



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114426540 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 26

(21) 申请号 202111259067.3

(22) 申请日 2021.10.28

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114426540 A

(43) 申请公布日 2022.05.03

(66) 本国优先权数据  
202011180962.1 2020.10.29 CN

(73) 专利权人 上海拓界生物医药科技有限公司  
地址 201203 上海市浦东新区自由贸易试  
验区金科路3728号14幢103室

(72) 发明人 祝伟 刘彪 余健 邹昊 李正涛  
刘浩淼

(51) Int. Cl.  
C07D 471/18 (2006.01)  
A61K 31/55 (2006.01)  
A61P 31/18 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101212903 A, 2008.07.02

CN 101346376 A, 2009.01.14

CN 101360752 A, 2009.02.04

CN 113795491 A, 2021.12.14

WO 2005087766 A1, 2005.09.22

WO 2010011814 A1, 2010.01.28

WO 2010068253 A1, 2010.06.17

WO 2020197991 A1, 2020.10.01

WO 2016094198 A1, 2016.06.16

WO 2014100323 A1, 2014.06.26

WO 2016161382 A1, 2016.10.06

WO 2014200880 A1, 2014.12.18

徐鸣夏 主编.《药物化学》.中国医药科技出版社, 1996, 210-211.

审查员 柴伟

权利要求书1页 说明书24页

(54) 发明名称

吡啶并[1,2-a]吡嗪-1,8-二酮类前药衍生物、其制备方法及其应用

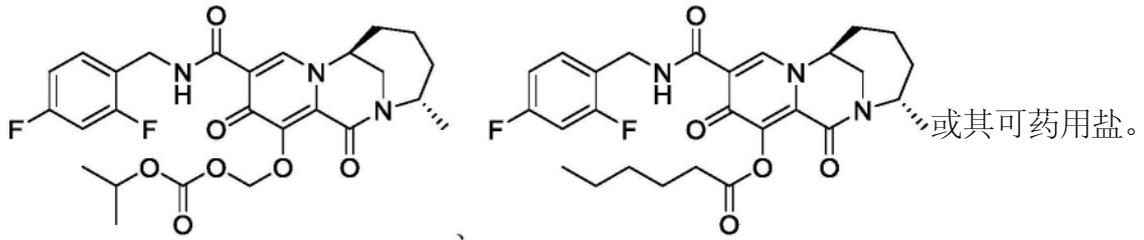
(57) 摘要

本公开中提供一种吡啶并[1,2-a]吡嗪-1,8-二酮类前药衍生物、其制备方法及其应用。具体而言,本公开提供式I所示化合物,



盐、立体异构体、旋转异构体、互变异构体、氘代物,其中式I中各取代基与说明书中的定义相同。所述式I所示化合物可用于治疗人类免疫缺陷病毒(HIV)感染。

1. 化合物, 其为



2. 一种药物组合物, 包括至少一种治疗有效量的如权利要求1所述的化合物以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

3. 权利要求1所述的化合物或权利要求2所述的药物组合物在制备治疗患有感染或处于患有感染风险中患者的HIV感染的药物中的用途。

## 吡啶并[1,2-a]吡嗪-1,8-二酮类前药衍生物、其制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本公开属于医药领域,涉及吡啶并[1,2-a]吡嗪-1,8-二酮类前药衍生物、其制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 人类免疫缺陷性病毒感染(HIV)是全世界的主要公共卫生问题。虽然靶向逆转录酶和蛋白酶的药物广泛使用并已显示一定有效性,特别是当组合应用时如鸡尾酒疗法,但是毒性和抗性株的发展限制了它们的有效性(Richman, D.D. Nature, (2001) 410:995-1001)。因此,需要开发新的HIV抑制剂。

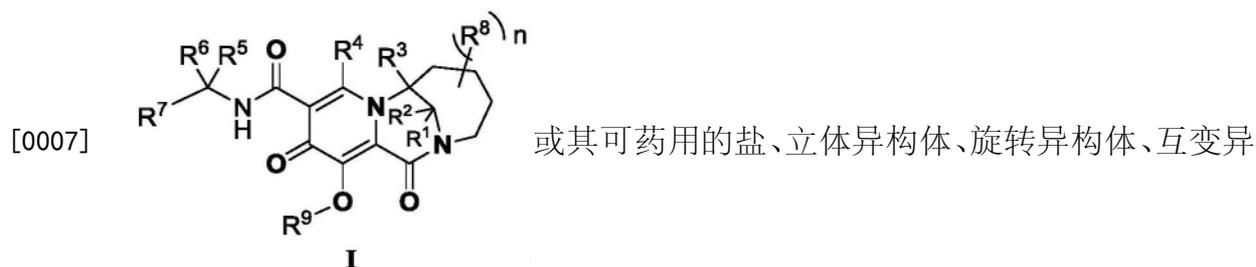
[0003] 另外,已知HIV病毒在感染的受试者中会发生突变(Tang et al., Drugs, (2012) 72(9) e1-e25),这也导致患者的HIV感染治疗策略复杂,而且HIV感染患者可能因患有其他病症而需要接受其他药物治疗,药物的相互作用会导致抗逆转录病毒治疗的评价标准失效。因此,需要开发更为有效的、降低药物相互作用的抗逆转录病毒的方法。

[0004] PCT/2020/087774公开了HIV整合酶抑制剂,所述化合物用于治疗HIV病毒感染,此PCT公布内容以引用方式结合到本文中。

[0005] 前药是给予患者时在体内重新生成各个母体分子的新化学实体,前药策略或方法可用以明显地增强药物的性质或克服药物成药缺陷。各种形式的前药策略为本领域技术人员熟知,同时现有技术中存在无数用于调节母体药物理化性质、药理或药代动力学性质的前药策略,且母体药物可供修饰的位点多,为此提供具有期望性质的前药存在很多不确定因素。

### 发明内容

[0006] 本公开提供了式I所示化合物,



构体、氘代物,

[0008] 其中, $R^1$ 或 $R^2$ 各自独立地选自氢、氘、卤素(如氟、氯、溴)、烷基(如 $C_{1-6}$ 烷基,包括但不限于甲基、乙基、丙基或异丙基)、环烷基(如 $C_{3-12}$ 环烷基,包括但不限于环丙基、环戊基、环己基)、杂环烷基(如3至12元杂环烷基,包括但不限于氧杂环丙烷、氧杂环丁烷、四氢吡咯基、四氢呋喃基),所述烷基、环烷基或杂环基任选被一个或多个选自烷基、环烷基(如 $C_{3-12}$ 环烷基,包括但不限于环丙基、环戊基、环己基)、杂环烷基(如3至12元杂环烷基,包括但不

限于氧杂环丙烷、氧杂环丁烷、四氢吡咯基、四氢呋喃基)、烷氧基(如 $C_{1-6}$ 烷氧基,包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)、芳基(如 $C_{6-12}$ 芳基,包括但不限于苯基或萘基)、杂芳基(如5-12元杂芳基,包括但不限于吡啶基或吡咯基)、硝基、腈基、羟基、卤素所取代,或者, $R^1$ 或 $R^2$ 与其相邻碳原子一起形成3元至12元碳环、杂环,优选3元至8元碳环、杂环,所述碳环或杂环任选被选自烷基(如 $C_{1-6}$ 烷基,包括但不限于甲基、乙基、丙基或异丙基)、卤素(如氟、氯、溴)、羟基、氨基、氧基、硝基、氰基、烷氧基(如 $C_{1-6}$ 烷氧基,包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)、环烷基(如 $C_{3-12}$ 环烷基,包括但不限于环丙基、环戊基、环己基)、杂环烷基(如3至12元杂环烷基,包括但不限于氧杂环丙烷、氧杂环丁烷、四氢吡咯基、四氢呋喃基)、芳基(如 $C_{6-12}$ 芳基,包括但不限于苯基或萘基)、杂芳基(如5-12元杂芳基,包括但不限于吡啶基或吡咯基)中的一个或多个取代基所取代;

[0009]  $R^3$ 选自氢、氘、卤素(如氟、氯、溴)、烷基(如 $C_{1-6}$ 烷基,包括但不限于甲基、乙基、丙基或异丙基),所述烷基任选被一个或多个环烷基、烷氧基、杂环烷基、芳基、杂芳基、硝基、腈基、羟基、卤素所取代;

[0010]  $R^4$ 选自氢、氘、卤素(如氟、氯、溴)、羟基、烷基(如 $C_{1-6}$ 烷基,包括但不限于甲基、乙基、丙基或异丙基)、烷氧基(如 $C_{1-6}$ 烷氧基,包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)、环烷基(如 $C_{3-12}$ 环烷基,包括但不限于环丙基、环戊基、环己基)、杂环烷基(如3至12元杂环烷基,包括但不限于氧杂环丙烷、氧杂环丁烷、四氢吡咯基、四氢呋喃基)、芳基(如 $C_{6-12}$ 芳基,包括但不限于苯基或萘基)、杂芳基(如5-12元杂芳基,包括但不限于吡啶基或吡咯基),所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自烷基(如 $C_{1-6}$ 烷基,包括但不限于甲基、乙基、丙基或异丙基)、烷氧基(如 $C_{1-6}$ 烷氧基,包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)、环烷基(如 $C_{3-12}$ 环烷基,包括但不限于环丙基、环戊基、环己基)、杂环烷基(如3至12元杂环烷基,包括但不限于氧杂环丙烷、氧杂环丁烷、四氢吡咯基、四氢呋喃基)、烷氧基(如 $C_{1-6}$ 烷氧基,包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)、烯基、炔基、芳基(如 $C_{6-12}$ 芳基,包括但不限于苯基或萘基)、杂芳基(如5-12元杂芳基,包括但不限于吡啶基或吡咯基)、硝基、腈基、羟基或卤素所取代;

[0011]  $R^5$ 或 $R^6$ 独立地选自氢、氘、卤素(如氟、氯、溴)、羟基、烷基(如 $C_{1-6}$ 烷基,包括但不限于甲基、乙基、丙基或异丙基)、烷氧基(如 $C_{1-6}$ 烷氧基,包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)、环烷基(如 $C_{3-12}$ 环烷基,包括但不限于环丙基、环戊基、环己基)、杂环烷基(如3至12元杂环烷基,包括但不限于氧杂环丙烷、氧杂环丁烷、四氢吡咯基、四氢呋喃基)、芳基(如 $C_{6-12}$ 芳基,包括但不限于苯基或萘基)、杂芳基(如5-12元杂芳基,包括但不限于吡啶基或吡咯基),所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自烷基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、烷氧基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、硝基、腈基、羟基或卤素所取代;或者, $R^5$ 或 $R^6$ 与其相邻碳原子一起形成5元至12元碳环、杂环、芳环或杂芳环,优选6元至8元碳环、杂环、芳环或杂芳环,所述碳环、杂环、芳环或杂芳环任选被选自烷基、卤素、羟基、氨基、氧基、羧基、硝基、氰基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基所取代;

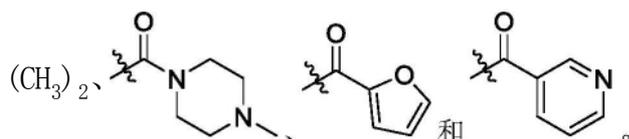
[0012]  $R^7$ 选自氢、氘、卤素(如氟、氯、溴)、羟基、硝基、腈基、烷基(如 $C_{1-6}$ 烷基,包括但不限于甲基、乙基、丙基或异丙基)、烷氧基(如 $C_{1-6}$ 烷氧基,包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基或异丙氧基)、环烷基(如 $C_{3-12}$ 环烷基,包括但不限于环丙基、环戊基、环己基)、杂环烷基(如



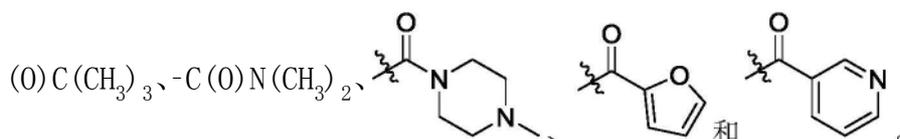
(O)-亚烷基-NH<sub>2</sub>和-(亚烷基)O-C(O)-亚烷基-NH<sub>2</sub>,其中所述烷基、烷氧基、亚烷基、亚烯基、杂环烷基和杂芳基各自任选被一个或多个羟基、卤素、烷基所取代,n为0或1。

[0022] 在另一些实施方案中,式I所示的化合物中R<sup>9</sup>选自-C(O)-C<sub>1-20</sub>烷基、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)-C<sub>1-20</sub>烷基、-C(O)-C<sub>1-20</sub>烷氧基、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)-C<sub>1-20</sub>烷氧基、-CH<sub>2</sub>OC(O)-N(C<sub>1-6</sub>烷基)<sub>2</sub>、-C(O)-杂环烷基、-C(O)-杂芳基、-C(O)-C<sub>1-6</sub>亚烷基-COOH、-C(O)-C<sub>2-6</sub>亚烯基-COOH、-C(O)-COOH、-S(O)<sub>2</sub>OH和-C(O)-C<sub>1-6</sub>亚烷基-NH<sub>2</sub>,其中所述烷基、烷氧基、亚烷基和亚烯基各自任选被一个或多个羟基所取代。

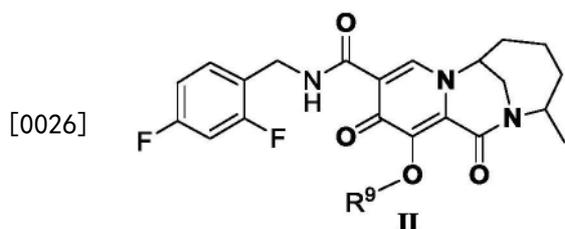
[0023] 在一些实施方案中,式I所示的化合物中R<sup>9</sup>选自-C(O)C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>、-C(O)C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>、-C(O)C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>、-C(O)OCH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)OCH<sub>3</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-C(O)CH(OH)CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH(OH)CH<sub>3</sub>、-C(O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-C(O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-C(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-C(O)CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>2</sub>COOH、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)CH<sub>2</sub>COOH、-C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、-C(O)CH(OH)CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH(OH)CH<sub>2</sub>COOH、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)CH(OH)CH<sub>2</sub>COOH、-C(O)CH<sub>2</sub>CH(OH)COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>2</sub>CH(OH)COOH、-C(O)CH(OH)CH(OH)COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH(OH)CH(OH)COOH、-C(O)-CH=CH-COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)-CH=CH-COOH、-C(O)-COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)-COOH、-S(O)<sub>2</sub>OH、-CH<sub>2</sub>OS(O)<sub>2</sub>OH、-C(O)N



[0024] 在另一些实施方案中,式I所示的化合物中R<sup>9</sup>选自-C(O)C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>、-C(O)C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>、-C(O)C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH<sub>3</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-



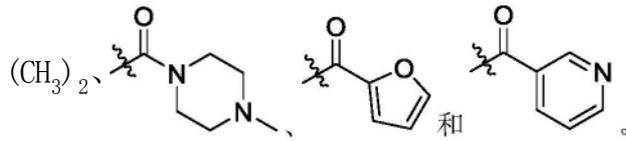
[0025] 另一方面,本公开所述式I所示化合物为



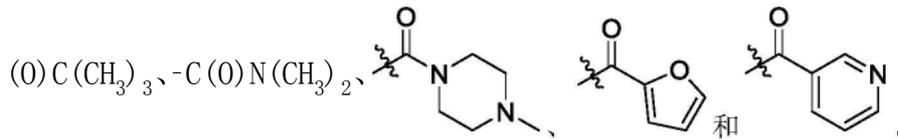
[0027] 其中,R<sup>9</sup>如前所定义。

[0028] 在另一些实施方案中,式II所示的化合物中R<sup>9</sup>选自-C(O)C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>、-C(O)C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>、-C(O)C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>、-C(O)OCH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)OCH<sub>3</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-C(O)CH(OH)CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH(OH)CH<sub>3</sub>、-C(O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-C(O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-C(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-C(O)CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>2</sub>COOH、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)CH<sub>2</sub>COOH、-C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、-C(O)CH(OH)CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH(OH)CH<sub>2</sub>COOH、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)CH(OH)CH<sub>2</sub>COOH、-C(O)CH<sub>2</sub>CH(OH)COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>2</sub>CH

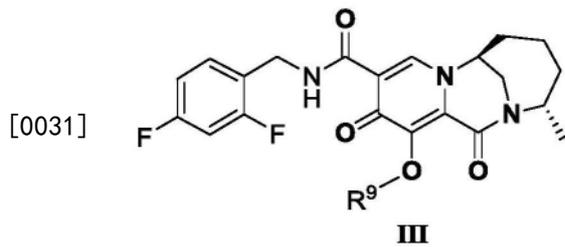
(OH)COOH、-C(O)CH(OH)CH(OH)COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)CH(OH)CH(OH)COOH、-C(O)-CH=CH-COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)-CH=CH-COOH、-C(O)-COOH、-CH<sub>2</sub>OC(O)-COOH、-S(O)<sub>2</sub>OH、-CH<sub>2</sub>OS(O)<sub>2</sub>OH、-C(O)N



[0029] 在一些实施方案中,式II所示的化合物中R<sup>9</sup>选自-C(O)C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>、-C(O)C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>、-C(O)C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH<sub>3</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)OC(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>OC(O)OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-C

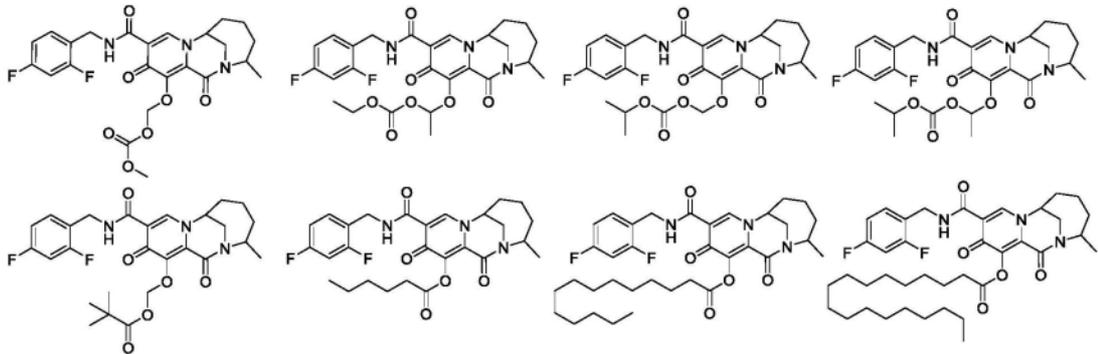


[0030] 另一方面,本公开所述式I所示化合物为

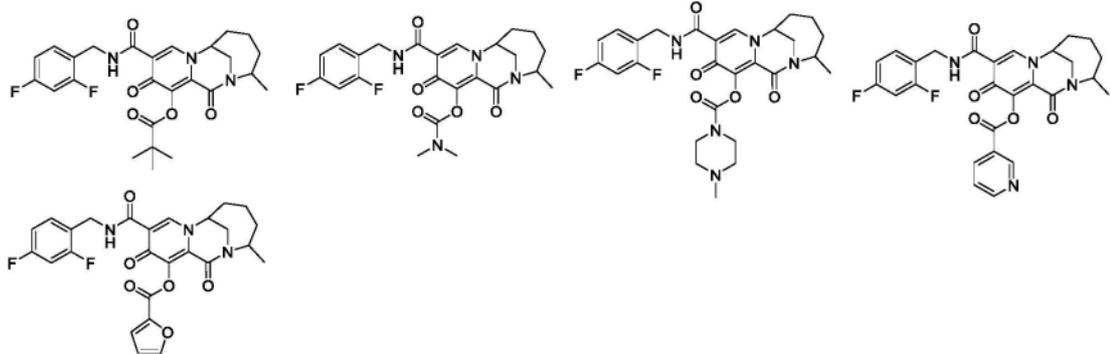


[0032] 其中,R<sup>9</sup>如前所定义。

[0033] 式I所示典型化合物,包括但不限于:

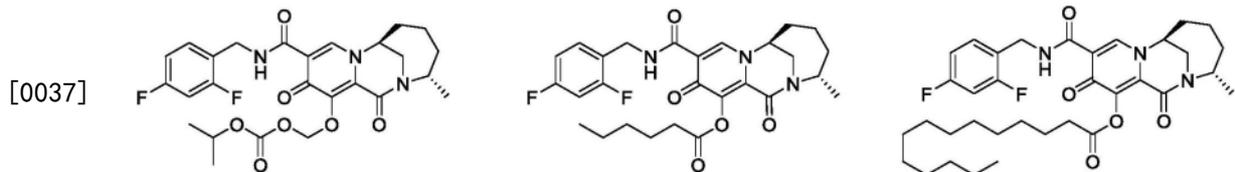


[0034]

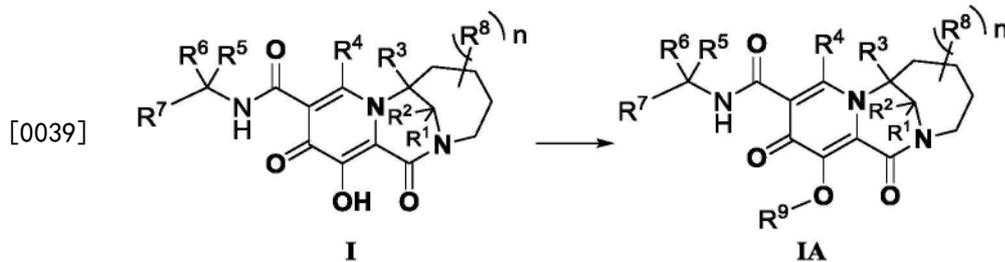


[0035] 或其可药用的盐、立体异构体、旋转异构体、互变异构体、氘代物。

[0036] 在一些实施方案中,式I所示化合物选自:



[0038] 本公开还提供一种制备式I化合物的方法,该方法包括:式IA化合物转化为式I化合物的步骤,

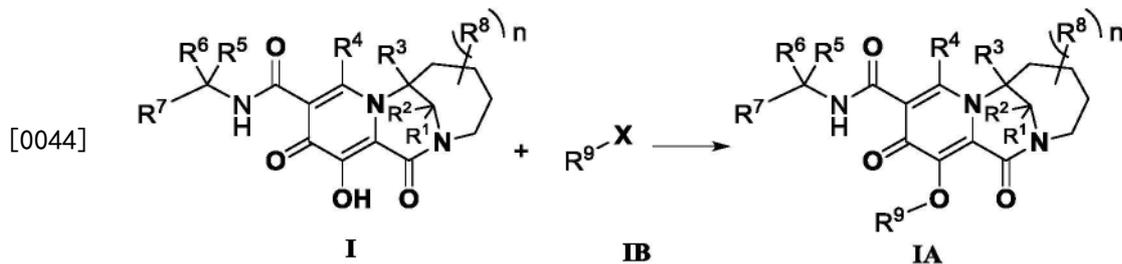


[0040] 其中, $R^1 \sim R^9$ 、 $n$ 如权利要求1中所定义。

[0041] 在一些实施方案中,式IA化合物转化为式I化合物步骤在碱性条件进行,所述碱选自有机碱或无机碱。所述有机碱选自但不限于三乙胺、吡啶或N,N-二甲基吡啶。所述无机碱选自但不限于碳酸钾、碳酸铯或氢氧化钠。

[0042] 在一些实施方案中,式I所示化合物在碳酸铯条件下转化为式IA所示化合物。

[0043] 另一方面,本公开制备式I化合物的方法,该方法包括:式I所示化合物与式IB所示化合物在碱性条件下反应以形成式IA所示化合物,



[0045] 其中,X为离去基团,所述离去基团选自卤素、-OTs、-OMs。

[0046] 本公开中还提供了一种药物组合物,包括至少一种治疗有效量的前述式I或II所示化合物或其可药用的盐以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0047] 另一方面,本公开中还提供了一种治疗患有感染或处于患有感染风险中患者的HIV感染的方法,其通过向所述患者施用治疗有效量的前述式I或II所示化合物或其可药用的盐或其立体异构体、旋转异构体或互变异构体,或前述的药物组合物。

[0048] 本公开中还涉及上述方案中所述化合物或其可药用的盐、立体异构体、旋转异构体、互变异构体、氘代物,或前述的药物组合物在制备治疗患有感染或处于患有感染风险中患者的HIV感染的药物中的用途。

[0049] 另一方面,本公开中所述化合物可药用盐选自无机盐或有机盐,本公开所述化合物与酸如三氟乙酸反应成相应盐,所述酸选自但不限于乙酸、盐酸、水杨酸、苹果酸、抗坏血酸、磷酸、柠檬酸、苯甲酸或富马酸。

[0050] 术语解释:

[0051] “可药用载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于任何已经被美国食品和药物管理局

批准对于人类或家畜动物使用可接受的任何助剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增香剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。

[0052] “可药用盐”是指本公开化合物的盐,这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性,且具有应有的生物活性。

[0053] “烷基”指饱和的脂族烃基团,包括1至20个碳原子的直链和支链基团。优选含有1至12个碳原子的烷基,更优选含有1至6个碳原子的烷基。非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基,及其各种支链异构体等。烷基可以是取代的或未取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,优选一个或多个以下基团,独立地选自芳基、杂芳基、卤素所取代。“烯基”包括具有2至12个碳原子的支链和直链烯烃或含有脂族烃基团的烯烃。例如“C<sub>2-6</sub>烯基”表示具有2、3、4、5或6个碳原子的烯基。烯基的实例包括但不限于,乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-甲基丁-2-烯基、3-甲基丁-1-烯基、1-戊烯基、3-戊烯基及4-己烯基。

[0054] “一价基团”是指一个化合物从“形式上”消除一个单价的原子或基团。“亚基”则是指化合物从“形式上”消除两个单价或一个双价形成的原子或原子团。示例“烷基”是指由烷烃分子中去除1个氢原子后余下的部分,包括1至20个碳原子的直链和支链一价基团。含有1至6个碳原子的烷基,非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基及其各种支链异构体等。烷基可以是取代的或未取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,优选一个或多个以下基团,独立地选自芳基、杂芳基、卤素所取代。

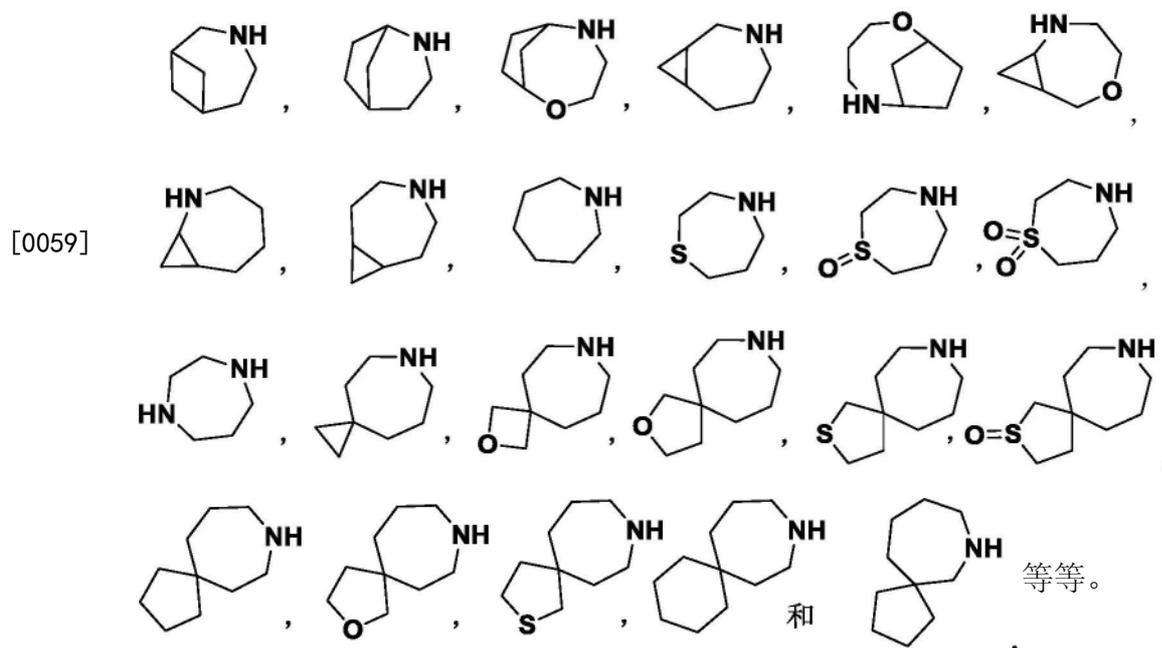
[0055] “亚烷基(-CH<sub>2</sub>-)”则表示烷烃分子中去除2个氢原子后余下的部分,包括1至20个碳原子的直链和支链亚基团。含有1至6个碳原子的亚烷基,非限制性实施例包括亚甲基(-CH<sub>2</sub>-)、亚乙基(如-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-或-CH(CH<sub>3</sub>)-)、亚丙基(如-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-或-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-)、亚丁基(如-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)。亚烷基可以是取代的或未取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,优选一个或多个以下基团,独立地选自芳基、杂芳基、卤素所取代。

[0056] 术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,环烷基环包含3至20个碳原子,优选包含3至12个碳原子,更优选包含3至6个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等;多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

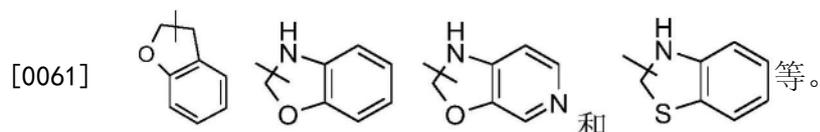
[0057] 所述环烷基环可以稠合于芳基、杂芳基或杂环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为环烷基,非限制性实例包括茛满基、四氢萘基、苯并环庚烷基等。环烷基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基、羧基或羧酸酯基。

[0058] 术语“杂环烷基(Heterocycloalkyl)”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,其包含3至20个环原子,其中一个或多个环原子为选自氮、氧或S(O)<sub>m</sub>(其中m是整数0至2)的杂原子,但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分,其余环原子为碳。优选包含3至12个环原子,其中1~4个是杂原子;更优选包含3至8个环原子。单环杂环基的非限制性实例包

括吡咯烷基、咪唑烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、二氢咪唑基、二氢呋喃基、二氢吡唑基、二氢吡咯基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。“杂环基”非限制性实例包括：

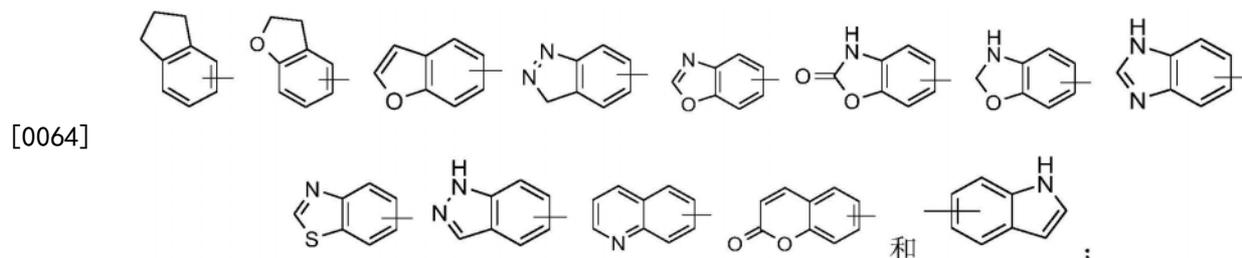


[0060] 所述杂环烷基环可以稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为杂环基,其非限制性实例包括:



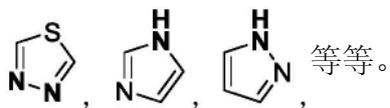
[0062] 杂环烷基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基、羧基或羧酸酯基。

[0063] 术语“芳基”指具有共轭的 $\pi$ 电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团,优选6至12元,例如苯基和萘基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为芳基环,其非限制性实例包括:

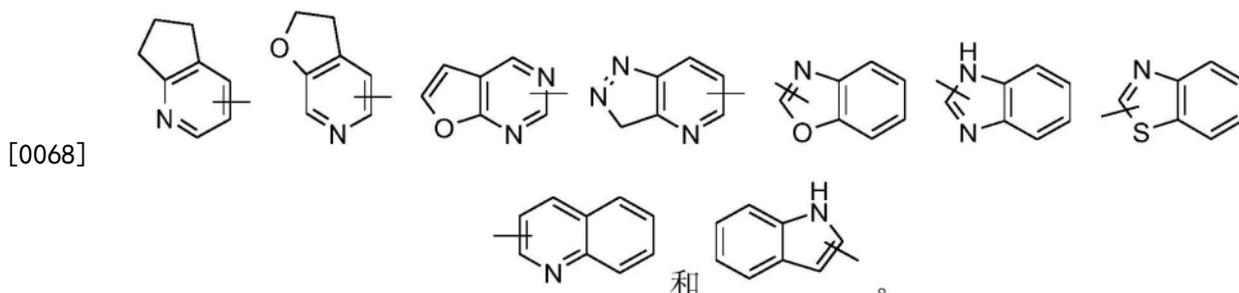


[0065] 芳基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、羧基或羧酸酯基,优选苯基。

[0066] 术语“杂芳基”指包含1至4个杂原子、5至14个环原子的杂芳族体系,其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选6至12元,更优选5元或6元。例如。其非限制性实例包括:咪唑基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡唑基、噁唑基、吡咯基、四唑基、吡啶基、嘧啶基、噻二唑、吡嗪,



[0067] 所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环,其非限制性实例包括:



[0069] 杂芳基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、羧基或羧酸酯基。

[0070] 术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基),其中烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括:甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、羧基或羧酸酯基。

[0071] 术语“杂环”指构成环的原子除碳原子外还有其他原子,其包括杂环烷基和杂芳环。

[0072] 术语“羟基”指-OH基团。

[0073] 术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

[0074] 术语“氨基”指-NH<sub>2</sub>。

[0075] 术语“氰基”指-CN。

[0076] 术语“硝基”指-NO<sub>2</sub>。

[0077] 术语“氧代”指=O取代基。

[0078] 术语“硫代”指=S取代基。

[0079] 术语“羧基”指-C(O)OH。

[0080] 术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)或-C(O)O(环烷基),其中烷基、环烷基如上所定义。术语“羧酸盐”指-C(O)O<sup>-</sup>Q<sup>+</sup>,其中Q<sup>+</sup>为药学上可接受的单价正离子(例如金属离子或铵根离子等)。

[0081] 术语“酰卤”指含有-C(O)-卤素的基团的化合物。

[0082] 术语“药学上可接受的单价阳离子”(Q<sup>+</sup>)包括(例如N(R<sup>y</sup>)<sub>4</sub>),其中R<sup>y</sup>为H或C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷

基)、碱金属离子(例如钾、钠及锂离子)、二环己胺离子及N-甲基D-还原葡萄糖胺离子。

[0083] 术语“药学上可接受的二价阳离子”(W<sup>2+</sup>)包括碱土金属离子,例如钙及镁离子,以及二价铝离子。还包括氨基酸阳离子,例如精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸等的单价或二价离子。药学上可接受的二价阳离子(W<sup>2+</sup>)可以被两个药学上可接受的单价阳离子(Q<sup>+</sup>)替换。

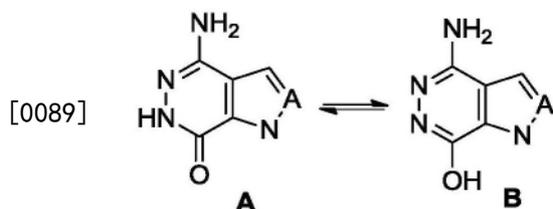
[0084] “任选地”或“任选”是指意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如“任选的被卤素或者氰基取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基”是指卤素或者氰基可以但不必须存在,该说明包括烷基被卤素或者氰基取代的情形和烷基不被卤素和氰基取代的情形。

[0085] “取代的”指基团中的一个或多个氢原子,优选最多5个,更优选1~3个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻,取代基仅处在它们的可能的化学位置,本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定(通过实验或理论)可能或不可能的取代。例如,具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和(如烯属)键的碳原子结合时可能是不稳定的。

[0086] “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,以及其他组分例如生理学可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0087] 虽然为简便起见将全部上述结构式画成某些异构体形式,但是本发明可以包括所有的异构体,如互变异构体、旋转异构体、几何异构体、非对映异构体、外消旋体和对映异构体。

[0088] 互变异构体是有机化合物的结构异构体,通过被称为互变异构化的化学反应容易相互转化。这种反应常导致氢原子或质子的形式迁移,伴随着单键和邻近的双键的转换。一些常见的互变异构对为:酮-烯醇、内酰胺-内酰亚胺。内酰胺-内酰亚胺平衡实例是在如下所示的A和B之间。



[0090] 本发明中的所有化合物可以被画成A型或B型。所有的互变异构形式在本发明的范围内。化合物的命名不排除任何互变异构体。“立体异构体”指通过相同的键键合但具有不同的三维结构的相同原子组成的化合物,其不可互换。本公开中预期各种立体异构体及其混合物,并且包括“对映异构体”,其指其分子彼此为不能重叠的镜像的两种立体异构体。

[0091] 本发明所述化合物的化学结构中,键“/”表示未指定构型,即如果化学结构中存在手性异构体,键“/”可以为“.....”或“/”,或者同时包含“.....”和“/”两种构型。

[0092] 本公开所述化合物或其可药用盐、或其异构体的任何同位素标记的衍生物都被本公开所覆盖。能够被同位素标记的原子包括但不限于氢、碳、氮、氧、磷、氟、氯、碘等。它们可分别被同位素同位素<sup>2</sup>H(D)、<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>F、<sup>31</sup>P、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>36</sup>C1和<sup>125</sup>I等代替。除另有说明,当一个位置被特别地指定为氘(D)时,该位置应理解为具有大于氘的天然丰度(其为0.015%)至少1000倍的丰度的氘(即,至少10%的氘掺入)。示例中化合物的具有大于氘的天然丰度可以是至少1000倍的丰度的氘、至少2000倍的丰度的氘、至少3000倍的丰度的氘、

至少4000倍的丰度的氘、至少5000倍的丰度的氘、至少6000倍的丰度的氘或更高丰度的氘。本公开还包括各种氘化形式的式(I)化合物。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式(I)化合物。在制备氘代形式的式(I)化合物时可使用市售的氘代起始物质,或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成,氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

### 具体实施方式

[0093] 以下结合实施例进一步描述本公开中,但这些实施例并非限制本公开中的范围。

[0094] 本公开中实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0095] 化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或/和质谱(MS)来确定的。NMR位移( $\delta$ )以 $10^{-6}$ (ppm)的单位给出。NMR的测定是用Bruker AVANCE-400核磁仪,测定溶剂为氘代二甲基亚砜(DMSO- $d_6$ ),氘代氯仿( $CDCl_3$ ),氘代甲醇( $CD_3OD$ ),内标为四甲基硅烷(TMS)。

[0096] HPLC的测定使用Waters ACQUITY ultra high performance LC、Shimadzu LC-20A systems、Shimadzu LC-2010HT series或安捷伦Agilent 1200LC高压液相色谱仪(ACQUITY UPLC BEH C18 1.7UM 2.1X50MM色谱柱、Ultimate XB-C18 3.0\*150mm色谱柱或Xtimate C18 2.1\*30mm色谱柱)。

[0097] MS的测定用Waters SQD2质谱仪,以正/负离子模式扫描,质量扫描范围为100~1200。

[0098] 手性HPLC分析测定使用Chiralpak IC-3 100×4.6mm I.D.,3 $\mu$ m、Chiralpak AD-3 150×4.6mm I.D.,3 $\mu$ m、Chiralpak AD-3 50×4.6mm I.D.,3 $\mu$ m、Chiralpak AS-3 150×4.6mm I.D.,3 $\mu$ m、Chiralpak AS-3 100×4.6mm I.D.,3 $\mu$ m、ChiralCel OD-3 150×4.6mm I.D.,3 $\mu$ m、Chiralcel OD-3 100×4.6mm I.D.,3 $\mu$ m、ChiralCel OJ-H 150×4.6mm I.D.,5 $\mu$ m、Chiralcel OJ-3 150×4.6mm I.D.,3 $\mu$ m色谱柱;

[0099] 薄层层析硅胶板使用烟台黄海HSGF254或青岛GF254硅胶板,薄层色谱法(TLC)使用的硅胶板采用的规格是0.15mm~0.2mm,薄层层析分离纯化产品采用的规格是0.4mm~0.5mm。

[0100] 快速柱纯化系统使用Combiflash Rf150(TELEDYNE ISCO)或者Isolara one(Biotage)。

[0101] 正向柱层析一般使用烟台黄海硅胶100~200目、200~300目或300~400目硅胶为载体,或者使用常州三泰预填预填超纯正相硅胶柱(40-63 $\mu$ m,60,12g,,25g,40g,80g或其他规格)。

[0102] 反相柱层析一般使用常州三泰预填超纯C18硅胶柱(20-45 $\mu$ m,100 Å,40g,80g,120g,220g或其他规格)。

[0103] 高压柱纯化系统使用Waters AutoP,配合使用Waters XBridge BEH C18 OBD Prep Column,130Å,5 $\mu$ m,19mm X 150mm或者Atlantis T30BD Prep Column,100Å,5 $\mu$ m,19mm X 150mm。

[0104] 手性制备柱使用DAICEL CHIRALPAK IC(250mm\*30mm,10 $\mu$ m)或Phenomenex-

Amylose-1 (250mm\*30mm, 5um)。

[0105] 本公开中的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成,或可购买自上海泰坦科技, ABCR GmbH&Co.KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, 韶远化学科技 (Accela ChemBio Inc)、达瑞化学品等公司。

[0106] 实施例中无特殊说明,反应能够均在氩气或氮气氛围下进行。

[0107] 氩气或氮气氛围是指反应瓶连接一个约1L容积的氩气或氮气气球。

[0108] 氢气氛围是指反应瓶连接一个约1L容积的氢气气球。

[0109] 加压氢化反应使用Parr 3916EKX型氢化仪和清蓝QL-500型氢气发生器或HC2-SS型氢化仪。

[0110] 氢化反应通常抽真空,充入氢气,反复操作3次。

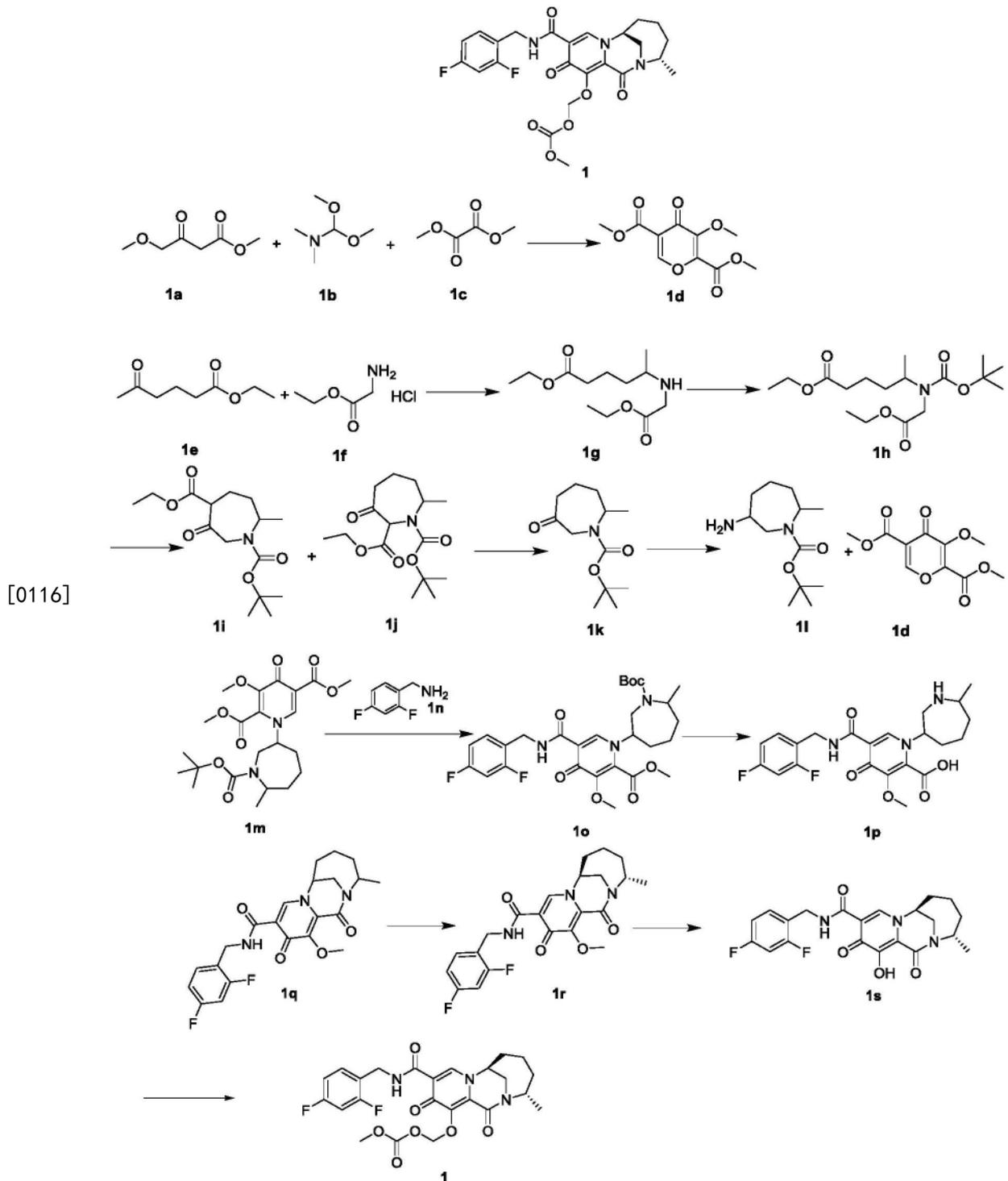
[0111] 实施例中无特殊说明,溶液是指水溶液。

[0112] 实施例中无特殊说明,反应的温度为室温,为20℃~30℃。

[0113] 实施例中的反应进程的监测采用薄层色谱法(TLC)。

[0114] 实施例1

[0115] (((3S,7S)-10-((2,4-二氟苯甲基)氨基甲酰)-3-甲基-1,11-二羰基-1,4,5,6,7,11-六氢-3H-2,7-亚甲基吡啶并[1,2-a][1,4]重氮基壬英-12-基)氧代)甲基甲基碳酸酯1



[0117] 第一步

[0118] 2-甲基 5-甲基 3-甲氧基-4-羰基-4H-吡喃-2,5-二羧酸酯1d

[0119] 将4-甲氧基乙酰乙酸甲酯(17.71mL,136.85mmol)和N,N-二甲基甲酰胺二甲缩醛(18.32mL,136.85mmol)的混合物在85℃加热搅拌,将草酸二甲酯(32.32g,273.70mmol)加入反应液中,搅拌至反应完全,降至室温,将含量30%的甲醇钠甲醇溶液(52.1542mL,273.7082mmol)加入到反应液中,继续搅拌反应2-4h,用50ml醋酸淬灭反应,经C18反相色谱柱纯化得到标题化合物1d(15.8g,产率48%)。

[0120] MS(ESI)m/z 265.3[M+Na]<sup>+</sup>

[0121] 第二步

[0122] 6-[(2-乙氧基-2-氧乙基)氨基]己酸乙酯1g

[0123] 将5-氧己酸乙酯(3g, 18.96mmol)溶于10mL甲醇中,再依次加入2-氨基乙酸乙酯盐酸盐(2.65g, 18.96mmol),三乙胺(2.64mL, 18.96mmol)和氰基硼氢化钠(2.38g, 37.93mmol),室温搅拌至基本反应完全,用20ml饱和碳酸氢钠淬灭反应,浓缩混合溶液,加入二氯甲烷(20mL×2),饱和盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到标题化合物1g(4g),直接用于下一步。

[0124] MS(ESI)m/z 246.2[M+H]<sup>+</sup>

[0125] 第三步

[0126] 5-((叔-丁氧基羰基)(2-乙氧基-2-羰基乙基)氨基)己酸乙酯1h

[0127] 将化合物1g(4g, 16.30mmol)溶于20mL二氯甲烷中,并依次加入二碳酸二叔丁酯(4.19mL, 19.57mmol)和三乙胺(6.80mL, 48.92mmol),室温下反应至基本反应完全,加水淬灭反应,分液,水洗,无水硫酸钠干燥,浓缩得到标题化合物1h(6g),直接用于下一步。

[0128] MS(ESI)m/z 368.3[M+H]<sup>+</sup>

[0129] 第四步

[0130] 1-(叔-丁基)-4-乙基-7-甲基-3-羰基吡庚环-1,4-二羧酸酯1i

[0131] 1-(叔-丁基)-2-乙基-7-甲基-3-羰基吡庚环-1,2-二羧酸酯1j

[0132] 将化合物1h(4g, 11.5797mmol)溶于10mL甲苯中,将叔丁醇钠(1.78g, 18.53mmol)加入到反应,反应液在110℃反应至基本反应完全,浓缩直接得到粗品标题化合物1i和化合物1j的混合物(6g),直接用于下一步。

[0133] MS(ESI)m/z 322.3[M+Na]<sup>+</sup>

[0134] 第五步

[0135] 叔-丁基-2-甲基-6-羰基吡庚环-1-羧酸酯1k

[0136] 将化合物1i和化合物1j的混合粗品(6g)溶于10mL水和10mL四氢呋喃的混合溶液中,再加入氢氧化钠(2.40g, 60.13mmol),反应在70℃下反应至基本反应完全。用乙酸乙酯(20mL×2)萃取,无水硫酸钠干燥,浓缩得到粗品。粗品通过C18反应进行纯化,得到标题化合物1k(0.9g, 四步总产率31%)。

[0137] MS(ESI)m/z 250.2[M+H]<sup>+</sup>

[0138] 第六步

[0139] 叔-丁基6-氨基-2-甲基吡庚环-1-羧酸酯1l

[0140] 将化合物1k(0.9g, 3.96mmol)溶于5毫升甲醇中,然后依次加入甲酸铵(2.50g, 39.60mmol)和10%钯碳(0.18g),氮气保护下,搅拌加热50度反应2小时,过滤,浓缩得到粗品,粗品通过C18反相纯化,得到标题化合物1l(400mg, 产率44.24%)。

[0141] MS(ESI)m/z 229.3[M+H]<sup>+</sup>

[0142] 第七步

[0143] 二甲基1-(1-(叔-丁氧基羰基)-7-甲基吡庚环-3-基)-3-甲氧基-4-羰基-1,4-二氢吡啶-2,5-二羧酸酯1m

[0144] 将化合物1l(424.25mg, 1.75mmol)溶于5毫升乙醇中,再将化合物1d(400mg, 1.75mmol)加入反应液中,在80℃反应至基本反应完全,减压浓缩得到粗品,经C18反相纯

化,得到标题化合物1m(400mg,产率50.46%)。

[0145] MS(ESI)m/z 453.5[M+H]<sup>+</sup>

[0146] 第八步

[0147] 二甲基1-(1-(叔-丁氧基羰基)-7-甲基吡啶庚环-3-基)-3-甲氧基-4-羰基-1,4-二氢吡啶-2,5-二羧酸酯1o

[0148] 将化合物1m(400mg,0.88mmol)溶于5毫升二甲苯,然后依次加入醋酸(530.84mg,8.84mmol)和2,4-二氟苄胺(126.53mg,0.88mmol),反应加热回流反应至基本反应完全,减压浓缩得到粗品,粗品通过C18反相纯化,得到标题化合物1o(350mg,70.25%)。

[0149] MS(ESI)m/z 564.5[M+H]<sup>+</sup>

[0150] 第九步

[0151] 5-((2,4-二氟苄基)氨基甲酰)-3-甲氧基-1-(7-甲基吡啶庚环-3-基)-4-羰基-1,4-二氢吡啶-2-羧酸1p

[0152] 将化合物1o(350mg,0.6210mmol)溶于10毫升甲醇中,依次加入氢氧化锂(52mg,1.2420mmol)和水(22mg,1.2420mmol),在70°C下反应至基本反应完全,浓缩得到粗品,再通过4摩尔/升的盐酸甲醇溶液(10mL)稀释,在室温下继续反应3小时。反应液通过浓缩得到化合物1p(370mg)。

[0153] MS(ESI)m/z 450.4[M+H]<sup>+</sup>

[0154] 第十步

[0155] N-(2,4-二氟苄基)-12-甲氧基-3-甲基-1,11-二羰基-1,4,5,6,7,11-六氢-3H-2,7-亚甲基吡啶并[1,2-a][1,4]重氮基壬英-10-甲酰胺1q

[0156] 将化合物1p(320mg,0.71mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(5mL),依次加入O-(7-氮杂苯并三氮唑-1-yl)-N,N,N,N-四甲基脲六氟磷盐(541.45mg,1.42mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.35mL,2.14mmol),在室温下反应至基本反应完全,反应液通过C18反相纯化,得到标题化合物1q(200mg,产率65.11%)。

[0157] MS(ESI)m/z 432.4[M+H]<sup>+</sup>

[0158] 第十一步

[0159] (3S,7S)-N-(2,4-二氟苄基)-12-甲氧基-3-甲基-1,11-二羰基-1,4,5,6,7,11-六氢-3H-2,7-亚甲基吡啶并[1,2-a][1,4]重氮基壬英-10-甲酰胺1r

[0160] 将化合物4m(60mg,0.138mmol)用超临界流体色谱在Chiralpak AD手性柱上进行拆分,得到标题化合物1r(19.4mg,32.33%,保留时间:2.238min)和对应异构体(3R,7R)-N-(2,4-二氟苄基)-12-甲氧基-3-甲基-1,11-二羰基-1,4,5,6,7,11-六氢-3H-2,7-亚甲基吡啶并[1,2-a][1,4]重氮基壬英-10-甲酰胺(23.3mg,产率38.83%,保留时间1.972min)。

[0161] 色谱条件如下:

[0162] 色谱柱:Chiralpak AD-3 50×4.6mm I.D.,3μm

[0163] 流动相:A:二氧化碳;B:乙醇(0.05%二乙胺)

[0164] 比例(B%):5-40%

[0165] 流速:4mL/min

[0166] 时间:4min

[0167] 第十二步

[0168] (3S,7S)-N-(2,4-二氟苯甲基)-12-羟基-3-甲基-1,11-二羰基-1,4,5,6,7,11-六氢-3H-2,7-亚甲基吡啶并[1,2-a][1,4]重氮基壬英-10-甲酰胺1s

[0169] 将化合物1r (46mg, 0.11mmol) 溶于3毫升乙腈, 再加入二溴化镁 (39.25mg, 0.21mmol), 在50°C下反应至基本反应完全, 浓缩得到粗品, 再通过C18反相纯化, 得到标题化合物1s (31mg, 收率70%)

[0170] MS (ESI) m/z 418.5 [M+H]<sup>+</sup>

[0171] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.39-10.46 (m, 1H) 8.49 (s, 1H) 7.36-7.45 (m, 1H) 7.20-7.28 (m, 1H) 7.02-7.11 (m, 1H) 4.77 (br s, 1H) 4.55 (br d, J=5.77Hz, 2H) 4.42-4.50 (m, 1H) 3.64-3.75 (m, 2H) 1.97-2.07 (m, 2H) 1.76-1.85 (m, 1H) 1.57-1.67 (m, 1H) 1.40-1.51 (m, 1H) 1.18 (d, J=6.53Hz, 3H) 0.97-1.01 (m, 1H).

[0172] 第十三步

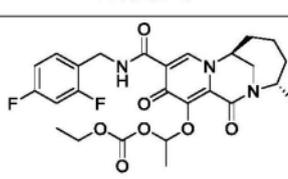
[0173] (((3S,7S)-10-((2,4-二氟苯甲基)氨基甲酰)-3-甲基-1,11-二羰基-1,4,5,6,7,11-六氢-3H-2,7-亚甲基吡啶并[1,2-a][1,4]重氮基壬英-12-基)氧代)甲基甲基碳酸酯1

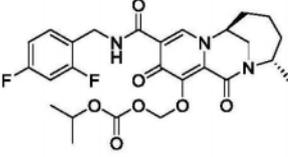
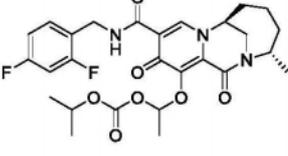
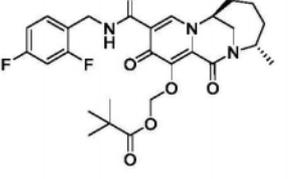
[0174] 将化合物1s (209mg, 0.50mmol) 悬浮于5mL乙腈中, 加入氯甲基碳酸甲基酯 (124mg, 1.00mmol), 碘化钾 (16.6mg, 0.1mmol) 和碳酸铯 (326mg, 1mmol)。混合物在80°C加热搅拌反应至基本反应完全。冷却至室温, 过滤除去残留的固体, 将滤液减压浓缩, 粗品经过反相纯化得标题化合物1c (124mg, 产率49%)。

[0175] MS (ESI) m/z 506.4 [M+H]<sup>+</sup>

[0176] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.37 (t, J=6.0Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.45-7.36 (m, 1H), 7.28-7.21 (m, 1H), 7.06 (dt, J=1.6, 8.4Hz, 1H), 5.85 (d, J=6.8Hz, 1H), 5.61 (d, J=6.8Hz, 1H), 4.76-4.71 (m, 1H), 4.58-4.47 (m, 3H), 3.70-3.57 (m, 5H), 2.10 (br d, J=15.2Hz, 1H), 2.06-1.96 (m, 1H), 1.84-1.72 (m, 1H), 1.64-1.54 (m, 1H), 1.46-1.34 (m, 1H), 1.14 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.02-0.88 (m, 1H)

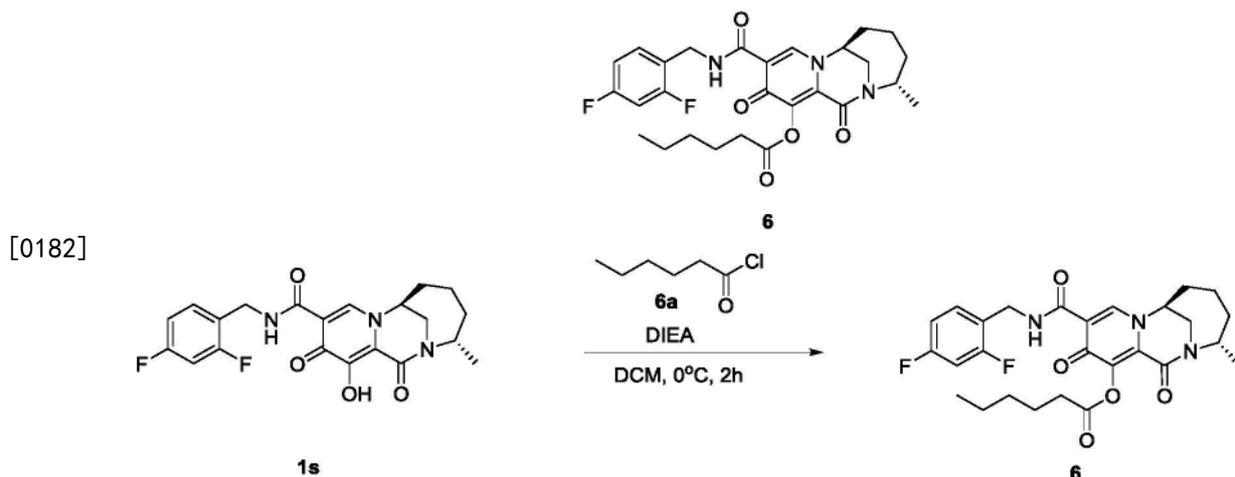
[0177] 参照实施例1第十三步合成得到化合物2-5, 相关数据见表1。

| 化合物      | 结构式   | <sup>1</sup> H NMR   | Mass                |
|----------|---|--|---------------------|
| [0178] 2 |  | <sup>1</sup> H NMR (400MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 10.41 - 10.33 (m, 1H), 8.63 - 8.59 (m, 1H), 7.44 - 7.37 (m, 1H), 7.28 - 7.20 (m, 1H), 7.07 (dt, J=2.4, 8.4 Hz, 1H), 6.20 (q, J=5.2 Hz, 1H), 4.76 - 4.69 (m, 1H), 4.60 - 4.47 (m, 3H), 4.00 - 3.91 (m, 2H), 3.73 - 3.59 (m, 1H), 3.52 - 3.44 (m, 1H), 2.16 - 2.04 (m, 1H), 2.03 - 1.94 (m, 1H), 1.84 - 1.70 (m, 1H), 1.58 (d, J=5.2 Hz, 3H), 1.45 - 1.33 (m, 1H), 1.28 - 1.21 (m, 1H), 1.16 - 1.08 (m, 6H), 1.03 - 0.88 (m, | 534.3<br>(ESI, M+H) |

|        |   |   |                        |
|--------|---|---|------------------------|
|        |   | 1H)   |                        |
|        |    | 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) $\delta$ = 10.37 (t, J=6.0 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.44 - 7.37 (m, 1H), 7.28 - 7.20 (m, 1H), 7.06 (dt, J=2.0, 8.8 Hz, 1H), 5.83 (d, J=6.8 Hz, 1H), 5.60 (d, J=6.0 Hz, 1H), 4.76 - 4.70 (m, 2H), 4.57 - 4.51 (m, 2H), 3.72 - 3.56 (m, 2H), 2.10 (br d, J=14.8 Hz, 1H), 2.04 - 1.94 (m, 1H), 1.85 - 1.71 (m, 1H), 1.64 - 1.53 (m, 1H), 1.46 - 1.33 (m, 1H), 1.28 - 1.22 (m, 1H), 1.18 (d, J=6.0 Hz, 6H), 1.14 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.03 - 0.90 (m, 1H)              | 534.4<br>(ESI,<br>M+H) |
| [0179] |    | 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) $\delta$ = 10.41 - 10.34 (m, 1H), 8.63 - 8.59 (m, 1H), 7.44 - 7.36 (m, 1H), 7.28 - 7.20 (m, 1H), 7.07 (dt, J=2.4, 8.4 Hz, 1H), 6.20 (q, J=5.2 Hz, 1H), 4.77 - 4.69 (m, 1H), 4.53 (d, J=6.0 Hz, 2H), 3.70 (s, 1H), 3.53 - 3.43 (m, 1H), 2.16 - 2.07 (m, 1H), 2.06 - 1.96 (m, 1H), 1.84 - 1.72 (m, 2H), 1.58 (d, J=5.2 Hz, 3H), 1.45 - 1.34 (m, 1H), 1.28 - 1.23 (m, 2H), 1.17 - 1.09 (m, 9H), 0.97 (s, 1H)  | 548.4<br>(ESI,<br>M+H) |
|        |  | 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) $\delta$ = 10.38 (t, J=5.9 Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.45 - 7.36 (m, 1H), 7.28 - 7.19 (m, 1H), 7.06 (dt, J=2.0, 8.4 Hz, 1H), 5.80 (d, J=6.4 Hz, 1H), 5.61 (d, J=6.4 Hz, 1H), 4.54 (br d, J=6.0 Hz, 2H), 3.71 - 3.64 (m, 1H), 3.55 (br d, J=14.8 Hz, 1H), 3.35 - 3.17 (m, 2H), 2.09 (br d, J=15.2 Hz, 1H), 2.00 (td, J=6.8, 14.0 Hz, 1H), 1.84 - 1.70 (m, 1H), 1.66 - 1.52 (m, 1H), 1.45 - 1.32 (m, 1H), 1.12 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.08 (s, 9H), 1.01 - 0.88 (m, 1H) | 532.3<br>(ESI,<br>M+H) |

[0180] 实施例6

[0181] (3S,7S)-10-((2,4-二氟苯基)氨基甲酰)-3-甲基-1,11-二羰基-1,4,5,6,7,11-六氢-3H-2,7-亚甲基吡啶并[1,2-a][1,4]重氮基壬英-12-基己酸酯6



[0183] 第一步

[0184] 将化合物1s (209mg, 0.50mmol) 和N,N-二异丙基乙胺(0.184mL, 1.0mmol) 溶解于5mL二氯甲烷中。将溶液冰浴冷却至0度, 缓慢滴加己酰氯(134mg, 1.0mmol) 反应液0度下搅拌2小时。将反应液减压浓缩, 粗品经过反相纯化得标题化合物6(121mg, 产率47%)。

[0185] MS (ESI) m/z 515.3 [M+H]<sup>+</sup>

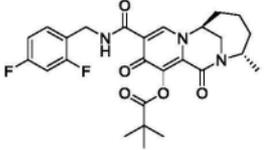
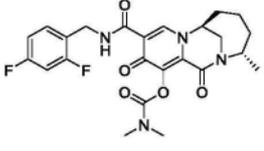
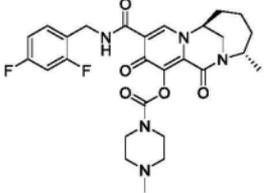
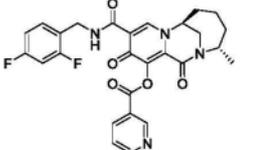
[0186] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.26 (t, J=6.0Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.39 (dt, J=7.2, 8.8Hz, 1H), 7.27-7.19 (m, 1H), 7.10-6.99 (m, 1H), 4.77 (br d, J=2.4Hz, 1H), 4.59-4.39 (m, 3H), 3.69 (br s, 2H), 2.56-2.51 (m, 1H), 2.49-2.46 (m, 1H), 2.12 (br d, J=15.2Hz, 1H), 2.05-1.94 (m, 1H), 1.88-1.72 (m, 1H), 1.68-1.53 (m, 3H), 1.49-1.26 (m, 5H), 1.14 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.00-0.81 (m, 4H)

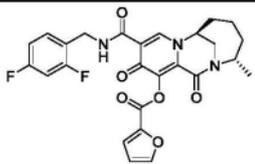
[0187] 参照实施例2的合成步骤合成得到化合物7-13, 相关数据见表2。

| 化合物 | 结构式 | <sup>1</sup> H NMR   | Mass                |
|-----|-----|--|---------------------|
| 7   |     | <sup>1</sup> H NMR (400MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 10.26 (t, J=6.0 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.43 - 7.35 (m, 1H), 7.27 - 7.18 (m, 1H), 7.10 - 7.01 (m, 1H), 4.78 (br s, 1H), 4.61 - 4.51 (m, 2H), 4.51 - 4.42 (m, 1H), 3.70 (br s, 2H), 2.12 (br d, J=15.2 Hz, 1H), 2.00 (td, J=6.4, 13.6 Hz, 1H), 1.87 - 1.72 (m, 1H), 1.67 - 1.54 (m, 3H), 1.51 - 1.31 (m, 4H), 1.31 - 1.19 (m, 19H), 1.14 (d, J=6.8 Hz, 3H), 0.97 - 0.88 (m, 1H), 0.88 - 0.80 (m, 3H) | 628.4<br>(ESI, M+H) |
| 8   |     | <sup>1</sup> H NMR (400MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 10.27 (t, J=6.0 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.43 - 7.35 (m, 1H), 7.27 - 7.18 (m, 1H), 7.10 - 7.00 (m, 1H), 4.78 (br s, 1H), 4.61 - 4.50 (m, 2H), 4.50 - 4.42 (m, 1H), 3.70 (br s, 2H), 2.12 (br d, J=15.2 Hz, 1H), 2.06 - 1.93 (m, 1H), 1.88 - 1.72 (m, 1H), 1.67 - 1.53 (m, 3H), 1.51 - 1.31 (m, 4H), 1.31-1.17 (m, 27H), 1.14 (d, J=6.8 Hz, 3H), 0.97 - 0.88 (m, 1H), 0.88 - 0.80 (m, 3H)             | 684.5<br>(ESI, M+H) |

[0188]

[0189]

|    |   |  |                     |
|----|---|--|---------------------|
| 9  |    | <p><sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 10.23 (t, J=6.0 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.41 - 7.30 (m, 1H), 7.26 - 7.18 (m, 1H), 7.09- 7.00 (m, 1H), 4.75 (br s, 1H), 4.60 - 4.40 (m, 3H), 3.75-3.71 (m, 2H), 2.15 (br d, J=15.2 Hz, 1H), 2.00 (td, J=6.4, 13.6 Hz, 1H), 1.90 - 1.75 (m, 1H), 1.65 - 1.60 (m, 1H), 1.50 - 1.40 (m, 1H), 1.27 (s, 9H), 1.15 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.00 - 0.80 (m, 1H).</p>   | 502.3<br>(ESI, M+H) |
| 10 |    | <p><sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 10.31 (t, J=6.0 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.41 - 7.37 (m, 1H), 7.26 - 7.23 (m, 1H), 7.09- 7.06 (m, 1H), 4.76 (br s, 1H), 4.54 - 4.49 (m, 2H), 4.49 - 4.47 (m, 1H), 3.71-3.68 (m, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 2.10 (br d, J=15.2 Hz, 1H), 2.00 (td, J=6.4, 13.6 Hz, 1H), 1.85 - 1.75 (m, 1H), 1.65 - 1.60 (m, 1H), 1.50 - 1.40 (m, 1H), 1.15 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.00 - 0.80 (m, 1H).</p>  | 489.2<br>(ESI, M+H) |
| 11 |   | <p><sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 10.26 (t, J=6.0 Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.42 - 7.40 (m, 1H), 7.28 - 7.22 (m, 1H), 7.10 - 7.07 (m, 1H), 4.80 (br s, 1H), 4.56 - 4.50 (m, 2H), 4.50 - 4.48 (m, 1H), 3.75-3.71 (m, 2H), 3.50-3.40 (m, 2H), 3.35-3.20 (m, 2H), 3.06-3.00 (m, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.12 (br d, J=15.2 Hz, 1H), 2.00 (td, J=6.4, 13.6 Hz, 1H), 1.85 - 1.75 (m, 1H), 1.65 - 1.58 (m, 1H), 1.50 - 1.35 (m, 1H), 1.15 (d, J=6.8 Hz, 3H), 0.97 - 0.80 (m, 1H).</p>      | 544.3<br>(ESI, M+H) |
| 12 |  | <p>10.22 (br t, J=6.0 Hz, 1H), 9.18 (br s, 1H), 8.91 (dd, J=1.6, 4.8 Hz, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.40 (br d, J=8.0 Hz, 1H), 7.65 (dd, J=4.8, 7.6 Hz, 1H), 7.47 - 7.32 (m, 1H), 7.30 - 7.13 (m, 1H), 7.06 (dt, J=1.6, 8.4 Hz, 1H), 4.84 (br s, 1H), 4.54 (br d, J=5.6 Hz, 2H), 4.49 - 4.36 (m, 1H), 3.83 - 3.63 (m, 2H), 2.16 (br d, J=14.4 Hz, 1H), 1.99 (td, J=6.8, 14.0 Hz, 1H), 1.89 - 1.76 (m, 1H), 1.67 - 1.57 (m, 1H), 1.48 - 1.36 (m, 1H), 1.13 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.05 - 0.78 (m, 1H)</p> | 523.2<br>(ESI, M+H) |

|        |    |   |  |                                 |
|--------|----|---|--|---------------------------------|
| [0190] | 13 |  | <p>10.23 (t, J=5.6 Hz, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.09 (d, J=0.8 Hz, 1H), 7.49 (d, J=3.6 Hz, 1H), 7.45 - 7.36 (m, 1H), 7.29 - 7.18 (m, 1H), 7.11 - 7.01 (m, 1H), 6.79 (dd, J=1.6, 3.6 Hz, 1H), 4.83 (br d, J=1.6 Hz, 1H), 4.60 - 4.50 (m, 2H), 4.49 - 4.39 (m, 1H), 3.84 - 3.65 (m, 2H), 2.16 (br d, J=15.6 Hz, 1H), 2.06 - 1.95 (m, 1H), 1.89 - 1.77 (m, 1H), 1.68 - 1.58 (m, 1H), 1.49 - 1.35 (m, 1H), 1.14 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.01 - 0.82 (m, 1H)</p> | <p>512.2<br/>(ESI,<br/>M+H)</p> |
|--------|----|---|--|---------------------------------|

[0191] 生物学评价

[0192] 以下结合测试例进一步描述解释本公开中,但这些实施例并非意味着限制本公开中的范围。

[0193] 测试例1、Intergrase酶体外活性检测实验:基于时间分辨荧光的链转移实验(HTRF based strand transfer assay)

[0194] 1、实验仪器及材料

|        |       |             |          |
|--------|-------|-------------|----------|
| [0195] | 仪器名称  | 设备厂家        | 型号       |
|        | 恒温振荡器 | IMB         | MB-1002A |
|        | 读板仪   | PerkinElmer | Envision |

[0196] 将N端带有6个HIS-tag的HIV整合酶(IN F185K/C280S)蛋白用大肠杆菌BL21(DE3)表达系统表达。用基于镍柱的亲和层析的方法纯化得到,纯度为85%,浓度为3.85mg/ml的重组HIS-IN蛋白(南京金斯瑞生物科技有限公司)。分装后-80℃保存。

[0197] N155H突变体HIV整合酶(IN F185K/C280S/N155H)表达方法与野生型类似均有由南京金斯瑞生物科技有限公司生产,纯度为85%,浓度为1.95mg/ml。

[0198] 实验所需脱氧核苷酸序列信息如下,由南京金斯瑞生物科技有限公司生产

|        |                      |     |        |        |
|--------|----------------------|-----|--------|--------|
| [0199] | 序列(5' to 3')         | 碱基数 | 5'末端修饰 | 3'末端修饰 |
|        | ATGTGGAAAATCTCTAGCA  | 19  | CY5    |        |
|        | ACTGCTAGAGATTTCCACAT | 21  | CY5    |        |
|        | ACAGGCCTAGCACGCGTCG  | 19  |        | 生物素    |
|        | CGACGCGTGCTAGGCCTGT  | 19  |        | 生物素    |

[0200] 实验所需其它试剂信息如下

|        |                         |       |             |
|--------|-------------------------|-------|-------------|
| [0201] | 试剂                      | 品牌    | 货号          |
|        | 氯化镁 六水合物                | sigma | M7304-100G  |
|        | 氯化锰(II) 四水合物            | sigma | M8054-100G  |
|        | glycerol                | sigma | G9012-500ML |
|        | 1M DTT                  | sigma | 43816-10ML  |
|        | Trizma <sup>®</sup> 盐酸盐 | sigma | T3253-250G  |

|        |                                     |              |                      |
|--------|-------------------------------------|--------------|----------------------|
| [0202] | 1M HEPES                            | thermofisher | 15630080             |
|        | 5M NaCl                             | sigma        | S6546-1L             |
|        | 30% Brij™-35                        | thermofisher | 20150                |
|        | EDTA                                | sigma        | EDS-500G             |
|        | Bovine Serum Albumin                | sigma        | B2064-50G            |
|        | LANCE Eu-W8044-labeled streptavidin | Perkin Elmer | (Cat: AD0060, 50 ug) |
|        | 384 孔板                              | corning      | 3573                 |
|        | 七水合硫酸锌                              | Taitan       | G80608A              |

[0203] 2、实验步骤

[0204] 将50μM Cy-5标记的(donor)两条序列互补的DNA序列以及生物素(biotin)标记的DNA(acceptor)互补序列分别加入退火溶液中(50mM Tris[pH 7.6],10mM MgCl<sub>2</sub>)加热至95℃20分钟,然后缓慢冷却至室温,使用前储存在-20℃。

[0205] 待测化合物用DMSO溶解至10mM。用反应液(20mM Hepes[pH 7.5],7.5mM MgCl<sub>2</sub>,1mM DTT,10%glycerol[w/v],0.1mg/ml bovine serum albumin[BSA],0.05% Brij-35,10μM ZnSO<sub>4</sub>,5mM NaCl)稀释至不同浓度。基于时间分辨荧光的链转移实验在384孔板中进行,将终浓度为50nM donor DNA和200nM 6HIS-IN以1:1体积比混合在反应液中,冰上孵育10分钟。将12.5μl酶和底物的混合液与同体积的待测浓度化合物同比例混合,冰上孵育10分钟后加入12.5μl的10nM acceptor DNA 37℃震荡混匀2个小时。反正终止后每孔加入25μl 12nM LANCE Eu-W8044-labeled streptavidin的检测试剂。在室温孵育3个小时。时间分辨荧光信号使用Envision读板仪(PerkinElmer激发光波长330nm,发射光波长665/620nm,)测量每个孔中的荧光信号。化合物对酶活的抑制活性IC<sub>50</sub>值用四参数logit方法计算。下列公式中x代表化合物浓度的对数形式;F(x)代表效应值(该浓度条件下对酶活的抑制率): $F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B)))+D$ 。A,B,C和D为四个参数。用Primer premier 6.0将IC<sub>50</sub>值进一步计算为最佳拟合曲线中50%酶活抑制所需的化合物浓度。

[0206] 本公开中化合物1s对HIV Integrase酶体外活性通过以上的试验进行测定,测得的IC<sub>50</sub>值见表3。

|        |             |                       |
|--------|-------------|-----------------------|
| [0207] | 化合物         | IC <sub>50</sub> (nM) |
|        | 多替拉韦        | 20.25                 |
|        | Bictegravir | 13.17                 |
|        | 1s          | 8.01                  |

[0208] 本公开中化合物1s对N155H突变型HIV Integrase酶体外活性通过以上的试验进行测定,测得的IC<sub>50</sub>值见表4。

[0209] 表4

|        |             |                       |
|--------|-------------|-----------------------|
| [0210] | 编号          | IC <sub>50</sub> (nM) |
|        | 多替拉韦        | 7.34                  |
|        | Bictegravir | 2.51                  |

|    |      |
|----|------|
| 1s | 8.89 |
|----|------|

[0211] 测试例2、抗HIV病毒及细胞毒性实验

[0212] 1、实验仪器及材料

|        |         |             |      |
|--------|---------|-------------|------|
| [0213] | 仪器名称    | 设备厂家        | 型号   |
|        | 微孔板读板仪  | PerkinElmer | 2105 |
|        | CO2培养箱  | Thermo      | 3111 |
|        | 二级生物安全柜 | Thermo      | 1389 |

[0214] 实验所需其它试剂信息如下

|        |                      |         |           |
|--------|----------------------|---------|-----------|
| [0215] | 试剂                   | 品牌      | 货号        |
|        | Bovine Serum Albumin | sigma   | B2064-50G |
|        | Dimethyl sulfoxide   | Sigma   | C34557    |
|        | CellTiter-Glo        | Promega | G7570     |
|        | 96孔板                 | corning | 3599      |
|        | 384孔板                | corning | 3573      |

[0216] 2、实验步骤

[0217] 将HIV-1IIIIB和MT-4 (NIH AIDS项目) 细胞于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中共培养1小时。同时稀释受试化合物和参照化合物(AZT, sigma)用DMSO倍比稀释好后加入细胞培养板中。随后将感染细胞以每孔10,000个细胞的密度接种于细胞培养板中。细胞培养液中DMSO终浓度为0.5%。将细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养5天。细胞毒性测试和抗病毒实验平行进行,实验的细胞为未感染的MT-4细胞。细胞活力由CellTiter-Glo (Promega) 测定。

[0218] 化合物的抗病毒活性和细胞毒性分别由化合物对病毒引起的抑制率(%)和细胞活率(%)表示。计算公式如下:

[0219] 抑制率(%) = (测试孔读值 - 病毒对照平均值) / (细胞对照平均值 - 病毒对照平均值) x 100

[0220] 细胞活率(%) = (测试孔读值 - 培养液对照平均值) / (细胞对照平均值 - 培养液对照平均值) x 100

[0221] 应用GraphPad Prism软件(Version 5)计算化合物的EC<sub>50</sub>和CC<sub>50</sub>值。EC<sub>50</sub>和CC<sub>50</sub>值用四参数logit方法。下列公式中x代表化合物浓度的对数形式;F(x)代表效应值(抑制率或细胞活率): $F(x) = (A-D) / (1 + ((x/C)^B)) + D$ 。A, B, C和D为四个参数。不同的浓度对应不同的抑制率,做出一条反曲线,从曲线上算出待测化合物的EC<sub>50</sub>和CC<sub>50</sub> (Primer premier 6.0)。

[0222] 本公开中化合物在MT4细胞中的抗病毒活性和细胞毒性通过以上的试验进行测定,测得的IC<sub>50</sub>值见表5。

[0223] 表5

|        |             |                       |                       |
|--------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| [0224] | 编号          | EC <sub>50</sub> (nM) | CC <sub>50</sub> (uM) |
|        | 多替拉韦        | 0.881                 | 7.45                  |
|        | Bictegravir | 0.343                 | 1.36                  |
|        | 1s          | 0.843                 | 11.79                 |

[0225] 测试例3、体外血浆稳定性实验

[0226] 1.目的

[0227] 测定受试物对在人和大鼠血浆中稳定性。

[0228] 2.材料

|        |    |                |    |                   |
|--------|----|----------------|----|-------------------|
| [0229] | 种属 | 品系             | 性别 | 供应商               |
|        | 人  | N/A            | 混合 | BioreclamationIVT |
|        | 大鼠 | Sprague Dawley | 混合 | BioreclamationIVT |

[0230] 血浆保存于-80℃冰箱。

[0231] 3.试验设计

[0232] 3.1化合物工作液的制备

[0233] 将受试物制备成10mM的DMSO储备液。通过混合3μL 10mM储备液和147μL乙腈稀释得到200μM药物溶液。

[0234] 3.2试验方法

[0235] 将2.5μL 200μM受试物工作液加入497.5μL预孵育过的血浆中,受试物浓度为1μM,最终的有机溶剂含量为0.5%。试验样品进行双平行制备。反应于60rpm、37℃水浴中进行孵育。分别在0、15、30、60、120、240和420分钟取50μL样品,用300μL含内标乙腈(1μM甲苯磺丁脲)进行反应终止。所有样品涡旋10分钟,之后于3220g离心30分钟进行蛋白沉淀。取250μL上清到新的板子,再将新板子于3220g离心20分钟。转移150μL上清液到进样板,加入150μL纯水混匀,用于UPLC-MS/MS分析。

[0236] 4.数据分析

[0237] 所得样品由离子色谱图定量,根据待测化合物或阳性对照的峰面积来计算残余率。斜率k使用Microsoft Excel由剩余率的自然对数值对孵育时间的线性回归测定。

[0238] 体外半衰期(in vitro t<sub>1/2</sub>)由斜率计算:in vitro t<sub>1/2</sub> = -(0.693/k)

[0239] 测得的血浆半衰期见表6。

[0240] 表6本公开化合物血浆半衰期

|        |       |             |            |
|--------|-------|-------------|------------|
| [0241] | 化合物编号 | 大鼠血浆半衰期(分钟) | 人血浆半衰期(分钟) |
|        | 3     | 1.34        | 79.04      |
|        | 5     | N/A         | 1166       |
|        | 9     | 2.74        | N/A        |
|        | 10    | ∞           | N/A        |
|        | 11    | 50513       | N/A        |
|        | 12    | 1.79        | N/A        |
|        | 13    | 1.67        | N/A        |

[0242] 注:N/A未检测

[0243] 测试例4、本公开化合物的药代动力学测试

[0244] 1、摘要

[0245] 以大鼠为受试动物,应用LC/MS/MS法测定了大鼠静脉注射以及灌胃给予本公开化合物后不同时刻血浆中的药物浓度。研究本发明化合物在大鼠体内的药代动力学行为,评价其药动学特征。

[0246] 2、试验方案

[0247] 2.1试验药品

[0248] 化合物1s、化合物3、化合物6和化合物7。

[0249] 2.2试验动物

[0250] 每组健康6-8周雄性SD大鼠3只。

[0251] 2.3药物配制

[0252] 静脉注射给药:称取一定量药物,加10%体积的N,N-二甲基乙酰胺、33%体积的三甘醇和57%体积的生理盐水配制成1mg/mL的无色澄清透明液体;

[0253] 灌胃给药:称取一定量药物,加0.5%质量的羟丙甲纤维素、0.1%体积的吐温80和99.6%体积的生理盐水配制成1mg/mL的白色悬浊液。

[0254] 2.4给药

[0255] SD大鼠禁食过夜后,静脉注射灌胃给药,给药剂量为1mg/kg。或者灌胃给药,化合物1s给药剂量为5mg/kg,实施例3给药剂量为6.39mg/kg,实施例6给药剂量为6.2mg/kg,实施例7给药剂量为7.5mg/kg。

[0256] 3.操作

[0257] 大鼠静脉注射给药本公开化合物,给药后0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24小时由颈静脉采血0.2mL,置于含EDTA-K2的试管中,4℃、4000转/分钟离心5分钟分离血浆,于-75℃保存。

[0258] 或者大鼠灌胃给药本公开化合物,给药后0.25、0.5、1、2、4、8、24小时由颈静脉采血0.2mL,置于含EDTA-K2的试管中,4℃、3500转/分钟离心10分钟分离血浆,于-75℃保存。

[0259] 测定不同浓度的药物灌胃给药后大鼠血浆中的化合物1s含量:取给药后各时刻的大鼠血浆30μL,加入内标地塞米松的乙腈溶液200μL(50ng/mL),涡旋混合30秒,4℃、4700转/分钟离心15分钟,血浆样品取上清液加水稀释三倍,取2.0μL进行LC/MS/MS分析。

[0260] 4、药代动力学参数结果

[0261] 本公开中化合物的药代动力学参数如下:

| 编 号           |                  | 药代实验 (检测化合物 1s)             |                  |                      |                                  |                                |       |
|---------------|------------------|-----------------------------|------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------|
|               |                  | 最大血药浓度                      | 曲线下面积            | 半衰期                  | 清除率                              | 表观分布容积                         | 生物利用度 |
|               |                  | C <sub>max</sub><br>(ng/mL) | AUC<br>(ng/mL*h) | T <sub>1/2</sub> (h) | CL <sub>obs</sub><br>(ml/min/kg) | V <sub>ss_obs</sub><br>(mL/kg) | F(%)  |
| [0262] 化合物 1s | IV<br>1 mg/kg    | -                           | 206320±12765     | 21.5                 | 0.045                            | 79.4                           | 23.5  |
|               | PO<br>5 mg/kg    | 13351±1378                  | 242126±23640     | 15.0                 | -                                | -                              |       |
| 化合物 3         | PO<br>6.25 mg/kg | 10090±3248                  | 305793±75075     | 22.4                 | /                                | /                              | 29.6  |
| 化合物 6         | PO<br>6.2 mg/kg  | 15291±1486                  | 284978±17012     | 27.2                 | /                                | /                              | 27.6  |
| 化合物 7         | PO<br>7.25 mg/kg | 7361±1754                   | 131572±31396     | 31.6                 | /                                | /                              | 12.7  |

[0263] 注:生物利用度是以化合物1s量计。