



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117126141 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 28

(21) 申请号 202211129251.0

(22) 申请日 2022.09.16

(66) 本国优先权数据

202210576546.6 2022.05.25 CN

(71) 申请人 成都施贝康生物医药科技有限公司

地址 611730 四川省成都市高新区天宇路2号26栋1单元1号

(72) 发明人 曾燕群 黄龙 周宁 牟霞

(51) Int. Cl.

C07D 403/14 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

权利要求书3页 说明书19页

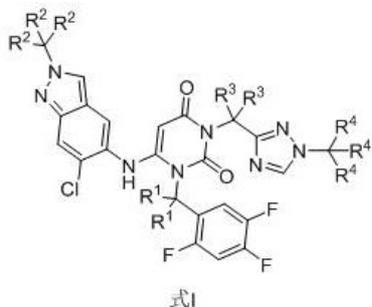
(54) 发明名称

二氢嘧啶类化合物及其制备和应用

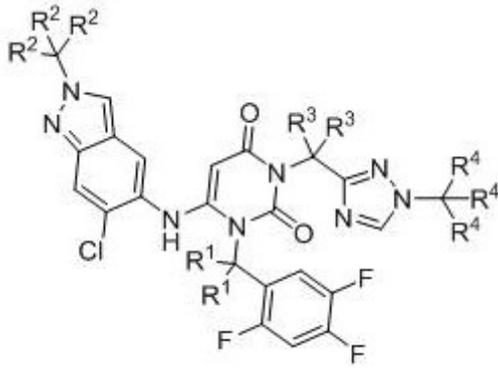
(57) 摘要

本发明提供一种式I所示的二氢嘧啶类化合物或其盐及其在治疗和/或预防3CL蛋白酶相关疾病的用途,尤其在治疗 and/或预防病毒感染方面的用途,特别是治疗和/或预防严重急性呼吸系统综合冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 或/和其突变体引起的2019年全球冠状病毒肺炎 (COVID-

19) 中的用途。



1. 一种结构如式I所示的化合物或其药学上可接受的盐：



式I

其中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 独立地选自氢、氘。

2. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述式I中:

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 均独立地选自氢;或, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 至少有一个选自氘。

3. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述式I中:

R^1 、 R^3 至少有一个选自氘, R^2 、 R^4 独立地选自氢。

4. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述式I中:

R^2 、 R^4 至少有一个选自氘, R^1 、 R^3 独立地选自氢。

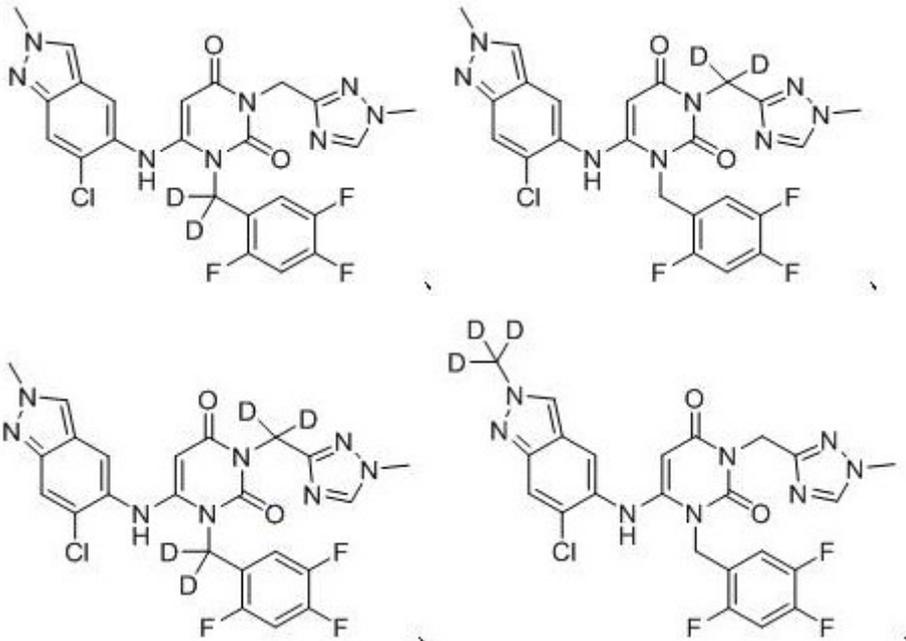
5. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述式I中:

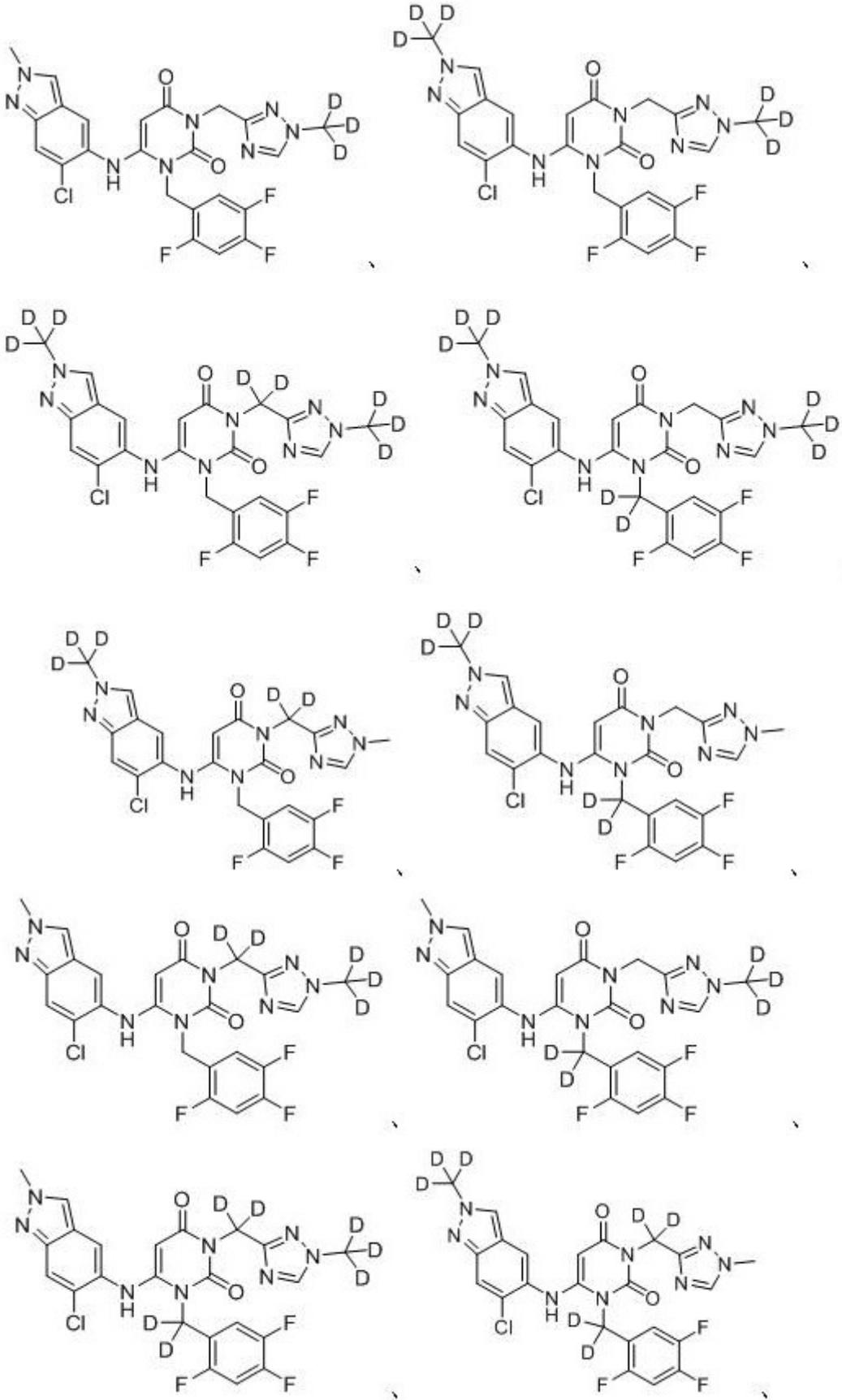
R^1 选自氘, R^2 、 R^3 、 R^4 独立地选自氢;

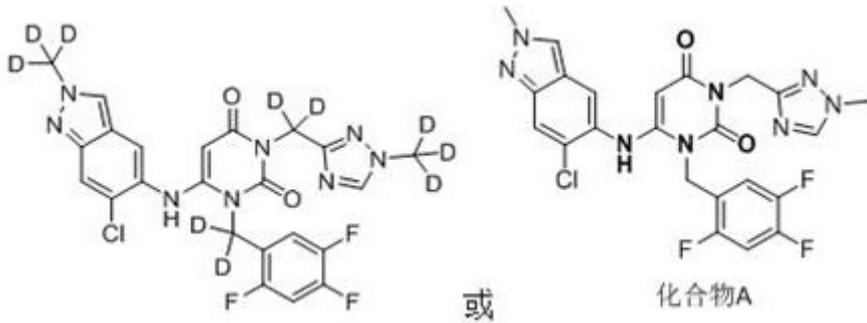
或 R^3 选自氘, R^1 、 R^3 、 R^4 独立地选自氢。

6. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述化合物或其

药学上可接受的盐是:





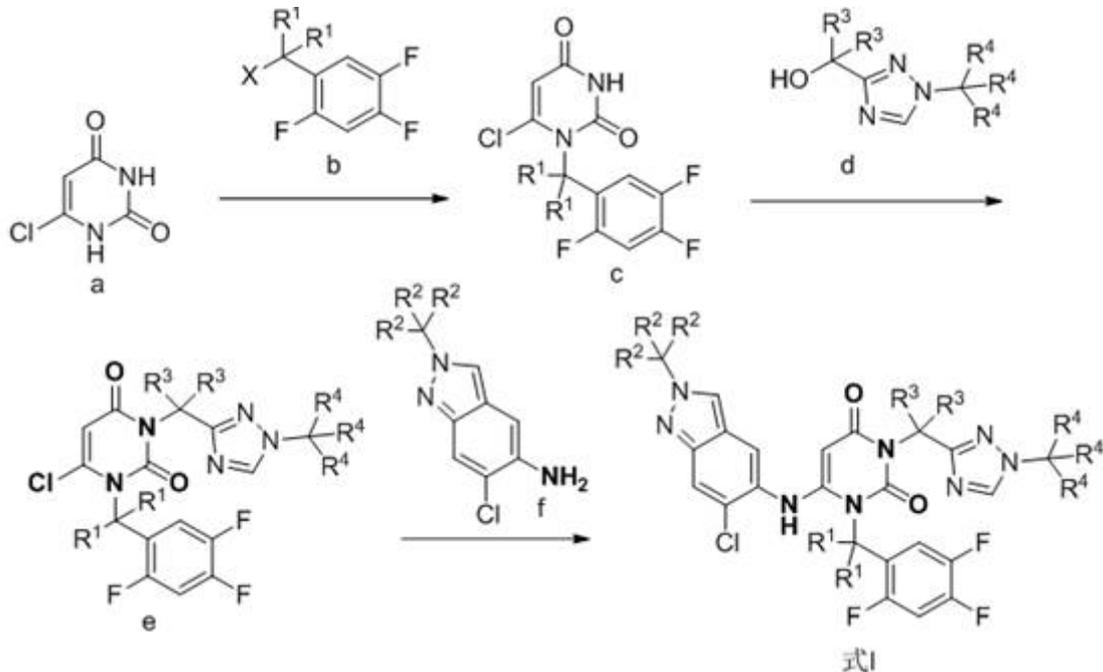


7. 权利要求1~6任意一项所述化合物或其药学上可接受的盐的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

步骤一:中间体化合物a与b在有机碱或无机碱存在下发生取代反应,得到中间体化合物c;

步骤二:中间体化合物c与d发生光延反应,得到中间体化合物e;

步骤三:中间体化合物e与f发生偶联反应,生成式I化合物;



其中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 的定义同权利要求1~5任一项的相应定义, X 为卤素。

8. 包含权利要求1~6任意一项所述化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

9. 权利要求1~8任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗和/或预防3CL蛋白酶相关疾病的药物中的用途;优选地,所述3CL蛋白酶相关疾病为呼吸道传染病;更优选地,所述3CL蛋白酶相关疾病为病毒感染。

10. 根据权利要求9所述的用途,其特征在于,所述3CL蛋白酶相关疾病为新冠病毒感染;优选地,所述3CL蛋白酶相关疾病是由病毒SARS-CoV-2或/和其突变体引起的冠状病毒肺炎(COVID-19)。

二氢嘧啶类化合物及其制备和应用

[0001] 相关申请

本申请要求2022年5月25日提交的中国专利申请CN 202210576546.6的优先权。以上所引用的优先权申请的内容全文以引用的方式并入本文。

技术领域

[0002] 本发明属于药物化学技术领域,具体涉及二氢嘧啶类化合物、其制备方法及应用。

背景技术

[0003] 严重急性呼吸系统综合症冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 引起的 2019 年全球冠状病毒肺炎 (COVID-19) 目前治疗的药物有限,治疗选择有限,迫切需要口服 COVID-19 小分子药物,特别是对于非住院患者,以防止住院和死亡。

[0004] SARS-CoV-2 对老年人和具有高危因素的人具有高致病性,可发展为严重的、危及生命的急性呼吸窘迫综合征。SARS-CoV-2 是一种有包膜的正义单链 RNA 病毒,属于 Betacoronavirus 属的成员。SARS-CoV-2 通过将其刺突糖蛋白与血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 结合进入宿主细胞,并在脱壳后将其病毒 RNA 基因组释放到细胞质中。进入后,病毒 RNA 基因组使细胞接受两种大型多蛋白 ppla 和 pplab 的翻译,这些多蛋白被加工成单独的非结构蛋白。

[0005] 3C 样蛋白酶 (3CL), 是一种半胱氨酸蛋白酶,负责切割多蛋白的 11 个不同位点以转化为成熟的功能蛋白。3CL 在病毒复制中起关键作用,其抑制作用阻止了复制必需酶的形成,例如依赖 RNA 的 RNA 聚合酶,从而抑制病毒复制。病毒蛋白酶是经过充分验证的用于治疗人类免疫缺陷病毒和丙型肝炎病毒的药物靶标,并已用于各种批准的口服药物中。此外,因蛋白突变特性 SARS-CoV-2 已产生多种突变,如 Alpha、Beta、Delta、Gamma 以及 Omicron 等突变体;然而 3CL 抑制剂的抗病毒功效可能不会受到刺突蛋白突变的影响,也不会诱导刺突蛋白突变,因为 3CL 和刺突蛋白是在不同区域编码的不同蛋白质病毒基因组。因此,3CL 是治疗 COVID-19 的小分子口服药物的一个有吸引力的靶标。

[0006] 日本盐野义制药公司报道的非共价 Mpro 小分子抑制剂 S-217662 为 3CL 抑制剂,目前处于临床 2/3 期,该公司目前已经报道了部分积极临床研究结果。该化合物能够显著抑制包括 α 、 β 、 γ 和 Omicron 等多种 SARS-CoV-2 变异株,表明其作为治疗新冠的治疗剂具有广泛的应用潜力。临床 2b 期结果显示 S-217622 具有很强的抗病毒作用,能够快速清除传染性 SARS-CoV-2 病毒,在治疗的第四天 (第三剂之后),病毒滴度阳性的患者比例与安慰剂相比减少了约 90%,与安慰剂相比,S-217622 将传染性病毒的脱落时间缩短了 1-2 天,与安慰剂相比,S-217622 在第 2、4、6 和 9 天显示病毒 RNA 显著减少。但是,S-217622 治疗组之间 12 种 COVID-19 症状的总分没有显著差异,仅 S-217622 显示 5 种“呼吸和发烧”症状的综合评分有所改善 (事后分析),并且临床前还发现 S-217622 具有胎儿致畸的风险。因此,日本暂缓了这个新药的批准。日前,新冠病毒肆虐,临床上急需风险低,活性高的小分子抗病毒药物。

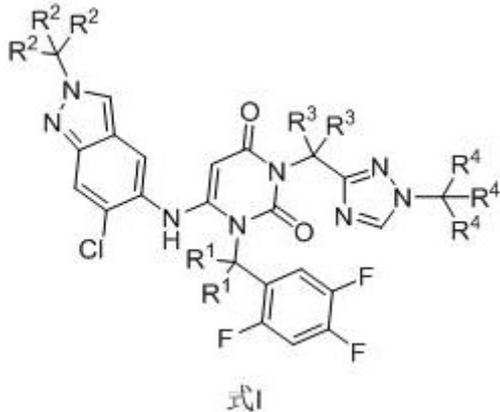
[0007] 而目前也未见S-217622的深层次衍生开发报道,因此如何开发制备S-217622的衍生物或者结构修饰改造物,以获得综合治疗效果好、毒副作用小,更安全的小分子抗病毒药物,是目前临床上亟待解决的难题。

发明内容

[0008] 为至少解决现有技术存在的技术问题之一,本发明提供了一种二氢嘧啶类化合物及其氘代物。本发明的化合物具有较好药代性能,药效和安全性更高。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

本发明提供一种结构如式I所示的化合物及其药学上可接受的盐:



其中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 独立地选自氢、氘。

[0010] 在某些实施例中,上述式I中: R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 独立地选自氢;或, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 所代表的氢可以任一地被氘取代。

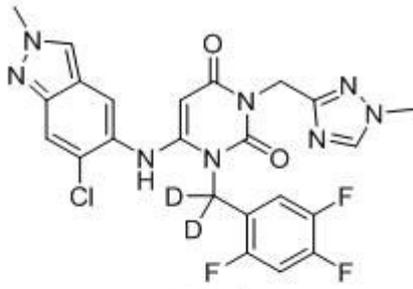
[0011] 在某些实施例中,上述式I中: R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 独立地选自氢、氘;同时, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 至少有一个选自氘。

[0012] 在某些实施例中,上述式I中: R^1 、 R^3 至少有一个选自氘, R^2 、 R^4 独立地选自氢。

[0013] 在某些实施例中,上述式I中: R^2 、 R^4 至少有一个选自氘, R^1 、 R^3 独立地选自氢。

[0014] 在某些实施例中,上述式I中: R^1 选自氘, R^2 、 R^3 、 R^4 独立地选自氢;或 R^3 选自氘, R^1 、 R^2 、 R^4 独立地选自氢。

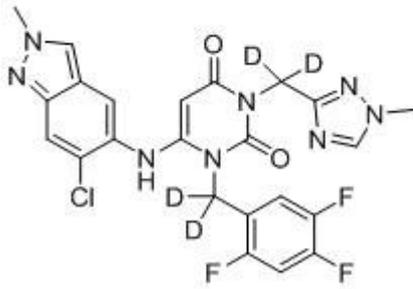
[0015] 在某些实施例中,上述式I所述的化合物或其药学上可接受的盐是:



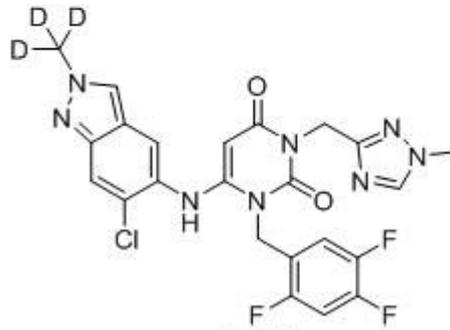
化合物1



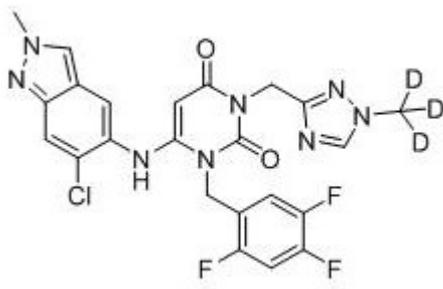
化合物2



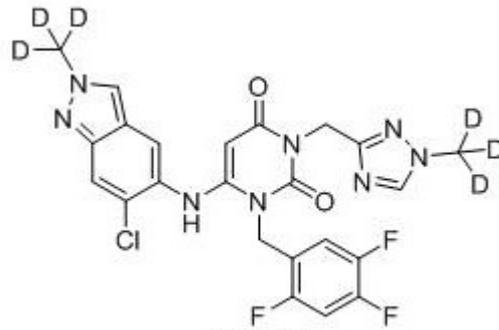
化合物3



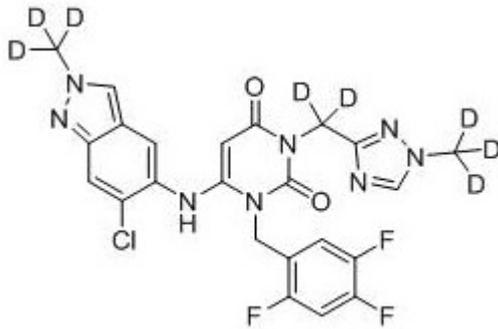
化合物4



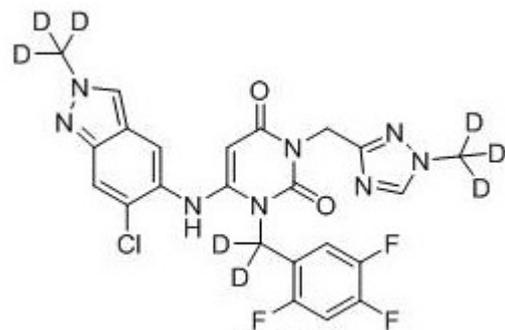
化合物5



化合物6



化合物7



化合物8



或

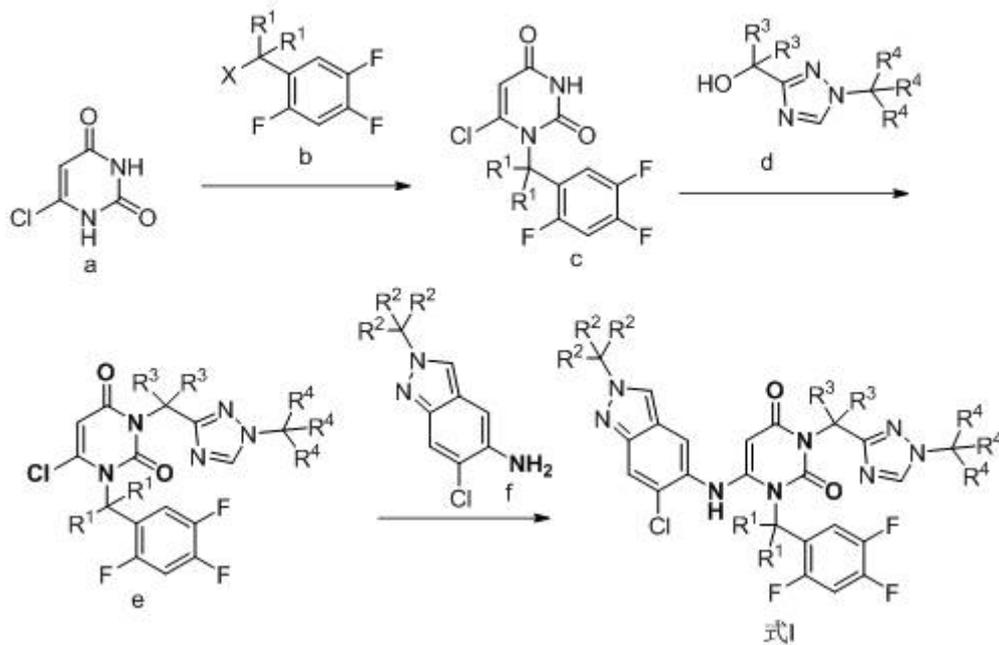


[0016] 进一步地,本发明提供上述任意一项所述化合物或其药学上可接受的盐的制备方法,包括以下步骤:

步骤一:中间体化合物a与b在有机碱或无机碱存在下发生取代反应,得到中间体化合物c;

步骤二:中间体化合物c与d发生光延反应,得到中间体化合物e;

步骤三:中间体化合物e与f发生偶联反应,生成式I化合物;



其中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 的定义同上述任一项的相应定义, X为卤素。

[0017] 本发明还提供包含上述任一所述化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物, 所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0018] 进一步地, 本发明还提供上述任意一项所述化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗和/或预防3CL蛋白酶相关疾病的药物中的用途。

[0019] 在某些实施例中, 上述3CL蛋白酶相关疾病为呼吸道传染病; 优选地, 上述3CL蛋白酶相关疾病为病毒感染。

[0020] 在某些实施例中, 上述3CL蛋白酶相关疾病为新冠病毒感染; 优选地, 上述3CL蛋白酶相关疾病是由病毒SARS-CoV-2或/和其突变体引起的冠状病毒肺炎 (COVID-19)。

[0021] 在某些实施例中, 上述疾病为呼吸道传染病。

[0022] 在某些实施例中, 上述呼吸道传染病为严重急性呼吸综合征。

[0023] 在某些实施例中, 上述疾病的症状选自发热或寒颤、咳嗽、呼吸急促或呼吸困难、疲劳、肌肉或身体疼痛、头痛、新的味觉或嗅觉丧失、咽喉痛、鼻充血或流鼻涕、恶心或呕吐、腹泻、持续性胸痛或胸压力、新的意识错乱、不能醒来或不能保持清醒、发青色的唇或脸、及其组合。

[0024] 在某些实施例中, 上述冠状病毒是SARS-CoV-2。

[0025] 进一步地, 本发明还提供降低或抑制冠状病毒的蛋白酶活性的方法, 所述方法包括用上述任一项的化合物或其药学上可接受的盐或上述任一项的药物组合物接触所述蛋白酶。

[0026] 在某些实施例中, 上述所述蛋白酶是3C样蛋白酶。

[0027] 在某些实施例中, 上述冠状病毒是SARS-CoV-2。

[0028] 进一步地, 本发明还提供降低或抑制冠状病毒复制的方法, 所述方法包括使用上述任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或上述任一项的药物组合物接触所述冠状病毒。

[0029] 在某些实施例中, 上述冠状病毒是SARS-CoV-2。

[0030] 如本发明使用的术语“药学上可接受载体”是指与活性成分一同给药的稀释剂、辅剂、赋形剂或媒介物,并且其在合理的医学判断的范围内适于接触人类和/或其它动物的组织而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或与合理的益处/风险比相应的其它问题或并发症。

[0031] 如本发明使用的术语“卤素”包括氟、氯、溴、碘。

[0032] 如本发明使用的术语“冠状病毒”指一组相关的RNA病毒,其引起哺乳动物和禽类的疾病,比如通常是人类和禽类的呼吸道传染病,其范围可以是牛和猪中的轻度到致死性腹泻,以及小鼠的肝炎和脑脊髓炎。冠状病毒是具有正义单链RNA基因组和螺旋对称的核壳的包膜病毒。它们具有从它们的表面突出的特征性棒状刺突(spikes),在电子显微照片中,其引起人想起太阳冠的形状,冠状病毒的名称即来自于此。致死性冠状病毒种类涵盖可以引起SARS(严重急性呼吸综合征)、MERS(中东呼吸综合征)和COVID-19(由严重急性呼吸综合征冠状病毒2引起的接触传染病)等疾病的冠状病毒。

[0033] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

本发明的二氢嘧啶类化合物及其氘代物对SARS-CoV-2的3CL蛋白酶有较好的抑制作用,抗病毒效果更强、更持久,血药浓度更高、生物利用度更好,安全性高,对现在正在流行的新冠肺炎有治疗和/或预防作用。

具体实施方式

[0034] 下面将结合实例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例和试验例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。各例中未注明的具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为通过市购获得的常规产品。

[0035] 化合物的结构是核磁共振(^1H NMR)或液质联用(LC-MS)来确定的。

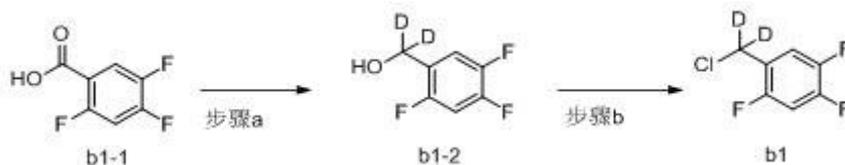
[0036] 液质联用仪(LC-MS)为安捷伦G6120B(与液相Agilent 1260配用);核磁共振仪(^1H NMR)为Bruker AVANCE-400或Bruker AVANCE-800,核磁共振(^1H NMR)位移(δ)以百万分之一(ppm)的单位给出,内标为四甲基硅烷(TMS),化学位移是以 10^{-6} (ppm)作为单位给出。

[0037] 本发明的术语“室温”是指温度为 $10\sim 25^\circ\text{C}$ 。

[0038] 实施例1:化合物1的制备



(1) 中间体b1的合成:



步骤a: (2,4,5-三氟苯基) 甲烷-d₂-醇的制备

将2,4,5-三氟苯甲酸(1.76g, 10.0mmol)用30ml 无水THF溶解后冰浴降温到0℃左右,分批次加入氘代氢化铝锂(505mg, 12.0mmol)后保持0℃反应1h,薄层色谱跟踪反应进程,反应完全后,保持冰浴0℃将过量十水硫酸钠加入到反应体系中淬灭过量氘代氢化铝锂,过滤固体并用乙酸乙酯2V洗涤滤饼,滤液干燥后浓缩得到(2,4,5-三氟苯基) 甲烷-d₂-醇(化合物b1-2)(1.52g, 无色油状物),收率92.6%,纯度为96.18%。

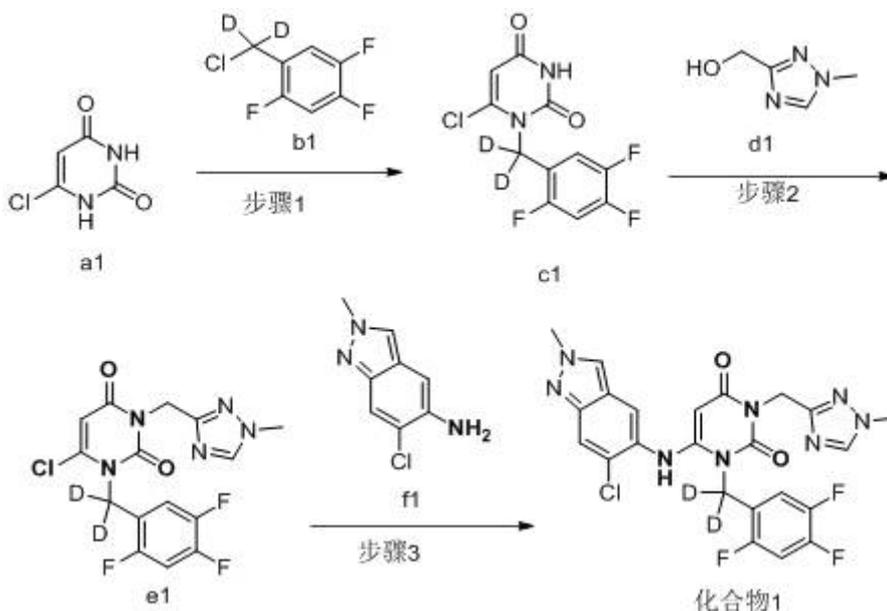
[0039] ESI-MS:m/z=165.1 (M+H)⁺。

[0040] 步骤b:1-(氯甲基-d₂) -2,4,5-三氟苯的制备

将(2,4,5-三氟苯基) 甲烷-d₂-醇(1.52g, 9.26mmol)用15ml 二氯亚砷溶解后升温到80℃回流反应1h,取样薄层色谱跟踪反应进程,反应完全后减压蒸馏出去过量的二氯亚砷,得到1-(氯甲基-d₂) -2,4,5-三氟苯(化合物b1)(1.68g, 无色油状物)直接用于下一步反应。

[0041] ESI-MS:m/z=183.1 (M+H)⁺。

[0042] (2) 化合物1的制备:



步骤1:6-氯-1-((2,4,5-三氟苯基) 甲基-d₂) 嘧啶-2,4(1H,3 H)-二酮(化合物c1)的制备

将6-氯尿嘧啶(1.48g, 10.15mmol)和中间体b1(1.68g, 9.23mmol)混合后用300ml DMF溶解后,加入碘化钠(1.52g, 10.15mmol),随后滴加DIPEA(96.9g, 0.75mol)后保持30℃反应12h,薄层色谱跟踪反应进程,反应完全后,将反应混合物加入3倍体积的水中,洗涤固体过滤,干燥后将滤饼用30ml石油醚打浆,过滤得到固体,鼓风干燥机干燥后得到6-氯-1-((2,4,5-三氟苯基) 甲基-d₂) 嘧啶-2,4(1H,3 H)-二酮(化合物c1)(1.98g, 白色固体),收率73.6%,纯度为98.62%。

[0043] ESI-MS:m/z=293.0 (M+H)⁺。

[0044] 步骤2:6-氯-3-((1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基) 甲基)-1-((2,4,5-三氟苯基) 甲基-d₂) 嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(化合物e1)的制备

将化合物c1(1.75g, 6.0mmol), (1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基) 甲醇(化合物d1)

(678mg, 6.0mmol) 以及三苯基膦 (3.15g, 12mmol), 用 50ml 无水四氢呋喃溶解澄清, 用氩气置换反应体系内空气后, 冰水浴冷却反应体系, 保持搅拌下缓慢匀速滴加偶氮二甲酸二异丙酯 (2.43g, 12mmol), 5min 内滴加完毕后, 保持室温反应, 3 小时后薄层色谱跟踪反应进程, 反应完全后, 反应液用 100ml 水淬灭, 用 30ml 乙酸乙酯萃取三次, 有机溶液干燥后浓缩得到油状物粗品。用 20ml 乙酸乙酯和 100ml 石油醚的混合溶剂分散油状物粗品, 析出大量三苯基氧膦固体, 过滤除去三苯基氧膦, 母液浓缩后柱层析提纯得到 6-氯-3-((1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)甲基)-1-((2,4,5-三氟苯基)甲基-d2)咪啉-2,4(1H,3H)-二酮(化合物e1) (1.76g, 白色固体), 收率 75.9%, 纯度 98.25%。

[0045] ESI-MS: $m/z=388.1$ (M+H)⁺。

[0046] 步骤 3: 6-((6-氯-2-甲基-2H-咪唑-5-基)氨基)-3-((1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)甲基)-1-((2,4,5-三氟苯基)甲基-d2)咪啉-2,4(1H,3H)-二酮(化合物1)的制备

将化合物 e1 (1.55g, 4mmol), 化合物 f1 (1.08g, 6mmol), xant-phos (695mg, 1.2mmol), 醋酸钨 (270mg, 1.2mmol), 磷酸钾 (1.70g, 8mmol) 混合后用 30ml 二氧六环溶解, 氩气置换反应瓶内空气, 并且氩气保护反应, 反应混合物在油浴中升温到 80°C 反应 2h, 薄层色谱检测反应至化合物 f 消耗完全, 反应混合物减压蒸馏除去二氧六环后用 100ml 乙酸乙酯和 100ml 水分液萃取三次, 乙酸乙酯相干燥浓缩后柱层析提纯得到 6-((6-氯-2-甲基-2H-咪唑-5-基)氨基)-3-((1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)甲基)-1-((2,4,5-三氟苯基)甲基-d2)咪啉-2,4(1H,3H)-二酮(化合物1) 1.44g (黄褐色泡沫状固体), 收率 67.8%, 纯度 97.56%。

[0047] ESI-MS: $m/z=533.1$ (M+H)⁺。

[0048] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.13 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 5.09 (s, 1H), 4.23 (s, 3H), 3.90 (s, 3H)。

[0049] 实施例 2: 化合物 2 的制备



(1) 中间体 d2 的制备:



步骤 a: (1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)甲烷-d2-醇的制备

将 (1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基) 甲醇 (3.39g, 30.0mmol) 用 D₂O (4.5ml) 和二氧六环 (30mL) 溶解, 随后加入 RuHCl(CO)(PPh₃)₃ (857mg, 0.9mmol), 油浴升温到 100°C 反应 4h, LCMS 跟踪反应进程, 反应完全后, 乙酸乙酯 20ml 萃取 50ml 水溶液处理的反应液两次, 30ml 饱

和食盐水洗涤两次后,浓缩,柱层析提纯得到 (1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基) 甲烷-d₂-醇 (化合物d₂) (2.5g, 白色固体), 收率72.6%, 纯度为97.21%。

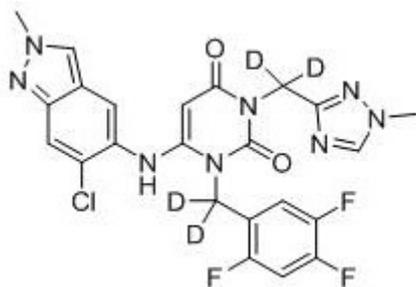
[0050] ESI-MS: m/z=116.1 (M+H)⁺。

[0051] (2) 化合物2的制备: 制备方法同实施例1的制备方法, 将步骤1中的化合物b₁替换为等摩尔b₂ (2,4,5-三氟苄溴), 将步骤2中的化合物d₁替换为等摩尔d₂, 得到黄褐色固体状的标题化合物, 收率: 62.8%, 纯度97.98%。

[0052] ESI-MS: m/z=533.1 (M+H)⁺。

[0053] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.42 (m, 1H), 7.05~7.01 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.09 (s, 1H), 4.22 (s, 3H), 3.88 (s, 3H)。

[0054] 实施例3: 化合物3的制备



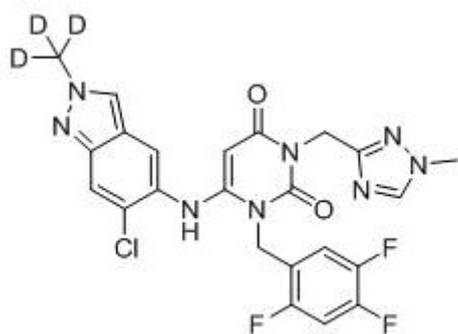
化合物3

制备方法同实施例1的制备方法, 将步骤2中的化合物d₁替换为等摩尔的化合物d₂, 得到黄褐色泡沫固体状标题化合物, 收率82.3%, 纯度98.62%。

[0055] ESI-MS: m/z=535.2 (M+H)⁺。

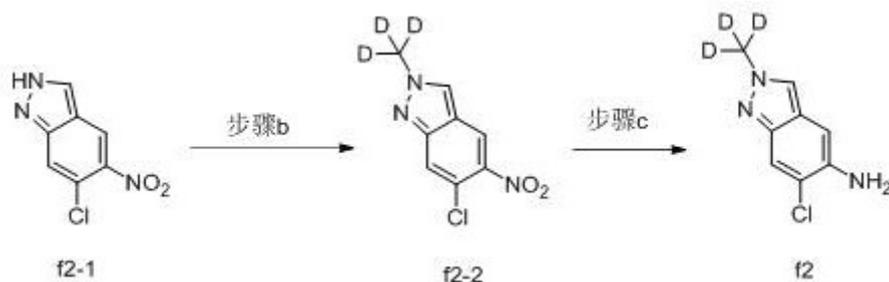
[0056] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.05~7.01 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.22 (s, 3H), 3.88 (s, 3H)。

[0057] 实施例4: 化合物4的制备



化合物4

(1) 中间体f₂的制备:



步骤b: 6-氯-2-(甲基-d3)-5-硝基-2H-咪唑的制备

将6-氯-5-硝基-1H-咪唑(1.98g, 10.0mmol)用DMF(30mL)溶解,随后加入 K_2CO_3 (2.76g, 20.0mmol),以及 CD_3I (1.60g, 11.0mmol)保持RT反应4h,LCMS跟踪反应进程,反应完全后,乙酸乙酯20ml萃取50ml水溶液处理反应液两次,30ml饱和食盐水洗涤两次后,浓缩,柱层析提纯得到(化合物f2-2)6-氯-2-(甲基-d3)-5-硝基-2H-咪唑(1.82g,黄色固体),收率85.0%,纯度为98.25%。

[0058] ESI-MS: $m/z=215.1$ (M+H)⁺。

步骤c: 6-氯-2-(甲基-d3)-2H-咪唑-5-胺的制备

将6-氯-2-(甲基-d3)-5-硝基-2H-咪唑(1.82g, 8.5mmol)加入醋酸(20 mL)然后将还原铁粉(1.91g, 34mmol),反应液在室温下搅拌16小时,然后过滤用乙酸乙酯洗涤,母液减压旋蒸除去溶剂后得到粗品,再用水和乙酸乙酯分液萃取,饱和碳酸氢钠溶液洗涤三次后,得到的乙酸乙酯溶液用无水硫酸钠干燥,浓缩后通过柱层析提纯得到(化合物f2)6-氯-2-(甲基-d3)-2H-咪唑-5-胺(1.26g,黄色固体),收率80.3%,纯度为98.66%。

[0060] ESI-MS: $m/z=185.1$ (M+H)⁺。

[0061] (2)化合物4的制备:制备方法同实施例1的制备方法,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物2,4,5-三氟苄溴,将步骤3中的化合物f1替换为等摩尔的化合物f2,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

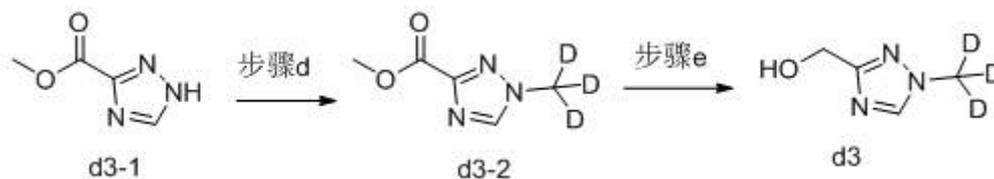
[0062] ESI-MS: $m/z=534.2$ (M+H)⁺。

[0063] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.12 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.48~7.45 (m, 1H), 7.02~6.98 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.32 (s, 2H), 5.07 (s, 1H), 3.88 (s, 3H)。

[0064] 实施例5:化合物5的制备



(1) 中间体d3的制备:



步骤d: 1-(甲基-d₃)-1H-1,2,4-三唑-3-羧酸甲酯的制备

将1,2,4-三氮唑-3-羧酸甲酯(1.27g, 10.0mmol)用DMF(30mL)溶解,随后加入K₂CO₃(2.76g, 20.0mmol),以及CD₃I(1.60g, 11.0mmol)保持RT反应4h,LCMS跟踪反应进程,反应完全后,乙酸乙酯20ml萃取50ml水溶液处理反应液两次,30ml饱和食盐水洗涤两次后,浓缩,柱层析提纯得到(化合物d3-2)1-(甲基-d₃)-1H-1,2,4-三唑-3-羧酸甲酯(1.32g,白色固体),收率91.7%,纯度为97.75%。

[0065] ESI-MS:m/z=145.1 (M+H)⁺。

[0066] 步骤e:(1-(甲基-d₃)-1H-1,2,4-三唑-3-基)甲醇的制备

将1-(甲基-d₃)-1H-1,2,4-三唑-3-羧酸甲酯(1.32g, 9.17mmol)加入无水THF(20mL)溶解,冰水浴保持反应液温度在0-5℃,分批加入氢化铝锂(522mg, 13.76mmol)后,回温到室温反应2小时,TLC跟踪反应完全后,加入适量十水硫酸钠淬灭反应,然后过滤固体并用乙酸乙酯洗涤,母液减压旋蒸除去溶剂后得到粗品,通过柱层析提纯得到(化合物d3)(1-(甲基-d₃)-1H-1,2,4-三唑-3-基)甲醇(920mg,黄色固体),收率86.8%,纯度为97.68%。

[0067] ESI-MS:m/z=117.1 (M+H)⁺。

[0068] (2)化合物5的制备:制备方法同实施例1的制备方法,将步骤1中的化合物b1替换为等摩尔的化合物2,4,5-三氟苄溴,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d3,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率76.8%,纯度98.05%。

[0069] ESI-MS:m/z=534.2 (M+H)⁺。

[0070] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.48~7.45 (m, 1H), 7.06~7.01 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.38 (s, 2H), 5.32 (s, 2H), 5.09 (s, 1H), 4.23 (s, 3H)。

[0071] 实施例6:化合物6的制备



制备方法同实施例1的制备方法,将步骤1中的化合物b1替换为等摩尔的化合物2,4,5-三氟苄溴,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d3,将步骤3中的化合物f1替换为等摩尔的化合物f2,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率76.2%,纯度97.86%。

[0072] ESI-MS:m/z=537.2 (M+H)⁺。

[0073] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.81 (s, 1H),

7.63 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.05~7.00 (m, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.38 (s, 2H), 5.32 (s, 2H), 5.10 (s, 1H), 3.92 (s, 3H)。

[0074] 实施例7:化合物7的制备



(1) 中间体d4的合成:



步骤f: (1-(甲基-d₃)-1H-1,2,4-三唑-3-基)甲基-d₂-醇的制备

将化合物d3-2 (1.44g, 10.0mmol) 用30ml 无水THF溶解后冰浴降温到0℃左右, 分批次加入氘代氢化铝锂 (505mg, 12.0mmol) 后保持0℃反应1h, 薄层色谱跟踪反应进程, 反应完全后, 保持冰浴0℃将过量十水硫酸钠加入到反应体系中淬灭过量氘代氢化铝锂, 过滤固体并用乙酸乙酯2V洗涤滤饼, 滤液干燥后浓缩得到(1-(甲基-d₃)-1H-1,2,4-三唑-3-基)甲基-d₂-醇(化合物d4) (1.08g, 白色固体), 收率91.5%, 纯度为97.08%。

[0075] ESI-MS: m/z=119.1 (M+H)⁺。

[0076] (2) 化合物7的合成: 制备方法同实施例1的制备方法, 将步骤1中的化合物b1替换为等摩尔的化合物2,4,5-三氟苄溴, 将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d4, 将步骤3中的化合物f1替换为等摩尔的化合物f2, 得到黄褐色泡沫固体状标题化合物, 收率75.2%, 纯度96.58%。

[0077] ESI-MS: m/z=539.2 (M+H)⁺。

[0078] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.36 (s, 2H), 5.08 (s, 1H)。

[0079] 实施例8: 化合物8的制备

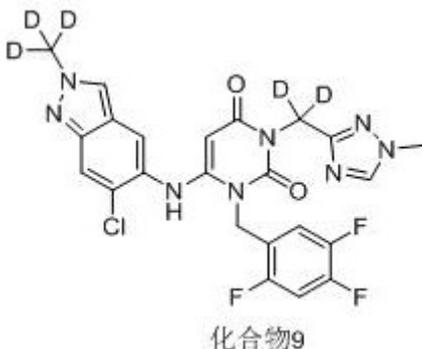


制备方法同实施例1的制备方法,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d2,将步骤3中的化合物f1替换为等摩尔的化合物f2,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

[0080] ESI-MS: $m/z=539.2 (M+H)^+$ 。

[0081] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.30 (s, 2H), 5.11 (s, 1H)。

[0082] 实施例9:化合物9的制备

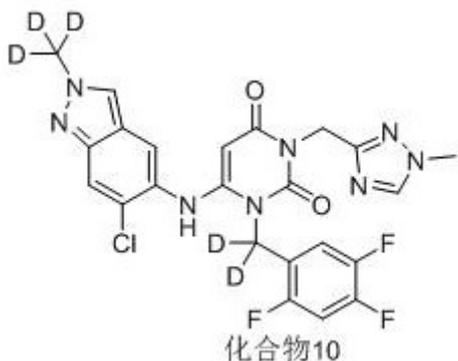


制备方法同实施例1的制备方法,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d2,将步骤3中的化合物f1替换为等摩尔的化合物f2,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

[0083] ESI-MS: $m/z=536.2 (M+H)^+$ 。

[0084] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.39 (s, 2H), 5.09 (s, 1H), 3.90 (s, 3H)。

[0085] 实施例10:化合物10的制备



制备方法同实施例1的制备方法,将步骤3中的化合物f1替换为等摩尔的化合物f2,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

[0086] ESI-MS: $m/z=536.2 (M+H)^+$ 。

[0087] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 5.09 (s, 1H), 3.90 (s, 3H)。

[0088] 实施例11:化合物11的制备



制备方法同实施例1的制备方法,将步骤1中的化合物b1替换为等摩尔的化合物2, 4,5-三氟苄溴,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d4,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

[0089] ESI-MS: $m/z=536.2 (M+H)^+$ 。

[0090] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.37 (s, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.20 (s, 3H)。

[0091] 实施例12:化合物12的制备



制备方法同实施例1的制备方法,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d3,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

[0092] ESI-MS: $m/z=536.2 (M+H)^+$ 。

[0093] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.31 (s, 2H), 5.10 (s, 1H), 4.22 (s, 3H)。

[0094] 实施例13:化合物13的制备



制备方法同实施例1的制备方法,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d4,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

[0095] ESI-MS: $m/z=538.2 (M+H)^+$ 。

[0096] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.48~7.46 (m, 1H), 7.06~7.02 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.11 (s, 1H), 4.22 (s, 3H)。

[0097] 实施例14:化合物14的制备



制备方法同实施例1的制备方法,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d2,将步骤3中的化合物f1替换为等摩尔的化合物f2,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

[0098] ESI-MS: $m/z=538.2 (M+H)^+$ 。

[0099] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 3.90 (s, 3H)。

[0100] 实施例15:化合物15的制备



制备方法同实施例1的制备方法,将步骤2中的化合物d1替换为等摩尔的化合物d4,将步骤3中的化合物f1替换为等摩尔的化合物f2,得到黄褐色泡沫固体状标题化合物,收率82.3%,纯度98.62%。

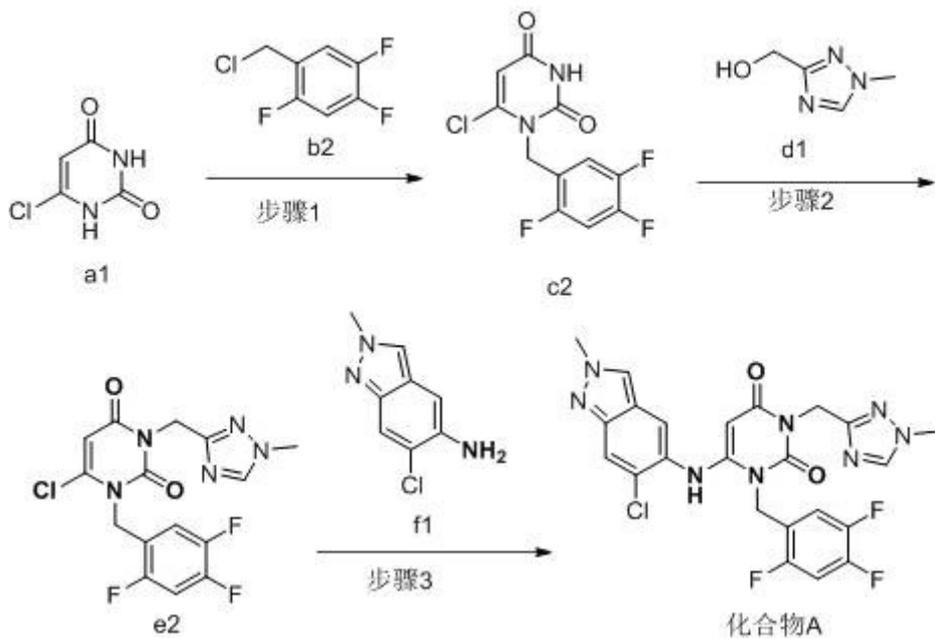
[0101] ESI-MS: $m/z=532.1$ (M+H)⁺。

[0102] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.13 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.09 (s, 1H)。

[0103] 实施例16:化合物A的制备



合成路线如下:

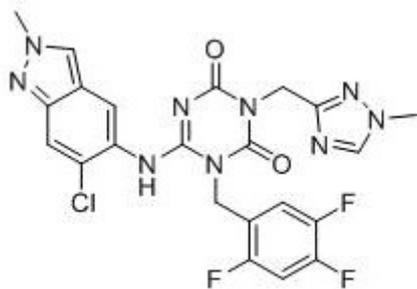


制备方法同实施例1的制备方法,将步骤1中的化合物b1替换为等摩尔的化合物b2,得到黄褐色固体状化合物A,收率76.6%,纯度98.22%。

[0104] ESI-MS: $m/z=531.1 (M+H)^+$ 。

[0105] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.13 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46~7.44 (m, 1H), 7.04~7.00 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 5.09 (s, 1H), 4.23 (s, 3H), 3.90 (s, 3H)。

[0106] 对比例1:对比例1(S-217622)的制备



对比例1

制备方法参照专利CN 115038696 A方法,得到浅白色固体状标题化合物,收率72.6%,纯度98.87%。

[0107] ESI-MS: $m/z=538.2 (M+H)^+$ 。

[0108] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.96 (s, 1H), 7.82 (d, $J=2.5\text{Hz}$, 2H), 7.48 (br s, 1H), 7.45~7.37 (m, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.97~6.88 (m, 1H), 5.35 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 4.21 (s, 3H), 3.89 (s, 3H)。

[0109] 试验例1:本发明化合物对 3CL蛋白酶活性抑制作用检测

1. 试验样品

实施例化合物1~15、化合物A和对比例1。

[0110] 试验方法

基于3CL蛋白酶是一种蛋白水解酶的基本特点,建立荧光法检测3CL蛋白酶活性的筛选体系。以SARS-CoV-2 3CL蛋白酶可特异性剪切P1位为Gln(Q)的底物,其活性检测可采用荧光多肽为底物,通过检测荧光信号的生成来反映其蛋白水解酶的活性。SARS-CoV-2 3CL蛋白酶活性检测使用荧光标记多肽底物,SARS-CoV-2 3CL蛋白酶溶液(在反应液中稀释到 $0.5\mu\text{M}$)与化合物在反应液(20mM Tris, pH7.3; 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Glycerol, 0.01% Tween-20)中室温共孵育10分钟,加入底物($40\mu\text{M}$, 反应液总体积 $50\mu\text{L}$),开始反应后用EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer)检测反应液的荧光强度(激发光320nm, 发射光405nm),每个剂量设三个复孔。对照孔(DMSO)的荧光值设为100%,化合物处理孔用相对于对照孔的百分数来表示其活性率。

[0111] 以不同浓度对3CL蛋白酶活性抑制作用进行检测,测试活性剂量依赖关系,通过样品活性对样品浓度进行非线性拟和得到,每个样品在测试中均设置复孔($n\geq 3$),在结果中以标准偏差(Standard Deviation, SD)计算 IC_{50} 。

[0112] 实验结果

表 1 3CL 蛋白酶活性抑制结果

测试样品	IC ₅₀ (nM)	测试样品	IC ₅₀ (nM)
对比例 1	15.9	化合物 A	9.2
化合物 1	4.2	化合物 2	3.6
化合物 3	8.5	化合物 4	2.9
化合物 5	5.6	化合物 6	9.4
化合物 7	2.8	化合物 8	5.2
化合物 9	11.4	化合物 10	7.5
化合物 11	9.6	化合物 12	6.9
化合物 13	9.9	化合物 14	13.2
化合物 15	11.5		

试验例2:大鼠药代动力学研究

1. 试验目的

考察相同剂量下,大鼠单次灌胃给药后,各个化合物的药代动力学特征,并对比主要药代动力学参数。

[0113] 材料和方法

(1) 受试物

对比例1、化合物A、化合物1、化合物2、化合物4。

[0114] (2) 给药制剂的配制

分别准确称取受试化合物于清洁给药容器中,加入适量Solutol溶解,涡旋震荡,加入纯水,超声,涡旋震荡,直至化合物完全溶解;给药制剂均在给药当天新鲜配制。

[0115] (3) 试验分组及给药情况

健康成年SD大鼠若干只,灌胃给药。具体方案见表2。

表 2 大鼠药动学试验给药方案

受试物	动物数量/性别	给药剂量 (mg/kg)	给药浓度 (mg/mL)	给药体积 (mL/kg)	给药途径
对比例 1	3 只大鼠,雄性	5	0.5	10	i. g.
化合物 A	3 只大鼠,雄性	5	0.5	10	i. g.
化合物 1	3 只大鼠,雄性	5	0.5	10	i. g.
化合物 2	3 只大鼠,雄性	5	0.5	10	i. g.
化合物 4	3 只大鼠,雄性	5	0.5	10	i. g.

[0116] (4) 试验方法

分组及禁食:雄性SD大鼠,随机分组,每组3只;禁食过夜 (>12 h),不禁水;给药后 4 h 统一进食。按表2灌胃给予相应化合物。

[0117] 样品采集和处理:于给药前(0h)及给药后5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8h、24h的时间点分别采血0.2 mL,经EDTA-K2抗凝后4℃离心5 min,分离血浆于-80℃保存待测。

[0118] 检测:采用LC/MS/MS法检测所有PK血浆样品中各个化合物的血药浓度,并利用WinNonlin7.2软件计算各个化合物的药代动力学参数。

[0119] 试验结果

表 3 各化合物主要药代动力学参数 (n=3, mean±SD)

受试物	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{0-12h} (h×ng/ml)
对比例 1	1.43±0.40	2.67±0.45	527.33±80.46	750.67±137.16
化合物 A	1.75±0.35	3.37±0.45	645.67±139.48	806.33±161.87
化合物 1	1.33±0.59	5.77±0.25**	851.00±161.04	1157.00±213.55
化合物 2	1.30±0.36	3.97±0.68	736.33±103.36	860.67±143.20
化合物 4	1.57±0.45	3.70±0.62	747.67±93.15	874.00±194.20

从表3看出,与对比例1化合物相比,化合物A、化合物1、化合物2、化合物4的T_{1/2}均有所延长,尤其是化合物1的T_{1/2}是对比例1的约2.2倍,且具有显著性差异(P<0.01),说明化合物1半衰期更长,预期药效持续时间更长。

[0120] 与对比例1化合物相比,化合物A、化合物1、化合物2、化合物4的C_{max}均有所提高,其中化合物1的C_{max}约为对比例1的1.6倍,说明化合物1在大鼠体内的最大血药浓度更高,预期药效更强。

[0121] 与对比例1化合物相比,化合物A、化合物1、化合物2、化合物4的AUC均有所升高,其中化合物1的AUC_{0-12h}约为对比例1的1.5倍,说明化合物1吸收更高,更能充分发挥药效。

[0122] 综上所述,化合物A相对于对比例1,即在母核少一个氮的情况下,半衰期延长,血药浓度C_{max}和AUC_{0-12h}均有提高,表明本发明的化合物A在药效持续时间、生物利用度等方面取得了显著的进步。而与对比例1和非氘代药物化合物A相比,本发明的氘代化合物能够延长药物治疗时间,尤其化合物1的半衰期具有显著性差异,具有更长的药效持续时间;且本发明的氘代化合物的血药浓度C_{max}和AUC_{0-12h}均高于对比例1和化合物A,尤其化合物1的C_{max}和AUC_{0-12h}均意料之外地优于阳性药物对比例1和结构改造物化合物A,生物利用度更高,药效更好,预期可以降低本发明的氘代物尤其化合物1的治疗剂量,从而大大降低毒副作用,安全性更高。

[0123] 值得注意的是,从本发明氘代物的研究过程可以看出,由于生物系统的代谢过程复杂,药物在生物体内的药代动力学性质受到多方面因素影响,也使得药物的药代动力学性质的变化表现出极大的偶然性和不可预测性。例如某些位点的氘代非但不能延长半衰期,反而可能会使其缩短,劣化其药代动力学性质;而氘代分子对细胞活性的影响更是不可预测,没有定论。