



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109415360 B

(45) 授权公告日 2021.11.02

(21) 申请号 201780036798.7

余冰

(22) 申请日 2017.06.12

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(65) 同一申请的已公布的文献号

11247

申请公布号 CN 109415360 A

代理人 宋卫霞 黄革生

(43) 申请公布日 2019.03.01

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07D 471/04 (2006.01)

62/349,697 2016.06.14 US

A61K 31/4545 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07D 401/14 (2006.01)

2018.12.13

C07D 403/14 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07D 487/04 (2006.01)

PCT/IB2017/053469 2017.06.12

C07D 513/04 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07D 519/00 (2006.01)

W02017/216706 EN 2017.12.21

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

(56) 对比文件

地址 瑞士巴塞尔

WO 2015107494 A1, 2015.07.23

WO 2015107495 A1, 2015.07.23

(72) 发明人 陈卓亮 J·G·弗塔内

R·卡尔基 M·J·拉麦尔施

D·马宗达 L·B·佩雷斯

M·森齐克 T·D·史密斯 杨凡

WO 2006065946 A1, 2006.06.22

审查员 孙文倩

权利要求书8页 说明书86页

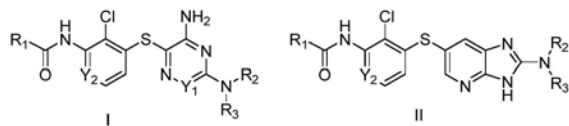
序列表1页

(54) 发明名称

用于抑制SHP2活性的化合物和组合物

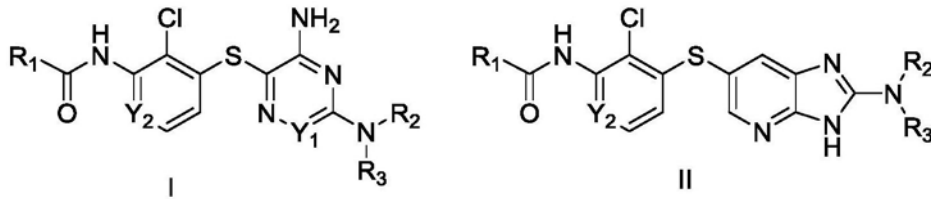
(57) 摘要

本发明涉及具有式I的化合物:



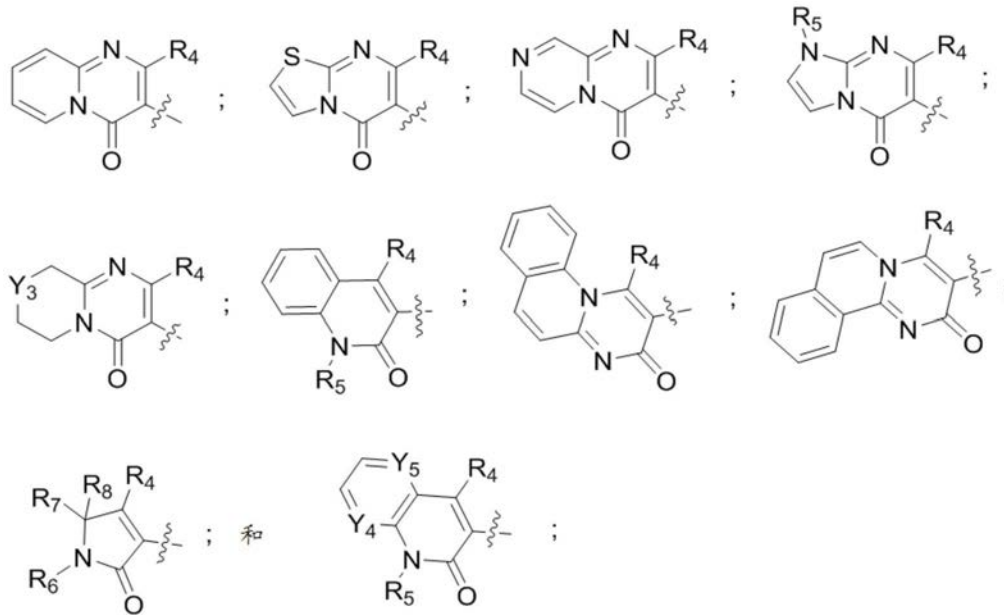
其中Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>在发明内容中进行定义;该化合物能够抑制SHP2活性。本发明进一步提供了用于制备本发明化合物的方法,包含此类化合物的药物制剂,和使用此类化合物和组合物管理与SHP2异常活性相关的疾病或障碍的方法。

1. 一种选自式I和式II的化合物或其药学上可接受的盐:



其中:

R<sub>1</sub>选自:



R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>与R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>两者所附接的氮一起形成环,该环选自哌啶基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基和吡咯烷基;其中所述吡咯烷基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基或哌啶基是未被取代的或被独立地选自以下的1至3个基团所取代:氨基、甲基、乙基、氨基-甲基、甲基-氨基、羟基、氰基、氟-甲基、氟和(((5-甲基-2-氧代-1,3-间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)羰基)氨基)甲基;

R<sub>4</sub>选自羟基、C<sub>1-3</sub>烷氧基和OC(O)C<sub>1-3</sub>烷基;

R<sub>5</sub>选自H和甲基;

R<sub>6</sub>选自氢、甲基和苯基;

R<sub>7</sub>选自氢、甲基、乙基、苯基和苄基;

R<sub>8</sub>选自氢和甲基;

Y<sub>1</sub>选自N和CH;

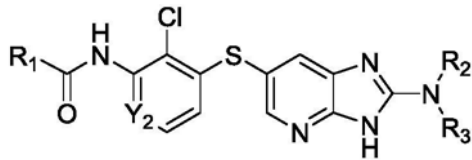
Y<sub>2</sub>选自N和CH;

Y<sub>3</sub>选自NH和CH<sub>2</sub>;

Y<sub>4</sub>选自N和CH;

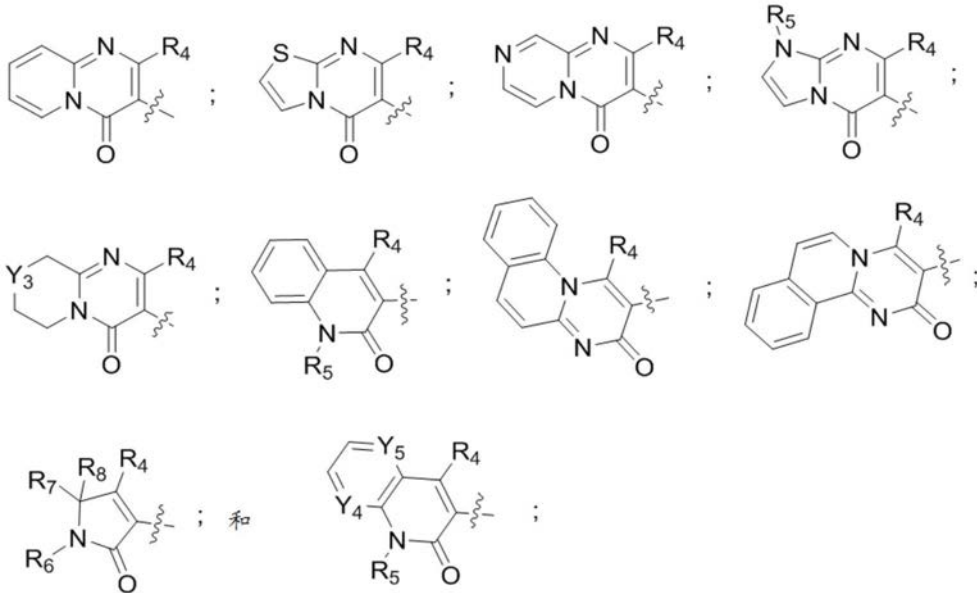
Y<sub>5</sub>选自N和CH。

2. 具有式II的如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐:



其中：

R<sub>1</sub>选自：



R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>与R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>两者所附接的氮一起形成环，该环选自哌啶基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基和吡咯烷基；其中所述吡咯烷基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基或哌啶基是未被取代的或被独立地选自以下的1至3个基团所取代：氨基、甲基、乙基、氨基-甲基、甲基-氨基、羟基、氰基、氟-甲基、氟和(((5-甲基-2-氧代-1,3-间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)羰基)氨基)甲基；

R<sub>4</sub>选自羟基；

R<sub>5</sub>选自H和甲基；

R<sub>6</sub>选自氢、甲基和苯基；

R<sub>7</sub>选自氢、甲基、乙基、苯基和苄基；

R<sub>8</sub>选自氢和甲基；

Y<sub>2</sub>选自N和CH；

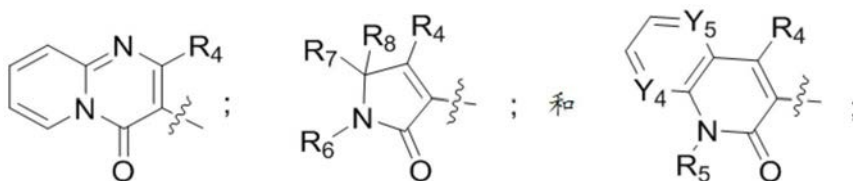
Y<sub>3</sub>选自NH和CH<sub>2</sub>；

Y<sub>4</sub>选自N和CH；

Y<sub>5</sub>选自N和CH。

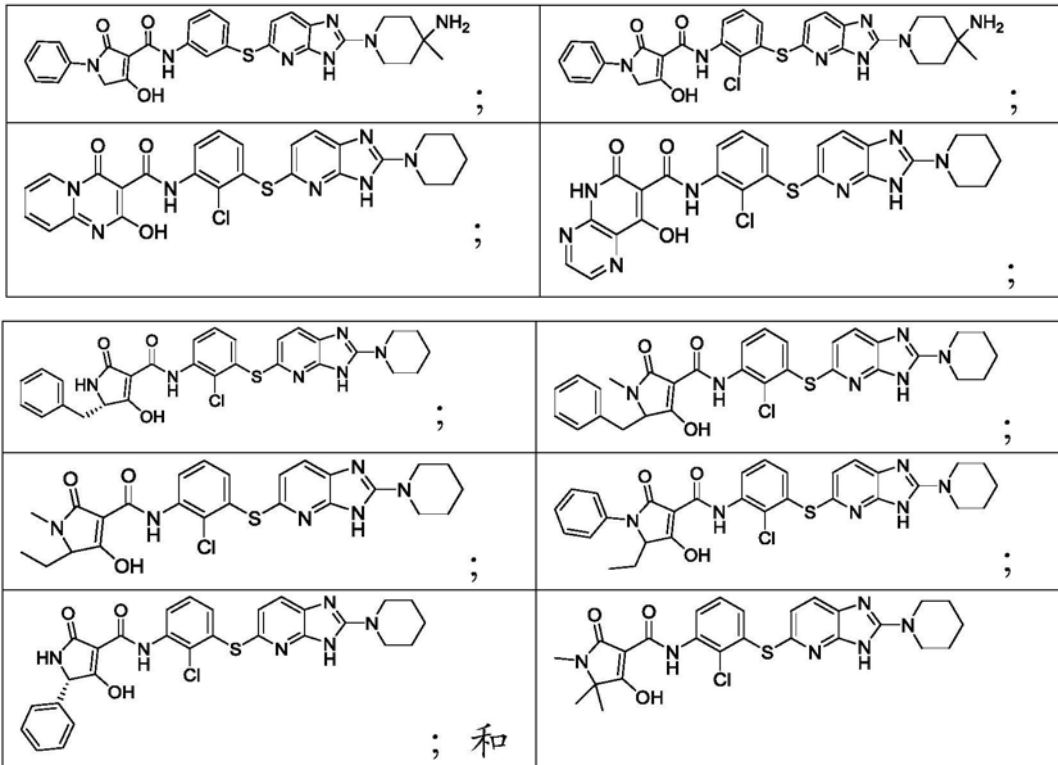
3. 如权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中：

R<sub>1</sub>选自：

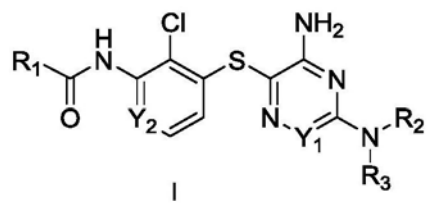


- R<sub>4</sub>选自羟基；
- R<sub>5</sub>选自H和甲基；
- R<sub>6</sub>选自氢、甲基和苯基；
- R<sub>7</sub>选自氢、甲基、乙基、苯基和苄基；
- R<sub>8</sub>选自氢和甲基；
- Y<sub>4</sub>选自N和CH；以及
- Y<sub>5</sub>选自N和CH。

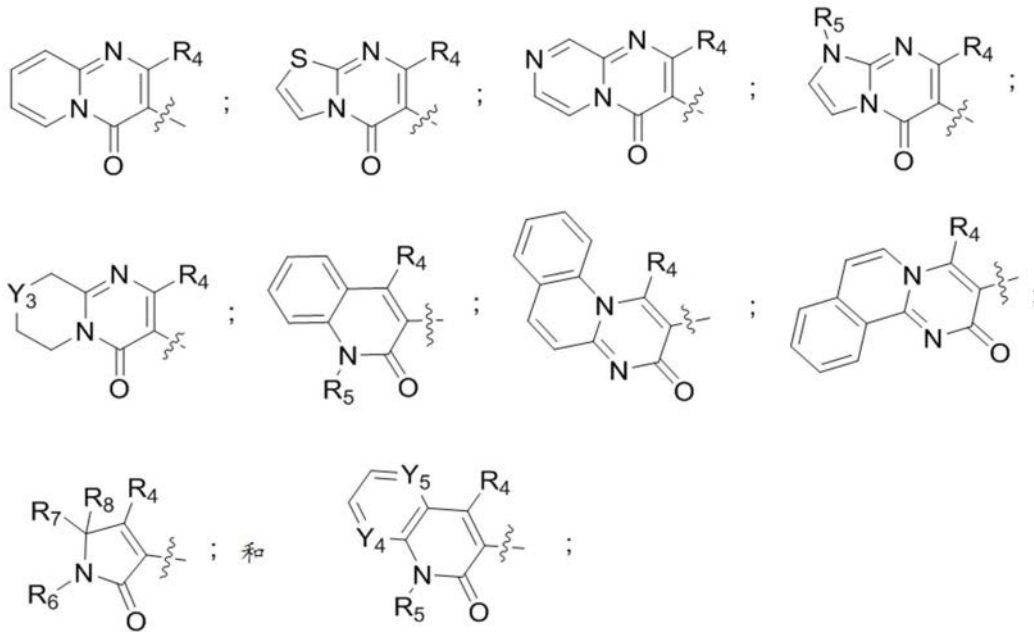
4. 化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物选自:



5. 具有式I的如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐:



- 其中:
- R<sub>1</sub>选自:



$R_2$ 和 $R_3$ 与 $R_2$ 和 $R_3$ 两者所附接的氮一起形成环,该环选自哌啶基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基和吡咯烷基;其中所述吡咯烷基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基或哌啶基是未被取代的或被独立地选自以下的1至3个基团所取代:氨基、甲基、乙基、氨基-甲基、甲基-氨基、羟基、氰基、氟-甲基、氟和(((5-甲基-2-氧代-1,3-间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)羰基)氨基)甲基;

$R_4$ 选自羟基;

$R_5$ 选自H和甲基;

$R_6$ 选自氢、甲基和苯基;

$R_7$ 选自氢、甲基、乙基、苯基和苄基;

$R_8$ 选自氢和甲基;

$Y_1$ 选自N和CH;

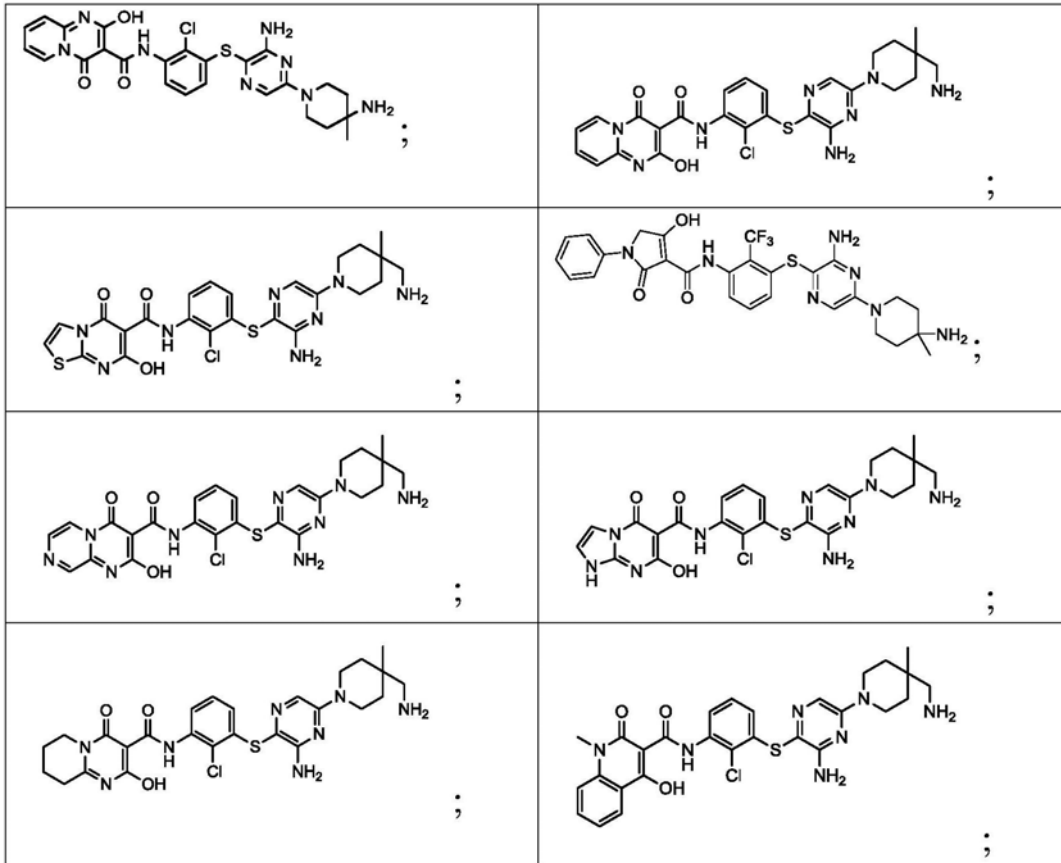
$Y_2$ 选自N和CH;

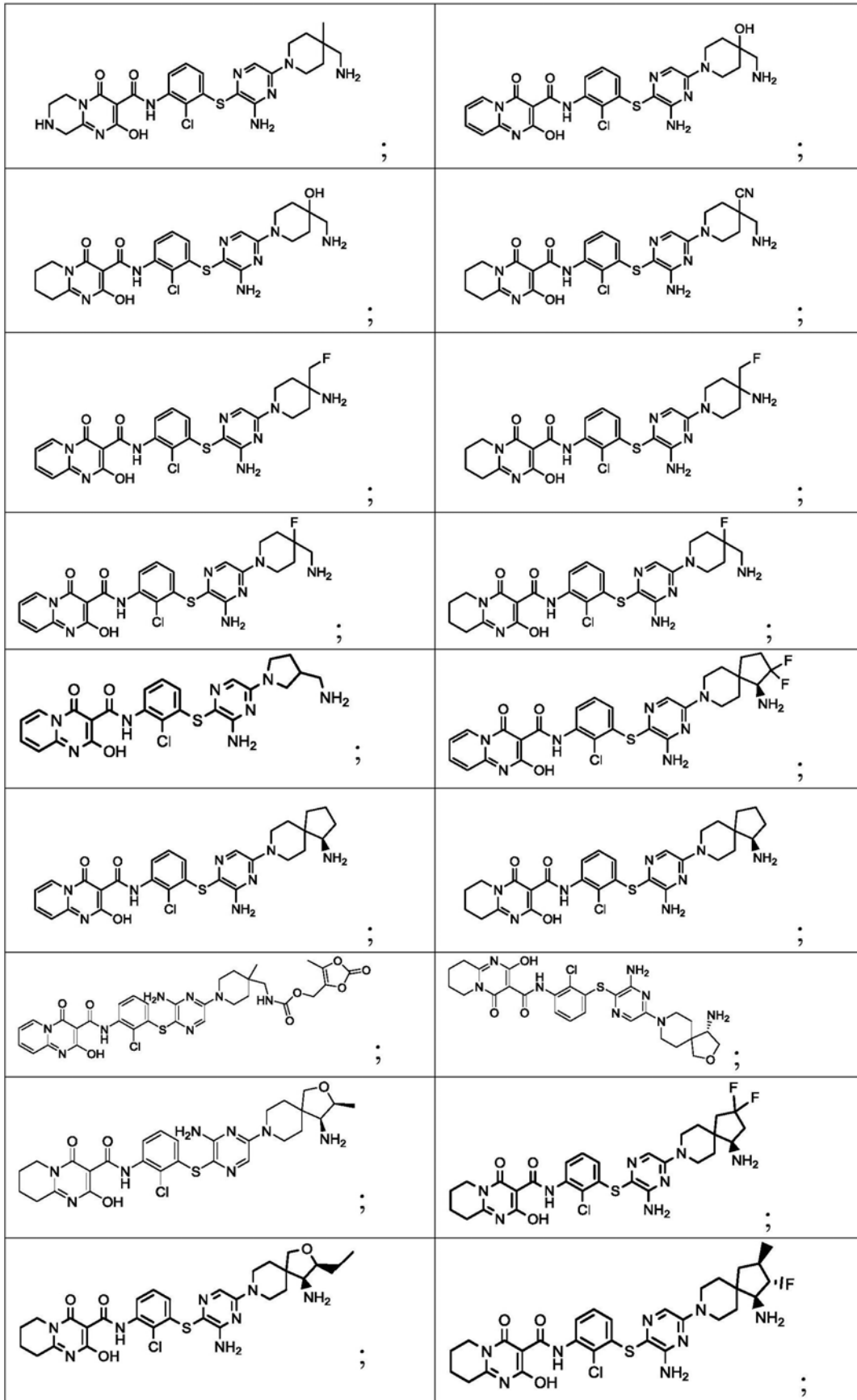
$Y_3$ 选自NH和 $CH_2$ ;

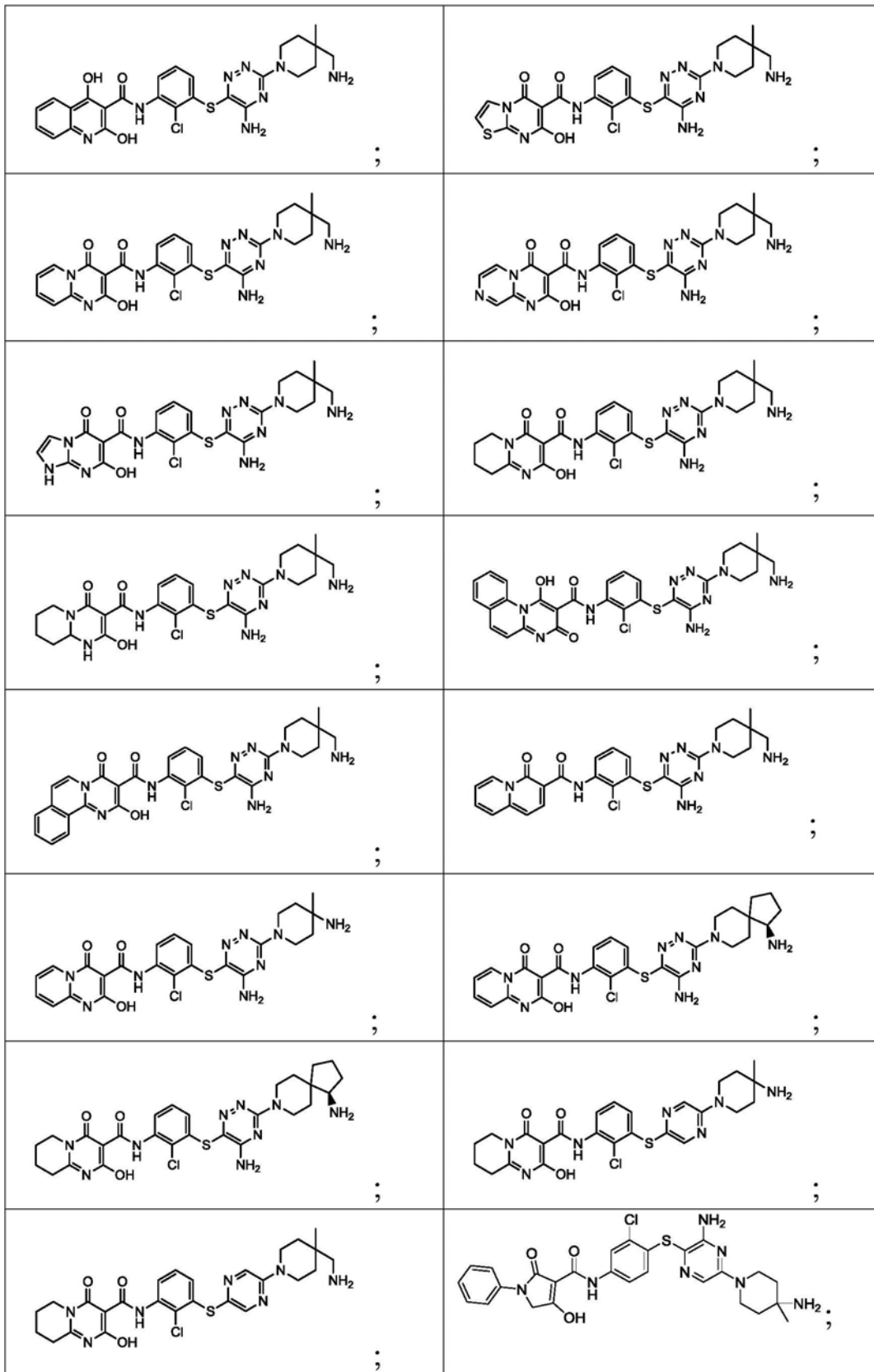
$Y_4$ 选自N和CH;

$Y_5$ 选自N和CH。

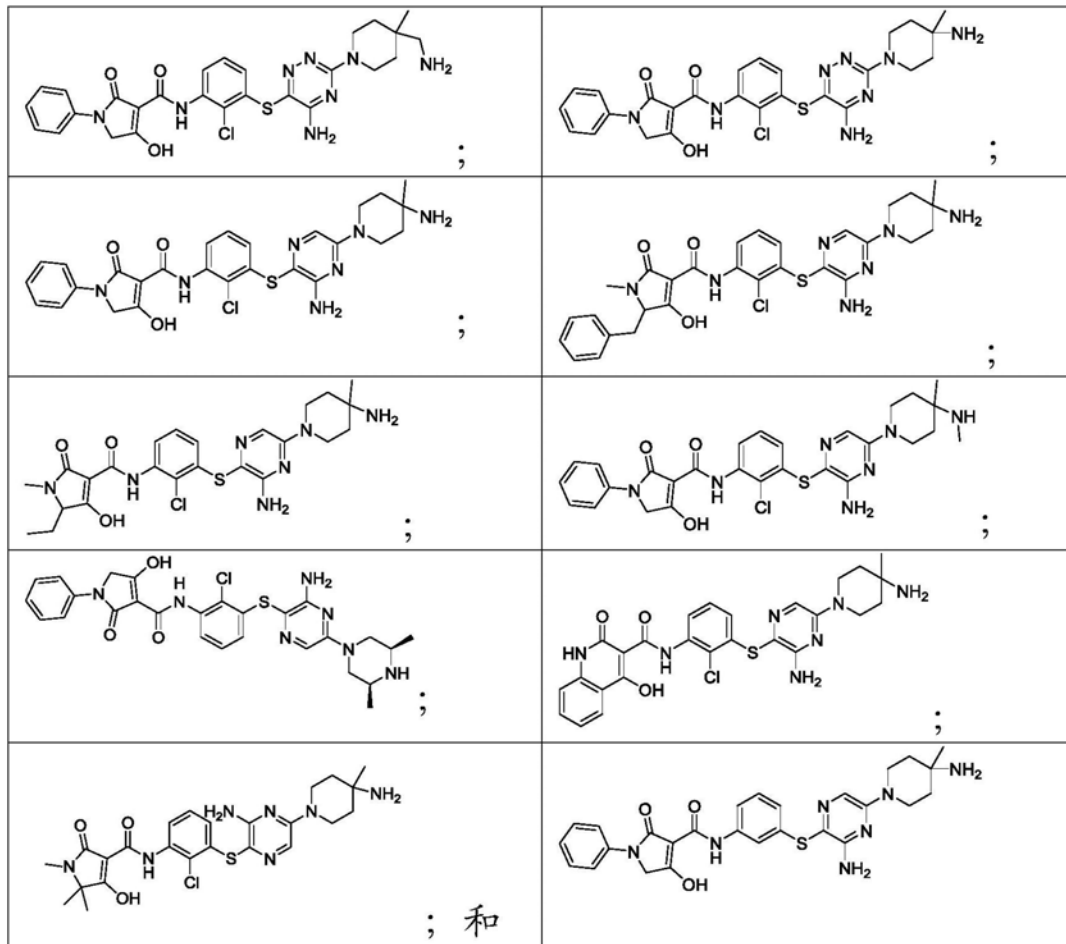
6. 化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物选自:











7. 一种药物组合物, 该药物组合物包含如权利要求1至6中任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的载体。

8. 如权利要求1至6中任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗由SHP2活性介导的疾病或障碍的药物中的用途。

9. 如权利要求8所述的用途, 其中所述由SHP2活性介导的疾病或障碍选自努南综合征、豹皮综合征、青少年骨髓单核细胞性白血病、神经母细胞瘤、黑素瘤、急性髓性白血病、乳腺癌、食管癌、肺癌、结肠癌、头癌、头颈部鳞状细胞癌、胃癌、和间变性大细胞淋巴瘤。

10. 如权利要求8所述的用途, 其中所述由SHP2活性介导的疾病或障碍选自胶质母细胞瘤。

## 用于抑制SHP2活性的化合物和组合物

[0001] 发明背景

### 技术领域

[0002] 本发明涉及能够抑制SHP2活性的化合物。本发明进一步提供了用于制备本发明化合物的方法,包含此类化合物的药物制剂,和使用此类化合物和组合物管理与SHP2异常活性相关的疾病或障碍的方法。

### 背景技术

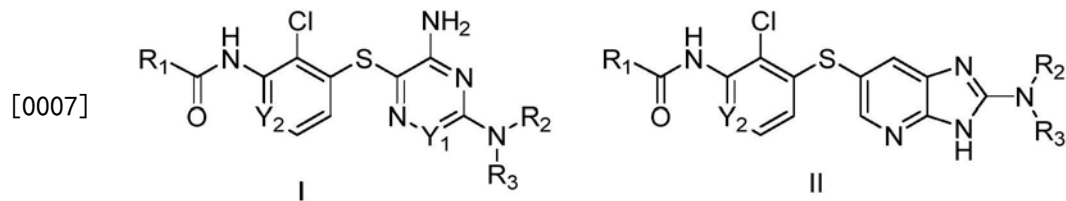
[0003] Src同源区-2磷酸酶 (SHP2) 是有助于多种细胞功能 (包括增殖、分化、细胞周期维持和迁移) 的、由PTPN11基因编码的非受体蛋白酪氨酸磷酸酶。SHP2参与通过Ras-丝裂原活化蛋白激酶、JAK-STAT或磷酸肌醇3-激酶-AKT途径的信号传导。

[0004] SHP2具有两个N末端Src同源区2结构域 (N-SH2和C-SH2)、催化结构域 (PTP) 和C末端尾部。两个SH2结构域控制SHP2的亚细胞定位和功能调节。该分子以通过涉及来自N-SH2和PTP结构域的残基的结合网络稳定的无活性的、自身抑制构象存在。通过例如细胞因子或生长因子的刺激导致催化位点的暴露,导致SHP2的酶促活化。

[0005] 在PTPN11基因并随后在SHP2中的突变已经在多种人类疾病 (如努南综合征、豹皮综合征、青少年骨髓单核细胞性白血病、神经母细胞瘤、黑素瘤、急性髓性白血病,以及乳腺癌、肺癌、和结肠癌) 中被鉴定出。因此,SHP2代表了用于开发治疗各种疾病的新疗法的极具吸引力的靶标。本发明的化合物满足了对用于抑制SHP2活性的小分子的需要。

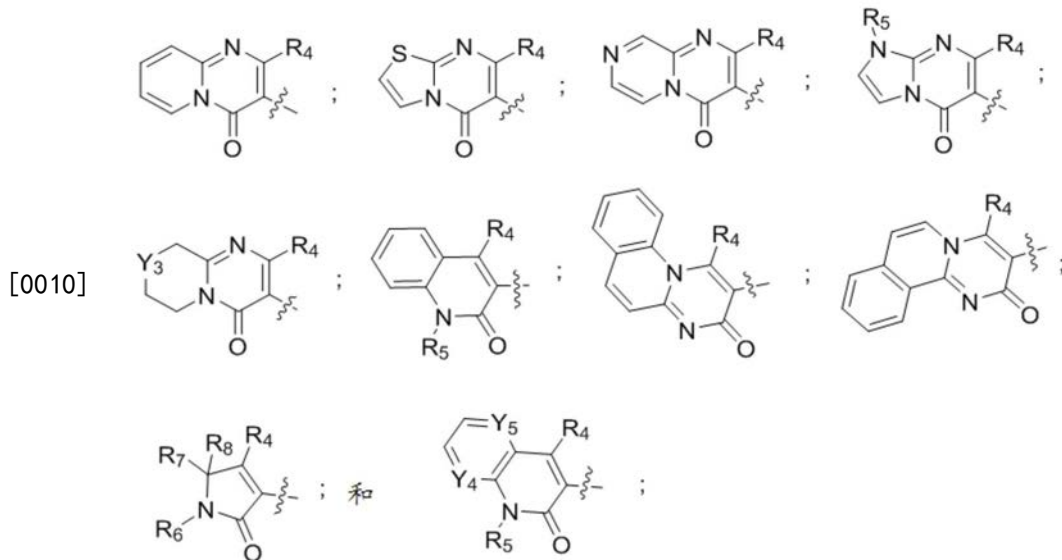
### 发明内容

[0006] 在一个方面,本发明提供了具有式I的化合物或其药学上可接受的盐:



[0008] 其中:

[0009]  $R_1$ 选自:



[0011]  $R_2$ 和 $R_3$ 与 $R_2$ 和 $R_3$ 两者所附接的氮一起形成环,该环选自哌啶基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基和吡咯烷基;其中所述吡咯烷基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基或哌啶基是未被取代的或被独立地选自以下的1至3个基团所取代:氨基、甲基、乙基、氨基-甲基、甲基-氨基、羟基、氰基、氟-甲基、氟和(((5-甲基-2-氧代-1,3-间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)羰基)氨基)甲基; $R_4$ 选自羟基、 $C_{1-3}$ 烷氧基和 $OC(O)C_{1-3}$ 烷基; $R_5$ 选自H和甲基; $R_6$ 选自氢、甲基和苯基; $R_7$ 选自氢、甲基、乙基、苯基和苄基; $R_8$ 选自氢和甲基; $Y_1$ 选自N和CH; $Y_2$ 选自N和CH; $Y_3$ 选自NH和 $CH_2$ ; $Y_4$ 选自N和CH; $Y_5$ 选自N和CH。

[0012] 在第二方面,本发明提供了药物组合物,该药物组合物含有具有式I的化合物或其N-氧化物衍生物、互变异构体、单独的异构体和异构体混合物;或其药学上可接受的盐,以上各项与一种或多种合适的赋形剂混合。

[0013] 在第三方面,本发明提供了治疗动物疾病的方法(其中SHP2活性的调节可以预防、抑制或改善这些疾病的病理和/或症状),该方法包括向该动物给予治疗有效量的具有式I的化合物或其N-氧化物衍生物、单独的异构体和异构体混合物,或其药学上可接受的盐。

[0014] 在第四方面,本发明提供了治疗动物疾病的方法(其中SHP2活性的调节可以预防、抑制或改善这些疾病的病理和/或症状),该方法包括向该动物给予治疗有效量的具有式I的化合物或其N-氧化物衍生物、单独的异构体和异构体混合物,或其药学上可接受的盐,以上各项与抗癌治疗剂同时或顺序组合。

[0015] 在第五方面,本发明提供了具有式I的化合物在制备用于治疗动物疾病(其中SHP2活性促成该疾病的病理和/或症状)的药物中的用途。

[0016] 在第六方面,本发明提供了用于制备具有式I的化合物及其N-氧化物衍生物、前药衍生物、受保护的衍生物、单独的异构体和异构体混合物,和其药学上可接受的盐的方法。

[0017] 定义

[0018] 除非另有说明,否则上文和下文中使用的通用术语优选在本公开的上下文中具有以下含义,其中无论在什么情况下使用的更通用的术语可以彼此独立地由更具体的定义代替或保留,从而定义本发明的更详细实施例:

[0019] “烷基”是指具有多达20个碳原子的完全饱和的支链或无支链的烃部分。除非另有

说明,否则烷基是指具有1至7个碳原子(C<sub>1-7</sub>烷基)或1至4个碳原子(C<sub>1-4</sub>烷基)的烃部分。烷基的代表性实例包括,但不限于,甲基、乙基、正-丙基、异-丙基、正-丁基、仲-丁基、异-丁基、叔-丁基、正-戊基、异戊基、新戊基、正-己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正-庚基、正-辛基、正-壬基、正-癸基等。取代的烷基是含有一个或多个,例如一个、两个或三个选自卤素、羟基或烷氧基基团的取代基的烷基基团。卤代烷基和卤代烷氧基可以是直链或支链的,并包括甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、五氟乙基、二氟甲氧基、三氟甲氧基等。

[0020] “芳基”是指含六至十个环碳原子的单环或稠合的二环芳族环组件。例如,芳基可以是苯基或萘基,优选苯基。“亚芳基”是指衍生自芳基基团的二价基团。

[0021] “杂芳基”是如以上对芳基所定义的,其中一个或多个环成员是杂原子。例如,C<sub>5-10</sub>杂芳基具有至少5个如由碳原子所示的成员,但这些碳原子可被杂原子取代。因此,C<sub>5-10</sub>杂芳基包括吡啶基、吡咯基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、吡唑基、苯并咪唑基、苯并吡唑基、苯并噻唑基、苯并[1,3]间二氧杂环戊烯、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、呋喃基、噁唑基、异噁唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、噻吩基等。

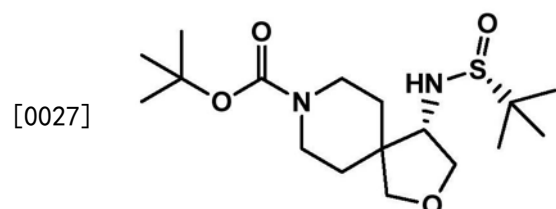
[0022] “环烷基”是指饱和或部分不饱和的含有所示环原子数的单环、稠合双环或桥连多环组件。例如,C<sub>3-10</sub>环烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环己烯基等。

[0023] “杂环烷基”是指如本申请中所定义的环境基,条件是所指示的一个或多个环碳被选自以下的部分取代:-O-、-N=、-NR-、-C(O)-、-S-、-S(O)-或-S(O)<sub>2</sub>- ,其中R是氢、C<sub>1-4</sub>烷基或氮保护基团。例如,如在本申请中用于描述本发明化合物的C<sub>3-8</sub>杂环烷基包括吗啉代、吡咯烷基、吡咯烷基-2-酮、哌嗪基、哌啶基、哌啶酮(piperidinylone)、1,4-二氧杂-8-氮杂-螺[4.5]癸-8-基、硫代吗啉代、磺烷吗啉代(sulfanomorpholino)、磺基吗啉代(sulfonomorpholino)等。

[0024] “卤素”(或卤代)优选代表氯或氟,但也可以是溴或碘。

[0025] “SHP2”是指“Src同源区-2磷酸酶”并且也被称为SH-PTP2、SH-PTP3、Syp、PTP1D、PTP2C、SAP-2或PTPN11。

[0026] 携带“PTPN11突变”的癌症包括但不限于:N58Y;D61Y、V;E69K;A72V、T、D;E76G、Q、K(ALL);G60A;D61Y;E69V;F71K;A72V;T73I;E76G、K;R289G;G503V(AML);G60R、D61Y、V、N;Y62D;E69K;A72T、V;T73I;E76K、V、G、A、Q;E139D;G503A、R;Q506P(JMML);G60V;D61V;E69K;F71L;A72V;E76A(MDS);Y63C(CMML);Y62C;E69K;T507K(神经母细胞瘤);V46L;N58S;E76V(肺癌);R138Q(黑素瘤);E76G(结肠癌)。



[0028] 对于本申请,上述结构由(S)-叔-丁基4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(名称由chemdraw生成)和(S)-叔-丁基4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰氨基)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(名称由chemdraw认可)代表。

[0029] 具有式I的化合物可具有不同的异构体形式。例如,任何不对称碳原子能以(R)-、

(S)-或(R,S)-构型存在,优选以(R)-或(S)-构型存在。双键或尤其是环处的取代基能以顺式(=Z-)或反式(=E-)形式存在。因此,化合物可以作为异构体混合物存在,或优选作为纯异构体存在,优选作为纯非对映异构体或纯对映异构体存在。

[0030] 当使用复数形式(例如多种化合物、多种盐)时,其包括单数(例如,单一化合物、单一盐)。“化合物”不排除(例如在药物配制品中)存在不止一种具有式I的化合物(或其盐),“一个/一种”仅代表不定冠词。因此,“一个/一种”可以优选地读作“一个或多个/一种或多种”,较不优选地可替代地读作“一”。

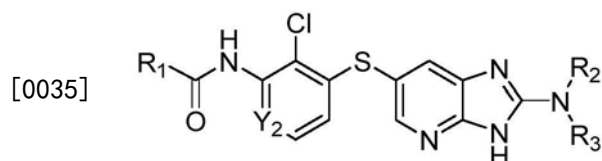
[0031] 无论在什么情况下提及化合物或具有式I的化合物,这进一步还意在包括此类化合物的N-氧化物和/或其互变异构体。

[0032] 术语“和/或其N-氧化物、其互变异构体和/或其(优选药学上可接受的)盐”尤其是指,具有式I的化合物可以原样存在或与其N-氧化物混合,作为互变异构体(例如由于酮-烯醇、内酰胺-内酰亚胺、酰胺-亚胺酸或烯胺-亚胺互变异构)存在或与其互变异构体(例如等效反应引起的)混合,或作为具有式I的化合物的盐和/或任何这些形式或两种或更多种此类形式的混合物。

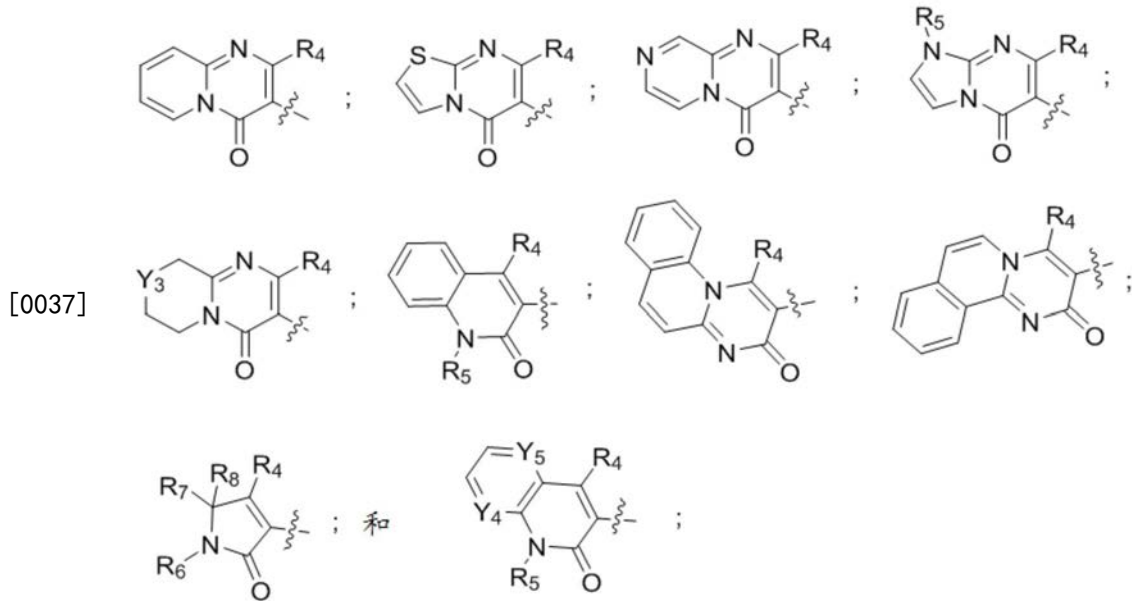
[0033] 本发明还包括本发明的化合物或其药学上可接受的盐的所有合适的同位素变体。本发明化合物或其药学上可接受的盐的同位素变体被定义为其中至少一个原子被具有相同原子序数但原子质量不同于通常在自然界中发现的原子质量的原子取代的同位素变体。可掺入本发明化合物及其药学上可接受的盐中的同位素的实例包括但不限于氢、碳、氮和氧的同位素,例如像 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 和 $^{123}\text{I}$ 。本发明化合物及其药学上可接受的盐的某些同位素变体,例如其中掺入放射性同位素如 $^3\text{H}$ 或 $^{14}\text{C}$ 的那些,可用于药物和/或底物组织分布研究。在特定实例中,可以使用 $^3\text{H}$ 和 $^{14}\text{C}$ 同位素以便于其制备和检测。在其他实例中,用例如 $^2\text{H}$ 的同位素进行取代可以提供由更高的代谢稳定性导致的某些治疗优势,例如体内半衰期延长或剂量需求减少。本发明化合物或其药学上可接受的盐的同位素变体通常可以通过常规方法使用合适试剂的适当同位素变体来制备。

## 具体实施方式

[0034] 本发明涉及能够抑制SHP2活性的化合物。在本发明的一个方面,对于具有式I和式II的化合物,是具有式II的化合物或其药学上可接受的盐:

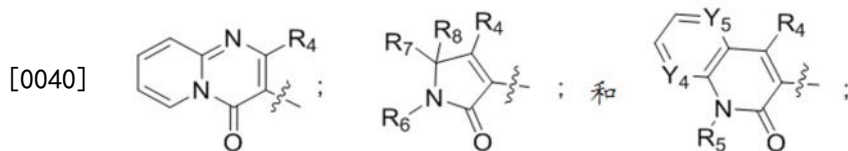


[0036] 其中:R<sub>1</sub>选自:



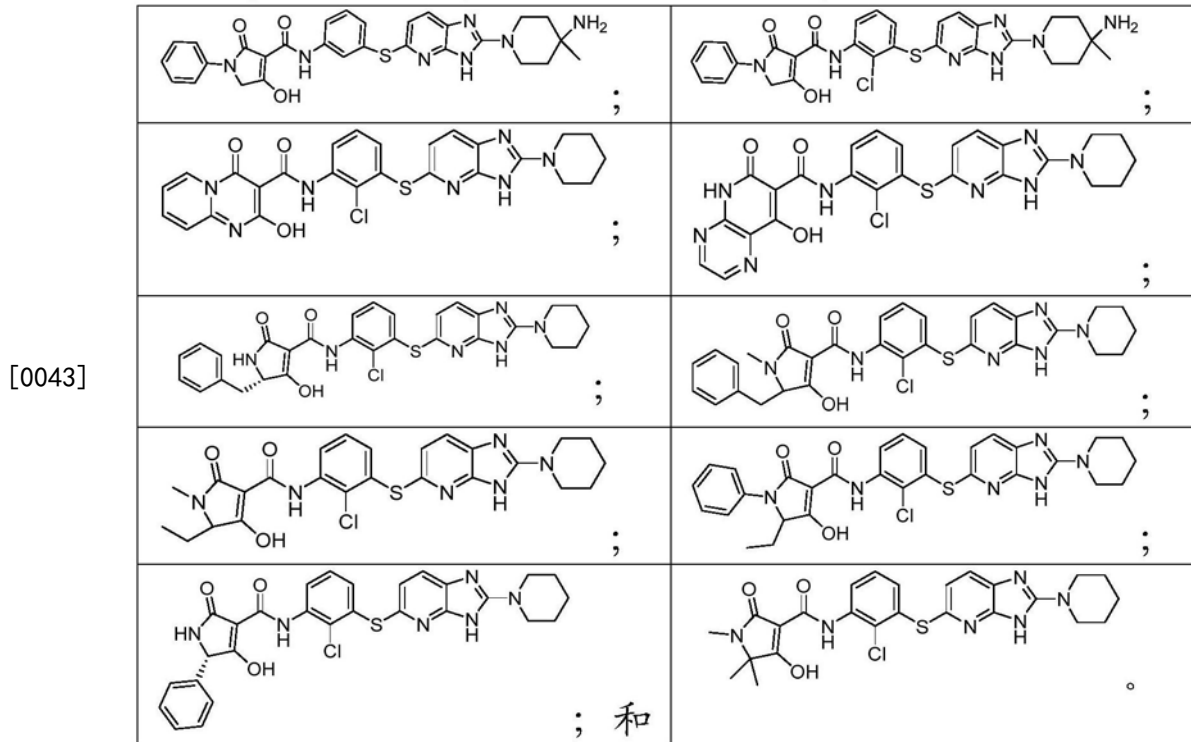
[0038]  $R_2$ 和 $R_3$ 与 $R_2$ 和 $R_3$ 两者所附接的氮一起形成环,该环选自哌啶基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基和吡咯烷基;其中所述吡咯烷基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基或哌啶基是未被取代的或被独立地选自以下的1至3个基团所取代:氨基、甲基、乙基、氨基-甲基、甲基-氨基、羟基、氰基、氟-甲基、氟和(((5-甲基-2-氧代-1,3-间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)羰基)氨基)甲基; $R_4$ 选自羟基; $R_5$ 选自H和甲基; $R_6$ 选自氢、甲基和苯基; $R_7$ 选自氢、甲基、乙基、苯基和苄基; $R_8$ 选自氢和甲基; $Y_1$ 选自N和CH; $Y_2$ 选自N和CH; $Y_3$ 选自NH和 $CH_2$ ; $Y_4$ 选自N和CH; $Y_5$ 选自N和CH。

[0039] 在进一步的实施例中,是化合物或其药学上可接受的盐,其中: $R_1$ 选自:

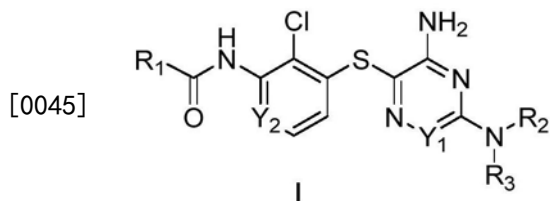


[0041]  $R_4$ 选自羟基; $R_5$ 选自H和甲基; $R_6$ 选自氢、甲基和苯基; $R_7$ 选自氢、甲基、乙基、苯基和苄基; $R_8$ 选自氢和甲基; $Y_4$ 选自N和CH;以及 $Y_5$ 选自N和CH。

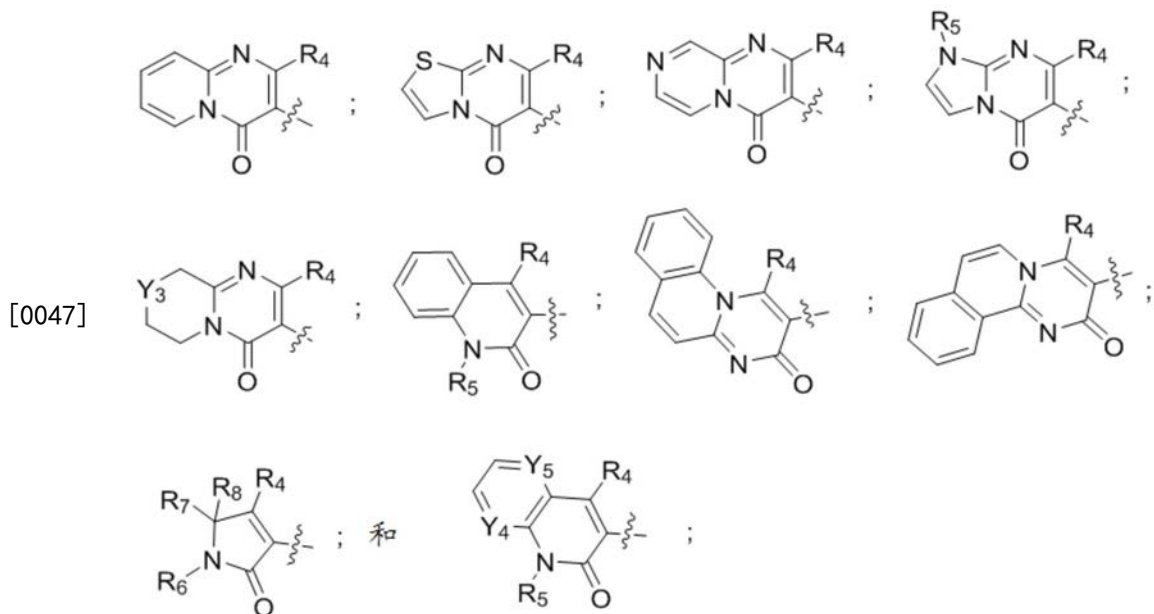
[0042] 在进一步的实施例中,是化合物或其药学上可接受的盐,其选自:



[0044] 在另一个实施例中,是具有式I的化合物或其药学上可接受的盐:



[0046] 其中:R<sub>1</sub>选自:

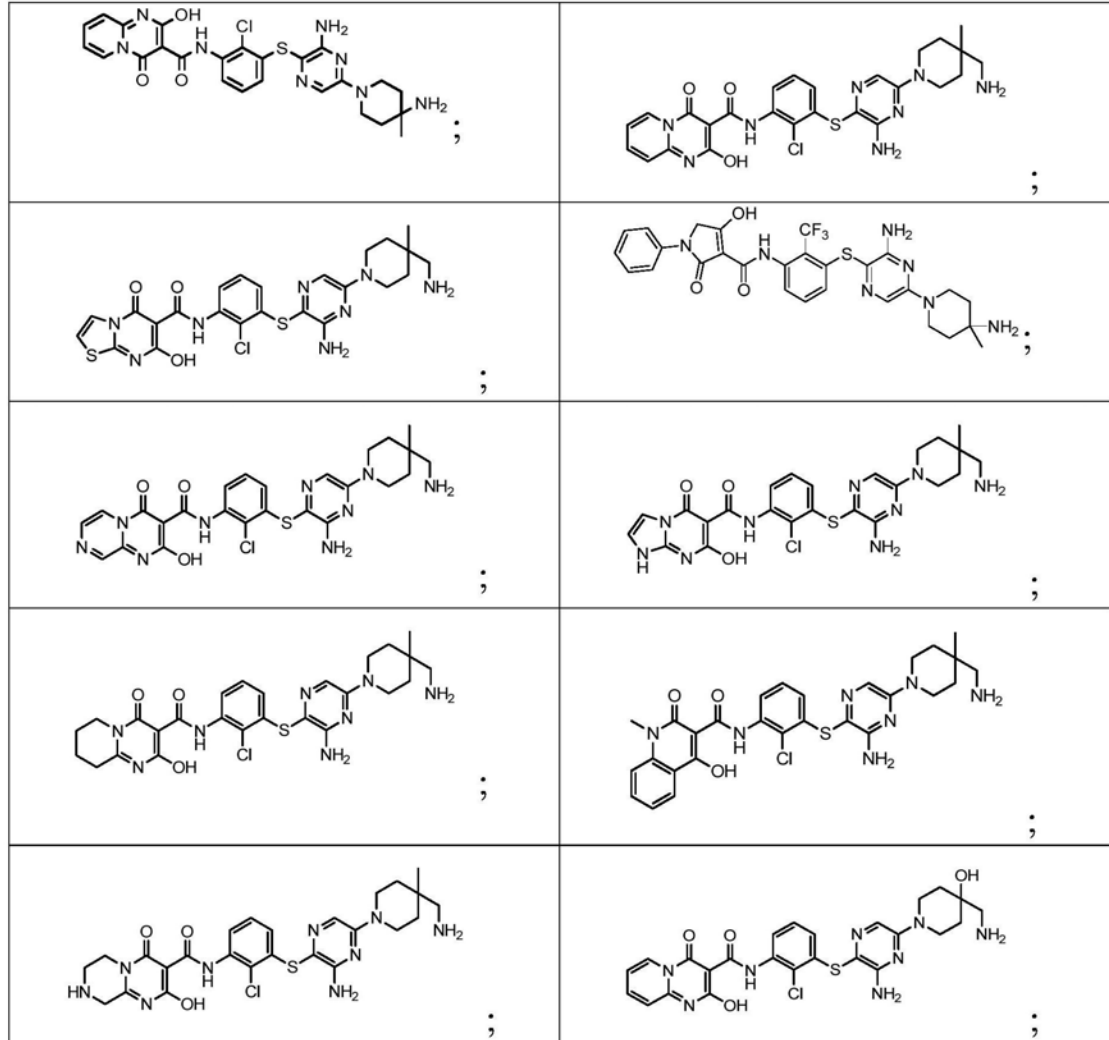


[0048] R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>与R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>两者所附接的氮一起形成环,该环选自哌啶基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基和吡咯烷基;其中所述吡咯烷基、哌嗪基、2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基、8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基或哌啶基是未被取代的或

被独立地选自以下的1至3个基团所取代:氨基、甲基、乙基、氨基-甲基、甲基-氨基、羟基、氰基、氟-甲基、氟和(((5-甲基-2-氧代-1,3-间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)羰基)氨基)甲基;  
 $R_4$ 选自羟基; $R_5$ 选自H和甲基; $R_6$ 选自氢、甲基和苯基; $R_7$ 选自氢、甲基、乙基、苯基和苄基;  
 $R_8$ 选自氢和甲基; $Y_1$ 选自N和CH; $Y_2$ 选自N和CH; $Y_3$ 选自NH和CH<sub>2</sub>; $Y_4$ 选自N和CH; $Y_5$ 选自N和CH。

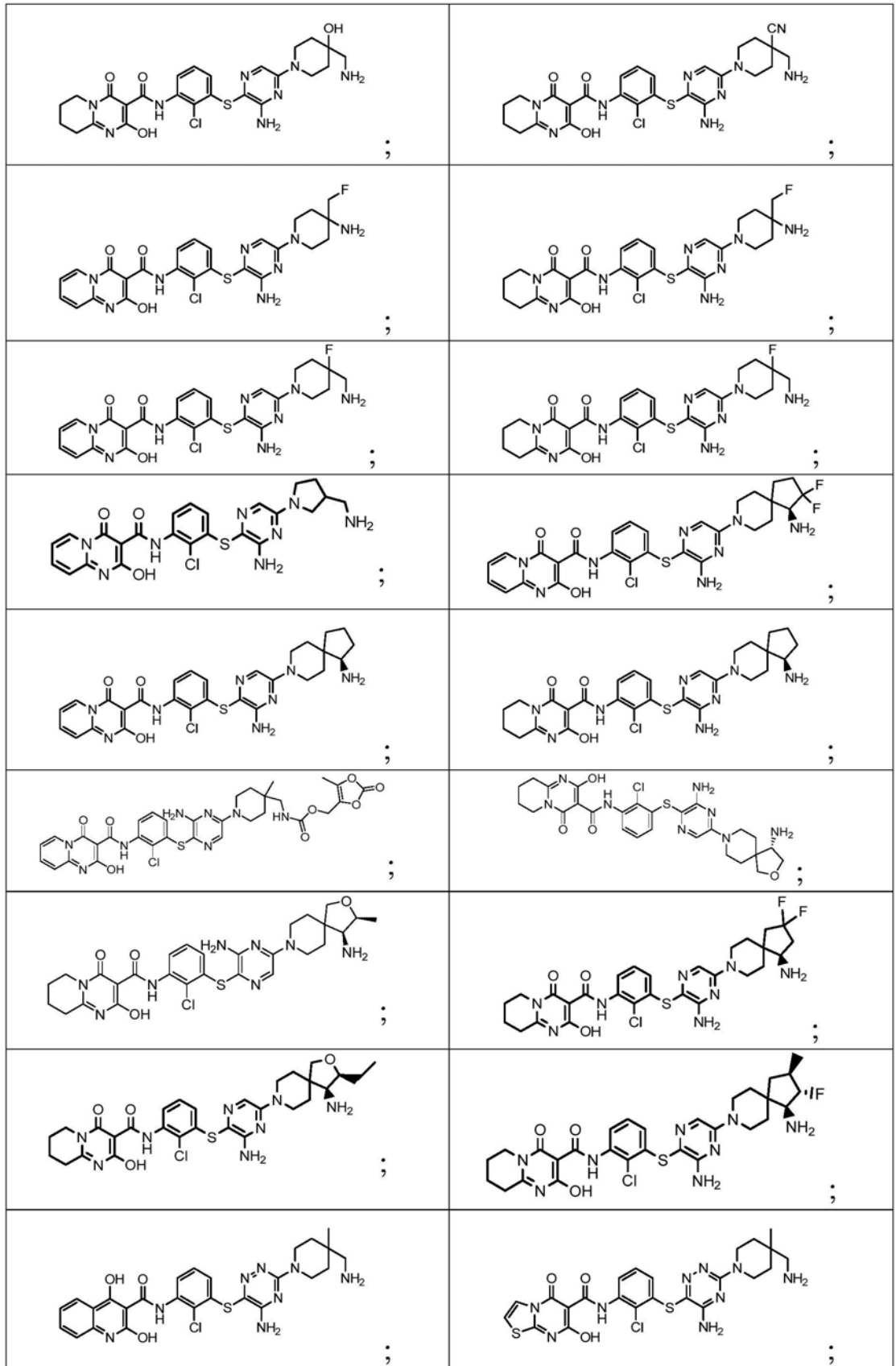
[0049] 在进一步的实施例中,是化合物或其药学上可接受的盐,其选自:

[0050]

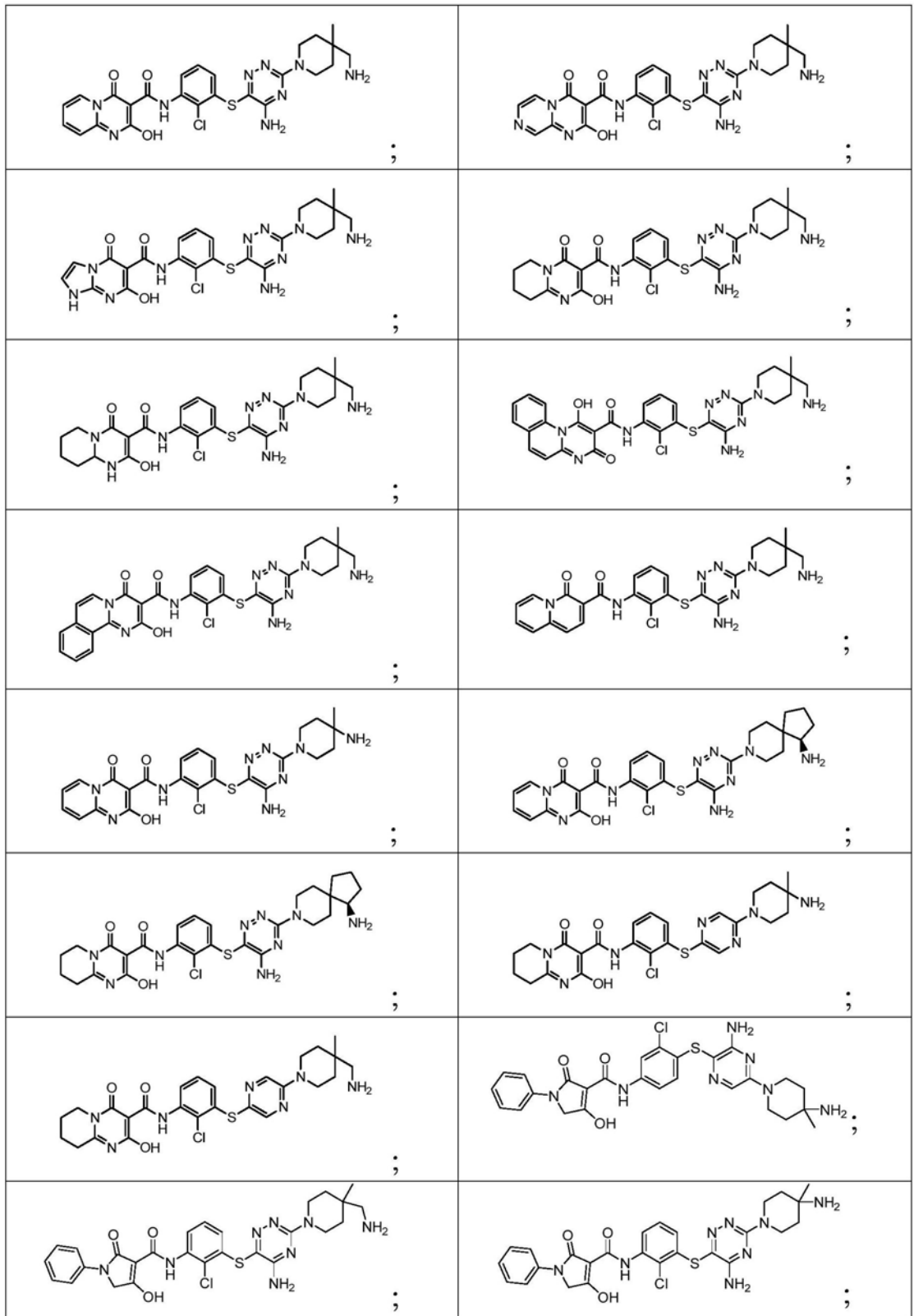


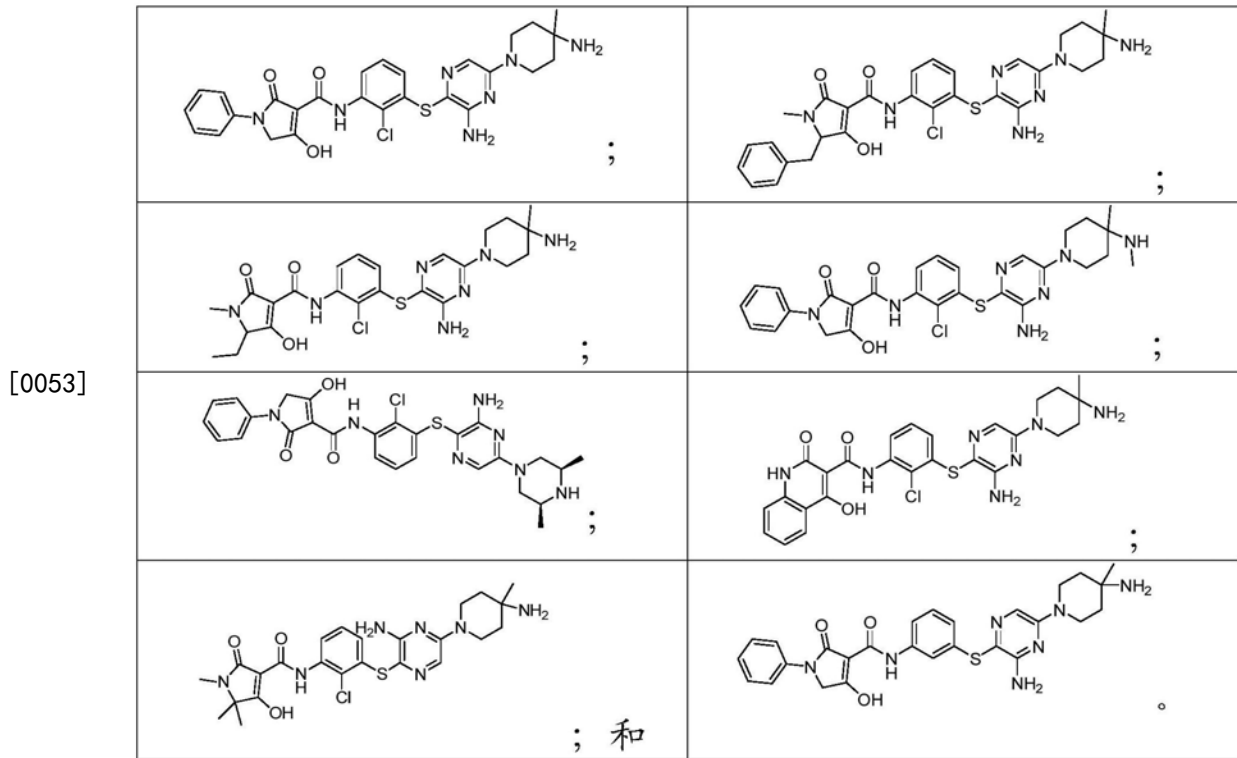


[0051]



[0052]





#### [0054] 药理学和效用

[0055] Src同源区-2磷酸酶 (SHP2) 是有助于多种细胞功能 (包括增殖、分化、细胞周期维持和迁移) 的、由PTPN11基因编码的蛋白酪氨酸磷酸酶。SHP2参与通过Ras-丝裂原活化蛋白激酶、JAK-STAT或磷酸肌醇3-激酶-AKT途径的信号传导。SHP2通过受体酪氨酸激酶 (例如ErbB1、ErbB2和c-Met) 介导Erk1和Erk2 (Erk1/2, Erk) MAP激酶的活化。

[0056] SHP2具有两个N末端Src同源区2结构域 (N-SH2和C-SH2)、催化结构域 (PTP) 和C末端尾部。两个SH2结构域控制SHP2的亚细胞定位和功能调节。该分子以无活性构象存在, 通过涉及来自N-SH2和PTP结构域的残基的结合网络抑制其自身活性。响应于生长因子刺激, SHP2通过其SH2结构域与停靠蛋白 (例如Gab1和Gab2) 上的特定酪氨酸磷酸化位点结合。这诱导构象变化, 导致SHP2活化。

[0057] PTPN11中的突变已经在多种人类疾病 (如努南综合征、豹皮综合征、青少年骨髓单核细胞性白血病、神经母细胞瘤、黑素瘤、急性髓性白血病, 以及乳腺癌、肺癌、和结肠癌) 中被鉴定出。SHP2是多种受体酪氨酸激酶的重要下游信号传导分子, 包括血小板衍生的生长因子 (PDGF-R)、成纤维细胞生长因子 (FGF-R) 和表皮生长因子 (EGF-R) 的受体。SHP2也是用于活化丝裂原活化蛋白 (MAP) 激酶途径的重要下游信号传导分子, 该途径可导致细胞转化 (这是癌症发展的先决条件)。敲低SHP2显著抑制具有SHP2突变或EML4/ALK易位的肺癌细胞系的细胞生长以及EGFR扩增的乳腺癌和食管癌。SHP2也在胃癌、间变性大细胞淋巴瘤和胶质母细胞瘤中的癌基因下游被活化。

[0058] 努南综合征 (NS) 和豹皮综合征 (LS) -PTPN11突变引起LS (多发性雀斑 (multiple lentigenes)、心电图传导异常、眼距过宽、肺动脉狭窄、生殖器异常、生长迟缓、感觉神经性耳聋) 和NS (先天性异常, 包括心脏缺陷、颅面骨畸形和身材矮小)。这两种障碍都是由正常细胞生长和分化所需的RAS/RAF/MEK/ERK分裂原活化蛋白激酶途径的组分中的种系突变引起的常染色体显性遗传综合征家族的一部分。该途径的异常调节具有深远的影响, 特别是

对心脏发育,导致各种异常,包括瓣膜隔膜缺损和/或肥厚性心肌病(HCM)。已经确定MAPK信号传导途径的扰动对这些障碍是关键的,并且已经在人类中鉴定了沿着该途径的几种候选基因,包括KRAS、NRAS、SOS1、RAF1、BRAF、MEK1、MEK2、SHOC2、和CBL中的突变。在NS和LS中最常突变的基因是PTPN11。PTPN11 (SHP2) 中的种系突变在约50%的NS病例和几乎所有与NS共享某些特征的LS患者中均有发现。对于NS,该蛋白质中的Y62D和Y63C取代很大程度上是不变的并且是最常见的突变之一。这两种突变均影响SHP2的催化上无活性的构象,而不干扰磷酸酶与其磷酸化信号传导配偶体的结合。

[0059] 青少年骨髓单核细胞性白血病(JMML) -PTPN11 (SHP2) 中的体细胞突变发生在约35%JMML(一种儿童骨髓增生性障碍(MPD))患者中。这些功能获得性突变通常是N-SH2结构域或磷酸酶结构域中的点突变,其阻止催化结构域和N-SH2结构域之间的自身抑制,产生SHP2活性。

[0060] 急性髓性白血病-PTPN11突变已在以下中被鉴定出:约10%的小儿急性白血病,如骨髓增生异常综合征(MDS);约7%的B细胞急性成淋巴细胞性白血病(B-ALL);和约4%的急性髓性白血病(AML)。

[0061] NS和白血病突变导致位于由呈自抑制型SHP2构象的N-SH2和PTP结构域形成的界面处的氨基酸改变,破坏了抑制性分子内相互作用,导致催化结构域的活性过高。

[0062] SHP2充当受体酪氨酸激酶(RTK)信号传导的正调节子。包含RTK改变(EGFR<sup>amp</sup>, Her2<sup>amp</sup>, FGFR<sup>amp</sup>, Met<sup>amp</sup>, 易位的/活化的RTK,即ALK、BCR/ABL)的癌症包括食管癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌。

[0063] 食管癌(esophageal cancer)或食道癌(oesophageal cancer)是食管的恶性肿瘤。存在多种亚型,主要是鳞状细胞癌(<50%)和腺癌。食管腺癌和鳞状细胞癌中RTK表达率很高。因此,本发明的SHP2抑制剂可用于创新性治疗策略。

[0064] 乳腺癌是癌症的主要类型并且是女性死亡的主要原因,其中患者对现有药物具有耐药性。乳腺癌有四个主要亚型,包括管腔上皮A型、管腔上皮B型、Her2样、以及三阴性/基底样乳腺癌。三阴性乳腺癌(TNBC)是一种缺乏特异性靶向治疗的侵袭性乳腺癌。表皮生长因子受体I(EGFR)已成为TNBC中有希望的靶标。通过SHP2抑制Her2以及EGFR可能是乳腺癌中有希望的治疗方法。

[0065] 肺癌-NSCLC目前是癌症相关死亡率的主要原因。约占肺癌的85%(主要是腺癌和鳞状细胞癌)。虽然细胞毒性化疗仍然是治疗的重要组成部分,但基于肿瘤中EGFR和ALK等遗传改变的靶向治疗更有可能从靶向疗法中获益。

[0066] 结肠癌-已知约30%至50%的结肠直肠肿瘤具有突变的(异常)KRAS,并且在10%至15%的结肠直肠癌中发生BRAF突变。对一部分患者(已经证明其结肠直肠肿瘤过度表达EGFR),这些患者对抗EGFR治疗表现出有利的临床反应。

[0067] 胃癌是最常见的癌症类型之一。酪氨酸激酶的异常表达,如由胃癌细胞中异常酪氨酸磷酸化所反映的,是本领域已知的。三种受体-酪氨酸激酶(c-met(HGF受体)、FGF受体2、和erbB2/neu)经常在胃癌中扩增。因此,不同信号途径的破坏可能促成不同类型的胃癌的进展。

[0068] 神经母细胞瘤是发育性交感神经系统的儿科肿瘤,约占儿童癌症的约8%。已假定间变性淋巴瘤激酶(ALK)基因的基因组改变促成神经母细胞瘤的发病机制。

[0069] 头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)。高水平的EGFR表达与多种癌症 (主要是头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)) 的不良预后和对放射疗法的抗性相关。阻断EGFR信号传导导致对受体刺激、细胞增殖的抑制,并使侵袭性和转移降低。因此,EGFR是SCCHN中新抗癌疗法的主要靶标。

[0070] 本发明涉及能够抑制SHP2活性的化合物。本发明进一步提供了制备本发明化合物的方法和包含此类化合物的药物制剂。本发明的另一个方面涉及治疗SHP2介导的障碍的方法,该方法包括向有需要的患者给予治疗有效量的如发明内容中所定义的具有式I的化合物的步骤。

[0071] 在某些实施例中,本发明涉及前述方法,其中所述SHP2介导的障碍是如下癌症,这些癌症选自但不限于:JMML;AML;MDS;B-ALL;神经母细胞瘤;食管癌;乳腺癌;肺癌;结肠癌;胃癌;头颈癌。

[0072] 本发明的化合物也可用于治疗与SHP2的异常活性相关的其他疾病或病症。因此,作为另外的方面,本发明涉及治疗选自以下的障碍的方法:NS;LS;JMML;AML;MDS;B-ALL;神经母细胞瘤;食管癌;乳腺癌;肺癌;结肠癌;胃癌;头颈癌。

[0073] 本发明的SHP2抑制剂可以有用地与另一种药学上有活性的化合物、或者与两种或更多种其他药学上有活性的化合物组合,特别是在癌症的治疗方面。例如,如上所定义的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐可以与一种或多种选自如下化学治疗剂的药剂以组合形式同时、依次或分开给予:例如,有丝分裂抑制剂,如紫杉烷、长春花生物碱、紫杉醇、多西他赛、长春新碱、长春花碱、长春瑞滨或长春氟宁,和其他抗癌剂,如顺铂、5-氟尿嘧啶或5-氟-2-4(1H,3H)-嘧啶二酮(5FU)、氟他胺或吉西他滨。

[0074] 这样的组合可以提供显著优势,包括治疗中的协同活性。

[0075] 在某些实施例中,本发明涉及前述方法,其中所述化合物经肠胃外给予。

[0076] 在某些实施例中,本发明涉及前述方法,其中所述化合物经肌内、静脉内、皮下、经口、经肺、鞘内、局部或鼻内给予。

[0077] 在某些实施例中,本发明涉及前述方法,其中所述化合物经全身给予。

[0078] 在某些实施例中,本发明涉及前述方法,其中所述患者是哺乳动物。

[0079] 在某些实施例中,本发明涉及前述方法,其中所述患者是灵长类动物。

[0080] 在某些实施例中,本发明涉及前述方法,其中所述患者是人类。

[0081] 在另一方面,本发明涉及治疗SHP2介导的障碍的方法,该方法包括以下步骤:向有需要的患者给予与治疗有效量的发明内容中所定义的具有式I的化合物组合的治疗有效量的化学治疗剂。

#### [0082] 药物组合物

[0083] 在另一方面,本发明提供了包含治疗有效量的一种或多种上述化合物的药学上可接受的组合物,其与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂配制在一起。如下文详细描述,本发明的药物组合物可以针对以固体或液体形式给予而进行特别配制,包括适用于以下的那些:(1)口服给予,例如,浸液(drenches)(水性或非水溶液或悬浮液)、片剂(例如针对口腔、舌下和全身吸收的那些)、丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂(应用于舌);(2)肠胃外给予,例如,通过皮下、肌内、静脉内或硬膜外注射(作为例如无菌溶液或悬浮液,或缓释制品);(3)局部施用,例如,作为施用于皮肤的乳膏剂、软膏剂或控释贴剂或喷雾;(4)阴道内或直肠内给予,例如作为阴道栓、乳膏剂或泡沫剂;(5)舌下给予;(6)经眼给予;(7)

经皮给予；(8) 经鼻给予；(9) 经肺给予；或(10) 鞘内给予。

[0084] 如本文所用的短语“治疗有效量”是指包含本发明化合物的化合物、材料或组合物的量，其对于在动物中的至少一个细胞亚群中以适用于任何医学治疗的合理的受益/风险比产生一些所需的治疗效果是有效的。

[0085] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断的范围，适合用于与人类和动物的组织接触而不产生过度毒性、刺激、过敏反应、或其他问题或并发症，同时具有相称的合理受益/风险比的那些化合物、材料、组合物、和/或剂型。

[0086] 如本文所用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或运载体，如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂（例如，润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌，或硬脂酸）或溶剂包封材料，参与将主题化合物从一个器官或身体的一部分运送或运输到另一个器官或身体的一部分。在与配制品的其他成分相容并且对患者无害的意义上，每种载体必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括：(1) 糖类，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；(4) 粉状黄芪胶；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石；(8) 赋形剂，如可可脂和栓剂蜡；(9) 油类，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油；(10) 二醇类，如丙二醇；(11) 多醇类，如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯类，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 海藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20) pH缓冲溶液；(21) 聚酯，聚碳酸酯和/或聚酰胺；和(22) 药物配制品中使用的其他无毒相容物质。

[0087] 如上文所述，本发明化合物的某些实施例可含有碱性官能团，例如氨基或烷基氨基，并且，由此，能够与药学上可接受的酸形成药学上可接受的盐。在这方面，术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在给药运载体或剂型制造过程中原位制备，或者通过使纯化的游离碱形式的本发明化合物与合适的有机或无机酸分别反应，并在随后的纯化过程中分离由此形成的盐来制备。代表性盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐(naphylate)、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐和月桂基磺酸盐等。（参见例如Berge等人(1977)“Pharmaceutical Salts [药用盐]”，J.Pharm.Sci. [药物科学杂志]66:1-19）。

[0088] 主题化合物的药学上可接受的盐包括化合物的常规的无毒盐或季铵盐，例如来自无毒的有机酸或无机酸。例如，这种常规的无毒盐包括衍生自无机酸的那些，例如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等；和由有机酸（如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、等硫酸离子酸等）制备的盐。

[0089] 在其他情况下，本发明的化合物可以含有一个或多个酸性官能团，并且因此，能够与药学上可接受的碱形成药学上可接受的盐。在这些例子中，术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒的无机和有机碱加成盐。这些盐也可以在给药运载体或剂型制造过程中原位制备，或者通过使纯化的游离酸形式的化合物与合适的碱（例如，药学上可接

受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)与氨、或与药学上可接受的有机伯、仲或叔胺分别反应来制备。代表性的碱或碱土金属盐包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等。(参见例如Berge等人,同上)

[0090] 在组合物中还可以存在润湿剂、乳化剂和润滑剂,如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0091] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基苯甲醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;以及(3)金属螯合剂,诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0092] 本发明的配制品包括适合于经口、鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外给予的那些。配制品可以方便地以单位剂型存在并且可以通过药学领域熟知的任何方法制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将取决于所治疗的宿主和特定的给药方式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常为产生疗效的化合物的量。通常,在百分之百的范围内,该量范围为从约0.1%至约99%的活性成分,优选从约5%至约70%,最优选从约10%至约30%。

[0093] 在某些实施例中,本发明的配制品包含选自下组的赋形剂,该组由以下组成:环糊精、纤维素、脂质体、胶束形成剂(例如胆汁酸)和聚合物载体(例如聚酯和聚酸酐);和本发明的化合物。在某些实施例中,前述配制品使得本发明化合物在口服方面是生物可利用的。

[0094] 制备这些配制品或组合物的方法包括将本发明的化合物与载体和任选的一种或多种辅助成分结合的步骤。通常,通过将本发明化合物与液体载体或细碎固体载体或两者均匀且紧密地结合,并且然后如果需要,使产物成形来制备配制品。

[0095] 适用于口服给药的本发明配制品可以呈胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)、粉剂、颗粒剂的形式,或作为在水溶性或非水溶性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳剂,或作为酞剂或糖浆,或作为软锭剂(使用惰性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶),和/或作为漱口水等等,每一形式含有预定量的本发明化合物作为活性成分。本发明化合物还能以大丸剂、药糖剂或糊剂形式给予。

[0096] 在本发明用于口服给药的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉剂、颗粒剂、含片(trouche)等)中,将活性成分与以下混合:一种或多种药学上可接受的载体,如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或以下任何一种:(1)填充剂或延长剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如像羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯树胶;(3)保湿剂,如甘油;(4)崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,如石蜡;(6)吸收促进剂,如季铵化合物和表面活性剂,如泊洛沙姆和十二烷基硫酸钠;(7)润湿剂,例如像鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯和非离子表面活性剂;(8)吸收剂,如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、硬脂酸锌、硬脂酸钠、硬脂酸及其混合物;(10)着色剂;和(11)控释剂,如交聚维酮或乙基纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可以包含缓释剂。还可以使用此类赋形剂,如乳糖(actose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等,将相

似类型的固体组合物用作软壳和硬壳明胶胶囊中的填料。

[0097] 片剂可以通过压缩或模制(任选地与一种或多种辅助成分一起)来制备。可以使用粘合剂(例如,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,羟基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备压缩片剂。模制片剂可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末化合物的混合物来制备。

[0098] 片剂和本发明的药物组合物的其他固体剂型,如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂,可任选地进行刻痕或制备有包衣和外壳,例如肠溶包衣和药物配制领域熟知的其他包衣。也可以使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素将它们配制成使其中的活性成分缓慢或受控释放以提供所需的释放曲线、其他聚合物基质、脂质体和/或微球。可以将它们配制用于快速释放,例如冷冻干燥。它们可以例如通过细菌截留过滤器滤过,或通过并入呈无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,这些无菌固体组合物可以在使用前立即溶解于无菌水或一些其他无菌可注射介质中。这些组合物也可以任选地包含遮光剂并且可以是如下组合物,该组合物在胃肠道的某一部分中,任选地以一种延迟的方式仅或者优先释放一种或多种活性成分。可利用的嵌入式组合物的实例包括聚合物物质以及蜡。活性成分还可以是微囊化形式,如果适当的话,可包含一种或多种上述赋形剂。

[0099] 用于口服给予本发明化合物的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了活性成分之外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂(例如像水或其他溶剂)、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯,及其混合物。

[0100] 除了惰性稀释剂之外,口服组合物还可包括佐剂,例如润湿剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂以及防腐剂。

[0101] 除了含有活性化合物外,悬浮液还可以含有悬浮剂如,例如乙氧化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(aluminum metahydroxide)、膨润土(bentonite)、琼脂和黄芪胶,及其混合物。

[0102] 用于直肠或阴道给药的本发明药物组合物的配制品可以作为栓剂呈现,该栓剂可以通过将一种或多种本发明化合物与一种或多种合适的无刺激性赋形剂或载体混合制备,该赋形剂或载体包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸盐,并且在室温下为固体,但是在体温下是液体,并且因此,将在直肠或阴道腔中融化并释放活性化合物。

[0103] 适用于阴道给药的本发明配制品还包括含有本领域已知是适当的此类载体的阴道栓、卫生棉条、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾配制品。

[0104] 用于局部或经皮给予本发明化合物的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液、贴剂和吸入剂。活性化合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载体混合,并与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0105] 除本发明的活性化合物之外,软膏剂、糊剂、乳膏剂和凝胶剂可以包括赋形剂,如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌,或其混合物。

[0106] 粉剂和喷雾剂可以含有,除本发明的化合物之外,赋形剂,如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉剂,或这些物质的混合物。喷雾剂可另外含有常规推进剂,例如



氯氟烃和挥发性未取代的烃,例如丁烷和丙烷。

[0107] 经皮贴剂具有向身体提供受控递送本发明化合物的额外优点。这些剂型可以通过将化合物溶解或分散在适当的介质中来制备。吸收促进剂也可用于增加化合物经皮肤的通量。可以通过提供速率控制膜或将化合物分散在聚合物基质或凝胶中来控制这种通量的速率。

[0108] 眼用配制品、眼用软膏剂、粉剂、溶液等也被涵盖在本发明的范围之内。

[0109] 适合肠胃外给药的本发明药物组合物包含与一种或多种药学上可接受的以下试剂组合的一种或多种本发明化合物:无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液或无菌粉剂,所述无菌粉剂可以在使用之前即刻于无菌注射溶液或分散体中重构,所述无菌可注射溶液或分散体可以含有糖类、醇类、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使配制品与预期受者的血液等渗的溶质、或悬浮剂或增稠剂。

[0110] 可以用于本发明的药物组合物中的适合的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适合的混合物、植物油(如橄榄油)以及可注射有机酯,例如油酸乙酯。恰当的流动性例如可通过使用涂层材料如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需的颗粒尺寸、以及通过使用表面活性剂来维持。

[0111] 这些组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过包括各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、山梨酸苯酚等)确保阻止微生物对主题化合物起作用。还令人希望的是在组合物中包括等渗剂,例如糖、氯化钠等等。另外,可以通过包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)引起可注射药物形式的延长吸收。

[0112] 在某些情况下,为了延长药物的作用,希望的是通过皮下或肌肉注射减慢药物的吸收。这可通过使用水溶性低的晶体或非晶体物质的液体悬浮液实现。然后,药物的吸收速率取决于其溶解速率,而溶解速率进而可取决于晶体尺寸以及晶型。可替代地,通过将药物溶解或悬浮于油性运载体中可以延迟经肠胃外给予的药物形式的吸收。

[0113] 通过在生物可降解的聚合物(如聚乳酸交酯-聚乙交酯)中形成主题化合物的微胶囊基质来制得可注射的贮库形式。根据药物与聚合物的比率、以及所采用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放速率。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还通过使药物裹入与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备可注射贮库配制品。

[0114] 当将本发明的化合物作为药物向人和动物给予时,它们可以本身或作为药物组合物给予,该药物组合物包含例如与药学上可接受的载体组合的0.1%至99%(更优选10%至30%)的活性成分。

[0115] 本发明的制剂可以经口、经胃肠外、局部或直肠给予。它们当然以适合于每种给药途径的形式给予。例如,它们以片剂或胶囊形式,通过注射、吸入、眼用洗剂、软膏剂、栓剂等给予,通过注射、输注或吸入给药;通过洗剂或软膏剂局部给予;和通过栓剂直肠给予。口服给药是优选的。

[0116] 如本文所用的短语“肠胃外给予”和“经肠胃外给予”是指除了肠道和局部给予以外的给予方式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、以及胸骨内注射和输注。

[0117] 如本文所用的短语“全身给予”、“经全身给予”、“外周给予”和“经外周给予”是指不同于将化合物、药物或其他物质直接向中枢神经系统给予,而是使其进入患者系统,并且从而进行代谢和其他类似过程,例如皮下给药。

[0118] 可以通过任何合适的给药途径将这些化合物向人类和其他动物给予以用于治疗,这些途径包括经口、经鼻(如通过,例如,喷雾)、直肠、阴道内、胃肠外、脑池内和局部(如通过粉剂、软膏剂或滴剂)给予,包括经颊和舌下给予。

[0119] 无论选择何种给药途径,通过本领域技术人员已知的常规方法将本发明的化合物(其能以合适的水合形式使用)和/或本发明的药物组合物配制成药学上可接受的剂型。

[0120] 本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以变化以便于获得有效实现对于具体的患者、组合物、以及给予方式来说希望的治疗应答而对患者无毒的量的活性成分。

[0121] 选择的剂量水平将取决于各种因素,包括所使用的本发明的具体化合物或其酯、盐或酰胺的活性,给予途径,给予时间,所采用的具体化合物的排泄率或代谢率,吸收的速度和程度,治疗的持续时间,与所采用的具体化合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料,正被治疗的患者的年龄、性别、体重、病况、一般健康状况和先前病史,以及在医学领域中熟知的类似因素。

[0122] 具有本领域普通技能的医生或兽医可容易地确定和开出有效量的所需药物组合物。例如,医生或兽医能以低于实现所需治疗效果所需的水平开始给药于药物组合物中使用的本发明化合物,并逐渐增加剂量直至达到所需效果。

[0123] 一般而言,本发明化合物的合适日剂量将是该化合物有效产生治疗效果的最低剂量的量。这种有效剂量通常取决于上述因素。通常,当用于所示的镇痛作用时,本发明化合物对患者的经口、静脉内、脑室内和皮下剂量范围为每天每千克体重从约0.0001至约100mg。

[0124] 如果需要的话,活性化合物的有效日剂量可以在全天以适当的间隔以二、三、四、五、六个或更多个亚剂量分开给予,任选地,以单位剂型给予。优选的剂量是每天一次给予。

[0125] 尽管可以单独给予本发明的化合物,优选的是,将该化合物作为药物配制品(组合物)给予。

[0126] 通过与其他药物类比,根据本发明的化合物能以用于人类或兽医学的任何方便的方式配制,以用于给予。

[0127] 在另一方面,本发明提供了包含治疗有效量的一种或多种上述主题化合物的药学上可接受的组合物,其与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂配制在一起。如下文详细描述,本发明的药物组合物可以针对以固体或液体形式给予而进行特别配制,包括适用于以下的那些:(1)口服给予,例如,浸液(水性或非水溶液或悬浮液)、片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂(应用于舌);(2)肠胃外给予,例如,通过皮下、肌肉、或静脉内注射,作为例如无菌溶液或悬浮液;(3)局部施用,例如,作为施用于皮肤、肺或粘膜的乳膏剂、软膏剂或喷雾剂;或(4)阴道内或直肠内给予,例如作为阴道栓、乳膏剂或泡沫剂;(5)舌下或经颊给予;(6)经眼给予;(7)经皮给予;或(8)经鼻给予。

[0128] 术语“治疗”旨在也涵盖预防、治疗和治愈。

[0129] 接受该治疗的患者是任何有需要的动物,包括灵长类,特别是人,以及例如马、牛、

猪和羊等其他哺乳动物；和一般的家禽和宠物。

[0130] 本发明的化合物可原样给予，或与药学上可接受的载体混合给予，并且还可以与抗微生物剂（例如青霉素、头孢菌素类、氨基糖苷类和糖肽）结合给予。因此，结合疗法包括以一定方式顺序、同时和分开给予活性化合物，达到的效果是当给予后者时，最初给予的药物的治疗效果未完全消失。

[0131] 微乳化技术可以提高一些亲脂性（水不溶性）药剂的生物利用度。实例包括 Trimetrine (Dordunoo, S.K. 等人, Drug Development and Industrial Pharmacy [药物开发与工业药学], 17 (12), 1685-1713, 1991 和 REV 5901 (Sheen, P.C. 等人, J Pharm Sci [药学杂志] 80 (7), 712-714, 1991)。其中，微乳化通过优先将吸收引导至淋巴系统而不是循环系统来提供增强的生物利用度，由此绕过肝脏，并防止肝胆循环中化合物的破坏。

[0132] 虽然考虑了所有合适的两亲性载体，目前优选的载体通常是具有通常公认为安全 (Generally-Recognized-as-Safe, GRAS) 状态，并且能够溶解本发明的化合物同时在稍后阶段当该溶液与复合水相（例如人胃肠道中发现的水相）接触时将其微乳化的那些。通常，满足这些要求的两亲性成分具有 2-20 的 HLB（亲水性至亲脂性平衡）值，并且它们的结构含有 C-6 至 C-20 范围内的直链脂族基团。实例是聚乙二醇化的脂肪酸甘油酯和聚乙二醇。

[0133] 特别考虑了可商购的两亲性载体，包括 Gelucire 系列、Labrafil、Labrasol 或 Lauroglycol（均由法国圣普列斯特 Gattefosse 公司制造和发行）；PEG 单油酸酯、PEG 二油酸酯、PEG 单月桂酸酯和二月桂酸酯、卵磷脂、聚山梨醇酯 80 等（由美国 and 全球众多公司制造和发行）。

[0134] 适合于本发明中使用的亲水性聚合物是易溶于水，可被共价附接至形成囊泡的脂质，并且在体内耐受，没有毒性作用（即，是生物相容的）的那些。合适的聚合物包括聚乙二醇 (PEG)、聚乳酸（也称为聚丙交酯）、聚乙醇酸（也称为聚乙交酯）、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物和聚乙烯醇。优选的聚合物是具有分子量为从约 100 或 120 道尔顿多至约 5,000 或 10,000 道尔顿，并且更优选从约 300 道尔顿至约 5,000 道尔顿的那些聚合物。在特别优选的实施例中，聚合物是具有分子量为从约 100 至约 5,000 道尔顿，并且更优选具有分子量为从约 300 至约 5,000 道尔顿的聚乙二醇。在特别优选的实施例中，聚合物是 750 道尔顿的聚乙二醇 (PEG (750))。聚合物也可以由其中的单体数量来定义；本发明的优选实施例使用至少约三种单体的聚合物，例如由三种单体（约 150 道尔顿）组成的 PEG 聚合物。

[0135] 可适用于本发明的其他亲水性聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚甲噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺、聚二甲基丙烯酸酰胺和衍生的纤维素，如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0136] 在某些实施例中，本发明的配制品包含选自下组的生物相容性聚合物，该组由以下组成：聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物、聚乙烯聚合物、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯及其共聚物、纤维素、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酸酐、聚（邻）酯、聚（丁酸）、聚（戊酸）、聚（丙交酯-共-己内酯）、多糖、蛋白质、聚透明质酸、聚氰基丙烯酸酯、及其共混物、混合物或共聚物。

[0137] 环糊精是环状低聚糖，其由 6、7、或 8 个葡萄糖单元（分别由希腊字母  $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\gamma$  指定）组成。尚不知道存在少于六个葡萄糖单元的环糊精。葡萄糖单元通过  $\alpha$ -1,4-糖苷键连接。由于糖单元的椅型构象，所有仲羟基基团 (C-2、C-3 处) 位于环的一侧，而 C-6 处的所有伯羟基

基团位于另一侧。结果,外表面是亲水的,使环糊精具有水溶性。相反,环糊精的腔是疏水的,因为这些腔的内衬是原子C-3和C-5的氢以及类似醚的氧。这些基质允许与各种相对疏水的化合物络合,该化合物包括例如类固醇化合物,如17 $\beta$ -雌二醇(参见例如van Uden等人,Plant Cell Tiss.Org.Cult.[植物细胞、组织和器官培养]38:1-3-113(1994))。络合通过范德华(Van der Waals)相互作用和氢键形成发生。关于环糊精化学过程的综述,参见Wenz,Agnew.Chem.Int.Ed.Engl.[应用化学-国际版],33:803-822(1994)。

[0138] 环糊精衍生物的物理-化学性质严重依赖于取代的种类和程度。例如,它们在水中的溶解度范围为从不溶(例如,三乙酰基- $\beta$ -环糊精)到147%可溶(w/v)(G-2- $\beta$ -环糊精)。此外,它们可溶于许多有机溶剂中。环糊精的性质使得能够通过增加或降低其溶解度来控制各种配制品组分的溶解度。

[0139] 已经描述了多种环糊精及其制备方法。例如,Parmeter(I)等人(美国专利号3,453,259)和Gramera等人(美国专利号3,459,731)描述了电中性的环糊精。其他衍生物包括具有阳离子性质的环糊精[Parmeter(II),美国专利号3,453,257]、不溶性交联环糊精(Solms,美国专利号3,420,788)、和具有阴离子性质的环糊精[Parmeter(III),美国专利号3,426,011]。在具有阴离子性质的环糊精衍生物中,羧酸、亚磷酸、次磷酸、磷酸、磷酸、硫代磷酸、硫代亚磺酸和磺酸已附加到母体环糊精上[参见Parmeter(III),同上]。此外,Stella等人(美国专利号5,134,127)描述了磺烷基醚环糊精衍生物。

[0140] 脂质体由至少一种包围水性内部隔室的脂质双层膜组成。脂质体可以通过膜类型和尺寸来表征。小单层囊泡(SUV)具有单膜,并且通常直径范围在0.02和0.05 $\mu\text{m}$ 之间;大单层囊泡(LUVS)通常大于0.05 $\mu\text{m}$ 。寡层大囊泡和多层囊泡具有多个(通常是同心的)膜层,并且通常大于0.1 $\mu\text{m}$ 。具有几个非同心的脂质体,即包含在较大囊泡内的几个较小囊泡,被称为多泡性囊泡。

[0141] 本发明的一个方面涉及包含含有本发明化合物的脂质体的配制品,其中配制脂质体膜以提供具有增加的承载能力的脂质体。可替代地或另外,本发明的化合物可以包含在脂质体的脂质体双层中或吸附在脂质体的脂质体双层上。本发明化合物可以与脂质表面活性剂聚合并在脂质体的内部空间内承载;在这些情况下,配制脂质体膜以抵抗活性剂-表面活性剂聚合体的破坏作用。

[0142] 根据本发明的一个实施例,脂质体的脂质双层包含用聚乙二醇(PEG)衍生的脂质,使得PEG链从脂质双层的内表面延伸到由脂质体包封的内部空间,并从脂质双层的外部延伸到周围环境中。

[0143] 包含在本发明的脂质体中的活性剂呈溶解形式。表面活性剂和活性剂(例如含有目标活性剂的乳液或胶束)的聚合物可以截留在根据本发明的脂质体的内部空间内。表面活性剂用于分散和溶解活性剂,并且可以选自任何合适的脂族、环脂族或芳族表面活性剂,包括但不限于具有不同链长的生物相容性溶血磷脂酰胆碱(LPC)(例如,从约C.sub.14至约C.sub.20)。聚合物衍生的脂质(如PEG脂质)也可用于胶束形成,因为它们将起到抑制胶束/膜融合的作用,并且因为向表面活性剂分子中添加聚合物会降低表面活性剂的CMC并有助于胶束形成。优选的是具有在微摩尔范围内的CMC的表面活性剂;较高CMC表面活性剂可用于制备截留在本发明脂质体内的胶束,然而,胶束表面活性剂单体可影响脂质体双层稳定性,并且是设计具有所需稳定性的脂质体的因素。

[0144] 根据本发明的脂质体可通过本领域中已知的多种技术中的任何一种来制备。参见例如美国专利号4,235,871;公开的PCT申请W0 96/14057;New RRC,Liposomes:A practical approach[新RRC,脂质体:一种实用方法],IRL出版社,牛津(1990),第33-104页;Lasic DD,Liposomes from physics to applications[Lasic DD,从物理到应用的脂质体],Elsevier Science Publishers BV[爱思唯尔科学出版社],阿姆斯特丹,1993。

[0145] 例如,本发明的脂质体可以通过将用亲水聚合物衍生的脂质扩散到预先形成的脂质体中来制备,例如通过将预先形成的脂质体暴露于由脂质接枝的聚合物组成的胶束,其脂质浓度对应于脂质体中所需的衍生化脂质的最终摩尔百分比。含有亲水性聚合物的脂质体也可以通过本领域已知的均质化、脂质场(lipid-field)水合或挤出技术形成。

[0146] 在本发明的一个方面,将脂质体制备成具有在所选择的尺寸范围内的基本均匀的尺寸。一种有效的尺寸分级方法涉及通过具有选定的均匀孔隙尺寸的一系列聚碳酸酯膜挤出脂质体的水性悬浮液;膜的孔隙尺寸大致对应于通过该膜挤出产生的脂质体的最大尺寸。参见例如美国专利号4,737,323(1988年4月12日)。

[0147] 本发明的配制品的释放特征取决于包封材料、包封药物的浓度、和释放调节剂的存在。例如,可以将释放操控为pH依赖性,例如,使用仅在低pH下释放的pH敏感性包衣,如在胃中,或在较高的pH下,如在肠中。肠溶包衣可用于防止在穿过胃之前发生释放。包封在不同材料中的多种包衣或氨脲的混合物可用于在胃中获得初始释放,随后在肠中释放。还可以通过包含盐或成孔剂来操控释放,这些盐或成孔剂可以增加水摄取或通过扩散增加药物从胶囊的释放。改变药物溶解度的赋形剂也可用于控制释放速率。还可以掺入增强基质降解或从基质中的释放的试剂。它们可以被添加到药物中,作为单独的相添加(即作为颗粒),或者可以根据化合物共溶在聚合物相中。在所有情况下,该量应在0.1%至30%(w/w聚合物)之间。降解增强剂的类型包括无机盐,如硫酸铵和氯化铵;有机酸,如柠檬酸、苯甲酸和抗坏血酸;无机碱,如碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙、碳酸锌和氢氧化锌;和有机碱,如硫酸鱼精蛋白、精胺、胆碱、乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺;以及表面活性剂,如Tween®和Pluronic®。将成孔剂(即,水溶性化合物,例如无机盐和糖,其将微观结构添加到基质中)作为颗粒添加。该范围应在1%至30%(w/w聚合物)之间。

[0148] 吸收还可以通过改变颗粒在肠道的停留时间进行操控。例如,这可以通过用粘膜粘合剂聚合物进行颗粒包衣或选择粘膜粘合剂聚合物作为包封材料来实现。实例包括具有游离羧基基团的大多数聚合物,例如壳聚糖、纤维素,并且尤其是聚丙烯酸酯(如本文所用,聚丙烯酸酯是指包括丙烯酸酯基团和改性的丙烯酸酯基团(例如氰基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯)的聚合物)。

#### [0149] 药物组合

[0150] 本发明尤其涉及具有式I的化合物(或包含具有式I的化合物的药物组合物)在治疗一种或多种本文所述的疾病中的用途;其中对治疗的反应是有益的,例如,通过部分或完全去除疾病的一种或多种症状直至完全治愈或缓解所证明的。

[0151] 具有式(I)的化合物也可以与以下化合物和抗体-药物偶联物组合使用:

[0152] BCR-ABL抑制剂:伊马替尼(Gleevec®);尼罗替尼盐酸盐:尼罗替尼(Tasigna®);达沙替尼(BMS-345825);伯舒替尼(SKI-606);帕纳替尼(AP24534);巴氟替尼(INN0406);达

鲁舍替 (PHA-739358); AT9283 (CAS 1133385-83-7); 塞卡替尼 (AZD0530); 和 N-[2-[(1S, 4R)-6-[[4-(环丁基氨基)-5-(三氟甲基)-2-嘧啶基]氨基]-1,2,3,4-四氢萘-1,4-亚胺-9-基]-2-氧代乙基]-乙酰胺 (PF-03814735, CAS942487-16-3)。

[0153] ALK抑制剂: PF-2341066 (**XALKORI**<sup>®</sup>; 克唑替尼); 5-氯-N4-(2-(异丙基磺酰基)苯基)-N2-(2-甲氧基-4-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)苯基)嘧啶-2,4-二胺; GSK1838705A; 和 CH5424802。

[0154] BRAF抑制剂: 威罗菲尼 (PLX4032); 和 达拉非尼。

[0155] FLT3抑制剂-苹果酸舒尼替尼 (由辉瑞在商标名 **Sutent**<sup>®</sup> 下出售); PKC412 (米哌妥林); 坦度替尼、索拉菲尼、舒尼替尼、米哌妥林、来他替尼、KW-2449、奎扎替尼 (AC220) 和 色瑞诺替尼 (crenolanib)。

[0156] MEK抑制剂-曲美替尼。

[0157] 血管内皮生长因子 (VEGF) 受体抑制剂: 贝伐单抗 (由基因泰克公司 (Genentech)/罗氏公司在商品名 **Avastin**<sup>®</sup> 下出售)、阿西替尼 (N-甲基-2-[[3-[(E)-2-吡啶-2-基乙烯基]-1H-引唑-6-基]磺酰基]苯甲酰胺, 也称为 AG013736, 并描述于 PCT 公开号 W0 01/002369 中)、丙氨酸布立尼布 ((S)-(R)-1-(4-(4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基氧基)-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基氧基)丙烷-2-基)2-氨基丙酸酯, 也称为 BMS-582664)、莫特塞尼 (N-(2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-吡啶-6-基)-2-[(4-吡啶基甲基)氨基]-3-吡啶甲酰胺, 并描述于 PCT 公开号 W0 02/066470 中)、帕瑞肽 (也称为 SOM230, 并描述于 PCT 公开号 W0 02/010192 中)、索拉菲尼 (在商品名 **Nexavar**<sup>®</sup> 下出售);

[0158] HER2受体抑制剂: 曲妥单抗 (由基因泰克公司/罗氏公司在商标 **Herceptin**<sup>®</sup> 下出售)、来那替尼 (也称为 HKI-272, (2E)-N-[4-[[3-氯-4-[(吡啶-2-基)甲氧基]苯基]氨基]-3-氰基-7-乙氧基喹啉-6-基]-4-(二甲基氨基)丁-2-烯酰胺, 并描述于 PCT 公开号 W0 05/028443 中)、拉帕提尼或二甲苯磺酸拉帕替尼 (由葛兰素史克公司 (GlaxoSmithKline) 在商标 **Tykerb**<sup>®</sup> 下出售)、曲妥珠单抗-美坦新 (Trastuzumab emtansine) (在美国, 为 ado-曲妥珠单抗-美坦新偶联物, 商品名 Kadcyca) - 一种抗体-药物偶联物, 由与细胞毒剂美登素 (DM1) 连接的单克隆抗体曲妥珠单抗 (赫塞汀 (Herceptin)) 组成;

[0159] CD20抗体: 利妥昔单抗 (由基因泰克公司/罗氏公司在商标 **Riuxan**<sup>®</sup> 和 **MabThera**<sup>®</sup> 下出售)、托西莫单抗 (由葛兰素史克公司在商标 **Bexxar**<sup>®</sup> 下出售)、奥法木单抗 (由葛兰素史克公司在商标 **Arzerra**<sup>®</sup> 下出售);

[0160] 酪氨酸激酶抑制剂: 埃罗替尼盐酸盐 (由基因泰克公司/罗氏公司在商标 **Tarceva**<sup>®</sup> 下出售)、利尼伐尼 (Linifanib) (N-[4-(3-氨基-1H-引唑-4-基)苯基]-N'-(2-氟-5-甲基苯基)尿素, 也称为 ABT 869, 从基因泰克公司可获得)、苹果酸舒尼替尼 (由辉瑞在商品名 **Sutent**<sup>®</sup> 下出售)、伯舒替尼 (4-[(2,4-二氯-5-甲氧基苯基)氨基]-6-甲氧基-7-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基]喹啉-3-甲腈, 也称为 SKI-606, 并描述于美国专利号 6,780,996 中)、达沙替尼 (由百时美施贵宝公司 (Bristol-Myers Squibb) 在商品名 **Sprycel**<sup>®</sup> 下

出售)、armala(也称为帕唑帕尼,由葛兰素史克公司在商品名 **Votrient®** 下出售)、伊马替尼和甲磺酸伊马替尼(由诺华公司在商品名 **Gilvec®** 和 **Gleevec®** 下出售);

[0161] DNA合成抑制剂:卡培他滨(由罗氏公司在商标 **Xeloda®** 下出售)、盐酸吉西他滨(由礼来公司(Eli Lilly and Company)在商标 **Gemzar®** 下出售)、奈拉滨((2R,3S,4R,5R)-2-(2-氨基-6-甲氧基-嘌呤-9-基)-5-(羟基甲基)氧杂戊环-3,4-二醇,由葛兰素史克公司在商品名 **Arranon®** 和 **Atriance®** 下出售);

[0162] 抗肿瘤剂:奥沙利铂(由赛诺菲-安万特公司(Sanofi-Aventis)在商品名 **Eloxatin®** 下出售并描述于美国专利号4,169,846中);

[0163] 表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂:吉非替尼(在商品名 **Iressa®** 下出售)、N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[3”S”]-四氢-3-咪唑基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺,由勃林格殷格翰公司(Boehringer Ingelheim)在商品名 **Tovok®** 下出售)、西妥昔单抗(由百时美施贵宝公司在商品名 **Erbitux®** 下出售)、帕尼单抗(由安进公司(Amgen)在商品名 **Vectibix®** 下出售);

[0164] HER二聚合抑制剂:帕妥珠单抗(由基因泰克公司在商标 **Omnitarg®** 下出售);

[0165] 人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)调节剂:非格司亭(由安进公司在商品名 **Neupogen®** 下出售);

[0166] 免疫调节剂:阿夫土珠(可从 **Roche®** 获得)、乙二醇化非格司亭(由安进公司在商品名 **Neulasta®** 下出售)、来那度胺(也称为CC-5013,在商品名 **Revlimid®** 下出售)、萨力多胺(在商品名 **Thalomid®** 下出售);

[0167] CD40抑制剂:达西珠单抗(Dacetuzumab)(也称为SGN-40或huS2C6,可从西雅图遗传学公司(Seattle Genetics,Inc)获得);

[0168] 促凋亡受体激动剂(PARA):杜拉乐明(也称为AMG-951,可从安进公司/基因泰克公司获得);

[0169] 刺猬(Hedgehog)拮抗剂:2-氯-N-[4-氯-3-(2-吡啶基)苯基]-4-(甲基磺酰基)-苯甲酰胺(也称为GDC-0449,并描述于PCT公开号W006/028958中);

[0170] PI3K抑制剂:4-[2-(1H-咪唑-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基]甲基]噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]吗啉(也称为GDC 0941并描述于PCT公开号W0 09/036082和W0 09/055730中)、2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧代-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(也称为BEZ 235或NVP-BEZ 235,并描述于PCT公开号W0 06/122806中);

[0171] 磷脂酶A2抑制剂:阿那格雷(在商品名 **Agrylin®** 下出售);

[0172] BCL-2抑制剂:4-[4-[[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-环己烯-1-基]甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[[(1R)-3-(4-吗啉基)-1-[(苯基硫)甲基]丙基]氨基]-3-[(三氟甲基)磺酰基]苯基]磺酰基]苯甲酰胺(也称为ABT-263并描述于PCT公开号W0 09/155386中);

[0173] 丝裂原活化蛋白激酶(MEK)抑制剂:XL-518(Cas号1029872-29-4,可从ACC集团获得);

- [0174] 芳香化酶抑制剂:依西美坦(由辉瑞在商标 **Aromasin®** 下出售)、来曲唑(由诺华公司在商品名 **Femara®** 下出售)、阿那曲唑(在商品名 **Arimidex®** 下出售);
- [0175] 拓扑异构酶I抑制剂:伊立替康(由辉瑞在商标 **Camptosar®** 下出售)、盐酸拓扑替康(由葛兰素史克公司在商品名 **Hycamtin®** 下出售);
- [0176] 拓扑异构酶II抑制剂:依托泊苷(也称为VP-16和磷酸依托泊苷,在商品名 **Toposar®**、**VePesid®**和**Etopophos®**下出售)、替尼泊苷(也称为VM-26,在商品名 **Vumon®**下出售);
- [0177] mTOR抑制剂:替西罗莫司(由辉瑞在商品名 **Torisel®** 下出售)、地磷莫司(正式称为deferolimus, (1R,2R,4S)-4-[ (2R)-2[ (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-戊氧杂-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]三十六烷-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基次磷酸酯,也称为AP23573和MK8669,并描述于PCT公开号W0 03/064383中)、依维莫司(由诺华公司在商品名 **Afinitor®** 下出售);
- [0178] 破骨细胞骨吸收抑制剂:1-羟基-2-咪唑-1-基-磷酸乙酰基)磷酸一水合物(由诺华公司在商品名 **Zometa®** 下出售);
- [0179] CD33抗体药物偶联物:吉妥珠单抗奥唑米星(由辉瑞/惠氏公司在商品名 **Mylotarg®** 下出售);
- [0180] CD22抗体药物偶联物:奥英妥珠单抗(也称为CMC-544和WAY-207294,可从杭州圣科化工有限公司(Hangzhou Sage Chemical Co.,Ltd.)获得);
- [0181] CD20抗体药物偶联物:替坦异贝莫单抗(在商品名 **Zevalin®** 下出售);
- [0182] 生长抑素类似物:奥曲肽(也称为醋酸奥曲肽,在商品名 **Sandostatin®** 和 **SandostatinLAR®** 下出售);
- [0183] 合成白细胞介素-11(IL-11):奥普瑞白介素(由辉瑞/惠氏公司在商品名 **Neumega®** 下出售);
- [0184] 合成红细胞生成素:阿法达贝泊汀(由安进公司在商品名 **Aranesp®** 下出售);
- [0185] 核因子κB(RANK)抑制剂的受体活化剂:狄诺塞麦(由安进公司在商品名 **Prolia®** 下出售);
- [0186] 促血小板生成素模拟肽体:罗米司亭(由安进公司在商品名 **Nplate®** 下出售);
- [0187] 细胞生长刺激剂:帕利夫明(由安进公司在商品名 **Kepivance®** 下出售);
- [0188] 抗胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)抗体:非吉木单抗(Figitumumab)(也称为CP-751,871,可从ACC集团获得)、罗妥木单抗(robatumumab)(CAS号934235-44-6);
- [0189] 抗CS1抗体:埃洛妥珠单抗(HuLuc63,CAS号915296-00-3);
- [0190] CD52抗体:阿仑单抗(在商品名 **Campath®** 下出售);
- [0191] CTLA-4抑制剂:曲美木单抗(Tremelimumab)(IgG2单克隆抗体,可从辉瑞获得,以



前称为替西木单抗 (ticilimumab), CP-675, 206)、伊匹单抗 (ipilimumab) (CTLA-4抗体, 也称为MDX-010, CAS号477202-00-9);

[0192] 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDI): 伏立诺他 (由默克公司在商品名 **Zolinza**<sup>®</sup> 下出售);

[0193] 烷化剂: 替莫唑胺 (由先灵葆雅公司 (Schering-Plough) / 默克公司在商品名 **Temodar**<sup>®</sup> 和 **Temodal**<sup>®</sup> 下出售)、更生霉素 (也称为放线菌素-D并在商品名 **Cosmegen**<sup>®</sup> 下出售)、美法仑 (也称为L-PAM、苯丙氨酸芥、和苯丙氨酸氮芥, 在商品名 **Alkeran**<sup>®</sup> 下出售)、六甲蜜胺 (也称为六甲三聚氰胺 (HMM), 在商品名 **Hexalen**<sup>®</sup> 下出售)、卡莫司汀 (在商品名 **BiCNU**<sup>®</sup> 下出售)、苯达莫司汀 (在商品名 **Treanda**<sup>®</sup> 腺癌出售)、白消安 (在商品名 **Busulfex**<sup>®</sup> 和 **Myleran**<sup>®</sup> 下出售)、卡铂 (在商品名 **Paraplatin**<sup>®</sup> 下出售)、洛莫司汀 (也称为CCNU, 在商品名 **CeeNU**<sup>®</sup> 下出售)、顺铂 (也称为CDDP, 在商品名 **Platinol**<sup>®</sup> 和 **Platinol**<sup>®</sup>-AQ下出售)、瘤可宁 (在商品名 **Leukeran**<sup>®</sup> 下出售)、环磷酰胺 (在商品名 **Cytosan**<sup>®</sup> 和 **Neosar**<sup>®</sup> 下出售)、达卡巴嗪 (也称为DTIC、DIC和咪唑甲酰胺, 在商品名 **DTIC-Dome**<sup>®</sup> 下出售)、六甲蜜胺 (也称为六甲三聚氰胺 (HMM), 在商品名 **Hexalen**<sup>®</sup> 下出售)、异环磷酰胺 (在商品名 **Ifex**<sup>®</sup> 下出售)、丙卡巴肼 (在商品名 **Matulane**<sup>®</sup> 下出售)、二氯甲基二乙胺 (也称为氮芥 (nitrogen mustard或mustine) 和盐酸氮芥, 在商品名 **Mustargen**<sup>®</sup> 下出售)、链脲霉素 (在商品名 **Zanosar**<sup>®</sup> 下出售)、噻替哌 (也称为硫代磷酰胺、TESPA和TSPA, 在商品名 **Thioplex**<sup>®</sup> 下出售);

[0194] 生物反应调节剂: 卡介苗素 (bacillus calmette-guerin) (在商品名 **theraCys**<sup>®</sup> 和 **TICE**<sup>®</sup> BCG下出售)、地尼白介素 (在商品名 **Ontak**<sup>®</sup> 下出售);

[0195] 抗肿瘤抗生素: 多柔比星 (在商品名 **Adriamycin**<sup>®</sup> 和 **Rubex**<sup>®</sup> 下出售)、博来霉素 (在商品名 **lenoxane**<sup>®</sup> 下出售)、道诺霉素 (也称为盐酸道诺霉素 (daunorubicin hydrochloride)、柔毛霉素 (daunomycin) 和盐酸红比霉素 (rubidomycin hydrochloride), 在商品名 **Cerubidine**<sup>®</sup> 下出售)、道诺霉素脂质体 (柠檬酸道诺霉素脂质体, 在商品名 **DaunoXome**<sup>®</sup> 下出售)、米托蒽醌 (也称为DHAD, 在商品名 **Novantrone**<sup>®</sup> 下出售)、表柔比星 (在商品名 **Ellence**<sup>™</sup> 下出售)、伊达比星 (在商品名 **Idamycin**<sup>®</sup>、**Idamycin PFS**<sup>®</sup> 下出售)、丝裂霉素C (在商品名 **Mutamycin**<sup>®</sup> 下出售);

[0196] 抗微管剂: 雌莫司汀 (在商品名 **Emcyl**<sup>®</sup> 下出售);

[0197] 组织蛋白酶K抑制剂: 奥当卡替 (也称为MK-0822, N-(1-氰基环丙基)-4-氟-N<sup>2</sup>-{(1S)-2,2,2-三氟-1-[4'-(甲基磺酰基)二苯基-4-基]乙基}-L-亮氨酸酰胺, 可从兰州化工股份有限公司 (Lanzhou Chon Chemicals, ACC Corp.) 和ChemieTek公司获得, 并描述于PCT公开号W0 03/075836中);

[0198] 埃博霉素B类似物: 伊沙匹隆 (由百时美施贵宝公司 (Bristol-Myers Squibb) 在商

品名 **Lxempra®** 下出售)；

[0199] 热休克蛋白 (HSP) 抑制剂:坦螺旋霉素 (17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素, 也称为KOS-953和17-AAG,可从西格玛公司 (SIGMA) 获得,并描述于美国专利号4,261,989中)；

[0200] TpoR激动剂:艾曲波帕 (由葛兰素史克公司在商品名 **Promacta®**和 **Revolade®** 下出售)；

[0201] 抗有丝分裂剂:多西他赛 (由赛诺菲-安万特公司在商品名 **Taxotere®** 下出售)；

[0202] 肾上腺类固醇抑制剂:氨鲁米特 (在商品名 **Cytadren®** 下出售)；

[0203] 抗雄激素:尼鲁米特 (在商品名 **Nilandron®**和 **Anandron®** 下出售)、比卡鲁胺 (在商品名 **Casodex®** 下出售)、氟他胺 (在商品名 **Fulexin™** 下出售)；

[0204] 雄激素:氟甲睾酮 (在商品名 **Halotestin®** 下出售)；

[0205] 蛋白酶体抑制剂:硼替佐米 (在商品名 **Velcade®** 下出售)；

[0206] CDK1抑制剂:阿伏西地 (Alvocidib) (也称为黄酮吡多或HMR-1275,2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(3S,4R)-3-羟基-1-甲基-4-哌啶基]-4-色满酮并描述于美国专利号5,621,002中)；

[0207] 促性腺激素释放激素 (GnRH) 受体激动剂:亮丙瑞林或醋酸亮丙瑞林 (由拜耳公司 (Bayer AG) 在商品名 **Viadure®** 下出售,由赛诺菲-安万特公司在 **Eligard®** 下出售,以及由雅培公司 (Abbott Lab) 在 **Lupron®** 下出售)；

[0208] 紫杉烷抗肿瘤剂:卡巴他赛 (1-羟基-7 $\beta$ ,10 $\beta$ -二甲氧基-9-氧代-5 $\beta$ ,20-环氧紫杉-11-烯-2 $\alpha$ ,4,13 $\alpha$ -三基-4-乙酸酯-2-苯甲酸酯-13-[(2R,3S)-3-[(叔-丁氧基)羰基]氨基]-2-羟基-3-苯基丙酸酯)、拉洛他赛 ((2 $\alpha$ ,3 $\xi$ ,4 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,13 $\alpha$ )-4,10-双(乙酰氧基)-13-[(2R,3S)-3-[(叔-丁氧基羰基)氨基]-2-羟基-3-苯基丙酰基]氧基)-1-羟基-9-氧代-5,20-环氧-7,19-环紫杉-11-烯-2-基苯甲酸酯)；

[0209] 5HT1a受体激动剂:扎利罗登 (也称为SR57746,1-[2-(2-萘基)乙基]-4-[3-(三氟甲基)苯基]-1,2,3,6-四氢吡啶,并描述于美国专利号5,266,573中)；

[0210] HPC疫苗:由葛兰素史克公司以 **Cervarix®** 出售,由默克公司以 **Gardasil®** 出售；

[0211] 铁螯合剂:地拉罗司 (由诺华公司在商品名 **Exjade®** 下出售)；

[0212] 抗代谢物:克拉屈滨 (2-氯脱氧腺苷,在商品名 **leustatin®** 下出售)、5-氟嘧啶 (在商品名 **Adrucil®** 下出售)、6-硫代鸟嘌呤 (在商品名 **Purinethol®** 下出售)、培美曲塞 (在商品名 **Alimta®** 下出售)、阿糖胞苷 (也称为阿糖胞嘧啶 (Ara-C),在商品名 **Cytosar-U®** 下出售)、阿糖胞苷脂质体 (也称为脂质体Ara-C,在商品名 **DepoCyt™** 下出售)、地西他滨 (在商品名 **Dacogen®** 下出售)、羟基脲 (在商品名 **Hydrea®**、**Droxia™**和 **Mylocel™** 下出售)、氟达拉滨 (在商品名 **Fludara®** 下出售)、氟尿苷 (在商品名 **FUDR®** 下出售)、克拉屈滨

(也称为2-氯脱氧腺苷(2-CdA),在商品名Leustatin<sup>TM</sup>下出售)、氨甲叶酸(也称为氨甲喋呤、甲氨喋呤钠(MTX),在商品名Rheumatrex<sup>®</sup>和Trexall<sup>TM</sup>下出售)、喷司他丁(在商品名Nipent<sup>®</sup>下出售);

[0213] 二膦酸盐:帕米膦酸盐(在商品名Aredia<sup>®</sup>下出售)、唑来膦酸(在商品名Zometa<sup>®</sup>下出售);

[0214] 去甲基化剂:5-阿扎胞苷(在商品名Vidaza<sup>®</sup>下出售)、地西他滨(在商品名Dacogen<sup>®</sup>下出售);

[0215] 植物生物碱:蛋白质结合紫杉醇(Paclitaxel protein-bound)(在商品名Abraxane<sup>®</sup>下出售)、长春花碱(也称为硫酸长春花碱、长春质碱和VLB,在商品名Alkaban-AQ<sup>®</sup>和Velban<sup>®</sup>下出售)、长春新碱(也称为硫酸长春新碱、LCR和VCR,在商品名Oncovin<sup>®</sup>和Vincasar Pfs<sup>®</sup>下出售)、长春瑞滨(在商品名Navelbine<sup>®</sup>下出售)、紫杉醇(在商品名Taxol和Onxal<sup>TM</sup>下出售);

[0216] 类视黄醇:阿里维A酸(在商品名Panretin<sup>®</sup>下出售)、维甲酸(全反式视黄酸,也称为ATRA,在商品名Vesanoid<sup>®</sup>下出售)、异维甲酸(13-顺式-视黄酸,在商品名

Accutane<sup>®</sup>、Amnesteem<sup>®</sup>、Claravis<sup>®</sup>、

Clarus<sup>®</sup>、Decutan<sup>®</sup>、Isotane<sup>®</sup>、Izotech<sup>®</sup>、Oratane<sup>®</sup>、Isotret<sup>®</sup>、和Sotret<sup>®</sup>下出售)、蓓萨罗丁(在商品名Targretin<sup>®</sup>下出售);

[0217] 糖皮质激素:氢化可的松(也称为可的松、氢化可的松琥珀酸钠、氢化可的松磷酸钠,并在商品名Ala-Cort<sup>®</sup>、氢化可的松磷酸盐、Solu-Cortef<sup>®</sup>、Hydrocort Acetate<sup>®</sup>和Lanacort<sup>®</sup>下出售)、地塞米松((8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-氟-11,17-二羟基-17-(2-羟基乙酰基)-10,13,16-三甲基-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十二氢-3H-环戊烷并[a]菲-3-酮)、氢化波尼松(在商品名Delta-Cortel<sup>®</sup>、Orapred<sup>®</sup>、Pediapred<sup>®</sup>和Prelone<sup>®</sup>下出售)、强的松(在商品名Deltasone<sup>®</sup>、Liquid Red<sup>®</sup>、Meticorten<sup>®</sup>和Orasone<sup>®</sup>下出售)、甲基氢化波尼松(也称为6-甲基氢化波尼松、醋酸甲基氢化波尼松、丁二酸钠甲基氢化波尼松,在商品名Duralone<sup>®</sup>、Medralone<sup>®</sup>、Medrol<sup>®</sup>、M-Prednisol<sup>®</sup>和Solu-Medrol<sup>®</sup>下出售);

[0218] 细胞因子:白细胞介素-2(也称为阿地白介素和IL-2,在商品名Proleukin<sup>®</sup>下出售)、白细胞介素-11(也称为oprevelkin,在商品名Neumega<sup>®</sup>下出售)、 $\alpha$ 干扰素阿法(alpha interferon alfa)(也称为IFN- $\alpha$ ,在商品名Intron<sup>®</sup>A和Roferon-A<sup>®</sup>下出售);

[0219] 雌激素受体下调剂:氟维司群(在商品名Faslodex<sup>®</sup>下出售);

[0220] 抗雌激素:三苯氧胺(在商品名Novaldex<sup>®</sup>下出售);

[0221] 托瑞米芬(在商品名Fareston<sup>®</sup>下出售);

[0222] 选择性雌激素受体调节剂(SERM):雷洛昔芬(在商品名Evista<sup>®</sup>下出售);

[0223] 促黄体生成激素释放激素 (LHRH) 激动剂: 戈舍瑞林 (在商品名 **Zoladex®** 下出售);

[0224] 孕激素: 甲地孕酮 (也称为醋酸甲地孕酮, 在商品名 **Megace®** 下出售);

[0225] 其他细胞毒性剂: 三氧化二砷 (在商品名 **Trisenox®** 下出售)、天冬酰胺酶, 也称为左旋天冬酰胺酶、欧文氏菌左旋天冬酰胺酶, 在商品名 **Elspar®** 和 **Kidrolase®** 下出售);

[0226] 具有式 (I) 的化合物也可以与以下辅助治疗组合使用:

[0227] 抗恶心药物: NK-1 受体拮抗剂: 卡索匹坦 (由葛兰素史克公司在商品名 **Rezonc®** 和 **Zunrisa®** 下出售); 以及

[0228] 细胞保护剂: 氨磷汀 (在商品名 **Ethyol®** 下出售)、甲酰四氢叶酸 (也称为甲酰四氢叶酸钙、嗜橙菌因子和亚叶酸)。

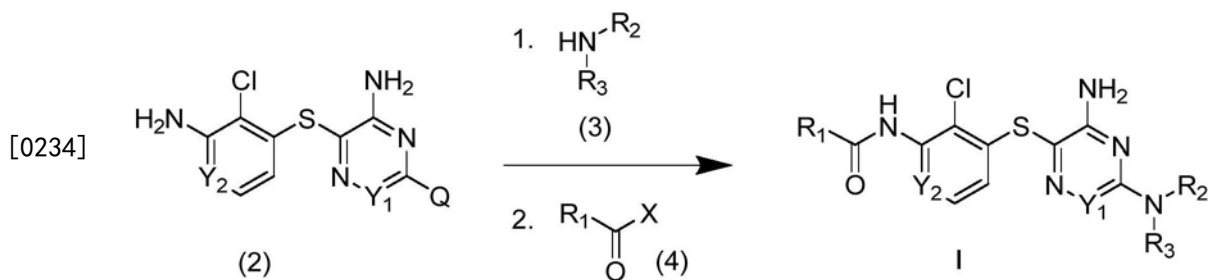
[0229] 本公开内容之内所作的参考文献引证均不应该理解为承认所引用的参考文献是现有技术, 否则将对本发明的可专利性产生负面影响。

[0230] 制备本发明化合物的方法

[0231] 本发明还包括制备本发明化合物的方法。在所述反应中, 在期望终产物中存在反应性官能团的情况下, 可能需要保护这些反应性官能团, 例如羟基、氨基、亚氨基、硫代或羧基基团, 以避免它们参与反应, 这是所不希望的。可以根据标准实践使用常规保护基团, 例如, 参见 T.W. Greene 和 P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Chemistry [有机化学中的保护基团]", 约翰·威利父子出版社 (John Wiley and Sons), 1991。

[0232] 具有式 I 的化合物可以通过如下面的反应方案 I 的程序来制备:

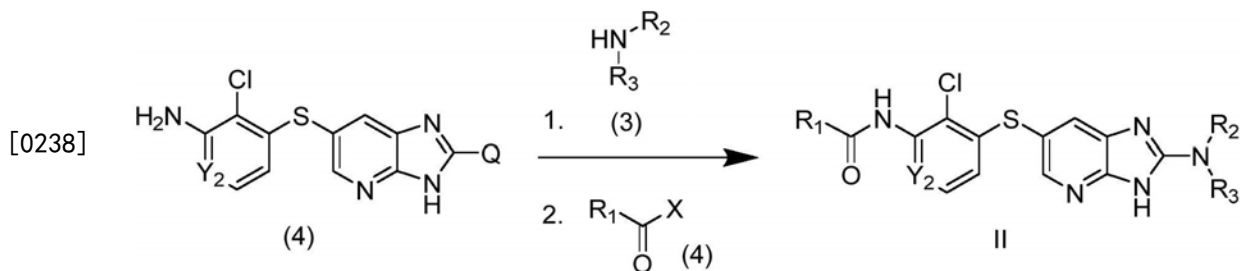
[0233] 反应方案 I:



[0235] 其中 Q 是离去基团, 并且 Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 和 R<sub>3</sub> 是如通过发明内容所定义的。具有式 I 的化合物可以通过使具有式 2 的化合物与具有式 3 的化合物在合适的碱 (例如 DIPEA 等) 和合适的溶剂 (例如 DMSO、NMP 等) 存在下反应来制备。该反应在温度范围为约 80°C 至约 140°C 下进行并可能耗时从约 1 小时至约 24 小时来完成。与具有合适的离去基团 X 的具有式 4 的化合物进一步反应可在合适的溶剂中在升高的温度下在碱存在或不存在下进行。这些过程可以通过使用合适的保护基团来进行, 这些保护基团可以随后被除去并且这些步骤能以相反的顺序发生。

[0236] 具有式 II 的化合物可以通过如下面的反应方案 II 程序来制备:

[0237] 反应方案 II:



[0239] 其中Q是离去基团,并且 $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 和 $R_3$ 是如通过发明内容所定义的。具有式II的化合物可以通过使具有式4的化合物与具有式3的化合物在合适的碱(例如DIPEA等)和合适的溶剂(例如DMSO、NMP等)存在下反应来制备。该反应在温度范围为约80°C至约140°C下进行并可能耗时从约1小时至约24小时来完成。与具有合适的离去基团X的具有式4的化合物进一步反应可在合适的溶剂中在升高的温度下在碱存在或不存在下进行。这些过程可以通过使用合适的保护基团来进行,这些保护基团可以随后被除去并且这些步骤能以相反的顺序发生。

[0240] 可以在下文实例中发现合成具有式I的化合物的详细实例。

[0241] 制备本发明化合物的另外的方法

[0242] 可以通过将游离碱形式的该化合物与药学上可接受的无机酸或有机酸反应来将本发明的化合物制备成药学上可接受的酸加成盐。可替代地,本发明化合物的药学上可接受的碱加成盐可以通过使游离酸形式的该化合物与药学上可接受的无机或有机碱反应来制备。

[0243] 具有式I的化合物还可以通过附加适当的官能来进行修饰以提高选择性生物学性质。这种修饰在本领域中是已知的,并包括以下那些:增加对给定生物系统(例如血液、淋巴系统、中枢神经系统、睾丸)的渗透,增加生物利用度,增加溶解度以允许肠胃外给药(例如注射、输注),改变新陈代谢和/或改变分泌速度。这类修饰的实例包括但不限于酯化(例如用聚乙二醇)、用新戊酰氧基或脂肪酸取代基衍生化、转化成氨基甲酸酯、芳环的羟基化和芳环中的杂原子取代。无论何处提及具有式I的化合物,和/或其N-氧化物、互变异构体和/或(优选药学上可接受的)盐,都包括这样的经修饰的化学式,但是优选地是指具有式I的分子,它们的N-氧化物、它们的互变异构体和/或它们的盐。

[0244] 可替代地,盐形式的本发明化合物可以使用起始材料或中间体的盐制备。鉴于游离形式的新颖具有式I的化合物与呈其盐(包括可用作中间体的那些盐,例如在新型化合物的纯化或鉴定中)形式的化合物之间的密切关系,在上文和下文中对这些化合物或具有式I的化合物的任何提及应理解为(在适当和有利的情况下)是指游离形式的化合物和/或也指其一种或多种盐,以及一种或多种溶剂化物,例如水合物。

[0245] 优选与来自具有碱性氮原子的具有式I的化合物的有机或无机酸形成盐,例如作为酸加成盐,尤其是药学上可接受的盐。合适的无机酸是例如氢卤酸,例如盐酸、硫酸或磷酸。合适的有机酸是例如羧酸、磷酸、磺酸或氨基磺酸,例如乙酸,丙酸,辛酸,癸酸,正十二烷酸,乙醇酸,乳酸,富马酸,琥珀酸,丙二酸,己二酸,庚二酸,辛二酸,壬二酸,苹果酸,酒石酸,柠檬酸,氨基酸(如谷氨酸或天冬氨酸),马来酸,羟基马来酸,甲基马来酸,环己烷羧酸,金刚烷羧酸,苯甲酸,水杨酸,4-氨基水杨酸,邻苯二甲酸,苯乙酸,扁桃酸,肉桂酸,甲烷或乙烷磺酸,2-羟基乙磺酸,乙烷-1,2-二磺酸,苯磺酸,4-甲苯磺酸,2-萘磺酸,1,5-萘-二磺

酸,2-或3-甲基苯磺酸,甲基硫酸,乙基硫酸,十二烷基硫酸,N-环己基氨基磺酸,N-甲基-、N-乙基-或N-丙基-氨基磺酸,或其他有机质子酸,如抗坏血酸。

[0246] 对于分离或纯化目的,也可能使用药学上不可接受的盐,例如苦味酸盐或高氯酸盐。对于治疗用途,仅使用药学上可接受的盐或游离化合物(适用于药物制剂形式的情况下),并且因此这些是优选的。

[0247] 游离酸或游离碱形式的本发明化合物可以分别从相应的碱加成盐或酸加成盐形式制备。例如,通过用合适的碱(例如氢氧化铵溶液、氢氧化钠等)处理,可以将酸加成盐形式的本发明化合物转化为相应的游离碱。通过用合适的酸(例如盐酸等)处理,可以将碱加成盐形式的本发明化合物转化为相应的游离酸。

[0248] 呈未氧化形式的本发明化合物可以通过在0-80℃下在合适的惰性有机溶剂(例如乙腈、乙醇、水性二噁烷等)中用还原剂(例如,硫、二氧化硫、三苯基膦、硼氢化锂、硼氢化钠、三氯化磷、三溴化物等)处理,由本发明化合物的N-氧化物制备。

[0249] 本发明化合物的前药衍生物可以通过本领域中普通技术人员已知的方法制备(例如,进一步的细节参见Saulnier等人,(1994),*Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*[生物有机和药物化学快报],卷4,第1985页)。例如,可以通过使本发明的非衍生化合物与合适的氨基甲酰化试剂(例如,1,1-酰氧基烷基氯代碳酸酯、对-硝基苯基碳酸酯等)反应来制备合适的前药。

[0250] 本发明化合物的受保护衍生物可以通过本领域普通技术人员已知的方法制备。适用于产生保护基团和除去它们的技术的详细描述可见于T.W.Greene,“*Protecting Groups in Organic Chemistry*[有机化学中的保护基团]”,第3版,John Wiley and Sons,Inc.[约翰威利父子出版公司],1999。

[0251] 本发明的化合物可以方便地制备,或在本发明的过程中形成(作为溶剂化物(例如,水合物))。本发明化合物的水合物可以通过使用有机溶剂(如二噁英、四氢呋喃或甲醇)从水性/有机溶剂混合物中重结晶而方便地制备。

[0252] 可以通过将该化合物的外消旋混合物与旋光活性拆分剂反应以形成一对非对映异构化合物、分离非对映异构体并回收光学纯的对映体来将本发明的化合物制备成其单个立体异构体。尽管可以使用本发明化合物的共价非对映异构体衍生物进行对映异构体的拆分,但优选可分离的络合物(例如结晶非对映异构体盐)。非对映异构体具有不同的物理性质(例如,熔点、沸点、溶解度、反应性等),并且可以通过利用这些不同点而容易地分离。非对映异构体可以通过色谱法分离,或优选通过基于溶解度差异的分离/拆分技术分离。然后通过任何不会导致外消旋化的实用方法,将光学纯的对映体与拆分剂一起回收。适用于从外消旋混合物中拆分化合物的立体异构体的技术的更详细描述可发现于Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, “*Enantiomers, Racemates and Resolutions*[对映体、外消旋体和拆分]”, John Wiley and Sons, Inc. [约翰威利父子出版公司], 1981。

[0253] 总之,可以通过以下方法制成具有式I的化合物,该方法涉及:

[0254] (a) 反应方案I和II的方法;以及

[0255] (b) 任选地将本发明化合物转化为药学上可接受的盐;

[0256] (c) 任选地将盐形式的本发明化合物转化为非盐形式;

[0257] (d) 任选地将呈未氧化形式的本发明化合物转化为药学上可接受的N-氧化物;

[0258] (e) 任选地将N-氧化物形式的本发明化合物转化为其未氧化形式;

[0259] (f) 任选地从异构体混合物中拆分本发明化合物的单个异构体;

[0260] (g) 任选地将非衍生的本发明化合物转化为药学上可接受的前药衍生物;和

[0261] (h) 任选地将本发明化合物的前药衍生物转化为其非衍生形式。

[0262] 在未具体描述起始材料的生产的情况下,这些化合物是已知的或者能以类似于本领域已知的方法或下文实例中公开的制备。

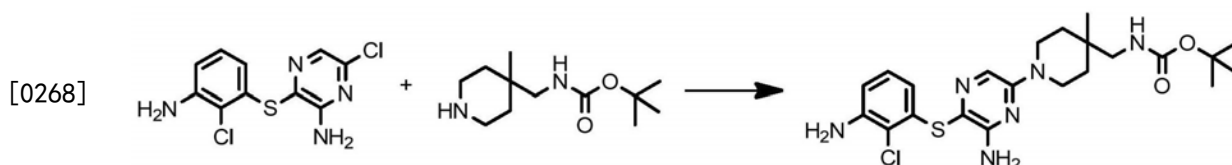
[0263] 本领域技术人员将理解,上述转化仅仅是用于制备本发明化合物的方法的代表,并且可以类似地使用其他众所周知的方法进行。

[0264] 实例

[0265] 下面的实例和中间体用于说明本发明而不限制其范围。实例中使用的一些缩写如下:乙酸(AcOH);乙腈(MeCN);三乙胺(TEA);四氢呋喃(THF);水性(aq.);气氛(atm.);2,2'-双-二苯基膦基-[1,1']联萘基(BINAP);4-二甲基氨基吡啶(DMAP);叔-丁氧基羰基(Boc);1,1-羰基二咪唑(CDI);二碳酸二叔丁酯(Boc<sub>2</sub>O);苯并三唑-1-基-氧基-三-(二甲基氨基)-磷六氟磷酸酯(BOP);二氯甲烷(DCM);二乙醚(Et<sub>2</sub>O);对-甲苯磺酸(PTSA);乙酸乙酯(EtOAc);乙醇(EtOH);双(三甲基甲硅烷基)酰胺锂(LHMDS);偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD);N,N-二异丙基-乙胺(DIEA或DIPEA);N,N-二甲基甲酰胺(DMF);二甲基亚砜(DMSO);二苯基磷酰基叠氮化物(DPPA);小时(h);2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU);高效液相色谱(HPLC);异丙醇(IPA);氢化铝锂(LAH);液相色谱-质谱联用(LCMS);二异丙基酰胺锂(LDA);甲醇(MeOH);毫升(mL);分钟(min);微波(MW);双(三甲基甲硅烷基)酰胺钠(NHMDS);正-丁基锂(n-BuLi);1,1-双(二苯基膦基)-二茂铁二氯化钯(II)(PdCl<sub>2</sub>(dppf));三(二苯亚甲基丙酮)二钯(0)(Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>);双(三苯基膦)二氯化钯(II)(PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>);室温(RT);四-正-丁基氟化铵(TBAF);叔-丁基二甲基甲硅烷基氯化物(TBSCl);三氟乙酸(TFA);四氢呋喃(THF);薄层色谱(TLC);保留时间(T<sub>R</sub>);(S)-(-)-2,2'-双(二-对-甲苯基膦)-1,1'-联萘((S)-To1BINAP);和4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基咕吨(XantPhos)。

[0266] 中间体1

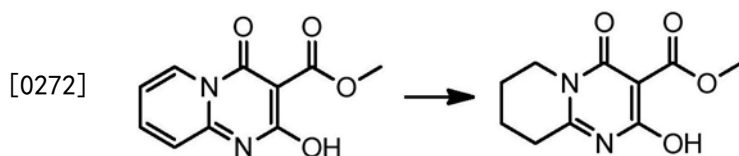
[0267] 叔-丁基((1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯



[0269] 如针对实例1所述,使用3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(1.5g, 5.2mmol)和叔-丁基((4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(1.9g, 8.4mmol)进行相似程序以给出叔-丁基((1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(2.4g)。MS m/z 479.3(M+H)<sup>+</sup>。

[0270] 中间体2

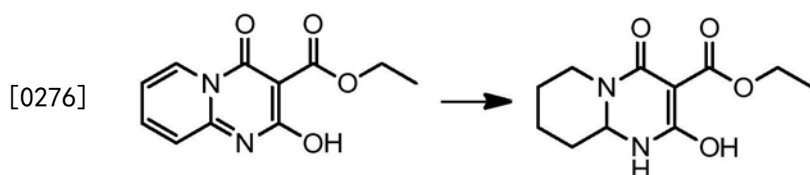
[0271] 甲基2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酸酯



[0273] 向甲基2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酸酯(2g,9.08mmol)在MeOH(50mL)中的溶液中添加10%Pd/C(1.9g,1.8mmol)。将反应混合物在室温下在H<sub>2</sub>气氛(气囊)下搅拌2.5h。此后,通过Celite过滤反应混合物并在减压下浓缩至干燥,给出标题化合物(2.15g)。MS m/z 225.1(M+H)<sup>+</sup>。

[0274] 中间体3

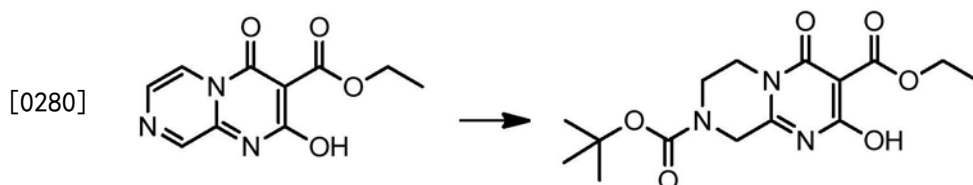
[0275] 乙基2-羟基-4-氧代-4,6,7,8,9,9a-六氢-1H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酸酯



[0277] 向乙基2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酸酯(0.05g,0.21mmol)在MeOH(1mL)中的溶液中添加10%Pd/C(0.045g,0.04mmol)。将反应混合物在室温下在H<sub>2</sub>气氛(气囊)下搅拌过夜。此后,通过Celite过滤反应混合物并在减压下浓缩至干燥,以给出乙基2-羟基-4-氧代-1,6,7,8,9,9a-六氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酸酯(0.043g)。MS m/z 241.1(M+H)<sup>+</sup>。

[0278] 中间体4

[0279] 8-叔-丁基3-乙基2-羟基-4-氧代-6,7-二氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3,8(9H)-二甲酸酯

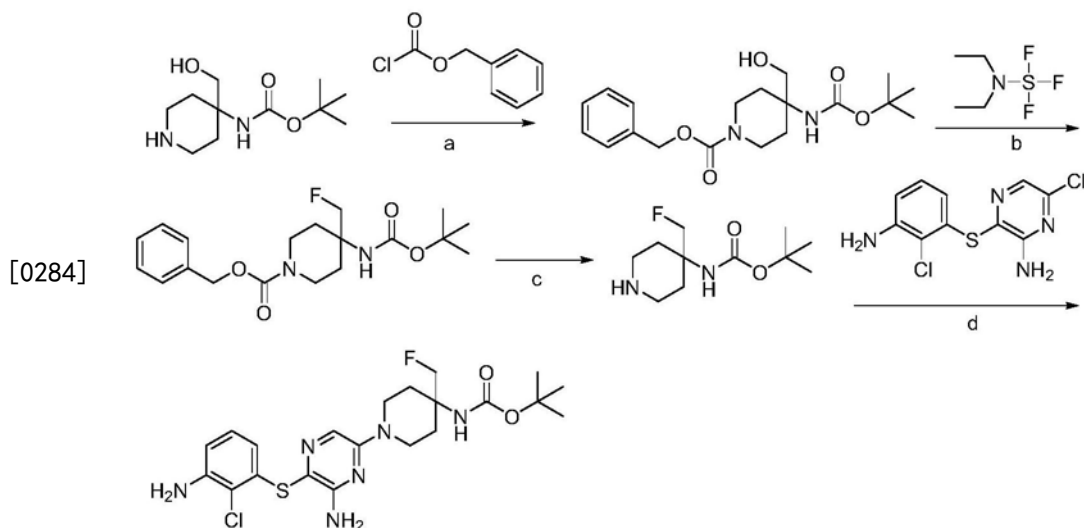


[0281] 向乙基2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酸酯(0.10g,0.44mmol)在MeOH(5mL)中的溶液中添加Pd/C(10%,0.09g,0.09mmol)、Boc<sub>2</sub>O(0.15mL、0.66mmol)和DIPEA(0.23mL,1.31mmol)。将反应混合物在室温下在H<sub>2</sub>气氛(气囊)下搅拌1h。将反应混合物通过Celite塞进行过滤并在减压下浓缩至干燥。将残余物通过快速二氧化硅色谱(0-3% MeOH/DCM)纯化以给出标题化合物(0.072g)。MS m/z 340.2(M+H)<sup>+</sup>。

[0282] 中间体5

[0283] 叔-丁基(1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡啶-2-基)-4-(氟甲基)哌啶-4-基)氨基甲酸酯





[0285] 步骤a: 在0℃, 向叔-丁基(4-羟基甲基)哌啶-4-基氨基甲酸酯(4.8g, 20.8mmol)在DCM(100mL)中的悬浮液中添加三乙胺(8.7mL, 6.3g, 62.3mmol), 接着添加氯甲酸苄酯(5.3g, 31.1mmol)。将反应混合物升温至室温并搅拌3h。将该反应混合物用DCM(150mL)稀释, 将有机层用水和盐水洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、过滤并在减压下浓缩。将粗产物通过二氧化硅色谱(0-20%MeOH/DCM)纯化以给出4.6g的苄基4-((叔-丁氧基羰基)氨基)-4-(羟基甲基)哌啶-1-甲酸酯。MS m/z 387.3 (M+Na)<sup>+</sup>。

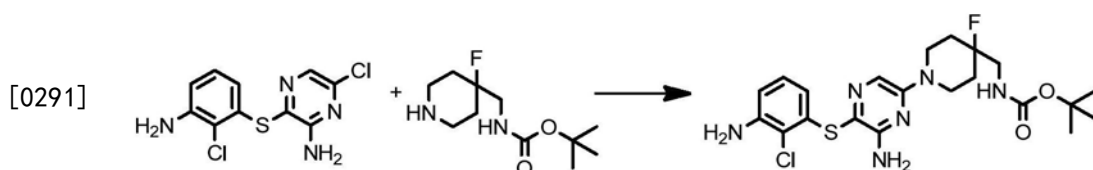
[0286] 步骤b: 在-78℃, 向苄基4-((叔-丁氧基羰基)氨基)-4-(羟基甲基)哌啶-1-甲酸酯(4.6g, 12.6mmol)在DCM(80mL)中的溶液中滴加三氟化二乙氨基硫(3.3mL, 4.1g, 25.2mmol)。将反应混合物在-78℃搅拌1h, 并且然后经30分钟升温至室温。将反应混合物用DCM(200mL)稀释, 用饱和水性Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>洗涤两次, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并减压浓缩为混浊的黄色油状物。将粗产物通过二氧化硅色谱(20-40%EtOAc/庚烷)纯化以给出1.9g的呈澄清油状物的苄基4-((叔-丁氧基羰基)氨基)-4-(氟甲基)哌啶-1-甲酸酯。MS m/z 367.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0287] 步骤c: 将苄基4-((叔-丁氧基羰基)氨基)-4-(氟甲基)哌啶-1-甲酸酯(0.26g, 0.71mmol)和Pd/C(10%, 0.08g)在MeOH(15mL)中的悬浮液用N<sub>2</sub>吹扫10min并然后在室温下在H<sub>2</sub>气氛(气囊)下搅拌12h。通过Celite垫和MeOH(100mL)过滤反应混合物。将合并的有机物在减压下浓缩为澄清的油状物以给出叔-丁基(4-(氟甲基)哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.16g)。MS m/z 233.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0288] 步骤d: 如针对实例1所述, 使用3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.37g, 1.29mmol)和叔-丁基(4-(氟甲基)哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.30g, 1.29mmol)进行类似程序以给出标题化合物(0.26g)。MS m/z 483.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0289] 中间体6

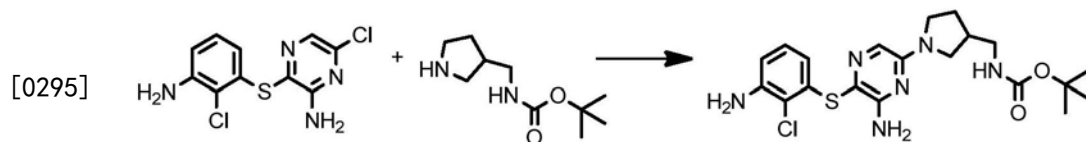
[0290] 叔-丁基((1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-氟哌啶-4-基)甲基)甲酸酯



[0292] 如针对中间体1所述,使用3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.2g, 0.70mmol)和叔-丁基((4-氟哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(0.24g, 1.05mmol)进行类似程序以给出标题化合物(0.29g)。MS  $m/z$  483.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0293] 中间体7

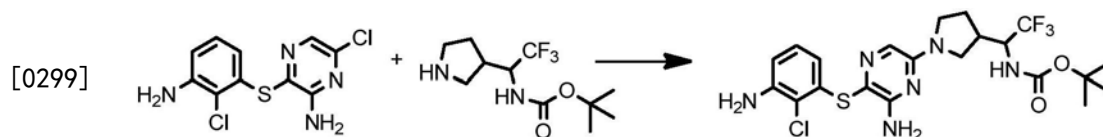
[0294] 叔-丁基((1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)吡咯烷-3-基)甲基)氨基甲酸酯



[0296] 如针对中间体1所述,使用3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.20g, 0.70mmol)和叔-丁基(吡咯烷-3-基甲基)氨基甲酸酯(0.21g, 1.05mmol)进行类似程序以给出标题化合物(0.19g)。MS  $m/z$  451.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0297] 中间体8

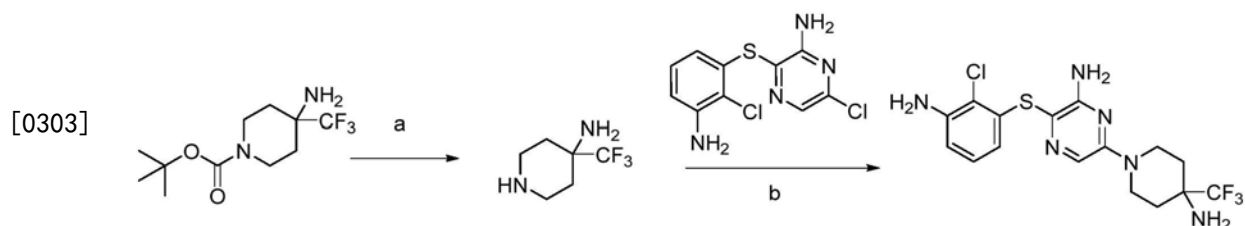
[0298] 叔-丁基((1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)吡咯烷-3-基)-2,2,2-三氟乙基)甲酸酯



[0300] 如针对中间体1所述,使用3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.20g, 0.70mmol)和叔-丁基(2,2,2-三氟-1-(吡咯烷-3-基)乙基)氨基甲酸酯(0.28g, 1.05mmol)进行类似程序以给出标题化合物(0.29g)。MS  $m/z$  519.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0301] 中间体9

[0302] 3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-(4-氨基-4-(三氟甲基)哌啶-1-基)吡嗪-2-胺



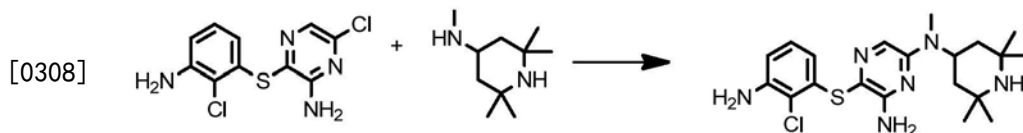
[0304] 步骤a: 在室温下,向叔-丁基4-氨基-4-(三氟甲基)哌啶-1-甲酸酯(0.50g, 1.86mmol)在二噁烷(6mL)和MeOH(1mL)中的悬浮液中添加在二噁烷(9.32mmol, 2.3mL)中的4M HCl。在室温下搅拌16h后,将反应混合物在减压下浓缩为白色固体(0.43g),为双-HCl盐。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ ppm 9.40-9.01 (m, 2H), 4.16 (br. s, 3H), 3.48 (d, J=11.5Hz, 2H), 3.31 (d, J=12.1Hz, 2H), 2.16 (t, J=10.9Hz, 2H), 1.99 (d, J=14.1Hz, 2H)。

[0305] 步骤b: 如针对中间体2所述,使用3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺二盐酸化物(0.23g, 0.80mmol)和4-(三氟甲基)哌啶-4-胺(0.25g)进行类似程序以给出标题化合物(0.32g)。MS  $m/z$  419.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0306] 中间体10

[0307] 5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-N<sup>2</sup>-甲基-N<sup>2</sup>-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)吡嗪-2,

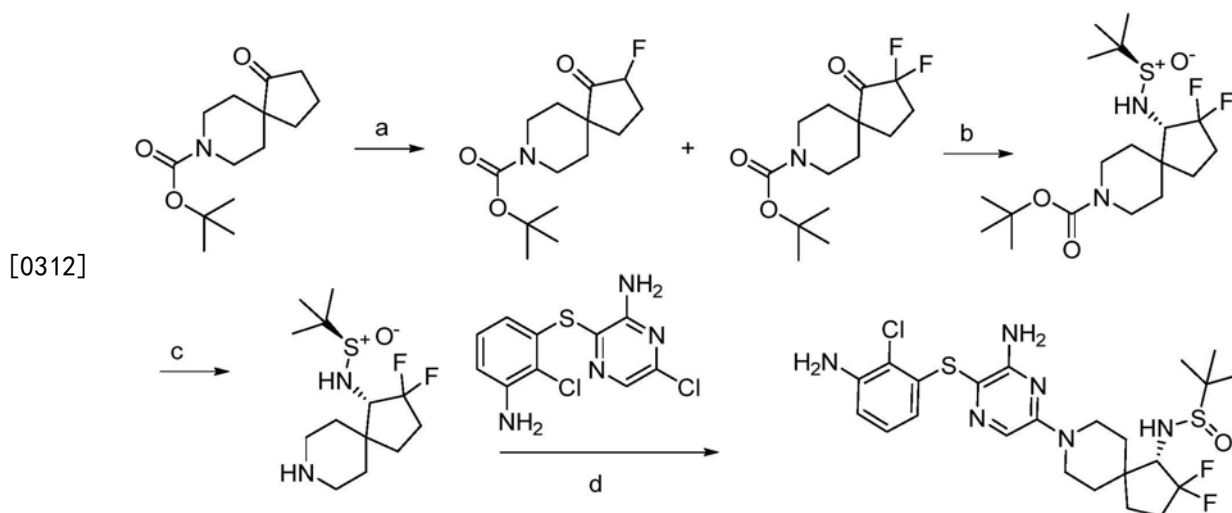
## 6-二胺



[0309] 如针对中间体1所述,使用3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.29g, 1.00mmol)和N,2,2,6,6-戊甲基哌啶-4-胺(0.51g)进行类似程序以给出作为HCl盐的标题化合物(0.48g)。MS  $m/z$  421.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0310] 中间体11

[0311] N-((S)-8-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-2,2-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺



[0313] 步骤a:向NaHMDS(1M于THF中,8.68mL,8.68mmol)的-78℃溶液中添加叔-丁基1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(2.0g,7.89mmol)在THF(5mL)中的溶液。在该温度搅拌30min后,添加N-氟苯磺酰胺(2.49g,7.89mmol)在THF(10mL)中的溶液。在-78℃搅拌3h后,将混合物用饱和水性NaHCO<sub>3</sub>(100mL)稀释并用DCM(3x100mL)萃取。将合并的有机相用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并在减压下浓缩。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-25%EtOAc/庚烷)纯化以给出外消旋叔-丁基2-氟-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(351mg, 1.29mmol)。MS  $m/z$  272.1 (M+H)<sup>+</sup>。将二氟酮与起始材料共洗脱。通过二氧化硅色谱(0-5% MeOH/DCM)再次纯化二氟酮/起始材料的合并的共洗脱的级分以给出叔-丁基2,2-二氟-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(573mg)。MS  $m/z$  290.1 (M+H)<sup>+</sup>。

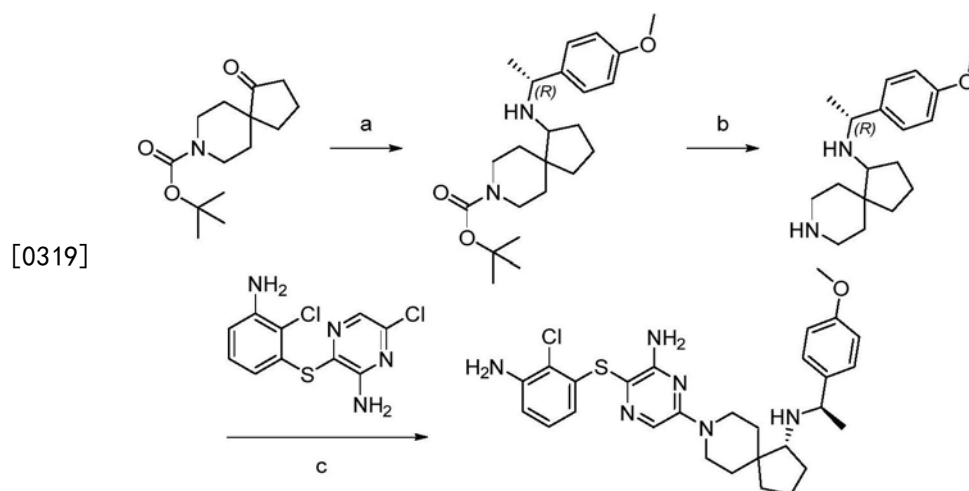
[0314] 步骤b:向含有在THF(4mL)中的叔-丁基2,2-二氟-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(224mg,0.774mmol)的10mL微波小瓶中添加固体(R)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(188mg,1.55mmol),接着添加净四乙氧基钛(0.649mL,3.1mmol)。将反应容器加盖并在90℃加热1h。冷却反应混合物(0℃)并将LiBH<sub>4</sub>(34mg,1.6mmol)直接添加到THF溶液中。将反应混合物搅拌30min,然后通过缓慢添加MeOH进行淬灭,直至发泡停止。将反应混合物用过量MeOH稀释,然后在减压下伴随进一步添加MeOH进行浓缩。将混合物用盐水稀释(伴随超声处理)并用EtOAc(4×10mL)萃取,并将有机物减压浓缩。硅胶快速色谱(0-50%EtOAc/庚烷)提供呈无色油状物的叔-丁基(S)-1-((R)-叔-丁基亚磺酰基)氨基)-2,2-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯,将其静置结晶(180mg),MS  $m/z$  395.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0315] 步骤c:向叔-丁基(S)-1-((R)-叔-丁基亚磺酰基)氨基)-2,2-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(180mg,0.46mmol)在DCM(2mL)中的冰冷溶液中添加TFA(1mL),并将混合物冷却至0℃持续20min。将混合物在减压下浓缩,再添加三次DCM,并不经进一步纯化使用。MS  $m/z$  295.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0316] 步骤d:向3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(42mg,0.15mmol)和N-((S)-2,2-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(60mg,0.15mmol)在压力管中的混合物中添加DIPEA(0.3mL,1.8mmol)。将管密封并在100℃的油浴中加热16h。冷却至室温后,将反应混合物用盐水和EtOAc稀释,并分离各层。将有机层用水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,并在减压下浓缩。将所得残余物通过二氧化硅色谱(20-100%EtOAc/庚烷)纯化以给出呈棕色油状物的标题化合物(18mg)。MS  $m/z$  545.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0317] 中间体12

[0318] (R)-8-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺



[0320] 步骤a:向叔-丁基1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(1.15g,4.54mmol)和(R)-1-(4-甲氧基苯基)乙胺(961mg,6.36mmol)在DCE(3mL)中的溶液中分批添加氰基硼氢化钠并在室温下搅拌16h。将混合物用饱和水性NaHCO<sub>3</sub>溶液(5mL)稀释并用EtOAc(3x 10mL)萃取。将合并的有机相用盐水洗涤,并且在减压下浓缩。将含有非对映异构体9:1混合物的所得残余物通过二氧化硅色谱(0-20%EtOAc/庚烷)纯化以给出叔-丁基1-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)氨基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(主要非对映异构体;431mg)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ ppm7.18-7.24(m,2H),6.81-6.86(m,2H),3.76(d,J=13.64Hz,1H),3.72(s,3H),3.64-3.70(m,2H),2.65-2.92(m,2H),2.05-2.14(m,1H),1.80-1.91(m,1H),1.65-1.75(m,1H),1.42-1.60(m,4H),1.40(s,9H),1.28-1.35(m,1H),1.20(d,J=6.6Hz,3H),1.09-1.17(m,2H),0.80(d,J=11.4Hz,1H)。MS  $m/z$  389.6 (M+H)<sup>+</sup>。

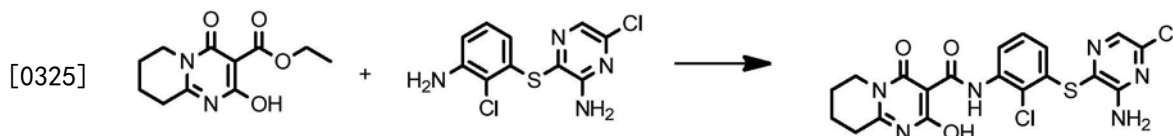
[0321] 步骤b:向叔-丁基1-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)氨基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(主要非对映异构体;431mg,1.11mmol)在DCM(2mL)中的溶液中添加TFA(2mL)并在室温下搅拌10min。伴随进一步添加DCM,在减压下浓缩反应混合物,然后用饱和水性NaHCO<sub>3</sub>稀释。将混合物用DCM(3x 20mL)萃取。将有机物用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并在减压下浓缩以给出N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺,将其不经进一

步纯化即使用。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δppm 7.25 (d, J=8.6Hz, 2H), 6.87 (d, J=8.7Hz, 2H), 3.85-3.78 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.35 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.03 (m, 2H), 2.63 (dd, J=9.6, 7.3Hz, 1H), 2.06-1.85 (m, 2H), 1.83-1.69 (m, 2H), 1.62 (m, 1H), 1.54-1.38 (m, 4H), 1.33 (d, J=6.6Hz, 3H), 1.31-1.23 (m, 1H)。MS m/z 289.5 (M+H)<sup>+</sup>。

[0322] 步骤c: 如针对中间体1所述, 使用3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺 (0.77g, 2.63mmol) 和 (R)-N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺 (0.75g, 2.60mmol) 进行类似程序以给出标题化合物 (0.95g)。MS m/z 539.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0323] 中间体13

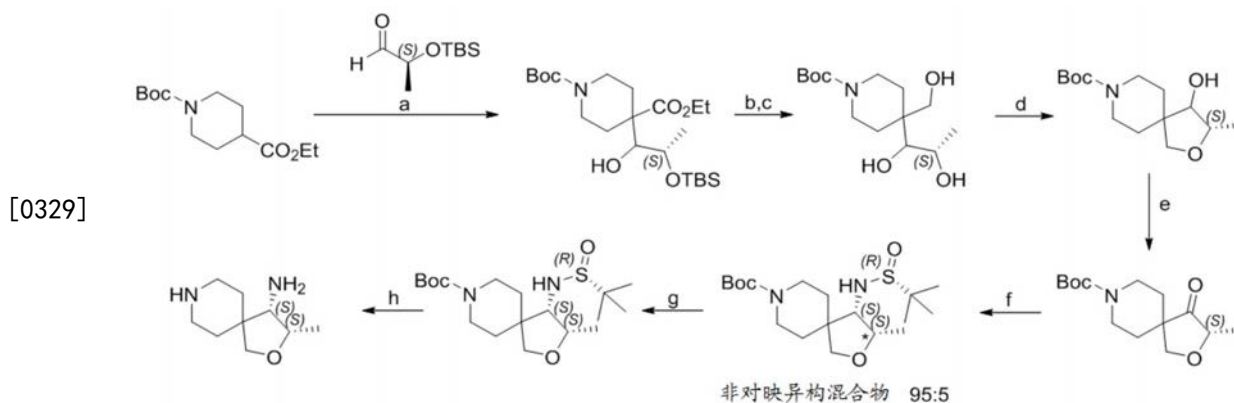
[0324] N-(3-((3-氨基-5-氯吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺



[0326] 将乙基2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酸酯 (1.5g, 5.6mmol) 和3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺 (1.0g, 3.5mmol) 在DMF (10mL) 中的悬浮液在160℃加热2.5h。冷却后, 将该反应混合物在EtOAc和盐水之间分配, 并且分离各层。用水洗涤有机层, 并用另外的EtOAc萃取水性层。将合并的有机层用MgSO<sub>4</sub>进行干燥, 过滤, 并在减压下浓缩。将浓缩物用MeOH研磨以给出作为黄色固体的标题化合物 (1.36g, 90% 纯)。MS m/z 479.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0327] 中间体14

[0328] (3S,4S)-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-胺



[0330] 步骤a: 向二异丙基胺 (23.4mL, 166mmol) 在THF (220mL) 中的-10℃溶液中滴加nBuLi (2.5M于己烷中, 64.1mL, 160mmol)。搅拌30min后, 滴加在THF (50mL) 中的1-叔-丁基4-乙基哌啶-1,4-二甲酸酯 (27.5g, 107mmol), 并将所得混合物在0℃搅拌30min。添加(S)-2-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)丙醛 (20.47mL, 102mmol) 并将混合物在0℃搅拌1h并在室温下搅拌1h。将反应混合物用饱和水性NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:4, 125mL) 稀释, 添加EtOAc (50mL), 并分离各相。将水相进一步用EtOAc (3×100mL) 萃取。将合并的有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、过滤并将溶剂在减压下去除。将所得残余物不经进一步纯化而用于下一步骤。MS m/z 346.4 (M+H-Boc)<sup>+</sup>。

[0331] 步骤b: 向粗1-叔-丁基4-乙基4-((2S)-2-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-羟

基丙基)哌啶-1,4-二甲酸酯(95g,214mmol)在THF(600mL)中的溶液中分批添加LiBH<sub>4</sub>(7.0g,321mmol)并将所得混合物在室温下搅拌16h。冷却至0℃后,添加饱和水性NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O(1:2,150mL)并剧烈搅拌所得混合物,直至发泡停止。添加EtOAc(100mL),过滤混合物,分离各相,并用EtOAc(3x 50mL)萃取水相。将合并的有机相用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并将挥发物在减压下去除以给出叔-丁基4-((2S)-2-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-羟基丙基)-4-(羟基甲基)哌啶-1-甲酸酯(64.8g),将其不经进一步纯化而用于下一步骤。

[0332] 步骤c:将叔-丁基4-((2S)-2-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-羟基丙基)-4-(羟基甲基)哌啶-1-甲酸酯(64.8g,161mmol)和TBAF(1M在THF中,242mL,242mmol)在THF(500mL)中的溶液在室温下搅拌2h。添加饱和水性NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O(1:2,150mL),分离各相,并且将水相用EtOAc(3x 100mL)进一步萃取。将合并的有机相用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(20%-100%EtOAc/庚烷)纯化以给出呈半固体无色油状物的叔-丁基4-((2S)-1,2-二羟基丙基)-4-(羟基甲基)哌啶-1-甲酸酯(39.25g)。

[0333] 步骤d:向NaH(10.60g,424mmol)在THF(600mL)中的0℃悬浮液中滴加叔-丁基4-((2S)-1,2-二羟基丙基)-4-(羟基甲基)哌啶-1-甲酸酯(35.06g,121mmol)和TsCl(23.10g,121mmol)在THF(200mL)中的溶液。在0℃,将所得混合物搅拌1h。在-20℃缓慢添加饱和水性NH<sub>4</sub>Cl(约5mL),并剧烈搅拌反应混合物,直至发泡停止。添加饱和水性NH<sub>4</sub>Cl(100mL),接着添加盐水(100mL),并将该混合物用EtOAc(3x 100mL)萃取。将合并的有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、过滤,并且在减压下浓缩,以给出(3S)-叔-丁基4-羟基-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(32.19g),将其不经进一步纯化而用于下一步骤。MS m/z171.1(M-Boc)<sup>-</sup>。

[0334] 步骤e:将(3S)-叔-丁基4-羟基-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(32.19g,119mmol)和戴斯-马丁过碘烷(67.4g,154mmol)在DCM(300mL)中的溶液在0℃搅拌2h。升温至室温后,减压除去挥发物,并通过二氧化硅色谱(0-40%EtOAc/庚烷)纯化所得残余物以给出呈淡黄色油状物的(S)-叔-丁基3-甲基-4-氧代-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(27.68g)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)δppm 4.09(d,J=9.60Hz,1H),3.66-3.86(m,4H),3.03(ddd,J=13.8,9.7,3.8Hz,1H),2.90(ddd,J=13.6,10.2,3.4Hz,1H),1.68(ddd,J=13.8,9.9,4.3Hz,1H),1.41-1.59(m,2H),1.30-1.40(m,10H),1.20-1.25(m,3H)。

[0335] 步骤f:将(3S)-叔-丁基3-甲基-4-氧代-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(22.52g mg,84mmol)、乙醇钛(IV)(70.1mL,334mmol)和(R)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(21g,173mmol)在THF(300mL)中的溶液在90℃搅拌21h。冷却至-4℃后,添加MeOH(30mL),接着滴加(保持反应温度低于2℃)硼氢化锂(1.82g,84mmol)并将所得混合物在-4℃搅拌1h。缓慢添加饱和水性NH<sub>4</sub>Cl,接着添加EtOAc(500mL)。将所得混合物在室温下剧烈搅拌15min,并且然后通过Celite垫(EtOAc)过滤。减压除去挥发物,并通过二氧化硅色谱(0-100%EtOAc/庚烷)纯化所得残余物以给出(3S,4S)-叔-丁基4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯,其为95:5非对映异构体混合物(次要非对映异构体(3R,4S)-叔-丁基4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯)。

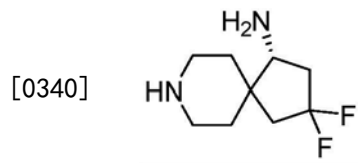
[0336] 步骤g:将非对映异构体通过如下手性SFC进行分离:柱LC-4 30x250mm,流速:100g/分钟,流动相:30%MeOH于CO<sub>2</sub>中,检测:225nm,R<sub>t</sub>:0.95min(次要非对映异构体R<sub>t</sub>:

0.55min),以给出(3S,4S)-叔-丁基4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(19g)。MS  $m/z$  375.2。

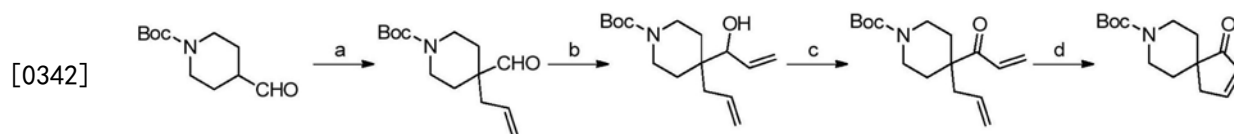
[0337] 步骤h:将(3S,4S)-叔-丁基4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(51mg,0.136mmol)和HCl(4M于二噁烷中,340 $\mu$ L,1.362mmol)在MeOH(5mL)中的混合物在40 $^{\circ}$ C搅拌1h。冷却至室温后,减压下除去挥发物以给出(3S,4S)-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-胺,将其不经进一步纯化而用于下一步骤。MS  $m/z$  171.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0338] 中间体15

[0339] (R)-3,3-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺



[0341] 叔-丁基1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸-2-烯-8-甲酸酯



[0343] 步骤a:将叔-丁基4-甲酰基哌啶-1-甲酸酯(35.0g,164mmol)、叔-丁氧基锂(15.77g,197mmol)和烯丙基溴(11.54mL,189mmol)在DMF(328mL)中的混合物在0 $^{\circ}$ C搅拌1h。将混合物倒入含有饱和水性NH<sub>4</sub>Cl/H<sub>2</sub>O(1:1,500mL)的分液漏斗中并用Et<sub>2</sub>O(5x 50mL)萃取。将合并的有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-25%EtOAc/庚烷)纯化以给出呈无色油状物的叔-丁基4-烯丙基-4-甲酰基哌啶-1-甲酸酯(24g)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)  $\delta$ ppm 9.52(s,1H),5.53-5.76(m,1H),4.96-5.19(m,2H),3.80(br.s.,2H),2.97(t,J=11.5Hz,2H),2.26(d,J=7.3Hz,2H),1.95(dt,J=13.7,3.1Hz,2H),1.38-1.58(m,11H)。

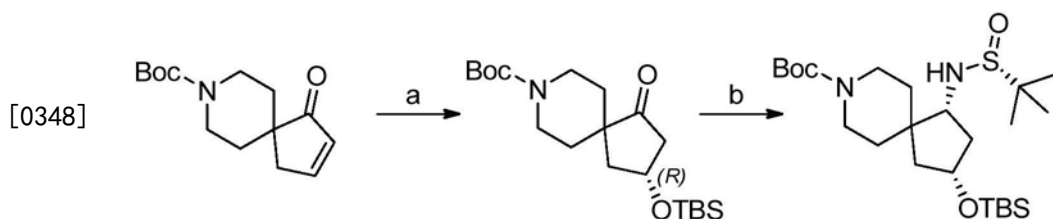
[0344] 步骤b:在N<sub>2</sub>下,向叔-丁基4-烯丙基-4-甲酰基哌啶-1-甲酸酯(24g,95mmol)在THF(300mL)中的-78 $^{\circ}$ C溶液中添加乙烯基溴化镁(1M于THF中,118mL,118mmol)。将所得溶液在1h内缓慢升温至室温。将混合物倒入含有饱和水性NH<sub>4</sub>Cl(250mL)的分液漏斗中并用EtOAc(4x 50mL)萃取。将合并的有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除,以给出呈无色油状物的叔-丁基4-烯丙基-4-(1-羟基烯丙基)哌啶-1-甲酸酯(26.7g,95mmol)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)  $\delta$ ppm 9.52(s,1H),5.56-5.75(m,1H),5.05-5.18(m,2H),3.80(br.s.,2H),2.97(t,J=11.5Hz,2H),2.26(d,J=7.3Hz,2H),1.96(dt,J=13.8,3.1Hz,2H),1.49-1.60(m,2H),1.41-1.49(m,9H)。将该化合物不经进一步纯化用于下一步骤中。

[0345] 步骤c:将叔-丁基4-烯丙基-4-(1-羟基烯丙基)哌啶-1-甲酸酯(26.7g,95mmol)和戴斯-马丁过碘烷(44.3g,105mmol)在DCM(380mL)中的混合物在室温下搅拌1h。将混合物倒入含有饱和水性NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(1:1,300mL)的分液漏斗中并用DCM(4x 50mL)萃取。将合并的有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得固体悬浮在庚烷(250mL)中并超声处理5min。将白色悬浮液通过Celite垫过滤并将挥发物在减压下去除,以给出呈黄色油状物的叔-丁基4-丙烯酰基-4-烯丙基哌啶-1-甲酸酯(26.5g)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-

d)  $\delta_{\text{ppm}}$  6.81 (dd,  $J=16.9, 10.4\text{Hz}$ , 1H), 6.40 (dd,  $J=16.8, 1.9\text{Hz}$ , 1H), 5.71 (dd,  $J=10.4, 2.0\text{Hz}$ , 1H), 5.46-5.66 (m, 1H), 4.91-5.14 (m, 2H), 3.78 (br. s., 2H), 2.96 (br. s., 2H), 2.25-2.39 (m, 2H), 1.97-2.15 (m, 2H), 1.37-1.57 (m, 11H)。将该化合物不经进一步纯化用于下一步骤中。

[0346] 步骤d: 向叔-丁基4-丙烯酰基-4-烯丙基哌啶-1-甲酸酯 (26.5g, 95mmol) 在甲苯 (脱气的, 850mL) 中的溶液中添加在甲苯 (脱气的, 100mL) 中的 Grubbs II 催化剂 (2.02g, 2.38mmol)。将所得混合物在 85°C 搅拌 45min。减压除去溶剂, 并通过二氧化硅色谱 (0-40% EtOAc/庚烷) 纯化所得残余物以给出呈棕色固体的叔-丁基1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸-2-烯-8-甲酸酯 (20.76g, 83mmol)。将该化合物和 DDQ (565mg, 2.49mmol) 在甲苯 (540mL) 中的溶液在室温下搅拌 15min。将所得红色溶液通过 Celite 垫过滤。添加炭 (200g), 并将所得悬浮液在室温下搅拌 2h。将混合物通过 Celite 垫过滤, 并在减压下除去挥发物。将所得残余物通过二氧化硅色谱 (0-40% EtOAc/庚烷) 纯化以给出呈白色固体的叔-丁基1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸-2-烯-8-甲酸酯 (15.6g)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta_{\text{ppm}}$  7.63-7.74 (m, 1H), 6.20 (dt,  $J=5.8, 2.2\text{Hz}$ , 1H), 3.99-4.25 (m, 2H), 2.92 (t,  $J=11.6\text{Hz}$ , 2H), 2.63 (s, 2H), 1.72-1.86 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.29 (d,  $J=12.9\text{Hz}$ , 2H)。

[0347] (1R, 3R)-叔-丁基3-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯



[0349] 步骤a: 将 Cu(I)Cl (142mg, 1.432mmol)、(S)-TolBINAP (972mg, 1.432mmol)、和叔-丁氧钠 (138mg, 1.432mmol) 在 THF (60mL) 中的混合物在室温下搅拌 30min。添加在 THF (20mL) 中的 B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub> (13.34g, 52.5mmol) 并将所得混合物在室温下搅拌 10min。添加在 THF (50mL) 中的叔-丁基1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸-2-烯-8-甲酸酯 (12.0g, 47.7mmol), 接着添加 MeOH (3.9mL, 95mmol)。将所得混合物在室温下搅拌 16h。添加 H<sub>2</sub>O (150mL), 接着添加过硼酸钠 (36.7g, 239mmol) 并将所得混合物在室温下剧烈搅拌 1h。将所得绿色悬浮液通过 Celite 垫过滤, 倒入含有饱和水性 NaHCO<sub>3</sub>/饱和水性 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (1:1, 300mL) 的分液漏斗中并用 EtOAc (4x 40mL) 萃取。将合并的有机相经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并将挥发物在减压下去除以给出粗 (R)-叔-丁基3-羟基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯。该混合物的对映体测定显示 90% ee (R<sub>t</sub> (S): 1.59min, R<sub>t</sub> (R): 1.80min; 手性 SFC; 柱: IA 4.6×100mm, 流速: 70g/分钟, 流动相: 5%-55% MeOH 于 CO<sub>2</sub> 中, 检测: 220nm UV)。

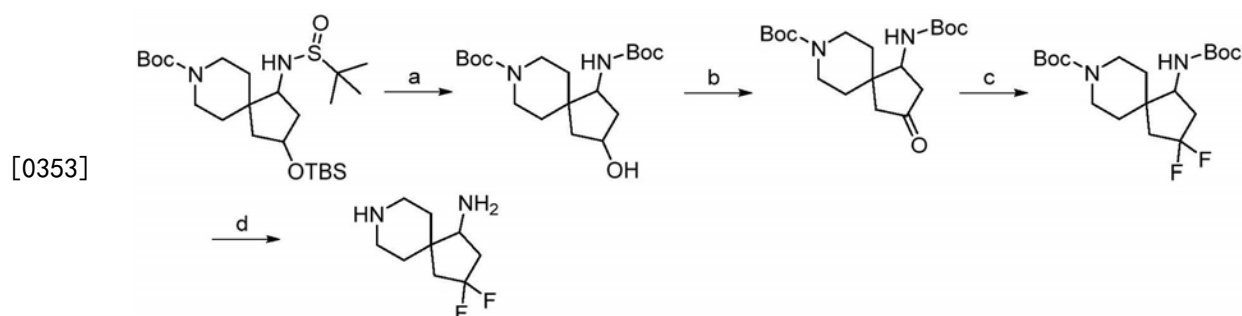
[0350] 将 (R)-叔-丁基3-羟基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯粗产品 (理论上 47.7mmol)、咪唑 (4.87g, 71.6mmol)、和 TBSCl (8.99g, 59.6mmol) 在 DMF (120mL) 中的混合物在室温下搅拌 16h。将反应混合物倒入含有饱和水性 NH<sub>4</sub>Cl/H<sub>2</sub>O (1:1, 250mL) 的分液漏斗中并用 Et<sub>2</sub>O (5x 50mL) 萃取。将合并的有机相经 MgSO<sub>4</sub> 干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱 (0-30% EtOAc/庚烷) 纯化以给出呈无色油状物的 (R)-叔-丁基3-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯 (13.11g), 将



其静置固化。

[0351] 步骤b: 将(R)-叔-丁基3-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(8g, 20.86mmol)、乙醇钛(IV)(17.49mL, 83.0mmol)、和(R)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(5.06g, 41.7mmol)在THF(100mL)中的溶液在65℃搅拌16h。冷却至-78℃后, 添加MeOH(15mL), 接着添加硼氢化锂(1.363g, 62.6mmol)。在-78℃, 将所得混合物搅拌16h。缓慢添加饱和水性NH<sub>4</sub>Cl以淬灭过量的硼氢化物, 接着添加EtOAc(100mL)。将所得混合物剧烈搅拌15min, 并且然后通过Celite垫过滤。减压除去挥发物, 并通过二氧化硅色谱(0-100%EtOAc/庚烷)纯化所得残余物以给出呈白色固体的(1R, 3R)-叔-丁基3-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(5.3g)。MS m/z 489.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0352] 3,3-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺



[0354] 步骤a: 将叔-丁基3-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-((1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(365mg, 0.746mmol)和HCl(4M于二噁烷中, 1.86mL, 7.46mmol)在MeOH(4mL)中的混合物在40℃搅拌1h。冷却至室温后, 将挥发物在减压下去除以给出白色固体。MS m/z 171.1 (M+H)<sup>+</sup>。将该残基、DIPEA(2.6mL, 14.92mmol)和Boc<sub>2</sub>O(407mg, 1.865mmol)在THF(15mL)中的混合物在室温下搅拌16h。将混合物倒入含有饱和水性NH<sub>4</sub>Cl的分液漏斗中并用Et<sub>2</sub>O(5x 10mL)萃取。将合并的有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(10%-80%EtOAc/庚烷)纯化以给出叔-丁基1-((叔-丁氧基羰基)氨基)-3-羟基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(275mg, 0.742mmol)。MS m/z 271.3 (M+H-Boc)<sup>+</sup>。

[0355] 步骤b: 将叔-丁基1-((叔-丁氧基羰基)氨基)-3-羟基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(275mg, 0.742mmol)和戴斯-马丁过碘烷(472mg, 1.113mmol)在DCM(7.5mL)中的混合物在0℃搅拌2h。将混合物倒入含有饱和水性NaHCO<sub>3</sub>的分液漏斗中并用DCM(3x 10mL)萃取。将合并的有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(5%-75%EtOAc/庚烷)纯化以给出叔-丁基1-((叔-丁氧基羰基)氨基)-3-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(135mg)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 4.57(d, J=9.1Hz, 1H), 4.16(d, J=8.1Hz, 1H), 3.89-4.08(m, 2H), 2.77-2.93(m, 2H), 2.71(dd, J=19.0, 8.1Hz, 1H), 2.50(d, J=18.2Hz, 1H), 2.07-2.24(m, 2H), 1.76(td, J=12.8, 4.7Hz, 1H), 1.58-1.70(m, 1H), 1.42-1.53(m, 18H), 1.25-1.38(m, 1H)。

[0356] 步骤c: 将叔-丁基1-((叔-丁氧基羰基)氨基)-3-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(95mg, 0.258mmol)和DeoxoFluor(190μL, 1.031mmol)在DCM(1mL)中的混合物在50℃搅拌48h。将混合物倒入含有饱和水性NaHCO<sub>3</sub>/冰的分液漏斗中并用EtOAc(3x 5mL)萃取。将合

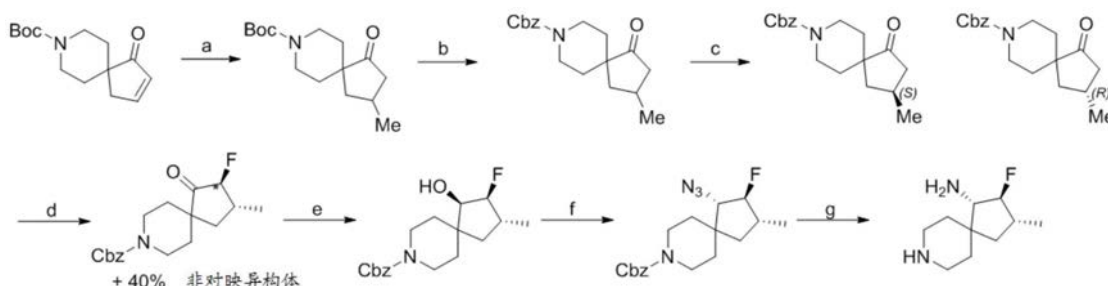
并的有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-30%EtOAc/庚烷)纯化以给出叔-丁基1-((叔-丁氧基羰基)氨基)-3,3-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(52mg,0.133mmol)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d) δppm 4.55(d,J=9.4Hz,1H),3.78-4.02(m,3H),2.64-2.86(m,2H),2.38-2.59(m,1H),2.10-2.32(m,1H),1.79-2.10(m,2H),1.58(qd,J=12.7,3.8Hz,1H),1.27-1.52(m,21H)。

[0357] 使用手性纯的(1R,3R)-叔-丁基3-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-1-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯作为起始材料,使用上述程序或对上述程序的改良合成叔-丁基(R)-1-((叔-丁氧基羰基)氨基)-3,3-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯。

[0358] 步骤d:向叔-丁基(R)-1-((叔-丁氧基羰基)氨基)-3,3-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(252mg,0.644mmol)在1,4-二噁烷(4mL)中的悬浮液中添加HCl(1.6mL,4M于1,4-二噁烷中)。将溶液在室温下搅拌16h,并且然后在减压下浓缩为白色固体。在小锥形瓶中,将Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(400mg)溶于2mL水中,并添加粗固体并搅拌直到发生溶解。将溶液转移至分液漏斗中,用6mL的CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH(20%于DCM中)稀释,并将混合物剧烈震荡。顶部水性层的pH是碱性的(约10)。分离各层并将水性层用DCM(20%三氟乙醇,8mL)萃取3次。将合并的有机萃取物干燥并减压浓缩成棕色半固体,将其不经进一步纯化用于下一步骤。MS 191.2m/z(M+H)<sup>+</sup>。

[0359] 中间体16

[0360] (1S,2S,3R)-2-氟-3-甲基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺



[0362] 步骤a:向在N<sub>2</sub>下的叔-丁基1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸-2-烯-8-甲酸酯(4.2g,16.71mmol)和在Et<sub>2</sub>O(100mL)中的Cu(I)I(6.37g,33.4mmol)的0℃悬浮液中添加MeLi(1.6M于THF中,31.3mL,50.1mmol)。在0℃搅拌90min后,将混合物倒入含有饱和水性NH<sub>4</sub>Cl的分液漏斗中并用EtOAc(3x15mL)萃取。将合并的有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-50%EtOAc/庚烷)纯化以给出呈无色油状物的叔-丁基3-甲基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸-2-烯-8-甲酸酯(4.23g)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d) δppm 3.89-4.00(m,1H),3.83(d,J=13.4Hz,1H),3.11(ddd,J=13.6,10.4,3.3Hz,1H),2.99(ddd,J=13.6,10.4,3.5Hz,1H),2.47-2.59(m,1H),2.19-2.36(m,2H),1.74-1.97(m,2H),1.50-1.65(m,2H),1.48(s,9H),1.33-1.44(m,2H),1.17(d,J=6.3Hz,3H)。

[0363] 步骤b:将叔-丁基3-甲基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸-2-烯-8-甲酸酯(4.23g,15.82mmol)和TFA(17mL)在DCM(80mL)中的混合物在室温下搅拌30min。将挥发物在减压下去除。将所得残余物、DIPEA(13.82mL,79mmol)和氯甲酸苄酯(3.39mL,23.73mmol)在DCM(80mL)中的混合物在室温下搅拌16h。将混合物倒入含有饱和水性NH<sub>4</sub>Cl的分液漏斗中并用DCM(3x25mL)萃取。将合并的有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-40%EtOAc/庚烷)纯化以给出呈淡黄色油状物的苄基3-甲基-

1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(4.58g)。MS  $m/z$  302.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0364] 步骤c:将苄基3-甲基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(4.58g,15.20mmol)通过如下手性SFC进一步纯化:柱:IA 21x 250mm,流速:70g/min,流动相:45% (9:1EtOH/MeCN)于CO<sub>2</sub>中,检测:220nm UV,以给出(R)-苄基3-甲基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(2.02g,6.70mmol), $R_t$ :2.0min;和(S)-苄基3-甲基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(2.11g,7.0mmol), $R_t$ :3.6min。

[0365] 步骤d:将LiHMDS溶液(1M于THF中,8.87mL,8.87mmol)添加到THF(36mL)中。将溶液冷却至-78℃,然后在-78℃将(R)-苄基3-甲基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(2.43g,8.06mmol)在THF(12mL)中的溶液添加到上述溶液中。将所得混合物在-78℃搅拌30min。在-78℃滴加N-氟-N-(苯基磺酰基)苯磺酰胺(2.80g,8.87mmol)的溶液,并将所得溶液在-78℃搅拌30min。向该溶液中添加水和饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液的1:1的混合物(20mL)并将混合物升温至室温。将溶液用EtOAc(3x)萃取,并且将合并的有机相用盐水洗涤。将有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-50%EtOAc/庚烷)纯化以给出(2S,3R)-苄基2-氟-3-甲基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(1.89g,含有40%的非对映异构体)。MS  $m/z$  320.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0366] 步骤e:在-78℃,向(2S,3R)-苄基2-氟-3-甲基-1-氧代-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(1.89g,5.92mmol,含有40%的非对映异构体)在THF/MeOH(9:1,20mL)中的溶液中添加四氢硼酸锂溶液(2M于THF中,11.84mL,23.67mmol)。将所得混合物在-78℃搅拌30min。向溶液中缓慢添加饱和水性NH<sub>4</sub>Cl并升温至室温。将溶液用EtOAc(3x)萃取,并且将合并的有机相用盐水洗涤。将有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-50%EtOAc/庚烷)纯化以给出(1R,2S,3R)-苄基2-氟-1-羟基-3-甲基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(970mg)。MS  $m/z$  322.2 (M+H)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,甲醇-d<sub>4</sub>) $\delta$ ppm 7.37-7.28(m,5H),5.10(s,2H),4.47(dt,J=54.4,4.7Hz,1H),3.86(d,J=12.9Hz,2H),3.65(dd,J=18.0,4.7Hz,1H),3.20-3.03(m,2H),2.39-2.21(m,1H),2.20-2.10(m,1H),1.75-1.60(m,2H),1.45(d,J=13.4Hz,1H),1.29(d,J=13.1Hz,1H),1.08(d,J=7.1Hz,3H),0.96(dd,J=13.3,8.5Hz,1H)。

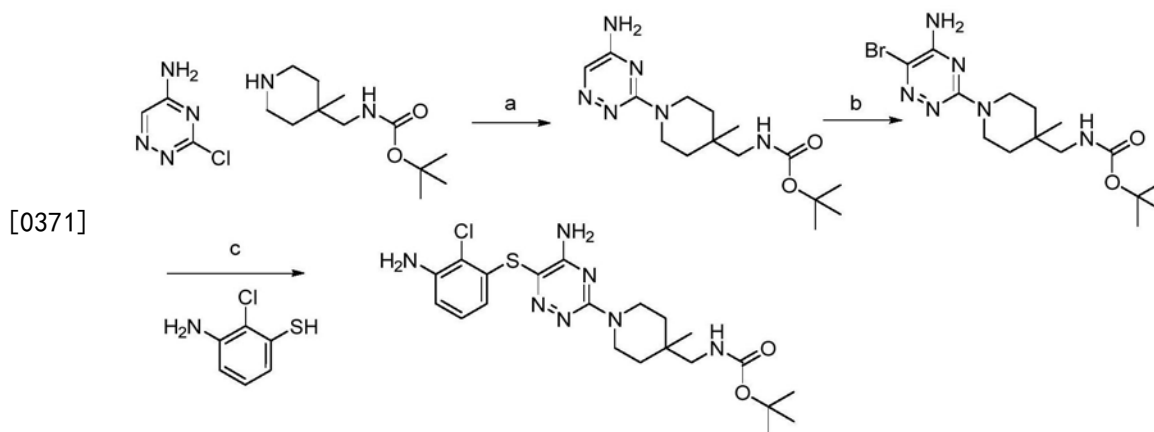
[0367] 步骤f:向苄基(1R,2S,3R)-2-氟-1-羟基-3-甲基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(760mg,2.365mmol)在THF(16.5mL)中的溶液中添加三苯基膦(744mg,2.85mmol)和DIAD(0.557mL,2.84mmol)。将所得混合物在0℃搅拌20min。向反应混合物中添加叠氮磷酸二苯酯(0.787mL,3.55mmol)。将反应混合物升温至室温并在室温下搅拌18h。将反应混合物倒入含有EtOAc(30mL)的分液漏斗中。将有机相用饱和水性NH<sub>4</sub>Cl和盐水洗涤。将有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并将挥发物在减压下去除。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-50%EtOAc/庚烷)纯化以给出苄基(1S,2S,3R)-1-叠氮-2-氟-3-甲基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(432mg)。MS  $m/z$  347.2 (M+H)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d) $\delta$ ppm 7.43-7.31(m,5H),5.15(s,2H),4.48(dt,J=54.4,7.5Hz,1H),3.93(s,2H),3.61(dd,J=16.1,6.9Hz,1H),3.13-2.95(m,2H),2.31-2.13(m,1H),1.96(dd,J=13.1,9.3Hz,1H),1.81-1.64(m,2H),1.47(s,1H),1.32-1.19(m,2H),1.16(d,J=6.7Hz,3H)。

[0368] 步骤g:将Pd/C(10%wt,65mg)和苄基(1S,2S,3R)-1-叠氮-2-氟-3-甲基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(423mg,1.221mmol)在EtOH(12.2mL)中的悬浮液在H<sub>2</sub>气氛(气囊)下刷

烈搅拌16h。将反应混合物通过Celite垫过滤,并在减压下除去挥发物以给出(1S,2S,3R)-2-氟-3-甲基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺(235mg)。MS  $m/z$  187.2 (M+H)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$ ppm 4.15 (dt, J=55.5, 8.1Hz, 1H), 2.95 (dt, J=12.5, 3.7Hz, 2H), 2.87 (dd, J=16.6, 8.0Hz, 1H), 2.74 (tdd, J=12.4, 7.3, 2.8Hz, 2H), 2.19-2.02 (m, 1H), 1.95 (dd, J=13.4, 8.4Hz, 1H), 1.71-1.48 (m, 4H), 1.34-1.23 (m, 3H), 1.18-1.09 (m, 4H)。

[0369] 中间体17

[0370] 叔-丁基((1-(5-氨基-6-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯



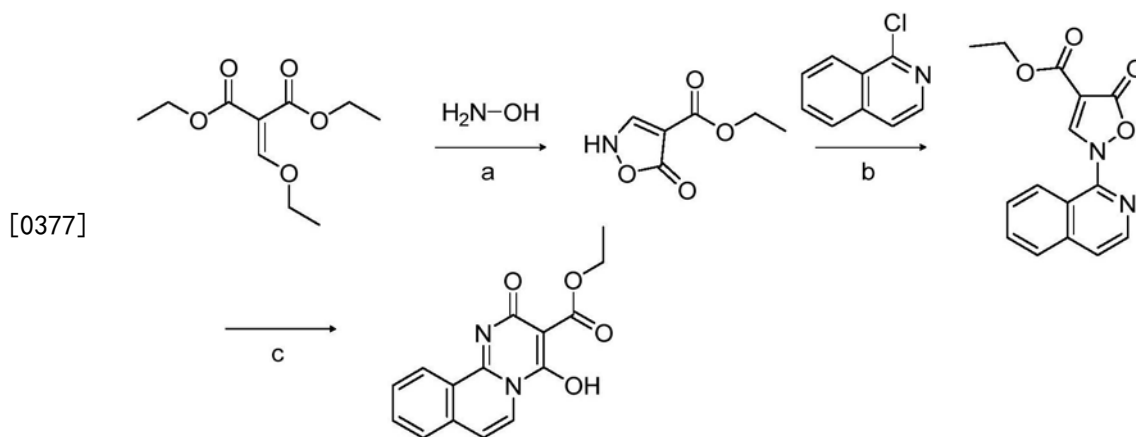
[0372] 步骤a:将3-氯-1,2,4-三嗪-5-胺(1.3g, 9.96mmol)、叔-丁基((4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(2.7g, 11.82mmol)和N-甲基吗啉(3.3mL, 30.0mmol)在NMP(20mL)中的溶液在密封的玻璃反应器中加热至130℃持续2h。冷却后,用EtOAc(250mL)稀释该反应混合物,用水和盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤、并减压浓缩。将浓缩物通过二氧化硅色谱(0-50% EtOAc/DCM)纯化以给出叔-丁基((1-(5-氨基-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(2.43g)。MS  $m/z$  323.5 (M+H)<sup>+</sup>。

[0373] 步骤b:在0℃,向叔-丁基((1-(5-氨基-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(2.4g, 7.44mmol)在氯仿(100mL)中的悬浮液中添加N-溴代琥珀酰亚胺(1.5g, 8.53g)。1h后,在0℃,减压浓缩反应混合物,溶于温热的DCM(50mL)中,用EtOAc(300mL)稀释,用5%水性K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液、水和盐水洗涤。将有机物用MgSO<sub>4</sub>进行干燥、过滤、并在减压下浓缩。二氧化硅色谱(0-10%MeOH/DCM)提供叔-丁基((1-(5-氨基-6-溴-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(2.88g)。MS  $m/z$  401.5 (M+H)<sup>+</sup>。

[0374] 步骤c:将3-氨基-2-氯苯硫酚盐酸盐(1.71g, 8.72mmol)、叔-丁基(1-(5-氨基-6-溴-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(2.80g, 6.98mmol)、Cu(I)I(0.27g, 1.40mmol)、TMEDA(4.21mL, 27.9mmol)在二噁烷(30mL)中的混合物在微波反应器中在125℃辐射2h。冷却后,将反应混合物用DCM/MeOH(9:1, 100mL)稀释,并通过Celite塞过滤。将滤液减压浓缩,重悬于EtOAc(200mL)中,用水和盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压浓缩。将浓缩物通过二氧化硅色谱(0-50%EtOAc/庚烷)纯化为标题化合物(3.29g)。MS  $m/z$  480.4 (M+H)<sup>+</sup>。

[0375] 中间体18

[0376] 乙基4-羟基-2-氧代-2H-嘧啶并[2,1-a]异喹啉-3-甲酸酯



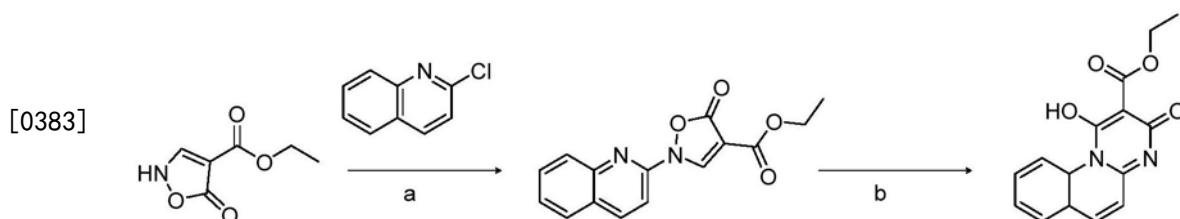
[0378] 步骤a:向盐酸羟胺(5.2g,75mmol)在EtOH/水(3:2,20mL)中的悬浮液中添加经研磨的KOH(4.2g,75mmol)。在室温下搅拌1h后,将悬浮液冷却至0℃并过滤以除去沉淀的KCl。在0℃,向滤液中滴加溶于EtOH(4mL)中的二乙基(2-乙氧基亚甲基)丙二酸酯(5.4g,25mmol)溶液。将反应混合物在室温下搅拌过夜,并且然后加热至75℃持续2h。在冷却至50℃后,用浓HCl(25mL)酸化反应混合物,并在50℃搅拌2h。减压浓缩反应混合物至其原始体积的一半,并通过过滤收集所得沉淀物并干燥,以给出呈白色粉末的乙基5-氧代-2,5-二氢异噁唑-4-甲酸酯(3.5g)。MS  $m/z$  158.0 (M+H)<sup>+</sup>。

[0379] 步骤b:在100℃,将1-氯异喹啉(0.82g,5.0mmol)和乙基5-氧代-2,5-二氢异噁唑-4-甲酸酯(0.79g,5.0mmol)在EtOH(20mL)中的悬浮液在微波反应器中辐射1h。冷却后,将所得沉淀过滤并干燥。将粗产物溶于在DCM中的5%MeOH(15mL)中并通过二氧化硅色谱(0-20%EtOAc/DCM)纯化以给出乙基2-(异喹啉-1-基)-5-氧代-2,5-二氢异噁唑-4-甲酸酯(0.43g)。MS  $m/z$  285.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0380] 步骤c:在室温下,向乙基2-(异喹啉-1-基)-5-氧代-2,5-二氢异噁唑-4-甲酸酯(0.79g,2.78mmol)在THF(20mL)中的溶液中添加Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.4g,2.8mmol)在水(20mL)中的溶液。将所得两相反应混合物在室温下搅拌3h。除去THF,并将剩余的反应混合物用6M水性HCl酸化至pH 1。将酸化的反应混合物用EtOAc萃取(2x),并将合并的有机层用水和盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并在减压下浓缩。将粗产物溶于EtOAc/DCM(10%)并通过二氧化硅色谱(0-20%EtOAc/DCM)纯化以给出标题化合物(0.43g)。MS  $m/z$  285.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0381] 中间体19

[0382] 乙基1-羟基-3-氧代-6a,10a-二氢-3H-嘧啶并[1,2-a]喹啉-2-甲酸酯



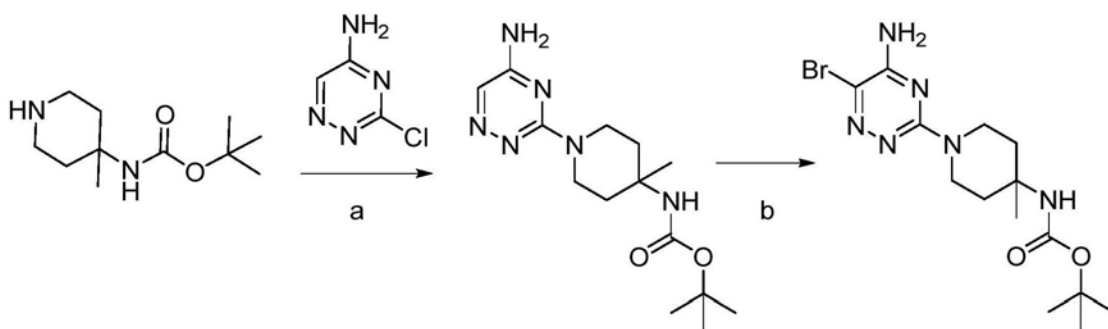
[0384] 步骤a:在100℃,将2-氯异喹啉(0.82g,5.0mmol)和乙基5-氧代-2,5-二氢异噁唑-4-甲酸酯(0.79g,5.0mmol)在EtOH(20mL)中的悬浮液在微波反应器中辐射1h。冷却至室温后,将反应混合物减压浓缩,再次溶解于5%MeOH/DCM(15mL)中并通过二氧化硅色谱(0-20%EtOAc/DCM)纯化以给出0.78g的乙基5-氧代-2-(喹啉-2-基)-2,5-二氢异噁唑-4-甲酸

酯。MS  $m/z$  285.1 (M+H)<sup>+</sup>。

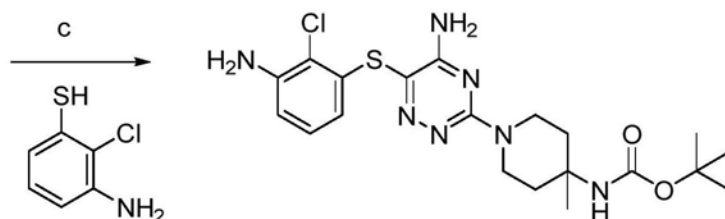
[0385] 步骤b: 向乙基5-氧代-2-(喹啉-2-基)-2,5-二氢异噻唑-4-甲酸酯(0.20g, 0.70mmol)在THF(50mL)中的室温溶液中添加Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.85g, 0.80mmol)在水(5mL)中的溶液。将所得混合物在室温下搅拌3h。减压除去THF,并将反应混合物用2M水性HCl酸化至pH 1。将反应混合物用EtOAc萃取(2x),并将合并的有机层用水和盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并在减压下浓缩。将粗产物溶于5%MeOH/DCM中并通过二氧化硅色谱(0-10%EtOAc/DCM)纯化以给出标题化合物(0.054g)。MS  $m/z$  285.1 (M-H)<sup>+</sup>。

[0386] 中间体20

[0387] 叔-丁基(1-(5-氨基-6-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯



[0388]



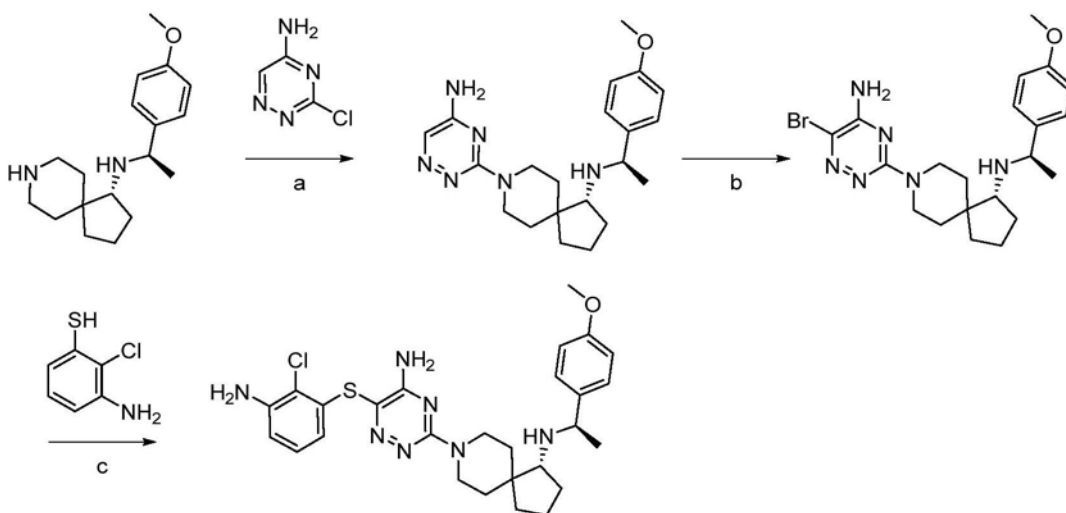
[0389] 步骤a: 如以上针对中间体17所述,使用具有3-氯-1,2,4-三嗪-5-胺(3.0g, 23.0mmol)和叔-丁基(4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(9.9g)的类似程序以给出7.4g。MS  $m/z$  309.4 (M+H)<sup>+</sup>。

[0390] 步骤b: 如针对中间体17所述,使用具有叔-丁基(1-(5-氨基-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(3.8g, 12.3mmol)的类似程序以给出叔-丁基(1-(5-氨基-6-溴-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(3.5g)。MS  $m/z$  389.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0391] 步骤c: 如针对中间体17所述,使用利用3-氨基-2-氯苯硫酚(0.32g, 1.62mmol)和叔-丁基(1-(5-氨基-6-溴-1,2,4-三嗪-3-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.50g, 1.30mmol)的类似程序以给出标题化合物(0.41g)。MS  $m/z$  466.4 (M+H)<sup>+</sup>。

[0392] 中间体21

[0393] (R)-8-(5-氨基-6-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-1,2,4-三嗪-3-基)-N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺



[0394]

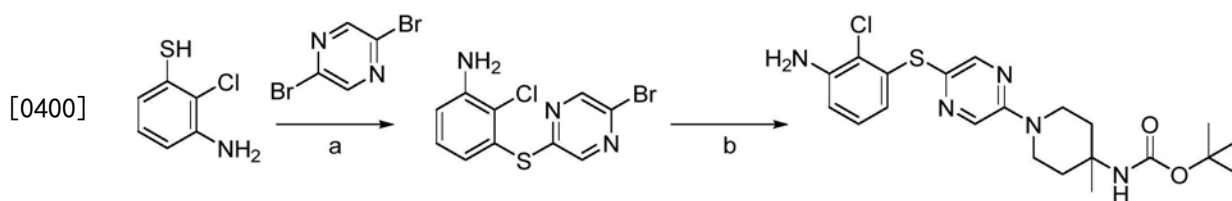
[0395] 步骤a:如针对中间体17所述,使用利用3-氯-1,2,4-三嗪-5-胺(0.51g,3.93mmol)和(R)-N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺(1.08g,3.74mmol)的类似程序以给出0.78g的(R)-8-(5-氨基-1,2,4-三嗪-3-基)-N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺。MS  $m/z$  383.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0396] 步骤b:如针对中间体17所述,使用利用(R)-8-(5-氨基-1,2,4-三嗪-3-基)-N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺(0.48g,1.26mmol)的相似程序以给出0.23g(0.49mmol)。MS  $m/z$  461.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0397] 步骤c:如针对中间体17所述,使用利用3-氨基-2-氯苯硫酚(0.07g,0.35mmol)和(R)-8-(5-氨基-6-溴-1,2,4-三嗪-3-基)-N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺(0.13g,0.27mmol)的类似程序以给出0.12g的(R)-8-(5-氨基-6-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-1,2,4-三嗪-3-基)-N-((R)-1-(4-甲氧基苯基)乙基)-8-氮杂螺[4.5]癸烷-1-胺。MS  $m/z$  540.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0398] 中间体22

[0399] 叔-丁基(1-(5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯



[0400]

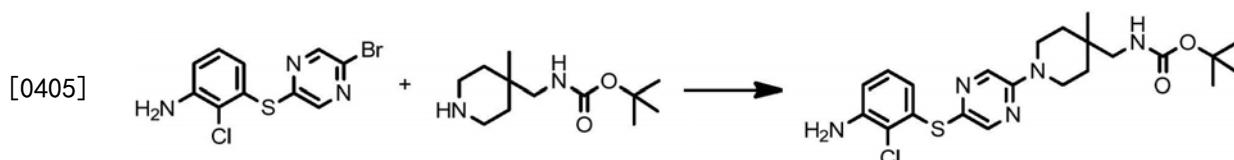
[0401] 步骤a:在100℃,将3-氨基-2-氯苯硫酚盐酸盐(0.21g,1.05mmol)、2,5-二溴吡嗪(0.62g,2.61mmol)、Cu(I)碘化物(0.04g,0.21mmol)、1,10-邻二氮杂菲(0.08g,0.42mmol)和磷酸钾(0.44g,2.10mmol)在二噁烷(7mL)中的混合物在微波反应器中辐射1h。冷却至室温后,将反应混合物通过Celite垫(EtOAc)过滤,并将滤液减压浓缩。将浓缩物通过二氧化硅色谱(0-100%EtOAc/庚烷)纯化以给出0.17g的3-((5-溴吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯胺。MS  $m/z$  317.9 (M+H)<sup>+</sup>。

[0402] 步骤b:在室温下,向3-((5-溴吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯胺(0.70g,2.21mmol)、叔-丁基((4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(0.76g,3.32mmol)、二环己基(2',6'-二异丙氧

基二苯基-2-基)膦(52mg,0.11mmol)、氯(2-二环己基膦-2',6'-二异丙氧基-1,1'-二苯基)[2-(2'-氨基-1,1'-二苯基)]钯(II)(81mg,0.11mmol)在二噁烷(25mL)中的混合物中添加叔丁醇钠(0.30g,3.10mmol)。在90℃搅拌14h后,将反应混合物冷却至室温,与硅胶合并,并减压浓缩至干燥。将所得残余物通过二氧化硅色谱(0-100%EtOAc/庚烷)纯化以给出标题化合物(0.50g)。MS  $m/z$  450.2(M+H)<sup>+</sup>。

[0403] 中间体23

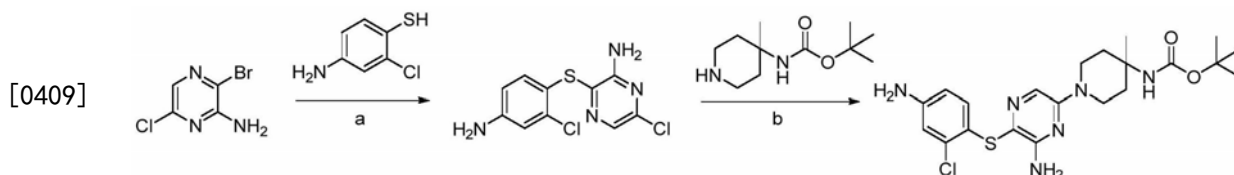
[0404] 叔-丁基((1-(5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯



[0406] 如针对中间体1所述,使用3-((5-溴吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯胺(0.70g,2.21mmol)和叔-丁基((4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(0.76g,3.32mmol)进行类似程序以给出标题化合物(0.46g)。MS  $m/z$  464.2(M+H)<sup>+</sup>。

[0407] 中间体24

[0408] 叔-丁基(1-(6-氨基-5-((4-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯

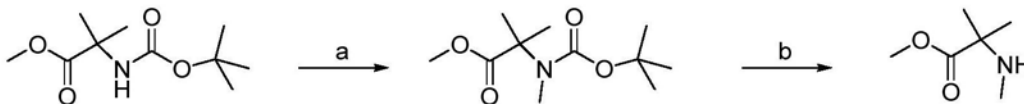


[0410] 步骤a:如针对中间体1所述,使用4-氨基-2-氯苯硫酚(1.0g,6.3mmol)、3-溴-6-氯吡嗪-2-胺(1.3g,6.26mmol)、Cu(I)碘化物(0.239g,1.3mmol)、1,10-邻二氮杂菲(0.45g,2.5mmol)和磷酸钾(3.32g,15.7mmol)进行类似程序以给出3-((4-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.95g)。MS  $m/z$  287.0(M+H)<sup>+</sup>。

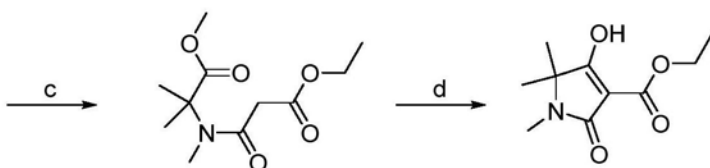
[0411] 步骤b:如针对中间体2所述,使用3-((4-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.74g,3.5mmol)和叔-丁基((4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯(0.83g,2.9mmol)进行类似程序以给出标题化合物(0.30g)。MS  $m/z$  465.0(M+H)<sup>+</sup>。

[0412] 中间体25

[0413] 乙基4-羟基-1,5,5-三甲基-2-氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酸酯



[0414]





[0415] 步骤a: 在0℃, 向甲基2-((叔-丁氧基羰基)氨基)-2-甲基丙酸酯(1.49g, 6.86mmol)的THF(20mL)溶液中添加氢化钠(60%于矿物油中, 0.49g, 20.57mmol)。将反应混合物搅拌5min, 向反应混合物中滴加碘甲烷(0.52mL, 8.23mmol)。将反应混合物升温至室温并搅拌过夜。将反应混合物用水淬灭, 直至发泡停止。减压除去THF, 并将粗产物用EtOAc萃取并通过快速二氧化硅色谱(0-25%EtOAc/庚烷)纯化以提供甲基2-((叔-丁氧基羰基)(甲基)氨基)-2-甲基丙酸酯(585mg)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 3.69(s, 3H), 2.90(s, 3H), 1.42(s, 15H)。

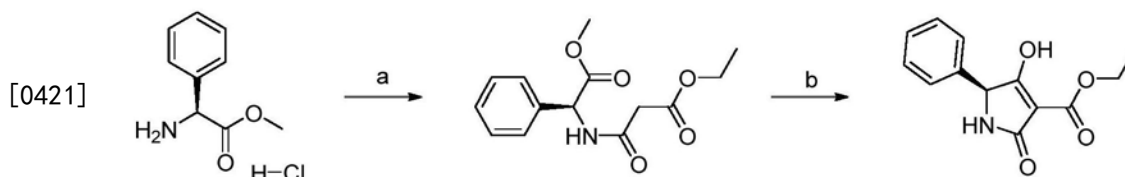
[0416] 步骤b: 向甲基2-((叔-丁氧基羰基)(甲基)氨基)-2-甲基丙酸酯(563mg, 2.43mmol)在DCM(5mL)中的溶液中添加TFA(5.0mL, 64.9mmol)。将反应混合物在室温下搅拌3h并且然后减压浓缩以提供呈白色结晶固体的甲基2-甲基-2-(甲基氨基)丙酸酯(597mg, 2.43mmol)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δppm 3.88(s, 3H), 2.70(s, 3H), 1.59(s, 6H)。

[0417] 步骤c: 向甲基2-甲基-2-(甲基氨基)丙酸酯(319mg, 2.43mmol)在THF(10mL)中的悬浮液中添加三乙胺(1.02mL, 7.29mmol)。将所得混合物冷却至0℃并添加乙基3-氯-3-氧代丙酸酯(530mg, 3.52mmol)。将反应混合物升温至室温并搅拌1h。将反应混合物减压浓缩并通过快速二氧化硅色谱(0-50%EtOAc/庚烷)纯化以提供呈淡黄色油状物的乙基3-((1-甲氧基-2-甲基-1-氧代丙烷-2-基)(甲基)氨基)-3-氧代丙酸酯(455mg)。MS m/z 246.3(M+H)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 4.27-4.11(m, 2H), 3.68(d, J=0.9Hz, 3H), 3.44(s, 2H), 2.97(s, 3H), 1.43(s, 6H), 1.26(t, J=7.1Hz, 3H)。

[0418] 步骤d: 在室温下, 向乙基3-((1-甲氧基-2-甲基-1-氧代丙烷-2-基)(甲基)氨基)-3-氧代丙酸酯(450mg, 1.83mmol)在EtOH(6mL)中的溶液中添加乙醇钠(1.03mL, 2.75mmol)。将反应混合物在85℃加热5min, 冷却并用Et<sub>2</sub>O稀释。将沉淀过滤并用Et<sub>2</sub>O洗涤。将干燥的固体溶解在水中并用2M HCl酸化。将混合物减压浓缩并通过快速二氧化硅色谱(0-10%MeOH/DCM)纯化以提供乙基4-羟基-1,5,5-三甲基-2-氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酸酯(306mg)。MS m/z 214.1(M+H)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 11.27(s, 1H), 4.37(q, J=7.0Hz, 2H), 2.97-2.72(m, 3H), 1.49-1.22(m, 9H)。

[0419] 中间体26

[0420] (S)-乙基4-羟基-2-氧代-5-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酸酯



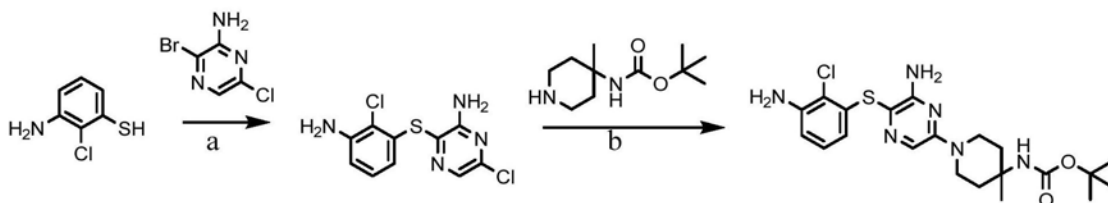
[0422] 步骤a: 向(S)-甲基2-氨基-2-苯基乙酸酯盐酸盐(1.5g, 7.44mmol)在THF(14.9mL)中的悬浮液中添加三乙胺(2.6mL, 18.6mmol)。将所得混合物冷却至0℃并添加乙基3-氯-3-氧代丙酸酯(1.17g, 7.81mmol)。将反应混合物升温至室温并搅拌1h。将反应混合物减压浓缩并通过快速二氧化硅色谱(0-50%EtOAc/庚烷)纯化以提供呈淡黄色固体的(S)-乙基3-((2-甲氧基-2-氧代-1-苯基乙基)氨基)-3-氧代丙酸酯(1.72g)。MS m/z 280.1(M+H)<sup>+</sup>。

[0423] 步骤b: 在室温下, 向(S)-乙基3-((2-甲氧基-2-氧代-1-苯基乙基)氨基)-3-氧代丙酸酯(1.0g, 3.58mmol)在EtOH(12mL)中的溶液中添加乙醇钠(1.27mL, 3.4mmol)。将反应混合物在85℃加热5min, 冷却并用Et<sub>2</sub>O稀释。将沉淀过滤并用Et<sub>2</sub>O洗涤。将干燥的固体溶解

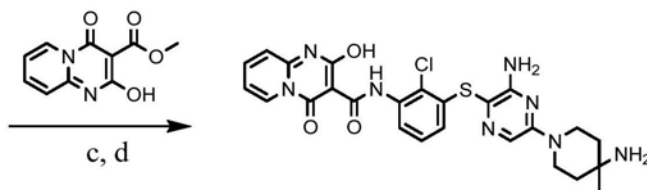
在水中并用2M HCl酸化。将混合物减压浓缩并将所得固体用水洗涤以给出(S)-乙基4-羟基-2-氧代-5-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酸酯(600mg)。MS  $m/z$  248.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0424] 实例1

[0425] N-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺



[0426]



[0427] 步骤a: 将3-氨基-2-氯苯硫酚盐酸盐(8.0g, 40.8mmol)、3-溴-6-氯吡嗪-2-胺(6.0g, 28.8mmol)、Cu(I)碘化物(1.1g, 5.8mmol)、1,10-邻二氮杂菲(2.1g, 11.7mmol)和磷酸钾(12.5g, 58.9mmol)在二噁烷(80mL)中的悬浮液加热至85℃持续4h。冷却至室温后,用EtOAc(100mL)稀释该反应混合物,通过Celite垫过滤,在减压下浓缩为油状物并悬浮在DCM(100mL)中。将所得灰白色沉淀通过过滤收集并干燥以给出3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(6.5g)。MS  $m/z$  287.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0428] 步骤b: 将3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.29g, 1.0mmol)、叔-丁基(4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.43g, 2.0mmol)和DIPEA(0.87mL, 5.0mmol)在NMP(5mL)中的悬浮液在微波反应器中辐射至150℃持续2h。冷却至室温后,用EtOAc(100mL)稀释该反应混合物,用水和盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤、并减压浓缩。将粗产物通过二氧化硅色谱(10%-50%EtOAc/庚烷)纯化以给出0.44g的叔-丁基(1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯。MS  $m/z$  465.2 (M+H)<sup>+</sup>。

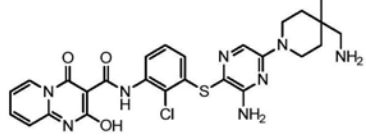
[0429] 步骤c: 将叔-丁基(1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.13g, 0.26mmol)和甲基2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酸酯(69.1mg, 0.314mmol)在溴苯(2mL)中的悬浮液在微波反应器中加热至170℃持续1h。将反应混合物冷却至室温后,将其减压浓缩,并将所得残余物通过HPLC(15%-40%MeCN于水中,0.1%NH<sub>4</sub>OH调节剂)纯化以给出叔-丁基(1-(6-氨基-5-((2-氯-3-(2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺基)苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.09g)。MS  $m/z$  653.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0430] 步骤d: 向叔-丁基(1-(6-氨基-5-((2-氯-3-(2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺基)苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.09g, 0.14mmol)在DCM(0.5mL)中的溶液中添加TFA(0.5mL)。在室温下搅拌2h后,将挥发物在减压下除去并将所得残余物通过HPLC(15%-40%MeCN于水中,0.1%TFA调节剂)纯化。将冻干产物溶于含有HCl(1.2M)的MeOH中并干燥以给出作为HCl盐的N-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-

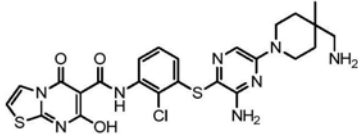
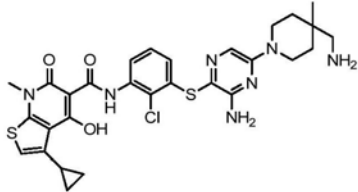
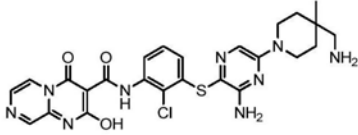
甲酰胺 (0.085g)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 9.19 (d, *J*=6.8Hz, 1H), 8.34 (d, *J*=8.0Hz, 1H), 8.24 (t, *J*=7.9Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.61 (d, *J*=8.7Hz, 1H), 7.52 (d, *J*=7.1Hz, 1H), 7.29 (t, *J*=8.3Hz, 1H), 6.74 (d, *J*=7.9Hz, 1H), 4.26 (d, *J*=14.2Hz, 2H), 3.52 (m, 2H), 1.93 (m, 4H), 1.53 (s, 3H)。HRMS 针对 C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 553.1537, 实测值是 553.1524。IC<sub>50</sub>=0.006 μM。

[0431] 使用如针对实例1所示的程序或对该程序的改良来制备表1中鉴定的以下化合物。

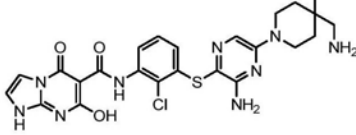
[0432] 表1

实例	化合物	表征	IC <sub>50</sub> (μM)
2	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡啶-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 TFA 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 甲醇-<i>d</i><sub>4</sub>) δ ppm 9.17-9.10 (m, 1 H), 8.28 (dd, <i>J</i> = 8.3, 1.4 Hz, 1 H), 8.13 (ddd, <i>J</i> = 8.7, 6.8, 1.6 Hz, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 7.55 (dt, <i>J</i> = 8.8, 1.1 Hz, 1 H), 7.42 (td, <i>J</i> = 7.0, 1.3 Hz, 1 H), 7.15 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 6.50 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.4 Hz, 1 H), 4.03 (dt, <i>J</i> = 13.9, 4.7 Hz, 2 H), 3.43 (ddd, <i>J</i> = 13.7, 9.4, 4.1 Hz, 2 H), 2.90 (s, 2 H), 1.58 (tdd, <i>J</i> = 14.1, 9.1, 4.5 Hz, 4 H), 1.19 (s, 3 H)。HRMS 针对 C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 567.1694, 实测值是 567.1717。</p>	0.007

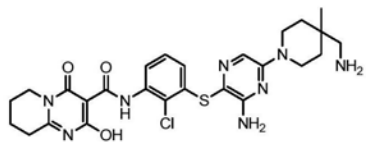
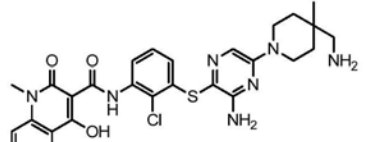
[0433]

3	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-7-羟基-5-氧代-5<i>H</i>-噻唑并[3,2-<i>a</i>]嘧啶-6-甲酰胺</p>	为 TFA 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ ppm 8.23 (dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1 H), 8.07 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 7.43 (d, $J = 4.7$ Hz, 1 H), 7.14 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 6.51 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1 H), 4.11-3.93 (m, 2 H), 3.43 (ddd, $J = 13.7, 9.4, 4.0$ Hz, 2 H), 2.92 (s, 2 H), 1.66-1.50 (m, 4 H), 1.20 (s, 3 H)。HRMS 针对 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClN}_8\text{O}_3\text{S}_2$ ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ 计算值是 573.1258, 实测值是 573.1266。	0.006
4	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-3-环丙基-4-羟基-7-甲基-6-氧代-6,7-二氢噻吩并[2,3-<i>b</i>]吡啶-5-甲酰胺</p>	为 TFA 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ ppm 12.97 (s, 1 H), 8.26 (dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz, 1 H), 7.60 (s, 1 H), 7.17 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 6.68 (s, 1 H), 6.54 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1 H), 4.05 (dt, $J = 13.9, 4.7$ Hz, 2 H), 3.69 (s, 3 H), 3.45 (ddd, $J = 13.6, 9.4, 4.0$ Hz, 2 H), 2.93 (s, 2 H), 2.52 (d, $J = 5.8$ Hz, 1 H), 1.68-1.52 (m, 4 H), 1.21 (s, 3 H), 1.02-0.93 (m, 2 H), 0.78-0.68 (m, 2 H)。HRMS 针对 $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{ClN}_7\text{O}_3\text{S}_2$ ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ 计算值是 626.1775, 实测值是 626.1785。	1.03
5		为 TFA 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ ppm 15.18 (s, 1 H), 12.05 (s, 1 H), 9.13 (d, $J = 1.2$ Hz, 1	0.003

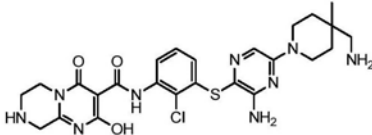
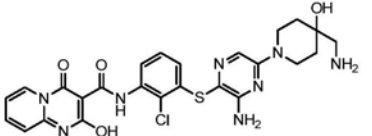
[0434]

	<p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡嗪并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>H), 8.83 (dd, <math>J = 4.7, 1.2</math> Hz, 1 H), 8.37 (d, <math>J = 4.7</math> Hz, 1 H), 8.12 (dd, <math>J = 8.3, 1.4</math> Hz, 1 H), 7.75 (t, <math>J = 6.2</math> Hz, 3 H), 7.66 (s, 1 H), 7.27 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 6.47 (dd, <math>J = 8.0, 1.4</math> Hz, 1 H), 6.42-5.99 (m, 2 H), 3.88 (dt, <math>J = 13.7, 4.7</math> Hz, 2 H), 3.36 (ddd, <math>J = 13.3, 9.3, 3.5</math> Hz, 2 H), 2.80 (q, <math>J = 5.8</math> Hz, 2 H), 1.51 (ddd, <math>J = 13.3, 9.5, 4.1</math> Hz, 2 H), 1.45-1.35 (m, 2 H), 1.07 (s, 3 H)。HRMS 针对 <math>C_{25}H_{27}ClN_9O_3S</math> (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 568.1646, 实测值是 568.1631。</p>	
[0435]	<p><b>6</b></p>  <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-7-羟基-5-氧代-1,5-二氢咪唑并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-6-甲酰胺</p>	<p>为 TFA 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ ppm 14.98 (s, 1 H), 13.23 (s, 1 H), 12.19 (s, 1 H), 8.14 (dd, <math>J = 8.2, 1.4</math> Hz, 1 H), 7.79-7.72 (m, 3 H), 7.65 (s, 1 H), 7.56 (d, <math>J = 2.7</math> Hz, 1 H), 7.22 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 6.41 (dd, <math>J = 8.0, 1.4</math> Hz, 1 H), 6.17 (s, 2 H), 3.86 (q, <math>J = 5.1, 4.3</math> Hz, 2 H), 3.35 (ddd, <math>J = 13.3, 9.3, 3.6</math> Hz, 2 H), 2.79 (q, <math>J = 5.8</math> Hz, 2 H), 1.50 (ddd, <math>J = 13.6, 9.4, 4.2</math> Hz, 2 H), 1.40 (dt, <math>J = 13.4, 4.4</math> Hz, 2 H), 1.06 (s, 3 H)。HRMS 针对 <math>C_{24}H_{27}ClN_9O_3S</math> (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 556.1646, 实测值是 556.1633。</p>	0.005

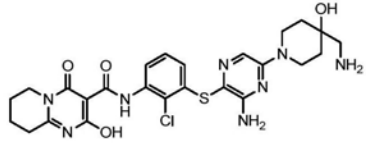
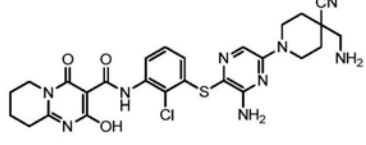
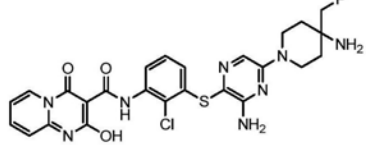
[0436]

7	 <p>N-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, 甲醇-<math>d_4</math>) <math>\delta</math> ppm 8.31 (dd, <math>J = 8.3, 1.3</math> Hz, 1 H), 7.76 (s, 1 H), 7.29 (t, <math>J = 8.2</math> Hz, 1 H), 6.75 (dd, <math>J = 7.9, 1.3</math> Hz, 1 H), 4.10 (dt, <math>J = 13.9, 4.8</math> Hz, 2 H), 3.99 (t, <math>J = 6.1</math> Hz, 2 H), 3.56 (ddd, <math>J = 13.7, 9.3, 4.2</math> Hz, 2 H), 3.34 (s, 2 H), 2.94 (s, 2 H), 2.09-1.96 (m, 2 H), 1.98-1.88 (m, 2 H), 1.73-1.56 (m, 4 H), 1.22 (s, 3 H)。HRMS 针对 <math>\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{ClN}_8\text{O}_3\text{S}</math> (<math>\text{M}+\text{H}</math>)<math>^+</math> 计算值是 571.2007, 实测值是 571.1993。</p>	0.006
8	 <p>N-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-1-甲基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, 甲醇-<math>d_4</math>) <math>\delta</math> ppm 13.15 (s, 1 H), 8.33 (dd, <math>J = 8.3, 1.4</math> Hz, 1 H), 8.24 (dd, <math>J = 8.0, 1.5</math> Hz, 1 H), 7.83 (ddd, <math>J = 8.6, 7.1, 1.6</math> Hz, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.65 (d, <math>J = 8.6</math> Hz, 1 H), 7.40 (t, <math>J = 7.6</math> Hz, 1 H), 7.24 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 6.64 (dd, <math>J = 8.0, 1.3</math> Hz, 1 H), 4.08 (dt, <math>J = 14.0, 4.7</math> Hz, 2 H), 3.78 (s, 3 H), 3.56-3.43 (m, 2 H), 2.92 (s, 2 H), 1.61 (dt, <math>J = 8.6, 4.4</math> Hz, 4 H), 1.21 (s, 3 H)。HRMS 针对 <math>\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_7\text{O}_3\text{S}</math> (<math>\text{M}+\text{H}</math>)<math>^+</math> 计算值是 580.1898, 实测值是 580.1902。</p>	0.044

[0437]

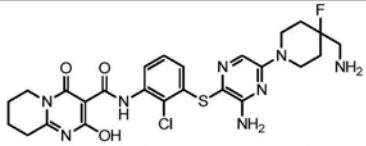
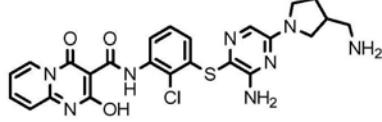
<p>9</p>	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4<i>H</i>-吡嗪并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 TFA 盐: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, <math>\text{DMSO-}d_6</math>) <math>\delta</math> ppm 12.05 (s, 1 H), 8.09 (dd, <math>J = 8.2, 1.4</math> Hz, 1 H), 7.74 (d, <math>J = 6.3</math> Hz, 3 H), 7.66 (s, 1 H), 7.26 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 6.46 (dd, <math>J = 8.0, 1.4</math> Hz, 1 H), 6.18 (s, 2 H), 4.35 (s, 2 H), 4.04 (t, <math>J = 5.7</math> Hz, 2 H), 3.93-3.82 (m, 2 H), 3.54 (t, <math>J = 5.8</math> Hz, 2 H), 2.80 (d, <math>J = 5.9</math> Hz, 2 H), 1.50 (ddd, <math>J = 13.4, 9.1, 4.1</math> Hz, 2 H), 1.41 (dt, <math>J = 13.3, 4.5</math> Hz, 2 H), 1.07 (s, 3 H)。HRMS 针对 <math>\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{ClN}_9\text{O}_3\text{S}</math> (<math>\text{M}+\text{H}</math>)<math>^+</math> 计算值是 572.1959, 实测值是 572.1971。</p>	0.007
<p>10</p>	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基羟甲基)-4-羟基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, 甲醇-<math>d_4</math>) <math>\delta</math> ppm 12.15 (s, 1 H), 9.07 (d, <math>J = 6.9</math> Hz, 1 H), 8.21 (ddd, <math>J = 8.6, 5.1, 1.6</math> Hz, 2 H), 8.00 (d, <math>J = 7.4</math> Hz, 3 H), 7.69 (s, 1 H), 7.59 (d, <math>J = 8.7</math> Hz, 1 H), 7.49-7.42 (m, 1 H), 7.23 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 6.43 (dd, <math>J = 8.1, 1.4</math> Hz, 1 H), 4.08-4.02 (m, 2 H), 3.33 (ddd, <math>J = 13.6, 10.6, 3.5</math> Hz, 2 H), 2.82 (q, <math>J = 5.7</math> Hz, 2 H), 1.69-1.51 (m, 4 H)。HRMS 针对 <math>\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_4\text{SCl}</math> (<math>\text{M}+\text{H}</math>)<math>^+</math> 计算值是 569.1486, 实测值是 569.1463。</p>	0.006

[0438]

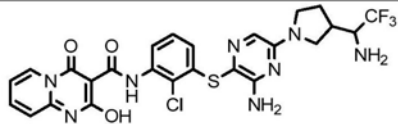
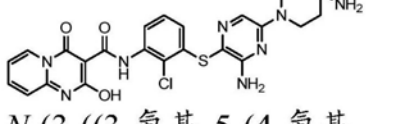
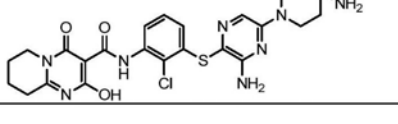
11	 <p>N-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-羟基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ ppm 8.30 (dd, $J = 8.3, 1.3$ Hz, 1 H), 7.80 (s, 1 H), 7.30 (t, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 6.76 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1 H), 4.32 (d, $J = 13.4$ Hz, 2 H), 3.99 (t, $J = 6.1$ Hz, 2 H), 3.57-3.44 (m, 2 H), 3.34 (s, 2 H), 2.96 (s, 2 H), 2.09-1.99 (m, 2 H), 1.97-1.88 (m, 2 H), 1.85-1.65 (m, 4 H)。HRMS 针对 $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_8\text{O}_4\text{S}$ $(\text{M}+\text{H})^+$ 计算值是 573.1799, 实测值是 573.1792。	0.012
12	 <p>N-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-氰基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ ppm 8.30 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, 1 H), 7.43 (s, 1 H), 7.25 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 6.69 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1 H), 3.98 (t, $J = 6.1$ Hz, 2 H), 3.88 (s, 2 H), 3.56 (dt, $J = 14.0, 3.5$ Hz, 2 H), 3.31 (m, 2 H), 3.21 (td, $J = 13.2, 3.0$ Hz, 2 H), 2.28 (d, $J = 15.0$ Hz, 2 H), 2.09-1.97 (m, 4 H), 1.96-1.88 (m, 2 H)。HRMS 针对 $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{ClN}_9\text{O}_3\text{S}$ $(\text{M}+\text{H})^+$ 计算值是 582.1803, 实测值是 582.1782。	0.26
13	 <p>N-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-氟哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ 9.28-9.06 (m, 1H), 8.40-8.29 (m, 1 H), 8.28-8.13 (m, 1 H), 7.79 (s,	0.0046

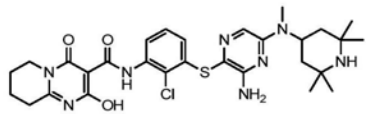
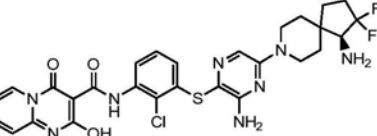


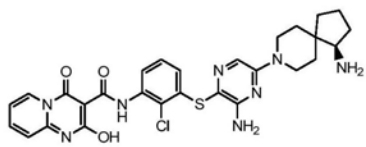
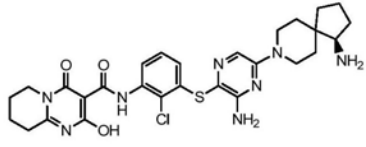


		(M+H) <sup>+</sup> 计算值是 571.1443, 实测值是 571.1427。	
16	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-(氨甲基)-4-氟哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ ppm 8.39-8.19 (m, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 7.30-7.11 (m, 1 H), 6.73-6.49 (m, 1 H), 4.42 (d, <i>J</i> = 13.8 Hz, 2 H), 4.05-3.89 (m, 2 H), 3.28-3.22 (m, 4 H), 2.10-2.00 (m, 6 H), 1.97-1.86 (m, 4 H)。MS <i>m/z</i> (M+H) <sup>+</sup> 575.1。HRMS 针对 C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> ClFN <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 575.1756, 实测值是 575.1727。	0.008
[0440]	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(3-(氨甲基)吡咯烷-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 12.14 (s, 1 H), 9.07 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 1 H), 8.21 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2 H), 7.91 (br. s, 3 H), 7.58 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1 H), 7.45 (td, <i>J</i> = 7.0, 1.2 Hz, 1 H), 7.30 (s, 1 H), 7.27-7.19 (m, 1 H), 6.38 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1 H), 6.14 (br. s, 2 H), 3.68-3.57 (m, 4 H), 3.47-3.38 (m, 1 H), 3.23 (dd, <i>J</i> = 10.9, 6.9 Hz, 1 H), 3.01-2.85 (m, 2 H), 2.62-2.54 (m, 1 H), 2.21-2.07 (m, 1 H), 1.88-1.68 (m, 1 H)。HRMS 针对 C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 539.1381, 实测值是	0.013

[0441]

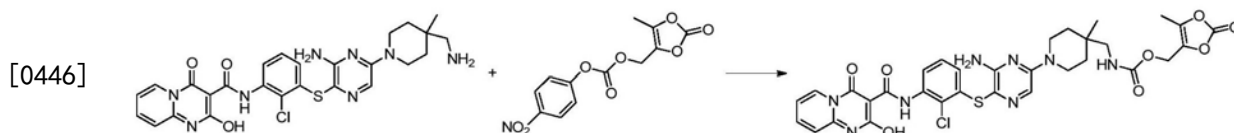
18	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(3-(1-氨基-2,2,2-三氟乙基)吡咯烷-1-基)吡啶-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	539.1373。 为 HCl 盐。 <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ ppm 9.30-9.06 (m, 1 H), 8.43-8.04 (m, 2 H), 7.74-7.28 (m, 3 H), 7.18-7.06 (m, 1 H), 6.60-6.42 (m, 1 H), 4.43-4.33 (m, 1 H), 4.02-3.91 (m, 1 H), 3.89-3.79 (m, 1 H), 3.56-3.48 (m, 1 H), 3.43-3.36 (m, 1 H), 2.92-2.80 (m, 1 H), 2.42-2.30 (m, 1 H), 2.12-1.97 (m, 1 H)。HRMS 针对 C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 607.1254, 实测值是 607.1241。	0.789
19	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-(三氟甲基)哌啶-1-基)吡啶-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 12.13 (s, 1 H), 9.36 (br. s, 1 H), 9.17-8.99 (m, 1 H), 8.30-8.10 (m, 2 H), 7.69 (s, 1 H), 7.58 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1 H), 7.45 (td, <i>J</i> = 7.0, 1.3 Hz, 1 H), 7.33-7.18 (m, 1 H), 6.44 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.5 Hz, 1 H), 6.25 (br. s, 1 H), 4.12 (s, 2 H), 3.63 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 2 H), 2.17-1.81 (m, 4 H)。HRMS 针对 C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 607.1254, 实测值是 607.1253。	2.19
20	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-(三氟甲基)哌啶-1-基)吡啶-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ ppm 8.32 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H),	5.0

		<p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-(三氟甲基)哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>7.78 (s, 1 H), 7.27 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 6.72 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1 H), 4.35-4.19 (m, 2 H), 4.01 (t, <i>J</i> = 6.1 Hz, 2 H), 3.81-3.65 (m, 2 H), 3.39-3.34 (m, 2 H), 2.45-2.29 (m, 2 H), 2.21-2.11 (m, 2 H), 2.11-2.01 (m, 2 H), 1.99-1.90 (m, 2 H)。HRMS 针对 C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 611.1567, 实测值是 611.1569。</p>	
[0442]	21	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)氨基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 甲醇-<i>d</i><sub>4</sub>) δ ppm 8.33 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1 H), 7.63 (s, 1 H), 7.27 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 6.72 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1 H), 3.99 (t, <i>J</i> = 6.1 Hz, 2 H), 3.07 (s, 3 H), 2.08-1.85 (m, 9 H), 1.64 (s, 6 H), 1.54 (s, 6 H); MS <i>m/z</i> (M+H)<sup>+</sup> 614.2。</p>	5.38
	22	 <p>(<i>S</i>)-<i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(1-氨基-2,2-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 甲醇-<i>d</i><sub>4</sub>) δ ppm 9.41-9.04 (m, 1 H), 8.54-8.07 (m, 2 H), 7.80-7.45 (m, 3 H), 7.33-7.10 (m, 1 H), 6.75-6.50 (m, 1 H), 4.60-4.28 (m, 2 H), 3.73-3.62 (m, 1 H), 3.24-3.12 (m, 2 H), 2.45-2.23 (m, 3 H), 2.03-1.89 (m, 2 H), 1.74-1.57 (m, 3 H)。MS <i>m/z</i> (M+H)<sup>+</sup> 629.1。</p>	0.010

[0443]	<p>23</p>  <p>(<i>R</i>)-<i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(1-氨基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, 甲醇-<math>d_4</math>) <math>\delta</math> ppm  9.16 (d, <math>J = 7.0</math> Hz, 1 H),  8.36 (d, <math>J = 8.2</math> Hz, 1 H),  8.20 (ddd, <math>J = 8.7, 6.9, 1.6</math> Hz, 1 H), 7.76 (s, 1 H),  7.58 (d, <math>J = 8.8</math> Hz, 1 H),  7.47 (t, <math>J = 7.0</math> Hz, 1 H),  7.27 (t, <math>J = 8.2</math> Hz, 1 H),  6.71 (d, <math>J = 7.9</math> Hz, 1 H),  4.43 (d, <math>J = 13.7</math> Hz, 1 H),  4.34 (d, <math>J = 13.6</math> Hz, 1 H),  3.29-3.23 (m, 3 H),  2.33-2.16 (m, 1 H),  1.99-1.52 (m, 10 H)。  HRMS 针对  <math>\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{ClN}_8\text{O}_3\text{S}</math> (<math>\text{M}+\text{H}</math>)<math>^+</math> 计算值是 593.1850, 实测值是 593.1854。</p>	0.005
	<p>24</p>  <p>(<i>R</i>)-<i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(1-氨基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, DMSO-<math>d_6</math>) <math>\delta</math> ppm  12.24 (s, 1 H), 8.13 (dd, <math>J = 8.2, 1.4</math> Hz, 1 H), 8.04 (d, <math>J = 6.5</math> Hz, 3 H), 7.68 (s, 1 H), 7.24 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 6.44 (dd, <math>J = 8.0, 1.4</math> Hz, 1 H), 4.26-4.15 (m, 2 H), 3.87 (t, <math>J = 6.1</math> Hz, 2 H), 3.16-2.98 (m, 3 H), 2.89 (t, <math>J = 6.5</math> Hz, 2 H), 2.05 (m, 1 H), 1.97-1.86 (m, 2 H), 1.85-1.61 (m, 8 H), 1.59-1.29 (m, 3 H)。  HRMS 针对  <math>\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{ClN}_8\text{O}_3\text{S}</math> (<math>\text{M}+\text{H}</math>)<math>^+</math> 计算值是 597.2163, 实测值是 597.2171。</p>	0.001

[0444] 实例25

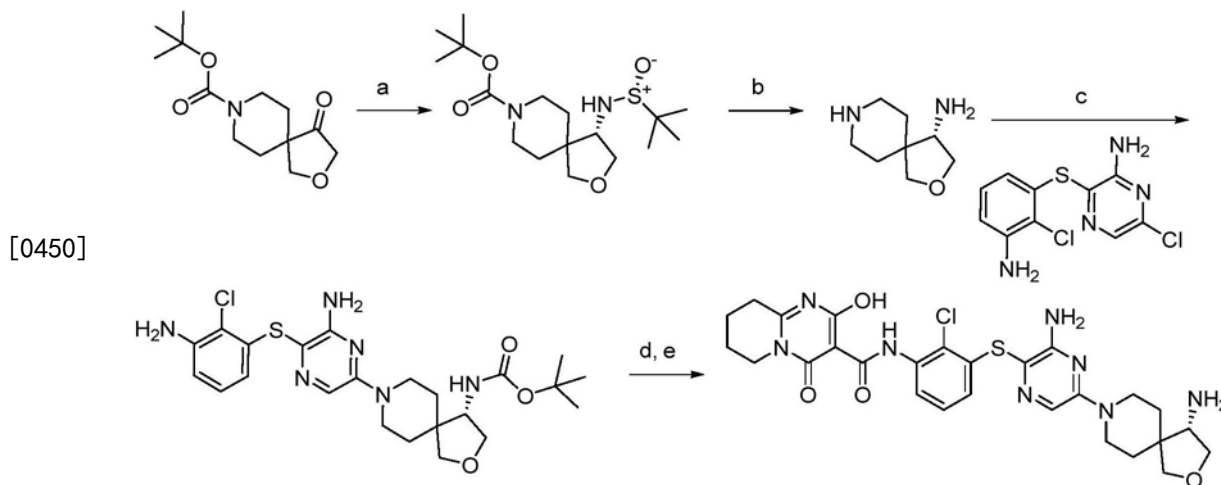
[0445] (5-甲基-2-氧代-1,3-间二氧杂环戊烯-4-基)甲基((1-(6-氨基-5-((2-氯-3-(2-羟基-4-氧代-4*H*-吡啶并[1,2-*a*]嘧啶-3-甲酰胺基)苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)甲基)氨基甲酸酯



[0447] 向N-(3-((3-氨基-5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺(50mg,0.078mmol)的DMSO(1mL)溶液中添加DIPEA(0.055mL,0.313mmol)和(5-甲基-2-氧代-1,3-间二氧杂环戊烯-4-基)甲基(4-硝基苯基)碳酸酯(24.2mg,0.082mmol)。在室温下搅拌1h后,将粗材料过滤并通过HPLC(45%-70%MeCN/水,0.1%甲酸)纯化以给出标题化合物(28mg)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,乙腈-d<sub>3</sub>) δ ppm 15.15(s,1H),12.14(s,1H),9.00(d,J=7.1Hz,1H),8.19(d,J=8.2Hz,1H),8.02(ddd,J=8.9,6.9,1.8Hz,1H),7.62(s,1H),7.54(d,J=8.9Hz,1H),7.32(t,J=7.0Hz,1H),7.19(t,J=8.1Hz,1H),6.54(dd,J=8.0,1.7Hz,1H),5.78(t,J=6.8Hz,1H),5.20(s,2H),4.81(s,2H),3.83(dt,J=13.4,5.1Hz,2H),3.41(ddd,J=13.5,9.4,3.6Hz,2H),3.06(d,J=6.7Hz,2H),2.12(s,3H),1.48(ddd,J=13.3,8.7,3.8Hz,2H),1.36(dt,J=13.6,4.7Hz,2H),0.97(s,3H)。HRMS针对C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S(M+H)<sup>+</sup>计算值是723.1752,实测值是723.1728。IC<sub>50</sub>=0.08μM。

[0448] 实例26

[0449] (S)-N-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺



[0451] 步骤a:向含有叔-丁基4-氧代-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(220mg,0.86mmol)在THF(4mL)中的溶液的20mL微波小瓶中添加(R)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(209mg,1.72mmol),接着添加四乙氧基钛(0.723mL,3.45mmol)。将小瓶加盖并在90℃加热1h。将混合物冷却至0℃,然后添加LiBH<sub>4</sub>(23mg,1.06mmol)。将反应混合物搅拌30min,然后通过缓慢添加MeOH进行淬灭,直至发泡停止。将混合物用MeOH稀释,然后减压浓缩。将残余物用盐水(伴随超声处理)稀释。将混合物用EtOAc(4x 10mL)萃取,然后将有机物用盐水洗涤,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并减压浓缩。硅胶快速色谱(0-100%EtOAc/庚烷)提供(S)-叔-丁基4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯(170mg),MS m/z 361.1(M+H)<sup>+</sup>。

[0452] 步骤b:向(S)-叔-丁基4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-2-氧杂-8-氮杂螺

[4.5] 癸烷-8-甲酸酯 (800mg, 2.22mmol) 在 MeOH (20mL) 中的溶液中添加在二噁烷 (3.33mL, 13.3mmol) 中的 4M HCl 并加热至 40°C 持续 20min。伴随另外三次添加 MeOH 将反应混合物减压浓缩以获得为 HCl 盐的 (S)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-胺, MS  $m/z$  157.2 (M+H)<sup>+</sup>。将粗残余物不经进一步纯化用于下一步骤。

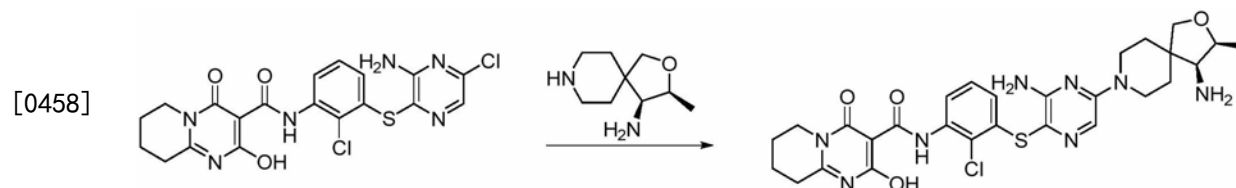
[0453] 替代性程序: 向 (S)-叔-丁基-4-((R)-1,1-二甲基乙基亚磺酰胺)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-甲酸酯 (891mg, 2.47mmol) 在 MeOH (9mL) 中的溶液中添加在二噁烷 (3.71mL, 14.8mmol) 中的 4M HCl 并加热至 40°C 持续 20min。将反应混合物减压浓缩, 并且然后用超声从 MeCN 中研磨出。将混合物通过 0.45 $\mu$ m PTFE 膜过滤以获得为双-HCl 盐的 (S)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-胺 (510mg)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>)  $\delta$ ppm 4.19 (dd, J=10.8, 5.5Hz, 1H), 3.92 (d, J=9.4Hz, 1H), 3.88-3.81 (m, 2H), 3.69 (dd, J=5.6, 2.6Hz, 1H), 3.48-3.34 (m, 2H), 3.20-3.03 (m, 2H), 2.10-1.97 (m, 2H), 1.94-1.84 (m, 2H)。MS  $m/z$  157.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0454] 步骤c: 将 3-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺 (0.10g, 0.24mmol)、(S)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-胺二盐酸化物 (0.084g, 0.29mmol) 和 DIPEA (0.5mL, 2.7mmol) 在 DMSO (0.8mL) 中的悬浮液在 120°C 加热 1h。冷却至室温并添加 MeCN 后, 通过过滤收集棕色沉淀并通过用 MeCN/MeOH (约 4mL, 9:1) 研磨来纯化以给出呈棕色固体的粗 (S)-8-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-胺。将该材料悬浮于 DCM/DMF 混合物 (1.1mL, 10:1) 中并添加至 DIPEA (0.04mL, 0.23mmol) 和 Boc<sub>2</sub>O (0.10g, 0.48mmol) 的溶液中。在室温下搅拌 60h 并且然后在 40°C 搅拌 5h 后, 将反应混合物在减压下浓缩。将所得固体溶于 EtOAc, 用饱和水性 NH<sub>4</sub>Cl 洗涤, 接着用水洗涤。将有机物经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 并在减压下浓缩以给出呈棕色固体的叔-丁基 (S)-8-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-基)氨基甲酸酯 (0.11g), 将其不经进一步纯化使用。MS  $m/z$  507.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0455] 根据实例 1, 使用在二噁烷中的 4M HCl 进行步骤 d 和 e 以提供为 HCl 盐的 (S)-N-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 8.25 (d, J=7.1Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.16 (t, J=8.1Hz, 1H), 6.51 (d, J=8.0Hz, 1H), 4.36-4.13 (m, 3H), 4.02-3.96 (m, 2H), 3.90 (d, J=9.2Hz, 1H), 3.82 (dd, J=10.6, 2.6Hz, 1H), 3.61-3.54 (m, 1H), 3.37-3.34 (m, 1H), 3.27-3.25 (m, 1H), 3.23-3.14 (m, 1H), 2.95 (t, J=6.5Hz, 2H), 2.06-1.99 (m, 2H), 1.97-1.89 (m, 2H), 1.81-1.67 (m, 3H)。HRMS 针对 C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>4</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 599.1956, 实测值是 599.1947。IC<sub>50</sub>=0.018 $\mu$ M。

[0456] 实例 27

[0457] N-(3-((3-氨基-5-((3S,4S)-4-氨基-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺

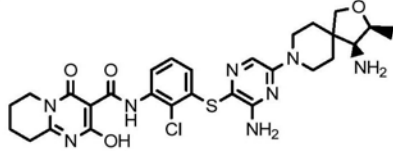


[0459] 在 100°C, 将 N-(3-((3-氨基-5-氯吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-

6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺 (0.13g, 0.27mmol)、(3S,4S)-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-胺 (0.20g, 0.81mmol, 约70%纯) 和DIPEA (0.1mL, 0.55mmol) 在DMF (2mL) 中的溶液在微波反应器中辐射90min。冷却至室温后, 将反应混合物与乙醚混合, 并通过过滤收集所得棕色沉淀。将沉淀通过反相HPLC (15%-40%MeCN于水中, 0.1%TFA调节剂) 纯化以给出为TFA盐的标题化合物。将纯级分在减压下浓缩并且然后用HCl (1.25M于MeOH中) 稀释并蒸发 (3x) 以给出为HCl盐的标题化合物 (56mg)。

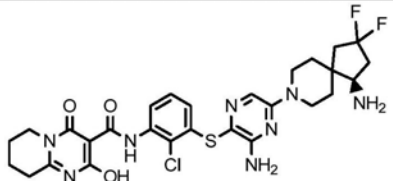
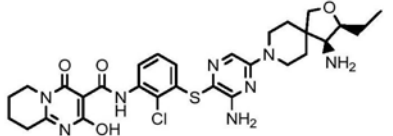
[0460] 使用如通过实例27所示例的程序或对该程序改良, 用N-(3-((3-氨基-5-氯吡嗪-2-基) 硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺和合适的胺来制备表2中鉴定的以下化合物。

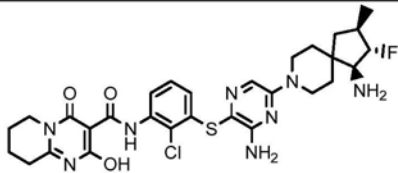
[0461] 表2

实例	化合物	表征	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
[0462] 27	 <i>N</i> -(3-((3-氨基-5-((3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-4-氨基-3-甲基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-4-基) 硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺	为 HCl 盐: : <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> <sub>4</sub> ) $\delta$ ppm 8.32 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1 H), 7.75 (s, 1 H), 7.24 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 6.67 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1 H), 4.44-4.21 (m, 3 H),	0.023



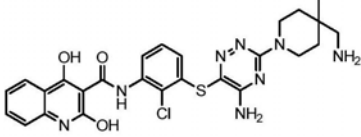
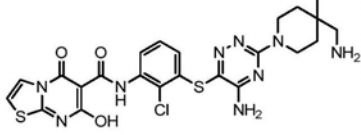
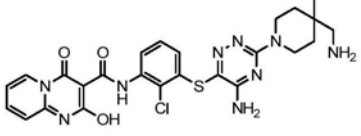
[0463]

	<p>杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>4.06-3.93 (m, 3 H), 3.88 (d, <math>J = 9.2</math> Hz, 1 H), 3.47 (d, <math>J = 4.0</math> Hz, 1 H), 3.27-3.17 (m, 2 H), 3.01-2.91 (m, 1 H), 2.07-1.99 (m, 2 H), 1.98-1.79 (m, 6 H), 1.78-1.69 (m, 1 H), 1.32 (d, <math>J = 6.5</math> Hz, 3 H)。HRMS 针对 <math>C_{28}H_{34}ClN_8O_4S</math> (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 613.2112, 实测值是 613.2142。</p>	
28	 <p>(<i>R</i>)-<i>N</i>-((3-((3-氨基-5-(1-氨基-3,3-二氟-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 甲醇-<i>d</i><sub>4</sub>) δ ppm 8.31 (d, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 7.23 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 6.65 (d, <math>J = 7.9</math> Hz, 1 H), 4.49 (d, <math>J = 13.8</math> Hz, 1 H), 4.40 (d, <math>J = 13.7</math> Hz, 1 H), 3.98 (t, <math>J = 6.0</math> Hz, 2 H), 3.60 (t, <math>J = 7.9</math> Hz, 1 H), 3.26-3.12 (m, 2 H), 3.00-2.89 (m, 1 H), 2.88-2.71 (m, 1 H), 2.71-2.55 (m, 1 H), 2.50-2.32 (m, 2 H), 2.07-1.99 (m, 2 H), 1.92 (q, <math>J = 5.6</math> Hz, 4 H), 1.71 (dt, <math>J = 25.0, 12.6</math> Hz, 3 H)。HRMS 针对 <math>C_{28}H_{32}ClF_2N_8O_3S</math> (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 633.1975, 实测值是 633.1967。</p>	0.042
29	 <p><i>N</i>-((3-((3-氨基-5-((3<i>S</i>,4<i>S</i>)-4-氨基-3-乙基-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪</p>	<p>为 HCl 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 甲醇-<i>d</i><sub>4</sub>) δ ppm 8.30 (d, <math>J = 7.1</math> Hz, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 7.24 (t, <math>J = 8.2</math> Hz, 1 H), 6.66 (d, <math>J = 6.9</math> Hz, 1 H), 4.40-4.23 (m, 2 H), 4.06-3.95 (m, 3 H), 3.90 (d,</p>	0.012

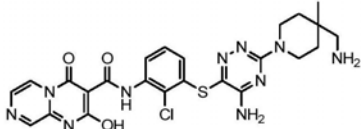
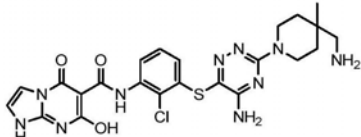
	-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺	$J = 9.3 \text{ Hz}$ , 1 H), 3.49 (dd, $J = 9.3, 2.7 \text{ Hz}$ , 1 H), 3.34 (s, 2 H), 3.24-3.16 (m, 1 H), 3.01-2.90 (m, 1 H), 2.06-1.99 (m, 5 H), 1.96-1.81 (m, 5 H), 1.77-1.70 (m, 1 H), 1.68-1.54 (m, 2 H), 1.32-1.27 (m, 1 H), 1.09 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$ , 3 H)。HRMS 针对 $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{ClN}_8\text{O}_4\text{S}$ ( $\text{M}+\text{H}$ ) <sup>+</sup> 计算值是 627.2260, 实测值是 627.2271。	
[0464]	 <p>N-(3-((3-氨基-5-((1S,2S,3R)-1-氨基-2-氟-3-甲基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ ppm 8.31 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$ , 1 H), 7.76 (s, 1 H), 7.29 (t, $J = 8.1 \text{ Hz}$ , 1 H), 6.74 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$ , 1 H), 4.68-4.37 (m, 3 H), 3.99 (t, $J = 6.1 \text{ Hz}$ , 2 H), 3.38 (dd, $J = 15.2, 8.5 \text{ Hz}$ , 1 H), 3.27-3.12 (m, 2 H), 2.99-2.91 (m, 1 H), 2.37-2.24 (m, 2 H), 2.07-1.99 (m, 2 H), 1.97-1.88 (m, 3 H), 1.77-1.63 (m, 2 H), 1.61-1.55 (m, 1 H), 1.47-1.44 (m, 1 H), 1.32 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$ , 1 H), 1.21 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$ , 3 H)。HRMS 针对 $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{ClFN}_8\text{O}_3\text{S}$ ( $\text{M}+\text{H}$ ) <sup>+</sup> 计算值是 629.2225, 获得的是 629.2228	0.016

[0465] 使用如针对实例1所示例的程序或对该程序的改良来制备表3中鉴定的以下化合物。

[0466] 表3

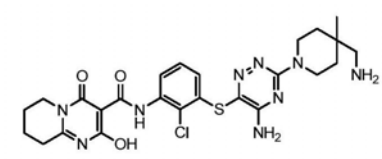
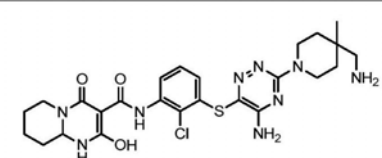
实例	化合物	表征	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
31	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-基)硫代)-2-氯苯基)-2,4-二羟基喹啉-3-甲酰胺</p>	<p>为 TFA 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 甲醇-<i>d</i><sub>4</sub>) <math>\delta</math> ppm 13.03 (s, 1 H), 8.59 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1 H), 8.14 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 7.72 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1 H), 7.52-7.29 (m, 4 H), 3.99 (br, s, 2 H), 3.60-3.47 (m, 2 H), 2.93 (s, 2 H), 1.75-1.57 (m, 4 H), 1.20 (s, 3 H).</p> <p>HRMS 针对 C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 567.1694, 实测值是 567.1707.</p>	0.038
32	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-7-羟基-5-氧代-5H-噻唑并[3,2-<i>a</i>]嘧啶-6-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> ppm 15.16 (s, 1 H), 12.06 (s, 1 H), 9.11 (s, 1 H), 8.38 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 8.19 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 1 H), 8.05 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz, 3 H), 7.62 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 1 H), 7.46 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 7.27 (s, 1 H), 3.91 (m, 2 H), 3.54 (m, 2 H), 2.77 (m, 2 H), 1.57 (m, 2 H), 1.50-1.36 (m, 2 H), 1.07 (s, 3 H). HRMS 针对 C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 574.1210, 实测值是 574.1165.</p>	0.008
33	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-7-羟基-5-氧代-5H-噻唑并[3,2-<i>a</i>]嘧啶-6-甲酰胺</p>	<p><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 甲醇-<i>d</i><sub>4</sub>) <math>\delta</math> ppm 9.20-9.07 (m, 1 H), 8.61 (dd, <i>J</i> = 7.0, 2.9 Hz, 1 H), 8.17 (ddd, <i>J</i> = 8.6, 6.9, 1.6 Hz, 1 H), 7.57 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1 H),</p>	0.010

[0467]

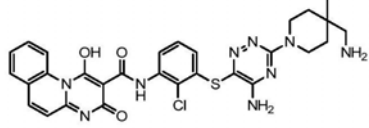
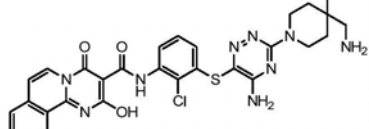
	基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺	7.48-7.35 (m, 3 H), 3.98 (br. s, 2 H), 3.63-3.49 (m, 2 H), 2.91 (s, 2 H), 1.71-1.52 (m, 4 H), 1.18 (s, 3 H)。HRMS 针对 $C_{25}H_{27}ClN_9O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 568.1646, 实测值是 568.1642。	
34	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 15.03 (s, 1 H), 12.10 (s, 1 H), 9.15 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1 H), 8.81 (dd, <i>J</i> = 4.7, 1.2 Hz, 1 H), 8.40 (q, <i>J</i> = 3.5, 2.9 Hz, 2 H), 7.99 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 3 H), 7.48 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 7.30 (s, 1 H), 3.90 (s, 2 H), 2.77 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2 H), 1.70-1.32 (m, 4 H), 1.07 (s, 3 H)。HRMS 针对 $C_{24}H_{26}ClN_{10}O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 569.1599, 实测值是 569.1626。	0.014
35	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-7-羟基-5-氧代-1,5-二氢咪唑并[1,2-a]嘧啶-6-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 14.85 (s, 1 H), 13.35 (s, 1 H), 12.26 (s, 1 H), 9.35 (s, 1 H), 8.67 (s, 1 H), 8.43 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 8.20 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 3 H), 7.74 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1 H), 7.58 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1 H), 7.45 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1 H), 7.34 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 3.88 (m, 2 H), 3.55 (m, 2 H), 2.75 (m, 2 H), 1.58 (m, 2 H), 1.44 (m, 2 H), 1.07 (s, 3 H)。HRMS 针对	0.035

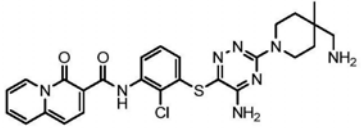
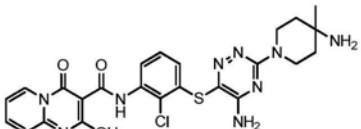
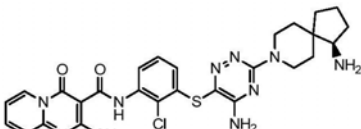
[0468]

[0469]

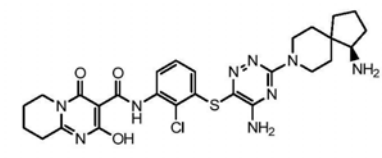
		$C_{23}H_{26}ClN_{10}O_3S (M+H)^+$ 计算值是 557.1599, 实测值是 557.1614。	
36	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 TFA 盐: $^1H$ NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> <sub>4</sub> ) $\delta$ ppm 12.24 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1 H), 8.51 (dt, <i>J</i> = 6.7, 2.4 Hz, 1 H), 7.34 (q, <i>J</i> = 2.8, 1.9 Hz, 2 H), 3.92 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 4 H), 3.48 (ddd, <i>J</i> = 13.7, 8.8, 4.4 Hz, 2 H), 2.95-2.82 (m, 4 H), 2.02-1.93 (m, 2 H), 1.88 (q, <i>J</i> = 6.1 Hz, 2 H), 1.57 (q, <i>J</i> = 5.0 Hz, 4 H), 1.14 (s, 3 H)。HRMS 针对 $C_{25}H_{31}ClN_9O_3S (M+H)^+$ 计算值是 572.1959, 实测值是 572.1947。	0.012
37	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4,6,7,8,9,9a-六氢-1<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	$^1H$ NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> <sub>4</sub> ) $\delta$ ppm 8.17 (dd, <i>J</i> = 8.3, 1.5 Hz, 1 H), 7.12 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 6.54 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.3 Hz, 1 H), 4.71-4.61 (m, 1 H), 4.42 (ddt, <i>J</i> = 13.5, 4.1, 2.1 Hz, 1 H), 4.21 (dt, <i>J</i> = 13.8, 4.7 Hz, 2 H), 3.49 (ddd, <i>J</i> = 13.7, 9.8, 3.6 Hz, 2 H), 2.70-2.56 (m, 3 H), 1.97-1.83 (m, 2 H), 1.75-1.38 (m, 8 H), 1.09 (s, 3 H)。HRMS 针对 $C_{25}H_{33}ClN_9O_3S (M+H)^+$ 计算值是 574.2116, 实测值是 574.2100。	0.006

[0470]

<p>38</p>  <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-3-羟基-1-氧代-1<i>H</i>-嘧啶并[1,2-<i>a</i>]喹啉-2-甲酰胺</p>	<p>为 TFA 盐: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, <math>\text{DMSO-}d_6</math>) <math>\delta</math> ppm 12.27 (s, 1 H), 9.49 (s, 1 H), 8.44 (d, <math>J = 9.1</math> Hz, 1 H), 8.37 (d, <math>J = 6.6</math> Hz, 1 H), 8.08 (dd, <math>J = 7.8, 1.5</math> Hz, 1 H), 7.86 (ddd, <math>J = 8.9, 7.3, 1.6</math> Hz, 1 H), 7.77 (s, 3 H), 7.75-7.70 (m, 1 H), 7.43 (d, <math>J = 10.2</math> Hz, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 3.50 (s, 2 H), 2.79 (d, <math>J = 5.7</math> Hz, 2 H), 1.58-1.47 (m, 2 H), 1.42 (dd, <math>J = 9.1, 5.2</math> Hz, 2 H), 1.06 (s, 3 H)。HRMS 针对 <math>\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{ClN}_9\text{O}_3\text{S}</math> (<math>\text{M}+\text{H}</math>)<math>^+</math> 计算值是 618.1803, 实测值是 618.1801。</p>	0.015
<p>39</p>  <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-嘧啶并[2,1-<i>a</i>]异喹啉-3-甲酰胺</p>	<p>为 TFA 盐: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, <math>\text{DMSO-}d_6</math>) <math>\delta</math> ppm 15.10 (s, 1 H), 12.28 (s, 1 H), 8.90 (d, <math>J = 8.3</math> Hz, 1 H), 8.77 (d, <math>J = 7.6</math> Hz, 1 H), 8.38 (d, <math>J = 8.2</math> Hz, 1 H), 8.06 (d, <math>J = 1.9</math> Hz, 1 H), 8.03 (dd, <math>J = 7.9, 1.1</math> Hz, 1 H), 7.87 (ddd, <math>J = 8.3, 6.7, 1.7</math> Hz, 1 H), 7.78 (s, 3 H), 7.71 (d, <math>J = 7.7</math> Hz, 1 H), 7.44 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 3.93 (s, 2 H), 2.79 (d, <math>J = 5.7</math> Hz, 2 H), 1.59-1.47 (m, 2 H), 1.42 (dd, <math>J = 9.2, 5.2</math> Hz, 2 H), 1.06 (s, 3 H)。HRMS 针对 <math>\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{ClN}_9\text{O}_3\text{S}</math> (<math>\text{M}+\text{H}</math>)<math>^+</math> 计算值是 618.1803, 实测值是 618.1796。</p>	0.013

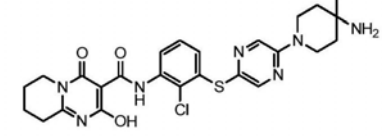
40	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-4-氧代-4<i>H</i>-喹啉-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ ppm 9.44 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 8.82-8.64 (m, 2 H), 8.07-7.88 (m, 2 H), 7.54 (t, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 7.49-7.37 (m, 2 H), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 4.00 (br, s, 2 H), 3.59-3.50 (m, 2 H), 2.93 (s, 2 H), 1.73-1.56 (m, 4 H), 1.20 (s, 3 H)。HRMS 针对 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClN}_8\text{O}_2\text{S}$ ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ 计算值是 551.1744, 实测值是 551.1727。	0.173
41	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ ppm 9.16 (d, $J = 7.1$ Hz, 1 H), 8.71-8.59 (m, 1 H), 8.19 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H), 7.52-7.39 (m, 3 H), 4.15 (br, s, 2 H), 3.60-3.45 (m, 2 H), 2.05-1.84 (m, 4 H), 1.52 (s, 3 H)。MS $m/z$ ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ 554.3。HRMS 针对 $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{ClN}_9\text{O}_3\text{S}$ ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ 计算值是 554.1490, 实测值是 554.1474。	0.011
42	 <p>(<i>R</i>)-<i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(1-氨基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 TFA 盐: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 甲醇- $d_4$ ) $\delta$ ppm 12.22 (s, 1 H), 9.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 8.59 (dt, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1 H), 8.16 (ddd, $J = 8.8, 6.8, 1.7$ Hz, 1 H), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 7.49-7.29 (m, 3 H),	0.016

[0471]

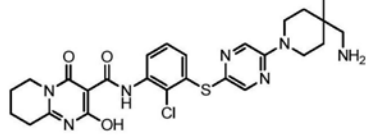
	代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺	4.26 (d, $J = 40.7$ Hz, 2 H), 3.29-3.19 (m, 3 H), 2.32-2.11 (m, 1 H), 1.96-1.47 (m, 9 H). HRMS 针对 $C_{27}H_{29}ClN_9O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 594.1803, 实测值是 594.1808。	
[0472]	<p><b>43</b></p>  <p>(R)-N-(3-((5-氨基-3-(1-氨基-8-氮杂螺[4.5]癸烷-8-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为 TFA 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ ppm 14.75 (s, 1 H), 12.28 (s, 1 H), 8.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 7.88 (d, $J = 5.7$ Hz, 3 H), 7.38 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 7.10-6.80 (s, 1 H), 4.27 (d, $J = 19.1$ Hz, 2 H), 3.85 (s, 2 H), 3.24-3.09 (m, 4 H), 2.89 (t, $J = 6.5$ Hz, 2 H), 2.06 (dt, $J = 9.5, 4.6$ Hz, 1 H), 1.91 (p, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 1.85-1.60 (m, 7 H), 1.57-1.35 (m, 3 H)。HRMS 针对 $C_{27}H_{33}ClN_9O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 598.2085, 实测值是 598.2116。	0.0015

[0473] 使用如针对实例1所示例的程序或对该程序的改良,用合适的嘧啶-3-甲酸酯和叔-丁基(1-(5-(3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯来制备表4中鉴定的以下化合物。

[0474] 表4

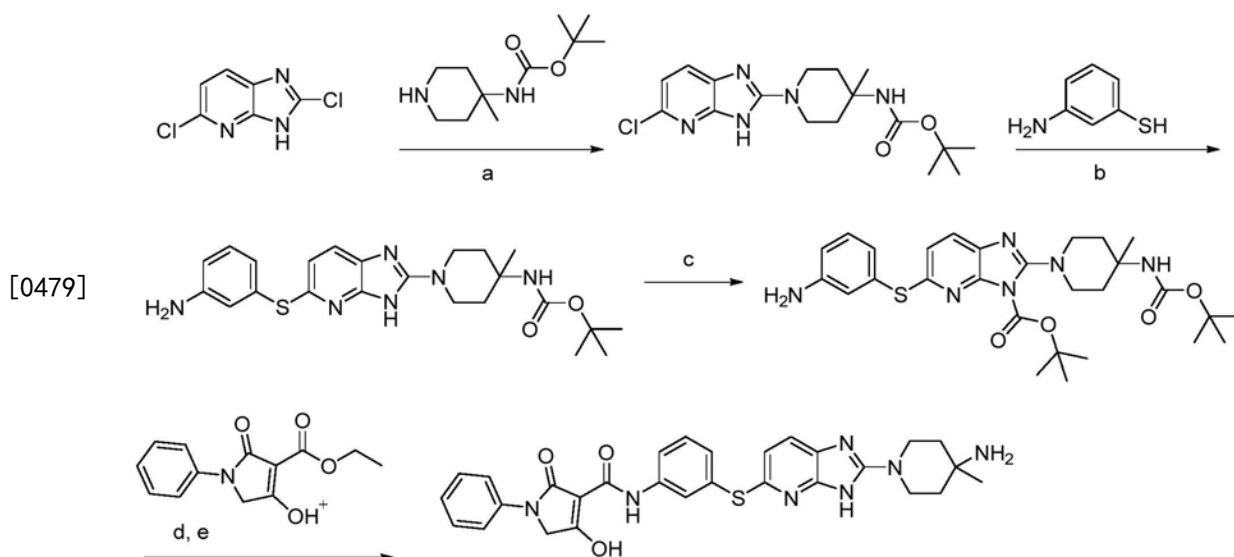
实例	化合物	表征	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
[0475]	<p><b>44</b></p> 	为 HCl 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ ppm 12.25 (s, 1 H), 8.48 (s, 1 H), 8.30 (d, $J = 1.1$ Hz, 1	0.014



	<p><i>N</i>-(3-((5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>H), 8.22 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 8.05 (br. s, 2 H), 7.28 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 6.72 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H), 4.18-4.05 (m, 2 H), 3.90-3.82 (m, 2 H), 3.42-3.37 (m, 3 H), 2.55-2.53 (m, 2 H), 1.96-1.87 (m, 2 H), 1.85-1.67 (m, 6 H), 1.39 (s, 3 H)。HRMS 针对 C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 542.1741, 实测值是 542.1757。</p>	
[0476]	<p><b>45</b></p>  <p><i>N</i>-(3-((5-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-2-羟基-4-氧代-6,7,8,9-四氢-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	<p>为 HCl 盐: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ ppm 12.23 (s, 1 H), 8.44 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1 H), 8.27 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1 H), 8.19 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.2 Hz, 1 H), 8.09 (br. s, 3 H), 7.27 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 6.70 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.3 Hz, 1 H), 3.96-3.82 (m, 4 H), 3.50-3.39 (m, 2H), 2.88 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2 H), 2.82-2.73 (m, 2 H), 1.95-1.86 (m, 2 H), 1.85-1.76 (m, 2 H), 1.61-1.51 (m, 2 H), 1.51-1.41 (m, 2 H), 1.09 (s, 3 H)。HRMS 针对 C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 556.1898, 实测值是 556.1898。</p>	0.007

[0477] 实例46

[0478] N-(3-((2-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-3H-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-5-基)硫代)苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-3-甲酰胺



[0480] 步骤a: 在110℃, 将2,5-二氯-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶 (2.0g, 10.64mmol)、叔-丁基(4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯 (3.19g, 14.89mmol) 和N-甲基吗啉 (1.29mL, 11.70mmol) 在NMP (13mL) 中的混合物在微波反应器中辐射1h。冷却至室温后, 将反应混合物倒入冰水 (800mL) 中, 并过滤。将固体残余物用水洗涤并在45℃减压干燥以给出叔-丁基(1-(5-氯-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯 (3.11g)。MS  $m/z$  366.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0481] 步骤b: 在230℃, 将叔-丁基(1-(5-氯-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯 (0.350g, 0.957mmol)、3-氨基苯硫酚 (0.599g, 4.78mmol) 和N-甲基吗啉 (1.578mL, 14.35mmol) 在NMP (3mL) 中的悬浮液在微波反应器中辐射45min。冷却后, 将反应混合物倒入DCM中, 并过滤。将粗固体通过HPLC (15%-40% MeCN于水中, 5mM NH<sub>4</sub>OH调节剂) 纯化以给出61mg的叔-丁基(1-(5-((3-氨基苯基)硫代)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯。MS  $m/z$  355.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0482] 步骤c: 向叔-丁基(1-(5-((3-氨基苯基)硫代)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯 (60mg, 0.169mmol)、Boc<sub>2</sub>O (85mg, 0.389mmol) 在THF (4mL) 中的溶液中添加TEA (0.083mL, 0.592mmol) 并加热至70℃持续4h。将反应混合物减压浓缩以提供94mg的叔-丁基5-((3-氨基苯基)硫代)-2-(4-((叔-丁氧基羰基)氨基)-4-甲基哌啶-1-基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-甲酸酯。MS  $m/z$  554.8 (M+H)<sup>+</sup>。

[0483] 步骤d: 在125℃, 将叔-丁基5-((3-氨基苯基)硫代)-2-(4-((叔-丁氧基羰基)氨基)-4-甲基哌啶-1-基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-甲酸酯 (90mg, 0.162mmol) 和乙基4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酸酯 (48.1mg, 0.195mmol) 在THF (2mL) 中的悬浮液在微波反应器中辐射20min。将反应混合物冷却至室温后, 过滤沉淀物并用MeOH冲洗以给出叔-丁基2-(4-((叔-丁氧基羰基)氨基)-4-甲基哌啶-1-基)-5-((3-(4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺基)苯基)硫代)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-甲酸酯 (0.095g)。MS  $m/z$  555.3 (M+H-2Boc)<sup>+</sup>。

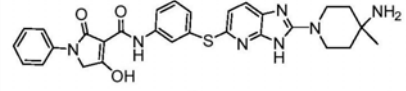
[0484] 步骤e: 向叔-丁基2-(4-((叔-丁氧基羰基)氨基)-4-甲基哌啶-1-基)-5-((3-(4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺基)苯基)硫代)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-甲酸酯 (0.091g, 0.120mmol) 在二噁烷 (0.2mL) 中的溶液中添加在二噁烷 (0.121mL) 中

的4M HCl。在环境温度下搅拌14h后,将挥发物在减压下去除。将粗残余物用MeOH研磨若干次,并将固体通过HPLC (15% -40% MeCN于水中, 5mM NH<sub>4</sub>OH调节剂) 纯化以提供N-(3-((2-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-5-基)硫代)苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺 (3.5mg)。

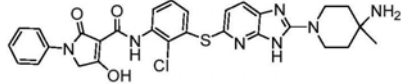
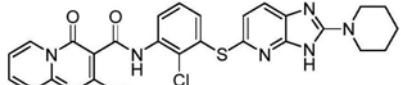
[0485] 使用如针对实例46所示例的程序或对该程序的改良来制备表5中鉴定的以下化合物。

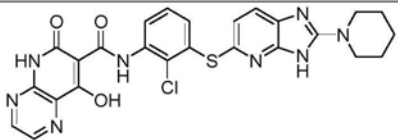
[0486] 表5

[0487]

实例	化合物	表征	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
46	 <i>N</i> -(3-((2-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-3H-咪唑并[4,5- <i>b</i> ]吡啶-5-基)硫代)苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ ppm 11.08 (s, 1 H), 7.80 (s, 2 H), 7.68 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 3 H), 7.44 (s, 2 H), 7.33-7.20 (m, 5 H), 6.97-6.87 (m, 3 H), 3.98-3.88 (m, 2 H), 3.83	0.07

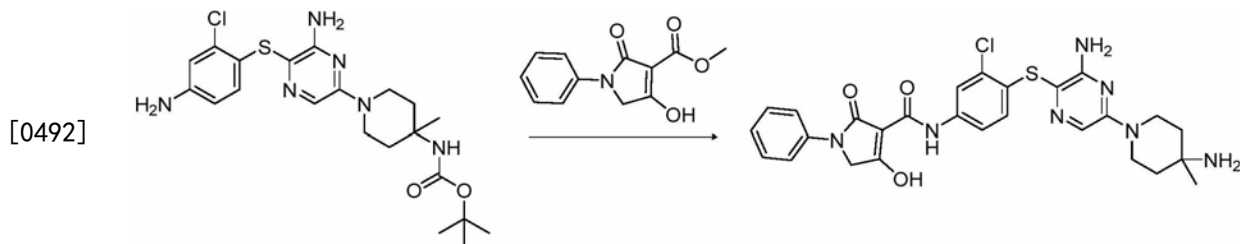
[0488]

	氨-1 <i>H</i> -吡咯-3-甲酰胺	(s, 2 H), 3.39-3.31 (m, 2 H), 1.85-1.64 (m, 4 H), 1.36 (s, 3 H)。HRMS 针对 C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 556.2158, 实测值是 556.2133。	
47	 <p><i>N</i>-(3-((2-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-3<i>H</i>-咪唑并[4,5-<i>b</i>]吡啶-5-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 11.37 (s, 1 H), 8.51 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 7.71 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2 H), 7.46 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H), 7.29-7.23 (m, 2 H), 7.01 (dt, <i>J</i> = 76.8, 7.7 Hz, 3 H), 6.73 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1 H), 3.95-3.75 (m, 4 H), 3.50-3.42 (m, 2 H), 1.74-1.60 (m, 4 H), 1.30 (s, 3 H)。HRMS 针对 C <sub>29</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 590.1748, 实测值是 590.1742。	0.003
48	 <p><i>N</i>-(2-氯-3-((2-(哌啶-1-基)-3<i>H</i>-咪唑并[4,5-<i>b</i>]吡啶-5-基)硫代)苯基)-2-羟基-4-氧代-4<i>H</i>-吡啶并[1,2-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>	为游离碱: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 12.31 (s, 1 H), 12.14 (bs, 1 H), 11.65 (bs, 1 H), 9.02 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1 H), 8.33 (s, 1 H), 8.14 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1 H), 7.56-7.34 (m, 3 H), 7.27 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1 H), 7.21-6.77 (m, 2 H), 3.55 (m, 4 H), 1.58 (m, 6 H)。HRMS 针对 C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 548.1272, 实测值是 548.1263。	0.061

[0489]	<p><b>49</b></p>  <p><i>N</i>-(2-氯-3-((2-(吡啶-1-基)-3<i>H</i>-咪唑并[4,5-<i>b</i>]吡啶-5-基)硫代)苯基)-8-羟基-6-氧代-5,6-二氢吡啶并[2,3-<i>b</i>]吡嗪-7-甲酰胺</p>	<p>为游离碱: <math>^1\text{H NMR}</math> (400 MHz, <math>\text{DMSO-}d_6</math>) <math>\delta</math> ppm  16.07 (s, 1H), 12.98 (s, 2H), 12.16 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.06 (m, 2H), 3.56 (m, 4H), 1.58 (m, 6H).  HRMS 针对 <math>\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{ClN}_8\text{O}_3\text{S}</math> (M+H)<math>^+</math> 计算值是 549.1224, 实测值是 549.1210.</p>	0.036
--------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------

[0490] 实例50

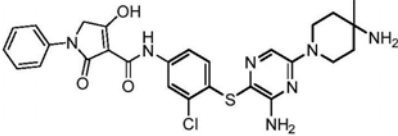
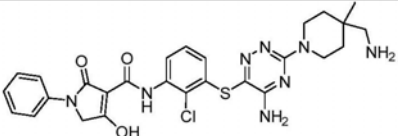
[0491] *N*-(4-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-3-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-3-甲酰胺



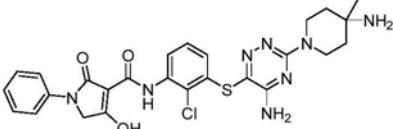
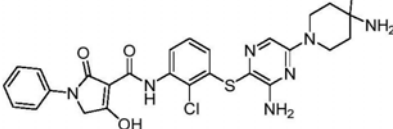
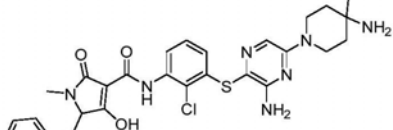
[0493] 将叔-丁基(1-(6-氨基-5-((4-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(50mg, 0.108mmol)和甲基4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-3-甲酰胺(30mg, 0.140mmol)在THF(1mL)中的悬浮液在微波反应器中辐射至115℃持续1.5h。冷却反应混合物后,在减压下除去挥发物,并将粗混合物溶于DCM(2mL)中。添加4M HCl溶液(在二噁烷中,2mL),并将所得混合物加热至40℃持续1h。冷却至室温后,将溶液减压浓缩,并将所得残余物通过HPLC(15%-40%MeCN/水,0.1% $\text{NH}_4\text{OH}$ 调节剂)纯化,以给出标题化合物(12mg)。MS  $m/z$  566.0 (M+H) $^+$ 。

[0494] 使用如针对实例46所示例的程序或对该程序的改良来制备表6中鉴定的以下化合物。

[0495] 表6

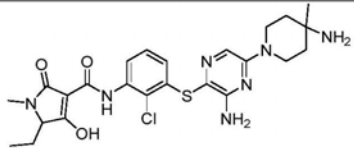
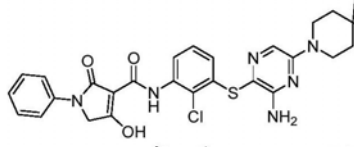
实例	化合物	表征	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
50	 <p data-bbox="448 405 847 622"><i>N</i>-(4-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-3-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ ppm 11.12 (br. s, 1 H) 8.04 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1 H) 7.97 (s, 1 H) 7.94 (br.s, 1 H) 7.69 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2 H) 7.61 (s, 1 H) 7.12-7.34 (m, 3 H) 6.91 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1 H) 6.77 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1 H) 6.13 (br. s, 1 H) 3.94-4.11 (m, 2 H) 3.87 (s, 2 H) 3.16-3.30 (m, 2 H) 2.54-2.68 (m, 1 H) 1.62-1.82 (m, 4 H) 1.38 (s, 3 H)。HRMS 针对 C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 566.1741, 实测值是 566.1719。	0.070
51	 <p data-bbox="448 1111 847 1384"><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-(氨基甲基)-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ ppm 11.40 (s, 1 H), 8.45 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 7.71 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2 H), 7.27 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2 H), 7.10 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 6.92 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1 H), 6.54 (s, 1 H), 6.29 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H), 4.17-4.05 (m, 2 H), 3.87 (s, 2 H), 3.53-3.44 (m, 2 H), 2.73 (s, 2 H), 1.55-1.44 (m, 2 H), 1.43-1.32 (m, 2 H), 1.05 (s, 3 H)。HRMS 针对 C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 581.1772, 实测值是 581.1852。	0.012

[0496]

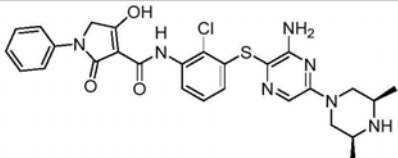
52	 <p><i>N</i>-(3-((5-氨基-3-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-1,2,4-三嗪-6-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 11.43 (s, 1 H), 8.42 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 7.86 (s, 2 H), 7.72 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2 H), 7.32-7.23 (m, 2 H), 6.99 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1 H), 6.92 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1 H), 6.31 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.1 Hz, 1 H), 4.38-4.19 (m, 2 H), 3.88 (s, 2 H), 3.51-3.40 (m, 2 H), 1.85-1.68 (m, 4 H), 1.38 (s, 3 H)。HRMS 针对 C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 567.1720, 实测值是 567.1688。	0.003
53	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 11.39 (s, 1 H), 8.38 (dd, <i>J</i> = 8.28, 1.25 Hz, 1 H), 7.83 (br. s., 2 H), 7.71 (d, <i>J</i> = 7.78 Hz, 2 H), 7.66 (s, 1 H), 7.26 (dd, <i>J</i> = 8.53, 7.28 Hz, 2 H), 6.99 (t, <i>J</i> = 8.03 Hz, 1 H), 6.91 (t, <i>J</i> = 7.28 Hz, 1 H), 6.12-6.22 (m, 3 H), 4.04 (d, <i>J</i> = 13.80 Hz, 2 H), 3.84 (s, 2 H), 3.21-3.33 (m, 2 H), 1.62-1.84 (m, 4 H), 1.37 (s, 3 H)。HRMS 针对 C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 566.1741, 实测值是 566.1754。	0.0044
54	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 11.42 (br. s, 1 H), 8.28 (d, <i>J</i> = 8.03 Hz, 1 H), 8.05 (br. s., 3 H), 7.64 (s, 1 H), 7.05-7.31 (m, 5 H), 6.70	0.0073

[0497]

[0498]

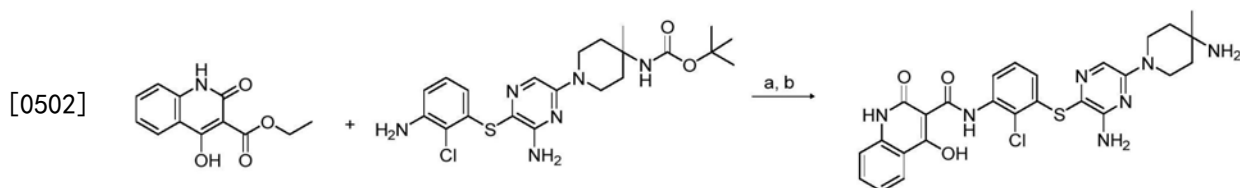
	<p>甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-5-苄基-4-羟基-1-甲基-2-氧代-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<p>(t, <math>J = 8.03</math> Hz, 1 H), 6.02-6.20 (m, 3 H), 3.97-4.14 (m, 2 H), 3.64 (br. s, 1 H), 3.27-3.40 (与 H<sub>2</sub>O 峰重叠, m, 1 H), 3.09 (dd, <math>J = 14.05, 4.27</math> Hz, 1 H), 2.91 (dd, <math>J = 13.93, 5.14</math> Hz, 1 H), 2.63 (s, 3 H), 1.80-2.00 (m, 2 H), 1.68 (d, <math>J = 13.30</math> Hz, 2 H), 1.30-1.45 (m, 3 H)。 HRMS 针对 C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 594.2054, 实测值是 594.2023。</p>	
55	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-5-乙基-4-羟基-1-甲基-2-氧代-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<p><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> ppm 11.49 (br. s., 1 H), 8.30 (d, <math>J = 8.0</math> Hz, 1 H), 8.10 (br. s, 3 H), 7.65 (s, 1 H), 6.68 (t, <math>J = 8.0</math> Hz, 1 H), 6.14 (d, <math>J = 7.0</math> Hz, 3 H), 3.91-4.14 (m, 2 H), 3.24-3.33 (m, 2 H), 2.75 (s, 3 H), 1.83-2.04 (m, 2 H), 1.55-1.83 (m, 4 H), 1.37 (s, 3 H), 0.66 (t, <math>J = 7.3</math> Hz, 3 H)。HRMS 针对 C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 532.1898, 实测值是 532.1861。</p>	0.0028
56	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-甲基-4-(甲基氨基)哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基</p>	<p><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> ppm 11.38 (s, 2 H), 8.39 (d, <math>J = 8.3</math> Hz, 2 H), 7.61-7.76 (m, 3 H), 7.26 (t, <math>J = 7.9</math> Hz, 2 H), 7.05 (t, <math>J = 8.2</math> Hz, 1 H), 6.90 (t, <math>J = 7.4</math> Hz, 1 H), 6.12-6.26 (m, 3 H),</p>	0.0066



	-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺	3.83 (s, 2 H), 3.32 (s, 与水重叠, 3 H), 3.17 (br. s., 2 H), 1.72 (br. s., 4 H), 1.35 (br. s., 3 H)。HRMS 针对 $C_{28}H_{31}ClN_7O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 580.1898, 实测值是 580.1885。	
[0499]	<p>57</p>  <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(顺式-3,5-二甲基哌嗪-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺</p>	为 HCl 盐: <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 10.96 (s, 1 H), 9.59-9.46 (m, 1 H), 9.16-9.03 (m, 1 H), 8.26 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.4 Hz, 1 H), 7.73 (s, 2 H), 7.72-7.70 (m, 1 H), 7.43-7.38 (m, 2 H), 7.22-7.17 (m, 1 H), 7.16-7.11 (m, 1 H), 6.39 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.4 Hz, 1 H), 4.62 (s, 2 H), 4.51-4.43 (m, 2 H), 3.38-3.26 (m, 2 H), 2.97-2.87 (m, 2 H), 1.31 (s, 3 H), 1.29 (s, 3 H)。HRMS 针对 $C_{27}H_{29}ClN_7O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 566.1741, 实测值是 566.1743。	0.011

[0500] 实例58

[0501] *N*-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺

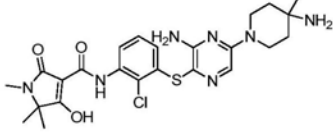


[0503] 将叔-丁基(1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-氯苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.140g, 0.30mmol)和乙基4-羟基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺(91mg, 0.39mmol)在THF(1.5mL)中的悬浮液在微波反应器中辐射至115℃持续1.5h。冷却反应混合物至室温后,在减压下除去挥发物,并将粗混合物溶于DCM(2mL)中。添加HCl溶液(4M于二噁烷中,2mL),并将所得混合物加热至40℃持续1h。冷却至室温后,将溶液减压浓缩,并将所得残余物通过HPLC(15%-40%MeCN/水,0.1%NH<sub>4</sub>OH调节剂)纯化,以给出标题化合物(12mg)。MS *m/z* 552.0 (M+H)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 8.23-8.37 (m, 1H), 7.91-8.03 (m, 1H),

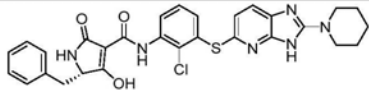
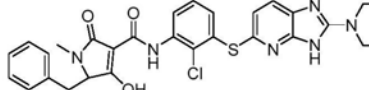
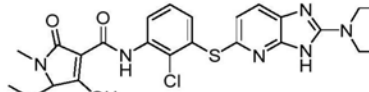
7.59-7.71 (m, 2H), 7.40-7.52 (m, 1H), 7.16-7.25 (m, 1H), 7.09 (br. s, 2H), 6.77-6.89 (m, 1H), 6.51-6.61 (m, 1H), 6.26-6.35 (m, 1H), 6.17 (br. s, 2H), 5.76-5.87 (m, 1H), 5.38-5.49 (m, 1H), 3.81-4.03 (m, 2H), 3.38-3.49 (m, 2H), 1.57-1.80 (m, 4H), 1.33 (s, 3H)。HRMS针对  $C_{26}H_{27}ClN_7O_3S$  (M+H)<sup>+</sup> 计算值是552.1585, 实测值是552.1602。 $IC_{50}=0.072\mu M$ 。

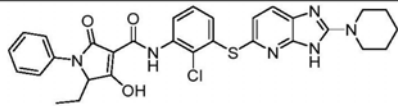
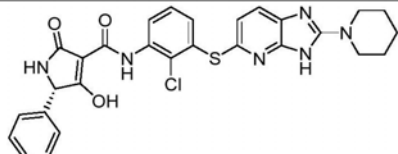
[0504] 使用如针对实例50所示例的程序或对该程序的改良来制备表7中鉴定的以下化合物。

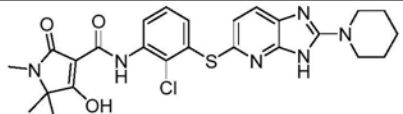
[0505] 表7

实例	化合物	表征	IC <sub>50</sub> ( $\mu M$ )
59	 <p><i>N</i>-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-氯苯基)-4-羟基-1,5,5-三甲基-2-氧代-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ ppm 11.51 (s, 1 H), 8.38-8.09 (m, 4 H), 7.65 (s, 1 H), 6.62 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1 H), 6.22-5.99 (m, 3 H), 4.21-3.90 (m, 2 H), 3.35-3.24 (m, 2 H), 2.73 (s, 3 H), 2.11-1.90 (m, 2 H), 1.79-1.59 (m, 2 H), 1.38 (s, 3 H), 1.12 (s, 6 H)。HRMS 针对 $C_{24}H_{31}ClN_7O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 532.1898, 实测值	< 0.003

[0506]

		是 532.1887。	
	 <p>60 (S)-5-苄基-N-(2-氯-3-((2-(咪啉-1-基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-5-基)硫代)苯基)-4-羟基-2-氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 11.13 (s, 1 H), 8.39 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 7.46 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 7.20 (ddt, <i>J</i> = 24.0, 15.4, 7.7 Hz, 6 H), 7.02 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 6.76 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.2 Hz, 1 H), 4.03 (s, 1 H), 3.56 (m, 4 H), 3.03 (dd, <i>J</i> = 13.8, 4.2 Hz, 1 H), 2.79 (dd, <i>J</i> = 13.8, 6.4 Hz, 1 H), 1.60 (m, 6 H)。HRMS 针对 C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 575.1632, 实测值是 575.1652。	0.011
[0507]	 <p>61 5-苄基-N-(2-氯-3-((2-(咪啉-1-基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-5-基)硫代)苯基)-4-羟基-1-甲基-2-氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 11.05 (s, 1 H), 8.43-8.34 (m, 1 H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1 H), 7.23 (q, <i>J</i> = 7.7, 7.3 Hz, 3 H), 7.17 (tt, <i>J</i> = 6.8, 2.8 Hz, 3 H), 7.06 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1 H), 6.85 (dd, <i>J</i> = 7.8, 1.4 Hz, 1 H), 4.19 (s, 1 H), 3.57 (m, 4 H), 3.20 (dd, <i>J</i> = 14.3, 4.7 Hz, 1H), 3.03 (dd, <i>J</i> = 14.3, 4.5 Hz, 1H), 2.79 (s, 3 H), 1.61 (m, 6 H)。HRMS 针对 C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 589.1789, 实测值是 589.1776。	0.022
	 <p>62 N-(2-氯-3-((2-(咪啉-1-基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 11.15 (s, 1 H), 8.41 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 7.51 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 7.23 (t, <i>J</i> = 8.1	0.025

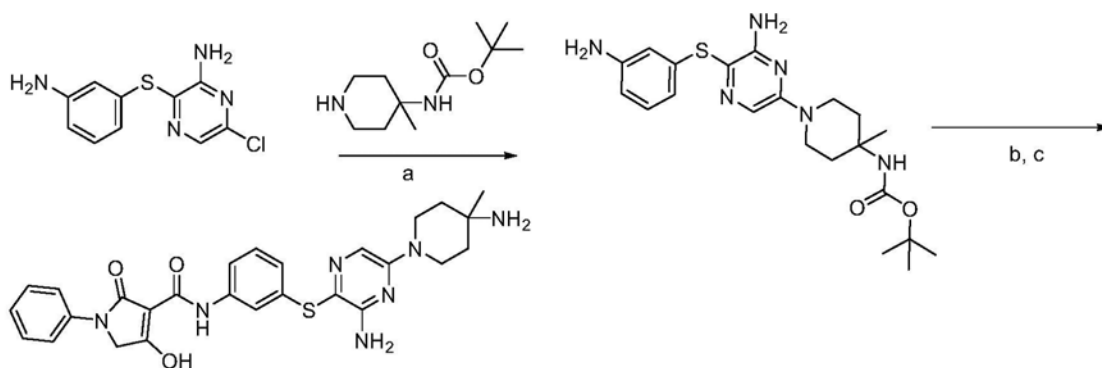
	<p>-5-基)硫代)苯基)-5-乙基-4-羟基-1-甲基-2-氧代-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<p>Hz, 1 H), 7.08 (d, <math>J = 8.0</math> Hz, 1 H), 6.86 (d, <math>J = 7.7</math> Hz, 1 H), 4.01 (s, 1 H), 3.57 (m, 4 H), 2.82 (s, 3 H), 1.90-1.79 (m, 2 H), 1.61 (m, 6 H), 0.64 (t, <math>J = 7.3</math> Hz, 3 H)。HRMS 针对 <math>C_{25}H_{28}ClN_6O_3S</math> (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 527.1632, 实测值是 527.1624。</p>	
[0508]	<p><b>63</b></p>  <p><i>N</i>-(2-氯-3-((2-(吡啶-1-基)-3<i>H</i>-咪唑并[4,5-<i>b</i>]吡啶-5-基)硫代)苯基)-5-乙基-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<p><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> ppm 11.32 (s, 1 H), 8.57 (d, <math>J = 8.0</math> Hz, 1 H), 7.61 (d, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 7.52 (d, <math>J = 7.9</math> Hz, 2 H), 7.34 (t, <math>J = 7.8</math> Hz, 2 H), 7.26 (t, <math>J = 7.9</math> Hz, 1 H), 7.12 (d, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 7.06 (t, <math>J = 7.3</math> Hz, 1 H), 7.00 (d, <math>J = 7.7</math> Hz, 1 H), 4.59 (s, 1 H), 3.59 (m, 4 H), 1.80 (d, <math>J = 6.8</math> Hz, 1 H), 1.69 (dd, <math>J = 13.3, 6.9</math> Hz, 1 H), 1.62 (m, 6 H), 0.56 (t, <math>J = 7.2</math> Hz, 3 H)。HRMS 针对 <math>C_{30}H_{30}ClN_6O_3S</math> (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 589.1789, 实测值是 589.1780。</p>	0.052
	<p><b>64</b></p>  <p>(<i>S</i>)-<i>N</i>-(2-氯-3-((2-(吡啶-1-基)-3<i>H</i>-咪唑并[4,5-<i>b</i>]吡啶-5-基)硫代)苯基)-4-羟基-2-氧代-5-苯基-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<p><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> ppm 11.27 (s, 1 H), 8.48 (d, <math>J = 8.0</math> Hz, 1 H), 7.48 (d, <math>J = 8.0</math> Hz, 1 H), 7.35-7.30 (m, 2 H), 7.29-7.24 (m, 3 H), 7.16 (t, <math>J = 8.1</math> Hz, 1 H), 7.03 (d, <math>J = 8.0</math> Hz, 1 H), 6.79 (d, <math>J = 7.8</math> Hz, 1 H), 4.65 (s, 1 H), 3.56 (m, 4 H), 1.60 (m, 6 H)。HRMS</p>	0.090

		针对 $C_{28}H_{26}ClN_6O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 561.1476, 实测值是 561.1458。	
[0509]	<p><b>65</b></p>  <p><i>N</i>-(2-氯-3-((2-(吡啶-1-基)-3<i>H</i>-咪唑并[4,5-<i>b</i>]吡啶-5-基)硫代)苯基)-4-羟基-1,5,5-三甲基-2-氧代-2,5-二氢-1<i>H</i>-吡咯-3-甲酰胺</p>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> <sub>4</sub> ) δ ppm 8.48 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1 H), 7.43 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 7.07 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1 H), 7.00 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H), 6.81 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1 H), 3.59 (m, 4 H), 2.86 (s, 3 H), 1.70 (m, 6 H), 1.26 (s, 6 H)。HRMS 针对 $C_{25}H_{28}ClN_6O_3S$ (M+H) <sup>+</sup> 计算值是 527.1632, 实测值是 527.1631。	0.042

[0510] 实例66

[0511] *N*-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-3-甲酰胺

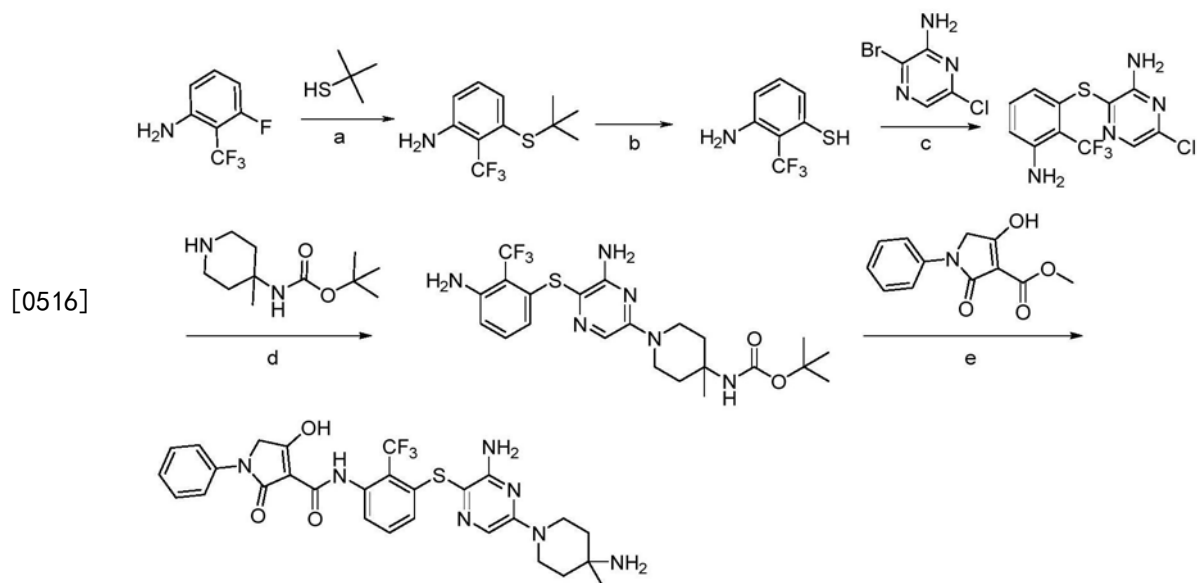
[0512]



[0513] 如针对中间体1所述,使用3-((3-氨基苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.150g, 0.594mmol)和叔-丁基(4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.191g, 0.890mmol)进行类似程序以给出叔-丁基(1-(6-氨基-5-((3-氨基苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(0.162g, 0.376mmol)。MS *m/z* 431.4 (M+H)<sup>+</sup>。使用如针对实例50所示例的程序或对该程序的改良来制备*N*-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-3-甲酰胺。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 11.05 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 7.8Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.55 (s, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.26 (dd, *J* = 8.6, 7.4Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.3Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 7.8Hz, 1H), 6.91 (t, *J* = 7.3Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 7.6Hz, 1H), 6.08 (s, 2H), 4.05 (d, *J* = 13.9Hz, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.26 (d, *J* = 10.4Hz, 2H), 1.79-1.62 (m, 4H), 1.37 (s, 3H)。HRMS针对  $C_{27}H_{30}N_7O_3S$  (M+H)<sup>+</sup> 计算值是 532.2131, 实测值是 532.2122。IC<sub>50</sub> = 0.017μM。

[0514] 实例67

[0515] N-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-(三氟甲基)苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺



[0517] 步骤a: 将3-氟-2-(三氟甲基)苯胺(9.7g, 54.1mmol)、2-甲基丙烷-2-硫醇(18.31mL, 162mmol)和 $\text{CS}_2\text{CO}_3$ (52.9g, 162mmol)在DMF(100mL)中的悬浮液加热至130℃持续14h。冷却之后,将该反应混合物用水(500mL)稀释,并且用EtOAc(500mL)萃取。然后将有机层用水(3x 400mL)、盐水(3x 300mL)洗涤,经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并减压浓缩以给出12.52g的3-(叔-丁基硫)-2-(三氟甲基)苯胺。MS  $m/z$  250.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0518] 步骤b: 将3-(叔-丁基硫)-2-(三氟甲基)苯胺(2.2g, 8.82mmol)在浓HCl(80mL)中的悬浮液加热至85℃持续3h。冷却后,将反应混合物减压浓缩至接近干燥,并过滤固体。将固体用EtOAc和庚烷洗涤,并在40℃在减压下进一步干燥以给出为HCl盐的3-氨基-2-(三氟甲基)苯硫酚(1.02g, 4.44mmol)。MS  $m/z$  194.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0519] 步骤c: 如针对中间体1所述,使用3-氨基-2-(三氟甲基)苯硫酚(0.45g, 1.94mmol)和3-溴-6-氯吡嗪-2-胺(0.27g, 1.30mmol)进行类似程序以给出3-((3-氨基-2-(三氟甲基)苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(0.211g, 0.66mmol)。MS  $m/z$  321.1 (M+H)<sup>+</sup>。

[0520] 步骤d: 如针对中间体1所述,使用3-((3-氨基-2-(三氟甲基)苯基)硫代)-6-氯吡嗪-2-胺(100mg, 0.31mmol)、叔-丁基(4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(66.7mg, 0.31mmol)进行类似程序以给出叔-丁基(1-(6-氨基-5-((3-氨基-2-(三氟甲基)苯基)硫代)吡嗪-2-基)-4-甲基哌啶-4-基)氨基甲酸酯(100mg, 0.201mmol)。MS  $m/z$  499.3 (M+H)<sup>+</sup>。

[0521] 步骤e: 使用如针对实例50所示的程序或对该程序的改良来制备N-(3-((3-氨基-5-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)吡嗪-2-基)硫代)-2-(三氟甲基)苯基)-4-羟基-2-氧代-1-苯基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-甲酰胺。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{ppm}}$  11.11(s, 1H), 7.91-7.80(m, 3H), 7.72-7.68(m, 2H), 7.66(s, 1H), 7.29-7.19(m, 3H), 6.92(t, J=7.3Hz, 1H), 6.44(d, J=8.0Hz, 1H), 6.14(s, 2H), 4.10-3.95(m, 2H), 3.86(s, 2H), 3.35-3.25(m, 2H), 1.82-1.66(m, 4H), 1.37(s, 3H)。HRMS针对 $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_3\text{S}$ (M+H)<sup>+</sup>计算值是600.2032, 实测值是600.2004。 $\text{IC}_{50}$ =0.004 $\mu\text{M}$ 。

[0522] 测定

[0523] 对本发明化合物选择性地抑制SHP2活性的能力进行了评估。本文所述的本发明化合物的抑制特性可按照以下任一测定通过测试来证明。

[0524] SHP2别构抑制测定

[0525] 通过双-酪氨酰-磷酸化肽与SHP2的Src同源区2 (SH2) 结构域的结合, SHP2被别构活化。后一活化步骤导致SHP2的自抑制界面的释放, 这反过来使SHP2蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 具有活性并可用于识别底物和催化反应。使用替代底物DiFMUP以快速荧光测定形式监测SHP2的催化活性。

[0526] 更具体地, 磷酸酶反应在室温下在384孔黑色聚苯乙烯板 (平底、低凸缘、非结合表面) (科宁公司 (Corning), 目录号3575) 中进行, 该反应使用25 $\mu$ L的最终反应体积和以下测定缓冲液条件进行: 60mM HEPES, pH 7.2, 75mM NaCl, 75mM KCl, 1mM EDTA, 0.05% P-20, 5mM DTT。

[0527] 使用其中0.5nM的SHP2与0.5 $\mu$ M的肽IRS1\_pY1172 (dPEG8) pY1222 (序列: H2N-LN (pY) IDLDLV (dPEG8) LST (pY) ASINFQK-酰胺) (SEQ ID NO:1) 一起孵育的测定, 来监测本发明化合物 (浓度范围为0.003-100 $\mu$ M) 对SHP2的抑制。在25 $^{\circ}$ C孵育30-60分钟后, 将替代底物DiFMUP (英杰公司, 目录号D6567) 添加到该反应中, 并在25 $^{\circ}$ C孵育30分钟。然后通过添加5 $\mu$ l的160 $\mu$ M bpV (Phen) 溶液 (恩佐生命科学公司 (Enzo Life Sciences), 目录号ALX-270-204) 来淬灭反应。使用酶标仪 (Envision, 珀金埃尔默公司 (Perki-Elmer)), 使用分别为340nm和450nm的激发和发射波长监测荧光信号。使用归一化IC<sub>50</sub>回归曲线 (用基于对照的归一化拟合) 分析抑制剂剂量响应曲线。本发明化合物的IC<sub>50</sub>结果显示在上文实例和表1-7中。

[0528] p-ERK细胞测定

[0529] p-ERK细胞测定使用 **AlphaScreen<sup>®</sup> SureFire<sup>™</sup>** 磷酸-ERK 1/2试剂盒 (珀金埃尔默公司 (PerkinElmer)): 使KYSE-520细胞 (30,000个细胞/孔) 在96孔板培养基中生长过夜, 并用浓度为20 $\mu$ M、6.6 $\mu$ M、2.2 $\mu$ M、0.74 $\mu$ M、0.24 $\mu$ M、0.08 $\mu$ M、0.027 $\mu$ M的Shp2抑制剂在37 $^{\circ}$ C处理2小时。通过添加30 $\mu$ L的供应有SureFire磷酸-胞外信号调节激酶 (pERK) 测定试剂盒 (珀金埃尔默公司) 的裂解缓冲液 (珀金埃尔默公司) 来终止孵育。根据制造商的指导对样品进行处理。使用2101多标记读数器 (Envision, 珀金埃尔默公司) 一式两份测量来自pERK的荧光信号。通过总ERK信号归一化抑制百分比, 并与DMSO载体对照进行比较。

[0530] 集落形成测定和细胞增殖测定

[0531] 将KYSE-520细胞 (1500个细胞/孔) 涂板到24孔板上的300 $\mu$ L培养基 (含有10%FBS的RPMI-1640, 龙沙集团 (Lonza)) 中。对于药物处理, 在细胞涂板后24小时和5天添加不同浓度 (20 $\mu$ M、10 $\mu$ M、5 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M、1.25 $\mu$ M) 的本发明化合物。在第11天, 用0.2%结晶紫 (MP生物学公司 (MP Biomedicals)) 对集落染色, 并将其随后溶解在20%乙酸中, 用于使用Spectramax读数器 (赛默飞世尔科技公司 (Thermo Scientific)) 进行定量。在细胞增殖测定中, 将细胞 (1500个细胞/孔) 涂板到96孔板上的100 $\mu$ L培养基 (含有10%FBS的RPMI-1640, 龙沙集团 (Lonza)) 中。在第6天, 添加50 $\mu$ L Celltiter-Glo试剂 (普洛麦格公司 (Promega)), 并根据供应商的说明 (普洛麦格公司) 确定发光信号。

[0532] 应当理解, 本文所描述的实例和实施例仅是出于说明的目的, 并且其各种修改或变化对于本领域技术人员将是明了的并包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求范围内。

- <110> 诺华公司 (Novartis AG)  
 Chen, Zhuoliang  
 Fortanet, Jorge Garcia  
 Karki, Rajesh  
 LaMarche, Matthew J  
 Majumdar, Dyuti  
 Perez, Lawrence Blas  
 Sendzik, Martin  
 Smith, Troy Douglas  
 Yang, Fan  
 Yu, Bing
- <120> 用于抑制SHP2活性的化合物和组合物
- <130> PAT057289-WO-PCT
- <160> 1
- <170> PatentIn版本3.5
- <210> 1  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列
- [0001] <220>  
 <223> 衍生自胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 的双磷酸化肽
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> 磷酸化酪氨酸
- <220>  
 <221> 尚未归类的特征  
 <222> (10)..(10)  
 <223> dPEG8
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 磷酸化酪氨酸
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 <223> 酰胺化赖氨酸
- <400> 1
- Leu Asn Tyr Ile Asp Leu Asp Leu Val Xaa Leu Ser Thr Tyr Ala Ser  
 1 5 10 15
- [0002] Ile Asn Phe Gln Lys  
 20