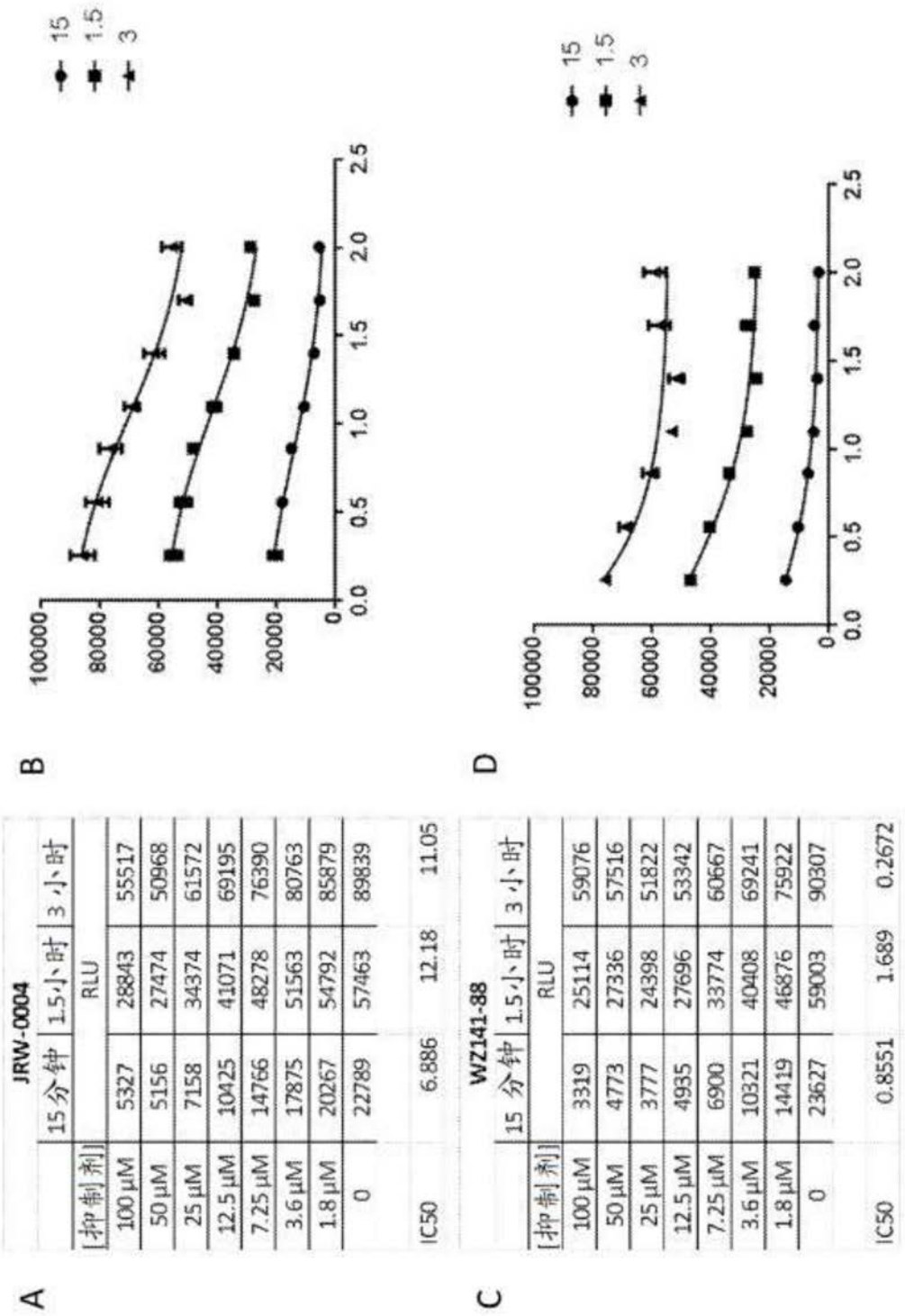
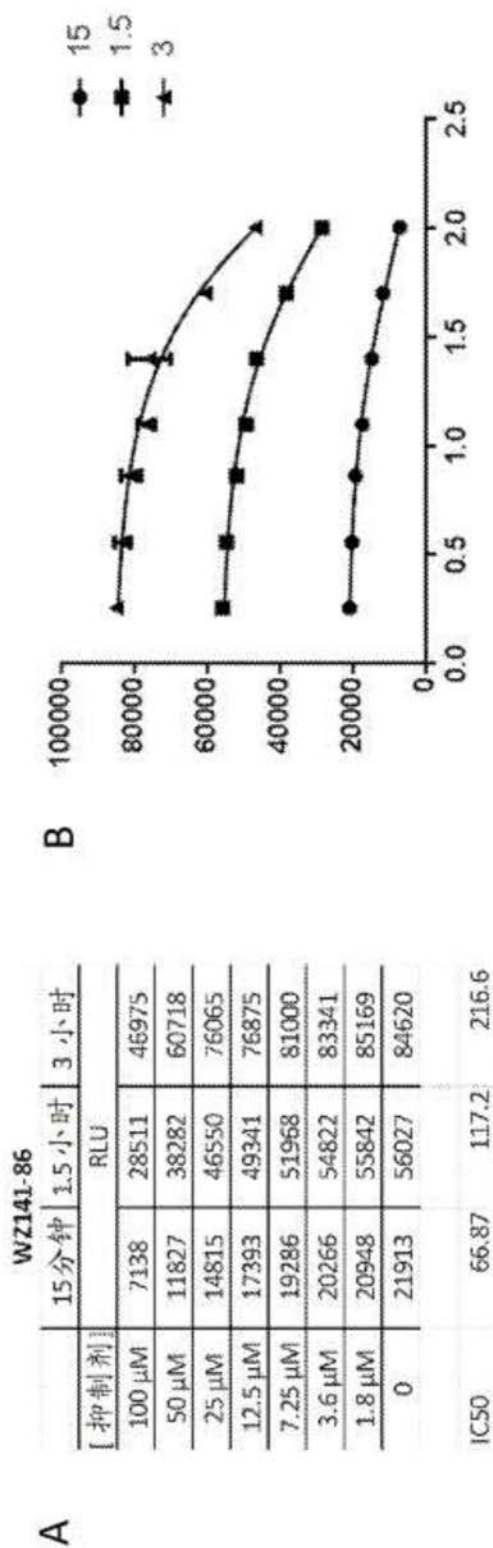
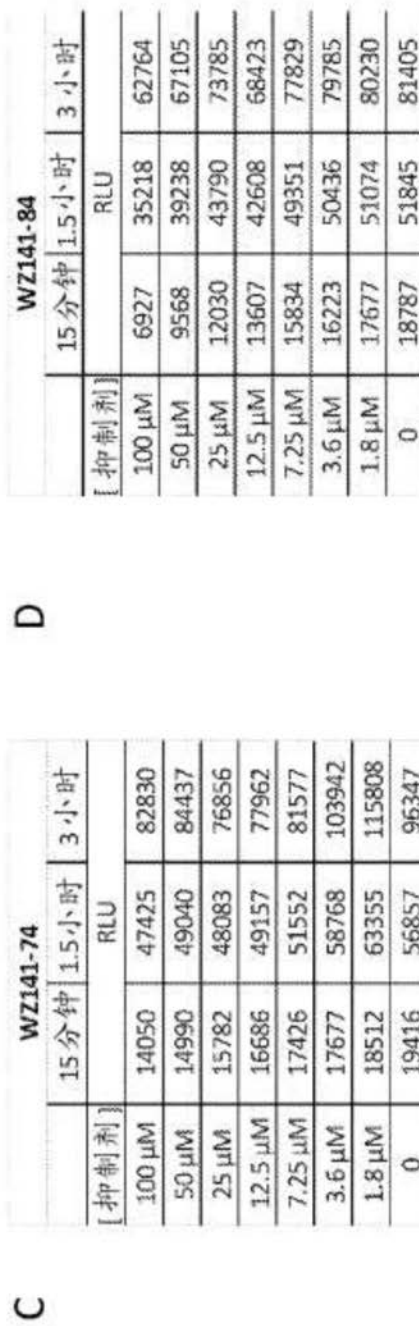


图4A-4D



WZ141-86			
	15分钟	1.5小时	3小时
【抑制剂】	RLU		
100 μ M	7138	28511	45975
50 μ M	11827	38282	60718
25 μ M	14815	46550	76065
12.5 μ M	17393	49341	76875
7.25 μ M	19286	51968	81000
3.6 μ M	20266	54822	83341
1.8 μ M	20948	55842	85169
0	21913	56027	84620
IC50	66.87	117.2	216.6



WZ141-74			
	15 分钟	1.5 小时	3 小时
[抑制剂]	RLU		
100 μ M	14050	47425	82830
50 μ M	14990	49040	84437
25 μ M	15782	48083	76856
12.5 μ M	16686	49157	77962
7.25 μ M	17426	51552	81577
3.6 μ M	17677	58768	103942
1.8 μ M	18512	63355	115808
0	19416	56857	96347

图5A-5D

WZ141-89				
【抑制剂】	15 分钟	1.5 小时	3 小时	
	RLU			
100 μ M	9199	39835	78109	
50 μ M	12384	43739	78050	
25 μ M	14868	48293	86555	
12.5 μ M	15802	45203	76954	
7.25 μ M	16667	47168	83983	
3.6 μ M	19679	53187	86724	
1.8 μ M	20849	54163	88151	
0	23061	54281	84519	

WZ141-90				
【抑制剂】	15 分钟	1.5 小时	3 小时	
	RLU			
100 μ M	12525	41624	72121	
50 μ M	13879	40551	69451	
25 μ M	15885	41834	67746	
12.5 μ M	17152	42802	68130	
7.25 μ M	18265	44364	70010	
3.6 μ M	18786	45342	70609	
1.8 μ M	19968	48547	74874	
0	21272	49474	75982	

WZ141-91				
【抑制剂】	15 分钟	1.5 小时	3 小时	
	RLU			
100 μ M	14121	50681	90633	
50 μ M	15454	48267	82610	
25 μ M	17075	47086	80557	
12.5 μ M	17805	47103	78131	
7.25 μ M	18562	46951	77770	
3.6 μ M	19657	48447	79251	
1.8 μ M	19120	48316	80070	
0	20326	49779	80791	

A

B

C

图6A-6C

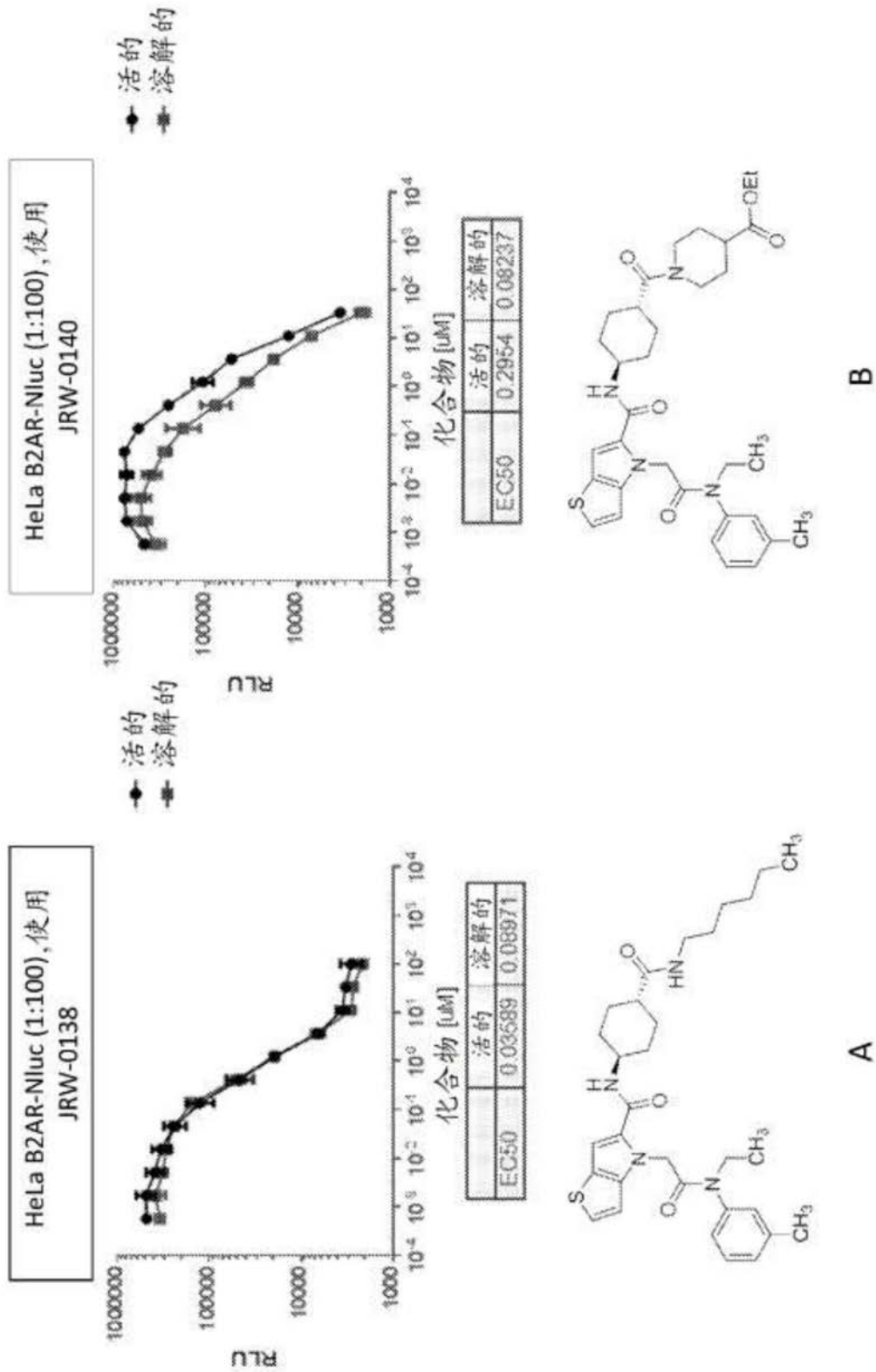


图7A-7B

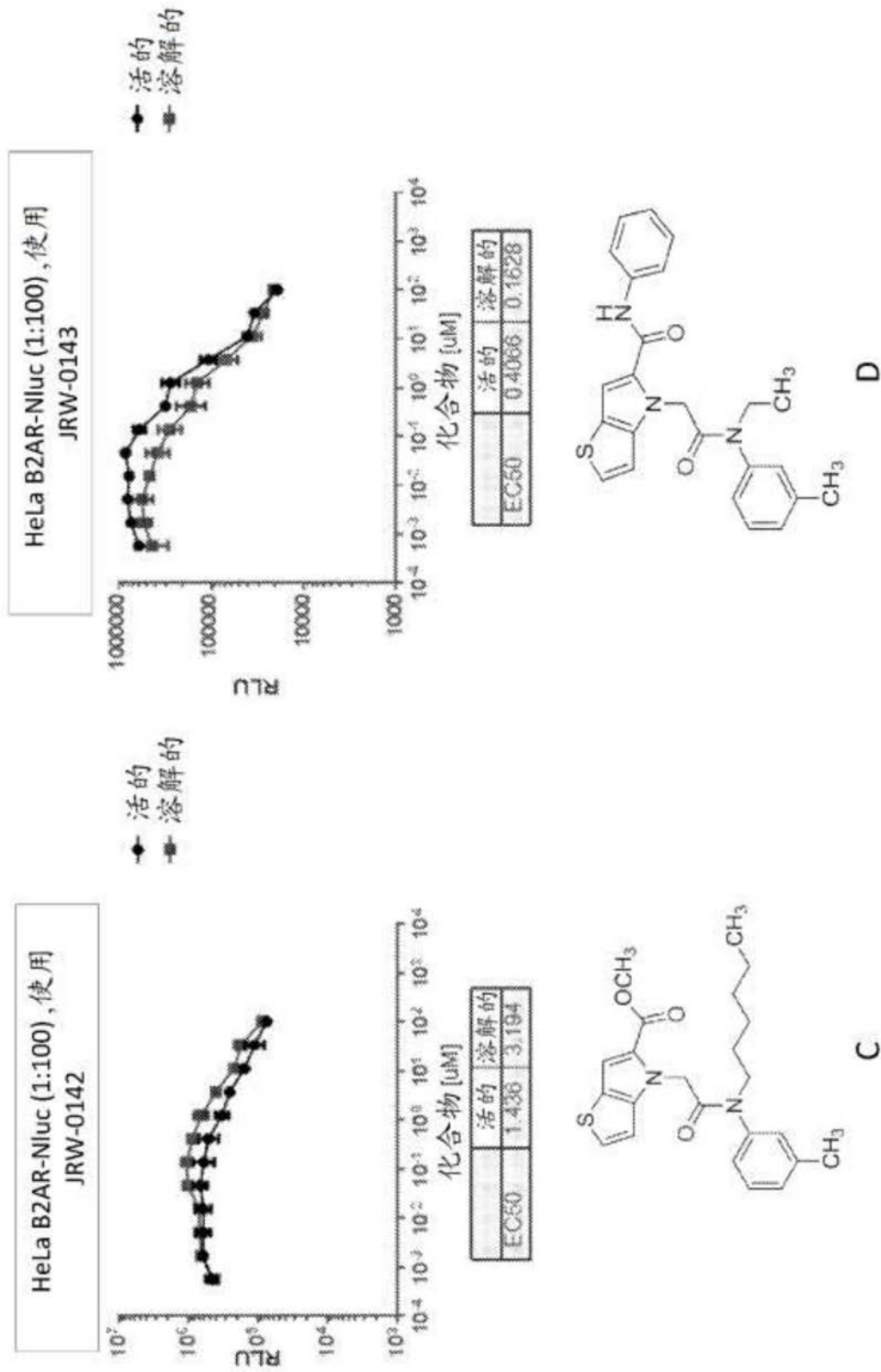


图7C-7D

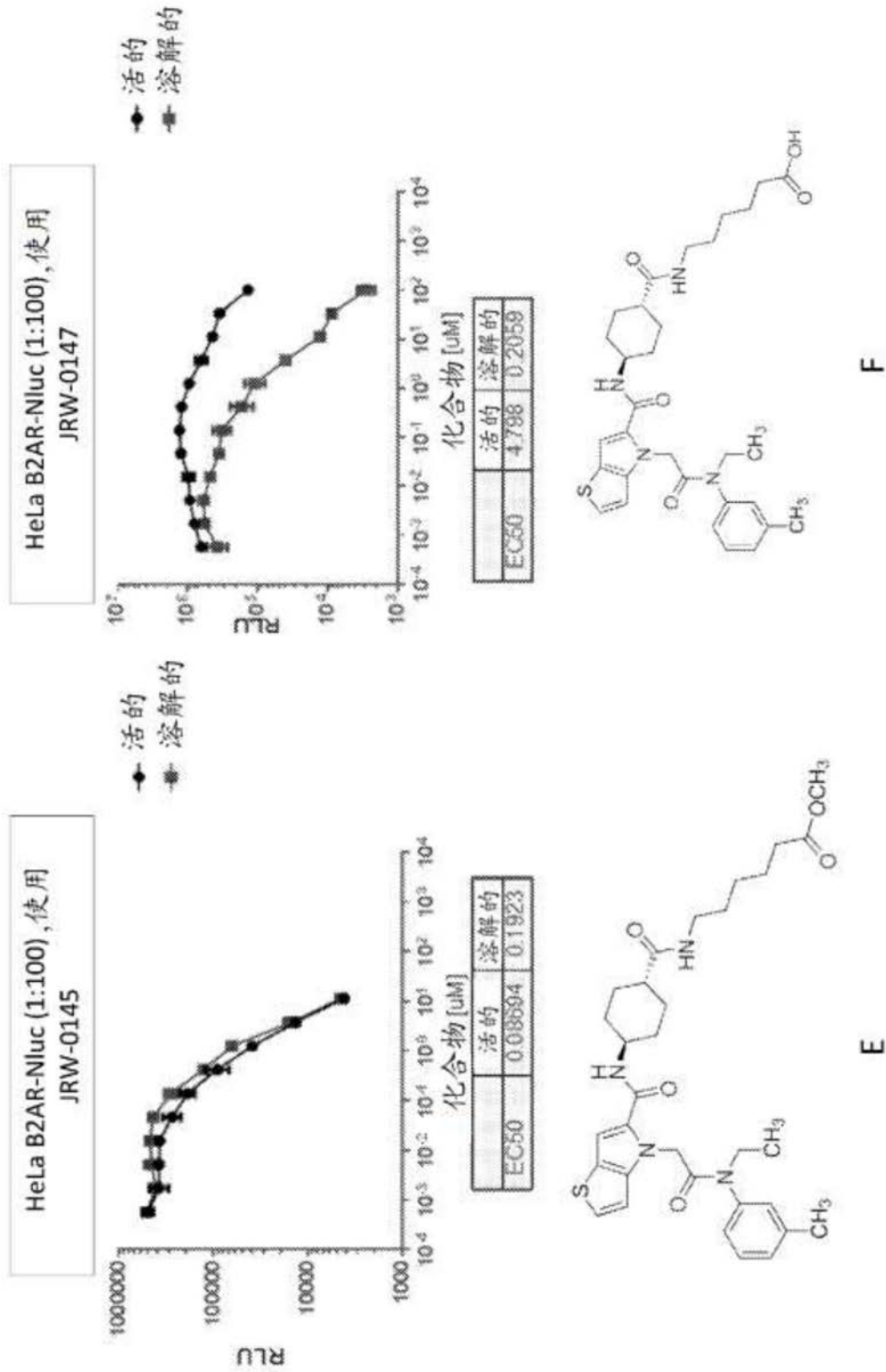


图7E-7F

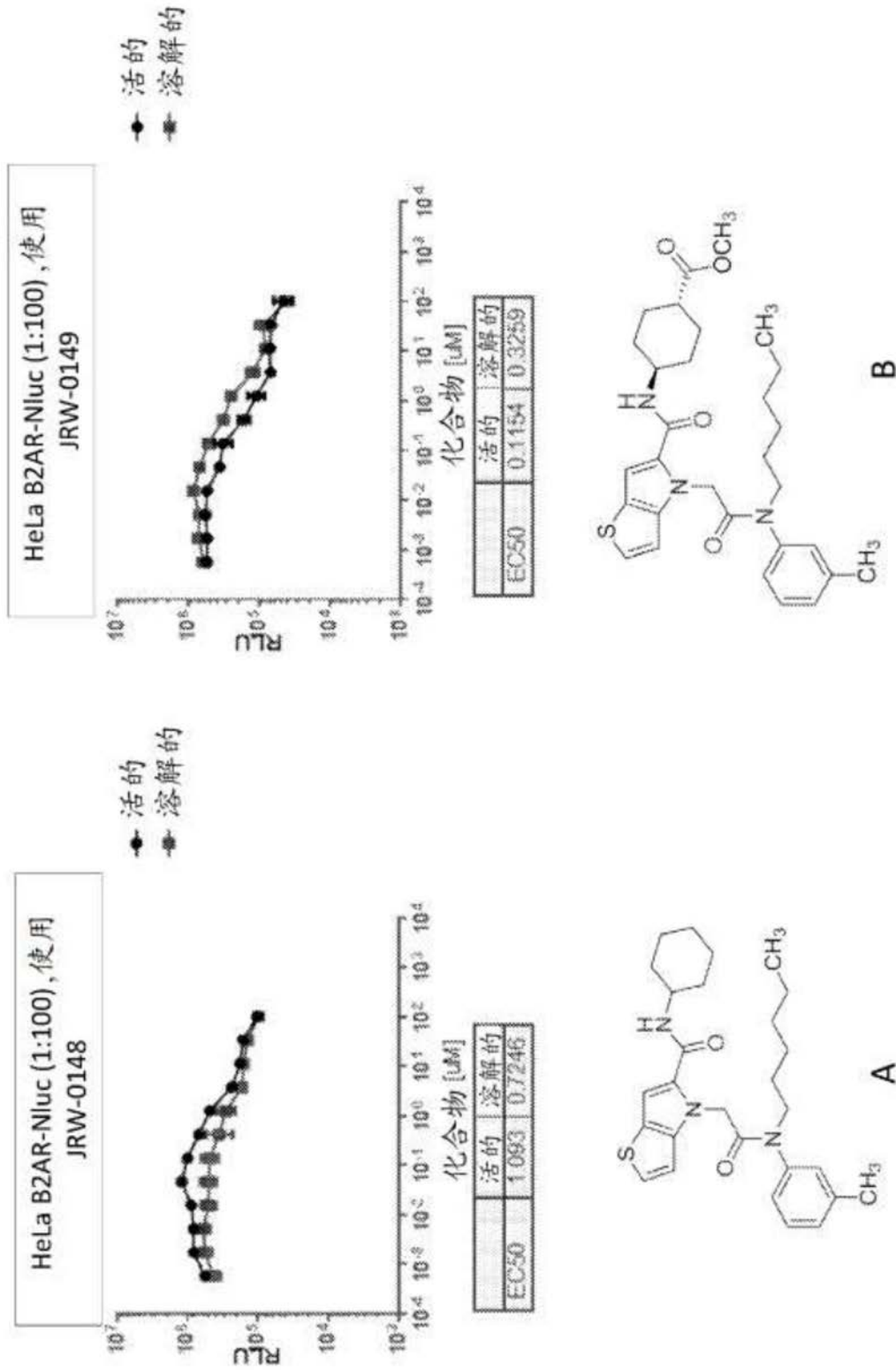


图8A-8B

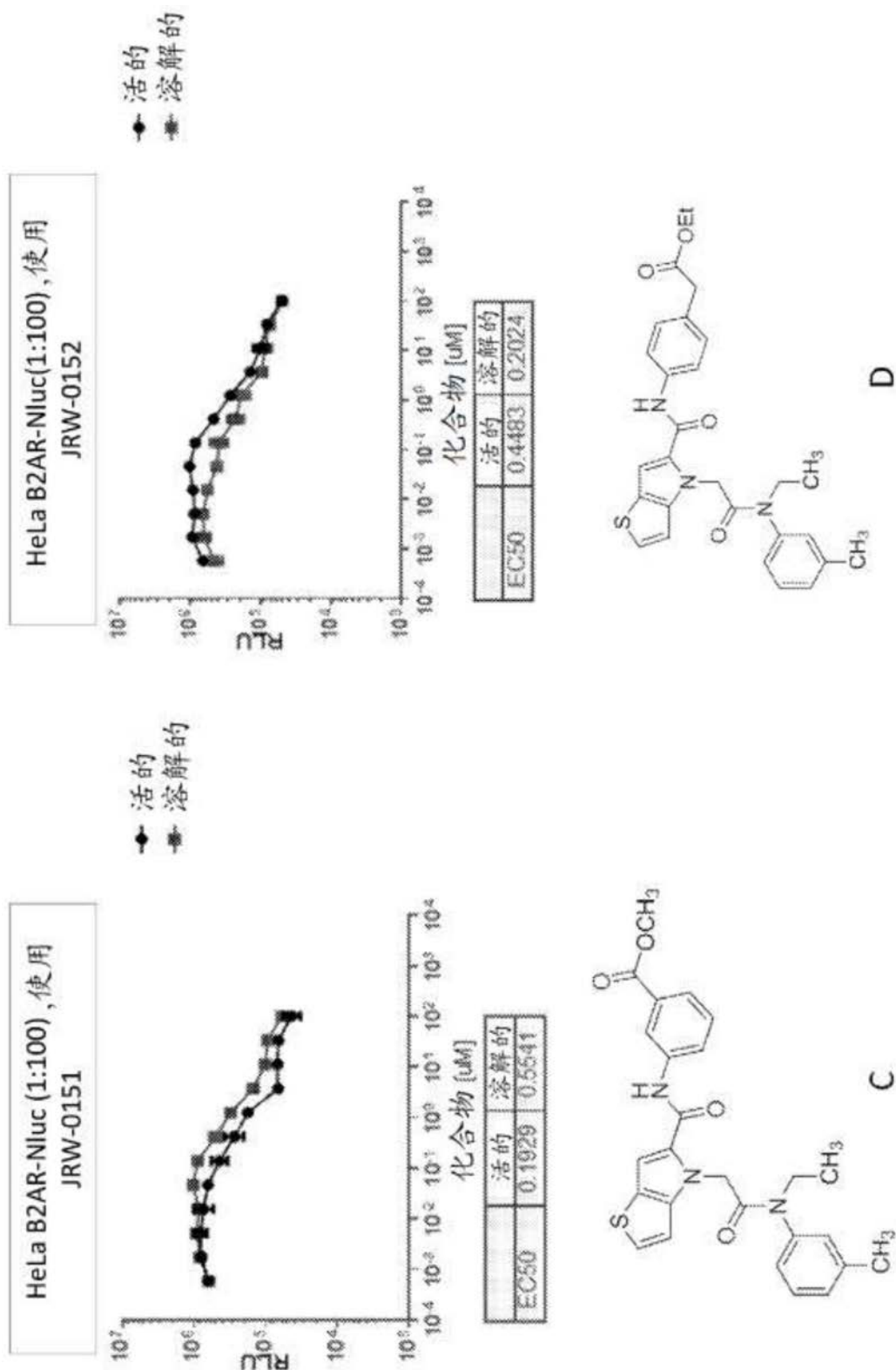


图8C-8D

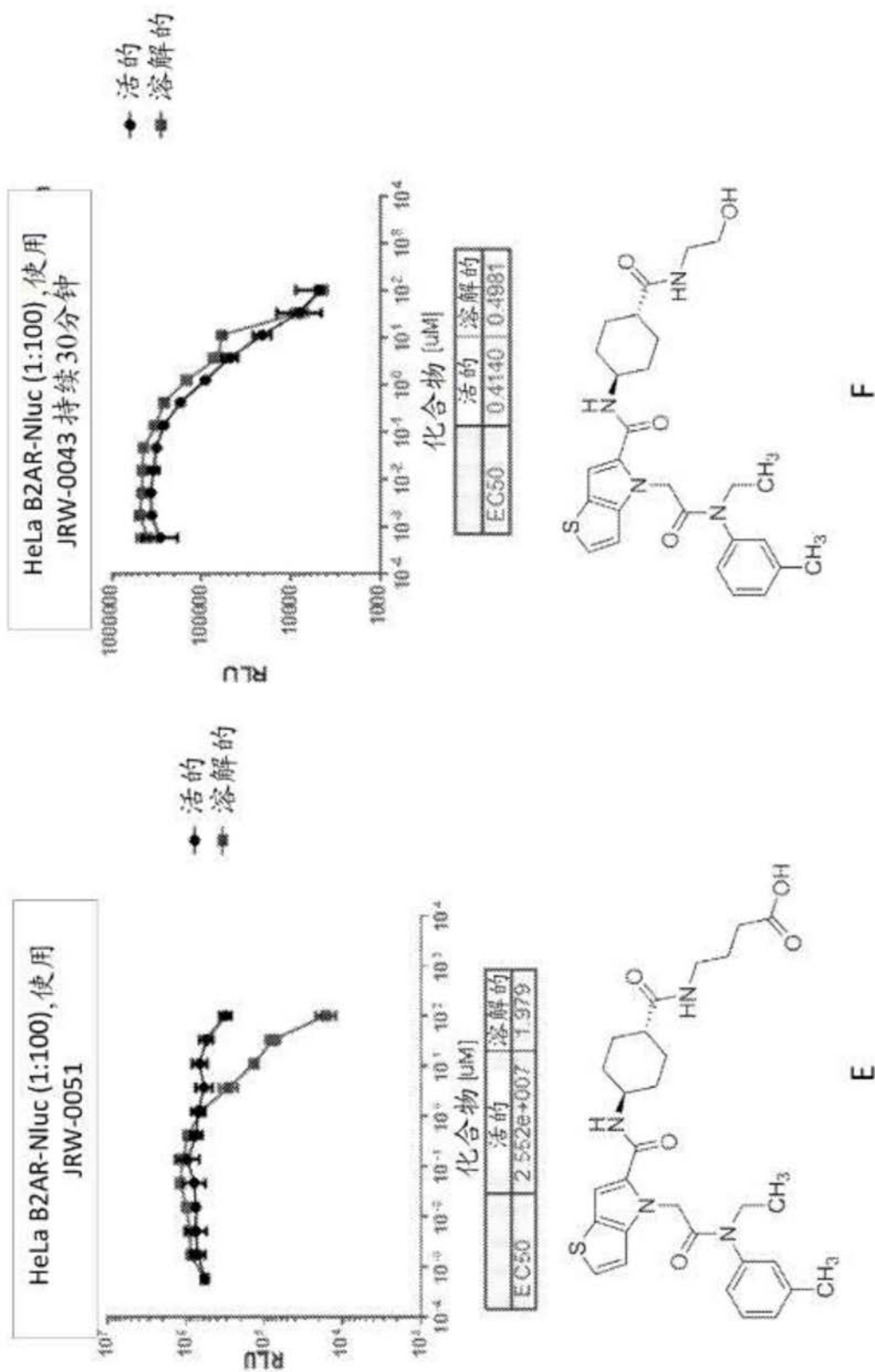


图8E-8F

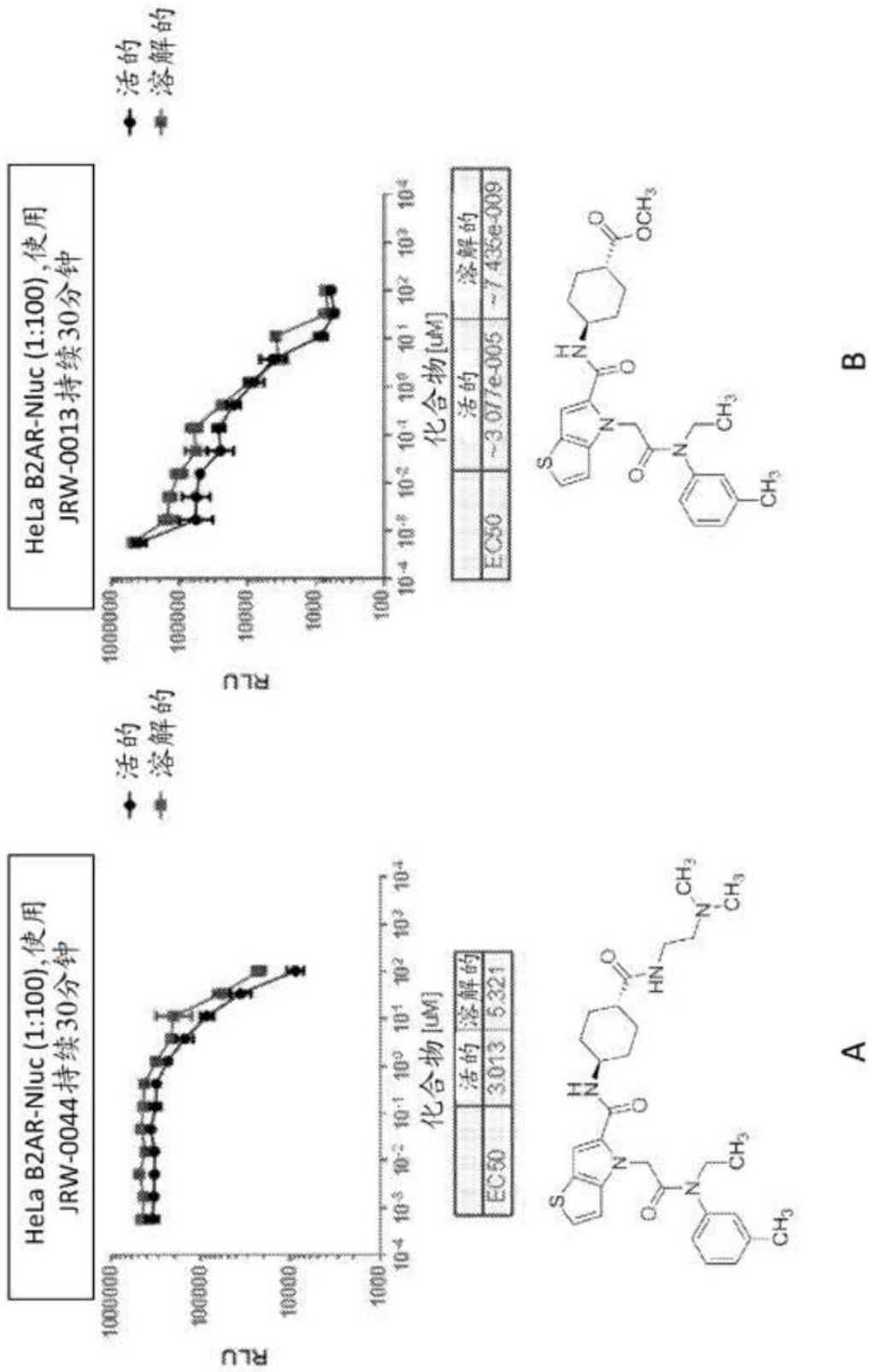


图9A-9B

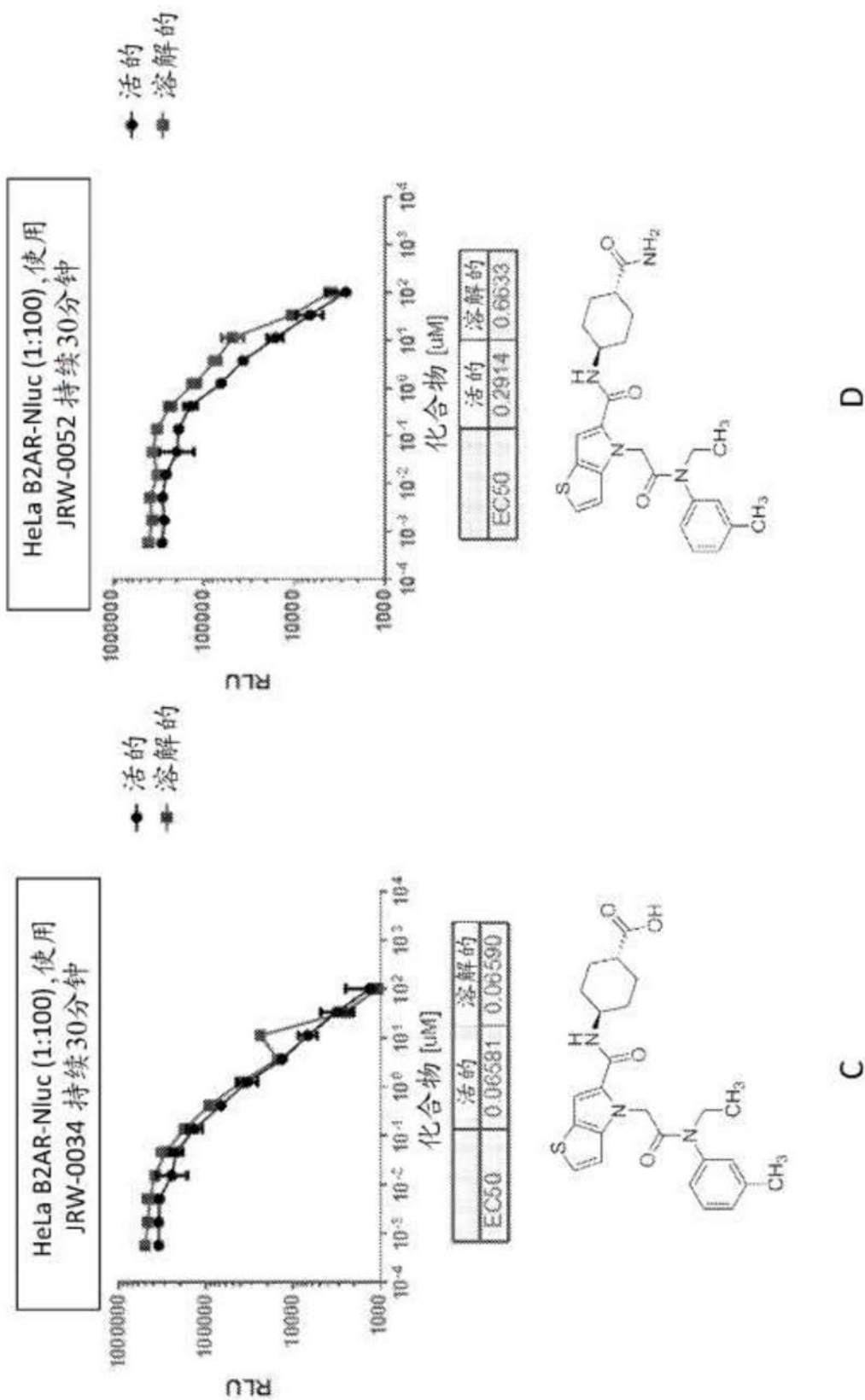


图9C-9D

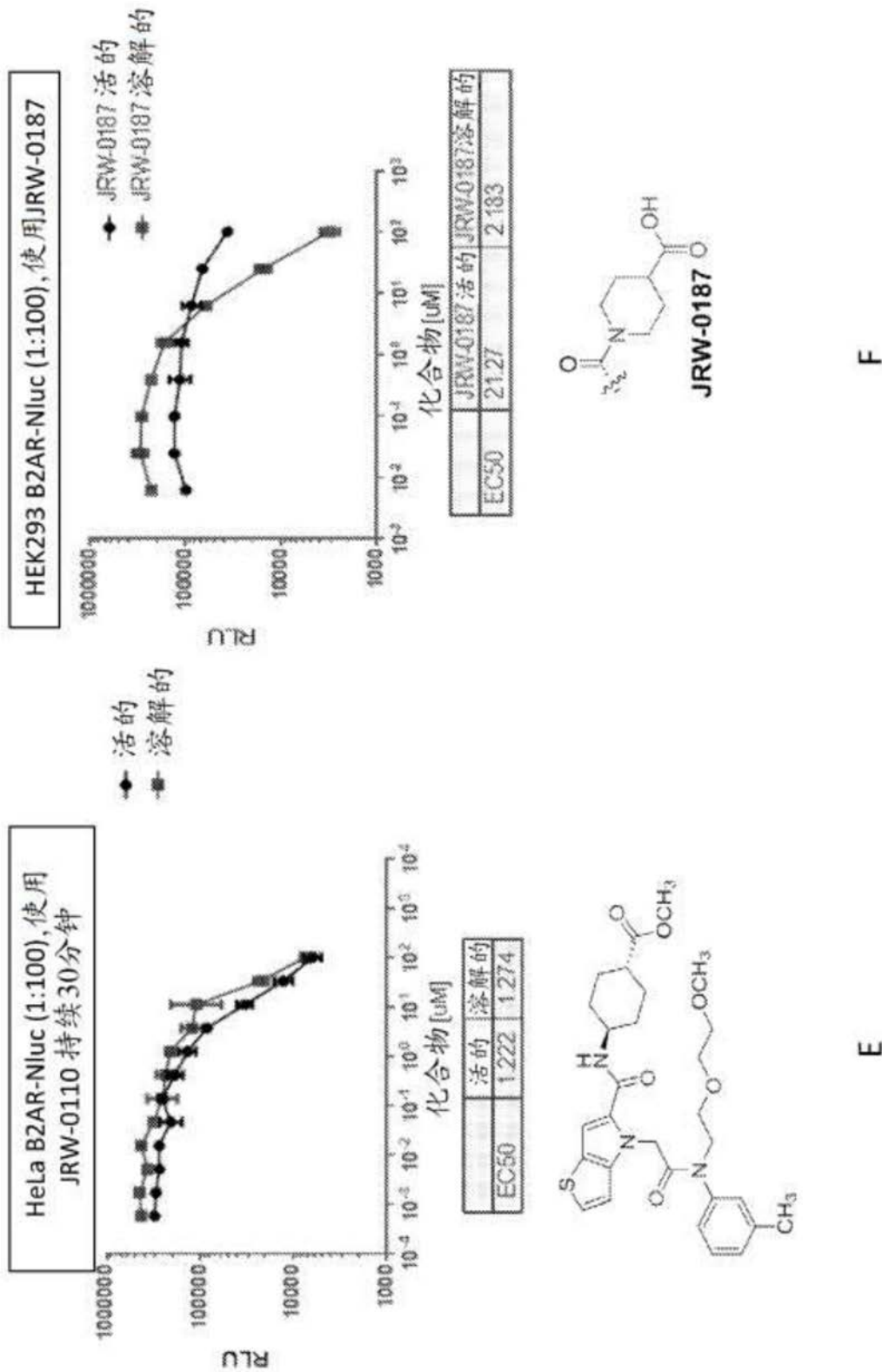


图9E-9F

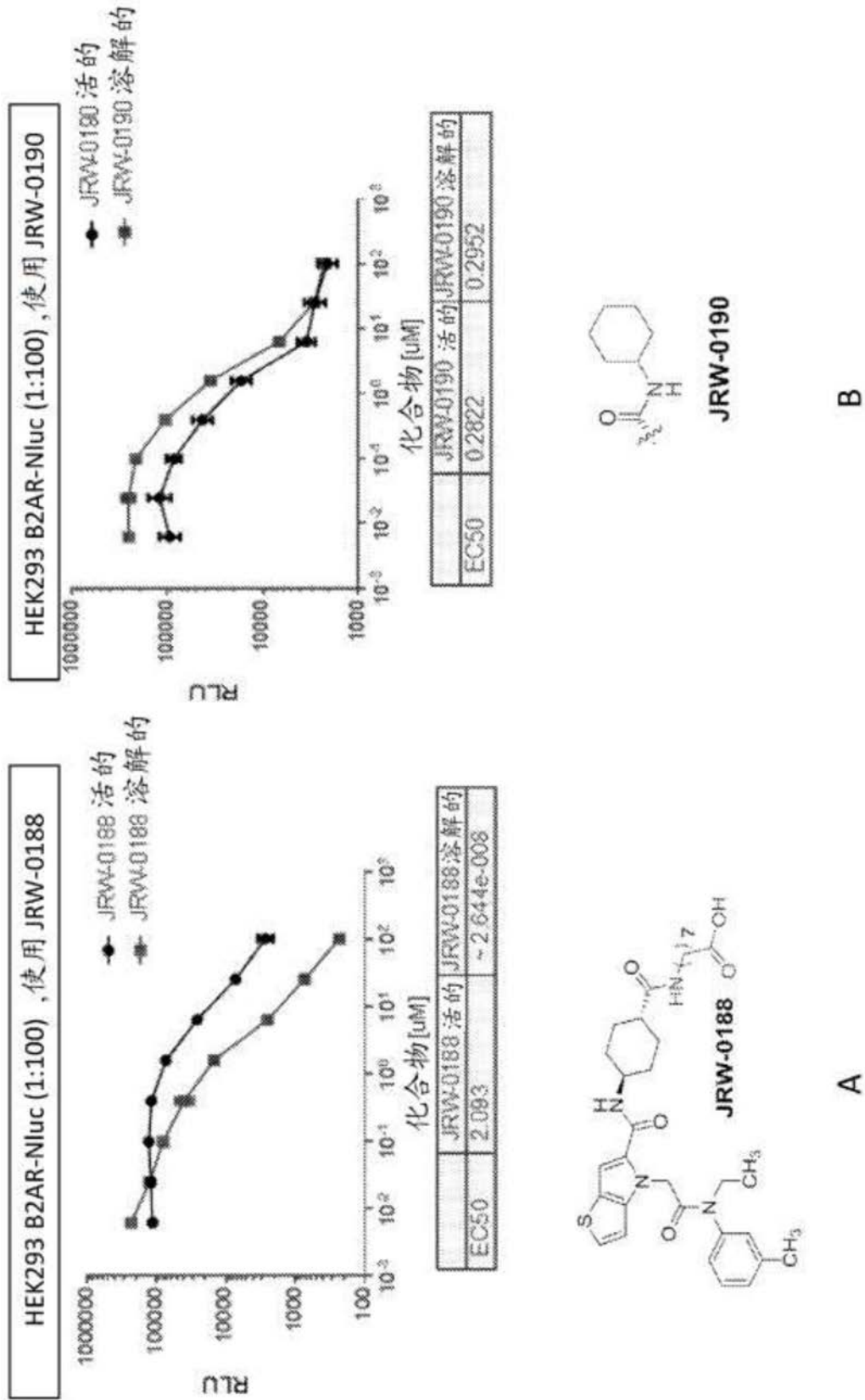


图10A-10B

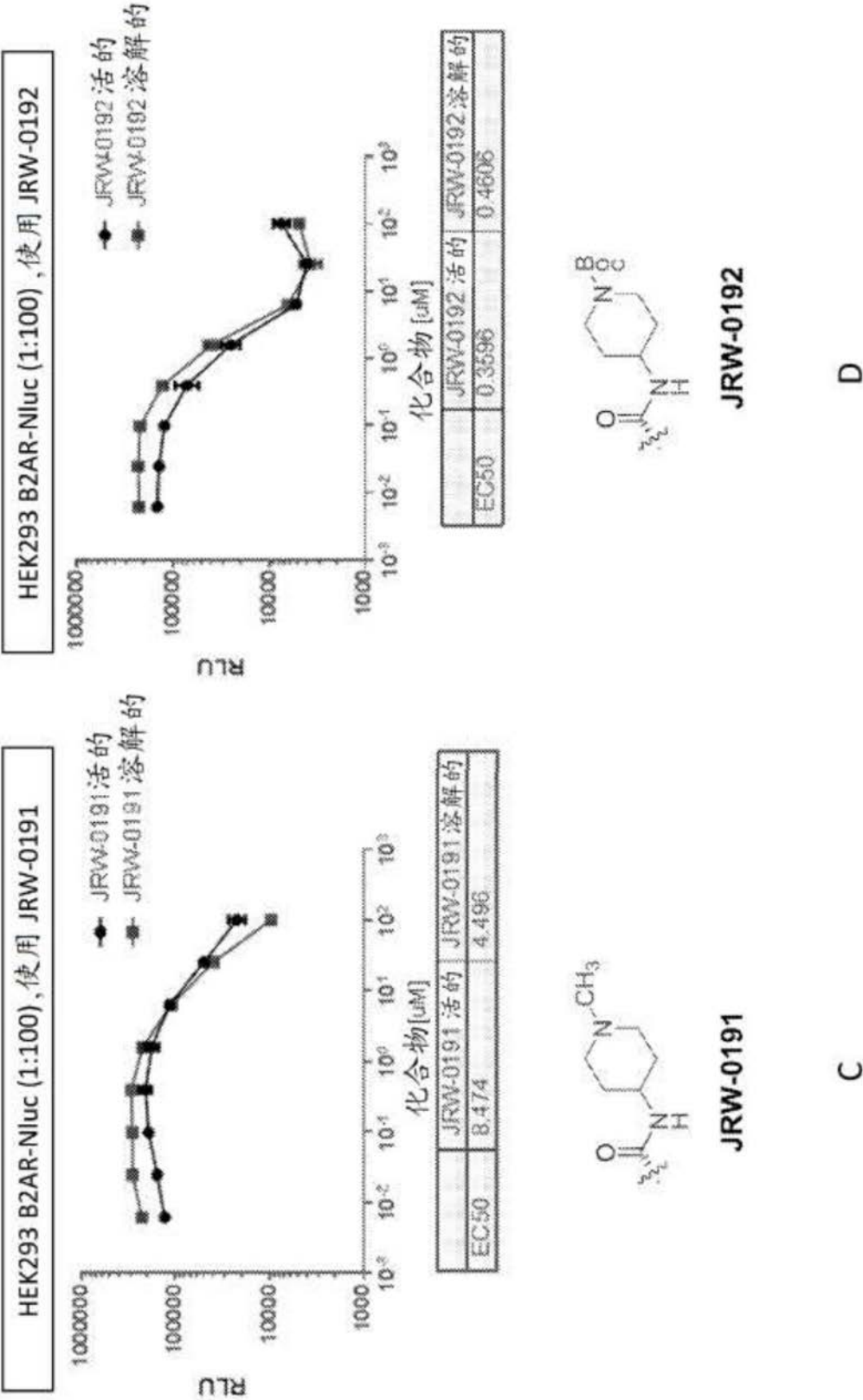


图10C-10D

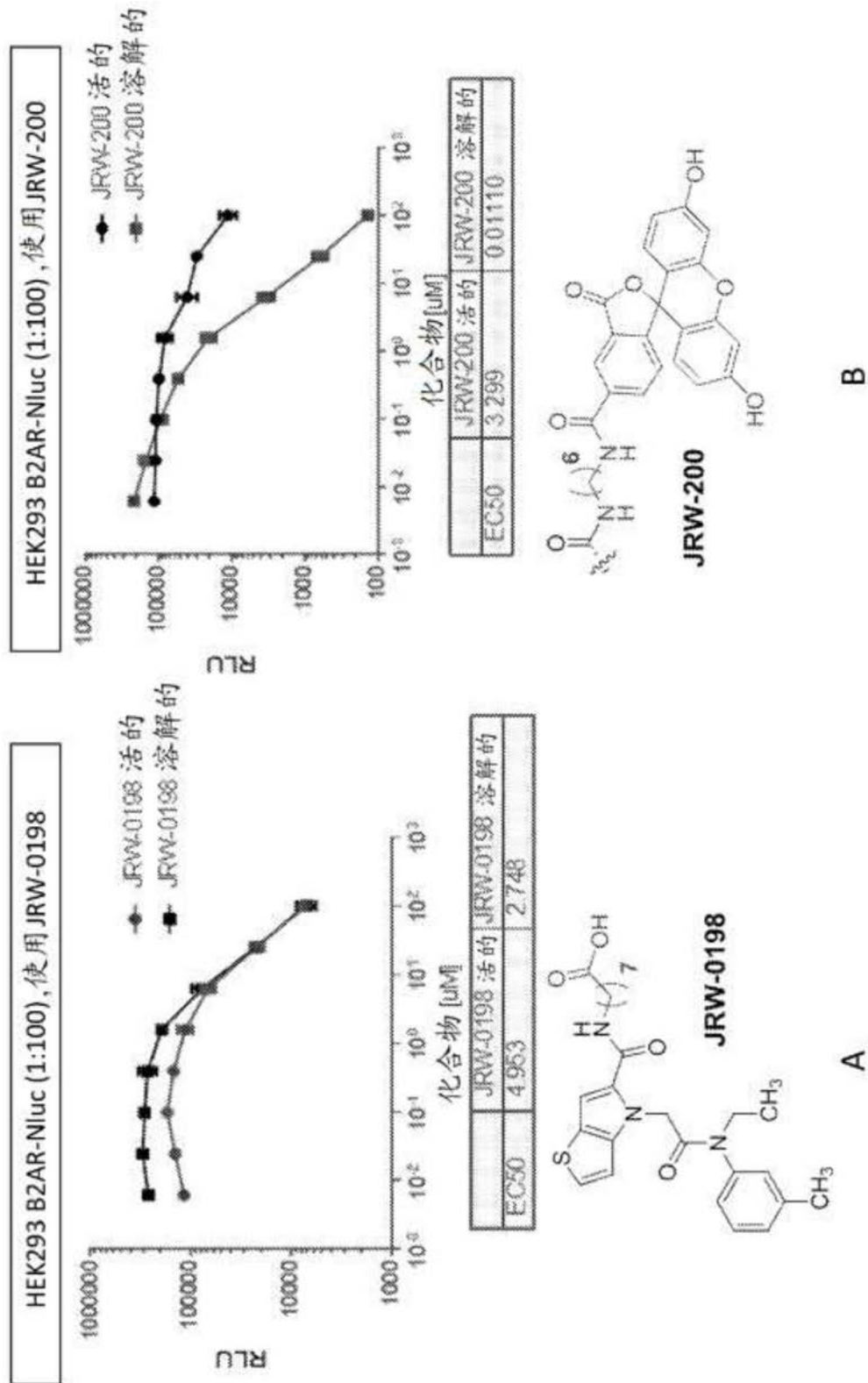


图11A-11B

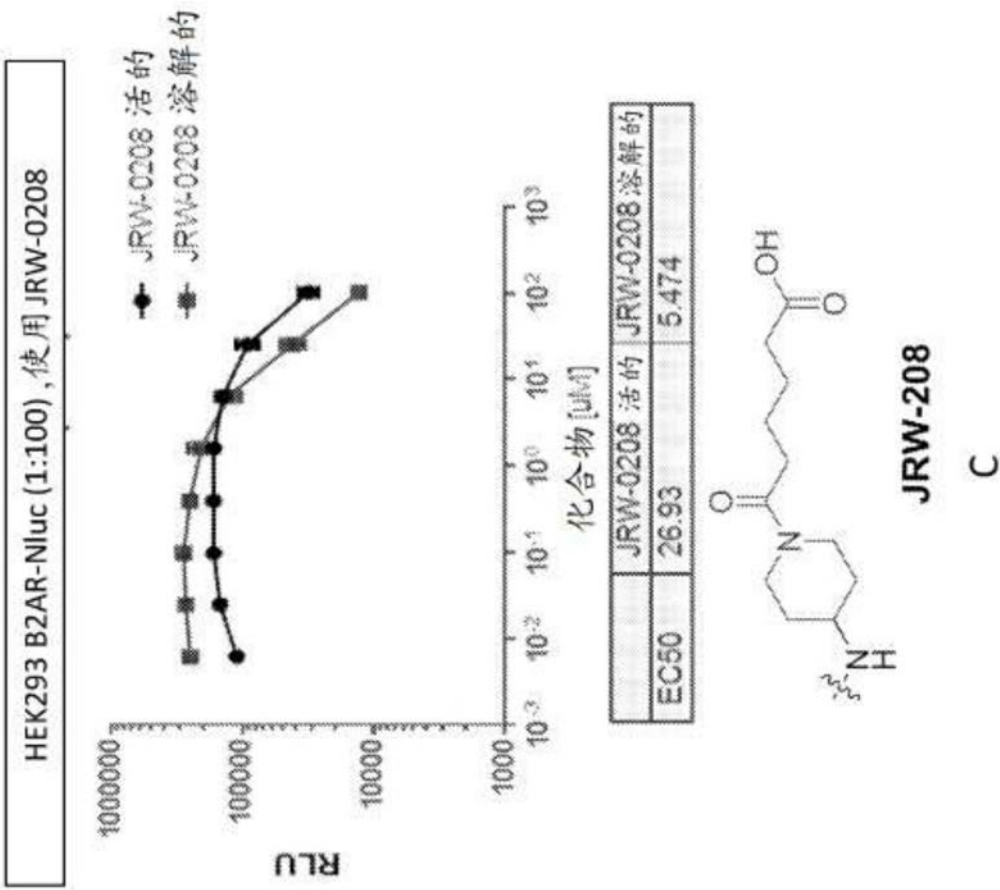


图11C

伪细胞外BRET

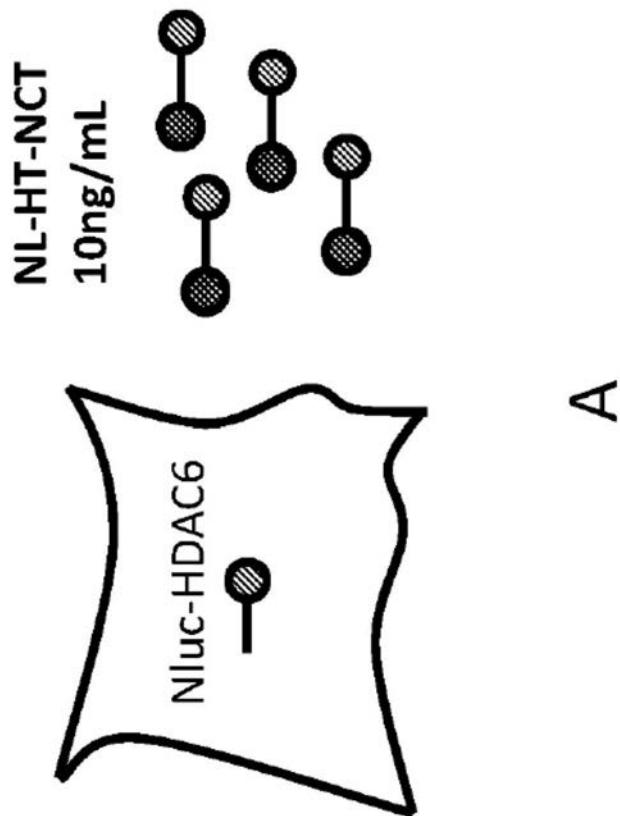


图12A

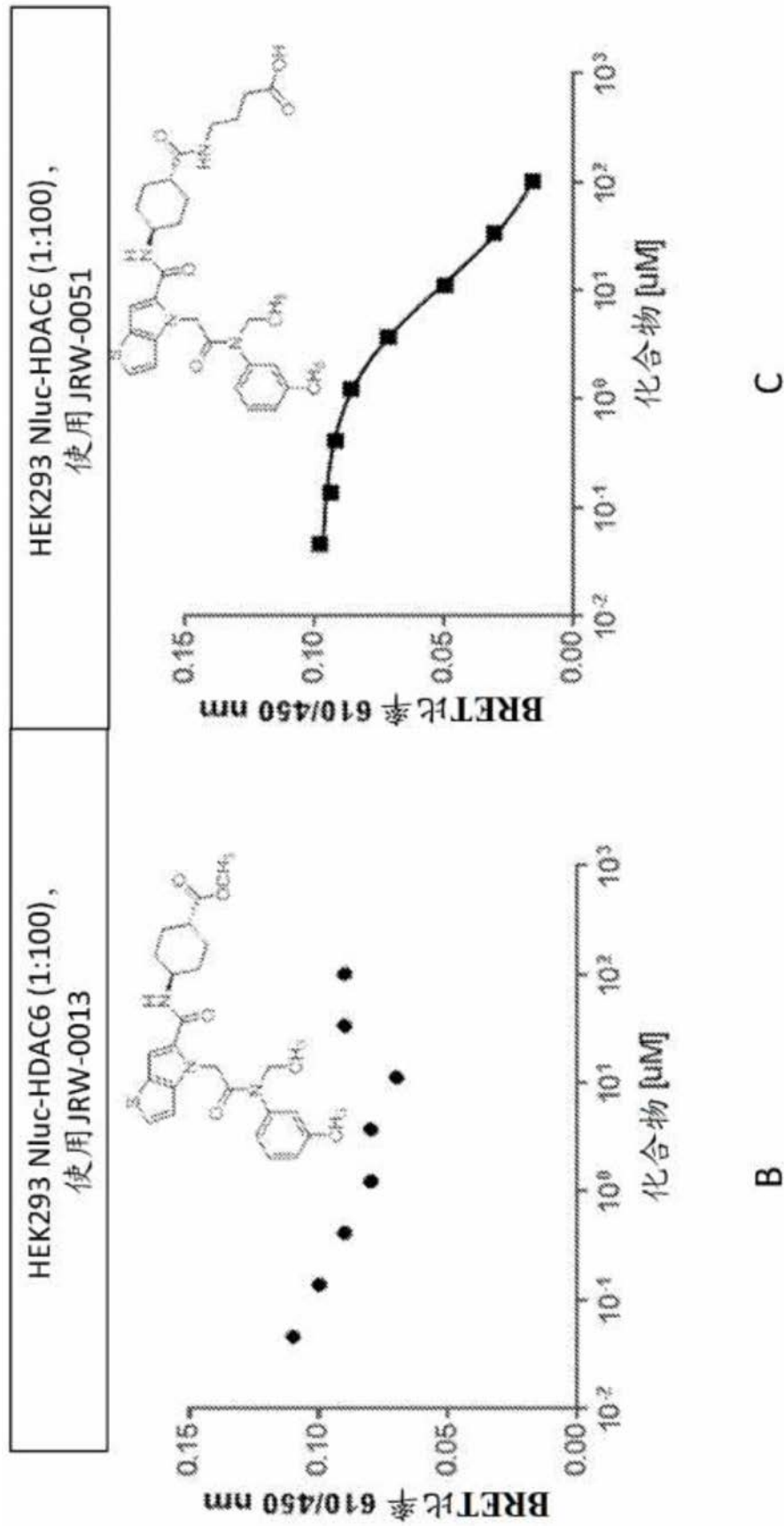


图12B-13C

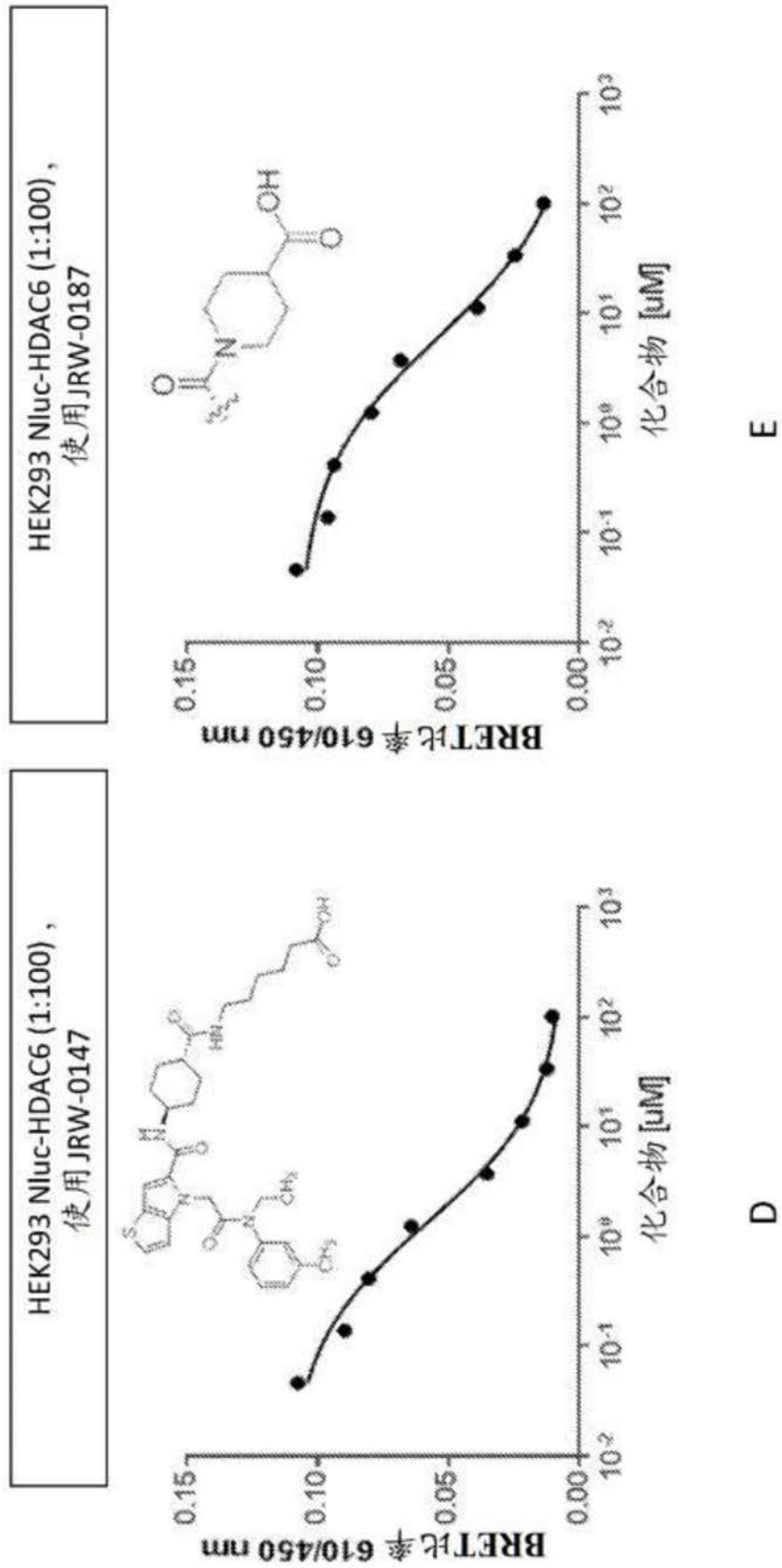


图12D-12E

伪细胞外Nluc

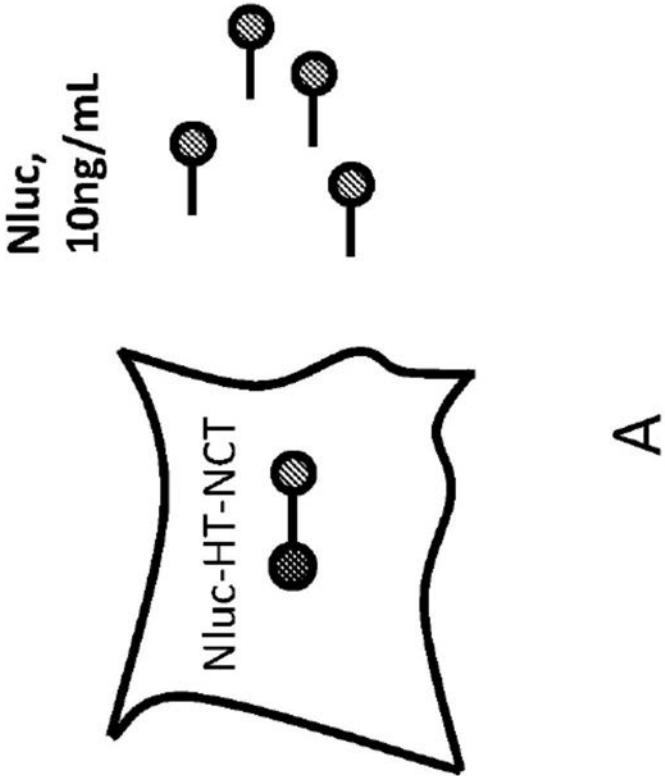


图13A

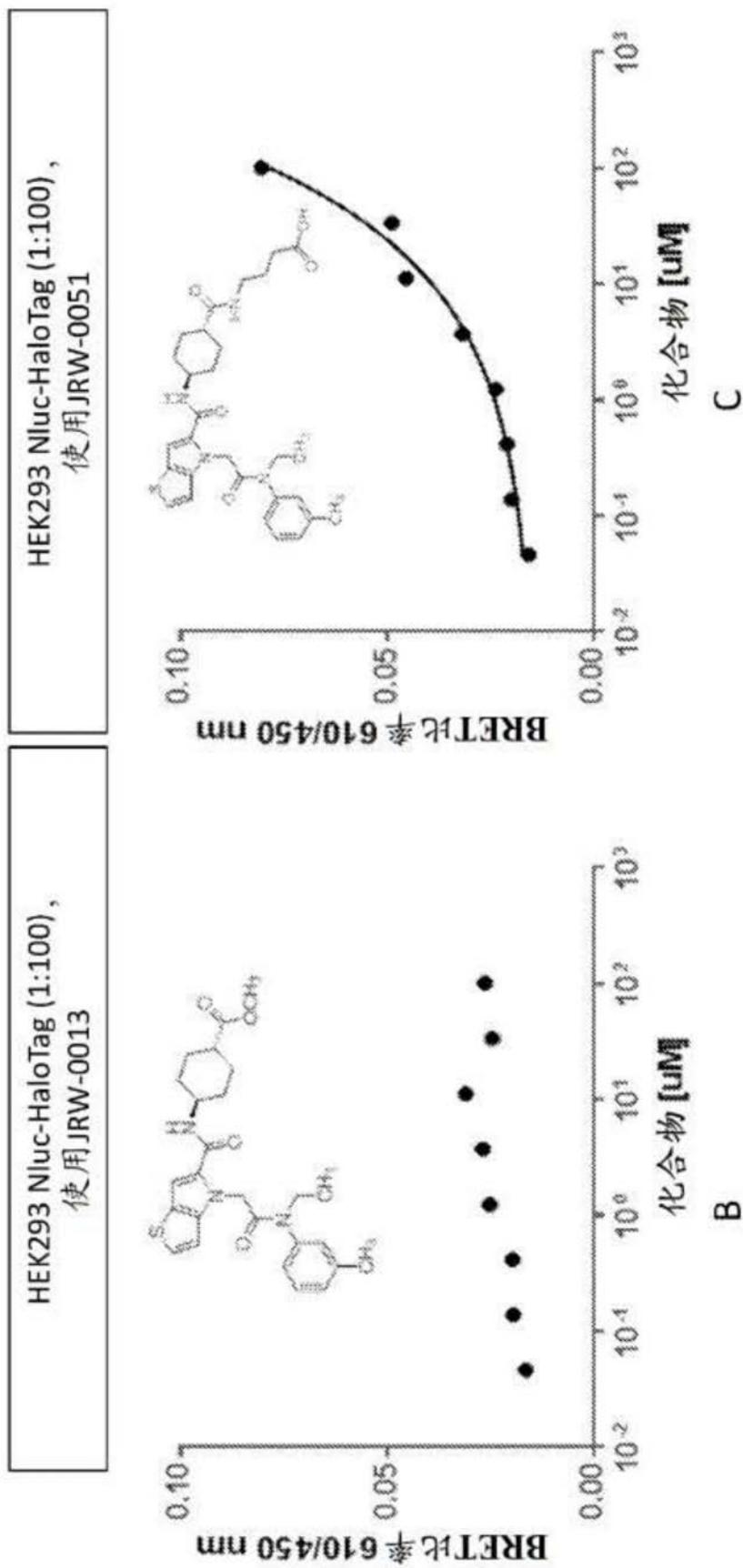


图13B-13C

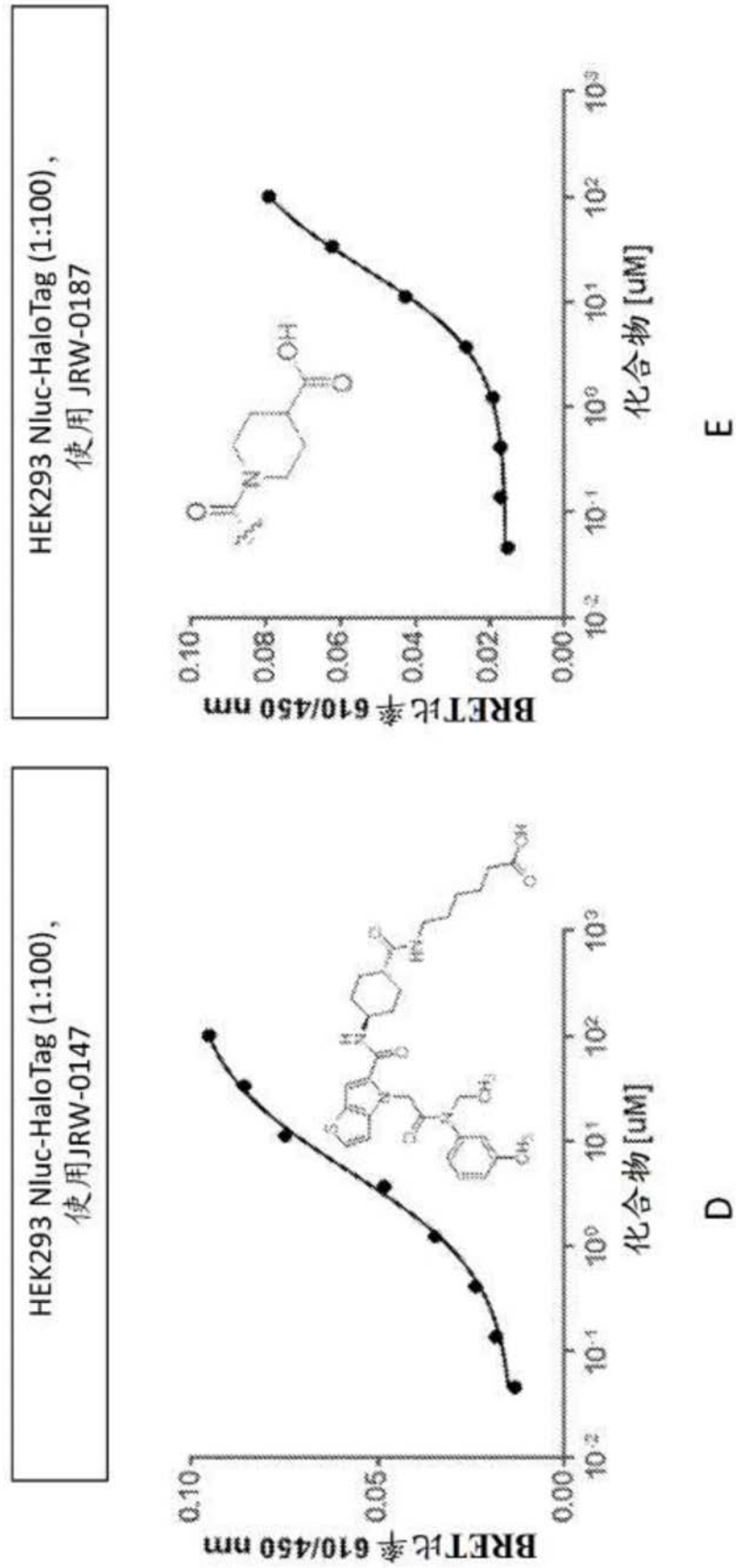


图13D-13E

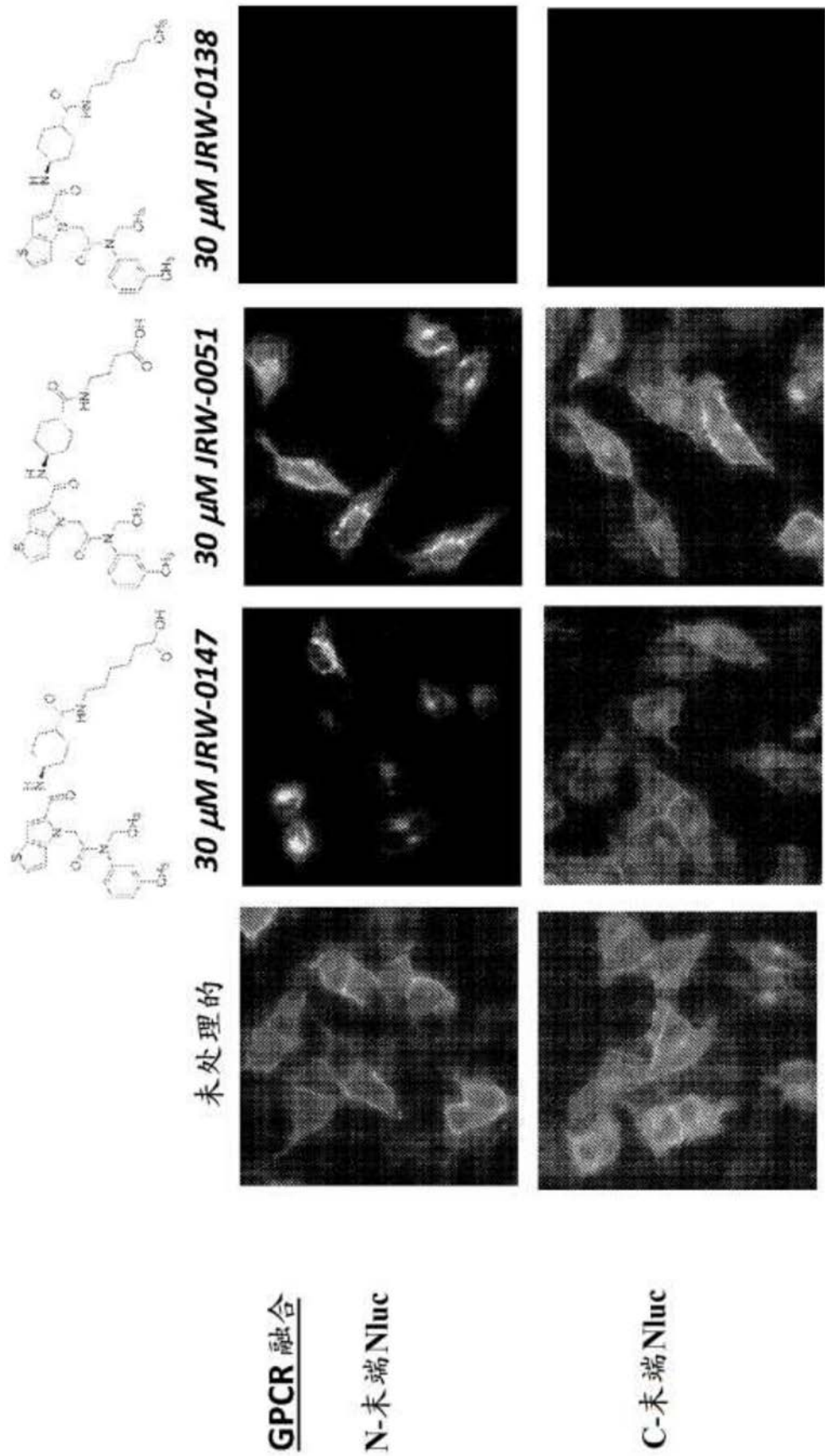


图14

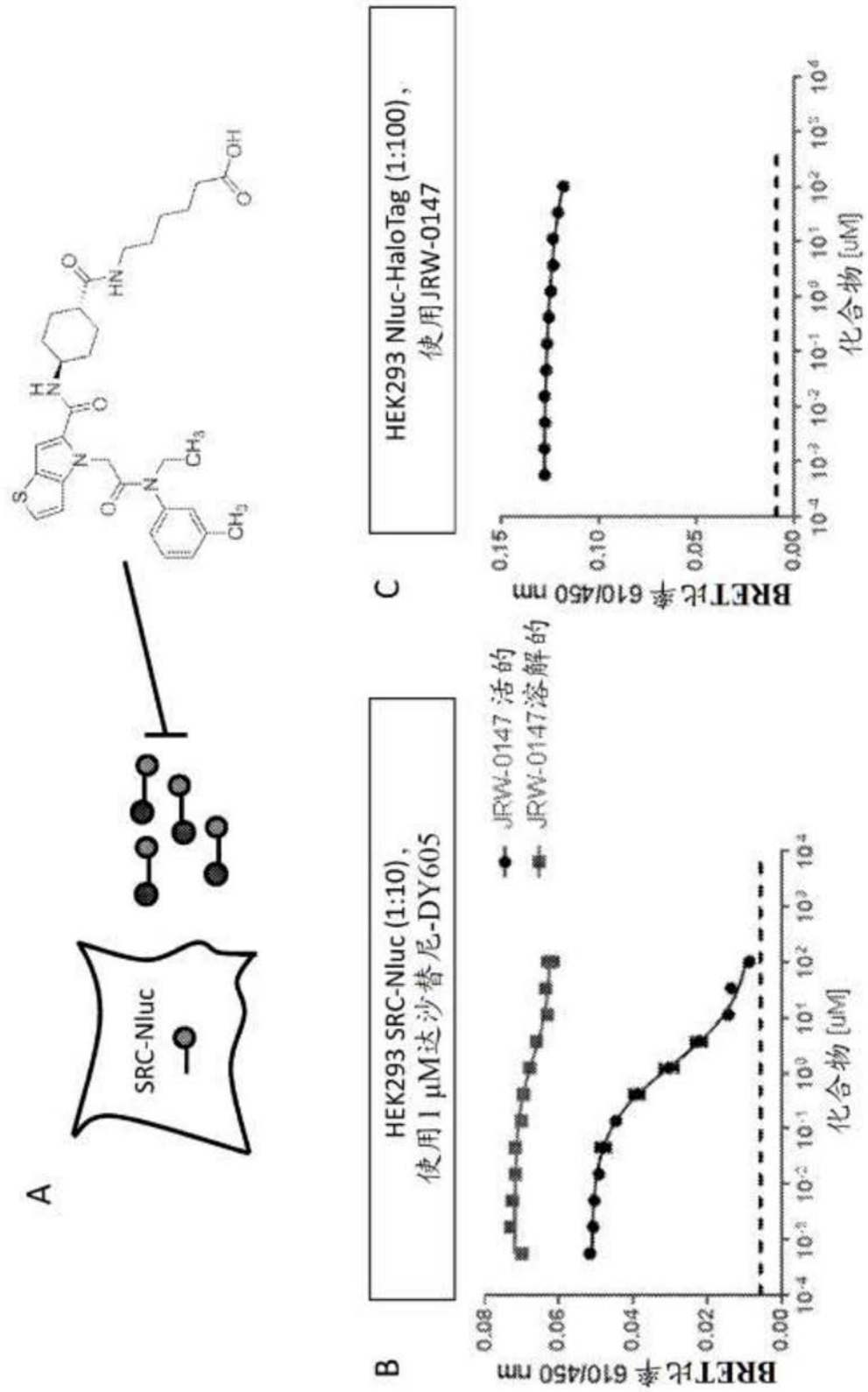


图15A-15C

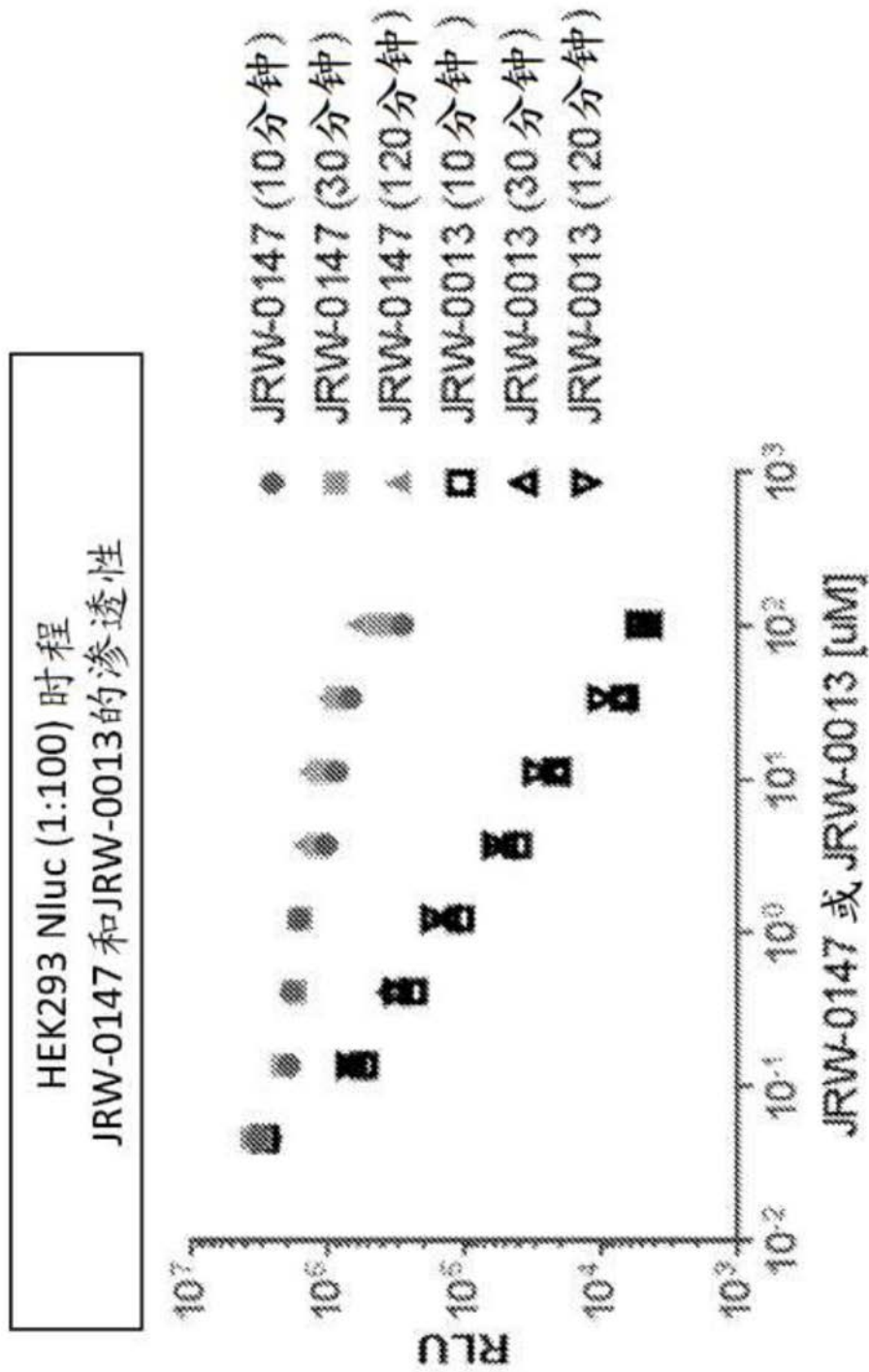


图16

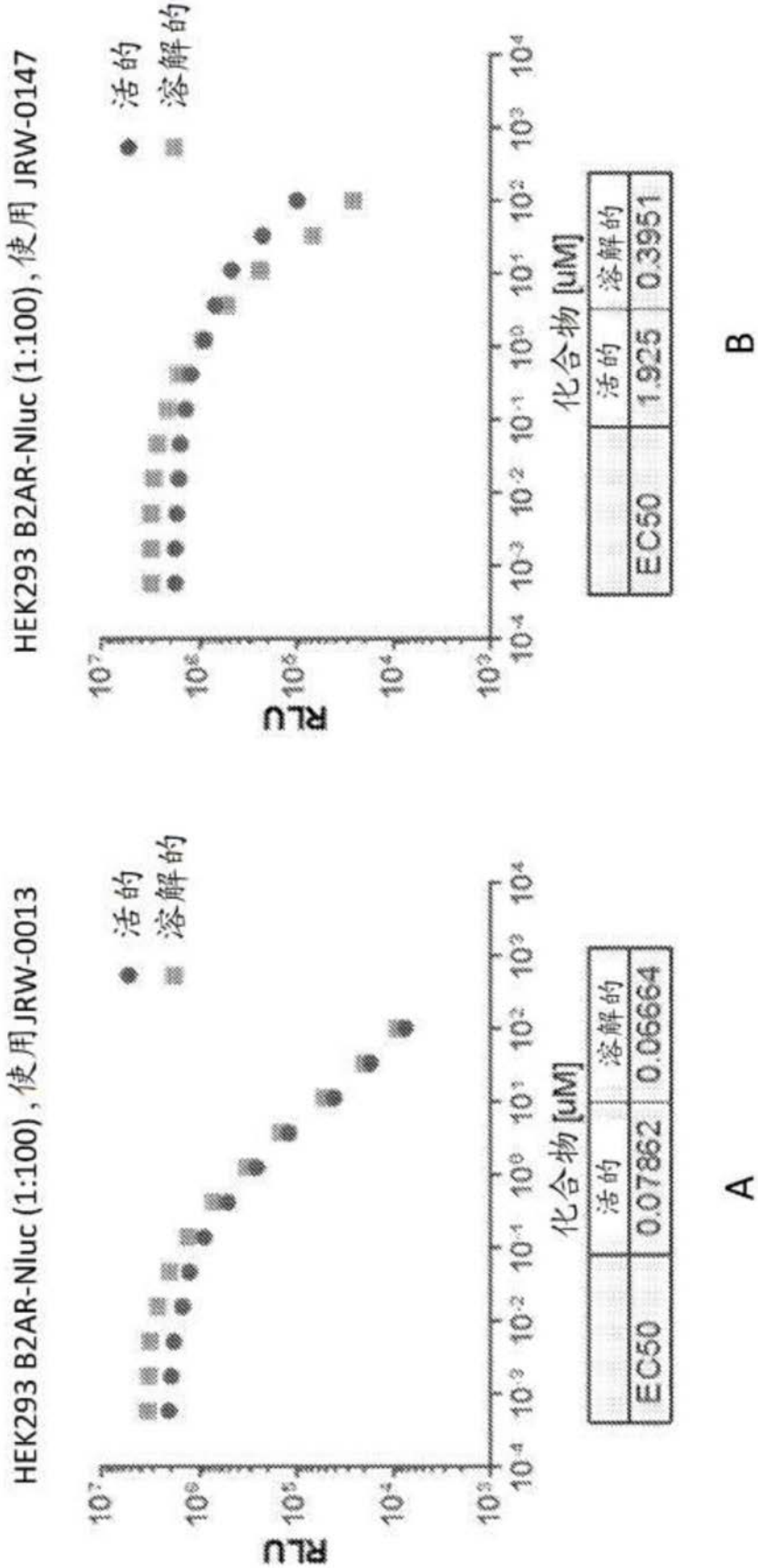


图17A-17B

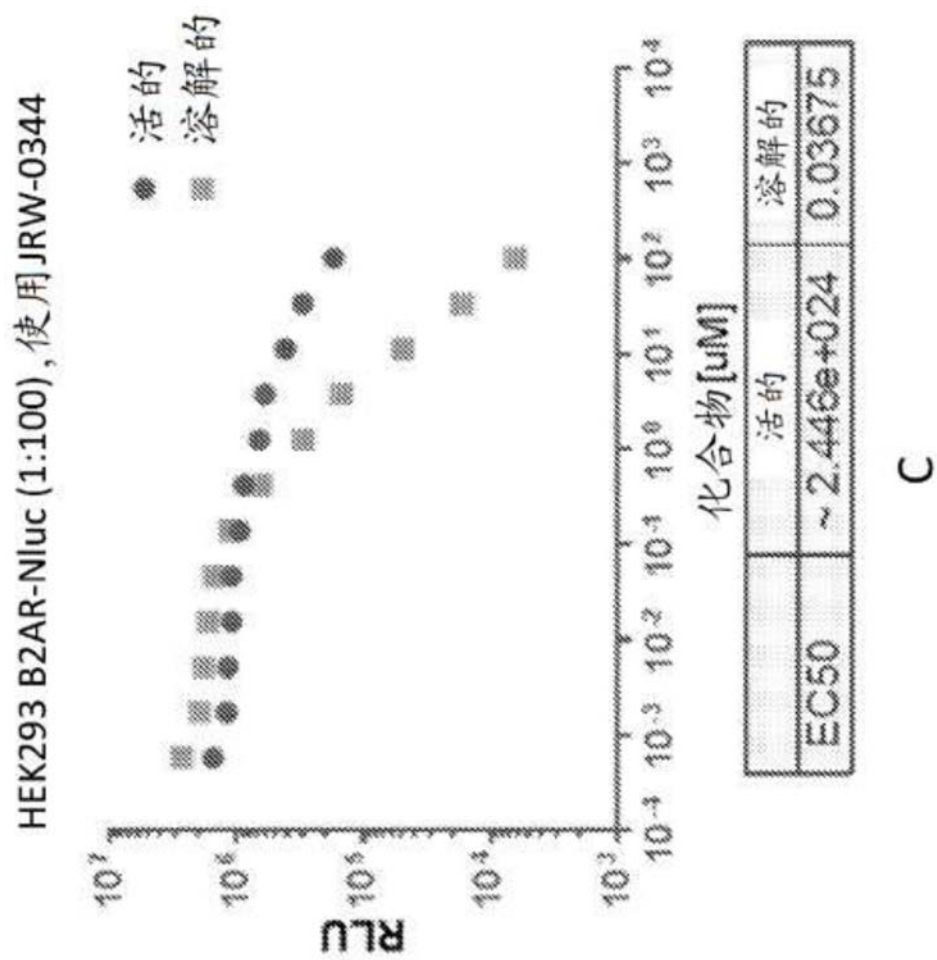


图17C

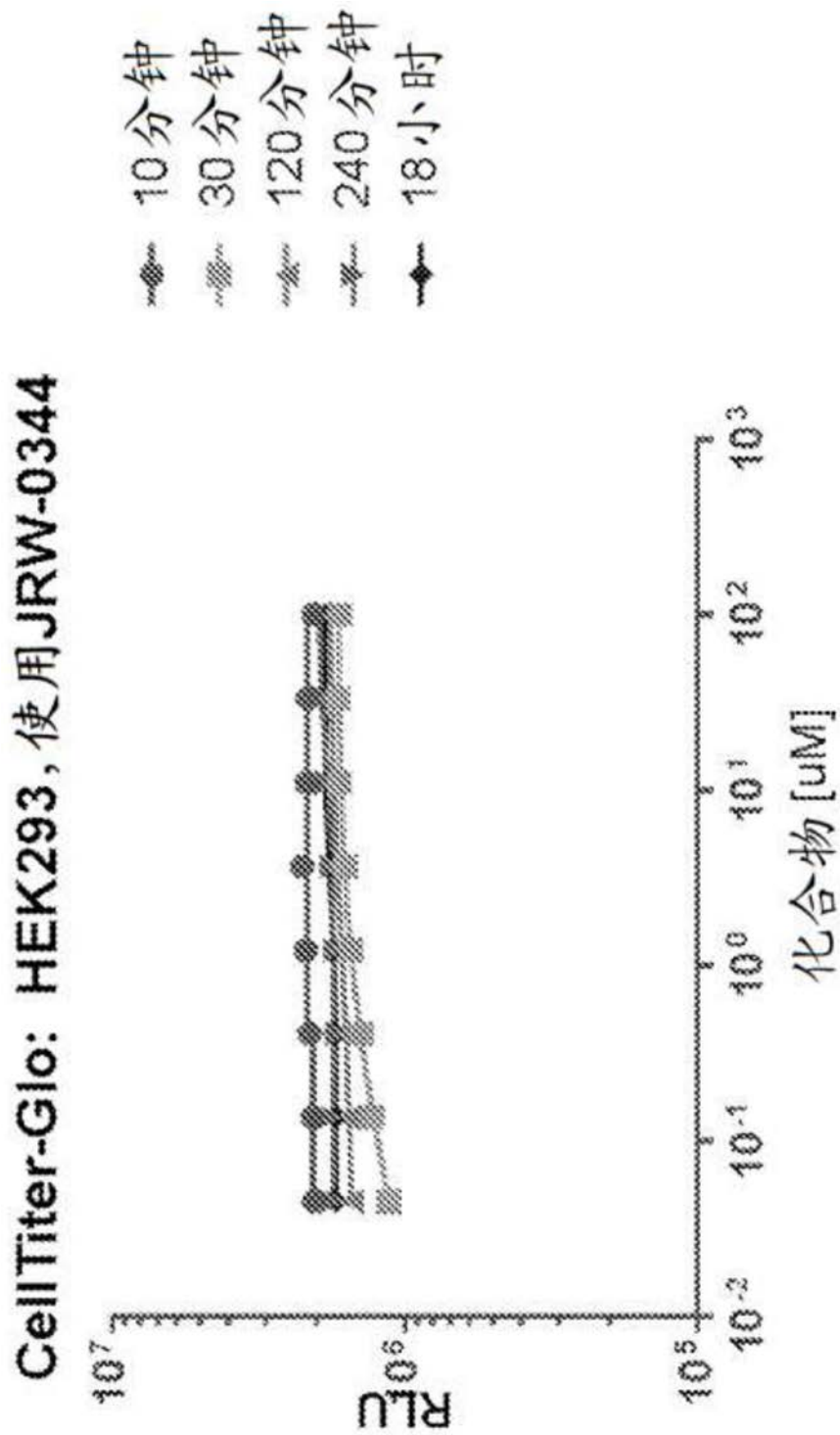


图18A

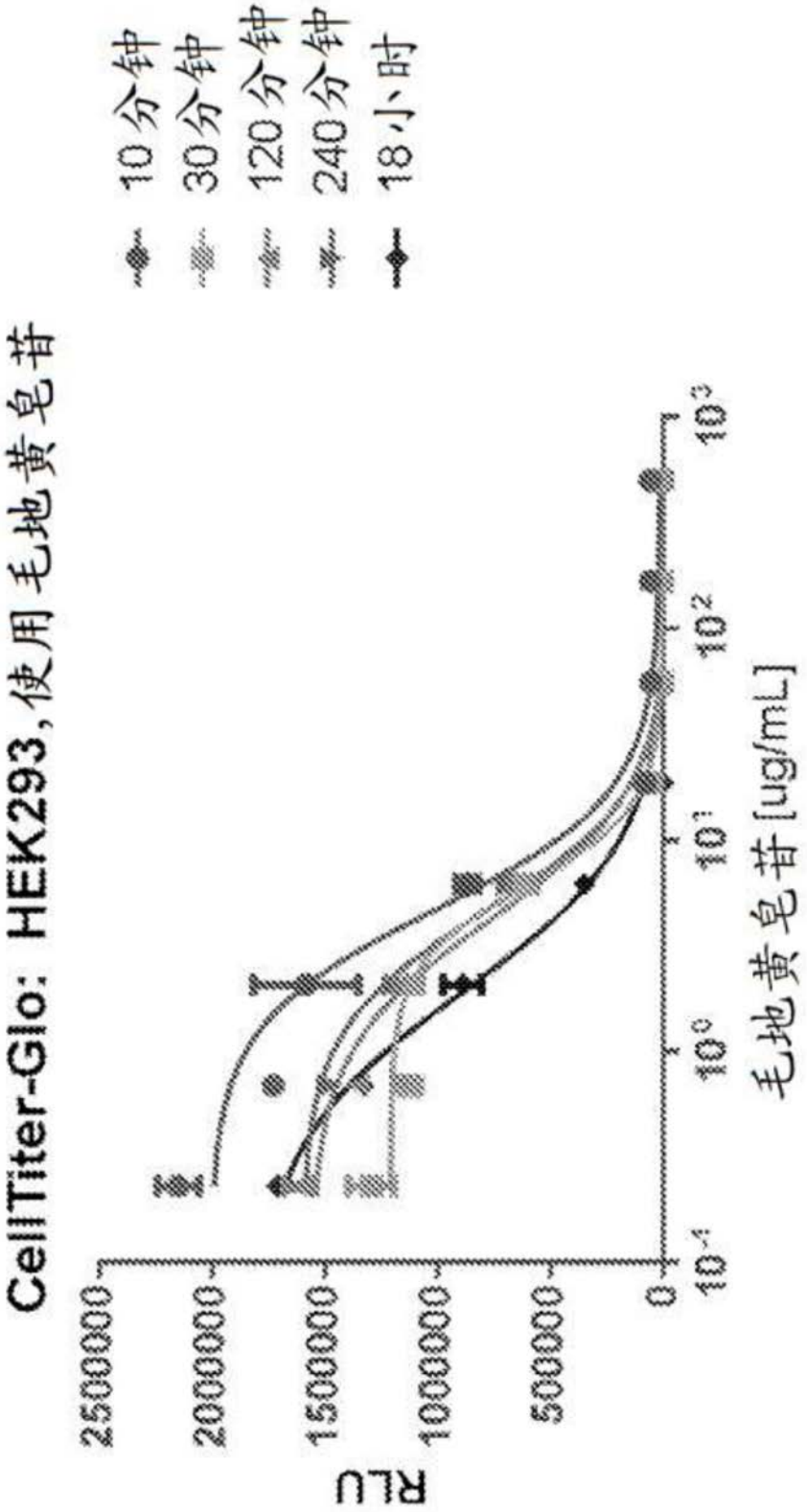


图18B

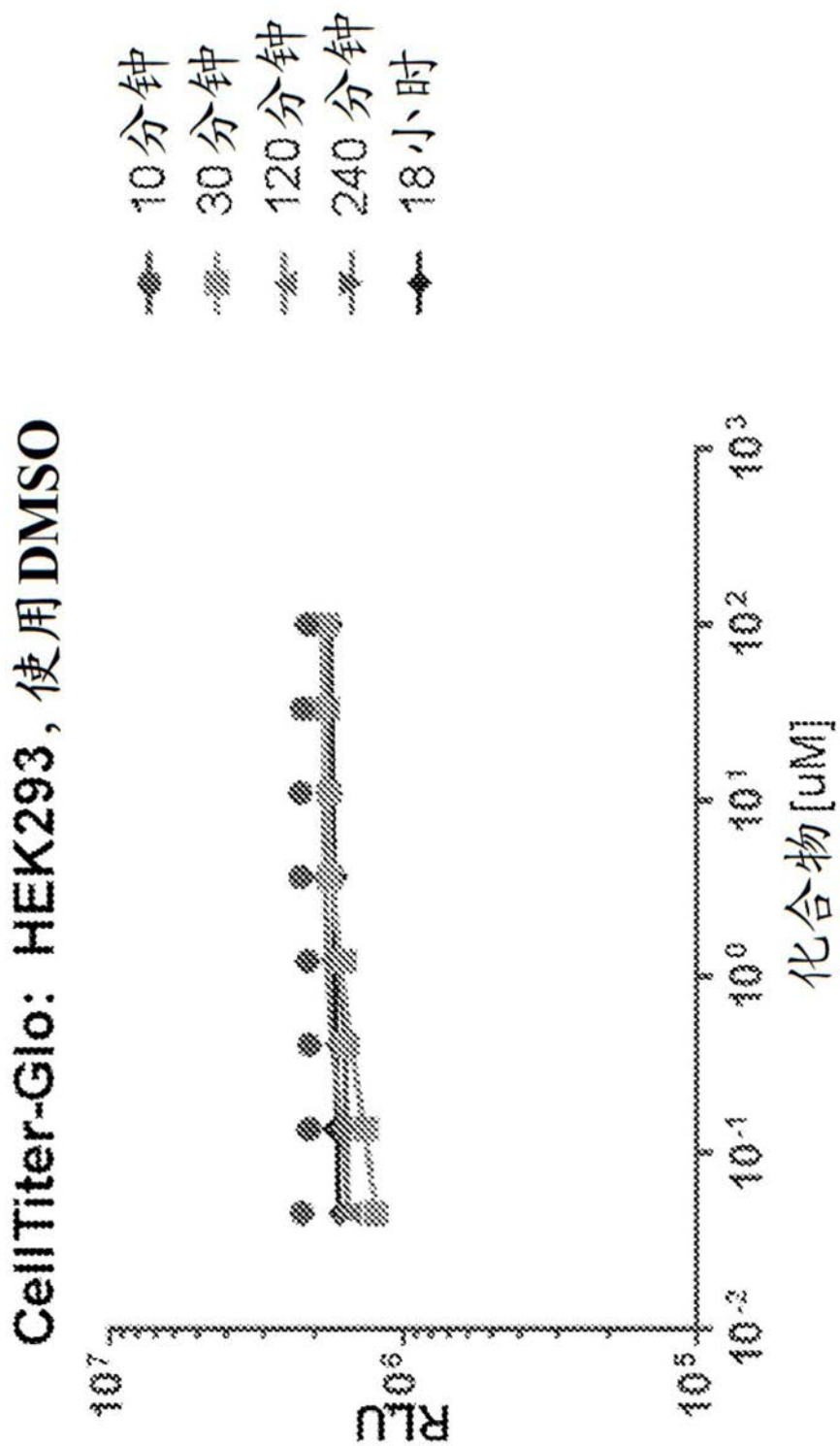


图18C

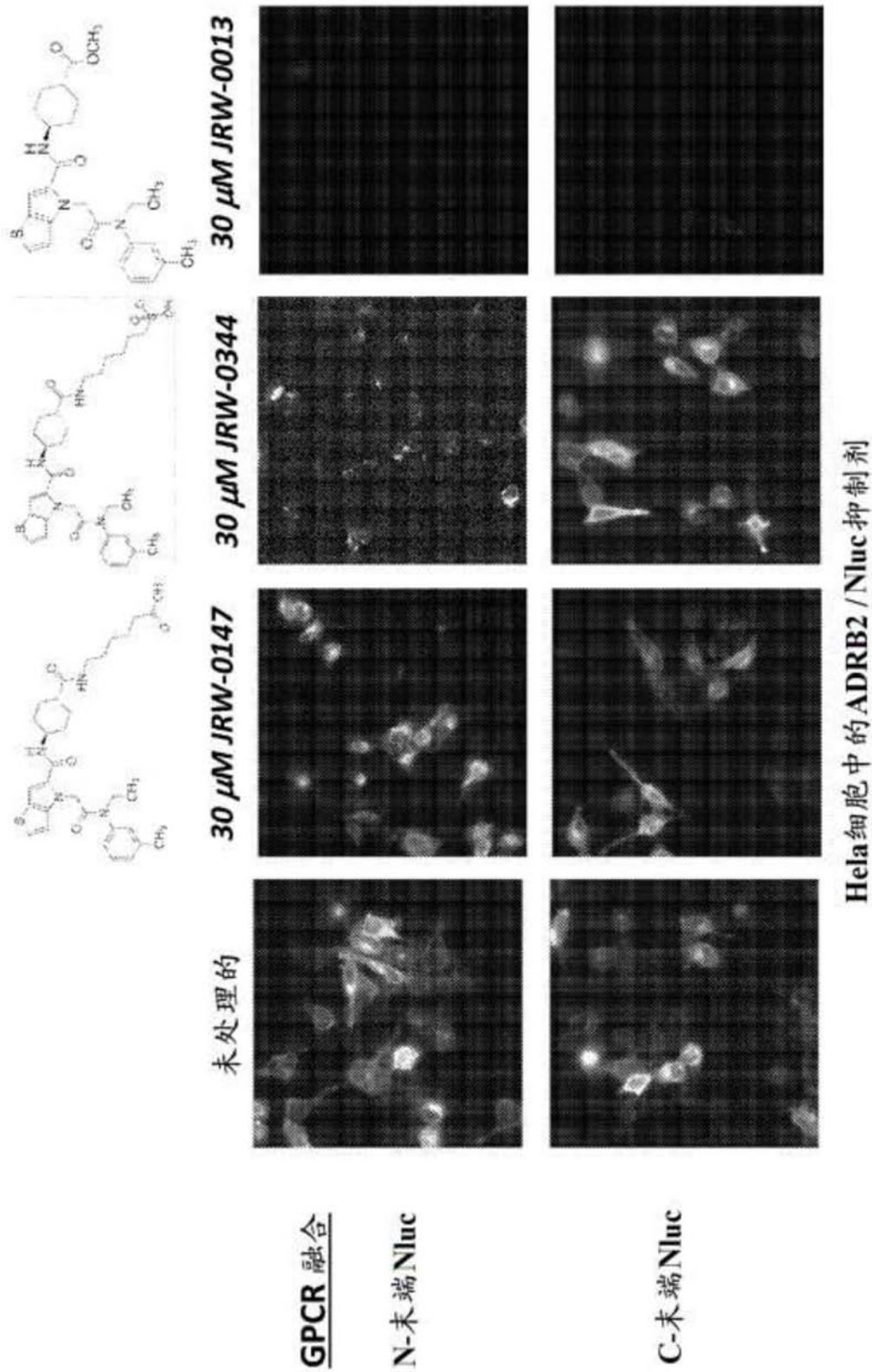


图19

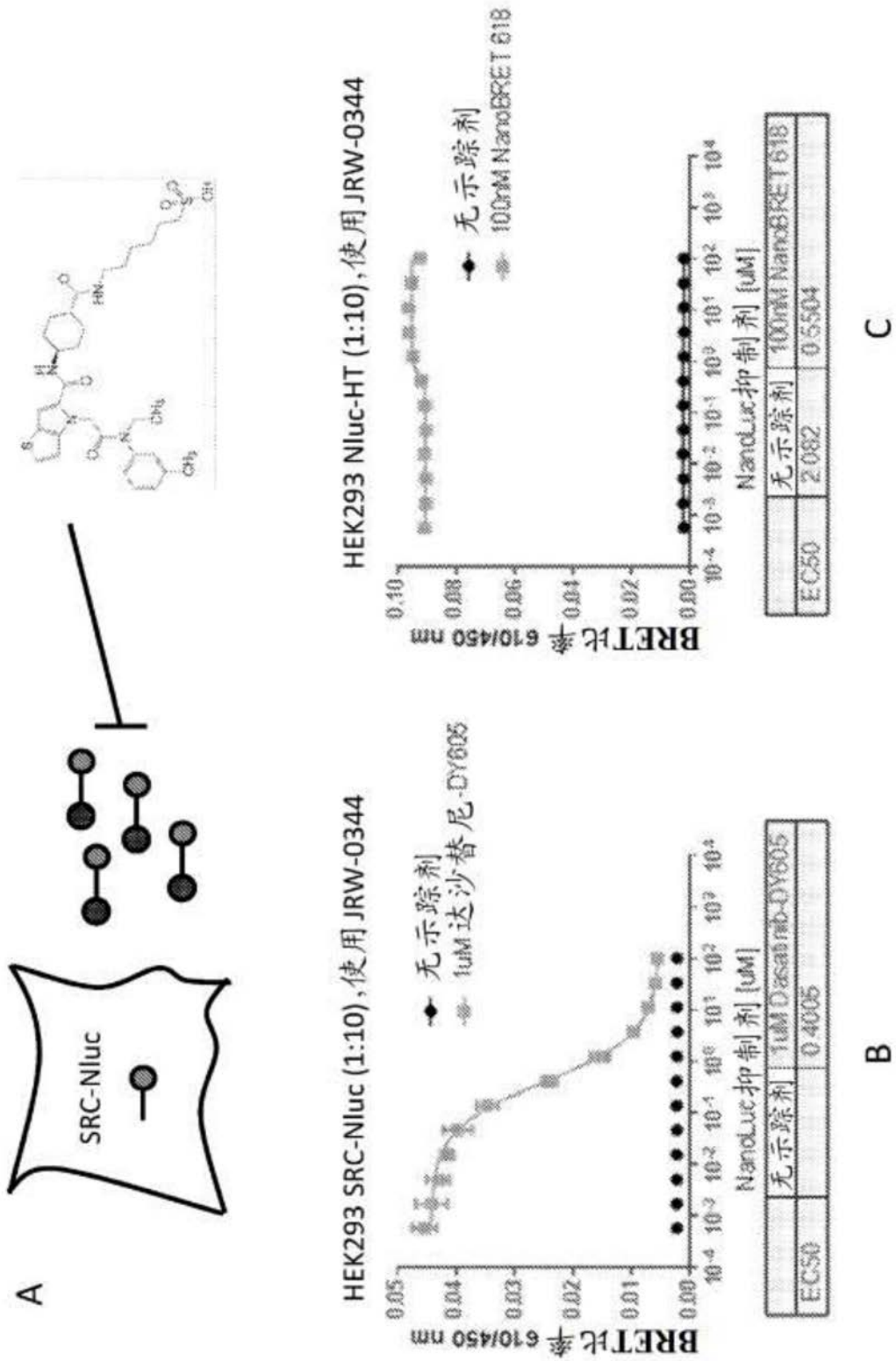


图20A-20C