

三环稠杂环类 PDE3/4 双重抑制剂及其制备方法与应用

技术领域

本发明是关于一种三环稠杂环类磷酸二酯酶抑制剂（特别是 PDE3/4 双重抑制剂）及其制备方法与应用。

背景技术

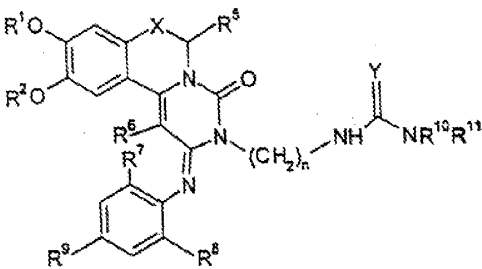
磷酸二酯酶（PDE）属超家族酶系，至少包含 11 个家族、22 个亚型，参与细胞内外信息传递和功能调控。PDE 可催化细胞内的第二信使环腺苷单磷酸（cAMP）和环鸟苷单磷酸（cGMP）水解开环，分别生成 AMP 和 GMP。

PDE3 家族由 2 个基因组成，即 PDE3A 和 PDE3B。PDE3 的活性在呼吸系统中主要集中在肺泡巨噬细胞、内皮细胞、血小板中。PDE3 参与体内多种生理活动的调节，如舒张血管平滑肌、抗血小板凝聚、抗血栓形成、强心以及抗细胞增殖等作用，PDE3 抑制剂过量使用会造成低血压、心动过速等不良反应，极大地限制了其临床应用。

PDE4 是一种特异性水解 cAMP 的酶，其家族由 PDE4A、PDE4B、PDE4C 和 PDE4D 四种亚型构成，每一种亚型都有对应的基因编码并分别具有不同的细胞分布及作用。PDE4 主要分布在气道平滑肌细胞、炎症细胞和免疫细胞中，调节胞内的 cAMP 水平。目前临床上的 PDE4 抑制剂大多具有一定程度的副作用，如恶心、呕吐等胃肠道反应，甚至抑郁。

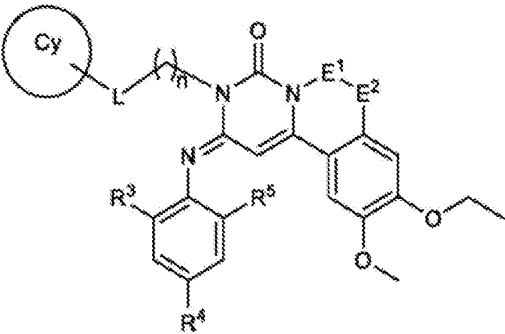
鉴于单独应用 PDE3 或者 PDE4 抑制剂的局限性以及 PDE 抑制剂的副作用，吸入性 PDE3/4 的双重抑制似乎是一种更有吸引力的方式来靶向治疗 COPD 和哮喘的关键病理特征。目前已有证据显示吸入给药的双靶点 PDE3/4 抑制剂具有协同抑制效应，包括协同抗炎和支气管扩张作用。

CN100415743C 公开了一种嘧啶并[6,1a]异喹啉-4-酮衍生物：



该通式化合物作为 PDE 抑制剂用于治疗呼吸道疾病如哮喘，与曲喹新相比具有更长作用持续时间，并且不具有曲喹辛非常苦的味道。

CN112368281A 公开了一类作为 PDE3/PDE4 双重抑制剂的三并环类化合物



该通式化合物可用于制备 PDE3/PDE4 相关疾病尤其是如慢性阻塞性肺病(COPD)方面的药物。

本领域仍然亟需新的 PDE3/PDE4 抑制剂，特别是具有高活性以及良好成药性的 PDE3/PDE4 抑制剂。

5

发明内容

本发明的一个目的在于提供一种新的化合物，以作为 PDE 抑制剂。

本发明的另一目的在于提供所述化合物的制备方法。

本发明的另一目的在于提供所述化合物的应用。

10

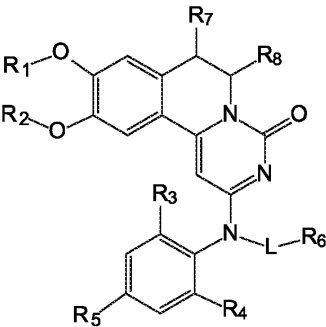
本发明的另一目的在于提供包含所述化合物的药物组合物及其应用。

本发明的另一目的在于提供制备所述化合物的中间体。

本发明的另一目的在于提供所述中间体的制备方法。

<第一方面>

15 本发明提供了一种具有结构式 I 的化合物或其药学上可接受的形式，所述药学上可接受的形式选自药学上可接受的盐或共晶、立体异构体、互变异构体、氘代物、溶剂化物、螯合物、非共价复合物或前体药物；

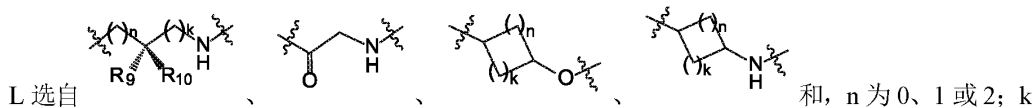


式 I

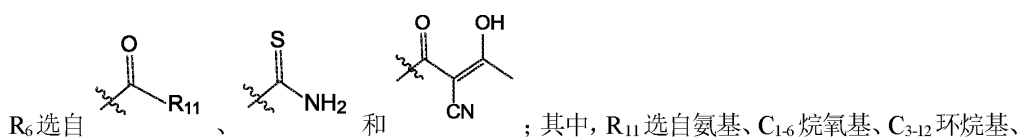
其中：

20 R₁、R₂各自独立地选自 H、C₁₋₆直链烷基、C₃₋₆支链烷基和 C₃₋₆环烷基；所述直链烷基、支链烷基或环烷基任选进一步被 0 至 4 个选自 D、F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基的取代基所取代；

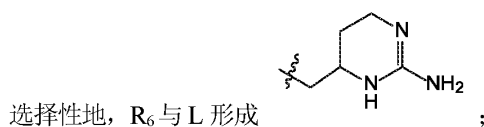
R₃、R₄、R₅各自独立地选自 H、卤素、CN、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 直链烷基、C₃₋₆ 支链烷基、和 C₃₋₆ 环烷基；所述烷氧基、直链烷基、支链烷基或环烷基任选进一步被 0 至 4 个选自 D、F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基的取代基所取代；



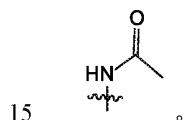
- 5 为 0、1、2 或 3；所述 L 中的 H 任选进一步被 0 至 4 个选自 F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基的取代基所取代；其中，R₉、R₁₀各自独立地选自 H、C₁₋₆ 直链烷基、C₃₋₆ 支链烷基、C₃₋₆ 环烷基、C₃₋₆ 杂环烷基、C₆₋₁₀ 芳基、C₅₋₁₀ 杂芳基和 COOCH₃，且 R₉、R₁₀不同时为 H；所述杂芳基含有 1-3 个选自 N、O 和 S 的杂原子；



- 10 C₆₋₁₀ 芳基、C₅₋₁₀ 杂环基，所述杂环基含有 1-3 个选自 N、O 和 S 的杂原子，所述氨基、烷氧基、环烷基、芳基、杂芳基任选进一步被 0 至 4 个选自 H、F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、CF₃、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基的取代基所取代；



R₇、R₈各自独立地选自 H、=O、卤素、NH₂、CN、C₁₋₆ 直链烷基、C₃₋₆ 支链烷基、C₃₋₆ 环烷基和



根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₁、R₂各自独立地选自 CH₃、CHF₂、CD₃或 C₃₋₆ 环烷基。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₁、R₂分别为 CD₃。

- 20 根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₁、R₂之一为 CH₃，另一为 CHF₂。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₃、R₄、R₅各自独立地选自 CH₃、i-Pr、OMe、CD₃或卤素。

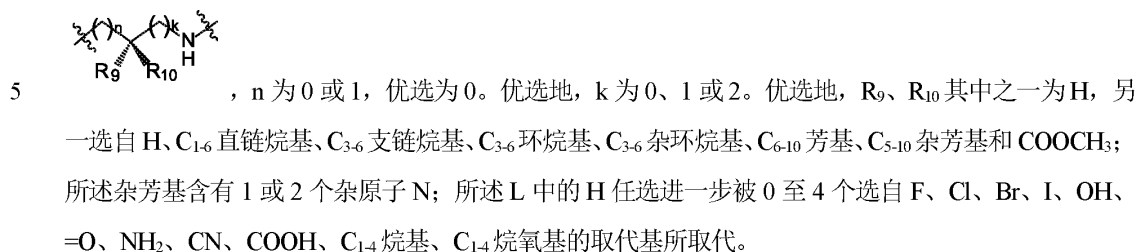
- 25 根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₁、R₂分别对应表 1 中任一化合物所示的基团或取值。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₅为 CH₃，

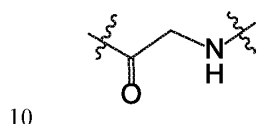
所述 CH_3 任选进一步被 0 至 3 个 D 所取代； R_3 、 R_4 相同，选自 CH_3 、i-Pr、OMe 或卤素。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中， R_3 、 R_4 、 R_5 分别对应表 1 中任一化合物所示的基团或取值。

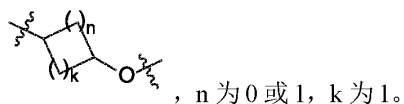
根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，L 为



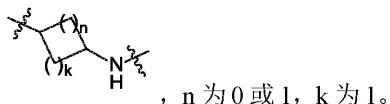
根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，L 为



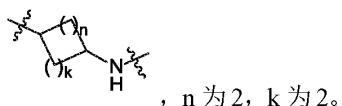
根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，L 为



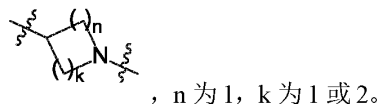
根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，L 为



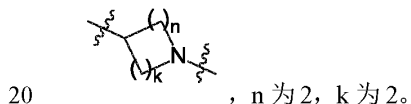
15 根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，L 为



根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，L 为

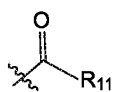


根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，L 为



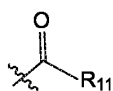
根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，L 对应表 1 中任一化合物所示的基团或取值。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₆ 为



；其中，R₁₁ 为氨基，所述氨基任选进一步被 0、1 或 2 个选自 F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、CF₃、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基的取代基所取代。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₆ 为



5 ；其中，R₁₁ 为 C₆₋₁₀ 芳基或 C₅₋₁₀ 杂环基，所述杂环基含有 1、2 或 3 个杂原子 N；所述芳基、杂芳基任选进一步被 0、1、2 或 3 个选自 H、F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、CF₃、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基的取代基所取代。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₆ 对应表 1 中任一化合物所示的基团或取值。

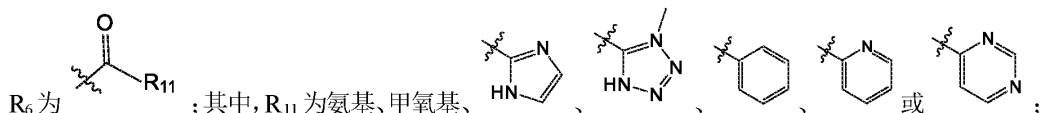
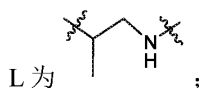
10 根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₇ 为 H 或 CH₃，R₈ 为 H 或 F。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，R₇、R₈ 对应表 1 中任一化合物所示的基团或取值。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中：

15 R₁、R₂ 各自独立地选自 CH₃ 或 CD₃；

R₃、R₄、R₅ 分别为 CH₃；



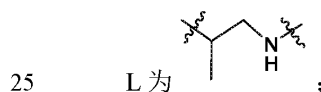
其中，所述氨基任选进一步被 0 或 1 个甲基或环丙基所取代；所述 任选进一步被 0 或 1 个甲基或 NH₂ 所取代；

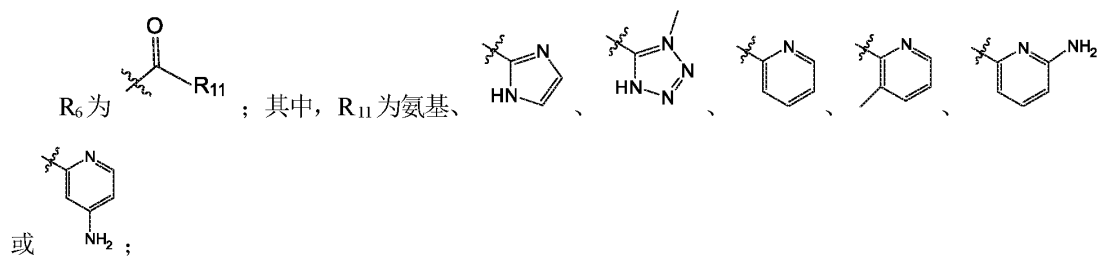
20 R₇、R₈ 分别为 H。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中：

R₁、R₂ 分别为 CH₃；

R₃、R₄、R₅ 分别为 CH₃；





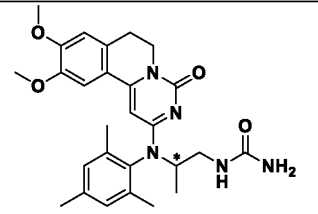
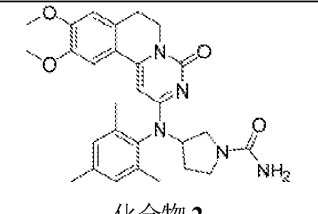
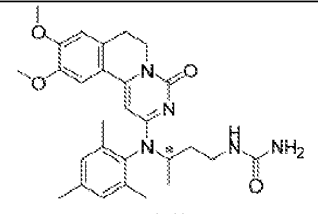
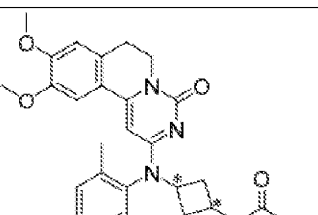
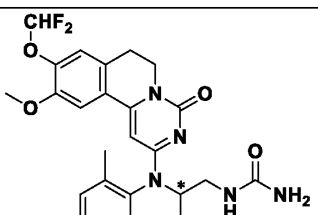
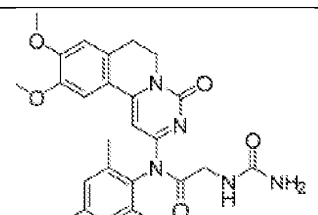
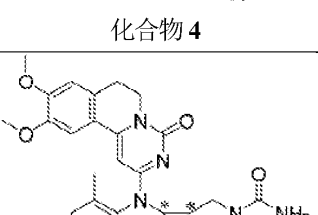
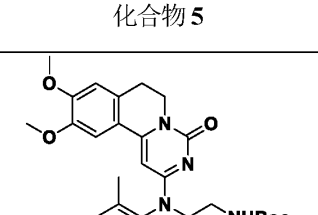
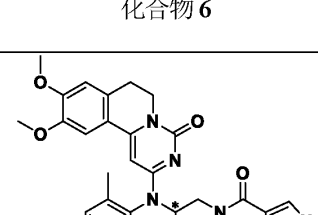
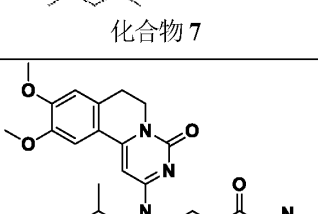
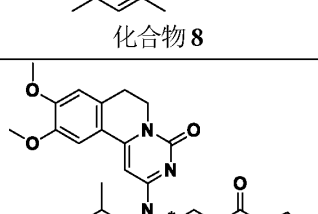
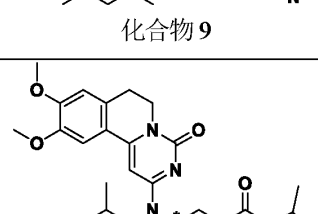
R_7 、 R_8 分别为 H。

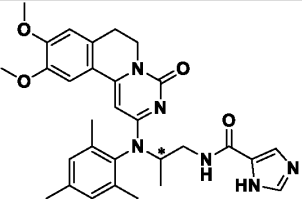
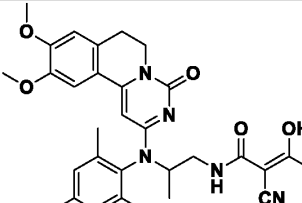
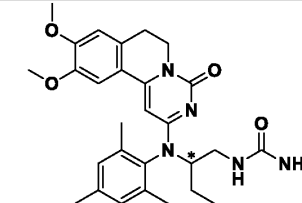
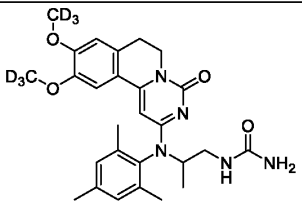
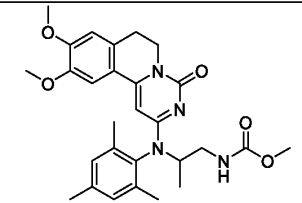
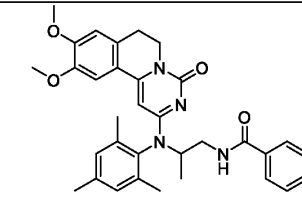
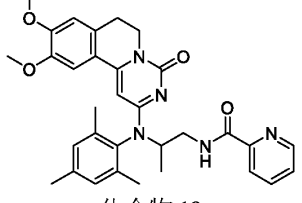
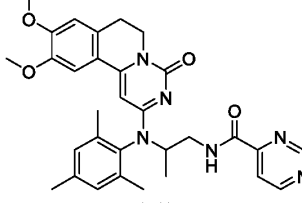
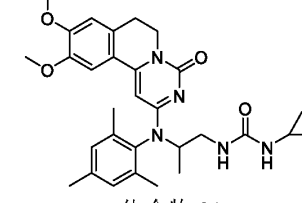
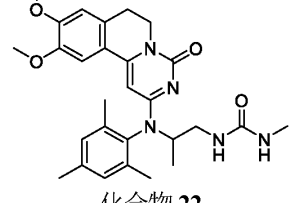
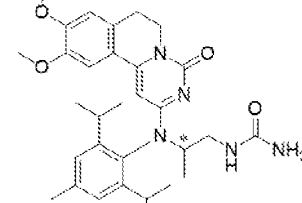
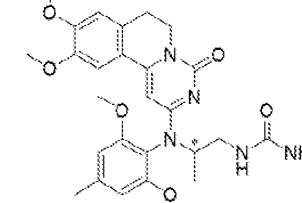
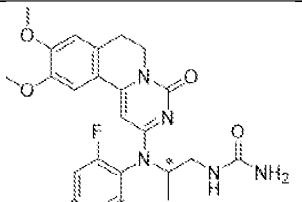
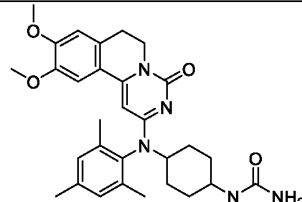
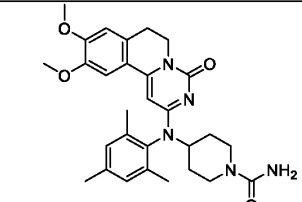
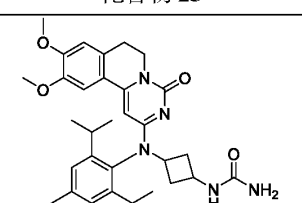
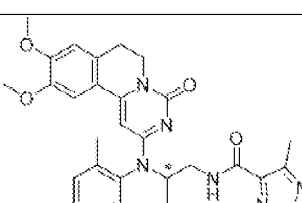
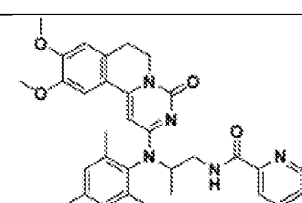
根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中, R_1 、 R_2 、 R_3 、

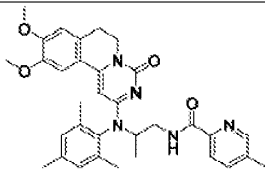
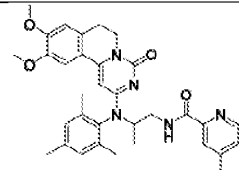
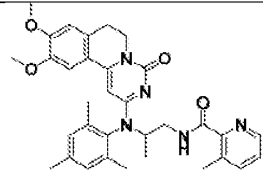
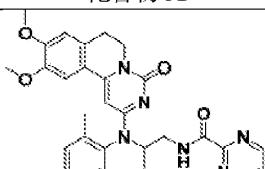
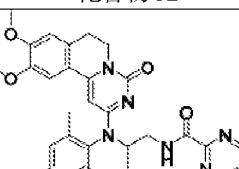
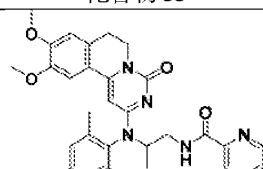
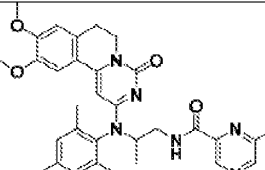
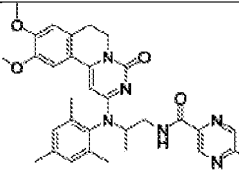
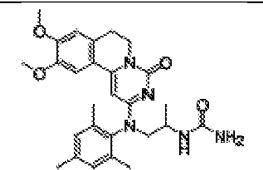
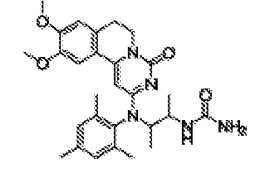
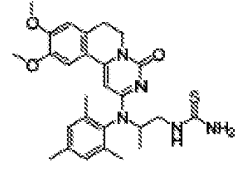
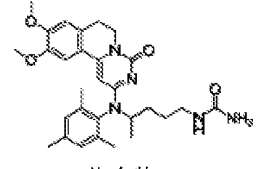
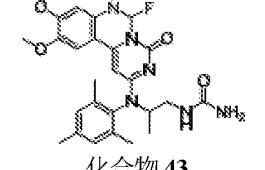
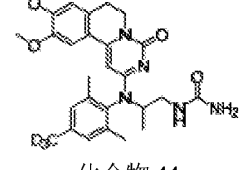
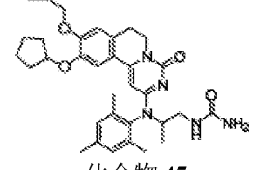
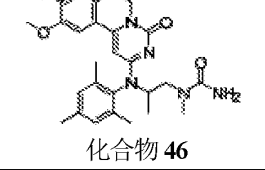
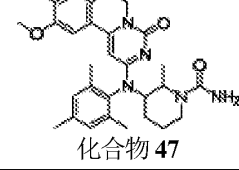
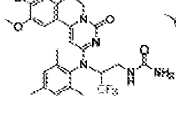
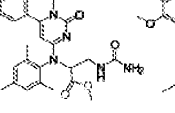
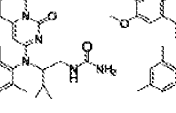
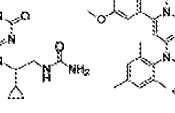
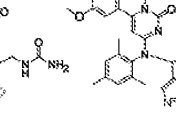
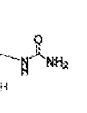
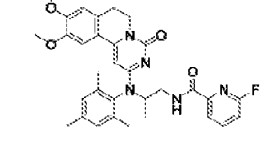
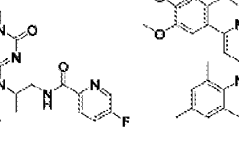
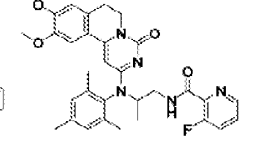
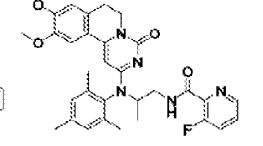
5 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、L 分别对应表 1 中任一化合物所示的基团或取值。

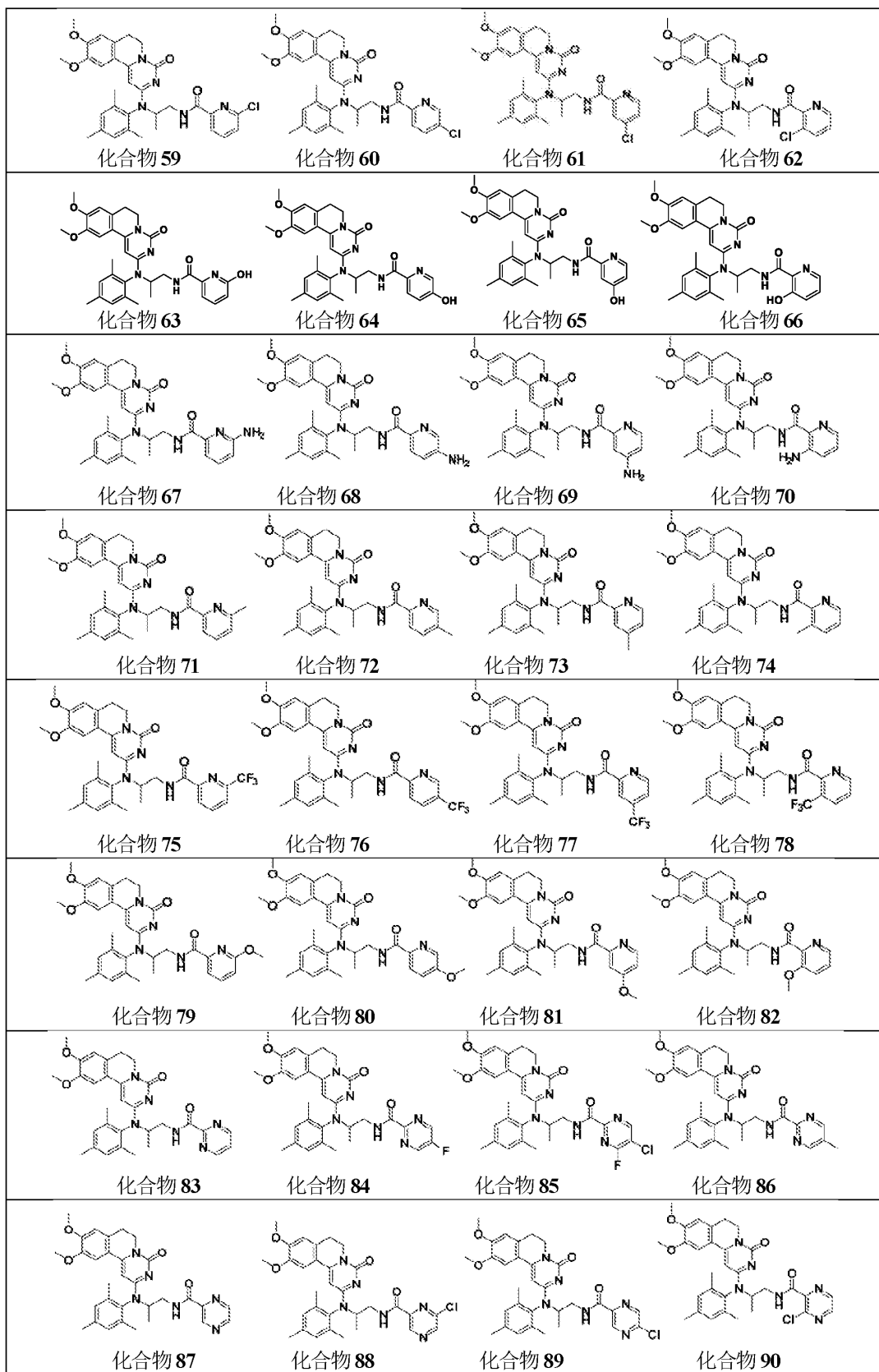
根据本发明的一些具体实施方案, 本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中, 所述化合物或其药学上可接受的形式选自表 1 所示化合物中的一种或多种:

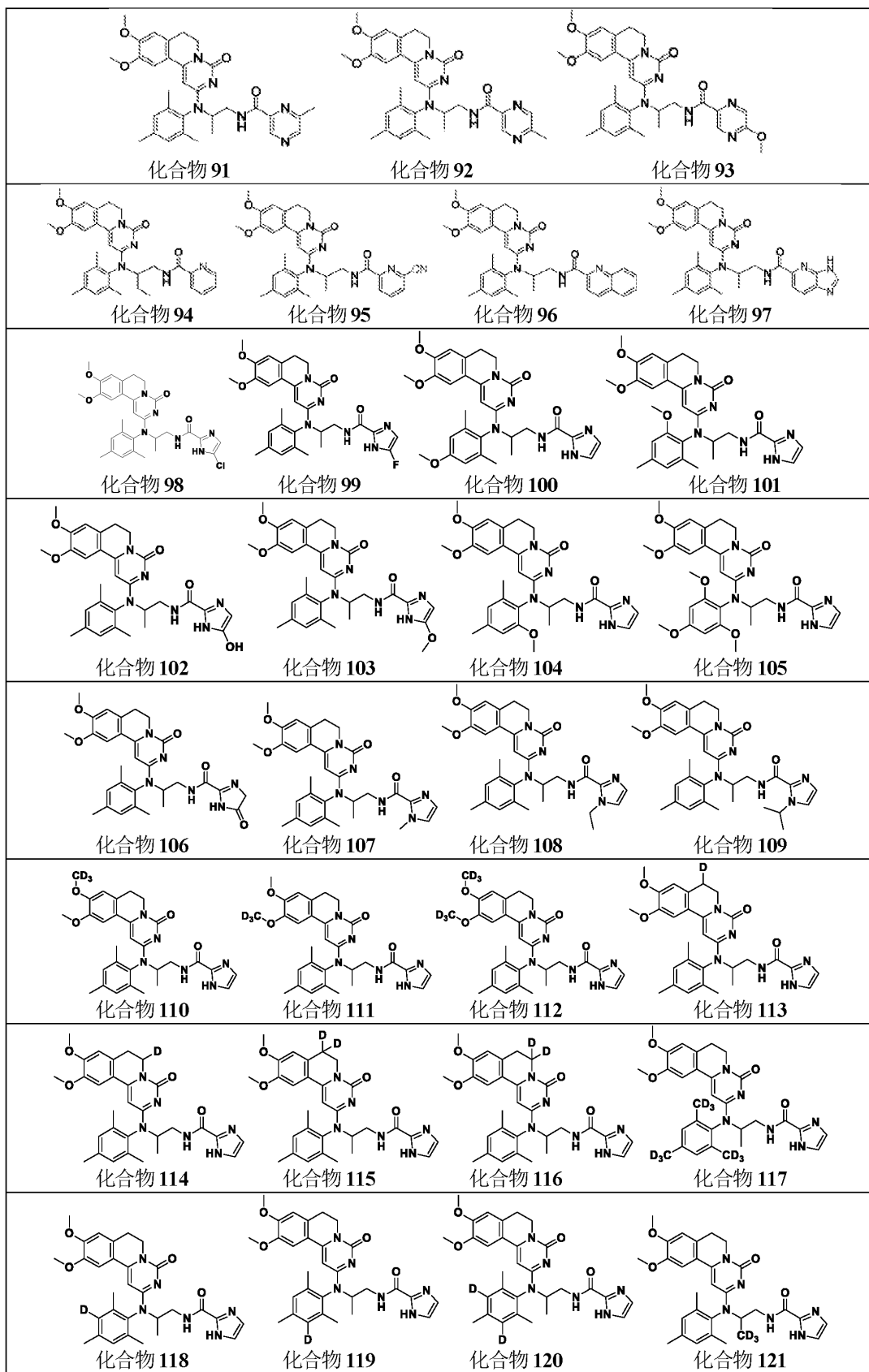
表 1

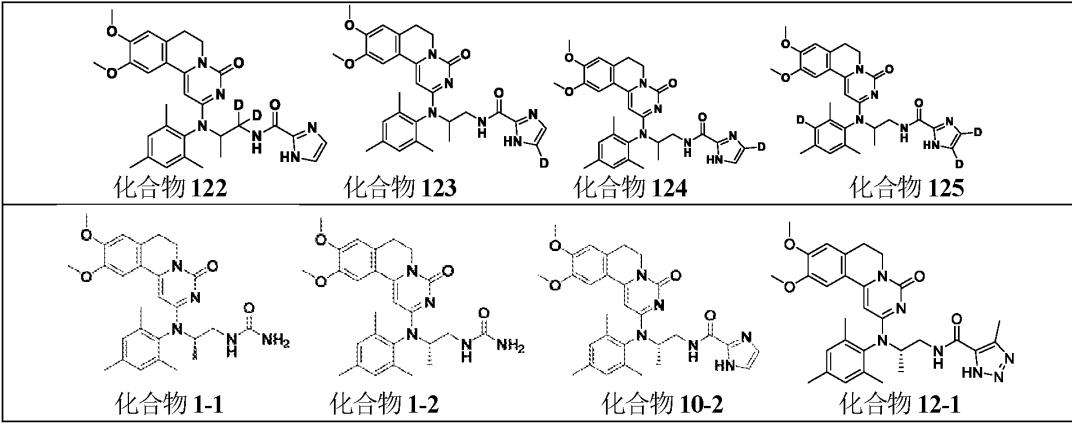
 化合物 1	 化合物 2	 化合物 3
 化合物 4	 化合物 5	 化合物 6
 化合物 7	 化合物 8	 化合物 9
 化合物 10	 化合物 11	 化合物 12

 化合物 13	 化合物 14	 化合物 15
 化合物 16	 化合物 17	 化合物 18
 化合物 19	 化合物 20	 化合物 21
 化合物 22	 化合物 23	 化合物 24
 化合物 25	 化合物 26	 化合物 27
 化合物 28	 化合物 29	 化合物 30

					
化合物 31	化合物 32	化合物 33			
					
化合物 34	化合物 35	化合物 36			
					
化合物 37	化合物 38	化合物 39			
					
化合物 40	化合物 41	化合物 42			
					
化合物 43	化合物 44	化合物 45			
					
化合物 46	化合物 47	化合物 48			
					
化合物 49	化合物 50	化合物 51	化合物 52	化合物 53	化合物 54
					
化合物 55	化合物 56	化合物 57	化合物 58		



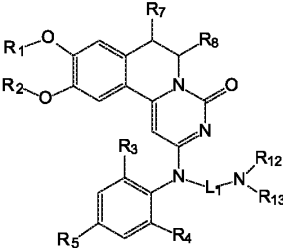




根据本发明的一些具体实施方案，本发明的式 I 化合物或其药学上可接受的形式中，所述药学上可接受的形式选自表 1 所示任意一种或多种化合物的药学上可接受的盐或共晶、立体异构体、互变异构体、氘代物、溶剂化物、螯合物、非共价复合物或前体药物。

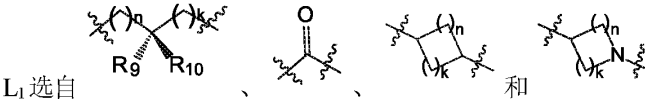
<第二方面>

5 本发明还提供了一种中间体化合物，其具有式 II 所示结构：



式 II

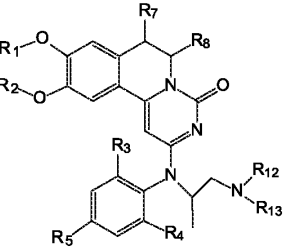
其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_7 、 R_8 如根据本发明<第一方面>式 I 化合物或其药学上可接受的形式中任一方案所定义；



L_1 选自

10 一方面>式 I 化合物或其药学上可接受的形式中任一方案所定义； R_{12} 、 R_{13} 各自独立地为 H、Boc、Cbz、SEM、Fmoc、Alloc、Pht、OTs、PMB、Bn、Trt。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的所述中间体化合物具有如下结构：



式 III

R_{12} 、 R_{13} 其中之一为 H，另一为 Boc、Cbz、SEM、Fmoc、Alloc、Pht、OTs、PMB、Bn、Trt。

<第三方面>

本发明还提供了一种制备本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式的方法。可根据所述式 I 化合物或其药学上可接受的形式化学结构，参照本领域的已知方法设计合成路线以制备所述式 I 化合物或其药学上可接受的形式。

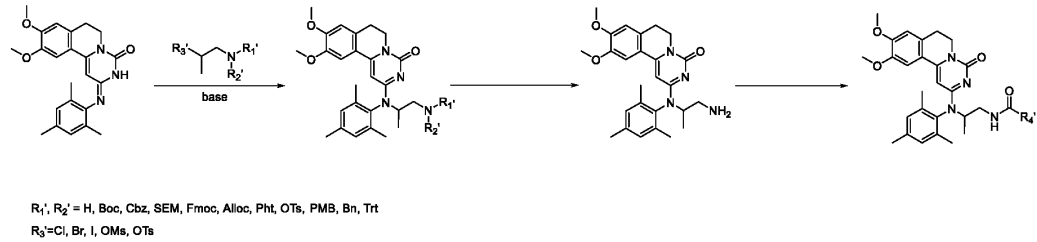
5 根据本发明的一些具体实施方案，本发明的制备本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式的方法包括：

对本发明<第二方面>所述的中间体化合物式 II 中所示的羧基端进行修饰反应，制备具有结构式 I 的化合物。

10 根据本发明的一些具体实施方案，本发明的制备本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式的方法还包括制备本发明<第二方面>所述的中间体化合物的过程。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的制备本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式的方法包括如实施例 1-实施例 38 中任一反应路线所示步骤。

根据本发明的一些具体实施方案，本发明的制备本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式的方法包括：



15

<第四方面>

本发明还提供了一种药物组合物，其包括：本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式（优选药学上可接受的盐），以及药学上可接受的载体、赋形剂和/或一种或多种其它治疗剂。

<第五方面>

20 本发明还提供了本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式（优选药学上可接受的盐）或本发明<第四方面>所述的药物组合物在制备用于抑制磷酸二酯酶的制剂中的应用。优选地，所述磷酸二酯酶包括 PDE3 和/或 PDE4。

<第六方面>

25 本发明还提供了本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式（优选药学上可接受的盐）或本发明<第四方面>所述的药物组合物在制备用于治疗磷酸二酯酶相关疾病的药物中的应用。

本发明还提供了一种治疗磷酸二酯酶相关疾病的方法，该方法包括给予受试者有效量的本发明<第一方面>所述的化合物或其药学上可接受的形式（优选药学上可接受的盐）或本发明<第四方面>所述的药物组合物。

根据本发明的一些具体实施方案，所述磷酸二酯酶包括 PDE3 和/或 PDE4。

30 根据本发明的一些具体实施方案，所述磷酸二酯酶相关疾病包括呼吸道疾病如哮喘。

根据本发明的一些具体实施方案，所述的受试者为哺乳动物或人，优选地，所述的受试者为人。

本发明的具有结构式I的化合物或其药学上可接受的形式，可作为磷酸二酯酶抑制剂，对磷酸二酯酶特别是PDE3和/或PDE4具有高效的抑制活性，具有实用价值。

定义和说明

5 除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短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，而应该按照普通的含义去理解。当本文中出现商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

除非另有说明，用楔形实线键(／)和楔形虚线键(／)表示一个立体中心的绝对构型，用直形实线键(／)和直形虚线键(／)表示立体中心的相对构型，用波浪线(／)表示楔形实线键(／)或楔形虚线键(／)，或用波浪线(／)表示直形实线键(／)和直形虚线键(／)。

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。

术语“药学上可接受的盐”或者“其药学上可接受的盐”是指本发明化合物的盐，由本发明发现的具
15 有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的情性溶剂中用足够量的碱与这类化合物的中性形式接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、有机氨或镁盐或类似的盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在纯的溶液或合适的情性溶剂中用足够量的酸与这类化合物的中性形式接触的方式获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括无机酸盐，所述无机酸包括例
20 如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、碳酸氢根、磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸等；以及有机酸盐，所述有机酸包括如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸和甲磺酸等类似的酸；还包括氨基酸(如精氨酸等)的盐，以及如葡萄糖醛酸等有机酸的盐。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团，从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

25 本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下，这样的盐的制备方法是：在水或有机溶剂或两者的混合物中，经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。

术语“共晶”是指结晶材料在室温下包含两种或多种独特固体，每种固体含有不同的物理特性，例如结构、熔点和熔化热。

30 术语“立体异构体”(或称“旋光异构体”)是指由于具有至少一个手性因素(包括手性中心、手性轴、手性面等)而导致具有垂直的不对称平面，从而能够使平面偏振光旋转的稳定异构体。由于本发明的化合物中存在可能导致立体异构的不对称中心以及其它化学结构，因此本发明也包括这些立体异构体及其混合物。由于本发明的化合物及其盐可包括不对称碳原子，因而能够以单一立体异构体形式、外消旋

物、对映异构体和非对映异构体的混合物形式存在。通常，这些化合物能够以外消旋混合物的形式制备。然而，如果需要的话，可以将这类化合物制备或分离后得到纯的立体异构体，即单一对映异构体或非对映异构体，或者单一立体异构体富集化(纯度 $\geq 98\%$ 、纯度 $\geq 95\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 88\%$ 、 $\geq 85\%$ 或 $\geq 80\%$)的混合物。化合物的单一立体异构体是由含有所需手性中心的旋光起始原料合成制备得到的，

5 或者通过制备得到对映异构体产物的混合物之后再分离或拆分制备得到的，例如转化为非对映异构体的混合物之后再进行分离或重结晶、色谱处理、使用手性拆分试剂，或者在手性色谱柱上将对映异构体进行直接分离。具有特定立体化学的起始化合物既可以商购得到，也可以按照本文中描述的方法制备再通过本领域熟知的方法拆分得到。除非另外指出，本发明的化合物的所有立体异构体形式都在本发明的化合物范围之内。

10 术语“互变异构体”(或称“互变异构形式”)是指具有不同能量的可通过低能垒互相转化的结构异构体。若互变异构是可能的(如在溶液中)，则可以达到互变异构体的化学平衡。例如，质子互变异构体(或称质子转移互变异构体)包括(但不限于)通过质子迁移来进行的互相转化，如酮-烯醇异构化、亚胺-烯胺异构化、酰胺-亚胺醇异构化等。除非另外指出，本发明的化合物的所有互变异构体形式都在本发明的化合物范围之内。

15 除非另外指出，本发明的结构式表示的化合物可以为纯化的单一的立体异构体或互变异构体形式，也可以是包含多个立体异构体或互变异构体的混合物的形式。

术语“溶剂化物”是指由本发明的化合物或其药学上可接受的盐与至少一种溶剂分子通过非共价分子间作用力结合而形成的物质。常见的溶剂化物包括(但不限于)水合物、乙醇合物、丙酮合物等。

20 术语“螯合物”是具有环状结构的配合物，是通过两个或多个配位体与同一金属离子形成螯合环的螯合作用而得到。

术语“非共价复合物”是通过化合物与另一分子的相互作用而形成的，其中该化合物与该分子之间不形成共价键。例如，可以通过范德华相互作用、氢键键合和静电相互作用(也称作离子键合)来发生复合。

25 术语“前体药物”是指在适用于患者后能够直接或间接地提供本发明的化合物的衍生化合物。特别优选的衍生化合物或前药是在施用于患者时可以提高本发明的化合物的生物利用度的化合物(例如，更易吸收入血)，或者促进母体化合物向作用位点(例如，淋巴系统)递送的化合物。除非另外指出，本发明的化合物的所有前药形式都在本发明的范围之内，且各种前药形式是本领域熟知的。

30 术语“各自独立地”是指结构中存在的取值范围相同或相近的至少两个基团(或环系)可以在特定情形下具有相同或不同的含义。例如，取代基X和取代基Y各自独立地为氢、卤素、羟基、氰基、烷基或芳基，则当取代基X为氢时，取代基Y既可以为氢，也可以为卤素、羟基、氰基、烷基或芳基；同理，当取代基Y为氢时，取代基X既可以为氢，也可以为卤素、羟基、氰基、烷基或芳基。

术语“包含”和“包括”以其开放、非限制性意义使用。

“任选”或“任选地”指的是随后描述的事件或状况可能但不是必需出现的，并且该描述包括其中所述事件或状况发生的情况以及所述事件或状况不发生的情况。

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,可以包括重氢和氢的变体,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(即=O)时,意味着两个氢原子被取代。氧取代不会发生在芳香基上。术语“任选被取代”是指可以被取代,也可以不被取代,除非另有规定,取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

- 5 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 0-2 个 R 所取代,则所述基团可以任选地至多被两个 R 所取代,并且每种情况下的 R 都有独立的选项。此外,取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

10 当结构式中一个变量选自缺失时,表示其不存在,比如 C-R 中 R 选自缺失时表示该结构实际上是 C。

当结构式中连接两个基团的一个变量选自键或不存在时,表示其连接的两个基团直接相连,比如 A-L-Z 中 L 代表键或不存在时表示该结构实际上是 A-Z。

当所列举的取代基中没有指明其通过哪一个原子连接到被取代的基团上时,这种取代基可以通过其任何原子相键合,例如,苯基作为取代基可以通过苯环上任意一个碳原子连接到被取代的基团上。

- 15 除非另有规定,术语“烷基”用于表示直链或支链的饱和烃基,可以是单取代(如-CH₂F)或多取代的(如-CF₃),可以是一价(如甲基)、二价(如亚甲基)或者多价(如次甲基)。烷基的例子包括甲基(Me),乙基(Et),丙基(如, n-丙基和异丙基),丁基(如, n-丁基, 异丁基, s-丁基, t-丁基),戊基(如, n-戊基, 异戊基, 新戊基)等。

- 20 除非另有规定,术语“亚烷基”是指二价的直链或支链的烷烃基团,其仅由碳原子和氢原子组成,不含有饱和度,并且通过两个单键分别与其它片段连接,包括(但不限于)亚甲基、1,1-亚乙基和1,2-亚乙基等。例如,“C₁₋₃亚烷基”指从包含1至3个碳原子的饱和的二价直链或支链烷基。

除非另有规定,“环烷基”包括任何稳定的环状或多环烃基,任何碳原子都是饱和的,可以是单取代或多取代的,可以是一价、二价或者多价。这些环烷基的实例包括,但不限于,环丙基、降冰片烷基、[2.2.2]二环辛烷、[4.4.0]二环癸烷等。

- 25 除非另有规定,术语“烷氧基”表示烷基基团通过氧原子与分子其余部分相连,其中烷基基团具有如本发明所述的含义。除非另有规定,C₁₋₅烷氧基包括 C1、C2、C3、C4 和 C5 的烷氧基。烷氧基的例子包括但不限于:甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基和 S-戊氧基。所述烷氧基基团可以任选地被一个或多个本发明描述的取代基所取代。

- 30 除非另有规定,术语“3-6 元环”表示含有或不杂原子的饱和或不饱和的单环,其环上含有 3、4、5 或 6 个 C、O、S、N 原子;所述“3-6 元环”可以通过任何一个碳原子,或,如果存在的话,氮原子,与结构式的其余部分相连接。

除非另有规定,术语“胺基(氨基)”是指是-NH₂、-NH(烷基)或者-N(烷基)(烷基)。

除非另有规定,术语“芳环”表示多不饱和的芳香族烷烃单环,可以是单取代或多取代的。

除非另有规定,术语“4-6 元杂环烷基”表示饱和的单价的单环烃环,其环上含有 3、4 或 5 个碳原

子, 以及一或多个选自 O、NR^a 的杂原子基团, 其中, R^a 代表氢原子或 C₁₋₆ 烷基; 所述“4-6 元杂环烷基”可以通过任何一个碳原子, 或, 如果存在的话, 氮原子, 与分子的其余部分相连接。

除非另有规定, 术语“杂芳环”表示含有一至四个杂原子的芳环, 杂原子选自 N、O 和 S 中的一种或多种。

- 5 除非另有规定, 术语“杂环基”是指饱和或部分饱和的、单环或多环(诸如双环, 例如: 并环、桥环或螺环)的非芳香族基团, 其环原子由碳原子以及至少一个选自N、O和S的杂原子构成, 其中S原子任选地被取代以形成S(=O)、S(=O)₂或S(=O)(=NR^x), R^x独立地选自H或C₁₋₄烷基。如果满足价键要求, 杂环基可以通过任意一个环原子与分子的其余部分连接。例如, 本发明中所使用的术语“3-8元杂环基”是指具有3至8个环原子的杂环基。例如, 杂环基可以是环氧乙烷基、氮杂环丙烷基、氮杂环丁烷基、氧
- 10 杂环丁烷基、四氢呋喃基、二氧杂环戊烯基、吡咯烷基、吡咯烷酮基、咪唑烷基、吡唑烷基、四氢吡喃基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫吗啉基、二噻烷基或三噻烷基。

除非另有规定, 术语“芳基”是指具有共轭 π 电子系统的单环或稠合多环的芳香族烃基。例如, 本发明中所使用的术语“C₆₋₁₀芳基”是指具有6至10个碳原子的芳基。例如, 芳基可以是苯基、萘基、蒽基、菲基、茚基、萘基、茚基、茚基、茚基等。

- 15 除非另有规定, 术语“杂芳基”是指具有共轭 π 电子系统的单环或稠合多环的芳香族基团, 其环原子由碳原子以及至少一个选自N、O和S的杂原子构成。如果满足价键要求, 杂芳基可以通过任意一个环原子与分子的其余部分连接。例如, 本发明中所使用的术语“5-10元杂芳基”是指具有5至10个环原子的杂芳基。例如, 杂芳基可以是噻吩基、呋喃基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、异噁唑基、异噻唑基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基及其苯并衍
- 20 生物、吡咯并吡啶基、吡咯并吡嗪基、吡唑并吡啶基、咪唑并吡啶基、吡咯并嘧啶基、吡唑并嘧啶基、嘌呤基等。

除非另有规定, 术语“卤素”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)和碘(I)。术语“羟基”是指-OH。术语“氰基”是指-CN。术语“氨基”是指-NH₂。

- 除非另有规定, 术语“药物组合物”是指一种或多种本发明所述化合物或药学上可接受的形式与其它化学组分形成的混合物, 其中, “其它化学组分”是指药学上可接受的载体、赋形剂和/或一种或多种其它治疗剂。“载体”是指不会对生物体产生明显刺激且不会消除所给予化合物的生物活性和特性的材料。“赋形剂”是指加入到药物组合物中以促进化合物给药的惰性物质。非限制性实施例包括碳酸钙、磷酸钙、糖、淀粉、纤维素衍生物 (包括微晶纤维素)、明胶、植物油、聚乙二醇类、稀释剂、成粒剂、
- 25 润滑剂、粘合剂和崩解剂。

- 30 本发明化合物具有良好的 PDE 抑制活性, 在治疗与 PDE 相关特别是与 PDE3/PDE4 相关的疾病中具有潜在的应用价值。

附图说明

图1为本发明化合物1-2单晶衍射图。

图 2A 至图 2G 显示各化合物对支气管平滑肌细胞活力的研究检查结果。

图 3 显示各化合物对 LPS 诱导炎症模型的药效学研究中细胞上清液中 TNF-α 水平检测结果。

图 4A 和图 4B 分别显示本发明化合物 10 对豚鼠气道阻力(RL, cmH₂O)及变化量的影响。

图 5A 和图 5B 分别显示本发明化合物 1-2 对豚鼠气道阻力(RL, cmH₂O)及变化量的影响。

图 6 显示本发明化合物对离体气管舒张功能的影响。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制

造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

化合物的结构通过核磁共振或质谱来确定。核磁共振使用 BRUKER 400M 核磁仪测定，测定溶剂为氘代二甲基亚砜 (DMSO-*d*₆) 或氘代氯仿 (CDCl₃)，内标为四甲基硅烷 (TMS)，化学位移 (δ) 以 10⁻⁶ (ppm) 作为单位给出。质谱使用 Waters ACQUITY Arc/ACQUITY QDa 或 Thermo U3000-ISQ EC 液质联用仪测定。

高效液相色谱法分析使用 Thermo U3000 高压液相色谱仪。高效液相制备使用汉邦 DAC-50 或岛津 LC-20AP 制备型色谱仪。

反应监测使用薄层色谱或液质联用。薄层色谱使用的展开剂体系有：二氯甲烷和甲醇体系，石油醚和乙酸乙酯体系，溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节，或者加入少量三乙胺等进行调节。液质联用使用 Waters ACQUITY Arc/ACQUITY QDa 或 Thermo U3000-ISQ EC 液质联用仪。

柱层析一般使用 200~300 目硅胶为载体。洗脱剂的体系包括：二氯甲烷和甲醇体系，石油醚和乙酸乙酯体系，溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节，或者加入少量三乙胺等进行调节。

以下实施例及对比例中无特殊说明，反应的温度为室温 (20℃~30℃)，溶剂均按照标准方法干燥纯化。

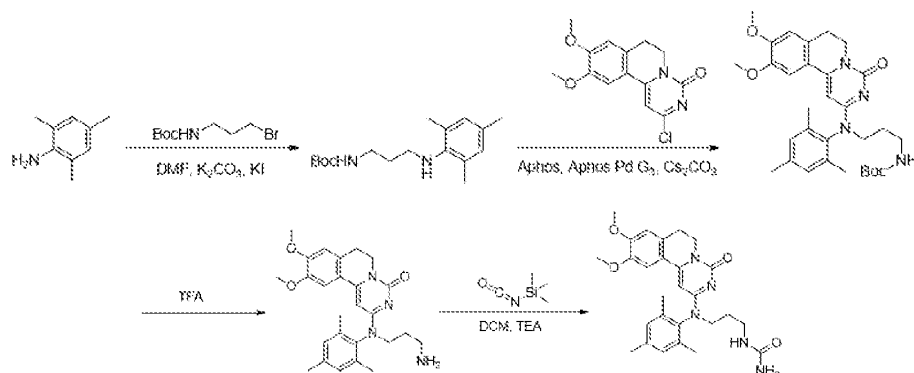
对比例化合物见表 2。

表 2、对比例化合物

对比例	化合物结构	对比例	化合物结构
阳性药 RPL-554		D4	
D1		D5	

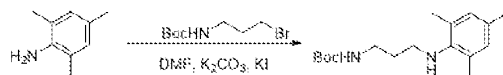
D2		D6	
D3		D7	

对比例化合物 D1 的制备:



制备步骤:

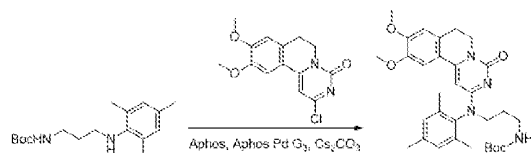
5 1.



氮气保护室温下，向 2, 4, 6-三甲基苯胺 (2.0 g, 14.7 mmol, 1 当量)和 N-(3-溴丙基)氨基甲酸叔丁酯 (14.1 g, 59.1 mmol, 4 当量)的 DMF (20 mL, 258.4 mmol) 溶液中，分别加入 K_2CO_3 (6.1 g, 44.3 mmol, 3 当量)和 KI (2.5 g, 14.7 mmol, 1 当量)。80 °C 下反应过夜。反应混合物用 EA 萃取 (3×50 ml)。合并有机相，用饱和氯化钠溶液洗涤 (2×30 ml)，无水硫酸钠干燥。混合物过滤，减压浓缩。所得残余物用硅胶柱层析纯化，EA/PE (1/4)，得到 N-(3-[(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基]丙基氨基甲酸叔丁酯 (2.2 g, 收率 50.86%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 293.2$

2.



15

在氮气保护室温下，向 N-(3-[(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基]丙基氨基甲酸叔丁酯 (1.2 g, 4.1 mmol, 1 当量)和 2-氯-9, 10-二甲氧基-6, 7-二氢嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-4-酮 (1.8 g, 6.1 mmol, 1.5 当量)的

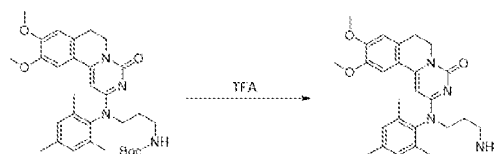
dioxane (20 mL) 溶液中, 分别加入 Cs_2CO_3 (2.7 g, 8.2 mmol, 2 当量), APhos Pd G₃ (0.3 g, 0.4 mmol, 0.1 当量) 和 4-(二叔丁基膦酰基)-N, N-二甲基苯胺 (0.1 g, 0.4 mmol, 0.1 当量)。氮气保护, 100°C 下搅拌反应过夜。反应混合物用 EA 萃取 (3×50 mL)。合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤 (2×30 mL), 无水硫酸钠干燥。所得混合物过滤后, 将滤液减压浓缩。所得残余物用反相柱层析纯化, 条件如下:

- 5 C18 层析柱, 流动相, 水和乙腈, 10%到 90%梯度 30 分钟, UV: 254 nm。得到 N-[3-((9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基)丙基)氨基甲酸叔丁酯 (200 mg, 收率 8.88%)。

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 549.4$

3.

10



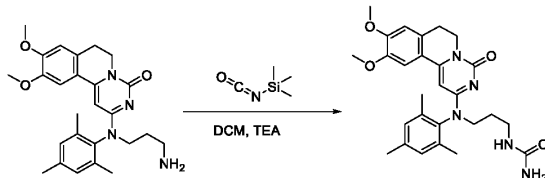
在氮气保护下, 0°C 下, 向 N-[3-((9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基)丙基)氨基甲酸叔丁酯 (290 mg, 1 当量) 的 DCM (5 mL) 溶液中, 滴加 TFA (5 mL)。氮气保护, 室温下, 所得残余物搅拌反应 2h。反应混合物用 DCM 萃取 (3×20 mL)。合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤 (2×10 mL), 无水硫酸钠干燥。所得混合物过滤后, 将滤液减压浓缩。得到 2-[(3-氨基丙基)(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基]-9, 10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-4-酮 (200 mg, 粗品)。

15

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 449.3$

4.

20



在氮气保护下, 0°C 下, 向 2-[(3-氨基丙基)(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基]-9, 10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-4-酮 (200 mg, 0.4 mmol, 1.0 当量) 和 TEA (135 mg, 1.3 mmol, 3 当量) 的 DCM (5 mL) 溶液中, 滴加三甲基硅基异氰酸酯 (128.4 mg, 1.1 mmol, 2.5 当量)。氮气保护, 50°C 下, 所得混合物搅拌反应 2 天。所得残余物减压浓缩。粗品通过高效液相纯化, 得到 3-((9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基)丙基)脒 (7.5 mg, 收率 3.4%), 条件如下 (柱型: Xbridge BEH Phenyl 5μm, 19×250mm; 流动相 A: 水(0.1%FA), 流动相 B: MeOH; 流量: 25 mL/min, 梯度: 10 分钟 43% B 到 53% B; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (分钟): 9.6

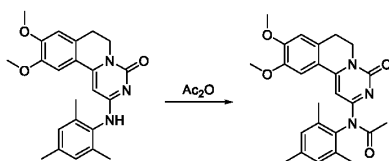
25

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 492.25$

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.22 (broad, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.01 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.91 (s, 6H), 3.61 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.45 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.01 – 2.89 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.24 (s, 6H), 1.88 (s, 2H)。

30

对比例化合物 D2 的制备:

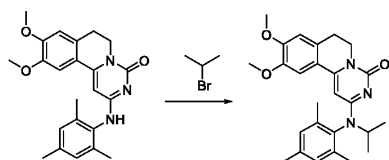


室温下, 向 50mL 烧瓶中加入 (2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚氨基]-3H, 6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮(1.0 g, 2.55 mmol, 1.0 equiv)和二氯甲烷(20mL)搅拌, 加入乙酸酐(0.29g, 2.81 mmol, 1.1 equiv), 氮气保护室温搅拌 24h。反应完毕, 体系降温至 0°C, 滴加水 10ml, 搅拌 1h, 二氯甲烷萃取三次, 合并有机相, 干燥旋蒸, 通过硅胶柱纯化得化合物 N-(9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)-N-间甲基乙酰胺(0.11g)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 434.21$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.74 (s, 1H), 4.19 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.92 (s, 6H), 2.95 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.12 (s, 6H), 2.05 (s, 3H)。

对比例化合物 D3 的制备:

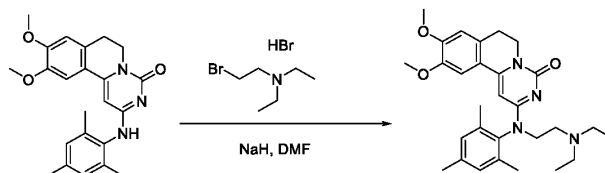


将 (2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚氨基]-3H, 6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (1.00g, 2.554mmol, 1.0eq)、2-溴丙烷 (0.47g, 3.831mmol, 1.5eq)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.23g, 0.255mmol, 0.1eq)、 Cs_2CO_3 (2.50g, 7.662mmol, 3.0eq) 溶于 1,4-二氧六环 (20ml) 中, 氮气保护下, 在搅拌升温至回流反应 12h, 反应完毕, 加水 (50ml) 和乙酸乙酯萃取 (50ml $\times$ 3), 饱和氯化钠 (50ml $\times$ 1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 得到 2-(异丙基(甲基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮 (7.8g, 71.43%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 434.25$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{Methanol-}d_4$) δ 7.08 (s, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.82 – 4.74 (m, 1H), 4.06 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 2.93 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.23 (s, 3H)。

对比例化合物 D4 的制备:



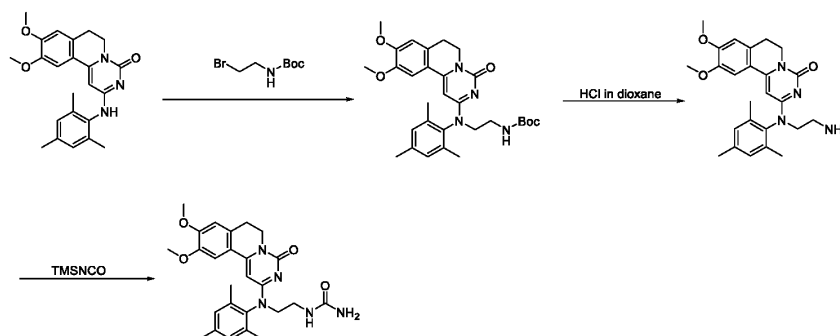
9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-酮(200 mg, 0.5 mmol, 1.0 当量), 溶剂 DMF (2 mL)溶解, 在 0 °C加入 NaH (40 mg, 1.0 mmol, 2.0 当量, 60% 纯度), 所得混合物在

氮气保护下搅拌 0.5 h。在上述混合物中加入(2-溴乙基)氢溴化二乙胺(400 mg, 1.5 mmol, 3.0 当量), 室温下搅拌 1 h。室温下加入水 (10 mL) 淬灭反应。混合物用乙酸乙酯(2 × 50 mL)萃取, 有机层用饱和食盐水 (3 × 100 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。柱层析 (EA/PE=1/2)纯化得到 2-[(2-(二乙基氨基)乙基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-1 (37.2 mg, 产率 14%)。

5 LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 491.25$

1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 6.95 – 6.85 (m, 3H), 6.77 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 4.44 – 4.35 (m, 2H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.99 – 2.90 (m, 4H), 2.74 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 2.28 (s, 3H), 2.05 (s, 6H), 1.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H)。

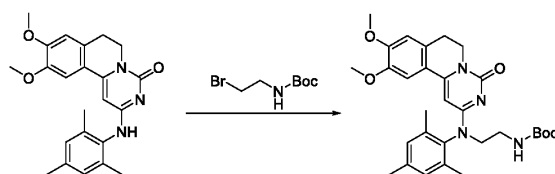
对比例化合物 D5 的制备:



10

制备步骤:

1.

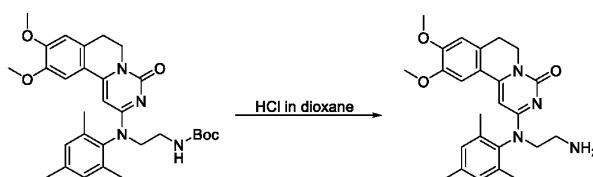


在氮气保护下, 室温下, 把 9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (500 mg, 1.2 mmol, 1.0 当量)和 CS_2CO_3 (1248 mg, 3.8 mmol, 3.0 当量)加入 DMF (10 mL) 溶液中, 分批加入 N-(2-溴乙基)氨基甲酸叔丁酯 (715 mg, 3.1 mmol, 2.5 当量) 和 $Pd_2(dba)_3$ (116 mg, 0.1 mmol, 0.1 当量)。氮气保护, 100 摄氏度下, 所得残余物搅拌反应过夜。反应混合物用乙酸乙酯萃取 (3 X 50 mL)。合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤(2 X 30 mL), 无水硫酸钠干燥。所得混合物过滤后, 将滤液减压浓缩。所得残余物用硅胶柱层析纯化, 二氯甲烷/甲醇(20/1), 得到 N-[2-((9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基)乙基)氨基甲酸叔丁酯 (200 mg, 29.29%)。

20

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 535.2$

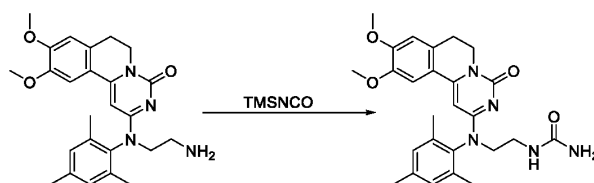
2.



氮气保护，室温下，把 N-[2-((9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基)乙基)氨基甲酸叔丁酯 (180 mg, 0.3 mmol, 1.0 当量)加入到 HCl 的二氧六环溶液 (4 mL, 4 M)，搅拌反应 1h。反应混合物用饱和碳酸氢钠水溶液碱化到 pH=8。反应混合物用乙酸乙酯萃取 (3 X 20 mL)。合并有机相，用饱和氯化钠溶液反洗(2 X 10 mL)，无水硫酸钠干燥。所得混合物过滤后，将滤液减压浓缩。得到 2-[(2-氨基乙基)(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基]-9, 10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-4-酮 (160 mg, 粗品)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 435.2$

3.

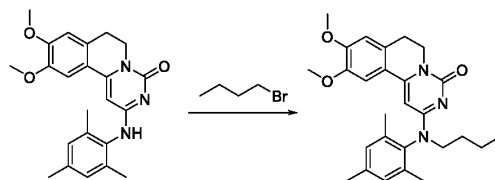


在氮气保护下，室温下，把 2-[(2-氨基乙基)(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基]-9, 10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-4-酮 (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)和 TEA (69 mg, 0.6 mmol, 3.0 当量)加入 DCM (5 mL) 溶液中，滴加异氰基三甲基硅烷 (53 mg, 0.4 mmol, 2.0 当量)。氮气保护，室温下，所得残余物搅拌反应 1.5h。反应混合物用二氯甲烷萃取 (3 X 20 mL)。合并有机相，用饱和食盐水反洗(2 X 50 mL)，无水硫酸钠干燥。所得混合物过滤后，将滤液减压浓缩。粗品通过高效液相纯化得到 2-((9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基)乙基)脒 (26.4 mg, 24.02%)，条件如下 (柱型: YMC Triart C18 ExRs 5 m, 19 mm * 250 mm; 流动相 A: 水 (10 mmol/L NH_4HCO_3), 流动相 B: 乙腈; 流速: 25 mL/min; 梯度: 32% B to 55% B in 10 min; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 9.17)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 478.20$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.11 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.51 (s, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 2H), 3.99 – 3.92 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.44 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.97 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.18 (s, 6H)。

对比例化合物 D6 的制备:



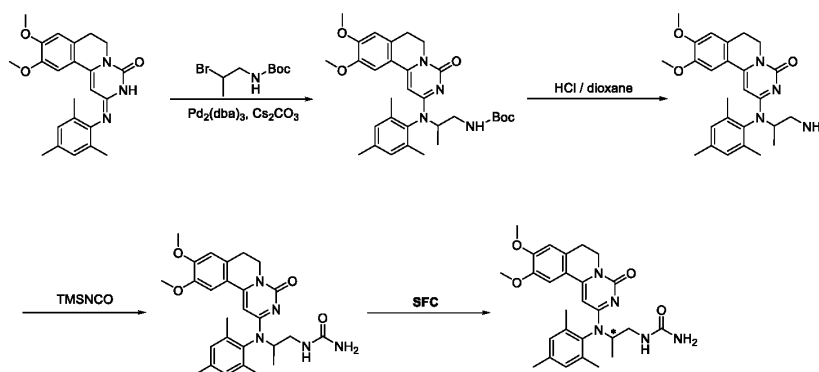
将 (2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚氨基]-3H, 6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (500mg, 1.28mmol, 1.0eq)、1-溴丁烷 (263mg, 1.92mmol, 1.5eq)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (119mg, 0.13mmol, 0.1eq)、 Cs_2CO_3 (1.25g, 3.84mmol, 3.0eq)、Xantphos (150mg, 0.26mmol, 0.2eq)溶于 1,4-二氧六环 (10ml) 中，氮气保护下，在搅拌升温至回流反应 12h，反应完毕，加水 (50ml) 和乙酸乙酯萃取 (50ml X 3)，

饱和氯化钠 (50ml×1) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 过硅胶柱纯化得到 2-(丁基(间甲基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮 (121mg, 21.1%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 448.26$

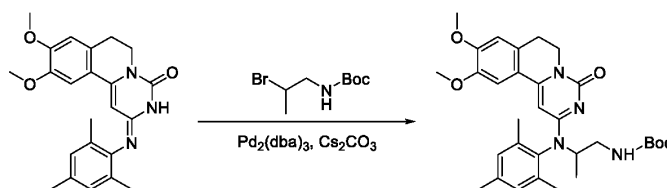
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.01 (s, 2H), 6.71 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.34 (s, 1H), 4.17 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.93 – 3.85 (m, 5H), 3.73 (s, 3H), 2.90 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.16 (s, 6H), 1.62 – 1.51 (m, 2H), 1.40 – 1.27 (m, 2H), 0.89 (t, $J=8.0$ Hz)。

实施例 1、化合物 1-1 和化合物 1-2



制备步骤:

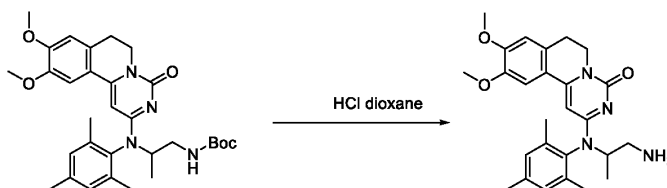
1.



将 N-(2-溴丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.91 g, 3.8 mmol, 1.5 当量), 碳酸铯(2.50 g, 7.662 mmol, 3 当量), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.23 g, 0.26 mmol, 0.1 当量)和(E)-2-(甲磺酰亚胺基)-9,10-二甲氧基-2,3,6,7-四氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮 (1 g, 2.54 mmol, 1.0 当量) 用 20 mL 1, 4-二氧六环溶解, 氮气保护, 110°C 搅拌过夜。减压浓缩, 用 10 mL 水溶解, 用乙酸乙酯(3 × 10 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 20 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗品用反相柱层析纯化, 条件如下 (色谱柱: C18; 流动相 A: 水(10mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 30% B to 50% B in 20 min; 波长: 254nm;) 得到 (E)-2-(2-(甲磺酰亚胺基)-9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-3(4H)-基)丙基)氨基甲酸叔丁酯(500 mg, 产率 35.6%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 549.06$

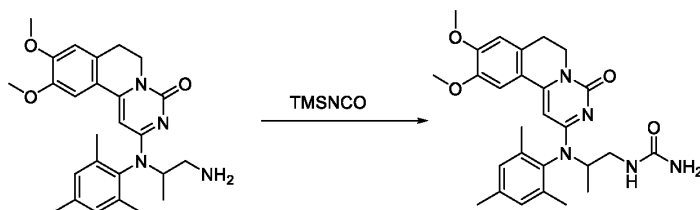
2.



将(E)-(2-(2-(甲磺酰氨基)-9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-3(4H)-基)丙基)氨基甲酸叔丁酯 (500 mg, 0.91 mmol, 1 当量) 用 10ml 盐酸的 1, 4 二氧六环溶液(4M)溶解, 室温下搅拌 1 小时。减压浓缩, 用 10 mL 水溶解, 用乙酸乙酯(3 × 10 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 20 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 得到 2-((1-氨基丙-2-基)(甲磺酰基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(300 mg, 产率 73.3%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 449.16$

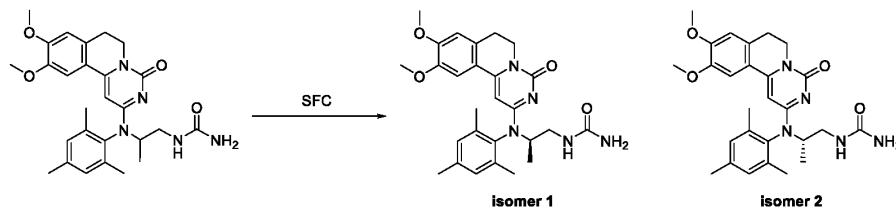
3.



将 2-((1-氨基丙-2-基)(甲磺酰基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮 (200 mg, 0.45 mmol, 1.0 当量), 三乙胺 (135 mg, 1.34 mmol, 3 当量) 和 异氰酸三甲基硅烷 (102.73 mg, 0.9 mol, 2 当量), 用 10 mL 二氯甲烷溶解, 在室温下搅拌 2 小时。减压浓缩, 用 10 mL 水溶解, 用乙酸乙酯(3 × 10 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 20 mL 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 减压浓缩。粗品用反相柱层析纯化, 条件如下 (色谱柱: Xselect CSH C185 m, 30 mm X 150 mm; 流动相 A: 水(0.1%FA), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 28% B 到 38% B 在 8 分钟; 波长: 254nm/220nm nm; RT1(min): 5.85/7.65)得到 1-(2-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)(甲磺酰氨基)丙基)脲 (100 mg, 产率 45.6%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 492.35$

4.



消旋体 (100 mg) 经 Chiral-HPLC 纯化, 条件为色谱柱: CHIRALPAK IE-3, 4.6*50mm, 3um; 流动相 A: DCM-HPLC, 流动相 B: ETOH: DCM=1:1; 流速: 18 mL/min; Gradient: 等度 20; 波长: 220 nm; RT1(min): 17.4; RT2(min): 21.8; 样品溶剂: MeOH-HPLC; 进样量: 0.45 mL; 运行次数: 5。得到产物。

化合物 1-1 (isomer 1, RT1(min): 17.4, 13.8 mg, 产率 22.14%)

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 492.35$

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.14 – 7.11 (d, $J = 10.1$ Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.49 (broad, 1H), 4.20 – 4.04 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 2.97 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.05 (s, 3H).

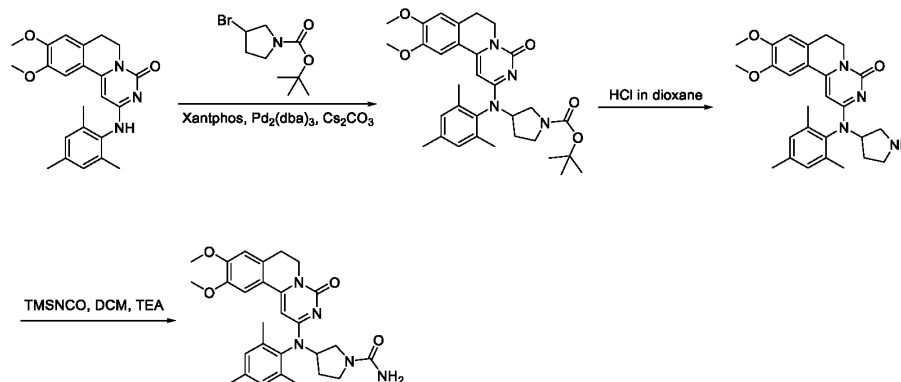
化合物 1-2 (isomer 2, RT2(min): 21.8, 13.0 mg, 产率 22.0%)

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 492.35$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.12 (d, $J = 10.1$ Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.49 (broad, 1H), 4.20 – 4.04 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 2.97 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.08 (s, 6H), 1.05 (s, 3H)。

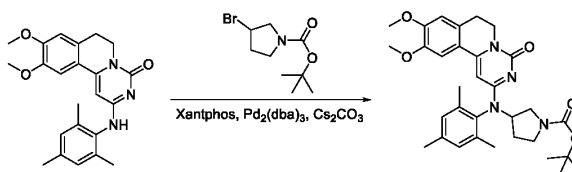
化合物 1-2 单晶衍射图如图 1。

5 实施例 2、化合物 2



制备步骤:

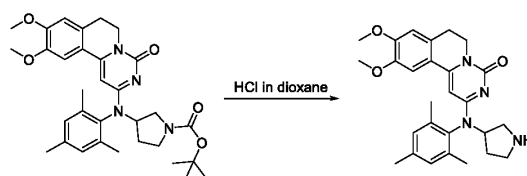
1.



10 将 9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (3.0 g, 7.7 mmol, 1.0 当量) 和 3-溴吡咯烷-1-甲酸叔丁酯 (2.3 g, 9.2 mmol, 1.2 当量) 溶于 1,4-二氧六环 (100 mL)，加入 Xantphos (0.9 g, 1.5 mmol, 0.2 当量)，碳酸铯 (5.0 g, 15.3 mmol, 2.0 当量) 和 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.7 g, 0.7 mmol, 0.1 当量)。在 100 °C 的氮气环境下搅拌 18 h 后，减压浓缩得到的混合物。残留物经反相纯化，条件如下：色谱柱，C18 硅胶柱；流动相，乙腈、水，0%-100% 梯度，30 分钟；检测器，紫外
15 254 纳米，得到 3-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯 (1.4 g, 收率 32.6%)。

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 561.3$

2.

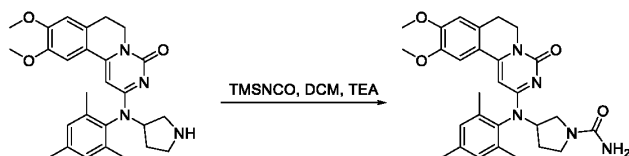


20 将 3-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯 (300 mg, 0.5 mmol, 1.0 当量) 与盐酸的 1,4-二氧六环溶液 (8 mL) 混合，所得混合物在室温下搅拌 1 h。所得混合物减压浓缩，得到 9,10-二甲氧基-2-[吡咯烷-3-基(2,4,6-三甲基苯基)氨基]

基]-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (300 mg, 粗品)。粗产物无需进一步纯化, 直接用于下一步骤。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 461.2$

3.

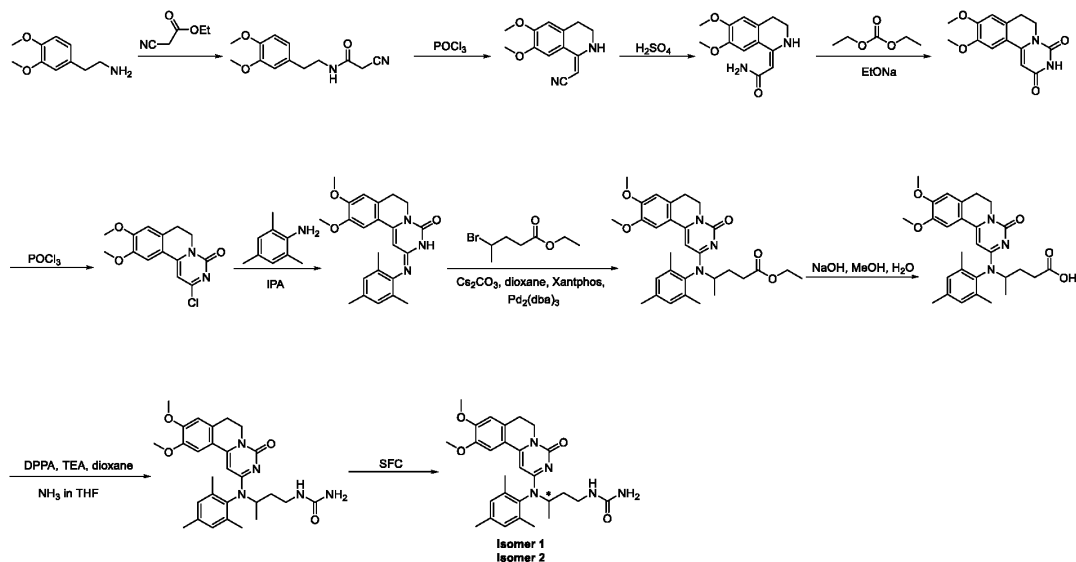


- 5 在室温下, 将 9,10-二甲氧基-2-[吡咯烷-3-基(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量) 溶于二氯甲烷 (4 mL), 加入 三乙胺 (109 mg, 1.1 mmol, 5.0 当量) 和异氰基三甲基硅烷 (38 mg, 0.3 mmol, 1.5 当量)。所得混合物在室温下搅拌 2h。所得混合物在减压下浓缩。粗产物在以下条件下进行反相纯化 (色谱柱: YMC-Triart C8 5.5 mmol/L, 流动相 A: 水 (10 mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 7 分钟内从 32%B 升至 50% B; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 6.23), 得到 3-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)吡咯烷-1-甲酰胺 (30.5 mg, 产率 27.4%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 504.25$

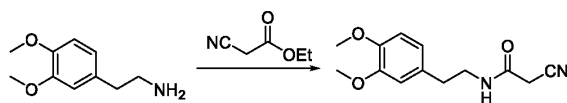
- ¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.13 (s, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.08 – 4.99 (m, 1H), 4.19 – 4.03 (m, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.58 – 3.52 (m, 1H), 3.29 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.25 – 3.18 (m, 1H), 2.96 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.29 – 2.22 (m, 1H), 2.17 – 2.15 (m, 6H), 1.77 (s, 1H)。

实施例 3、化合物 3-1 和化合物 3-2



制备步骤:

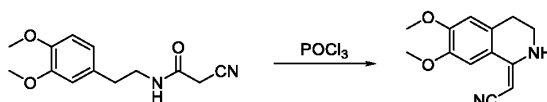
1.



单口瓶中依次加入二甲氧基苯乙胺 (50.0 g, 275.8 mmol, 1.0 当量) 和氰基乙酸乙酯, 氮气保护, 100 °C 下反应 16 h, 然后降温至 70 °C, 加入乙醇 (80 mL)。过滤, 滤饼用乙醇 (3 x 30 mL) 冲洗, 缩干滤饼中残留的乙醇得到 2-氰基-N-[2-(3,4-二甲氧基苯基)乙基]乙酰胺 (50.0 g, 73.0%收率)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 249.2$

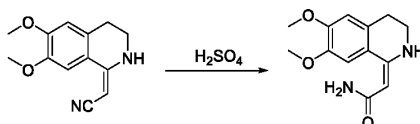
5 2.



在单口瓶中依次加入 2-氰基-N-[2-(3,4-二甲氧基苯基)乙基]乙酰胺 (50.0 g, 201.3 mmol, 1.0 当量) 和三氯氧磷(500 mL), 氮气保护, 85 °C 下反应过夜。缩干溶剂, 加入水 (300 mL), 用 DCM (3 x 400 mL) 萃取, 合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 缩干有机相得到 2-[(1E)-6,7-二甲氧基-3,4-二氢-2H-异喹啉-1-亚基]乙腈 (45.0 g, 97.0%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 231.2$

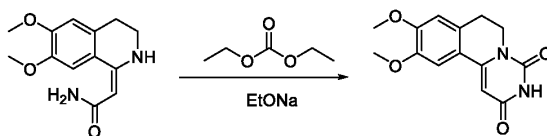
3.



在单口瓶中依次加入 2-[(1E)-6,7-二甲氧基-3,4-二氢-2H-异喹啉-1-亚基]乙腈 (45.0 g, 195.4 mmol, 1.0 当量) 和浓硫酸 (320 mL), 室温下反应 3 h。将反应液缓慢倒入冰水中 (1 L), 在 0 °C 用氢氧化钠 (4 M) 调碱至 pH=7, 用 EtOAc (3 x 600 mL) 萃取, 合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 缩干有机相得到 2-[(1E)-6,7-二甲氧基-3,4-二氢-2H-异喹啉-1-亚基]乙酰胺 (40.0 g, 82.4%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 249.2$

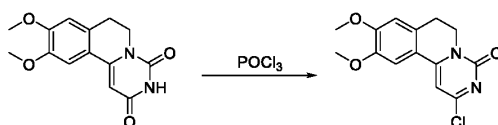
4.



在单口瓶中依次加入 2-[(1E)-6,7-二甲氧基-3,4-二氢-2H-异喹啉-1-亚基]乙酰胺 (40.0 g, 161.1 mmol, 1.0 当量)、乙醇 (600 mL) 和乙醇钠的乙醇溶液 (127 mL, 21%), 80°C 下反应 0.5 h, 然后在该温度下加入碳酸二乙酯(57.1 g, 483.3 mmol, 3.0 当量), 80°C 下反应过夜。冷却至室温, 加入水 (500 mL), 用稀盐酸调酸至 pH=7, 过滤, 滤饼用乙醇 (3 x 100 mL) 冲洗, 缩干滤饼中残留的乙醇得到 9,10-二甲氧基-3H, 6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2,4-二酮 (40.0 g, 90.5%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 275.2$

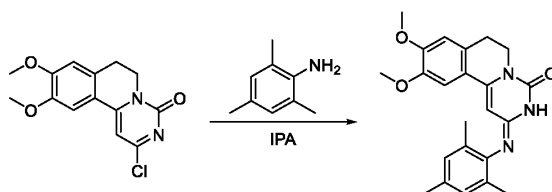
5.



在单口瓶中依次加入 9,10-二甲氧基-3H, 6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2,4-二酮 (40.0 g, 145.8 mmol, 1.0 当量) 和三氯氧磷(240 mL), 氮气保护, 100 °C 下反应过夜。缩干溶剂, 加水 (500 mL) 溶解, 用 DCM (3 x 500 mL) 萃取, 合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 缩干有机相得到 2-氯-9,10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (30.0 g, 70.2%)。

5 LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 293.2$

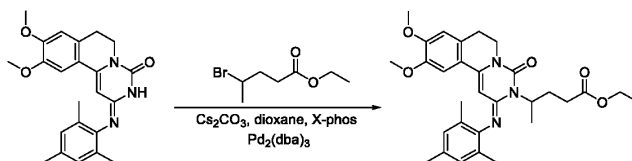
6.



在单口瓶中依次加入 2-氯-9,10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (2.0 g, 6.8 mmol, 1.0 当量)、异丙醇(50 mL) 和三甲基苯胺(4.6 g, 34.1 mmol, 5.0 当量), 氮气保护, 90 °C 下反应过夜。缩干溶剂, 加入 EA (20 mL) 和饱和碳酸氢钠水溶液 (200 mL), 过滤, 滤饼用 EA (3 x 50 mL) 冲洗, 缩干滤饼中残留的 EA 得到 (2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-3H, 6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (2.0 g, 74.8%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 392.2$

7.



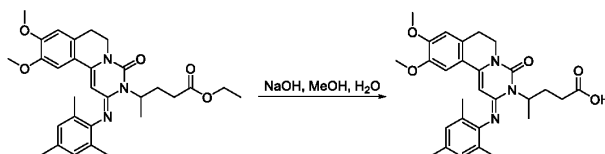
15

在单口瓶中依次加入 (2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-3H, 6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮(2.0 g, 5.1 mmol, 1.0 当量)、4-溴戊酸乙酯(2.1 g, 10.2 mmol, 2.0 当量)、1,4-二氧六环 (100 mL)、碳酸铯(5.0 g, 15.3 mmol, 3.0 当量)、Xantphos (0.6 g, 1.0 mmol, 0.2 当量)和 $Pd_2(dba)_3$ (0.5 g, 0.5 mmol, 0.1 当量), 氮气保护, 100 °C 下反应 12 h。用 DCM/MeOH(10/1)为流动相进行正相纯化得到 4-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基} (2,4,6-三甲基苯基)氨基)戊酸乙酯 (500 mg, 18.8%yield)。

20

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 520.3$

8.



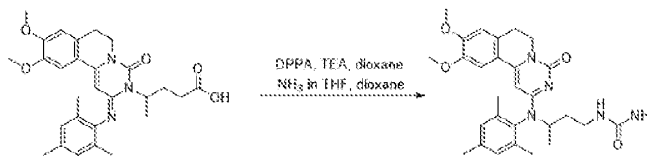
25

在单口瓶中依次加入 4-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基} (2,4,6-三甲基苯基)氨基)戊酸乙酯 (500 mg, 1.0 mmol, 1.0 当量)、甲醇 (50 mL) 和氢氧化钠 (77 mg, 2.0 mmol, 2.0 当量) 的水 (10 mL) 溶液, 室温下反应 3 h。缩干溶剂, 加水 (20 mL), 用稀盐酸调酸至 pH=5, 用

EA (3 x 50 mL) 萃取, 合并的有机相用无水硫酸钠干燥, 缩干有机相得到 4-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)戊酸 (450 mg, 95.1%yield)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 492.2$

9.



5

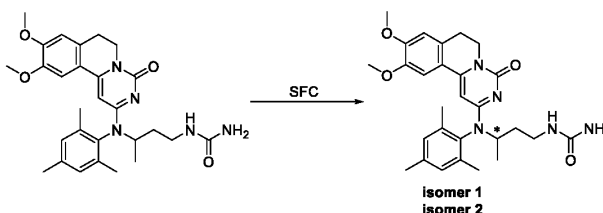
在三口瓶中依次加入 4-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)戊酸(300 mg, 0.6 mmol, 1.0 当量)、1,4-二氧六环 (100 mL)、三乙胺 (182 mg, 1.8 mmol, 3.0 当量) 和 DPPA (336 mg, 1.2 mmol, 2.0 当量), 氮气保护, 室温反应 1 h, 然后加热至 100 °C 并反应 1 h, 降温至 80 °C 并加入氨的四氢呋喃溶液 (1.4 M) (100 mL), 室温反应 2 h, 缩干溶剂, 进行反向 (柱型:

10 X-Bridge BEH C18 5 μ m, 30*150mm; 流动相 A: 水(10mmol/L NH_4HCO_3), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min mL/min; 梯度: 39% B to 48% B in 9 min; 波长: 254nm/220nm nm; RT1(min): 8) 纯化得到 3-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丁脒(94 mg, 30.46% 收率)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 506.3$

15

10.



粗品 3-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丁脒(50 mg) 经 Chiral-HPLC 拆分(柱型: CHIRAL ART Cellulose-SB, 2*25 cm, 5 μ m; 流动相 A: MtBE(0.1% DEA)-HPLC, 流动相 B: MeOH: DCM=1: 1-HPLC; Flow rate: 20 mL/min; 梯度: isocratic; 波长: 254 nm; 20 RT1(min): 5.3; RT2(min): 7.2; Sample Solvent: MeOH: DCM=1: 1-HPLC; 注射量: 1 mL; Number Of Runs: 5) 得到产物。

化合物 3-1 (isomer 1, RT1(min): 5.3, 17.6 mg, 34.78%收率)

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 506.50$

25 ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.16 – 7.08 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.59 – 4.55 (m, 1H), 4.19 – 4.02 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.38 – 3.34 (m, 1H), 3.25 – 3.21 (m, 1H), 2.97 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.34 – 2.30 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.80 – 1.76 (m, 1H), 0.99 (d, J = 6.9 Hz, 3H).

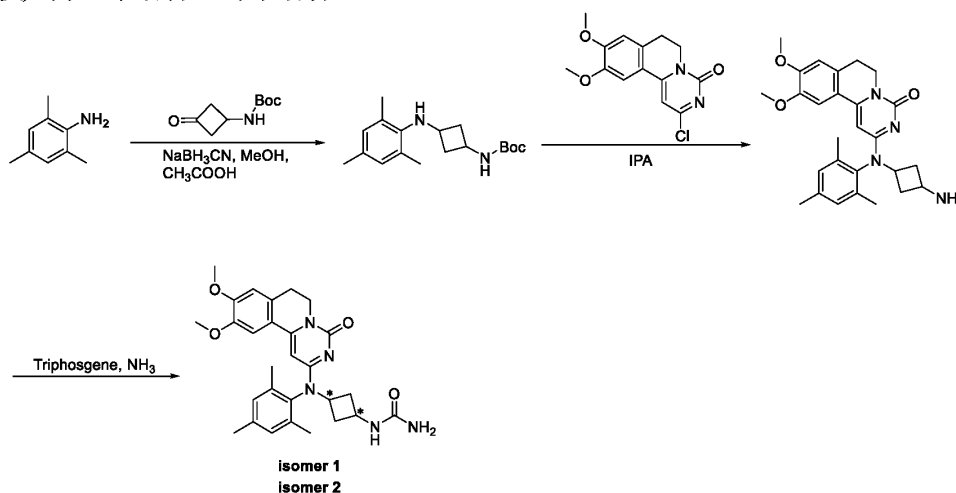
化合物 3-2 (isomer 2, RT2(min): 7.2, 17.8 mg, 34.78%收率)

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 506.50$

30 ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.16 – 7.08 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.59 –

4.45 (m, 1H), 4.19 – 4.02 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.38 – 3.34 (m, 1H), 3.25 – 3.21 (m, 1H), 2.97 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.34 – 2.30 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.80 – 1.76 (m, 1H), 0.99 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H)。

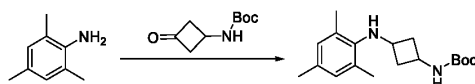
实施例 4、化合物 4-1 和化合物 4-2



5

制备步骤:

1.

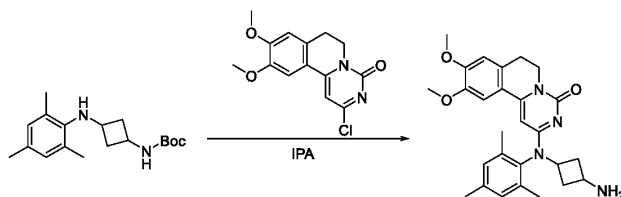


在室温和空气环境下，把 2,4,6-三甲基苯胺 (3.0 g, 22.2 mmol, 1.0 当量) 溶解在 MeOH (30 mL) 中，加入 NaBH_3CN (1.0 g, 44.3 mmol, 2.0 当量) 和 乙酸 (1 mL, 17.4 mmol, 0.7 当量)。所得混合物在室温氮气环境下搅拌过夜。所得混合物在减压下浓缩。反应物在室温下用水淬灭。所得混合物用乙酸乙酯 (2 x 100 mL) 萃取。合并的有机相用饱和食盐水 (3 x 200 mL) 洗涤，用无水硫酸钠干燥。减压浓缩滤液，得到 N-{3-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]环丁基}氨基甲酸叔丁酯 (1.2 g, 收率 16%)。

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 305.1$

15

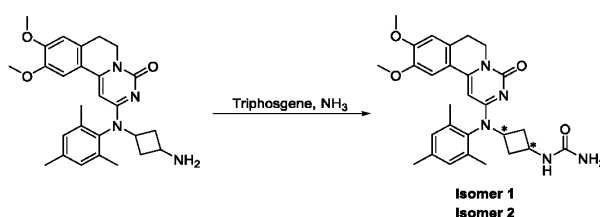
2.



将 N-{3-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]环丁基}氨基甲酸叔丁酯 (1.2 g, 3.9 mmol, 1.0 当量) 和 2-氯-9,10-二甲氧基-6H,7H-吡啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (1.3 g, 4.7 mmol, 1.2 当量) 在室温下加入异丙醇 (15 mL) 中。将反应混合物加热至 100 °C，并在 100 °C 的氮气环境下搅拌过夜。所得混合物在减压下浓缩。残留物经硅胶柱色谱纯化，用石油醚/乙酸乙酯 (2/1) 洗脱，得到 2-[(3-氨基环丁基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-吡啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (150 mg, 产率 6%)。

LC-MS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 461.2$

3.



室温下，在空气中把 N1-(2,4,6-三甲基苯基)环丁烷-1,3-二胺 (150 mg, 0.7 mmol, 1.0 当量) 用 DCM (1 ml) 溶解，溶液中加入固体光气 (193 mg, 0.6 mmol, 2.0 当量)。所得混合物在室温氮气环境下搅拌 1 小时。室温下，向上述混合物中加入氨气的甲醇溶液 (15 mL, 7 M)。所得混合物在室温下再搅拌过夜。所得混合物在减压下浓缩。残留物经反相快速色谱纯化，条件如下：色谱柱，C18 硅胶；流动相，乙腈 水 (10 mmol/L NH_4HCO_3)，30%–47% 梯度，7 分钟；检测器，紫外 254 纳米。粗产物通过预高效液相色谱法纯化，条件如下 (色谱柱：CHIRAL ART Cellulose-SB, 2*25 cm, 5 μm ；流动相 A: MtBE(0.1% DEA)-HPLC，流动相 B: MeOH: DCM=1: 1-HPLC；流速: 20 mL/min；梯度: 等度；波长: 220 nm；RT1(min): 6.5; RT2(min): 9.4; Sample Solvent: 进样量: 0.7 mL; 运行次数: 3)，得到产物。

化合物 4-1 (isomer 1, RT1(min): 6.5, 16.3 mg, 9% 收率)

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 504.30$

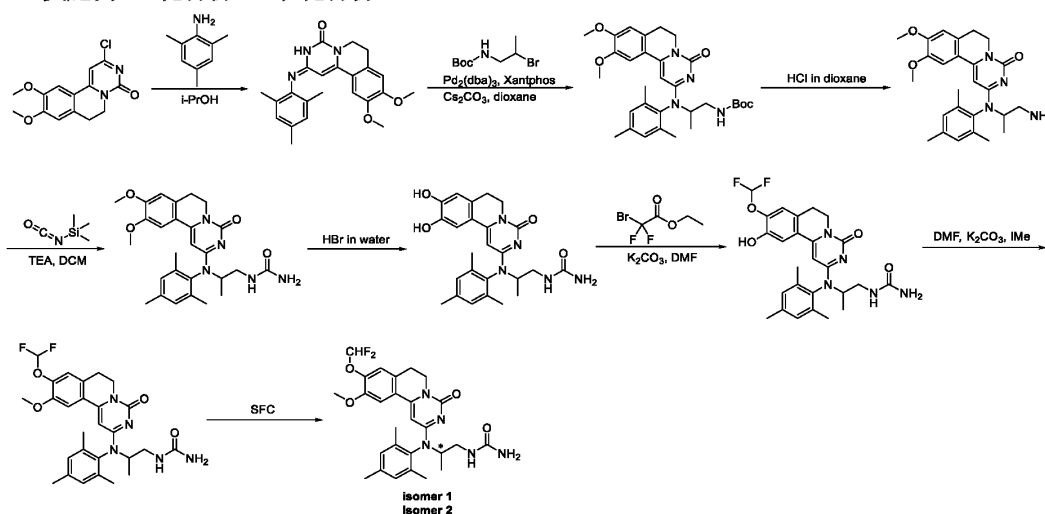
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.20 (s, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 4.56 – 4.47 (m, 1H), 4.28 – 4.15 (m, 1H), 4.03 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.90 – 3.88 (m, 6H), 2.93 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.78 – 2.66 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.23 (s, 6H), 1.88 – 1.73 (m, 2H).

化合物 4-2 (isomer 2, RT2(min): 9.4, 15.5 mg, 10% 收率)

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 504.40$

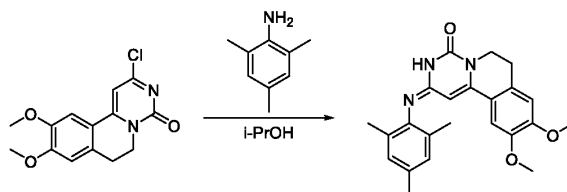
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.26 (s, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.05 – 4.90 (m, 1H), 4.28 – 4.15 (m, 1H), 4.04 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.92 (s, 6H), 2.95 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.34 – 2.32 (m, 7H), 2.22 (s, 6H)。

实施例 5、化合物 5-1 和化合物 5-2



制备步骤:

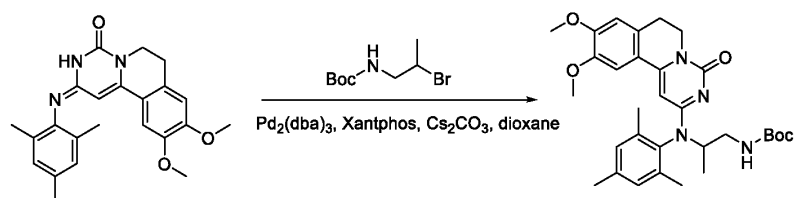
1.



将2-氯-9,10-二甲氧基-6h, 7h -嘧啶[4,3- A]异喹啉-4- 1 (200 mg, 0.7 mmol, 1.0 当量)和2,4,6-三甲基苯胺(369 mg, 2.7 mmol, 4.0 当量)溶于异丙醇(4 mL)中, 在90°C氮气保护下搅拌3小时。得到的混合物在减压下浓缩。柱层析纯化, 用DCM/ MeOH(10/1), 得到(2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚胺]-3h,6H, 7h -嘧啶[4,3-a]异喹啉-4- 1 (100 mg, 产率 37.39%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 392.1$

2.



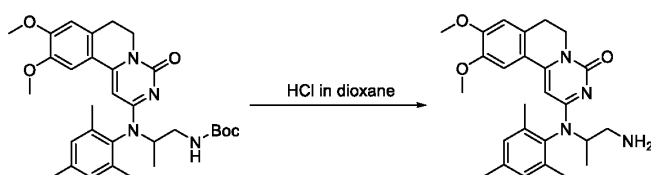
10

将叔丁基 2-溴丙基氨基甲酸酯 (304 mg, 1.3 mmol, 1.0 当量)和Cs₂CO₃ (1.0 g, 3.9 mmol, 3.0 当量)加入到(2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚胺]-3h,6H,7H-pyrimido[4,3-a]异喹啉- 1 (500 mg, 1.3 mmol, 1.0 当量)和二甲氧六烷(10 mL)的混合溶液中, 氮气保护下加入Pd₂(dba)₃ (117 mg, 0.1 mmol, 0.1 当量)、Xantphos (74 mg, 0.1 mmol, 0.1 当量)。所得混合物在80°C氮气保护下搅拌6小时。得到的混合物在减压下浓缩。反相柱层析纯化, 条件为:色谱柱为C18 硅胶;流动相, 水, MeCN (0.1% FA), 梯度30%~70%, 15 min; 紫外, 254 nm。得到叔丁基 N-[2-[(9,10-二甲氧基-4-氧-6h, 7h -嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]丙基]氨基甲酸酯(400 mg, 产率 57.08%)。

15

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 549.6$

3.



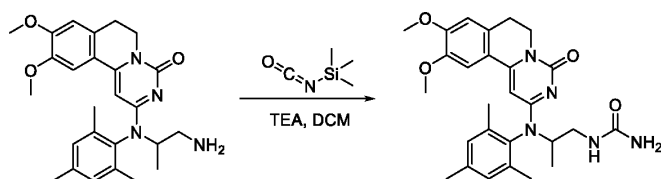
20

在25 mL 圆底烧瓶中加入 N-[2-[(9,10-二甲氧基-4-氧-6h, 7h -嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]丙基]氨基甲酸酯(100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)和HCl 的1,4-二氧六环 (2 mL, 4M)溶液。反应混合物在25°C氮气保护下搅拌1小时。得到的混合物在减压下浓缩。得到2-[(1-氨基丙烯-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6h, 7h -嘧啶[4,3-a]异喹啉-4- 1 (80 mg, 粗品)。

25

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 449.2$

4.

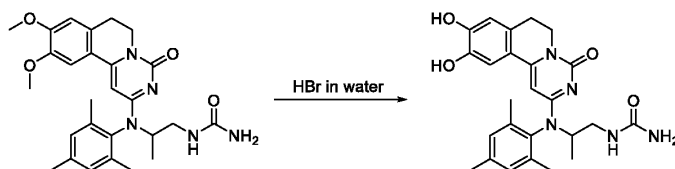


2-[(1-氨基丙烷-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-1 (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)和异氰基三甲基硅烷(38 mg, 0.3 mmol, 1.5 当量)在 DCM (5 mL)中搅拌, 25°C氮气保护下滴加 TEA (60 mg, 0.6 mmol, 3.0 当量)。反应混合物在 25°C氮气保护下搅拌 2 小时。得到的混合物减压浓缩。柱层析纯化, 色谱柱为 C18 硅胶; 流动相:ACN 水溶液(0.1% NH₃·H₂O), 梯度为 25%~75%, 20 min; 紫外, 254 nm。得到 2-({9,10-二甲氧基-4-氧-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基脒(80 mg, 产率 73.0%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 492.2

10

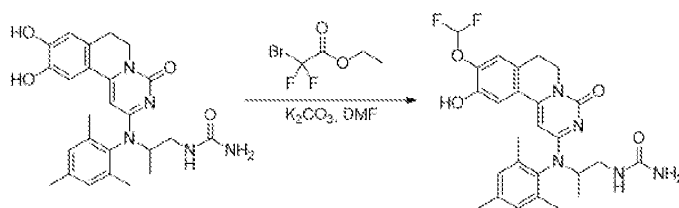
5.



在 50 mL 圆底烧瓶中加入 2-({9,10-二甲氧基-4-氧-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基脒(100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)和氢溴酸的水溶液(5 mL)。所得混合物在 120°C氮气保护下搅拌 3 小时。混合物用乙酸乙酯(2 × 50 mL)萃取, 有机层用饱和食盐水(3 × 100 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。得到 2-({9,10-二羟基-4-氧-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基脒(80 mg, 粗品)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 464.2

6.



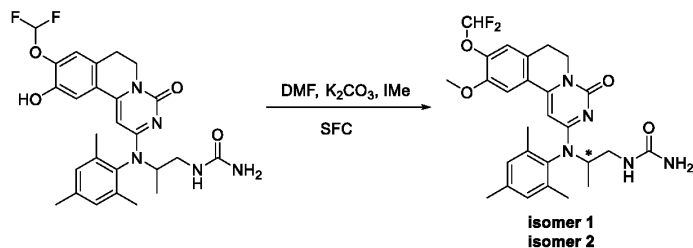
20

2-({9,10-二羟基-4-氧-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基脒(100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)和 K₂CO₃ (149 mg, 1.0 mmol, 5.0 当量)加入到 DMF (1.5 mL)中, 室温下滴加 2-溴-2,2-二氟乙酸乙酯(44 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)。反应混合物在 55°C氮气保护下搅拌 1.5 小时。得到的混合物在减压下浓缩。反相柱层析纯化, 条件为:色谱柱为 C18 硅胶;流动相, 水, ACN (0.1% FA), 梯度 20%~70%, 20 min;紫外, 254 nm。得到 2-({9-(二氟甲氧基)-10-羟基-4-氧-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基脒(10 mg, 产率 9.03%)。

25

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 514.2

7.



2-{{9-(二氟甲氧基)-10-羟基-4-氧- 6h, 7h -嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基}丙基脲
(10 mg, 0.02 mmol, 1.0 当量)和 K_2CO_3 (4 mg, 0.03 mmol, 1.5 当量), 溶剂 DMF (0.5 mL), 室温下滴加碘
5 甲烷(4mg, 0.03 mmol, 1.5 当量)。所得混合物在 60°C 氮气保护下搅拌 1.5 小时。得到的混合物在减压下
浓缩。采用高效液相色谱纯化, 柱型: XBridge BEH C18 5 μm , 30*150mm; 流动相 A: 水(10mmol/L
 NH_4HCO_3), 流动相 B: ACN; 流量: 60 mL/min; 梯度: 40% B 到 50% B, 8 分钟; 波长: 254nm/220nm nm;
RT1(min): 7.3 得到消旋产物。消旋产物采用手性高效液相色谱法(柱: 手性 ART Cellulose-SB, 2*25 cm, 5
 μm ; 流动相 A: MeOH: DCM= 1:1—HPLC, 流动相 B: MtBE(0.1% DEA)—HPLC; 流量: 20ml /min; 梯度:
10 等距 50; 波长: 220 nm; RT1(分钟): 4.4; RT2(分钟): 10.7; 样品溶剂: MeOH—HPLC; 注射量: 1ml)得到产物。

化合物 5-1 (isomer 1, RT1(min): 4.4, 1.54 mg, 产率 14.87%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 529.40$.

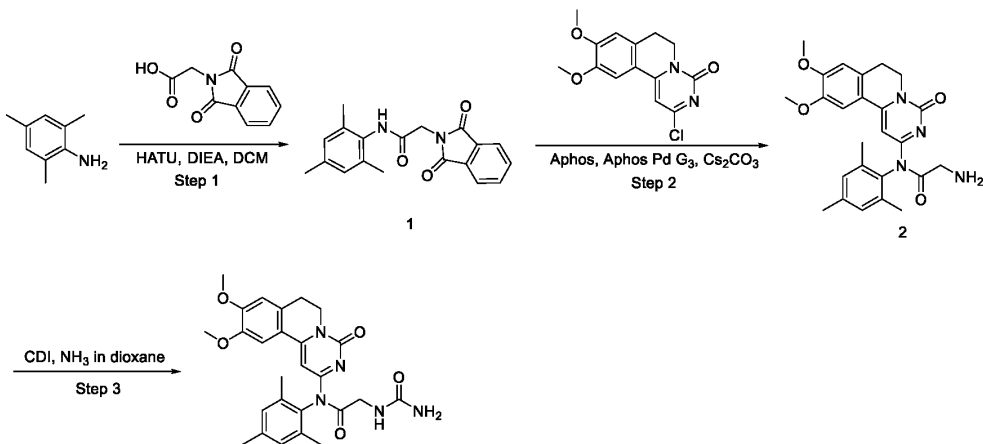
1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.20 – 7.05 (m, 3H), 6.95 – 6.82 (m, 1H), 6.80 (s, 1H), 5.49 (s, 1H),
4.49 (s, 1H), 4.16 – 4.10 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.97 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.10 (s, 3H),
15 1.35 – 1.28 (m, 2H), 1.06 (s, 3H).

化合物 5-2 (isomer 2, RT2(min): 10.7, 2.19 mg, 产率 20.9%)

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 529.45$

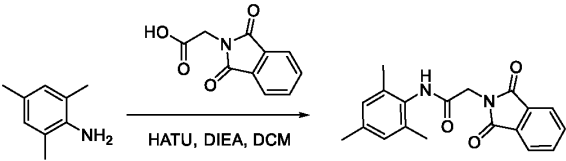
1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.20 – 7.05 (m, 3H), 6.95 – 6.82 (m, 1H), 6.80 (s, 1H), 5.49 (s, 1H),
4.49 (s, 1H), 4.16 – 4.10 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.96 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.11 (s, 3H),
20 1.35 – 1.28 (m, 2H), 1.06 (s, 3H)。

实施例 6、化合物 6



制备步骤:

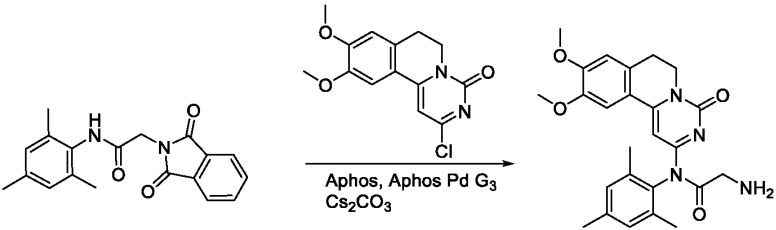
1.



将三甲基苯胺 (1.0 g, 7.4 mmol, 1.0 当量), N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)六氟磷酸脒 (3.4 g, 8.8 mmol, 1.2 当量) 和 N,N-二异丙基乙胺 (3.9 mL, 22.2 mmol, 3.0 当量) 用 20 mL 二氯甲烷溶解, 室温下搅拌 2 小时。减压浓缩, 用 10 mL 水溶解, 用乙酸乙酯(3 × 10 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 20 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗品用正相柱层析纯化, 条件如下 (流动相 A: 石油醚, 流动相 B: 乙酸乙酯; 流速: 60 mL/min; 梯度: 10% B to 50% B in 20 min; 波长: 254nm;) 得到 2-(1,3-二氧代异吲哚-2-基)-N-甲磺酰乙酰胺 (600 mg, 产率 25.17%)。

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 323.14

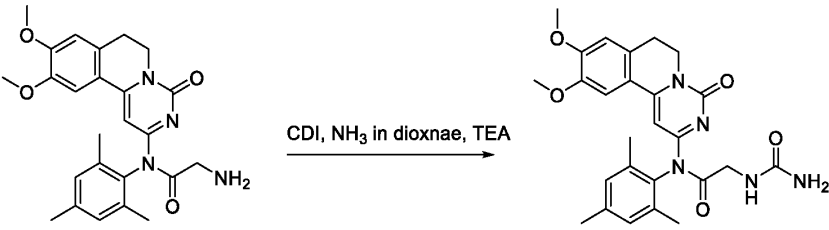
2.



将 2-(1,3-二氧代异吲哚-2-基)-N-(2,4,6-三甲基苯基)乙酰胺 (600 mg, 1.8 mmol, 1.0 当量), 2-氯-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶【6,1-A】异喹啉-4-酮 (653 mg, 2.2 mmol, 1.2 当量), O,O-(1-乙酰氧基-2,2,2-三氯乙基)膦酸二苯酯(118.40 mg, 0.186 mmol, 0.1 当量), 甲磺酸{[4-(N,N-(二甲氨基)苯基]二叔丁基膦基}(2'-氨基-1,1'-联苯-2-基)钯(II) (49.39 mg, 0.186 mmol, 0.1 当量) 和 碳酸铯 (1.5 g, 4.6 mmol, 2.5 当量) 用 10 mL 1,4-二氧六环溶解, 氮气保护, 110°C 搅拌过夜。减压浓缩, 用 10 mL 水溶解, 用乙酸乙酯 (3 × 20 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 20 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗品用反相柱层析纯化, 条件如下 (色谱柱: C18; 流动相 A: 水 (10mmol/L 碳酸氢铵) 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 30% B to 50% B in 20 min; 波长: 254nm;) 得到 2-氨基-N-(9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)-N-甲磺酰基乙酰胺(50 mg, 产率 5.04%)。

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 449.16

3.

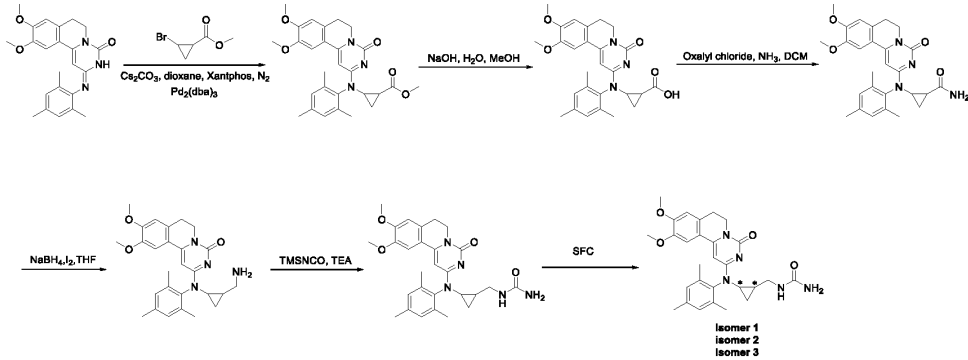


将 2-氨基-N-(9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)-N-甲磺酰基乙酰胺 (20 mg, 0.05 mmol, 1.0 当量), 三乙胺 (14 mg, 0.15 mmol, 3.0 当量) 和 N,N'-羰基二咪唑 (10.9 mg, 0.07 mmol, 1.5 当量) 用 2 mL 二氯甲烷溶解, 氮气保护, 0 °C 滴加 2 mL 胺的 1,4-二氧六环溶液, 室温搅拌 2 小时。粗品用反相柱层析纯化, 条件如下(色谱柱: SunFire C18 5 m, 30 mm X 150 mm; 流动相 A: 水 (0.1%甲酸), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min mL/min; 梯度: 45% B to 59% B in 7 分钟; 波长: 254 nm/220 nm; 时间: 5.92) 得到 N-(9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)-N-甲磺酰基-2-脒基乙酰胺(2.9 mg, 产率 13.10%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 475.20

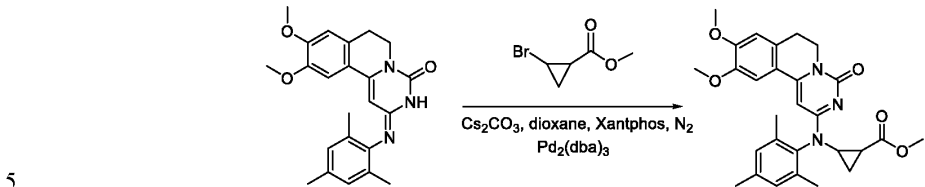
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.45 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.08 - 7.01 (m, 3H), 4.77 (s, 2H), 4.08 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 2.97 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.12 - 2.10 (s, 6H)。

实施例 7、化合物 7-1、化合物 7-2 和化合物 7-3



制备步骤:

1.



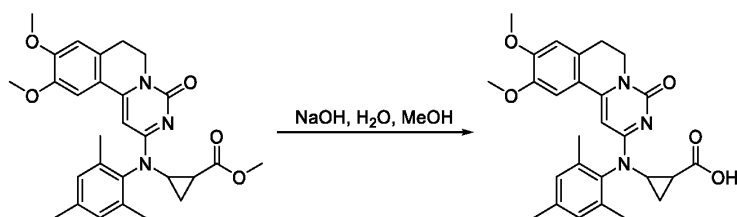
15

向在 1,4-二氧六环 (80 mL) 中的 2-溴环丙烷-1-甲酸甲酯 (200 mg, 1.1 mmol, 1.0 当量) 和 (2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚氨基]-3H,6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (437 mg, 1.1 mmol, 1.0 当量) 中加入碳酸铯 (1.1 g, 3.4 mmol, 3.0 当量), Xantphos (106 mg, 0.2 mmol, 0.2 当量) 和 Pd₂(dba)₃ (64 mg, 0.1 mmol, 0.1 当量)。在氮气环境下于 100 °C 搅拌 12h 后, 将所得混合物减压浓缩。残留物经硅胶柱色谱纯化, 用甲醇/二氯甲烷 (1/10) 洗脱, 得到粗产物。粗产物经色谱柱 (YMC Triart C18 ExRs 5 m, 30 mm * 150 mm; 流动相 A: 水 (10 mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 39% B 至 62% B, 10 分钟; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 8.33), 得到 2-[(2E)-9,10-二甲氧基-4-氧代-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚氨基]-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-3-基]环丙烷-1-甲酸甲酯 (100 mg, 产率 18.3%)。

25

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 490.2

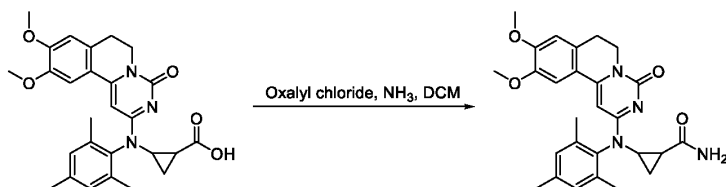
2.



室温下，向在甲醇（20 mL）中的 2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)环丙烷-1-甲酸甲酯（160 mg, 0.3 mmol, 1.0 当量）加入氢氧化钠（65 mg, 1.6 mmol, 5.0 当量）在水（5 mL）中的水溶液。上述混合物在 50 °C 下搅拌 18 h。反应完成后，反应液减压浓缩。所得混合物用乙酸乙酯（3 x 50 mL）萃取。水层用 6M 盐酸水溶液酸化至 pH=4。所得混合物用二氯甲烷（3 x 100 mL）萃取。合并的有机层用盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥。过滤后，减压浓缩滤液，得到 2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)环丙烷-1-羧酸（170 mg, 粗品）。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 476.2$

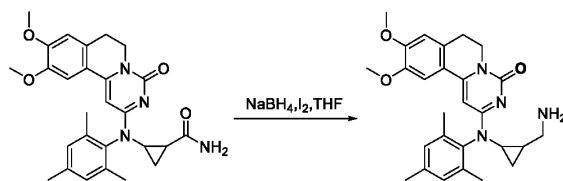
3.



向在二氯甲烷（10 mL）中的 2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)环丙烷-1-羧酸（170 mg, 0.4 mmol, 1.0 当量）滴加草酰氯（0.1 mL, 1.1 mmol, 3.0 当量）。所得混合物在氮气环境下于 0 °C 搅拌 1 h。所得混合物在减压下浓缩。粗产物直接使用，无需进一步纯化。将粗产物溶解在二氯甲烷（1 mL）中，并在 0 °C 下加入到氨的四氢呋喃溶液（60 mL, 1.3 M）中。所得混合物在 0 °C 下搅拌 1 h。所得混合物用乙酸乙酯（3 x 60 mL）萃取。合并的有机层用盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥。过滤后，减压浓缩滤液，得到 2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)环丙烷-1-甲酰胺（180 mg, 粗品）。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 475.2$

4.

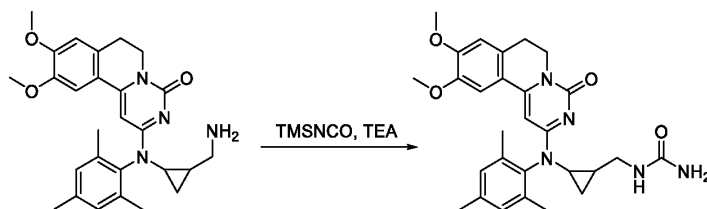


将 2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)环丙烷-1-甲酰胺（180 mg, 0.4 mmol, 1.0 当量）在四氢呋喃（20 mL）中的混合物冷却至 0 °C，并分批加入硼氢化钠（143 mg, 3.8 mmol, 10.0 当量）。将碘粒（963 mg, 3.8 mmol, 10.0 当量）溶解在四氢呋喃（3 mL）中加入所得混合物中。所得混合物在 70 °C 下搅拌 18 h。室温下加入水（30 mL）淬灭反应。所

得混合物用乙酸乙酯 (2 x 50 mL) 萃取。合并的有机层用盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥。过滤后, 减压浓缩滤液。残留物经 Prep-TLC 纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 10/1), 得到 2-([2-(氨基甲基)环丙基](2,4,6-三甲基苯基)氨基)-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (45 mg, 产率 25.8%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 461.2$

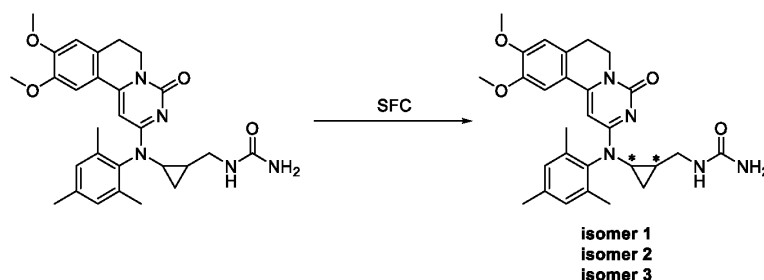
5 5.



将 2-([2-(氨基甲基)环丙基](2,4,6-三甲基苯基)氨基)-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (45 mg, 0.1 mmol, 1.0 当量)、三乙胺 (30 mg, 0.3 mmol, 3.0 当量) 和异氰酸三甲基硅烷 (23 mg, 0.2 mmol, 2.0 当量) 在 DCM (5 mL) 中的混合物在室温下搅拌 3h。所得混合物减压浓缩。粗产物 (45 mg) 经 Prep-HPLC 纯化, 条件如下 (色谱柱: XBridge BEH C18 OBD Prep Column 130, 5 mm, 19 mm * 250 mm; 流动相 A: 水 (10 mmol/L 碳酸氢铵); 流速: 25 mL/min; 梯度: 45% B to 67% B 10 分钟; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 7.93), 得到 2-([2-(羧基甲基)环丙基](2,4,6-三甲基苯基)氨基)-9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基 (20 mg, 产率 40.65%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 504.3$

15 6.



化合物 7-1, isomer 1 (色谱柱: CHIRAL ART Amylose-SA, 2*25 cm, 5 μ m; 流动相 A: 甲醇: 二氯甲烷=1: 1, 流动相 B: 甲基叔丁基醚 (0.1% 二乙胺) 流速: 20 mL/min; 梯度: 等度; 波长: 254 nm; RT1 (min): 6.7; 样品溶剂: 甲醇 (0.1% 二乙胺); 进样量: 1 mL; 运行次数: 3) 得到产物 (3.8 mg, 产率 12.43%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 504.30$

^1H NMR (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 7.10 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 4.25 – 4.06 (m, 2H), 3.90 (s, 4H), 3.68 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H), 2.48 – 2.40 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.43 – 1.31 (m, 2H).

25 化合物 7-2, isomer 2 (色谱柱: CHIRAL ART Amylose-SA, 2*25 cm, 5 μ m; 流动相 A: 甲醇: 二氯甲烷=1: 1, 流动相 B: 甲基叔丁基醚 (0.1% 二乙胺) 流速: 20 mL/min; 梯度: 等度; 波长: 254 nm; RT2 (min): 10.9; 样品溶剂: 甲醇 (0.1% 二乙胺); 进样量: 1 mL; 运行次数: 3) 得到产物

(3.5 mg, 产率 11.29%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 504.35$

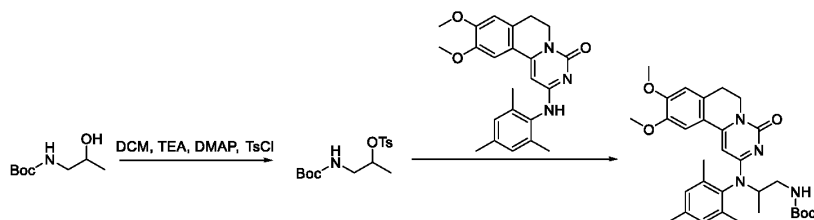
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.10 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 4.25 – 4.06 (m, 2H), 3.90 (s, 4H), 3.68 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H), 2.48 – 2.40 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.43 – 1.31 (m, 2H).

化合物 7-3, isomer 3 (色谱柱: XBridge BEH C18 OBD Prep Column 130, 5 m, 19 mm * 250 mm; 流动相 A: 水 (10 mmol/L 碳酸氢铵); 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 39% B to 61% B 9 分钟; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 5.45), 得产物 (20 mg, 产率 40.6%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 504.35$

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.10 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.02 – 6.89 (m, 2H), 6.70 (s, 1H), 5.57 (s, 1H), 4.61 (s, 6H), 4.27 – 4.04 (m, 2H), 4.05 – 3.91 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.85 – 3.72 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.05 – 2.95 (m, 2H), 2.92 – 2.87 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.31 – 2.14 (m, 8H)。

实施例 8、化合物 8



制备步骤

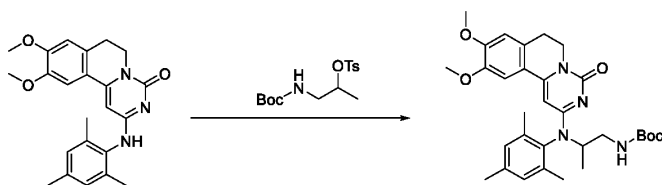
1.



将 *N*-(2-羟丙基)氨基甲酸酯叔丁酯 (15.0 g, 85.6 mmol, 1.0 当量) 和 TEA (26.0 g, 256.8 mmol, 1.5 当量) 在 DCM (80 mL) 中搅拌后, 在 0°C 下分批加入 DMAP (1.1 g, 8.6 mmol, 0.1 当量) 和 TsCl (21.2 g, 111.3 mmol, 1.3 当量)。将所得混合物在室温下搅拌 2 h。所得混合物用二氯甲烷 (3 x 200 mL) 提取。有机层用盐水洗涤, 在无水硫酸钠上干燥。过滤后的滤液在减压下浓缩, 经硅胶柱层析纯化, PE/EA (5/1) 洗脱得到 *N*-[2-[(4-甲基苯磺酰)氧]丙基]氨基甲酸酯 (20.3 g, 产率 71.9%)。

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 330.1$

2.



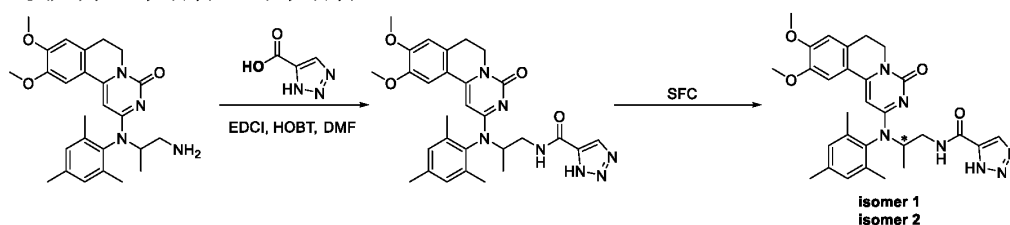
向 9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6h, 7h-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (1.6 g, 4.1 mmol, 1.0 当量) 的 1,4-二氧六环 (20 mL) 溶液中加入叔丁基 *N*-[2-[(4-甲基苯磺酰)氧]丙基]氨基甲酸酯 (2.0 g, 6.1 mmol, 1.5 当量), 碳酸铯 (2.7 g, 8.2 mmol, 2.0 当量), 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽 (0.5 g, 0.8 mmol,

0.2 当量) 和三(二亚苄基丙酮)二钯 (0.4 g, 0.4 mmol, 0.1 当量), 混合物用氮气换气后升温至 100 °C。氮气条件下, 混合物在 100 °C 下搅拌 5 h。反应体系用乙酸乙酯(3 x 200 mL)和水(150 mL) 萃取。有机相加入无水硫酸钠干燥后, 过滤旋蒸。所得残余物用反相柱层析纯化, 条件如下: 色谱柱: XBridge BEH C18, 5 μ m, 30*150 mm; 流动相 A: 水(10 mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 55% B to 65% B in 7 min; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 5.67/6.05。得到叔丁基 N-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]氨基甲酸酯(35.33 mg, 产率 1.55%)。

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 549.35$

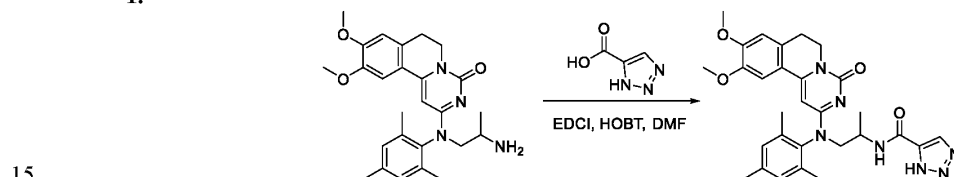
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.11 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.57 – 4.39 (m, 1H), 4.18 – 4.02 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.55 – 3.48 (m, 1H), 3.40 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 2.97 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.31 (s, 1H), 1.08 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H)。

实施例 9、化合物 9-1 和化合物 9-2



制备步骤:

1.



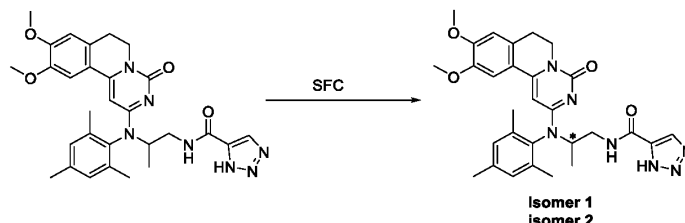
15

将 2-((1-氨基丙-2-基)(甲磺酰基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(150 mg, 0.33 mmol, 1.0 当量), 3H-1,2,3-三唑-4-羧酸(56 mg, 0.5 mmol, 1.5 当量), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二胺(96 mg, 0.5 mmol, 1.5 当量), 1-羟基苯并三唑(67 mg, 0.5 mmol, 1.5 当量)用 2 ml DMF 溶解, 氮气保护, 室温搅拌 1 小时, 减压浓缩。粗品用反相柱层析纯化, 条件如下 (色谱柱: Xselect CSH C185 m, 30 mm X 150 mm; 流动相 A: 水 (0.1%FA), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 27% B to 55% B in 9 min; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 6.77/8.43) 得 N-(2-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)(甲磺酰基)丙基)-1H-1,2,3-三唑-5-甲酰胺 (30 mg, 产率 16.5%)。

20

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 544.25$

2.



25

消旋体 (30 mg) 经 Chiral-SFC 纯化, 条件如下 (色谱柱: CHIRALPAK IH 3*25 cm, 5 μ m; 流动相 A: CO₂, 流动相 B: 甲醇 (0.1% 2M NH₃-MeOH); 流速: 85 mL/min; 梯度: 等度 35% B; 柱温 (°C): 35; 压力 (bar): 100; 波长: 220 nm; RT1 (min): 2.92; RT2 (min): 4.42; 样品溶剂: DCM (0.1% 2M NH₃-MeOH)-HPLC; 进样量: 1 mL) 得产物

5 **化合物 9-1** (isomer 1, RT1 (min): 2.92, 9.2 mg, 产率 28.58%)

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 544.25$

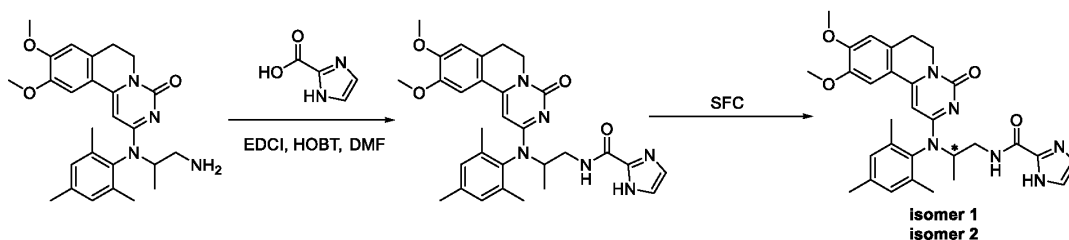
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.25 (s, 1H), 7.15 – 7.11 (m, 2H), 6.99 – 6.92 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.23 – 4.04 (m, 2H), 3.95 – 3.88 (m, 4H), 3.85 – 3.75 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.31 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

10 **化合物 9-2** (isomer 2, RT2 (min): 4.42, 8.8 mg, 收率 24.5%)

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 544.25$

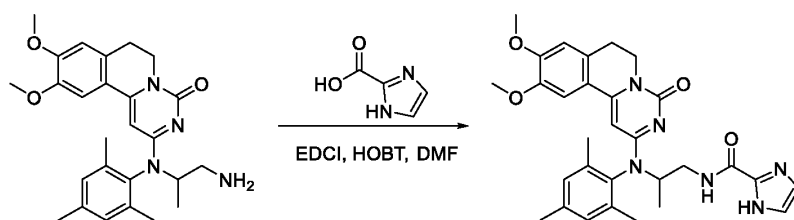
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.25 (s, 1H), 7.15 – 7.11 (m, 2H), 6.99 – 6.92 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.23 – 4.04 (m, 2H), 3.95 – 3.88 (m, 4H), 3.85 – 3.75 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.31 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

15 **实施例 10、化合物 10-1 和化合物 10-2**



制备步骤:

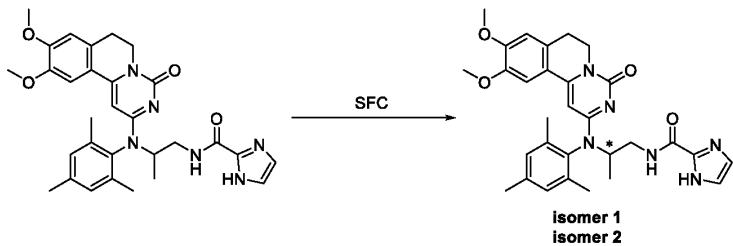
1.



20 将 2-((1-氨基丙-2-基)(甲磺酰基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(150 mg, 0.33 mmol, 1.0 当量), 咪唑-2-甲酸(56 mg, 0.5 mmol, 1.5 当量), 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二胺(96 mg, 0.5 mmol, 1.5 当量), 1-羟基苯并三唑(67 mg, 0.5 mmol, 1.5 当量)用 2 ml DMF 溶解, 氮气保护, 室温搅拌 1 小时, 减压浓缩。粗品用反相柱层析纯化, 条件如下 (色谱柱: Xselect CSH C18 5 m, 30 mm X 150 mm; 流动相 A: 水 (0.1% FA), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 27% B to 55% B in 9 分钟; 波
25 长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 6.77/8.43) 得到 N-(2-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)(甲磺酰胺基)丙基)-1H-咪唑-2-甲酰胺(70 mg, 产率 44.0%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 544.25$

2.



消旋体 (70 mg) 经 Chiral-SFC 纯化, 条件如下 (色谱柱: CHIRAL ART Cellulose-SB, 3*25 cm, 5 μm; 流动相 A: CO₂, 流动相 B: MeOH (0.1% 2M NH₃-MeOH); 流速: 100 mL/min; 梯度: 等度 25% B; 柱温 (°C): 35; 压力 (bar): 100; 波长: 220 nm; RT1 (min): 9.4; RT2 (min): 10.72; 样品溶剂: MeOH (0.1% DEA) 5 -HPLC; 进样量: 1 mL) 得到产物。

化合物 10-1 (isomer 1, RT1 (min): 9.4, 24.9 mg, 产率 34.5%)。

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 543.25

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.21 (s, 3H), 7.16 – 7.08 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.21 – 4.02 (m, 2H), 3.97 – 3.91 (m, 1H), 3.89 (s, 4H), 3.82 – 3.84 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.05 – 2.94 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.31 (s, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

化合物 10-2 (isomer 2, RT2 (min): 10.72, 24.4 mg, 产率 34.5%)

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 543.25

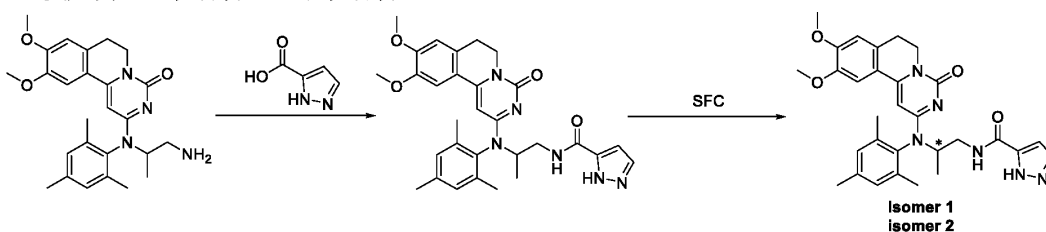
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.21 (s, 3H), 7.16 – 7.08 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.21 – 4.02 (m, 2H), 3.97 – 3.91 (m, 1H), 3.89 (s, 4H), 3.84 – 3.76 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.05 – 2.94 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.31 (s, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H) 。

分别合成化合物 98-化合物 125 (化合物 10 的衍生结构与氘代结构), 各化合物结构见表 1, MS 数据见表 3。

表 3

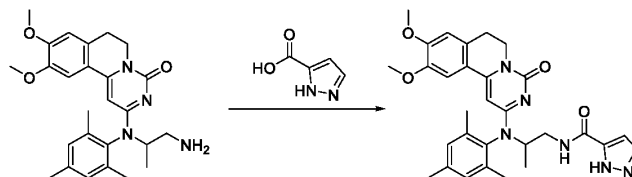
实施例编号	MS 值 [M+H] ⁺	实施例编号	MS 值 [M+H] ⁺
化合物 98	577.23	化合物 112	549.30
化合物 99	561.25	化合物 113	544.27
化合物 100	559.26	化合物 114	544.27
化合物 101	559.26	化合物 115	545.28
化合物 102	559.26	化合物 116	545.28
化合物 103	573.27	化合物 117	552.32
化合物 104	559.26	化合物 118	544.27
化合物 105	591.25	化合物 119	544.27
化合物 106	559.26	化合物 120	545.28
化合物 107	557.28	化合物 121	546.28
化合物 108	571.30	化合物 122	545.28
化合物 109	585.31	化合物 123	544.27
化合物 110	546.28	化合物 124	544.27
化合物 111	546.28	化合物 125	546.28

实施例 11、化合物 11-1 和化合物 11-2



制备步骤:

1.

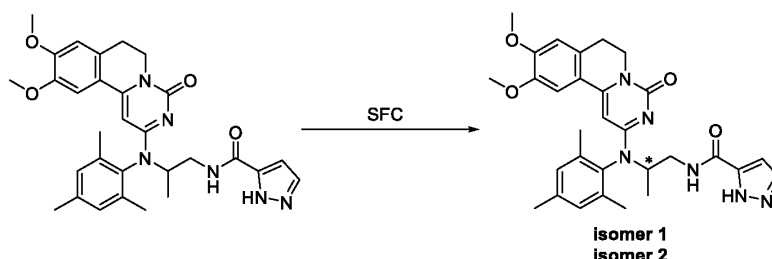


5

2H-吡唑-3-羧酸 (25 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量) 溶于 SOCl_2 (1 mL), 在氮气保护下室温搅拌 2 h。所得混合物真空浓缩旋干。将上述混合物溶于 DCM (1 mL), 在 0°C , 氮气保护下滴加到 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量) 和 N,N-二异丙基乙胺 (86 mg, 0.7 mmol, 3.0 当量) 的 DCM (5 mL) 溶液中。反应液在氮气保护下室温搅拌 2 h。反应液在室温下用水 (5 mL) 淬灭, 用乙酸乙酯 (3 x 10 mL) 萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。采用反相纯化, 条件为: 色谱柱为 C18 硅胶; 流动相, 水中 ACN (0.1% FA), 10%~50% 梯度, 10 min; 紫外检测器, 254 nm。纯化得到 N-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧-6h,7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]-2H-吡唑-3-甲酰胺 (40 mg, 产率 32.0%)。

15

2.



粗产物 (40 mg) 经色谱柱纯化: 色谱柱: CHIRALPAK IH 3*25 cm, $5\mu\text{m}$; 流动相 A: CO_2 , 流动相 B: ME OH (0.1% DEA); 流速: 80 mL/min; 梯度: 等度 40%B; 柱温 ($^\circ\text{C}$): 10°C ; 柱头温度 ($^\circ\text{C}$): 10°C ; 80 mL/min; 梯度: 40%B 等度; 柱温 ($^\circ\text{C}$): 35; 压 (bar): 100; 波长: 220 nm;

20 RT1 (min): 2.73; RT2 (min): 4.17; 样品溶剂: 进样量: 4.8 mL, 得到产物。

化合物 11-1 (isomer 1, RT1 (min): 2.73, 12.1 mg, 产率 9.6%)

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 543.55$

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.71 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.78

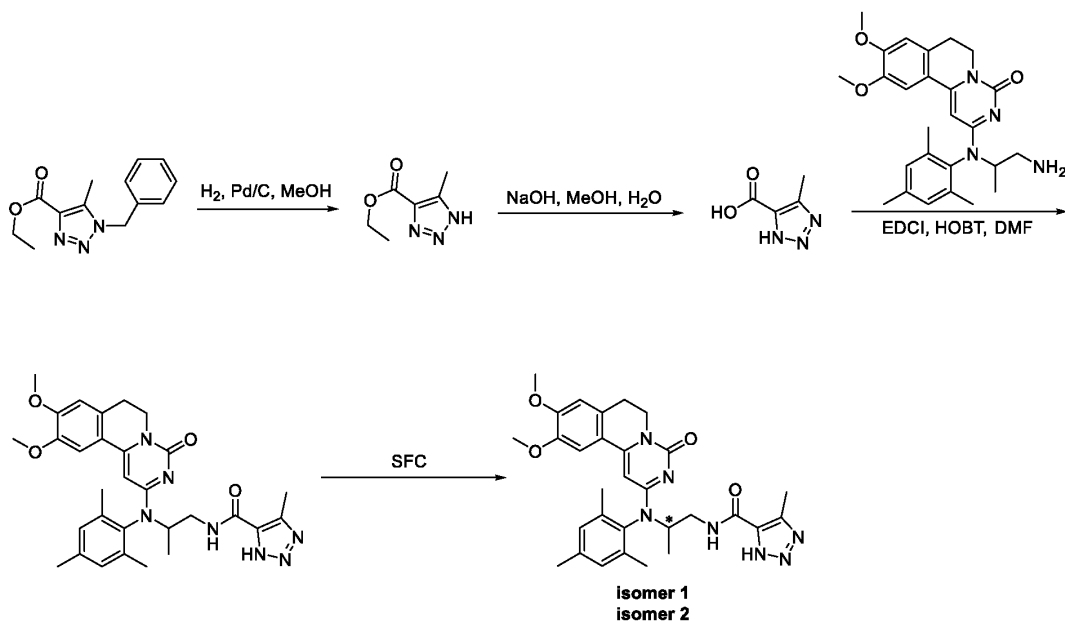
(d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.16 – 4.10 (m, 2H), 3.91 – 3.78 (m, 5H), 3.67 (s, 3H), 2.98 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

化合物 11-2 (isomer 2, RT2 (min): 4.17, 10.9 mg, 产率 26.6%)

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 543.35$

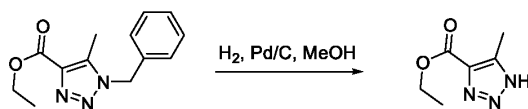
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.71 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.18 – 7.12 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.78 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.75 – 4.55 (m, 1H), 4.16 – 4.10 (m, 2H), 3.91 – 3.78 (m, 5H), 3.67 (s, 3H), 2.98 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

实施例 12、化合物 12-1 和化合物 12-2



制备步骤:

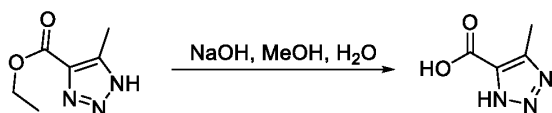
1.



在高压反应釜中, 向在 150 mL 甲醇 中的 1-苄基-5-甲基-1,2,3-三唑-4-羧酸乙酯(850 mg, 3.5 mmol, 1.0 当量) 加入钯碳 (10%, 2.90 g)。混合物在室温 20 bar 氢气压力下搅拌 18 小时, 用硅藻土过滤, 减压浓缩滤液。残留物经硅胶柱色谱纯化, 用 PE/EA (1/1) 洗脱, 得到 5-甲基-1-氢-1,2,3-三唑-4-羧酸乙酯 (260 mg, 产率 48.4%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 156.1$

2.

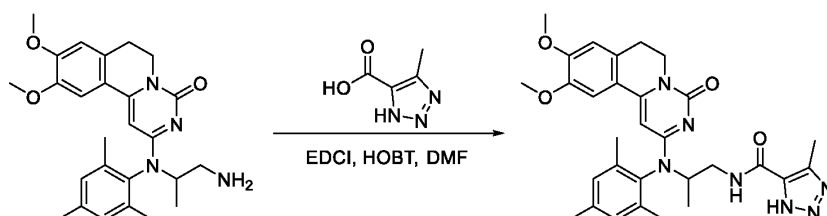


将 5-甲基-1-氢-1,2,3-三唑-4-羧酸乙酯 (260 mg, 1.7 mmol, 1.0 当量) 和 氢氧化钠 (201mg, 5.1

mmol, 3.0 当量) 在 甲醇 (10 mL) 和 水 (10 mL) 中的混合物在 60 °C 下搅拌 18 小时。所得混合物在减压下浓缩。用 2 摩尔盐酸水溶液将混合物酸化至 pH=5。所得混合物在减压下浓缩。残留物经反相色谱纯化, 条件如下: 色谱柱, C18 硅胶; 流动相, 乙腈、水, 0%-10% 梯度, 10 分钟; 检测器, 紫外 254 纳米, 得到 5-甲基-3H-1,2,3-三唑-4-羧酸 (200 mg, 产率 93.9%)。

5 LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 128.0$

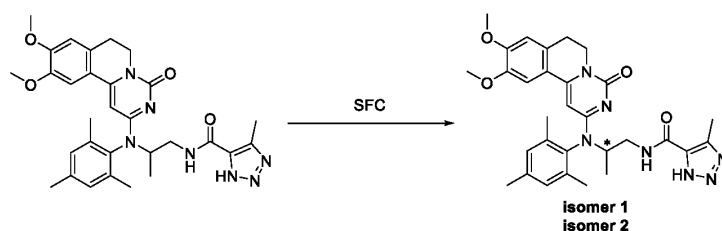
3.



室温下, 将 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量) 和 5-甲基-3H-1,2,3-三唑-4-羧酸 (28.3 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量) 溶解在 DMF (3 mL) 中, 加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (64 mg, 0.3 mmol, 1.5 当量) 和 1-羟基苯并三唑 (45 mg, 0.3 mmol, 1.5 当量)。所得混合物在室温下搅拌 2 h。所得混合物减压浓缩, 得到粗产物。粗产物在以下条件下进行反相纯化 (色谱柱: XBridge BEH Shield RP18 5 m, 30 mm * 150 mm; 流动相 A: 水 (10mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60ml/min; 梯度: 10 分钟内从 36% B 到 54% B; 波长: 254nm/220nm nm; RT1(min): 6.18), 得到 N-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]-5-甲基-3H-1,2,3-三唑-4-甲酰胺 (30 mg, 产率 24.1%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 558.3$

4.



20 粗品 (30 mg) 经 Chiral-HPLC 纯化, 条件如下: CHIRALPAK IH 3*25 cm, 5 μ m; 流动相 A: CO₂, 流动相 B: 甲醇 (0.1% 二乙胺); 流速: 85 mL/min; 梯度: 等度 35% B; 柱温 (°C): 25 °C; 背压 (bar): 100; 波长: 254nm; RT1(min): 2.85; RT2(min): 4.5 样品溶剂: 甲醇: 二氯甲烷=1: 1-HPLC; 进样量: 1 mL) 得到产物。

化合物 12-1 (isomer 1, RT1 (min): 2.85, 1.6 mg, 产率 5.14%)

25 LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 558.35$

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.17 – 7.10 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.78 – 4.69 (m, 1H), 4.20 – 4.04 (m, 2H), 3.97 – 3.77 (m, 5H), 3.67 (s, 3H), 2.98 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.59 – 2.52 (m,

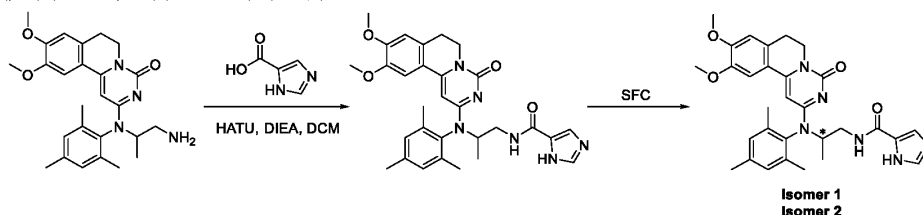
3H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.11 (d, $J=6.9$ Hz, 3H).

化合物 12-2 (isomer 2, RT2 (min): 4.5, 3.2 mg, 收率 9.86%)

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 558.46$

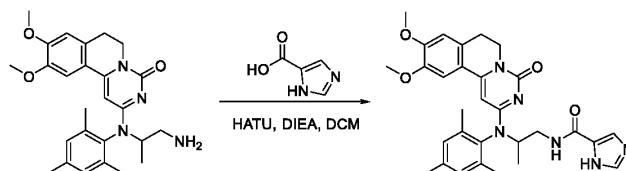
1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.17 – 7.10 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.78 – 4.69 (m, 1H), 4.20 – 4.04 (m, 2H), 3.97 – 3.77 (m, 5H), 3.67 (s, 3H), 2.98 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 2.59 – 2.52 (m, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.11 (d, $J=6.9$ Hz, 3H)。

实施例 13、化合物 13-1 和化合物 13-2



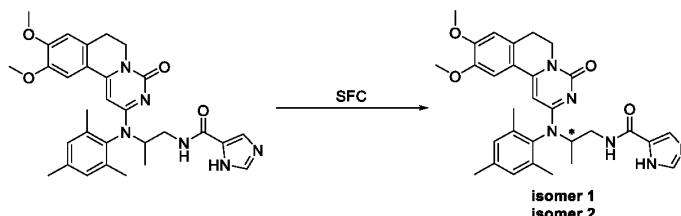
制备步骤:

10 1.



2-[1-(氨基丙-2-基)(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基]-9, 10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-4-酮 (100mg, 0.2mmol, 1.0 当量)、3H-咪唑-4-羧酸 (25 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)、HOBT (45 mg, 0.3mmol, 1.5 当量)、EDCI (64 mg, 0.3 mmol, 1.5 当量) 溶于 DMF (5 mL), 在室温氮气保护下 15 搅拌 2h。室温下用水 (10 mL) 淬灭反应液。水层用乙酸乙酯 (3 x 20 mL) 萃取, 有机层用饱和食盐水 (3 x 50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。用反相纯化, 条件如下: 色谱柱, C18 硅胶; 流动相, 乙腈 水 (0.1%FA), 10 分钟内梯度从 10%到 50%; 检测器, 紫外 254nm。纯化得到 N-[2-((9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基)(2, 4, 6-三甲基苯基)氨基)丙基]-3H-咪唑-4-甲酰胺 (20 mg, 产率 15.7%)。

20 2.



粗产物 (20 mg) 经 Chiral-HPLC 纯化: CHIRALPAK IH 3*25 cm, 5 μ m; 流动相 A: CO₂, 流动相 B: MeOH: DCM=2: 1(0.1%2MNH₃-MeOH); 流速: 100 mL/min; 梯度: 等度 18%B; 柱温 (°C): 20 °C; 柱头温度 (°C): 20 °C: 100 mL/min; 梯度: 等度 18%B; 柱温 (°C): 35; 背压 (巴): 100;

波长: 220 nm; RT1 (min): 14.2; RT2 (min): 21.37; Sample Solvent: DCM-HPLC; 进样量: 2 mL, 得产物。

化合物 13-1 (isomer 1, RT1 (min): 14.2, 2.04mg, 产率 1.6%)

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 543.20$

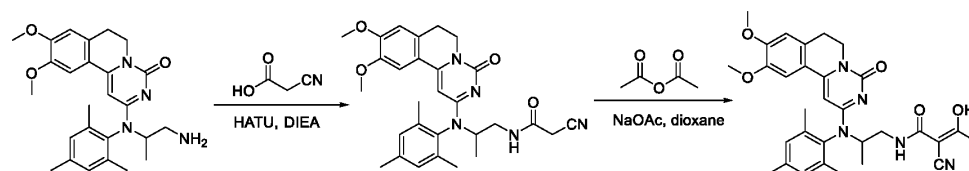
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.75 – 7.70 (m, 2H), 7.15 – 7.11 (m, 2H), 6.98 – 6.92 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.75 – 4.55 (m, 1H), 4.15 – 4.09 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.85 – 3.80 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 2.98 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.33 – 2.27 (m, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.16 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H).

化合物 13-2 (isomer 2, RT2 (min): 21.37, 2.72mg, 产率 13.0%)

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 543.20$

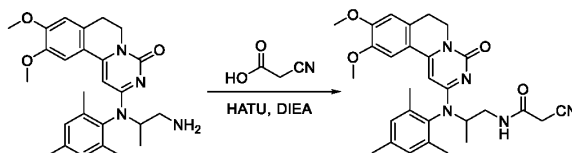
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.75 – 7.70 (m, 2H), 7.15 – 7.11 (m, 2H), 6.98 – 6.92 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.75 – 4.55 (m, 1H), 4.15 – 4.09 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.85 – 3.80 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 2.98 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.33 – 2.27 (m, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.16 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H)。

实施例 14、化合物 14



制备步骤:

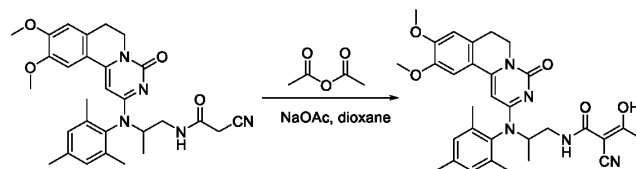
1.



在单口瓶中依次加入 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮(250 mg, 0.6 mmol, 1.0 当量)、DCM(5 mL)、DIEA(216 mg, 1.7 mmol, 3.0 当量)、氰基乙酸(57 mg, 0.7 mmol, 1.2 当量)和 HATU(318 mg, 0.8 mmol, 1.5 当量), 室温下反应过夜, 缩干溶剂, 进行反相(柱型, C18 silica gel; 流动相, 乙腈/水(10mmol/L NH₄HCO₃), 梯度 10% to 50% 30 分钟; 检测波长 254 nm)纯化, 得到 2-氰基-N-[2-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]乙酰胺(200 mg, 69.6% 收率)。

LCMS (ESI, *m/z*): $[M+H]^+ = 516.2$

2.



在单口瓶中依次加入 2-氰基-N-[2-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基)(2,4,6-

三甲基苯基(氨基)丙基]乙酰胺 (200 mg, 0.4 mmol, 1.0 当量)、1,4-二氧六环 (30 mL)、醋酸钠 (95 mg, 1.2 mmol, 3.0 当量) 和 醋酸酐 (48 mg, 0.5 mmol, 1.2 当量), 100 °C 下反应过夜。 缩干溶剂, 进行反相 (柱型: XBridge BEH Shield RP18 5 m, 30 mm *150 mm; 流动相 A: 水 (10 mmol/L NH_4HCO_3), 流动相 B: 乙腈, 流速: 60 mL/min; 梯度: 21% B to 44% B 9 分钟; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 6.82) 得到

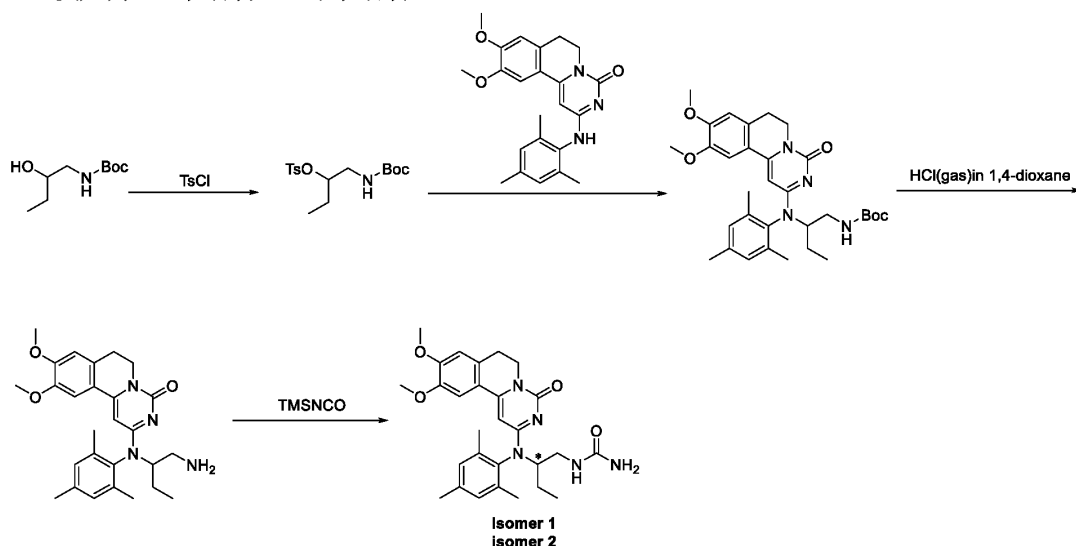
5 (2Z)-2-氰基-N-[2-(9,10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]-3-羟基-2-烯酰胺 (13.27 mg, 6.1% 收率)。

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 558.25$

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.15 – 7.05 (m, 2H), 7.07 – 6.88 (m, 2H), 6.63 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.68 – 4.59 (m, 1H), 4.21 – 4.12 (m, 2H), 4.11 – 4.05 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 2.98 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H),

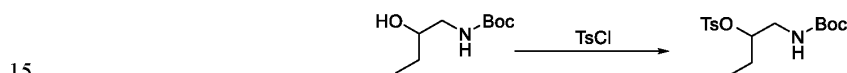
10 2.37 (s, 3H), 2.33 (s, 1H), 2.25 – 2.23 (m, 6H), 2.14 (s, 3H), 1.09 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H)。

实施例 15、化合物 15-1 和化合物 15-2



制备步骤:

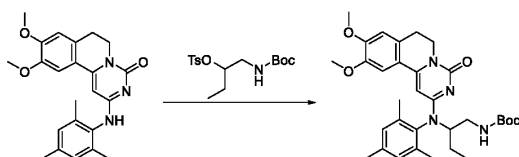
1.



在 0 °C 的空气环境下, 把 N-(2-羟基丁基)氨基甲酸叔丁酯 (500 mg, 2.6 mmol, 1.0 当量) 和 TEA (1.1 mL, 7.9 mmol, 3.0 当量) 溶解在 DCM (5 mL) 溶液中, 分别加入 TsCl (1.2 g, 3.9 mmol, 1.5 当量) 和 DMAP (32 mg, 0.3 mmol, 0.1 当量)。所得混合物在室温氮气环境下搅拌 1.5 小时。反应在室温下用水淬灭。所得混合物用二氯甲烷 (2 x 50 mL) 萃取。合并的有机层用饱和食盐水 (2 x 100 mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥。过滤后, 减压浓缩滤液。残留物通过反相纯化, 条件如下: 色谱柱, C18 硅胶; 流动相, ACN 水 (10 mmol/L NH_4HCO_3), 10 分钟内梯度从 10% 到 50%; 检测器, 紫外 254 nm, 得到 N-{2-[(4-甲基苯磺酰基)氧基]丁基}氨基甲酸叔丁酯 (700 mg, 产率 69%)。

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 361.2$

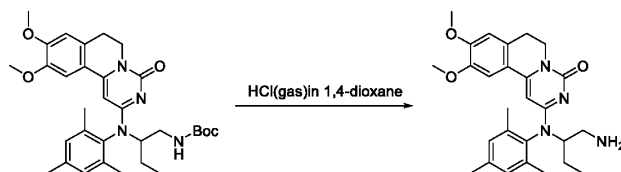
2.



把 9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (1.0 g, 2.5 mmol, 1.0 当量) 和 N-{2-[(4-甲基苯磺酰)氧基]丁基}氨基甲酸叔丁酯 (1.3 g, 3.8 mmol, 1.5 当量) 和 碳酸铯 (1.7 g, 5.108 mmol, 2.0 当量) 于 N,N-二甲基甲酰胺 (10 mL) 中, 在室温、空气气氛下加入 XantPhos (295 mg, 0.5 mmol, 0.2 当量) 和 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (233. mg, 0.3 mmol, 0.1 当量)。所得混合物在 100 °C 的氮气环境下搅拌过夜。反应在室温下用水淬灭。所得混合物用 乙酸乙酯 (2 x 50 mL) 萃取。合并的有机层用饱和食盐水 (2 x 100 mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥。过滤后, 减压浓缩滤液。残留物通过反相纯化, 条件如下: 色谱柱, C18 硅胶; 流动相, 乙腈/水 (10 mmol/L NH_4HCO_3), 50%-60% 梯度, 10 分钟; 检测器, 紫外 254 nm。最终得到 N-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基})(2,4,6-三甲基苯基)氨基]丁基]氨基甲酸叔丁酯 (330 mg, 粗品)。

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 563.2$

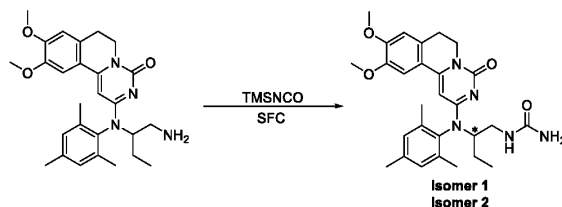
3.



在室温氮气环境下, 把 N-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基})(2,4,6-三甲基苯基)氨基]丁基]氨基甲酸叔丁酯 (330 mg, 0.6 mmol, 1.0 当量) 溶解在 1,4-二氧六环 (2 mL) 中, 加入盐酸的 1,4-二氧六环 (2 mL, 4M) 溶液。所得混合物在室温氮气环境下搅拌 1.5 小时。反应在室温下用水淬灭。用饱和碳酸钠溶液将混合物中和至 pH=9。所得混合物用乙酸乙酯 (2 x 50 mL) 萃取。合并的有机层用饱和食盐水 (2 x 100 mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥。过滤后, 减压浓缩滤液。残留物经 Prep-TLC 纯化 (DCM / MeOH=20/1), 得到 2-[(1-氨基丁-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (150 mg, 产率 49%)。

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 463.2$

4.



把 2-[(1-氨基丁-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (100 mg, 0.2 mmol, 1 当量) 和三乙胺 (65. mg, 0.6 mmol, 3.0 当量) 溶解在 DCM (1 mL) 中, 在 0 °C 的

空气下加入异氰基三甲基硅烷 (37 mg, 0.3 mmol, 1.5 当量)。所得混合物在室温氮气环境下搅拌 2 小时。所得混合物在减压下浓缩。粗产物 (50 mg) 经预液相色谱纯化, 条件 (色谱柱: XBridge BEHC185, 19*250mm; 流动相 A: 水 (10mmol/L NH_4HCO_3), 流动相 B: 乙腈; 流速: 25 mL/min; 梯度: 10 分钟内从 41%B 到 48%B; 波长: 254nm/220nm; RT(min): 7.25/8.32), 得到产物。

5 **化合物 15-1** (isomer 1, RT(min): 7.25, 4.02 mg, 收率 4%)

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 506.25$

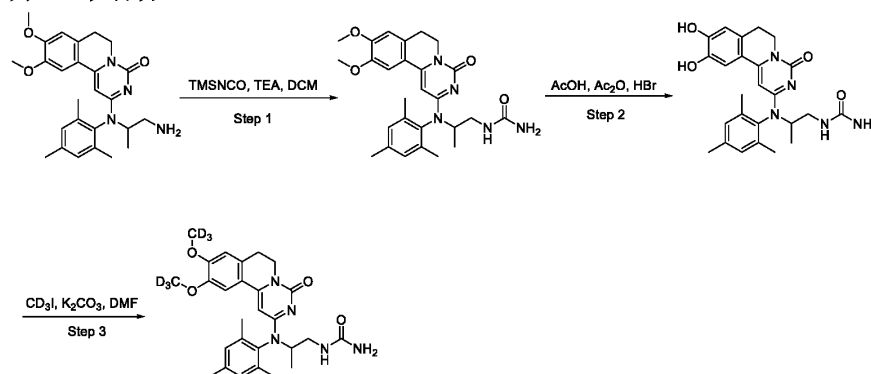
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.15 – 7.06 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.21 – 4.02 (m, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 4H), 2.97 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.66 – 1.52 (m, 2H), 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

10 **化合物 15-2** (isomer 2, RT(min): 8.32, 4.02 mg, 收率 4%)

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 506.25$

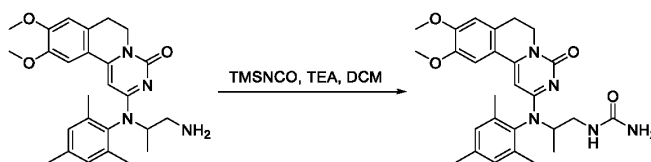
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.15 – 7.06 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.21 – 4.02 (m, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 4H), 2.97 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.66 – 1.52 (m, 2H), 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)。

15 **实施例 16、化合物 16**



制备步骤

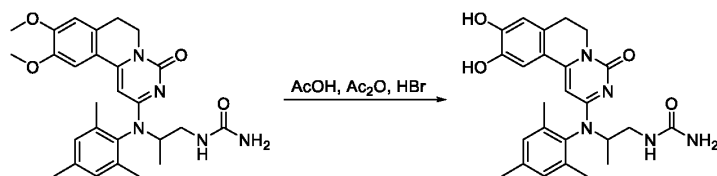
1.



20 室温下, 向 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (200 mg, 0.4 mmol, 1.0 当量)和三乙胺 (135 mg, 1.3 mmol, 3.0 当量)的二氯甲烷 (5 mL) 溶液中, 加入三甲基硅基异氰酸酯 (77 mg, 0.7 mmol, 1.5 当量)。室温下, 所得反应液搅拌反应 2 小时。反应混合物用二氯甲烷萃取 (3 x 20 mL)。合并有机相, 用饱和食盐水反洗, 无水硫酸钠干燥。所得混合物过滤后, 将滤液减压浓缩得到 2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙脒 (200 mg, 粗品)。

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 492.3$

2.



在室温下,向8 mL样品瓶内加入2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙脒 (200 mg, 0.4 mmol, 1.0 当量), 醋酸 (1 mL), 醋酸酐 (1 mL) 和氢溴酸 (1 mL)。

- 5 120 °C 下, 所得反应液搅拌反应过夜。反应混合物用饱和碳酸氢钠水溶液碱化到 pH=6。反应混合物用二氯甲烷和甲醇萃取 (3 x 50 mL)。合并有机相, 用饱和食盐水反洗 (3 x 50 mL), 无水硫酸钠干燥。所得混合物过滤后, 将滤液减压浓缩得到 2-({9,10-二羟基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙脒 (180 mg, 产率 95.4%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 464.2$

10

3.



室温下, 向 2-({9,10-二羟基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙脒 (150 mg, 0.3 mmol, 1.0 当量) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (9 mL) 溶液中, 加入碳酸钾 (268 mg, 1.8 mmol, 6.0 当量) 和氘代碘甲烷 (234 mg, 1.5 mmol, 5.0 当量)。室温下, 所得反应液搅拌反应过夜。所得粗品用反相柱层析纯化得到 2-({9,10-二(2H3)甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙脒 (25.92 mg, 产率 15.52%), 条件如下: (Column: Xbridge BEH Shield RP185 μ m, 30*150 mm; 流动相 A: 水 (10 mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 35% B to 45% B in 7 min; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 6.23。

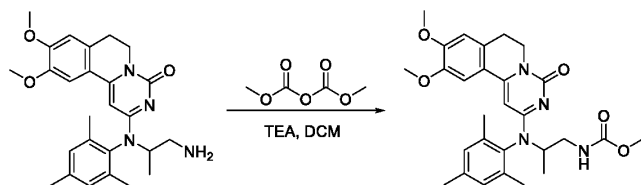
15

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 498.30$

20

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.11 (d, $J = 10.6$ Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.49 (s, 1H), 4.20 – 4.01 (m, 2H), 2.97 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.04 – 0.96 (m, 3H)。

实施例 17、化合物 17



25

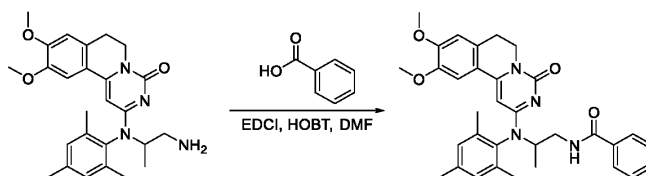
向 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (60

mg, 0.18 mmol, 1.0 当量)的 DCM (2 mL)溶液中加入三乙胺 (41 mg, 0.40 mmol, 3.0 当量)和二碳酸二甲酯 (36 mg, 0.27 mmol, 2.0 当量)。搅拌两小时后, 混合物减压旋蒸浓缩。粗产物(80 mg)经 Prep-TLC 正相纯化, EA/PE=1/3, 得到产物 *N*-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-*a*]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]氨基甲酸甲酯(23.01 mg, 产率 32.94%)。

5 LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 507.25$

^1H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.09 (m, 2H), 6.90 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.48 – 4.42 (m, 1H), 4.20 – 4.02 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.64 (s, 6H), 3.60 – 3.53 (m, 1H), 3.48 – 3.38 (m, 1H), 2.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H)。

实施例 18、化合物 18



10

将苯甲酸(76 mg, 0.62 mmol, 3.5 当量)的 DMF(1 mL)溶液中加入 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-*a*]异喹啉-4-酮(80 mg, 0.18 mmol, 1.0 当量), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (103 mg, 0.53 mmol, 3.0 当量), 1-羟基苯并三唑(72 mg, 0.53 mmol, 3.0 当量)。混合物搅拌 2 h。混合物减压浓缩, 粗产物(100 mg)经 Prep-TLC 纯化, EA/PE=1/5 得到 *N*-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-*a*]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]苯甲酰胺 (18.91 mg, 产率 19.11%)。

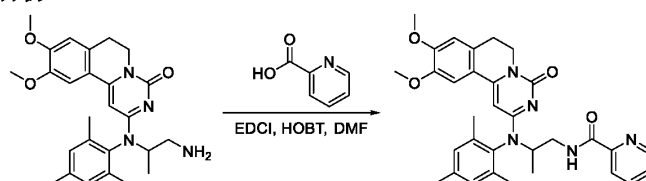
15

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 553.3$

^1H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.59 – 7.45 (m, 3H), 7.17 – 7.08 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 4.69 – 4.60 (m, 1H), 4.19 – 4.02 (m, 2H), 3.93 – 3.82 (m, 4H), 3.79 – 3.72 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.96 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)。

20

实施例 19、化合物 19



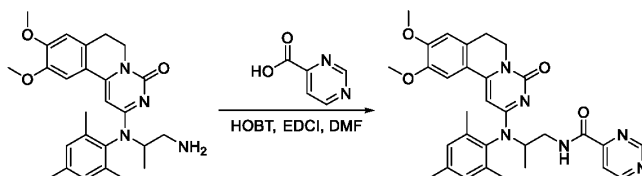
将 2-吡啶甲酸(41 mg, 0.34 mmol, 1.0 当量)的 DMF(1 mL)溶液中加入 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-*a*]异喹啉-4-酮(100 mg, 0.22 mmol, 1.0 当量), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (64 mg, 0.34 mmol, 1.5 当量), 1-羟基苯并三唑(45 mg, 0.34 mmol, 1.5 当量)。混合物搅拌 2 h。混合物减压浓缩, 粗产物(100 mg)经 Prep-HPLC 纯化, 得到 *N*-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-*a*]异喹啉-2-基}(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]吡啶-2-甲酰胺(17.35 mg, 产率 13.93%)。

25

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 554.25$

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.69 – 8.60 (m, 1H), 8.06 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.02 – 7.90 (m, 1H), 7.58 – 7.50 (m, 1H), 7.15 – 7.09 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.83 – 4.76 (m, 1H), 4.18 – 4.04 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 3.64 (s, 3H), 2.95 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.09 (d, J = 6.9 Hz, 3H)。

5 实施例 20、化合物 20



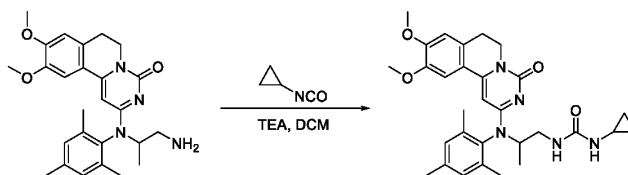
9,10-二甲氧基-2-[(1-氨基-2-丙基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-1(70 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)和嘧啶-4-甲酸(58 mg, 0.5 mmol, 3.0 当量), 溶剂 DMF (2 mL)溶解。室温下在上述混合物中加入 HOBT (63 mg, 0.5 mmol, 3.0 当量)和 EDCI (90 mg, 0.5 mmol, 3.0 当量), 室温下搅拌 2 h。

10 粗产物经 Prep-HPLC 纯化, 条件如下(色谱柱: XBridge BEH C18 5 μm , 30*150mm; 流动相 A: 水(10mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 7 分钟内从 40% B 升至 47% B; 波长: 254nm/220nm nm; RT1(min): 6.45), 得到 N-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基})(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]嘧啶-4-甲酰胺(19.00 mg, 产率 21.34%)。

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 555.35$

15 ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 9.32 (s, 1H), 9.03 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.16 – 8.02 (m, 1H), 7.18 – 7.10 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.23 – 4.08 (m, 2H), 3.89 (d, J = 6.5 Hz, 5H), 3.67 (s, 3H), 2.98 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.23 – 0.98 (m, 3H)。

实施例 21、化合物 21



20 9,10-二甲氧基-2-[(1-氨基-2-丙基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-1(50 mg, 0.1 mmol, 1.0 当量), 溶剂 DCM (3 mL)溶解。室温下在上述混合物中加入异氰酰基环丙烷(14 mg, 0.2 mmol, 1.5 当量)和三乙胺(34 mg, 0.3 mmol, 3.0 当量), 室温下搅拌 2 h。粗产物经 Prep-HPLC 纯化, 条件如下(色谱柱 Xbridge BEH Shield RP18, 5 μm , 19*250mm; 流动相 A: 水(10mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 7 分钟内从 36% B 升至 50% B; 波长: 254nm/220nm; RT1(min): 6.05/6.5), 得到 3-环丙基-1-[2-({9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基})(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]脲(17.19 mg, 产率 28.92%)。

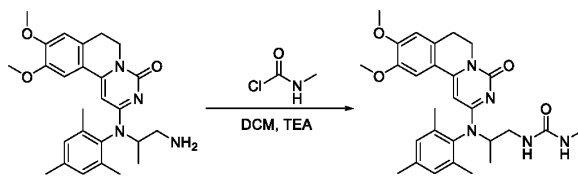
LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 532.30$

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.15 – 7.05 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.40 (s, 1H),

4.57 – 4.49 (m, 1H), 4.17 – 4.04 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.75 – 3.60 (m, 4H), 3.55 – 3.45 (m, 1H), 2.96 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.57 – 2.48 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.09 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.79 – 0.67 (m, 2H), 0.57 – 0.46 (m, 2H)。

实施例 22、化合物 22

5



10

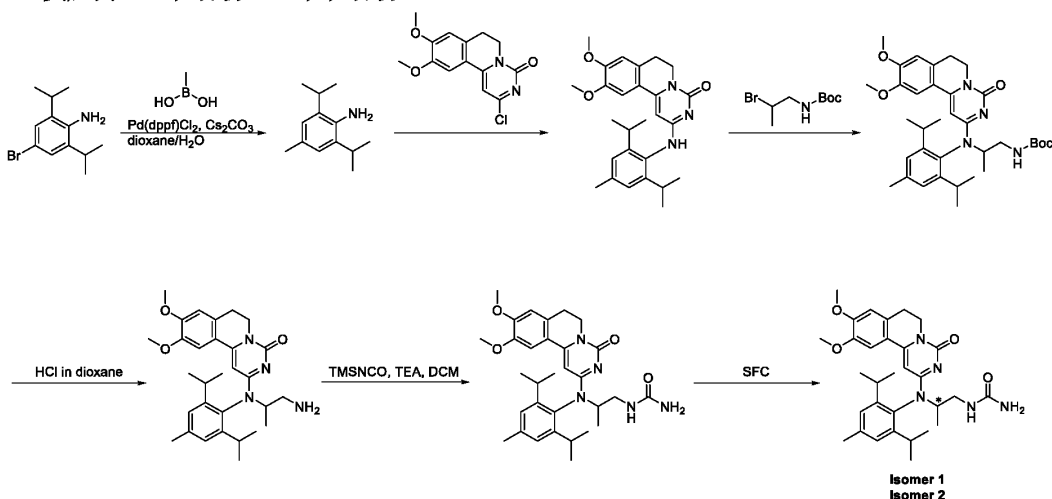
9,10-二甲氧基-2-[(1-氨基-2-丙基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-6h, 7h-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-1(70 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量)和三乙胺 (47 mg, 0.5 mmol, 3.0 当量), 溶剂 DCM (3 mL) 室温下溶解。在 0 °C 下向上述混合物中加入 N-甲基氨基甲酰氯 (22 mg, 0.2 mmol, 1.5 当量), 室温下搅拌 2 h。粗产物经 Prep-HPLC 纯化, 条件如下 (色谱柱: XBridge BEH C18 5 μ m, 30*150mm; 流动相 A: 水 (10mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 7 分钟内从 36% B 升至 48% B; 波长: 254nm/220nm; RT1(min): 6.37), 得到 1-[2-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶 [4,3-a]异喹啉-2-基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基)丙基]-3-甲基脲 (16.82 mg, 产率 21.25%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 506.30$

15

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.16 – 7.07 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.46 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.21 – 4.00 (m, 2H), 3.95 – 3.85 (m, 4H), 3.66 (s, 3H), 3.05 – 2.80 (m, 5H), 2.37 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.02 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H)。

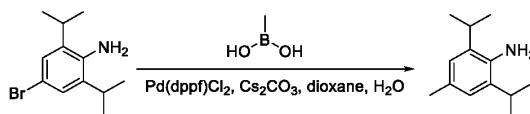
实施例 23、化合物 23-1 和化合物 23-2



制备步骤:

20

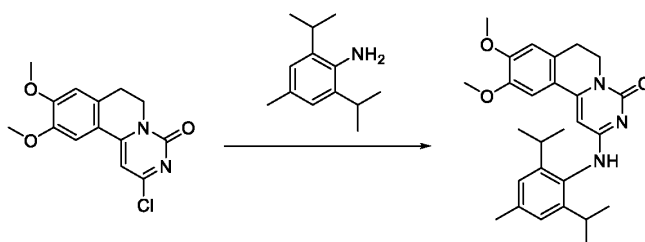
1.



将 4-溴-2, 6-二异丙基苯胺 (5 g, 20 mmol, 1.0 当量), 碳酸铯 (20.0 g, 60 mmol, 3 当量), [1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷络合物 (1.6 g, 2 mmol, 0.1 当量), 甲基硼酸 (5.8 g, 98 mmol, 5 当量)和 2-二环己基膦-2', 6'-二甲氧基联苯 (1.6g, 4 mmol, 0.2 当量) 用 1, 4-二氧六环 (90 mL)和水(15 mL)溶解, 氮气保护, 100 °C 搅拌过夜。冷却到室温, 用 100 mL 水溶解, 用乙酸乙酯 (3 × 100 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 100 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗品用正相柱层析纯化, 条件如下(流动相 A: 二氯甲烷, 流动相 B: 甲醇; 流速: 100 mL/min; 梯度: 0% B to 10% B in 30 min; 波长: 254 nm;) 得 2, 6-二异丙基-4-甲基苯胺 (2.1 g, 产率 56.2%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 192.17$

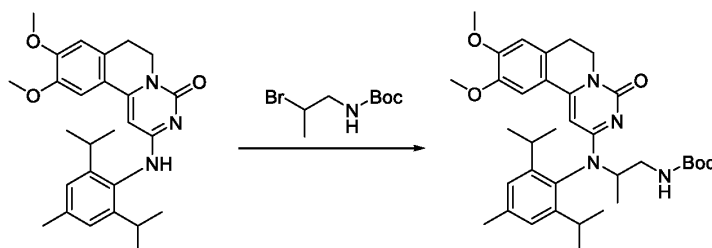
2.



氮气保护, 90°C 下, 2, 6-二异丙基-4-甲基苯胺 (1 g, 5.2 mmol, 1 当量)和 2-氯-9, 10-二甲氧基-6, 7-二氢-4H-嘧啶 6, 1-A 异喹啉-4-酮 (1.68 g, 5.8 mmol, 1.1 当量)的异丙醇(2 mL)溶液搅拌反应过夜。所得反应液减压浓缩, 过滤, 收集滤饼并用乙酸乙酯 (2 x 10 毫升) 洗涤, 得 2-[(2, 6-二异丙基-4-甲基苯基)氨基]-9, 10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-4-酮 (1.0 g, 产率 42.7%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 448.25$

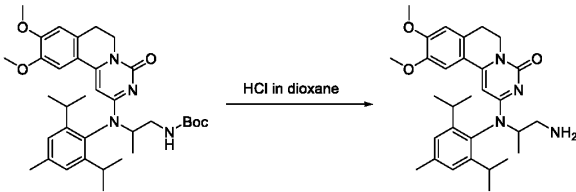
3.



将 2-[(2, 6-二异丙基-4-甲基苯基)氨基]-9, 10-二甲氧基-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-4-酮 (700 mg, 1.6 mmol, 1 当量), 碳酸铯(1.6 g, 4.8 mmol, 3 当量)和 N-(2-溴丙基)氨基甲酸叔丁酯 (560 mg, 2.3 mmol, 1.5 当量) 用 1, 4 二氧六环 (10 mL) 溶解, 氮气保护, 100 °C 搅拌过夜。冷却到室温, 用 20 mL 水溶解, 用乙酸乙酯(3 × 10 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 20 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗品用反相柱层析纯化, 条件如下(色谱柱: C18; 流动相 A: 水(10 mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 50% B 到 80% B in 20 min; 波长: 254 nm;) 得 N-{2-[(2, 6-二异丙基-4-甲基苯基)(9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基)氨基]丙基}氨基甲酸叔丁酯 (600 mg, 产率 63.4%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 605.35$

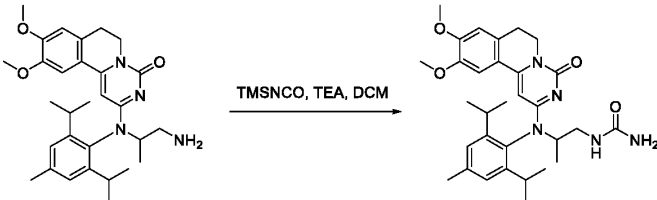
4.



将 N-{2-[(2, 6-二异丙基-4-甲基苯基)(9, 10-二甲氧基-4-氧代-6H, 7H-嘧啶并[4, 3-a]异喹啉-2-基)氨基]丙基}氨基甲酸叔丁酯 (500 mg, 0.91 mmol, 1 当量) 用 10 mL 盐酸的 1, 4 二氧六环溶液(4 M) 溶解, 室温下搅拌 1 小时。减压浓缩, 用 10 mL 水溶解, 用乙酸乙酯(3 × 10 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 20 mL 洗涤, 无水 Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩, 得 2-((1-氨基丙-2-基)(2, 6-二异丙基-4-甲基苯基)氨基)-9, 10-二甲氧基-6, 7-二氢-4H-嘧啶并[6, 1-a]异喹啉-4-酮(300 mg, 产率 73.3%)。

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 505.30

5.

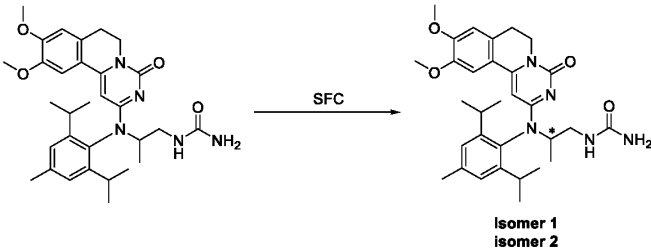


10

将 2-((1-氨基丙-2-基)(2, 6-二异丙基-4-甲基苯基)氨基)-9, 10-二甲氧基-6, 7-二氢-4H-嘧啶并[6, 1-a]异喹啉-4-酮(300 mg, 0.59 mmol, 1.0 当量), 三乙胺 (180 mg, 1.8mmol, 3 当量)和异氰酸三甲基硅烷 (103 mg, 1.2 mmol, 2 当量), 用 10 mL DCM 溶解, 在室温下搅拌 2 小时。减压浓缩, 用 10 mL 水溶解, 用乙酸乙酯(3 × 10 mL)萃取, 有机层用饱和氯化钠 20 mL 洗涤, 无水 Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压浓缩。粗品用反相柱层析纯化, 条件如下 (色谱柱: XBridge BEHC18 5 μm, 30*150 mm;流动相 A: 水(10 mmol/L 碳酸氢铵)流动相 B: 乙腈; 流速: 60 mL/min; 梯度: 43% B to 55% B, 8 分钟; 波长: 254/220 nm; RT1 (min): 5.77)得 1-(2-((2, 6-二异丙基-4-甲基苯基)(9, 10-二甲氧基-4-氧代-6, 7-二氢-4H-嘧啶并[6, 1-a]异喹啉-2-基)氨基)丙基)脲(150 mg, 产率 45.0 %)。

15

6.



20

消旋体(150mg) 经 Chiral-SFC 纯化, 条件如下 (色谱柱: CHIRALPAK IH, 2*25 cm, 5 μm; 流动相 A: 甲醇: 二氯甲烷=1: 1-HPLC, 流动相 B:甲叔醚(0.1% 乙二胺)-HPLC; 流速: 20 mL/min; 梯度: 等度; 柱温 (°C): 35; 压力 (bar): 100; 波长: 220 nm; RT1 (min):10; RT2 (min): 5; 样品溶剂:甲醇-HPLC; 进样量: 1 mL) 得产物。

化合物 23-1 (isomer 1, RT1 (min): 10, 16.5 mg, 产率 6.4%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 548.30$

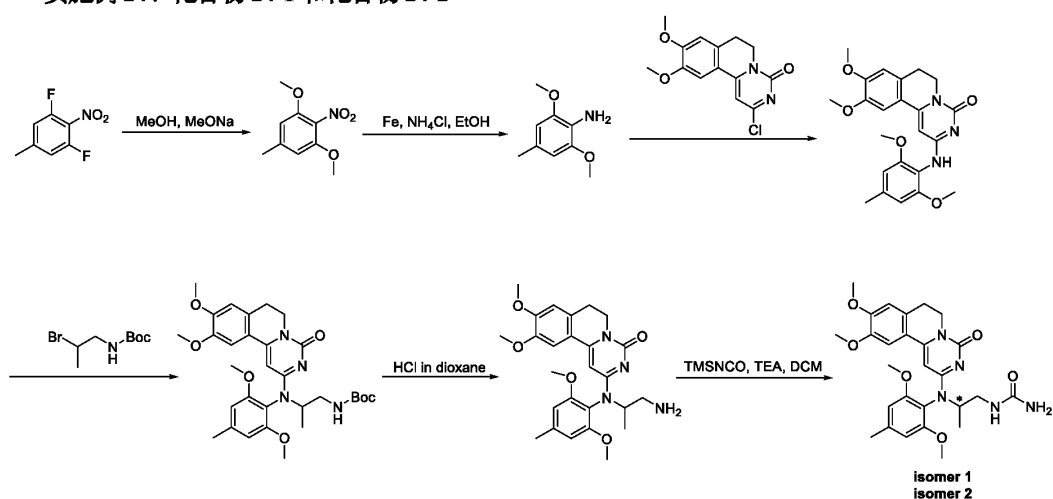
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.25 – 7.18 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.45 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.11 – 2.93 (m, 4H), 2.75 (s, 1H), 2.44 (s, 3H), 1.36 – 1.25 (m, 8H), 1.17 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H).

化合物 23-2 (isomer 2, RT2 (min): 5, 16.42 mg, 产率 6.4%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 548.30$

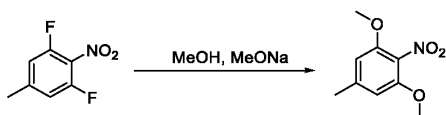
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.26 – 7.18 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.45 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.16 – 4.08 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.11 – 2.93 (m, 3H), 2.75 (s, 1H), 2.44 (s, 3H), 1.35 – 1.28 (m, 7H), 1.17 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H)。

实施例 24、化合物 24-1 和化合物 24-2



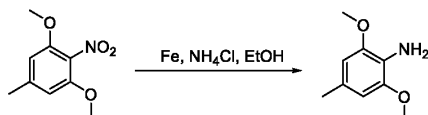
制备步骤:

1.



室温下, 在空气中把 1,3-二氟-5-甲基-2-硝基苯 (200 mg, 1.1 mmol, 1 当量) 溶解在 MeOH (5 mL) 中, 再加入甲醇钠的甲醇溶液 (3 mL, 60%)。室温下反应过夜。减压蒸干, 加入水 50 mL, 乙酸乙酯萃取 2 x 50 mL, 合并的有机层用饱和食盐水 (2 x 100 mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤后, 减压浓缩滤液, 得到 1,3-二甲氧基-5-甲基-2-硝基苯 (200 mg, 粗品)。

2.

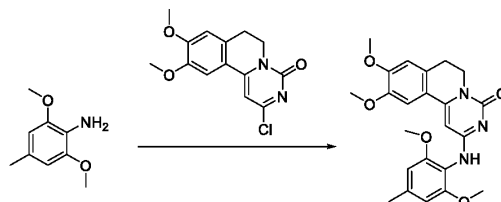


室温下, 在空气中把 1,3-二甲氧基-5-甲基-2-硝基苯 (190 mg, 0.9 mmol, 1 当量) 和 H_2O (1 mL) 加入 EtOH (5 mL) 溶液中, 再加入 NH_4Cl (154. mg, 3. mmol, 3 当量) 和 Fe (8.5 mg, 0.2 mmol,

3 当量)。反应在 80°C 下反应两个小时, 所得混合物经过滤, 滤饼用乙酸乙酯 (2 x 30 mL) 洗涤。室温下水淬灭反应物。所得混合物用乙酸乙酯 (2 x 100 mL) 萃取。合并的有机层用饱和氯化钠 (2 x 150 mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥。过滤后, 减压浓缩滤液, 得到 2,6-二甲氧基-4-甲基苯胺 (150 mg, 粗品)。

5 LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 168.2$

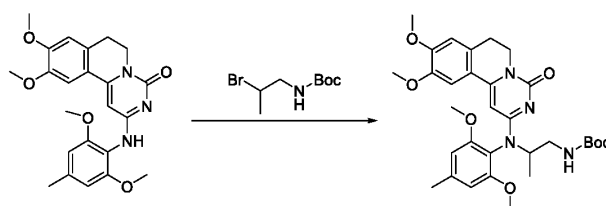
3.



室温下, 在空气中把 2-氯-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (273. mg, 0.9 mmol, 1.2 当量) 溶解在异丙醇 (3 ml) 溶液中, 加入 2,6-二甲氧基-4-甲基苯胺 (152. mg, 0.9 mmol, 1.2 当量)。将所得混合物减压浓缩, 得到 2-[(2,6-二甲氧基-4-甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (300 mg, 粗品)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 424.2$

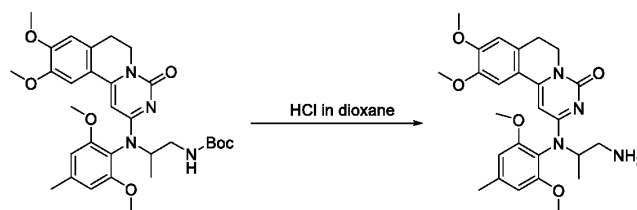
4.



15 把 2-[(2,6-二甲氧基-4-甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (300 mg, 0.7 mmol, 1 当量) 和 N-(2-溴丙基)氨基甲酸叔丁酯 (168. mg, 0.7 mmol, 1 当量) 和 Cs_2CO_3 (461 mg, 1.4 mmol, 2 当量) 溶解在 1,4-二氧六环 (5 ml) 溶液中, 加入 XantPhos (81. mg, 0.1 mmol, 0.1 当量) 和 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (64. mg, 0.1 mmol, 0.1 当量)。将所得混合物在 100 °C 的氮气环境下搅拌过夜。滤液经减压浓缩, 残留物通过反相闪蒸色谱纯化, 条件如下: 色谱柱, C18 硅胶; 流动相, 乙腈 在水中 (10 mmol/L NH_4HCO_3), 10 分钟内梯度从 10% 到 50%; 检测器, UV 254 nm。最终得到 N-{2-[(2,6-二甲氧基-4-甲基苯基)(9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基)氨基]丙基}氨基甲酸叔丁酯 (270 mg, 59% 收率)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 581.2$

5.

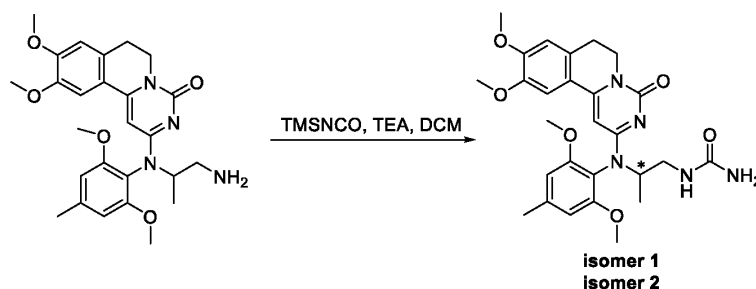


25

在室温氮气环境下，把 N-{2-[(2,6-二甲氧基-4-甲基苯基)(9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-2-基)氨基]丙基}氨基甲酸叔丁酯 (300 mg, 0.6 mmol, 1.0 当量) 溶解在 1,4-二氧六环 (2 mL) 中，加入盐酸的 1,4-二氧六环 (2 mL) 溶液。所得混合物在室温氮气环境下搅拌 1.5 小时。反应在室温下用水淬灭。用饱和碳酸钠溶液将混合物中和至 pH = 9。所得混合物用乙酸乙酯 (2 x 50 mL) 萃取。合并的有机层用饱和食盐水 (2 x 100 mL) 洗涤，用无水硫酸钠干燥。过滤后，减压浓缩滤液。残留物经 Prep-TLC 纯化 (CH₂Cl₂/MeOH=20/1)，得到 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,6-二甲氧基-4-甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (150 mg, 49% 收率)。

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 481.2

6.



把 2-[(1-氨基丙-2-基)(2,6-二甲氧基-4-甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (400 mg, 0.8 mmol, 1 当量) 和 TEA (0.4 mL, 2.5 mmol, 3 当量) 加入 DCM (4 mL) 中溶液中加入异氰基三甲基硅烷 (191 mg, 1.6 mmol, 2.0 当量)。所得混合物在氮气环境下于室温搅拌 2 小时，反应混合物低压浓缩。粗产物 (420 mg) 通过高效液相色谱法纯化，条件如下 (色谱柱: Sunfire C18 5 μm, 30 mm x 4.5 mm): 流动相 A: 水 (0.1% FA)，流动相 B: 乙腈; 流速: 60 ml/分钟; 梯度: 10 分钟内从 51%B 到 74%B; 波长: 254 纳米/220 纳米; RT1 (分钟): 6.03; 6.62)，得到 1-(2-[(2,6-二甲氧基-4-甲基苯基)(9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)氨基]丙基)脲 (130 mg)，再经过 Chiral-HPLC 纯化，条件如下 (色谱柱: JW-CHIRALPAK IG-3, 3.0*50 mm; 3 μm; 流动相 A: MeOH: DCM=1:1-HPLC, 流动相 B: MeOH (0.1% DEA)-HPLC; 流速: 20 mL/min; 梯度: 等度; 波长: 220 nm; RT1 (min): 12; RT2 (min): 16.5; 样品溶剂: 样品溶剂: MeOH: DCM=1:1-HPLC; 进样量: 0.7 mL; 运行次数: 5 次) 得到产物。

化合物 24-1 (isomer 1, RT1 (min): 12, 30.12 mg, 6.8% 收率)

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 524.25

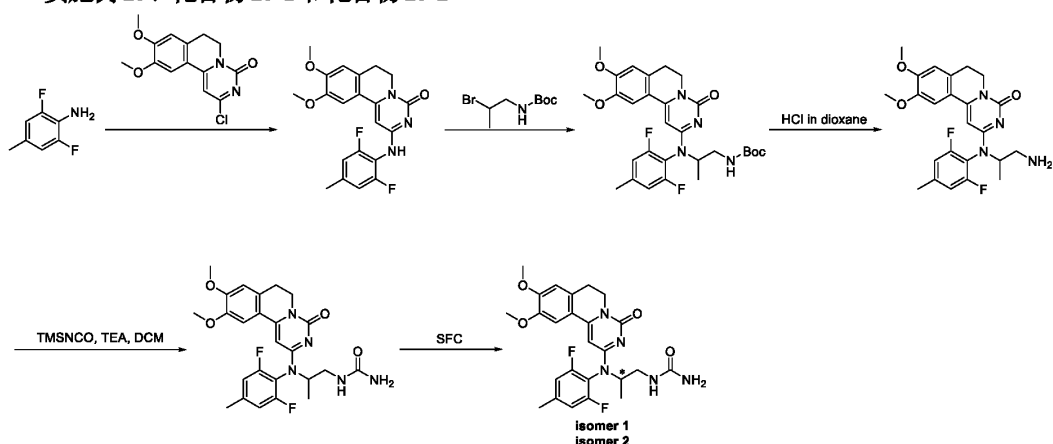
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 6.92 (s, 1H), 6.72 – 6.66 (m, 3H), 5.53 (s, 1H), 4.11 – 4.05 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.81 (d, *J* = 10.1 Hz, 6H), 3.69 (s, 3H), 2.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H).

化合物 24-2 (isomer 2, RT2 (min) 16.5, 44.03 mg, 10% 收率)

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 524.25

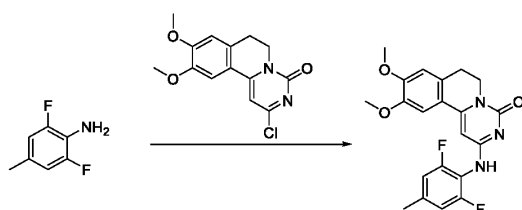
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 6.92 (s, 1H), 6.72 – 6.66 (m, 3H), 5.53 (s, 1H), 4.11 – 4.05 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.81 (d, *J* = 10.1 Hz, 6H), 3.69 (s, 3H), 2.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H)。

实施例 25、化合物 25-1 和化合物 25-2



制备步骤:

1.



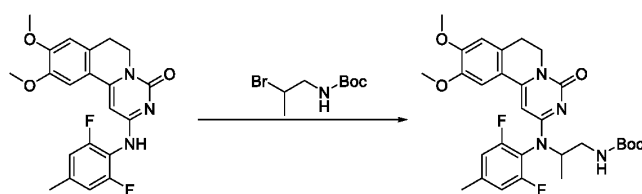
5

将 2,6-二氟-4-甲基苯胺(1.0 g, 6.9 mmol, 1 当量)与 2-氯-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-1 (2.6 g, 9.0 mmol, 1.3 当量)的 IPA (40 mL)混合物在 90°C 氮气气氛下搅拌过夜。得到的混合物在减压下浓缩。用饱和 NaHCO_3 碱化至 $\text{PH} = 8$ 。所得混合物用 EtOEt (3 x 50 mL)提取。结合有机层用盐水(2 x 100 mL)洗涤,在无水 Na_2SO_4 上干燥。过滤后的滤液在减压下浓缩。用硅胶柱层析纯化,用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (80/1~60/1)洗脱得到 2-[(2,6-二氟-4-甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-1 (2.0 g, 71.6%)。

10

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 400.15$

2.



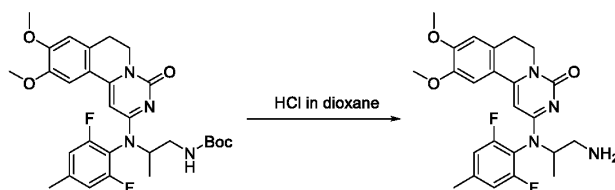
15

将 2-[(2,6-二氟-4-甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-one (440 mg, 1.1 mmol, 1 当量)和 N-(2-溴丙基)氨基甲酸叔丁酯(288.5 mg, 1.2 mmol, 1.1 当量)在 DMF (15 mL)中搅拌,在 100°C 氮气气氛下搅拌过夜。所得混合物在真空中浓缩。用硅胶柱层析纯化,用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10/1)洗脱得到 N-{2-[(2,6-二氟-4-甲基苯基)({9,10-二甲氧基-4-氧-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基})氨基]丙基}氨基甲酸叔丁酯(200 mg, 32.6%)。

20

LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 557.25$

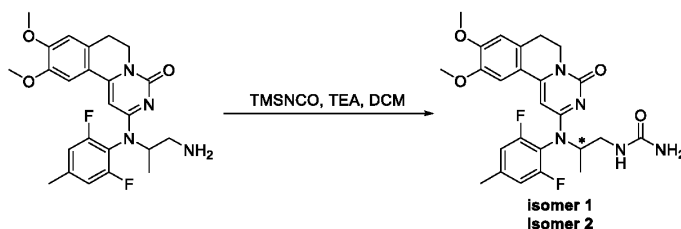
3.



将 N-{2-[(2,6-二氟-4-甲基苯基)({9,10-二甲氧基-4-氧基-6H,7H-吡啶[4,3- A]异喹啉-2-基})氨基]丙基}氨基甲酸酯(200 mg, 0.359 mmol, 1 等量)在 1,4-二恶烷(15 mL)中室温氮气氛围下搅拌 3 h。得到的混合物在减压下浓缩。结果得到 2-[(1-氨基丙烯-2-基)(2,6-二氟-4-甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-吡啶[4,3-a]异喹啉-4-1(150 毫克, 91.45%)。粗产物直接用于下一步, 无需进一步提纯。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 457.2$

4.



2-[(1-氨基丙烯-2-基)(2,6-二氟-4-甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-吡啶[4,3-a]异喹啉-4-1 (50 mg, 0.11 mmol, 1.0 当量)和异氰酸三甲基硅烷(12.6 mg, 0.11 mmol, 1.0 当量)在 DCM (5 mL)中搅拌, 室温, 氮气氛围下过夜。得到的混合物在减压下浓缩。粗产物(60 mg)采用 Prep-HPLC 纯化, 条件如下(柱:XSelect CSH Fluoro Phenyl 5 m, 19 mm * 250 mm;流动相 A:水(0.1% FA), 流动相 B: ACN;流量:25 mL/min;梯度:42% B 到 65% B, 10 分钟;波长:254 nm/220 nm;RT1 (min): 5.67)得到(2R)-2-[(2,6-二氟-4-甲基苯基)({9,10-二甲氧基-4-氧基-6H,7H-吡啶[4,3-a]异喹啉-2-基})氨基]丙基胺(50 mg)。再经过 Chiral-HPLC 纯化, 条件如下(色谱柱:CHIRALPAK IH 2* 25 cm, 5 μ m;流动相 A: MeOH: DCM=1:1—HPLC, 流动相 B: MtBE (0.1% DEA)—HPLC;流量:- 20mL/min;梯度:等距;波长:220 nm;RT1(分钟):11.2; RT2(分钟):15.0; 样品溶剂:MeOH: DCM=1:1—HPLC;注射量:1.5 mL; 运行次数:5)得到产物。

化合物 25-1 (isomer 1, RT1(min):11.2, 13.41 mg, 24.49%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 500.25$

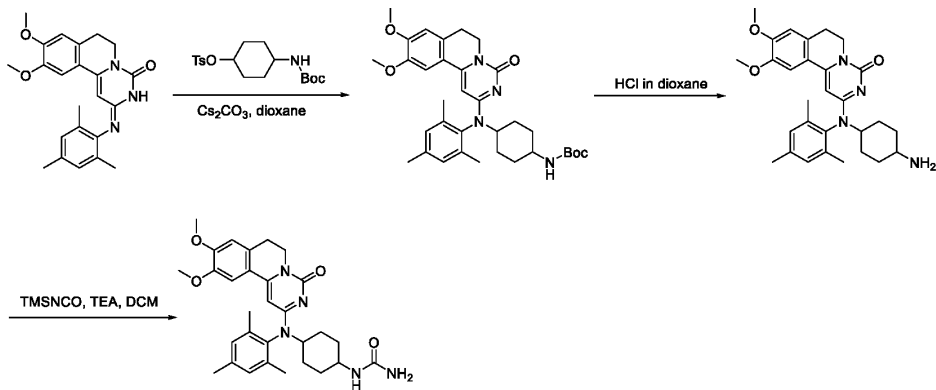
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 6.90 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 5.70 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 5.63 (s, 1H), 4.00 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.96 – 3.90 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.65 – 3.56 (m, 1H), 2.95 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.54 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H)。

化合物 25-2 (isomer 2, RT2(min):15.0, 15.09 mg, 21.59%)

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 500.25$

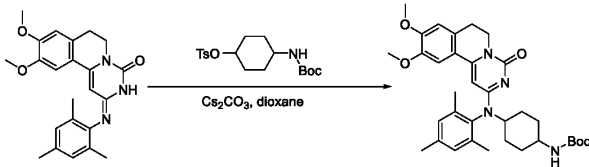
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 6.89 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.86 – 6.84 (m, 1H), 6.84 – 6.81 (m, 1H), 5.70 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.63 (s, 1H), 4.00 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.96 – 3.90 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.97 – 2.93 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.54 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H)。

实施例 26、化合物 26



制备步骤

1.

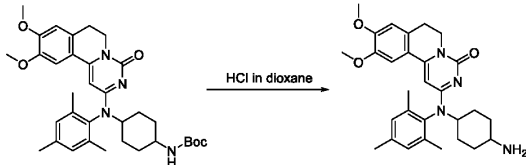


5

在单口瓶中依次加入(2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚氨基]-3H,6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-酮 (1.0 g, 2.6 mmol, 1.0 当量)、二氧六环 (100 mL)、碳酸铯 (1.7 g, 5.1 mmol, 2.0 当量) 和 (N-{4-[(4-甲基苯磺酰)氧基]环己基}氨基甲酸叔丁酯) (1.4 g, 3.8 mmol, 1.5 当量), 100 °C下反应过夜。过滤, 缩干滤液, 所得残余物用反相柱层析纯化, 条件如下: 层析柱规格 C18, 流动相, 水和乙腈, 10%到 100%梯度 30 分钟, UV220 纳米检测器。得到 (4-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶[6,1-a]异喹啉-2-基)(甲磺基)氨基)环己基)氨基甲酸叔丁酯 (110 mg, 7.3%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 589.3

2.



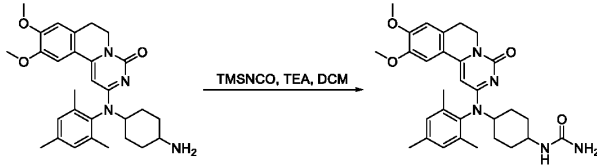
15

在单口瓶中依次加入(4-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶[6,1-a]异喹啉-2-基)(甲磺基)氨基)环己基)氨基甲酸叔丁酯 (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量) 和 HCl 的 1,4-二氧六环溶液 (4 M, 15 mL), 室温下反应 2h。缩干溶剂的到 2-[(4-氨基环己基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-酮 (80 mg, 96.4%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 489.3

20

3.

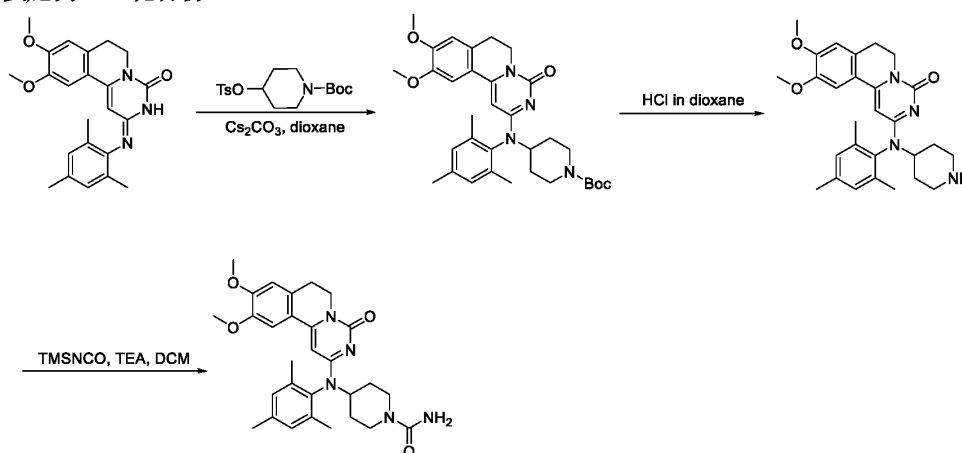


2-[(4-氨基环己基)(2,4,6-三甲基苯基)氨基]-9,10-二甲氧基-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-4-酮(140 mg, 0.3 mmol, 1.0 当量), 溶剂 DCM(8 mL)溶解。室温下在上述混合物中加入三乙胺 (145 mg, 1.5 mmol, 5.0 当量) 和异氰酸三甲基硅脂 (40 mg, 0.4 mmol, 1.2 当量), 室温下搅拌 3 h。粗产物经 Prep-HPLC 纯化, 条件如下 (色谱柱: Xbridge BEH Shield RP18, 5 μ m, 19*250mm; 流动相 A: 水(10 mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 25 mL/min; 梯度: 10 分钟内从 39% B 降至 4% B; 波长: 254nm/220nm nm; RT1 (min): 9.4), 得到 4-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6H,7H-嘧啶[4,3-a]异喹啉-2-基)(2,6-二甲基苯基)氨基)环己基脲 (35.71mg, 产率 22.81%)。

LCMS (ESI): [M+H]⁺ = 532.25

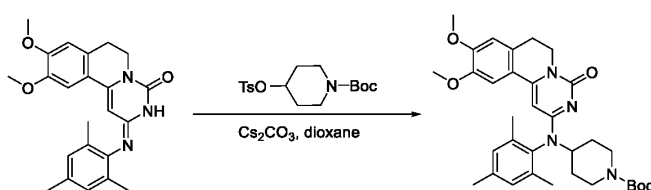
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.10 (s, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.18 – 4.03 (m, 3H), 3.88 (s, 4H), 3.66 (s, 3H), 2.96 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.21 (s, 6H), 2.05 – 1.92 (m, 4H), 1.88 – 1.80 (m, 2H), 1.75 – 1.62 (m, 2H)。

实施例 27、化合物 27



制备步骤

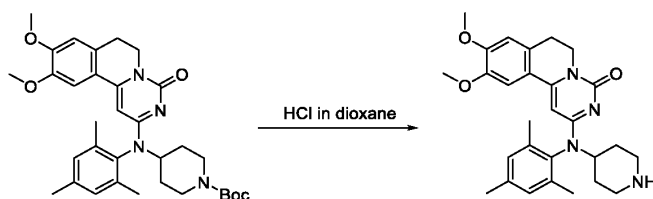
15 1.



在单口瓶中依次加入(2E)-9,10-二甲氧基-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚氨基]-3H,6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-4-酮 (1.0 g, 2.6 mmol, 1.0 当量)、1,4-二氧六环 (100 mL)、碳酸铯 (2.5 g, 7.7 mmol, 3.0 当量) 和 4-[(4-甲基苯磺酰)氧基]哌啶-1-甲酸叔丁酯 (1.0 g, 2.8 mmol, 1.1 当量), 100 °C 下反应过夜。过滤, 浓缩滤液, 所得残余物用反相柱层析纯化, 条件如下: 流动相, 水和乙腈, 10%到 100%梯度 30 分钟, UV220 纳米检测器, 得到 4-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)(甲脒基)氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (120 mg, 产率 8.17%)。

LCMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ = 575.3

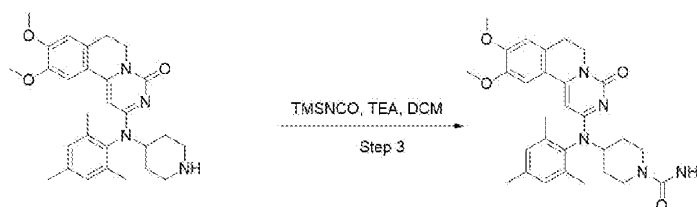
2.



在单口瓶中依次加入 4-((9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)(甲脒基)氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 当量) 和氯化氢的 1,4-二氧六环 (17 mL), 室温下反应 2 h。浓缩溶剂得到 2-(甲磺酰基(哌啶-4-基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮 (80 mg, 产率 96.9%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 475.3$

3.

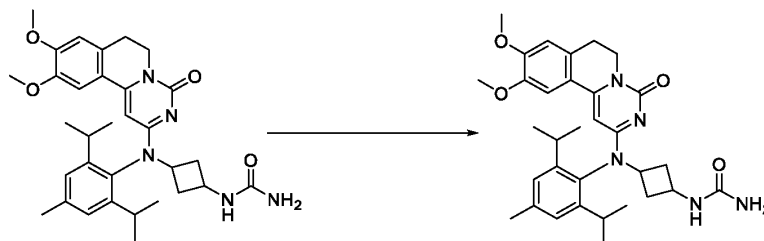


向 2-(甲磺酰基(哌啶-4-基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮 (1050 mg, 2.2 mmol, 1.0 当量) 的二氯甲烷 (20 mL) 溶液中加入三乙胺 (640 mg, 6.3 mmol, 3.0 当量), 三甲基硅基异氰酸酯 (364 mg, 3.2 mmol, 1.5 当量)。混合物室温下搅拌 2h。混合物减压旋蒸浓缩后, 所得残余物用反相柱层析纯化, 条件如下: 色谱柱: XBridge BEH Shield RP18, 5 μ m, 19*250 mm; 流动相 A: 水 (10 mmol/L 碳酸氢铵), 流动相 B: 乙腈; 流速: 25 mL/min; 梯度: 35% B to 40%B in 10 min; 波长: 254 nm/220 nm; RT1 (min): 8.57, 得 4-[(2E)-9,10-二甲氧基-4-氧代-2-[(2,4,6-三甲基苯基)亚氨基]-6H,7H-嘧啶并[4,3-a]异喹啉-3-基]哌啶-1-甲酰胺 (39.74 mg, 产率 3.63%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 518.40$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.10 (s, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.73 – 4.62 (m, 1H), 4.18 – 3.97 (m, 4H), 3.88 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.02 – 2.90 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 2.17 (s, 8H), 1.43 – 1.29 (m, 2H)。

实施例 28、化合物 28



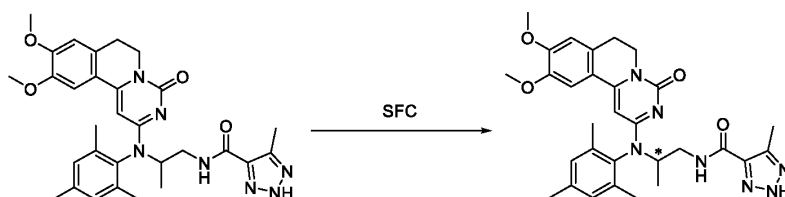
粗品 (150 mg) 经 Chiral-SFC 纯化, 条件如下 (色谱柱: CHIRALPAK IH, 2*25 cm, 5 μ m; 流动相 A: 甲醇: 二氯甲烷=1: 1-HPLC, 流动相 B: 甲叔醚 (0.1% 乙二胺)-HPLC; 流速: 20 mL/min; 梯度: 等度; 波

长: 220 nm; RT1 (min):8; RT2 (min):13.0; 样品溶剂:甲醇-HPLC; 进样量: 1 mL) 得 1-(3-((2,6-二异丙基-4-甲基苯基)(9,10-二甲氧基-4-氧代-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-2-基)氨基)环丁基)脲 (13.00 mg, 产率 14.9%)。

LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 560.30$

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.21 (s, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 4.51 – 4.44 (m, 1H), 4.14 – 4.06 (m, 2H), 3.97 – 3.88 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 2.94 – 2.90 (m, 4H), 2.74 – 2.78 (m, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.20 – 2.08 (m, 2H), 1.30 (d, *J* = 6.8 Hz, 7H), 1.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H)。

实施例 29、化合物 29



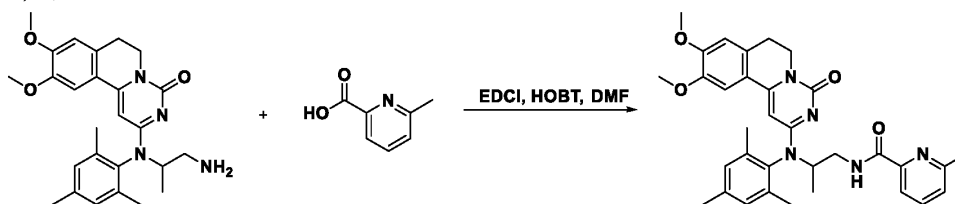
粗品 (30 mg) 经 Chiral-HPLC 纯化, 条件如下: CHIRALPAK IH 3*25 cm, 5 μ m; 流动相 A: CO₂, 流动相 B: 甲醇 (0.1% 二乙胺); 流速: 85 mL/min; 梯度: 等度 35% B; 柱温 (°C): 25 °C; 背压 (bar): 100; 波长: 254 nm; RT1 (min): 2.85; RT2 (min): 4.5 样品溶剂: 甲醇: 二氯甲烷=1: 1-HPLC; 进样量: 1 mL) 得到产物。

化合物 29 (isomer 1, RT1 (min): 2.85, 3.2 mg, 产率 10.3%)

LCMS (ESI, *m/z*): $[M+H]^+ = 558.35$

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.17 – 7.10 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.78 – 4.69 (m, 1H), 4.20 – 4.04 (m, 2H), 3.97 – 3.77 (m, 5H), 3.67 (s, 3H), 2.98 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.59 – 2.52 (m, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H)。

实施例 30、化合物 30



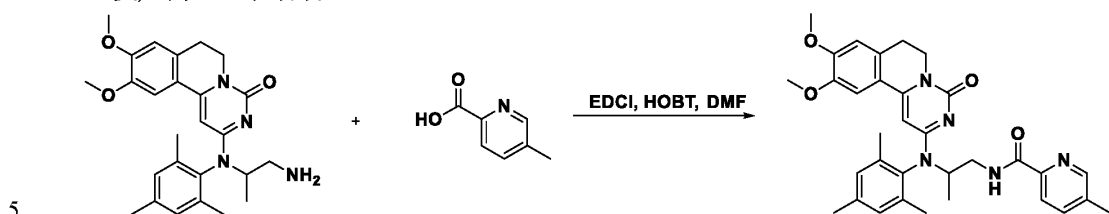
室温下, 向 25mL 单口瓶中加入 2-(1-氨基丙-2-基)(甲三甲基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮 (100 mg, 0.22 mmol), 6-甲基吡啶-2-甲酸 (45.3 mg, 0.33 mmol), EDCI (63.3 mg, 0.33 mmol), HOBT (44.6 mg, 0.33 mmol) 和 DMF (2 mL) 搅拌, 室温下搅拌 24h。反应完毕, 反应体系过滤, 过反相 Flash 纯化 (流动相 A: 0.5% FA 水溶液, 流动相 B: 乙腈; 流速: 40 mL/min; 梯度: 20 分钟内从 0% B 到 55% B; 50% B 出产品, 波长: 254 nm/220 nm;) 得产物 (19.2 mg, 10.3%)。

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 568.2$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 8.76-8.74 (m, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.63 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H),

7.19-7.16 (m, 1H), 6.91 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.96-4.95 (m, 1H), 4.16 – 4.10 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.82-3.75 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.84 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.05 (d, J = 8.0 Hz, 3H) 。

实施例 31、化合物 31

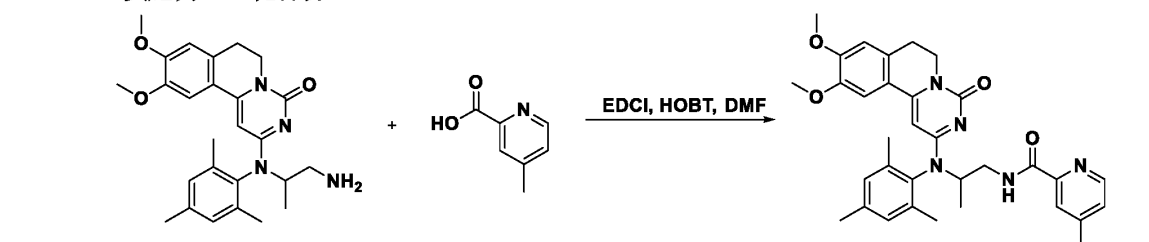


室温下，向 25mL 单口瓶中加入 2-（（1-氨基丙-2-基）（甲三甲基）氨基）-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(150 mg, 0.33 mmol), 5-甲基-2-吡啶甲酸 (68.6 mg, 0.50 mmol), EDCI (95.9 mg, 0.50 mmol), HOBT (67.6 mg, 0.50 mmol)和 DMF (3 mL)搅拌，室温下搅拌 24h。反应完毕，反应体系过滤，过反相 Flash 纯化（流动相 A: 0.5% FA 水溶液，流动相 B: 乙腈；流速: 40 mL/min; 梯度: 20 分钟内从 0%B 到 55%B ; 50%B 出产品，波长: 254 nm/220 nm; ）得产物 (37.5 mg, 19.7%)。

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 568.2$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 8.81 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.54-7.51 (m, 1H), 6.93 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.92-4.87 (m, 1H), 4.17 – 4.07 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.82-3.75 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.84 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.09 (d, J = 8.0 Hz, 3H) 。

实施例 32、化合物 32



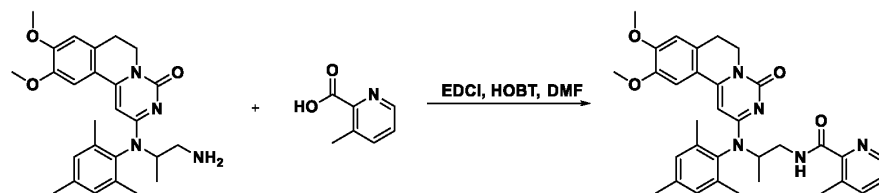
室温下，向 25mL 单口瓶中加入 2-（（1-氨基丙-2-基）（甲三甲基）氨基）-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(150 mg, 0.33 mmol), 4-甲基-2-吡啶甲酸 (68.6 mg, 0.50 mmol), EDCI (95.9 mg, 0.50 mmol), HOBT (67.6 mg, 0.50 mmol)和 DMF (3 mL)搅拌，室温下搅拌 24h。反应完毕，反应体系过滤，过反相 Flash 纯化（流动相 A: 0.5% FA 水溶液，流动相 B: 乙腈；流速: 40 mL/min; 梯度: 20 分钟内从 0%B 到 55%B ; 50%B 出产品，波长: 254 nm/220 nm; ）得产物 (32.3 mg, 17.3%)。

25 LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 568.2$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 8.87 (s, 1H), 8.37 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.15 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 12Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.87-4.82 (m, 1H),

4.19 – 4.07 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.82-3.75 (m, 2H), 3.64 (s, 3H), 2.85 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.07 (d, J = 4.0 Hz, 3H) 。

实施例 33、化合物 33



5 室温下，向 25mL 单口瓶中加入 2-（（1-氨基丙-2-基）（甲三甲基）氨基）-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(150 mg, 0.33 mmol), 3-甲基-2-吡啶甲酸 (68.6 mg, 0.50 mmol), EDCI (95.9 mg, 0.50 mmol), HOBT (67.6 mg, 0.50 mmol)和 DMF (3 mL)搅拌，室温下搅拌 24h。反应完毕，反应体系过滤，过反相 Flash 纯化（流动相 A: 0.5%FA 水溶液，流动相 B: 乙腈；流速：40 mL/min；梯度：20 分钟内从 0%B 到 55%B；50%B 出产品，波长：254 nm/220

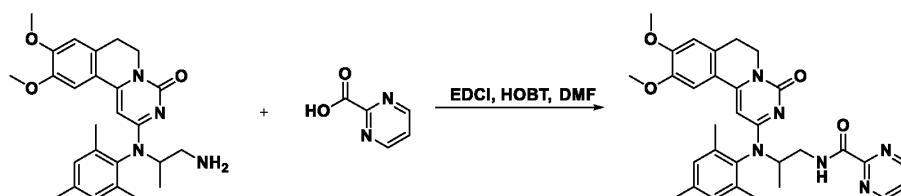
10 nm；）得产物 (12.8mg, 6.8%)。

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 568.2$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 8.86 (s, 1H), 8.35 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.22-7.20 (m, 1H), 6.91 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.96-4.91 (m, 1H), 4.19 – 4.03 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.82-3.75 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.84 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.26 (s,

15 3H), 2.18 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.08 (d, J = 4.0 Hz, 3H) 。

实施例 34、化合物 34



室温下，向 25mL 单口瓶中加入 2-（（1-氨基丙-2-基）（甲三甲基）氨基）-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(100 mg, 0.22 mmol), 嘧啶-2-羧酸 (40.9 mg, 0.33 mmol), EDCI (63.3 mg, 0.33 mmol), HOBT (44.6 mg, 0.33 mmol)和 DMF (2 mL)搅拌，室温下搅拌 24h。反应完毕，反应体系过滤，过反相 Flash 纯化（流动相 A: 0.5%FA 水溶液，流动相 B: 乙腈；流速：40 mL/min；梯度：20 分钟内从 0%B 到 55%B；50%B 出产品，波长：254 nm/220 nm；）得产物 (20 mg, 10.9%)。

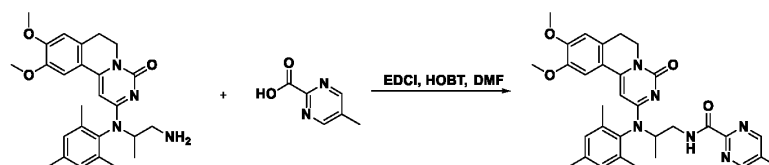
20

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 555.2$

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 9.56 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 9.03-9.00 (m, 2H), 8.16 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.74-7.71 (m, 1H), 7.12-7.10 (m, 2H), 7.02 (s, 1H), 4.74 – 4.70 (m, 1H), 4.16 (s, 3H), 4.15-4.10 (m, 2H), 3.98-3.95 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.05-3.00 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 0.83 (d, J = 8.0 Hz, 3H) 。

25

实施例 35、化合物 35

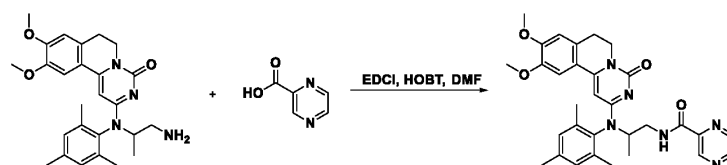


室温下，向 25mL 单口瓶中加入 2-((1-氨基丙-2-基)(甲三甲基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(100 mg, 0.22 mmol), 5-甲基嘧啶-2-羧酸 (45.6 mg, 0.33 mmol), EDCI (63.3 mg, 0.33 mmol), HOBT (44.6 mg, 0.33 mmol)和 DMF (2 mL)搅拌，室温下搅拌 24h。反应完毕，反应体系过滤，过反相 Flash 纯化（流动相 A: 0.5%FA 水溶液，流动相 B: 乙腈；流速: 40 mL/min; 梯度: 20 分钟内从 0%B 到 55%B ; 50%B 出产品，波长: 254 nm/220 nm; ）得产物 (27.6 mg, 14.7%)。

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 569.2$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 9.28 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 6.91 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.93-4.90 (m, 1H), 4.13 – 4.10 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.82-3.75 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.85-2.83 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.05 (d, J = 8.0 Hz, 3H) 。

实施例 36、化合物 36

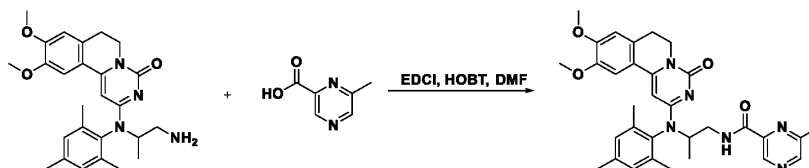


室温下，向 25mL 单口瓶中加入 2-((1-氨基丙-2-基)(甲三甲基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(100 mg, 0.22 mmol), 吡啶-2-甲酸 (40.9 mg, 0.33 mmol), EDCI(63.3 mg, 0.33 mmol), HOBT(44.6 mg, 0.33 mmol)和 DMF (2 mL)搅拌，室温下搅拌 24h。反应完毕，反应体系过滤，过反相 Flash 纯化（流动相 A: 0.5%FA 水溶液，流动相 B: 乙腈；流速: 40 mL/min; 梯度: 20 分钟内从 0%B 到 55%B ; 50%B 出产品，波长: 254 nm/220 nm; ）得产物 (9.5 mg, 5.2%)。

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 555.2$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 9.51 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 9.13-9.12 (m, 1H), 8.92 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.78-8.77 (m, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.10-7.08 (m, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.74 – 4.70 (m, 1H), 4.08 (s, 3H), 4.07-4.05 (m, 2H), 3.98-3.95 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.05-3.00 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 0.83 (d, J = 8.0 Hz, 3H) 。

实施例 37、化合物 37

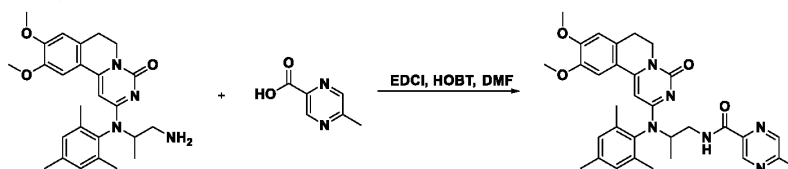


室温下, 向 25mL 单口瓶中加入 2-((1-氨基丙-2-基)(甲三甲基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(100 mg, 0.22 mmol), 6-甲基吡嗪-2-羧酸 (45.6 mg, 0.33 mmol), EDCI (63.3 mg, 0.33 mmol), HOBT (44.6 mg, 0.33 mmol)和 DMF (2 mL)搅拌, 室温下搅拌 24h。反应完毕, 反应体系过滤, 过反相 Flash 纯化(流动相 A: 0.5% FA 水溶液, 流动相 B: 乙腈; 流速: 40 mL/min; 梯度: 20 分钟内从 0%B 到 55%B ; 50%B 出产品, 波长: 254 nm/220 nm;)得产物 (29.3 mg, 15.6%)。

LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 569.2$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 9.17 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 5.08-5.07 (m, 1H), 4.23 – 4.17 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.92-3.85 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.94-2.91 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.11 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H)。

实施例 38、化合物 38



室温下, 向 25mL 单口瓶中加入 2-((1-氨基丙-2-基)(甲三甲基)氨基)-9,10-二甲氧基-6,7-二氢-4H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(150 mg, 0.33 mmol), 5-甲基吡嗪-2-羧酸 (69.1 mg, 0.50 mmol), EDCI (95.8 mg, 0.50 mmol), HOBT (67.6 mg, 0.50 mmol)和 DMF (3 mL)搅拌, 室温下搅拌 24h。反应完毕, 反应体系过滤, 过反相 Flash 纯化(流动相 A: 0.5% FA 水溶液, 流动相 B: 乙腈; 流速: 40 mL/min; 梯度: 20 分钟内从 0%B 到 55%B ; 50%B 出产品, 波长: 254 nm/220 nm;)得产物 (50.2 mg, 26.8%)。

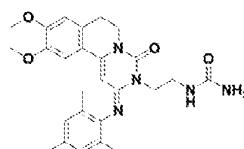
LC-MS (ESI): $[M+H]^+ = 569.2$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 9.23 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.00 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.98-4.93 (m, 1H), 4.23 – 4.17 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.92-3.85 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.94-2.91 (m, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H)。

生物学测试评价

一、PDE 酶活性抑制实验一

用 FP 方法测试各实施例的化合物对 PDE 酶活性抑制实验, 并采用 CN100415743C 的实施例 1 化合物 RPL-554 作为阳性对照。



RPL-554

在反应缓冲液（添加 1mM DTT 的 1× IMAP Reaction Buffer containing 0.1% BSA）中制备 PDE 酶和 Substrate （FAM-环磷酸腺苷/环磷酸腺苷）溶液。阳性对照品在 PDE 的起始浓度为 1/10 μM，3 倍稀释，10+0dose。通过声学液体输送技术（Echo 655）将 100% DMSO 中的化合物 0.05 μL 输送到 384 孔板（Coming4514）中，1000 rpm 离心 1 分钟；转移 2.5 μL PDE 酶溶液到 384 反应板中并 1000 rpm 离心 1 分钟，于 25°C 孵育 10min；转移 2.5 μL Sub 溶液到 384 反应板中，1000 rpm 离心 1 分钟，25°C 孵育 60 min；转移 15 μL 结合剂混合物到 384 反应板中并 1000 rpm 离心 1 分钟，于 25°C 孵育 60min；最后用 BMG（PHERAstar FSX）读取 FP 信号。使用 GraphPad Prism 软件获得 IC50 值和非线性回归曲线拟合。

表 4 展示了对比例和实施例各化合物的酶活实验 IC₅₀ 值。IC₅₀ 数值越小说明对不同 PDE 酶的半数抑制所需化合物的量越少，表明其抑制活性越强。

表 4

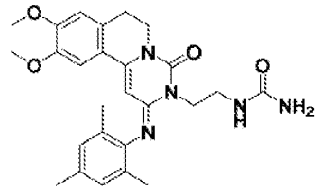
化合物编号	PDE3A (nM)	PDE3B (nM)	PDE4B2 (nM)	PDE4D2 (nM)
RPL-554	0.5789	0.7748	106.8	74.42
对比例 D1	1206	972.8	3067	1808
对比例 D2	2.197	2.886	1119	669.3
对比例 D3	0.2408	0.1652	814.4	198.6
对比例 D4	21.24	>40	15198	13756
对比例 D5	0.1249	0.1734	87.23	60.73
对比例 D6	0.2489	0.4602	113.3	120.8
本发明化合物编号	PDE3A (nM)	PDE3B (nM)	PDE4B2 (nM)	PDE4D2 (nM)
1-1	0.09958	0.06978	75.41	61.36
1-2	0.08997	0.05435	23.83	15.35
2	0.07702	0.1225	130	98.66
3-1	0.09455	0.1033	186.9	226.6
3-2	0.0979	0.1	152.2	215.1
4-1	>40	>40	468.9	490.5
4-2	>40	>40	425.3	516.6
5-1	0.1089	0.1015	39.78	44.1
5-2	0.1117	0.1011	20.05	17.32
6	13.9	27.31	1286	1402
7-1	0.1408	0.2875	151.7	150.3
7-2	0.1138	0.2563	204.9	276.7
7-3	0.0896	0.1492	139.2	164.8
8	0.04497	0.103	489.4	274.8
9-1	0.0726	0.1392	18.07	19.96
9-2	0.07512	0.08175	162	159.7
10-1	0.04769	0.06416	35.49	40.24

10-2	0.03318	0.04673	10.91	9.789
11-1	>40	>40	5.073	4.554
11-2	0.06964	0.1	154.9	157
12-1	0.04507	0.06946	1.239	1.684
12-2	0.06906	0.07273	105.7	78.75
13-1	0.1117	0.1576	9.778	5.838
13-2	0.06613	0.07678	139	119.5
14	0.08874	0.1357	598.5	367.7
15-1	0.07961	0.08241	73.66	64.67
15-2	0.07565	0.0767	21.79	13.23
16	0.1142	0.1057	52.36	41.84
17	0.09994	0.1223	30.36	22.96
18	0.1724	0.4613	26.58	15.56
19	0.07852	0.1113	2.997	1.613
20	0.1014	0.1693	151.7	108.4
21	0.08215	0.1182	122.1	115.2
22	0.07804	0.1335	23.27	17.2
23-1	3.89	6.942	11.61	3.874
23-2	0.1355	0.171	85.29	63.39
24-1	2.913	4.469	201.2	319.1
24-2	7.628	12.67	76.5	58
25-1	0.2808	0.488	14.47	8.636
25-2	6.376	11.01	938.3	800.6
26	0.07115	0.08478	64.84	29.47
27	0.06952	0.08831	29.25	23.3
28	6.062	17.79	44.07	30.66
29	0.1259	0.1012	1.225	1.416
30	0.1143	0.1258	1.397	0.8306
31	0.1073	0.1076	6.3	5.748
32	0.1247	0.1352	4.896	2.857
33	0.1079	0.1217	1.01	0.5679
37	0.09047	0.1099	5.135	4.04

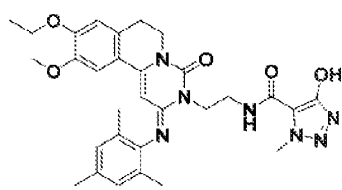
结论：本发明的的化合物，对 PDE3/4 具有高效的抑制活性，优于现有技术，具有良好的开发前景。

二、PDE 酶活性抑制实验二

用 FP 方法测试化合物对 PDE 酶活性抑制实验，并采用对照化合物 RPL-554 和化合物 D7 作为对照。具体测试方法同 PDE 酶活性抑制实验一。化合物 RPL-554 和化合物 D7 结构式如下。



化合物 RPL-554



化合物 D7

表 5 展示了对照化合物 RPL-554、化合物 D7 与本发明化合物 1-1 和 1-2 的酶活实验 IC₅₀ 值。

表 5

表 5IC ₅₀ , nM	对照化合物 RPL-554	对照化合物 D7	本发明化合物 1-1	本发明化合物 1-2
PDE1A	>10000		4026	5465
PDE1B	>10000		616	521.2
PDE1C	>10000		1773	3788
PDE2A1	3167		1487	1349
PDE3A	0.5789	0.1918	0.09958	0.08997
PDE3B	0.7748	0.2607	0.06978	0.05435
PDE4A1	74.7		158	47.75
PDE4B1	449.8		820.2	269.4
PDE4B2	106.8	1.412	75.41	23.83
PDE4C1	546.7		2160	618.1
PDE4D2	74.42	0.8177	61.36	15.35
PDE4D3	181.7		252.4	96.22
PDE5A1	>10000	2443	5823	7578
PDE6C	>10000		6207	9326
PDE7A1	>10000		>10000	>10000
PDE7B	>10000		>10000	9947
PDE8A1	>10000		1795	266.4
PDE9A2	>10000		>10000	>10000
PDE10A1	891.7		59.88	65.9
PDE10A2	679.9		40.27	48.34
PDE11A4	>10000		3070	1639

5 三、化合物对支气管平滑肌细胞活力的研究

取对数生长期细胞，将人支气管平滑肌细胞以每孔 1×10^5 个/mL 细胞密度接种于 96 孔板中，置于培养箱中培养，待细胞贴壁生长至密度 80% 时，分成 9 组，每组设置 6 个平行对照。分别用 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物处理细胞，空白对照（control）组加入基础培养基，继续培养 24 h，吸弃孔内液体。将 MTS 试剂：基础培养基按 1：4 比列进行配制，每孔加入 100 μL MTS 工作液，并且设置 Blank 对照孔，37℃避光孵育 2 h，选择 490 nm、630 nm 波长，在酶标仪上测定各孔光吸收值，记录结果，并计算 IC₅₀ 值。

用 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物处理人支气管平滑肌细胞 24 h，MTS 法评估细胞活力。结果见图 2A 至图 2G，与对照组相比，各浓度的本发明化合物均抑制人支气管平滑肌细胞的生长，并具有量效依赖性。

四、化合物对 LPS 诱导炎症模型的药效学研究

将人单核细胞重悬于含 1%胎牛血清（FBS）的 RPMI 1640 完全培养基中，以 1×10^6 个/ml 细胞密度，接种于 96 孔板中，每孔 100 μ L 细胞悬液。分为 14 个组，每组设置 6 个平行对照，包括：正常对照组，模型对照组，化合物 RPL-554 阳性对照低、高剂量组（0.78，1.56 μ mol/L），化合物 1-2 低、高剂量组（0.78，1.56 μ mol/L），化合物 10-2 低、高剂量组（0.78，1.56 μ mol/L），化合物 12-1 低、高剂量组（0.78，1.56 μ mol/L），化合物 19 低、高剂量组（0.78，1.56 μ mol/L），其中模型对照组和化合物组的 LPS 工作浓度为 1 μ g/ml。将细胞在无或有 LPS 及化合物的条件下继续孵育（5% CO₂，37℃）。24 h 后收集细胞培养上清，2000-3000 g 离心 5 min，去除沉淀，收集上清，检测 TNF- α 的水平。

细胞上清液中 TNF- α 水平检测结果如图 3 所示。模型对照组细胞上清液中 TNF- α 水平较正常对照组显著升高。RPL-554 阳性对照组和化合物组相较于模型组降低具有显著意义。

五、化合物对氯化乙酰胆碱诱导的气道收缩性豚鼠模型的药效试验

（1）观察供试品（本发明化合物 10-2）吸入给药对氯化乙酰胆碱引起的豚鼠气道收缩的抑制作用。将 40 只雄性 Hartley 豚鼠，随机分为阴性对照组（洁净空气，吸入时长 60 min）、供试品低剂量组（吸入时长 10min）、供试品中剂量组（吸入时长 20 min）、供试品高剂量组（吸入时长 60 min），10 只/组，单次吸入。动物吸入给药后约 2 h 时麻醉，手术分离气管及颈静脉，气管插入插管，颈静脉插入导管。动物放入体描箱支撑板上与气路相连，静脉导管远端牵引至体描箱外，然后关闭体描箱。通过颈静脉导管给予 25 μ g/kg、50 μ g/kg、100 μ g/kg 的氯化乙酰胆碱，采用 AniRes2005 动物肺功能分析系统进行气道阻力检测。

检测结果如图 4A 和图 4B 所示。供试品（本发明化合物 10-2）于 0.171 mg/kg、0.341 mg/kg、1.024 mg/kg 实际递送剂量下，单次雾化吸入给药，药后 2 h 对 25 μ g/kg~100 μ g/kg 剂量的乙酰胆碱诱导的气道收缩具有明显抑制作用，具有剂量反应关系。

（2）观察供试品（本发明化合物 1-2）吸入给药对氯化乙酰胆碱引起的豚鼠气道收缩的抑制作用。将 40 只雄性 Hartley 豚鼠，随机分为阴性对照组（洁净空气，吸入时长 30 min）、供试品低剂量组（吸入时长 6 min）、供试品中剂量组（吸入时长 12 min）、供试品高剂量组（吸入时长 30 min），10 只/组，单次吸入。动物吸入给药后约 2h 时麻醉，手术分离气管及颈静脉，气管插入插管，颈静脉插入导管。动物放入体描箱支撑板上与气路相连，静脉导管远端牵引至体描箱外，然后关闭体描箱。通过颈静脉导管给予不同剂量的氯化乙酰胆碱，采用 AniRes2005 动物肺功能分析系统进行气道阻力检测。

检测结果如图 5A 和图 5B 所示。供试品（本发明化合物 1-2）于 0.235 mg/kg、0.470 mg/kg、1.174 mg/kg 实际递送剂量下，单次雾化吸入给药，药后 2 h 对 25 μ g/kg~100 μ g/kg 剂量的乙酰胆碱诱导的气道收缩具有明显抑制作用，具有剂量反应关系。

六、化合物对雾化乙酰胆碱致小鼠气道收缩的影响

供试品配制：供试品纯度较高，称量时忽略杂质，按纯品计算。受试药配制浓度为 10mg/mL，溶剂为 25%DMSO 的 PH3.2 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液。

供试品的给予：采用 DSI 公司的 NAM 系统进行小鼠口鼻雾化给药，400 μL/只，分两次雾化，每 5 次雾化 5min，模型组雾化等量溶剂。

新接收实验动物，检疫 3 天，分组如前所述。使用 NAM 系统进行气道雾化给药，雾化过程为 5min（200 μL），间隔 3min，再次 5min（200μL），雾化给药完成后约 0.5h，采用 RC 系统雾化乙酰胆碱（15mg/ml，20μl，30s，0.9%生理盐水配制）进行激发致气道收缩，同时用 RC 仪器检测气道阻力（RL）的变化。结果见表 6。

10表 6

分组	基础值	15mg/ml Ach 激发	激发值	均值	标准差	抑制率%
RPL-554（14 mg/ml）	1	5.5	4.5			
	0.9	10.3	9.4			
	1	9.9	8.9	7.6	2.7	28.3
化合物 1-1（14 mg/ml）	1.0	13.2	12.2			
	0.9	4.1	3.2			
	1.1	9.7	8.6	8.0	4.5	24.5
化合物 1-2（14 mg/ml）	1.0	3.1	2.1			
	1.0	1.9	0.9			
	1.0	2.3	1.3	1.4	0.6	86.5

七、大鼠口服生物利用度试验

试验目的：考察大鼠灌胃给药 1 mg/kg 的 RPL-554、本发明化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 的生物利用度等药代动力学参数。

试验药品：RPL-554、本发明化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69。

15试验动物：雄性 SD 大鼠，30 只。

RPL-554-iv-1 mg/kg 组与 RPL-554-po-1 mg/kg 组给药溶液：称取约 3.11 mg 的 RPL-554，加入 0.3 mL 的 DMSO，再加入 29.7 mL 的生理盐水，涡旋 2 min 即得。溶液现配现用。

化合物 10-2-iv-1 mg/kg 组与化合物 10-2-po-1 mg/kg 组给药溶液：称取约 3.0 mg 的 10-2，加入 0.3 mL 的 DMSO，混匀后再加入 29.7 mL 的 10%碘丁基-β-环糊精生理盐水溶液，涡旋 2 min 至完全溶解，20 即得。溶液现配现用。

化合物 1-2-iv-1 mg/kg 组与化合物 1-2-po-1 mg/kg 组给药溶液：称取约 3.0 mg 的 1-2，加入 0.3 mL 的 DMSO，再加入 29.7 mL 的生理盐水，涡旋 2 min 即得。溶液现配现用。

化合物 67-iv-1 mg/kg 组与化合物 67-po-1 mg/kg 组给药溶液：称取约 3.0mg 的 67，加入 1.5 mL 的纯化聚氧乙烯 35 蓖麻油，再加入 28.5 mL 的生理盐水，涡旋 2 min，超声至完全溶解，即得。溶液现

配现用。

化合物 69-iv-1 mg/kg 组与化合物 69-po-1 mg/kg 组给药溶液：称取约 3.0mg 的 69，加入 1.5 mL 的 PEG-400，混匀后再加入 28.5 mL 的生理盐水，涡旋 2 min 超声至完全溶解，即得。溶液现配现用。

给药方案：尾静脉组尾静脉给药，灌胃组灌胃给药。见表 7。

5

表 7

组别	动物数量	给药剂量 (mg/kg)
	♂	
RPL-554-iv-1 mg/kg 组	3	1 (RPL-554)
RPL-554-po-1 mg/kg 组	3	1 (RPL-554)
化合物 1-2-iv-1 mg/kg 组	3	1 (化合物 1-2)
化合物 1-2-po-1 mg/kg 组	3	1 (化合物 1-2)
化合物 10-2-iv-1 mg/kg 组	3	1 (化合物 10-2)
化合物 10-2-po-1 mg/kg 组	3	1 (化合物 10-2)
化合物 67-iv-1 mg/kg 组	3	1 (化合物 67)
化合物 67-po-1 mg/kg 组	3	1 (化合物 67)
化合物 69-iv-1 mg/kg 组	3	1 (化合物 69)
化合物 69-po-1 mg/kg 组	3	1 (化合物 69)

大鼠给药及采样：10 组动物均按照 10 mL/kg 的给药体积，分别尾静脉/灌胃给药。给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、48 h，取血 0.2 mL，加入一次性使用抗凝管中，3500 rpm，4℃离心 10 min，取上清液-20℃冰箱保存，备测。

血浆处理和 LC/MS 分析：取 50 μL 的血浆样品于 1.5 mL 离心管中，加入 200 μL 的内标工作液，涡旋 5 min 后，于高速离心机 12000 rpm 下离心 10 min，取上清液，加入进样器小瓶进行 LC/MS 分析，记录色谱图。

10

药代动力学参数结果：化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 在大鼠体内主要 PK 特征与原研化合物 RPL-554 基本一致，口服生物利用度均极低。 见表 8、表 9。

表 8

PK 参数	T _{1/2}	C ₀	AUC _{last}	AUC _{INF_obs}
	h	ng/mL	h*ng/mL	h*ng/mL
RPL-554-iv-1 mg/kg 组	1.62	333.09	210.79	211.41
化合物 10-2-iv-1 mg/kg 组	0.58	706.51	381.25	381.58
化合物 1-2-iv-1 mg/kg 组	1.10	748.58	347.00	347.40
化合物 67-iv-1 mg/kg 组	1.08	339.49	193.67	196.57
化合物 69-iv-1 mg/kg 组	2.03	407.83	215.26	237.56

表 9

PK 参数	T _{1/2}	T _{max}	C _{max}	AUC _{last}	AUC _{INF_obs}	F
	h	h	ng/mL	h*ng/mL	h*ng/mL	%
RPL-554-po-1 mg/kg 组	4.60	0.25	0.91	1.59	3.13	1.48
化合物 10-2-po-1 mg/kg 组	2.05	0.42	3.83	4.02	4.69	1.23
化合物 1-2-po-1 mg/kg 组	9.61	0.28	1.15	2.23	5.21	1.50
化合物 67-po-1 mg/kg 组	2.76	0.83	0.76	1.04	2.43	1.24
化合物 69-po-1 mg/kg 组	3.42	0.67	2.62	3.04	4.36	1.84

八、人体外 PK 实验-血浆蛋白结合率

试验目的：考察 RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 体外人血浆蛋白结合率。

5 试验药品：RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69。

试验血浆：人血浆。

孵育条件：测试物孵育时间 5 小时；测试物孵育终浓度 0.5 μM；种属人；温度 37.0 °C。

试验步骤：

配制测试物以及华法林储备液，然后稀释并加入到血浆基质中，使体系中测试物的最终浓度为 10
10 μM；华法林的最终浓度为 1 μM。配制完后，随即取出 50 μL 于终止液中并补加入 50 μL 空白缓冲液，
作为 T0 样本，用以计算回收率；

试验组和系统对照组：在平衡透析装置的给药端分别加入 100 μL 含有华法林或测试物的血浆溶液
或 100 μL 含测试物的缓冲液；

将给药端和接收端置于 37 °C，100 转/分的条件下，孵育 5 小时；

15 稳定性试验组：测试物与血浆或空白缓冲液孵育 0 和 5 小时；

孵育结束后，按照组别取给药端的 50 μL 溶液样本并补加入 50 μL 空白缓冲液；取接收端的 50 μL
溶液样本并补加入 50 μL 空白血浆，使所有样本的最终体积量为 100 μL；

所有样本加入含内标的甲醇，沉淀蛋白，离心取上清后，LC-MS/MS 相对定量检测样品中测试物
或华法林的含量。

20 药代动力学参数结果：RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 在人血浆中均
表现高血浆蛋白结合率。见表 10。

表 10

化合物	蛋白结合率 (%)		平均值
	样本 1	样本 2	
RPL-554	91.8	92.9	92.4
化合物 10-2	96.3	96.9	96.6
化合物 1-2	93.9	90.6	92.3
化合物 67	98.5	98.4	98.4
化合物 69	98.0	97.7	97.9

九、人体外 PK 实验- CYP450 DDI

试验目的: 考察 RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 对 CYP3A4、CYP2C9、CYP2D6 的抑制作用。

试验药品: RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69。

5 CYP 酶: CYP3A4、CYP2C9、CYP2D6。

孵育条件: 测试物孵育时间: CYP3A4, 5 分钟; CYP2C9 和 CYP2D6, 10 分钟; 测试物孵育终浓度 10 μM; 微粒体蛋白浓度 0.5 mg/mL; NADPH 浓度 1.0 mM; 温度 37.0 °C。

试验步骤:

分别配制 CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4 的底物和抑制剂的工作液;

10 配制 NADPH 溶液, 并在使用前于水浴振荡器内 37 °C 预温;

将肝微粒体解冻并用缓冲液稀释;

在孵育板内每孔加入相应溶液后预孵育 15 分钟。分组: 测试物试验组= 各个浓度的测试物和肝微粒体溶液。阴性对照组 (NC) = 微粒体+缓冲液。阳性对照组 (PC) = 微粒体+ 各个亚酶的选择性抑制剂;

15 预孵育后再次加入相应溶液反应 (CYP3A4: 5 分钟; CYP2C9 和 CYP2D6: 10 分钟) 测试物试验组= 各个亚酶的底物+辅酶。阴性对照组 (NC) = 各个亚酶的底物+辅酶。阳性对照组 (PC) = 各亚个酶的底物+辅酶;

所有样本均在 37 °C 孵育, 在终止时间加入 预冷的甲醇以终止反应并记录时间;

所有样本混匀后 4000 转离心 10 分钟后取上清用 LC-MS/MS 上样分析。

20 药代动力学参数结果: 在 10 μM 的浓度下, RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 均对 CYP2C9 表现出一定的抑制作用, 但对 CYP2D6 的抑制作用较低。在 10 μM 的浓度下, RPL-554、化合物 10-2 对 CYP3A4 无抑制作用, 但化合物 1-2、化合物 67、化合物 69 对 CYP3A4 表现出不同程度的抑制。见表 11。

表 11

相对活性 (% of NC)				
测试物	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4 (底物: 睾酮)	CYP3A4 (底物: 咪达唑仑)
RPL-554	66.5	94.1	97.3	76.5
化合物 10-2	69.9	106	107	95.2
化合物 1-2	67.3	89.8	66.2	78.9
化合物 67	16.8	82.0	31.7	17.2
化合物 69	26.0	91.6	28.4	26.5

25 十、人体外 PK 实验-肝微粒体孵育试验

试验目的: 考察 RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 的体外代谢稳定性。

试验药品: RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69。

试验体系：人肝微粒体。

孵育条件：测试物孵育时间 0, 30, 60, 120 分钟；测试物孵育终浓度 0.5 μM；微粒体蛋白浓度 0.5 mg/mL；NADPH 和 UDPGA 浓度 1.0 mM；温度 37.0 °C。

试验步骤：

- 5
- 配制混合睾酮和 7-羟基香豆素工作液；
配制混合 NADPH 和 UDPGA 溶液，并在使用前于水浴振荡器内 37 °C 预温；
将肝微粒体解冻并用缓冲液稀释；
在孵育板内每孔加入配制好的测试物、肝微粒体溶液；
试验分成 3 组并进行加样。测试物试验组=测试物+微粒体+辅酶。测试物阴性对照组（NC）=测试物+微粒体+缓冲液。阳性对照组=Ⅰ相和Ⅱ相底物+微粒体+辅酶；
所有样本均在 37 °C 孵育，在每一个终止时间加入预冷的含内标的甲醇以终止反应并记录时间；
所有样本混匀后 4000 转离心 10 分钟后取上清用 LC-MS/MS 上样分析。
药代动力学参数结果：RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 的代谢类型见表 12。

15

表 12

测试物	种属	T120 - Remaining (% of 0 min)	T1/2 (min)	CLint (mL/min/kg)	T120 NC - Remaining (% of 0 min- NC)	代谢类型（快、中、慢）
RPL-554	人	5.10	<30 (15.1)	>57.9 (115)	86.3	快
化合物 1-2	人	27.5	64.2	27.1	86.1	中
化合物 10-2	人	4.53	<30 (11.8)	>57.9 (147)	79.3	快
化合物 67	人	8.76	<30 (9.7)	>57.9 (179)	56.6	快
化合物 69	人	10.9	<30 (12.3)	>57.9 (142)	91.0	快

十一、人体外 PK 实验- Caco2 细胞通透性试验

试验目的：考察 RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 的 Caco2 细胞通透性。

试验药品：RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69。

试验细胞系：人体结直肠腺癌细胞系。

- 20
- 孵育条件：试验体系 Caco-2；孵育时间 2 小时；测试物孵育终浓度 1 μM；温度 37.0 °C。

试验步骤：

渗透性试验前质量控制试验：在试验开始前，用电阻仪测定细胞跨膜电阻值，计算单层细胞膜的跨膜表观电阻值；

- 25
- 渗透性试验：试验前，吸去培养板中的细胞培养液后加入 37 °C 预温的 HBSS 缓冲液清洗 3 次（Apical 端和 Basal 端）；吸去板内缓冲液，在 B 端加入 800 μL 37 °C 预温的 HBSS 缓冲液，分别在 A 端*加入 500 μL 37 °C 预温普萘洛尔溶液（PC）、纳多洛尔溶液（SC）、测试物溶液*，并在 A 端取出 100 μL 溶液作为 0 小时 A 端样本，保存于-20 °C 待测；将培养板放入 37 °C 培养箱孵育 120 分钟；

孵育结束后，分别从所有样本的 A 端和 B 端各取出 100 μL 溶液作为 120 分钟的样本，保存于-20 °C 待测；所有样本与含内标甲醇按 1:4 混匀，采用 LC-MS/MS 方法进行检测；孵育结束后，从 B 端分别吸取 100 μL 放入黑色 96 孔板，配制 LFY 标准曲线，用荧光酶标仪在激发波长 485 nm。

注：A 端含 10 μM 荧光黄，测试物 buffer 中皆添加 0.1%BSA。

5 药代动力学参数结果：在测试浓度为 1 μM 时，测试物 RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 的 Papp (A-B)分别为 0.643×10⁻⁶ cm/s、0.412×10⁻⁶ cm/s、0.0477×10⁻⁶ cm/s、0.422×10⁻⁶ cm/s 和 0.594×10⁻⁶ cm/s，根据渗透性判定标准，提示测试物 RPL-554、化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 67、化合物 69 为低渗透性化合物。 见表 13。

表 13

测试物	P _{app} / 10 ⁻⁶ cm/s	回收率 %
RPL-554	0.643	116
化合物 1-2	0.412	97.0
化合物 10-2	0.0477	87.7
化合物 67	0.422	75.9
化合物 69	0.594	117

10 **十二、化合物对离体气管舒张功能的影响**

营养液的配制：改良 K-H 液（Krebs-Henseleit solution）成份为（mmol/L）：NaCl 133、KCl 4.7、MgSO₄ 0.61、NaH₂PO₄ 1.35、CaCl₂ 2.52、NaHCO₃ 16.3、glucose 7.8。除 NaHCO₃、CaCl₂和 glucose 于实验前临时加入外，其他成份均配成高浓度母液（常温保存）。实验当日，取适量的各母液，加入超纯水，稀释至所需浓度。配制好的营养液用盐酸调 pH 至 7.2~7.4，以 95%O₂ 和 5%CO₂ 的混合气体充分预饱和后备用。

15 实验动物：豚鼠，雄性，体重 300~350g/只，由北京维通利华实验动物技术有限公司，饲料亦有该中心提供。所有动物实验均根据国家卫生研究院关于实验动物的护理和使用的指南，饲养于河北以岭医药研究院有限公司新药评价中心，光照 12 小时/天，温度 20~26℃，相对湿度 40~70%，5 只/笼。实验动物玉米芯垫料，由江苏省协同医药生物工程有限公司提供，经高温高压消毒后使用。SPF 级繁殖饲料喂养，灌装洁净用水，动物自由饮用，每日换水一次。适应性喂养一周后，进行后续实验操作。

实验时称重记录，以木棒击其头部，击昏后迅速开胸，取自甲状软骨至肺实质气管分支处的完整气管，浸于通有 95% O₂、5% CO₂ 混合气体的 K-H 液中。

25 剥离气管周围的结缔组织，每隔 2 个软骨环将气管横行剪断，每四环结扎为一段气管连环，于气管环的管腔中平行穿入两个钨丝环，将标本至于含有 10 mL 改良 K-H 液的浴槽中。气管环的一侧借助钨丝环将标本固定于不锈钢支架的下端，另一侧借助钨丝环经丝线连接于张力换能器，气管的张力信号通过张力换能器记录于数据采集系统。浴槽维持温度 37℃，持续供给氧气，初始负荷调节 2 g，每 15 min 更换一次营养液，标本平衡 1h，此间换液 4 次，待实验条件平稳后开始实验。记录一段正常曲线，加入氯化乙酰胆碱(Ach) 至终浓度 1×10⁻⁵ mol/L，观察收缩高度达最大值时，依次加入终浓度为

0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物，每个浓度间隔 5min，记录舒张高度最小时的数值。气管舒张功能以气管舒张率表示，(化合物舒张幅度占 Ach 预收缩幅度的百分比)，并计算各化合物的 EC_{50} 值。

结果见图 6 和表 14。与阳性对照组比较，化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 12-1 和化合物 19 均能有效缓解乙酰胆碱引起的豚鼠离体器官平滑肌的收缩。

表 14

化合物名称	EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)
RPL-554	6.211
化合物 1-2	0.6258
化合物 10-2	0.1667
化合物 12-1	1.435
化合物 19	0.6657

十三、hERG 实验评价

实验材料见表 15。

表 15

试剂	品牌	货号
DMEM (高糖) 培养液	Gibco	C11995500BT
胎牛血清 (FBS)	Gibco	16000-044
G418	MedChem Express	HY-17561

10 稳定表达 hERG 通道的人胚肾细胞 (HEK293) 细胞系在含有 5% CO_2 的 37°C 细胞培养箱中的 DMEM 培养液里培养。细胞培养液中添加 10% 的胎牛血清 (FBS)，终浓度为 400 $\mu\text{g/ml}$ 的 G418。试验前，倒置显微镜下观察细胞生长融合度至 75% 左右时，用 0.25% 的胰蛋白酶消化后，得到单个的细胞悬液。吸取细胞悬液滴到细胞爬片上，置于细胞培养箱培养，待贴壁后用于膜片钳检测。阳性药用特非那定。

15 使用 Clampex 10.6 软件进行电压钳参数设置。在全细胞模式下，将细胞钳制在 -80 mV，125ms，施以 +50 mV，5000ms 的去极化电压以启动 hERG 通道，然后复极至 -50 mV，持续 5000 ms，诱发 hERG 通道特征性的尾电流，记录 hERG 特征性的尾电流。尾电流用于数据采集测量及分析。实验结果见表 16。

表 16

药物	抑制率(%)			
	n	1 μM	n	10 μM
RPL-554	3	17.2 $\pm$ 6.5	4	67.2 $\pm$ 3.4
化合物 1-2	3	6.9 $\pm$ 1.0	3	35.4 $\pm$ 2.0
化合物 10-2	3	23.0 $\pm$ 4.9	3	62.5 $\pm$ 15.4
化合物 12-1	3	11.5 $\pm$ 4.6	5	27.9 $\pm$ 5.6
化合物 19	3	7.7 $\pm$ 3.6	3	50.5 $\pm$ 2.4
特非那定			3	74.5 $\pm$ 1.5

结论：RPL-554、化合物 1-2 和化合物 19 在 10 μ M 浓度对 hERG 电流有抑制作用，其余各药物在 1 μ M 和 10 μ M 浓度对 hERG 电流均无作用。

十四、化合物对鼠伤寒沙门氏菌诱变性试验研究

分别评价化合物 1-2、化合物 10-2、化合物 12-1、化合物 19 对鼠伤寒沙门氏菌的细菌毒性和潜在诱变性，以确定后续鼠伤寒沙门氏菌诱变性试验中供试品的最佳剂量范围。

试验采用 5 种组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535（邵衍(苏州)新药研究中心有限公司提供）进行测试。在非代谢活化和代谢活化条件下，各菌株体系加入供试品的剂量分别为 5000、1500、500、150、50 μ g/皿。另外设溶媒对照组（DMSO）。每个测试点在代谢活化（加 S9 混合液：+S9）和非代谢活化（不加 S9 混合液：-S9）条件下，2 个平行皿，TA97a、TA98、TA100 和 TA1535 于 37 $^{\circ}$ C 培养约 48h，菌株 TA102 于 37 $^{\circ}$ C 培养约 72h，计数每皿回变菌落数，同时显微镜下观察背景菌苔。此外，观察对照品或供试品加入时或培养结束时是否有浑浊、沉淀析出现象。

①化合物 1-2：本试验中，在代谢活化和非代谢活化条件下，菌株 TA97a 和 TA100 在供试品 5000 μ g/皿剂量下可见细菌毒性，菌株 TA98、TA102、TA1535 在供试品 5000 μ g/皿剂量下各培养皿因析出无法判断毒性，其余条件下未见明显细菌毒性。在非代谢活化以及代谢活化条件下，化合物 1-2 对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 均无致突变性。

②化合物 10-2：本试验中，在代谢活化和非代谢活化条件下，菌株 TA100 在供试品 1500 μ g/皿剂量下可见细菌毒性，菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 在供试品 5000 μ g/皿剂量下、菌株 TA97a、TA98、TA102、TA1535 在供试品 1500 μ g/皿剂量下以及菌株 TA102 在供试品 500 μ g/皿剂量下各培养皿因析出的影响无法计数，无法判断毒性，其余条件下未见明显细菌毒性。在非代谢活化以及代谢活化条件下，化合物 10-2 对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 均无致突变性。

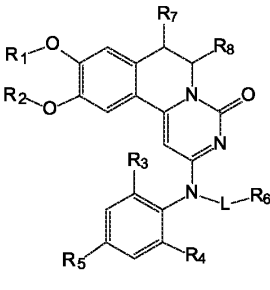
③化合物 12-1：本试验中，菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 在供试品 1500~5000 μ g/皿剂量下各培养皿因析出的影响无法观察背景菌苔，菌株 TA97a、TA98 和 TA102 在代谢活化和非代谢活化条件下以及 TA100 在代谢活化条件下因析出的影响无法计数无法判断毒性，其余条件下未见明显细菌毒性。在非代谢活化以及代谢活化条件下，化合物 12-1 对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 均无致突变性。

④化合物 19：本试验中，在非代谢活化以及代谢活化条件下，菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 在供试品 1500~5000 μ g/皿剂量下各培养皿因析出的影响无法观察背景菌苔，无法判断毒性，其余条件下未见明显细菌毒性。在非代谢活化以及代谢活化条件下，化合物 19 对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 均无致突变性。

以上所述仅是本发明的具体实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权利要求书

1. 一种具有结构式 I 的化合物或其药学上可接受的形式，所述药学上可接受的形式选自药学上可接受的盐或共晶、立体异构体、互变异构体、氘代物、溶剂化物、螯合物、非共价复合物或前体药物：

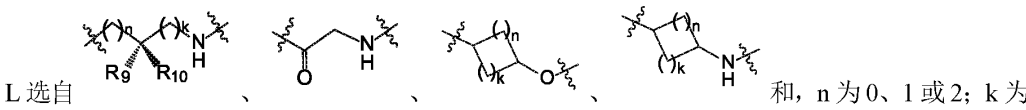


式 I

5 其中：

R₁、R₂ 各自独立地选自 H、C₁₋₆ 直链烷基、C₃₋₆ 支链烷基和 C₃₋₆ 环烷基；所述直链烷基、支链烷基或环烷基任选进一步被 0 至 4 个选自 D、F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基的取代基所取代；

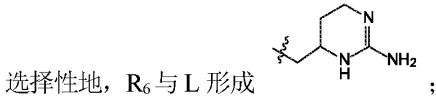
R₃、R₄、R₅ 各自独立地选自 H、卤素、CN、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 直链烷基、C₃₋₆ 支链烷基、和 C₃₋₆ 环烷基；所述烷氧基、直链烷基、支链烷基或环烷基任选进一步被 0 至 4 个选自 D、F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基的取代基所取代；



L 选自 和，n 为 0、1 或 2；k 为 0、1、2 或 3；所述 L 中的 H 任选进一步被 0 至 4 个选自 F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基的取代基所取代；其中，R₉、R₁₀ 各自独立地选自 H、C₁₋₆ 直链烷基、C₃₋₆ 支链烷基、C₃₋₆ 环烷基、C₃₋₆ 杂环烷基、C₆₋₁₀ 芳基、C₅₋₁₀ 杂芳基和 COOCH₃，且 R₉、R₁₀ 不同时为 H；所述杂芳基含有 1-3 个选自 N、O 和 S 的杂原子；



R₆ 选自 ；其中，R₁₁ 选自氨基、C₁₋₆ 烷氧基、C₃₋₁₂ 环烷基、C₆₋₁₀ 芳基、C₅₋₁₀ 杂环基，所述杂环基含有 1-3 个选自 N、O 和 S 的杂原子，所述氨基、烷氧基、环烷基、芳基、杂芳基任选进一步被 0 至 4 个选自 H、F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、CF₃、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基的取代基所取代；



选择性地，R₆ 与 L 形成

R₇、R₈ 各自独立地选自 H、=O、卤素、NH₂、CN、C₁₋₆ 直链烷基、C₃₋₆ 支链烷基、C₃₋₆ 环烷基和



2. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的形式, 其中:

R_1 、 R_2 各自独立地选自 CH_3 、 CHF_2 、 CD_3 或 C_{3-6} 环烷基;

优选地, R_1 、 R_2 分别为 CD_3 ;

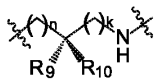
优选地, R_1 、 R_2 之一为 CH_3 , 另一为 CHF_2 。

5 3. 根据权利要求1或2所述的化合物或其药学上可接受的形式, 其中:

R_3 、 R_4 、 R_5 各自独立地选自 CH_3 、 i -Pr、OMe、 CD_3 或卤素;

优选地, R_5 为 CH_3 , 所述 CH_3 任选进一步被0至3个D所取代; R_3 、 R_4 相同, 选自 CH_3 、 i -Pr、OMe 或卤素。

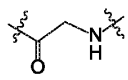
4. 根据权利要求1-3任一项所述的化合物或其药学上可接受的形式, 其中, L 选自以下方案之一:

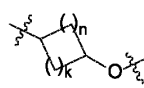
10 L 为  , n 为0或1, 优选为0;

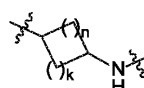
优选地, k 为0、1或2;

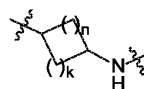
优选地, R_9 、 R_{10} 其中之一为 H, 另一选自 H、 C_{1-6} 直链烷基、 C_{3-6} 支链烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{3-6} 杂环烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{5-10} 杂芳基和 $COOCH_3$; 所述杂芳基含有1或2个杂原子 N; 所述 L 中的 H 任选进一步被0至4个选自 F、Cl、Br、I、OH、=O、 NH_2 、CN、COOH、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基的取代基

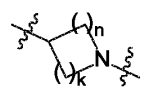
15 所取代;

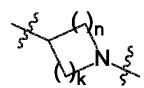
L 为  ;

L 为  , n 为0或1, k 为1;

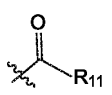
L 为  , n 为0或1, k 为1;

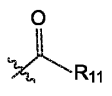
L 为  , n 为2, k 为2;

20 L 为  , n 为1, k 为1或2; 或者

L 为  , n 为2, k 为2。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的化合物或其药学上可接受的形式, 其中, R_6 选自以下方案之一:

R_6 为 ; 其中, R_{11} 为氨基, 所述氨基任选进一步被 0、1 或 2 个选自 F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、CF₃、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基的取代基所取代;

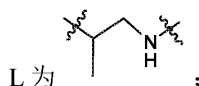
R_6 为 ; 其中, R_{11} 为 C₆₋₁₀ 芳基或 C₅₋₁₀ 杂环基, 所述杂环基含有 1、2 或 3 个杂原子 N; 所述芳基、杂芳基任选进一步被 0、1、2 或 3 个选自 H、F、Cl、Br、I、OH、=O、NH₂、CN、COOH、CF₃、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷基的取代基所取代。

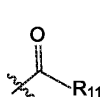
6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的化合物或其药学上可接受的形式, 其中, R_7 为 H 或 CH₃, R_8 为 H 或 F。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的形式, 其中:

R_1 、 R_2 各自独立地选自 CH₃ 或 CD₃;

10 R_3 、 R_4 、 R_5 分别为 CH₃;



R_6 为 ; 其中, R_{11} 为氨基、甲氧基、、、、 或 ;

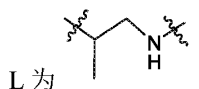
其中, 所述氨基任选进一步被 0 或 1 个甲基或环丙基所取代; 所述  任选进一步被 0 或 1 个甲基或 NH₂ 所取代;

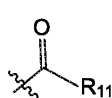
15 R_7 、 R_8 分别为 H。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的形式, 其中:

R_1 、 R_2 分别为 CH₃;

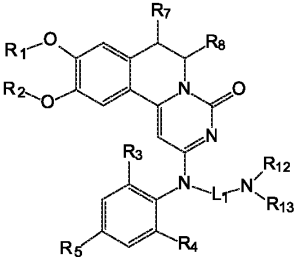
R_3 、 R_4 、 R_5 分别为 CH₃;



20 R_6 为 ; 其中, R_{11} 为氨基、、、、、、、、、、

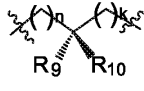
9. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的形式，其中，所述化合物或其药学上可接受的形式选自表 1 所示化合物中的一种或多种。

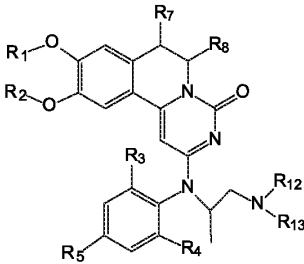
10. 一种中间体化合物，其具有式 II 所示结构：



式 II

5 其中，R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₇、R₈如权利要求 1-9 任一项所定义；

L₁选自 、、和；R₉、R₁₀、n、k 如权利要求 1-9 任一项所定义；R₁₂、R₁₃ 各自独立地为 H、Boc、Cbz、SEM、Fmoc、Alloc、Pht、OTs、PMB、Bn、Trt；
优选地，所述中间体化合物为



式 III

10 R₁₂、R₁₃ 其中之一为 H，另一为 Boc、Cbz、SEM、Fmoc、Alloc、Pht、OTs、PMB、Bn、Trt。

11. 一种制备权利要求 1-9 任一项所述的化合物或其药学上可接受的形式的方法，该方法包括：
对权利要求 10 所述的中间体化合物式 II 中所示的 R₁₂、R₁₃ 端进行修饰反应，制备具有结构式 I 的化合物。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，该方法还包括制备权利要求 10 所述的中间体化合物的过程。

15 13. 一种药物组合物，其包括：权利要求 1-9 任一项所述的化合物或其药学上可接受的形式，以及药学上可接受的载体、赋形剂和/或一种或多种其它治疗剂。

14. 权利要求 1-9 任一项所述的化合物或其药学上可接受的形式或权利要求 13 所述的药物组合物在制备用于抑制磷酸二酯酶的制剂中的应用。

15 15. 权利要求 1-9 任一项所述的化合物或其药学上可接受的形式或权利要求 13 所述的药物组合物在制备用于治疗磷酸二酯酶相关疾病的药物中的应用；

优选地，其中所述磷酸二酯酶相关疾病包括呼吸道疾病如哮喘。