

哌啶基吡啶生物及其制备方法和应用

技术领域

5 本发明涉及一种哌啶基吡啶生物及应用，具体为一种哌啶基吡啶生物及其制备方法，以及用于补体旁路途径活化特别是补体因子 B 相关的疾病或障碍治疗中的应用。

背景技术

10 补体系统主要由肝脏合成的多种蛋白质组成，在血液和组织中循环，约占血清中球蛋白的10%，是先天免疫系统的重要组成部分。在正常宿主细胞中，补体受到许多细胞表面蛋白的严格控制，避免了对自身组织造成伤害；而外来病原体和受损的宿主细胞容易受到这种攻击。当补体系统异常激活或过度活化时，可导致细胞和组织损伤，引起自身免疫性疾病和炎症性疾病。

15 补体系统主要由补体激活因子、调节因子和补体受体组成。在生理状态下，补体激活因子是以无活性的酶前体形式存在；当补体系统激活后会生成膜攻击复合物，作用于细胞膜形成小孔，最终导致靶细胞死亡。补体调节因子可以精细调控补体激活的各个环节。补体受体主要表达在免疫细胞膜表面，是一类膜蛋白。补体受体可以与激活的补体成分结合从而发挥招募白细胞到炎症部位、促进病原微生物的吞噬、清除血液系统中产生的免疫复合物等作用。

补体系统主要由 3 条途径激活：经典途径(classical pathway, CP)、凝集素途径 (lectin pathway, LP)和旁路途径(alternative pathway, AP)。

20 经典途径和凝集素途径是通过识别细胞表面的信号启动的。在这两种途径中，C4 和 C2 分子被裂解并形成 C4b2a。经典途径的这一反应是通过 C1 复合物实现的，而凝集素途径则是通过一些病原体相关分子模式 PAMPs，激活丝氨酸蛋白酶原（MASPs），MASP-1 和 MASP-2 进一步形成复合物，促进 C4 和 C2 的裂解，最终形成 C3 转化酶（C4b2a）。

25 旁路途径途径则不同于上述两条途径，它是通过 C3 的水解，暴露硫酸酯结构域，并在补体因子 B（CFB）和补体因子 D（CFD）的作用下，与活化的 Bb 分子结合，形成有活性的 C3 转化酶（C3（H₂O）Bb）。C3 分子在 C3 转化酶的作用下，进一步裂解为 C3a 和 C3b。沉积在表面的 C3b 可以在 CFB 的作用下，再形成新的 C3 转化酶（C3bBb），由此形成了 C3 的反应环。

此外，多余的 C3b 分子又可以与 C3 转化酶结合，形成 C5 转化酶（包括 C4b2aC3b 和 C3bBbC3b），将 C5 分子裂解为 C5a 和 C5b。C5b 与 C6、C7、C8 以及 C9 结合，形成膜攻击复合物（C5b9），最终引起靶细胞的损伤。

30 目前研究发现，血液性、自身免疫性、炎症性和神经变性等多种疾病与补体系统调节异常有关，如阵发性睡眠性血红蛋白尿（PNH）、免疫球蛋白 A 肾病（IgAN）、非典型溶血性尿毒症综合征（aHUS）、C3 肾小球病（C3G）、年龄相关性黄斑变性（AMD）、系统性红斑狼疮（SLE）、致密物沉积病（DDD）、ANCA 相关性血管炎（AAV）、免疫性血小板减少症（ITP）、冷凝集素病（CAD）等。

35 阵发睡眠性血红蛋白尿症（PNH）是一种罕见的获得性造血干细胞克隆性疾病，临床表现为不同程度的发作性血管内溶血、阵发性血红蛋白尿、骨髓造血功能衰竭和静脉血栓的形成。补体

衰变加速因子 CD55 和膜攻击复合物抑制因子 CD59 的缺失被认为是 PNH 患者血管内溶血的主要机制。CD55 和 CD59 在细胞表面生理性表达，CD55 通过加速 C3 和 C5 转化酶的衰变来抑制补体激活，而 CD59 通过在膜攻击复合物（MAC）组装过程中阻止 C9 插入 C5b-8 复合物来直接抑制 MAC 的形成，达到抑制补体终末攻击反应的作用。

5 IgAN 肾病是指肾小球系膜区以 IgA 沉积为主，伴或不伴有其他免疫球蛋白在肾小球系膜区沉积的原发性肾小球病。

IgA 肾病是由多种因素共同导致的，目前国际较为公认的为遗传或环境等因素导致半乳糖缺陷 IgA1（Gd-IgA1）增多；产生特异性抗 Gd-IgA1 的抗体；Gd-IgA1 与抗体结合形成含 IgA 的致病性免疫复合物；该免疫复合物导致肾小球损伤。补体活化是 Gd-IgA1 的免疫复合物沉积于 IgAN 患者肾脏系膜区后最常见的下游事件之一，提示补体旁路途径的异常活化与临床和病理改变程度相关。

C3 肾小球病(C3G)是一类由于补体旁路途径遗传性或获得性调节缺陷而引起补体 C3 在肾小球异常沉积的疾病。可表现为无症状血尿和/或蛋白尿，或急性肾炎综合征、肾病综合征、急进型肾炎综合征等。补体旁路途径失调是 C3G 发病机制中的主要驱动因素。

15 非典型溶血性尿毒症综合征（atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS）是一组临床表现为微血管病性溶血性贫血、血小板减少和脏器损伤，尤其是急性肾损伤的罕见而危重的临床综合征。先天性的补体旁路蛋白异常，或针对补体因子或补体途径调节蛋白的自身抗体，致补体旁路途径持续激活，是 aHUS 的主要致病机制。

年龄相关性黄斑变性（age-related macular degeneration, AMD）是由多因素引起的退行性疾病，是老年人群低视力乃至失明的主要原因，2040 年全球 AMD 患者数量预计将达到 2.88 亿例。目前，已有大规模的研究证实，补体激活在 AMD 的发病中起重要作用。抑制补体系统是一种涉及抑制补体蛋白以下调互补途径和形成膜攻击复合物的方法之一，是 dAMD 潜在的治疗方法。

ANCA 相关性血管炎（AAV）是一组以小血管免疫坏死性炎症为特征的系统性疾病。AAV 的特征是存在针对中性粒细胞蛋白酶 3（PR3-ANCA）或髓过氧化物酶（MPO-ANCA）的抗体。25 这些抗体可以激活中性粒细胞和补体系统，导致血管壁炎症和损伤。补体活化产物 C5a 与其相关受体 C5aR1（CD88）的相互作用成为公认的诱发炎症反应的关键环节，也成为治疗干预的关键靶点。

系统性红斑狼疮（SLE）是一种累及多脏器的慢性系统性自身免疫病，以多种致病性自身抗体的产生、免疫复合物（IC）的广泛沉积为特征，50%~60%的 SLE 患者在起病后 10 年内并发狼疮性肾炎（LN），LN 是导致 SLE 患者预后不良的主要原因之一。研究发现，大量免疫复合物的形成、沉积及补体系统过度激活或调节失衡与 LN 的发病、进展密切相关，补体活化是 LN 病情活动及复发的重要标志。

免疫性血小板减少症(ITP)是一种以血小板破坏增加和血小板生成减少而导致的以血小板降低为特征性疾病。大量的实验和临床证据表明，加速血小板清除的自身抗体的产生是 ITP 发病机制的核心，而这些 IgM 和一些 IgG 抗血小板抗体在体内激活补体进而导致补体级联放大反应加重疾病进展。早期研究显示，抑制 C5 末端补体激活可以改善血小板计数并迅速减少血栓栓塞并发症发生。

35 冷凝集素病（Cold agglutinin disease, CAD）是一种受较低温度影响，由冷凝集素

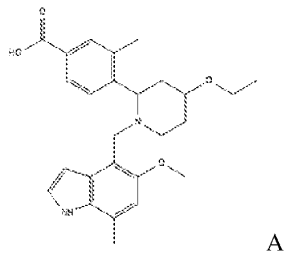
(coldagglutinins, CAs) 引起的自身免疫性溶血性贫血 (AIHA)。在这种疾病中, 免疫系统中的补体系统错误地攻击人体健康红细胞并导致红细胞破裂 (溶血)。CAD 患者可能会经历慢性贫血、严重疲劳、急性溶血危象和其他潜在的并发症, 包括血栓栓塞事件和早期死亡的风险升高。目前针对 CAD 治疗包括非药物治疗和药物治疗, 药物治疗包括一般治疗、针对 B 细胞的治疗以及补体抑制剂的治疗。补体抑制剂起效快, 可用于急性溶血, 但需长期维持治疗, 以避免溶血发生。

发明内容

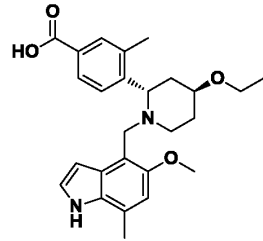
本发明的一个目的在于提供一种新的化合物, 以作为补体旁路途经活化因子调节剂。
本发明的另一个目的在于提供所述化合物的制备方法。
10 本发明的另一个目的在于提供包含所述化合物的组合物。
本发明的另一个目的在于提供所述化合物的应用。

技术方案一:

本发明提供了一种具有结构式 A 的化合物或其药学上可接受的形式:

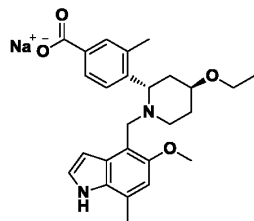


15 优选地, 所述化合物为式 I 所示的立体异构体:



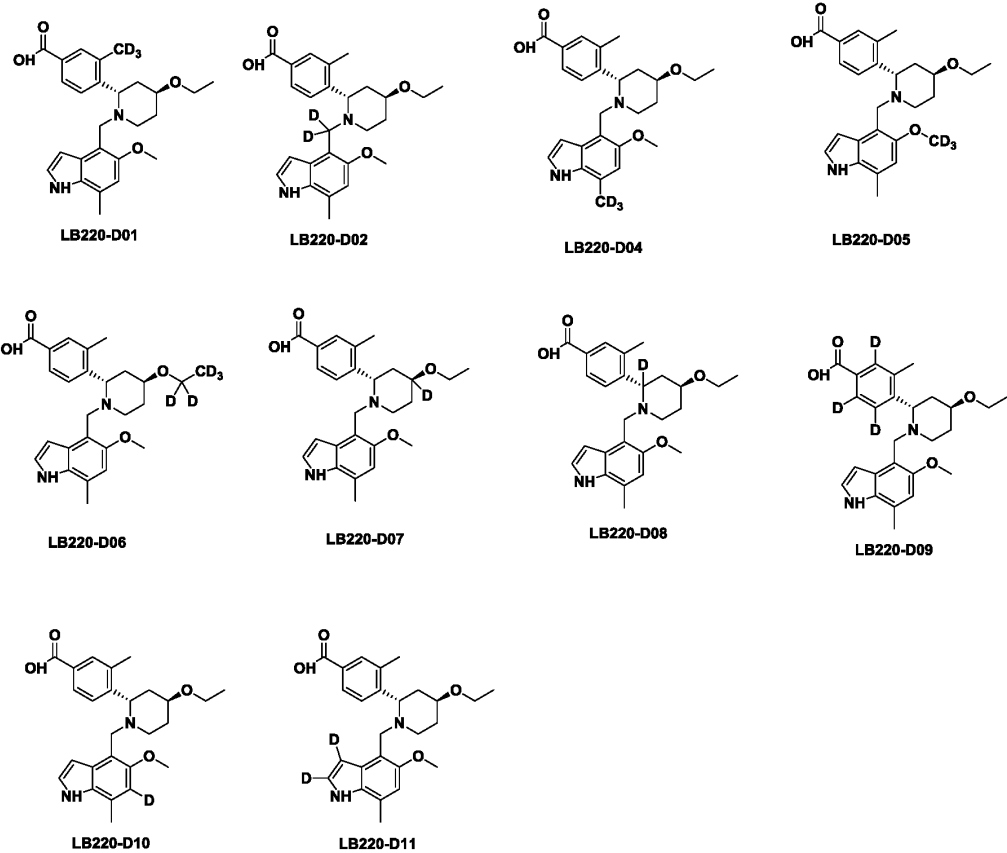
根据本发明的一些具体实施方案, 式 A 或式 I 化合物药学上可接受的形式选自药学上可接受的盐、氘代物、前体药物、多晶型物或溶剂化物。

所述药学上可接受的盐通常指当以适当的方式用于治疗时(特别是在人类和/或哺乳动物中应用或使用)在生理学上可耐受的任何盐(通常来说, 这意味着它是无毒的, 特别是作为抗衡离子的结果是无毒的)。这些生理上可接受的盐可以是化合物与阳离子或碱形成的, 也可以是与阴离子或酸形成的。具体地, 可以包括与碱金属、碱土金属或铵阳离子(NH₄⁺)形成的盐, 以及与盐酸、氢溴酸、硫酸、甲磺酸、甲酸、乙酸、草酸、琥珀酸、苹果酸、酒石酸、扁桃酸、富马酸、乳酸或柠檬酸形成的盐形成的盐。示例性的式 I 化合物药学上可接受的盐的化学结构式如下:



所述氘代物是指式 I 化合物中任意的 H 被氘取代得到的化合物，其可因更大的代谢稳定性而提供某些治疗优势，例如增加体内半衰期或降低剂量需求或治疗指数的改善。

根据本发明的一些具体实施方案，所述氘代物选自如下结构之一：



所述前体药物是指能在体内转化成式 I 化合物的那些衍生物，用以提高化合物的生物利用度或递送效率。

所述多晶型物是指化合物的任意晶体形式，可以是一种晶体单独存在，也可以是多种晶体共同存在。

10 所述溶剂化物通常指任何形式的根据本发明的活性化合物通过非共价键与另一分子(通常为极性溶剂)相结合，所获得的物质，具体可以是包括但不限于水化物和醇化物，例如甲醇化物。

技术方案二：

本发明提供了式 A 化合物的制备方法，包括如下步骤：

(1) 4-溴-3-甲基苯甲腈、4-甲氧基吡啶和氯甲酸苄酯在格氏试剂的催化下反应生成 2-(4-

氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯;

(2) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯加氢反应得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代哌啶-1-甲酸苄酯;

(3) 将所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代哌啶-1-甲酸苄酯中的羰基进行还原得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸苄酯;

(4) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸苄酯在缚酸剂存在下与硅烷化试剂反应, 对羟基进行保护, 得 4-((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)哌啶-1-甲酸酯;

(5) 所述 4-((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)哌啶-1-甲酸酯脱除羟基保护基得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯;

(6) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯与卤代烃进行亲核取代反应, 得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯;

(7) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯与酸和烷基醇反应, 得 4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸酯;

(8) 所述 4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸甲酯与 4-甲酰基-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯反应, 得 4-(4-乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯;

(9) 所述 4-(4-乙氧基-2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯水解得式 A 化合物 4-(4-乙氧基-1-(5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-4-基)甲基)哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸。

式 I 化合物可由式 A 化合物经 SFC 分离制备得到, 具体制备方法如下:

(1) 4-溴-3-甲基苯甲腈、4-甲氧基吡啶和氯甲酸苄酯在格氏试剂的催化下反应生成 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯;

(2) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯加氢反应得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代哌啶-1-甲酸苄酯;

(3) 将所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代哌啶-1-甲酸苄酯中的羰基进行还原得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸苄酯;

(4) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸苄酯在缚酸剂存在下与硅烷化试剂反应, 对羟基进行保护, 纯化得反式-4-((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)哌啶-1-甲酸酯;

(5) 所述反式-4-((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)哌啶-1-甲酸酯脱除羟基保护基得反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯;

(6) 所述反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯与卤代烃进行亲核取代反应, 得反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯;

(7) 所述反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯与酸和烷基醇反应, 得反式-4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸酯;

(8) 所述反式-4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸酯与 4-甲酰基-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯反应, 得反式-4-(4-反式乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)

甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯;

(9) 所述反式-4-(4-反式乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯经 SFC 纯化得 4-(2S, 4S)-4-乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯;

5 (10) 所述 4-(2S, 4S)-4-乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯水解得式 I 化合物 4-(2S, 4S)-4-乙氧基-1-(5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-4-基)甲基)哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸。

作为上述制备方法的一种具体方案, 步骤(1)中所述格氏试剂为异丙基溴化镁或异丙基氯化镁。

10 作为上述制备方法的一种具体方案, 步骤(4)中所述硅烷化试剂为叔丁基二苯基氯硅烷, 所述缚酸剂为咪唑。

作为上述制备方法的一种具体方案, 步骤(6)中所述卤代烃为碘乙烷。

作为上述制备方法的一种具体方案, 步骤(7)中所述酸为硫酸, 所述烷基醇为甲醇。

技术方案三:

15 本发明还提供了一种组合物, 其包含式 I 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。

所述载体是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的材料, 其对人体没有明显的刺激性且不会消除药物的生物活性。所述赋形剂是指与药物共同形成特定的给药形态以方便给药的材料, 其应与药物无配伍禁忌, 不产生副作用, 不影响疗效。所述其它治疗剂是指能与式 I 化合物共同给药且与其不发生不良反应的其他药物。

技术方案四:

本发明还提供了式 A 或式 I 化合物、其药学上可接受的形式或包含其的药物组合物的应用, 用于制备治疗补体旁路途径失调介导的疾病或障碍的药物。

25 根据本发明的一些具体实施方式, 所述补体旁路途径失调介导的疾病或障碍是由补体因子 B 介导的。

根据本发明的一些具体实施方式, 所述疾病或障碍为血液性、自身免疫性、炎症性和/或神经变性相关疾病或障碍。

30 根据本发明的一些具体实施方式, 所述疾病或障碍为阵发睡眠性血红蛋白尿、免疫球蛋白 A 肾病、非典型溶血性尿毒症综合征、年龄相关性黄斑病变、ANCA 相关性血管炎、系统性红斑狼疮、免疫性血小板减少症、冷凝集素病等补体旁路途径失调介导的疾病和/或 C3 肾小球病。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明的技术方案进行详细描述。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。没有特殊说明时, 柱层析一般使用 200~300 目硅胶为载体, 反应温度为室温

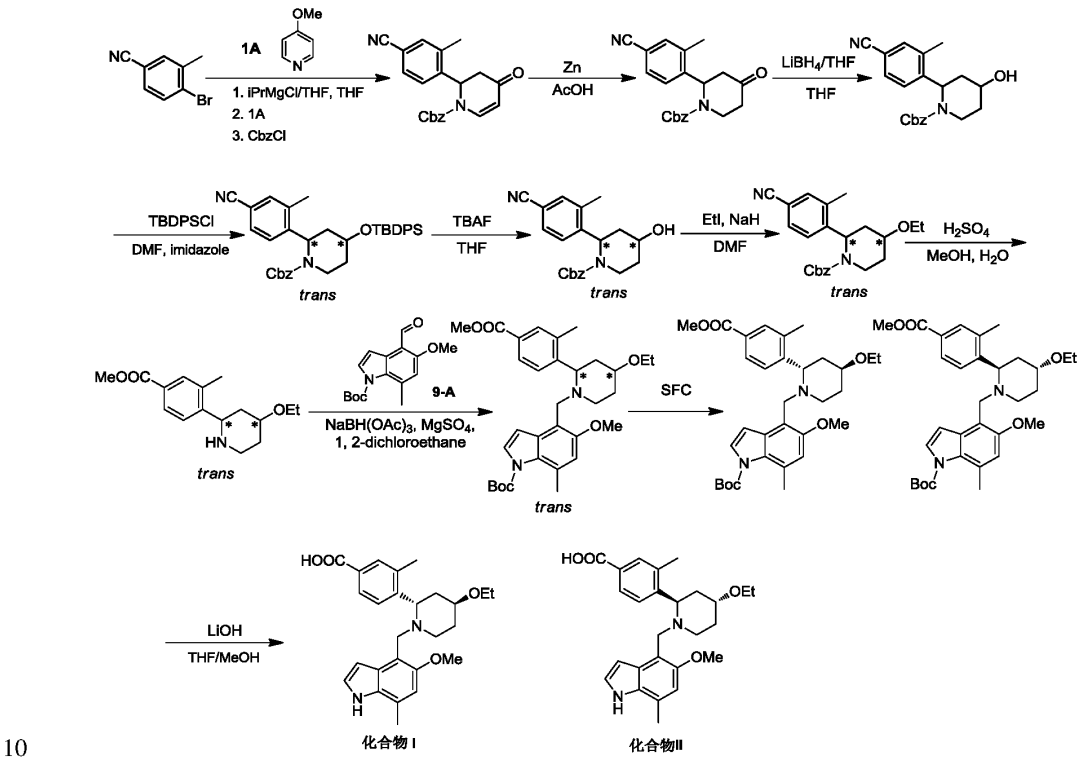
35 (20-30℃)。

字母缩写及含义

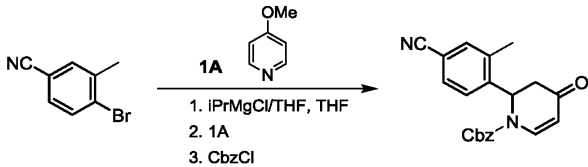
CbzCl 氯甲酸苄酯
EA 乙酸乙酯
PE 石油醚
MTBE 甲基叔丁基醚
5 TBDPSCI 叔丁基二苯基氯硅烷
SFC 超临界流体色谱

实施例 1

本实施例提供式 I 化合物，其制备方法如下：
合成路线：



1.

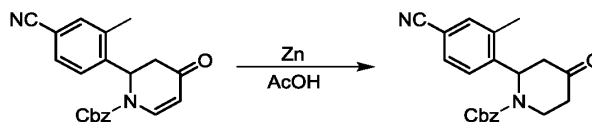


15

-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯 (28.8g, 产率 60.4%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 347.1$ 。

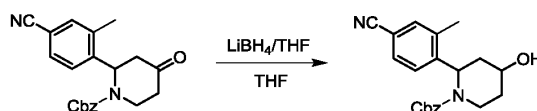
2.



5 氮气保护室温下, 向 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯 (28.0 g, 80.8 mmol) 的乙酸 (100 mL) 溶液中, 加入锌粉 (13.2 g, 202 mmol), 80 °C 下反应 1h。反应结束后过滤除去滤饼, 滤液旋干, 粗产物溶于 MTBE (150 mL) 和水 (80 mL)。分液得有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤 (80 mL), 无水硫酸钠干燥。混合物过滤, 减压浓缩得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代吡啶-1-甲酸苄酯 (18.2g)。

10 LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 349.0$ 。

3.



15 氮气保护, -45°C 下, 向 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代吡啶-1-甲酸苄酯 (19.5g, 55.9 mmol) 的四氢呋喃 (195 mL) 溶液中滴入硼氢化锂的四氢呋喃溶液 (2M, 36.9 mL), -45°C 下反应 1h。反应结束后加入硫酸氢钾的饱和水溶液 (100 mL) 淬灭反应。加入 MTBE (300 mL) 和饱和氯化钠溶液 (300 mL), 分液, 有机相用无水硫酸钠干燥后旋干, 得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基吡啶-1-甲酸苄酯 (19.0g, 产率 96.8%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 351.0$ 。

4.



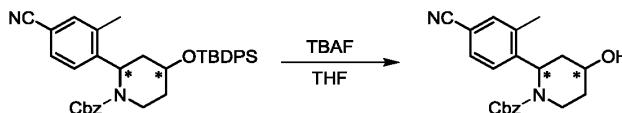
20

2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基吡啶-1-甲酸苄酯 (19 g, 54.2 mmol, 1.0 当量) 溶于 DMF (190 mL), 在室温下加入 TBDPSCI (19.4 g, 70.5 mmol, 1.3 当量) 和咪唑 (5.02 g, 73.7 mmol, 1.36 当量), 室温搅拌 12h。反应结束后室温下加入饱和食盐水 (150 mL) 和 MTBE (200 mL), 分液, 有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。柱层析 (EA/PE=1/10) 纯化得到反式-4-((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)吡啶-1-甲酸酯 (4 g, 产率 12.5%)。

25

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 589.2$ 。

5.

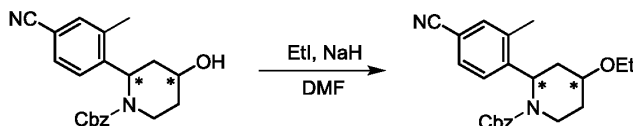


30 反式-4-((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)吡啶-1-甲酸酯 (3 g, 5.1

mmol, 1.0 当量)溶于四氢呋喃 (30 mL), 在室温下加入四丁基氟化铵 (2.41 g, 7.64 mmol), 室温搅拌 1h。反应结束后室温下加入饱和食盐水 (20 mL)和 MTBE (10 mL), 搅拌后分液, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗产物柱层析 (EA/PE=1/10 至 1/2)纯化得到反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯 (1.75 g, 产率 98.02%)。

5 LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 351.1$ 。

6.

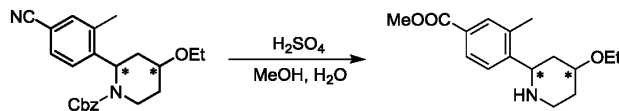


氢化钠 (499 mg, 12.5 mmol, 60%纯度) 溶于 DMF (9 mL), 降温至 -5°C 。反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯 (1.75g, 4.99 mmol) 加入至反应液中, $-5\sim 0^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 30min。

10 碘乙烷 (2.65g, 17 mmol) 逐滴滴入, $-5\sim 0^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 1h。反应结束后加入硫酸氢钾饱和溶液 (30 mL) 淬灭反应。加入乙酸乙酯 (80 mL) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗产物柱层析 (EA/PE=1/5) 纯化得到反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯 (1.3g, 产率 68.8%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 379.1$ 。

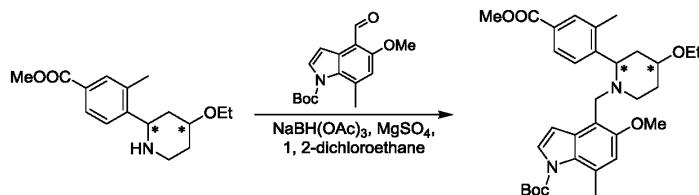
15 7.



反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯 (1.3 g, 3.43 mmol) 溶于甲醇 (13 mL) 和水 (13 mL) 中, 加入硫酸 (23.9g, 243 mmol), 80°C 下反应 12h。反应结束后加入饱和碳酸钠溶液至 pH=8-9。加入乙酸乙酯 (40 mL) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗产物柱层析 (DCM/MeOH=5/1) 纯化得到反式-4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸甲酯 (600 mg, 产率 62.9%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 278.0$ 。

8.



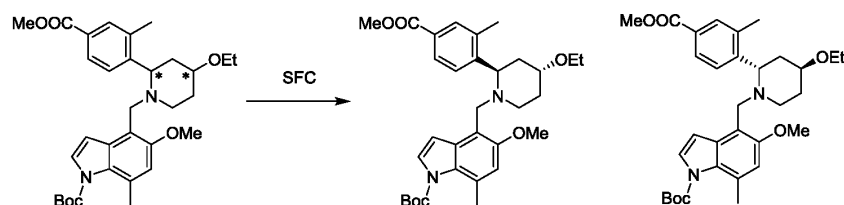
25 氮气保护室温下, 向反式-4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸甲酯 (600 mg, 2.16 mmol) 的 1,2-二氯乙烷 (12 mL) 溶液中加入硫酸镁 (796 mg, 6.62 mmol) 和 4-甲酰基-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (1.26 g, 4.37 mmol), 室温反应 4h。将三乙酰基硼氢化钠 (1.63 g, 7.68 mmol) 加入至反应液中, 室温反应 12h。反应结束后过滤得滤液, 除去溶剂得粗产物。制备液相提纯得反式-4-(4-反式乙氧基-2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (500 mg, 产率 41.9%)。条件如下 (柱型: Welch Ultimate XB - CN

30

250*50*10 μm ; 流动相: 体积比正己烷:乙醇=97:3, 等度洗脱, 流速: 60mL/min; 波长: 254nm/220nm, RT = 8.5 min。

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 551.3$ 。

9.



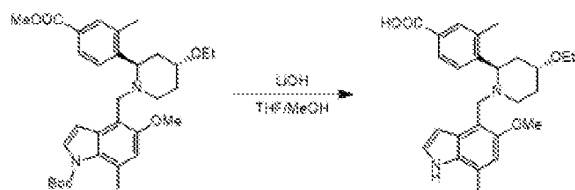
5

反式-4-乙氧基-2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (500 mg) SFC 纯化得 4-((2R, 4R)-4-乙氧基-2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (210 mg, 产率 42%) 和 4-((2S, 4S)-4-乙氧基-2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (165 mg, 产率 33%)。SFC 条件: 柱型: DAICEL CHIRALPAK AD (250 mm * 30 mm, 10 μm); 流动相: 体积比 CO_2 :MeOH=7:3, 等度洗脱, 波长: 254/220 nm; 流速: 40mL/min; 两个产物的保留时间分别为 RT1 = 10.2 min, RT2 = 16.5 min。

10

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 551.3$ 。

10.



15

4-((2R, 4R)-4-乙氧基-2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (210 mg, 0.381 mmol) 和氢氧化锂 (101 mg, 4.19 mmol) 溶于四氢呋喃 (2.3 mL) 和水 (2.3 mL), 50-55 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5.5h。反应结束后用 HCl (1M) 中和至 pH=7~8, 除去溶剂得粗产物。制备液相提纯, 得 4-((2R, 4R)-4-乙氧基-1-((5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-4-基)甲基)哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸 (化合物 II, 68.8 mg, 产率 41.2%)。制备条件, 柱型: Waters xbridge 150 * 25 mm 10 μm ; 水 (0.1% NH_4HCO_3), 流动相 B: 乙腈; 梯度: 10min 16% B 到 46% B; 流速: 40mL/min; 波长: 254/220nm; RT=12 min。

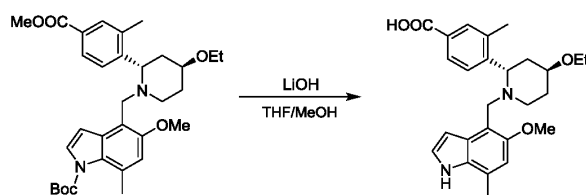
20

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 437.2$ 。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.75-9.25 (broad, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.75-7.45 (broad, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.50-4.45 (m, 2H), 3.72-3.55 (m, 7H), 3.52-3.30 (m, 4H), 3.01 (s, 1H), 2.41 (s, 6H), 2.05-1.75 (m, 2H), 1.22 (s, 3H)。

25

11.

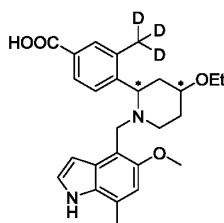


- 4-((2S, 4S)-4-乙氧基-2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吲哚-1-羧酸叔丁酯 (163 mg, 0.296 mmol) 和氢氧化锂 (77.9 mg, 3.26 mmol) 溶于四氢呋喃 (1.4 mL) 和水 (1.4 mL), 50-55°C 下反应 5.5h。反应结束后用 HCl (1M) 中和至 pH=7~8, 除去溶剂得粗产物。制备液相提纯, 得 4-((2S, 4S)-4-乙氧基-1-((5-甲氧基-7-甲基-1H-吲哚-4-基)甲基)哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸 (化合物 I, 88.4 mg, 产率 68.1%)。制备条件: 柱型: Waters xbridge 150 * 25 mm 10 um; 流动相 A: 水 (0.1% NH₄HCO₃), 流动相 B: 乙腈; 梯度: 10min 15% B 到 45% B; 流速: 40mL/min; 波长: 254/220nm; RT=12 min。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 437.2。

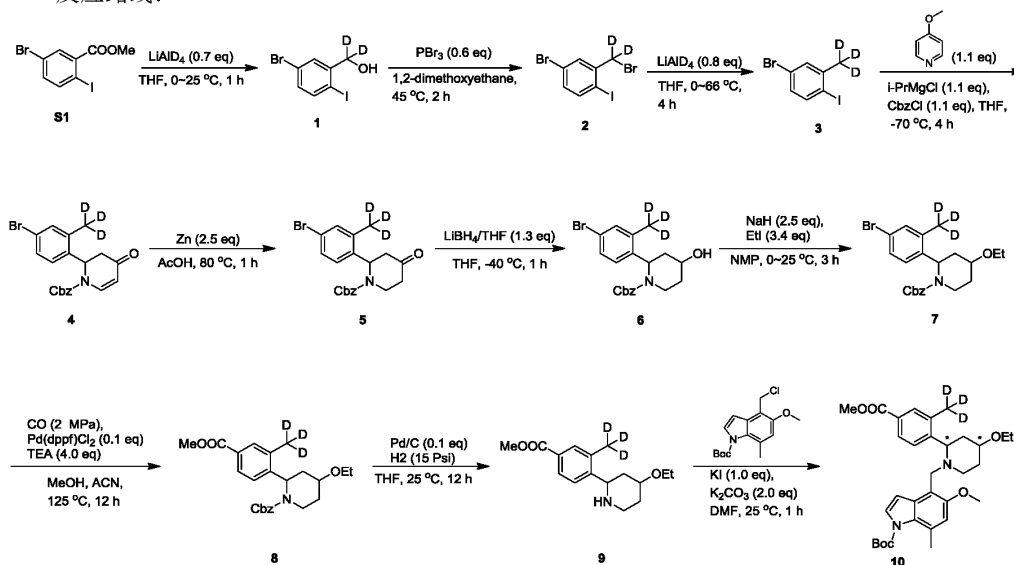
- ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.75-9.25 (broad, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.75-7.45 (broad, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.50-4.45 (m, 2H), 3.72-3.55 (m, 7H), 3.52-3.30 (m, 4H), 3.01 (s, 1H), 2.41 (s, 6H), 2.05-1.75 (m, 2H), 1.22 (s, 3H)。

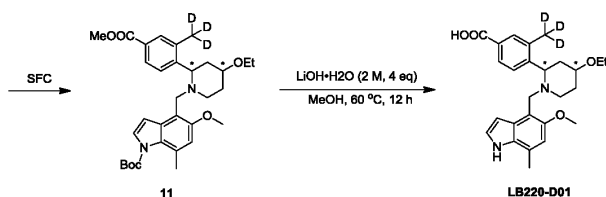
实施例 2



LB220-D01

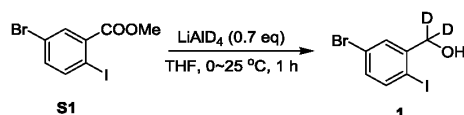
- 15 反应路线:





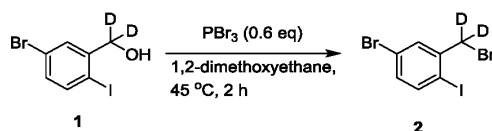
实验操作:

1:



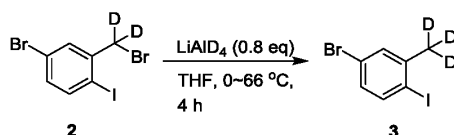
- 5 将化合物 **S1** (46.9 g, 138 mmol) 加入无水四氢呋喃(500 mL)中, 反应降温至 0 °C, 滴加 LiAlD_4 (3.46 g, 4.71 mL), 在 25 °C 反应 1 小时。薄层色谱 (乙酸乙酯: 石油醚= 20 : 1) 监测原料消耗完全。反应液在 0 ~10 °C 缓慢滴加水 (50.0 mL), 用乙酸乙酯 (100 mL * 2) 萃取, 有机相直接浓缩, 经柱层析 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 10: 1 到 3: 1) 分离纯化, 得到化合物 **1** (19.0 g, 产率: 43.8%)。

- 10 2:



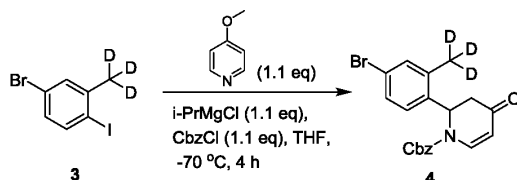
- 15 将化合物 **1** (17.9 g, 56.8 mmol) 加入乙二醇二甲醚(200 mL)中, 反应降温至 0 °C, 加入三溴化硼 (9.23 g, 34.1 mmol), 在 45 °C 反应 4 小时。薄层色谱 (乙酸乙酯 : 石油醚 = 20 : 1) 监测原料消耗完全。反应液在 0 ~10 °C 缓慢滴加饱和碳酸氢钠溶液 (100 mL)、水 (50.0 mL), 用乙酸乙酯 (100 mL * 3) 萃取, 有机相直接浓缩, 得到化合物 **2** (21.0 g, 产率: 97.7%)。

3:



- 20 将化合物 **2** (21.0 g, 55.5 mmol) 加入无水四氢呋喃(220 mL)中, 降温至 0 °C, 滴加 LiAlD_4 (1.87 g, 44.4 mmol), 在 25 °C 反应 0.5 小时, 后升温至 66 °C 反应 3 小时。薄层色谱 (乙酸乙酯: 石油醚 = 0 : 1) 监测原料消耗完全。反应液在 0 °C 缓慢滴加水 (20.0 mL), 用乙酸乙酯 (100 mL * 2) 萃取, 有机相直接浓缩, 经柱层析 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 100: 1 到 10: 1) 分离纯化得到化合物 **3** (19.0 g, 粗品)。

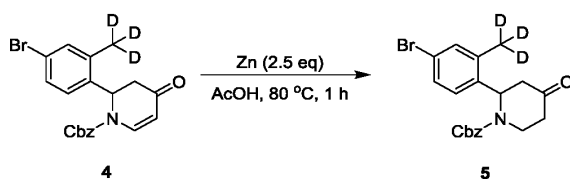
4:



将 **3** (16.5 g, 55.0 mmol) 加入无水四氢呋喃(170 mL)中降温至 -70~-60 °C, 滴加异丙基氯化镁氯化锂络合物 (1.30 M, 46.5 mL), 在该温度下反应 1 小时后加入 4-甲氧基吡啶 (6.60 g, 60.5 mmol) 和氯甲酸苄酯 (10.3 g, 60.5 mmol), 然后体系在 -70~-60 °C 反应 1 小时。薄层色谱 (乙酸乙酯: 石油醚 = 5 : 1) 监测原料消耗完全; 向反应液加盐酸 (5 M, 50.0 mL), 用乙酸乙酯 (200 mL * 3) 萃取, 饱和碳酸氢钠溶液 (500 mL * 2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥有机相, 干燥后的有机相直接过滤浓缩, 经柱层析 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 100: 1 到 3: 1) 分离纯化得到化合物 **4** (20.0 g, 产率: 87.8%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 404.9。

5:

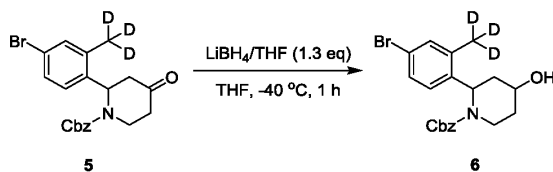


10

将化合物 **4** (7.20 g, 17.8 mmol) 加入乙酸(30.0 mL)中, 反应升温至 30 - 40 °C, 加入锌粉 (3.57 g, 49.1 mmol), 在 80 °C 反应 1 小时。¹H NMR 监测原料消耗完全。反应液过滤, 滤饼用乙酸乙酯 (100 mL * 1) 洗, 滤液用乙酸乙酯 (300 mL) 稀释, 合并有机相, 用饱和碳酸氢钠溶液 (500 mL * 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥有机相, 过滤后减压浓缩, 得到化合物 **5** (6.68 g, 产率: 92.3%)。

15

6:

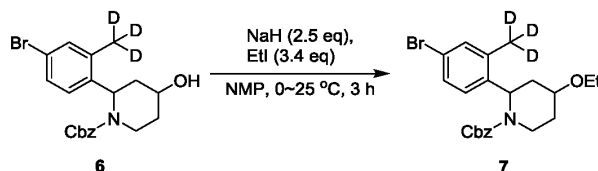


20

将化合物 **5** (6.68 g, 16.4 mmol) 加入无水四氢呋喃(70.0 mL)中, 反应降温至 -40 °C, 滴加硼氢化锂四氢呋喃溶液 (2 M, 10.7 mL), 在 -40 °C 反应 1 小时。薄层色谱 (乙酸乙酯: 石油醚 = 5 : 1) 监测到原料消耗完全。反应液在 0 °C 缓慢滴加氯化铵水溶液 (50.0 mL), 反应液用乙酸乙酯 (100 mL * 3) 萃取, 其中有机相直接浓缩, 经柱层析 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 100: 1 到 50: 1) 分离纯化得到化合物 **6** (5.70 g, 收率 84.8%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 409。

7:



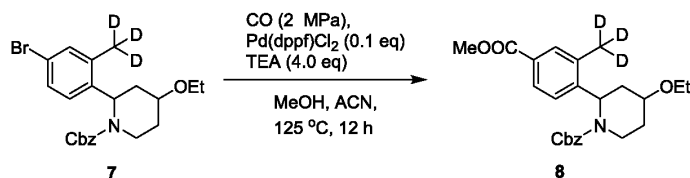
25

将 **6** (2.00 g, 4.91 mmol) 加入到 1-甲基-2-吡咯烷酮 (20.0 mL), 在 0 °C 氮气氛围下加入钠氢 (490 mg, 12.2 mmol, 60% purity), 在 25 °C 反应 1 小时, 然后在 0 - 5 °C 氮气氛围下加入碘乙烷(2.68 g, 17.1 mmol), 在 25 °C 反应 3 小时。薄层色谱 (乙酸乙酯: 石油醚 = 5 : 1) 显示原料消耗完全。在 0 °C 下, 向反应液中加入氯化铵水溶液(10.0 mL), 反应液用乙酸乙酯(50 mL * 3) 萃取, 其中有

机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。经柱层析分离提纯得到化合物 **7** (1.66 g, 收率: 77.6%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 391.1$ 。

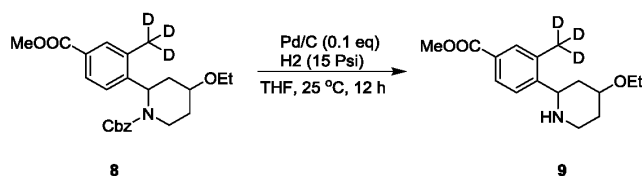
8:



- 5 将双三苯基膦二氯化钯(311 mg, 381 μ mol)加入无水甲醇(40.0 mL)和乙腈(10.0 mL), 依次加入化合物 **7** (1.66g, 3.81 mmol)和三乙胺(1.54 g, 15.2 mmol), 用 Ar 置换三次, 然后用 CO 置换三次, 体系在 CO (2 Mpa)氛围下, 升温至 125 °C, 反应 12 小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5 : 1)显示原料消耗完全。反应液过滤, 滤液减压浓缩。用柱层析 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 100: 1 到 3: 1) 分离提纯得到化合物 **8** (1.11g, 产率: 70.3%)。

- 10 LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 415.3$ 。

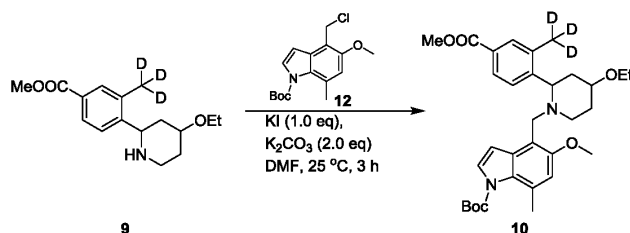
9:



- 15 将化合物 **8** (1.10 g, 2.65 mmol), 溶于无水乙醇(10.0 mL)和四氢呋喃(10.0 mL)中, 在氩气氛围下加入钯碳 (2.82 g, 10.0%), 然后用氩气置换三次, 再用氢气置换三次, 在氢气 (15 Psi) 氛围中 25 °C 下反应 12 小时。LCMS 监测发现化合物 **9** 生成。反应液过滤减压浓缩, 得到化合物 **9** (700 mg, 产率: 97.0%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 281.0$ 。

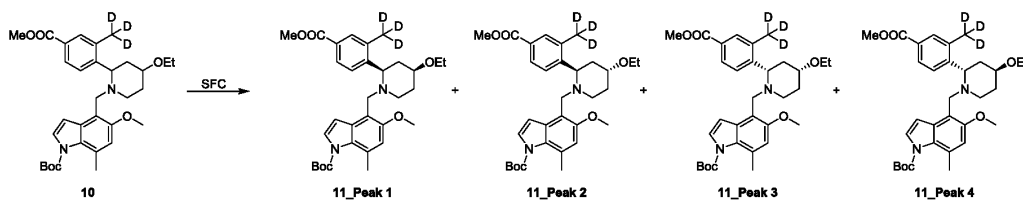
10:



- 20 将化合物 **9** (700 mg, 2.50 mmol)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(10.0 mL)中, 依次加入碘化钾(414 mg, 2.50 mmol), 碳酸钾(6.90 mg, 4.99 mmol)和化合物 **12** (1.16g, 3.74 mmol)室温反应 2 小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 3 : 1)监测到化合物 **10** 生成。向反应体系加入水(20.0 mL), 反应液用乙酸乙酯 (10.0 mL * 3)萃取, 有机相用盐水 (20.0 mL * 1) 洗涤后分液, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。经柱层析 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 100: 1 到 4: 1) 分离提纯得到化合物 **10** (500 mg, 收率: 91.7%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 554.7$ 。

11:



将化合物 **10** 用下述方法进行手性拆分 (which was further separated by SFC (柱: DAICEL CHIRALPAK AD(250mm*30mm, 10um); 流动相: [CO₂-异丙醇]; B%: 25%, 等度洗脱, 柱: DAICEL CHIRALPAK AD(250mm*30mm,10um); mobile phase: [CO₂-EtOH]; B%: 35%, 等度洗脱 and 柱: DAICEL CHIRALPAK AD(250mm*30mm, 10um); 流动相: [CO₂-异丙醇]; B%:30%, 等度洗脱). 得到化合物 **11_Peak 1** (30.0 mg, 产率: 6.00%, 保留时间 3.5min); 化合物 **11_Peak 2** (30.0 mg, 产率: 6.00%, 保留时间 5.5min); 化合物 **11_Peak 3** (180 mg, 产率: 36.0%, 保留时间 12.5min); 化合物 **11_Peak 4** (200 mg, 产率: 40.0%, 保留时间 15.5min)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 554.3。

10 12:



将化合物 **11_Peak 1** (30.0 mg, 54.1 μmol)加入无水甲醇(0.50 mL)和水(0.10 mL), 依次加入一水合氢氧化锂 (11.3 mg, 270 μmol), 体系升温至 60 °C, 反应 12 小时。LCMS 显示原料消耗完全。减压浓缩去除甲醇, 水相用盐酸(0.5 M)调 pH 至 7, 用乙酸乙酯 (10.0 mL * 3) 萃取水相, 有机相合并后直接减压浓缩。用中性反相高效液相色谱分离提纯(柱: CD24-WePure Biotech XPT C18 150*25*7um; 流动相: [H₂O(10mM NH₄HCO₃)-ACN]; 梯度:12%-42% B over 11.0 min)。得到化合物 **LB220-D01-1** (6.86 mg, 收率: 28.6%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 440.3。

¹H NMR: EC19837-666-P1A1 (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ = 9.93 - 8.92 (m, 1H), 8.38 - 8.12 (m, 1H), 7.97 - 7.86 (m, 1H), 7.80 - 7.49 (m, 1H), 7.05 - 6.92 (m, 1H), 6.59 - 6.48 (m, 1H), 6.35 (br s, 1H), 4.51 - 4.36 (m, 1H), 4.30 - 4.16 (m, 1H), 3.78 - 3.71 (m, 1H), 3.66 (br s, 3H), 3.50 - 3.44 (m, 2H), 3.36 (br s, 1H), 2.98 (br d, J = 2.0 Hz, 1H), 2.39 (br s, 5H), 2.00 (br d, J = 12.5 Hz, 1H), 1.84 - 1.75 (m, 1H), 1.31 - 1.17 (m, 4H) 。

13:



25

化合物 **11_Peak 2** (30.0 mg, 54.1 μmol)加入无水甲醇(0.50 mL)和水(0.10 mL), 依次加入一水合氢氧化锂 (11.3 mg, 270 μmol), 体系升温至 60 °C, 反应 12 小时。LCMS 显示原料消耗完全。

减压浓缩移除甲醇，水相用盐酸(0.5 M)调 pH 至 7，用乙酸乙酯 (10.0 mL * 3) 萃取水相，有机相合并后直接减压浓缩。用中性反相高效液相色谱分离提纯(柱: CD24-WePure Biotech XPT C18 150*25*7um; 流动相: [H₂O(10mM NH₄HCO₃)-ACN]; 梯度: 12%-42% B over 11.0 min)。得到化合物 **LB220-D01-2** (9.81 mg, 收率: 40.0%)。

5 LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 440.3。

¹H NMR: EC19837-668-P1A2 (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.93 - 7.79 (m, 2H), 7.78 - 7.70 (m, 1H), 7.27 - 7.19 (m, 1H), 6.68 - 6.61 (m, 1H), 6.45 - 6.35 (m, 1H), 3.89 (br d, J = 10.8 Hz, 1H), 3.70 - 3.65 (m, 3H), 3.64 - 3.53 (m, 2H), 3.47 - 3.36 (m, 2H), 3.31 (br d, J = 11.4 Hz, 1H), 2.55 (br d, J = 12.0 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.82 (br d, J = 12.1 Hz, 1H), 1.69 - 1.54 (m, 2H), 1.25 - 1.18 (m, 1H), 1.16 - 0.99 (m, 3H)。

14:



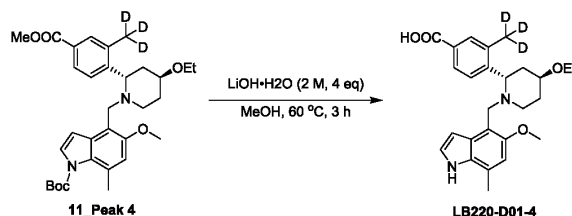
将化合物 **11_Peak 3** (180 mg, 325 μmol) 加入无水甲醇(1.00 mL)和水(0.50 mL)，依次加入一水合氢氧化锂 (68.2 mg, 1.63 mmol)，体系升温至 60 °C，反应 12 小时。LCMS 显示原料消耗完全。

15 减压浓缩移除甲醇，水相用盐酸(0.5 M)调 pH 至 7，用乙酸乙酯 (10.0 mL * 3) 萃取水相，有机相合并后直接减压浓缩。用中性反相高效液相色谱分离提纯(柱: CD24-WePure Biotech XPT C18 150*25*7um; 流动相: [H₂O(10mM NH₄HCO₃)-ACN]; 梯度: 12%-42% B over 11.0 min)。得到化合物 **LB220-D01-3** (52.4 mg, 收率: 36.0%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 440.3。

20 ¹H NMR: EC19837-665-P1A (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.85 - 10.77 (m, 1H), 7.90 - 7.80 (m, 2H), 7.80 - 7.73 (m, 1H), 7.28 - 7.22 (m, 1H), 6.68 - 6.61 (m, 1H), 6.43 - 6.36 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.55 - 3.51 (m, 1H), 3.47 (br s, 1H), 3.45 - 3.39 (m, 3H), 3.15 (br d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.79 (br d, J = 12.1 Hz, 1H), 2.44 - 2.38 (m, 3H), 2.10 - 2.01 (m, 1H), 1.97 (br d, J = 11.0 Hz, 1H), 1.88 - 1.80 (m, 1H), 1.40 - 1.30 (m, 1H), 1.25 - 1.15 (m, 1H), 1.07 - 1.01 (m, 3H)。

25 15:



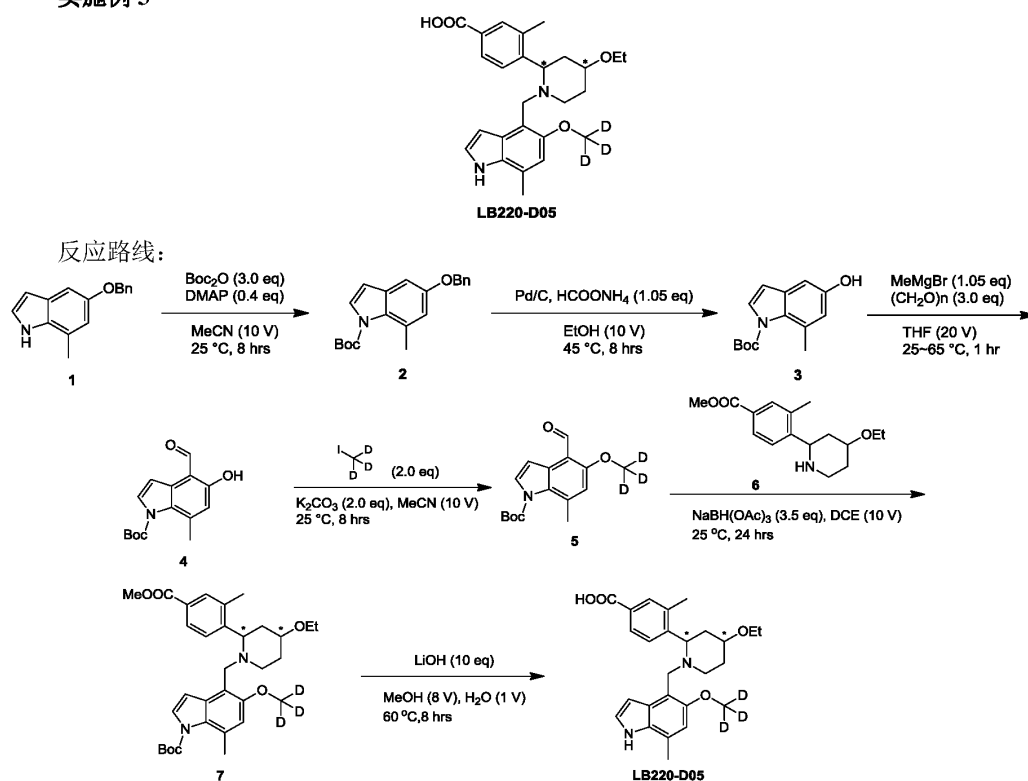
将化合物 **11_Peak 4** (200 mg, 331 μmol) 加入无水甲醇(1.00 mL)和水(0.50 mL)，依次加入一水合氢氧化锂 (75.7 mg, 1.81 mmol)，体系升温至 60 °C，反应 12 小时。LCMS 显示原料消耗完全。减压浓缩移除甲醇，水相用盐酸(0.5 M)调 pH 至 7，用乙酸乙酯 (10.0 mL * 3) 萃取水相，有机

相合并后直接减压浓缩。用中性反相高效液相色谱分离提纯(柱: CD24-WePure Biotech XPT C18 150*25*7um; 流动相: [H₂O(10mM NH₄HCO₃)-ACN]; 梯度: 12%-42% B over 11.0 min)。得到化合物 **LB220-D01-4** (59.8 mg, 收率: 37.5%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 440.3。

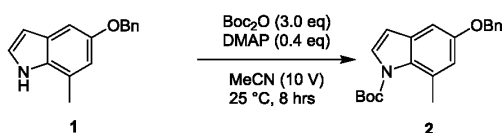
- 5 ¹H NMR: EC19837-665-P1A (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ = 8.05 - 7.97 (m, 2H), 7.94 (br s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.21 - 7.17 (m, 1H), 6.70 - 6.68 (m, 1H), 6.65 (br s, 1H), 3.78 (s, 4H), 3.51 (q, J = 7.0 Hz, 3H), 3.44 - 3.37 (m, 1H), 3.29 (br d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.05 (br d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.15 (br d, J = 12.6 Hz, 1H), 2.09 - 2.04 (m, 1H), 1.92 (br d, J = 12.1 Hz, 1H), 1.64 - 1.50 (m, 2H), 1.17 (t, J = 7.0 Hz, 3H)。

10 实施例 3



15 实验操作:

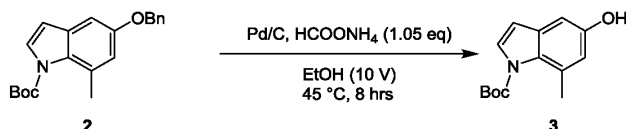
1:



- 将化合物 **1** (2.00 g, 8.43 mmol, 1.00 eq)溶解于 MeCN (20.0 mL), 在 25 °C 加入 Boc₂O (5.52 g, 25.3 mmol, 5.81 mL, 3.00 eq)和 DMAP (412 mg, 3.37 mmol, 0.40 eq), 反应液在 25 °C 反应 8 小时。
- 20 薄层色谱板检测(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯= 10: 1) 监测到原料消耗完全。在 25 °C 下向反应液中加入饱和 NH₄Cl 水溶液(20.0 mL), 用乙酸乙酯(20 mL * 2)萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 过

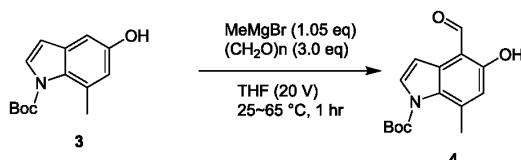
滤，减压浓缩。经柱层析分离提纯(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 20: 1 到 10: 1) 得到化合物 **2** (2.80 g, 收率: 98.5% yield)。

2:



5 将化合物 **2** (2.80 g, 8.30 mmol, 1.00 eq) 溶解于 EtOH (25.0 mL), 在 25 °C 加入 Pd/C (883 mg, 830 μmol , 纯度 10.0%, 0.10 eq) 和 HCOONH_4 (549 mg, 8.71 mmol, 1.05 eq), 反应液在 45 °C 反应 3 小时。薄层色谱板检测(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 10: 1) 监测到原料消耗完全。反应液通过硅藻土过滤, 滤饼用 MeOH (50.0 mL) 洗涤, 合并有机相, 减压浓缩得到化合物 **3** (2.10 g, 粗品)。

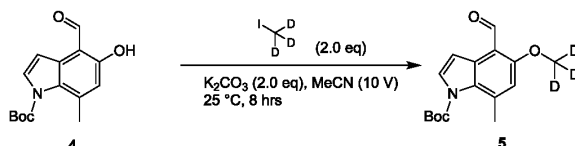
3:



10

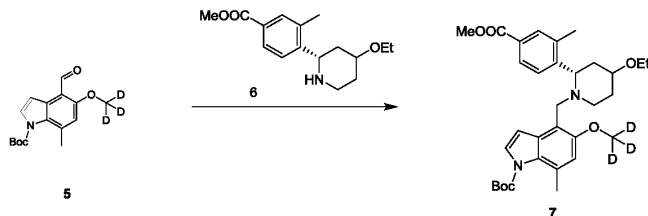
将化合物 **3** (1.60 g, 6.47 mmol, 1.00 eq) 溶解于 THF (30.0 mL), 在 20~25 °C 缓慢滴加 MeMgBr (3.00 M, 2.26 mL, 1.05 eq), 反应液在 45 °C 反应 0.5 小时, 然后加入多聚甲醛(640 mg, 19.4 mmol, 3.00 eq), 反应液在 65 °C 反应 1 小时。薄层色谱板检测(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 10: 1, $R_f = 0.66$) 监测到原料消耗完全。在 25 °C 下向反应液中缓慢滴加饱和 NH_4Cl 水溶液(20.0 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL * 2) 萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。经柱层析分离提纯(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 1: 0 到 100: 1)。得到黄色固体化合物 **4** (640 mg, 收率: 35.9%)。

4:



20 将化合物 **4** (640 mg, 2.32 mmol, 1.00 eq) 和 K_2CO_3 (643 mg, 4.65 mmol, 2.00 eq) 溶解于 MeCN (7.00 mL), 在 25 °C 加入 CD_3I (674 mg, 4.65 mmol, 289 μL , 2.00 eq), 反应液在 25 °C 反应 8 小时。薄层色谱板检测(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 20: 1) 监测到原料消耗完全。在 25 °C 下向反应液中加入水(10.0 mL), 用乙酸乙酯(10 mL * 2)萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。经柱层析分离提纯(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 20: 1)。得到化合物 **5** (600 mg, 收率: 88.3%)。

5:



25

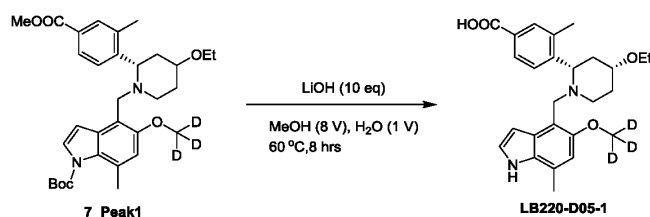
将化合物 **6** (600 mg, 2.05 mmol, 1.00 eq) 和 **5** (569 mg, 2.05 mmol, 1.00 eq) 溶解于 DCE (10.0

mL), 在 25 °C 加入 MgSO_4 (741 mg, 6.16 mmol, 3.00 eq), 反应液在 25 °C 反应 12 小时。然后 25 °C 加入 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1.52 g, 7.18 mmol, 3.50 eq), 反应液在 25 °C 反应 12 小时。LCMS 显示原料消耗完全。反应液通过硅藻土过滤, 滤饼用 EtOAc (20.0 mL) 洗涤, 合并有机相用饱和 NaHCO_3 水溶液(15.0 mL)洗涤, 有机相用水(10.0 mL)洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。用中性反相高效液相色谱分离提纯(柱: Phenomenex luna C18 100*40mm*3 μm ; 流动相: $[\text{H}_2\text{O}(0.05\%\text{HCl})\text{-ACN}]$; 梯度: 38%-68% B over 15.0 min)。得到化合物 **7_Peak1** (170 mg, 收率: 15.0%, 保留时间 4.8min)。得到化合物 **7_Peak2** (209 mg, 收率: 16.7%, 保留时间 8.5min)。得到化合物 **LB220-D05-7_Peak3** (32.0 mg, 收率: 2.82%, 保留时间 13.4min)。

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 554.4$ 。

10

6:

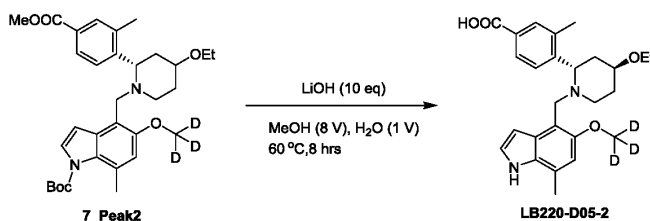


将化合物 **7_Peak1** (170 mg, 307 μmol , 1.00 eq)溶于 MeOH (5.00 mL)和 H_2O (1.00 mL)中, 加入一水合氢氧化锂(129 mg, 3.07 mmol, 10.0 eq), 反应液在 60 °C 下反应 8 小时。LCMS 显示原料消耗完全。反应液用盐酸(2.00 M)将体系 pH 调至 7~8 后减压浓缩。用中性反相高效液相色谱分离提纯(柱: CD07-Daisogel SP-100-8-ODS-PK 150*25*10 μm ; 流动相: $[\text{H}_2\text{O}(10\text{mM } \text{NH}_4\text{HCO}_3)\text{-ACN}]$; 梯度: 15%-45% B over 10.0 min)。得到化合物 **LB220-D05-1** (40.53 mg, 收率: 29.1%)。

^1H NMR: (400 MHz, MeOD) δ 8.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.32 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 4.59-4.64 (m, 2H), 4.24-4.27 (m, 1H), 4.00-4.03 (m, 1H), 3.72-3.78 (m, 1H), 3.55-3.60 (m, 2H), 3.47-3.50 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.30-2.34 (m, 1H), 2.17-2.20 (m, 1H), 1.83-1.93 (m, 1H), 1.69-1.77 (m, 1H), 1.16 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)。

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 440.2$ 。

7:



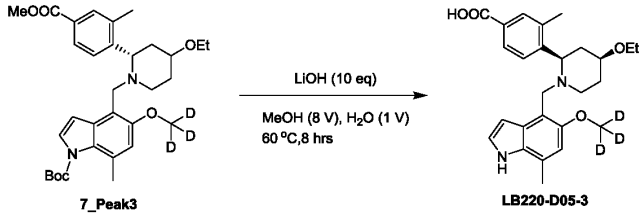
将化合物 **7_Peak2** (209 mg, 3.77 μmol , 1.00 eq)溶于 MeOH (5.00 mL)和 H_2O (1.00 mL)中, 加入一水合氢氧化锂(158 mg, 3.77 mmol, 10.0 eq), 反应液在 60 °C 下反应 8 小时。LCMS 显示原料消耗完全。反应液用盐酸(2.00 M)将体系 pH 调至 7~8 后减压浓缩。用中性反相高效液相色谱分离提纯(柱: CD07-Daisogel SP-100-8-ODS-PK 150*25*10 μm ; 流动相: $[\text{H}_2\text{O}(10\text{mM } \text{NH}_4\text{HCO}_3)\text{-ACN}]$; 梯度: 15%-45% B over 10.0 min)。得到化合物 **LB220-D05-2** (64.40 mg, 收率: 38.8%)。

^1H NMR: (400 MHz, MeOD) δ 8.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H),

7.31 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.40 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.29-4.32 (m, 1H), 4.16-4.19 (m, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.59-3.64 (m, 2H), 3.53-3.56 (m, 1H), 3.36 (s, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.10-2.21 (m, 2H), 1.98-2.06 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)。

LCMS (ESI, *m/z*): [*M*+*H*]⁺ = 440.2。

5 8:

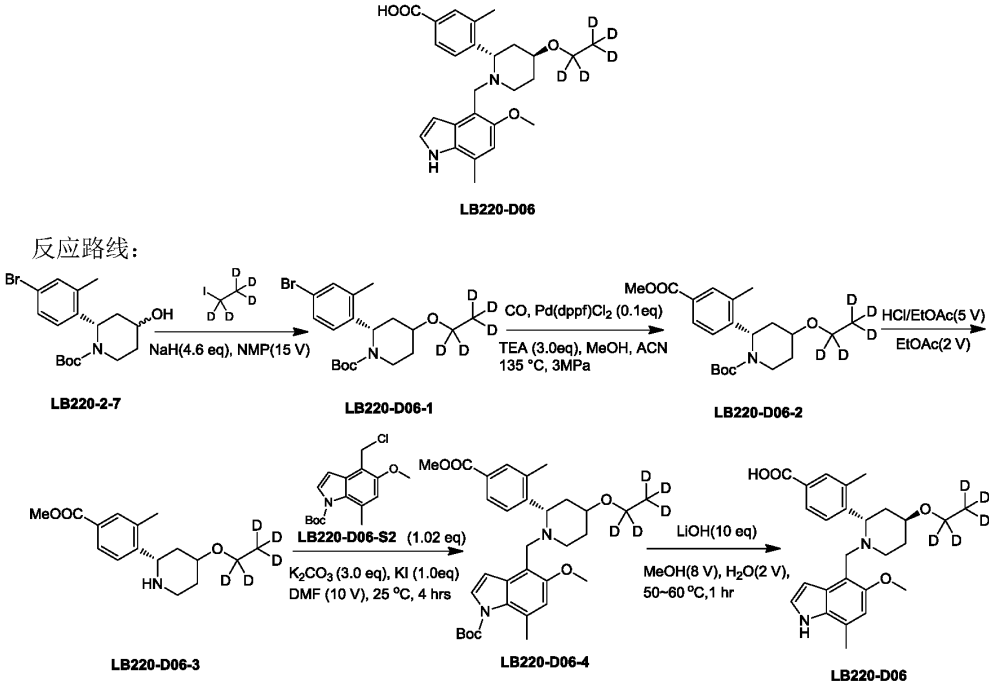


将化合物 **7_Peak3** (32 mg, 57.8 μ mol, 1.00 eq)溶于 MeOH (5.00 mL)和 H₂O (1.00 mL)中, 加入一水合氢氧化锂(24.3 mg, 578 μ mol, 10.0 eq), 反应液在 60 °C 下反应 8 小时。LCMS 显示原料消耗完全。反应液用盐酸(2.00 M)将体系 pH 调至 7~8 后减压浓缩。用中性反相高效液相色谱分离提纯(柱: CD02-Waters Xbridge BEH C18 150*25*10 μ m; 流动相: [H₂O(10mM NH₄HCO₃)-ACN]; 梯度: 15%-45% B over 10.0 min)。得到化合物 **LB220-D05-3** (64.40 mg, 收率: 38.8%)。

¹H NMR: (400 MHz, MeOD) δ 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.40 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.25-4.29 (m, 1H), 4.12-4.15 (m, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.56-3.63 (m, 2H), 3.49-3.56 (m, 1H), 3.34 (s, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 2.08-2.18 (m, 2H), 1.98-2.05 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)。

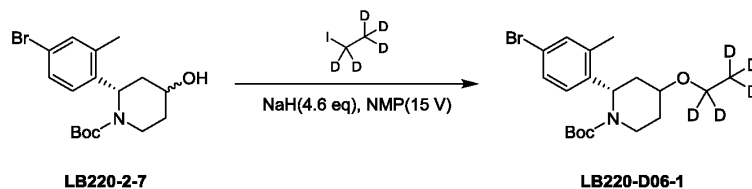
LCMS (ESI, *m/z*): [*M*+*H*]⁺ = 440.2。

实施例 4



实验操作:

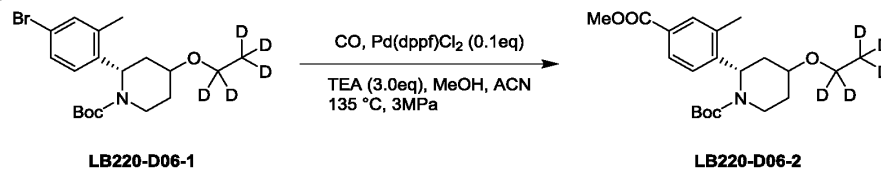
1.



- 将氢化钠 (600.00 mg, 15.00 mmol, 纯度 60%, 4.63 eq) 溶于 N-甲基吡咯烷酮 (12 mL) 中, 并且将化合物 **LB220-2-7** (1.2 g, 3.24 mmol, 1eq) 溶于 N-甲基吡咯烷酮 (3 mL) 中控温 0 - 5 °C 加入反应液中, 反应液在 0 - 5 °C 反应 0.5 小时。然后控温 0 - 5 °C 将氘代碘乙烷 (1 g, 6.21 mmol, 1.92 eq) 加入反应液中, 在 15 - 25 °C 下搅拌 4 小时。LCMS 显示化合物 **LB220-D06-1** 生成。控温 0 - 15 °C 向反应液中加入饱和氯化铵水溶液调节 pH 至 6-7, 然后搅拌 0.5 小时。反应液使用乙酸乙酯 (30 mL * 2) 进行萃取, 合并有机相浓缩得到粗品。粗品通过柱层析进行纯化(二氧化硅, 石油醚: 乙酸乙酯 = 1: 0 to 20: 1) 得到化合物 **LB220-D06-1** (0.95 g, 收率 72%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 403.1$ 。

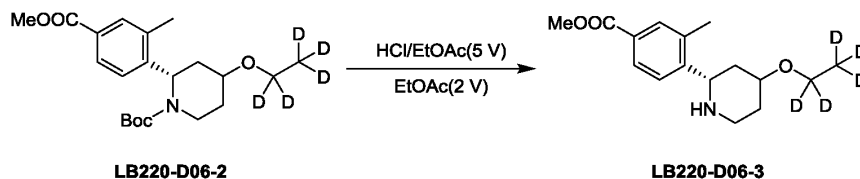
2.



- 将三乙胺 (790 mg, 7.82 mmol, 1.09 mL, 3.32eq) 溶于甲醇 (10 mL) 和乙腈 (20 mL) 中, 在 20 - 30 °C 下加入 Pd(dppf)Cl₂ (633 mg, 775 μmol, 3.29eq) 和化合物 **LB220-D06-1** (950 mg, 2.36 mmol, 1eq)。然后在一氧化碳(3Mpa)氛围下在 125 - 135 °C 反应 12 小时。LCMS 显示原料消耗完全。反应液冷却至 20 - 25 °C, 反应液浓缩除去甲醇和乙腈, 然后加入乙酸乙酯 (10 mL) 和水 (10 mL), 过滤, 滤液分离。水相使用乙酸乙酯 (10 mL * 2) 萃取, 合并有机相后浓缩后通过柱层析进行纯化(二氧化硅, 石油醚: 乙酸乙酯 = 50: 0 to 30: 1) 得到化合物 **LB220-D06-2** (710 mg, 收率 78.8%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 383.2$ 。

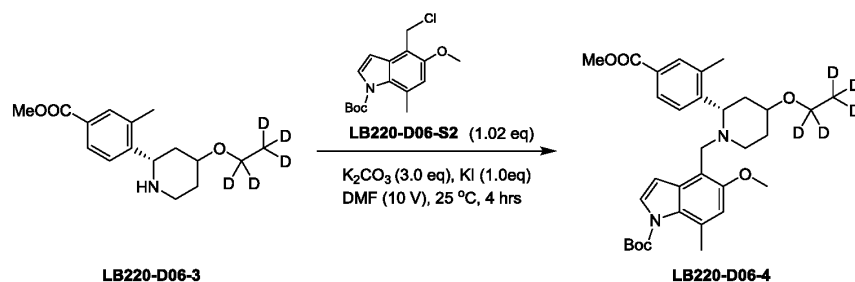
3.



- 将化合物 **LB220-D06-2** (710 mg, 1.86 mmol, 1.00 eq) 溶于乙酸乙酯 (1.4 mL) 中, 加入盐酸/乙酸乙酯 (2 M, 3.5 mL), 然后在 30 - 40 °C 下搅拌 4 小时。LCMS 显示原料消耗完全。反应液浓缩除去乙酸乙酯得到化合物 **LB220-D06-3** (550 mg, 盐酸盐 粗品)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 283.2$ 。

4.

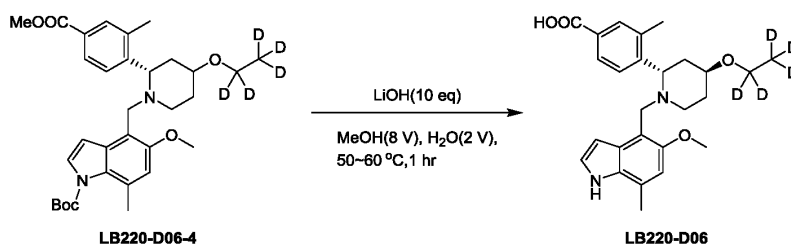


将化合物 **LB220-D06-3** (200 mg, 627 μmol , 1.00 eq, HCl)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(2.00 mL)中,依次加入碘化钾(100 mg, 602 μmol , 1.06 eq), 碳酸钾(260 mg, 1.88 μmol , 3.00 eq) 和化合物 **LB220-D06-S2** (200 mg, 645 μmol , 1.03 eq), 在 10~20°C 反应 4 小时。LCMS 显示原料消耗完全。

5 向反应体加入水(10.0 mL), 用乙酸乙酯 (10.0 mL * 2)萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。经薄层色谱板分离提纯(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 3:1)得到化合物 **LB220-D06-4** (234 mg, 收率 67.1%)。

LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 556.3$ 。

5.



10

将化合物 **LB220-D06-4** (234 mg, 421 μmol , 1.00eq)溶于甲醇 (2 mL)和水 (0.5 mL)中, 在 15 - 25 °C 下加入一水合氢氧化锂 (177 mg, 4.21 mmol, 10 eq)。然后在 55 - 65 °C 下搅拌 1 小时。LCMS 显示原料消耗完全。反应液用盐酸(0.1M)调 pH 至 6~7, 然后减压浓缩得到粗品。经反相制备进行纯化(CD20-Waters Xbridge BEH C18 250*25*10 μm ; 流动相: $[\text{H}_2\text{O}(10\text{mM } \text{NH}_4\text{HCO}_3)\text{-ACN}]$; 梯度: 15%-45% B over 10.0 min) 得到化合物 **LB220-D06** (48 mg, 99.9%纯度)。

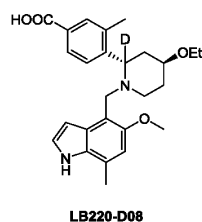
15

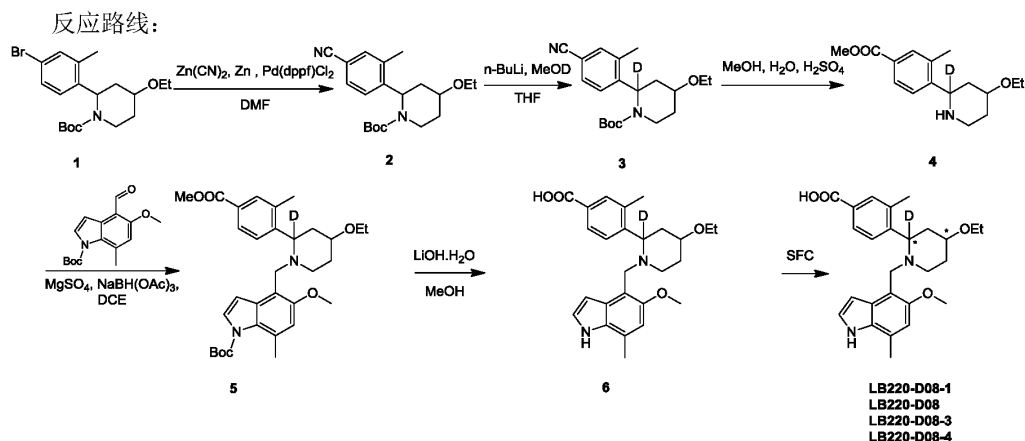
LCMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 442.2$ 。

^1H NMR: EC20710-463-P1F (400 MHz, DMSO-d_6), δ ppm: 10.81 (s, 1 H), 7.95 - 7.89 (m, 1 H), 7.88 - 7.82 (m, 1 H), 7.76 (s, 1 H), 7.25 (t, $J=2.80$ Hz, 1 H), 6.65 (s, 1 H), 6.49 - 6.40 (m, 1 H), 3.78 - 3.72 (m, 1 H), 3.70 (s, 3 H), 3.59 - 3.53 (m, 2 H), 3.17 (d, $J=11.6$ Hz, 1 H), 2.54 - 2.51 (m, 1 H), 2.43 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 2.39 - 2.30 (m, 1 H), 1.84 - 1.80 (m, 1 H), 1.72 - 1.62 (m, 1 H), 1.61 - 1.43 (m, 2 H)。

20

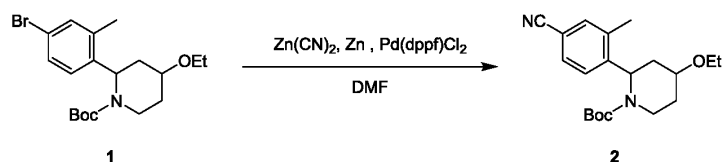
实施例 5





实验操作:

1:

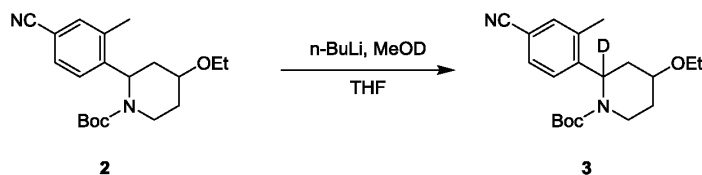


5

将化合物 1 (2.3 g, 5.77 mmol), 锌粉 (1.38 g, 21.1 mmol) 和氰化锌 (3.68 g, 31.3 mmol) 加入 N,N-二甲基甲酰胺 (23 mL), 在氮气氛围下加入 1,1-双(二苯基磷)二茂铁氯化钯 (422 mg, 577 μ mol), 然后将反应液升温至 130 - 135 $^{\circ}$ C, 然后在 130 - 135 $^{\circ}$ C 反应 4 小时。TLC (石油醚: 乙酸乙酯 = 3: 1) 显示原料消耗完全。反应液加入水 (50 mL) 稀释, 水相用乙酸乙酯 (50 mL * 2) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。经柱层析分离提纯 (石油醚: 乙酸乙酯 = 100: 20 到 100: 30) 得到化合物 2 (610 mg, 粗品)。

LCMS (ESI, m/z): $[M-99]^+ = 245.1$ 。

2:

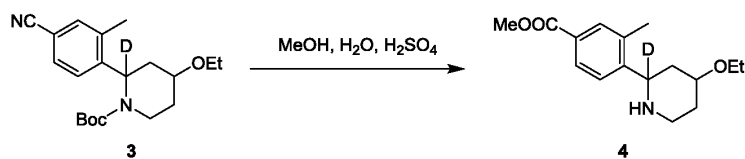


将化合物 2 (200 mg, 580 μ mol) 溶于无水四氢呋喃 (4 mL) 中, 降温至 -70 至 -60 $^{\circ}$ C, 然后在氮气氛围下滴加正丁基锂 (2.5 M, 301 μ L), 在 -70 至 -60 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 在 -70 至 -60 $^{\circ}$ C 下滴加氘代甲醇 (41.9 mg, 1.16 mmol), 在 -70 至 -60 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。LCMS 显示化合物原料消耗完全。反应液加入水 (5 mL) 稀释, 水相用乙酸乙酯 (5 mL * 2) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (5 mL) 洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。经柱层析分离提纯 (石油醚: 乙酸乙酯 = 100: 20 到 100: 30) 得到化合物 3 (670 mg, 收率: 47.8%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M-99]^+ = 246.1$ 。

3:

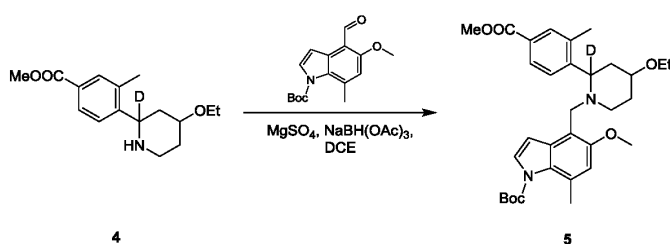
20



将化合物 3 (730 mg, 2.11 mmol) 溶于水 (7.3 mL) 和硫酸 (7.3 mL) 中, 加入甲醇 (7.3 mL), 在 75 - 80 °C 反应 24 小时。LCMS 显示原料消耗完全。加饱和的碳酸氢钠水溶液调节 pH 为 8 到 9, 用乙酸乙酯 (50 mL * 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩得到化合物 4 (520 mg, 收率: 88.4%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 279.1$ 。

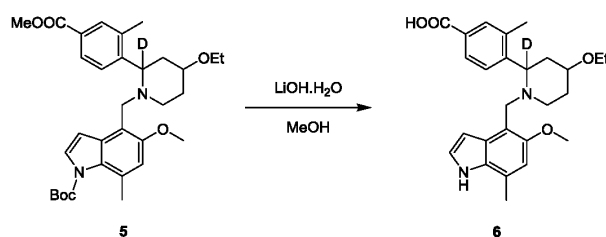
5:



将化合物 4 (520 mg, 1.87 mmol) 和 5-甲氧基-7-甲基-T-BOC-1H-吲哚-4-甲醛 (1.08 g, 3.74 mmol) 溶于 1,2-二氯乙烷 (10 mL) 中, 加入化合物无水硫酸镁 (674 mg, 5.60 mmol), 在 15 - 25 °C 搅拌 12 小时。再加入三乙酰氧基硼氢化钠 (1.39 g, 6.54 mmol), 在 15 - 25 °C 搅拌 12 小时。过滤, 滤液加入饱和的碳酸氢钠水溶液 (50 mL) 稀释, 水相用乙酸乙酯 (50 mL * 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。经柱层析分离提纯 (石油醚: 乙酸乙酯 = 100: 20 到 100: 30) 得到化合物 5 (690 mg, 收率: 66.9%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 552.4$ 。

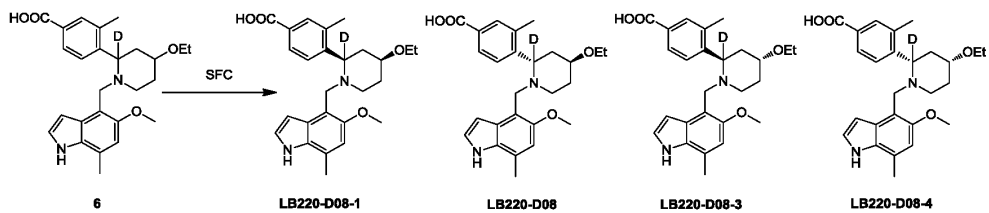
6:



将化合物 5 (670 mg, 1.21 mmol) 溶于甲醇 (10 mL) 中, 加入一水合氢氧化锂 (2 M, 3.04 mL) 在 60 - 65 °C 反应 1 小时。LCMS 显示原料消耗完全。反应液用盐酸 (2 M) 将体系 pH 调至 6 到 7, 减压浓缩。用反相高效液相色谱分离提纯 (柱: CD18-Welch Ultimate C18 150*40*7um; 流动相: $[H_2O(0.05\% HCl)-ACN]$; 梯度: 7%-37% B over 10.0 min) 和反相高效液相色谱分离提纯 (柱: CD09-Phenomenex Gemini C18 150*30*5um; 流动相: $[H_2O(10mM NH_4HCO_3)-ACN]$; 梯度: 16%-46% B over 13.0 min) 得到化合物 6 (55 mg, 收率: 10.3%)。

LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 438.3$ 。

7:



将化合物 6 (250 mg) 用 SFC 分离提纯 (柱: SFC-IK-30-DAICEL CHIRAL IK (250mm*30mm,10um); 流动相: [CO₂-MeOH(0.1%NH₃H₂O)。得到化合物 LB220-D08-1 (15 mg), 化合物 LB220-D08-3 (10 mg), LB220-D08 (150 mg)和化合物 LB220-D08-4 (15 mg)。

5 LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 438.3。

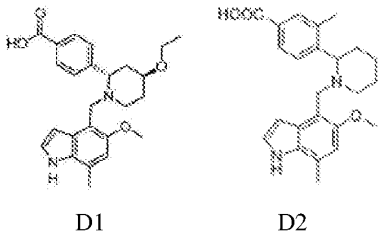
实施例 6-10

参照前面的实施例 (起始原料与前面实施例不同, 制备步骤可参考前面实施例) 进一步合成了如下化合物, 各化合物的 LCMS 数据如下表所示:

实施 例	结构式	MS 值 [M+H ⁺]	实施 例	结构式	MS 值 [M+H ⁺]
6		439.25	7		440.26
8		440.26	9		438.24
10		439.25			

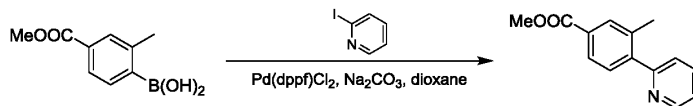
对比例

10 本对比例提供化合物 D1 和 D2, 其结构式分别如下:



其中, D1 购自 MCE 公司, D2 为自制, 其制备方法如下:

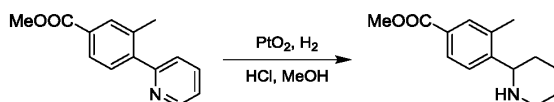
1.



氮气保护室温下, 向 4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基硼酸 (500 mg, 2.58 mmol, 1 当量) 和 2-碘吡啶 (600 mg, 2.93 mmol, 1.14 当量) 的 1,4-二氧六环 (4 mL) 和水 (1 mL) 的溶液中, 分别加入 Pd(dppf)Cl₂ (100 mg, 137 μmol, 0.05 当量) 和碳酸钠 (550 mg, 5.19 mmol, 2 当量)。氮气保护, 100 °C 下反应 2 小时。反应结束后用水 (5 mL) 稀释, EA 萃取 (3×5 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。所得粗产物用硅胶柱层析纯化, EA/PE(1/3), 得 3-甲基-4-(吡啶-2-基) 苯甲酸甲酯 (375 mg, 产率 64%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 228.0。

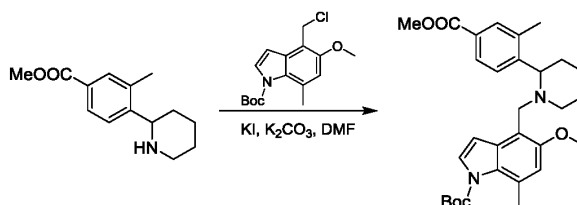
2.



室温下, 向 3-甲基-4-(吡啶-2-基) 苯甲酸甲酯 (370 mg, 1.63 mmol, 1 当量) 的甲醇 (10 mL) 溶液中, 分别加入 HCl (261 μL, 12M) 和二氧化铂 (37 mg, 163 μmol, 0.1 当量)。用氢气置换三次, 再用氢气置换三次, 在 60 °C, 氢气 (2.0 MPa) 氛围下反应过夜。过滤除去滤饼, 滤液旋干后得 3-甲基-4-(哌啶-2-基) 苯甲酸甲酯盐酸盐 (430 mg)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 234.1。

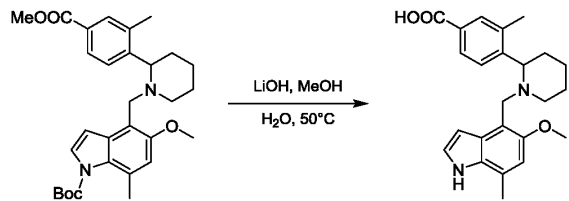
3.



氮气保护室温下, 向 3-甲基-4-(哌啶-2-基) 苯甲酸甲酯 (430 mg, 1.59 mmol, 1 当量) 和 4-(氯甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吲哚-1-羧酸叔丁酯 (750 mg, 2.42 mmol, 1.52 当量) 的 DMF (10 mL) 的溶液中, 分别加入碳酸钾 (750 mg, 5.43 mmol, 3.4 当量) 和碘化钾 (300 mg, 1.81 mmol, 1.13 当量)。氮气保护, 室温下反应 2 小时。反应结束后用水 (10 mL) 稀释, EA 萃取 (3×10 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。所得粗产物用硅胶柱层析纯化, EA/PE(1/40~1/10), 得 5-甲氧基-4-((2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-7-甲基-1H-吲哚-1-羧酸叔丁酯 (610 mg, 产率 75.5%)。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 507.3。

4.



室温下，向 5-甲氧基-4-((2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-7-甲基-1H-吲哚-1-羧酸叔丁酯 (600 mg, 1.18 mmol, 1.0 当量) 的甲醇 (6 mL) 和水 (2 mL) 溶液中，加入氢氧化锂一水合物 (500 mg, 11.9 mmol, 10.1 当量)。氮气保护，50℃下反应 10h。所得残余物减压浓缩。粗品通过制备液相纯化，得到 4-(1-((5-甲氧基-7-甲基-1H-吲哚-4-基)甲基)哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸 (100 mg, 产率 21.4%)，条件如下 (柱型: CD20-Waters Xbridge BEH C18 250*25*10um; 流动相: 流动相 A: 水 (0.1%NH₄HCO₃), 流动相 B: 乙腈; 梯度: 15 min 10%B-40% B; 流速: 40mL/min; 波长:254nm/220nm, RT= 12.5 min。

LCMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 393.2。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.80 (s, 1H), 7.85 (s, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.54 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.39 (m, 2H), 3.15 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 2.80 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.05 – 1.95 (m, 3H), 1.70 – 1.35 (m, 5H)。

试验例

本发明对实施例 1 中制备得到的化合物的药理活性进行了考察，参照对比例 D1 伊普可泮临床前实验资料，分别开展了亲和力实验、体外酶活实验 (CVF-Bb 实验、AP-deposition 实验、PNH-Like 溶血实验)、大小鼠药代动力学实验，同时与对比例 D1 伊普可泮进行了平行对比。

伊普可泮临床前实验资料中通过 CVF-Bb 实验及 AP-deposition 实验证明了该药具有通过靶向补体通路治疗 IgA 肾病等补体通路相关肾病、血液类疾病的潜力。发明人采用相同实验项目对本发明提供的化合物进行考察，通过与伊普可泮进行对比，证明本发明化合物的药理活性。

试验例 1 亲和力实验

检测实施例 1 和对比例 1 与补体因子 B 的亲和力，评估化合物与因子 B 的结合强度。

实验材料:

CFB (义翘神州)、NTA 传感器 (赛多利斯)，实施例 1 的化合物 I 以及对比例化合物 D1 和 D2。

实验方法:

1) 将 8 根 NTA 传感器分为 2 组，均在 PBST 中预湿 10min 以上。其中 4 根传感器固化，另外 4 根传感器作为参比传感器，不需要固化蛋白。在 96 孔样品板中第一列加 PBST，第二列加 50μg/mL 的 CFB。设置 baseline 60s, loading 3000s, 使固化高度达 4nm 以上，再 baseline 60s 进行平衡。

2) 取新 96 孔板，设置 Buffer 和 Sample 孔。Buffer 孔加入 PBST+0.1%DMSO 缓冲液，Sample 孔分别加化合物 I、D1 和 D2，药物浓度从左到右 2.47, 7.41, 22.22, 66.67, 200, 400nM。

3) 在固化完毕后，首先设定比较长的平衡步骤 (10min 以上)，然后再进入 baseline/ association / dissociation 的循环。Assay Definition 设置如下: baseline 60s, association 120s, dissociation 360s。

- 4) 设定固化传感器循环后，增加一组参比传感器循环，该循环程序与固化传感器循环程序保持一致。
- 5) 设置完毕，在 Sensor Assignment 中设置 sensor 的位置，传感器分为两列，一组固化传感器，一组参比传感器，每列 4 根。Review Experiment 检查无误后，在 Run Experiment 中设置保存路径，文件名，温度等，点击 GO 运行。
- 6) 使用 Octet 分析软件 Data Analysis 软件对原始数据双扣除处理后进行动力学及稳态分析。
- 实验结果：
- 三个化合物对补体因子 B 的亲合力如表 1 所示。

表 1 亲合力数据

化合物	因子 B 亲合力
D1	1.02E ⁻⁰⁸ M
D2	1.90E ⁻⁰⁸ M
I	3.19E ⁻⁰⁹ M

- 由表 1 中结果可以看出，化合物 I 与补体因子 B 的亲合力高于对比比例 D1 和 D2，提示化合物 I 与补体因子 B 有更强结合，具有通过靶向 CFB 治疗补体旁路途径异常引起的相关肾病(比如 IgA 肾病)、血液类疾病的潜力。

试验例 2 CVF-Bb 实验

- 眼镜蛇毒因子 (Cobra venom factor, CVF) 是一种从眼镜蛇毒中分离出来的抗补体因子，与补体系统关系密切，具有与 C3 降解产物 C3b 片段相似的功能，在体内、体外均能够与血清中的 B 因子以 1:1 的比例可逆结合，形成稳定的 C3 剪切体 CVF-B 复合物。在 D 因子的水解激活作用下，CVF-B 复合物裂解为具有 C3 转化酶功能的 CVF-Bb。随后，CVF-Bb 能够裂解 C3，生成 C3b 和 C3a 两个片段，进一步激活补体的旁路途径，从而引发级联放大反应，造成补体的大量激活及耗竭。
- 实验材料：
- 纯化人因子 B、纯化人因子 D (补体技术)，眼镜蛇毒因子、C3 蛋白 (quidel)，Anti-C3a / C3a des Arg 抗体[2991]、山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP) (Abcam)、QuantaBlu 荧光过氧化物酶底物试剂盒、Thermo Scientific™StartingBlock™ T20 (PBS) 1X (thermofisher)，实施例 1 的化合物 I 以及对比比例化合物 D1 和 D2。
- 实验方法：
- 1) 因子 B、因子 D 和 CVF 分别加入实验孔，混匀之后于 37℃ 孵育 3 小时。
- 2) 分别用 DMSO 配置 100mM 化合物 I、D1、D2 溶液，并进行 100 倍稀释配置成 1mM 工作液。对工作液进行 3 倍梯度系列稀释，以配置成各系列工作液。实验时反应孔分别每孔加入 1μL 各系列工作液，使其终浓度分别为 10000, 3333.33, 1111.11, 370.37, 123.45, 41.15, 13.72, 4.57, 1.52nM。振荡匀之后于 37℃ 孵育 1 小时。
- 3) 将人补体因子 C3 protein 加入到反应孔中，混匀后于 37℃ 孵育 2 小时，制备 C3 反应样品。
- 4) 在 96 孔黑色吸附板里分别加入 97μL 包被缓冲液和 3 μL 反应样品，混匀后封板，4℃ 孵

育过夜。

- 5
- 5) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，加入 300μL startingBlock 封闭缓冲液，室温孵育 15 分钟。
6) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，加入 100μL Anti-C3a / C3a des Arg 抗体 37℃孵育 1 小时。
7) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，加入 100μL 山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP) 37℃孵育 30 分钟。
8) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，加入 100μL Quantablu 底物溶液室温孵育 20 分钟。
9) 加入 100μL Quantablu 终止液。
10) 使用酶标仪测量 320nm 和 420nm 的吸光度值。

实验结果：

三个化合物对 C3 剪切体酶活抑制效果如表 2 所示。

10

表 2 CVF-Bb 酶活数据

化合物	CVF-Bb assay (IC50)
D1	16.1nM
D2	50.9nM
I	11.2nM

由表 2 中结果可以看出，化合物 I 对 C3 剪切体酶活抑制 IC₅₀ 与对比例 D1 基本一致，说明化合物 I 对补体旁路途径的抑制作用显著，具有通过靶向 CFB 治疗补体旁路途径异常引起的相关肾病（比如 IgA 肾病）、血液类疾病的潜力。

试验例 3 AP-deposition 实验

- 15
- 本实验中，采用脂多糖（LPS）作为激活起始物，激活补体旁路途径。LPS 能够直接与 C3b 结合，并在因子 B、因子 D 等因子的参与下形成 C3 转化酶。C3 转化酶能够将 C3 裂解为 C3a 和 C3b 片段，随后与裂解后的 C3b 结合形成 C5 转化酶。C5 转化酶将 C5 裂解为 C5a 和 C5b 片段，C5b 在液相中依次与 C6、C7、C8 和 C9 反应，最终形成末端补体复合物（TCC，SC5b-9），从而发挥溶解细胞的效应。

20

实验材料：

Normal Human Serum（Complement Technology），WIESLAB Complement System Alternative Pathway（Svarlifesience），实施例 1 的化合物 I 以及对比例化合物 D1。

实验方法：

- 25
- 1) 分别用 DMSO 配置 100mM 化合物 I、D1、D2 溶液，并进行 1000 倍稀释配置成 100μ M 工作液。对工作液进行 3 倍梯度系列稀释，以配置成各系列工作液。实验时样品孔分别每孔加入 95μL 人血清和 5μL 各系列工作液，使其终浓度分别为 5000, 1666.67, 555.55, 185.185, 61.728, 20.576, 6.858nM。对照孔分别加入 100μL Diluent AP 作为空白对照, positive control NHS 作为阳性对照, negative control NHS 作为阴性对照，混匀之后于 37℃孵育 1 小时。

- 30
- 2) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，最后一次将板拍干。加入 100μL C5b-9 conjugate 于室温孵育 30 分钟。

3) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，最后一次将板拍干。加入 100μL substrate solution 于室温孵育 30 分钟。

4) 使用酶标仪测量 405nm 的吸光度值。

实验结果:

两个化合物的 AP-deposition 酶活数据如表 3 所示。

表 3 AP-deposition 酶活数据

化合物	AP complement deposition assy
D1	51.35nM
I	58.5nM

5 由表 3 可以看出，化合物 I 对 AP-deposition 酶活抑制 IC₅₀ 与对比例 D1 基本一致，说明化合物 I 对补体旁路途径具有显著的抑制活性，具有通过靶向 CFB 治疗补体旁路途径异常引起的相关肾病（比如 IgA 肾病）、血液类疾病的潜力。

试验例 4 PNH 样溶血实验

在酸性条件（pH 6.4~6.5）下，血清中的补体系统易于被激活。由于 PNH 患者的红细胞缺乏 CD55 和 CD59，因此无法有效阻止末端补体复合物的攻击，从而导致溶血现象的出现；而正常红细胞则能够抵御这种攻击，所以不会发生溶血现象。在本实验中，使用 CD55 和 CD59 抗体中和正常红细胞表面的 CD55 和 CD59 以模拟 PNH 红细胞特性，用 EGTA 螯合血清中的 Ca²⁺以阻断补体经典途径和凝集素途径，仅保留补体旁路途径的活性。

实验材料:

15 C5B-9 ANTIBODY、CD55 抗体、EDTA（Thermo），Anti-CD59 抗体[MEM-43]（abcam），PIPES（麦克林），EGTA（索莱宝），健康个体全血、血清，实施例 1 的化合物 I 以及对比例化合物 D1 和 D2。

实验方法:

- 1) 使用肝素抗凝管采集健康志愿者 1ml 新鲜血液，使用促凝管采集 15ml 血液。
- 20 2) 2000 rpm，室温离心 5 min 去除血浆等上层溶液，加入 10 倍体积的氯化钠溶液洗 3 次。
- 3) 用 PBS 溶液将 RBCs 稀释至 2×10⁹ 细胞/ml。
- 4) 取 100ul 2×10⁹ 细胞/ml 红细胞，分别加入 1ul 1mg/ml 鼠抗人 CD 55 和 3ul 1mg/ml CD 59 单克隆抗体，37℃下振荡孵育 30 min。
- 5) 用 PIPES-GVBR 溶液清洗三次 RBCs，去除多余的抗体。
- 25 6) 用 PIPES-GVBR 溶液将 RBCs 稀释至 1×10⁸ 细胞/ml。
- 7) 采集同一个健康个体血清(NHS)作为补体来源。用促凝管采集血液进行离心获取血清，4℃，3000g，15min 。
- 8) 向血清中加入 EGTA 和 MgCl₂ 阻断经典补体途径激活(终浓度分别为 8 mM 和 2.85 mM)；并用 0.25M HCL 进行酸化使其 PH 为 6.4，以激活 AP 系统。
- 30 9) 用酸化血清配置各药物系列浓度，并在冰上预孵育 10min；同时设置基线组（终浓度为 10mM EDTA 组）及最大溶血组（纯水组）。
- 10) 药物孵育：分别取 200ul 含有药物的酸化血清与 20ul 1×10⁸ 细胞/ml 红细胞混匀，37℃下振荡孵育 6h。

11) 终止反应：每管加入 200ul E-GVBR 溶液（EDTA 终浓度为 15mM），室温 4000rpm 离心 5min。

12) 溶血检测：分别取 100ul 上清加入 96 孔板中，进行 OD 405nm 检测。

实验结果：

5 三个化合物的溶血抑制 IC₅₀ 如表 4 所示。

表 4 血清溶血数据

化合物	Hemolysis Inbition Rate(%)
D1	164.6nM
D2	623.8nM
I	89.84nM

由表 4 中结果可以看出，化合物 I 的溶血抑制 IC₅₀ 优于对比例 D1 约 2 倍，提示化合物 I 对阵发性睡眠性血红蛋白尿具有更强的潜在药理活性。

试验例 5 小鼠药代动力学实验

10 本实验考察小鼠分别灌胃给药 1 mg/kg 的化合物 I、D1 和 D2 后的生物利用度，探索化合物 I、D1 和 D2 在小鼠体内的药代动力学特征。

实验材料：

BALB/c 小鼠（维通利华），乙腈、甲醇、异丙醇（色谱纯 Merck），甲酸（麦克林），PEG400（索莱宝），DMSO（阿拉丁），实施例 1 的化合物 I 以及对比例化合物 D1 和 D2。

15 实验方法：

1) 受试动物于给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h，取血 0.1 mL，加入一次性使用抗凝管中，4000 rpm 离心 10 min，取上清液-20℃ 冰箱保存，备测。

2) 血浆样品处理方法如下：取 20 μL 的血浆样品于 1.5 mL 离心管中，加入 180 μL 的内标工作液（10 ng/mL 的内标乙腈溶液），5 档涡旋 5 min 后，于高速离心机 12000 rpm 下离心 10 min，

20 取上清液，加入进样器小瓶进行 LC/MS 分析，记录色谱图。

实验结果：

三个化合物的生物利用度及药代动力学参数如表 5 所示。其中，D1-iv-1 为静脉给药，D1-po-1 为灌胃给药。

表 5 小鼠药代数据

PK 参数	T _{1/2}	T _{max}	C ₀ /C _{max}	AUC _{last}	AUC _{INF_obs}	Vz _{F_obs}	Cl _{F_obs}	MRT _{last}	MRTINF _{obs}	F
	h	h	ng/mL	h*ng/mL	h*ng/mL	mL/kg	mL/h/kg	h	h	%
D1-iv-1 mg/kg 组	5.77	—	2459.79	2132.34	2216.50	3755.47	451.16	4.38	5.44	—
D1-po-1 mg/kg 组	5.22	0.500	620.61	2609.90	2708.24	2778.22	369.24	6.35	7.26	122.19
D2-iv-1 mg/kg 组	1.66	—	806.67	877.37	881.92	2719.14	1133.89	1.85	1.91	—

D2-po-1 mg/kg 组	1.73	0.50	349.90	937.46	943.54	2652.76	1059.83	2.62	2.70	106.99
I-iv-1 mg/kg 组	2.61	—	1533.65	3975.81	3982.96	944.00	251.07	3.47	3.51	—
I-po-1 mg/kg 组	2.83	0.250	780.43	4134.29	4146.24	983.41	241.18	4.54	4.61	104.10

实验结论：

BALB/c 小鼠分别灌胃给药 1 mg/kg 的化合物 I、D1 和 D2 后，生物利用度都较高。相比化合物 I 灌胃组，对比例 D1 和 D2 灌胃组原型药物的系统暴露水平（AUC）较低；D2 灌胃组的 AUCINF_obs 约为化合物 I 灌胃组的 22.7%，Cmax 约为化合物 I 灌胃组的 44.8%，且血浆清除率更快，半衰期较短。综上所述，在 BALB/c 小鼠上，化合物 I 的 PK 特征优于 D1 和 D2。

试验例 6 大鼠药代动力学实验

本实验考察大鼠分别灌胃给药 1 mg/kg 的化合物 I 和对比例 D1 后的生物利用度，探索化合物 I 和对比例 D1 在大鼠体内的药代动力学特征。

实验材料：

SD 大鼠（北京华阜康），乙腈、甲醇、异丙醇（色谱纯 Merck），甲酸（麦克林），PEG400（索莱宝），DMSO（阿拉丁），化合物 I 和 D1。

实验方法：

- 1) 受试动物于给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h，取血 0.1 mL，加入一次性使用抗凝管中，4000 rpm 离心 10 min，取上清液-20℃ 冰箱保存，备测。
- 2) 血浆样品处理方法如下：取 20 μL 的血浆样品于 1.5 mL 离心管中，加入 180 μL 的内标工作液（(1 ng/mL 的内标乙腈溶液)），5 档涡旋 10 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/MS 分析，记录色谱图。

实验结果：

两个化合物的生物利用度及药代动力学参数如表 6 所示。

表 6 大鼠药代数据

PK 参数	T1/2	Tmax	C0/Cmax	AUClast	AUCINF_obs	Vz_F_obs	Cl_F_obs	MRTlast	MRTINF_obs	F
	h	h	ng/mL	h*ng/mL	h*ng/mL	mL/kg	mL/h/kg	h	h	%
D1-po-1 mg/kg 组	4.14	0.79	379.15	2028.57	2170.66	3016.40	494.31	5.59	7.11	102.38
I-po-1 mg/kg 组	3.49	0.88	545.29	2890.13	2947.03	1719.48	359.73	4.74	5.13	136.82

实验结论：

SD 大鼠分别灌胃给药 1 mg/kg 的化合物 I 和对比例 D1 后，生物利用度都较高，化合物 I 灌胃组原型药物的系统暴露水平（AUC、Cmax）高于对比例 D1 灌胃组。综上所述，在 SD 大鼠上，化合物 I 的 PK 特征优于 D1。

试验例 7 LPS 诱导小鼠补体激活试验

脂多糖 LPS 作为旁路途径的激活物质，在注射给小鼠后，可快速激活旁路途径，诱发一系列的级联反应，导致 C3b 水平显著增加，进一步放大旁路途径效应。在本实验中，通过检测 C3b 水平变化，评估对比例 D1 和化合物 I 抑制旁路途径的作用。

- 5实验材料：
C57BL/6J 小鼠小鼠（维通利华），LPS（Sigma），C3b Elisa Kit（华美生物）；化合物 I 和 D1（以岭药业）
实验方法：
动物检疫结束后，模型对照组和各给药组动物腹腔注射约 0.1ml/只（浓度 0.5mg/ml，剂量 2.5mg/kg）LPS（生理盐水配制），正常对照组动物腹腔注射等体积生理盐水。小鼠造模约 1.5h 后，给药组灌胃给予相应受试药，正常对照组（未注射 LPS 的空白对照组）、模型对照组（仅注射 LPS 的对照组）灌胃给予相应体积溶剂。给药约 6h 后，小鼠摘眼球取血（用 EDTA 抗凝管）。将血液经 3500rpm，4℃离心 10min，取上清-80℃保存，检测 C3b 指标含量。
实验结果：
15与模型对照组比较，D1-120mg/kg 组血浆 C3b 含量明显降低（ $P<0.05$ ），D1-60mg/kg 组血浆 C3b 含量有降低趋势（ $P>0.05$ ）；化合物 I-60mg/kg 组、化合物 I-120mg/kg 组血浆 C3b 含量显著降低（ $P<0.01$ ）。与 D1-60mg/kg 组比较，化合物 I-60mg/kg 组血浆 C3b 含量显著降低（ $P<0.01$ ）；与 D1-120mg/kg 组比较，化合物 I-120mg/kg 组血浆 C3b 含量明显降低（ $P<0.05$ ）。
实验结论：
20在 60 mg/kg，120 mg/kg 剂量下，化合物 I 可显著抑制 LPS 诱导旁路途径的激活，且抑制效果优于对比例 D1。
C3b 含量数据如下表 7 所示：

表 7	
组别	C3b 含量（ng/ml）
正常对照组	1.60±3.06
模型对照组	113.47±20.20 ^{##}
D1-60mg/kg 组	100.01±14.44
D1-120mg/kg 组	89.89±16.73 [*]
化合物 I-60mg/kg 组	77.19±8.93 ^{**△}
化合物 I-120mg/kg 组	73.16±5.36 ^{**\$}

- 注：[#]与正常对照组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；^{*}与模型对照组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；[△]与 D1-60mg/kg 组比较，[△] $P<0.05$ ，^{△△} $P<0.01$ ；^{\$}与 D1-120mg/kg 组比较，^{\$} $P<0.05$ ，^{\$\$} $P<0.01$ 。
- 25为稳定化合物 I 易消旋化的手性中心，提升其稳定性，在化合物 I 基础上设计了一系列氘代的分子，以达到“同活性，高稳定性”的目标。对于化合物 I 氘代分子及消旋分子开展了亲和力和实验、体外酶活实验（CVF-Bb 实验、AP-deposition 实验、兔红溶血实验）、犬药代动力学实验及稳定性实验，同时与化合物 I 进行了平行对比。如下所示：

试验例 8 兔红细胞溶血实验

2%未致敏兔红细胞可激活血清中补体途径，在大鼠血清中加入 EGTA 螯合血清中的 Ca^{2+} ，以阻断补体经典途径和凝集素途径，而 EGTA 与 Mg^{2+} 结合能力很弱，可用于激活补体旁路途径。根据兔红细胞的溶血程度，可测定补体旁路途径的补体活性。

- 5实验材料：
大鼠血清，EGTA（索莱宝），EDTA（Thermo），2%兔红细胞（南京森贝伽生物），化合物 I、LB220-D01、LB220-D05-1、LB220-D05-2、LB220-D05-3、LB220-D06、LB220-D08、LB220-D08-1、LB220-D08-3、LB220-D08-4、化合物 II（化合物 I 的异构体分子，以岭药业）。
- 10实验方法：
1）红细胞悬液制备：取 10ml 市售 2%兔红细胞溶血，2500 rpm，室温离心 5 min 去除上层溶液，加入 10ml 生理盐水洗 2 次至上清为澄清溶液。倒掉上清，重新加入 10ml 生理盐水以配置 2%兔红细胞溶液。
2）药物预处理：取 10ml 大鼠血清作为反应体系，向血清中加入 EGTA 和 MgCl_2 阻断经典补体途径激活（终浓度分别为 8 Mm（62.5x）和 2.85 mM（200X））。用处理过血清配置各药物系列浓度（药物终浓度为：2500nM、1000nM、333.33nM、111.11nM、37.04nM、12.35nM），并在
15室温孵育 10min；同时设置阴性对照组（含 10mM EDTA 血清组）及阳性最大溶血组（不含药血清组）。
3）药物孵育：取 0.2 ml 含药及阴性和阳性对照（即阳性最大溶血组）大鼠血清分别与 0.2 ml 2%的红细胞悬液混合（1:1 混合），混匀后，立即放置 $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 培养箱中进行振荡温育（150rpm），
20连续振荡孵育 3 小时。
4）终止反应：反应结束，每管加入 200ul 含 EDTA 终浓度为 15mM 的生理盐水，室温 4000rpm 离心 5min。
12）溶血检测：分别取 100ul 上清加入 96 孔板中，进行 OD 405nm 检测。
- 25实验结果：
LB220-D05-2、LB220-D05-3、LB220-D06 和 LB220-D08 的兔红溶血抑制 IC_{50} 与化合物 I 的溶血抑制 IC_{50} 基本一致，其余氘代分子 LB220-D05-1、LB220-D01、LB220-D08-1、LB220-D08-3、LB220-D08-4 及化合物 I 异构体分子化合物 II 对兔红细胞溶血无抑制作用。
兔红溶血数据如下表 8 所示：

表 8

实施例编号	化合物编号	Rabbit Hemolysis Inbition Rate(IC_{50})
实施例 1	化合物 I	547.6nM
实施例 3	LB220-D05-2	607.4nM
实施例 3	LB220-D05-3	537.0nM
实施例 4	LB220-D06	568.1nM
实施例 5	LB220-D08	544.2nM
实施例 2	LB220-D01	>1000nM
实施例 3	LB220-D05-1	>1000nM

实施例 5	LB220-D08-1	1088nM
实施例 5	LB220-D08-3	>1000nM
实施例 5	LB220-D08-4	>1000nM
实施例 1	化合物 II	>1000nM

试验例 9 亲和力实验

基于体外兔红溶血试验结果，检测化合物 I 及其氙代化合物（实施例 3 的化合物 LB220-D05-2 和 LB220-D05-3、实施例 4 的化合物 LB220-D06 及实施例 5 的化合物 LB220-D08）与补体因子 B 的亲和力，评估化合物与因子 B 的结合强度。

- 5
- 实验材料：
- CFB（义翘神州）、NTA 传感器（赛多利斯），实施例 1 的化合物 I、实施例 3 的化合物 LB220-D05-2 和 LB220-D05-3、实施例 4 的化合物 LB220-D06 及实施例 5 的化合物 LB220-D08（以岭药业）。
- 实验方法：
- 10
- 1）将 12 根 NTA 传感器分为 2 组，均在 PBST 中预湿 10min 以上。其中 6 根传感器固化，另外 6 根传感器作为参比传感器，不需要固化蛋白。在 96 孔样品板中第一列加 PBST，第二列加 50μg/mL 的 CFB。设置 baseline 60s，loading 3000s，使固化高度达 4nm 以上，再 baseline60s 进行平衡。
- 15
- 2）取新 96 孔板，设置 Buffer 和 Sample 孔。Buffer 孔加入 PBST+0.1%DMSO 缓冲液，Sample 孔分别加化合物 I、LB220-D05-2、LB220-D05-3、LB220-D06 和 LB220-D08，药物浓度从左到右 2.47，7.41，22.22，66.67，200，400nM。
- 3）在固化完毕后，首先设定比较长的平衡步骤(10min 以上)，然后再进入 baseline/ association / dissociation 的循环。Assay Definition 设置如下：baseline 60s，association 120s，dissociation 360s。
- 20
- 4）设定固化传感器循环后，增加一组参比传感器循环，该循环程序与固化传感器循环程序保持一致。
- 5）设置完毕，在 Sensor Assignment 中设置 sensor 的位置，传感器分为两列，一组固化传感器，一组参比传感器，每列 6 根。Review Experiment 检查无误后，在 Run Experiment 中设置保存路径，文件名，温度等，点击 GO 运行。
- 25
- 6）使用 Octet 分析软件 Data Analysis 软件对原始数据双扣除处理后进行动力学及稳态分析。
- 实验结果：
- 5 个化合物对补体因子 B 的亲和力如表 9 所示。

表 9 亲和力数据

化合物	因子 B 亲和力
I	5.63E ⁻⁰⁹ M
LB220-D05-2	1.03E ⁻⁰⁸ M
LB220-D05-3	1.53E ⁻⁰⁸ M
LB220-D06	4.46E ⁻⁰⁹ M

LB220-D08	2.65E ⁻⁰⁹ M
-----------	------------------------

由表 9 中结果可以看出，实施例 5 的化合物 LB220-D08 与 CFB 的亲合力最高，与 CFB 结合强度按大小排序：LB220-D08 > LB220-D06 > I > LB220-D05-2 > LB220-D05-3。

试验例 10 CVF-Bb 实验

实验材料：

- 5
- 纯化人因子 B、纯化人因子 D（Complement Technology），眼镜蛇毒因子、C3 蛋白（quidel），Anti-C3a / C3a des Arg 蛋白[2991]、山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP)（Abcam）、QuantaBlu 荧光过氧化物酶底物试剂盒、Thermo Scientific™StartingBlock™ T20 (PBS) 1X（thermofisher），实施例 1 的化合物 I、实施例 3 的化合物 LB220-D05-2 和 LB220-D05-3、实施例 4 的化合物 LB220-D06 及实施例 5 的化合物 LB220-D08（以岭药业）。
- 10
- 实验方法：
- 1) 因子 B、因子 D 和 CVF 分别加入实验孔，混匀之后于 37℃ 孵育 3 小时。
- 2) 分别用 DMSO 配置 100mM 化合物 I、LB220-D05-2、LB220-D05-3、LB220-D06 和 LB220-D08 溶液，并进行 100 倍稀释配置成 1mM 工作液。对工作液进行 3 倍梯度系列稀释，以配置成各系列工作液。实验时反应孔分别每孔加入 1μL 各系列工作液，使其终浓度分别为 10000, 3333.33, 1111.11, 370.37, 123.45, 41.15, 13.72, 4.57, 1.52nM。振荡匀之后于 37℃ 孵育 1 小时。
- 15
- 3) 将人补体因子 C3 protein 加入到反应孔中，混匀后于 37℃ 孵育 2 小时，制备 C3 反应样品。
- 4) 在 96 孔黑色吸附板里分别加入 97μL 包被缓冲液和 3 μL 反应样品，混匀后封板，4℃ 孵育过夜。
- 5) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，加入 300μL startingBlock 封闭缓冲液，室温孵育 15 分钟。
- 20
- 6) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，加入 100μL Anti-C3a / C3a des Arg 抗体 37℃ 孵育 1 小时。
- 7) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，加入 100μL 山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP) 37℃ 孵育 30 分钟。
- 8) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，加入 100μL Quantablu 底物溶液室温孵育 20 分钟。
- 9) 加入 100μL Quantablu 终止液。
- 10) 使用酶标仪测量 320nm 和 420nm 的吸光度值。
- 25
- 实验结果：
- 5 个化合物对 C3 剪切体酶活抑制效果如表 10 所示。

表 10 CVF-Bb 酶活数据

化合物	CVF-Bb assay (IC ₅₀)
I	12.85nM
LB220-D05-2	30.57nM
LB220-D05-3	46.31nM
LB220-D06	16.01nM
LB220-D08	12.53nM

由表 10 中结果可以看出，实施例 5 的化合物 LB220-D08 对 C3 剪切体酶活抑制 IC₅₀ 与实施

例 1 的化合物 I 基本一致，酶活抑制活性按大小排序：LB220-D08 > LB220-D06 > I > LB220-D05-2 > LB220-D05-3。

试验例 11 AP-deposition 实验

实验材料：

5 Normal Human Serum（Complement Technology），WIESLAB Complement System Alternative Pathway（Svarlifescience），实施例 1 的化合物 I、实施例 3 的化合物 LB220-D05-2 和 LB220-D05-3、实施例 4 的化合物 LB220-D06 及实施例 5 的化合物 LB220-D08（以岭药业）。

实验方法：

1) 分别用 DMSO 配置 100mM 化合物 I、LB220-D05-2、LB220-D05-3、LB220-D06 和 LB220-D08 溶液，并进行 1000 倍稀释配置成 100μ M 工作液。对工作液进行 3 倍梯度系列稀释，以配置成
10 各系列工作液。实验时样品孔分别每孔加入 95μL 人血清和 5μL 各系列工作液，使其终浓度分别为 5000, 1666.67, 555.55, 185.185, 61.728, 20.576, 6.858nM。对照孔分别加入 100μL Diluent AP 作为空白对照, positive control NHS 作为阳性对照, negative control NHS 作为阴性对照，混匀之后于 37℃ 孵育 1 小时。

15 2) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，最后一次将板拍干。加入 100μL C5b-9 conjugate 于室温孵育 30 分钟。

3) 用 300μL 洗涤液清洗 3 次，最后一次将板拍干。加入 100μL substrate solution 于室温孵育 30 分钟。

4) 使用酶标仪测量 405nm 的吸光度值。

20 实验结果：

两个化合物的 AP-deposition 酶活数据如表 11 所示。

表 11 AP-deposition 酶活数据

化合物	AP complement deposition assy
I	54.85nM
LB220-D05-2	59.94nM
LB220-D05-3	66.67 nM
LB220-D06	55.48nM
LB220-D08	47.34nM

由表 11 可以看出，实施例 3 的化合物 LB220-D05-2 和 LB220-D05-3、实施例 4 的化合物 LB220-D06 及实施例 5 的化合物 LB220-D08 对 AP-deposition 酶活抑制 IC₅₀ 与实施例 1 的化合物
25 I 基本一致，说明以上化合物对补体旁路途径均具有显著的抑制活性，具有通过靶向 CFB 治疗补体旁路途径异常引起的相关肾病（比如 IgA 肾病）、血液类疾病的潜力。

试验例 9 比格犬药代 PK 试验

实验目的：

综合亲和力及体外酶活结果，考察比格犬分别灌胃给药 1 mg/kg 的化合物 I、实施例 4 的

LB220-D06、实施例 5 的 LB220-D08 后体内的药代动力学特征。

实验材料：SD 大鼠（北京华阜康），乙腈、甲醇、异丙醇（色谱纯 Merck），甲酸（麦克林），PEG400（索莱宝），DMSO（阿拉丁），化合物 I、LB220-D06、LB220-D08（以岭药业）。

实验方法：

- 5
- 1) 受试动物于给药后 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、48h，取血 0.1 mL，加入一次性使用抗凝管中，4000 rpm 离心 10 min，取上清液-20° C 冰箱保存，备测。
- 2) 血浆样品处理方法如下：取 20 μL 的血浆样品于 1.5 mL 离心管中，加入 180 μL 的内标工作液（1 ng/mL 的内标乙腈溶液），5 档涡旋 10 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/MS 分析，记录色谱图。

- 10
- 实验结果：
- 1) 雄性比格犬灌胃给予 1 mg/kg 的化合物 I 后，AUCINF_obs 为 8568.02 h*ng/mL，Tmax 为 0.42 h，Cmax 为 1473.27 ng/mL，T1/2 为 5.92 h。
- 2) 雄性比格犬灌胃给予 1 mg/kg 的 LB220-D06 后，AUCINF_obs 为 8478.75 h*ng/mL，Tmax 为 0.83 h，Cmax 为 1249.67 ng/mL，T1/2 为 6.46 h，口服相对生物利用度为 98.96%。
- 15
- 3) 雄性比格犬灌胃给予 1 mg/kg 的 LB220-D08 后，AUCINF_obs 为 9328.75 h*ng/mL，Tmax 为 0.50 h，Cmax 为 1250.78 ng/mL，T1/2 为 7.03 h，口服相对生物利用度为 108.88%。

实验结论：比格犬分别灌胃给药 1 mg/kg 的化合物 LB220-D06、LB220-D08 后，各灌胃组原型药物的系统暴露水平按高低排序：LB220-D08 > I > LB220-D06，但 3 者间无显著差异。

犬药代数据如下表 12 所示：

20

表 12

SD 大鼠尾静脉及灌胃给药 1 mg/kg 的化合物 I、LB220-D08 后，血浆中药物主要 PK 参数对比										
PK 参数	T1/2	Tmax	C0/Cmax	AUClast	AUCINF_obs	Vz_F_obs	Cl_F_obs	MRTlast	MRTINF_obs	F
	h	h	ng/mL	h*ng/mL	h*ng/mL	mL/kg	mL/h/kg	h	h	%
化合物 I-po-1 mg/kg 组	5.92	0.42	1473.27	8509.98	8568.02	1037.81	139.62	6.15	6.41	—
LB220-D06-po-1 mg/kg 组	6.46	0.83	1249.67	8434.01	8478.75	1115.49	121.57	7.63	7.87	98.96
LB220-D08-po-1 mg/kg 组	7.03	0.50	1250.78	9258.45	9328.75	1131.98	111.05	7.46	7.86	108.88

试验例 10 稳定性实验：

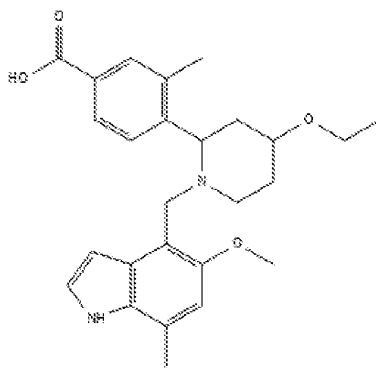
在 4N 浓度 HCl，50℃，12h 条件下，LB220-D08 手性纯度和化学纯度都可以保持，纯度没有降低；对比例（LNP023）与其他氘代化合物，在化学纯度和手性纯度上，各有不同程度的降低（如下表 13 所示）。

	手性纯度	化学纯度
对比例（LNP023）	不变	-6.48%
化合物 I	-0.41%	不变
LB220-D01	-0.49%	不变
LB220-D02	-0.71%	-2.16%
LB220-D04	-0.62%	不变
LB220-D05	不变	-1.22%
LB220-D06	-0.55	不变
LB220-D07	-0.33%	-4.55%
LB220-D08	不变	不变
LB220-D09	-0.41%	不变
LB220-D10	不变	-0.29%
LB220-D11	-2.33%	-4.25%

以上内容仅为本发明的具体实施方式，是为了解释和说明本发明，而不是对本发明保护范围的限制，在不脱离本发明原理的前提下所做出的任何改进也都应包含在本发明的保护范围内。

权利要求书

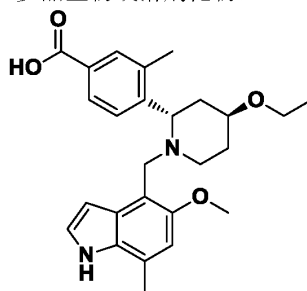
1. 式 A 所示的化合物或其药学上可接受的形式，所述药学上可接受的形式选自药学上可接受的立体异构体、盐、氘代物、前体药物、多晶型物或溶剂化物：



5

A。

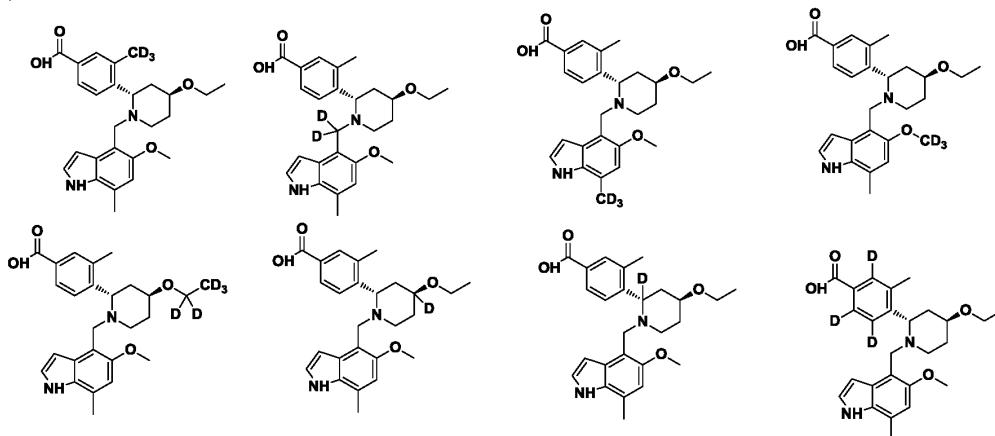
2. 式 I 所示的化合物或其药学上可接受的形式，其中，所述药学上可接受的形式选自药学上可接受的盐、氘代物、前体药物、多晶型物或溶剂化物：

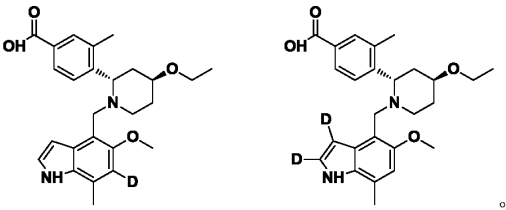


I。

10

3. 根据权利要求 2 所述的化合物或其药学上可接受的形式，其中，所述氘代物选自如下结构之一：





4. 权利要求 1 所述化合物的制备方法，其中，包括如下步骤：

- (1) 4-溴-3-甲基苯甲腈、4-甲氧基吡啶和氯甲酸苄酯在格氏试剂的催化下反应生成 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯；
- 5 (2) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯加氢反应得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代哌啶-1-甲酸苄酯；
- (3) 将所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代哌啶-1-甲酸苄酯中的羰基进行还原得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸苄酯；
- (4) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸苄酯在缚酸剂存在下与硅烷化试剂反应，对羟基进行保护，得 4-(叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)哌啶-1-甲酸酯；
- 10 (5) 所述 4-(叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)哌啶-1-甲酸酯脱除羟基保护基得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯；
- (6) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯与卤代烃进行亲核取代反应，得 2-
- 15 (4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯；
- (7) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯与酸和烷基醇反应，得 4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸酯；
- (8) 所述 4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸甲酯与 4-甲酰基-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯反应，得 4-(4-乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯；
- 20 (9) 所述 4-(4-乙氧基-2-(4-(甲氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯水解得式 A 化合物 4-(4-乙氧基-1-(5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-4-基)甲基)哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸。

5. 权利要求 4 所述化合物的制备方法，其中，包括如下步骤：

- 25 (1) 4-溴-3-甲基苯甲腈、4-甲氧基吡啶和氯甲酸苄酯在格氏试剂的催化下反应生成 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯；
- (2) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代-3,4-二氢吡啶-1(2H)-羧酸苄酯加氢反应得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代哌啶-1-甲酸苄酯；
- (3) 将所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-氧代哌啶-1-甲酸苄酯中的羰基进行还原得 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸苄酯；
- 30 (4) 所述 2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸苄酯在缚酸剂存在下与硅烷化试剂反应，对羟基进行保护，纯化得反式-4-(叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)哌啶-1-甲酸酯；

(5) 所述反式-4-((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)-2-(4-氰基-2-甲基苯基)哌啶-1-甲酸酯脱除羟基保护基得反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯;

(6) 所述反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-羟基哌啶-1-甲酸酯与卤代烃进行亲核取代反应,得反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯;

5 (7) 所述反式-2-(4-氰基-2-甲基苯基)-4-乙氧基哌啶-1-甲酸酯与酸和烷基醇反应,得反式-4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸酯;

(8) 所述反式-4-(4-乙氧基哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸酯与 4-乙酰基-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯反应,得反式-4-(4-反式乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯;

10 (9) 所述反式-4-(4-反式乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯经 SFC 纯化得 4-((2S, 4S)-4-乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯;

(10) 所述 4-((2S, 4S)-4-乙氧基-2-(4-(烷氧羰基)-2-甲基苯基)哌啶-1-基)甲基)-5-甲氧基-7-甲基-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯水解得式 I 化合物 4-((2S, 4S)-4-乙氧基-1-((5-甲
15 氧基-7-甲基-1H-吡啶-4-基)甲基)哌啶-2-基)-3-甲基苯甲酸。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的制备方法,其中,步骤(1)中所述格氏试剂为异丙基氯化镁;和/或:

步骤(4)中所述硅烷化试剂为叔丁基二苯基氯硅烷,所述缚酸剂为咪唑;和/或:

步骤(6)中所述卤代烃为碘乙烷;和/或:

20 步骤(7)中所述酸为硫酸,所述烷基醇为甲醇。

7. 一种药物组合物,其中,包含权利要求 1、2 或 3 所述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。

8. 权利要求 1、2 或 3 所述的化合物或其药学上可接受的形式在制备治疗补体旁途径失调介导的疾病或障碍的药物中的应用。

25 9. 权利要求 1、2 或 3 所述的化合物或其药学上可接受的形式在制备治疗补体因子 B 介导的疾病或障碍的药物中的应用。

10. 权利要求 1、2 或 3 所述的化合物或其药学上可接受的形式在制备治疗血液性、自身免疫性、炎症性和/或神经变性相关疾病或障碍的药物中的应用。

30 11. 权利要求 1、2 或 3 所述的化合物或其药学上可接受的形式在制备治疗阵发性睡眠性血红蛋白尿、免疫球蛋白 A 肾病、C3 肾小球病、非典型溶血性尿毒症综合征、年龄相关性黄斑病变、ANCA 相关性血管炎、系统性红斑狼疮、免疫性血小板减少症、冷凝集素病等补体旁途径失调介导的疾病药物中的应用。