



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112292377 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 201980041379.1

S·康德-塞德 J·A·维加拉米罗

(22) 申请日 2019.06.20

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30) 优先权数据

代理人 初明明 黄希贵

18382447.3 2018.06.20 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2020.12.18

C07D 401/14 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07D 471/04 (2006.01)

PCT/EP2019/066385 2019.06.20

A61P 25/28 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07D 405/14 (2006.01)

W02019/243527 EN 2019.12.26

C07D 491/048 (2006.01)

(71) 申请人 詹森药业有限公司

C07D 491/056 (2006.01)

地址 比利时·比尔斯·特恩豪特斯路30号

C07D 498/04 (2006.01)

(72) 发明人 J·M·巴托洛梅-内布雷达

A61K 31/5365 (2006.01)

A·A·特拉班科-苏亚雷斯

A61K 31/536 (2006.01)

C·M·马蒂尼兹-比图罗

A61K 31/538 (2006.01)

F·德尔加多-吉米涅兹

A61K 31/5383 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

权利要求书3页 说明书129页

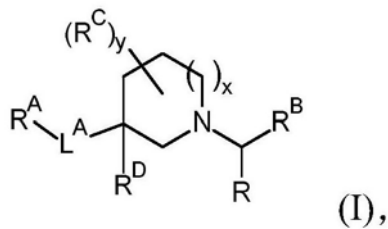
(54) 发明名称

OGA抑制剂化合物

(57) 摘要

本发明涉及O-GlcNAc水解酶(OGA)抑制剂。本发明还涉及包含此类化合物的药物组合物、用于制备此类化合物和组合物的方法、以及此类化合物和组合物用于预防和治疗其中OGA的抑制是有益的障碍的用途,这些障碍是例如tau病变,特别是阿尔茨海默氏病或进行性核上性麻痹;和伴有tau病理学的神经退行性疾病,特别是由C90RF72突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆。

1. 一种具有式 (I) 的化合物



或其互变异构体或立体异构形式, 其中

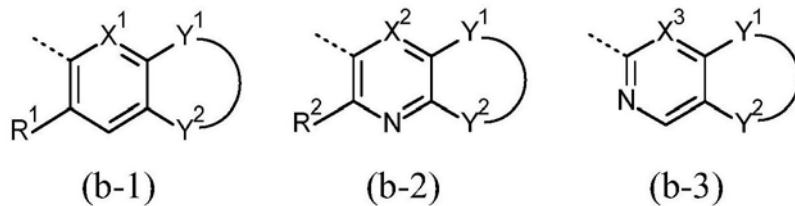
R^A 是选自下组的杂芳基基团, 该组由以下组成: 吡啶-2-基、吡啶-3-基、吡啶-4-基、咪唑-3-基、咪唑-4-基、咪唑-5-基和吡嗪-2-基, 其各自可任选地被各自独立地选自下组的1个、2个或3个取代基取代, 该组由以下组成: 卤代; 氰基; 任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷基; $-C(O)NR^{aa}$; NR^{aa} ; 和任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基; 其中 R^a 和 R^{aa} 各自独立地选自由以下组成的组: 氢和任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷基;

L^A 选自由以下组成的组: 共价键、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ 、 $-NHCH_2-$ 和 $-CH_2NH-$;

x 表示0;

R 是H或 CH_3 ; 并且

R^B 是具有式 (b-1)、(b-2) 或 (b-3) 的二环基团



其中

R^1 和 R^2 各自选自由以下组成的组: 氢、氟和甲基;

X^1 、 X^2 和 X^3 各自表示CH、CF或N;

$-Y^1-Y^2-$ 形成选自下组的二价基团, 该组由以下组成:

$-O(CH_2)_mO-$ (c-1);

$-O(CH_2)_n-$ (c-2); $-(CH_2)_nO-$ (c-3);

$-O(CH_2)_pNR^3-$ (c-4); $-NR^3(CH_2)_pO-$ (c-5);

$-O(CH_2)(CO)NR^3-$ (c-6); $-NR^3(CO)(CH_2)O-$ (c-7);

$-(CH_2)_nNR^3(CO)-$ (c-8); $-(CO)NR^3(CH_2)_n-$ (c-9); 和

$-N=CH(CO)NR^3-$ (c-10);

其中

m 是1或2;

n 和 p 各自独立地表示2或3;

每个 R^3 独立地是H或 C_{1-4} 烷基;

R^C 选自由以下组成的组: 氟、甲基、羟基、甲氧基、三氟甲基和二氟甲基;

R^D 选自由以下组成的组: 氢、氟、甲基、羟基、甲氧基、三氟甲基和二氟甲基; 并且

y表示0、1或2；

条件是

a) 当存在于与哌啶二基环或吡咯烷二基环的氮原子相邻的碳原子处时， R^C 不是羟基或甲氧基；

b) 当 R^C 存在于与C- R^D 相邻的碳原子处时， R^C 或 R^D 不能同时选自羟基或甲氧基；

c) 当 L^A 是-O-、-OCH₂-、-CH₂O-、-NH-、-N(CH₃)-、-NH(CH₂)-或-(CH₂)NH-时， R^D 不是羟基或甲氧基；

或其药学上可接受的加成盐或溶剂化物。

2. 如权利要求1所述的化合物，其中

R^A 是选自下组的杂芳基基团，该组由以下组成：吡啶-4-基、嘧啶-4-基和吡嗪-2-基，其各自可任选地被各自独立地选自下组的1个、2个或3个取代基取代，该组由以下组成：卤代；任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的C₁₋₄烷基；和任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的C₁₋₄烷氧基。

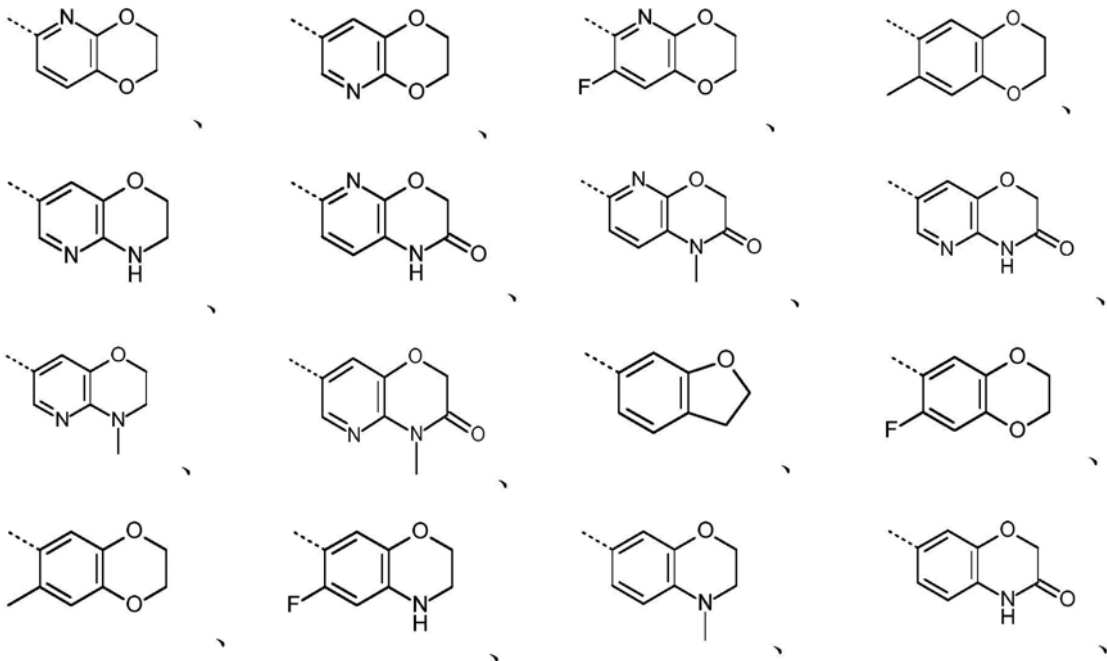
3. 如权利要求1或2所述的化合物，其中 L^A 选自由以下组成的组：共价键、-CH₂-、-O-、-OCH₂-、-CH₂O-、和-NHCH₂-。

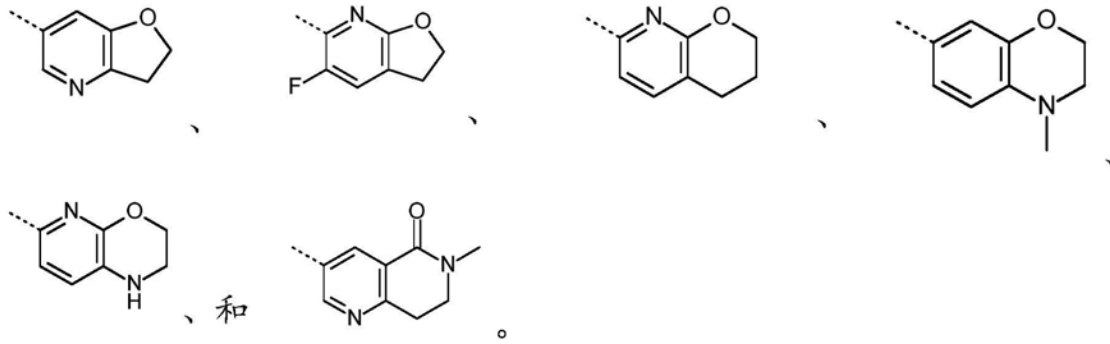
4. 如权利要求1至3中任一项所述的化合物，其中 R^B 是具有式 (b-1) 或 (b-2) 的二环基团。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的化合物，其中 R^B 是具有式 (b-1) 或 (b-2) 的二环基团，其中 R^1 选自由以下组成的组：氢、氟和甲基； R^2 是氢； X^1 是N或CH；并且 X^2 是CH。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的化合物，其中 R^B 是具有式 (b-1) 或 (b-2) 的二环基团，其中 R^1 选自由以下组成的组：氢、氟和甲基； R^2 是氢； X^1 是N或CH； X^2 是CH；并且-Y¹-Y²-形成选自下组的二价基团，该组由以下组成：(c-1)、(c-2)、(c-4)、(c-6) 和 (c-9)，其中m是2；n是2或3；并且p是2。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的化合物，其中 R^B 选自由以下组成的组：





8. 如权利要求1至7中任一项所述的化合物,其中R^D选自由以下组成的组:氢、氟和甲基;并且y表示0或1。

9. 一种药物组合物,该药物组合物包含预防或治疗有效量的如权利要求1至8中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

10. 一种用于制备药物组合物的方法,该方法包括:将药学上可接受的载体与预防或治疗有效量的如权利要求1至8中任一项所述的化合物混合。

11. 如权利要求1至8中任一项所定义的化合物或如权利要求9所定义的药物组合物,用于用作药剂。

12. 如权利要求1至8中任一项所定义的化合物或如权利要求9所定义的药物组合物,用于治疗或预防tau病变,特别是选自下组的tau病变,该组由以下组成:阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、唐氏综合征、额颞叶痴呆、伴有帕金森综合征-17的额颞叶痴呆、皮克氏病、皮质基底节变性、和嗜银颗粒疾病;或伴有tau病理学的神经退行性疾病,特别是选自由C90RF72突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆的神经退行性疾病。

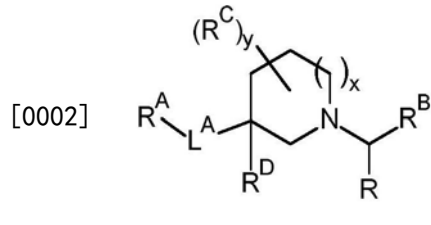
13. 一种预防或治疗选自由tau病变组成的组的障碍的方法,特别是选自下组的tau病变,该组由以下组成:阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、唐氏综合征、额颞叶痴呆、伴有帕金森综合征-17的额颞叶痴呆、皮克氏病、皮质基底节变性、和嗜银颗粒疾病;或伴有tau病理学的神经退行性疾病,特别是选自由C90RF72突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆的神经退行性疾病,该方法包括向有需要的受试者施用预防或治疗有效量的如权利要求1至8中任一项所述的化合物或如权利要求9所述的药物组合物。

14. 一种用于抑制O-GlcNAc水解酶的方法,该方法包括向有需要的受试者施用预防或治疗有效量的如权利要求1至8中任一项所述的化合物或如权利要求9所述的药物组合物。

OGA抑制剂化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及具有式 (I) 所示结构的O-GlcNAc水解酶 (OGA) 抑制剂



[0003] 其中这些基团是如在说明书中所定义的。本发明还涉及包含此类化合物的药物组合物、用于制备此类化合物和组合物的方法、以及此类化合物和组合物用于预防和治疗其中OGA的抑制是有益的障碍的用途,这些障碍是例如tau病变,特别是阿尔茨海默氏病或进行性核上性麻痹;和伴有tau病理学的神经退行性疾病,特别是由C9ORF72突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆。

背景技术

[0004] O-GlcNAc酰化是蛋白质的可逆修饰,其中N-乙酰基-D-葡萄糖胺残基被转移至丝氨酸残基和苏氨酸残基的羟基基团,产生O-GlcNAc酰化蛋白。已经在真核生物的胞质溶胶和细胞核中鉴定了超过1000种这样的靶蛋白。该修饰被认为调节大范围的细胞过程,包括转录、细胞骨架过程、细胞周期、蛋白酶体降解和受体信号传导。

[0005] O-GlcNAc转移酶 (OGT) 和O-GlcNAc水解酶 (OGA) 是描述的向靶蛋白添加 (OGT) 或从靶蛋白去除 (OGA) O-GlcNAc的仅有的两种蛋白质。OGA最初于1994年从脾脏制剂中纯化,1998年鉴定为由脑膜瘤表达的抗原,并且称为MGEA5,由作为细胞胞质区室中的单体的916个氨基酸 (102915道尔顿) 组成。它与ER相关的和高尔基体相关的糖基化过程 (其对于蛋白质的运输和分泌是重要的) 不同,并且不同于OGA具有酸性pH最佳值,而OGA在中性pH下显示出最高活性。

[0006] 具有双天冬氨酸催化中心的OGA催化结构域位于该酶的N-末端部分,该酶的侧翼是两个柔性结构域。C-末端部分由其前面是茎结构域的推定的HAT (组蛋白乙酰转移酶结构域) 组成。尚未证明HAT结构域具有催化活性。

[0007] O-GlcNAc酰化蛋白以及OGT和OGA本身在脑和神经元中特别丰富,表明这种修饰在中枢神经系统中起重要作用。实际上,研究证实O-GlcNAc酰化代表了促进神经元通讯、记忆形成和神经退行性疾病的关键调节机制。此外,已经显示OGT对于几种动物模型中的胚胎发生是必需的,并且ogt无效小鼠是胚胎致死的。OGA对于哺乳动物的发育也是必不可少的。两项独立研究表明,OGA纯合无效小鼠在出生后存活不过24-48小时。Oga缺失导致幼崽中糖原动员的缺陷,并且它在源自纯合敲除胚胎的MEF中导致基因组不稳定性相关的细胞周期停滞。杂合动物存活至成年期,但它们在转录和代谢方面均表现出改变。

[0008] 已知O-GlcNAc循环中的扰动影响慢性代谢疾病,例如糖尿病以及癌症。Oga杂合性抑制了Apc-/+小鼠癌症模型中的肠道肿瘤发生,并且Oga基因 (MGEA5) 是一种有记录的人糖

尿病易感基因位点。

[0009] 此外,0-GlcNAc修饰已经在几种参与神经退行性疾病的发展和进展的蛋白质上被鉴定,并且已表明0-GlcNAc水平的变化与Tau在阿尔茨海默氏病中形成神经原纤维缠结(NFT)蛋白的相关性。此外,已经描述了帕金森病中 α -突触核蛋白的0-GlcNAc酰化。

[0010] 在中枢神经系统中已经描述了六种tau剪接变体。Tau在17号染色体上编码,并且其中在中枢神经系统中表达的最长剪接变体由441个氨基酸组成。这些同种型的不同之处在于两个N-末端插入物(外显子2和3)和位于微管结合结构域内的外显子10。在tau病变中外显子10是值得考虑的目标,因为它具有多个突变,使得tau易于聚集,如下所述。Tau蛋白结合并稳定神经元微管细胞骨架,这对于调节细胞器沿轴突区室的细胞内运输是重要的。因此,tau在轴突的形成和维持其完整性中起重要作用。此外,还提出了树突棘生理学中的作用。

[0011] Tau聚集是多种所谓的tau病变的潜在原因之一,例如PSP(进行性核上性麻痹)、唐氏综合征(DS)、FTLD(额颞叶痴呆)、FTDP-17(伴有帕金森综合征-17的额颞痴呆)、皮克氏病(Pick's disease,PD)、CBD(皮质基底节变性)、嗜银颗粒疾病(agryophilic grain disease,AGD)和AD(阿尔茨海默氏病)。此外,tau病理学伴随着其他神经退行性疾病,例如由C9ORF72突变引起的肌萎缩侧索硬化(ALS)或FTLD。在这些疾病中,tau通过过度磷酸化进行翻译后修饰,这被认为是使tau从微管分离并使其易于聚集。tau的0-GlcNAc酰化调节磷酸化的程度,因为携带0-GlcNAc残基的丝氨酸或苏氨酸残基不适于磷酸化。这有效地使得tau不易于从微管分离并且减少聚集成神经毒性缠结,这最终导致神经毒性和神经元细胞死亡。这种机制还可以减少神经元通过脑中相互连接的回路释放的tau聚集体的细胞间扩散,最近已经讨论这会加速tau相关性痴呆的病理学。实际上,从AD患者的脑中分离的过度磷酸化的tau显示出显著降低的0-GlcNAc酰化水平。

[0012] 施用于JNPL3 tau转基因小鼠的OGA抑制剂成功地减少了NFT形成和神经元损失而没有明显的副作用。该观察结果已在另一种tau病变啮齿动物模型中得到证实,其中可诱导FTD中发现的突变tau的表达(tg4510)。OGA的小分子抑制剂的给药在减少tau聚集的形成方面是有效的,并且减弱了皮质萎缩和脑室扩大。

[0013] 此外,淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的0-GlcNAc酰化有利于通过非淀粉样蛋白生成途径加工以产生可溶性APP片段并避免导致AD相关淀粉样蛋白- β (A β)形成的切割。

[0014] 通过抑制OGA维持tau的0-GlcNAc酰化代表了减少上述神经退行性疾病中的tau-磷酸化和tau-聚集从而减弱或阻止神经退行性tau病变-疾病的进展的潜在方法。

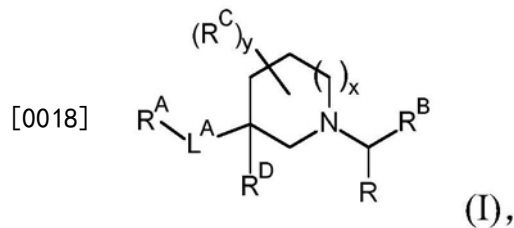
[0015] WO 2012/117219(英国顶峰公司(Summit Corp.plc.),2012年9月7日公开)描述了N-[[5-(羟甲基)吡咯烷-2-基]甲基]烷基酰胺和N-烷基-2-[5-(羟甲基)吡咯烷-2-基]乙酰胺衍生物作为OGA抑制剂。WO 2014/159234(默克专利有限公司(Merck Patent GMBH),2014年10月2日公开)主要披露了4-苯基或苄基-哌啶和哌嗪化合物(其在1-位被乙酰胺基-噻唑基甲基或乙酰胺基噻唑基甲基取代基取代),以及化合物N-[5-(3-苯基-1-哌啶基)甲基]噻唑-2-基]乙酰胺;WO 2016/0300443(神经内科公司(Asceneuron S.A.),2016年3月3日公开)、WO 2017/144633和WO 2017/0114639(神经内科公司,2017年8月31日公开)披露了1,4-双取代的哌啶或哌嗪作为OGA抑制剂;WO 2017/144637(神经内科公司,2017年8月31日公开)披露了,更特别地,4-取代的1-[1-(1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)乙基]-哌嗪;1-[1-

(2,3-二氢苯并呋喃-5-基)乙基]-;1-[1-(2,3-二氢苯并呋喃-6-基)乙基]-;和1-[1-(2,3-二氢-1,4-苯并二噁英-6-基)乙基]-哌嗪衍生物作为OGA抑制剂;WO 2017/106254(默沙东公司(Merck Sharp&Dohme Corp.))描述了取代的N-[5-[(4-亚甲基-1-哌啶基)甲基]噻唑-2-基]乙酰胺化合物作为OGA抑制剂。

[0016] 仍然需要具有有利的特性平衡的OGA抑制剂化合物,例如具有改善的效力、良好的生物利用度、药代动力学、和脑渗透和/或更好的毒性谱。因此,本发明的目的是提供克服这些问题中的至少一些问题的化合物。

发明内容

[0017] 本发明涉及具有式(I)的化合物



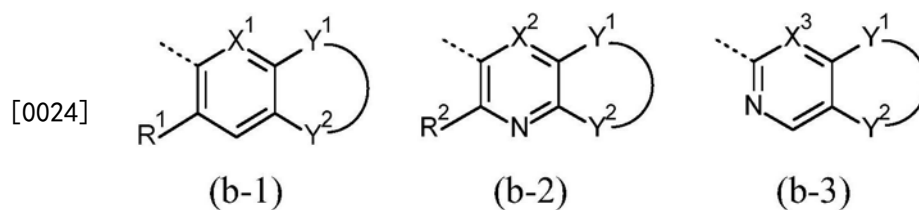
[0019] 及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^A 是选自下组的杂芳基基团,该组由以下组成:吡啶-2-基、吡啶-3-基、吡啶-4-基、哒嗪-3-基、嘧啶-4-基、嘧啶-5-基和吡嗪-2-基,其各自可任选地被各自独立地选自下组的1个、2个或3个取代基取代,该组由以下组成:卤代;氰基;任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷基; $-C(O)NR^aR^{aa}$; NR^aR^{aa} ;和任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基;其中 R^a 和 R^{aa} 各自独立地选自自由以下组成的组:氢和任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷基;

[0020] L^A 选自自由以下组成的组:共价键、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ 、 $-NHCH_2-$ 和 $-CH_2NH-$;

[0021] x 表示0;

[0022] R 是H或 CH_3 ;并且

[0023] R^B 是具有式(b-1)、(b-2)或(b-3)的二环基团



[0025] 其中

[0026] R^1 和 R^2 各自选自自由以下组成的组:氢、氟和甲基;

[0027] X^1 、 X^2 和 X^3 各自表示CH、CF或N;

[0028] $-Y^1-Y^2-$ 形成选自下组的二价基团,该组由以下组成:

[0029] $-O(CH_2)_mO-$ (c-1);

[0030] $-O(CH_2)_n-$ (c-2); $-(CH_2)_nO-$ (c-3);

[0031] $-O(CH_2)_pNR^3-$ (c-4); $-NR^3(CH_2)_pO-$ (c-5);

- [0032] $-O(CH_2)_m(CO)NR^3-$ (c-6); $-NR^3(CO)(CH_2)_nO-$ (c-7);
- [0033] $-(CH_2)_nNR^3(CO)-$ (c-8); $-(CO)NR^3(CH_2)_n-$ (c-9); 和
- [0034] $-N=CH(CO)NR^3-$ (c-10);
- [0035] 其中
- [0036] m是1或2;
- [0037] n和p各自独立地表示2或3;
- [0038] 每个 R^3 独立地是H或 C_{1-4} 烷基;
- [0039] R^C 选自由以下组成的组:氟、甲基、羟基、甲氧基、三氟甲基和二氟甲基;
- [0040] R^D 选自由以下组成的组:氢、氟、甲基、羟基、甲氧基、三氟甲基和二氟甲基;并且
- [0041] y表示0、1或2;
- [0042] 条件是
- [0043] a) 当存在于与哌啶二基环或吡咯烷二基环的氮原子相邻的碳原子处时, R^C 不是羟基或甲氧基;
- [0044] b) 当 R^C 存在于与 $C-R^D$ 相邻的碳原子处时, R^C 或 R^D 不能同时选自羟基或甲氧基;
- [0045] c) 当 L^A 是 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ 、 $-NH(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)NH-$ 时, R^D 不是羟基或甲氧基;
- [0046] 及其药学上可接受的盐和溶剂化物。
- [0047] 本发明例证了包含药学上可接受的载体以及上述化合物中的任一种的药物组合物。本发明例证了通过混合上述化合物中的任一种与药学上可接受的载体而制备的药物组合物。本发明例证了用于制备药物组合物的方法,该方法包括将上述化合物中的任一种与药学上可接受的载体混合。
- [0048] 本发明例示了预防或治疗由O-GlcNAc水解酶(OGA)的抑制介导的障碍的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的上述化合物或药物组合物中的任一种。
- [0049] 本发明进一步例示了抑制OGA的方法,该方法包括向有需要的受试者施用预防或治疗有效量的上述化合物或药物组合物中的任一种。
- [0050] 本发明的一个实例是预防或治疗选自tau病变的障碍的方法,特别是选自下组的tau病变,该组由以下组成:阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、唐氏综合征、额颞叶痴呆、伴有帕金森综合征-17的额颞叶痴呆、皮克氏病、皮质基底节变性、和嗜银颗粒疾病;或伴有tau病理学的神经退行性疾病,特别是选自由C9ORF72突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆的神经退行性疾病,该方法包括向有需要的受试者施用预防或治疗有效量的上述化合物或药物组合物中的任一种。
- [0051] 本发明的另一个实例是上述化合物中的任一种用于在有需要的受试者中预防或治疗tau病变,特别是选自下组的tau病变,该组由以下组成:阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、唐氏综合征、额颞叶痴呆、伴有帕金森综合征-17的额颞叶痴呆、皮克氏病、皮质基底节变性、和嗜银颗粒疾病;或伴有tau病理学的神经退行性疾病,特别是选自由C9ORF72突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆的神经退行性疾病。

具体实施方式

- [0052] 本发明涉及如上文所定义的具有式(I)的化合物及其药学上可接受的加成盐和溶

剂化物。具有式 (I) 的化合物是 O-GlcNAc 水解酶 (OGA) 的抑制剂, 并且可用于预防或治疗 tau 病变, 特别是选自下组的 tau 病变, 该组由以下组成: 阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、唐氏综合征、额颞叶痴呆、伴有帕金森综合征-17 的额颞叶痴呆、皮克氏病、皮质基底节变性、和嗜银颗粒疾病; 或者可用于预防或治疗伴有 tau 病理学的神经退行性疾病, 特别是选自由 C90RF72 突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆的神经退行性疾病。

[0053] 在一个特定的实施例中, 本发明涉及如在本文中提及的具有式 (I) 的化合物及其互变异构体和立体异构形式, 其中

[0054] R^A 是选自下组的杂芳基基团, 该组由以下组成: 3-吡啶基、吡啶-4-基、嘧啶-4-基和吡嗪-2-基, 其各自可任选地被各自独立地选自下组的 1 个、2 个或 3 个取代基取代, 该组由以下组成: 卤代; 任选地被 1 个、2 个或 3 个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷基; 和任选地被 1 个、2 个或 3 个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基;

[0055] 及其药学上可接受的盐和溶剂化物。

[0056] 在另一个实施例中, 本发明涉及如在本文中提及的具有式 (I) 的化合物及其互变异构体和立体异构形式, 其中

[0057] R^A 是选自下组的杂芳基基团, 该组由以下组成: 吡啶-4-基、嘧啶-4-基和吡嗪-2-基, 其各自可任选地被各自独立地选自下组的 1 个、2 个或 3 个取代基取代, 该组由以下组成: 卤代; 任选地被 1 个、2 个或 3 个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷基; 以及

[0058] 任选地被 1 个、2 个或 3 个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基;

[0059] 及其药学上可接受的盐和溶剂化物。

[0060] 在另一个实施例中, 本发明涉及如在本文中提及的具有式 (I) 的化合物及其互变异构体和立体异构形式, 其中

[0061] R^A 是选自下组的杂芳基基团, 该组由以下组成: 吡啶-4-基、嘧啶-4-基和吡嗪-2-基, 其各自可任选地被各自独立地选自下组的 1 个、2 个或 3 个取代基取代, 该组由以下组成: 任选地被 1 个、2 个或 3 个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷基; 以及

[0062] 任选地被 1 个、2 个或 3 个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基;

[0063] 及其药学上可接受的盐和溶剂化物。

[0064] 在另一个实施例中, 本发明涉及如在本文中提及的具有式 (I) 的化合物及其互变异构体和立体异构形式, 其中 R^A 是吡啶-4-基或嘧啶-4-基, 其各自可任选地被各自独立地选自下组的 1 个、2 个或 3 个取代基取代, 该组由以下组成: 任选地被 1 个、2 个或 3 个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷基; 和任选地被 1 个、2 个或 3 个独立选择的卤代取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基。

[0065] 在另一个实施例中, 本发明涉及如在本文中提及的具有式 (I) 的化合物及其互变异构体和立体异构形式, 其中

[0066] R^A 是选自下组的杂芳基基团, 该组由 3-吡啶基和吡啶-4-基组成, 其各自被 1 个或 2 个独立选择的 C_{1-4} 烷基取代基取代;

[0067] 及其药学上可接受的盐和溶剂化物。

[0068] 在另一个实施例中, 本发明涉及如在本文中提及的具有式 (I) 的化合物及其互变异构体和立体异构形式, 其中

[0069] L^A 选自由以下组成的组: 共价键、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 和 $-NHCH_2-$ 。

[0070] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中

[0071] L^A 选自自由以下组成的组:共价键、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、和 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 。

[0072] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 L^A 选自自由以下组成的组: $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{NHCH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 。

[0073] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 L^A 选自自由以下组成的组: $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 和 $-\text{NHCH}_2-$ 。

[0074] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 L^A 是 $-\text{O}-$ 或 $-\text{OCH}_2-$ 。

[0075] 在又一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 是具有式(b-1)或(b-2)的二环基团。

[0076] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 是具有式(b-1)或(b-2)的二环基团,其中 R^1 选自自由以下组成的组:氢、氟和甲基; R^2 是氢; X^1 是N或CH;并且 X^2 是CH。

[0077] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 是具有式(b-1)或(b-2)的二环基团,其中 R^1 选自自由以下组成的组:氢、氟和甲基; R^2 是氢; X^1 是N或CH; X^2 是CH;并且 $-\text{Y}^1-\text{Y}^2-$ 形成选自下组的二价基团,该组由以下组成:(c-1)、(c-2)、(c-4)、(c-5)、(c-6)和(c-9),特别是(c-1)、(c-2)、(c-4)、(c-5)和(c-9)。

[0078] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 是具有式(b-1)或(b-2)的二环基团,其中 R^1 选自自由以下组成的组:氢、氟和甲基; R^2 是氢; X^1 是N或CH; X^2 是CH;并且 $-\text{Y}^1-\text{Y}^2-$ 形成选自下组的二价基团,该组由以下组成:(c-1)、(c-2)、(c-4)和(c-6)。

[0079] 在另一个实施例中,本发明涉及具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 是具有式(b-1)或(b-2)的二环基团,其中 R^1 选自自由以下组成的组:氢、氟和甲基; R^2 是氢; X^1 是N或CH; X^2 是CH;并且 $-\text{Y}^1-\text{Y}^2-$ 形成选自下组的二价基团,该组由以下组成:(c-1)、(c-2)、(c-4)和(c-6),其中m是2;n是2或3;并且p是2。

[0080] 在另一个实施例中,本发明涉及具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 是具有式(b-1)或(b-2)的二环基团,其中 R^1 选自自由以下组成的组:氢、氟和甲基; R^2 是氢; X^1 是N或CH; X^2 是CH;并且 $-\text{Y}^1-\text{Y}^2-$ 形成选自下组的二价基团,该组由以下组成:(c-1)、(c-2)、(c-4)、(c-5)和(c-9),其中m是2;n是2或3;并且p是2。

[0081] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^D 选自自由以下组成的组:氢、氟和甲基。

[0082] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^D 是氢或甲基。

[0083] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中y表示0或1。

[0084] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变

异构体和立体异构形式,其中y表示0。

[0085] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中y表示1。

[0086] 在另一个实施例中,本发明涉及如在本文中提及的具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中R^A是选自下组的杂芳基基团,该组由以下组成:吡啶-4-基、嘧啶-4-基和吡嗪-2-基,其各自可任选地被各自独立地选自下组的1个、2个或3个取代基取代,该组由以下组成:卤代;任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的C₁₋₄烷基;和任选地被1个、2个或3个独立选择的卤代取代基取代的C₁₋₄烷氧基;L^A选自由以下组成的组:共价键、-CH₂-、-O-、-OCH₂-、-CH₂O-和-NHCH₂-;

[0087] x表示0;

[0088] R是H或CH₃;并且

[0089] R^B是具有式(b-1)或(b-2)的二环基团,其中

[0090] R¹和R²各自选自由以下组成的组:氢、氟和甲基;

[0091] X¹、X²和X³各自表示CH、CF或N;

[0092] -Y¹-Y²-形成选自下组的二价基团,该组由以下组成:(c-1)、(c-2)、(c-4)和(c-6);其中

[0093] m是1或2;

[0094] n和p各自独立地表示2或3;

[0095] 每个R³独立地是H或C₁₋₄烷基;

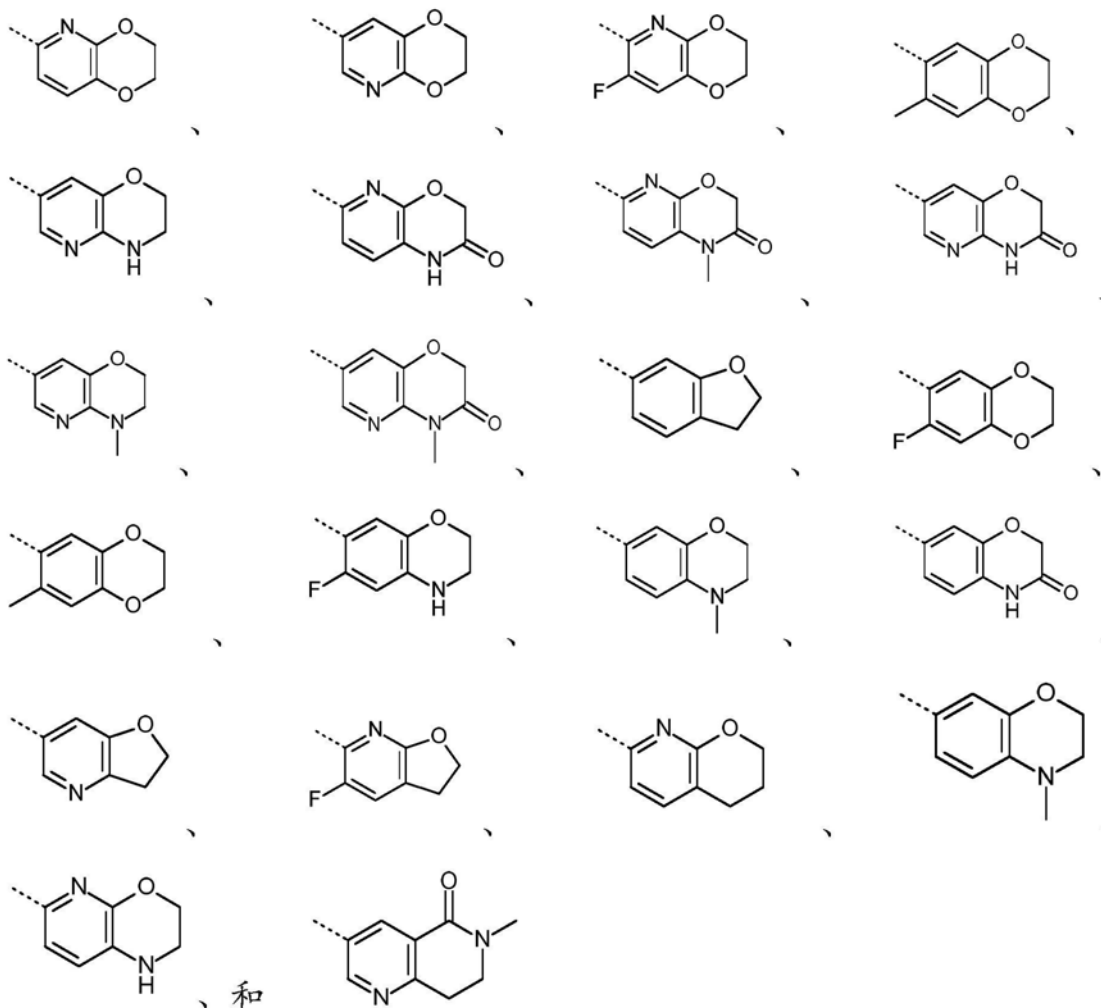
[0096] R^C是氟或甲基;

[0097] R^D选自由以下组成的组:氢、氟和甲基;并且

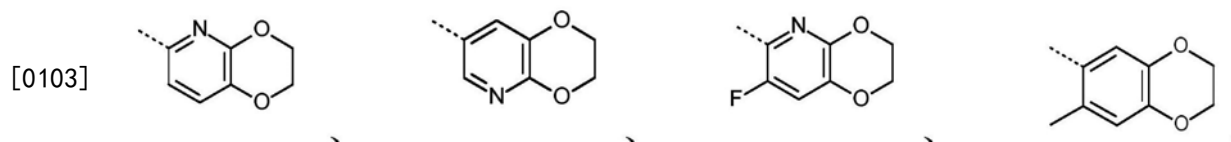
[0098] y表示0或1;

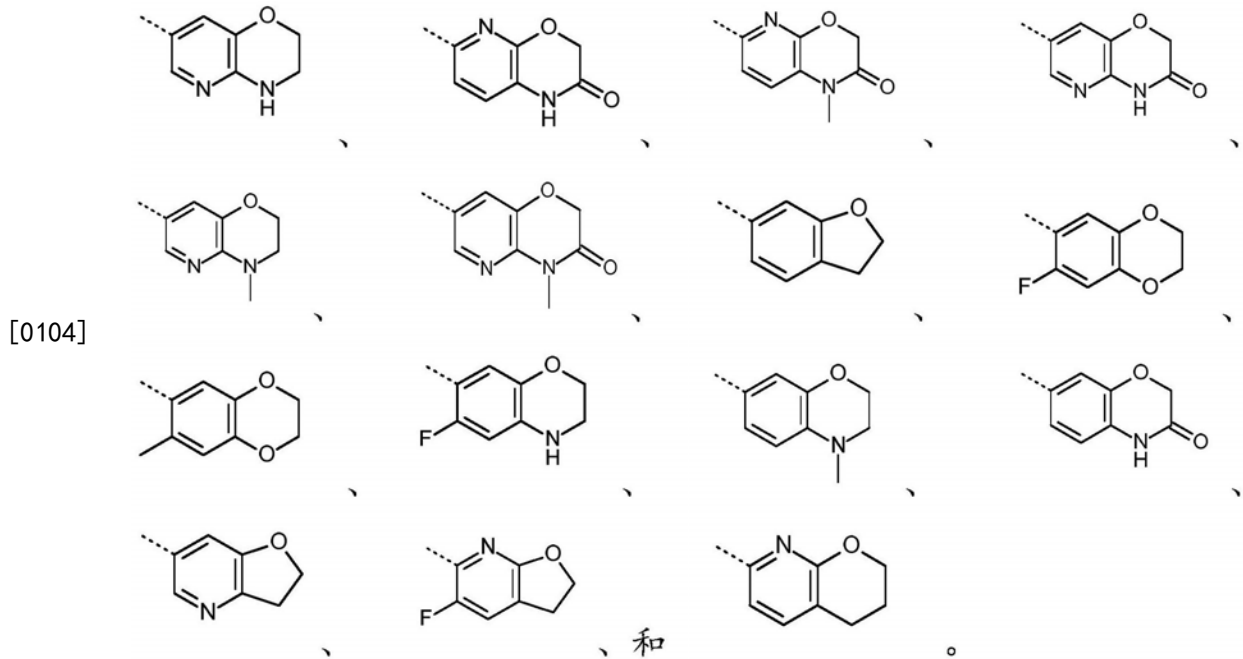
[0099] 及其药学上可接受的盐和溶剂化物。

[0100] 在另一个实施例中,本发明涉及具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中R^B选自由以下组成的组:

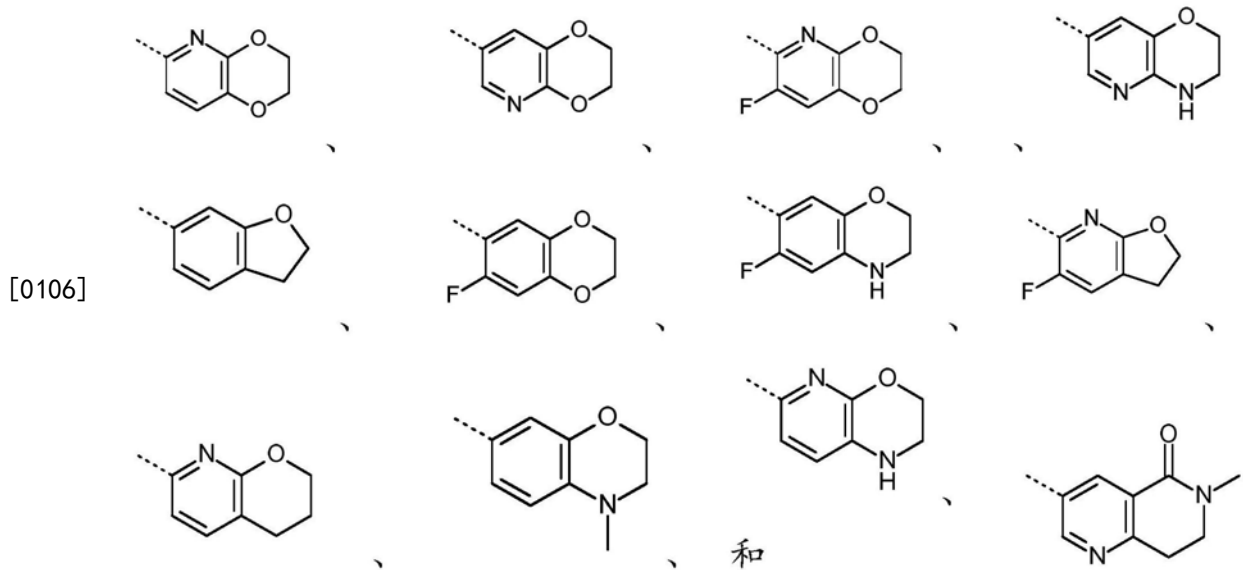


[0102] 在另一个实施例中,本发明涉及具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 选自由以下组成的组:

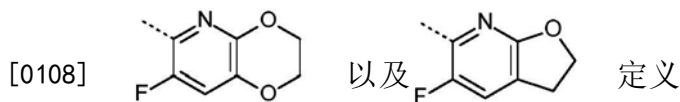




[0105] 在另一个实施例中,本发明涉及具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 选自由以下组成的组:



[0107] 在另一个实施例中,本发明涉及具有式(I)的化合物及其互变异构体和立体异构形式,其中 R^B 选自由以下组成的组:



[0109] “卤代”应当表示氟、氯以及溴;“ C_{1-4} 烷基”应当表示分别具有1个、2个、3个或4个碳原子的直链或支链饱和烷基基团,例如甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、丁基、1-甲基-丙基、2-甲基-1-丙基、1,1-二甲基乙基等;“ C_{1-4} 烷氧基”应当表示醚基团,其中 C_{1-4} 烷基如前所定义。当提及 L^A 时,应从左到右读取定义,其中接头的左侧部分结合至 R^A ,并且接头的右侧部分结合至吡咯烷二基环或哌啶二基环。因此,当 L^A 是例如 $-O-CH_2-$ 时,则 R^A-L^A 是 R^A-O-CH_2- 。当 R^C

存在不止一次时,在可能的情况下,它可以结合在吡咯烷二基环或哌啶二基环的相同碳原子处,并且每种情况可以不同。

[0110] 一般而言,每当术语“取代”用于本发明时,除非另外指示或上下文中是明确的,否则意在指示在使用“取代”的表述中指示的原子或基团上的一个或多个氢(特别是1至3个氢、优选地1个或2个氢、更优选地1个氢)被来自所指示基团的取代基的选择项替换,条件是未超过正常的化合价,并且该取代导致了化学稳定的化合物(即,足够稳健以承受从反应混合物分离至有用程度的纯度并且配制成治疗剂的化合物)。

[0111] 如本文所用的术语“受试者”是指动物,优选地是哺乳动物,最优选地是人类,该受试者是或已经成为治疗、观察或实验的对象。因此,如本文所用,术语“受试者”涵盖患者、以及具有发展如本文所定义的疾病或病症风险的无症状或症前个体。

[0112] 如本文所用的术语“治疗有效量”意指由研究员、兽医、医师或其他临床医生寻找的,在组织系统、动物或人类中引起生物学或医学应答的活性化合物或药物试剂的量,该应答包括正在被治疗的疾病或障碍的症状的减轻。如本文所用的术语“预防有效量”意指显著降低要预防的疾病或障碍发作可能性的活性化合物或药物试剂的量。

[0113] 如本文所用,术语“组合物”旨在涵盖包含处于特定量的特定成分的产品,以及直接或间接地源于处于特定量的特定成分的组合的任何产品。

[0114] 在上下文中,术语“具有式(I)的化合物”意指包括其加成盐、溶剂化物以及立体异构体。

[0115] 在上下文中,术语“立体异构体”或“立体化学异构形式”可互换地使用。

[0116] 本发明包括呈纯立体异构体形式或呈两种或更多种立体异构体的混合物的具有式(I)的化合物的所有立体异构体。

[0117] 对映异构体为彼此不可重叠的镜像的立体异构体。对映异构体对的1:1混合物是外消旋体或外消旋混合物。非对映体(或非对映异构体)为不是对映异构体的立体异构体,即它们并非为镜像关系。如果化合物含有双键,则这些取代基可以呈E或Z构型。如果化合物含有双取代的环烷基基团,则这些取代基可以呈顺式或反式构型。因此,本发明包括对映异构体、非对映体、外消旋体、E异构体、Z异构体、顺式异构体、反式异构体及其混合物。

[0118] 绝对构型是根据卡恩-英戈尔德-普雷洛格(Cahn-Ingold-Prelog)系统指定的。不对称原子处的构型由R或S指定。绝对构型未知的已拆分的化合物可以根据它们旋转平面偏振光的方向而由(+)或(-)指定。

[0119] 当鉴定特定的立体异构体时,这意指所述立体异构体基本上不含其他异构体,即与小于50%、优选地小于20%、更优选地小于10%、甚至更优选地小于5%,特别是小于2%并且最优选地小于1%的其他立体异构体相关联。因此,当具有式(I)的化合物例如被指定为(R)时,这意指该化合物基本上不含(S)异构体;当具有式(I)的化合物例如被指定为E时,这意指该化合物基本上不含Z异构体;当具有式(I)的化合物例如被指定为顺式时,这意指该化合物基本上不含反式异构体。

[0120] 用于在医学中使用,本发明的化合物的加成盐是指无毒性“药学上可接受的加成盐”。然而,其他盐可以适用于制备根据本发明的化合物或其药学上可接受的加成盐。化合物的合适的药学上可接受的加成盐包括可以例如通过将化合物的溶液与药学上可接受的酸的溶液混合而形成的酸加成盐,该药学上可接受的酸如盐酸、硫酸、富马酸、马来酸、琥珀

酸、乙酸、苯甲酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸或磷酸。此外,在本发明的化合物携带酸性部分时,其合适的药学上可接受的加成盐可以包括碱金属盐,例如钠盐或钾盐;碱土金属盐,例如钙盐或镁盐;以及与合适的有机配体形成的盐,例如季铵盐。

[0121] 可以在药学上可接受的加成盐的制备中使用的代表性酸包括但不限于以下:乙酸、2,2-二氯乙酸、酰化氨基酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、(+)-樟脑酸、樟脑磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基-乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、D-葡萄糖醛酸、L-谷氨酸、 β -氧代-戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸、乳糖酸、马来酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(±)-DL-扁桃酸、甲磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、磷酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、单宁酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟甲基磺酸以及十一碳烯酸。可以用于制备药学上可接受的加成盐的代表性碱包括但不限于以下:氨、L-精氨酸、苯乙苄胺、苯乍生、氢氧化钙、胆碱、二甲基乙醇胺、二乙醇胺、二乙胺、2-(二乙氨基)-乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、海巴明、1H-咪唑、L-赖氨酸、氢氧化镁、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、氢氧化钾、1-(2-羟乙基)吡咯烷、仲胺、氢氧化钠、三乙醇胺、缓血酸胺以及氢氧化锌。

[0122] 化合物的名称根据由化学文摘社 (Chemical Abstracts Service) (CAS) 商定的命名规则或者根据由国际纯粹与应用化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry) (IUPAC) 商定的命名规则来产生。

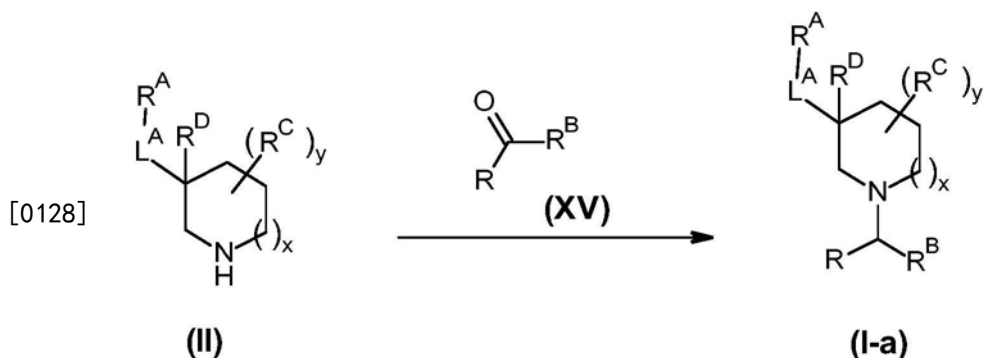
[0123] 最终化合物的制备

[0124] 根据本发明的这些化合物通常可以通过一系列步骤进行制备,其中的每个步骤是本领域技术人员所已知的。特别地,这些化合物可以根据以下合成方法进行制备。

[0125] 具有式 (I) 的化合物能以对映异构体的可以遵循领域已知的拆分程序与彼此分离的外消旋混合物形式合成。具有式 (I) 的外消旋化合物可以通过与合适的手性酸反应而转化为相应的非对映盐形式。所述非对映盐形式随后例如通过选择性或分步结晶而分离,并且对映异构体通过碱由其释放。分离具有式 (I) 的化合物的对映异构形式的替代性方式涉及使用手性固定相的液相色谱法。所述纯立体化学异构形式还可以来源于适当起始材料的相应的纯立体化学异构形式,条件是反应立体定向地发生。

[0126] 实验程序1

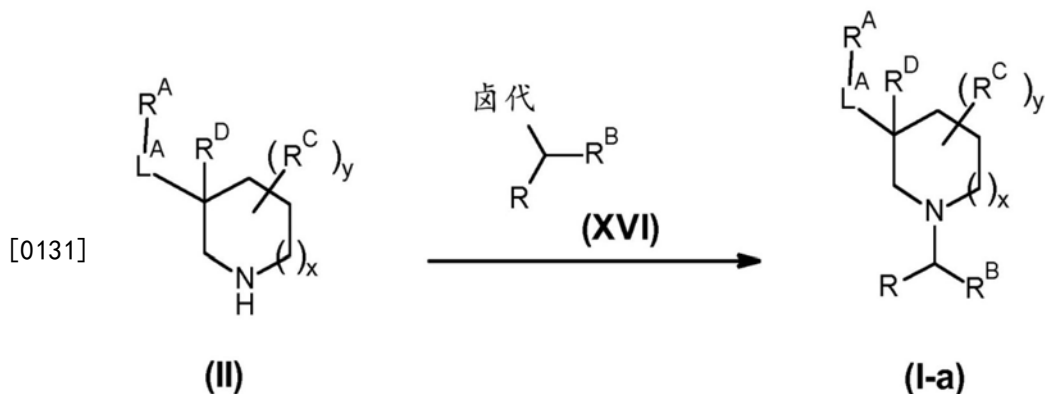
[0127] 根据反应方案 (1),可以通过使具有式 (II) 的中间体化合物与具有式 (XV) 的化合物进行反应来制备具有式 (I-a) 的最终化合物。反应在合适的反应惰性溶剂(例如像,二氯甲烷),金属氢化物(例如像,三乙酰氧基硼氢化钠、氰基硼氢化钠或硼氢化钠)中进行,并且可能需要合适的碱(例如像,三乙胺)和/或路易斯酸(例如像,四异丙醇钛或四氯化钛)的存在,在热条件(如0°C或室温或140°C)下进行例如1小时或24小时。在反应方案 (1) 中,所有变量都如在式 (I) 中所定义的。



反应方案 1

[0129] 实验程序2

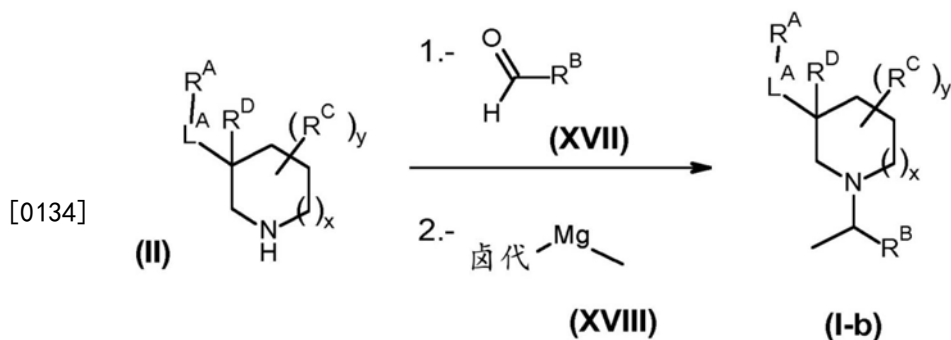
[0130] 此外,根据反应方案(2),可以通过使具有式(II)的中间体化合物与具有式(XVI)的化合物进行反应来制备具有式(I-a)的最终化合物。反应在合适的反应惰性溶剂(例如像,乙腈),合适的碱(例如像,三乙胺或二异丙基乙胺)中,在热条件(如0°C或室温或75°C)下进行例如1小时或24小时。在反应方案(2)中,所有变量都如在式(I)中所定义的,并且其中卤代是氯、溴或碘。



反应方案 2

[0132] 实验程序3

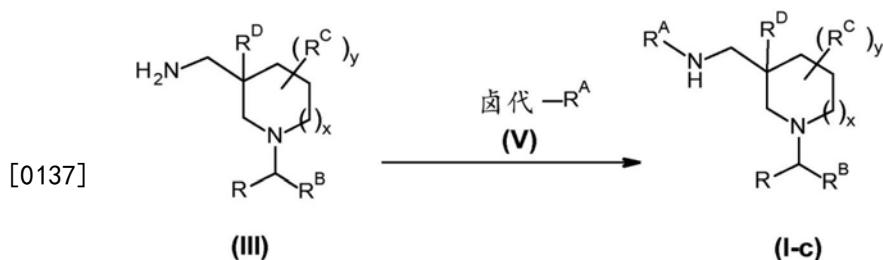
[0133] 此外,根据反应方案(3),可以通过使具有式(II)的中间体化合物与具有式(XVII)的化合物进行反应,随后使形成的亚胺衍生物与具有式(XVIII)的中间体化合物进行反应来制备具有式(I)的最终化合物,其中R是CH₃,在本文中称为(I-b)。反应在合适的反应惰性溶剂(例如像,无水二氯甲烷),路易斯酸(例如像,四异丙醇钛或四氯化钛)中,在热条件(如0°C或室温)下进行例如1小时或24小时。在反应方案(3)中,所有变量都如在式(I)中所定义的,并且其中卤代是氯、溴或碘。



反应方案 3

[0135] 实验程序4

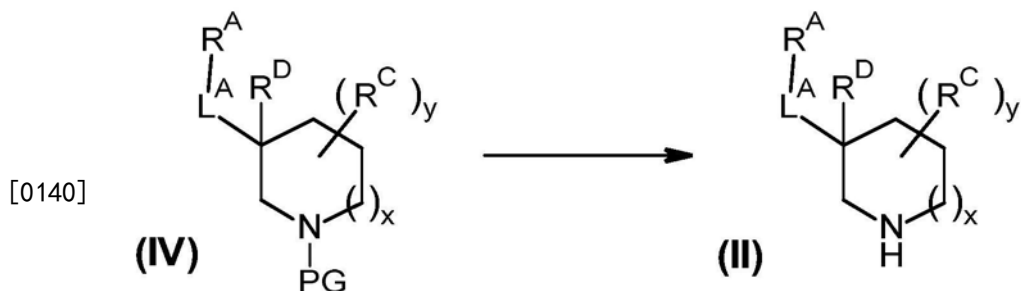
[0136] 此外,根据反应方案(4),可以通过使具有式(III)的中间体化合物与具有式(V)的化合物进行反应来制备具有式(I)的最终化合物,其中 L^A 是 $-\text{NH}-\text{CH}_2-$,在本文中称为(I-c)。反应在钯催化剂(例如像,三(二亚苄基丙酮)二钯(0)),配体(例如像,2-二环己基膦基-2'-(N,N-二甲基氨基)联苯),碱(例如像,叔丁醇钠),合适的反应惰性溶剂(例如像,无水1,4-二噁烷)的存在下,在热条件(如 100°C)下进行例如4小时或24小时。在反应方案(4)中,所有变量都如在式(I)中所定义的,并且其中卤代是氯、溴或碘。



反应方案 4

[0138] 实验程序5

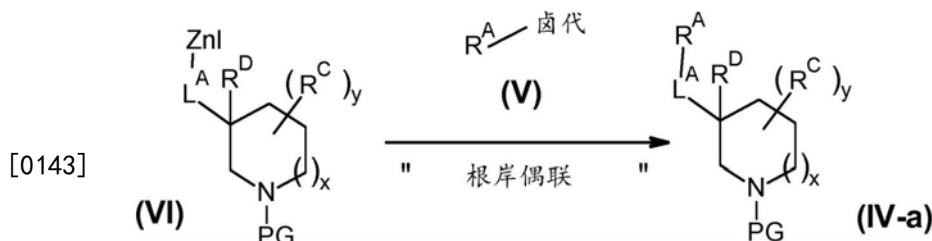
[0139] 根据反应方案(5),可以切割具有式(IV)的中间体化合物中的保护基团来制备具有式(II)的中间体化合物。在反应方案(5)中,所有变量都如在式(I)中所定义的,并且PG是氮官能团的合适的保护基团,例如像,叔丁氧基羰基(Boc)、乙氧基羰基、苄基、苄氧基羰基(Cbz)。用于除去此类保护基团的合适的方法是本领域技术人员公知的,并且包括但不限于: Boc脱保护:在反应惰性溶剂(例如像,二氯甲烷)中用质子酸(例如像,三氟乙酸)处理;乙氧基羰基脱保护:在反应惰性溶剂(例如像,湿的四氢呋喃)中用强碱(例如像,氢氧化钠)处理;苄基脱保护:在合适的催化剂(例如像,钯碳)的存在下,在反应惰性溶剂(例如像,乙醇)中进行催化氢化;苄氧基羰基脱保护:在合适的催化剂(例如像,钯碳)的存在下,在反应惰性溶剂(例如像,乙醇)中进行催化氢化。



反应方案 5

[0141] 实验程序6

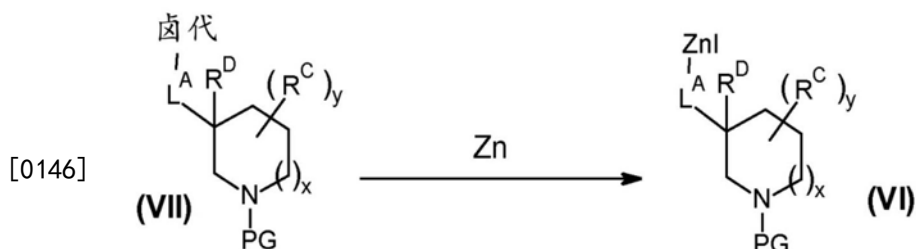
[0142] 根据反应方案(6),可以通过使具有式(V)的卤代化合物与具有式(VI)的有机锌化合物进行“根岸偶联(Negishi coupling)”反应来制备具有式(IV-a)的中间体化合物。反应在合适的反应惰性溶剂(例如像,四氢呋喃)和合适的催化剂(例如像, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$),合适的过渡金属的配体(例如像,2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基联苯[CAS:787618-22-8])中,在热条件(例如像,室温)下进行例如1小时。在反应方案(6)中,所有变量都如在式(I)中所定义的, L^A 是键或 CH_2 ,并且卤代优选地是溴或碘。PG如在式(IV)中所定义。



反应方案 6

[0144] 实验程序7

[0145] 根据反应方案(7),可以通过使具有式(VII)的卤代化合物与锌反应来制备具有式(VI)的中间体化合物。反应在合适的反应惰性溶剂(例如像,四氢呋喃)和合适的盐(例如像,氯化锂)中,在热条件(例如像, 40°C)下,例如在连续流动反应器中进行。在反应方案(7)中,所有变量都如在式(I)中所定义的, L^A 是键或 CH_2 ,并且卤代优选地是碘。PG如在式(IV)中所定义。

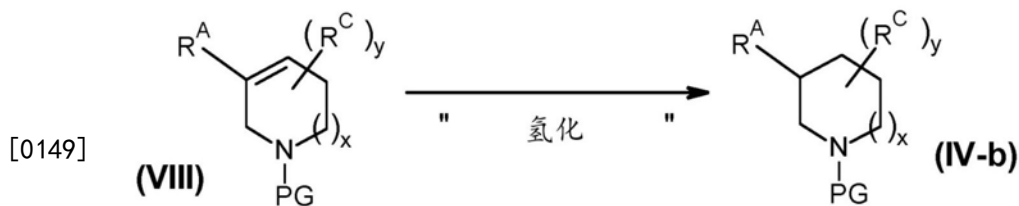


反应方案 7

[0147] 实验程序8

[0148] 根据反应方案(8),可以通过具有式(VIII)的烯烃化合物的氢化反应来制备具有式(IV)的中间体化合物,其中 R^D 是H,在本文中称为(IV-b)。反应在合适的反应惰性溶剂(例如像,甲醇)和合适的催化剂(例如像,钯碳)和氢中,在热条件(例如像,室温)下进行例如3

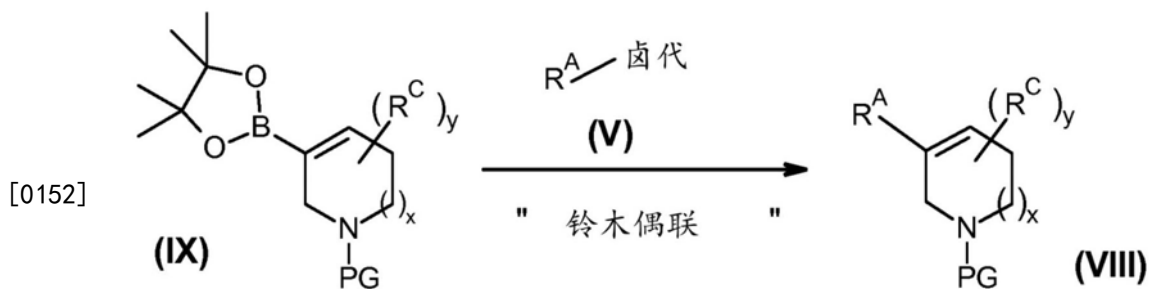
小时。在反应方案(8)中,所有变量都如在式(I)中所定义的,并且PG如在式(IV)中所定义。



反应方案 8

[0150] 实验程序9

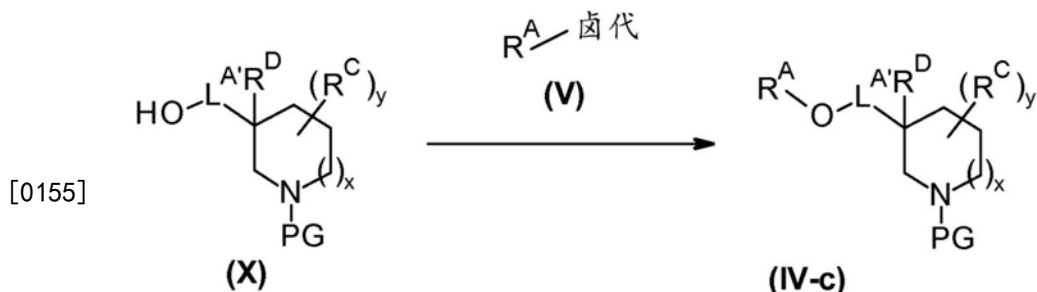
[0151] 根据反应方案(9),可以通过使具有式(IX)的烯炔化合物与具有式(V)的卤代衍生物进行“铃木偶联(Suzuki coupling)”反应来制备具有式(VIII)的中间体化合物。反应在合适的反应惰性溶剂(例如像,1,4-二噁烷)和合适的催化剂(例如像,四(三苯基膦)钯(0)),合适的碱(例如像,NaHCO₃(水性饱和溶液))中,在热条件(例如像,130℃)下,在微波辐射下进行例如30min。在反应方案(9)中,所有变量都如在式(I)中所定义的,卤代优选地是溴或碘,L^A是键,并且PG是如在式(IV)中所定义的,L^A是键并且R^D是H。



反应方案 9

[0153] 实验程序10

[0154] 根据反应方案(10),可以通过使具有式(X)的羟基化合物与具有式(V)的卤代衍生物进行反应来制备具有式(IV-c)的中间体化合物。反应在合适的反应惰性溶剂(例如像,二甲基甲酰胺或二甲亚砜)和合适的碱(例如像,氢氧化钠或叔丁醇钾)中,在热条件(例如像,50℃)下进行例如48小时。在反应方案(10)中,所有变量都如在式(I)中所定义的,L^A是键或CH₂,并且卤代优选地是氯、溴或氟。PG如在式(IV)中所定义。

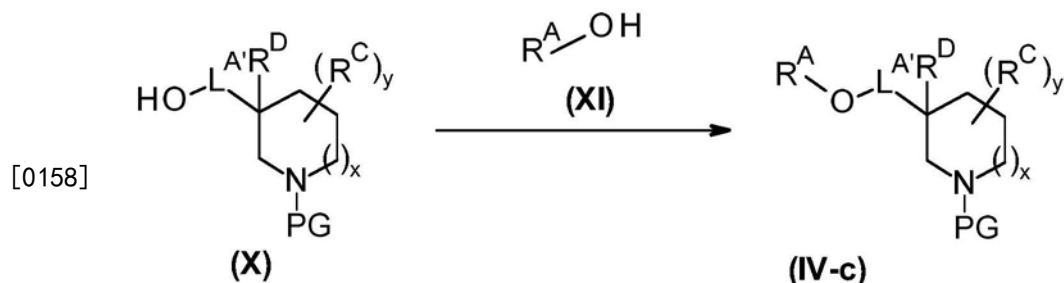


反应方案 10

[0156] 实验程序11

[0157] 可替代地,根据反应方案(11),可以通过使具有式(X)的羟基化合物与具有式(XI)

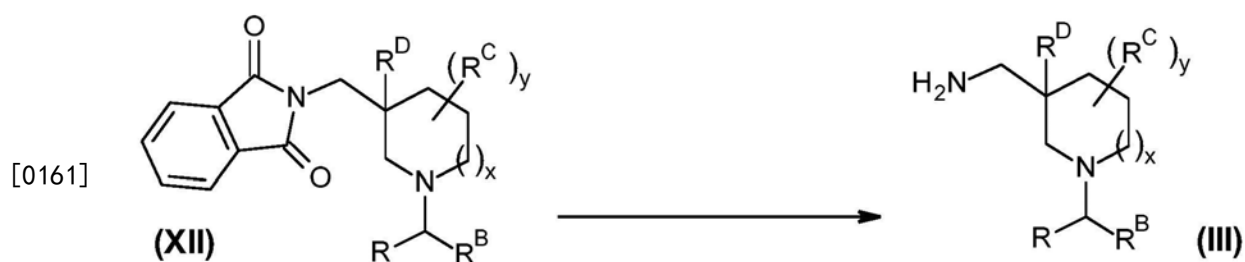
的羟基衍生物进行“光延反应 (Mitsunobu reaction)”来制备具有式 (IV-c) 的中间体化合物。反应在合适的反应惰性溶剂 (例如像, 甲苯), 膦 (如三苯基膦), 合适的偶联剂 (例如像, DIAD (CAS: 2446-83-5)) 中, 在热条件 (例如像, 70°C) 下进行例如 17 小时。在反应方案 (11) 中, 所有变量都如在式 (I) 中所定义的, L^A 是键或 CH_2 , 并且卤代优选地是氯、溴或氟。PG 如在式 (IV) 中所定义。



反应方案 11

[0159] 实验程序 12

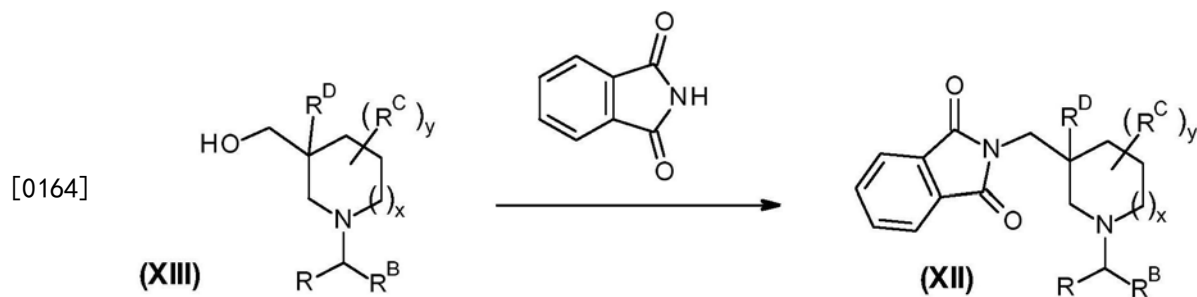
[0160] 根据反应方案 (12), 可以切割具有式 (XI) 的中间体化合物中的保护基团来制备具有式 (III) 的中间体化合物。反应在水合肼的存在下, 在合适的反应惰性溶剂 (例如像, 乙醇) 中, 在热条件 (例如像, 80°C) 下进行例如 2 小时。在反应方案 (12) 中, 所有变量都如在式 (I) 中所定义的。



反应方案 12

[0162] 实验程序 13

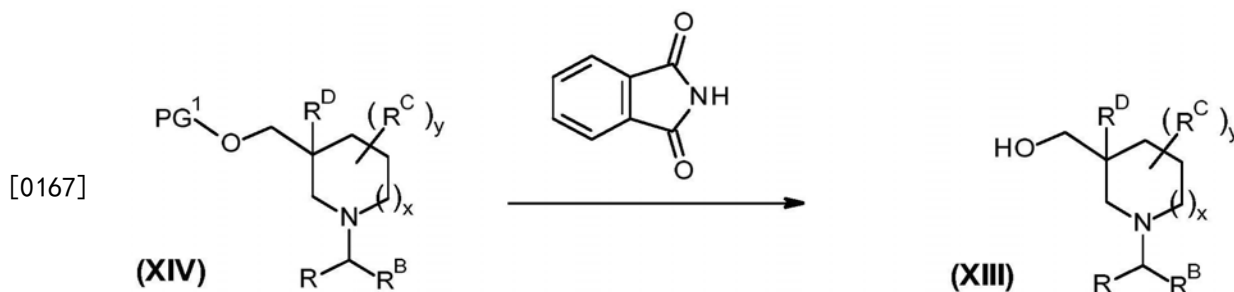
[0163] 根据反应方案 (13), 可以通过使具有式 (XIII) 的中间体化合物与邻苯二甲酰亚胺进行反应来制备具有式 (XII) 的中间体化合物。反应在膦 (例如像, 三苯基膦), 合适的偶联剂 (例如像, 偶氮二甲酸二异丙酯) 的存在下, 在合适的反应惰性溶剂 (例如像, 无水四氢呋喃) 中, 在热条件 (例如像, 室温) 下进行例如 24 小时。在反应方案 (13) 中, 所有变量都如在式 (I) 中所定义的。



反应方案 13

[0165] 实验程序14

[0166] 根据反应方案(14),可以脱保护具有式(XIV)的中间体化合物中的醇基团来制备具有式(XIII)的中间体化合物。反应在氟化物源(例如像,四丁基氟化铵)的存在下,在合适的反应惰性溶剂(例如像,无水四氢呋喃)中,在热条件(例如像,室温)下进行例如16小时。在反应方案(13)中,所有变量都如在式(I)中所定义的,并且PG¹选自由以下组成的组:三甲基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、三异丙基硅烷基、或叔丁基二苯基甲硅烷基。



反应方案 14

[0168] 具有式(V)、(VII)、(IX)、(XV)、(XVI)、(XVII)和(XVIII)的中间体是可商购的或者可以通过本领域技术人员已知的程序来制备。

[0169] 药理学

[0170] 本发明的化合物及其药学上可接受的组合物抑制O-GlcNAc水解酶(OGA)并且因此可以用于治疗或预防涉及tau病理学(也称为tau病变)的疾病,以及具有tau包涵体的疾病。此类疾病包括但不限于:阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化和帕金森综合征-痴呆复合征、嗜银颗粒疾病、慢性创伤性脑病、皮质基底节变性、弥散性神经原纤维缠结伴钙化、唐氏综合征、家族性英国型痴呆、家族性丹麦型痴呆、连锁于17号染色体的伴帕金森综合征的额颞痴呆(由MAPT突变引起)、额颞叶变性(某些病例由C9ORF72突变引起)、吉斯特曼-斯召斯列疾病(Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease)、瓜德罗普岛帕金森综合征(Guadeloupean parkinsonism)、强直性肌营养不良、神经退行性病变伴有脑铁沉积、C型尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease, type C)、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元疾病、皮克氏病、脑炎后帕金森综合征、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、SLC9A6相关的精神发育迟滞、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结痴呆、以及具有球状胶质包涵体的白质tau病变。

[0171] 如本文所用,术语“治疗”旨在是指其中可能存在一种疾病的进展的减慢、中断、遏制或阻止或者症状的减轻的所有过程,但未必指示所有症状的全部消除。如本文所用,术语“预防”旨在是指其中可能存在一种疾病的发作的减慢、中断、遏制或阻止的所有过程。

[0172] 本发明还涉及根据通式(I)的化合物、其立体异构形式或其药学上可接受的酸或碱加成盐,用于治疗或预防选自下组的疾病或病症,该组由以下组成:阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化和帕金森综合征-痴呆复合征、嗜银颗粒疾病、慢性创伤性脑病、皮质基底节变性、弥散性神经原纤维缠结伴钙化、唐氏综合征、家族性英国型痴呆、家族性丹麦型痴呆、连锁于17号染色体的伴帕金森综合征的额颞痴呆(由MAPT突变引起)、额颞叶变性(某些病例由C9ORF72突变引起)、吉斯特曼-斯召斯列疾病、瓜德罗普岛帕金森综合征、强直性肌营养不良、神经退行性病变伴有脑铁沉积、C型尼曼-皮克病、具有神经原纤维缠结的非关岛运

动神经元疾病、皮克氏病、脑炎后帕金森综合征、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、SLC9A6相关的精神发育迟滞、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结痴呆、以及具有球状胶质包涵体的白质tau病变。

[0173] 本发明还涉及根据通式 (I) 的化合物、其立体异构形式或其药学上可接受的酸或碱加成盐,用于治疗、预防、改善、控制选自下组的疾病或病症或者降低其风险,该组由以下组成:阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化和帕金森综合征-痴呆复合征、嗜银颗粒疾病、慢性创伤性脑病、皮质基底节变性、弥散性神经原纤维缠结伴钙化、唐氏综合征、家族性英国型痴呆、家族性丹麦型痴呆、连锁于17号染色体的伴帕金森综合征的额颞痴呆(由MAPT突变引起)、额颞叶变性(某些病例由C9ORF72突变引起)、吉斯特曼-斯召斯列疾病、瓜德罗普岛帕金森综合征、强直性肌营养不良、神经退行性病变伴有脑铁沉积、C型尼曼-皮克病、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元疾病、皮克氏病、脑炎后帕金森综合征、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、SLC9A6相关的精神发育迟滞、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结痴呆、以及具有球状胶质包涵体的白质tau病变。

[0174] 特别地,这些疾病或病症可特别选自tau病变,更特别是选自下组的tau病变,该组由以下组成:阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、唐氏综合征、额颞叶痴呆、伴有帕金森综合征-17的额颞痴呆、皮克氏病、皮质基底节变性、和嗜银颗粒疾病;或者这些疾病或病症可特别是伴有tau病理学的神经退行性疾病,更特别是选自由C9ORF72突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆的神经退行性疾病。

[0175] 阿尔茨海默氏病和tau病变疾病的临床前状态:

[0176] 近年来,美国(US)国家老龄化研究所和国际工作组已经提出了更好地定义AD的临床前(无症状)阶段的指南(Dubois B等人,Lancet Neurol.[柳叶刀神经病学],2014;13:614-629;Sperling,RA等人,Alzheimers Dement.[阿尔茨海默氏病与痴呆],2011;7:280-292)。假设模型假定A β 累积和tau聚集在明显的临床损害发作前许多年开始。升高的淀粉样蛋白累积、tau聚集和AD发展的关键风险因素是年龄(即65岁或以上)、APOE基因型和家族史。大约三分之一的75岁以上的临床正常老年人表现出PET淀粉样蛋白和tau成像研究(后者目前不太先进)中A β 或tau累积的证据。此外,观察到CSF测量中降低的A β 水平,而CSF中未修饰的和磷酸化的tau的水平升高。在大型尸检研究中可以看到类似的发现,并且已经表明早在20岁及更年轻时就在脑中检测到tau聚集体。淀粉样蛋白阳性(A β +)临床上正常的个体一致地展示出在其他生物标志物上的“AD样内表型”的证据,包括功能性磁共振成像(MRI)和静息态连接两者中扰乱的功能性网络活性、氟脱氧葡萄糖¹⁸F(FDG)代谢减退、皮质变薄以及加速萎缩。累积的纵向数据也强烈地表明A β +/临床上正常的个体认知减退和进展为轻度认知损害(MCI)和AD痴呆的风险增加。阿尔茨海默氏病的科学界达成共识,即这些A β +/临床上正常的个体代表AD病理学连续体中的早期阶段。因此,有人认为,如果在广泛的神经退行性病变已发生之前的疾病阶段开始,用降低A β 产生或tau聚集的治疗剂进行干预可能更有效。许多医药公司目前正在测试在前驱AD中的BACE抑制作用。

[0177] 由于不断发展的生物标志物研究,现在可以在第一症状发生之前的临床前阶段识别出阿尔茨海默氏病。所有与临床前阿尔茨海默氏病相关的不同问题,如定义和词汇、限制、自然史、进展标志物和无症状阶段检测疾病的伦理后果,都在Alzheimer's & Dementia [阿尔茨海默氏病与痴呆] 12 (2016) 292-323中进行了综述。

[0178] 在临床前阿尔茨海默氏病或tau病变中可以识别两类个体。在PET扫描中明显具有淀粉样蛋白 β 或tau聚集,或者在CSF A β 、tau和磷酸化tau方面发生改变的认知上正常的个体被定义为处于“阿尔茨海默氏病的无症状风险状态 (AR-AD)”或处于“tau病变的无症状状态”。据说患有家族性阿尔茨海默氏病的完全渗透性显性常染色体突变的个体患有“症前阿尔茨海默氏病”。已经针对多种形式的tau病变描述了tau蛋白内的显性常染色体突变。

[0179] 因此,在一个实施例中,本发明还涉及根据通式 (I) 的化合物,其立体异构形式或其药学上可接受的酸或碱加成盐,用于控制或降低临床前阿尔茨海默氏病、前驱性阿尔茨海默氏病、或在不同形式的tau病变中观察到的与tau相关的神经退行性病变的风险。

[0180] 如在上文已经提及的,术语“治疗”未必指示所有症状的全部消除,而是还可以指在上面提及的任何障碍中的对症治疗。鉴于具有式 (I) 的化合物的效用,提供治疗罹患任一种上文中提及的疾病的受试者如温血动物 (包括人类) 的方法,或防止受试者如温血动物 (包括人类) 罹患任一种上文中提及的疾病的方法。

[0181] 所述方法包括向受试者如温血动物 (包括人类) 施用,即,全身施用或局部施用,优选口服施用预防或治疗有效量的具有式 (I) 的化合物、其立体异构形式、其药学上可接受的加成盐或溶剂化物。

[0182] 因此,本发明还涉及用于预防和/或治疗任何上文中提及的疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用预防或治疗有效量的根据本发明的化合物。

[0183] 本发明还涉及用于调节O-GlcNAc水解酶 (OGA) 活性的方法,该方法包括向有需要的受试者施用预防或治疗有效量的根据本发明的和如权利要求书中所定义的化合物或根据本发明的和如权利要求书中所定义的药物组合物。

[0184] 治疗方法还可包括以每天一到四次摄入之间的方案施用活性成分。在这些治疗方法中,根据本发明的化合物优选地在施用之前进行配制。如在下文中所述的,合适的药物制品通过已知程序使用熟知并且容易可得成分来制备。

[0185] 可适合于治疗或预防上面提及的任何障碍或其症状的本发明的化合物可以单独施用或与一种或多种另外的治疗剂组合施用。联合疗法包括:含有具有式 (I) 的化合物以及一种或多种另外的治疗剂的单个药物剂量配制品的施用,以及具有式 (I) 的化合物和以其自身分开的药物剂量配制品存在的每种另外的治疗剂的施用。例如,可以向患者施用一起处于单个口服剂量组合物 (如片剂或胶囊) 中的具有式 (I) 的化合物和治疗剂,或可以将每种药剂以分开的口服剂量配制品施用。

[0186] 技术人员将熟悉本文提及的疾病或病症的替代性命名、疾病分类学以及分类系统。例如,美国精神病学协会 (American Psychiatric Association) 精神障碍诊断和统计手册 (Diagnostic & Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-5TM) 第五版采用神经认知障碍 (NCD) (重度和轻度),特别是由于阿尔茨海默氏病的神经认知障碍等术语。技术人员可以使用此类术语作为用于一些本文提及的疾病或病症的替代性命名。

[0187] 药物组合物

[0188] 本发明还提供了用于预防或治疗其中O-GlcNAc水解酶 (OGA) 的抑制是有益的疾病的组合物,这些疾病如阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、唐氏综合征、额颞叶痴呆、伴有帕金森综合征-17的额颞叶痴呆、皮克氏病、皮质基底节变性、嗜银颗粒疾病、由C9orf72突变引起的肌萎缩侧索硬化或额颞叶痴呆,所述组合物包含治疗有效量的根据式 (I) 的化合物

以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0189] 虽然活性成分可以单独施用,但优选地其作为药物组合物呈现。因此,本发明进一步提供了药物组合物,该药物组合物包含根据本发明的化合物以及药学上可接受的载体或稀释剂。载体或稀释剂必须在与组合物的其他成分相容的意义上是“可接受的”并且对其接受者是无害的。

[0190] 可以通过制药领域所熟知的任何方法来制备本发明的药物组合物。治疗有效量的呈碱形式或加成盐形式的作为活性成分的特定化合物与药学上可接受的载体组合成紧密混合物,该载体可以取决于施用所希望的制剂形式而采用多种多样的形式。令人希望的是这些药物组合物处于适合于,优选适合于全身施用,如口服、经皮或肠胃外施用;或局部施用,如经由吸入、鼻喷雾、滴眼剂或经由霜剂、凝胶剂、洗发剂等施用的单位剂型。例如,在制备呈口服剂型的组合物时,可使用任何常见的药物介质,在口服液体制剂(如悬浮液、糖浆、酞剂和溶液)的情况下是例如水、二醇、油、醇等;或在粉末、丸剂、胶囊和片剂的情况下是固体载体例如淀粉、糖、高岭土、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。片剂和胶囊由于其施用简易性而代表了最有利的口服单位剂型,在这种情况下显然使用固体药物载体。对于肠胃外组合物而言,载体通常将至少在很大程度上包含无菌水,但也可以包括其他成分例如以辅助溶解性。例如可制备可注射溶液,其中载体包含盐溶液、葡萄糖溶液或盐水和葡萄糖溶液的混合物。也可以制备可注射悬浮液,在这种情况下可以使用适当的液体载体、悬浮剂等。在适合于经皮施用的组合物中,载体任选地包含渗透增强剂和/或合适的可湿润剂,任选地与小比例的具有任何性质的合适的添加剂组合,这些添加剂不会对皮肤造成任何显著有害作用。所述添加剂可促进向皮肤施用和/或可有助于制备期望的组合物。这些组合物能够以不同方式,例如作为透皮贴剂、作为滴剂或作为软膏剂施用。

[0191] 尤其有利的是,将上述药物组合物以单位剂型配制,以实现施用的简易性和剂量的均匀性。如本说明书和权利要求书中所用的单位剂型在本文中是指适合作为单位剂量的物理离散单位,每一单位含有经计算以与所需的药物载体结合而产生所希望的治疗作用的预定量的活性成分。此类单位剂型的实例是片剂(包括刻痕或包衣片剂)、胶囊、丸剂、粉末包、糯米纸囊剂、可注射溶液或悬浮液、茶匙剂(teaspoonful)、汤匙剂(tablespoonful)等,以及分离的多个这些单位剂型。

[0192] 如本领域的技术人员所熟知的,施用的确切剂量和频率取决于所使用的具有式(I)的特定化合物,所治疗的特定病症,所治疗的病症的严重程度,特定患者的年龄、体重、性别、障碍程度以及总体身体健康状况,以及个体可以服用的其他药物。此外,显而易见的是,所述有效日用量可以降低或提高,这取决于所治疗的受试者的应答和/或取决于给出本发明的化合物处方的医师的评估。

[0193] 取决于施用模式,该药物组合物将包含按重量计从0.05%至99%,优选地按重量计从0.1%至70%,更优选地按重量计从0.1%至50%的活性成分,以及按重量计从1%至99.95%,优选地按重量计从30%至99.9%,更优选地按重量计从50%至99.9%的药学上可接受的载体,所有的百分数都基于该组合物的总重量。

[0194] 本发明的化合物可以用于全身性施用,如口服、经皮或肠胃外施用;或局部施用,如经由吸入、鼻喷雾、滴眼剂或经由霜剂、凝胶剂、洗发剂等施用。化合物优选地口服施用。如本领域的技术人员所熟知的,施用的确切剂量和频率取决于所使用的根据式(I)的特定

化合物,所治疗的特定病症,所治疗的病症的严重程度,特定患者的年龄、体重、性别、障碍程度以及总体身体健康状况,以及个体可以服用的其他药物。此外,显而易见的是,所述有效日用量可以降低或提高,这取决于所治疗的受试者的应答和/或取决于给出本发明的化合物处方的医师的评估。

[0195] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的具有式(I)的化合物的量将取决于治疗的疾病、哺乳动物种类以及特定施用模式而变化。然而,作为一般指导,本发明的化合物的合适单位剂量可以例如优选地含有0.1mg至约1000mg之间的活性化合物。优选的单位剂量是在1mg至约500mg之间。更优选的单位剂量是在1mg至约300mg之间。甚至更优选的单位剂量是在1mg至约100mg之间。此类单位剂量可以每天超过一次地被施用,例如一天2次、3次、4次、5次或6次,但是优选每天1次或2次,这样使得对于一个70kg的成人每次施用的总剂量是每kg受试者体重在0.001至约15mg的范围内。优选的剂量是每次施用每kg受试者体重0.01至约1.5mg,并且此类疗法可以持续多个星期或月,并且在一些情况中,持续多年。然而,应当理解,任何特定患者的具体剂量水平取决于各种因素,包括采用的特定化合物的活性;所治疗的个体的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;施用时间和途径;排泄速率;先前施用的其他药物;及进行医疗的特定疾病的严重性,如本领域技术人员所理解的。

[0196] 典型剂量可以是一天服用一次或一天多次的一片1mg至约100mg片剂或1mg至约300mg,或者一天服用一次的、并且含有在比例上含量较高的活性成分的一粒延时释放(time-release)的胶囊或片剂。延时释放效应可以通过在不同的pH值下溶解的胶囊材料、通过经渗透压造成的缓慢释放的胶囊、或者通过控制释放的任何其他已知手段来获得。

[0197] 如本领域技术人员将理解的,在一些情况下有必要使用这些范围外的剂量。此外,应当注意临床医生或治疗医师结合个体患者应答将知道如何以及何时开始、中断、调节或终止治疗。

[0198] 本发明还提供了试剂盒,其包含根据本发明的化合物、处方信息(也称为“说明书”)、泡罩包装或瓶、以及容器。此外,本发明提供了试剂盒,其包含根据本发明的药物组合物、处方信息(也称为“说明书”)、泡罩包装或瓶、以及容器。处方信息优选包括关于施用根据本发明的化合物或药物组合物而给患者的建议或指导。特别地,处方信息包括如下给患者的建议或指导:关于根据本发明的所述化合物或药物组合物的施用,关于如何使用根据本发明的化合物或药物组合物,以预防和/或治疗有需要的受试者的tau病变。因此,在一个实施例中,本发明提供了套装试剂盒,其包含具有式(I)的化合物或其立体异构体,或其药学上可接受的盐或溶剂化物,或包含所述化合物的药物组合物,以及用于预防或治疗tau病变的说明书。本文提及的试剂盒特别地可以是适于商业销售的药物包装。

[0199] 对于以上提供的组合物、方法以及试剂盒,本领域技术人员将理解,用于各个的优选化合物是根据以上优选提到的那些化合物。用于组合物、方法和试剂盒的其他优选化合物是在以下非限制性实例中提供的那些化合物。

[0200] 实验部分

[0201] 在下文中,术语“m.p.”意指熔点,“min”意指分钟,“ACN”或“CH₃CN”意指乙腈,“aq.”意指水性,“Boc”意指叔丁氧基羰基,“DMF”意指二甲基甲酰胺,“r.t.”或“RT”意指室温,“rac”或“RS”意指外消旋,“SFC”意指超临界流体色谱法,“SFC-MS”意指超临界流体色谱法/质谱法,“LC-MS”意指液相色谱法/质谱法,“HPLC”意指高效液相色谱法,“iPrOH”意指异

丙醇,“RP”意指反相,“R_t”意指保留时间(以分钟计),“[M+H]⁺”意指化合物的游离碱的质子化质量,“wt”意指重量,“THF”意指四氢呋喃,“Et₂O”意指二乙醚,“EtOAc”意指乙酸乙酯,“DCM”意指二氯甲烷,“DBAD”意指偶氮二甲酸二叔丁酯,“DIPEA”意指N,N-二异丙基乙胺,“DCE”意指1,2-二氯乙烷,“MeOH”意指甲醇,“sat”意指饱和,“soltn”或“sol.”意指溶液,“EtOH”意指乙醇,“TFA”意指三氟乙酸,“2-meTHF”或“Me-THF”意指2-甲基-四氢呋喃,“NMP”意指N-甲基吡咯烷酮,“Pd(OAc)₂”或“(OAc)₂Pd”意指乙酸钯(II),“Pd₂(dba)₃”意指三(二亚苄基丙酮)二钯(0),“Pd(PPh₃)₄”意指四(三苯基膦)钯(0),“PdCl₂(dppf)”意指[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II),“PdCl₂(PPh₃)₂”意指双(三苯基膦)二氯化钯(II),“Pd(t-Bu₃P)₂”意指双(叔丁基膦)钯(0),“PdCl₂(dtbpf)”意指[1,1'-双(二-叔丁基膦基)二茂铁]二氯化钯(II),“RuPhos”意指2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基联苯,并且“TMSCl”意指三甲基甲硅烷基氯。

[0202] 无论何时在本文中表明符号“RS”,它都是指该化合物是在指定中心的一种外消旋混合物,除非另外指明。当将该一种或多种混合物分离时,已经将在一些化合物中心的立体化学构型指定为“R”或“S”;对于一些化合物,尽管该化合物本身已经作为单一的立体异构体被分离并且是对映异构体纯的/非对映体纯的,但是当绝对立体化学未确定时,已经将在指定中心的立体化学构型指定为“R*”或“S*”。通过由超临界流体色谱法(SFC)分析外消旋混合物,随后SFC比较该一种或多种分离的对映异构体,来确定在本文中报道的化合物的对映异构体过量。

[0203] 使用供应商提供的标准反应器在Vapourtec R2+R4单元中进行流动化学反应。

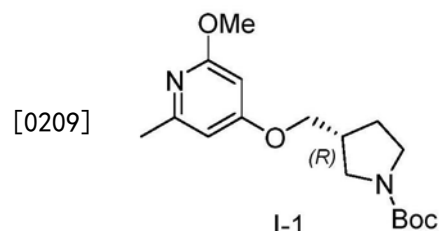
[0204] 微波辅助的反应是在单模式反应器Initiator™ Sixty EXP微波反应器(拜泰齐公司(Biotage AB))中或在多模式反应器MicroSYNTH Labstation(迈尔斯通公司(Milestone, Inc.))中进行的。

[0205] 使用试剂级溶剂,在硅胶60 F254板(默克公司(Merck))上进行薄层色谱法(TLC)。使用标准技术,在硅胶上进行开口柱色谱法,粒度60 Å,网目=230-400(默克公司)。

[0206] 使用易连接柱,在不规则硅胶上,粒度15-40μm(正相一次性快速柱),在以下不同的快速系统上进行自动快速柱色谱法:来自阿尔钦仪器公司(Armen Instrument)的SPOT或LAFLASH系统、或来自因特奇美拉公司(Interchim)的PuriFlash® 430evo系统、或来自安捷伦公司(Agilent)的971-FP系统、或来自拜泰齐公司的Isolera 1SV系统。

[0207] 中间体的制备

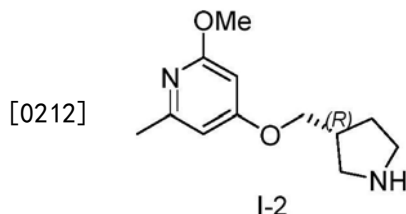
[0208] 中间体1的制备



[0210] 在0℃下在N₂气氛下,将NaH(60%分散体在矿物油中,238mg,5.96mmol)添加至(R)-3-羟甲基-吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(CAS:138108-72-2;1.00g,4.97mmol)在DMF(10mL)中的溶液中。将混合物在0℃下搅拌15min,并逐滴添加4-溴-2-甲氧基-6-甲基吡啶(CAS:

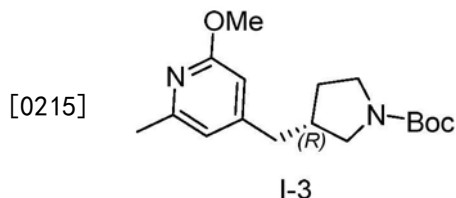
1083169-00-9; 1.15g, 5.47mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌1h,然后在70℃下搅拌20h。将反应用NH₄Cl (饱和水溶液) 淬灭,并用庚烷萃取。将有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中蒸发。将粗混合物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 梯度从100:0至50:50) 纯化, 以得到中间体1 (970mg, 61%)。

[0211] 中间体2的制备



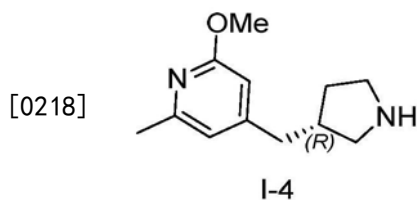
[0213] 将中间体1 (970mg, 3.01mmol) 在MeOH (30mL) 中的溶液添加至含有 Amberlyst®15 氢型 (CAS: 39389-20-3; 3.20g, 15.0mmol) 的闭式反应器中。将混合物在室温下在固相反应器中振荡16h。将树脂用MeOH洗涤 (弃去级分), 然后用NH₃ (7N在MeOH中) 洗涤。将滤液在真空中浓缩, 以给出呈淡棕色油状物的中间体2 (600mg, 90%)。

[0214] 中间体3的制备



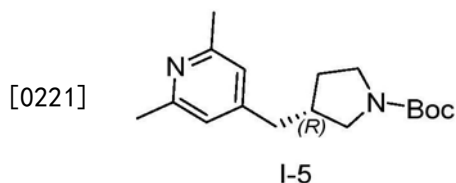
[0216] 在N₂气氛下, 将中间体2在THF (34mL, 10.9mmol) 中的0.32M溶液添加至含有4-溴-6-甲基吡啶-2-醇 (CAS: 865156-59-8; 2.00g, 9.89mmol) 的烧瓶中。依次添加TMEDA (CAS: 110-18-9; 1.63mL, 10.9mmol) 和Pd (PPh₃)₂Cl₂ (417mg, 0.59mmol)。将反应混合物在60℃下搅拌1h。然后, 将混合物用NH₄Cl (饱和) 和NH₃ (26%水溶液) 的1/1溶液淬灭, 并用EtOAc萃取。将有机层干燥 (MgSO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在DCM中, 梯度从0/100至40/60) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈油状物的中间体3 (2.49g, 82%)。

[0217] 中间体4的制备



[0219] 将中间体3 (2.49g, 8.13mmol) 在MeOH (70mL) 中的溶液添加至含有 Amberlyst®15 氢型 (CAS: 39389-20-3; 8.65g, 40.6mmol) 的闭式反应器中。将混合物在室温下在固相反应器中振荡16h。将树脂用MeOH洗涤 (弃去级分), 并用NH₃ (7N在MeOH中) 洗涤。将滤液在真空中浓缩, 以给出呈淡棕色油状物的中间体4 (1.62g, 97%)。

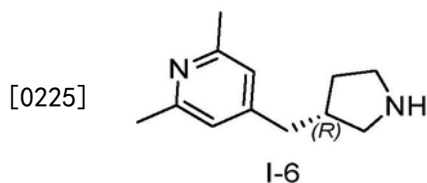
[0220] 中间体5的制备



[0222] 使用中间体72在THF中的0.32M溶液和4-溴-2,6-二甲基吡啶 (CAS:5093-70-9), 按照与针对中间体3的合成报道的类似的程序来制备中间体5。

[0223] 将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 梯度从30/70至80/20) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈油状物的中间体5 (2.50g, 87%)。

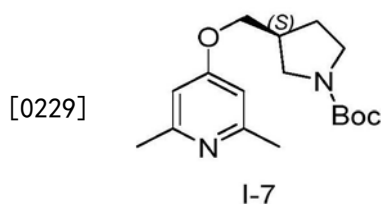
[0224] 中间体6的制备



[0226] 使用中间体5作为起始材料, 按照与针对中间体4的合成报道的类似的程序来制备中间体6。

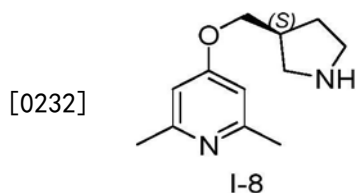
[0227] 将树脂用MeOH洗涤 (弃去级分), 并用NH₃ (7N在MeOH中) 洗涤。将滤液在真空中浓缩, 以给出呈淡棕色油状物的中间体6 (1.53g, 93%)。

[0228] 中间体7的制备



[0230] 在0°C在N₂气氛下, 将NaH (60%分散体在矿物油中, 238mg, 5.96mmol) 添加至 (S)-叔丁基3-(羟甲基)吡咯烷-1-甲酸酯 (CAS:199174-24-8; 1.00g, 4.97mmol) 在DMF (10mL) 中的溶液中。将反应混合物在0°C下搅拌30min, 并且逐滴添加4-氯-2,6-二甲基吡啶 (CAS:3512-75-2; 697μL, 5.47mmol)。将反应混合物在0°C下搅拌1h, 并在80°C下搅拌20h。将反应用NH₄Cl (饱和) 淬灭, 并用EtOAc萃取。将有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅; EtOAc在庚烷中, 梯度从50/50至100/0) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到中间体7 (1.50g, 99%)。

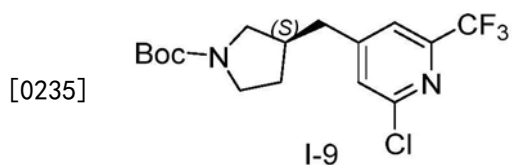
[0231] 中间体8的制备



[0233] 将中间体7 (1.50g, 4.89mmol) 在MeOH (39.8mL) 中的溶液添加至含有 Amberlyst®15 氢型 (CAS:39389-20-3; 5.21g, 24.5mmol) 的闭式反应器中。将混合物在室温下在固相反应器中振荡16h。将树脂用MeOH洗涤 (弃去级分), 然后用NH₃ (7N在MeOH中) 洗

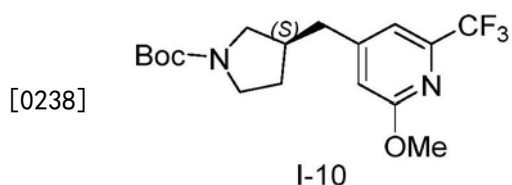
涤。将滤液在真空中浓缩,以给出呈淡棕色油状物的中间体8 (1.00g,99%)。

[0234] 中间体9的制备



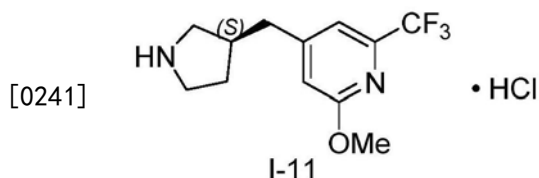
[0236] 在N₂气氛下,将中间体73在THF (0.15M在THF中,10mL,1.50mmol) 中的溶液添加至2-氯-4-碘-6-三氟甲基吡啶 (CAS:205444-22-0;419mg,1.36mmol) 和Pd (t-Bu₃P)₂ (34.8mg,68.2μmol) 的混合物中。将反应混合物在室温下搅拌1h。将混合物用NH₄Cl (饱和) 和NH₄OH的1/1混合物处理,并用EtOAc萃取。将有机层干燥 (Na₂SO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至20/80) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈淡黄色油状物的中间体9 (350mg,70%)。

[0237] 中间体10的制备



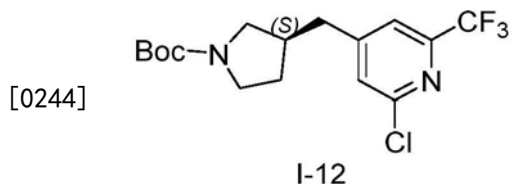
[0239] 将中间体9 (350mg,0.96mmol) 溶于NaOMe (0.22mL,0.96mmol,25%纯度) 的无水溶液中,并且将混合物在室温下搅拌16h。添加水,并且将水相用DCM萃取。将有机层干燥 (Na₂SO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发,以给出呈无色油状物的中间体10 (250mg,72%)。

[0240] 中间体11的制备



[0242] 将中间体10 (250mg,0.69mmol) 溶于HCl (4M在1,4-二噁烷中,0.17mL,0.70mmol) 中,并且将反应混合物在室温下搅拌1h。将溶剂在真空中蒸发,以得到呈HCl盐 (190mg,92%) 的中间体11,将其不经进一步纯化而用于下一步骤。

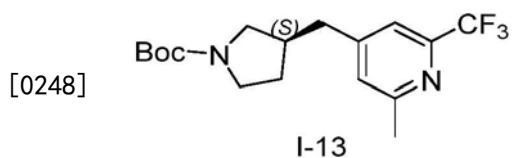
[0243] 中间体12的制备



[0245] 使用中间体73在THF中的溶液和2-氯-4-碘-6-三氟甲基吡啶 (CAS:205444-22-0) 作为起始材料,按照与针对中间体9的合成所述类似的程序来制备中间体12。

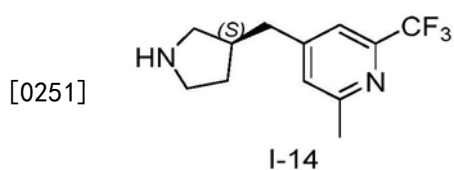
[0246] 将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至20/80) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈淡黄色油状物的中间体12 (2.50g,40%,75%纯度)。

[0247] 中间体13的制备



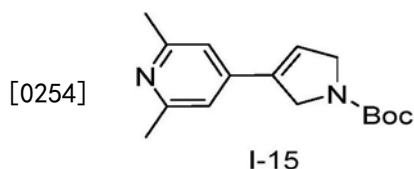
[0249] 将 K_2CO_3 (1.42g, 10.3mmol) 添加至中间体12 (2.50g, 5.14mmol, 75%纯度) 在1,4-二噁烷 (15mL) 中的搅拌溶液中。将混合物用 N_2 流脱氧持续5min。添加三甲基环硼氧烷 (CAS: 823-96-1; 1.29mL, 9.25mmol)、 $Pd(OAc)_2$ (57.7mg, 0.26mmol) 和三环己基磷四氟硼酸盐 (CAS: 58656-04-5; 189mg, 0.51mmol)。将反应混合物在 $100^\circ C$ 下在 N_2 下搅拌2h。将混合物冷却, 用 H_2O 洗涤并用DCM萃取。将有机层干燥 ($MgSO_4$), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, EtOAc在庚烷中, 梯度从0/100至15/85) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以产生呈灰色油状物的中间体13 (1.90g, 86%, 80%纯度)。

[0250] 中间体14的制备



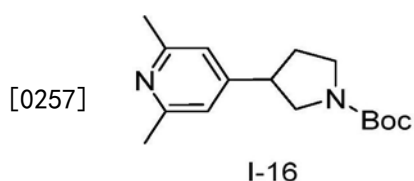
[0252] 将 Amberlyst®15 氢型 (CAS: 39389-20-3; 4.40g) 添加至中间体13 (1.90g, 4.14mmol, 80%纯度) 在MeOH (22.4mL) 中的搅拌溶液中。将反应混合物在室温下在固相反应器中振荡16h。将树脂用MeOH洗涤 (弃去级分), 并用 NH_3 (7N在MeOH中) 洗涤。将滤液在真空中浓缩, 以给出呈棕色油状物的中间体14 (980mg, 91%)。

[0253] 中间体15的制备



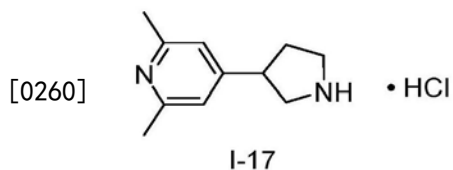
[0255] 在密封管中并且在 N_2 气氛下, 将1,4-二噁烷 (3.57mL) 和 Na_2CO_3 (饱和水溶液, 2.5mL) 添加至4-氯-2,6-二甲基吡啶 (CAS: 3512-75-2; 0.20g, 1.41mmol)、叔丁基3-(四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-2,5-二氢-1H-吡咯-1-甲酸酯 (CAS: 212127-83-8; 0.48g, 1.63mmol) 和 $Pd(PPh_3)_4$ (167mg, 0.15mmol) 的搅拌混合物中。将反应混合物在 $130^\circ C$ 下搅拌30min。将混合物用水处理, 并用DCM萃取。将有机层干燥 (Na_2SO_4), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, EtOAc在庚烷中, 梯度从0/100至100/0) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以给出静置时固化的呈淡黄色油状物的中间体15 (207mg, 53%)。

[0256] 中间体16的制备



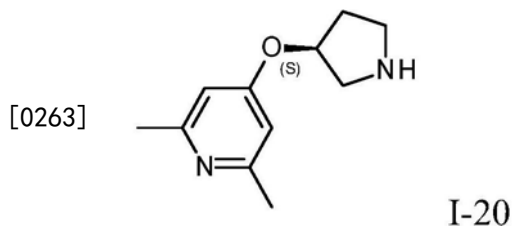
[0258] 将中间体15 (200mg, 0.73mmol) 和 Pd/C (10%) 在EtOH (14mL) 中的混合物在H-cube中氢化。将溶剂在真空中蒸发, 以得到呈无色油状物的中间体16 (190mg, 94%)。

[0259] 中间体17的制备



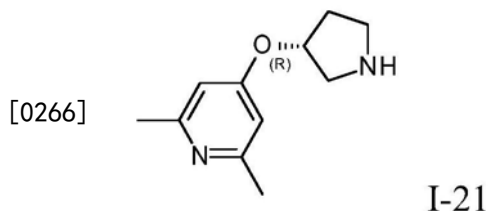
[0261] 将中间体16 (190mg, 0.69mmol) 溶于HCl (4M在1,4-二噁烷中, 1.0mL, 4.0mmol) 中, 并且将反应混合物在室温下搅拌1h。将溶剂在真空中蒸发, 以得到呈HCl盐 (145mg, 定量) 的中间体17, 将其不经进一步纯化而用于下一步骤。

[0262] 中间体20的制备



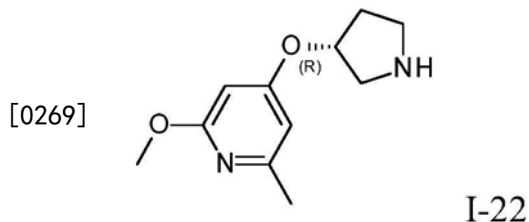
[0264] 在rt下, 将Amberlyst®15氢型 (CAS:39389-20-3, 6.01g, 加载4.7meq/g) 添加至中间体44 (1.67g, 5.71mmol) 在MeOH (44mL) 中的搅拌溶液中。将混合物在rt下在固相反应器中振荡16h。将树脂用MeOH洗涤 (弃去该级分)。然后添加NH₃ (7N溶液在MeOH中, 31.7mL)。将混合物在固相反应器中振荡2h。将树脂滤出, 并用另外的NH₃ (7N溶液在MeOH中, 2x31mL; 振荡30min) 洗涤两次。将滤液在真空中浓缩, 以产生呈棕色油状物的中间体20 (960mg, 87%)。

[0265] 中间体21的制备



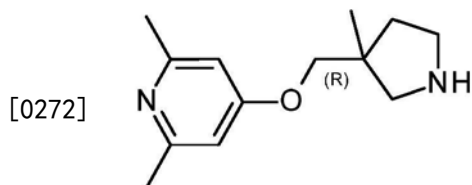
[0267] 使用中间体45作为起始材料, 按照与针对中间体20的合成所述类似的程序来制备中间体21。

[0268] 中间体22的制备



[0270] 使用中间体46作为起始材料, 按照与针对中间体20的合成所述类似的程序来制备中间体22。

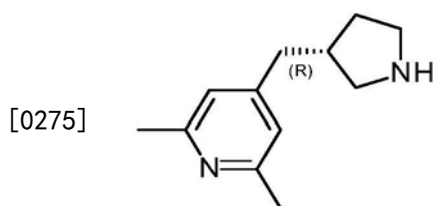
[0271] 中间体23的制备



I-23

[0273] 在rt下,将HCl (9.55mL, 38.2mmol, 4M溶液在1,4-二噁烷中)添加至中间体47中。将混合物在rt下进一步搅拌90min。将挥发物在真空中蒸发,并且将由此获得的残余物溶于MeOH中并使其通过Isolute SCX-2柱,并且将产物用在甲醇中的7N氨洗脱,以产生呈褐色油状物的中间体23 (336mg, 95%)。

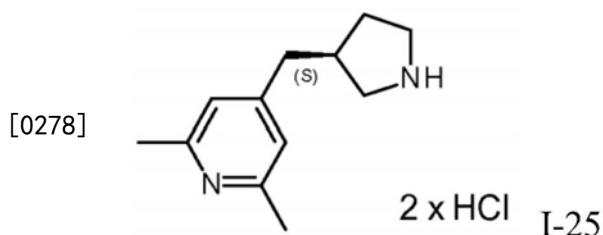
[0274] 中间体24的制备



I-24

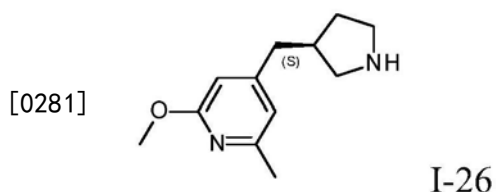
[0276] 使用中间体48作为起始材料,按照与针对中间体20的合成所述类似的程序来制备中间体24。

[0277] 中间体25的制备



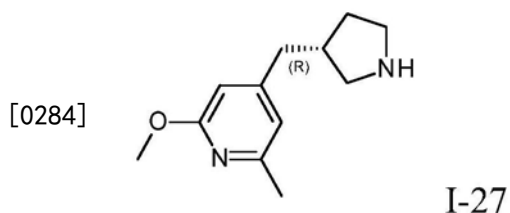
[0279] 在rt下,将HCl (47.98mL, 287.91mmol, 6M在异丙醇中)添加至中间体49 (8.36g, 28.8mmol) 在MeOH (70mL) 中的溶液中。将混合物在50°C下进一步搅拌1h。将挥发物在真空下蒸发,得到呈白色固体的粗中间体25 (7.35g, 97%, 2 x HCl盐)。

[0280] 中间体26的制备



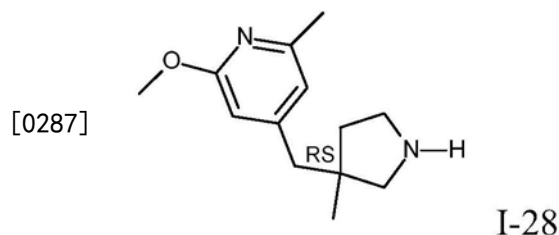
[0282] 使用中间体50作为起始材料,按照与针对中间体20的合成所述类似的程序来制备中间体26。

[0283] 中间体27的制备



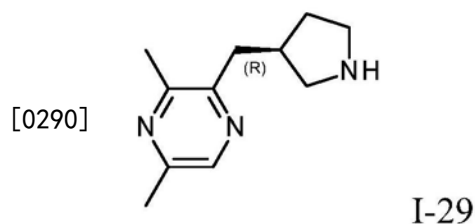
[0285] 使用中间体51作为起始材料,按照与针对中间体20的合成所述类似的程序来制备中间体27。

[0286] 中间体28的制备



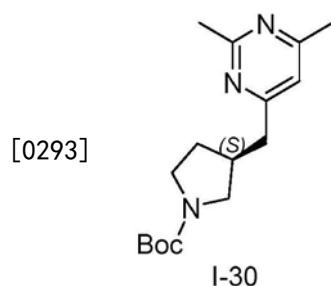
[0288] 使用中间体52作为起始材料,按照与针对中间体23的合成所述类似的程序来制备中间体28。

[0289] 中间体29的制备



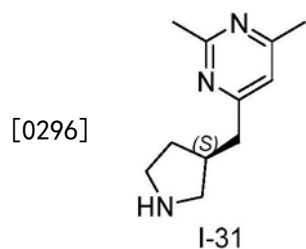
[0291] 使用中间体53作为起始材料,按照与针对中间体20的合成所述类似的程序来制备中间体29。

[0292] 中间体30的制备



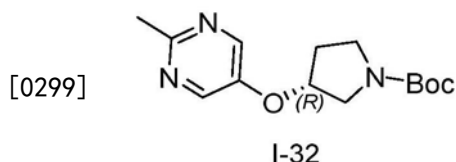
[0294] 在N₂气氛下,将中间体73 (0.33M在THF中,47.4mL,15.7mmol) 的溶液添加至4-氯-2,6-二甲基嘧啶 (CAS:4472-45-1;2.03g,14.2mmol) 和Pd (tBu₃P)₂ (0.60g,0.85mmol) 的混合物中。添加TMEDA (CAS:110-18-9;2.33mL,15.7mmol), 并且将反应混合物在60℃下搅拌18h。将反应用NH₄Cl (饱和) 和NH₃ (32%水溶液) 的1/1溶液淬灭。将混合物用EtOAc萃取。将有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 梯度从0/100至80/20) 纯化。收集所希望的级分, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以产生呈黄色油状物的中间体30 (735mg, 9%, 51%纯度)。

[0295] 中间体31的制备



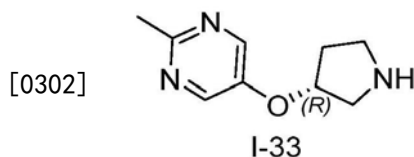
[0297] 将中间体30 (735mg, 2.52mmol, 51%纯度) 在MeOH (19.4mL) 中的溶液添加至含有 amberlyst®15 氢型 (CAS:39389-20-3; 2.68g, 12.6mmol) 的闭式反应器中。将混合物在室温下在固相反应器中振荡16h。将树脂用MeOH洗涤 (弃去级分)。添加NH₃ (7N在MeOH中) (25mL)。将混合物在固相反应器中振荡2h。将树脂滤出, 并用NH₃ (7N在MeOH中) (2x25mL; 振荡30min) 洗涤。将滤液在真空中浓缩, 以得到呈浅棕色油状物的中间体31 (430mg, 89%)。

[0298] 中间体32的制备



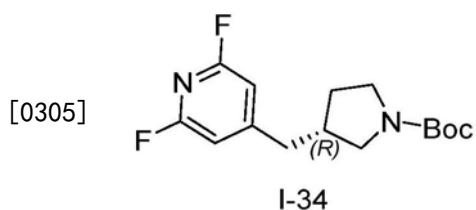
[0300] 将DBAD (CAS:870-50-8; 1.36g, 5.90mmol) 添加至2-甲基嘧啶-5-醇 (CAS:35231-56-2; 500mg, 4.54mmol)、(R)-(-)-N-boc-3-吡咯烷醇 (CAS:109431-87-0; 1.11g, 5.90mmol) 和三苯基膦 (1.55g, 5.90mmol) 在THF (10mL) 中的混合物中。将反应混合物在室温下搅拌18h并浓缩至干燥。将残余物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, EtOAc在庚烷中, 梯度从0/100至100/0) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以产生呈无色油状物的中间体32 (1.1g, 87%)。

[0301] 中间体33的制备



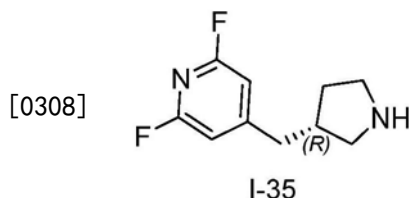
[0303] 将HCl (4M在1,4-二噁烷中, 10mL, 40mmol) 添加至中间体32 (1.10g, 3.94mmol) 中, 并且将反应混合物在室温下搅拌3h。将反应混合物浓缩至干燥。将残余物悬浮于EtOAc中并用NH₄OH碱化。将水层用EtOAc萃取。将合并的有机层干燥 (MgSO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以得到呈白色固体的中间体32 (560mg, 79%)。

[0304] 中间体34的制备



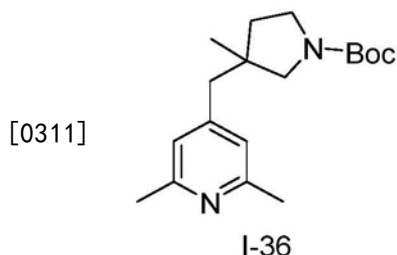
[0306] 在密封管中并且在N₂气氛下, 将中间体72 (11mL, 4.18mmol)、TMEDA (CAS:110-18-9; 0.63mL, 4.20mmol) 和Pd (PPh₃)₂Cl₂ (68.0mg, 96.6μmol) 的0.38M溶液依次添加至2-溴-3,5-二氟吡啶 (CAS:660425-16-1; 761mg, 3.92mmol) 中。将反应混合物在65°C下搅拌16h。将反应用NH₄Cl (饱和) 和NH₃ (26%水溶液) 的1/1溶液淬灭, 并用EtOAc萃取。将有机层干燥 (MgSO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 梯度从0/100至30/70) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈黄色油状物的中间体34 (715mg, 61%)。

[0307] 中间体35的制备



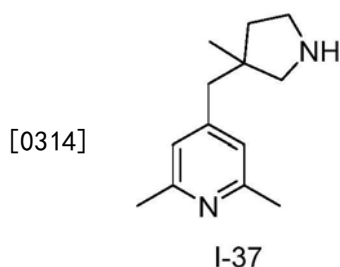
[0309] 将中间体34 (1.16g, 3.91mmol) 在MeOH (19.7mL) 中的溶液逐滴添加至在固相反应器中的 Amberlyst®15 氢型 (CAS:39389-20-3; 3.93g, 18.5mmol) 中。一旦CO₂逸出停止, 将混合物在室温下振荡2天。将树脂用MeOH洗涤 (弃去级分), 并用NH₃ (7N在MeOH中) 洗涤。将滤液在真空中浓缩, 以给出呈棕色油状物的中间体35 (698mg, 90%)。

[0310] 中间体36的制备



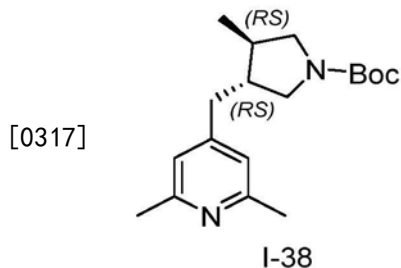
[0312] 在N₂气氛下, 将中间体74 (0.24M在THF中, 11.0mL, 2.64mmol) 添加至含有4-溴-2,6-二甲基吡啶 (CAS:5093-70-9; 492mg, 2.64mmol) 和Pd(PPh₃)₂Cl₂ (111mg, 0.16mmol) 的烧瓶中。添加TMEDA (CAS:110-18-9; 0.43mL, 2.91mmol), 并且将反应混合物在60℃下搅拌2.5h。将反应通过添加NH₄Cl (饱和) 和NH₃ (32%水溶液) 的1/1溶液淬灭。将混合物用EtOAc萃取。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 梯度从0/100至80/20) 纯化。收集所希望的级分, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以得到呈黄色油状物的中间体36 (578mg, 72%)。

[0313] 中间体37的制备



[0315] 在室温下, 将HCl (4M在1,4-二噁烷中, 11.4mL, 45.4mmol) 添加至中间体36 (578mg, 1.90mmol) 中, 并且将反应混合物搅拌12h。将挥发物在真空中蒸发。将残余物溶于MeOH中, 并使其通过Isolute SCX-2柱。弃去MeOH输出溶液。将产物用NH₃ (7N在MeOH中) 洗脱, 以给出呈无色油状物的中间体37 (384mg, 99%)。

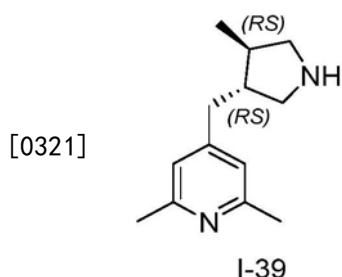
[0316] 中间体38的制备



[0318] 使用中间体133 (0.29M在THF中) 和4-溴-2,6-二甲基吡啶 (CAS:5093-70-9) 作为起始材料,按照与针对中间体36的合成所述类似的程序来制备中间体38。

[0319] 将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO_2 , EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至70/30) 纯化。收集所希望的级分,并且将溶剂在真空中蒸发,以得到呈黄色油状物的中间体38 (1.17g, 65%)。

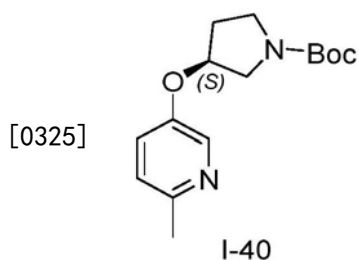
[0320] 中间体39的制备



[0322] 使用中间体38作为起始材料,按照与针对中间体37的合成所述类似的程序来制备中间体39。

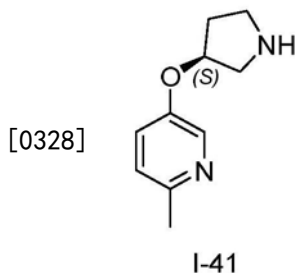
[0323] 将残余物溶于MeOH中,并使其通过Isolute SCX-2柱。弃去MeOH输出溶液,并且将产物用 NH_3 (7N在MeOH中) 洗脱,以得到呈淡黄色油状物的中间体39 (645mg, 82%)。

[0324] 中间体40的制备



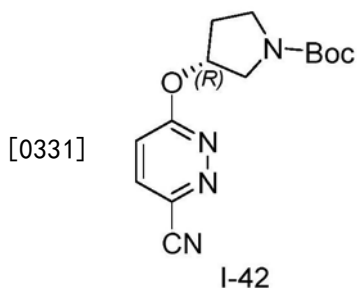
[0326] 在 0°C 下,将DBAD (CAS:870-50-8; 37.0mg, 0.16mmol) 逐滴添加至 (R)-(-)-N-Boc-3-吡咯烷醇 (CAS:109431-87-0, 20.0mg, 0.11mmol)、5-羟基-2-甲基吡啶 (CAS:1121-78-4; 11.7mg, 0.11mmol) 和三苯基膦 (42.0mg, 0.16mmol) 在甲苯 (0.57mL) 中的混合物中,同时将溶液用 N_2 鼓泡。将反应混合物在 60°C 下搅拌过夜并在真空中浓缩。将粗混合物原样用于下一步骤。

[0327] 中间体41的制备



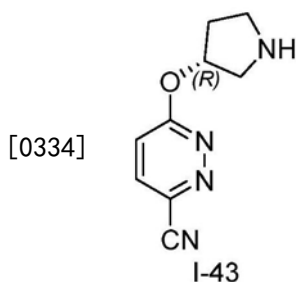
[0329] 将HCl (4M在1,4-二噁烷中,3.34mL,13.3mmol)添加至中间体40(粗品,372mg)中,并且将反应混合物在室温下搅拌3h。将残余物通过离子交换色谱法(ISOLUTE SCX2柱)(用MeOH洗脱,然后用NH₃在MeOH中的7M溶液洗脱)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈无色固体的中间体41(63.9mg)。

[0330] 中间体42的制备



[0332] 在0℃下,将(R)-(-)-N-boc-3-吡咯烷醇(CAS:109431-87-0;0.80g,4.27mmol)在DMF(3.31mL)中的溶液逐滴添加至NaH(60%分散体在矿物油中,0.21g,5.13mmol)和15-冠-5(1.14mL,4.27mmol)在DMF(3.31mL)中的搅拌混合物中。将反应混合物在0℃下搅拌30min,并且在0℃下分批添加6-氯-3-哒嗪甲腈(CAS:35857-89-7;656mg,4.70mmol)溶于DMF(3.1mL)中的溶液中。将所得的混合物在80℃下搅拌3h。将混合物在真空中浓缩,并且将残余物用水稀释并用EtOAc萃取。将有机层干燥(MgSO₄),过滤并在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至60/40)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈白色固体的中间体42(810mg,65%)。

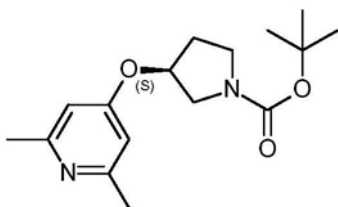
[0333] 中间体43的制备



[0335] 将HCl(4M在1,4-二噁烷中,6.98mL,27.9mmol)添加至中间体42(810mg,2.79mmol)中,并且将反应混合物在室温下搅拌3h。将反应混合物浓缩至干燥。将残余物悬浮于EtOAc中并用NH₄Cl碱化。将水相用EtOAc萃取。将合并的有机萃取物干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发,以得到中间体43,将其原样用于下一步骤。

[0336] 中间体44的制备

[0337]

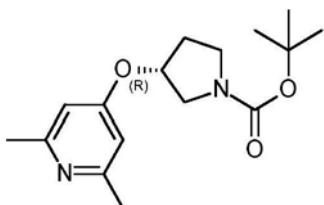


I-44

[0338] 在0℃下,将氢氧化钠(341.8mg,8.55mmol)添加至(3S)-1-Boc-3-羟基吡咯烷(CAS:109431-87-0,1600mg,8.55mmol)在DMF(4.12mL)中的搅拌溶液中,并且将混合物搅拌30min。然后允许混合物温热至rt,并且逐滴添加4-氯-2,6-二甲基吡啶(CAS:3512-75-2,1.09mL,8.55mmol)在DMF(2.78mL)中的溶液。将混合物在rt下搅拌16h,然后在60℃下搅拌6h。冷却至rt后,添加水并且将混合物用EtOAc萃取。将有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并在真空中浓缩。将残余物通过快速色谱法(硅胶,EtOAc在庚烷中:0/100至30/70)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈无色油状物的中间体44(1670mg,67%)。

[0339] 中间体45的制备

[0340]

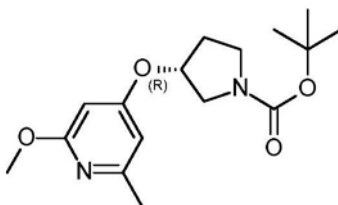


I-45

[0341] 使用(3R)-1-Boc-3-羟基吡咯烷(CAS:109431-87-0)和4-氯-2,6-二甲基吡啶(CAS:3512-75-2)作为起始材料,按照与针对中间体44的合成所述类似的程序来制备中间体45。

[0342] 中间体46的制备

[0343]

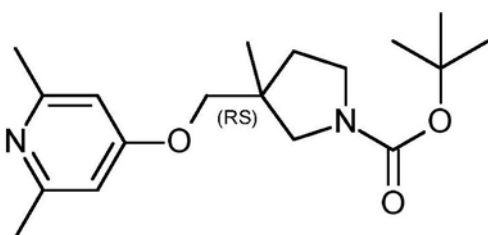


I-46

[0344] 使用(3R)-1-Boc-3-羟基吡咯烷(CAS:109431-87-0)和4-溴-2-甲氧基-6-甲基吡啶(CAS:1083169-00-9)作为起始材料,按照与针对中间体44的合成所述类似的程序来制备中间体46。

[0345] 中间体47的制备

[0346]

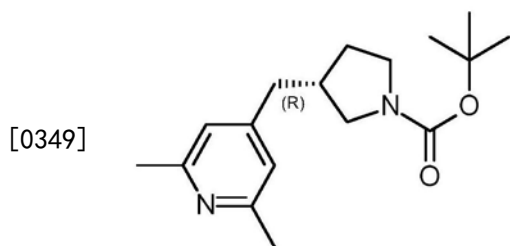


I-47

[0347] 使用1-Boc-3-甲基吡咯烷-3-甲醇(CAS:1263506-20-2)和4-氯-2,6-二甲基吡啶(CAS:3512-75-2)作为起始材料,按照与针对中间体44的合成所述类似的程序来制备中间

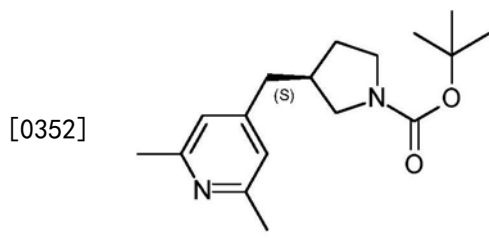
体47。

[0348] 中间体48的制备



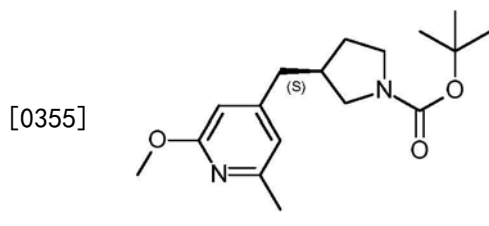
[0350] 在N₂下,将中间体72(0.24M在THF中,43mL,10.32mmol)的溶液添加至含有4-溴-2,6-二甲基吡啶(CAS:5093-70-9,1.75g,9.38mmol)和双(三苯基膦)二氯化钯(II)(0.395g,0.56mmol)的烧瓶中。然后添加N,N,N',N'-四甲基乙二胺(1.538mL,10.32mmol),并且将混合物在60℃下搅拌18h。将混合物通过添加饱和NH₄Cl/32%NH₃水溶液的1/1溶液淬灭,然后将其用EtOAc萃取。将有机层分离,干燥(Na₂SO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO₂,EtOAc在庚烷中,0/100至80/20)纯化。收集所希望的级分,并且将溶剂在真空中蒸发,以产生呈黄色油状物的中间体48(2.59g,95%)。

[0351] 中间体49的制备



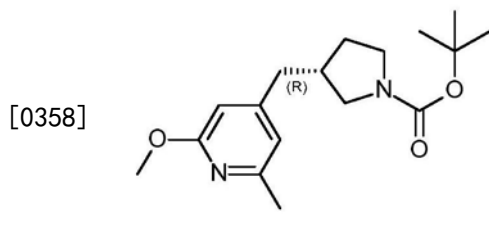
[0353] 使用中间体73和4-溴-2,6-二甲基吡啶(CAS:5093-70-9)作为起始材料,按照与针对中间体48的合成所述类似的程序来制备中间体49。

[0354] 中间体50的制备



[0356] 使用中间体73和4-溴-2-甲氧基-6-甲基吡啶(CAS:1083169-00-9)作为起始材料,按照与针对中间体48的合成所述类似的程序来制备中间体50。

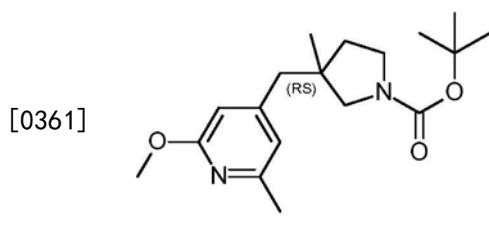
[0357] 中间体51的制备



[0359] 使用中间体72和4-溴-2-甲氧基-6-甲基吡啶(CAS:1083169-00-9)作为起始材料,

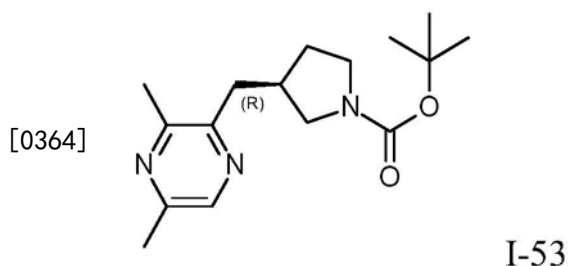
按照与针对中间体48的合成所述类似的程序来制备中间体50。

[0360] 中间体52的制备



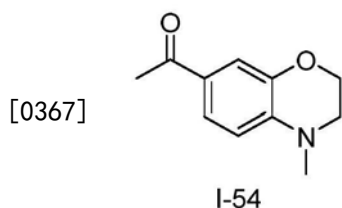
[0362] 使用中间体74和4-溴-2-甲氧基-6-甲基吡啶 (CAS:1083169-00-9) 作为起始材料,按照与针对中间体48的合成所述类似的程序来制备中间体52。

[0363] 中间体53的制备



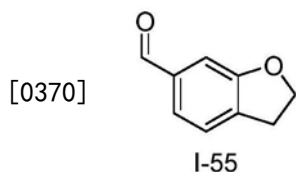
[0365] 使用中间体73和2-氯-3,5-二甲基吡嗪 (CAS:38557-72-1) 作为起始材料,按照与针对中间体48的合成所述类似的程序来制备中间体53。

[0366] 中间体54的制备



[0368] 在N₂气氛下在-78℃下,将正丁基锂(1.6M在己烷中,6.85mL,11.0mmol)逐滴添加至7-溴-4-甲基-3,4-二氢-2H-1,4-苯并噁嗪(CAS:154264-95-6;2.00g,8.77mmol)在Me-THF(30mL)中的搅拌溶液中。将反应混合物在-78℃下搅拌30min,并逐滴添加N-甲氧基-N-甲基乙酰胺(CAS:78191-00-1;1.81g,17.5mmol)在Me-THF(10mL)中的溶液。将反应混合物在-78℃下搅拌1h,并在室温下搅拌1h。将反应用NH₄Cl(饱和)淬灭,并用EtOAc萃取。将有机层干燥(Na₂SO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至30/70)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈黄色油状物的中间体54(818mg,49%)。

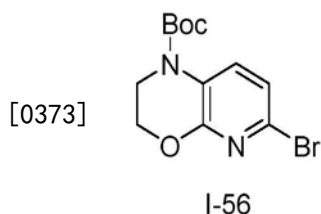
[0369] 中间体55的制备



[0371] 在N₂气氛下在-78℃下,将正丁基锂(1.6M在己烷中,3.87mL,6.18mmol)逐滴添加至6-溴-2,3-二氢苯并呋喃(CAS:189035-22-1;1.00g,5.02mmol)在Me-THF(24.1mL)中的搅

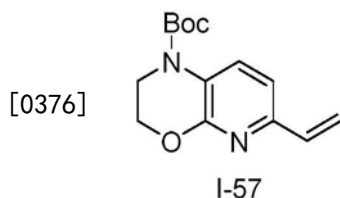
拌溶液中。将反应混合物在 -78°C 下搅拌30min,并逐滴添加DMF(0.97mL,12.5mmol)。将反应混合物在 -78°C 下搅拌2h,用 NH_4Cl (饱和)淬灭并用EtOAc萃取。将有机层干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO_2 ,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至100/0)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈膏状固体的中间体55(631mg,85%)。

[0372] 中间体56的制备



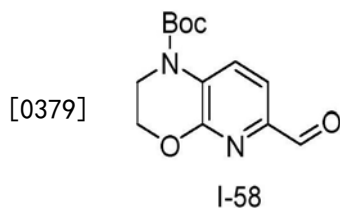
[0374] 在 N_2 气氛下,将硼烷二甲基硫醚复合物(CAS:13292-87-0;950 μL ,10.0mmol)逐滴添加至6-溴-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮(CAS:1245708-13-7;1.13g,4.95mmol)在THF(26mL)中的搅拌悬浮液中。将反应混合物在回流下搅拌2h。将混合物冷却至 0°C ,并且逐滴添加MeOH(10mL)。将混合物在室温下搅拌1h。将溶剂在真空中蒸发。将粗混合物用THF(26mL)溶解,并冷却至 0°C 。逐滴添加Boc酸酐(CAS:24424-99-5;1.2mL,1.1当量)和双(三甲基甲硅烷基)酰胺锂(1M在THF中,5.75mL)。将反应混合物在 0°C 下搅拌2h,并在室温下搅拌1h。将混合物冷却至 0°C ,并且逐滴添加Boc酸酐(0.25mL,0.2当量)和双(三甲基甲硅烷基)酰胺锂(1M在THF中,1mL)。将反应混合物在 0°C 下搅拌1h,并用 NH_4Cl (饱和)处理。将混合物用EtOAc萃取。将有机层干燥(MgSO_4),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO_2 ,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至70/30)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以给出静置时沉淀的呈淡黄色油状物的中间体56(1.29g,83%)。

[0375] 中间体57的制备



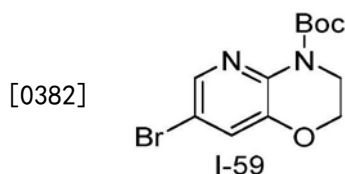
[0377] 在 N_2 气氛下,将 K_2CO_3 (饱和水溶液,22mL)、乙烯基硼酸频哪醇酯(CAS:75927-49-0;0.95mL,5.60mmol)和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 依次添加至中间体56(1.28g,4.06mmol)在1,4-二噁烷(41mL)中的搅拌溶液中。将反应混合物在 80°C 下搅拌20h。将混合物用水处理,并用EtOAc萃取。将有机层干燥(MgSO_4),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO_2 ,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至50/50)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈黄色油状物的中间体57(940mg,88%)。

[0378] 中间体58的制备



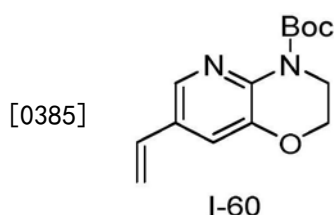
[0380] 在N₂气氛下,将高碘酸钠(CAS:7790-28-5;1.71g,8.01mmol)和四氧化钨(2.5%在t-BuOH中,066mL,48.8μmol)添加至中间体57(940mg,3.58mmol)在1,4-二噁烷(27.7mL)和H₂O(11.1mL)中的搅拌溶液中。将反应混合物在室温下搅拌18h。将混合物用Na₂S₂O₃(饱和)处理,并用EtOAc萃取。将有机层干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO₂,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至100/0)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈白色固体的中间体58(440mg,46%)。

[0381] 中间体59的制备



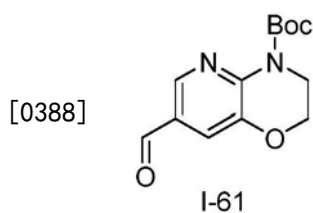
[0383] 在0℃下并且在N₂气氛下,将双(三甲基甲硅烷基)酰胺锂(1M在THF中,1.1当量)经10min逐滴添加至7-溴-3,4-二氢-2H-吡啶并[3,2-b][1,4]噁嗪(CAS:34950-82-8;3.00g,14.0mmol)和boc-酸酐(CAS:24424-99-5;1.1当量)在THF(67.8mL)中的搅拌混合物中。将反应混合物在0℃下搅拌2h,并且在0℃下添加另外的量的在THF(10mL)中的boc-酸酐(0.52当量)。将反应混合物在0℃下搅拌1h,用NH₄Cl(饱和)处理并用EtOAc萃取。将有机层干燥(Na₂SO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO₂,EtOAc在DCM中,梯度从0/100至2/98)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈米色固体的中间体59(3.66g,83%)。

[0384] 中间体60的制备



[0386] 在N₂气氛下,将Pd(PPh₃)₄(0.67g,0.58mmol),随后是乙烯基硼酸频哪醇酯(CAS:75927-49-0;2.46mL,14.5mmol)添加至中间体59(3.66g,11.6mmol)在K₂CO₃(饱和水溶液,29mL)和1,4-二噁烷(57.9mL)中的脱氧溶液中。将反应混合物在80℃下搅拌18h。将混合物用水处理,并用EtOAc萃取。将有机层干燥(Na₂SO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO₂,EtOAc在DCM中,梯度从0/100至5/95)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈棕色固体的中间体60(2.69g,88%)。

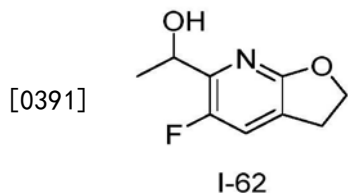
[0387] 中间体61的制备



[0389] 在N₂气氛下,将高碘酸钠(CAS:7790-28-5;4.9g,22.9mmol),随后是四氧化钨(2.5%在t-BuOH中,1.89mL,0.14mmol)添加至中间体60(2.69g,10.2mmol)在1,4-二噁烷

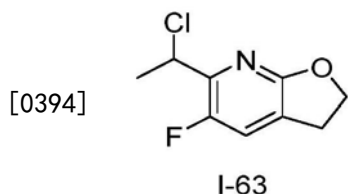
(79.3mL) 和H₂O (31.7mL) 中的搅拌混合物中。将反应混合物在室温下搅拌4.5h, 用Na₂S₂O₃ (饱和) 处理并用EtOAc萃取。将有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 梯度从0/100至40/60) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈白色固体的中间体61 (1.93g, 71%)。

[0390] 中间体62的制备



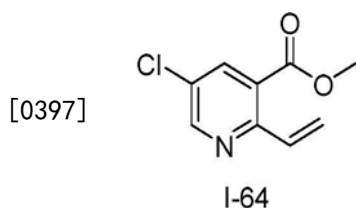
[0392] 在0℃下, 将NaBH₄ (55.5mg, 1.47mmol) 添加至中间体97 (133mg, 0.73mmol) 在EtOH (3mL) 中的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌30min, 并且将反应用NH₄Cl (饱和水溶液) 淬灭。将混合物用DCM萃取。将合并的有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩, 以得到呈油状物的中间体62 (130mg, 97%)。

[0393] 中间体63的制备



[0395] 在0℃下, 将亚硫酸氯 (0.8mL, 11.0mmol) 添加至中间体62 (500mg, 2.73mmol) 在DCM (12mL) 中的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌2h, 用水稀释并用DCM萃取。将合并的有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中蒸发, 以产生中间体63 (520mg), 将其不经任何纯化而用于下一步骤。

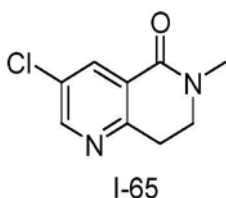
[0396] 中间体64的制备



[0398] 将甲基2,5-二氯烟酸酯 (CAS:67754-03-4; 1.95g, 9.47mmol)、乙烯基硼酸频哪醇酯 (CAS:75927-49-0; 1.79mL, 10.4mmol)、Pd(PPh₃)₄ (547mg, 0.47mmol) 和K₂CO₃ (2M, 9.47mL, 18.9mmol) 在1,2-二甲氧基乙烷 (24.6mL) 中的混合物在120℃下在N₂气氛下搅拌3h。将悬浮液通过Celite®过滤, 并在真空中蒸发。将残余物吸收进水中, 并用DCM萃取。将有机层干燥 (NaSO₄), 过滤并在真空中蒸发。将残余物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, DCM) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈棕色油状物的中间体64 (1.46g, 78%)。

[0399] 中间体65的制备

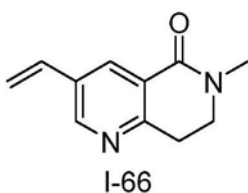
[0400]



[0401] 在微波辐射下,在160℃下,将中间体64(1.40g,4.68mmol)和甲胺盐酸盐(CAS:593-51-1;473mg,7.01mmol)在DIPEA(2M在NMP中,5.85mL,11.7mmol)中的混合物搅拌10min。将混合物用EtOAc稀释,并用NaHCO₃(饱和)和盐水洗涤。将有机层干燥(Na₂SO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在DCM中,梯度从0/100至30/70)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到静置时固化的呈红色油状物的中间体65(633mg,69%)。

[0402] 中间体66的制备

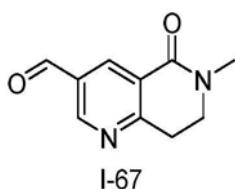
[0403]



[0404] 在N₂气氛下,将Pd(dtbpf)Cl₂(167mg,0.25mmol)添加至中间体65(500mg,2.54mmol)、三氟(乙烯基)硼酸钾(CAS:13682-77-4;681mg,5.09mmol)和K₃PO₄(1.62g,7.63mmol)在1,4-二噁烷(11.9mL)和H₂O(4.13mL)中的混合物中。将反应混合物在110℃下搅拌16h。将悬浮液通过Celite®过滤,并用水和EtOAc洗涤。将有机层分离,干燥(Na₂SO₄),过滤并在真空中蒸发。将粗混合物通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在DCM中,梯度从0/100至20/80)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到中间体66(569mg,89%纯度),将其原样用于下一步骤。

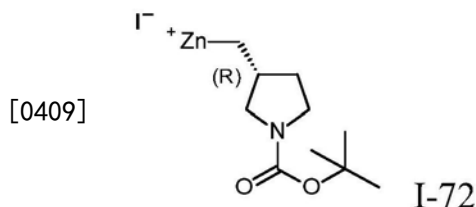
[0405] 中间体67的制备

[0406]



[0407] 在N₂气氛下,将四氧化锇(2.5%在t-BuOH中,0.53mL,38.9μmol),随后是高碘酸钠(1.39g,6.52mmol)添加至中间体66(569mg,3.02mmol,89%纯度)在1,4-二噁烷(22.1mL)和H₂O(9.47mL)中的搅拌溶液中。将反应混合物在室温下搅拌1h,用Na₂S₂O₃(饱和)处理并用EtOAc萃取。将有机层干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO₂,EtOAc在DCM中,梯度从0/100至50/50)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈黄色蜡状物的中间体67(217mg,38%)。

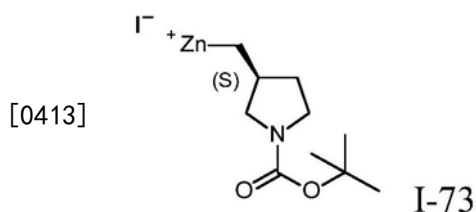
[0408] 中间体72的制备



[0410] 在40℃下,将(3R)-1-Boc-3-碘甲基吡咯烷(CAS:1187932-69-9;10.1g,32.4mmol)在THF(65mL)中的溶液以1mL/min的流速泵送通过含有活化的Zn(30g,458.8mmol)的柱。在N₂气氛下收集得到的溶液,以产生呈澄清溶液的中间体72,将其不经任何进一步操作而使用。

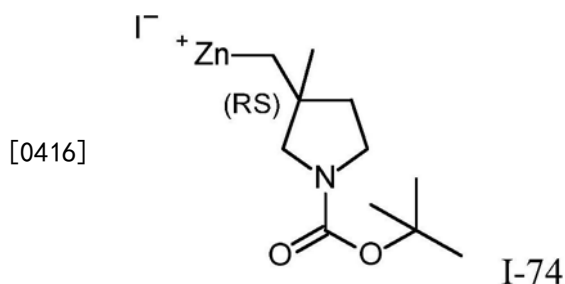
[0411] 对于上述反应,Zn如下活化:将TMSCl(2mL)和1-溴-2-氯乙烷(1.2mL)在THF(20mL)中的溶液以1mL/min的流速通过含有Zn的柱。

[0412] 中间体73的制备



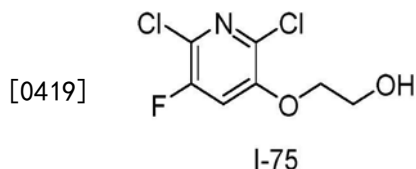
[0414] 使用(3S)-1-Boc-3-碘甲基吡咯烷(CAS:224168-68-7)作为起始材料,按照与针对中间体72的合成所述类似的程序来制备中间体73。

[0415] 中间体74的制备



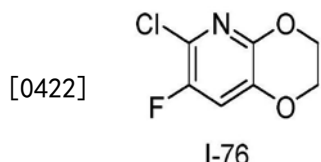
[0417] 使用中间体81作为起始材料,按照与针对中间体72的合成所述类似的程序来制备中间体74。

[0418] 中间体75的制备



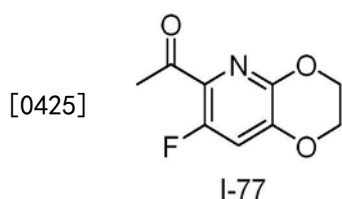
[0420] 将(2-溴乙氧基)-叔丁基二甲基硅烷(CAS:86864-60-0;1.51mL,7.06mmol)添加至2,6-二氯-5-氟吡啶-3-醇(CAS:2228660-663-5;1.13g,6.21mmol)和K₂CO₃(1.22g,8.82mmol)在DMF(5.95mL)中的搅拌悬浮液中。将反应混合物在90℃下搅拌16h,用水稀释并用EtOAc萃取(两次)。将合并的有机层干燥(Na₂SO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO₂,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至50/50)纯化。收集所希望的级分,并且将溶剂在真空中蒸发,以得到呈白色固体的中间体75(1.095g,78%)。

[0421] 中间体76的制备



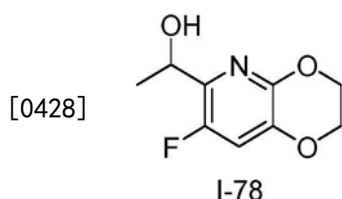
[0423] 向中间体75 (1.30g, 5.77mmol) 在 *t*-BuOH (32.6mL) 中的混合物中添加 *t*-BuOK (777mg, 6.92mmol)。将反应混合物在 90°C 下加热 1h, 冷却, 并且将溶剂在真空中去除。将残余物用水和 EtOAc 稀释。将混合物通过 Celite® 垫过滤, 并用 EtOAc 洗涤。将有机层用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc 在庚烷中, 梯度从 0/100 至 50/50) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以产生呈白色固体的中间体76 (470mg, 43%)。

[0424] 中间体77的制备



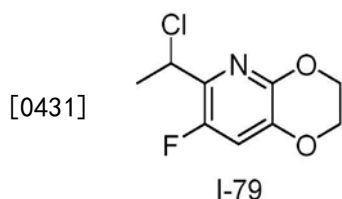
[0426] 向中间体76 (900mg, 4.75mmol) 在甲苯 (16.7mL) 中的混合物中添加 Pd (PPh₃)₂Cl₂ (366mg, 0.52mmol) 和三丁基 (1-乙氧基乙烯基) 锡 (CAS: 97674-02-7; 2.25mL, 6.65mmol)。将反应混合物在 92°C 下搅拌 16h。然后添加 HCl (2N, 1mL), 并且将混合物在室温下搅拌 3h。将混合物用 NaHCO₃ (饱和) 中和, 并用 EtOAc 萃取。将有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗混合物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc 在庚烷中, 梯度从 0/100 至 100/0) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈棕色固体的中间体77 (563mg, 60%)。

[0427] 中间体78的制备



[0429] 在 0°C 下, 将 NaBH₄ (432mg, 11.4mmol) 添加至中间体77 (563mg, 2.86mmol) 在 EtOH (13.4mL) 中的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 10min。添加水, 并且将混合物用 DCM 萃取。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空中浓缩, 以给出中间体78 (465mg, 81%), 将其原样用于下一步骤。

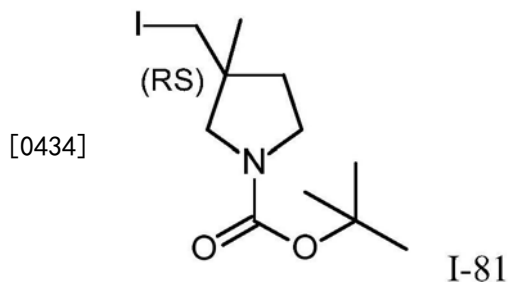
[0430] 中间体79的制备



[0432] 在 0°C 下, 将亚硫酸氯 (0.64mL, 8.74mmol) 添加至中间体78 (435mg, 2.18mmol) 在 DCM (14.6mL) 中的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 12h。添加水 (20mL), 并且将混合物用

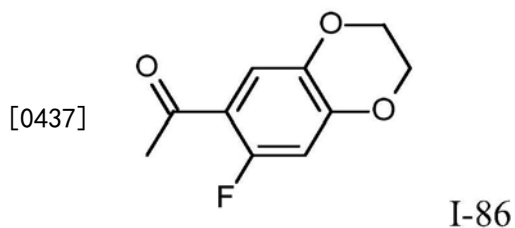
DCM (3x20mL) 萃取。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄)，过滤并在真空中蒸发，以得到呈棕色油状物的中间体79 (453mg, 87%, 91%纯度)。

[0433] 中间体81的制备



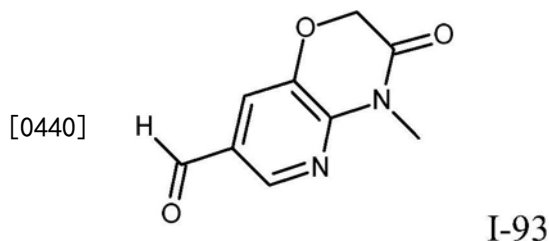
[0435] 在rt下，将1-Boc-3-甲基吡咯烷-3-甲醇 (CAS:1263506-20-2; 1g, 4.64mmol) 分批添加至I2 (1.3g, 5.1mmol)、PPh₃ (1.34g, 5.1mmol) 和咪唑 (474mg, 6.96mmol) 在甲苯 (16.6mL) 中的溶液中。将混合物在80℃下搅拌16h。然后将混合物冷却至室温，并且添加EtOAc、水和Na₂S₂O₃ (饱和水溶液)。将有机层分离，并且将挥发物在真空下蒸发。将由此获得的残余物通过快速色谱法 (硅胶, EtOAc在庚烷中, 0:100至10:90) 纯化。将含有产物的级分在真空中蒸发，以产生呈无色油状物的中间体81 (1.1g, 73%)。

[0436] 中间体86的制备



[0438] 向1-(2,3-二氢-1,4-苯并二噁英-6-基) 乙烯酮 (2.1g, 11.78mmol) 在1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐 (CAS:174501-65-6, 7mL) 中的混合物中添加N-氟-N'-(氯甲基) 三亚乙基二胺双(四氟硼酸盐) (CAS:140681-55-6; 10.43g, 29.5mmol)。将反应混合物在70℃下加热16h。然后将其冷却至rt，用水处理，并用EtOAc (2x15mL) 萃取。将合并的有机层在真空中蒸发以得到油状物，将该油状物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 0/100至10/90) 纯化。将所希望的级分浓缩，以产生呈白色固体的中间体86 (1.1g, 48%)。

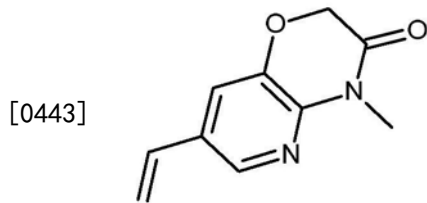
[0439] 中间体93的制备



[0441] 在密封管中并且在N₂气氛下，将高碘酸钠 (2.91g, 13.6mmol)，随后是四氧化钨 (0.472mL, 0.035mmol, 2.5%在t-BuOH中) 和2,6-二甲基吡啶 (0.71mL, 6.11mmol) 添加至中间体94 (508mg, 2.67mmol) 在1,4-二噁烷 (25mL) 和水 (7.5mL) 中的搅拌溶液中。将混合物在rt下搅拌16h。将混合物用水处理，过滤并用EtOAc洗涤。将滤液用另外的EtOAc萃取。将有机层分离，干燥 (MgSO₄)，过滤，并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂,

EtOAc在DCM中,0/100至100/0)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈白色固体的中间体93(230mg,45%)。

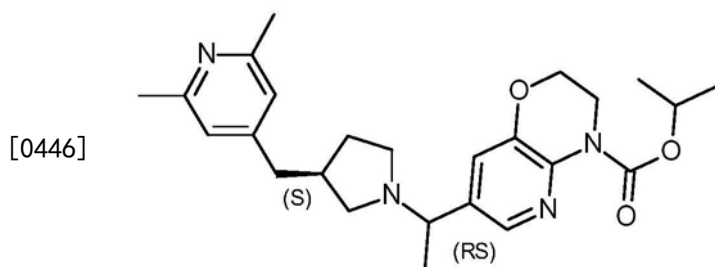
[0442] 中间体94的制备



I-94

[0444] 在密封管中并且在N₂气氛下,将碳酸钾(7.5mL,10%水溶液),随后是4,4,5,5-四甲基-2-乙基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷(CAS:75927-49-0;0.65mL,3.83mmol)和Pd(PPh₃)₄(365mg,0.31mmol)添加至7-溴-4-甲基-2,3-二氢-4H-吡啶并[3,2-b][1,4]噁嗪-3-酮(CAS:122450-97-9)在1,4-二噁烷(7.5mL)中的搅拌溶液中。在微波辐射下,在150℃下,将混合物搅拌15min。将混合物用水处理,并用DCM萃取。将有机层分离,干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO₂,EtOAc在庚烷中,0/100至100/0)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈白色固体的中间体94(516mg,87%)。

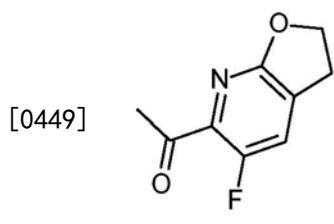
[0445] 中间体96的制备



I-96

[0447] 在密封管中并且在N₂下,将异丙醇钛(IV)(578.5μL,1.98mmol)逐滴添加至中间体25(125mg,0.66mmol)和叔丁基7-甲酰基-2H-吡啶并[3,2-b][1,4]噁嗪-4(3H)-甲酸酯(CAS:1287312-62-2,216.36mg,0.82mmol)在DCM(3.98mL)中的搅拌溶液中。将混合物在rt下搅拌16h。将混合物在0℃下冷却,并且经10min逐滴添加甲基溴化镁(1.4M在THF中,2.31mL,3.24mmol)。将混合物在rt下搅拌19h。将混合物用饱和NH₄Cl和DCM处理,并且通过硅藻土垫过滤,并用更多的DCM洗涤。将滤液用另外的DCM萃取。将有机层分离,干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅;MeOH在DCM中,0/100至10/90)纯化。收集所希望的级分并将其蒸发,以产生呈黄色粘性固体的中间体96(80.2mg,28%)。

[0448] 中间体97的制备

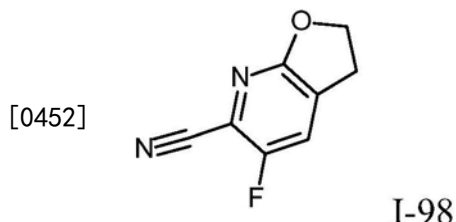


I-97

[0450] 在0℃下,向中间体98(340mg,2.071mmol)在无水THF(20mL)中的混合物中添加甲

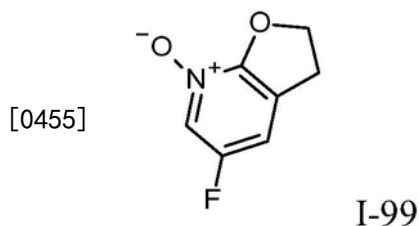
基溴化镁 (2.071mL, 2.9mmol, 1.4M在THF中)。添加完成后,将反应在rt下搅拌16h。将混合物用1M HCl水溶液淬灭并搅拌30min,然后将粗品用NH₄OH碱化直至pH 8。将溶液用EtOAc (2×5mL) 萃取。将合并的有机萃取物干燥 (Na₂SO₄), 过滤并蒸发至干燥, 以给出残余物, 将该残余物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 0/100至20/80) 纯化。收集所希望的级分并将其浓缩, 以产生呈无色油状物的中间体97 (150mg, 40%)。

[0451] 中间体98的制备



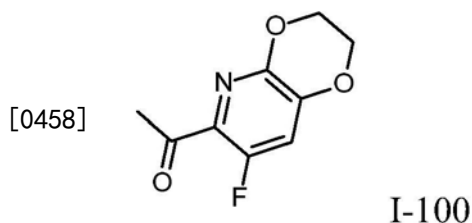
[0453] 向中间体99 (400mg, 2.57mmol) 在乙腈 (7mL) 中的混合物中添加三甲基氰硅烷 (CAS: 7677-24-9; 1.29mL, 10.3mmol) 和三乙胺 (0.9mL, 6.47mmol)。将混合物在90℃下搅拌24h。将混合物冷却并用水处理, 并用EtOAc (2x10mL) 萃取。将合并的有机萃取物经MgSO₄干燥, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以给出残余物, 将该残余物通过快速柱色谱法 (SiO₂, EtOAc在庚烷中, 0/100至30/60) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以呈油状物的中间体98 (320mg, 76%)。

[0454] 中间体99的制备



[0456] 在rt下, 向5-氟-2,3-二氢咪喃并[2,3-b]吡啶 (CAS: 1356542-41-0; 500mg, 3.6mmol) 在DCM (15mL) 中的混合物中添加间氯过苯甲酸 (806mg, 4.7mmol)。将混合物在25℃下搅拌36h。将溶剂在真空中去除, 并且将由此获得的残余物通过硅胶柱色谱法 (二氧化硅; EtOAc在庚烷中, 0/100至30/70, 然后DCM在MeOH中, 0/100至6/94) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈白色固体的中间体99 (400mg, 72%)。

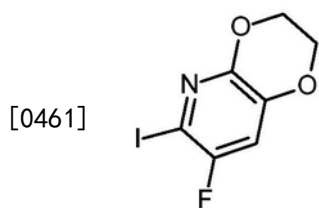
[0457] 中间体100的制备



[0459] 向中间体101 (1.6g, 5.7mmol) 在甲苯 (15mL) 中的混合物中添加双(三苯基膦)二氯钯 (II) (400mg, 0.57mmol) 和三丁基(1-乙氧基乙烯基)锡 (CAS: 97674-02-7; 2.5mL, 7.4mmol)。将混合物在92℃下加热16h, 然后将粗品冷却并用2N HCl水溶液 (5mL) 处理, 并且将混合物搅拌2h。将粗品用NaHCO₃的饱和水溶液中和并用EtOAc萃取, 并且将合并的有机层在真空中蒸发。将粗品通过快速柱色谱法 (SiO₂, MeOH在DCM中, 0/100至5/95) 纯化。收集所

希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈橙色固体的中间体100 (850mg,76%)。

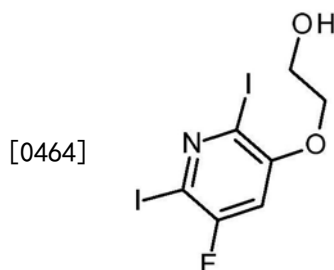
[0460] 中间体101的制备



I-101

[0462] 在rt下,向中间体102 (5g,12.2mmol) 在t-BuOH (6.91mL) 中的混合物中添加叔丁醇钾 (206mg,1.83mmol)。将混合物在90℃下加热3h。冷却后,将溶剂在真空中去除,并且将残余物用水稀释。将水溶液用EtOAc (3x12mL) 萃取。将合并的有机层用盐水 (2x10mL) 洗涤,分离并经无水Na₂S₄干燥,并浓缩。将粗品通过快速柱色谱法 (SiO₂,MeOH在DCM中,0/100至5/95) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈白色固体的中间体101 (1.6g,47%)。

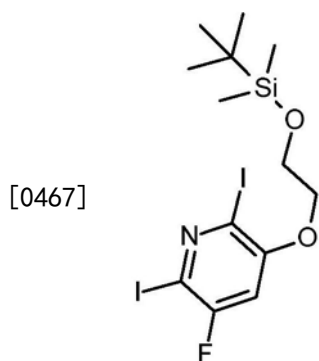
[0463] 中间体102的制备



I-102

[0465] 向中间体103 (8g,15.3mmol) 在THF (120mL) 中的混合物中添加四丁基氟化铵 (15.3mL,15.3mmol,1M溶液在THF中),将混合物在rt下搅拌3h。添加水,并且将粗品用EtOAc萃取。将有机相干燥 (Na₂S₄),并在真空中蒸发,以得到油状物,将该油状物通过柱色谱法 (SiO₂,MeOH在DCM中,0/100至5/95) 纯化。将所希望的级分浓缩,以产生呈油状物的中间体102 (5.8g,92%)。

[0466] 中间体103的制备

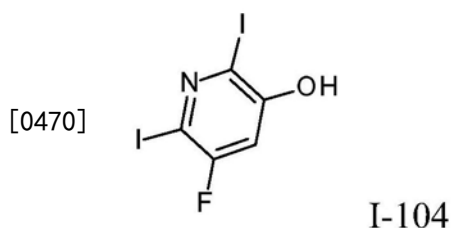


I-103

[0468] 将中间体104 (6.1g,16.7mmol)、(2-溴乙氧基) 二甲基-叔丁基硅烷 (4.4mg,18.4mmol) 和叔丁醇钾 (5.08g,36.78mmol) 在DMF (15mL) 中的混合物在90℃下加热5h。将粗品冷却并用水处理,并用EtOAc (2x20mL) 萃取。将合并的有机萃取物在真空中蒸发,以得到残余物,将该残余物通过柱色谱法 (SiO₂,EtOAc在庚烷中,0/100至20/80) 纯化。将所希望的

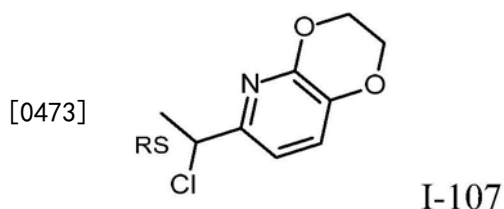
级分在真空中浓缩,以产生呈油状物的中间体103 (8.1g,93%)。

[0469] 中间体104的制备



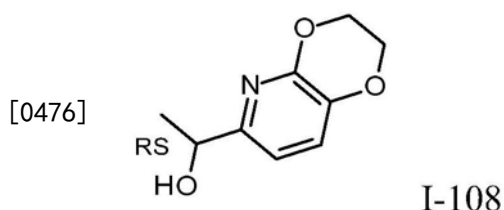
[0471] 向3-氟-5-羟基吡啶 (2g,17.7mmol) 在Na₂CO₃ (30mL,饱和水溶液) 和水 (10mL) 中的溶液中添加I₂ (9.2g,36.25mmol), 并且将混合物在rt下搅拌16h。将反应混合物用Na₂S₂O₃的饱和水溶液淬灭,并且通过添加HCl水溶液将溶液pH调节至pH=5。将反应混合物用EtOAc (3x70mL) 萃取,并且将合并的有机层经MgSO₄干燥,过滤并在真空中蒸发,以产生呈黄色固体的中间体104 (6.02g,93%)。

[0472] 中间体107的制备



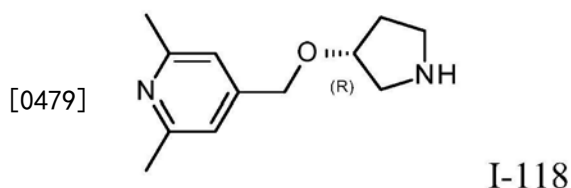
[0474] 在0℃下,将亚硫酸酐 (6.51mL,89mmol) 添加至中间体108 (4.04g;22.3mmol) 在DCM (150mL) 中的溶液中。将混合物在rt下搅拌12h。添加水 (80mL), 并且将混合物用DCM (80mL x 3) 萃取。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空中蒸发,以产生静置时固化的呈棕色油状物的粗中间体107 (3.53g,79%)。

[0475] 中间体108的制备



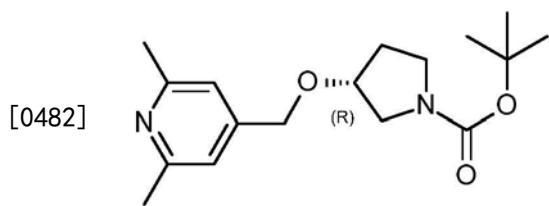
[0477] 在0℃下,将硼氢化钠 (3.54g,94mmol) 添加至1-(2,3-二氢-[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-基) 乙烯酮 (CAS:1254044-25-1;4.5g,23.4mmol) 在EtOH (109mL) 中的溶液中。将混合物在rt下搅拌10min。添加水,并且将混合物用DCM (80mL x 3) 萃取。将有机层合并,干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空中浓缩,以产生呈淡黄色油状物的中间体108 (4.04g,95%)。

[0478] 中间体118的制备



[0480] 使用中间体119作为起始材料,按照与针对中间体20的合成所述类似的程序来制备中间体118。

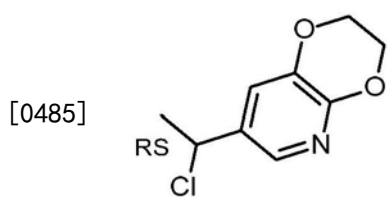
[0481] 中间体119的制备



I-119

[0483] 使用(R)-1-Boc-3-羟基吡咯烷 (CAS:109431-87-0) 和4-氯甲基-2,6-二甲基吡啶 (CAS:120739-87-9) 作为起始材料,按照与针对中间体44的合成所述类似的程序来制备中间体119。

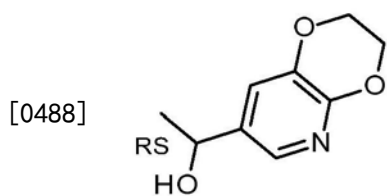
[0484] 中间体120的制备



I-120

[0486] 使用中间体121作为起始材料,按照与针对中间体107的合成所述类似的程序来制备中间体120。

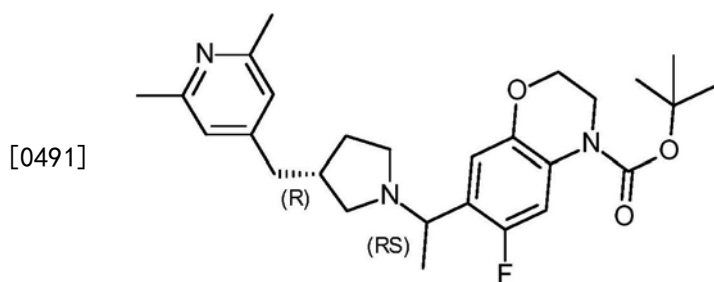
[0487] 中间体121的制备



I-121

[0489] 使用1-(2,3-二氢-[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-7-基)-乙酮 (CAS:1254044-15-9) 作为起始材料,按照与针对中间体108的合成所述类似的程序来制备中间体121。

[0490] 中间体122的制备

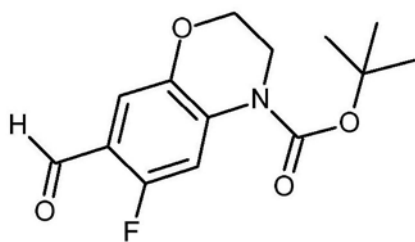


I-122

[0492] 使用中间体27和中间体123作为起始材料,按照与针对中间体96的合成所述类似的程序来制备中间体122。

[0493] 中间体123的制备

[0494]

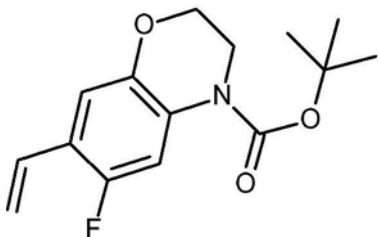


I-123

[0495] 使用中间体124作为起始材料,按照与针对中间体93的合成所述类似的程序来制备中间体123。

[0496] 中间体124的制备

[0497]

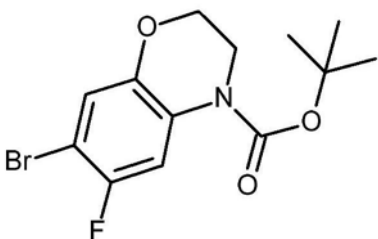


I-124

[0498] 使用中间体125作为起始材料,按照与针对中间体94的合成所述类似的程序来制备中间体124。

[0499] 中间体125的制备

[0500]

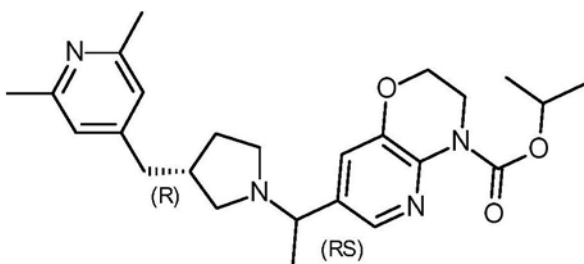


I-125

[0501] 在冷凝器下的圆底烧瓶中,并且在N₂气氛下,将硼烷二甲基硫化物复合物(1.65mL,17.4mmol)逐滴添加至7-溴-6-氟-2H-苯并[b][1,4]噁嗪-3(4H)-酮(CAS:1260829-35-3;2.1g,8.53mmol)在THF(44mL)中的搅拌悬浮液中。将混合物在回流温度下搅拌2h。将混合物在0℃下冷却,并且逐滴添加MeOH(12mL)。将混合物在rt下搅拌1h。将溶剂在真空中蒸发。将粗品吸收进THF(44mL)中,并在0℃下冷却。一次性添加Boc-酸酐(CAS:24424-99-5;2.65mL,12.4mmol),随后逐滴添加双(三甲基甲硅烷基)酰胺锂(12.1mL,12.1mmol,1M溶液在THF中),并且将混合物在0℃下搅拌1h并在rt下搅拌60h。将混合物用NH₄Cl饱和水溶液处理,并用EtOAc萃取。将有机层分离,干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO₂,EtOAc在庚烷中,0/100至70/30)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈黄色油状物的中间体125(2.8g,99%)。

[0502] 中间体126的制备

[0503]

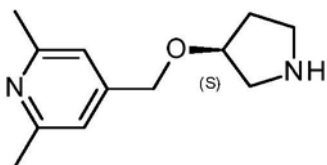


I-126

[0504] 使用中间体24和叔丁基7-甲酰基-2H-吡啶并[3,2-b][1,4]噁嗪-4(3H)-甲酸酯(CAS:1287312-62-2)作为起始材料,按照与针对中间体96的合成所述类似的程序来制备中间体126。

[0505] 中间体127的制备

[0506]

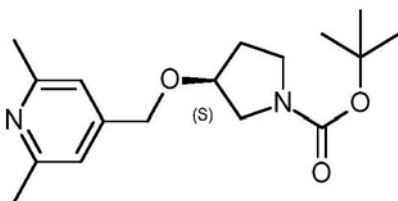


I-127

[0507] 使用中间体128作为起始材料,按照与针对中间体20的合成所述类似的程序来制备中间体127。

[0508] 中间体128的制备

[0509]

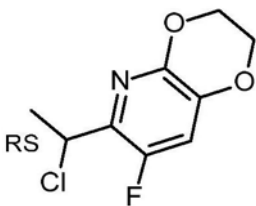


I-128

[0510] 使用(S)-1-Boc-3-(羟甲基)吡咯烷(CAS:109431-87-0)和4-氯甲基-2,6-二甲基吡啶(CAS:120739-87-9)作为起始材料,按照与针对中间体44的合成所述类似的程序来制备中间体128。

[0511] 中间体129的制备

[0512]

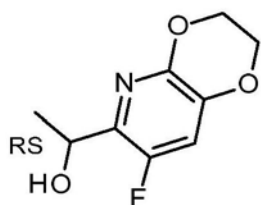


I-129

[0513] 使用中间体130作为起始材料,按照与针对中间体107的合成所述类似的程序来制备中间体129。

[0514] 中间体130的制备

[0515]

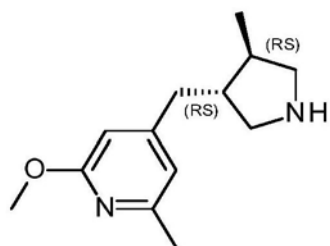


I-130

[0516] 使用中间体100作为起始材料,按照与针对中间体108的合成所述类似的程序来制备中间体130。

[0517] 中间体131的制备

[0518]

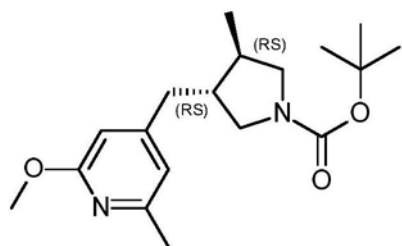


I-131

[0519] 使用中间体132作为起始材料,按照与针对中间体23的合成所述类似的程序来制备中间体131。

[0520] 中间体132的制备

[0521]

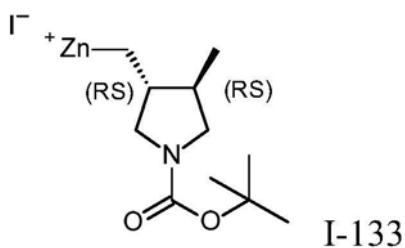


I-132

[0522] 使用中间体133和4-溴-2-甲氧基-6-甲基吡啶 (CAS:1083169-00-9) 作为起始材料,按照与针对中间体48的合成所述类似的程序来制备中间体132。

[0523] 中间体133的制备

[0524]

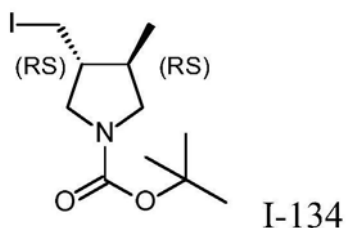


I-133

[0525] 使用中间体134作为起始材料,按照与针对中间体72的合成所述类似的程序来制备中间体133。

[0526] 中间体134的制备

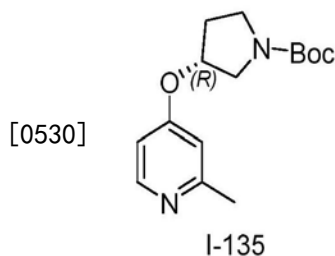
[0527]



I-134

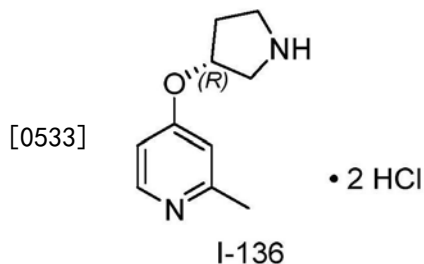
[0528] 使用中间体反式-叔丁基-3-(羟甲基)-4-吡咯烷-1-甲酸酯作为起始材料,按照与针对中间体81的合成所述类似的程序来制备中间体134。

[0529] 中间体135的制备



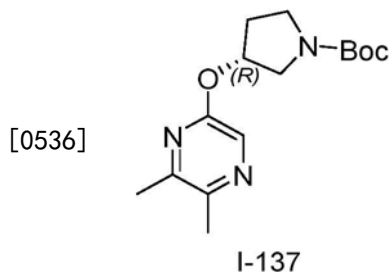
[0531] 在0℃下在N₂气氛下,向(R)-(-)-N-Boc-3-吡咯烷醇(CAS:103057-44-9;150mg,0.80mmol)在无水DMF(2.02mL)中的溶液中添加NaH(60%分散体在矿物油中,38.5mg,0.96mmol)和15-冠-5(0.2mL,0.96mmol)。添加4-氯-2-甲基吡啶(CAS:3678-62-4;97.8μL,0.88mmol),并且将反应混合物在60℃下搅拌16h。添加另外的量的NaH(60%分散体在矿物油中,1当量),并且将反应混合物在60℃下搅拌过夜。再次添加NaH(60%分散体在矿物油中,1当量),并且将反应混合物在60℃下再搅拌4h。在0℃下添加水,并且将混合物用EtOAc萃取。将有机层干燥(Na₂SO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗混合物通过快速色谱法(二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至80/20)纯化。收集所希望的级分,并且将溶剂在真空中蒸发,以给出呈黄色油状物的中间体135(178.9mg,80%)。

[0532] 中间体136的制备



[0534] 将HCl(4M在1,4-二噁烷中,1.93mL,7.71mmol)添加至中间体135(179mg,0.64mmol)在1,4-二噁烷(5.5mL)中的搅拌溶液中。将反应混合物在室温下搅拌3h,并且将溶剂在真空中蒸发,以给出中间体136(2HCl盐,191mg),将其不经任何纯化而用于下一步骤。

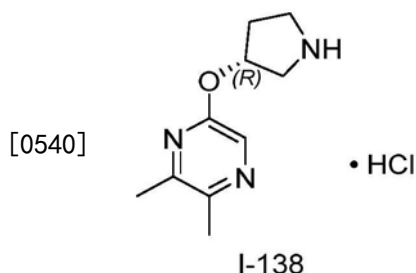
[0535] 中间体137的制备



[0537] 使用(R)-(-)-N-boc-3-吡咯烷醇(CAS:103057-44-9)和5-氯-2,3-二甲基吡嗪(CAS:182500-28-3)作为起始材料,按照与针对中间体135的合成所述类似的程序来制备中间体137。

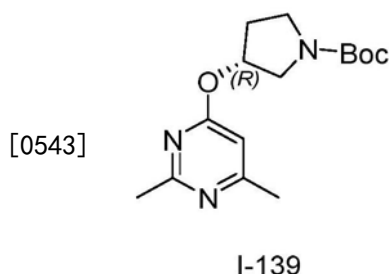
[0538] 将粗品通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至80/20)纯化。收集所希望的级分,并且将溶剂在真空中蒸发,以得到呈浅黄色油状物的中间体137(198mg,84%)。

[0539] 中间体138的制备



[0541] 使用中间体137作为起始材料,按照与针对中间体136的合成所述类似的程序来制备中间体138。将粗产物(HCl盐,190mg)不经任何纯化而用于下一步骤。

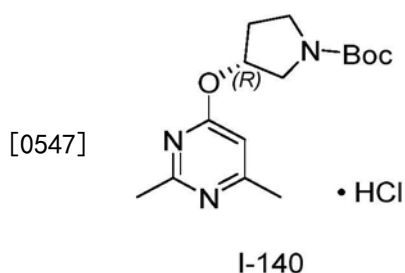
[0542] 中间体139的制备



[0544] 使用(R)-(-)-N-boc-3-吡咯烷醇(CAS:103057-44-9)和4-氯-2,6-二甲基嘧啶(CAS:182500-28-3)作为起始材料,按照与针对中间体135的合成所述类似的程序来制备中间体139。

[0545] 将粗品通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至80/20)纯化。收集所希望的级分,并且将溶剂在真空中蒸发,以得到呈浅黄色油状物的中间体139(167mg,71%)。

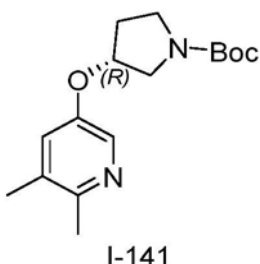
[0546] 中间体140的制备



[0548] 使用中间体139作为起始材料,按照与针对中间体136的合成所述类似的程序来制备中间体140。将粗产物(HCl盐,160mg)不经任何纯化而用于下一步骤。

[0549] 中间体141的制备

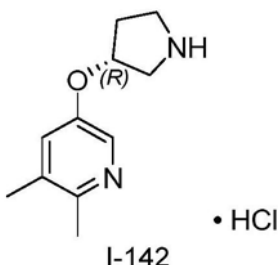
[0550]



[0551] 在 N_2 气氛下,向5,6-二甲基吡啶-3-醇(CAS:61893-00-3;100mg,0.81mmol)在DMSO(2.56mL)中的溶液中添加 CS_2CO_3 (337mg,1.03mmol)和(R)-叔丁基3-(甲苯磺酰基氧基)吡咯烷-1-甲酸酯(CAS:139986-03-1;252mg,0.74mmol)。将反应混合物在60℃下搅拌4h。添加水,并且将混合物用EtOAc萃取。将有机层干燥(Na_2SO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗混合物通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至80/20)纯化。收集所希望的级分,并且将溶剂在真空中蒸发,以得到呈浅黄色固体的中间体141(146mg,68%)。

[0552] 中间体142的制备

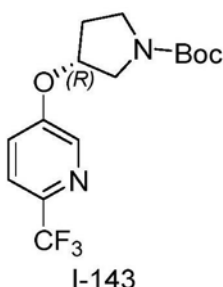
[0553]



[0554] 使用中间体141作为起始材料,按照与针对中间体136的合成所述类似的程序来制备中间体142。将粗产物(HCl盐,151mg)不经任何纯化而用于下一步骤。

[0555] 中间体143的制备

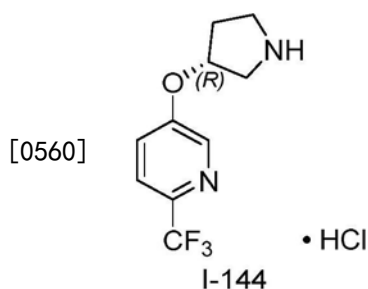
[0556]



[0557] 使用(R)-叔丁基3-(甲苯磺酰基氧基)吡咯烷-1-甲酸酯(CAS:139986-03-1)和5-羟基-2-(三氟甲基)吡啶(CAS:216766-12-0)作为起始材料,按照与针对中间体141的合成所述类似的程序来制备中间体143。

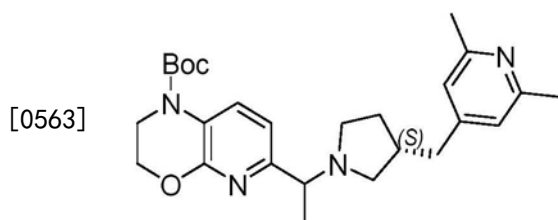
[0558] 将粗混合物通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至80/20)纯化。收集所希望的级分,并且将溶剂在真空中蒸发,以得到呈浅黄色油状物的中间体143(172mg,78%)。

[0559] 中间体144的制备



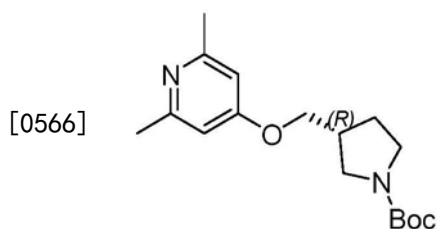
[0561] 使用中间体143作为起始材料,按照与针对中间体136的合成所述类似的程序来制备中间体144。将粗产物(HCl盐,144mg)不经任何纯化而用于下一步骤。

[0562] 中间体145的制备



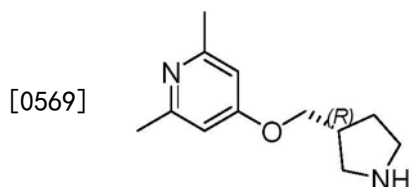
[0564] 在密封管中并且在 N_2 气氛下,将 $Ti(Oi-Pr)_4$ (CAS:546-68-9;0.58mL,1.98mmol) 逐滴添加至中间体25 (125mg,0.66mmol) 和中间体58 (216mg,0.82mmol) 在DCM (3.98mL) 中的搅拌混合物中。将反应混合物在室温下搅拌16h,冷却至 $0^\circ C$,并且经10min逐滴添加甲基溴化镁 (1.4M在THF中,2.31mL,3.24mmol)。将反应混合物在室温下搅拌19h。将混合物用 NH_4Cl (饱和溶液) 和DCM处理,通过Celite®垫过滤并用DCM洗涤。将滤液用DCM萃取。将有机层干燥($MgSO_4$),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,MeOH在DCM中,梯度从0/100至10/90)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发,以给出呈棕色油状物的中间体145 (118mg,40%)。

[0565] 中间体146的制备



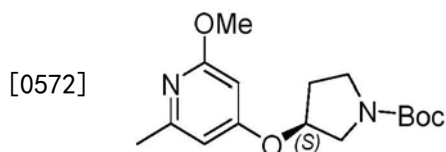
[0567] 在 $0^\circ C$ 下,在氮气气氛下,将NaH (60%分散体在矿物油中,2338mg,5.96mmol) 添加至(R)-3-羟甲基-吡咯烷-1-甲酸叔丁基 (CAS:138108-72-2;1.00g,4.97mmol) 在DMF (10mL) 中的溶液中。将反应混合物在 $0^\circ C$ 下搅拌30min,并且逐滴添加4-氯-2,6-二甲基吡啶 (CAS:3512-75-2;697mg,5.47mmol)。将反应混合物在 $0^\circ C$ 下搅拌1h,然后在 $80^\circ C$ 下搅拌20h。将反应用 NH_4Cl (饱和) 淬灭,并用EtOAc萃取。将有机层分离,干燥($MgSO_4$),过滤并在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,EtOAc在庚烷中,梯度从50/50至100/0)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈油状物的中间体146 (1.40g,92%)。

[0568] 中间体147的制备



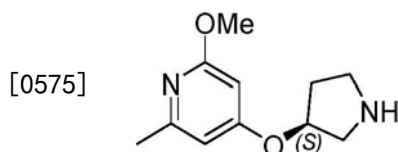
[0570] 将中间体146 (1.40g, 4.57mmol) 在MeOH (30mL) 中的溶液添加至含有 Amberlyst®15氢型 (CAS:39389-20-3; 4.86g) 的反应器中。将混合物在室温下在固相反应器中振荡16h。将树脂用MeOH洗涤 (弃去级分), 然后用NH₃ (7N在MeOH中) 洗涤。将滤液在真空中浓缩, 以给出呈淡棕色油状物的中间体147 (500mg, 53%)。

[0571] 中间体148的制备



[0573] 使用 (S)-(+)-N-boc-3-吡咯烷醇 (CAS:101469-92-5) 和4-溴-2-甲氧基-6-甲基吡啶 (CAS:1083169-00-9) 作为起始材料, 按照与针对中间体146的合成所述类似的程序来制备中间体148。

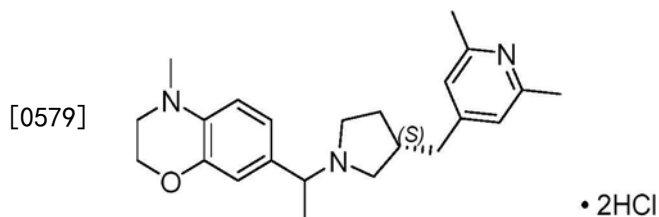
[0574] 中间体149的制备



[0576] 使用中间体148作为起始材料, 按照与针对中间体147的合成所述类似的程序来制备中间体149。

[0577] 最终化合物的制备

[0578] E1. 产物1的制备

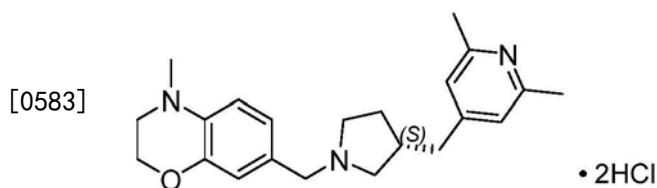


[0580] 在室温下, 将氰基硼氢化钠 (CAS:25895-60-7; 71.6mg, 1.14mmol) 添加至中间体 54 • 2HCl (250mg, 0.95mmol)、中间体25 (182mg, 0.95mmol)、Ti(Oi-Pr)₄ (CAS:546-68-9; 0.28mL, 0.95mmol) 和Et₃N (0.39mL, 2.85mmol) 在DCM (3.12mL) 中的混合物中。将反应混合物在80℃下搅拌16h。添加水, 并且将产物用DCM萃取。将有机层分离, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗混合物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, NH₃ (7M在MeOH中) 在DCM中, 梯度从0/100至5/95) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 30x100mm 5μm, 流动相:NH₄HCO₃ (0.25%水溶液)/CH₃CN, 梯度从67/33至50/50) 进行第二次纯化, 以得到无色油状物。

[0581] 将产物 (220mg) 溶于MeOH中, 并用HCl (6M在i-PrOH中, 0.48mL, 2.85mmol) 处理。将

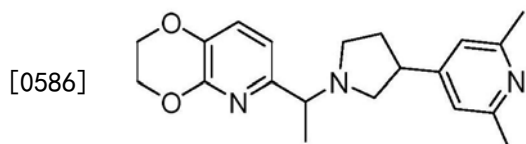
混合物在室温下搅拌2h并在真空中浓缩,以给出呈白色固体的产物1 (221mg, 53%)。

[0582] E2. 产物2的制备



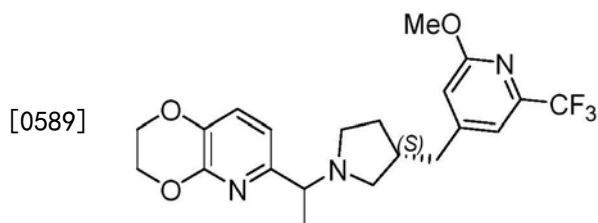
[0584] 将三乙酰氧基硼氢化钠 (CAS: 56553-60-7; 302mg, 1.43mmol) 添加至中间体25 • 2HCl (250mg, 0.95mmol)、4-甲基-3,4-二氢-2H-1,4-苯并噁嗪-7-甲醛 (CAS: 141103-93-7; 168mg, 0.95mmol) 和Et₃N (0.40mL, 2.85mmol) 在MeOH (3.08mL) 中的混合物中。将反应混合物在室温下搅拌16h。添加水,并且将产物用EtOAc萃取。将有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗混合物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, NH₃ (7M在MeOH中) 在DCM中, 梯度从0/100至5/95) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5μm, 流动相: NH₄HCO₃ (0.25%水溶液) / CH₃CN, 梯度从80/20至60/40) 进行第二次纯化。将残余物 (180mg) 溶于MeOH中, 并用HCl (6M在i-PrOH中, 0.16mL, 0.95mmol) 处理。将混合物在室温下搅拌2h并在真空中浓缩, 以得到呈灰色固体的产物2 (198mg, 49%)。

[0585] E3. 产物3的制备



[0587] 在室温下并且在N₂气氛下, 将2,3-二氢-[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS: 615568-24-6; 85.9mg, 0.52mmol) 和Ti (Oi-Pr)₄ (CAS: 546-68-9; 0.37mL, 1.23mmol) 添加至中间体17 • HCl (65.0mg, 0.37mmol) 在DCM (1.28mL) 中的搅拌溶液中。将反应混合物搅拌16h, 冷却至0℃, 并且分批添加甲基溴化镁 (1.4M在THF和甲苯中, 1.53mL, 2.14mmol)。将反应混合物在此温度下搅拌15min, 并在室温下搅拌16h。将混合物用NH₄Cl (饱和溶液) 处理, 用DCM稀释, 并通过硅藻土垫过滤。将有机层分离, 干燥 (MgSO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, MeOH在EtOAc中, 梯度从0/100至10/90) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5μm, 流动相: NH₄HCO₃ (0.25%水溶液) / CH₃CN, 梯度从80/20至60/40) 进行第二次纯化, 以给出呈淡黄色油状物的产物3 (14mg, 11%)。

[0588] E4. 产物4的制备

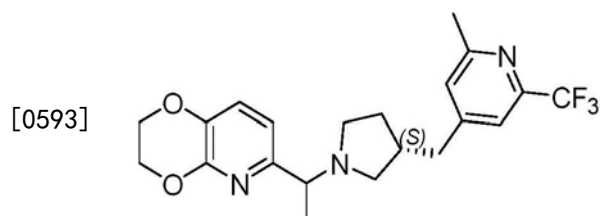


[0590] 使用2,3-二氢-[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS: 615568-24-6) 和中间体11 • HCl, 按照与针对产物3的合成所述类似的程序来制备产物4。将中间体11 • HCl溶于MeOH中, 并使其通过Isolute SCX-2柱, 在将产物用于反应之前将其用NH₃ (7N在MeOH中) 洗

脱。

[0591] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅, MeOH在EtOAc中, 梯度从0/100至10/90)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相:NH₄HCO₃ (0.25%水溶液)/CH₃CN, 梯度从54/46至36/64)进行第二次纯化。将残余物(36mg)用EtOAc和H₂O处理。将有机层分离, 干燥(Na₂SO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以给出呈无色膜的产物4(30mg, 21%)。

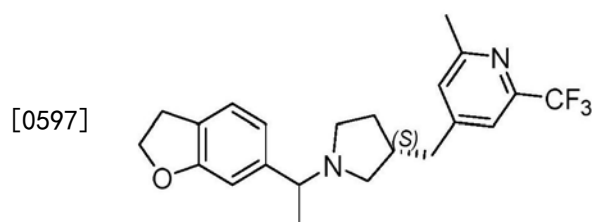
[0592] E5. 产物5的制备



[0594] 使用2,3-二氢-[1,4]二噁英并[2,3-B]吡啶-6-甲醛(CAS:615568-24-6)和中间体14, 按照与针对产物3的合成所述类似的程序来制备产物5。

[0595] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅, MeOH在EtOAc中, 梯度从0/100至10/90)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相:NH₄HCO₃ (0.25%水溶液)/CH₃CN, 梯度从54/46至36/64)进行第二次纯化。将残余物(65mg)用EtOAc和H₂O处理。将有机层分离, 干燥(Na₂SO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以得到呈无色膜的产物5(50mg, 30%)。

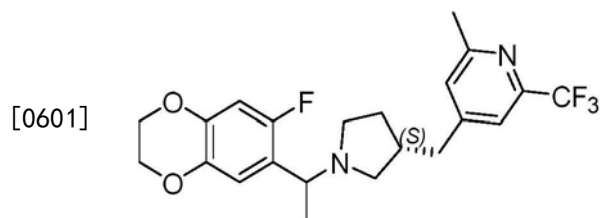
[0596] E6. 产物6的制备



[0598] 使用中间体55和中间体14, 按照与针对产物3的合成所述类似的程序来制备产物6。

[0599] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅, MeOH在EtOAc中, 梯度从0/100至10/90)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈无色油状物的产物6(115mg, 72%)。

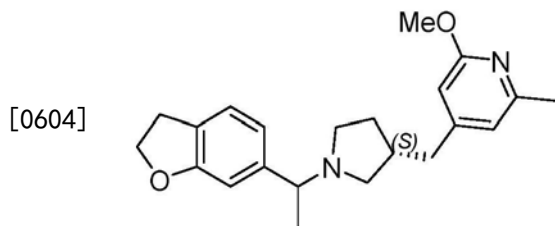
[0600] E7. 产物7的制备



[0602] 在室温下, 将Ti(Oi-Pr)₄(CAS:546-68-9; 0.12mL, 0.41mmol)和氰基硼氢化钠(CAS:25895-60-7; 30.9mg, 0.49mmol)顺序添加至中间体14(100mg, 0.41mmol)和中间体86(80.3mg, 0.41mmol)在DCE(1.66mL)中的混合物中。将反应混合物在密封管中在80 $^{\circ}$ C下搅拌16h。将混合物用NaHCO₃(饱和溶液)处理, 用DCM稀释, 并通过Celite[®]过滤。将有机层分离,

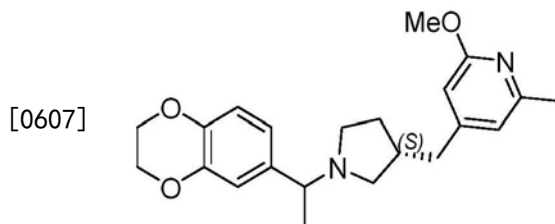
干燥 (Na_2SO_4), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, MeOH 在 EtOAc 中, 梯度从 0/100 至 10/90) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发, 以得到呈淡黄色油状物的产物 7 (130mg, 75%)。

[0603] E8. 产物 8 的制备



[0605] 在室温下并且在 N_2 气氛下, 将中间体 55 (80.4mg, 0.54mmol) 和 $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$ (CAS: 546-68-9; 0.34mL, 1.16mmol) 添加至中间体 26 (80.0mg, 0.39mmol) 在 DCM (1.58mL) 中的搅拌溶液中。将反应混合物搅拌 16h, 冷却至 0°C , 并且添加 THF (0.45mL), 随后逐滴添加甲基溴化镁 (1.4M 在 THF 和 甲苯中, 1.39mL, 1.94mmol)。将反应混合物在此温度下搅拌 25min, 并在室温下搅拌 2h。将混合物用 NH_4Cl (饱和溶液) 处理, 并用 DCM 萃取。将有机层干燥 (Na_2SO_4), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (氨基官能化的 SiO_2 , MeOH 在 DCM 中, 梯度从 0/100 至 4/96) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过 RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5 μm , 流动相: NH_4HCO_3 (0.25% 水溶液) / CH_3CN , 梯度从 54/46 至 36/64) 进行第二次纯化。将残余物 (80mg) 用水洗涤并用 EtOAc 萃取。将有机层干燥 (Na_2SO_4), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以给出呈油状物的产物 8 (78mg, 57%)。

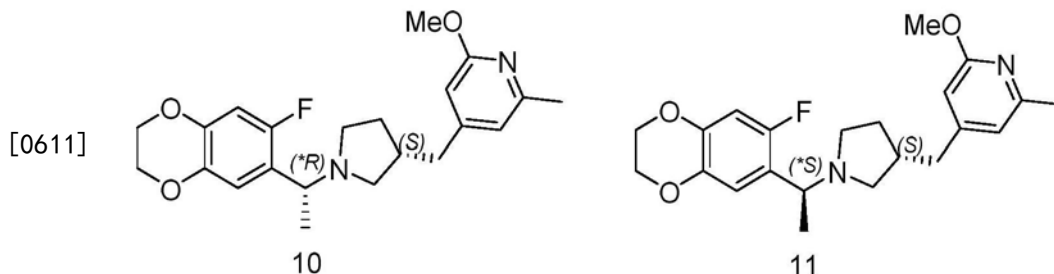
[0606] E9. 产物 9 的制备



[0608] 使用中间体 26 和 2,3-二氢 [1,4] 二噁英并 [2,3-b] 吡啶-6-甲醛 (CAS: 615568-24-6) 作为起始材料, 按照与针对产物 8 的合成所述类似的程序来制备产物 9。

[0609] 将粗产物通过快速柱色谱法 (氨基官能化的 SiO_2 , MeOH 在 DCM 中, 梯度从 0/100 至 4/96) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈油状物的产物 9 (90mg, 63%)。

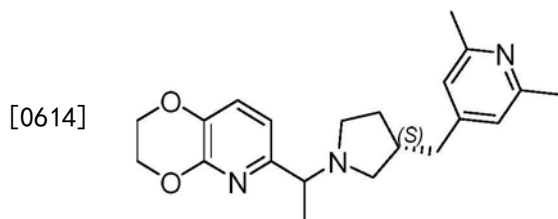
[0610] E10. 产物 10 和 11 的制备



[0612] 在室温下, 将 $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$ (CAS: 546-68-9; 0.1mL, 0.34mmol) 和 氰基硼氢化钠 (CAS: 25895-60-7; 25.6mg, 0.41mmol) 顺序添加至中间体 26 (70.0mg, 0.34mmol) 和 中间体 86 (66.6mg, 0.34mmol) 在 DCE (1.38mL) 中的混合物中。将反应混合物在密封管中在 75°C 下搅拌

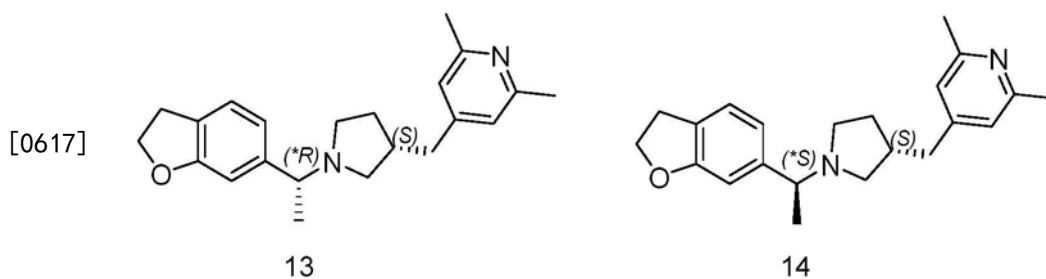
5h,并在55℃下搅拌18h。将混合物用水处理,用DCM稀释,并通过**Celite®**过滤。将有机层分离,干燥(Na_2SO_4),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,MeOH在DCM中,梯度从0/100至4/96)纯化。经由RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相: NH_4HCO_3 (0.25%水溶液)/ CH_3CN ,梯度从47/53至30/70)进行第二次纯化,以给出呈油状物的产物10(25mg,19%)和产物11(30mg,23%)。

[0613] E11.产物12的制备



[0615] 在密封管中并且在 N_2 气氛下,将 $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$ (CAS:546-68-9;0.46mL,1.58mmol)逐滴添加至中间体25(100mg,0.53mmol)和2,3-二氢-[1,4]二噁英[2,3-b]吡啶-6-甲醛(CAS:615568-24-6;95.5mg,0.58mmol)在THF(2.5mL)中的搅拌混合物中。将反应混合物搅拌16h,冷却至0℃,并且逐滴添加甲基溴化镁(2.66mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌5min,并在室温下搅拌18h。将混合物用 NH_4Cl (饱和溶液)和DCM处理,并通过**Celite®**垫过滤。将滤液用DCM萃取。将有机层干燥(MgSO_4),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(SiO_2 , NH_3 (7N在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至3/97)纯化。通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相: NH_4HCO_3 (0.25%水溶液)/ CH_3CN ,梯度从60/40至37/63)进行第二次纯化。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发,以得到呈微黄色油状物的产物12(23.4mg,13%)。

[0616] E12.产物13和14的制备

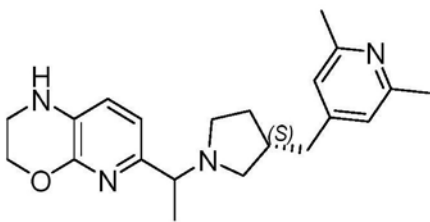


[0618] 使用中间体25和中间体55作为起始材料,按照与针对产物12的合成所述类似的程序来制备产物13和14。

[0619] 将粗产物通过快速柱色谱法(SiO_2 , NH_3 (7N在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至3/97)纯化。通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相: NH_4HCO_3 (0.25%水溶液)/ CH_3CN ,梯度从60/40至37/63)进行第二次纯化。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发,以给出呈无色油状物的产物13(15mg,8%)和产物14(22.1mg,22%)。

[0620] E13.产物15的制备

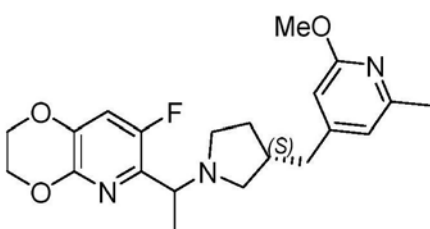
[0621]



[0622] 将HCl (4M在1,40-二噁烷中, 1.89mL, 7.57mmol) 添加至中间体145 (118mg, 0.26mmol) 中, 并且将反应混合物在室温下搅拌2h。将溶剂在真空中蒸发。使用 **Isolute®** SCX-2柱来纯化残余物。将残余物用MeOH洗涤, 并且将产物用NH₃ (7N在MeOH中) 洗脱。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发。将残余物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, NH₃ (7N在MeOH中) 在DCM中, 梯度从0/100至10/90) 纯化。收集所希望的级分, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以给出产物15 (53.5mg, 58%)。

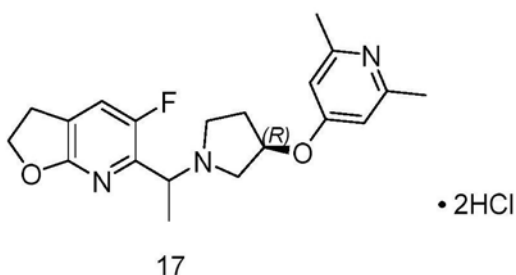
[0623] E14. 产物16的制备

[0624]

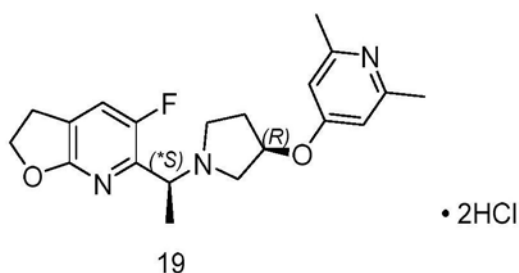
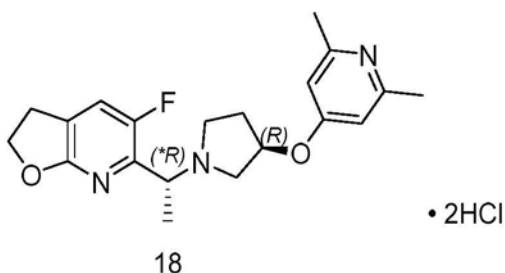


[0625] 在N₂气氛下, 将氰基硼氢化钠 (CAS:25895-60-7; 19.2mg, 0.31mmol) 添加至中间体26 (30.0mg, 0.15mmol)、中间体77 (34.4mg, 0.18mmol) 和Ti (Oi-Pr)₄ (CAS:546-68-9; 86.1μL, 0.29mmol) 在无水THF (1.98mL) 中的搅拌混合物中。将反应混合物在密封管中在70℃下搅拌4h。将溶剂在真空中蒸发, 并且将粗混合物通过快速柱色谱法 (SiO₂, MeOH在DCM中, 梯度从0/100至5/95) 纯化。通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 30x100mm 5um, 流动相:[0.1% NH₄CO₃H/NH₄OH pH 9水溶液]/CH₃CN, 梯度从54/46至64/36) 进行第二次纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以给出呈油状物的产物16 (43mg, 76%)。

[0626] E15. 产物17、18和19的制备



[0627]

[0628] 在密封管中, 将中间体63 (173mg, 0.86mmol) 在无水CH₃CN (10.8mL) 中的溶液添加

至中间体21 (150mg, 0.78mmol) 和 K_2CO_3 (323mg, 2.34mmol) 的搅拌混合物中。将反应混合物在70°C下搅拌36h。将反应混合物用水稀释并用EtOAc萃取。将有机层干燥(Na_2SO_4), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅, MeOH在DCM中, 梯度从0/100至5/95)纯化。收集所希望的级分, 并且将溶剂在真空中蒸发。将产物与DIPE研磨并过滤, 以得到固体(102mg, 37%)。

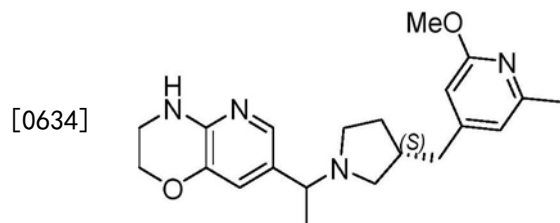
[0629] 将固体(23mg)溶于 Et_2O (3mL) 中, 并且在0°C下添加HCl (1M在 Et_2O 中, 0.1mL, 0.1mmol)。将混合物搅拌30min。将固体滤出并用冷 Et_2O 洗涤, 以得到呈白色固体的产物17 (20mg)。

[0630] 将固体(89mg)的其他级分经由手性SFC(固定相: Chiralpak IG 5 μ m 250*20mm, 流动相: 75% CO_2 , 25%MeOH(0.3%*i*-PrNH₂))纯化, 以给出级分A(20mg)和级分B(29mg)。

[0631] 将级分A(20mg)溶于 Et_2O (2mL) 中, 并且在0°C下添加HCl (2M在 Et_2O 中, 0.06mL, 0.12mmol)。将混合物在室温下搅拌30min。将固体过滤, 以得到呈膏状固体的产物18 (22.5mg)。

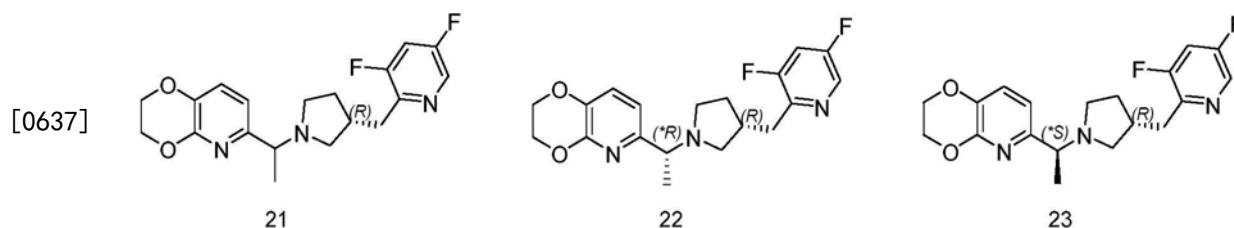
[0632] 使用级分B(29mg)作为起始材料, 按照类似的程序来获得产物19(33.5mg)。

[0633] E16. 产物20的制备



[0635] 在室温下并且在 N_2 气氛下, 将中间体61 (160mg, 0.60mmol) 和 $Ti(Oi-Pr)_4$ (CAS: 546-68-9; 0.43mL, 1.45mmol) 添加至中间体26 (100mg, 0.49mmol) 在DCM (1.98mL) 中的搅拌溶液中。将反应混合物搅拌16h。将混合物在0°C下冷却, 并且添加THF (0.57mL), 随后逐滴添加甲基溴化镁 (1.4M在THF和甲苯中, 1.73mL, 2.42mmol)。将反应混合物在此温度下搅拌25min, 并在室温下搅拌18h。将混合物用 NH_4Cl (饱和溶液) 和DCM处理, 通过Celite®过滤, 并且将滤液用DCM萃取。将合并的有机层干燥(Na_2SO_4), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗混合物通过快速柱色谱法(SiO_2 , MeOH在EtOAc中, 梯度从0/100至12/88)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈棕色粘性固体的产物20 (28.8mg, 16%)。

[0636] E17. 产物21、22和23的制备



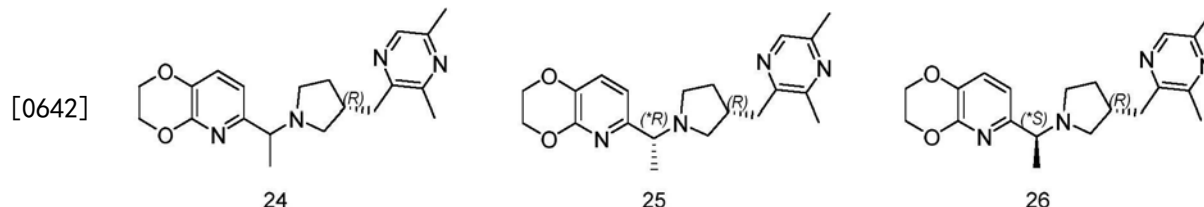
[0638] 使用中间体35和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS: 615568-24-6) 作为起始材料, 按照与针对产物20的合成所述类似的程序来制备产物21、22和23。

[0639] 将粗产物通过快速柱色谱法(SiO_2 , MeOH在EtOAc中, 梯度从0/100至10/90)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过快速柱色谱法(二氧化硅, MeOH在DCM中, 梯度从0/100至10/90)进行第二次纯化。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发, 以产生呈淡黄

色油状物的产物21 (118.9mg, 65%)。

[0640] 经由手性SFC (固定相:CHIRACEL OJ-H 5 μ m 250*20mm, 流动相:75%CO₂, 25% i-PrOH (0.3% i-PrNH₂)) 进行纯化, 以得到产物22 (45mg, 25%) 和产物23 (42mg, 23%)。将两种产物通过制备型LC (固定相: 不规则裸二氧化硅40g, 流动相:0.5% NH₄OH, 92% DCM, 8% MeOH) 进一步纯化, 以给出呈淡黄色油状物的产物22 (40mg, 22%) 和呈淡黄色油状物的产物23 (38mg, 21%)。

[0641] E18. 产物24、25和26的制备

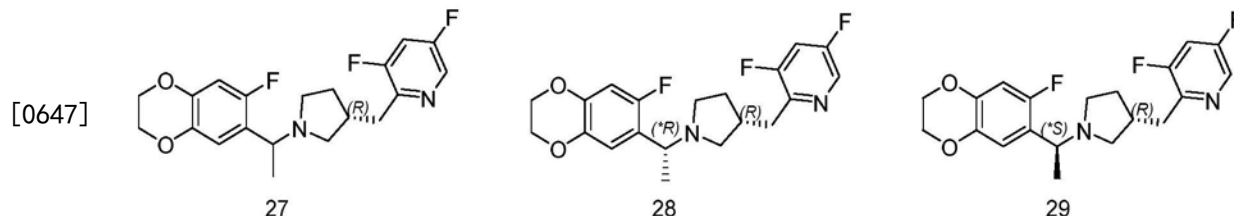


[0643] 使用中间体29和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS:615568-24-6) 作为起始材料, 按照与针对产物20的合成所述类似的程序来制备产物24、25和26。

[0644] 将粗产物通过快速柱色谱法 (SiO₂, MeOH在EtOAc中, 梯度从0/100至15/85) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以产生呈浅棕色油状物的产物24 (128.5mg, 69%)。

[0645] 经由手性SFC (固定相:CHIRACEL OJ-H 5 μ m 250*20mm, 流动相:70%CO₂, 30% i-PrOH (0.3% i-PrNH₂)) 进行纯化, 以给出呈浅棕色油状物的产物25 (48mg, 26%) 和产物26 (48mg, 26%)。

[0646] E19. 产物27、28和29的制备



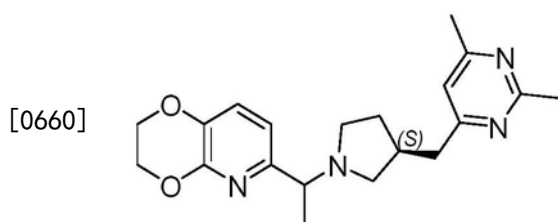
[0648] 在密封管中在室温下, 将Ti (Oi-Pr)₄ (CAS:546-68-9; 0.12mL, 0.41mmol) 和氰基硼氢化钠 (CAS:25895-60-7; 30.9mg, 0.49mmol) 顺序添加至中间体35 (100mg, 0.51mmol) 和中间体86 (80.3mg, 0.41mmol) 在DCE (1.66mL) 中的混合物中。将反应混合物在80℃下搅拌16h。将混合物用NaHCO₃ (饱和溶液) 处理, 用DCM稀释, 并通过Celite®过滤。将有机层分离, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, EtOAc在DCM中, 梯度从0/100至100/0) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发, 以产生呈无色油状物的产物27 (80.9mg, 52%)。

[0649] 经由手性SFC (固定相:CHIRALPAKAD-H 5 μ m 250*30mm, 流动相:88%CO₂, 12%EtOH (0.3% i-PrNH₂)) 进行纯化, 以得到呈无色油状物的产物28 (23mg, 15%) 和产物29 (26mg, 17%)。

[0650] E20. 产物30、31和32的制备

[0658] 将中间体120 (100mg, 0.50mmol) 溶于CH₃CN (4mL) 中, 并且添加中间体24 (105mg, 0.55mmol) 和K₂CO₃ (208mg, 1.50mmol)。将反应混合物在80℃下搅拌过夜。添加水, 并且将混合物用DCM萃取。将合并的有机萃取物干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, NH₃ (7N在MeOH中) 在DCM中, 梯度从0/100至10/90) 纯化 (两次)。通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5μm, 流动相: NH₄HCO₃ (0.25%水溶液) / CH₃CN, 梯度从80/20至0/100) 进行另一次纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。将残余物溶于EtOAc中并用NaHCO₃ (饱和溶液) 洗涤。将有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空中浓缩, 以产生呈无色油状物的外消旋混合物 (32.8mg, 19%)、产物35 (30.3mg, 17%) 和产物36 (24mg, 14%)。

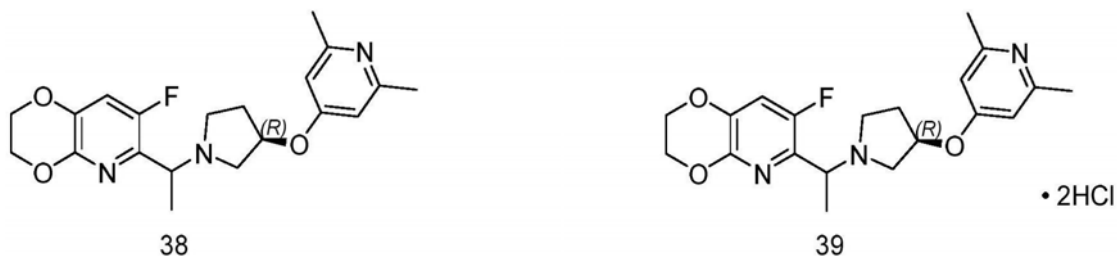
[0659] E23. 产物37的制备



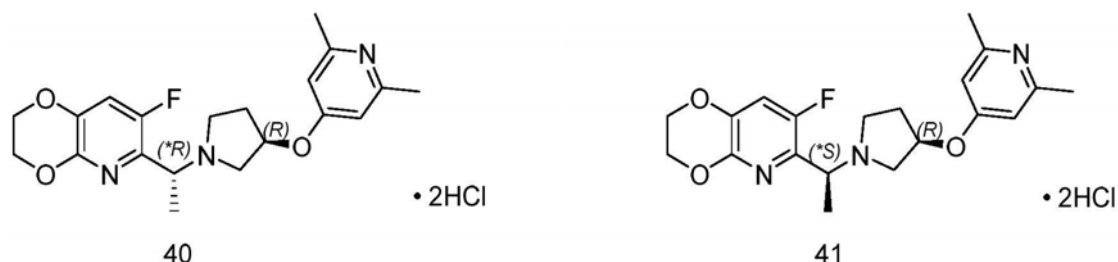
[0661] 使用中间体107和中间体31作为起始材料, 按照与针对产物35和36的合成所述类似的程序来制备产物37。

[0662] 将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, NH₃ (7M在MeOH中) 在DCM中, 梯度从0/100至10/90) 纯化 (两次)。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈浅棕色油状物的产物37 (137.2mg, 97%)。

[0663] E24. 产物38、39、40和41的制备



[0664]



[0665] 使用中间体129和中间体21作为起始材料, 按照与针对产物35和36的合成所述类似的程序来制备产物38、39、40和41。

[0666] 将粗混合物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, NH₃ (7N在MeOH中) 在DCM中, 梯度从0/100至10/90) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5μm, 流动相: NH₄HCO₃ (0.25%水溶液) / CH₃CN, 梯度从75/25至57/43) 进

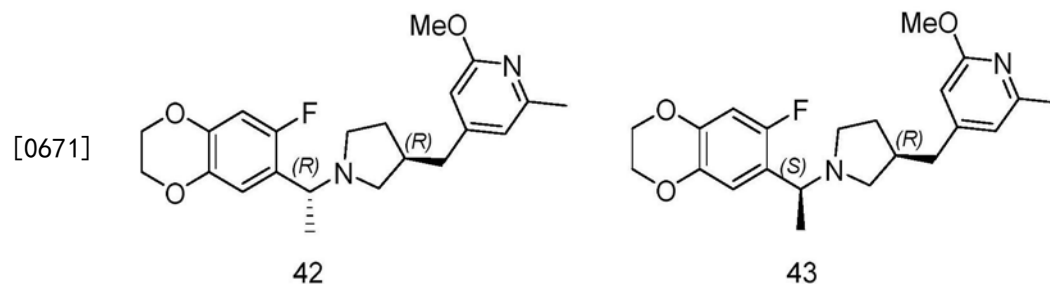
行第二次纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。将残余物溶于EtOAc中并用NaHCO₃ (饱和溶液) 洗涤。将有机层干燥 (Na₂SO₄) , 过滤并在真空中浓缩, 以得到产物38 (170.9mg, 55%)。

[0667] 将HCl (6M在*i*-PrOH中, 44.6μL, 0.27mmol) 添加至产物38 (20mg, 53.6μmol) 在Et₂O (0.1mL) 中的搅拌溶液中。将混合物在室温下搅拌4h, 并且将溶剂在真空中浓缩。添加叔丁基甲基醚, 并且将混合物超声处理5min。将溶剂在真空中浓缩。重复该程序直至获得固体, 将该固体在真空中干燥, 以得到呈浅棕色固体的产物139 (15.2mg, 64%)。

[0668] 经由手性SFC (固定相: Chiralpak IC 5μm 250*21.2mm, 流动相: 78%CO₂, 22% EtOH (0.3% *i*-PrNH₂)) 对产物138进行纯化, 以给出级分A (75mg) 和级分B (47mg)。将级分B经由手性SFC (固定相: Chiralpak IC 5μm 250*21.2mm, 流动相: 78%CO₂, 22% EtOH (0.3% *i*-PrNH₂)) 再次纯化, 以给出40mg的级分B。

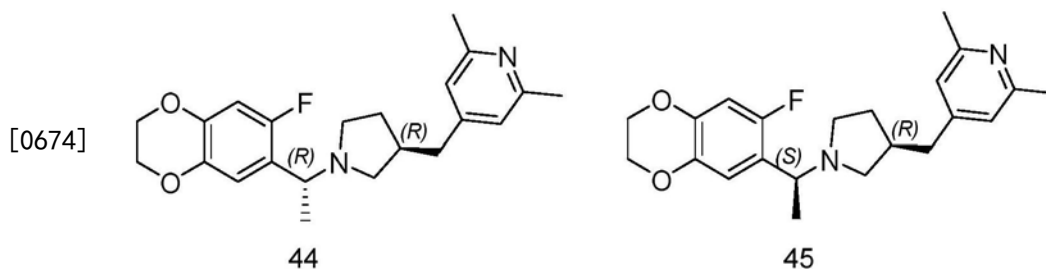
[0669] 将级分A溶于Et₂O (0.2mL) 中, 并且添加7N HCl-IPA (0.2mL)。将混合物在室温下搅拌4h。将溶剂在真空中浓缩, 以得到呈膏状固体的产物40 (80mg)。按照类似的程序, 也将级分B转化为产物41 (86mg)。

[0670] E25. 产物42和43的制备



[0672] 将中间体86 (99.8mg, 0.51mmol) 和Ti (O*i*-Pr)₄ (CAS: 546-68-9; 0.22mL, 0.73mmol) 添加至中间体4 (100mg, 0.49mmol) 在DCE (2mL) 中的溶液中。将反应混合物在80℃下搅拌4h, 冷却至室温, 并且添加氰基硼氢化钠 (CAS: 25895-60-7; 36.6mg, 0.58mmol)。将反应混合物搅拌16h。将反应用NaHCO₃ (饱和溶液) 淬灭, 并用DCM稀释。将乳液通过 **Celite®** 垫过滤。将滤液用DCM萃取。将合并的有机层干燥 (MgSO₄) , 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, EtOAc在庚烷中, 梯度从30/70至70/30) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到呈无色油状物的产物的混合物 (85mg)。将混合物通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5μm, 流动相: NH₄HCO₃ (0.25% 水溶液) / CH₃CN, 梯度从47/53至30/70) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以给出呈油状物的级分A (35mg) 和级分B (30mg)。将级分A和B用DCM和NaHCO₃ (溶液) 稀释。将水相用DCM萃取。将有机层干燥 (MgSO₄) , 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以给出产物42 (30mg, 16%) 和产物43 (30mg, 16%)。

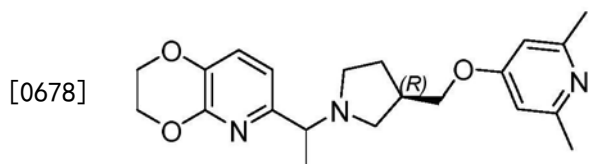
[0673] E26. 产物44和45的制备



[0675] 使用中间体6和中间体86作为起始材料,按照与针对产物42和43的合成所述类似的程序来制备产物44和45。

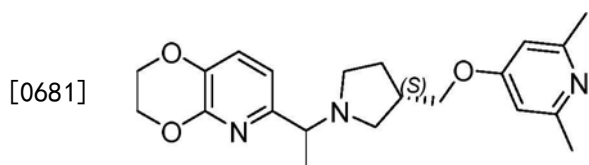
[0676] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,MeOH在DCM中,梯度从0/100至5/95)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈无色油状物的产物的混合物(140mg)。将混合物通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相:NH₄HCO₃(0.25%水溶液)/CH₃CN,梯度从60/40至43/57)纯化,以得到级分A和级分B。将级分A和B用DCM和NaHCO₃(溶液)稀释。将水相用EtOAc萃取。将有机层干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发,以给出呈油状物的产物44(21mg,11%)和产物45(20mg,10%)。

[0677] E27.产物46的制备



[0679] 将K₂CO₃(208mg,1.50mmol)添加至中间体107(100mg,0.50mmol)和中间体118(114mg,0.55mmol)在CH₃CN(4mL)中的混合物中。将反应混合物在60 $^{\circ}$ C下搅拌20h。将反应混合物用EtOAc稀释,通过Celite[®]过滤,用EtOAc洗涤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,NH₃(7M在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至5/95)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈油状物的产物46(130mg,70%)。

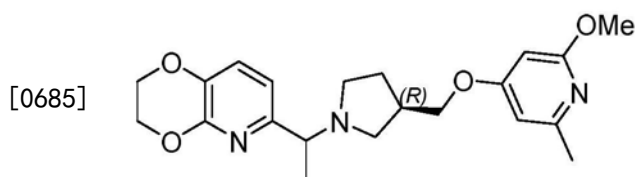
[0680] E28.产物47的制备



[0682] 使用中间体107和中间体8作为起始材料,按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物47。

[0683] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,NH₃(7M在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至05/95)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以给出呈油状物的产物47(170mg,92%)。

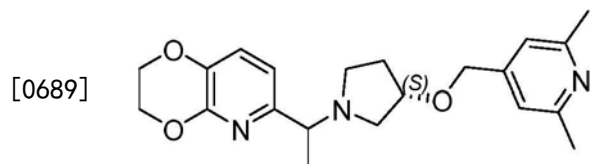
[0684] E29.产物48的制备



[0686] 使用中间体107和中间体2作为起始材料,按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物48。

[0687] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,NH₃(7M在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至4/96)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈油状物的产物48(190mg,73%)。

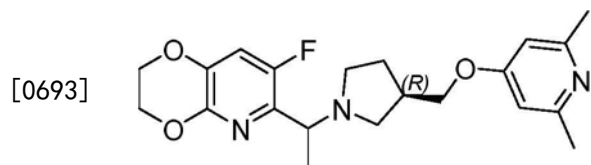
[0688] E30.产物49的制备



[0690] 使用中间体107和中间体127作为起始材料,按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物49。

[0691] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,NH₃(7M在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至04/96)纯化。通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5μm,流动相:NH₄HCO₃(0.25%水溶液)/CH₃CN,梯度从80/20至60/40)进行第二次纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈油状物的产物49(70mg,65%)。

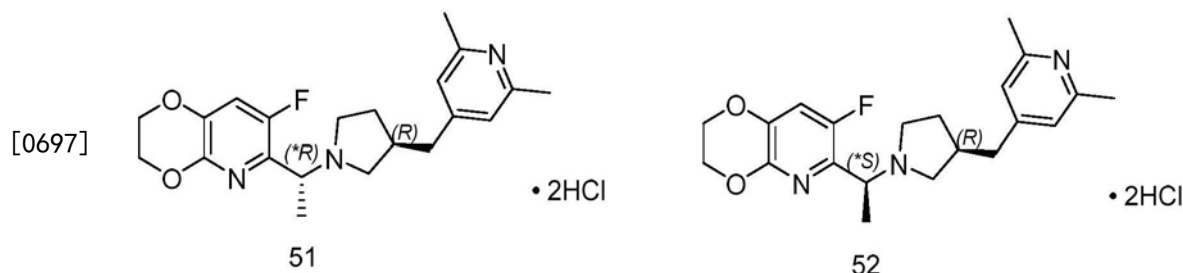
[0692] E31.产物50的制备



[0694] 使用中间体129和中间体147作为起始材料,按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物50。

[0695] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,NH₃(7M在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至04/96)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈油状物的产物50(70mg,75%)。

[0696] E32.产物51和52的制备



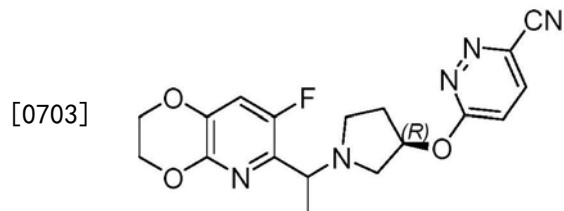
[0698] 使用中间体79和中间体24作为起始材料,按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物51和52。

[0699] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,NH₃(7M在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至07/93)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈油状物的产物的混合物(160mg)。经由手性SFC(固定相:CHIRACEL OJ-H 5μm 250*20mm,流动相:85%CO₂,15%EtOH(0.3% iPrNH₂))进行纯化,以给出级分A(52mg)和级分B(46mg)。

[0700] 将级分A (35mg) 通过快速柱色谱法 (二氧化硅, NH₃ (7M在MeOH中) 在DCM中, 梯度从0/100至03/97) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。将所得的产物溶于叔丁基甲基醚 (2mL) 中, 并且在搅拌下添加HCl (2M在Et₂O中, 2mL, 4mmol)。将沉淀物过滤并在50℃下在真空下干燥, 以得到产物51 (35mg)。

[0701] 使用级分B作为起始材料, 按照类似的程序来制备产物52。

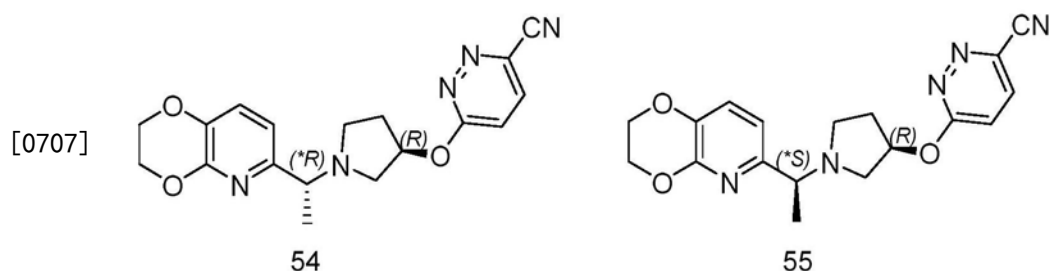
[0702] E33. 产物53的制备



[0704] 使用中间体129和中间体43作为起始材料, 按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物53。

[0705] 将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, MeOH在DCM中, 梯度从0/100至10/90) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到产物53 (69.5mg, 71%)。

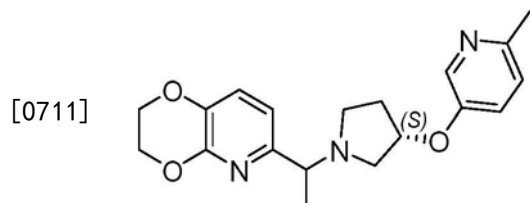
[0706] E34. 产物54和55的制备



[0708] 使用中间体107和中间体43作为起始材料, 按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物54和55。

[0709] 将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, MeOH在DCM中, 梯度从0/100至10/90) 纯化, 以得到产物的混合物。将混合物通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5μm, 流动相: NH₄HCO₃ (0.25%水溶液) / CH₃CN, 梯度从90/10至60/40) 纯化, 以得到产物54 (15.6mg, 17%) 和产物55 (16.4mg, 18%)。

[0710] E35. 产物56的制备

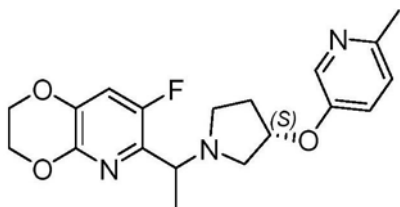


[0712] 使用中间体107和中间体41作为起始材料, 按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物56。

[0713] 将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, MeOH在DCM中, 梯度从0/100至10/90) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以得到产物56 (17.5mg, 27%)。

[0714] E36. 产物57的制备

[0715]

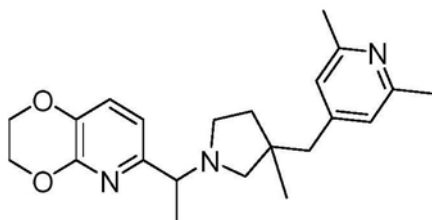


[0716] 使用中间体129和中间体41作为起始材料,按照与针对产物46的合成所述类似的程序来制备产物57。

[0717] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,MeOH在DCM中,梯度从0/100至10/90)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈无色油状物的产物57(31.2mg,60%)。

[0718] E37.产物58的制备

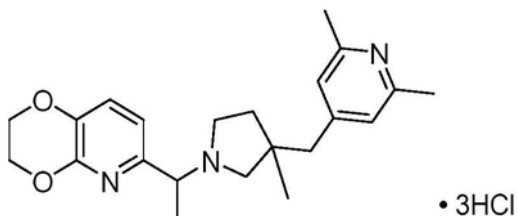
[0719]



[0720] 将 K_2CO_3 (779mg,5.64mmol)添加至中间体37(384mg,1.88mmol)和中间体107(338mg,1.69mmol)在无水 CH_3CN (14.8mL)中的搅拌混合物中。将反应混合物在密封管中在 $80^\circ C$ 下搅拌12h。将反应混合物用水稀释并用EtOAc萃取。将有机层干燥(Na_2SO_4),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将残余物通过快速柱色谱法(SiO_2 ,EtOAc在庚烷中,梯度从0/100至100/0)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发,以给出呈淡棕色油状物的产物58(502mg,73%)。

[0721] E38.产物59的制备

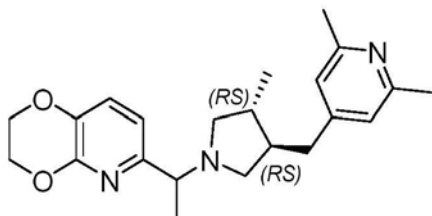
[0722]



[0723] 将产物58(435mg)悬浮于 Et_2O 中,并在室温下用HCl(2N在 Et_2O 中,4当量)处理。将白色沉淀物过滤并干燥,以给出呈白色固体的产物59(428.7mg)。

[0724] E39.产物60的制备

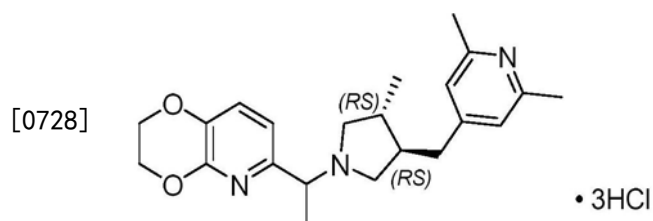
[0725]



[0726] 使用中间体39和中间体107作为起始材料,按照与针对产物58的合成所述类似的程序来制备产物60。将残余物通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μm ,流动相: NH_4HCO_3 (0.25%水溶液)/ CH_3CN ,梯度从80/20至0/100)纯化。收集所希望的级分,并且将溶

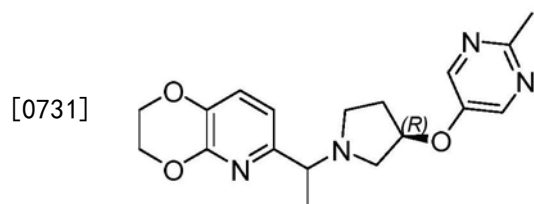
剂在真空中蒸发,以得到呈无色油状物的产物60 (125.8mg, 56%)。

[0727] E40. 产物61的制备



[0729] 使用产物60作为起始材料,按照与针对化合物59的合成所述类似的程序来制备产物61。

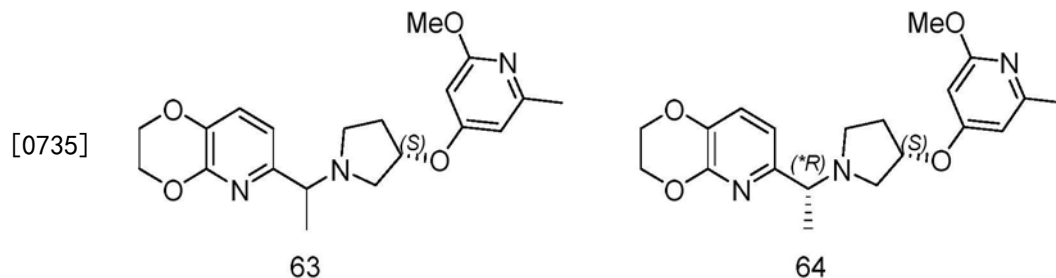
[0730] E41. 产物62的制备



[0732] 使用中间体33和中间体107作为起始材料,按照与针对产物58的合成所述类似的程序来制备产物62。

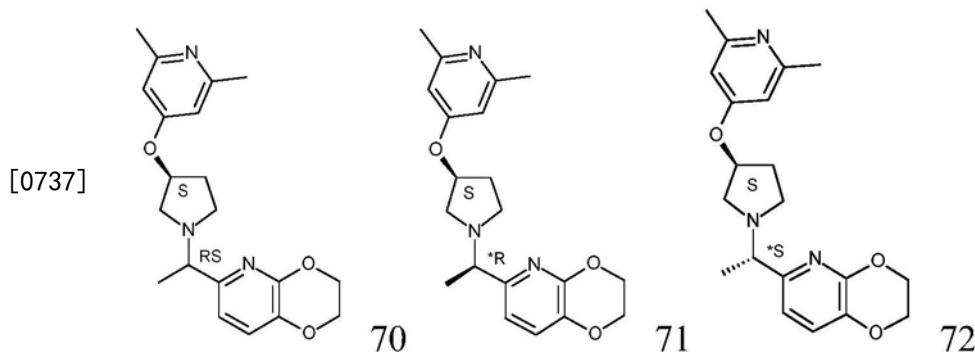
[0733] 将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅, MeOH在DCM中,梯度从0/100至10/90)纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5um,流动相:[0.1%NH₄CO₃H/NH₄OH pH 9水溶液]/CH₃CN,梯度从67/33至50/50)进行第二次纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈浅黄色固体的产物62 (115mg, 60%)。

[0734] E42. 产物63和64的制备



[0736] 将2,3-二氢-[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛(CAS:615568-24-6;95.2mg, 0.58mmol)和Ti(Oi-Pr)₄(CAS:546-68-9;0.21mL,0.72mmol)添加至中间体149(100mg, 0.48mmol)在无水DCM(1.92mL)中的搅拌溶液中。将反应混合物在室温下搅拌20h。将反应混合物冷却至0℃,并且逐滴添加甲基溴化镁(1.4M在THF中,1.72mL,2.40mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌5min,并在室温下搅拌2h。添加NH₄Cl(饱和溶液),并且将产物用DCM萃取。将有机层干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法(二氧化硅,NH₃(7M在MeOH中)在DCM中,梯度从0/100至3/97)纯化。将残余物通过RP HPLC(固定相:C18 X Bridge 30x100mm 5um,流动相:NH₄HCO₃(0.25%水溶液)/CH₃CN,梯度从67/33至50/50)纯化。添加NaHCO₃(饱和溶液),并且将产物用DCM萃取。将有机层干燥(MgSO₄),过滤,并且将溶剂在真空中蒸发,以得到呈黄色油状物的产物63(15mg,8%)和产物64(20mg,11%)。

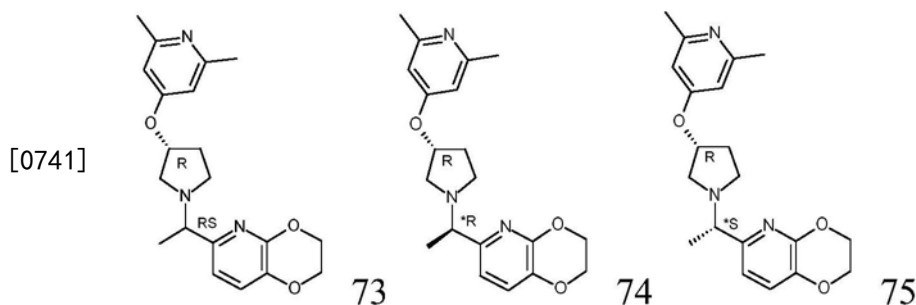
E48. 产物70、71和72的制备



[0738] 使用中间体20 (100mg, 0.52mmol) 和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS:615568-24-6) 作为起始材料,按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物70。将粗产物70通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相:梯度从54% NH₄HCO₃ 0.25%水溶液,46% CH₃CN至36% NH₄HCO₃ 0.25%水溶液,64% CH₃CN) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。将由此获得的残余物溶于EtOAc中,并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机相分离,干燥 (Na₂SO₄),过滤并在真空中浓缩,以产生呈无色油状物的产物70 (121mg, 65%, 非对映异构体的混合物)。

[0739] 将产物70 (110mg) 经由手性SFC (固定相:CHIRACEL OJ-H 5 μ m 250*20mm,流动相:80% CO₂, 20% MeOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化,产生均呈油状物的产物71 (50mg, 27%) 和产物72 (42mg, 23%)。将产物71吸收进二乙醚中,并用HCl (6N溶液在i-PrOH中) 处理。将溶剂在真空中蒸发,以产生呈奶油色固体的产物71 (60.3mg, 27%, 2 x HCl盐)。将产物72吸收进二乙醚中,并用HCl (6N溶液在i-PrOH中) 处理。将溶剂在真空中蒸发,以产生呈奶油色固体的产物72 (49mg, 22%, 2 x HCl盐)。

[0740] E49. 产物73、74和75的制备

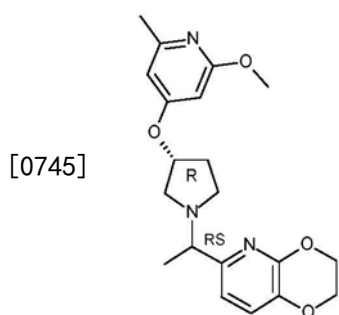


[0742] 使用中间体21 (100mg, 0.52mmol) 和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS:615568-24-6) 作为起始材料,按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物73。将粗产物73通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相:梯度从80% 10mM NH₄HCO₃/NH₄OH pH=9水溶液,20% CH₃CN至60% 10mM NH₄HCO₃/NH₄OH pH=9水溶液,40% CH₃CN) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩。将由此获得的残余物溶于EtOAc中,并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机相分离,干燥 (Na₂SO₄),过滤并在真空中浓缩,以产生呈无色油状物的产物73 (78mg, 42%, 非对映异构体的混合物)。

[0743] 将产物73 (65mg) 经由手性SFC (固定相:CHIRALPAK AD-H 5 μ m 250*30mm,流动相:80% CO₂, 20% MeOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化,产生均呈油状物的产物74 (20mg, 11%) 和产物75

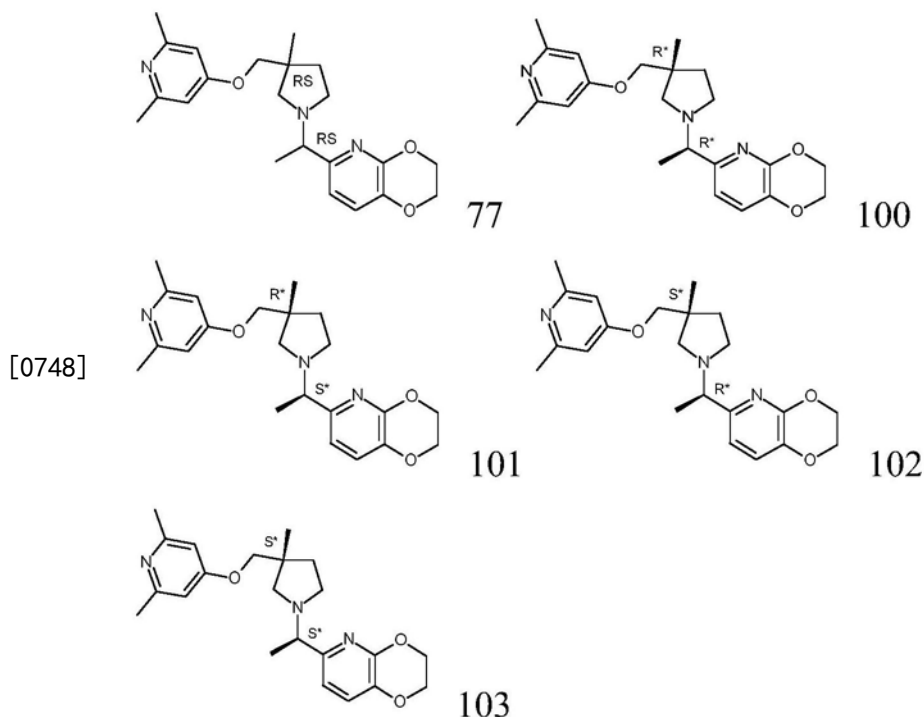
(19mg, 10%)。

[0744] E50. 产物76的制备



[0746] 使用中间体22 (100mg, 0.48mmol) 和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS: 615568-24-6) 作为起始材料, 按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物76。将产物76通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相: 梯度从67% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 33% CH₃CN至50% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 50% CH₃CN) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 产生呈无色油状物的产物76 (61.1mg, 34%, 非对映异构体的混合物)。

[0747] E51. 产物77、100、101、102和103的制备



[0749] 使用中间体23 (336mg, 1.52mmol) 和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS: 615568-24-6) 作为起始材料, 按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物77。将粗产物77通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相: 梯度从75% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 25% CH₃CN至57% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 43% CH₃CN) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以产生呈无色油状物的产物77 (232mg, 40%, 非对映异构体的混合物)。

[0750] 将产物77 (220mg) 经由手性SFC (固定相: Lux-纤维素-45 μ m 250*21.2mm, 流动相: 80% CO₂, 20% EtOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化, 产生全部呈油状物的产物77 (101mg)、产物102

(55mg, 9%) 和产物103 (49mg, 8%)。将产物77 (101mg) 经由手性SFC (固定相: CHIRALPAK AD-H 5 μ m 250*30mm, 流动相: 90%CO₂, 10% iPrOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化, 产生全部呈油状物的产物100 (44mg, 7%) 和不纯的产物101 (47mg, 8%)。

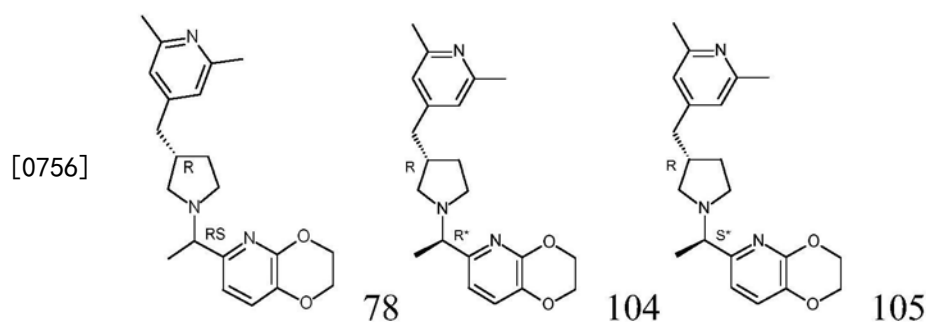
[0751] 将不纯的产物101 (47mg) 经由手性SFC (固定相: CHIRACEL OJ-H 5 μ m 250*20mm, 流动相: 75%CO₂, 25% iPrOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化, 产生呈油状物的产物101 (39mg, 7%)。

[0752] 将产物100悬浮于Et₂O中, 并在室温下用HCl (4当量, 2N溶液在Et₂O中) 处理。将淡棕色沉淀物过滤并在烘箱中干燥, 以产生呈白色固体的产物100 (40mg, 5%, 3 x HCl盐)。

[0753] 将产物101悬浮于Et₂O中, 并在室温下用HCl (4当量, 2N溶液在Et₂O中) 处理。将淡棕色沉淀物过滤并在烘箱中干燥, 以产生呈白色固体的产物101 (36mg, 5%, 3 x HCl盐)。

[0754] 将产物103悬浮于Et₂O中, 并在室温下用HCl (4当量, 2N溶液在Et₂O中) 处理。将淡棕色沉淀物过滤并在烘箱中干燥, 以产生呈白色固体的产物103 (48mg, 6%, 3 x HCl盐)。

[0755] E52. 产物78、104和105的制备

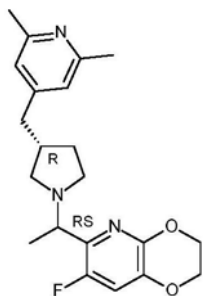


[0757] 使用中间体24 (100mg, 0.53mmol) 和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS: 615568-24-6) 作为起始材料, 按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物78。分离呈无色油状物的产物78 (120mg, 64%, 非对映异构体的混合物)。

[0758] 将产物78 (110mg) 经由手性SFC (固定相: CHIRALPAK AD-H 5 μ m 250*30mm, 流动相: 90%CO₂, 10%EtOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化, 产生全部呈油状物的产物104 (37mg, 20%) 和不纯的产物105 (41mg, 22%)。将产物104 (37mg) 溶于Et₂O (1mL) 中, 然后添加HCl (1mL, 2N在Et₂O中)。将所得的固体过滤并干燥, 以给出呈粘性泡沫的产物104 (35mg, 16%, 2 x HCl盐)。将不纯的产物105 (41mg) 吸收进DCM中, 并用NaHCO₃ (饱和水溶液) 洗涤。将有机层分离, 干燥 (MgSO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发以给出不纯的产物105 (40mg), 将该不纯的产物105通过快速柱色谱法 (二氧化硅; 在甲醇中的7M氨溶液, 在DCM中, 0/100至05/95) 进一步纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩, 以产生呈油状物的纯的产物105 (30mg, 16%)。将产物105 (30mg) 溶于Et₂O (1mL) 中, 然后添加HCl (1mL, 2N在Et₂O中)。将所得的固体过滤并干燥, 以给出呈粘性泡沫的产物105 (30mg, 13%, 2 x HCl盐)。

[0759] E53. 产物79的制备

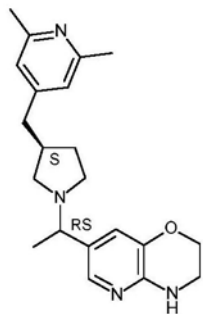
[0760]



[0761] 使用中间体24 (106mg, 0.55mmol) 和中间体86作为起始材料,按照与针对产物2的合成所述类似的程序来制备产物79。将产物79通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相:梯度从75%NH₄HCO₃0.25%水溶液,25%CH₃CN至57%NH₄HCO₃0.25%水溶液,43%CH₃CN) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,产生呈无色油状物的不纯的产物79 (12mg, 6%, 非对映异构体的混合物)。将不纯的产物79 (12mg) 通过快速柱色谱法 (二氧化硅; 在甲醇中的7M氨溶液, 在DCM中, 0/100至2/98) 进一步纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以给出呈油状物的产物79 (8.5mg, 4%, 非对映异构体的混合物)。

[0762] E54. 产物80的制备

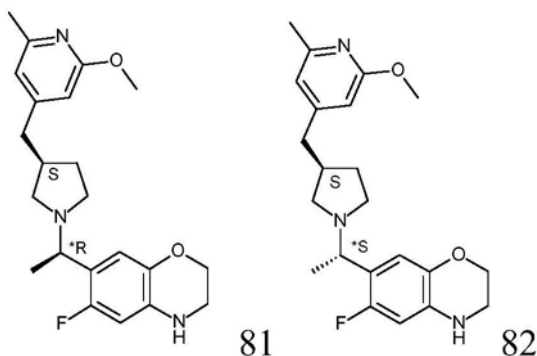
[0763]



[0764] 使用中间体96 (80mg, 0.18mmol) 作为起始材料,按照与针对产物14的合成所述类似的程序来制备产物80。将粗产物80通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相:梯度从47%10mM NH₄HCO₃/NH₄OH pH=9水溶液,53%MeOH至24%10mM NH₄HCO₃/NH₄OH pH=9水溶液,76%MeOH) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生产物80 (20mg, 31%, 非对映异构体的混合物)。

[0765] E55. 产物81和82的制备

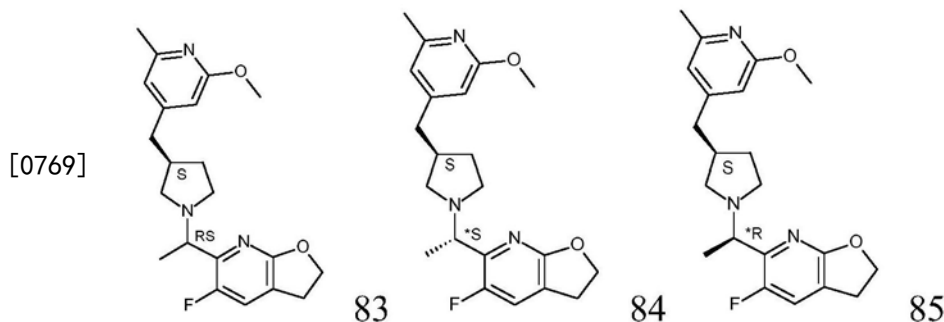
[0766]



[0767] 使用中间体26 (200mg, 0.53mmol) 和中间体123 (300mg, 1.07mmol) 作为起始材料,按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物81和产物82。将粗产物81和粗产物82的混合物 (258mg) 通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相:梯度从60%NH₄HCO₃0.25%水溶液,40%CH₃CN至43%NH₄HCO₃0.25%水溶液,57%CH₃CN) 纯化。收集所希

望的级分并将其在真空中浓缩,产生产物81和产物82的混合物(215mg),将该混合物通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相:梯度从60%NH₄HCO₃0.25%水溶液,40%CH₃CN至43%NH₄HCO₃0.25%水溶液,57%CH₃CN)进一步纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,产生均呈黄色油状物的产物81(46mg,12%,单一外消旋非对映异构体)和产物82(40mg,11%,单一外消旋非对映异构体)。

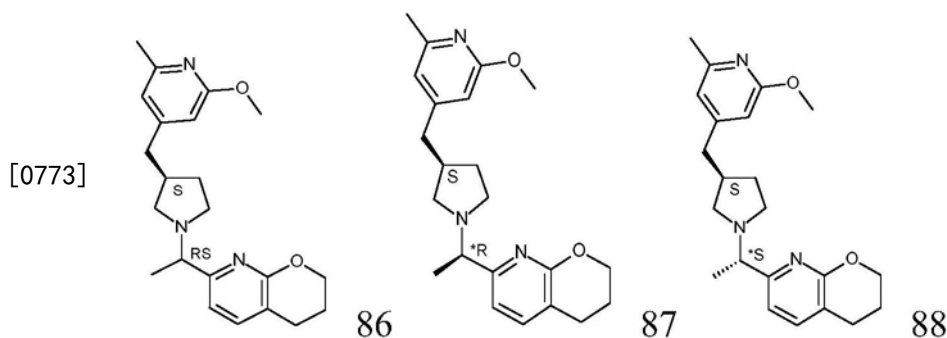
[0768] E56.产物83、84和85的制备



[0770] 使用中间体26(50mg,0.242mmol)和中间体97作为起始材料,按照与针对产物2的合成所述类似的程序来制备产物83。将产物83通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相:梯度从54%0.1%NH₄CO₃H/NH₄OH pH 9水溶液,46%CH₃CN至64%0.1%NH₄CO₃H/NH₄OH pH 9水溶液,36%CH₃CN)纯化,收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈无色油状物的产物83(31.2mg,33%,非对映异构体的混合物)。

[0771] 将产物83(23mg)经由手性SFC(固定相:CHIRACEL OJ-H 5 μ m 250*20mm,流动相:90%CO₂,10%iPrOH(0.3%iPrNH₂))纯化,产生呈油状物的产物84(10mg,11%)和产物85(11mg,12%)。

[0772] E57.产物86、87和88的制备

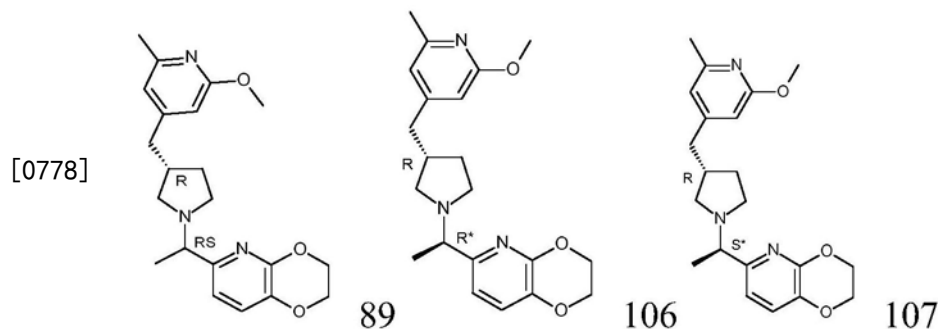


[0774] 使用中间体26(150mg,0.727mmol)和7-乙酰基(3,4-二氢-2H-吡喃并)[2,3-b]吡啶(CAS:253874-77-0)作为起始材料,按照与针对产物2的合成所述类似的程序来制备产物86。将产物86通过RP HPLC(固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相:梯度从54%0.1%NH₄CO₃H/NH₄OH pH 9水溶液,46%CH₃CN至64%0.1%NH₄CO₃H/NH₄OH pH 9水溶液,36%CH₃CN)纯化,收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以得到呈异构体的混合物的产物86(90mg,34%)。将化合物溶于EtOAc中,并用NaHCO₃的饱和溶液处理(搅拌30min),将有机层分离并在真空中蒸发,以得到呈油状物的产物86(82.6mg,31%)。

[0775] 将产物86(70mg)经由手性SFC(固定相:CHIRALPAK AD-H 5 μ m 250*30mm,流动相:70%CO₂,30%MeOH(0.3%iPrNH₂))纯化,产生均呈油状物的不纯的产物87(39mg)和产物88(25mg,9%)。

[0776] 将不纯的产物87 (39mg) 经由制备型LC (固定相:不规则裸二氧化硅40g,流动相:0.5%NH₄OH,94%DCM,6%MeOH) 纯化,产生呈油状物的产物87 (32mg,12%)。

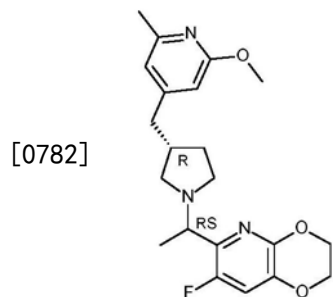
[0777] E58.产物89、106和107的制备



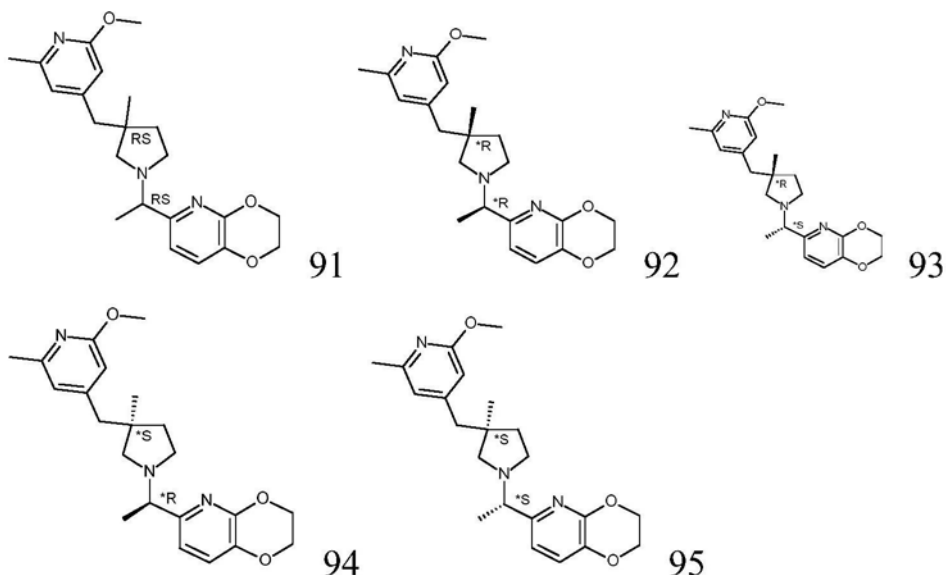
[0779] 使用中间体27 (100mg,0.485mmol) 和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS:615568-24-6) 作为起始材料,按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物89.获得呈油状物的产物89 (98mg,55%)。

[0780] 将产物89 (85mg) 经由手性SFC (固定相:CHIRALPAK AD-H 5 μ m 250*30mm,流动相:90%CO₂,10%EtOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化,产生产物106 (33mg,18%) 和产物107 (35mg,19%)。

[0781] E59.产物90的制备



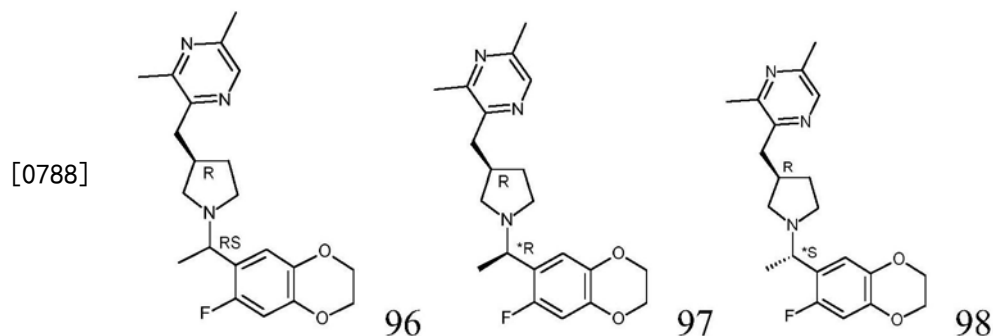
[0783] 使用中间体27 (115mg,0.558mmol) 和中间体100 (100mg,0.507mmol) 作为起始材料,按照与针对产物2的合成所述类似的程序来制备产物90.将产物90通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 30x100mm 5 μ m,流动相:梯度从67%NH₄HCO₃0.25%水溶液,33%CH₃CN至50%NH₄HCO₃0.25%水溶液,50%CH₃CN) 纯化.收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以给出不纯的产物90 (15mg).将不纯的产物90 (15mg) 通过快速柱色谱法 (二氧化硅;在甲醇中的7M氨溶液,在DCM中,0/100至2/98) 纯化.收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以给出呈油状物的产物90 (9.5mg,5%)。E60.产物91、92、93、94和95的制备



[0785] 使用中间体28 (154.8mg, 0.726mmol) 和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS:615568-24-6) 作为起始材料,按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物91。将粗产物91通过RP HPLC (固定相:C18 XBridge 50x100mm 5 μ m,流动相:梯度从60% NH₄HCO₃0.25%水溶液,40% CH₃CN至43% NH₄HCO₃0.25%水溶液,57% CH₃CN) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中浓缩,以产生呈黄色油状物的产物91 (151mg, 56%, 非对映异构体的混合物)。将产物91 (140mg) 经由手性SFC (固定相:CHIRALPAK AD-H 5 μ m 250*30mm,流动相:92% CO₂,8% iPrOH (0.9% iPrNH₂)) 纯化,产生全部呈油状物的产物91 (45mg)、产物92 (21mg,8%) 和产物93 (21mg,8%)。

[0786] 将产物91 (45mg) 经由手性SFC (固定相:CHIRACEL OJ-H 5 μ m 250*20mm,流动相:92% CO₂,8% MeOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化,产生全部呈油状物的产物94 (17mg,6%) 和不纯的产物95 (19mg,7%)。

[0787] E61.产物96、97和98的制备

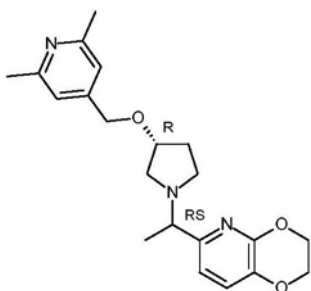


[0789] 使用中间体29 (100mg, 0.523mmol) 和中间体86 (80.3mg, 0.409mmol) 作为起始材料,按照与针对产物2的合成所述类似的程序来制备产物96。获得呈无色油状物的产物96 (108.8mg, 72%, 非对映异构体的混合物)。

[0790] 将产物96 (100mg) 经由SFC (固定相:CHIRALPAK AD-H 5 μ m 250*30mm,流动相:85% CO₂,15% EtOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化,产生呈黄色油状物的产物97 (42mg, 28%) 和产物98 (43mg, 28%)。

[0791] E68.产物115的制备

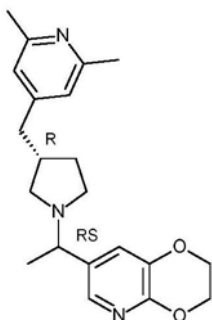
[0792]



[0793] 使用中间体118 (110mg, 0.53mmol) 和中间体107 (106mg, 0.53mmol) 作为起始材料, 按照与针对产物110的合成所述类似的程序来制备产物115。

[0794] E69. 产物116的制备

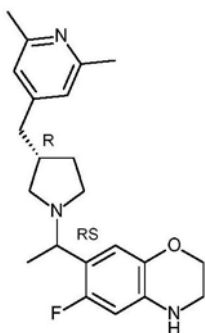
[0795]



[0796] 使用中间体24 (104mg, 0.55mmol) 和中间体120 (100mg, 0.50mmol) 作为起始材料, 按照与针对产物110的合成所述类似的程序来制备产物116。

[0797] E70. 产物117的制备

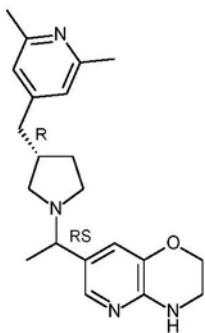
[0798]



[0799] 在0℃下, 将三氟乙酸 (0.38mL, 4.98mmol) 添加至中间体122 (130mg, 0.28mmol) 在DCM (1.1mL) 中的溶液中。将反应混合物在rt下搅拌18h, 作为起始材料。然后添加NaHCO₃ (饱和水溶液), 并且将产物用DCM萃取。将有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, 在MeOH中的7M氨溶液, 在DCM中, 0/100至30/70) 纯化。收集所希望的级分并将其在真空中蒸发, 以给出不纯的产物70。将不纯的产物70通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5μm, 流动相: 梯度从80% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 20% CH₃CN至60% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 40% CH₃CN) 纯化两次。收集所希望的级分, 添加Na₂CO₃的饱和溶液, 并且将产物用DCM萃取。将有机相分离, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以产生呈油状物的产物117 (30mg, 29%)。

[0800] E71. 产物118的制备

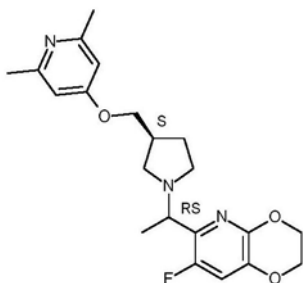
[0801]



[0802] 使用中间体126 (30mg, 0.068mmol) 作为起始材料, 按照与针对产物14的合成所述类似的程序来制备产物118。将粗产物118通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相: 梯度从80% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 20% CH₃CN至60% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 40% CH₃CN) 纯化。收集所希望的级分, 添加NaHCO₃的饱和溶液, 并且将产物用DCM萃取。将有机相分离, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以产生呈油状物的产物118 (22mg, 91%)。

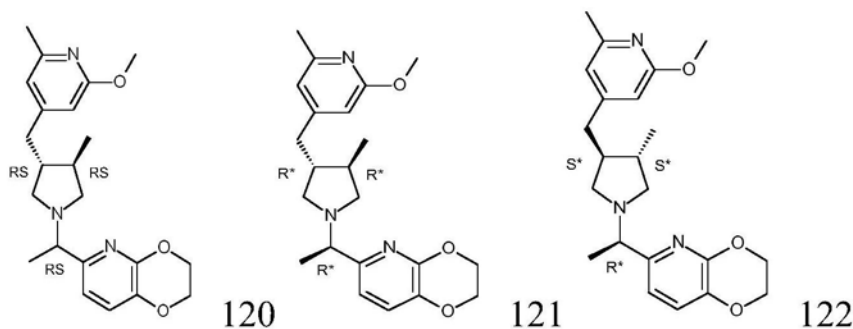
[0803] E72. 产物119的制备

[0804]

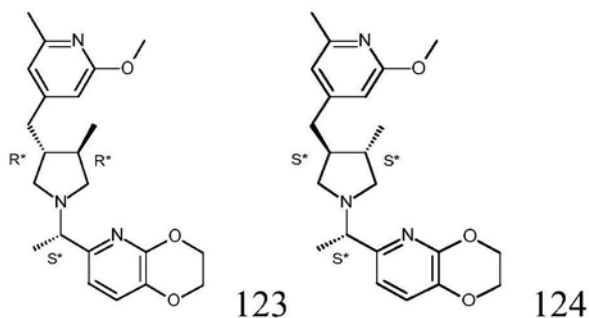


[0805] 使用中间体129 (50mg, 0.23mmol) 和中间体127 (52mg, 0.25mmol) 作为起始材料, 按照与针对产物110的合成所述类似的程序来制备产物119。将产物119通过RP HPLC (固定相: C18 XBridge 30x100mm 5 μ m, 流动相: 梯度从75% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 25% CH₃CN至57% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 43% CH₃CN) 纯化。收集所希望的级分并将其用EtOAc萃取。将有机相分离, 并且将溶剂在真空中蒸发, 以产生呈油状物的产物119 (30mg, 34%)。

[0806] E73. 产物120、121、122、123和124的制备



[0807]



[0808] 使用中间体131 (500mg, 2.5mmol) 和2,3-二氢[1,4]二噁英并[2,3-b]吡啶-6-甲醛 (CAS: 615568-24-6) 作为起始材料, 按照与针对产物1的合成所述类似的程序来制备产物120。将产物120通过RP HPLC (固定相: XBridge C18 50x100mm, 5 μ m, 流动相: 梯度从60% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 40% CH₃CN至43% NH₄HCO₃ 0.25% 水溶液, 57% CH₃CN) 纯化。将所希望的级分在真空中蒸发, 以产生呈粘性黄色油状物的产物120 (388mg, 44%)。

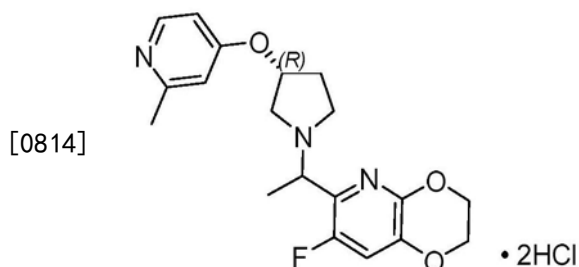
[0809] 将产物120 (375mg) 经由手性SFC (固定相: CHIRACEL OJ-H 5 μ m 250*30mm, 流动相: 75% CO₂, 25% iPrOH (0.3% iPrNH₂)) 纯化, 产生产物121 (87mg, 10%)、产物122和产物123的混合物 (127mg)、和产物124 (88mg, 10%)。

[0810] 将产物122和产物123的混合物 (127mg) 经由手性SFC (固定相: Chiralpak IC 5 μ m 250*21.2mm, 流动相: 82% CO₂, 18% iPrOH (0.6% iPrNH₂)) 纯化, 产生不纯的产物122 (50mg) 和产物123 (46mg, 5%)。

[0811] 将不纯的产物122 (50mg) 经由制备型LC (固定相: 不规则裸二氧化硅10g, 流动相: 0.3% NH₄OH, 95% DCM, 5% MeOH) 纯化, 产生产物122 (39mg, 5%)。

[0812] 获得呈粘性油状物的全部产物。

[0813] E74. 产物125的制备

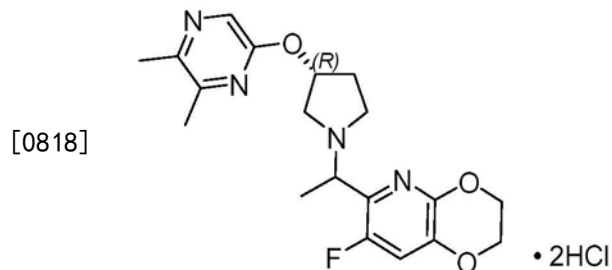


[0815] 将中间体136 • 2HCl (191mg, 0.76mmol)、中间体129 (165mg, 0.76mmol) 和DIPEA (0.79mL, 4.56mmol) 在无水CH₃CN (2.92mL) 中的混合物在70℃下搅拌20h。将反应混合物用水稀释并用EtOAc萃取。将有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 并且将溶剂在真空中蒸发。将粗产物通过快速柱色谱法 (二氧化硅, MeOH在DCM中, 梯度从0/100至5/95) 纯化。收集所希望的级分

并将其在真空中蒸发。

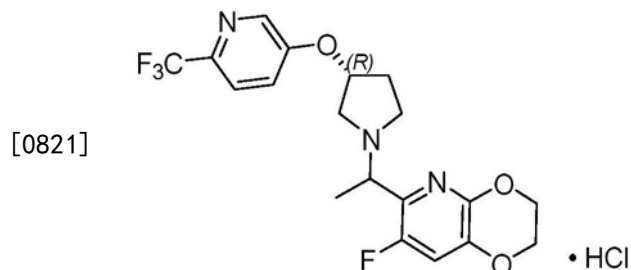
[0816] 将残余物 (177mg) A溶于Et₂O (1.25mL)中,并且在搅拌下添加HCl (2M在Et₂O中, 0.74mL, 1.48mmol)。将沉淀物过滤,并且将产物在室温下在真空下干燥16h,以给出呈白色固体的产物125 (145.3mg, 44%)。

[0817] E75. 产物126的制备



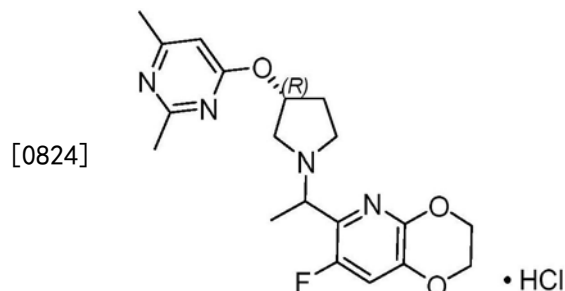
[0819] 使用中间体129和中间体138作为起始材料,按照与针对产物125的合成所述类似的程序来制备产物126。

[0820] E76. 产物127的制备



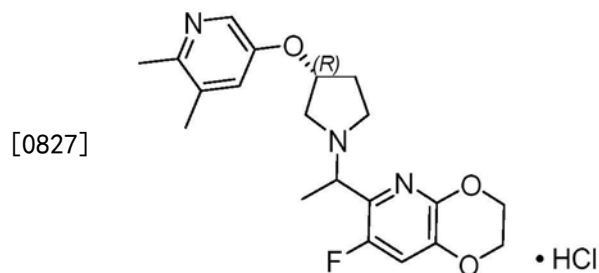
[0822] 使用中间体129和中间体144作为起始材料,按照与针对产物125的合成所述类似的程序来制备产物127。

[0823] E77. 产物128的制备



[0825] 使用中间体129和中间体140 • HCl作为起始材料,按照与针对产物125的合成所述类似的程序来制备产物128。

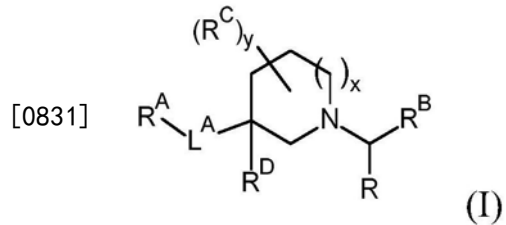
[0826] E78. 产物129的制备

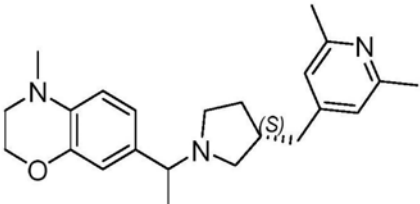
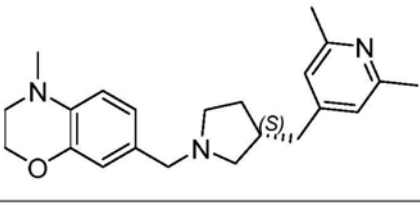
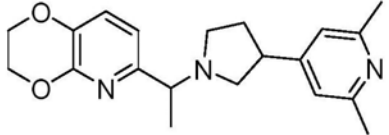
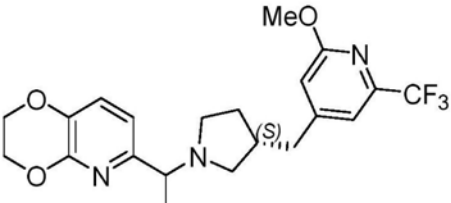
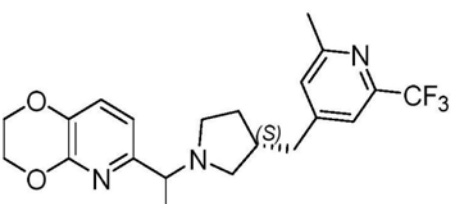


[0828] 使用中间体129和中间体142·HCl作为起始材料,按照与针对产物125的合成所述类似的程序来制备产物129。

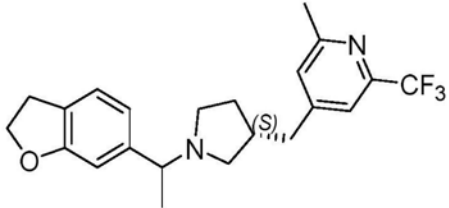
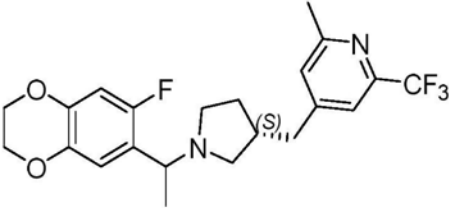
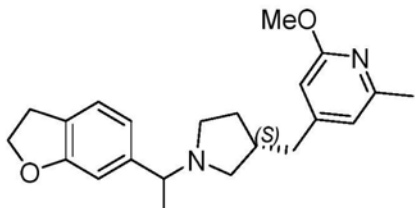
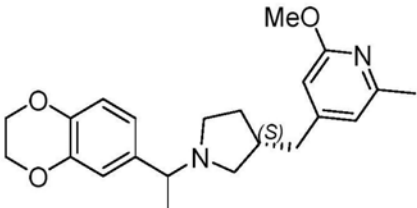
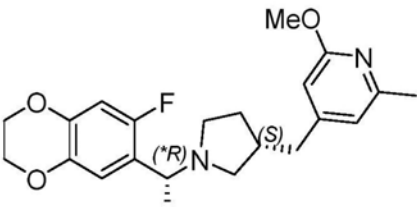
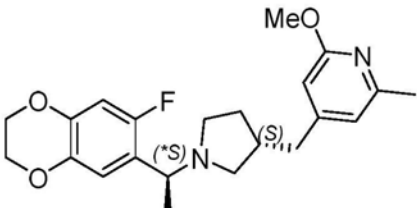
[0829] 以下化合物的制备遵循例示于实验部分的方法。在没有指明盐形式的情况下,该化合物作为游离碱获得。‘Ex.No.’是指合成该化合物所依据的方案的实例编号。‘Co.No.’意指化合物编号。

[0830] 表1

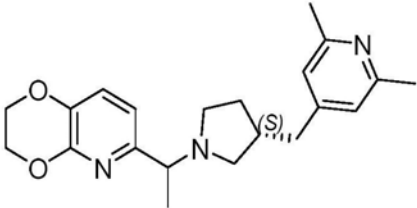
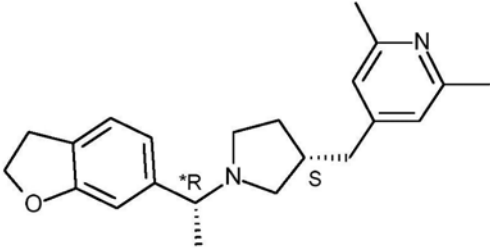
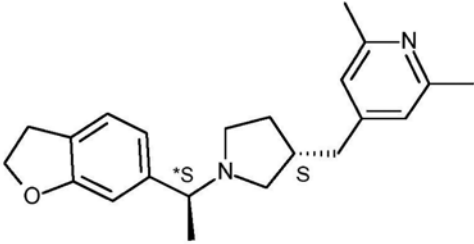
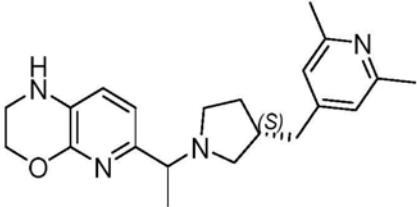
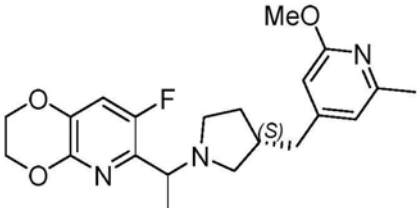


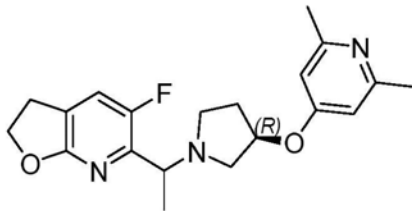
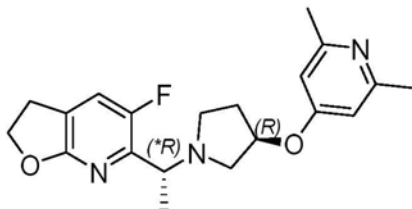
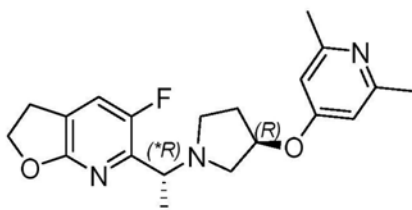
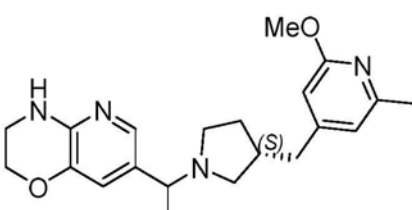
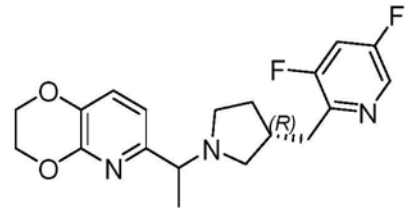
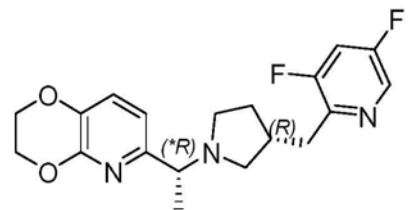
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E1	1		2HCl
E2	2		2HCl
E3	3		
E4	4		
E5	5		

[0832]

化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E6	6		
E7	7		
E8	8		
E9	9		
E10	10		
E10	11		

[0833]

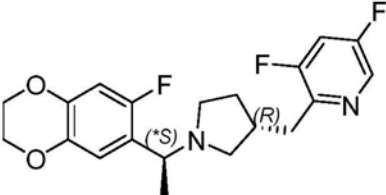
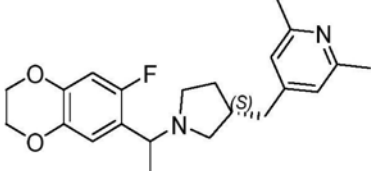
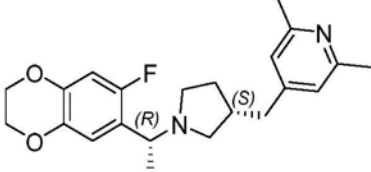
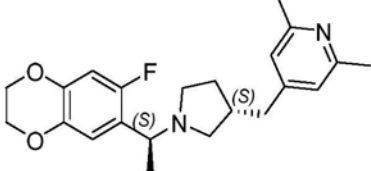
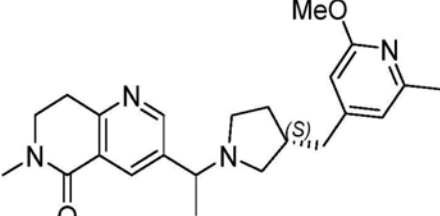
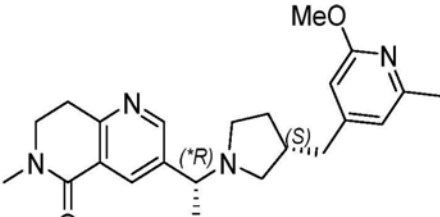
化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E11	12		
E12	13		
[0834] E12	14		
E13	15		
E14	16		

化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E15	17		2HCl
E15	18		2HCl
E15	19		2HCl
E16	20		
E17	21		
E17	22		

[0835]

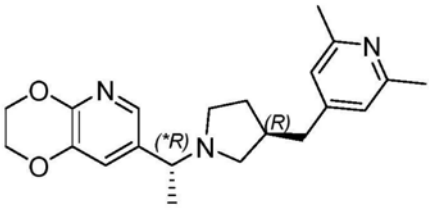
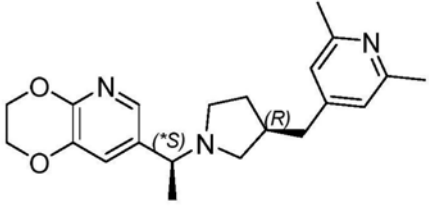
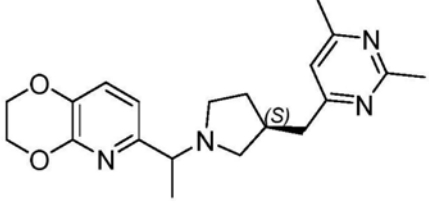
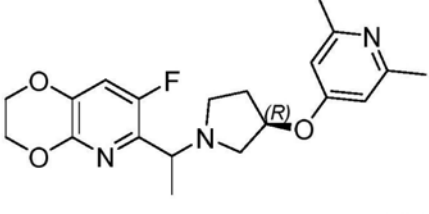
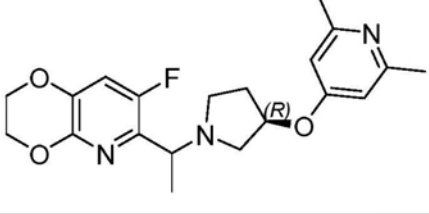
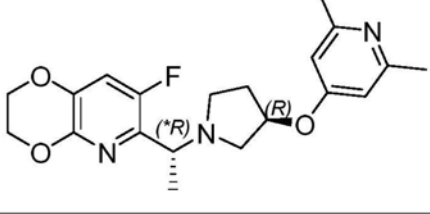
[0836]

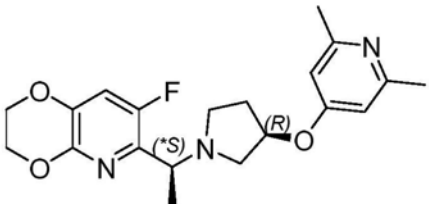
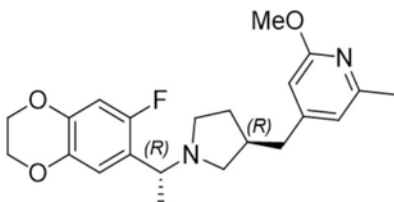
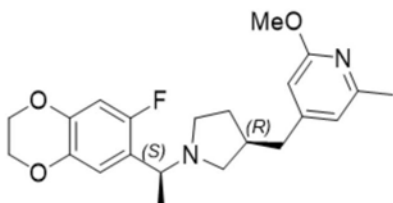
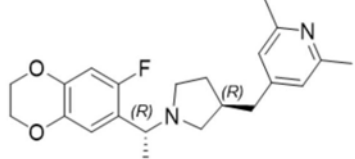
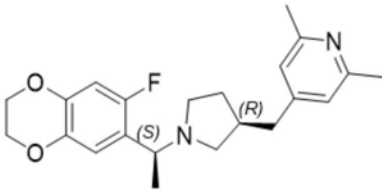
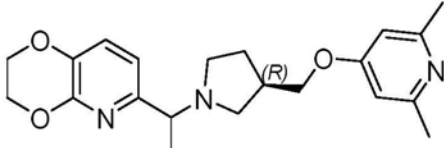
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E17	23		
E18	24		
E18	25		
E18	26		
E19	27		
E19	28		

化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E19	29		
E20	30		
E20	31		
E20	32		
E21	33		
E21	34		

[0837]

[0838]

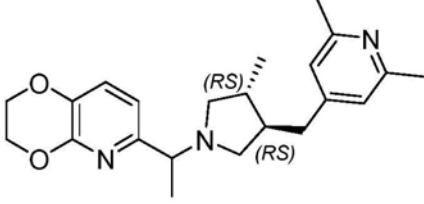
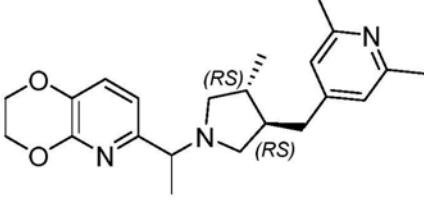
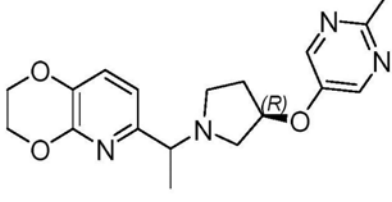
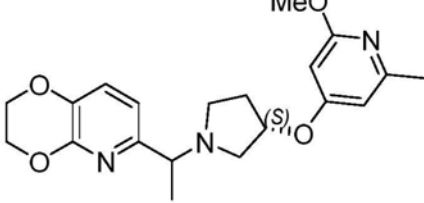
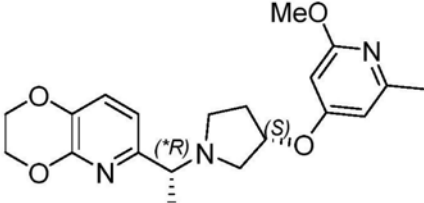
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E22	35		
E22	36		
E23	37		
E24	38		
E24	39		2HCl
E24	40		2HCl

化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E24	41		2HCl
E25	42		
[0839] E25	43		
E26	44		
E26	45		
E27	46		

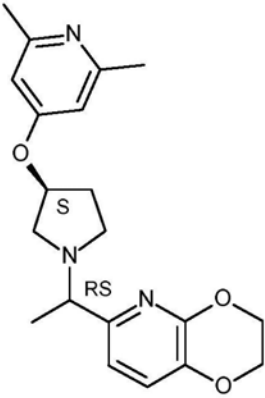
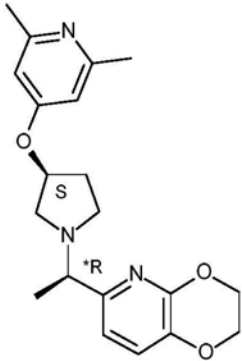
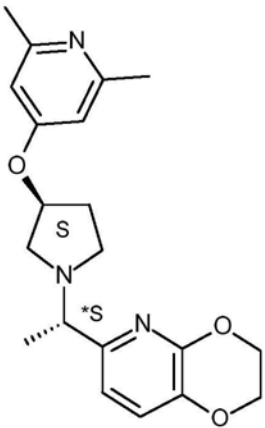
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E28	47		
E29	48		
E30	49		
[0840] E31	50		
E32	51		2HCl
E32	52		2HCl
E33	53		

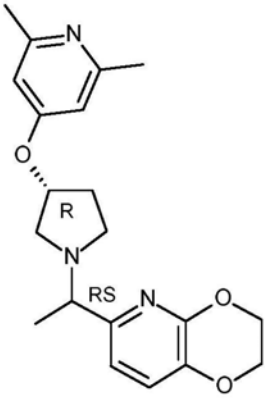
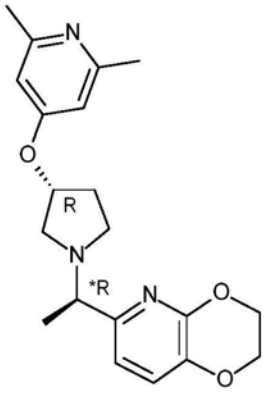
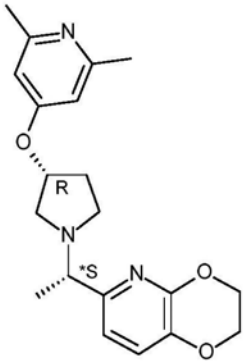
[0841]

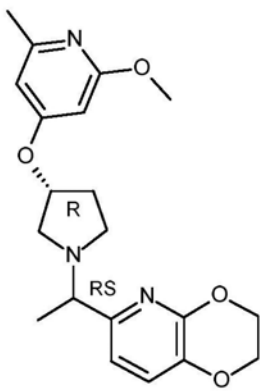
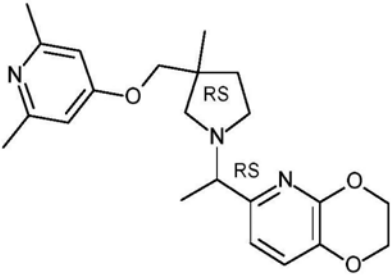
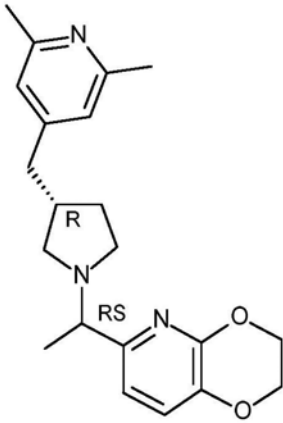
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E34	54		
E34	55		
E35	56		
E36	57		
E37	58		
E38	59		3HCl

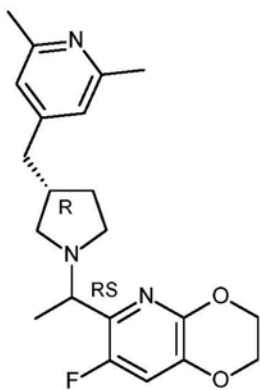
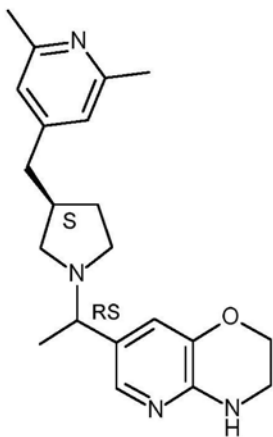
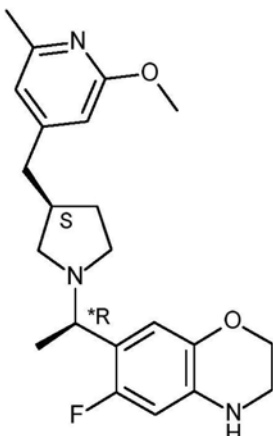
化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E39	60		
E40	61		3 HCl
E41	62		
E42	63		
E42	64		

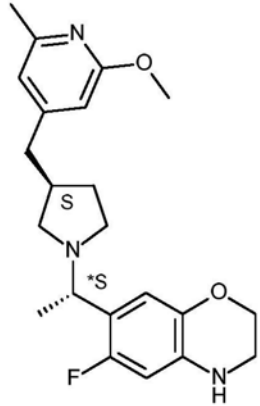
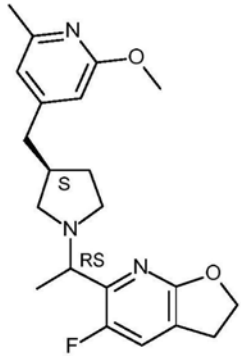
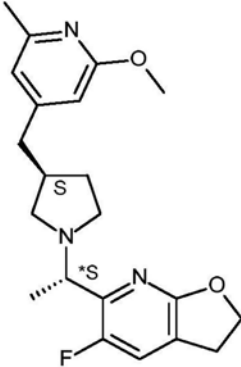
[0842]

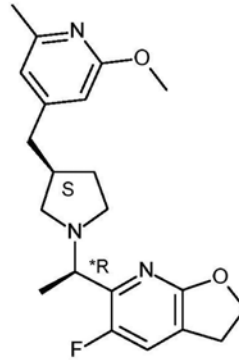
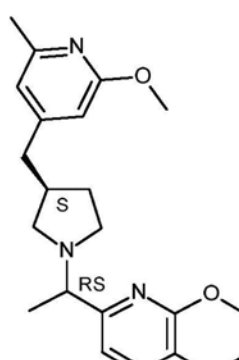
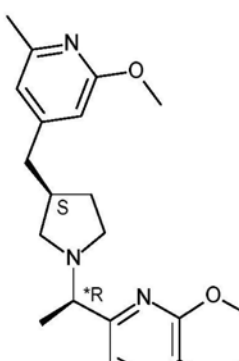
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
70	E48		
[0843] 71	E48		.2HCl
72	E48		.2HCl

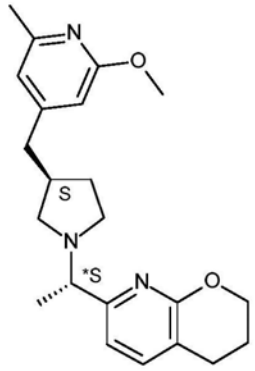
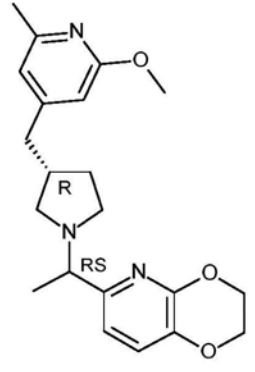
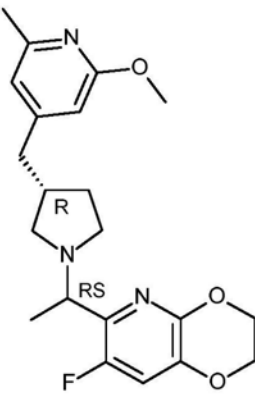
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
73	E49		
[0844] 74	E49		
75	E49		

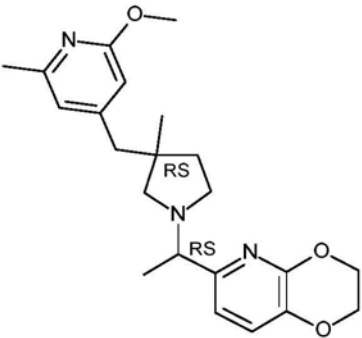
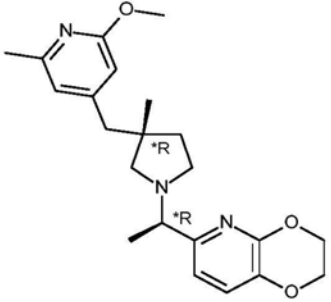
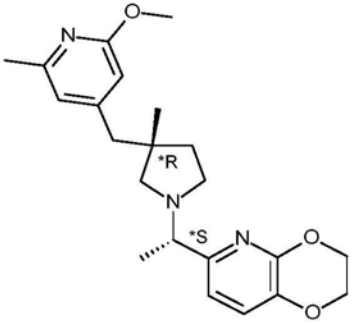
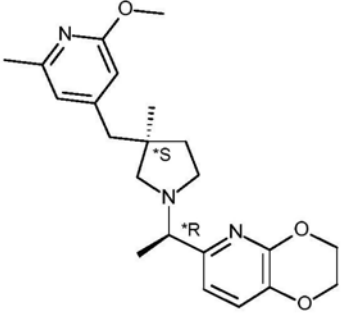
化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
76	E50		
[0845] 77	E51		
78	E52		

化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
79	E53		
[0846] 80	E54		
81	E55		

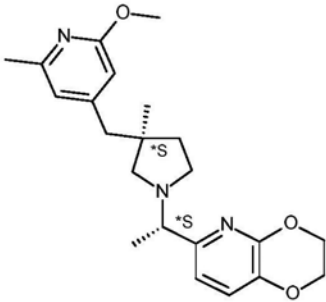
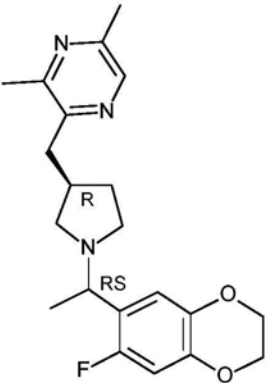
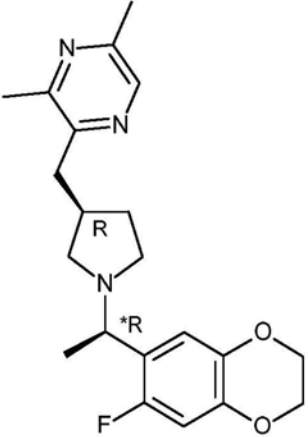
化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
82	E55		
[0847] 83	E56		
84	E56		

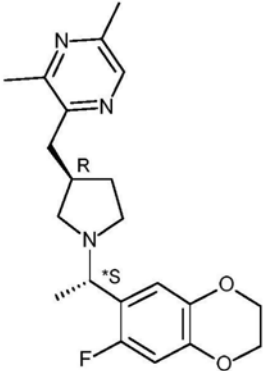
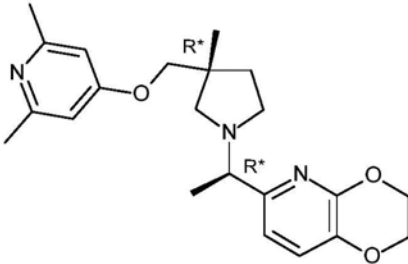
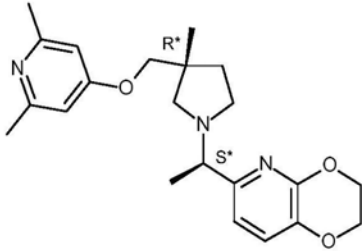
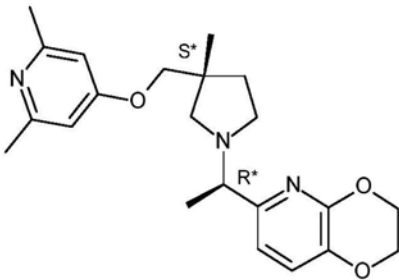
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
85	E56		
[0848] 86	E57		
87	E57		

化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
88	E57		
[0849] 89	E58		
90	E59		

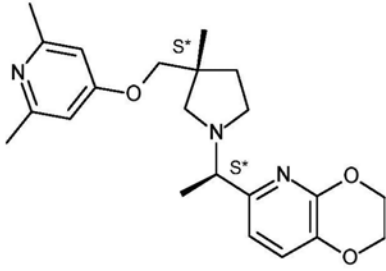
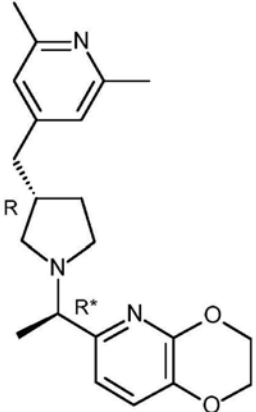
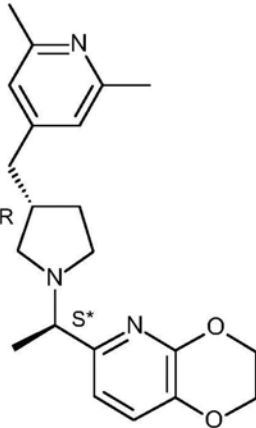
化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
91	E60		
92	E60		
93	E60		
94	E60		

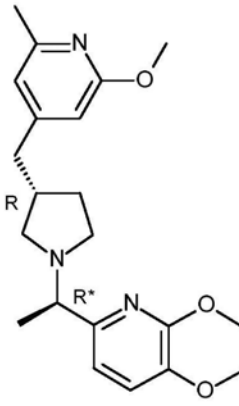
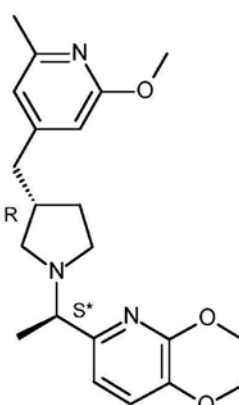
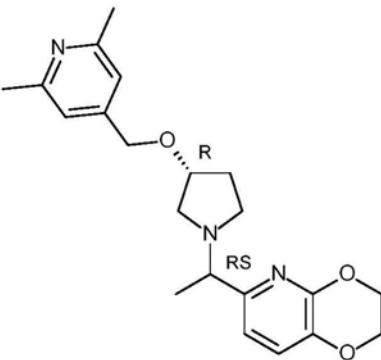
[0850]

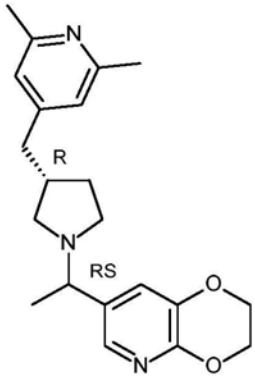
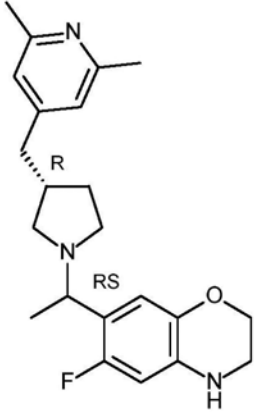
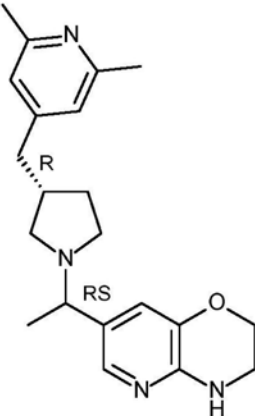
化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
95	E60		
[0851] 96	E61		
97	E61		

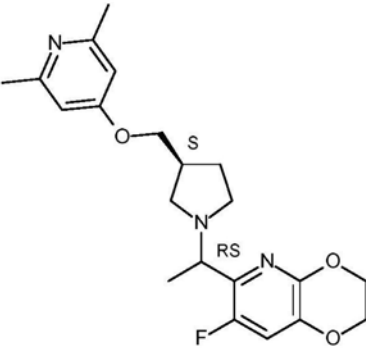
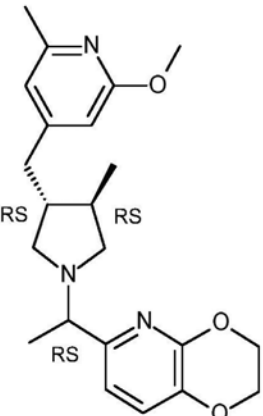
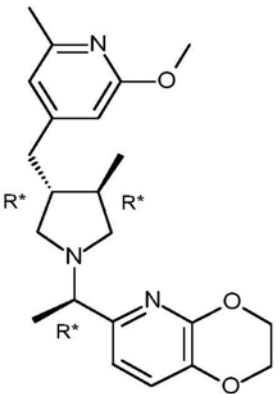
化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
98	E61		
100	E51		.3 HCl
101	E51		.3 HCl
102	E51		

[0852]

化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
103	E51		.3 HCl
[0853] 104	E52		.2 HCl
105	E52		.2 HCl

化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
106	E58		
[0854] 107	E58		
115	E68		

化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
116	E69		
[0855] 117	E70		
118	E71		

化合物 编号	实例 编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
119	E72		
[0856] 120	E73		
121	E73		

化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
122	E73		
[0857] 123	E73		
124	E73		

化合物编号	实例编号	具有式 (I) 的化合物	盐形式
E74	125		2HCl
E75	126		2HCl
[0858] E76	127		HCl
E77	128		HCl
E78	129		HCl

[0859] 如本文提供的化合物中的盐化学计量或酸含量的值是以实验方式获得的那些。通过¹H NMR综合分析和/或元素分析确定在本文中报道的盐酸的含量。

[0860] 分析部分

[0861] 熔点

[0862] 值是峰值,并且获得的值具有与这个分析方法通常相关的实验不确定性。

[0863] DSC823e (A):对于多种化合物,用DSC823e(梅特勒-托利多(Mettler-Toledo))装置来确定熔点。使用10°C/分钟的温度梯度来测量熔点。最高温度是300°C。值是峰值(A)。

[0864] 梅特勒-托利多MP50 (B):对于多种化合物,在梅特勒(Mettler)FP 81HT/FP90装置上在开管毛细管中确定熔点。用1°C/分钟、3°C/分钟、5°C/分钟或10°C/分钟的温度梯度对熔点进行测量。最高温度是300°C。从数字显示器读取熔点。

[0865] LCMS

[0866] 通用程序

[0867] 使用LC泵、二极管阵列(DAD)或UV检测器以及如在对应的方法中所指定的柱进行高效液相色谱法(HPLC)测量。如果必要的话,包括其他检测器(参见下文的方法表格)。

[0868] 将来自柱的流带至配置有大气压离子源的质谱仪(MS)。设置调谐参数(例如扫描范围、停留时间等)以便获得允许鉴定化合物的标称单一同位素分子量(MW)的离子和/或准确质量单一同位素分子量的离子在技术人员知识内。利用适当的软件进行数据采集。

[0869] 通过其实验保留时间(R_t)和离子描述化合物。如果未在数据表中不同地指定,那么报道的分子离子对应于 $[M+H]^+$ (质子化的分子)和/或 $[M-H]^-$ (去质子的分子)。在该化合物不是直接可电离的情况下,指定该加合物的类型(即 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+HCOO]^-$ 、 $[M+CH_3COO]^-$ 等)。对于具有多种同位素模式的分子(Br、Cl等)来说,报道的值是针对最低同位素质量获得的值。获得的所有结果具有通常与所使用的方法相关的实验不确定性。

[0870] 在下文中,“SQD”单四极检测器、“MSD”质量选择检测器、“QTOF”四极杆飞行时间、“rt”室温、“BEH”桥接的乙基硅氧烷/二氧化硅杂合物、“HSS”高强度二氧化硅、“CSH”带电的表面杂化、“UPLC”超高效液相色谱法、“DAD”二极管阵列检测。

[0871] 表2.LC-MS方法(以mL/min表示流速;以°C表示柱温(T);以min表示运行时间)。

[0872]

方法 代码	仪器	柱	流动相	梯度	流速 ----- 柱温	运行 时间
1	Waters: Acquity® IClass UPLC® -DAD和 Xevo G2-S QTOF	Waters: BEH C18 (1.7 μm, 2.1 x 50 mm)	A: 95% CH ₃ COONH 4 6.5 mM + 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	在4.6 min 内, 从95% A至5% A, 保持0.4 min	1 ----- 50	5
2	Agilent: HP1100-DA D, MSD G1956B	Agilent: Eclipse Plus C18 (3.5 μm, 2.1 x 30 mm)	A: 95% CH ₃ COONH 4 6.5 mM + 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	在5.0 min 内从95% A至0% A, 保持0.15 min, 在 0.15 min内 返回至 95% A, 保 持1.7 min	1 ----- 60	7
3	Waters: Acquity UPLC® - DAD和 Quattro Micro™	Waters: BEH C18 (1.7 μm, 2.1 x 100 mm)	A: 95% CH ₃ COONH 4 7 mM/5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	84.2% A保 持0.49 min, 在 2.18 min内 至10.5% A, 保持 1.94 min, 在0.73 min	0.343 ----- 40	6.2

[0873]

方法 代码	仪器	柱	流动相	梯度	流速 ----- 柱温	运行 时间
				内返回至 84.2% A, 保持0.73 min。		
4	Waters: Acquity [®] UPLC [®] -DAD和 SQD	Waters: BEH C18 (1.7 μm, 2.1 x 50 mm)	A: 95% CH ₃ COONH 4 6.5 mM + 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	在1.2 min 内从95% A至40% A, 在0.6 min内至 5% A, 保 持0.2 min	1 ----- 50	2
5	Agilent: 1100-DAD 和MSD	YMC: Pack ODS-AQ(3 μm, 4.6 x 50 mm)	A: 在水中的 HCOOH 0.1%, B: CH ₃ CN	在4.8 min 内95% A 至5% A, 保持1 min, 在0.2 min内返回 至95% A。	2.6---- -- 35	6
6	Agilent 1260 Infinity DAD TOF-LC/MS G6224A	YMC-pack ODS-AQ C18 (50 x 4.6 mm, 3 μm)	A: 0.1% HCOOH在 H ₂ O中 B: CH ₃ CN	在4.8 min 内从95% A至5% A, 保持1.0 min, 在0.2 min内至 95% A。	2.6 ----- 35	6.8
7	Waters: Acquity [®] UPLC [®] -DAD和 SQD	Waters: BEH C18 (1.7 μm, 2.1 x 50 mm)	A: 95% CH ₃ COONH 4 6.5 mM + 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	在2.0 min 内, 从95% A至5% A, 保持0.5 min	0.8 ----- 50	2.5

方法 代码	仪器	柱	流动相	梯度	流速 ----- 柱温	运行 时间
[0874] 8	Waters: Acquity [®] IClass UPLC [®] -DAD和 SQD	Agilent: RRHD (1.8 μm , 2.1 x 50 mm)	A: 95% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 6.5 mM + 5% CH_3CN , B: CH_3CN	在2.0 min 内从95% A至5% A, 保持0.5 min	0.8 ----- -- 50	2.5
9	Waters: Acquity [®] UPLC [®] -DAD和 SQD	Waters: BEH C18 (1.7 μm , 2.1 x 50 mm)	A: 95% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 6.5 mM + 5% CH_3CN , B: CH_3CN	在4.5 min 内从95% A至5% A, 保持0.5 min	0.8 ----- ----- 50	S605 3S60 06

[0875] 表3. 分析数据-熔点 (M.p.) 和LCMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 意指该化合物的游离碱的质子化质量, $[\text{M}-\text{H}]^-$ 意指该化合物的游离碱的去质子质量或指定的加合物的类型 ($[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$)。R_t 意指保留时间 (以min计)。

[0876] 对于一些化合物, 确定准确质量。

化合物 编号	熔点 (°C)	$[\text{M}+\text{H}]^+$	R _t	LCMS 方法
70	未确定	356	1.64	1
71	未确定	356	1.23	1
72	未确定	356	1.26	1
73	未确定	356	1.30/1.34	1
74	未确定	356	2.16	3
75	未确定	356	2.15	3
[0877] 76	未确定	372	1.70	1
77	未确定	384	2.20	1
78	未确定	354	1.05	1
79	未确定	372	1.31	1
80	未确定	353	1.03/1.06	1
81	未确定	386	1.05	7
82	未确定	386	1.08	7
83	未确定	372	2.48	3

[0878]

化合物 编号	熔点 (°C)	[M+H] ⁺	R _t	LCMS 方法
84	未确定	372	2.52	3
85	未确定	372	2.50	3
86	未确定	368	2.38	3
87	未确定	368	2.38	3
88	未确定	368	2.38	3
89	未确定	370	2.26	3
90	未确定	388	1.68	1
91	未确定	384	2.55	3
92	未确定	384	2.56	3
93	未确定	384	2.54	3
94	未确定	384	2.54	3
95	未确定	384	2.54	3
96	未确定	372	2.39/2.43	3
97	未确定	372	2.38	3
98	未确定	372	2.42	3
100	未确定	384	1.33	1
101	未确定	384	1.34	1
102	未确定	384	2.22	3
103	未确定	384	1.34	1
104	未确定	354	1.93	3
105	未确定	354	1.93	3
106	未确定	370	2.27	3
107	未确定	370	2.26	3
115	未确定	370	1.18	1
116	未确定	354	1.17/1.21	1
117	未确定	370	1.25/1.28	1
118	未确定	353	0.97/1.00	1
119	未确定	388	1.38	1
120	未确定	384	1.53	1
121	未确定	384	2.44	3
122	未确定	384	2.45	3
123	未确定	384	2.43	3
124	未确定	384	2.45	3
45	未确定	371.2	1.79	1

[0879]

化合物 编号	熔点 (°C)	[M+H] ⁺	R _t	LCMS 方法
1	297.50°C (A)	366.1	2.68	2
2	未确定	352	2.46	2
3	未确定	340.2	1.16	1
4	未确定	424.19	2.12	1
4	未确定	424.2	2.11	1
5	未确定	408.19	1.67	1
6	未确定	391.2000/3 91.1997	2.25/2.32	1
7	未确定	425.1866/4 25.1867	2.62/2.70	1
8	未确定	353	1.95/1.98	1
9	未确定	370.2	1.33	1
9	未确定	370	0.93	7
10	未确定	387	2.33	1
11	未确定	387	2.39	1
12	未确定	354.2	1.09	1
13	未确定	337.2	1.56	1
14	未确定	337.2	1.6	1
15	未确定	351.2	0.86	1
16	未确定	388.2	1.17	8
17	未确定	358.3	1	7
18	未确定	358.3	0.99	7
18	未确定	358.2 418.4 M+ (CH ₃ COO)-	2.39	3
19	未确定	358.3	1	7
19 游 离碱	未确定	358.2 418.3 M+ (CH ₃ COO)-	2.39	3
20	未确定	369.2	1.33, 1.36	1
21	未确定	362	2.12	3
21	未确定	362.2	1.25	1
22	未确定	362	2.12	3

[0880]

化合物 编号	熔点 (°C)	[M+H] ⁺	R _t	LCMS 方法
23	未确定	362	2.12	3
24	未确定	355	1.8	3
24	未确定	355.2	0.97, 0.99	1
25	未确定	355	1.79	3
26	未确定	355	1.78	3
27	未确定	379	2.87, 2.92	3
27	未确定	379.2	2.04, 2.08	1
28	未确定	379 439.8 [M+CH ₃ C OO]-	2.87	3
29	未确定	379 439.3 [M+CH ₃ C OO]-	2.92	3
30	未确定	371.2	1.77/1.84	1
32	未确定	371.2	1.84	1
33	未确定	395.2	1.44-1.48	1
34	未确定	395.2	1.44	1
35	未确定	354.2	1.23	1
36	未确定	354.2	1.17	1
37	未确定	355.2	0.81	1
39	未确定	374.2	1.57/1.59	1
38	未确定	374.2	1.55/1.58	1
40	未确定	374.2	1.57	1
31	未确定	371.2	1.78	1
41	未确定	374.2	1.56	1
42	未确定	387.2	2.29	1
43	未确定	387.2	2.23	1
44	未确定	371.2	1.82	1
46	未确定	370.1	2.01	3
46	未确定	370.2	1.1	1
47	未确定	370.2	1.09	1
48	未确定	386.2	1.46	1
49	未确定	370.2	1.19	1

[0881]

化合物 编号	熔点 (°C)	[M+H] ⁺	R _t	LCMS 方法
50	未确定	388.2	1.39	1
51	未确定	372.2	1.32	1
51 游离碱	未确定	372.2	1.32	1
51 游离碱	未确定	372.1 432.3 [M+CH ₃ C OO]-	2.17	3
52 游离碱	未确定	372.2	1.32	1
52	未确定	372.2	1.31	1
52 游离碱	未确定	372.1 431.6 [M+CH ₃ C OO]-	2.18	3
53	未确定	372.21	1.66/1.68	9
54	未确定	354.2	1.37	1
55	未确定	354.16	1.42	1
56	未确定	342.2	1.3	1
57	未确定	360.2	1.6	1
58	未确定	368.2	1.2825	1
59	未确定	368.2	1.27	1
60	未确定	368.2	1.24	1
61	未确定	368.2	1.21	1
62	未确定	343.2	1.03/1.05	1
63	未确定	372.2	1.67-1.70	1
64	未确定	372	1.69	1
125	未确定	360.2	1.51 和 1.52	1
125 游离碱	未确定	360.2	1.53 和 1.54	1
126	未确定	375.2	1.83	1
127	未确定	414.1	2.19 和 2.20	1
128	未确定	375.2	1.57	1

化合物编号	熔点 (°C)	[M+H] ⁺	R _t	LCMS方法
[0882] 128 游离碱	未确定	375.2	1.64	1
129	未确定	374.2	1.75	1
129 游离碱	未确定	374.2	1.74	1

[0883] 旋光度

[0884] 在具有钠灯的铂金-埃尔默 (Perkin-Elmer) 341旋光计上测量旋光度并且报道如下: $[\alpha]^\circ (\lambda, c \text{ g}/100\text{ml}, \text{溶剂}, T^\circ\text{C})$ 。

[0885] $[\alpha]_\lambda^T = (100\alpha) / (l \times c)$: 其中 l 是以 dm 计的路径长度并且 c 是针对在温度 T ($^\circ\text{C}$) 和波长 λ (以 nm 计) 下的样品的以 $\text{g}/100\text{ml}$ 计的浓度。如果所使用的光波长是 589nm (钠D线), 那么可以改为使用符号 D 。始终应给出旋转符号 (+或-)。当使用这一方程式时, 常常在旋转后的括号中提供浓度和溶剂。使用度报道旋转并且浓度不带单位地给出 (将其假定为 $\text{g}/100\text{mL}$)。

[0886] 表4. 旋光度数据

化合物编号	α_D ($^\circ$)	波长 (nm)	浓度 w/v%	溶剂	温度 ($^\circ\text{C}$)
[0887] 2	+0.8 $^\circ$	589	0.54	MeOH	20

[0888] SFCMS-方法

[0889] 用于SFC-MS方法的通用程序

[0890] 使用分析型超临界流体色谱法 (SFC) 系统来进行SFC测量, 该系统由以下构成: 用于递送二氧化碳 (CO_2) 和改性剂的二元泵、自动进样器、柱温箱、配备有经得起400巴的高压流动池的二极管阵列检测器。如果配置有质谱仪 (MS), 来自该柱的流被引至该 (MS)。设置调谐参数 (例如扫描范围、停留时间等) 以便获得允许鉴定化合物的标称单一同位素分子量 (MW) 的离子在技术人员的技术内。利用适当的软件进行数据采集。

[0891] 表5. 分析型SFC-MS方法 (以 mL/min 表示流速; 以 $^\circ\text{C}$ 表示柱温 (T); 以分钟表示运行时间; 以巴表示背压 (BPR))。

方法 代码	柱	流动相	梯度	流速 ----- 柱温	运行 时间 ----- BPR
1	Daicel Chiralpak® AD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	20% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
2	Daicel Chiralpak® AD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	20% B保 持4 min,	3.5 ----- 35	4 ----- 103
3	Daicel Chiralpak® AD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	10% B保 持6 min,	3.5 ----- 35	6 ----- 103
4	Daicel Chiralpak® AD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	15% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
5	Daicel Chiralpak® AD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	20% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
6	Daicel Chiralpak® AD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	10% B保 持6 min,	3.5 ----- 35	6 ----- 103
7	Daicel Chiralpak® AD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	15% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103

[0892]

[0893]

方法 代码	柱	流动相	梯度	流速 ----- 柱温	运行 时间 ----- BPR
8	Daicel Chiralcel® OJ-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	10% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
9	Daicel Chiralcel® OJ-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	20% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
10	Daicel Chiralcel® OJ-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	25% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
11	Daicel Chiralcel® OJ-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	10% B保 持6 min,	3.5 ----- 35	6 ----- 103
12	Daicel Chiralcel® OJ-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	20% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
13	Daicel Chiralcel® OJ-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	25% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
14	Daicel Chiralpak® IC-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	40% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
15	Daicel Chiralpak® IC-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	50% B保 持6 min,	3.5 ----- 35	6 ----- 103
16	Daicel	A: CO ₂	20% B保	3.5	3

方法 代码	柱	流动相	梯度	流速 ----- 柱温	运行 时间 ----- BPR
	Chiralcel® OD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	持3 min,	----- 35	----- 103
17	Phenomenex Lux纤维素4柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	30% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
18	Phenomenex Lux纤维素4柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	30% B保 持6 min,	3.5 ----- 35	6 ----- 103
[0894] 19	Daicel Chiralpak® IC-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	30% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
20	Daicel Chiralpak® AD-3柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	10% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 -----1 03
21	Daicel Chiralcel® OJ-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	30% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
22	Daicel Chiralcel® OJ-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	15% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
23	Daicel Chiralpak® IG-3 柱 (3 μm, 100 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH (+ 0.3% iPrNH ₂)	30% B保 持3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103

[0895] 表6. 分析型SFC数据-R_t意指保留时间(以分钟计), [M+H]⁺意指该化合物的质子化质量, 方法是指用于对映异构体纯的化合物的(SFC)MS分析的方法。

[0896]

化合物编号	R _t	[M+H] ⁺	UV 面积%	方法	异构体洗脱顺序
71	1.05	356	100	9	A
72	1.50	356	100	9	B
74	0.79	356	100	1	A
75	0.94	356	100	1	B
84	1.02	372	100	12	A
85	1.25	372	99.3	12	B
86	0.95	368	100	5	A
87	2.00	368	99.1	5	B
92	2.63	384	90.6	6	A
93	3.15	384	98.6	6	B
94	1.38	384	98.4	8	A
95	1.70	384	97	8	B
97	1.11	372	100	4	A
98	1.61	372	100	4	B
100	1.40	384	100	13	A
101	1.83	384	100	13	B
102	1.46	384	100	17	A
103	1.60	384	98.9	17	B
104	1.28	354	100	4	A
105	1.42	354	95.2	4	B
106	2.38	370	100	3	A
107	2.69	370	94	3	B
121	0.97	384	100	12	A
122	1.64	384	100	19	A
123	1.94	384	100	19	B
124	1.55	384	100	12	B
27	0.98, 1.36	379	46.43, 53.57	20	20
24	0.99, 1.53	355	49.79, 50.21	20	
21	0.92, 1.60	362	52.01, 47.99	13	
28	0.98	379	100.00	20	A

化合物编号	R _t	[M+H] ⁺	UV 面积%	方法	异构体洗脱顺序
29	1.36	379	99.06	20	B
25	0.99	355	100.00	21	A
26	1.53	355	100.00	21	B
23	0.93	362	100.00	13	A
[0897] 22	1.63	362	99.89	13	B
46	1.26, 1.89	370	50.24, 49.76	21	
52 游离碱	0.87	372	100.00	22	A
51 游离碱	1.13	372	99.14	22	B
18 游离碱	1.23	358	100.00	23	A
19 游离碱	1.60	358	100.00	23	B

[0898] NMR

[0899] 对于多种化合物,在具有300MHz超屏蔽磁体的Bruker Avance III上,在以400MHz操作的Bruker DPX-400光谱仪上,在以500MHz操作的Bruker Avance I上,在以360MHz操作的Bruker DPX-360上,或在以600MHz操作的Bruker Avance 600光谱仪上,使用氘仿-d (氘化的氯仿,CDCl₃) 或DMSO-d₆ (氘化的DMSO,二甲基-d₆亚砜) 作为溶剂记录¹H NMR谱。化学位移(δ)被报告为相对于四甲基硅烷(TMS) (用作内部标准)的百万分率(ppm)。

[0900] 表6. ¹H NMR结果

化合物编号	¹ H NMR 结果
[0901] 125	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 1.57 (dd, <i>J</i> = 6.36, 4.74 Hz, 3 H) 2.04 - 2.42 (m, 2 H) 2.68 (s, 4 H) 3.17 - 3.37 (m, 1 H) 3.60 - 4.23 (m, 2 H) 4.23 - 4.62 (m, 4 H) 4.86 (br dd, <i>J</i> = 12.25, 6.01 Hz, 1 H) 5.30 - 5.66 (m, 1 H) 7.12 - 7.87 (m, 3 H) 8.64 (d, <i>J</i> = 6.94 Hz, 2 H) 11.07 - 11.96 (m, 1 H) 15.08 - 16.14 (m, 1 H)
128	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 1.48 - 1.64 (m, 3 H) 2.05 - 2.32 (m, 1 H) 2.53 (br d, <i>J</i> = 3.01 Hz, 3 H) 2.60 - 2.72 (m, 3 H) 3.18 - 3.67 (m, 4 H) 4.26 - 4.52 (m, 5 H) 4.72 - 4.90 (m, 1 H) 5.56 - 5.74 (m, 1 H) 6.79 - 7.05 (m, 1 H) 7.43 - 7.63 (m, 1 H) 11.07 - 11.66 (m, 1 H)

化合物编号	¹ H NMR 结果
62	¹ H NMR (500 MHz, 氯仿- <i>d</i>) δ ppm 1.37 - 1.43 (m, 3 H) 1.91 - 2.02 (m, 1 H) 2.26 - 2.36 (m, 1 H) 2.42 - 2.99 (m, 7 H) 3.37 - 3.46 (m, 1 H) 4.22 - 4.28 (m, 2 H) 4.41 - 4.46 (m, 2 H) 4.76 - 4.88 (m, 1 H) 6.93 - 7.02 (m, 1 H) 7.12 - 7.20 (m, 1 H) 8.13 - 8.33 (m, 2 H)
57	¹ H NMR (400 MHz, 氯仿- <i>d</i>) δ ppm 1.47 (dd, <i>J</i> = 6.70, 3.70 Hz, 3 H) 1.84 - 2.01 (m, 1 H) 2.17 - 2.34 (m, 1 H) 2.47 (d, <i>J</i> = 2.08 Hz, 3 H) 2.50 - 2.78 (m, 2 H) 2.83 - 2.94 (m, 1 H) 2.98 - 3.25 (m, 1 H) 3.92 - 4.05 (m, 1 H) 4.12 - 4.32 (m, 2 H) 4.35 - 4.47 (m, 2 H) 4.69 - 4.83 (m, 1 H) 6.96 (d, <i>J</i> = 9.02 Hz, 1 H) 7.00 - 7.09 (m, 2 H) 8.10 (dt, <i>J</i> = 12.72, 1.85 Hz, 1 H)
[0902] 40	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ ppm 1.56 (br d, <i>J</i> = 6.47 Hz, 3 H) 2.05 - 2.44 (m, 2 H) 2.65 (br s, 6 H) 3.45 - 3.62 (m, 2 H) 3.65 - 4.08 (m, 2 H) 4.28 - 4.65 (m, 4 H) 4.86 (br s, 1 H) 5.23 - 5.71 (m, 1 H) 7.12 - 7.41 (m, 2 H) 7.58 (br d, <i>J</i> = 9.48 Hz, 1 H) 11.00 - 1.88 (m, 1 H) 14.90 - 15.70 (m, 1 H)
52	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ ppm 1.54 (d, <i>J</i> = 6.65 Hz, 3 H) 1.58 - 1.64 (m, 1 H) 1.65 - 1.78 (m, 1 H) 1.94 - 2.08 (m, 1 H) 2.64 - 2.85 (m, 1 H) 2.86 - 3.07 (m, 2 H) 3.23 - 3.37 (m, 2 H) 3.54 - 3.65 (m, 1 H) 4.29 - 4.39 (m, 2 H) 4.41 - 4.54 (m, 2 H) 4.74 (dq, <i>J</i> = 14.21, 6.92, 6.92, 6.92, 6.92, Hz, 1 H) 7.54 (br d, <i>J</i> = 1.44 Hz, 1 H) 7.53 - 7.66 (m, 2 H) 10.66 - 10.99 (m, 1 H) 15.47 - 15.99 (m, 1 H)
50	¹ H NMR (500 MHz, 氯仿- <i>d</i>) δ ppm 1.36 - 1.49 (m, 3 H) 1.49 - 1.56 (m, 1 H) 1.94 - 2.08 (m, 1 H) 2.28 - 2.41 (m, 3 H) 2.45 (s, 6 H) 2.51 (br s, 1 H) 2.56 - 2.68 (m, 1 H) 2.68 - 2.84 (m, 2 H) 2.94 (br d, <i>J</i> = 6.94 Hz, 3 H) 4.18 - 4.29 (m, 2 H) 4.40 (br dd, <i>J</i> = 3.47, 2.02 Hz, 2 H) 6.46 (s, 2 H) 6.94 (br d, <i>J</i> = 9.25 Hz, 1 H) 6.95 (br d, <i>J</i> = 9.25 Hz, 1 H)

[0903] 药理学实例

[0904] 1) OGA-生化测定

[0905] 该测定基于重组人脑膜瘤表达的抗原5 (MGEA5) (也称为O-GlcNAc酶 (OGA)) 对荧光素单-β-D-N-乙酰基-葡糖胺 (FM-GlcNAc) (Mariappa等人, 2015, Biochem J [生物化学杂志] 470:255) 的水解的抑制。水解FM-GlcNAc (马克基因技术公司 (Marker Gene technologies), 目录号M1485) 导致β-D-N-葡糖胺乙酸盐和荧光素的形成。后者的荧光可以在485nm的激发波长和538nm的发射波长下测量。酶活性的增加导致荧光信号的增加。在定向基因公司 (OriGene) (目录号TP322411) 购买全长OGA酶。将酶在-20℃下储存在25mM Tris.HCl, pH 7.3, 100mM甘氨酸, 10%甘油中。作为参考化合物测试Thiamet G和GlcNAcStatin (Yuzwa等人, 2008 Nature Chemical Biology [自然化学生物学] 4:483; Yuzwa等人, 2012 Nature Chemical Biology [自然化学生物学] 8:393)。该测定在补充有0.005%吐温-20的200mM柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液中进行。将35.6g Na₂HPO₄·2 H₂O (西格玛公

司(Sigma),#C0759)溶于1L水中,以得到200mM溶液。将19.2g柠檬酸(默克公司,#1.06580)溶于1L水中,以得到100mM溶液。将磷酸钠溶液的pH用柠檬酸溶液调节至7.2。用于终止反应的缓冲液由500mM碳酸盐缓冲液(pH 11.0)组成。将734mg FM-GlcNAc溶于5.48mL DMSO中,以得到250mM溶液,并储存在-20℃。OGA以2nM浓度使用,并且FM-GlcNAc以100uM最终浓度使用。在测定缓冲液中制备稀释液。

[0906] 将50nl溶于DMSO中的化合物分配到黑色Proxiplate™ 384Plus测定板(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer),#6008269)上,随后添加3μl f1-OGA酶混合物。将板在室温下预孵育60min,然后添加2μl FM-GlcNAc底物混合物。最终的DMSO浓度不超过1%。将板以1000rpm短暂离心1min,并在室温下孵育6h。为了终止反应,添加5μl终止缓冲液,并将板以1000rpm再次离心1min。在赛默科技公司(Thermo Scientific)Fluoroskan Ascent或珀金埃尔默公司EnVision中定量荧光,激发波长为485nm,发射波长为538nm。

[0907] 对于分析,通过最小平方和方法拟合最佳拟合曲线。由此获得IC₅₀值和希尔系数。高对照(无抑制剂)和低对照(标准抑制剂的饱和浓度)用于定义最小值和最大值。

[0908] 2) OGA-细胞测定

[0909] 在杨森公司(Janssen)建立了可诱导P301L突变型人Tau(同种型2N4R)的HEK293细胞。Thiamet-G用于板验证(高对照)和作为参考化合物(参考EC₅₀测定验证)。通过如前所述使用检测O-GlcN酰化残基的单克隆抗体(CTD110.6;细胞信号传导公司(Cell Signaling),#9875)对O-GlcN酰化蛋白进行免疫细胞化学(ICC)检测来评估OGA抑制(Dorfmüller等人,2010 Chemistry&biology[化学与生物学],17:1250)。OGA的抑制将导致O-GlcN酰化蛋白水平的增加,导致实验中的信号增加。细胞核用Hoechst染色以提供细胞培养物质量对照和粗略估计的即时化合物毒性(如果有的话)。ICC图片用珀金埃尔默公司Opera Phenix平板显微镜成像,并用提供的软件珀金埃尔默公司Harmony4.1进行定量。

[0910] 按照标准程序,将细胞在DMEM高葡萄糖(西格玛公司,#D5796)中繁殖。细胞测定前2天将细胞分开,计数并接种于聚-D-赖氨酸(PDL)包被的96孔(葛莱娜公司(Greiner),#655946)平板(细胞密度为12,000个细胞/cm²(4,000个细胞/孔))的100μl测定培养基中(低葡萄糖培养基用于降低GlcN酰化的基础水平)(Park等人,2014 The Journal of biological chemistry[生物化学杂志]289:13519)。在化合物测试当天,从测定板中取出培养基并用90μl新鲜测定培养基补充。将10μl的10倍终浓度的化合物添加至孔中。在细胞孵育箱中孵育6小时之前不久将板离心。DMSO浓度设定为0.2%。通过施加真空丢弃培养基。为了细胞染色,除去培养基,并且用100μl D-PBS(西格玛公司,#D8537)洗涤细胞一次。从下一步开始,除非另有说明,否则测定体积总是50μl,并且在没有搅拌和室温下进行孵育。将细胞在50μl 4%多聚甲醛(PFA,阿法埃莎公司(Alpha aesar),#043368)PBS溶液中在室温下固定15分钟。然后弃去PFA PBS溶液并在10mM Tris缓冲液(生命技术公司(LifeTechnologies),#15567-027)、150mM NaCl(生命技术公司(LifeTechnologies),#24740-0110)、0.1%Triton X(阿法埃莎公司,#A16046)(pH 7.5(ICC缓冲液))中洗涤细胞一次,之后在相同缓冲液中透化10分钟。随后将样品在含有5%山羊血清(西格玛公司,#G9023)的ICC中在室温下封闭45-60分钟。然后将样品与第一抗体(来自商业提供者的1/1000,参见上文)在4℃下孵育过夜,并且随后在ICC缓冲液中洗涤3次,持续5分钟。将样品与第二荧光抗体(1/500稀释,生命技术公司,#A-21042)一起孵育,并用在ICC(生命技术公

司, #H3570) 中终浓度为1 μ g/ml的Hoechst 33342进行细胞核染色1小时。在分析之前, 将样品在ICC碱缓冲液中手动洗涤2次, 持续5分钟。

[0911] 使用珀金埃尔默公司Phenix Opera使用水20x物镜并每孔记录9个视野进行成像。在488nm处的强度读数用作孔中总蛋白质的O-GlcN酰化水平的量度。为了评估化合物的潜在毒性, 使用Hoechst染色计数细胞核。使用参数非线性回归模型拟合计算IC₅₀值。作为最大抑制, 在每个平板上存在200 μ M浓度的Thiamet G。另外, 在每个板上计算Thiamet G的浓度应答。

[0912] 表7. 生化测定和细胞测定中的结果。

[0913]

化合物 编号	酶法 hOGA; pIC ₅₀	酶法 E _{max} (%)	细胞 hOGA; pEC ₅₀	细胞 E _{max} (%)
1	5.7	85		
2	5.21	61		
3	6.3	99		
4	7.0	103		
5	6.9	100	6	45
6	7.1	103	< 6	47
7	7.7	102	6.4	79
8	6.9	101	6.1	58
9	6.9	100	6.1	51
10	5.8	88	< 6	-5
11	7.6	102	6.7	83
12	6.8	101		
13	6.0	91		
14	7.3	103	6.9	74

[0914]

化合物 编号	酶法 hOGA; pIC ₅₀	酶法 E _{max} (%)	细胞 hOGA; pEC ₅₀	细胞 E _{max} (%)
15	6.3	95	< 6	45
16	7.7	102	6.9	89
17	8.6	101	7.7	77
18	6.8	98	6.0	42
19	8.8	97	7.73	94
20	7.1	101	6.3	61
21	6.2	94		
22	< 5	32		
23	6.4	97		
24	6.6	101		
25	6.8	100		
26	< 5	35		
27	6.9	102		
28	5.3	67		
29	7.3	102	< 6	35
30	7.7	102		
31	6.2	96		
32	7.8	101	6.9	72
33	6.9	102		
34	5.1	58		
35	5.1	54	< 6	-6
36	6.7	99	< 6	15
37	6.6	96	< 6	14
38	7.7	98	6.5	69
39	8.0	100	6.6	74
40	8.1	100	6.8	84
41	5.8	87	< 6	-13
42	6.0	93		
43	7.8	102	6.4	68
44	6.6	99		
45	8.3	101	7.0	72
46	6.6	97		
47	6.2	97	< 6	9
48	6.0	91	< 6	1
49	5.3	70	< 6	-5
50	7.3	100	6.2	58

[0915]

化合物 编号	酶法 hOGA; pIC ₅₀	酶法 E _{max} (%)	细胞 hOGA; pEC ₅₀	细胞 E _{max} (%)
51	6.4	96	< 6	8
52	8.2	101	7.2	80
53	7.2	93	< 6	43
54	< 5	19	< 6	2
55	6.7	94	< 6	24
56	5.6	83	< 6	8
57	6.5	96	< 6	33
58	6.5	100	< 6	17
59	6.4	97	< 6	34
60	7.1	99	< 6	44
61	6.9	97	6.1	56
62	5.6	86	< 6	1
63	6.0	95		
64	6.4	99		
70	5.9	94		
71	6.1	99	< 6	9
72	< 5	21	< 6	-8
73	7.1	99	< 6	33
74	5.1	50	< 6	-9
75	7.4	99	< 6	34
76	5.8	84		
77	6.1	94		
78	7.2	101		
79	8.1	98	7.0	85
80	7.4	101	6.4	71
81	6.1	92		
82	8.0	101	6.6	81
83	8.3	102	7.5	89
84	8.5	102	7.8	100
85	6.7	99		
86	6.8	101	6.13	50
87	6.9	99		
88	< 5	38		
89	7.0	100		
90	7.9	101	6.9	90
91	6.8	100		

[0916]

化合物 编号	酶法 hOGA; pIC ₅₀	酶法 E _{max} (%)	细胞 hOGA; pEC ₅₀	细胞 E _{max} (%)
92	5.2	63		
93	5.1	55		
94	6.0	93		
95	7.1	100	< 6	39
96	7.2	101		
97	< 5	37		
98	7.5	103		
100	5.7	87	< 6	-5
101	< 5	13	< 6	-4
102	6.4	93	< 6	7
103	< 5	29	< 6	-5
104	7.2	100	6.2	51
105	6.1	91	< 6	6
106	7.1	100	6.0	47
107	5.9	90	< 6	-6
115	6.2	94	< 6	9
116	6.8	97	< 6	20
117	7.8	99	6.5	60
118	7.5	100	6.2	49
119	7.0	100	6.2	59
120	6.8	100	< 6	36
121	7.3	99	< 6	47
122	5.0	49	< 6	-7
123	6.9	100	约 6	47
124	< 5	40	< 6	-3
125	6.8	89	6.3	48
126	7.0	94	6.3	73
127	6.7	96	< 6	26
128	7.3	95	6.36	59
129	6.7	91	6.0	45