



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112812128 B

(45) 授权公告日 2024.04.02

(21) 申请号 202011287719.X

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.17

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 104169286 A, 2014.11.26

申请公布号 CN 112812128 A

CN 104513253 A, 2015.04.15

(43) 申请公布日 2021.05.18

US 2019151322 A1, 2019.05.23

(66) 本国优先权数据

审查员 费嘉

201911126948.0 2019.11.18 CN

(73) 专利权人 正大天晴药业集团股份有限公司

地址 222062 江苏省连云港市郁州南路369号

(72) 发明人 张寅生 高勇 殷缘 施伟

徐宏江 赵大敏 王承启

(51) Int. Cl.

C07D 498/22 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

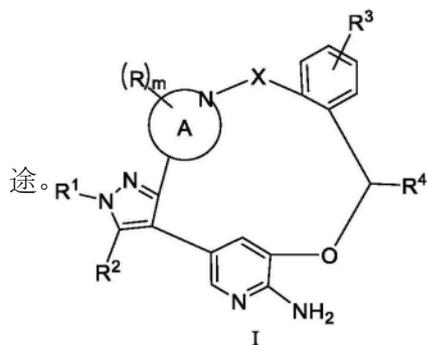
权利要求书3页 说明书42页

(54) 发明名称

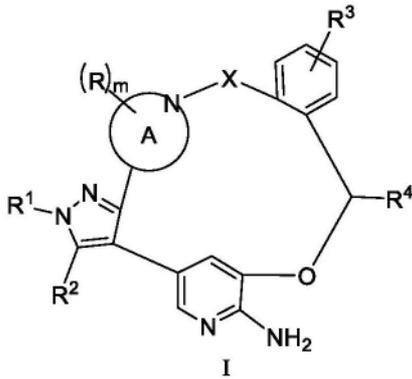
作为ALK和ROS调节剂的大环化合物

(57) 摘要

本发明属于药物化学领域,涉及作为ALK和ROS调节剂的大环化合物,具体而言,涉及式I化合物或其药学上可接受的盐、制备方法、含有该化合物的药物组合物,以及其在治疗癌症中的用途。



1. 式I化合物或其药学上可接受的盐,



其中,环A选自4-7元含氮杂环烷基,含氮杂环烷基是指完全饱和的并且可以以单环或螺环存在的环状基团,其中含氮杂环烷基中氮原子个数选自1个或2个;

R分别独立地选自卤素、-OH或-CN;

m选自0、1或2;

X选自-C(=O)-或-CH₂-;

R¹选自氢或C₁₋₃烷基;

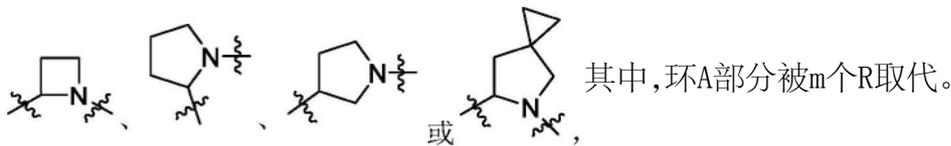
R²选自-CN;

R³选自卤素;

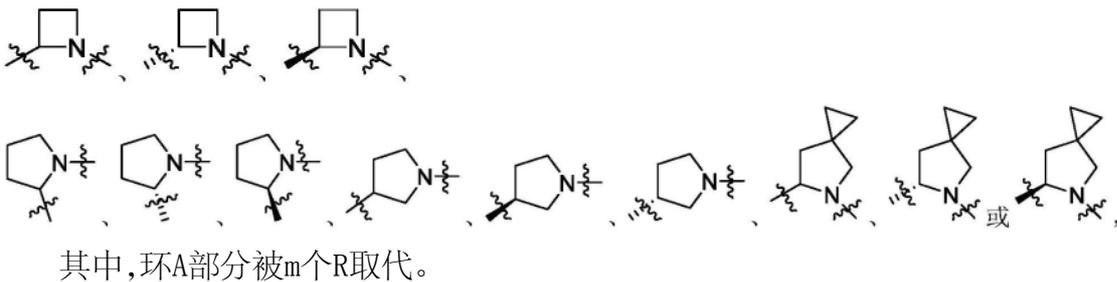
R⁴选自氢或C₁₋₃烷基。

2. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,环A选自4元、5元或7元含氮杂环烷基。

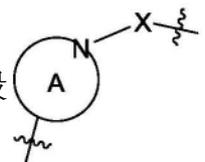
3. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,环A选自

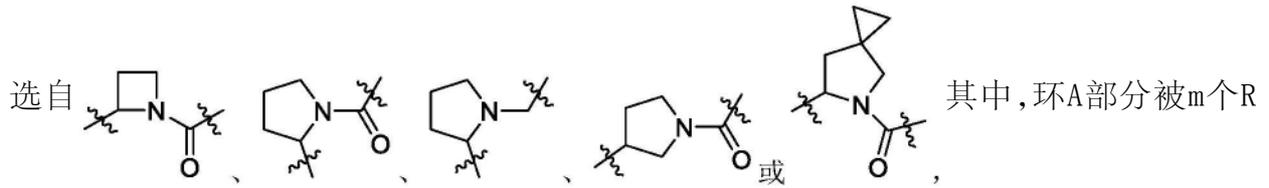


4. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,环A选自



5. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,其中结构片段





取代。

6. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,其中含氮杂环烷基氮原子个数选自1个。

7. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,R分别独立地选自氟、氯或溴。

8. 如权利要求7所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,R分别独立地选自氟。

9. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,其中m选自0或1。

10. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,R¹选自氢或甲基。

11. 如权利要求10所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,R¹选自甲基。

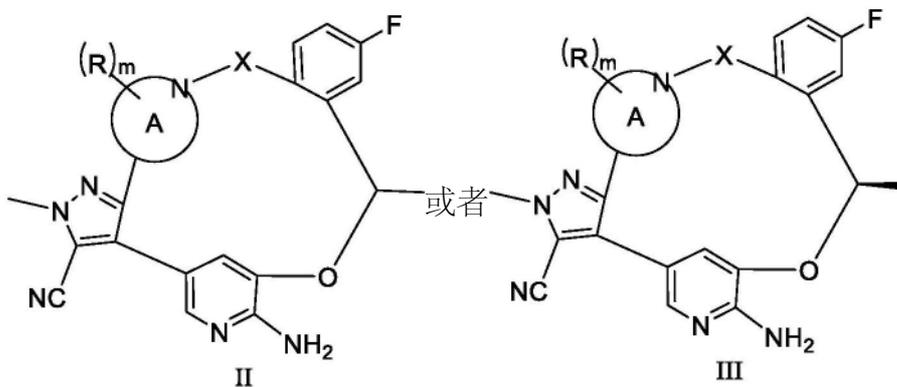
12. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,其中R³选自氟、氯或溴。

13. 如权利要求12所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,其中R³选自氟。

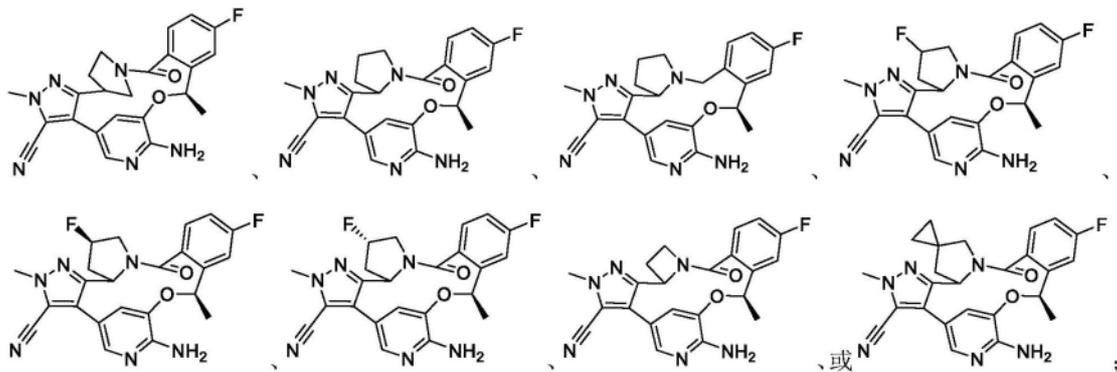
14. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,其中R⁴选自氢或甲基。

15. 如权利要求14所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,其中R⁴选自甲基。

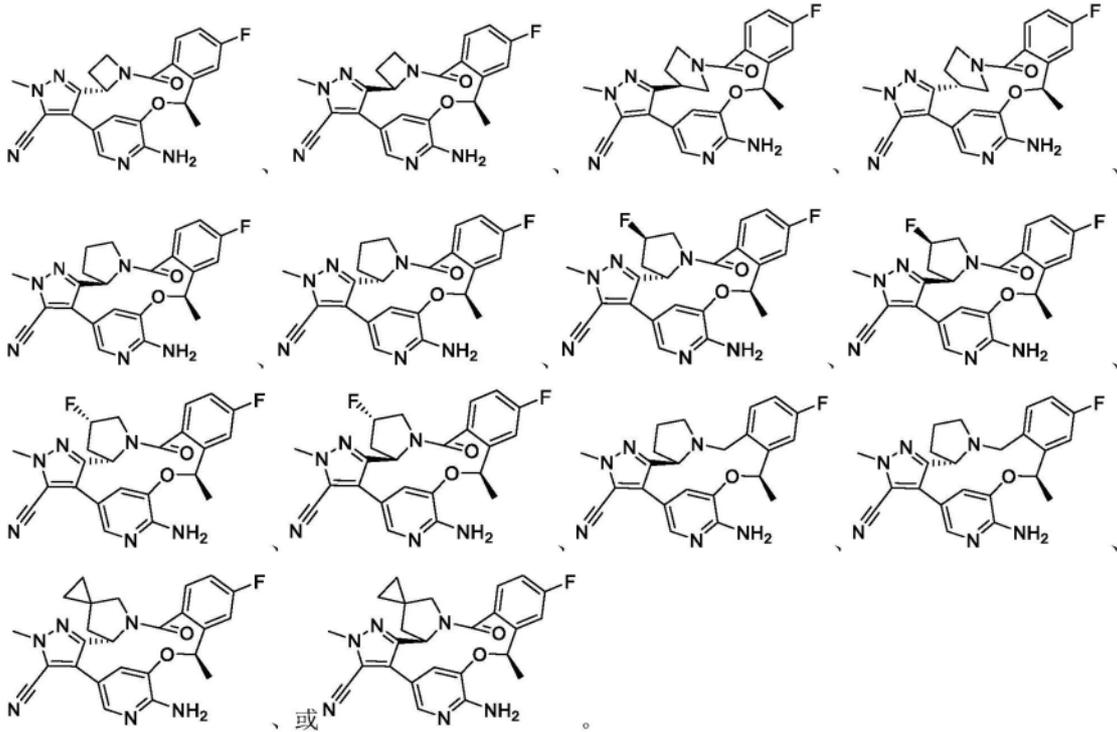
16. 如权利要求1所述的式I化合物或其药学上可接受的盐,选自式II或者式III化合物或其药学上可接受的盐:



17. 以下化合物或其药学上可接受的盐:



或者,以下化合物或其药学上可接受的盐:



作为ALK和ROS调节剂的大环化合物

技术领域

[0001] 本申请涉及作为ALK和ROS调节剂的大环化合物、其制备方法、含有该化合物的药物组合物,以及其在治疗癌症中的用途。

背景技术

[0002] 间变性淋巴瘤激酶 (Anaplastic lymphoma kinase, ALK) 是一种受体酪氨酸激酶,属于胰岛素受体超家族。ALK是在间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL) 的一个亚型中被发现的。在非小细胞肺癌 (NSCLC)、弥漫性大B细胞淋巴瘤和炎症性肌纤维母细胞瘤 (IMT) 中分别发现了有多种类型的ALK基因重排,至此证明ALK是强力致癌驱动基因。

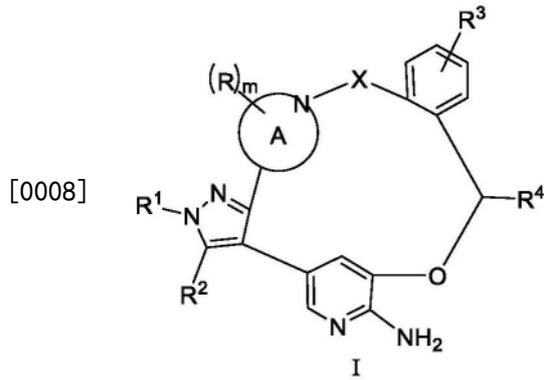
[0003] EML4-ALK融合基因可见于多种肿瘤,例如间变性大细胞淋巴瘤、炎性成肌纤维细胞瘤、成神经细胞瘤和NSCLC等,EML4-ALK融合基因通过下游底物分子的激活、传递,各转导途径的相互交叉、重合,形成了一个错综复杂的信号转导网络,影响细胞增殖、分化和凋亡。EML4-ALK融合基因主要见于不吸烟肺腺癌,且与EGFR突变和KRAS突变相互排斥,在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的发生率为3~5%。ALK抑制剂在ALK异常基因肺癌患者的治疗中取得了巨大的成功。但是,耐药性的出现限制了其长期的临床应用(包括~20%的G1202R、~14%的L1196M、~14%的F/L1174M)。耐药机制通常包括靶基因扩增、获得性耐药突变、旁路信号传导、上皮-间质转化 (EMT) 和转移。与此同时,临床上接近70%的高比例脑转移患者也对提高ALK抑制剂血脑屏障渗透性和平衡中枢神经系统安全性之间提出了更高的要求。

[0004] ROS1激酶是具有未知配体的受体酪氨酸激酶,ROS1基因融合生存的嵌合蛋白具有较强的增殖活性,已经报道ROS1激酶经历遗传重排以在多种人类癌症中产生组成型活性融合蛋白,所述癌症包括成胶质细胞瘤、NSCLC胆管癌、卵巢癌、胃腺癌、结肠直肠癌、炎性成肌纤维细胞瘤、血管肉瘤和上皮样血管内皮瘤。Crizotinib在ROS1融合突变呈阳性的NSCLC患者中间表现出比在ALK阳性的患者几乎高一倍的中位PFS,达到18.3个月,ORR为66%。但是在Crizotinib治疗患者中观察到获得性耐药突变,迫切需要开发用于克服Crizotinib ROS1抗性的第二代ROS1抑制剂。

[0005] 临床需要更多具有适当的药理学特征的ALK/EML4-ALK/ROS小分子抑制剂,需要具有更好的药效、更高选择性、良好的药代动力学、穿透血脑屏障的能力和持续作用时间方面的优势。具体而言,需要抑制具有ALK和ROS1耐药突变的的小分子抑制剂,例如G1202R、L1196M、F1174L和C1156Y等EML4-ALK融合蛋白耐药突变。本发明合成了一系列作为抑制ALK/ROS的小分子大环化合物。

[0006] 发明详述

[0007] 本申请涉及式I化合物或其药学上可接受的盐,



[0009] 其中,环A选自4-10元含氮杂环烷基;

[0010] R分别独立地选自卤素、-OH、-CN、任选被卤素取代的C₁₋₃烷基或C₁₋₃烷氧基;

[0011] m选自0、1、2、3、4、5或6;

[0012] X选自-C(=O)-或-(CH₂)_n-,其中n选自1、2或3;

[0013] R¹选自氢或C₁₋₃烷基;

[0014] R²选自氢、-CN、C₁₋₃烷基、C₁₋₃烷氧基或C₃₋₆环烷基;

[0015] R³选自卤素;

[0016] R⁴选自氢或C₁₋₃烷基。

[0017] 在一些实施方案中,环A选自4元、5元、6元、7元、8元、9元或10元含氮杂环烷基。在一些实施方案中,环A选自4元、5元、6元或7元含氮杂环烷基。在一些实施方案中,环A选自4元、5元或7元含氮杂环烷基。

[0018] 在一些实施方案中,上述含氮杂环烷基是指完全饱和的并且可以以单环、桥环或螺环存在的环状基团。在一些实施方案中,上述含氮杂环烷基是指完全饱和的并且可以以单环或螺环存在的环状基团。

[0019] 在一些实施方案中,上述含氮杂环烷基除了含有氮的杂原子,还可以任选地含有1-3个选自硫或氧的杂原子。在一些实施方案中,上述含氮杂环烷基仅含有氮的杂原子。

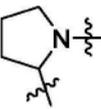
[0020] 在一些实施方案中,上述含氮杂环烷基中氮原子个数选自1个、2个、或3个;或者氮原子个数选自1个或2个;或者氮原子个数选自1个。

[0021] 在一些实施方案中,环A被m个R取代。

[0022] 在一些实施方案中,环A选自 其中,环A部分被m个R取代。

[0023] 在一些实施方案中,环A选自

其中,环A部分被m个R取代

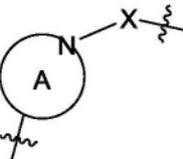
代;在一些实施方案中,环A选自 

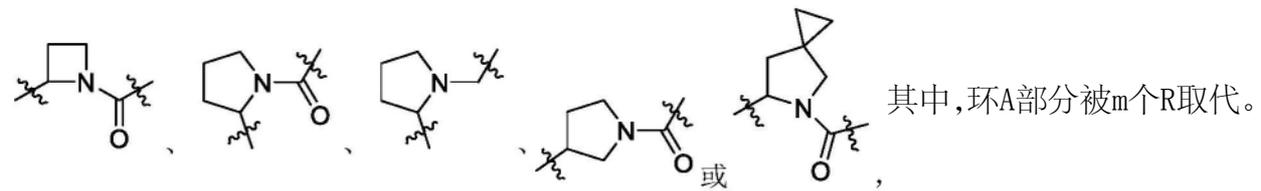
[0024] 在一些实施方案中,R分别独立地选自氟、氯、溴、甲基、乙基、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{CN}$;在一些实施方案中,R分别独立地选自氟、氯或溴;在一些实施方案中,R分别独立地选自氟。

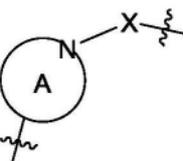
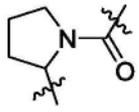
[0025] 在一些实施方案中,m选自0、1、或2。在一些实施方案中,m选自0或1。

[0026] 在一些实施方案中,n选自1或2。

[0027] 在一些实施方案中,X选自 $-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{CH}_2-$ 。

[0028] 在一些实施方案中,结构片段  选自



[0029] 在一些实施方案中,结构片段  选自 

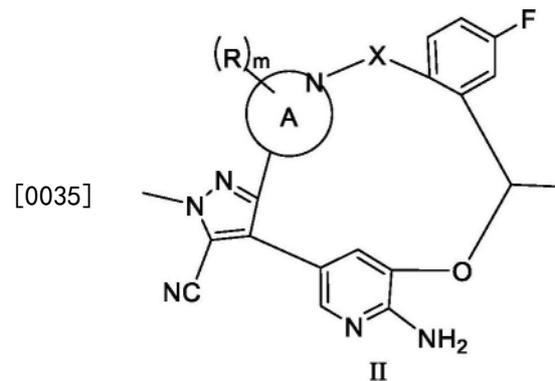
[0030] 在一些实施方案中, R^1 选自氢或甲基。在一些实施方案中, R^1 选自甲基。

[0031] 在一些实施方案中, R^2 选自氢、 $-\text{CN}$ 或 C_{1-3} 烷基。在一些实施方案中, R^2 选自 $-\text{CN}$ 。

[0032] 在一些实施方案中, R^3 选自氟、氯或溴。在一些实施方案中, R^3 选自氟。

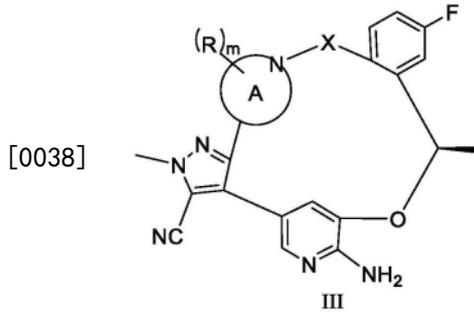
[0033] 在一些实施方案中, R^4 选自氢或甲基。在一些实施方案中, R^4 选自甲基。

[0034] 在一些实施方案中,本申请的式I化合物或其药学上可接受的盐选自式II化合物或其药学上可接受的盐:



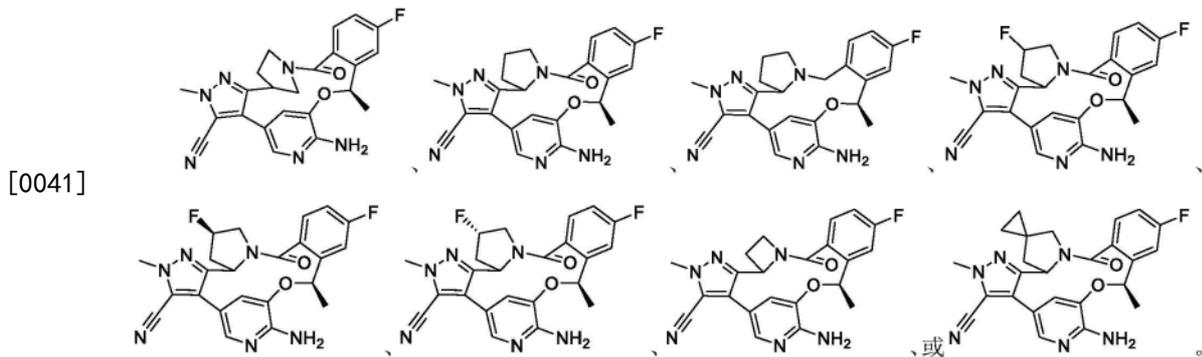
[0036] 其中,环A、X、R、m同式I化合物中的定义。

[0037] 在一些实施方案中,本申请的式I化合物或其药学上可接受的盐选自式III或其药学上可接受的盐:

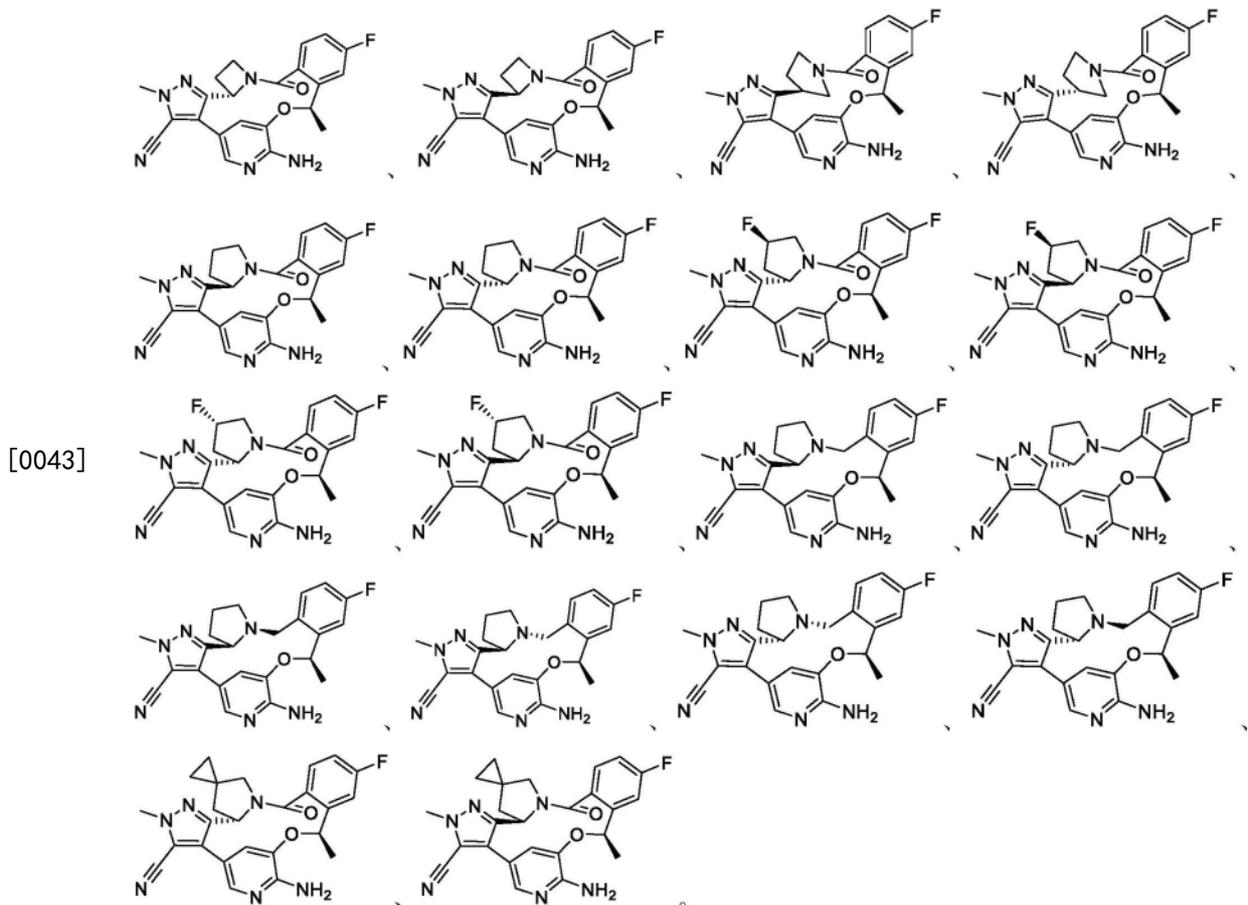


[0039] 其中,环A、X、R、m同式I化合物中的定义。

[0040] 在一些实施方案中,本申请的式I化合物或其药学上可接受的盐选自以下化合物或其药学上可接受的盐:



[0042] 在一些实施方案中,本申请的式I化合物或其药学上可接受的盐选自以下化合物或其药学上可接受的盐:



[0044] 另一方面,本申请涉及药物组合物,其包含本申请的式I化合物或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本申请的药物组合物还包括药学上可接受的辅料。

[0045] 另一方面,本申请涉及治疗由蛋白激酶介导的疾病的方法,包括对需要该治疗的哺乳动物,给予治疗有效量的式I化合物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物。

[0046] 另一方面,本申请涉及式I化合物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物在制备预防或者治疗哺乳动物由蛋白激酶介导的疾病的药物中的用途。

[0047] 另一方面,本申请涉及式I化合物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物在预防或者治疗哺乳动物由蛋白激酶介导的疾病中的用途。

[0048] 另一方面,本申请涉及预防或者治疗哺乳动物由蛋白激酶介导的疾病的式I化合物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物。

[0049] 在一些实施方案中,所述蛋白激酶包括ALK、突变ALK、ROS或突变ROS。

[0050] 在一些实施方案中,所述突变ALK包括G1202R、R1275Q、F1174L、L1196M、C1156Y、G1269A突变的ALK。

[0051] 在一些实施方案中,所述突变ROS包括G2032R、L2026M突变的ROS。

[0052] 在一些实施方案中,所述ALK包括EML4-ALK。

[0053] 在一些实施方案中,所述由蛋白激酶介导的疾病选自癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自间变性大细胞淋巴瘤。

[0054] 在一些实施方案中,所述哺乳动物优选人类。

[0055] 技术效果

[0056] 本申请化合物针对不同酶及细胞具有良好的抑制活性,其中酶包括但不限于EML4-ALK、ALK G1202R、ALK R1275Q、ALK F1174L、ALK L1196M、ALK C1156Y、ALK G1269A、ROS1、ROS1 G2032R、ROS1 L2026M,细胞包括但不限于Karpas299细胞、Ba/F3-TEL-ALK细胞、TEL-ALK-F1174L细胞;另外具有良好的体外代谢稳定性、及体内药代动力学及药效学性质。

[0057] 定义

[0058] 除非另有说明,本申请中所用的下列术语具有下列含义。一个特定的术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的,而应该按照本领域普通的含义去理解。当本文中出現商品名时,意在指代其对应的商品或其活性成分。

[0059] 术语“被取代”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代,只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧代(即=O)时,意味着两个氢原子被取代,氧代不会发生在芳香基上。

[0060] 术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生,该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。例如,乙基“任选”被卤素取代,指乙基可以是未被取代的(CH_2CH_3)、单取代的(如 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$)、多取代的(如 CHFCH_2F 、 CH_2CHF_2 等)或完全被取代的(CF_2CF_3)。本领域技术人员可理解,对于包含一个或多个取代基的任何基团,不会引入任何在空间上不可能存在和/或不能合成的取代或取代模式。

[0061] 本文中的 C_{m-n} ,是该部分具有给定范围中的整数个碳原子。例如“ C_{1-6} ”是指该基团可具有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子。

[0062] 当任何变量(例如R)在化合物的组成或结构中出现一次以上时,其在每一种情况下的定义都是独立的。因此,例如,如果一个基团被2个R所取代,则每个R都有独立的选项。

[0063] 当一个连接基团的数量为0时,比如 $-(\text{CH}_2)_0-$,表示该连接基团为共价键。

[0064] 当其中一个变量选自共价键时,表示其连接的两个基团直接相连,比如A-L-Z中L代表共价键时表示该结构实际上是A-Z。

[0065] 当一个取代基的键交叉连接到一个环上的两个原子时,这种取代基可以与这个环

上的任意原子相键合。例如,结构单元表示其可在环己基或者环己二烯上的任意一个位置发生取代。

[0066] 术语“卤”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0067] 术语“羟基”指-OH基团。

[0068] 术语“氰基”指-CN基团。

[0069] 术语“氨基”指-NH₂基团。

[0070] 术语“烷基”是指通式为C_nH_{2n+1}的烃基。该烷基可以是直链或支链的。例如,术语“C₁₋₆烷基”指含有1至6个碳原子的烷基(例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、新戊基、己基、2-甲基戊基等)。类似地,烷氧基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基磺酰基和烷硫基的烷基部分(即烷基)具有上述相同定义。

[0071] 术语“环烷基”指完全饱和的并且可以以呈单环、桥环或螺环存在的碳环。除非另有指示,该碳环通常为3至10元环。环烷基非限制性实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、降冰片基(双环[2.2.1]庚基)、双环[2.2.2]辛基、金刚烷基等。

[0072] 术语“杂环烷基”是指完全饱和的并且可以以单环、桥环或螺环存在的环状基团。除非另有指示,该杂环通常为含有1至3个独立地选自硫、氧和/或氮的杂原子(优选1或2个杂原子)的3至7元环。3元杂环烷基的实例包括但不限于环氧乙烷基、环硫乙烷基、环氮乙烷基,4元杂环烷基的非限制性实例包括但不限于吡啶基、噁丁环基、噻丁环基,5元杂环烷基的实例包括但不限于四氢呋喃基、四氢噻吩基、吡咯烷基、异噻唑烷基、噻唑烷基、异噻唑烷基、噻唑烷基、咪唑烷基、四氢吡唑基,6元杂环烷基的实例包括但不限于哌啶基、四氢吡喃基、四氢噻喃基、吗啉基、哌嗪基、1,4-噻噁烷基、1,4-二氧六环基、硫代吗啉基、1,3-二噻烷基、1,4-二噻烷基,7元杂环烷基的实例包括但不限于氮杂环庚烷基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基。

[0073] 术语“治疗”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状,且包括:

[0074] (i) 抑制疾病或疾病状态,即遏制其发展;

[0075] (ii) 缓解疾病或疾病状态,即使该疾病或疾病状态消退。

[0076] 术语“预防”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以预防疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状,且包括:预防疾病或疾病状态在哺乳动物中出现,特别是当这类哺乳动物易患有该疾病状态,但尚未被诊断为已患有该疾病状态时。

[0077] 术语“治疗有效量”意指(i) 治疗或预防特定疾病、病况或障碍,(ii) 减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状,或(iii) 预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本申请化合物的用量。构成“治疗有效量”的本申请化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待被治疗的哺乳动物

的年龄而改变,但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本公开内容而确定。

[0078] 术语“药学上可接受的”,是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言,它们在可靠的医学判断的范围之内,适用于与人类和动物的组织接触使用,而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

[0079] 作为药学上可接受的盐,例如,可以提及金属盐、铵盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与碱性或者酸性氨基酸形成的盐等。

[0080] 术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。

[0081] 术语“药学上可接受的辅料”是指对有机体无明显刺激作用,而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些辅料。合适的辅料是本领域技术人员熟知的,例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等。

[0082] 词语“包括(comprise)”或“包含(comprise)”及其英文变体例如comprises或comprising应理解为开放的、非排他性的意义,即“包括但不限于”。

[0083] 本申请的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在,并且所有这样的形式包含于本申请的范围之内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能垒互变的不同能量的结构异构体。例如,质子互变异构体(也称为质子转移互变异构体)包括经由质子迁移的互变,如酮-烯醇及亚胺-烯胺异构化。质子互变异构体的具体实例是咪唑部分,其中质子可在两个环氮间迁移。价互变异构体包括通过一些成键电子的重组的互变。

[0084] 本申请还包括与本文中记载的那些相同的,但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本申请化合物。可结合到本申请化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素,诸如分别为²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹³N、¹⁵N、¹⁵O、¹⁷O、¹⁸O、³¹P、³²P、³⁵S、¹⁸F、¹²³I、¹²⁵I和³⁶Cl等。例如,。

[0085] 某些同位素标记的本申请化合物(例如用³H及¹⁴C标记的那些)可用于化合物和/或底物组织分布分析中。氚化(即³H)和碳-14(即¹⁴C)同位素对于由于它们易于制备和可检测性是尤其优选的。正电子发射同位素,诸如¹⁵O、¹³N、¹¹C和¹⁸F可用于正电子发射断层扫描(PET)研究以测定底物占有率。通常可以通过与公开于下文的方案和/或实施例中的那些类似的下列程序,通过同位素标记试剂取代未经同位素标记的试剂来制备同位素标记的本申请化合物。

[0086] 此外,用较重同位素(诸如氘(即²H))取代可以提供某些由更高的代谢稳定性产生的治疗优点(例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求),并且因此在某些情形下可能是优选的,其中氘取代可以是部分或完全的,部分氘取代是指至少一个氢被至少一个氘取代。

[0087] 本申请化合物可以是不对称的,例如,具有一个或多个立体异构体。除非另有说明,所有立体异构体都包括,如对映异构体和非对映异构体。本申请的含有不对称碳原子的化合物可以以光学活性纯的形式或外消旋形式被分离出来。光学活性纯的形式可以从外消旋混合物拆分,或通过使用手性原料或手性试剂合成。

[0088] 本申请的化合物可以存在特定的几何异构体或立体异构体形式。本申请设想所有的这类化合物,包括互变异构体、顺式和反式异构体、(-)-和(+)-对映体、(R)-和(S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体,及其外消旋混合物和其他混合物,例如对映异构体或非对映体富集的混合物,所有这些都属于本申请的范围之内。烷基等取代基中可以

存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物均包括在本申请的范围之内。

[0089] 本申请的药物组合物可通过将本申请的化合物与适宜的药学上可接受的辅料组合而制备,例如可配制成固态、半固态、液态或气态制剂,如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、膏剂、乳剂、悬浮剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球及气溶胶等。

[0090] 给予本申请化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的典型途径包括但不限于口服、直肠、局部、吸入、肠胃外、舌下、阴道内、鼻内、眼内、腹膜内、肌内、皮下、静脉内给药。

[0091] 本申请的药物组合物可以采用本领域众所周知的方法制造,如常规的混合法、溶解法、制粒法、制糖衣药丸法、磨细法、乳化法、冷冻干燥法等。

[0092] 在一些实施方案中,药物组合物是口服形式。对于口服给药,可以通过将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的辅料混合,来配制该药物组合物。这些辅料能使本申请的化合物被配制成片剂、丸剂、锭剂、糖衣剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、浆剂、悬浮剂等,用于对患者的口服给药。

[0093] 可以通过常规的混合、填充或压片方法来制备固体口服组合物。例如,可通过下述方法获得:将所述的活性化合物与固体辅料混合,任选地碾磨所得的混合物,如果需要则加入其它合适的辅料,然后将该混合物加工成颗粒,得到了片剂或糖衣剂的核心。适合的辅料包括但不限于:粘合剂、稀释剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、甜味剂或矫味剂等。

[0094] 药物组合物还可适用于肠胃外给药,如合适的单位剂型的无菌溶液剂、混悬剂或冻干产品。

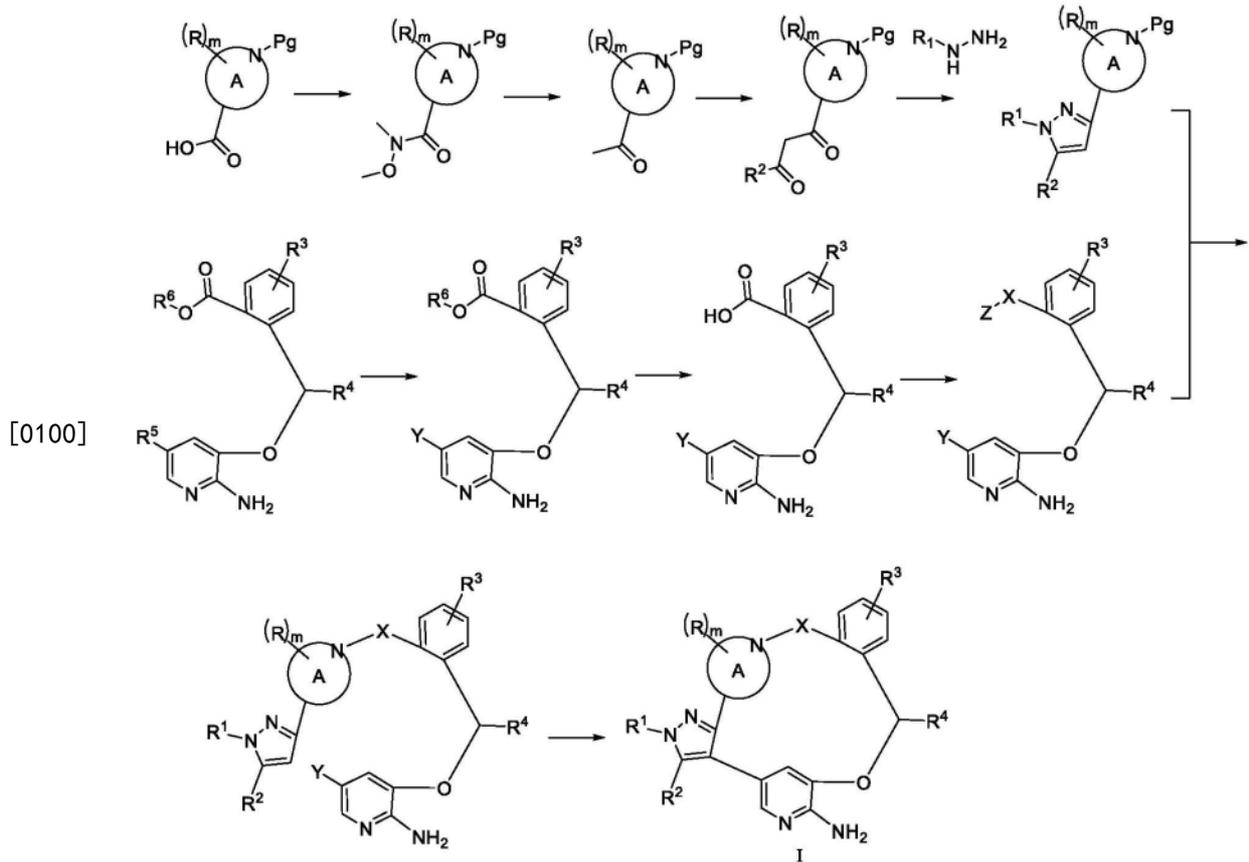
[0095] 本文所述的通式I化合物的所有施用方法中,每天给药的剂量为0.01到200mg/kg体重,以单独或分开剂量的形式。

[0096] 本申请的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备,包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式,优选的实施方式包括但不限于本申请的实施例。

[0097] 本申请具体实施方式的化学反应是在合适的溶剂中完成的,所述的溶剂须适合于本申请的化学变化及其所需的试剂和物料。为了获得本申请的化合物,有时需要本领域技术人员在已有实施方式的基础上对合成步骤或者反应流程进行修改或选择。

[0098] 本领域合成路线规划中的一个重要考量因素是为反应性官能团(如本申请中的氨基)选择合适的保护基,例如,可参考Greene's Protective Groups in Organic Synthesis(4th Ed).Hoboken,New Jersey:John Wiley&Sons,Inc.本申请引用的所有参考文献整体上并入本申请。

[0099] 在一些实施方案中,本申请通式I的化合物可以由有机合成领域技术人员通过以下路线来制备:



[0101] 其中R、m、R¹、R²、R³、R⁴、A、X同式I化合物的定义；R⁵表示氢、Pg表示保护基例如Boc等、Y表示卤素、R⁶表示C₁₋₆烷基，Z表示羟基或者卤素。

[0102] 本申请采用下述缩略词：

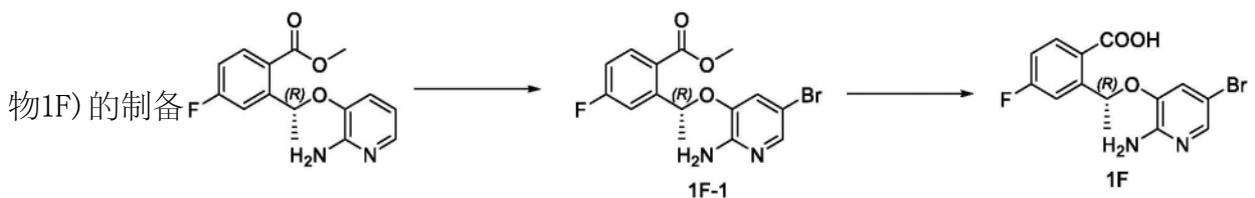
[0103] EA代表乙酸乙酯；DCM代表二氯甲烷；HATU代表2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯；DIPEA代表N,N-二异丙基乙胺；DMF代表N,N-二甲基甲酰胺；DEAD代表偶氮二甲酸二乙酯；NBS代表N-溴代丁二酰亚胺；DMA代表N,N-二甲基乙酰胺；FDPP代表五氟苯基二苯基磷酸酯；MeOH代表甲醇；TEA代表三乙胺；T3P代表1-丙基磷酸酐；MsCl代表甲基磺酰氯；DIAD代表偶氮二甲酸二异丙酯；Boc表示叔丁氧羰基；HEPES代表4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸；DTT代表二硫苏糖醇；EGTA代表乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸。

[0104] 为清楚起见，进一步用实施例来阐述本发明，但是实施例并非限制本申请的范围。本申请所使用的所有试剂是市售的，无需进一步纯化即可使用。

实施例

[0105] 中间体的制备

[0106] 中间体例1：(R)-2-(1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酸(化合物1F)的制备



[0107] 步骤一：(R)-2-(1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酸甲酯(化合物1F-1)的制备

物1F-1)的制备

[0108] 于0℃,氮气保护条件下,将N-溴代丁二酰亚胺(5.16g)的乙腈(50mL)的溶液缓慢的滴加到甲基(R)-2-(1-((2-氨基吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酸酯(8g)的溶液乙腈(100mL)溶液中,滴加完毕,然后0℃条件下搅拌反应,反应完全,向反应液中加入水(20mL),二氯甲烷(100mL*3)萃取,合并有机相,并用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/1)分离得到化合物1F-1(6.5g)。

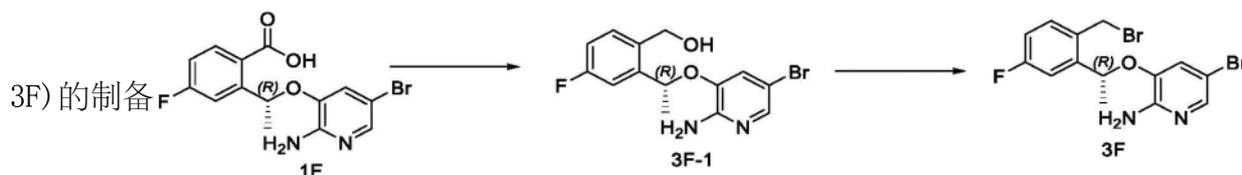
[0109] MS:m/z=369.1[M+H]⁺。

[0110] 步骤二:(R)-2-(1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酸(化合物1F)的制备

[0111] 于室温条件下,向250mL的反应瓶中,依次加入化合物1F-1(6.5g),甲醇(160mL),室温搅拌反应,滴加氢氧化钠(16.76g)的水溶液(32mL),滴加完毕,将混合物加热至40℃反应,反应完全,反应液倒入冰水(250mL)中,加入3M盐酸调节pH至2~3,乙酸乙酯(200mL*3)萃取水相,合并有机相,用200mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=2/1)分离得到化合物1F(6.7g)。

[0112] MS:m/z=355.4[M+H]⁺。

[0113] 中间体例2:(R)-5-溴-3-(1-(2-(溴甲基)-5-氟苯基)乙氧基)吡啶-2-胺(化合物



[0114] 步骤一:(R)-(2-(1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯基)甲醇(化合物3F-1)的制备

[0115] 于100mL反应瓶中,加入化合物1F(1g)和四氢呋喃(150mL),然后于0℃,氮气保护条件下,缓慢滴加1M硼烷的四氢呋喃溶液(12mL),滴加完毕,混合物在室温搅拌反应,反应完全,冰水浴下,四氢呋喃:水=1:1(100mL)滴入反应液中,淬灭反应,滴加完后,向反应中加入固体碳酸钾使得水层饱和,通过分液漏斗分液,水层再用乙酸乙酯萃取(40mL*2次),合并有机相,加入无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/1)分离得到化合物3F-1(0.95g)。

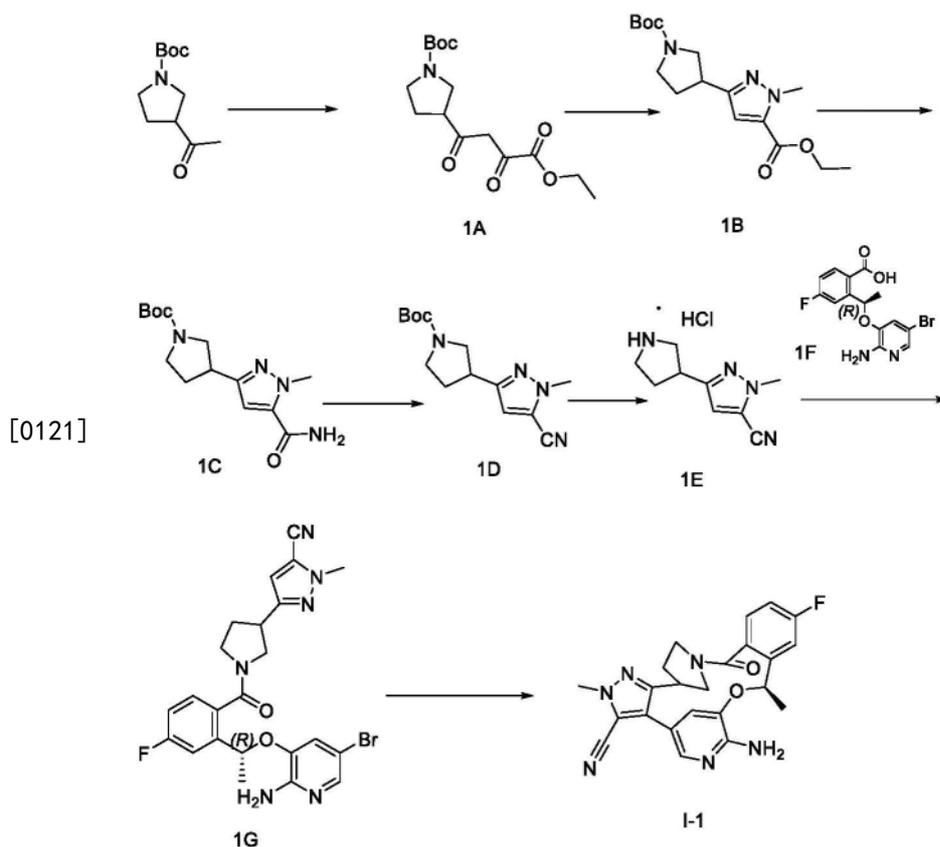
[0116] MS:m/z=341.2[M+H]⁺。

[0117] 步骤二:(R)-5-溴-3-(1-(2-(溴甲基)-5-氟苯基)乙氧基)吡啶-2-胺(化合物3F)的制备

[0118] 于100mL反应瓶中,加入化合物3F-1(1g)和二氯甲烷(15mL),然后于0℃条件下,缓慢滴加用二氯甲烷(5mL)溶解的三溴化磷(0.7g),滴加完毕,室温下搅拌反应,反应完全,加入2mL饱和碳酸氢钠水溶液淬灭反应,得到化合物3F不做纯化,直接用于下一步反应。

[0119] MS:m/z=402.3[M+H]⁺。

[0120] 实施例1:(6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(3,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-腈(化合物I-1)的制备



[0122] 步骤一:1-叔丁氧基羰基-3-(4-乙氧基-3,4-二氧丁基)吡咯烷(化合物1A)的制备

[0123] 向500mL反应瓶依次加入1-叔丁氧基羰基-3-乙酰吡咯烷(20g),草酸二乙酯(14.92g)和干燥的四氢呋喃(150mL),0℃条件下,向反应瓶中缓慢滴加干燥四氢呋喃(150mL)溶解的叔丁醇钾(12.5g)溶液,滴加完毕,混合物在室温搅拌反应。反应完全,向反应液加入乙酸乙酯(100mL),水浴搅拌下加入1N盐酸水溶液,调节溶液pH=6,加入饱和氯化钠水溶液(100mL),分离有机相,水相用乙酸乙酯萃取(80mL*3),合并有机相,用100mL饱和氯化钠水溶液洗涤,干燥。过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物1A(28.0g)。

[0124] MS:m/z=336.4[M+Na]⁺。

[0125] 步骤二:3-(1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-3-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物1B)的制备

[0126] 向100mL反应瓶依次加入化合物1A(2.8g),三乙胺(1.0g)和三氟乙醇(20mL),于0℃条件下,缓慢加入硫酸甲基胍(1.5g),加毕,反应液缓慢升至室温搅拌反应,反应完全,浓缩,向残留物中加入乙酸乙酯(50mL),饱和氯化钠水溶液(30mL),分离有机相,乙酸乙酯萃取(30mL*2),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,干燥。过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物1B(2.7g)。

[0127] MS:m/z=346.5[M+Na]⁺。

[0128] 步骤三:1-叔丁氧基羰基-3-(5-甲酰胺基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物1C)的制备

[0129] 向100mL反应瓶中,依次加化合物1B(2.7g),甲醇(10mL),加毕,60℃搅拌反应,反应完全,向反应液中加入氨水(1.5mL),加毕,60℃搅拌反应,反应完全,减压浓缩,残余物经

柱层析(石油醚/乙酸乙酯=1/1)分离得到化合物1C(2.1g)。

[0130] MS:m/z=317.4[M+Na]⁺。

[0131] 步骤四:1-叔丁氧基羰基-3-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物1D)的制备

[0132] 于0℃条件下,向50mL反应瓶中依次加入化合物1C(2.1g),四氢呋喃(15mL),三乙胺(1.5g)及三氟乙酸酐(2.7g),室温搅拌反应,反应完全,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/1)分离得到化合物1D(1.4g)。

[0133] MS:m/z=299.1[M+Na]⁺。

[0134] 步骤五:1-甲基-3-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-5-腈盐酸盐(化合物1E)的制备

[0135] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物1D(1.4g),1,4-二氧六环(10mL),4M氯化氢的1,4-二氧六环溶液(2mL),室温搅拌反应,反应完全,减压浓缩得到化合物1E(1.6g),不经纯化直接用于下一步反应。

[0136] MS:m/z=199.6[M+Na]⁺。

[0137] 步骤六:3-(1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酰基)吡咯烷-3-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈(化合物1G)的制备

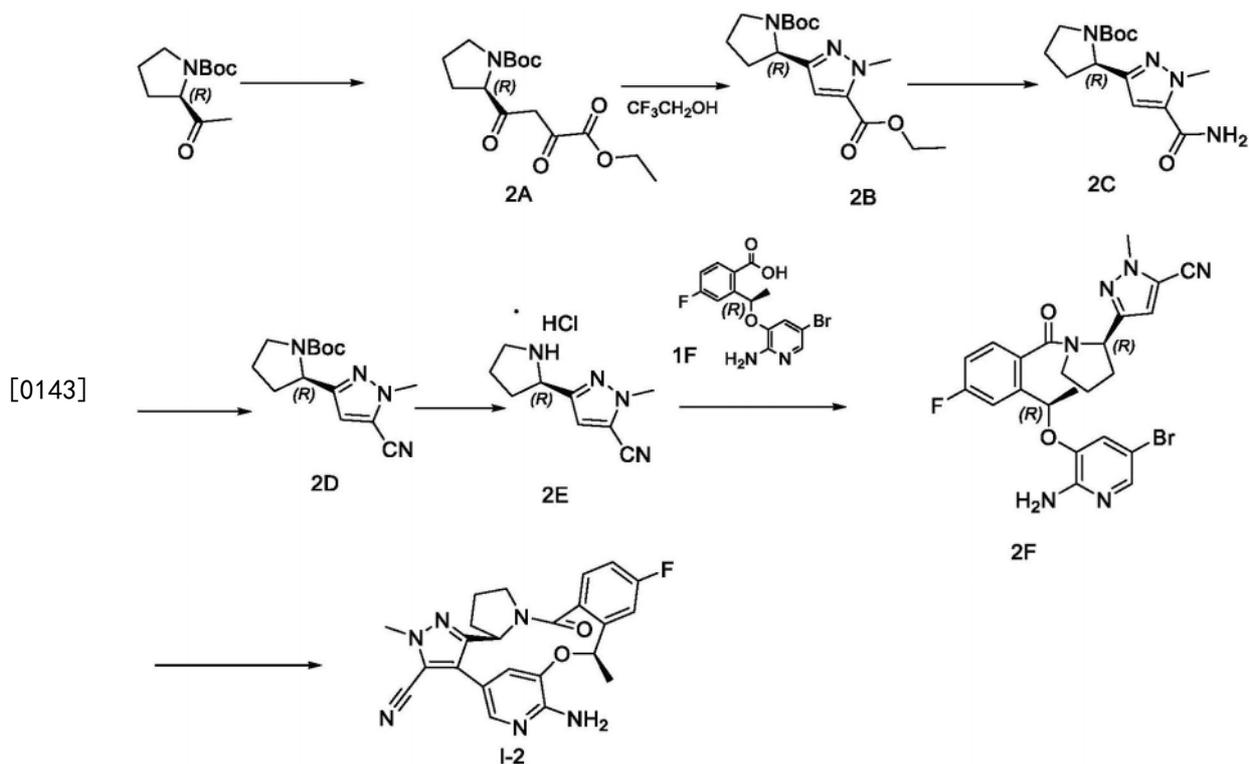
[0138] 向50mL单口瓶中,依次加入化合物1E(1.5g)、N,N-二甲基甲酰胺(8mL)、化合物1F(1.8g)及N,N-二异丙基乙胺(3.3g),0℃条件下向上述混合物中加入HATU(3.8g),室温搅拌反应,反应完全,向反应液中加入50mL乙酸乙酯,饱和碳酸氢钠水溶液洗(50mL*2),干燥。过滤,浓缩得到残余物,经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/2)分离得到化合物1G(2.1g)。

[0139] MS:m/z=535.3[M+Na]⁺。

[0140] 步骤七:(6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(3,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-1)的制备

[0141] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物1G(10g),乙酸钾(3.3g),乙酸钡(0.08g),正丁基二(1-金刚烷基)膦(0.3g)和特戊醇(100mL),在氮气保护条件下,于130℃搅拌反应,反应完全,减压浓缩得到残余物,向其中加入饱和氯化钠水溶液100mL,乙酸乙酯萃取(100mL*3),合并有机相,干燥。过滤,减压浓缩。残余物经柱层析(二氯甲烷/甲醇=9/1)分离得到化合物I-1(1.5g)。HR-ESI MS:m/z=433.1787[M+H]⁺。

[0142] 实施例2:(3²R,6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-2)的制备



[0144] 步骤一: (R)-1-叔丁氧羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基)吡咯烷(化合物2A)的制备

[0145] 于 0°C ,氮气保护下,在250mL的反应瓶中,将草酸二乙酯(3.77g)缓慢加入到(R)-1-叔丁氧羰基-2-乙酰基吡咯烷(5g),叔丁醇钾(3.16g)的四氢呋喃(80mL)反应液中,滴加完毕,将反应液转移至室温搅拌反应,反应结束。向反应液加入乙酸乙酯(50mL), 0°C 条件下加入1N盐酸水溶液,调节溶液 $\text{pH}=6$,加入饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,水相用乙酸乙酯萃取($40\text{mL}\times 3$),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,干燥。过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物2A(6.5g)。

[0146] MS: $m/z=336.4[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

[0147] 步骤二: (R)-3-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物2B)的制备- 20°C 条件下,向100mL反应瓶中,依次加入2A(5.6g)、甲基胍硫酸盐(3.09g)及三氟乙醇(50mL),然后将N,N-二异丙基乙胺(3.46g)缓慢加入至上述反应液中,加毕,将反应液置于该温度搅拌反应,反应结束。减压浓缩,向残渣中加入乙酸乙酯(80mL),饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,乙酸乙酯萃取($80\text{mL}\times 2$),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物2B(3.82g)。

[0148] MS: $m/z=346.5[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

[0149] 步骤三: (R)-1-叔丁氧羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物2C)的制备

[0150] 在100mL的反应瓶中,将2B(3.60g)溶于甲醇(35mL)中, 60°C 条件下搅拌反应。然后向体系中加入氨水(30mL),继续在加热 60°C 条件下搅拌反应,反应完全,停止搅拌,减压浓缩,然后在 0°C 条件下,向残余物中依次加入二氯甲烷(40mL),HATU(12.56g),N,N-二异丙基乙胺(11.38g)和氯化铵(4.42g),加毕,转移到室温搅拌反应,反应完全,反应液用饱和碳酸

氢钠(50mL)溶液洗,然后用二氯甲烷萃取(150×3),合并有机相,用100mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥。残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/7)分离得到化合物2C(2.7g)。

[0151] MS:m/z=317.4[M+Na]⁺。

[0152] 步骤四:(R)-1-叔丁氧羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物2D)的制备

[0153] 0℃条件下,将三氟乙酸酐(3.76mL)缓慢的滴加到2C(2.7g)和三乙胺(3.01mL)的四氢呋喃(50mL)中,混合物在室温下搅拌反应,反应完成,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物2D(2.32g)。

[0154] MS:m/z=299.5[M+Na]⁺。

[0155] 步骤五:(R)-1-甲基-3-(吡咯烷-2-基)-1H-吡唑-5-甲腈盐酸盐(化合物2E)的制备

[0156] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物2D(2.3g),1,4-二氧六环(10mL),4M氯化氢的1,4-二氧六环溶液(10mL),室温搅拌反应。反应完成,减压浓缩得到化合物2E(2.6g),不经纯化直接用于下一步反应。

[0157] MS:m/z=177.6[M+H]⁺。

[0158] 步骤六:3-((R)-1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酰基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈(化合物2F)的制备

[0159] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物2E(2.5g)、N,N-二甲基甲酰胺(13mL)、化合物1F(3.0g)及N,N-二异丙基乙胺(5.4g),0℃条件下向上述混合物中加入HATU(6.4g),室温搅拌反应,反应完全,向反应液中加入50mL乙酸乙酯,饱和碳酸氢钠水溶液洗(30mL*2),干燥。过滤,浓缩,经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/2)分离得到化合物2F(2.6g)。

[0160] MS:m/z=535.3[M+Na]⁺。

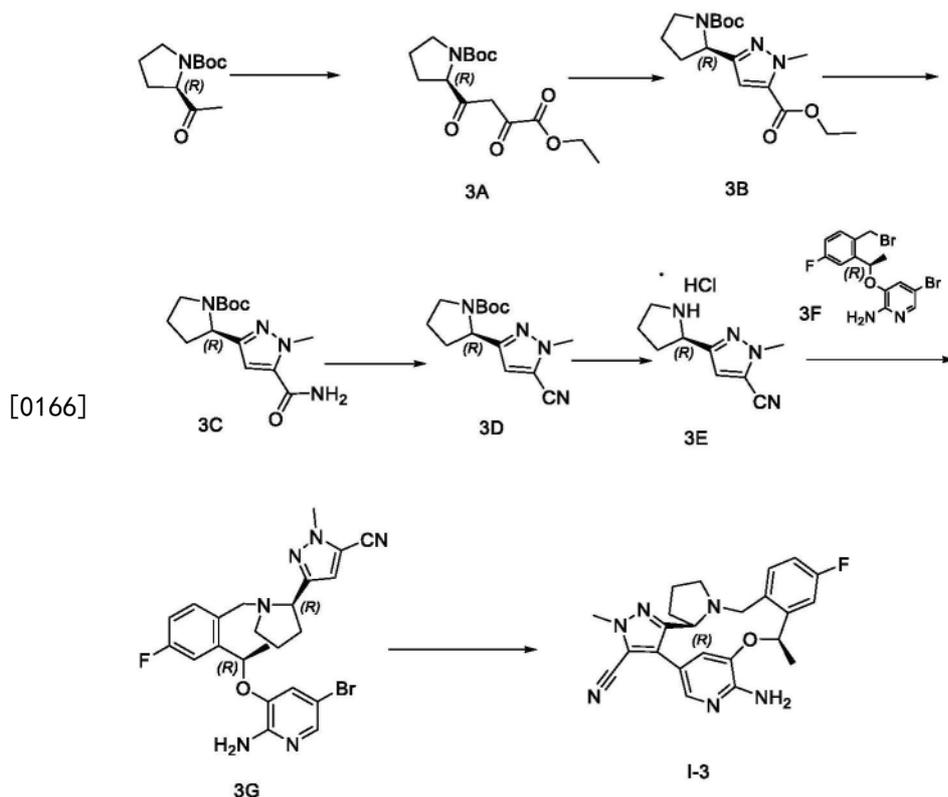
[0161] 步骤七:(3²R,6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-2)的制备

[0162] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物4G(2g),乙酸钾(0.7g),乙酸钡(0.02g),正丁基二(1-金刚烷基)膦(0.06g)和特戊醇(20mL),在氮气保护条件下,于130℃搅拌反应。反应完全,减压浓缩,向其中加入饱和氯化钠水溶液20mL,乙酸乙酯萃取(30mL*3),合并有机相,干燥。过滤,减压浓缩。残余物经柱层析(二氯甲烷/甲醇=9/1)分离得到化合物I-2(0.22g)。

[0163] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ7.61(dd,J=10.3,2.6Hz,1H),7.50(d,J=1.8Hz,1H),7.26(dd,J=8.5,5.6Hz,1H),7.12(td,J=8.4,2.6Hz,1H),7.03(d,J=1.6Hz,1H),6.16(s,2H),5.64(q,J=6.2,5.2Hz,1H),4.74(d,J=6.6Hz,1H),4.34-4.30(m,1H),3.99(s,3H),3.04-2.98(m,1H),2.45-2.39(m,2H),2.24-2.19(m,1H),2.15-2.11(m,1H),1.65(d,J=6.2Hz,3H)。

[0164] ¹³C NMR(125MHz,DMSO-d₆) δ167.19,164.01,151.18,147.05,143.74,137.85,137.22,133.59,127.11,126.59,121.08,115.11,114.13,112.59,112.49,111.12,71.41,56.33,42.59,38.88,28.94,22.58,21.67。MS:m/z=433.2[M+H]⁺。

[0165] 实施例3:(3²R,6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-3)的制备



[0167] 步骤一：(R)-1-叔丁氧羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基)吡咯烷(化合物3A)的制备

[0168] 于0℃,氮气保护下,在250mL的反应瓶中,将草酸二乙酯(3.77g)缓慢加入到(R)-1-叔丁氧羰基-2-乙酰基吡咯烷(5g),叔丁醇钾(3.16g)的四氢呋喃(80mL)反应液中,滴加完毕,将反应液转移至室温搅拌反应,反应完全,向反应液加入乙酸乙酯(50mL),0℃条件下加入1N盐酸水溶液,调节溶液pH=6,加入饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,水相用乙酸乙酯萃取(40mL*3),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,干燥。过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物3A(6.5g)。

[0169] MS:m/z=336.4[M+Na]⁺。

[0170] 步骤二：(R)-3-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物3B)的制备

[0171] 于-20℃条件下,依次向100mL反应瓶中加入化合物3A(5.6g)、甲基胍硫酸盐(3.09g)及三氟乙醇(50mL),然后将N,N-二异丙基乙胺(3.46g)缓慢加入至上述反应液中,加毕,将反应液置于该温度搅拌反应,反应完全,减压浓缩,向残渣中加入乙酸乙酯(80mL),饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,乙酸乙酯萃取(80mL*2),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物3B(2.3g)。MS:m/z=346.5

[0172] [M+Na]⁺。

[0173] 步骤三：(R)-1-叔丁氧羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物3C)的制备

[0174] 在100mL的反应瓶中,将3B(3.56g)溶于甲醇(35mL)中,60℃条件下搅拌反应。然后向体系中加入氨水(30mL),继续在加热60℃条件下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,然后向

残余物中依次加入二氯甲烷(40mL), HATU(12.56g), N,N-二异丙基乙胺(11.38g)和氯化铵(4.42g), 然后转移到室温搅拌反应, 反应完全, 反应液用饱和碳酸氢钠(50mL)溶液洗, 然后用二氯甲烷萃取(150×3), 合并有机相, 用100mL饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/7)分离得到化合物3C(5g)。

[0175] MS:m/z=317.4[M+Na]⁺。

[0176] 步骤四: (R)-1-叔丁氧羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物3D)的制备

[0177] 于0℃条件下, 将三氟乙酸酐(3.76mL)缓慢的滴加到5C(3.2g)和三乙胺(3.01mL)的四氢呋喃(50mL)中, 混合物在室温下搅拌反应, 反应完成, 减压浓缩, 残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物3D(2.32g)。MS:m/z=299.5[M+Na]⁺。

[0178] 步骤五: (R)-1-甲基-3-(吡咯烷-2-基)-1H-吡唑-5-甲腈盐酸盐(化合物3E)的制备

[0179] 向100mL反应瓶中, 依次加入化合物3D(2.3g), 1,4-二氧六环(10mL), 4M氯化氢的1,4-二氧六环溶液(10mL), 室温搅拌反应, 反应完全, 减压浓缩得到化合物3E(2.6g), 不经纯化直接用于下一步反应。MS:m/z=177.4[M+H]⁺。

[0180] 步骤六: 3-((R)-1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苄基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈(化合物3G)的制备

[0181] 向50mL反应瓶中, 依次加入化合物3E(0.3g)、二氯甲烷(2.5mL)、化合物3F(0.3g)及N,N-二异丙基乙胺(0.3g), 加毕, 回流搅拌反应, 反应完全, 向反应液中加入50mL二氯甲烷和50mL水, 分离有机相, 水层用50mL二氯甲烷萃取两次, 合并有机相, 干燥。过滤, 浓缩, 残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物3G(0.5g)。MS:m/z=521.3[M+Na]⁺。

[0182] 步骤七: (3²R, 6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹, 6-二甲基-2¹H-7-氧杂-1(3, 5)-吡啶-2(4, 3)-吡唑-3(2, 1)-吡咯烷-5(1, 2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-3)的制备

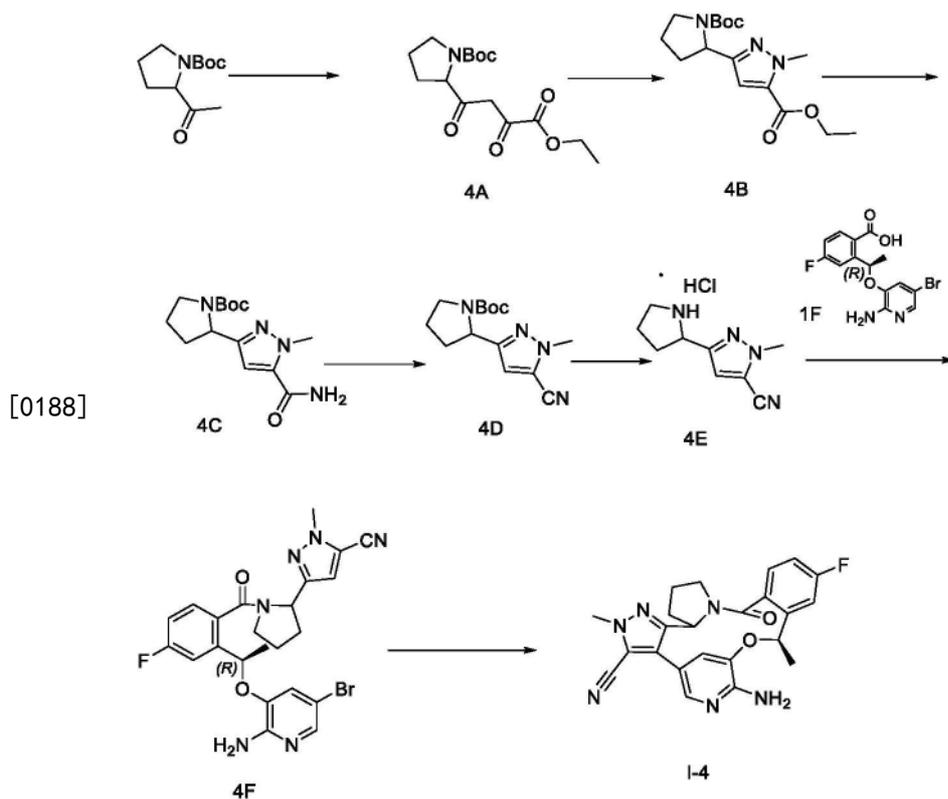
[0183] 向100mL反应瓶中, 依次加入化合物3G(0.5g), 乙酸钾(0.2g), 乙酸钬(0.005g), 正丁基二(1-金刚烷基)膦(0.02g)和特戊醇(20mL), 在氮气保护条件下, 于130℃搅拌反应, 反应完全, 减压浓缩得到残余物, 向其中加入饱和氯化钠水溶液20mL, 乙酸乙酯萃取(30mL*3), 合并有机相, 干燥。过滤, 减压浓缩。残余物经柱层析(二氯甲烷/甲醇=9/1)分离得到化合物I-3(0.04g)。

[0184] ¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ8.04(s, 1H), 7.75(s, 1H), 7.49(dd, J=10.5, 2.7Hz, 1H), 7.32(dd, J=8.5, 6.0Hz, 1H), 7.04(td, J=8.4, 2.8Hz, 1H), 6.01(m, 3H), 4.71(d, J=7.1Hz, 1H), 4.18(d, J=13.8Hz, 1H), 3.92(s, 3H), 3.40-3.34(m, 1H), 3.03-2.93(m, 1H), 2.53(m, 1H), 2.18-2.08(m, 2H), 2.06-2.00(m, 1H), 1.79-1.71(m, 1H), 1.56(d, J=6.2Hz, 3H)。

[0185] ¹³C NMR(125MHz, DMSO-d₆) δ162.73, 150.33, 150.09, 143.94, 139.38, 136.39, 134.23, 132.16, 124.25, 122.63, 114.80, 114.53, 113.49, 112.03, 110.80, 73.80, 54.95, 53.40, 49.53, 38.35, 31.18, 29.85, 21.94。

[0186] MS:m/z=419.3[M+H]⁺。

[0187] 实施例4: (6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹, 6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3, 5)-吡啶-2(4, 3)-吡唑-3(2, 1)-吡咯烷-5(1, 2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-4)的制备



[0189] 步骤一:1-叔丁氧羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基)吡咯烷(化合物4A)的制备

[0190] 于0℃,氮气保护下,在250mL的反应瓶中,将草酸二乙酯(3.77g)缓慢加入到1-叔丁氧羰基-2-乙酰基吡咯烷(5g),叔丁醇钾(3.16g)的四氢呋喃(80mL)反应液中,滴加完毕,将反应液转移至室温搅拌反应,反应结束。向反应液加入乙酸乙酯(50mL),0℃条件下加入1N盐酸水溶液,调节溶液pH=6,加入饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,水相用乙酸乙酯萃取(40mL*3),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,干燥。过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物4A(6.3g)。MS:m/z=336.4[M+Na]⁺。

[0191] 步骤二:3-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物4B)的制备

[0192] -20℃条件下,向100mL反应瓶中,依次加入4A(6.0g)、甲基胍硫酸盐(3.31g)及三氟乙醇(50mL),然后将N,N-二异丙基乙胺(3.71g)缓慢加入至上述反应液中,加毕,将反应液置于该温度搅拌反应,反应结束。减压浓缩,向残渣中加入乙酸乙酯(80mL),饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,乙酸乙酯萃取(80mL*2),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物4B(3.56g)。MS:m/z=346.5

[0193] [M+Na]⁺。

[0194] 步骤三:1-叔丁氧羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物4C)的制备

[0195] 在100mL的反应瓶中,将4B(3.56g)溶于甲醇(35mL)中,60℃条件下搅拌反应。然后向体系中加入氨水(30mL),继续在加热60℃条件下搅拌反应,反应完全,停止搅拌,减压浓缩,然后在0℃条件下,依次向残余物中加入二氯甲烷(40mL),HATU(12.56g),N,N-二异丙基

乙胺 (11.38g) 和氯化铵 (4.42g), 加毕, 转移到室温搅拌反应, 反应完全, 反应液用饱和碳酸氢钠 (50mL) 溶液洗, 然后用二氯甲烷萃取 (150×3), 合并有机相, 用100mL饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。残余物经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=3/7) 分离得到化合物4C (2.45g)。MS:m/z=317.4[M+Na]⁺。

[0196] 步骤四: 1-叔丁氧羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡咯烷 (化合物4D) 的制备

[0197] 0℃条件下, 将三氟乙酸酐 (3.76mL) 缓慢的滴加到4C (2.45g) 和三乙胺 (3.01mL) 的四氢呋喃 (50mL) 中, 混合物在室温下搅拌反应, 反应完成, 减压浓缩, 残余物经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=4/1) 分离得到化合物4D (2.05g)。MS:m/z=299.5[M+Na]⁺。

[0198] 步骤五: 1-甲基-3-(吡咯烷-2-基)-1H-吡唑-5-甲腈盐酸盐 (化合物4E) 的制备

[0199] 向100mL反应瓶中, 依次加入化合物4D (2.0g), 1,4-二氧六环 (10mL), 4M氯化氢的1,4-二氧六环溶液 (10mL), 室温搅拌反应。反应完成, 减压浓缩得到化合物4E (2.5g), 不经纯化直接用于下一步反应。MS:m/z=177.4[M+H]⁺。

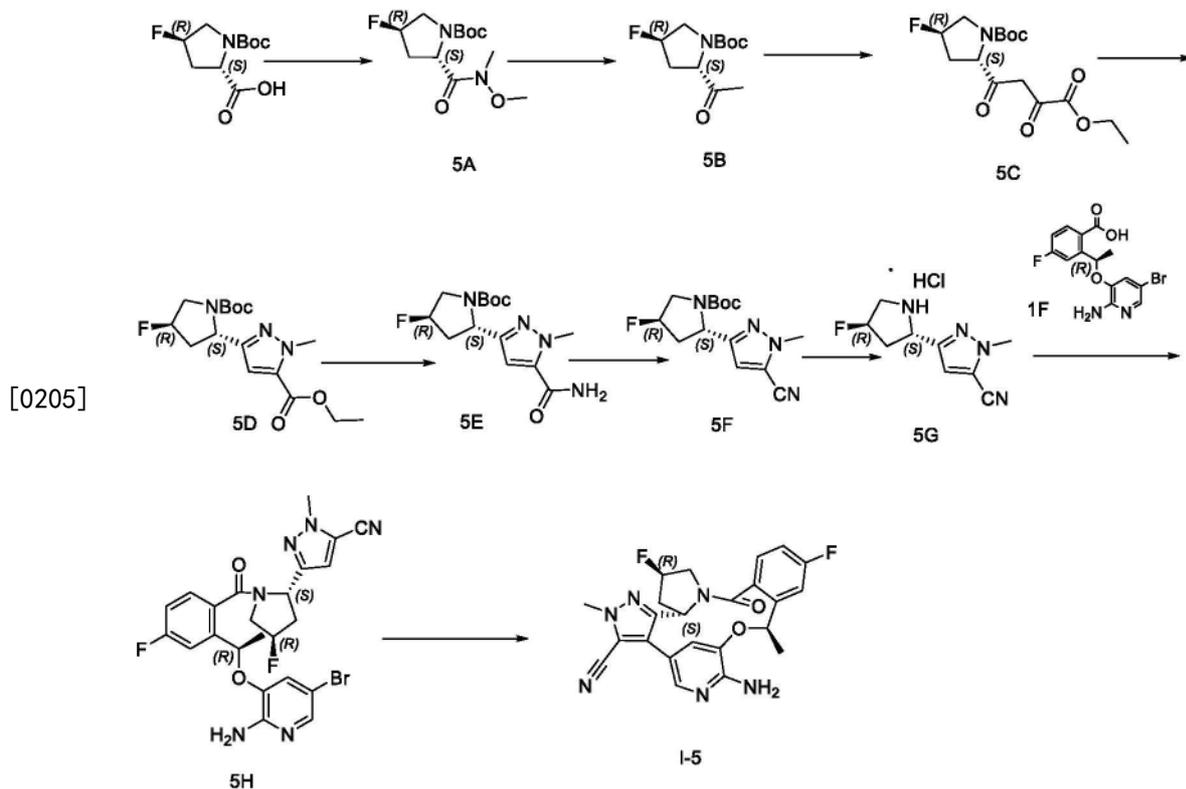
[0200] 步骤六: 3-(1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基) 氧基) 乙基)-4-氟苯甲酰基) 吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈 (化合物4F) 的制备

[0201] 向50mL反应瓶中, 依次加入化合物4E (2.5g)、N,N-二甲基甲酰胺 (13mL)、化合物1F (3.0g) 及N,N-二异丙基乙胺 (5.4g), 0℃条件下向上述混合物中加入HATU (6.4g), 室温搅拌反应, 反应完全, 向反应液中加入50mL乙酸乙酯, 饱和碳酸氢钠水溶液洗 (30mL*2), 干燥。过滤, 浓缩得到残余物, 经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=3/2) 分离得到化合物4F (2.9g)。MS:m/z=535.3[M+Na]⁺。

[0202] 步骤七: (6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈 (化合物I-4) 的制备

[0203] 向50mL反应瓶中, 依次加入化合物4F (2g), 乙酸钾 (0.7g), 乙酸钡 (0.02g), 正丁基二(1-金刚烷基) 膦 (0.06g) 和特戊醇 (20mL), 在氮气保护条件下, 于130℃搅拌反应。反应完全, 减压浓缩得到残余物, 向其中加入饱和氯化钠水溶液20mL, 乙酸乙酯萃取 (30mL*3), 合并有机相, 干燥。过滤, 减压浓缩。残余物经柱层析 (二氯甲烷/甲醇=9/1) 分离得到化合物I-4 (0.19g)。MS:m/z=433.2[M+H]⁺。

[0204] 实施例5: (3²S,3⁴R,6R)-1⁶-氨基-3⁴,5⁴-二氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈 (化合物I-5) 的制备



[0206] 步骤一：((2S,4R)-1-叔丁氧羰基-4-氟-2-(甲氧基(甲基)氨基甲酰基)吡咯烷(化合物5A)的制备

[0207] 于0℃条件下,将HATU(63.6g)分批加入到(2S,4R)-1-叔丁氧羰基-4-氟吡咯烷-2-羧酸(4.66g)的二氯甲烷(120mL)搅拌液中,反应液在0℃下搅拌反应,反应完全。分别向反应混合物中加入N,N-二异丙基乙胺(55.3mL)和N,0-二甲羟胺盐酸盐(7.66g),反应混合物恢复至室温搅拌反应。反应完全,向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(300mL),二氯甲烷萃取(100mL*3),合并有机相,无水硫酸钠干燥,抽滤,旋干,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物5A(35g)。MS:m/z=277.1[M+H]⁺。

[0208] 步骤二：(2S,4R)-1-叔丁氧羰基-2-乙酰-4-氟吡咯烷(化合物5B)的制备

[0209] 于-20℃,氮气保护条件下,向5A(19.65g)的干燥四氢呋喃(100mL)中逐滴加入3M甲基溴化镁的四氢呋喃溶液(14.6mL),-15℃下搅拌反应,然后升至室温搅拌反应,反应完全,将反应体系至于置于冰水浴中,缓慢的向其中加入饱和氯化铵(60mL)进行淬灭,加入乙酸乙酯(70mL)萃取,水相再用用乙酸乙酯(50mL*2)萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,抽滤除去干燥剂,浓缩。残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物5B(7.5g)。

[0210] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ4.24-4.29(m,1H),3.44-3.74(m,2H),3.44-3.74(m,1H),2.08(s,3H),1.90-2.04(m,2H),1.33(s,9H)。

[0211] 步骤三：(2S,4R)-1-叔丁氧羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基)-4-氟吡咯烷(化合物5C)的制备

[0212] 于0℃,氮气保护条件下,将草酸二乙酯(3.18g)缓慢加入含有化合物5B(6.35g),叔丁醇钾(2.66g)的四氢呋喃(40mL)反应液中,滴加完毕,反应液升至室温搅拌反应,反应完全,冰水浴下使用1M盐酸调节反应液pH至酸性(4-6),乙酸乙酯(60mL*3)萃取,有机相合并,用60mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,残余物经柱层析(石油醚/

乙酸乙酯=3/17) 分离得到化合物5C (2.9g)。

[0213] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 4.50-4.58 (m, 1H), 4.29 (s, 2H), 4.22 (q, J=6.3Hz, 2H), 3.45-3.76 (m, 2H), 3.45-3.76 (m, 1H), 1.96-2.12 (m, 2H), 1.28 (t, J=7.5Hz, 3H), 1.29 (s, 9H)。

[0214] 步骤四: (3-((2S, 4R)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物5D)的制备

[0215] 于-15℃, 氮气保护条件下, 在100mL反应瓶中依次加入化合物5C (2.9g)、甲基胍硫酸盐 (1.474g) 及三氟乙醇 (20mL), 然后将N,N-二异丙基乙胺 (1.652g) 缓慢滴加至上述反应液中, 加毕, 反应液缓慢升至室温搅拌反应, 反应完全, 减压浓缩, 残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1) 分离得到化合物5D (0.82g)。

[0216] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 6.79 (s, 1H), 4.81-4.89 (m, 1H), 4.28 (q, J=7.1Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.47-3.80 (m, 2H), 3.47-3.80 (m, 1H), 2.16-2.30 (m, 2H), 1.28 (t, J=7Hz, 3H), 1.19 (s, 9H)。MS:m/z=342.2[M

[0217] +H] $^+$ 。

[0218] 步骤五: (2S, 4R)-1-叔丁氧羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-氟吡咯烷(化合物5E)的制备

[0219] 在100mL的反应瓶中, 将化合物5D (820mg) 溶于甲醇 (20mL) 中, 65℃条件下搅拌反应。然后加入40mL氨水, 继续在加热60℃条件下搅拌反应, 反应完全, 减压浓缩, 然后在0℃条件下, 依次向残余物中加入二氯甲烷 (30mL), HATU (2.7g), N,N-二异丙基乙胺 (3.15mL) 和氯化铵 (0.955g)。然后升至室温搅拌反应, 反应液用饱和碳酸氢钠 (30mL) 溶液洗, 然后用二氯甲烷萃取 (40mL×3), 合并有机相, 用100mL饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩。残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/7) 分离得到化合物5E (368mg)。MS:m/z=313.2[M+H] $^+$ 。

[0220] 步骤六: ((2S, 4R)-1-叔丁氧羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-氟吡咯烷(化合物5F)的制备

[0221] 于0℃条件下, 将三氟乙酸酐 (0.408mL) 缓慢的滴加到化合物5E (370mg) 和三乙胺 (0.304mL) 的四氢呋喃 (20mL) 中, 加毕, 反应液升至室温搅拌反应, 反应完全, 减压浓缩, 残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1) 分离得到化合物5F (348mg)。MS:m/z=295.2[M+H] $^+$ 。

[0222] 步骤七: 3-((2S, 4R)-4-氟吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲脒盐酸盐(化合物5G)的制备

[0223] 于100mL反应瓶中, 依次加入化合物5F (360mg)、4M HCl的1,4-二氧六环溶液 (10mL), 室温下搅拌反应, 反应完全, 浓缩, 得到化合物5G (279mg), 未做进一步纯化直接用于下一步反应。MS:m/z=195.2[M+H] $^+$ 。

[0224] 步骤八: 3-((2S, 4R)-1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲脒(化合物5H)的制备

[0225] 于0℃条件下, 将化合物5G (232mg) 溶解于N,N-二甲基甲酰胺 (20mL), 然后依次加入N,N-二异丙基乙胺 (772mg), 化合物1F (776mg), HATU (908mg), 室温搅拌反应, 反应完全, 减压浓缩, 加入饱和碳酸氢钠溶液 (20mL), 乙酸乙酯 (60mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干, 浓缩, 残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3) 分离得到化合物

5H(680mg)。MS:m/z=553.2[M+Na]⁺。

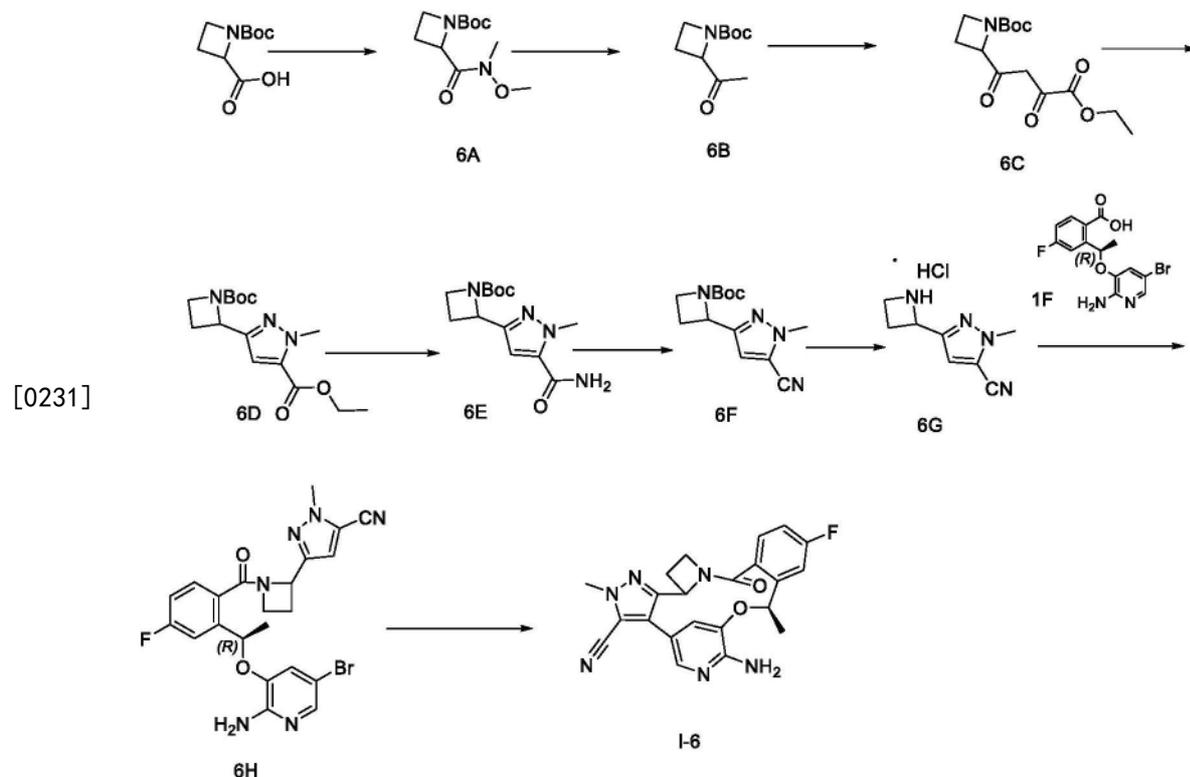
[0226] 步骤九: (3²S,3⁴R,6R)-1⁶-氨基-3⁴,5⁴-二氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-5)的制备

[0227] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物5H(0.5g),乙酸钾(0.2g),乙酸钡(0.005g),正丁基二(1-金刚烷基)膦(0.02g)和特戊醇(20mL),在氮气保护条件下,于130℃搅拌反应,反应完全,减压浓缩得到残余物,向其中加入饱和氯化钠水溶液20mL,乙酸乙酯萃取(30mL*3),合并有机相,干燥。过滤,减压浓缩。残余物经柱层析(二氯甲烷/甲醇=80/1)分离得到化合物I-5(0.08g)。

[0228] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ7.66(dd,J=10.2,2.5Hz,1H),7.50(d,J=1.6Hz,1H),7.29(dd,J=8.5,5.6Hz,1H),7.16(dt,J=8.4,4.2Hz,1H),7.00(s,1H),6.20(s,2H),5.86(m,0.5H),5.74(m,0.5H),5.66-5.59(m,1H),4.99(s,1H),4.51-4.40(m,1H),4.04-4.01(m,0.5H),3.99(s,3H),3.30(m,0.5H),3.05(dt,J=14.5,7.2Hz,1H),2.49-2.34(m,1H),1.70(d,J=6.2Hz,3H)。

[0229] ¹³C NMR(125MHz,DMSO-d₆) δ167.82,164.17,151.24,146.41,143.68,137.80,137.18,132.78,127.04,126.52,120.93,115.61,114.35,113.04,112.20,110.90,94.80,71.31,56.39,50.68,38.89,37.73,21.70。MS:m/z=451.3[M+H]⁺。

[0230] 实施例6: (6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-氮杂环丁烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-6)的制备



[0232] 步骤一:1-叔丁氧羰基-2-(甲氧基(甲基)氨甲酰)氮杂环丁烷(化合物6A)的制备

[0233] 于0℃条件下,HATU(37.8g)分批加入到1-(叔丁氧羰基)氮杂环丁烷-2-羧酸(20g)的二氯甲烷(250mL)搅拌液中,反应液在0℃下搅拌反应,反应完全。然后向反应液中加入N,

N-二异丙基乙胺 (12.8g) 和二甲羟胺盐酸盐 (19.4g), 加毕, 反应液升至室温搅拌反应。反应完全, 向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液 (300mL), 二氯甲烷萃取 (100mL*3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 旋干, 残余物经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=7/3) 分离得到化合物6A (22.8g)。MS:m/z=245.4[M+H]⁺。

[0234] 步骤二: 1-叔丁氧羰基-2-乙酰氮杂环丁烷 (化合物6B) 的制备

[0235] 于-20℃, 氮气保护下, 向6A (22g) 的干燥四氢呋喃 (200mL) 中逐滴加入3M甲基溴化镁的四氢呋喃溶液 (35.8g, 100mL), -15℃下搅拌反应, 然后升至室温搅拌反应, 反应完全, 将反应体系至于置于冰水浴中, 缓慢的向其中加入饱和氯化铵 (100mL) 进行淬灭, 直至不再产生气泡, 加入乙酸乙酯 (100mL) 萃取, 水相用乙酸乙酯 (50mL*2) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤除去干燥剂, 浓缩。残余物经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=7/3) 分离得到化合物6B (13.8g)。MS:m/z=200.3[M+H]⁺。

[0236] 步骤三: 1-叔丁氧羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基) 氮杂环丁烷 (化合物6C) 的制备

[0237] 于100mL反应瓶中, 依次加入化合物6B (6.9g), 草酸二乙酯 (5.3g) 和干燥THF (40mL), 于0℃条件下, 缓慢加入叔丁醇钾 (4.4g), 加毕, 混合物在室温搅拌反应, 反应完全, 向反应液加入乙酸乙酯 (80mL), 加入1N盐酸水溶液调节反应液pH=5, 分离有机相, 水相用乙酸乙酯萃取 (50mL*3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥、抽滤、浓缩, 残余物经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=7/3) 分离得到化合物6C (6.9g)。

[0238] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ6.64 (s, 1H), 4.79-4.65 (m, 1H), 4.35 (q, J=7.2Hz, 2H), 4.22 (q, J=7.1Hz, 1H), 3.99-3.90 (m, 2H), 2.55 (dtd, J=18.0, 9.4, 6.2Hz, 1H), 2.27-2.18 (m, 1H), 1.42 (d, J=5.8Hz, 9H), 1.37 (t, J=7.1Hz, 3H)。MS:m/z=322.5[M+Na]⁺。

[0239] 步骤四: 3-(1-(叔丁氧基羰基) 氮杂环丁烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯 (化合物6D) 的制备

[0240] 于100mL反应瓶中, 依次加入化合物6C (2g), 三乙胺 (1.1mL) 和无水乙醇 (25mL), 于0℃条件下, 缓慢加入甲基肼硫酸盐 (1.1g), 加毕, 于室温下搅拌反应, 反应完全, 将反应液减压浓缩, 残余物经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=6/4) 分离得到化合物6D (1.27g)。

[0241] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ6.88 (s, 1H), 5.20 (t, J=7.3Hz, 1H), 4.31 (q, J=7.1Hz, 2H), 4.13 (s, 3H), 4.00-3.91 (m, 2H), 2.53 (dt, J=16.9, 8.7Hz, 1H), 2.38 (p, J=8.2, 7.6Hz, 1H), 1.41-1.32 (m, 12H)。

[0242] ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ159.99, 151.93, 133.25, 109.43, 79.71, 61.07, 39.55, 28.45, 23.34, 14.35。MS:m/z=332.4[M+Na]⁺。

[0243] 步骤五: 1-叔丁氧羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基) 氮杂环丁烷 (化合物6E) 的制备

[0244] 于100mL反应瓶中, 将化合物6D (1.27g) 溶于甲醇 (25mL) 中, 65℃条件下搅拌反应。然后加入40mL氨水, 继续加热在60℃条件下搅拌反应, 反应完全, 减压浓缩, 然后在0℃条件下, 依次向残余物中加入二氯甲烷 (25mL), HATU (4.5g), N,N-二异丙基乙胺 (5.2mL) 和氯化铵 (1.58g)。加毕, 缓慢升至室温搅拌反应, 反应完全, 反应液用饱和碳酸氢钠 (30mL) 溶液洗, 然后用二氯甲烷萃取 (40×3), 合并有机相, 用100mL饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥。残余物经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯

[0245] =6/4) 分离得到化合物6E(1.48g)。

[0246] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3) δ 6.65(s, 1H), 5.21(t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 4.13(s, 3H), 3.95(t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 3.74-3.69(m, 2H), 3.18(d, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 1.42(d, $J=6.5\text{Hz}$, 9H)。MS:m/z=303.4[M+Na] $^+$ 。

[0247] 步骤六:1-叔丁氧羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)氮杂环丁烷(化合物6F)的制备

[0248] 于0℃条件下,将三氟乙酸酐(1.348mL)缓慢的滴加到化合物6E(1.48g)和三乙胺(3.5mL)的四氢呋喃(20mL)中,室温下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物6F(0.92g)。

[0249] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3) δ 6.81(s, 1H), 5.20(t, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 4.01(s, 3H), 3.95(t, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 2.56(dd, $J=18.4, 7.6\text{Hz}$, 1H), 2.46-2.33(m, 1H), 1.38(s, 9H)。MS:m/z=285.2[M+Na] $^+$ 。

[0250] 步骤七:2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)氮杂环丁烷盐酸盐(化合物6G)的制备

[0251] 于50mL反应瓶中,依次加入化合物6F(370mg)、4M HCl的1,4-二氧六环溶液(10mL),室温下搅拌反应,反应完全。浓缩,得到化合物6G(279mg),未做进一步纯化直接用于下一步反应。MS:m/z=163.1[M+H] $^+$ 。

[0252] 步骤八:3-(1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酰基)氮杂环丁烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈(化合物6H)的制备

[0253] 于0℃条件下,将化合物6G(220mg)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(20mL),然后依次加入N,N-二异丙基乙胺(772mL),化合物1F(720mg),HATU(842mg),室温搅拌反应,反应完全,减压浓缩,加入饱和碳酸氢钠溶液(30mL),乙酸乙酯(50mL*3)萃取,合并有机相,并用无水硫酸钠干燥、抽滤、浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物6H(430mg)。

[0254] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3) δ 8.00(s, 1H), 7.43(m, 1H), 7.36(m, 1H), 6.94(s, 1H), 6.78(s, 1H), 6.35(s, 1H), 5.97(t, $J=8.22\text{Hz}$, 1H), 5.05(q, $J=6.07\text{Hz}$, 1H), 3.95(s, 3H), 3.52-3.59(m, 2H), 2.32-2.43(m, 2H), 1.28(d, $J=2.8\text{Hz}$, 3H), 1.348(s, 18H)。MS:m/z=499.3[M+H] $^+$ 。

[0255] 步骤九:(6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-氮杂环丁烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-6)的制备

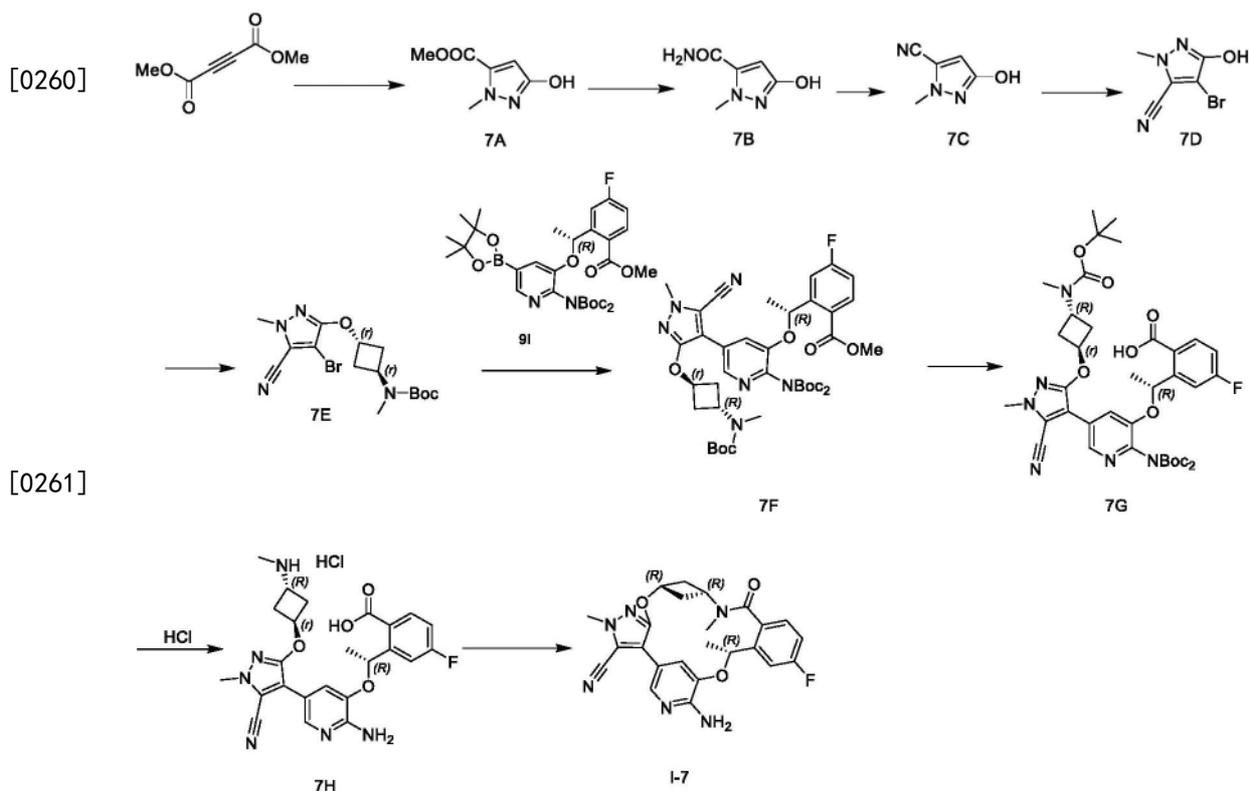
[0256] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物6H(0.5g),乙酸钾(0.2g),乙酸钡(0.005g),正丁基二(1-金刚烷基)膦(0.02g)和特戊醇(20mL),在氮气保护条件下,于130℃搅拌反应,反应完全,减压浓缩得到残余物,向其中加入饱和氯化钠水溶液20mL,乙酸乙酯萃取(30mL*3),合并有机相,干燥。过滤,减压浓缩。残余物经柱层析(DCM/MeOH=80/1)分离得到化合物I-6(0.03g)。

[0257] ^1H NMR(500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.74(dd, $J=8.6, 3.2\text{Hz}$, 1H), 8.04(dd, $J=10.5, 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.64(s, 1H), 7.59(dd, $J=8.5, 5.7\text{Hz}$, 1H), 7.21(td, $J=8.4, 2.5\text{Hz}$, 1H), 6.92(s, 1H), 6.42(s, 2H), 6.30(d, $J=6.1\text{Hz}$, 1H), 6.05(d, $J=16.0\text{Hz}$, 1H), 4.53-4.48(m, 1H), 4.00(s, 3H), 3.62-3.59(m, 2H), 1.61(d, $J=6.1\text{Hz}$, 3H)。

[0258] ^{13}C NMR(125MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 167.34, 164.68, 151.66, 146.32, 144.76, 138.58,

137.70, 130.41, 129.39, 128.99, 124.41, 114.91, 114.57, 112.65, 111.69, 111.38, 70.47, 54.93, 40.20, 38.68, 28.08, 23.97. MS: $m/z = 419.4 [M+H]^+$.

[0259] 实施例7: (4¹R, 4³R, 8R) - 1⁶-氨基-7⁴-氟-2¹, 5, 8-三甲基-6-氧代-2¹H-3, 9-二氧杂-5-氮杂-1(3, 5)-吡啶-2(4, 3)-吡唑-4(1, 3)-环丁烷-7(1, 2)-苯基并环壬烷-2⁵-甲酰(化合物I-7)的制备



钠水溶液洗涤有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离,得到化合物7D(681mg)。MS:m/z=200.0[M-H]⁻。

[0270] 步骤五:((1r,3r)-3-((4-溴-5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)氧杂)环丁基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯(化合物7E)的制备

[0271] 于50mL反应瓶中,依次加入化合物7D(453mg)、三苯基磷(888mg)、((1r,3r)-3-羟基环丁基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯(500mg),四氢呋喃(2mL),氮气保护冰水浴下,混向合物缓慢加入偶氮二甲酸二乙酯(629mg),将反应混合物加热至50℃下反应,反应完全后,减压浓缩,柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离,得到化合物7E(771mg)。

[0272] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆):δ4.96(s,1H),4.70(br,1H),3.87(s,3H),2.78(s,3H),2.58-2.56(m,2H),2.32-2.30(m,2H),1.39(s,9H)。

[0273] ¹³C NMR(125MHz,DMSO-d₆):δ157.85,154.99,116.80,109.84,86.69,79.31,72.73,48.25,34.59,29.86,28.53。MS:m/z=407.13[M+Na]⁺。

[0274] 步骤六:2-((R)-1-((2-(双(叔丁氧羰基)氨基)-5-(3-((1r,3R)-3-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)环丁氧基)-5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶基-3-基)氧杂)乙基)-4-氟苯甲酸甲酯(化合物7F)的制备

[0275] 于50mL反应瓶中,依次加入化合物7E(0.576g)、(R)-2-(1-((5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)-2-(双(叔丁氧羰基)氨基)吡啶-3-基)氧杂)乙基)-4-氟苯甲酸(0.3g)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(0.040g),氟化铯(0.355g),甲苯(5mL),水(1mL),氮气保护下,将混合物加热至90℃反应,反应完成,向反应液加入10mL水淬灭反应,乙酸乙酯20mL萃取反应液,有机相合并,用30mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离,得到化合物7F(170mg)。MS:m/z=795.6[M+H]⁺。

[0276] 步骤七:(R)-2-(1-((2-(双(叔丁氧羰基)氨基)-5-(3-((1r,3R)-3-((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)环丁氧基)-5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶基-3-基)氧杂)乙基)-4-氟苯甲酸(化合物7G)的制备

[0277] 于50mL反应瓶中,依次加入化合物7F(160mg)、氢氧化钠(160mg)、甲醇(6mL),四氢呋喃(1.00mL)及水(1.00mL),将混合物室温搅拌反应,反应完全,使用0.5M的稀盐酸调节反应液的pH=3,加入水20mL,使用乙酸乙酯40mL萃取反应液,合并有机相,用20mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,柱层析(二氯甲烷/甲醇=24/1)分离,得到化合物7G(60mg)。MS:m/z=781.5[M+H]⁺。

[0278] 步骤八:(R)-2-(1-((2-氨基-5-(5-氰基-1-甲基-3-(3-((1r,3R)-甲基氨基)环丁氧基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-3-基)氧杂)乙基)-4-氟苯甲酸盐(化合物7H)的制备

[0279] 于50mL反应瓶中,依次加入化合物7G(60mg)、4M氯化氢的二氧六环(4mL),氮气保护下,反应混合物室温搅拌反应,反应完全,减压浓缩反应液,残留物7H,未经进一步分离纯化直接用于下一步反应。

[0280] 步骤九:(4¹R,4³R,8R)-1⁶-氨基-7⁴-氟-2¹,5,8-三甲基-6-氧代-2¹H-3,9-二氧杂-5-氮杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-4(1,3)-环丁烷-7(1,2)-苯基并环壬烷-2⁵-甲氧(化合物I-7)的制备

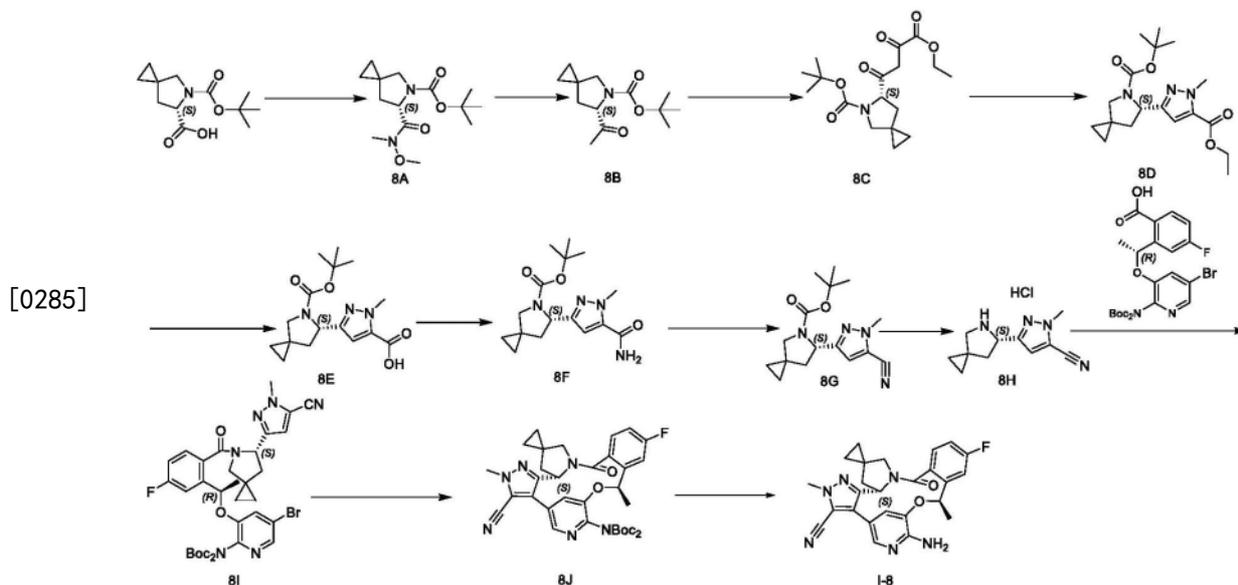
[0281] 于50mL反应瓶中,依次加入化合物7H(32mg)、N,N-二异丙基乙基胺(15mg)、N,N-二

甲基甲酰胺 (5mL), 氮气保护下, 将HATU (5mg), N,N-二甲基甲酰胺 (5mL) 缓慢加至上述反应液, 加毕室温搅拌反应, 反应完全, 向残留物中加入水20mL, 有机溶剂乙酸乙酯30mL萃取反应液。有机相分离, 用20mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离, 得化合物I-7 (6mg)。

[0282] ^1H NMR (500MHz, DMSO-d_6): δ 7.58 (s, 1H), 7.19-7.14 (m, 3H), 6.96 (s, 1H), 6.44 (s, 2H), 5.59 (m, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.51 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.51-2.48 (m, 2H), 2.30-2.28 (m, 1H), 1.74-1.72 (m, 1H), 1.64-1.63 (m, 3H)。

[0283] ^{13}C NMR (125MHz, DMSO-d_6): δ 169.54, 163.59, 161.64, 156.97, 152.19, 141.57, 139.16, 133.32, 129.39, 117.84, 115.54, 113.31, 112.30, 111.67, 111.49, 75.31, 72.93, 52.75, 34.71, 27.96, 24.27。MS: m/z = 463.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0284] 实施例8: (3²S, 6R) -1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹, 6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3, 5)-吡啶-2(4, 3)-吡唑-3(5, 6)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5(1, 2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-8)的制备



[0286] 步骤一: (S) -5-(叔丁氧羰基)-N-甲氧基-N-甲基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-甲酰胺(化合物8A)的制备

[0287] 于0℃, 氮气保护条件下, HATU (18.91g) 加至 (S) -5-(叔丁氧羰基)-5-氮杂螺[2.4]庚烷-6-羧酸 (12g) 的二氯甲烷 (120mL), 加毕将反应液维持在该温度继续搅拌反应。N, O-二甲基羟胺盐酸盐 (9.70g), 三乙胺 (10.57g) 缓慢加入上述搅拌液中, 加毕, 反应液缓慢升至室温反应, 反应完全, 向反应液加入100mL饱和碳酸氢钠水溶液淬灭反应, 加入水100mL, 乙酸乙酯200mL萃取反应液, 有机相合并, 用200mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相, 有机相合并, 减压浓缩, 柱层析(石油醚/乙酸乙酯=1/1)分离, 得到化合物8A (13.98g)。

[0288] 步骤二: (S) -5-叔丁氧羰基-6-乙酰基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷(化合物8B)的制备

[0289] 于-20℃, 氮气保护条件下, 将甲基溴化镁 (3M, 5mL) 缓慢加入化合物8A (13.98g) 的四氢呋喃 (150mL) 搅拌液中, 滴加完毕, 混合物缓慢升至室温反应, 反应完全, 将反应液倒入150g碎冰中, 后向溶液加入50mL饱和氯化铵水溶液, 使用乙酸乙酯100mL萃取三次, 水60mL洗涤有机相, 有机相合并, 饱和氯化钠水溶液40mL洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓

缩,经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离,得到化合物8B 10.02g。

[0290] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6): 4.30-4.25 (m, 1H), 3.34-3.29 (m, 1H), 3.25-3.23 (m, 1H), 2.22-2.17 (m, 1H), 2.10 (d, J=5.0Hz, 3H), 1.73-1.65 (m, 1H), 1.39 (s, 5H), 1.33 (s, 4H) 0.59-0.53 (m, 2H), 0.51-0.45 (m, 2H)。

[0291] 步骤三: (S)-5-叔丁氧基羰基-6-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷(化合物8C)的制备

[0292] 于0℃条件下,向250mL反应瓶中,依次加入化合物8B(10g)、四氢呋喃(120mL)及叔丁醇钾(5.16g),氮气保护下将混合物置于冰水浴温度下反应20min。冰水浴下缓慢向反应瓶加入草酸二乙酯(6.41g),反应完全,停止搅拌,冰水浴下缓慢向反应瓶加入1M稀盐酸调节反应液pH=6,后使用乙酸乙酯200mL萃取反应液三次,有机相合并,水100mL洗涤有机相,100mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3),得化合物8C(12.24g)。MS:m/z=362.3[M+Na]⁺。

[0293] 步骤四: (S)-3-(5-叔丁氧基羰基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物8D)的制备

[0294] 向500mL反应瓶中,依次加入化合物8C(10.01g)、甲基胍硫酸盐(4.68g)、及三氟乙醇(120mL),冰水浴下将DIPEA(4.57g)缓慢滴加至上述反应液,加毕,反应液室温搅拌反应,反应完全,柱层析(石油醚/乙酸乙酯=6/1),减压浓缩,后得到化合物8D(4.24g)。MS:m/z=372.4[M+Na]⁺。

[0295] 步骤五: (S)-5-叔丁氧基羰基-6-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷(化合物8F)的制备

[0296] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物8D(3.9g)、氢氧化锂一水合物(2.81g)、甲醇(50mL),四氢呋喃(10mL)及水(5mL),氮气保护下,将混合物加热至60℃反应,反应完全,使用1M稀盐酸调节反应液pH=6,使用乙酸乙酯60mL萃取反应液三次,合并有机相,使用60mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,将浓缩的残留物加入到二氯甲烷(50.0mL),HATU(12.73g),N,N-二异丙基乙胺(8.66g),加毕将反应液置于室温搅拌反应,反应完全。将氯化铵(2.388g)加入上述反应液中,加毕室温搅拌反应。反应完全,停止反应,向反应液中加入40mL水,80mL二氯甲烷,分离有机相,水相再用40mL二氯甲烷萃取两次,合并有机相,使用60mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩,得到化合物8F(16.338)g。MS:m/z=343.4[M+Na]⁺。

[0297] 步骤六: (S)-5-叔丁氧基羰基-6-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷(化合物8G)的制备

[0298] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物8F(16.338g)、三乙胺(3.1g)及四氢呋喃(40mL),冰水浴下将三氟乙酸酐(4.2g)缓慢加入上述混合物中,加毕将反应液转移至室温反应,反应完全,停止搅拌,加入水30mL,乙酸乙酯60mL萃取反应液,分离有机相,水相用30mL乙酸乙酯萃取两次,合并有机相,用60mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相,有机相使用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/1)分离得到化合物8G(2.288g)。MS:m/z=325.2[M+Na]⁺。

[0299] 步骤七: (S)-1-甲基-3-(5-氮杂螺[2.4]庚烷-6-基)-1H-吡唑-5-甲酰胺(化合物8H)的制备

[0300] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物8G(0.5g)、二氯甲烷(5mL),氮气保护下,将混合物室温搅拌使原料完全溶解,后将氯化氢的二氧六环溶液(1.46g,)缓慢加入至上述反应液,加毕室温搅拌反应,反应完全,浓缩,得到残留物8H(920mg)。MS:m/z=203.3[M+H]⁺。

[0301] 步骤八:3-((2S)-5-(2-((R)-1-((2-双叔丁氧羰基氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-1-甲基-1H-吡啶-5-甲腈(化合物8I)的制备

[0302] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物8H(460mg)、(R)-2-(1-((5-溴-2-(双(叔丁氧羰基)氨基)吡啶-3-基)氧杂)乙基)-4-氟苯甲酸(1070mg)、HATU(733mg)及N,N-二异丙基乙胺(249mg),N,N-二甲基甲酰胺(20mL),氮气保护下,将混合物室温搅拌反应。反应完全后,浓缩,向残留物中加入水30mL,乙酸乙酯50mL萃取反应液,分离有机相,水相用30mL乙酸乙酯萃取两次,合并有机相,用60mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相,有机相使用无水硫酸钠干燥,过滤,经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=41/9)分离,得到化合物8I(360mg)。MS:m/z=761.3[M+Na]⁺。

[0303] 步骤九:(3²S,6R)-1⁶-双叔丁氧羰基氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡啶-3(5,6)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物8J)的制备

[0304] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物8I(180mg)、乙酸钾(119mg)、醋酸钨(16.39mg)及双(金刚烷基-1-基)(丁基)磷(43.6mg),正丁醇10mL氮气反复置换气体三次,将混合物加热至130℃反应。反应完全后,恢复至室温,滤除催化剂,减压浓缩,经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离,得到化合物8J(88mg)。MS:m/z=659.7[M+H]⁺。

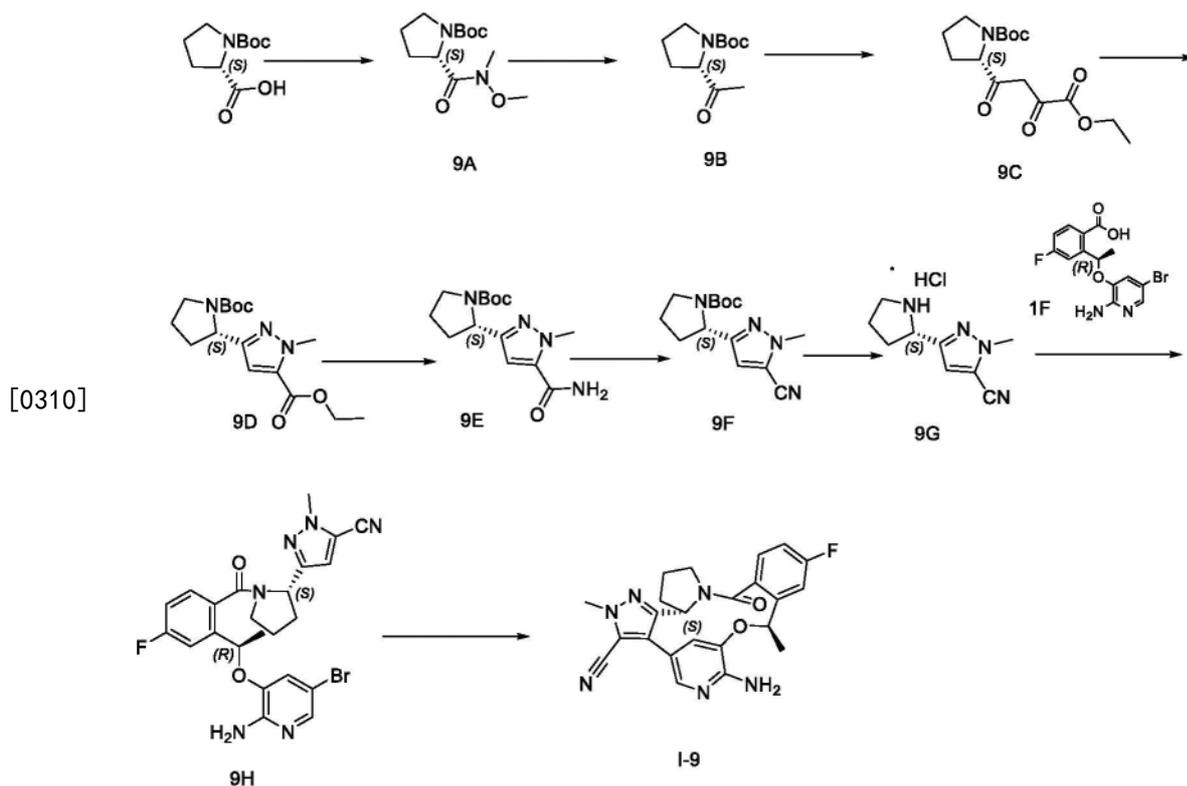
[0305] 步骤十:(3²S,6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡啶-3(5,6)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-8)的制备

[0306] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物8J(72mg)、二氯甲烷(4mL)及(4M氯化氢的1,4-二氧六环,5mL),氮气保护下,将混合物室温搅拌反应。反应完全后,浓缩,经柱层析(二氯甲烷/甲醇=20/1)分离,得化合物I-8(60mg)。

[0307] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆):7.64(d,J=10.0Hz,1H),7.51(s,1H),7.30(d,J=10.0Hz,1H),7.14(d,J=5.0Hz,1H),7.05(s,1H),6.19(s,2H),5.65(d,J=5.0Hz,1H),4.89(d,J=5.0Hz,1H),4.03(s,3H),3.16(d,J=5.0Hz,1H),2.38(d,J=5.0Hz,1H),1.69(d,J=5.0Hz,3H),1.24(br,1H),0.99(br,1H),0.85-0.71(m,4H)。

[0308] ¹³C NMR(125MHz,DMSO-d₆):δ167.85,164.47,162.50,151.59,147.43,144.19,138.27,137.63,133.72,127.39,121.53,115.79,114.66,113.30,111.15,71.85,57.89,51.63,38.93,26.80,22.05,20.89,15.00,12.98。MS:m/z=459.5[M+H]⁺。

[0309] 实施例9:(3²S,6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡啶-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-9)的制备



[0311] 步骤一：((2S)-1-叔丁氧基羰基-2-(甲氧基(甲基)氨基甲酰基)吡咯烷(化合物9A)的制备

[0312] 于0℃条件下,HATU(34.2g)分批加入到(2S)-1-叔丁氧基羰基吡咯烷-2-羧酸(9.691g)的二氯甲烷(90mL)反应液中,搅拌反应,反应完全。然后向反应液中加入二异丙基乙胺(23.28g)和二甲羟胺盐酸盐(6.59g),反应混合物恢复至室温搅拌反应,反应完全,向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(300mL),二氯甲烷萃取(100mL*3),合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物9A(8.847g)。MS:m/z=259.4[M+H]⁺。

[0313] 步骤二：(2S)-1-叔丁氧基羰基-2-乙酰吡咯烷(化合物9B)的制备

[0314] 于-20℃,氮气保护条件下,向化合物9A(8.8g)的干燥四氢呋喃(87mL)中逐滴加入甲基溴化镁的四氢呋喃溶液(3M,17.3mL),-15℃下搅拌反应,然后升至室温搅拌反应,反应完全,将反应体系至于置于冰水浴中,缓慢的向其中加入饱和氯化铵(60mL)进行淬灭,加入乙酸乙酯(70mL)萃取,分离有机相,水相用乙酸乙酯(50mL*2)萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩。残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物9B(6.6g)。MS:m/z=214.6[M+H]⁺。

[0315] 步骤三：(S)-1-叔丁氧基羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基)吡咯烷(化合物9C)的制备

[0316] 于0℃,氮气保护条件下,在250mL的反应瓶中,将草酸二乙酯(3.0g)缓慢加入化合物9B(6.5g)和叔丁醇钾(2.3g)的四氢呋喃(80mL)溶液中,滴加完毕,将反应液升至室温搅拌反应,反应完全,向反应液加入乙酸乙酯(50mL),0℃条件下加入1M盐酸水溶液,调节溶液pH=6,加入饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,水相用乙酸乙酯萃取(60mL*3),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析

(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物9C(6.2g)。MS:m/z=336.4[M+Na]⁺。

[0317] 步骤四:(S)-3-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物9D)的制备

[0318] 向100mL反应瓶中,-20℃条件下依次加入9C(6.2g)、硫酸甲基肼(3.2g)及三氟乙醇(54mL),然后将二异丙基乙胺(3.5g)缓慢加入至上述反应液中,加毕,将反应液置于该温度搅拌反应,反应完全,减压除去溶剂,向残渣中加入乙酸乙酯(80mL),饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,乙酸乙酯萃取(50mL*2),合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(50mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物9D(1.1g)。MS:m/z=346.5[M+Na]⁺。

[0319] 步骤五:(S)-1-叔丁氧基羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物9E)的制备

[0320] 在100mL的反应瓶中,将化合物9D(1.1g)溶于甲醇(35mL)中,60℃条件下搅拌反应。然后向体系中加入氨水(30mL),继续在加热60℃条件下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,然后在0℃条件下,依次向残余物中加入二氯甲烷(40mL),HATU(2.6g),二异丙基乙胺(2.2g)和氯化铵(0.6g)。然后转移到室温搅拌反应,反应完全。反应液用饱和碳酸氢钠(50mL)溶液洗,然后用二氯甲烷萃取(150mL×3),合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(100mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,mL残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/7)分离得到化合物9E(0.9g)。MS:m/z=317.4[M+Na]⁺。

[0321] 步骤六:(S)-1-叔丁氧基羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物9F)的制备

[0322] 于0℃条件下,将三氟乙酸酐(1.8g)缓慢的滴加到化合物9E(0.9g)和三乙胺(2.9mL)的四氢呋喃(35mL)中,加毕。室温下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物9F(0.9g)。MS:m/z=299.5[M+Na]⁺。

[0323] 步骤七:3-((2S)-吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈盐酸盐(化合物9G)的制备

[0324] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物9F(0.9g)、氯化氢的二氧六环溶液(4M,30mL),加毕,室温下搅拌反应,反应完全。减压浓缩,得到化合物9G(0.8g),未做进一步纯化,直接用于下一步反应。MS:m/z=177.4[M+H]⁺。

[0325] 步骤八:3-((2S)-1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)4-氟苯甲酰基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈(化合物9H)的制备

[0326] 于0℃条件下,将化合物9G(0.8g)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(35mL),然后依次加入二异丙基乙胺(2.1g),1F(0.7g),HATU(2.5mg),室温搅拌反应,反应完全,向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(20mL)和乙酸乙酯(60mL),分离有机相,水相用60mL乙酸乙酯萃取两次,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(100mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物9H(1.4g)。MS:m/z=535.3[M+Na]⁺。

[0327] 步骤九:(3²S,6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-9)的制备

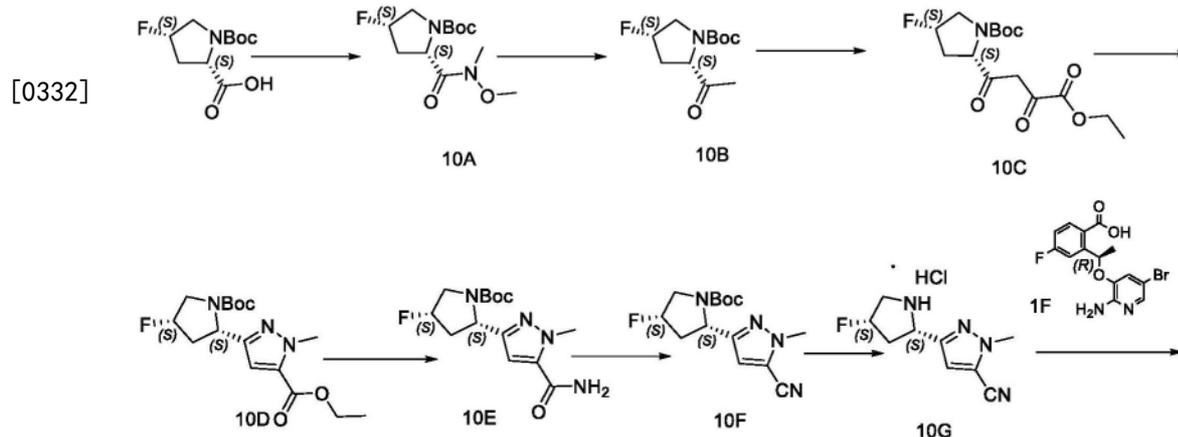
[0328] 在100mL反应瓶中,依次加入化合物9H(417mg)、二(金刚烷-1-基)(丁基)膦

(150mg)、乙酸钡(98mg)、特戊醇(20mL)和乙酸钾(475mg),加毕氨气置换6次后,加热至外温130℃搅拌反应,反应完全。向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(50mL)和乙酸乙酯(100mL),分离有机相,水相用50mL乙酸乙酯萃取两次,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(100mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,经柱层析(二氯甲烷/甲醇=9/1)分离得化合物I-9(7mg)。

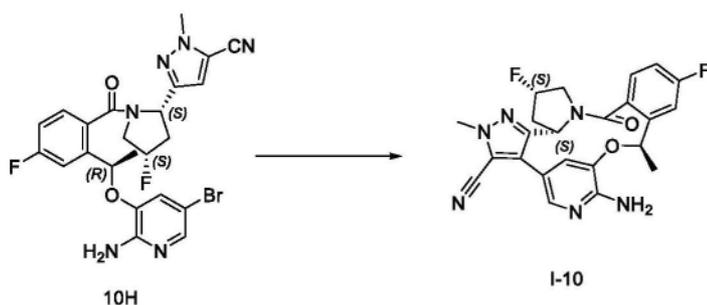
[0329] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6): δ 7.62 (d, J=10.0Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26-7.22 (m, 1H), 7.14-7.12 (m, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 5.65-5.64 (m, 1H), 4.75-4.74 (m, 1H), 4.32-4.30 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.04-2.99 (m, 1H), 2.45-2.42 (m, 2H), 2.21-2.14 (m, 2H), 1.69 (d, J=5.0Hz, 3H)。

[0330] ^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6): δ 167.59, 164.42, 151.60, 147.47, 144.15, 138.26, 137.64, 134.01, 127.52, 127.01, 121.49, 115.68, 114.53, 112.99, 111.53, 71.82, 56.72, 42.99, 39.28, 29.34, 22.98, 22.07。MS: m/z = 433.4 [M+H] $^+$ 。

[0331] 实施例10: (3 2 S, 3 4 S, 6R) - 1 6 -氨基-5 4 -氟-2 1 , 6-二甲基-4-氧代-2 1 H-7-氧杂-1(3, 5)-吡啶-2(4, 3)-吡唑-3(2, 1)-吡咯烷-5(1, 2)-苯基并环庚烷-2 5 -甲腈(化合物I-10)的制备



[0333]



[0334] 步骤一: ((2S, 4S) - 1-叔丁氧基羰基-4-氟-2-(甲氧基(甲基)氨基甲酰基)吡咯烷(化合物10A)的制备

[0335] 于0℃条件下,将HATU(15.2g)分批加入到(2S, 4S) - 1-(叔丁氧羰基) - 4-氟吡咯烷-2-羧酸(4.7g)的二氯甲烷(120mL)搅拌液中,反应液在0℃下搅拌反应。然后向反应液中依次加入二异丙基乙胺(14.2mL)和二羟胺盐酸盐(2.9g),加毕,将反应液缓慢升至室温搅拌反应,反应完全,向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(50mL)和二氯甲烷(60mL),分离有机相,水相用60mL二氯甲烷萃取两次,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(100mL)洗涤有机相,

有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物10A(7.3g)。MS:m/z=277.1[M+H]⁻。

[0336] 步骤二:(2S,4S)-1-叔丁氧基羰基-2-乙酰-4-氟吡咯烷(化合物10B)的制备

[0337] 于-15℃,氮气保护下,向化合物10A(7.3g)的干燥四氢呋喃(60mL)中逐滴加入甲基溴化镁的四氢呋喃溶液(3M,5.9mL),加毕,缓慢升至室温搅拌反应,反应完全,将反应体系至于置于冰水浴中,缓慢的向其中加入饱和氯化铵(60mL)进行淬灭,然后加入乙酸乙酯(60mL)萃取,分离有机相,水相用60mL乙酸乙酯萃取两次,合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩。残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物10B(7.5g)。

[0338] ¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ5.26(ddd, J=54.8, 6.8, 3.6Hz, 1H), 4.34-4.24(m, 1H), 3.67-3.58(m, 1H), 3.55(dd, J=8.6, 2.3Hz, 1H), 2.58-2.34(m, 1H), 2.23(dt, J=19.2, 14.2Hz, 1H), 2.09(d, J=7.8Hz, 3H), 1.39(d, J=36.9Hz, 9H)。MS:m/z=232.1[M+H]⁻。

[0339] 步骤三:(2S,4S)-1-叔丁氧基羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧化丁酰基)-4-氟吡咯烷(化合物10C)的制备

[0340] 在100mL反应瓶中,依次加入草酸二乙酯(2.2g)四氢呋喃(40mL)和化合物10B(7.5g),然后于0℃条件下,缓慢加入叔丁醇钾(1.9g),加毕,缓慢升至室温搅拌反应,反应完全。冰水浴下使用1M的盐酸水溶液调节反应液pH=6,使用乙酸乙酯60mL萃取反应液三次,有机相合并,饱和氯化钠水溶液(60mL)洗涤有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=15/85)分离得到化合物10C(1.2g)。MS:m/z=332.1[M+H]⁻。

[0341] 步骤四:(3-((2S,4S)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物10D)的制备

[0342] 于-15℃,氮气保护下,在100mL反应瓶中依次加入化合物10C(1.2g)、甲基胍硫酸盐(0.6g)及三氟乙醇(15mL),然后将二异丙基乙胺(0.7g)缓慢滴加至上述反应液中,加毕,反应液缓慢升至室温,然后在室温下搅拌2h。反应完成,将反应液减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物10D(0.4g)。MS:m/z=342.2[M+H]⁺。

[0343] 步骤五:(2S,4S)-1-叔丁氧基羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-氟吡咯烷(化合物10E)的制备

[0344] 在100mL的反应瓶中,将化合物10D(0.4g)溶于甲醇(10mL)中,65℃条件下搅拌反应。然后加入20mL氨水,继续在加热60℃条件下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,然后在0℃条件下,依次向残余物中加入二氯甲烷(30mL),HATU(0.8g),二异丙基乙胺(0.7g)和氯化铵(0.2g)。然后转移到室温搅拌反应,反应完全,向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(20mL)和二氯甲烷(40mL),分离有机相,水相用40mL二氯甲烷萃取两次,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(50mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/7)分离得到化合物10E(0.2g)。MS:m/z=335.2[M+Na]⁺。

[0345] 步骤六:((2S,4S)-1-叔丁氧基羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-氟吡咯烷(化合物10F)的制备

[0346] 于0℃条件下,将三氟乙酸酐(0.3mL)缓慢的滴加到10E(0.2g)和三乙胺(0.6mL)的四氢呋喃(8mL)中,加毕,室温下搅拌反应,反应完成,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物10F(0.17g)。MS:m/z=295.2[M+H]⁺。

[0347] 步骤七:3-((2S,4S)-4-氟吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈盐酸盐(化合物10G)的制备

[0348] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物10F(0.17g)、氯化氢的1,4-二氧六环溶液(4M,6mL),室温下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,得到化合物10G(0.1g),未做进一步纯化,直接用于下一步反应。

[0349] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 7.41 (s, 1H), 5.56 (dt, $J=52.9, 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.84 (dd, $J=12.2, 6.1\text{Hz}$, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.68 (ddd, $J=34.8, 13.8, 4.3\text{Hz}$, 1H), 3.53-3.44 (m, 1H), 2.73-2.58 (m, 1H), 2.41 (dddd, $J=39.7, 14.7, 12.2, 4.0\text{Hz}$, 1H), 1.38-1.21 (m, 1H) .

[0350] MS $m/z=195.2[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0351] 步骤八:3-((2S,4S)-1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苯甲酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈(化合物10H)的制备

[0352] 于0°C条件下,将化合物10G(0.1g)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(5mL),用二异丙基乙胺(0.4g)调节 $\text{pH}=6$,然后依次加入1F(0.7g),HATU(0.5g),室温搅拌反应,减压浓缩,向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(10mL)和乙酸乙酯(40mL),分离有机相,水相用40mL乙酸乙酯萃取两次,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(30mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物10H(0.3g)。MS: $m/z=553.4[\text{M}+\text{Na}]^+$.

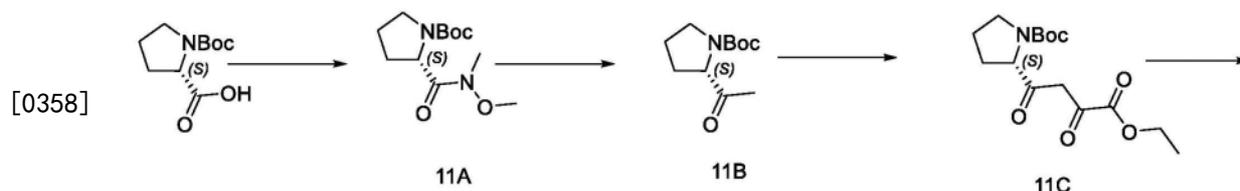
[0353] 步骤九:(3 ^2S ,3 ^4S ,6R)-1 6 -氨基-5 4 -氟-2 1 ,6-二甲基-4-氧代-2 ^1H -7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2 5 -甲腈(化合物I-10)的制备

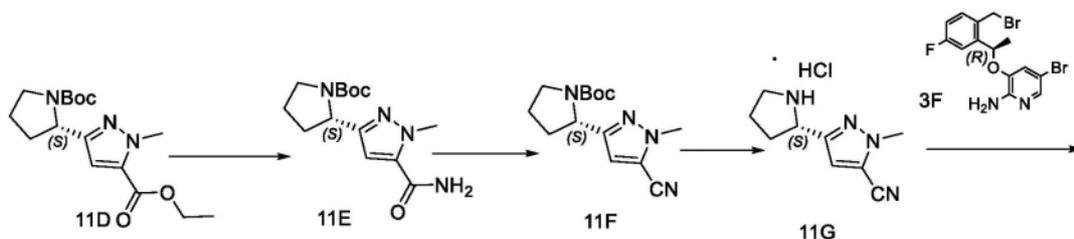
[0354] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物10H(0.3g),乙酸钾(0.1g),乙酸钡(0.003g),正丁基二(1-金刚烷基)膦(0.01g)和特戊醇(20mL),在 N_2 保护条件下,于130°C搅拌反应。反应完成,向反应液中加入饱和氯化钠水溶液(20mL)和乙酸乙酯(40mL),分离有机相,水相用40mL乙酸乙酯萃取两次,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(30mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(二氯甲烷/甲醇=80/1)分离得目标化合物I-10(0.009g)。

[0355] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 7.77 (dd, $J=2.5, 10.5\text{Hz}$, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.32-7.24 (m, 3H), 6.14-6.10 (m, 1H), 5.98 (brs, 2H), 5.84 (dd, $J=3.0, 9.0\text{Hz}$, 1H), 5.14 (s, 0.5H), 5.04 (s, 0.5H), 4.03 (s, 3H), 3.44-3.33 (m, 1H), 2.80-2.69 (m, 1H), 2.25-2.15 (m, 1H), 2.11-2.01 (m, 1H), 1.69 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H) .

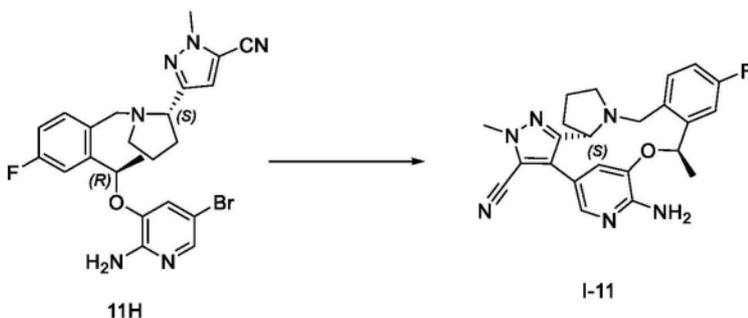
[0356] ^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6) δ 168.63, 163.92, 152.40, 149.93, 142.99, 138.66, 137.08, 131.28, 129.68, 124.04, 123.68, 116.30, 115.92, 114.15, 112.24, 111.06, 93.10, 69.48, 54.03, 53.68, 42.60, 39.15, 20.72. MS: $m/z=451.4[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0357] 实施例11:(3 ^2S ,6R)-1 6 -氨基-5 4 -氟-2 1 ,6-二甲基-2 ^1H -7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2 5 -甲腈(化合物I-11)的制备





[0359]



[0360] 步骤一：((2S)-1-羧酸叔丁酯-4-氟-2-(甲氧基(甲基)氨基甲酰基)吡咯烷(化合物11A)的制备

[0361] 于0℃条件下,HATU(34.2g)分批加入到(2S)-1-(叔丁氧羰基)-吡咯烷-2-羧酸(9.7g)的二氯甲烷(90mL)溶液中,反应液在0℃下搅拌反应反应完全,加入二异丙基乙胺(23.3g),加毕,反应液升至室温搅拌反应,反应完全,向反应液中加入饱和碳酸氢钠溶液(150mL)和二氯甲烷(100mL),分离有机相,水相用100mL二氯甲烷萃取两次,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(150mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物11A(8.8g)。

[0362] MS:m/z=259.4[M+H]⁺。

[0363] 步骤二：(2S)-1-叔丁氧羰基-2-乙酰吡咯烷(化合物11B)的制备

[0364] 于-20℃,氮气保护条件下,向11A(8.8g)的干燥四氢呋喃(87mL)中逐滴加入甲基溴化镁的四氢呋喃溶液(3M,17.33mL),加毕,反应液缓慢升至室温搅拌,反应完全,于0℃条件下,缓慢的向其中加入饱和氯化铵(60mL)进行淬灭,然后向反应液中加入乙酸乙酯(50mL),分离有机相,水相用50mL二氯甲烷萃取两次,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(100mL)洗涤有机相,有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=7/3)分离得到化合物11B(6.6g)。MS:m/z=214.6[M+H]⁺。

[0365] 步骤三：(S)-1-叔丁氧羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基)吡咯烷(化合物11C)的制备

[0366] 于0℃,氮气保护下,在250mL的反应瓶中,将草酸二乙酯(3.0g)缓慢加入到化合物11B(6.5g)和叔丁醇钾(2.3g)的四氢呋喃(80mL)溶液中,滴加完毕,将反应液升至室温搅拌反应,反应完全,向反应液加入乙酸乙酯(50mL),水浴搅拌下加入盐酸水溶液(1M),调节溶液pH=6,加入饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,水相用乙酸乙酯萃取(60mL*3),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物11C(6.2g)。MS:m/z=336.4[M+Na]⁺。

[0367] 步骤四：(S)-3-(1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物11D)的制备

[0368] 向100mL反应瓶中,于-20℃条件下,依次加入化合物11C(6.2g)、硫酸甲基胍(3.2g)及三氟乙醇(54mL),然后将二异丙基乙胺(3.6g)缓慢加入至上述反应液中,加毕,搅拌反应,反应完全。减压浓缩,向残渣中加入乙酸乙酯(80mL),饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,水相乙酸乙酯萃取(50mL*2),合并有机相,饱和氯化钠水洗(50mL),干燥。过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物11D(1.1g)。

[0369] MS:m/z=346.5[M+Na]⁺。

[0370] 步骤五:(S)-1-叔丁氧基羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物11E)的制备

[0371] 在100mL的反应瓶中,将化合物11D(1.1g)溶于甲醇(35mL)中,60℃条件下搅拌反应。然后向体系中加入氨水(30mL),继续在加热60℃条件下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,然后在0℃条件下,向残余物中依次加入二氯甲烷(40mL),HATU(2.6g),二异丙基乙胺(2.2g)和氯化铵(0.7g)。然后转移到室温搅拌反应,反应完全,反应液用饱和碳酸氢钠(50mL)溶液洗涤,然后用二氯甲烷萃取(150mL*3),合并有机相,用100mL饱和氯化钠水溶液洗涤有机相,分离有机相,用无水硫酸钠干燥。过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/7)分离得到化合物11E(0.9g)。MS:m/z=317.4[M+Na]⁺。

[0372] 步骤六:(S)-1-叔丁氧基羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物11F)的制备

[0373] 于0℃条件下,将三氟乙酸酐(1.8g)缓慢的滴加到11E(0.9g)和三乙胺(2.90mL)的四氢呋喃(35mL)溶液中,加毕。室温下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物11F(0.9g)。MS:m/z=299.5[M+Na]⁺。

[0374] 步骤七:3-((2S)-吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈盐酸盐(化合物11G)的制备

[0375] 向100mL反应瓶中,依次加入11F(0.9g)、氯化氢的1,4-二氧六环溶液(4M,30mL),室温下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,得到化合物11G(0.8g),未做进一步纯化,直接用于下一步反应。MS:m/z=177.4[M+H]⁺。

[0376] 步骤八:3-((S)-1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苄基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈(化合物11H)的制备

[0377] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物11G(0.2g)、二氯甲烷(15mL)、化合物3F(0.5g)及N,N-二异丙基乙胺(0.3g),加毕,回流搅拌反应,反应完成,向反应液中加入50mL二氯甲烷和50mL水,分离有机相,水层用50mL二氯甲烷萃取两次,合并有机相,干燥。过滤,浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物11H(0.3g)。MS:m/z=521.3[M+Na]⁺。

[0378] 步骤九:(3²S,6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-11)的制备

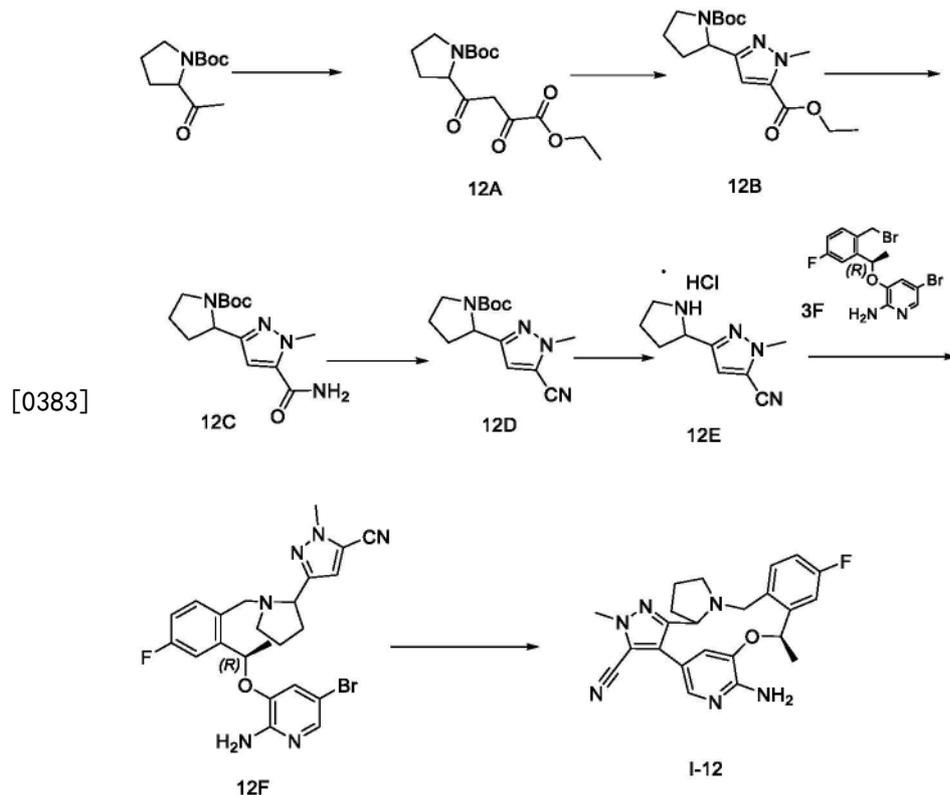
[0379] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物11H(0.3g),乙酸钾(0.2g),乙酸钡(0.003g),正丁基二(1-金刚烷基)膦(0.02g)和特戊醇(20mL),在氮气保护条件下,于130℃搅拌反应,反应完成,减压浓缩得到残余物,向其中加入饱和氯化钠水溶液20mL,乙酸乙酯萃取(30mL*3),合并有机相,干燥。过滤,减压浓缩。残余物经柱层析(二氯甲烷/甲醇=9/1)分离得到化合物I-11(0.03g)。

[0380] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ9.02(s,1H),8.45(s,1H),8.13(d,J=1.8Hz,1H),7.40

(dd, $J=10.4, 2.7\text{Hz}$, 1H), 7.36 (dd, $J=8.5, 6.1\text{Hz}$, 1H), 7.06 (td, $J=8.1, 2.6\text{Hz}$, 1H), 5.98 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 4.68 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 4.23 (d, $J=14.0\text{Hz}$, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.45-3.42 (m, 2H), 3.08-3.02 (m, 1H), 2.52-2.48 (m, 1H), 2.28-2.22 (m, 1H), 2.15-2.07 (m, 1H), 2.06-2.01 (m, 1H), 1.87-1.80 (qm, 1H), 1.56 (d, $J=6.2\text{Hz}$, 3H).

[0381] ^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6) δ 162.74, 152.33, 151.18, 143.25, 140.51, 136.06, 133.97, 132.08, 124.87, 123.46, 122.44, 115.01, 113.47, 112.11, 111.51, 74.90, 64.96, 53.52, 49.87, 38.55, 28.08, 24.82, 22.12. MS: $m/z=419.3$ [M+H] $^+$.

[0382] 实施例12: (6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-12)的制备



[0384] 步骤一:1-叔丁氧羰基-2-(4-乙氧基-3,4-二氧代丁酰基)吡咯烷(化合物12A)的制备

[0385] 于0℃,氮气保护下,在250mL的反应瓶中,将草酸二乙酯(3.77g)缓慢加入到2-乙酰基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯(5g),叔丁醇钾(3.16g)的四氢呋喃(80mL)反应液中,滴加完毕,将反应液转移至室温搅拌反应,反应完全,向反应液加入乙酸乙酯(50mL),0℃条件下加入1N盐酸水溶液,调节溶液pH=6,加入饱和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,水相用乙酸乙酯萃取(40mL*3),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,干燥。过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物12A(6.9g)。MS: $m/z=336.4$ [M+Na] $^+$ 。

[0386] 步骤二:3-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-羧酸乙酯(化合物12B)的制备

[0387] 于-20℃条件下,依次向100mL反应瓶中加入化合物12A(5.66.5g)、甲基胍硫酸盐(3.6g)及三氟乙醇(50mL),然后将N,N-二异丙基乙胺(4.0g)缓慢加入至上述反应液中,加毕,将反应液置于该温度搅拌反应,反应完全,减压浓缩,向残渣中加入乙酸乙酯(80mL),饱

和氯化钠水溶液(50mL),分离有机相,乙酸乙酯萃取(80mL*2),合并有机相,用50mL饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物12B(3.8g)。MS:m/z=346.5[M+Na]⁺。

[0388] 步骤三:1-叔丁氧羰基-2-(5-氨基甲酰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物12C)的制备

[0389] 在100mL的反应瓶中,将12B(3.8g)溶于甲醇(35mL)中,60℃条件下搅拌反应。然后向体系中加入氨水(30mL),继续在加热60℃条件下搅拌反应,反应完全,减压浓缩,然后在0℃条件下,向残余物中依次加入二氯甲烷(40mL),HATU(12.56g),N,N-二异丙基乙胺(11.38g)和氯化铵(4.42g),然后转移到室温搅拌反应,反应完全,反应液用饱和碳酸氢钠(50mL)溶液洗,然后用二氯甲烷萃取(150×3),合并有机相,用100mL饱和氯化钠水溶液洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=3/7)分离得到化合物12C(3.2g)。MS:m/z=317.4[M+Na]⁺。

[0390] 步骤四:1-叔丁氧羰基-2-(5-氰基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡咯烷(化合物12D)的制备

[0391] 于0℃条件下,将三氟乙酸酐(3.76mL)缓慢的滴加到12C(3.2g)和三乙胺(3.01mL)的四氢呋喃(50mL)中,混合物在室温下搅拌反应,反应完成,减压浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物12D(2.32g)。MS:m/z=299.5[M+Na]⁺。

[0392] 步骤五:1-甲基-3-(吡咯烷-2-基)-1H-吡唑-5-甲腈盐酸盐(化合物12E)的制备

[0393] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物12D(2.3g),1,4-二氧六环(10mL),4M氯化氢的1,4-二氧六环溶液(10mL),室温搅拌反应,反应完全,减压浓缩得到化合物12E(2.6g),不经纯化直接用于下一步反应。MS:m/z=177.4[M+H]⁺。

[0394] 步骤六:3-(1-(2-((R)-1-((2-氨基-5-溴吡啶-3-基)氧基)乙基)-4-氟苄基)吡咯烷-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲腈(化合物12F)的制备

[0395] 向50mL反应瓶中,依次加入化合物12E(0.5g)、二氯甲烷(2.5mL)、化合物3F(0.5g)及N,N-二异丙基乙胺(0.6g),加毕,回流搅拌反应,反应完全,向反应液中加入50mL二氯甲烷和50mL水,分离有机相,水层用50mL二氯甲烷萃取两次,合并有机相,干燥。过滤,浓缩得到残余物,经柱层析(石油醚/乙酸乙酯=4/1)分离得到化合物12F(0.8g)。MS:m/z=521.3[M+Na]⁺。

[0396] 步骤七:(6R)-1⁶-氨基-5⁴-氟-2¹,6-二甲基-4-氧代-2¹H-7-氧杂-1(3,5)-吡啶-2(4,3)-吡唑-3(2,1)-吡咯烷-5(1,2)-苯基并环庚烷-2⁵-甲腈(化合物I-12)的制备

[0397] 向100mL反应瓶中,依次加入化合物12F(0.3g),乙酸钾(0.12g),乙酸钡(0.005g),正丁基二(1-金刚烷基)膦(0.012g)和特戊醇(20mL),在氮气保护条件下,于130℃搅拌反应,反应完全,减压浓缩得到残余物,向其中加入饱和氯化钠水溶液20mL,乙酸乙酯萃取(30mL*3),合并有机相,干燥。过滤,减压浓缩。残余物经柱层析(二氯甲烷/甲醇=9/1)分离得到化合物I-12(0.024g)。MS:m/z=419.3[M+H]⁺。

[0398] 试验例1:体外激酶抑制活性

[0399] 1.1 EML4-ALK抑制活性筛选

[0400] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/μL的EML4-ALK母液进行稀释,按每孔加入6μL 1.67×的0.0835ng/μL的工作液(终浓

度为0.05ng/ μ L),用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中,使化合物终浓度为1000nM-0.24nM,4倍梯度,共7个浓度,同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶,加溶媒DMSO),设2个复孔。酶与化合物或溶媒反应30min后,将用激酶缓冲液配制好的5 \times 的50 μ M ATP(终浓度为10 μ M)与5 \times 的0.5 μ M底物(终浓度为0.1 μ M,U Light-poly GT),按1:1混合后按每孔4 μ L加入孔中;封板膜封板以后,室温反应2h后,每孔加入5 μ L 4 \times 的40mM EDTA(终浓度为10mM),室温5min,再每孔加入5 μ L 4 \times 的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eu-anti-phospho-tyrosine antibody),室温孵育1小时,PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm,发射665nm),采用四参数拟合,计算IC50。

[0401] 1.2 ALK(G1202R)抑制活性筛选

[0402] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/uL的ALK(G1202R)母液进行稀释,按每孔加入6 μ L 1.67 \times 的0.01ng/uL的工作液(终浓度为0.006ng/ μ L),用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中,使化合物终浓度为1000nM-0.24nM,4倍梯度,共7个浓度,同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶,加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后,将用激酶缓冲液配制好的5 \times 的50 μ M ATP(终浓度为10 μ M)与5 \times 的0.5 μ M底物(终浓度为0.1 μ M,U Light-poly GT),按1:1混合后按每孔4 μ L加入孔中;封板膜封板以后,室温反应2h后,每孔加入5 μ L 4 \times 的40mM EDTA(终浓度为10mM),室温5min,再每孔加入5 μ L 4 \times 的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eu-anti-phospho-tyrosine antibody),室温孵育1小时;PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm,发射665nm),采用四参数拟合,计算IC50。

[0403] 1.3 ALK(C1156Y)抑制活性筛选

[0404] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/ μ L的ALK(C1156Y)母液进行稀释,按每孔加入6 μ L 1.67 \times 的0.00668ng/ μ L的工作液(终浓度为0.004ng/ μ L),用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中,使化合物终浓度为1000nM-0.24nM,4倍梯度,共7个浓度,同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶,加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后,将用激酶缓冲液配制好的5 \times 的50 μ M ATP(终浓度为10 μ M)与5 \times 的0.5 μ M底物(终浓度为0.1 μ M,U Light-poly GT),按1:1混合后按每孔4 μ L加入孔中;封板膜封板以后,室温反应2h后,每孔加入5 μ L 4 \times 的40mM EDTA(终浓度为10mM),室温5min,再每孔加入5 μ L 4 \times 的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eu-anti-phospho-tyrosine antibody),室温孵育1小时;PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm,发射665nm),采用四参数拟合,计算IC50。

[0405] 1.4 ALK(G1269A)抑制活性筛选

[0406] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/ μ L的ALK(G1269A)母液进行稀释,按每孔加入6 μ L 1.67 \times 的0.005ng/ μ L的工作液(终浓度为0.003ng/ μ L),用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中,使化合物终浓度为1000nM-0.244nM,共7个浓度梯度,4倍稀释,同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶,加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后,将用激酶缓冲液配制好的5 \times 的50 μ M ATP(终浓度为10 μ M)与5 \times 的0.5 μ M底物(终浓度为0.1 μ M,U Light-poly GT),按1:1混合后按每孔4 μ L加入孔中;封板膜封板以后,室温反应2h后,每孔加入5 μ L 4 \times 的40mM EDTA(终浓度为10mM),室温5min,再每孔加入5 μ L 4 \times 的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eu-anti-

phospho-tyrosine antibody), 室温孵育1小时; PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm, 发射665nm), 采用四参数拟合, 计算IC₅₀。

[0407] 1.5 ALK(F1174L) 抑制活性筛选

[0408] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/μL的ALK(F1174L)母液进行稀释, 按每孔加入6μL 1.67×的0.005ng/μL的工作液(终浓度为0.003ng/μL), 用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中, 使化合物终浓度为1000nM-0.244nM, 共7个浓度梯度, 4倍稀释, 同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶, 加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后, 将用激酶缓冲液配制好的5×的50μM ATP(终浓度为10μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM, U Light-poly GT), 按1:1混合后按每孔4μL加入孔中; 封板膜封板以后, 室温反应2h后, 每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM), 室温5min, 再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eμ-anti-phospho-tyrosine antibody), 室温孵育1小时; PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm, 发射665nm), 采用四参数拟合, 计算IC₅₀。

[0409] 1.6 ALK(R1275Q) 抑制活性筛选

[0410] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/μL的ALK(R1275Q)母液进行稀释, 按每孔加入6μL 1.67×的0.01ng/μL的工作液(终浓度为0.006ng/μL), 用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中, 使化合物终浓度为1000nM-0.244nM, 共7个浓度梯度, 4倍稀释, 同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶, 加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后, 将用激酶缓冲液配制好的5×的50μM ATP(终浓度为10μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM, U Light-poly GT), 按1:1混合后按每孔4μL加入孔中; 封板膜封板以后, 室温反应2h后, 每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM), 室温5min, 再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eμ-anti-phospho-tyrosine antibody), 室温孵育1小时; PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm, 发射665nm), 采用四参数拟合, 计算IC₅₀。

[0411] 1.7 ALK(L1196M) 抑制活性筛选

[0412] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/μL的ALK(L1196M)母液进行稀释, 按每孔加入6μL 1.67×的0.00668ng/μL的工作液(终浓度为0.004ng/μL), 用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中, 使化合物终浓度为1000nM-0.244nM, 共7个浓度梯度, 4倍稀释, 同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶, 加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后, 将用激酶缓冲液配制好的5×的50μM ATP(终浓度为10μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM, U Light-poly GT), 按1:1混合后按每孔4μL加入孔中; 封板膜封板以后, 室温反应2h后, 每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM), 室温5min, 再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eμ-anti-phospho-tyrosine antibody), 室温孵育1小时; PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm, 发射665nm), 采用四参数拟合, 计算IC₅₀。

[0413] 1.8 ROS1抑制活性筛选

[0414] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/μL的ROS1母液进行稀释, 按每孔加入6μL 1.67×的0.0334ng/μL的工作液(终浓度为0.02ng/μL), 用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中, 使化合物终浓度为

1000nM-0.244nM, 阳性化合物浓度为100nM-0.0244nM, 共7个浓度梯度, 4倍稀释, 同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶, 加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后, 将用激酶缓冲液配制好的5×的50μM ATP(终浓度为10μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM, U Light-poly GT), 按1:1混合后按每孔4μL加入孔中; 封板膜封板以后, 室温反应2h后, 每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM), 室温5min, 再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eμ-anti-phospho-tyrosine antibody), 室温孵育1小时; PE仪器读板(激发320or 340nm, 发射665nm), 采用四参数拟合, 计算IC50。

[0415] 1.9 ROS1(L2026M)抑制活性筛选

[0416] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将230ng/μL的ROS1(L2026M)母液进行稀释, 按每孔加入6μL 1.67×的0.00668ng/μL的工作液(终浓度为0.004ng/μL), 用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中, 使化合物终浓度为1000nM-0.244nM, 阳性化合物浓度为100nM-0.0244nM, 共7个浓度梯度, 4倍稀释, 同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶, 加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后, 将用激酶缓冲液配制好的5×的50μM ATP(终浓度为10μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM, U Light-poly GT), 按1:1混合后按每孔4μL加入孔中; 封板膜封板以后, 室温反应2h后, 每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM), 室温5min, 再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eμ-anti-phospho-tyrosine antibody), 室温孵育1小时; PE仪器读板(激发320or 340nm, 发射665nm), 采用四参数拟合, 计算IC50。

[0417] 2.0 ROS1(G2032R)抑制活性筛选

[0418] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl₂、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将270ng/μL的ROS1(G2032R)母液进行稀释, 按每孔加入6μL 1.67×的0.00668ng/μL的工作液(终浓度为0.004ng/μL), 用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中, 使化合物终浓度为1000nM-0.244nM, 阳性化合物浓度为100nM-0.0244nM, 共7个浓度梯度, 4倍稀释, 同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶, 加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后, 将用激酶缓冲液配制好的5×的50μM ATP(终浓度为10μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM, U Light-poly GT), 按1:1混合后按每孔4μL加入孔中; 封板膜封板以后, 室温反应2h后, 每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM), 室温5min, 再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eμ-anti-phospho-tyrosine antibody), 室温孵育1小时; PE仪器读板(激发320or 340nm, 发射665nm), 采用四参数拟合, 计算IC50。

[0419] 上述测试结果见表1。

[0420] 表1体外酶抑制活性(IC₅₀ nM)

化合物 编号	EML4 -ALK	ALK G1202R	ALK R1275Q	ALK F1174L	ALK L1196M	ALK C1156Y	ALK G1269A	ROS1	ROS1 G2032R	ROS1 L2026M
I-2	0.44	7.7	1.6	2.1	13.8	2.2	12.5	4.04	24	1.26
I-3	0.31	2.49	0.49	0.57	3.86	0.53	7.94	1.31	7.51	0.31
I-4	0.99	7.5	1.7							
I-5	1.38					3.67				
I-7	2.3	52	3.4							
I-8	0.48	4.3	0.92	1.41	7.52	1.91	6.79	2.08	11.7	0.67
I-9	0.74	7.4	1.4	2	10.8	2.57	10.5	3.52	23	1.16
I-12	0.6	2.06	0.59	1.09						

[0422] 试验例2:细胞的增殖抑制作用

[0423] 取处于指数生长期状态良好的Karpas299细胞一皿,收集细胞至离心管,低速台式离心机,1500转/min,离心3min,弃上清,用移液器加入10mL种板培养基(RPMI培养基+5%FBS)进行细胞重悬。使用细胞计数仪计数,种板培养基进行稀释,调整细胞密度至 6×10^4 个/mL。使用排枪接种于96孔板上,100 μ L/孔,置于37 $^{\circ}$ C、含5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养。培养24h后,使用纳升加样仪进行化合物加样,每一浓度设置2个复孔,以不加化合物的细胞作为阴性对照,72小时后加CCK-8,10 μ L/孔,4小时后Envision酶标仪450nm处检测其吸光值,计算抑制率,抑制率(%) = (阴性对照组平均值 - 实验组平均值) / (阴性对照组平均值 - 空白组平均值) \times 100%,以化合物浓度对数为横坐标,抑制率为纵坐标,四参数分析,拟合量效曲线,计算IC₅₀。

[0424] 表2体外细胞增殖抑制活性

化合物编号	Karpas299 (IC ₅₀ , nM)
I-4	6.9

[0426] 试验例3化合物对Ba/F3-TEL-ALK细胞的增殖抑制作用

[0427] 取处于指数生长期状态良好的Ba/F3-TEL-ALK细胞,收集细胞至离心管,低速台式离心机,1000转/min,离心5min,弃上清,加入5mL种板培养基(RPMI-1640基础培养基+10%FBS+1%青霉素/链霉素)进行细胞重悬。使用细胞计数仪计数,取所需量的细胞调整密度至2整 10^4 个/mL,然后增殖抑制种板;其余的细胞根据需要添加常规培养的培养基(RPMI-1640基础培养基+10%FBS+1%青霉素/链霉素)进行后续细胞培养。增殖抑制细胞使用排枪接种于96孔板上,95 μ L/孔。待测化合物先用DMSO稀释成1000x母液,根据需要用培养基稀释成20x待用浓度(eg:2 μ L 1000X化合物+98 μ L培养基),按照板分布,将化合物加入已铺好细胞的培养板中,5 μ L/孔,使得每孔中DMSO终浓度为0.1%,每一浓度设置2个复孔,以不加化合物的细胞作为阴性对照,置于37 $^{\circ}$ C、含5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养。72小时后,将细胞板平衡到室温,然后根据说明书要求,加入Promega的检测试剂CellTiter-Glo®,50 μ L/孔,微孔板振荡器上震荡混匀2min,然后室温孵育10min,采用SpectraMax Paradigm酶标仪化学发光模块处检测其发光值,计算抑制率,抑制率(%) = 100 - (实验组平均值 - 空白组平均

值) / (阴性对照组平均值 - 空白组平均值) $\times 100\%$, 以化合物浓度对数为横坐标, 抑制率为纵坐标, 四参数分析, 拟合量效曲线, 计算 IC_{50} 。化合物I-2及I-9 $IC_{50} \leq 10nM$ 。

[0428] 试验例4化合物对TEL-ALK-F1174L细胞的增殖抑制作用

[0429] 取处于指数生长期状态良好的TEL-ALK-F1174L细胞, 收集细胞至离心管, 低速台式离心机, 1000转/min, 离心5min, 弃上清, 加入5mL种板培养基 (RPMI-1640基础培养基+10%FBS+1%青霉素/链霉素) 进行细胞重悬。使用细胞计数仪计数, 取所需量的细胞调整密度至 2×10^4 个/mL, 然后增殖抑制种板; 其余的细胞根据需要添加常规培养的的培养基 (RPMI-1640基础培养基+10%FBS+1%青霉素/链霉素) 进行后续细胞培养。增殖抑制细胞使用排枪接种于96孔板上, 95 μ L/孔。待测化合物先用DMSO稀释成1000x母液, 根据需要用培养基稀释成20x待用浓度 (eg: 2 μ L 1000X化合物+98 μ L培养基), 按照板分布, 将化合物加入已铺好细胞的培养板中, 5 μ L/孔, 使得每孔中DMSO终浓度为0.1%, 每一浓度设置2个复孔, 以不加化合物的细胞作为阴性对照, 置于37 $^{\circ}C$ 、含5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养。72小时后, 将细胞板平衡到室温, 然后根据说明书要求, 加入Promega的检测试剂CellTiter-Glo®, 50 μ L/孔, 微孔板振荡器上震荡混匀2min, 然后室温孵育10min, 采用SpectraMax Paradigm酶标仪化学发光模块处检测其发光值, 计算抑制率, 抑制率 (%) = 100 - (实验组平均值 - 空白组平均值) / (阴性对照组平均值 - 空白组平均值) $\times 100\%$, 以化合物浓度对数为横坐标, 抑制率为纵坐标, 四参数分析, 拟合量效曲线, 计算 IC_{50} 。化合物I-2及I-9 $IC_{50} \leq 10nM$ 。