



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116375713 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 04

(21) 申请号 202310209418.2

A61P 3/10 (2006.01)

(22) 申请日 2023.03.07

A61P 31/04 (2006.01)

(71) 申请人 中国人民解放军海军军医大学
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72) 发明人 盛春泉 武善超 李柯良 刘杨
董国强 陈玉平 孙驭航 王磊
白学鑫 夏哲炜

(74) 专利代理机构 上海申浩律师事务所 31280
专利代理师 赵青

(51) Int. Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/5513 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

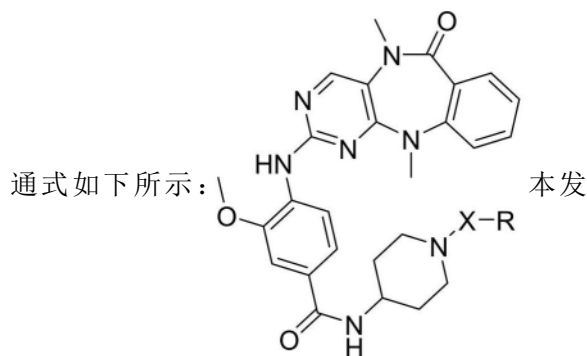
权利要求书3页 说明书36页 附图2页

(54) 发明名称

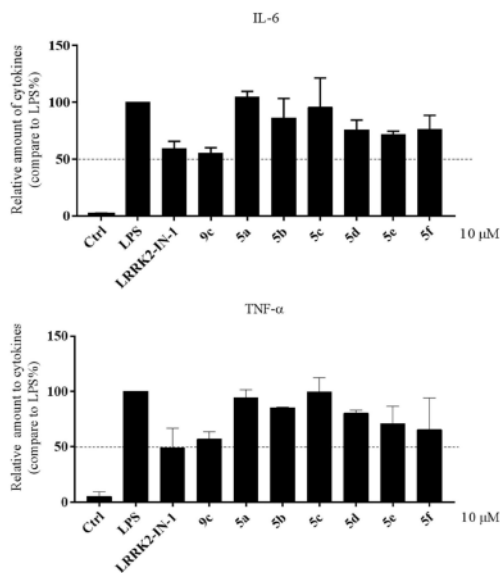
一种DCLK1蛋白降解靶向嵌合体及其应用

(57) 摘要

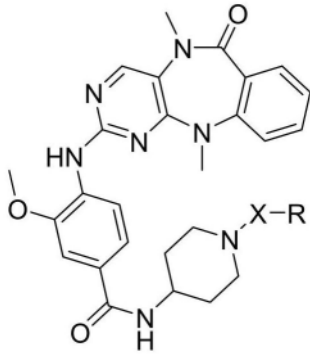
本发明公开了一种化合物或其药用盐,结构



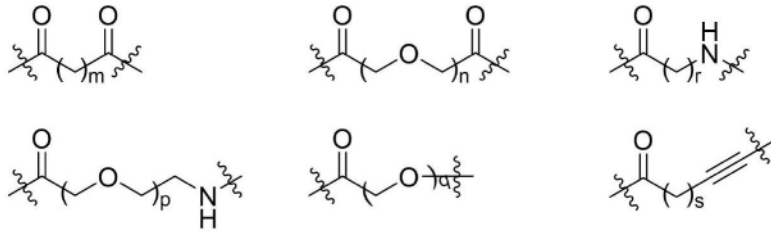
明的化合物表现出良好的DCLK1蛋白降解活性, DCLK1蛋白降解活性测试结果显示,以泊马度胺为E3连接酶配体的化合物P-11、P-12以及P-14具有较好的降解活性,且优于以VHL为E3连接酶配体的化合物。



1. 一种化合物或其药用盐,其特征在于,结构通式如下所示:



其中,X选自以下结构的一种:键、



m选自1至10的正整数;

n选自1至10的正整数;

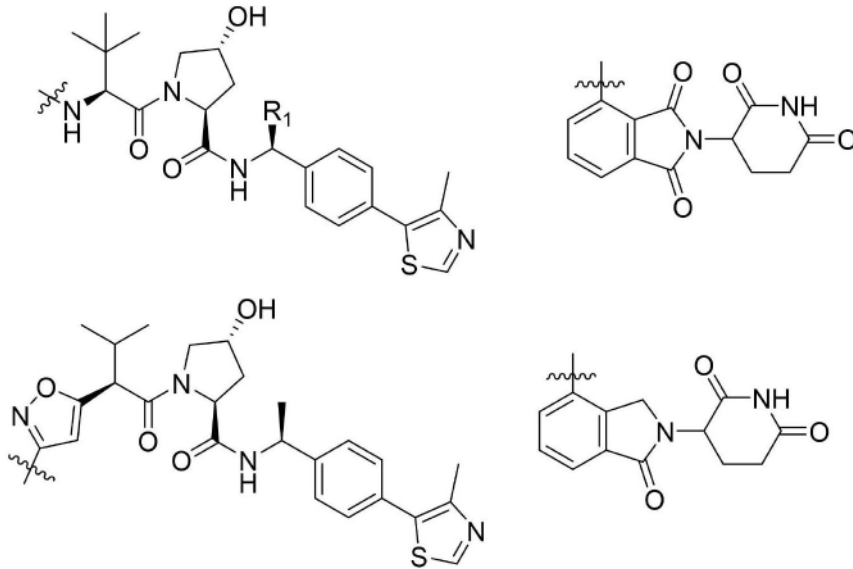
r选自1至10的正整数;

p选自1至10的正整数;

q选自1至10的正整数;

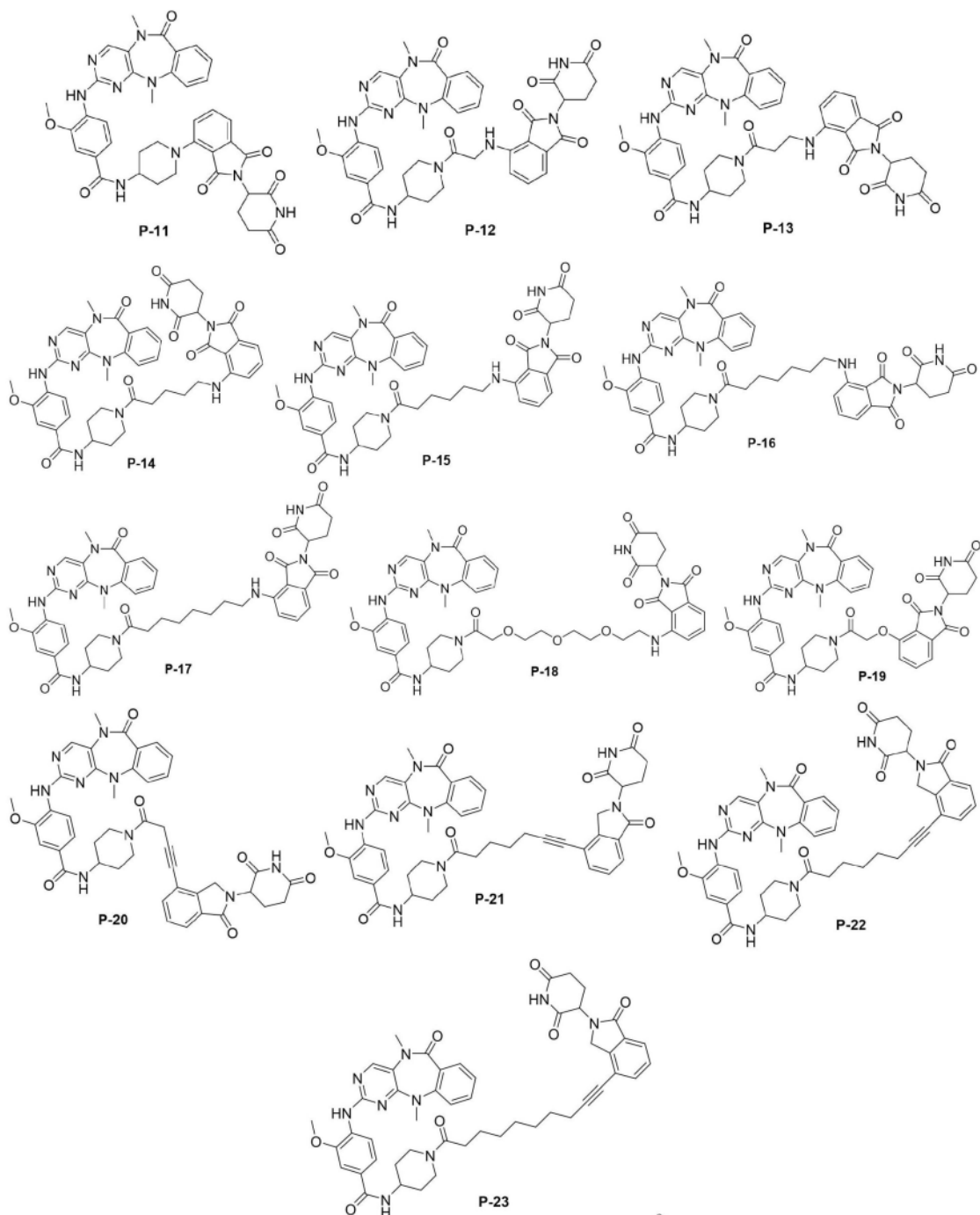
s选自1至10的正整数;

R选自以下结构的一种:



R₁选自氢、甲基。

2. 根据权利要求1所述的化合物或其药用盐,其特征在于,所述化合物选自以下结构的一种:



3. 一种权利要求1或2所述的化合物或其药用盐在制备DCLK1蛋白降解靶向嵌合体中的应用。

4. 一种权利要求1或2所述的化合物或其药用盐在制备抗炎的药物中的应用。

一种DCLK1蛋白降解靶向嵌合体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体地说,涉及一种DCLK1蛋白降解靶向嵌合体及其应用。

背景技术

[0002] 从药物发展历史中可以看出,药物研发的重点一直是通过阻断受体或调节蛋白结合位点来发挥治疗作用。然而,这种药物作用模式通常需要高剂量的药物才能保持较高的靶标占有率,同时可能由于脱靶引起副作用。激酶抑制剂同样存在这种作用模式上的局限性,为解决这一问题,蛋白降解靶向嵌合体(proteolysis-targeting chimeras, PROTACs)技术应运而生,利用细胞自身的降解机制降解靶蛋白,可解决激酶抑制剂选择性低的缺陷。

[0003] PROTAC分子一般包括两个关键的结构域:与靶蛋白(protein of interest, POI)结合的特异结构域以及与E3泛素化连接酶结合的结构域,两者通过特定的连接子连接,诱导POI的泛素化,并通过蛋白酶体途径进行降解。重要的是,PROTAC分子在POI泛素化后仍可被回收,再参与新的反应。从药效学的角度,这种催化的降解方式相较于提高靶蛋白占有率更有意义。此外,根据PROTAC分子在细胞内的稳定性和POI重新合成的速率,PROTAC分子的作用时间有所不同。只要具有对POI亲和力适当的小分子配体,且能够将靶蛋白与E3连接酶置于合适的空间位置,形成靶蛋白-PROTAC-E3连接酶三元复合物,PROTAC分子理论上可以靶向降解任何类型的蛋白质。

[0004] 目前,常见的E3连接酶配体有CRBN、VHL、MDM2、c1AP1、KEAP1和RNF114,其中以CRBN和VHL最为常用。不同的E3连接酶在组织中的分布、与靶蛋白的亲合性以及选择性均呈现出多样性,这对PROTAC的安全性、成药性以及药效产生重要影响。因此,需要通过合理的药物化学和药理学手段指导PROTAC的合成。

[0005] 2001年格列卫作为第一个蛋白激酶抑制剂上市后,蛋白激酶抑制剂受到了广泛关注和研究,目前已经有48个蛋白激酶抑制剂上市。但蛋白激酶抑制剂的选择性较差,主要原因是三分之一的蛋白激酶可能被磷酸化,且大部分激酶的结合域十分相似,实现选择性抑制非常困难。此外,激酶抑制剂的“脱靶效应”在临床上往往会引起毒副作用,所以提高激酶抑制剂的选择性、降低其毒性对激酶药物的优化意义重大。

[0006] 由于PROTAC需要将靶蛋白与E3连接酶置于合适的空间位置,形成稳定的靶蛋白-PROTAC-E3连接酶三元复合物,且靶蛋白表面有合适的泛素化位点(如赖氨酸),所以即使激酶抑制剂的选择性差,设计成PROTAC后也能很好地改善选择性,因此PROTAC技术是提高选择性的重要策略之一。

[0007] 双肾上腺皮质激素样激酶1(doublecortin-like kinase 1, DCLK1)是一种微管相关的丝氨酸/苏氨酸激酶,它在结构上属于钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶家族(calcium/calmodulin-dependent protein kinases, CaMK),主要表达在细胞浆中。DCLK1由729个氨基酸分子构成,分为DCX结构域、PEST序列和激酶结构域三部分,其N端区域具有两个微管结合结构域(分别为DCX1和DCX2),用以驱动微管相关功能;C端区域包含一个丝氨酸/苏氨酸

激酶结构域,与钙/钙调蛋白依赖性蛋白1(CaMK 1)激酶结构域高度相似。

[0008] DCLK1具有诸多生物功能,目前以其为药物靶点的研究工作主要集中在抗肿瘤方面,但未取得显著进展,近期有研究证实DCLK1与炎症密切相关,因此,推测DCLK1极有可能是潜在的抗炎症药物靶点。

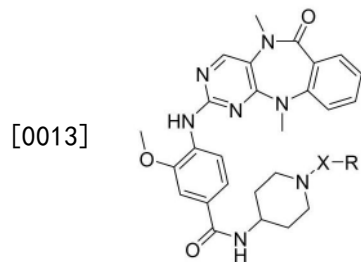
发明内容

[0009] 本发明的第一个目的是提供一种可以制备DCLK1蛋白降解靶向嵌合体的化合物。

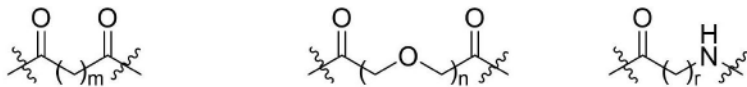
[0010] 本发明的第二个目的是,提供一种所述化合物在制备DCLK1蛋白降解靶向嵌合体中的应用。

[0011] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

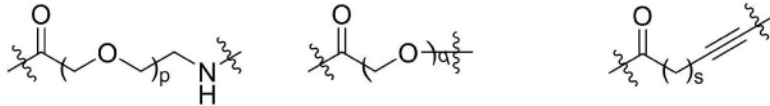
[0012] 本发明的第一方面提供了一种化合物或其药用盐,结构通式如下所示:



[0014] 其中,X选自以下结构的一种:键、



[0015]



[0016] m选自1至10的正整数(如1、2、3、4、5、6、7);

[0017] n选自1至10的正整数(如1、2、3、4、5);

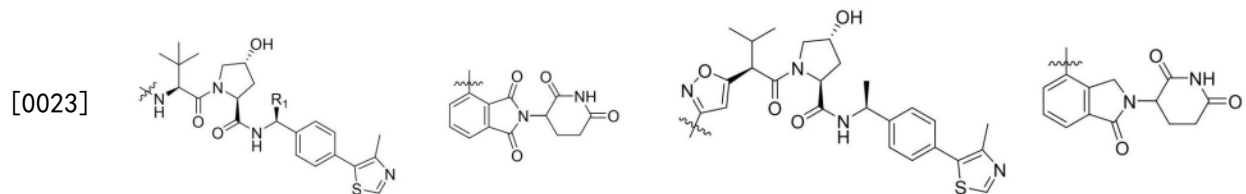
[0018] r选自1至10的正整数(如1、2、3、4、5、6、7);

[0019] p选自1至10的正整数(如1、2、3、4);

[0020] q选自1至10的正整数(如1、2、3);

[0021] s选自1至10的正整数(如1、2、3、4、5、6、7);

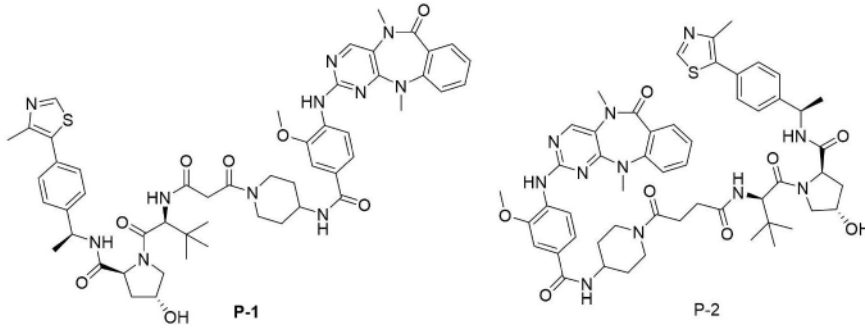
[0022] R选自以下结构的一种:



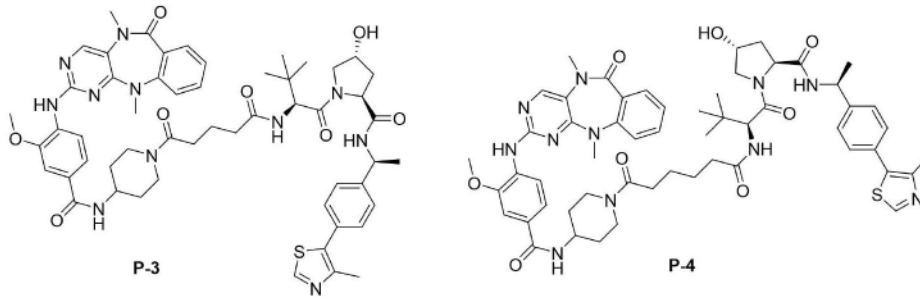
[0024] R₁选自氢、甲基。

[0025] 所述药用盐为上述化合物与下列酸形成的酸加成盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、乳酸、柠檬酸、磷酸、甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘磺酸、酒石酸、丙酮酸、乙酸、马来酸、琥珀酸、富马酸、水杨酸、苯基乙酸或杏仁酸。

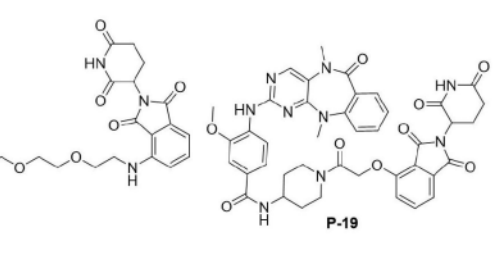
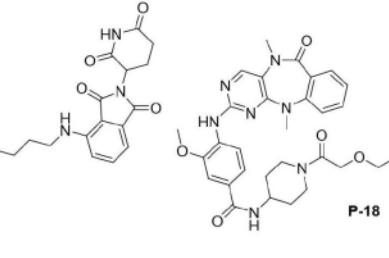
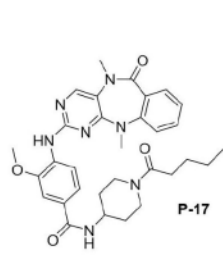
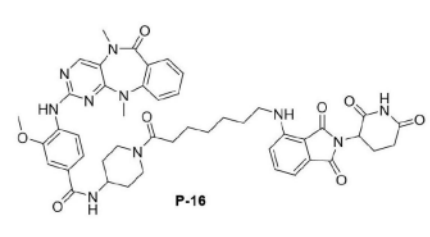
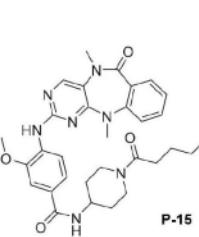
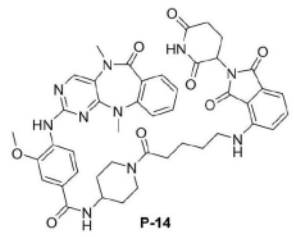
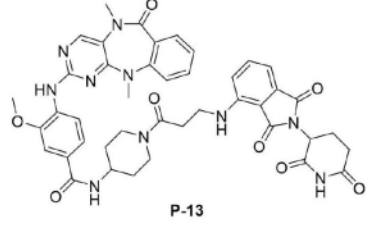
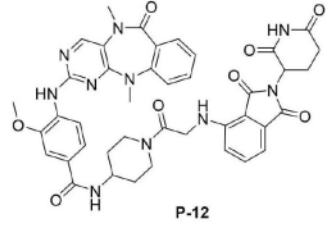
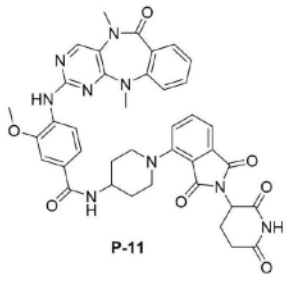
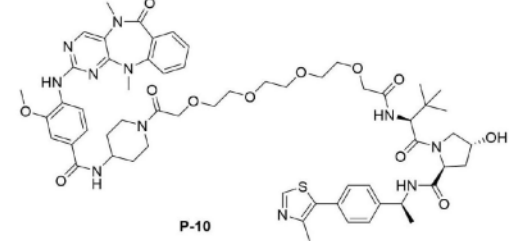
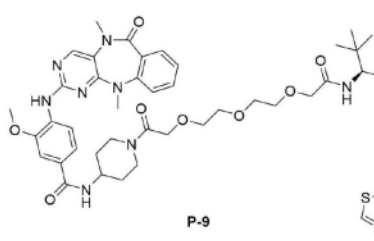
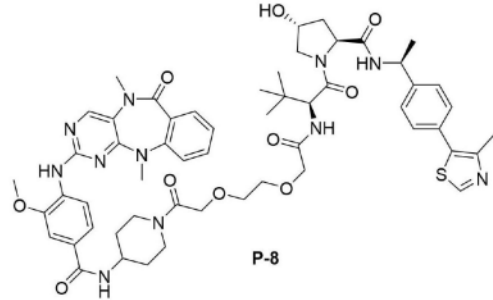
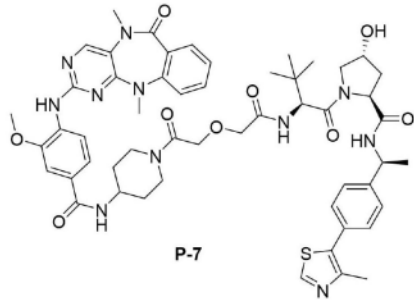
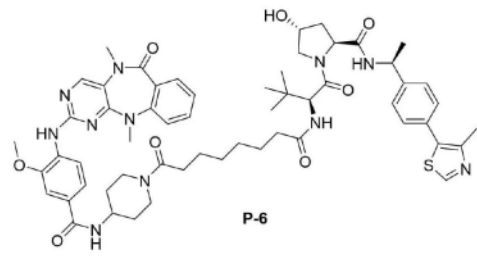
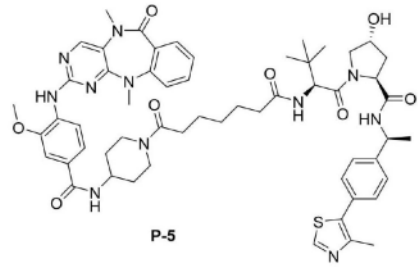
[0026] 所述化合物选自以下结构的一种：

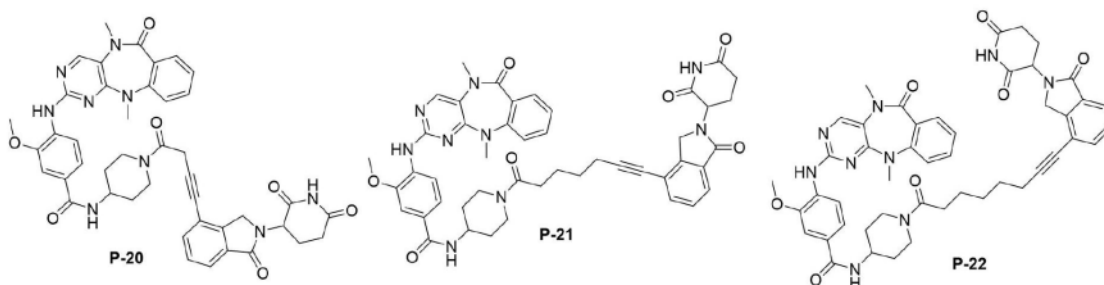


[0027]

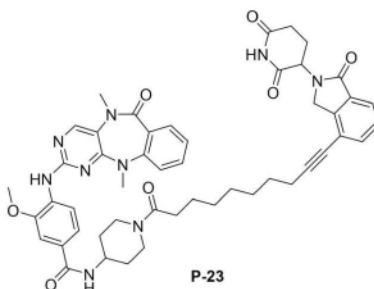


[0028]





[0029]



[0030] 本发明的第二方面提供了一种所述化合物或其药用盐在制备DCLK1蛋白降解靶向嵌合体中的应用,所述DCLK1蛋白靶向降解嵌合体分子由三部分组成,E3连接酶配体(VHL配体、泊马度胺配体和来那度胺配体)、靶蛋白配体和连接子linker。E3连接酶配体负责特异性招募E3连接酶。靶蛋白配体用于靶向和捕获目标蛋白。Linker用于结合这两个配体形成稳定的三元复合物。因此PROTAC分子能够将E3连接酶募集到靶点蛋白附近,为靶点蛋白贴上“泛素”标签,而在细胞上打上泛素标签的蛋白将被送入蛋白酶体进行降解。这样PROTAC分子就能够特异性的促进致病蛋白的降解,从而达到治疗疾病的目的。

[0031] 本发明的第三方面提供了一种所述化合物或其药用盐在制备抗炎的药物中的应用。

[0032] 所述抗炎的药物中炎症指的是与DCLK1表达有关的炎症,与DCLK1表达有关的炎症可以为脓毒症、败血症、急性肺损伤或糖尿病并发症。

[0033] 由于采用上述技术方案,本发明具有以下优点和有益效果:

[0034] 本发明的化合物表现出良好的DCLK1蛋白降解活性,DCLK1蛋白降解活性测试结果显示,在 $10\mu\text{M}$ 的单浓度下,在以VHL为E3连接酶配体的DCLK1蛋白降解靶向嵌合体(化合物P-1~P-6、P-9)中,碳氧杂链和含三个碳原子的脂肪链的化合物P-1、P-9具有一定的降解活性,4-8个碳原子的脂肪链化合物P-2~P-6中,随着链长增加,降解活性逐渐减弱;对抗炎活性最好的化合物P-9进行时间依赖性实验,在给药后0.5h至3h,DCLK1降解率随时间增长逐渐加大,3h后降解效果不再变化,说明3h时PROTAC分子能达到最大降解,因此后续的药物作用时间为3h;对于部分以泊马度胺为E3连接酶配体的DCLK1蛋白降解靶向嵌合体进行 $10\mu\text{M}$ 单浓度降解活性筛选,发现化合物P-11、P-12以及P-14具有较好的降解活性,其对应的分别为无linker、含2个碳原子脂肪linker以及含5个碳原子的脂肪linker的DCLK1蛋白降解靶向嵌合体。通过对两种不同类型的E3连接酶配体降解活性对比发现,E3连接酶配体为CRBN的PROTAC分子具有更好的降解活性。优选降解活性较好的化合物P-14进行浓度依赖性降解实验,发现在 $0.1\sim 10\mu\text{M}$ 这三个浓度中,随着浓度加大,降解效率反而降低,分析原因可能是高浓度下PROTAC分子产生了HOOK效应,具体降解效率还有待进一步验证。

[0035] 本发明的化合物作为首次报道的DCLK1蛋白降解靶向嵌合体,具有进一步的开发

和研究价值。

附图说明

[0036] 图1是本发明化合物的体外抗炎活性测试结果示意图。

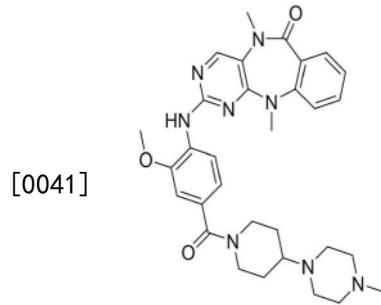
[0037] 图2是DCLK1-PROTAC的降解活性测试结果示意图。

具体实施方式

[0038] 为了更清楚地说明本发明,下面结合优选实施例对本发明做进一步的说明。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

[0039] 在本发明中,EDCI为1-乙基-3-(3-二甲基丙胺)碳二亚胺,HOBT为1-羟基苯并三唑,DIPEA为N,N-二异丙基乙胺,DCM为二氯甲烷,MeOH为甲醇,THF为四氢呋喃。

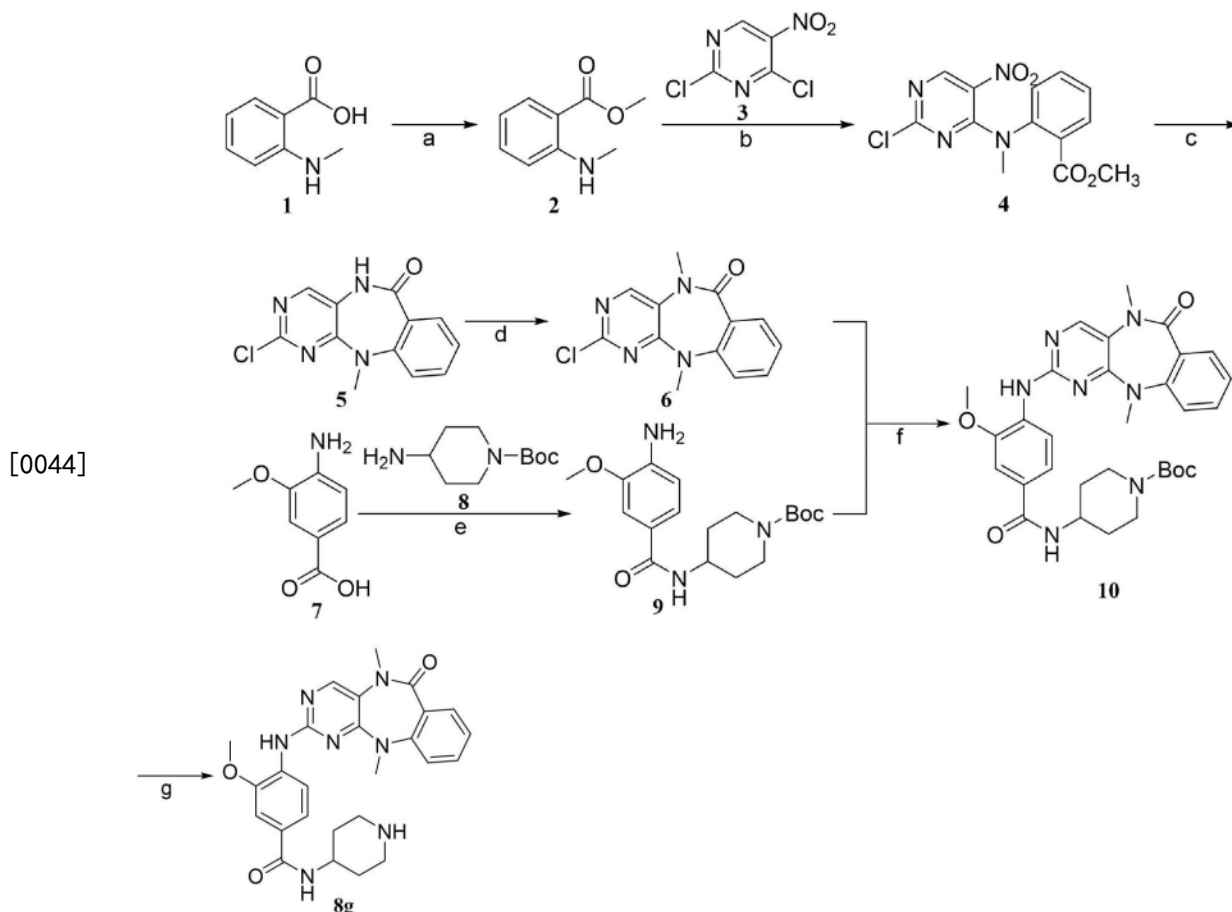
[0040] 具有优秀活性的DCLK1抑制剂LRRK2-IN-1的结构如下所示:



LRRK2-IN-1

[0042] 实施例1

[0043] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺(8g)的合成



[0045] 试剂和条件:a) SOCl_2 , MeOH, 60°C , 2h, yield 92%; b) DIPEA, 1,4-dioxane, 50°C , 5h, yield 82%; c) Fe, AcOH, 60°C , overnight, yield 93%; d) MeI, NaH, DMF, 0°C , 5h, yield 80%; e) DCM, EDCI, HOBT, DIPEA, r.t., overnight, yield 84.3%; f) X-Phos, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 1,4-dioxane, 100°C , 5h, yield 37.1%; g) DCM, TFA, 4h, yield 39%.

[0046] 步骤a: 2-(甲基氨基)苯甲酸甲酯(2)的合成

[0047] 将化合物1(2-(甲基氨基)苯甲酸)(5.00g, 33.08mmol)置于250mL茄形瓶中,加入甲醇(100mL)溶解,搅拌下缓慢滴加二氯亚砷(19.70g, 165.38mmol), 60°C 反应2h。TLC检测反应完全,将反应液倒入冰水(500mL)中,搅拌5min,有大量白色固体析出,抽滤,烘干,无需进一步纯化,得到化合物2(白色固体,5g,收率:92%)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ : 7.73(s, 1H), 7.40(s, 1H), 6.93(s, 1H), 6.82(s, 1H), 3.95(s, 3H), 2.64(s, 3H)。

[0048] 步骤b: 2-((2-氯-5-硝基咪唑-4-基)(甲基)氨基)苯甲酸甲酯(4)的合成

[0049] 将化合物2(1.00g, 6.06mmol)和化合物3(2,4-二氯-5-硝基咪唑, 1.40g, 7.26mmol)溶于1,4-二氧六环(50mL)中,搅拌下缓慢滴加DIPEA(1.60g, 12.12mmol),在 50°C 条件下搅拌5h以上。待反应完全后,将反应液减压浓缩得到粗产品,然后经硅胶柱层析(hexane:EtOAc=15:1-10:1)分离纯化得到化合物4(黄色固体,1.6g,收率:82%)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ : 8.72(s, 1H), 7.93(dd, $J=8.3, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.65-7.76(m, 1H), 7.46-7.59(m, 2H), 4.03-4.26(m, 2H), 3.47(s, 3H), 1.19(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H)。

[0050] 步骤c: 2-氯-11-甲基-5,11-二氢-6H-苯并[e]咪唑并[5,4-b][1,4]二氮杂-6-酮(5)的合成

[0051] 将化合物4 (1.00g, 3.10mmol) 溶于20mL醋酸中, 搅拌下依次加入铁粉 (0.87g, 15.49mmol), DIPEA (0.80g, 6.20mmol), 60℃下搅拌过夜。TLC检测反应完全后, 过滤剩余的铁粉, 将滤液加入500mL冰水中, 有大量白色固体析出, 抽滤, 滤饼于50℃条件下烘干, 无需纯化直接进行下一步, 得到化合物5 (白色固体, 0.7g, 收率: 93%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 10.48 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.72 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.59 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.28 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.22 (t, J=7.5Hz, 1H), 3.34 (s, 3H)。

[0052] 步骤d: 2-氯-5,11-二甲基-5,11-二氢-6H-苯并[e]嘧啶并[5,4-b][1,4]二氮杂-6-酮(6)的合成

[0053] 将化合物5 (1.00g, 3.84mmol) 溶于干燥DMF (20mL) 中, -10℃条件下分批加入NaH (120.00mg, 4.60mmol), 反应0.5h后, 再缓慢滴加碘甲烷 (660.00mg, 4.60mmol), 然后将反应转移至室温条件下继续搅拌4h。待原料完全反应后, 将反应液倒入冰水 (400mL) 中, 搅拌5min, 有大量白色固体析出, 抽滤, 滤饼于50℃烘干至恒重, 无需进一步纯化, 得到化合物6 (白色固体, 0.8g, 收率80%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.60 (s, 1H), 7.71 (dd, J=7.8, 1.5Hz, 1H), 7.51-7.62 (m, 1H), 7.29 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.22 (t, J=7.7Hz, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.34 (s, 3H)。

[0054] 步骤e: 4-(4-氨基-3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(9)的合成

[0055] 称取化合物7 (2.00g, 12.00mmol)、化合物8 (2.88g, 14.36mmol)、EDCI (2.75g, 14.36mmol)、HOBT (1.94g, 14.36mmol) 于100mL圆底烧瓶中, 加入干燥二氯甲烷(40mL)充分溶解, 边搅拌边缓慢滴加DIPEA (5.93mL, 35.89mmol) 室温下搅拌反应过夜, TLC点板监测(展开剂条件, DCM:MeOH=100:10), 反应完全。将反应液倒入250mL分液漏斗中, 加入100mL水, 加入30mL二氯甲烷, 充分振摇, 静置待液体彻底分层, 取下层液体于250mL圆底烧瓶中, 重复萃取4-5次, 将萃取液合并旋干后拌样柱层析, 洗脱剂: DCM:MeOH=100:1, 极性逐步加大至DCM:MeOH=100:5, 洗脱液减压浓缩, 得化合物9 (淡黄色固体, 3.52g, 收率84.3%)。

[0056] 步骤f: 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-3-甲氧基-N-(哌啶-4-基)苯甲酰胺(8g)的合成

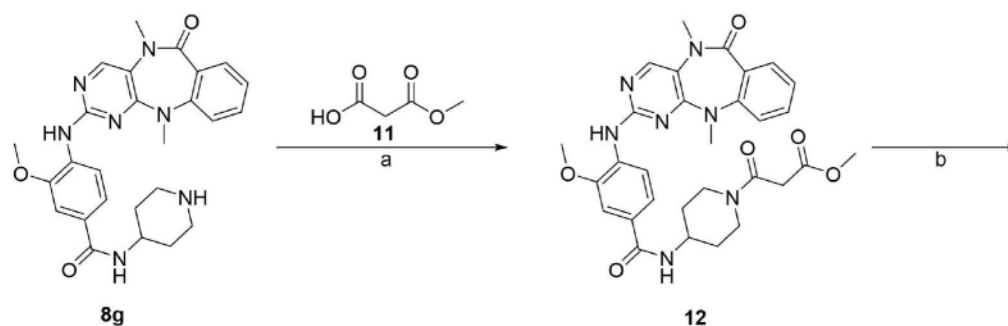
[0057] 称取化合物6 (250mg, 0.90mmol)、化合物9 (344mg, 0.98mmol)、X-Phos (39mg, 0.08mmol)、Pd₂(dba)₃ (74mg, 0.08mmol) 和碳酸钾 (375mg, 2.68mmol) 于100mL圆底烧瓶中, 加入干燥1,4-Dioxane (30mL) 充分溶解, 抽真空N₂保护, 106℃条件下回流反应4.5h, 整个反应过程尽量避免接触空气和水, 使用的球形冷凝管应提前在烘箱中充分干燥, TLC点板监测(展开剂条件, DCM:MeOH=100:10), 反应完全。反应液用三角漏斗抽滤, 尽可能除去无机盐固体, 用少许甲醇冲洗滤渣3次, 将滤液倒入100mL分液漏斗中, 加入40mL水, 后加入15mL乙酸乙酯, 充分振摇, 静置待液体彻底分层, 取上层液体于100mL圆底烧瓶中, 重复萃取4-5次, 将萃取液合并旋干后拌样柱层析, 洗脱剂: PE:EA=50:1, 极性逐步加大至: PE:EA=73:27, 洗脱液减压浓缩, 得产物10 (黄色固体, 195mg, 产率37.1%)。

[0058] 称取化合物10 (195mg, 0.33mmol) 于50mL圆底烧瓶中, 加入干燥二氯甲烷 (8mL) 充分溶解, 边搅拌边加入三氟乙酸 (2mL), 室温下搅拌反应过夜, TLC点板监测(展开剂条件, DCM:MeOH=100:10), 反应完全。将反应液旋干, 加入少许甲醇充分溶解后再次旋干, 重复5-6次, 最后用二氯甲烷充分溶解后直接拌样柱层析, 洗脱剂: DCM:MeOH=100:1, 极性逐步加大至DCM:MeOH=100:7, 洗脱液减压浓缩, 得产物8g (白色固体, 63mg, 产率39%)。¹H NMR

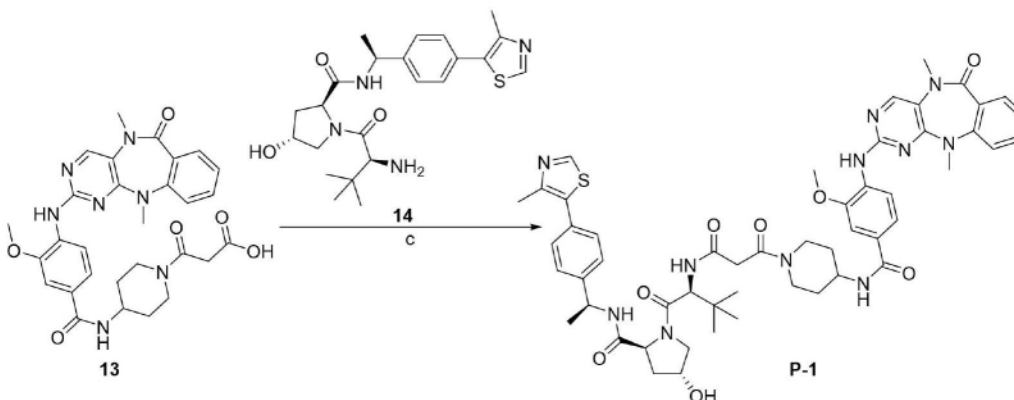
(600MHz, CDCl_3) δ : 8.51 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.78-7.86 (m, 2H), 7.45 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 7.38-7.43 (m, 1H), 7.31 (dd, $J=8.4, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.12 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.07 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.06-6.17 (m, 1H), 4.02-4.13 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 2.77 (t, $J=12.1\text{Hz}$, 1H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.04 (d, $J=11.1\text{Hz}$, 2H), 1.40-1.48 (m, 2H); ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ : 168.22, 166.35, 163.67, 155.38, 151.30, 149.28, 147.47, 132.46, 132.35, 132.28, 127.53, 126.49, 123.84, 122.04, 118.97, 117.39, 116.45, 109.31, 56.00, 47.33, 45.44, 38.24, 35.96, 33.48.

[0059] 实施例2

[0060] (2S, 4R) -1- ((S) -2- (3- (4- (4- (5, 11-二甲基-6-氧代-6, 11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基) [5, 4-b] [1, 4]二氮杂-2- (基) 氨基) -3-甲氧基苯甲酰胺基) 哌啶-1-基) -3-氧代丙酰胺基) -3, 3-二甲基丁酰基) -4-羟基-N- ((S) -1- (4- (4- (4-甲基噻唑-5-基) 苯基) 乙基) 吡咯烷-2-羧酰胺 (P-1) 的合成



[0061]



[0062] 试剂和条件:a) EDCI, HOBT, DIPEA, DCM, rt, 1h, yield 80-90%; b) MeOH, THF, H_2O , LiOH, rt, 50°C, 5h, yield 80-87%; c) EDCI, HOBT, DIPEA, DCM, rt, 2h, yield 50-65%.

[0063] 步骤a: 化合物12的合成

[0064] 将化合物8g (0.70g, 1.44mmol) 和化合物11 (0.20g, 1.72mmol) 溶于20mL干燥DCM中, 再依次加入EDCI (0.30g, 1.72mmol)、HOBT (0.20g, 1.72mmol)、DIPEA (0.40g, 3.59mmol), 室温下搅拌2h. TLC监测反应完全结束后, 将反应液用60mL饱和氯化钠溶液洗涤3次, 将有机层减压浓缩, 使用硅胶柱层析 (hexane/EtOAc=3:1-1:1) 分离纯化得到化合物12 (白色固体, 698mg, 收率85%). ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ : 8.50 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.84 (dd, $J=7.8, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.40-7.45 (m, 2H), 7.30 (dd, $J=8.4, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.14 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 7.08 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 6.08 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 4.62 (d, $J=13.9\text{Hz}$, 1H), 4.18-4.26 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.72-3.77 (m, 1H), 3.70 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.42 (s,

3H), 3.21-3.26 (m, 1H), 2.78-2.85 (m, 1H), 2.11-2.16 (m, 1H), 2.03-2.08 (m, 1H), 1.48-1.57 (m, 4H), 1.46 (s, 3H).

[0065] 步骤b: (P-1)的合成

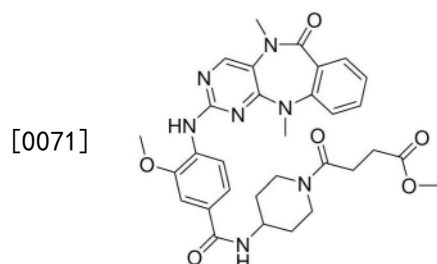
[0066] 将化合物12(500mg, 0.85mmol)溶于THF:MeOH:H₂O=3:2:1的混合溶剂(100mL)中,再分批加入LiOH(96mg, 4.25mmol),室温条件下反应5h,TLC检测反应完全。将反应液减压蒸馏,除去有机溶剂,在转移至冰浴下,以1mol/L HCl调节pH至中性,有大量白色固体析出,抽滤,烘干,无需进一步纯化,得到化合物13的粗产物400mg,收率87%。

[0067] 将化合物13(100mg, 0.17mmol)与VHL配体14(133.2mg, 0.26mmol)溶于干燥的DCM(20mL)中,在依次加入EDCI(58mg, 0.26mmol)、HOBT(42mg, 0.26mmol)、DIPEA(77mg, 0.52mmol),室温下反应2h。TLC监测反应结束后,用饱和氯化钠溶液将反应液洗涤三次(150mL×3),无水硫酸钠干燥后,用硅胶柱层析(DCM:MeOH=100:1-100:3)分离纯化得到化合物P-1(白色固体,300mg,收率37%)。¹H NMR(600MHz, CDCl₃) δ: 8.64(d, J=7.5Hz, 1H), 8.50(dd, J=8.5, 4.5Hz, 1H), 8.37(d, J=8.2Hz, 1H), 8.13(s, 1H), 7.81-7.86(m, 2H), 7.38-7.50(m, 3H), 7.29-7.36(m, 4H), 7.10-7.15(m, 1H), 7.06(d, J=8.4Hz, 1H), 6.94(dd, J=102.9, 8.0Hz, 1H), 5.00-5.07(m, 1H), 4.73(t, J=8.4Hz, 1H), 4.63(t, J=8.0Hz, 1H), 4.54-4.61(m, 2H), 4.47(s, 1H), 4.13-4.23(m, 1H), 4.07(dd, J=31.0, 13.0Hz, 1H), 3.90-3.95(m, 3H), 3.76-3.89(m, 1H), 3.56-3.63(m, 1H), 3.46-3.49(m, 3H), 3.39(s, 3H), 3.31-3.37(m, 1H), 3.11-3.18(m, 1H), 2.68-2.76(m, 2H), 2.46-2.50(m, 3H), 2.22-2.32(m, 1H), 1.91-2.15(m, 3H), 1.45(d, J=6.9Hz, 3H), 1.40(d, J=6.1Hz, 2H), 1.07(s, 9H); ¹³C NMR(150MHz, CDCl₃) δ: 172.63, 171.47, 169.59, 168.86, 168.43, 168.05, 167.73, 167.32, 165.03, 156.66, 152.58, 151.69, 150.57, 149.73, 148.66, 144.93, 144.78, 133.88, 133.68, 133.00, 132.01, 130.80, 128.41, 128.20, 127.75, 125.21, 123.47, 121.14, 118.81, 117.77, 110.68, 71.50, 60.19, 59.98, 59.70, 59.44, 58.38, 57.36, 55.49, 50.23, 48.31, 46.75, 43.67, 42.85, 42.01, 41.03, 39.62, 37.68, 37.45, 37.29, 36.77, 36.41, 33.59, 32.99, 27.92, 23.68, 19.94, 18.68, 17.42, 13.46; HRMS(ESI, positive)m/z calcd for C₅₂H₆₂N₁₁O₈S[M+H]⁺: 1000.4498; found 1000.4487.

[0068] 实施例3

[0069] (2R,4S)-1-((R)-2-(4-(4-(4-((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基)[5,4-b][1,4]二氮杂-2-(氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基)-4-氧杂戊酰胺基)-3,3-二甲基丁酰基)-4-羟基-N-((R)-1-(4-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧酰胺(P-2)的合成

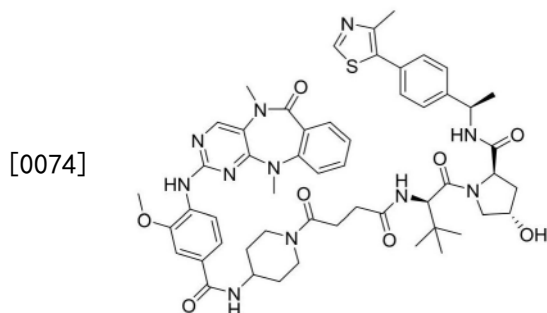
[0070] 步骤a: 化合物12-1的合成



[0072] 将化合物11替换为化合物4-甲氧基-4-氧代丁酸,合成方法参考实施例2中步骤a。

白色固体600mg,收率86%。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ: 8.51 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.85 (dd, J=7.8, 1.6Hz, 1H), 7.39-7.46 (m, 2H), 7.29 (dd, J=8.3, 1.6Hz, 1H), 7.15 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.10 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.09 (d, J=7.9Hz, 1H), 4.61 (d, J=14.0Hz, 1H), 4.19-4.27 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.70-3.78 (m, 1H), 3.71 (q, J=7.2Hz, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.20-3.28 (m, 1H), 2.79-2.86 (m, 1H), 2.09-2.17 (m, 1H), 2.02-2.09 (m, 1H), 1.49-1.58 (m, 6H), 1.46 (s, 3H)。

[0073] 步骤b: 化合物P-2的合成



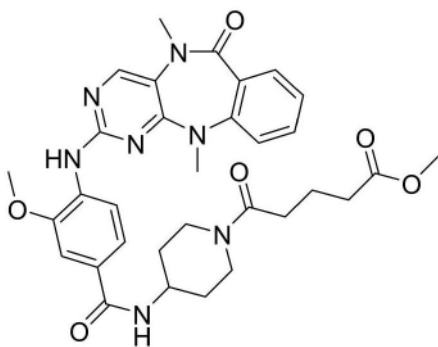
[0075] 合成方法参考实施例2中步骤b。白色固体100mg,收率30%。¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 8.67 (s, 1H), 8.51 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.86 (d, J=4.5Hz, 1H), 7.84 (dd, J=7.9, 1.7Hz, 1H), 7.64-7.69 (m, 1H), 7.46-7.50 (m, 1H), 7.32-7.45 (m, 6H), 7.13 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.09 (t, J=8.4Hz, 1H), 6.86-6.94 (m, 1H), 5.01-5.12 (m, 1H), 4.72-4.81 (m, 1H), 4.49-4.60 (m, 2H), 4.46 (s, 1H), 4.18-4.27 (m, 1H), 4.08 (t, J=12.1Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.84-3.91 (m, 1H), 3.57-3.61 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.10-3.16 (m, 1H), 2.63-2.75 (m, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.44-2.48 (m, 1H), 2.35-2.42 (m, 1H), 2.10-2.17 (m, 1H), 2.02-2.08 (m, 1H), 1.47 (d, J=6.7Hz, 3H), 1.23-1.34 (m, 4H), 1.06 (s, 9H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ: 174.53, 173.3, 171.83, 169.59, 167.93, 165.06, 156.66, 152.54, 151.78, 150.57, 149.72, 148.77, 144.73, 133.87, 133.72, 133.02, 132.10, 130.87, 128.48, 127.79, 125.22, 123.45, 120.47, 118.79, 117.75, 110.75, 71.55, 59.83, 59.48, 58.20, 57.37, 50.20, 48.28, 46.28, 43.01, 39.64, 37.54, 37.31, 36.46, 33.83, 33.11, 32.94, 32.27, 30.37, 29.31, 27.92, 24.00, 23.56, 15.58, 12.78; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₅₃H₆₄N₁₁O₈S [M+H]⁺: 1014.4655; found 1014.4554.

[0076] 实施例4

[0077] (2S, 4R) -1-((S) -2-(5-(4-(4-((5, 11-二甲基-6-氧代-6, 11-二氢-5H-苯并[e] 嘧啶基)[5, 4-b][1, 4]二氮杂-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基)-5-氧戊酰胺)-3, 3-二甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S) -1-(4-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧酰胺(P-3)的合成

[0078] 步骤a: 化合物12-2的合成

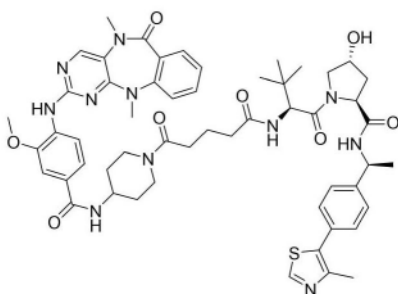
[0079]



[0080] 将化合物11替换为化合物5-甲氧基-5-氧代戊酸,合成方法参考实施例2中步骤a。白色固体500mg,收率80%。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ: 8.50 (d, J=8.5Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.84 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.40-7.49 (m, 2H), 7.29 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.14 (t, J=7.7Hz, 1H), 7.07 (d, J=8.3Hz, 1H), 6.03 (d, J=7.7Hz, 1H), 4.60 (d, J=13.6Hz, 1H), 4.16-4.25 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.89 (d, J=13.8Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.19 (t, J=11.7Hz, 1H), 2.78 (t, J=11.9.Hz, 1H), 2.38-2.43 (m, 4H), 2.15-2.19 (m, 1H), 2.03-2.08 (m, 1H), 1.93-2.00 (m, 4H)。

[0081] 步骤b: 化合物P-3的合成

[0082]



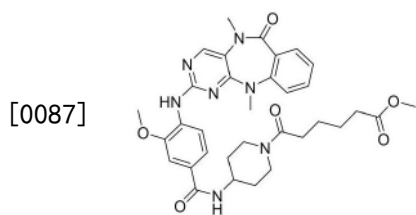
[0083] 合成方法参考实施例2中步骤b。白色固体106mg,收率36%。¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 8.68 (s, 1H), 8.53 (dd, J=8.3, 5.0Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.86 (dd, J=7.9, 1.2Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.32-7.47 (m, 6H), 7.15 (t, J=7.4Hz, 1H), 7.09 (d, J=8.7Hz, 1H), 6.67-6.91 (m, 1H), 6.51-6.61 (m, 1H), 5.01-5.13 (m, 1H), 4.73 (q, J=7.9Hz, 1H), 4.64-4.57 (m, 1H), 4.52-4.56 (m, 1H), 4.44-4.52 (m, 1H), 4.26-4.19 (m, 1H), 4.09-4.18 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.82-3.88 (m, 1H), 3.56-3.63 (m, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.12-3.21 (m, 1H), 2.73-2.80 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.19-2.49 (m, 6H), 2.09-2.16 (m, 2H), 1.91-2.05 (m, 4H), 1.46 (d, J=22.8Hz, 3H), 1.08 (s, 9H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ: 174.72, 173.42, 172.33, 171.10, 169.56, 167.89, 163.91, 156.64, 152.51, 150.56, 149.83, 148.83, 14.68, 133.86, 132.20, 130.90, 127.78, 127.75, 120.71, 118.79, 117.81, 110.70, 71.43, 59.79, 59.39, 58.18, 57.38, 50.18, 48.47, 46.18, 42.43, 39.63, 37.34, 36.37, 34.22, 33.26, 27.98, 23.65, 17.46; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₅₄H₆₆N₁₁O₈S [M+H]⁺: 1028.4211; found 1028.4836。

[0084] 实施例5

[0085] (2S,4R)-1-((S)-2-(6-(4-(4-((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]噻啶基)[5,4-b][1,4]二氮杂-2-(氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基)-6-氧六氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧

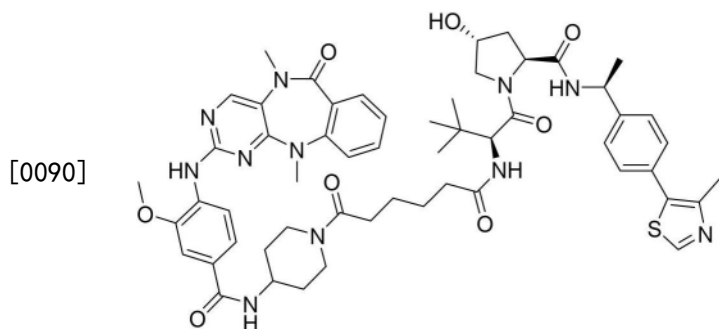
酰胺(P-4)的合成

[0086] 步骤a:化合物12-3的合成



[0088] 将化合物11替换为化合物6-甲氧基-6-氧代己酸,合成方法参考实施例2中步骤a。白色固体400mg,收率83%。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ: 8.49 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.83 (dd, J=7.8, 1.5Hz, 1H), 7.44 (d, J=1.7Hz, 1H), 7.39-7.43 (m, 1H), 7.30 (dd, J=8.4, 1.6Hz, 1H), 7.13 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.06 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.15 (d, J=7.9Hz, 1H), 4.60 (d, J=14.0Hz, 1H), 4.16-4.25 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.85 (d, J=13.7Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.14-3.21 (m, 1H), 2.72-2.80 (m, 1H), 2.28-2.36 (m, 6H), 2.12-2.18 (m, 1H), 1.2-1.68 (m, 6H)。

[0089] 步骤b:化合物P-4的合成

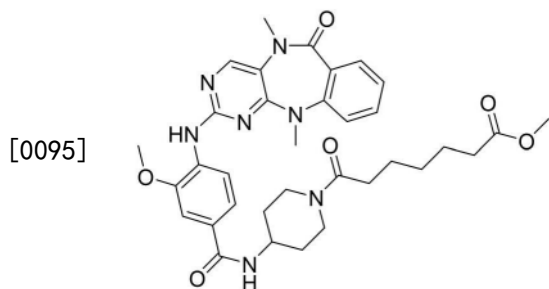


[0091] 合成方法参考实施例2中步骤b。白色固体110mg,收率36%。¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 8.68 (s, 1H), 8.51 (t, J=7.3Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.86 (dd, J=7.6, 1.4Hz, 1H), 7.34-7.59 (m, 9H), 7.15 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.09 (d, J=8.3Hz, 1H), 6.46-6.62 (m, 2H), 5.02-5.13 (m, 1H), 4.70-4.79 (m, 2H), 4.48 (s, 1H), 4.21 (s, 1H), 4.08 (d, J=11.1Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.84 (d, J=12.2Hz, 1H), 3.56-3.63 (m, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.17 (t, J=12.5Hz, 1H), 2.71-2.80 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.13-2.43 (m, 8H), 1.59-1.72 (m, 4H), 1.47 (d, J=4.5Hz, 3H), 1.06 (s, 9H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ: 174.72, 173.37, 172.67, 171.20, 169.48, 167.96, 165.21, 151.69, 149.97, 148.93, 144.63, 133.89, 132.63, 130.90, 127.80, 125.34, 123.42, 120.70, 118.86, 117.98, 110.73, 71.40, 59.91, 59.11, 58.29, 57.40, 50.18, 48.52, 46.10, 42.36, 39.69, 37.42, 37.23, 36.57, 34.12, 33.20, 27.92, 26.51, 25.87, 24.01, 23.63, 17.41; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₅₅H₆₈N₁₁O₈S [M+H]⁺: 1042.4968; found 1042.4967。

[0092] 实施例6

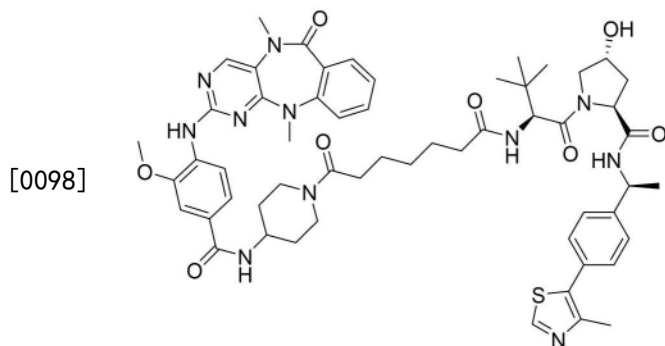
[0093] (2S,4R)-1-((S)-2-(7-(4-(4-((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基(氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基)-7-氧庚酰胺基)-3,3-二甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧酰胺(P-5)的合成

[0094] 步骤a: 化合物12-4的合成



[0096] 将化合物11替换为化合物7-甲氧基-7-氧代庚酸, 合成方法参考实施例2中步骤a。白色固体600mg, 收率86%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.43 (s, 1H), 8.32 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.22 (d, J=8.0Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.68 (dd, J=7.6, 1.5Hz, 1H), 7.54 (dd, J=8.4, 1.5Hz, 1H), 7.47-7.52 (m, 2H), 7.24 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.16 (t, J=7.3Hz, 1H), 4.38 (d, J=12.4Hz, 1H), 4.00-4.07 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.89 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.09 (t, J=12.4Hz, 1H), 2.64 (t, J=12.1Hz, 1H), 2.25-2.37 (m, 2H), 2.13 (t, J=7.1Hz, 2H), 1.76-1.88 (m, 2H), 1.65-1.71 (m, 2H), 1.34-1.51 (m, 2H)。

[0097] 步骤b: 化合物P-5的合成



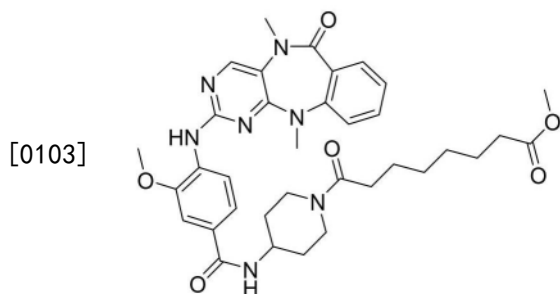
[0099] 合成方法参考实施例2中步骤b。白色固体120mg, 收率33%。¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 8.67 (s, 1H), 8.50 (t, J=7.8Hz, 1H), 8.15 (d, J=1.5Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.84 (dd, J=8.0, 1.5Hz, 1H), 7.49-7.53 (m, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.34-7.43 (m, 6H), 7.13 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.07 (d, J=8.3Hz, 1H), 6.63-6.81 (m, 1H), 6.43-6.60 (m, 1H), 5.04-5.12 (m, 1H), 4.67-4.75 (m, 1H), 4.53-4.64 (m, 2H), 4.49 (s, 1H), 4.22 (s, 1H), 4.02 (dd, J=20.0, 11.4Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (d, J=12.9Hz, 1H), 3.58-3.63 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.06-3.20 (m, 2H), 2.68-2.76 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.22-2.42 (m, 4H), 2.08-2.19 (m, 1H), 1.57-1.65 (m, 4H), 1.46 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.29-1.37 (m, 6H), 1.03 (s, 9H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ: 174.99, 173.26, 172.97, 171.34, 169.56, 167.97, 165.08, 156.62, 152.46, 151.74, 150.54, 149.73, 148.79, 144.70, 133.72, 133.01, 132.13, 130.88, 128.49, 127.79, 125.24, 123.45, 120.83, 118.79, 117.83, 110.73, 71.26, 60.12, 58.98, 58.32, 57.38, 55.09, 50.17, 48.50, 46.20, 42.40, 39.64, 37.34, 36.80, 34.23, 33.20, 31.05, 29.90, 27.92, 26.48, 26.16, 24.05, 23.58, 17.40; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₅₆H₇₀N₁₁O₈S [M+H]⁺: 1056.5124; found 1056.5131.

[0100] 实施例7

[0101] (2S, 4R) -1-((S) -2-(8-(4-(4-((5, 11-二甲基-6-氧代-6, 11-二氢-5H-苯并[e]噻

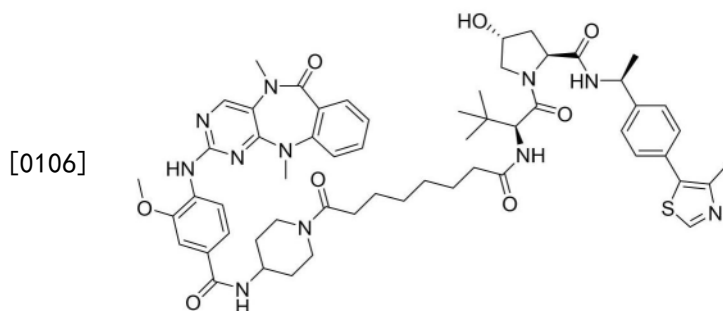
啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-(氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基)-8-氧辛基氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧酰胺(P-6)的合成

[0102] 步骤a:化合物12-5的合成



[0104] 将化合物11替换为化合物8-甲氧基-8-氧代辛酸,合成方法参考实施例2中步骤a。白色固体400mg,收率80%。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ: 8.49 (d, J=8.2Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.82 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.44 (d, J=1.4Hz, 1H), 7.40 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.32 (dd, J=8.6, 1.1Hz, 1H), 7.12 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.05 (d, J=8.3Hz, 1H), 6.26 (d, J=7.9Hz, 1H), 4.60 (d, J=13.0Hz, 1H), 4.15-4.23 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.86 (d, J=14.2Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.17 (t, J=12.1Hz, 1H), 2.71-2.80 (m, 1H), 2.11-2.17 (m, 1H), 1.98-2.03 (m, 1H), 1.56-1.63 (m, 10H), 1.42-1.44 (m, 2H), 1.35-1.39 (m, 2H)。

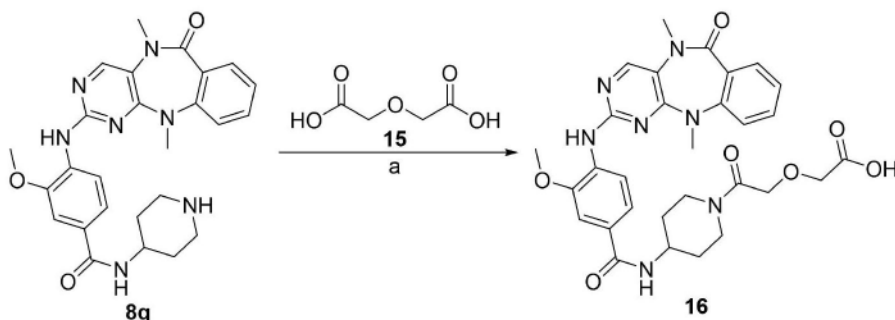
[0105] 步骤b:化合物P-6的合成



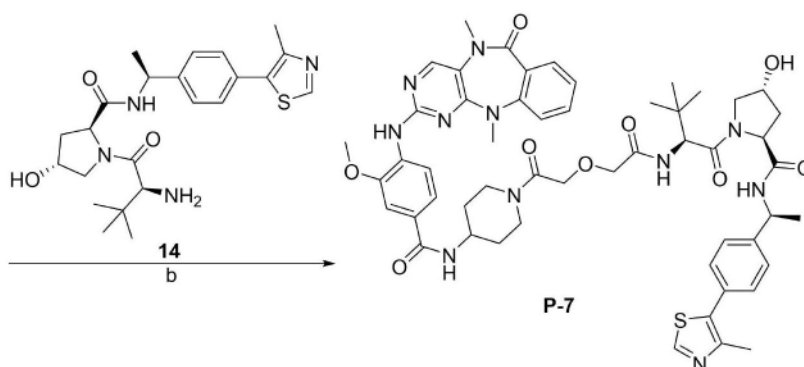
[0107] 合成方法参考实施例2中步骤b。白色固体39mg,收率28%。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 8.67 (s, 1H), 8.54 (dd, J=8.4, 5.1Hz, 1H), 8.18 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.84-7.87 (m, 2H), 7.34-7.50 (m, 9H), 7.15 (t, J=7.2Hz, 1H), 7.08 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.47 (dd, J=8.1, 69.1Hz, 1H), 6.30 (dd, J=8.6, 31.0Hz, 1H), 5.06-5.11 (m, 1H), 4.72 (q, J=8.6Hz, 1H), 4.57-4.64 (m, 2H), 4.50 (s, 1H), 4.19-4.27 (m, 1H), 4.03 (t, J=11.2Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.85-3.90 (m, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.56-3.60 (m, H), 3.51 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.16-3.21 (m, 1H), 2.72-7.78 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.29-2.40 (m, 2H), 1.98-2.25 (m, 8H), 1.59-1.64 (m, 4H), 1.48 (d, J=6.9Hz, 1H), 1.31-1.35 (m, 4H), 1.03 (d, J=3.2Hz, 1H); ¹³C NMR (150MHz, DMSO-d₆) δ: 175.05, 173.40, 173.04, 171.19, 169.57, 167.91, 165.06, 156.70, 152.62, 151.66, 150.60, 149.86, 148.78, 144.58, 133.84, 133.74, 132.94, 132.25, 130.91, 128.45, 127.84, 127.80, 125.24, 123.52, 120.66, 118.76, 117.77, 110.70, 71.86, 71.27, 59.98, 58.88, 58.19, 57.39, 50.19, 48.50, 46.16, 42.32, 39.63, 37.62, 37.32, 36.60, 34.45, 34.38, 33.26, 30.01, 29.87, 27.89, 26.55, 26.42, 23.60, 17.46; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₅₇H₇₂N₁₁O₈S [M+H]⁺: 1070.5281; found 1070.5285.

[0108] 实施例8

[0109] (2S,4R)-1-((S)-2-(2-(2-(4-(4-((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶并[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰氨基)哌啶-1-基)-2-氧代乙氧基)乙酰氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧酰胺(P-7)的合成



[0110]



[0111] 试剂和条件:a)EDCI,HOBT,DIPEA,DCM,rt,0.5h;b)EDCI,HOBT,DIPEA,DCM,rt,1h, two steps yield 30-40%.

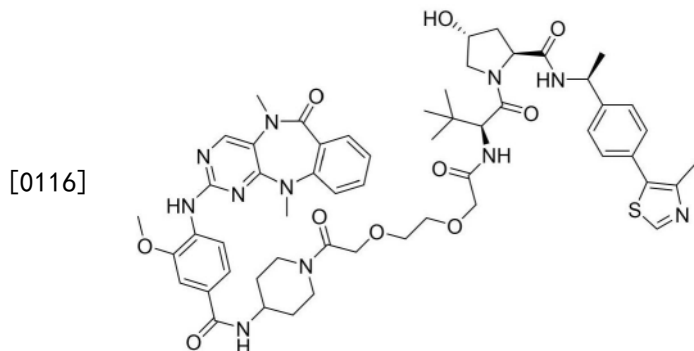
[0112] 步骤:化合物P-7的合成

[0113] 将化合物8g (500mg, 1.03mmol)、化合物15 (165mg, 1.23mmol) 溶于干燥的DCM (20mL) 中,再依次加入EDCI (287mg, 1.54mmol)、HOBT (209mg, 1.54mmol)、DIPEA (387mg, 3.08mmol), 室温条件下搅拌0.5h.待反应结束后,将反应液减压蒸馏,通过硅胶柱层析(DCM:MeOH=100:1)纯化得到化合物16.然后将化合物16 (300mg, 0.50mmol)、中间体8 (266mg, 0.60mmol)、EDCI (133mg, 0.70mmol)、HOBT (97mg, 0.70mmol) 以及DIPEA (258mg, 2.00mmol) 溶于干燥的DCM (20mL) 中,室温反应1h.TLC监测反应结束后,用饱和氯化钠溶液 (20mL) 洗涤反应液3次,无水硫酸钠干燥后,通过硅胶柱层析(DCM:MeOH=100:1)纯化,得到化合物P-7 (白色固体,154mg,收率30%).¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 8.68 (s, 1H), 8.55 (d, J=8.1Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.73-7.79 (m, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.87 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.32-7.57 (m, 9H), 7.16 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.10 (d, J=7.9Hz, 1H), 6.69 (d, J=46.8Hz, 1H), 5.01-5.13 (m, 1H), 4.48-4.78 (m, 4H), 4.08-4.28 (m, 4H), 3.96 (s, 3H), 3.64-3.80 (m, 2H), 3.52 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 3.14-3.21 (m, 1H), 2.80-2.87 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.33-2.43 (m, 2H), 2.01-2.20 (m, 4H), 1.45-1.48 (m, 3H), 1.31-1.37 (m, 2H), 1.11 (s, 9H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ: 171.43, 170.09, 169.88, 168.22, 166.64, 163.74, 155.24, 151.11, 150.32, 149.19, 148.41, 147.45, 146.43, 132.50, 132.36, 131.64, 130.73, 129.48, 126.95, 126.41, 123.89, 122.13, 119.54, 117.47, 116.51, 109.36, 70.10, 58.79, 57.38, 56.86, 56.02, 48.85, 46.99, 41.36,

38.29, 35.99, 35.37, 32.60, 31.82, 31.58, 29.69, 26.54, 22.62, 22.27, 16.07; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $C_{53}H_{64}N_{11}O_9S[M+H]^+$: 1030.4604; found 1030.4634.

[0114] 实施例9

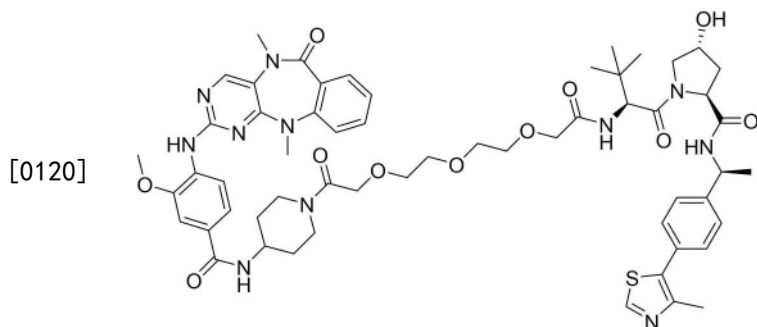
[0115] (2S,4R)-1-((S)-2-(2-(2-(2-(4-(4-((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基)-2-氧乙氧基)乙氧基)乙酰氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧酰胺(P-8)的合成



[0117] 将化合物15替换为3,6-辛二氧杂二酸,其他合成方法参考实施例8。白色固体90.6mg,收率40%。 1H NMR (600MHz, $CDCl_3$) δ : 8.68 (s, 1H), 8.55 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.85-7.90 (m, 2H), 7.38-7.51 (m, 5H), 7.30-7.35 (m, 3H), 7.17 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.04-7.14 (m, 2H), 6.78-6.84 (m, 1H), 5.06 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 4.57-4.63 (m, 2H), 4.45 (t, $J=23.2$ Hz, 2H), 4.17-4.23 (m, 2H), 3.73-3.86 (m, 4H), 3.67 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.11-3.23 (m, 1H), 2.76-2.87 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.30-2.37 (m, 1H), 1.75-2.01 (m, 8H), 1.48 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 9.01 (s, 9H); HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $C_{55}H_{68}N_{11}O_{10}S[M+H]^+$: 1074.4866; found 1074.4873.

[0118] 实施例10

[0119] (2S,4R)-1-((S)-2-(叔丁基)-14-(4-(4-((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-(氨基)-3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基)-4,14-二氧代-6,9,12-三氧杂-3-叠氮基硫烷基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑)-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧酰胺(P-9)的合成

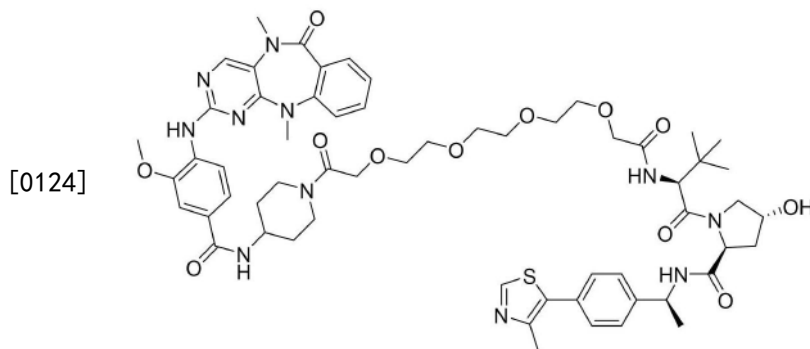


[0121] 将化合物15替换为2,2'-((氧基双(乙烷-2,1-二基))双(氧基))二乙酸,其他合成方法参考实施例8。白色固体84mg,收率34%。 1H NMR (600MHz, $CDCl_3$) δ : 8.65 (s, H), 8.48 (dd, $J=27.7, 8.2$ Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.83 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.32-7.49 (m, 9H), 7.12 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 5.01-5.11 (m, 1H), 4.46-4.68 (m, 4H), 4.15-

4.23(m, 2H), 3.91-3.96(m, 4H), 3.62-3.71(m, 8H), 3.48(s, 3H), 3.40(s, 3H), 3.04-3.19(m, 2H), 2.67-2.83(m, 4H), 2.51(s, 3H), 2.33-2.41(m, 1H), 2.05-2.13(m, 2H), 1.43-1.46(m, 4H), 1.38(d, J=6.5Hz, 3H), 1.04(s, 9H); ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ : 172.47, 171.88, 171.39, 169.57, 169.29, 167.88, 165.09, 155.64, 152.47, 151.68, 150.56, 149.77, 148.72, 144.70, 133.85, 133.72, 133.01, 132.12, 130.87, 127.60, 127.80, 125.23, 123.42, 121.05, 118.80, 117.83, 110.75, 72.78, 72.50, 71.94, 71.34, 60.22, 58.32, 57.36, 54.94, 50.19, 48.19, 45.86, 43.28, 42.89, 39.63, 37.33, 37.24, 34.17, 32.99, 27.85, 23.58, 19.94, 18.80, 17.42; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $\text{C}_{57}\text{H}_{72}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$: 1118.5128; found 1118.5101.

[0122] 实施例11

[0123] (2S, 4R) -1-((S) -2-(叔丁基) -17-(4-(4-((5, 11-二甲基-6-氧代-6, 11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5, 4-b][1, 4]二氮杂-2-(基)氨基) -3-甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基) -4, 17-二氧-6, 9, 12, 15-四氧-3-氮杂十七烷酰基) -4-羟基-N-((S) -1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-羧酰胺(P-10)的合成

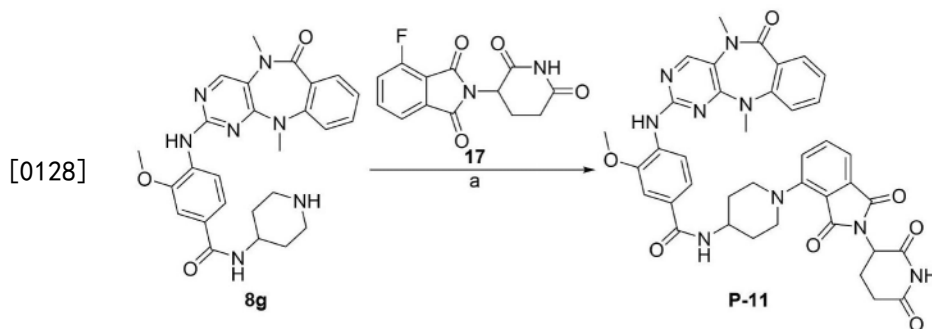


[0125] 将化合物15替换为3, 6, 9, 12-四氧杂十四烷-1, 14-二甲酸, 其他合成方法参考实施例8。白色固体57mg, 收率32%。 ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.63(s, 1H), 8.48(d, J=8.3Hz, 1H), 8.13(s, 1H), 7.82(s, 1H), 7.80(d, J=7.9Hz, 1H), 7.54(d, J=7.3Hz, 1H), 7.45(s, 1H), 7.28-7.43(m, 8H), 7.10(t, J=7.6Hz, 1H), 7.04(d, J=8.3Hz, 1H), 6.76(s, 1H), 4.99-5.07(m, 1H), 4.69(t, J=7.9Hz, 1H), 4.57(d, J=9.0Hz, 1H), 4.51(d, J=12.8Hz, 1H), 4.45(s, 1H), 4.10-4.28(m, 4H), 3.95-4.00(m, 2H), 3.92(s, 3H), 3.83-3.92(m, 2H), 3.60-3.67(m, 12H), 9.45(s, 3H), 3.38(s, 3H), 3.06-3.16(m, 1H), 2.74(t, J=12.09Hz, 1H), 2.62(s, 2H), 2.48(s, 3H), 2.31-2.38(m, 1H), 2.03-2.11(m, 2H), 1.45-1.55(m, 2H), 1.43(d, J=6.9Hz, 3H), 1.01(s, 9H); ^{13}C NMR (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 171.43, 170.30, 169.88, 168.20, 167.80, 166.56, 163.70, 155.30, 151.17, 150.28, 149.21, 148.46, 147.41, 132.48, 132.37, 130.80, 129.52, 127.12, 126.43, 123.87, 122.11, 119.38, 117.41, 116.42, 109.34, 71.05, 70.56, 70.45, 70.39, 70.02, 58.52, 57.04, 56.83, 56.04, 48.83, 47.05, 44.23, 41.29, 38.26, 35.97, 35.79, 35.41, 32.74, 31.87, 31.57, 29.68, 26.50, 22.22, 16.08, 14.10; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $\text{C}_{59}\text{H}_{76}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$: 1162.5390; found 1162.5424.

[0126] 实施例12

[0127] 4-(((5, 11-二甲基-6-氧代-6, 11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5, 4-b][1, 4]二氮杂-2-(基)氨基) -N-(1-(2-(2, 6-二氧代哌啶-3-基) -1, 3-二氧异吲哚-4-基)哌啶-4-基) -3-甲

氧基苯甲酰胺(P-11)的合成



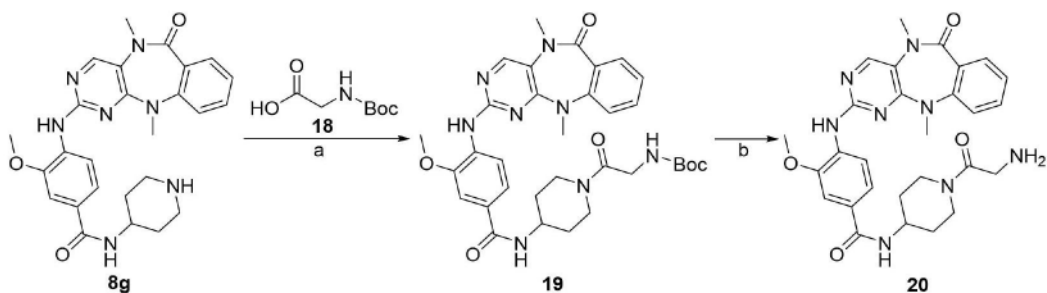
[0129] 试剂和条件:a)EDCI,HOBt,DIPEA,DCM,r.t.,2h,yield 63%.

[0130] 步骤:化合物P-11的合成

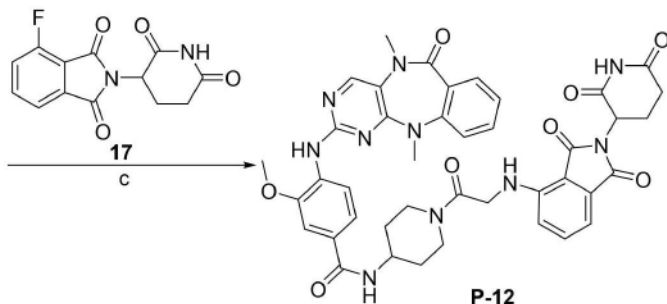
[0131] 将化合物8g (0.5g,1.03mmol) 和泊马度胺(331mg,1.23mmol) 溶于干燥DCM (20mL) 中,再依次加入EDCI (229mg,1.23mmol)、HOBt (167mg,1.23mmol) 以及DIPEA (258mg,2.05mmol),室温条件下反应2h.待反应结束后,将反应液以饱和氯化钠溶液洗涤(20mL×3)后,通过无水硫酸钠干燥,再以硅胶柱层析(DCM/MeOH=100:1)分离纯化,得到化合物P-11(黄色固体,100mg,收率36%).¹H NMR (600MHz,DMSO-d₆) δ:11.09(s,1H),8.45(s,1H),8.34(d,J=8.7Hz,1H),8.25(d,J=7.9Hz,1H),8.15(s,1H),7.66-7.73(m,2H),7.58(dd,J=1.8,8.3Hz,1H),7.48-7.55(m,2H),7.35(d,J=7.1Hz,1H),7.26(d,J=7.9Hz,3H),7.16-7.20(m,1H),5.10(dd,J=12.7,5.5Hz,1H),4.00-4.10(m,1H),3.94(s,3H),3.75(d,J=11.9Hz,3H),3.41(s,3H),3.36(s,3H),3.03(t,J=12.8Hz,1H),2.84-2.93(m,1H),2.52-2.64(m,2H),2.00-2.09(m,1H),1.90-1.97(m,2H),1.78-1.89(m,2H);¹³C NMR (150MHz,DMSO-d₆) δ:173.27,170.50,167.56,167.49,166.81,165.51,163.45,155.62,152.80,150.31,149.57,148.14,136.22,134.16,133.04,132.20,131.73,128.50,126.59,124.50,124.06,121.83,120.65,118.31,118.04,116.96,115.02,109.98,56.53,50.71,49.27,46.73,37.94,36.08,32.06,31.43,26.81,22.57;HRMS (ESI,positive)m/z calcd for C₃₉H₃₈N₉O₇[M+H]⁺:744.2889;found 744.2904.

[0132] 实施例13

[0133] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基)甘氨酸)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-12)的合成



[0134]



[0135] 试剂和条件:a) EDCI, HOBT, DIPEA, DCM, r. t., 1h, yield 80-90%; b) DCM, TFA, r. t., 2h, yield 90-95%; c) EDCI, HOBT, DIPEA, DCM, r. t., 2h, yield 60-65%.

[0136] 步骤a: 化合物19的合成

[0137] 将化合物8g (500mg, 1.03mmol) 和Boc-甘氨酸 (210mg, 1.23mmol) 溶于干燥DCM (20mL) 中, 搅拌下依次加入EDCI (287mg, 1.54mmol)、HOBT (209mg, 1.54mmol) 和DIPEA (387mg, 1.54mmol), 室温反应1h。TLC检测反应结束后, 将反应液以饱和氯化钠洗涤 (20mL × 3), 有机层以无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏, 硅胶柱层析 (hexane:EtOAc=4:1-1:1) 分离纯化得到化合物19 (黄色固体, 527mg, 收率80%)。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 8.46 (s, 1H), 8.34 (s, J=8.4Hz, 1H), 8.24 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.70 (dd, J=7.7, 1.6Hz, 1H), 7.56 (dd, J=8.4, 1.7Hz, 1H), 7.49-7.53 (m, 2H), 7.26 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.16-7.20 (m, 1H), 6.80-8.87 (m, 1H), 4.39 (d, J=13.1Hz, 1H), 3.99-4.09 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (d, J=13.4Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.12 (t, J=12.9Hz, 1H), 2.95 (q, J=6.5Hz, 1H), 2.64-2.71 (m, 1H), 2.32 (t, J=6.9Hz, 2H), 1.84 (dd, J=35.1, 10.5Hz, 2H), 1.38 (s, 9H)。

[0138] 步骤b: 化合物P-12的合成

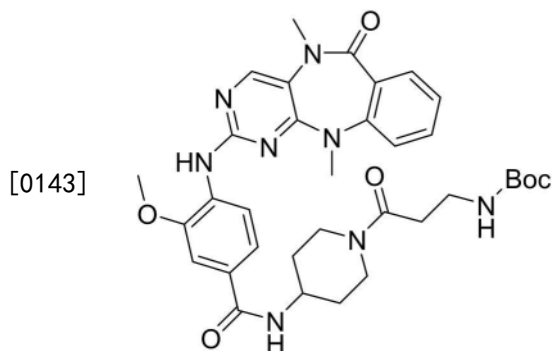
[0139] 将化合物19 (500mg, 0.78mmol) 置于25mL反应瓶中, 加入10mLDCM充分溶解, 缓慢滴加TFA (273.6mg, 2.33mmol), 室温反应2h。TLC监测反应结束后, 将反应液减压蒸馏, 无需进一步纯化, 得到化合物20的粗产品。然后将上一步获得的化合物20和泊马度胺 (248.4mg, 0.93mmol) 溶解于干燥DCM (20mL) 中, 再依次加入EDCI (229.2mg, 1.16mmol)、HOBT (166.8mg, 1.16mmol) 以及DIPEA (309.6mg, 2.33mmol), 室温条件下反应2h。待反应结束后, 用饱和氯化钠溶液洗涤反应液 (20mL × 3), 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏后以硅胶柱层析 (DCM/MeOH=100:1) 分离纯化得到化合物P-12 (黄色固体, 600mg, 收率37%)。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 11.11 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.34 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.22 (d, J=7.9Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.69 (dd, J=7.7, 1.5Hz, 1H), 7.62 (t, J=8.1Hz, 1H), 7.55 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.48-7.53 (m, 2H), 7.25 (d, J=8.5Hz, 1H), 7.18 (t, J=7.2Hz, 1H), 7.06-7.15 (m, 2H), 5.08 (dd, J=12.9, 5.3Hz, 1H), 4.34-4.48 (m, 1H), 4.15-4.33 (m, 2H), 4.06-4.14 (m, 1H), 3.94-4.00 (m, 1H),

3.93 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.12-3.27 (m, 1H), 2.69-2.96 (m, 2H), 2.50-2.65 (m, 2H), 1.98-2.01 (m, 1H), 1.86-1.96 (m, 2H), 2.69-2.96 (m, 2H), 1.41-1.63 (m, 1H), 1.13-1.35 (m, 1H); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ : 173.26, 170.53, 169.28, 167.82, 167.48, 166.60, 165.61, 163.44, 155.60, 152.81, 149.56, 148.15, 145.90, 136.64, 133.04, 132.50, 132.20, 131.77, 128.44, 126.58, 124.06, 121.83, 120.59, 118.76, 118.31, 118.01, 111.28, 110.02, 56.53, 49.07, 46.96, 44.14, 43.31, 41.30, 37.94, 36.07, 32.32, 31.64, 31.46, 22.62.

[0140] 实施例14

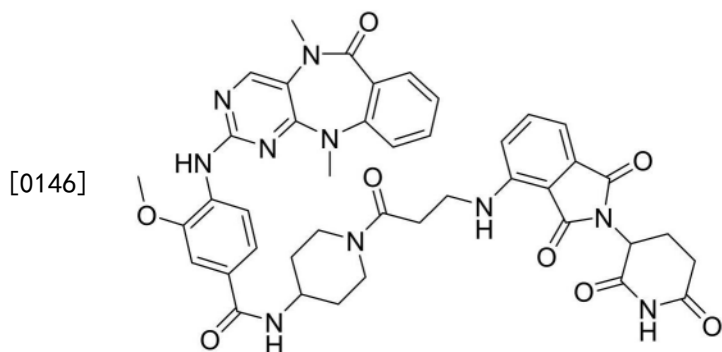
[0141] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(3-((2-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基)氨基)丙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-13)的合成

[0142] 步骤a:化合物19-1的合成



[0144] 将化合物18替换为Boc- β -丙氨酸,其他合成方法参考实施例13。白色固体286mg,收率88%。 ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 8.45 (s, 1H), 8.33 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 8.23 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.69 (dd, $J=7.8, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.55 (dd, $J=8.3, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.49-7.54 (m, 2H), 7.25 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.17 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 6.79-6.87 (m, 1H), 4.38 (d, $J=13.2\text{Hz}$, 1H), 4.00-4.09 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.87 (d, $J=13.3\text{Hz}$, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.11 (t, $J=13.0\text{Hz}$, 1H), 2.94 (q, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 2.64-2.70 (m, 1H), 2.31 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 1.75-1.90 (m, 2H), 1.58-1.62 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

[0145] 步骤b:化合物P-13的合成



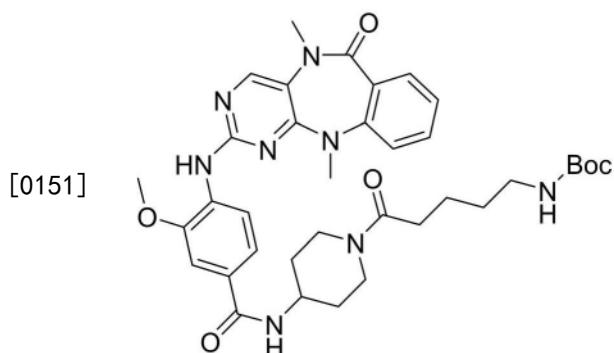
[0147] 合成方法参考实施例13。黄色固体80mg,收率29%。 ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 8.54 (dd, $J=8.7, 3.1\text{Hz}$, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.81-7.94 (m, 2H), 7.49-7.58 (m, 1H), 7.40-7.49 (m, 2H), 2.49 (dd, $J=8.6, 1.9\text{Hz}$, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.15-7.19 (m, 1H), 7.08-7.15 (m, 2H), 7.00 (dd, $J=8.7, 3.1\text{Hz}$, 1H), 6.48-6.65 (m, 1H), 6.39 (dd, $J=$

36.7, 8.3Hz, 1H), 4.87-4.96 (m, 1H), 4.63-4.72 (m, 1H), 4.15-4.26 (m, 1H), 3.99 (d, J=1.8Hz, 3H), 3.72-3.88 (m, 2H), 3.63-3.72 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.18 (t, J=12.4Hz, 1H), 2.69-2.91 (m, 4H), 2.54-2.64 (m, 1H), 2.00-2.14 (m, 3H); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ : 170.97, 169.35, 169.05, 168.71, 167.61, 166.70, 163.70, 155.31, 151.23, 149.23, 147.46, 146.55, 136.28, 132.59, 132.48, 127.17, 126.47, 123.86, 122.14, 119.24, 117.42, 116.70, 116.59, 116.37, 111.77, 110.37, 109.38, 56.03, 48.99, 47.12, 44.79, 41.10, 38.72, 35.95, 32.67, 32.24, 31.79, 31.44, 29.69, 22.66.

[0148] 实施例15

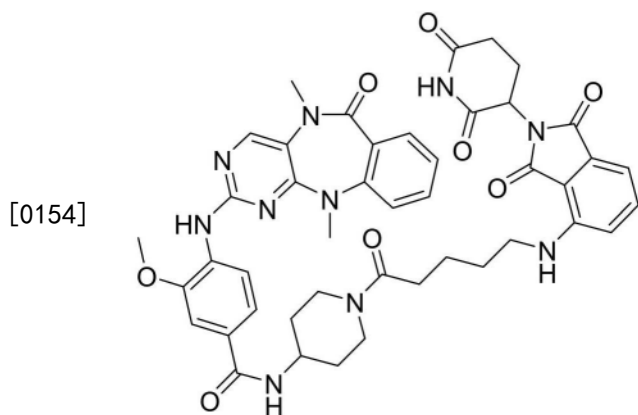
[0149] 4-((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)-氨基)-N-(1-(5-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚啉-4-基)氨基)戊酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-14)的合成

[0150] 步骤a:化合物19-2的合成



[0152] 将化合物18替换为Boc-5-氨基戊酸,其他合成方法参考实施例13。白色固体396mg,收率90%。 ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 8.45 (s, 1H), 8.33 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.10-8.21 (m, 1H), 7.69 (dd, J=7.7, 1.6Hz, 1H), 7.54 (dd, J=8.4, 1.6Hz, 1H), 7.47-7.53 (m, 2H), 7.25 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.18 (t, J=7.3Hz, 1H), 6.79 (t, J=5.4Hz, 1H), 4.38 (d, J=13.2Hz, 1H), 3.99-4.10 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.86-3.92 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.11 (t, J=12.3Hz, 1H), 2.92 (q, J=6.7Hz, 1H), 2.67 (t, J=11.7Hz, 1H), 2.31 (t, J=7.3Hz, 2H), 1.84 (dd, J=37.0, 11.0Hz, 2H), 1.44-1.52 (m, 3H), 1.37 (s, 9H).

[0153] 步骤b:化合物P-14的合成



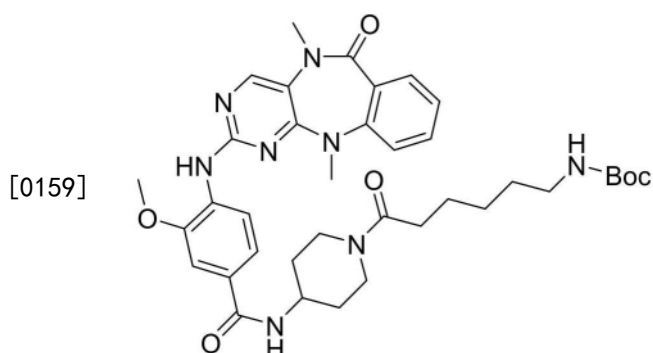
[0155] 合成方法参考实施例13步骤b。黄色固体200mg,收率41%。 ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 11.09 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.33 (d, J=8.7Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.69

(dd, J=7.8, 1.7Hz, 1H), 7.59 (t, J=8.1Hz, 1H), 7.48-7.56 (m, 3H), 7.25 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.18 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.12 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.02 (d, J=7.0Hz, 1H), 6.57 (t, J=5.6Hz, 1H), 5.05 (dd, J=12.8, 5.5Hz, 1H), 4.38 (d, J=12.9Hz, 1H), 3.99-4.99 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.86-3.92 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.08-3.18 (m, 2H), 2.83-2.95 (m, 1H), 2.64-2.71 (m, 1H), 2.54-2.61 (m, 1H), 2.51-2.54 (m, 1H), 2.39 (t, J=7.3, 1H), 2.00-2.05 (m, 1H), 1.78-1.89 (m, 2H), 1.56-1.68 (m, 4H), 1.33-1.53 (m, 3H); HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $C_{44}H_{47}N_{10}O_8$ [M+H]⁺: 843.3573; found 843.3575.

[0156] 实施例16

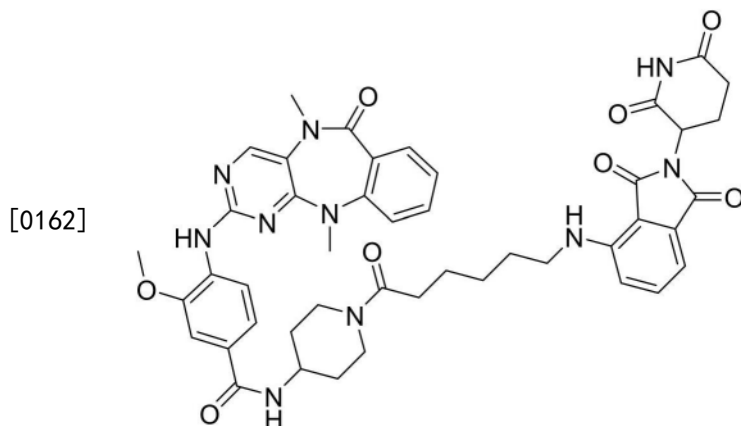
[0157] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(6-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基)氨基)己酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-15)的合成

[0158] 步骤a: 化合物19-3的合成



[0160] 将化合物18替换为6-((叔丁氧基羰基)氨基)己酸,其他合成方法参考实施例13。白色固体256mg,收率86%。¹H NMR(600MHz, DMSO-d₆) δ: 8.45 (s, 1H), 8.33 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.19 (d, J=7.5Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.69 (dd, J=7.8, 1.7Hz, 1H), 7.55 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.45-7.53 (m, 2H), 7.25 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.18 (t, J=7.3Hz, 1H), 6.77 (t, J=5.6Hz, 1H), 4.38 (d, J=13.2Hz, 1H), 4.00-4.08 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (d, J=13.7Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.11 (t, J=12.1Hz, 1H), 2.90 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.66 (t, J=11.9Hz, 1H), 2.30 (t, J=7.3Hz, 2H), 1.83 (dd, J=36.4, 10.4Hz, 2H), 1.44-1.53 (m, 4H), 1.37 (s, 9H), 1.23-1.29 (m, 4H)。

[0161] 步骤b: 化合物P-15的合成



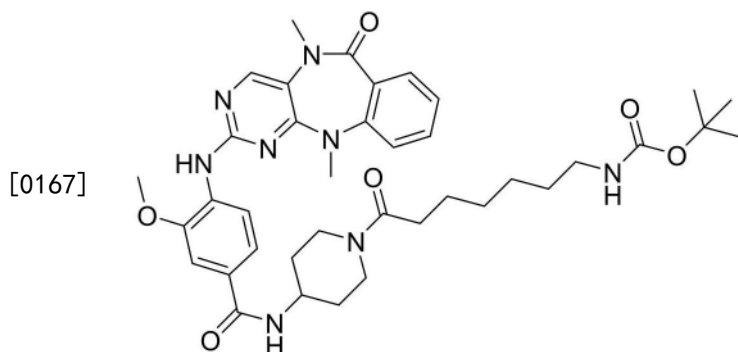
[0163] 合成方法参考实施例13步骤b。黄色固体90mg,收率28%。¹H NMR(600MHz, DMSO-d₆)

δ : 11.09 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.33 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 8.13-8.20 (m, 2H), 6.89 (dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, 1H), 7.56-7.61 (m, 1H), 7.53-7.56 (m, 1H), 7.47-7.53 (m, 2H), 7.25 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.18 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 6.54 (t, $J=5.8$ Hz, 1H), 6.05 (dd, $J=5.6, 13.0$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 3.99-4.08 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.87-3.92 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.27-3.32 (m, 2H), 3.11 (t, $J=12.1$ Hz, 1H), 2.83-2.92 (m, 1H), 2.56-2.62 (m, 1H), 2.51-2.56 (m, 1H), 2.29-2.37 (m, 2H), 2.00-2.06 (m, 1H), 1.77-1.90 (m, 2H), 1.50-1.64 (m, 4H), 1.24-1.41 (m, 4H); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ : 173.25, 170.83, 170.55, 169.42, 167.76, 167.48, 165.50, 163.43, 155.60, 152.80, 149.56, 148.14, 146.91, 136.75, 133.04, 132.67, 132.20, 131.75, 128.45, 126.59, 124.05, 121.83, 120.57, 118.31, 118.00, 117.66, 110.85, 109.97, 109.45, 56.52, 49.02, 47.09, 44.58, 42.26, 40.75, 37.94, 36.07, 32.72, 31.80, 31.44, 29.04, 26.61, 25.16, 22.63; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{N}_{10}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 857.3429; found 3757.

[0164] 实施例17

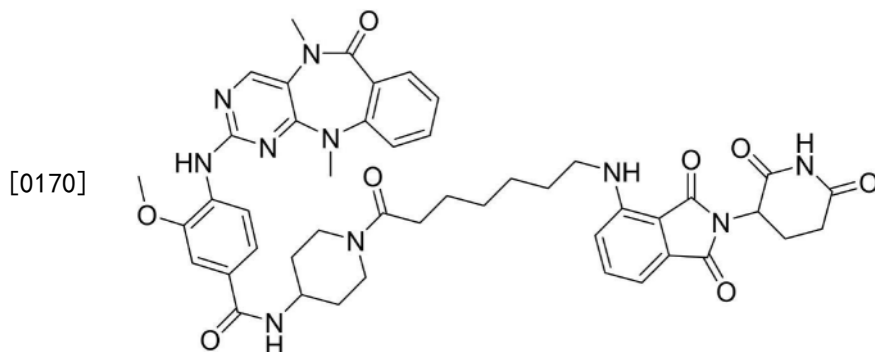
[0165] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(7-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基)氨基)庚酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-16)的合成

[0166] 步骤a: 化合物19-4的合成



[0168] 将化合物18替换为7-(N-叔丁氧羰基氨基)庚酸,其他合成方法参考实施例13。白色固体240mg,收率82%。 ^1H NMR(600MHz, CDCl_3) δ : 8.44 (s, 1H), 8.32 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.69 (dd, $J=7.7, 1.2$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.48-7.54 (m, 2H), 7.25 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 4.39 (d, $J=12.8$ Hz, 1H), 4.01-4.10 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (d, $J=12.8$ Hz, 1H), 3.54-3.69 (m, 4H), 3.40 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.10 (t, $J=12.5$ Hz, 1H), 2.66 (t, $J=12.0$ Hz, 1H), 2.55-2.63 (m, 2H), 2.31 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.83 (dd, $J=36.4, 11.5$ Hz, 2H), 1.34-1.54 (m, 6H), 1.28 (s, 9H).

[0169] 步骤b: 化合物P-16的合成

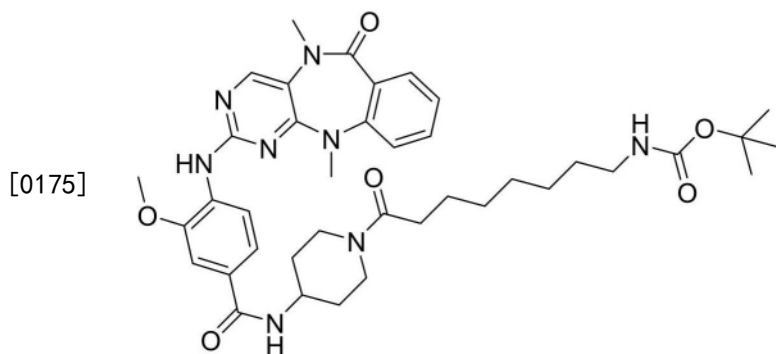


[0171] 合成方法参考实施例13步骤b。黄色固体90mg,收率36%。¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆) δ:11.09(s,1H),8.44(s,1H),8.33(d,J=8.5Hz,1H),8.16(d,J=8.1Hz,1H),8.14(s,1H),7.69(dd,J=7.8,1.6Hz,1H),7.55-7.59(m,1H),7.54(dd,J=8.6,1.8Hz,1H),7.47-7.52(m,2H),7.25(d,J=8.3Hz,1H),7.17(t,J=7.8Hz,1H),7.01(d,J=6.9Hz,1H),6.53(t,J=5.7Hz,1H),5.05(dd,J=12.9,5.4Hz,1H),4.39(d,J=12.5Hz,1H),4.00-4.99(m,1H),3.94(s,3H),3.88(d,J=12.8Hz,1H),3.41(s,3H),3.35(s,3H),3.29(q,J=6.5Hz,1H),3.11(t,J=12.4Hz,1H),2.82-2.93(m,1H),2.66(t,J=11.6Hz,1H),2.50-2.62(m,2H),2.31(t,J=7.5Hz,1H),2.00-2.06(m,1H),1.79-1.88(m,2H),1.55-1.60(m,2H),1.49-1.53(m,2H),1.33-1.38(m,4H),1.21-1.26(m,2H);¹³C NMR(150MHz,DMSO-d₆) δ:173.25,170.87,170.54,169.43,167.76,167.48,165.51,163.43,155.59,152.77,149.55,148.11,146.91,136.73,133.03,132.67,132.20,131.75,128.42,126.58,124.04,121.83,120.58,118.29,117.95,117.63,110.84,109.96,109.51,56.51,55.36,49.02,47.10,44.59,42.28,40.74,37.93,36.07,32.73,31.81,31.44,31.41,29.06,29.00,26.72,25.38,22.93,22.62,22.51,14.41;HRMS(ESI,positive)m/z calcd for C₄₅H₄₉N₁₀O₈[M+H]⁺:871.3886;found 871.3871.

[0172] 实施例18

[0173] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]咪唑基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(8-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基)氨基)辛酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-17)的合成

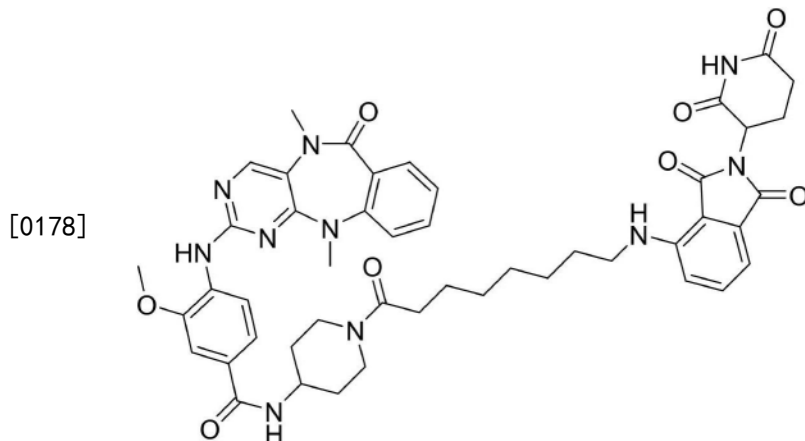
[0174] 步骤a:化合物19-5的合成



[0176] 将化合物18替换为Boc-8-氨基辛酸,其他合成方法参考实施例13。白色固体251mg,收率85%。¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ:8.50(d,J=7.8Hz,1H),8.29(d,J=7.1Hz,1H),8.16(s,1H),7.86-7.95(m,1H),7.84(dd,J=7.9,1.4Hz,1H),7.47(t,J=7.5Hz,1H),7.38-7.45(m,2H),7.29(d,J=8.5Hz,1H),7.13(t,J=7.6Hz,1H),7.07(s,1H),7.06(s,1H),6.86

(d, J=8.6Hz, 1H), 6.21 (t, J=5.7Hz, 1H), 6.07 (d, J=7.5Hz, 1H), 4.89 (dd, J=12.3, 5.2Hz, 1H), 4.60 (d, J=12.7Hz, 1H), 4.15-4.25 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.86 (d, J=12.7Hz, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.25 (q, J=6.6Hz, 2H), 3.19 (t, J=12.5Hz, 1H), 2.64-2.90 (m, 4H), 2.33 (dd, J=12.7, 7.5Hz, 2H), 1.96-2.18 (m, 3H), 1.36 (s, 9H).

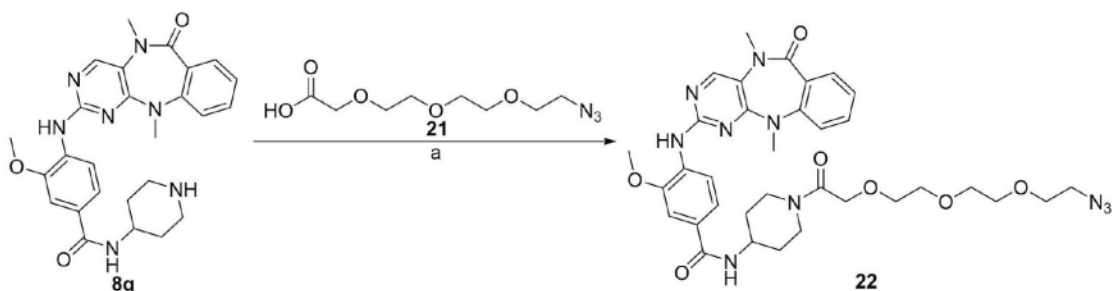
[0177] 步骤b: 化合物P-17的合成



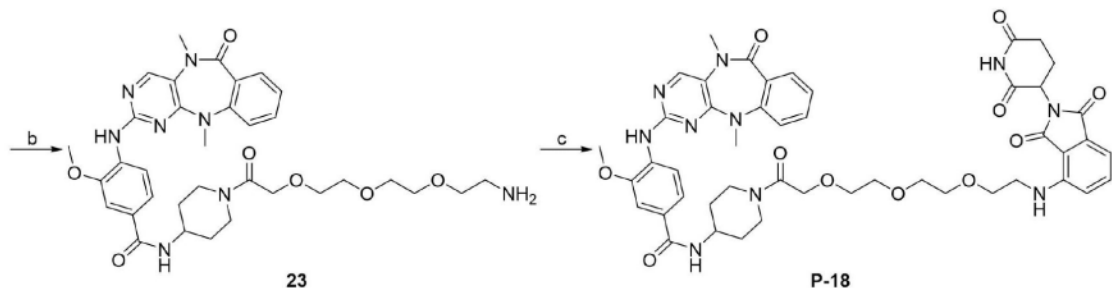
[0179] 合成方法参考实施例13步骤b。黄色固体60mg, 收率28%。¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 8.50 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.29 (d, J=7.1Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.86-7.95 (m, 1H), 7.84 (dd, J=7.7, 1.4Hz, 1H), 7.47 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.39-7.45 (m, 2H), 7.29 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.13 (t, J=7.7Hz, 1H), 7.07 (d, J=7.3Hz, 1H), 6.86 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.21 (t, J=5.6Hz, 1H), 6.07 (d, J=7.7Hz, 1H), 4.89 (dd, J=12.3, 5.3Hz, 1H), 4.61 (d, J=12.8Hz, 1H), 4.15-4.25 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.82-3.91 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.25 (q, J=6.8Hz, 2H), 3.19 (t, J=12.3Hz, 1H), 2.64-2.92 (m, 4H), 2.26-2.41 (m, 2H), 1.97-2.18 (m, 3H), 1.52-1.70 (m, 10H), 1.34-1.39 (m, 4H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ: 172.93, 172.35, 170.92, 169.74, 169.55, 169.00, 167.90, 165.14, 148.95, 148.40, 137.50, 133.86, 133.77, 127.84, 125.29, 120.36, 118.80, 118.03, 117.89, 112.78, 111.26, 110.69, 57.41, 50.27, 48.63, 45.96, 43.98, 42.12, 39.66, 39.66, 37.37, 34.70, 34.41, 33.33, 32.79, 30.66, 30.50, 30.42, 28.12, 26.60, 24.20; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₄₇H₅₃N₁₀O₂ [M+H]⁺: 885.4042; found 885.4048.

[0180] 实施例19

[0181] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]咪唑基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(2-(2-(2-(2-((2-(2-2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚啉-4-基)氨基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-18)的合成



[0182]



[0183] 试剂和条件:a) EDCI, HOBT, DIPEA, DCM, rt, 1h, yield 68%; b) DCM, H₂, Pd/C, rt, overnight, yield 85%; c) EDCI, HOBT, DIPEA, DCM, rt, 1h, yield 78%.

[0184] 步骤a: 化合物22的合成

[0185] 将化合物8g (1.0g, 2.05mmol) 和化合物21 (662mg, 2.46mmol) 溶于干燥DCM (50mL) 中, 再依次加入EDCI (458mg, 2.46mmol)、HOBT (333mg, 2.46mmol)、DIPEA (516mg, 4.10mmol), 室温条件下反应2h。TLC监测反应结束后, 将反应液减压蒸馏, 再通过硅胶柱层析 (DCM/MeOH = 100:0.5) 分离纯化, 得到化合物22 (白色固体, 963mg, 收率68%)。¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 8.53 (d, J=8.2Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.85 (dd, J=7.8, 1.7Hz, 1H), 7.43-7.49 (m, 2H), 7.41 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 7.12 (d, J=8.3Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.38 (d, J=8.2Hz, 1H), 4.52 (d, J=13.0Hz, 1H), 4.21-4.67 (m, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.78-3.84 (m, 1H), 3.70-3.77 (m, 10H), 3.51 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 3.15-3.20 (m, 2H), 2.75-2.81 (m, 1H), 1.97-2.10 (m, 2H), 1.61-1.74 (m, 2H)。

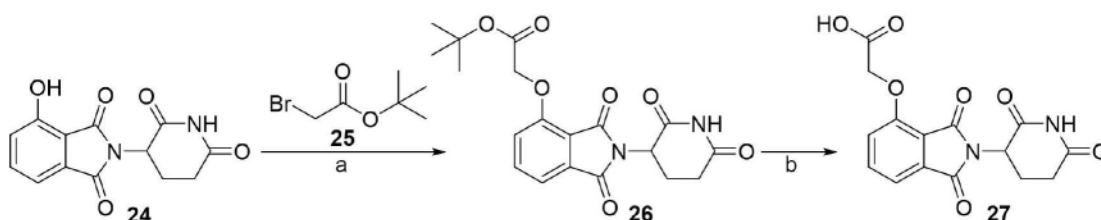
[0186] 步骤b: 化合物P-18的合成

[0187] 将化合物22 (0.5g, 0.71mmol) 溶于DCM (20mL) 中, 再加入0.1g钯碳, 在室温、氢气条件下反应过夜。TLC监测反应结束后, 将反应液用硅藻土过滤, 滤液减压蒸馏, 无需进一步纯化, 得到化合物23的粗产品400mg。然后将化合物23 (300mg, 0.44mmol)、泊马度胺 (138mg, 0.53mmol) 溶于干燥的DCM (15mL) 中, 再依次加入EDCI (115mg, 0.66mmol)、HOBT (83mg, 0.66mmol)、DIPEA (194mg, 1.50mmol), 室温条件下反应2h。待反应结束后将反应液用饱和氯化钠溶液洗涤 (20mL × 3), 有机层以无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏, 再通过硅胶柱层析 (DCM/MeOH = 100:1) 分离纯化, 得到化合物P-18 (黄色固体, 508.9mg, 收率78%)。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 11.09 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.32 (d, J=8.5Hz, 1H), 8.17 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.69 (dd, J=7.8, 1.7Hz, 1H), 7.47-7.58 (m, 4H), 7.25 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.18 (t, J=7.8Hz, 1H), 7.12 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.02 (d, J=7.1Hz, 1H), 6.59 (t, J=5.8Hz, 1H), 5.05 (dd, J=12.9, 5.6Hz, 1H), 4.32 (d, J=14.0Hz, 1H), 4.09-4.13 (m, 1H), 4.00-4.07 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.83 (d, J=14.2Hz, 1H), 3.61 (t, J=5.6Hz, 1H), 3.51-3.59 (m, 7H), 3.42-3.51 (m, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.16 (d, J=5.0Hz, 1H), 3.02-3.10 (m, 1H), 2.82-2.91 (m,

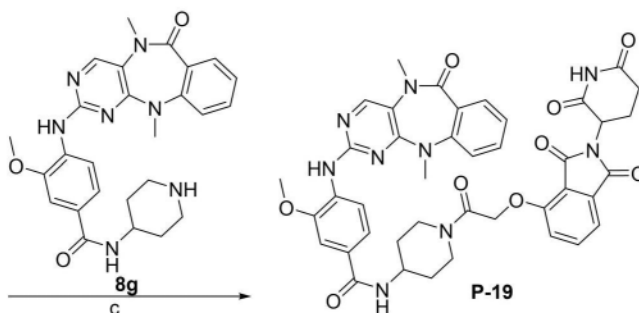
1H), 2.71 (t, J=12.5Hz, 1H), 2.55-2.64 (m, 1H), 1.94-2.06 (m, 2H), 1.84 (t, J=13.4Hz, 1H), 1.32-1.56 (m, 3H); ¹³C NMR (150MHz, DMSO-d₆) δ: 173.25, 170.52, 169.40, 167.74, 167.48, 165.52, 163.44, 155.59, 152.80, 149.56, 148.12, 148.86, 136.67, 133.04, 132.55, 132.20, 131.74, 128.42, 126.59, 124.05, 121.83, 120.59, 118.31, 117.98, 117.86, 111.12, 109.97, 109.72, 70.25, 70.14, 70.07, 69.36, 49.03, 46.98, 43.93, 42.15, 40.87, 37.94, 36.07, 32.57, 31.71, 31.44, 22.61; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₄₇H₅₃N₁₀O₁₁ [M+H]⁺: 933.3890; found 933.3867.

[0188] 实施例20

[0189] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(2-((2-(2,6-二氧杂哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基氧基)乙酰基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-19)的合成



[0190]



[0191] 试剂和条件:a) DIPEA, DMF, 80°C, 8h, yield 58%; b) DCM, TFA, rt, 2h, yield 90-95%; c) EDCI, HOBT, DIPEA, DCM, rt, 1h, yield 38%.

[0192] 步骤: 化合物P-19的合成

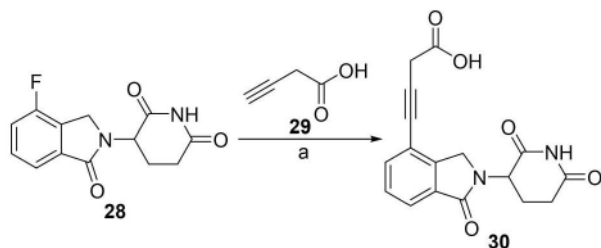
[0193] 将化合物24 (110mg, 0.40mmol) 和化合物25 (94mg, 0.48mmol) 溶于干燥DMF (10mL) 中, 加入DIPEA (104mg, 0.80mmol), 再转移至80°C 搅拌过夜。TLC检测反应结束后, 将反应液倒入300mL水中, 乙酸乙酯萃取 (20mL × 3), 收集有机层, 用饱和氯化钠溶液 (100mL) 洗涤3次, 经无水硫酸钠干燥, 过滤后将滤液浓缩, 得到的粗产品经硅胶柱层析 (DCM/MeOH=100:1) 分离纯化得到化合物26 (黄色固体, 90mg, 收率58%)。

[0194] 将化合物26 (90mg, 0.23mmol) 置于25mL反应瓶中, 加入10mL DCM充分溶解, 缓慢滴加TFA (2mL), 室温反应2h。TLC监测反应结束后, 将反应液减压蒸馏, 无需进一步纯化, 得到化合物27的粗产品。将化合物8g (113mg, 0.23mmol) 和化合物27 (92mg, 0.28mmol) 溶于干燥DCM (10mL) 中, 再依次加入EDCI (53mg, 0.28mmol)、HOBT (38mg, 0.28mmol)、DIPEA (60mg, 0.46mmol), 室温条件下反应2h。TLC监测反应结束后, 将反应液减压蒸馏, 再通过硅胶柱层析 (DCM/MeOH=100:1) 分离纯化, 得到化合物P-19 (黄色固体, 70mg, 收率38%)。 ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 11.12 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.34 (d, J=8.6Hz, 1H), 8.23 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.78 (t, J=8.1Hz, 1H), 7.69 (dd, J=7.8, 1.4Hz, 1H), 7.56 (d, J=8.4Hz,

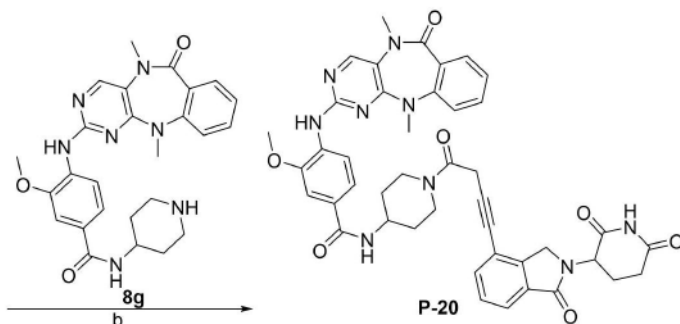
1H), 7.48-7.53 (m, 2H), 7.46 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.33 (d, J=8.7Hz, 1H), 7.26 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.18 (t, J=7.3Hz, 1H), 5.21-5.34 (m, 1H), 5.11 (dd, J=12.9, 5.5Hz, 1H), 4.3 (d, J=11.3Hz, 1H), 4.04-4.14 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.86 (d, J=13.1Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.20 (t, J=11.9Hz, 1H), 2.85-2.94 (m, 1H), 2.80 (t, J=11.6Hz, 1H), 2.53-2.64 (m, 1H), 2.01-2.08 (m, 1H), 1.82-1.95 (m, 2H), 1.58-1.66 (m, 1H), 1.41-1.52 (m, 1H), 1.16-1.31 (m, 2H); ¹³C NMR (150MHz, DMSO-d₆) δ: 170.24, 170.39, 167.49, 167.27, 165.71, 165.62, 165.28, 163.44, 155.16, 155.60, 152.80, 149.56, 148.14, 136.97, 133.60, 133.04, 132.20, 1321.78, 128.44, 126.58, 124.06, 121.84, 120.62, 118.30, 117.99, 116.65, 115.92, 110.02, 66.65, 60.21, 56.53, 49.24, 46.96, 43.59, 41.10, 37.94, 36.08, 32.40, 31.61, 31.42, 22.47, 21.22, 14.55; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₄₁H₄₀N₉O₉ [M+H]⁺: 802.2944; found 802.2959.

[0195] 实施例21

[0196] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(6-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)六-5-炔基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-20)的合成



[0197]



[0198] 试剂和条件:a) DIPEA, DMF, 90°C, 5h, yield 69%; b) EDCI, HOBT, DIPEA, DCM, 2h, yield 85%.

[0199] 步骤a: 化合物30的合成

[0200] 合成方法参照文献(Wang, B., et al., Eur J Med Chem, 2021, 219:113425.)。

[0201] 步骤b: 化合物P-20的合成

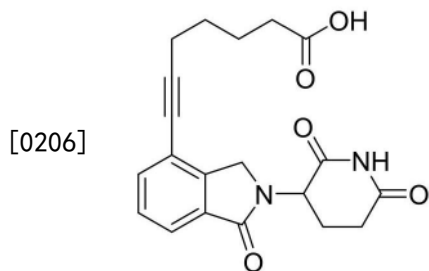
[0202] 将化合物8g (83mg, 0.17mmol) 和化合物30 (67mg, 0.21mmol) 溶于干燥DCM (10mL) 中, 再依次加入EDCI (40mg, 0.21mmol)、HOBT (28mg, 0.21mmol)、DIPEA (27mg, 0.34mmol), 室温条件下反应2h。TLC监测反应结束后, 将反应液减压蒸馏, 再通过硅胶柱层析 (DCM/MeOH=100:1) 分离纯化, 得到化合物P-20 (黄色固体, 50mg, 收率37%)。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 10.99 (d, J=4.5Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.33 (d, J=8.5Hz, 1H), 8.11-8.19 (m, 2H), 7.67-7.72 (m, 2H), 7.63 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.47-7.59 (m, 6H), 7.26 (d, J=8.5Hz, 1H), 7.18 (t, J=

7.8Hz, 1H), 5.16 (dd, J=13.2, 5.3Hz, 1H), 4.47 (d, J=17.94Hz, 1H), 4.37 (d, J=13.8Hz, 1H), 4.32 (d, J=17.5Hz, 1H), 4.01-4.07 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.91 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.09-3.16 (m, 1H), 2.88-2.97 (m, 1H), 2.64-2.71 (m, 1H), 2.56-2.62 (m, 1H), 2.40 (t, J=7.0Hz, 1H), 1.97-2.04 (m, 1H), 1.78-1.89 (m, 1H), 1.67-1.73 (m, 2H), 1.58-1.64 (m, 2H), 1.44-1.50 (m, 1H), 1.34-1.41 (m, 1H), 1.21-1.29 (m, 1H); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ : 173.31, 171.43, 170.70, 168.12, 167.46, 165.49, 163.43, 155.59, 152.80, 149.55, 148.13, 144.31, 134.37, 133.02, 132.43, 132.18, 131.73, 131.16, 129.04, 128.44, 126.57, 124.04, 123.06, 121.81, 120.55, 119.28, 118.30, 118.00, 109.96, 96.67, 56.50, 52.03, 47.42, 47.07, 44.52, 37.92, 36.05, 32.69, 32.14, 31.78, 31.69, 28.09, 24.55, 22.76, 19.04.

[0203] 实施例22

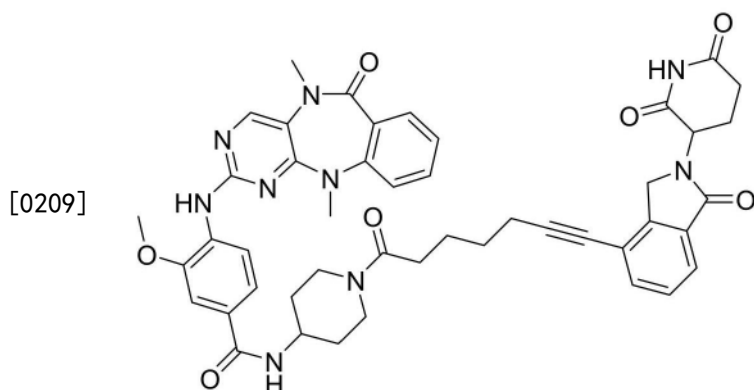
[0204] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(7-(2-(2,6-二氧化代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)庚-6-炔基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-21)的合成

[0205] 步骤a: 化合物30-1的合成



[0207] 将化合物29替换为6-庚炔酸,其他合成方法参考实施例21步骤a。淡蓝色固体325mg, 收率55%。 ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 12.04 (s, 1H), 10.98 (s, 1H), 7.71 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.63 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.52 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.37-7.43 (m, 2H), 5.14 (dd, J=13.2, 4.5Hz, 1H), 4.38 (dd, J=85.2, 17.5Hz, 2H), 2.87-2.96 (m, 1H), 2.57-2.64 (m, 1H), 2.25-2.34 (m, 1H), 1.94-2.06 (m, 1H), 1.52-1.73 (m, 4H).

[0208] 步骤b: 化合物P-21的合成



[0210] 合成方法参考实施例21步骤b。黄色固体90mg, 收率35%。 ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 10.99 (d, J=3.9Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.33 (d, J=8.1Hz, 1H), 8.03-8.23 (m, 2H), 7.70 (t, J=8.4Hz, 2H), 7.63 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.44-7.58 (m, 4H), 7.25 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.18 (t, J=8.4Hz, 1H).

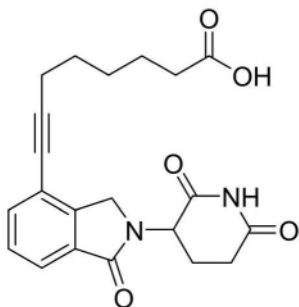
=7.3Hz, 1H), 5.16 (dd, J=12.8, 4.8Hz, 1H), 4.27-4.42 (m, 2H), 4.01-4.06 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.90 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.12 (t, J=12.9Hz, 1H), 2.85-2.97 (m, 1H), 2.67 (t, J=11.8Hz, 1H), 2.59 (d, J=17.0Hz, 1H), 2.39 (t, J=7.1Hz, 1H), 1.99-2.04 (m, 1H), 1.76-1.90 (m, 2H), 1.55-1.75 (m, 4H), 1.32-1.19 (m, 3H); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ : 173.30, 171.42, 168.12, 167.46, 165.50, 163.43, 155.58, 152.78, 149.54, 148.13, 144.30, 134.37, 133.02, 132.43, 132.18, 131.73, 129.04, 128.44, 126.57, 124.04, 123.05, 121.81, 120.55, 119.28, 118.29, 118.00, 109.97, 96.67, 77.07, 55.50, 52.04, 47.42, 47.07, 44.52, 40.73, 37.92, 36.05, 32.70, 32.15, 31.78, 31.68, 28.12, 124.55, 22.77, 19.05; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{48}\text{N}_9\text{O}_7$ [M+H] $^+$: 838.3677; found 838.3657.

[0211] 实施例23

[0212] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]嘧啶基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(8-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)辛-7-炔基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-22)的合成

[0213] 步骤a: 化合物30-2的合成

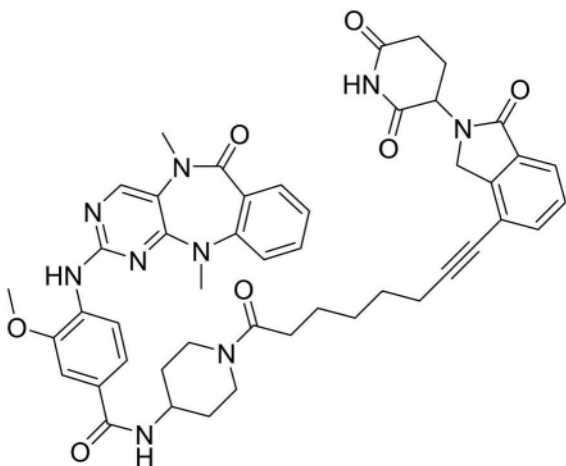
[0214]



[0215] 将化合物29替换为7-辛炔酸,其他合成方法参考实施例21步骤a。淡蓝色固体 371mg, 收率51%。 ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.00 (s, 1H), 10.97 (s, 1H), 7.75-7.67 (m, 1H), 7.65-7.57 (m, 1H), 7.51 (t, J=7.6Hz, 1H), 5.14 (dd, J=13.3, 5.0Hz, 1H), 4.45 (d, J=17.7Hz, 1H), 4.32 (d, J=17.7Hz, 1H), 2.98-2.89 (m, 1H), 2.62-2.56 (m, 1H), 2.54-2.48 (m, 3H), 2.25 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.14-1.93 (m, 1H), 1.77-1.26 (m, 6H); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 174.87, 173.34, 171.46, 168.16, 144.24, 134.54, 132.45, 129.07, 123.07, 119.34, 96.74, 76.92, 52.15, 47.48, 34.06, 31.69, 28.31, 28.24, 24.51, 22.84, 19.16; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$ $^+$ 383.1597, found [M+H] $^+$ 383.2847

[0216] 步骤b: 化合物P-22的合成

[0217]



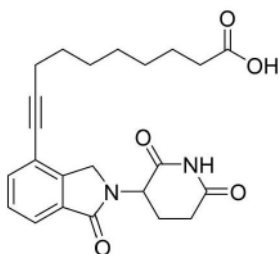
[0218] 合成方法参考实施例21步骤b。黄色固体80mg,收率40%。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 11.01 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.33 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.01-8.21 (m, 2H), 7.66-7.73 (m, 2H), 7.64 (d, J=7.7Hz, 1H), 7.47-7.58 (m, 4H), 7.25 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.17 (t, J=3.7Hz, 1H), 5.15 (dd, J=13.6, 5.1Hz, 1H), 4.39 (dd, J=84.3, 18.0Hz, 2H), 4.38 (d, J=12.5Hz, 1H), 4.00-4.12 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.90 (d, J=14.3Hz, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.11 (t, J=12.8Hz, 1H), 2.87-2.96 (m, 1H), 2.57-2.70 (m, 2H), 2.44-2.50 (m, 2H), 2.35 (t, J=7.3Hz, 1H), 1.97-2.05 (m, 1H), 1.83 (dd, J=34.5, 10.6Hz, 2H), 1.55-1.62 (m, 3H), 1.43-1.50 (m, 3H), 1.35-1.40 (m, 1H), 1.22-1.27 (m, 1H); ¹³C NMR (150MHz, DMSO-d₆) δ: 173.27, 171.41, 170.82, 168.11, 167.46, 165.52, 163.42, 155.58, 152.77, 149.54, 148.11, 144.20, 134.50, 133.01, 132.44, 132.18, 131.74, 129.02, 128.44, 126.57, 124.03, 123.02, 121.82, 120.56, 119.32, 118.28, 117.97, 109.97, 96.78, 76.89, 56.51, 52.13, 47.45, 47.09, 44.55, 40.73, 37.91, 36.05, 32.71, 31.78, 31.67, 28.59, 28.37, 24.91, 22.80, 19.17; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₄₇H₄₈N₉O₇ [M-H]⁻: 850.3682; found 850.3685.

[0219] 实施例24

[0220] 4-(((5,11-二甲基-6-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[e]咪唑基[5,4-b][1,4]二氮杂-2-基)氨基)-N-(1-(10-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)癸-9-炔基)哌啶-4-基)-3-甲氧基苯甲酰胺(P-23)的合成

[0221] 步骤a: 化合物30-3的合成

[0222]

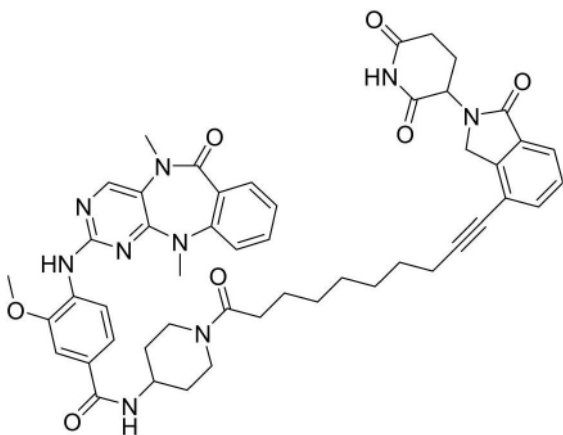


[0223] 将化合物29替换为癸-9-炔酸,其他合成方法参考实施例21步骤a。淡蓝色固体331mg,收率59%。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 11.96 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 7.70 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.63 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.51 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.29-7.41 (m, 1H), 5.14 (dd, J=13.4, 5.0Hz, 1H), 4.37 (dd, J=82.3, 17.6Hz, 1H), 2.87-2.96 (m, 1H), 2.56-2.63 (m, 1H), 2.40-2.49 (m, 3H), 2.19 (t, J=7.5Hz, 2H), 1.93-2.06 (m, 1H), 1.53-1.60 (m, 2H), 1.46-1.53

(m, 2H), 1.38-1.56 (m, 2H), 1.24-1.35 (m, 4H).

[0224] 步骤b: 化合物P-23的合成

[0225]



[0226] 黄色固体60mg, 收率38%。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 11.02 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.34 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.10-8.22 (m, 2H), 7.71 (t, J=7.7Hz, 1H), 7.64 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.47-7.60 (m, 4H), 7.26 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.19 (t, J=7.7Hz, 1H), 5.16 (dd, J=5.1, 12.5Hz, 1H), 4.39 (dd, J=80.3, 17.4Hz, 2H), 4.39 (d, J=12.2Hz, 1H), 4.00-4.10 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.11 (t, J=13.2Hz, 1H), 2.88-2.98 (m, 1H), 2.67 (t, J=12.5Hz, 1H), 2.61 (d, J=17.3Hz, 1H), 2.41-2.49 (m, 2H), 2.32 (t, J=7.6Hz, 2H), 2.00-2.07 (m, 1H), 1.85 (dd, J=11.8, 35.3Hz, 1H), 1.55-1.63 (m, 2H), 1.49-1.55 (m, 2H), 1.42-1.46 (m, 2H), 1.22-1.36 (m, 6H), 0.81-0.90 (m, 1H); ¹³C NMR (150MHz, DMSO-d₆) δ: 173.28, 171.42, 170.89, 168.10, 167.45, 165.49, 163.41, 155.57, 152.76, 149.53, 148.09, 144.16, 134.47, 133.01, 132.41, 132.18, 131.73, 129.03, 128.41, 126.56, 124.02, 123.02, 121.81, 120.56, 119.30, 118.27, 117.94, 109.94, 96.83, 76.83, 56.49, 52.10, 47.41, 47.09, 44.56, 40.71, 37.91, 36.04, 32.75, 31.78, 31.65, 29.20, 28.81, 28.66, 28.47, 25.35, 22.83, 19.19; HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₄₉H₅₂N₉O₇ [M-H]⁻: 878.3995; found 878.3932.

[0227] 实施例25

[0228] 本发明化合物的体外抗炎活性测试

[0229] 步骤a: ICR小鼠腹腔巨噬细胞提取和培养

[0230] 实验前3天对每只小鼠每天注射5%肉汤(巯基乙醇酸钠)(2mL), 可获得较多的腹腔巨噬细胞。细胞提取按照以下步骤:

[0231] 1) 将小鼠处死, 在75%乙醇中浸泡2-3min, 转移至超净台。仰卧固定在解剖板上, 再用乙醇擦拭腹部皮肤, 用手术剪剪开腹部皮肤, 暴露腹肌层(注意不要破坏腹肌层), 再用乙醇消毒腹部肌层;

[0232] 2) 用5mL注射器抽取含1%双抗的RPMI1640培养基(5mL)注入腹腔, 前后左右轻晃小鼠身体, 再用注射器抽取细胞悬液, 转移至离心管。再重复三次;

[0233] 3) 将收集的细胞悬液以1×10³rpm离心5min后, 弃去上清液, 用含双抗的RPMI1640培养基(10mL)吹打细胞, 在1×10³rpm条件下离心5min;

[0234] 4) 用含10%胎牛血清和1%双抗的RPMI1640培养基(5mL)吹打均匀, 取细胞悬液

(10 μ L)再稀释10倍至100 μ L,置于细胞计数板上计数;

[0235] 5) 计算实验所需细胞数,将细胞悬液稀释后直接转移至96孔板或6孔板中,于37 $^{\circ}$ C、CO₂浓度为5%的细胞培养箱中孵育12h后可进行实验。

[0236] 步骤b:酶联免疫法(ELISA)检测炎症因子含量

[0237] 在6孔板中每孔加入浓度为 8×10^4 个/mL的细胞悬液2mL,在37 $^{\circ}$ C、CO₂浓度为5%的细胞培养箱中孵育12h后,将培养基吸出,加入已配好的化合物2mL。再孵育1h后,加入1 μ L 0.5mg/mL的LPS溶液,继续孵育72h。ELISA法检测炎症因子TNF- α 和IL-6可参照ELISA试剂盒说明书上的方法进行,主要步骤如下。

[0238] 1) 标准品配制:用标准品稀释液将标准品按照最大浓度为2000pg/mL的浓度2倍稀释为8个浓度;

[0239] 2) 每个孔中分别加入配制好的各个浓度的标准品和待测样品100 μ L,于37 $^{\circ}$ C条件下孵育1h;

[0240] 3) 吸除孔内液体,除空白外每孔加入检测抗体100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0241] 4) 吸除孔内液体,在每孔中加入洗涤液(洗涤液以双蒸水稀释25倍使用,200 μ L)静置2min,吸除,重复3次后晾干;

[0242] 5) 除空白外,向每个孔中加入酶标试剂100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育60min;

[0243] 6) 吸除孔内液体,在每孔中加入洗涤液200 μ L静置2min,吸除,重复3次后晾干;

[0244] 7) 向每孔分别加入显色剂A和B各90 μ L,混匀,置于37 $^{\circ}$ C避光孵育15min后加入终止液50 μ L终止反应;

[0245] 8) 立即使用酶标仪检测,读取波长为450nm条件下每个孔的OD值。用ELISACalc软件,计算出所测炎症因子的浓度。

[0246] 以LRRK2-IN-1为阳性对照,由LPS诱导的小鼠原代腹腔巨噬细胞在10 μ M的化合物P-1~P-6及P-9作用24h后,通过ELISA试剂盒检测炎症因子IL-6和TNF- α 释放量的变化。

[0247] 实验结果如图1所示,图1是本发明化合物的体外抗炎活性测试结果示意图。其中,图1中的上侧图片是炎症因子IL-6释放量的变化示意图,图1中的下侧图片是炎症因子TNF- α 释放量的变化示意图。从图中可以看出,除化合物P-9外,其它化合物相与阳性药LRRK2-IN-1相比,体外抗炎活性具有明显的降低,且相较于IL-6,化合物对TNF- α 的抑制作用更佳。化合物P-9是以碳氧杂链为linker的DCLK1蛋白降解靶向嵌合体,分子碳氧杂链活性更佳的原因可能是碳氧杂链具有更好的脂溶性。

[0248] 实施例26

[0249] 本发明化合物对DCLK1的蛋白降解实验(Westernblot)

[0250] 步骤a:提取蛋白

[0251] 1) 收集细胞:将6孔板或者培养皿中的培养基弃去,用预冷的PBS将细胞洗涤两遍,加入细胞裂解液100 μ L(含1%蛋白酶抑制剂和1%磷酸酶抑制剂),4 $^{\circ}$ C放置30min,用细胞刮将细胞刮下来,收集细胞悬液至1.5mL离心管中,每隔5min涡旋1次,重复2次;

[0252] 2) 离心:将细胞悬液置于预冷的离心机中,在4 $^{\circ}$ C、 1.2×10^5 rpm条件下离心15min;

[0253] 3) 蛋白变性:吸取离心后的上清液,加上四分之一体积的loadingbuffer,涡旋1min,95 $^{\circ}$ C水浴锅中变性20min。

[0254] 步骤b:蛋白浓度测定(BCA法)

- [0255] 4) 配制BCA工作液:A液和B液按照50:1配制;
- [0256] 5) 在96孔板中每孔先后加入PBS 18 μ L、蛋白上清液2 μ L和BCA工作液200 μ L,置于酶标仪中,37 $^{\circ}$ C条件下振板5min,再孵育25min;
- [0257] 6) 测定562nm波长下的OD值,置于标曲中,测定蛋白浓度。
- [0258] 步骤c:电泳
- [0259] 1) 配胶;
- [0260] 2) 上样:将胶放入电泳槽中,加入电泳液,拔出齿梳。将蛋白样品按照计算好的体积加入上样孔;
- [0261] 3) 以恒压跑胶,100V通电80min。
- [0262] 步骤d:转膜
- [0263] 4) 将胶切成所需片段置于滤纸上,裁剪大小合适的PVDF膜置于甲醇中活化5min,再覆盖至胶上;
- [0264] 5) 将转膜夹子置于转膜槽中,恒流270A通电100min。
- [0265] 步骤e:抗体孵育
- [0266] 1) 封闭:转膜完成后,用TBST将PVDF膜清洗一遍,放入5%BSA中,室温下摇晃2h;
- [0267] 2) 一抗孵育:将膜用TBST稍微清洗一遍,再置于配制好的一抗中,室温孵育2h(或4 $^{\circ}$ C孵育过夜);
- [0268] 3) 二抗孵育:一抗孵育完毕,用TBST清洗膜3次(每次5min),再置于二抗溶液中,室温避光放置2h。
- [0269] 步骤f:曝光
- [0270] 避光下用TBST将膜洗涤三遍(每次5min),用LI-COR Odyssey扫膜仪对膜进行扫描,然后用Image J软件对蛋白条带进行分析。
- [0271] 本发明中,PROTAC分子P-1~P-10以VHL为E3连接酶配体,P-11~P-19以泊马度胺为E3连接酶配体,P-20~P-23以来那度胺为E3连接酶配体。
- [0272] 实验结果如图2所示,图2是DCLK1-PROTAC的降解活性测试结果示意图。其中,A是以VHL为E3连接酶配体的PROTAC分子在10 μ M下降解活性筛选结果示意图;B是化合物9在10 μ M时间依赖性降解实验结果示意图;C是以泊马度胺为E3连接酶配体的PROTAC分子在10 μ M下降解活性筛选结果示意图;D是化合物14依赖性降解实验结果示意图。在10 μ M的单浓度下,在以VHL为E3连接酶配体的DCLK1蛋白降解靶向嵌合体(化合物P-1~P-6、P-9)中,碳氧杂链和含三个碳原子的脂肪链的化合物P-1、P-9具有一定的降解活性,4-8个碳原子的脂肪链化合物P-2~P-6中,随着链长增加,降解活性逐渐减弱(图2中A);对抗炎活性最好的化合物P-9进行时间依赖性实验,在给药后0.5h至3h,DCLK1降解率随时间增长逐渐加大,3h后降解效果不再变化(图2中B),说明3h时PROTAC分子能达到最大降解,因此后续的药物作用时间为3h;对于部分以泊马度胺为E3连接酶配体的DCLK1蛋白降解靶向嵌合体进行10 μ M单浓度降解活性筛选,发现化合物P-11、P-12以及P-14具有较好的降解活性(图2中C),其对应的分别为无linker、含2个碳原子脂肪linker以及含5个碳原子的脂肪linker的DCLK1蛋白降解靶向嵌合体。通过对两种不同类型的E3连接酶配体降解活性对比发现,E3连接酶配体为CRBN的PROTAC分子具有更好的降解活性。优选降解活性较好的化合物P-14进行浓度依赖性降解实验,发现在0.1~10 μ M这三个浓度中,随着浓度加大,降解效率反而降低,分析原因可能是

高浓度下PROTAC分子产生了HOOK效应,具体降解效率还有待进一步验证(图2中D)。

[0273] 以上所述仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,虽然本发明已以较佳实施例揭露如上,然而并非用以限定本发明,任何熟悉本专利的技术人员在不脱离本发明技术方案范围内,当可利用上述提示的技术内容作出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明方案的范围内。

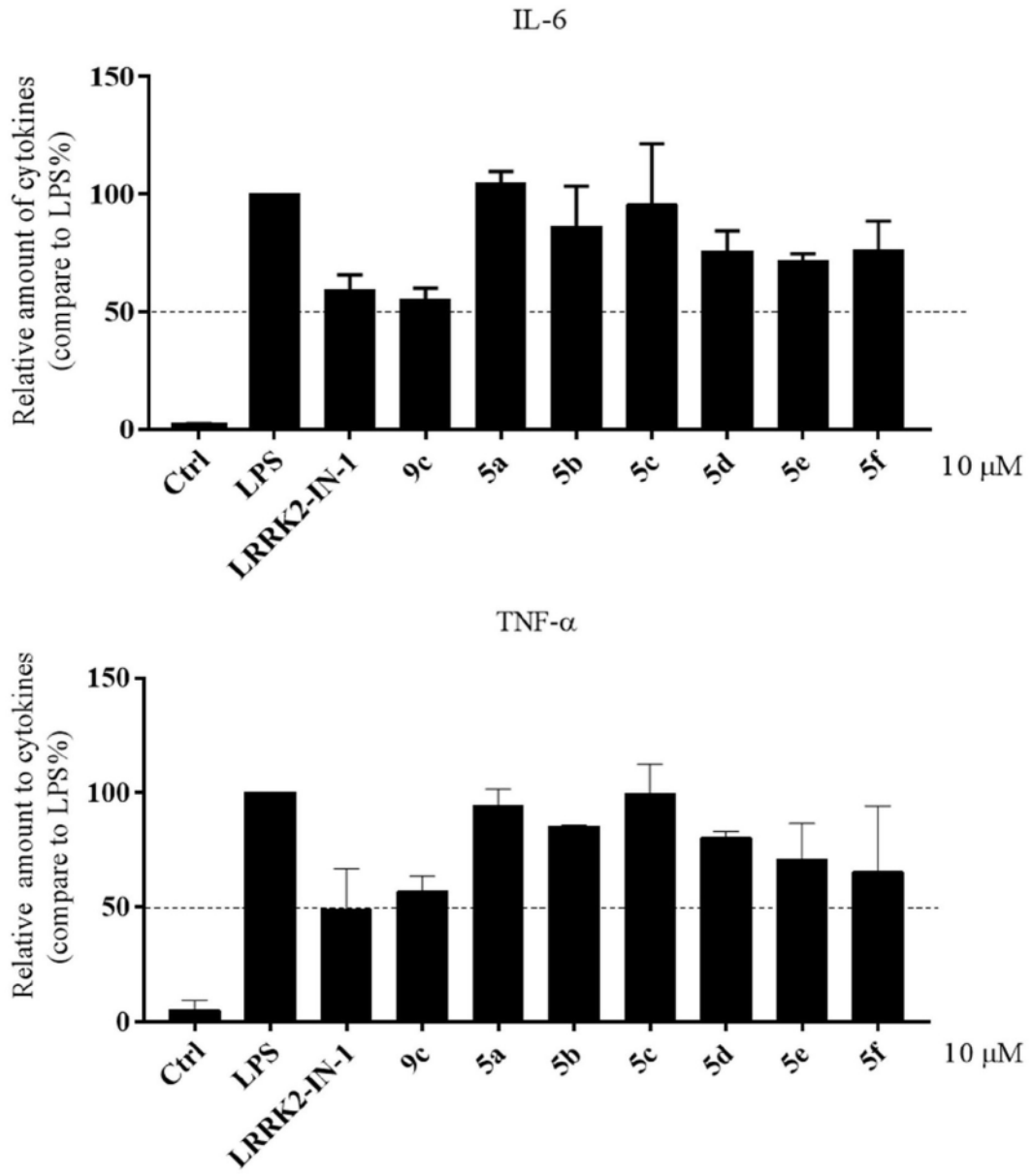


图1

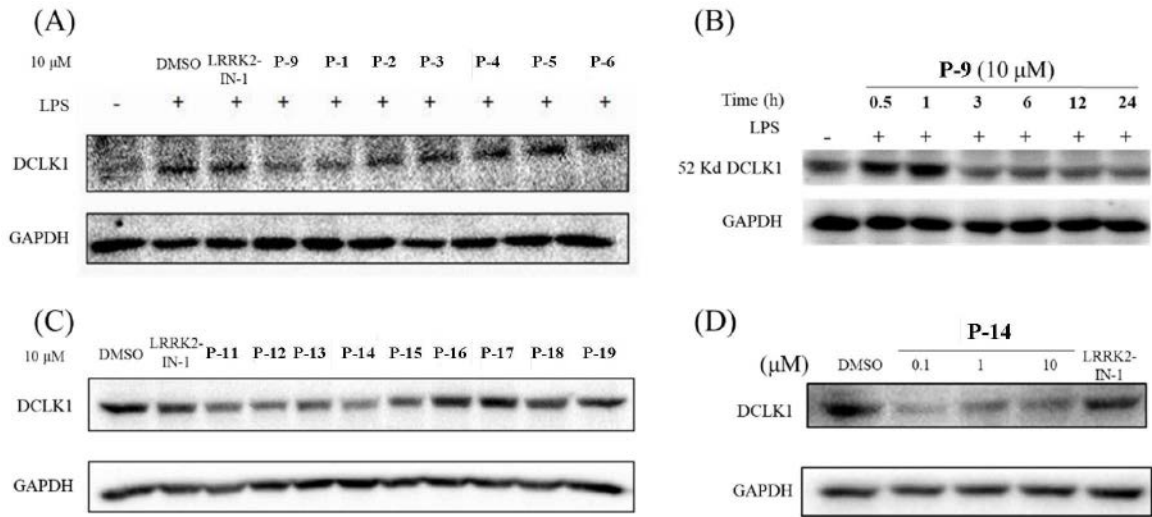


图2