



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104271558 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201380012529.9

(22)申请日 2013.03.04

(30)优先权数据

61/606,786 2012.03.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/028796 2013.03.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/134085 EN 2013.09.12

(73)专利权人 贝林格尔·英格海姆国际有限公司

地址 德国英格海姆

专利权人 生命医药公司

(72)发明人 Y·布克蒂亚罗维 S·卡卡蒂安

L·W·迪拉德

C·多尔纳-西奥塞克 K·富克斯

贾兰齐 D·S·拉拉

A·莫拉尔斯-拉莫斯 G·拉斯特

J·里夫斯 S·B·辛

S·文卡特拉曼 徐振荣 苑晶

赵毅 郑亚军

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

代理人 陈文平

(51)Int.Cl.

C07D 235/02(2006.01)

C07D 403/06(2006.01)

C07D 407/06(2006.01)

C07C 49/323(2006.01)

A61K 31/4184(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(56)对比文件

CN 102348698 A,2012.02.08,

WO 2011106414 A1,2011.09.01,

CN 102317289 A,2012.01.11,

廖国超等.β-分泌酶抑制剂的研究进展.《中国药物化学杂志》.2006,第16卷(第6期),第373-379页.

黄文海等.β分泌酶抑制剂的药效团模型研究.《化学学报》.2008,第66卷(第16期),第1889-1897页.

审查员 刘健颖

权利要求书5页 说明书48页

序列表1页

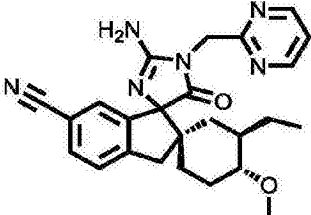
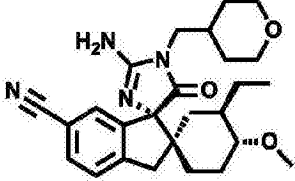
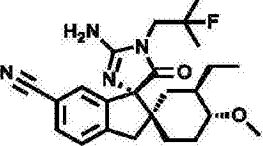
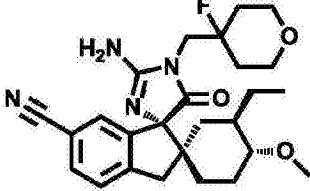
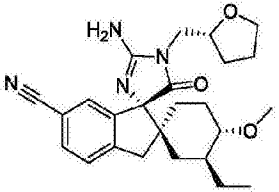
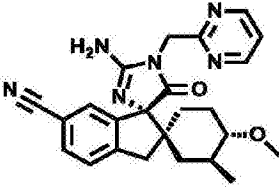
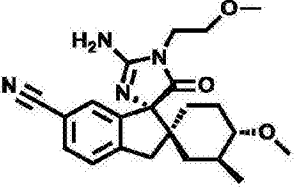
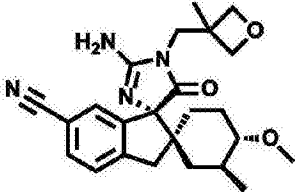
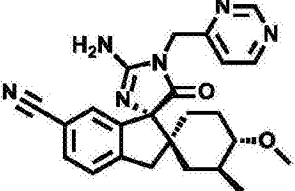
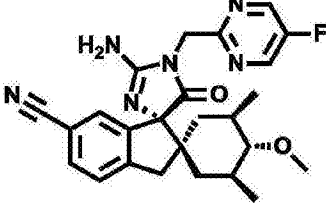
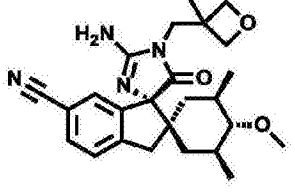
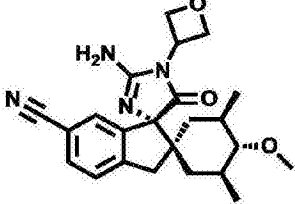
(54)发明名称

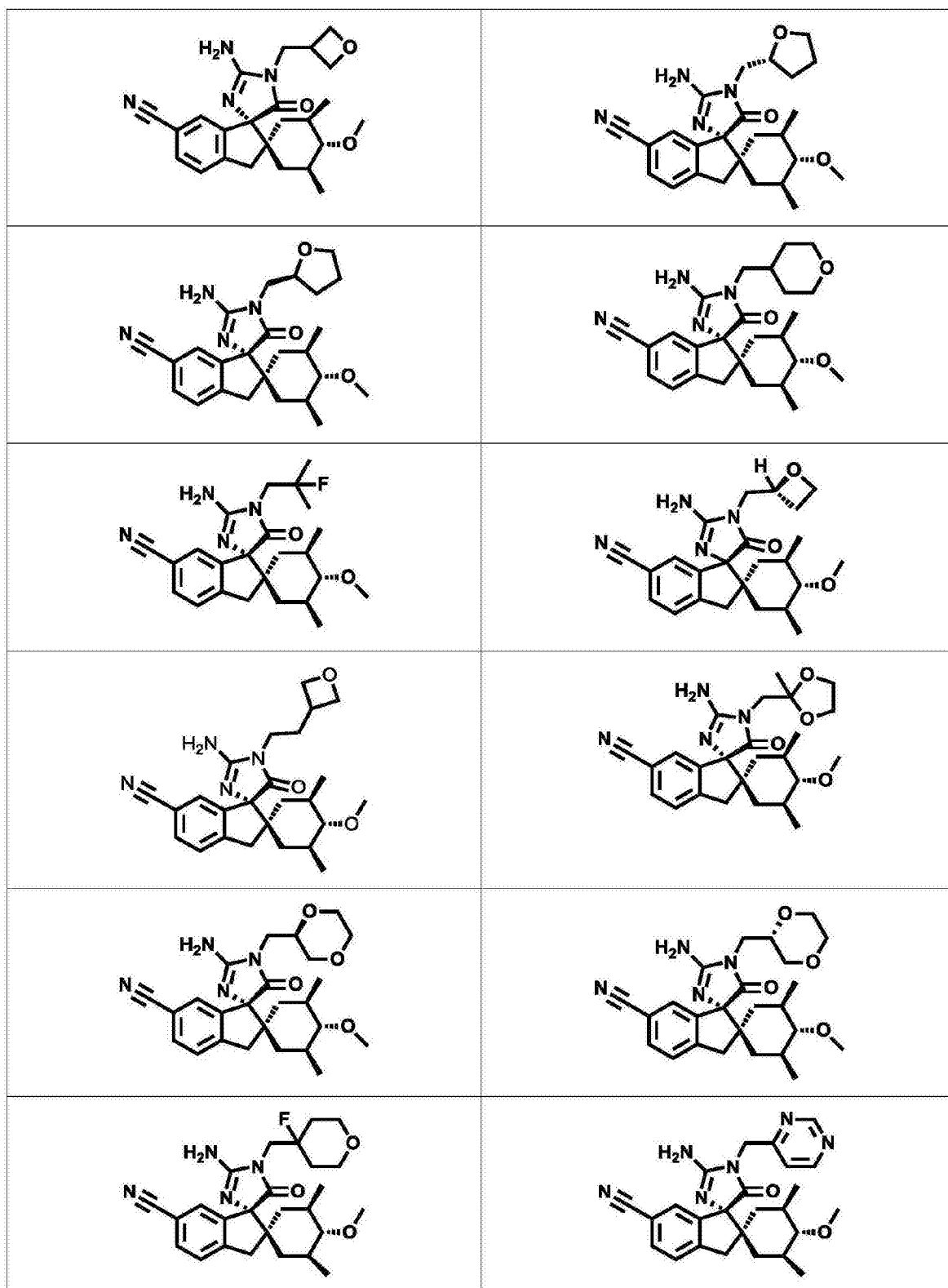
β-分泌酶抑制剂

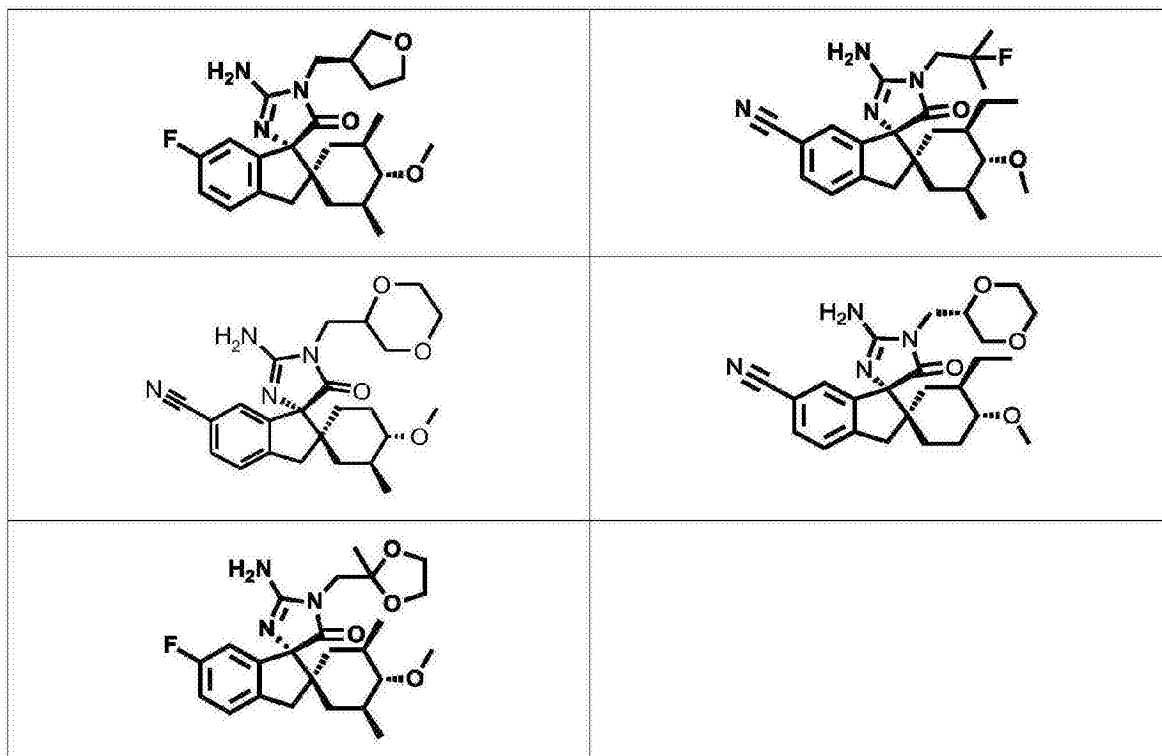
(57)摘要

本发明涉及螺环酰基胍和其作为β分泌酶(BACE1)活性抑制剂的用途,含有其的药物组合物,以及使用其作为治疗剂治疗神经退行性了、特征为认知减退的紊乱、认知损伤、痴呆和特征为产生β-淀粉样蛋白聚集的疾病的方法。

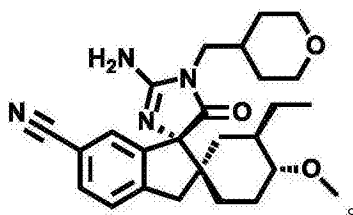
1. 由选自以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐：

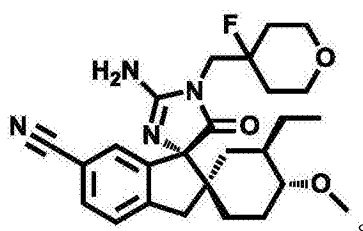




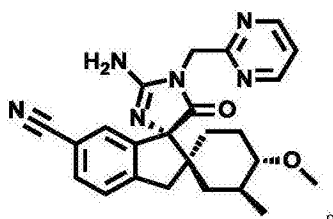
2. 权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



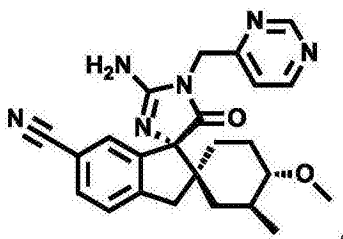
3. 权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



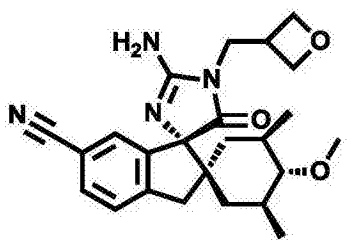
4. 权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



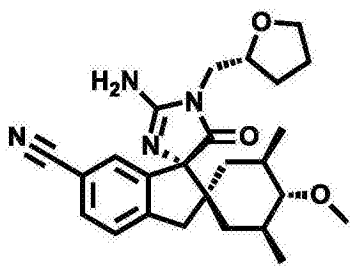
5. 权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



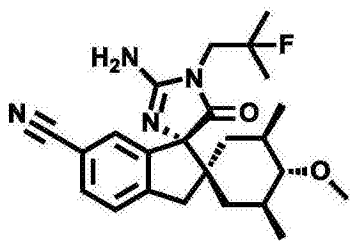
6. 权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



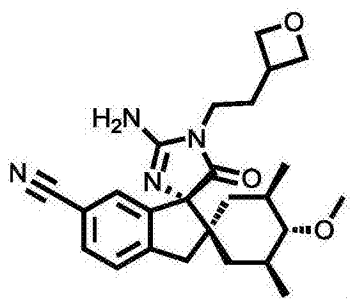
7. 权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



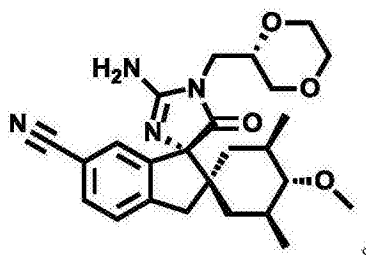
8. 权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



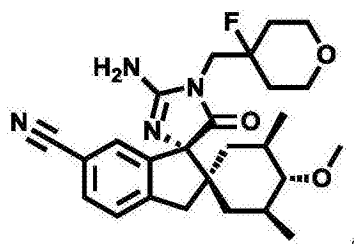
9. 权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



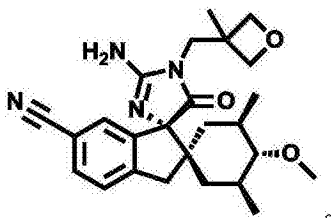
10. 权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



11. 权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



12. 权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是由以下的结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐



13. 药物组合物,包含与药学可接受的助剂、稀释剂和/或载体混合的至少一种根据权利要求1-12的化合物或其药学上可接受的盐。

14. 根据权利要求1-12任一项的化合物或其药学可接受的盐用于制备治疗受试者中BACE1介导的疾病或紊乱的药物的用途。

15. 权利要求14的用途,其中所述BACE1介导的疾病或紊乱选自神经退行性紊乱、认知减退、认知损伤、痴呆、和特征为产生 β -淀粉样蛋白沉积或神经元纤维缠结的疾病。

16. 权利要求15的用途,其中所述疾病或紊乱选自阿尔茨海默病、21三体综合征即唐氏综合征、伴有荷兰型淀粉样蛋白变性的遗传性脑出血、脑淀粉样蛋白血管病、混合型血管并退行性起源的痴呆、与帕金森氏病有关的痴呆、与进行性核上性麻痹有关的痴呆、与皮质基底退化有关的痴呆、干型年龄相关性黄斑变性和青光眼。

17. 权利要求16的用途,其中所述疾病或紊乱是阿尔茨海默病。

18. 权利要求16的用途,其中所述疾病或紊乱是青光眼。

19. 权利要求15的用途,其中所述疾病或紊乱是弥散性路易体型阿尔茨海默病。

20. 权利要求15的用途,其中所述疾病或紊乱是退行性痴呆。

21. 权利要求15的用途,其中所述疾病或紊乱是老年性痴呆。

β -分泌酶抑制剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2012年3月5日提交的美国临时申请系列号61/606786的权益,其全部教导通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及螺环酰基胍和其作为 β 分泌酶(BACE1)活性抑制剂的用途,含有其的药物组合物,以及使用其作为治疗剂治疗神经退行性紊乱、特征为认知减退的紊乱、认知损伤、痴呆和特征为产生 β -淀粉样蛋白沉积或神经元纤维缠结的疾病的方法。

[0004] 发明背景

[0005] β -淀粉样蛋白(本文也称作“Abeta”或“AB”)沉积和神经原纤维缠结是与阿尔茨海默氏病(AD)有关的两种主要的病理学表征,包括由于淀粉样蛋白前体蛋白(APP)、早老蛋白1和2的突变而与遗传有关的早发性家族型,以及迟发性的偶发AD。临床上,AD的特征为记忆力、认知、推理、判断和定向的丧失。随着疾病进展,运动、感觉和语言能力也受到影响,直到发生多种认知功能的全面损害。这些认知丧失是逐渐发生的,但通常导致严重的损伤并且在4-12年内最终死亡。

[0006] β -淀粉样蛋白沉积主要是AB肽的聚集体,AB肽则是来自APP的蛋白水解产物。更具体地,作为 β -淀粉样蛋白生成途径的一部分,AB肽由APP在C端被一种或多种 γ -分泌酶裂解以及在N端被 β -分泌酶(BACE1,也称为天冬氨酰蛋白酶和膜天冬氨酸蛋白酶(memapsin)2)裂解而产生。

[0007] BACE活性与从APP产生AB肽直接相关,且研究日益表明抑制BACE能抑制AB肽的产生。淀粉样蛋白生成斑块和血管性淀粉样蛋白血管病也是患有21三体综合症(唐氏综合症)、伴有荷兰型淀粉样蛋白变性的遗传性脑出血(HCHWA-D)和其他神经退行性紊乱患者的大脑的特征。神经原纤维缠结也发生在其他神经退行性紊乱(包括痴呆诱导性紊乱)中。

[0008] 近来,已有报道AB涉及青光眼中视网膜神经节细胞(RGC)凋亡的进展中,证据是半胱天冬酶-3-介导的异常淀粉样蛋白前体蛋白加工、实验性青光眼中的RGC中AB表达增加以及青光眼患者中玻璃体AB水平降低(与视网膜AB沉积一致)。淀粉样蛋白沉积也与患有干型年龄相关性黄斑变性(AMD)的患者和AMD动物模型中的黄斑变性有关。

[0009] W02010/021680,W02011/106414和W02010/105179公开了作为 β 分泌酶抑制剂的具有螺环骨架的螺环酰基胍。

[0010] 发明简述

[0011] 本发明提供作为BACE1抑制剂、并可用作治疗特征为患者中 β -淀粉样蛋白沉积或 β -淀粉样蛋白水平升高的疾病或紊乱的治疗剂的化合物。所公开的BACE1抑制剂不仅是高效的BACE1酶抑制剂(实验1)而且显示:

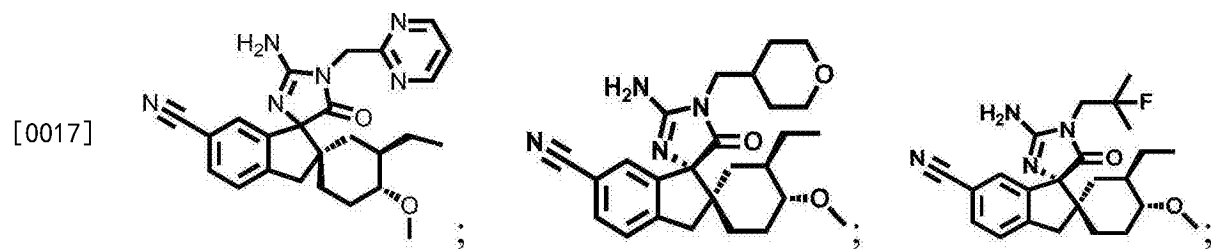
[0012] (1)在细胞AB实验(实验2)中高效的抑制活性,

[0013] (2)在细胞实验(实验3)中选择性对抗心脏hERG通道,和

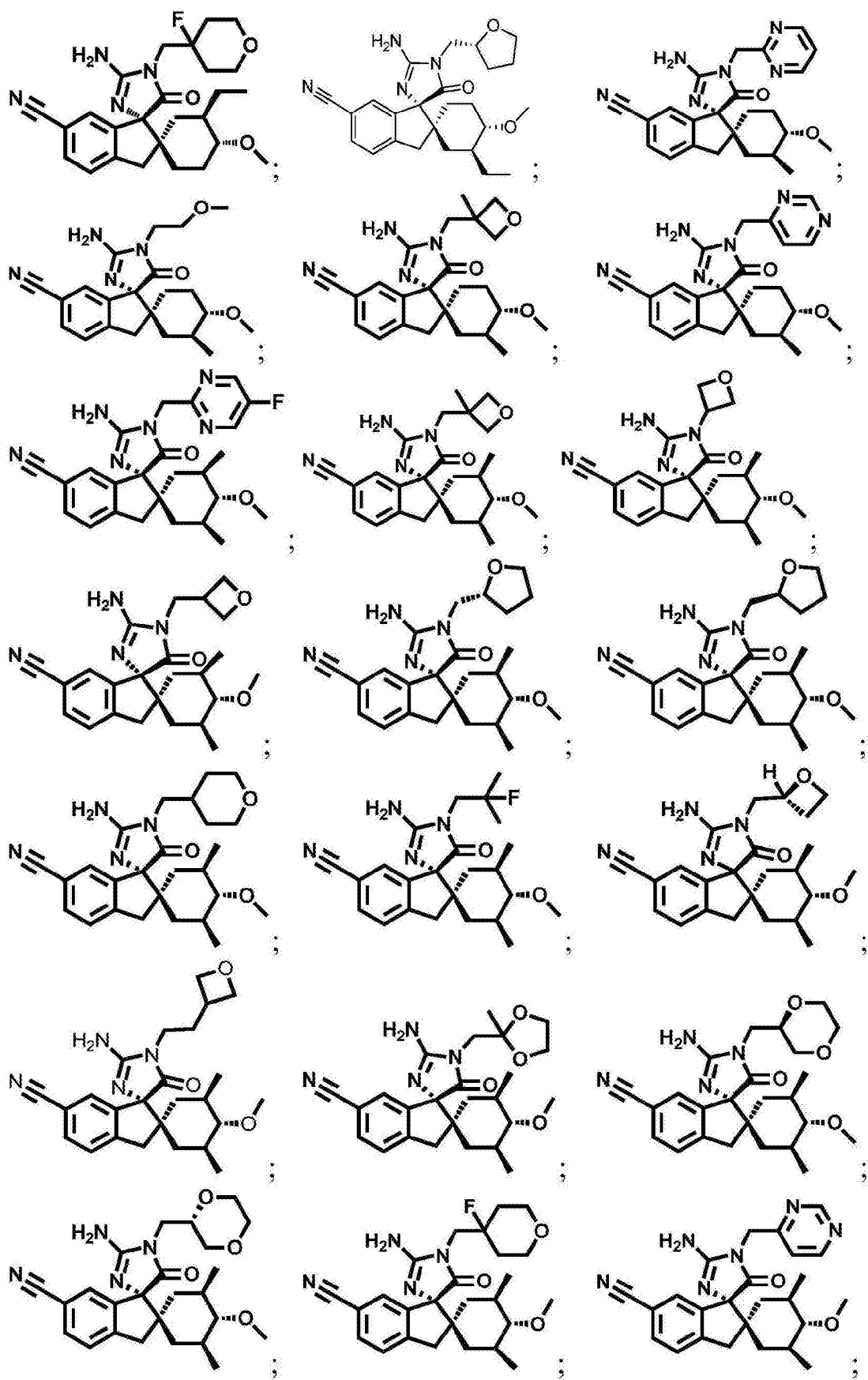
[0014] (3)也在细胞磷脂沉积实验(实验4)中引起磷脂沉积的倾向低。

[0015] 因此,本发明提供的化合物,兼具BACE1抑制剂的高效力,对抗心脏hERG通道的高选择性和低的磷脂沉积活性。

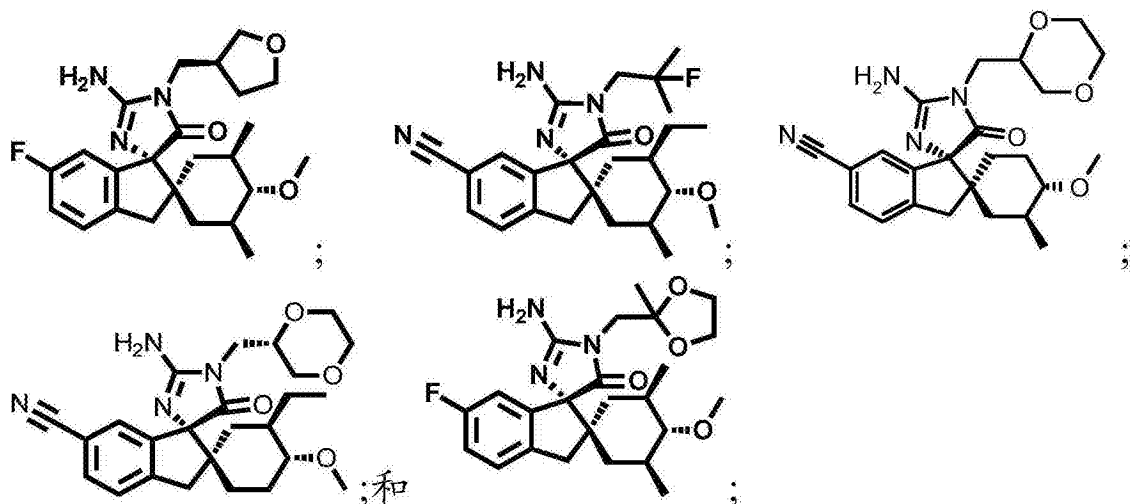
[0016] 本发明的一个实施方案是由选自以下结构式表示的化合物:



[0018]



[0019]



[0020] 或任何前述化合物药学上可接受的盐。前述化合物在本文称为“本发明的化合物”。

[0021] 本发明的另一个实施方案是用作药物的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。

[0022] 本发明的另一个实施方案是药物组合物,其包含与药学可接受的助剂、稀释剂或载体混合的本发明的化合物或其药学可接受的盐。

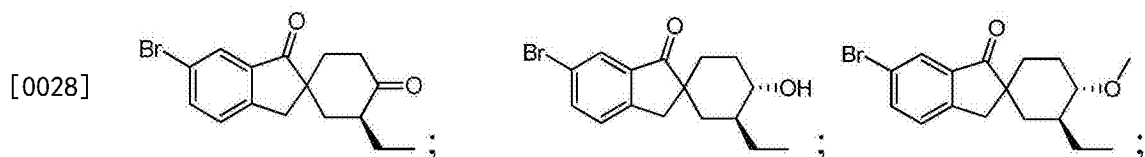
[0023] 本发明的另一个实施方案是用于治疗受试者中BACE1介导的紊乱或疾病的本发明的化合物或其药学可接受的盐。

[0024] 本发明的另一个实施方案是本发明化合物或其药学可接受的盐用于制备治疗受试者中BACE1介导的紊乱的药物的用途。

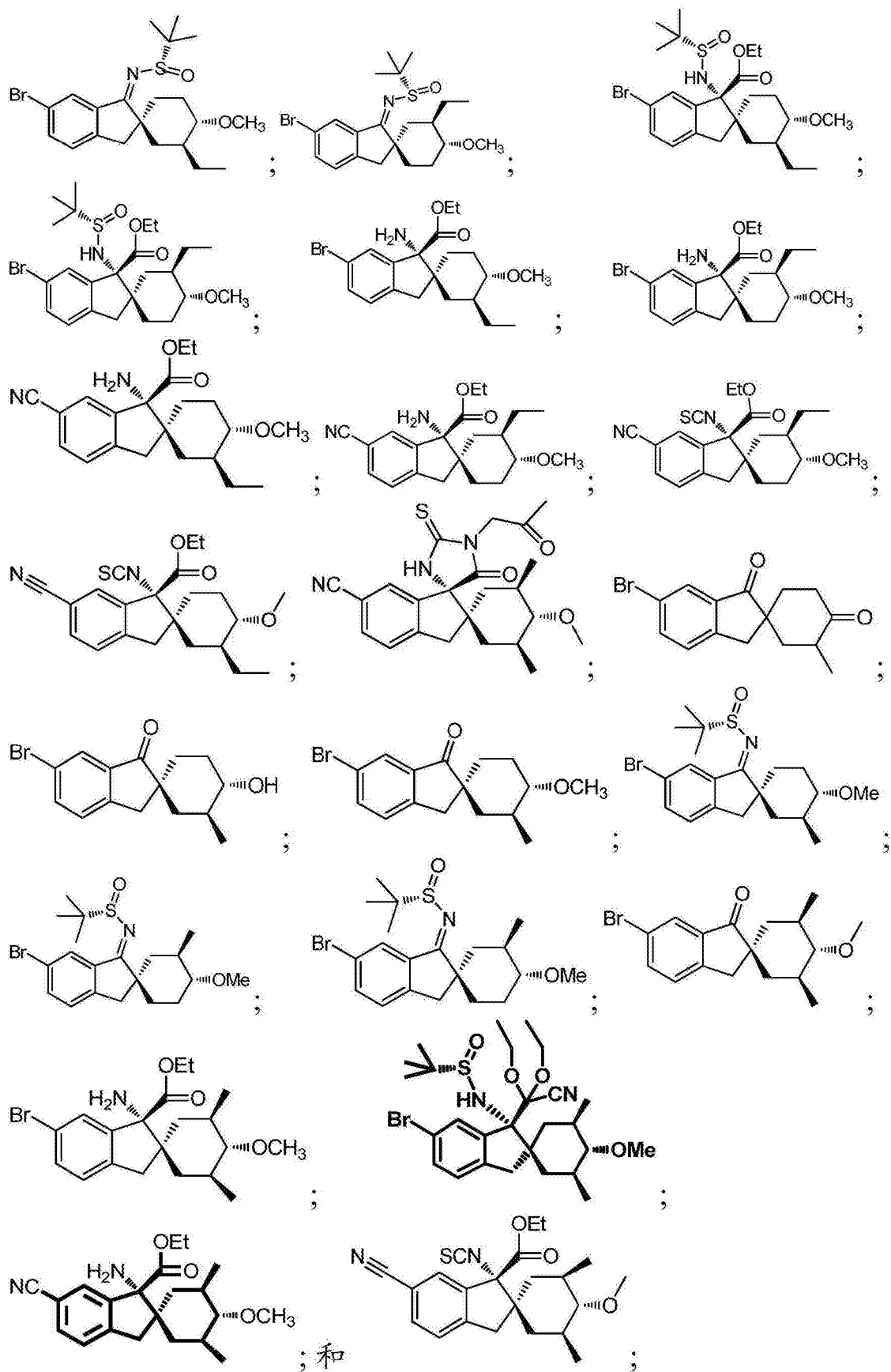
[0025] 本发明的另一个实施方案是用于治疗受试者中BACE1介导的紊乱或疾病的包含本发明化合物的药物组合物。

[0026] 本发明的另一个实施方案是治疗患有BACE1介导的紊乱或疾病的受试者的方法,包括给所述受试者施用有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。

[0027] 本发明的另一个实施方案还是在制备本发明化合物中使用的中间体。这些中间体是由选自以下的结构式表示的化合物:



[0029]



[0030] 或任何前述化合物的盐

[0031] 发明详述

[0032] 本发明化合物显示出对抗BACE1酶和A β 形成的强效活性,以及对抗hERG通道的选择性和引起磷脂沉积的低倾向性。例如,本发明化合物显示具有IC₅₀<15nM的BACE1抑制,具有IC₅₀<2nM的抑制细胞A β 产生,在10 μ M时<50%的hERG抑制,磷脂沉积的首次效应浓度(First Effect Concentration(FEC))>150 μ M。兼具这些特性使得本发明的化合物可用于治疗人的病理状态,特别是治疗阿尔茨海默氏病以及其他由BACE1介导的紊乱和疾病。

[0033] 通过异生物质和之后的延迟的心脏复极化来抑制hERG(人类Ether-à-go-go-相关基因)通道与特定的多形性室性快速型心律失常(polymorphic ventricular tachyarrhythmia)、尖端扭转型室性心动过速(torsade de pointes)的风险增加有关,已由Sanguinetti等(1995,Cell, Apr. 21, 81(2):299-307)和大量之后的证据所确认。为了早期避免这种风险,在体外系统使用hERG通道的异源表达来筛选对抗hERG相互作用的物质是常规做法,并且这种类型的实验也被ICH指导原则S7B(国际药品注册协调会议(International Conference on Harmonization)(2005):ICH Topic S 7 B用于延迟的心室复极化(QT间期延长)的人用药潜力的非临床评估(www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html))推荐为后期临床前药物性能分析的重要一部分。因此,例如此本发明化合物所显示的低hERG通道抑制对于治疗而言是很期望的。

[0034] 磷脂沉积是过量磷脂在细胞内累积的脂质贮存异常。药物诱导的磷脂沉积是不期望的药物反应。因此,为了避免有害的副作用,优选具有低磷脂沉积潜力的化合物用于人的治疗。下文表1提供的数据显示本发明的化合物兼具有效的BACE1细胞活性、选择性对抗心脏hERG和引起磷脂沉积的低倾向性。据信在W02010/021680和W02010/105179例举的化合物并不兼具期望的特性。另外,表2提供的数据显示本发明的某些化合物相对于W02010/105179描述的某些对比化合物在BACE1酶实验和细胞A β 实验中具有显著更低的IC₅₀抑制值。

[0035] 本文非专门定义的术语具有本领域技术人员根据本公开内容和上下文所理解的含义。然而,当在本说明书中使用,除非有相反说明,以下术语具有所指明的含义,且遵循以下规则。

[0036] 当本发明的化合物以名称或结构描述而没有指明全部互变异构体形式,应当理解化合物和其药学可接受的盐将涵盖全部互变异构体。

[0037] 当本发明的化合物以名称或结构描述而没有指明立体化学,应当理解化合物和其药学可接受的盐将涵盖所有立体、光学和几何异构体(例如对映体、非对映体、E/Z异构体等)和外消旋物,以及单独对映体的不同比例的混合物、非对映体混合物、或者上述任何形式的混合物。

[0038] 当立体异构体、光学异构体或几何异构体以名称或结构描述时,应当理解所命名或描述的立体异构体、光学异构体或几何异构体的立体异构、光学异构和/或或几何异构纯度为至少60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、99重量%或99.9重量%纯。立体异构体、光学异构体和几何异构体的纯度通过将命名或描述的立体异构体、光学异构体和几何异构体在混合物中的重量除以混合物中所有立体异构体、光学异构体和几何异构体总重量来确定。

[0039] 当本发明的化合物或其药学可接受的盐以结构命名或描述时,应当理解化合物的溶剂合物、水合物和无水形式以及药学可接受的盐的溶剂合物、水合物和无水形式包括在

本发明中。“溶剂合物”指在结晶期间溶剂分子进入晶格的结晶形式。溶剂合物可以包括水或非水溶剂例如乙醇、异丙醇、DMSO、乙酸、乙醇胺和EtOAc。当进入晶格的溶剂分子是水时，溶剂合物通常称作“水合物”。水合物包括化学计量的水合物以及含有可变量水的组成。“无水形式”指没有溶剂或水或是基本没有溶剂或水进入晶体结构(例如溶剂或水与化合物的摩尔比小于1:10、1:20、1:100或1:200)的化合物。

[0040] 盐

[0041] 本文使用的短语“药学可接受的”是指在合理医学判断范围内，适合用于与人类和动物组织接触，而无过度的毒性、刺激性、变态反应或其他问题或并发症，且与合理的效益/风险比相称的那些化合物、原料、组合物和/或剂型。

[0042] 如本文所使用，“药学可接受的盐”是指其中母体化合物通过制备其酸式或碱式盐而修饰的所公开化合物的衍生物。药学可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基例如胺的无机或有机酸盐、酸性残基例如羧酸的碱性或有机盐等。例如，这些盐包括由氨、L-精氨酸、甜菜碱、苄乙苄胺(benethamine)、苄卞生(benzathine)、氢氧化钙、胆碱、二甲基乙醇胺(deanol)、二乙醇胺(2,2'-亚氨基双(乙醇))、二乙胺、2-(二乙基氨基)-乙醇、2-氨基乙醇、乙二胺、N-乙基-葡萄糖胺、海卓胺(hydrabamine)、1H-咪唑、赖氨酸、氢氧化镁、4-(2-羟基乙基)-吗啉、哌嗪、氢氧化钾、1-(2-羟基乙基)-吡咯烷、氢氧化钠、三乙醇胺(2,2',2''-次氨基三(乙醇))、氨基丁三醇、氢氧化锌、乙酸、2,2-二氯-乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、2,5-二羟基苯甲酸、4-乙酰氨基-苯甲酸、(+)-樟脑酸、(+)-樟脑-10-磺酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸(cyclamic acid)、癸酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基-乙磺酸、乙二胺四乙酸、甲酸、富马酸、粘酸、龙胆酸、D-葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、D-葡萄糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、甘氨酸、羟乙酸、己酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、异丁酸、DL-乳酸、乳糖酸、月桂酸、赖氨酸、马来酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、DL-扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘酸、烟酸、硝酸、辛酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸(双羟萘酸)、磷酸、丙酸、(-)-L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、鞣酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸和十一烯酸形成的盐。其它药学上可接受的盐可通过与金属阳离子形成，如铝、钙、锂、镁、钾、钠、锌等(还参见Pharmaceutical-salts, Berge, S.M.等, J.Pharm.Sci., (1977), 66, 1-19)。

[0043] 本发明的药学上可接受的盐可通过常规化学方法由含碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常，通过将这些化合物的游离酸或碱形式与足量的合适的碱或酸在水或有机稀释液(如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈或其混合物)中反应制备这些盐。

[0044] 用于纯化或分离本发明的化合物的除上述提及的酸的盐(如三氟乙酸盐)也构成本发明的一部分。

[0045] 生物数据

[0046] BACE1实验(实验1)

[0047] 使用商购可得的底物HiLyte-Fluor™ 488-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Lys-(QXL™-520)-OH(SEQ ID NO:1)AnaSpec, San-Jose, CA)和自HEK 293/BACE_{ect}细胞向OptiMEM™(Invitrogen)中分泌的并融合有myc-his标签的截短型人β-分泌酶BACE1(氨基酸1-454)通过BACE1活性的荧光淬灭实验来测定化合物的抑制活性。底物以1mg/ml溶解

于DMSO中。

[0048] 实验在存在含有BACE1胞外域的OptiMEM(经24小时收集的上清液,并通过离心清除细胞碎片),25 μ l含有期望2倍浓度的测试化合物和2% DMSO的水、1 μ M底物肽、20mM NaOAc,pH 4.4和0.04% Triton-X100的384孔板中的50 μ l总实验体积中进行。一般而言,25 μ l化合物稀释液被送至板中,随后加入在含0.2% Triton X-100的水中以1:10稀释的10 μ l含BACE1的OptiMEM™。在NaOAc缓冲液中通过添加15 μ l底物来开始反应。反应在Envision®多标记读数器(Perkin Elmer)中室温温育(避光),以ex:485nm,em:538nm记录底物断裂动力学60分钟。记录每个板上不含酶的空白孔。

[0049] 为了推导全部384孔板中的反应速度,将荧光强度相对时间进行回归。使用含有1% DMSO的未抑制对照作为100%以及在不含酶的情况下进行的空白对照作为0%,这些速度用于计算对照百分率。使用Assay Explorer,通过拟合对照百分率vs.测试化合物浓度计算IC₅₀值。

[0050] 基于H4-APPwt细胞的实验(实验2)

[0051] 在稳定表达人APP的H4神经胶质瘤细胞系(ATCC,Cat.#HTB-148)中监控产生A β 1-X肽的实验中,使用免疫分析仪例如AlphaLISA(PerkinElmer,Cat.#AL288)来评价本发明的化合物的细胞效力。测试化合物溶解在DMSO中,并用培养基(含10% FBS和1% 青霉素/链霉素的DMEM)预先稀释至实验中化合物终浓度的2倍。将等体积的2x测试化合物溶液和细胞悬浮液加到96-孔培养板,以使每孔在200 μ l终体积中含有~10,000细胞。实验中DMSO终浓度为0.2%。在测试化合物存在情况下于37℃、5% CO₂下温育板5小时,以使细胞贴附孔底部。然后移去培养基并用含有同样终浓度测试化合物的新鲜培养基代替。于37℃、5% CO₂下温育板18小时。按照制造商的实验方案使用AlphaLISA免疫分析仪(PerkinElmer,Cat.#AL288)测定A β 1-x的浓度。将含有DMSO或10 μ M β -分泌酶抑制剂(BACE抑制剂IV,EMD Bioscience,Cat.#565788)的孔中的A β 1-x的浓度相应地用作未抑制和背景对照,用于计算含有测试化合物的每孔的抑制百分数值。使用四参数曲线拟合将这些抑制百分数值相对化合物浓度进行回归,IC₅₀值(观察到50%抑制作用的化合物浓度)被计算为对应于曲线上拐点的化合物浓度。

[0052] hERG-通道实验(实验3)

[0053] 细胞:

[0054] 稳定转染hERG cDNA的HEK(人胚胎肾)293细胞

[0055] 记录电极和溶液:

[0056] 细胞用含有下列成分的细胞外液灌流(mM):NaCl(137),KCl(4.0),MgCl₂(1.0),CaCl₂(1.8),葡萄糖(10),HEPES(10),用NaOH将其pH调节为7.4。膜片钳记录电极由硼硅酸盐玻璃管使用水平拉制仪制造并用电极内液填充,该内液含有(mM):K-天门冬氨酸(130),MgCl₂(5.0),EGTA(5.0),K₂ATP(4.0),HEPES(10.0),用KOH将其pH调节为7.2。微电极的电阻范围为2至5M Ω 。

[0057] 刺激和记录:

[0058] 使用EPC-10膜片钳放大器和PatchMaster软件记录膜电流。在35℃下,使用全细胞模式的膜片钳技术记录hERG介导的膜电流。将转染的HEK293细胞的电位钳制在-60mV,并使用以15秒间隔重复的固定幅度脉冲模式(激活/失活:40mV持续2000ms;恢复:120mV持续

2ms; 2ms内渐变至40mV; 失活尾电流: 40mV持续50ms) 诱导hERG介导的失活尾电流。在每个脉冲间隔间, 记录以0.2的因数按比例降低的4个脉冲, 用于P/n漏减程序。记录中采用Rs补偿, 标准是其可稳定的进行记录而不会诱发振鸣的水平。

[0059] 化合物制备和应用:

[0060] 将不同浓度的测试化合物按顺序依次应用在待研究的每种细胞上。在应用首个测试化合物浓度之前对细胞至少扫描6次来测量基线电流的稳态水平。用DMSO溶解测试化合物以获得母贮备液, 随后用DMSO进一步稀释至所需更低浓度的贮备液。在实验开始前, 每次由这些贮备液以1:1000的稀释比配置新鲜制备细胞外缓冲液。

[0061] 数据分析:

[0062] 在渐变至+40毫伏3毫秒之后测量峰电流振幅。在应用下个浓度之前将基线和每个浓度的上三次扫描的峰电流平均化。以真实平均峰电流和平均基线峰电流的分数计算每种细胞的残余电流(I/I_0)。结果提供为10 μ M的抑制百分数($\%$)($1-I/I_0$)*100%。

[0063] 体外磷脂沉积实验(实验4)

[0064] 使用人造血U937细胞系分析测试化合物的磷脂沉积原性(phospholipidogenic)的潜力。测试原理是通过用荧光染料尼罗红染色细胞来分析磷脂含量。

[0065] 将U937细胞以在RPMI培养基(含有10% FBS、1% DMSO和0.005% 庆大霉素)中的 0.5×10^6 细胞/毫升的浓度接种到细胞培养板。然后在标准培养条件下在不同浓度测试化合物存在或不存在情况下培养细胞。

[0066] 为了收集, 以130x g离心细胞4分钟并用PBS洗涤一次。然后制备2x0.5mL细胞悬液, 用于非固定细胞测量(0.5mL用于碘化丙啶(PI)存活率测量, 0.5mL用于尼罗红测量)。

[0067] 剩余细胞用3.7% 甲醛固定30min。在进一步的离心步骤后, 用1.3mL 尼罗红工作溶液(1 μ g/mL)重新悬浮细胞并在室温下温育5分钟。然后用3mL PBS洗涤细胞悬液两次并用130x g离心4分钟。丢弃上清液并用0.5mL PBS重新悬浮细胞并保存用于流式细胞术测量。

[0068] 对于0.5mL 尼罗红染色的非固定细胞样品, 向每份样品添加50 μ L即用的尼罗红溶液(10 μ g/mL)。样品在冰浴保持5分钟。此后, 用4mL PBS洗涤它们一次(4 $^{\circ}$ C, 250x g, 8分钟), 最终用400 μ L PBS重新悬浮并保存用于流式细胞术测量。

[0069] 对于存活率测量, 向0.5mL非固定细胞悬液中加入12.5 μ L即用的PI溶液(10 μ g/mL)。在冰上培育15分钟后, 使用Coulter Epics XL/MCL流式细胞仪通过流式细胞术测量样品。

[0070] 通过流式细胞术测量通道2(568-590nm)的PI含量来确定每份样品细胞的存活率。活细胞与死细胞之间荧光依赖分化(fluorescence-dependent differentiation)的截止门限(Cut-off gates)基于细胞培养基对照样品分析来定义。

[0071] 只有相对于对照样品细胞存活率 $\geq 90\%$ 的样品才用于磷脂沉积分析。对此, 通过流式细胞术通道1(504-541nm)和通道4(660-680nm)测量每份尼罗红样品(非固定和固定样品)。

[0072] 对于每条通道, 相对于对照样品计算测试样品的相对尼罗红荧光强度, 表示为对照荧光强度的百分数。评价测试化合物的磷脂沉积原性潜力和首次效应浓度(FEC)是基于用于固定细胞和非固定细胞的二者波长的荧光强度来手工完成。

[0073] 大鼠脑AB降低实验(实验5)

[0074] 大鼠脑A β 降低(减少)实验证明了本发明化合物的体内效力,数据呈现于表3。使用雄性Sprague-Dawley大鼠,5至6周龄来证明本发明化合物减少脑淀粉样肽A β 1-x的能力。以表3注明的单次剂量用1%聚山梨酯-80和0.5% Natrosol[®]经口灌胃施用化合物。给药后3小时后处死动物,切除大脑,分割成小脑、左大脑和右大脑并在液氮中速冻。

[0075] 使用玻璃Dounce均质器,将大脑于4℃下在补充有蛋白酶抑制剂(cOmplete, Roche Applied Science)的20mM Tris-HCL, pH 8.5、0.2% Triton-X100中均质化(每重量5体积)。在4℃下以120,000×g将匀浆离心60分钟,收集上清液并使用带有化学发光检测的免疫分析(Meso-Scale Discovery, Rockville, MD(MSD))来分析A β 1-x。

[0076] 于室温下在定轨振荡器上将链霉亲和素96-孔板(MSD)用5%封闭剂A溶液(MSD)预先封闭1小时,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤4次。于室温下将孔用20ng/孔生物素化的抗体SIG-39155(Clone M3.2,对啮齿类A β 的氨基酸10-15具有特异性)预涂覆1小时,并用PBS洗涤4次。对于A β 1-x分析,将25 μ l洁净的脑溶解物或A β 1-40标准物(8-500pg/ml, 2x增量)在室温下温育1小时,并持续振荡。用PBS洗涤孔4次,加入25 μ l检测抗体(Sulfo-TAG标记抗-A β 40抗体,由MSD供应)并在室温下温育1小时。在4次PBS洗涤后,加入150 μ l化学发光检测试剂(Read Buffer T, MSD),用MSD Sector Imager 6000设备对培养板读数。将校准曲线拟合到非线性四参数回归模型,计算含有洁净脑溶解物的每孔的A β 1-x浓度。基于与用载体单独处理的动物大脑获得的平均A β 浓度的差异来计算A β 降低百分数。

[0077] 表1显示本发明化合物的以下特性:实验1测量的BACE1抑制效力,实验2测量的细胞抑制效力,实验3测量的hERG抑制,实验4测量的磷脂沉积的首次效应浓度(FEC)。

[0078] 表1. 本发明化合物的生物特性

[0079]

实施例	BACE1 IC ₅₀ nM (实验 1)	H4-APPwt 细胞 IC ₅₀ nM (实验 2)	hERG% 抑制, 10 μM (实验 3)	磷脂沉积 FEC IC ₅₀ μM (实验 4)
1	11	0.76	8	200
2	8	0.29	22	200
3	10	0.57	9	> 200
4	5	0.28	0	> 400
5	8	0.90	7	200
6	11	1.24	35	200
7	2	1.42	8	400
8	5	0.49	16	> 200
9	9	1.90	16	400
10	9	1.12	38	200
11	4	0.35	6	> 400
12	3	1.10	11	400

[0080]

实施例	BACE1 IC ₅₀ nM (实验 1)	H4-APPwt 细胞 IC ₅₀ nM (实验 2)	hERG% 抑制, 10 μM (实验 3)	磷脂沉积 FEC IC ₅₀ μM (实验 4)	
13	9	0.92	18		200
14	5	0.12	20	>	200
15	11	0.11	11		200
16	11	0.20	6		200
17	14	0.89	12	>	200
18	9	1.02	17	>	400
19	6	0.40	8		400
20	-	0.28	8	>	400
21	5	0.48	24		400
22	8	0.26	9	>	400
23	12	0.18	16	>	200
24	5	0.65	23		200
25		0.99	10		200

[0081]

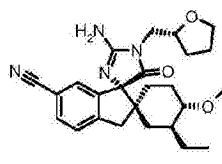
实施例	BACE1 IC ₅₀ nM (实验 1)	H4-APPwt 细胞 IC ₅₀ nM (实验 2)	hERG% 抑制, 10 μM (实验 3)	磷脂沉积 FEC IC ₅₀ μM (实验 4)
26	9	0.20	8	> 200
27	6	0.95	19	> 200
28		0.5	9	400
29		0.3	7	200

[0082] 表2提供的数据显示本发明的某些化合物相对于W02010/105179描述的某些比较化合物在BACE1酶实验(实验1)和细胞Aβ实验(实验2)中具有显著更低的IC₅₀抑制值。

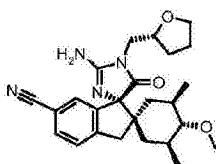
[0083] 表2.

[0084]

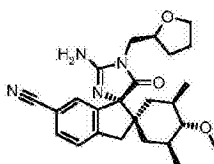
本发明的化合物



实施例 5

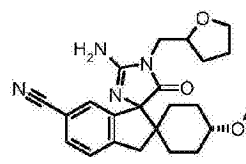


实施例 14



实施例 15

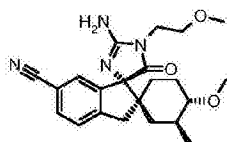
比较例

WO 2010/105179 中实施例
281BACE IC₅₀ (实验 1) 35 nM

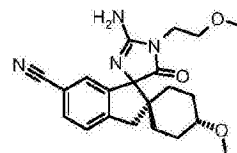
H4-细胞试验 (实验 2) 7.0 nM

hERG (实验 3) 16% 10 μM

[0085]



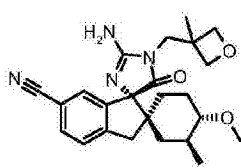
实施例 7



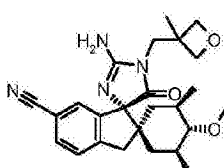
WO 2010/105179 中实施例

259BACE IC₅₀ (实验 1) 49 nM

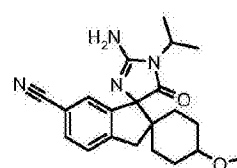
H4-细胞试验 (实验 2) 16 nM



实施例 8



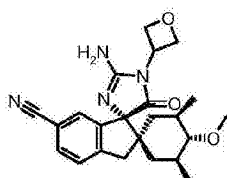
实施例 11



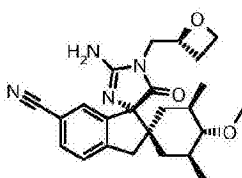
WO 2010/105179 中实施例

121BACE IC₅₀ (实验 1) 107 nM

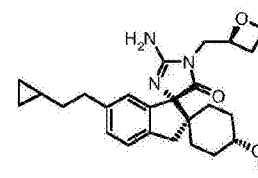
H4-细胞试验 (实验 2) 16 nM



实施例 12



实施例 18



WO 2010/105179 中实施例

320BACE IC₅₀ (实验 1) 415 nM

H4-细胞实验 (实验 2) 16 nM

[0086] 如实验5所描述,在大鼠中证明了本发明化合物减少脑Aβ的能力,体内效力数据呈现于表3。

[0087] 表3.

[0088]

实施例	剂量(mg/kg)	%Aβ减少
2	30	42

4	25	75
6	50	60
8	25	37
9	25	37
12	25	39
13	30	47
14	25	67
15	25	62
17	25	70
18	25	56
20	25	73
21	50	59
22	12.5	45
23	25	68
26	25	71
28	12.5	30
29	25	78

[0089] 治疗方法

[0090] 本发明涉及用于治疗受试者的特征在于升高的 β -淀粉状蛋白沉积或 β -淀粉状蛋白水平的异常或疾病的化合物,其中抑制 β -分泌酶(BACE1)的活性具有治疗益处,包括但不限于治疗、缓解或预防神经退行性紊乱、特征为认知退化的紊乱、认知损伤、痴呆和特征为产生 β -淀粉状蛋白沉积或神经原纤维缠结的疾病。

[0091] 本发明的化合物可用于治疗阿尔茨海默病、21三体综合征(唐氏综合征)、伴有荷兰型淀粉样蛋白变性的遗传性脑出血(HCHWA-D)、老年性痴呆、脑淀粉样蛋白血管病、退行性痴呆、混合型血管并退行性起源的痴呆、与帕金森氏病有关的痴呆、与进行性核上性麻痹有关的痴呆、与皮质基底退化有关的痴呆、弥散性路易体型阿尔茨海默病、干型年龄相关性黄斑变性(AMD)和青光眼。“干”型的AMD,也被称作“中央地图样萎缩(central geographic atrophy)”,是由感觉神经视网膜下面的视网膜色素上皮层萎缩造成的,通过眼中央部分感光感受器(视杆细胞和圆锥体细胞)丧失而导致视力丧失。此病症目前没有可用的内科或外科治疗方法。迄今为止的可用治疗方法(例如国家眼科研究所(National Eye Institute)建议)包括使用含有高剂量抗氧化剂、叶黄素和玉米黄素的维生素补剂,这会延缓干型黄斑变性的发展。青光眼是一种眼内液体压力升高的疾病,引起视神经不可逆的损坏和视力丧失。在试验性青光眼中A β 与凋亡的视网膜神经节细胞共局域化(colocalizes)并以剂量和时间依赖方式诱导显著的视网膜神经节细胞凋亡。

[0092] 因此本发明涉及用作药物的化合物或其药学可接受的盐。

[0093] 进一步地,本发明涉及化合物治疗疾病和/或病症的用途,其中抑制 β -分泌酶(BACE1)活性具有治疗益处。

[0094] 进一步地,本发明涉及化合物治疗神经退行性紊乱、特征为认知退化的疾病、认知损伤、痴呆和特征为产生 β -淀粉状蛋白沉积或神经原纤维缠结的疾病的用途。

[0095] 因此,本发明涉及本发明的化合物在治疗:阿尔茨海默病、21三体综合征(唐氏综合征)、伴有荷兰型淀粉样蛋白变性的遗传性脑出血(HCHWA-D)、老年性痴呆、脑淀粉样蛋白血管病、退行性痴呆、混合型血管并退行性起源的痴呆、与帕金森氏病有关的痴呆、与进行性核上性麻痹有关的痴呆、与皮质基底退化有关的痴呆、弥散性路易体型阿尔茨海默病、干型AMD和青光眼中的用途。

[0096] 本发明还提供在有需要的患者中治疗与过度BACE1活性相关或有关的异常的方法,包括向患者施用有效量的所公开的化合物或其药学上可接受的盐。本发明还提供在有需要的受试者中抑制BACE1活性的方法,包括给受试者施用有效量的至少一种所公开的化合物或其药学可接受的盐和/或用有效量的至少一种所公开的化合物或其药学可接受的盐接触其受体。本发明还提供在有需要的受试者中缓解 β -淀粉状蛋白沉积的方法,包括给所述受试者施用有效量的至少一种所公开的化合物或其药学可接受的盐。

[0097] 本发明包括在有需要的受试者中治疗或缓解BACE1介导的紊乱的治疗方法,包括给受试者施用有效量的本文公开的本发明的化合物或其药学可接受的盐或其组合物。

[0098] 如本文所使用,术语“受试者”和“患者”可互换使用,并且是指需要治疗的哺乳动物,例如,伴侣动物(例如,狗、猫等)、家畜(例如,母牛、猪、马、绵羊、山羊等等)和实验动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠等等)。一般地,受试者是需要治疗的人。

[0099] 如本文所使用,术语“治疗(treating或treatment)”是指获得期望的药理和/或生理效果。所述效果可以是预防性的(即减少紊乱或疾病发展的可能性)或治疗性的,其包括部分地或基本上实现一种或多种下列结果:部分或完全地降低疾病、紊乱或综合征的程度;缓解或改善与紊乱有关的临床症状或指征;或延迟、抑制或降低疾病、紊乱或综合征发展的可能性。

[0100] 根据本发明的化合物每天可应用的剂量范围通常是0.1至3000mg,优选1至2000mg,更优选10至1000mg,最优选50至500mg。每个剂量单位可方便地含有0.1至1000mg,25至250mg。

[0101] 实际药理学有效量或治疗剂量通常依赖于本领域技术人员已知的因素,例如患者年龄和体重、施用途径和疾病的严重程度。在任何情况下,根据患者的特定状况,应以允许递送药理学有效量的剂量和方式施用组合。

[0102] 药物组合物

[0103] 用于施用本发明化合物的合适制剂对于本领域普通技术人员是显而易见的,包括例如片剂、丸剂、胶囊、栓剂、锭剂、糖锭、溶液、糖浆、酏剂、扁囊剂、注射剂、吸入剂和粉末等。药理学活性化合物的含量应当在组合物整体的0.1至95重量%,优选5至90重量%。

[0104] 合适的片剂可例如通过将一种或多种本发明的化合物与已知的赋形剂(例如惰性稀释剂、载体、崩解剂、助剂、表面活性剂、粘合剂和/或润滑剂)混合而获得。片剂也可以由若干个层组成。

[0105] 组合疗法

[0106] 在一个实施方案中,本发明包括用于治疗或缓解本文描述的疾病或紊乱的组合疗法。组合疗法包括施用至少一种本发明的化合物与一种或多种选自以下的化合物的组合:例如 γ -分泌酶抑制剂或调节剂;阻断A β 寡聚体或A β 小纤维形成的淀粉样蛋白聚集抑制剂(例如,ELND-005);直接或间接作用的神经保护性和/或疾病改善性物质;抗氧化剂(例如,

维生素E或银杏内酯);抗炎物质(例如,Co_x抑制剂、额外或专门具有AB降低性质的NSAID);HMG-CoA还原酶抑制剂(他汀类);乙酰胆碱酯酶抑制剂(例如,多奈哌齐、利斯的明、他克林、加兰他敏、他克林);NMDA受体拮抗剂(例如,美金刚);AMPA受体激动剂;AMPA受体正向调节剂;AMPkine、单胺受体再摄取抑制剂、调节神经递质的浓度或释放的物质;诱导生长激素分泌的物质(例如,伊布莫仑(ibutamoren)甲磺酸盐和卡普瑞林);CB-1受体拮抗剂或反向激动剂;抗生素(例如,米诺环素(minocyclin)或利福平);PDE2、PDE4、PDE5、PDE9、PDE10抑制剂;GABAA受体反向激动剂、GABAA受体拮抗剂、烟碱型受体激动剂或部分激动剂或正向调节剂、 $\alpha 4\beta 2$ 烟碱型受体激动剂或部分激动剂或正向调节剂、 $\alpha 7$ 烟碱型受体激动剂或部分激动剂或正向调节剂;组胺H3拮抗剂、5HT-4激动剂或部分激动剂、5HT-6拮抗剂、 $\alpha 2$ -肾上腺素受体拮抗剂、钙拮抗剂、毒蕈碱型受体M1激动剂或部分激动剂或正向调节剂、毒蕈碱型受体M2拮抗剂、毒蕈碱型受体M4拮抗剂、代谢型谷氨酸受体5正向调节剂、抗抑郁剂(诸如西酞普兰、氟西汀、帕罗西汀、舍曲林和曲唑酮);抗焦虑剂,诸如劳拉西泮和奥沙西泮;抗精神病剂,诸如阿立哌唑、氯氮平、氟哌啶醇、奥氮平、喹硫平、利培酮和齐拉西酮(ziprasidone),以及以使得根据本发明的化合物的功效和/或安全性增加和/或不期望的副作用降低的方式调节受体或酶的其它物质。根据本发明的化合物也可与免疫治疗剂(例如,利用AB或其部分的主动免疫或者利用人源化抗AB抗体或纳米抗体(nanobody)的被动免疫)组合,用来治疗上述疾病和病症。组合疗法包括共同施用本发明化合物和一种或多种其它药剂、顺序施用所述化合物和一种或多种其它药剂、施用包含所述化合物和一种或多种其它药剂的组合物、或同时施用包含所述化合物和一种或多种其它药剂的单独组合物。

[0107] 实验部分

[0108] 制备化合物的方法

[0109] 可以使用容易获得的试剂和原材料,使用常规方法制备本发明的化合物。制备本发明化合物使用的试剂可商购获得或使用文献中描述的标准程序制备。

[0110] 可在使用discovery SP系统的CEM反应器中进行微波反应。当提供NMR数据时,使用Varian-400(400MHz)获得波谱,并报告为距离四甲基硅烷低场的ppm,并标有质子数,多重峰性和偶合常数(括号注明氘化溶剂)。

[0111] 通过下文描述的基本制备性HPLC方法来纯化化合物。

[0112] 方法1:

[0113] 流动相A:含有0.05%氨的水溶液;流动相B:CAN;流速:25mL/min;检测:UV 220nm/254nm;柱:Phenomenex Gemini C18250*30mm*5um

[0114] 柱温:30°C

[0115]	时间(分钟)	%A	%B
	0.0	68	32
	12.00	38	62
	12.20	0	100
	13.5	0	100
	13.7	90	10

[0116] 方法2:

[0117] 流动相A:含有0.05%氨溶液的水;流动相B:ACN;流速:25mL/min;检测:UV 220nm/254nm;柱:Durashell C18250*30mm*5um;柱温:30℃

	时间 (分钟)	%A	%B
	0.0	67	33
[0118]	12.00	47	53
	12.20	0	100
	13.5	0	100
	13.7	90	10

[0119] 通过采用以下色谱条件获得LC-MS数据:

[0120] HPLC系统:Waters ACQUITY;柱:Waters ACQUITY CSH™C181.7μM

[0121] 保护柱:Waters Assy.Frit,0.2μM,2.1mm;柱温:40℃

[0122] 流动相A:TFA:水(1:1000,体积:体积)流动相B:TFA:ACN(1:1000,体积:体积);流速:0.65mL/min;注射体积:2μL;收集时间:大约1.5分钟.

[0123] 梯度程序:

	时间 (分钟)	B%
	0	10
[0124]	0.8	90
	1.20	90
	1.21	10

[0125] 质谱仪参数

[0126] 质谱仪:Waters SQD;离子化:正离子电喷雾离子化(ESI);模式扫描(每0.2秒100-1400m/z);ES毛细管电压:3.5kv;ES锥孔电压:25v源温度:120℃;脱溶剂气温度(Disolvation temperature):500℃;脱溶剂气流速:氮气设定650(L/h);锥孔气流速:氮气设定50(L/h)

[0127] 对于实施例10,步骤2,和中间体38的替代合成,步骤1和2,使用以下色谱条件和仪器操作:

[0128] 采用以下色谱条件获得LC-MS数据:

	HPLC 系统:	Agilent 1100 Series
	柱:	Zorax Eclipse XDB-C8, 2.1x50mm
[0129]	柱温:	35 °C
	流动相:	A: 甲酸 : 水 (1 : 1000, 体积:体积)
		B: 甲酸 : ACN (1: 1000, 体积:体积)

- [0130] 梯度程序:
- | 时间 (分钟) | B% |
|----------|----|
| 0 | 5 |
| [0131] 3 | 95 |
| 4.5 | 95 |
| 5.0 | 5 |
- 流速: 0.60 mL/min
- [0132] 注射体积: 2 μ L
- 保留时间: 大约 1-4 分钟
- 收集时间: 大约 5 分钟
- [0133] 质谱仪参数
- 质谱仪: Agilent 77
- [0134] 离子化 正离子电喷雾离子化(ESI)
- 模式 扫描 (每 0.2 秒钟 100-800 m/z)
- ES 毛细管电压: 3.5 kv
- ES 锥孔电压: 25 v
- 源温度 120 °C
- [0135] 溶解温度: 500 °C
- 脱溶剂气流速: 氮气 设置 (setting) 650 (L/h)
- 锥孔气体流: 氮气 设置 50 (L/h)
- [0136] 对于实施例27,使用以下色谱条件和仪器操作:
- [0137] HPLC系统: Waters Alliance/DA-und MS-检测器
- [0138] 柱: Waters XBridge C18,4.6x30mm,3.5 μ m

[0139]

梯度程序:	% Sol	% Sol	流速	温度 [°C]
时间 [分钟]	[H ₂ O, 0.1%TFA]	[甲醇]	[ml/min]	
0.0	95	5	4	60
1.6	0	100	4	60
1.85	0	100	4	60
1.9	95	5	4	60

[0140] 使用以下方法进行化合物的SFC分离和表征。

[0141] 方法A:

[0142] 仪器:Thar SFC 80;柱:AD 250mm*30mm,5um;流动相:A:超临界CO₂,B:IPA(0.05% DEA),A:B=80:20,60ml/min;柱温:38℃;喷嘴压力:100Bar;喷嘴温度:60℃;蒸发器温度:20℃;微调电容器温度(Trimmer Temp):25℃;波长:220nm。

[0143] 方法B:

[0144] 仪器:SFC MG2;柱:0J 250mm*30mm,5um;流动相:A:超临界CO₂,B:MeOH(0.05% DEA),A:B=90:10,70ml/min;柱温:38℃;喷嘴压力:100Bar;喷嘴温度:60℃;蒸发器温度:20℃;微调电容器温度:25℃;波长:220nm。

[0145] 以下技术、溶剂和试剂通过它们以下的缩写引用:

[0146]

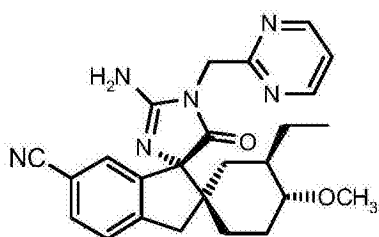
缩写	含义
ACN	乙腈
Boc	叔丁氧基羰基
盐水	饱和 NaCl 水溶液
DCM	二氯甲烷
DIEA	二异丙基乙胺
DMF	二甲基甲酰胺
DMSO	二甲亚砜
dppf	1,1-双(二苯基膦)二茂铁
EDCI	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐
EtI	碘乙烷
Et	乙基
Et ₂ O	乙醚
EtOAc	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
HPLC	高效液相色谱
LDA	二异丙基氨基锂
MeOH	甲醇
MeI	碘甲烷
Me	甲基
Me ₂ S	二甲基硫醚
MsCl	甲磺酰氯

[0147]

缩写	含义
NaOMe	甲醇钠
PdCl ₂ dppf	[1,1-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)
Pd ₂ (dba) ₃	三(二亚苺基丙酮)二钯(0)
PE	石油醚
Rt	室温
SFC	超临界流体色谱
<i>t</i> -BuOK	叔丁醇钾
<i>t</i> -BuLi	叔丁基锂
<i>t</i> -BuNH ₂ -BH ₃	叔丁胺-硼烷络合物
<i>t</i> -BuOOH	叔丁基过氧化物
TFA	三氟乙酸
TFAA	三氟乙酸酐
THF	四氢呋喃
TLC	薄层色谱
Ti(OEt) ₄	四乙氧基钛

[0148] 实施例1

[0149]



[0150] 步骤1:合成中间体3

[0151]



[0152] 将化合物1(50.0g, 236mmol)和丙烯酸甲酯(42.0g, 472mmol)的无水THF(900mL)混合物在0℃预冷, 30min内加入等份的*t*-BuOK(31.8g, 284mmol, 1.1当量), 然后1h内将混合物温热至室温并在室温搅拌40min。向该反应混合物加入DMF(200mL)和EtI(74g, 472mmol), 室

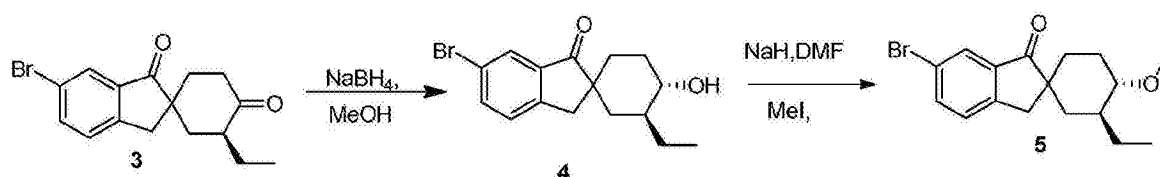
温搅拌过夜。减压除去THF。残余物用H₂O(300mL)稀释并用EtOAc萃取,浓缩得到粗制化合物2(120.0g)。该产物原样用于下一步骤。

[0153] 将化合物2A(120.0g,310mmol)和LiCl(130.0g,3100mmol)的DMSO(900mL)混合物回流过夜。用水(3L)淬灭混合物并用EtOAc(3×400mL)萃取。将分离的有机相干燥并减压浓缩。残余物通过硅胶柱色谱(石油醚:EtOAc=20:1)纯化,提供中间体3(15g,20%)。

[0154] ¹H NMR:(CDCl₃):δ7.91(s,1H),7.74(dd,J=8.0Hz,1H),7.41(d,J=8.0Hz,1H),3.80(s,2H),2.48-2.53(m,2H),2.33-2.49(m,1H),2.15-2.23(m,1H),1.75-1.95(m,4H),1.21-1.40(m,1H),0.88(t,J=8.0Hz,3H)。

[0155] 步骤2:合成中间体5

[0156]



[0157] 在-78℃向THF(20mL)和MeOH(5mL)混合物中加入中间体3(6.0g,18.7mmol)、NaBH₄(355mg,9.3mmol)和CeCl₃·7H₂O(70mg,0.19mmol)。将混合物在-78℃搅拌20分钟,用饱和NH₄Cl溶液(30mL)淬灭,用EtOAc(400mL X4)萃取。将EtOAc相合并,浓缩得到粗制化合物4(6.5g,粗品)。

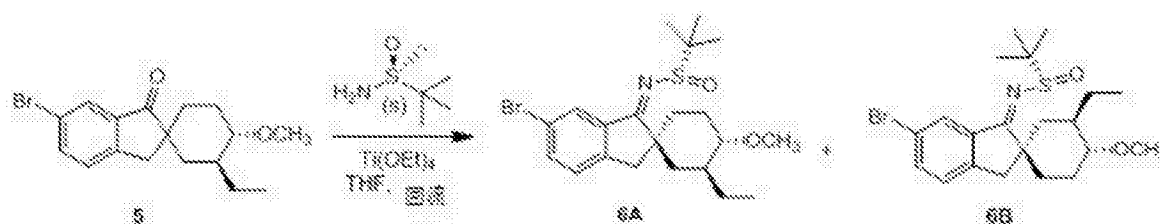
[0158] 在0℃向化合物4(6.5g,20.0mmol)和NaH(3.2g,80.0mmol)的DMF(100mL)的混合物中加入MeI(11.4g,80.0mmol)。室温搅拌混合物过夜。用H₂O淬灭混合物,用EtOAc萃取,浓缩得到粗产物,通过硅胶柱色谱(洗脱剂:石油醚:乙酸乙酯20:1至15:1)纯化,得到中间体5(3.5g,56%)。

[0159] LC-MS: t_R=1.315分钟,MS(ESI)m/z 339.1[M+H]⁺。

[0160] ¹H NMR:(CDCl₃):δ7.88(s,1H),7.69(dd,J=8.4,2.0Hz,1H),7.31(d,J=8.4Hz,1H),3.39(s,3H),2.97(s,2H),2.88-2.94(m,1H),2.21-2.26(m,1H),1.81-1.87(m,1H),1.70-1.78(m,1H),1.40-1.59(m,4H),1.12-1.39(m,2H),0.88(t,J=8.0Hz,3H)。

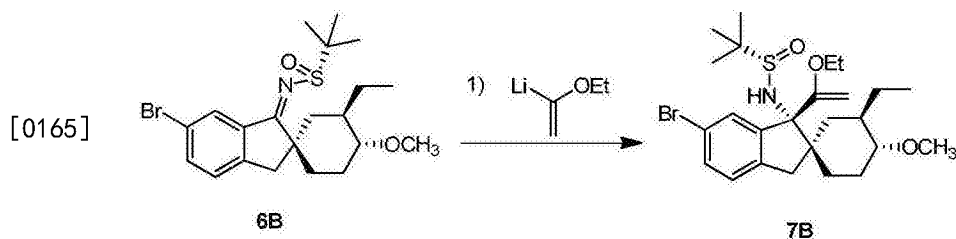
[0161] 步骤3:合成中间体6A&6B

[0162]



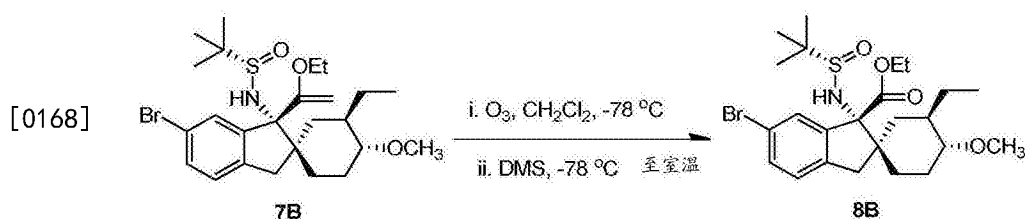
[0163] 将中间体5(3.5g,10.4mmol)和乙氧基钛(IV)(23.7g,104mmol)的无水THF(40mL)混合物室温搅拌1h。加入(S)-N-叔丁基亚磺酰胺(1.6g,11.6mmol),将所得混合物在N₂气氛下80℃搅拌过夜。然后冷却反应混合物,加入水(400mL)并过滤。用EtOAc(3×400mL)萃取水层。合并分离的有机相并干燥,减压浓缩。残余物通过硅胶柱色谱(石油醚:EtOAc=20:1)纯化,以下列顺序洗脱化合物提供中间体6A(1.5g,33%)和6B(1.5g,33%)。

[0164] 步骤4:合成中间体7B



[0166] 在 N_2 气氛下 $-78^\circ C$ 向乙氧基乙烯(1.3g, 17.0mmol)的无水THF(20mL)混合物中, 逐滴加入 $t\text{-BuLi}$ (13.0mL, 17.0mmol, 1.3M于己烷中)并搅拌20分钟。然后将所得混合物在 $0^\circ C$ 搅拌另外45分钟。在 $-78^\circ C$ 向该混合物中逐滴加入中间体6B(1.5g, 3.4mmol)的无水THF(20mL)溶液并搅拌2.5h。用饱和 NH_4Cl (50mL)淬灭反应, 用 $EtOAc$ ($3 \times 300mL$)萃取。合并有机相并浓缩, 提供残余物, 用硅胶柱色谱(石油醚: $EtOAc = 20:1$)纯化, 得到中间体7B(1.2g, 69%)。

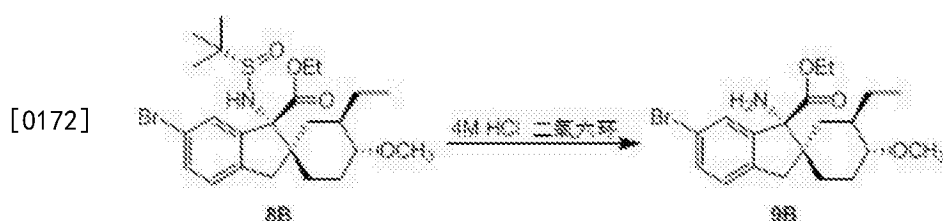
[0167] 步骤5: 合成中间体8B



[0169] 将中间体7B(1.2g, 2.4mmol)加入 $DCM:MeOH(5:1, 20mL)$, 将混合物冷冻至 $-78^\circ C$ 并鼓入臭氧通过混合物20分钟。然后用 N_2 吹扫混合物并在 $-78^\circ C$ 用 Me_2S 处理。然后将反应温热至室温并搅拌3小时。真空除去溶剂, 残余物通过制备TLC(石油醚: $EtOAc = 3:1$)纯化提供化合物8B(860mg, 70%)。

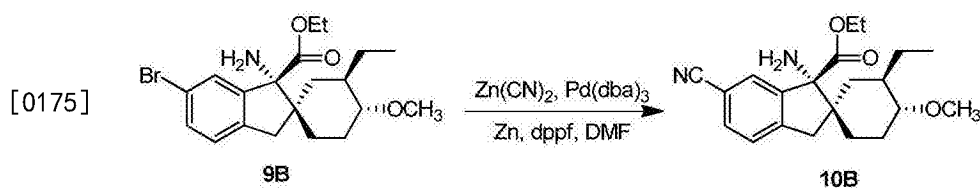
[0170] LC-MS: $t_R = 1.351$ 分钟, MS(ESI) m/z 516.1 $[M+H]^+$ 。

[0171] 步骤6: 合成中间体9B



[0173] 向化合物8B(860mg, 1.7mmol)的 $MeOH(10mL)$ 溶液中加入4M HCl 的二氧六环溶液(2mL)。搅拌所得混合物30分钟。减压除去溶剂得到粗制化合物9B(800mg)。残余物用于下一步骤而没有进一步纯化。

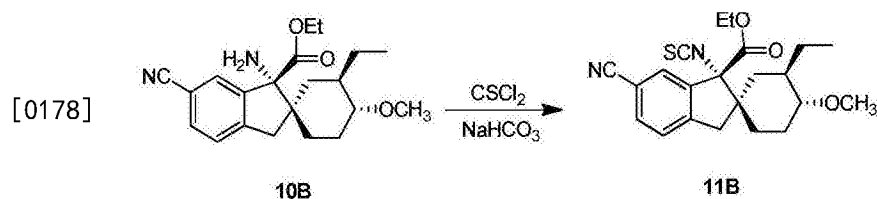
[0174] 步骤7: 合成中间体10B



[0176] 在CEM微波反应器中在 $120^\circ C$ 加热中间体9B(500mg, 1.9mmol)、 $Zn(CN)_2$ (300mg, 2.6mmol)、 $Pd_2(dba)_3$ (150mg, 0.16mmol)、dppf(160mg, 0.32mmol)和 Zn 粉(60mg, 0.9mmol)的 $DMF(15mL)$ 的悬液3小时。真空浓缩混合物, 残余物用硅胶柱色谱(洗脱剂: 石油醚: $EtOAc$ 从

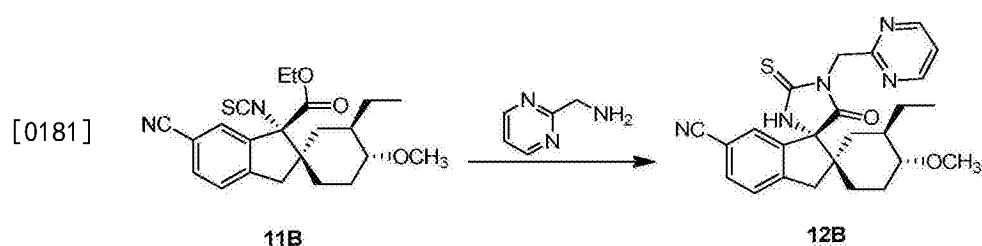
20:1至8:1)纯化得到化合物10B(150mg,40%)。

[0177] 步骤8:合成中间体11B



[0179] 将中间体10B(150mg,0.42mmol)加到DCM(10mL)、H₂O(10mL)和NaHCO₃(350mg,4.2mmol)。剧烈搅拌下向该混合物中加入二氯硫化碳(100mg,0.84mmol),室温搅拌50分钟并用DCM(3×40mL)萃取。用盐水(2×40mL)洗涤有机层,干燥并减压除去溶剂得到粗化合物11B(150g,93%),用于下一步骤而没有进一步纯化。

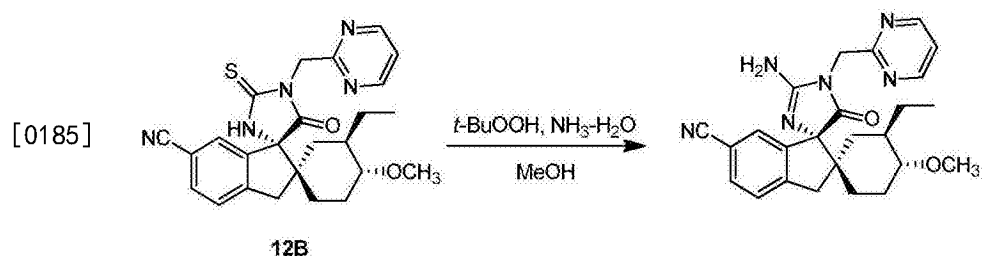
[0180] 步骤9:合成中间体12B



[0182] 向化合物11B(150mg,0.39mmol)的THF(5mL)的混合物中加入2-氨基甲基嘧啶(67mg,0.78mmol)和TEA(395mg,3.90mmol)。室温搅拌化合物过夜。用水稀释反应并用EtOAc(30mL)萃取。残余物通过柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=10:1)纯化得到12B(100mg,70%)。

[0183] LC-MS: t_R =1.204分钟,MS(ESI) m/z 462.2[M+H]⁺。

[0184] 步骤1:合成实施例1

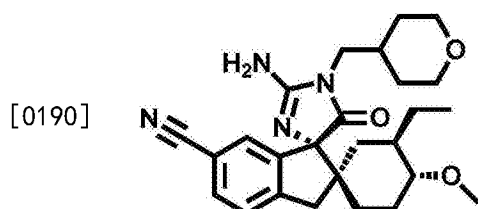


[0186] 加入化合物12B(100mg,0.22mmol)的MeOH(10mL)和NH₄OH(3mL)的溶液,随后加入t-BuOOH(1mL)。加入后,室温搅拌混合物24小时。用饱和Na₂S₂O₃(0.5mL)溶液淬灭混合物。残余物在EtOAc(20mL)和H₂O(10mL)之间分配。分离有机层并用盐水(10mL)洗涤,干燥,过滤并真空浓缩。残余物用HPLC纯化(方法1)提供化合物实施例1(14.60mg,15%)。

[0187] LC-MS: t_R =0.933分钟,MS(ESI) m/z 445.2[M+H]⁺。

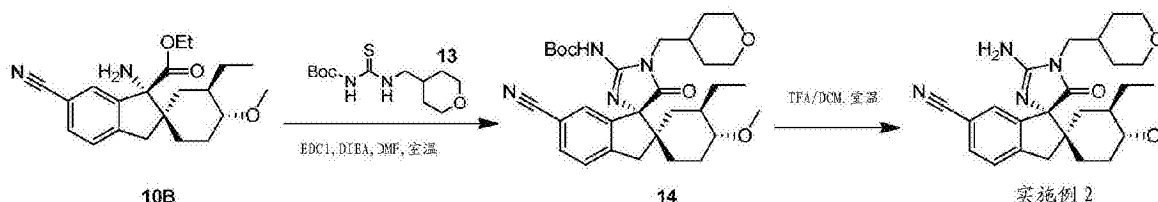
[0188] ¹H NMR:(CD₃OD): δ 8.74(d,J=5.2Hz,2H),7.61(dd,J=7.6,1.6Hz,1H),7.52(s,1H),7.45(d,J=8.0Hz,1H),7.35(t,J=5.2Hz,1H),4.94(s,2H),3.38(s,3H),3.17(s,2H),2.80-2.87(m,1H),2.08-2.13(m,1H),1.90-1.94(m,1H),1.38-1.85(m,2H),1.22-1.39(m,3H),1.12-1.18(m,2H),0.76(t,J=8.0Hz,3H)。

[0189] 实施例2



[0191] 该化合物由实施例1中间体10B按照以下所示方案合成。

[0192]



[0193] 步骤1:合成中间体13

[0194] 0℃在氩气下向搅拌的硫脲(23g, 302mmol)的THF(5.0L)溶液中加入氢化钠(29.9g, 755mmol, 60%于矿物油中)。5分钟后, 移去冰浴, 室温搅拌反应混合物10分钟。再次将混合物冷却至0℃, 添加二碳酸二叔丁酯(138g, 635mmol), 在该温度搅拌30分钟后除去冰浴。室温搅拌所得浆料另外2小时。然后用饱和NaHCO₃水溶液(500mL)淬灭反应。将反应混合物倾入水(5.0L)中并用EtOAc(3×2.0L)萃取。干燥合并的有机层, 过滤并真空浓缩得到呈白色固体中间体13(80g, 96%), 用于下一步骤而没有进一步纯化。

[0195] 0℃向中间体13(4.14g, 15.0mmol)和无水THF(300mL)的混合物中加入NaH(60%于矿物油中, 720mg, 18.0mmol)。0℃搅拌反应混合物1小时, 然后加入TFAA(3.47g/2.33mL, 16.5mmol)并继续搅拌另外1小时。然后加入4-(氨基乙基)四氢吡喃(2.5g, 16.5mmol)和Et₃N(3.03g/4.16mL, 30.0mmol)的无水THF(130mL)溶液, 室温搅拌所得反应过夜。加入H₂O(150mL)淬灭反应, 并用EtOAc(3×200mL)萃取混合物。干燥合并的有机层, 减压除去溶剂。残余物通过快速柱色谱法纯化获得呈白色固体的化合物13(3.54g, 86%)。

[0196] LCMS: t_R=0.973分钟; MS(ESI)m/z 219[M-t-Bu]⁺。

[0197] 步骤2:合成中间体14

[0198] 向化合物10B(2.5g, 7.0mmol)的30mL DMF混合物中加入化合物13(2.3g, 8.4mmol)、EDCI(2.5g, 14.0mmol)和DIEA(1.7g, 14.0mmol)。室温搅拌混合物过夜。用EtOAc(3×80mL)萃取, 用盐水(3×50mL)洗涤, 干燥并减压除去溶剂。残余物通过柱色谱法(石油醚:乙酸乙酯=5:1)纯化得到14(2.7g, 75%)。

[0199] LC-MS: t_R=0.972min, MS(ESI)m/z 495.3[M-t-Bu]⁺。

[0200] 步骤3:合成实施例2

[0201] 向中间体14(2.7g, 4.9mmol)的DCM(30mL)的混合物中加入TFA(6mL)。加入后, 室温搅拌混合物1小时。通过NaHCO₃溶液调节反应混合物至pH 8.0-9.0。减压浓缩有机层。残余物通过柱色谱法(石油醚:乙酸乙酯=1:1)纯化得到呈白色固体的实施例2的化合物(1.83g, 83%)。

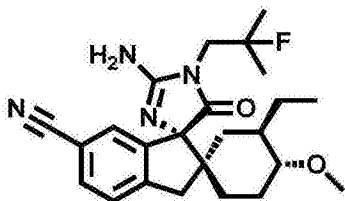
[0202] LC-MS: t_R=0.897分钟, MS(ESI)m/z 451.2[M+H]⁺。

[0203] ¹H-NMR:(CD₃OD): δ7.66(dd, J=8.0, 1.6Hz, 1H), 7.51(d, J=7.6Hz, 1H), 7.33(s, 1H), 3.92-3.98(m, 2H), 3.37-3.43(m, 7H), 3.20(m, 2H), 2.78-2.83(m, 1H), 2.16-2.20(m,

1H), 1.87-2.03(m, 1H), 1.71-1.77(m, 1H), 1.58-1.62(m, 1H), 1.51-1.54(m, 2H), 1.28-1.37(m, 7H), 1.09-1.10(m, 1H), 0.76(t, J=7.6Hz, 3H)。

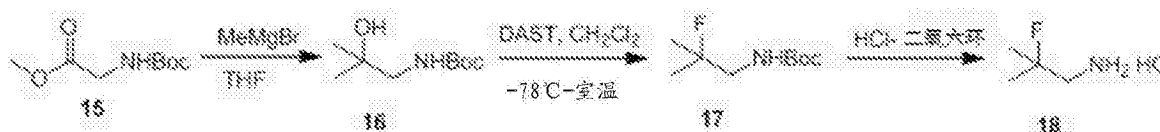
[0204] 实施例3

[0205]



[0206] 合成中间体18

[0207]



[0208] 步骤1:合成中间体16

[0209] -30℃在氮气氛下将化合物15(2.0g, 10.6mmol)的无水THF(20mL)的混合物加入到甲基溴化镁(14mL, 42mmol, 3.0M于Et₂O中)溶液中。于30℃下搅拌混合物4小时,然后加入水(40mL)和HCl水溶液(50mL, 1M)淬灭,0℃搅拌。分离混合物,用EtOAc(2×50mL)萃取水层。合并有机层用盐水(2×50mL)洗涤,干燥,过滤并真空浓缩得到为无色油的粗制中间体16(2.1g, 100%粗制),直接用于下一步骤而没有纯化。

[0210] ¹H NMR:(CDCl₃):δ4.97(br, 1H), 3.10(s, 2H), 2.17(br, 1H), 1.44(s, 9H), 1.20(s, 6H)。

[0211] 步骤2:合成中间体17

[0212] -78℃氮气氛下向中间体16(3.0g, 15.9mmol, 粗制)的无水DCM(50mL)混合物中加入DAST(2.3mL, 17.4mmol)。^{-78℃}搅拌混合物1小时,温热至室温过夜。然后将混合物冷却至0℃,在0℃通过加入饱和NaHCO₃(30mL)水层淬灭,缓慢搅拌。分离混合物,用DCM(2×20mL)萃取水层。合并的有机层用盐水(2×30mL)洗涤,干燥,过滤并真空浓缩得到粗中间体17(2.5g, 76%粗制),直接用于下一步骤而没有纯化。

[0213] ¹H NMR:(CDCl₃):δ4.82(br, 1H), 3.30-3.35(d, J=6.0Hz, 1H), 3.24-3.26(d, J=6.0Hz, 1H), 1.44(s, 9H), 1.37(s, 3H), 1.35(s, 3H)。

[0214] ¹⁹F NMR:(CDCl₃400MHz):δ-144.93。

[0215] 步骤3:合成中间体18

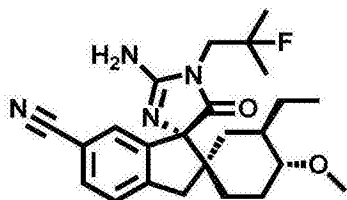
[0216] 向在中间体17(2.0g, 10.5mmol, 粗制)的无水DCM(10mL)混合物中加入HCl-二氧六环(10mL, 40mmol, 4M于二氧六环中)的混合物,同时搅拌。在真空浓缩溶剂后,室温搅拌混合物2小时。残余物用DCM:石油醚(1:1)的混合物(3×10mL)洗涤,收集沉淀物并真空干燥提供粗制化合物18(1.1g),直接用于下一步骤而没有纯化。

[0217] ¹H NMR:(CD₃OD):δ3.15-3.25(d, J=20.0Hz, 2H), 1.51(s, 3H), 1.48(s, 3H)。

[0218] ¹⁹F NMR:(CDCl₃400MHz):δ-147.59。

[0219] 实施例3

[0220]



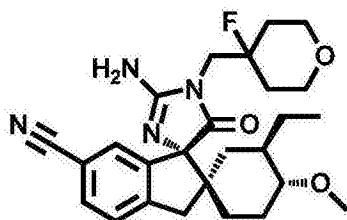
[0221] 实施例3由实施例1中间体11B按照与实施例1相同程序和使用实施例1步骤9的中间体18合成。

[0222] LC-MS: t_R = 1.12分钟, MS(ESI) m/z 427 $[M+H]^+$ 。

[0223] 1H -NMR: (CD_3OD) δ 7.65 (dd, 1H, J = 8, 2Hz), 7.51 (d, 1H, J = 8Hz), 7.31 (s, 1H), 3.72 (dd, 2H, J = 22, 4Hz), 3.37 (s, 3H), 3.20 (ap q, 2H, J = 16Hz), 2.82 (m, 1H), 2.18 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.79-1.70 (m, 1H), 1.52-1.22 (m, 10H), 1.21-1.09 (m, 1H), 0.77 (t, 3H, J = 7Hz)。

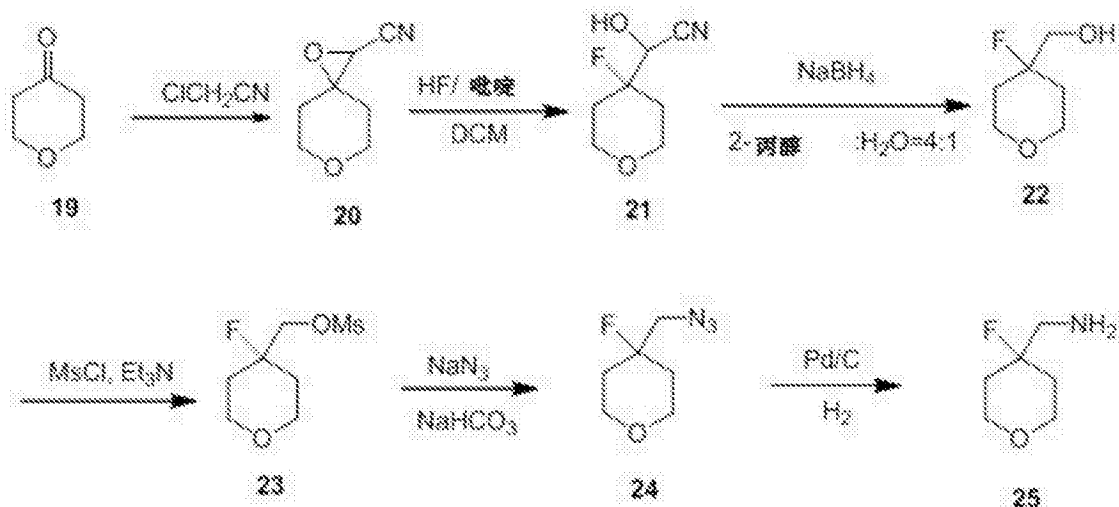
[0224] 实施例4

[0225]



[0226] 合成中间体25

[0227]



[0228] 步骤1:合成中间体20

[0229] 搅拌二氢-2H-吡喃-4(3H)-酮(19, 50.0g, 500mmol)和2-氯乙腈(35.0g, 350mmol)的叔丁醇(50mL)混合物30分钟。向混合物经40分钟加入 t -BuOK(60g, 550mmol)的叔丁醇(500mL)溶液。室温搅拌反应混合物16小时。用水稀释并用10% HCl淬灭。将反应混合物浓缩至原体积的1/3, 用二乙醚萃取四次。合并的有机层用盐水洗涤, $MgSO_4$ 干燥, 过滤并浓缩得到中间体20(57g), 直接用于下一步骤而没有纯化。

[0230] 步骤2:合成中间体21

[0231] 在聚丙烯瓶中将中间体20(57g)与二氯甲烷(200mL)混合。将该瓶冷却至0℃, 缓慢加入70%氟化氢-吡啶(50mL)。将混合物温热至室温过夜, 用乙酸乙酯(500mL)稀释反应混

合物, 倾入饱和 NaHCO_3 水溶液中。另外的固体 NaHCO_3 用于仔细地中和混合物直到鼓泡终止。分离有机层, 用乙酸乙酯($3 \times 500\text{mL}$)萃取水层。合并的有机层用1% HCl 水溶液、盐水洗涤, 干燥(MgSO_4), 过滤并浓缩得到粗制中间体21(54g), 直接用于下一步骤而没有纯化。

[0232] ^1H NMR: (CDCl_3): δ : 4.37(m, 2H), 3.96–2.70(m, 4H), 1.97–1.81(m, 4H)。

[0233] 步骤3: 合成中间体22

[0234] 0°C 向中间体21(54g; 340mmol)的2-丙醇(1000mL)和水(250mL)的混合物中加入硼氢化钠(20g, 509mmol)。搅拌混合物并在3小时内温热至室温。用丙酮淬灭反应, 搅拌另外1小时。通过倾析将澄清液体与固体分离。用另外 EtOAc 洗涤固体, 并倾析。将合并的有机溶液浓缩。通过快速硅胶柱色谱法, 用5–20% EtOAc 的己烷溶液洗脱纯化残余物, 提供呈液体的中间体22(22g, 40%, 用于3个步骤)。

[0235] ^1H NMR: (CDCl_3): δ : 3.82–3.77(m, 4H), 3.72–3.52(dd, $J=20.8, 6.4\text{Hz}$, 2H), 2.69(s, 1H), 1.82–1.60(m, 4H)。

[0236] 步骤4: 合成中间体23

[0237] 0°C 向中间体22(20g, 150mmol)和三乙胺(22.7g, 225mmol)的 DCM (200mL)混合物中加入 MsCl (25.8g, 225mmol)。室温搅拌混合物2小时, 然后加水。水层用 DCM ($2 \times 200\text{mL}$)萃取。干燥溶剂并除去得到粗制中间体23(30g, 100%), 直接用于下一步骤而没有进一步纯化。

[0238] ^1H NMR: (CDCl_3): δ : 4.22(d, $J=20.0\text{Hz}$, 2H), 3.87–3.82(m, 4H), 3.06(s, 3H), 1.88–1.68(m, 4H)

[0239] 步骤5: 合成中间体24

[0240] 120°C 向中间体23(10g, 47mmol)和 DMF (150mL)的混合物中加入 NaN_3 (16g, 250mmol)和 NaHCO_3 (9.3mg, 100mmol)。 120°C 搅拌混合物20小时, 用水淬灭反应, 用 EtOAc ($2 \times 300\text{mL}$)萃取。干燥溶剂并真空除去得到粗中间体24(8g), 直接用于下一步骤而没有进一步纯化。

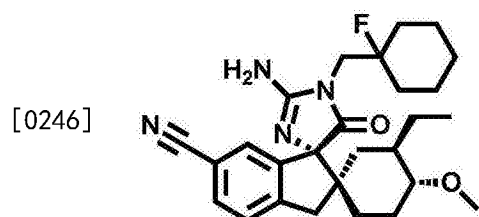
[0241] 步骤6: 合成中间体25

[0242] 氮气氛下向中间体24(8g, 50mmol)的乙酸乙酯(100mL)混合物中加入 Pd/C (0.8g, 10%含量), 将混合物脱气并与氢气交换3次。在1大气压的氢气气氛下室温搅拌最终混合物24小时。通过 $\text{Celite}^{\text{®}}$ 垫滤除催化剂并用 EtOAc ($2 \times 50\text{mL}$)洗涤。减压浓缩合并的滤液得到中间体25(5.3g, 80%)。

[0243] $^1\text{HNMR}$: (CD_3OD): δ : 3.83–3.79(m, 4H), 2.76–2.71(d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 1.83–1.65(m, 4H)。

[0244] ^{19}F NMR: (CD_3OD , 400MHz) δ : -169.66。

[0245] 实施例4

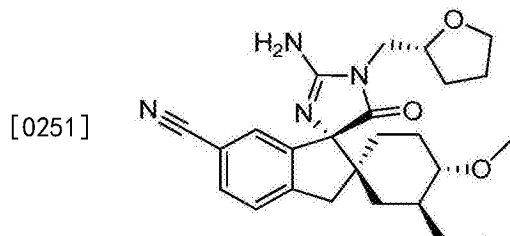


[0247] 实施例4由中间体11B按照与实施例1相同程序, 在步骤9中使用中间体25代替2-嘧啶甲胺来合成。

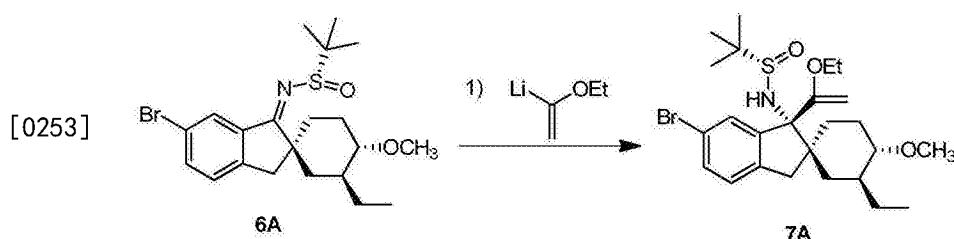
[0248] LC-MS: t_R =0.98分钟, MS(ESI) m/z 469[M+H]⁺。

[0249] ¹H-NMR: (CD₃OD) δ 7.64(d, 1H, J=8Hz), 7.50(d, 1H, J=8Hz), 7.31(s, 1H), 3.84-3.65(m, 6H), 3.36(s, 3H), 3.19(ap q, 2H, J=16Hz), 2.81(m, 1H), 2.17(m, 1H), 1.89-1.66(m, 6H), 1.50-1.37(m, 3H), 1.34(m, 2H), 1.20-1.11(m, 1H), 0.76(t, 3H, J=8Hz)。

[0250] 实施例5

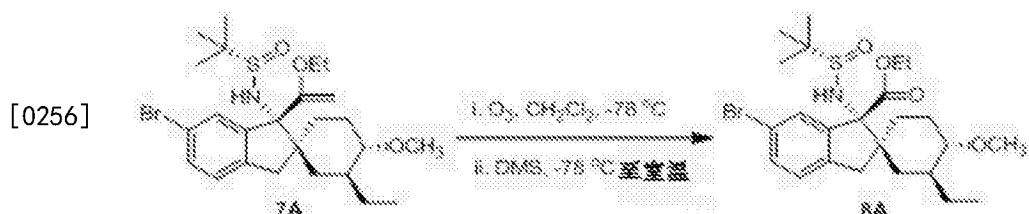


[0252] 步骤4: 合成中间体7A



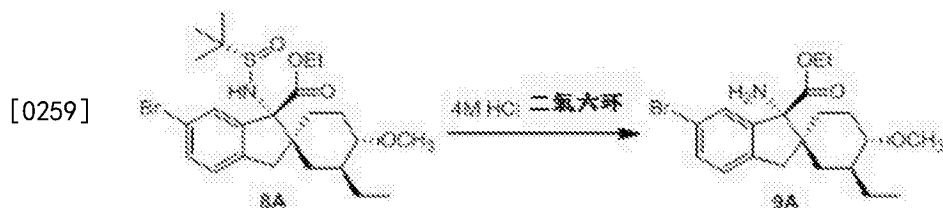
[0254] -78℃在N₂气氛下向乙氧基乙烯(1.3g, 17.0mmol)的无水THF(20mL)混合物中逐滴加入t-BuLi(13.0mL, 17.0mmol, 1.3M, 己烷), 搅拌混合物20分钟。然后0℃搅拌所得混合物另外45分钟, 加入化合物6A(1.5g, 3.4mmol)的无水THF(20mL)溶液, 并搅拌2.5小时。用饱和NH₄Cl(50mL)淬灭反应并用EtOAc(3×300mL)萃取。合并有机相并浓缩得到粗制产物。通过硅胶柱(石油醚:EtOAc=20:1)纯化得到化合物7A(1.2g, 69%), 按原样用于下一步骤。

[0255] 步骤5: 合成中间体8A



[0257] 将化合物7A(1.2g, 2.4mmol)的DCM:MeOH=5:1(20mL)混合物冰冷至-78℃, 鼓入臭氧通过混合物20分钟。-78℃用N₂吹扫混合物并用Me₂S(5mL)处理, 然后温热至室温并搅拌3小时。真空除去溶剂, 通过制备性TLC(石油醚:EtOAc=3:1)纯化残余物, 提供化合物8A(860mg, 70%)。LC-MS: t_R =1.333分钟; MS(ESI) m/z 516.1[M+H]⁺。

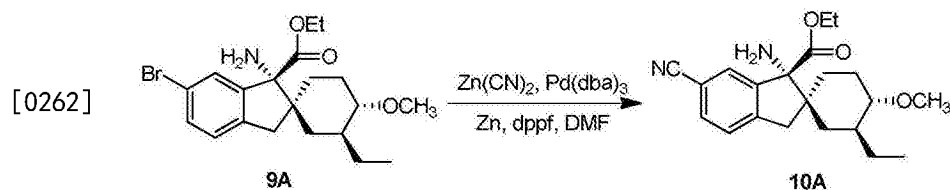
[0258] 步骤6: 中间体9A



[0260] 向化合物8A(860mg, 1.7mmol)的MeOH(10mL)混合物中加入4M HCl的二氧六环(2mL)

溶液。室温搅拌所得的混合物30分钟。减压除去溶剂得到粗制化合物9A(800mg),用于下一步骤而没有进一步纯化。LC-MS: $t_R=0.976$ 分钟;MS(ESI) m/z 361.1[M+H]⁺。

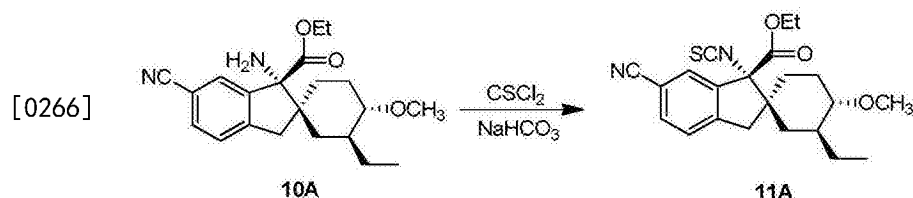
[0261] 步骤7:合成中间体10A



[0263] 在CEM微波反应器中将化合物9A(500mg, 1.9mmol)、Zn(CN)₂(300mg, 2.6mmol)、Pd₂(dba)₃(150mg, 0.16mmol)、dppf(160mg, 0.32mmol)和Zn粉(60mg, 0.9mmol)的DMF(15mL)的混合物加热至120℃,持续3小时。真空浓缩混合物,通过硅胶柱(洗脱剂:石油醚:EtOAc, 20:1至8:1)纯化残余物,得到化合物10A(300mg, 40%)。

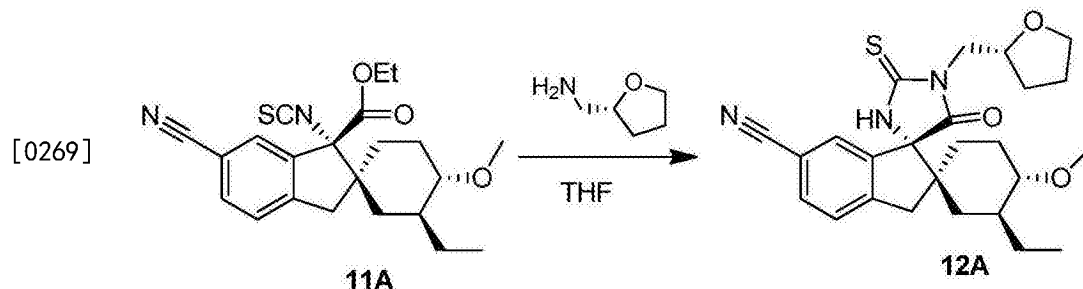
[0264] LC-MS: $t_R=0.880$;MS(ESI) m/z 308.1[M+H]⁺。

[0265] 步骤8:合成中间体11A



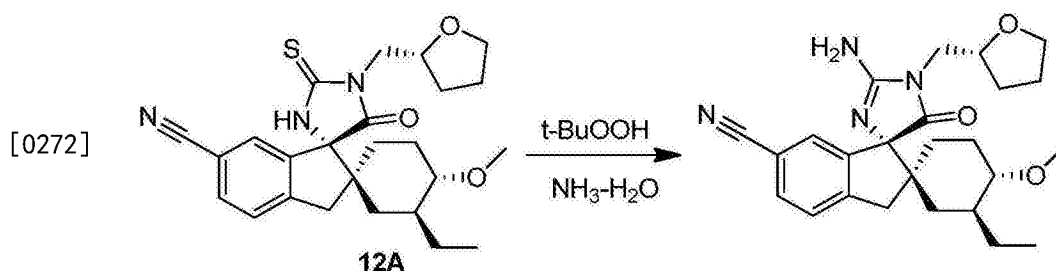
[0267] 向10A(300mg, 0.84mmol)的DCM(10mL)、H₂O(10mL)和NaHCO₃(655mg, 8.4mmol)的混合物中加入二氯硫化碳(180mg, 1.68mmol)。搅拌混合物50分钟,然后用DCM(3×40mL)萃取,用盐水(2×40mL)洗涤,干燥并减压除去溶剂得到粗制化合物11A(300g,),用于下一步骤而没有进一步纯化。

[0268] 步骤9:合成中间体12A



[0270] 向化合物11A(200mg, 0.50mmol)的THF(10mL)溶液中加入R-(2-氨基甲基)四氢呋喃(61mg, 0.6mmol)和三乙胺(2mL, 5.0mmol)。室温搅拌混合物过夜。用水稀释反应并用EtOAc(30mL)萃取。残余物通过柱色谱法(石油醚:EtOAc=10:1)纯化得到12A(180mg, 79%)。

[0271] 步骤10:合成实施例5

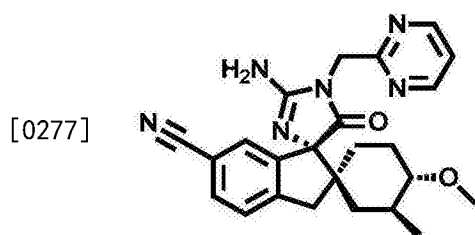


[0273] 将中间体12A(250mg, 0.54mmol)的MeOH(10mL)和NH₄OH(3mL)的混合物加入到t-BuO₂H(1mL, 9M, 己烷)的溶液并室温搅拌24小时。用饱和Na₂S₂O₃(0.5mL)淬灭反应。残余物在EtOAc(20mL)和H₂O(10mL)之间分配。分离有机层并用盐水(10mL)洗涤,干燥,过滤并真空浓缩。残余物用HPLC(方法1)纯化提供实施例5(89.10mg, 52%)。

[0274] LC-MS: tR=0.971分钟, MS(ESI)m/z 437.2[M+H]⁺。

[0275] ¹H NMR: (CD₃OD): δ7.60(dd, J=8.0, 1.6Hz, 1H), 7.46(d, J=7.6Hz, 1H), 7.28(s, 1H), 4.08-4.01(m, 1H), 3.63-3.90(m, 4H), 3.33(s, 3H), 3.09-3.20(m, 2H), 2.74-2.79(m, 1H), 1.80-2.06(m, 5H), 1.65-1.78(m, 1H), 1.55-1.64(m, 2H), 1.29-1.35(m, 3H), 1.07-1.29(m, 1H), 0.89-0.96(m, 1H), 0.85(t, J=7.6Hz, 3H)。

[0276] 实施例6

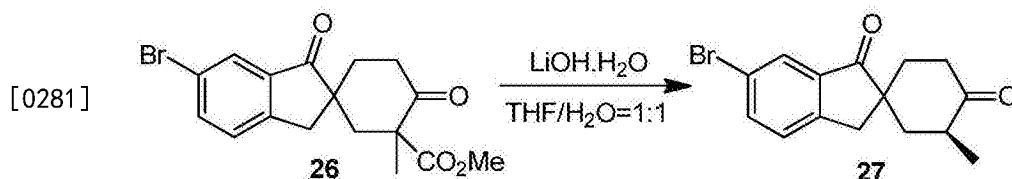


[0278] 步骤1: 合成中间体27

[0279]



[0280] 向烘干的3L烧瓶中装入6-溴-1-茚满酮(indanone)(100g, 473.8mmol)、丙烯酸甲酯(86.4g, 90mL, 995mmol, 2.1当量)和无水THF(800mL),将烧瓶浸于冰水冷却浴中并搅拌。起初,仔细加入tBuOK(0.5g),2分钟后,再加入另外份的tBuOK(0.5g)。移去冷却浴,经20分钟将剩余的tBuOK(63g)等份加入(总计64g, 568.6mmol, 1.2当量)。室温搅拌混合物另外2小时。向反应混合物中加入DMF(240mL),随后加入MeI(134.6g, 60mL, 947.6mmol, 2.0当量),搅拌混合物另外2小时。用10%柠檬酸溶液淬灭反应。然后在过滤之前减压浓缩反应混合物除去大部分溶剂。用水,随后用MeOH洗涤滤饼,得到粗制中间体26(200g),直接用于下一步骤。

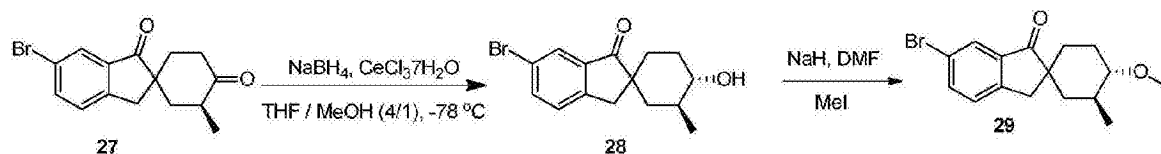


[0282] 向化合物26(200g, 547.6mmol, 粗制)的THF/H₂O(1.8L/1.8L)溶液加入LiOH·H₂O

(92g, 2190mmol, 4.0当量)。室温搅拌混合物16小时, 然后70℃搅拌12小时。减压浓缩反应混合物以除去THF并过滤。用H₂O洗涤滤饼, 然后与MeOH(50mL)搅拌几分钟并再次过滤, 用另外量MeOH(50mL)洗涤。收集固体得到中间体27(75g, 51.7%)。

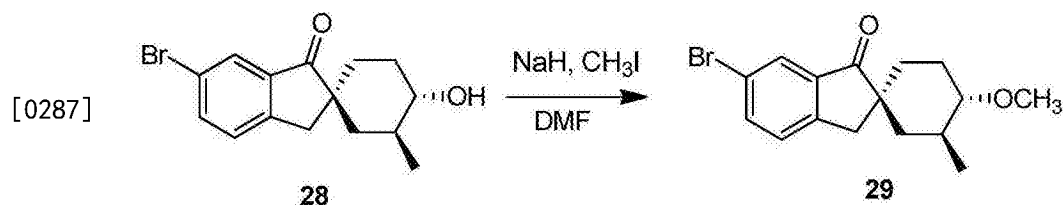
[0283] 步骤2: 合成中间体29

[0284]



[0285] 氮气氛下向三颈烧瓶中装入CeCl₃·7H₂O(1.2g, 3.3mmol)和无水MeOH(60mL)并搅拌得到澄清溶液。在氮气氛下加入化合物27(10.0g, 32.6mmol)和无水THF(240mL), 将混合物冷却至-78℃。氮气氛下-78℃加入NaBH₄(0.4g, 13.0mmol), 剧烈搅拌。-78℃搅拌混合物20分钟。-78℃通过加入饱和NH₄Cl水溶液(100mL)和H₂O(200mL)淬灭反应混合物, 同时搅拌。将混合物缓慢温热至室温。用EtOAc(3×150mL)萃取混合物。用H₂O(2×200mL)、盐水(2×200mL)洗涤合并的有机层, 干燥、过滤并真空浓缩, 通过硅胶柱色谱法纯化残余物, 用石油醚:EtOAc(20:1至3:1)洗脱, 提供中间体28(7.5g, 75%)。LC-MS: t_R=3.195分钟: MS(ESI)m/z 311.0[M+H]⁺。

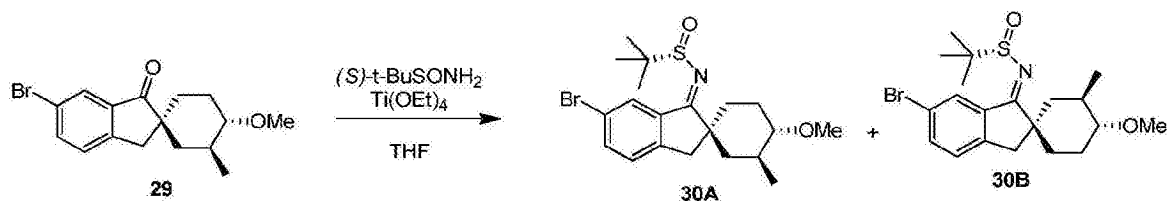
[0286] ¹H NMR: (CDCl₃): δ7.59(s, 1H), 7.22-7.25(d, J=8.4Hz, 1H), 7.08(s, 1H), 6.88-6.91(dd, J=2.4, 8.4Hz, 1H), 6.80-6.81(d, J=2.4Hz, 1H), 5.84(s, 1H), 4.87(s, 2H), 4.31-4.36(m, 2H), 3.50-3.55(q, J=6.8Hz, 2H), 3.15-3.25(m, 1H), 3.09-3.14(d, J=15.6Hz, 1H), 3.00-3.06(d, J=15.2Hz, 1H), 1.90-2.10(m, 3H), 1.25-1.50(m, 5H), 1.15-1.25(t, J=6.4Hz, 3H)。



[0288] 0℃向化合物28(6.18g, 20mmol)的DMF(20mL)混合物中加入NaH(60%于矿物油中, 0.96g, 40mmol)。然后0℃搅拌混合物2小时, 然后向混合物中加入MeI(3.5mL)并搅拌过夜。用EtOAc(40mL)和H₂O(40mL)稀释混合物, 用EtOAc(2×60mL)萃取。将合并的有机相干燥, 除去溶剂得到中间体29(5.0g)。

[0289] 步骤2: 合成中间体30A和30B

[0290]

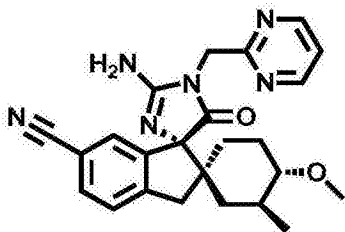


[0291] 向中间体29(5.0g, 15.3mmol)的THF(100mL)溶液中加入Ti(OEt)₄(35.0g, 153mmol)。室温搅拌1小时后, 加入(S)-N-叔丁基亚磺酰胺(7.4g, 61.2mmol)。搅拌反应混合

物回流过夜,混合物在H₂O(80mL)和EtOAc(80mL)之间分配。过滤混合物,滤液用EtOAc(3×80mL)萃取。用盐水(50mL)洗涤合并的有机层,干燥,浓缩得到残余物。通过硅胶柱色谱(石油醚:EtOAc=20:1)以以下顺序洗脱纯化所述残余物提供中间体30A(1.6g,35%) and 30B(1.4g,33%)。

[0292] 合成实施例6

[0293]



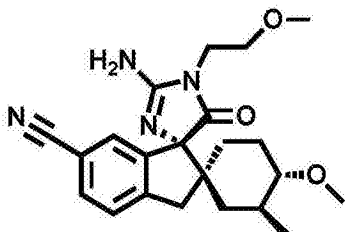
[0294] 如实施例5步骤4-10所示,对中间体30A进一步详细说明。在步骤9中,使用2-氨基乙基嘧啶代替R-(2-氨基乙基)四氢呋喃。

[0295] LC-MS: tR=1.05MS(ESI)m/z 431.4[M+H]⁺。

[0296] ¹H NMR:(CD₃OD):δ8.78(d,J=4.8Hz,2H),7.76(s,1H),7.75(dd,J=6.0,1.6Hz,1H),7.56(d,J=8.4Hz,1H)7.44(t,J=5.2Hz1H),5.16(m,2H),3.38(s,3H),3.24(m,2H),2.79(m,1H),2.15(m,1H),1.74(m,1H),1.65(d,J=6.8Hz,1H),1.39-1.57(m,4H),0.99(d,J=6.4Hz,3H)。

[0297] 实施例7

[0298]



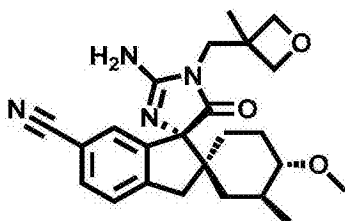
[0299] 按照与实施例6所述相似的程序合成该化合物。如实施例1步骤4-10所述,对中间体30A进一步详细说明。步骤9中使用(2-甲氧基)乙胺,随后按照步骤10所述氧化获得实施例7。

[0300] LC-MS: tR=1.08分钟,MS(ESI)m/z 397[M+H]⁺。

[0301] ¹H NMR:(CD₃OD)δ7.74(d,1H,J=8Hz),7.63(d,1H,J=1Hz),7.57(d,1H,J=8Hz),4.02-3.95(m,1H),3.89-3.83(m,1H),3.54(m,2H),3.36(s,3H),3.35(s,3H),3.24(ap q,2H,J=16Hz),2.75(m,1H),2.10(m,1H),1.79(dt,1H,J=13,2Hz),1.56(m,1H),1.41(m,3H),1.14(t,1H,J=13Hz),1.01(d,3H,J=6Hz)。

[0302] 实施例8

[0303]



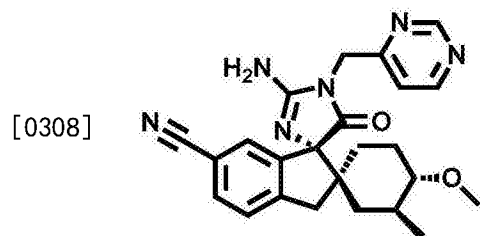
[0304] 按照与实施例6所述相似的程序合成该化合物。按照实施例1步骤9所述使用(3-甲

基氧杂环丁烷(methyloxetan)-3-基)甲胺,随后如步骤10所述氧化获得实施例8。

[0305] LC-MS: $t_R=0.930$ 分钟,MS(ESI) m/z 423.0 $[M+H]^+$ 。

[0306] 1H NMR: (CD_3OD): δ 7.66–7.64(d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.51–7.49(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.34(s, 1H), 4.72–4.67(m, 2H), 4.29–4.25(m, 2H), 3.74–3.59(m, 2H), 3.37(s, 3H), 3.25–3.14(m, 2H), 2.74–2.67(m, 1H), 2.08–2.03(m, 1H), 1.80–1.53(m, 3H), 1.30(m, 5H), 1.08(m, 1H), 0.90(m, 3H)。

[0307] 实施例9

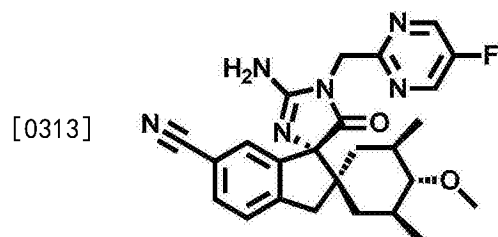


[0309] 按照与实施例6所述相似的程序合成该化合物。按照实施例1步骤9所述使用4-(氨基甲基)嘧啶,随后如实施例6步骤10所述氧化获得实施例9。

[0310] LCMS: $t_R=0.88$ 分钟,MS(ESI) m/z 431.2 $[M+H]^+$ 。

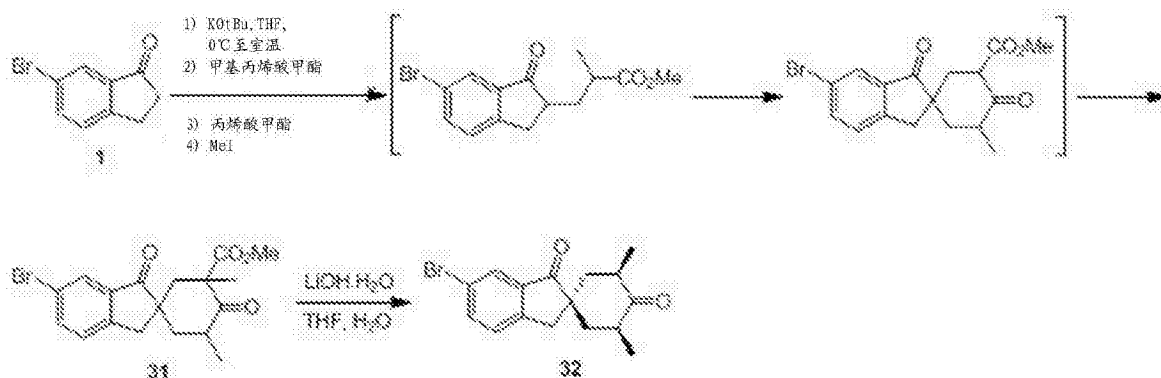
[0311] 1H NMR: (CD_3OD): δ 9.05(s, 1H), 8.70–8.71(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 7.60–7.62(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.44–7.47(m, 3H), 4.86(s, 2H), 3.35(s, 3H), 3.10–3.20(q, 2H), 2.70–2.71(m, 1H), 2.04–2.06(m, 1H), 1.70(m, 2H), 1.491(m, 1H), 1.30–1.33(m, 2H), 1.15–1.18(m, 1H), 0.95–0.96(d, $J=6.0$ Hz, 3H)。

[0312] 实施例10



[0314] 步骤1:合成中间体32

[0315]

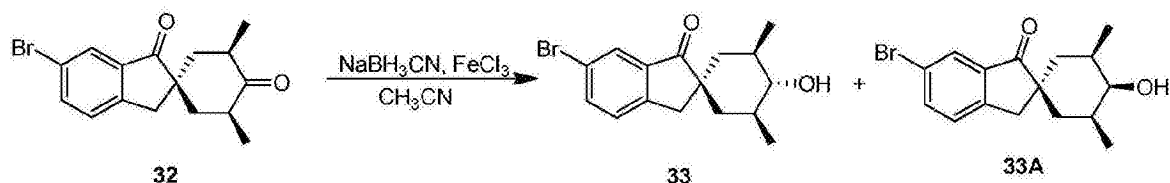


[0316] 0°C向6-溴-茚满-1-酮(100.00g, 473.8mmol)的无水THF(1L)的混合物中添加t-BuOK(58.5g, 521.2mmol, 1.1当量),2分钟后将混合物温热至室温,搅拌另外10分钟,然后加入一份甲基丙烯酸甲酯(49.8g, 53.2mL, 497.5mmol, 1.05当量)。2小时后,向反应混合物中

添加丙烯酸甲酯(49.0g, 51.2mL, 568.6mmol, 1.2当量)。室温3小时后, 向反应混合物中添加MeI(101g, 44.3mL, 710.7mmol, 1.5当量), 搅拌16小时。加入H₂O(1L), 随后加入LiOH·H₂O(79.5g, 1895.2mmol, 4.0当量), 室温搅拌混合物28小时。减压除去THF。用H₂O(1L)稀释残余物并过滤, 用H₂O洗涤直到滤液为中性。用MeOH洗涤产物得到50g中间体32。

[0317] 步骤2: 合成中间体33

[0318]

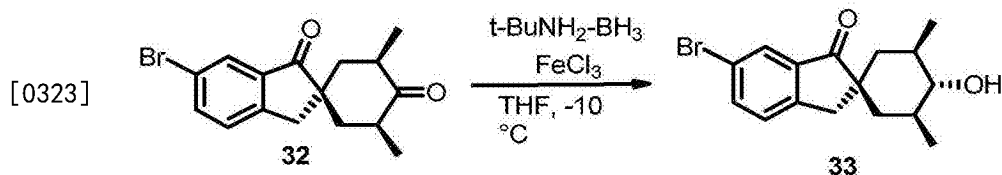


[0319] 0℃向中间体32(60.0g, 186.9mmol)和FeCl₃(33.0g, 205.5mmol, 1.1当量)的THF(600mL)混合物中添加NaBH₃CN(29.4g, 367.1mmol, 2.5当量)。将混合物温热至室温并室温搅拌1小时。加入水淬灭反应并真空除去THF。用DCM(3x200mL)萃取。用H₂O和盐水洗涤合并的有机相, 真空浓缩得到粗制产物, 通过硅胶柱色谱纯化产生化合物33(25.2g, 42%)和33A(12.0g)。

[0320] LC-MS: tR=1.239分钟, MS(ESI)m/z 323.1[M+H]⁺。

[0321] ¹H-NMR(CDCl₃): δ: 7.889–7.894(s, 1H), 7.671–7.696(d, 1H), 7.311–7.332(d, 1H), 3.605(s, 1H), 2.981(s, 2H), 1.769–1.797(m, 4H), 1.072–1.082(m, 2H), 1.019–1.056(m, 6H)。

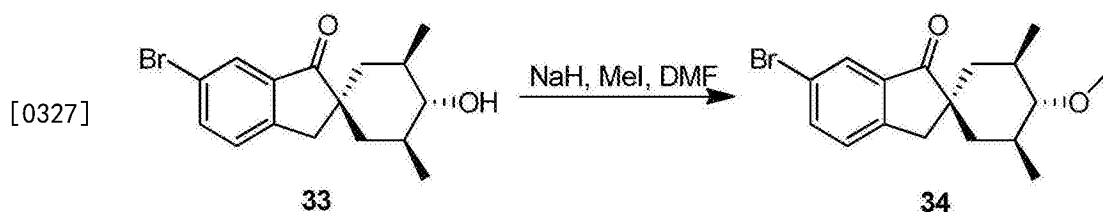
[0322] 步骤2: 中间体33的替代合成



[0324] 将FeCl₃(6.0 g, 37.0mmol)和甲苯(60mL)的混合物冷却至0℃。然后向混合物中加入化合物32(11.9g, 37.0mmol)的THF(48mL)混合物。0℃搅拌混合物5分钟, 然后冷却至-10℃。-10℃向反应混合物中逐滴加入t-BuNH₂-BH₃(3.5g, 40.7mmol)的THF(12mL)溶液。约-10℃搅拌反应混合物30分钟, 用6N HCl水溶液(10mL)淬灭, 约0℃搅拌30分钟, 然后温热至室温。浓缩混合物以除去THF, 加入甲苯(60mL)。除去水层, 有机相用水(3x60mL)洗涤。将有机相浓缩至1/2体积, 加热至50℃获得溶液, 然后1小时内冷却至0℃并在0℃保持1小时。过滤固体并用冷(0℃)甲苯(12mL)洗涤, 真空干燥提供化合物33(9.93g, 83%)。

[0325] LC-MS: tR=2.36分钟, MS(ESI)m/z 323.0/325.0[M+H]⁺。

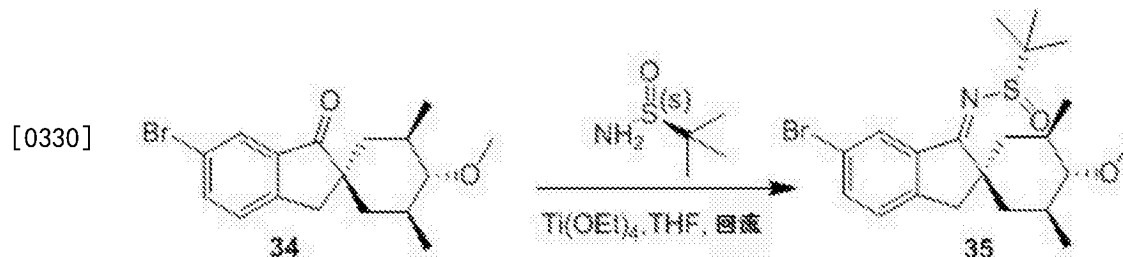
[0326] 步骤3: 合成中间体34



[0328] 0℃向化合物33(20.0g, 61.9mmol)和DMF(200mL)的混合物添加NaH(5.0g,

123.8mmol, 2.0当量)。然后0℃搅拌15小时,并在0℃添加MeI(17.6g, 123.8mmol, 2.0当量)。然后温热至室温,室温搅拌1.5小时。用H₂O淬灭混合物并用EtOAc萃取。用H₂O和盐水洗涤合并的有机相,干燥,浓缩得到粗制产物,通过硅胶柱(洗脱剂:石油醚:EtOAc, 100/1至5/1)得到中间体34(20g, 96.2%)。

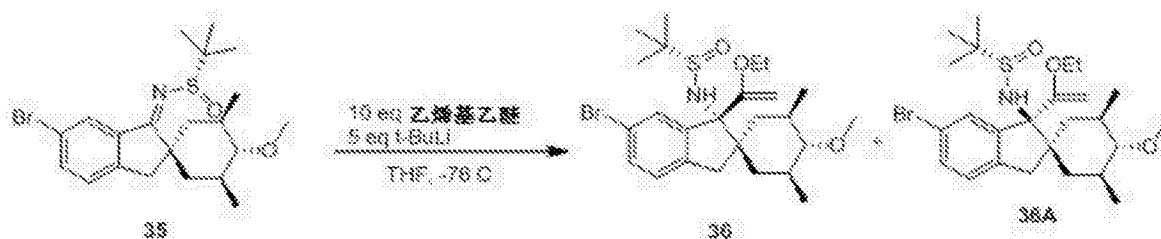
[0329] 步骤4:合成中间体35



[0331] 将化合物34(20.0g, 59.3mmol)和乙氧化钛(IV)(108.2g, 474.4mmol)的无水THF(200mL)混合物室温搅拌1小时。加入(S)-N-叔丁基亚磺酰胺(29g, 237.2mmol)。所得混合物在N₂气氛下80℃搅拌过夜。然后冷却反应混合物并添加水(400mL)。过滤混合物,水层用EtOAc(3×400mL)萃取。干燥分离的有机相,减压浓缩提供粗制产物。通过硅胶柱色谱(石油醚:EtOAc=20:1)纯化残余物提供中间体35(18.4g, 70.5%)。

[0332] 步骤5:合成中间体36

[0333]

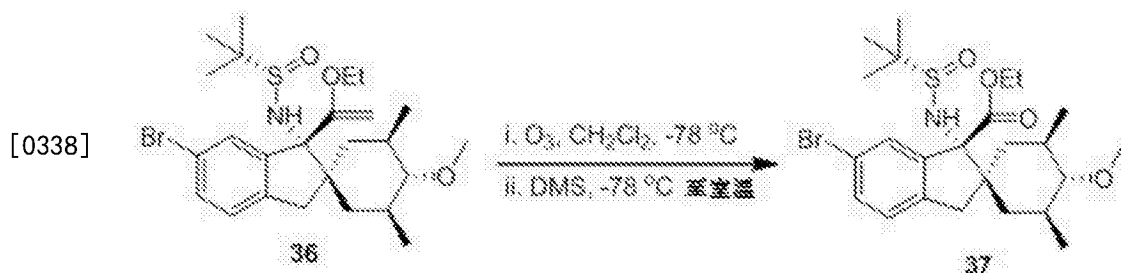


[0334] -78℃在N₂下将t-BuLi(131mL, 170.3mmol, 1.3M于己烷中)逐滴加入到乙烯基乙醚(12.3g, 170.3mmol, 5.0当量)的无水THF(100mL)溶液,并搅拌20分钟。然后0℃搅拌所得混合物另外45分钟。重新将溶液冷却至-78℃,逐滴加入化合物35(15.0g, 34.1mmol)的无水THF(50mL)溶液,-78℃搅拌混合物2小时。用饱和NH₄Cl(50mL)淬灭反应混合物,用EtOAc(3×300mL)萃取。浓缩有机相得到残余物,通过硅胶柱色谱纯化得到中间体36(11g, 64.7%)和36A(1.441g, 100%纯度)。

[0335] LC-MS tR=5.676分钟;MS(ESI)m/z 514.2[M+H]⁺。

[0336] ¹H-NMR(CD₃OD):δ7.546(s, 1H), 7.454-7.479(d, 1H), 7.208-7.228(d, 1H), 4.620-4.755(d, 1H), 4.373-4.381(m, 1H), 4.048-4.055(m, 1H), 3.844-3.903(m, 2H), 3.458-3.474(s, 3H), 2.986-3.000(m, 2H), 2.326-2.377(m, 1H), 1.969-2.001(m, 1H), 1.671(s, 1H), 1.457-1.520(t, J=12Hz, 3H), 1.373-1.408(m, 2H), 1.328(s, 9H), 1.169-1.278(m, 5H), 1.073-1.106(d, 3H)。

[0337] 步骤5:合成中间体37



[0339] 将中间体36(4.8g, 9.37mmol)的DCM:MeOH=5:1(40mL)混合物冷冻至-78℃, 鼓入臭氧通过混合物20分钟。然后-78℃用N₂吹扫混合物并用Me₂S(10mL)处理, 然后温热至室温, 搅拌3小时。真空除去溶剂, 通过硅胶柱色谱(石油醚:EtOAc=20:1至8:1)纯化残余物提供中间体37(3.5g, 72.9%)。

[0340] LC-MS tR=1.297分钟; MS(ESI)m/z 516.1[M+H]⁺。

[0341] ¹H NMR(CDCl₃): δ7.84(s, 1H), 7.42-7.44(d, J=8.0Hz, 1H), 7.09-7.11(d, J=8.0Hz, 1H), 4.40(s, 1H), 4.26-4.39(m, 2H), 3.44(s, 3H), 2.93-2.97(d, J=15.6Hz, 1H), 2.70-2.74(d, J=15.2Hz, 1H), 2.22-2.30(t, J=10.0Hz, 1H), 1.75-1.79(m, 1H), 1.61-1.66(m, 1H), 1.54-1.57(m, 2H), 1.32-1.38(m, 4H), 1.14(s, 9H), 1.06-1.08(d, J=6.0Hz, 3H), 0.89-0.91(d, J=6.0Hz, 3H), 0.67-0.74(m, 1H)。

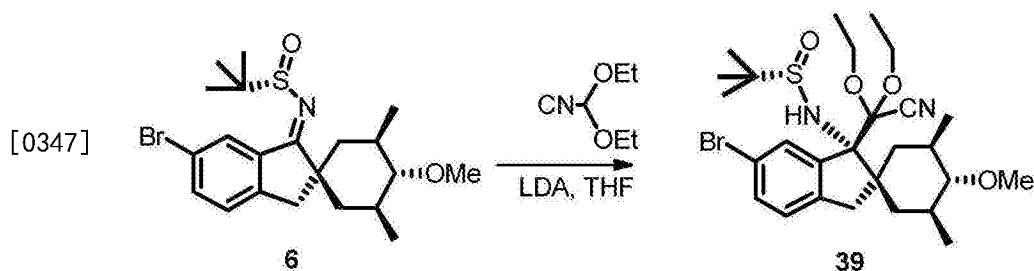
[0342] 步骤6: 合成中间体38



[0344] 向化合物37(860mg, 1.7mmol)的MeOH(10mL)溶液中加入4MHCl的二氧六环(2mL)溶液。搅拌所得混合物30分钟。减压除去溶剂得到粗制中间体38(800mg)。残余物用于下一步骤而没有进一步纯化。

[0345] 中间体38的替代合成

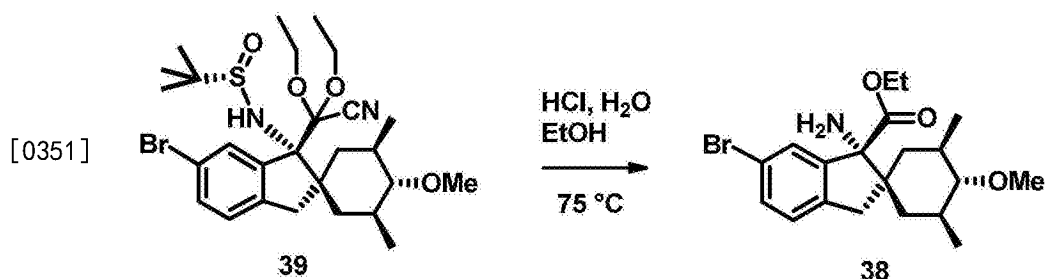
[0346] 步骤1: 合成中间体39



[0348] 将中间体6(5.00g, 11.4mmol), 二乙氧基乙腈(3.5mL, 24.4mmol)和THF(50mL)的混合物冷却至-7℃, 用LDA(25.0mL, 45.0mmol, 1.8M于THF/庚烷/乙苯)逐滴处理。-7至-2℃搅拌混合物2小时, 然后用水(50mL)和饱和NH₄Cl水溶液(25mL)淬灭。添加己烷(100mL), 分离该层。用水, 盐水洗涤有机层, 浓缩提供粗制中间体39(9.00g, 139%), 直接用于下一步骤。

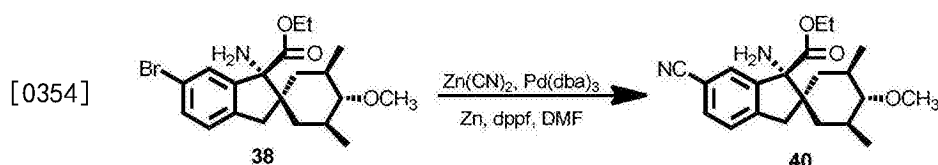
[0349] LC-MS: tR=3.74分钟, MS(ESI)m/z 523.2/525.2[M-OEt+H]⁺。

[0350] 步骤2: 合成中间体38



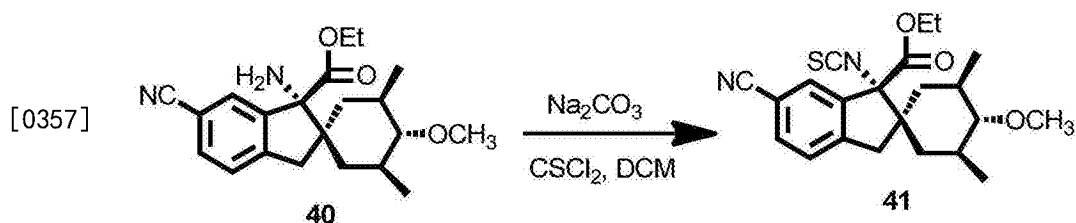
[0352] 用6N HCl(20mL)水溶液处理以上中间体39(9.00g, 11.4mmol)的EtOH(30mL)混合物。在75℃加热反应混合物24小时,冷却至室温。用甲苯(50mL)萃取反应,然后用2N NaOH水溶液(~60mL)将水相碱化至pH=8。添加甲苯(100mL),然后搅拌该层并分离。用NaHCO₃水溶液和盐水洗涤有机层并浓缩。添加己烷,再次浓缩溶液得到粗制中间体38(3.47g, 74%),直接用于下一步骤。LC-MS: tR=0.86min, MS(ESI)m/z 410.2/412.2[M+H]⁺。

[0353] 步骤7:合成中间体40



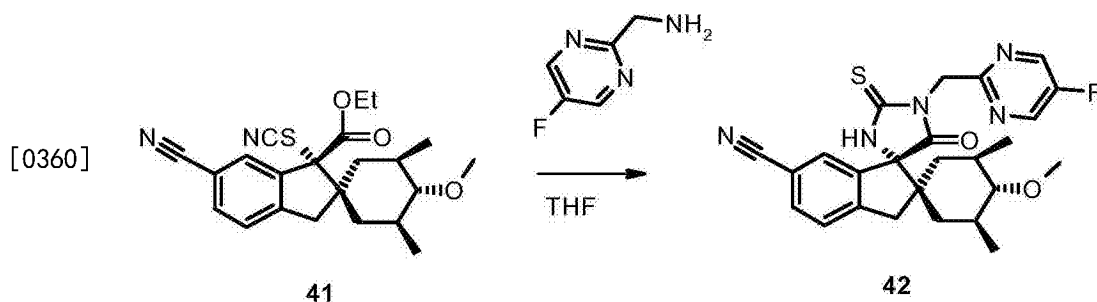
[0355] 中间体40使用与中间体10A的步骤7所述类似的方式合成。直接用于下一步骤。

[0356] 步骤8:合成中间体41



[0358] 中间体41使用与中间体11的步骤8所述类似的方式合成。在下一步骤直接使用粗制中间体41。

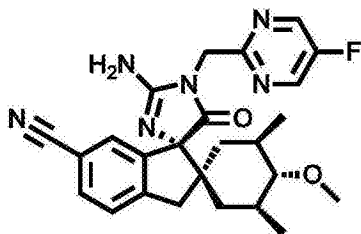
[0359] 步骤9:合成中间体42



[0361] 中间体42使用与中间体12A的步骤9所述类似的方式合成。粗制中间体42直接用于下一步步骤。

[0362] 步骤10:合成实施例10

[0363]



[0364] 向中间体42(400mg, 0.8mmol)的EtOH(8mL)溶液中添加 $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ (1mL)和叔丁基过氧化氢(1mL)。添加后,室温搅拌混合物12小时。真空蒸发除去溶剂。通过制备性HPLC方法1纯化残余物得到实施例6(65.0mg, 20%产率)。

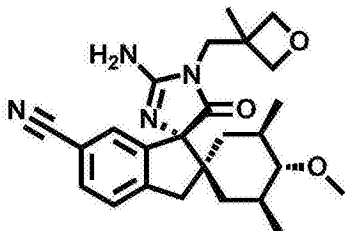
[0365] LC-MS: t_R =0.945分钟, MS(ESI) m/z 463.2 $[M+H]^+$ 。

[0366] ^1H NMR: (CD_3OD) δ 8.65–8.70(s, 2H), 7.60–7.65(d, J =7.2Hz, 1H), 7.45–7.55(m, 2H), 4.95–5.00(s, 2H), 3.40–3.45(s, 3H), 3.10–3.20(m, 2H), 2.30–2.40(m, 1H), 1.70–1.80(m, 3H), 1.45–1.55(m, 1H), 1.25–1.35(m, 2H), 0.90–1.00(m, 6H)。

[0367] ^{19}F NMR(400MHz, MeOD): -141.57。

[0368] 实施例11

[0369]



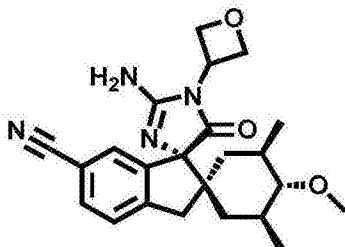
[0370] 按照实施例10所述程序合成实施例11。在步骤9中,使用(3-甲基氧杂环丁烷-3-基)甲胺代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺得到实施例11。

[0371] LC-MS: t_R =0.96分钟, MS(ESI) m/z 437 $[M+H]^+$ 。

[0372] ^1H NMR: (CD_3OD): δ 7.75(dd, J =7.6, 1.6Hz, 1H), 7.68(d, J =1.6Hz, 1H), 7.56(d, J =7.6Hz, 1H), 4.60(d, J =6.4Hz, 2H), 4.32(dd, J =8.0, 6.4Hz, 2H), 3.97(d, J =15.6Hz, 1H), 3.69(d, J =15.6Hz, 1H), 3.44(s, 3H), 3.25(m, 2H), 2.44(t, J =10.0Hz, 1H), 1.81–1.75(m, 2H), 1.67(m, 1H), 1.41(s, 3H), 1.36(m, 1H), 1.30–1.21(m, 2H), 1.07(d, J =6.4Hz, 3H), 0.98(d, J =6.4Hz, 3H)。

[0373] 实施例12

[0374]



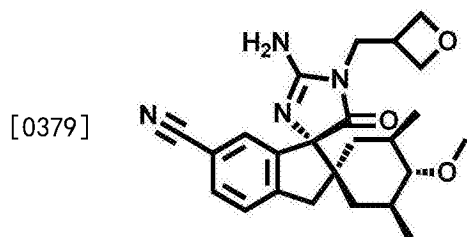
[0375] 按照实施例10所述程序合成实施例12。在步骤9中,使用2-氨基氧杂环丁烷代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺得到实施例12。

[0376] LC-MS: t_R =0.91分钟, MS(ESI) m/z 409 $[M+H]^+$ 。

[0377] ^1H NMR: (CD_3OD): δ 7.75(dd, J =7.6, 1.2Hz, 1H), 7.71(d, J =1.2Hz, 1H), 7.56(d, J

=7.6Hz, 1H), 5.28(m, 1H), 5.13(dd, J=14.0, 6.8Hz, 2H), 4.87(dd, J=8.0, 6.4Hz, 2H), 3.44(s, 3H), 3.26(m, 2H), 2.43(t, J=10.0Hz, 1H), 1.85-1.77(m, 2H), 1.68(m, 1H), 1.35-1.18(m, 3H), 1.03(d, J=6.4Hz, 3H), 0.97(d, J=6.4Hz, 3H)。

[0378] 实施例13

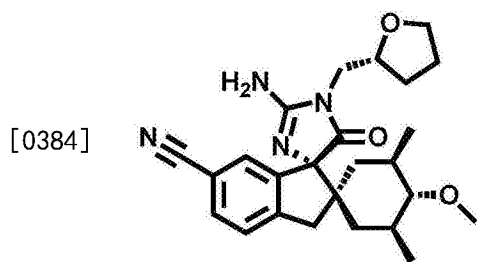


[0380] 按照实施例10所述程序合成实施例13。在步骤9中,使用氧杂环丁烷-3-基甲胺代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺得到实施例13。

[0381] LC-MS: t_R =0.904分钟;MS(ESI) m/z 423.3[M+H]⁺。

[0382] ¹H NMR:(CD₃OD): δ 7.60-7.62(d, J=8.0Hz, 1H), 7.45-7.47(d, J=8.0Hz, 1H), 7.27(s, 1H), 4.69-4.73(d, J=7.2Hz, 2H), 4.44-4.49(d, J=7.2Hz, 2H), 3.85-3.91(m, 1H), 3.74-3.80(m, 1H), 3.42(s, 3H), 3.34-3.38(m, 1H), 3.08-3.22(m, 2H), 2.32-2.37(t, J=10.0Hz, 1H), 1.61-1.71(m, 3H), 1.38(m, 1H), 1.19-1.23(m, 1H), 0.92-0.99(m, 7H)。

[0383] 实施例14

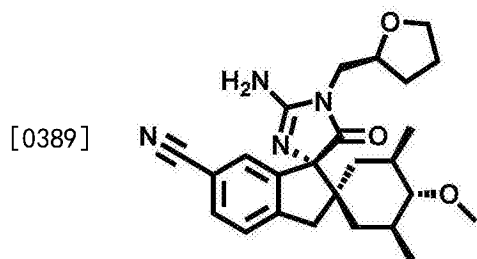


[0385] 按照实施例10所述程序合成实施例14。在步骤9中,使用(S)-2-(氨基甲基)-四氢呋喃代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺得到实施例14。

[0386] LC-MS: t_R =1.02分钟,MS(ESI) m/z 437[M+H]⁺。

[0387] ¹H NMR:(CD₃OD): δ 7.75(d, J=7.6Hz, 1H), 7.53(d, J=7.6Hz, 1H), 7.35(s, 1H), 4.16(m, 1H), 3.96(m, 1H), 3.83(m, 1H), 3.70(m, 2H), 3.50(s, 3H), 3.30(d, J=15.6Hz, 1H), 3.19(d, J=15.6Hz, 1H), 2.42(t, J=10.0Hz, 1H), 2.08-1.95(m, 3H), 1.88-1.1.63(m, 4H), 1.55(m, 1H), 1.40-1.30(m, 2H), 1.05(d, J=6.4Hz, 3H), 1.01(d, J=6.4Hz, 3H)。

[0388] 实施例15

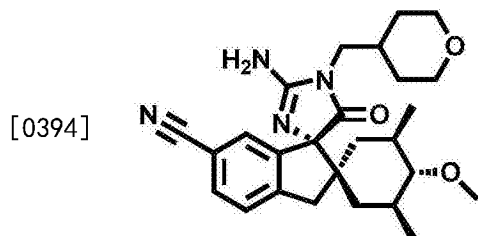


[0390] 按照实施例10所述每项程序合成实施例15。在步骤9中,使用(R)-2-(氨基甲基)-四氢呋喃代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺得到实施例15。

[0391] LC-MS: t_R = 1.02 分钟, MS(ESI) m/z 437 $[M+H]^+$ 。

[0392] 1H NMR: (CD_3OD): δ 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.88 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.66 (dd, J = 14.8, 3.2 Hz, 1H), 3.57 (dd, J = 14.8, 6.8 Hz, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.23 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 3.10 (d, 16.0 Hz, 1H), 2.35 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 2.01–1.86 (m, 3H), 1.76–1.50 (m, 4H), 1.44 (t, J = 13.2 Hz, 1H), 1.24 (m, 1H), 1.03 (t, J = 12.8 Hz, 1H), 0.98 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.4 Hz, 1H)。

[0393] 实施例16

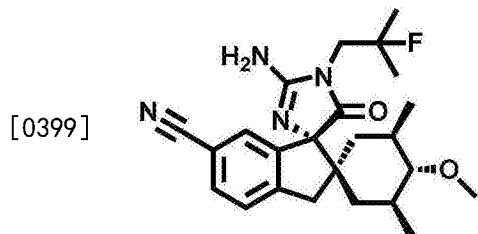


[0395] 按照实施例10所述每项程序合成实施例16。在步骤9中,使用2-(氨基甲基)-四氢吡喃代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺得到实施例16。

[0396] LC-MS: t_R = 0.958 分钟, MS(ESI) m/z 451.3 $[M+H]^+$ 。

[0397] 1H NMR (CD_3OD): δ 7.62–7.65 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.48–7.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 3.93–3.96 (m, 2H), 3.37–3.45 (m, 7H), 3.23–3.27 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 3.11–3.15 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 2.35–2.40 (t, J = 10.0 Hz, 1H), 1.96–2.03 (m, 1H), 1.53–1.80 (m, 5H), 1.23–1.46 (m, 4H), 0.92–1.08 (m, 7H)。

[0398] 实施例17



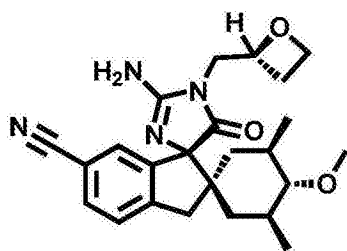
[0400] 按照实施例10所述程序合成实施例17。在步骤9中,使用中间体18代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺得到实施例17。

[0401] LC-MS: t_R = 0.969 分钟, MS(ESI) m/z 427.2 $[M+H]^+$ 。

[0402] 1H NMR: (CD_3OD): δ 7.63–7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.49–7.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 3.70–3.76 (m, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.13–3.28 (m, 2H), 2.36–2.41 (t, J = 10.0 Hz, 1H), 1.65–1.84 (m, 3H), 1.48–1.51 (m, 1H), 1.37–1.42 (m, 6H), 1.26–1.33 (m, 1H), 1.02–1.09 (m, 1H), 0.92–1.00 (m, 6H). ^{19}F NMR: (CD_3OD): δ -139.58。

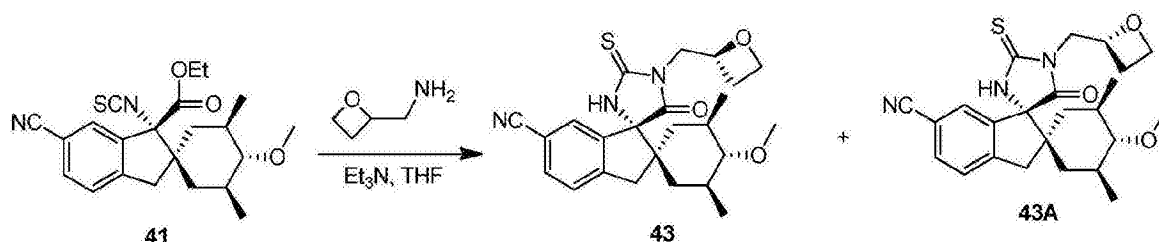
[0403] 实施例18

[0404]



[0405] 步骤9:合成中间体43

[0406]



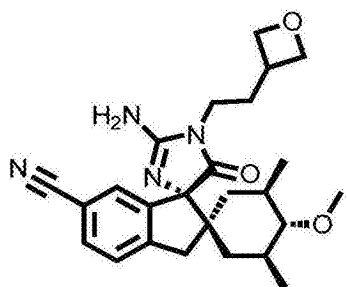
[0407] 向化合物41(1g, 2.51mmol)的THF(25mL)溶液中加入化合物2-(2-氨基甲基)氧杂环丁烷(262mg, 3.01mmol)和三乙胺(760mg, 7.53mmol)。室温搅拌混合物过夜。用EtOAc(45mL)、随后的饱和NaHCO₃水溶液(2×35mL)和盐水(2×35mL)稀释反应混合物。干燥后除去溶剂提供粗制化合物43和43A,使用SFC-方法A将其纯化。对映异构体由SFC-方法B分离。在这些条件下的第二峰是分离的期望的对映异构体43。如实施例10的步骤10所述的进一步详尽描述得到实施例18。

[0408] LC-MS: t_R =0.863分钟, MS(ESI) m/z 423.1[M+H]⁺。

[0409] ¹H NMR:(CD₃OD): δ 7.61-7.63(d, J=8.0Hz, 1H), 7.47-7.49(d, J=7.6Hz, 1H), 7.30(s, 1H), 4.95-5.01(m, 1H), 4.65-4.70(m, 1H), 4.52-4.58(m, 1H), 3.73-3.85(m, 2H), 3.43(s, 3H), 3.22-3.26(d, J=16.0Hz, 1H), 3.10-3.14(d, J=16.4Hz, 1H), 2.64-2.72(m, 1H), 2.33-2.45(m, 2H), 1.59-1.76(m, 3H), 1.40-1.49(m, 1H), 1.22-1.27(m, 1H), 0.93-1.07(m, 7H)。

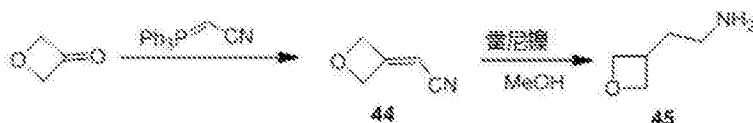
[0410] 实施例19

[0411]



[0412] 合成3-((2-氨基)乙基)氧杂环丁烷

[0413]



[0414] 步骤1:合成中间体44

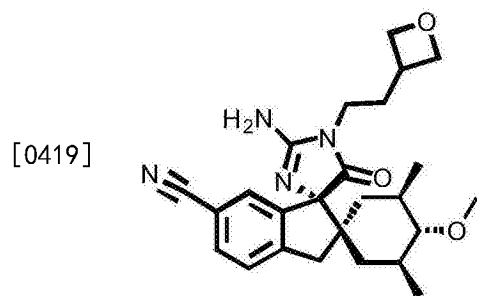
[0415] 向3-氧杂环丁酮(oxanone)(0.42g, 6mmol)的DCM(20mL)溶液中加入2-(三苯基亚

正膦基)(triphenylphosphoranylidene)乙腈(1.8g, 6mmol)并室温搅拌过夜。过这段时间后,减压除去溶剂提供粗制产物(260mg, 粗制),通过硅胶柱色谱法(石油醚:EtOAc, 3:1)提供呈白色固体的中间体44(260mg, 产率46%)。

[0416] 步骤2: 合成中间体45

[0417] 向中间体44(260mg, 2.74mmol)的MeOH(10mL)混合物中添加雷尼镍(Raney-Ni)(100mg), 室温在氢气氛下搅拌12小时。然后通过 Celite® 垫过滤混合物。浓缩滤液提供中间体45(200mg, 粗制)。

[0418] 实施例19

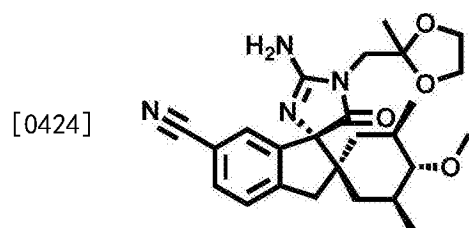


[0420] 按照实施例10所述程序合成实施例19。在步骤9中,使用中间体45合成得到实施例19。

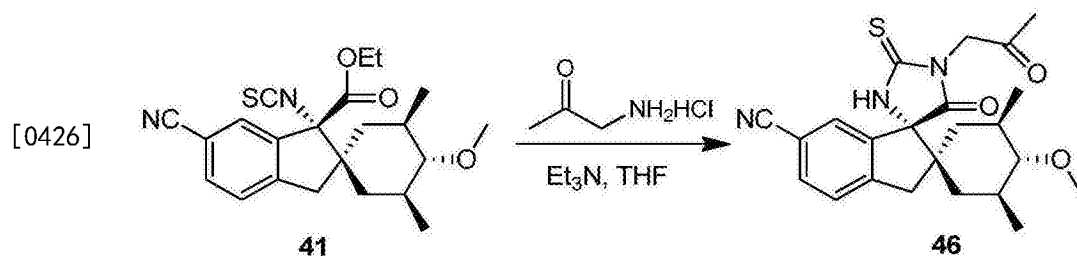
[0421] LCMS: tR=2.358分钟, MS(ESI)m/z 437.3[M+H]⁺。

[0422] ¹H NMR: (CD₃OD): δ7.64-7.66(d, 1H), 7.49-7.51(d, J=8.0Hz, 1H), 7.31(s, 1H), 4.74-4.79(d, 2H), 4.40-4.43(d, 2H), 3.49-3.52(m, 2H), 3.45(s, 3H), 2.95-3.27(m, 3H), 2.36-2.41(m, 1H), 1.97-2.05(m, 2H), 1.21-1.80(m, 5H), 1.01-1.09(m, 4H), 0.92-0.99(m, 3H)。

[0423] 实施例20

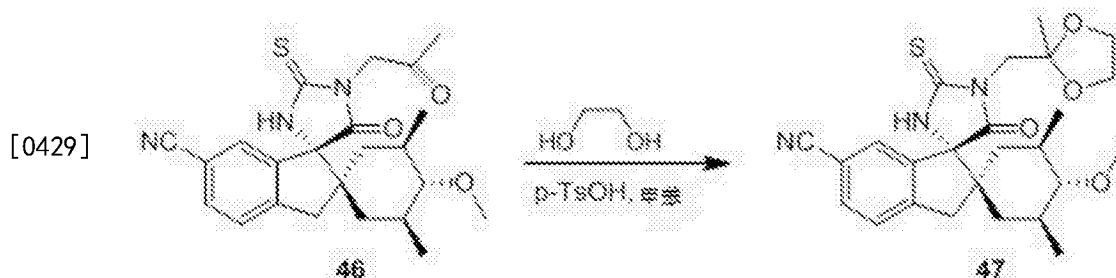


[0425] 步骤1: 合成中间体46



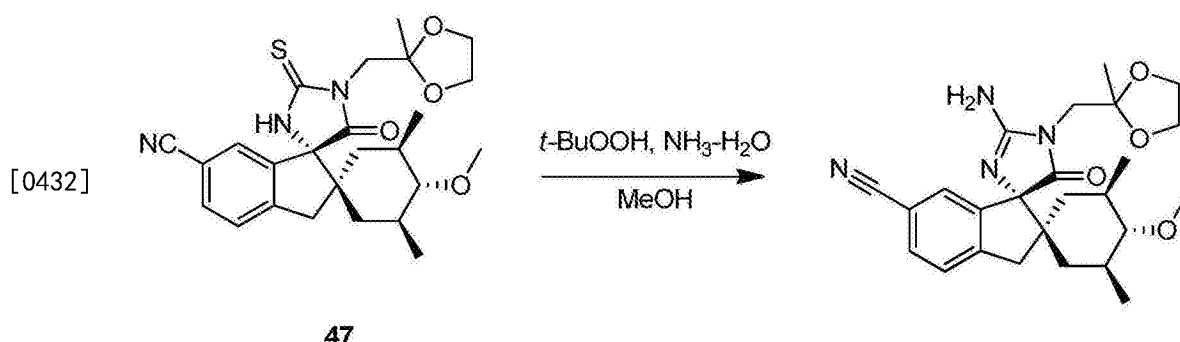
[0427] 向化合物41(100mg, 0.25mmol)的无水THF(3mL)溶液中添加2-氨基丙酮盐酸盐(41mg, 0.377mmol)和三乙胺(76mg, 0.754mmol)。室温搅拌混合物过夜。添加水(3mL)淬灭反应,用EtOAc(2×5mL)萃取。干燥合并的有机层,真空蒸发。通过制备性TLC纯化粗制材料得到化合物46(50mg, 24%)。

[0428] 步骤2:合成中间体47



[0430] 向化合物46(50mg,0.118mmol)的甲苯(3mL)溶液添加乙二醇(0.03mL)和对甲苯磺酸(1.1mg,0.0068mmol)。将溶液加热至回流2天。将反应混合物冷却至室温,添加盐水(3mL)。用EtOAc(2×5mL)萃取混合物。干燥合并的有机层并真空蒸发。通过制备性TLC纯化粗制材料提供化合物47(51mg,%)。

[0431] 步骤3:合成实施例20

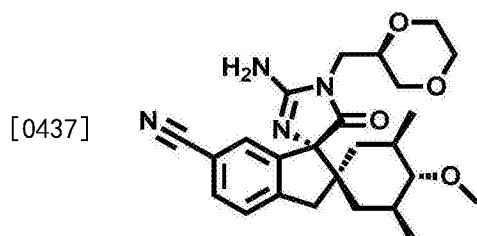


[0433] 向化合物47(51mg,0.113mmol)的MeOH(2.5mL)混合物中加入氨水(0.8mL)、t-BuOOH(2.5mL)。室温搅拌混合物过夜。然后添加饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2.5mL)淬灭反应。用EtOAc(2×5mL)萃取混合物。干燥合并的有机层并真空蒸发。通过基本的制备性HPLC纯化粗制材料得到呈白色固体的实施例20(12.8mg,25%)。

[0434] $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 7.60(d, $J=8.1\text{Hz}$,1H),7.50(d, $J=8.1\text{Hz}$,1H),7.22(s,1H),3.86-4.01(m,4H),3.64-3.75(m,2H),3.42(s,3H),3.03-3.23(m,2H),2.34(t,1H),1.61-1.84(m,3H),1.43(s,1H),1.20-1.37(m,4H),0.89-1.08(m,7H)。

[0435] LC-MS $t_R=0.891$ 分钟,MS(ESI) m/z 453.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0436] 实施例21



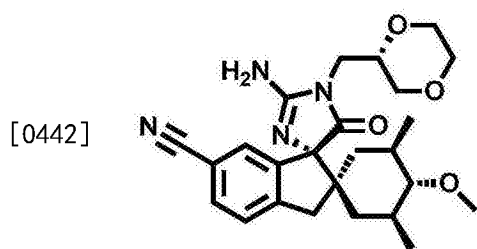
[0438] 按照实施例10所述程序合成实施例21。在步骤9中,使用(R)-(1,4-二氧六环-2-基)甲胺产生实施例21。

[0439] LC-MS: $t_R=0.928$ 分钟,MS(ESI) m/z 453.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0440] $^1\text{H NMR}$:(CD_3OD): δ 7.63-7.61(dd, $J=1.6\text{Hz}$,4.0Hz,1H),7.48(d,1H),7.3(s,1H),3.6-3.8(m,6H),3.6-3.5(m,2H),3.45(s,3H),3.3-3.1(m,3H),2.4(m,1H),1.8-1.6(m,3H),

1.6-1.4(m, 1H), 1.3-1.2(m, 1H), 1.1(m, 1H), 0.9-1.01(m, 6H)。

[0441] 实施例22

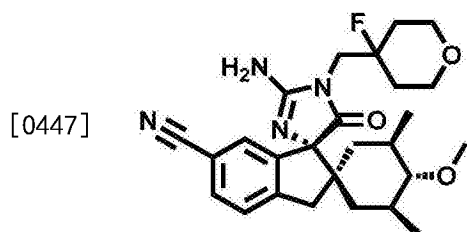


[0443] 按照实施例10所述程序合成实施例22。在步骤9中,使用(S)-(1,4-二氧六环-2-基)甲胺代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺产生实施例22。

[0444] LC-MS: t_R =0.928分钟, MS(ESI) m/z 453.3[M+H]⁺。

[0445] ¹H NMR: (CD₃OD): δ 7.63-7.61(dd, J=1.6Hz, 4.0Hz, 1H), 7.48(d, 1H), 7.3(s, 1H), 3.6-3.8(m, 6H), 3.6-3.5(m, 2H), 3.45(s, 3H), 3.3-3.1(m, 3H), 2.4(m, 1H), 1.8-1.6(m, 3H), 1.6-1.4(m, 1H), 1.3-1.2(m, 1H), 1.1(m, 1H), 0.9-1.01(m, 6H)。

[0446] 实施例23

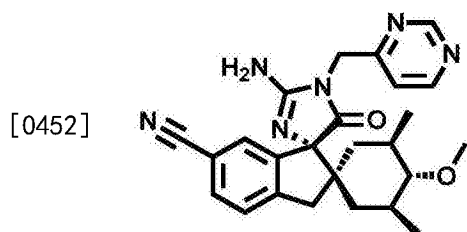


[0448] 按照实施例10所述程序合成实施例23。在步骤9中,使用中间体25产生实施例23。

[0449] LC-MS: t_R =0.918分钟, MS(ESI) m/z 469.2[M+H]⁺。

[0450] ¹H NMR: (CD₃OD): δ 7.62(d, J=8.0Hz, 1H), 7.48(d, J=8.0Hz, 1H), 7.27(s, 1H), 3.88-3.79(m, 3H), 3.73-3.62(m, 3H), 3.43(s, 3H), 3.25-3.09(m, 2H), 2.36(t, 1H), 1.81-1.60(m, 7H), 1.46(m, 1H), 1.23(m, 1H), 1.06(m, 1H), 0.99-0.92(m, 6H). ¹⁹F NMR: (CD₃OD 400MHz): δ -160.19。

[0451] 实施例24



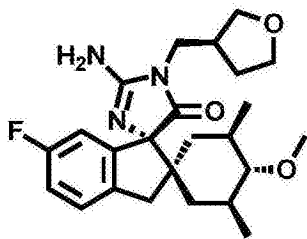
[0453] 按照实施例10所述程序合成实施例24。在步骤9中,使用3-嘧啶基-甲胺代替(5-氟嘧啶)-2-甲胺产生实施例24。

[0454] LC-MS: t_R =0.867分钟, MS(ESI) m/z 445.1[M+H]⁺。

[0455] ¹H NMR: (CD₃OD): δ 9.08(s, 1H), 8.74(d, J=5.2Hz, 1H), 7.65(d, J=7.6Hz, 1H), 7.48(m, 3H), 4.90(s, 2H), 3.46(s, 3H), 3.12-3.24(m, 2H), 2.41(m, 1H), 1.63-1.75(m, 3H), 1.49(m, 1H), 1.28(m, 2H), 1.02(d, J=6.4Hz, 3H), 0.96(d, J=6.4Hz, 3H)。

[0456] 实施例25

[0457]



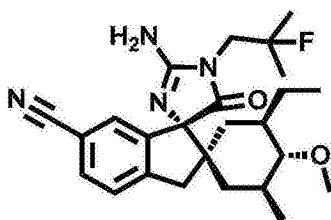
[0458] 按照与实施例18相似的方法合成实施例25。在步骤9中,使用(四氢呋喃-3-基)甲胺和通过SFC-方法B制备两种对映异构体。起因于SFC-方法B第二峰的对中间体的详尽说明产生了实施例26。

[0459] LCMS: $t_R=0.845$ 分钟; m/z 430.3[M+H]⁺。

[0460] ¹H NMR:(CD₃OD): δ 7.63–7.66(m, 1H), 7.49–7.51(m, 1H), 7.31(s, 1H), 3.84–3.93(m, 1H), 3.71–3.81(m, 2H), 3.48–3.63(m, 3H), 3.43(s, 3H), 3.11–3.31(m, 2H), 2.51–2.78(m, 2H), 1.22–2.09(m, 7H), 1.00–1.06(m, 4H), 0.93–0.99(m, 3H)。

[0461] 实施例26

[0462]



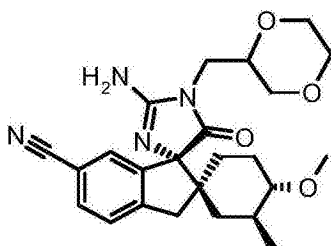
[0463] 使用与实施例1类似的方法合成实施例26。在合成实施例28中,在实施例1的步骤1,用甲基丙烯酸甲酯代替丙烯酸甲酯。在步骤3中,分离相应的极性异构体6B,并且如实施例1所述做进一步详尽说明。步骤9中,使用中间体17产生实施例28。

[0464] LC-MS: $t_R=1.16$ 分钟,MS(ESI) m/z 441[M+H]⁺。

[0465] ¹H NMR(CD₃OD): δ 7.64(dd, 1H, $J=8$, 2Hz), 7.50(d, 1H, $J=8$ Hz), 7.30(s, 1H), 3.73(dd, 2H, $J=22$, 4Hz), 3.44(s, 3H), 3.19(ap q, 2H, $J=16$ Hz), 2.49(t, 1H, $J=10$ Hz), 1.82–1.72(m, 2H), 1.71–1.63(m, 1H), 1.55(m, 1H), 1.42–1.33(m, 8H), 1.22–1.12(m, 1H), 1.08(t, 1H, $J=13$ Hz), 1.01(d, 3H, $J=6$ Hz), 0.79(t, 3H, $J=7$ Hz)。

[0466] 实施例27

[0467]



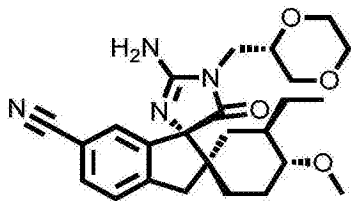
[0468] 按照实施例6所述方法合成实施例27。在步骤9中,使用(1,4-二氧六环-2-基)甲胺,随后如步骤10所述氧化产生实施例27。

[0469] LC-MS: $t_R=0.68$ 分钟,MS(ESI) m/z 439[M+H]⁺。

[0470] ¹H NMR:(CD₃OD, 400MHz) δ 7.67(未解析, 1H), 7.48(d, 1H), 7.20(未解析, 1H), 6.66(s, 2H), 3.78–2.97(m, 14H), 2.59(m, 1H), 1.92(m, 1H), 1.66(m, 2H), 1.42(m, 1H), 1.28–1.03(m, 2H), 0.89(d, 3H), 0.88(m, 1H)。

[0471] 实施例28

[0472]



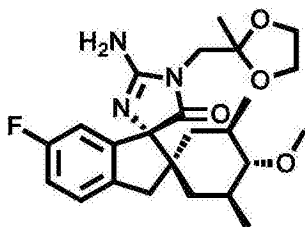
[0473] 根据实施例1相同的程序由实施例1中间体11B,并使用实施例1步骤9的S-2-(氨基甲基)二氧六环合成实施例28。

[0474] LC-MS: $t_R=0.894$ 分钟, MS(ESI) m/z 453.2 $[M+H]^+$ 。

[0475] 1H NMR:(CD_3OD): δ 7.63(dd, $J=7.6, 1.2$ Hz, 1H), 7.48(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.28(s, 1H), 3.61-3.85(m, 8H), 3.58(s, 3H), 3.56(s, 1H), 3.17(m, 2H), 2.77-2.82(m, 1H), 2.10-2.17(m, 1H), 1.85-1.88(m, 1H), 1.69-1.75(m, 1H), 1.37-1.45(m, 3H), 1.24-1.34(m, 2H), 1.09-1.15(m, 1H), 0.75(t, $J=7.6$ Hz, 3H)。

[0476] 实施例29

[0477]



[0478] 由6-氟-3-茚满酮开始,使用与实施例20类似的方法合成实施例29。

[0479] LC-MS $t_R=1.02$ 分钟; MS(ESI) m/z 446 $[M+H]^+$ 。

[0480] 1H NMR(CD_3OD): δ 7.26(dd, $J=8.4, 5.2$ Hz, 1H), 6.95(m, 1H), 6.62(dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, 1H), 4.02-3.89(m, 4H), 3.70(d, $J=14.8$ Hz, 1H), 3.65(d, $J=14.8$ Hz, 1H), 3.42(s, 3H), 3.12(d, $J=15.2$ Hz, 1H), 2.98(d, $J=15.2$ Hz, 1H), 2.34(t, $J=10.0$ Hz, 1H), 1.79-1.60(m, 3H), 1.43(m, 1H), 1.34(m, 1H), 1.32(m, 1H), 1.30(s, 3H), 1.00(m, 1H), 0.99(d, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.94(d, $J=6.0$ Hz, 3H)。

序列表

<110> 贝林格尔·英格海姆国际有限公司
生命医药公司

<120> β -分泌酶抑制剂

<130> 120573-00420

<140> PCT/US2013/028796

<141> 2013-03-04

<150> 61/606,786

<151> 2012-03-05

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

[0001] <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列说明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> HiLyte FluorTM488-Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9).. (9)
<223> Lys-(QXLTM520)-OH

<400> 1
Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Lys
1 5