



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113348168 A

(43) 申请公布日 2021.09.03

(21) 申请号 202080010269.1	(51) Int. Cl.
(22) 申请日 2020.01.20	C07D 401/14 (2006.01)
(30) 优先权数据	C07D 407/14 (2006.01)
19152928.8 2019.01.22 EP	C07D 409/14 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	C07D 417/14 (2006.01)
2021.07.20	C07D 471/10 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	A61P 3/00 (2006.01)
PCT/EP2020/051210 2020.01.20	A61P 9/00 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据	A61P 17/00 (2006.01)
W02020/152067 EN 2020.07.30	A61P 27/00 (2006.01)
(71) 申请人 默克专利有限公司	A61P 29/00 (2006.01)
地址 德国达姆施塔特	A61P 33/00 (2006.01)
(72) 发明人 蒂莫·海因里希 莎拉·沃罗德	A61P 35/00 (2006.01)
(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限	A61K 31/454 (2006.01)
责任公司 11219	A61K 31/404 (2006.01)
代理人 郭国清 宫方斌	A61K 31/405 (2006.01)

权利要求书19页 说明书104页

(54) 发明名称

杂环衍生物

(57) 摘要

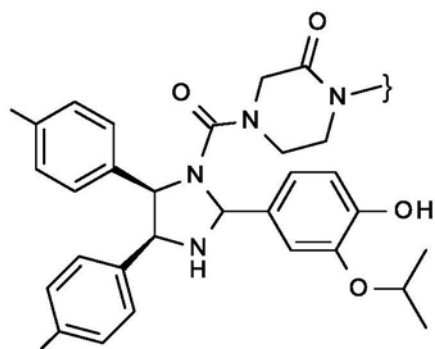
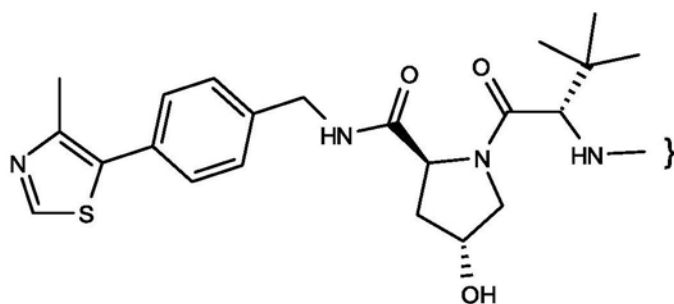
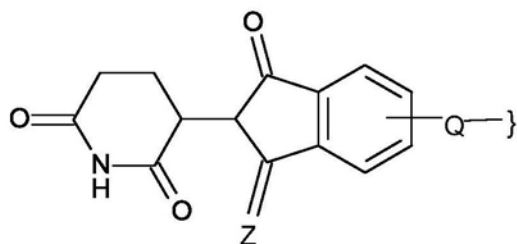
式(I)化合物:Q¹-Q²-Q³降解靶蛋白且尤其可以用于治疗疾病,例如癌症、多发性硬化、心血管疾病、中枢神经系统损伤和不同形式的炎症,其中Q¹、Q²和Q³具有权利要求1中所示的含义。

1. 式I化合物

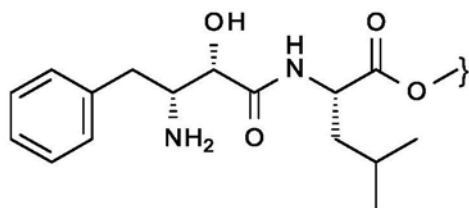
$Q^1-Q^2-Q^3$ I

其中

Q^1 表示



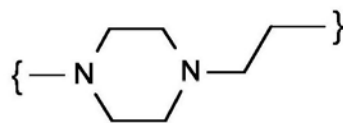
或

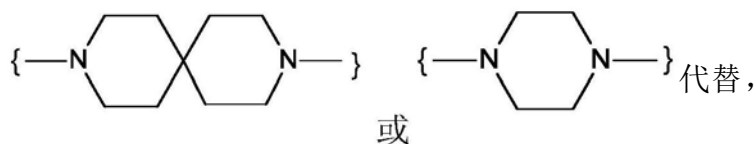


Z表示O或CH₂,

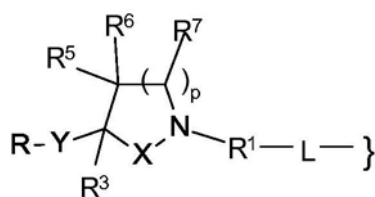
Q表示O、NH、NCH₃或CH₂,

Q^2 表示具有4至25个碳原子的非支链烷亚基,其中1至8个不相邻的CH₂基团可以被O、CONH和/或NHCO代替,并且其中一个CH₂基团可以被





Q^3 表示



L表示 NR^4CO 、 CONR^4 、 NH 、 O 、 CO 、 S 、 SO_2 、 $\text{SO}(\text{=NH})$ 、 NHCONH 、 SO_2NH 或 NHSO_2 ，

R表示 NR^2R^4 、 Alk 、 $\text{C}(\text{=CH}_2)[\text{C}(\text{R}^4)_2]_n\text{Ar}^2$ 、 Het^2 、 $\text{O}[\text{C}(\text{R}^4)_2]_n\text{Ar}^2$ 或 OA ，

X表示 CO 或 CH_2 ，

Y表示 CO 或 CH_2 ，

R^1 表示 $(\text{CH}_2)_n$ 、 $[\text{C}(\text{R}^4)_2]_n\text{Ar}^1$ —、 $(\text{CH}_2)_n\text{Het}$ —、 $(\text{CH}_2)_n\text{Cyc}$ —、 $[\text{C}(\text{R}^4)_2]_n\text{CONHAr}^1$ —、 $[\text{C}(\text{R}^4)_2]_n\text{NA}$ —、 $\text{O}[\text{C}(\text{R}^4)_2]_n\text{Ar}^1$ —或 $[\text{C}(\text{R}^4)_2]_n\text{COO}(\text{CH}_2)_n\text{Ar}^1$ —，

其中取代基L直接连接至 Ar^1 、 Het 或 Cyc ，

R^2 表示 H 、 $[\text{C}(\text{R}^4)_2]_n\text{Ar}^2$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{COHet}^1$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{COAr}^2$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{NA}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{Cyc}$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{Het}^1$ ，

R^3 表示 OH 或 OCoA ，

R^4 表示 H 或具有1、2、3或4个碳原子的烷基，

R^2 和 R^4 一起也表示具有2、3、4或5个碳原子的烷亚基，其中 CH_2 基团也可以被 $\text{N}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ 或 SO_2 代替，

R^5 、 R^6 各自彼此独立为 H 、 F 或 A ，

R^5 和 R^6 一起也表示具有2、3、4或5个碳原子的烷亚基，其中 CH_2 基团也可以被 NCoA 或 O 代替，

R^7 表示 H 、 Hal 或 A ，

Ar^1 表示苯基，所述苯基未被取代或被 Hal 、 OH 、 OA 、 CONH_2 、 CONHA 、 CONA_2 、 NHSO_2A 、 CONHCyc 、 NHSO_2Cyc 、 CONHAr^2 、 Het^1 、 COHet^1 和/或 NASO_2A 单-、二-、三-、四-或五取代，

Ar^2 表示苯基，所述苯基未被取代或被 Hal 、 A 、 CONH_2 和/或 OAr^3 单-、二-、三-、四-或五取代，

Ar^3 表示苯基，所述苯基未被取代或被 NH_2 单取代，

Het 表示具有1至4个 N 和/或 O 和/或 S 原子的单环或双环的饱和、不饱和或芳族杂环，所述单环或双环的饱和、不饱和或芳族杂环未被取代或被 Hal 、 A 、 OA 、 CN 、 NH_2 、 NHA 、 NA_2 、 NO_2 、 CN 、 COOH 、 COOA 、 $(\text{CH}_2)_n\text{CONH}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{CONHA}$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{CONA}_2$ 、 NHCOA 、 COA 、 CHO 、 Het^1 、 SO_2A 、 SO_2NH_2 、 SO_2NHA 、 SO_2NA_2 、 CONHNH_2 、 CONHAr^3 、 $=\text{O}$ 和/或 Ar^3 单-、二-或三取代，

Het^1 表示哒嗪基、吡唑基、吡啶基、哌嗪基、吗啉基、噻啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、吡咯基、噁唑基、噁二唑基、异噁唑基、噻唑基、三唑基、四唑基、噻二唑、哌啶-1-基、吡咯烷-1-基、四氢吡喃基、1,2-噁嗪-2-基、1,2,5-噁二嗪-2-基、1,3-噁嗪-3-基或六氢嘧啶基，所述基团各自未被取代或被 A 和/或 OA 单-、二-或三取代，

Het²表示异吡啶基,

A表示具有1至10个碳原子的非支链或支链烷基,其中1至7个氢原子可以被F、Cl、Br、OH、CHO、COA、COOA、CN、CONA₂、CONHA和/或CONH₂代替,

和/或其中一个或两个不相邻的CH和/或CH₂基团可以被O代替,

或Cyc,

Alk表示具有2、3、4、5或6个碳原子的烯基

Cyc表示具有3至7个碳原子的环状烷基,所述环状烷基未被取代或被NHCOA、NHSO₂、OH、OA、A、NH₂、NHA、NA₂、COOA、COOH和/或CONHA单-、二-或三取代,

Hal表示F、Cl、Br或I,

m表示1、2、3或4,

n表示0、1、2、3或4,

p表示1、2或3,

及其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

2. 根据权利要求1所述的化合物,

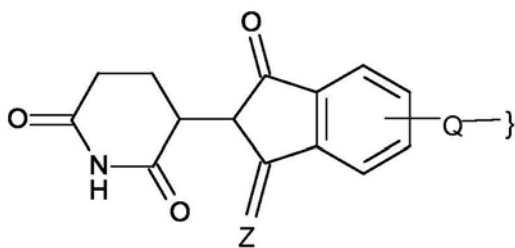
其中

Het表示吡嗪基、吡啶基、苯并咪唑基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡啶基、二氢吡啶基、苯并呋喃基、四氢吡喃基、二氢喹啉基、二氢异喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、吡啶基、咪唑基、吡咯基、~~噻~~唑基、~~噻~~二唑基、异~~噻~~唑基、苯并噻唑基、哌啶-1-基、吡咯烷-1-基、3,4-二氢-2H-吡啶并[3,2-b]-1,4-~~噻~~嗪基、3,4-二氢-2H-苯并-1,4-~~噻~~嗪基、苯并呋喃基、氮杂环丁烷基、1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基、2H-苯并吡喃基、3-氮杂双环[3.2.0]己基、吡咯并[2,3-b]吡啶基、四氢呋喃基、四氢-1,8-萘啶基、2,3-二氢-苯并异噻唑基、1,2,3,4-四氢苯并噻嗪基或六氢-苯并-1,3-二氧杂环戊烷基,所述基团各自未被取代或被Hal、A、OA、CN、NH₂、NHA、NA₂、NO₂、CN、COOH、COOA、(CH₂)_nCONH₂、(CH₂)_nCONHA、(CH₂)_nCONA₂、NHCOA、COA、CHO、Het¹、SO₂A、SO₂NH₂、SO₂NHA、SO₂NA₂、CONHNH₂、CONHAr³、=O和/或Ar³单-、二-或三取代,

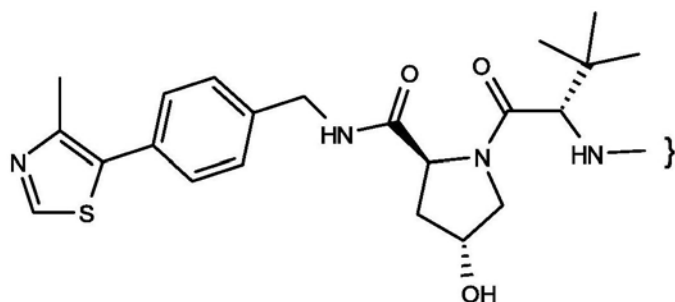
及其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中

Q¹表示



或



及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

4. 根据权利要求1至3中的一项或多项所述的化合物,其中

R 表示 NR^2R^4 ,

及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

5. 根据权利要求1至4中的一项或多项所述的化合物,其中

R^1 表示 $(CH_2)_n$ 、 $[C(R^4)]_nAr^1$ -或 $(CH_2)_nHet$ -,

及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

6. 根据权利要求1至5中的一项或多项所述的化合物,其中

R^2 表示 $[C(R^4)]_nAr^2$ 、 $(CH_2)_nCyc$ 或 $(CH_2)_nHet^1$,

及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

7. 根据权利要求1至6中的一项或多项所述的化合物,其中

Het 表示苯并咪唑基或咪唑基,所述基团各自未被取代或被 Hal 单取代;

及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

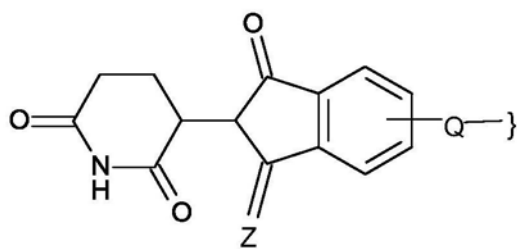
8. 根据权利要求1至7中的一项或多项所述的化合物,其中

A 表示具有1至6个碳原子的非支链或支链烷基,其中1至5个氢原子可以被 F 、 Cl 和/或 OH 代替,

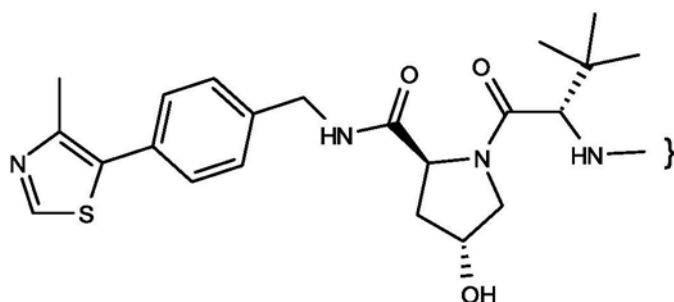
及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

9. 根据权利要求1至8中的一项或多项所述的化合物,其中

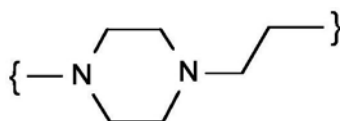
Q^1 表示



或

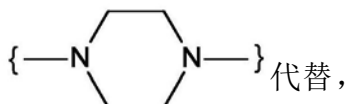
Z表示O或CH₂,Q表示O、NH、NCH₃或CH₂,

Q²表示具有4至25个碳原子的非支链烷亚基,其中1至8个不相邻的CH₂基团可以被O、CONH和/或NHCO代替,并且其中一个CH₂基团可以被



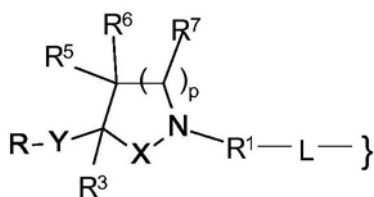
、

、



代替,

或

Q³表示

、

L表示NR⁴CO、CONR⁴、NH、O、CO、S、SO₂、SO(=NH)、NHCONH、SO₂NH或NHSO₂,R表示NR²R⁴,X表示CO或CH₂,Y表示CO或CH₂,R¹表示(CH₂)_n、[C(R⁴)₂]_nAr¹-或(CH₂)_nHet-,其中取代基L直接连接至Ar¹、Het或Cyc,R²表示[C(R⁴)₂]_nAr²、(CH₂)_nCyc或(CH₂)_nHet¹,R³表示OH,

R^4 表示H或具有1、2、3或4个碳原子的烷基，

R^5 、 R^6 表示H，

R^7 表示H、Ha1或A，

Ar^1 表示苯基，

Ar^2 表示苯基，所述苯基未被取代或被Ha1单-、二-、三-或四-取代，

Het表示吡嗪基、吡唑基、苯并咪唑基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、二氢吡咯基、苯并呋喃基、四氢吡喃基、二氢喹啉基、二氢异喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、吡唑基、咪唑基、吡咯基、噁唑基、噁二唑基、异噁唑基、苯并噻唑基、哌啶-1-基、吡咯烷-1-基、3,4-二氢-2H-吡啶并[3,2-b]-1,4-噁嗪基、3,4-二氢-2H-苯并-1,4-噁嗪基、苯并呋喃基、氮杂环丁烷基、1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基、2H-苯并吡喃基、3-氮杂双环[3.2.0]己基、吡咯并[2,3-b]吡啶基、四氢呋喃基、四氢-1,8-萘啶基、2,3-二氢-苯并异噻唑基、1,2,3,4-四氢苯并噻嗪基或六氢-苯并-1,3-二氧杂环戊烷基，所述基团各自未被取代或被Ha1、A、OA、CN、 NH_2 、NHA、 NA_2 、 NO_2 、CN、COOH、COOA、 $(CH_2)_nCONH_2$ 、 $(CH_2)_nCONHA$ 、 $(CH_2)_nCONA_2$ 、NHCOA、COA、CHO、Het¹、 SO_2A 、 SO_2NH_2 、 SO_2NHA 、 SO_2NA_2 、CONHNH₂、CONHAr³、=O和/或Ar³单-、二-或三取代，

Het¹表示吡啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑基或吡咯基，

A表示具有1至6个碳原子的非支链或支链烷基，其中1至5个氢原子可以被F、Cl和/或OH代替，

Cyc表示具有3至7个碳原子的环状烷基，

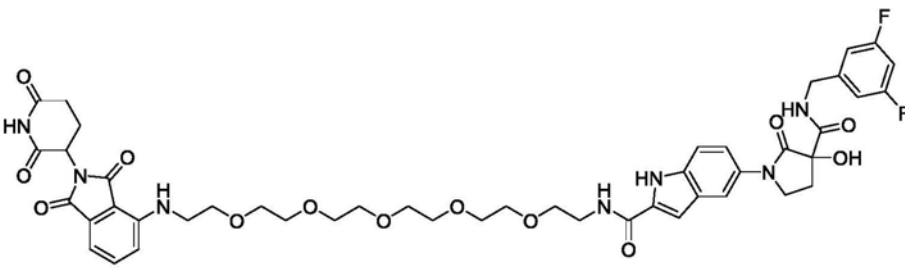
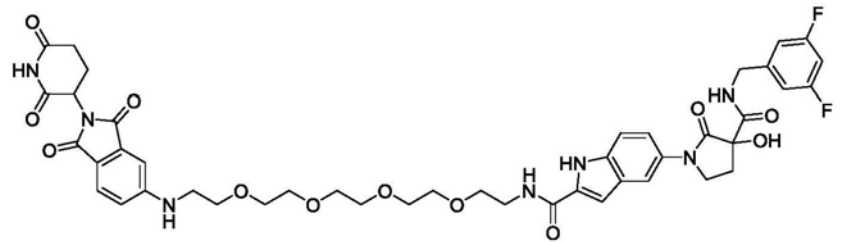
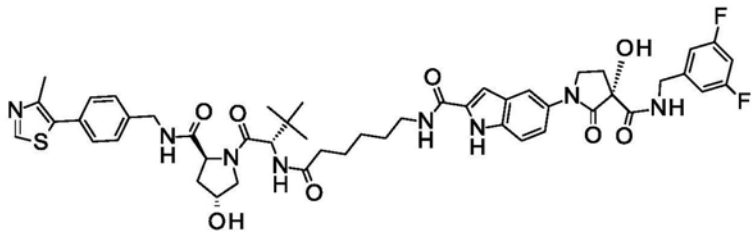
Ha1表示F、Cl、Br或I，

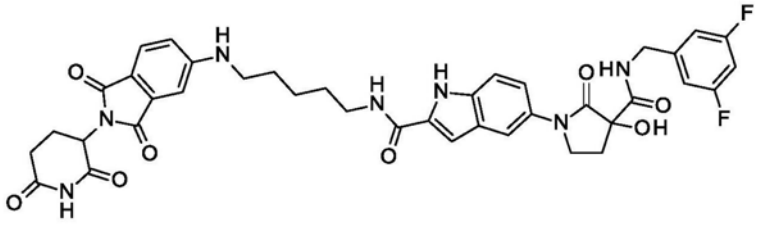
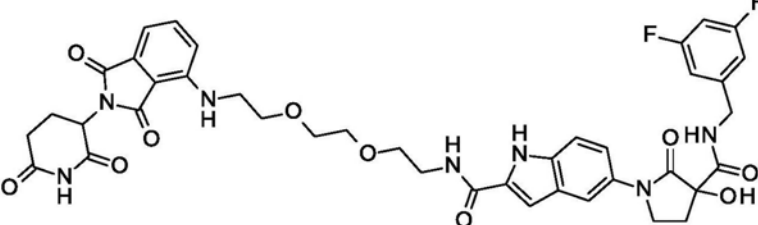
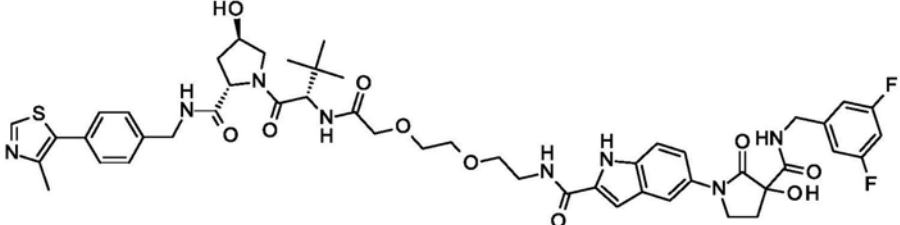
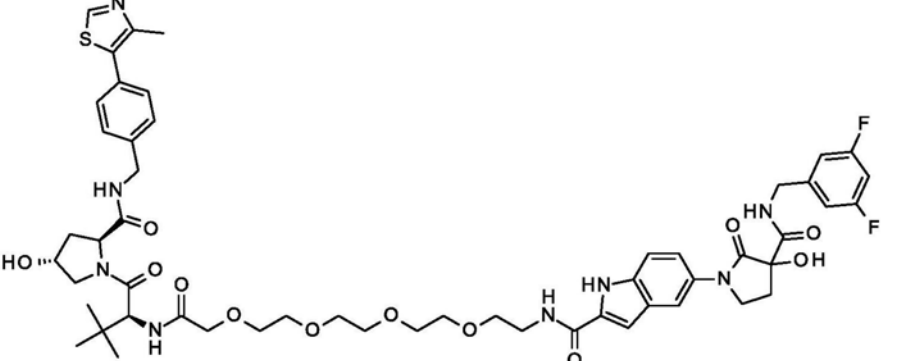
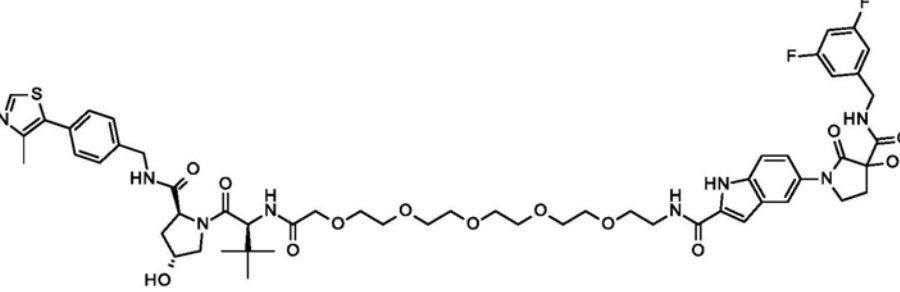
n表示0、1、2、3或4，

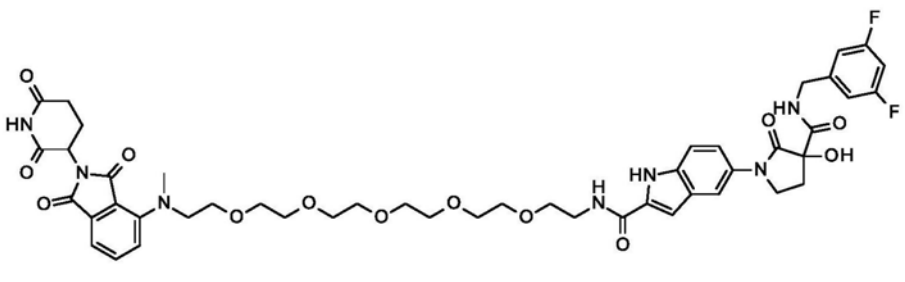
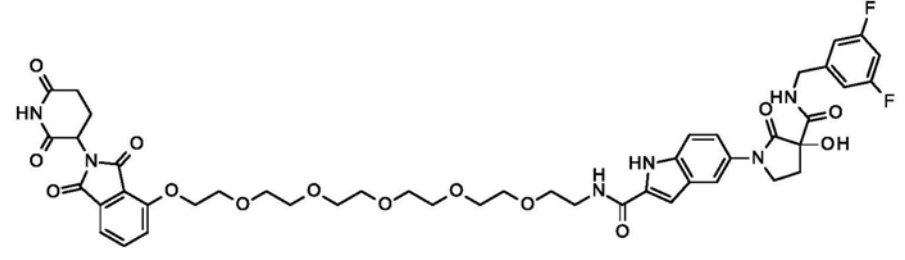
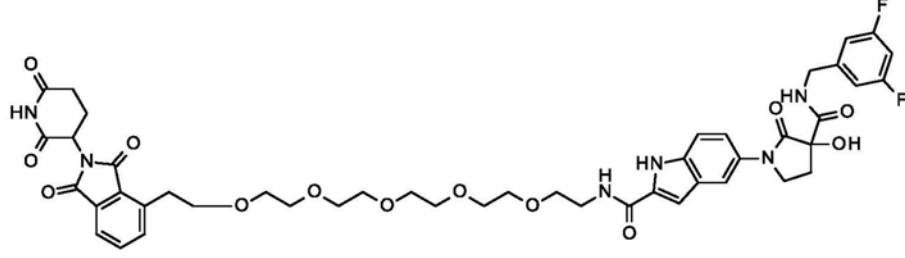
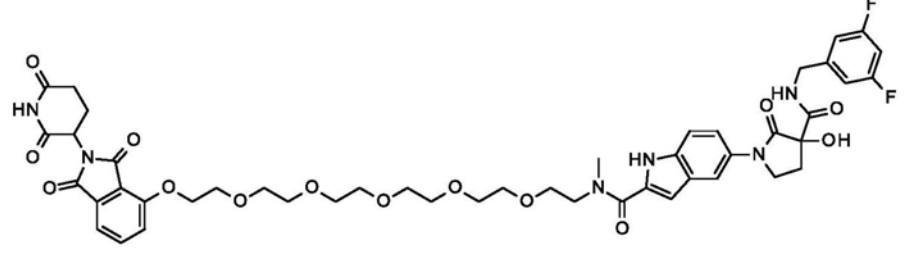
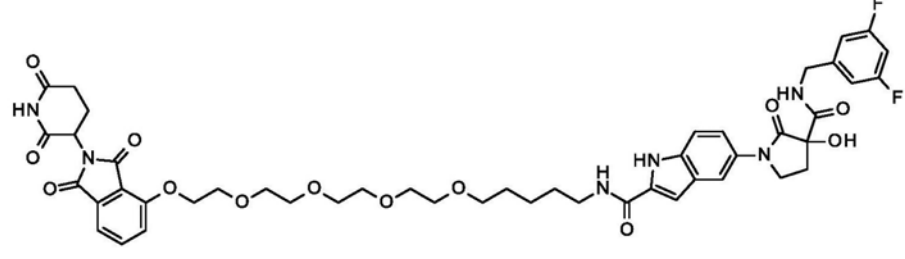
p表示1、2或3，

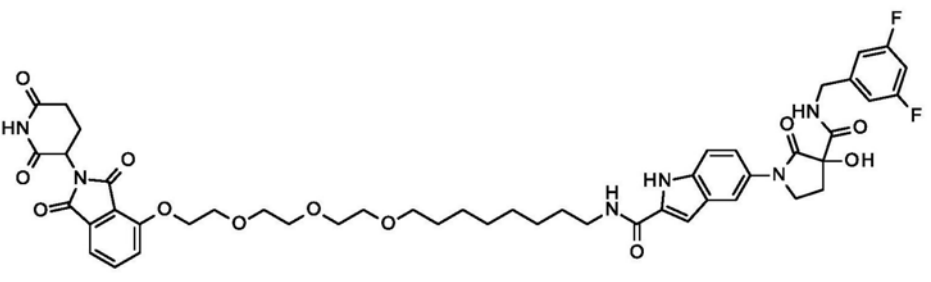
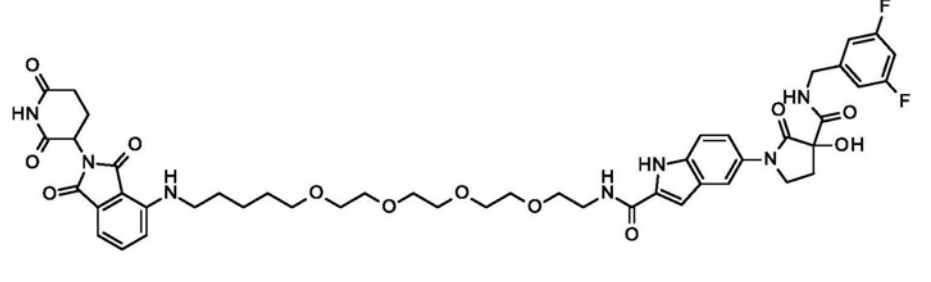
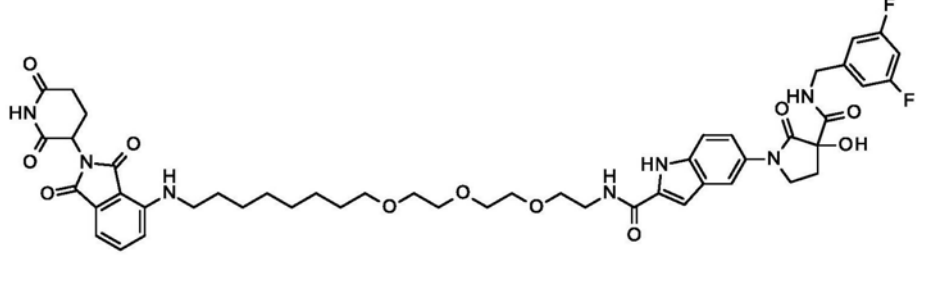
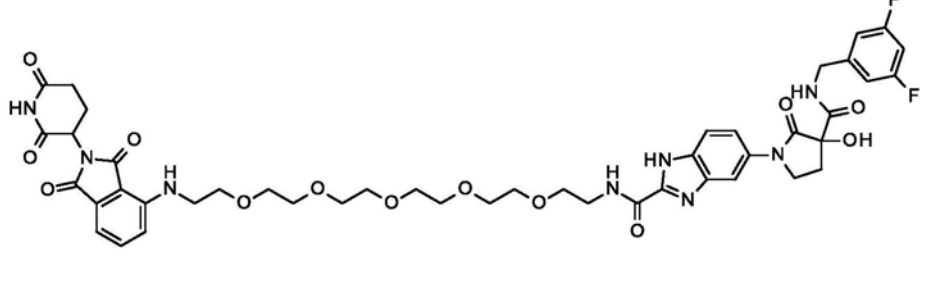
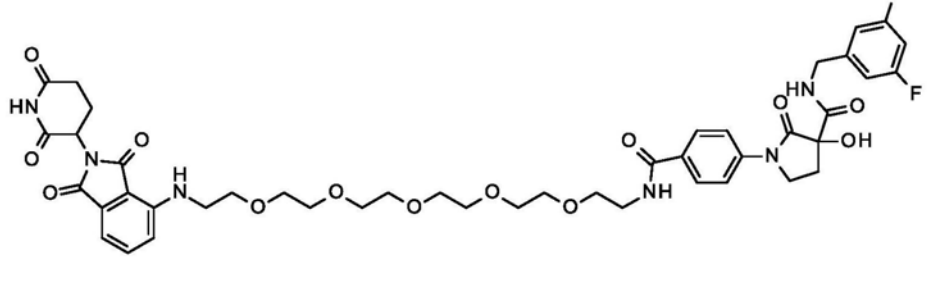
及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体，包括其所有比率的混合物。

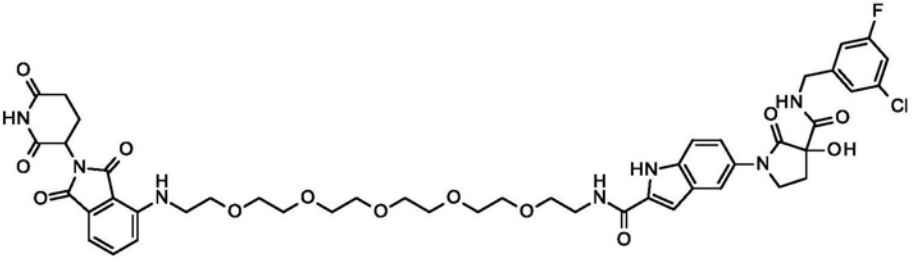
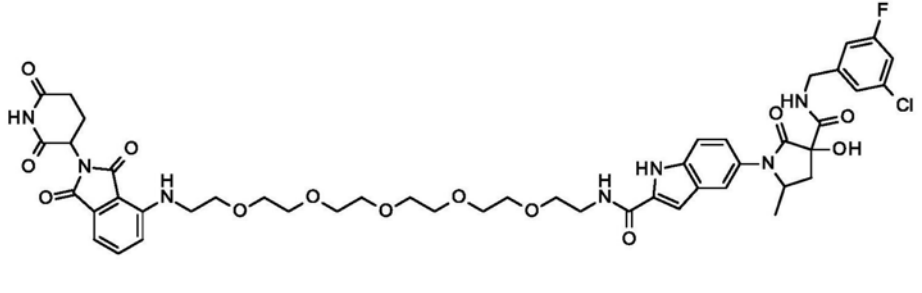
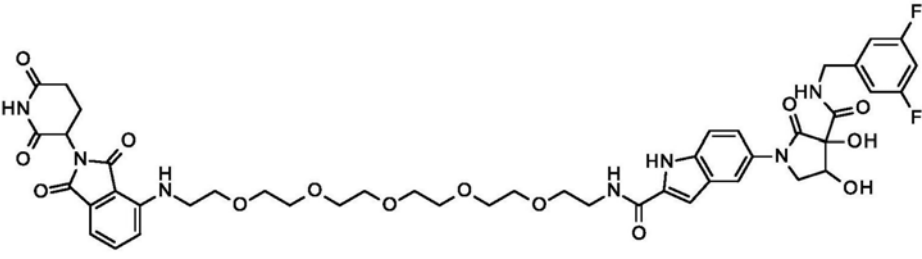
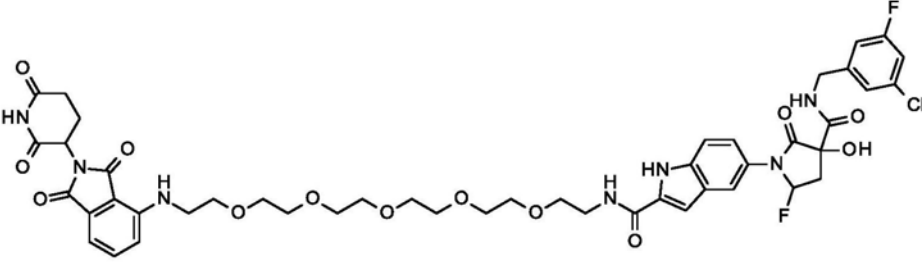
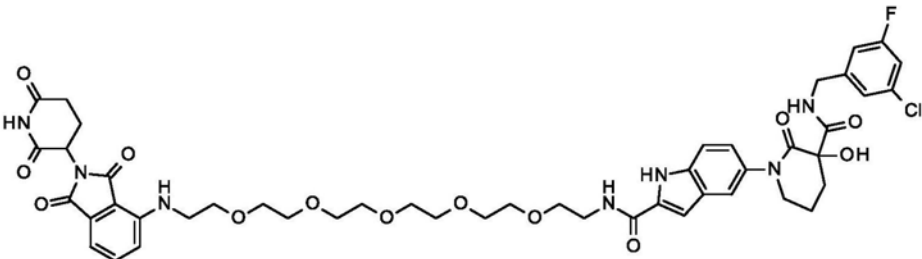
10. 根据权利要求1所述的化合物，所述化合物选自

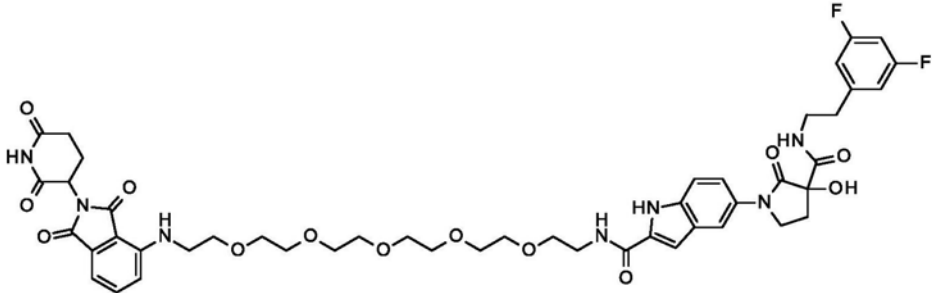
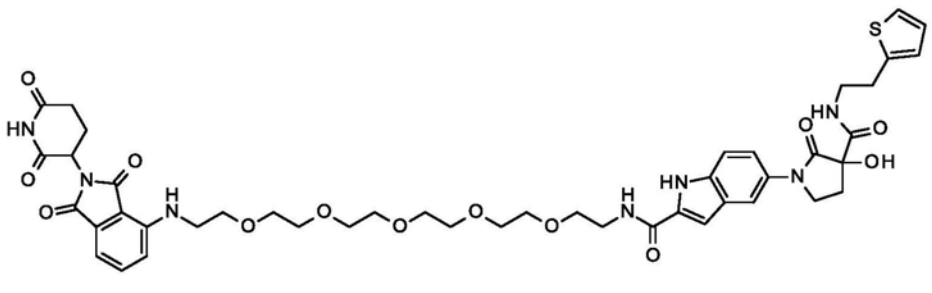
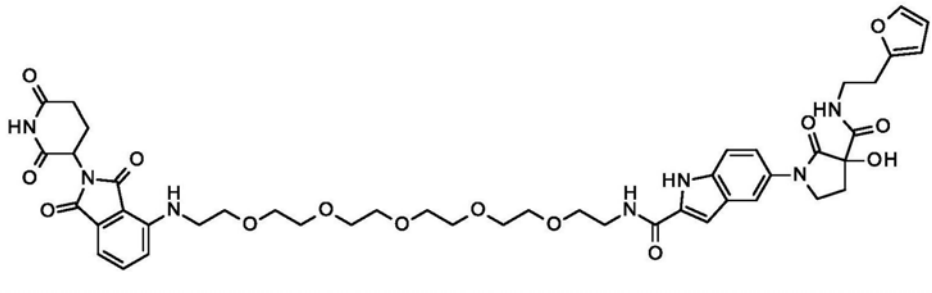
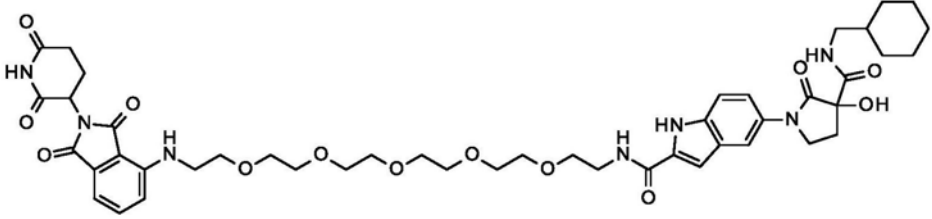
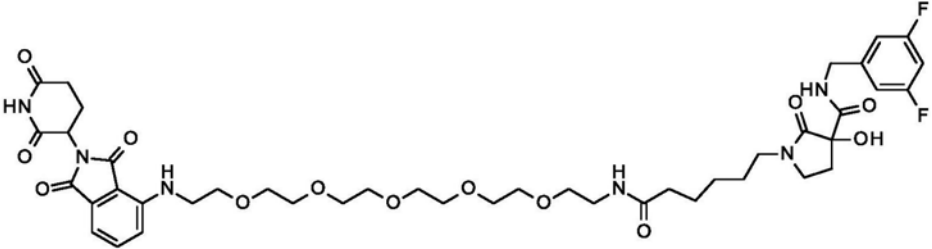
编号	化学结构
“A1”	
“A2”	
“A3”	

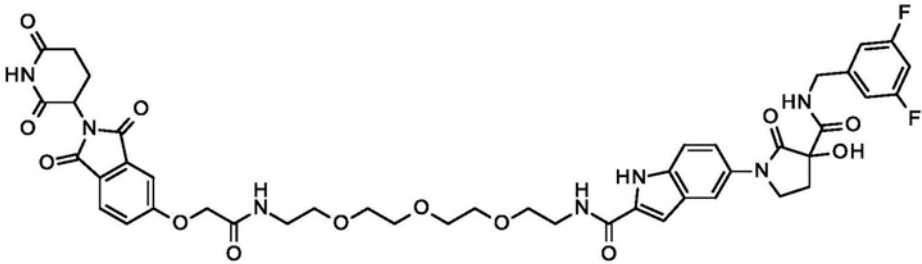
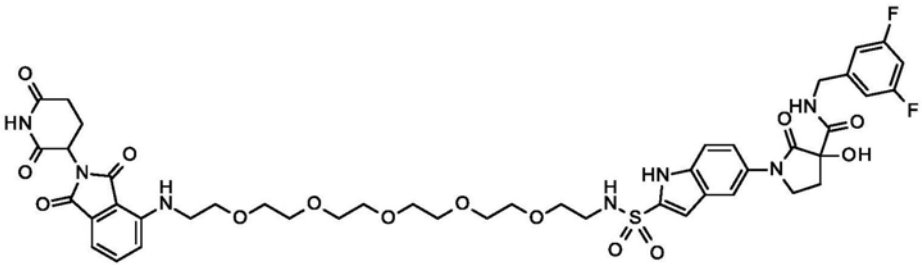
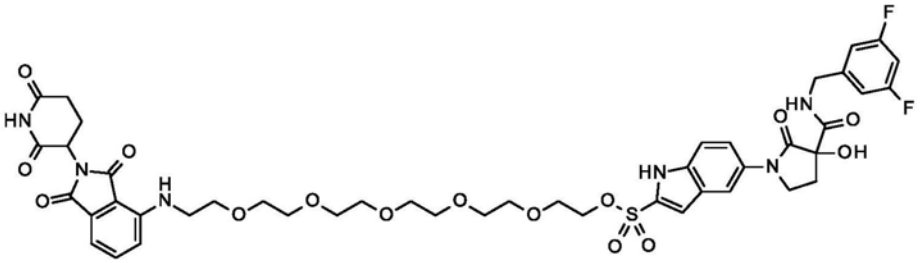
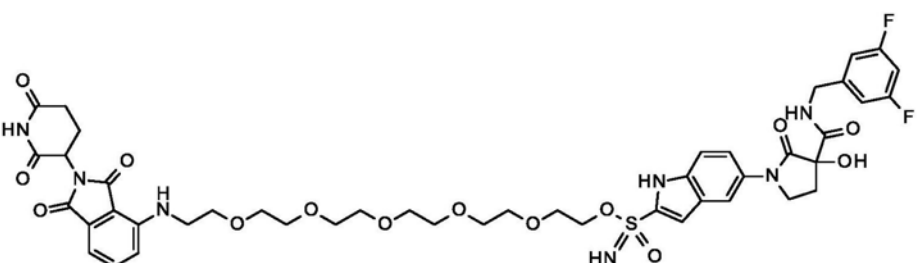
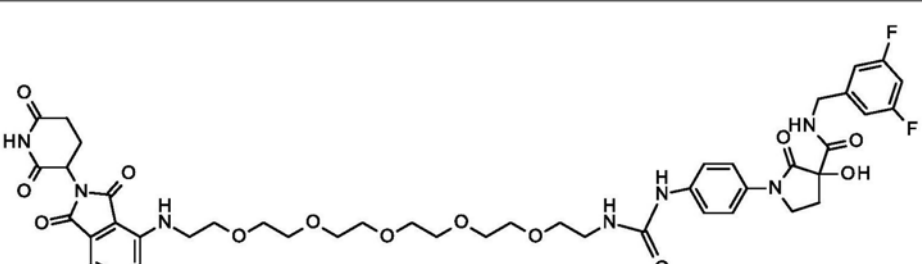
“A4”	
“A5”	
“A6”	
“A7”	
“A8”	

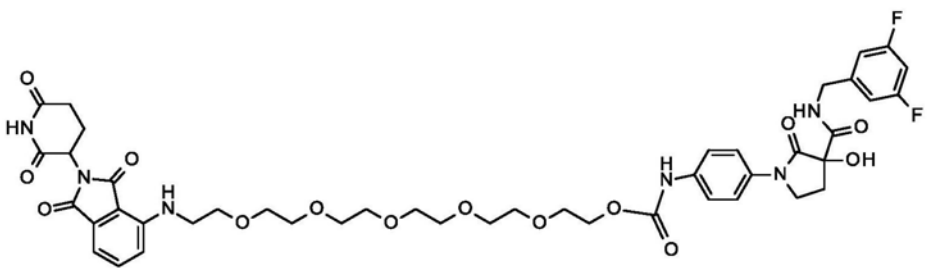
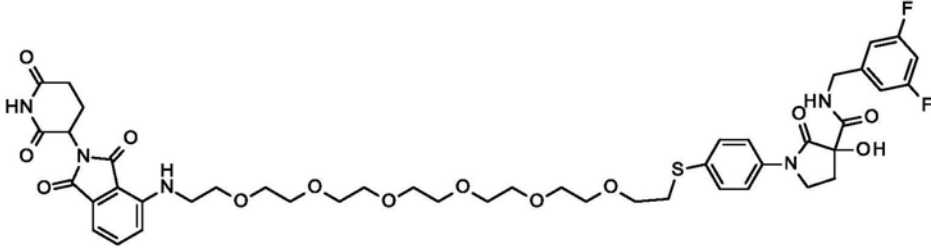
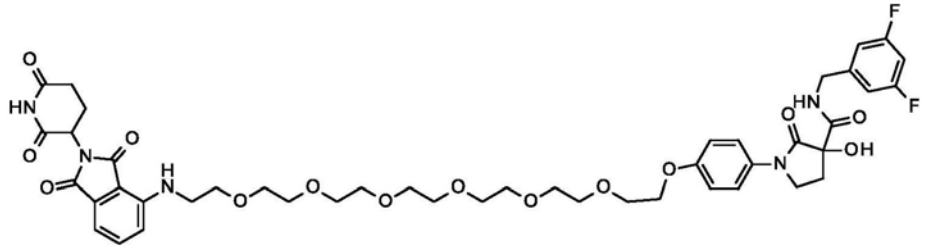
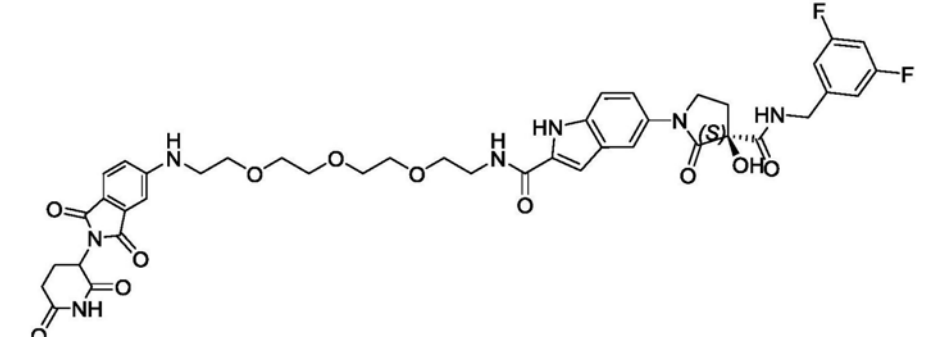
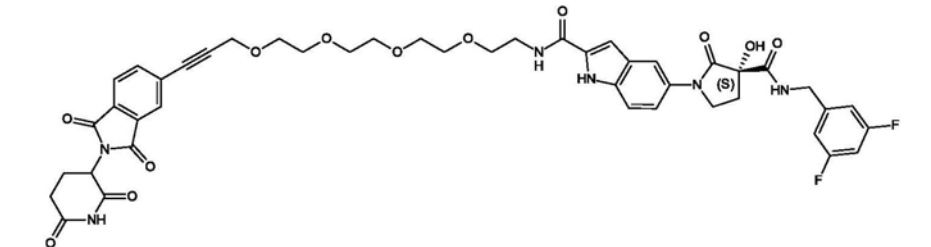
“A9”	
“A10”	
“A11”	
“A12”	
“A13”	

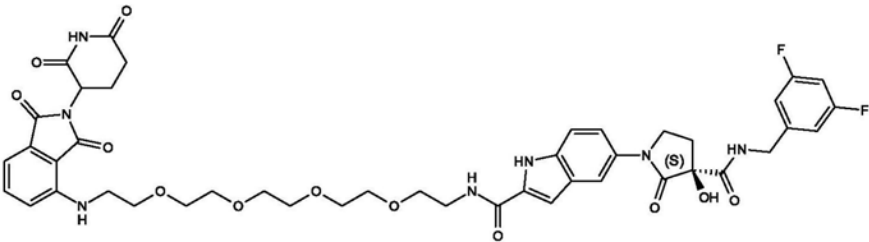
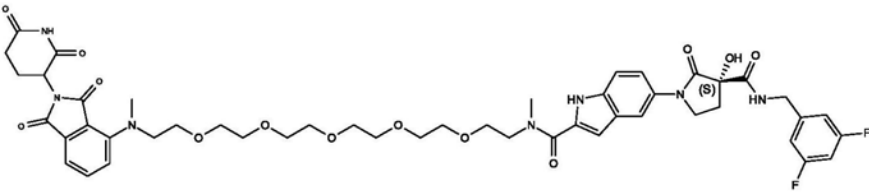
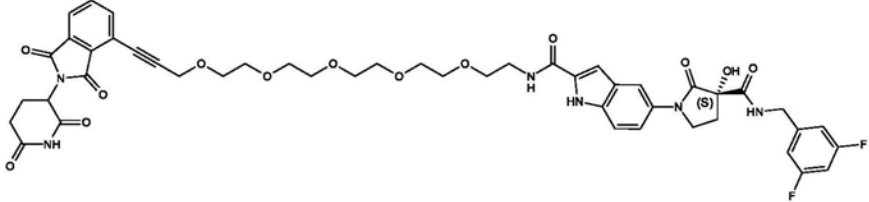
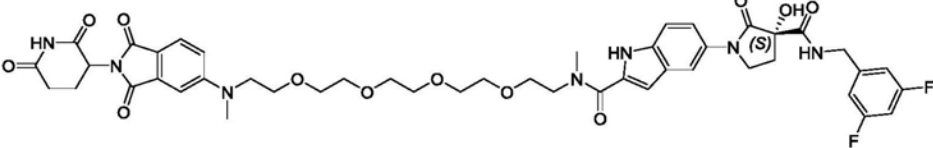
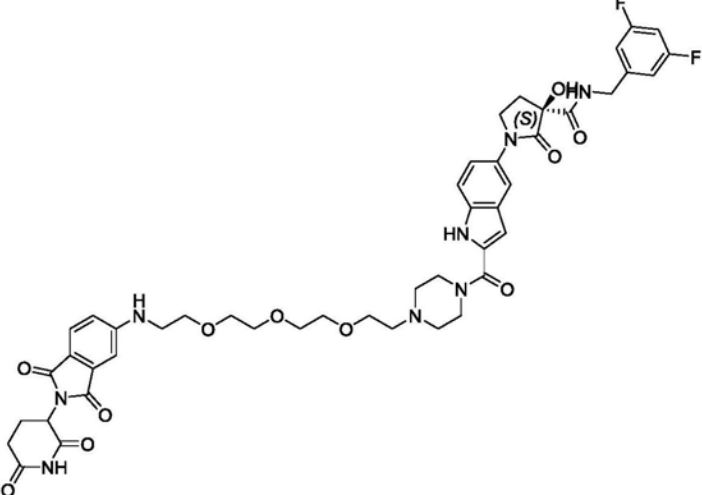
“A14”	
“A15”	
“A16”	
“A17”	
“A18”	

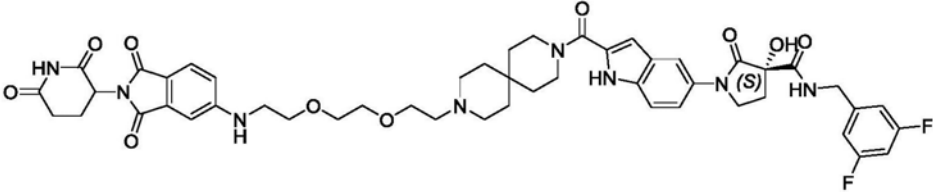
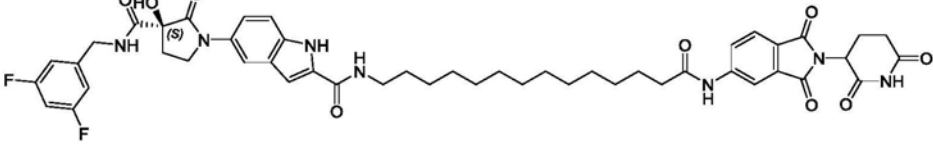
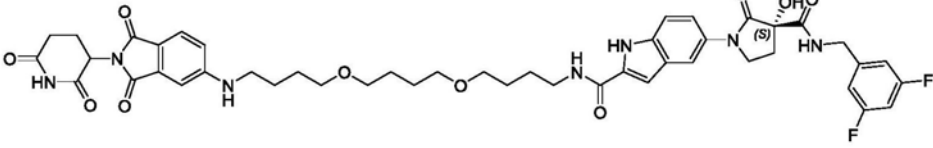
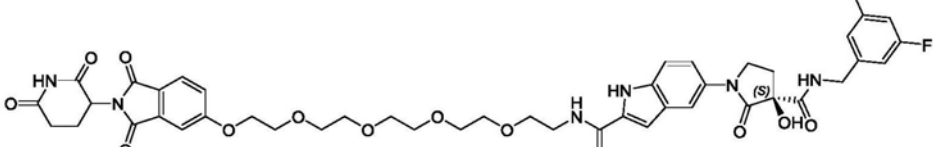
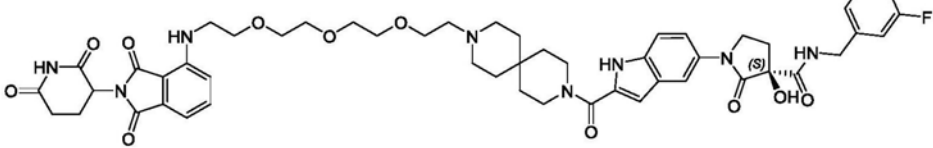
“A19”	
“A20”	
“A21”	
“A22”	
“A23”	

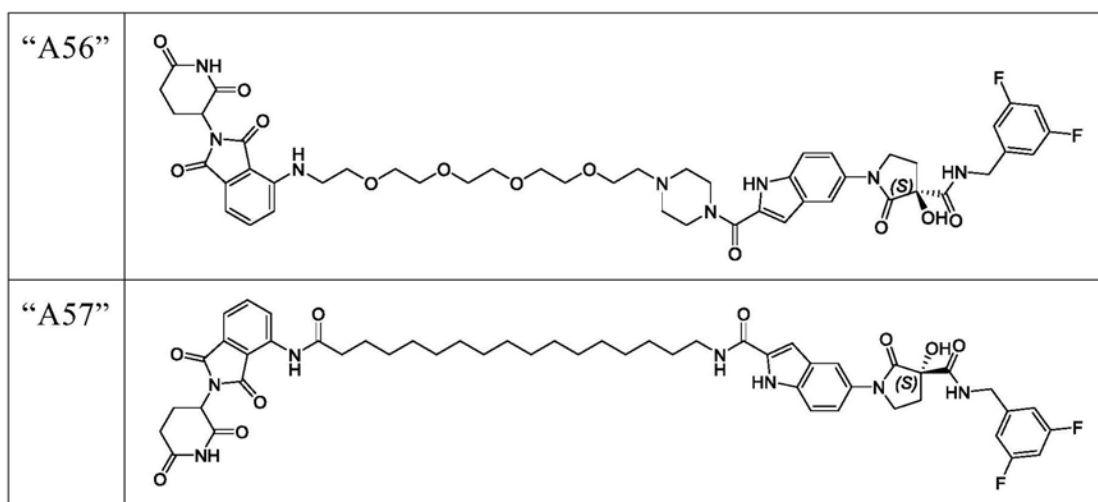
“A24”	
“A25”	
“A26”	
“A27”	
“A28”	

“A34”	
“A35”	
“A36”	
“A37”	
“A38”	

“A39”	
“A40”	
“A41”	
“A42”	
“A43”	

“A44”	
“A45”	
“A46”	
“A47”	
“A48”	

“A49”	
“A50”	
“A51”	
“A52”	
“A53”	
“A54”	
“A55”	

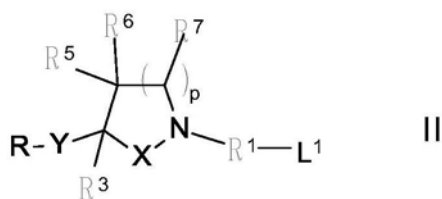


及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

11. 一种用于制备根据权利要求1至10所述的式I化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物、互变异构体和立体异构体的方法,

其中L表示 CONR^4 ,

其特征在于使式II化合物



其中X、R、 R^1 、 R^3 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和p具有权利要求1中所示的含义,

且 L^1 表示Cl、Br、I或游离或反应性官能化改性的OH基团,

与式III化合物反应



其中 Q^1 和 Q^2 具有权利要求1中所示的含义,

和/或

将所述式I的碱或酸转化为其盐中的一种。

12. 一种药物,所述药物包含至少一种根据权利要求1所述的式I化合物和/或其药学上可接受的盐、溶剂化物、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物,和任选的药学上可接受的载体、赋形剂或媒剂。

13. 根据权利要求1所述的式I化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物的用途,其用于治疗 and/或预防肿瘤、肿瘤转移、系膜细胞的增殖性疾病、血管瘤、增殖性视网膜病、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化新血管形成、银屑病、眼部新血管形成、骨质疏松症、糖尿病和肥胖症、淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、疟疾和前列腺肥大。

14. 根据权利要求10所述的化合物的用途,其中所述肿瘤疾病选自以下的肿瘤疾病:鳞状上皮、膀胱、胃、肾、头颈部、食管、子宫颈、甲状腺、肠、肝、脑、前列腺、泌尿生殖道、淋巴系统、胃、喉、肺、皮肤,单核细胞白血病、肺腺癌、小细胞肺癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、乳腺癌、

急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤。

15. 一种药物,所述药物包含至少一种根据权利要求1所述的式I化合物和/或其药学上可接受的盐、溶剂化物和立体异构体,包括其所有比率的混合物,和至少一种其它药物活性成分。

16. 一种套件(试剂盒),所述套件由以下的单独包装组成:

(a) 有效量的根据权利要求1所述的式I化合物和/或其药学上可接受的盐、溶剂化物、盐和立体异构体,包括其以所有比率的混合物,

和

(b) 有效量的其它药物活性成分。

杂环衍生物

[0001] 发明背景

[0002] 本发明的目的是发现具有有价值的性质的新型化合物,特别是可以用于制备药物的那些化合物。

[0003] 本发明涉及降解靶蛋白、优选MetAP-2的E3连接酶结合化合物。

[0004] 本发明的化合物是杂环衍生物,并且可用于治疗疾病,例如肿瘤、肿瘤转移、系膜细胞的增殖性疾病、血管瘤、增殖性视网膜病、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化新血管形成、牛皮癣、眼部新血管形成、骨质疏松症、糖尿病和肥胖症、淋巴白血病、淋巴瘤、疟疾和前列腺肥大。本发明还提供用于制备这些化合物的方法和包含这些化合物的药物组合物。

[0005] 小分子降解物越来越多地用作检查蛋白质的功能作用的工具,并且作为新型治疗方式而出现。在翻译后水平下操作时,这些分子与经典抑制剂相比提供分化生物学反应的潜力,并且将蛋白质敲减方法的所有项目扩展到遗传学方法(例如:敲除,siRNA)之外。

[0006] 降解分子提供了一个化学遗传技术的例子,其能够更普遍地针对蛋白质组。这些嵌合分子被设计成诱导其靶蛋白经由泛素蛋白酶体系统(UPS)降解,从而消除预先存在的蛋白。UPS是蛋白质降解的主要胞内途径,其中称为E1(泛素活化酶)、E2(泛素结合酶)和E3(泛素连接酶)的一系列酶将9kDa、76氨基酸的蛋白质泛素共价连接至靶蛋白质。随后的酶促反应导致形成多聚泛素链,所述多聚泛素链以由26S蛋白酶体降解的蛋白质作为目标。

[0007] 双功能降解物包含连接至靶蛋白结合部分的E3连接酶结合基序。因此,这些分子通过在靶蛋白附近招募E3连接酶而劫持细胞自身的降解机制。空间邻近性使得蛋白质能够泛素化,并且随后通过形成稳定的三元络合物而被UPS识别和耗尽。

[0008] 对特定靶蛋白的特异性与E3连接酶相关(Li W等人,PLoS One. (《公共科学图书馆》)2008;3:e1487),所述E3连接酶促进泛素连接靶蛋白的最终步骤。尽管使用肽作为E3泛素连接酶识别基序成功地开发了第一代降解物,但它们不是细胞可渗透的,也无法通过添加细胞渗透基序如TAT肽而使其变得细胞可渗透(Sakamoto KM等人,Proc Natl Acad Sci U S A. (《美国科学院院报》)2001;98:8554~8559;Zhang D等人,Bioorg Med Chem Lett. (《生物有机药物化学杂志》)2004;14:645~648;Schneekloth JS Jr.等人,J Am Chem Soc. (《美国化学会志》)2004;126:3748~3754)。通过发现结合E3连接酶的小分子,例如结合VHL连接酶的Von Hippel Lindau (VHL) 配体(Buckley等人,J. Am. Chem. Soc. (《美国化学会志》),2012,134(10),第4465~4468页)或结合CRBN或Cereblon E3连接酶的沙利度胺衍生物(Winter等人,Science (《科学》)2015年6月19日:第348卷,第6241期,第1376~1381页),显著改进了第一代双功能降解物的差细胞渗透性。掌握的所有小分子降解物使得科学家能够将这些工具化合物优化成相关的治疗化合物。

[0009] 迄今为止,靶向雄激素受体(AR)和雌激素受体(ER)的降解物已经被开发为临床候选物,证实这些分子在治疗前列腺癌和乳腺癌中的潜在应用(Rodriguez-Gonzalez A等人,Oncogene. (《致癌基因》)2008;27:7201~7211;Cyrus K等人,Chembiochem. (《化学生物化学》)2010;11:1531~1534)。

[0010] 紧挨着靶向甲硫氨酸氨肽酶-2 (MetAP-2) 的肽降解物(Sakamoto KM等人,Proc

Natl Acad Sci U S A. (《美国科学院院报》) 2001;98:8554~8559;W02002020740), 已经开发了一系列其它双功能降解物, 其靶向蛋白质包括激酶、信号蛋白以及胞质蛋白和膜受体 (例如, 在Ottis等人, ACS Chem.Biol. (《生化与分子生物学》), 2017, 12 (4), 第892~898页中)。

[0011] 通过招募VHL E3连接酶来介导MetAP-2降解的降解物化合物的合成报道在(W02002020740)中。这种方法集中于以共价方式结合靶蛋白的MetAP-2配体和肽序列靶向性VHL。共价作用模式严重损害降解物分子的推定催化功能。

[0012] 在本发明中, 靶蛋白MetAP-2被例如在W02013/149704中所述的可逆结合配体结合。E3连接酶被已知的基序所识别, 如例如在W02018/033556或CN107540608中所述。

[0013] 已经发现根据本发明的化合物及其盐具有非常有价值的药理学性质, 同时是良好耐受的。

[0014] 令人惊讶地, 我们发现本发明的化合物在疾病相关细胞系中以剂量依赖性方式降解MetAP-2。

[0015] 本发明的化合物以纳摩尔浓度抑制MetAP-2酶且以如附表中所给出的微摩尔IC50抑制HUVEC细胞增殖。

[0016] MetAP-2在酶测定以及细胞测定中的这种抑制作用与用来自默克申请W0 2012/048775、W0 2013/149704、W0 2016/020031的化合物证实的MetAP-2抑制作用相当。

[0017] 因此, 目前要求保护的化合物可用于治疗如W0 2012/048775、W0 2013/149704、W0 2016/020031中所述的疾病。

[0018] 本发明具体涉及降解靶蛋白MetAP-2的式I化合物、包含这些化合物的组合物以及使用其治疗疾病和病痛的方法。

[0019] 宿主或患者可以属于任何哺乳动物物种, 例如灵长类物种, 特别是人类; 啮齿类动物, 包括小鼠、大鼠和仓鼠; 兔; 马、牛、狗、猫等。动物模型具有用于实验研究的益处, 从而为人类疾病的治疗提供模型。

[0020] 特定细胞对用根据本发明的化合物治疗的易感性可以通过体外测试确定。典型地, 将细胞的培养物与各种浓度的根据本发明的化合物组合一段时间, 所述时间段足以使活性剂如抗IgM诱导细胞反应, 如表面标记物的表达, 通常在约1小时和1周之间。体外测试可以使用来自血液或来自活组织检查样本的培养的细胞进行。所表达的表面标记物的量通过流式细胞仪, 使用识别所述标记物的特异性抗体来评估。

[0021] 所述剂量取决于所用的具体化合物、具体疾病、患者状态等而变化。治疗剂量通常足以在维持患者生存能力的同时显著减少靶组织中不需要的细胞群。治疗通常持续到出现显著减少, 例如细胞负荷减少至少约50%, 并且可以持续到在体内基本上未检测出更多的不需要的细胞。

现有技术

[0022] W0 2018/033556A1中公开了作为靶蛋白活性抑制剂的其它杂环酰胺衍生物。

[0023] 环状酰胺在W0 2012/048775 A1、W0 2013/149704 A1和W0 2016/020031 A1中描述为MetAP-2抑制剂。

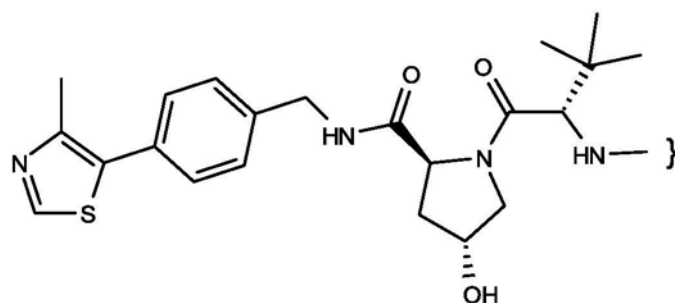
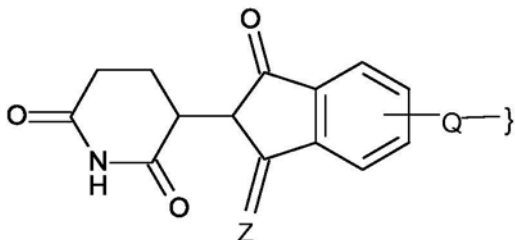
发明内容

[0024] 本发明涉及式I化合物

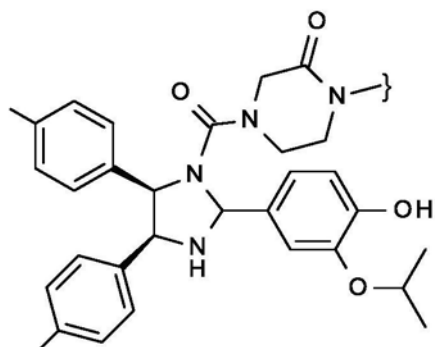
[0025] $Q^1-Q^2-Q^3$ I

[0026] 其中

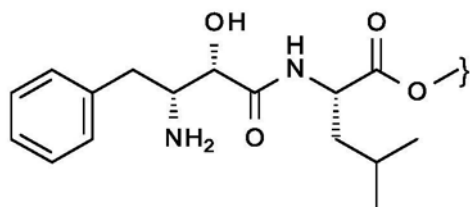
[0027] Q^1 表示



[0028]



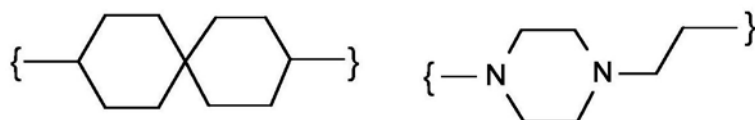
或



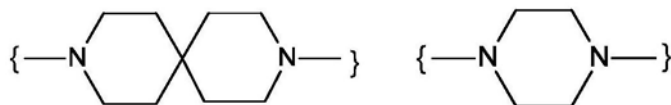
[0029] Z表示O或CH₂,

[0030] Q表示O、NH、NCH₃或CH₂,

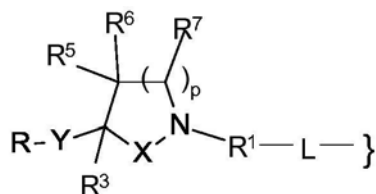
[0031] Q^2 表示具有4至25个碳原子的非支链烷亚基,其中1至8个不相邻的CH₂基团可以被O、CONH和/或NHC=O代替,并且其中一个CH₂基团可以被以下代替:



[0032]



或

[0033] Q^3 表示

[0034]

[0035] L表示 NR^4CO 、 $CONR^4$ 、 NH 、 O 、 CO 、 S 、 SO_2 、 $SO(=NH)$ 、 $NHCONH$ 、 SO_2NH 或 $NHSO_2$ ，[0036] R表示 NR^2R^4 、 Alk 、 $C(=CH_2)[C(R^4)_2]_nAr^2$ 、 Het^2 、 $O[C(R^4)_2]_nAr^2$ 或 OA ，[0037] X表示 CO 或 CH_2 ，[0038] Y表示 CO 或 CH_2 ，[0039] R^1 表示 $(CH_2)_n$ 、 $[C(R^4)_2]_nAr^1-$ 、 $(CH_2)_nHet-$ 、 $(CH_2)_nCyc-$ 、 $[C(R^4)_2]_nCONHAr^1-$ 、 $[C(R^4)_2]_nNA-$ 、 $O[C(R^4)_2]_nAr^1-$ 或 $[C(R^4)_2]_nCOO(CH_2)_nAr^1-$ ，[0040] 其中取代基L直接连接至 Ar^1 、 Het 或 Cyc ，[0041] R^2 表示 H 、 $[C(R^4)_2]_nAr^2$ 、 $(CH_2)_nCOHet^1$ 、 $(CH_2)_nCOAr^2$ 、 $(CH_2)_mNA_2$ 、 $(CH_2)_nCyc$ 或 $(CH_2)_nHet^1$ ，[0042] R^3 表示 OH 或 $OCOA$ ，[0043] R^4 表示 H 或具有1、2、3或4个碳原子的烷基，[0044] R^2 和 R^4 一起也表示具有2、3、4或5个碳原子的烷亚基，其中 CH_2 基团也可以被 $N(CH_2)_mOH$ 或 SO_2 代替，[0045] R^5 、 R^6 各自彼此独立为 H 、 F 或 A ，[0046] R^5 和 R^6 一起也表示具有2、3、4或5个碳原子的烷亚基，其中 CH_2 基团也可以被 $NCOA$ 或 O 代替，[0047] R^7 表示 H 、 Hal 或 A ，[0048] Ar^1 表示苯基，其未被取代或被 Hal 、 OH 、 OA 、 $CONH_2$ 、 $CONHA$ 、 $CONA_2$ 、 $NHSO_2A$ 、 $CONHCyc$ 、 $NHSO_2Cyc$ 、 $CONHAr^2$ 、 Het^1 、 $COHet^1$ 和/或 $NASO_2A$ 单-、二-、三-、四-或五取代，[0049] Ar^2 表示苯基，其未被取代或被 Hal 、 A 、 $CONH_2$ 和/或 OAr^3 单-、二-、三-、四-或五取代，[0050] Ar^3 表示苯基，其未被取代或被 NH_2 单取代，[0051] Het 表示具有1至4个N和/或O和/或S原子的单环或双环的饱和、不饱和或芳族杂环，其未被取代或被 Hal 、 A 、 OA 、 CN 、 NH_2 、 NHA 、 NA_2 、 NO_2 、 CN 、 $COOH$ 、 $COOA$ 、 $(CH_2)_nCONH_2$ 、 $(CH_2)_nCONHA$ 、 $(CH_2)_nCONA_2$ 、 $NHCOA$ 、 COA 、 CHO 、 Het^1 、 SO_2A 、 SO_2NH_2 、 SO_2NHA 、 SO_2NA_2 、 $CONHNH_2$ 、 $CONHAr^3$ 、 $=O$ 和/或 Ar^3 单-、二-或三取代，[0052] Het^1 表示哒嗪基、吡啶基、吡啶基、哌嗪基、吗啉基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑

基、吡咯基、咪唑基、咪唑二基、异咪唑基、噻唑基、三唑基、四唑基、噻二唑、哌啶-1-基、吡咯烷-1-基、四氢吡喃基、1,2-咪唑-2-基、1,2,5-咪唑二基、1,3-咪唑-3-基或六氢嘧啶基，其各自未被取代或被A和/或OA单-、二-或三取代，

[0053] Het²表示异吲哚基，

[0054] A表示具有1至10个碳原子的非支链或支链烷基，其中1至7个氢原子可以被F、Cl、Br、OH、CHO、COA、COOA、CN、CONA₂、CONHA和/或CONH₂代替，

[0055] 和/或其中一个或两个不相邻的CH和/或CH₂基团可以被O代替，

[0056] 或Cyc，

[0057] Alk表示具有2、3、4、5或6个碳原子的烯基，

[0058] Cyc表示具有3至7个碳原子的环状烷基，其未被取代或被NHCOA、NHSO₂、OH、OA、A、NH₂、NHA、NA₂、COOA、COOH和/或CONHA单-、二-或三取代，

[0059] Hal表示F、Cl、Br或I，

[0060] m表示1、2、3或4，

[0061] n表示0、1、2、3或4，

[0062] p表示1、2或3，

[0063] 及其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体，包括其所有比率的混合物。

[0064] 本发明还涉及这些化合物的光学活性形式(立体异构体)、对映体、外消旋体、非对映体及水合物和溶剂化物。

[0065] 此外，本发明涉及式I化合物的药学上可接受的衍生物。

[0066] 术语化合物的溶剂化物用以指由于它们的相互吸引力而形成的惰性溶剂分子加合到化合物上。溶剂化物例如是单水合物或二水合物或醇盐。

[0067] 应理解，本发明还涉及盐的溶剂化物。

[0068] 术语药学上可接受的衍生物用以指例如根据本发明的化合物的盐以及所谓的前药化合物。

[0069] 如本文所用并且除非另外指明，否则术语“前药”意指式I化合物的衍生物在生物条件下(体外或体内)可以水解、氧化或以其它方式反应以提供活性化合物，特别是式I化合物。前药的实例包括但不限于式I化合物的衍生物和代谢产物，其包括可生物水解的部分，例如可生物水解的酰胺、可生物水解的酯、可生物水解的氨基甲酸酯、可生物水解的碳酸酯、可生物水解的酰胺和可生物水解的磷酸酯类似物。在某些实施方式中，具有羧基官能团的化合物的前药是羧酸的低级烷基酯。羧酸酯通过酯化存在于分子上的任何羧酸部分而常规地形成。前药一般可以使用众所周知的方法制备。

[0070] 表述“有效量”表示药物或药物活性成分在组织、系统、动物或人类中引起生物学或医学反应的量，所述反应是例如由研究者或临床医师所寻找或想得到的。

[0071] 另外，表述“治疗有效量”表示与没有接受所述量的相应受试者相比，具有以下结果的量：

[0072] 改进治疗、治愈、预防或消除疾病、综合征、病况、病痛、病症或副作用或亦减慢疾病、病痛或病症的发展。

[0073] 表述“治疗有效量”还涵盖有效增加正常生理学功能的量。

[0074] 本发明还涉及式I化合物的混合物、例如两种非对映异构体的混合物的用途，所述

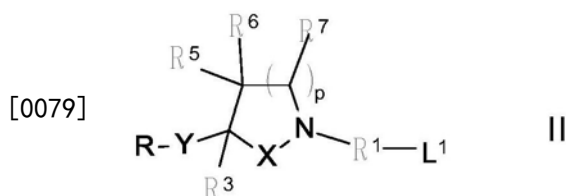
两种非对映异构体的比率例如为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:100或1:1000。

[0075] 特别优选存在立体异构化合物的混合物。

[0076] “互变异构体”是指彼此处于平衡的化合物的异构形式。异构形式的浓度将取决于发现化合物所处的环境并且可以取决于例如化合物是固体或是在有机或水性溶液中而不同。

[0077] 本发明涉及式I化合物及其盐并且涉及用于制备式I化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物、互变异构体和立体异构体的方法，其中L表示CONR⁴，

[0078] 其特征在于式II化合物



[0080] 其中X、R、R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁷和p具有权利要求1中所示的含义，

[0081] 且L¹表示Cl、Br、I或游离或反应性官能化改性的OH基团，与式III化合物反应

[0082] Q¹-Q²-NH₂ III

[0083] 其中Q¹和Q²具有权利要求1中所示的含义，

[0084] 和/或

[0085] 将所述式I的碱或酸转化为其盐中的一种。

[0086] 在上下文中，除非另外明确地说明，否则基团R¹、R²、R³具有对式I所示的含义。

[0087] A表示烷基，这是非支链（直链）或支链的，并且具有1、2、3、4、5、6、7或8个碳原子。A优选地表示甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基，此外还表示戊基，1-、2-或3-甲基丁基，1,1-、1,2-或2,2-二甲基丙基，1-乙基丙基，己基，1-、2-、3-或4-甲基戊基，1,1-、1,2-、1,3-、2,2-、2,3-或3,3-二甲基丁基，1-或2-乙基丁基，1-乙基-1-甲基丙基，1-乙基-2-甲基丙基，1,1,2-或1,2,2-三甲基丙基，此外优选表示，例如，三氟甲基。

[0088] A非常特别优选表示具有2、3、4、5或6个碳原子的烷基，优选乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基、三氟甲基、五氟乙基或1,1,1-三氟乙基。

[0089] 此外，A优选表示CH₂OCH₃、CH₂CH₂OH或CH₂CH₂OCH₃。

[0090] 环状烷基优选表示环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基。

[0091] R优选表示NR²R⁴，此外表示Alk、C(=CH₂) [C(R⁴)₂]_nAr²或Het²。

[0092] R特别优选表示NR²R⁴，非常特别优选表示NHCH₂Ar²。

[0093] X优选表示CO，此外表示CH₂。

[0094] Y优选表示CO，此外表示CH₂。

[0095] R¹优选表示(CH₂)_n、[C(R⁴)₂]_nAr¹-、(CH₂)_nHet-或(CH₂)_nCyc-，此外表示[C(R⁴)₂]_nCONHAr¹或[C(R⁴)₂]_nNA-。

[0096] 取代基L直接连接至Ar¹、Het或Cyc，而不连接至(CH₂)_n或[C(R⁴)₂]_n部分。

[0097] R¹特别优选表示邻-、间-或对-苯亚基、吡啶-二基或苯并咪唑-二基。

[0098] R²优选表示[C(R⁴)₂]_nAr²、(CH₂)_nCyc或(CH₂)_nHet¹。

[0099] R³优选表示OH。

[0100] R⁴优选表示H、甲基、乙基或丙基，非常特别优选表示H或甲基。

[0101] R^5 、 R^6 优选表示 H。

[0102] R^7 优选表示 H、F 或 CH_3 。

[0103] Ar^1 优选表示苯基, 邻-、间-或对-氟苯基, 邻-、间-或对-溴苯基, 邻-、间-或对-氯苯基, 邻-、间-或对-羟基苯基, 邻-、间-或对-甲氧基苯基, 邻-、间-或对-氨基羰基苯基, 进一步优选 2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、3,4-或 3,5-二氟苯基, 2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、3,4-或 3,5-二氯苯基, 2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、3,4-或 3,5-二溴苯基, 2,3,4-、2,3,5-、2,3,6-、2,4,6-或 3,4,5-三氯苯基, 对碘苯基、4-氟-3-氯苯基、2-氟-4-溴苯基或 2,5-二氟-4-溴苯基。

[0104] Ar^1 优选表示苯基。

[0105] Ar^2 优选表示苯基, 邻-、间-或对-甲基苯基, 邻-、间-或对-乙基苯基, 邻-、间-或对-丙基苯基, 邻-、间-或对-异丙基苯基, 邻-、间-或对-叔丁基苯基, 邻-、间-或对-三氟甲基苯基, 邻-、间-或对-氟苯基, 邻-、间-或对-溴苯基, 邻-、间-或对-氯苯基, 邻-、间-或对-氨基羰基苯基, 进一步优选 2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、3,4-或 3,5-二氟苯基, 2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、3,4-或 3,5-二氯苯基, 2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、3,4-或 3,5-二溴苯基, 2,3,4-、2,3,5-、2,3,6-、2,4,6-或 3,4,5-三氯苯基, 对碘苯基、4-氟-3-氯苯基、2-氟-4-溴苯基, 2,5-二氟-4-溴苯基或 2,5-二甲基-4-氯苯基。

[0106] Ar^2 优选表示苯基, 其未被取代或被 Hal 单-、二-、三-或四-取代。

[0107] Ar^2 此外特别优选表示苯基, 其被 Hal 单-或二取代。

[0108] 不管是否有其它取代, Het 优选表示 2-或 3-呋喃基, 2-或 3-噻吩基, 1-、2-或 3-吡咯基, 1-、2-、4-或 5-咪唑基, 1-、3-、4-或 5-吡唑基, 2-、4-或 5-噁唑基, 3-、4-或 5-异噁唑基, 2-、4-或 5-噻唑基, 3-、4-或 5-异噻唑基, 2-、3-或 4-吡啶基, 2-、4-、5-或 6-嘧啶基, 此外优选 1,2,3-三唑-1-、-4-或-5-基, 1,2,4-三唑-1-、-3-或-5-基, 1-或-5-四唑基, 1,2,3-噁二唑-4-或-5-基, 1,2,4-噁二唑-3-或-5-基, 1,3,4-噻二唑-2-或-5-基, 1,2,4-噻二唑-3-或-5-基, 1,2,3-噻二唑-4-或-5-基, 3-或-4-哒嗪基, 吡嗪基, 1-、2-、3-、4-、5-、6-或-7-吡啶基, 4-或-5-异吡啶基, 1-、2-、4-或-5-苯并咪唑基, 1-、2-、3-、4-、5-、6-或-7-吡唑基, 1-、3-、4-、5-、6-或-7-苯并吡唑基, 2-、4-、5-、6-或-7-苯并噁唑基, 3-、4-、5-、6-或-7-苯并异噁唑基, 2-、4-、5-、6-或-7-苯并噻唑基, 2-、4-、5-、6-或-7-苯并异噻唑基, 4-、5-、6-或-7-苯并-2,1,3-噁二唑基, 2-、3-、4-、5-、6-、7-或-8-喹啉基, 1-、3-、4-、5-、6-、7-或-8-异喹啉基, 3-、4-、5-、6-、7-或-8-噌啉基, 2-、4-、5-、6-、7-或-8-喹唑啉基, 5-或-6-喹喔啉基, 2-、3-、5-、6-、7-或-8-2H-苯并-1,4-噁嗪基, 进一步优选 1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基, 1,4-苯并二氧杂环己烷-6-基, 2,1,3-苯并噻二唑-4-或-5-基或 2,1,3-苯并噁二唑-5-基。

[0109] 杂环基还可以是部分或完全氢化的。

[0110] 未取代的 Het 因此也可以表示例如 2,3-二氢-2-、-3-、-4-或-5-呋喃基, 2,5-二氢-2-、-3-、-4-或-5-呋喃基, 四氢-2-或-3-呋喃基, 1,3-二氧杂戊环-4-基, 四氢-2-或-3-噻吩基, 2,3-二氢-1-、-2-、-3-、-4-或-5-吡咯基, 2,5-二氢-1-、-2-、-3-、-4-或-5-吡咯基, 1-、2-或-3-吡咯烷基, 四氢-1-、-2-或-4-咪唑基, 2,3-二氢-1-、-2-、-3-、-4-或-5-吡唑基, 四氢-1-、-3-或-4-吡唑基, 1,4-二氢-1-、-2-、-3-或-4-吡啶基, 1,2,3,4-四氢-1-、-2-、-3-、-4-、-5-或-6-吡啶基, 1-、2-、3-或-4-哌啶基, 2-、3-或-4-吗啉基, 四氢-2-、-3-或-4-吡喃基, 1,4-二氧杂环己烷基, 1,3-二氧杂环己烷-2-、-4-或-5-基, 六氢-1-、-3-或-4-哒嗪基, 六氢-

1-、-2-、-4-或-5-嘧啶基,1-、2-或3-哌嗪基,1,2,3,4-四氢-1-、-2-、-3-、-4-、-5-、-6-、-7-或-8-喹啉基,1,2,3,4-四氢-1-、-2-、-3-、-4-、-5-、-6-、-7-或-8-异喹啉基,2-、3-、5-、6-、7-或-8-3,4-二氢-2H-苯并-1,4-**咪**噻基,进一步优选2,3-甲亚基二氧苯基,3,4-甲亚基二氧苯基,2,3-乙亚基二氧苯基,3,4-乙亚基二氧苯基、3,4-(二氟甲亚基二氧基)苯基,2,3-二氢苯并呋喃-5-或6-基,2,3-(2-氧杂甲亚基二氧基)苯基或3,4-二氢-2H-1,5-苯并二氧杂环庚烷-6-或-7-基,此外优选2,3-二氢苯并呋喃基或2,3-二氢-2-氧杂呋喃基。

[0111] Het此外优选表示吡嗪基、吡啶基、苯并咪唑基、吡啶基、吡啶基、二氢吡啶基、苯并呋喃基、四氢吡喃基、二氢喹啉基、二氢异喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、咪唑基、咪唑基、吡咯基、**咪**唑基、**咪**二唑基、异**咪**唑基、苯并噻唑基、哌啶-1-基、吡咯烷-1-基、3,4-二氢-2H-吡啶并[3,2-b]-1,4-**咪**噻基、3,4-二氢-2H-苯并-1,4-**咪**噻基、苯并呋喃基、氮杂环丁烷基、3-氮杂双环[3.2.0]己基、吡咯并[2,3-b]吡啶基、四氢呋喃基、四氢-1,8-萘啶基、2,3-二氢苯并异噻唑基、1,2,3,4-四氢苯并噻唑基或六氢-苯并-1,3-二氧杂环戊烷基,其各自未被取代或被Hal、A、OA、CN、NH₂、NHA、NA₂、NO₂、CN、COOH、COOA、(CH₂)_nCONH₂、(CH₂)_nCONHA、(CH₂)_nCONA₂、NHCOA、COA、CHO、Het¹、SO₂A、SO₂NH₂、SO₂NHA、SO₂NA₂、CONHNH₂、CONHAr³、=O和/或Ar³单-、二-或三取代。

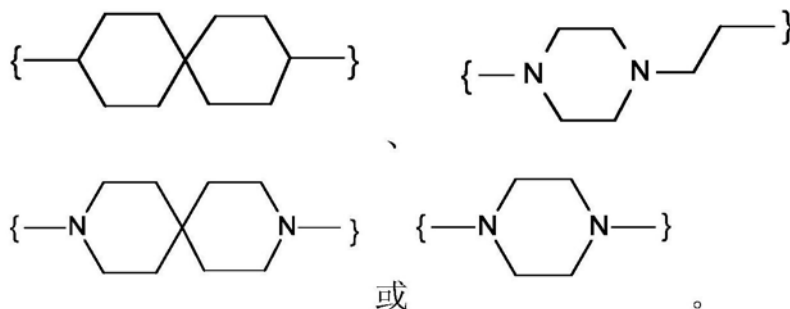
[0112] Het此外优选表示苯并咪唑基或吡啶基,其各自未被取代或被Hal单取代。

[0113] Het¹优选表示吡嗪基、吡啶基、吡啶基、哌嗪基、吗啉基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、吡咯基、**咪**唑基、**咪**二唑基、异**咪**唑基、噻唑基、三唑基、四唑基、噻二唑、哌啶-1-基、吡咯烷-1-基、四氢吡喃基、1,2-**咪**噻-2-基、1,2,5-**咪**二噻-2-基、1,3-**咪**噻-3-基或六氢嘧啶基,其各自未被取代或被A和/或OA单取代。

[0114] Het¹此外优选表示吡啶基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、吡咯基、**咪**唑基、异**咪**唑基、噻唑基、三唑基或四唑基。

[0115] Het¹此外特别优选表示吡啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑基或吡咯基。

[0116] Q²优选表示CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂O、(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂、OCH₂CH₂CH₂OCH₂CH₂CH₂、(CH₂)₅、(CH₂)₆、(CH₂)₇、(CH₂)₈、(CH₂)₃O(CH₂)₄、(CH₂)₂O(CH₂)₄O,其中一个CH₂基团可被例如以下的基团代替:



[0118] 在整个发明中,出现一次以上的所有基团可以相同或不同,即彼此独立。

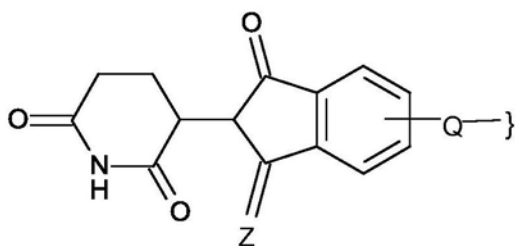
[0119] 式I化合物可以具有一个或多个手性中心,并且因此可以以各种立体异构形式存在。式I涵盖所有这些形式。

[0120] 因此,本发明特别涉及式I化合物,其中所述基团中的至少一个具有上文指示的优选含义之一。化合物的一些优选基团可以由下列子式Ia至Ie表示,其符合式I并且其中未更详细地指定的基团具有对式I指示的含义,但是其中

[0121] 在Ia中Het表示吡嗪基、吡唑基、苯并咪唑基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、吲哚基、二氢吲哚基、苯并呋喃基、四氢吡喃基、二氢喹啉基、二氢异喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、吲唑基、咪唑基、吡咯基、**噁**唑基、**噁**二唑基、异**噁**唑基、苯并噻唑基、哌啶-1-基、吡咯烷-1-基、3,4-二氢-2H-吡啶并[3,2-b]-1,4-**噁**嗪基、3,4-二氢-2H-苯并-1,4-**噁**嗪基、苯并呋喃基、氮杂环丁烷基、1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基、2H-苯并吡喃基、3-氮杂双环[3.2.0]己基、吡咯并[2,3-b]吡啶基、四氢呋喃基、四氢-1,8-萘啶基、2,3-二氢-苯并异噻唑基、1,2,3,4-四氢苯并噻嗪基或六氢-苯并-1,3-二氧杂环戊烷基,其各自未被取代或被Hal、A、OA、CN、NH₂、NHA、NA₂、NO₂、CN、COOH、COOA、(CH₂)_nCONH₂、(CH₂)_nCONHA、(CH₂)_nCONA₂、NHCOA、COA、CHO、Het¹、SO₂A、SO₂NH₂、SO₂NHA、SO₂NA₂、CONHNH₂、CONHAr³、=O和/或Ar³单-、二-或三取代;

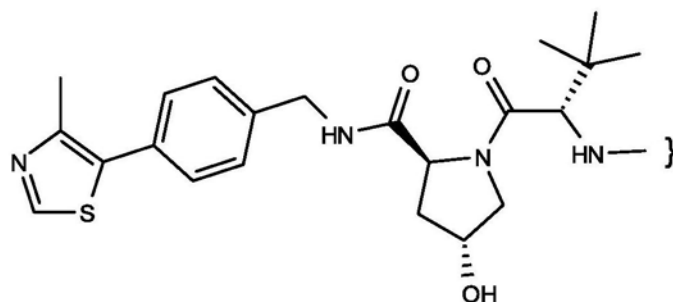
[0122] 在Ib中Het表示苯并咪唑基或吲哚基,其各自未被取代或被Hal单取代;

[0123] 在Ic中Q¹表示



或

[0124]



[0125] 在Id中R表示NR²R⁴;

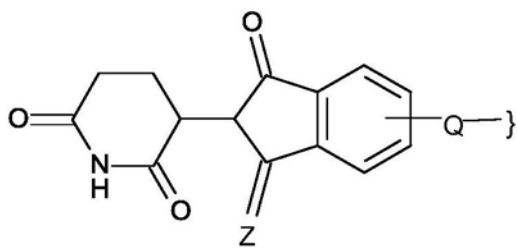
[0126] 在Ie中R¹表示(CH₂)_n、[C(R⁴)₂]_nAr¹-或(CH₂)_nHet-;

[0127] 在If中Ar²表示苯基,其未被取代或被Hal单-、二-、三-或四-取代;

[0128] 在Ig中R²表示[C(R⁴)₂]_nAr²、(CH₂)_nCyc或(CH₂)_nHet¹;

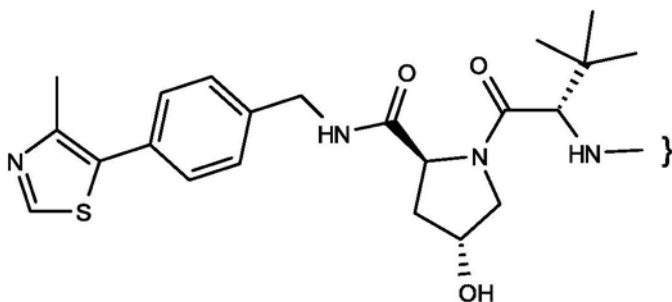
[0129] 在Ih中A表示具有1至6个碳原子的非支链或支链烷基,其中1至5个氢原子可以被F、Cl和/或OH代替;

[0130] 在Ii中Q¹表示



或

[0131]

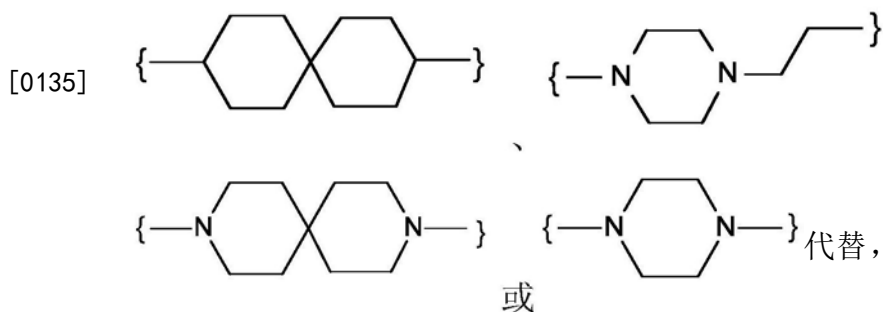


2

[0132] Z表示0或CH₂,

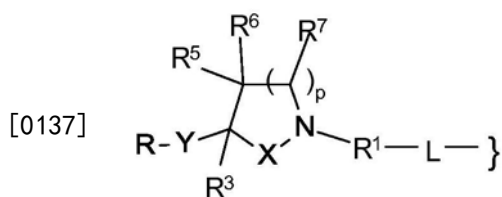
[0133] Q表示O、NH、NCH₃或CH₂,

[0134] Q²表示具有4至25个碳原子的非支链烷亚基,其中1至8个不相邻的CH₂基团可以被O、CONH和/或NHCO代替,并且其中一个CH₂基团可以被



或

[0136] Q^3 表示



,

[0138] L表示 NR^4CO 、 CONR^4 、 NH 、 O 、 CO 、 S 、 SO_2 、 SO ($=\text{NH}$)、 NHCONH 、 SO_2NH 或 NHSO_2 ,

[0139] R表示 NR^2R^4 ,

[0140] X表示CO或CH₃,

[0141] Y表示CO或CH₂,

[0142] R^1 表示 $(CH_2)_n$ 、 $[C(R^4)_2]_n$ Ar¹-或 $(CH_2)_n$ Het-

[0143] 其中取代基L直接连接至Ar¹、Het或Cyc,

[0144] R^2 表示 $[C(R^4)_2]_nAr^2$ 、 $(CH_2)_nCyc$ 或 $(CH_2)_nHet^1$,

[0145] R^3 表示OH,

[0146] R⁴表示H或具有1、2、3或4个碳原子的烷基，

[0147] R^5 、 R^6 表示H,

[0148] R^7 表示H、Hal或A,

[0149] Ar^1 表示苯基,

[0150] Ar^2 表示苯基,其未被取代或被Hal单-、二-、三-或四-取代。

[0151] Het表示吡嗪基、吡唑基、苯并咪唑基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、二氢吡咯基、苯并呋喃基、四氢吡喃基、二氢喹啉基、二氢异喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、吡唑基、咪唑基、吡咯基、**噁**唑基、**噁**二唑基、异**噁**唑基、苯并噻唑基、哌啶-1-基、吡咯烷-1-基、3,4-二氢-2H-吡啶并[3,2-b]-1,4-**噁**嗪基、3,4-二氢-2H-苯并-1,4-**噁**嗪基、苯并呋喃基、氮杂环丁烷基、1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基、2H-苯并吡喃基、3-氮杂双环[3.2.0]己基、吡咯并[2,3-b]吡啶基、四氢呋喃基、四氢-1,8-萘啶基、2,3-二氢-苯并异噻唑基、1,2,3,4-四氢苯并噻嗪基或六氢-苯并-1,3-二氧杂环戊烷基,其各自未被取代或被Hal、A、OA、CN、 NH_2 、NHA、 NA_2 、 NO_2 、CN、COOH、COOA、 $(CH_2)_nCONH_2$ 、 $(CH_2)_nCONHA$ 、 $(CH_2)_nCONA_2$ 、NHCOA、COA、CHO、 Het^1 、 SO_2A 、 SO_2NH_2 、 SO_2NHA 、 SO_2NA_2 、CONHNH $_2$ 、CONHAr ^{3} 、=O和/或 Ar^3 单-、二-或三取代。

[0152] Het^1 表示吡啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑基或吡咯基,

[0153] A表示具有1至6个碳原子的非支链或支链烷基,其中1至5个氢原子可以被F、Cl和/或OH代替,

[0154] Cyc表示具有3至7个碳原子的环状烷基,

[0155] Hal表示F、Cl、Br或I,

[0156] n表示0、1、2、3或4,

[0157] p表示1、2或3;

[0158] 及其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物。

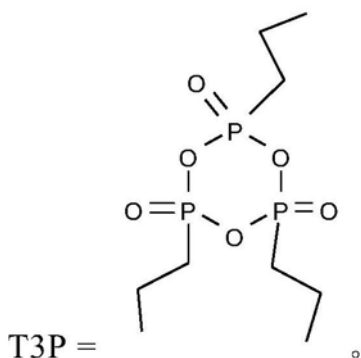
[0159] 另外,式I化合物以及制备它们的起始材料通过本身已知的方法,如在文献中(例如在标准教科书中,例如Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie[有机化学的方法], Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart)所述的方法制备,确切地说在已知的且适合所述反应的反应条件下。在此也可以使用本文未更详细地提及的本身已知的变体。

[0160] 式I化合物优选可以通过使式II化合物与式III化合物反应获得。

[0161] 式II化合物和式III化合物通常是已知的。然而,如果它们是新的,则它们可以通过本身已知的方法制备。

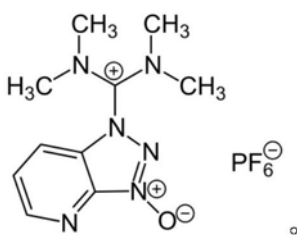
[0162] 在式II化合物中,L优选表示Cl、Br、I或游离或反应性改性的OH基团,例如活性酯、具有1至6个碳原子的咪唑**鎓**或烷基磺酰氧基(优选甲基磺酰氧基或三氟甲基磺酰氧基)或具有6至10个碳原子的芳基磺酰氧基(优选苯基磺酰氧基或对甲苯基磺酰氧基)。所述反应优选在脱水剂存在下进行,所述脱水剂例如碳二亚胺,例如N,N'-二环己基碳二亚胺("DCCI")、1,1'-羰基二咪唑或N-3-二甲基氨基丙基-N'-乙基碳二亚胺("DAPECI"),此外丙烷膦酸酐T3P(参见Angew.Chem.《有机化学杂志》92,129(1980))、二苯基磷酰基叠氮化物或2-乙氧基-N-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉,任选地在N-羟基苯并三唑存在下进行;

[0163]



[0164] 此外, 优选HATU[0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓-六氟磷酸盐]

[0165]



[0166] 反应在惰性溶剂中进行, 并且通常在酸结合剂, 优选有机碱, 例如DIPEA、4-甲基吗啉、三乙胺、二甲基苯胺、吡啶或喹啉存在下进行。

[0167] 碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐或碱金属或碱土金属的弱酸的另一种盐的添加也可以是有利的, 所述碱金属或碱土金属优选为钾、钠、钙或铯。

[0168] 取决于所用的条件, 反应时间在数分钟和14天之间, 反应温度在约-15℃和150℃之间, 通常在0℃和120℃之间, 特别优选在20℃和40℃之间。

[0169] 合适的惰性溶剂例如为烃, 例如己烷、石油醚、苯、甲苯或二甲苯; 氯代烃, 例如三氯乙烯、1,2-二氯乙烷、四氯化碳、氯仿或二氯甲烷; 醇, 例如甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、正丁醇或叔丁醇; 醚, 例如乙醚、二异丙醚、四氢呋喃 (THF) 或二噁烷; 二醇醚, 例如乙二醇单甲基或单乙基醚、乙二醇二甲基醚 (二甘醇二甲醚); 酮, 例如丙酮或丁酮; 酰胺, 例如乙酰胺、二甲基乙酰胺或二甲基甲酰胺 (DMF); 腈, 例如乙腈; 亚砜, 例如二甲亚砜 (DMSO); 二硫化碳; 羧酸, 例如甲酸或乙酸; 硝基化合物, 例如硝基甲烷或硝基苯; 酯, 例如乙酸乙酯, 或所述溶剂的混合物。

[0170] 特别优选二醇醚, 例如乙二醇单甲醚、THF、二氯甲烷和/或DMF。

[0171] 药物盐和其它形式

[0172] 根据本发明的所述化合物可以以其最终非盐形式使用。另一方面, 本发明还涵盖以可以通过本领域已知的方法衍生自各种有机和无机的酸和碱的其药学上可接受的盐的形式, 这些化合物的用途。式I化合物的药学上可接受的盐形式大部分通过常规方法制备。如果式I化合物含有羧基基团, 则其合适盐中的一种可以通过使所述化合物与合适的碱反应以给出相应的碱加成盐来形成。这样的碱例如为碱金属氢氧化物, 包括氢氧化钾、氢氧化钠和氢氧化锂; 碱土金属氢氧化物, 例如氢氧化钡和氢氧化钙; 碱金属醇盐, 例如乙醇钾和丙醇钠; 和各种有机碱, 例如吡啶、二乙醇胺和N-甲基谷氨酰胺。同样包括式I化合物的铝盐。在特定式I化合物的情况下, 酸加成盐可以通过用以下药学上可接受的有机和无机酸处理这些化合物来形成: 例如卤化氢, 例如氯化氢、溴化氢或碘化氢; 其它无机酸及其相应盐,

例如硫酸盐、硝酸盐或磷酸盐等；和烷基-和单芳基磺酸盐，例如乙烷磺酸盐、甲苯磺酸盐和苯磺酸盐；及其它有机酸及其相应盐，例如乙酸盐、三氟乙酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、苯甲酸盐、水杨酸盐、抗坏血酸盐等。因此，式I化合物的药理学上可接受的酸加成盐包括以下：乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、精氨酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐 (benzenesulfonate) (苯磺酸盐 (besylate))、硫酸氢盐、亚硫酸氢盐、溴化物、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、辛酸盐、氯化物、氯苯甲酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、磷酸二氢盐、二硝基苯甲酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、富马酸盐、甲酸盐、半乳糖二酸盐 (由粘酸得到)、半乳糖醛酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、甘油磷酸盐、半琥珀酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、马尿酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙烷磺酸盐、碘化物、羟乙基磺酸盐、异丁酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、偏磷酸盐、甲烷磺酸盐、甲基苯甲酸盐、磷酸一氢盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、草酸盐、油酸盐、棕榈酸盐 (palmoate)、果胶酸盐、过硫酸盐、苯基乙酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、膦酸盐、邻苯二甲酸盐，但这不代表限制。

[0173] 此外，根据本发明的化合物的碱式盐包括铝、铵、钙、铜、铁(III)、铁(II)、锂、镁、锰(III)、锰(II)、钾、钠及锌盐，但这无意代表限制。在上述盐之中，优选铵、碱金属钠和钾盐及碱土金属钙和镁盐。衍生自药理学上可接受的有机无毒碱的式I化合物的盐包括以下的盐：伯胺、仲胺和叔胺；被取代的胺，还包括天然存在的被取代的胺；环状胺；和碱离子交换树脂，例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、氯普鲁卡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺(苄星青霉素)、二环己胺、二乙醇胺、二乙胺、2-二乙基氨基乙醇、2-二甲基氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、还原葡萄糖胺、氨基葡萄糖、组氨酸、哈胺、异丙胺、利多卡因、赖氨酸、葡甲胺、N-甲基-D-葡萄糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙醇胺、三乙胺、三甲胺、三丙胺和三(羟甲基)甲胺(氨丁三醇)，但这无意代表限制。

[0174] 含有碱性含氮基团的本发明的化合物可以使用例如以下试剂季铵化： (C_1-C_4) 烷基卤化物，例如甲基、乙基、异丙基和叔丁基氯化物、溴化物和碘化物；硫酸二 (C_1-C_4) 烷基酯，例如硫酸二甲酯、硫酸二乙酯和硫酸二戊酯； $(C_{10}-C_{18})$ 烷基卤化物，例如癸基、十二烷基、月桂基、肉豆蔻基和十八烷基氯化物、溴化物和碘化物；和芳基 (C_1-C_4) 烷基卤化物，例如苄基氯和苄基溴。根据本发明的水溶性化合物和油溶性化合物两者都可以使用这样的盐制备。

[0175] 优选的上述药物盐包括乙酸盐、三氟乙酸盐、苯磺酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、半琥珀酸盐、马尿酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、羟乙基磺酸盐、扁桃酸盐、葡甲胺、硝酸盐、油酸盐、膦酸盐、新戊酸盐、磷酸钠、硬脂酸盐、硫酸盐、磺基水杨酸盐、酒石酸盐、硫代苹果酸盐、甲苯磺酸盐和氨丁三醇，但这无意代表限制。

[0176] 特别优选盐酸盐、二盐酸盐、氢溴酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、磷酸盐、硫酸盐和琥珀酸盐。

[0177] 式I的碱性化合物的酸加成盐通过使游离碱形式与足够量的所需酸接触，从而促使以常规形式形成所述盐来制备。所述游离碱可以通过使所述盐形式与碱接触并以常规方式分离所述游离碱而再生。所述游离碱形式在某一方面例如关于某些物理性质如在极性溶剂中的溶解性而与其相应盐形式不同；然而，对于本发明的目的，所述盐在其它方面与其相应游离碱形式一致。

[0178] 如所提到的,式I化合物的药学上可接受的碱加成盐用金属或胺如碱金属和碱土金属或有机胺形成。优选的金属为钠、钾、镁和钙。优选的有机胺为N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、N-甲基-D-葡萄糖胺和普鲁卡因。

[0179] 根据本发明的酸性化合物的碱加成盐通过使游离酸形式与足够量的所需碱接触,从而促使以常规方式形成所述盐来制备。所述游离酸可以通过使所述盐形式与酸接触并以常规方式分离所述游离酸而再生。所述游离酸形式在某一方面例如关于某些物理性质如在极性溶剂中的溶解性而与其相应盐形式不同;然而,对于本发明的目的,所述盐在其它方面与其相应游离酸形式一致。

[0180] 如果根据本发明的化合物含有多于一个能够形成这种类型的药学上可接受的盐的基团,本发明则还涵盖多重盐。典型的多重盐形式例如包括酒石酸氢盐、二乙酸盐、富马酸氢盐、二甲葡胺、磷酸氢盐、二钠和三盐酸盐,但这无意代表限制。

[0181] 关于上文所述,可见在本上下文中的表述“药学上可接受的盐”用以指活性成分,其包含以其盐中的一种的形式存在的式I化合物,特别是如果与活性成分的游离形式或先前使用的活性成分的任何其它盐形式相比较,所述盐形式赋予活性成分改进的药动学性质。所述活性成分的药学上可接受的盐形式还可以首次提供给所述活性成分先前没有的所需药动学性质,且关于其在体内的治疗功效,甚至可以对所述活性成分的药效学具有有利的影响。

[0182] 同位素

[0183] 此外预期式I化合物包括其同位素标记形式。除了式I化合物的一个或多个原子已经被具有与通常自然存在的原子的原子质量和质量数不同的原子质量或质量数的一个或多个原子代替的事实之外,所述式I化合物的同位素标记形式与所述化合物相同。易于商购获得且可以通过众所周知的方法掺入式I化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素,例如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 和 ^{36}Cl 。含有一个或多个上述同位素和/或其它原子的其它同位素的式I化合物、其前药或任一者的药学上可接受的盐意指为本发明的一部分。式I的同位素标记化合物可以许多有益的方式使用。例如,已经掺入例如放射性同位素如 ^3H 或 ^{14}C 的式I的同位素标记化合物适合用于药物和/或底物组织分布测定。这些放射性同位素,即氚(^3H)和碳-14(^{14}C),由于制备简单和可检测性优异而特别优选。将较重同位素如氘(^2H)掺入式I化合物,由于所述同位素标记化合物的较高新陈代谢稳定性而具有治疗优势。较高的新陈代谢稳定性直接转变为体内半衰期增加或剂量降低,其在大多数情况下将代表本发明的一个优选实施方式。式I的同位素标记化合物通常可以通过进行在本文中的合成方案和相关描述、实施例部分和制备部分中公开的方法用易于购得的同位素标记反应物代替非同位素标记反应物来制备。

[0184] 氘(^2H)出于通过初级动力学同位素效应处理化合物的氧化新陈代谢的目的也可以掺入式I化合物中。所述初级动力学同位素效应是由同位素核的交换引起的化学反应的速率的改变,其依次由在所述同位素交换之后共价键形成所必需的基态能量的改变引起。较重同位素的交换通常引起化学键的基态能量降低且因此引起限制速率的键断裂的速率降低。如果键断裂在沿多产物反应的坐标的鞍点区域中或所述区域附近发生,则产物分布会比明显地改变。出于解释的目的:如果氘在不可交换的位置键合到碳原子,则 $k_M/k_D=2\sim 7$ 的率差是典型的。如果所述率差成功地施用到对氧化敏感的式I化合物,则所述化合物在体

内的概况可以大幅改变并产生改进的药动学性质。

[0185] 在发现和研发治疗剂时,本领域技术人员试图优化药动学参数,同时保持合乎需要的体外性质。假定具有差的药动学概况的许多化合物对氧化新陈代谢敏感是合理的。目前可用的体外肝微粒体测定提供关于所述类型的氧化新陈代谢过程的有价值的信息,这进而容许合理地设计经由抵抗这样的氧化新陈代谢而具有改进的稳定性的式I的氘化化合物。由此获得在式I化合物的药动学概况方面的显著改进,并且所述改进可以根据体内半衰期($t_{1/2}$)、在最大治疗效应下的浓度(C_{max})、在剂量反应曲线下的面积(AUC)和F的增加;及根据清除率、剂量和材料成本的降低来定量地表述。

[0186] 以下意欲对上文进行说明:将具有多个氧化新陈代谢攻击的潜在位点(例如苯型氢原子和键合到氮原子的氢原子)的式I化合物制备为一系列类似物,其中各种组合的氢原子由氘原子置换,以使得这些氢原子中的一些、大多数和全部被氘原子置换。半衰期确定能够实现有利且精确的确定改进对氧化新陈代谢的抵抗性的改进程度。以此方式,确定母体化合物的半衰期可以由于所述类型的氘-氢交换而延长到高达100%。

[0187] 在式I化合物中的氘-氢交换还可以用以实现起始化合物的代谢物谱的有利改进,以减少或消除不想要的毒性代谢物。例如,如果毒性代谢物经由氧化碳-氢(C-H)键断裂产生,则可以合理地假设氘化类似物将大大地减少或消除不想要代谢物的产生,即使特定的氧化不是一个速度决定步骤。在现有技术水平上关于氘-氢交换的另外信息可以在例如以下文献中见到:Hanzlik等人,J.Org.Chem.《有机化学杂志》55,3992~3997,1990;Reider等人,J.Org.Chem.《有机化学杂志》52,3326~3334,1987;Foster,Adv.Drug Res.《先进药物研究》14,1~40,1985;Gillette等人,Biochemistry《生物化学》33(10)2927~2937,1994;以及Jarman等人,Carcinogenesis《致癌》16(4),683~688,1993。

[0188] 本发明还涉及药物,所述药物包含至少一种式I化合物和/或其药学上可接受的衍生物、溶剂化物及立体异构体,包括其以所有比率的混合物,及任选的赋形剂和/或助剂。

[0189] 药物制剂可以以包含预定量的活性成分/剂量单位的剂量单位形式施用。这一单位可以取决于所治疗的病况、给药方法及患者的年龄、体重和病况而包含例如0.5mg至1g、优选1mg至700mg、特别优选5mg至100mg的根据本发明的化合物,或者药物制剂可以以包含预定量的活性成分/剂量单位的剂量单位形式施用。优选的剂量单位制剂为包含如上指示的日剂量或份剂量的那些或其相应分数的活性成分。此外,所述类型的药物制剂可以使用在制药领域中通常已知的方法制备。

[0190] 药物制剂可以适合经由任何所需的合适方法,例如经口(包括颊或舌下)、直肠、鼻、局部(包括颊、舌下或经皮)、阴道或胃肠外(包括皮下、肌肉内、静脉内或皮内)方法施用。这样的制剂可以使用制药领域中已知的所有方法通过例如将活性成分与一种或多种赋形剂或一种或多种助剂组合来制备。

[0191] 适合口服的药物制剂可以作为独立单位如胶囊或片剂;粉剂或颗粒剂;在水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂;可食用泡沫或泡沫食品;或水包油液体乳剂或油包水液体乳剂来施用。

[0192] 因此,例如,在以片剂或胶囊形式口服的情况下,可以将活性成分组分与经口、无毒且药学上可接受的惰性赋形剂如乙醇、甘油、水等组合。粉剂通过将化合物粉碎成合适的精细尺寸并将其与以类似方式粉碎的药物赋形剂如可食用的碳水化合物如淀粉或甘露糖

醇混合来制备。同样可以存在矫味剂、防腐剂、分散剂和染料。

[0193] 胶囊通过制备如上所述的粉末混合物并用其填充成型的明胶壳来生成。在填充操作之前可以将例如以固体形式的高度分散的硅酸、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钙或聚乙二醇的助流剂和润滑剂添加到所述粉末混合物中。同样可以添加例如琼脂、碳酸钙或碳酸钠的崩解剂或增溶剂以改进服用胶囊之后的药物有效性。

[0194] 另外,如果需要或必需,则同样可以将合适的粘合剂、润滑剂和崩解剂以及染料掺入所述混合物中。合适的粘合剂包括淀粉,明胶,天然糖,例如葡萄糖或 β -乳糖,由玉米制造的甜味剂,天然和合成橡胶,例如阿拉伯胶、黄蓍胶或海藻酸钠,羧甲基纤维素,聚乙二醇,蜡等。在这些剂型中使用的润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。所述崩解剂包括(而不受此限制)淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土、黄原胶等。所述片剂通过例如制备粉末混合物、制粒或压干所述混合物、添加润滑剂和崩解剂和压制全部混合物以给出片剂来配制。粉末混合物通过混合以合适方式粉碎的化合物与如上所述的稀释剂或基质和任选与粘合剂,例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶或聚乙烯吡咯烷酮;溶解延缓剂,例如石蜡;吸收加速剂,例如季盐;和/或吸收剂,例如膨润土、高岭土或磷酸二钙来制备。所述粉末混合物可以通过用粘合剂如糖浆、淀粉糊、阿卡迪亚胶浆或纤维素或聚合物材料的溶液将其润湿并挤压穿过筛网来制粒。作为制粒的代替,可以使所述粉末混合物穿过压片机,给出不均匀形状的结块,将其破碎以形成颗粒。所述颗粒可以通过添加硬脂酸、硬脂酸盐、滑石粉或矿物油润滑以防止粘住铸片模具。随后将润滑的混合物压制成片剂。根据本发明的化合物也可以与自由流动的惰性赋形剂组合且随后直接压制给出片剂而不进行制粒或压干步骤。可以存在由虫胶封闭层、糖或聚合物材料的层和石蜡光泽层组成的透明或不透明的保护层。可以将染料添加到这些涂层中以能够区分不同的剂量单位。

[0195] 例如溶液、糖浆和酏剂的口服液体可以剂量单位形式制备,使得给定的量包含预定量的所述化合物。糖浆可以通过将所述化合物溶解在具有合适矫味剂的水溶液中来制备,而酏剂使用无毒醇媒剂制备。混悬剂可以通过将所述化合物分散在无毒媒剂中来配制。同样可以添加增溶剂和乳化剂,例如乙氧化异硬脂醇和聚氧乙烯山梨糖醇醚;防腐剂;矫味添加剂,例如薄荷油;或天然甜味剂或糖精;或其它人工甜味剂等。

[0196] 如果需要,可以将用于口服的剂量单位制剂封装在微囊中。所述制剂还可以延长或延迟释放的方式,例如通过将微粒材料包衣或包埋在聚合物、蜡等中来制备。

[0197] 式I化合物及其药物盐、互变异构体和立体异构体还可以脂质体递送系统如小单层脂质体、大单层脂质体和多层脂质体的形式施用。脂质体可以由各种磷脂如胆固醇、硬脂胺或磷脂酰胆碱形成。

[0198] 式I化合物及其盐、互变异构体和立体异构体还可以使用单克隆抗体作为化合物分子与其偶联的单独的载体来递送。所述化合物也可以偶联到作为靶向药物载体的可溶性聚合物。所述聚合物可以涵盖被棕榈酰基取代的聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟基丙基甲基丙烯酰胺基苯酚、聚羟基乙基天冬酰胺基苯酚或聚环氧乙烷聚赖氨酸。所述化合物此外可以偶联到一类可生物降解的聚合物,所述可生物降解的聚合物适合实现药物的受控释放,例如聚乳酸、聚 ϵ -己内酯、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二羟基吡喃、聚氰基丙烯酸酯和水凝胶的交联或两亲的嵌段共聚物。

[0199] 适合经皮施用的药物制剂可以作为独立膏剂施用或与受体的表皮广泛地紧密接

触。因此,例如,活性成分可以通过离子电渗从膏剂中递送。

[0200] 可以将适合局部施用的药物化合物配制为软膏、乳膏、混悬剂、洗液、粉剂、溶液剂、糊剂、凝胶剂、喷剂、气溶胶或油剂。

[0201] 为了治疗眼睛或其它外部组织如口和皮肤,所述制剂优选作为局部软膏或乳膏施用。在给出软膏的制剂的情况下,活性成分可以与石蜡或水混溶的膏基一起使用。或者,活性成分可以用水包油膏基或油包水基质一起配制以给出乳膏。

[0202] 适合局部施用到眼睛的药物制剂包括滴眼剂,其中活性成分溶解或悬浮在合适载体、特别是水性溶剂中。

[0203] 适合在口中局部施用的药物制剂涵盖锭剂、软锭剂和漱口剂。

[0204] 适合直肠施用的药物制剂可以栓剂或灌肠剂的形式施用。

[0205] 其中载体物质为固体的适合经鼻施用的药物制剂包括具有例如在20~500微米范围内的粒度的粗粉剂,其以采用嗅剂的方式,即通过从保持靠近鼻的含有粉剂的容器经鼻道迅速吸入来施用。以液体作为载体物质的鼻喷剂或滴鼻剂的合适制剂涵盖在水或油中的活性成分溶液。

[0206] 适合通过吸入施用的药物制剂涵盖细微粒粉尘或烟雾,其可以通过各种类型的具有气溶胶、喷雾器或吹入器的加压分配器产生。

[0207] 适合阴道施用的药物制剂可以作为阴道栓剂、棉条、乳膏、凝胶剂、糊剂、泡沫或喷雾制剂施用。

[0208] 适合胃肠外施用的药物制剂包括水性和非水性无菌注射液,其包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,借助于所述无菌注射液使所述制剂与欲治疗的受体的血液等渗;和水性和非水性无菌悬浮液,其可以包含悬浮介质和增稠剂。所述制剂可以在单剂量或多剂量容器如密封安瓿和小瓶中施用并以冷冻干燥(冻干)状态储存,以便只有在使用前立即添加无菌载液,例如用于注射目的的水。根据所述配方制备的注射溶液和悬浮液可以由无菌粉末、颗粒剂和片剂制备。

[0209] 不用说,关于特定制剂类型,除了以上特定提到的成分之外,所述制剂还可以包含本领域中常用的其它试剂;因此,例如,适合口服的制剂可以包含矫味剂。

[0210] 式I化合物的治疗有效量取决于许多因素,所述因素例如包括动物的年龄和体重、需要治疗的精确病况及其严重性、制剂的性质和施用方法,且其最终由治疗医师或兽医确定。然而,根据本发明的化合物的有效量通常在0.1至100mg/kg受体(哺乳动物)体重/日的范围内且特定典型地在1至10mg/kg体重/日的范围内。因此,对于体重为70kg的成年哺乳动物每日的实际量通常在70mg至700mg之间,其中所述量可以每日单一剂量或通常以每日一系列多份剂量(例如2、3、4、5或6份)施用,以使得日总剂量相同。盐或溶剂化物或其生理学功能衍生物的有效量可以被确定为根据本发明的化合物的有效量本身的分数。可以假定类似的剂量适合治疗上述其它病况。

[0211] 这种类型的组合处理可以借助于同时、连续或分别分配处理的单独组分来实现。这类组合产品使用根据本发明的化合物。

[0212] 本发明还涉及药物,所述药物包含至少一种式I化合物和/或其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其以所有比率的混合物,及至少一种其它药物活性成分。

[0213] 本发明还涉及一种由以下单独包装组成的套件(试剂盒):

[0214] (a) 有效量的式I化合物和/或其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其以所有比率的混合物,

[0215] 和

[0216] (b) 有效量的其它药物活性成分。

[0217] 所述套件包括合适的容器,例如箱、单个瓶、袋或安瓿。所述套件例如可以包括单独的安瓿,其各自含有有效量的式I化合物和/或其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其以所有比率的混合物,

[0218] 和有效量的以溶解或冻干形式的其它药物活性成分。

[0219] 如本文使用的“治疗”意指完全或部分地减轻与病症或疾病相关的症状,或减慢或中止那些症状的进一步进展或恶化,或防止或预防处于发展所述疾病或病症的危险之中的受试者的疾病或病症。

[0220] 结合式(I)化合物的术语“有效量”可以意指能够完全或部分地减轻与病症或疾病相关的症状,或减慢或中止那些症状的进一步进展或恶化,或防止或预防具有本文公开的疾病或处于发展本文公开的疾病的危险之中的受试者的疾病或病症的量,所述疾病例如为炎性病况、免疫病况、癌症或新陈代谢病况。

[0221] 用途

[0222] 本发明特别涉及式I化合物及其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物,用于治疗其中对MetAP-2的降解和/或调制起作用的疾病。

[0223] 本发明具体涉及式I化合物及其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物,用于MetAP-2的降解和/或调制。

[0224] 本发明具体涉及式I化合物及其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物,用于治疗和控制疾病。

[0225] 这些疾病包括肿瘤细胞的增殖、促进实体瘤生长的病理性新血管形成(或血管生成)、眼部新血管形成(糖尿病性视网膜病、年龄性黄斑变性等)和炎症(银屑病、类风湿性关节炎等)以及系膜细胞的增殖性疾病。

[0226] 本发明涉及使用根据权利要求1所述的式I的化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物、互变异构体和立体异构体,包括其所有比率的混合物,用于治疗和/或预防肿瘤、肿瘤转移、系膜细胞的增殖性疾病、血管瘤、增殖性视网膜病、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化新血管形成、银屑病、眼部新血管形成、骨质疏松症、糖尿病和肥胖症、淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、疟疾和前列腺肥大。

[0227] 本发明涉及化合物,其用于选自以下部位的肿瘤疾病:

[0228] 鳞状上皮、膀胱、胃、肾、头颈部、食管、子宫颈、甲状腺、肠、肝、脑、前列腺、泌尿生殖道、淋巴系统、胃、喉、肺、皮肤,单核细胞白血病、肺腺癌、小细胞肺癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、乳腺癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤。

[0229] 本发明涵盖式I化合物和/或其生理学上可接受的盐和溶剂化物用于制备用于治疗或预防肿瘤、肿瘤疾病和/或肿瘤转移的药物的用途。

[0230] 肿瘤疾病优选选自以下:

[0231] 鳞状上皮、膀胱、胃、肾、头颈部、食管、子宫颈、甲状腺、肠、肝、脑、前列腺、泌尿生殖道、淋巴系统、胃、喉、肺、皮肤的肿瘤,单核细胞白血病、肺腺癌、小细胞肺癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、乳腺癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤。

[0232] 同样涵盖根据本发明的根据权利要求1所述的化合物和/或其生理学上可接受的盐和溶剂化物用于制备用于治疗骨质疏松症、糖尿病和肥胖症的药物的用途。

[0233] 同样涵盖根据本发明的根据权利要求1所述的化合物和/或其生理学上可接受的盐和溶剂化物用于制备用于治疗或预防其中涉及血管生成的疾病的药物的用途。

[0234] 涉及血管生成的这种类型的疾病是眼病,例如视网膜血管形成、糖尿病性视网膜病、年龄性黄斑变性等。

[0235] 血管生成疾病优选选自以下:

[0236] 糖尿病性视网膜病、关节炎、癌症、银屑病、卡波西肉瘤、血管瘤、心肌血管生成、动脉粥样硬化斑块新血管形成、血管生成性眼病、脉络膜新血管形成、晶状后纤维增生、黄斑变性、角膜移植排斥、虹膜红变、神经眼青光眼、奥斯特韦伯综合征。

[0237] 系膜细胞的增殖性疾病优选选自以下:

[0238] 肾小球肾炎、糖尿病性肾病、恶性肾硬化、血栓性微血管病综合征、移植排斥、肾小球病。

[0239] 式I化合物和/或其生理学上可接受的盐和溶剂化物用于制备用于治疗或预防炎症性疾病的药物的用途同样落入本发明的范围内。这样的炎症性疾病的实例包括类风湿性关节炎、银屑病、接触性皮炎、迟发型超敏反应等。

[0240] 炎症性疾病优选选自以下:

[0241] 炎性肠病、关节炎、动脉粥样硬化、哮喘、过敏、炎性肾病、多发性硬化、慢性阻塞性肺病、炎性皮肤病、牙周病、银屑病、T细胞促进的免疫疾病。

[0242] 炎性肠病优选选自以下:

[0243] 溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、非特异性结肠炎。

[0244] T细胞促进的免疫疾病优选选自以下:

[0245] 过敏性脑脊髓炎、过敏性神经炎、移植排斥、移植物抗宿主反应、心肌炎、甲状腺炎、肾炎、系统性红斑狼疮、胰岛素依赖型糖尿病。

[0246] 关节炎疾病优选选自以下:

[0247] 类风湿性关节炎、骨关节炎、卡普兰综合征、费尔蒂综合征、舍格伦综合征、强直性脊柱炎、斯蒂尔病、软骨钙质沉着症、代谢性关节炎、风湿热、赖特病、韦斯莱综合征。

[0248] 炎性肾病优选选自以下:

[0249] 肾小球肾炎、肾小球损伤、肾病综合征、间质性肾炎、狼疮肾炎、古德帕斯丘综合征、韦格纳肉芽肿病、肾血管炎、IgA肾病、特发性肾小球疾病。

[0250] 炎性皮肤病优选选自以下:

[0251] 银屑病、特应性皮炎、接触敏感性、痤疮。

[0252] 同样涵盖式I化合物和/或其生理学上可接受的盐和溶剂化物用于制备用于治疗或预防哺乳动物的疾病或病况的药物的用途,其中对于所述方法,将治疗有效量的根据本发明的化合物施用到需要这样的治疗的患病哺乳动物。所述治疗量根据具体疾病而不同,

并且可以由本领域的技术人员确定而无需过度工作。

[0253] 本发明还涵盖式I化合物和/或其生理学上可接受的盐和溶剂化物用于制备用于治疗或预防视网膜血管形成的药物的用途。

[0254] 同样涵盖式I化合物和/或其生理学上可接受的盐用于制备用于治疗 and/或对抗哺乳动物中的肿瘤诱导疾病的药物的用途,其中对于所述方法,将治疗有效量的根据本发明的化合物施用到需要这样的治疗的患病哺乳动物。所述治疗量根据具体疾病而不同,并且可以由本领域的技术人员确定而无需过度工作。

[0255] 所公开的式I化合物可以与包括抗癌剂的其它已知治疗剂组合施用。如本文所用,术语“抗癌剂”涉及出于治疗癌症的目的而施用到患有癌症的患者的任何剂。

[0256] 本文定义的抗癌治疗可以作为单一疗法施用,或者除了本文公开的式I化合物之外还可以包括常规手术或放射疗法或药物疗法。这样的药物疗法,例如化学疗法或靶向疗法,可以包括以下抗肿瘤剂中的一种或多种,但优选一种:

[0257] 烷化剂

[0258] 例如,六甲蜜胺、苯达莫司汀、白消安、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、氮芥(chlormethine)、环磷酰胺、达卡巴嗪、异环磷酰胺、英丙舒凡、甲苯磺酸盐、洛莫司汀、美法仑、二溴甘露醇、二溴卫茅醇、尼莫司汀、雷莫司汀、替莫唑胺、塞替派、曲奥舒凡、氮芥(mechlorethamine)、卡波醌;

[0259] 阿帕齐醌、福莫司汀、葡磷酰胺、帕利伐米、哌泊溴烷、曲磷胺、乌拉莫司汀、TH-302⁴、VAL-083⁴;

[0260] 铂化合物

[0261] 例如,卡铂、顺铂、依他铂、水合米铂、奥沙利铂、洛铂、奈达铂、吡铂、沙铂;

[0262] 洛铂、奈达铂、吡铂、沙铂;

[0263] DNA改变剂

[0264] 例如,氨柔比星、比生群、地西他滨、米托蒽醌、丙卡巴肼、曲贝替定、氯法拉滨;

[0265] 安吡啶、溴他利星、匹杉琼、laromustine^{1,3};

[0266] 拓扑异构酶抑制剂

[0267] 例如,依托泊苷、伊立替康、雷佐生、索布佐生、替尼泊苷、托泊替康;

[0268] 氨茶非特、贝洛替康、依利醋铵、voreloxin;

[0269] 微管改性剂

[0270] 例如,卡巴他赛、多西他赛、艾日布林、伊沙匹隆、紫杉醇、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、长春地辛、长春氟宁;

[0271] 康普瑞汀磷酸、替司他赛;

[0272] 抗代谢药

[0273] 例如,天冬酰胺酶³、阿扎胞苷、左旋亚叶酸钙、卡培他滨、克拉屈滨、阿糖胞苷、依诺他滨、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、奈拉滨、培美曲塞、普拉曲沙、硫唑嘌呤、硫鸟嘌呤、卡莫氟;

[0274] 去氧氟尿苷、艾西拉滨、雷替曲塞、沙帕他滨、替加氟^{2,3}、三甲曲沙;

[0275] 抗癌抗生素

[0276] 例如,博来霉素、放线霉素D、多柔比星、表柔比星、伊达比星、左旋咪唑、米替福新、

丝裂霉素C、罗米地新、链佐星、戊柔比星、净司他丁、佐柔比星、道诺霉素、普卡霉素；

[0277] 阿柔比星、培洛霉素、吡柔比星；

[0278] 激素/拮抗剂

[0279] 例如，阿巴瑞克、阿比特龙、比卡鲁胺、布舍瑞林、卡鲁睾酮、氯烯雌醚、地加瑞克、地塞米松、雌二醇、氟可龙氟甲睾酮、氟他胺、氟维司群、戈舍瑞林、组胺瑞林、亮丙瑞林、甲地孕酮、米托坦、那法瑞林、诺龙、尼鲁米特、奥曲肽、泼尼松龙、雷洛昔芬、他莫昔芬、促甲状腺素 α 、托瑞米芬、曲洛司坦、曲普瑞林、己烯雌酚；

[0280] 阿考比芬、达那唑、地洛瑞林、环硫雄醇、orterone1、恩杂鲁胺^{1,3}；

[0281] 芳香酶抑制剂

[0282] 例如，氨鲁米特、阿那曲唑、依西美坦、法偈唑、来曲唑、睾内酯；

[0283] 福美坦；

[0284] 小分子激酶抑制剂

[0285] 例如，克唑替尼、达沙替尼、厄洛替尼、伊马替尼、拉帕替尼、尼洛替尼、帕唑帕尼、瑞格非尼、鲁索利替尼、索拉非尼、舒尼替尼、凡德他尼、威罗菲尼、伯舒替尼、吉非替尼、阿西替尼；

[0286] 阿法替尼、阿立塞替、达拉非尼、达克替尼、dinaciclib、多韦替尼、恩扎妥林、尼达尼布、乐伐替尼、利尼伐尼、linsitinib、马赛替尼、米哌妥林、莫特沙尼、来那替尼、奥安替尼、哌立福辛、帕纳替尼、雷多替尼、rigosertib、替吡法尼、tivantinib、tivozanib、曲美替尼、匹玛舍替、丙氨酸布立尼布、西地尼布、阿帕替尼⁴、卡博替尼S-苹果酸盐^{1,3}、依鲁替尼^{1,3}、埃克替尼⁴、布帕尼西²、西帕替尼⁴、考比替尼^{1,3}、艾代拉利司^{1,3}、菲卓替尼¹、XL-647⁴；

[0287] 光敏剂

[0288] 例如，甲氧沙林³；

[0289] 吡吩姆钠、他拉泊芬、替莫泊芬；

[0290] 抗体

[0291] 例如，阿维单抗、阿仑珠单抗、贝索单抗、本妥昔单抗、西妥昔单抗、地舒单抗、依匹木单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、群司珠单抗、贝伐珠单抗、帕妥珠单抗^{2,3}；

[0292] 卡妥索单抗、埃罗妥珠单抗、依帕珠单抗、法勒珠单抗、莫加珠单抗、耐昔妥珠单抗、尼妥珠单抗、奥滨尤妥珠单抗、阿巴伏单抗、奥戈伏单抗、雷莫芦单抗、利妥木单抗、西妥昔单抗、托珠单抗、扎鲁木单抗、扎木单抗、马妥珠单抗、达洛珠单抗^{1,2,3}、奥纳珠单抗^{1,3}、雷妥莫单抗¹、他贝芦单抗^{1,3}、EMD-525797⁴、纳武单抗^{1,3}；

[0293] 细胞因子

[0294] 例如，阿地白介素、干扰素 α^2 、干扰素 $\alpha 2a^3$ 、干扰素 $\alpha 2b^{2,3}$ ；

[0295] 西莫白介素、他索纳明、替西白介素、奥普瑞白介素^{1,3}、重组干扰素 $\beta-1a^4$ ；

[0296] 药物缀合物

[0297] 例如，地尼白介素、替伊莫单抗、碘苄胍I123、泼尼莫司汀、曲妥珠单抗美坦新、雌莫司汀、吉妥单抗、奥佐米星、阿柏西普；

[0298] 贝辛白介素、依多曲肽、奥英妥珠单抗、伊那莫单抗、莫奥珠单抗、锝(99mTc)阿西莫单抗^{1,3}、vintafolide^{1,3}；

[0299] 疫苗

[0300] 例如西普鲁塞³;维特斯朋³、emepepimut-S³、oncoVAX⁴、rindopepimut³、troVax⁴、MGN-1601⁴、MGN-1703⁴;

[0301] 杂项

[0302] 阿利维甲酸、贝沙罗汀、硼替佐米、依维莫司、伊班膦酸、咪喹莫特、来那度胺、香菇多糖、甲酪氨酸、米伐木肽、帕米膦酸、培门冬酶、喷司他丁、西普鲁塞³、西佐喃、他米巴罗汀、坦罗莫司、沙利度胺、维甲酸、维莫德吉、唑来膦酸、伏林司他;

[0303] 塞来考昔、西仑吉肽、恩替诺特、依他硝唑、ganetespib、伊屈诺昔、iniparib、伊沙佐米、氯尼达明、尼莫唑、帕比司他、peretinoin、普利肽新、泊马度胺、丙考达唑、地磷莫司、他喹莫德、特罗司他、胸腺法新、替拉扎明、托舍多特、trabedersen、乌苯美司、伐司扑达、今又生⁴、青霉素钠⁴、reolysin⁴、瑞他霉素盐酸盐^{1,3}、trebananib^{2,3}、维鲁利秦⁴、卡非佐米^{1,3}、内皮抑素⁴、immucothel⁴、贝利司他³、MGN-1703⁴;

[0304] ¹Prop. INN (Proposed International Nonproprietary Name) (申报的国际非专利名称)

[0305] ²Rec. INN (Recommended International Nonproprietary Names) (推荐的国际非专利名称)

[0306] ³USAN (United States Adopted Name) (美国选定名称)

[0307] ⁴无INN.

具体实施方式

[0308] 以下缩写分别指以下定义:

[0309] aq (水性), h (小时), g (克), L (升), mg (毫克), MHz (兆赫兹), min. (分钟), mm (毫米), mmol (毫摩尔), mM (毫摩尔浓度), m.p. (熔点), eq (当量), mL (毫升), L (微升), ACN (乙腈), AcOH (乙酸), CDCl₃ (氘代氯仿), CD₃OD (氘代甲醇), CH₃CN (乙腈), c-hex (环己烷), DCC (二环己基碳二亚胺), DCM (二氯甲烷), DIC (二异丙基碳二亚胺), DIEA (二异丙基乙基胺), DMF (二甲基甲酰胺), DMSO (二甲基亚砜), DMSO-d₆ (氘代二甲亚砜), EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺), ESI (电喷雾离子化), EtOAc (乙酸乙酯), Et₂O (二乙醚), EtOH (乙醇), HATU (六氟磷酸二甲基氨基-([1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-基氧基)-甲亚基)-二甲铵), HPLC (高效液相色谱), i-PrOH (2-丙醇), K₂CO₃ (碳酸钾), LC (液相色谱法), MeOH (甲醇), MgSO₄ (硫酸镁), MS (质谱法), MTBE (甲基叔丁基醚), NaHCO₃ (碳酸氢钠), NaBH₄ (硼氢化钠), NMM (N-甲基吗啉), NMR (核磁共振), PyBOP (六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯烷基-磷鎓), RT (室温), Rt (保留时间), SPE (固相萃取), TBTU (四氟硼酸2-(1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓), TEA (三乙胺), TFA (三氟乙酸), THF (四氢呋喃), TLC (薄层色谱法), UV (紫外线)。

[0310] 在上下文中,所有温度均以℃表示。在以下实施例中,“常规处理”意指:如果必要,则添加水,如果必要,则取决于最终产物的组成将pH调节到在2和10之间的值,用乙酸乙酯或二氯甲烷萃取混合物,使各相分离,使有机相经硫酸钠干燥且蒸发,且通过硅胶层析法和/或通过结晶纯化残留物。硅胶上的R_f值;洗脱剂:乙酸乙酯/甲醇9:1。

[0311] 在Bruker DPX-300、DRX-400、AVII-400上或在500MHz光谱仪上,使用氘化溶剂的

残留信号作为内标记记录¹H NMR。相对于残留溶剂信号以ppm报道化学位移(δ) (对于在DMSO-d₆中的¹H NMR, δ =2.49ppm)。¹H NMR数据报告如下:化学位移(多重性、耦合常数和氢数)。多重性缩写如下:s(单峰),d(双峰),t(三重峰),q(四重峰),m(多重峰),br(宽峰)。

[0312] MetAP-2的生化活性测试

[0313] 通过酶偶联测定,使用三肽Met-Ala-Ser(MAS)作为底物和重组人MetAP-2(His-Tev-MetAP-2,在默克制备)确定MetAP-2活性。释放的甲硫氨酸通过L-氨基酸氧化酶(AAO)转化为氧化的甲硫氨酸,并且释放过氧化氢。在第二步骤中,辣根过氧化物酶催化使用过氧化氢作为共底物将无色染料联茴香胺氧化成氧化的联茴香胺。通过光度法检测450nm处吸光度的增加来检测产生的氧化的联茴香胺。Met-AP2活性以动力学测量模式确定。一分子甲硫氨酸的释放对应于一分子氧化的联茴香胺的产生。MetAP2酶活性直接对应于单位时间内吸光度的增加。

[0314] 详细地,在22℃下在384孔微量滴定板(Greiner 78110MTP,透明)中在50μL的总反应体积中进行测定。在22℃下在不存在或存在测试化合物(10倍稀释浓度)的情况下,在100mM Hepes、50mM NaCl、50μM MnCl₂,pH 7.0中,孵育0.35μg N-末端His标签人rec MetAP2(在家制备,AA 2-478,终浓度(fc)123nM)、1单位辣根过氧化物酶(罗氏,曼海姆)、0.02单位L-氨基酸氧化酶(默克,达姆施塔特)、0.6mM联茴香胺(默克(Merck),达姆施塔特,溶解于50mM HCl、10%DMSO中)15分钟。反应通过添加500μM(fc)MAS肽(默克,达姆施塔特)开始。混合后,在Envision多模式读取器(珀金埃尔默公司,沃尔瑟姆)上在450nm波长下进行第一吸光度测量。将反应物在22℃下再孵育45分钟,并且进行第二吸光度测量。确定单位时间内吸光度的增加。所用的对照值是具有0.5%DMSO(fc)的无抑制剂反应。使用终浓度为5μM的烟曲霉素(默克,达姆施塔特)作为药理学抑制剂对照。抑制值(IC₅₀)使用来自GeneData(瑞士巴塞尔)的程序ASSAY ANALYZER®确定。

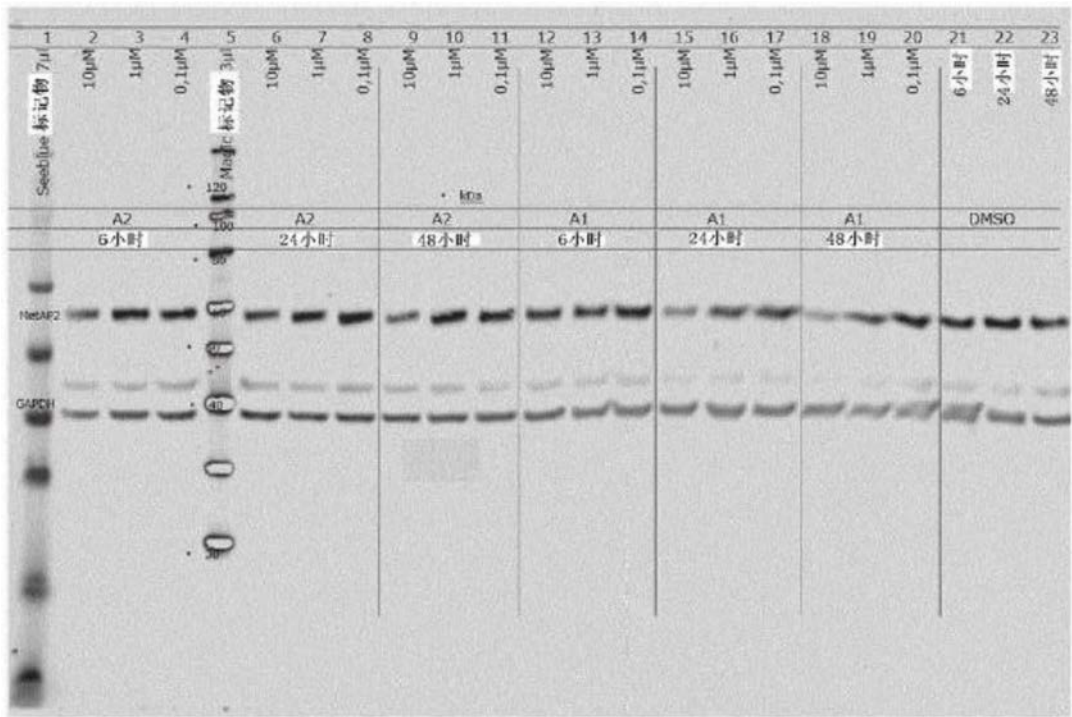
[0315] HUVEC增殖测定

[0316] HUVEC原代内皮细胞的增殖用作基于细胞的机制测定。²⁵应用CyQUANT®直接细胞增殖测定(Invitrogen C35011),其基于细胞渗透的荧光DNA结合染料,将DNA含量用作细胞数量的直接量度。将汇集的HUVEC细胞(Promocell C-12203)在由Promocell供应的培养基(登录号C-22020)中培养最多4代。对于所述测定,将500个细胞/孔接种到具有透明底部的黑色384孔培养板中的70μl培养基中,并且在37℃、5%CO₂下孵育6小时。添加10μl预稀释的测试化合物,并且在测量DNA含量之前将细胞在37℃、5%CO₂下孵育3天。CyQUANT检测试剂根据制造商方案制备,添加20μl/孔并且在37℃、5%CO₂下孵育至少1小时,然后在Envision多模式读取器(珀金埃尔默公司,沃尔瑟姆)上用激发480nm和发射535nm(底部读取模式)测量荧光。用10种化合物稀释液以剂量反应进行测定。抑制值(IC₅₀)使用来自GeneData(瑞士巴塞尔)的程序ASSAY ANALYZER®确定。

[0317] 另外,可以证明MetAP-2在HCT116细胞中的降解。参见下面的扫描。这种降解表明延长/持续的作用,因为化合物不仅抑制靶蛋白MetAP-2,而且甚至将其从细胞中降解/去除,并且因此,适应症的治疗应当更加有效。

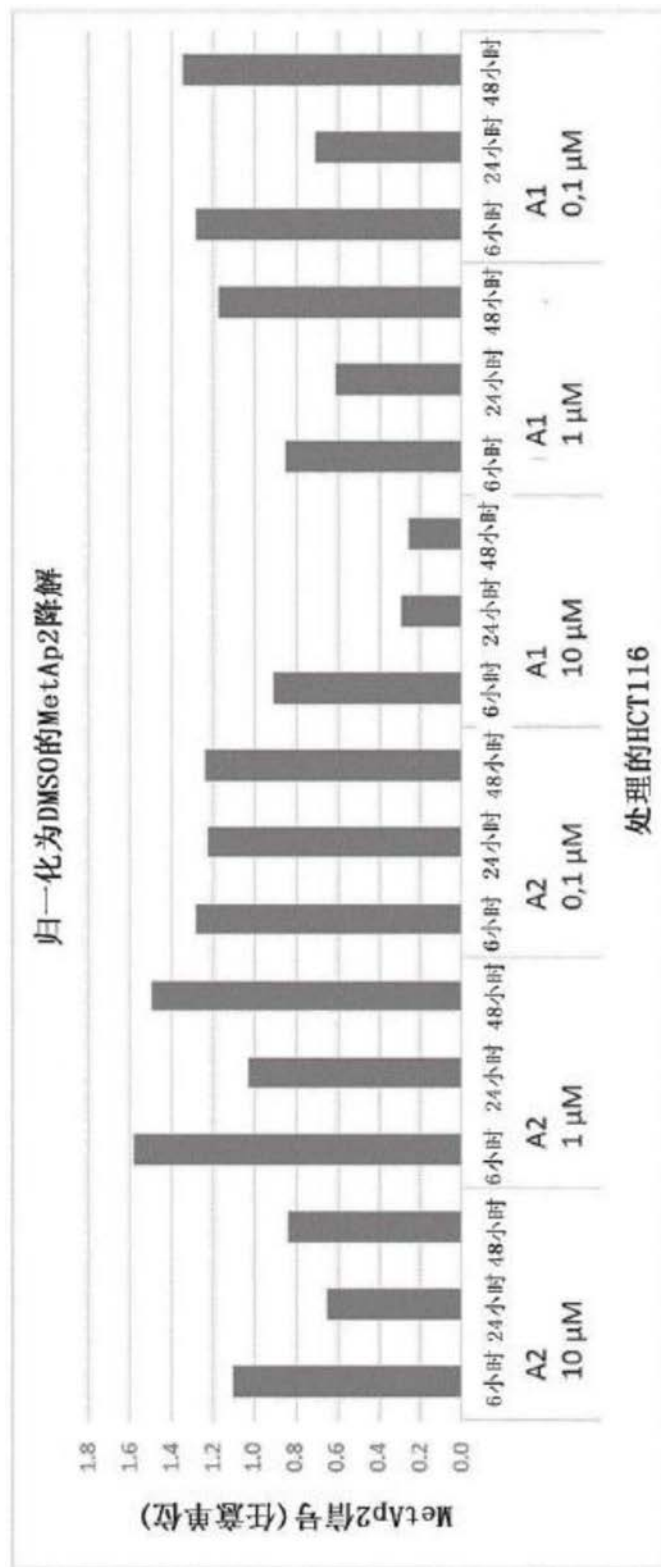
[0318] 在三种不同浓度(0.1μM;1μM;10μM)的化合物24小时孵育、细胞裂解、SDS-PAGE分离、印迹和抗体辅助检测后,获得初始MetAP-2降解结果。下面的图片指示两种化合物“A1”和“A2”如何随时间降解MetAP-2。

[0319]



- [0320] 下表含有这些结果的定量。
- [0321] 概括地讲：
- [0322] “A2”显示在10μM下的活性 (24小时后MetAP-2蛋白减少40%，并且48小时后减少20%)
- [0323] “A1”更有活性：在10μM下：6小时后减少10%，24小时后减少70%，并且48小时后再次减少70%。在1μM下：6小时后减少15%，24小时后减少40%。48小时后，可以检测到任何减少。在0.1μM下：24小时后减少30%。
- [0324] 比较在不同浓度和时间点化合物处理后HTC116细胞中的MetAP2蛋白水平。作为对照，使用DMSO并且将其值设定为“1”。MetAp2值<1意指降解。

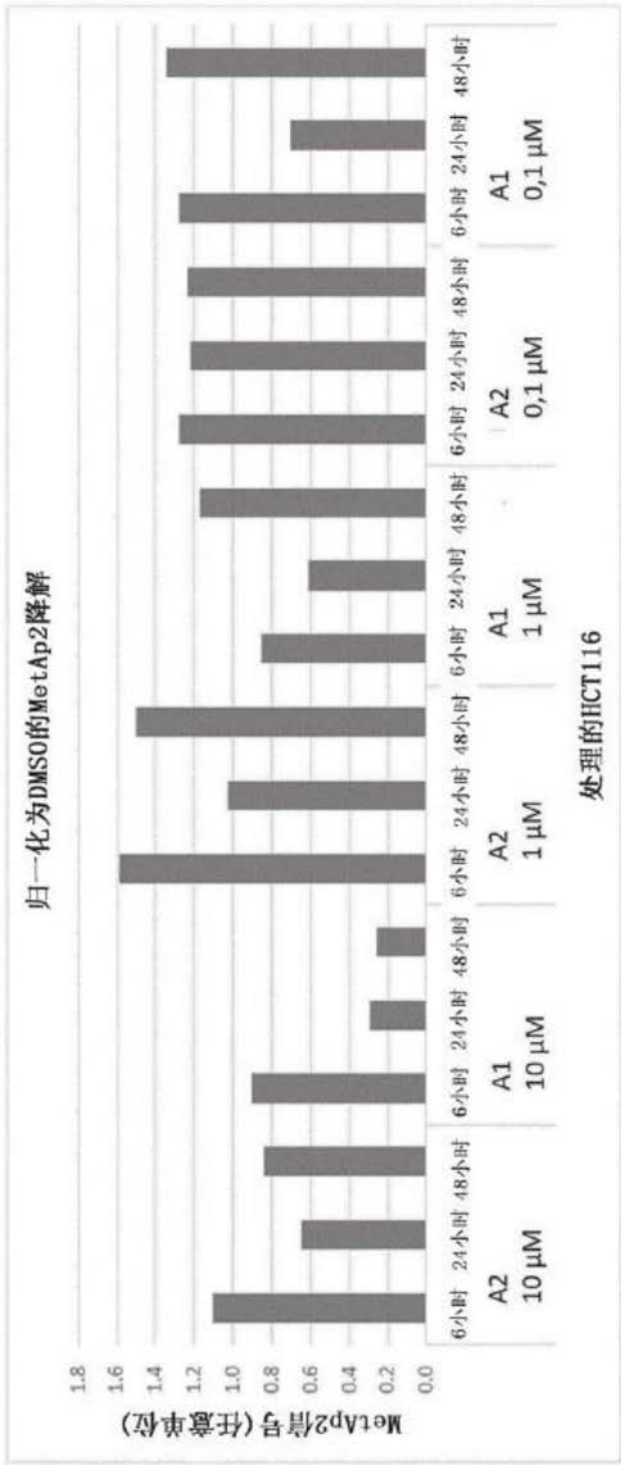
[0325]



[0326]

	样品		归一化为未处理 (DMSO)的信号 MetAp2/GAPDH
10 μ M	A2	6 小时	1,1
		24 小时	0,6
		48 小时	0,8
1 μ M	A2	6 小时	1,6
		24 小时	1,0
		48 小时	1,5
0,1 μ M	A21	6 小时	1,3
		24 小时	1,2
		48 小时	1,2
10 μ M	A1	6 小时	0,9
		24 小时	0,3
		48 小时	0,3
1 μ M	A1	6 小时	0,9
		24 小时	0,6
		48 小时	1,2
0,1 μ M	A1	6 小时	1,3
		24 小时	0,7
		48 小时	1,3

[0327]

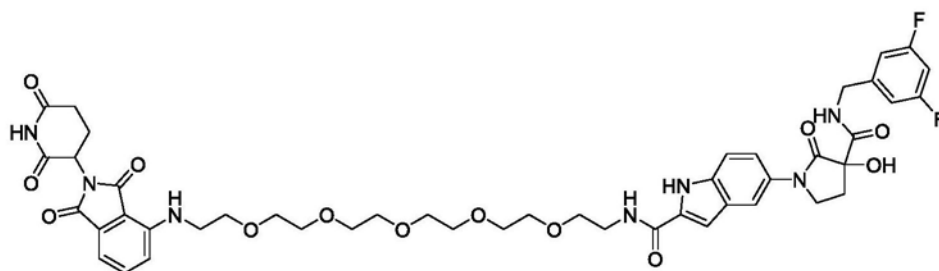


[0328]

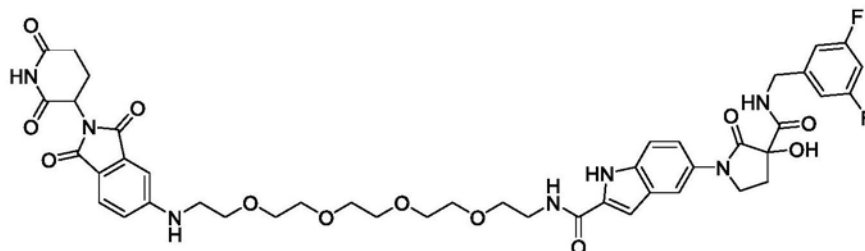
样品			归一化为未处理 (DMSO)的信号 MetAp2/GAPDH
10 μ M	A2	6 小时	1,1
		24 小时	0,6
		48 小时	0,8
10 μ M	A1	6 小时	0,9
		24 小时	0,3
		48 小时	0,3
1 μ M	A2	6 小时	1,6
		24 小时	1,0
		48 小时	1,5
1 μ M	A1	6 小时	0,9
		24 小时	0,6
		48 小时	1,2
0,1 μ M	A2	6 小时	1,3
		24 小时	1,2
		48 小时	1,2
0,1 μ M	A1	6 小时	1,3
		24 小时	0,7
		48 小时	1,3

[0329] 下面显示的优选实施例以剂量和时间依赖性方式降解HCT116细胞中的MetAP-2。

[0330] “A1”

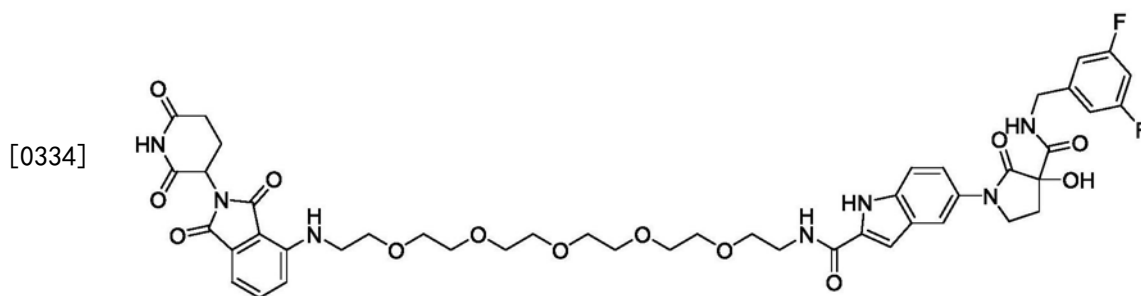


[0331] “A2”

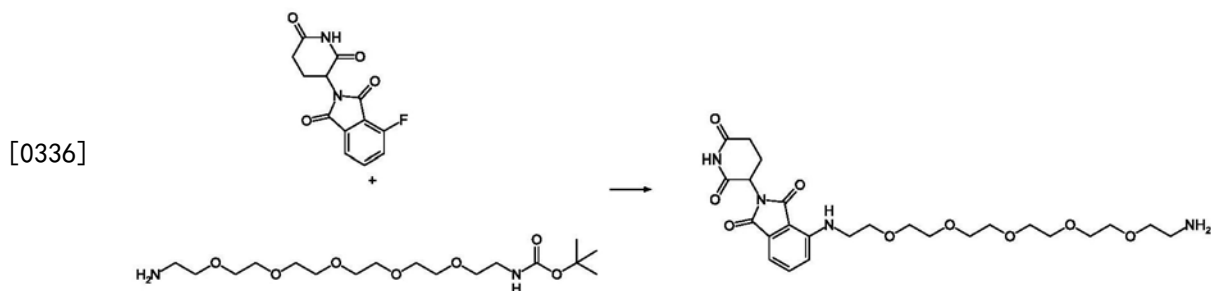


[0332] 1. “A1”的示例性合成:

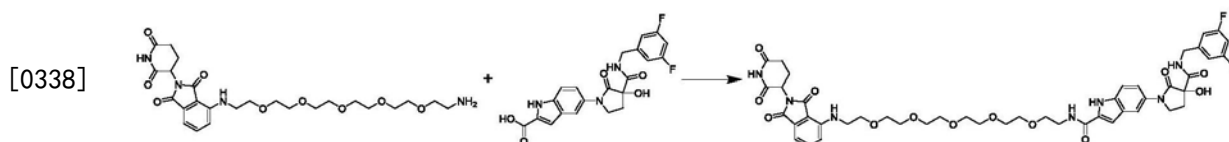
[0333] 5-[3-[(3,5-二氟苯基) 甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-吡啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吡啶-2-甲酰胺



[0335] 结构单元如从文献中已知的那样制备,并且如下所示在酰胺形成反应中连接:



[0337] 向市售2-(2,6-二氧杂吡啶-3-基)-4-氟-2,3-二氢-1H-异吲哚-1,3-二酮(200mg; 0.72mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(1.5ml; 18mmol)中的搅拌溶液中添加市售N-(17-氨基-3,6,9,12,15-五氧杂十七烷-1-基)氨基甲酸叔丁酯(275mg; 0.72mmol)和无水碳酸钠(153mg; 1.45mmol)。将反应混合物加热至90℃,持续14小时。冷却至室温后,将反应混合物蒸发,溶解在DMSO中并且通过反相色谱法纯化。蒸发含有产物的级分。将化合物N-(17-{[2-(2,6-二氧杂吡啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基]氨基}-3,6,9,12,15-五氧杂十七烷-1-基)氨基甲酸叔丁酯溶解于二氯甲烷(4ml)中,并且用三氟乙酸(1ml)处理3小时。将反应物蒸发至干,用甲苯共蒸发两次,且不经进一步纯化直接用于下一反应。



[0339] 方法:

[0340] 将5-(3-[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基)-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基)-1H-吡啶-2-羧酸(30mg;0.07mmol)、5-(15-氨基-4,7,10,13-四氧杂-1-氮杂十五烷-1-基)-2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-2,3-二氢-1H-异吡啶-1,3-二酮(40.5mg;0.07mmol)、HATU(31.9mg;0.08mmol)和4-甲基吗啉(31μL;0.28mmol)溶解在N,N-二甲基甲酰胺(5.4mL)中并且在室温下搅拌14小时。

[0341] 在由LC-MS指示的反应完成后,将混合物蒸发至干,再溶解在DMSO中,并且通过制备型HPLC纯化。所有级分通过UPLC检测。产生纯产物级分25.1mg和不纯级分。将不纯级分溶解在DCM/MeOH中,在Isolute®上吸收且通过柱色谱法使用DCM至DCM/20%MeOH作为洗脱剂纯化。合并纯级分。

[0342] 将产物从水/MeCN中冷冻干燥。

[0343] 分析数据:

[0344] 产量:42.2mg (66%)

[0345] 外观:白色固体

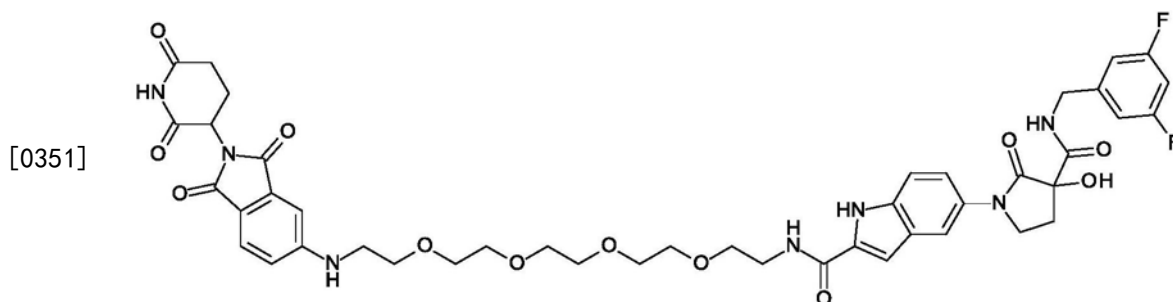
[0346] LC-MS:RT:1.46分钟;面积:100%,m/z 452.8=[M+2H]²⁺;m/z904.8=[M+H]⁺

[0347] NMR:

[0348] ¹H NMR (700MHz, DMSO-d₆) δ11.62 (d, J=2.3Hz, 1H), 11.05 (s, 1H), 8.69 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.55 (t, J=5.7Hz, 1H), 7.78 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.61-7.51 (m, 2H), 7.43 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.17-7.10 (m, 2H), 7.06 (tt, J=9.4, 2.4Hz, 1H), 7.00 (qd, J=6.4, 3.1Hz, 4H), 6.88 (dd, J=8.5, 2.2Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.03 (dd, J=12.8, 5.5Hz, 1H), 4.41 (dd, J=15.8, 6.8Hz, 1H), 4.27 (dd, J=15.8, 6.0Hz, 1H), 3.89 (ddt, J=9.2, 5.8, 3.4Hz, 2H), 3.59-3.45 (m, 18H), 3.44 (q, J=5.9Hz, 2H), 3.36-3.33 (m, 2H), 2.87 (m, 1H), 2.65-2.51 (m, 4H), 2.17-2.10 (m, 1H), 1.99 (dtd, J=13.1, 5.4, 2.4Hz, 1H)。

[0349] 类似地制备以下化合物:

[0350] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基)-N-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶啉-5-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A2”)

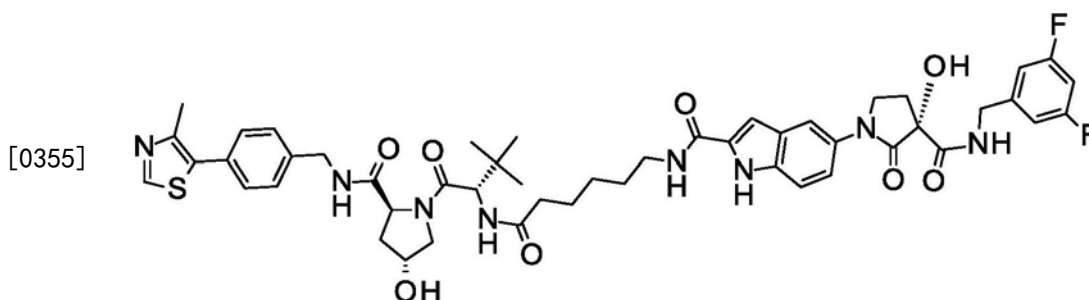


[0352] LC-MS:RT:1.46分钟,面积:100%,m/z 452.8=[M+2H]²⁺,m/z904.8=[M+H]⁺。

[0353] ¹H NMR (700MHz, DMSO-d₆) δ11.62 (d, J=2.3Hz, 1H), 11.05 (s, 1H), 8.69 (t, J=

6.4Hz, 1H), 8.55 (t, J=5.7Hz, 1H), 7.78 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.61-7.51 (m, 2H), 7.43 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.16-7.11 (m, 2H), 7.06 (tt, J=9.4, 2.4Hz, 1H), 7.00 (qd, J=6.4, 3.1Hz, 3H), 6.88 (dd, J=8.5, 2.2Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.03 (dd, J=12.8, 5.5Hz, 1H), 4.41 (dd, J=15.8, 6.8Hz, 1H), 4.27 (dd, J=15.8, 6.0Hz, 1H), 3.89 (ddt, J=9.2, 5.8, 3.4Hz, 2H), 3.59-3.46 (m, 14H), 3.44 (q, J=5.9Hz, 2H), 3.36-3.32 (m, 3H), 2.87 (m, 1H), 2.65-2.52 (m, 4H), 2.20-2.07 (m, 1H), 1.99 (dtd, J=13.1, 5.4, 2.4Hz, 1H)。

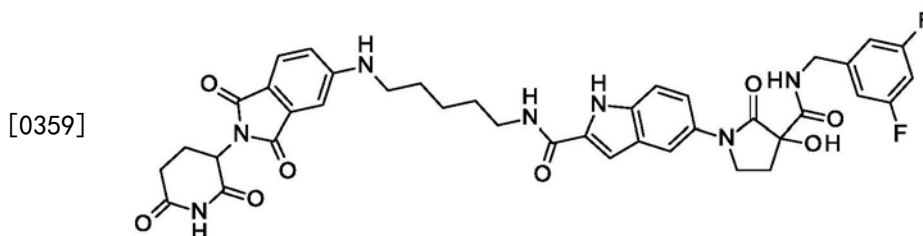
[0354] (3RS)-N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-3-羟基-1-{2-[(5-{[(2S)-1-[(2S,4R)-4-羟基-2-({[4-(4-甲基-1,3-噻唑-5-基)苯基]甲基)氨基甲酰基]吡咯烷-1-基]-3,3-二甲基-1-氧杂丁-2-基}氨基甲酰基)戊基)氨基甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-2-氧杂吡咯烷-3-甲酰胺 (“A3”)



[0356] LC-MS:RT:1,51分钟,面积:96%,m/z 638.3=片段。

[0357] ^1H NMR (700MHz, DMSO- d_6) δ 11.56 (d, J=2.1Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.66 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.52 (t, J=6.0Hz, 1H), 8.43 (t, J=5.8Hz, 1H), 7.81 (d, J=9.4Hz, 1H), 7.77 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.52 (dd, J=9.0, 2.1Hz, 1H), 7.44-7.40 (m, 3H), 7.38 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.10 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.05 (tt, J=9.3, 2.6Hz, 1H), 7.00 (h, J=4.7Hz, 2H), 4.54 (d, J=9.4Hz, 1H), 4.42 (dt, J=13.0, 7.0Hz, 3H), 4.35 (dq, J=6.5, 3.5, 3.0Hz, 1H), 4.27 (dd, J=15.8, 6.1Hz, 1H), 4.22 (dd, J=15.9, 5.6Hz, 1H), 3.91-3.87 (m, 2H), 3.69-3.62 (m, 2H), 3.26 (q, J=7.1Hz, 2H), 2.62 (ddd, J=11.8, 6.6, 4.8Hz, 1H), 2.27 (dt, J=14.6, 7.6Hz, 1H), 2.14 (ddd, J=14.7, 9.9, 5.9Hz, 2H), 2.03 (ddd, J=11.2, 7.9, 2.6Hz, 1H), 1.90 (ddd, J=12.8, 8.5, 4.7Hz, 1H), 1.59-1.47 (m, 4H), 1.35-1.26 (m, 2H), 0.93 (s, 9H)。

[0358] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[5-[[2-(2,6-二氧杂-3-嘧啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶-5-基]氨基]戊基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A4”)

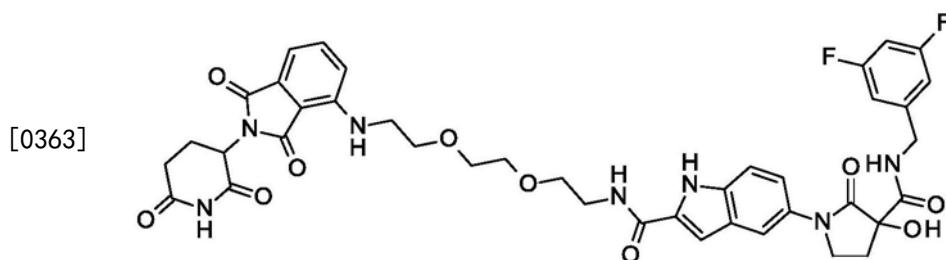


[0360] LC-MS:RT:1,53分钟,面积:97%,m/z 770.4。

[0361] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 11.56 (d, J=2.2Hz, 1H), 11.02 (s, 1H), 8.66 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.46 (t, J=5.8Hz, 1H), 7.77 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.55 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.52 (dd, J=8.9, 2.1Hz, 1H), 7.43 (d, J=8.9Hz, 1H), 7.12-7.02 (m, 2H), 6.95 (d, J=2.1Hz, 1H),

6.85 (dd, $J=8.4, 2.1\text{Hz}$, 1H), 5.02 (dd, $J=12.7, 5.4\text{Hz}$, 1H), 4.42 (dd, $J=15.8, 6.8\text{Hz}$, 1H), 4.27 (dd, $J=15.8, 6.0\text{Hz}$, 1H), 3.93-3.86 (m, 2H), 3.31 (q, $J=6.7\text{Hz}$, 2H), 3.17 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.87 (ddd, $J=16.6, 13.7, 5.3\text{Hz}$, 1H), 2.66-2.57 (m, 2H), 2.54 (s, 4H), 2.14 (dt, $J=12.8, 7.5\text{Hz}$, 1H), 1.99 (ddd, $J=12.6, 5.6, 3.2\text{Hz}$, 1H), 1.62 (dp, $J=15.0, 7.3\text{Hz}$, 4H), 1.45 (dt, $J=13.8, 7.1\text{Hz}$, 2H)。

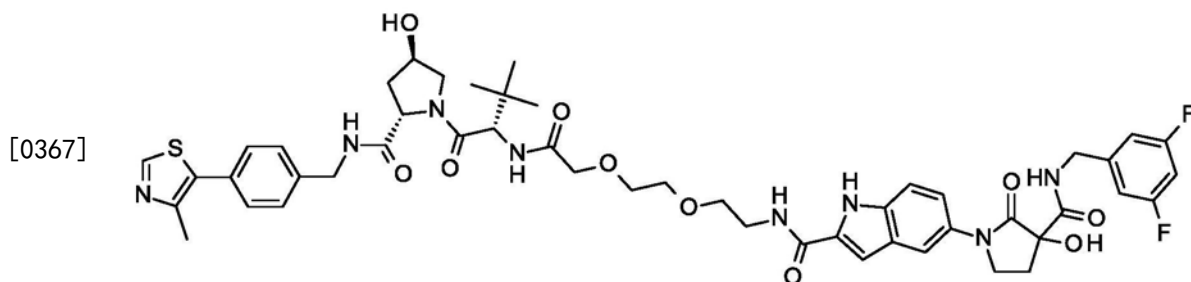
[0362] 5-[3-[(3,5-二氟苯基) 甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A5”)



[0364] LC-MS:RT:1,49分钟,面积:98%, m/z 816,4。

[0365] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 11.58 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 11.06 (s, 1H), 8.66 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 8.50 (t, $J=5.7\text{Hz}$, 1H), 7.76 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 7.57-7.51 (m, 2H), 7.42 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 1H), 7.11 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 7.10-7.04 (m, 2H), 7.01 (qd, $J=6.9, 3.6\text{Hz}$, 4H), 6.67 (s, 1H), 6.58 (t, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 5.04 (dd, $J=12.8, 5.4\text{Hz}$, 1H), 4.42 (dd, $J=15.8, 6.8\text{Hz}$, 1H), 4.27 (dd, $J=15.8, 6.0\text{Hz}$, 1H), 3.89 (dd, $J=8.3, 5.5\text{Hz}$, 2H), 3.67-3.49 (m, 8H), 3.43 (dq, $J=11.1, 5.6\text{Hz}$, 4H), 2.87 (ddd, $J=16.8, 13.7, 6.1\text{Hz}$, 1H), 2.66-2.53 (m, 4H), 2.14 (dt, $J=12.9, 7.5\text{Hz}$, 1H), 2.08-1.94 (m, 1H), 1.24 (d, $J=3.4\text{Hz}$, 1H)。

[0366] 5-[3-[(3,5-二氟苯基) 甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[(1S)-1-[(2S,4R)-4-羟基-2-[[4-(4-甲基噻唑-5-基) 苯基] 甲基氨基甲酰基] 吡咯烷-1-羰基]-2,2-二甲基-丙基]氨基]-2-氧杂-乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A6”)

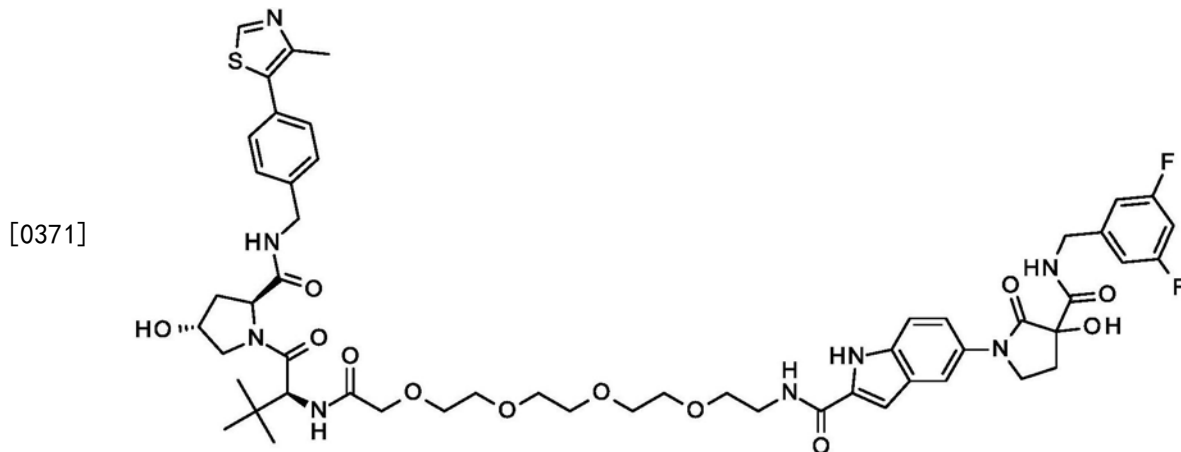


[0368] LC-MS:RT:1,48分钟,面积:91%, m/z 670.3=片段。

[0369] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 11.58 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.66 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 1H), 8.53 (dt, $J=9.8, 5.9\text{Hz}$, 2H), 7.77 (t, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 7.54 (dt, $J=8.9, 1.8\text{Hz}$, 1H), 7.43 (dd, $J=9.2, 5.3\text{Hz}$, 2H), 7.38 (s, 4H), 7.12 (d, $J=2.5\text{Hz}$, 1H), 7.09-6.97 (m, 3H), 4.57 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 4.50-4.32 (m, 6H), 4.26 (dt, $J=15.7, 6.4\text{Hz}$, 2H), 3.98 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 2H), 3.92-3.85 (m, 2H), 3.71-3.54 (m, 8H), 3.47 (q, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 2.66-2.57 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.18-2.10 (m, 1H), 2.10-2.03 (m, 1H), 1.91 (ddd, $J=13.0, 8.7, 4.6\text{Hz}$,

1H), 0.94 (s, 9H)。

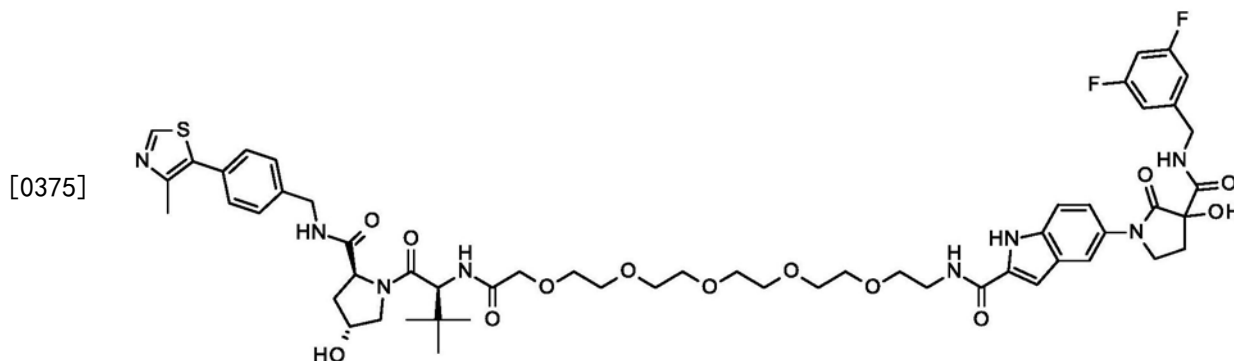
[0370] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-1-[(2S,4R)-4-羟基-2-[[4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基]甲基氨基甲酰基]吡咯烷-1-羰基]-2,2-二甲基-丙基]氨基]-2-氧杂-乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A7”)



[0372] LC-MS:RT:1,49分钟,面积:98%, m/z 538.4 = $[M+2H]^{2+}$, m/z 1075.4 = $[M+H]^+$ 。

[0373] ^1H NMR (700MHz, DMSO- d_6) δ 11.62 (d, J = 2.1Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.69 (t, J = 6.4Hz, 1H), 8.57 (m, 2H), 7.77 (d, J = 2.1Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 9.0, 2.1Hz, 1H), 7.48-7.33 (m, 6H), 7.13 (d, J = 2.2Hz, 1H), 7.06 (tt, J = 9.3, 2.4Hz, 1H), 7.00 (h, J = 4.3Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.56 (d, J = 9.6Hz, 1H), 4.46-4.33 (m, 4H), 4.26 (ddd, J = 16.1, 11.0, 5.8Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.90 (tq, J = 9.1, 4.7, 4.0Hz, 2H), 3.67 (dd, J = 10.6, 4.0Hz, 1H), 3.63-3.48 (m, 14H), 3.43 (q, J = 5.9Hz, 2H), 2.65-2.58 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.14 (dt, J = 12.7, 7.5Hz, 1H), 2.06 (ddd, J = 9.1, 4.4, 2.2Hz, 1H), 1.90 (ddd, J = 13.1, 8.9, 4.6Hz, 1H), 1.29-1.17 (m, 1H), 0.94 (s, 9H)。

[0374] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-1-[(2S,4R)-4-羟基-2-[[4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基]甲基氨基甲酰基]吡咯烷-1-羰基]-2,2-二甲基-丙基]氨基]-2-氧杂-乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A8”)

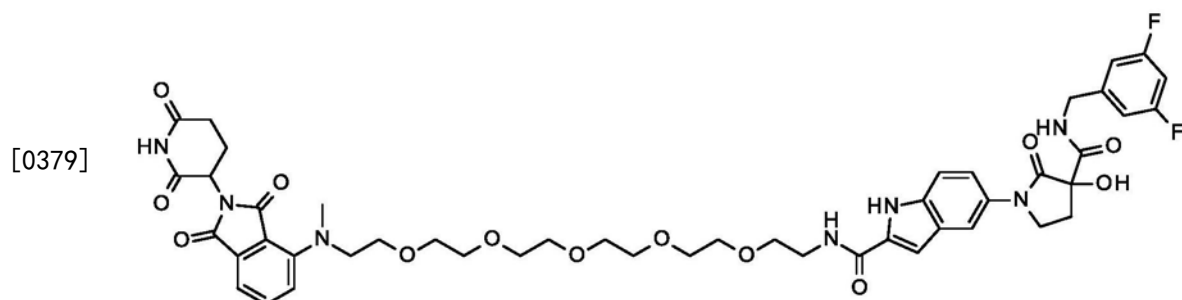


[0376] LC-MS:RT:1,49分钟,面积:100%, m/z 560.4 = $[M+2H]^{2+}$, m/z 1119.4 = $[M+H]^+$ 。

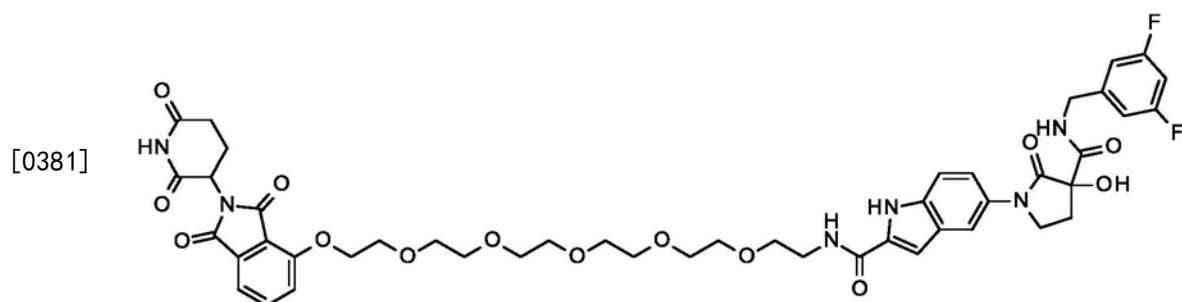
[0377] ^1H NMR (700MHz, DMSO- d_6) δ 11.62 (d, J = 2.1Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.69 (t, J = 6.5Hz, 1H), 8.57 (m, 2H), 7.77 (d, J = 2.0Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 8.9, 2.1Hz, 1H), 7.45-7.37

(m, 6H), 7.13 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.06 (tt, J=9.3, 2.4Hz, 1H), 7.00 (h, J=4.3Hz, 2H), 4.56 (d, J=9.6Hz, 1H), 4.41 (m, 3H), 4.35 (tt, J=4.4, 2.1Hz, 1H), 4.26 (m, 3H), 3.96 (m, 2H), 3.90 (m, 3H), 3.67 (dd, J=10.6, 4.0Hz, 1H), 3.62-3.58 (m, 3H), 3.56-3.42 (m, 18H), 2.66-2.58 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.14 (m, 1H), 2.05 (ddt, J=12.0, 7.6, 1.9Hz, 1H), 1.90 (ddd, J=13.0, 8.8, 4.5Hz, 1H), 0.94 (s, 9H)。

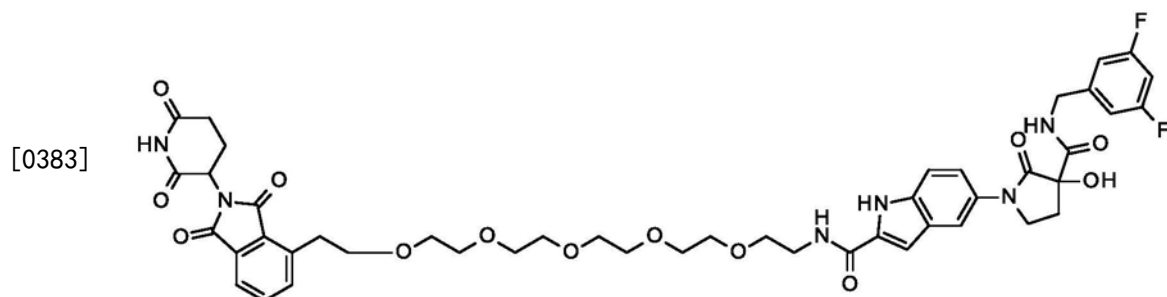
[0378] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]-甲基-氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A9”)



[0380] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A10”)

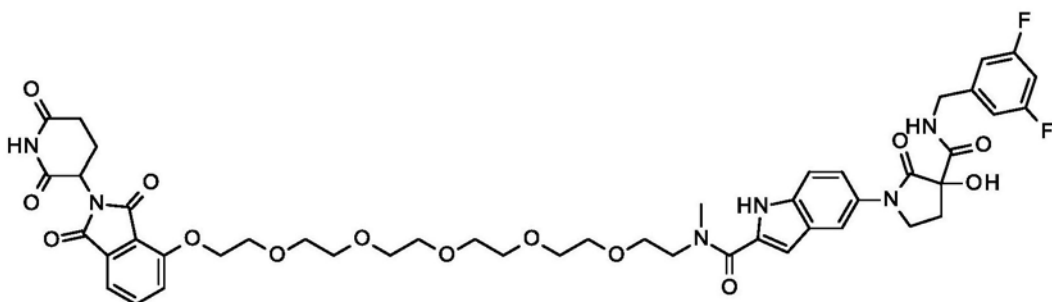


[0382] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A11”)



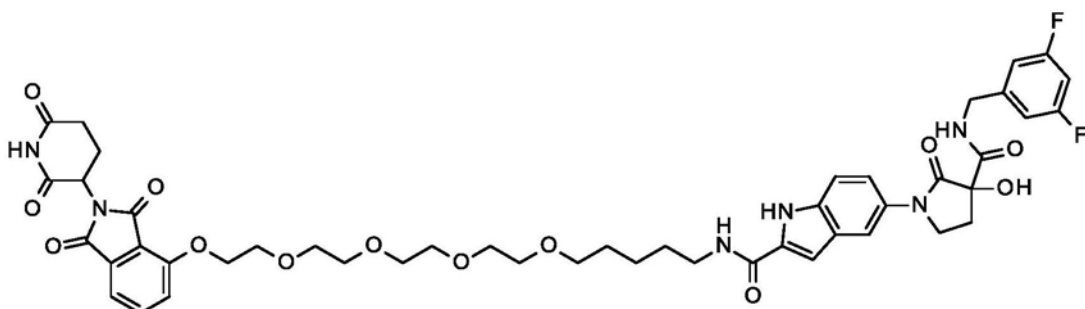
[0384] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-N-甲基-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A12”)

[0385]



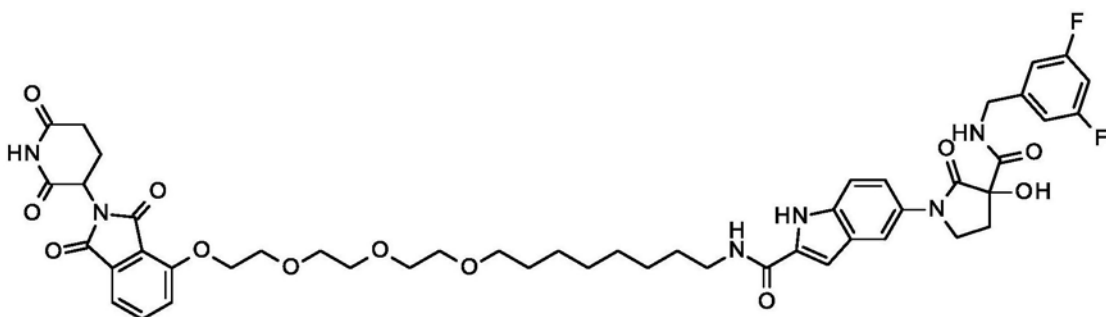
[0386] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[5-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧代-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]戊基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A13”)

[0387]



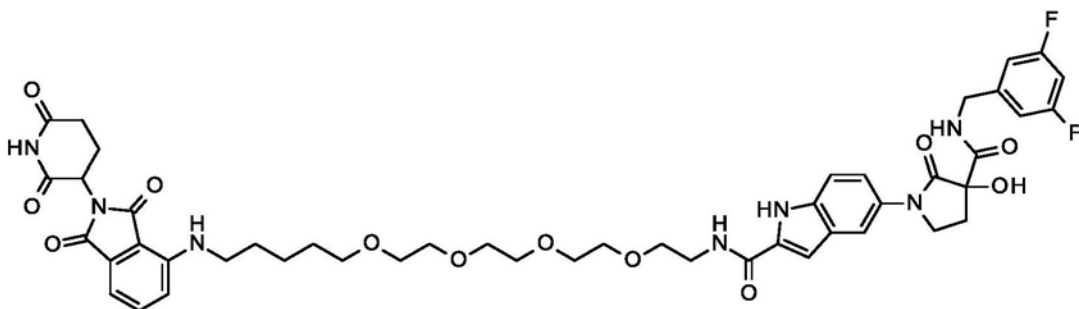
[0388] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[8-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧代-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]辛基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A14”)

[0389]



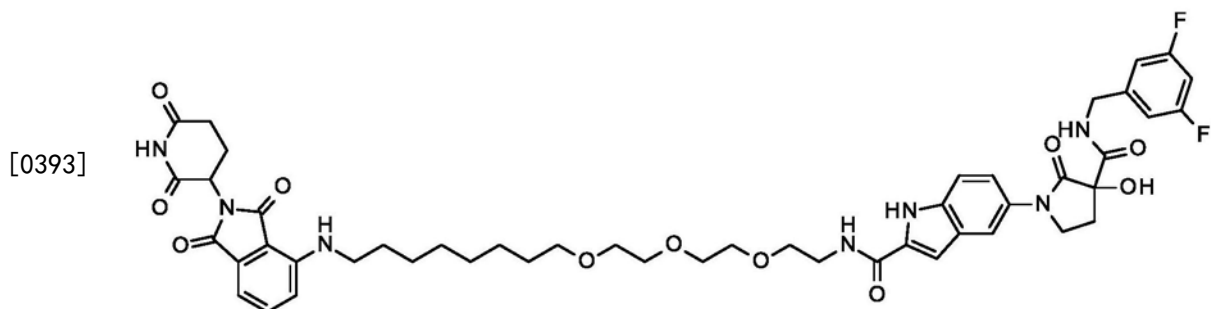
[0390] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[5-[[2-(2,6-二氧代-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]戊氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A15”)

[0391]

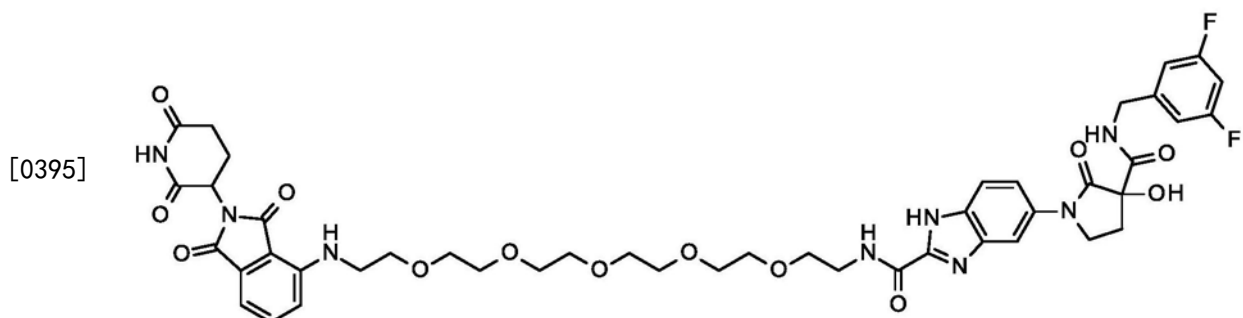


[0392] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[8-[[2-(2,6-二氧代-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]辛氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A15”)

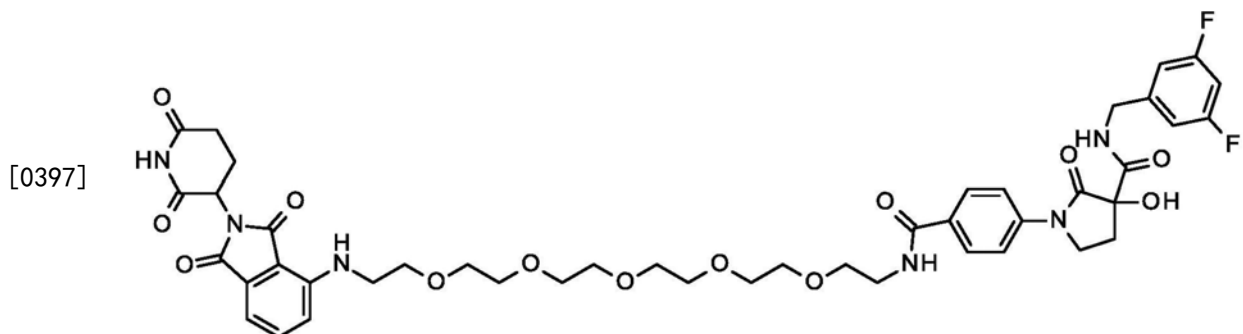
基]乙氧基]乙基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A16”)



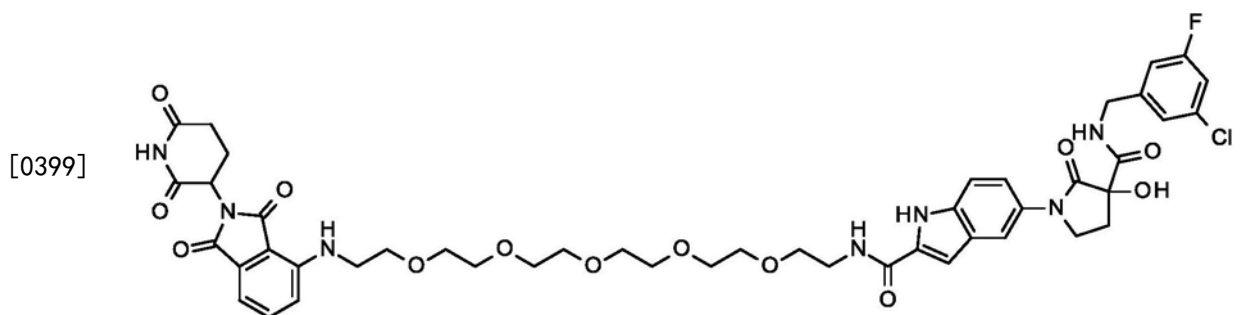
[0394] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-苯并咪唑-2-甲酰胺 (“A17”)



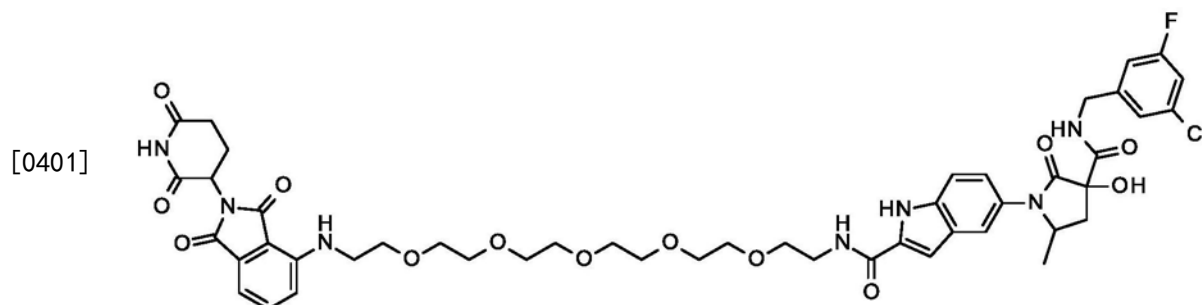
[0396] N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-[4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基甲酰基]苯基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-3-甲酰胺 (“A18”)



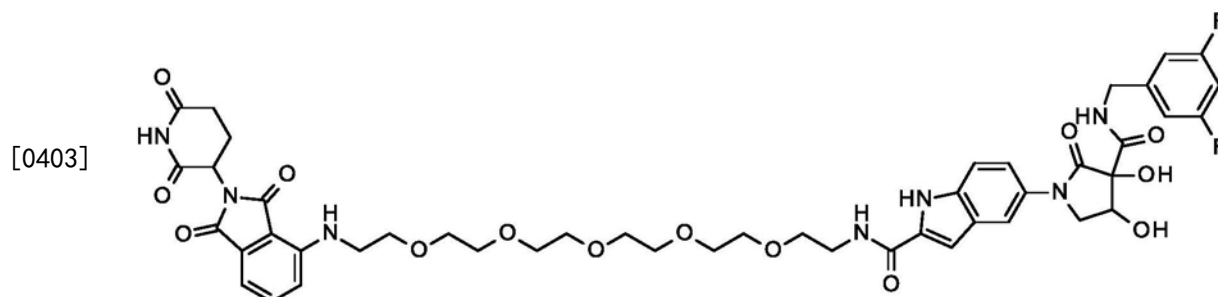
[0398] 5-[3-[(3-氯-5-氟-苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A19”)



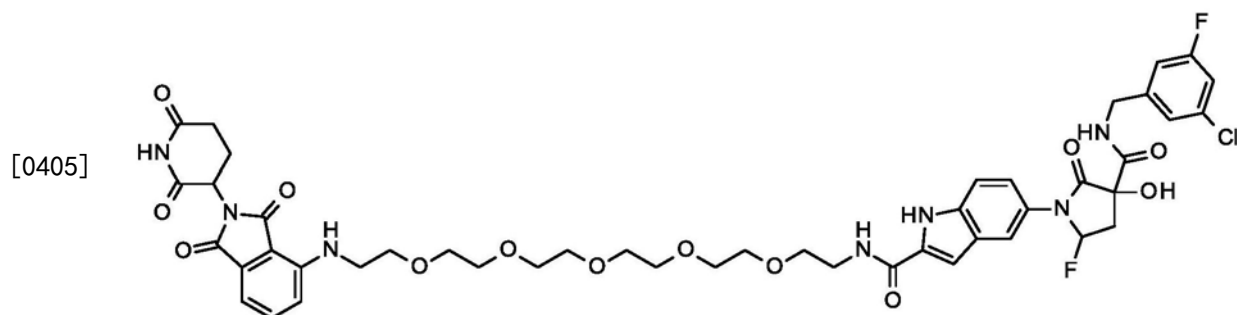
[0400] 5-[3-[(3-氯-5-氟-苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-5-甲基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺(“A20”)



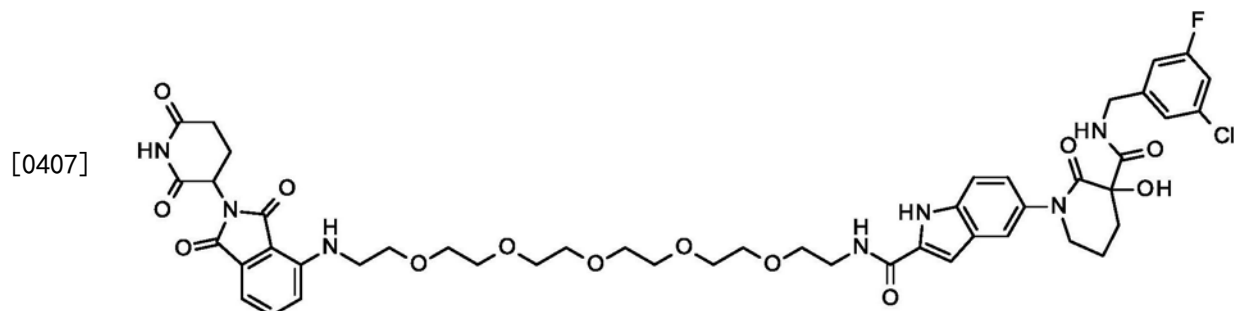
[0402] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3,4-二羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺(“A21”)



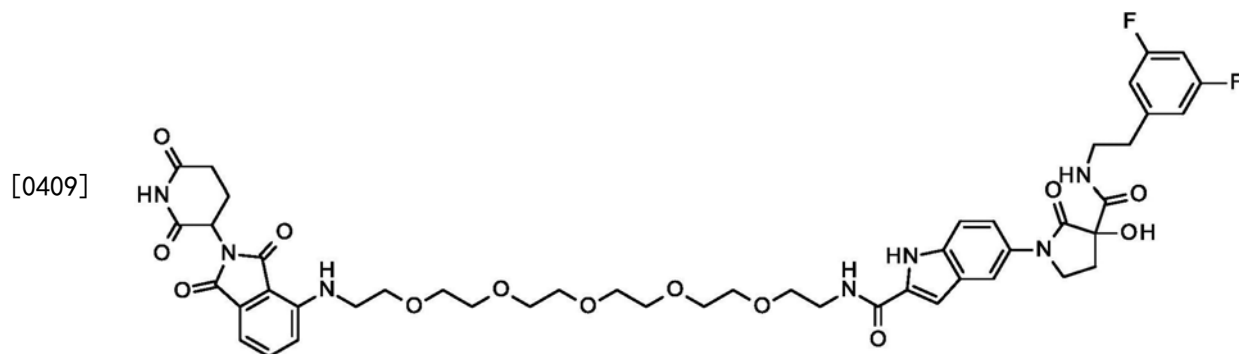
[0404] 5-[3-[(3-氯-5-氟-苯基)甲基氨基甲酰基]-5-氟-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺(“A22”)



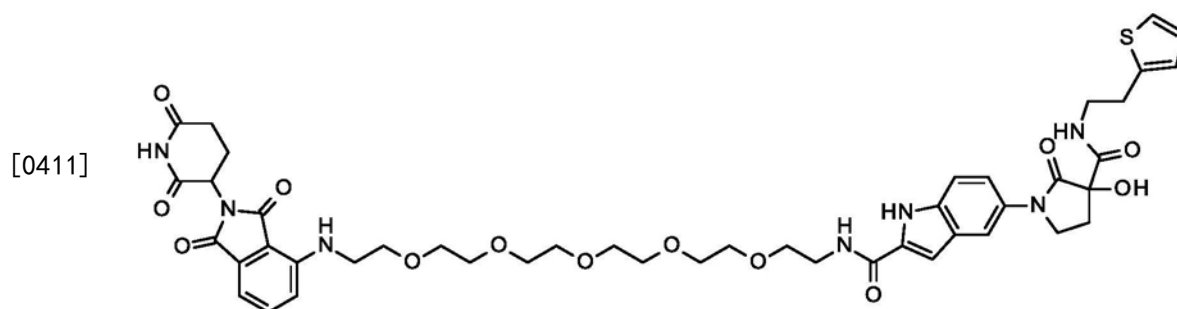
[0406] 5-[3-[(3-氯-5-氟-苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-1-哌啶基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺(“A23”)



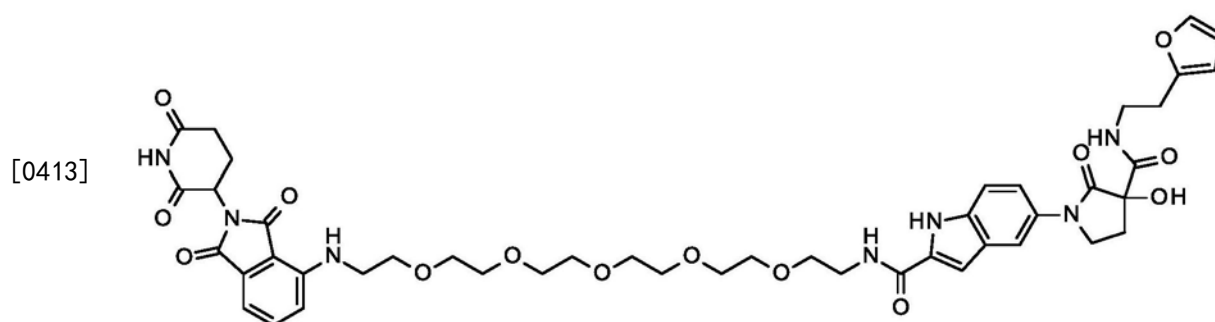
[0408] 5-[3-[2-(3,5-二氟苯基)乙基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A24”)



[0410] N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-5-[3-羟基-2-氧杂-3-[2-(2-噻吩基)乙基氨基甲酰基]吡咯烷-1-基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A25”)

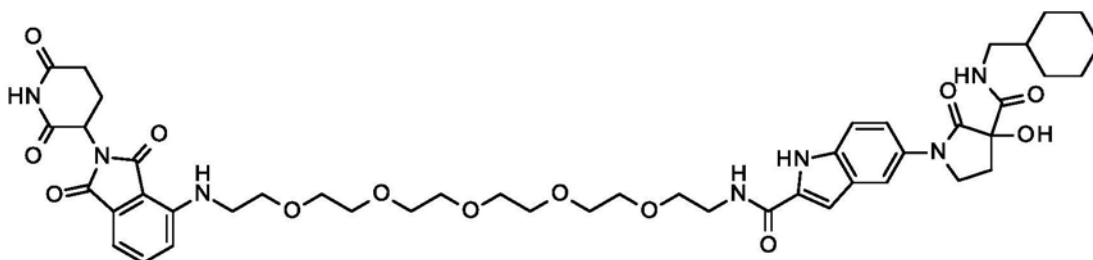


[0412] N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-5-[3-[2-(2-呋喃基)乙基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A26”)



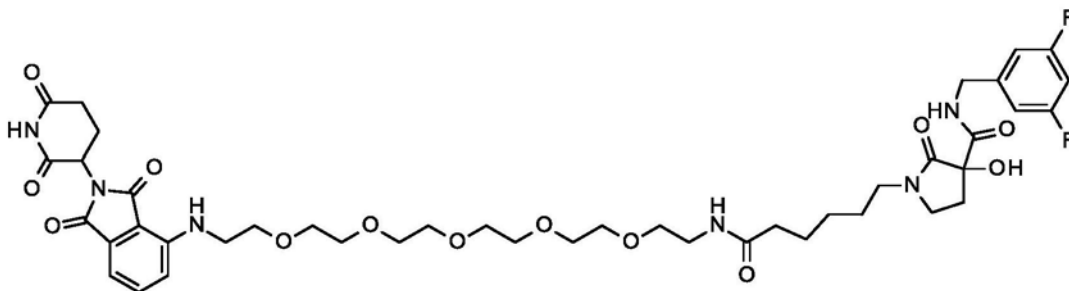
[0414] 5-[3-(环己基甲基氨基甲酰基)-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A27”)

[0415]



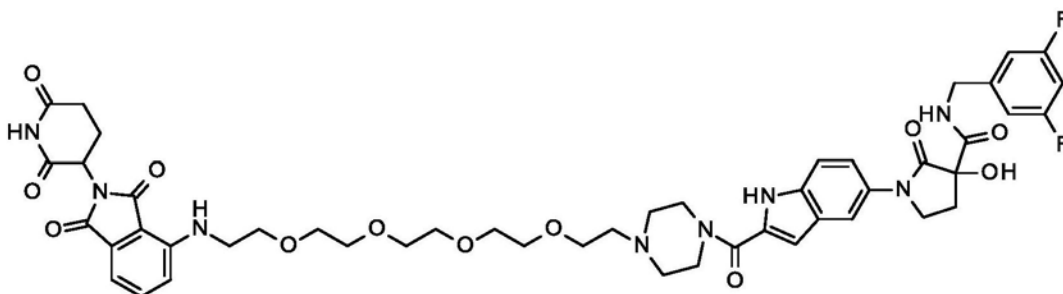
[0416] N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-[6-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-二氧杂-3-吡啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-6-氧杂-己基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-3-甲酰胺 (“A28”)

[0417]



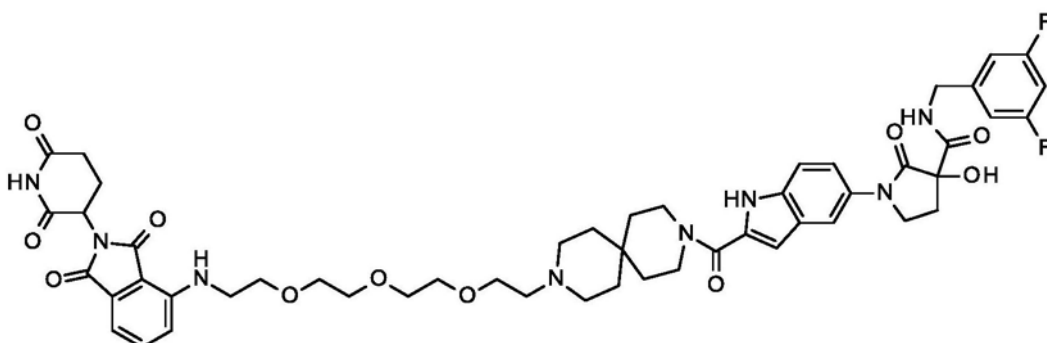
[0418] N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-[2-[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-二氧杂-3-吡啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]哌嗪-1-羰基]-1H-吡啶-5-基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-3-甲酰胺 (“A29”)

[0419]

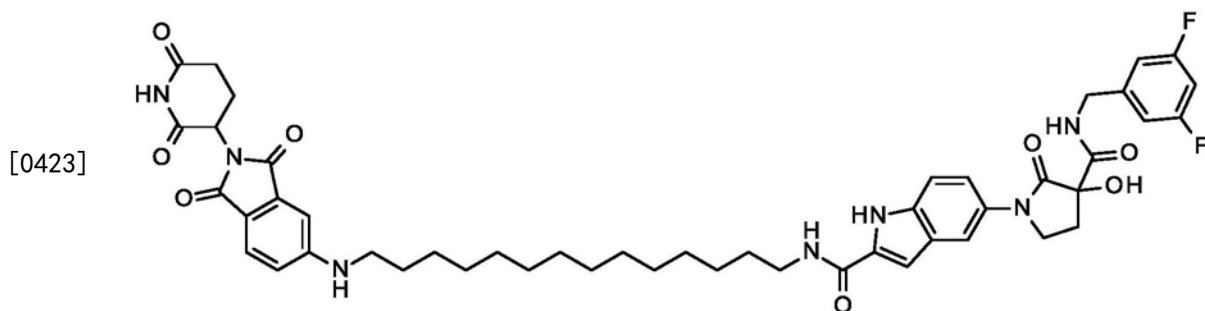


[0420] N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-[2-[9-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,6-二氧杂-3-吡啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-3,9-二氮杂螺[5.5]十一烷-3-羰基]-1H-吡啶-5-基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-3-甲酰胺 (“A30”)

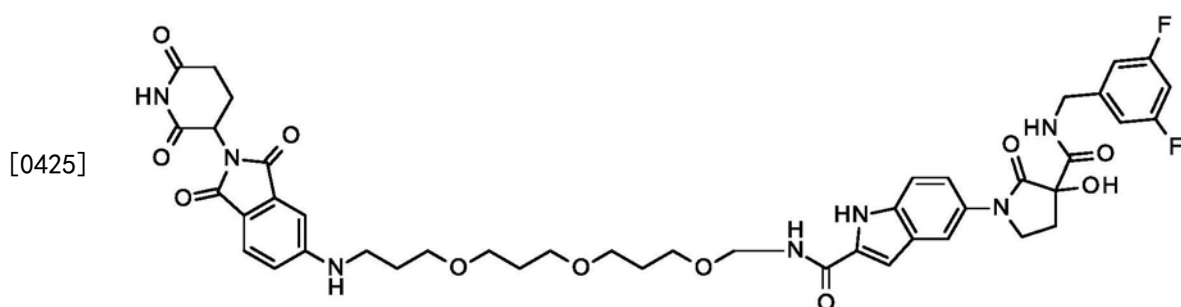
[0421]



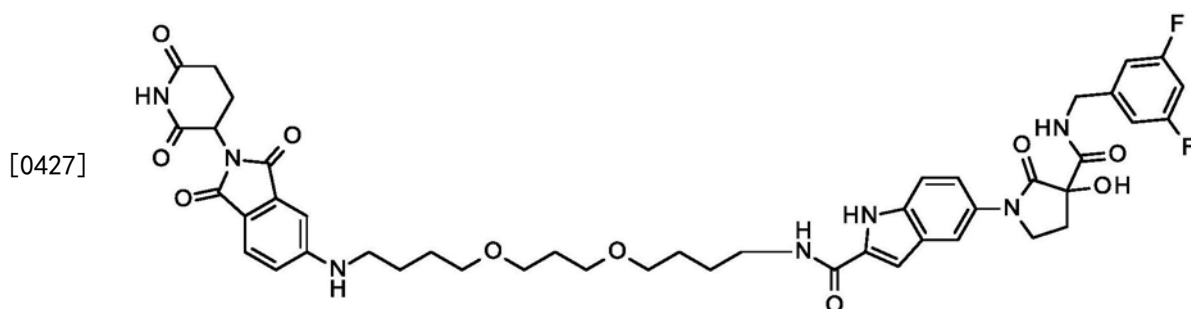
[0422] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[14-[[2-(2,6-二氧杂-3-吡啶基)-1,3-二氧杂-异吡啶-5-基]氨基]十四烷基]-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A31”)



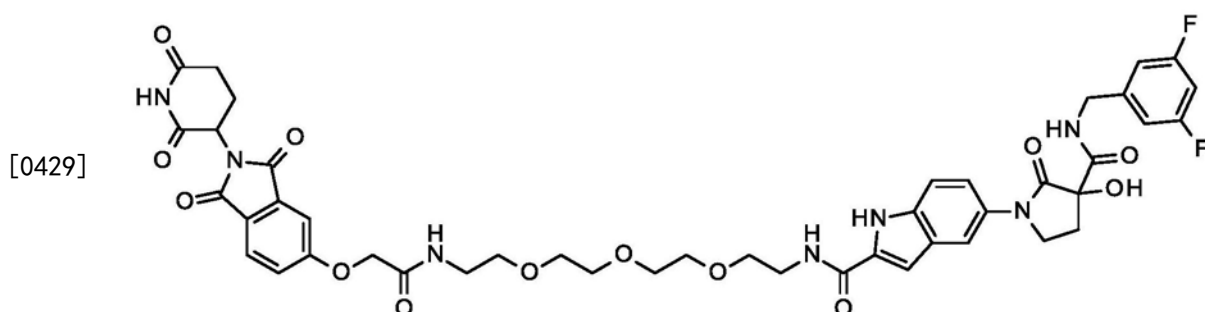
[0424] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[3-[3-[3-[[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-5-基]氨基]丙氧基]丙氧基]丙氧基甲基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A32”)



[0426] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[4-[3-[4-[[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-5-基]氨基]丁氧基]丙氧基]丁基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A33”)



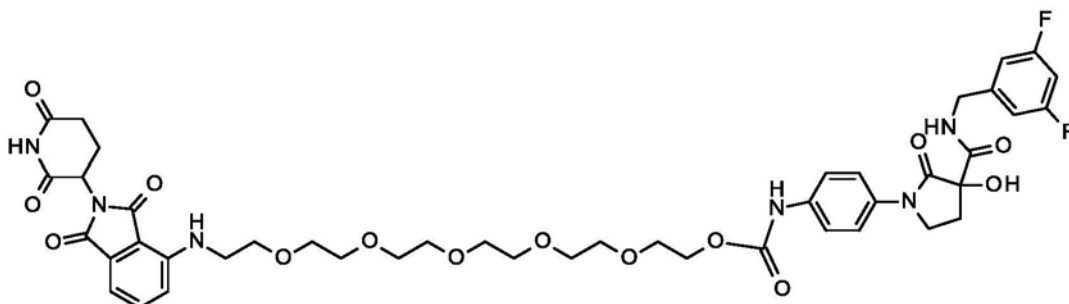
[0428] 5-[3-[(3,5-二氟苯基)甲基氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-1-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-5-基]氧基乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A34”)



[0430] N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-哌啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基磺酰基]-1H-吲哚-5-基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-3-甲酰胺 (“A35”)

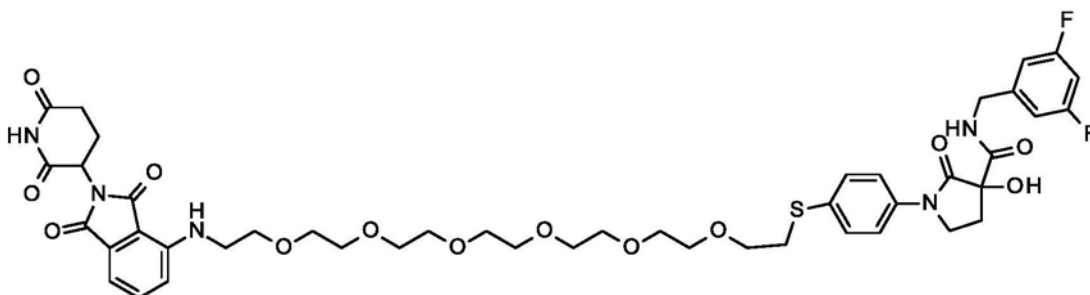
基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯 (“A39”)

[0439]



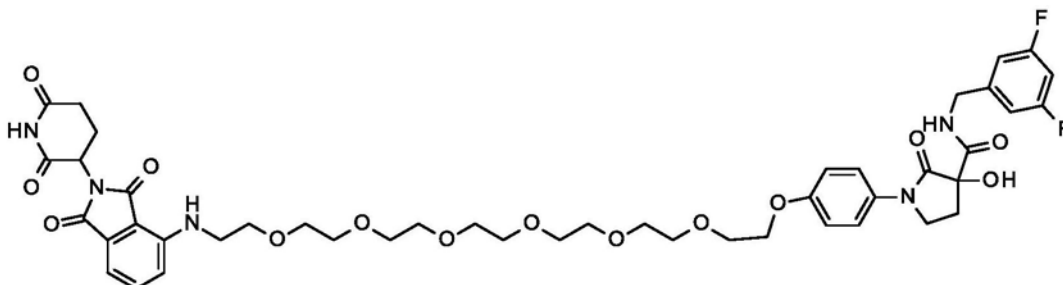
[0440] N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-[4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-嘧啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基磺酰基]苯基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-3-甲酰胺 (“A40”)

[0441]



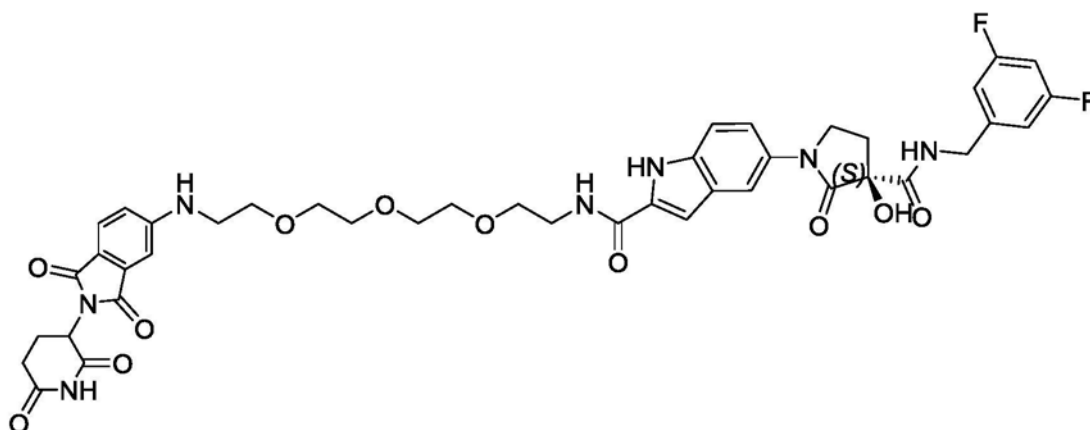
[0442] N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-[4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,6-二氧杂-3-嘧啶基)-1,3-二氧杂-异吲哚啉-4-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]苯基]-3-羟基-2-氧杂-吡咯烷-3-甲酰胺 (“A41”)

[0443]



[0444] 5-[(3S)-3-{[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-二氧杂嘧啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-5-基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙基})-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A42”)

[0445]



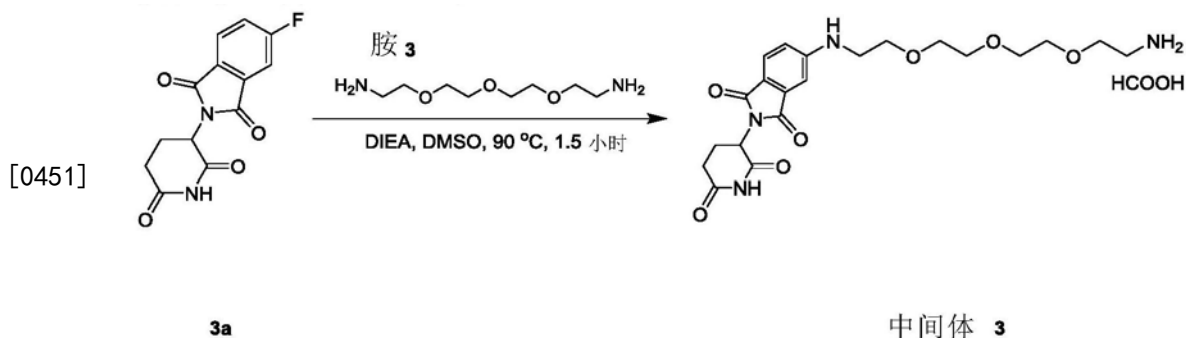
[0446] 方法1:

[0447] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020;管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um;流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v);梯度:0.0分钟5%B→0.80分钟95%B→1.20分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B;流速:1.5(毫升/分钟);烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0448] 方法2:

[0449] HPLC仪器类型:SHIMADZU LC-20AB;管柱:Kinetex C18 LC Column 4.6×50mm,5um;流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v);梯度:0.0分钟10%B→2.40分钟80%B→3.70分钟80%B→3.71分钟10%B→4.00分钟10%B;烘箱温度:50℃;UV检测:PDA(220nm、215nm、254nm)。

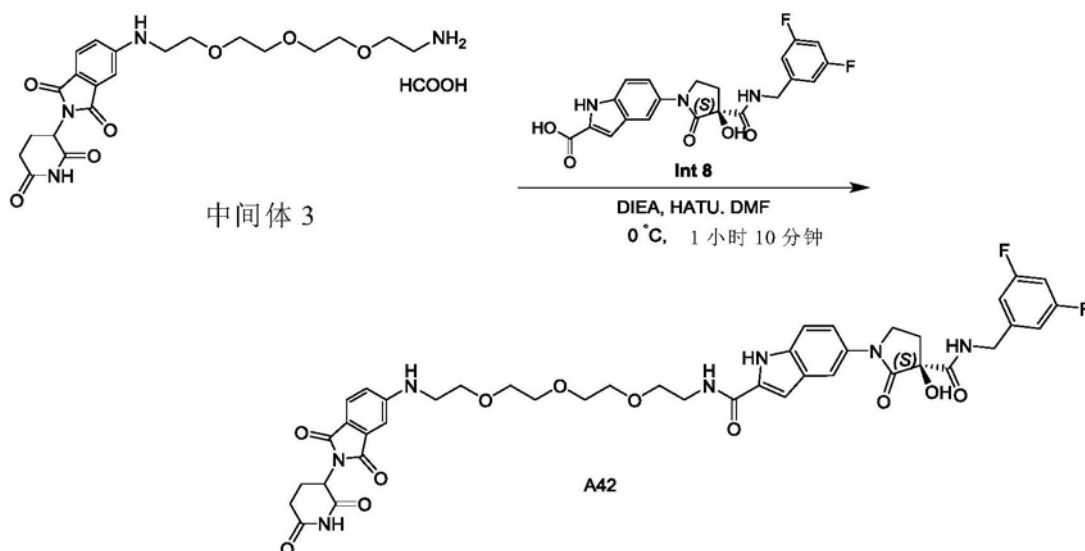
[0450] 制备中间体3的通用方法



[0452] 在90℃下在N₂下将化合物3a(70mg,253umol)、胺3(80mg,416umol)和DIEA(222mg,1.72mmol,300μL)在DMSO(3mL)中的溶液搅拌1.5小时。LCMS(R_t=0.687分钟,MS+1=449.2)显示检测到中间体3的MS。将混合物冷却至25~30℃,用AcOH将混合物的pH值调节至6~7。混合物通过制备型HPLC(管柱:Phenomenex Synergi C18150*25*10um;流动相:[水(0.225%FA)-ACN];B%:0%~30%,10分钟)纯化,减压浓缩级分,得到为棕色油的中间体3(50mg,96.4umol,12.7%收率,95.3%纯度,FA),其通过LCMS(R_t=0.698分钟,MS+1=449.3)证实。

[0453] LCMS:(方法1),R_t=0.687分钟,MS+1=449.2

[0454] 制备标题化合物“A42”的通用方法



[0455]

[0456] 在0℃下在N₂下向Int 8 (35mg, 81.5μmol) 在DMF (2mL) 中的溶液中依次添加DIEA (30mg, 232μmol) 和HATU (35mg, 92.0μmol), 将混合物在0℃下搅拌10分钟, 然后在0℃下将中间体3 (40mg, 80.8μmol, 1.00当量, FA) 在DMF (2.00mL) 中的溶液添加到混合物中, 将其在N₂下在0℃下搅拌1小时。将混合物倾入冰水 (20.0mL) 中, 用乙酸乙酯 (10.0mL × 2) 萃取, 将有机相分离且用盐水 (20.0mL × 2) 洗涤, 用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。将其通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 75*30*3μm; 流动相: [水 (0.225% FA) - ACN]; B%: 31% ~ 51%, 8分钟) 纯化, 通过冷冻干燥除去级分的溶剂, 得到为黄色固体的A42 (23mg, 24.52μmol, 30.32% 收率), 其通过¹H-NMR、LCMS和HPLC证实。

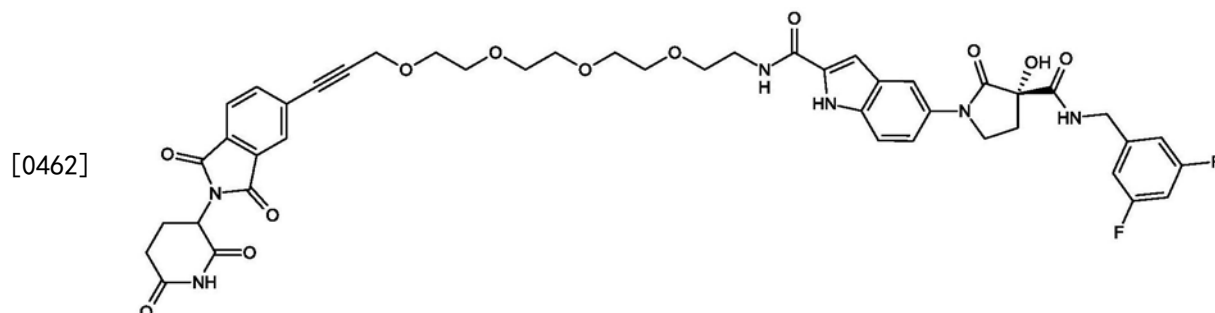
[0457] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆:

[0458] 11.62 (s, 1H), 11.05 (s, 1H), 8.70 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.60-8.52 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.58-7.50 (m, 2H), 7.42 (d, J=8.9Hz, 1H), 7.18-7.10 (m, 2H), 7.09-6.96 (m, 4H), 6.87 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.02 (d, J=8.8Hz, 1H), 4.41 (d, J=7.6Hz, 1H), 4.26 (d, J=8.8Hz, 1H), 3.89 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.59-3.49 (m, 15H), 2.92-2.81 (m, 1H), 2.65-2.58 (m, 3H), 2.19-2.10 (m, 1H), 2.03-1.95 (m, 1H), 1.23 (s, 1H)

[0459] LCMS: Rt=0.720分钟, MS+1=860.2;

[0460] HPLC: Rt=1.860分钟

[0461] 5-[(3S)-3-{[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-{15-[2-(2,6-二氧杂嘧啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吡啶-5-基]-3,6,9,12-四氧杂十五碳-14-炔-1-基}-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A43”)



[0463] LC-MS或HPLC方法:

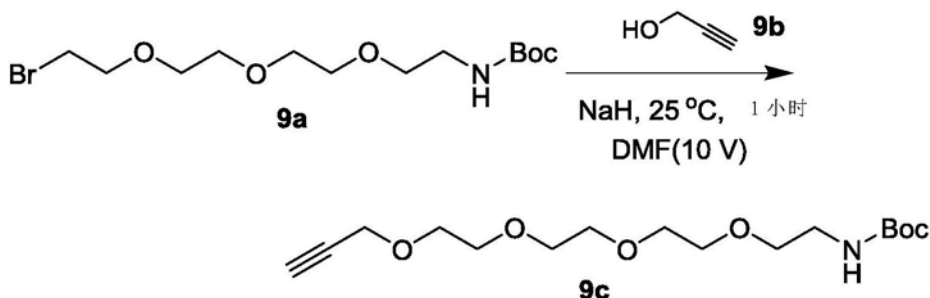
[0464] 方法1:

[0465] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020;管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟0%B→0.8分钟95%B→1.2分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B,流速:1.5毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0466] 方法2:

[0467] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020;管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟0%B→3.0分钟95%B→3.5分钟95%B→3.51分钟5%B→4.0分钟5%B,流速:0.8毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0468] 制备化合物9c的通用方法

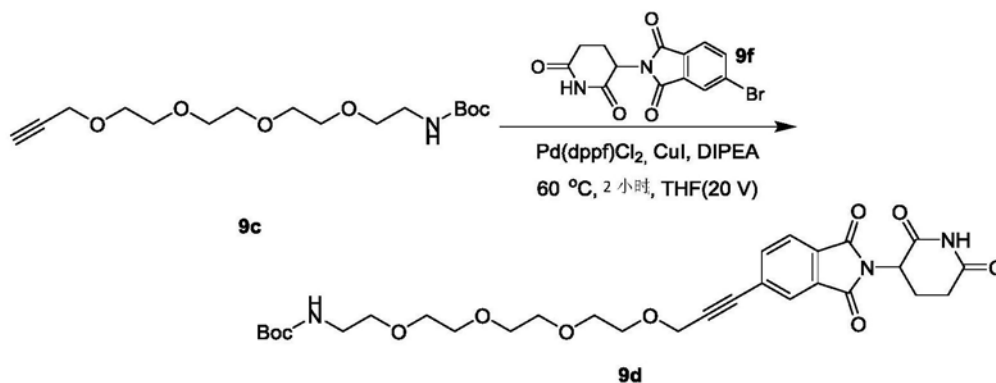


[0470] 在20~25℃下在N₂下向化合物9b(52mg,927umol)在DMF(4mL)中的溶液中添加NaH(70mg,1.75mmol,60%纯度),且搅拌30分钟,然后在N₂下在20~25℃下添加化合物9a(300mg,842umol,1.00当量),添加后,将混合物溶液在20~25℃下搅拌1小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1)显示化合物9a消耗完(R_f=0.60),检测到新斑点(R_f=0.40)。将反应溶液倾入水(10mL)中,然后用乙酸乙酯(10mL*2)萃取,将合并的有机层用盐水(20mL)洗涤,然后经Na₂SO₄干燥,过滤且减压浓缩,提供粗产物。粗产物通过硅胶柱色谱法(SiO₂,石油醚:乙酸乙酯=20:1~10:1~3:1,收集斑点(R_f=0.40))纯化。获得为无色油的化合物9c(200mg,603umol,71.7%收率),其通过¹H-NMR证实。

[0471] ¹H NMR:400MHz,CDCl₃

[0472] δ5.09(s,1H),4.23(d,J=2.4Hz,2H),3.61-3.76(m,12H),3.56(t,J=5.2Hz,2H),3.34(d,J=5.2Hz,2H),2.50-2.53(m,1H),1.47(s,9H)。

[0473] 制备化合物9d的通用方法



[0475] 在20~25℃下在N₂下向化合物9f(187mg,554umol)在THF(5mL)中的溶液中添加

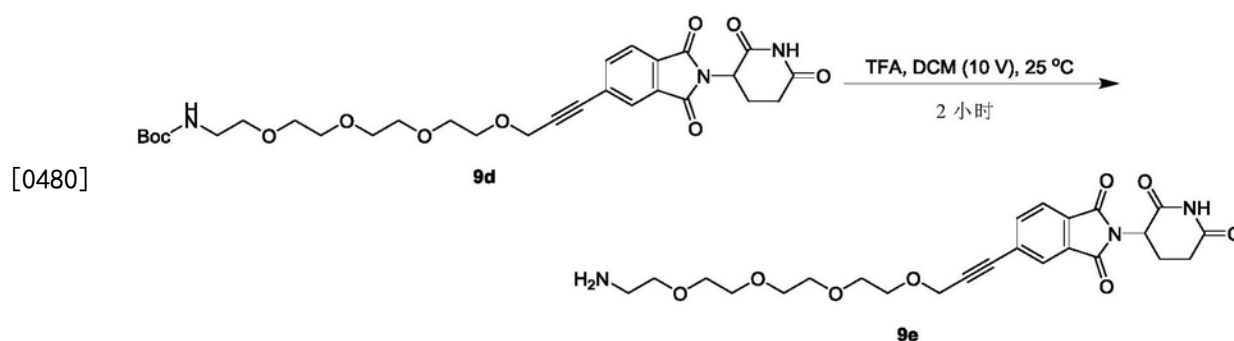
CuI (15mg, 78.7 μ mol) 和DIPEA (585mg, 4.53mmol), 然后在20~25℃下在N₂下, 将Pd (dppf) Cl₂ • CH₂Cl₂ (38mg, 46.5 μ mol) 和化合物9c (150mg, 452 μ mol) 添加到溶液中, 然后将其在60~65℃下搅拌2小时。LCMS显示检测到化合物9d的MS (RT=0.903分钟M/Z+1=588), TLC (石油醚:乙酸乙酯=0:1) 显示化合物9c (R_f=0.67) 消耗完, 检测到新斑点 (R_f=0.30)。将反应溶液冷却至20~30℃, 然后用乙酸猝灭至pH=3~4并倾入水 (10mL) 中, 然后用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 将合并的有机层用盐水 (5mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩, 提供粗产物。然后通过硅胶柱色谱法 (SiO₂, 石油醚:乙酸乙酯=10:1~5:1~0:1, 收集斑点 (R_f=0.30)) 纯化。获得为无色油的化合物9d (90mg, 145 μ mol, 32.1%收率), 其通过LCMS, RT=0.897分钟, M/Z+1-100=488)、¹H-NMR证实。

[0476] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0477] δ 7.94 (s, 1H), 7.81-7.88 (m, 1H), 7.70-7.79 (m, 1H), 7.26-7.48 (m, 1H), 4.91 (dd, J=12.4, 5.2Hz, 1H), 4.94-5.00 (m, 1H), 4.40 (s, 1H), 4.21 (s, 1H), 4.13 (s, 1H), 3.61-3.75 (m, 12H), 3.55 (t, J=5.2Hz, 2H), 3.26-3.36 (m, 2H), 2.71-2.95 (m, 2H), 2.13-2.23 (m, 1H), 1.37 (s, 9H)。

[0478] LCMS: (方法1), RT=0.903分钟, M/Z+1=588

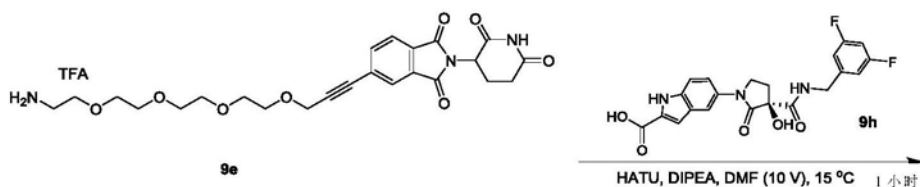
[0479] 制备化合物9e的通用方法



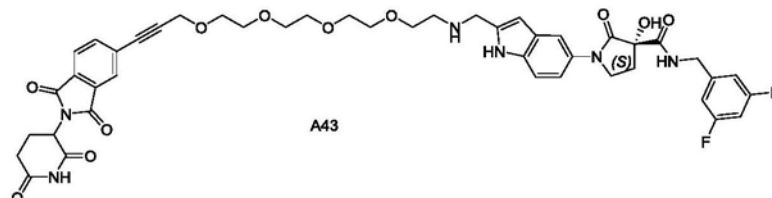
[0481] 在20~25℃下向化合物9d (90mg, 153 μ mol) 在DCM (3mL) 中的溶液中滴加TFA (174mg, 1.53mmol), 添加后, 将混合物在20~25℃下搅拌2小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=0:1) 显示化合物9d消耗完 (R_f=0.60), 检测到新斑点 (R_f=0.00)。将反应溶液在30℃下减压浓缩, 提供为棕色油的化合物9e (90mg, 110 μ mol, 72.3%收率, TFA), 其通过LCMS, RT=0.746分钟, M/Z+1=488) 证实。

[0482] LCMS: (方法1), RT=0.746分钟, M/Z+1=488

[0483] 制备标题化合物“A43”的通用方法



[0484]



[0485] 在10~15℃下在N₂下向化合物9h (25mg, 58.2μmol) 在DMF (3mL) 中的溶液中添加DIPEA (38mg, 294μmol) 和HATU (34mg, 89.4μmol), 然后在10~15℃下, 将溶解于DMF (1mL) 中的化合物9e (42mg, 69.8μmol, TFA) 添加到所述溶液中, 添加后, 将其在10~15℃下搅拌1小时。LCMS显示检测到化合物9的MS (RT=0.917分钟, M/Z+1=899)。将反应溶液用AcOH (2mL) 猝灭, 然后将其倾入水 (10mL) 中并且用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 将合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 然后经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩, 提供粗产物。粗产物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3μm; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 35%~45%, 7分钟) 纯化, 减压浓缩溶剂以除去ACN, 然后将其用乙酸乙酯 (10mL*3) 萃取, 用盐水 (10mL) 洗涤, 然后经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩, 提供为白色固体的标题化合物 (33.7mg, 35.6μmol, 61.1% 收率), 其通过LCMS, RT=2.199分钟, M/Z+1=899, ¹H-NMR, HPLC (RT=1.856分钟) 证实。

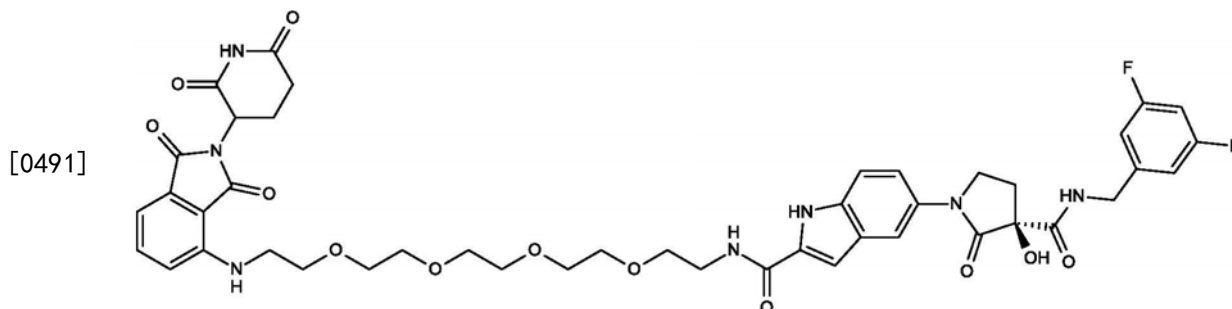
[0486] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆

[0487] δ 11.62 (s, 1H), 11.14 (s, 1H), 8.48-8.77 (m, 2H), 7.88-8.03 (m, 3H), 7.78 (s, 1H), 7.40-7.59 (m, 2H), 7.00-7.25 (m, 4H), 6.71 (s, 1H), 5.15-5.28 (m, 1H), 4.37-4.54 (m, 2H), 4.24-4.35 (m, 1H), 3.90 (t, J=6.8Hz, 3H), 3.63-3.71 (m, 2H), 3.48-3.60 (m, 14H), 3.40-3.48 (m, 2H), 2.82-2.99 (m, 1H), 2.59-2.66 (m, 2H), 1.96-2.23 (m, 2H)。

[0488] LCMS: (方法2), RT=2.199分钟, M/Z+1=899

[0489] HPLC: (方法2), RT=1.856分钟

[0490] 5-[(3S)-3-{[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-(14-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基]氨基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A44”)



[0492] LC-MS或HPLC方法:

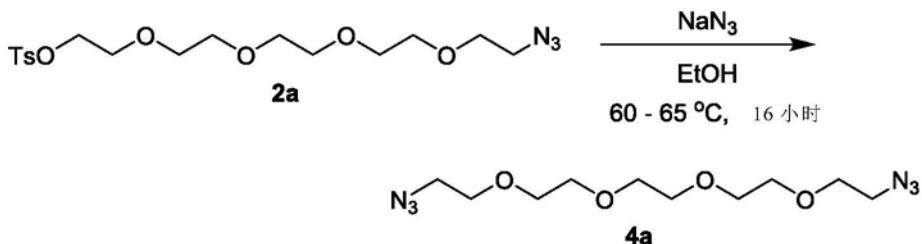
[0493] 方法1:

[0494] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020;管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um;流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v);梯度:0.0分钟5%B→0.80分钟95%B→1.20分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B;流速:1.5毫升/分钟;烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0495] 方法2:

[0496] HPLC仪器类型:SHIMADZU LC-20AB;管柱:Kinetex C18 LC Column 4.6×50mm,5um;流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v);梯度:0.0分钟10%B→2.40分钟80%B→3.70分钟80%B→3.71分钟10%B→4.00分钟10%B;烘箱温度:50℃;UV检测:PDA(220nm、215nm、254nm)。

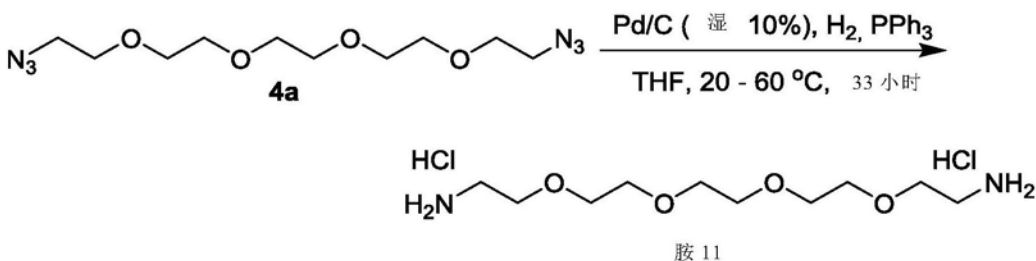
[0497] 制备化合物4a的通用方法



[0498]

[0499] 向化合物2a(8.00g,19.2mmol)在EtOH(60.0mL)中的溶液中添加NaN₃(2.49g,38.3mmol)。将混合物在60~65℃下在N₂下搅拌16小时。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1/2)显示化合物2a(R_f=0.75)消耗完,并且形成新斑点(R_f=0.80)。将反应混合物倾入饱和NaHCO₃水溶液(150mL)中,然后用MTBE(30.0mL×5)萃取。有机层直接用于下一步骤。

[0500] 制备胺11的通用方法



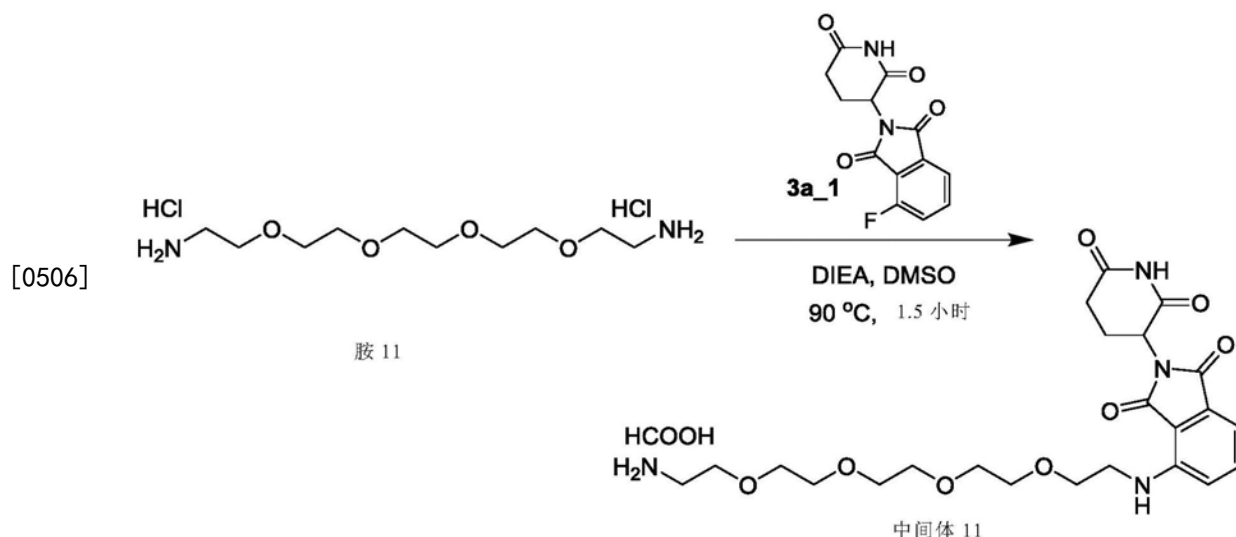
[0501]

[0502] 将化合物4a(2.76g,MTBE溶液,9.57mmol,75.0mL)、Pd/C(200mg,湿,10%纯度)在THF(75mL)中的混合物脱气,并在20~25℃下用H₂(15psi)吹扫3次,然后将混合物搅拌21小时,同时在H₂(15psi)下升温至55~60℃。1H-NMR显示化合物4a被保留。向混合物中添加PPh₃(5.50g,21.0mmol,2.19当量),将混合物在35~40℃下保持搅拌12小时。1H-NMR显示化合物4a消耗完,并且形成化合物胺11。将反应混合物经硅藻土过滤,减压浓缩滤液,得到棕色残余物。然后,向残余物中添加HCl水溶液(1M,25mL),用乙酸乙酯(40mL×2)洗涤混合物。分离水层并冷冻干燥,得到为黄色固体的化合物胺11(1.30g,4.20mmol,2HCl),其通过1H-NMR证实。

[0503] ¹H NMR:400MHz,DMSO-d₆;

[0504] δ8.00(s,6H)3.60-3.65(m,4H)3.51-3.60(m,12H)2.92-3.01(m,4H)

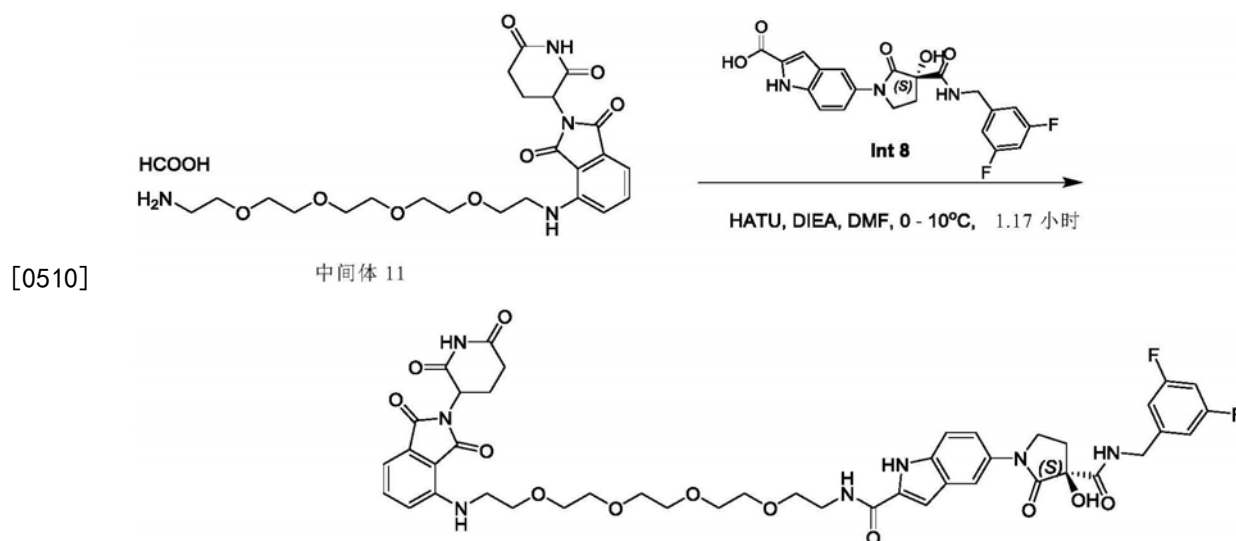
[0505] 制备中间体11的通用方法



[0507] 在90℃下在N₂下将化合物胺11 (100mg, 323umol, 2HCl)、DIEA (222mg, 1.72mmol, 300μL) 和化合物3a_1 (80mg, 289umol) 在DMSO (5.00mL) 中的溶液搅拌1.5小时。LCMS显示检测到化合物中间 11 的MS (R_t=0.748分钟, MS+1=493.3)。将混合物冷却至25~30℃, 并且用AcOH将pH值调节至5~6, 然后通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10μm; 流动相: [水 (0.225%FA) -ACN]; B%: 7%~37%, 10分钟, MS+1=493.3) 纯化。减压浓缩级分, 得到为棕色油的化合物中间 11 (45mg), 其通过下一步骤证实。

[0508] LCMS: (方法1), R_t=0.748分钟, MS+1=493.3;

[0509] 制备标题化合物“A44”的通用方法



[0511] 在0~10℃下在N₂下向化合物Int 8 (36mg, 83.8umol) 在DMF (1.00mL) 中的溶液中依次添加DIEA (35mg, 271umol) 和HATU (40mg, 105umol), 将混合物在0~10℃下搅拌10分钟, 然后在0~10℃下将化合物中间 11 (45mg, 83.6umol, FA) 在DMF (1.00mL) 中的溶液添加到混合物中, 将其在N₂下在0~10℃下搅拌1小时。LCMS显示检测到A44的MS (R_t=0.878分钟, MS+1=904.4)。将混合物倾入冰水 (20mL) 中, 用乙酸乙酯 (10.0mL×2) 萃取, 将有机相分离, 并且用盐水 (20.0mL×2) 洗涤, 用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。将其通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10μm; 流动相: [水 (0.225%FA) -

ACN]; B%: 29%~59%, 10分钟) 纯化, 减压浓缩级分, 得到为黄色固体的A44 (25.88mg, 99.5%纯度), 其通过¹H-NMR、¹⁹F-NMR、LCMS (Rt=0.884分钟, MS+1=904.4) 和HPLC (Rt=1.974分钟) 证实。

[0512] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

[0513] δ11.6 (s, 1H), 10.9-11.3 (m, 1H), 8.69 (t, J=6.0Hz, 1H), 8.55 (t, J=5.2Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.50-7.61 (m, 2H), 7.42 (d, J=8.8Hz, 1H), 6.93-7.24 (m, 6H), 6.72 (s, 1H), 6.58 (t, J=4.8Hz, 1H), 5.00-5.10 (m, 1H), 4.37-4.45 (m, 1H), 4.22-4.30 (m, 1H), 3.89 (t, J=6.4Hz, 2H), 3.46-3.58 (m, 18H), 2.81-2.93 (m, 2H), 2.58 (d, J=15.2Hz, 3H), 2.09-2.17 (m, 1H), 1.97-2.07 (m, 1H), 1.23 (s, 1H)。

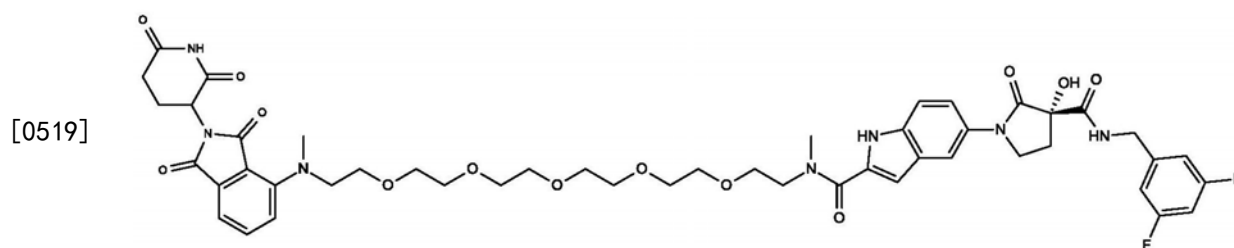
[0514] ¹⁹F NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

[0515] δ-110.29

[0516] LCMS: (方法1), Rt=0.878分钟, MS+1=904.4;

[0517] HPLC: (方法2), Rt=1.974分钟;

[0518] 5-[(3S)-3-[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基]-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-{2-[2-(2,6-二氧杂嘧啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基]-5,8,11,14,17-五氧杂-2-氮杂十九烷-19-基}-N-甲基-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A45”)



[0520] LC-MS或HPLC方法:

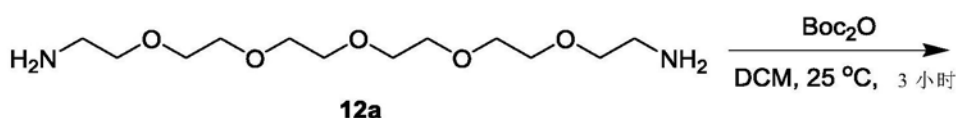
[0521] 方法1:

[0522] MS仪器类型: SHIMADZU LCMS-2020; 管柱: Kinetex EVO C18 300*2.1mm, 5μm; 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v); 梯度: 0.0分钟5%B→0.80分钟95%B→1.20分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B; 流速: 1.5毫升/分钟; 烘箱温度: 50℃; UV检测: 220nm和254nm。

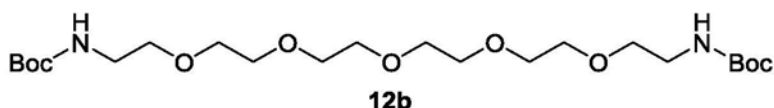
[0523] 方法2:

[0524] HPLC仪器类型: SHIMADZU LC-20AB; 管柱: Kinetex C18 LC Column 4.6×50mm, 5μm; 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v); 梯度: 0.0分钟10%B→4.20分钟80%B→5.30分钟80%B→5.31分钟10%B→6.00分钟10%B; 烘箱温度: 50℃; UV检测: PDA (220nm、215nm、254nm)。

[0525] 制备化合物12b的通用方法

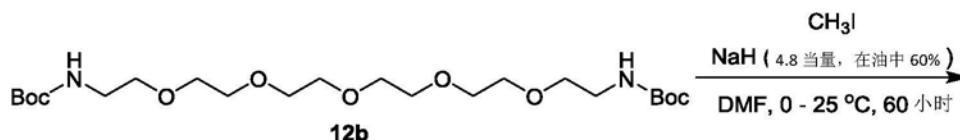


[0526]

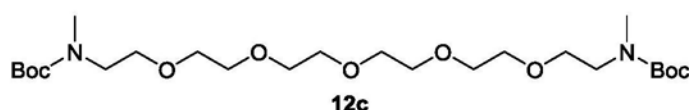


[0527] 在0~10℃下向化合物12a (500mg, 1.78mmol) 在DCM (10mL) 中的溶液中添加Boc₂O (807mg, 3.70mmol, 850μL), 将混合物搅拌3小时, 同时在N₂下升温至25℃。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示化合物12a (R_f=0.00) 消耗完并且形成新斑点 (R_f=0.30)。将混合物倾入水 (50mL) 中, 用乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 将有机相用盐水 (50mL×4) 洗涤, 然后减压浓缩, 得到棕色油状物, 将其直接用于下一步骤。

[0528] 制备化合物12c的通用方法



[0529]



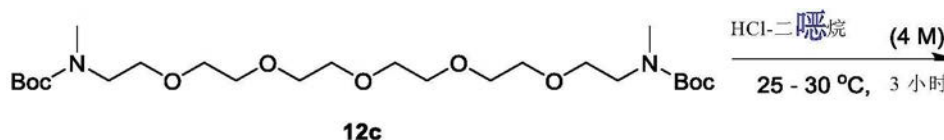
[0530] 在0~10℃下在N₂下向化合物12b (1.00g, 2.08mmol) 在DMF (10mL) 中的溶液中添加NaH (200mg, 5.00mmol, 60%纯度), 将其在0~10℃下在N₂下搅拌1小时, 然后将CH₃I (650mg, 4.58mmol, 285μL, 2.20当量) 添加到混合物中, 在N₂下搅拌10小时, 同时升温至25℃。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示化合物12b (R_f=0.30) 被保留并且形成新斑点 (R_f=0.40)。然后将混合物冷却至0~10℃, 在N₂下将NaH (200mg, 5.00mmol, 60%纯度, 2.40当量) 添加到混合物中, 将其在N₂下在0~10℃下搅拌1小时, 然后在0~10℃下在N₂下将CH₃I (1.50g, 10.6mmol, 660μL, 5.08当量) 添加到混合物中, 将混合物在N₂下搅拌48小时, 同时升温至25℃。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示化合物12b (R_f=0.30) 消耗完并且形成新斑点 (R_f=0.40)。LCMS (R_t=1.183分钟, MS+23=531.4) 显示检测到化合物12c的MS。将混合物倾入水 (30mL) 中, 用乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 将有机相用盐水 (50mL×2) 洗涤, 然后分离并用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。将其通过柱色谱法 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯, 1/0~0/1, R_f=0.40) 纯化, 得到为无色油的化合物12c (400mg, 786μmol), 其通过¹H-NMR证实。

[0531] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

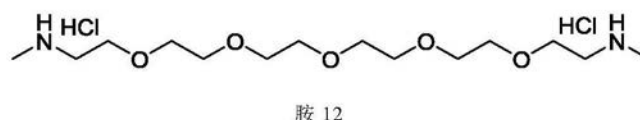
[0532] δ3.48-3.68 (m, 20H), 3.37 (d, J=2.8Hz, 4H), 2.89 (s, 6H), 1.43 (s, 18H)

[0533] LCMS: (方法1), R_t=1.183分钟, MS+23=531.4;

[0534] 制备化合物胺12的通用方法



[0535]



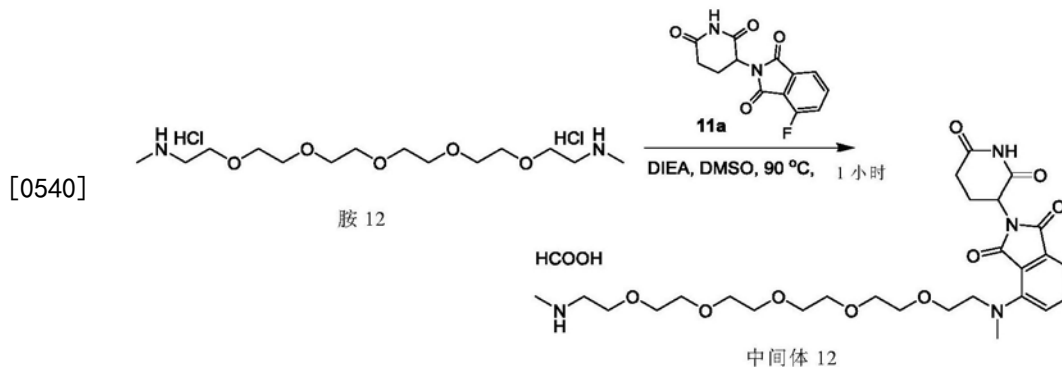
[0536] 在25~30℃下在N₂下向HCl/二噁烷 (4M, 20.0mL) 中添加化合物12c (400mg, 786μmol) 在二噁烷 (10mL) 中的溶液, 将混合物在25~30℃下在N₂下搅拌3小时。取300μL反

应混合物并且减压浓缩得到棕色油状物,将其送去¹H-NMR监测。¹H-NMR显示形成了化合物胺12。将混合物减压浓缩,得到为棕色油的化合物胺12,将其直接用于下一步骤。

[0537] ¹H NMR:400MHz,CDCl₃;

[0538] δ3.84-3.96 (m, 4H), 3.69 (s, 10H), 3.67 (s, 6H), 3.20 (s, 4H), 2.78 (t, J=5.6Hz, 5H), 2.56 (s, 5H)。

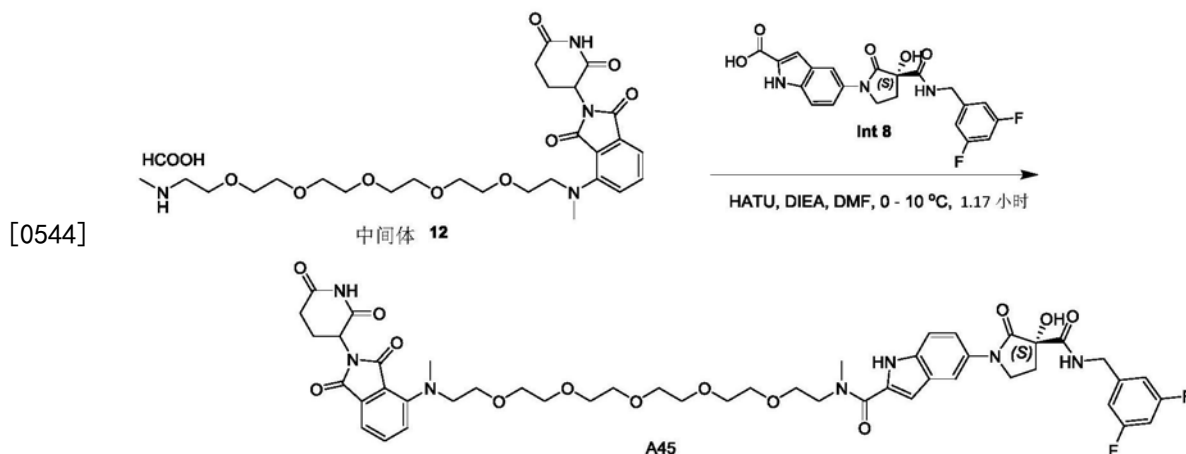
[0539] 制备化合物中间体12的通用方法



[0541] 在90 °C下在N₂下将化合物11a (50mg, 181 μmol)、化合物胺12 (200mg, 524 μmol, 2HCl) 和DIEA (230mg, 1.78 mmol, 310 μL) 在DMSO (3mL) 中的溶液搅拌1小时。LCMS (R_t=0.770 分钟, MS+1=565.3) 显示检测到化合物中间体12的MS。将混合物冷却至25~30 °C, 用AcOH将混合物的pH值调节至5~6, 然后通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10 μm; 流动相: [水 (0.225%FA) -ACN]; B%: 3%~33%, 10分钟) 纯化。将反应物减压浓缩, 得到为黄色油的化合物中间体12 (50mg, 81.9 μmol, 45.2% 收率, FA), 其直接用于下一步骤。

[0542] LCMS: (方法1), R_t=0.770 分钟, MS+1=565.3;

[0543] 制备标题化合物“A45”的通用方法



[0545] 在0~10 °C下在N₂下向化合物Int 8 (30mg, 70.0 μmol) 在DMF (1.00mL) 中的溶液中依次添加DIEA (37mg, 287 μmol, 50 μL) 和HATU (40mg, 105 μmol), 将混合物在0~10 °C下搅拌10 分钟, 然后在0~10 °C下将化合物中间体12 (45mg, 73.7 μmol, FA) 在DMF (1.00mL) 中的溶液添加到混合物中, 将其在N₂下在0~10 °C下搅拌1小时。LCMS (R_t=0.897 分钟, MS+1=976.7) 显示检测到A45的MS。将混合物倾入冰水 (10mL) 中, 用乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 将有机相用盐水 (20mL×3) 洗涤, 用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。将其通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10 μm; 流动相: [水 (0.225%FA) -ACN]; B%:

30%~60%, 10分钟) 纯化, 减压浓缩级分, 得到为黄色固体的A45 (30.51mg, 31.2 μ mol, 42.4% 收率, 99.9% 纯度), 其通过¹H-NMR、¹⁹F-NMR、LCMS (R_t=0.901分钟, MS+1=976.5) 和 HPLC (R_t=2.761分钟) 证实。

[0546] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

[0547] δ 11.6 (s, 1H), 11.1 (s, 1H), 8.70 (t, J=6.4Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.52-7.61 (m, 2H), 7.42 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.19-7.30 (m, 2H), 6.95-7.11 (m, 3H), 6.89 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.08 (dd, J=13.2, 5.2Hz, 1H), 4.41 (dd, J=15.6, 6.8Hz, 1H), 4.21-4.29 (m, 1H), 3.89 (t, J=6.8Hz, 3H), 3.64 (dd, J=7.6, 4.0Hz, 10H), 3.53 (d, J=2.8Hz, 3H), 3.47 (s, 2H), 3.41-3.43 (m, 4H), 3.31 (s, 4H), 3.03 (s, 3H), 2.81-2.95 (m, 3H), 2.58-2.65 (m, 4H), 2.10-2.18 (m, 1H), 1.96-2.06 (m, 1H)。

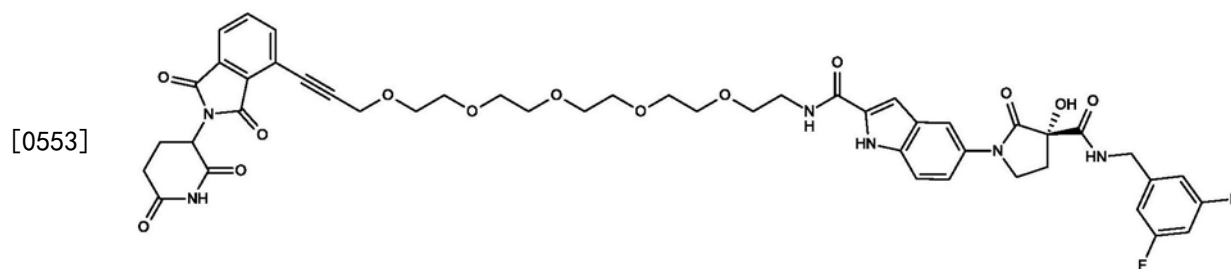
[0548] ¹⁹F NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

[0549] δ -110.29

[0550] LCMS: (方法1), R_t=0.897分钟, MS+1=976.7;

[0551] HPLC: (方法2), R_t=2.761分钟。

[0552] 5-[(3S)-3- { [(3,5-二氟苯基) 甲基] 氨基甲酰基 } -3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-{18-[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基]-3,6,9,12,15-五氧杂十八碳-17-炔-1-基}-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A46”)



[0554] LC-MS或HPLC方法:

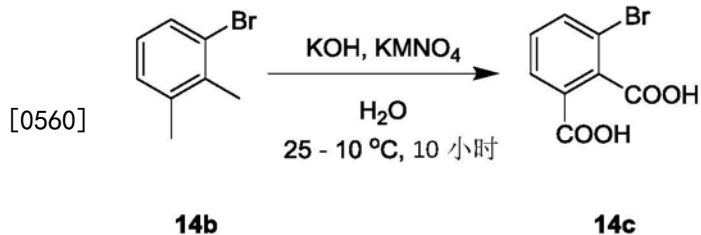
[0555] 方法1:

[0556] MS仪器类型: SHIMADZU LCMS-2020; 管柱: Kinetex EVO C18 300*2.1mm, 5 μ m; 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v); 梯度: 0.0分钟5%B→0.80分钟95%B→1.20分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B; 流速: 1.5 (毫升/分钟); 烘箱温度: 50℃; UV检测: 220nm和254nm。

[0557] 方法2:

[0558] HPLC仪器类型: SHIMADZU LC-20AB; 管柱: Kinetex C18 LC Column 4.6×50mm, 5 μ m; 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v); 梯度: 0.0分钟10%B→4.20分钟80%B→5.30分钟80%B→5.31分钟10%B→6.00分钟10%B; 烘箱温度: 50℃; UV检测: PDA (220nm、215nm、254nm)。

[0559] 制备化合物14c的通用方法

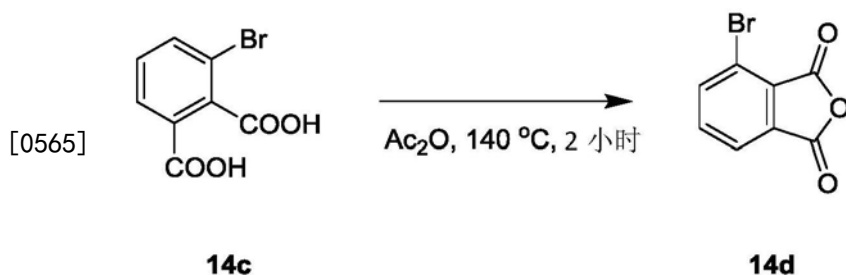


[0561] 在25~30℃下,在0.5小时内,向化合物14b(10.0g,54.0mmol,7.30mL)和KOH(2.39g,36.2mmol,85.0%纯度)在H₂O(500mL)中的溶液中滴加KMnO₄(40.0g,252mmol)在H₂O(100mL)中的溶液,将混合物在100℃下搅拌9.5小时。取出0.5mL混合物并添加到3mL水中,向溶液中添加EtOH(1mL),用1M HCl水溶液将混合物的pH值调节至1,用乙酸乙酯(1mL)萃取,在减压下浓缩有机相,得到白色固体,送去通过HNMR和LCMS监测,¹H-NMR显示化合物14b消耗完并且形成化合物14c,LCMS显示没有检测到化合物14c的MS。将混合物冷却至30℃,在30~40℃下在N₂下将EtOH(200mL)滴加到混合物中,再搅拌1小时,然后将混合物用乙酸乙酯(400mL×2)萃取,将有机相用盐水(400mL×3)洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤,减压浓缩滤液,得到为白色固体的化合物14c,其通过¹H-NMR证实。

[0562] ¹H NMR:400MHz,DMSO-d₆;

[0563] δ8.00(dd,J=7.6,1.2Hz,1H),7.76(dd,J=8.0,1.2Hz,1H),7.32(t,J=8.0Hz,1H)

[0564] 制备化合物14d的通用方法

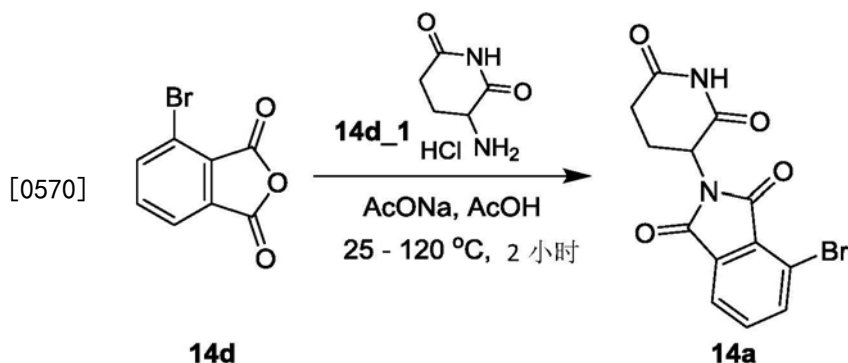


[0566] 将化合物14c(9.50g,38.8mmol)在Ac₂O(80mL)中的溶液在140℃下在N₂下搅拌2小时。取0.2mL混合物,并且送去通过¹H-NMR监测,¹H-NMR显示化合物14c消耗完并且形成化合物14d。将混合物减压浓缩,得到为棕色固体的化合物14d(8g,粗产物),其通过¹H-NMR证实。

[0567] ¹H NMR:400MHz,DMSO-d₆;

[0568] δ8.18(d,J=8.0Hz,1H),8.06(d,J=7.6Hz,1H),7.78-7.90(m,1H)

[0569] 制备化合物14a的通用方法



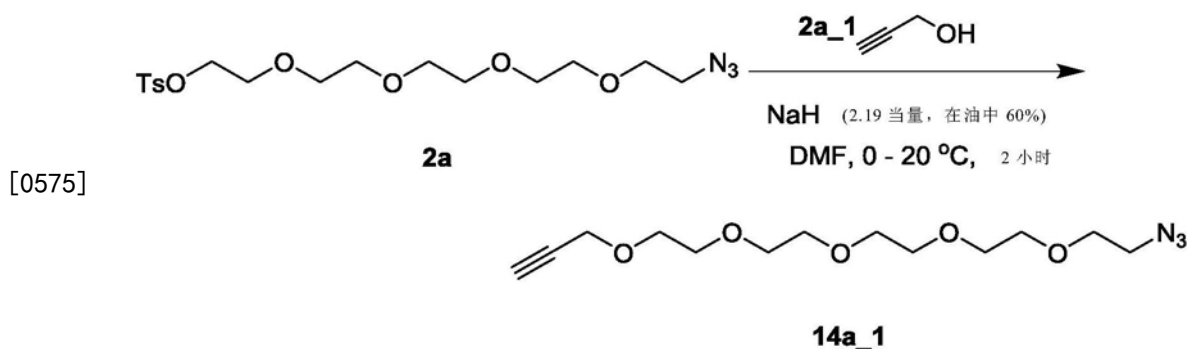
[0571] 在25~30℃下向化合物14d(650mg,2.86mmol)和化合物14d_1(630mg,3.83mmol),

HCl) 在AcOH (15.0mL) 中的溶液中添加AcONa (380mg, 4.63mmol), 将混合物在N₂下在120℃下搅拌2小时。取0.3mL混合物且减压浓缩, 得到灰色固体, 将其送去NMR监测, ¹H-NMR显示形成了化合物14a。将混合物冷却至25~30℃, 然后过滤, 收集为灰色固体的滤饼。将固体倾入0.05M HCl水溶液 (50mL) 中并搅拌0.5小时, 然后过滤, 将滤饼用水 (20mL) 洗涤, 收集并在60℃下减压 (-0.09MPa) 干燥, 得到为灰色固体的化合物14a (800mg, 2.37mmol, 82.9%收率), 其通过¹H-NMR证实。

[0572] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

[0573] δ11.15 (s, 1H), 8.06 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.93 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.72-7.82 (m, 1H), 5.17 (dd, J=12.8, 5.4Hz, 1H), 2.80-2.97 (m, 1H), 2.52-2.70 (m, 2H), 1.96-2.15 (m, 1H)。

[0574] 制备化合物14a₁的通用方法

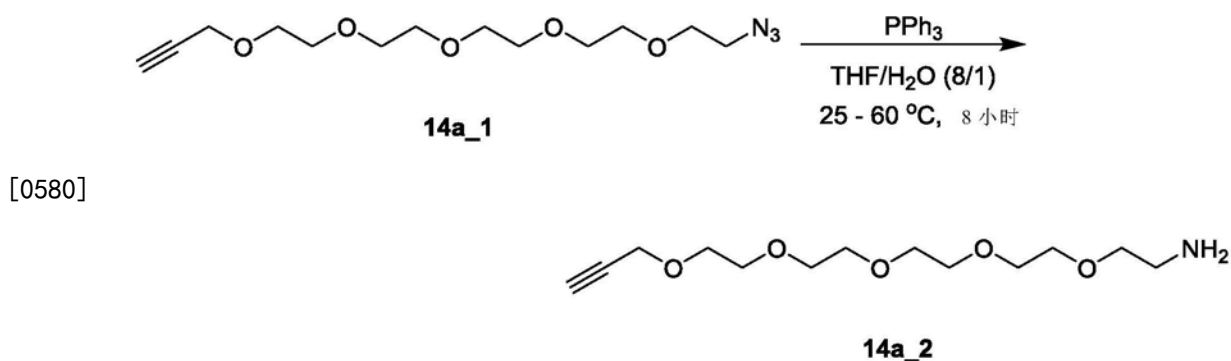


[0576] 在0~10℃下在N₂下向化合物2a₁ (1.50g, 26.7mmol, 1.58mL) 在DMF (100mL) 中的溶液中分批添加NaH (2.10g, 52.5mmol, 60%纯度), 将其在0~10℃下在N₂下搅拌0.5小时, 在0~10℃下在N₂下将化合物2a (10.0g, 23.9mmol) 滴加到混合物中, 将混合物搅拌1.5小时, 同时在N₂下升温至15~20℃。LCMS显示未检测到化合物14a₁的MS。取0.5mL混合物, 将其倾入冰水 (2mL) 中, 用乙酸乙酯 (2mL) 萃取, 将有机相分离且减压浓缩, 得到无色油状物, ¹H-NMR显示化合物2a消耗完并且形成化合物14a₁。将混合物倾入水 (200mL) 中, 用乙酸乙酯 (100mL×2) 萃取, 将有机相用盐水 (100mL×3) 洗涤, 用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到为棕色油的化合物14a₁ (7.60g, 粗产物), 将其直接用于下一步骤。

[0577] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0578] δ4.16 (d, J=2.4Hz, 2H), 3.59-3.67 (m, 18H), 3.35 (t, J=5.2Hz, 2H), 2.41 (t, J=2.4Hz, 1H)

[0579] 制备化合物14a₂的通用方法



[0581] 在25℃下向化合物14a₁ (1.00g, 3.32mmol) 在THF (16mL) 和H₂O (2mL) 的混合溶剂中的溶液中添加PPh₃ (1.74g, 6.64mmol), 将混合物在N₂下在60℃下搅拌8小时。LCMS (R_t=

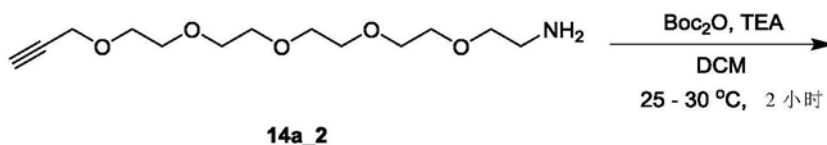
1.146分钟, MS+1=263.2) 显示检测到化合物14a_2的MS。将混合物倾入水 (20mL) 中, 用1M HCl水溶液将混合物的pH值调节至2~3, 用乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 分离水溶液, 并且用饱和Na₂CO₃水溶液将pH值调节至10~11。减压浓缩, 得到为棕色油的化合物14a_2 (1g, 粗产物), 其通过¹H-NMR证实。

[0582] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

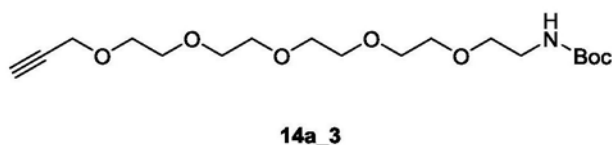
[0583] δ4.89 (s, 2H), 4.13-4.26 (m, 2H), 3.61-3.69 (m, 16H), 3.49 (t, J=5.2Hz, 2H), 2.77-2.92 (m, 2H), 2.42 (t, J=2.4Hz, 1H)

[0584] LCMS: (方法1), Rt=1.146分钟, MS+1=263.2;

[0585] 制备化合物14a_3的通用方法



[0586]

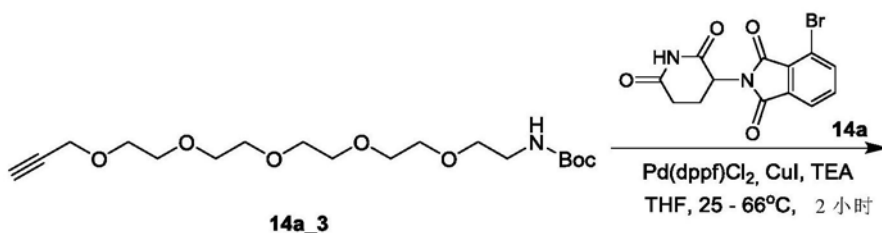


[0587] 在25~30℃下向14a_2 (1g, 3.63mmol) 在DCM (5.00mL) 中的溶液中依次添加TEA (1.10g, 10.9mmol, 1.52mL) 和Boc₂O (950mg, 4.35mmol, 1mL) 在DCM (5mL) 中的溶液, 将混合物在25~30℃下在N₂下搅拌2小时。取0.5mL混合物且将其倾入水 (2mL) 中, 用乙酸乙酯 (1mL) 萃取, 将有机相分离且用盐水 (2mL×3) 洗涤, 然后分离且减压浓缩, 得到棕色油状物, ¹H-NMR显示形成了化合物14a_3。将混合物倾入水 (20mL) 中, 用乙酸乙酯 (40mL) 萃取, 将有机相分离且用盐水 (30mL×3) 洗涤, 用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1, R_f=0.70)。所述油通过柱色谱法 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯, 1/0~0/1, R_f=0.70) 纯化, 得到为无色油的化合物14a_3 (750mg, 2.00mmol), 其通过¹H-NMR证实。

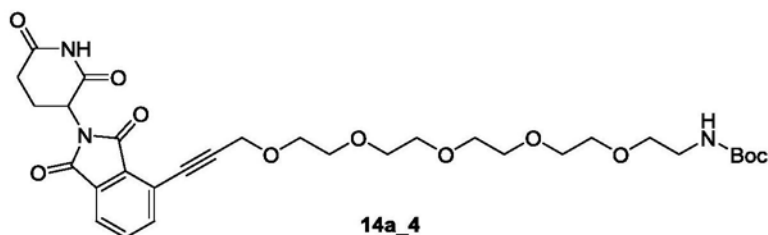
[0588] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0589] δ5.09 (s, 1H), 4.18 (d, J=2.4Hz, 2H), 3.59-3.68 (m, 16H), 3.51 (t, J=5.07Hz, 2H), 3.21-3.35 (m, 2H), 2.41 (t, J=2.4Hz, 1H), 1.42 (s, 9H)。

[0590] 制备化合物14a_4的通用方法



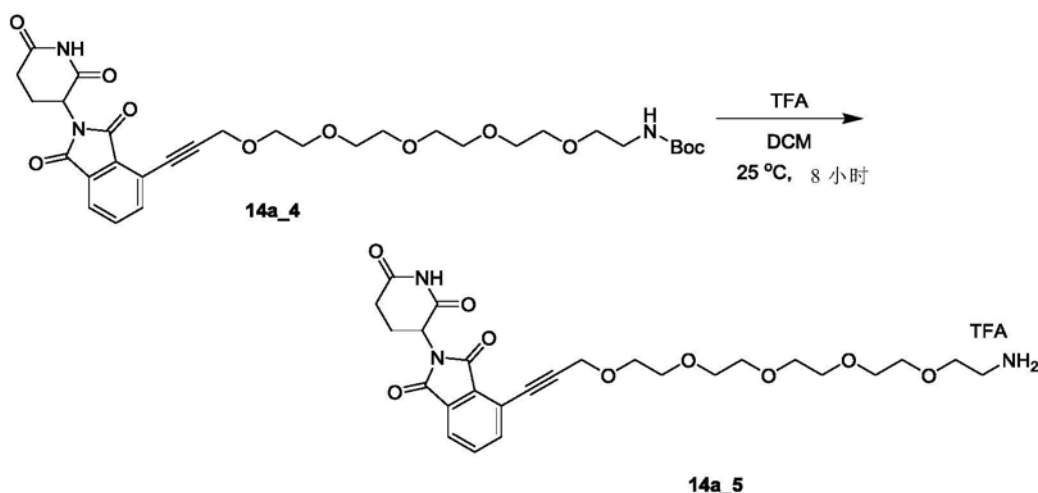
[0591]



[0592] 在25~30℃下向化合物14a (400mg, 1.19mmol) 和化合物14a_3 (500mg, 1.33mmol) 在THF (10.0mL) 中的溶液中依次添加DIEA (1.48g, 11.5mmol, 2mL)、CuI (50mg, 262umol, 0.22当量) 和Pd (dppf) Cl₂ (100mg, 136umol), 将混合物在66℃下在N₂下搅拌2小时。LCMS (R_t = 0.878分钟, MS-100+1 = 532.3) 显示检测到化合物14a_4的MS。将混合物冷却至25~30℃, 然后倾入水 (30mL) 中, 用乙酸乙酯 (30mL × 3) 萃取, 将有机相用盐水 (30mL × 3) 洗涤, 然后分离并用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。所述油状物通过制备型HPLC (反相色谱法ACN (0%~50%) /H₂O (甲酸0.1%)) 纯化, 减压浓缩级分, 得到为棕色油的化合物14a_4 (120mg, 143umol, 12.1%收率), 其通过LCMS (R_t = 0.878分钟, MS-100+1 = 532.3) 证实。

[0593] LCMS: (方法1), R_t = 0.878分钟, MS-100+1 = 532.3;

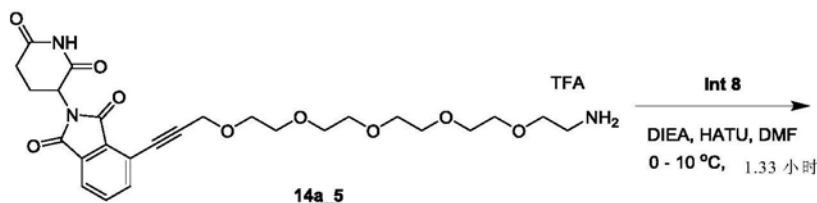
[0594] 制备化合物14a_5的通用方法



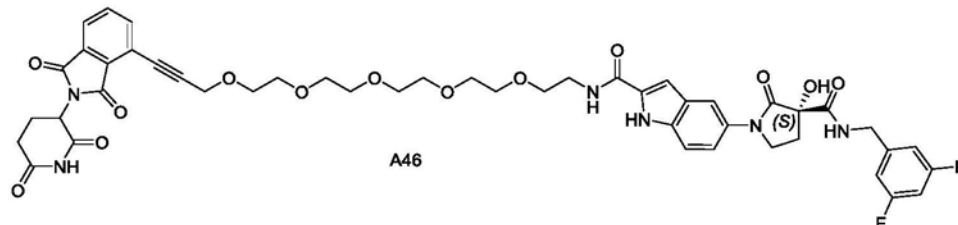
[0596] 在25℃下向化合物14a_4 (120mg, 143umol) 在DCM (10mL) 中的溶液中添加TFA (1.54g, 13.5mmol, 1mL), 将混合物在25℃下在N₂下搅拌8小时。LCMS (R_t = 0.737分钟, MS1 = 532.3) 显示检测到化合物14a_5的MS。将混合物减压浓缩, 得到棕色油状物。将油状物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex luna C18 150*25mm*10um; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 12%~42%, 9分钟) 纯化, 减压浓缩级分, 得到为棕色油的化合物14a_5 (50mg, 77.5umol, 53.9%收率, TFA), 其通过LCMS (R_t = 0.761分钟, MS+1 = 532.2) 证实。

[0597] LCMS: R_t = 0.737分钟, MS+1 = 532.3;

[0598] 制备标题化合物“A46”的通用方法



[0599]



[0600] 在0~10℃下在N₂下向化合物Int 8 (30mg, 69.9μmol) 在DMF (2mL) 中的溶液中依次添加DIEA (58mg, 449μmol, 80uL) 和HATU (46mg, 121μmol), 将其在0~10℃下搅拌20分钟, 在0~10℃下在N₂下将化合物14a_5 (50mg, 85μmol, FA) 在DMF (1.00mL) 中的溶液添加到混合物中, 在0~10℃下在N₂下将其再搅拌1小时。LCMS显示检测到标题化合物的MS值 (R_t=0.872分钟, MS+1=943.4)。将混合物倾入冰水 (20mL) 中, 用乙酸乙酯 (15mL×2) 萃取, 将有机相用盐水 (30mL×3) 洗涤, 然后分离并用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。将油状物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18150*25*10μm; 流动相: [水 (0.225% FA) - ACN]; B%: 28%~58%, 10分钟) 纯化, 减压浓缩级分, 得到为淡黄色固体的A46 (13.19mg, 14.0μmol, 16.2% 收率, 100% 纯度), 其通过¹H-NMR、¹⁹F-NMR、LCMS (R_t=0.885分钟, MS+1=943.4) 和HPLC (R_t=2.671分钟) 证实。

[0601] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

[0602] δ 11.6 (s, 1H), 11.1 (s, 1H), 8.69 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.55 (t, J=5.2Hz, 1H), 7.80-7.97 (m, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.48-7.59 (m, 1H), 7.42 (d, J=9.2Hz, 1H), 6.92-7.17 (m, 4H), 6.71 (s, 1H), 5.00-5.25 (m, 1H), 4.34-4.56 (m, 3H), 4.20-4.33 (m, 1H), 3.89 (t, J=6.8Hz, 2H), 3.67-3.76 (m, 2H), 3.43-3.60 (m, 18H), 2.85-2.97 (m, 1H), 2.56-2.68 (m, 3H), 2.11-2.20 (m, 1H), 2.04 (s, 1H)。

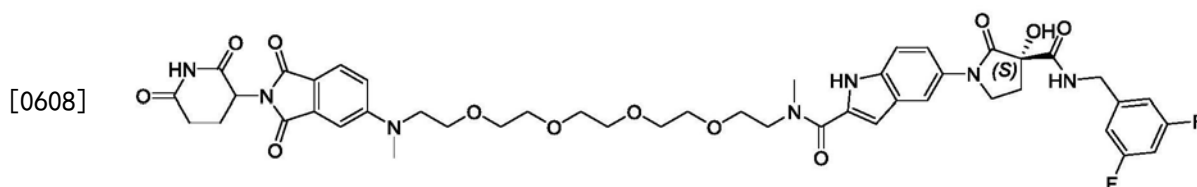
[0603] ¹⁹F NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

[0604] δ-110.29

[0605] LCMS: (方法1), R_t=0.872分钟, MS+1=943.4

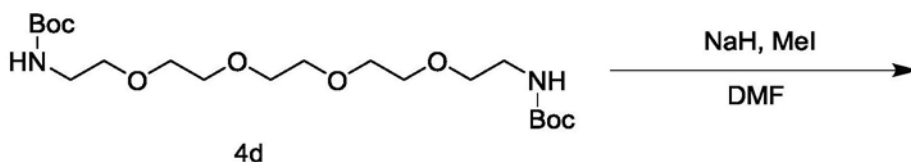
[0606] HPLC: (方法2), R_t=2.671分钟。

[0607] 5-[(3S)-3-{[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-{2-[2-(2,6-二氧杂嘧啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-5-基]-5,8,11,14-四氧杂-2-氮杂十六烷-16-基}-N-甲基-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A47”)

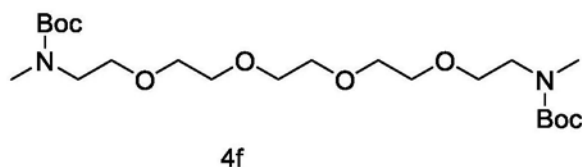


[0608]

[0609] 制备化合物4f的通用方法;



[0610]

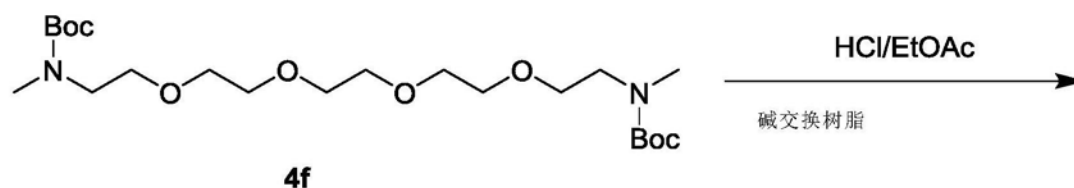


[0611] 在0~10℃下在N₂下向化合物4d (500mg, 1.15mmol) 在DMF (10mL) 中的溶液中添加NaH (230mg, 5.75mmol, 60%纯度), 将混合物在0~10℃下在N₂下搅拌1小时, 然后在0~10℃将CH₃I (600mg, 4.23mmol, 263μL) 滴加到混合物中, 将混合物在N₂下保持搅拌11小时, 同时升温至25℃。将混合物倾入饱和NH₄Cl水溶液 (30mL) 中, 用乙酸乙酯 (15mL×2) 萃取, 将合并的有机相用盐水 (30mL×3) 洗涤, 将有机相分离且用Na₂SO₄干燥, 然后过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。油状物通过柱色谱法 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=1/0~1/1, R_f=0.50) 纯化。获得为黄色油的化合物4f (500mg, 1.08mmol, 94%收率)。

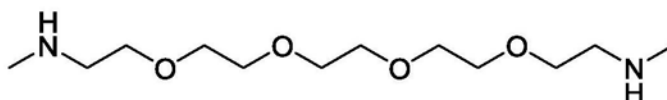
[0612] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0613] 3.67-3.54 (m, 16H), 3.39 (d, J=2.2Hz, 4H), 2.91 (s, 6H), 1.46 (s, 18H)

[0614] 制备胺4的通用方法



[0615]

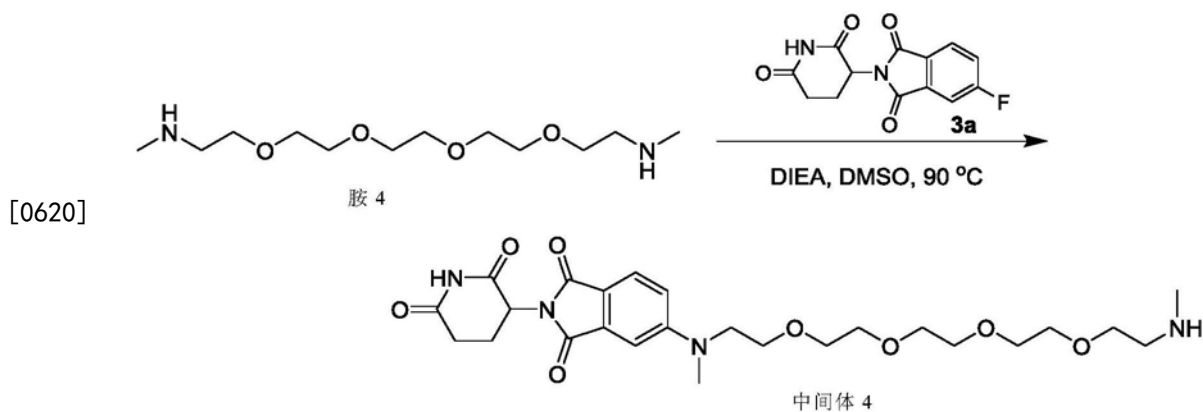


[0616] 在0~10℃下在N₂下向化合物4f (500mg, 1.08mmol) 在EtOAc (5mL) 中的溶液中添加HCl/EtOAc (4M, 5mL), 将混合物在20℃下在N₂下搅拌1小时, TLC (石油醚/乙酸乙酯=1/2) 化合物4f (R_f=0.4) 消耗完并且形成新斑点 (R_f=0)。将混合物浓缩并且用MeOH (20mL) 稀释, 溶液通过碱交换树脂碱化, 过滤且浓缩滤液。获得为黄色油的化合物胺4 (280mg, 粗产物) 并且用¹H-NMR证实。

[0617] ¹H NMR: 400MHz, MeOH;

[0618] δ3.74-3.80 (m, 4H), 3.68 (d, 10H), 3.16-3.26 (m, 4H), 2.74 (s, 6H)

[0619] 制备中间体4的通用方法



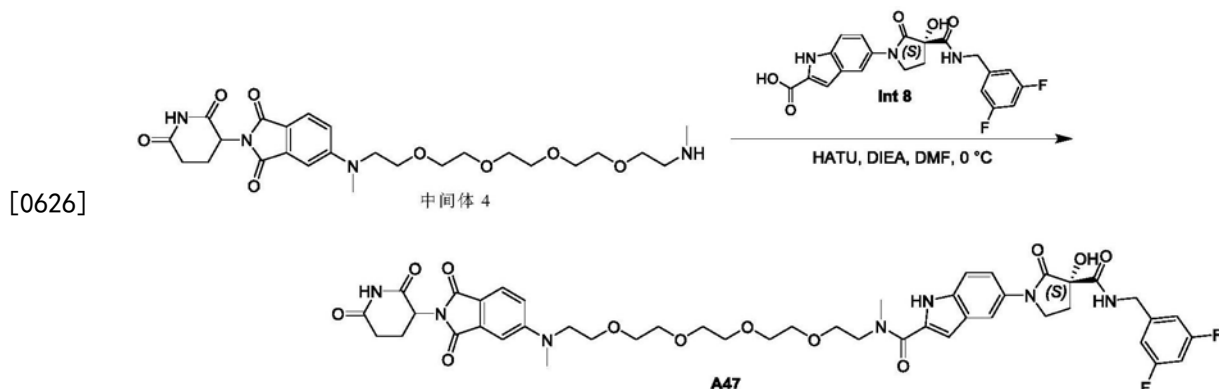
[0621] 向化合物3a (250mg, 905 μ mol) 和胺4 (250mg, 946 μ mol) 在DMSO (3mL) 中的溶液中添加DIEA (371mg, 2.87mmol, 0.5mL), 且将混合物在90℃下搅拌1小时。用AcOH (1mL) 稀释反应物。混合物用制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10 μ m; 流动相: [水 (0.225% FA) - ACN]; B%: 5% ~ 35%, 10分钟) 纯化。获得为黄色胶的中间体4 (130mg, 229.44 μ mol, 25% 收率, FA)。

[0622] LCMS: RT=0.725分钟, m/z (M+1) = 521.2

[0623] ^1H NMR: 400MHz, DMSO;

[0624] δ 8.35 (s, 1H), 7.63 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.11 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.02-6.99 (m, 1H), 5.08-5.03 (m, 1H), 3.71-3.68 (m, 2H), 3.63-3.60 (m, 2H), 3.55 (t, J=5.6Hz, 2H), 3.50-3.48 (m, 12H), 3.09 (s, 3H), 2.93-2.84 (m, 3H), 2.60-2.54 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.01-1.99 (m, 1H)。

[0625] 制备“A47”的通用方法



[0627] 在0℃下在N₂下向Int 8 (40mg, 93.2 μ mol) 在DMF (1mL) 中的溶液中依次添加DIEA (35mg, 271 μ mol) 和HATU (38mg, 99.9 μ mol), 将混合物在0℃下搅拌10分钟, 然后在0℃下将中间体4 (50mg, 88.3 μ mol) 在DMF (1mL) 中的溶液添加到混合物中, 将其在N₂下在0℃下搅拌1小时。将反应混合物倾入冰水 (30mL) 中, 且用EtOAc (20mL*3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤且浓缩。混合物通过制备型HPLC (管柱: 3-Phenomenex Luna C18 75*30mm*3 μ m; 流动相: [水 (0.225% FA) - ACN]; B%: 32% ~ 62%, 7分钟) 纯化。获得为黄色固体的“A47” (30.46mg, 30.9 μ mol, 35.1% 收率, 99.3% 纯度, FA盐)。

[0628] ^1H NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

[0629] δ 11.56 (s, 1H), 11.18-10.85 (m, 1H), 8.69 (t, J=6.3Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.66-

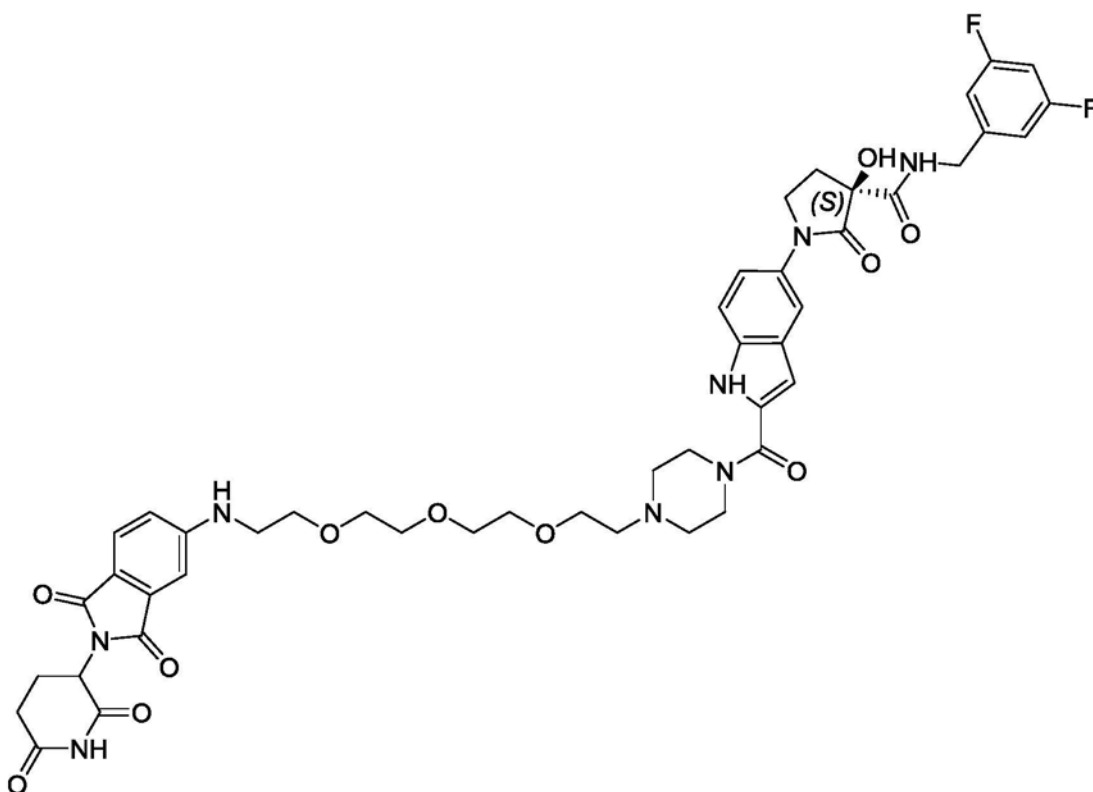
7.51 (m, 2H), 7.42 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.12-6.95 (m, 5H), 6.89 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.07-5.02 (m, 1H), 4.44-4.39 (m, 1H), 4.29-4.23 (m, 1H), 3.89 (s, 2H), 3.80-3.46 (m, 23H), 3.05 (s, 3H), 2.94-2.85 (m, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.22-2.12 (m, 1H), 2.03-1.97 (m, 1H)。

[0630] LCMS: RT=0.908分钟, m/z (M+1) = 932.4;

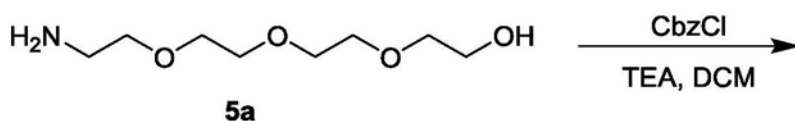
[0631] HPLC: RT=1.948分钟。

[0632] (3S)-N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-{2-[4-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-5-基]氨基}乙氧基)乙氧基]乙基)哌嗪-1-羰基]-1H-吲哚-5-基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-3-甲酰胺 (“A48”)

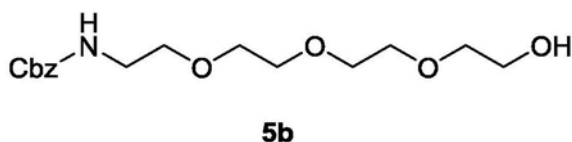
[0633]



[0634] 制备化合物5b的通用方法-



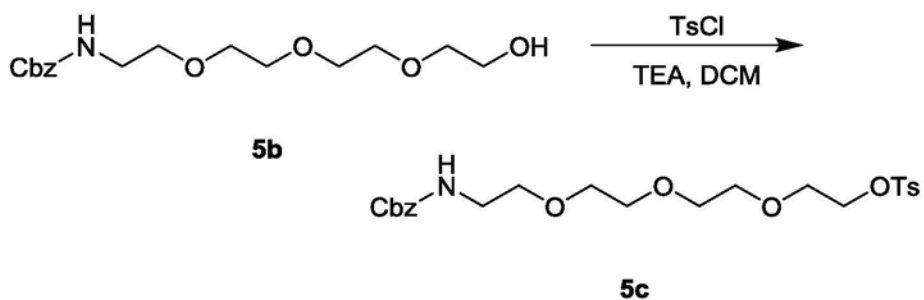
[0635]



[0636] 将化合物5a (5g, 25.9mmol) 和TEA (2.88g, 28.5mmol) 在DCM (150mL) 中的溶液用一份CbzCl (4.80g, 28.1mmol) 处理, 且将混合物在20℃下搅拌10小时。浓缩混合物, 且通过柱色谱法 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=2/1至0/1), (石油醚/乙酸乙酯=0/1, R_f=0.4) 纯化。获得为无色油的化合物5a (2.50g, 7.21mmol, 94.4%纯度)。

[0637] LCMS: RT=0.775分钟, M/z (M+23) = 550.3

[0638] 制备化合物5c的通用方法

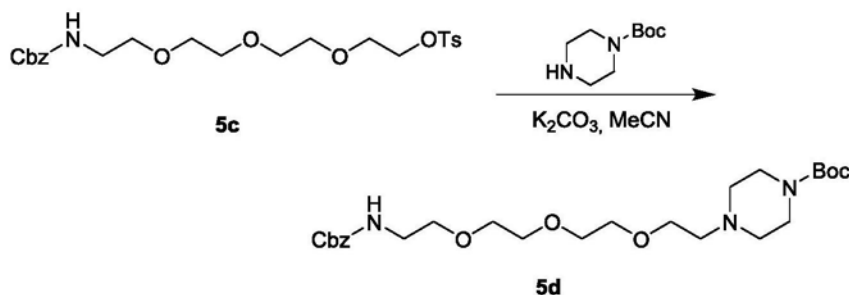


[0640] 在20℃下向化合物5b (2.50g, 7.64mmol) 和TEA (2.18g, 21.5mmol) 在DCM (40mL) 中的溶液中添加4-甲基苯磺酰氯 (2.20g, 11.5mmol), 将混合物在N₂下在40℃下搅拌10小时。浓缩混合物。残余物通过柱色谱法 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=5/1至1/2), (石油醚/乙酸乙酯=1/2, R_f=0.5) 纯化。获得为黄色油的化合物5c (2.00g, 4.15mmol, 54%收率)。

[0641] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0642] δ 7.79 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.36-7.31 (m, 7H), 5.32 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.15-4.11 (m, 2H), 3.66-3.63 (m, 2H), 3.60-3.54 (m, 10H), 3.40-3.36 (m, 2H), 2.44 (s, 3H)

[0643] 制备化合物5d的通用方法



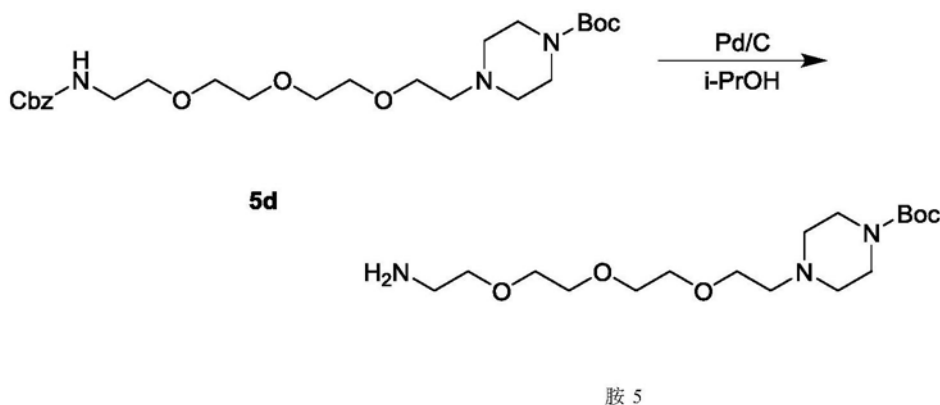
[0645] 向化合物5c (1.50g, 3.11mmol) 和哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (600mg, 3.22mmol) 在MeCN (10mL) 中的溶液中添加KI (1.03g, 6.23mmol) 和K₂CO₃ (1.29g, 9.34mmol), 将混合物在N₂下在70℃下搅拌12小时。过滤混合物并浓缩滤液。残余物通过反相色谱柱 (0.1% NH₃·H₂O 条件) 纯化。获得为黄色油的化合物5d (500mg, 32%收率)。

[0646] LCMS: RT=0.989分钟, m/z (M+1) = 496.5

[0647] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0648] 7.37-7.27 (m, 5H), 5.58 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.65-3.55 (m, 12H), 3.44-3.38 (m, 6H), 2.56 (t, J=5.6Hz, 2H), 2.42 (d, J=4.4Hz, 4H), 1.46 (s, 9H)

[0649] 制备胺5的通用方法-



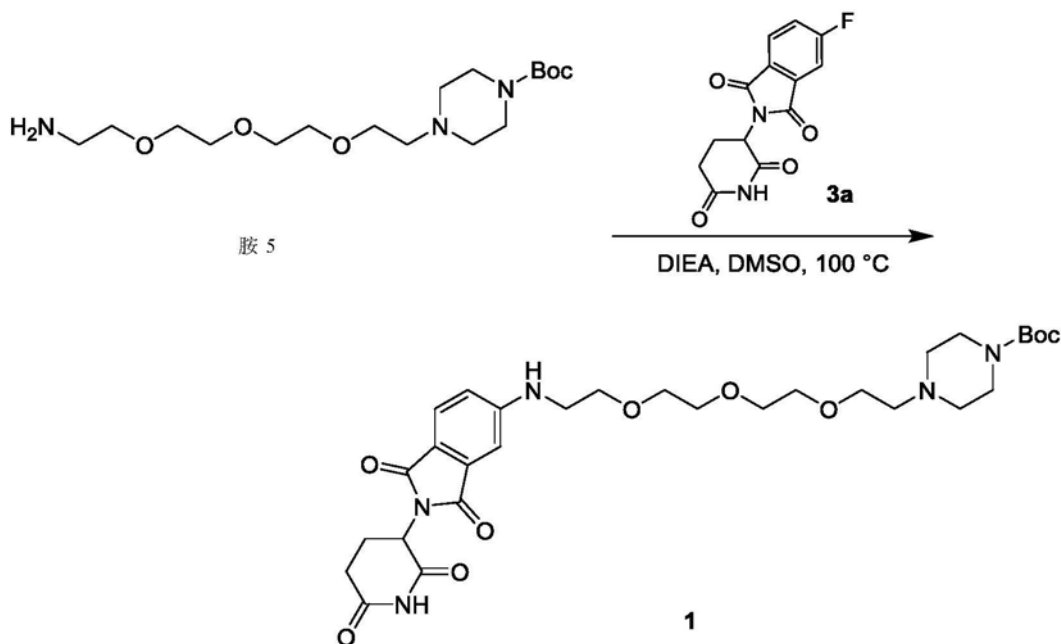
[0650]

[0651] 在N₂下向化合物5d (500mg, 1.01mmol) 在i-PrOH (20mL) 中的溶液中添加Pd/C (100mg, 10%纯度), 在真空下悬浮且用H₂吹扫三次, 然后将混合物在H₂ (15psi) 下在25℃下搅拌10小时。过滤混合物并浓缩滤液。获得为黄色油的化合物胺5 (360mg, 粗产物)。

[0652] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0653] δ 3.67-3.1 (m, 10H), 3.51 (t, J=5.2Hz, 2H), 3.44-3.42 (m, 4H), 2.86 (t, J=5.2Hz, 2H), 2.59 (t, J=5.8Hz, 2H), 2.45-2.43 (m, 4H), 1.45 (s, 9H)

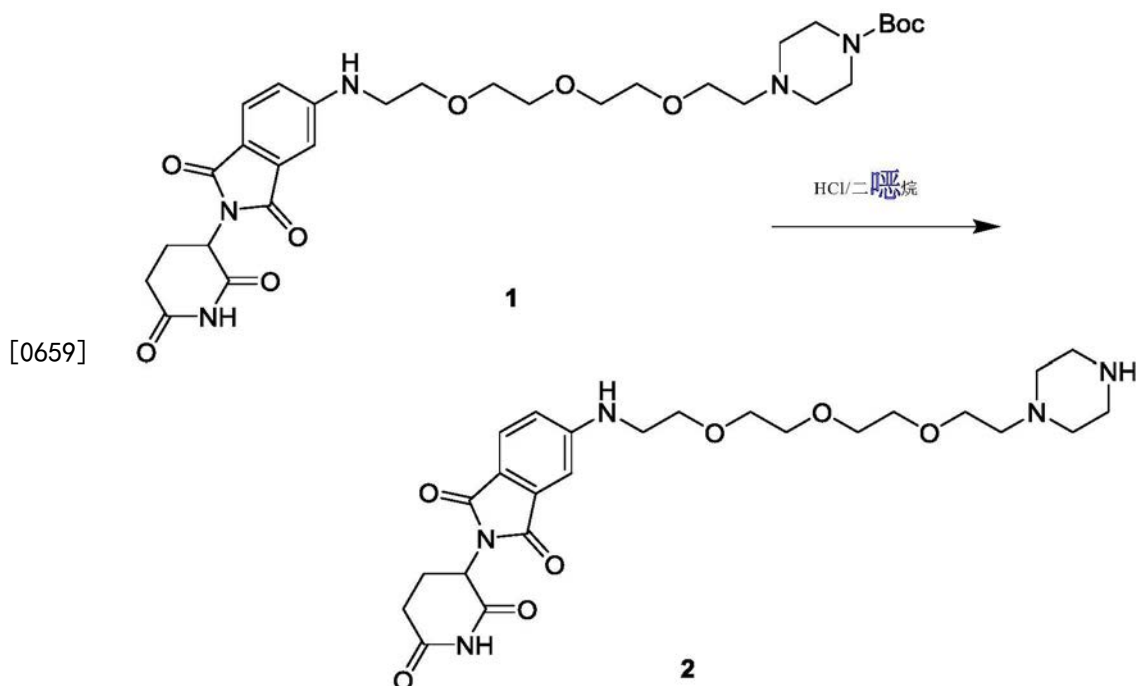
[0654] 制备1的通用方法;



[0656] 在100℃下向化合物3a (150mg, 543μmol) 和DIEA (281mg, 2.17mmol, 378μL) 在DMSO (3mL) 中的溶液中添加胺5 (350mg, 968μmol), 且将混合物在100℃下搅拌8小时。LCMS显示检测到所需的质量 (RT=0.758分钟, m/z=618.3)。反应混合物用制备型HPLC (管柱: Phenomenex luna C18 150*40mm*15um; 流动相: [水 (0.225%FA) -ACN]; B%: 9%~39%, 10分钟) 纯化。获得为黄色胶的化合物1 (85mg, 121μmol, 22%收率, 94.35%纯度, FA), 并且用LCMS证实。

[0657] LCMS: RT=0.762分钟, m/z (M+1) = 618.3

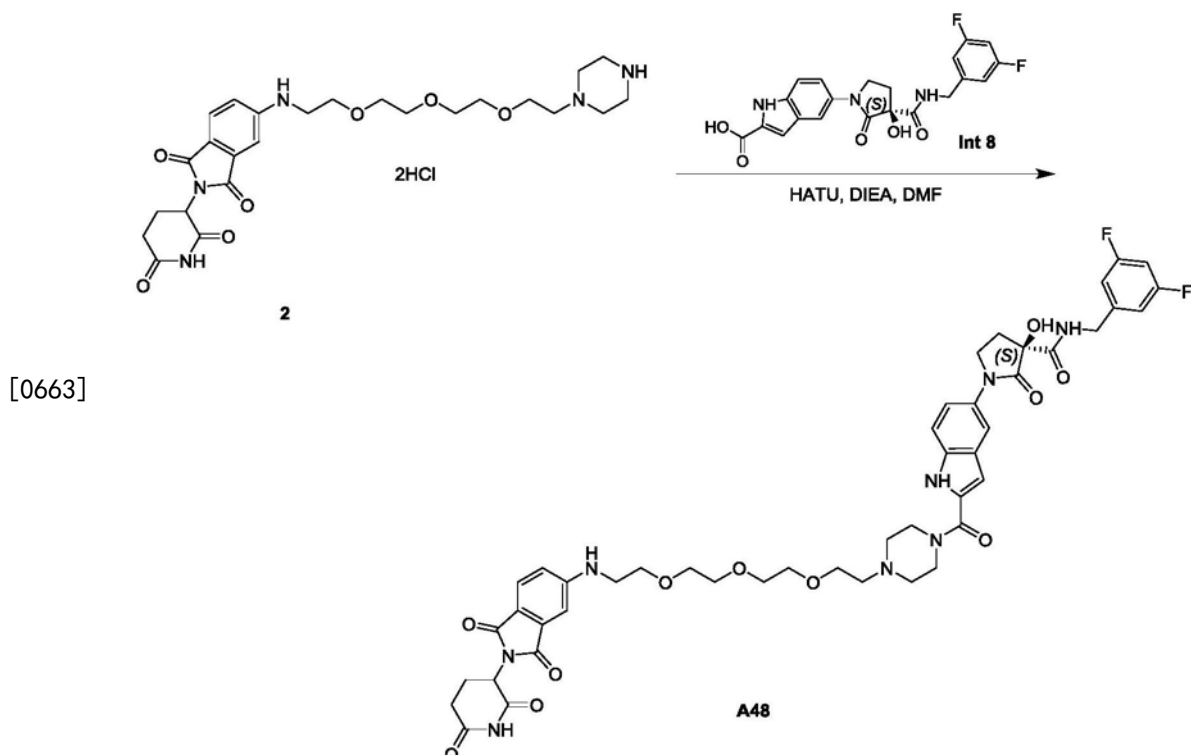
[0658] 制备2的通用方法



[0660] 在0℃下向化合物1 (80mg, 130 μ mol) 在二噁烷 (2mL) 中的溶液中添加HCl/二噁烷 (4M, 2mL), 然后将混合物在20℃下搅拌10分钟。浓缩反应混合物。获得为黄色胶的化合物2 (76mg, 粗产物, 2HCl)。

[0661] LCMS: RT=0.650分钟, m/z (M+1) = 518.3

[0662] 制备化合物“A48”的通用方法



[0664] 在0℃下在N₂下向Int 8 (52mg, 120 μ mol) 在DMF (1mL) 中的溶液中依次添加DIEA (23mg, 181 μ mol, 31.6 μ L) 和HATU (59mg, 155 μ mol), 将混合物在0℃下搅拌10分钟, 然后在0℃下将化合物2 (76mg, 129 μ mol, 2HCl) 在DMF (1mL) 中的溶液添加到混合物中, 将其在0℃在N₂

下搅拌1小时。将反应混合物倾入冰水(30mL)中,且用EtOAc(20mL*3)萃取。将合并的有机层用盐水(20mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。混合物通过制备型HPLC(管柱:Phenomenex Luna C18150*25mm*10um;流动相:[水(0.225%FA)-ACN];B%:15%~45%,10分钟)纯化。获得为黄色固体的“A48”(35.04mg,35.3μmol,27%收率,98%纯度,FA)。

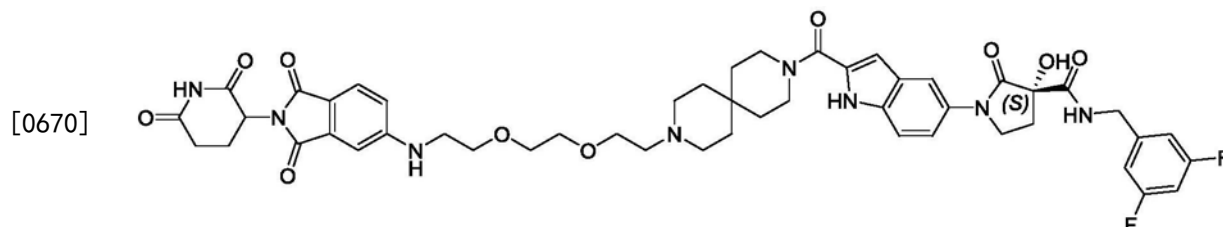
[0665] ¹H NMR:400MHz,DMSO-d₆;

[0666] δ11.61(s,1H),11.05(s,1H),8.69(t,J=6.4Hz,1H),8.24(s,1H),7.78(s,1H),7.56-7.54(m,2H),7.42(d,J=8.8Hz,1H),7.14(t,J=5.6Hz,1H),7.08-6.99(m,4H),6.89(d,J=8.6Hz,1H),6.78(s,1H),5.05-5.00(m,1H),4.44-4.39(m,1H),4.29-4.24(m,1H),3.90-3.87(m,2H),3.60-3.50(m,19H),3.37-3.24(m,2H),2.91-2.82(m,2H),2.63-2.54(m,6H),2.18-2.13(m,1H),1.99-1.97(m,1H)

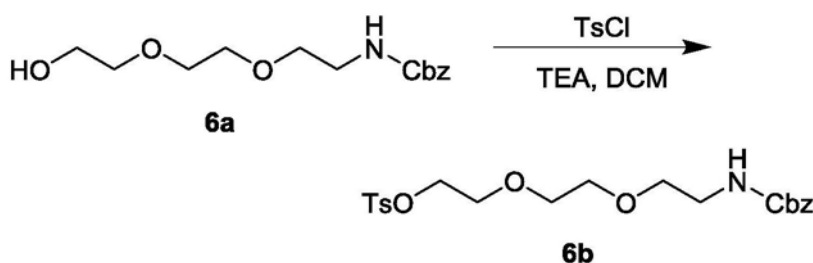
[0667] LCMS:RT=0.818分钟,m/z(M+1)=932.4;

[0668] HPLC:RT=1.487分钟。

[0669] (3S)-N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-[2-(9-{2-[2-(2-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-5-基]氨基}乙氧基)乙氧基]乙基}-3,9-二氮杂螺[5.5]十一烷-3-羰基)-1H-吲哚-5-基)-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-3-甲酰胺(“A49”)

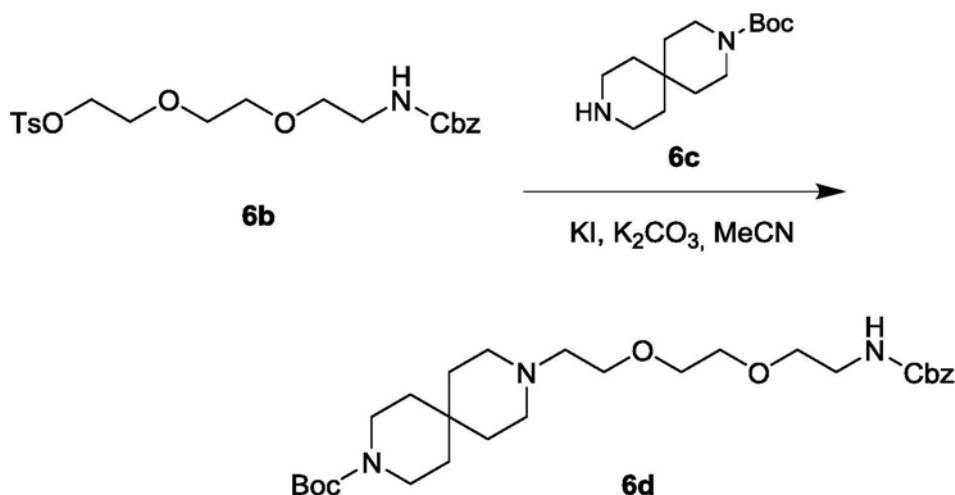


[0671] 制备化合物6b的通用方法



[0673] 在20℃下向化合物6a(1.00g,3.53mmol)和TEA(1g,9.88mmol,1.38mL)在DCM(20mL)中的溶液中添加4-甲基苯磺酰氯(1.01g,5.29mmol),将混合物在N₂下在40℃搅拌10小时。浓缩混合物。残余物通过柱色谱法(SiO₂,石油醚/乙酸乙酯=5/1至1/1),(石油醚/乙酸乙酯=1:1,R_f=0.5)纯化。获得为黄色油的化合物6b(1.40g,3.20mmol,91%收率),并且用下一步骤证实。

[0674] 制备胺4的通用方法



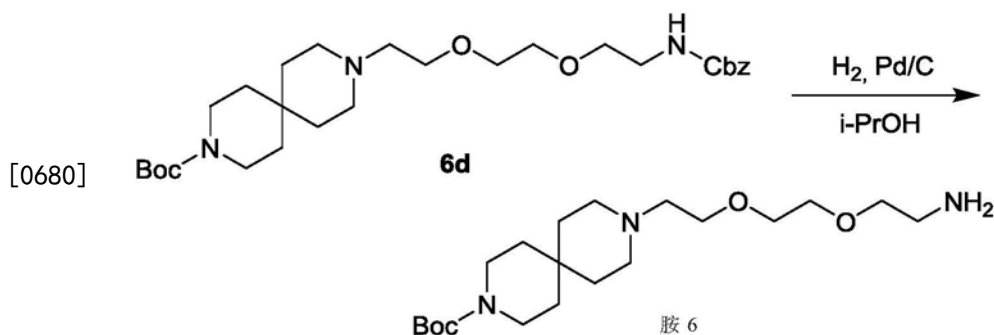
[0675]

[0676] 向化合物6b (800mg, 1.83mmol) 和化合物6c (500mg, 1.97mmol) 在MeCN (10mL) 中的溶液中添加KI (700mg, 4.22mmol) 和K₂CO₃ (800mg, 5.79mmol), 将混合物在N₂下在70℃下搅拌12小时。将混合物冷却至25℃, 然后倾入水 (50mL) 中, 用乙酸乙酯 (30mL × 2) 萃取, 将合并的有机相用盐水 (50mL × 3) 洗涤, 分离并用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。油状物通过反相色谱法 (CH₃CN:H₂O (含有0.1% NH₃·H₂O) = 0:1~45:1) 纯化, 将级分收集且减压浓缩得到无色油状物。获得为黄色油的化合物6d (500mg, 962μmol, 49%收率)。

[0677] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0678] δ 7.42-7.28 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 3.73-3.52 (m, 8H), 3.43-3.27 (m, 6H), 2.61 (t, J = 5.4Hz, 2H), 2.48 (s, 4H), 1.53 (t, J = 5.3Hz, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.39 (s, 4H)

[0679] 制备胺6的通用方法



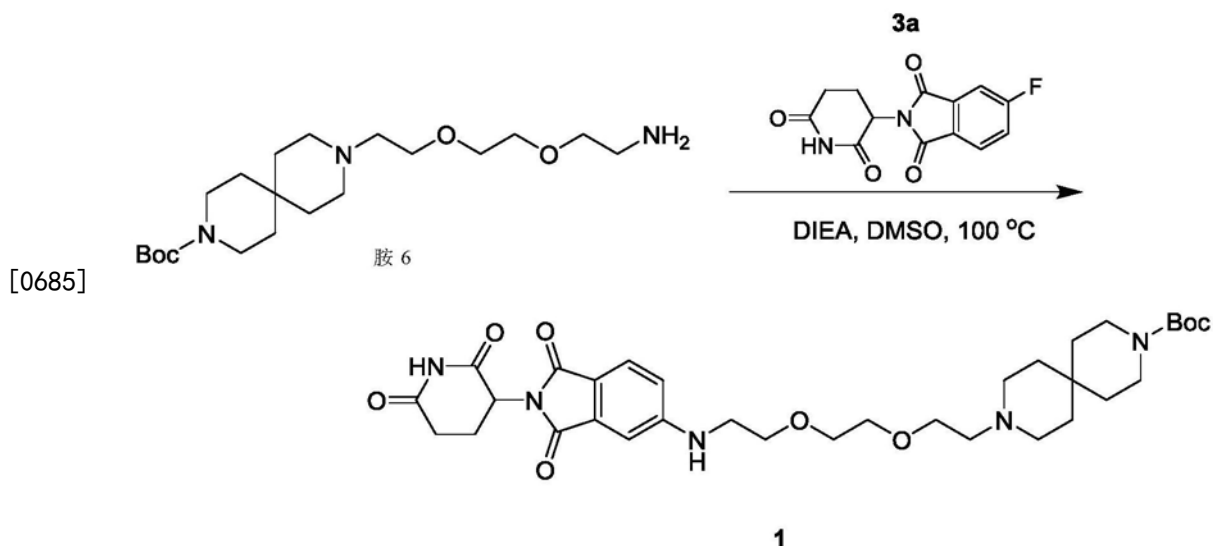
[0680]

[0681] 在N₂下向化合物6d (500mg, 962μmol) 在i-PrOH (20mL) 中的溶液中添加Pd/C (100mg, 10%纯度), 在真空下悬浮并用H₂吹扫三次, 然后将混合物在H₂ (15psi) 下在25℃下搅拌10小时。过滤混合物, 并且浓缩滤液。获得为黄色油的化合物胺6 (350mg, 908μmol, 94%收率) 并且用¹H-NMR证实。

[0682] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0683] δ 3.63-3.58 (m, 6H), 3.55-3.49 (m, 2H), 3.36-3.34 (m, 4H), 2.86 (t, J = 5.2Hz, 2H), 2.59 (t, J = 6.0Hz, 2H), 2.45 (s, 4H), 1.54-1.51 (m, 1H), 1.52 (t, J = 5.6Hz, 3H), 1.44 (s, 8H), 1.42-1.39 (m, 4H)

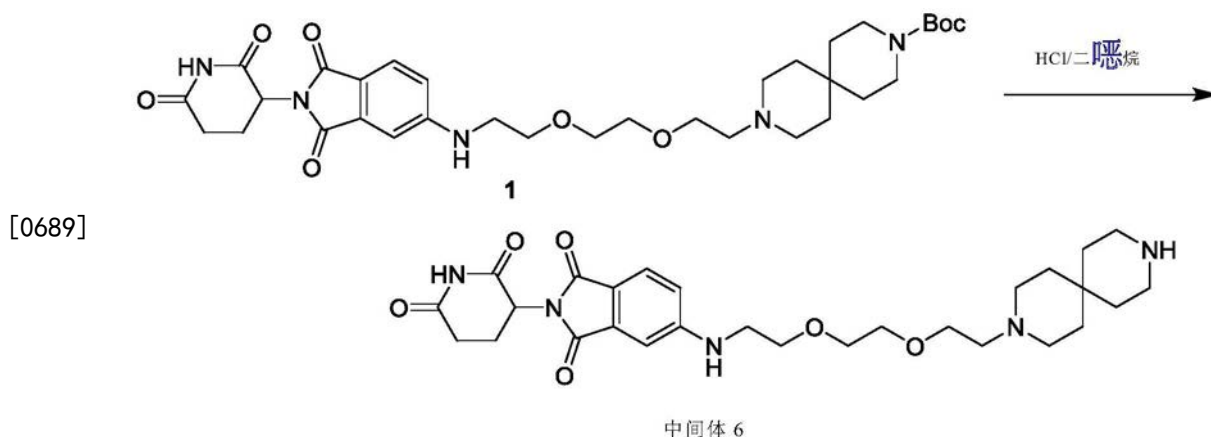
[0684] 制备化合物1的通用方法



[0686] 在100℃下向化合物3a (100mg, 362μmol) 和DIEA (374mg, 2.90mmol, 504μL) 在DMSO (1mL) 中的溶液中添加胺6 (250mg, 648μmol), 且将混合物在100℃下搅拌12小时。反应混合物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex luna C18 150*25mm*10um; 流动相: [水 (0.225% FA) - ACN]; B%: 15%~45%, 10分钟) 纯化。获得为黄色固体的化合物1 (90mg, 127μmol, 35% 收率, 91% 纯度)。

[0687] LCMS: RT=0.636分钟, m/z (M+1) = 642.2

[0688] 制备中间体6的通用方法



[0690] 在0℃下向化合物1 (80mg, 106μmol) 在二噁烷 (2mL) 中的溶液中添加HCl/二噁烷 (4M, 1.70mL), 且将混合物在20℃下搅拌1小时。浓缩反应混合物。获得为黄色固体的中间体6 (61mg, 粗产物, HCl), 并且用下一步骤证实。

[0691] 制备化合物“A49”的通用方法

O=C1C(=O)N(C1c2ccc3c(c2)C(=O)N3)C(=O)NCCCCCCCCCCCCCCCCCCCNC(=O)c4c[nH]c5ccc(cc45)N2C(=O)C[C@H](C2)C(=O)N[C@@H](C3=CC=C(C=C3)F)C(=O)O

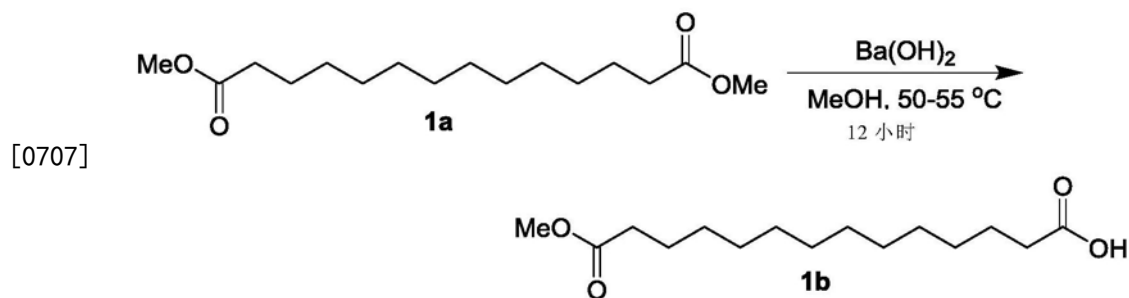
88

[0703] 方法2:

[0704] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟0%B→3.0分钟95%B→3.5分钟95%B→3.51分钟5%B→4.0分钟5%B,流速:0.8毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0705] 4.最大规模运行的实验:

[0706] 制备化合物1b的通用方法

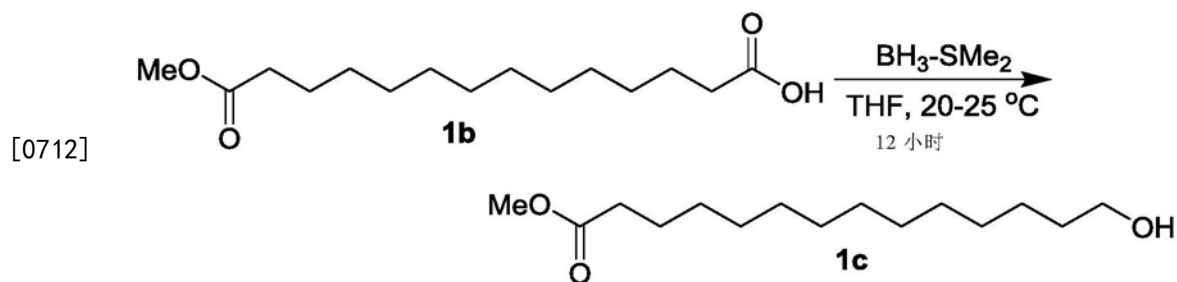


[0708] 在20~25℃下向化合物1a (3g, 10.5mmol) 在MeOH (100mL) 中的溶液中添加 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (1.08g, 6.28mmol), 添加后, 将混合物在50~55℃下搅拌12小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=5:1) 显示痕量的化合物1a ($R_f=0.60$) 没有完全消耗, 检测到新斑点 ($R_f=0.10$)。过滤反应溶液, 并且将滤饼用MeOH (20mL) 洗涤, 且在1N HCl (50mL) 中搅拌30分钟。然后将其过滤, 减压浓缩滤饼, 将其直接用于下一步骤。获得为白色固体的化合物1b (2.30g, 8.44mmol, 80.6% 收率), 其通过 ^1H NMR证实。

[0709] ^1H NMR: 400MHz, CDCl_3

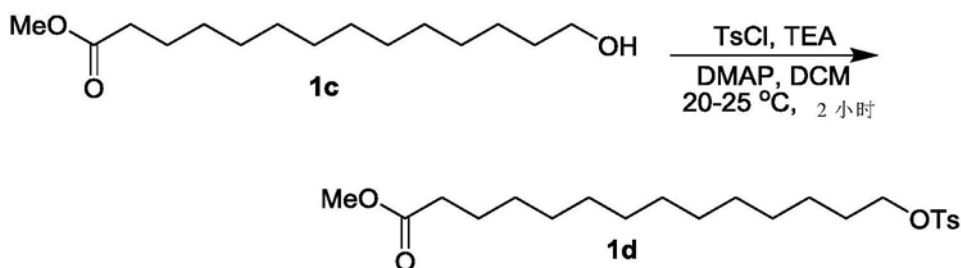
[0710] δ 3.69 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 3H), 2.25-2.54 (m, 5H), 1.29 (s, 19H)。

[0711] 制备化合物1c的通用方法



[0713] 在15~20℃下在 N_2 下向化合物1b (2.30g, 8.44mmol) 在THF (23mL) 中的溶液中添加 $\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ (10M, 1.01mL), 添加后, 将混合物在20~25℃下在 N_2 下搅拌12小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=5:1) 显示化合物1b ($R_f=0.10$) 消耗完, 检测到新斑点 ($R_f=0.20$)。将反应溶液倾入饱和 NH_4Cl (50mL) 中, 然后将其用乙酸乙酯 (50mL*5) 萃取, 并且用盐水 (30mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且减压浓缩, 提供为白色固体的化合物1c (1.60g, 粗产物), 将其直接用于下一步骤。

[0714] 制备化合物1d的通用方法



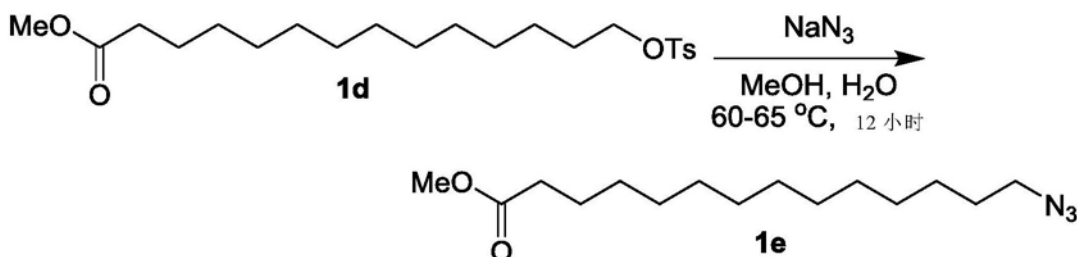
[0715]

[0716] 在20~25℃下向化合物1c (1.60g, 6.19mmol) 和TsCl (2.40g, 12.6mmol) 在DCM (50mL) 中的溶液中添加Et₃N (1.92g, 18.9mmol) 和DMAP (400mg, 3.27mmol), 添加后, 将混合物溶液在20~25℃下搅拌2小时。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=5:1) 显示化合物1c ($R_f=0.25$) 消耗完, 检测到新斑点 ($R_f=0.65$)。将反应溶液倾入水 (200mL) 中, 然后将其用乙酸乙酯 (50mL*2) 萃取, 且将有机层用1N HCl洗涤至pH=6~7, 并用盐水 (50mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩, 提供粗产物。其通过硅胶柱色谱法 (SiO₂, 石油醚: 乙酸乙酯=50:1~25:1~10:1) 纯化, 收集斑点 ($R_f=0.65$)。获得为白色固体的化合物1d (2g, 4.85mmol, 78.3% 收率), 其通过¹H NMR证实。

[0717] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0718] δ7.81 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.37 (d, J=8.0Hz, 2H), 4.04 (t, J=6.4Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.32 (t, J=7.6Hz, 2H), 1.61-1.73 (m, 4H), 1.17-1.41 (m, 18H)。

[0719] 制备化合物1e的通用方法



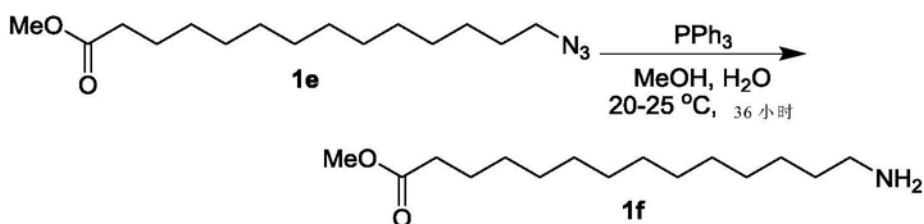
[0720]

[0721] 在20~25℃下向化合物1d (2g, 4.85mmol) 在MeOH (20mL) 和H₂O (2mL) 中的溶液中添加NaN₃ (470mg, 7.23mmol), 添加后, 将混合物在N₂下在60~65℃下搅拌12小时。粗¹H NMR (将0.5mL溶液倾入1mL水中, 然后用1mL乙酸乙酯萃取, 然后浓缩) 显示检测到化合物1e。将反应溶液直接用于下一步骤。

[0722] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0723] δ3.69 (s, 3H), 3.27 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.32 (t, J=7.6Hz, 2H), 1.55-1.72 (m, 4H), 1.19-1.44 (m, 18H)。

[0724] 制备化合物1f的通用方法



[0725]

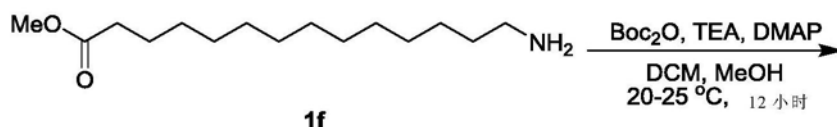
[0726] 在20~25℃下向最后步骤的溶液中添加PPh₃ (2.41g, 9.17mmol), 添加后, 将混合物溶液在20~25℃下搅拌36小时。粗¹H NMR (将0.5mL反应溶液倾入1mL水中, 然后用1mL乙

酸乙酯萃取,然后浓缩)显示检测到化合物1f。将反应溶液倾入水(20mL)中,且用1N HCl调节至pH=2,然后将其用乙酸乙酯(20mL*2)萃取,将水相用NaHCO₃溶液调节至pH=7,且用乙酸乙酯(20mL*2)萃取,然后减压浓缩,提供粗产物。获得为白色固体的化合物1f(1g, 3.88mmol, 84.7%收率)。

[0727] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0728] δ3.57 (s, 3H), 2.16-2.29 (m, 4H), 1.44-1.61 (m, 4H), 1.01-1.32 (m, 18H)。

[0729] 制备化合物1g的通用方法



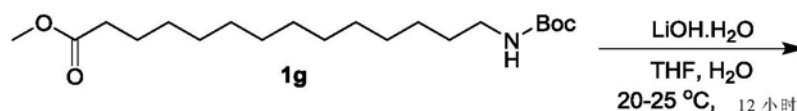
[0730]

[0731] 向化合物1f(1g, 3.40mmol)在DCM(10mL)和MeOH(1mL)中的溶液中添加Boc₂O(1.11g, 5.10mmol)、DMAP(84mg, 687μmol)和Et₃N(1.03g, 10.2mmol),然后将其在20~25℃下搅拌12小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=20:1)显示检测到新斑点(R_f=0.60),化合物1f消耗完(R_f=0.10)。将反应溶液倾入水(20mL)中,且用乙酸乙酯(20mL*2)萃取,然后将有机层用1N HCl洗涤至pH=7,且用盐水(20mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤且减压浓缩,提供为白色固体的化合物1g(900mg, 粗产物),其通过¹H NMR证实。

[0732] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0733] δ4.41 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.03 (q, J=7.2Hz, 2H), 2.23 (t, J=7.6Hz, 2H), 1.50-1.63 (m, 2H), 1.34-1.44 (m, 11H), 1.13-1.29 (m, 18H)。

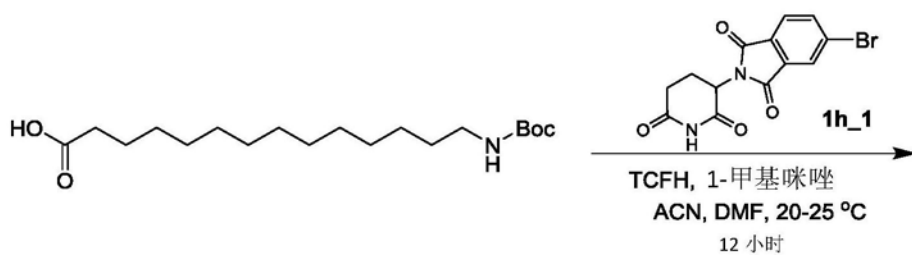
[0734] 制备化合物1h的通用方法



[0735]

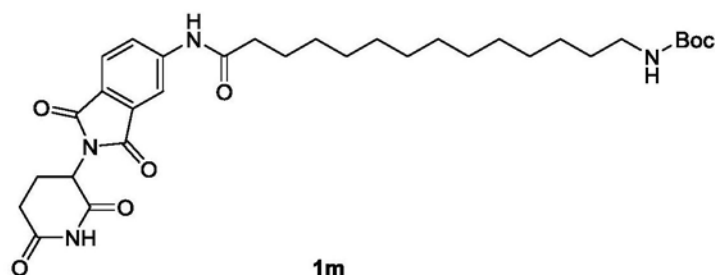
[0736] 在20~25℃下向化合物1g(900mg, 2.52mmol)在THF(10mL)和H₂O(2mL)中的溶液中添加LiOH·H₂O(126mg, 3mmol),添加后,将混合物在20~25℃下搅拌12小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=2:1)显示化合物1g消耗完(R_f=0.90),检测到新斑点(R_f=0.30)。将反应溶液倾入水(20mL)中,且用1N HCl调节至pH=2,然后将其用乙酸乙酯(10mL*2)萃取,将有机层用盐水(10mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤且减压浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱法(SiO₂, 石油醚:乙酸乙酯=10:1~5:1~2:1)纯化,收集斑点(R_f=0.30),提供为白色固体的化合物1h(600mg, 1.75mmol, 69.4%收率)。

[0737] 制备化合物1m的通用方法



[0738]

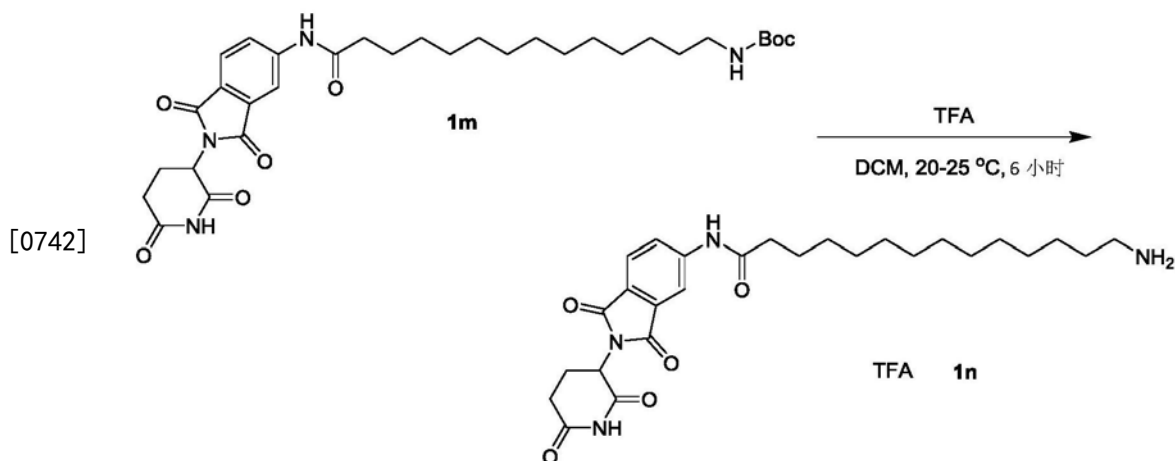
1h



[0739] 在N₂下在20~25℃下向化合物1h (80mg, 232μmol) 和化合物1h₁ (60mg, 219μmol) 在ACN (4mL) 和DMF (2mL) 中的溶液中添加TCFH (151mg, 538μmol) 和NMI (125mg, 1.52mmol), 添加后, 将混合物在20~25℃下搅拌12小时。将反应溶液用AcOH (2mL) 猝灭, 然后将其倾入水 (10mL) 中并且用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 将有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩。粗产物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex luna C18 150*25mm*10μm; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 59%~89%, 10分钟) 纯化, 然后将其减压浓缩, 提供为无色油的化合物1m (40mg)。

[0740] LCMS: (方法1), RT=1.125分钟, m/z=543

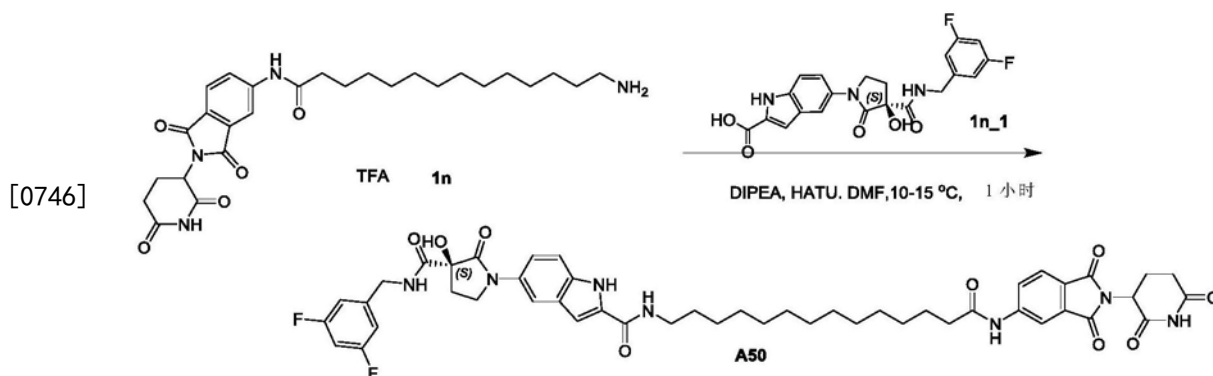
[0741] 制备化合物1n的通用方法



[0743] 在20~25℃下向化合物1m (40mg, 66.8μmol) 在DCM (5mL) 中的溶液中添加TFA (76mg, 666μmol, 10.0当量), 添加后, 将混合物在20~25℃下搅拌6小时。LCMS显示检测到化合物1n (RT=0.853分钟, m/z=499)。减压浓缩反应溶液, 提供为棕色油的化合物1n (40.0mg, TFA)。

[0744] LCMS: (方法1), RT=0.853分钟, m/z=499

[0745] 制备“A50”的通用方法



[0747] 在10~15℃下向化合物1n-1 (25mg, 58.2 μ mol) 在DMF (3mL) 中的溶液中添加DIPEA (40mg, 309 μ mol) 和HATU (35mg, 92.1 μ mol), 添加后, 在10~15℃下将溶解在DMF (1mL) 中的化合物1n (40mg, 65.3 μ mol, TFA) 添加到溶液中, 然后将其在10~15℃下搅拌1小时。将反应溶液用AcOH猝灭至pH=3, 然后将其倾入水 (10mL) 中并且用乙酸乙酯 (10mL*3) 萃取, 将有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩。粗产物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3 μ m; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 58%~68%, 7分钟) 纯化, 然后减压浓缩, 提供为白色固体的“A50” (27.86mg, 29.6 μ mol, 50.9%收率, 96.8%纯度), 其通过¹H NMR、LCMS RT=1.045min, m/z+1=910)、HPLC (RT=2.455分钟) 证实

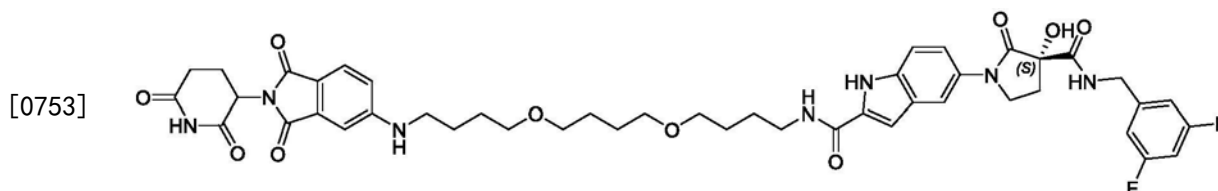
[0748] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆

[0749] δ 11.59 (s, 1H), 11.11 (s, 1H), 10.53 (s, 1H), 8.70 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.46 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.82-7.99 (m, 2H), 7.78 (d, J=1.6Hz, 1H), 7.52-7.57 (m, 1H), 7.43 (d, J=8.8Hz, 1H), 6.96-7.15 (m, 4H), 6.71 (s, 1H), 5.05-5.14 (m, 1H), 4.39-4.45 (m, 1H), 4.22-4.32 (m, 1H), 3.90 (t, J=6.8Hz, 2H), 3.22-3.28 (m, 2H), 2.77-2.99 (m, 1H), 2.59-2.70 (m, 2H), 2.38 (t, J=7.6Hz, 2H), 2.02-2.21 (m, 2H), 1.89-1.93 (m, 1H), 1.49-1.74 (m, 4H), 1.22-1.44 (m, 18H)。

[0750] LCMS: (方法1), RT=1.045分钟, m/z=910

[0751] HPLC: (方法2), RT=2.455分钟

[0752] 5-[(3S)-3-{[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-{4-[4-(4-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-5-基]氨基}丁氧基)丁氧基]丁基}-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A51”)



[0754] LC-MS或HPLC方法:

[0755] 方法1:

[0756] MS仪器类型: SHIMADZU LCMS-2020, 管柱: Kinetex EVO C18 30*2.1mm, 5 μ m, 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v), 梯度: 0.0分钟0%B→0.8分钟95%B→1.2分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B, 流速: 1.5毫升/分钟, 烘箱

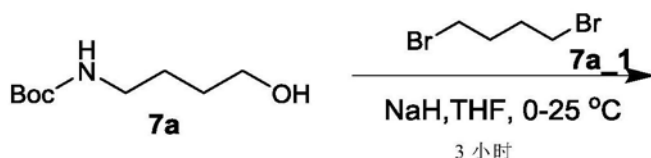
温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0757] 方法2:

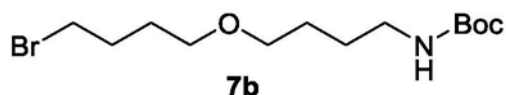
[0758] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟0%B→3.0分钟95%B→3.5分钟95%B→3.51分钟5%B→4.0分钟5%B,流速:0.8毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0759] 4.最大规模运行的实验:

[0760] 制备化合物7b的通用方法



[0761]

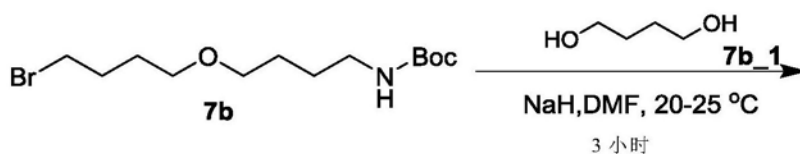


[0762] 在0~5℃下在N₂下向化合物7a(1g,5.28mmol)和化合物7a_1(3.42g,15.8mmol)在THF(10mL)中的溶液中添加NaH(634mg,15.8mmol,60%纯度),然后将其在20~25℃下在N₂下搅拌3小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=5:1)显示化合物7a消耗完(R_f=0.05),检测到新斑点(R_f=0.40)。将反应溶液倾入水(10mL)中,然后将其用乙酸乙酯(10mL*2)萃取,将合并的有机层用盐水(10mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤且减压浓缩,提供为无色油的化合物7b(460mg,1.42mmol,26.8%收率),其通过¹H NMR证实。

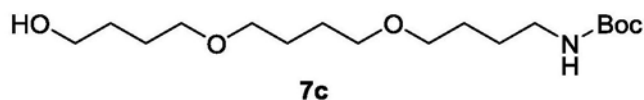
[0763] ¹H NMR:400MHz,CDC1₃

[0764] δ4.58(s,1H),3.29-3.53(m,6H),3.07(d,J=6.0Hz,2H),1.81-1.95(m,2H),1.61-1.75(m,2H),1.45-1.58(m,4H),1.37(s,9H)。

[0765] 制备化合物7c的通用方法



[0766]

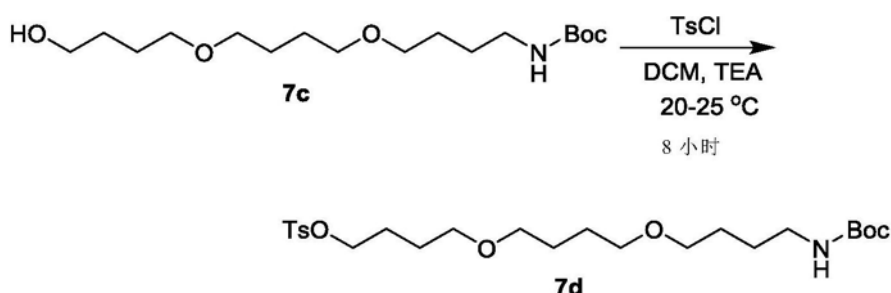


[0767] 在20~25℃下在N₂下向化合物7b(350mg,1.08mmol)和化合物7b_1(486mg,5.39mmol,476μL)在DMF(10mL)中的溶液中添加NaH(560mg,14.0mmol,60%纯度),添加后,将混合物在20~25℃下搅拌1小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=5:1)显示检测到一些新斑点(R_f=0.45,0.10),化合物7b(R_f=0.70)消耗完。将反应溶液倾入水(100mL)中,然后将其用乙酸乙酯(30mL*3)萃取,将有机层用盐水(30mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤且减压浓缩。然后其通过硅胶柱色谱法(SiO₂,石油醚:乙酸乙酯=20:1~10:1~3:1)纯化,收集斑点(R_f=0.10)。获得为无色油的化合物7c(230mg,689μmol,63.9%收率),其通过¹H NMR证实。

[0768] ^1H NMR: 400MHz, CDCl_3

[0769] δ 4.65 (s, 1H), 3.54-3.64 (m, 2H), 3.29-3.46 (m, 8H), 3.06 (d, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 1.47-1.73 (m, 12H), 1.37 (s, 9H)。

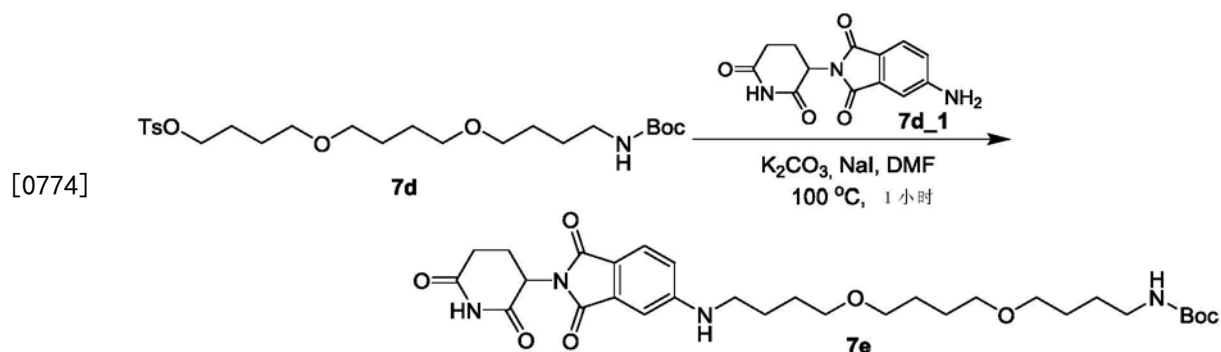
[0770] 制备化合物7d的通用方法



[0771]

[0772] 在20~25℃下向化合物7c (230mg, 689 μmol) 和TsCl (200mg, 1.05mmol) 在DCM (5mL) 中的溶液中添加 Et_3N (210mg, 2.08mmol), 添加后, 将混合物溶液在20~25℃下搅拌8小时。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=1:1) 显示化合物7c ($R_f=0.10$) 消耗完, 检测到新斑点 ($R_f=0.70$)。将反应溶液倾入水 (10mL) 中, 然后将其用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 将合并的有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且减压浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱法 (SiO_2 , 石油醚: 乙酸乙酯=20:1~10:1~5:1) 纯化, 收集斑点 ($R_f=0.70$)。获得为无色油的化合物7d (120mg, 246 μmol , 35.6%收率), 其通过下一步骤证实。

[0773] 制备化合物7e的通用方法

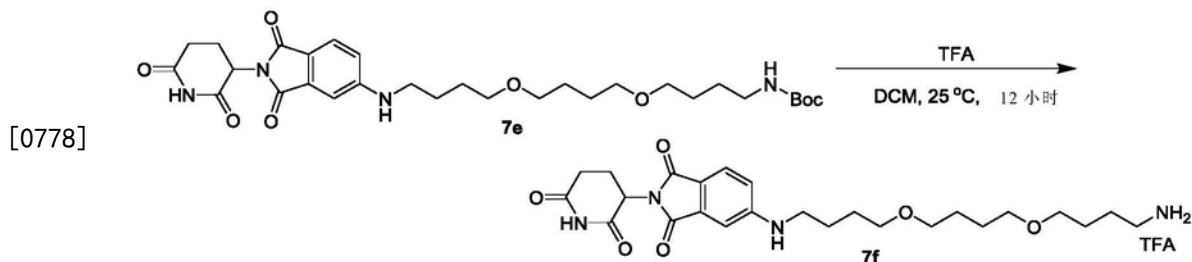


[0774]

[0775] 在20~25℃下向化合物7d (90mg, 184 μmol) 和化合物7d_1 (56mg, 204 μmol) 在DMF (5mL) 中的溶液中添加NaI (14mg, 93.4 μmol) 和 K_2CO_3 (51mg, 369 μmol , 2.00当量), 添加后, 将混合物溶液在100℃下搅拌1小时。将反应溶液冷却至15~20℃, 然后将其倾入水 (20mL) 中且用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 将合并的有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且减压浓缩, 提供粗产物, 粗产物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3 μm ; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 52%~62%, 7分钟) 纯化, 然后将其减压浓缩, 提供为淡绿色油的化合物7e (40mg, 80.2 μmol , 43.4%收率), 其通过LCMS $\text{RT}=0.967$ 分钟, $m/z+1=489$ 证实,

[0776] LCMS: (方法1), $\text{RT}=0.967$ 分钟, $m/z=489$

[0777] 制备化合物7f的通用方法



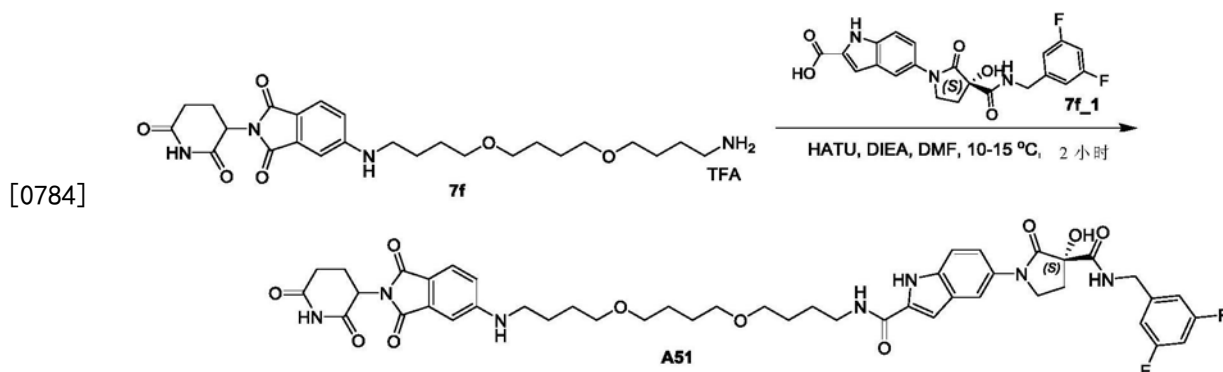
[0779] 在25℃下向化合物7e (40mg, 69.6 μ mol) 在DCM (5mL) 中的溶液中添加TFA (154mg, 1.35mmol), 然后将其在25℃下搅拌12小时。LCMS显示检测到化合物7f的MS (RT=0.795分钟, m/z =489)。减压浓缩反应溶液, 提供为黄色油的化合物7f (40mg, 66.3 μ mol, 95.3%收率, TFA), 其通过 ^1H NMR证实

[0780] ^1H NMR: 400MHz, DMSO- d_6

[0781] δ 7.55 (s, 3H), 7.43 (d, J =8.4Hz, 1H), 6.86 (d, J =2.0Hz, 1H), 6.75 (dd, J =8.4, 2.0Hz, 1H), 5.02 (dd, J =13.2, 5.4Hz, 1H), 4.31 (t, J =6.4Hz, 1H), 3.17-3.34 (m, 10H), 2.81-2.95 (m, 1H), 2.64-2.76 (m, 3H), 1.88-2.01 (m, 1H) 1.30-1.59 (m, 14H)。

[0782] LCMS: (方法1), RT=0.795分钟, $m/z+1$ =489

[0783] 制备“A51”的通用方法



[0785] 在10~15℃下向化合物7f_1 (30mg, 69.8 μ mol) 在DMF (3mL) 中的溶液中添加HATU (85mg, 105 μ mol, 1.51当量) 和DIEA (45mg, 348 μ mol), 添加后, 将混合物在10~15℃下搅拌30分钟, 然后将在DMF (2mL) 中的化合物7f (40mg, 66.3 μ mol, TFA) 添加到溶液中, 然后将其在10~15℃搅拌1小时。LCMS显示检测到化合物7的MS (RT=0.949分钟, m/z =900)。将反应溶液用AcOH (0.5mL) 猝灭, 然后将其倾入水 (20mL) 中并且用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 将合并的有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且减压浓缩。粗产物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3 μ m; 流动相: [水 (0.1% TFA) -ACN]; B%: 48%~58%, 7分钟) 纯化, 然后减压浓缩, 提供产物。获得为黄色胶的“A51” (44.3mg, 47.7 μ mol, 68.3%收率), 其通过 ^1H NMR, LCMS RT=0.945分钟, m/z =900), HPLC RT=2.292分钟) 证实。

[0786] ^1H NMR: 400MHz, DMSO- d_6

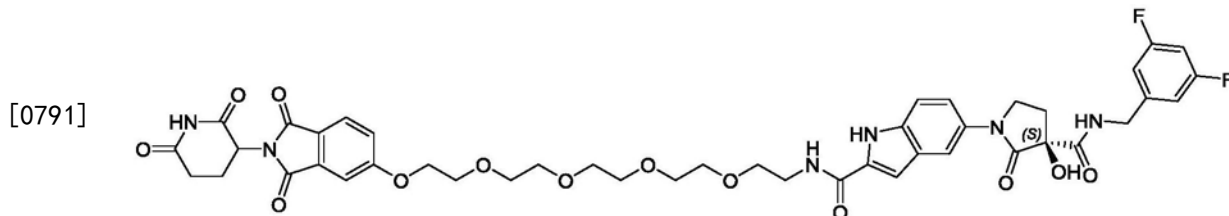
[0787] δ 11.59 (s, 1H), 8.70 (t, J =6.4Hz, 1H), 8.70 (t, J =6.4Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.48-7.64, (m, 2H), 7.43 (d, J =8.8Hz, 1H), 6.92-7.17 (m, 5H), 6.84 (dd, J =8.4, 2.0Hz, 1H), 5.11 (dd, J =12.8, 5.2Hz, 2H), 4.25-4.45 (m, 2H), 3.90 (t, J =6.4Hz, 1H) (重叠 H_2O 信号), 3.64 (s, 1H), 3.18-3.48 (m, 10H), 2.86-3.07 (m, 1H), 2.56-2.81 (m, 4H) (重叠DMSO信号), 1.92-

2.24 (m, 3H), 1.35-1.70 (m, 14H)。

[0788] LCMS: (方法1), RT=0.945分钟, m/z =900

[0789] HPLC: (方法2), RT=2.292分钟

[0790] 5-[(3S)-3-{[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-(14-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-5-基]氧基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A52”)



[0792] LC-MS或HPLC方法:

[0793] 方法1:

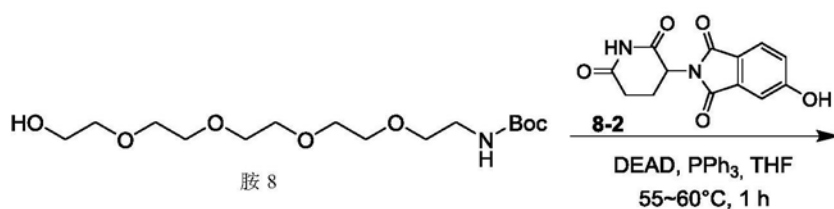
[0794] MS仪器类型: SHIMADZU LCMS-2020, 管柱: Kinetex EVO C1830*2.1mm, 5 μ m, 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v), 梯度: 0.0分钟0%B→0.8分钟95%B→1.2分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B, 流速: 1.5毫升/分钟, 烘箱温度: 50℃; UV检测: 220nm和254nm。

[0795] 方法2:

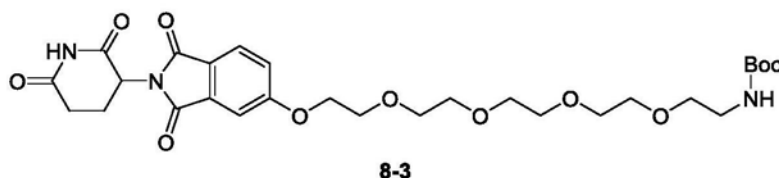
[0796] MS仪器类型: SHIMADZU LCMS-2020, 管柱: Kinetex EVO C1830*2.1mm, 5 μ m, 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v), 梯度: 0.0分钟0%B→3.0分钟95%B→3.5分钟95%B→3.51分钟5%B→4.0分钟5%B, 流速: 0.8毫升/分钟, 烘箱温度: 50℃; UV检测: 220nm和254nm。

[0797] 4.最大规模运行的实验:

[0798] 制备化合物8-3的通用方法



[0799]



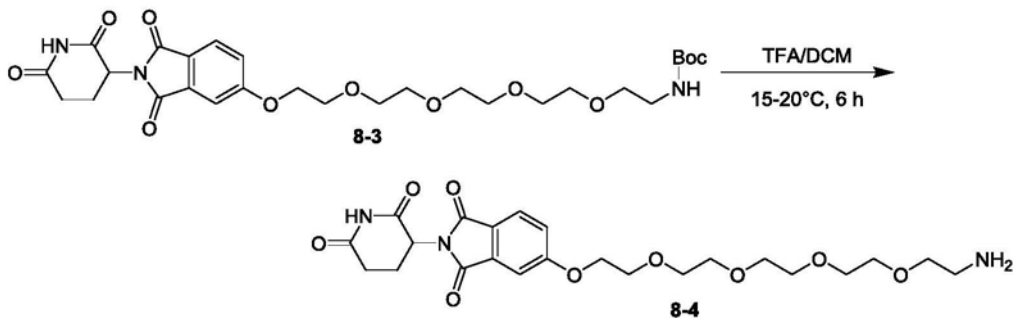
[0800] 在0~5℃下向化合物8-2 (90mg, 328 μ mol)、胺8 (100mg, 296 μ mol) 和DEAD (70mg, 402 μ mol) 在THF (3.00mL) 中的溶液中添加PPh₃ (130mg, 495 μ mol)。将混合物在10~20℃下搅拌1小时。然后将混合物在55~60℃下搅拌12小时。LCMS显示化合物8-2的MS被保留 (RT=0.652分钟, m/z (M+1)=275) 并且未发现化合物8-3的MS。在55~60℃下向混合物中添加PPh₃ (172mg, 656 μ mol) 和DEAD (114mg, 655 μ mol), 并保持搅拌1小时。LCMS显示化合物8-2的MS被保留 (RT=0.643分钟, m/z (M+1)=275) 并且发现化合物8-3的MS (RT=0.881分钟, m/z

(M+23) = 616)。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示化合物8-2被保留 ($R_f=0.68$) 并且发现主要的新斑点 ($R_f=0.25$)。将反应混合物用AcOH调节pH=6~7且减压浓缩。残余物通过快速硅胶色谱法 (硅胶快速柱, 洗脱剂为0~100%乙酸乙酯/石油醚梯度) 纯化。收集 $R_f=0.25$ 的斑点。获得为黄色胶的化合物8-3 (110mg, 182 μ mol, 55.4%收率, 98.2%纯度)。

[0801] LCMS: (方法1), RT=0.881分钟, m/z (M+23) = 616

[0802] LCMS: (方法1), RT=0.877分钟, m/z (M+1-100) = 494

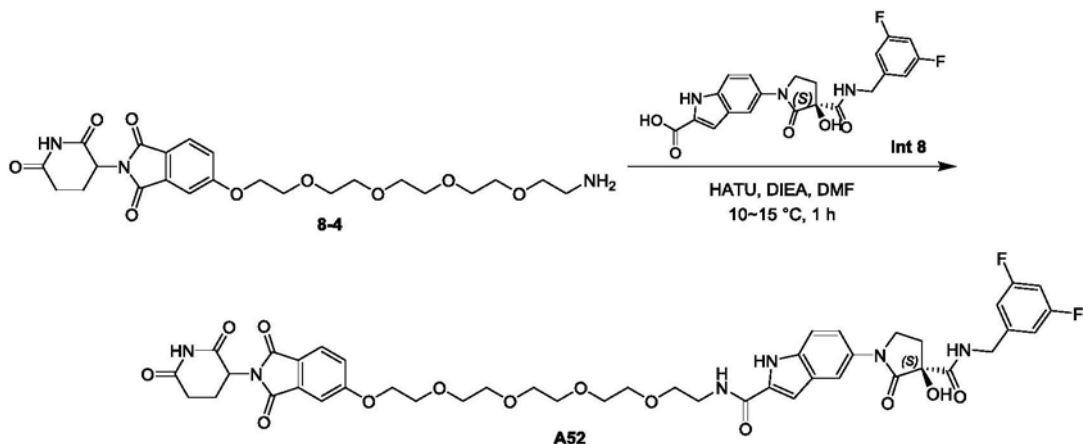
[0803] 制备化合物8-4的通用方法



[0805] 向化合物8-3 (110mg, 185 μ mol) 在DCM (5.00mL) 中的溶液中添加TFA (211mg, 1.85mmol)。将混合物在15~20°C下搅拌6小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示化合物8-3 ($R_f=0.25$) 被消耗并且发现主要的新斑点 ($R_f=0.00$)。减压浓缩反应混合物。获得为黄色胶的化合物8-4 (98mg, 155 μ mol, 83.8%收率, 96.3%纯度, TFA盐)。

[0806] LCMS: (方法1), RT=0.752分钟, m/z (M+1) = 494

[0807] 制备“A52”的通用方法



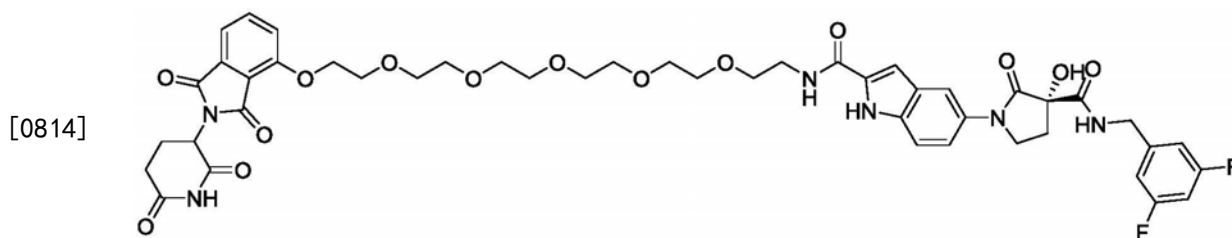
[0809] 在10~15°C下向Int 8 (30mg, 69.8 μ mol) 在DMF (3mL) 中的溶液中添加HATU (40mg, 105 μ mol) 和DIEA (45mg, 348 μ mol), 添加后, 将在DMF (1mL) 中的化合物8-4 (51mg, 84.0 μ mol TFA盐) 添加到溶液中, 然后将其在10~15°C下搅拌1小时。LCMS显示Int 8被消耗并且发现具有所需MS的主要新峰 (RT=0.871分钟, m/z (M+1) = 905)。将反应溶液倾入水 (5mL) 中, 然后将其用AcOH (1.00mL) 猝灭且用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 将有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩。残余物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Luna C18150*25mm*10 μ m; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 25%~55%, 10分钟) 纯化, 然后将其减压浓缩, 提供为淡黄色胶的“A52” (51.4mg, 56.8 μ mol, 81.3%收率, 100%纯度), 其通过¹H-NMR和LCMS证实。

[0810] ^1H NMR: 400MHz, DMSO- d_6

[0811] δ 11.62 (s, 1H), 11.11 (s, 1H), 8.70 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 8.56 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 7.83 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.78 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 7.54 (dd, $J=8.8, 2.0\text{Hz}$, 1H), 7.41-7.47 (m, 2H), 7.36 (dd, $J=8.4, 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.11-7.16 (m, 1H), 6.97-7.10 (m, 3H), 5.12 (dd, $J=12.8, 5.6\text{Hz}$, 1H), 4.42 (dd, $J=16.0, 6.8\text{Hz}$, 1H), 4.22-4.34 (m, 3H), 3.90 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 3.73-3.78 (m, 2H), 2.83-2.96 (m, 1H), 2.54-2.66 (m, 3H), 2.09-2.19 (m, 1H), 1.99-2.09 (m, 1H)。

[0812] LCMS: (方法2), RT=2.144分钟, m/z (M+1) = 905

[0813] 5-[(3S)-3-{[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-(14-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吡啶-4-基]氧基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)-1H-吡啶-2-甲酰胺 (“A53”)



[0815] LC-MS或HPLC方法:

[0816] 方法1:

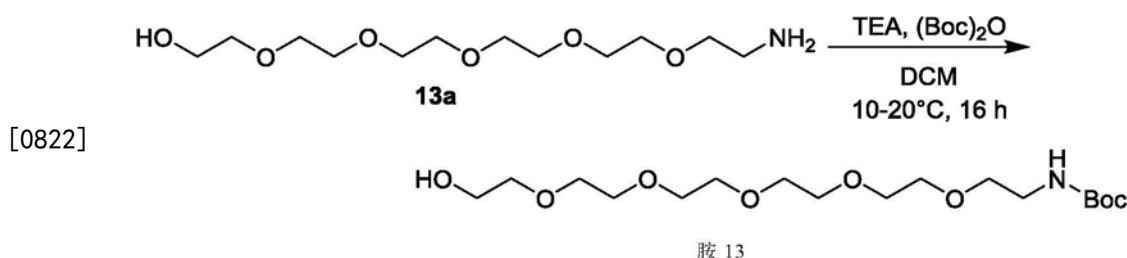
[0817] MS仪器类型: SHIMADZU LCMS-2020, 管柱: Kinetex EVO C1830*2.1mm, 5 μm , 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v), 梯度: 0.0分钟0%B→0.8分钟95%B→1.2分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B, 流速: 1.5毫升/分钟, 烘箱温度: 50℃; UV检测: 220nm和254nm。

[0818] 方法2:

[0819] MS仪器类型: SHIMADZU LCMS-2020, 管柱: Kinetex EVO C1830*2.1mm, 5 μm , 流动相 A: 在水中的0.0375% TFA (v/v), B: 在乙腈中的0.01875% TFA (v/v), 梯度: 0.0分钟0%B→3.0分钟95%B→3.5分钟95%B→3.51分钟5%B→4.0分钟5%B, 流速: 0.8毫升/分钟, 烘箱温度: 50℃; UV检测: 220nm和254nm。

[0820] 4. 最大规模运行的实验:

[0821] 制备胺13的通用方法-



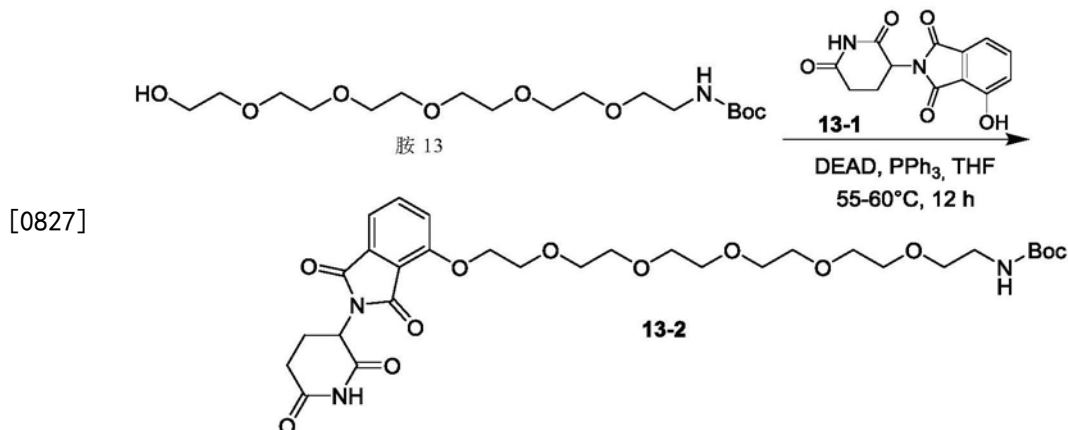
[0823] 在10~20℃下在 N_2 气氛下向化合物13a (650mg, 2.31mmol) 和TEA (468mg, 4.63mmol) 在DCM (6.50mL) 中的溶液中滴加 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (706mg, 3.23mmol), 并在10~20℃下在 N_2 气氛下保持搅拌16小时。TLC (DCM/甲醇=10/1) 显示化合物13a ($R_f=0.00$) 消失, 并且发现新斑点 ($R_f=0.52$)。减压浓缩反应混合物。残余物通过快速硅胶色谱法 (ISCO®; X g SepaFlash® 二氧化硅快速柱, 洗脱剂: 0~2% 甲醇/DCM) 纯化。获得为无色油的胺13

(610mg, 1.60mmol, 69.2% 收率), 其通过¹H NMR证实。

[0824] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0825] δ 5.22 (s, 1H), 3.59-3.77 (m, 20H), 3.55 (t, J=5.2Hz, 2H), 3.32 (d, J=5.2Hz, 2H), 2.87-3.07 (m, 1H), 1.45 (s, 9H)

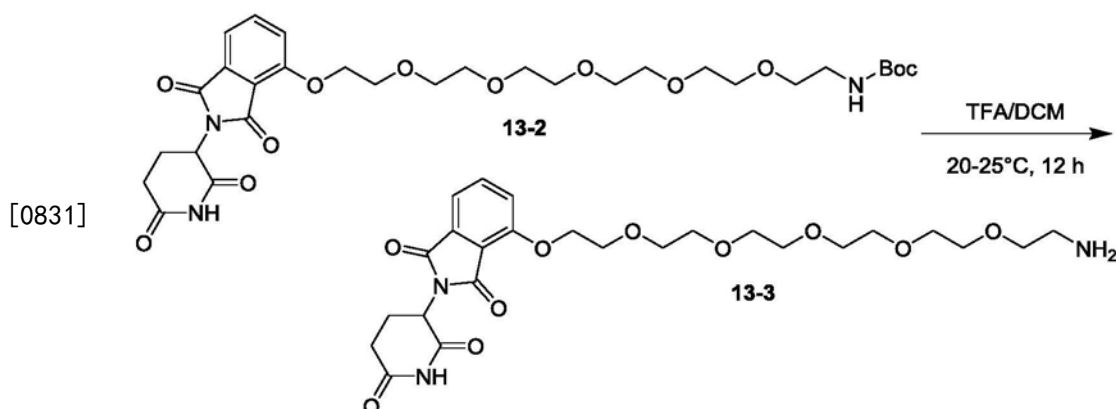
[0826] 制备化合物13-2的通用方法



[0828] 在20~25℃下在N₂气氛下向胺13 (265mg, 694μmol) 和化合物13-1 (200mg, 729μmol) 在THF (10.0mL) 中的溶液中添加PPh₃ (600mg, 2.29mmol)。然后在55~60℃下在N₂气氛下向混合物中滴加DEAD (320mg, 1.84mmol), 并在55~60℃下在N₂气氛下保持搅拌12小时。LC-MS (EW18817-71-P1A1) 显示检测到化合物13-2的MS (RT=0.867分钟, m/z (M-100+1) = 538)。将混合物减压浓缩。残余物通过快速硅胶色谱法 (SepaFlash® 硅胶快速柱, 洗脱剂为0~100% 乙酸乙酯/石油醚梯度) 纯化。残余物通过制备型HPLC (TFA条件, 管柱: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3μm; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 35%~45%, 7分钟) 纯化。获得为黄色胶的化合物13-2 (190mg, 294μmol, 40.4% 收率, 99% 纯度), 其通过LCMS证实 (BOC裂解的MS: RT=0.711分钟)。

[0829] LCMS: (方法1), RT=0.877分钟, m/z (M-56+1) = 538 (RT=0.711分钟, m/z (M-100+1) = 494)

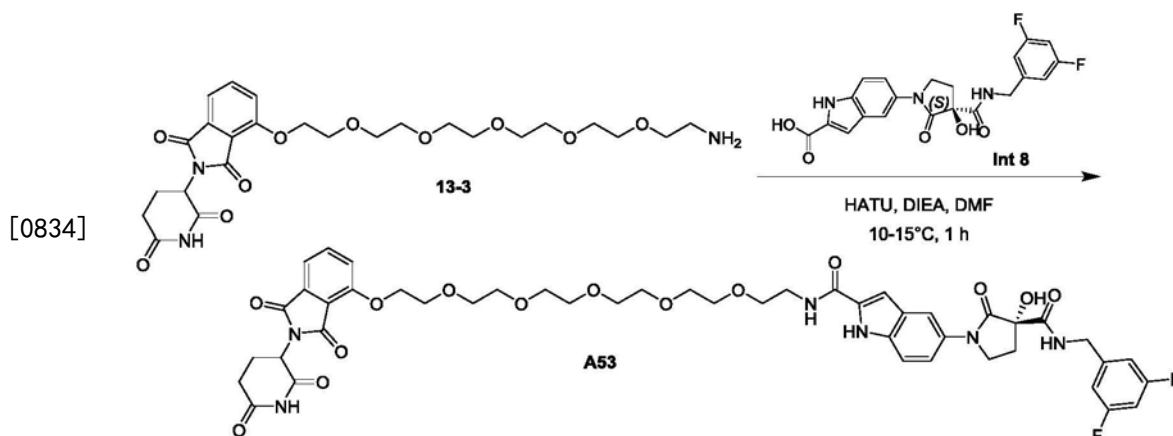
[0830] 制备化合物13-3的通用方法



[0832] 在20~25℃下向化合物13-2 (190mg, 298μmol) 在DCM (5mL) 中的溶液中添加TFA (340mg, 2.98mmol), 并保持搅拌12小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示化合物13-2 (R_f=0.28) 被消耗并且形成主要的新斑点 (R_f=0.00)。减压浓缩混合物。获得为黄色胶的化合

物13-3 (151mg, 230 μ mol, 77.5%收率, 99.6%纯度, TFA盐)。

[0833] 制备化合物“A53”的通用方法



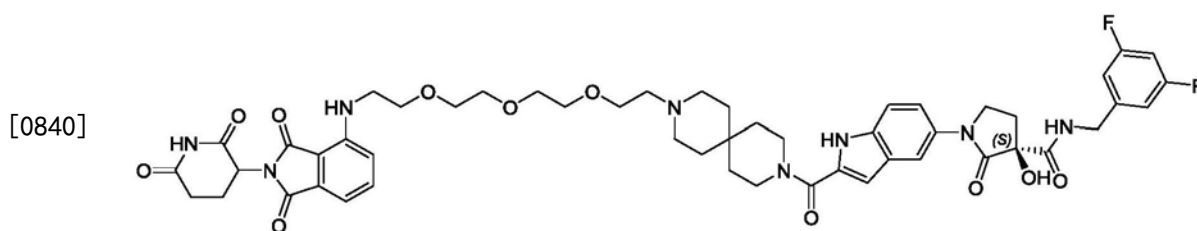
[0835] 在10~15℃下向Int 8 (30mg, 69.8 μ mol) 在DMF (3.00mL) 中的溶液中添加HATU (40mg, 105 μ mol) 和DIEA (45mg, 348 μ mol), 添加后, 将在DMF (1.00mL) 中的化合物13-3 (55mg, 84.4 μ mol, TFA盐) 添加到溶液中, 然后将其在10~15℃下搅拌1小时。LCMS显示Int 8被保留 (RT=0.750分钟, M+1=538) 并且发现化合物13的MS的新主峰 (RT=0.904分钟, M+1=949)。将反应溶液倾入水 (5.00mL) 中, 然后将其用AcOH (1.00mL) 猝灭并且用乙酸乙酯 (10.0mL*2) 萃取, 将有机层用盐水 (10.0mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩。粗产物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3 μ m; 流动相: [水 (0.1% TFA) -ACN]; B%: 38%~48%, 7分钟) 纯化, 然后将其冷冻干燥以提供为黄色胶的“A53” (28.32mg, 29.8 μ mol, 42.7%收率, 100%纯度), 其通过¹H NMR和LCMS证实。

[0836] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆

[0837] δ 11.62 (s, 1H), 11.10 (s, 1H), 8.70 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.56 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.75-7.85 (m, 2H), 7.50-7.58 (m, 2H), 7.41-7.49 (m, 2H), 7.13 (d, J=1.2Hz, 1H), 7.03-7.11 (m, 1H), 6.97-7.03 (m, 2H), 6.72 (s, 1H), 5.09 (dd, J=12.8, 5.4Hz, 1H), 4.37-4.48 (m, 1H), 4.31-4.36 (m, 2H), 4.21-4.31 (m, 1H), 3.90 (t, J=6.8Hz, 2H), 3.75-3.84 (m, 2H), 3.62 (dd, J=5.6, 3.6Hz, 2H), 3.41-3.58 (m, 20H), 2.82-2.96 (m, 1H), 2.54-2.66 (m, 3H), 2.15 (dt, J=13.2, 7.6Hz, 1H), 1.97-2.07 (m, 1H) (~20H重叠H₂O信号, ~3H重叠DMSO信号)。

[0838] LCMS: (方法2), RT=2.101分钟, m/z (M+1) = 949

[0839] 5-[(3S)-3-{[(3,5-二氟苯基)甲基]氨基甲酰基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-1-基]-N-(14-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基]氧基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)-1H-吲哚-2-甲酰胺 (“A54”)



[0841] LC-MS或HPLC方法:

[0842] 方法1:

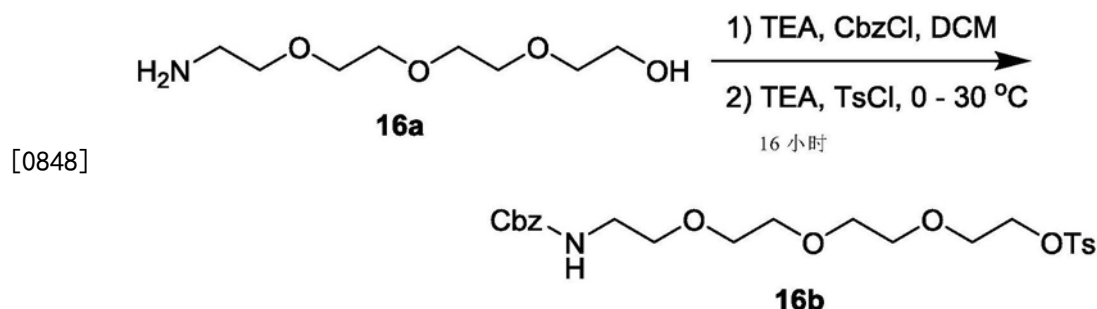
[0843] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C182.1×30mm,5um,流动相A:在水中的0.025%NH₃·H₂O(v/v),B:乙腈,梯度:0.0分钟5%B→0.8分钟95%B→1.2分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B,流速:1.5毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0844] 方法2:

[0845] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟5%B→0.8分钟95%B→1.2分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B,流速:1.5毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0846] 4.最大规模运行的实验:

[0847] 制备中间体16b的通用方法



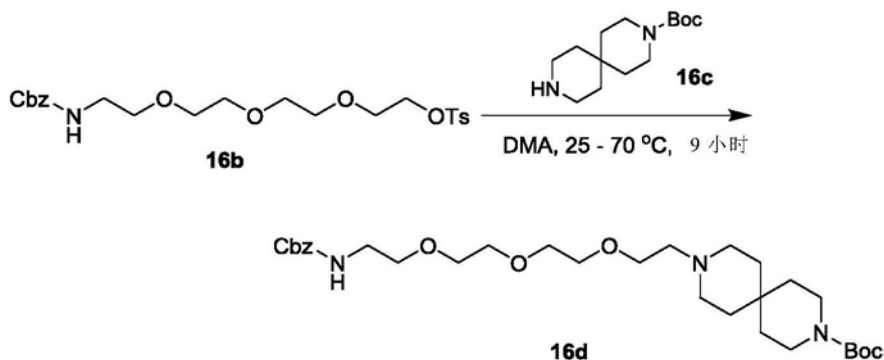
[0849] 在25~30℃下在N₂下向化合物16a(1.10g,5.69mmol)在DCM(10mL)中的溶液中添加TEA(1.32g,13.1mmol,1.82mL),然后在25~30℃下在N₂下将CbzCl(1.17g,6.83mmol,100μL)添加到混合物中,将混合物搅拌10小时。将混合物冷却至0~10℃,在0~10℃下在N₂下将TEA(5g,49.4mmol)添加到混合物中,然后在0~10℃下在N₂下将TsCl(5.00g,26.2mmol)添加到混合物中,将其在25~30℃下在N₂下搅拌6小时。取0.5mL反应混合物并且将其倾入水(3mL)中,用乙酸乙酯(1mL)萃取,将有机相用水(3mL×3)洗涤,然后减压浓缩,得到无色油,LCMS Rt=0.915分钟,m/z(M+1)=482.4)显示检测到化合物16b的MS,HNMR(EW18785-17-P1A2)显示形成了化合物16。将混合物倾入水(100mL)中,用乙酸乙酯(50mL×2)萃取,将有机相用盐水(100mL×3)洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤,减压浓缩滤液,得到棕色油状物。TLC 1(石油醚/乙酸乙酯=1/1,R_f=0.30)。将油状物通过柱色谱法(SiO₂,石油醚/乙酸乙酯=1/0~1/1,R_f=0.30)纯化,得到为棕色油的化合物16b(1.80g,3.74mmol,65.7%收率)。

[0850] ¹H NMR:400MHz,CDCl₃

[0851] δ7.78(d,J=8.4Hz,2H),7.26-7.42(m,7H),5.42(s,1H),5.08(s,2H),4.76(s,1H),4.11(d,J=4.4Hz,2H),3.45-3.74(m,13H),3.37(d,J=5.2Hz,2H),2.43(s,3H),1.83(s,3H)

[0852] LCMS:(方法1),Rt=0.915分钟,m/z(M+1)=482.4

[0853] 制备化合物16d的通用方法



[0854]

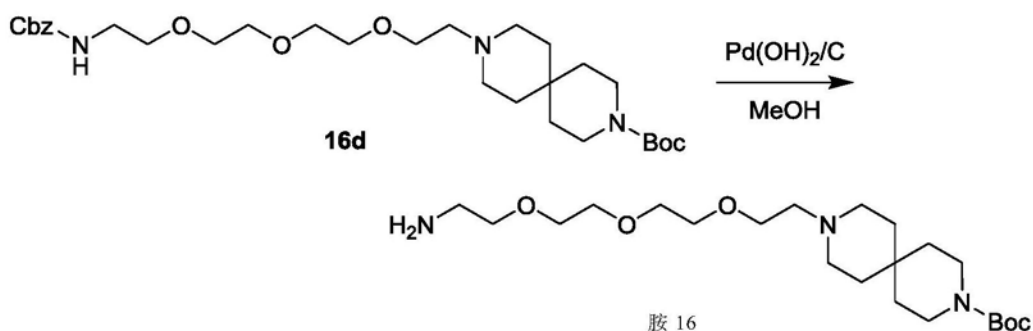
[0855] 在25℃下向化合物16b (1g, 2.08mmol) 和化合物16c (600mg, 2.36mmol) 在DMA (20mL) 中的溶液中添加TEA (2.18g, 21.5mmol, 3mL, 10.4当量), 将混合物在70℃下搅拌9小时。将混合物冷却至25~30℃, 倾入水 (50mL) 中, 用乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 将有机相用盐水 (30mL×3) 洗涤, 然后分离并用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。油状物通过制备型HPLC (管柱: Waters Xbridge C18 150*50mm*10um; 流动相: [水 (10mM NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 38%~68%, 11.5分钟) 纯化, 减压浓缩级分, 得到为棕色油的化合物16d (500mg, 886umol, 42.7%收率)。

[0856] ¹H NMR: 400MHz CDCl₃

[0857] δ 7.30 (m, 5H), 5.92 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.58 (m, 12H), 3.38 (m, 6H), 2.54 (m, 2H), 2.40 (m, 4H), 1.49 (m, 4H), 1.44 (s, 9H)。

[0858] LCMS: (方法1), Rt=0.844分钟, m/z (M+1) = 564.5

[0859] 制备胺16的通用方法



[0860]

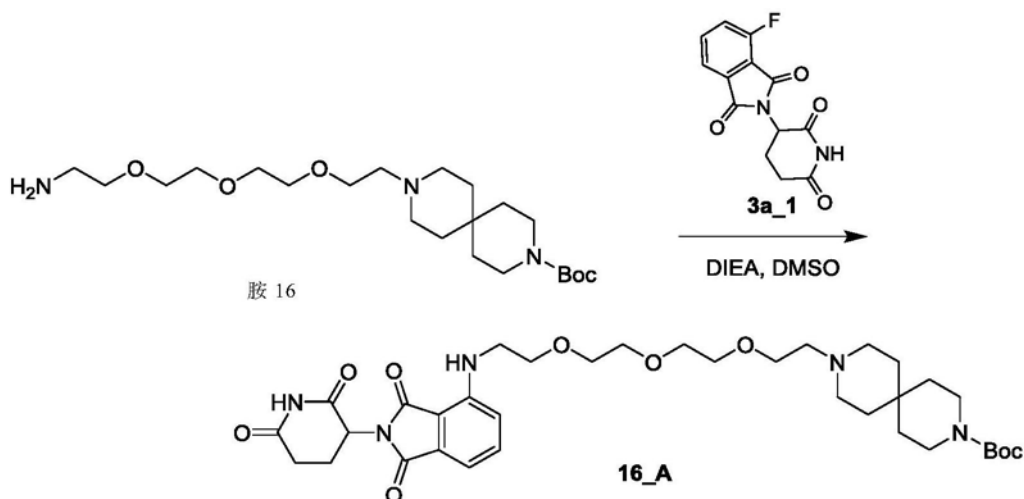
[0861] 向化合物16d (180mg, 319umol) 在MeOH (3mL) 中的溶液中添加Pd (OH)₂ (225mg, 320umol, 20%纯度)。将混合物在20℃下在H₂ (15psi) 下搅拌1小时。减压浓缩反应混合物, 获得为黄色油的胺16 (120mg, 279umol, 87.4%收率)。

[0862] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0863] δ 3.71-3.59 (m, 11H), 3.39 (s, 4H), 3.35 (s, 1H), 3.32 (s, 1H), 3.04-2.95 (m, 1H), 2.69-2.62 (m, 2H), 2.56 (s, 4H), 1.57 (s, 4H), 1.45 (s, 13H)

[0864] 制备胺16的通用方法

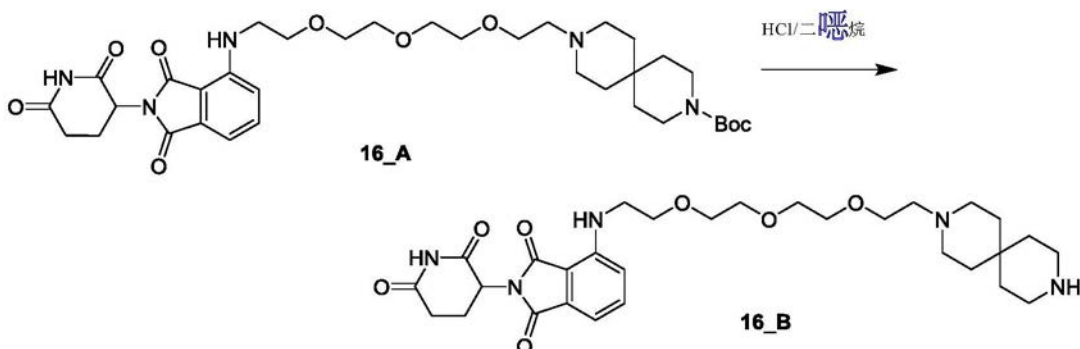
[0865]



[0866] 向化合物3a_1 (80mg, 289 μ mol) 在DMSO (3mL) 中的溶液中添加DIEA (140mg, 1.08mmol, 188 μ L) 和胺16 (120mg, 279 μ mol)。将混合物在90℃下搅拌1小时。通过添加AcOH将反应混合物酸化至pH=5。粗产物通过反相HPLC (0.1%FA条件) 纯化, 获得为红色固体的化合物16_A (50mg, 72.9 μ mol, 26.1%收率)。

[0867] 制备化合物16_B的通用方法

[0868]

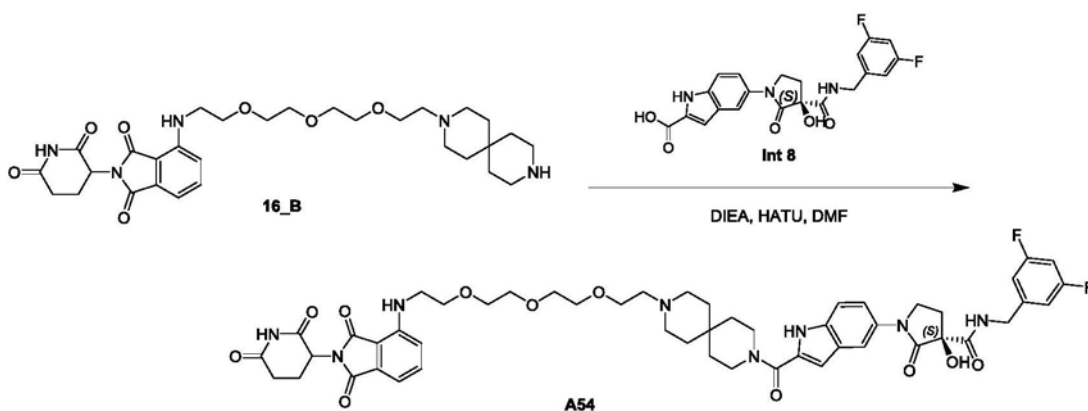


[0869] 将化合物16_A (40mg, 58.3 μ mol) 在HCl/二噁烷 (4M, 5mL) 中的混合物在20℃下搅拌1小时。减压浓缩反应混合物, 获得为黄色油的化合物16_B (30mg, 51.2 μ mol, 87.8%收率)。

[0870] LCMS: Rt=0.539分钟, m/z (M+1) = 586.2

[0871] 制备“A54”的通用方法

[0872]



[0873] 在0℃下在N₂下向Int 8 (30mg, 60.8 μ mol) 在DMF (3mL) 中的溶液中依次添加DIEA (24mg, 185 μ mol) 和HATU (30mg, 78.9 μ mol), 将混合物在0℃下搅拌10分钟, 然后在0℃下将化

合物16_B (30mg, 51.2μmol, FA) 在DMF (3.00mL) 中的溶液添加到混合物中, 将其在N₂下在0℃下搅拌20分钟。将混合物倾入冰水 (20.0mL) 中, 用乙酸乙酯 (10.0mL × 2) 萃取, 将有机相分离并且用盐水 (20.0mL × 2) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤。减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。粗产物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 75*30*3μm; 流动相: [水 (0.225% FA) - ACN]; B%: 20% ~ 40%, 8分钟) 纯化, 通过冷冻干燥除去级分的溶剂, 得到为黄色固体的“A54” (8.38mg, 7.93μmol, 15.4% 收率, 94.2% 纯度)。

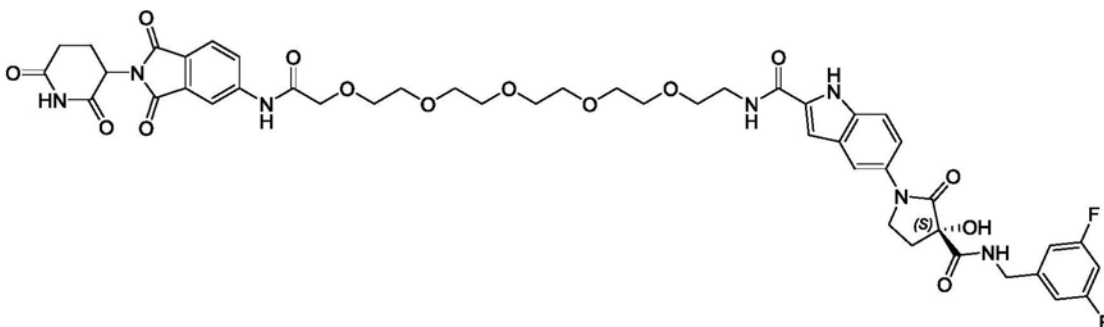
[0874] ^1H NMR: 400MHz, DMSO- d_6 ;

[0875] δ 11.58 (s, 1H), 11.07 (s, 1H), 8.80-8.61 (m, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.65-7.51 (m, 2H), 7.41 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.32-7.20 (m, 1H), 7.18-7.06 (m, 1H), 7.06-6.96 (m, 3H), 6.76 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.14-4.97 (m, 1H), 4.41 (d, J=6.4Hz, 1H), 4.26 (d, J=8.0Hz, 1H), 3.88 (d, J=8.4Hz, 3H), 3.76-3.61 (m, 8H), 3.55 (d, J=4.4Hz, 4H), 3.47 (s, 4H), 3.05 (s, 2H), 2.86 (d, J=12.4Hz, 3H), 2.61 (d, J=4.8Hz, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.19-2.11 (m, 1H), 2.02 (s, 1H), 1.46 (s, 8H)。

[0876] LCMS: Rt=0.846分钟, m/z (M+1) =997.5;

[0877] HPLC: $R_t = 1.675$ 分钟。

[0878] (3S)-N-[(3,5-二氟苯基) 甲基]-1-{2-[(1-{2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吡啶-5-基} 氨基甲酰基)-2,5,8,11,14-五氧杂十七烷-16-基) 氨基甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-3-甲酰胺 (“A55”)



[0879]

[0880] LC-MS或HPLC方法:

[0881] 方法1:

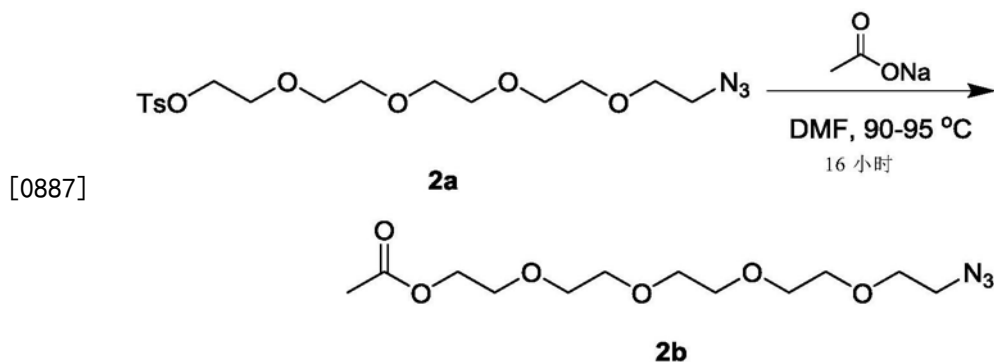
[0882] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟0%B→0.8分钟95%B→1.2分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B,流速:1.5毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0883] 方法2:

[0884] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟0%B→3.0分钟95%B→3.5分钟95%B→3.51分钟5%B→4.0分钟5%B,流速:0.8毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0885] 4. 最大规模运行的实验:

[0886] 制备化合物2b的通用方法

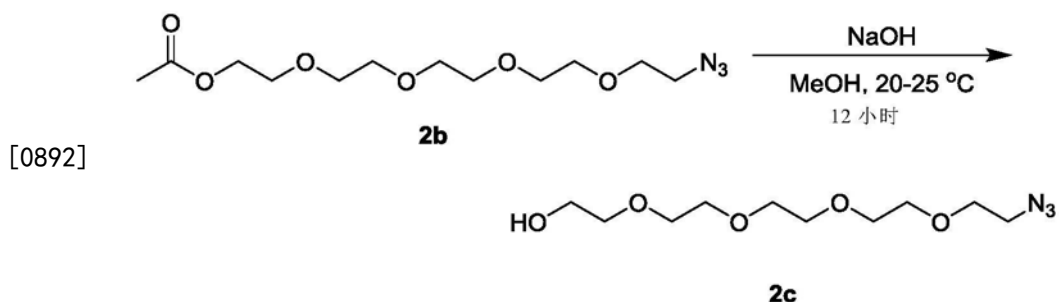


[0888] 将化合物2a (5.00g, 12.0mmol)、乙酸钠 (10.0g, 122mmol) 在DMF (75mL) 中的混合物脱气并用N₂吹扫3次, 然后将混合物在95~100℃下在N₂气氛下搅拌16小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=1/2) 显示化合物2a ($R_f=0.65$) 被消耗并且形成主要斑点 ($R_f=0.62$)。将反应混合物倾入饱和碳酸氢钠水溶液 (300mL) 中, 用MTBE (100mL×3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (60mL×2) 洗涤, 将有机相分离且用Na₂SO₄干燥, 过滤, 且减压浓缩滤液, 得到为黄色油的化合物2b (4.27g, 粗产物)。

[0889] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0890] δ4.16-4.25 (m, 2H), 3.64-3.70 (m, 16H), 3.38 (t, J=5.2Hz, 2H), 2.07 (s, 3H)。

[0891] 制备化合物2c的通用方法

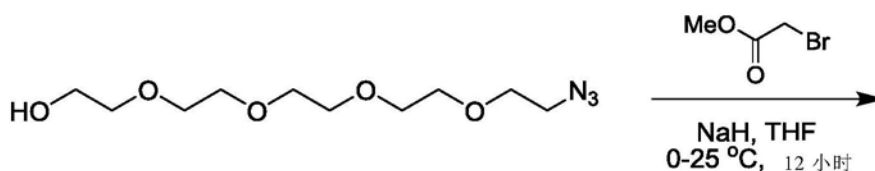


[0893] 在20~25℃下在N₂气氛下, 将化合物2b (3.66g, 12.0mmol)、NaOH (2M, 35mL) 在MeOH (35mL) 中的混合物搅拌12小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=1/1) 指示化合物2b ($R_f=0.50$) 被完全消耗并且形成一个新斑点 ($R_f=0.20$)。根据TLC分析, 反应是清洁的。将反应混合物用H₂O (200mL) 稀释, 用MTBE (50×2mL) 洗涤。然后将水层用NaCl (s) 饱和且用EtOAc (100mL×2) 萃取。将合并的有机层用Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩滤液, 得到为黄色油的化合物2c (1.96g, 7.44mmol, 62.1% 收率)。

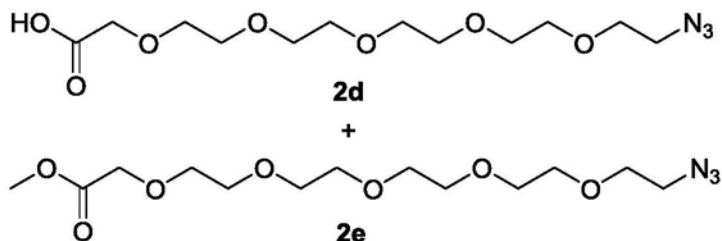
[0894] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0895] δ3.69-3.73 (m, 2H), 3.62-3.68 (m, 14H), 3.57-3.61 (m, 2H), 3.33-3.42 (m, 2H)。

[0896] 制备化合物2d的通用方法

**2c**

[0897]

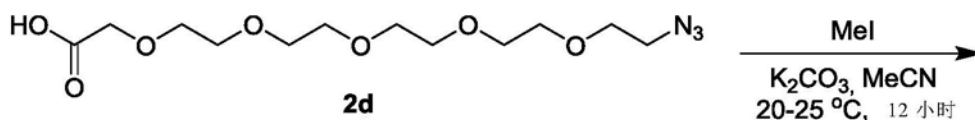


[0898] 在0~5℃下在N₂下向NaH (1.83g, 45.8mmol, 60%纯度) 在THF (30mL) 中的溶液中添加在THF (10mL) 中的化合物2c (1.96g, 7.44mmol) 并在20~25℃下在N₂下保持搅拌1小时。在0~5℃下在N₂下向混合物中添加在THF (10mL) 中的2-溴乙酸甲酯 (2.28g, 14.9mmol, 1.40mL), 并在20~25℃下在N₂下保持搅拌12小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=1/1) 指示化合物2c (R_f=0.50) 被完全消耗。将反应混合物倾入饱和NH₄Cl (120mL) 中, 用EtOAc (30mL×3) 萃取, 将合并的有机层用盐水 (15mL) 洗涤, 将有机相分离且用Na₂SO₄干燥, 过滤, 且减压浓缩滤液, 得到为棕色油的化合物2e (200mg, 粗产物), 其通过¹H NMR检查。用柠檬酸(s) 调节水层到pH=5~6。然后将混合物用MeCN萃取 (三次, 100mL, 50mL, 50mL)。将合并的有机层 (化合物2d的MeCN溶液) 通过¹H NMR检查并直接用于下一步骤。

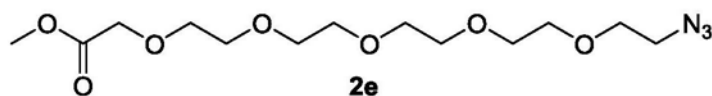
[0899] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0900] δ3.48-3.63 (m, 20H), 3.25-3.30 (m, 2H)。

[0901] 制备化合物2e的通用方法



[0902]

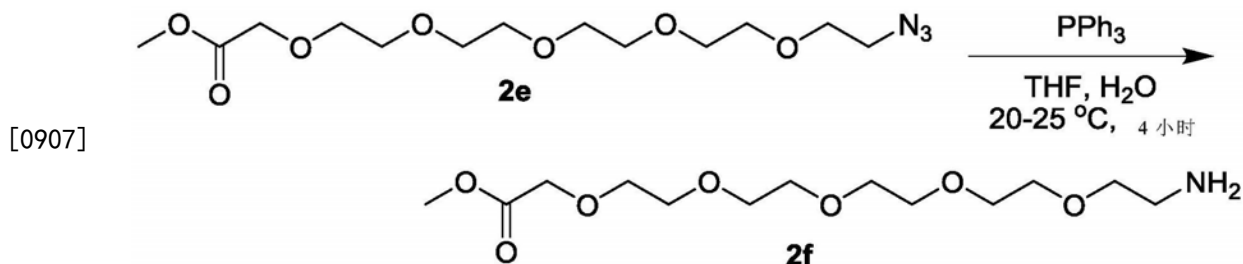


[0903] 在20~25℃下向化合物2d (2.39g, 7.44mmol) 在MeCN (200mL) 中的溶液中添加K₂CO₃ (4.11g, 29.8mmol), 在20~25℃下在N₂气氛下搅拌1小时。然后在20~25℃下在N₂气氛下向混合物中添加MeI (10.6g, 74.4mmol, 4.63mL)。将混合物在20~25℃下在N₂下搅拌12小时。¹H NMR显示化合物2d消失并且发现化合物2e (将反应混合物浓缩并引导到¹H NMR)。减压浓缩反应混合物。将残余物用EtOAc (200mL) 溶解, 然后将溶液经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩滤液, 得到为棕色油的化合物2e (890mg, 2.65mmol, 35.7%收率)。

[0904] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

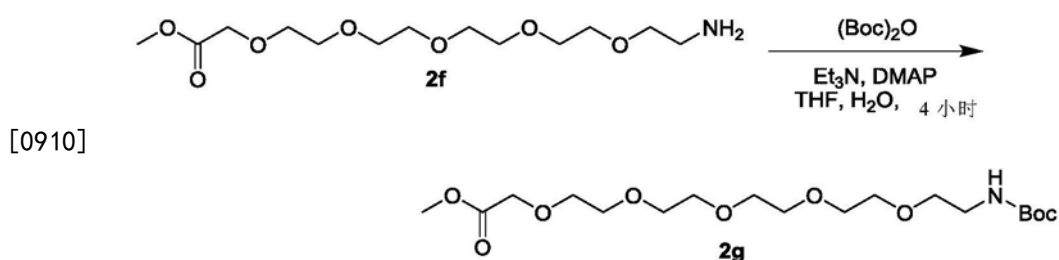
[0905] δ4.18 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.62-3.74 (m, 18H), 3.40 (t, J=5.2Hz, 2H)。

[0906] 制备化合物2f的通用方法



[0908] 将化合物2e (800mg, 2.39mmol)、 PPh_3 (1.12g, 4.27mmol) 在 H_2O (3mL) 和THF (15mL) 中的混合物脱气且用 N_2 吹扫3次,然后将混合物在20~25 $^\circ\text{C}$ 下在 N_2 气氛下搅拌4小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示化合物2e ($R_f=0.60$) 被消耗 (反应物溶液被引导用于下一步骤)。

[0909] 制备化合物2g的通用方法

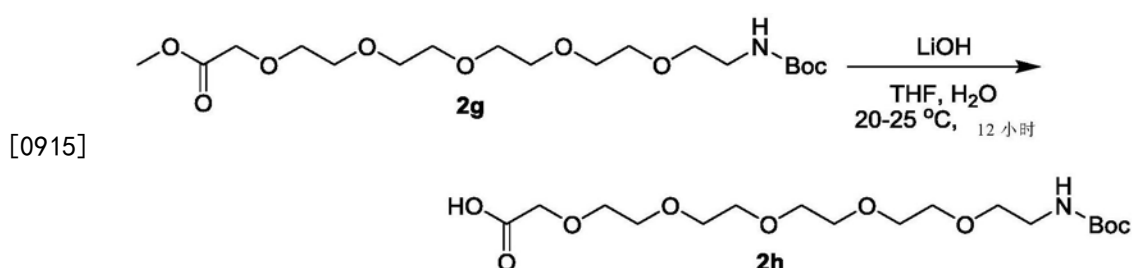


[0911] 将化合物2f (800mg, 2.59mmol)、TEA (730mg, 7.21mmol, 1.00mL)、 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.30g, 5.96mmol, 1.37mL)、DMAP (145mg, 1.19mmol) 在 H_2O (3mL) 和THF (15mL) 中的混合物脱气,并用 N_2 吹扫3次,然后将混合物在20~25 $^\circ\text{C}$ 下在 N_2 气氛下搅拌12小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示形成了化合物2g ($R_f=0.45$)。减压浓缩反应混合物。残余物用快速硅胶色谱法 (硅胶快速柱,洗脱剂为0~100%乙酸乙酯/石油醚梯度) 纯化,收集斑点 ($R_f=0.45$),得到为黄色油的化合物2g (145mg, 354 μmol , 13.7%收率)。

[0912] ^1H NMR: 400MHz, CDCl_3

[0913] δ 5.06 (s, 1H), 4.17 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.59-3.74 (m, 16H), 3.54 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 3.31 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 1.44 (s, 9H)。

[0914] 制备化合物2h的通用方法

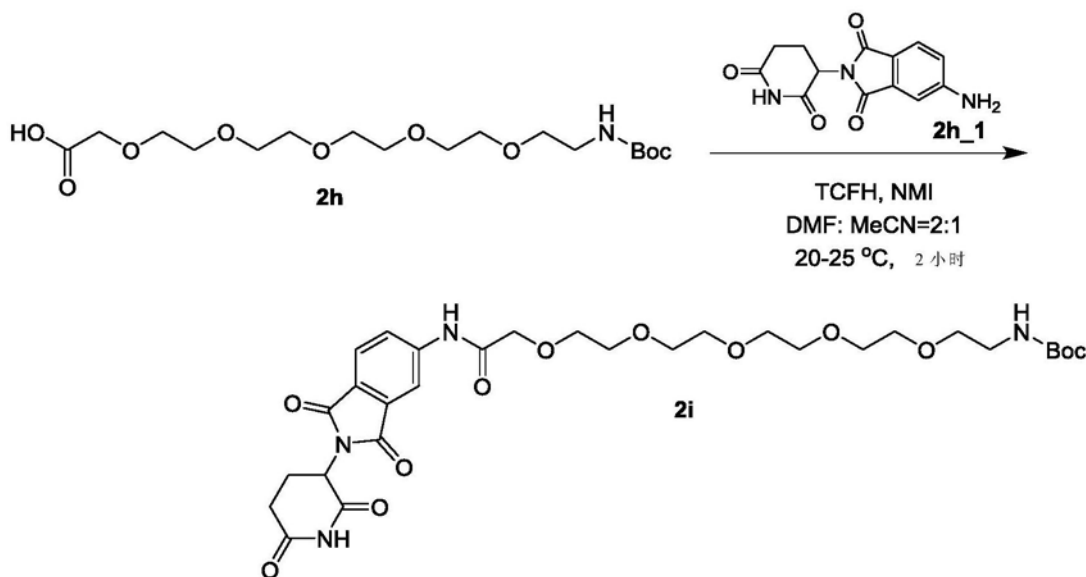


[0916] 将化合物2g (145mg, 354 μmol)、 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (30mg, 715 μmol) 在THF (4mL) 和 H_2O (1mL) 中的混合物在20~25 $^\circ\text{C}$ 下在 N_2 气氛下搅拌12小时。TLC (二氯甲烷/甲醇=10/1) 显示化合物2g ($R_f=0.60$) 被消耗并且形成主要的新斑点 ($R_f=0.00$)。将反应混合物用 H_2O (30mL) 稀释。用柠檬酸 (4M, 在 H_2O 中) 和添加的NaCl (s) 将混合物调节到pH=3~4,直至饱和。然后将混合物用EtOAc (10mL $\times$ 3) 萃取,将有机层合并并且经 Na_2SO_4 干燥,过滤,且减压浓缩滤液,得到为黄色油的化合物2h (137mg, 346 μmol , 97.8%收率),其通过 ^1H NMR证实。

[0917] ^1H NMR: 400MHz, $\text{DMSO}-d_6$

[0918] δ 12.53 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.44-3.62 (m, 16H), 3.35-3.38 (m, 2H), 3.05 (q, J=6.0Hz, 2H), 1.37 (s, 9H)。

[0919] 制备化合物2i的通用方法

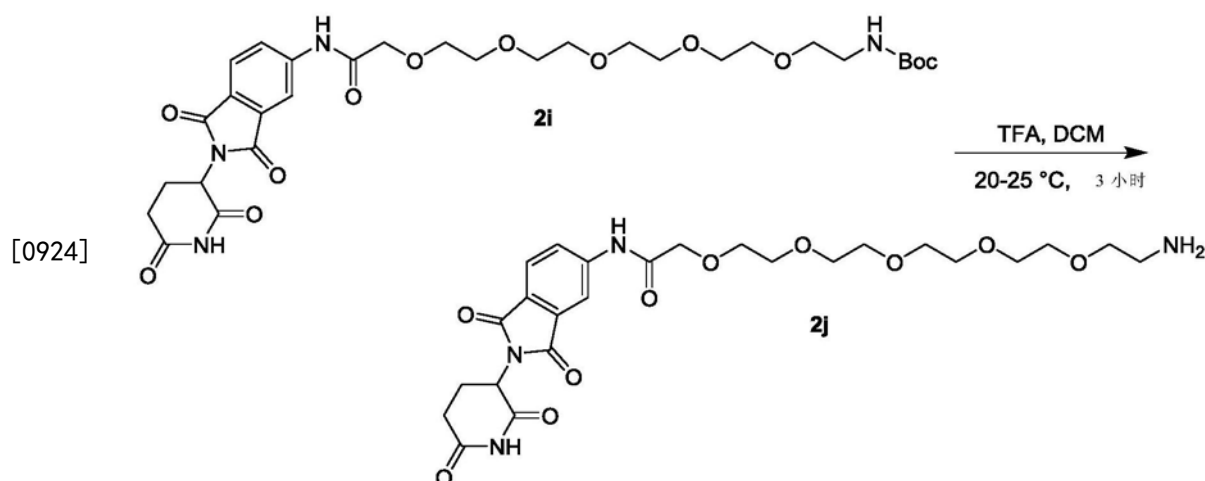


[0920]

[0921] 在 N_2 下在20~25 $^\circ\text{C}$ 下向化合物2h (70mg, 177 μmol) 和化合物2h₁ (51mg, 186 μmol) 在ACN (4mL) 和DMF (2mL) 中的溶液中添加TCFH (121mg, 431 μmol) 和NMI (100mg, 1.22mmol), 添加后, 将混合物在20~25 $^\circ\text{C}$ 下搅拌2小时。LCMS显示检测到化合物2i (RT=0.876分钟, m/z (M+1-100=551), TLC (石油醚/乙酸乙酯=0/1) 显示化合物2i消耗完 (R_f =0.00), 检测到新斑点 (R_f =0.10)。将反应溶液用AcOH (2mL) 猝灭, 然后将其倾入水 (10mL) 中并且用乙酸乙酯 (10mL*1) 萃取, 将有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且减压浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱法 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯=5/1~1/1~0/1, 收集斑点 R_f =0.10) 纯化, 然后减压浓缩, 提供为淡黄色油的化合物2i (90mg, 137 μmol , 77.4%收率)。

[0922] LCMS: (方法1), RT=0.875分钟, m/z (M+1-100) = 551

[0923] 制备化合物2j的通用方法



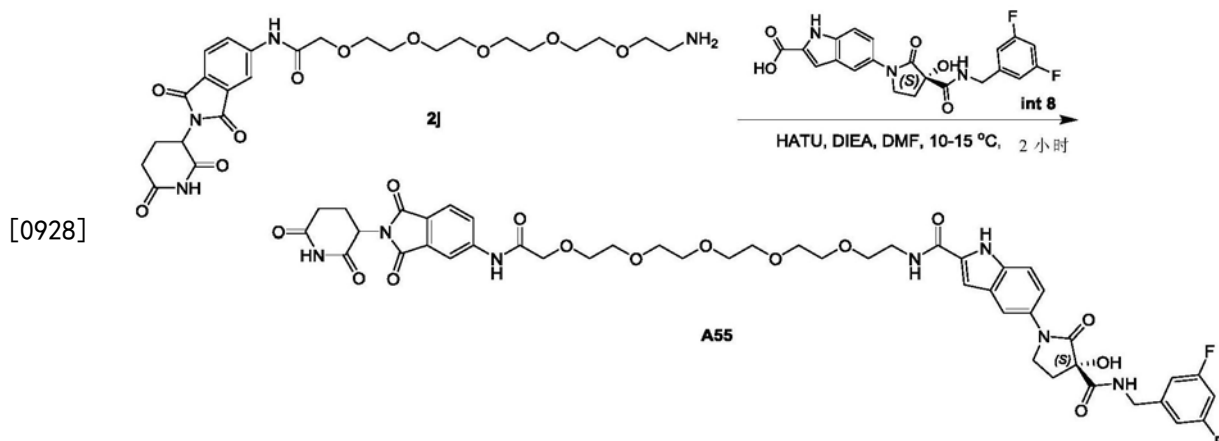
[0924]

[0925] 在20~25 $^\circ\text{C}$ 下向化合物2i (90mg, 138 μmol) 在DCM (5mL) 中的溶液中添加TFA (158mg, 1.39mmol), 添加后, 将混合物在20~25 $^\circ\text{C}$ 下搅拌3小时。LCMS显示检测到化合物2j的MS (Rt=0.733分钟 m/z (M+1) = 551)。减压浓缩反应物, 提供为黄色油的化合物2j (90mg,

粗产物, TFA)。

[0926] LCMS: (方法1), RT=0.733分钟, m/z (M+1) = 551

[0927] 制备“A55”的通用方法



[0929] 在10~15℃下在N₂下向化合物int 8 (30mg, 69.8μmol) 在DMF (3mL) 中的溶液中添加HATU (40mg, 105μmol) 和DIEA (45mg, 348μmol), 添加后, 在10~15℃下将溶解在DMF (1mL) 中的化合物2j (55mg, 82.7μmol TFA) 添加到溶液中, 然后将其在10~15℃下在N₂下搅拌1小时。LCMS显示检测到化合物2的质量 (RT=0.890分钟, m/z (M+1) = 962)。将反应溶液用AcOH (1mL) 猝灭, 且倾入水 (5mL) 中, 然后将其用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 将有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩。粗产物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Luna C18 150*25mm*10μm; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 25%~55%, 10分钟) 纯化, 然后将其减压浓缩, 提供为黄色胶的“A55” (33.96mg, 33.6μmol, 95.2%纯度)。

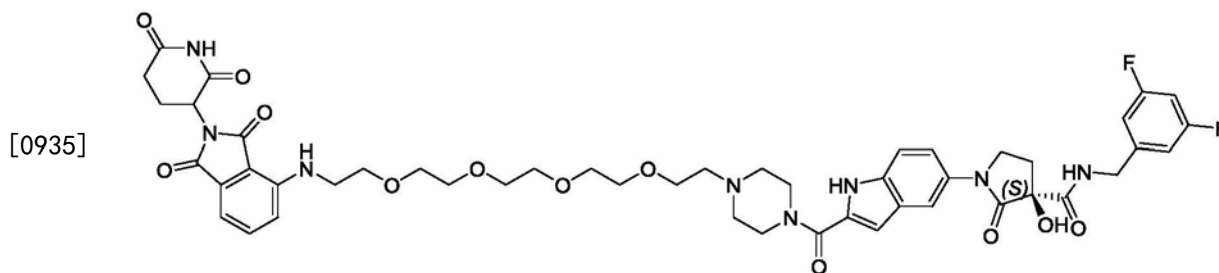
[0930] LCMS: (方法1), RT=0.885分钟, m/z (M+1) = 962

[0931] HPLC: (方法2), RT=1.885分钟

[0932] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆

[0933] δ 11.68 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 8.76 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.61 (t, J=5.6Hz, 1H), 8.36 (d, J=1.6Hz, 1H), 8.09 (dd, J=8.4, 1.6Hz, 1H), 7.95 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.84 (d, J=1.6Hz, 1H), 7.60 (dd, J=8.8, 2.0Hz, 1H), 7.49 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.01-7.15 (m, 3H), 5.19 (dd, J=12.8, 5.2Hz, 1H), 4.48 (dd, J=16.0, 6.8Hz, 1H), 4.33 (dd, J=16.0, 6.0Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.96 (t, J=6.8Hz, 1H), 3.83-3.43 (m, 24H重叠H₂O信号), 2.89-3.02 (m, 1H), 2.64-2.76 (m, 2H), 2.05-2.27 (m, 2H)。

[0934] (3S)-N-[(3,5-二氟苯基) 甲基]-1-{2-[4-(14-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基]氨基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基) 哌嗪-1-羰基]-1H-吲哚-5-基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-3-甲酰胺 (“A56”)



[0936] LC-MS或HPLC方法:

[0937] 方法1:

[0938] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C182.1×30mm,5um,流动相A:在水中的0.025% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (v/v), B:乙腈,梯度:0.0分钟0%B→0.8分钟60%B→1.2分钟60%B→1.21分钟0%B→1.55分钟0%B,流速:1.5毫升/分钟,烘箱温度:40℃;UV检测:220nm和254nm。

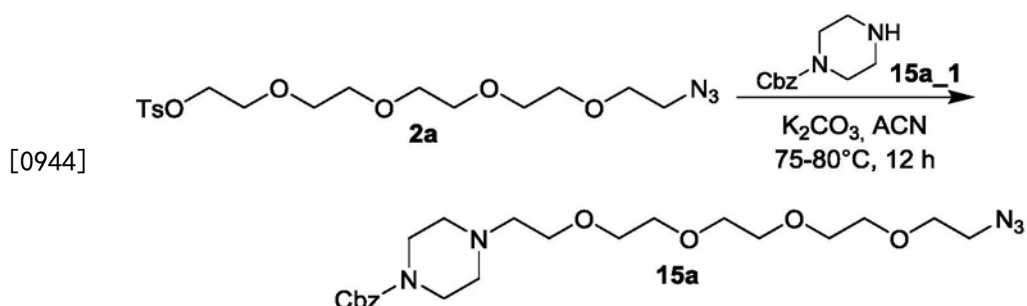
[0939] 方法2:

[0940] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA (v/v), B:在乙腈中的0.01875%TFA (v/v), 梯度:0.0分钟0%B→0.8分钟60%B→1.2分钟60%B→1.21分钟0%B→1.55分钟0%B,流速:1.5毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

[0941] 4.0min 0%B,流速:0.8毫升/分钟,烘箱温度:50℃;UV检测:220nm和254nm。

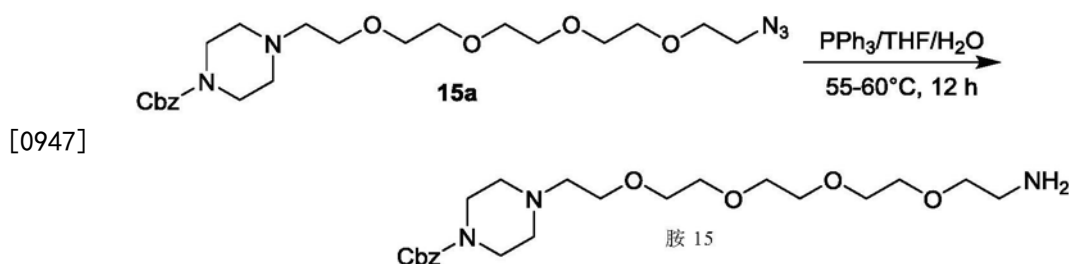
[0942] 最大规模运行的实验:

[0943] 制备化合物15a的通用方法



[0945] 将化合物2a (5g, 12mmol)、化合物15a_1 (2.90g, 13.2mmol)、 K_2CO_3 (3.31g, 24.0mmol) 在ACN (30.0mL) 中的混合物脱气,并用 N_2 吹扫3次,然后将混合物在75~80℃下在 N_2 气氛下搅拌12小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=1/2) 显示化合物2a ($R_f=0.75$) 被消耗,并且发现主要的新斑点 ($R_f=0.05$)。将反应混合物倾入 H_2O (140mL) 中,将混合物用MTBE (30.0mL × 3) 萃取。将有机层合并且用于下一步骤。

[0946] 制备化合物15_A的通用方法



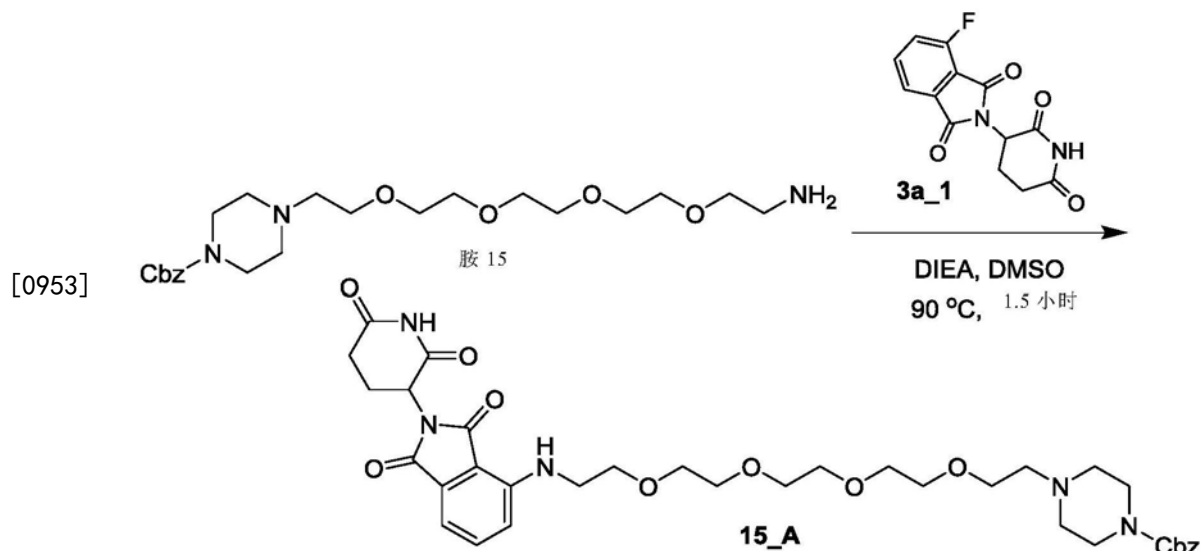
[0948] 将化合物15a (5.58g, 12mmol)、 PPh_3 (6.30g, 24.0mmol) 在THF (80mL) 和 H_2O (10mL) 中的混合物脱气且用 N_2 吹扫3次,然后将混合物在55~60℃下在 N_2 气氛下搅拌12小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=1/2) 指示化合物15a ($R_f=0.60$) 被保留。将混合物在55~60℃下保持搅拌16小时。LCMS显示化合物15a被消耗,检测到具有胺15的MS值的主要新峰 ($\text{RT}=0.941$ 分钟, $\text{M}+1=440$)。减压浓缩反应混合物。一半的残余物通过柱色谱法 (SiO_2 , $\text{DCM}/\text{MeOH}=1/0\sim 10/1$) 纯化,得到为黄色油的胺15 (430mg, 978umol, 8.16%收率),其通过 ^1H NMR和LCMS证实。

[0949] ^1H NMR: 400MHz, CDCl_3

[0950] δ 7.28-7.41 (m, 5H), 5.13 (s, 2H), 3.59-3.67 (m, 13H), 3.51-3.58 (m, 5H), 2.90 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 2.61 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 2.48 (s, 4H), 2.18 (s, 2H) (重叠 H_2O 信号)

[0951] LCMS: (方法1), $\text{RT}=0.966$ 分钟, m/z ($M+1$) = 440

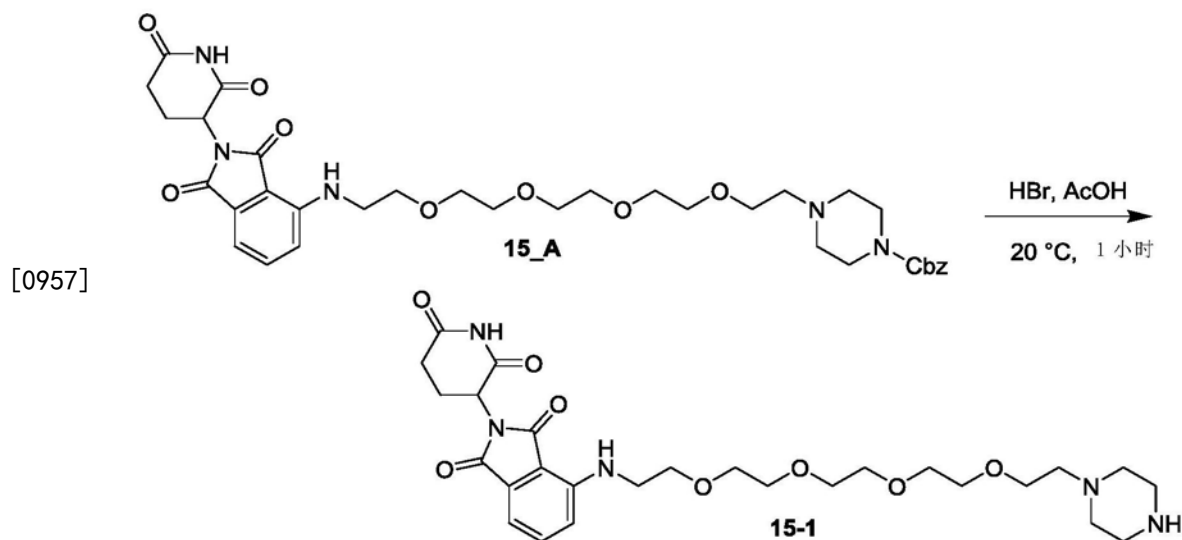
[0952] 制备化合物15_A的通用方法



[0954] 将化合物3a_1 (50mg, 181 μmol)、胺15 (100mg, 227 μmol) 和DIEA (148mg, 1.15mmol, 200 μL) 在DMSO (3mL) 中的溶液在90 $^{\circ}\text{C}$ 下在 N_2 下搅拌1.5小时。三个批次平行进行。将混合物冷却至25~30 $^{\circ}\text{C}$, 用AcOH将混合物的pH值调节至6~7。混合物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10 μm ; 流动相: [水 (0.225%FA) -ACN]; B%: 18%~48%, 10分钟) 纯化, 减压浓缩级分, 得到为黄色油的化合物15_A (160mg, 204 μmol , 37.7%收率, 94.9%纯度, FA)。

[0955] LCMS: EW18785-68-P1A, $\text{Rt}=0.799$ 分钟, m/z ($M+1$) = 696.4

[0956] 制备化合物15-1的通用方法

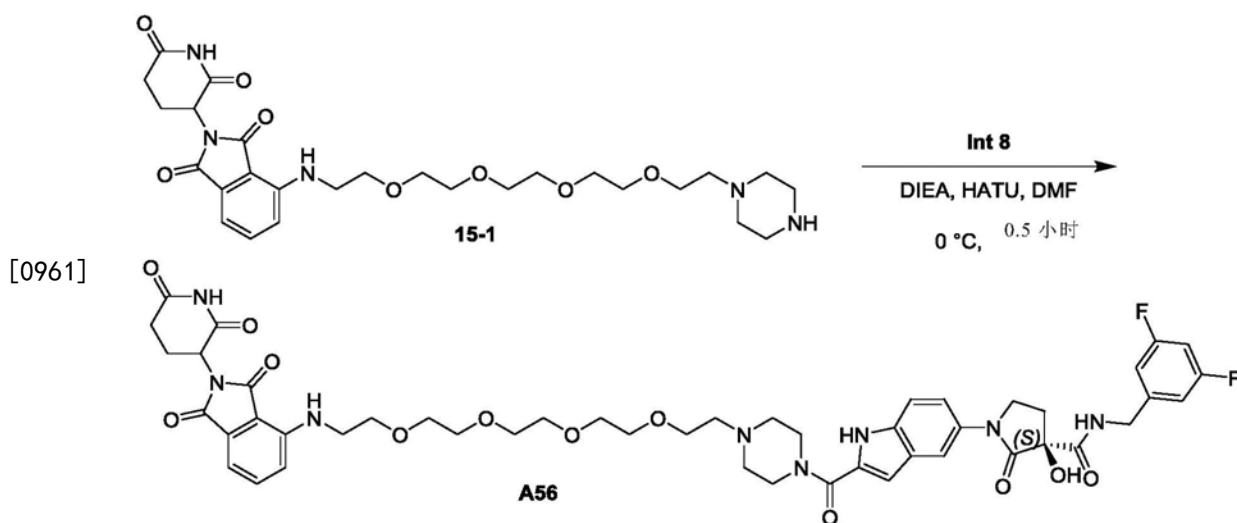


[0958] 在20 $^{\circ}\text{C}$ 下在 N_2 气氛下将化合物15_A (40mg, 57.4 μmol) 在HBr (10mL) 和 H_2OAc (5mL) 中的混合物搅拌1小时。通过添加 NaHCO_3 (aq) 将反应混合物酸化至 $\text{pH}=7$, 然后减压浓缩得到

残余物。粗产物通过反相HPLC (0.1%FA条件) 纯化, 获得为黄色固体的化合物15-1 (30mg, 53.4 μ mol, 92.9%收率), 并通过下一步骤证实。

[0959] LCMS: R_t = 0.543分钟, m/z ($M+1$) = 562.0

[0960] 制备“A56”的通用方法



[0962] 在0℃下在N₂下向Int 8 (20mg, 46.5 μ mol) 在DMF (3mL) 中的溶液中依次添加DIEA (20mg, 154 μ mol) 和HATU (30mg, 78.9 μ mol), 将混合物在0℃下搅拌10分钟, 然后在0℃下将化合物15-1 (30mg, 53.4 μ mol, FA) 在DMF (3.00mL) 中的溶液添加到混合物中, 将其在N₂下在0℃下搅拌20分钟。将混合物倾入冰水 (20.0mL) 中, 用乙酸乙酯 (10.0mL $\times$ 2) 萃取, 将有机相分离且用盐水 (20.0mL $\times$ 2) 洗涤, 用Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到棕色油状物。将其通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Synergi C18 150*50*3 μ m; 流动相: [水 (0.225%FA) - ACN]; B%: 20%~50%, 10分钟) 纯化, 通过冷冻干燥除去级分的溶剂, 得到为黄色固体的“A56” (10mg, 10.1 μ mol, 18.9%收率, 98.3%纯度)。

[0963] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆;

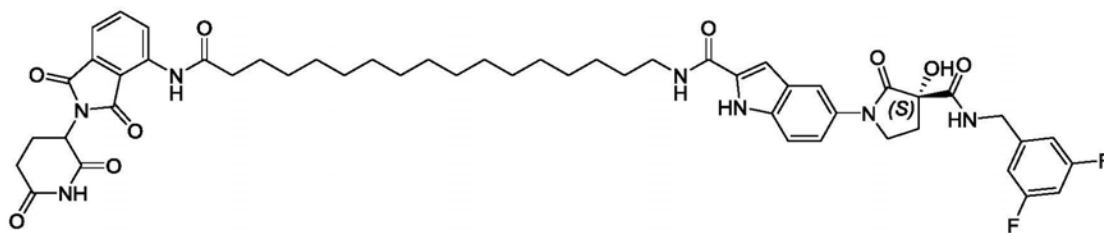
[0964] δ 11.61 (s, 1H), 11.09 (s, 1H), 8.69 (t, J = 6.4Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.89-7.72 (m, 1H), 7.60-7.50 (m, 2H), 7.42 (d, J = 9.2Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.09-6.98 (m, 4H), 6.79 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 5.10-5.00 (m, 1H), 4.41 (d, J = 6.4, 15.5Hz, 1H), 4.31-4.23 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.72 (s, 5H), 3.60 (t, J = 5.6Hz, 3H), 3.53 (d, J = 4.0Hz, 5H), 3.50 (s, 7H), 3.49-3.46 (m, 6H), 2.64-2.60 (m, 3H), 2.14 (d, J = 12.4Hz, 1H), 2.04 (s, 1H)。

[0965] LCMS: R_t = 0.671分钟, m/z ($M+1$) = 973.3;

[0966] HPLC: R_t = 1.637分钟。

[0967] (3S)-N-[(3,5-二氟苯基)甲基]-1-{2-[(16-{[2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧杂-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基]氨基甲酰基}十六烷基)氨基甲酰基]-1H-吲哚-5-基}-3-羟基-2-氧杂吡咯烷-3-甲酰胺 (“A57”)

[0968]



[0969] LC-MS或HPLC方法:

[0970] 方法1:

[0971] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟5%B→0.8分钟95%B→1.2分钟95%B→1.21分钟5%B→1.55分钟5%B,流速:1.5毫升/分钟,烘箱温度:50℃;PDA检测:220nm和254nm。

[0972] 方法2:

[0973] MS仪器类型:SHIMADZU LCMS-2020,管柱:Kinetex EVO C1830*2.1mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟5%B→3.0分钟95%B→3.5分钟95%B→3.51分钟5%B→4.0分钟5%B,流速:0.8毫升/分钟,烘箱温度:50℃;PDA检测:220nm和254nm。

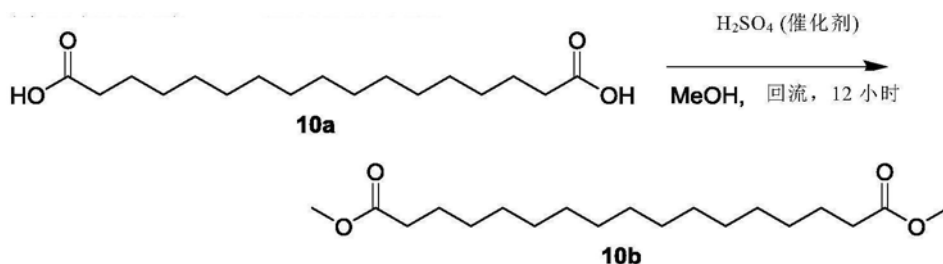
[0974] 方法3:

[0975] 仪器类型:SHIMADZU LC-20AD,管柱:Kinetex C18 LC Column4.6×50mm,5um,流动相A:在水中的0.0375%TFA(v/v),B:在乙腈中的0.01875%TFA(v/v),梯度:0.0分钟10%B→2.40分钟80%B→3.7分钟80%B→3.71分钟10%B→4.00分钟10%B,流速:1.5毫升/分钟,烘箱温度:50℃;PDA检测:(220nm、215nm、254nm)。

[0976] 4.最大规模运行的实验:

[0977] 制备化合物10b的通用方法

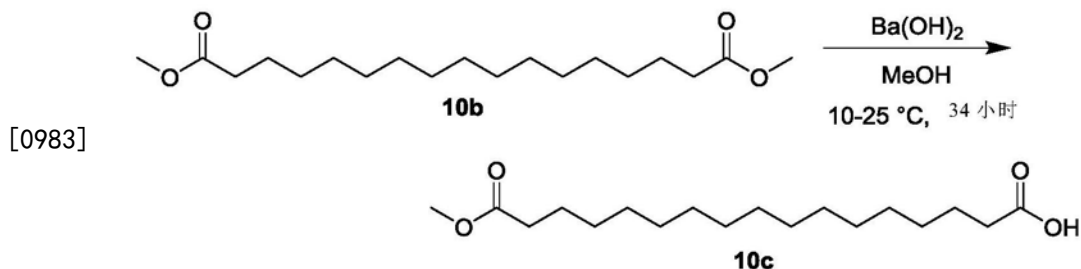
[0978]



[0979] 将化合物10a (3g, 9.99mmol) 和 H_2SO_4 (8滴, 98%纯度) 在MeOH (30mL) 中的混合物在64~65℃下在 N_2 气氛下搅拌12小时。 ^1H NMR显示化合物10a消失并且发现化合物10b(溶液通过 ^1H NMR直接测定)。将反应混合物冷却至10~20℃并在10~20℃下保持搅拌30分钟,然后过滤,且减压干燥滤饼,得到为白色固体的化合物10b (3.02g, 9.19mmol, 92.1%收率),其通过 ^1H NMR证实。

[0980] ^1H NMR:400MHz, CDCl_3 [0981] δ 3.69 (s, 6H), 2.32 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 4H), 1.59-1.69 (m, 4H), 1.22-1.37 (m, 22H)。

[0982] 制备化合物10c的通用方法

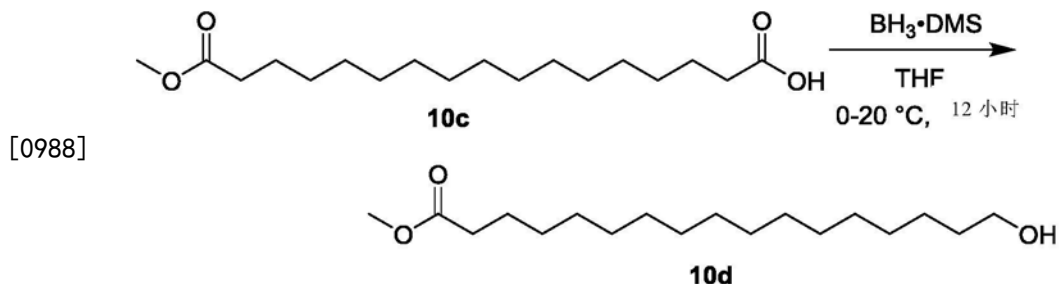


[0984] 在10~20℃下在N₂气氛下向化合物10b (3.02g, 9.19mmol) 在MeOH (12.0mL) 中的悬浮液中添加Ba (OH)₂ (866mg, 5.05mmol) 在MeOH (12mL) 中的溶液, 并且在15~25℃下在N₂气氛下保持搅拌22小时。1H NMR显示化合物10b被保留 (将一滴反应溶液添加到一滴12M HCl中, 然后通过1H NMR测定)。将反应混合物在15~25℃下在N₂气氛下搅拌12小时。1H NMR显示发现大多数化合物10c (将一滴反应溶液添加到一滴12M HCl中, 然后通过1H NMR测定)。过滤反应混合物且将滤饼在15~25℃下悬浮在4M HCl溶液 (15mL) 中, 并在15~25℃下保持搅拌30分钟, 然后过滤混合物, 并减压干燥滤饼, 得到为白色固体的化合物10c (2.42g, 7.70mmol, 83.7%收率), 其通过1H NMR证实。

[0985] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0986] δ3.60 (s, 3H), 2.19-2.33 (m, 4H), 1.48-1.63 (m, 4H), 1.12-1.33 (m, 22H)。

[0987] 制备化合物10d的通用方法

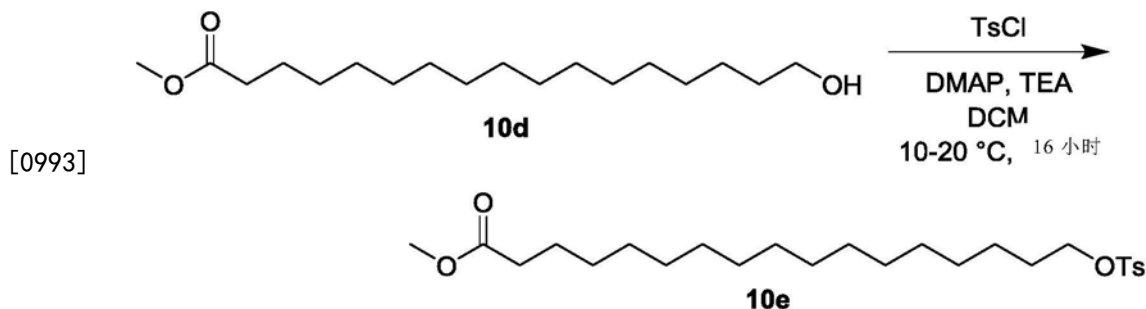


[0989] 在0~10℃下在N₂气氛下向化合物10c (2.42g, 7.70mmol) 在THF (25.0mL) 中的悬浮液中滴加BH₃-Me₂S (10.0M, 940uL), 且在10~20℃下在N₂气氛下保持搅拌12小时。1H NMR显示发现大多数化合物10d (将一滴反应溶液添加到一滴12M HCl中, 然后通过1H NMR测定)。在0~10℃下将反应混合物倾入饱和NH₄Cl溶液 (25mL) 中, 且在10~20℃下保持搅拌15分钟, 用EtOAc (50mL×2) 萃取水相, 将合并的有机相经无水Na₂SO₄干燥, 过滤, 并且减压浓缩滤液。通过1H NMR检查残余物。TLC 1 (石油醚/乙酸乙酯=3/1)。将残余物通过硅胶柱 (石油醚/乙酸乙酯, 20/1至3/1) 纯化, 收集斑点 (R_f=0.32), 得到为白色固体的化合物10d (1.98g, 6.59mmol, 85.6%收率), 其通过1H NMR证实。

[0990] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃

[0991] δ3.60 (s, 3H), 3.57 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.23 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.44-1.61 (m, 4H), 1.13-1.33 (m, 22H)。

[0992] 制备化合物10e的通用方法

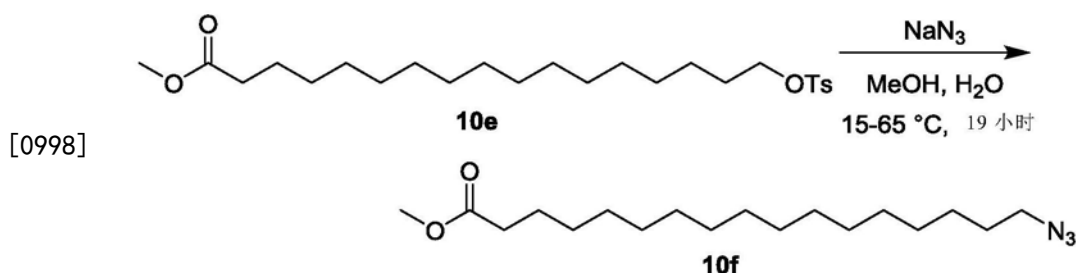


[0994] 在10~20℃下在N₂气氛下向化合物10d (1.98g, 6.59mmol) 在DCM (20.0mL) 中的溶液中添加TEA (1.33g, 13.2mmol, 1.83mL)、DMAP (80mg, 655μmol) 和4-甲基苯磺酰氯 (1.63g, 8.57mmol), 且在10~20℃下在N₂气氛下保持搅拌16小时。在10~20℃下向混合物中添加水 (50.0mL), 且将有机相经无水Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩滤液。将残余物通过硅胶柱 (石油醚/乙酸乙酯, 1/0至3/1) 纯化, 收集斑点 (R_f=0.83), 得到为白色固体的化合物10e (1.43g, 3.15mmol, 47.7%收率)。

[0995] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[0996] δ 7.72 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.27 (d, J=8.4Hz, 2H), 3.95 (t, J=6.4Hz, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.23 (t, J=7.6Hz, 2H), 1.52-1.60 (m, 4H), 1.10-1.28 (m, 24H)。

[0997] 制备化合物10f的通用方法

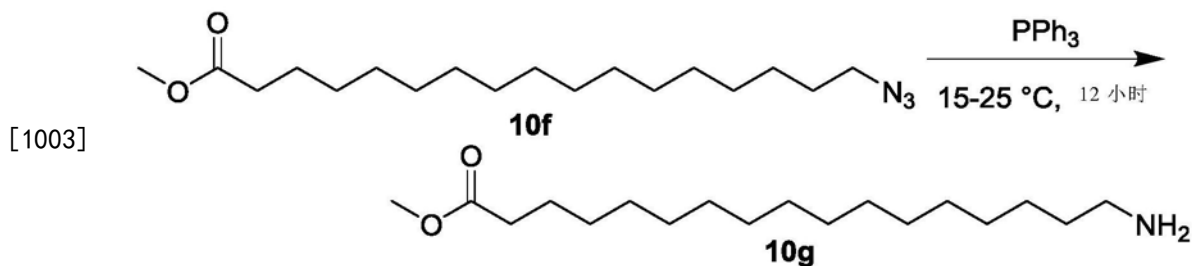


[0999] 在15~25℃下向甲基化合物10e (1.43g, 3.15mmol) 在MeOH (15.0mL) 和H₂O (1.50mL) 中的溶液中添加NaN₃ (310mg, 4.77mmol), 然后将混合物加热至64~65℃, 并在64~65℃下保持搅拌19小时。¹H NMR显示化合物10e消失, 并且发现化合物10f (向0.3mL的反应溶液中添加饱和NaHCO₃ (5mL) 和DCM (4.00mL), 在25℃下减压浓缩有机相, 然后通过¹H NMR测定)。将反应混合物冷却至15~25℃。反应混合物不经纯化并且直接用于下一步骤。

[1000] ¹H NMR: 400MHz, CDCl₃;

[1001] δ 3.69 (s, 3H), 3.28 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.34 (t, J=6.8Hz, 2H), 1.56-1.72 (m, 4H), 1.24-1.43 (m, 22H)。

[1002] 制备化合物10g的通用方法



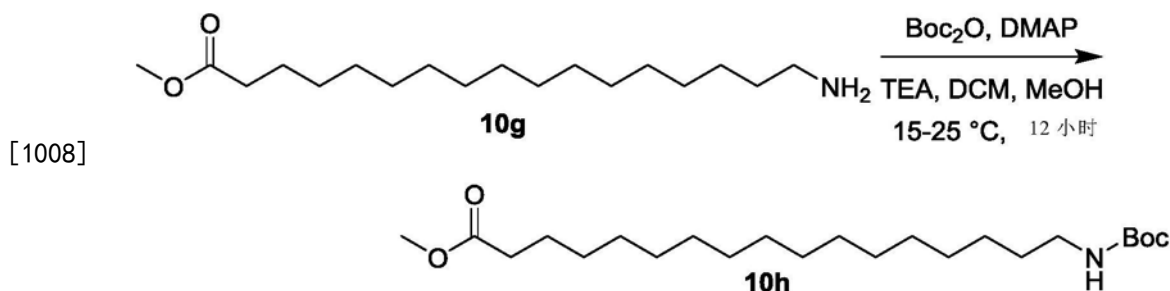
[1004] 在15~25℃下向化合物10f (1.02g, 3.13mmol) 的混合物中添加PPh₃ (1.48g,

5.64mmol),并在15~25℃下保持搅拌12小时。¹H NMR显示化合物10f消失并且发现化合物10g(反应物溶液直接通过¹H NMR测定)。在15~25℃下向混合物中添加1M HCl溶液直至pH=1~2,然后减压浓缩混合物。在15~25℃下向残余物中添加EtOAc (15.0mL)并且在15~25℃下保持搅拌15分钟,过滤且减压干燥滤饼,得到为白色固体的10g (1.15g, TsOH和HCl盐)。

[1005] ¹H NMR:400MHz, DMSO-d₆;

[1006] δ7.70 (s, 3H), 7.48 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.12 (d, J=8.0Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.70-2.83 (m, 2H), 2.29 (t, J=7.6Hz, 2H), 2.29 (s, 1.5H), 1.45-1.58 (m, 4H), 1.19-1.34 (m, 24H)。

[1007] 制备化合物10h的通用方法

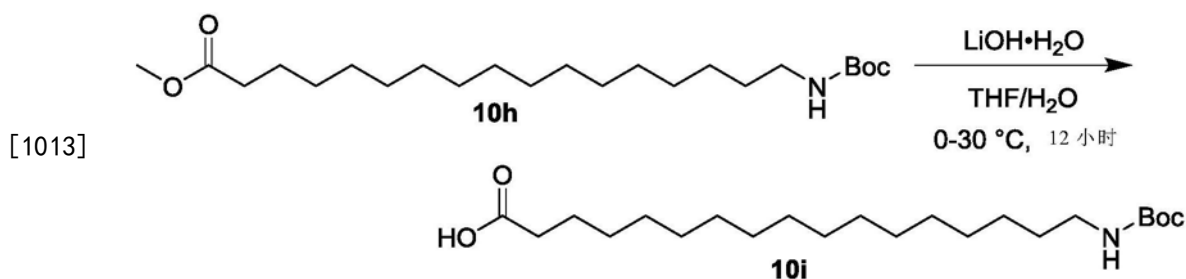


[1009] 在15~25℃下向化合物10g (1.15g, TsOH和HCl盐) 在DCM (10mL) 和MeOH (1mL) 中的混合物中添加Boc₂O (1.03g, 4.71mmol, 1.08mL)、DMAP (39mg, 319umol) 和TEA (794mg, 7.84mmol, 1.09mL), 且在15~25℃下在N₂气氛下保持搅拌12小时。MS显示化合物10g的MS值消失。减压浓缩反应混合物。残余物通过硅胶柱(石油醚/乙酸乙酯, 1/0~20/1) 纯化, 得到为白色固体的化合物10h (341mg, 853umol, 27.2%收率)。

[1010] ¹H NMR:400MHz, CDCl₃;

[1011] δ4.42 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.03 (q, J=6.4Hz, 2H), 2.23 (t, J=7.6Hz, 2H), 1.49-1.61 (m, 4H), 1.37 (s, 9H), 1.11-1.29 (m, 24H)。

[1012] 制备化合物10i的通用方法



[1014] 在0~10℃下向化合物10h (341mg, 853umol) 在THF (4mL) 和H₂O (1mL) 中的混合物中添加LiOH·H₂O (46mg, 1.10mmol) 且在20~30℃下保持搅拌12小时。向混合物中添加水 (20.0mL) 和EtOAc (50mL), 然后在0~10℃下添加10%柠檬酸溶液直至pH=3。将有机相经无水Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩滤液, 其通过¹H NMR证实。残余物通过硅胶柱(石油醚/乙酸乙酯, 1/0至5/1) 纯化。收集斑点 (R_f=0.22), 得到为白色固体的化合物10i (228mg, 591umol, 69.3%收率)。

[1015] ¹H NMR:400MHz, CDCl₃

[1016] δ4.54 (s, 1H), 3.00-3.20 (m, 2H), 2.37 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.60-1.70 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.21-1.40 (m, 24H)。

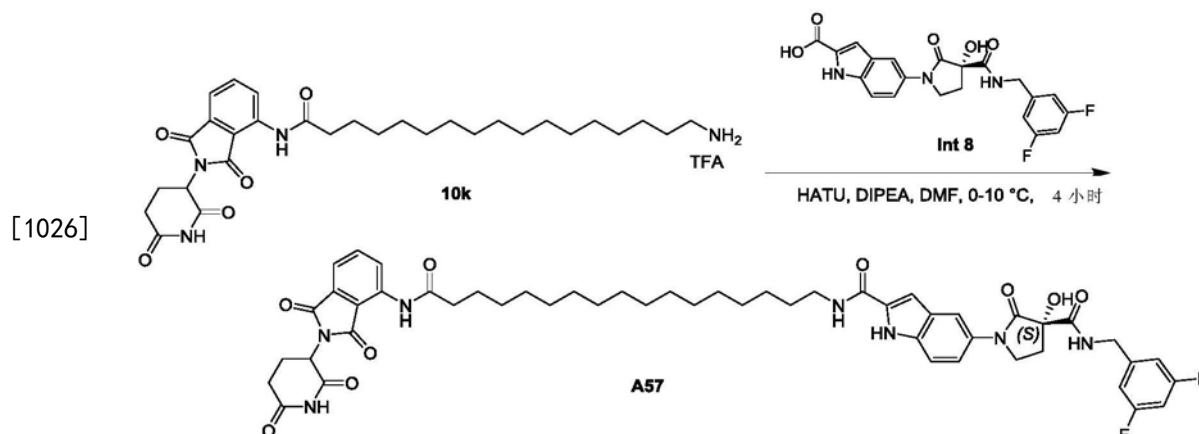
CC1(C)C(=O)NCCC1C2C(=O)N(C2C(=O)c3ccccc3NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCNC(=O)OC(C)(C)C)C4=CC=CC=C4

[1021] 制备化合物10k的通用方法

118

[1024] LCMS: (方法1), RT=0.933分钟, m/z (M+1) = 541.4

[1025] 制备“A57”的通用方法



[1027] 在0~10℃下在N₂气氛下向化合物int 8 (30mg, 69.9μmol) 和DIPEA (37mg, 286μmol, 49.9μL) 在DMF (2.00mL) 中的溶液中添加HATU (40mg, 105μmol) 和化合物10k (48mg, 73.3μmol, TFA) 在DMF (2.00mL) 中的溶液且在0~10℃下在N₂气氛下保持搅拌4小时。在0~5℃下向反应混合物中添加冰乙酸, 直至pH=5~6, 然后在0~5℃下将混合物倾入水 (20.0mL) 中, 将水相用EtOAc (30.0mL×3) 萃取, 将合并的有机相用无水Na₂SO₄干燥, 过滤且减压浓缩滤液, 残余物通过LCMS检测。残余物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex luna C18 150*40mm*15μm; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 62%~92%, 11分钟) 纯化, 直接减压浓缩收集的级分。残余物通过LCMS检测 (RT=2.946分钟, MS=952.5)。残余物通过制备型HPLC (管柱: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3μm; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 70%~80%, 7分钟) 进一步纯化, 直接减压浓缩收集的级分, 得到为棕色固体的“A57” (7.02mg, 7.25μmol, 10.4% 收率, 98.3% 纯度)。

[1028] ¹H NMR: 400MHz, DMSO-d₆

[1029] δ 11.58 (s, 1H), 11.15 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 8.69 (t, J=6.0Hz, 1H), 8.42-8.52 (m, 2H), 7.83 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.78 (d, J=1.6Hz, 1H), 7.61 (d, J=6.8Hz, 1H), 7.53 (dd, J=8.8, 2.0Hz, 1H), 7.43 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.11 (d, J=1.6Hz, 1H), 6.97-7.09 (m, 3H), 6.72 (s, 1H), 5.14 (dd, J=12.8, 6.4Hz, 1H), 4.43 (dd, J=15.6, 6.8Hz, 1H), 4.28 (dd, J=16.4, 6.0Hz, 1H), 3.87-3.93 (m, 1H), 3.28 (q, J=6.4Hz, 3H), 3.05 (q, J=6.0Hz, 1H), 2.83-2.97 (m, 2H), 2.55-2.70 (m, 7H), 2.46 (t, J=7.6Hz, 2H), 2.13-2.20 (m, 1H), 1.99-2.10 (m, 3H), 1.46-1.67 (m, 5H), 1.15-1.41 (m, 46H)。

[1030] ¹⁹F NMR: 400MHz, DMSO-d₆

[1031] δ -110.35。

[1032] LCMS: (方法2), RT=2.946分钟, m/z (M+1) = 952.5

[1033] LCMS: (方法1), RT=1.139分钟, m/z (M+1) = 952.5

[1034] HPLC: (方法3), RT=2.715分钟

[1035] 2. 化合物的示例性测试

[1036] 1. 细胞接种

[1037] 将HCT116细胞播种在6孔板中。吸取1mL新鲜培养基至每个孔中, 并孵育至少1小时

(37℃, 5%CO₂, 95%rH)。

[1038] 在Vi-Cell.Equinr.70198475中收获并计数细胞。将细胞浓度调节至0.35e⁶细胞/毫升, 并且添加1mL细胞悬浮液(总共0.35e⁶细胞/孔)。将细胞孵育24小时(37℃, 5%CO₂, 95%rH)

[1039] 2. 化合物处理

[1040] HCT116:24小时:处理前~50%汇合

[1041] 用选定的化合物处理

[1042] 化合物将被第一次解冻, 储备液:10mM; 终浓度:10μM、1μM、0.1μM

[1043] 用Digital Dispenser:HCT116 platte用基于DMSO的溶液处理

[1044] 2A1.jpg_meta.xml

[1045] →产生新的化合物分配方案

[1046] →应用测试化合物的名称及其储备液浓度(以mM计)以便测试

[1047] →3x 1:10系列稀释

[1048] →最终0.3%DMSO, 对于每个孔进行DMSO归一化

[1049] →添加化合物/DMSO后振荡

[1050] 再孵育细胞24小时(37℃, 5%CO₂, 95%rH)

[1051] 3. 细胞裂解

[1052] HCT116:裂解前70~80%汇合

[1053] -孵育后, 将细胞用包括HaItTM蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解,

[1054] 混合液(1x)

[1055] 所有步骤均在冰上或在4℃下进行

[1056] -从细胞中吸取上清液

[1057] -用2.0mL冰冷的PBS缓冲液洗涤细胞两次

[1058] -在每个洗涤步骤之后从细胞中吸取上清液

[1059] -每孔用100μL Ripa裂解缓冲液裂解细胞

[1060] -用细胞刮棒刮取细胞并将裂解物转移至埃普多夫杯中

[1061] -在冰上孵育15分钟

[1062] -在13000x g和4℃下离心150分钟

[1063] -将上清液转移至新鲜的埃普多夫杯中

[1064] -移出20μL裂解物用于BCA测定

[1065] -等分试样并在-20℃下冷冻

[1066] 4. 蛋白质提取物的BCA测定

[1067] 用BCA蛋白测定试剂盒测定裂解物中的蛋白质浓度。

[1068] 试剂盒供应的BSA为2mg/mL。

[1069] 在96孔板中稀释标准品(储备液BSA浓度=2mg/mL):

[1070] 样品以1:4运行。在裂解缓冲液中稀释, 仅运行裂解缓冲液以确定测定中来自洗涤剂的背景。

[1071] BCA试剂:以1:50比率稀释试剂A和试剂B。向9.8mL A中添加200μL B。

[1072] 测定方法:将5μL/孔的标准品或样品吸移到96个孔中(参见板布局)。样品一式两

份地运行。空白=5 μ L/孔PBS或5 μ L/孔裂解缓冲液。添加100 μ L/孔的制备的BCA试剂。在埃普多夫混合器上轻敲板以混合或振荡1~2分钟。在37℃下孵育30分钟。

[1073] 读取562nm处的OD值。在EnVision 2104多标记读取器(珀金埃尔默公司,设备号70160330)上读板,仪器在2017年8月17日最后验证(每年一次)(A25/531)。AEH181012_BCA.csv

[1074] 5.数据计算:

[1075] 在EXCEL中,将一式两份取平均,并减去平均背景PBS作为标准曲线。

[1076] 产生趋势线,截距(b)设定为0。对于可接受的结果,R²应该>0.950。从试验值中减去裂解物缓冲液空白,并且使用平均的背景校正的O.D.值用方程计算mg/mL,然后用稀释因子校正最终mg/mL值。只有来自标准曲线范围内的OD值的结果才是可接受的。标准曲线范围之外的值被忽略。BCA AEH00350 Berechnung.xlsx

[1077] 6.样品计算和制备

[1078] -在冰上解冻AEH00350的裂解物

[1079] -计算用于蛋白质免疫印迹上样每槽10 μ g总蛋白/13 μ L的样品量:

[1080] -用裂解缓冲液和10x还原剂和4x LDS缓冲液将样品稀释至10 μ g。

[1081] -在70℃下将其加热10分钟和1000rpm

[1082] 7.WB分析

[1083] -插入一个NuPAGE 4-12%Bis-Tris Midi Gel (26孔)并固定在标准细胞装置电泳室(BIO-RAD,#165-6001)中

[1084] -用1x NuPAGE MES SDS电泳缓冲液填充室

[1085] -移液样品,参见每个梳Blue Plus 2Pre-Stained Protein Standard和MagicMark XP:

[1086] -3 μ L Magic Marker和7 μ L Seeblue Marker,每个slotlayout.xlsx13 μ L样品

[1087] -两种凝胶,具有以下布局

[1088] -2D-SDS-Page运行:45分钟,恒定200V(右电源)

[1089] -将硝化纤维素膜浸泡在甲醇中,并将印迹纸浸泡在1x转移缓冲液中

[1090] -制备印迹夹心:2x印迹纸、凝胶、膜、在Fast Blot B44 (Biometra,#015-200)上的2x印迹纸

[1091] -蛋白免疫印迹运行:1小时35分钟,恒定150mA

[1092] 封闭

[1093] -将膜转移至封闭缓冲液中并在室温下振荡1小时

[1094] -封闭溶液:Odyssey封闭缓冲液

[1095] 与一抗MetAP2克隆EPR6887 RabMAb Abcam ab134124 (1:5000)一起孵育

[1096] -一抗溶液:0.5x Odyssey封闭缓冲液+0.5x PBS+0.1%Tween20

[1097] -在4℃下在轻微振荡下与一抗孵育一起过夜:

[1098] 与二抗(山羊抗兔(700nm),Molecular Probes A21076 39542A (1:20000)一起孵育

[1099] -在室温下洗涤膜4次,持续10分钟

[1100] -洗涤溶液:1x PBS+0.1%Tween20

- [1101] -在室温下在黑暗中将膜与二抗一起孵育1小时
- [1102] -二抗溶液:0.5x Odyssey封闭缓冲液+0.5x PBS+0.1%Tween20+0.01%SDS
- [1103] -仅在1x PBS中进行最后洗涤步骤
- [1104] -Odyssey成像仪上扫描膜
- [1105] 表1根据本发明的式I化合物的IC₅₀

[1106]

化合物编号	IC ₅₀ 酶 [μM]	IC ₅₀ HUVEC [μM]
“A1”	0.19	25
“A2”	0.25	30
“A3”	0.55	30
“A4”	0.48	1.6
“A5”	0.33	5.8
“A6”	0.37	30

[1107]

“A7”	0.32	7.3
“A8”	0.33	30
“A42”		4.6
“A43”		7.1
“A44”		7
“A45”		0.61
“A46”		>30
“A47”		0.24
“A48”		0.085
“A49”		0.051
“A50”		0.18
“A51”		0.4
“A52”		4.9
“A53”		2.8
“A54”		0.11
“A55”		>30
“A56”		0.12
“A57”		>30

[1108] 以下实施例涉及药物：

[1109] 实施例A：注射小瓶

[1110] 将100g的式I活性成分和5g磷酸氢二钠在3L双蒸水中的溶液使用2N盐酸调节到pH 6.5, 无菌过滤, 转移到注射小瓶中, 在无菌条件下冷冻干燥且在无菌条件下密封。每个注射小瓶含有5mg活性成分。

[1111] 实施例B：栓剂

[1112] 将20g的式I活性成分与100g大豆卵磷脂和1400g可可脂的混合物熔融, 倾入模具中且允许冷却。每个栓剂含有20mg活性成分。

[1113] 实施例C：溶液

[1114] 溶液由1g的式I活性成分、9.38g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、28.48g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和0.1g苯扎氯铵在940mL双蒸水中制备。将pH调节到6.8, 且将溶液补足至1L且通过照射灭菌。所述溶液可以以滴眼剂的形式使用。

[1115] 实施例D：软膏

[1116] 将500mg的式I活性成分与99.5g凡士林在无菌条件下混合。

[1117] 实施例E:片剂

[1118] 将1kg的式I活性成分、4kg乳糖、1.2kg马铃薯淀粉、0.2kg滑石粉和0.1kg硬脂酸镁的混合物以常规方式压制以给出片剂,以这样的方式使得每个片剂含有10mg活性成分。

[1119] 实施例F:糖衣丸

[1120] 类似于实施例E压制片剂,且随后用蔗糖、马铃薯淀粉、滑石粉、黄蓍胶和染料的包衣以常规方式进行包衣。

[1121] 实施例G:胶囊

[1122] 将2kg的式I活性成分以常规方式引入硬明胶胶囊中,以这样的方式使得每个胶囊含有20mg活性成分。

[1123] 实施例H:安瓿

[1124] 将1kg的式I活性成分在60L双蒸水中的溶液无菌过滤,转移到安瓿中,在无菌条件下冷冻干燥且在无菌条件下密封。每个安瓿含有10mg活性成分。