



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101965189 A

(43) 申请公布日 2011.02.02

(21) 申请号 200980108890.5

(22) 申请日 2009.01.09

(30) 优先权数据

61/020,608 2008.01.11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.09.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/030680 2009.01.09

(87) PCT申请的公布数据

W02009/089508 EN 2009.07.16

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·韦尔斯 A·R·伦斯罗 D·沃兰

J·佐恩

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东 崔佳佳

(51) Int. Cl.

A61K 31/535 (2006.01)

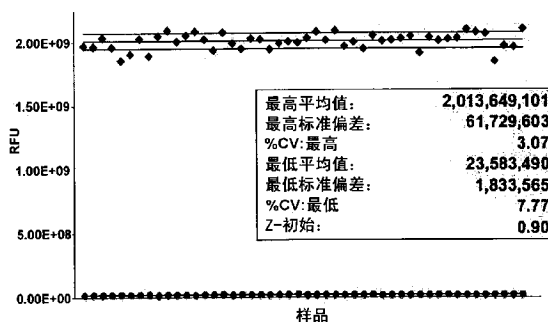
权利要求书 6 页 说明书 83 页 附图 6 页

(54) 发明名称

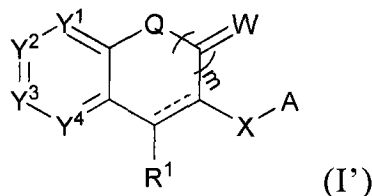
处决胱冬酶原 3、6 和 7 的激活剂

(57) 摘要

本发明提供作为胱冬酶原 3、6 和 / 或 7 的活化剂的化合物及其相关衍生物、药物组合物,它们的使用方法和这些化合物的制备方法。在一方面,这些化合物可用于治疗癌症和肿瘤疾病。



1. 式 I' 所示化合物或其药学上可接受的盐：



式中：

下标 m 是 0 或 1；

W 是 = O、= N-OR^a、= S，或者与和其相连的碳原子一起形成 CR^aR^a，其中各 R^a 独立为 -H、C₁₋₆ 烷基、芳基 -C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、-C₃₋₈ 环烷基，或者任选地，两个 R^a 取代基与和它们相连的碳原子一起形成具有 0-2 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的 5- 或 6- 元环，其中 R^a 的脂族部分任选被 1-3 个 R^b 取代基取代；

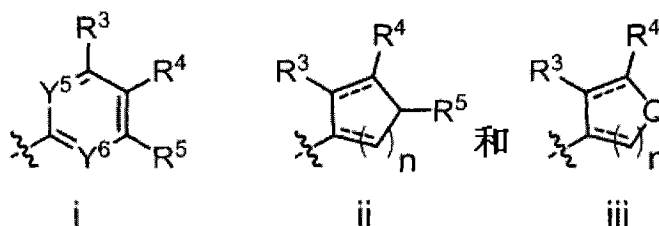
Q 是 -O- 或 N-R^a；

X 是键或选自下组：-C(=W¹)NH-、-C(=W¹)-C₀₋₄ 亚烷基-、-SO₂NH-、-C₀₋₄ 亚烷基-NHC(=W¹)-、-C₀₋₄ 亚烷基-NH(C=W¹)O-、-C₀₋₄ 亚烷基-NH(C=W¹)NH- 和 -C₀₋₄ 亚烷基-C(=W¹)-，其中各 W¹ 独立为 O、N-OR^a、S，或者与和其相连的碳原子一起形成 CR^aR^a；

Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵ 和 Y⁶ 各自独立为 C-R² 或 N，其中各 R² 独立选自下组：-H、芳基 -C₁₋₆ 烷基、-C₁₋₆ 烷基、-OC₁₋₆ 烷基、-OH、卤素、芳基 -C₁₋₆ 烷基 -NH- 和 -NHC₁₋₆ 烷基；

R¹ 独立为 -H、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基或 -C₃₋₈ 环烷基；

A 是 -C₁₋₆ 烷基 -R³ 或选自下 (i)、(ii) 或 (iii) 的结构：



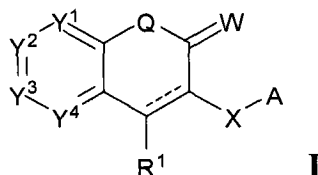
式中 R³、R⁴ 和 R⁵ 各自独立选自：-H、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 烷基氨基、-NH(C=O)R^b、-NHR^b、-OR^b 和 -R^b、-(C=O)R^b 和 -(C=O)NHR^b，其中 R^b 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基，或芳基，其中 R^b 的所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个独立选自下组的 R^k 成员取代：C₁₋₄ 烷基、芳基 -C₁₋₄ 烷基、卤素、卤代烷基、-OR^c、-SR^c、-CN、-NO₂、NR^cR^d、氧代、C₁₋₄ 烷基 (C=O)NH-、卤代烷氧基、-C(=O)C₁₋₄ 烷基、OC(=O)C₁₋₄ 烷基、-C(=O)OR^c、S(O)C₁₋₄ 烷基、S(O)₂ 杂环烷基和 S(O)₂C₁₋₄ 烷基，或者任选两个毗邻的 R^k 取代基与和它们相连的原子形成具有 1-2 个选自 O 或 N 的杂原子作为环成员的任选取代的稠合 5- 或 6- 元杂芳基或杂环烷基环；其中 R^c 和 R^d 各自独立选自下组：-H、C₁₋₆ 烷基、-R^e、-NHC₁₋₆ 烷基和 -NH(C=O)R^e，其中 R^e 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基，或芳基，其中所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个选自下组的 R^f 进一步取代：卤素、卤代烷基、-OH、-OR^g、-SR^g、-CN、-NO₂、NR^gR^g、氧代、卤代烷氧基、-C(=O)C₁₋₄ 烷基、OC(=O)C₁₋₄ 烷基、-C(=O)OR^g、S(O)C₁₋₄ 烷基和 S(O)₂C₁₋₄ 烷基，其中 R^g 是 C₁₋₆ 烷基；其中各下标 n 独立为选自 0、1、2 或 3 的整数；和

部分 是单键或双键；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 的脂族部分各自任选独立被选自下组的 1-3 个 R^b 取代基取代： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、 C_{3-8} 环烷基或 C_{2-6} 烯基，任选被以下取代： C_{1-6} 卤代烷基、卤素、OH、 C_{1-4} 烷氧基、 $-NHC_{1-4}$ 烷基、 $N(C_{1-4} \text{ 烷基})_2$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-O(C=O)C_{1-4}$ 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $-C(=O)C_{1-4}$ 烷基、 OR^c 、 SR^c 、 CN 、 $-NO_2$ 、 NR^cR^d 、 $C(=O)OC_{1-4}$ 烷基、 $S(O)C_{1-4}$ 烷基和 $S(O)_2C_{1-4}$ 烷基；和

前提是当 X 是 $-(C=O)-$ 时， R^3 不是 $-H$ 、烷基或 R^b ，并且下标 n 不是 0。

2. 式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐：



式中

W 是 $=O$ 、 $=N-OR^a$ 、 $=S$ ，或者与和其相连的碳原子一起形成 CR^aR^a ，其中各 R^a 独立为 $-H$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基 $-C_{1-6}$ 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 $-C_{3-8}$ 环烷基或者任选地，两个 R^a 取代基与和它们相连的碳原子一起形成具有 0-2 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的 5- 或 6- 元环，其中 R^a 的脂族部分任选被 1-3 个 R^b 取代基取代；

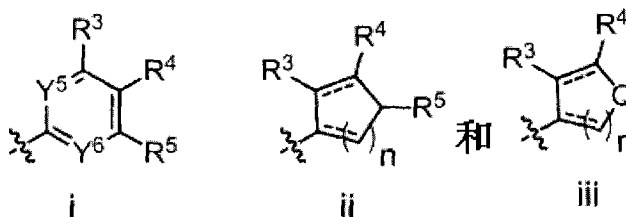
Q 是 $-O-$ 或 $N-R^a$ ；

X 是键或选自下组： $-C(=W^1)NH-$ 、 $-C(=W^1)-C_{0-4}$ 亚烷基 $-$ 、 $-SO_2NH-$ 、 $-C_{0-4}$ 亚烷基 $-NHC(=W^1)-$ 、 $-C_{0-4}$ 亚烷基 $-NH(C=W^1)O-$ 、 $-C_{0-4}$ 亚烷基 $-NH(C=W^1)NH-$ 和 $-C_{0-4}$ 亚烷基 $-C(=W^1)-$ ，其中各 W^1 独立为 O、 $N-OR^a$ 、 S ，或者与和其相连的碳原子一起形成 CR^aR^a ；

Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 和 Y^6 各自独立为 $C-R^2$ 或 N，其中各 R^2 独立选自： $-H$ 、芳基 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-OC_{1-6}$ 烷基、 $-OH$ 、卤素、芳基 $-C_{1-6}$ 烷基 $-NH-$ 和 $-NHC_{1-6}$ 烷基；

R^1 独立为 $-H$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基或 $-C_{3-8}$ 环烷基；

A 是 $-C_{1-6}$ 烷基 $-R^3$ 或选自 (i)、(ii) 或 (iii) 的结构：



其中 R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立选自： $-H$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 $-NH(C=O)R^b$ 、 $-NHR^b$ 、 $-OR^b$ 和 $-R^b$ 、 $-(C=O)R^b$ 和 $-(C=O)NHR^b$ ，其中 R^b 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基，或芳基，其中 R^b 的所述芳基或杂芳基任选被独立选自下组的 1-3 个 R^k 成员取代： C_{1-4} 烷基、芳基 $-C_{1-4}$ 烷基、卤素、卤代烷基、 $-OR^c$ 、 $-SR^c$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 NR^cR^d 、氧代、 C_{1-4} 烷基 $(C=O)NH-$ 、卤代烷氧基、 $-C(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $OC(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $-C(=O)OR^c$ 、 $S(O)C_{1-4}$ 烷基、 $S(O)_2$ 杂环烷基和 $S(O)_2C_{1-4}$ 烷基，或者任选两个毗邻的 R^k 取代基与和它们相连的原子一起形成具有 1-2 个选自 O 或 N 的杂原子作为环成员的任选取代的稠合 5- 或 6- 元杂芳基或杂环烷基环；其中 R^c 和 R^d 各自独立选自： $-H$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-R^e$ 、 $-NHC_{1-6}$ 烷基和 $-NH(C=O)R^e$ ，其中 R^e 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基，或芳基，其中所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个选自下组的 R^f 进一步取代：卤素、卤代烷

基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^g$ 、 $-\text{SR}^g$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 NR^gR^g 、氧代、卤代烷氧基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $\text{OC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^g$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基,其中 R^g 是 C_{1-6} 烷基;其中各下标 n 独立为选自 0、1、2 或 3 的整数;和

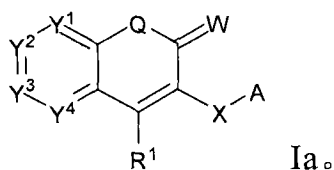
其中:

部分 $\text{---}\text{---}$ 是单键或双键;

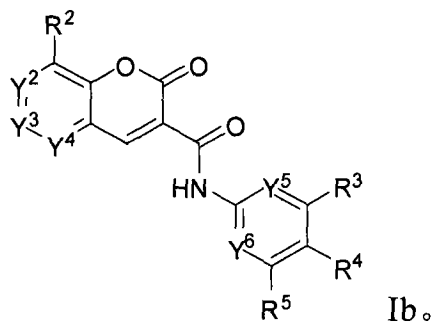
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 的脂族部分各自任选独立被选自下组的 1-3 个 R^h 取代基取代: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、 C_{3-8} 环烷基或 C_{2-6} 烯基,任选被以下取代: C_{1-6} 卤代烷基、卤素、 OH 、 C_{1-4} 烷氧基、 $-\text{NHC}_{1-4}$ 烷基、 $\text{N}(\text{C}_{1-4} \text{ 烷基})_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 OR^c 、 SR^c 、 CN 、 $-\text{NO}_2$ 、 NR^cR^d 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OC}_{1-4}$ 烷基、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基;和

前提是当 X 是 $-(\text{C}=\text{O})-$ 时, R^3 不是 $-\text{H}$ 、烷基或 R^h ,并且下标 n 不是 0。

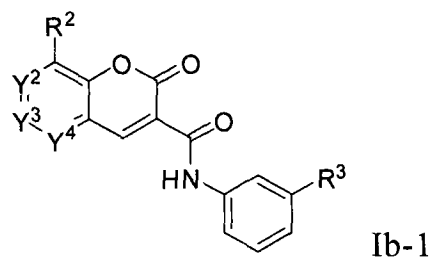
3. 如权利要求 2 所述的化合物,其如式 Ia 所示:



4. 如权利要求 3 所述的化合物,其如式 Ib 所示:

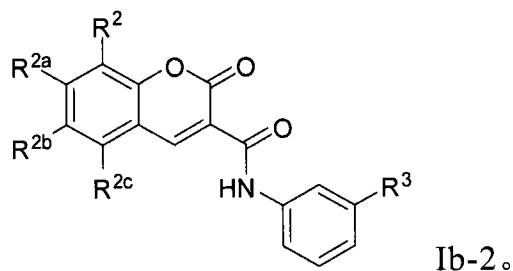


5. 如权利要求 4 所述的化合物,其如式 Ib-1 所示:

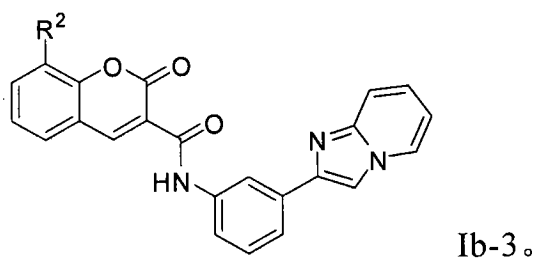


式中 R^3 是杂芳基或杂环基。

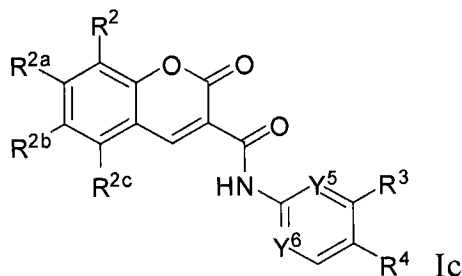
6. 如权利要求 5 所述的化合物,其如式 Ib-2 所示:



7. 如权利要求 6 所述的化合物,其如式 Ib-3 所示:

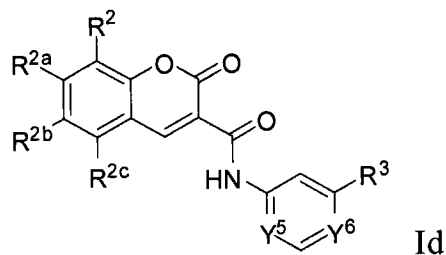


8. 如权利要求 4 所述的化合物,其如式 Ic 所示:



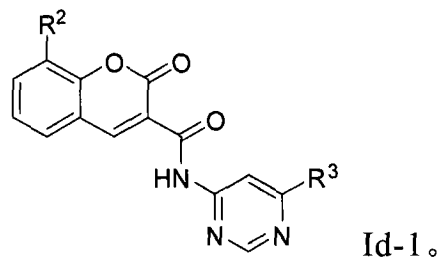
R^{2a} 、 R^{2b} 和 R^{2c} 各自独立为 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-OC_{1-6}$ 烷基、 $-OH$ 、卤素和 $-NHC_{1-6}$ 烷基。

9. 如权利要求 3 所述的化合物,其如式 Id 所示:

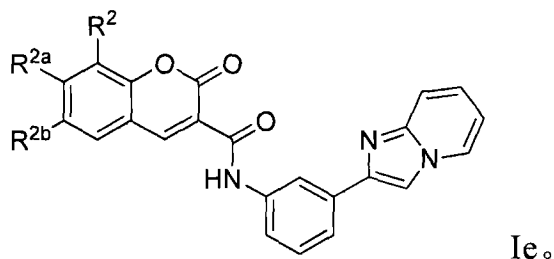


式中 R^{2a} 、 R^{2b} 和 R^{2c} 各自独立为 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-OC_{1-6}$ 烷基、 $-OH$ 、卤素或 $-NHC_{1-6}$ 烷基, Y^5 、 Y^6 和 R^3 如上定义。

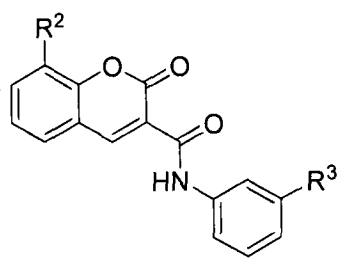
10. 如权利要求 9 所述的化合物,其如式 Id-1 所示:



11. 如权利要求 3 所述的化合物,其如式 Ie 所示:



12. 如权利要求 3 所述的化合物,其如式 (If) 所示:



If。

13. 如权利要求 8 或 9 所述的化合物,其特征在于, R^{2a} 、 R^{2b} 和 R^{2c} 各自独立为 $-H$ 或 C_{1-6} 烷氧基。

14. 如权利要求 1-12 种任一项所述的化合物,其特征在于, R^2 是 $-H$ 或 C_{1-6} 烷氧基。

15. 如权利要求 2 或 3 所述的化合物,其特征在于, R^1 是 $-H$ 。

16. 如权利要求 1 或 2 或 3 所述的化合物,其特征在于, Y^1 、 Y^2 、 Y^3 和 Y^4 各自独立为 CR^2 。

17. 如权利要求 16 所述的化合物,其特征在于, Y^1 是 CR^2 。

18. 如权利要求 1 或 2 或 3 所述的化合物,其特征在于, Q 是 $-O-$ 或 NR^a 。

19. 如权利要求 18 所述的化合物,其特征在于, Q 是 $-O-$ 。

20. 如权利要求 18 所述的化合物,其特征在于, Q 是 NR^a 。

21. 如权利要求 1 或 2 或 3 所述的化合物,其特征在于, W 是 $=O$ 、 $=S$ 或 $=N-OC_{1-6}$ 烷基。

22. 如权利要求 1 或 2 或 3 所述的化合物,其特征在于, X 是 $-C(=O)NH-$ 。

23. 如权利要求 4-12 中任一项所述的化合物,其特征在于, R^2 是 $-H$ 或 C_{1-6} 烷氧基。

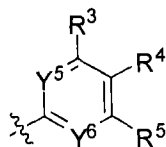
24. 如权利要求 4-5、8-10 和 12 中任一项所述的化合物,其特征在于, R^3 是 $-H$ 或杂芳基,其中所述杂芳基被 1-3 个 R^h 任选取代。

25. 如权利要求 24 所述的化合物,其特征在于, R^3 是用 1-3 个 R^h 任选取代的杂 (C_{3-8}) 芳基。

26. 如权利要求 25 所述的化合物,其特征在于, R^h 选自下组: $-CF_3$ 、 CF_3O 、卤素、 OH 、 C_{1-4} 烷氧基、 $-NHC_{1-4}$ 烷基、 $N(C_{1-4} \text{ 烷基})_2$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-O(C=O)C_{1-4}$ 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $-C(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $-OR^e$ 、 $-O(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-SR^e$ 、 $-S(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^eR^e$ 、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 、 $C(=O)OC_{1-4}$ 烷基、 $S(O)C_{1-4}$ 烷基和 $S(O)_2C_{1-4}$ 烷基。

27. 如权利要求 4、8 或 9 所述的化合物,其特征在于, Y^5 和 Y^6 各自独立为 CH 或 N 。

28. 如权利要求 1、2 或 3 所述的化合物,其特征在于, A 是结构 (i) :



i。

29. 一种包含权利要求 1-12 中任一项所述的化合物和药学上可接受的运载体或赋形剂的药物组合物。

30. 一种活化处决胱冬酶原 3、6 和 / 或 7 的方法,所述方法包括:在足以活化处决胱冬酶原 3、6 和 7 的条件下将权利要求 1-12 中任一项所述的化合物与处决胱冬酶原 3、6 和 / 或 7 受体接触。

31. 一种治疗哺乳动物中的疾病状态的方法,所述方法包括:给予该哺乳动物治疗有

效量的权利要求 1-12 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中通过活化效应胱冬酶原 3、6 和 / 或 7 而预防所述疾病或降低所述疾病的严重程度。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述疾病是肿瘤疾病或癌症。

处决胱冬酶原 3、6 和 7 的激活剂

[0001] 关于联邦资助研发作出的发明的权利的声明

[0002] 本申请要求 2008 年 1 月 11 日提交的美国临时专利申请号 61/020,608 的优先权, 该申请出于所有目的通过引用全文纳入本文。

[0003] 本发明部分在国立卫生研究院 (NIH) 基金号 R21NS057022 的支持下作出。政府对本发明享有一定权利。

[0004] 发明背景

[0005] 多细胞生物采用程序性细胞死亡或凋亡根除威胁发育、稳态和总体存活的生理分歧的细胞。凋亡循环破坏可导致许多威胁生命的人类疾病, 包括癌症、免疫缺陷、自身免疫和神经变性疾病。历史上, 癌症研究的一个焦点是致力于阐述调控机制和鉴定在正常和转化细胞中负责程序性细胞死亡的蛋白质。比较分析阐述了各种疾病和癌性肿瘤对凋亡机能障碍的作用, 因此揭示了治疗干预的靶蛋白。

[0006] 可采用各种途径启动程序性细胞死亡。两种主要途径是 i) 外在途径, 其依赖于胞外信号导致细胞表面死亡受体活化, 和 ii) 内在途径, 其依赖于细胞 DNA 破坏或存活信号丧失导致线粒体释放细胞色素 c。两种途径均活化称为胱冬酶的半胱氨酸蛋白酶家族, 这些蛋白酶特异性靶向和降解核膜和 DNA 破碎、染色质凝聚和最终细胞死亡的关键细胞蛋白。胱冬酶因其活性的极端重要性而是严格调控的蛋白质, 因为不适当的活化对生物体具有破坏作用。因此, 合成的所有胱冬酶是无活性的胱冬酶原, 其活性在它们的成熟切割位点的蛋白水解后诱导, 并受特定胞内蛋白抑制剂进一步调控。许多癌症与胱冬酶功能的缺陷有关, 因此, 代表了抗肿瘤设计的一类重要药物靶标。此外, 该类药物可靶向其它疾病状态。

[0007] 凋亡胱冬酶分成“起始胱冬酶”和“处决胱冬酶”。外在和内在凋亡途径分别利用独立的起始胱冬酶 8 和 9。一旦活化, 起始胱冬酶 8 和 9 一起活化处决胱冬酶 3、6 和 7。据信, 处决胱冬酶原 3、6 和 7 代表了通过切割许多蛋白质, 包括肌动蛋白、核纤层蛋白和各种调控蛋白而单独负责细胞凋亡级联反应最后一步的一类蛋白酶。癌性组织显示表达的处决胱冬酶原水平升高, 因此代表了抗肿瘤干预的重要靶标。具体地说, 小分子激动剂活化处决胱冬酶原会代替上游信号转导级联和细胞凋亡抑制剂而促进细胞死亡。

[0008] 然而, 完全缺乏胱冬酶指导的治疗证明胱冬酶家族的靶向成员用于治疗设计的困难。所有胱冬酶活性位点对底物亲电羰基和天冬氨酰基官能团的严格偏爱阻碍了药物递送, 从而阻止了给药期间小分子抑制剂经细胞膜扩散。

[0009] 因此, 需要开发能在体外生理浓度下特异性活化处决胱冬酶原 3、6 和 7 和促进体内细胞凋亡以及显示治疗包括癌症和肿瘤疾病在内的各种疾病活性的小分子化合物和方法。本发明符合该需求以及其它需要。

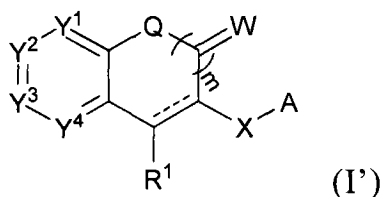
[0010] 发明简述

[0011] 本发明提供作为胱冬酶原 3、6 和 7 的新型活化剂的化合物及其相关衍生物、药物组合物, 它们的使用方法和制备这些化合物的方法。这些化合物可用于治疗肿瘤癌症和疾病并调节依赖于处决胱冬酶活化的其它药理学 (状况)。发现该系统的激动剂的优点是活性胱冬酶反馈和催化产生更多胱冬酶以供凋亡。如何通过小分子活化的胱冬酶原结构来调节

凋亡的潜在优点极具价值,不仅在于研究活化肿瘤细胞凋亡的新型药物,还在于开发靶向蛋白质的新型方法以供变构药物开发。

[0012] 本发明一方面提供式 I' 所示化合物或其药学上可接受的盐:

[0013]



[0014] 式中:

[0015] 下标 m 是 0 或 1;

[0016] W 是 = O、= N-OR^a、= S, 或者与和其相连的碳原子一起形成 CR^aR^a, 其中各 R^a 独立为 -H、C₁₋₆ 烷基、芳基 -C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、-C₃₋₈ 环烷基, 或者任选地, 两个 R^a 取代基与和它们相连的碳原子一起形成具有 0-2 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的 5- 或 6- 元环, 其中 R^a 的脂族部分任选被 1-3 个 R^b 取代基取代;

[0017] Q 是 -O- 或 N-R^a;

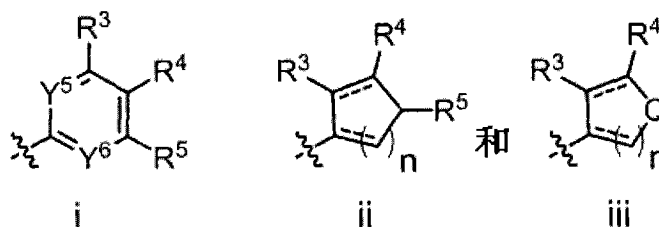
[0018] X 是键或选自下组: -C(=W¹)NH-, -C(=W¹)-C₀₋₄ 亚烷基-, -SO₂NH-, -C₀₋₄ 亚烷基 -NHC(=W¹)-, -C₀₋₄ 亚烷基 -NH(C=W¹)O-, -C₀₋₄ 亚烷基 -NH(C=W¹)NH- 和 -C₀₋₄ 亚烷基 -C(=W¹)-, 其中各 W¹ 独立为 O、N-OR^a、S, 或者与和其相连的碳原子一起形成 CR^aR^a;

[0019] Y¹、Y²、Y³、Y⁴、Y⁵ 和 Y⁶ 各自独立为 C-R² 或 N, 其中各 R² 独立选自下组: -H、芳基 -C₁₋₆ 烷基、-C₁₋₆ 烷基、-OC₁₋₆ 烷基、-OH、卤素 (halo)、芳基 -C₁₋₆ 烷基 -NH- 和 -NHC₁₋₆ 烷基;

[0020] R¹ 独立为 -H、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基或 -C₃₋₈ 环烷基;

[0021] A 是 -C₁₋₆ 烷基 -R³ 或选自下 (i)、(ii) 或 (iii) 的结构:

[0022]



[0023] 式中 R³、R⁴ 和 R⁵ 各自独立选自: -H、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 烷基氨基、-NH(C=O)R^b、-NHR^b、-OR^b 和 -R^b、-(C=O)R^b 和 -(C=O)NHR^b, 其中 R^b 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基, 或芳基, 其中 R^b 的所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个独立选自下组的 R^k 成员取代: C₁₋₄ 烷基、芳基 -C₁₋₄ 烷基、卤素、卤代烷基、-OR^c、-SR^c、-CN、-NO₂、NR^cR^d、氧代、C₁₋₄ 烷基 (C=O)NH-, 卤代烷氧基、-C(=O)C₁₋₄ 烷基、OC(=O)C₁₋₄ 烷基、-C(=O)OR^c、S(O)C₁₋₄ 烷基、S(O)₂ 杂环烷基和 S(O)₂C₁₋₄ 烷基, 或者任选两个毗邻的 R^k 取代基与和它们相连的原子形成具有 1-2 个选自 O 或 N 的杂原子作为环成员的任选取代稠合 5- 或 6- 元杂芳基或杂环烷基环; 其中 R^c 和 R^d 各自独立选自下组: -H、C₁₋₆ 烷基、-R^e、-NHC₁₋₆ 烷基和 -NH(C=O)R^e, 其中 R^e 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基或芳基, 其中所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个选自下组的 R^f 进一步取代: 卤素、卤代烷基、-OH、-OR^g、-SR^g、-CN、-NO₂、NR^gR^g、氧代、卤代烷氧基、-C(=O)C₁₋₄ 烷基、OC(=O)C₁₋₄ 烷

基、 $-C(=O)OR^g$ 、 $S(O)C_{1-4}$ 烷基和 $S(O)_2C_{1-4}$ 烷基,其中 R^g 是 C_{1-6} 烷基;其中各下标 n 独立为选自 0、1、2 或 3 的整数;和

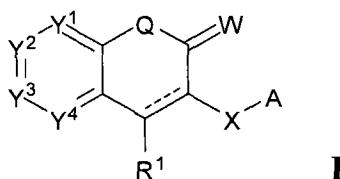
[0024] 部分 --- 是单键或双键;

[0025] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 的脂族部分各自任选独立被选自下组的 1-3 个 R^b 取代基取代: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、 C_{3-8} 环烷基或 C_{2-6} 烯基,任选被以下取代: C_{1-6} 卤代烷基、卤素、OH、 C_{1-4} 烷氧基、 $-NHC_{1-4}$ 烷基、 $N(C_{1-4} \text{ 烷基})_2$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-O(C=O)C_{1-4}$ 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $-C(=O)C_{1-4}$ 烷基、 OR^c 、 SR^c 、 CN 、 $-NO_2$ 、 NR^eR^d 、 $C(=O)OC_{1-4}$ 烷基、 $S(O)C_{1-4}$ 烷基和 $S(O)_2C_{1-4}$ 烷基;和

[0026] 前提是当 X 是 $-(C=O)-$ 时, R^3 不是 $-H$ 、烷基或 R^b ,并且下标 n 不是 0。

[0027] 在另一方面,本发明提供式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐:

[0028]



[0029] 式中

[0030] W 是 $=O$ 、 $=N-OR^a$ 、 $=S$,或者与和其相连的碳原子一起形成 CR^aR^a ,其中各 R^a 独立为 $-H$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基 $-C_{1-6}$ 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基或者任选地,两个 R^a 取代基与和它们相连的碳原子一起形成具有 0-2 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的 5- 或 6- 元环,其中 R^a 的脂族部分任选被 1-3 个 R^b 取代基取代;

[0031] Q 是 $-O-$ 或 $N-R^a$;

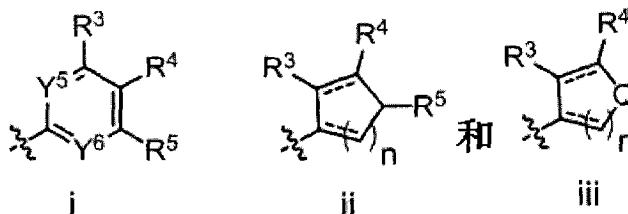
[0032] X 是键或选自下组: $-C(=W^1)NH-$ 、 $-C(=W^1)-C_{0-4}$ 亚烷基-、 $-SO_2NH-$ 、 $-C_{0-4}$ 亚烷基 $-NHC(=W^1)-$ 、 $-C_{0-4}$ 亚烷基 $-NH(C=W^1)O-$ 、 $-C_{0-4}$ 亚烷基 $-NH(C=W^1)NH-$ 和 $-C_{0-4}$ 亚烷基 $-C(=W^1)-$,其中各 W^1 独立为 O、 $N-OR^a$ 、 S ,或者与和其相连的碳原子一起形成 CR^aR^a ;

[0033] Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 和 Y^6 各自独立为 $C-R^2$ 或 N,其中各 R^2 独立选自: $-H$ 、芳基 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-OC_{1-6}$ 烷基、 $-OH$ 、卤素、芳基 $-C_{1-6}$ 烷基 $-NH-$ 和 $-NHC_{1-6}$ 烷基;

[0034] R^1 独立为 $-H$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基或 C_{3-8} 环烷基;

[0035] A 是 $-C_{1-6}$ 烷基 $-R^3$ 或选自 (i)、(ii) 或 (iii) 的结构:

[0036]



[0037] 其中 R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立选自: $-H$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 $-NH(C=O)R^b$ 、 $-NHR^b$ 、 $-OR^b$ 和 $-R^b$ 、 $-(C=O)R^b$ 和 $-(C=O)NHR^b$,其中 R^b 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基,或芳基,其中 R^b 的所述芳基或杂芳基任选被独立选自下组的 1-3 个 R^k 成员取代: C_{1-4} 烷基、芳基 $-C_{1-4}$ 烷基、卤素、卤代烷基、 $-OR^c$ 、 $-SR^c$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 NR^eR^d 、氧代、 C_{1-4} 烷基 $(C=O)NH-$ 、卤代烷氧基、 $-C(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $OC(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $-C(=O)OR^c$ 、 $S(O)C_{1-4}$ 烷基、 $S(O)_2$ 杂环烷基和 $S(O)_2C_{1-4}$ 烷基,或者任选两个毗邻的 R^k 取代基与

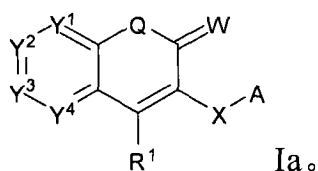
和它们相连的原子一起形成具有 1-2 个选自 O 或 N 的杂原子作为环成员的任选取代的稠合 5- 或 6- 元杂芳基或杂环烷基环；其中 R^c 和 R^d 各自独立选自： $-H$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-R^e$ 、 $-NHC_{1-6}$ 烷基和 $-NH(C=O)R^e$ ，其中 R^e 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基，或芳基，其中所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个选自下组的 R^f 进一步取代：卤素、卤代烷基、 $-OH$ 、 $-OR^g$ 、 $-SR^g$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 NR^gR^g 、氧代、卤代烷氧基、 $-C(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $OC(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $-C(=O)OR^g$ 、 $S(O)C_{1-4}$ 烷基和 $S(O)_2C_{1-4}$ 烷基，其中 R^g 是 C_{1-6} 烷基；其中各下标 n 独立为选自 0、1、2 或 3 的整数；和

[0038] 其中：

[0039] 部分 $-----$ 是单键或双键；

[0040] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 的脂族部分各自独立被选自下组的 1-3 个 R^h 取代基取代： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、 C_{3-8} 环烷基或 C_{2-6} 烯基，任选被以下取代： C_{1-6} 卤代烷基、卤素、 OH 、 C_{1-4} 烷氧基、 $-NHC_{1-4}$ 烷基、 $N(C_{1-4} \text{ 烷基})_2$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-O(C=O)C_{1-4}$ 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $-NH_2$ 、 $-NHC(=O)C_{1-4}$ 烷基、 $-C(=O)C_{1-4}$ 烷基、 OR^c 、 SR^c 、 CN 、 $-NO_2$ 、 NR^cR^d 、 $C(=O)OC_{1-4}$ 烷基、 $S(O)C_{1-4}$ 烷基和 $S(O)_2C_{1-4}$ 烷基；和前提是当 X 是 $-(C=O)-$ 时， R^3 不是 $-H$ 、烷基或 R^b ，并且下标 n 不是 0。在一个实施方式中，所述化合物如式 Ia 所示：

[0041]



[0042] 在还有另一方面，本发明提供包含式 I 所示化合物和药学上可接受的运载体或赋形剂的药物组合物。

[0043] 在还有另一方面，本发明提供在有此需要的对象中活化处决胱冬酶原 3、6 和 / 或 7 的方法。该方法包括在足以活化处决胱冬酶原 3、6 和 / 或 7 的条件下将式 I 所示化合物与处决胱冬酶原 3、6 和 / 或 7 受体接触。在一个实施方式中，本发明提供治疗和 / 或预防哺乳动物中疾病的方法，所述疾病包括但不限于癌症和肿瘤疾病。该方法包括给予哺乳动物治疗有效量的式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐。

[0044] 附图简述

[0045] 图 1. 胱冬酶原 -7 的纯化。A. 从 HiTrap Q 阴离子交换柱上洗脱胱冬酶原 -7，SDS-PAGE 凝胶上标出相应的峰。峰 2 含有单体胱冬酶原 -7，收集用于凝胶过滤。B. 对获自 Q 柱的含有相应峰组分的峰 2 进行 SDS-PAGE 凝胶过滤。单体胱冬酶原 -7 在峰 14 柱洗脱，约 95% 纯。C. 4°C 温育单体胱冬酶原 -7 过夜丧失前结构域残基 (1-23)；25°C 下，略微自我切割成活性胱冬酶 -7 的大和小结构域；37°C 下，约 50% 自催化。

[0046] 图 2. Z' 测定活性胱冬酶 -7。激动剂的胱冬酶原 -7HTS 试验预计有类似结果。

[0047] 图 3. 针对胱冬酶原 -7 的 HTS 激动剂选中物的优先分配途径 (triagepipeline)。通过评估并从进一步研究中除去的选中物分别标记为蓝色和红色。

[0048] 图 4. 用于 HTS 试验的胱冬酶原 -3 纯度的例子。显示了 4-12% SDS page 凝胶和电喷雾电离质谱。

[0049] 图 5. 筛选胱冬酶原 -3 活化的所有化合物的示意图。所有试验的 Z' 介于 0.85-0.95 之间。

[0050] 发明详述

[0051] I. 引言

[0052] 处决胱冬酶原 3、6 和 7 代表通过切割许多蛋白质,包括肌动蛋白、核纤层蛋白和各种调控蛋白而单独负责细胞凋亡级联最后一步的一类胱冬酶原。癌性组织显示表达的处决胱冬酶原水平升高,因此代表了抗肿瘤干预的重要靶标。具体地说,小分子激动剂活化处决胱冬酶原会代替上游信号转导级联和细胞凋亡抑制剂而促进细胞死亡。式 I 所示新型化合物已在体外和体内显示特异性活化处决胱冬酶原 3、6 和 7。此类新型化合物为重复开发抗癌药以及治疗其它疾病提供重要的基础。

[0053] 虽然不想局限于目前的机制,但处决胱冬酶中的两个加工位点经切割以便活化。一个在前序列和大亚单位之间,一个在大和小亚单位之间。就胱冬酶原 3 和 6 而言,一旦本发明化合物产生一些成熟的胱冬酶 -3 或 -6,它们能自发切割胱冬酶原 -3 和 -6 的其它分子,从而导致爆发性活化。较低浓度的胱冬酶原 -7 只能自动切割前序列和大亚单位之间的连接点。然而,较高浓度时,其确实自活化。癌细胞中产生较高浓度的胱冬酶 -7,因此,自活化是可能的。

[0054] II. 定义

[0055] 本文所用的术语“烷基”指具有指定碳原子数(即, C_{1-8} 或 C_1-C_8 表示 1-8 个碳)的直链或支链、饱和的脂族基团。例如, C_1-C_6 烷基包括但不限于:甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基、己基、异-丙基、异-丁基、仲-丁基、叔-丁基,等。对于本文的各定义(例如,烷基、烷氧基、烷基氨基、烷硫基、亚烷基、卤代烷基),当未包括前缀以表示烷基部分中主链碳原子的数目时,其基团或部分将具有 12 或更少的主链碳原子。例如, C_{1-8} 烷基指具有 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个碳原子的直链或支链烃基团,包括但不限于: C_{1-2} 烷基、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-6} 烷基、 C_{2-4} 烷基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-8} 烷基、 C_{1-7} 烷基、 C_{2-7} 烷基和 C_{3-8} 烷基。

[0056] 本文所用的术语“亚烷基”,其本身或作为另一取代基的一部分表示衍生自链烷的二价基团,例如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 。烷基(或亚烷基)通常具有 1-24 个碳原子,其中本发明优选具有 10 个或更少碳原子的基团。

[0057] 本文所用的术语“烯基”指具有前缀中所示碳原子数并含有至少一个双键的线形单价烃基团或支链单价烃基团。例如, (C_2-C_6) 烯基表示包括乙烯基、丙烯基等。

[0058] 本文所用的术语“炔基”指含有至少一个三键并具有前缀中所示碳原子数的线形单价烃基团或支链单价烃基团。此类不饱和烷基的例子包括乙烯基、2-丙烯基、丁烯基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-和 3-丙炔基、3-丁炔基,以及高级同系物和异构体。

[0059] 本文所用的术语“烷氧基”、“烷基氨基”和“烷硫基”(或硫代烷氧基)以其常规意义使用,指分别通过氧原子、氨基或硫原子连接于分子其余部分的那些烷基。此外,对于二烷基氨基,烷基部分可以相同或不同,还可以组合形成含有各自与之相连的氮原子的 3-7 元环。因此, $-\text{NR}'\text{R}''$ 所示基团表示包括哌啶基、吡咯烷基、吗啉基、氮杂环丁烷基等。

[0060] 本文所用的术语“环烷基”指具有所示环原子数(例如, C_{3-6} 环烷基)并且是完全饱和的或在环顶点之间具有不超过 1 个双键的烃环。1 或 2 个 C 原子可任选被羰基替代。

[0061] 本文所用的术语“环烷基-烷基”指基团 $-\text{R}'\text{R}''$,其中 R' 是亚烷基(具有所

示碳原子数,或者如果未指明则具有 6 个或更少的主链碳原子), R'' 是本文定义的环境基。环境基烷基的例子包括环己基甲基、戊基乙基等。

[0062] 除非另有表述,本文所用的术语“芳基”指多不饱和的,通常是芳族的烃基,其可以是单环或共价稠合在一起或相连的多环(最多 3 个环)。芳基的非限制性例子包括苯基、萘基和联苯基。

[0063] 本文所用的术语“芳基烷基”指基团 $-R' R''$, 其中 R' 是亚烷基(具有所示碳原子数,或者如果未指明则具有 6 个或更少的主链碳原子), R'' 是本文定义的芳基。芳基烷基的例子包括苄基、苯乙基等。

[0064] 除非另有表述,本文所用的术语“杂烷基”本身或与另一术语联用时指稳定的直链或支链,或其组合,由所述数目的碳原子和 1-3 个选自 O、N 或 Si 的杂原子构成,例如 Si、S、-N、-N-、-N=、-O、-O-、O=、-S-、-SO- 和 $-S(O)_2-$, 其中氮和硫原子可任选氧化,氮杂原子可任选季铵化。杂原子 O、N 和 S 可位于杂烷基的任何内部位置。杂原子 Si 可位于杂烷基的任何内部位置,包括烷基与该分子其余部分相连的位置。例子包括 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 。最多两个杂原子可以毗连,例如 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。

[0065] 本文所用的术语“杂环烷基”指含有 1-5 个选自 N、O 或 S 的杂原子的环境基,其中氮和硫原子任选氧化,氮原子任选季铵化,其余环原子是 C,其中 1 或 2 个 C 原子可任选被羰基替代。杂环烷基可以是单环、双环或多环系统。杂环烷基还可以是与芳基或杂芳基环稠合的杂环烷基环。杂环烷基的非限制性例子包括吡咯烷基、哌啶基、咪唑烷基、吡唑烷基、丁内酰胺、戊内酰胺、咪唑烷酮、乙内酰脲、二氧戊环、苯邻二甲酰亚胺、哌啶、1,4-二噁烷基、吗啉基、硫代吗啉基、硫代吗啉基-S-氧化物、哌嗪基、吡喃基、噻喃基、吡喃酮、四氢呋喃基、四氢噻吩基、奎宁环基等。杂环烷基可经环碳或杂原子连接于该分子的其余部分。

[0066] 本文所用的术语“杂环烷基烷基”指基团 $-R' R''$, 其中 R' 是亚烷基(具有所示碳原子数,或者如果未指明则具有 6 个或更少的主链碳原子), R'' 是本文定义的杂环烷基。杂环烷基烷基的例子包括哌啶基甲基、四氢呋喃基乙基等。

[0067] 本文所用的术语“杂环状”或“杂环”指具有 3-8 个环原子的饱和或不饱和的非芳族环状基团,其中 1 或 2 个环原子是选自 O、NR(其中 R 独立为氢或烷基)或 $S(O)_n$ (其中 n 是 0-2 的整数)的杂原子,其余环原子是 C,其中 1 或 2 个 C 原子可任选被羰基替代。杂环的例子包括但不限于:四氢吡喃基、哌啶子基(piperidino)、N-甲基哌啶-3-基、哌嗪子基(piperazino)、N-甲基吡咯烷-3-基、3-吡咯烷子基(pyrrolidino)、3-吡咯啉基、2-吡咯烷酮-1-基、吗啉代(morpholino)、硫代吗啉代(thiomorpholino)、硫代吗啉代-1-氧化物、硫代吗啉代-1,1-二氧化物、吡咯烷基等。

[0068] 本文所用的术语“杂环基烷基”指基团 $-R' R''$, 其中 R' 是亚烷基(具有所示碳原子数,或者如果未指明则具有 6 个或更少的主链碳原子), R'' 是本文定义的杂环基团。杂环基烷基的例子包括哌啶基甲基、四氢呋喃基乙基、吡喃酮基甲基、3-吡咯啉基甲基等。

[0069] 本文所用的术语“杂芳基”指含有 1-5 个选自 N、O 或 S 的杂原子的芳基(或环),其中氮和硫原子任选氧化,氮原子任选季铵化。杂芳基可经杂原子连接于该分子的其余部分。芳基的非限制性例子包括苯基、萘基和联苯基,而杂芳基的非限制性例子包括吡啶基、

哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基 (pyrimindinyl)、三嗪基、喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、2,3- 二氮杂萘基 (phthalaziniyl)、苯并三嗪基、嘌呤基、苯并咪唑基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、异苯并呋喃基、异吲哚基、中氮茛基、苯并三嗪基、噻吩并吡啶基、噻吩并嘧啶基、吡唑并嘧啶基、咪唑并吡啶、苯并噻唑基 (benzothiazolyl)、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、喹啉基、异喹啉基、异噻唑基、吡唑基、吲唑基、蝶啶基、咪唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、吡咯基、噻唑基、呋喃基、噻吩基等。为简明起见,当术语芳基与其它基团(例如,芳氧基、芳基烷基)联用时,表示同时包括上述芳基和杂芳基。

[0070] 本文所用的术语“杂芳基烷基”指基团 $-R'R''$, 其中 R' 是亚烷基(具有所示碳原子数,或者如果未指明则具有 6 个或更少的主链碳原子), R'' 是本文定义的杂芳基。杂芳基烷基的例子包括吡啶基甲基、吡唑基乙基、苯并咪唑基甲基等。

[0071] 除非另有表述,本文所用的术语“卤代”或“卤素”本身或作为另一取代基的一部分表示氟、氯、溴或碘原子。

[0072] 本文所用的术语“卤代烷基”指单卤代烷基和多卤代烷基。例如,术语“ C_{1-4} 卤代烷基”表示包括三氟甲基、2,2,2- 三氟乙基、4- 氯丁基、3- 溴丙基等。

[0073] 除非另有表述,本文所用的芳基和杂芳基的取代基通常选自: - 卤素、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-R'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-NR'C(O)_2R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''$ 、 $-NH-C(NH_2)=NH$ 、 $-NR'C(NH_2)=NH$ 、 $-NH-C(NH_2)=NR'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NR'S(O)_2R''$ 、 $-N_3$ 、全氟代(C_1-C_4) 烷氧基和全氟代(C_1-C_4) 烷基,其数量从 0 到芳族环系统上开放化合价的总数;其中 R' 、 R'' 和 R''' 独立选自: 氢、 C_{1-8} 烷基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)- C_{1-4} 烷基和未取代的芳氧基- C_{1-4} 烷基。

[0074] 本文所用的术语“保护基团”或“其受保护的形式”指原子团,当连接于分子中的反应活性基团时,能掩蔽、降低或阻止该反应活性。保护基团的例子可见 T. W. Greene 和 P. G. Wuts, *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC CHEMISTRY* (有机化学中的保护基团), (Wiley, 第 4 版, 2006), Beaucage 和 Iyer, *Tetrahedron* 48:2223-2311(1992), Harrison 和 Harrison 等, *COMPENDIUM OF SYNTHETIC ORGANIC METHODS* (有机合成方法概要), 第 1-8 卷(约翰威利父子公司(John Wiley and Sons). 1971-1996)。代表性的氨基保护基团包括甲酰基、乙酰基、三氟乙酰基、苄基、苄氧基羰基(CBZ)、叔丁氧基羰基(Boc)、三甲基甲硅烷基(TMS)、2- 三甲基甲硅烷基- 乙磺酰基(SES)、三苯甲基和取代的三苯甲基、烯丙氧基羰基、9- 芴基甲基氧基羰基(FMOC)、硝基- 芴基氧基羰基(NVOC)等(还参见,Boyle, A. L. (编), *CURRENT PROTOCOLS IN NUCLEIC ACID CHEMISTRY* (最新核酸化学方案), 约翰威利父子公司, 纽约, 第 1 卷, 2000)。

[0075] 本文所用的术语“组合物”应包括含有指定量的指定成分的产品以及从混合指定量的指定成分而直接或间接获得的任何产品。

[0076] 本文所用的“给予”指口服给予、作为栓剂给予、局部接触、胃肠外、静脉内、腹膜内、肌肉内、伤口内、鼻内或皮下给予、鞘内给予或植入缓释装置,例如迷你渗透泵而给予对象。

[0077] 本文所用的术语“抑制”指部分或完全阻止特定作用或功能的化合物或部分或完全阻止特定作用或功能的方法。“活化”指部分或完全诱导或促进功能性分子或作用的化合物。

[0078] 本文所用的术语“盐”指本发明方法所用化合物的酸盐或碱盐。药学上可接受的盐的示范性例子是无机酸（盐酸、氢溴酸、磷酸等）盐、有机酸（乙酸、丙酸、谷氨酸、柠檬酸等）盐、季铵（甲基碘、乙基碘等）盐。应该知道药学上可接受的盐是无毒的。合适的药学上可接受的盐的其它信息可见通过引用纳入本文的 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药学科学和实践), 第 21 版, LWW 公司 (Lippincott Williams & Wilkins), 伊斯顿, 宾夕法尼亚州, 2005。

[0079] 本文所用的本发明碱性化合物的药学上可接受的盐是与酸, 例如无机酸、有机羧酸和有机磺酸, 例如盐酸、甲磺酸、马来酸形成的盐, 还可能提供碱性基团, 例如吡啶基, 构成结构的一部分。

[0080] 本文所用的术语“离去基团”具有其在合成有机化学常规相关的意义, 即, 能被亲核基团取代的原子或基团, 包括卤素、烷基磺酰基氧基、酯或氨基, 例如氯、溴、碘、甲磺酰氧基 (mesyloxy)、甲苯磺酰氧基 (tosyloxy)、三氟磺酰基氧基、甲氧基、N, O- 二甲基羟基 - 氨基等。

[0081] 可采用本领域普通技术人员熟知的缩写 (例如, “Ph” 是苯基, “Me” 是甲基, “Et” 是乙基, “h” 是小时, “rt” 是室温)。

[0082] 本文所用的“药学上可接受的”表示必须与制剂中其它成分相容并且对其受者无害的运载体、稀释剂或赋形剂。术语“药学上可接受的运载体”表示用于制备药物组合物的运载体, 其通常是安全、无毒, 非生物学或其它方面有害的, 包括兽用以及人类医药应用可接受的运载体。本说明书和权利要求书中所用的“药学上可接受的运载体”包括一种或多种此类运载体。

[0083] 采用常规方式将盐与碱或酸接触并分离母体化合物可再生化合物的中性形式。化合物的母体形式与各种盐形式在某些物理特性上不同, 例如在极性溶剂中的溶解性, 但对于本发明的目的, 盐与化合物的母体形式是等价的。

[0084] 本文所用的术语“治疗有效量或剂量”或“治疗充足量或剂量”或“有效或充足量或剂量”指产生给药所需疗效的剂量。确切的剂量取决于治疗目的, 可由本领域技术人员采用已知的技术确定 (参见, 例如 Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (药物剂型) (第 1-3 卷, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (药物配制的领域、科学和技术) (1999); Pickar, Dosage Calculations (剂量计算) (1999); 和 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药物科学和实践), 第 20 版, 2003, Gennaro 编., LWW 公司 (Lippincott, Williams & Wilkins))。在敏化细胞中, 治疗有效剂量常低于非敏化细胞的常规治疗有效剂量。

[0085] 本文所用的术语“治疗”指损伤、病理、病症或症状 (例如, 疼痛) 的治疗或缓解成功的任何标志, 包括任何客观或主观参数, 例如减轻; 缓解; 症状减少或使得患者对症状、损伤、病理或病症更耐受; 降低症状或病症的频率或持续时间; 或者, 在某些情况中, 防止症状或病症的发作。症状的治疗或缓解可依据任何客观或主观参数; 包括, 例如体检的结果。

[0086] 本文所用的术语“哺乳动物”指人或温血动物, 包括家畜和陪伴动物。

[0087] 本文所用的术语“肿瘤”指所有瘤细胞生长和增殖, 无论恶性还是良性的, 以及所有癌前和癌细胞及组织。

[0088] 本文所用的术语“癌症”或“肿瘤疾病”指涉及有可能转移至远端位点并显示不同于非癌细胞的表型特征的细胞的疾病。癌细胞在其发育期间获得特征性的一组机能性能，虽然通过各种机制。此类性能包括规避凋亡、生长信号的自给自足、对抗生长信号不敏感、组织侵袭性 / 转移性、无限复制能力和持续的血管生成。术语“癌细胞”表示包括恶化前和恶性癌细胞。肿瘤疾病可包括但不限于：上皮内瘤样变、宫颈非典型增生、光化性角化病。

[0089] 因此，“癌症”指人癌症和癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病等，包括实体和淋巴癌，肾脏、乳腺、肺、肾脏、膀胱、结肠、卵巢、前列腺、胰腺、胃、脑、头颈、皮肤、子宫、睾丸、食道和肝脏癌症，包括肝癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西肉瘤、黑色素瘤、淋巴瘤，包括非霍奇金淋巴瘤（例如，伯基特、小细胞和大细胞淋巴瘤）和霍奇金淋巴瘤、白血病及多发性骨髓瘤。

[0090] 本文所用的术语“防止”指因给予预防或治疗性药剂而防止对象疾病的复发、恶化或扩散。

[0091] 本文所用的术语“任选”或“任选地”表示下述事件或情况可以，但不一定发生，该表述包括该事件或情况发生的例子也包括不发生的例子。

[0092] 本发明实施例和说明书中使用以下缩写：

[0093] bm = 宽多重峰

[0094] BOC = 叔丁氧基羰基

[0095] bd = 宽双峰

[0096] bs = 宽单峰

[0097] CDI = 1,10- 碳二咪唑

[0098] DIEA = 二异丙基乙胺

[0099] d = 双峰

[0100] dd = 双重双峰

[0101] dq = 双重四重峰

[0102] dt = 双重三重峰

[0103] DMF = 二甲基甲酰胺

[0104] DMAP = 二甲基氨基吡啶

[0105] DMSO = 二甲基亚砷

[0106] eq. = 当量

[0107] g = 克

[0108] h = 小时

[0109] HPLC = 高压液相色谱

[0110] HATU = 六氟磷酸 N-[(二甲基氨基)-1H-1,2,3- 三唑并-[4,5-b] 吡啶-1-基-亚甲基]-N- 甲基甲铵 N- 氧化物

[0111] LG = 离去基团

[0112] m = 多重峰

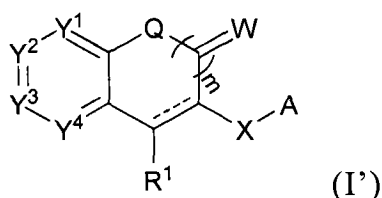
[0113] M = 摩尔 / 升 (molar)

[0114] M% = 摩尔百分比

[0115] max = 最大

[0116] meq = 毫克当量 (milliequivalent)

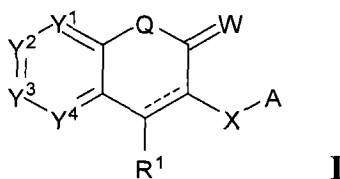
- [0117] mg = 毫克
[0118] mL = 毫升
[0119] mm = 毫米
[0120] mmol = 毫摩尔
[0121] q = 四重峰
[0122] s = 单峰
[0123] t 或 tr = 三重峰
[0124] TBS = 三丁基甲硅烷基
[0125] TFA = 三氟乙酸
[0126] THF = 四氢呋喃
[0127] TLC = 薄层层析
[0128] p-TLC = 制备型薄层层析
[0129] μ L = 微升
[0130] N = 当量浓度 (normality)
[0131] MeOH = 甲醇
[0132] DCM = 二氯甲烷
[0133] HCl = 盐酸
[0134] ACN = 乙腈
[0135] MS = 质谱法
[0136] rt = 室温
[0137] EtOAc = 乙酸乙酯
[0138] EtO = 乙氧基
[0139] Ac = 乙酸酯基
[0140] NMP = 1- 甲基 -2- 吡咯烷酮
[0141] μ L = 微升
[0142] J = 偶联常数
[0143] NMR = 核磁共振
[0144] MHz = 兆赫兹
[0145] Hz = 赫兹
[0146] m/z = 质荷比
[0147] min = 分钟
[0148] Boc = 叔丁氧基羰基
[0149] CBZ = 苄氧基羰基
[0150] DCC = 1,3- 二环己基碳二亚胺
[0151] PyBop = 六氟磷酸苯并三唑 -1- 基 - 氧基 - 三吡咯烷磷鎓
[0152] III. 化合物
[0153] 本发明一方面提供式 (I') 所示化合物或其药学上可接受的盐：
[0154]



[0155] 式中部分 --- 是单键或双键。在一个实施方式中,部分 --- 是双键, m 是 0。取代基 Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 W 、 Q 、 R^1 、 X 和 A 如上定义。在一些实施方式中, m 是 0, Y^2 、 Y^3 和 Y^4 是 $-\text{CH}=\text{}$, Y^1 是 $-\text{C}(\text{OC}_{1-4}\text{烷基})=\text{}$, Q 是 0, A 是杂芳基。

[0156] 本发明另一方面提供式 I 所示化合物获取药学上可接受的盐:

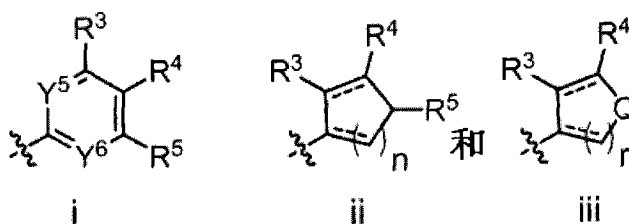
[0157]



[0158] 式中部分 --- 是单键或双键。在一个实施方式中,部分 --- 是双键。

[0159] 在式 I 中, A 是 $-\text{C}_{1-6}$ 烷基 $-\text{R}^3$ 或选自 (i)、(ii) 或 (iii) 的结构:

[0160]



[0161] 式中各 n 独立为选自 0、1、2 或 3 的整数。在一个实施方式中, A 是式 (i) 所示结构。在一个实施方式中, Y^5 和 Y^6 各自独立为 CR^2 或 N 。在另一实施方式中, Y^5 是 CR^2 , Y^6 是 N 。在还有另一实施方式中, Y^5 和 Y^6 是 CH 或 N 。在某些情况中, R^2 是 $-\text{H}$ 、 C_{1-6} 烷基、卤代烷基或烷氧基。

[0162] 在式 I 所示化合物的一组实施方式中, R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立选自: $-\text{H}$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基氨基、 $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{NHR}^b$ 、 $-\text{OR}^b$ 和 $-\text{R}^b$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{R}^b$ 和 $-(\text{C}=\text{O})\text{NHR}^b$, 其中 R^b 是具有 1-4 个选自 0、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基, 或芳基, 其中所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个独立选自下组的 R^k 成员取代: C_{1-4} 烷基、芳基 $-\text{C}_{1-4}$ 烷基、卤素、卤代烷基、 $-\text{OR}^c$ 、 $-\text{SR}^c$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 NR^cR^d 、氧代、 C_{1-4} 烷基 $(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ 、卤代烷氧基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $\text{OC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^c$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $\text{S}(\text{O})_2$ 杂环烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基; 或两个毗邻 R^k 取代基任选与和它们相连的原子一起形成任选取代的、具有 1-2 个选自 0 或 N 的杂原子作为环成员的稠合 5- 或 6- 元杂芳基或杂环烷基环; 其中 R^c 和 R^d 各自独立选自: $-\text{H}$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-\text{R}^e$ 、 $-\text{NHC}_{1-6}$ 烷基和 $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{R}^e$, 其中 R^e 是具有 1-4 个选自 0、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基, 或芳基, 其中所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个选自下组的 R^f 进一步取代: 卤素、卤代烷基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^g$ 、 $-\text{SR}^g$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 NR^gR^g 、氧代、卤代烷氧基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $\text{OC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^g$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基, 其中 R^g 是 C_{1-6} 烷基; 其中各下标 n 独立为选自 0、1、2 或 3 的整数。两个毗邻 R^k 取代基形成的 5- 或 6- 元杂芳基或杂环烷基环任选被 R^c 基团, 优选被 C_{1-8} 烷基取代。在某些情况中, R^b 是被选自以下的 1-3 个成员取代的

杂芳基或杂环基： $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{OC}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{SC}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 NR^{d} 、氧代、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $\text{OC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^5$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基。

[0163] 在一些实施方式中， R^3 是 $-\text{H}$ 或杂芳基。在某些情况中， R^3 是杂 (C_{3-8}) 芳基。在某些其它情况中， R^3 是稠合的双环杂芳基。非限制性的示例性 R^3 取代基包括苯并咪唑基和咪唑并 [1,2-a] 吡啶基。

[0164] 在式 I，W 是 $=\text{O}$ 、 $=\text{N}-\text{OR}^{\text{a}}$ 、 $=\text{S}$ ，或与和其相连的碳原子一起形成 $\text{CR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{a}}$ ，其中各 R^{a} 独立为 $-\text{H}$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基 $-\text{C}_{1-6}$ 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 $-\text{C}_{3-8}$ 环烷基或两个 R^{a} 基团任选与和它们相连的碳原子一起形成具有 0-2 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的 5- 或 6- 元环，其中 R^{a} 的脂族部分被 1-3 个选自下组的 R^{b} 取代基任选取代： C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基或 C_{2-6} 烯基，任选被以下取代： C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素、 OH 、 C_{1-4} 烷氧基、 $-\text{NHC}_{1-4}$ 烷基、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 烷基)₂、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 OR^{c} 、 SR^{c} 、 CN 、 $-\text{NO}_2$ 、 $\text{NR}^{\text{c}}\text{R}^{\text{d}}$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OC}_{1-4}$ 烷基、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基。在一个实施方式中，W 是 $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 或 $=\text{N}-\text{OC}_{1-6}$ 烷基。在另一实施方式中，W 是 $=\text{O}$ 。

[0165] 在式 I 所示化合物的一组实施方式中， R^{b} 选自下组： $-\text{CF}_3$ 、 CF_3O 、卤素、 OH 、 C_{1-4} 烷氧基、 $-\text{NHC}_{1-4}$ 烷基、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 烷基)₂、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{OR}^{\text{e}}$ 、 $-\text{O}(\text{C}_{1-6}$ 烷基)、 $-\text{SR}^{\text{e}}$ 、 $-\text{S}(\text{C}_{1-6}$ 烷基)、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{e}}\text{R}^{\text{e}}$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ 烷基)₂、 $\text{C}(=\text{O})\text{OC}_{1-4}$ 烷基、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基。

[0166] 在式 I 中， R^1 是 $-\text{H}$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基或 $-\text{C}_{3-8}$ 环烷基，其中 R^1 的脂族部分任选被 1-3 个 R^{b} 取代基取代。在一个实施方式中， R^1 是 $-\text{H}$ 或 C_{1-6} 烷基。

[0167] 在式 I 中，Q 是 $-\text{O}-$ 或 $\text{N}-\text{R}^{\text{a}}$ ，其中 R^{a} 的脂族部分任选被 1-3 个 R^{b} 取代。在一个实施方式中，Q 是 $-\text{O}-$ 。

[0168] 在式 I 中，X 选自下组： $-\text{C}(=\text{W}^1)\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(=\text{W}^1)-\text{C}_{0-4}$ 亚烷基 $-$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{C}_{0-4}$ 亚烷基 $-\text{NHC}(=\text{W}^1)-$ 、 $-\text{C}_{0-4}$ 亚烷基 $-\text{NH}(\text{C}=\text{W}^1)\text{O}-$ 、 $-\text{C}_{0-4}$ 亚烷基 $-\text{NH}(\text{C}=\text{W}^1)\text{NH}-$ 和 $-\text{C}_{0-4}$ 亚烷基 $-\text{C}(=\text{W}^1)-$ ，其中各 W^1 独立为 $=\text{O}$ 、 $=\text{N}-\text{OR}^{\text{a}}$ 、 S ，或者与和其相连的碳原子一起形成 $\text{CR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{a}}$ ，其中 R^{a} 的脂族部分任选被 1-3 个 R^{b} 取代。在一组实施方式中， W^1 是 $=\text{O}$ 。在另一组实施方式中，X 是 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ 。

[0169] 在式 I 中， Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 和 Y^6 各自独立为 $\text{C}-\text{R}^2$ 或 N 。在一个实施方式中， Y^1 、 Y^2 、 Y^3 和 Y^4 是 CR^2 。在一个情况中， Y^1 、 Y^2 、 Y^3 和 Y^4 是 $-\text{H}$ 。在另一情况中， Y^2 、 Y^3 和 Y^4 是 $-\text{H}$ ， Y^1 是 $-\text{OH}$ 、 C_{1-6} 卤代烷氧基或 C_{1-6} 烷氧基。在还有另一情况中， Y^2 、 Y^3 和 Y^4 是 $-\text{H}$ ， Y^1 是 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OMe}$ 或 $-\text{OCF}_3$ 。

[0170] 在式 I 所示化合物的一组实施方式中， R^2 独立选自： $-\text{H}$ 、芳基 $-\text{C}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{C}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{OC}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{OH}$ 、卤素、芳基 $-\text{C}_{1-6}$ 烷基 $-\text{NH}-$ 和 $-\text{NHC}_{1-6}$ 烷基， R^2 的脂族部分任选被 1-3 个 R^{b} 取代。在一个情况中， R^2 是 $-\text{H}$ 、 $-\text{OMe}$ 、 $-\text{OH}$ 、 F 、 Cl 、 Br 、 $-\text{NHC}_{1-6}$ 烷基、苄基或苄基氨基。在另一情况中， R^2 是 $-\text{H}$ 或 C_{1-6} 烷氧基。

[0171] 在某些实施方式中，杂环（杂芳基和 / 或杂环基）包括但不限于：氮杂环丁烷、吡咯、咪唑、吡唑、1,2,3- 三唑、1,3,4- 三唑、噁唑、噻唑、异噁唑、异噻唑、1,3,4- 噁二唑、1,3,4- 噻二唑、1,2,3- 噻二唑、四唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、中氮茚、异吲哚 (isoindole)、吲哚、二氢吲哚、吡啶、嘌呤、喹啉、喹啉、2,3- 二氮杂萘、喹啉、喹啉、噌啉、蝶啶、呋唑、呋啉、菲啶、吡啶、菲咯啉、异噻唑、吩嗪、异噻唑、异噻唑啉酮 (isoxazolinone)、吩噻

嗟、吩噻嗪、咪唑烷、咪唑啉、哌啶、哌嗪、二氢吡啶、苯邻二甲酰亚胺、1,2,3,4-四氢异喹啉、4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩、噻唑、噻二唑、四唑、噻唑烷、噻吩、苯并[b]噻吩、吗啉、硫代吗啉(也称为硫代吗啉(thiamorpholine))、哌啶、吡咯烷、四氢呋喃,等。

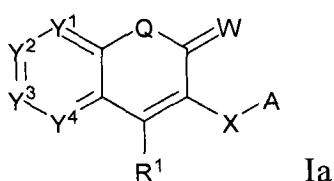
[0172] 在某些其它实施方式中,杂芳基包括但不限于:吡啶、噻吩、呋喃、吡唑、嘧啶、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、3-哒嗪基、4-哒嗪基、3-吡嗪基、4-氧代-2-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、3-吡唑基、4-吡唑基、5-吡唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、4-氧代-2-噁唑基、5-噁唑基、1,2,3-噁噻唑(oxathiazole)、1,2,3-噁二唑、1,2,4-噁二唑、1,2,5-噁二唑、1,3,4-噁二唑、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、3-异噻唑、4-异噻唑、5-异噻唑、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-异吡咯基、4-异吡咯基、5-异吡咯基、1,2,3,-噁噻唑-1-氧化物、1,2,4-噁二唑-3-基、1,2,4-噁二唑-5-基、5-氧代-1,2,4-噁二唑-3-基、1,2,4-噻二唑-3-基、1,2,5-噻二唑-3-基、1,2,4-噻二唑-5-基、3-氧代-1,2,4-噻二唑-5-基、1,3,4-噻二唑-5-基、2-氧代-1,3,4-噻二唑-5-基、1,2,3-三唑-1-基、1,2,4-三唑-3-基、1,2,4-三唑-5-基、四唑-1-基、1,2,3,4-四唑-5-基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基和5-异噁唑基、1,3,4,-噁二唑、4-氧代-2-噻唑啉基、或5-甲基-1,3,4-噻二唑-2-基、噻唑二酮(thiazolodione)、1,2,3,4-噻三唑、或1,2,4-二噻唑酮(dithiazolone)等。

[0173] 在还有某些其它实施方式中,杂芳基包括但不限于:苯并咪唑基、苯并咪唑-2基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并四唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噁二唑基、苯并噻吩基、苯并异噻唑基、苯并呋喃基、喹啉基、异喹啉基、喹唑啉基、喹喔啉基、萘基吡啶基(naphthyridinyl)、嘧啶并吡啶基、哒嗪并吡啶基、吡嗪并吡啶基、吡啶并嘧啶基、嘧啶并嘧啶基、哒嗪并嘧啶基、吡嗪并嘧啶基、吡啶并哒嗪基、嘧啶并哒嗪基、哒嗪并哒嗪基、吡嗪并哒嗪基、吡啶并咪唑基、嘌呤基、哒嗪并咪唑基、吡嗪并咪唑基、吡啶并噁唑基、嘧啶并噁唑基、哒嗪并噁唑基、吡嗪并噁唑基、吡啶并异噁唑基、嘧啶并异噁唑基、哒嗪并异噁唑基、吡嗪并异噁唑基、吡啶并噁噻二唑基、嘧啶并噁噻二唑基、哒嗪并噁噻二唑基、吡嗪并噁噻二唑基、吡啶并噁噻唑基、嘧啶并噁噻唑基、哒嗪并噁噻唑基、吡嗪并噁噻唑基、吡啶并噻唑基、嘧啶并噻唑基、哒嗪并噻唑基、吡嗪并噻唑基、吡啶并吡咯基、嘧啶并吡咯基、哒嗪并吡咯基、吡嗪并吡咯基、异苯并呋喃基、中氮茛基、异吡啶基、吡啶基、咪唑基、2,3-二氮杂萘基、噌啉基、咪唑并[1,2-a]吡啶基、咪唑并[1,2-a]吡啶-2基、咪唑并[1,2-a]吡啶-3基、它们的异构体等。

[0174] 在式 I 所示化合物的一组实施方式中,当 X 是 $-(C=O)-$ 时, R^3 不是 $-H$ 、烷基或 R^b , 下标 n 不是 0。

[0175] 在一组实施方式中,化合物如式 Ia 所示:

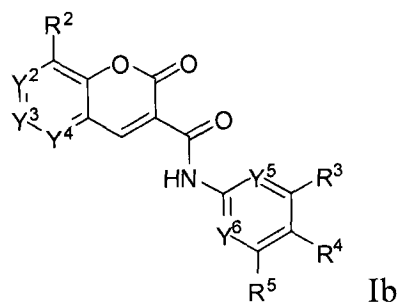
[0176]



[0177] 式中取代基如上定义。

[0178] 在第二组实施方式中,化合物如式 Ib 所示:

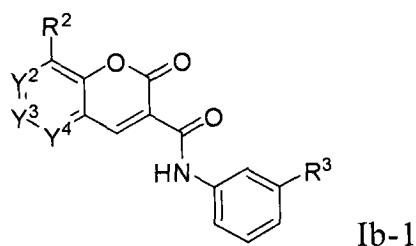
[0179]



[0180] 式中取代基如上定义。

[0181] 在第三组实施方式中,化合物如式 Ib-1 所示:

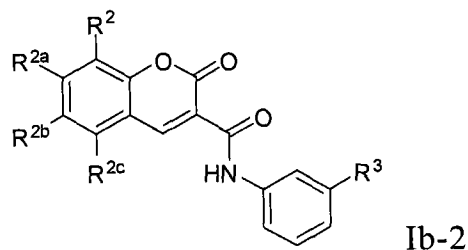
[0182]



[0183] 式中取代基如上定义。

[0184] 在第四组实施方式中,化合物如式 Ib-2 所示:

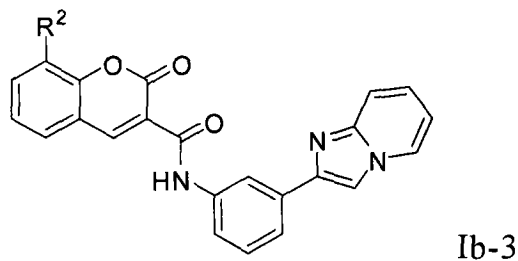
[0185]



[0186] 式中取代基如上定义。

[0187] 在第五组实施方式中,化合物如式 Ib-3 所示:

[0188]

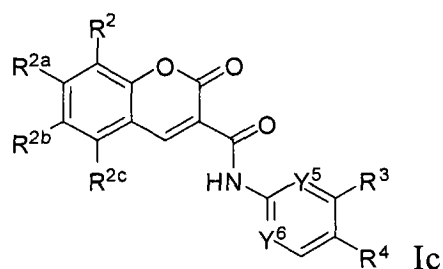


[0189] 式中取代基如以上式 (I) 定义。在一些实施方式中, R² 选自 -H、-OH、-OMe、-Oet、-

F、-Cl、-Br、-OCF₃、4- 吗啉基或 。

[0190] 在第六组实施方式中,化合物如式 Ic 所示:

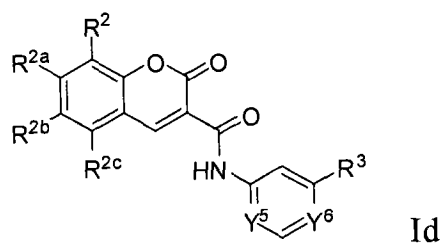
[0191]



[0192] 式中 R^{2a} 、 R^{2b} 和 R^{2c} 如式 (I) 定义。在一些实施方式中, R^{2a} 、 R^{2b} 和 R^{2c} 各自独立为 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-OC_{1-6}$ 烷基、 $-OH$ 、卤素和 $-NHC_{1-6}$ 烷基, Y^5 和 Y^6 如上定义。

[0193] 在第七组实施方式中, 化合物如式 Id 所示:

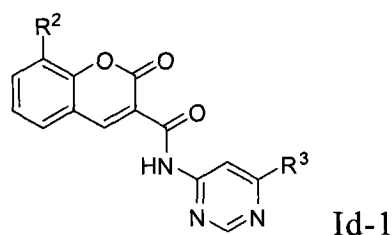
[0194]



[0195] 式中 R^{2a} 、 R^{2b} 和 R^{2c} 各自独立为 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-OC_{1-6}$ 烷基、 $-OH$ 、卤素或 $-NHC_{1-6}$ 烷基, Y^5 、 Y^6 和 R^3 如上定义。

[0196] 在第八组实施方式中, 化合物如式 Id-1 所示:

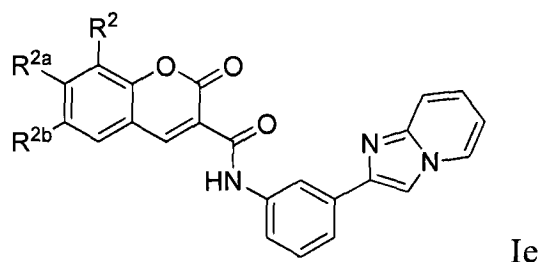
[0197]



[0198] 式中 R^2 和 R^3 如以上式 I 定义。

[0199] 在第九组实施方式中, 化合物如式 Ie 所示:

[0200]

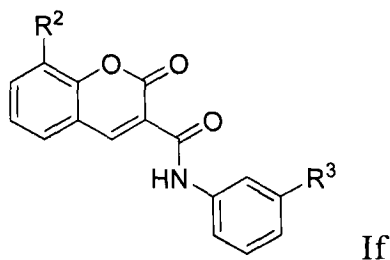


[0201] 式中取代基如以上定义。在一些实施方式中, R^2 选自: 氢、 $-OH$ 、 C_{1-8} 烷氧基、 C_{1-8} 卤代烷氧基、卤素、杂环烷基和杂环烷基 $-C_{1-4}$ 烷基。在某些情况中, R^2 选自 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-OEt$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-OCF_3$ 、4- 吗啉基或 $\text{---}CH_2CH_2N(CH_2CH_2O)CH_2CH_2\text{---}$ 。在一些实施方式和以上实施方式中, R^{2a} 是

氢、卤素、 C_{1-8} 烷氧基或 $-OH$ 。在某些例子中, R^{2a} 是氢、 $-OMe$ 、 $-OH$ 。在一些实施方式和以上实施方式中, R^{2b} 是 $-H$ 、卤素、 C_{1-8} 。在某些情况中, R^{2b} 是 $-H$ 、 Br 、 $-F$ 、 $-I$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 或 $-OCF_3$ 。

[0202] 在第十组实施方式中, 化合物如式 (If) 所示:

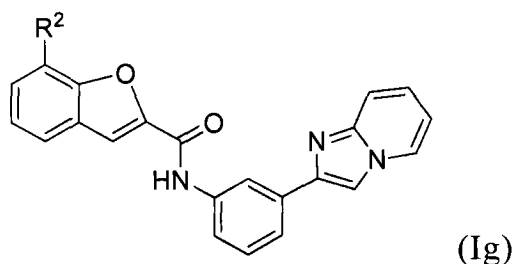
[0203]



[0204] 式中取代基 R^2 和 R^3 如上定义。在一些实施方式中, R^2 选自: $-\text{OH}$ 、 C_{1-8} 烷氧基和 C_{1-8} 卤代烷氧基。在某些情况中, R^2 是 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OMe}$ 或 $-\text{OCF}_3$ 。在一些实施方式和以上实施方式中, R^3 是 $-\text{H}$ 、杂环烷基、杂环烷基 $-\text{C}_{1-4}$ 烷基、芳基或杂芳基, 其中 R^3 基团的芳基或杂芳基任选被独立选自下组的 1-3 个 R^k 成员取代: C_{1-4} 烷基、芳基 $-\text{C}_{1-4}$ 烷基、卤素、卤代烷基、 $-\text{OR}^c$ 、 $-\text{SR}^c$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 NR^cR^d 、氧代、 C_{1-4} 烷基 ($\text{C} = \text{O}$) NH 、卤代烷氧基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $\text{OC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^c$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $\text{S}(\text{O})_2$ 杂环烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基, 或者两个毗邻的 R^k 取代基任选与和它们相连的原子一起形成任选取代的具有 1-2 个选自 O 或 N 的杂原子作为环成员的稠合 5- 或 6- 元杂芳基或杂环烷基环, 稠合的 5- 或 6- 元环被 R^e 任选取代; 其中 R^c 和 R^d 各自独立选自: $-\text{H}$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-\text{R}^e$ 、 $-\text{NHC}_{1-6}$ 烷基和 $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{R}^e$, 其中 R^e 是具有 1-4 个选自 O、N 或 S 的环杂原子的杂芳基或杂环基, 或芳基, 其中所述芳基或杂芳基任选被 1-3 个选自下组的 R^f 进一步取代: 卤素、卤代烷基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^g$ 、 $-\text{SR}^g$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 NR^gR^g 、氧代、卤素烷氧基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $\text{OC}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^g$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基和 $\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-4}$ 烷基, 其中 R^g 是 C_{1-6} 烷基; 并且其中各下标 n 独立为选自 0、1、2 或 3 的整数。在某些情况中, 所述芳基或杂芳基任选被选自以下的 1-3 个成员取代: C_{1-4} 烷基、 C_{1-8} 烷氧基、芳氧基、 C_{1-8} 卤代烷氧基、 $-\text{CN}$ 、 C_{1-8} 烷基 ($\text{C} = \text{O}$) NH 、杂环烷基 $-\text{SO}_2$ 、 C_{1-8} 二烷基氨基、 $-\text{OH}$ 、卤素、芳基 $-\text{C}_{1-4}$ 烷基或 C_{1-8} 烷基 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$; 或者所述芳基或杂芳基取代基的两个毗邻成员与和它们相连的原子一起形成具有 1-2 个选自 O 或 N 作为环成员的杂原子的 5- 或 6- 元杂环烷基或杂芳基环, 其中所述杂环任选被 R_g 取代。在一些实施方式中, R^3 是任选被 1-3 个选自下组的成员取代的苯基: $-\text{H}$ 、 $-\text{OMe}$ 、 $-\text{OEt}$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 CH_3CONH 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NMe}_2$ 、 $\text{O}=\text{S}(=\text{O})\text{N}$ 连接一个六元杂环 (含氧), $-\text{F}$ 、 $-\text{F}$ 和 $-\text{Br}$, 或者所述芳基或杂芳基取代基的两个毗邻成员与和它们相连的原子一起形成稠合的 1,3- 二氧戊环、四氢呋喃、1,4- 二噁烷、吡咯、咪唑烷、异噁唑、噁唑、吡唑、噁二唑、1,2,5- 噁二唑或 4H- 吡喃-4- 酮环。

[0205] 在第十一组实施方式中, 化合物如式 (Ig) 所示:

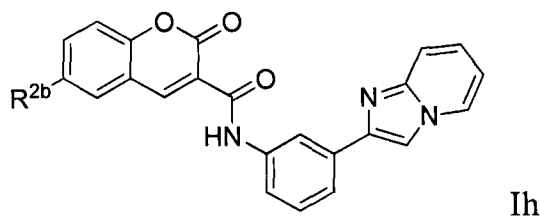
[0206]



[0207] 式中 R^2 如以上式 (I) 定义。在一些实施方式中, R^2 是 C_{1-8} 烷氧基。

[0208] 在第十二组实施方式中, 化合物如式 (Ih) 所示:

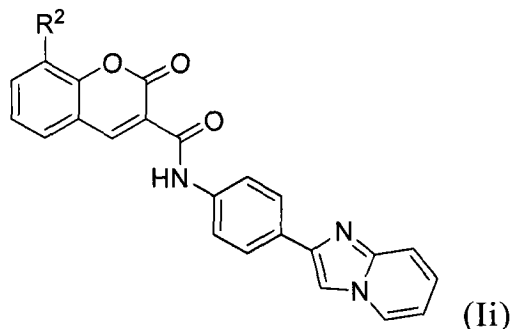
[0209]



[0210] 式中 R^{2b} 如以上式 (I) 定义。在一些实施方式中, R^{2b} 是卤素。

[0211] 在第十三组实施方式中, 化合物如式 (Ii) 所示:

[0212]



[0213] 式中 R^2 如以上式 (I) 定义。在一些实施方式中, R^2 是烷氧基, 例如 $-OMe$ 。

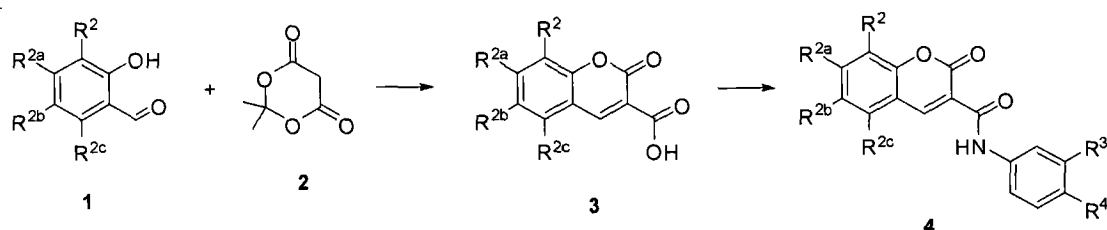
[0214] 化合物的制备

[0215] 如以下实施例所示, 技术人员可采用各种合成途径制备本发明的化合物和中间体。流程 I-VII 说明制备本发明的某些胱冬酶-3 激活剂的几种方法。可通过合成流程所述的方法制备所有化合物。可按照流程 I-VII 所示方法制备表 I 的化合物。在各流程中, X' 是离去基团, 例如卤素原子; 非干扰性取代基是 $-R'$ 、 $-R''$ 和 $-R'''$ 。

[0216] 以下流程提供了可获得本发明的某些胱冬酶-3 激活剂的某些合成途径。技术人员不难知道属于本发明范围内的其它途径或以下所示途径的改进形式。所有起始材料可商品化购得, 或可通过有机化学领域普通技术人员熟知的方法制备。

[0217] 流程 I

[0218]

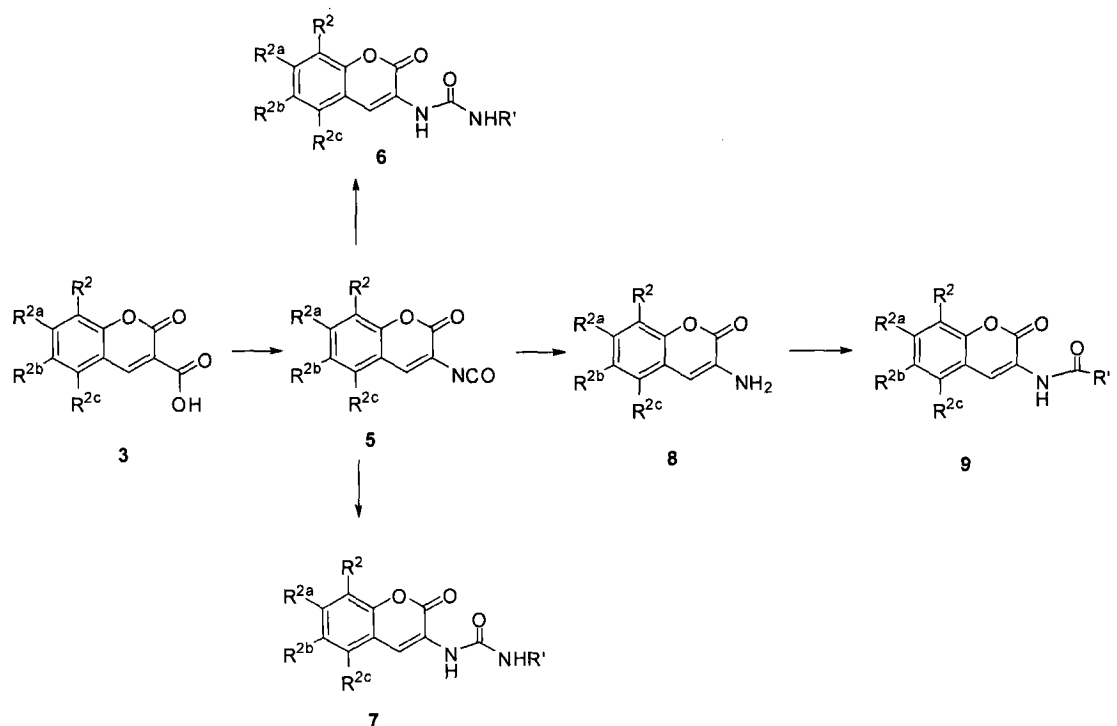


[0219] 流程 I 说明了从可商品化购得的各种取代水杨醛构建 3-羧基香豆素体系。首先, 水杨醛 (1) 与梅尔德拉姆酸 (Meldrum's acid) (2) 或相关的丙二酸酯衍生物在 $25-150^\circ\text{C}$, 任选有碱, 例如乙醇钠或氢氧化钾存在下, 在有机溶剂或水性溶液中反应获得 3-羧基香豆素 3。还可在异质条件下, 利用各种无机粘土作为促进剂进行该反应 (J. Org. Chem. 1999, 64, 1033-5 和其中的参考文献)。如上所述, 优选在约 $50-100^\circ\text{C}$ 加热, 用水作为溶剂与梅尔德拉姆酸进行该反应 (Synth. Commun. 2003, 33, 3299-3303)。然后可采用熟知的偶联反应 (包括例如转化成酰氯) 和与胺的反应, 或利用碳二亚胺或实现酸-胺偶联的其它熟知试剂

将胺与酸直接偶联而将羧酸转化成各种酰胺衍生物。收集的产物可直接使用,或者可先采用常规技术,例如制备型 TLC 或 HPLC、层析、沉淀、结晶等进行纯化。

[0220] 流程 II

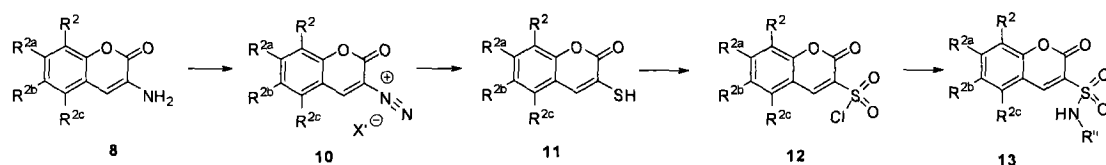
[0221]



[0222] 流程 II 说明了在式 I 所示化合物上构建独特的 X 基团。首先,在 25-100℃,有碱,例如三乙胺存在下,将 3-羧基香豆素 (3) 环体系与二苯基磷酰基叠氮化物 (DPPA) 或叠氮钠在有机溶剂中反应。该反应形成分解为异氰酸酯 (5) 的酰基叠氮化物衍生物。如上所述,优选在约 70-100℃ 加热,用 DPPA、三乙胺和苯作为溶剂进行该反应 (Tetrahedron 2005, 61, 3637-3649)。然后,采用熟知的反应将异氰酸酯 (5) 转化成各种氨基甲酸酯 (6)、脒 (7) 和酰胺 (9) 衍生物。在有机溶剂中,用醇或酚将异氰酸酯 (5) 转化成氨基甲酸酯 (6) 类似物。通过与取代的胺或苯胺反应形成脒 (7) 类似物。最后,通过水解从异氰酸酯 (5) 形成胺或苯胺 (8),可利用商品化购得的羧酸,通过流程 I 所示的标准偶联条件作进一步衍生从而形成酰胺 (9) 连接。收集的产物可直接使用,或者可先采用常规技术,例如制备型 TLC 或 HPLC、层析、沉淀、结晶等进行纯化。

[0223] 流程 III

[0224]

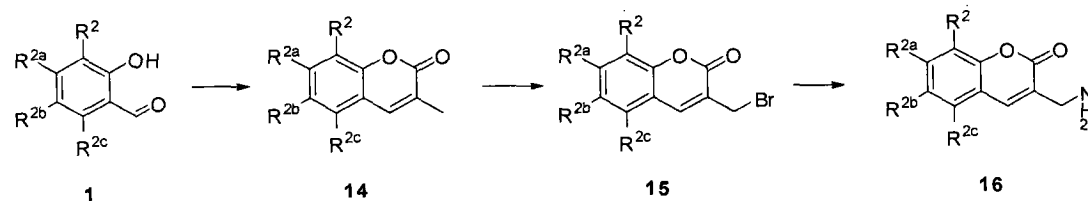


[0225] 流程 III 说明了磺酰氯取代的香豆素环的构建,其可与商品化购得的苯胺或胺反应以形成式 I 所示化合物中的磺胺连接 (其中 $X = -SO_2NH-$)。首先,如以前所述 (Bioorg. Med. Chem. 2002, 10, 31-40),在 -20-25℃,3-氨基香豆素 (8) 环与亚硝酸 (用亚硝酸钠和

强酸形成) 在水中反应。这形成了重氮盐 (10)。然后, 3- 重氮 - 香豆素 (10) 在有烷基黄原酸钾存在下经历 Leukart 苯硫酚反应形成香豆素取代的黄原酸酯。在碱性条件下, 该黄原酸酯在香豆素环的 3- 位形成游离巯基。随后, 0-50°C, 酸性条件下, 3- 硫代香豆素 (11) 在有机溶剂中与 N- 氯代琥珀酰亚胺反应。在这些条件下, 如前所述 (Synthesis 2006, 24, 4131-4134) 形成磺酰氯官能团 (12)。一旦形成, 可采用流程 I 所示标准偶联条件将磺酰氯与商品化购得的苯胺和胺反应以形成氨磺酰衍生物 (13)。产物可先采用常规技术, 例如制备型 TLC 或 HPLC、层析、沉淀、结晶等进行纯化。

[0226] 流程 IV

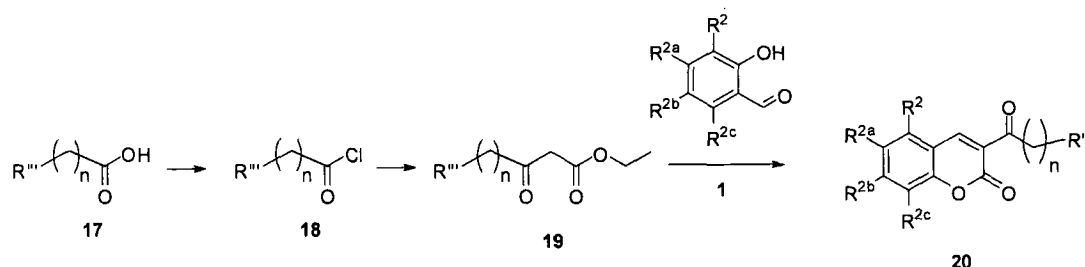
[0227]



[0228] 流程 IV 描述了在式 I 所示化合物中形成额外的 X 连接。现在, 商品化购得的水杨醛 (1) 可再次用于形成 3- 位甲基化的香豆素。首先, 在 10-50°C, 水杨醛 (1) 与 $\text{Ph}_3\text{P} = \text{CCH}_3\text{COOMe}$ 在有机溶剂中进行标准 Wittig 反应。然后在有机溶剂中加热该反应混合物以促进 3- 甲基香豆素 (14) 的环化。以前描述过形成甲基化香豆素的这些最优条件 (Journal of Medicinal Chemistry 1999, 42, 2662-2672)。然后在 50-100°C, 在无水有机溶剂中用 N- 溴代琥珀酰亚胺处理香豆素化合物。该处理形成 3- 溴代甲基香豆素 (15), 如前所述 (Journal of Medicinal Chemistry 2004, 47, 756-760)。最后, 在回流条件下, 溴代甲基香豆素与六亚甲基四胺 (hexanemethylenetetramine) 在有机溶剂中反应。然后除去溶剂, 残留物在酸性条件下水解形成伯胺 (16)。如以前报道的 (Journal of Medicinal Chemistry 2004, 47, 756-760), 水解的最优条件是在乙醇中与浓盐酸回流。最后, 可采用流程 I 所示的标准偶联条件, 将得到的胺与商品化购得的羧酸反应。收集的产物可直接使用, 或者可先采用常规技术, 例如制备型 TLC 或 HPLC、层析、沉淀、结晶等进行纯化。

[0229] 流程 V

[0230]

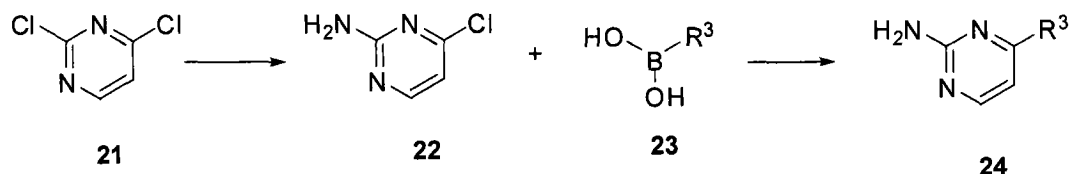


[0231] 流程 V 说明了对式 I 所示化合物中连接基团 X 的额外修饰。回流条件下用纯净亚硫酰氯处理商品化购得的羧酸 (17) 产生酰基氯 (18)。一旦形成, 在 0-50°C, 有碱, 例如吡啶存在下, 用梅尔德拉姆酸 (2) 在有机溶剂中处理该酰基氯。然后通过乙醇中回流使得粗制反应混合物脱去羧基形成 β - 酮酯 (19)。最后, 如前所示 (Journal of Medicinal Chemistry 2005, 48, 7592-7603), 在回流条件下, 在有机溶剂中缩合商品化购得的水杨醛 (1) 与 β - 酮酯 (19) 获得在 3- 位具有酮官能团的香豆素衍生物 (20)。收集的产物可直接

使用,或者可先采用常规技术,例如制备型 TLC 或 HPLC、层析、沉淀、结晶等进行纯化。

[0232] 流程 VI

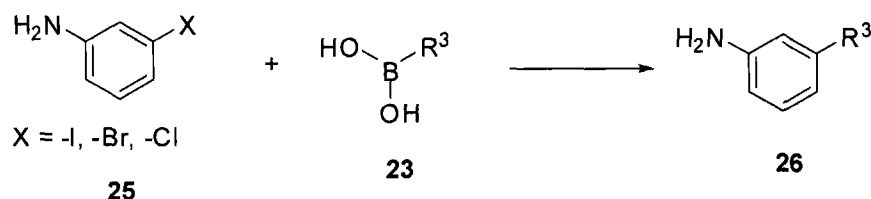
[0233]



[0234] 流程 VI 说明了用于与上述式 I 所示化合物的前体反应的氨基杂环,例如 2-氨基嘧啶和衍生物的形成。首先,如前所述 (Journal of Medicinal Chemistry 2005,48, 5570-5579),在降低温度下 (-20-10℃) 将氨水缓慢加入到在有机溶剂中的 2,4-二氯嘧啶 (21) 以形成 2-氨基-4-氯嘧啶 (22)。然后,在 20-120℃,有碱和钯催化剂存在下,该氯嘧啶与商品化购得的硼酸 (23) 在水性和 / 或有机溶剂中发生铃木偶联反应。已被描述的优选反应条件包括在 DMF 中利用碱 K₂CO₃ 和四 (三苯基膦) 钯 (Tetrahedron 2001,57,2787-9; Bioorg Med Chem Lett 2005,15(16),3670-4; Bioorg Med Chem Lett 2005,15(16), 3675-8)。收集的产物可直接使用,或者可先采用常规技术,例如制备型 TLC 或 HPLC、层析、沉淀、结晶等进行纯化。形成的 2-氨基嘧啶 (24) 可用于流程 I、II 和 III 中所述的偶联反应。

[0235] 流程 VII

[0236]



[0237] 流程 VII 说明了形成新型苯胺小分子 (26) 的另一方法,该小分子还可用于形成流程 I、II 和 III 的化合物。可利用商品化购得的卤化苯胺 (25) 与上述商品化购得的硼酸 (23) 进行铃木反应。铃木偶联的条件仍包括在水性和 / 或有机溶剂中利用碱和钯催化剂。收集的产物可直接使用,或者可先采用常规技术,例如制备型 TLC 或 HPLC、层析、沉淀、结晶等进行纯化。

[0238] IV. 药物组合物

[0239] 按照本发明,可利用治疗有效量的式 I'、I、Ia、Ib、Ib-1、Ib-2、Ib-3、Ic、Id、Id-1、Ie、If、Ig、Ih 或 Ii 所示化合物制备用于治疗哺乳动物的肿瘤疾病的药物组合物。

[0240] 本发明组合物可包括式 I'、I、Ia、Ib、Ib-1、Ib-2、Ib-3、Ic、Id、Id-1、Ie、If、Ig、Ih 或 Ii 所示化合物或其药学上可接受的盐、其水合物或其可水解的前体。通常将化合物以治疗有效量与合适载体或赋形剂混合。“治疗有效剂量”、“治疗有效量”,或可互换的“药理学上可接受的剂量”或“药理学上可接受的量”表示存在足够量的本发明化合物和药学上可接受的载体以便得到所需结果,例如缓解肿瘤疾病的症状或并发症。

[0241] 用于本发明方法的式 I'、I、Ia、Ib、Ib-1、Ib-2、Ib-3、Ic、Id、Id-1、Ie、If、Ig、Ih 或 Ii 所示化合物可掺入各种制剂以便治疗性给予。更具体地说,通过与合适的、药学上可接受的载体或稀释剂混合,可将式 I'、I、Ia、Ib、Ib-1、Ib-2、Ib-3、Ic、Id、Id-1、Ie、If、

Ig、Ih 或 Ii 所示化合物配制成药物组合物,可将药物组合物配制成固体、半固体、液体或气体形式的制品,例如片剂、胶囊、丸剂、粉末、颗粒、糖锭、悬液、凝胶、浆液、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂和气溶胶。因此,可通过各种途径给予所述化合物,包括口服、舌下含化、直肠、胃肠外、腹膜内、真皮内、经皮、气管内给药。此外,可采用局部方式、利用长效或持续释放制剂给予所述化合物。另外,可用脂质体给予所述化合物。

[0242] 可用常规赋形剂、稀释剂或运载体配制式 I'、I、Ia、Ib、Ib-1、Ib-2、Ib-3、Ic、Id、Id-1、Ie、If、Ig、Ih 或 Ii 所示化合物,将其压缩成片剂或配制成酞剂或溶液以便口服给药或通过肌肉内或静脉内途径给予。所述化合物可经皮给予,可配制成持续释放剂型等。式 (I) 所示化合物可单独给予、彼此组合给予,或者它们可与其它已知的化合物联用。

[0243] 用于本发明的合适制剂见通过引用纳入本文的 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药学科学和实践), 第 21 版, LWW 公司 (Lippincott Williams & Wilkins), 费城, 宾夕法尼亚州 PA, 2005。此外, 药物递送的简单综述可参见通过引用纳入本文的 Langer, Science (1990) 249: 1527-1533。可采用本领域技术人员已知的方式制备本文所述的药物组合物, 即, 通过常规混合、溶解、造粒、制锭剂、研磨、乳化、包封、包埋或冻干方法。以下方法和赋形剂只是示范性而绝非限制性的。

[0244] 给予本发明化合物的药物组合物可采用单位剂型方便地提供, 可通过药学和药物递送领域熟知的任何方法制备。所有方法包括将活性成分与构成一种或多种辅助成分的运载体结合的步骤。一般通过将活性成分与液体运载体或精细分级的固体运载体或二者均匀而紧密地结合, 然后 (如果需要) 使产品成形为所需制剂来制备药物组合物。在药物组合物中, 活性化合物的含量足以对疾病过程或状况产生所需作用。

[0245] 含有式 I 所示化合物的药物组合物可以是适合口服给予的形式, 例如片剂、锭剂、糖锭、水性或油性悬液、可分散粉末或颗粒、乳液和自乳化物 (如美国专利申请 2002-0012680 所述)、硬或软胶囊、糖浆、酞剂、溶液、口腔贴片剂、口服凝胶、咀嚼胶、可咀嚼片剂、泡腾粉末和泡腾片。可按照制备药物组合物领域已知的任何方法制备要口服应用的组合物, 此类组合物可含有选自甜味剂、调味剂、着色剂、抗氧化剂或防腐剂的一种或多种试剂以便提供药学上精致而可口的制品。片剂含有与适于制备片剂的药学上可接受的无毒赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是, 例如惰性稀释剂, 例如纤维素、二氧化硅、氧化铝、碳酸钙、碳酸钠、葡萄糖、甘露糖、山梨醇、乳糖、磷酸钙或磷酸钠; 造粒和崩解剂, 例如玉米淀粉或海藻酸; 粘合剂, 例如 PVP、纤维素、PEG、淀粉、明胶或阿拉伯胶; 和润滑剂, 例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可以是未包衣的, 或者可通过已知技术包衣、制成肠溶片等以减缓在胃肠道中的崩解和吸收, 从而在较长期间提供持续释放作用。例如, 可利用时间延迟材料, 例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。还可通过美国专利号 4, 256, 108; 4, 166, 452 和 4, 265, 874 所述的技术包衣它们以形成用于控释的渗透治疗片剂。

[0246] 口服应用的制剂还可以是硬明胶胶囊, 其中活性成分与惰性固体稀释剂, 例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合, 或是软明胶胶囊, 其中活性成分与水或油性介质, 例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。此外, 可用与水不可混溶的成分, 例如油制备乳液, 并用表面活性剂, 例如单酸甘油酯-甘油二酯 (mono-diglycerides)、PEG 酯等使之稳定。

[0247] 水性悬液含有与适于制备水性悬液的赋形剂混合的活性材料。此类赋形剂是助悬剂, 例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄

薯胶和阿拉伯胶；分散剂或润湿剂可以是天然磷脂，例如卵磷脂，或烯化氧与脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，例如十七烷乙烯氧基鲸蜡醇 (heptadecaethyleneoxycetanol)，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。水性悬液还可含有一种或多种防腐剂，例如对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯，一种或多种着色剂、一种或多种调味剂和一种或多种甜味剂，例如蔗糖或糖精。

[0248] 可将活性成分悬浮在植物油，例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰油中，或矿物油，例如液体石蜡中来配制油性悬液。油性悬液可含有增稠剂，例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可加入甜味剂，例如以上所列那些和调味剂以提供可口的口服制品。可通过加入抗氧化剂，例如抗坏血酸使这些组合物防腐。

[0249] 适于通过加入水来制备水性悬液的可分散粉末和颗粒提供与分散剂或润湿剂、助悬剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。以上所述已示例了合适的分散剂或润湿剂和助悬剂。还可存在其它赋形剂，例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0250] 本发明药物组合物还可采取水包油乳液的形式。油相可以是植物油，例如橄榄油或花生油，或矿物油，例如液体石蜡或这些物质的混合物。合适的乳化剂可以是天然树胶，例如阿拉伯胶或黄蓍胶，天然磷脂，例如大豆、卵磷脂，和衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯，例如山梨糖醇酐单油酸酯，和所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。所述乳液还可含有甜味剂和调味剂。

[0251] 可用甜味剂配制糖浆和酏剂，例如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖。此类制剂还可含有缓和剂、防腐剂和调味剂及着色剂。可与，例如环糊精、PEG 和表面活性剂组合制备口服溶液。

[0252] 药物组合物可以是无菌可注射的水性或油性悬液形式。可利用上述那些合适的分散剂或润湿剂，根据已知的技术配制该悬液。无菌可注射制品还可以是无毒、胃肠外可接受的稀释剂或溶剂配制的无菌可注射溶液或悬液，例如配制成 1,3- 丁二醇溶液。可用的可接受载体和溶剂是水、林格液和等渗氯化钠溶液。此外，常规利用无菌的不挥发油作为溶剂或助悬介质。为此目的，可利用任何温和的不挥发油，包括合成的单酸甘油酯或甘油二酯。此外，脂肪酸，例如油酸可用于制备可注射剂。

[0253] 为直肠给药，还可采用栓剂的形式给予本发明化合物。可通过混合药物与合适的非刺激性赋形剂来制备这些组合物，所述赋形剂在常温是固体，但在直肠温度下是液体，因此会在直肠中融化以释放药物。此类材料包括可可脂和聚乙二醇。此外，可利用溶液或软膏经眼部递送给予化合物。另外，可利用离子电渗贴剂 (iontophoretic patches) 等经皮递送主题化合物。对于局部应用，利用含有本发明化合物的乳膏、软膏、胶冻剂、溶液或悬液等。本文所用的局部应用还包括利用口洗剂和漱口剂。

[0254] 给錠剂核心提供合适包衣。为此目的，可利用可任选含有阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧乙烯凝胶 (carbopol gel)、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、漆溶液 (lacquer solution) 和合适的有机溶剂或溶剂混合物的浓缩糖溶液。可将染料或色素加入片剂或錠剂包衣以便区分或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0255] 为通过吸入给药，本发明所用的化合物采取气溶胶喷雾的形式，从利用合适推进

剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适气体的加压包或喷雾器,或从无推进剂的干粉吸入器方便地递送。在加压气溶胶的情况中,可通过提供阀门确定剂量单位以便递送计量用量。可将用于吸入器或吹入器中的,例如明胶的胶囊和药盒配制成含有化合物和合适粉基,例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0256] 或者,可采用疏水性药物化合物的其它递送方式。脂质体或乳液是疏水性药物的递送载体或运载体的熟知例子。在目前优选的实施方式中,可利用长循环的,即隐秘脂质体 (stealth liposome)。此类脂质体通常描述于 Woodle 等,美国专利号 5,013,556。还可通过控释方法和递送装置给予本发明化合物,例如美国专利号 3,845,770 ;3,916,899 ;3,536,809 ;3,598,123 和 4,008,719 所述那些。

[0257] 本发明化合物还可与运载体偶联,所述运载体是合适的聚合物,例如可靶向目标的药物运载体。此类聚合物可包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基-甲基丙烯酰胺-苯酚、聚羟乙基-天冬酰胺 (aspartamide)-苯酚或棕榈酰残基取代的聚环氧乙烷-聚赖氨酸。此外,本发明化合物可偶联于可用于实现药物缓释的生物可降解聚合物类的运载体,例如聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸和聚乙醇酸的共聚物、聚 ϵ -己内酯、聚羟基丁酸、聚原氨酸、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚腈基丙烯酸酯和水凝胶的交联或两亲嵌段共聚物。可将聚合物和半透过性聚合物基质制成成形制品,例如阀门、支架、导管、假体等。在本发明的一个实施方式中,本发明化合物偶联于形成支架或支架-移植装置的聚合物或半透过性聚合物基质。

[0258] 还可利用某些有机溶剂,例如二甲基亚砜 (DMSO),虽然通常毒性大一些。此外,可采用缓释递送化合物,例如含有治疗剂的固体疏水性聚合物的半透过性基质。现已有各种类型的持续释放材料,本领域技术人员熟知这些材料。根据其化学性质,持续释放胶囊能在数小时到高达 100 天期间释放化合物。

[0259] 药物组合物还可包含合适的固体或凝胶相运载体或赋形剂。此类运载体或赋形剂的例子包括但不限于:碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和诸如聚乙二醇等聚合物。

[0260] 适用于本发明的药物组合物包括其中包含治疗有效量的活性成分的组合物。组合物的给予量当然取决于所治疗的对象、对象的体重、疾患的严重性、给药方式和开处方医师的判断。本领域技术人员,特别是鉴于本文详述不难测定有效量。

[0261] 对于本发明方法所用的任何化合物,可从细胞培养试验或动物模型估计治疗有效剂量。

[0262] 此外,可通过标准药学方法,在细胞培养物或实验性动物中测定本文所述化合物的毒性和疗效,例如通过测定 LD_{50} (50%群体致死的剂量) 和 ED_{50} (在 50%群体中治疗有效的剂量)。毒性和疗效之间的剂量比是治疗指数,可表示为 LD_{50} 和 ED_{50} 之比。优选显示高治疗指数的化合物。可利用这些细胞培养试验和动物研究获得的数据制定人用无毒的剂量范围。此类化合物的剂量优选在包括 ED_{50} (毒性很小或无毒性) 在内的循环浓度范围内。剂量可根据所用的剂型和给药途径而在该范围内变动。每位医师可根据患者的情况选择确切的制剂、给药途径和剂量。(参见,例如 Fingl 等,1975 刊于: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (治疗的药理学基础),第 1 章)。

[0263] V. 活化处决胱冬酶原和治疗疾病状态的方法

[0264] 在另一方面,本发明提供活化胰冬酶原,例如处决胰冬酶原 3、6 和 / 或 7 的方法。该方法包括将式 I 所示化合物或其药物组合物与胰冬酶原,例如处决胰冬酶原 3、6 和 / 或 7 接触。给予本发明化合物可阻止对胰冬酶原活化起反应的疾病状态或可减轻疾病的严重程度或可减少疾病的时程。

[0265] 一旦与式 I 所示化合物接触,处决胰冬酶原 3 和 / 或 6 通常经历自活化。在某些情况下,接触式 I 所示化合物时,处决胰冬酶原 7 在较高浓度时可经历自活化。

[0266] 在还有另一方面,本发明还提供治疗哺乳动物疾病,例如肿瘤疾病和癌症的方法。该方法包括给予哺乳动物治疗有效量的式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐。可通过该方法治疗的疾病包括待除去患病细胞的疾病状态,例如自身免疫疾病、感染性疾病、癌症和肿瘤疾病。

[0267] 在本发明的一个实施方式中,可利用本发明的化合物治疗选自下组的疾病:白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、脊髓发育不良、多发性骨髓瘤、霍奇金病或非霍奇金淋巴瘤、小细胞或非小细胞肺癌、胃癌、肠癌或结肠直肠癌、前列腺癌、卵巢或乳腺癌、脑癌、头或颈癌、泌尿道癌、肾癌或膀胱癌、恶性黑色素瘤、肝癌、子宫癌或胰腺癌、结肠癌、甲状腺癌、肠癌和胰腺癌。

[0268] 本文提供的治疗方法通常包括给予患者有效量的一种或多种本文提供的化合物,例如经口服、鼻部或胃肠外途径。合适的患者包括患有本文鉴定的病症或疾病或对之易感(即,预防性治疗)的那些患者。如本文所述治疗的典型患者包括哺乳动物,特别是灵长类,尤其是人。其它合适的患者包括家养陪伴动物,例如狗、猫、马等,或家畜,例如牛、猪、绵羊等。

[0269] 本文提供的治疗方法通常包括给予患者有效量的本文提供的化合物、一种或多种化合物,例如式 I 所示化合物。在优选的实施方式中,优选口服给予患者(例如,人)本发明化合物。有效量可以是足以活化处决胰冬酶原 3、6 和 / 或 7 的用量和 / 或足以减轻或缓解患者所呈现症状的用量。给药量产生的化合物(或其活性代谢物,如果该化合物是前药的话)血浆浓度最好足够高从而足以可检测地活化处决胰冬酶原 3、6 和 / 或 7。治疗方案可根据所用的化合物和待治疗的具体病症而有所不同;对于大多数疾病的治疗,优选每日 4 次或低一些的给药频率。通常优选每日两次的给药方案,尤其优选每日给予一次。然而,应该知道任何特定患者的具体剂量水平和治疗方案取决于各种因素,包括所用具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给药时间、给药途径、排出率、药物组合(即,给予患者的其它药物)和进行治疗的疾病的严重程度以及开处方医学从业人员的判断。通常优选采用足以提供有效治疗的最低剂量。通常可采用适于所治疗或所预防疾病的医学或兽医学标准来监测患者的疗效。

[0270] 可视需要频繁给予本发明化合物,包括每小时一次、每日一次、每周一次或每月一次。还可根据所用的化合物和所治疗的具体疾病改变给药频率。然而,对于大多数疾病的治疗,优选每日 4 次、每日 3 次或更低频率的给药方案,尤其优选每日一次或每日两次的给药方案。本发明医学方法中所用化合物的初始给药剂量是每日约 0.0001mg/kg-约 3000mg/kg。可采用约 0.01mg/kg-约 500mg/kg,或约 0.1mg/kg-约 200mg/kg,或约 1mg/kg-约 100mg/kg,或约 10mg/kg-约 50mg/kg 的每日剂量范围。然而,可根据患者的需要、所治疗疾病的严重程度和所用的化合物而改变剂量。例如,可考虑具体患者中所诊断疾病的类型和阶段,凭

经验确定剂量。就本发明而言,给予患者的剂量应足以在该患者中随时间产生有益的治疗反应。还可通过在特定患者中给予特定化合物相伴的任何不利副作用是否存在、其性质和程度确定剂量大小。然而,应该知道任何特定患者的具体剂量水平将取决于各种因素,包括所用具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给药时间、给药途径、排出率、药物组合(即,给予患者的其它药物)和进行治疗的特定疾病的严重程度以及其它因素,包括开处方医学从业人员的判断。从业技术人员能够确定特定状况的合适剂量。通常自低于化合物的最佳剂量的较低剂量开始治疗。随后小量提升剂量直至获得该情况下的最佳作用。为简便起见,如果需要,可将每日总剂量分割并在一天期间分几部分给予。治疗医师可决定每日,或隔天给予剂量。还可在较长期间(数周、数月或数年)定期或连续给予剂量,例如利用皮下胶囊、囊剂或长效剂型,或通过贴剂。然而,应该知道任何特定患者的具体剂量水平将取决于各种因素,包括所用具体化合物的活性;所治疗个体的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;给药时间和途径;排出率;以前给予的其它药物;进行治疗的特定疾病的严重程度,这些是本领域技术人员熟知的。

[0271] 利用在不同 pH 值下溶解的胶囊材料,通过渗透压缓慢释放的胶囊或通过任何其它已知的控释方法可实现定时释放作用。

[0272] 本领域技术人员明白在一些情况中,必需采用这些范围外的剂量。此外,应该注意,临床医师或治疗医师知道如何和何时根据各患者反应中断、调节或终止治疗。

[0273] 在一些实施方式中,如权利要求 1-32 中任一项所限定的,本发明提供式 I'、I、Ia、Ib、Ib-1、Ib-2、Ib-3、Ic、Id、Id-1、Ie、If、Ig、Ih、Ii 所示化合物或其药学上可接受的盐以便用作药物。

[0274] 在其它实施方式中,如权利要求 1-32 中任一项所述,本发明提供式 I'、I、Ia、Ib、Ib-1、Ib-2、Ib-3、Ic、Id、Id-1、Ie、If、Ig、Ih、Ii 所示化合物或其药学上可接受的盐以便用于治疗肿瘤疾病或癌症。可治疗的疾病包括:白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、脊髓发育不良、多发性骨髓瘤、霍奇金病或非霍奇金淋巴瘤、小细胞或非小细胞肺癌、胃癌、肠癌或结肠直肠癌、前列腺癌、卵巢或乳腺癌、脑癌、头或颈癌、泌尿道癌、肾癌或膀胱癌、恶性黑色素瘤、肝癌、子宫癌或胰腺癌、结肠癌、甲状腺癌、肠癌和胰腺癌。为从属权利要求加上病痛类型基础。

[0275] 在一些实施方式中,如权利要求 1-32 中任一项所述,本发明提供式 I'、I、Ia、Ib、Ib-1、Ib-2、Ib-3、Ic、Id、Id-1、Ie、If、Ig、Ih、Ii 所示化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗肿瘤疾病或癌症的药物中的应用。可治疗的疾病包括:白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、脊髓发育不良、多发性骨髓瘤、霍奇金病或非霍奇金淋巴瘤、小细胞或非小细胞肺癌、胃癌、肠癌或结肠直肠癌、前列腺癌、卵巢或乳腺癌、脑癌、头或颈癌、泌尿道癌、肾癌或膀胱癌、恶性黑色素瘤、肝癌、子宫癌或胰腺癌、结肠癌、甲状腺癌、肠癌和胰腺癌。为从属权利要求加上病痛类型基础。

[0276] 可采用各种途径给予药物组合物,包括局部、胃肠外、静脉内、真皮内、肌肉内、经结肠、经直肠或腹膜内。药物组合物优选胃肠外、局部、静脉内、肌肉内或口服给予。

[0277] 还可与其它治疗剂或诊断剂组合给予式 I 所示化合物。

[0278] VI. 实施例

[0279] 实施例 1

[0280] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 咪唑并 [1,2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯基) - 酰胺 (1541)

[0281] 室温下, 将二异丙基乙胺 (DIEA, 0.044mL, 0.25mmol) 加入到在 2mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.05g, 0.23mmol) 和六氟磷酸 0-(7- 氮杂苯并三唑 -1- 基) -N, N, N, N' - 四甲基脒鎓 (HATU, 0.096g, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。随后, 加入 3- 咪唑并 [1,2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯胺 (0.048g, 0.023mmol), 反应约 30 分钟, 此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物, 抽气干燥, 然后经真空干燥得到 1541: ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10.78 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.54 (d, J = 7.0Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.73 (m, 2H), 7.60 (d, J = 9.0Hz, 1H), 7.57 (d, J = 9.0Hz, 1H), 7.44 (m, 3H), 7.26 (dd, J = 5.5, 6.8Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 5.5, 6.8Hz, 1H), 3.96 (s, 3H); LCMS (ESI) m/z 412 (MH^+)。

[0282] 实施例 2

[0283] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 咪唑并 [1,2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯基) - 酰胺 (1541A)

[0284] 在 H_2O (1mL) 中混合 2,3- 二羟基苯甲醛 (0.096g, 0.69mmol) 和梅尔德拉姆酸 (0.100g, 0.69mmol)。75°C, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 0.123g 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素, 产率为 85%; LCMS (ESI) m/z 207 (MH^+)。

[0285] 室温下, 将 DIEA (0.046mL, 0.27mmol) 加入到在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.050g, 0.24mmol) 和 HATU (0.101g, 0.27mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。随后加入 3- 咪唑并 [1,2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯胺 (0.051g, 0.24mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物, 抽气干燥, 然后经真空干燥得到 0.021g 1541A, 产率为 22%; LCMS (ESI) m/z 398 (MH^+)。

[0286] 实施例 3

[0287] 合成 2- 氧代 -8- 三氟甲氧基 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 咪唑并 [1,2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯基) - 酰胺 (1541B)

[0288] 在 H_2O (2mL) 中混合 3-(三氟甲氧基) 水杨醛 (0.250g, 1.21mmol) 和梅尔德拉姆酸 (0.200g, 1.39mmol)。75°C 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 0.197g 8-(三氟甲氧基)-3- 羧基 - 香豆素, 产率为 60%; LCMS (ESI) m/z 275 (MH^+)。

[0289] 室温下, 将 DIEA (0.035mL, 0.20mmol) 加入到在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8-(三氟甲氧基)-3- 羧基 - 香豆素 (0.050g, 0.18mmol) 和 HATU (0.076g, 0.20mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。随后, 加入 3- 咪唑并 [1,2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯胺 (0.038g, 0.18mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物, 抽气干燥, 然后经真空干燥得到 0.039g 1541B, 产率为 46%; LCMS (ESI) m/z 466 (MH^+)。

[0290] 实施例 4

[0291] 合成 7- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 咪唑并 [1,2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯基) - 酰胺 (1541C)

[0292] 室温下, 将 DIEA (0.027mL, 0.16mmol) 加入到在 2mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 7- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.031g, 0.14mmol) 和 HATU (0.060g, 0.16mmol) 并持续搅拌直至得到清澈溶液。随后, 加入 3- 咪唑并 [1,2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯胺 (0.030g, 0.14mmol), 反

应约 30 分钟,此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物,抽气干燥,然后经真空干燥得到 0.051g 1541C,产率为 86% : ^1H NMR(400MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$) δ 10.95(s, 1H), 8.96(s, 1H), 8.23(dd, $J = 1.8, 1.9\text{Hz}$, 1H), 8.20(d, $J = 7.1\text{Hz}$, 1H), 7.99(s, 1H), 7.79(d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H), 7.75(d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H), 7.68(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 1H), 7.63(d, $J = 9.1\text{Hz}$, 1H), 7.48(dd, $J = 7.9, 8.0\text{Hz}$, 1H), 7.25(dd, $J = 5.5, 6.8\text{Hz}$, 1H), 7.01(dd, $J = 2.4, 8.8\text{Hz}$, 1H), 6.95(d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.85(dd, $J = 7.0, 7.3\text{Hz}$, 1H), 3.96(s, 3H) ;LCMS(ESI) m/z 412(MH^+)。

[0293] 实施例 5

[0294] 合成 6- 甲氧基 -8- 吗啉 -4- 基甲基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 咪唑并 [1, 2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯基) - 酰胺 (1541D)

[0295] 在 H_2O (2mL) 中混合 2- 羟基 -5- 甲氧基 -3-(4- 吗啉基甲基) 苯甲醛 (0.349g, 1.39mmol) 和梅尔德拉姆酸 (0.200g, 1.39mmol)。75°C, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 0.381g 8-(4- 吗啉基甲基) -3- 羧基 -6- 甲氧基 - 香豆素, 产率为 85% ;LCMS(ESI) m/z 320(MH^+)。

[0296] 室温下, 将 DIEA (0.030mL, 0.17mmol) 加入到在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8-(4- 吗啉基甲基) -3- 羧基 -6- 甲氧基 - 香豆素 (0.050g, 0.16mmol) 和 HATU (0.065g, 0.17mmol) 并持续搅拌直至获得清澈溶液。随后, 加入 3- 咪唑并 [1, 2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯胺 (0.033g, 0.16mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物, 抽气干燥, 然后经真空干燥得到 0.047g 1541D, 产率为 59% ;LCMS(ESI) m/z 511(MH^+)。

[0297] 实施例 6

[0298] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸嘧啶 -4- 基酰胺 (1541E)

[0299] 室温下, 将 DIEA (0.044mL, 0.25mmol) 加入到在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.030g, 0.14mmol) 和 HATU (0.095g, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入嘧啶 -4- 基胺 (0.009g, 0.09mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤沉淀物, 抽气干燥, 然后经真空干燥得到 0.003g 1541E, 产率为 11% ;LCMS(ESI) m/z 298(MH^+)。

[0300] 实施例 7

[0301] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(1H- 苯并咪唑 -2- 基) - 苯基] - 酰胺 (1541F)

[0302] 室温下, 将 DIEA (0.044mL, 0.25mmol) 加入到在 2mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.050g, 0.23mmol) 和 HATU (0.095g, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H- 苯并咪唑 -2- 基) - 苯胺 (0.048g, 0.23mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物, 抽气干燥, 然后经真空干燥得到 1541F :LCMS(ESI) m/z 412(MH^+)。

[0303] 实施例 8

[0304] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4- 咪唑并 [1, 2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯基) - 酰胺 (1541G)

[0305] 室温下, 将 DIEA (0.044mL, 0.25mmol) 加入到在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.050g, 0.23mmol) 和 HATU (0.095g, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4- 咪唑并 [1, 2-a] 吡啶 -2- 基 - 苯胺 (0.048g, 0.23mmol), 反应

过夜,此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物,抽气干燥,然后经真空干燥得到 0.071g 1541G,产率为 76% :LCMS (ESI) m/z 412 (MH^+)。

[0306] 实施例 9

[0307] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸苯基酰胺 (1541H)

[0308] 室温下,将 DIEA (0.044mL, 0.25mmol) 加入到在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 7-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.050g, 0.23mmol) 和 HATU (0.095g, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入苯胺 (0.021g, 0.23mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物,抽气干燥,然后经真空干燥得到 0.055g 1541H,产率为 82% :LCMS (ESI) m/z 296 (MH^+)。

[0309] 实施例 10

[0310] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-吗啉-4-基-苯基)-酰胺 (1541I)

[0311] 室温下,将 DIEA (0.044mL, 0.25mmol) 加入到在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.050g, 0.23mmol) 和 HATU (0.095g, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-吗啉-4-基-苯胺 (0.040g, 0.23mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出黄色固体。过滤沉淀物,抽气干燥,然后经真空干燥得到 0.066g 1541I,产率为 76% :LCMS (ESI) m/z 381 (MH^+)。

[0312] 实施例 11

[0313] 合成 6-溴-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (1)

[0314] 室温下,将 DIEA (35.6 μ L, 0.2mmol) 加入到在 2mL DMF 中的 6-溴-3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.19mmol) 和 HATU (77.7mg, 0.2mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (38.9mg, 0.19mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的沉淀物,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 61.4mg 产物,产率为 68% :LCMS (ESI) m/z 461 (MH^+)。

[0315] 实施例 12

[0316] 合成 8-氟-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (2)

[0317] 在 H_2O (1mL) 中混合 3-氟水杨醛 (97.2mg, 0.69mmol) 和梅尔德拉姆酸 (100mg, 0.69mmol)。75 $^{\circ}C$, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后,过滤沉淀物,抽气干燥得到 99.6mg 8-氟-3-羧基-香豆素,产率为 68%。

[0318] 室温下,将 DIEA (46.0 μ L, 0.26mmol) 加入到在 2mL DMF 中的 8-氟-3-羧基-香豆素 (50.3mg, 0.24mmol) 和 HATU (100.5mg, 0.26mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (50.0mg, 0.24mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到终产物 :LCMS (ESI) m/z 400 (MH^+)。

[0319] 实施例 13

[0320] 合成 7,8-二羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (3)

[0321] 在 H_2O (1mL) 中混合 2,3,4-三羟基苯甲醛 (106.7mg, 0.69mmol) 和梅尔德拉姆酸

(100mg, 0.69mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 114.1mg 7,8-二羟基-3-羧基-香豆素, 产率为 74%。

[0322] 室温下, 将 DIEA (43.1 μL, 0.25mmol) 加入到在 2mL DMF 中的 7,8-二羟基-3-羧基-香豆素 (50mg, 0.23mmol) 和 HATU (94.1mg, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (47.1mg, 0.23mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥得到终产物: LCMS (ESI) m/z 414 (MH⁺)。

[0323] 实施例 14

[0324] 合成 8-溴-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (4)

[0325] 在 H₂O (1mL) 中混合 3-溴羟基苯甲醛 (139.5mg, 0.69mmol) 和梅尔德拉姆酸 (100mg, 0.69mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 135.0mg 8-溴-3-羧基-香豆素, 产率为 73%。

[0326] 室温下, 将 DIEA (35.6 μL, 0.2mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 8-溴-3-羧基-香豆素 (50mg, 0.19mmol) 和 HATU (77.73mg, 0.2mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (38.89mg, 0.19mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到终产物: LCMS (ESI) m/z 461 (MH⁺)。

[0327] 实施例 15

[0328] 合成 8-乙氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (5)

[0329] 在 H₂O (1mL) 中混合 3-乙氧基-水杨醛 (115.3mg, 0.69mmol) 和梅尔德拉姆酸 (100mg, 0.69mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥。

[0330] 室温下, 将 DIEA (40.9 μL, 0.23mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 8-乙氧基-3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.21mmol) 和 HATU (89.29mg, 0.23mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (44.7mg, 0.21mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 37.4mg 产物, 产率为 42%: LCMS (ESI) m/z 426 (MH⁺)。

[0331] 实施例 16

[0332] 合成 6-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (6)

[0333] 在 H₂O (2mL) 中混合 5-甲氧基-水杨醛 (211.1mg, 1.39mmol) 和梅尔德拉姆酸 (200mg, 1.39mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 241.1mg 6-甲氧基-3-羧基-香豆素, 产率为 79%。

[0334] 室温下, 将 DIEA (43.5 μL, 0.25mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 6-甲氧基-3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.23mmol) 和 HATU (95.0mg, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (47.5mg, 0.23mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 78.5mg 产物, 产率为 83%: LCMS (ESI) m/z 412 (MH⁺)。

[0335] 实施例 17

[0336] 合成 6,7-二羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯基)-酰胺(7)

[0337] 在 H₂O(2mL) 中混合 4,5-二羟基-水杨醛(213.0mg, 1.39mmol) 和梅尔德拉姆酸(200mg, 1.39mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 271.0mg 6,7-二羟基-3-羧基-香豆素, 产率为 88%。

[0338] 室温下, 将 DIEA(43.1 μL, 0.25mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 6,7-二羟基-3-羧基-香豆素(50.0mg, 0.23mmol) 和 HATU(94.1mg, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯胺(47.1mg, 0.23mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到终产物: LCMS(ESI) m/z 413(MH⁺)。

[0339] 实施例 18

[0340] 合成 7,8-二甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯基)-酰胺(8)

[0341] 在 H₂O(2mL) 中混合 3,4-二甲氧基-水杨醛(252.8mg, 1.39mmol) 和梅尔德拉姆酸(200mg, 1.39mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 271.0mg 7,8-二甲氧基-3-羧基-香豆素, 产率为 78%。

[0342] 将 DIEA(38.3 μL, 0.22mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 7,8-二甲氧基-3-羧基-香豆素(500mg, 0.20mmol) 和 HATU(83.6mg, 0.22mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯胺(41.8mg, 0.20mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 68.7mg 产物, 产率为 78%: LCMS(ESI) m/z 442(MH⁺)。

[0343] 实施例 19

[0344] 合成 6-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯基)-酰胺(9)

[0345] 在 H₂O(2mL) 中混合 5-三氟甲氧基-水杨醛(286.0mg, 1.39mmol) 和梅尔德拉姆酸(200mg, 1.39mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 189.1mg 6-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素, 产率为 50%。

[0346] 室温下, 将 DIEA(34.9 μL, 0.20mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 6-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素(50.0mg, 0.18mmol) 和 HATU(76.3g, 0.20mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯胺(38.2mg, 0.18mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 30.5mg 产物, 产率为 36%: LCMS(ESI) m/z 466(MH⁺)。

[0347] 实施例 20

[0348] 合成 6-碘-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯基)-酰胺(10)

[0349] 在 H₂O(2mL) 中混合 5-碘水杨醛(344.2mg, 1.39mmol) 和梅尔德拉姆酸(200mg, 1.39mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 302.0mg 6-碘-3-羧基-香豆素, 产率为 69%。

[0350] 室温下,将 DIEA (30.3 μ L, 0.17mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 6-碘-3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.16mmol) 和 HATU (66.2g, 0.17mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (33.1mg, 0.16mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 27.4mg 产物,产率为 34% ;LCMS (ESI)m/z 508 (MH⁺)。

[0351] 实施例 21

[0352] 合成 6-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (11)

[0353] 在 H₂O (2mL) 混合中 5-羟基水杨醛 (191.7mg, 1.39mmol) 和梅尔德拉姆酸 (200mg, 1.39mmol)。75℃,搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后,过滤沉淀物,抽气干燥得到 249.0mg 产物,产率为 87%。

[0354] 室温下,将 DIEA (46.5 μ L, 0.27mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 6-羟基-3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.24mmol) 和 HATU (101.4mg, 0.27mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (50.8mg, 0.24mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 81.1mg 产物,产率为 85% ;LCMS (ESI)m/z 398 (MH⁺)。

[0355] 实施例 22

[0356] 合成 6-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (12)

[0357] 在 H₂O (2mL) 中混合 5-甲氧基水杨醛 (211.1mg, 1.39mmol) 和梅尔德拉姆酸 (200mg, 1.39mmol)。75℃,搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后,过滤沉淀物,抽气干燥得到 241. mg 6-甲氧基-3-羧基-香豆素,产率为 79%。

[0358] 室温下,将 DIEA (43.5 μ L, 0.25mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 6-甲氧基-3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.23mmol) 和 HATU (95.0mg, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (475. mg, 0.23mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 78.5mg 产物,产率为 83% ;LCMS (ESI)m/z 412 (MH⁺)。

[0359] 实施例 23

[0360] 合成 2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (13)

[0361] 室温下,将 DIEA (50.4 μ L, 0.29mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.26mmol) 和 HATU (110.0mg, 0.29mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (55.0mg, 0.26mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 83.6mg 产物,产率为 85% ;LCMS (ESI)m/z 382 (MH⁺)。

[0362] 实施例 24

[0363] 合成 6-甲氧基-8-吗啉-4-基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰胺 (14)

[0364] 在 H₂O (1mL) 中混合 3-吗啉-5-甲氧基水杨醛 (100mg, 0.40mmol) 和梅尔德拉姆酸

(60.5mg, 0.42mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 76.7mg 6-甲氧基-8-吗啉-3-羧基-香豆素, 产率为 60%。

[0365] 室温下, 将 DIEA (30.0 μ L, 0.17mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 6-甲氧基-8-吗啉-3-羧基-香豆素 (50mg, 0.16mmol) 和 HATU (65.5mg, 0.17mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯胺 (32.8mg, 0.16mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 46.8mg 产物, 产率为 57% : LCMS (ESI) m/z 511 (MH⁺)。

[0366] 实施例 25

[0367] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-酰胺 (15)

[0368] 在 H₂O (1mL) 中混合 2,3-二羟基苯甲醛 (95.8mg, 0.69mmol) 和 梅尔德拉姆酸 (100mg, 0.69mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后, 过滤沉淀物, 抽气干燥得到 8-羟基-3-羧基-香豆素。

[0369] 室温下, 将 DIEA (46.5 μ L, 0.27mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.24mmol) 和 HATU (101.4mg, 0.27mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基 (50.8mg, 0.24mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到终产物 : LCMS (ESI) m/z 398 (MH⁺)。

[0370] 实施例 26

[0371] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-吗啉-4-基-苯基)-酰胺 (16)

[0372] 室温下, 将 DIEA (0.028mL, 0.160mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.030g, 0.146mmol) 和 HATU (0.061g, 0.160mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-吗啉-4-基苯胺 (0.026g, 0.146mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.023g 产物, 产率为 43% : LCMS (ESI) m/z 367 (MH⁺)。

[0373] 实施例 27

[0374] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-吡啶-3-基-苯基)-酰胺 (17)

[0375] 室温下, 将 DIEA (0.028mL, 0.160mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.030g, 0.146mmol) 和 HATU (0.061g, 0.160mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-吡啶-3-基苯胺 (0.025g, 0.146mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.017g 产物, 产率为 32% : LCMS (ESI) m/z 359 (MH⁺)。

[0376] 实施例 28

[0377] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-吡啶-3-基-苯基)-酰胺 (18)

[0378] 室温下, 将 DIEA (43.5 μ L, 0.25mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (50.0mg, 0.23mmol) 和 HATU (95.0mg, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-吡啶-3-基-苯胺 (38.7mg, 0.23mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 71.6mg 产物, 产率为 84% : LCMS (ESI) m/z 373 (MH⁺)。

[0379] 实施例 29

[0380] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-吡啶-4-基-苯基)-酰胺(19)

[0381] 室温下,将 DIEA(0.028mL,0.160mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.030g,0.146mmol) 和 HATU(0.061g,0.160mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-吡啶-4-基苯胺(0.025g,0.146mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.022g 产物,产率为 42% :LCMS(ESI)m/z 359(MH⁺)。

[0382] 实施例 30

[0383] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-吡啶-4-基-苯基)-酰胺(20)

[0384] 室温下,将 DIEA(43.5 μL,0.25mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(50.0mg,0.23mmol) 和 HATU(95.0mg,0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯胺(38.7mg,0.23mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 65.0mg 产物,产率为 76% :LCMS(ESI)m/z 373(MH⁺)。

[0385] 实施例 31

[0386] 合成 3-(2-乙氧基-吡啶-3-基)-苯胺(21)

[0387] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME(2mL) 中混合 2-乙氧基吡啶-3-硼酸(0.123g,0.693mmol) 和 3-溴苯胺(0.05mL,0.462mmol)。将 Na₂CO₃(2M,0.485mL,0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄(0.017g,0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 H₂O 中,用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析(0-10% EtOAc/己烷)纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。除去含产物部分的溶剂,得到 0.079g,产率为 80%。

[0388] 实施例 32

[0389] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸[3-(2-乙氧基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺(41)

[0390] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.070mmol) 和 HATU(0.029g,0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-乙氧基-吡啶-3-基)-苯胺(0.015g,0.070mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.017g 产物,产率为 61% :LCMS(ESI)m/z 403(MH⁺)。

[0391] 实施例 33

[0392] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸[3-(2-乙氧基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺(42)

[0393] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.015g,0.070mmol) 和 HATU(0.029g,0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-乙氧基-吡啶-3-基)-苯胺(0.015g,0.070mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.025g 产物,产率为 86% :LCMS(ESI)m/z 417(MH⁺)。

[0394] 实施例 34

[0395] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2-乙氧基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺 (43)

[0396] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.019g,0.070mmol) 和 HATU(0.029g,0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-乙氧基-吡啶-3-基)-苯胺 (0.015g,0.070mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.016g 产物,产率为 48% ;LCMS(ESI)m/z 471(MH⁺)。

[0397] 实施例 35

[0398] 合成 4'-甲氧基-联苯-3-基胺 (22)

[0399] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME(2mL) 中混合 4-甲氧基苯基硼酸 (0.105g,0.693mmol) 和 3-溴苯胺 (0.05mL,0.462mmol)。将 Na₂CO₃(2M,0.485mL,0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄(0.017g,0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂。将得到的残留物重悬在 H₂O 中,用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-20% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.063g,产率为 68%。

[0400] 实施例 36

[0401] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (4'-甲氧基-联苯-3-基)-酰胺 (44)

[0402] 室温下,将 DIEA(0.0144mL,0.083mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.016g,0.075mmol) 和 HATU(0.032g,0.083mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-甲氧基-联苯-3-基胺 (0.015g,0.075mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司(Biotage)) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到 0.015g 产物,产率为 52% ;LCMS(ESI)m/z 388(MH⁺)。

[0403] 实施例 37

[0404] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (4'-甲氧基-联苯-3-基)-酰胺 (45)

[0405] 室温下,将 DIEA(0.0144mL,0.083mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.017g,0.075mmol) 和 HATU(0.032g,0.083mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-甲氧基-联苯-3-基胺 (0.015g,0.075mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.021g 产物,产率为 68% ;LCMS(ESI)m/z 402(MH⁺)。

[0406] 实施例 38

[0407] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (4'-甲氧基-联苯-3-基)-酰胺 (46)

[0408] 室温下,将 DIEA(0.0144mL,0.083mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.021g,0.075mmol) 和 HATU(0.032g,0.083mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-甲氧基-联苯-3-基胺 (0.015g,0.075mmol),反应过夜,此

时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.019g 产物,产率为 55% :LCMS(ESI)m/z 456 (MH⁺)。

[0409] 实施例 39

[0410] 合成 4' - 甲氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基胺 (23)

[0411] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME (2mL) 中混合 4- 甲氧基 -3- 甲基苯基硼酸 (0.115g, 0.693mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬于 H₂O 中,用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-20% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.074g,产率为 75%。

[0412] 实施例 40

[0413] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4' - 甲氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (47)

[0414] 室温下,将 DIEA (0.014mL, 0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.015g, 0.070mmol) 和 HATU (0.029g, 0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4' - 甲氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.070mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.017g 产物, 产率为 61% :LCMS(ESI)m/z 402 (MH⁺)。

[0415] 实施例 41

[0416] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4' - 甲氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (48)

[0417] 室温下,将 DIEA (0.014mL, 0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.016g, 0.070mmol) 和 HATU (0.029g, 0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4' - 甲氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.070mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.023g 产物, 78% 产率 :LCMS(ESI)m/z 416 (MH⁺)。

[0418] 实施例 42

[0419] 合成 8- 三氟甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4' - 甲氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (49)

[0420] 室温下,将 DIEA (0.014mL, 0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 三氟甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.019g, 0.070mmol) 和 HATU (0.029g, 0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4' - 甲氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.070mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.022g 产物, 产率为 65% :LCMS(ESI)m/z 470 (MH⁺)。

[0421] 实施例 43

[0422] 合成 2' , 4' - 二甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (24)

[0423] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME (2mL) 中混合 2, 4- 二甲氧基苯基硼酸 (0.126g,

0.693mmol) 和 3- 溴 苯 胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na_2CO_3 (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 H_2O 中, 用 CH_2Cl_2 萃取。 MgSO_4 干燥有机相, 真空浓缩。二氧化硅柱层析 (5-20% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.078g, 产率为 74%。

[0424] 实施例 44

[0425] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (2', 4' - 二甲氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (50)

[0426] 室温下, 将 DIEA (0.013mL, 0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2', 4' - 二甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.019g 产物, 产率为 70% :LCMS(ESI)m/z 418(MH^+)。

[0427] 实施例 45

[0428] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (2', 4' - 二甲氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (51)

[0429] 室温下, 将 DIEA (0.013mL, 0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2', 4' - 二甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.024g 产物, 产率为 86% :LCMS(ESI)m/z 432(MH^+)。

[0430] 实施例 46

[0431] 合成 8- 三氟甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (2', 4' - 二甲氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (52)

[0432] 室温下, 将 DIEA (0.013mL, 0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 三氟甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.018g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2', 4' - 二甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.022g 产物, 产率为 70% :LCMS(ESI)m/z 486(MH^+)。

[0433] 实施例 47

[0434] 合成 3', 4' - 二甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (25)

[0435] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (2mL) 中混合 3, 4- 二甲氧基苯基硼酸 (0.126g, 0.693mmol) 和 3- 溴 苯 胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na_2CO_3 (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 H_2O 中, 用 CH_2Cl_2 萃取。 MgSO_4 干燥有机

相,真空浓缩。二氧化硅柱层析(0-20% EtOAc/ 己烷)纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.067g,产率 63%。

[0436] 实施例 48

[0437] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3',4'-二甲氧基-联苯-3-基)-酰胺(53)

[0438] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3',4'-二甲氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.065mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到 0.005g 产物,产率为 19%:LCMS(ESI)m/z 418(MH⁺)。

[0439] 实施例 49

[0440] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3',4'-二甲氧基-联苯-3-基)-酰胺(54)

[0441] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3',4'-二甲氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.018g 产物,产率为 64%:LCMS(ESI)m/z 432(MH⁺)。

[0442] 实施例 50

[0443] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3',4'-二甲氧基-联苯-3-基)-酰胺(55)

[0444] 室温下,将 DIEA(0.0144mL,0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素(0.018g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3',4'-二甲氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.021g 产物,产率为 65%:LCMS(ESI)m/z 486(MH⁺)。

[0445] 实施例 51

[0446] 合成 2',5'-二甲氧基-联苯-3-基胺(26)

[0447] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME(2mL) 中混合 2,5-二甲氧基苯基硼酸(0.126g,0.693mmol) 和 3-溴苯胺(0.05mL,0.462mmol)。将 Na₂CO₃(2M,0.485mL,0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄(0.017g,0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 H₂O 中,用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析纯化粗产物(0-20% EtOAc/ 己烷)。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.091g,产率为 91%。

[0448] 实施例 52

[0449] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(2',5'-二甲氧基-联苯-3-基)-酰胺(56)

[0450] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.013g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2',5'-二甲氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.065mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,冻干 48 小时得到 0.007g 产物,产率为 27% :LCMS(ESI)m/z 418(MH⁺)。

[0451] 实施例 53

[0452] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(2',5'-二甲氧基-联苯-3-基)-酰胺(57)

[0453] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2',5'-二甲氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.023g 产物,产率为 83% :LCMS(ESI)m/z 432(MH⁺)。

[0454] 实施例 54

[0455] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(2',5'-二甲氧基-联苯-3-基)-酰胺(58)

[0456] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素(0.018g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2',5'-二甲氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.065mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,冻干 48 小时得到 0.02g 产物,产率为 64% :LCMS(ESI)m/z 486(MH⁺)。

[0457] 实施例 55

[0458] 合成 4'-苯氧基-联苯-3-基胺(27)

[0459] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME(2mL) 中混合 4-苯氧基苯基硼酸(0.148g,0.693mmol) 和 3-溴苯胺(0.05mL,0.462mmol)。将 Na₂CO₃(2M,0.485mL,0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄(0.017g,0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将残留物重悬在 H₂O 中,用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析(0-20% EtOAc/己烷)纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.065g,产率为 54%。

[0460] 实施例 56

[0461] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(4'-苯氧基-联苯-3-基)-酰胺(59)

[0462] 室温下,将 DIEA(0.011mL,0.063mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.012g,0.057mmol) 和 HATU(0.024g,0.063mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-苯氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.057mmol),反应过夜。真空除去

DMF,将反应(混合物)重悬在DMSO中。采用含0.05% TFA的10-95% ACN/H₂O溶剂梯度,20毫升/分钟的流速,利用Parallex Flex平行制备型反相HPLC仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测254nm的UV吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到0.009g产物,产率为34%:LCMS(ESI)m/z 450(MH⁺)。

[0463] 实施例 57

[0464] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4' - 苯氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (60)

[0465] 室温下,将DIEA(0.011mL,0.063mmol)加入到在0.36mL DMF中的8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.013g,0.057mmol)和HATU(0.024g,0.063mmol)中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入4'-苯氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.057mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到0.022g产物,产率为83%:LCMS(ESI)m/z 464(MH⁺)。

[0466] 实施例 58

[0467] 合成 8- 三氟甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4' - 苯氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (61)

[0468] 室温下,将DIEA(0.011mL,0.063mmol)加入到在0.36mL DMF中的8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素(0.016g,0.057mmol)和HATU(0.024g,0.063mmol)中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入4'-苯氧基-联苯-3-基胺(0.015g,0.057mmol),反应过夜。真空除去DMF,将反应(混合物)重悬在DMSO中。采用含0.05% TFA的10-95% ACN/H₂O溶剂梯度,20毫升/分钟的流速,利用Parallex Flex平行制备型反相HPLC仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测254nm的UV吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到0.023g产物,产率为78%:LCMS(ESI)m/z 518(MH⁺)。

[0469] 实施例 59

[0470] 合成 3- 苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基 - 苯胺 (28)

[0471] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在DME(2mL)中混合3,4-亚甲基二氧基苯基硼酸(0.115g,0.693mmol)和3-溴苯胺(0.05mL,0.462mmol)。将Na₂CO₃(2M,0.485mL,0.970mmol)和Pd(PPh₃)₄(0.017g,0.014mmol)加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在H₂O中,用CH₂Cl₂萃取。MgSO₄干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析(0-20% EtOAc/己烷)纯化粗产物。通过TLC监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到0.057g,产率为58%。

[0472] 实施例 60

[0473] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基 - 苯基) - 酰胺 (62)

[0474] 室温下,将DIEA(0.014mL,0.077mmol)加入到在0.36mL DMF中的8-羟基-3-羧基-香豆素(0.015g,0.070mmol)和HATU(0.029g,0.077mmol)中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入3-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-苯胺(0.015g,0.070mmol),反应过夜。真空除去DMF,将反应(混合物)重悬在DMSO中。采用含0.05% TFA的10-95% ACN/H₂O溶剂梯度,20毫升/分钟的流速,利用Parallex Flex平行制备型反相HPLC仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测254nm的UV吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除

去溶剂得到 0.008g 产物,产率为 29% :LCMS(ESI)m/z 402(MH⁺)。

[0475] 实施例 61

[0476] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基 - 苯基) - 酰胺 (63)

[0477] 室温下,将 DIEA (0.014mL,0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.016g,0.070mmol) 和 HATU (0.029g,0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3- 苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基 - 苯胺 (0.015g,0.070mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.023g 产物,产率为 77% :LCMS(ESI)m/z 416(MH⁺)。

[0478] 实施例 62

[0479] 合成 8- 三氟甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基 - 苯基) - 酰胺 (64)

[0480] 室温下,将 DIEA (0.014mL,0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 三氟甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.019g,0.070mmol) 和 HATU (0.029g,0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3- 苯并 [1,3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基 - 苯胺 (0.015g,0.070mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.023g 产物,产率为 70% :LCMS(ESI)m/z 470(MH⁺)。

[0481] 实施例 63

[0482] 合成 4' - 乙氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基胺 (29)

[0483] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME (2mL) 中混合 4- 乙氧基 -3- 甲基苯基硼酸 (0.125g,0.693mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.05mL,0.462mmol)。将 Na₂CO₃ (2M,0.485mL,0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.017g,0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 H₂O 中,用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-20% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.071g,产率为 67%。

[0484] 实施例 64

[0485] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4' - 乙氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (65)

[0486] 室温下,将 DIEA (0.013mL,0.072mmol) 加入到在 0.37mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.013g,0.067mmol) 和 HATU (0.028g,0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4' - 乙氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g,0.067mmol), 反应过夜。真空除去 DMF,将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升 / 分钟的流速,利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,冻干 48 小时得到 0.011g 产物,产率为 41% :LCMS(ESI)m/z 416(MH⁺)。

[0487] 实施例 65

[0488] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4' - 乙氧基 -3' - 甲基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (66)

[0489] 室温下,将 DIEA (0.013mL,0.072mmol) 加入到在 0.37mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧

基-香豆素 (0.016g, 0.067mmol) 和 HATU (0.028g, 0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-乙氧基-3'-甲基-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.067mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.018g 产物, 产率为 65% :LCMS (ESI) m/z 430 (MH⁺)。

[0490] 实施例 66

[0491] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (4'-乙氧基-3'-甲基-联苯-3-基)-酰胺 (67)

[0492] 室温下, 将 DIEA (0.013mL, 0.072mmol) 加入到在 0.37mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.020g, 0.067mmol) 和 HATU (0.028g, 0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-乙氧基-3'-甲基-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.067mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.017g 产物, 产率为 53% :LCMS (ESI) m/z 484 (MH⁺)。

[0493] 实施例 67

[0494] 合成 4'-乙氧基-联苯-3-基胺 (30)

[0495] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (2mL) 中混合 4-乙氧基苯基硼酸 (0.115g, 0.693mmol) 和 3-溴苯胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 H₂O 中, 用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相, 真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-20% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.067g, 产率为 68%。

[0496] 实施例 68

[0497] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (4'-乙氧基-联苯-3-基)-酰胺 (68)

[0498] 室温下, 将 DIEA (0.014mL, 0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.015g, 0.070mmol) 和 HATU (0.029g, 0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-乙氧基-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.070mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.012g 产物, 产率为 41% :LCMS (ESI) m/z 402 (MH⁺)。

[0499] 实施例 69

[0500] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (4'-乙氧基-联苯-3-基)-酰胺 (69)

[0501] 室温下, 将 DIEA (0.014mL, 0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.016g, 0.070mmol) 和 HATU (0.029g, 0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-乙氧基-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.070mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.021g 产物, 产率为 73% :LCMS (ESI) m/z 416 (MH⁺)。

[0502] 实施例 70

[0503] 合成 8- 三氟甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (4' - 乙氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (70)

[0504] 室温下, 将 DIEA (0.014mL, 0.077mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 三氟甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.019g, 0.070mmol) 和 HATU (0.029g, 0.077mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4' - 乙氧基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.070mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.018g 产物, 产率为 55% :LCMS(ESI)m/z 470 (MH⁺)。

[0505] 实施例 71

[0506] 合成 2' - 三氟甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (31)

[0507] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (2mL) 中混合 2- 三氟甲氧基苯基硼酸 (0.143g, 0.693mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 H₂O 中, 用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相, 真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-5% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.086g, 产率为 74%。

[0508] 实施例 72

[0509] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (2' - 三氟甲氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (71)

[0510] 室温下, 将 DIEA (0.011mL, 0.065mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.012g, 0.059mmol) 和 HATU (0.025g, 0.065mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2' - 三氟甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.059mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.017g 产物, 产率为 63% :LCMS(ESI)m/z 442 (MH⁺)。

[0511] 实施例 73

[0512] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (2' - 三氟甲氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (72)

[0513] 室温下, 将 DIEA (0.011mL, 0.065mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.013g, 0.059mmol) 和 HATU (0.025g, 0.065mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2' - 三氟甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.059mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.021g 产物, 产率为 76% :LCMS(ESI)m/z 456 (MH⁺)。

[0514] 实施例 74

[0515] 合成 8- 三氟甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (2' - 三氟甲氧基 - 联苯 -3- 基) - 酰胺 (73)

[0516] 室温下, 将 DIEA (0.011mL, 0.065mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 三氟甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.016g, 0.059mmol) 和 HATU (0.025g, 0.065mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2' - 三氟甲氧基 - 联苯 -3- 基胺 (0.015g, 0.059mmol), 反应过

夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.027g 产物, 产率为 90% :LCMS(ESI)m/z 510 (MH^+)。

[0517] 实施例 75

[0518] 合成 3-(2,3-二氢-苯并呋喃-5-基)-苯胺 (32)

[0519] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (2mL) 中混合 2,3-二氢苯并呋喃-5-硼酸 (0.114g, 0.693mmol) 和 3-溴苯胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na_2CO_3 (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 $Pd(PPh_3)_4$ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 H_2O 中, 用 CH_2Cl_2 萃取。 $MgSO_4$ 干燥有机相, 真空浓缩。二氧化硅柱层析 (5-20% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.0762g, 产率为 78%。

[0520] 实施例 76

[0521] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2,3-二氢-苯并呋喃-5-基)-苯基]-酰胺 (74)

[0522] 室温下, 将 DIEA (0.014mL, 0.078mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.015g, 0.071mmol) 和 HATU (0.030g, 0.078mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2,3-二氢-苯并呋喃-5-基)-苯胺 (0.015g, 0.071mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.014g 产物, 产率为 49% :LCMS(ESI)m/z 400 (MH^+)。

[0523] 实施例 77

[0524] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2,3-二氢-苯并呋喃-5-基)-苯基]-酰胺 (75)

[0525] 室温下, 将 DIEA (0.014mL, 0.078mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.016g, 0.071mmol) 和 HATU (0.030g, 0.078mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2,3-二氢-苯并呋喃-5-基)-苯胺 (0.015g, 0.071mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.028g 产物, 产率为 94% :LCMS(ESI)m/z 414 (MH^+)。

[0526] 实施例 78

[0527] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2,3-二氢-苯并呋喃-5-基)-苯基]-酰胺 (76)

[0528] 室温下, 将 DIEA (0.014mL, 0.078mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.020g, 0.071mmol) 和 HATU (0.030g, 0.078mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2,3-二氢-苯并呋喃-5-基)-苯胺 (0.015g, 0.070mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.026g 产物, 产率为 76% :LCMS(ESI)m/z 484 (MH^+)。

[0529] 实施例 79

[0530] 合成 3-(6-甲氧基-萘-2-基)-苯胺 (33)

[0531] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (2mL) 中混合 6-甲氧基-萘-2-硼酸 (0.140g,

0.693mmol) 和 3- 溴 苯 胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na_2CO_3 (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 H_2O 中, 用 CH_2Cl_2 萃取。 MgSO_4 干燥有机相, 真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-20% EtOAc / 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.06g, 产率为 75%。

[0532] 实施例 80

[0533] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(6- 甲氧基 - 萘 -2- 基) - 苯基] - 酰胺 (77)

[0534] 室温下, 将二异丙基乙胺 (DIEA, 0.0115mL, 0.067mmol) 加入到在 0.5mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.012g, 0.06mmol) 和六氟磷酸 0-(7- 氮杂苯并三唑 -1- 基) -N, N, N' - 四甲基脒鎓 (HATU, 0.025g, 0.067mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6- 甲氧基 - 萘 -2- 基) - 苯胺 (0.015g, 0.06mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在二甲基亚砷 (DMSO) 中。采用含 0.05% 三氟乙酸 (TFA) 的 10-95% 乙腈 (CAN)/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分。真空除去溶剂, 得到的固体在真空中静置过夜得到 0.010g 产物, 产率为 38% :LCMS(ESI) m/z 438 (MH^+)。

[0535] 实施例 81

[0536] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(6- 甲氧基 - 萘 -2- 基) - 苯基] - 酰胺 (78)

[0537] 室温下, 将 DIEA (0.0115mL, 0.067mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.013g, 0.06mmol) 和 HATU (0.025g, 0.067mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6- 甲氧基 - 萘 -2- 基) - 苯胺 (0.015g, 0.06mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.023g 产物, 产率为 83% :LCMS(ESI) m/z 452 (MH^+)。

[0538] 实施例 82

[0539] 合成 8- 三氟甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(6- 甲氧基 - 萘 -2- 基) - 苯基] - 酰胺 (79)

[0540] 室温下, 将 DIEA (0.0115mL, 0.067mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 三氟甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.016g, 0.06mmol) 和 HATU (0.025g, 0.067mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6- 甲氧基 - 萘 -2- 基) - 苯胺 (0.015g, 0.06mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.015g 产物, 产率为 49% :LCMS(ESI) m/z 506 (MH^+)。

[0541] 实施例 83

[0542] 合成 3- 萘 -2- 基 - 苯胺 (34)

[0543] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (2mL) 中混合 萘 -2- 硼酸 (0.119g, 0.693mmol) 和 3- 溴 苯 胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na_2CO_3 (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 H_2O 中, 用 CH_2Cl_2 萃取。 MgSO_4 干燥有机

相,真空浓缩。二氧化硅柱层析(5-20% EtOAc/己烷)纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.063g,产率为 63%。

[0544] 实施例 84

[0545] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-萘-2-基-苯基)-酰胺(80)

[0546] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.075mmol)加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.068mmol)和 HATU(0.029g,0.075mmol)中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-萘-2-基-苯胺(0.015g,0.068mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,冻干 48 小时得到 0.010g 产物,产率为 36%;LCMS(ESI)m/z 408(MH⁺)。

[0547] 实施例 85

[0548] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-萘-2-基-苯基)-酰胺(81)

[0549] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.075mmol)加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.015g,0.068mmol)和 HATU(0.029g,0.075mmol)中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-萘-2-基-苯胺(0.015g,0.068mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.025g 产物,产率为 86%;LCMS(ESI)m/z 422(MH⁺)。

[0550] 实施例 86

[0551] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-萘-2-基-苯基)-酰胺(82)

[0552] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.075mmol)加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素(0.019g,0.068mmol)和 HATU(0.029g,0.075mmol)中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-萘-2-基-苯胺(0.015g,0.068mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.024g 产物,产率为 63%;LCMS(ESI)m/z 476(MH⁺)。

[0553] 实施例 87

[0554] 合成 3-喹啉-3-基-苯胺(35)

[0555] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在二甲氧基乙烷(DME,2mL)中混合喹啉-3-硼酸(0.120g,0.693mmol)和 3-溴苯胺(0.05mL,0.462mmol)。将碳酸钠(Na₂CO₃,2M,0.485mL,0.970mmol)和四[三苯基膦]钯(0)(Pd(PPh₃)₄,0.017g,0.014mmol)加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将残留物重悬在 H₂O 中,用二氯甲烷(CH₂Cl₂)萃取。硫酸镁(MgSO₄)干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析(0-5% 甲醇(MeOH)/CH₂Cl₂)纯化粗产物。通过薄层层析(TLC)监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.054g,产率为 53%。

[0556] 实施例 88

[0557] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸[3-喹啉-3-基-苯基]-酰胺(83)

[0558] 室温下,将 DIEA(0.013mL,0.075mmol)加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.068mmol)和 HATU(0.028g,0.075mmol)中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-喹啉-3-基-苯胺(0.015g,0.068mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀

出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.013g 产物,产率为 48% : LCMS (ESI) m/z 409 (MH^+)。

[0559] 实施例 89

[0560] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3- 喹啉 -3- 基 - 苯基] - 酰胺 (84)

[0561] 室温下,将 DIEA (0.013mL, 0.075mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.015g, 0.068mmol) 和 HATU (0.028g, 0.075mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3- 喹啉 -3- 基 - 苯胺 (0.015g, 0.068mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.017g 产物,产率为 59% : LCMS (ESI) m/z 423 (MH^+)。

[0562] 实施例 90

[0563] 合成 8- 三氟甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3- 喹啉 -3- 基 - 苯基] - 酰胺 (85)

[0564] 室温下,将 DIEA (0.013mL, 0.075mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 三氟甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.019g, 0.068mmol) 和 HATU (0.028g, 0.075mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3- 喹啉 -3- 基 - 苯胺 (0.015g, 0.068mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.022g 产物,产率为 68% : LCMS (ESI) m/z 477 (MH^+)。

[0565] 实施例 91

[0566] 合成 3-(2,3- 二氢 - 苯并 [1,4] 二氧杂环己烯 -6- 基 (benzo[1,4] dioxin-6-yl)) - 苯胺 (36)

[0567] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME (2mL) 中混合 1,4- 苯并二噁烷 -6- 硼酸 (0.125g, 0.693mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na_2CO_3 (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 $Pd(PPh_3)_4$ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 H_2O 中,用 CH_2Cl_2 萃取。 $MgSO_4$ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-20% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.079g,产率为 75%。

[0568] 实施例 92

[0569] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(2,3- 二氢 - 苯并 [1,4] 二氧杂环己烯 -6- 基) - 苯基] - 酰胺 (86)

[0570] 室温下,将 DIEA (0.013mL, 0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.013g, 0.067mmol) 和 HATU (0.028g, 0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2,3- 二氢 - 苯并 [1,4] 二氧杂环己烯 -6- 基) - 苯胺 (0.015g, 0.067mmol), 反应过夜。真空除去 DMF,将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度,20 毫升 / 分钟的流速,利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,冻干 48 小时得到 0.011g 产物,产率为 39% : LCMS (ESI) m/z 416 (MH^+)。

[0571] 实施例 93

[0572] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(2,3- 二氢 - 苯并 [1,4] 二氧杂环己烯 -6- 基) - 苯基] - 酰胺 (87)

[0573] 室温下,将 DIEA (0.013mL, 0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.016g, 0.067mmol) 和 HATU (0.028g, 0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2,3-二氢-苯并[1,4]二氧杂环己烯-6-基)-苯胺 (0.015g, 0.067mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,和最终经真空干燥过夜得到 0.022g 产物,产率为 79% :LCMS(ESI)m/z 430 (MH⁺)。

[0574] 实施例 94

[0575] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2,3-二氢-苯并[1,4]二氧杂环己烯-6-基)-苯基]-酰胺 (88)

[0576] 室温下,将 DIEA (0.013mL, 0.072mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.020g, 0.067mmol) 和 HATU (0.028g, 0.072mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2,3-二氢-苯并[1,4]二氧杂环己烯-6-基)-苯胺 (0.015g, 0.067mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.022g 产物,产率为 67% :LCMS(ESI)m/z 484 (MH⁺)。

[0577] 实施例 95

[0578] 合成 2'-氰基-联苯-3-基胺 (37)

[0579] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME (2mL) 中混合 2-氰基苯基硼酸 (0.102g, 0.693mmol) 和 3-溴苯胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-20% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.071g,产率为 79%。

[0580] 实施例 96

[0581] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-氰基-联苯-3-基)-酰胺 (89)

[0582] 室温下,将 DIEA (0.015mL, 0.085mmol) 加入到在 0.45mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.016g, 0.077mmol) 和 HATU (0.032g, 0.085mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2'-氰基-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.077mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速,利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,冻干 48 小时得到 0.008g 产物,产率为 26% :LCMS(ESI)m/z 383 (MH⁺)。

[0583] 实施例 97

[0584] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-氰基-联苯-3-基)-酰胺 (90)

[0585] 室温下,将 DIEA (0.015mL, 0.085mmol) 加入到在 0.45mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.017g, 0.077mmol) 和 HATU (0.032g, 0.085mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2'-氰基-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.077mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.026g 产物,产率为 85% :LCMS(ESI)m/z 397 (MH⁺)。

[0586] 实施例 98

[0587] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-氰基-联苯-3-基)-酰胺

(91)

[0588] 室温下,将 DIEA(0.015mL,0.085mmol) 加入到在 0.45mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素(0.021g,0.077mmol) 和 HATU(0.032g,0.085mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2'-氰基-联苯-3-基胺(0.015g,0.077mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.022g 产物,产率为 63% ;LCMS(ESI)m/z 451(MH⁺)。

[0589] 实施例 99

[0590] 合成 3-(1H-吡啶-5-基)-苯胺(38)

[0591] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME(2mL) 中混合吡啶-5-硼酸(0.111g,0.693mmol) 和 3-溴苯胺(0.05mL,0.462mmol)。将 Na₂CO₃(2M,0.485mL,0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄(0.017g,0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析(50-100% EtOAc/己烷)纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.049g,产率为 50%。

[0592] 实施例 100

[0593] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-(1H-吡啶-5-基)-苯基)-酰胺(92)

[0594] 室温下,将 DIEA(0.014mL,0.073mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.015g,0.066mmol) 和 HATU(0.030g,0.073mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡啶-5-基)-苯胺(0.015g,0.066mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到 0.017g 产物,产率为 61% ;LCMS(ESI)m/z 397(MH⁺)。

[0595] 实施例 101

[0596] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-(1H-吡啶-5-基)-苯基)-酰胺(93)

[0597] 室温下,将 DIEA(0.014mL,0.073mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.016g,0.066mmol) 和 HATU(0.030g,0.073mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡啶-5-基)-苯胺(0.015g,0.066mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.017g 产物,产率为 56% ;LCMS(ESI)m/z 411(MH⁺)。

[0598] 实施例 102

[0599] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(3-(1H-吡啶-5-基)-苯基)-酰胺(94)

[0600] 室温下,将 DIEA(0.014mL,0.073mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素(0.020g,0.066mmol) 和 HATU(0.030g,0.073mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡啶-5-基)-苯胺(0.015g,0.066mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶

剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.023g 产物, 产率为 68% :LCMS(ESI)m/z 465(MH⁺)。

[0601] 实施例 103

[0602] 合成 N-(3'-氨基-联苯-2-基)-乙酰胺 (39)

[0603] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME(2mL) 中混合 2-乙酰氨基苯基硼酸 (0.124g, 0.693mmol) 和 3-溴苯胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 H₂O 中, 用 CH₂Cl₂ 萃取。MgSO₄ 干燥有机相, 真空浓缩。二氧化硅柱层析 (0-50% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.103g, 产率为 98%。

[0604] 实施例 104

[0605] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-乙酰基氨基-联苯-3-基)-酰胺 (95)

[0606] 室温下, 将 DIEA (0.013mL, 0.073mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.066mmol) 和 HATU (0.028g, 0.073mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 N-(3'-氨基-联苯-2-基)-乙酰胺 (0.015g, 0.066mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.007g 产物, 产率为 27% :LCMS(ESI)m/z 415(MH⁺)。

[0607] 实施例 105

[0608] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-乙酰基氨基-联苯-3-基)-酰胺 (96)

[0609] 室温下, 将 DIEA (0.013mL, 0.073mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.015g, 0.066mmol) 和 HATU (0.028g, 0.073mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 N-(3'-氨基-联苯-2-基)-乙酰胺 (0.015g, 0.066mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.020g 产物, 产率为 69% :LCMS(ESI)m/z 429(MH⁺)。

[0610] 实施例 106

[0611] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-乙酰基氨基-联苯-3-基)-酰胺 (97)

[0612] 室温下, 将 DIEA (0.013mL, 0.073mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.018g, 0.066mmol) 和 HATU (0.028g, 0.073mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 N-(3'-氨基-联苯-2-基)-乙酰胺 (0.015g, 0.066mmol), 反应过夜, 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.008g 产物, 产率为 26% :LCMS(ESI)m/z 483(MH⁺)。

[0613] 实施例 107

[0614] 合成 2'-(吗啉-4-磺酰基)-联苯-3-基胺 (40)

[0615] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME (2mL) 中混合 2-(吗啉子基磺酰基)苯基硼酸 (0.188g, 0.693mmol) 和 3-溴苯胺 (0.05mL, 0.462mmol)。将 Na_2CO_3 (2M, 0.485mL, 0.970mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.017g, 0.014mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 H_2O 中,用 CH_2Cl_2 萃取。 MgSO_4 干燥有机相,真空浓缩。二氧化硅柱层析 (5-20% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.113g,产率为 77%。

[0616] 实施例 108

[0617] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-(吗啉-4-磺酰基)-联苯-3-基)-酰胺 (98)

[0618] 室温下,将 DIEA (0.009mL, 0.052mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.010g, 0.047mmol) 和 HATU (0.020g, 0.052mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2'-(吗啉-4-磺酰基)-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.047mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.013g 产物, 产率为 53% :LCMS(ESI)m/z 507 (MH^+)。

[0619] 实施例 109

[0620] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-(吗啉-4-磺酰基)-联苯-3-基)-酰胺 (99)

[0621] 室温下,将 DIEA (0.009mL, 0.052mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.010g, 0.047mmol) 和 HATU (0.020g, 0.052mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2'-(吗啉-4-磺酰基)-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.047mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.018g 产物, 产率为 73% :LCMS(ESI)m/z 521 (MH^+)。

[0622] 实施例 110

[0623] 合成 8-三氟甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (2'-(吗啉-4-磺酰基)-联苯-3-基)-酰胺 (100)

[0624] 室温下,将 DIEA (0.009mL, 0.052mmol) 加入到在 0.36mL DMF 中的 8-三氟甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.047mmol) 和 HATU (0.020g, 0.052mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2'-(吗啉-4-磺酰基)-联苯-3-基胺 (0.015g, 0.047mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.014g 产物, 产率为 50% :LCMS(ESI)m/z 591 (MH^+)。

[0625] 实施例 111

[0626] 合成 3-(2,4-二甲氧基-嘧啶-5-基)-苯胺 (101)

[0627] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME (3mL) 中混合 2,4-二甲氧基嘧啶-5-硼酸 (0.160g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 Na_2CO_3 (2M, 0.610mL, 1.22mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.02g, 0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后

冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 MgSO_4 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析(10-100% EtOAc/ 己烷)纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.074g,产率为 55%。

[0628] 实施例 112

[0629] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸[3-(2,4-二甲氧基-嘧啶-5-基)-苯基]-酰胺(127)

[0630] 室温下,将 DIEA(0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.013g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2,4-二甲氧基-嘧啶-5-基)-苯胺(0.015g,0.065mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到 0.010g 产物,产率为 39% :LCMS(ESI)m/z 420(MH^+)。

[0631] 实施例 113

[0632] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸[3-(2,4-二甲氧基-嘧啶-5-基)-苯基]-酰胺(128)

[0633] 室温下,将 DIEA(0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2,4-二甲氧基-嘧啶-5-基)-苯胺(0.015g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.019g 产物,产率为 69% :LCMS(ESI)m/z 434(MH^+)。

[0634] 实施例 114

[0635] 合成 3-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-苯胺(102)

[0636] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME(3mL) 中混合 2-甲氧基吡啶-5-硼酸(0.133g,0.872mmol) 和 3-溴苯胺(0.063mL,0.581mmol)。将 Na_2CO_3 (2M,0.610mL,1.22mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.02g,0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 MgSO_4 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析(10-100% EtOAc/ 己烷)纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.091g,产率为 76%。

[0637] 实施例 115

[0638] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸[3-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺(129)

[0639] 室温下,将 DIEA(0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.013g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-苯胺(0.013g,0.065mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物)重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司)纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到 0.012g 产物,产率为 49% :LCMS(ESI)m/z 389(MH^+)。

[0640] 实施例 116

[0641] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(6- 甲氧基 - 吡啶 -3- 基) - 苯基] - 酰胺 (130)

[0642] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6- 甲氧基 - 吡啶 -3- 基) - 苯胺 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.022g 产物, 产率为 84% :LCMS (ESI) m/z 403 (MH⁺)。

[0643] 实施例 117

[0644] 合成 3-(5- 甲氧基 - 吡啶 -3- 基) - 苯胺 (103)

[0645] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (3mL) 中混合 3- 甲氧基吡啶 -5- 硼酸频哪醇酯 (0.205g, 0.872mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.610mL, 1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.02g, 0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.067g, 产率为 58%。

[0646] 实施例 118

[0647] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(5- 甲氧基 - 吡啶 -3- 基) - 苯基] - 酰胺 (131)

[0648] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(5- 甲氧基 - 吡啶 -3- 基) - 苯胺 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.014g 产物, 产率为 56% :LCMS (ESI) m/z 389 (MH⁺)。

[0649] 实施例 119

[0650] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(5- 甲氧基 - 吡啶 -3- 基) - 苯基] - 酰胺 (132)

[0651] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(5- 甲氧基 - 吡啶 -3- 基) - 苯胺 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.020g 产物, 产率为 79% :LCMS (ESI) m/z 403 (MH⁺)。

[0652] 实施例 120

[0653] 合成 3-(2- 甲氧基 - 嘧啶 -5- 基) - 苯胺 (104)

[0654] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (3mL) 中混合 2- 甲氧基嘧啶 -5- 硼酸 (0.134g, 0.872mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.610mL, 1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.02g, 0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (10-100% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情

况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.097g,产率为 83%。

[0655] 实施例 120

[0656] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2-甲氧基-嘧啶-5-基)-苯基]-酰胺 (133)

[0657] 室温下,将 DIEA (0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g,0.065mmol) 和 HATU (0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-甲氧基-嘧啶-5-基)-苯胺 (0.013g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.005g 产物,产率为 20% :LCMS (ESI) m/z 390 (MH⁺)。

[0658] 实施例 121

[0659] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2-甲氧基-嘧啶-5-基)-苯基]-酰胺 (134)

[0660] 室温下,将 DIEA (0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g,0.065mmol) 和 HATU (0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-甲氧基-嘧啶-5-基)-苯胺 (0.013g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.012g 产物,产率为 48% :LCMS (ESI) m/z 404 (MH⁺)。

[0661] 实施例 122

[0662] 合成 3-嘧啶-5-基-苯胺 (105)

[0663] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME (3mL) 中混合 5-嘧啶基-硼酸 (0.108g,0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL,0.581mmol)。将 Na₂CO₃ (2M,0.610mL,1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.02g,0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (10-100% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.031g,产率为 31%。

[0664] 实施例 123

[0665] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-嘧啶-5-基-苯基)-酰胺 (135)

[0666] 室温下,将 DIEA (0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g,0.065mmol) 和 HATU (0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-嘧啶-5-基-苯胺 (0.011g,0.065mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到 0.002g 产物,产率为 9% :LCMS (ESI) m/z 360 (MH⁺)。

[0667] 实施例 124

[0668] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3-嘧啶-5-基-苯基)-酰胺 (136)

[0669] 室温下,将 DIEA (0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g,0.065mmol) 和 HATU (0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-嘧啶-5-基-苯胺 (0.011g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀

出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.015g 产物,产率为 62% : LCMS(ESI)m/z 374(MH⁺)。

[0670] 实施例 125

[0671] 合成 3-(6-二甲基氨基-吡啶-3-基)-苯胺 (106)

[0672] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在 DME(3mL) 中混合 2-(二甲基氨基)-吡啶-5-硼酸水合物 (0.145g,0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL,0.581mmol)。将 Na₂CO₃(2M,0.610mL,1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄(0.02g,0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (10-100% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.067g,产率为 54%。

[0673] 实施例 126

[0674] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(6-二甲基氨基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺 (137)

[0675] 室温下,将 DIEA(0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6-二甲基氨基-吡啶-3-基)-苯胺 (0.014g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.011g 产物,产率为 42% :LCMS(ESI)m/z 402(MH⁺)。

[0676] 实施例 127

[0677] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(6-二甲基氨基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺 (138)

[0678] 室温下,将 DIEA(0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6-二甲基氨基-吡啶-3-基)-苯胺 (0.014g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.018g 产物,产率为 66% :LCMS(ESI)m/z 416(MH⁺)。

[0679] 实施例 128

[0680] 合成 3-(6-羟基-吡啶-3-基)-苯胺 (107)

[0681] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在二噁烷 (2mL) 中混合 3-羟基吡啶-5-硼酸频哪醇酯 (0.193g,0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL,0.581mmol)。将 K₃PO₄(1.27M,0.778mL,0.99mmol)、PCy₃(0.004g,0.014mmol) 和 Pd₂(dba)₃(0.005g,0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (0-10% MeOH/CH₂Cl₂) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.013g,产率为 12%。

[0682] 实施例 129

[0683] 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(6-羟基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺 (139)

[0684] 室温下,将 DIEA(0.008mL,0.048mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧

基-香豆素 (0.009g, 0.043mmol) 和 HATU (0.018g, 0.048mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6-羟基-吡啶-3-基)-苯胺 (0.008g, 0.043mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.003g 产物, 产率为 15% :LCMS (ESI) m/z 375 (MH⁺)。

[0685] 实施例 130

[0686] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(6-羟基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺 (140)

[0687] 室温下, 将 DIEA (0.008mL, 0.048mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.009g, 0.043mmol) 和 HATU (0.018g, 0.048mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(6-羟基-吡啶-3-基)-苯胺 (0.008g, 0.043mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.003g 产物, 产率为 21% :LCMS (ESI) m/z 389 (MH⁺)。

[0688] 实施例 131

[0689] 合成 3-(2-甲氧基-吡啶-3-基)-苯胺 (108)

[0690] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (3mL) 中混合 2-甲氧基吡啶-3-硼酸水合物 (0.133g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.610mL, 1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.02g, 0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (10-100% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.092g, 产率为 80%。

[0691] 实施例 132

[0692] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2-甲氧基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺 (141)

[0693] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-甲氧基-吡啶-3-基)-苯胺 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.013g 产物, 产率为 54% :LCMS (ESI) m/z 389 (MH⁺)。

[0694] 实施例 133

[0695] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2-甲氧基-吡啶-3-基)-苯基]-酰胺 (142)

[0696] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-甲氧基-吡啶-3-基)-苯胺 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.024g 产物, 产率为 92% :LCMS (ESI) m/z 403 (MH⁺)。

[0697] 实施例 134

[0698] 合成 4'-氰基-3'-氟-联苯-3-基胺 (109)

[0699] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在二噁烷 (2mL) 中混合 4-氰基-3-氟苯基硼酸 (0.144g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K_3PO_4 (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、 PCy_3 (0.004g, 0.014mmol) 和 $Pd_2(dba)_3$ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 $MgSO_4$ 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (5-60% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.120g,产率为 98%。

[0700] 实施例 135

[0701] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (4'-氰基-3'-氟-联苯-3-基)-酰胺 (143)

[0702] 室温下,将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-氰基-3'-氟-联苯-3-基胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.004g 产物,产率为 15% :LCMS (ESI) m/z 401 (MH^+)。

[0703] 实施例 136

[0704] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (4'-氰基-3'-氟-联苯-3-基)-酰胺 (144)

[0705] 室温下,将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4'-氰基-3'-氟-联苯-3-基胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.021g 产物,产率为 81% :LCMS (ESI) m/z 415 (MH^+)。

[0706] 实施例 137

[0707] 合成 3'-氰基-4'-氟-联苯-3-基胺 (110)

[0708] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在二噁烷 (2mL) 中混合 3-氰基-4-氟苯基硼酸 (0.144g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K_3PO_4 (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、 PCy_3 (0.004g, 0.014mmol) 和 $Pd_2(dba)_3$ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 $MgSO_4$ 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (5-60% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.099g,产率为 81%。

[0709] 实施例 138

[0710] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3'-氰基-4'-氟-联苯-3-基)-酰胺 (145)

[0711] 室温下,将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3'-氰基-4'-氟-联苯-3-基胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜。真

空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.011g 产物, 产率为 46% :LCMS (ESI) m/z 401 (MH⁺)。

[0712] 实施例 139

[0713] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3'-氰基-4'-氟-联苯-3-基)-酰胺 (146)

[0714] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3'-氰基-4'-氟-联苯-3-基胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.021g 产物, 产率为 82% :LCMS (ESI) m/z 415 (MH⁺)。

[0715] 实施例 140

[0716] 合成 3'-氰基-联苯-3-基胺 (111)

[0717] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在二噁烷 (2mL) 中混合 3-氰基苯基硼酸 (0.131g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K₃PO₄ (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、PCy₃ (0.004g, 0.014mmol) 和 Pd₂(dba)₃ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (10-100% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.085g, 产率为 75%。

[0718] 实施例 141

[0719] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3'-氰基-联苯-3-基)-酰胺 (147)

[0720] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3'-氰基-联苯-3-基胺 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.012g 产物, 产率为 49% :LCMS (ESI) m/z 383 (MH⁺)。

[0721] 实施例 142

[0722] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3'-氰基-联苯-3-基)-酰胺 (148)

[0723] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3'-氰基-联苯-3-基胺 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.021g 产物, 产率为 84% :LCMS (ESI) m/z 397 (MH⁺)。

[0724] 实施例 143

[0725] 合成 3-(1H-吡唑-4-基)-苯胺 (112)

[0726] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在二噁烷 (2mL) 中混合 1H-吡唑-4-硼酸 (0.0976g, 0.639mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K_3PO_4 (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、 PCy_3 (0.004g, 0.014mmol) 和 $Pd_2(dba)_3$ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 $MgSO_4$ 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (0-10% MeOH/ CH_2Cl_2) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.024g,产率为 26%。

[0727] 实施例 144

[0728] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-酰胺 (149)

[0729] 室温下,将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡唑-4-基)-苯胺 (0.011g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速, 利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.002g 产物, 产率为 11% :LCMS (ESI) m/z 348 (MH^+)。

[0730] 实施例 145

[0731] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-酰胺 (150)

[0732] 室温下,将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡唑-4-基)-苯胺 (0.011g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.006g 产物, 产率为 24% :LCMS (ESI) m/z 362 (MH^+)。

[0733] 实施例 146

[0734] 合成 3-(2-甲基-2H-吡唑-3-基)-苯胺 (113)

[0735] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在二噁烷 (2mL) 中混合 1-甲基-1H-吡唑-5-硼酸频哪醇酯 (0.181g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K_3PO_4 (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、 PCy_3 (0.004g, 0.014mmol) 和 $Pd_2(dba)_3$ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 $MgSO_4$ 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (10-100% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.048g,产率为 47%。

[0736] 实施例 147

[0737] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2-甲基-2H-吡唑-3-基)-苯基]-酰胺 (151)

[0738] 室温下,将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-甲基-2H-吡唑-3-基)-苯胺 (0.011g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时

从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体，抽气干燥，最终经真空干燥过夜得到 0.010g 产物，产率为 44% :LCMS (ESI)m/z 362 (MH⁺)。

[0739] 实施例 148

[0740] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(2-甲基-2H-吡唑-3-基)-苯基]-酰胺 (152)

[0741] 室温下，将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2-甲基-2H-吡唑-3-基)-苯胺 (0.011g, 0.065mmol)，反应过夜，此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体，抽气干燥，最终经真空干燥过夜得到 0.018g 产物，产率为 77% :LCMS (ESI)m/z 376 (MH⁺)。

[0742] 实施例 149

[0743] 合成 3-(3,5-二甲基-异噁唑-4-基)-苯胺 (114)

[0744] 在火焰干燥的圆底烧瓶中，在 DME (2mL) 中混合 3,5-二甲基异噁唑-4-硼酸 (0.123g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.610mL, 1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.02g, 0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜，随后冷却至室温。真空除去溶剂，将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相，过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (10-60% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂，得到 0.077g，产率为 71%。

[0745] 实施例 150

[0746] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(3,5-二甲基-异噁唑-4-基)-苯基]-酰胺 (153)

[0747] 室温下，将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(3,5-二甲基-异噁唑-4-基)-苯胺 (0.012g, 0.065mmol)，反应过夜。真空除去 DMF，将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度，20 毫升/分钟的流速，利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度，收集对应于产物峰的诸部分，真空除去溶剂得到 0.015g 产物，产率为 61% :LCMS (ESI)m/z 377 (MH⁺)。

[0748] 实施例 151

[0749] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(3,5-二甲基-异噁唑-4-基)-苯基]-酰胺 (154)

[0750] 室温下，将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(3,5-二甲基-异噁唑-4-基)-苯胺 (0.012g, 0.065mmol)，反应过夜，此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体，抽气干燥，最终经真空干燥过夜得到 0.020g 产物，产率为 80% :LCMS (ESI)m/z 391 (MH⁺)。

[0751] 实施例 152

[0752] 合成 3-(2H-吡唑-3-基)-苯胺 (115)

[0753] 在火焰干燥的圆底烧瓶中，在二噁烷 (2mL) 中混合 1H-吡唑-5-硼酸 (0.072g,

0.639mmol) 和 3- 溴 苯 胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K_3PO_4 (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、 PCy_3 (0.004g, 0.014mmol) 和 $Pd_2(dba)_3$ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 $MgSO_4$ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (70-100% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.018g, 产率为 20%。

[0754] 实施例 153

[0755] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(2H- 吡唑 -3- 基) - 苯基] - 酰胺 (155)

[0756] 室温下, 将 DIEA (0.011mL, 0.062mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.012g, 0.057mmol) 和 HATU (0.024g, 0.062mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2H- 吡唑 -3- 基) - 苯胺 (0.009g, 0.057mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.0014g 产物, 产率为 7% : LCMS (ESI) m/z 348 (MH^+)。

[0757] 实施例 154

[0758] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(2H- 吡唑 -3- 基) - 苯基] - 酰胺 (156)

[0759] 室温下, 将 DIEA (0.011mL, 0.062mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.012g, 0.057mmol) 和 HATU (0.024g, 0.062mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2H- 吡唑 -3- 基) - 苯胺 (0.009g, 0.057mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.0014g 产物, 产率为 7% : LCMS (ESI) m/z 362 (MH^+)。

[0760] 实施例 155

[0761] 合成 3-(2- 氧代 -2,3- 二氢 -1H- 苯并咪唑 -5- 基) - 苯胺 (116)

[0762] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在二噁烷 (2mL) 中混合 2- 氧代 -2,3- 二氢 -1H- 苯并咪唑 -5- 硼酸频哪醇酯 (0.227g, 0.872mmol) 和 3- 溴 苯 胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K_3PO_4 (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、 PCy_3 (0.004g, 0.014mmol) 和 $Pd_2(dba)_3$ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 $MgSO_4$ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (0-20% MeOH/ CH_2Cl_2) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.021g, 产率为 15%。

[0763] 实施例 156

[0764] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(2- 氧代 -2,3- 二氢 -1H- 苯并咪唑 -5- 基) - 苯基] - 酰胺 (157)

[0765] 室温下, 将 DIEA (0.0085mL, 0.049mmol) 加入到在 0.3mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.009g, 0.044mmol) 和 HATU (0.019g, 0.049mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2- 氧代 -2,3- 二氢 -1H- 苯并咪唑 -5- 基) - 苯胺 (0.009g, 0.044mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95%

ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.0014g 产物, 产率为 8% :LCMS(ESI)m/z 414(MH⁺)。

[0766] 实施例 157

[0767] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(2- 氧代 -2,3- 二氢 -1H- 苯并咪唑 -5- 基) - 苯基] - 酰胺 (158)

[0768] 室温下, 将 DIEA (0.0085mL, 0.049mmol) 加入到在 0.3mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.009g, 0.044mmol) 和 HATU (0.019g, 0.049mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(2- 氧代 -2,3- 二氢 -1H- 苯并咪唑 -5- 基) - 苯胺 (0.009g, 0.044mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.007g 产物, 产率为 39% :LCMS(ESI)m/z 428(MH⁺)。

[0769] 实施例 158

[0770] 合成 3- 苯并 [1,2,5] 噁二唑 -5- 基 - 苯胺 (117)

[0771] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (3mL) 中混合 2,4- 二甲氧基嘧啶 -5- 硼酸 (0.143g, 0.872mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.610mL, 1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.02g, 0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。二氧化硅柱层析 (10-100% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.078g, 产率为 63%。

[0772] 实施例 159

[0773] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 苯并 [1,2,5] 噁二唑 -5- 基 - 苯基) - 酰胺 (159)

[0774] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3- 苯并 [1,2,5] 噁二唑 -5- 基 - 苯胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.005g 产物, 产率为 18% :LCMS(ESI)m/z 400(MH⁺)。

[0775] 实施例 160

[0776] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 (3- 苯并 [1,2,5] 噁二唑 -5- 基 - 苯基) - 酰胺 (160)

[0777] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3- 苯并 [1,2,5] 噁二唑 -5- 基 - 苯胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.023g 产物, 产率为 88% :LCMS(ESI)m/z 414(MH⁺)。

[0778] 实施例 161

[0779] 合成 3-(4- 氧代 -4H- 色烯 -6- 基) - 苯胺 (118)

[0780] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在二噁烷 (2mL) 中混合色酮 -6- 硼酸频哪醇酯 (0.237g, 0.872mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K₃PO₄ (1.27M, 0.778mL,

0.99mmol)、PCy₃(0.004g, 0.014mmol) 和 Pd₂(dba)₃(0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (0-100% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.059g, 产率为 43%。

[0781] 实施例 162

[0782] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(4-氧代-4H-色烯-6-基)-苯基]-酰胺 (161)

[0783] 室温下, 将 DIEA(0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU(0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(4-氧代-4H-色烯-6-基)-苯胺 (0.015g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.007g 产物, 27% 产率; LCMS (ESI) m/z 426 (MH⁺)。

[0784] 实施例 163

[0785] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(4-氧代-4H-色烯-6-基)-苯基]-酰胺 (162)

[0786] 室温下, 将 DIEA(0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU(0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(4-氧代-4H-色烯-6-基)-苯胺 (0.015g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.028g 产物, 产率为 100%; LCMS (ESI) m/z 440 (MH⁺)。

[0787] 实施例 164

[0788] 合成 3-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-苯胺 (119)

[0789] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在二噁烷 (2mL) 中混合 1-甲基吡啶-5-硼酸频哪醇酯 (0.224g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K₃PO₄(1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、PCy₃(0.004g, 0.014mmol) 和 Pd₂(dba)₃(0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (5-60% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.059g, 产率为 46%。

[0790] 实施例 165

[0791] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-苯基]-酰胺 (163)

[0792] 室温下, 将 DIEA(0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU(0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-苯胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速, 利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂

得到 0.012g 产物,产率为 48% :LCMS(ESI)m/z 411(MH⁺)。

[0793] 实施例 166

[0794] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-苯基]-酰胺 (164)

[0795] 室温下,将 DIEA(0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-苯胺(0.014g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.013g 产物,产率为 46% :LCMS(ESI)m/z 425(MH⁺)。

[0796] 实施例 167

[0797] 合成 3-(1H-吡唑-6-基)-苯胺 (120)

[0798] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在二噁烷(2mL) 中混合吡唑-6-硼酸(0.140g,0.872mmol) 和 3-溴苯胺(0.063mL,0.581mmol)。将 K₃PO₄(1.27M,0.778mL,0.99mmol)、PCy₃(0.004g,0.014mmol) 和 Pd₂(dba)₃(0.005g,0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜,随后冷却至室温。真空除去溶剂,将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相,过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析(5-60% EtOAc/己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂,得到 0.096g,产率为 79%。

[0799] 实施例 168

[0800] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1H-吡唑-6-基)-苯基]-酰胺 (165)

[0801] 室温下,将 DIEA(0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素(0.013g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡唑-6-基)-苯胺(0.014g,0.065mmol),反应过夜。真空除去 DMF,将反应(混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度,20 毫升/分钟的流速,利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器(拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度,收集对应于产物峰的诸部分,真空除去溶剂得到 0.015g 产物,产率为 58% :LCMS(ESI)m/z 397(MH⁺)。

[0802] 实施例 169

[0803] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1H-吡唑-6-基)-苯基]-酰胺 (166)

[0804] 室温下,将 DIEA(0.012mL,0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(0.014g,0.065mmol) 和 HATU(0.027g,0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡唑-6-基)-苯胺(0.014g,0.065mmol),反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 0.014g 产物,产率 53% :LCMS(ESI)m/z 411(MH⁺)。

[0805] 实施例 170

[0806] 合成 3-(1H-吡唑-4-基)-苯胺 (121)

[0807] 在火焰干燥的圆底烧瓶中,在二噁烷(2mL) 中混合吡唑-4-硼酸(0.140g,0.872mmol) 和 3-溴苯胺(0.063mL,0.581mmol)。将 K₃PO₄(1.27M,0.778mL,0.99mmol)、

PCy₃(0.004g, 0.014mmol) 和 Pd₂(dba)₃(0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (5-60% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.094g, 产率为 78%。

[0808] 实施例 171

[0809] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1H-吡啶-4-基)-苯基]-酰胺 (167)

[0810] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡啶-4-基)-苯胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速, 利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.013g 产物, 产率为 52% :LCMS (ESI) m/z 397 (MH⁺)。

[0811] 实施例 172

[0812] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1H-吡啶-4-基)-苯基]-酰胺 (168)

[0813] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1H-吡啶-4-基)-苯胺 (0.014g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升/分钟的流速, 利用 Parallellex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.018g 产物, 产率为 70% :LCMS (ESI) m/z 411 (MH⁺)。

[0814] 实施例 173

[0815] 合成 3-(1-苄基-1H-吡啶-4-基)-苯胺 (122)

[0816] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (3mL) 中混合 1-苄基-1H-吡啶-4-硼酸 (0.176g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.610mL, 1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.02g, 0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (10-100% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.137g, 产率为 94%。

[0817] 实施例 174

[0818] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 [3-(1-苄基-1H-吡啶-4-基)-苯基]-酰胺 (169)

[0819] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羧基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1-苄基-1H-吡啶-4-基)-苯胺 (0.016g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶

剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallax Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.015g 产物, 产率为 55% :LCMS(ESI)m/z 438(MH⁺)。

[0820] 实施例 175

[0821] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(1- 苄基 -1H- 吡唑 -4- 基) - 苯基] - 酰胺 (170)

[0822] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1- 苄基 -1H- 吡唑 -4- 基) - 苯胺 (0.016g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.018g 产物, 产率为 62% :LCMS(ESI)m/z 452(MH⁺)。

[0823] 实施例 176

[0824] 合成 3-(1- 甲基 -1H- 吡唑 -4- 基) - 苯胺 (123)

[0825] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在二噁烷 (2mL) 中混合 1- 甲基 -1H- 吡唑 -4- 硼酸频哪醇酯 (0.098g, 0.639mmol) 和 3- 溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K₃PO₄ (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、PCy₃ (0.004g, 0.014mmol) 和 Pd₂(dba)₃ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH₂Cl₂ 中。MgSO₄ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (0-10% MeOH/CH₂Cl₂) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.095g, 产率为 94%。

[0826] 实施例 177

[0827] 合成 8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(1- 甲基 -1H- 吡唑 -4- 基) - 苯基] - 酰胺 (171)

[0828] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1- 甲基 -1H- 吡唑 -4- 基) - 苯胺 (0.011g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.009g 产物, 产率为 39% :LCMS(ESI)m/z 362(MH⁺)。

[0829] 实施例 178

[0830] 合成 8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羧酸 [3-(1- 甲基 -1H- 吡唑 -4- 基) - 苯基] - 酰胺 (172)

[0831] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羧基 - 香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-(1- 甲基 -1H- 吡唑 -4- 基) - 苯胺 (0.011g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.017g 产物, 产率为 71% :LCMS(ESI)m/z 376(MH⁺)。

[0832] 实施例 179

[0833] 合成 2-(3- 氨基 - 苯基) - 吡咯 -1- 羧酸叔丁酯 (124)

[0834] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在二噁烷 (2mL) 中混合 1-N-Boc- 吡咯 -2- 硼酸

(0.184g, 0.872mmol) 和 3- 溴 苯 胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K_3PO_4 (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、 PCy_3 (0.004g, 0.014mmol) 和 $Pd_2(dba)_3$ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 $MgSO_4$ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (5-60% EtOAc/ 己烷) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.037g, 产率为 25%。

[0835] 实施例 180

[0836] 合成 2-[3-[(8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羰基) - 氨基] - 苯基] - 吡咯 -1- 羧酸叔丁酯 (173)

[0837] 室温下, 将 DIEA (0.009mL, 0.053mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羰基 - 香豆素 (0.010g, 0.048mmol) 和 HATU (0.02g, 0.053mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2-(3- 氨基 - 苯基) - 吡咯 -1- 羧酸叔丁酯 (0.013g, 0.048mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.014g 产物, 产率为 62% : LCMS (ESI) m/z 447 (MH^+)。

[0838] 实施例 181

[0839] 合成 2-[3-[(8- 甲氧基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羰基) - 氨基] - 苯基] - 吡咯 -1- 羧酸叔丁酯 (174)

[0840] 室温下, 将 DIEA (0.009mL, 0.053mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 甲氧基 -3- 羰基 - 香豆素 (0.010g, 0.048mmol) 和 HATU (0.02g, 0.053mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2-(3- 氨基 - 苯基) - 吡咯 -1- 羧酸叔丁酯 (0.013g, 0.048mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.007g 产物, 产率为 29% : LCMS (ESI) m/z 461 (MH^+)。

[0841] 实施例 182

[0842] 合成 2-(3- 氨基 - 苯基) - 吡咯 -1- 羧酸叔丁酯 (125)

[0843] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在二噁烷 (2mL) 中混合 1-(N-Boc) - 吡咯 -2- 硼酸 (0.228g, 0.872mmol) 和 3- 溴 苯 胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 K_3PO_4 (1.27M, 0.778mL, 0.99mmol)、 PCy_3 (0.004g, 0.014mmol) 和 $Pd_2(dba)_3$ (0.005g, 0.006mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 CH_2Cl_2 中。 $MgSO_4$ 干燥有机相, 过滤并真空浓缩。快速二氧化硅柱层析 (100% CH_2Cl_2) 纯化粗产物。通过 TLC 监测纯化情况。真空除去含产物部分的溶剂, 得到 0.078g, 产率为 44%。

[0844] 实施例 183

[0845] 合成 2-[3-[(8- 羟基 -2- 氧代 -2H- 色烯 -3- 羰基) - 氨基] - 苯基] - 吡咯 -1- 羧酸叔丁酯 (175)

[0846] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8- 羟基 -3- 羰基 - 香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2-(3- 氨基 - 苯基) - 吡咯 -1- 羧酸叔丁酯 (0.02g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/ H_2O

溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.02g 产物, 产率为 64% :LCMS(ESI)m/z 497(MH⁺)。

[0847] 实施例 184

[0848] 合成 2-{3-[(8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羰基)-氨基]-苯基}-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (176)

[0849] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羰基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2-(3-氨基-苯基)-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (0.02g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.024g 产物, 产率为 76% :LCMS(ESI)m/z 511(MH⁺)。

[0850] 实施例 185

[0851] 合成 3',5'-二氟-联苯-3-基胺 (126)

[0852] 在火焰干燥的圆底烧瓶中, 在 DME (3mL) 中混合 3,5-二氟苯基-硼酸 (0.138g, 0.872mmol) 和 3-溴苯胺 (0.063mL, 0.581mmol)。将 Na₂CO₃ (2M, 0.610mL, 1.22mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.02g, 0.017mmol) 加入搅拌中的该溶液。在氩气流下回流该反应过夜, 随后冷却至室温。真空除去溶剂, 将得到的残留物重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 真空除去含产物部分的溶剂。

[0853] 实施例 188

[0854] 合成 8-羟基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3',5'-二氟-联苯-3-基)-酰胺 (177)

[0855] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-羟基-3-羰基-香豆素 (0.013g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3',5'-二氟-联苯-3-基胺 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜。真空除去 DMF, 将反应 (混合物) 重悬在 DMSO 中。采用含 0.05% TFA 的 10-95% ACN/H₂O 溶剂梯度, 20 毫升 / 分钟的流速, 利用 Parallelex Flex 平行制备型反相 HPLC 仪器 (拜尔泰格公司) 纯化粗产物。监测 254nm 的 UV 吸光度, 收集对应于产物峰的诸部分, 真空除去溶剂得到 0.009g 产物, 产率为 35% :LCMS(ESI)m/z 394(MH⁺)。

[0856] 实施例 189

[0857] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸 (3',5'-二氟-联苯-3-基)-酰胺 (178)

[0858] 室温下, 将 DIEA (0.012mL, 0.071mmol) 加入到在 0.5mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羰基-香豆素 (0.014g, 0.065mmol) 和 HATU (0.027g, 0.071mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 2-(3-氨基-苯基)-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (0.013g, 0.065mmol), 反应过夜, 此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体, 抽气干燥, 最终经真空干燥过夜得到 0.012g 产物, 产率为 47% :LCMS(ESI)m/z 408(MH⁺)。

[0859] 实施例 190

[0860] 合成 7-甲氧基-苯并呋喃-2-羧酸 (3-咪唑并 [1,2-a] 吡啶-2-基-苯基)-酰

胺 (179)

[0861] 室温下,将 DIEA(49.9 μ L, 0.29mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 7-甲氧基-苯并咪唑-2-羧酸(50mg, 0.26mmol) 和 HATU(108.8mg, 0.29mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯胺(54.4mg, 0.26mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到终产物:LCMS(ESI) m/z 384(MH⁺)。

[0862] 实施例 191

[0863] 合成 6-氯-2H-色烯-3-羧酸(3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯基)-酰胺(180)

[0864] 室温下,将 DIEA(45.5 μ L, 0.26mmol) 加入到在 2mL DMF 中的 6-氯-2H-色烯-3-羧酸(50.0mg, 0.24mmol) 和 HATU(99.3mg, 0.26mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯胺(49.7mg, 0.24mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 66.6mg 产物,产率为 69% :LCMS(ESI) m/z 401(MH⁺)。

[0865] 实施例 192

[0866] 合成 2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸(3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯基)-酰胺(181)

[0867] 在 H₂O(1mL) 中混合 2-氨基苯甲醛(84.1mg, 0.69mmol) 和梅尔德拉姆酸(100mg, 0.69mmol)。75℃, 搅拌该溶液 2 小时。冷却至室温后,过滤沉淀物,抽气干燥得到 86.2mg 1,2-二氢-喹啉-3-羧酸,产率为 66%。

[0868] 室温下,将 DIEA(50.7 μ L, 0.29mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-羧酸(50.0mg, 0.26mmol) 和 HATU(110.6mg, 0.29mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯胺(55.3mg, 0.26mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到终产物:LCMS(ESI) m/z 381(MH⁺)。

[0869] 实施例 193

[0870] 合成 8-甲氧基-2H-色烯-3-羧酸(3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯基)-酰胺(182)

[0871] 室温下,将 DIEA(46.5 μ L, 0.27mmol) 加入到在 2mL DMF 中的 8-甲氧基-2H-色烯-3-羧酸(50.0mg, 0.24mmol) 和 HATU(101.4mg, 0.27mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 3-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基-苯胺(50.7mg, 0.24mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 81.0mg 产物,产率为 85% :LCMS(ESI) m/z 398(MH⁺)。

[0872] 实施例 194

[0873] 合成 8-甲氧基-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-酰胺(183)

[0874] 室温下,将 DIEA(43.5 μ L, 0.25mmol) 加入到在 1mL DMF 中的 8-甲氧基-3-羧基-香豆素(50.0mg, 0.23mmol) 和 HATU(95.0mg, 0.25mmol) 中并持续搅拌直至获得清澈溶液。然后加入 4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺(47.5mg, 0.23mmol), 反应过夜,此时从溶液中沉淀出固体。过滤得到的固体,抽气干燥,最终经真空干燥过夜得到 71.0mg 产物,产率为

75% :LCMS(ESI)m/z 412(MH⁺)。

[0875] 实施例 195

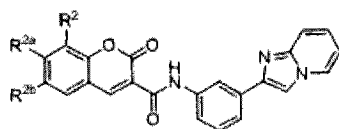
[0876] 应用和测试

[0877] 处决胱冬酶原 -3、-6 和 -7 活化试验方案包括在 50mM HEPES, pH 7.4, 50mM KCl, 1mM DTT 和 0.01% Triton-X100 反应缓冲液构成的 50 μL 总体积中 (为减少化合物凝聚导致的假阳性选中) 温育 100nM 的生理相关浓度靶蛋白与活化化合物 (100nM-100uM)。然后在 37℃ 振荡胱冬酶原 / 小分子温育物, 在各时间点通过加入荧光肽底物 7-氨基-4-三氟甲基香豆素-DEVD (Ac-DEVD-AFC) (胱冬酶原 -3、-7) 或 Ac-VEID-AFC (胱冬酶原 -6) 至终浓度 25 μM 作检验, 并通过动力学 30 分钟试验 (激发 365nm 和发射 495nm) 分析。各孔中 DMSO 的终浓度是 3%, 对酶稳定性或活性没有影响。用粒酶 -b 蛋白水解切割胱冬酶原产生“活化”胱冬酶原的最高活性, 因而“开启”了胱冬酶原 (粒酶 -b 的加入浓度是胱冬酶原 -3 的 1 : 1000, 因此不产生可观察的活性)。包括蛋白质、底物和抑制剂在内的该试验的所有成分以冷冻试样保存, 融化后立即用于试验。

[0878] 表 1 和 2 显示了本发明某些化合物的例子和对胱冬酶原 3 活化的作用。

[0879] 表 1.

[0880]



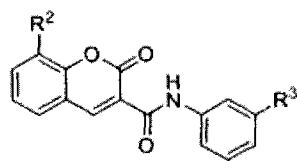
[0881] 胱冬酶原活化

ID	R ²	R ^{2a}	R ^{2b}	3	6	7
1541	-OMe	-H	-H	+++	+++	-
1541A	-OH	-H	-H	+++	-	-
1	-H	-H	-Br	+	+	ND
1541B	-OCF ₃	-H	-H	-	-	ND
1541C	-H	-OMe	-H	-	-	ND
2	-F	-H	-H	+++	+++	ND
3	-OH	-OH	-H	+	-	ND
4	-Br	-H	-H	-	-	ND
5	-OEt	-H	-H	-	-	ND
6	-H	-H	-OMe	-	-	ND
7	-H	-OH	-OH	-	-	ND
8	-OMe	-OMe	-H	-	ND	ND
9	-H	-H	-OCF ₃	-	-	ND
10	-H	-H	-I	-	-	ND
11	-H	-H	-OH	-	-	ND
12	-H	-H	-OMe	-	-	ND
13	-H	-H	-H	-	ND	ND
14		-H	-OMe	-	-	ND
1541D		-H	-OMe	-	-	ND

[0882]

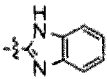
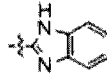
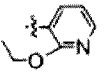
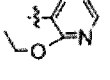
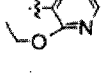
[0883] 表 2

[0884]

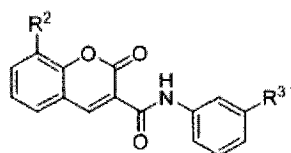


[0885] 胱冬酶原活化

[0886]

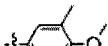
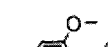
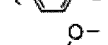
ID	R ²	R ³	3	6	7
1541H	-OMe	-H	-	-	ND
15	-OH		-	-	-
1541F	-OMe		-	-	ND
16	-OH		-	-	-
1541I	-OMe		-	-	ND
17	-OH		-	-	-
18	-OMe		-	-	-
19	-OH		+++	+++	+
20	-OMe		-	-	ND
41	-OH		++	+	-
42	-OMe		-	-	-
43	-OCF ₃		-	-	-

[0887]

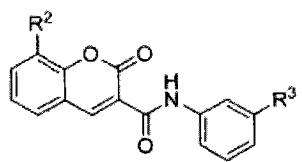


[0888] 胱冬酶原活化

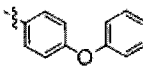
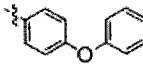
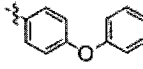
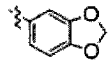
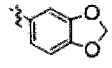
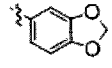
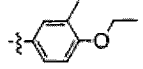
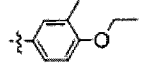
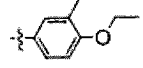
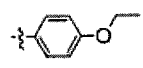
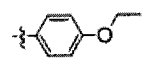
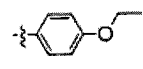
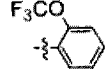
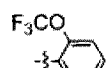
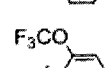
[0889]

ID	R ²	R ³	3	6	7
44	-OH		-	-	+++
45	-OMe		-	-	-
46	-OCF ₃		-	-	-
47	-OH		-	-	-
48	-OMe		-	-	-
49	-OCF ₃		-	-	-
50	-OH		-	-	-
51	-OMe		-	-	-
52	-OCF ₃		-	-	-
53	-OH		-	-	+++
54	-OMe		-	-	-
55	-OCF ₃		-	-	-
56	-OH		-	-	-
57	-OMe		-	-	-
58	-OCF ₃		-	-	-

[0890]

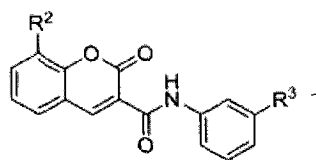


[0891] 胱冬酶原活化

ID	R ²	R ³	3	6	7
59	-OH		-	-	-
60	-OMe		-	-	-
61	-OCF ₃		-	-	-
62	-OH		-	-	++
63	-OMe		-	-	-
64	-OCF ₃		-	-	-
65	-OH		-	-	-
66	-OMe		-	-	-
67	-OCF ₃		-	-	-
68	-OH		-	-	-
69	-OMe		-	-	-
70	-OCF ₃		-	-	-
71	-OH		-	-	-
72	-OMe		-	-	-
73	-OCF ₃		-	-	-

[0892]

[0893]

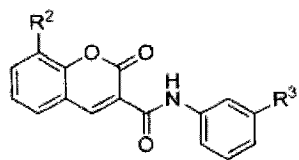


[0894] 胱冬酶原活化

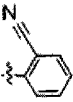
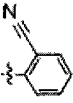
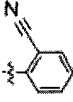
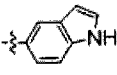
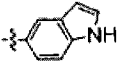
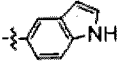
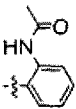
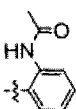
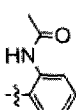
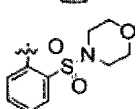
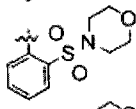
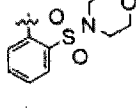
ID	R ²	R ³	3	6	7
74	-OH		-	-	++
75	-OMe		-	-	-
76	-OCF ₃		-	-	-
77	-OH		-	-	+++
78	-OMe		-	-	-
79	-OCF ₃		-	-	-
80	-OH		-	-	-
81	-OMe		-	-	-
82	-OCF ₃		-	-	-
83	-OH		-	-	-
84	-OMe		-	-	-
85	-OCF ₃		-	-	-
86	-OH		-	-	-
87	-OMe		-	-	-
88	-OCF ₃		-	-	-

[0895]

[0896]

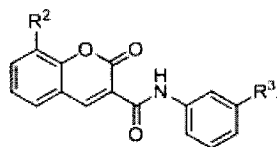


[0897] 胱冬酶原活化

ID	R ²	R ³	3	6	7
89	-OH		-	-	-
90	-OMe		-	-	-
91	-OCF ₃		-	-	-
92	-OH		-	-	-
93	-OMe		-	-	-
94	-OCF ₃		-	-	-
95	-OH		-	-	-
96	-OMe		-	-	-
97	-OCF ₃		-	-	-
98	-OH		++	-	++
99	-OMe		-	-	-
100	-OCF ₃		-	-	-

[0898]

[0899]

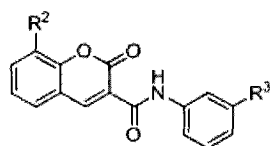


[0900] 胱冬酶原活化

[0901]

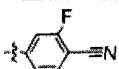
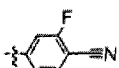
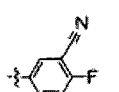
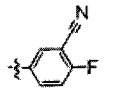
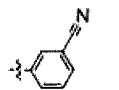
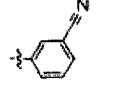
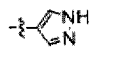
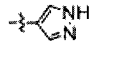
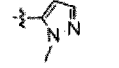
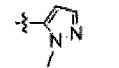
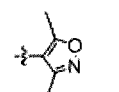
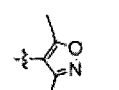
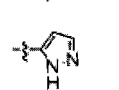
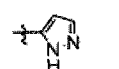
ID	R ²	R ³	3	6	7
127	-OH		-	-	-
128	-OMe		-	-	-
129	-OH		-	-	-
130	-OMe		-	-	-
131	-OH		-	-	-
132	-OMe		-	-	-
133	-OH		-	-	-
134	-OMe		-	-	-
135	-OH		-	-	-
136	-OMe		+	+	-
137	-OH		-	-	-
138	-OMe		-	-	-
139	-OH		-	-	-
140	-OMe		-	-	-
141	-OH		-	-	++
142	-OMe		-	-	-

[0902]

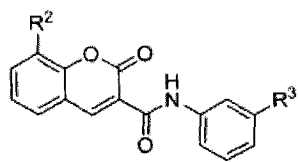


[0903] 胱冬酶原活化

[0904]

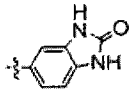
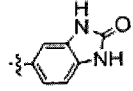
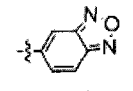
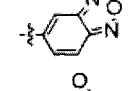
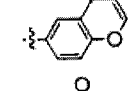
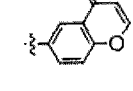
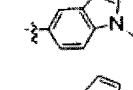
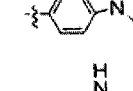
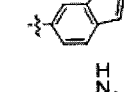
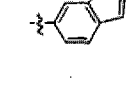
ID	R ²	R ³	3	6	7
143	-OH		-	-	-
144	-OMe		-	-	-
145	-OH		-	-	-
146	-OMe		-	-	-
147	-OH		-	-	-
148	-OMe		-	-	-
149	-OH		-	-	-
150	-OMe		-	-	-
151	-OH		++	-	++
152	-OMe		-	-	-
153	-OH		++	-	++
154	-OMe		-	-	-
155	-OH		-	-	-
156	-OMe		-	-	-

[0905]

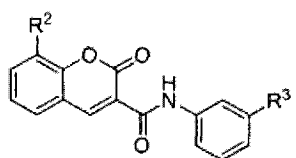


[0906] 胱冬酶原活化

[0907]

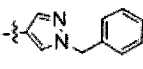
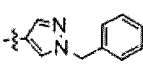
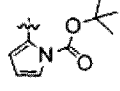
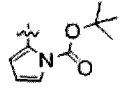
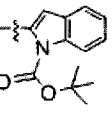
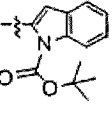
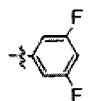
ID	R ²	R ³	3	6	7
157	-OH		-	-	-
158	-OMe		-	-	-
159	-OH		-	-	-
160	-OMe		-	-	-
161	-OH		+++	-	-
162	-OMe		-	+++	-
163	-OH		-	-	-
164	-OMe		-	-	-
165	-OH		-	-	-
166	-OMe		-	-	-

[0908]

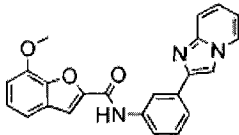
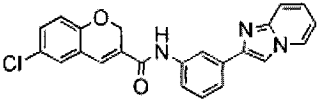
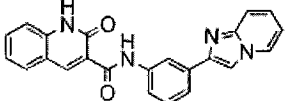
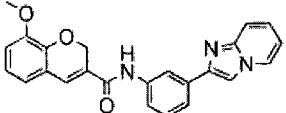
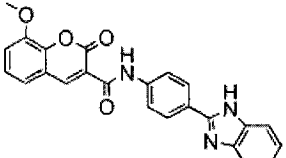


[0909] 胱冬酶原活化

[0910]

ID	R ²	R ³	3	6	7
167	-OH		-	-	-
168	-OMe		-	-	-
169	-OH		-	-	-
170	-OMe		-	-	-
171	-OH		-	-	-
172	-OMe		-	-	-
173	-OH		-	-	-
174	-OMe		-	-	-
175	-OH		-	-	-
176	-OMe		-	-	-
177	-OH		-	-	-
178	-OMe		-	++	-

[0911] 胱冬酶原活化

	ID	化合物	3	6	7
[0912]	179		++	++	ND
	180		+	-	ND
	181		++	++	ND
	182		-	-	ND
	183		+++	ND	ND

[0913] 表1和2. 在37℃,与化合物温育5小时导致胰冬酶原活化(+++EC₅₀约0.5-10 μM; ++EC₅₀约10-50 μM; +EC₅₀约50-200 μM; -未观察到活化; ND未测定)。

[0914] 胰冬酶原-7表达和纯化:全长胰冬酶原-7从大肠杆菌细胞过表达30分钟以防止自催化。通过Ni-NTA亲和层析、阴离子交换层析和凝聚过滤层析将可溶性组分纯化成均质, SDS-PAGE测定到总蛋白得率约为0.2毫克/升培养液,纯度>95%(图1A和1B)。胰冬酶原-7纯化成单体,未观察到活性。37℃,温育过夜导致约50%自催化成活性胰冬酶-7。

[0915] 利用pET-21b载体(诺瓦金公司(Novagen)),大肠杆菌BL21(DE3)RP细胞(斯塔拉塔基因公司(Stratagene))将全长胰冬酶原-7表达成含有C-末端His₆-亲和标签。37℃,用补加了50 μg/mL氨苄青霉素和25 μg/mL氯霉素的1.5L 2xYT培养基将细胞培养至OD_{600nm}为0.8-1.0。30℃,用0.2mIPTG诱导胰冬酶原-7过表达,30分钟后立即收集细胞,冷冻在-70℃以限制自催化。将细胞融化,重悬在100mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl中,通过微流化(马萨诸塞州牛顿市微流化公司(Microfluidics, Inc., Newton, MA))进行裂解。然后以25,000g离心40分钟以除去细胞碎片,依次通过Ni-NTA亲和层析(HisTrap HP柱, GEA公司(GE Amersham))、阴离子交换层析(HiTrap Q HP, GEA公司)和凝胶过滤层析(Superdex 20016/60, GEA公司)纯化可溶性组分。立即将纯胰冬酶原-7保存在-70℃。胰冬酶原-7的得率约是0.2毫克/升培养液。

[0916] 活性胰冬酶-7 HTS筛选:由小分子发现中心(Small Molecule Discovery Center)(SMDC)从式I所示12,000种化合物中初筛活性胰冬酶-7构象异构体的抑制剂。在384-孔平板中测定到Z'为0.9,反应体积为100mM HEPES, pH 7.0, 5mM CaCl₂, 0.5mM β-ME和0.1% CHAPS构成的50 μL缓冲液(图2)。胰冬酶-7和荧光肽底物罗丹明110, 双-(N-CBZ-DEVD)(Z-DEVD-R110)的浓度分别是50nM和10 μM,根据30分钟后的线性活性和最大信号标准作优化。为获得平均最低活性,加入10 μM共价活性位点抑制剂DEVD-CHO,室温下先温育10分钟再通过加入底物启动反应。加入Z-DEVD-R110底物后30分钟,用40mM HCl猝灭

反应,用加利福尼亚州桑尼维尔 LJL 生物系统公司的分析 HT 试验检测系统 (Analyst HT AssayDetection System, LJL Biosystem, Sunnyvale, CA) 检测终点荧光。各孔中 DMSO 的终浓度是 3%,对酶稳定性或活性没有影响。除蛋白外的所有试验组分可商品化购得,蛋白质、底物和抑制剂储备物作为冷冻试样保存,融化后立即用于试验。Z-DEVD-R110 对光敏感,胱冬酶 -7 抑制剂 DEVD-CHO 在数小时后降解;因此,操作这些溶液时必须小心。

[0917] 筛选方案开发和优化:在 384-孔平板中,采用 100mM HEPES, pH 7.0, 5mM CaCl_2 , 0.5mM β -ME 和 0.1% CHAPS 的反应缓冲液构成的 50 μL 体积(为降低化合物凝聚导致的假阳性选中),通过加入底物 Z-DEVD-R110 至约 100nM 胱冬酶原 -7 启动试验。用 40mM HCl 猝灭反应,室温下在各时间点进行终点试验,用能提供 96-孔和 384-孔形式的 Analyst HT AD 平板读数计读数。对于胱冬酶原 -7 的任何潜在活化剂,利用加利福尼亚州圣迭戈 GP 公司的 GPP 软件 (GraphPad Prism software, GraphPad, Inc., San Diego, CA) 测定 IC_{50} 检测值。

[0918] 为获得 Z' 并优化试验条件,蛋白水解切割胱冬酶原 -7,通过加入少量活性胱冬酶 -7“开启”该蛋白。然后从活性胱冬酶 -7 的作用外推胱冬酶原 -7 的最高活性。一旦完成,即评估蛋白质和底物浓度以及 HTS 化合物的温育时间和温度的优化。从活性胱冬酶 -7 的 Z' 测定可观察到,无活性和活化胱冬酶原 -7 之间获得类似的不同,因为底物 Z-DEVD-R110 信号极其强烈(图 2)。

[0919] 潜在活化剂的优先分配和分析:高通量筛选得到活性比胱冬酶原 -7 固有活性增加 20%的任何化合物视作“选中物”,并分析特异性和结合方式。HTS 筛选后建立激动化合物之间的构效关系以及共有结构特征(图 3)。体外活性试验测定有和没有洗涤剂存在下的 IC_{50} 以除去可能凝聚的选中物 (McGovern 等, A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening(实际和高通量筛选的无区分性抑制剂的潜在共同机制). J. Med. Chem. 45, 1712-1722 (2002); 和 Seidler 等, Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs(已知药物中无区分性凝聚抑制剂的鉴定和预测). J. Med. Chem. 46, 4477-4486 (2003))。分析化合物对胱冬酶原 -7 的特异性是否能促进胱冬酶原 -1 的活性,任何无区分性活化剂作为假象不作进一步研究。购买具体胱冬酶原 -7 活化剂选中物的可商品化购得的分子衍生物,筛选亲和力是否增加作为快速初始优化程序 (SAR 目录)。

[0920] 胱冬酶 -3 和 -7 在凋亡中行使相似的作用,提示全效抑制剂 (pan inhibitor) 会有用的。这些酶的序列和结构高度保守。因此,与胱冬酶原 -7 平行对胱冬酶原 -3 进行激动剂鉴定、优化和选择性(图 3)。分析所有激动胱冬酶原 -7 HTS 选中物对胱冬酶原 -3 的任何潜在选择性,因为预计靶向保守性变构二聚体袋的化合物对两种蛋白质具有相似的活化作用;然而,与其它保守性较低的表面区域相互作用的化合物对特定胱冬酶可具有优先亲和力和活化作用。对胱冬酶原 -3 或 -7 具有优先特异性的化合物作类似物文库合成以拆分和优化亲和力。

[0921] 通过 X-射线晶体学测定与有希望的分子形成复合物的胱冬酶原 -7 的结构。对任何胱冬酶原晶体的共结晶和/或配体浸渍 (ligand soaking) 实验会提供胱冬酶原 - 激动剂复合物以便鉴定结合位置和方式,以及提供化合物优化的建议。对于共结晶,先混合蛋白质 (10-12mg/ml) 和各化合物的 0.5-5mM 溶液,4℃ 保存过夜,然后采用标

准微蒸汽扩散方法,在包括以前为天然和复杂结构测定的条件下进行主结晶筛选(Chai, J. 等, Crystal structure of a procaspase-7zymogen: Mechanisms of activation and substrate binding(胱冬酶原-7 酶原的晶体结构:活化和底物结合的机制). Cell 107, 399-407(2001); Hardy 等, Searching for new allosteric sites in enzymes(在酶中检索新变构位点). Curr. Opin. Struct. Biol. 14, 706-715(2004); Riedl, S. J. 等, Structural basis for the activation of human procaspase-7(活化人胱冬酶原-7的结构基础). Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 14790-14795(2001). Riedl, S. J. 等, Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP(通过 XIAP 抑制胱冬酶-3的结构基础). Cell 110, 791-800(2001)). 如果共结晶未产生具有可解析的化合物密度的晶体结构,可在室温下,有高浓度激动剂(5-10mM)存在下浸渍天然晶体 5-8 小时。确定主结晶条件后,检验 pH、温度、盐浓度、沉淀剂和有机溶剂的作用是否会优化晶体大小、形态,特别是晶体衍射。为观察激动剂结合诱导的结构转变并消除结晶期间自我蛋白水解的可能性,通过丙氨酸取代活性位点半胱氨酸来灭活胱冬酶原-7。

[0922] 胱冬酶原-3 和-7 表达及纯化:将质粒包含入包含不同亲和标签和蛋白质末端位置的各种表达载体,包括 pGEX-6P1(N-末端 GST 融合,GEA 公司)和 pET19b(N-末端 His₆ 亲和标签,诺瓦金公司)以及各种感受态大肠杆菌表达细胞系中以提高胱冬酶原-7 表达。类似地,优化用 IPTG 诱导的浓度、温度和过表达持续时间。虽然对我们的蛋白质进行了产量优化,但胱冬酶原-7 的分析显示缺乏前述自活化的能力(Van de Craen 等, The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis(蛋白水解胱冬酶原活化网络:体外分析). Cell Death Differ. 6, 1117-1124(1999))。因此,将注意力转移到胱冬酶原-3,因为胱冬酶-3 和-7 在凋亡中行使相似的作用,序列和结构高度保守,此外胱冬酶原-3 能自活化(参见, Van de Craen 等,)。

[0923] 利用 pET-23b 载体(诺瓦金公司),大肠杆菌 BL21(DE3)RP 细胞(斯塔拉塔基因公司)将胱冬酶原-3 过表达成含有 C-末端 His₆-亲和标签。37℃,用补加了 200 μg/mL 氨苄青霉素和 50 μg/mL 氯霉素的 2x YT 培养基将细胞培养至 OD_{600nm} 为 0.8-1.0。30℃,用 0.2mM IPTG 诱导胱冬酶原-3 过表达,40 分钟后立即收集细胞,冷冻在 -70℃ 以限制自催化。将细胞融化,重悬在 100mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl 中,通过微流化(马萨诸塞州牛顿市微流化公司)进行裂解。然后以 25,000g 离心 40 分钟以除去细胞碎片,依次通过 Ni-NTA 亲和层析(HisTrap HP 柱,GEA 公司)、阴离子交换层析(HiTrap Q HP,GEA 公司)和凝胶过滤层析(Superdex 20016/60,GEA 公司)纯化可溶性组分。立即将纯胱冬酶原-3 保存在 -70℃。根据 SDS-page 凝胶电泳和电喷雾电离质谱法,最终纯化的胱冬酶原-3 是约 95-98% 纯(图 4)。我们的产量约为每次纯化 0.3 毫克/升培养液,需要多轮表达和纯化以累积 HTS 试验所需的蛋白量。

[0924] 筛选方案开发和优化:为获得 Z' 并优化试验条件,用粒酶-b 蛋白水解切割胱冬酶原-3,因而“开启”了胱冬酶原以便测定最高活性(粒酶-b 的加入浓度是胱冬酶原-3 的 1/1000,因此不产生可观察的活性)。一旦完成,即评估蛋白质和底物浓度以及 HTS 化合物的温育时间和温度的优化。相比于在针对活性胱冬酶-7 的抑制剂 HTS 筛选期间获得平均 Z' 为 0.90,我们很高兴在无活性和活化的胱冬酶原-3 之间获得类似的活性不同。

[0925] 依据 384-孔平板活性胱冬酶-7 HTS 抑制筛选开发高通量胱冬酶原-3 活化试验方

案。在 25mM HEPES, pH 7.4, 50mM KCl, 1mM DTT 和 0.1% CHAPS 反应缓冲液构成的 50 μ L 总体积中 (为减少化合物凝聚导致的假阳性选中) 温育 100nM 生理相关浓度的胱冬酶原 -3 (Pop, C. 等, Removal of the pro-domain does not affect the conformation of the procaspase-3 dimer (除去原结构域不影响胱冬酶原 -3 二聚体的构象). Biochemistry 40, 14224-14235 (2001)) 与 30 μ M HTS 化合物。然后在 37°C 振荡胱冬酶原 -3/ 小分子温育物 3 小时。然后通过贝克曼公司的 MultiMixer 大量液体分配器 (MultiMixer bulk liquid dispenser, Beckman) 加入荧光肽底物罗丹明 110, 双-(N-CBZ-DEVD) (Z-DEVD-R110) 至终浓度 10 μ M, 再于室温下温育 30 分钟。用 40mM HCl 猝灭反应, 用加利福尼亚州桑尼维尔 LJI 生物系统公司的分析 HT 试验检测系统检测终点荧光。各孔中 DMSO 的终浓度是 3%, 对酶稳定性或活性没有影响。包括蛋白质、底物和抑制剂在内的所有试验组分作为冷冻试样保存, 融化后立即用于试验。

[0926] HTS 筛选结果: 37°C 温育 3 小时后, 筛选 3 个小分子文库构成的总共 62,000 种式 I 所示化合物活化胱冬酶原 -3 的能力。筛选的小分子 HTS 文库包括 CD (ChemDiv) 多样性组的约 12,000 种化合物, CD (ChemDiv) 激酶文库的 10,000 种化合物和在 SMDI 的 UCSF 封装的定制文库的 40,000 种小分子。在两个月期间, 每天检验约 4,000 种化合物, Z' 为 0.85-0.95。高通量筛选得到活性比胱冬酶原 -3 固有活性增加 20% 或更多的任何化合物视作潜在的“选中物”, 再合成并分析特异性和结合方式。根据图 5 所示的基准, 几种化合物显示活化胱冬酶原 -3。

[0927] 虽然出于清晰理解的目的, 借助说明和实施例描述了上述发明的一些细节, 但本领域技术人员应明白可在随附权利要求的范围内实施某些改变和改进。此外, 如同各参考文献单独通过引用纳入本文的程度一样, 本文提供的各参考文献通过引用全文纳入本文。

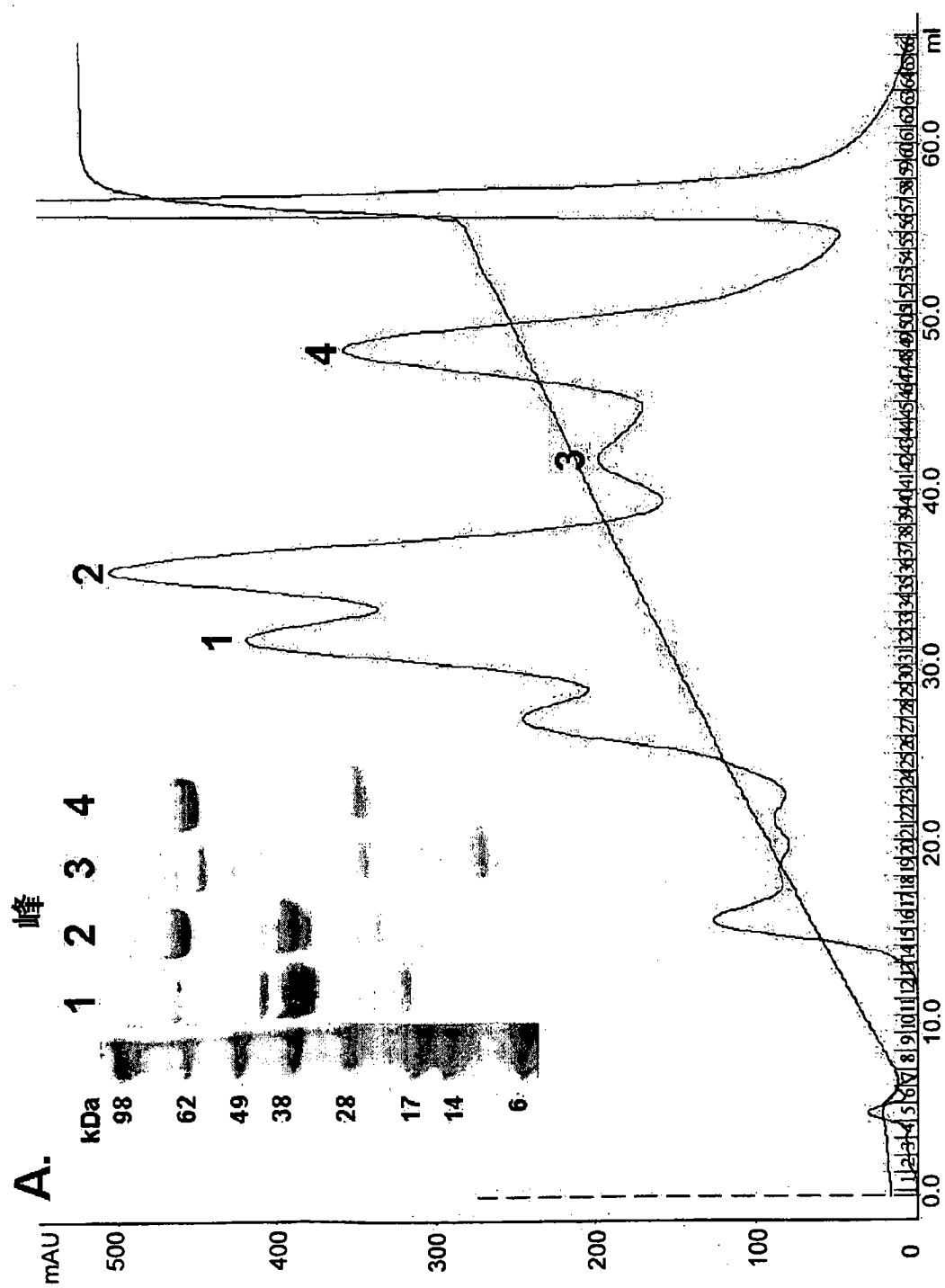


图 1-1



图 1-2

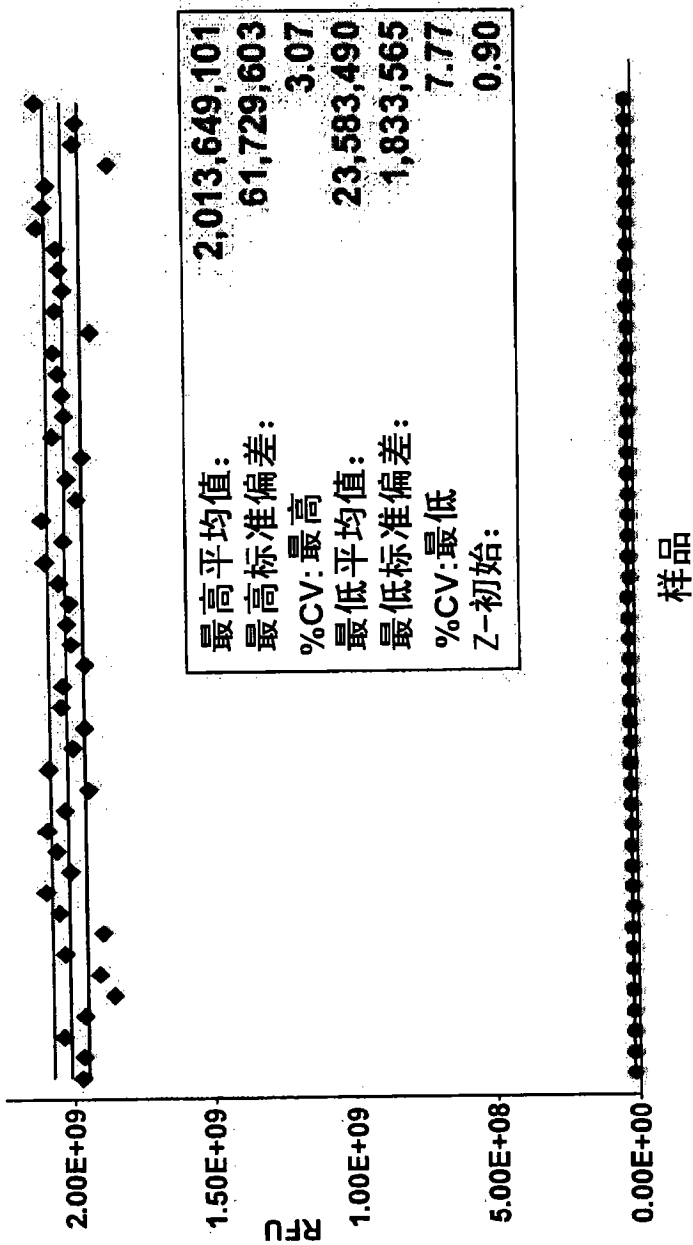


图 2

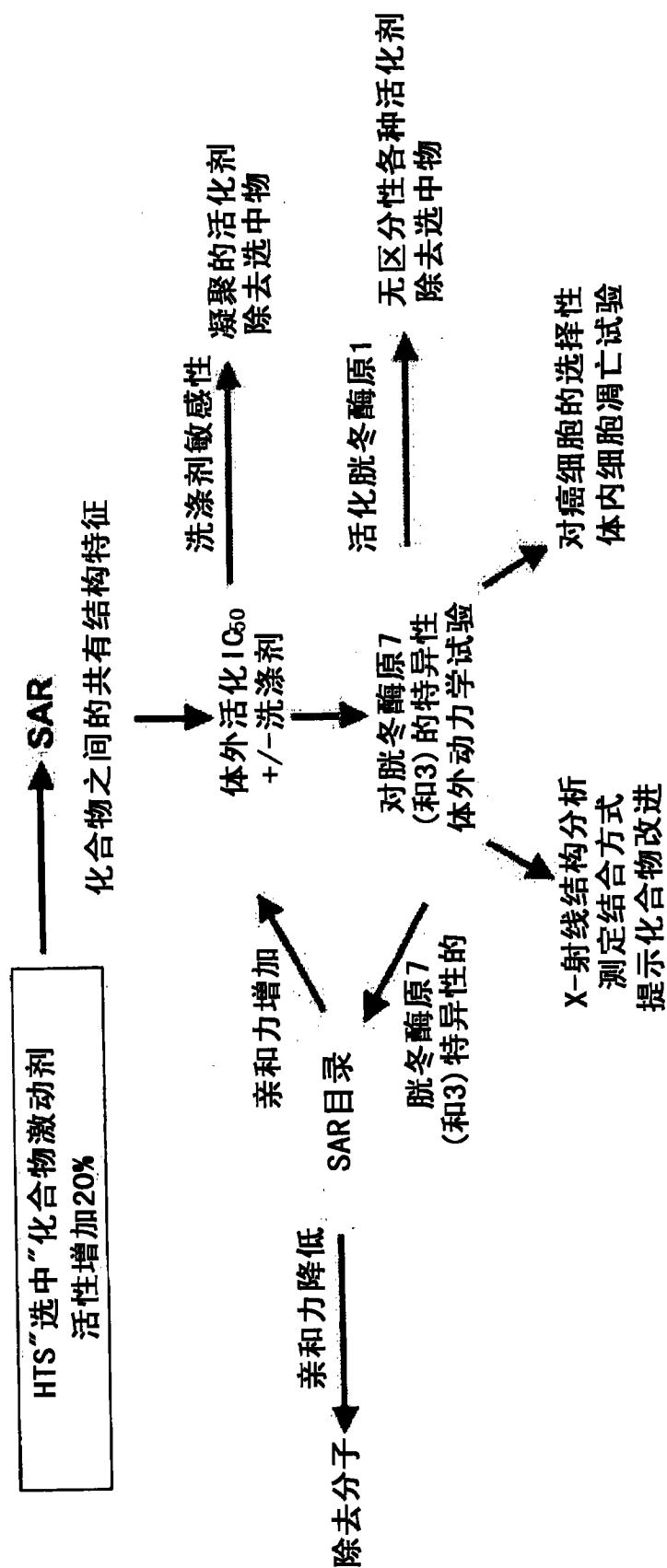


图 3

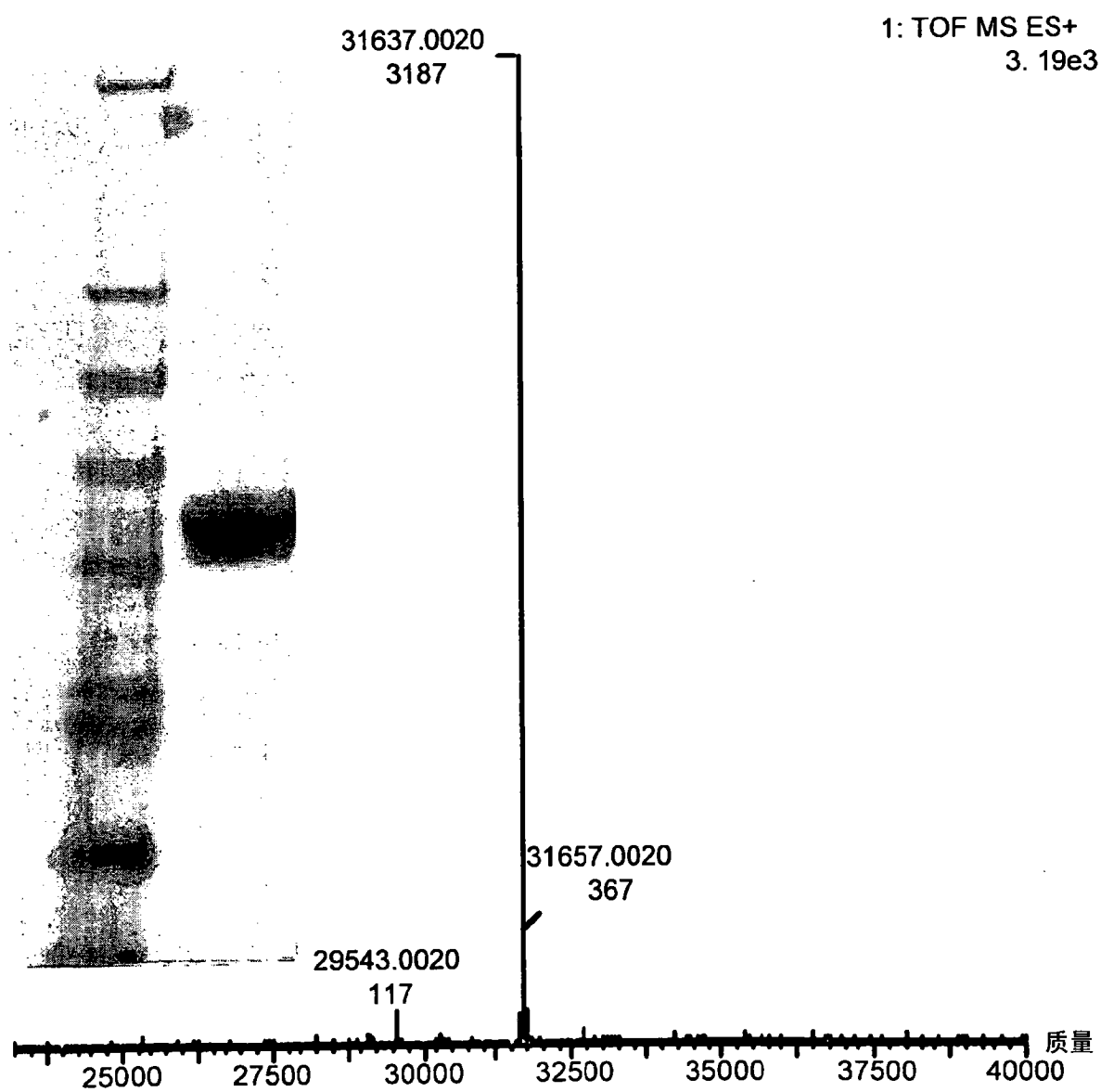


图 4

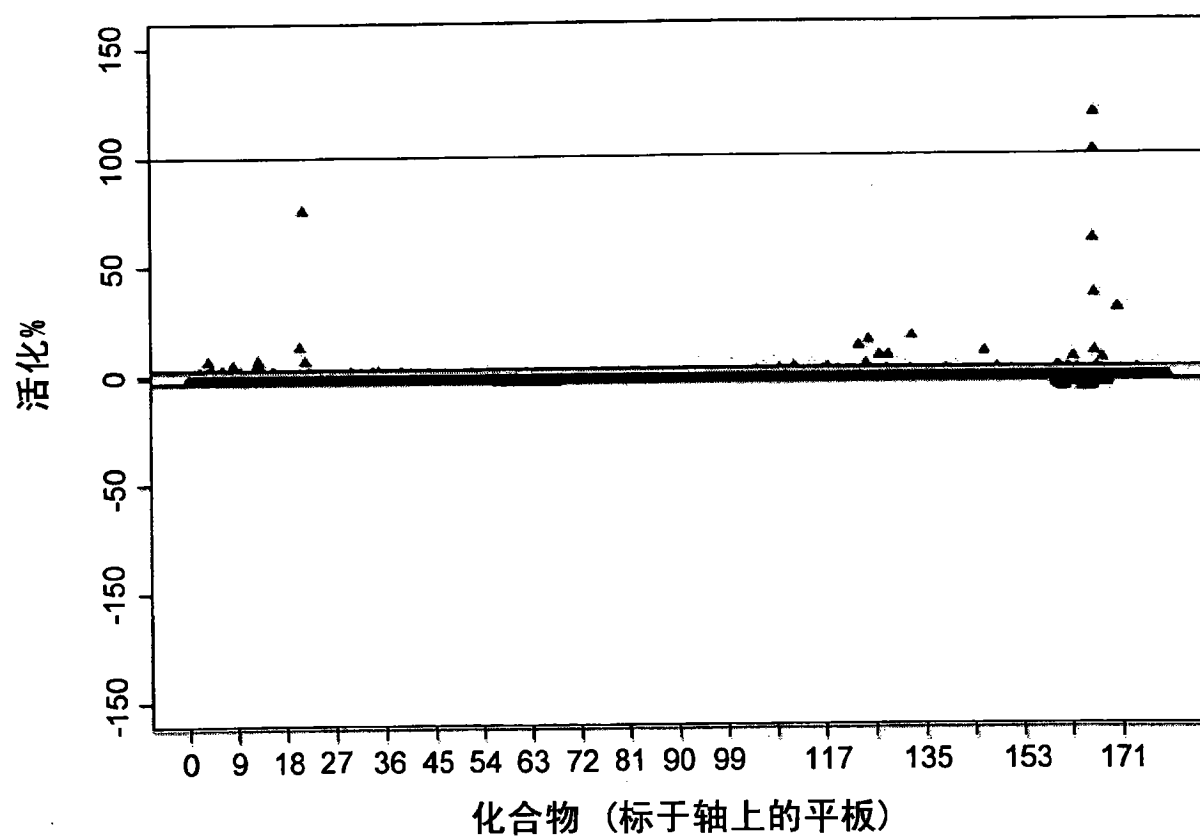


图 5