



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110997657 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201880055377.3

(22)申请日 2018.08.31

(66)本国优先权数据

PCT/CN2017/101042 2017.09.08 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.02.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/049068 2018.08.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/050794 EN 2019.03.14

(71)申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72)发明人 刘连柱 王晓卿 M.R.维利

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 甘霖 李唐

(51)Int.Cl.

*G07D 401/14*(2006.01)

*A61P 1/16*(2006.01)

*A61P 3/06*(2006.01)

*A61K 31/4439*(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页

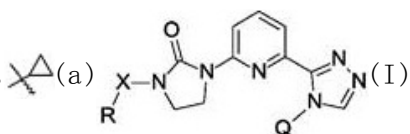
(54)发明名称

咪唑烷化合物

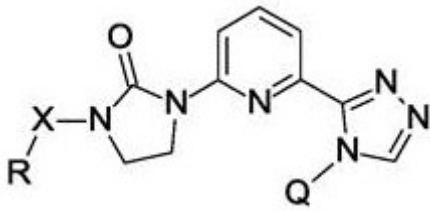
(57)摘要

本发明提供了式(I)的化合物,其中X选自(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-和CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-;Q选自C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>和式(a);或者其药学上可接受的盐;组合物、方法以治疗

肝病和NASH。




1. 下式的化合物

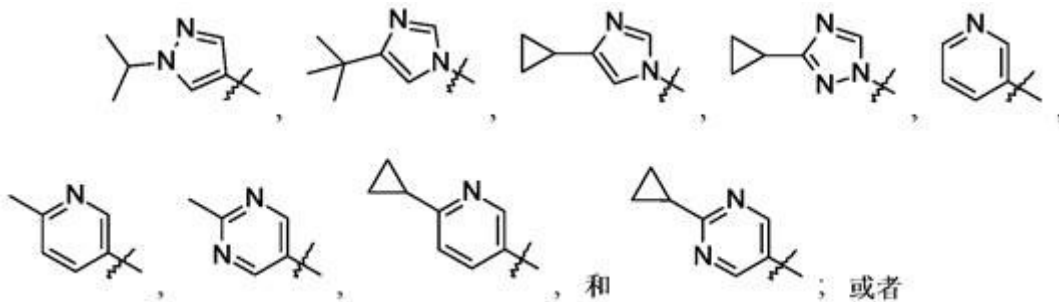


其中

X选自 $-(CH_2)_2-$ 和 $-CH_2-CH(CH_3)-$ ;

Q选自 $-C(CH_3)_2$ 和 ;

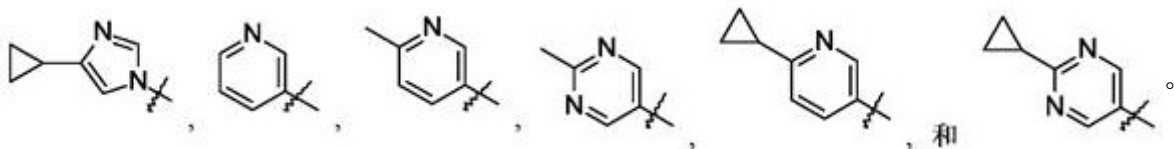
R选自



其药学上可接受的盐。

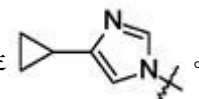
2. 由权利要求1要求保护的化合物,其中Q是 $-C(CH_3)_2$ 。

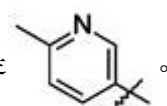
3. 由权利要求1或权利要求2要求保护的化合物,其中R选自



4. 由权利要求1-3中的任一项要求保护的化合物,其中X是 $-(CH_2)_2-$ 。

5. 由权利要求1-3中的任一项要求保护的化合物,其中X是 $-CH_2-CH(CH_3)-$ 。

6. 由权利要求1至权利要求5中的任一项要求保护的化合物,其中R是 。

7. 由权利要求1至权利要求5中的任一项要求保护的化合物,其中R是 。

8. 由权利要求1要求保护的化合物,其中所述化合物是1-[2-(4-环丙基咪唑-1-基)乙基]-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮或其药学上可接受的盐。

9. 由权利要求1要求保护的化合物,其中所述化合物是1-[(1R)-2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮;或其药学上可接受的盐。

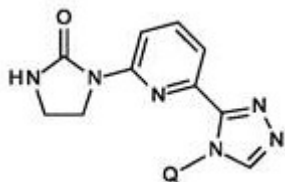
10. 一种药物制剂,其包含由权利要求1-9中的任一项要求保护的化合物或其药学上可接受的盐和选自药学上可接受的载体、稀释剂和赋形剂的至少一种。

11. 一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的方法, 所述方法包括给有此需要的哺乳动物施用有效量的由权利要求1-9中的任一项要求保护的化合物或其药学上可接受的盐。


12. 由权利要求1-9中的任一项要求保护的化合物或其药学上可接受的盐, 其用于用治疗中。

13. 由权利要求1-9中的任一项要求保护的化合物或其药学上可接受的盐, 其用于用治疗NASH中。

14. 下式的中间体化合物



其中

Q选自 $-C(CH_3)_2$ 和 ; 或者

其药学上可接受的盐。

15. 由权利要求14要求保护的化合物, 其中Q是 $-C(CH_3)_2$ 。

## 咪唑烷化合物

[0001] 本发明提供了咪唑烷化合物或其药学上可接受的盐,以及所述化合物在治疗中的用途。本发明的咪唑烷化合物是细胞凋亡信号调节激酶1 (ASK1) 的抑制剂。

[0002] ASK1是大促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶(“MAP3K”)家族的一个成员。ASK1活化和信号传递与宽范围的疾病有关。抑制ASK1的化合物被期望用在ASK1介导的病况的治疗中。

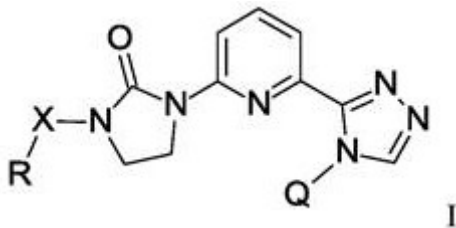
[0003] 抑制ASK1的化合物被期望用在非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的治疗中。非酒精性脂肪性肝炎是一种肝病,其具有以大泡性肝性脂肪变性、炎症肝细胞膨大和纤维化为特征的病因群(etiological constellation)。目前,没有经批准的药用药物专门用于治疗非酒精性脂肪性肝炎。需要药用药物来给患有非酒精性脂肪性肝炎的患者提供额外治疗选择。

[0004] 美国专利号8,742,126公开了5-(4-环丙基-1H-咪唑-1-基)-N-(6-(4-异丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-基)-2-氟-4-甲基苯甲酰胺作为ASK1抑制剂。

[0005] 美国专利申请公开号US 2015/0342943公开了使用ASK1抑制剂预防和/或治疗肝病的方法。


[0006] 需要具有ASK1抑制活性的化合物。

[0007] 本发明提供了式I的化合物

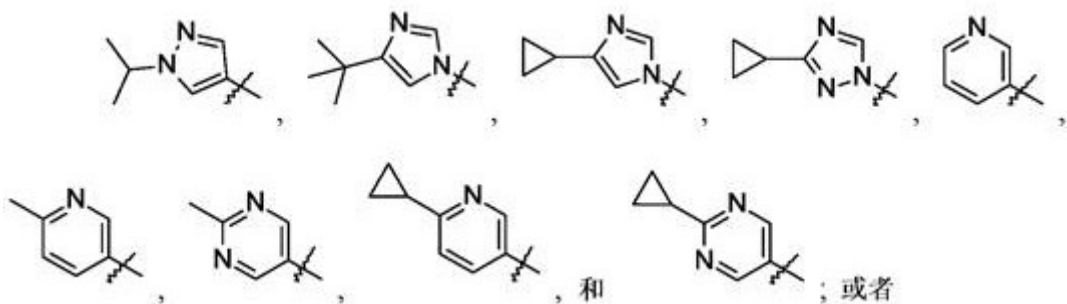


其中

X选自 $-(CH_2)_2-$ 和 $-CH_2-CH(CH_3)-$ ;

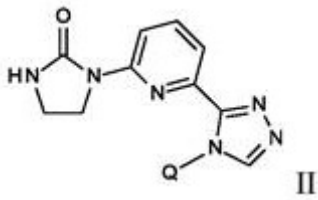
Q选自 $-C(CH_3)_2$ 和 ;

R选自



其药学上可接受的盐。

[0008] 本发明提供了式II的化合物

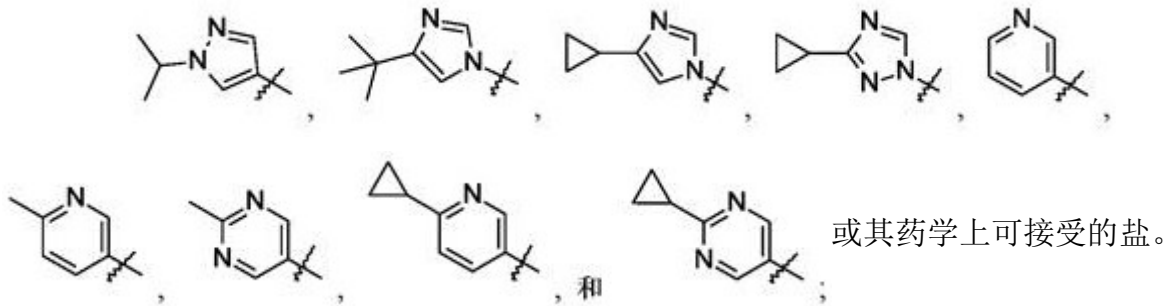


其中

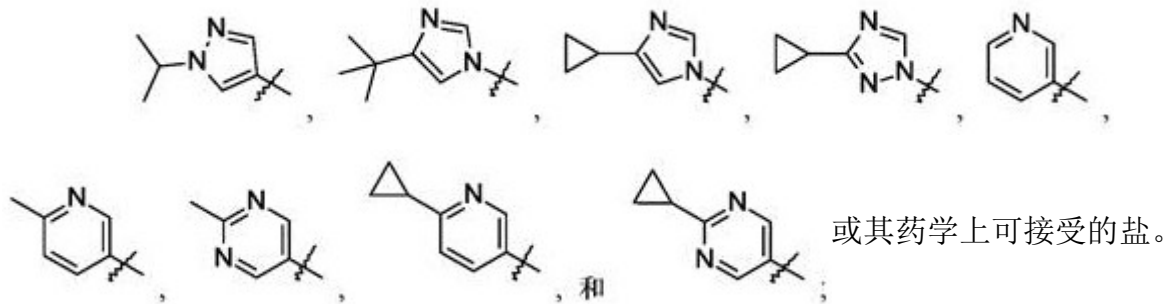
Q选自  $-C(CH_3)_2$  和 ;或者

其药学上可接受的盐。

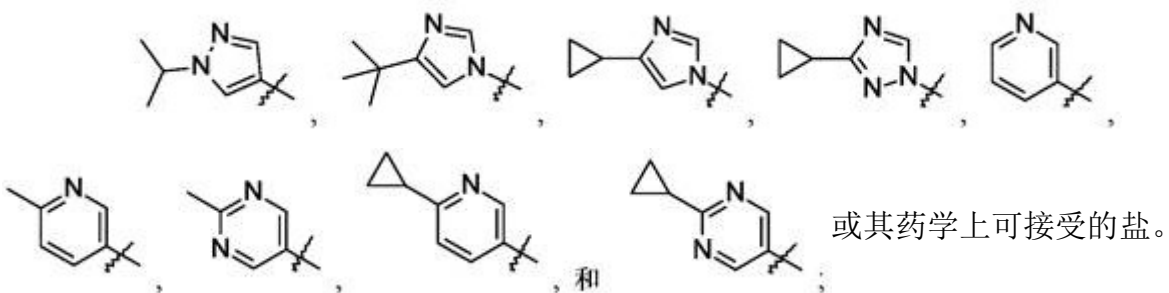
[0009] 在一个实施方案中, X是  $-(CH_2)_2-$ ; Q是  $-C(CH_3)_2$ ; 且R选自



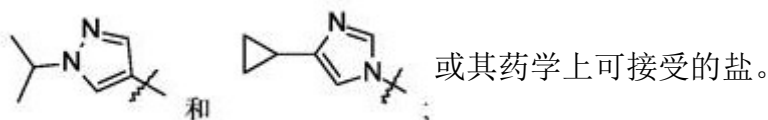
[0010] 在一个实施方案中, X是  $-CH_2-CH(CH_3)-$ ; Q是  $-C(CH_3)_2$ ; 且R选自



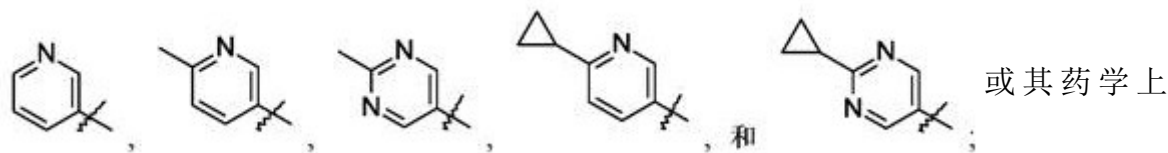
[0011] 在一个实施方案中, X是  $-(CH_2)_2-$ ; Q是 ; 且R选自



[0012] 在一个实施方案中, X是  $-(CH_2)_2-$ ; Q是  $-C(CH_3)_2$ ; 且R选自

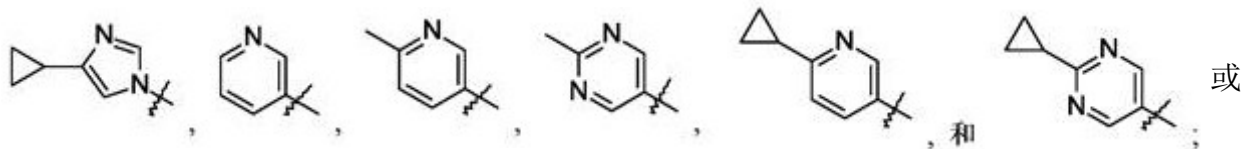


[0013] 在一个实施方案中, X是  $-(CH_2)_2-$ ; Q是  $-C(CH_3)_2$ ; 且R选自



可接受的盐。

[0014] 在一个实施方案中，X是 $-(CH_2)_2-$ ；Q是 $-C(CH_3)_2$ ；且R选自



其药学上可接受的盐。

[0015] 在一个实施方案中，Q是 $-C(CH_3)_2$ 且 $R^2$ 是 $CH_3$ ；或其药学上可接受的盐。

[0016] 在一个实施方案中，所述化合物是1-(6-(4-异丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-基)咪唑烷-2-酮或其药学上可接受的盐。

[0017] 在一个实施方案中，1-(6-(4-异丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-基)咪唑烷-2-酮或其药学上可接受的盐是可用于制备式I的化合物的中间体。

[0018] 在一个实施方案中，式I的化合物是1-[2-(4-环丙基咪唑-1-基)乙基]-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮或其药学上可接受的盐。

[0019] 在一个实施方案中，式I的化合物是1-[(1R)-2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮；或其药学上可接受的盐。

[0020] 本发明提供了一种药物组合物，其包含式I的化合物或其药学上可接受的盐以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0021] 本发明提供了一种用于治疗由ASK1活性介导的病况的方法，所述方法包括给需要治疗的哺乳动物施用有效量的式I的化合物或其药学上可接受的盐。本发明也提供了一种用于治疗肝病的方法，所述方法包括给有此需要的哺乳动物施用有效量的式I的化合物或其药学上可接受的盐。本发明提供了一种用于治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的方法，所述方法包括给有此需要的哺乳动物施用有效量的式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0022] 在另一个实施方案中，本发明提供了用在治疗中的式I的化合物或其药学上可接受的盐。进一步，提供了用于用在肝病的治疗中的本发明的化合物或其药学上可接受的盐或药物组合物。进一步，提供了用于用在NASH的治疗中的本发明的化合物或其药学上可接受的盐或药物组合物。

[0023] 在另一个实施方案中，提供了式I的化合物或其药学上可接受的盐，其用在用于治疗肝病的药物的制备中。优选地，所述药物用于治疗NASH。

[0024] 优选地将本发明的化合物配制为通过使所述化合物生物可利用的任何途径施用的药物组合物。最优选地，这样的组合物是用于口服施用。这样的药物组合物及其制备方法是本领域众所周知的。参见，例如，*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (L.V. Allen, 编辑，第2版，Pharmaceutical Press, 2012)。

[0025] 可以将本发明的化合物提供为药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”表示被认

为对于临床和/或兽医学应用可接受的本发明的化合物的盐。药学上可接受的盐和用于制备它们的常见方法是本领域众所周知的。参见,例如,P. Stahl, 等人, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCHA/Wiley-VCH, 2002)。

[0026] 人是优选的哺乳动物。本文中使用的“患者”表示需要治疗的哺乳动物。本文中使用的术语化合物的“有效量”或“治疗有效量”表示这样的量或剂量:其有效地治疗病症或疾病,诸如如本文中所述的NASH、慢性肾脏疾病或糖尿病肾病。主治诊断医生作为本领域技术人员通过使用常规技术和通过观察在类似情况下得到的结果可以容易地确定有效量。在确定化合物的有效量或剂量时,考虑许多因素,包括、但不限于,要施用的化合物;如果使用的话,其它药剂的共同施用;哺乳动物的物种;它的大小、年龄和总体健康;牵连程度或所述病症的严重程度;个别患者的应答;施用模式;施用的制品的生物利用度特征;选择的给药方案;其它伴随药物的应用;和其它有关的情况。

[0027] 将所述药物组合物以有效地治疗肝病(更具体地,NASH)的量施用给患者。有效地治疗患者的适当量或剂量可以由保健提供者确定。

[0028] 本文中使用的术语“治疗”意图表示所有这样的过程:其中可能存在现有病症和/或其症状的进展的减慢、中断、阻止、控制或停止,但是不一定指示所有症状的完全消除。

[0029] 本文中使用的术语“肝病”包括与ASK1介导有关的肝病况或症状,例如,代谢肝病、脂肪变性、肝纤维化、原发性硬化性胆管炎(PSC)、肝硬化、肝纤维化、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝缺血再灌注损伤和原发性胆汁性肝硬化(PBC)。

[0030] 术语“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”是指,所述载体、稀释剂和赋形剂与组合物的其它成分是药学上相容的。在一个特定实施方案中,将所述药物组合物配制为用于口服施用的片剂或胶囊。所述片剂或胶囊可以包括有效地治疗肝病(特别是NASH)的量的本发明的化合物。

[0031] 本文中使用的缩写根据*Aldrichimica Acta*, 第17卷, 第1期, 1984来定义。其它缩写定义如下:“ACN”表示乙腈;“ADP”表示腺苷二磷酸;“ATP”表示腺苷三磷酸;“BSA”表示牛血清白蛋白;“DCM”表示二氯甲烷;“DMEM”表示Dulbecco氏改良的伊格尔培养基;“DMF”表示二甲基甲酰胺;“DMSO”表示二甲基亚砷;“DTT”表示二硫苏糖醇;“EtOAc”表示乙酸乙酯;“FA”表示甲酸;“FBS”表示胎牛血清;“HEK”表示人胚胎肾;“HPLC”表示高效液相色谱法;“IC<sub>50</sub>”表示产生该药剂可能的最大抑制应答的50%的药剂浓度;“MAP”表示促分裂原活化蛋白;“MeOH”表示甲醇或甲基醇;“MOPS”表示(3-(N-吗啉代)丙烷磺酸);“pASK1”表示磷酸化的ASK1;“PE”表示石油醚;“TBAF”表示四正丁基氟化铵;“TFA”表示三氟乙酸;“THF”表示四氢呋喃;“TIPS”表示三异丙基甲硅烷基;“t<sub>R</sub>”表示保留时间;“XantPhos”表示4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基咕吨,且“Xantphos PD G3”表示4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基咕吨)-2-(2'-氨基-1,1'-联苯)]钯(II)甲磺酸盐。

[0032] 在以下制备中描述的中间体可以含有许多氮、羟基和酸保护基诸如酯。所述可变保护基在每次出现时可以相同或不同,取决于特定反应条件和要进行的特定转化。保护和去保护条件是技术人员众所周知的,并且描述于文献中。参见,例如,Greene和Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, (T. Greene和P. Wuts, 编, 第2版, 1991)。

[0033] 本发明的化合物或其盐可以通过本领域已知的多种规程来制备,其中的一些在下

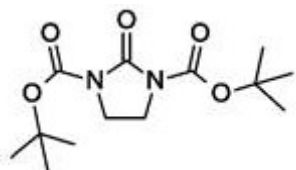
面的制备和实施例中举例说明。描述的每个途径的具体合成步骤可以以不同的方式组合，以制备本发明的化合物或其盐。通过本领域众所周知的常规方法，包括萃取、蒸发、沉淀、色谱法、过滤、研磨和结晶，可以回收每个步骤的产物。试剂和起始原料是本领域普通技术人员容易得到的。其它可以通过有机和杂环化学的标准技术来制备，它们类似于已知的结构上类似的化合物的合成和在下面的制备和实施例中所述的规程，包括任何新颖的规程。

[0034] 除非另有说明，否则所有取代基如前面所定义。试剂和起始原料通常是本领域普通技术人员容易得到的。其它可以通过有机和杂环化学的标准技术来制备，它们类似于已知的结构上类似的化合物的合成和在下面的制备和实施例中所述的规程，包括任何新颖的规程。

#### [0035] 制备和实施例

##### 制备1

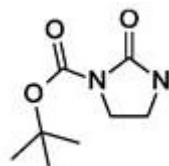
##### 2-氧代咪唑烷-1,3-二甲酸二叔丁酯



在室温 (15-20°C) 将二碳酸二叔丁酯 (113 g, 511 mmol) 和4-二甲基氨基吡啶 (0.573 g, 4.65 mmol) 加入咪唑烷-2-酮 (20.0 g, 232 mmol) 在DMF (100 mL) 中的溶液中。将反应混合物在70°C搅拌16小时。将反应混合物倒入水 (600 mL) 中并过滤。将滤饼干燥以得到作为白色固体的标题化合物 (55.0 g, 81.9%)。ES/MS (m/z): 231 (M-55)。

#### [0036] 制备2

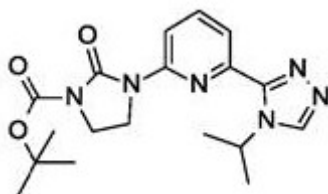
##### 2-氧代咪唑烷-1-甲酸叔丁酯



将2-氧代咪唑烷-1,3-二甲酸二叔丁酯 (55.0 g, 190 mmol) 和高氯酸镁 (8.75 g, 38.0 mmol) 在ACN (200 mL) 中的混合物在55°C搅拌16小时。将反应混合物在真空下浓缩。将水加入残余物 (300 mL) 并将残余物用DCM (3×200 mL) 萃取。将合并的有机萃取物用盐水 (500 mL) 洗涤，经硫酸钠干燥，过滤，并在减压下浓缩。将粗产物通过硅胶快速色谱法 (DCM: MeOH = 98: 2) 纯化以得到作为黄色油的标题化合物 (14.0 g, 31.6%)。ES/MS (m/z): 232 (M+2Na)。

#### [0037] 制备3

##### 3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]-2-氧代-咪唑烷-1-甲酸叔丁酯

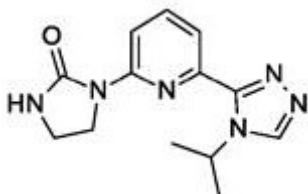




将2-氯-6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)吡啶(1.0 g, 4.2664 mmol)、2-氧代咪唑烷-1-甲酸叔丁酯(1.986 g, 8.5328 mmol)、Xantphos PD G3 (212.95 mg, 0.21332 mmol)、Xantphos (127.2 mg, 0.21332 mmol)和碳酸铯(4.17 g, 12.799 mmol)一起加入1,4-二氧杂环己烷(15 mL)中并将得到的混合物在110°C在微波条件下搅拌2小时。将混合物用DCM稀释,过滤,并浓缩以得到作为棕色固体的标题产物(1.672 g, 100%)。ES/MS (m/z): 373 (M+1)。

[0038] 制备4

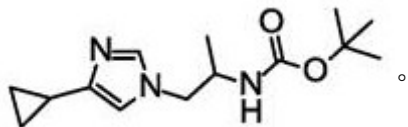
1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮



在室温将TFA (3 mL, 39.68 mmol)加入3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]-2-氧代-咪唑烷-1-甲酸叔丁酯(1.672 g, 4.265 mmol)在DCM (15 mL)中的溶液中。将混合物在室温搅拌4小时。将混合物浓缩并通过硅胶快速色谱法纯化,用4%MeOH在DCM中的溶液洗脱,以得到作为黄色固体的标题产物(406 mg, 30.76%)。ES/MS (m/z): 273 (M+1)。

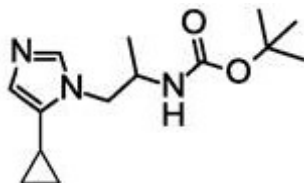
[0039] 制备5

外消旋的N-[2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]氨基甲酸叔丁酯



[0040] 制备6

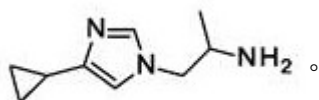
外消旋的N-[2-(5-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]氨基甲酸叔丁酯



在0°C将氢氧化钾(73.9 mg, 1.3177 mmol)和N-[(2R)-2-溴丙基]氨基甲酸叔丁酯(230.1mg, 0.96634 mmol)加入4-环丙基-1H-咪唑(100 mg, 0.087849 mmol)在DMSO (2 mL)中的溶液中。将混合物在室温搅拌65小时。将反应物用水淬灭,并用EtOAc (3x)萃取。将有机萃取物用饱和的NaCl (3x)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并浓缩至干燥。将残余物用4% MeOH在DCM中的溶液通过硅胶快速色谱法纯化以得到标题化合物,作为2种位置异构体的混合物(112 mg, 22.82%)和作为黄色油。ES/MS (m/z): 266 (M+1)。

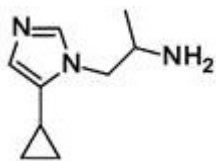
[0041] 制备7

外消旋的-1-(4-环丙基咪唑-1-基)丙烷-2-胺



## [0042] 制备8

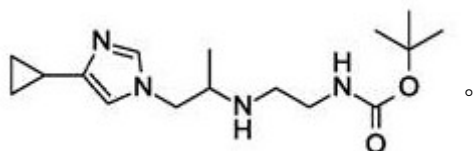
外消旋的-1-(5-环丙基咪唑-1-基)丙烷-2-胺



在室温将TFA (2 mL, 26.45 mmol)加入外消旋的N-[2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]氨基甲酸叔丁酯和外消旋的N-[2-(5-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]氨基甲酸叔丁酯(112 mg, 0.2005 mmol)在DCM (10 mL)中的溶液中。将混合物在室温搅拌1小时并浓缩以得到粗制的标题化合物,作为位置异构体的混合物(69.8 mg, 100%),为黄色油。ES/MS (m/z): 166 (M+1)。

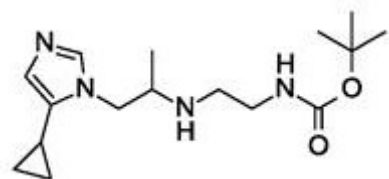
## [0043] 制备9

外消旋的N-[2-[[2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]氨基]乙基]氨基甲酸叔丁酯



## [0044] 制备10

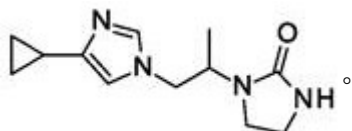
外消旋的N-[2-[[2-(5-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]氨基]乙基]氨基甲酸叔丁酯



在室温将三乙氧基硼氢化钠(56.9 mg, 0.260 mmol)加入外消旋的-1-(4-环丙基咪唑-1-基)丙烷-2-胺和外消旋的-1-(5-环丙基咪唑-1-基)丙烷-2-胺(69.7 mg, 0.200 mmol)和N-(2-氧代乙基)氨基甲酸叔丁酯(33.6 mg, 0.200 mmol)在DCM (5 mL)和乙酸(15.6 mg, 0.260 mmol)中的溶液中。将混合物在室温搅拌18小时。通过加入饱和的NaHCO<sub>3</sub>,淬灭反应。将混合物用DCM (3x)萃取,将有机萃取物经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并浓缩以得到粗制的标题化合物,作为位置异构体的混合物(130 mg, 100%),为黄色油。ES/MS (m/z): 309 (M+1)。

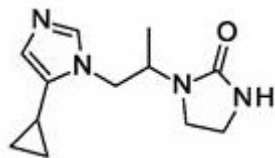
## [0045] 制备11

外消旋的1-[2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]咪唑烷-2-酮



## [0046] 制备12

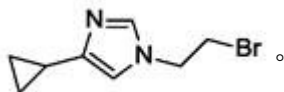
外消旋的1-[2-(5-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]咪唑烷-2-酮



在室温将叔丁醇钾 (68.1 mg, 0.6007 mmol) 在 $N_2$ 下加入外消旋的N-[2-[[2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]氨基]乙基]氨基甲酸叔丁酯和外消旋的N-[2-[[2-(5-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]氨基]乙基]氨基甲酸叔丁酯 (130 mg, 0.2002 mmol) 在THF (5 mL) 中的溶液中。将混合物在60℃搅拌2小时。通过加入水,淬灭反应混合物。将所述混合物用DCM (3x) 萃取,并将有机萃取物经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤,并浓缩至干燥。将残余物用6%MeOH在DCM中的溶液通过硅胶快速色谱法纯化以得到标题化合物,作为位置异构体的混合物 (37.6 mg, 38.1%),为黄色油。ES/MS (m/z): 235 (M+1)。

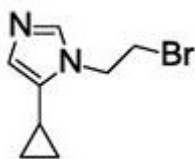
[0047] 制备13

1-(2-溴乙基)-4-环丙基-咪唑



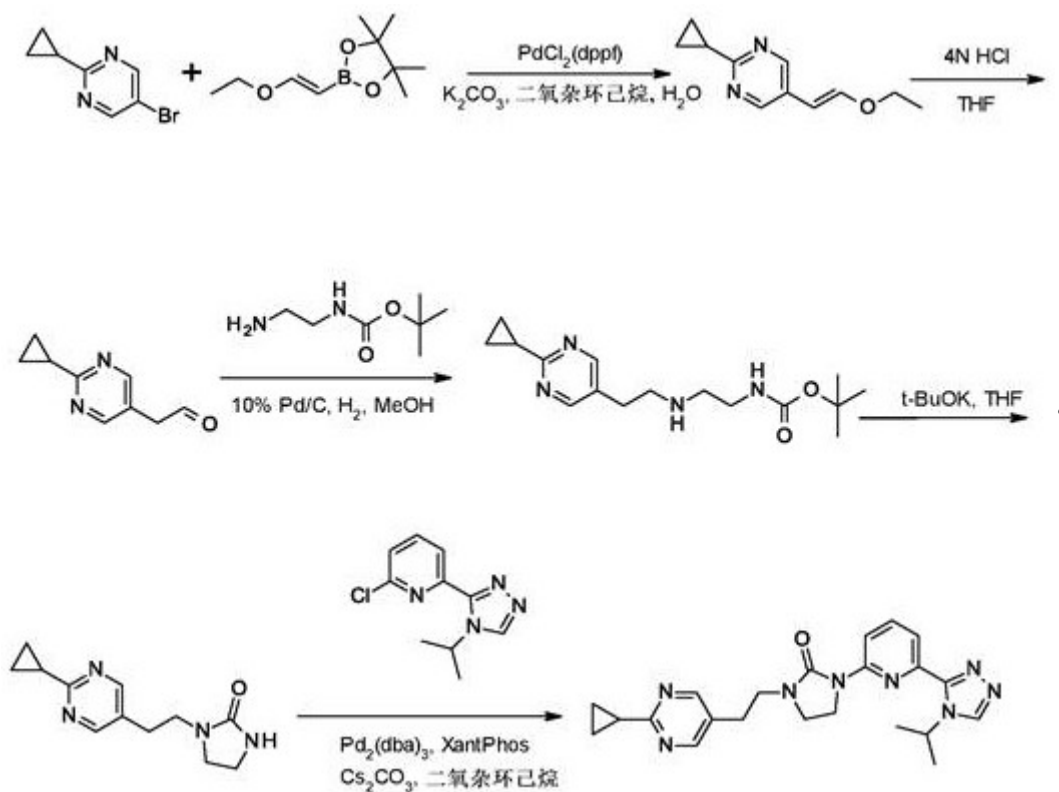
[0048] 制备14

1-(2-溴乙基)-5-环丙基-咪唑



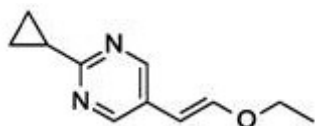
在氮气氛下在0℃将在矿物油中的NaH (60质量%) (148 mg, 3.6989 mmol) 加入4-环丙基-1H-咪唑 (200 mg, 1.8495 mmol) 在DMF (2 mL) 中的溶液中。将混合物在0℃搅拌15分钟。在0℃加入1,2-二溴乙烷 (0.504 mL 5.5484 mmol), 并将混合物在氮气氛下在室温搅拌4小时。通过加入水,淬灭反应。将混合物用EtOAc (3x) 萃取。将有机相用饱和的NaCl (3x) 洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤,并浓缩至干燥。将残余物用3%MeOH在DCM中的溶液通过硅胶快速色谱法纯化以得到标题化合物,作为1-(2-溴乙基)-4-环丙基-咪唑和1-(2-溴乙基)-5-环丙基-咪唑位置异构体的混合物 (120 mg, 28.7%),为无色油。ES/MS (m/z): 215 (M+1)。

[0049] 方案1



## [0050] 制备15

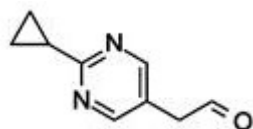
2-环丙基-5-[(E)-2-乙氧基乙烯基]嘧啶



在室温在 $N_2$ 下将水 (1 mL) 加入5-溴-2-环丙基-嘧啶 (200 mg, 0.954 mmol)、2-[(E)-2-乙氧基乙烯基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷 (219mg, 1.05 mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物 (39.8mg, 0.0477 mmol) 和 $K_2CO_3$  (395.8mg, 2.86 mmol) 在1,4-二氧杂环己烷 (4 mL) 中的溶液中。将混合物在90°C在 $N_2$ 下搅拌18小时。将混合物用DCM稀释,经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤,并浓缩至干燥。将残余物用13%EtOAc在己烷类中的溶液通过硅胶快速色谱法纯化以得到作为无色油的标题化合物 (164 mg, 85.8%)。ES/MS (m/z): 191 (M+1)。

## [0051] 制备16

2-(2-环丙基嘧啶-5-基)乙醛

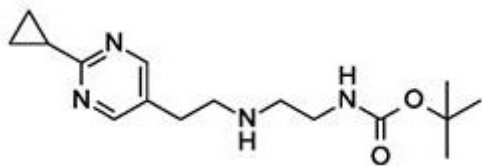


在室温将在 $H_2O$  (2 mL) 中的HCl (4 mol/L) 加入2-环丙基-5-[(E)-2-乙氧基乙烯基]嘧啶 (164 mg, 0.819 mmol) 在THF (6 mL) 中的溶液中。将混合物在80°C搅拌1小时。通过加入饱和的 $NaHCO_3$ 以将pH调至>7,淬灭反应。将混合物用DCM (3x) 萃取。将有机萃取物经 $Na_2SO_4$ 干燥,过滤,并浓缩以得到作为黄色油的粗产物 (139.8 mg 100.00%)。将粗产物不经

进一步纯化地使用。ES/MS (m/z): 163 (M+1)。

[0052] 制备17

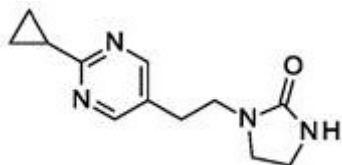
N-[2-[2-(2-环丙基嘧啶-5-基)乙基氨基]乙基]氨基甲酸叔丁酯



在室温将在活性炭上的钯(10%) (10 mg)加入2-(2-环丙基嘧啶-5-基)乙醛(139.8 mg, 0.819 mmol)和N-(2-氨基乙基)氨基甲酸叔丁酯(207.1 mg, 1.23 mmol)在MeOH (5 mL)中的溶液中。将混合物在1个大气压H<sub>2</sub>下在室温搅拌2小时。将混合物穿过硅藻土过滤,并将滤液浓缩以得到作为无色油的粗产物(264.1 mg, 100.0%)。ES/MS (m/z): 307 (M+1)。

[0053] 制备18

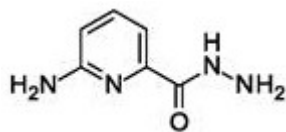
1-[2-(2-环丙基嘧啶-5-基)乙基]咪唑烷-2-酮



在室温将叔丁醇钾(278.4 mg, 2.46 mmol)在N<sub>2</sub>下加入N-[2-[2-(2-环丙基嘧啶-5-基)乙基氨基]乙基]氨基甲酸叔丁酯(264.1 mg, 0.819 mmol)在THF (5 mL)中的溶液中。将混合物在N<sub>2</sub>下在60℃搅拌2小时。将反应物通过加入水淬灭,并用DCM (3x)萃取。将有机萃取物经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并浓缩至干燥。将残余物用4%MeOH在DCM中的溶液通过硅胶快速色谱法纯化以得到作为白色固体的标题化合物(87 mg, 43.5%)。ES/MS (m/z): 233 (M+1)。

[0054] 制备19

6-氨基吡啶-2-碳酰肼

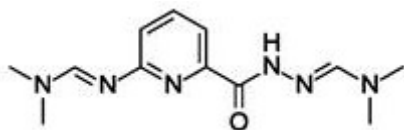


将水合肼(118 g, 2310 mmol)加入6-氨基吡啶-2-甲酸甲酯(145 g, 953 mmol)在MeOH (1.5 L)中的溶液中。将反应混合物在氮气氛下在75℃搅拌16小时。冷却后,将得到的沉淀物通过过滤收集并在真空中干燥以得到作为白色固体的标题化合物(130 g, 89.7%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO-) δ 9.15 (br, 1H), 7.51 (t, J=7.8 Hz, 1H), 7.10 (d, J=7.2 Hz, 1H), 6.60 (d, J=8.4 Hz, 1H), 6.07 ((br, 2H), 4.47 ((br, 2H).

[0055] 制备20

N,6-双[(E)-二甲基氨基亚甲基氨基]吡啶-2-甲酰胺

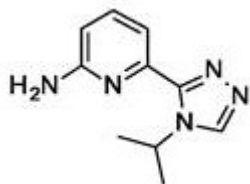


将6-氨基吡啶-2-碳酰肼 (65.0 g, 427 mmol) 在N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛 (600 g, 5040 mmol) 中的混合物在95℃搅拌1小时。将反应物冷却并在减压下浓缩以得到黄色残余物。将残余物悬浮于EtOAc (300 mL) 中并在25℃搅拌30分钟。将得到的沉淀物通过过滤收集并在真空下干燥以得到作为白色固体的标题化合物 (95.0 g, 84.8%)。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  8.85 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.68 (t,  $J=7.6$  Hz, 1H), 7.50 - 7.45 (m, 1H), 6.91 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 3.13 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.86 (s, 6H)

[0056] 制备21

6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-胺

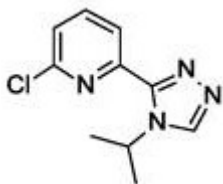


维持温度低于30℃,将丙烷-2-胺 (100 g, 1690 mmol) 逐份加入N,6-双[(E)-二甲基氨基亚甲基氨基]吡啶-2-甲酰胺 (105.0 g, 360 mmol) 在ACN (450 mL) 和乙酸 (120 mL) 中的溶液中。将得到的混合物在110℃搅拌60小时。将反应混合物冷却至25℃,并在减压下除去溶剂。将残余物溶解在水 (500 mL) 中,并将pH用NaOH水溶液 (1 N) 调至~10。将沉淀物通过过滤收集;将滤液溶解在DCM (500 mL) 中,经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,并在减压下浓缩以得到灰白色残余物。将残余物悬浮于EtOAc (100 mL) 中并搅拌15分钟,随后缓慢加入PE (200 mL)。将得到的沉淀物通过过滤收集并将滤液在真空下干燥以得到作为灰白色固体的标题化合物 (47.0 g, 62.9%)。ES/MS ( $m/z$ ): 204.1 (M+1), LCMS:  $t_{\text{R}} = 0.565$  min, 在0-30%ACN水溶液 (含有0.05% TFA) 中历时7.0分钟 (柱:Xtimate C18, 2.1\*30 mm, 3 $\mu\text{m}$ ),

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.75 (s, 1H), 7.57 (t,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 6.65 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 5.52 (spt,  $J=6.8$  Hz, 1H), 1.52 (d,  $J=6.8$  Hz, 6H).

[0057] 制备22

2-氯-6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)吡啶



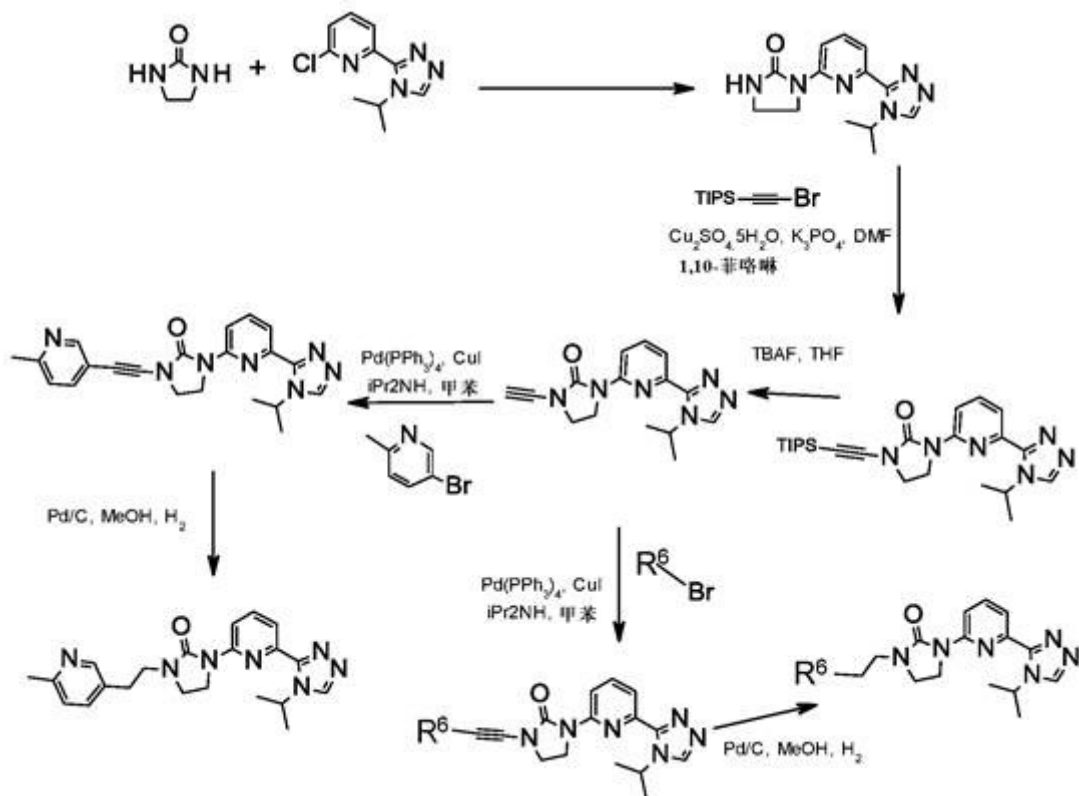
在0℃将苄基三乙基氯化铵 (133.2 g, 578.4 mmol) 加入6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-胺 (60.0 g, 289.2 mmol) 在DCM (1200 mL) 中的混悬液中。通过逐滴加入,加入

亚硝酸叔丁酯 (124.8 g, 1156.8 mmol)。将混合物温热至30℃并搅拌17小时。通过加入NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (1200 mL) 淬灭反应,并将产物用DCM (3×1500 mL) 萃取。将有机萃取物用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在真空中浓缩以得到作为黄色固体的粗产物 (64.363 g, 289.2 mmol), 将其通过硅胶快速色谱法纯化,用0%至1%MeOH在DCM中的溶液梯度洗脱,以得到作为棕色固体的标题化合物 (36.4 g, 52.6%)。

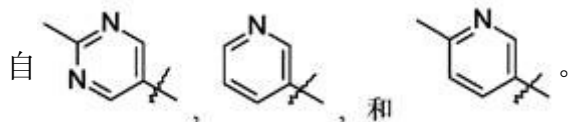
ES/MS m/z

(<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl): 223.0/ 225.0 (M+1), <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.37 (s, 1H), 8.26 (dd, J=0.8, 7.8 Hz, 1H), 7.80 (t, J=7.8 Hz, 1H), 7.38 (dd, J=0.8, 7.8 Hz, 1H), 5.67 - 5.57 (m, 1H), 1.59 - 1.54 (m, 6H) 和 <sup>13</sup>CNMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 150.63, 150.03, 148.31, 142.49, 139.82, 124.72, 122.38, 49.18, 23.72.

## [0058] 方案2

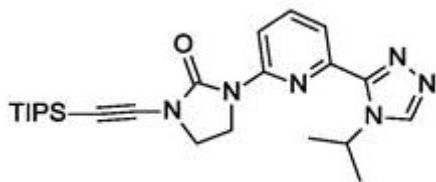


使用基本上如实施例所述的方法,通常如方案2所示,制备本发明的化合物,其中R<sup>6</sup>选



## [0059] 制备23

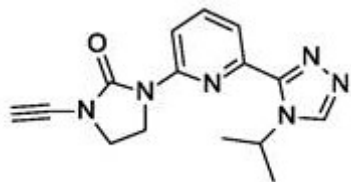
1-(6-(4-异丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-基)-3-((三异丙基甲硅烷基)乙炔基)咪唑烷-2-酮



将2-溴乙炔基(三异丙基)硅烷(1.5 g, 5.7 mmol)、DMF (50 mL)和硫酸铜(II)五水合物(0.138 g, 0.551 mmol)加入装有1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮(1.50 g, 5.51 mmol)、磷酸三钾(2.34 g, 11.0 mmol)和1,10-菲咯啉(0.199 g, 1.10 mmol)的微波容器中。将混合物用N<sub>2</sub>脱气并加热至80℃保持2小时。将反应物过滤,在真空下浓缩,并通过硅胶快速色谱法纯化,用0%至5%MeOH在DCM中的溶液梯度洗脱,以得到作为棕色固体的标题化合物(2.08 g, 75.1%, 90%纯度)。ES/MS (m/z): 453 (M+1)。

#### [0060] 制备24

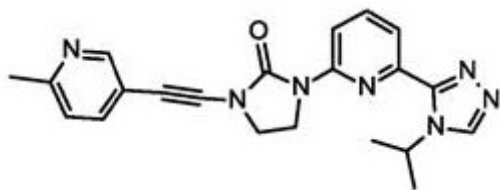
1-乙炔基-3-(6-(4-异丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-基)咪唑烷-2-酮



将TBAF (1 M,在THF中) (4.6 mL, 4.6 mmol)加入1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]-3-(2-三异丙基甲硅烷基乙炔基)咪唑烷-2-酮(2.08 g, 4.14 mmol, 90质量%)的THF (50 mL)溶液中。将混合物在室温搅拌1小时。在真空下除去溶剂,并将残余物通过硅胶快速色谱法纯化,用0%至4%MeOH在DCM中的溶液梯度洗脱,以得到作为白色固体的标题化合物(897.8 mg, 71.7%, 98%纯度)。ES/MS (m/z): 297 (M+1)。

#### [0061] 制备25

1-(6-(4-异丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-基)-3-((6-甲基吡啶-3-基)乙炔基)咪唑烷-2-酮



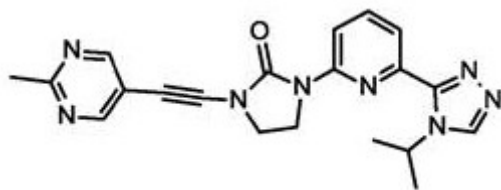
将1-乙炔基-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮(100 mg, 0.338 mmol)、5-溴-2-甲基-吡啶(870.8 mg, 0.5062 mmol)、四(三苯基膦)钯(0) (0.04021 g, 0.03375 mmol)、碘化亚铜(32 mg, 0.017 mmol)一起加入并密封在微波瓶中并用N<sub>2</sub> (3x)脱气。将二异丙胺(4 mL)和甲苯(2 mL)一起加入并将反应物在室温搅拌1小时,并在微波反应器上在80℃加热1小时。LCMS指示期望的产物的形成。将反应物过滤,在真空下浓缩,并通过HPLC纯化进行纯化。条件:(流动相:在水(10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)中的12-27% ACN

历时15 min,在21 min停止)。得到标题化合物(7.9 mg, 6%, 95%纯度)并分离为白色固体。ES/MS (m/z): 388 (M+1)。

#### [0062] 制备26



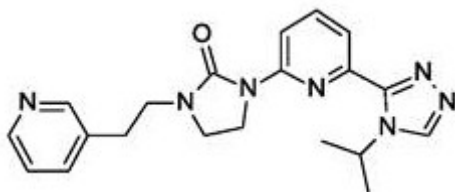
1-(6-(4-异丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-基)-3-((2-甲基咪唑-5-基)乙炔基)咪唑烷-2-酮



将5-溴-2-甲基-咪唑 (0.1518 g, 0.8775 mmol)、1-乙炔基-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮 (200 mg, 0.6750 mmol)、四(三苯基膦)钯(0) (0.08041 g, 0.06750 mmol) 和碘化亚铜 (9.0 mg, 0.047 mmol) 一起加入并密封在微波瓶中,并用N<sub>2</sub> (3x) 脱气。将二异丙胺 (4 mL) 和甲苯 (2 mL) 加入混合物并将反应物在80°C加热1小时。在真空下除去溶剂,并将残余物通过硅胶快速色谱法纯化,用0%至5%MeOH在DCM中的溶液梯度洗脱,以得到作为黄色固体的标题化合物 (20 mg, 3.3%, 43%纯度)。ES/MS (m/z): 389 (M+1)。

#### [0063] 实施例1

1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]-3-[2-(3-吡啶基)乙基]咪唑烷-2-酮



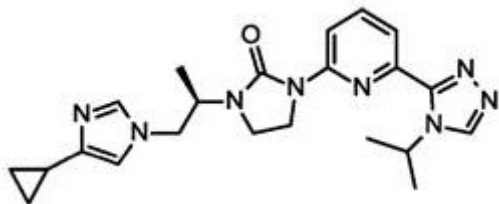
在0°C将在矿物油中的氢化钠 (60质量%) (19.4 mg, 0.4848 mmol) 加入1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮 (50 mg, 0.1616 mmol) 在DMF (2 mL) 中的溶液中。将混合物在0°C搅拌15分钟。将3-(2-溴乙基)吡啶 (80 mg, 0.40849 mmol) 加入混合物,并将混合物在室温搅拌1小时。通过加入水淬灭反应,并将混合物用DCM (3x) 萃取。将有机萃取物经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并浓缩至干燥。将残余物通过制备型HPLC (A: 水 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), B: ACN, 16-31%B历时9分钟) 纯化以得到作为白色固体的标题化合物 (22 mg, 34.27%)。

ES/MS (m/z): 378 (M+1), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

8.62-8.60 (m, 2H), 8.35-8.34 (m, 2H), 7.90 (d, J= 7.5 Hz, 1H), 7.78 (t, J= 8.0 Hz, 1H), 7.66-7.47 (m, 1H), 7.29-7.26 (m, 1H), 5.60-5.53 (m, 1H), 4.00-3.97 (m, 2H), 3.62 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 3.45 (t, J= 8.0 Hz, 2H), 2.95 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 1.56 (d, J= 7.0 Hz, 6H).

#### [0064] 实施例2

1-[(1R)-2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮



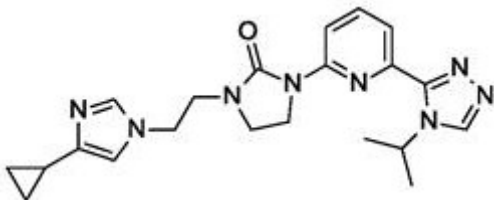
将外消旋的1-[2-(4-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]咪唑烷-2-酮和外消旋的1-[2-(5-环丙基咪唑-1-基)-1-甲基-乙基]咪唑烷-2-酮(37.6 mg, 0.0762 mmol)、Xantphos PD G3 (76.1 mg, 0.00762 mmol)、4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基咕吨(Xantphos) (45.5 mg, 0.00762 mmol)和碳酸铯(74.5 mg, 0.229 mmol)一起加入1,4-二氧杂环己烷(2 mL)中,并将得到的混合物在微波条件下在130℃搅拌2小时。将混合物用DCM稀释,过滤,并浓缩至干燥。将残余物通过制备型HPLC(A:水(0.1%FA),B:ACN(0.1%FA),7-22%B在10 min中)纯化以得到作为白色固体的标题化合物(27 mg, 77.5%)。

ES/MS (m/z): 421 (M+1),

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.36 (s, 1H), 8.31 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.91 (d, J= 7.5 Hz, 1H), 7.80 (t, J= 8.0 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.57-5.51 (m, 1H), 4.30-4.23 (m, 1H), 4.13 (dd, J= 7.0, 14.0 Hz, 1H), 4.03-3.96 (m, 2H), 3.49-3.32 (m, 1H), 3.23-3.22 (m, 1H), 1.86-1.79 (m, 1H), 1.56 (d, J= 7.0 Hz, 6H), 1.32 (d, J= 7.0 Hz, 3H), 0.86-0.81 (m, 1H), 0.73-0.68 (m, 1H).

#### [0065] 实施例3

1-[2-(4-环丙基咪唑-1-基)乙基]-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮

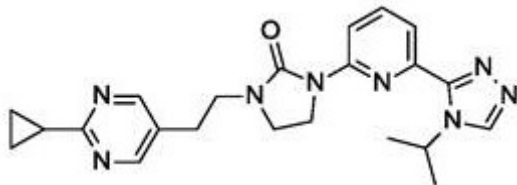


在0℃将在矿物油中的NaH(60质量%)(39.4 mg, 0.9838 mmol)在氮气氛下加入1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮(94 mg, 0.3279 mmol)在DMF(2 mL)中的溶液中。将混合物在0℃搅拌15分钟,并在0℃加入1-(2-溴乙基)-4-环丙基-咪唑和1-(2-溴乙基)-5-环丙基-咪唑(120 mg, 0.2650 mmol)的混合物,并将溶液在氮气氛下在室温搅拌1小时。通过加入水淬灭反应,并将混合物用DCM(3x)萃取。将有机萃取物经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并浓缩至干燥。将残余物通过制备型HPLC纯化:A:H<sub>2</sub>O(0.1%FA);B:ACN(0.1%FA),梯度:5-15%B历时15分钟,在22分钟停止;柱温度:室温;流速:30 mL/min, t<sub>(R)</sub> = 11.2分钟(UV)。将物质浓缩,溶解在水中并低压冻干以得到作为白色固体的标题化合物(32 mg, 22.8%)。

ES/MS (m/z): 407 (M+1), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.36 (s, 1H), 8.33 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.93 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.81 (t, J=8.0 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 5.57-5.52 (m, 1H), 4.13 (t, J= 6.0 Hz, 2H), 3.95 (t, J=8.0 Hz, 2H), 3.63 (t, J= 6.0 Hz, 2H), 3.14 (t, J= 8.0 Hz, 2H), 1.87-1.82 (m, 1H), 1.56 (d, J=7.0 Hz, 6H), 0.87-0.84 (m, 2H), 0.74-0.71 (m, 2H).

[0066] 实施例4

1-[2-(2-环丙基嘧啶-5-基)乙基]-3-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]咪唑烷-2-酮



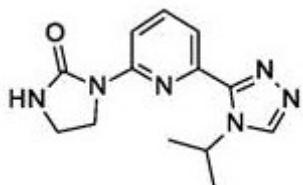
将2-氯-6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)吡啶 (125.1 mg, 0.534 mmol)、1-[2-(2-环丙基嘧啶-5-基)乙基]咪唑烷-2-酮 (87 mg, 0.356 mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯 (0) (33.6 mg, 0.0356 mmol)、Xantphos (42.5 mg, 0.0712 mmol) 和 Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (347.8 mg, 1.07 mmol) 一起加入 1,4-二氧杂环己烷 (2 mL) 中。将混合物在微波条件下在 130°C 搅拌 2 小时。将混合物用 DCM 稀释, 过滤, 并浓缩至干燥。将残余物通过制备型 HPLC 纯化: A: H<sub>2</sub>O (0.1%FA); B: ACN (0.1%FA), 梯度: 24-39%B 历时 10 min, 在 17 min 停止; 柱温度: 室温; 流速: 30 mL/min, t<sub>R</sub> = 6.0 分钟 (UV)。将物质浓缩, 溶解在水中并低压冻干以得到作为白色固体的标题化合物 (120 mg, 76.56%)。

ES/MS (m/z):

419 (M+1), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.48 (s, 2H), 8.36 (s, 1H), 8.33 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.91 (d, J= 7.0 Hz, 1H), 7.79 (t, J= 8.0 Hz, 1H), 5.59-5.53 (m, 1H), 4.01 (t, J=8.0 Hz, 2H), 3.58 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 3.48 (t, J=8.0 Hz, 2H), 2.87 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.25-2.20 (m, 1H), 1.56 (d, J= 6.5 Hz, 6H), 1.12-1.06 (m, 4H).

[0067] 实施例5

1-(6-(4-异丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)吡啶-2-基)咪唑烷-2-酮



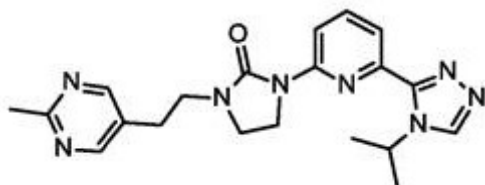
将2-氯-6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)吡啶 (100 mg, 0.449 mmol)、咪唑烷-2-酮 (0.116 g, 1.35 mmol)、Xantphos Pd G3 (22.4 mg, 0.0225 mmol) 和叔丁醇钠 (89.0 mg, 89.8 mmol) 一起加入, 将混合物密封在微波瓶中并用 N<sub>2</sub> (3x) 脱气。加入 1,4-二氧杂环己烷 (5 mL) 并将反应物在 140°C 加热 3 小时。将反应混合物过滤, 浓缩, 并通过 HPLC 纯化; 条件: (流动相: 8-23% 的 ACN 水溶液 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), 在 9 min 停止。得到作为白色固体的标题化

合物 (1.8 mg, 1.4%, 93%纯度)。

ES/MS (m/z): 273(M+1),  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.86 (s, 1H), 8.36 (d, J=8.5 Hz 1H), 7.90 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 7.74 (d, J= 7.0 Hz, 1H), 5.63-5.58 (m, 1H), 4.21 (t, J= 8.0 Hz, 2H), 3.60 (t, J= 8.0 Hz, 2H), 1.61 (d, J= 6.5 Hz, 6H).

[0068] 实施例6

1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]-3-[2-(2-甲基咪唑-5-基)乙基]咪唑烷-2-酮



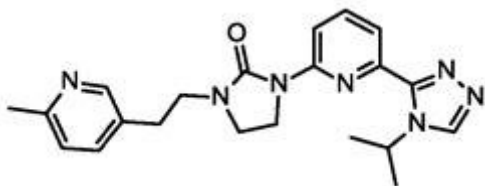
将1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]-3-[2-(2-甲基咪唑-5-基)乙炔基]咪唑烷-2-酮 (20 mg, 0.022 mmol, 43%纯度) 加入炭载钯 (20%) (10 mg) 的 MeOH (10 mL) 混悬液中。将反应物用  $\text{H}_2$  脱气并在  $\text{H}_2$  气氛下搅拌 1 小时。将反应物过滤, 在真空下浓缩, 并用下述条件通过 HPLC 纯化: (流动相: 在 10 min 中 18-33% 的 ACN (0.1%FA) 在水 (0.1%FA) 中的溶液, 在 17 分钟停止。得到作为白色固体的标题化合物 (2 mg, 21.86%, 95%纯度)。

ES/MS (m/z):

393(M+1),  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.87 (s, 1H), 8.68 (s, 2H), 8.29 (d, J= 7.0 Hz, 1H), 7.89 (t, J= 7.5 Hz, 1H), 7.73 (d, J= 6.5 Hz, 1H), 5.62-5.57 (m, 1H), 4.11 (t, J= 8.0 Hz, 2H), 3.67-3.61 (m, 4H), 2.98 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.67 (s, 3H), 1.61 (d, J= 6.5 Hz, 6H).

[0069] 实施例7

1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]-3-[2-(6-甲基-3-吡啶基)乙基]咪唑烷-2-酮



将1-[6-(4-异丙基-1,2,4-三唑-3-基)-2-吡啶基]-3-[2-(6-甲基-3-吡啶基)乙炔基]咪唑烷-2-酮 (7.9 mg, 0.019 mmol) 加入炭载钯 (20%) (10 mg) 的 MeOH (10 mL) 混悬液中。将反应物用  $\text{H}_2$  脱气并在  $\text{H}_2$  气氛下搅拌 1 小时。将反应物过滤, 浓缩, 并用下述条件通过 HPLC 纯化: (流动相: 在 10 分钟中 18-28% 的 ACN 在水 (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 中的溶液, 在 15 分钟停止。分离作为白色固体的标题化合物 (2 mg, 92%, 95%纯度)。

ES/MS (m/z): 392(M+1),  $^1\text{H NMR}$  (500

MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.85 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.32-8.30 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.88 (dd, J= 7.6, 8.6 Hz, 1H), 7.74-7.71 (m, 2H), 7.28 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 5.60-5.51 (m, 1H), 4.08 (t, J= 8.0 Hz, 2H), 3.61-3.58 (m, 4H), 2.96 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.60 (d, J= 7.0 Hz, 6H).

## [0070] 生物学测定

通过ASK1酶测定确定的ASK1抑制剂效应

该测定的目的是通过ASK1确定ASK1抑制剂对ADP的产生的影响。使用用谷胱甘肽S-转移酶标记的重组人ASK1 (hASK1) 催化结构域, 并且组氨酸-标记的全长人MAP激酶激酶6 (MKK6) 和ATP分别是底物和辅因子。

[0071] 根据生产商的方案, 经以下修改, 使用ADP-Glo™ 激酶测定试剂盒 (Promega, 目录号V9102) 完成该测定。简而言之, 将在缓冲液 (10 mM MOPS pH 7.0; 10 mM乙酸镁; 1 mM DTT; 0.025%NP-40; 0.05%BSA; 1.5%甘油) 中的hASK1 (0.25 nM) 和MKK6 (300 nM) 与在从10.00  $\mu$ M至0.17 nM范围内的不同浓度的ASK1抑制剂一起温育15分钟, 随后与ATP (100  $\mu$ M) 一起在室温温育30分钟。加入ADP-Glo™ 试剂以终止激酶反应并耗竭剩余的ATP。然后加入激酶检测试剂以将ADP转化成ATP。使用萤光素酶/萤光素反应测量新合成的ATP, 并通过Envision (PerkinElmer) 确定发光。通过GeneData分析发光强度, 并拟合至4参数剂量响应-抑制剂逻辑曲线以确定IC<sub>50</sub>值, 其中使用作为标准的5-(4-环丙基-1H-咪唑-1-基)-2-氟-4-甲基-N-{6-[4-(丙烷-2-基)-4H-1,2,4-三唑-3-基]吡啶-2-基} 苯甲酰胺和DMSO媒介物的影响分别作为100%和0%抑制。

[0072] 基本上如上所述试验所述实施例, 并表现出如在下面表1中所示的IC<sub>50</sub>值。

表1

实施例编号	hASK1 IC <sub>50</sub> (nM)	效力 (%)
1	36.0 ± 6.25, n=2	100
2	14.0 ± 2.61, n=2	100
3	10.8 ± 2.01, n=4	100
4	13.7 ± 6.57, n=4	100
5	64.4 ± 58.5, n=4	100
6	88.3 ± 21.8, n=2	100
7	16.6 ± 3.16, n=4	100

平均值±标准差

[0073] 这些结果指示, 实施例的化合物抑制ASK1酶活性, 如在表1中所示。

## [0074] 通过ASK1自磷酸化 (Thr838) 测定确定的ASK1抑制剂效应

该测定的目的是在过表达人ASK1的HEK293细胞中确定ASK1抑制剂对在Thr838处的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激的ASK1自磷酸化的影响。

[0075] 在37°C和5%CO<sub>2</sub>下将过表达人流感血凝素- (HA-) 标记的全长人ASK1的HEK293细胞维持在补充了10%FBS的DMEM中。关于测定, 将所述细胞铺板在基质胶包被的96-孔平板中 (25,000个细胞/孔) 并温育过夜。将所述细胞用在10.00 $\mu$ M至0.17 nM范围内的不同浓度的ASK1抑制剂处理1小时, 随后用1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激10分钟。然后将所述细胞用含有磷酸酶抑制剂 (ThermoFisher, 目录号78430) 的Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF®) 裂解缓冲液 (Cisbio, 目录号64KL1FDF) 裂解。使用由Cisbio定制的抗-HA和抗-pASK1 (Thr838) 抗体对, 分别用620和665 nm的发射和激发波长通过HTRF® 在Envision

(PerkinElmer) 上定量pASK1。通过GeneData分析在665 nm和620 nm的荧光强度的比率,并拟合至4参数剂量响应-抑制剂逻辑曲线以确定IC<sub>50</sub>值,其中使用作为标准的5-(4-环丙基-1H-咪唑-1-基)-2-氟-4-甲基-N-{6-[4-(丙烷-2-基)-4H-1,2,4-三唑-3-基]吡啶-2-基}苯甲酰胺和DMSO媒介物的影响分别作为100%和0%抑制。

[0076] 基本上如上所述试验所述化合物,并表现出如下面表2中所示的IC<sub>50</sub>值。

表2

实施例编号	HEK pASK1 IC <sub>50</sub> (nM)	效力(%)
1	1400	80.5
2	886 ± 65.4, n=2	96.0
3	1130 ± 300, n=3	101
4	735	107
5	3770	100
7	520	100

平均值±标准差

[0077] 这些结果指示,以上实施例的化合物抑制HEK293细胞中在Thr838处的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激的ASK1自磷酸化,如在上面表2中所示。