

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年6月25日 (25.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/125673 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07D 487/06 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/126277
- (22) 国际申请日: 2019年12月18日 (18.12.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201811556309.3 2018年12月19日 (19.12.2018) CN
- (71) 申请人: 南京药石科技股份有限公司 (PHARMABLOCK SCIENCES (NANJING), INC.) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江北新区学府路10号, Jiangsu 210032 (CN)。
- (72) 发明人: 李进 (LI, Jin); 中国江苏省南京市江北新区学府路10号, Jiangsu 210032 (CN)。 王利莎 (WANG, Lisha); 中国江苏省南京市江北新区学府路10号, Jiangsu 210032 (CN)。 王琳 (WANG, Lin); 中国江苏省南京市江北新区学府路10号, Jiangsu 210032 (CN)。 杨民民 (YANG, Minmin); 中国江苏省南京市江北新区学府路10号, Jiangsu 210032 (CN)。
- (74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司 (BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路39号西金大厦6层, Beijing 100036 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。

(54) Title: INFLUENZA VIRUS REPLICATION INHIBITOR, INTERMEDIATE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 流感病毒复制抑制剂及其中间体和用途

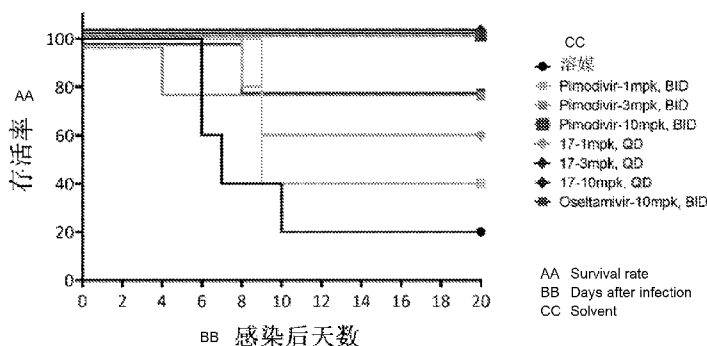


图2

(57) Abstract: The present application discloses a compound that can be used as influenza virus replication inhibitor, an intermediate for preparing the compound, and a use of the compound in the preparation of medicament for preventing or treating viral infectious diseases, in particular influenza A virus infection.

(57) 摘要: 本申请公开了一类可作为流感病毒复制抑制剂的化合物, 制备所述化合物的中间体, 以及所述化合物用于制备预防或治疗病毒感染性疾病药物, 尤其是A型流感病毒感染药物中的用途。



WO 2020/125673 A1

流感病毒复制抑制剂及其中间体和用途

技术领域

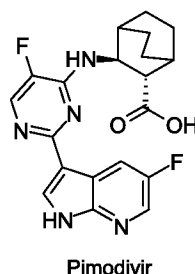
本申请属于化学医药领域，具体涉及一种流感病毒复制抑制剂及其中间体和用途。

背景技术

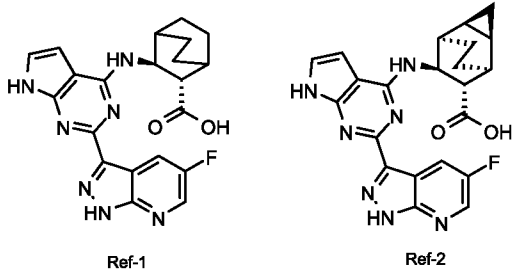
流行性感冒（简称流感，Flu）是由流感病毒（Influenza virus）引起的呼吸系统疾病。根据病毒核蛋白和基质蛋白的抗原决定簇的差异，可将流感病毒分为甲（A）、乙（B）、丙（C）三种类型，其中 A 型流感最为常见，致病性强，易发生大规模流行，严重威胁人类生命与健康。预防和治疗流感，通常采用疫苗接种和抗流感药物治疗两种方法。疫苗接种是目前预防流感的一种有效措施。成年人接种后可以达到较好的预防效果，但是婴幼儿、老年人等免疫力较低者接种后效果并不理想。而且流感病毒不断地变异，旧疫苗难以对抗新病毒。化学药物是治疗流感的另一种重要手段，但是迄今为止，上市抗流感化学药物数量少，应用较多的是 M2 离子通道抑制剂、神经氨酸酶（NA）抑制剂以及核苷类抗病毒药物。

近年来，流感 RNA 聚合酶（RdRp）受到了广泛关注。RdRp 是由 PA、PB1 和 PB2 三个亚基组成的异源三聚体，在流感病毒基因组转录和复制过程中发挥重要作用。流感病毒 RNA 的转录具有特殊的“夺帽”机制，在此过程中，PB2 亚基负责识别和结合宿主前体 mRNA 的“帽子结构”，然后 PA 亚基剪切“帽子”作为引物，启动转录过程。抑制“夺帽”可以阻断转录过程，达到抑制流感病毒增殖的效果。因此，PB2 被认为是很有前途的抗流感药物靶标，已引起了制药公司和学术研究机构的高度重视。

目前，全球首创的流感病毒聚合酶复合物 PB2 亚单位抑制剂候选药物是 Pimodivir，由强生公司在 2014 年从 Vertex pharmaceuticals 获得了药物的全球开发权益，该药目前正处于 III 期临床。试验表明，相比安慰剂组，Pimodivir 可以显著降低病患的病毒载量。其结构如下所示：



公开日期为 2017 年 2 月 3 日的国际专利公开文本 WO2017133664A1 中也公开了一类用于制备抗流感药物的化合物，其中一些化合物表现出了较好的抗病毒活性，如：

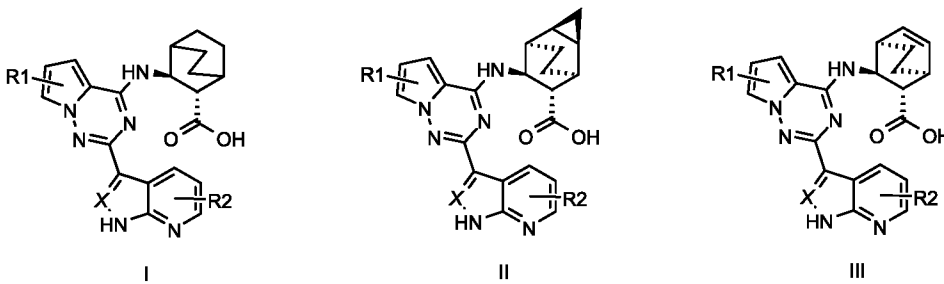


目前临床上可应用的抗流感药物的种类和数量都较少，且均存在耐药性、临床效果差等问题，因此基于该新作用机理的临床候选化合物仍迫切地需要进行开发。

发明内容

本申请公开了一类作为流感病毒复制抑制剂的化合物以及其在制备预防或治疗病毒性感染性疾病药物中的用途，与现有的同类型化合物相比，本申请的化合物显示出更好的抗病毒活性。

一方面，本申请提供了如式 (i)、式 (ii) 或式 (iii) 的化合物：



其中， R_1 、 R_2 分别独立地选自氢、C1-C6 烷基、氰基、卤素、硝基或氨基；

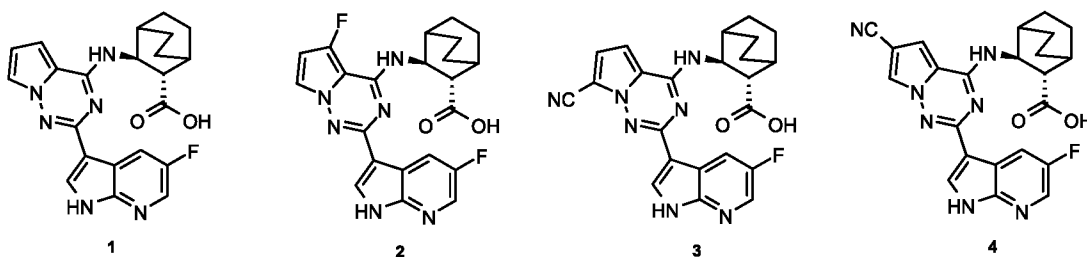
X 选自 C 或 N。

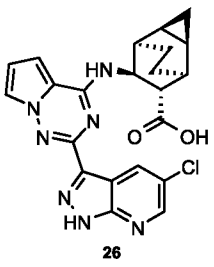
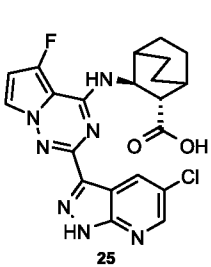
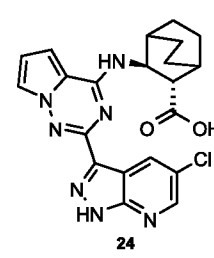
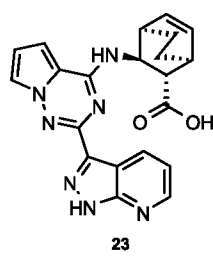
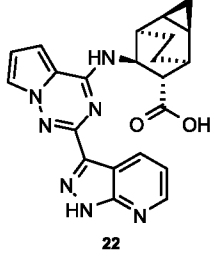
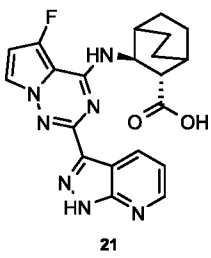
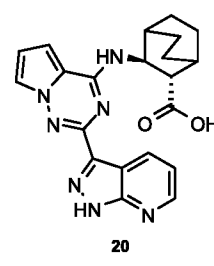
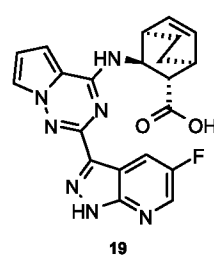
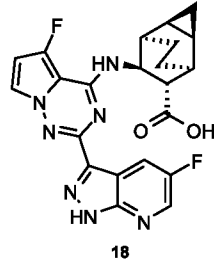
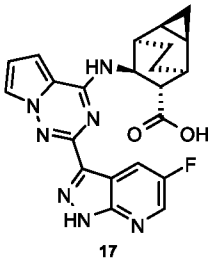
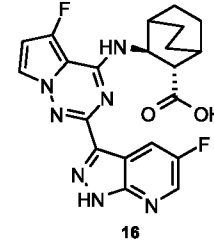
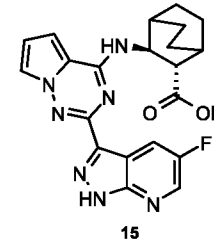
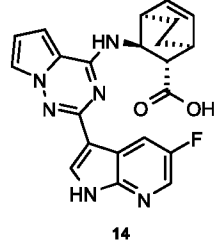
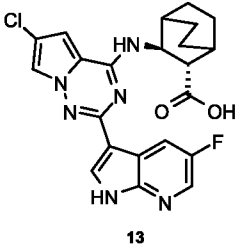
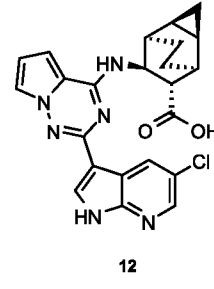
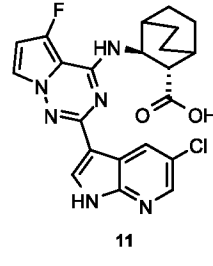
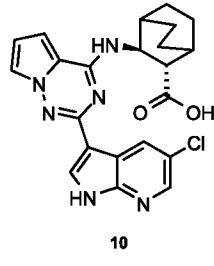
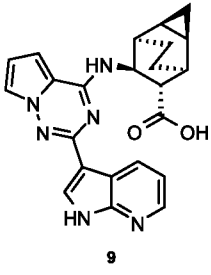
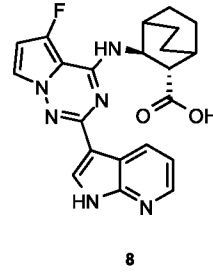
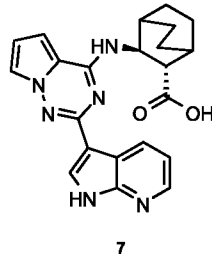
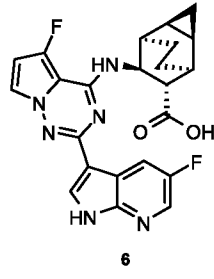
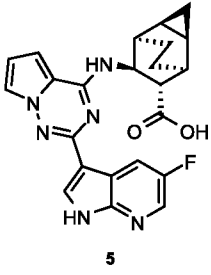
在一些实施方案中， R_1 、 R_2 分别独立地选自氢、氰基或卤素。

在另一些实施方案中， R_1 选自氢、氰基、氟或氯。

在另一些实施方案中， R_2 选自氢、氟或氯。

在另一些实施方案中，本申请涉及到以下化合物及其药学上可接受的盐、酯、溶剂化物、多晶型、前药、立体异构体或互变异构体，但不限于这些化合物：



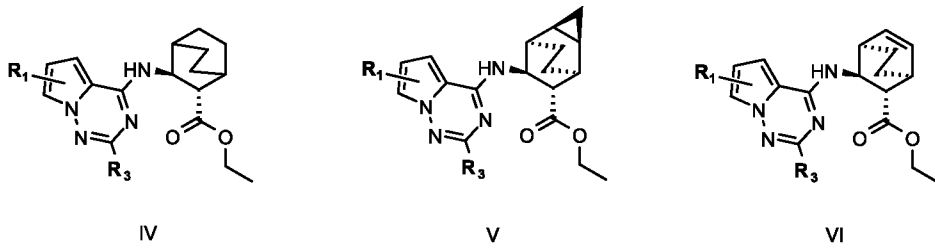


另一方面，本申请提供了所述化合物用于制备预防或治疗病毒感染性疾病药物中的用途。

在一些实施方案中，所述病毒感染为流感病毒感染。

在另一些实施方案中，所述病毒感染为 A 型流感病毒感染。

另一方面，本申请提供可作为制备前述具有抗病毒活性化合物中间体的式 (IV)、式 (V) 或式 (VI) 的化合物：

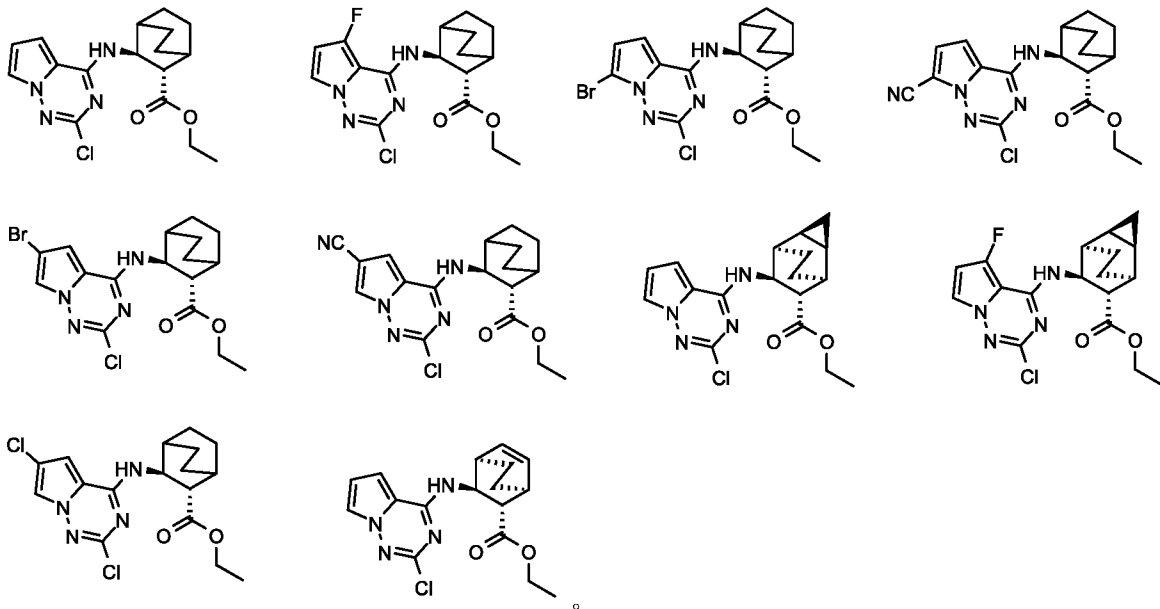


其中，R₁ 选自氢、C1-C6 烷基、氰基、卤素、硝基或氨基；

R₃ 选自氯、溴或碘。

在一些实施方案中，R₁ 选自氢、氰基、氟、氯或溴；R₃ 为氯。

在另一些实施方案中，所述式 (IV)、式 (V) 或式 (VI) 的化合物具有如下结构：



附图说明

图 1. H1N1 Puerto Rico/8/34 病毒感染前 2 小时用药小鼠生存图；

图 2. H1N1 Puerto Rico/8/34 病毒感染后 24 小时用药小鼠生存图。

下面简写词的使用贯穿本申请:

THF: 四氢呋喃;

DIPEA: N,N-二异丙基乙胺;

Pd(dppf)Cl₂: [1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯;

MgSO₄: 硫酸镁;

Zn(CN)₂: 氰化锌;

DPPF: 1,1'-双(二苯基膦)二茂铁;

Pd(PPh₃)₄: 四(三苯基膦)钯;

DCM: 二氯甲烷;

MeCN: 乙腈;

K₃PO₄: 磷酸钾;

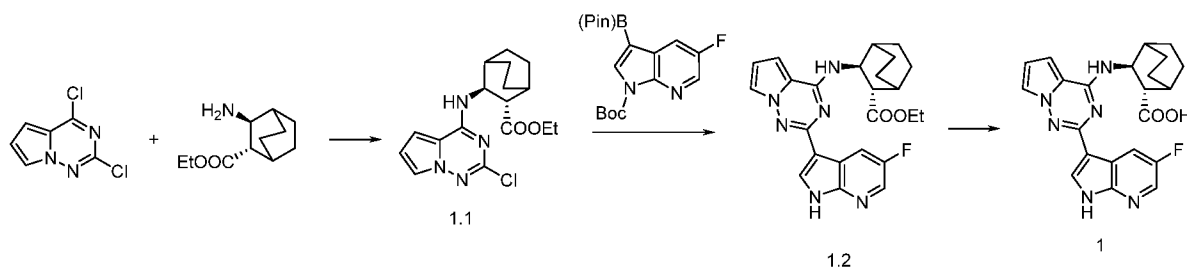
DMF: N,N-二甲基甲酰胺;

DMSO: 二甲基亚砷;

DMAC: N,N-二甲基乙酰胺。

具体实施方式

实施例 1 (2S, 3S)-3-((2-(5-氟-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸(化合物 1)



步骤 1 中间体 1.1 的制备

向反应瓶中加入 2,4-二氯吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪(10.00 g, 53.18 mmol, 1.0 eq.) 和 THF (100 mL), 冰水浴降温, 搅拌下滴加 DIPEA (13.75 g, 106.4 mmol, 2.0 eq.), 加毕, 向上述反应体系中分批加入 (2S, 3S)-3-氨基双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸乙酯(12.59 g, 63.82 mmol, 1.2 eq.), 室温搅拌反应 2 小时。浓缩反应液, 向浓缩液中加入乙酸乙酯和水, 分层分液, 有机相用无水硫酸镁干燥, 浓缩制砂, 柱层析(石油醚: 乙酸乙酯=5:1)得中间体 1.1, 为黄色油状物 18.47 g,

收率: 100%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 7.51 (s, 1H), 6.60 (m, 2H), 5.58 (brs, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.22 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 2.45 (d, *J*=4.8 Hz, 1H), 1.45-2.05 (m, 10H), 1.26 (t, *J*=7.2 Hz, 3H)。

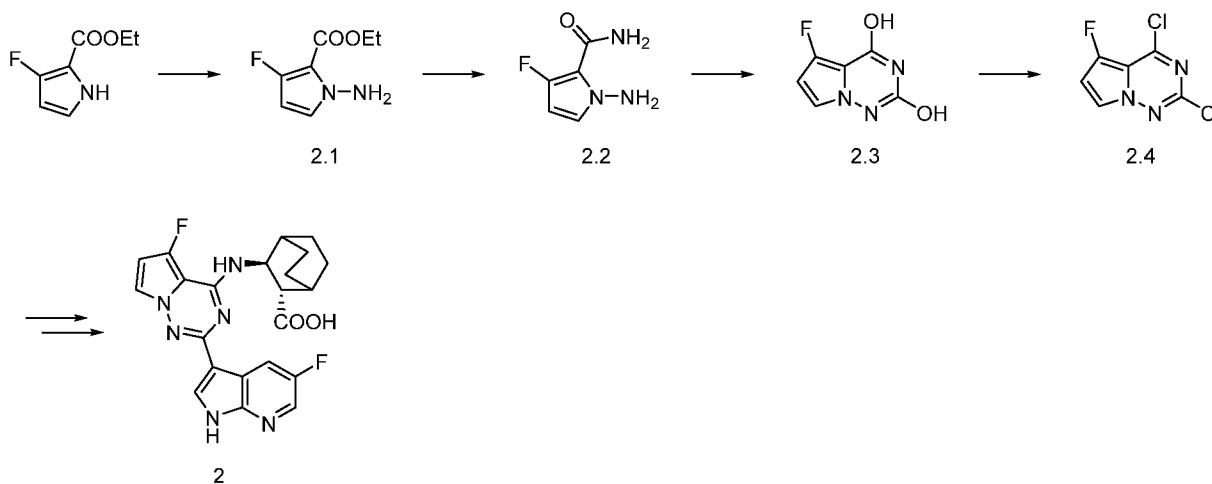
步骤2 中间体 1.2 的制备

向反应瓶中加入中间体 1.1(1.15 g, 3.31 mmol, 1.2 eq.)、5-氟-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-1-羧酸叔丁酯(1.00 g, 2.76 mmol, 1.0 eq.)和 1,4-二氧六环(30 mL), 向其中加入碳酸钾(1.14 g, 8.28 mmol, 3.0 eq.)的水(10 mL)溶液, 再向反应体系中加入催化量的 Pd(dppf)Cl₂, 氮气保护下加热至回流反应 8 小时, 向反应液中加入水后用乙酸乙酯萃取, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 浓缩制砂, 柱层析(石油醚: 乙酸乙酯=3: 1)得中间体 1.2 为类白色固体 0.43 g, 收率: 35%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 9.52 (s, 1H), 8.62 (dd, *J*=2.8 Hz, 9.3 Hz, 1H), 8.31 (d, *J*=2.6 Hz, 1H), 8.26 (t, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J*=1.6 Hz, 2.5 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J*=2.6 Hz, 4.4 Hz, 1H), 6.56 (t, *J*=1.2 Hz, 1H), 5.41 (d, *J*=6.7 Hz, 1H), 4.93 (m, 1H), 4.04-4.24 (m, 2H), 2.49-2.51 (m, 1H), 2.07 (m, 2H), 1.62-1.93 (m, 8H), 1.15 (t, *J*=7.2 Hz, 3H)。

步骤3 化合物 1 的制备

将中间体 1.2(430 mg, 0.96 mmol, 1.0 eq.)溶于四氢呋喃(30 mL)置于反应瓶中, 加入一水合氢氧化锂(80 mg, 1.92 mmol, 2.0 eq.)的水(10 mL)溶液, 反应体系升温至回流反应 16 小时, 浓缩反应液后加入水, 用 6 N 盐酸水溶液调节 pH 至 5~6, 用乙酸乙酯萃取, 有机相用无水硫酸镁干燥, 浓缩制砂, 柱层析(二氯甲烷: 甲醇=30: 1)得化合物 1 为类白色固体 200 mg, 收率: 50%。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.31 (brs, 1H), 12.18 (brs, 1H), 8.52 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 2.78 (s, 1H), 1.42-2.03 (m, 10H); LC-MS (*m/z*): 421 [M+H]⁺。

实施例 2 (2S, 3S) -3-((5-氟-2-(5-氟-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸(化合物 2)



步骤 1 中间体 2.1 的制备

将 3-氟-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 (7.20 g, 45.8 mmol, 1.0 eq.) 溶于 DMF 置于反应瓶中, 冰水浴条件下分批加入氢氧化钠 (60%, 2.40 g, 59.6 mmol, 1.3 eq.), 加毕, 搅拌 1 小时。分批加入 O-(2,4-二硝基苯基)羟胺 (13.67 g, 68.7 mmol, 1.5 eq.), 加毕, 室温搅拌 17 小时。将反应混合物倒入冷水中, 并用乙酸乙酯萃取。将有机相用盐水洗涤, MgSO_4 干燥并浓缩至干。柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=30:1) 得中间体 2.1, 7.00 g, 收率 89%, 为黄色油状物。

步骤 2 中间体 2.2 的制备

将中间体 2.1 (7.00 g, 40.7 mmol, 1.0 eq.) 的饱和氨甲醇溶液 (200 mL) 在密封管中加热至 150 °C 反应 48 小时。将反应混合物浓缩至干, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=30:1) 得中间体 2.2, 2.30 g, 收率 40%, 为灰白色固体。

步骤 3 中间体 2.3 的制备

将化合物 2.2 (2.30 g, 16.0 mmol, 1.0 eq.) 悬浮于甲苯 (20 mL) 中, 加入草酰氯 (3.4 mL, 40.2 mmol, 2.5 eq.), 反应混合物加热回流 17 小时。反应物浓缩至干, 甲醇洗涤, 过滤, 收集滤饼即得中间体 2.3, 1.80 g, 收率 67%, 为灰白色固体。

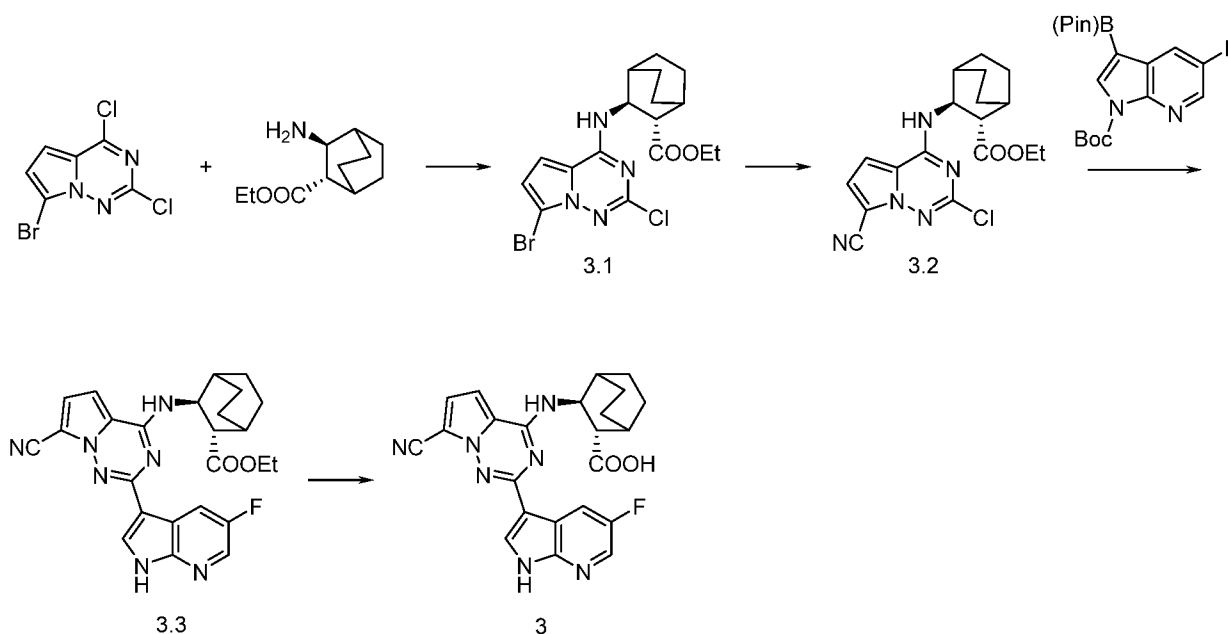
步骤 4 中间体 2.4 的制备

密闭试管中加入中间体 2.3 (1.00 g, 6.0 mmol, 1.0 eq.), POCl_3 (4.60 g, 30.0 mmol, 5.0 eq.), DIPEA (2.33 g, 18.0 mmol, 3.0 eq.), 反应混合物加热至 120 °C 反应 12 小时。将反应混合物倒入冷水中, 并用饱和碳酸钠水溶液调节 pH = 7-8。用乙酸乙酯萃取混合物。有机相用盐水洗涤, MgSO_4 干燥并浓缩至干。柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=100:1) 得中间体 2.4, 0.97 g, 收率 79%, 为黄色油状物。

步骤 5 化合物 2 的制备

根据实施例 1 中的合成方法, 使用化合物 2.4 作为起始原料获得化合物 2。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.24-12.27 (m, 2H), 8.49 (dd, *J*=2.8 Hz, 9.6 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.18 (d, *J*=2.8 Hz, 1H), 7.61-7.63 (m, 1H), 7.14 (d, *J*=6.4 Hz, 1H), 6.50 (d, *J*=3.1 Hz, 1H), 4.82 (t, *J*=6.5 Hz, 1H), 2.96 (d, *J*=6.7 Hz, 1H), 1.41-2.00 (m, 10H); LC-MS (*m/z*): 439 [M+H]⁺。

实施例 3 (2*S*, 3*S*) -3-((7-氰基-2-(5-氟-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 3)



步骤 1 中间体 3.1 的制备

中间体 3.1 以 7-溴-2,4-二氯吡咯并[2,1-*f*] [1,2,4]三嗪作为起始原料, 使用与实施例 1 中的化合物 1.1 类似的方法合成。

步骤 2 中间体 3.2 的制备

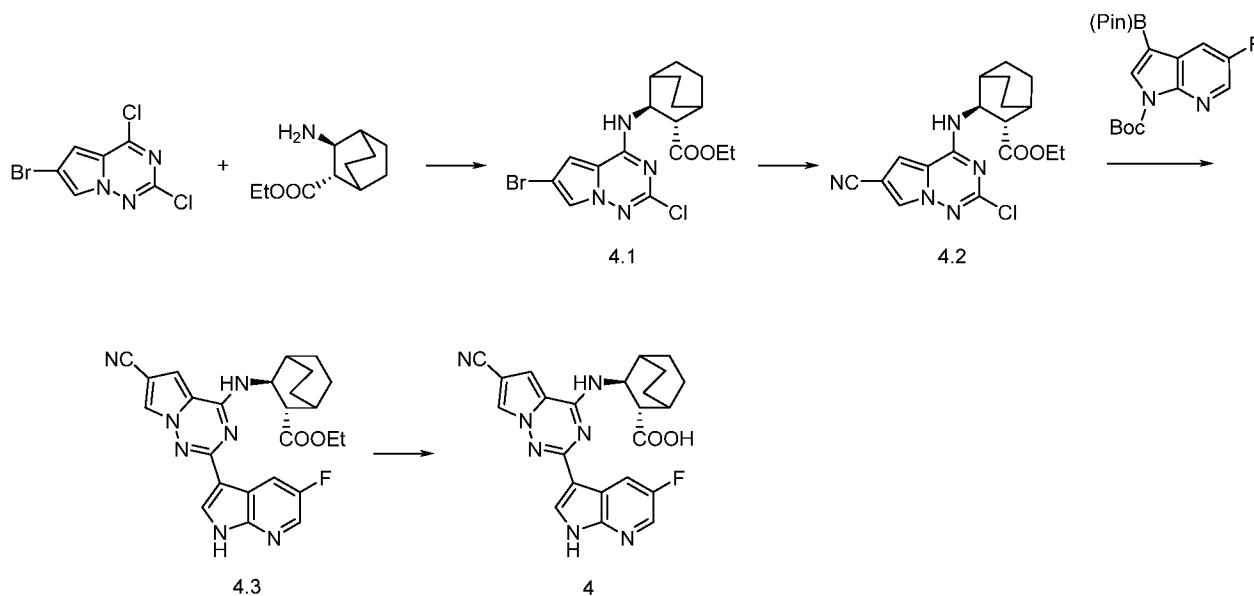
将中间体 3.1 (800 mg, 1.87 mmol, 1.0 eq.) 溶于 DMAC (15 mL) 中, 加入 Zn(CN)₂ (164 mg, 1.40 mmol, 0.75 eq.), 再加入催化量的 DPPF 和 Pd(PPh₃)₄, 将所得混合物在氮气条件下加热回流 12 小时。将反应混合物倒入冷水中, 乙酸乙酯萃取混合物。有机相用盐水洗涤, MgSO₄ 干燥并浓缩至干。柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=2:1) 得中间体 3.2, 300 mg, 收率 43%, 为淡黄色固体。

步骤 3 化合物 3 的制备

化合物 3 根据实施例 1 中合成化合物 1 的类似方法, 以中间体 3.2 为起始原料制得。¹HNMR

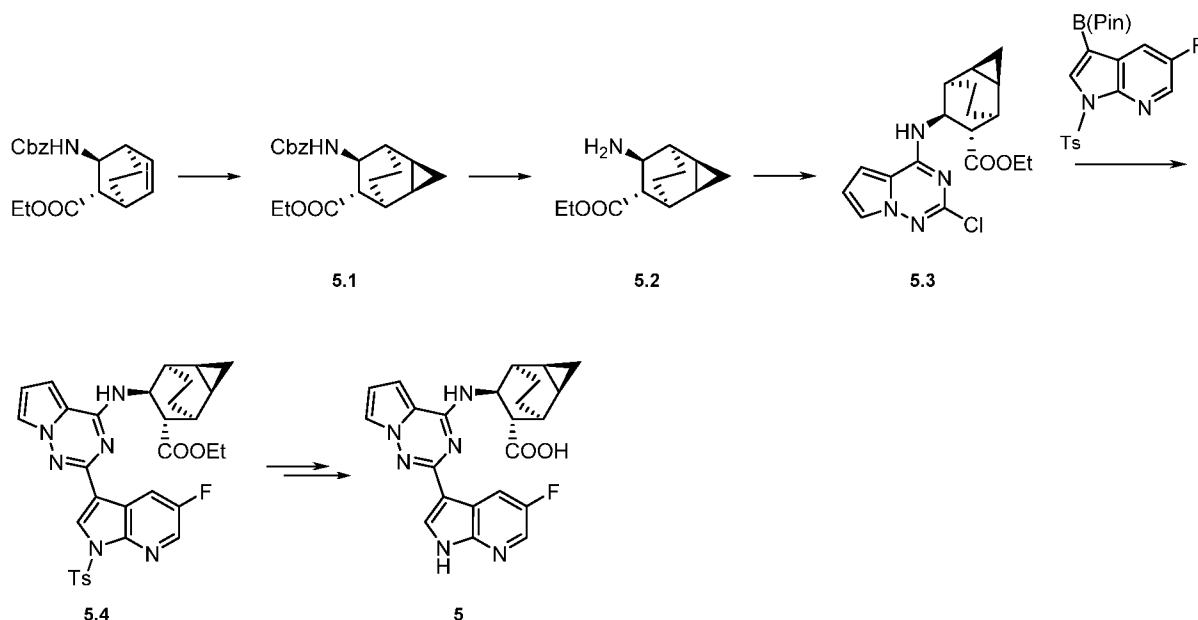
(400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 12.39 (br, 2H), 8.46 (dd, $J=2.6$ Hz, 9.6 Hz, 1H), 8.40 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.35 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 4.80 (t, $J=6.4$ Hz, 1H), 2.75 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 1.43-2.02 (m, 10H); LC-MS (m/z): 446 [M+H]⁺。

实施例 4 (2S, 3S) -3-((6-氰基-2-(5-氟-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 4)



化合物 4 根据实施例 3 中合成化合物 3 的类似方法, 以 6-溴-2,4-二氯吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 12.34 (br, 2H), 8.49 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.25-8.31 (m, 3H), 7.43 (s, 1H), 4.80 (m, 1H), 2.73 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 1.44-2.03 (m, 10H); LC-MS (m/z): 446 [M+H]⁺。

实施例 5 (1R, 2S, 4R, 5S, 6S, 7S) -7-((2-(5-氟-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸 (化合物 5)



步骤 1 中间体 5.1 的制备

将 (1S, 2S, 3S, 4R) -3 (((苄氧基) 羰基) 氨基) 双环[2.2.2]辛-5-烯-2-羧酸乙酯 (40.00 g, 121.4 mmol, 1.0 eq.) 溶于 DCM, 在冰水浴温度和氮气保护的条件下滴加 2 M 二乙基锌的正己烷溶液 (121.4 mL, 242.8 mmol, 2.0 eq.)。向体系中滴加 CH_2I_2 (130.1 g, 485.7 mmol, 4.0 eq.)，在冰水浴温度下再滴加 2M 二乙基锌的正己烷溶液 (121.4 mL, 242.8 mmol, 2.0 eq.)。反应混合物升至室温反应过夜，用饱和氯化铵水溶液淬灭反应，然后用 DCM 萃取。有机相用盐水洗涤，用无水 MgSO_4 干燥并浓缩至干。柱层析 (石油醚：乙酸乙酯=10：1) 得中间体 5.1, 21.00 g, 收率 50%，为无色油状物。

步骤 2 中间体 5.2 的制备

将中间体 5.1 (21.00 g, 61.1 mmol, 1.0 eq.) 溶于 MeCN, 冰水浴温度下滴加三甲基碘硅烷 (26.91 g, 134.5 mmol, 2.2 eq.)，反应 2 小时后加入三乙胺 (15.46 g, 152.8 mmol, 2.5 eq.)，搅拌 15 分钟。反应混合物浓缩至干，加入乙酸乙酯萃取。有机相用水洗涤，用无水 MgSO_4 干燥并浓缩至干，即得中间体 5.2, 9.50 g, 收率 75%。

步骤 3 中间体 5.3 的制备

将 2,4-二氯吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪 (8.48 g, 45.4 mmol, 1.0 eq.) 溶于四氢呋喃 (95 mL)，在冰水浴温度下滴加 DIPEA (17.59 g, 136.17 mmol, 3.0 eq.)，再加入中间体 5.2 (9.50 g, 45.4 mmol, 1.0 eq.)，室温搅拌 2 小时。反应混合物浓缩至干，加入乙酸乙酯萃取。有机相用水洗涤，用无水 MgSO_4 干燥并浓缩至干。柱层析 (石油醚：乙酸乙酯=8：1) 得中间体 5.3, 12.00 g, 收率 73%，为黄色固体。

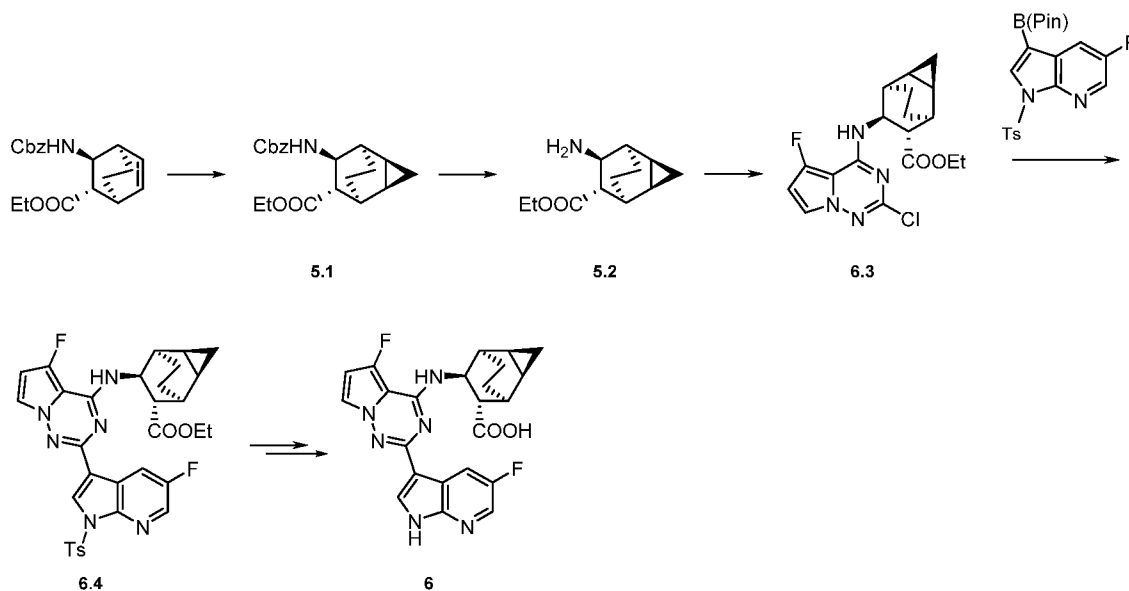
步骤 4 中间体 5.4 的制备

将 5-氟-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶 (28.04 g, 67.4 mmol, 2.2 eq.) 和中间体 5.3 (11.10 g, 30.6 mmol, 1.0 eq.) 溶于 1,4-二氧六环 (300 mL), 向体系中加入 K_3PO_4 (21.62 g, 101.8 mmol, 3.0 eq.) 的水溶液 (60 mL), 再加入催化量的 $Pd(dppf)Cl_2$, 混合物在氮气条件下加热回流 8 小时。反应物用水稀释, 加入乙酸乙酯萃取。有机相用盐水洗涤, 用无水 $MgSO_4$ 干燥并浓缩至干。柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 10:1) 得中间体 5.4, 15.00 g, 收率 71%, 为白色固体。

步骤 5 化合物 5 的制备

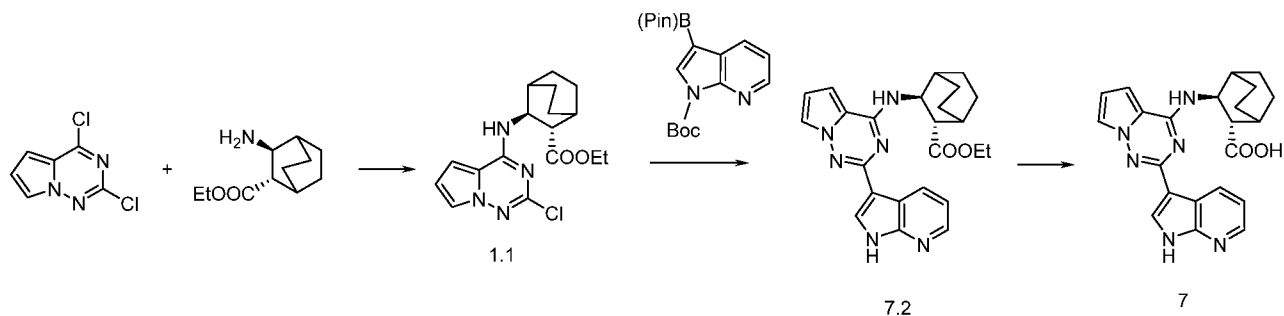
将中间体 5.4 (15.00 g, 21.3 mmol, 1.0 eq.) 溶于 DCM (150 mL), 加入三氟乙酸 (24.30 g, 213.1 mmol, 10.0 eq.) 和三乙基硅烷 (12.38 g, 106.6 mmol, 5.0 eq.), 室温搅拌过夜。反应混合物浓缩至干后, 用甲醇 (80 mL), 水 (15 mL) 和四氢呋喃 (20 mL) 溶解, 再加入一水合氢氧化锂 (2.18 g, 52.0 mmol, 3.0 eq.), 将反应混合物在 50°C 下搅拌 5 小时。浓缩反应混合物, 除去四氢呋喃和甲醇, 并将残余物用水稀释。将得到的混合物用 6 N HCl 调节 pH = 5-6, 过滤收集固体, 用乙酸乙酯 (10 mL) 洗涤, 得到化合物 5, 3.85 g, 收率 51%, 为白色固体。
 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) 14.15 (brs, 1H), 12.56 (brs, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.55 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73 (d, $J=4.1$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 6.70 (dd, $J=2.6$ Hz, 4.2 Hz, 1H), 4.62 (brs, 1H), 2.85 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 2.76 (s, 1H), 1.51-1.69 (m, 4H), 1.10-1.12 (m, 2H), 0.75-0.85 (m, 1H), 0.30-0.39 (m, 1H); LC-MS (m/z): 434 $[M+H]^+$; $[\alpha]_D^{25} = -26.6^\circ$ (c=1.08 g/100 mL, MeOH)。

实施例 6 (1R, 2S, 4R, 5S, 6S, 7S) -7 - ((5-氟-2-(5-氟-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸 (化合物 6)



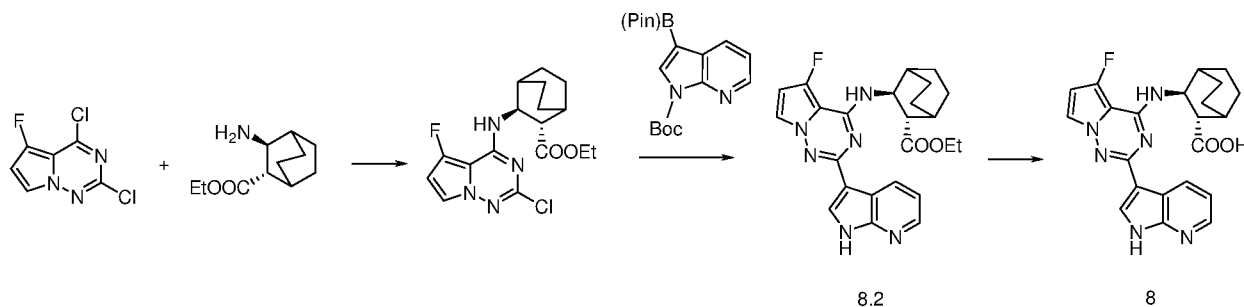
化合物 6 根据实施例 5 中合成化合物 5 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.28 (s, 1H), 12.23 (d, 1H), 8.50-8.47 (dd, 1H), 8.29 (d, 1H), 8.23 (d, 1H), 7.64 (t, 1H), 6.63 (d, 1H), 6.51 (d, 1H), 4.53 (brs, 1H), 2.72 (d, 1H), 2.51 (m, 1H), 2.35 (d, 1H), 1.69-1.67 (m, 2H), 1.59-1.54 (m, 2H), 1.10 (m, 1H), 0.91-0.82 (m, 2H), 0.49-0.37 (m, 1H); LC-MS (m/z): 451 [M+H]⁺。

实施例 7 (2*S*, 3*S*)-3-((2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-*f*] [1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 7)



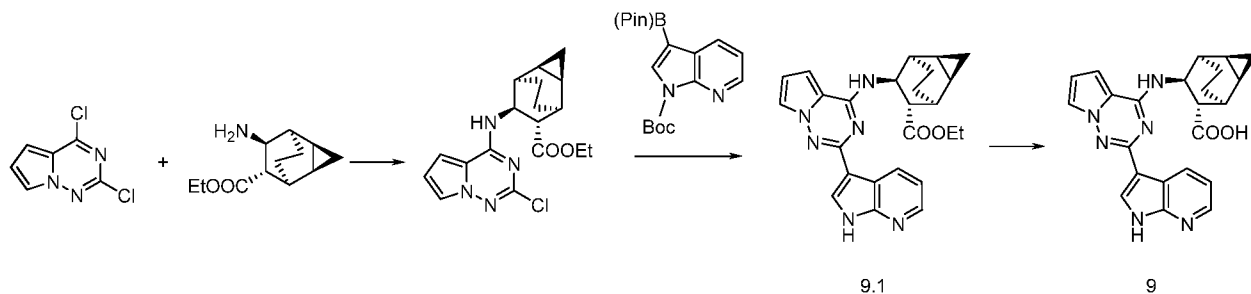
化合物 7 根据实施例 1 中合成化合物 1 类似的制备方法, 以 3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-1-羧酸叔丁酯为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.30 (s, 1H), 11.98 (s, 1H), 8.75 (d, *J*=1.36 Hz, 1H), 8.27 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 8.09 (d, *J*=2.7 Hz, 1H), 7.84 (d, *J*=6.6 Hz, 1H), 7.65 (t, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.18 (d, *J*=4.7 Hz, 1H), 6.95 (d, *J*=1.4 Hz, 1H), 6.58 (d, *J*=2.6 Hz, 1H), 4.78 (t, *J*=6.7 Hz, 1H), 2.76 (d, *J*=7.0 Hz, 1H), 2.03 (s, 2H), 1.39-1.80 (m, 7H); LC-MS (m/z): 404 [M+H]⁺。

实施例 8 (2S, 3S) -3-((5-氟-2-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 8)



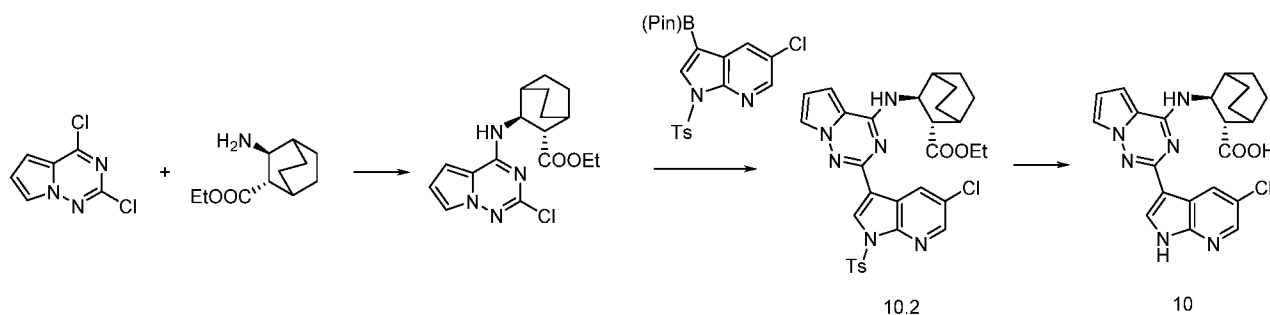
化合物 8 根据实施例 7 中合成化合物 7 类似的制备方法, 以实施例 2 中的中间体 2.4 为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.25 (brs, 1H), 12.07 (brs, 1H), 8.73 (d, 1H), 8.29 (d, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.58 (t, 1H), 7.20 (q, 1H), 7.08 (d, 1H), 6.49 (d, 1H), 4.82 (m, 1H), 2.96 (d, 1H), 2.03-1.99 (m, 2H), 1.78-1.60 (m, 3H), 1.58-1.40 (m, 5H); LC-MS (m/z): 422 [M+H]⁺。

实施例 9 (1R, 2S, 4R, 5S, 6S, 7S) -7-((2-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸 (化合物 9)



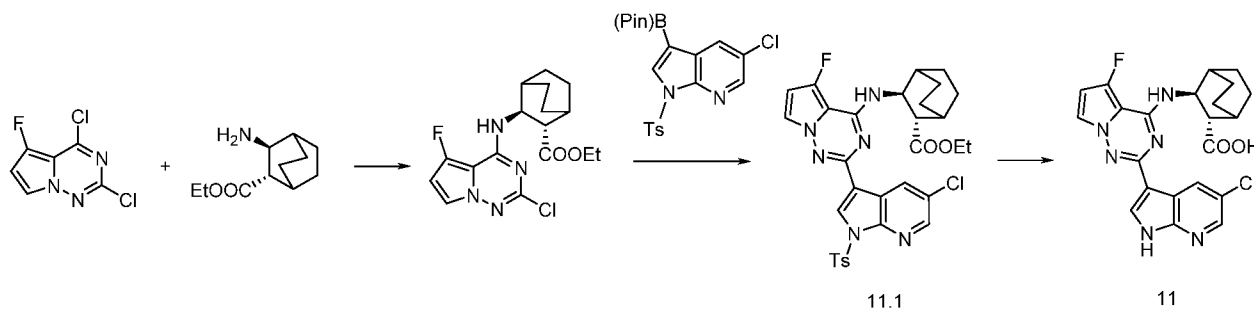
化合物 9 根据实施例 7 中合成化合物 7 类似的制备方法, 以实施例 5 中的中间体 5.2 为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.37 (s, 1H), 11.98 (s, 1H), 8.74-8.76 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.64-7.66 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 4.46 (s, 1H), 2.68 (s, 2H), 2.35 (s, 1H), 1.71 (s, 1H), 1.55 (s, 1H), 1.01-1.06 (d, *J*=18.1, 2H), 0.84 (s, 1H), 0.36 (s, 1H); LC-MS (m/z): 416 [M+H]⁺。

实施例 10 (2S, 3S) -3-((2-(5-氯-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 10)



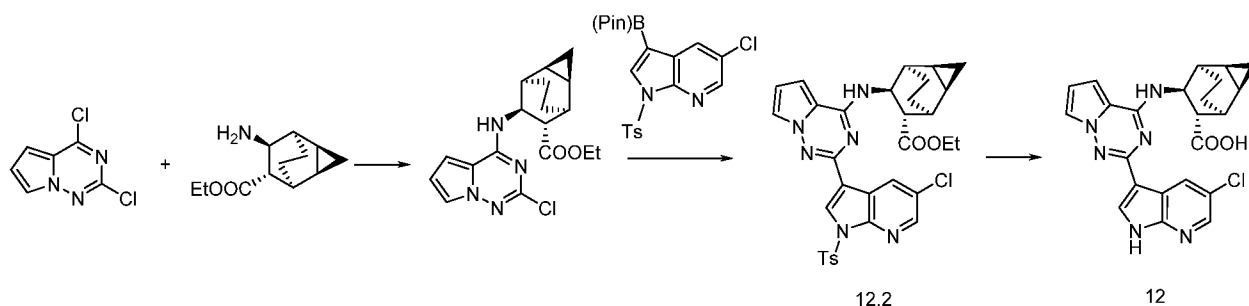
化合物 10 根据实施例 7 中合成化合物 7 类似的制备方法,以 5-氯-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.32 (s, 1H), 12.28 (s, 1H), 8.78 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.29 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.17 (d, *J*=2.7 Hz, 1H), 7.90 (d, *J*=6.7 Hz, 1H), 7.69 (t, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.97 (q, 1H), 6.59 (q, 1H), 4.80 (t, 1H), 2.77 (d, 1H), 2.03 (s, 2H), 1.59-1.87 (m, 8H); LC-MS (*m/z*): 438 [M+H]⁺。

实施例 11 (2*S*, 3*S*)-3-((2-(5-氯-1H-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)-5-氟-吡咯并[2,1-*f*] [1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸(化合物 11)



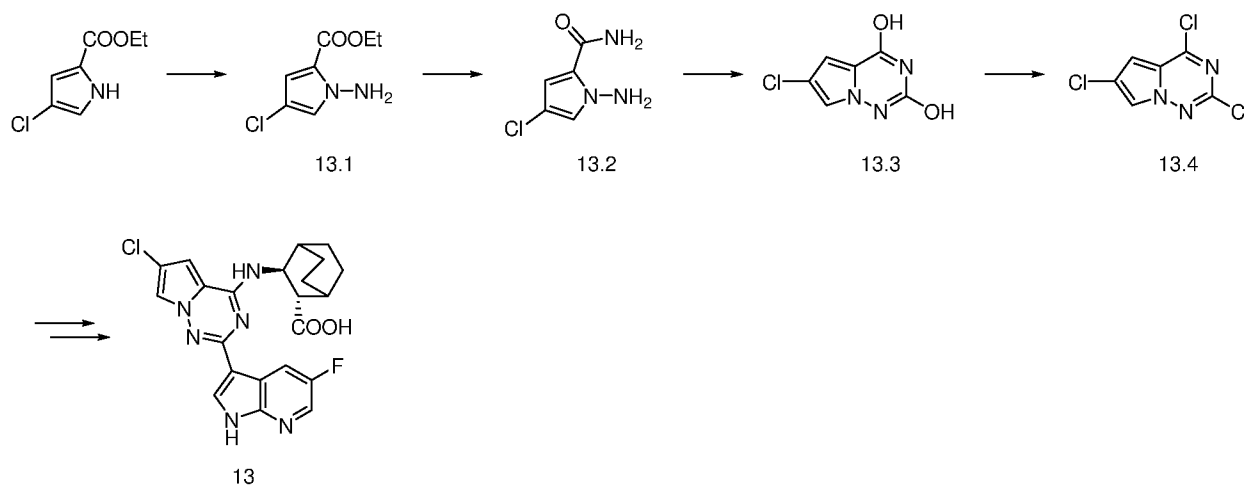
化合物 11 根据实施例 10 中合成化合物 10 类似的制备方法,以实施例 2 中的中间体 2.4 为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.34 (brs, 1H), 12.26 (brs, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.16 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 4.84 (m, 1H), 2.98 (d, 1H), 2.01 (m, 2H), 1.79-1.91 (m, 3H), 1.40-1.57 (m, 5H); LC-MS (*m/z*): 456 [M+H]⁺。

实施例 12 (1*R*, 2*S*, 4*R*, 5*S*, 6*S*, 7*S*)-7-((2-(5-氯-1H-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-*f*] [1,2,4]三嗪-4-基)氨基)三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸(化合物 12)



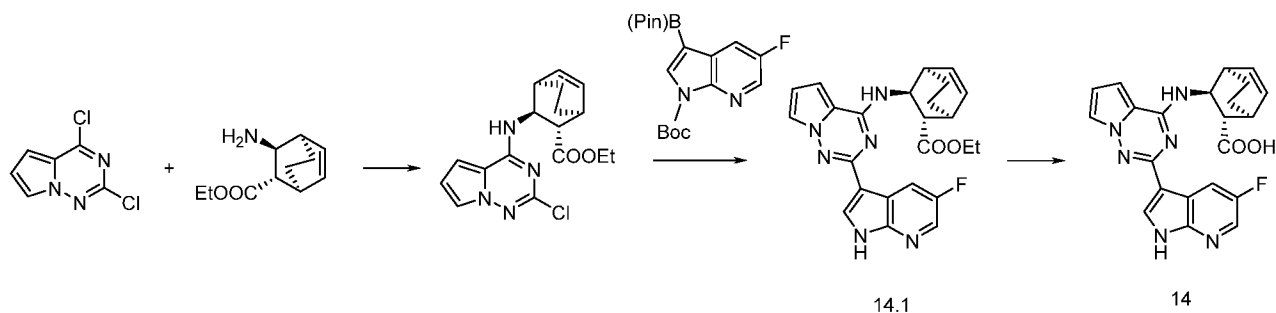
化合物 12 根据实施例 10 中合成化合物 10 类似的制备方法, 以实施例 5 中的中间体 5.2 为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.38 (s, 1H), 12.27 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.68-7.71 (t, 2H, *J*=14.0 Hz), 7.01-7.02 (d, 1H, *J*=2.6 Hz), 6.60 (s, 1H), 4.47 (s, 1H), 2.66-2.70 (t, 2H, *J*=16.0), 2.40 (s, 1H), 1.71-1.75 (t, 2H, *J*=15.8), 1.55 (s, 2H), 1.18-1.19 (d, 2H, *J*=6.8), 0.82-0.96 (d, 2H), 0.36 (s, 1H); LC-MS (*m/z*): 450 [M+H]⁺。

实施例 13 (1R, 2S, 3S, 4R) -3-((6-氯-2-(5-氟-1H-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸(化合物 13)



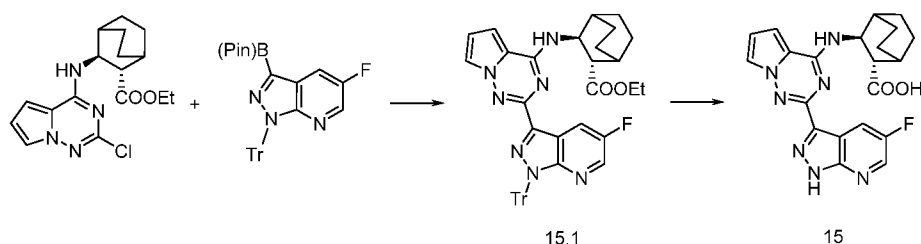
化合物 13 根据实施例 2 中合成化合物 2 类似的制备方法, 以 4-氯-1H-吡咯-2-羧酸乙酯为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.34 (s, 1H), 12.24 (s, 1H), 8.48 (d, *J*=2.8 Hz, 1H), 8.29 (d, *J*=1.4 Hz, 1H), 8.19 (d, *J*=2.8 Hz, 1H), 7.93 (d, *J*=6.7 Hz, 1H), 7.88 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.04 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 4.76 (t, *J*=6.1 Hz, 1H), 2.67 (m, 1H), 2.03 (s, 2H), 1.62-1.81 (m, 7H); LC-MS (*m/z*): 456 [M+H]⁺。

实施例 14 (1S, 2S, 3S, 4R) -3-((2-(5-氟-1H-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛-5-烯-2-羧酸(化合物 14)



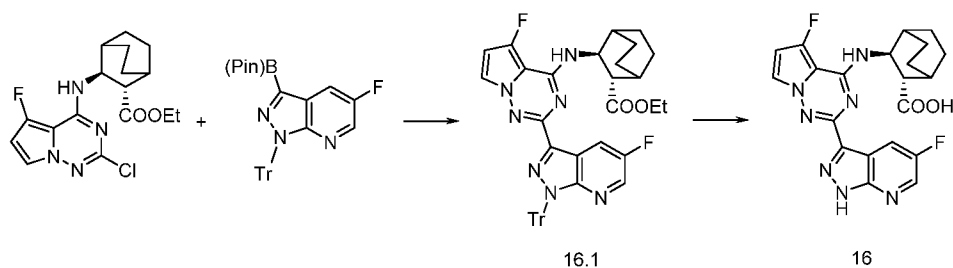
化合物 14 根据实施例 1 中合成化合物 1 类似的制备方法，以 (1S, 2S, 3S, 4R) -3-氨基双环[2.2.2]辛-5-烯-2-羧酸乙酯为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 12.45 (s, 1H), 12.19 (s, 1H), 8.52 (d, *J*=2.8 Hz, 1H), 8.29 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 8.28 (d, *J*=1.4 Hz, 1H), 8.23 (d, *J*=2.7 Hz, 1H), 7.68 (t, *J*=1.7 Hz, 1H), 7.58 (d, *J*=6.3 Hz, 1H), 6.94 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 6.52-6.57 (m, 2H), 6.27 (t, *J*=7.0 Hz, 1H), 4.76 (s, 1H), 3.08 (d, *J*=3.0 Hz, 1H), 2.91 (d, *J*=3.52 Hz, 1H), 1.61-1.78 (m, 2H), 1.13-1.34 (m, 3H); LC-MS (*m/z*): 420 [M+H]⁺。

实施例 15 (2S, 3S) -3-((2-(5-氟-1H-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 15)



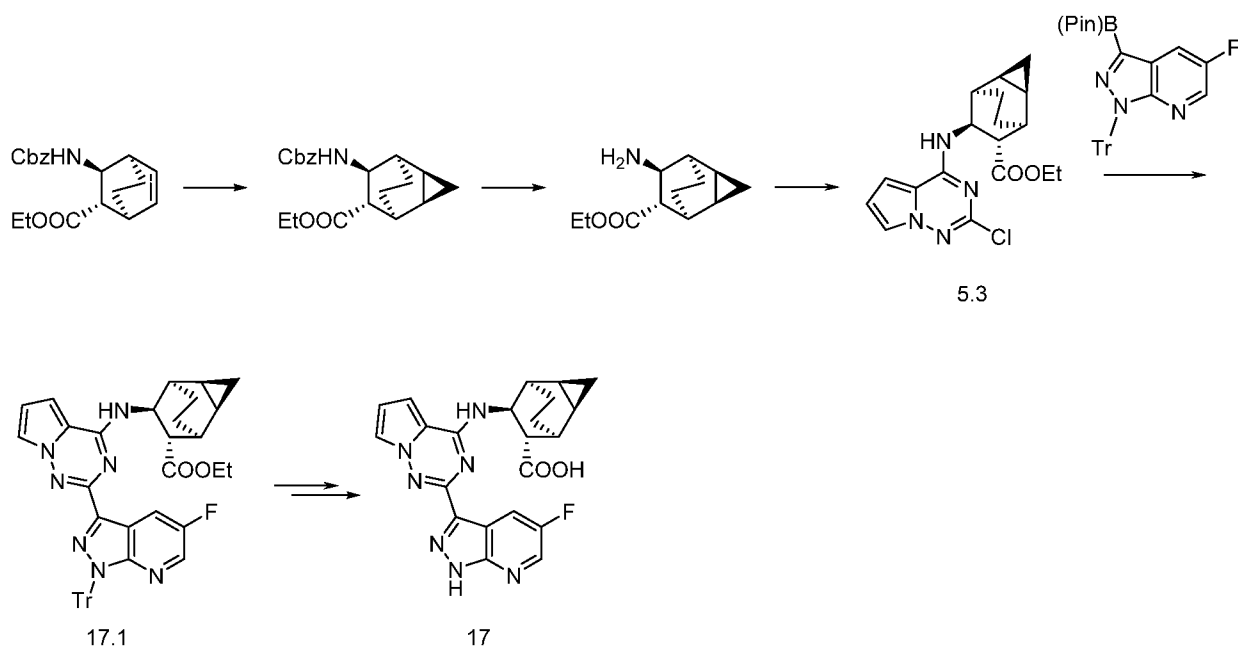
化合物 15 根据实施例 1 中合成化合物 1 类似的制备方法，以 5-氟-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-1-三苯甲基-1H-吡唑并[3,4-*b*]吡啶为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 14.13 (brs, 1H), 12.41 (brs, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.58 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 8.11 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.04 (d, *J*=3.8 Hz, 1H), 6.69 (t, *J*=2.4 Hz, 1H), 4.92 (m, 1H), 2.85 (t, *J*=7.0 Hz, 1H), 1.57-2.07 (m, 10H); LC-MS (*m/z*): 422 [M+H]⁺; [α]_D²⁰ = -22.6° (c=0.87 g/100 mL, DMSO)。

实施例 16 (2S, 3S) -3-((5-氟-2-(5-氟-1H-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 16)



化合物 16 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法, 以 (2S, 3S) -3 - ((2-氯-5-氟吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基) 氨基) 双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸乙酯为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 14.16 (brs, 1H), 12.31 (brs, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.57 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.43 (d, *J*=6.9 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.98 (m, 1H), 3.11 (d, *J*=6.3 Hz, 1H), 1.46-2.04 (m, 10H); LC-MS (*m/z*): 440 [M+H]⁺; [α]_D²⁰ = -19.0° (c=0.89 g/100 mL, DMSO)。

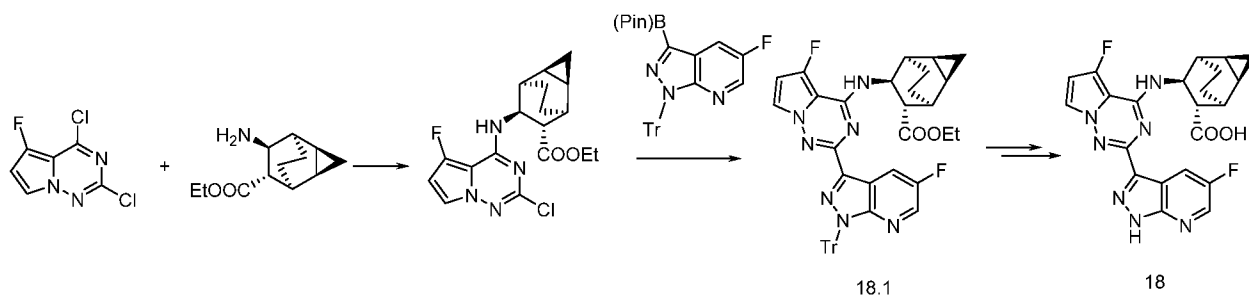
实施例 17 (1R, 2S, 4R, 5S, 6S, 7S) -7- ((2- (5-氟-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基) 吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基) 氨基) 三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸 (化合物 17)



将 5-氟-3- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基) -1-三苯甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶 (28.04 g, 67.4 mmol, 2.2 eq.) 和中间体 5.3 (11.10 g, 30.6 mmol, 1.0 eq.) 溶于 1,4-二氧六环 (300 mL), 加入 K₃PO₄ (21.62 g, 101.8 mmol, 3.0 eq.) 的水 (60 mL) 溶液, 再加入催化量的 Pd(dppf)Cl₂, 将所得混合物在氮气下加热回流 8 小时。将反应混合物用水稀释, 并用乙酸乙酯萃取。有机相用盐水洗涤, 用无水 MgSO₄ 干燥并浓缩至干。柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 10:1) 得中间体 17.1, 15.00 g, 收率 71%, 为白色固体。

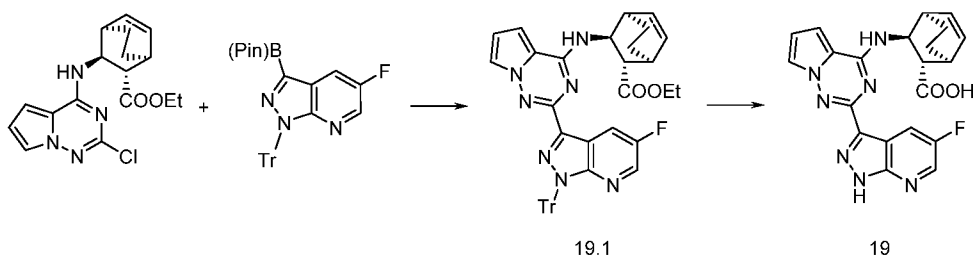
将中间体 17.1 (15.00g, 21.3 mmol, 1.0 eq.) 溶于 DCM (150 mL), 加入三氟乙酸 (24.30 g, 213.1 mmol, 10.0 eq.) 和三乙基硅烷 (12.38 g, 106.6 mmol, 5.0 eq.), 将反应混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物浓缩至干, 并将获得的残余物用甲醇 (80 mL), 水 (15 mL) 和四氢呋喃 (20 mL) 溶解, 加入一水合氢氧化锂 (2.18 g, 52.0 mmol, 3.0 eq.)。将反应混合物在 50 °C 下搅拌 5 小时。浓缩反应混合物以除去四氢呋喃和甲醇, 并将残余物用水稀释。将得到的混合物用 6N HCl 调节 pH = 5-6, 过滤收集固体, 用乙酸乙酯 (10ml) 洗涤, 得到化合物 17, 3.85 g, 收率 51%, 为白色固体。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 14.15 (brs, 1H), 12.56 (brs, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.55 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73 (d, *J*=4.1 Hz, 1H), 7.06 (d, *J*=3.2 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J*=2.6 Hz, 4.2 Hz, 1H), 4.62 (brs, 1H), 2.85 (d, *J*=6.4 Hz, 1H), 2.76 (s, 1H), 1.51-1.69 (m, 4H), 1.10-1.12 (m, 2H), 0.75-0.85 (m, 1H), 0.30-0.39 (m, 1H); LC-MS (m/z): 434 [M+H]⁺; [α]_D²⁰ = -26.6° (c=1.08 g/100 mL, MeOH)。

实施例 18 (1R, 2S, 4R, 5S, 6S, 7S) -7-((5-氟-2-(5-氟-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸 (化合物 18)



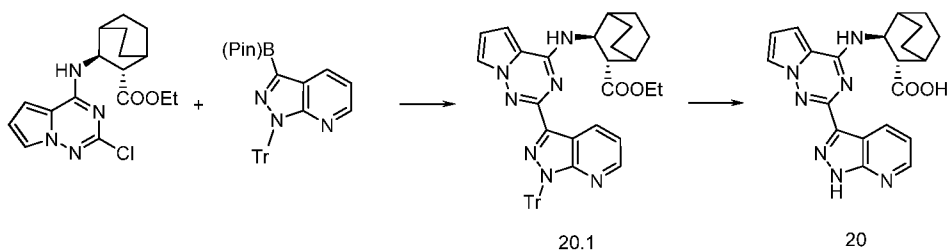
化合物 18 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法, 以 2,4-二氯-5-氟-[2,1-f][1,2,4]三嗪和实施例 5 中的中间体 5.2 为起始原料制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 8.57 (s, 1H), 8.49-8.47 (d, 1H), 7.66 (s, 1H), 4.77 (s, 1H), 2.43 (s, 1H), 2.35 (s, 1H), 1.68-1.63 (m, 3H), 1.41-1.39 (m, 1H), 0.98 (s, 1H), 0.79 (s, 2H), 0.33-0.32 (m, 1H); LC-MS (m/z): 452 [M+H]⁺。

实施例 19 (1S, 2S, 3S, 4R) -3-((2-(5-氟-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛-5-烯-2-羧酸 (化合物 19)



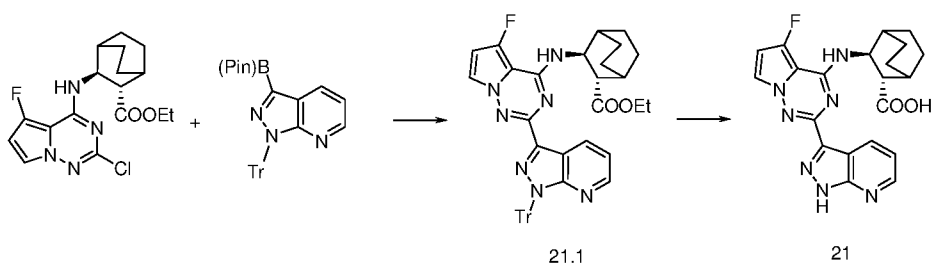
化合物 19 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 8.70-8.60 (m, 2H), 7.80-7.75 (m, 2H), 7.03-7.02 (d, 1H), 6.66-6.64 (dd, 1H), 6.59-6.55 (t, 1H), 6.24-6.21 (t, 1H), 4.92 (s, 1H), 3.14 (s, 1H), 2.98 (m, 1H), 2.63 (s, 1H), 1.78-1.75 (m, 2H), 1.62 (m, 1H), 1.36-1.29 (m, 1H), 1.16-1.14 (m, 1H); LC-MS (m/z): 421 [M+H]⁺。

实施例 20 (1R, 2S, 3S, 4R) -3-((2-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 20)



化合物 20 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 13.91 (s, 1H), 12.40 (s, 1H), 8.84 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 8.57 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 8.06 (d, *J*=7.0 Hz, 1H), 7.74 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.30 (d, *J*=4.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J*=1.4 Hz, 1H), 6.68 (d, *J*=2.6 Hz, 1H), 4.89 (t, *J*=6.8 Hz, 1H), 2.84 (d, *J*=7.0 Hz, 1H), 2.06 (s, 1H), 1.63-1.79 (m, 7H); LC-MS (m/z): 405 [M+H]⁺。

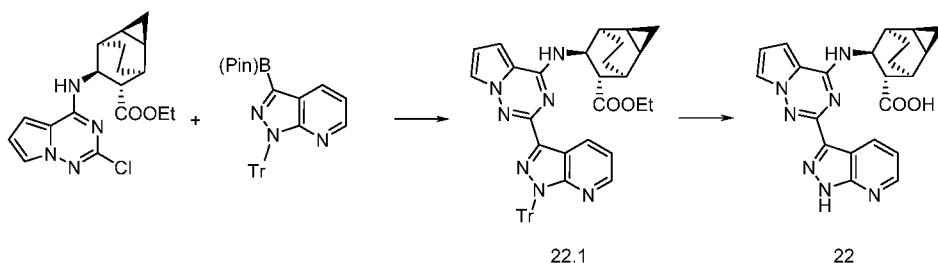
实施例 21 (1R, 2S, 3S, 4R) -3-((5-氟-2-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 21)



化合物 21 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)

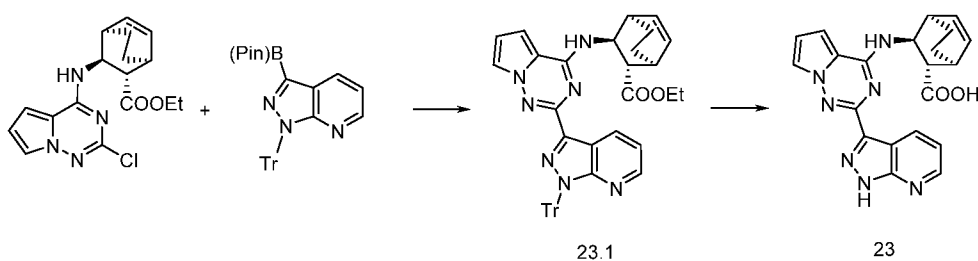
δ (ppm) 13.98 (brs, 1H), 12.31 (brs, 1H), 8.84-8.82 (d, 1H), 8.58 (d, 1H), 7.68 (t, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.32 (q, 1H), 6.60 (d, 1H), 4.96 (m, 1H), 3.10 (d, 1H), 2.04-1.99 (m, 2H), 1.82-1.72 (m, 3H), 1.61-1.38 (m, 5H); LC-MS (m/z): 423 [M+H]⁺。

实施例 22 (1R, 2S, 4R, 5S, 6S, 7S) -7- ((2-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸 (化合物 22)



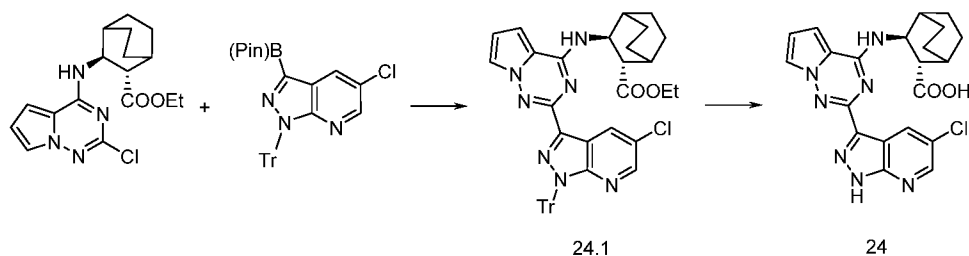
化合物 22 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.82-8.85 (m, 1H), 8.57-8.89 (m, 1H), 7.74-7.76 (d, 2H), 7.30-7.34 (m, 1H), 7.07-7.08 (m, 1H), 6.68-6.70 (m, 1H), 4.61 (s, 1H), 2.86-2.87 (t, 1H), 2.77 (s, 1H), 1.68 (s, 2H), 1.50-1.52 (d, 2H), 1.11-1.13 (m, 1H), 1.08 (m, 1H), 0.82 (s, 1H), 0.33 (d, 1H); LC-MS (m/z): 417 [M+H]⁺。

实施例 23 (1S, 2S, 3S, 4R) -3- ((2-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛-5-烯-2-羧酸 (化合物 23)



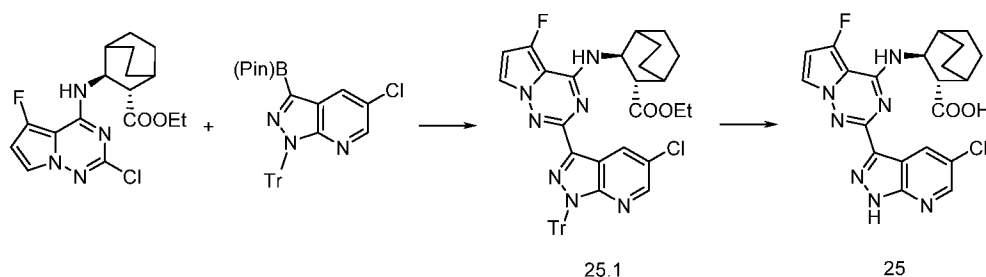
化合物 23 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13.94 (s, 1H), 12.60 (s, 1H), 8.87-8.90 (m, 1H), 8.58-8.59 (m, 1H), 7.74-7.77 (m, 2H), 7.31-7.34 (m, 1H), 7.00-7.01 (m, 1H), 6.65-6.67 (m, 1H), 6.55-6.59 (m, 1H), 6.22-6.25 (m, 1H), 4.91 (s, 1H), 2.97-3.17 (m, 2H), 2.67 (s, 1H), 1.59-1.63 (m, 2H); LC-MS (m/z): 403 [M+H]⁺。

实施例 24 (1R, 2S, 3S, 4R) -3- ((2-(5-氯-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 24)



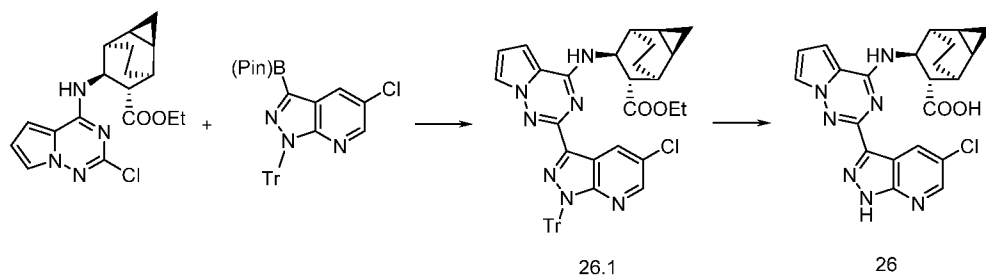
化合物 24 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 14.20 (s, 1H), 12.40 (s, 1H), 8.90 (d, *J*=2.1 Hz, 1H), 8.61 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 8.13 (d, *J*=6.9 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.05 (d, *J*=3.2 Hz, 1H), 6.69 (q, *J*=2.7 Hz, 1H), 4.91 (t, *J*=6.4 Hz, 1H), 2.85 (d, *J*=6.8 Hz, 1H), 2.04 (d, *J*=13.9 Hz, 2H), 1.78-1.87 (m, 3H), 1.57-1.66 (m, 5H); LC-MS (*m/z*): 439 [M+H]⁺。

实施例 25 (1R, 2S, 3S, 4R)-3-((2-(5-氯-1H-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-3-基)-5-氟吡咯[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-羧酸 (化合物 25)



化合物 25 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 14.25 (brs, 1H), 12.32 (brs, 1H), 8.88 (d, 1H), 8.62 (d, 1H), 7.71 (t, 1H), 7.47 (d, 1H), 6.61 (d, 1H), 4.99 (t, 1H), 3.11 (d, 1H), 2.04-2.02 (m, 2H), 1.83-1.62 (m, 3H), 1.60-1.31 (m, 5H); LC-MS (*m/z*): 457 [M+H]⁺。

实施例 26 (1R, 2S, 4R, 5S, 6S, 7S)-7-((2-(5-氯-1H-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-3-基)吡咯并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-4-基)氨基)三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸 (化合物 26)



化合物 26 根据实施例 15 中合成化合物 15 类似的制备方法制得。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 14.21 (s, 1H), 12.53 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 2.85-2.86 (d, *J*=5.20 Hz, 2H), 2.75 (s, 1H), 1.70-1.80 (d, *J*=38.6 Hz, 2H), 1.55-1.57 (d, *J*=9.9 Hz, 2H), 1.10-1.15 (d, 2H), 0.85-0.89 (m, 2H), 0.36 (d, 2H); LC-MS (*m/z*): 451 [M+H]⁺。

实验例 1 抑制流感病毒 (influenza A/CA/07/2009) 活性实验

测试物: 本申请部分化合物 1、2、3, 其结构式和制备方法见各个化合物的制备实施例。

对照物: Pimodivir, 其结构式见背景技术部分。

实验方法简述如下:

MDCK 细胞在含有 10%胎牛血清的 MEM 培养基中培养。病毒感染细胞在含有 0.42%牛血清白蛋白和 5 μg/mL 的胰蛋白酶的 MEM 培养基中培养。在接种病毒的前一天, 将 MDCK 细胞按 3×10⁴/孔的密度接种到 96 孔的细胞培养板上。第二天, 在 100 μL 含有牛血清白蛋白的 MEM 培养基中加入 50 PFU 的流感病毒(influenza A/CA/07/2009)感染 MDCK 细胞, 置于 37 °C 孵育 1 小时。移除病毒后, 用 100 μL MEM 培养基将病毒感染过的细胞进行两倍梯度稀释, 分别在含有不同浓度测试化合物 (0~10 μM) 的培养基中孵育, 每个浓度设定三个复孔。三个未被病毒感染的 MDCK 细胞孔作为对照组。在被病毒感染 72 小时细胞的每孔中加入 0.15 mg/mL 刃天青溶液 20 μL, 孵育 4 小时。采用荧光剂在 560 nm 激发/590 nm 发射条件下进行荧光定量实验。MDCK 细胞保护率按照下列公式计算。测试化合物抑制流感病毒的 EC₅₀ 通过细胞保护率转化得到。

$$\text{细胞保护率} = \frac{\text{荧光}_{\text{对照}} - \text{荧光}_{\text{病毒}}}{\text{荧光}_{\text{化合物}} - \text{荧光}_{\text{病毒}}} \times 100\%$$

刃天青溶液的制备:

- 1、用 pH 7.4 的 DPBS 溶液溶解刃天青至浓度为 0.15 mg/mL;
- 2、采用 0.2 μm 过滤器过滤刃天青溶液至无菌避光试管中;
- 3、刃天青溶液避光保存在-20 °C 冰箱中。

实验结果:

表 1 本申请部分化合物的流感病毒抑制活性

化合物编号	EC ₅₀ (nM)
-------	-----------------------

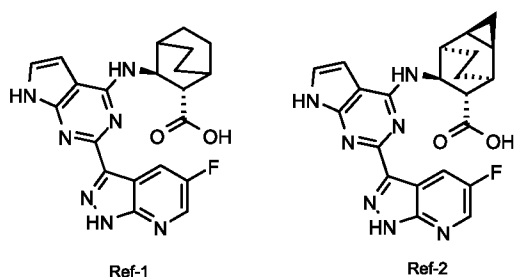
化合物编号	EC ₅₀ (nM)
Pimodivir	15
1	8
2	7.5
3	10

由表 1 可知, 化合物 1、2、3 在细胞内显示出足够好的流感病毒抑制活性, 且均优于对照物。

实验例 2 抑制流感病毒 (A/PR/8/34 (H1N1)) 活性实验

测试物: 本申请部分化合物, 其结构式和制备方法见各个化合物的制备实施例。

对照物: Pimodivir, 及 WO2017133664A1 中公开的化合物:



细胞: 犬肾细胞 MDCK 购自 ATCC, 货号 CCL-34。细胞使用添加了 10% 胎牛血清 (Hyclone), 1% 双抗 (Hyclone), 1% L-谷氨酰胺 (Gibco) 和 1% 非必需氨基酸 (Gibco) 的 EMEM (Sigma) 培养液培养。添加了 1% 双抗, 1% L-谷氨酰胺和 1% 非必需氨基酸的 OptiPRO SFM (Gibco) 培养液为实验用培养液。添加了胰酶 (Invitrogen) 的实验用培养液为病毒感染培养液。

病毒: 流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 株购自 ATCC, 货号 VR-1469。

实验步骤:

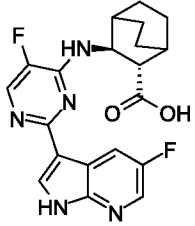
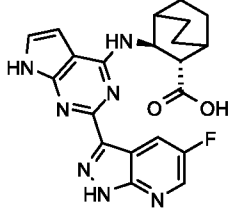
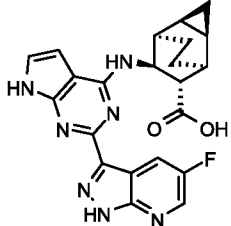
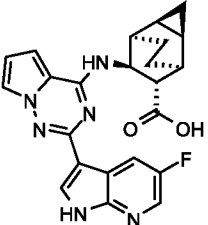
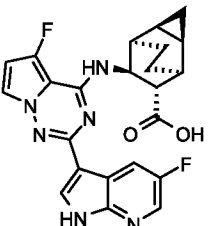
MDCK 细胞以每孔 2,000 个细胞的密度接种到 384 孔测试板中并于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养过夜。第二天, 化合物 (8 个浓度点、双复孔) 和病毒加入 384 孔细胞培养板。培养液中 DMSO 和胰酶的终浓度分别为 0.5% 和 2.5 μg/mL。细胞于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 5 天直至无化合物的病毒对照孔内细胞病变达 80-95%。使用 Cell counting kit 8 试剂盒 (上海李记) 检测细胞活力。化合物的抗病毒活性由不同浓度下的化合物对病毒引起的细胞病变效应的抑制率 (%) 表示。计算公式如下:

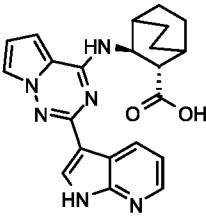
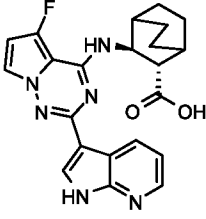
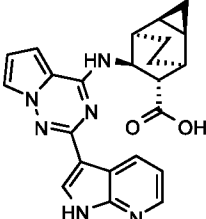
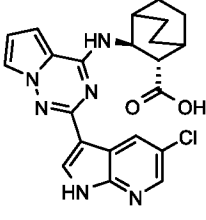
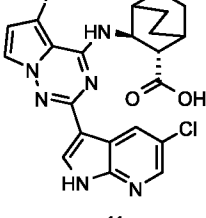
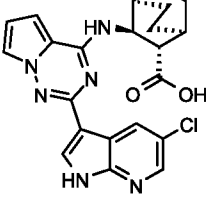
$$\text{抑制率 (\%)} = (\text{测试孔读值} - \text{病毒对照平均值}) / (\text{细胞对照平均值} - \text{病毒对照平均值}) \times 100$$

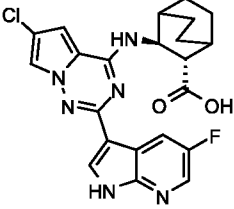
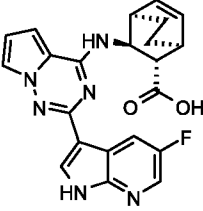
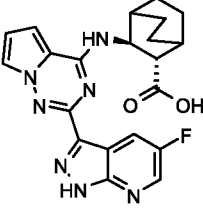

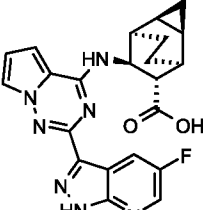
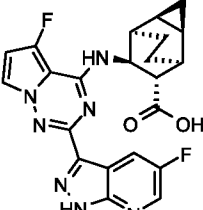
使用 GraphPad Prism 软件对化合物的抑制率和细胞活率进行非线性拟合分析, 计算化合物的半数有效浓度 (EC₅₀) 值。

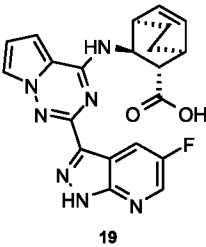
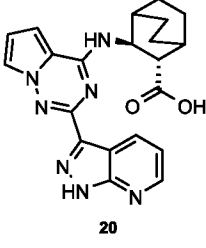
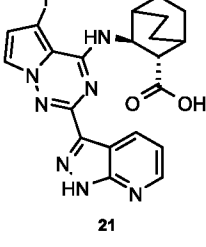
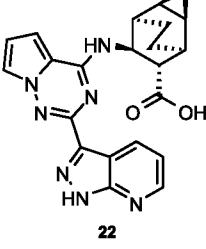
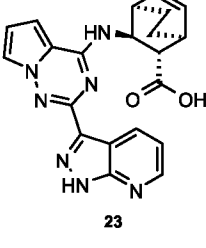
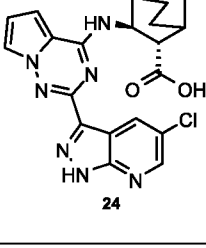
实验结果:

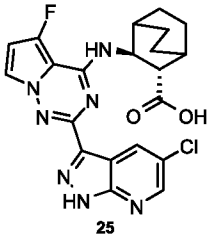
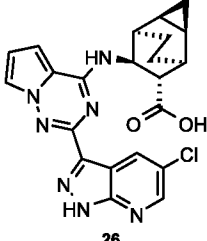
表 2 本申请部分化合物的流感病毒抑制活性

化合物	EC ₅₀ (nM)
 Pimodivir	0.882
 Ref-1	10.66
 Ref-2	1.621
 5	2.601
 6	N/A

 <p>7</p>	12.58
 <p>8</p>	34.43
 <p>9</p>	10.41
 <p>10</p>	0.991
 <p>11</p>	1.440
 <p>12</p>	0.964

 <p style="text-align: center;">13</p>	12.35
 <p style="text-align: center;">14</p>	5.128
 <p style="text-align: center;">15</p>	0.252
 <p style="text-align: center;">16</p>	0.358
 <p style="text-align: center;">17</p>	0.064
 <p style="text-align: center;">18</p>	1.181

 <p>19</p>	0.752
 <p>20</p>	4.419
 <p>21</p>	2.799
 <p>22</p>	0.438
 <p>23</p>	17.51
 <p>24</p>	0.079

 <p style="text-align: center;">25</p>	0.233
 <p style="text-align: center;">26</p>	0.019

可见本申请的化合物均具有良好的抗病毒活性，其中化合物 15、16、17、19、22、24、25、26 的抗病毒均显著优于对照物 Pimodivir。

实验例3 体内药代动力学研究

将雄性CD-1小鼠(购自LC Laboratory Animal Co. LTD; 22-23 g; 6-8 周; n=18, 每种给药途径9只, 每个时间点3只动物)在测试化合物单一剂量条件下分别通过尾部静脉注射(5 mg/kg)和口服饲喂(10 mg/kg)进行给药处理, 所用化合物溶液均在含5% *N,N*-二甲基亚砜(DMSO)和10% 聚乙二醇15羟硬脂酸酯(Solutol HS15)的生理盐水中配制。实验动物在给药前一天禁食过夜并在给药之后4 小时进食, 自由饮水。所述研究符合实验动物管理评估和认可协会(国际AAALAC)和美国国立卫生研究院的指南和标准。在指定的取样时间点, 使用异氟烷麻醉动物后, 通过面部静脉或心脏穿刺, 在异氟醚吸入麻醉状态下采用交错出血的方式采集大约110 μ L 的血液样品到EDTA-2K 管中存储。所采集血液样品保持在湿冰中并且在采样后15 分钟内离心以获得血浆(2000 g, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)。将血浆样品储存在大约-70 $^{\circ}$ C冷冻条件下, 直至分析。在分析所采集血浆样品前, 将20 μ L未稀释的血浆样品的等分试样加入200 μ L IS(含20ng/mL格列甲嗪的乙腈溶液)。将混合物在750rpm条件下涡旋10 min 并在5800 rpm 下离心10 min。取2 μ L 上清液的等分试样, 采用UPLC-MS/MS-22(Triple QuadTM 6500)进行化合物浓度定量分析。通过分析含有格列甲嗪(20 ng/mL)作为内参的3.0-3,000 ng/mL 测试化合物的一系列对照血浆等分试样来构建标准校准曲线。对于10 倍稀释的血浆样品, 将2 μ L 血液样品的等分试样加入18 μ L 空白稀释血浆, 稀释因子为10。随后的操作与上述未稀释的血浆样品相同。

实验结果如表3所示。

表3

		Pimodivir	15	16	17
Mouse PK (IV) 5mpk	Cl_{int} (L/h/kg)	0.823	0.476	0.134	0.157
	V_{ss} (L/kg)	2.11	1.16	0.927	0.826
Mouse PK (PO) 10mpk	$T_{1/2}$ (h)	3.29	2.09	5.58	7.5
	T_{max} (h)	0.25	0.5	0.5	0.67
	C_{max} (ng/ml)	6425	9740	22867	28078
	F (%)	83.8	79.4	86.4	82.4
	AUC_{last} (h*ng/mL)	10830	16685	62328	48532

化合物15, 16, 17和对照化合物Pimodivir相比, 均具有更低的体内清除率, 更高的峰值浓度和总暴露量, 呈现明显更为优良的成药性。

实验例4 甲型流感H1N1病毒小鼠感染模型体内药效研究

实验选用6-8周雌性BALB/c小鼠, 经鼻滴感染甲型流感H1N1 A/PuertoRico/8/34病毒。感染当天设定为实验周期第0天。分别在感染前2小时 (PI-2) 以及感染后24小时 (PI24) 开始进行待测化合物口服给药处理, 通过观察小鼠存活率以及体重变化来评估化合物的抗甲型流感病毒H1N1的体内药效。连续给药10天, 观察周期为20天。20天后所有存活小鼠实施安乐死。

待测化合物溶液均在含5% *N,N*-二甲基亚砜 (DMSO) 和10% 聚乙二醇15羟硬脂酸酯 (Solutol HS15) 的生理盐水中配制。实验小鼠安置于麻醉箱后, 采用含5% v/v异氟烷的氧气 (2.5 L/min) 麻醉, 在含2-2.5%异氟烷的氧气维持麻醉的状态下, 缓慢鼻腔滴注50微升LD90剂量的H1N1 Puerto Rico/8/34病毒进行感染。根据实验要求分别在感染前两个小时以及感染后24小时开始口服给药。阳性对照物Pimodivir在两个不同感染时间实验中均采用每日两次给药方式。而受试化合物17在PI-2实验中采用每天两次给药方式, PI24实验给药方式为每天一次。给药剂量如图1, 2结果所示。每天观察小鼠状态并记录体重及存活率。当受试小鼠出现体重下降超过动物福利组织所规定标准, 健康指数到达6, 严重嗜睡, 以及瘫痪等严重病理状态时, 实行安乐死。

实验结束，所有存活小鼠均实施安乐死。

实验结果如图1, 2所示。

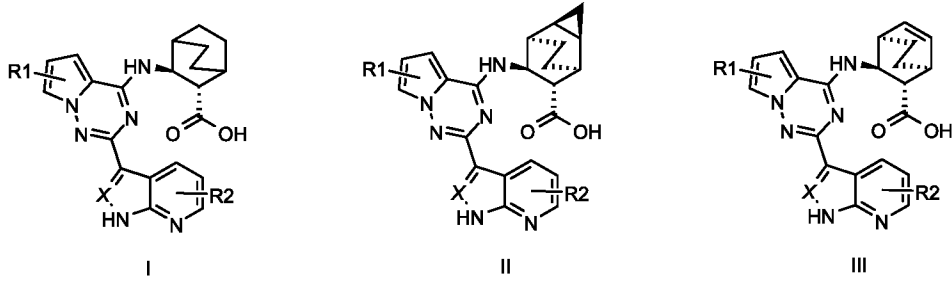
感染前两小时开始用药条件下，化合物17在实验所采用全部三个剂量（1, 3, 10mg/kg, BID），小鼠存活率均达到100%。而对照化合物Pimodivir在低剂量（1mg/kg, BID）时存活率为0%，在中剂量（3mg/kg, BID）时，存活率为80%，只有在最高剂量条件下（10mg/kg, BID）达到完全存活。与存活率结果相对应，化合物17组所有三个剂量用药处理后，动物体重未出现明显下降。而对照化合物Pimodivir，低剂量组从第4天开始出现体重下降，第8天开始出现小鼠体重下降超过20%现象，按照动物福利规范实施安乐死，直至第10天，所有动物体重下降超过20%。中剂量组从第6天开始出现明显体重下降。随着用药继续，从第9天开始体重逐渐恢复。其中在第10天，出现1例体重下降超过20%。

感染后24小时开始用药条件下，化合物17在低剂量每日一次给药（1mg/kg, QD）时存活率为60%，中剂量和高剂量每日一次给药（3, 10mg/kg, QD）时，小鼠存活率均达到100%。而对照化合物Pimodivir在低剂量每日两次给药（1mg/kg, BID）时存活率为40%，在中剂量（3mg/kg, BID）时，存活率为80%，只有在最高剂量条件下（10mg/kg, BID）达到完全存活。目前已获批上市的奥司他韦在10mg/kg, BID剂量条件下，存活率为80%。

化合物17在不同给药时间都显示出和对照化合物Pimodivir相比明显优越抗甲型流感病毒的药效。感染后24小时后给药情况下，化合物17在每日总用药量（3mg/kg/Day）远低于Pimodivir的情况下（20mg/kg/Day），显示出类似的药效。

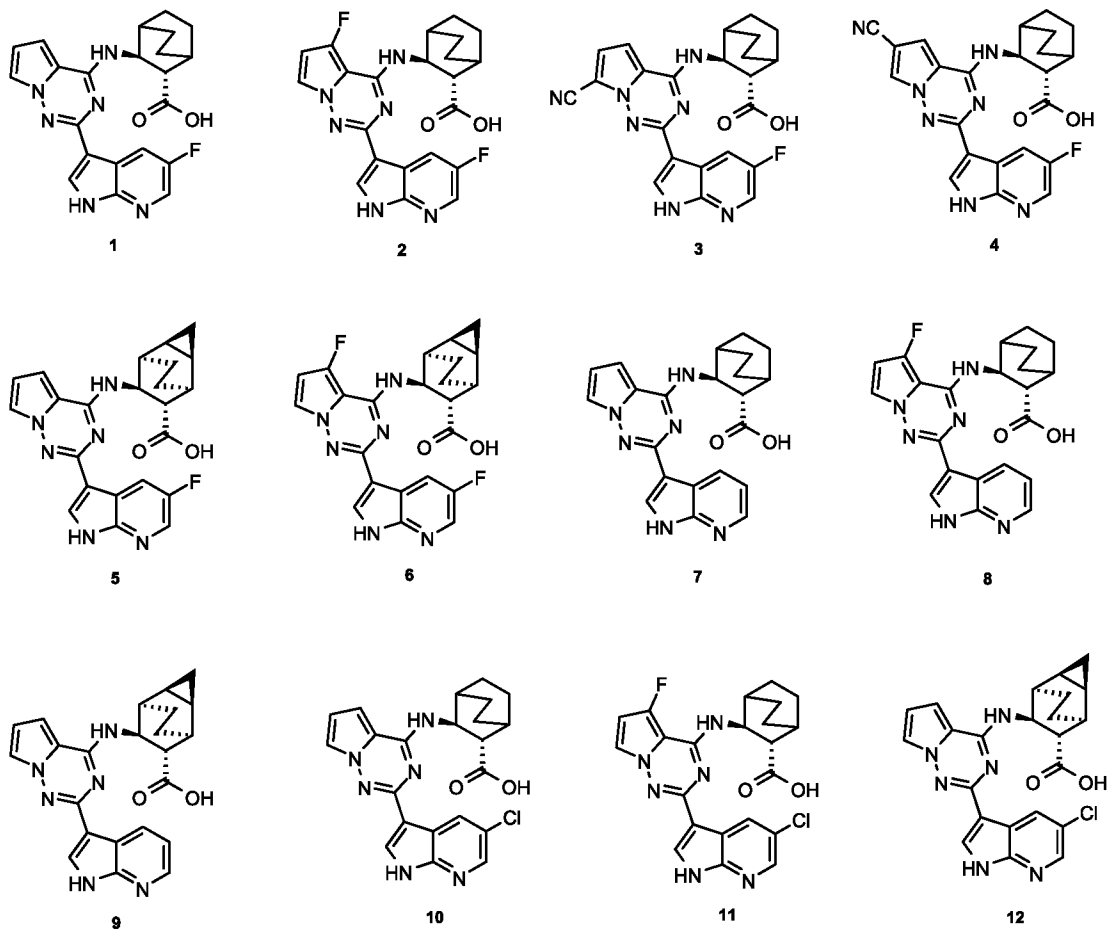
权利要求书

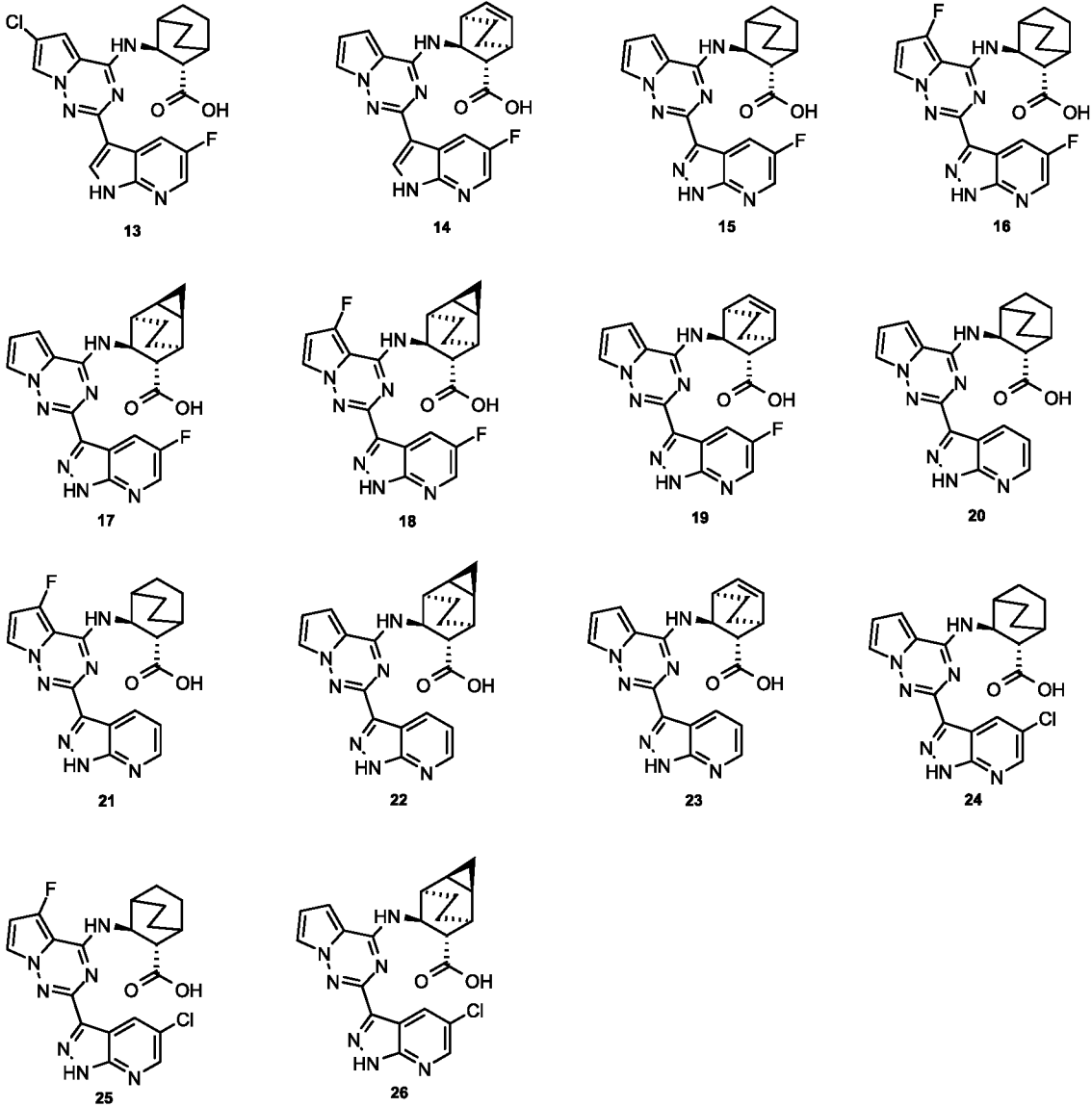
1、式 (I)、式 (II) 或式 (III) 的化合物：



其中，R₁、R₂ 分别独立地选自氢、C1-C6 烷基、氰基、卤素、硝基或氨基；
X 选自 C 或 N。

- 2、根据权利要求 1 所述的化合物，其中，R₁、R₂ 分别独立地选自氢、氰基或卤素。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，R₁ 选自氢、氰基、氟或氯。
- 4、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，R₂ 选自氢、氟或氯。
- 5、根据权利要求 1 所述的化合物，其结构式为以下中的任意一种：





6、根据权利要求 1-2 和 5 中任一项的所述的化合物，其中，所述化合物以药学上可接受的盐、酯、溶剂化物、多晶型、前药、立体异构体或互变异构体的形式存在。

7、权利要求 1-2 和 5 中任一项所述的化合物用于制备预防或治疗病毒感染性疾病药物中的用途。

8、根据权利要求 7 所述的用途，其中，所述病毒感染为流感病毒感染。

9、根据权利要求 8 所述的用途，其中，所述病毒感染为 A 型流感病毒感染。

10、式 (IV)、式 (V) 或式 (VI) 的化合物：

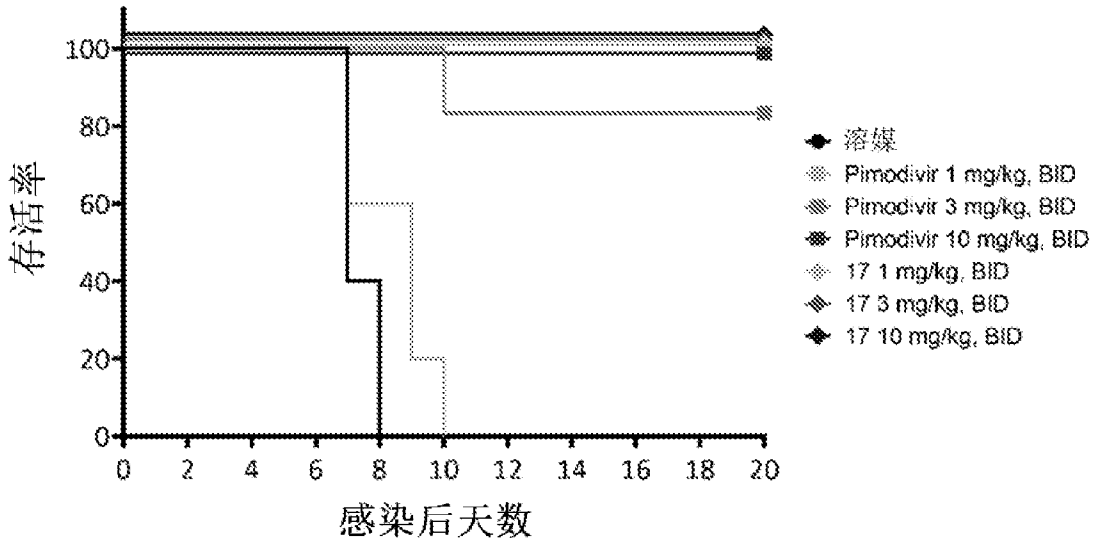


图 1

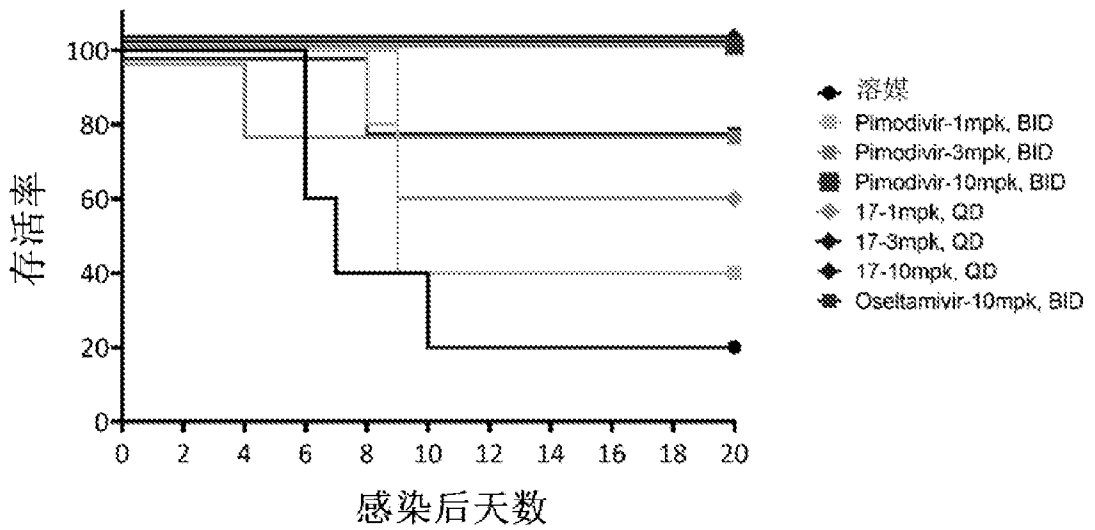


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/126277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07D 487/06(2006.01)i; A61K 31/53(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D487/-,A61K31/-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNKI, VEN, STN(REG, CAPLUS): 吡咯并, 三嗪, 双环辛烷, 羧酸, 病毒, 流感, pyrolo+, bicyclo, octane, carboxylic, substructural search according to the general structural formula in claims 1 and 10		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017133664 A1 (SAVIRA PHARMACEUTICALS GMBH et al.) 10 August 2017 (2017-08-10) description, pages 5, 12-17, 34-37, 41, 75-89, and embodiment	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 12 March 2020		Date of mailing of the international search report 18 March 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/126277

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017133664 A1	10 August 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/126277

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07D 487/06(2006.01)i; A61K 31/53(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>								
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07D487/-, A61K31/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CNKI, VEN, STN(REG, CAPLUS): 吡咯并, 三嗪, 双环辛烷, 羧酸, 病毒, 流感, pyrolo+, bicyclo, octane, carboxylic, 根据权利要求1和10中的通式结构进行了子结构检索</p>								
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2017133664 A1 (SAVIRA PHARMACEUTICALS GMBH等) 2017年 8月 10日 (2017-08-10) 说明书第5、12-17、34-37、41、75-89页和实施例</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2017133664 A1 (SAVIRA PHARMACEUTICALS GMBH等) 2017年 8月 10日 (2017-08-10) 说明书第5、12-17、34-37、41、75-89页和实施例	1-13
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求						
X	WO 2017133664 A1 (SAVIRA PHARMACEUTICALS GMBH等) 2017年 8月 10日 (2017-08-10) 说明书第5、12-17、34-37、41、75-89页和实施例	1-13						
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>								
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>								
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 3月 12日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 3月 18日</p>						
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>杨轶</p> <p>电话号码 86-(010)-62086352</p>						

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/126277

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
W0 2017133664 A1	2017年 8月 10日	无	
<hr/>			