



(10) 授权公告号 CN 115397811 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 23

(21) 申请号 202180023267.0

(22) 申请日 2021.01.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115397811 A

(43) 申请公布日 2022.11.25

(30) 优先权数据

2000789.4 2020.01.20 GB

2003559.8 2020.03.11 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2021/050122 2021.01.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/148786 EN 2021.07.29

(73) 专利权人 奈奥芬莱有限公司

地址 英国柴郡

(72) 发明人 朱利安·布拉格

乔纳森·理查德·安东尼·罗菲

保罗·科林·迈克尔·温希普

加雷斯·威廉·兰利

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

专利代理师 刘明海 胡彬

(51) Int.Cl.

C07D 209/44 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07F 5/02 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 2019118830 A1, 2019.06.20

R. Howes等.A Xuorescence polarization assay for inhibitors of Hsp90.《Analytical Biochemistry》.2006,第350卷(第2期),全文.

审查员 李小宏

权利要求书4页 说明书40页 附图11页

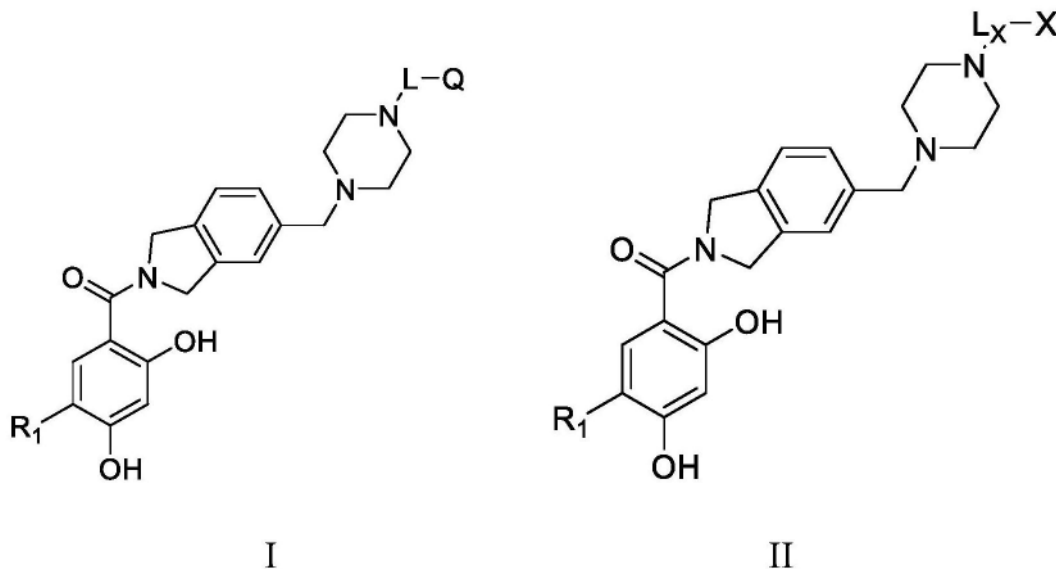
(54) 发明名称

与ATP结合位点结合的异吡啶啉衍生物

(57) 摘要

本发明涉及本文定义的式I和II的新型探针化合物。本发明还涉及合成这些新型探针化合物的方法,以及它们在测定和筛选中的用途,用于确定测试分子与靶蛋白(例如错配修复(MMR)组分蛋白PMS2和MLH1)的ATP结合位点的结合,或者用于确定这种靶蛋白在生物样品中的位置和/或数量。

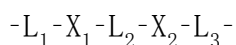
1. 式I或II的探针化合物或其盐：



其中：

R_1 是卤素或(1-6C)烷基、(3-6C)环烷基或(3-4C)环烷基-(1-2C)烷基,它们各自任选被一个或多个选自卤素、氰基或羟基的取代基取代；

L是具有下式的接头：



其中

L_1 不存在或为(2-6C)亚烷基；

X_1 不存在或选自 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NR_{10}-$ 、或 $-NR_{10}C(O)-$ ；

L_2 是(2-6C)亚烷基或式 $-[CH_2CH_2-O]_a-[CH_2]_b-$ 或 $-[CH_2]_b-[O-CH_2CH_2]_a-$ 的基团,其中a是2-10,并且b是2-4；

X_2 不存在或选自 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NR_{10}-$ 、或 $-NR_{10}C(O)-$ ；

L_3 不存在或为(2-6C)亚烷基；

其中 R_{10} 为氢或甲基；并且

条件是 X_1 或 X_2 中的至少一个存在；

Q是荧光团；

L_x 是(1-3C)亚烷基接头；以及

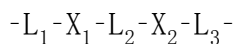
X是选自卤素、 N_3 或乙炔基的官能团。

2. 根据权利要求1所述的探针化合物,其中 R_1 是卤素或(1-6C)烷基、(3-4C)环烷基或(3-4C)环烷基-(1-2C)烷基,它们各自任选被一个或多个卤素取代基取代。

3. 根据权利要求1或2所述的探针化合物,其中 R_1 选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、环丙基、环丙基甲基、环丁基、三氟甲基。

4. 根据权利要求1或2所述的探针化合物,其中 R_1 是异丙基。

5. 根据权利要求1或2所述的探针化合物,其中L是具有下式的接头：



其中

L_1 是(2-6C)亚烷基;

X_1 选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、或-NR₁₀C(O)-;

L_2 是(2-6C)亚烷基或式-[CH₂CH₂-O]_a-[CH₂]_b-或-[CH₂]_b-[O-CH₂CH₂]_a-的基团,其中a是2-10,并且b是2-4;

X_2 选自-O-、-C(O)NR₁₀-、或-NR₁₀C(O)-;

L_3 不存在或为(2-6C)亚烷基;

其中R₁₀为氢或甲基;并且

条件是 X_1 或 X_2 中的至少一个存在。

6. 根据权利要求1或2所述的探针化合物,其中L是具有下式的接头:

-L₁-X₁-L₂-X₂-L₃-

其中

L_1 是(2-6C)亚烷基;

X_1 选自-O-、-C(O)NR₁₀-、或-NR₁₀C(O)-;

L_2 是(2-6C)亚烷基或式-[CH₂CH₂-O]_a-[CH₂]_b-或-[CH₂]_b-[O-CH₂CH₂]_a-的基团,其中a是2-10,并且b是2-4;

X_2 选自-O-、-C(O)NR₁₀-、或-NR₁₀C(O)-;

L_3 为(2-6C)亚烷基;

其中R₁₀为氢或甲基;并且

条件是 X_1 或 X_2 中的至少一个存在。

7. 根据权利要求1或2所述的探针化合物,其中Q是选自由AlexaFluor染料、花青染料、荧光素、BODIPY或BODIPY衍生物、TAMRA、俄勒冈绿染料、FITC、Ru(bpy)₃、罗丹明染料、吖啶橙和德克萨斯红组成的组的荧光团。

8. 根据权利要求1或2所述的探针化合物,其中Q是选自由AlexaFluor-647、AlexaFluor-633、AlexaFluor-594、AlexaFluor-488、花青-5B、花青-3B、荧光素、BODIPY TMR、TAMRA、俄勒冈绿488、俄勒冈绿514、FITC、Ru(bpy)₃、罗丹明染料、吖啶橙和德克萨斯红的荧光团。

9. 根据权利要求1或2所述的探针化合物,其中X是乙炔基或N₃。

10. 式I的探针化合物或其盐,所述探针化合物选自以下任何一种:

1-(6-((2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-鎓;

3-(2-((1E,3E)-5-((Z)-3-(5-((2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基))异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-5-氧代戊基)-3-甲基-5-磺基-1-(3-磺丙基)吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3,3-二甲基-5-磺基-3H-吲哚-1-鎓-1-基)丙烷-1-磺酸盐;

1-(6-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-甲酸鎓;

2-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊

基)氨基甲酰基)-5-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸和5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸;

5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕吨-9-基)苯甲酸铵;

3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^{4,5}$ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)丙酰胺;

3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^{4,5}$ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)丙酰胺基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)-3,6,9,12-十四氧杂十五烷-15-酰胺;

4-(3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^{4,6}$ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)丙酰胺基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)丁酰胺;

3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^{4,5}$ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-1-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)丙烷-1-酮;

3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^{4,5}$ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(15-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)-15-氧代-3,6,9,12-四氧杂十五烷基)丙酰胺;

3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^{4,6}$ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(4-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)-4-氧代丁基)丙酰胺。

11. 式I的探针化合物或其盐,所述探针化合物选自以下任何一种:

1-(6-((2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-鎓;

1-(6-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-甲酸鎓;

2-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-5-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸和5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸;

5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕吨-9-基)苯甲酸铵。

12. 式II的探针化合物或其盐,所述探针化合物是:

(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮。

13. 一种化合物或其盐,所述化合物选自以下任何一种:

(2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯;

(5-((4-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮盐酸盐;

(5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮。

14. 根据权利要求1至8中任一项或权利要求10或权利要求11所述的式I的探针化合物或其盐在置换测定中的用途,所述置换测定用于确定测试分子对靶蛋白质的ATP结合位点的结合亲和力。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述靶蛋白是MLH1或PMS2。

16. 一种用于确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力的测定,所述测定包括:

(i) 在根据权利要求1至8中任一项或权利要求10或权利要求11所述的式I的探针化合物或其盐的存在下,将测试分子与所述靶蛋白质培养;和

(ii) 确定是否有任何探针化合物从靶蛋白的ATP结合位点被置换。

17. 一种用于确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力的方法,所述测定包括:

(i) 在根据权利要求1至8中任一项或权利要求10或权利要求11所述的式I的探针化合物或其盐的存在下,将测试分子与所述靶蛋白质培养;和

(ii) 确定是否有任何探针化合物从靶蛋白的ATP结合位点被置换。

18. 一种用于确定生物样品中靶蛋白的数量和位置的测定,所述测定包括:

(i) 将所述生物样品与根据权利要求1至8中任一项或权利要求10或权利要求11所述的式I的探针化合物或其盐接触;和

(ii) 通过检测和量化式I的化合物在生物样品中的位置和分布来确定所述式I的化合物在所述样品中的分布和数量。

19. 一种用于确定生物样品中靶蛋白的数量和位置的测定,所述测定包括:

(i) 将所述生物样品与根据权利要求1至4中任一项或权利要求9或权利要求12所述的式II的探针化合物或其盐接触;和

(ii) 将所述生物样品与检测部分接触,所述检测部分能够与式II的化合物上存在的官能团X反应,以在所述生物样品中原位形成根据权利要求1至8中任一项或权利要求10或权利要求11所述的式I的化合物;

(iii) 通过检测和量化式I的化合物在生物样品中的位置和分布来确定所述式I的化合物在所述样品中的分布和数量。

20. 根据权利要求16、18或19所述的测定,或根据权利要求17所述的方法,其中所述靶蛋白是MLH1或PMS2。

与ATP结合位点结合的异吲哚啉衍生物

技术领域

[0001] 本发明涉及新型探针分子。本发明还涉及合成这些新型探针分子的方法,以及它们在测定和筛选中的用途,用于确定测试分子与靶蛋白(例如错配修复(MMR)组分蛋白PMS2和MLH1)的ATP结合位点的结合,或者用于确定这种靶蛋白在生物样品中的位置和/或数量。

背景技术

[0002] ATP酶的GHKL家族包括伴侣蛋白HSP90[1],错配修复(MMR)组分蛋白PMS2和MLH1[2]以及DNA回旋酶——一种催化双链DNA超螺旋的细菌II型拓扑异构酶[3]。GHKL家族的每个成员都有一个ATP结合位点,并且已知ATP结合对GHKL家族蛋白的功能很重要[4]。

[0003] HSP90的ATP竞争性抑制剂已经显示出作为抗癌剂的效用[5,6],并且ATP竞争性荧光探针已经被报道用于发现与HSP90的ATP结合位点结合的化合物并置换荧光探针[7]。在这种测定中,附着于在发射前快速旋转并破坏偏振光平面的小配体的荧光染料分子(所谓的荧光探针分子),导致低荧光偏振。探针分子与缓慢旋转的蛋白质如HSP90的结合导致高荧光偏振;测试配体对探针分子的置换导致荧光偏振的浓度依赖性降低。因此,可以应用荧光偏振来提供测试化合物与蛋白质如Hsp90[7,8]或DNA回旋酶[9]结合程度的直接定量读数。

[0004] 令人惊讶的是,已经发现商业上可获得的ATP衍生的荧光探针如BODIPY-FL-ATP- γ -S(Invitrogen)、EDA-AMPPNP-5/6-TAMRA(Jena Bioscience GmbH)和EDA-AMPPNP-Cy5(Jena Bioscience GmbH)在根据本文举例说明的方案类型进行的荧光偏振测定中没有显示信号,并且还显示通过表面等离子体共振与MLH1的N-末端结构域的结合非常弱。因此,这些探针不适合用作荧光偏振筛选工具。

[0005] 因此,需要进一步的探针化合物,其表现出对GHKL家族成员MLH1和PMS2的ATP结合位点的改善的结合,并因此适合用作荧光偏振筛选工具。

[0006] 本发明是考虑到前述内容而设计的。

发明内容

[0007] 本发明在于发现了一系列新的探针化合物,它们能有效地结合GHKL家族蛋白MLH1和PMS2的ATP结合位点。这些探针化合物可用于评估测试化合物对MLH1和PMS2的ATP结合位点的结合亲和力的测定和方法中。此外,这些探针化合物可用于确定生物样品中MLH1或PMS2的位置和/或数量。

[0008] 在第一方面,本发明提供了如本文所定义的式I或II的探针化合物或其盐。

[0009] 另一方面,本发明提供了一种合成如本文所定义的式I或II的探针化合物或其盐的方法。

[0010] 在另一方面,本发明提供了式I的探针化合物或其盐在置换测定中的用途,以确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力。在一个实施方案中,靶蛋白选自MLH1、PMS2或HSP90。在一个特定的实施方案中,靶蛋白是MLH1或PMS2。

[0011] 在另一方面,本发明提供了式I的探针化合物或其盐,其用于置换测定以确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力。在一个实施方案中,靶蛋白选自MLH1、PMS2或HSP90。在一个特定的实施方案中,靶蛋白是MLH1或PMS2。

[0012] 在另一方面,本发明提供了用于确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力的测定,该测定包括:

[0013] (i) 在如本文所定义的式I的探针化合物或其盐的存在下,将测试分子与靶蛋白一起培养;和

[0014] (ii) 确定式I的探针化合物是否从靶蛋白的ATP结合位点被置换。

[0015] 在一个实施方案中,靶蛋白选自MLH1、PMS2或HSP90。在一个特定的实施方案中,靶蛋白是MLH1或PMS2。

[0016] 在另一方面,本发明提供了用于确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力的方法,该方法包括:

[0017] (i) 在如本文所定义的式I的探针化合物或其盐的存在下,将测试分子与靶蛋白一起培养;和

[0018] (ii) 确定式I的探针化合物是否从靶蛋白的ATP结合位点被置换。

[0019] 在另一方面,本发明提供了一种用于确定生物样品中存在的靶蛋白的位置和/或数量的测定,该测定包括:

[0020] (i) 将生物样品与如本文所定义的式I的探针化合物或其盐接触;和

[0021] (ii) 通过检测生物样品中存在的式I的化合物的检测部分的位置和/或强度,确定样品中存在的式I的化合物的位置和/或数量。

[0022] 在另一方面,本发明提供了一种用于确定生物样品中存在的靶蛋白的位置和/或数量的测定,该测定包括:

[0023] (i) 将生物样品与如本文所定义的式II的探针化合物或其盐接触;和

[0024] (ii) 将生物样品与本文定义的检测部分Q或式Q-L₂-Y的化合物接触,其能够与式II的化合物上存在的官能团X反应以在生物样品中原位形成式I的化合物;

[0025] (iii) 通过检测生物样品中存在的式I的化合物的检测部分的位置和/或强度,确定样品中存在的式I的化合物的位置和/或数量。

[0026] 在另一方面,本发明提供了一种用于确定生物样品中存在的靶蛋白的位置和/或数量的方法,该方法包括:

[0027] (i) 将生物样品与如本文所定义的式I的探针化合物或其盐接触;和

[0028] (ii) 通过检测生物样品中存在的式I的化合物的检测部分的位置和/或强度,确定样品中存在的式I的化合物的位置和/或数量。

[0029] 在另一方面,本发明提供了一种用于确定生物样品中存在的靶蛋白的位置和/或数量的方法,该方法包括:

[0030] (i) 将生物样品与如本文所定义的式II的探针化合物或其盐接触;和

[0031] (ii) 将生物样品与本文定义的检测部分Q或式Q-L₂-Y的化合物接触,其能够与式II的化合物上存在的官能团X反应以在生物样品中原位形成式I的化合物;

[0032] (iii) 通过检测生物样品中存在的式I的化合物的检测部分的位置和/或强度,确定样品中存在的式I的化合物的位置和/或数量。

[0033] 在一个实施方案中,靶蛋白选自MLH1、PMS2或HSP90。在一个特定的实施方案中,靶蛋白是MLH1或PMS2。

具体实施方式

[0034] 定义

[0035] 除非另有说明,否则说明书和权利要求书中使用的下列术语具有以下含义。

[0036] 在本说明书中,术语“烷基”包括直链和支链烷基。提到单个烷基如“丙基”时,仅针对直链形式,提到单个支链烷基如“异丙基”时,仅针对支链形式。例如,“(1-6C)烷基”包括(1-4C)烷基、(1-3C)烷基、丙基、异丙基和叔丁基。类似的惯例适用于其它基团,例如“环烷基(1-2C)烷基”包括环丙基-甲基、1-环丙基乙基、2-环丙基乙基等。

[0037] 单独使用或作为前缀使用的术语“(m-nC)”或“C_{m-n}”,或“(m-nC)基团”或“C_{m-n}”是指具有m至n个碳原子的任何基团。

[0038] “亚烷基”是位于两个其它化学基团之间并用于连接它们的烷基。因此,“(3-20C)亚烷基”是指1-3个碳原子的直链饱和二价烃基或3个原子的支链饱和二价烃基,例如亚甲基、亚乙基、亚丙基等。

[0039] 术语“(m-nC)环烷基”是指含有m至n个碳原子的烃环,例如“(3-6C)环烷基”是指含有3至6个碳原子的烃环,例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基。术语“(m-nC)环烷基”还包括非芳族饱和或部分饱和的单环碳环体系。

[0040] 术语“卤素”或“卤代”是指氟、氯、溴和碘。

[0041] 术语“任选取代的”是指取代的和未取代的基团、结构或分子。

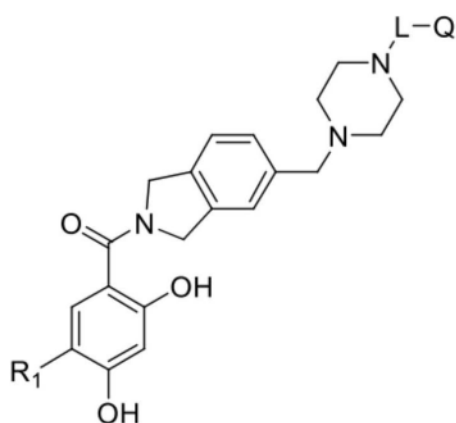
[0042] 当任选的取代基选自“一个或多个”基团时,应理解该定义包括选自一个特定基团的所有取代基或选自两个或多个特定基团的取代基。

[0043] 短语“本发明的化合物”是指本文公开的那些化合物,包括一般的和具体的。

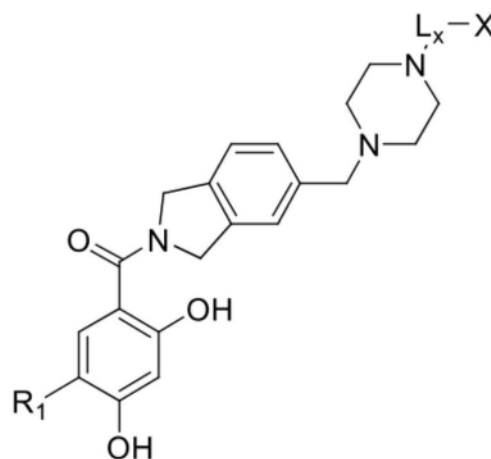
[0044] 探针化合物

[0045] 本发明涉及式I或II的探针化合物或其盐:

[0046]



I



II

[0047] 其中:

[0048] R₁是卤素或(1-6C)烷基、(3-6C)环烷基或(3-4C)环烷基-(1-2C)烷基,它们各自任

选被一个或多个选自卤素、氰基或羟基的取代基取代；

[0049] L是接头；

[0050] Q是检测部分；

[0051] L_x 是接头；和

[0052] X是官能团。

[0053] 本发明的特定探针化合物包括式I或II的探针化合物或其盐，其中 R_1 、L、Q、 L_x 和X各自如上文所定义，或者如以下段落(1)至(56)中任一段落所定义：

[0054] (1) R_1 是卤素或(1-6C)烷基、(3-4C)环烷基或(3-4C)环烷基-(1-2C)烷基，它们各自任选被一个或多个卤素取代基取代；

[0055] (2) R_1 是卤素或(1-6C)烷基、(3-4C)环烷基或(3-4C)环烷基-(1C)烷基，它们各自任选被一个或多个卤素取代基取代；

[0056] (3) R_1 是卤素或(1-6C)烷基、(3-4C)环烷基或(3-4C)环烷基-(1C)烷基，它们各自任选被一个或多个氟取代基取代；

[0057] (4) R_1 是氟、氯或(1-6C)烷基、(3-4C)环烷基或(3-4C)环烷基-(1C)烷基，它们各自任选被一个或多个氟取代基取代；

[0058] (5) R_1 是(1-6C)烷基、(3-4C)环烷基或(3-4C)环烷基-(1C)烷基，它们各自任选被一个或多个氟取代基取代；

[0059] (6) R_1 是(1-6C)烷基，其任选被一个或多个氟取代基取代；

[0060] (7) R_1 是(1-4C)烷基；

[0061] (8) R_1 选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、环丙基、环丙基甲基、环丁基、三氟甲基；

[0062] (9) R_1 是异丙基；

[0063] (10) L是(2-20C)亚烷基接头，其中所述亚烷基链任选进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个或多个-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键，其中 R_{10} 是氢或(1-2C)烷基，并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立地选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0064] (11) L是(3-20C)亚烷基接头，其中所述亚烷基链任选进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个或多个-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键，其中 R_{10} 是氢或(1-2C)烷基，并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立地选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0065] (12) L是(2-20C)亚烷基接头，其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至八个-O-键和/或一至四个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键；

[0066] 其中 R_{10} 是氢或(1-2C)烷基，并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0067] (13) L是(3-20C)亚烷基接头，其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/

或其末端之一的一至八个-O-键和/或一至四个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键；

[0068] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0069] (14)L是(2-18C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至五个-O-键;和/或一至四个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键;

[0070] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0071] (15)L是(3-12C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至五个-O-键;和/或一至四个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键;

[0072] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0073] (16)L是(2-18C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至五个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键;

[0074] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0075] (17)L是(3-12C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至五个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键;

[0076] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0077] (18)L是(2-18C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至五个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0078] (19)L是(3-12C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至五个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0079] (20)L是(2-18C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至三个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0080] (21)L是(3-12C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/

或其末端之一的一至三个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0081] (22)L是(2-18C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个-O-键和/或一个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0082] (23)L是(3-12C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个-O-键和/或一个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0083] (24)L是(2-17C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链任选地进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至四个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键;

[0084] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0085] (25)L是(3-10C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链任选地进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至四个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键;

[0086] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0087] (26)L是(2-17C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至四个-O-键;和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键;

[0088] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0089] (27)L是(3-10C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至四个-O-键;和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键;

[0090] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0091] (28)L是(2-17C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至四个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-或三唑环键;

[0092] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0093] (29)L是(3-10C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/

或其末端之一的一至四个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-或三唑环键；

[0094] 其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基,并且其中所述亚烷基链任选被一个或多个独立选自卤素、羟基、氰基、氨基、(1-2C)烷基、(1-2C)羟烷基、(1-2C)卤代烷基或(1-2C)烷氧基的取代基取代。

[0095] (30)L是(2-17C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至四个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0096] (31)L是(3-10C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至四个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0097] (32)L是(2-17C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至三个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0098] (33)L是(3-10C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一至三个-O-键和/或一至三个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0099] (34)L是(2-17C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个-O-键和/或一个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0100] (35)L是(3-10C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个-O-键和/或一个-C(O)-、-C(O)NR₁₀-或-NR₁₀C(O)-键或一个三唑环键,并且其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0101] (36)L是具有下式的接头:

[0102] -L₁-X₁-L₂-X₂-L₃-

[0103] 其中

[0104] L₁不存在或为(1-8C)亚烷基;

[0105] X₁不存在或选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环;

[0106] L₂是(1-10C)亚烷基或式-[CH₂CH₂-O]_a-[CH₂]_b-或-[CH₂]_b-[O-CH₂CH₂]_a-的基团,其中a是1-10,并且b是2-4;

[0107] X₂不存在或选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环;

[0108] L₃不存在或为(1-8C)亚烷基;

[0109] 其中R₁₀为氢或(1-2C)烷基;并且

[0110] 条件是X₁或X₂中的至少一个存在。

[0111] (37)L是具有下式的接头:

[0112] -L₁-X₁-L₂-X₂-L₃-

[0113] 其中

[0114] L₁不存在或为(1-6C)亚烷基;

[0115] X₁不存在或选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环;

- [0116] L_2 是(1-10C)亚烷基或式- $[\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}]_a-[\text{CH}_2]_b-$ 或- $[\text{CH}_2]_b-[\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2]_a-$ 的基团,其中a是2-10,并且b是2-4;
- [0117] X_2 不存在或选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环;
- [0118] L_3 不存在或为(1-6C)亚烷基;
- [0119] 其中R₁₀为氢或甲基;并且
- [0120] 条件是 X_1 或 X_2 中的至少一个存在。
- [0121] (38)L是具有下式的接头:
- [0122] $-\text{L}_1-\text{X}_1-\text{L}_2-\text{X}_2-\text{L}_3-$
- [0123] 其中
- [0124] L_1 不存在或为(2-6C)亚烷基;
- [0125] X_1 不存在或选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-或三唑环;
- [0126] L_2 是(2-10C)亚烷基或式- $[\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}]_a-[\text{CH}_2]_b-$ 或- $[\text{CH}_2]_b-[\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2]_a-$ 的基团,其中a是2-10,并且b是2-4;
- [0127] X_2 不存在或选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-或三唑环;
- [0128] L_3 不存在或为(1-6C)亚烷基;
- [0129] 其中R₁₀为氢或甲基;并且
- [0130] 条件是 X_1 或 X_2 中的至少一个存在。
- [0131] (39)L是具有下式的接头:
- [0132] $-\text{L}_1-\text{X}_1-\text{L}_2-\text{X}_2-\text{L}_3-$
- [0133] 其中
- [0134] L_1 不存在或为(2-6C)亚烷基;
- [0135] X_1 不存在或选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-或三唑环;
- [0136] L_2 是(2-6C)亚烷基或式- $[\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}]_a-[\text{CH}_2]_b-$ 或- $[\text{CH}_2]_b-[\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2]_a-$ 的基团,其中a是2-10,并且b是2-4;
- [0137] X_2 不存在或选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-或三唑环;
- [0138] L_3 不存在或为(2-6C)亚烷基;
- [0139] 其中R₁₀为氢或甲基;并且
- [0140] 条件是 X_1 或 X_2 中的至少一个存在。
- [0141] (40)L是具有下式的接头:
- [0142] $-\text{L}_1-\text{X}_1-\text{L}_2-\text{X}_2-\text{L}_3-$
- [0143] 其中
- [0144] L_1 不存在;
- [0145] X_1 不存在;
- [0146] L_2 是不存在或(2-6C)亚烷基或式- $[\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}]_a-[\text{CH}_2]_b-$ 或- $[\text{CH}_2]_b-[\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2]_a-$ 的基团,其中a是2-10,并且b是2-4;
- [0147] X_2 选自-O-、-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-或三唑环;
- [0148] L_3 不存在或为(2-6C)亚烷基;
- [0149] 其中R₁₀为氢或甲基;并且
- [0150] 条件是 X_1 或 X_2 中的至少一个存在。

[0151] (41)L是具有下式的接头:

[0152] $-L_1-X_1-L_2-X_2-L_3-$

[0153] 其中

[0154] L_1 是(2-6C)亚烷基;

[0155] X_1 选自 $-O-$ 、 $-C(O)NR_{10}-$ 、 $-NR_{10}C(O)-$ 或三唑环;

[0156] L_2 是(2-6C)亚烷基或式 $-[CH_2CH_2-O]_a-[CH_2]_b-$ 或 $-[CH_2]_b-[O-CH_2CH_2]_a-$ 的基团,其中a是2-10,并且b是2-4;

[0157] X_2 选自 $-O-$ 、 $-C(O)NR_{10}-$ 、 $-NR_{10}C(O)-$ 或三唑环;

[0158] L_3 是(2-6C)亚烷基;

[0159] 其中 R_{10} 为氢或甲基;并且

[0160] 条件是 X_1 或 X_2 中的至少一个存在。

[0161] (42)Q是选自由荧光团、寡核苷酸、生物分子、分子传感器、蛋白质或肽组成的组的检测部分。

[0162] (43)Q是荧光团。

[0163] (44)Q是选自由AlexaFluor染料、花青染料、荧光素、BODIPY或BODIPY衍生物(例如BODIPYTMR)、TAMRA、俄勒冈绿染料、FITC、Ru(bpy)3、罗丹明染料、吖啶橙和德克萨斯红组成的组的荧光团。

[0164] (45)Q是选自由AlexaFluor-647、AlexaFluor-633、AlexaFluor-594、AlexaFluor-488、花青-5B、花青-3B、荧光素、BODIPY或BODIPY衍生物(例如BODIPY TMR)、TAMRA、俄勒冈绿488、俄勒冈绿514、FITC、Ru(bpy)3、罗丹明染料、吖啶橙和德克萨斯红的荧光团。

[0165] (46)X是能够与检测部分上存在的官能团反应的官能团,从而将检测部分共价结合到式II的化合物上。

[0166] (47)X是能够与检测部分上存在的官能团反应的官能团,从而将检测部分共价结合到式II的化合物上,其中所述检测部分选自由荧光团、寡核苷酸、生物分子、分子传感器、蛋白质或肽组成的组。

[0167] (48)X是能够与荧光团上存在的官能团反应的官能团X,从而将荧光团共价结合到式II的化合物上。

[0168] (49)X是能够与荧光团上存在的官能团反应的官能团,从而将荧光团共价结合到式II的化合物上,并且其中所述荧光团如上文段落(44)或(45)中所定义。

[0169] (50)X是选自卤素、 N_3 或乙炔基($—C\equiv CH$)的官能团。

[0170] (51)X是乙炔基($—C\equiv CH$)或 N_3 。

[0171] (52) L_x 是如以上段落(10)至(41)中任一段落所定义的接头基团L。

[0172] (53) L_x 是(1-8C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链任选地进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个或多个 $-O-$ 、 $-C(O)NR_{10}-$ 、 $-NR_{10}C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或三唑环键,其中 R_{10} 是氢或(1-2C)烷基。

[0173] (54) L_x 是(1-8C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链任选地进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个 $-O-$ 、 $-C(O)NR_{10}-$ 、 $-NR_{10}C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或三唑环键,其中 R_{10} 是氢或(1-2C)烷基。

[0174] (55) L_x 是(1-5C)亚烷基接头。

[0175] (56) L_x 是(1-3C)亚烷基接头。

[0176] 合适地,卤素基团,当存在时,是氟和/或氯,特别是氟。

[0177] 合适地, R_1 如以上段落(1)至(9)中任一段所定义。更合适地, R_1 如以上段落(8)和(9)中任一段所定义。在特定的一组式I或II的探针化合物中, R_1 是异丙基。

[0178] 接头基团L可以是将检测部分Q连接到式I的探针化合物的剩余部分或将官能团X连接到式II的探针化合物的剩余部分的任何合适的连接部分。合适地,接头基团L的长度为3至30个原子,更合适地,长度为4至20个原子,甚至更合适地,长度为5至18个原子。在本文定义的特定的一组式I或II的探针化合物中,L的长度为5至12个原子。

[0179] 合适地,L如以上段落(10)至(41)中任一段所定义。更合适地如以上段落(24)至(35)或(39)至(41)中任一段所定义。在特定的一组式I或II的探针化合物中,L如以上段落(40)或(41)中所定义。

[0180] 检测部分Q可以是能够检测和定量式I的探针化合物的任何部分。如下文进一步描述的,本文定义的式I的探针化合物被设计用于置换测定,由此测试化合物将式I的探针化合物从靶蛋白(例如MLH1或PMS2)的ATP结合位点置换的能力可用于确定该测试化合物对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力。因此,检测部分Q可以是任何易于检测和定量的部分。在某些情况下,检测部分Q使得从靶蛋白的ATP结合位点置换(即“未结合”)的任何式I的探针化合物能够被检测和定量。在本发明的某些实施方案中,这可以通过从测试样品中收集任何置换的或“未结合的”式I的化合物并测定样品以确定存在多少未结合的探针化合物来实现。这反过来将指示样品中存在的探针化合物有多少已被测试化合物取代。

[0181] 因此,应当理解,检测部分Q的性质并不重要,只要它能够用于确定样品中存在的式I的探针化合物的量。本领域技术人员将能够选择合适的检测部分Q和合适的方法来检测和定量样品中的式I的化合物的量,特别是检测被测试化合物从靶蛋白的ATP结合位点置换的式I的探针化合物的量。

[0182] 合适地,检测部分Q选自由荧光团、寡核苷酸、生物分子、分子传感器、蛋白质或肽组成的组。

[0183] 在检测部分Q是寡核苷酸、生物分子、分子传感器、蛋白质或肽的实施方案中,可以利用本领域已知的任何合适的技术来检测和定量存在的寡核苷酸、生物分子、分子传感器、蛋白质或肽的量。例如,可以使用荧光标记的第二探针,其能够特异性结合到式I的探针化合物的检测部分Q,并且一旦任何过量的第二探针被除去,第二探针与式I的化合物的检测部分Q的结合量可以被检测和定量,从而能够确定式I的探针化合物的量。

[0184] 例如,如果Q是寡核苷酸,那么具有合适的可检测标记(例如荧光团或放射性标记)的第二探针和能够与Q杂交的互补寡核苷酸序列可用于检测和定量样品中存在的式I的探针化合物的量(和合适地被测试化合物从靶蛋白的ATP结合位点置换的探针化合物的量)。类似地,如果Q是蛋白质或肽,那么第二探针可以是能够选择性结合该蛋白质或肽的抗体和合适的可检测标记,例如荧光团或放射性标记。

[0185] 更合适的是,所述检测部分Q是荧光团。在这种情况下,式I的化合物可用于荧光偏振测定。在特定的一组式I的探针化合物中,所述检测部分Q是选自由AlexaFluor染料、花青染料、荧光素、BODIPY或BODIPY衍生物(例如BODIPYTMR)、TAMRA、俄勒冈绿染料、FITC、Ru(bpy)3、罗丹明染料、吖啶橙和德克萨斯红组成的组的荧光团。在另一组式I的探针化合物

中,检测部分Q是选自由以下组成的组的荧光团:AlexaFluor-647、AlexaFluor-633、AlexaFluor-594、AlexaFluor-488、花青-5B、花青-3B、荧光素、BODIPY TMR、TAMRA、俄勒冈绿488、俄勒冈绿514、FITC、Ru(bpy)₃、罗丹明染料、吖啶橙和德克萨斯红。

[0186] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(1)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0187] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(2)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0188] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(3)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0189] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(4)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0190] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(5)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0191] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(6)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0192] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(7)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0193] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(8)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0194] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(10)至(41)段中任一段所定义。

[0195] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(10)段中所定义。

[0196] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(11)段中所定义。

[0197] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(14)段中所定义。

[0198] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(15)段中所定义。

[0199] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(18)段中所定义。

[0200] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(19)段中所定义。

[0201] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(22)段中所定义。

[0202] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(23)段中所定义。

[0203] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团,R₁如上文第(9)段中所定义,L如上文第(26)段中所定义。

[0204] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(27)段中所定义。

[0205] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(30)段中所定义。

[0206] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(31)段中所定义。

[0207] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(34)段中所定义。

[0208] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(35)段中所定义。

[0209] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(36)段中所定义。

[0210] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(37)段中所定义。

[0211] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(38)段中所定义。

[0212] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(39)段中所定义。

[0213] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(40)段中所定义。

[0214] 在特定的一组式I的探针化合物中,Q是荧光团, R_1 如上文第(9)段中所定义,L如上文第(41)段中所定义。

[0215] 合适地,X如以上段落(46)至(51)中任一段所定义。

[0216] 应当理解,X可以是任何合适的官能团,其能够与检测部分Q上存在的官能团或本文定义的式Q-L₂-Y的化合物反应,以将检测部分共价结合到式II的化合物上,从而形成本文定义的式I的化合物。

[0217] 本领域技术人员将熟悉可用于与合适的检测部分形成共价键的合适的官能团。例如,X可以选自卤素、N₃或乙炔基(—C≡CH)。

[0218] 在一个特定的实施方案中,X是N₃或乙炔基。

[0219] 合适地,X是能够与检测部分上存在的官能团反应以在检测部分和式II的化合物之间形成键或三唑键的官能团。在一个具体实施方案中,形成的键是三唑键(可通过点击化学形成)。

[0220] 合适地,L_x如以上段落(52)至(56)中任一段所定义。

[0221] 在本发明的某些实施方案中,通过式II的化合物与下式基团反应形成式I的化合物:

[0222] Q-L_y-Y

[0223] 其中:

[0224] Q是上文定义的检测部分:

[0225] L_y不存在或者是接头基团,当与式II的化合物的基团L_x共价结合时,所述接头基团

形成式I的化合物的接头L;

[0226] Y是能够与式II的化合物上存在的官能团X反应以将Q-L₂共价连接到式II的化合物的L_x上的官能团。

[0227] 在一个实施方案中,L_y是(1-8C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链任选地进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个或多个-O-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键,其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0228] 在另一个实施方案中,L_y是(1-8C)亚烷基接头,其中所述亚烷基链任选地进一步包含位于亚烷基链内和/或其末端之一的一个-O-、-C(O)NR₁₀-、-NR₁₀C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或三唑环键,其中R₁₀是氢或(1-2C)烷基。

[0229] 在进一步的实施方案中,L_y是(1-5C)亚烷基接头。

[0230] 在另一个实施方案中,L_y是(1-3C)亚烷基接头。

[0231] 应当理解,Y可以是能够与式II的探针化合物上存在的官能团X反应以将基团Q-L_y共价结合到式II的化合物上并由此形成本文定义的式I的化合物的任何合适的官能团。

[0232] 本领域技术人员将熟悉可用于与式II的化合物上的官能团X形成共价键的合适官能团。例如,Y可以选自卤素、N₃或乙炔基。

[0233] 在一个具体的实施方案中,当X是乙炔基时,Y是N₃,或者当X是N₃时,Y是乙炔基。

[0234] 合适地,Y是能够与式II的探针化合物上存在的官能团X反应以形成键或三唑键的官能团。在一个具体实施方案中,形成的键是三唑键(可通过点击化学形成)。

[0235] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(1)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0236] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(2)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0237] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(3)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0238] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(4)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0239] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(5)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0240] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(6)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0241] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(7)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0242] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(8)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0243] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(9)段所定义,并且L_x如上文第(52)、(53)或(54)段所定义。

[0244] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(9)段所定义,并且L_x如上文第(52)段所定义。

[0245] 在特定的一组式II的探针化合物中,X如上文第(50)段所定义,R₁如上文第(9)段

所定义,并且 L_x 如上文第(53)段所定义。

[0246] 在特定的一组式II的探针化合物中, X 如上文第(50)段所定义, R_1 如上文第(9)段所定义,并且 L_x 如上文第(54)段所定义。

[0247] 在特定的一组式II的探针化合物中, X 如上文第(50)段所定义, R_1 如上文第(9)段所定义,并且 L_x 如上文第(55)段所定义。

[0248] 在特定的一组式II的探针化合物中, X 如上文第(50)段所定义, R_1 如上文第(9)段所定义,并且 L_x 如上文第(56)段所定义。

[0249] 本发明的特定化合物包括以下任何一种:

[0250] 1-(6-((2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吡啶啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吡啶-1-鎓(实施例1);

[0251] 3-(2-((1E,3E)-5-((Z)-3-(5-((2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基))异吡啶啉)-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-5-氧代戊基)-3-甲基-5-磺基-1-(3-磺丙基)吡啶啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3,3-二甲基-5-磺基-3H-吡啶-1-鎓-1-基)丙烷-1-磺酸盐(实施例2);

[0252] 1-(6-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吡啶啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吡啶-1-甲酸鎓(实施例3);

[0253] 2-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-5-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸和5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸(实施例4);

[0254] 5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕吨-9-基)苯甲酸铵(实施例5);

[0255] 2,4-二羟基-5-异丙基苯基(5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲羰基)异吡啶啉-2-基)甲酮(实施例6);

[0256] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)丙酰胺(实施例7);

[0257] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)丙酰胺基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)-3,6,9,12-十四氧杂十五烷-15-酰胺(实施例8);

[0258] 4-(3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-5 λ^4 ,6 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)丙酰胺基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)丁酰胺(实施例9);

[0259] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-1-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)丙烷-1-酮(实施例10);

[0260] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(15-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)-15-氧代-3,6,9,12-四氧杂十五烷基)丙酰胺(实施例11);

[0261] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-5 λ^4 ,6 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(4-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)-4-氧代丁基)丙酰胺(实施例12);

[0262] (2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯;

[0263] (5-((4-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮盐酸盐;

[0264] (5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯;

[0265] (5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮。

[0266] 本发明的特定探针化合物包括以下任何一种:

[0267] 2,4-二羟基-5-异丙基苯基(5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮(实施例6);

[0268] (2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯;

[0269] (5-((4-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮盐酸盐;

[0270] (5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯;

[0271] (5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮。

[0272] 本发明的特定探针化合物包括以下任何一种:

[0273] 1-(6-((2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-鎓(实施例1);

[0274] 3-(2-((1E,3E)-5-((Z)-3-(5-((2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基))异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-5-氧代戊基)-3-甲基-5-磺基-1-(3-磺丙基)吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3,3-二甲基-5-磺基-3H-吲哚-1-鎓-1-基)丙烷-1-磺酸盐(实施例2);

[0275] 1-(6-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-甲酸鎓(实施例3);

[0276] 2-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-5-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸和5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-羟

基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸(实施例4);

[0277] 5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕吨-9-基)苯甲酸铵(实施例5);

[0278] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^4,^5\lambda^4$ -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)丙酰胺(实施例7);

[0279] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^4,^5\lambda^4$ -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)丙酰胺基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)-3,6,9,12-十四氧杂十五烷-15-酰胺(实施例8);

[0280] 4-(3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^4,^6\lambda^4$ -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)丙酰胺基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)丁酰胺(实施例9);

[0281] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)- $^{5H-4}\lambda^4,^5\lambda^4$ -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-1-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)丙烷-1-酮(实施例10);

[0282] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H- $\lambda^4,^5\lambda^4$ -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(15-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)-15-氧代-3,6,9,12-四氧杂十五烷基)丙酰胺(实施例11);

[0283] 3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)- $^{5H-5}\lambda^4,^6\lambda^4$ -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基)-N-(4-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)-4-氧代丁基)丙酰胺(实施例12);

[0284] 本发明的探针化合物的合适盐是,例如,本发明化合物的酸加成盐,其足够碱性,例如,与例如无机酸或有机酸的酸加成盐,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、三氟乙酸、甲酸、柠檬酸甲烷磺酸盐或马来酸。此外,足够酸性的本发明化合物的合适盐是碱金属盐,例如钠盐或钾盐,碱土金属盐,例如钙盐或镁盐,铵盐或与有机碱的盐。

[0285] 本发明还包括本文定义的本发明的探针化合物,其包含一个或多个同位素取代。例如,H可以是任何同位素形式,包括 ^1H 、 ^2H (D)和 ^3H (T);C可以是任何同位素形式,包括 ^{12}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C ;并且O可以是任何同位素形式,包括 ^{16}O 和 ^{18}O 等等。

[0286] 还应当理解,某些式(I)的探针化合物可以以溶剂化和非溶剂化的形式存在,例如水合形式。

[0287] 还应当理解,某些式(I)的探针化合物可能表现出多态性,并且本发明包括所有这些多态形式。

[0288] 某些式(I)的探针化合物也可以以许多不同的互变异构体形式存在,提及式(I)的化合物包括所有这些形式。

[0289] 探针化合物的合成

[0290] 另一方面,本发明提供了一种合成如本文所定义的式I或II的探针化合物或其盐的方法。

[0291] 本发明的探针化合物可以通过本领域已知的任何合适的技术制备。制备这些化合

物的具体方法在所附实施例中进一步描述。

[0292] 在本文所述合成方法的描述中和在用于制备原料的任何参考合成方法中,应该理解的是,本领域技术人员可以选择所有提出的反应条件,包括选择溶剂、反应气氛、反应温度、实验持续时间和后处理程序。

[0293] 有机合成领域的技术人员可以理解,分子不同部分的功能必须与所用的试剂和反应条件相适应。

[0294] 应当理解,在本文定义的方法中合成本发明化合物的过程中,或者在合成某些原料的过程中,可能需要保护某些取代基以防止它们发生不希望的反应。熟练的化学家会理解何时需要这种保护,以及如何将这种保护基团置于适当的位置,然后再除去。

[0295] 有关保护基团的示例,请参阅有关该主题的许多一般文本之一,例如Theodora Green的《有机合成中的保护基》;第四版;2006年(出版商:John Wiley&Sons)。保护基团可以通过文献中描述的或熟练的化学家已知的适合于除去所讨论的保护基团的任何方便的方法除去,选择这样的方法以便在对分子中其他基团的干扰最小的情况下实现保护基团的去除。

[0296] 一方面,本发明提供了合成本文定义的式I的化合物的方法,该方法包括使本文定义的式II的化合物与本文定义的式Q-L₂-Y的化合物反应,形成式I的化合物;并且可选地此后:

[0297] (i) 除去任何存在的保护基团;

[0298] (ii) 形成式I的化合物的盐;和/或

[0299] (iii) 分离和纯化式I的化合物。

[0300] 探针化合物的应用

[0301] 一方面,本发明提供了如本文所定义的式I的探针化合物或其盐在置换试验中的用途,以确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力。

[0302] 在另一个方面,本发明提供了式I的探针化合物或其盐,用于置换测定,以确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力。

[0303] 在一个实施方案中,所述靶蛋白选自MLH1、PMS2或HSP90。在一个特定的实施方案中,所述靶蛋白是MLH1或PMS2。在一个具体的实施方案中,所述靶蛋白是MLH1。在另一个具体实施方案中,所述靶蛋白是PMS2。

[0304] 置换测定在本领域中是众所周知的。在Q是荧光团的本发明的实施方案中,置换测定是荧光偏振测定。荧光偏振测定在本领域中是众所周知的(参见例如本文的参考文献[7、8、9])。

[0305] 测试化合物可以是任何生物或小分子化合物,其将被筛选与靶蛋白(例如MLH1或PMS2)的ATP结合位点的结合。

[0306] 在另一方面,本发明提供了用于确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力的测定,该测定包括:

[0307] (i) 在如本文所定义的式I的探针化合物或其盐的存在下,将测试分子与靶蛋白一起培养;和

[0308] (ii) 确定是否有任何探针化合物从靶蛋白的ATP结合位点被置换。

[0309] 在一个实施方案中,所述靶蛋白选自MLH1、PMS2或HSP90。在一个特定的实施方案

中,所述靶蛋白是MLH1或PMS2。在一个具体的实施方案中,所述靶蛋白是MLH1。在另一个具体实施方案中,所述靶蛋白是PMS2。

[0310] 合适的是,该测定是置换测定。置换测定在本领域中是众所周知的。在Q是荧光团的本发明的实施方案中,置换测定是荧光偏振测定。荧光偏振测定在本领域中是众所周知的(参见例如本文的参考文献[7、8、9])。

[0311] 确定任何探针化合物是否从靶蛋白的ATP结合位点被置换的步骤适当地包括检测测试化合物是否导致未结合到ATP结合位点的式I的探针化合物的比例增加。这可以通过检测未结合的探针化合物的量是否增加(相对于对照)来实现,或者如果结合的探针化合物的量可以容易地检测到(例如通过荧光偏振),则检测结合的探针化合物的量是否减少(同样相对于对照)。

[0312] 可以通过本领域已知的技术来确定与靶蛋白的ATP结合位点结合的探针化合物相对于未结合的量的比例。所用的具体技术将取决于式I的化合物中检测部分Q的性质。合适地,Q是荧光团,并且该测定是荧光偏振测定。在这种测定中,可以检测由探针化合物从靶蛋白的ATP结合位点的置换引起的荧光差异,并用于量化任何置换的探针化合物的量,从而确定测试化合物对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力。

[0313] 在另一方面,本发明提供了用于确定测试分子对靶蛋白的ATP结合位点的结合亲和力的方法,该测定包括:

[0314] (i) 在如本文所定义的式I的探针化合物或其盐的存在下,将测试分子与靶蛋白一起培养;和

[0315] (ii) 确定是否有任何探针化合物从靶蛋白的ATP结合位点被置换。

[0316] 在一个实施方案中,所述靶蛋白选自MLH1、PMS2或HSP90。在一个特定的实施方案中,所述靶蛋白是MLH1或PMS2。在一个具体的实施方案中,所述靶蛋白是MLH1。在另一个具体实施方案中,所述靶蛋白是PMS2。

[0317] 合适的是,所述方法是置换测定。置换测定在本领域中是众所周知的。在Q是荧光团的本发明的实施方案中,置换测定是荧光偏振测定。荧光偏振测定在本领域中是众所周知的(参见例如本文的参考文献[7、8、9])。

[0318] 确定任何探针化合物是否从靶蛋白的ATP结合位点被置换的步骤可以以上述方式进行。

[0319] 在另一方面,本发明提供了一种用于确定生物样品中存在的靶蛋白的位置和/或数量的测定,该测定包括:

[0320] (i) 将生物样品与如本文所定义的式I的探针化合物或其盐接触;和

[0321] (ii) 通过检测生物样品中存在的式I的化合物的检测部分的位置和/或强度,确定样品中存在的式I的化合物的位置和/或数量。

[0322] 在另一方面,本发明提供了一种用于确定生物样品中存在的靶蛋白的位置和/或数量的测定,该测定包括:

[0323] (i) 将生物样品与如本文所定义的式II的探针化合物或其盐接触;和

[0324] (ii) 将生物样品与检测部分Q或本文定义的式Q-L₂-Y的化合物接触,其能够与式II的化合物上存在的官能团X反应以在生物样品中原位形成式I的化合物;

[0325] (iii) 通过检测生物样品中存在的式I的化合物的检测部分的位置和/或强度,确

定样品中存在的式I的化合物的位置和/或数量。

[0326] 在另一方面,本发明提供了一种用于确定生物样品中存在的靶蛋白的位置和/或数量的方法,该方法包括:

[0327] (i) 将生物样品与如本文所定义的式I的探针化合物或其盐接触;和

[0328] (ii) 通过检测生物样品中存在的式I的化合物的检测部分的位置和/或强度,确定样品中存在的式I的化合物的位置和/或数量。

[0329] 在另一方面,本发明提供了一种用于确定生物样品中存在的靶蛋白的位置和/或数量的方法,该方法包括:

[0330] (i) MLH1或PMS2使生物样品与检测部分Q或本文定义的式Q-L₂-Y的化合物接触,其能够与式II的化合物上存在的官能团X反应以在生物样品中原位形成式I的化合物;

[0331] (ii) 通过检测生物样品中存在的式I的化合物的检测部分的位置和/或强度,确定样品中存在的式I的化合物的位置和/或数量。

[0332] 在一个实施方案中,所述靶蛋白选自MLH1、PMS2或HSP90。在一个特定的实施方案中,所述靶蛋白是MLH1或PMS2。在一个具体的实施方案中,所述靶蛋白是MLH1。在另一个具体实施方案中,所述靶蛋白是PMS2。

[0333] 合适地,使生物样品与式I或II的探针化合物接触的步骤(上述测定和方法中的步骤(i))包括在使探针化合物能够结合到靶蛋白(例如MLH1或PMS2)的ATP结合位点的条件下,将生物样品与探针化合物一起培养。

[0334] 生物样品中式I的化合物的分布和数量的测定可通过本领域已知的技术实现。所用的具体技术将取决于式I的化合物中检测部分Q的性质。合适地,Q是荧光团,并且样品中式I的化合物的位置和数量的测定可通过荧光显微镜/成像实现。荧光强度的适当校准可用于测定样品中不同位置的式I的化合物的量。

[0335] 本文定义的本发明的测定和方法可以任选地进一步包括在步骤(i)之后进行的一个或多个洗涤步骤,以从生物样品中除去过量的式I或II的探针化合物。

[0336] 在探针化合物是式II的化合物的实施方案中,本文定义的测定和方法包括将生物样品与式II的化合物接触,使其与靶蛋白的ATP结合位点结合,任选地将生物样品洗涤一次或多次以除去任何未结合的式II的探针化合物,然后将生物样品与合适的检测部分Q或如本文所定义的式Q-L₂-Y的化合物接触,其能够在生物样品中原位与式II的探针化合物反应以形成式I的化合物。在与检测部分培养后,样品可以任选地被洗涤以从样品中除去任何未结合/未反应的检测部分。检测部分可以是如本文所定义的基团Q,其带有可与式II的探针化合物上的官能团X反应的合适官能团。或者,检测部分可以是本文定义的式Q-L₂-Y的化合物,其与式II的化合物反应形成本文定义的式I的化合物。

[0337] 实验部分

[0338] 附图

[0339] 图1显示了用于制备(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮的合成方案(实施例6)。

[0340] 图2显示了用于制备(5-((4-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮盐酸盐的合成方案。

[0341] 图3显示了用于制备2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸的合成方案。

[0342] 图4显示了用于制备(5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮的合成方案。

[0343] 图5显示了用于制备4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-羧酸苄酯(AA)和(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-(哌嗪-1-基甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮盐酸盐(AB)的合成方案。

[0344] 图6显示了在GraphPad Prism 8.1.0中绘制和分析的实施例1的数据。

[0345] 图7显示了在GraphPad Prism 8.1.0中绘制和分析的实施例3的数据。

[0346] 图8显示了在GraphPad Prism 8.1.0中绘制和分析的实施例4的数据。

[0347] 图9显示了在GraphPad Prism 8.1.0中绘制和分析的实施例5的数据。

[0348] 图10显示了化合物AB的抑制数据,使用测定方案A确定的 IC_{50} 。

[0349] 图11显示了化合物AB的抑制数据,使用测定方案C确定的 IC_{50} 。

[0350] 分析方法

[0351] 为了制备实施例1-6和相关的中间体,市售的原料、试剂和干燥溶剂按原样使用。使用Merck硅胶230-400目进行快速柱色谱分析。还使用玻璃柱色谱或快速色谱进行柱色谱。在combi-flash RF Teledyne Isco机器上进行快速色谱分析。在Merck板上进行制备型TLC。在Bruker Avance-400上记录 1H NMR谱。将样品在合适的氘代溶剂中制备为溶液,并参考合适的内部非氘代溶剂峰或四甲基硅烷。化学位移在四甲基硅烷的低场中以ppm(δ)记录。

[0352] 对于实施例7-12的制备,溶剂购自Sigma Aldrich或Fisher Scientific,不经纯化直接使用。**NanoBRET® 590SE**、**NanoBRET® 590-04-SE**和**NanoBRET® 590-C4-SE**是从Madison,WI的Promega公司获得的。质谱在Thermo Fisher Vanquish™(LC-MS)上记录,并且纯度($\geq 95\%$)通过反相高压液相色谱(RP-HPLC)测定,使用Kinetex 5 μm EVO C18 100 Å LC柱30 $\times$ 2.1mm柱或Phenomenex Synergi 2.5 μm Max-RP100 Å LC柱。根据标准方法1,使用Waters XBridge Prep C180BD 30 $\times$ 250mm柱,在Waters LC Prep 150上纯化化合物:初始流动相:90%水溶液(H_2O 中含有0.1%的TFA),10%乙腈;最终流动相:0%水溶液,100%乙腈;30分钟线性梯度。

[0353] HPLC法

[0354] 方法-A

[0355] 使用以下条件分析样品:带PDA检测器的Agilent Series 1260Infinity-II,色谱柱:Waters Sunfire C18,150 $\times$ 4.6mm,3.5微米,柱温:室温,自动进样器温度:15 $^{\circ}C$,流动相A:0.05%(v/v)三氟乙酸在Milli-Q水中的溶液(pH $\sim$ 2.5),流动相B:100%乙腈;流动相梯度详情:t=0分钟(90%A,10%B;梯度到t=7分钟(10%A,90%B);梯度到t=9分钟(0%A,100%B);t=14分钟(0%A,100%B);梯度到t=14.01分钟(90%A,10%B);t=17分钟时运行结束(90%A,10%B),流速:1mL/min,分析时间17分钟。

[0356] LC-MS方法

[0357] 方法-A

[0358] WatersAcquity UPLC,配备有二元溶剂管理器、PDA检测器和Acquity QDA高性能质谱检测器,色谱柱:Ymc tri-art C18,50 $\times$ 2.1mm,1.9微米,柱温:35 $^{\circ}C$,自动进样器温度:5

℃,流动相A:0.1% (v/v) 甲酸的ddH₂O溶液 (pH=2.70),流动相B:0.1% 甲酸的水:乙腈 (10:90) 溶液,流动相梯度详情:t=0min (97%A,3%B) 流速:0.8mL/min;t=0.75min (97%A,3%B) 流速:0.8mL/min;梯度至t=2.7min (2%A,98%B) 流速:0.8mL/min;梯度至t=3min (0%A,100%B) 流速:1mL/min;t=3.5min (0%A,100%B) 流速:1mL/min;梯度至t=3.51min (97%A,3%B) 流速:0.8mL/min;在t=4分钟时运行结束 (97%A,3%B),流速:0.8mL/min,分析时间4分钟。质谱检测器参数:电离模式通过正负模式循环,锥孔电压为10V和30V,毛细管电压为0.8kV,源和探针温度分别为120℃和600℃。

[0359] 方法-B

[0360] Waters Acquity UPLC,配备有四元溶剂管理器、PDA检测器和Acquity QDA质谱检测器,色谱柱:Ymc tri-art C18,50*2.1mm,1.9微米,柱温:35℃,自动进样器温度:5℃,流动相A:0.1% (v/v) 甲酸的ddH₂O溶液 (pH=2.70),流动相B:0.1% (v/v) 甲酸的水:乙腈 (10:90) 溶液,流动相梯度详情:t=0min (97%A,3%B) 流速:0.8mL/min;t=0.75min (97%A,3%B) 流速:0.8mL/min;梯度至t=2.7min (2%A,98%B) 流速:0.8mL/min;梯度至t=3min (0%A,100%B) 流速:1mL/min;t=3.5min (0%A,100%B) 流速:1mL/min;梯度至t=3.51min (97%A,3%B) 流速:0.8mL/min;在t=4分钟时运行结束 (97%A,3%B),流速:0.8mL/min,分析时间4分钟。质谱检测器参数:探针为ESI毛细管探针,电离模式通过正负模式循环,锥孔电压为10V和30V,毛细管电压为0.8kV,源和探针温度分别为120℃和600℃。

[0361] 方法-C

[0362] WatersAcquity,配备有PDA检测器和SQ检测器,色谱柱:X-bridge C18,50*4.6mm,3.5微米,柱温:25℃,流动相A:5mM碳酸氢铵的ddH₂O溶液 (pH=7.35),流动相B:甲醇,流动相梯度详情:t=0min (92%A,8%B);t=0.75分钟 (92%A,8%B);梯度到t=3分钟 (30%A,70%B)梯度到t=3.75分钟 (5%A,95%B);梯度到t=4.20分钟 (0%A,100%B);t=5.20分钟 (0%A,100%B);梯度到t=5.21分钟 (92%A,8%B);t=7分钟时运行结束 (92%A,8%B),流速:1mL/min,分析时间7分钟。质谱检测器参数:电离模式通过正负模式循环,锥孔电压为10V和30V,毛细管电压为3.25kV,源和探针温度分别为120℃和600℃。

[0363] 方法-D

[0364] Waters Acquity,配备有PDA检测器和SQ检测器,色谱柱:X-bridge C18,50*4.6mm,3.5微米,柱温:25℃,流动相A:5mM碳酸氢铵的ddH₂O溶液 (pH=7.35),流动相B:乙腈;流动相梯度详情:t=0min (97%A,3%B) 流速:0.5mL/min;t=0.2min (97%A,3%B) 流速:0.5mL/min;梯度至t=2.7min (2%A,98%B) 流速:0.5mL/min;梯度至t=3min (0%A,100%B) 流速:0.7mL/min;t=3.5min (0%A,100%B) 流速:0.7mL/min;梯度至t=3.51min (97%A,3%B) 流速:0.5mL/min;在t=4分钟时运行结束 (97%A,3%B),流速:0.5mL/min,分析时间4分钟。质谱检测器参数:电离模式通过正负模式循环,锥孔电压为10V和30V,毛细管电压为3.25kV,源和探针温度分别为120℃和600℃。

[0365] 方法E

[0366] Waters Acquity UPLC,配备有二元溶剂管理器、PDA检测器和Acquity QDA高性能质谱检测器,色谱柱:Xbridge BEH C18,50*2.1mm,2.5微米,柱温:35℃,自动进样器温度:5℃,流动相A:0.1% (v/v) 甲酸的ddH₂O溶液 (pH=2.70),流动相B:0.1% 甲酸的水:乙腈 (10:90) 溶液,流动相梯度详情:t=0min (97%A,3%B) 流速:0.8mL/min;t=0.75min (97%A,3%

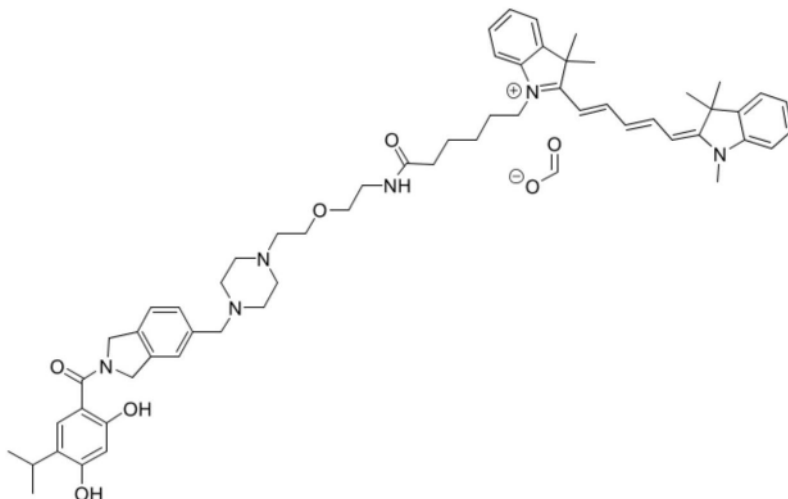
B) 流速:0.8mL/min;梯度至t=2.7min(2%A,98%B) 流速:0.8mL/min;梯度至t=3min(0%A,100%B) 流速:1mL/min;t=3.5min(0%A,100%B) 流速:1mL/min;梯度至t=3.51min(97%A,3%B) 流速:0.8mL/min;在t=4分钟时运行结束(97%A,3%B),流速:0.8mL/min,分析时间4分钟。质谱检测器参数:电离模式通过正负模式循环,锥孔电压为10V和30V,毛细管电压为0.8kV,源和探头温度分别为120℃和600℃。

[0367] 制备HPLC方法(用于X)

[0368] Waters Quaternary-2545梯度模块,配备有Waters 2489紫外/可见波长检测器,色谱柱:YMC-TRIARTC18,250*21.2毫米,5微米,柱温:室温,流动相A:5mM碳酸氢铵水溶液,流动相B:100%乙腈;流动相梯度详情:T=0.01min(50%A,50%B;梯度到T=17分钟(40%A,60%B);梯度到T=17.01分钟(2%A,98%B);T=19分钟(2%A,98%B);梯度到T=19.01分钟(50%A,50%B);T=21分钟时运行结束(50%A,50%B),流速:17mL/min,分析时间21分钟。

[0369] 实施例1-1-(6-((2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-鎓的制备

[0370]

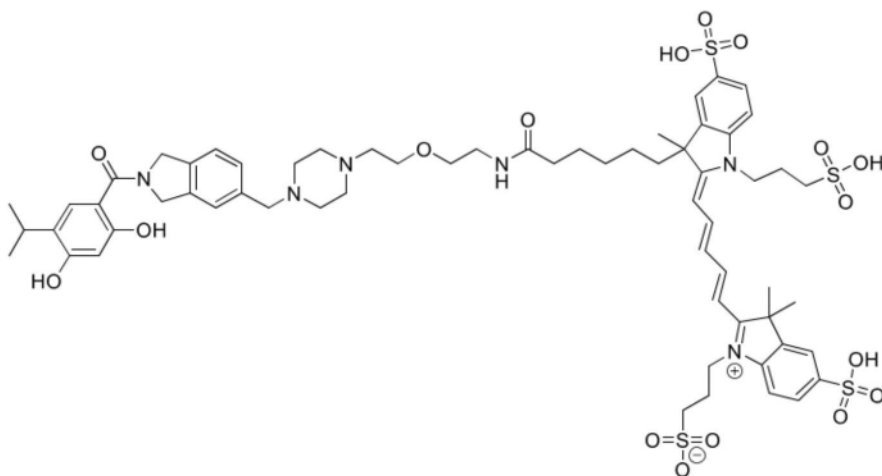


[0371] 向(5-((4-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮盐酸盐(3.5mg,0.0073mmol)在DMF(1.0mL)中的溶液中加入花青-5NHS酯(CAS:1263093-76-0,5.1mg,0.0040mmol)和N,N-二异丙基乙胺(3.8μL,0.22mmol)。将反应混合物在室温下避光搅拌1小时,然后真空浓缩。通过硅胶色谱纯化(Flash 4g,0-20%MeOH:CH₂Cl₂),然后反相HPLC(Sunfire C18,5-60%MeCN:H₂O(0.1%HC0₂H)),接着冷冻干燥,得到标题化合物,为蓝色固体(1.6mg,23%)。¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz) δ10.1(br.s,1H),9.68(s,1H),8.45-8.31(m,2H),8.19(s,1H),7.97-7.90(m,1H),7.70-7.63(m,2H),7.52-7.23(m,9H),7.09(s,1H),6.61(t,J=12.4Hz,1H),6.46(s,1H),6.36(d,J=14.0Hz,1H),6.30(d,J=14.0Hz,1H),4.90-4.74(m,4H),4.17-4.09(m,2H),3.64-3.83-3.71(m,2H),3.65(s,3H),3.39-3.03(m,9H),2.16-2.08(m,2H),1.75-1.67(m,12H),1.60-1.51(m,2H),1.41-1.35(m,2H),1.32-1.27(m,2H),1.19(d,J=7.2Hz,6H)。假设有8个质子被H₂O峰遮挡;HPLC纯度97%;LC/MS R_t=3.83min;MS m/z:948.2[M+H]⁺。

[0372] 实施例2-3-(2-((1E,3E)-5-((Z)-3-(5-((2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基

苯甲酰基))异吲哚啉)-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-5-氧代戊基)-3-甲基-5-磺基-1-(3-磺丙基)吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3,3-二甲基-5-磺基-3H-吲哚-1-鎓-1-基)丙烷-1-磺酸盐的制备

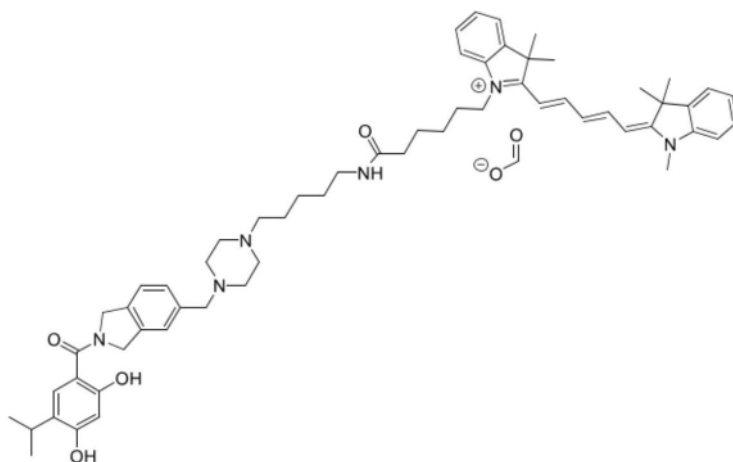
[0373]



[0374] 向(5-((4-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮盐酸盐(3.2mg,0.0066mmol)在DMF(1.0mi)中的溶液中加入AlexaFluor-647NHS酯(5.0mg,0.0076mmol)和N,N-二异丙基乙胺(2.6μL,0.20mmol)。将反应混合物在室温下避光搅拌8小时,然后用DMSO稀释至总体积为1.5mL。通过反相HPLC(Sunfire C18,5-60%MeCN:H₂O(10mM NH₄CO₃))纯化,随后冷冻干燥,得到标题化合物,为蓝色固体(1.3mg,25%)。HPLC纯度91%;LC/MS R_t=2.39min;MS m/z:662.8[M+2H]²⁺。

[0375] 实施例3-1-(6-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-甲酸鎓的制备

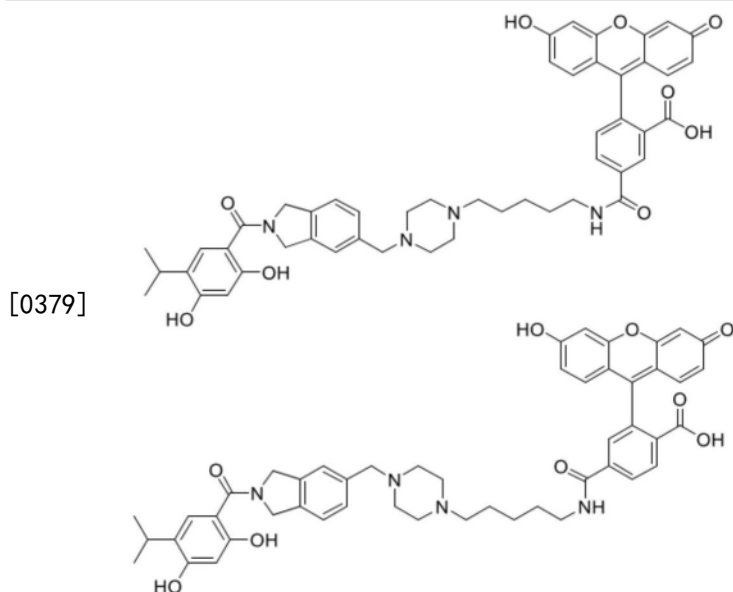
[0376]



[0377] 向(5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮(5mg,0.0085mmol)在DMF(1.0ml)中的溶液中加入花青-5NHS酯(CAS:1263093-76-0,3.9mg,0.0068mmol)和N,N-二异丙基乙胺(22μL,0.13mmol)。将反应混合物在室温下避光搅拌4小时,通过反相HPLC(Sunfire C18,5-60%MeCN:H₂O(0.1%HCO₂H))纯化粗反应混合物,真空浓缩并冷冻干燥,得到标题化合物,为蓝色固体(3.0mg,38%)。¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz) δ10.89-9.55(br.m,1H),8.44(s,1H),8.39-8.30(m,2H),7.74(t,J=5.6Hz,1H),7.65-7.0(m,2H),7.45-7.37(m,4H),7.29-7.16(m,5H),7.04(s,1H),6.61-6.53(m,1H),

6.43 (s, 1H), 6.34-6.24 (m, 2H), 4.79-4.72 (m, 4H), 4.12-4.06 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.11 (quin, J=6.8, 1H), 3.02-2.95 (m, 2H), 2.37-2.17 (m, 10H), 2.11-2.02 (m, 2H), 1.69 (s, 12H), 1.59-1.51 (m, 3H), 1.40-1.30 (m, 6H), 1.25-1.21 (m, 3H), 1.14 (d, J=6.8Hz, 6H). 未观察到1x OH. 2个质子被H₂O峰遮蔽; LC/MS Rt=3.86min; MS m/z: 946.0 [M+H]⁺.

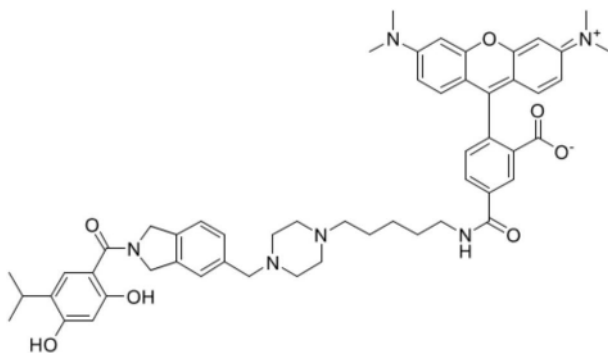
[0378] 实施例4-2-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-5-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸和5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-羟基-3-氧代-3H-咕吨-9-基)苯甲酸的制备



[0380] 向5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮(5.0mg, 0.0085mmol)在DMF(1.0ml)中的溶液中加入NHS-荧光素(5/6-羧基荧光素琥珀酰亚胺酯)、混合异构体(CAS:117548-22-8, 3.2mg, 0.0068mmol)和N,N-二异丙基乙胺(22μL, 0.13mmol)。将反应混合物在室温下避光搅拌2小时,用反相HPLC(Sunfire C18, 5-60% MeCN:H₂O(10mM (NH₄)₂CO₃))纯化粗反应混合物,真空浓缩,得到橙色粉末形式的标题化合物(3.2mg, 45%)。¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ 10.50-9.50 (m, 3H), 8.90-8.13 (m, 3H), 7.75-7.24 (m, 4H), 7.13 (s, 1H), 6.74-6.67 (m, 4H), 6.62-6.58 (m, 2H), 6.48 (s, 1H), 4.88-4.79 (m, 4H), 3.18 (quin, J=6.8, 1H), 2.50-2.24 (m, 8H), 1.69-1.28 (m, 6H), 1.22 (d, J=6.8Hz, 6H). 6个质子被H₂O峰遮蔽,没有观察到CO₂H; LC/MS Rt=3.32min; MS m/z: 839.7 [M+H]⁺.

[0381] 实施例5-5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕吨-9-基)苯甲酸铵的制备

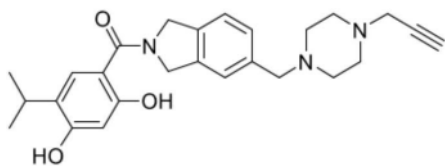
[0382]



[0383] 向(5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮(3.8mg,0.0064mmol)在DMF(1.0ml)中的溶液中加入5-TAMRA SE(5-羧基四甲基罗丹明,琥珀酰亚胺酯)(CAS:150810-68-7,2.7mg,0.0052mmol)和N,N-二异丙基乙胺(17 μ L,0.097mmol)。将反应混合物在室温下避光搅拌2.5小时,用反相HPLC(Sunfire C18,20-80%MeCN:H₂O(10mM(NH₄)₂CO₃))纯化粗反应混合物,真空浓缩,得到标题化合物,为紫色粉末(3.9mg,67%)。¹H NMR(DMSO-d₆,400MHz) δ 10.33-10.02(m,2H),9.67(s,1H),8.92-8.83(m,1H),8.54-8.43(m,1H),8.25(d,J=8.0Hz,1H),7.39-7.18(m,7H),7.11-7.03(m,2H),6.62-6.49(m,5H),6.44(s,1H),4.82-4.73(m,4H),3.60-3.52(m,2H),3.14-2.84(m,19H),1.90-1.56(m,4H),1.41-1.32(m,2H),1.15(d,J=6.8Hz,6H)。6个质子被H₂O和DMSO峰遮蔽。0.5eq NH₄CO₃加合物;LC/MS R_t=3.09min;MS m/z:893.8[M+H]⁺。

[0384] 实施例6-2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮的制备

[0385]



[0386] 合成方案(见图1)

[0387] 5-甲基异吲哚啉-2,5-二羧酸叔丁酯(A)

[0388] 在室温下,向5-溴异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(CAS#201940-08-1)(10.0g,33.5mmol)在MeOH:DMF(9:1,100mL)中的溶液中加入TEA(14mL,137.81mmol)。使用N₂将反应混合物脱气10-15分钟。在室温下向反应混合物中加入PdCl₂(dppf)(4.91克,6.71mmol)。将反应混合物置于30kg/cm²的CO₂(_{气体})压力下,加热至120℃并搅拌16小时。将反应混合物冷却至室温,减压浓缩。用水(200ml)稀释得到的粗产物,用乙酸乙酯(3×100ml)萃取。用盐水溶液(200mL)洗涤合并的有机层,用硫酸钠干燥并减压浓缩,得到粗物质,将其通过柱色谱(硅胶,用12%乙酸乙酯的己烷溶液洗脱)纯化,得到棕色固体的2-(叔丁基)5-甲基异吲哚啉-2,5-二羧酸酯(A)(10g)。

[0389] LCMS(方法B):2.657min,MS:ES+278.18(M+1);¹H NMR(DMSO-d₆,400MHz): δ 1.45(s,9H),3.84(s,3H),4.61(t,J=7.6Hz,4H),7.43-7.47(m,1H),7.86-7.91(m,2H)。

[0390] 5-(羟甲基)异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(B)

[0391] 在0℃下,将LiAlH₄溶液(1M,在THF中)(36ml,36.10mmol)滴加到搅拌着的2-(叔丁基)5-甲基异吲哚啉-2,5-二羧酸酯(A)(10克,36.07mmol)的THF(200ml)溶液中。将反应混合物在0℃下搅拌3小时,然后倒入冷的饱和氯化铵水溶液(100ml)中,用乙酸乙酯(3×

100ml) 萃取。用无水硫酸钠干燥合并的有机层,过滤并在真空下浓缩,得到棕色固体形式的5-(羟甲基)异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(B) (5g, 56%)。这种材料不经进一步纯化直接用于下一步。LCMS (方法B): 2.061min, MS: ES+250.18 (M+1); ^1H NMR (DMSO- d^6 , 400MHz): δ 1.45 (s, 9H), 4.48-4.55 (m, 6H), 5.21 (br. s, 1H), 7.19-7.26 (m, 3H)。

[0392] 5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(C)

[0393] 在室温下,向5-(羟甲基)异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(B) (3克, 12.04mmol) 的DCM (30ml) 溶液中加入活化的 MnO_2 (10.36g, 120.40mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时。将反应混合物通过硅藻土床过滤,用10%甲醇:DCM (3 $\times$ 50ml) 洗涤。在真空下浓缩合并的滤液,得到灰色固体形式的5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(C) (2.6g, 86%)。这种材料不经任何进一步纯化直接用于下一步。

[0394] LCMS (方法B): 2.387min, MS: ES+248.18 (M+1); ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 1.54 (s, 9H), 4.73-4.76 (m, 4H), 7.40-7.45 (dd, $J=8.4, 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.77-7.82 (m, 2H), 10.20 (s, 1H)。

[0395] 4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(D)

[0396] 在0 $^\circ\text{C}$ 下,向哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (15克, 80.51mmol) 的乙腈 (300ml) 溶液中加入 K_2CO_3 (22.26g, 161.30mmol)。在0 $^\circ\text{C}$ 下将炔丙基溴 (80% (w/v) 的甲苯溶液) (12mL, 80.51mmol) 滴加到反应混合物中。将所得反应混合物缓慢升温至室温,并在室温下搅拌1.5小时。过滤反应混合物,用乙腈 (100mL) 洗涤。在真空下浓缩合并的滤液,通过柱色谱 (硅胶, 用3% (v/v) MeOH的DCM溶液洗脱) 纯化所得粗物质,得到4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯,为棕色固体 (12.5g, 71%)。

[0397] LCMS (方法A): 0.937min, MS: ES+225.20 (M+1); ^1H NMR (DMSO- d^6 , 400MHz): δ 1.38 (s, 9H), 2.36 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 4H), 3.18 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 3.27-3.34 (m, 6H)。

[0398] 1-(丙-2-炔-1-基)哌嗪(E)

[0399] 在0 $^\circ\text{C}$ 和氮气氛围下,将4M HCl的二恶烷 (20mL) 溶液滴加到4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(D) (2g, 8.93mmol) 的DCM (10mL) 溶液中。将反应混合物在0 $^\circ\text{C}$ 搅拌10-15分钟。将反应混合物缓慢升温至室温,并在室温下搅拌2小时。所得反应混合物在真空下浓缩,并通过滴加甲醇氨 (pH 7) 进行中和。通过过滤收集所得沉淀,并在高真空下干燥,得到棕色油状的1-(丙-2-炔-1-基)哌嗪(E) (1.45g)。该物质用于下一步,无需任何进一步纯化。

[0400] LCMS (方法A): 0.295min, MS: ES+125.00 (M+1); ^1H NMR (DMSO- d^6 , 400MHz): δ 2.36-2.38 (m, 4H), 2.73 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 4H), 3.16 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 3.22 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 3.58 (br. s, 1H)。

[0401] 5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(F)

[0402] 在室温下,向5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(C) (0.996克, 4.03mmol) 和1-(丙-2-炔-1-基)哌嗪(E) (0.5克, 4.03mmol) 在DCM (10ml) 中的混合物中加入乙酸 (4-5滴)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。将反应混合物冷却至0 $^\circ\text{C}$ 。在0 $^\circ\text{C}$ 下将 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (2.13g, 10.05mmol) 分批加入到反应混合物中。将反应混合物缓慢升温至室温,并在室温下搅拌24小时。将反应混合物倒入水 (50ml) 中,用EtOAc (3 $\times$ 50ml) 萃取。用饱和 NaHCO_3 水溶液 (50mL) 洗涤合并的有机层,用硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。通过快速色谱法 (硅胶, 用在DCM中的2.5% (v/v) MeOH洗脱) 纯化粗物质,得到5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚

啉-2-羧酸叔丁酯(F),为灰白色固体(0.550g,77%)。

[0403] LCMS(方法A):1.588min,MS:ES+356.27(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.45(s,9H),2.32-2.43(m,8H),3.14(s,1H),3.23(d,J=2.4Hz,2H),3.43(s,2H),4.54-4.55(m,4H),7.18-7.25(3H)。

[0404] 5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉盐酸盐(G)

[0405] 在0℃下,将4M HCl在二恶烷(5mL)中的溶液滴加到5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(F)(0.55g,15.48mmol)在DCM(5mL)中的溶液中。将反应混合物在0℃搅拌10-15分钟。将反应混合物缓慢升温至室温并搅拌16小时。所得混合物在真空下浓缩,粗物质用乙醚(2×10mL)研制;所得固体物质在高真空下浓缩,产生5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉盐酸盐(G),为白色固体(0.55g)。该物质用于下一步,无需任何进一步纯化。

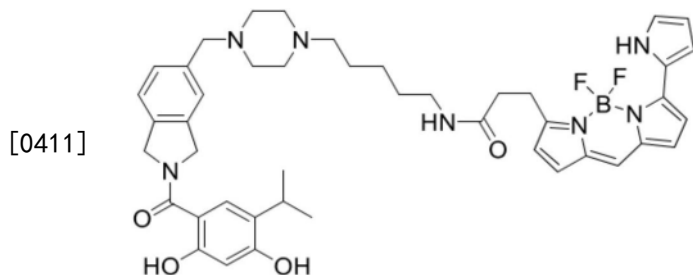
[0406] LCMS(方法D):1.24min,MS:ES+256.46(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 3.24-3.43(m,6H),3.69(br.s,1H),3.90(br.s,2H),4.36(br.s,3H),4.50-4.51(m,4H),7.48(d,J=7.6Hz,1H),7.62(d,J=8.8Hz,2H),10.13(br.s,1H),11.70(br.s,1H)。

[0407] (2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮(实施例6)

[0408] 在室温下在微波玻璃管中,向5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉盐酸盐(G)(0.058克,0.198mmol)和2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸(0.032克,0.163mmol)在DMF(2mL)中的混合物中加入N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.063克,0.33mmol)、HOBt(0.033g,0.24mmol)和DIPEA(0.057mL,0.33mmol)。密封该微波玻璃管,并在120℃下微波辐射3小时。将所得反应混合物倒入冰冷的水(30mL)中,并在EtOAc(3×30mL)中萃取。用硫酸钠干燥合并的有机层,并在真空下浓缩;通过快速色谱法(硅胶,用在DCM中的6.8%(v/v)MeOH洗脱)纯化粗物质,得到(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-((4-(丙-2-炔-1-基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮(实施例6),为灰白色固体(0.032g,43%)。

[0409] LCMS(方法A):1.340min,MS:ES+434.22(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.07-1.13(dd,J=7.5,6.8Hz,6H),2.32-2.45(m,8H),3.05-3.11(m,1H),3.14(s,1H),3.23(s,2H),3.43(s,2H),4.74-4.76(m,4H),6.39(s,1H),7.03(s,1H),7.20-7.29(m,3H),9.62(br.s,1H),10.32-10.10(m,1H)。

[0410] 实施例7-3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茚-3-基)-N-(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)丙酰胺

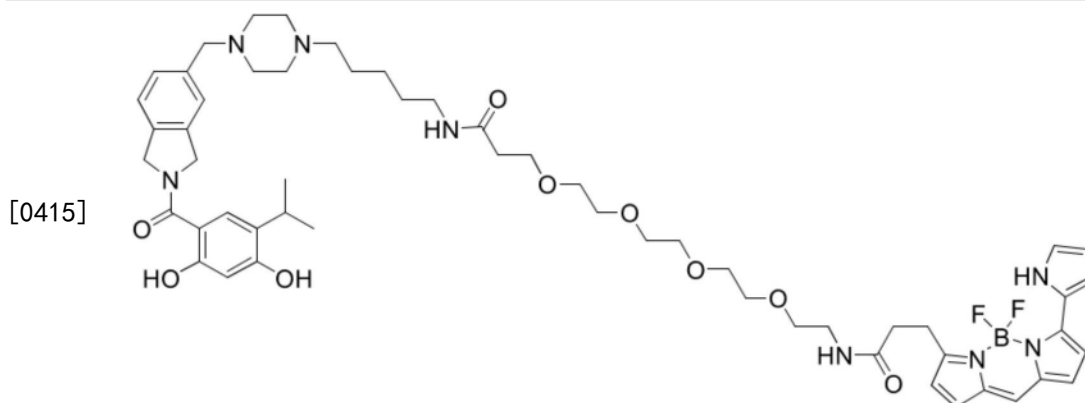


[0412] 将5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙

基苯基) 甲酮 (5.4mg, 0.011mmol) 装入5ml琥珀色小瓶中, 并加入DMF (1ml)。向搅拌的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺 (5.9 μ L, 0.034mmol), 并继续搅拌5分钟。加入**NanoBRET® 590-SE** (5.8mg, 0.014mmol), 将小瓶加盖并在黑暗中搅拌2小时。用1:1:0.01乙腈、水、TFA稀释混合物, 并使用标准方法1进行反相制备HPLC纯化。将含有产物的级分合并并减压浓缩, 得到紫色薄膜, 将其溶解在乙腈 (10mL) 中, 浓缩至干, 一式三份, 以除去假三氟乙酸。所得残余物在高真空下干燥, 得到紫色固体产物 (8.1mg, 91.1%)。

[0413] MS (ESI, m/z) 计算值, 对于 $C_{44}H_{53}BF_5N_7O_4$ [M+H]⁺: 792.4, 实测值792.5。

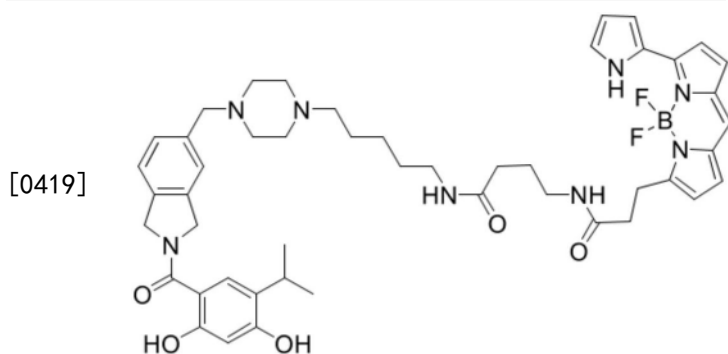
[0414] 实施例8-1- (3- (5,5-二氟-7- (1H-吡咯-2-基) -5H-4 λ^4 , 5 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基) 丙酰胺基) -N- (5- (4- ((2- (2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基) 异吲哚啉-5-基) 甲基) 哌嗪-1-基) 戊基) -3,6,9,12-十四氧杂十五烷-15-酰胺



[0416] 将(5-((4- (5-氨基戊基) 哌嗪-1-基) 甲基) 异吲哚啉-2-基) (2,4-二羟基-5-异丙基苯基) 甲酮 (5.0mg, 0.010mmol) 装入5ml琥珀色小瓶中, 用DMF (0.5ml) 处理。向悬浮液中加入N,N-二异丙基乙胺 (5.4 μ L, 0.031mmol), 使溶液澄清。将**NanoBRET® 590PEG-04-SE** (8.4mg, 0.012mmol) 溶解在0.5ml DMF中, 并使用另外2x0.5mL份的DMF添加到反应混合物中, 以定量转移活性染料。将混合物加盖, 并在黑暗中搅拌2小时。混合物用1:1:0.01乙腈、水、TFA稀释, 并使用标准方法1进行反相制备HPLC纯化。将含有产物的级分合并, 减压浓缩, 得到紫色薄膜, 将其溶解在乙腈 (10mL) 中, 浓缩至干, 一式三份, 以除去假三氟乙酸。所得残余物在高真空下干燥, 得到紫色固体产物 (8.3mg, 76.4%)。

[0417] MS (ESI, m/z) 计算值, 对于 $C_{55}H_{74}BF_2N_8O_9$ [M+H]⁺: 1039.6, 实测值1039.7。

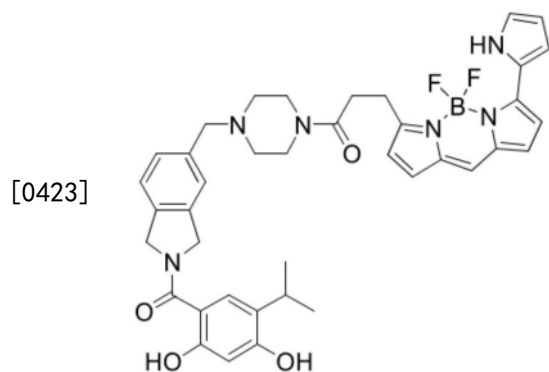
[0418] 实施例9-4- (3- (5,5-二氟-7- (1H-吡咯-2-基) -5H-5 λ^4 , 6 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茛-3-基) 丙酰胺基) -N- (5- (4- ((2- (2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基) 异吲哚啉-5-基) 甲基) 哌嗪-1-基) 戊基) 丁酰胺



[0420] 将(5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮(5.0mg,0.010mmol)装入5ml琥珀色小瓶中,并加入DMF(1ml)。向搅拌的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺(7.6 μ L,0.042mmol),并继续搅拌5分钟。加入NanoBRET 590[®]-C4-SE(6.4mg,0.012mmol),将小瓶加盖并在黑暗中搅拌2小时。用1:1:0.01乙腈、水、TFA稀释混合物,并使用标准方法1进行反相制备HPLC纯化。将含有产物的级分合并并减压浓缩,得到紫色薄膜,将其溶解在乙腈(10mL)中,浓缩至干,一式三份,以除去假三氟乙酸。所得残余物在高真空下干燥,得到紫色固体产物(3.6mg,39.4%)。

[0421] MS(ESI,m/z)计算值:对于C₄₈H₆₀BF₂N₈O₅[M+H]⁺:877.5,实测值877.6。

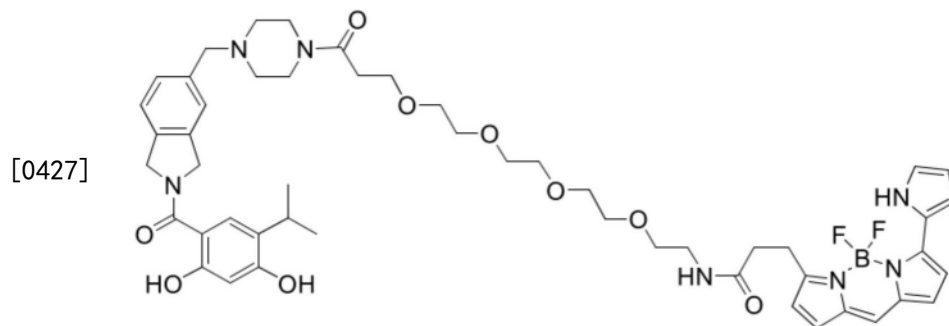
[0422] 实施例10-3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f]11,3,2]二氮杂硼杂茚-3-基)-1-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)丙烷-1-酮



[0424] 将(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-(哌嗪-1-基甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮盐酸盐(5.0mg,0.012mmol)装入5mL琥珀色小瓶中,并加入DMF(1mL)。向搅拌的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺(8.1 μ L,0.046mmol),并继续搅拌5分钟。加入 NanoBRET[®] 590-SE(5.9mg,0.014mmol),将小瓶加盖并在黑暗中搅拌2小时。用1:1:0.01乙腈、水、TFA稀释混合物,并使用标准方法1进行反相制备HPLC纯化。将含有产物的级分合并并减压浓缩,得到紫色薄膜,将其溶解在乙腈(10mL)中,浓缩至干,一式三份,以除去假三氟乙酸。所得残余物在高真空下干燥,得到紫色固体产物(3.25mg,39.7%)。

[0425] MS(ESI,m/z)计算值,对于C₃₉H₄₂BF₂N₆O₄[M+H]⁺:707.3,实测值707.4。

[0426] 实施例11-3-(5,5-二氟-7-(1H-吡咯-2-基)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茚-3-基)-N-(15-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)-15-氧代-3,6,9,12-四氧杂十五烷基)丙酰胺

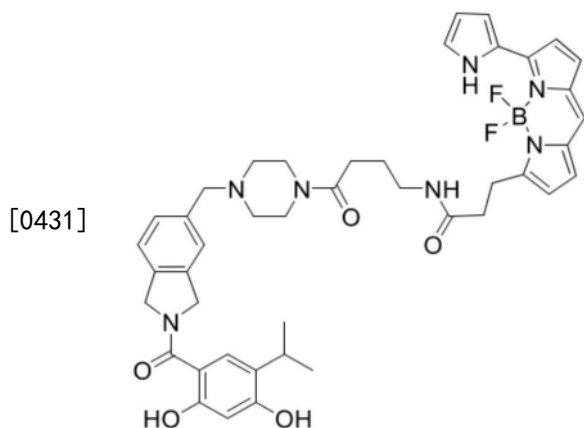


[0428] 将(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-(哌嗪-1-基甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮盐酸盐

(5.0mg, 0.012mmol) 装入5ml琥珀色小瓶中, 用DMF (0.5ml) 处理。向混合物中加入N,N-二异丙基乙胺 (8.1μL, 0.046mmol), 并将所得溶液搅拌5分钟。将 NanoBRET® 590PEG-04-SE (8.6mg, 0.013mmol) 溶解在0.5ml DMF中, 并使用另外2x0.5mL份的DMF添加到反应混合物中, 以定量转移活性染料。将反应混合物加盖并在黑暗中搅拌2小时, 用1:1:0.01乙腈、水、TFA稀释, 并使用标准方法1进行反相制备HPLC纯化。将含有产物的级分合并并减压浓缩, 得到紫色薄膜, 将其溶解在乙腈 (10mL) 中, 浓缩至干, 一式三份, 以除去假三氟乙酸。所得残余物在高真空下干燥, 得到紫色固体产物 (4.8mg, 43.6%)。

[0429] MS (ESI, m/z) 计算值: 对于 $C_{50}H_{63}BF_2N_7O_9 [M+H]^+$: 954.5, 实测值954.6。

[0430] 实施例12--3- (5,5-二氟-7- (1H-吡咯-2-基) -5H-5λ⁴,6λ⁴-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼杂茚-3-基) -N- (4- (4- ((2- (2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基) 异吲噪啉-5-基) 甲基) 哌嗪-1-基) -4-氧代丁基) 丙酰胺



[0432] 将 (2,4-二羟基-5-异丙基苯基) (5- (哌嗪-1-基甲基) 异吲噪啉-2-基) 甲酮盐酸盐 (5.0mg, 0.012mmol) 装入5mL琥珀色小瓶中, 并加入DMF (1mL)。向混合物中加入N,N-二异丙基乙胺 (20.2μL, 0.116mmol), 并继续搅拌5分钟。加入 NanoBRET® 590-C4-SE (8.9mg, 0.017mmol), 将小瓶加盖并在黑暗中搅拌2小时。用1:1:0.01乙腈、水、TFA稀释混合物, 并使用标准方法1进行反相制备HPLC纯化。将含有产物的级分合并并减压浓缩, 得到紫色薄膜, 将其溶解在乙腈 (10mL) 中, 浓缩至干, 一式三份, 以除去假三氟乙酸。所得残余物在高真空下干燥, 得到紫色固体产物 (2.3mg, 24.7%)。

[0433] MS (ESI, m/z) 计算值, 对于 $C_{43}H_{49}BF_2N_7O_5 [M+H]^+$: 792.4, 实测值792.5。

[0434] 中间体的制备

[0435] (5- ((4- (2- (2-氨基乙氧基) 乙基) 哌嗪-1-基) 甲基) 异吲噪啉-2-基) (2,4-二羟基-5-异丙基苯基) 甲酮盐酸盐的制备 (图2)

[0436] (2- (2-碘乙氧基) 乙基) 氨基甲酸叔丁酯 (H)

[0437] 在室温下, 向 (2- (2-羟基乙氧基) 乙基) 氨基甲酸叔丁酯 (CAS#139115-91-6) (5.2克, 25.36mmol) 的DCM (60mL) 溶液中加入三苯基膦 (7.98克, 30.43mmol) 和咪唑 (0.569克, 8.36mmol)。将反应混合物冷却至0°C。在0°C下将碘 (8.36克, 32.92mmol) 分批加入到反应混合物中。将反应混合物缓慢升温至室温, 搅拌20小时。将反应混合物倒入水 (100mL) 中, 用DCM (3×50mL) 萃取。用硫酸钠干燥合并的有机层, 过滤并减压浓缩。向粗物质中加入乙醚 (100mL), 过滤所得沉淀并用乙醚 (3×50mL) 洗涤。在减压下浓缩合并的滤液, 通过柱色谱

(硅胶,用20% (v/v) 乙酸乙酯的己烷溶液洗脱) 纯化粗产物,得到无色油状的(2-(2-碘乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(H) (7.8g,98%)。

[0438] LCMS(方法B):2.254min,MS:ES+316.13(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.36(s,9H),3.04-3.08(m,2H),3.30(t,J=6.4Hz,2H),3.40(t,J=6.4Hz,2H),3.62(t,J=6.4Hz,2H),6.08(s,1H)。

[0439] 4-(2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-羧酸苄酯(I)

[0440] 在室温下,向(2-(2-碘乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(H) (2.0克,6.35mmol)和哌嗪-1-羧酸苄酯(CAS#31166-44-6) (1.25克,5.72mmol)在丙酮(20ml)中的溶液中加入K₂CO₃ (2.45g,17.75mmole)和NaI (0.38克,2.54mmol)。将反应混合物在70°C加热16小时。将反应混合物真空浓缩,用水(100ml)稀释,用乙酸乙酯(3×100ml)萃取。用无水硫酸钠干燥合并的有机层,过滤并真空浓缩;通过快速色谱法(硅胶,用2.5% (v/v) MeOH的DCM溶液洗脱) 纯化粗产物,得到4-(2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-羧酸苄酯(I),为黄色油状物(2.0g,77%)。

[0441] LCMS(方法A):1.640min,MS:ES+408.32(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.35(s,9H),2.38(t,J=4.8Hz,4H),2.44-2.47(m,2H),3.02-3.06(m,2H),3.33-3.36(m,6H),3.48(t,J=5.6Hz,2H),5.06(s,2H),6.80(t,J=5.2Hz,1H),7.29-7.39(m,5H)。

[0442] (2-(2-(哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(J)

[0443] 在室温下,向4-(2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-羧酸苄酯(I) (1.5克,3.68mmol)和乙酸(0.23ml,4.03mmol)在甲醇(7ml)中的混合物中加入10%碳载Pd(OH)₂ (0.45克)。将反应混合物用H₂(g)鼓泡4小时。将反应混合物通过硅藻土床过滤,用MeOH(2×10mL)洗涤并在真空下浓缩合并的滤液,随后冻干,得到油状的(2-(2-(哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(J) (0.971g,96%)。这种材料不经进一步纯化直接用于下一步。

[0444] ¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.36(s,9H),2.39-2.42(m,6H),2.71(t,J=4.8Hz,4H),3.02-3.06(m,2H),3.34(t,J=6.0Hz,2H),3.45(t,J=5.6Hz,2H),5.76(s,1H),6.80(t,J=5.2Hz,1H)。

[0445] 异吲哚啉-5-甲醛盐酸盐(K)

[0446] 将4M HCl的二恶烷溶液(20mL)滴加到5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(C) (1.3g,5.26mmol)的DCM(20mL)溶液中。将反应混合物缓慢升温至室温并搅拌6小时。减压浓缩反应混合物,通过用乙醚(3×20mL)研制来纯化粗产物。在高真空下干燥所得固体材料,得到异吲哚啉-5-甲醛盐酸盐(K),为灰白色固体(0.8g,83%)。

[0447] LCMS(方法C):2.154min,MS:ES+148.18(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz) δ 4.57(d,J=4.0Hz,4H),7.62(d,J=8.0Hz,1H),7.92(d,J=7.6Hz,2H),10.21(s,1H),10.63(s,1H)。

[0448] 5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸苄酯(L)

[0449] 在室温下,向异吲哚啉-5-甲醛盐酸盐(K) (0.8克,4.37mmol)在THF(10ml)中的溶液中加入TEA(2.30ml,13.02mmol)。将反应混合物冷却至0°C。在0°C下将氯甲酸苄酯(0.745克,4.38mmol)滴加到反应混合物中。将反应混合物在0°C搅拌30分钟。真空浓缩反应混合物,用2M HCl(10ml)稀释,用乙酸乙酯(3×30ml)萃取。用水(100mL)洗涤合并的有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。粗物质通过柱色谱(硅胶,用25% (v/v) 乙酸乙酯的己烷

溶液洗脱)纯化,得到5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸苄酯(L),为黄色固体(1.0g,82%)。

[0450] ^1H NMR (DMSO- d^6 , 400MHz) δ 4.72-4.80 (m, 4H), 5.15 (s, 2H), 7.32-7.43 (m, 5H), 7.53-7.58 (m, 1H), 7.84-7.88 (m, 2H), 9.99 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H)。

[0451] 5-((4-(2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸苄酯(M)

[0452] 在室温下,向5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸苄酯(L)(1.0克,3.56mmol)和乙酸(0.1ml)的DCM(20ml)溶液中加入(2-(2-(哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(J)(0.971克,3.56mmol)。将反应混合物在室温下搅拌5小时。将 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (4.52g, 21.35mmol)加入到反应混合物中,并将混合物在室温下搅拌24小时。将反应混合物倒入饱和 NaHCO_3 水溶液(50mL)中,并用DCM(2x150ml)提取。用硫酸钠干燥合并的有机层,并在真空下浓缩;通过快速色谱法(硅胶,用7% (v/v) MeOH的DCM溶液洗脱)纯化粗产物,得到棕色油状的5-((4-(2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸苄酯(M)(0.9g,48%)。

[0453] LCMS(方法C):4.34min,MS:ES+539.64(M+1); ^1H NMR (DMSO- d^6 , 400MHz): δ 1.34 (s, 9H), 2.32-2.43 (m, 8H), 3.02-3.04 (m, 2H), 3.31-3.34 (m, 2H), 3.42-3.46 (m, 4H), 4.48-4.49 (m, 1H), 5.22 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 4.62-4.68 (m, 4H), 5.14 (s, 2H), 6.72-6.77 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 7.20-7.42 (m, 8H)。

[0454] (2-(2-(4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(N)

[0455] 在室温下,向5-((4-(2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸苄酯(M)(0.1克,0.186mmol)的乙醇(5ml)溶液中加入10% Pd/C(50% 水分)(0.020克)。将反应混合物用 H_2 (g)鼓泡12小时。将反应混合物通过硅藻土床过滤,用甲醇(2x5ml)洗涤。在真空下浓缩合并的滤液,得到棕色油状的(2-(2-(4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(N)(0.076g,100%)。这种材料不经任何进一步纯化直接用于下一步。

[0456] LCMS(方法A):1.036min,MS:ES+405.32(M+1)

[0457] (2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(O)

[0458] 在室温下在微波玻璃管中,向(2-(2-(4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(N)(0.076克,0.187mmol)和2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸(0.030克,0.153mmol)在DMF(2ml)中的混合物中加入N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(0.059克,0.307mmol)、HOBt(0.020g,0.148mmol)和DIPEA(0.05mL,0.305mmol);将试管密封并在120°C的微波下辐射1小时。将所得反应混合物倒入冰冷的水(20ml)中,用EtOAc(5x30ml)萃取。用硫酸钠干燥合并的有机层,过滤并在真空下浓缩,得到粗物质,用快速色谱法(硅胶,用8% (v/v) MeOH的DCM溶液洗脱)纯化,得到棕色油状的(2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(O)(0.020g,18%)。

[0459] LCMS(方法A):1.728min,MS:ES+583.5(M+1); ^1H NMR (DMSO- d^6 , 400MHz): δ 1.12 (d, $J=6\text{Hz}$, 6H), 1.34 (s, 9H), 2.23-2.33 (m, 10H), 3.04 (s, 4H), 3.46 (s, 4H), 4.75 (s, 4H), 6.39 (s, 1H), 6.78 (br.s, 1H), 7.02 (br.s, 1H), 7.20-7.28 (m, 4H), 9.63 (s, 1H), 10.09 (d, $J=$

24.4Hz, 1H) .

[0460] (5-((4-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮盐酸盐

[0461] 在0℃和氮气氛下,向(2-(2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(O)(0.015g,0.0257mmol)的DCM(1mL)溶液中加入4M HCl的二恶烷(0.2mL)溶液。将反应混合物在0℃下搅拌4小时。将所得反应混合物在真空下浓缩,得到粗物质,用乙醚(2×10mL)研制所述粗物质,并在高真空下干燥,得到棕色油状的(5-((4-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮盐酸盐(0.012g,90%)。

[0462] LCMS(方法B):1.456min,MS:ES+483.5(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz):δ1.12(d,J=6.8Hz,6H),1.29-1.30(m,4H),2.99-3.07(m,4H),3.25-3.30(m,4H),3.62-3.63(m,3H),3.76-3.77(m,2H),4.32-4.37(br.s,2H),4.75-4.80(m,4H),6.43(s,1H),7.01(s,1H),7.38-7.52(m,3H),8.10(br.s,3H),9.68(bs,1H),10.03(bs,1H)。

[0463] 2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸的制备(图3)

[0464] 2,4-二羟基苯甲酸甲酯(P)

[0465] 在室温下,向搅拌着的2,4-二羟基苯甲酸(100克,649.35mmol)的甲醇(400ml)溶液中加入浓H₂SO₄(50ml)。将反应混合物加热至100℃并搅拌12小时。将所得溶液真空浓缩并倒入水(500mL)中。通过过滤收集所得沉淀,并在高真空下干燥,得到2,4-二羟基苯甲酸甲酯(P),为灰白色固体(170g,78%)。该材料不经任何进一步纯化直接用于下一步。

[0466] LCMS(方法C):4.24min,MS:ES+169.19(M+1);¹H NMR(CDCl₃,400MHz)δ3.39(s,3H),5.72(br.s,1H),6.38-6.42(m,2H),7.74(d,J=8.8Hz,1H),11.02(s,1H)。

[0467] 2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸甲酯(Q)

[0468] 在50℃下,向2,4-二羟基苯甲酸甲酯(80克,475.76mmol)在DCM(1200ml)中的溶液中加入无水AlCl₃(126.87克,951.48mmol),然后加入异丙基溴(351.09克,2854.62mmol,每6小时分3等份(每份117.03克)加入)。加完异丙基溴后,将反应物在50℃加热6小时;总反应时间为24小时。反应混合物在真空下浓缩,粗物质用水(1000ml)稀释,用乙酸乙酯(4×500ml)萃取。合并的有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。通过柱色谱(硅胶,用3%(v/v)EtOAc的己烷溶液洗脱)将获得的粗物质纯化三次,产生2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸甲酯(Q),为黄色固体(25.5g,26%)。

[0469] LCMS(方法A):2.069min,MS:ES+211.11(M+1);¹H NMR(DMSO,400MHz)δ1.13(d,J=7.6Hz,6H),3.03-3.16(m,1H),3.83(s,3H),6.35(s,1H),7.49(s,1H),10.48(s,1H),10.57(s,1H)。

[0470] 2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸

[0471] 在室温下,向2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸甲酯(Q)(23.0克,109.40mmol)的甲醇:水(2:1,300ml)溶液中加入氢氧化钠(21.88克,547.00mmol)。将反应混合物加热至70℃持续4小时。将反应混合物冷却至室温,用冰冷的水(500mL)稀释,并用1M HCl(pH5)酸化。通过过滤收集所得沉淀物,并在高真空下干燥,得到2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸,为白色固体(13g,61%)

[0472] LCMS:(方法B)2.044min,MS:ES+197.22(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz):δ1.02(d,

$J=6.8\text{Hz}$, 6H), 3.02-3.09 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 10.44 (s, 1H), 11.24 (s, 1H), 13.33 (br. s, 1H) .

[0473] (5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮的制备(图4)

[0474] (5-羟基戊基)氨基甲酸叔丁酯(R)

[0475] 将5-氨基戊烷-1-醇(CAS#2508-29-4)(5克, 48.54mmol)在DCM(50ml)中的混合物冷却至0℃。在0℃下向反应混合物中加入Boc酸酐(11.16ml, 48.46mmol)。将所得反应升温至室温并搅拌16小时。将反应混合物倒入水(150ml)中,在DCM(2×100ml)中萃取。合并的有机层用无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。通过快速色谱法(二氧化硅,用18% (v/v) 乙酸乙酯的己烷溶液洗脱)纯化获得的粗物质,得到淡黄色油状的(5-羟基戊基)氨基甲酸叔丁酯(R)(15g, 76%)。

[0476] ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz): δ 1.34-1.40 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.46-1.51 (m, 2H), 1.54-1.61 (m, 2H), 1.97 (br. s, 1H), 3.10-3.11 (m, 2H), 6.63 (t, $J=6.40\text{Hz}$, 2H), 4.63 (bs, 1H) .

[0477] (5-溴戊基)氨基甲酸叔丁酯(S)

[0478] 在0℃下,向(5-羟基戊基)氨基甲酸叔丁酯(8克, 39.41mmol)在THF(80ml)中的混合物中加入三苯基膦(15.48克, 59.11mmol)和 CBr_4 (19.60克, 59.11mmol)。将所得反应混合物缓慢升温至室温并搅拌16小时。将反应混合物倒入水(150ml)中,用乙酸乙酯(3×150ml)萃取。用硫酸钠干燥合并的有机层,过滤并减压浓缩。通过柱色谱(硅胶,用10% (v/v) 乙酸乙酯的己烷溶液洗脱)纯化粗物质,得到无色油状的(5-溴戊基)氨基甲酸叔丁酯(9g, 86%)。

[0479] LCMS(方法A): 2.150min, MS: ES+210.1, 212.1 (M-56); ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz): δ 1.32-1.36 (m, 13H), 1.75-1.79 (m, 2H), 2.88-2.90 (m, 2H), 3.51 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 6.81 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H) .

[0480] 4-(5-((叔丁氧基羰基)氨基)戊基)哌嗪-1-羧酸苄酯(T)

[0481] 在室温下,向哌嗪-1-羧酸苄酯(CAS#31166-44-6)(4.135克, 18.79mmol)在丙酮(50ml)中的混合物中加入 K_2CO_3 (7.78丸, 56.38mmol)和NaI(1.40丸, 9.39mmol)。将反应物在室温下搅拌15分钟。在室温下,将(5-溴戊基)氨基甲酸叔丁酯(5g, 18.79mmol)加入到反应混合物中。将反应混合物在70℃加热16小时。将所得反应混合物冷却至室温,用水(150mL)稀释,用乙酸乙酯(3×150mL)萃取。用无水硫酸钠干燥合并的有机层,过滤并在真空下浓缩,得到粗物质,通过快速色谱法(硅胶,用3% (v/v) MeOH的DCM溶液洗脱)纯化,得到棕色油状的4-(5-((叔丁氧基羰基)氨基)戊基)哌嗪-1-羧酸苄酯(T)(6.5g, 85%)。

[0482] LCMS(方法A): 1.492min, MS: ES+406.42 (M+1); ^1H NMR($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz): δ 1.21-1.23 (m, 2H), 1.35 (s, 11H), 2.28-2.32 (m, 6H), 2.85-2.90 (m, 2H), 3.32-3.34 (m, 6H), 5.06 (m, 2H), 6.77 (s, 1H), 7.31-7.38 (m, 5H) .

[0483] (5-(哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(U)

[0484] 在室温下,向4-(5-((叔丁氧基羰基)氨基)戊基)哌嗪-1-羧酸苄酯(T)(6.4g, 15.80mmol)在MeOH(70mL)中的溶液中加入10% Pd/C(50%水分)(0.640g, 10% w/w)。用 H_2 (g)吹扫反应混合物5小时。通过硅藻土床过滤反应混合物,用MeOH(2×10mL)洗涤,减压浓缩合并的滤液,得到棕色油状的(5-(哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(U)(4g, 93%)。该物

质不经进一步纯化直接用于下一步。

[0485] MS:ES+272.20 (M+1). ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 1.28-1.35 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.43-1.50 (m, 2H), 2.14 (br. s, 3H), 2.29-2.33 (m, 2H), 2.42 (bs, 4H), 2.90-2.92 (m, 3H), 3.10-3.11 (m, 2H), 3.47 (s, 1H), 4.61 (bs, 1H).

[0486] 5-((4-(5-((叔丁氧基羰基)氨基)戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸苄酯 (V)

[0487] 在室温下,向5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸苄酯(L) (1.6克, 5.69mmol) 和(5-(哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(U) (1.54克, 5.69mmol) 在DCM (50ml) 中的混合物中加入乙酸 (0.2ml)。将反应混合物在室温下搅拌2小时。将反应混合物冷却至0°C。在0°C下将NaBH (OAc)₃ (3.618g, 17.078mmol) 加入到反应混合物中。将反应混合物缓慢升温至室温并搅拌16小时。将反应混合物倒入水 (50mL) 中,用DCM (2×150mL) 萃取。用硫酸钠干燥合并的有机层,过滤并真空浓缩;通过快速色谱法(硅胶,用3% (v/v) MeOH的DCM溶液洗脱) 纯化粗产物,得到棕色油状的5-((4-(5-((叔丁氧基羰基)氨基)戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸苄酯(V) (2.2g, 72%)。

[0488] LCMS(方法A): 1.552min, MS:ES+537.41 (M+1); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz): δ 1.15-1.23 (m, 2H), 1.36 (s, 11H), 1.51 (br. s, 2H), 1.90 (s, 1H), 2.32-2.39 (m, 2H), 2.88-2.95 (m, 7H), 3.53 (br. s, 2H), 4.63-4.69 (m, 4H), 5.14 (s, 2H), 6.82 (br. s, 1H), 7.23-7.42 (m, 8H), 10.04 (br. s, 1H), 11.99 (br. s, 1H).

[0489] (5-(4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(W)

[0490] 在室温下,向5-((4-(5-((叔丁氧基羰基)氨基)戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸苄酯(V) (2.1g, 3.92mmol) 的乙醇 (60mL) 溶液中加入10% Pd/C (50%水分) (0.420g, 20% w/w)。用H₂ (g) 吹扫反应混合物5小时。将反应混合物通过硅藻土床过滤,用MeOH (2×20mL) 洗涤,在真空下浓缩合并的滤液,得到棕色油状的(5-(4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(W) (1.7g, 定量)。该材料未经进一步提纯即可使用。

[0491] LCMS(方法A): 0.757min, MS:ES+403.37 (M+1); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz): δ 1.19-1.22 (m, 2H), 1.36 (s, 13H), 2.19-2.21 (m, 2H), 2.23-2.27 (m, 3H), 2.28-2.32 (m, 3H), 2.86-2.87 (m, 2H), 2.96-2.97 (m, 1H), 3.40-3.43 (m, 4H), 4.32-4.33 (m, 4H), 6.77-6.79 (m, 1H), 7.15-7.29 (m, 3H).

[0492] (5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(X)

[0493] 在室温下在微波玻璃管中,向(5-(4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(W) (0.504克, 1.253mmol) 和2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸 (0.205克, 1.046mmol) 在DMF (8ml) 中的混合物中加入N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (0.399克, 2.081mmol)、HOBt (0.141g, 1.042mmol) 和DIPEA (0.428mL, 2.502mmol)。将微波玻璃管密封,并在120°C的微波下辐射3h。将所得反应混合物倒入冷水 (50ml) 中,用乙酸乙酯 (3×50ml) 萃取。用硫酸钠干燥合并的有机层,过滤并真空浓缩,得到粗产物 (270mg)。通过HPLC (5mM碳酸氢铵水溶液/MeCN) 纯化180mg粗物质。将分离的级分冻干,得到(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(X),为灰白色固体 (0.032g, 5%)。

[0494] LCMS(方法A):1.728min,MS:ES+583.5(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.12(d,J=6Hz,6H),1.20-1.23(m,4H),1.34(s,9H),2.33-2.50(m,10H),3.03-3.04(m,4H),3.35-3.46(m,4H),4.74-4.75(m,4H),6.39(s,1H),6.78(s,1H),7.07(s,1H),7.20-7.28(m,3H),9.63(s,1H),10.03-10.09(d,J=24.4Hz,1H).

[0495] (5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮

[0496] 在0℃下,向(5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酸叔丁酯(X)(0.060g,0.103mmol)在DCM(2mL)中的溶液中加入4M HCl在二恶烷(0.6mL)中的溶液。将反应混合物在0℃下搅拌1小时。在真空下浓缩所得反应混合物,用乙醚(2x)研制粗物质。将获得的固体在冻干下干燥,得到棕色粘性固体形式的(5-((4-(5-氨基戊基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-基)(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)甲酮(0.043g,80%)。

[0497] LCMS(方法B):1.625min,MS:ES+481.50(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.13(d,J=6.8Hz,6H),1.32-1.34(m,2H),1.52-1.57(m,2H),1.70-1.72(m,2H),2.81-2.83(m,2H),3.20-3.30(m,5H),3.40-3.50(m,3H),4.35(m,2H),4.77-4.80(m,4H),6.45(s,1H),7.02(s,1H),7.40-7.54(m,3H),7.93(br.s,3H),9.68(bs,1H),10.38(br.s,1H),11.78-12.09(br.s,2H)。

[0498] 4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-羧酸苄酯(AA)和(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-(哌嗪-1-基甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮盐酸盐(AB)的制备(图5)

[0499] 5-((4-((苄氧基)羰基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(Y)

[0500] 将5-甲酰基异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(C)(见实施例6)(3.0克,12.13mmol)和哌嗪-1-羧酸苄酯(CAS:31166-44-6)(3.2g,14.54mmol)在甲醇(10ml)中的混合物在40℃蒸发至干(以除去冷凝水)。将残余物溶解在二氯甲烷(50ml)中,蒸发至干(除去痕量甲醇);重复该过程一次,以完全除去甲醇。将所得残余物溶解在DCM(90mL)中,置于氮气氛下,冷却至0℃。在0℃下将NaBH(OAc)₃(3.8克,17.93mmol)分批加入到反应混合物中。将反应混合物缓慢温热至室温并搅拌16小时。在2个平行批次中进行前述制备,将合并的反应混合物倒入水(200ml)中,并在DCM(3×250ml)中萃取。用饱和碳酸氢钠水溶液(2×100mL)洗涤合并的有机层,用硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩,得到粗物质,通过快速色谱法(硅胶,用25%(v/v) EtOAc的正己烷溶液洗脱)纯化,得到棕色油状的5-((4-((苄氧基)羰基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(Y)(5.0g,46%)。

[0501] LCMS(方法A):1.631min,MS:ES+452.32(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.45(s,9H),2.30-2.33(m,4H),3.33-3.39(m,4H),3.48(s,2H),4.56(d,J=8.8Hz,4H),5.07(s,2H),7.22-7.37(m,8H)。

[0502] 4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-羧酸苄酯盐酸盐(Z)

[0503] 在0℃下,向5-((4-((苄氧基)羰基)哌嗪-1-基)甲基)异吲哚啉-2-羧酸叔丁酯(Y)(1.0克,2.21mmol)在DCM(20ml)中的溶液中加入4M HCl在二恶烷(5.0ml)中的溶液。将反应混合物在0℃下搅拌2小时,然后真空浓缩,用乙醚(3×10ml)研制粗物质。将所得固体在高真空下干燥,得到4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-羧酸苄酯盐酸盐(Z),为绿色固体

(0.99g, 定量)。

[0504] LCMS(方法E):0.865min,MS:ES+352.22(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 3.02-3.04(m,2H),3.26-3.29(m,2H),3.36-3.46(m,2H),3.60-3.62(m,4H),4.06-4.10(m,2H),4.32-4.34(m,2H),4.50-4.52(m,4H),5.11(s,2H),7.32-7.40(m,5H),7.48(d,J=7.6Hz,1H),7.62(d,J=8Hz,1H),10.23(br.s,2H),11.71(br.s,1H)。

[0505] 4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-羧酸苄酯(AA)

[0506] 在室温下,在微波玻璃管中,向2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酸(0.205克,1.046mmol)在DMF(10ml)中的混合物中加入N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.97克,5.06mmol)、HOBt(0.340克,2.51mmol)和DIPEA(0.65克,5.03mmol)。在室温下向反应中加入4-(异吲哚啉-5-基甲基)哌嗪-1-羧酸苄酯盐酸盐(Z)(0.980克,2.52mmol)。密封微波玻璃管,在120°C下微波辐射1小时。将所得反应混合物倒入冷水(60mL)中,由此固体物质沉淀,分离并在真空下干燥,得到0.8g粗物质。通过快速色谱法纯化(硅胶,用1.5%(v/v)MeOH的DCM溶液洗脱),得到4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-羧酸苄酯,为灰白色固体(0.395g,30%)。

[0507] LCMS(方法E):1.567min,MS:ES+530.22(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.10-1.19(m,6H),2.30-2.32(m,4H),3.06-3.13(m,1H),3.39-3.43(m,4H),3.48(s,2H),4.66-4.76(m,4H),5.07(s,2H),6.39(s,1H),7.04(s,2H),7.22-7.28(m,2H),7.30-7.39(m,5H),9.61(s,1H),10.06(s,1H)。

[0508] (2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-(哌嗪-1-基甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮盐酸盐(AB)

[0509] 在室温下,向4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)-哌嗪-1-羧酸苄酯(AB)(0.30克,0.56mmol)在乙醇(20ml)中的溶液中加入AcOH(0.6ml)和10%Pd/C(50%水分)(0.20g,20%w/w)。将反应混合物冷却到10°C和15°C之间,用H₂(g)吹扫2小时。将反应混合物通过硅藻土床过滤,用10%MeOH:DCM(200mL)洗涤,得到粗物质(0.40g),使用(0.05%HC1水溶液和乙腈),通过制备型HPLC纯化。将获得的级分冻干,得到(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)(5-(哌嗪-1-基甲基)异吲哚啉-2-基)甲酮盐酸盐,为灰白色固体(0.20g,82%)。

[0510] LCMS(方法E):1.072min,MS:ES+396.27(M+1);¹H NMR(DMSO-d⁶,400MHz): δ 1.12-1.14(m,6H),3.07-3.10(m,1H),3.40-3.47(m,8H),4.36-4.37(m,2H),4.77-4.49(m,4H),6.49(s,1H),7.01(s,1H),7.38-7.59(m,3H),9.73(s,1H),9.92(s,1H),10.05(s,1H)。

[0511] 荧光偏振的蛋白质依赖性

[0512] 在透明聚丙烯平板(Greiner Bio-One,产品编号784201)中构建蛋白质(重组N-末端PMS2(残基1-365)或重组N-末端MLH1(残基15-340))在测定缓冲液(25mM HEPES,pH 7.5,250mM NaCl,10mM MgCl₂,0.01%Triton X-100,5mM二硫苏糖醇)中的11个点的1/2系列稀释。系列稀释的最高浓度为2 μ M。第12个浓度点仅为缓冲液(无蛋白质对照)。

[0513] 将系列稀释用作2x蛋白质,并将20 μ L加入到Black Fluotrac 200384孔培养基结合板(Greiner Bio-One,产品编号781076)中。将板在250xg下离心1分钟,并在室温下培养30分钟,然后用MultiDrop Combi(ThermoFisher)加入20 μ L2x(5nM或2nM)探针的测定缓冲

液(从100 μ M DMSO储备液制备)。

[0514] 将化合物平板在250xg下离心1分钟,并在室温下培养1小时,然后在PheraStar FSX (配有384孔匙和合适的FP模块)上读取。在读取每个板之前调节增益(gain)和焦距,使得无蛋白质对照的偏振等于35mP。在GraphPad Prism 8.1.0中绘制并分析数据(图6-图9)。

[0515] 测定方案

[0516] 测定A:MLH1的荧光偏振测定

[0517] 使用lab cyte Echo acoustic liquid handler将测试化合物(10mM DMSO储备液)分配到黑色Fluotrac 200384孔培养基结合板(Greiner Bio-One,产品编号781076)中。将测试化合物加入到第1-22列的孔中,同时将DMSO加入到第23和24列的孔中,以使平板标准化。使用MultiDrop Combi (ThermoFisher)将20 μ L重组N-末端MLH1(残基15-340)在测定缓冲液(25mM HEPES,pH 7.5,250mM NaCl,10mM MgCl₂,0.01% Triton X-100,5mM二硫苏糖醇)中的2x溶液(200nM)添加到第1-23列的所有孔中,并将20 μ L测定缓冲液添加到第24列的所有孔中。将平板以250xg离心1分钟,并在室温下培养30分钟,然后用MultiDrop Combi (ThermoFisher)加入20 μ L的2 $\times$ 10nM的1-(6-((2-(4-((2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-鎓(实施例1)。N-末端MLH1的最终浓度为100nM,1-(6-((2-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)乙氧基)乙基)氨基)-6-氧代己基)-3,3-二甲基-2-((1E,3E)-5-((E)-1,3,3-三甲基吲哚啉-2-亚基)戊-1,3-二烯-1-基)-3H-吲哚-1-鎓(实施例1)的最终浓度为5nM。将化合物平板在250xg下离心1分钟,并在室温下培养1小时,然后在PheraStar FSX (配有384孔勺和590675675FP光学模块)上读取。在读取每个板之前调节获得和焦距,使得无酶对照(第24列)的偏振等于35mP。数据相对于无抑制剂对照(第23列)和无酶对照(第24列)进行标准化。

[0518] 测定B:MLH1的荧光偏振测定

[0519] 使用Labcyte Echo acoustic liquid handler将测试化合物(10mM DMSO储备液)分配到Black Fluotrac 200384孔培养基结合板(Greiner Bio-One,产品编号781076)中。对于单点筛选,将测试化合物加入到第1-22列的孔中,同时将DMSO加入到第23和24列的孔中,以使平板标准化。为了测定效力,将测试化合物的系列稀释液加入到第3-22列的孔中,并在整个平板上将DMSO体积标准化。

[0520] 将20 μ L重组N-末端MLH1(残基15-340)在测定缓冲液(25mM HEPES,pH 7.5,250mM NaCl,10mM MgCl₂,0.01% Triton X-100,5mM二硫苏糖醇)中的2x溶液(200nM)加入到用于效价测定的第2-23列或用于单点筛选的第1-23列的所有孔中。使用MultiDrop Combi (ThermoFisher)将20 μ L测定缓冲液添加到第1列和第24列的所有孔中(第24列仅用于单点筛选)。将平板以250xg离心1分钟,并在室温下培养30分钟,然后用MultiDrop Combi (ThermoFisher)在测定缓冲液(由100 μ M DMSO储备液制备)中加入20 μ L 2x(10nM)5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕吨-9-基)苯甲酸酯(实施例5)。N-末端MLH1的最终浓度为100nM,5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吲哚啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕

吨-9-基)苯甲酸酯(实施例5)的最终浓度为5nM。

[0521] 将化合物平板以250xg离心1分钟,并在室温下培养15分钟,然后在PheraStar FSX (配有384孔勺和540 590 590FP光学模块)上读取。在读取每个板之前调节获得和焦距,使得无酶对照(第24列)的偏振等于35mP。数据相对于无抑制剂对照(第23列)和无酶对照(第24列)进行标准化。

[0522] 测定C:PMS2的荧光偏振测定

[0523] 使用Labcyte Echo acoustic liquid handler将测试化合物(10mM DMSO储备液)分配到Black Fluotrac 200384孔培养基结合板(Greiner Bio-One,产品编号781076)中。对于单点筛选,将测试化合物加入到第1-22列的孔中,同时将DMSO加入到第23和24列的孔中,以使平板标准化。为了测定效力,将测试化合物的系列稀释液加入到第3-22列的孔中,并在整个平板上将DMSO体积标准化。

[0524] 将20μL重组N-末端PMS2(残基1-365)在测定缓冲液(25mM HEPES,pH 7.5,250mM NaCl,10mM MgCl₂,0.01% Triton X-100,5mM二硫苏糖醇)中的2x溶液(20nM)加入到用于效价测定的第2-23列或用于单点筛选的第1-23列的所有孔中。使用MultiDrop Combi (ThermoFisher)将20μL测定缓冲液添加到第1列和第24列的所有孔中(第24列仅用于单点筛选)。将平板以250xg离心1分钟,并在室温下培养30分钟,然后用MultiDrop Combi (ThermoFisher)在测定缓冲液(由100μM DMSO储备液制备)中加入20μL2x(20nM)5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕吨-9-基)苯甲酸酯(实施例5)。N-末端PMS2的最终浓度为10nM,5-((5-(4-((2-(2,4-二羟基-5-异丙基苯甲酰基)异吡啶啉-5-基)甲基)哌嗪-1-基)戊基)氨基甲酰基)-2-(6-(二甲基氨基)-3-(二甲基亚胺基)-3H-咕吨-9-基)苯甲酸酯(实施例5)的最终浓度为5nM。

[0525] 将化合物平板以250xg离心1分钟,并在室温下培养1小时,然后在PheraStar FSX (配有384孔勺和540590590FP光学模块)上读取。在读取每个板之前调节获得和焦距,使得无酶对照(第24列)的偏振等于35mP。数据相对于无抑制剂对照(第23列)和无酶对照(第24列)进行标准化。

[0526] 上述试验可用于筛选与MLH1和/或PMS2结合的化合物。例如,使用测定方案A测定化合物AB的IC₅₀为10.7μM(图10);使用测定方案C测定化合物AB的IC₅₀为0.179μM(图11)。

[0527] 参考文献

[0528] 1.The HSP90chaperone machinery,F.H.Schopf,M.M.Biebl and J.Buchner, Nat.Rev.Mol.Cell Biol.,2017,18,345-360.

[0529] 2.Mismatch Repair,R.Fishel,J.Biol.Chem.,2015,290,44,26395-26403.

[0530] 3.DNA Gyrase:structure and function,R.J.Reece and A.Maxwell, Crit.Rev.Biochem.mol.Biol.,1991,26,335-375.

[0531] 4.GHKL,an emergent ATPase/kinase superfamily,R.Dutta and M.Inouye, Trends Biochem.Sci.2000,25,24-28.

[0532] 5.Hsp90inhibitors as anti-cancer agents,from basic discoveries to clinical development,S Soga,S.Akinaga,Y Shiotsu,Curr.Pharm.Des.,2013,19,366-76

[0533] 6.Hsp90 molecular chaperone inhibitors:are we there yet?P.Workman and L.Neckers,Clin.Canc.Res.,2012,18,64-76.

[0534] 7.A fluorescence polarization assay for inhibitors of Hsp90R.Howes, X.Barrila,B.W.Dymock,K.Grant,C.J.Northfield,A.G.S.Robertson,A.Surgenor, J.Wayne,L.Wright,K.James,T.Matthews,K.-M.Cheung,E.McDonald,P.Workman, M.J.Drysdale;Analytical Biochemistry,2006,350,202-213.

[0535] 8.Development of a Fluorescence Polarization Assay for the Molecular Chaperone Hsp90.J.Kim,S.Felts,L.Llauger,H.He,H.Huezo,N.Rosen,and G.Chiosis, J.Biomol.Screen,2004,9,375-381.

[0536] 9.A High-Throughput Fluorescence Polarization Assay for Inhibitors of Gyrase B:B.T.Glaser,J.P.Malerich,S.J.Duellman,J.Fong,C.Hutson,R.M.Fine, B.Keblansky,M.J.Tanga and P.B.Madrid,J.Biomol.Screen.,2011,16,230-238.

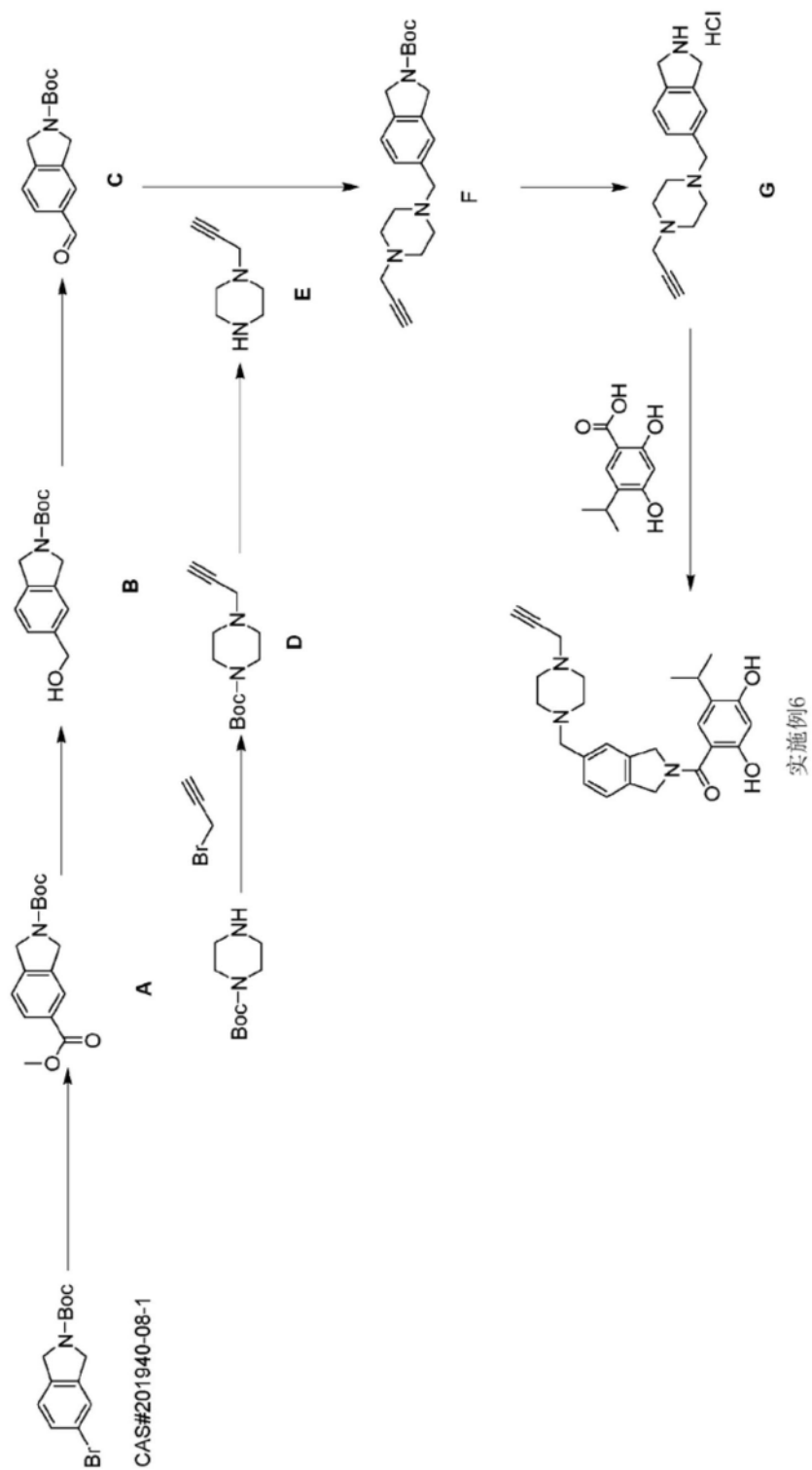


图1

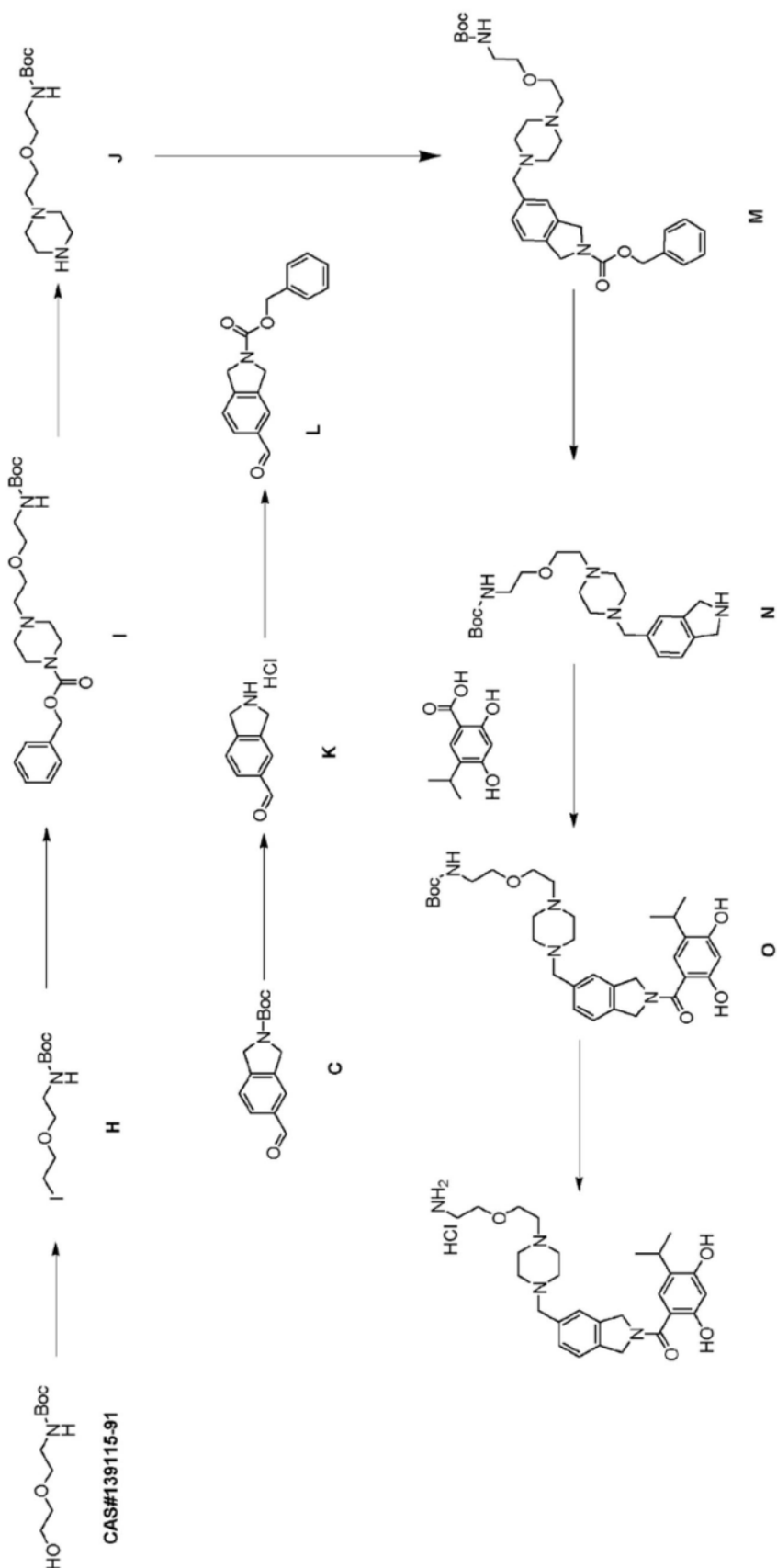


图2

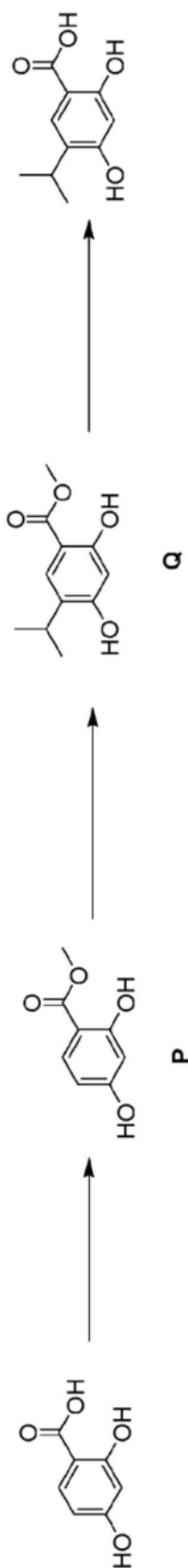


图3

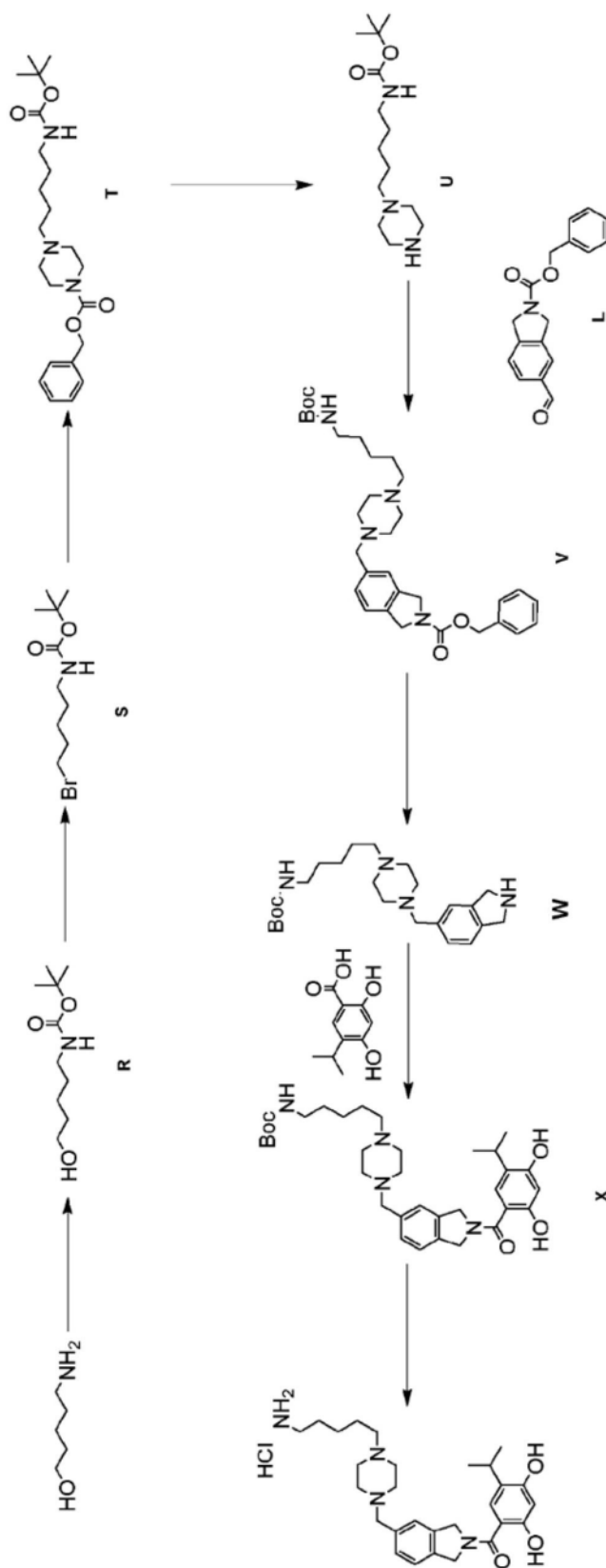


图4

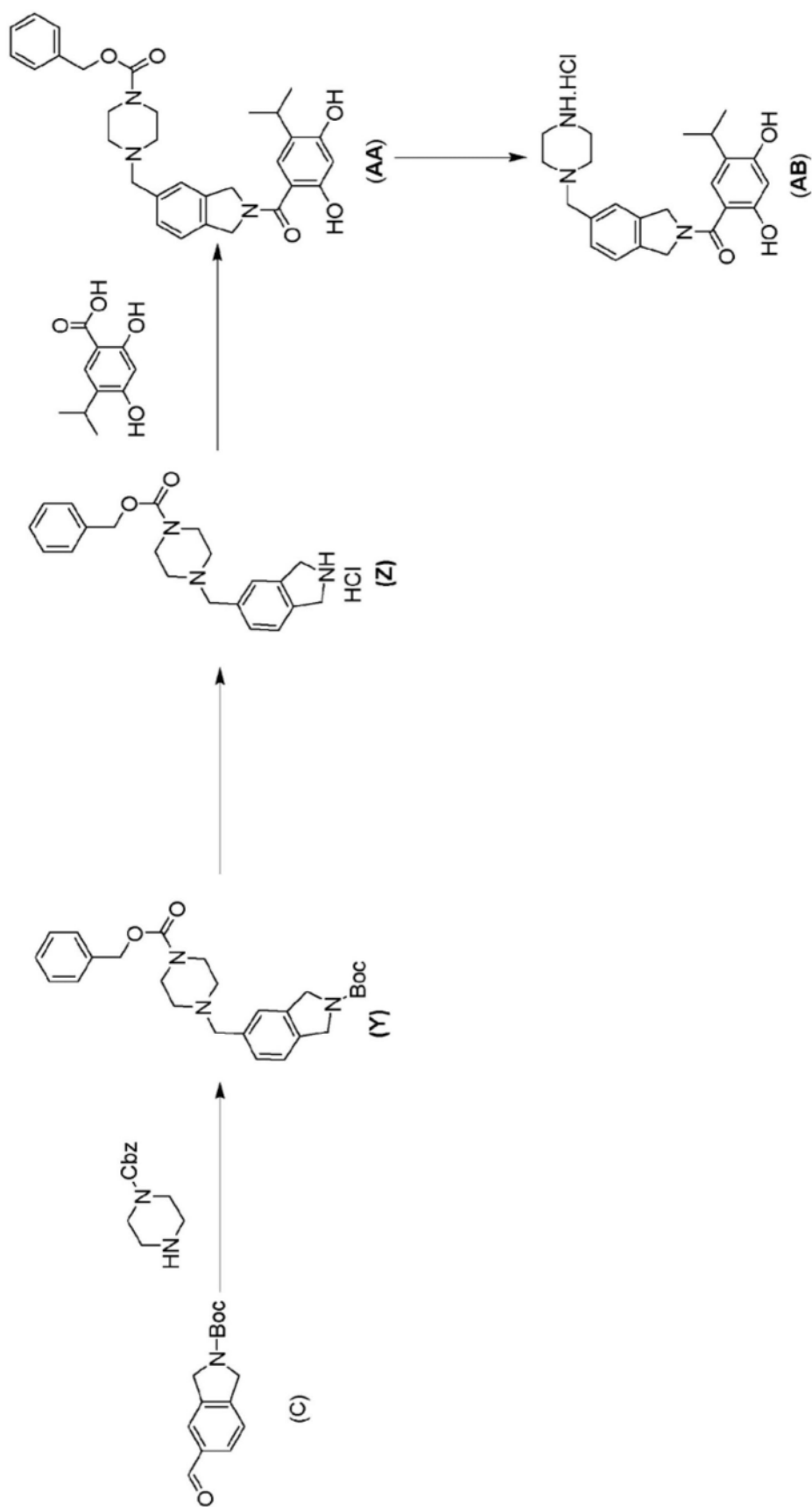


图5

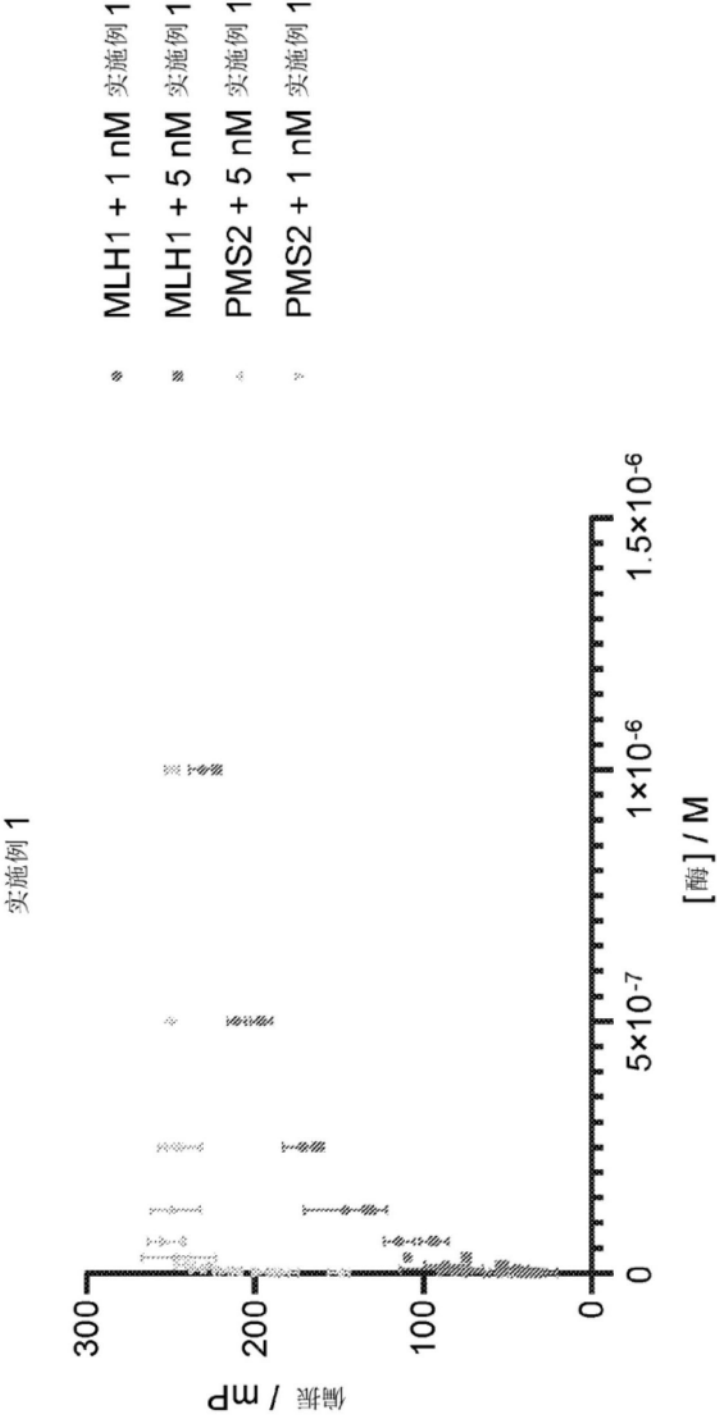


图6

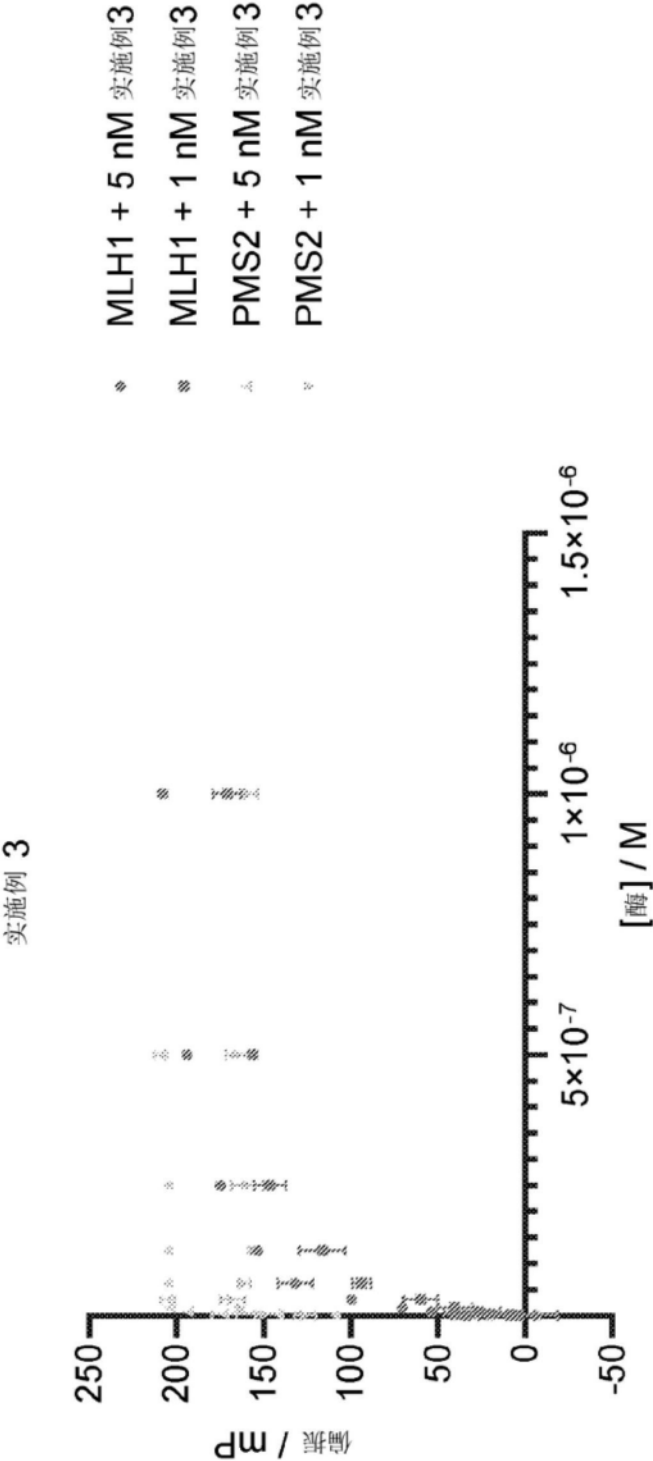


图7

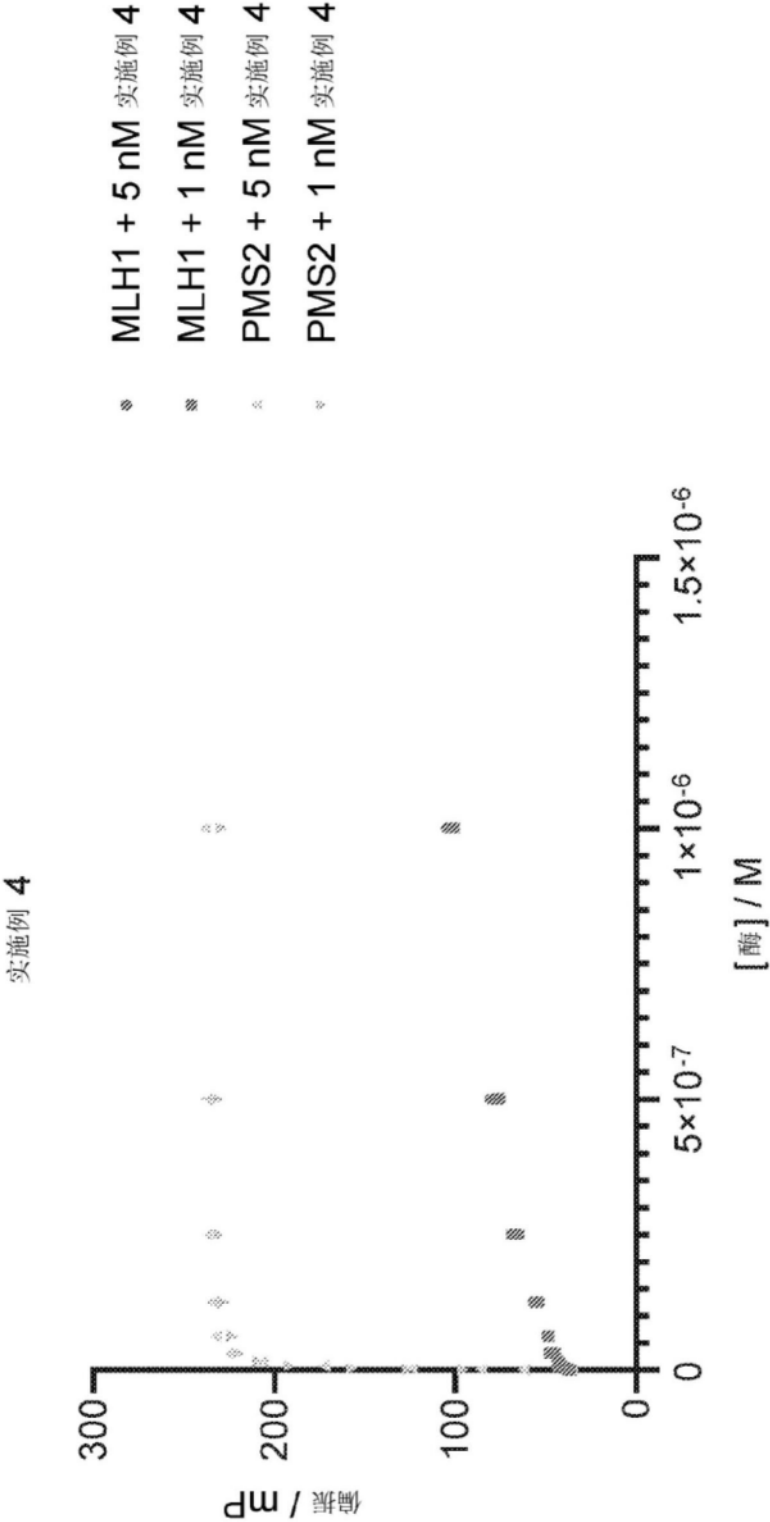


图8

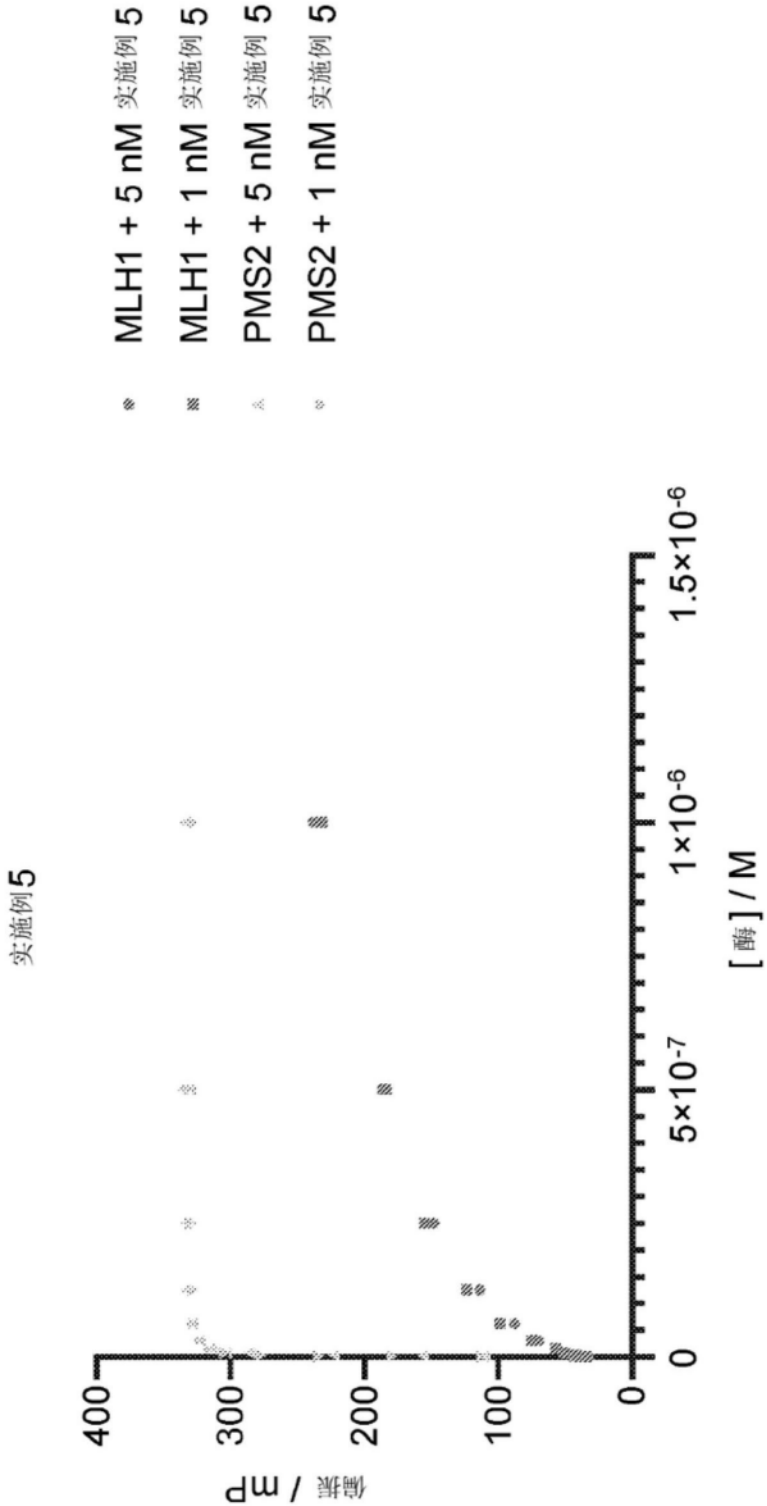


图9

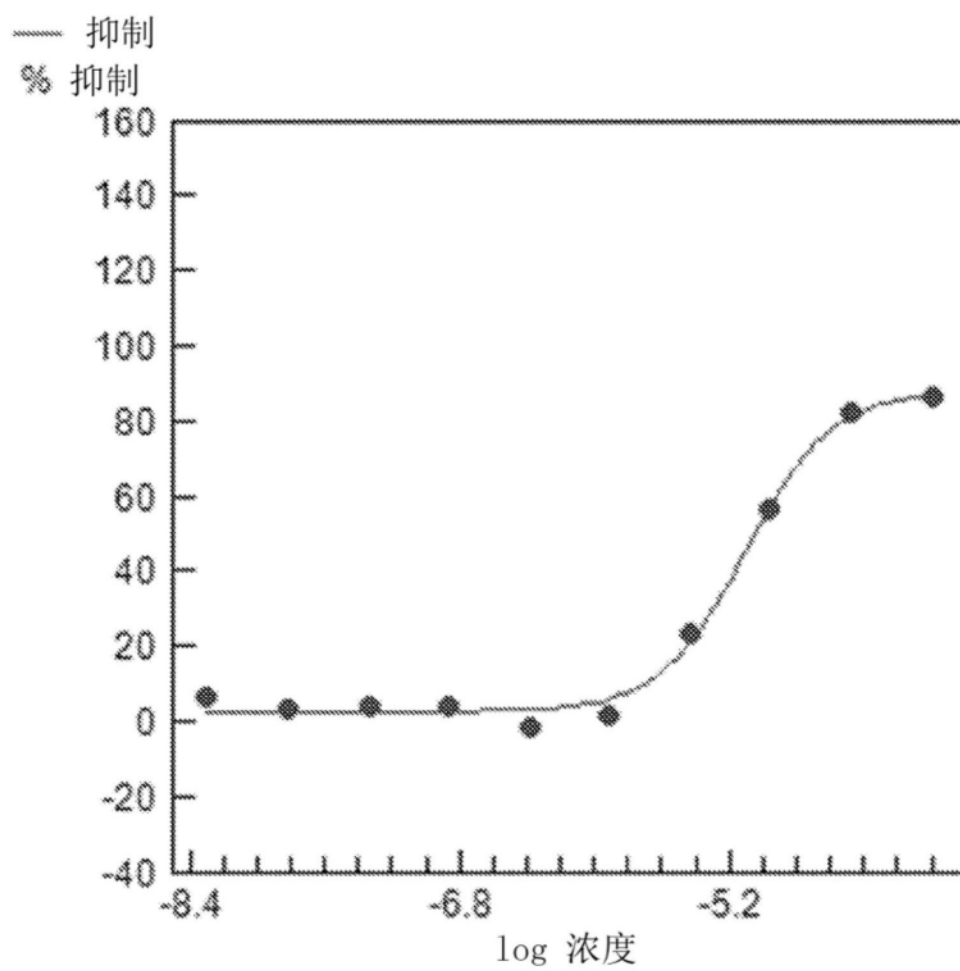


图10

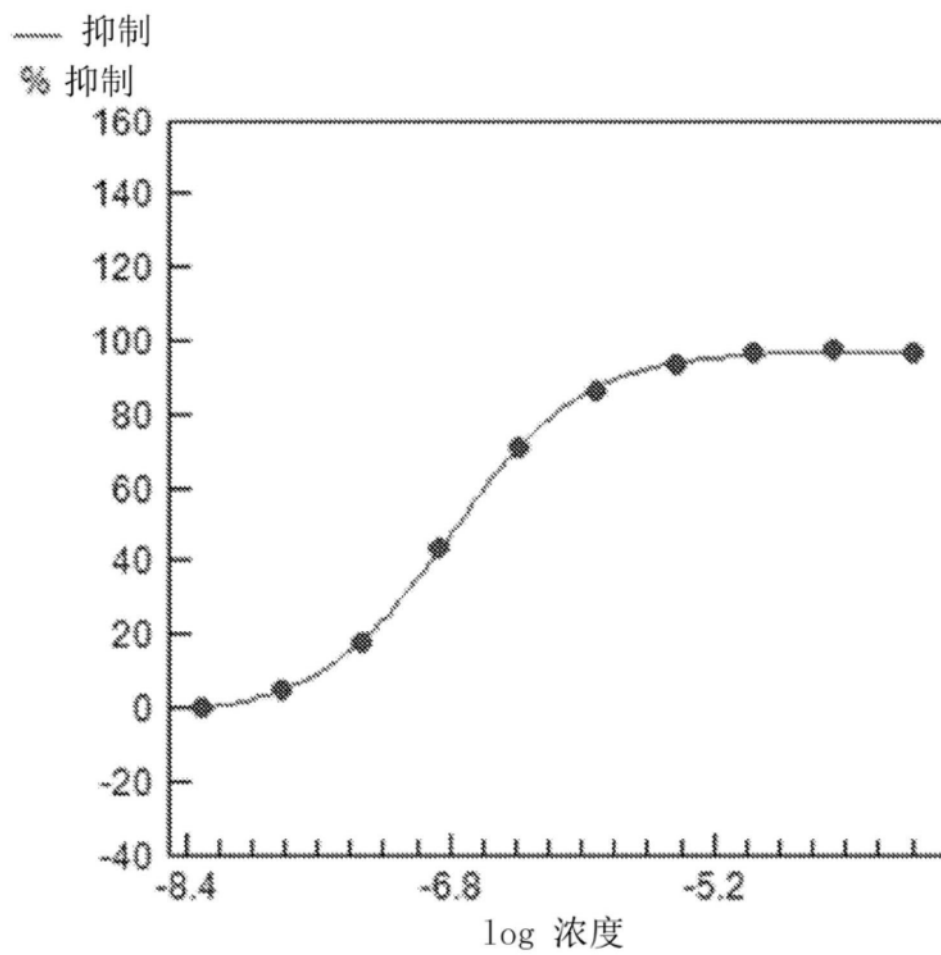


图11