含苯基并内磺酰胺的化合物

本申请要求申请日为2020年4月30日的中国专利申请CN202010363156.1和申请日为2021年2月2日的中国专利申请CN202110145140.8的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明涉及一类含苯基并内磺酰胺的化合物，具体涉及式 (II) 所示化合物、其药学上可接受的盐或其异构体。

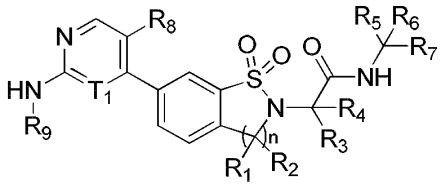
背景技术

丝裂活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases，MAPK）通路存在于细胞增殖、分化、凋亡与应激反应等一系列细胞进程中。其中，RAS-RAF-MEK-ERK通路是最广为人知的MAPK通路之一。该通路首先由细胞外生长因子（PDGF或EGF）与跨膜受体（EGFR或PDGFR等）结合，活化受体，活化的受体通过鸟甘酸交换因子（SOS）使膜内的RAS蛋白与GTP结合并活化；被激活的RAS进一步间接磷酸化RAF；活化的RAF在MEK1/2的两个丝氨酸残基上进行磷酸化；被激活的MEK1/2反过来激活其下游底物ERK1/2; 磷酸化的ERK1/2二聚后移向细胞核内并积聚。在细胞核内的ERK涉及到许多细胞功能，包括核转运、信号传导、DNA修复以及mRNA加工与翻译等。若该通路涉及的基因发生突变或生长因子、下游信号蛋白或蛋白激酶过表达，将会导致细胞通路的持续激活，细胞增殖失控并最终导致肿瘤的形成。例如，大约30%的人类癌细胞属于RAS突变，其中KRAS突变是RAS突变中最常见的一种亚型，KRAS突变的肿瘤大约占人类所有肿瘤细胞的22%，其中70-90%的胰腺癌、10-20%的非小细胞肺癌以及25-35%的结直肠癌都属于KRAS突变；大约8% 的肿瘤属于BRAF突变，其中50-60%的黑色素瘤以及40-60%的乳头状甲状腺癌等均属于BRAF突变。

外信号调节激酶 (ERK 1/2) 是MAPK家族的重要成员，作为RAS/RAF/MEK/ERK通路下游的“最终管理器”，靶向抑制ERK1/2有望用于治疗MAPK通路异常激活（RAS/RAF/MEK 等激活变异）造成的癌变，也可能对由于ERK1/2重新激活而产生RAF或MEK抑制剂耐药的患者有效。据许多临床前报道，MAPK通路抑制剂可以有效地抑制BRAF和RAS突变的癌细胞，例如，BRAF抑制剂威罗菲尼、达拉菲尼以及MEK抑制剂曲美替尼已被批准用于治疗BRAF突变的黑色素瘤。然而，这些药物仍然存在着耐药问题。BRAF抑制剂耐药机理已经被证实，其中包括MEK反式激活CRAF、RTK，NRAS信号的上调，以及MEK激活突变等；MEK抑制剂耐药机制包括MEK突变降低其与药物的结合或增强MEK本身活性、以及BRAF或KRAS扩增等。不论是RAF抑制剂耐药还是MEK抑制剂耐药都将使RAS-RAF-MEK-ERK通路重新激活从而导致癌细胞持续扩增。所以，开发一类新型的双机制ERK抑制剂，不仅将对MAPK信号通路产生突变的病人有效，对于BRAF、MEK抑制剂产生耐药的病人也将同样有效。

发明内容

本发明提供了式 (II) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



(II)，

其中，

T_1 为 CH 或 N；

n 为 1 或 2；

R_1 和 R_2 各自独立地为 H、D、F、Cl 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br 和 I 的取代基所取代；

或 R_1 和 R_2 与其连接的碳原子一起形成；

R_3 和 R_4 各自独立地为 H 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代；

R_5 和 R_6 各自独立地为 H 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I、-OH 和-OCH_3 的取代基所取代；

R_7 为苯基或吡啶基，其中所述苯基和吡啶基任选被 1、2、3 或 4 个 R_a 所取代；

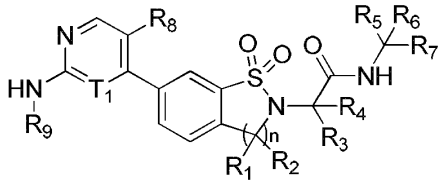
R_8 为 H、F、Cl 或 Br；

R_9 为四氢-2*H*-吡喃基，其中所述四氢-2*H*-吡喃基任选被 1、2、3 或 4 个 R_b 所取代；

各 R_a 独立地为 F、Cl、Br、I、C_{1-3} 烷基、C_{1-3} 烷氧基、NH-C_{1-3} 烷基或 N-(C_{1-3} 烷基)$_2$，其中所述 C_{1-3} 烷基、C_{1-3} 烷氧基、-NH-C_{1-3} 烷基和-N-(C_{1-3} 烷基)$_2$ 分别独立地任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代；

各 R_b 独立地为 F、Cl、Br、I、D 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代。

本发明还提供了式 (II) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



(II)，

其中，

T_1 为 CH 或 N；

n 为 1 或 2；

R_1 和 R_2 各自独立地为 H、F、Cl 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br 和 I 的取代基所取代；

或 R_1 和 R_2 与其连接的碳原子一起形成；

R_3 和 R_4 各自独立地为 H 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代；

R_5 和 R_6 各自独立地为 H 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I、-OH 和-OCH_3 的取代基所取代；

R_7 为苯基或吡啶基，其中所述苯基和吡啶基任选被 1、2、3 或 4 个 R_a 所取代；

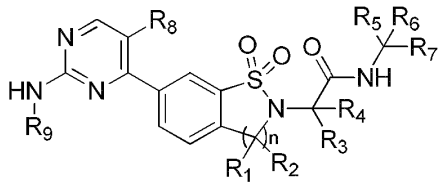
R_8 为 H、F、Cl 或 Br；

R_9 为四氢-2*H*-吡喃基，其中所述四氢-2*H*-吡喃基任选被 1、2、3 或 4 个 R_b 所取代；

各 R_a 独立地为 F、Cl、Br、I、C_{1-3} 烷基、C_{1-3} 烷氧基、NH-C_{1-3} 烷基或 N-(C_{1-3} 烷基)$_2$，其中所述 C_{1-3} 烷基、C_{1-3} 烷氧基、-NH-C_{1-3} 烷基和-N-(C_{1-3} 烷基)$_2$ 分别独立地任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代；

各 R_b 独立地为 F、Cl、Br、I、D 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代。

本发明还提供了式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐，


(I)，

其中，n 为 1 或 2；

R_1 和 R_2 各自独立地为 H、F、Cl 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br 和 I 的取代基所取代；

或 R_1 和 R_2 与其连接的碳原子一起形成；

R_3 和 R_4 各自独立地为 H 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br 和 I 的取代基所取代；

R_5 和 R_6 各自独立地为 H 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I、-OH 和-OCH_3 的取代基所取代；

R_7 为苯基，其中所述苯基任选被 1、2、3 或 4 个 R_a 所取代；

R_8 为 H、F 或 Cl；

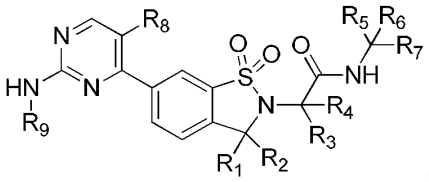
R_9 为四氢-2*H*-吡喃基，其中所述四氢-2*H*-吡喃基任选被 1、2、3 或 4 个 R_b 所取代；

各 R_a 独立地为 F、Cl、Br、I、C_{1-3} 烷基或 C_{1-3} 烷氧基，其中所述 C_{1-3} 烷基和 C_{1-3} 烷氧基任选被 1、

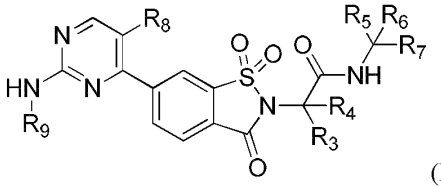
2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代；

各 R_b 独立地为 F、Cl、Br、I 或 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代。

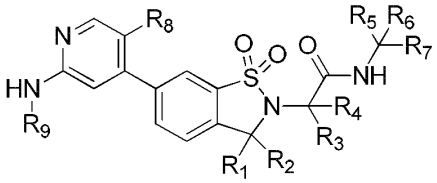
在本发明的一些方案中，上述化合物具有式 (I-1) 或 (I-2) 所示结构：



(I-1)



(I-2) 或

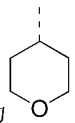
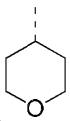


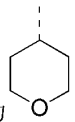
(II-1)，

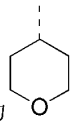
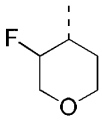
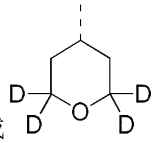
其中，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8 和 R_9 如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述各 R_b 独立地为 F、Cl、Br、I、D 或-CH_3，其他变量如本发明所定义。

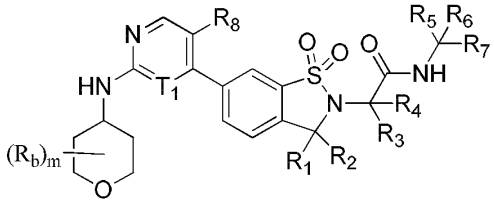
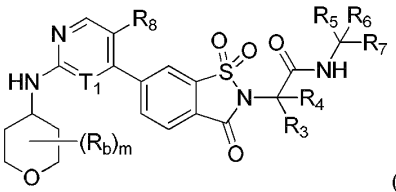
在本发明的一些方案中，上述各 R_b 独立地为 F、Cl、Br、I 或-CH_3，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_9 为 ，其中所述  任选被 1、2、3 或 4 个 R_b 所取代，R_b 及其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_9 为 ，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_9 为 、 或 ，R_b 及其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述所述化合物具有式 (III-1) 或 (III-2) 所示结构：

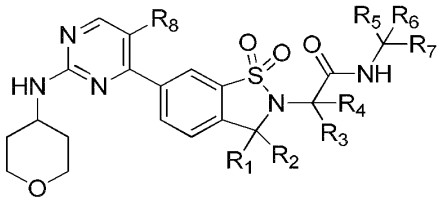
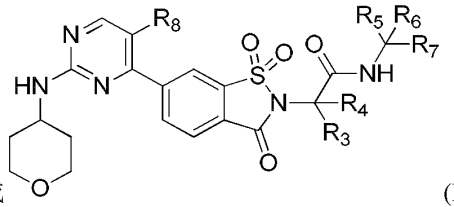

(III-1) 或

(III-2)，

其中，

m 为 0、1、2、3 或 4；

T_1、R_b、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7 和 R_8 如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述化合物具有式 (I-3) 或 (I-4) 所示结构：


(I-3) 或

(I-4)，

其中，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7 和 R_8 如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_1 和 R_2 各自独立地为 H、D、F、Cl 或-CH_3，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_1 和 R_2 各自独立地为 H、F、Cl 或-CH_3，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_1 和 R_2 各自独立地为 H，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_1 和 R_2 与其连接的碳原子一起形成，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_3 和 R_4 各自独立地为 H 或-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_3 和 R_4 各自独立地为 H 或-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br 和 I 的取代基所取代，其他变量如本发明所定义。

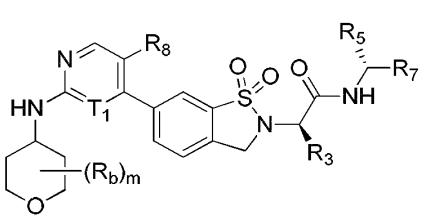
在本发明的一些方案中，上述 R_3 和 R_4 各自独立地为 H 或-CH_3，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_5 和 R_6 各自独立地为 H 或-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I、-OH 和-OCH_3 的取代基所取代，其他变量如本发明所定义。

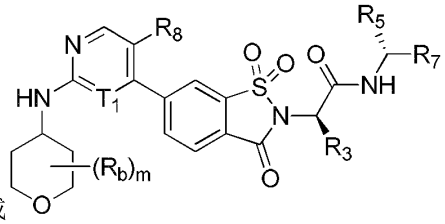
在本发明的一些方案中，上述 R_5 和 R_6 各自独立地为 H、-CH_3 或，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_5 和 R_6 各自独立地为 H 或，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述化合物具有式(III-3)或 (III-4) 所示结构：



(III-3) 或



(III-4)，

其中，

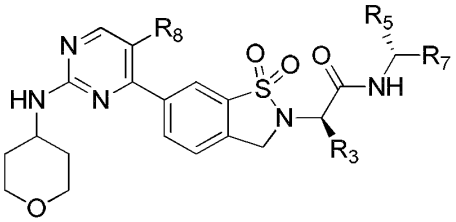
m 为 0、1、2、3 或 4；

T_1、R_b、R_7 和 R_8 如本发明所定义；

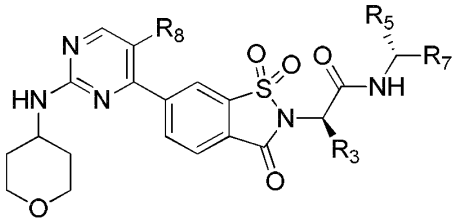
R_3 为-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代；

R_5 为-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I、-OH 和-OCH_3 的取代基所取代。

在本发明的一些方案中，上述化合物具有式 (I-5) 或 (I-6) 所示结构：



(I-5) 或



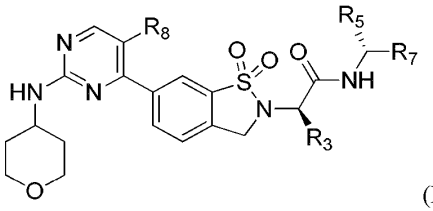
(I-6)，

其中，R_7 和 R_8 如本发明所定义；

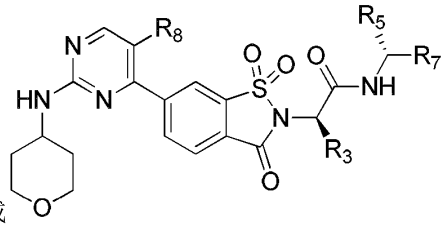
R_3 为-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I 和-OH 的取代基所取代；

R_5 为-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I、-OH 和-OCH_3 的取代基所取代。

在本发明的一些方案中，上述化合物具有式 (I-5) 或 (I-6) 所示结构：



(I-5) 或



(I-6)，

其中，R_7 和 R_8 如本发明所定义；

R_3 为-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br 和 I 的取代基所取代；

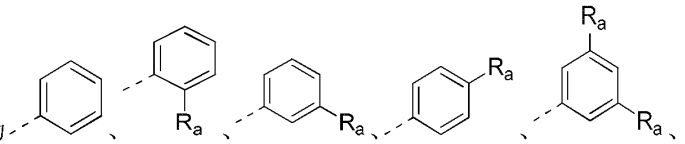
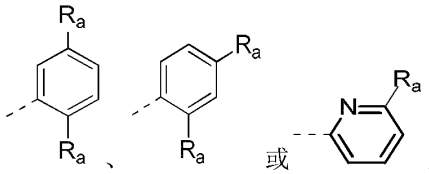
R_5 为-CH_3，其中所述-CH_3 任选被 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、I、-OH 和-OCH_3 的取代基所取代。

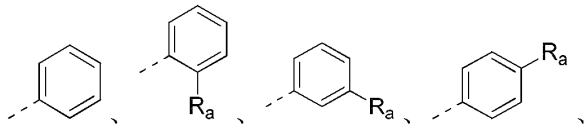
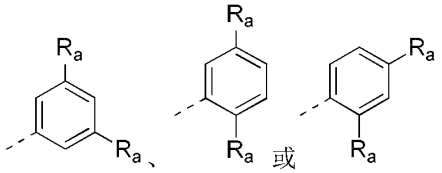
在本发明的一些方案中，上述各 R_a 独立地为 F、Cl、Br、I、$-CH_3$、$-OCH_3$、$-NH-CH_3$ 或，其他变量如本发明所定义。

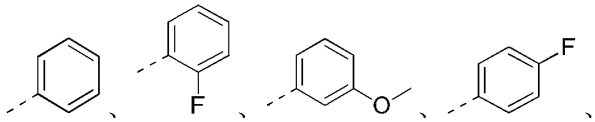
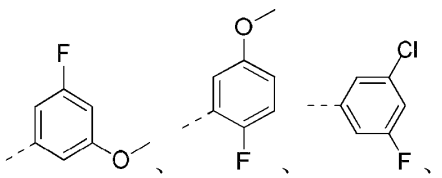
在本发明的一些方案中，上述各 R_a 独立地为 F、Cl、Br、I、$-CH_3$ 或$-OCH_3$，其他变量如本发明所定义。

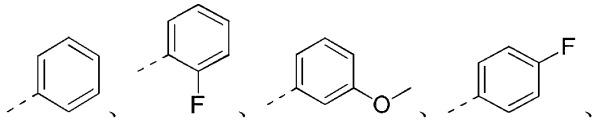
在本发明的一些方案中，上述各 R_a 独立地为 F、Cl、$-CH_3$、$-OCH_3$ 或，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述各 R_a 独立地为 F 或$-OCH_3$，其他变量如本发明所定义。

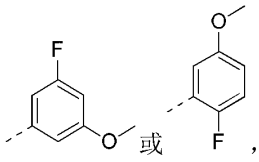
在本发明的一些方案中，上述 R_7 为、或，R_a 及其他变量如本发明所定义。

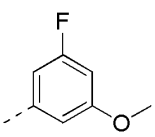
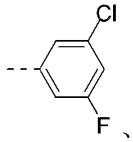
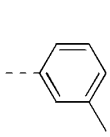
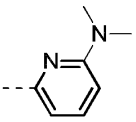
在本发明的一些方案中，上述 R_7 为、或，R_a 及其他变量如本发明所定义。

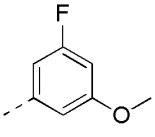
在本发明的一些方案中，上述 R_7 为、或，R_a 及其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_7 为、或，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_7 为、

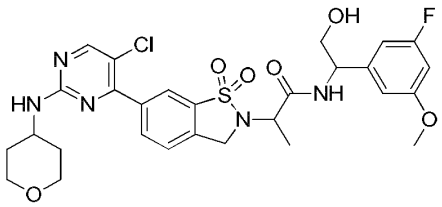
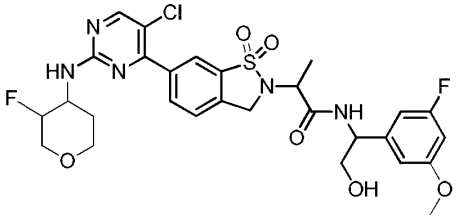
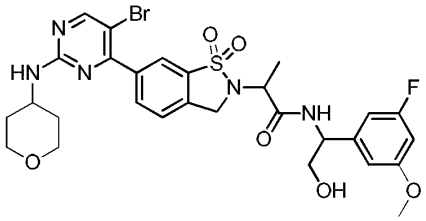
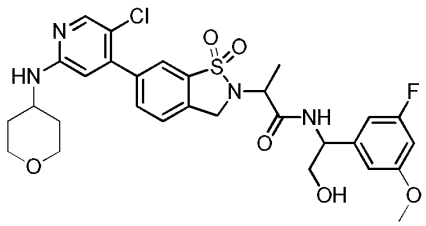
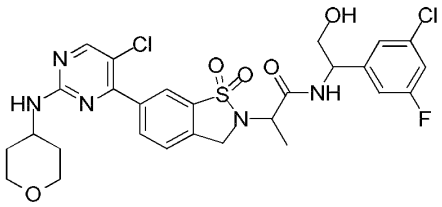
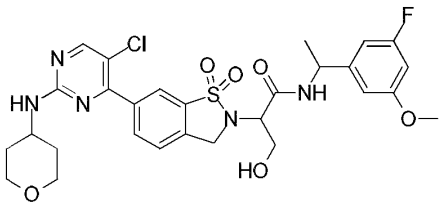
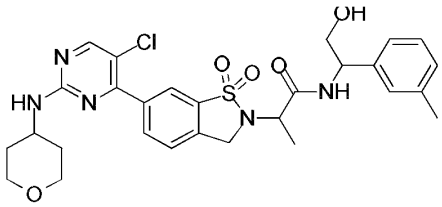
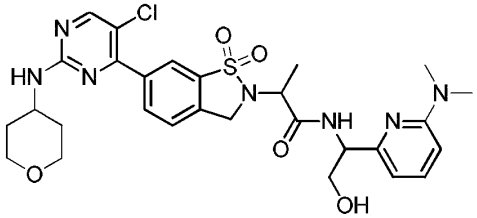

或，其他变量如本发明所定义。

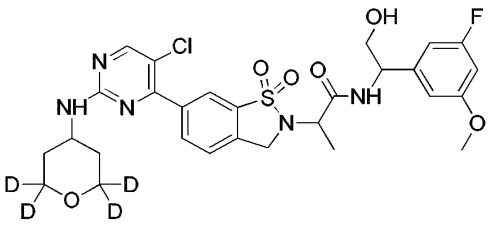
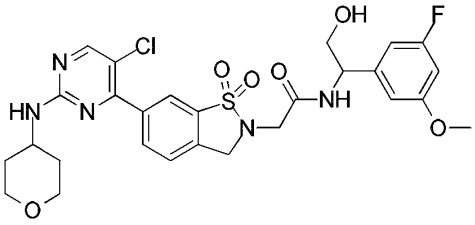
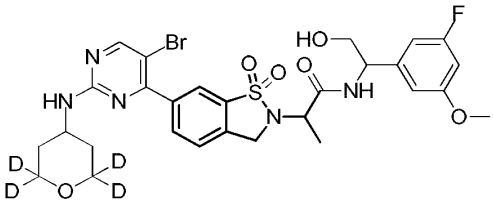
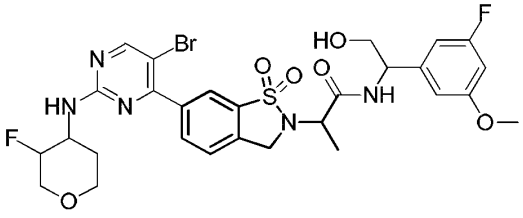
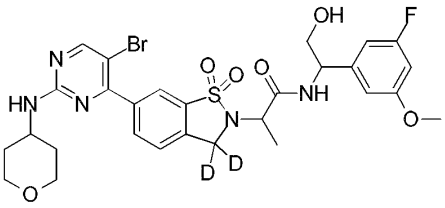
在本发明的一些方案中，上述 R_7 为、、或，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_7 为，其他变量如本发明所定义。

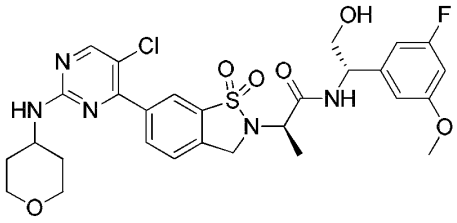
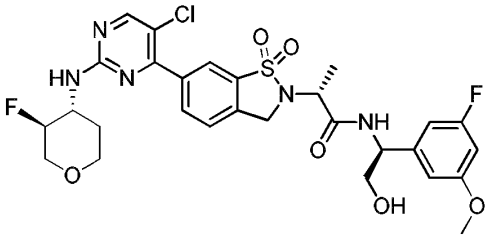
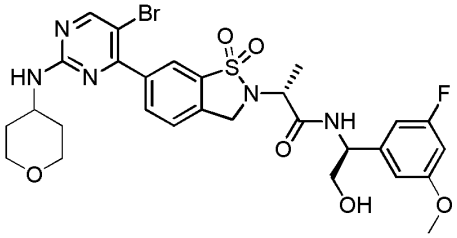
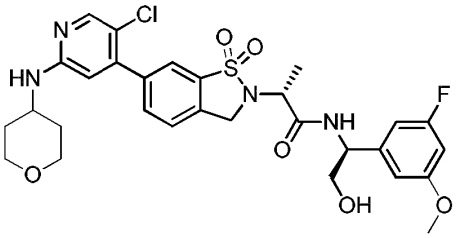
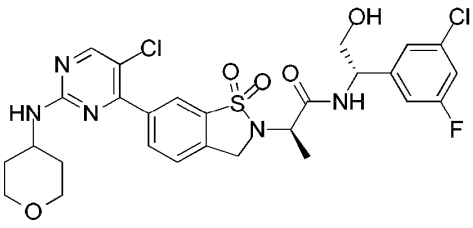
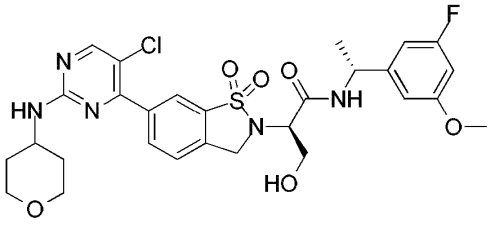
在本发明还有一些方案是由上述各变量任意组合而来。

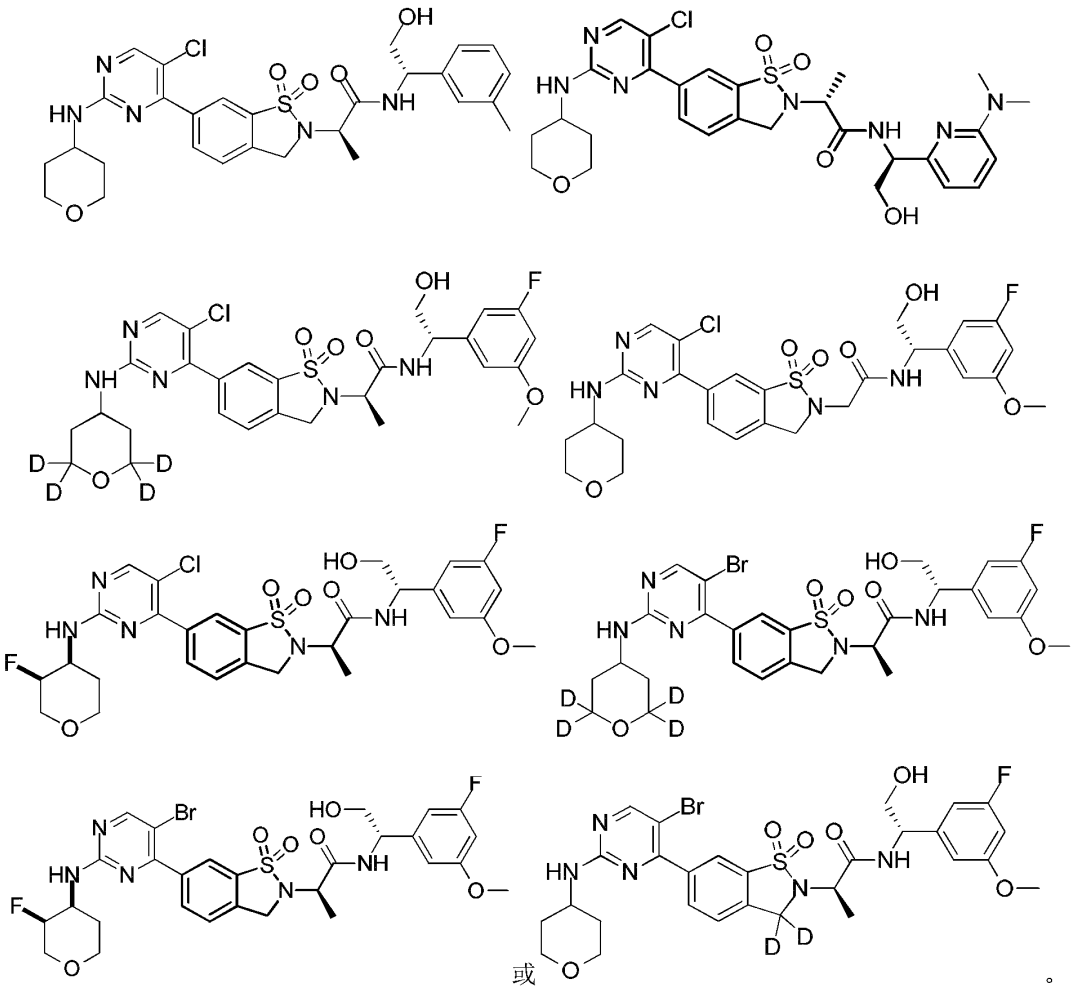
本发明提供了下式化合物或其药学上可接受的盐：





或

。

本发明提供了下式化合物或其药学上可接受的盐：



或 。

本发明还提供了上述化合物及其药学上可接受的盐在制备 ERK1/2 抑制剂药物中的应用。

技术效果

本发明化合物对 ERK1/2 具有很好的抑制活性。有望用于 MAPK 信号通路异常激活（RAS/RAF/MEK 等激活变异）造成的癌变，也可能对由于 ERK1/2 重新激活而产生 RAF 或 MEK 抑制剂耐药的患者有效；本发明化合物在小鼠和犬中口服吸收较好，清除率较低，暴露量较高，具有较好的生物利用度；本发明化合物对人肺癌 Calu-6 细胞皮下异种移植瘤模型荷瘤鼠生长有显著的抑制作用。

定义和说明

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。

这里所采用的术语“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”是指本发明化合物的盐，由本发明发现的具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惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物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、有机胺或镁盐或类似的盐。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惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物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。

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。

本发明的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本发明设想所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、(-)- 和 (+)-对映体、(*R*)- 和 (*S*)-对映体、非对映异构体、(*D*)-异构体、(*L*)-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本发明的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本发明的范围之内。

除非另有说明，术语“对映异构体”或者“旋光异构体”是指互为镜像关系的立体异构体。

除非另有说明，术语“顺反异构体”或者“几何异构体”系由因双键或者成环碳原子单键不能自由旋转而引起。

除非另有说明，术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心，并且分子间为非镜像的关系的立体异构体。

除非另有说明，“(+)”表示右旋，“(-)”表示左旋，“(±)”表示外消旋。

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（ ）。

除非另有说明，术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于 100%，并且，该异构体或对映体的含量大于等于 60%，或者大于等于 70%，或者大于等于 80%，或者大于等于 90%，或者大于等于 95%，或者大于等于 96%，或者大于等于 97%，或者大于等于 98%，或者大于等于 99%，或者大于等于 99.5%，或者大于等于 99.6%，或者大于等于 99.7%，或者大于等于 99.8%，或者大于等于 99.9%。

除非另有说明，术语“异构体过量”或“对映体过量”指两种异构体或两种对映体相对百分数之间的差值。例如，其中一种异构体或对映体的含量为90%，另一种异构体或对映体的含量为10%，则异构体或对映体过量（ee值）为80%。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的(*R*)-和(*S*)-异构体以及 *D* 和 *L* 异构体。如果想得到本发明某化合物的一种对映体，可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备，其中将所得非对映体混合物分离，并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者，当分子中含有碱性官能团（如氨基）或酸性官能团（如羧基）时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分，然后回收得到纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合（例如由胺生成氨基甲酸盐）。本发明的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如，可用放射性同位素标记化合物，比如氚（^{3}H），碘-125（^{125}I）或C-14（^{14}C）。又例如，可用重氢取代氢形成氘代药物，氘与碳构成的键比普通氢与碳构成的键更坚固，相比于未氘化药物，氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本发明的化合物的所有同位素组成的变换，无论放射性与否，都包括在本发明的范围之内。“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。

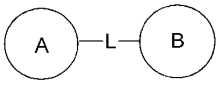
术语“被取代的”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，取代基可以包括重氢和氢的变体，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧（即=O）时，意味着两个氢原子被取代。氧取代不会发生在芳香基上。术语“任选被取代的”是指可以被取代，也可以不被取代，除非另有规定，取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

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。

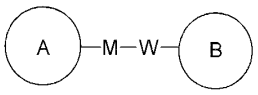
当一个连接基团的数量为0时，比如-$(CRR)_0$-，表示该连接基团为单键。

当其中一个变量选自单键时，表示其连接的两个基团直接相连，比如A-L-Z中L代表单键时表示该结构实际上是A-Z。

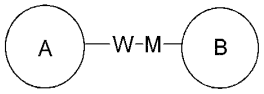
当一个取代基为空缺时，表示该取代基是不存在的，比如A-X中X为空缺时表示该结构实际上是A。当所列举的取代基中没有指明其通过哪一个原子连接到被取代的基团上时，这种取代基可以通过其任何原子相键合，例如，吡啶基作为取代基可以通过吡啶环上任意一个碳原子连接到被取代的基团上。

当所列举的连接基团没有指明其连接方向，其连接方向是任意的，例如，

中连接基团L为-M-W-，此时-M-W-既可以按与从左往右的读取顺序相同的方向连接环A和环B构成

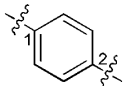


，也可以按照与从左往右的读取顺序相反的方向连接环 A 和环 B 构成



。所述连接基团、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。

除非另有规定，当某一基团具有一个或多个可连接位点时，该基团的任意一个或多个位点可以通过化学键与其他基团相连。所述位点与其他基团连接的化学键可以用直形实线键（—）、直形虚线键（----）、或波浪线（～）表示。例如-OCH_3 中的直形实线键表示通过该基团中的氧原子与其他基团相连；

中的直形虚线键表示通过该基团中的氮原子的两端与其他基团相连；

中的波浪线表示通过该苯基基团中的 1 和 2 位碳原子与其他基团相连。

除非另有规定，环上原子的数目通常被定义为环的元数，例如，“5-7 元环”是指环绕排列 5-7 个原子的“环”。

除非另有规定，“5 元环”表示由 5 个环原子组成的环烷基、杂环烷基、环烯基、杂环烯基、环炔基、杂环炔基、芳基或杂芳基。所述的环包括单环，也包括螺环、并环和桥环等双环体系。除非另有规定，该环任选地包含 1、2 或 3 个独立选自 O、S 和 N 的杂原子。术语“环”还包括含有至少一个环的环系，其中的每一个“环”均独立地符合上述定义。

除非另有规定，术语“C_{1-3} 烷基”用于表示直链或支链的由 1 至 3 个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述 C_{1-3} 烷基包括 C_{1-2} 和 C_{2-3} 烷基等；其可以是一价（如甲基）、二价（如亚甲基）或者多价（如次甲基）。C_{1-3} 烷基的实例包括但不限于甲基 (Me)、乙基 (Et)、丙基 (包括 *n*-丙基和异丙基) 等。

除非另有规定，术语“C_{1-3} 卤代烷基”表示包含 1 至 3 个碳原子的单卤代烷基和多卤代烷基。所述 C_{1-3} 卤代烷基包括 C_{1-2}、C_{2-3}、C_3、C_2 和 C_1 卤代烷基等。C_{1-3} 卤代烷基的实例包括但不限于三氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、五氟乙基、五氯乙基、3-溴丙基等。

除非另有规定，术语“C_{1-3} 烷氧基”表示通过一个氧原子连接到分子的其余部分的那些包含 1 至 3 个碳原子的烷基基团。所述 C_{1-3} 烷氧基包括 C_{1-2}、C_{2-3}、C_3 和 C_2 烷氧基等。C_{1-3} 烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基 (包括正丙氧基和异丙氧基)等。

除非另有规定，术语“C_{6-10} 芳环”和“C_{6-10} 芳基”可以互换使用，术语“C_{6-10} 芳环”或“C_{6-10} 芳基”表示由 6 至 10 个碳原子组成的具有共轭 π 电子体系的环状碳氢基团，它可以是单环、稠合双环或稠合三环体系，其中各个环均为芳香性的。其可以是一价、二价或者多价，C_{6-10} 芳基包括 C_{6-9}、C_9、C_{10} 和 C_6 芳基等。C_{6-10} 芳基的实例包括但不限于苯基、萘基 (包括 1-萘基和 2-萘基等)。

除非另有规定，C_{n-n+m} 或 C_n-C_{n+m} 包括 n 至 n+m 个碳的任何一种具体情况，例如 C_{1-12} 包括 C_1、C_2、C_3、C_4、C_5、C_6、C_7、C_8、C_9、C_{10}、C_{11}、和 C_{12}，也包括 n 至 n+m 中的任何一个范围，例如 C_{1-}

$_{12}$包括 C_{1-3}、C_{1-6}、C_{1-9}、C_{3-6}、C_{3-9}、C_{3-12}、C_{6-9}、C_{6-12}、和 C_{9-12}等；同理，n 元至 n+m 元表示环上原子数为 n 至 n+m 个，例如 3-12 元环包括 3 元环、4 元环、5 元环、6 元环、7 元环、8 元环、9 元环、10 元环、11 元环、和 12 元环，也包括 n 至 n+m 中的任何一个范围，例如 3-12 元环包括 3-6 元环、3-9 元环、5-6 元环、5-7 元环、6-7 元环、6-8 元环、和 6-10 元环等。

术语“D”表示为氘，氢的同位素，化学符号也可为 ^{2}H，又称重氢，由一个质子、一个中子和一个电子组成。

术语“离去基团”是指可以被另一种官能团或原子通过取代反应（例如亲和取代反应）所取代的官能团或原子。例如，代表性的离去基团包括三氟甲磺酸酯；氯、溴、碘；磺酸酯基，如甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、对溴苯磺酸酯、对甲苯磺酸酯等；酰氧基，如乙酰氧基、三氟乙酰氧基等等。

术语“保护基”包括但不限于“氨基保护基”、“羟基保护基”或“巯基保护基”。术语“氨基保护基”是指适合用于阻止氨基氮位上副反应的保护基团。代表性的氨基保护基包括但不限于：甲酰基；酰基，例如链烷酰基（如乙酰基、三氯乙酰基或三氟乙酰基）；烷氧基羰基，如叔丁氧基羰基(Boc)；芳基甲氧羰基，如苄氧羰基(Cbz)和 9-芴甲氧羰基(Fmoc)；芳基甲基，如苄基（Bn）、三苯甲基(Tr)、1,1-二-（4'-甲氧基苯基）甲基；甲硅烷基，如三甲基甲硅烷基（TMS）和叔丁基二甲基甲硅烷基（TBS）等等。术语“羟基保护基”是指适合用于阻止羟基副反应的保护基。代表性羟基保护基包括但不限于：烷基，如甲基、乙基和叔丁基；酰基，例如：链烷酰基（如乙酰基）；芳基甲基，如苄基（Bn），对甲氧基苄基（PMB）、9-芴基甲基(Fm)和二苯基甲基（二苯甲基，DPM）；甲硅烷基，如三甲基甲硅烷基（TMS）和叔丁基二甲基甲硅烷基（TBS）等等。

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

本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构，如果本发明涉及化合物的绝对构型，则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。例如单晶 X 射线衍射法（SXRD），把培养出的单晶用 Bruker D8 venture 衍射仪收集衍射强度数据，光源为 CuKα 辐射，扫描方式：φ/ω 扫描，收集相关数据后，进一步采用直接法(Shelxs97)解析晶体结构，便可以确证绝对构型。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。

本发明采用下述缩略词：$BF_3{\cdot}Et_2O$ 代表三氟化硼乙醚加合物；DMSO 代表二甲基亚砜；DMF 代表 *N,N*-二甲基甲酰胺；DPBS 代表杜氏磷酸盐缓冲液；EDCI 代表 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亚胺；HOBt 代表 1-羟基苯并三唑；HPLC 代表高压液相色谱；LCMS 代表液质联用色谱；MeOH 代表甲醇；NMM 代表氮甲基吗啡啉；$Pd(dppf)Cl_2{\cdot}CH_2Cl_2$ 代表[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷加合物；$Pd(PPh_3)_4$ 代表四三苯基膦钯；PBS 代编磷酸盐缓冲液；HATU 代表 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基）-*N,N,N′,N′*-四甲基脲六氟磷酸盐；PMB 代表对甲氧基苄基；NMP 代表氮甲基吡咯烷酮；DIEA 代表 *N,N*-二异丙基乙胺； $LiAlD_4$ 代表氘代四氢铝锂；MsCl 代表甲烷磺酰氯；BNS 代表 *N*-溴代丁二酰

亚胺；AIBN 代表偶氮二异丁腈。

附图说明

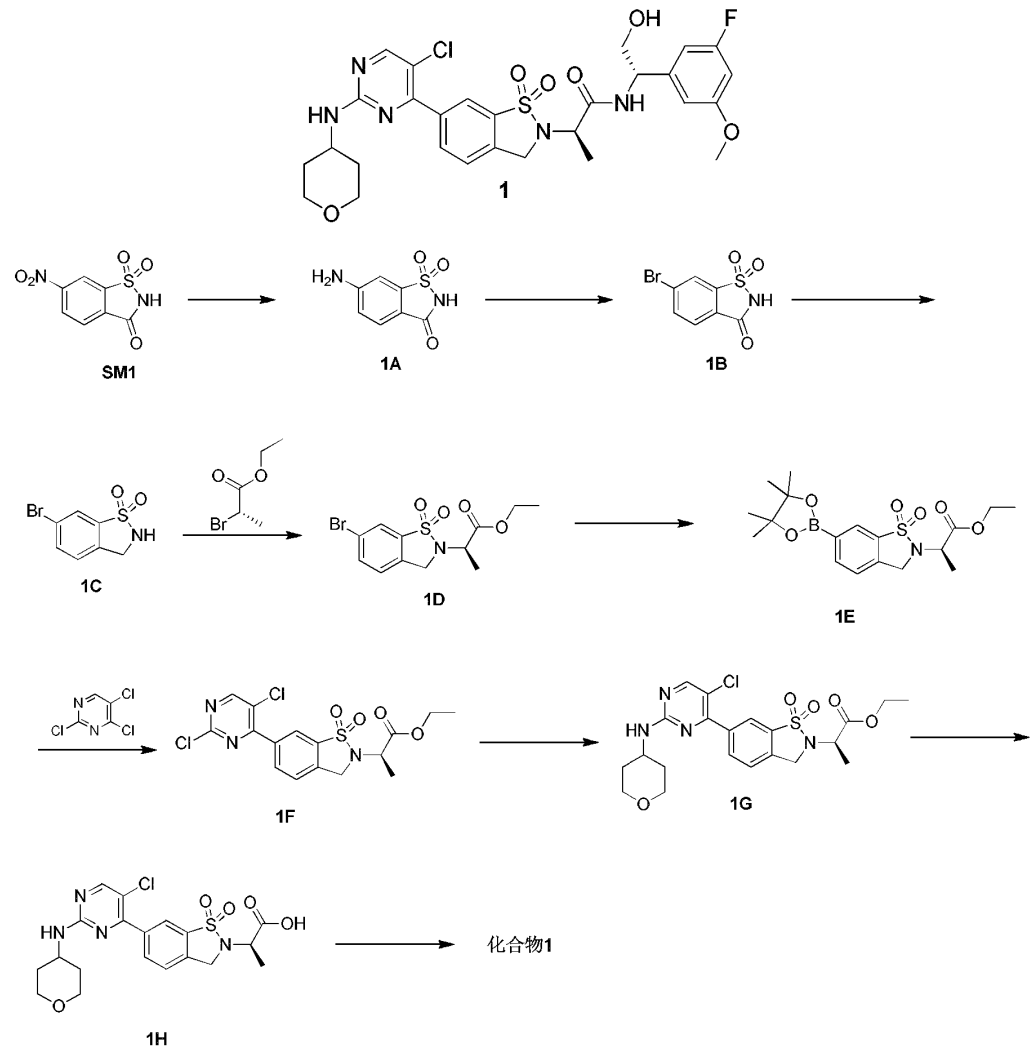
图 1：各组在不同时间点的瘤体积；

图 2：受试物对小鼠体重的影响。

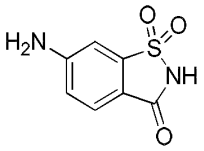
具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行详细描述，但并不意味着对本发明任何不利限制。本文已经详细地描述了本发明，其中也公开了其具体实施例方式，对本领域的技术人员而言，在不脱离本发明精神和范围的情况下针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进将是显而易见的。

实施例 1



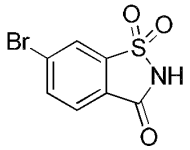
化合物 1A：



1A

将化合物 SM1 (4 克，17.53 毫摩尔)，钯/碳 (400 毫克，17.53 毫摩尔，10%纯度) 溶于甲醇(40 毫升)中，反应液用氢气置换三次排出空气，然后在氢气（15psi）保护下于 15℃下搅拌 2 小时。反应液过滤，滤液减压浓缩得到粗品 1A 直接用于下一步反应。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 1.9, 8.5 Hz, 1H)。

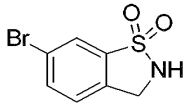
化合物 1B：



1B

0℃条件下，向化合物溴化铜 (3.00 克，13.43 毫摩尔，628.93 微升) 和亚硝酸叔丁酯 (3.38 克，32.79 毫摩尔，3.9 毫升)的乙腈 (30 毫升)中逐滴加入化合物 1A (2.66 克，13.42 毫摩尔) 的乙腈 (30 毫升) 溶液。滴加完后，反应液在 0℃条件下搅拌 1 小时。然后在 15℃条件下搅拌 15 小时。反应液用水 (100 毫升) 稀释，加入盐酸溶液 (2 摩尔) 将 pH 调到 2 以下。然后用乙酸乙酯 (100 毫升×2 次) 萃取。合并有机相减压浓缩得到化合物 1B。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.51 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 8.09 (dd, J = 1.7, 8.2 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 8.2 Hz, 1H)。

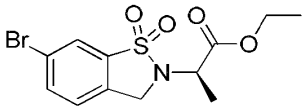
化合物 1C：



1C

将化合物 1B (4.26 克，16.25 毫摩尔)溶于四氢呋喃 (50 毫升) 中，加入硼氢化钠 (6.40 克，169.05 毫摩尔)。反应液冷却到-8℃，然后在-8℃下逐滴加入 BF_3·Et_2O (26.45 克，186.36 毫摩尔，23 毫升)。并在-8℃条件下搅拌 10 分钟。然后在 80℃条件下搅拌 2 小时。将反应液倒入冰水 (120 毫升) 中，用 2 摩尔的氢氧化钠 (100 毫升) 溶液将反应液的 pH 调节到 10。反应液用乙酸乙酯 (100 毫升) 萃取。有机相用 2 摩尔的氢氧化钠 (50 毫升×3 次) 水溶液萃取。合并的水相用 2 摩尔的盐酸 (500 毫升) 溶液将 pH 调节到 2，然后用乙酸乙酯 (300 毫升×2 次) 萃取，合并有机相经减压浓缩得到粗品化合物 1C。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.12 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.97 (br s, 1H), 7.87 (dd, J = 1.8, 8.2 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.37 (br s, 2H)。

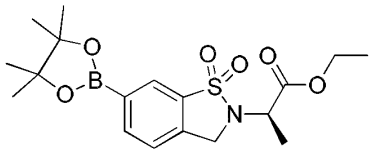
化合物 1D：



1D

氮气保护下，将化合物1C (3.1克，12.50毫摩尔)，2-溴-(2*S*)丙酸乙酯 (3.40克，18.78毫摩尔) 和碳酸钾 (5.06克，36.65毫摩尔) 溶于DMF (30毫升) 中，混合液在20℃条件下搅拌1小时。反应液用50毫升水稀释，然后用乙酸乙酯(50毫升×3次)萃取。合并有机相，减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 10:1-5:1洗脱) 得到化合物1D。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.93 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 1.8, 8.2 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.82 (d, J = 14.1 Hz, 1H), 4.59 - 4.46 (m, 2H), 4.20 (dq, J = 1.4, 7.2 Hz, 2H), 1.63 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.26 (s, 3H)。

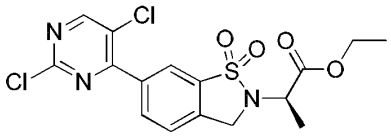
化合物 1E：



1E

氮气保护下，将双频哪醇硼酸酯 (1.19 克，4.69 毫摩尔)，化合物 1D (1.36 克，3.91 毫摩尔)，$Pd(dppf)Cl_2·CH_2Cl_2$ (319 毫克，390.63 微摩尔) 和醋酸钾 (767 毫克，7.82 毫摩尔) 溶于二氧六环 (14 毫升) 中，混合液在 90℃条件下搅拌 16 小时。反应液过滤，将滤液减压浓缩得到粗品化合物 1E。

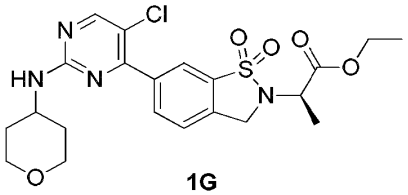
化合物 1F：



1F

氮气保护下，将化合物 1E (2.53 克，6.40 毫摩尔)，2,4,5-三氯嘧啶 (2.35 克，12.81 毫摩尔)，$Pd(PPh_3)_4$ (740 毫克，640.38 微摩尔) 和碳酸钠 (1.36 克，12.83 毫摩尔) 溶于二氧六环 (24 毫升) 和水 (8 毫升) 中，混合液在 90℃条件下搅拌 2 小时。将反应液过滤，向滤液中加入乙酸乙酯(50 毫升)，用饱和氯化钠溶液 (50 毫升×3 次) 洗涤。合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 10:1-4:1 洗脱) 得到化合物 1F。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.72 (s, 1H), 8.42 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 8.19 (dd, J = 1.7, 8.1 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.99 (d, J = 14.5 Hz, 1H), 4.71 - 4.54 (m, 2H), 4.22 (dq, J = 1.5, 7.2 Hz, 2H), 1.67 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.30 - 1.26 (m, 3H)。

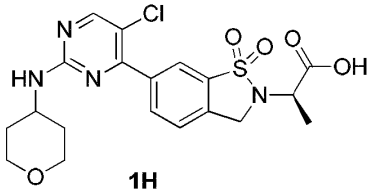
化合物 1G：



1G

氮气保护下，将化合物 1F (865 毫克，2.08 毫摩尔)，四氢吡喃-4-胺 (420 毫克，4.15 毫摩尔)，DIEA (675.22 毫克，5.22 毫摩尔，910 微升) 溶于二氧六环 (9 毫升) 中，混合液在 90℃条件下搅拌 16 小时。反应液用乙酸乙酯 (20 毫升) 稀释并用 1 摩尔的盐酸 (20 毫升×1 次) 水溶液洗涤，水相用乙酸乙酯 (20 毫升×2 次) 萃取，合并的有机相用盐水 (20 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、减压浓缩得到粗品化合物 1G。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.33 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.08 (dd, J = 1.3, 8.1 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.34 (br s, 1H), 4.95 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 4.64 - 4.58 (m, 2H), 4.22 (dq, J = 1.4, 7.1 Hz, 2H), 4.03 - 3.98 (m, 2H), 3.56 (dt, J = 1.7, 11.5 Hz, 2H), 2.07 - 2.02 (m, 2H), 1.67 (d, J = 7.4 Hz, 3H), 1.61 - 1.55 (m, 2H), 1.31 - 1.27 (m, 3H)。

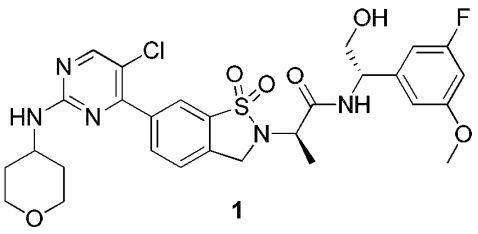
化合物 1H：



1H

向化合物 1G (1.03 克，2.14 毫摩尔) 的四氢呋喃 (10 毫升) 和甲醇 (10 毫升) 溶液中加入一水合氢氧化锂 (4 摩尔，1.1 毫升)。混合液在 20℃条件下搅拌 16 小时。反应液减压浓缩，用 2 摩尔的盐酸 (2 毫升) 溶液将调节 pH=4，然后用乙酸乙酯 (20 毫升×3 次) 萃取。合并的有机相过滤，滤液减压浓缩得粗品化合物 1H。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.32 (br s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.03 (br d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.15 - 6.07 (m, 1H), 4.83 (br d, J = 13.7 Hz, 1H), 4.67 - 4.55 (m, 3H), 4.02 - 3.96 (m, 3H), 3.58 - 3.51 (m, 2H), 2.02 (br d, J = 10.7 Hz, 2H), 1.69 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 2H)。

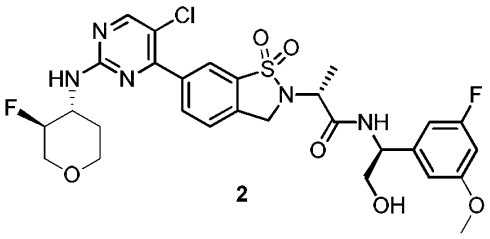
化合物 1：



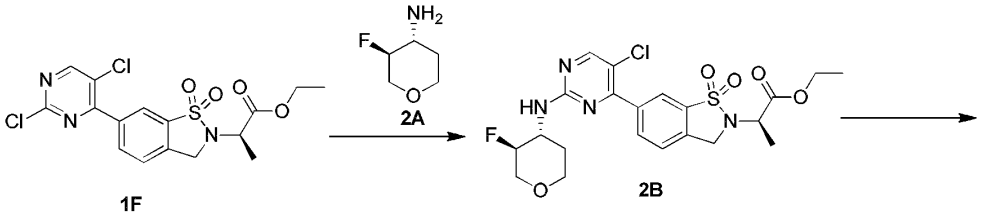
1

氮气保护下，将化合物 1H (247 毫克，545.36 微摩尔)，(2*S*)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基)乙醇 (101 毫克，545.37 微摩尔)，HOBt (82 毫克，606.85 微摩尔)，NMM (61 毫克，603.08 微摩尔，66.30 微升) 和 EDCI (115 毫克，599.89 微摩尔) 溶于 DMF (3 毫升)和二氯甲烷 (6 毫升) 的混合溶剂中，混合液在 20℃条件下搅拌 16 小时。反应液减压浓缩得到残渣，残渣用二氯甲烷 (40 毫升) 稀释，然后用盐酸水溶液 (2 摩尔，40 毫升×2 次) 洗涤。合并有机相过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (三氟乙酸体系)，得到化合物 1 的游离碱。^{1}H NMR (400 MHz, MeOH-d_4) δ = 8.38 (s, 1H), 8.24 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 1.5, 8.1 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.70 (br d, J = 9.4 Hz, 1H), 6.65 - 6.55 (m, 1H), 4.99 - 4.91 (m, 2H), 4.71 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 4.64 - 4.59 (m, 1H), 4.09 - 3.95 (m, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.79 - 3.67 (m, 2H), 3.55 (dt, J = 1.9, 11.6 Hz, 2H), 2.01 (br dd, J = 2.0, 12.5 Hz, 2H), 1.70 - 1.57 (m, 5H)。LCMS (ESI) m/z: 620.3 [M+1]。

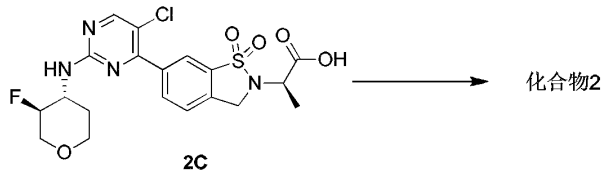
实施例 2



2

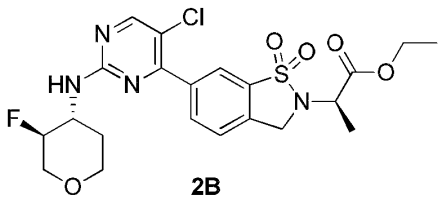


1F **2A** **2B**



2C 化合物2

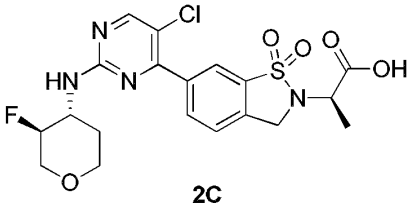
化合物 2B：



2B

向化合物 1F (200 毫克，480.45 微摩尔) 的二氧六环 (3 毫升) 溶液中加入化合物 2A (74.76 毫克，480.45 微摩尔，HCl) 和 DIEA (186.28 毫克，1.44 毫摩尔 251.06 微升)，反应液 90℃条件下搅拌 24 小时。反应结束后，反应液用乙酸乙酯 (20 毫升) 稀释并用 1 摩尔的盐酸 (20 毫升×1 次) 水溶液洗涤，水相用乙酸乙酯 (20 毫升×2 次) 萃取，合并的有机相用盐水 (20 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、减压浓缩得到粗品化合物 2B。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ=8.37 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.09 (dd, 1H, J=1.5, 8.2 Hz), 7.53 (d, 1H, J=8.1 Hz), 5.32 (br d, 1H, J=8.1 Hz), 4.96 (d, 1H, J=14.3 Hz), 4.6-4.7 (m, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.1-4.2 (m, 2H), 3.8-3.9 (m, 1H), 3.5-3.6 (m, 2H), 2.2-2.4 (m, 1H), 1.67 (d, 3H, J=7.3 Hz), 1.3-1.3 (m, 3H). LCMS (ESI): m/z: 416.2[M+1]。

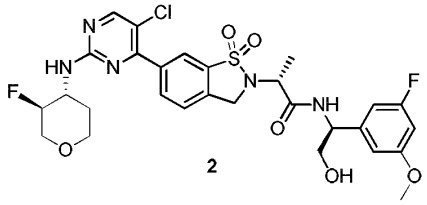
化合物 2C：



2C

向化合物 2B (60 毫克，120.25 微摩尔) 的四氢呋喃 (3 毫升) 溶液中加入一水和氢氧化锂 (15.14 毫克，360.75 微摩尔) 的水 (0.5 毫升) 溶液，反应液在 25℃下搅拌 1 小时。反应完全后，将反应液减压浓缩，用 2 摩尔的盐酸（2 毫升）溶液将调节 pH=4，然后用乙酸乙酯 (20 毫升× 3 次) 萃取。合并的有机相过滤，滤液经减压浓缩得粗品化合物 2C。LCMS (ESI): m/z: 471.0[M+1]。

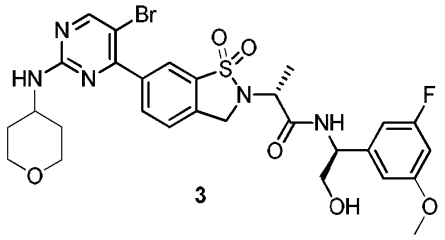
化合物 2C：



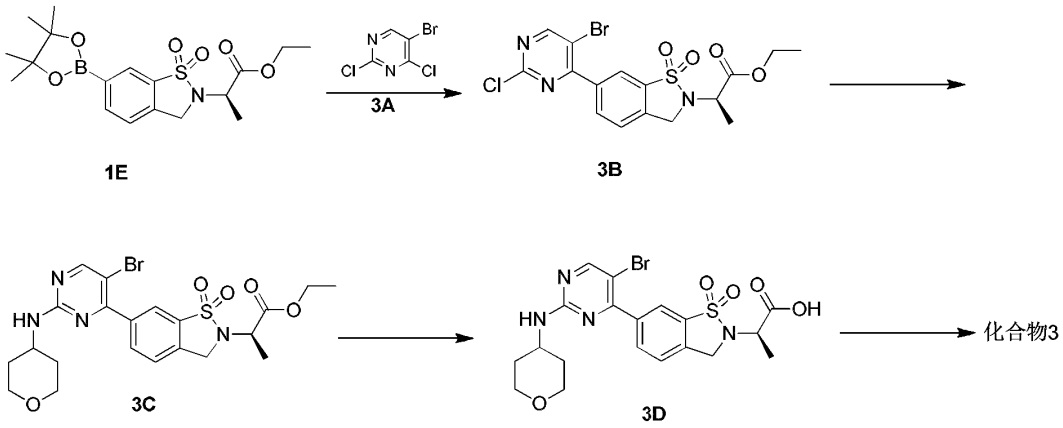
2

向化合物 2C (50 毫克，106.18 微摩尔) 的二氯甲烷 (3 毫升) 溶液中加入(2S)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基)乙醇 (28.24 毫克，127.42 微摩尔) 和 DIEA (41.17 毫克，318.54 微摩尔，55.48 微升)，混合液在 0℃下搅拌 15 分钟，然后将 HATU (48.45 毫克，127.42 微摩尔) 加入到混合液中，反应液在 0℃下搅拌 1 小时。反应液用盐酸(2M)水溶液调节 PH<7, 然后用二氯甲烷 (10 毫升×2 次) 萃取，然后用水 (10× 1 次) 洗涤。合并有机相过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (甲酸体系)，得到化合物 2 的游离碱。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ=8.41 (s, 1H), 8.26 (d, 1H, J=1.1 Hz), 8.18 (dd, 1H, J=1.6, 8.1 Hz), 7.72 (d, 1H, J=8.1 Hz), 6.77 (s, 1H), 6.70 (td, 1H, J=1.7, 9.3 Hz), 6.6-6.6 (m, 1H), 5.0-5.0 (m, 1H), 4.72 (d, 1H, J=14.8 Hz), 4.5-4.7 (m, 4H), 4.2-4.4 (m, 1H), 4.07 (dt, 1H, J=3.9, 11.2 Hz), 3.9-4.0 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.7-3.8 (m, 2H), 3.5-3.6 (m, 2H), 2.1-2.3 (m, 1H), 1.7-1.8 (m, 1H), 1.62 (d, 3H, J=7.1 Hz). LCMS (ESI): m/z: 638.0[M+1]。

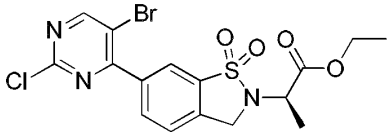
实施例 3



3



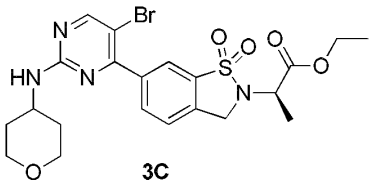
化合物 3B：



3B

氮气保护下，将化合物 1E (500 毫克，1.26 毫摩尔)，3A (454 毫克，1.99 毫摩尔，255.06 微升)，$Pd(PPh_3)_4$ (145 毫克，125.48 微摩尔) 和碳酸钠（409 毫克，3.86 毫摩尔）溶于二氧六环 (8 毫升) 和水 (2 毫升) 中，混合液在 100℃条件下搅拌 1 小时。将反应液过滤，向滤液中加入乙酸乙酯 (30 毫升)，用饱和氯化钠溶液 (30 毫升×1 次) 洗涤。合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 1:1 洗脱) 得到化合物 3B。^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.84 (s, 1H), 8.35 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 8.12 (dd, J = 1.6, 8.1 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.98 (d, J = 14.4 Hz, 1H), 4.67 - 4.57 (m, 2H), 4.25 - 4.18 (m, 2H), 1.67 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.31 - 1.27 (m, 3H). LCMS (ESI): m/z: 527.2[M+1]。LCMS (ESI): m/z: 461.9[M+1]。

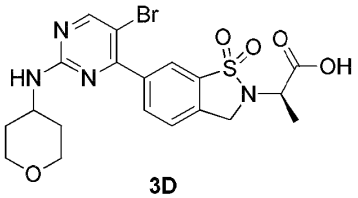
化合物 3C：



3C

向化合物 3B (100 毫克，217.05 微摩尔) 的二氧六环 (3 毫升) 溶液中加入 DIEA (61 毫克，471.98 微摩尔，82.21 微升)和四氢吡喃-4-胺(66 毫克，652.52 微摩尔)。反应液在 90℃条件下搅拌 16 小时。反应结束后，混合液用水 (10 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (10 毫升×2 次) 萃取。合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 1:1 洗脱) 得到化合物 3C。 LCMS (ESI): m/z: 527.2[M+1]。

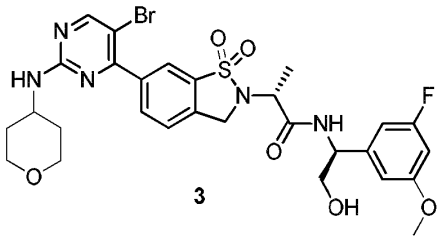
化合物 3D：



3D

向化合物 3C(100 毫克，190.33 微摩尔)的四氢呋喃 (1 毫升) 和乙醇 (1 毫升) 溶液中加入一水和氢氧化锂 (12 毫克，285.96 微摩尔) 的水 (1 毫升) 溶液，反应液在 25℃下搅拌 1 小时。反应完全后将反应液减压浓缩，用盐酸 (2 摩尔) 水溶液将反应液调节 pH=2，然后用乙酸乙酯 (10 毫升×3 次) 萃取。合并的有机相过滤，滤液减压浓缩得粗品化合物 3D。LCMS (ESI): m/z:497.2[M+1]。

化合物 3：

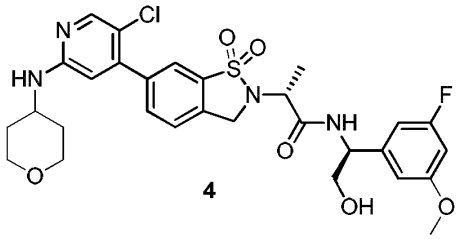


3

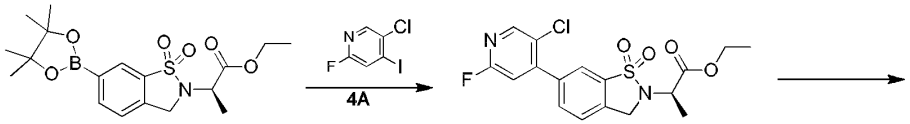
向化合物 3D (70 毫克，140.74 微摩尔) 的二氯甲烷 (3 毫升)溶液中加入(2S)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基) 乙醇 (58 毫克，261.67 微摩尔) 和 DIEA (74.20 毫克，574.11 微摩尔，100 微升)，反应液在 0℃下搅拌 5 分钟。然后将 HATU (70 毫克，184.10 微摩尔) 加入到反应液中继续反应 2 小时。反应液用盐酸(2M)水溶液调节 PH<7，然后用二氯甲烷 (10 毫升×2 次) 萃取，然后用水 (10 毫升×1 次) 洗涤。合并有机相过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (甲酸体系)，得到化合物 3 的游离碱。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.46 (s, 1H), 8.15 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 8.08 (dd, J = 1.6, 8.1 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.72 - 6.65 (m, 1H), 6.59 (td, J = 2.3, 10.8 Hz, 1H), 4.95 -

4.90 (m, 2H), 4.69 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.07 - 3.93 (m, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.75 - 3.66 (m, 2H), 3.52 (dt, J = 1.9, 11.6 Hz, 2H), 2.03 - 1.94 (m, 2H), 1.68 - 1.53 (m, 5H). LCMS (ESI): m/z:666.3[M+1]。

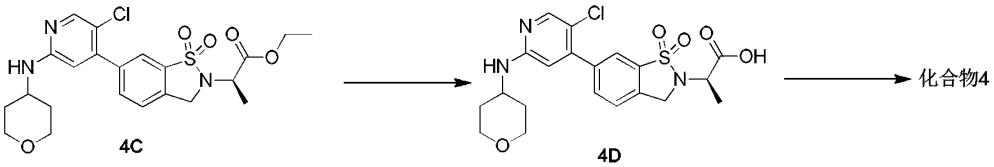
实施例 4



4

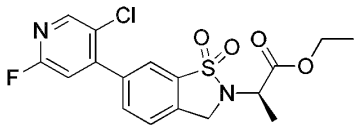


1E 4A 4B



4C 4D 化合物4

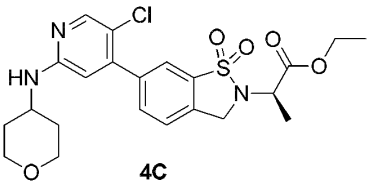
化合物 4B：



4B

氮气保护下，将化合物 1E (100 毫克，252.99 微摩尔)，化合物 4A(97.69 毫克，379.48 微摩尔)，$Pd(dppf)Cl_2.CH_2Cl_2$ (10.33 毫克，12.65 微摩尔) 和碳酸钠 (53.63 毫克，505.97 微摩尔) 溶于二氧六环 (5 毫升) 和水 (1 毫升) 中，反应液在 80℃条件下搅拌 2 小时。反应结束后，向反应液中加入 0.5 毫升盐酸 (2 摩尔) 淬灭反应，混合液用水 (10 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (10 毫升×2 次) 萃取。合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 2:1 洗脱) 得到化合物 4B。^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ=8.27 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.65 (dd, 1H, J=1.4, 8.0 Hz), 7.49 (d, 1H, J=8.1 Hz), 6.90 (d, 1H, J=2.5 Hz), 4.90 (d, 1H, J=14.1 Hz), 4.5-4.6 (m, 2H), 4.1-4.2 (m, 2H), 1.6-1.6 (m, 3H), 1.2-1.3 (m, 3H). LCMS (ESI): m/z:647.0[M+1]。

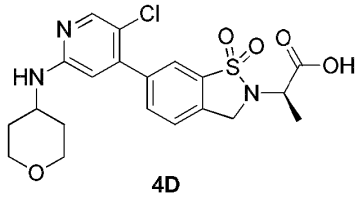
化合物 4C：



4C

氮气保护下，将化合物4B (50毫克，0.125毫摩尔)，四氢吡喃-4-胺 (25.36毫克，0.251毫摩尔)，DIEA (48.61毫克，0.376毫摩尔，65.51微升) 溶于NMP (3毫升) 中，混合液在140℃条件下搅拌4小时。反应液用乙酸乙酯 (10毫升) 稀释并用2摩尔的盐酸 (10毫升×1次) 水溶液洗涤，有机相用乙酸乙酯 (10毫升×2次) 萃取，合并的有机相用盐水 (10毫升×1次) 洗涤，合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 10:1-4:1洗脱) 得到化合物4C。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ=8.07 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.6-7.7 (m, 1H), 7.4-7.5 (m, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.87 (d, 1H, J=13.9 Hz), 4.5-4.6 (m, 2H), 4.43 (br d, 1H, J=7.7 Hz), 4.1-4.2 (m, 2H), 3.9-4.0 (m, 2H), 3.7-3.9 (m, 1H), 3.48 (br t, 2H, J=10.8 Hz), 1.9-1.9 (m, 2H), 1.60 (d, 3H, J=7.3 Hz), 1.42 (br d, 2H, J=3.9 Hz), 1.2-1.2 (m, 3H). LCMS (ESI):m/z:480.1[M+1]。

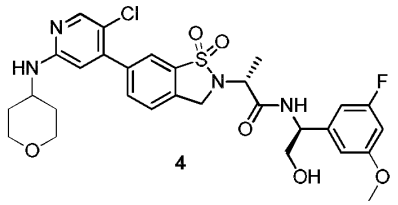
化合物 4D：



4D

向化合物4C(50 毫克，104.17 微摩尔)的四氢呋喃(5毫升)溶液中加入一水和氢氧化锂(21.86 毫克，520.86 微摩尔)的水(1毫升)溶液，反应液在25℃条件下搅拌2小时。反应完全后，将反应液减压浓缩，用2摩尔的盐酸水溶液将反应液调节pH=2，然后用乙酸乙酯(10毫升× 3次)萃取。合并的有机相过滤，滤液减压浓缩得粗品化合物4D。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ=8.06 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.79 (dd, 1H, J=1.4, 8.0 Hz), 7.6-7.7 (m, 1H), 6.59 (s, 1H), 4.94 (br s, 2H), 4.72 (d, 1H, J=14.5 Hz), 4.54 (q, 1H, J=7.3 Hz), 4.0-4.0 (m, 2H), 3.5-3.6 (m, 2H), 3.4-3.5 (m, 2H), 2.0-2.1 (m, 2H), 1.7-1.7 (m, 3H), 1.5-1.6 (m, 2H). LCMS (ESI): m/z:452.0[M+1]。

化合物 4：

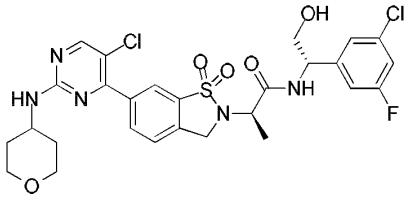


4

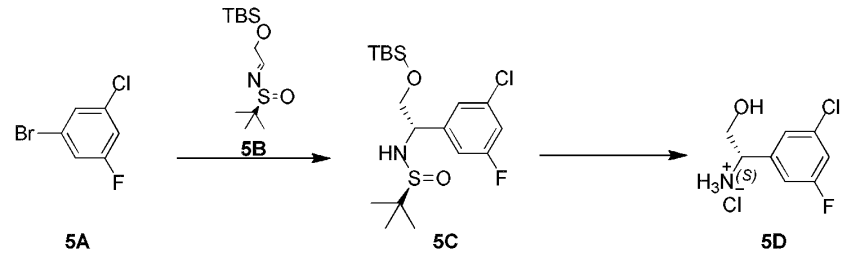
0℃下，向化合物4D (40 毫克，88.51 微摩尔) 和 (2S)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基) 乙醇 (21.58 毫克，97.36 微摩尔) 的二氯甲烷 (4 毫升) 溶液中加入DIEA (34.32 毫克，265.53 微摩尔，46.25 微

升)，混合液在0℃下搅拌20分钟，然后加入HATU (40.39 毫克，106.21 微摩尔) 继续在0℃下搅拌40分钟。反应液用盐酸 (2摩尔) 水溶液调节PH<7，然后用二氯甲烷 (10毫升×2次) 萃取，然后用水 (10×1次) 洗涤。合并有机相过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (甲酸体系)，得到化合物4的游离碱。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ=8.06 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.80 (dd, 1H, J=1.3, 8.1 Hz), 7.69 (d, 1H, J=7.9 Hz), 6.77 (s, 1H), 6.70 (br d, 1H, J=9.9 Hz), 6.61 (td, 1H, J=2.2, 10.8 Hz), 6.57 (s, 1H), 4.9-5.0 (m, 2H), 4.6-4.7 (m, 2H), 3.9-4.1 (m, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.7-3.8 (m, 2H), 3.5-3.6 (m, 2H), 2.0-2.1 (m, 2H), 1.61 (d, 3H, J=7.1 Hz), 1.56 (br dd, 2H, J=3.5, 11.8 Hz). LCMS (ESI): m/z:619.0[M+1]。

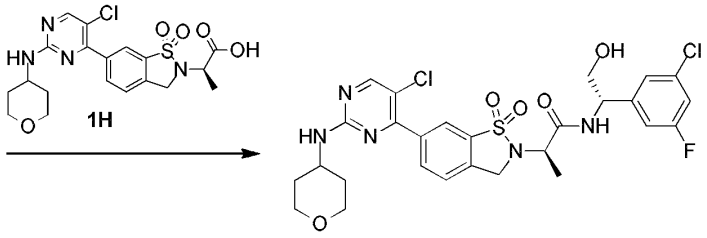
实施例 5



5

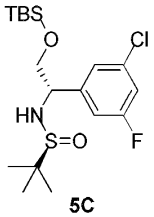


5A **5B** **5C** **5D**



1H **5**

化合物 5C：

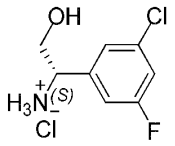


5C

氮气保护，-15℃下，向异丙基溴化镁 (1.3 摩尔，3.75 毫升) 的四氢呋喃 (12 毫升) 溶液中缓慢加入化合物 5A (1 克，4.77 毫摩尔) 的四氢呋喃 (4 毫升) 溶液。混合液在-15℃下搅拌 2 小时，然后加入化合物 5B (1.33 克，4.78 毫摩尔) 的四氢呋喃 (4 毫升) 溶液，反应液在-15℃下继续搅拌 2 小

时。反应结束后加入饱和氯化铵 (20 毫升) 溶液淬灭反应液，然后用水 (10 毫升) 稀释，用乙酸乙酯 (10 毫升×2 次) 萃取，有机相用盐水(10 毫升×1 次) 洗涤，合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经高效液相色谱制备分离(甲酸体系)，得到化合物 5C。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ = 7.32 (br t, J = 4.5 Hz, 2H), 7.23 (br d, J = 9.5 Hz, 1H), 5.24 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.36 (q, J = 6.2 Hz, 1H), 3.83 (dd, J = 6.1, 9.9 Hz, 1H), 3.71 (dd, J = 7.2, 10.0 Hz, 1H), 1.14 - 1.10 (m, 9H), 0.79 (s, 9H), -0.07 (d, J = 12.1 Hz, 6H). LCMS (ESI): m/z:408.4[M+1]。

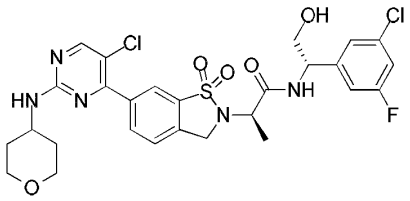
化合物 5D：



5D

向化合物 5C (280 毫克，686.20 微摩尔) 的二氧六环 (3 毫升) 溶液中加入盐酸/二氧六环 (4 摩尔，1.5 毫升)。反应液在 25℃条件下搅拌 0.5 小时。反应结束后，将混合液减压浓缩得到粗品 5D 直接用于下一步。

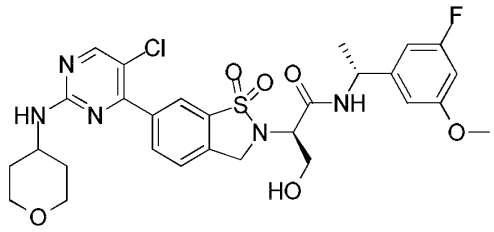
化合物 5：



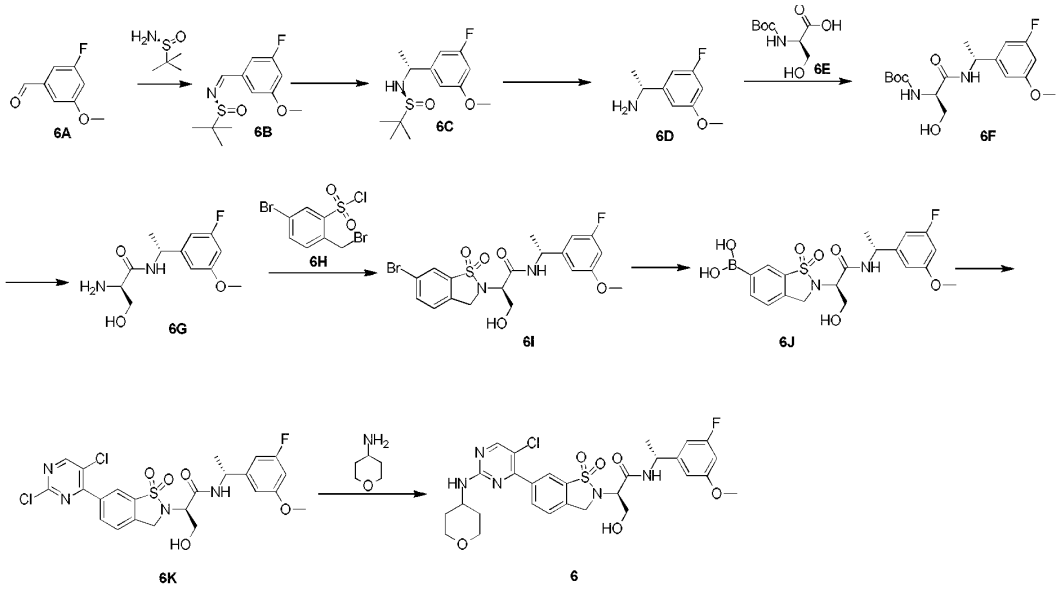
5

0℃下，向化合物 1H (70 毫克，154.56 微摩尔) 的二氯甲烷 (3 毫升) 溶液中加入化合物 5D (55 毫克， 243.28 微摩尔) 和 DIEA (81.62 毫克，631.54 微摩尔，110 微升)，反应液在 0℃下搅拌 5 分钟，然后加入 HATU (79 毫克，207.77 微摩尔) 继续反应 2 小时。反应结束后，将反应液用水 (10 毫升) 稀释并用二氯甲烷 (10 毫升×3 次) 萃取，水 (20 毫升×1 次) 洗涤，合并有机相过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离(甲酸体系)，得到化合物 5 的游离碱。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.36 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.15 (dd, J = 1.5, 8.0 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.14 - 7.05 (m, 2H), 4.94 (br t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.69 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 4.63 - 4.57 (m, 1H), 4.09 - 3.93 (m, 3H), 3.79 - 3.69 (m, 2H), 3.58 - 3.48 (m, 2H), 1.99 (br dd, J = 1.8, 12.8 Hz, 2H), 1.68 - 1.55 (m, 5H). LCMS (ESI): m/z: 624.4[M+1]。

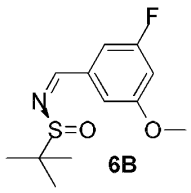
实施例 6



6

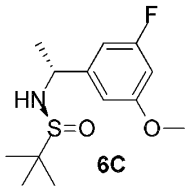


化合物 6B：



向化合物 6A（5 克，32.44 毫摩尔）的二氯甲烷（80 毫升）溶液中加入硫酸铜（12.94 克，81.10 毫摩尔，12.45 毫升）和 (S)-2-甲基丙基-2-亚磺酰胺（4.72 克，38.93 毫摩尔）。反应液在 50℃条件下搅拌 16 小时。反应结束后，将反应液过滤、减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 40:1-10:1 洗脱) 得到化合物 6B。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.50 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.20 - 7.15 (m, 2H), 6.77 (td, J = 2.3, 10.3 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 1.27 (s, 9H)。

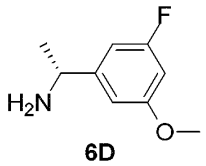
化合物 6C：



6C

-78℃，氮气保护下，向化合物 6B（5.3 克，20.60 毫摩尔）的四氢呋喃（100 毫升）溶液中加入甲基溴化镁(3 摩尔，17.1 毫升)，反应液在 15℃条件下搅拌 16 小时。反应结束后，向反应液中加入饱和的氯化铵 (30 毫升) 溶液，有机相用乙酸乙酯（10 毫升×2 次）萃取，合并的有机相用盐水（10 毫升×1 次）洗涤，合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 5:1-1:1 洗脱) 得到化合物 6C。LCMS (ESI): m/z: 547.2[M+1]。

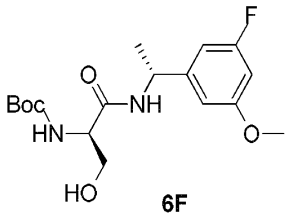
化合物 6D：



6D

向化合物 6C（3.67 克，13.43 毫摩尔）的二氧六环（72 毫升）溶液中加入盐酸/二氧六环（4 摩尔，36 毫升）。反应液在 20℃条件下搅拌 1 小时。反应结束后将反应液减压浓缩得到粗品 6D 的盐酸盐直接用于下一步。

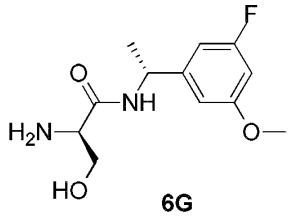
化合物 6F：



6F

0℃下，向化合物 6E（900 毫克，4.39 毫摩尔）的二氯甲烷（20 毫升）溶液中加入化合物 6D 盐酸盐（1.05 克，5.11 毫摩尔）和 DIEA (2.37 克，18.37 毫摩尔，3.2 毫升)。然后加入 HATU（2.2 克，5.79 毫摩尔），反应液在 0℃条件下搅 2 小时。反应完全后，反应液用水（50 毫升）稀释，有机相用二氯甲烷（50 毫升×3 次）萃取，合并的有机相用盐水（10 毫升×1 次）洗涤，合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化（二氯甲烷：甲醇= 50:0-50:1 洗脱）得到化合物 6F。LCMS (ESI): m/z: 442.3[M+1]。

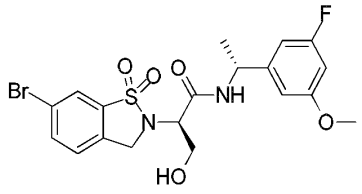
化合物 6G：



6G

0℃下，向化合物 6F（300 毫克，841.78 微摩尔）的二氯甲烷（5 毫升）溶液中加入三氟乙酸（1.92 克，16.88 毫摩尔，1.25 毫升）。反应液在 20℃条件下搅拌 3 小时。反应结束后，将混合液减压浓缩得到粗品 6G 直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z:257.1[M+1]。

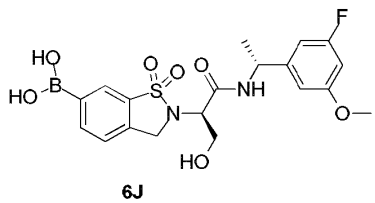
化合物 6I：



6I

向化合物 6G（310 毫克，837.17 微摩尔）的乙腈（5 毫升）溶液中加入 DIEA（430.36 毫克，3.33 毫摩尔，580 微升）和化合物 6H（435 毫克，1.25 毫摩尔）。反应液在 80℃条件下搅拌 16 小时。反应结束后，反应液用水（20 毫升）稀释，有机相用二氯甲烷（20 毫升×3 次）萃取，合并的有机相用盐水 (10 毫升×1 次) 洗涤，合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (二氯甲烷：甲醇 = 10:1 洗脱) 得到化合物 6I。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ = 8.70 (br d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.91 (dd, J = 1.8, 8.3 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.79 - 6.60 (m, 3H), 5.24 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.94 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 4.89 - 4.83 (m, 1H), 4.61 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 4.34 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 3.84 - 3.70 (m, 5H), 1.32 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (ESI): m/z:489.0[M+1]。

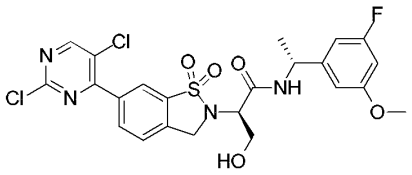
化合物 6J：



6J

氮气保护下，将化合物 6I(130 毫克，266.75 微摩尔)，双频哪醇硼酸酯，Pd(dppf)Cl_2.CH_2Cl_2 (12 毫克，14.69 微摩尔)，叔丁醇钾 (80 毫克，815.16 微摩尔) 溶于二氧六环 (3 毫升) 中，反应液在 90℃条件下搅拌 1 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩得到粗品化合物 6J 直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z:453.1[M+1]。

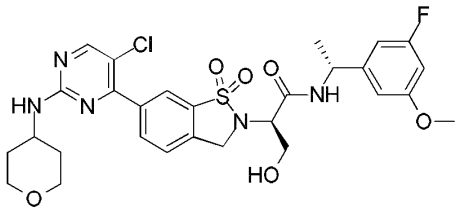
化合物 6K：



6K

氮气保护下，将化合物 6J(140 毫克，261.97 微摩尔)， 2,4,5-三氯嘧啶 (114 毫克，621.51 微摩尔，56.29 微升)，$Pd(PPh_3)_4$ (30 毫克，25.96 微摩尔) 和碳酸钠 (70 毫克，660.44 微摩尔) 溶于二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中，反应液在 100℃条件下搅拌 1 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，滤液用水(20 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (20 毫升×3 次) 萃取。合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 1:1 洗脱) 得到化合物 6K。LCMS (ESI): m/z: 555.1[M+1]。

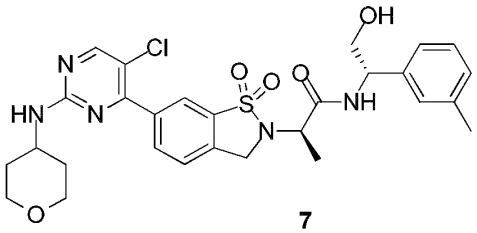
化合物 6：



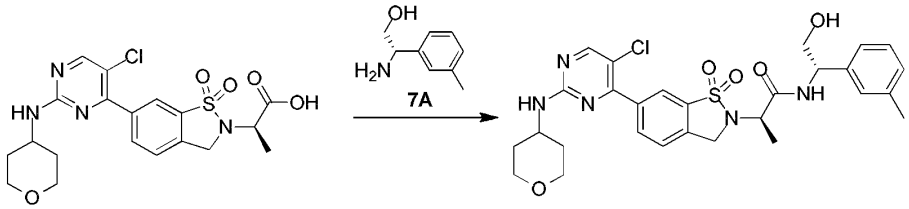
6

向化合物 6K (70 毫克，126.03 微摩尔) 的二氧六环 (3 毫升) 溶液中加入 DIEA (44.52 毫克，344.48 微摩尔，60 微升) 和四氢吡喃-4-胺 (40 毫克，395.47 微摩尔)。反应液在 90℃条件下搅拌 16 小时。反应液用水 (20 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (15 毫升×3 次) 萃取，有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，合并有机相，过滤，减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (甲酸体系)，得到化合物 6 的游离碱。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.37 (s, 1H), 8.22 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 1.6, 8.1 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.71 - 6.65 (m, 1H), 6.54 (td, J = 2.2, 10.7 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 5.00 - 4.92 (m, 1H), 4.76 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 4.47 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.08 - 3.93 (m, 5H), 3.79 (s, 3H), 3.53 (dt, J = 1.9, 11.6 Hz, 2H), 1.99 (br dd, J = 2.2, 12.4 Hz, 2H), 1.68 - 1.56 (m, 2H), 1.44 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (ESI): m/z: 620.5[M+1]。

实施例 7

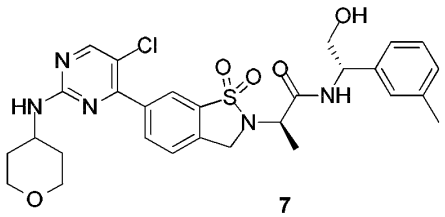


7



1H 7A 7

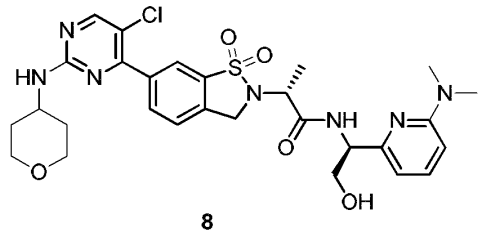
化合物 7：



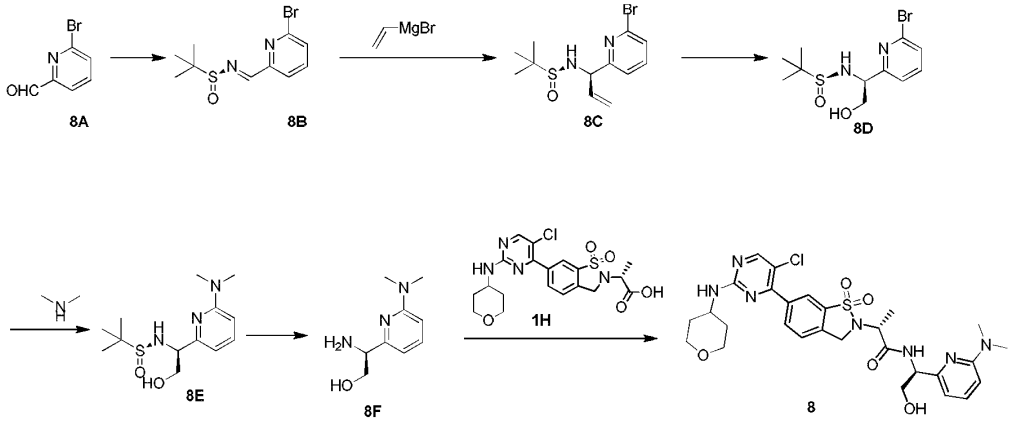
7

0℃下，向化合物 1H（100 毫克，220.79 微摩尔）的二氯甲烷（3 毫升）溶液中加入化合物 7A（65.78 毫克，350.52 微摩尔）和 DIEA (118.72 毫克，918.60 微摩尔，160 微升)，反应液在 0℃下搅拌 10 分钟.然后加入 HATU (112 毫克，294.56 微摩尔) 继续搅拌 2 小时。反应液用水 (10 毫升) 稀释并用过二氯甲烷（10 毫升×3 次）萃取，有机相用盐水（20 毫升×1 次）洗涤，合并有机相过滤、减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (甲酸体系)，得到化合物 7 的游离碱。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.36 (s, 1H), 8.22 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 1.6, 8.1 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.25 - 7.19 (m, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.10 (dd, J = 7.6, 15.3 Hz, 2H), 4.96 - 4.93 (m, 1H), 4.93 - 4.89 (m, 1H), 4.69 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 4.59 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 4.10 - 3.93 (m, 3H), 3.78 - 3.66 (m, 2H), 3.53 (dt, J = 1.9, 11.7 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.99 (br dd, J = 1.9, 12.6 Hz, 2H), 1.68 - 1.55 (m, 5H). LCMS (ESI): m/z: 586.1[M+1]。

实施例 8

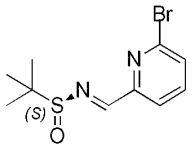


8



8A 8B 8C 8D 8E 8F 1H 8

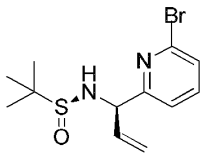
化合物 8B：



8B

向化合物 8A（9 克，48.39 毫摩尔）的二氯甲烷（300 毫升）溶液中加入硫酸铜（19.31 克，120.96 毫摩尔，18.57 毫升）和(S)-2-甲基丙基-2-亚磺酰胺（7 克，57.76 毫摩尔）。反应液在 50℃条件下搅拌 48 小时。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯=40:1-10:1 洗脱）得到化合物 8B。

化合物 8C：

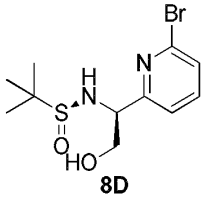


8C

-78℃，氮气保护下，向烯丙基溴化镁（1 摩尔，21.78 毫升）的四氢呋喃（40 毫升）溶液中加入化合物 8B（3 克，10.37 毫摩尔）的四氢呋喃（20 毫升）溶液，反应液在-78℃条件下搅拌 1 小时。反应结束后，混合液用饱和的氯化铵（30 毫升）溶液淬灭，然后用水（50 毫升）稀释，用乙酸乙酯(50 毫升×3 次) 萃取，有机相用盐水（50 毫升×1 次）洗涤，合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经高

效液相色谱制备分离（甲酸体系），得到化合物 8C。LCMS (ESI): m/z: 319.0[M+1]。

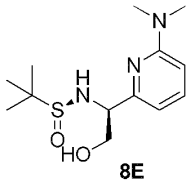
化合物 8D：



8D

-78℃，臭氧（3.15 毫摩尔，15 psi）条件下，将化合物 8C（1 克，3.15 毫摩尔）溶于二氯甲烷（10 毫升）和甲醇（10 毫升）中，硼氢化钠（240.00 毫克，6.34 毫摩尔）加入到反应液中，并在-78℃条件下搅拌 3 小时。反应结束后，加入饱和的氯化铵（30 毫升）溶液淬灭反应液，然后用水 (30 毫升) 稀释，乙酸乙酯 (50 毫升×2 次) 萃取，有机相用盐水 (80 毫升×1 次) 洗涤，合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯=3:1 洗脱) 得到化合物 8D。LCMS (ESI): m/z: 337.0[M+1]。

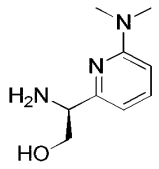
化合物 8E：



8E

将化合物 8D（100.00 毫克，311.30 微摩尔）溶于二甲胺（2 摩尔，3 毫升）中，微波条件下，120℃反应 4 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化（二氯甲烷：甲醇=10:1 洗脱）得到化合物 8E。LCMS (ESI): m/z: 286.1[M+1]。

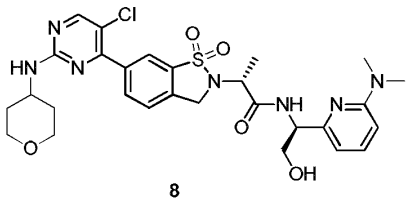
化合物 8F：



8F

向化合物 8E（90 毫克，315.34 微摩尔）的二氧六环（2 毫升）溶液中加入盐酸/二氧六环（4 摩尔，1 毫升）。反应液在 25℃下搅拌 1 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩得到粗品化合物 8F 的盐酸盐直接用于下一步。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ = 8.33 (br s, 3H), 7.57 (br t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.73 - 6.58 (m, 2H), 4.26 (br d, J = 1.6 Hz, 1H), 3.84 - 3.66 (m, 2H), 3.07 (s, 6H)。

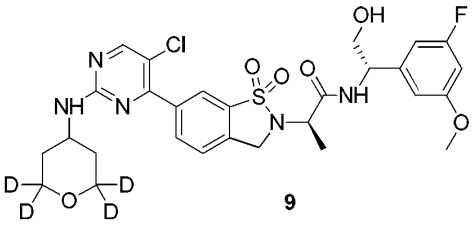
化合物 8：



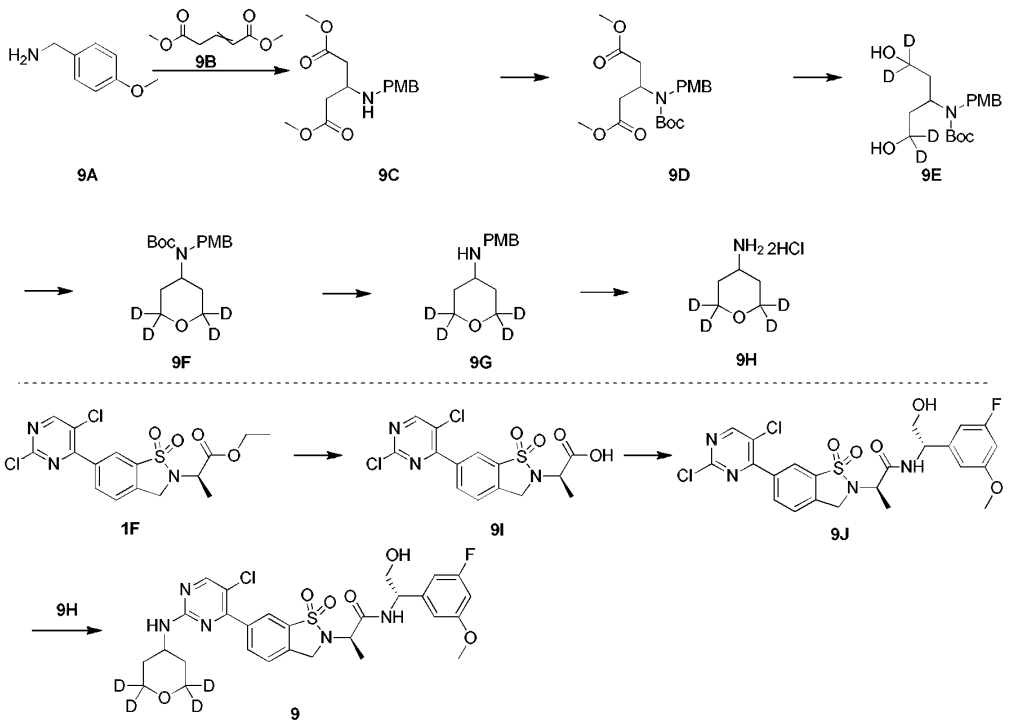
8

0 ℃下，向化合物 1H（100 毫克，220.79 微摩尔）的二氯甲烷（3 毫升）溶液中加入化合物 8F（54.00 毫克， 248.06 微摩尔，HCl）和 DIEA（118.72 毫克，918.60 微摩尔，160 微升）。反应液搅拌 10 分钟后加入 HATU（110 毫克，289.30 微摩尔）继续搅拌 2 小时。反应液用水（10 毫升）稀释并用二氯甲烷 (10 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (20 毫升×1) 洗涤，合并有机相过滤，滤液减压浓缩得到粗品，粗品经高效液相色谱制备分离 (甲酸体系)，然后用手性拆分方法（0.1%氨水 甲醇体系，保留时间 3.6 分钟，ee 值：100%）得到化合物 8 的游离碱。^{1}H NMR (400 MHz, MeOH-d_4) δ = 8.37 (s, 1H), 8.22 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 1.6, 8.1 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 7.3, 8.5 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.92 - 4.89 (m, 1H), 4.81 - 4.65 (m, 2H), 4.60 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.12 - 3.93 (m, 3H), 3.80 (dq, J = 5.6, 10.9 Hz, 2H), 3.53 (dt, J = 1.9, 11.6 Hz, 2H), 2.91 (s, 6H), 2.04 - 1.95 (m, 2H), 1.66 - 1.56 (m, 5H). LCMS (ESI): m/z: 616.3[M+1]。

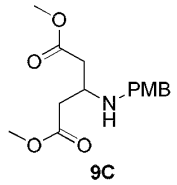
实施例 9



9

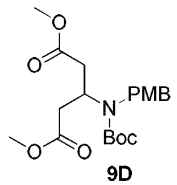


化合物 9C：



将化合物 9A（2 克，14.58 毫摩尔，1.89 毫升）溶于甲醇（2 毫升）中，加入化合物 9B（2.08 克，13.13 毫摩尔，1.85 毫升），混合液在 10℃条件下搅拌 16 小时。反应完全后，将混合液经减压减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯= 4:1-2:1 洗脱）得到化合物 9C。^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ = 7.24 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.92 - 6.79 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 2H), 3.69 (s, 6H), 3.44 (quin, J=6.2 Hz, 1H), 2.59 (d, J=6.3 Hz, 4H)。

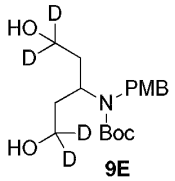
化合物 9D：



向化合物 9C（2.85 克，9.65 毫摩尔）的四氢呋喃（30 毫升）溶液中加入$(Boc)_2O$（2.53 克，11.57 毫摩尔, 2.66 毫升）和 DIEA（1.77 克，13.68 毫摩尔，2.38 毫升）。混合液在 10℃条件下搅拌 16 小

时。反应完全后，将混合液减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 10:1-5:1 洗脱) 得到化合物 9D。^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ = 7.22 (br s, 2H), 6.85 (d, J=8.6 Hz, 2H), 4.42 (br s, 2H), 4.35 - 4.20 (m, 1H), 3.85 - 3.73 (m, 3H), 3.61 (s, 6H), 2.86 - 2.50 (m, 4H), 1.50 (br d, J=16.0 Hz, 9H)。LCMS (ESI): m/z: 296.1[M+1]。

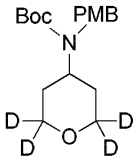
化合物 9E：



9E

氮气保护下，向化合物 9D (3.16 克，7.99 毫摩尔) 的四氢呋喃 (35 毫升) 溶液中加入 $LiAlD_4$ (910 毫克，23.98 毫摩尔，1.24 毫升)。反应液在 0℃条件下搅拌 20 分钟。反应结束后，向混合液中加入 15%的氢氧化钠 (0.91 毫升) 水溶液淬灭，然后过滤，滤液经减压浓缩得到粗品 9E 直接用于下一步。^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ = 7.21 (br d, J=7.4 Hz, 2H), 6.88 - 6.82 (m, 2H), 4.52 - 4.32 (m, 1H), 4.26 (br s, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.67 (br d, J=6.9 Hz, 4H), 1.50 - 1.46 (m, 9H)。

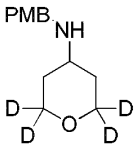
化合物 9F：



9F

向化合物 9E（1.5 克，4.37 毫摩尔）的四氢呋喃（20 毫升）溶液中加入叔丁醇钾（975.00 毫克，8.69 毫摩尔），搅拌 15 分钟后，加入 MsCl（555.00 毫克，4.85 毫摩尔，375.00 微升）和叔丁醇钾 (495.00 毫克，4.41 毫摩尔)，混合液在 25℃条件下搅拌 2 小时，反应结束后，向反应液中加入饱和的氯化铵 (10 毫升)溶液，然后用乙酸乙酯 (50 毫升× 3 次) 萃取。合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化(石油醚：乙酸乙酯= 10:1-5:1 洗脱) 得到化合物 9F。^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ = 7.15 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.87 (d, J=8.7 Hz, 2H), 4.29 (br s, 2H), 4.08 - 3.75 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 1.63 (br t, J=12.3 Hz, 2H), 1.46 - 1.30 (m, 11H)

化合物 9G：

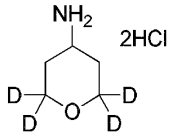


9G

向化合物 9F (560 毫克，1.72 毫摩尔) 的甲醇 (2 毫升) 溶液中加入盐酸/二氧六环 (4 摩尔，2 毫

升)。反应液在 25℃条件下搅拌 2 小时。反应结束后，将反应液倒入甲基叔丁基醚 (10 毫升) 中，过滤得到滤饼，将滤饼溶于水 (10 毫升)，用氢氧化钠 (2 摩尔) 水溶液调节 pH=11，然后用乙酸乙酯 (10 毫升×2 次)萃取。合并有机相减压浓缩得到粗品 9G 直接用于下一步。^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ = 7.25 (d, J=8.6 Hz, 2H), 6.90 - 6.83 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 2H), 2.73 (tt, J=4.1, 10.5 Hz, 1H), 1.84 (dd, J=4.1, 13.3 Hz, 2H), 1.45 (br d, J=11.7 Hz, 2H)。

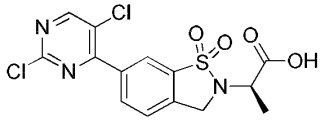
化合物 9H：



9H

向化合物 9G (150 毫克， 665.72 微摩尔) 的甲醇 (10 毫升) 溶液中加入钯/碳(50 毫克，10%纯度)。氢气 (0.8 Mpa) 条件下，反应液 50℃搅拌 16 小时。反应完全后，过滤，将滤液减压浓缩然后溶于甲醇 (1 毫升) 中，用盐酸/二氧六环 (4 摩尔) 将混合液的 pH 调节到 1，然后将甲基叔丁基醚 (5 毫升) 加入到混合液中过滤得到粗品 9H 直接用于下一步。^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ = 8.11 (br s, 2H), 3.29 - 3.15 (m, 1H), 1.82 (dd, J=4.2, 13.0 Hz, 2H), 1.52 (br t, J=12.0 Hz, 2H)。

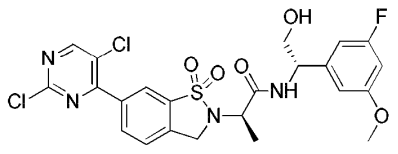
化合物 9I：



9I

向化合物的 1F (1.18 克，2.83 毫摩尔) 的四氢呋喃 (5 毫升) 和水 (5 毫升) 的溶液中加入一水合氢氧化锂 (472.00 毫克，11.25 毫摩尔) 。反应液在 0℃下搅拌 1 小时。反应结束后，向反应液中加入水 (10 毫升)，然后用乙酸乙酯 (10 毫升× 1 次) 萃取，水相用盐酸 (2 摩尔) 调节 pH=2，并用二氯甲烷 (10 毫升×2 次)萃取，合并有机相过滤，减压浓缩得到粗品 9I 直接用于下一步。^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ = 8.73 (s, 1H), 8.42 (d, J=1.3 Hz, 1H), 8.20 (dd, J=1.5, 8.1 Hz, 1H), 7.59 (d, J=8.1 Hz, 1H), 4.94 - 4.86 (m, 1H), 4.70 - 4.60 (m, 2H), 1.72 (d, J=7.3 Hz, 3H)。LCMS (ESI): m/z:387.9[M+1]。

化合物 9J：

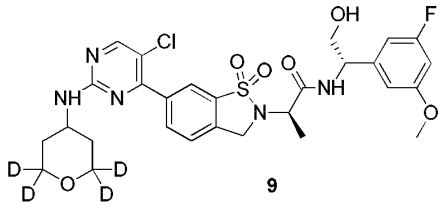


9J

0 ℃下，向化合物 9I (450 毫克，1.04 毫摩尔，89.44%纯度) 的二氯甲烷 (10 毫升) 溶液中加入 HATU (585.85 毫克，1.54 毫摩尔)， (2S)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基)乙醇(280 毫克，1.26 毫摩尔)

和 DIEA (406.27 毫克，3.14 毫摩尔，547.54 微升)。反应液在 15℃下搅拌 30 分钟。反应液加入水 (2 毫升) 稀释，并用乙酸乙酯 (2 毫升×3 次) 萃取，合并有机相过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 2:1 洗脱) 得到化合物 9F。^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ = 8.68 - 8.64 (m, 2H), 8.39 - 8.32 (m, 2H), 8.19 - 8.12 (m, 2H), 7.56 - 7.44 (m, 2H), 6.60 - 6.24 (m, 7H), 4.99 - 4.90 (m, 2H), 4.74 - 4.67 (m, 1H), 4.56 - 4.50 (m, 3H), 3.70 (s, 3H), 1.97 - 1.92 (m, 3H), 1.57 - 1.50 (m, 7H)。LCMS (ESI): m/z: 555.0[M+1]。

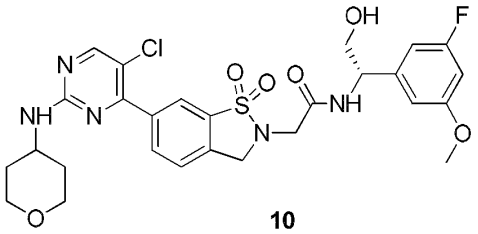
化合物 9：



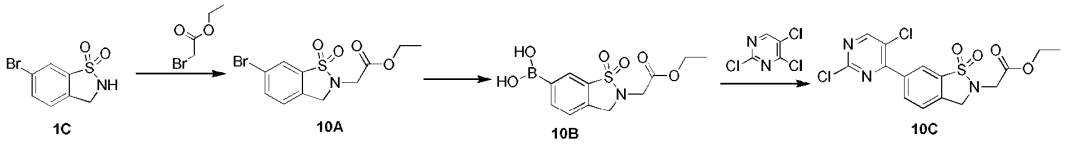
9

向化合物 9J (90 毫克，162.04 微摩尔) 和 9H (70 毫克，393.05 微摩尔) 的二氧六环 (3 毫升) 溶液中加入 DIEA (83.85 毫克，648.75 微摩尔，113 微升)。反应液在 100℃闷罐条件下搅拌 16 小时。反应液用水(5 毫升) 稀释，并用乙酸乙酯 (2 毫升×3 次) 萃取，合并有机相经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品，粗品经高效液相色谱制备分离 (甲酸体系)，得到化合物 9 的游离碱。^{1}H NMR (400MHz, MeOH-d_4) δ = 8.36 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.15 (dd, J=1.5, 8.1 Hz, 1H), 7.69 (d, J=8.3 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.68 (br d, J=9.3 Hz, 1H), 6.59 (td, J=2.2, 10.7 Hz, 1H), 4.92 (d, J=7.1 Hz, 1H), 4.83 - 4.79 (m, 1H), 4.70 (d, J=15.0 Hz, 1H), 4.59 (q, J=7.1 Hz, 1H), 4.10 - 3.97 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.76 - 3.69 (m, 2H), 1.98 (dd, J=4.1, 13.4 Hz, 2H), 1.63 - 1.55 (m, 5H)。LCMS (ESI): m/z: 624.0[M+1]。

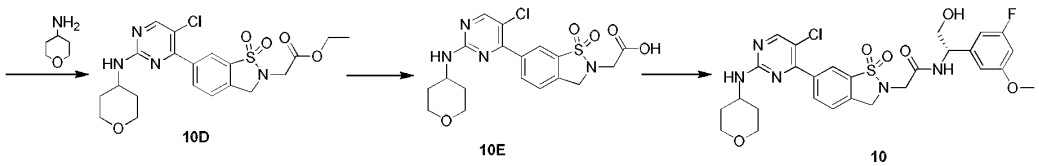
实施例 10



10

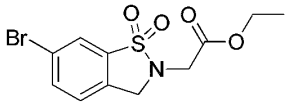


1C 10A 10B 10C



10D 10E 10

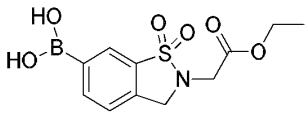
化合物 10A：



10A

氮气保护下，将化合物 1C (400 毫克，1.61 毫摩尔)，乙基-2-溴乙酸乙酯 (404 毫克，2.42 毫摩尔，267.55 微升)，碳酸钾 (450 毫克，3.26 毫摩尔) 溶于 DMF (6 毫升) 中，反应液在 25℃下搅拌 16 小时。反应结束后，用水 (30 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (20 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (50 毫升×1 次) 洗涤，合并有机相减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 10:1-5:1 洗脱) 得到化合物 10A。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.96 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 1.8, 8.3 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.24 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.08 (s, 2H), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LCMS (ESI): m/z: 320.0[M+1]。

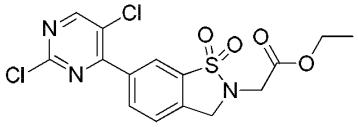
化合物 10B：



10B

氮气保护下，将化合物 10A (360 毫克，1.08 毫摩尔)，双频哪醇硼酸酯 (410 毫克，1.61 毫摩尔)，$Pd(dppf)Cl_2.CH_2Cl_2$ (45 毫克，55.10 微摩尔) 和醋酸钾 (320 毫克，3.26 毫摩尔) 溶于二氧六环 (4 毫升) 中，反应液在 90℃条件下搅拌 1 小时。将反应液减压浓缩得到粗品化合物 10B 直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z: 300.1[M+1]。

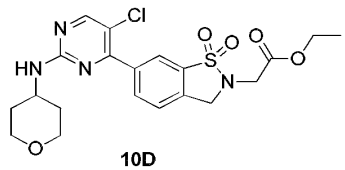
化合物 10C：



10C

氮气保护下，将化合物 10B (322 毫克，1.08 毫摩尔)， 2,4,5-三氯嘧啶（355 毫克，1.94 毫摩尔），$Pd(PPh_3)_4$（62 毫克，53.65 微摩尔）和碳酸钠（235 毫克，2.22 毫摩尔）溶于二氧六环（6 毫升）和水(1.5 毫升)中，反应液在 90℃ 条件下搅拌 2 小时。反应结束后，将反应液过滤，滤液用水（20 毫升）稀释并用乙酸乙酯 (20 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤、减压浓缩后得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 1:1 洗脱) 得到化合物 10C。LCMS (ESI): m/z: 374.0[M+1]。

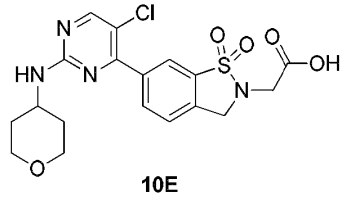
化合物 10D：



10D

向化合物 10C (185 毫克，459.91 微摩尔)的二氧六环 (4 毫升) 加入四氢吡喃-4-胺(140 毫克，1.38 毫摩尔， 694.34 微升) 和 DIEA (148.40 毫克，1.15 毫摩尔，200 微升)，反应液在 90℃条件下搅拌 16 小时。向反应液中加入水 (10 毫升) 和氯化铵 (20 毫升)，然后用乙酸乙酯 (20 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (20 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品 10D 直接用于下一步反应。LCMS (ESI): m/z: 467.1[M+1]。

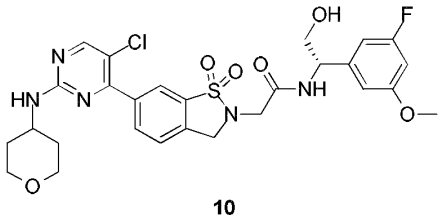
化合物 10E：



10E

向化合物 10D (140 毫克，299.83 微摩尔) 的四氢呋喃 (2 毫升) 和乙醇 (1 毫升) 溶液中加入一水合氢氧化锂 (20 毫克，476.64 微摩尔) 的水 (1 毫升) 溶液，反应液在 20℃下搅拌 0.5 小时。反应液用水 (10 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (10 毫升×1 次) 萃取，水相加入盐酸（2 摩尔）水溶液调节 pH=2，然后用乙酸乙酯 (10 毫升×3 次) 萃取。合并有机相经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品 10E 直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z: 438.9[M+1]。

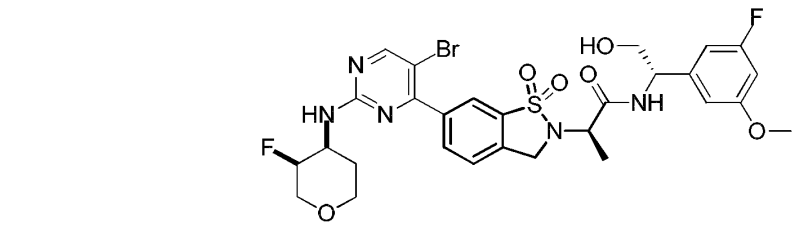
化合物 10：



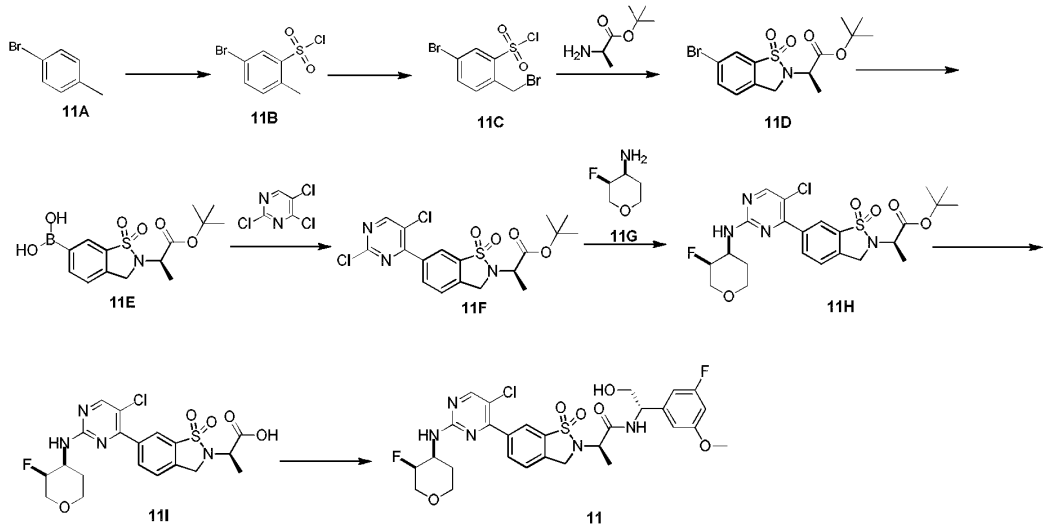
10

0℃下，向化合物 10E (120 毫克，273.42 微摩尔) 的二氯甲烷 (4 毫升) 溶液中加入(2S)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基)乙醇 (90 毫克，406.03 微摩尔) 和 DIEA (148.40 毫克，1.15 毫摩尔，200 微升)，反应液在 0℃下搅拌 10 分钟。然后加入 HATU (142 毫克，373.46 微摩尔) 继续反应 2 小时。反应液用水 (10 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (10 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (20 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (甲酸体系)，得到化合物 10 的游离碱。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.36 (s, 1H), 8.24 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 1.5, 8.2 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.71 (br d, J = 9.4 Hz, 1H), 6.58 (td, J = 2.3, 10.8 Hz, 1H), 4.99 (dd, J = 5.3, 6.9 Hz, 1H), 4.79 - 4.62 (m, 2H), 4.19 - 3.93 (m, 5H), 3.83 - 3.68 (m, 5H), 3.53 (dt, J = 2.0, 11.7 Hz, 2H), 1.99 (br dd, J = 2.1, 12.4 Hz, 2H), 1.68 - 1.55 (m, 2H). LCMS (ESI): m/z: 606.1[M+1]。

实施例 11

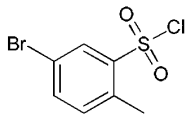


11



11A 11B 11C 11D 11E 11F 11G 11H 11I 11

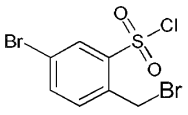
化合物 11B：



11B

0℃下，向化合物 11A(30 克，175.40 毫摩尔， 21.58 毫升)的的二氯甲烷 (20 毫升) 溶液中缓慢加入氯磺酸 (61.32 克，526.21 毫摩尔, 35.04 毫升) ，混合液在 20℃下搅拌 3 小时。反应完全后，将反应液缓慢地加入到冰水中，然后用二氯甲烷 (100 毫升×2 次) 萃取，合并有机相用水 (100 毫升×2 次) 洗涤, 经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品 11B 直接用于下一步。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.22 (d, 1H, J=2.1 Hz), 7.75 (dd, 1H, J=2.0, 8.2 Hz), 7.33 (d, 1H, J=8.2 Hz), 2.76 (s, 3H)。

化合物 11C：

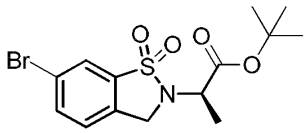


11C

向化合物 11B (4 克，14.84 毫摩尔) 的二氯甲烷 (100 毫升) 溶液中加入 NBS (2.91 克，16.32 毫摩尔)和 AIBN (24.37 毫克, 148.40 微摩尔)，反应液在 80℃条件下搅拌 3 小时，反应结束后将反应液

过滤后减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚洗脱) 得到化合物 11C。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.23 (d, 1H, J=2.1 Hz), 7.86 (dd, 1H, J=2.0, 8.3 Hz), 7.63 (d, 1H, J=8.4 Hz), 4.94 (s, 2H)。

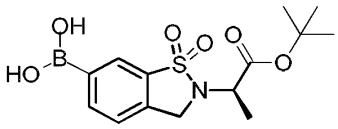
化合物 11D：



11D

向化合物 11C (1 克，2.87 毫摩尔) 和化合物(R)-叔丁基-2-氨基丙酯 (521.35 毫克，2.87 毫摩尔) 的乙腈 (10 毫升) 溶液中加入碳酸钠 (912.55 毫克，8.61 毫摩尔) 的水 (2 毫升) 溶液，混合液在 20℃下搅拌 1 小时，然后在 80℃条件下搅拌 13 小时。反应完全后，反应液用水 (20 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (20 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (20 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品化合物 11D 直接用于下一步。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.94 (s, 1H), 7.72 (d, 1H, J=8.2 Hz), 7.29 (d, 1H, J=8.2 Hz), 4.86 (d, 1H, J=13.9 Hz), 4.4-4.5 (m, 2H), 1.61 (d, 3H, J=7.3 Hz), 1.45 (s, 9H)。LCMS (ESI): m/z: 377.9[M+1]。

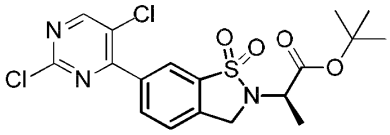
化合物 11E：



11E

氮气保护下，将化合物 11D (15 克，39.87 毫摩尔)，双频哪醇硼酸酯 (15.19 克，59.80 毫摩尔)，$Pd(dppf)Cl_2.CH_2Cl_2$ (1.63 克，1.99 毫摩尔) 和醋酸钾 (7.82 克，79.73 毫摩尔) 溶于二氧六环(70 毫升)中，反应液在 90℃条件下搅拌 1 小时。将反应液减压浓缩得到粗品化合物 11E 直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z: 341.7[M+1]。

化合物 11F：

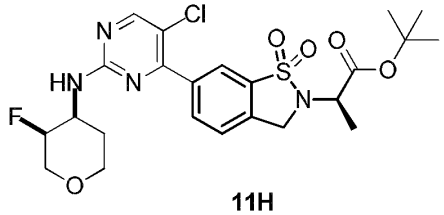


11F

氮气保护下，将化合物 11E (4.2 克，12.31 毫摩尔)， 2,4,5-三氯嘧啶（4.52 克，24.62 毫摩尔），$Pd(PPh_3)_4$（711.25 毫克，615.50 微摩尔）和碳酸钠（2.61 克，24.62 毫摩尔）溶于二氧六环（20 毫升）和水 (4 毫升)中，反应液在 90℃条件下搅拌 16 小时。反应结束后，将反应液过滤，滤液用水（30 毫升）稀释并用乙酸乙酯 (30 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤、减压浓缩后得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 10:1-3:1 洗脱) 得到化合物 11F。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.71 (s, 1H), 8.41 (d, 1H, J=1.1 Hz), 8.18 (dd, 1H, J=1.5, 8.1 Hz), 7.58 (d, 1H,

J=8.1 Hz), 5.01 (d, 1H, J=14.5 Hz), 4.62 (d, 1H, J=14.5 Hz), 4.48 (d, 1H, J=7.3 Hz), 1.64 (d, 3H, J=7.3 Hz), 1.46 (s, 9H)。

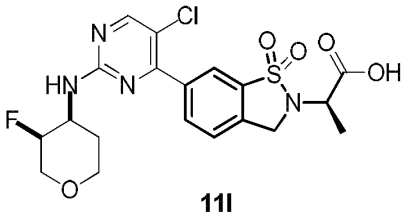
化合物 11H：



11H

向化合物 11F (1.3 克，2.93 毫摩尔) 的二氧六环(4 毫升)溶液中加入化合物 11 克(682.86 毫克, 4.39 毫摩尔)和 DIEA (1.89 克，14.63 毫摩尔，2.55 毫升) ，反应液在 100℃ 条件下搅拌 16 小时，反应液用乙酸乙酯 (30 毫升) 稀释并用 1 摩尔的盐酸 (30 毫升×1 次) 水溶液洗涤，水相用乙酸乙酯 (30 毫升×3 次) 萃取，合并的有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 5:1-2:1 洗脱) 得到化合物 11H。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.2-8.3 (m, 1H), 8.18 (br s, 1H), 7.99 (dd, 1H, J=1.4, 8.1 Hz), 7.44 (d, 1H, J=8.3 Hz), 5.47 (br d, 1H, J=9.0 Hz), 4.91 (d, 1H, J=14.4 Hz), 4.6-4.7 (m, 1H), 4.52 (d, 1H, J=14.3 Hz), 4.40 (q, 1H, J=7.3 Hz), 4.1-4.3 (m, 2H), 3.99 (br dd, 1H, J=4.4, 11.6 Hz), 3.4-3.6 (m, 2H), 1.9-2.0 (m, 1H), 1.8-1.9 (m, 1H), 1.56 (d, 3H, J=7.4 Hz), 1.38 (s, 9H)，LCMS (ESI): m/z: 526.9[M+1]。

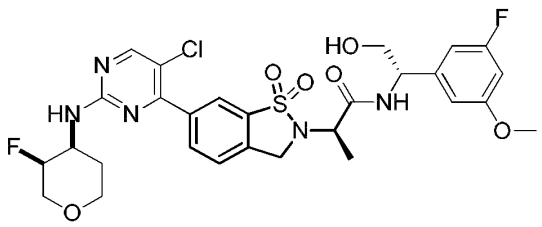
化合物 11I：



11I

向化合物 11H(850 毫克，1.61 毫摩尔) 的二氯甲烷 (10 毫升) 溶液中加入三氟乙酸 (1.84 克，16.13 毫摩尔，1.19 毫升)，反应液在 50℃条件下搅拌 16 小时。反应完全后，反应液用水 (30 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (30 毫升×2 次) 萃取。有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品化合物 11I 直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z: 470.8[M+1]。

化合物 11：

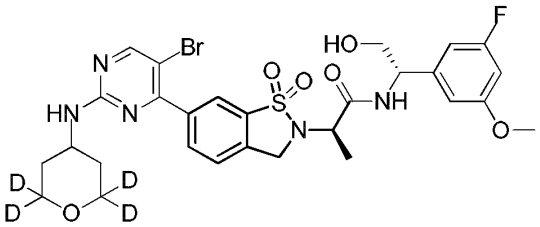


11

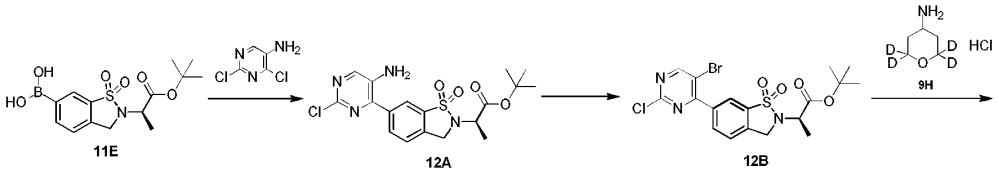
-5℃下，向化合物 11I (639.6 毫克，1.36 毫摩尔) 的二氯甲烷 (10 毫升) 溶液中加入(2S)-2-氨基-

2-(3-氟-5-甲氧基-苯基)乙醇 (361.3 毫克，1.63 毫摩尔) 和 DIEA (526.65 毫克，4.07 毫摩尔，200 微升)，反应液在 0℃下搅拌 10 分钟。然后加入 HATU (774.70 毫克，2.04 毫摩尔) 继续反应 1 小时。反应液用水 (10 毫升) 稀释并用二氯甲烷 (10 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (20 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (三氟乙酸体系)，得到化合物 11 的游离碱。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 8.43 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.17 (dd, 1H, J=1.5, 8.2 Hz), 7.72 (d, 1H, J=8.1 Hz), 6.77 (s, 1H), 6.7-6.7 (m, 1H), 6.61 (td, 1H, J=2.3, 10.8 Hz), 4.9-4.9 (m, 1H), 4.7-4.7 (m, 1H), 4.6-4.6 (m, 1H), 4.2-4.4 (m, 1H), 4.1-4.2 (m, 1H), 4.0-4.1 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.7-3.8 (m, 2H), 3.4-3.6 (m, 2H), 2.0-2.1 (m, 1H), 1.7-1.9 (m, 1H), 1.5-1.7 (m, 3H). LCMS (ESI): m/z: 684.1[M+1]。

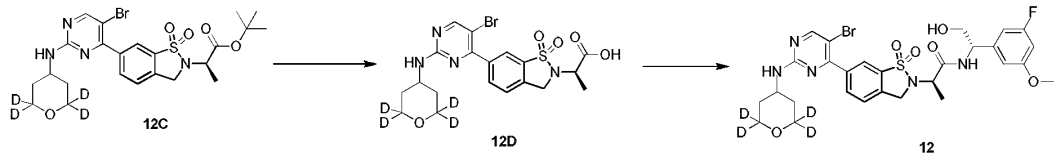
实施例 12



12

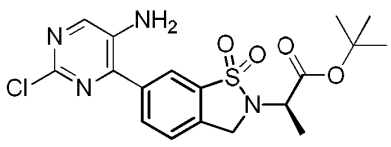


11E **12A** **12B** **9H**



12C **12D** **12**

化合物 12A：

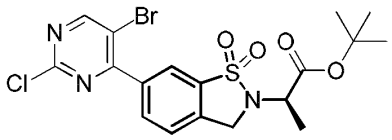


12A

氮气保护下，将化合物 11E (14.8 克，43.38 毫摩尔)， 2,4-二氯嘧啶-5 胺（14.23 克，86.76 毫摩尔）， $Pd(PPh_3)_4$（2.51 克，2.17 毫摩尔）和碳酸钠（9.2 克，86.76 毫摩尔）溶于二氧六环（50 毫升）和水(10 毫升)中，反应液在 90℃条件下搅拌 16 小时。反应结束后，将反应液过滤，滤液用水（100 毫升）稀释并用乙酸乙酯 (100 毫升×2 次) 萃取。有机相用盐水 (100 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤、

减压浓缩后得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 10:1-3:1 洗脱) 得到化合物 12A。LCMS (ESI): m/z: 424.8[M+1]。

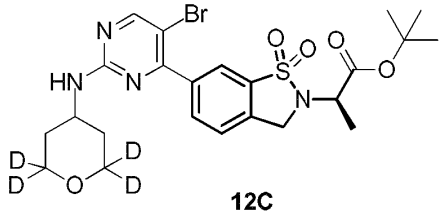
化合物 12B：



12B

向溴化亚铜 (50.64 毫克，353.02 微摩尔，10.75 微升) 和叔丁基亚硝酸酯 (60.67 毫克，588.37 微摩尔，69.98 微升) 的乙腈 (3 毫升) 溶液中加入化合物 12A (100 毫克，235.35 微摩尔) 的乙腈(3 毫升)溶液，反应物在 20℃下搅拌 18 小时。反应液用水 (10 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (10 毫升×2 次) 萃取。有机相用盐水 (10 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 1:1 洗脱) 得到化合物 12B。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.84 (s, 1H), 8.35 (d, 1H, J=1.1 Hz), 8.11 (dd, 1H, J=1.6, 8.1 Hz), 7.57 (d, 1H, J=8.4 Hz), 5.01 (d, 1H, J=14.5 Hz), 4.62 (d, 1H, J=14.5 Hz), 4.49 (d, 1H, J=7.4 Hz), 1.64 (d, 3H, J=7.4 Hz), 1.46 (s, 9H). LCMS (ESI): m/z: 489.8[M+1]。

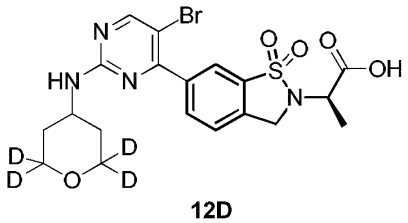
化合物 12C：



12C

向化合物 12B (1.5 克，3.07 毫摩尔) 的二氧六环 (15 毫升) 溶液中加入化合物 9H (869.3 毫克，6.14 毫摩尔) 和 DIEA (1.19 克，9.21 毫摩尔，2.55 毫升)，反应液在 90℃条件下搅拌 16 小时，反应液用乙酸乙酯 (30 毫升) 稀释并用 1 摩尔的盐酸 (30 毫升×1 次) 水溶液洗涤，水相用乙酸乙酯 (30 毫升×3 次) 萃取，合并的有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 5:1-2:1 洗脱) 得到化合物 12C。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.66 (d, 1H, J=5.1 Hz), 8.4-8.5 (m, 1H), 8.36 (dd, 1H, J=1.6, 8.1 Hz), 7.63 (d, 1H, J=5.1 Hz), 7.5-7.5 (m, 1H), 4.9-5.0 (m, 1H), 4.54 (d, 1H, J=14.6 Hz), 4.40 (q, 1H, J=7.3 Hz), 1.56 (d, 3H, J=7.3 Hz), 1.38 (s, 9H)。LCMS (ESI): m/z:559.1[M+1]。

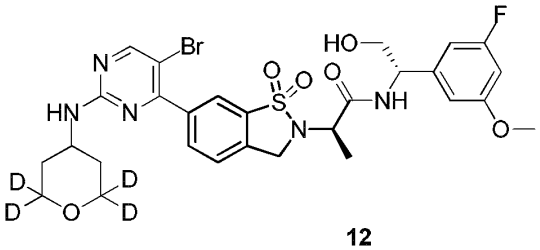
化合物 12D：



12D

向化合物 12C(600 毫克，1.08 毫摩尔)的二氯甲烷 (10 毫升) 溶液中 加入三氟乙酸 (1.23 克，10.76 毫摩尔，796.86 毫升)，反应液在 50℃ 条件下搅拌 6 小时。反应完全后，反应液用水 (30 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (30 毫升×2 次) 萃取。有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品化合物 12D 直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z: 502.19[M+1]。

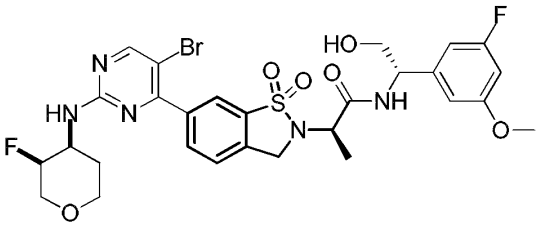
化合物 12：



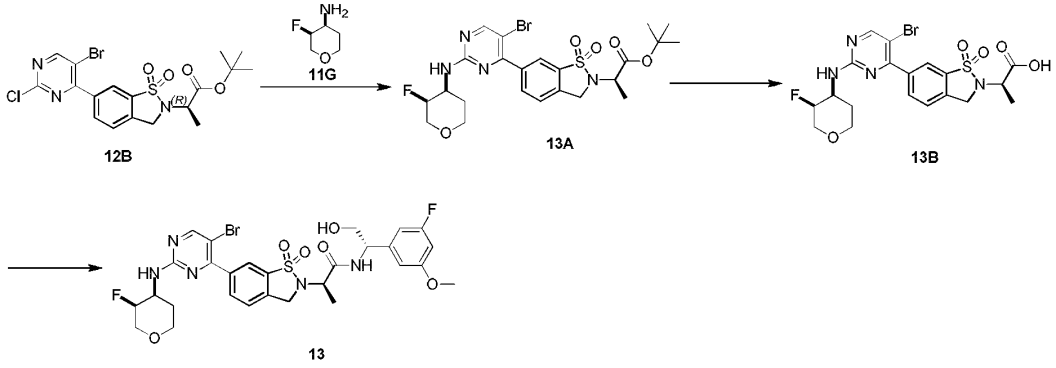
12

-5℃下，向化合物 12D (400 毫克，797.79 微摩尔) 的二氯甲烷 (10 毫升) 溶液中加入(2S)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基)乙醇 (212.2 毫克，957.34 微摩尔) 和 DIEA (309.32 毫克，2.39 毫摩尔，416.87 微升)，反应液在 0℃下搅拌 10 分钟。然后加入 HATU (455.01 毫克，1.2 毫摩尔) 继续反应 1 小时。反应液用水 (10 毫升) 稀释并用二氯甲烷(10 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (20 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (三氟乙酸体系)，得到化合物 12 的游离碱。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 8.48 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.0-8.1 (m, 1H), 7.70 (d, 1H, J=8.1 Hz), 6.77 (s, 1H), 6.70 (br d, 1H, J=9.5 Hz), 6.6-6.7 (m, 1H), 5.0-5.0 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.6-4.6 (m, 1H), 4.0-4.1 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.7-3.8 (m, 2H), 1.99 (dd, 2H, J=4.2, 13.3 Hz), 1.5-1.7 (m, 6H). LCMS (ESI): m/z: 670.0[M+1]。

实施例 13

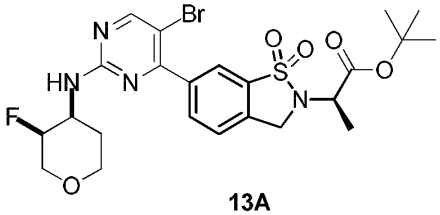


13



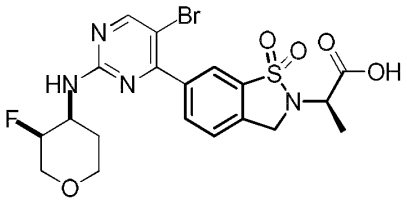
12B 11G 13A 13B 13

化合物 13A：



13A

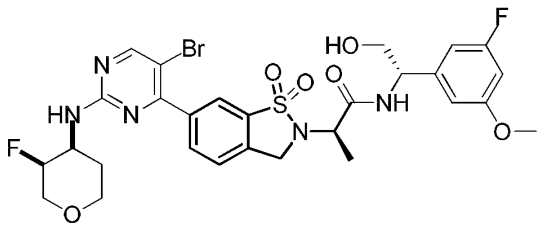
向化合物 12B (1.5 克，3.07 毫摩尔) 的二氧六环(10 毫升)溶液中加入化合物 11G (955.37 毫克，6.14 毫摩尔) 和 DIEA (1.98 克，15.35 毫摩尔，2.67 毫升) ，反应液在 90℃条件下搅拌 16 小时，反应液用乙酸乙酯 (30 毫升) 稀释并用 1 摩尔的盐酸 (30 毫升×1 次) 水溶液洗涤，水相用乙酸乙酯 (30 毫升×3 次) 萃取，合并的有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 5:1-2:1 洗脱) 得到化合物 13A。LCMS (ESI): m/z: 572.9[M+1]。化合物 13B：



13B

向化合物 13A(1.2 克，2.1 毫摩尔)的二氯甲烷 (15 毫升) 溶液中加入三氟乙酸 (1.2 克，10.5 毫摩尔，777.39 毫升)，反应液在 50℃条件下搅拌 16 小时。反应完全后，反应液用水 (30 毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (30 毫升×2 次) 萃取。有机相用盐水 (30 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品化合物 13B 直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z: 516.9[M+1]。

化合物 13：

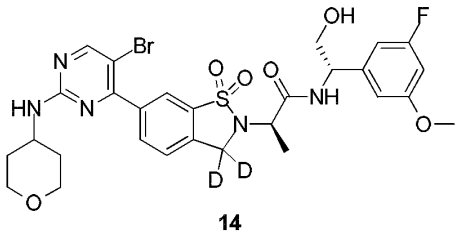


13

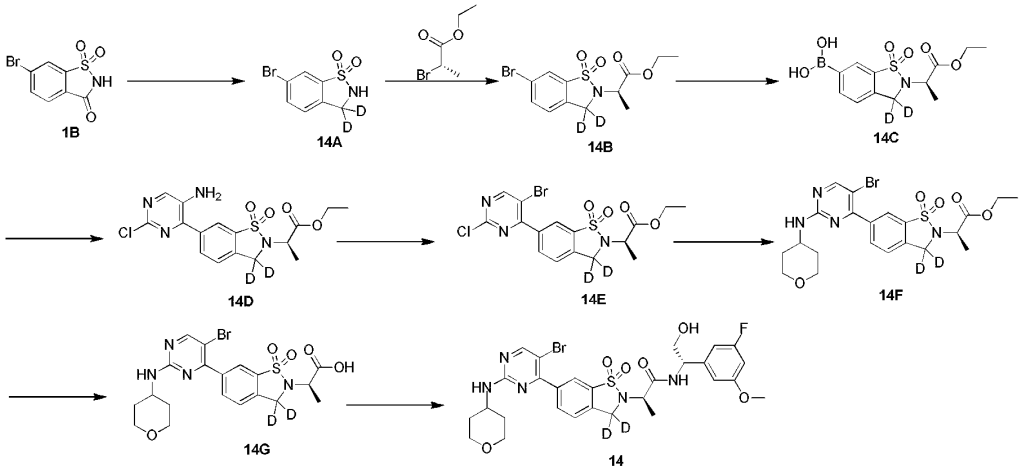
-5℃下，向化合物 13B (900 毫克，1.75 毫摩尔) 的二氯甲烷 (20 毫升) 溶液中加入(2S)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基)乙醇 (464.51 毫克，2.1 毫摩尔) 和 DIEA (677.12 毫克，5.24 毫摩尔，912.56 微升)，反应液在-5℃下搅拌 10 分钟。然后加入 HATU (455.01 毫克，1.2 毫摩尔) 继续反应 1 小时。反应液用水 (10 毫升) 稀释并用二氯甲烷 (20 毫升×3 次) 萃取。有机相用盐水 (20 毫升×1 次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离 (三氟乙酸体系)，得到化合物 13 的游离碱。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 8.52 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.10 (dd, 1H, J=1.5, 8.1 Hz), 7.71 (d,

1H, J=8.1 Hz), 6.77 (s, 1H), 6.70 (br d, 1H, J=9.3 Hz), 6.61 (td, 1H, J=2.1, 10.7 Hz), 5.0-5.0 (m, 2H), 4.7-4.8 (m, 2H), 4.61 (q, 1H, J=7.1 Hz), 4.2-4.4 (m, 1H), 4.12 (br t, 1H, J=12.3 Hz), 4.0-4.1 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.7-3.8 (m, 2H), 3.5-3.7 (m, 2H), 2.05 (dq, 1H, J=4.3, 12.6 Hz), 1.83 (br dd, 1H, J=3.5, 13.3 Hz), 1.61 (d, 3H, J=7.1 Hz)。LCMS (ESI): m/z: 684.1[M+1]。

实施例 14

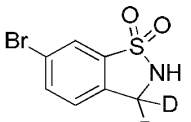


14



1B **14A** **14B** **14C** **14D** **14E** **14F** **14G** **14**

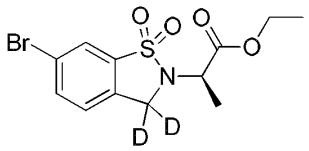
化合物 14A：



14A

向化合物1B (1.4 克，5.34 毫摩尔) 的四氢呋喃 (10 毫升)溶液中硼氘化钠(646.80 毫克，17.10 毫摩尔)，然后将反应液温度降至-5℃，将三氟化硼乙醚 (2.43 克，17.09 毫摩尔， 2.11 毫升) 缓慢地滴加到反应液中，混合液在80℃条件下搅拌两小时。反应结束后，0℃下用氯化铵水溶液 (20毫升) 将反应液淬灭，然后加入乙酸乙酯 (60 毫升) 后过滤，滤液用乙酸乙酯 (20毫升×2次) 萃取，合并的有机相用盐水 (30毫升×1次) 洗涤，经干燥、减压浓缩得到粗品。粗品用石油醚：乙酸乙酯=3:1在25℃下搅拌0.5小时，过滤得到的滤饼即为化合物14A。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.12 (d, J=1.3 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.87 (dd, J=1.3, 8.2 Hz, 1H), 7.54 (d, J=8.3 Hz, 1H)。LCMS (ESI): m/z: 250.11。

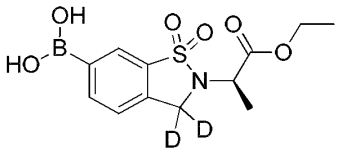
化合物 14B：



14B

氮气保护下，将化合物 14A (990 毫克，3.60 毫摩尔)，2-溴-(2S)丙酸乙酯 (990 毫克，5.14 毫摩尔) 和碳酸钾 990 毫克，5.47 毫摩尔) 溶于 DMF (10 毫升) 中，混合液在 20℃条件下搅拌 16 小时。反应液用 30 毫升水稀释，然后用乙酸乙酯 (30 毫升× 2 次) 萃取。合并的有机相用水 (40 毫升×2 次) 洗涤，减压浓缩得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯=20:1-15:1 洗脱) 得到化合物 14B。^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$, 400 MHz) δ = 7.86 (d, J=1.7 Hz, 1H), 7.65 (dd, J=1.7, 8.3 Hz, 1H), 7.20 (d, J=8.7 Hz, 1H), 4.47 (q, J=7.3 Hz, 1H), 4.17 - 4.07 (m, 2H), 1.56 (d, J=7.3 Hz, 3H), 1.19 (t, J=7.1 Hz, 3H). LCMS (ESI): m/z: 350.22[M+1]。

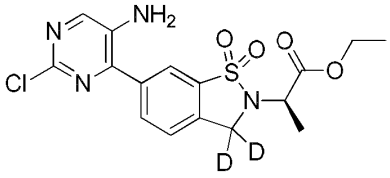
化合物 14C：



14C

氮气保护下，将化合物14B (550毫克，1.57毫摩尔)，双频哪醇硼酸酯(630毫克，2.48毫摩尔)，$Pd(dppf)Cl_2.CH_2Cl_2$ (80毫克，97.96微摩尔) 和醋酸钾 (314毫克，3.2毫摩尔) 溶于二氧六环 (8毫升) 中，反应液在100℃条件下搅拌2小时。将反应液过滤、减压浓缩得到粗品化合物14C直接用于下一步。LCMS (ESI): m/z: 315.15[M+1]。

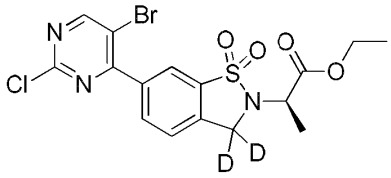
化合物 14D：



14D

氮气保护下，将化合物 14C (494 毫克，1.57 毫摩尔)， 2,4-二氯嘧啶-5 胺（462 毫克，2.82 毫摩尔）， $Pd(PPh_3)_4$（96 毫克，83.08 微摩尔）和碳酸钠（334 毫克，3.15 毫摩尔）溶于二氧六环（5 毫升）和水(1 毫升)中，反应液在 100℃条件下搅拌 2 小时。反应结束后，将反应液过滤，经干燥、过滤、减压浓缩后得到粗品，粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 3:1-1:1 洗脱) 得到化合物 14D。^{1}H NMR ($CDCl_3$,400 MHz) δ = 8.20 (d, J=1.1 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.00 (dd, J=1.4, 8.0 Hz, 1H), 7.51 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.51 (q, J=7.3 Hz, 1H), 4.19 - 4.09 (m, 2H), 1.59 (d, J=7.4 Hz, 3H), 1.24 - 1.17 (m, 3H). LCMS (ESI): m/z: 398.86[M+1]。

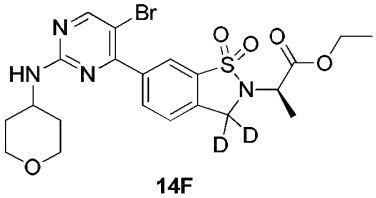
化合物 14E：



14E

0℃下，向溴化亚铜 (360 毫克，2.51毫摩尔，76.43 微升) 和叔丁基亚硝酸酯 (387 毫克，3.75毫摩尔，446.37 微升)的乙腈 (3毫升) 溶液中加入化合物14D (500 毫克，1.25毫摩尔)的乙腈 (3毫升) 溶液，反应物在25℃下搅拌12小时。反应液用水 (10毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (10毫升×3次) 萃取。有机相用盐水 (10毫升×1次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (石油醚：乙酸乙酯= 4:1-3:1洗脱) 得到化合物14E。^{1}H NMR ($CDCl_3$,400 MHz) δ = 8.76 (s, 1H), 8.27 (d, J=1.1 Hz, 1H), 8.04 (dd, J=1.7, 8.1 Hz, 1H), 7.50 (d, J=8.1 Hz, 1H), 4.52 (q, J=7.3 Hz, 1H), 4.18 - 4.10 (m, 2H), 1.59 (d, J=7.3 Hz, 3H), 1.23 - 1.18 (m, 3H)。LCMS (ESI): m/z: 462.74[M+1]。

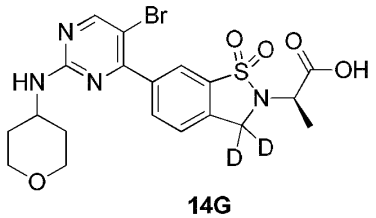
化合物 14F：



14F

向化合物14E (370 毫克，799.58 微摩尔) 的二氧六环 (5毫升) 溶液中加入化合物四氢吡喃胺 (202 毫克，2.00 毫摩尔) 和DIEA (207 毫克，1.60 毫摩尔，278.98 微升)，反应液在 90℃ 条件下搅拌4小时，反应液用水 (10毫升) 稀释并用乙酸乙酯 (10毫升×3次) 萃取，合并的有机相经干燥、减压浓缩得到粗品14F直接用于下一步。^{1}H NMR ($CDCl_3$,400 MHz) δ = 8.37 (s, 1H), 8.13 (d, J=1.0 Hz, 1H), 7.94 (dd, J=1.6, 8.0 Hz, 1H), 7.53 - 7.38 (m, 1H), 4.52 (q, J=7.3 Hz, 1H), 4.20 - 4.10 (m, 2H), 3.96 - 3.89 (m, 2H), 3.52 - 3.42 (m, 2H), 2.01 - 1.91 (m, 2H), 1.59 (d, J=7.4 Hz, 3H), 1.51 - 1.47 (m, 3H), 1.22 - 1.20 (m, 3H)。LCMS (ESI): m/z: 527.43[M+1]。

化合物 14G：

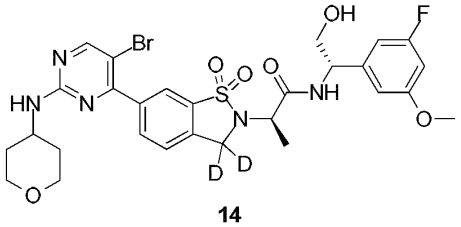


14G

向化合物14F (370 毫克，701.52微摩尔)的四氢呋喃 (2毫升) 溶液中加入一水和氢氧化锂 (59 毫克，1.4毫摩尔) 的水 (2毫升) 溶液，反应液在20℃条件下搅拌0.5小时。反应完全后，将反应液减压

浓缩，用2摩尔的盐酸水溶液将反应液调节pH=2，然后用乙酸乙酯 (10毫升× 3次) 萃取。合并的有机相过滤，滤液减压浓缩得粗品化合物14G。^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ = 8.54 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.04 - 7.95 (m, 1H), 7.76 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.41 (q, J=7.3 Hz, 1H), 3.97 - 3.90 (m, 1H), 3.86 (br d, J=10.8 Hz, 2H), 3.42 - 3.38 (m, 2H), 1.84 (br d, J=10.1 Hz, 2H), 1.56 - 1.47 (m, 5H)。

化合物 14：



14

向化合物14G (330毫克，660.83微摩尔) 和(2*S*)-2-氨基-2-(3-氟-5-甲氧基-苯基)乙醇 (176毫克，794.02微摩尔) 的二氯甲烷 (5毫升) 溶液中加入HATU (376毫克，988.88微摩尔) 和DIEA (170毫克，1.32毫摩尔，229.11微升)，反应液在20℃下搅拌1小时。反应液用水 (10毫升) 稀释并用二氯甲烷 (20毫升×3次) 萃取。有机相用盐水 (20毫升×1次) 洗涤，经干燥、过滤后减压浓缩得到粗品。粗品经高效液相色谱制备分离(三氟乙酸体系)，得到化合物14的游离碱。^{1}H NMR (400MHz, CD_3OD) δ = 8.48 (s, 1H), 8.17 (d, J=1.0 Hz, 1H), 8.10 (dd, J=1.6, 8.1 Hz, 1H), 7.70 (d, J=8.4 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.73 - 6.67 (m, 1H), 6.61 (td, J=2.3, 10.8 Hz, 1H), 4.98 - 4.91 (m, 1H), 4.61 (q, J=7.0 Hz, 1H), 4.10 - 4.02 (m, 1H), 4.01 - 3.94 (m, 2H), 3.83 - 3.79 (m, 3H), 3.78 - 3.68 (m, 2H), 3.59 - 3.49 (m, 2H), 2.04 - 1.96 (m, 2H), 1.68 - 1.56 (m, 5H)。LCMS (ESI): m/z: 666.10[M+1]。

活性测试

实验例 1：Calu-6($Kras^{Q61K}$)抗增殖活性实验

实验材料：

名称	品牌货号
Calu-6 细胞	ATCC-HTB-56
RPMI1640 培养基	Cibco-22400-089
胎牛血清	Cellmax-BL100-02
左旋谷酰胺	Gibco-35050-061
DPBS	Corning-21-031-CVR
胰蛋白酶	Gibco-25200-072
双抗（青霉素、链霉素）	Merck-TMS-AB2-C
CellTiterGlo	Promega-g7573
细胞板	Greiner-781091

Echo 浅孔板	Labcyte-LP-0200

实验步骤：

细胞接种：

（1）细胞培养基：88%RPMI-1640，10%胎牛血清，1%左旋谷酰胺和 1%青霉素-链霉素；

（2）培养基，胰蛋白酶和 DPBS 置于 37℃水浴预热；

（3）除去细胞培养瓶中原有培养基，并用 6 毫升 PBS 清洗一次；

（4）向细胞培养瓶中加入 3.5 毫升胰酶，轻轻晃动，使胰酶与细胞充分接触后除去胰酶，后将培养瓶放入含 5% CO_2 的 37℃培养箱约 1 分钟；

（5）用 10 毫升细胞培养基重悬细胞，取出约 0.6 毫升细胞悬液计数（ViCell XR）；

（6）用培养基将细胞悬液稀释到铺板所需的细胞密度 2.5×10^4 个细胞每毫升；

（7）在细胞板四周每孔中加入 100 微升 PBS，向其它孔中加入 40 微升细胞悬液，放入含 5% CO_2 的 37℃培养箱中培养过夜。

（8）取所需的细胞量和培养基于新的 T75 培养瓶中继续培养。

加药：

（1）用 DMSO 将待测化合物配制成 10 毫摩尔溶液；

（2）取 9 微升化合物到 Echo 用浅孔板 (Labcyte, #LP-0200) 中，1000 rpm 离心浅孔板 10 秒；

（3）吸出细胞板外围的 DPBS；

（4）用 Echo 对化合物进行梯度稀释和加药，将每个化合物稀释 10 个浓度梯度并分别加 100 纳升到 384 细胞板中，然后将细胞板放回到培养箱中培养三天；

（5）再向细胞板外围加入 100 微升 DPBS。

读板、分析数据：

（1）加 CTG 并读板：向细胞板的每个孔中加入 20 微升的 CellTiterGlo，避光震荡 10min，在 Envision 上读板。

实验结果：

化合物	**Calu-6 细胞抗增殖活性 IC_{50} (nM)**
化合物 1	88.45
化合物 2	222
化合物 3	300
化合物 4	239
化合物 5	222

化合物 6	508
化合物 7	210
化合物 8	313
化合物 9	222
化合物 10	253

实验结论：本发明化合物具有一定的 Calu-6 细胞抗增殖活性。

实验例 2：HCT116($Kras^{G13D}$)抗增殖活性实验

实验材料：

1) 实验试剂耗材:

名称	品牌货号
Mc'Coy 5A培养基	BI- 01-075-1ACS
胎牛血清	Biosera-FB-1058/500
0.25%胰蛋白酶	源培-S310KJ
双抗（青霉素、链霉素）	Procell- PB180120
CellTiter Glo	Promega-G7573
细胞板	Corning-3610

2) 实验仪器:

名称	品牌货号
细胞计数板	求精
Victor Nivo	PerkinElmer

实验步骤：

细胞接种：

（1）细胞培养基：89% Mc'Coy 5A，10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素；

（2）培养基，胰蛋白酶置于 37℃水浴预热；

（3）除去细胞培养瓶中的培养基，并用 1 毫升 胰酶清洗一次；

（4）向细胞培养瓶中加入 1 毫升胰酶，轻轻晃动，使胰酶与细胞充分接触后除去胰酶，后将培养瓶放入含 5% CO_2 的 37℃培养箱约 1 min；

（5）用 2 毫升细胞培养基重悬细胞，取出约 0.01 毫升细胞悬液计数；

（6）用培养基将细胞悬液稀释到铺板所需的细胞密度 2.5×10^4 个细胞每毫升；

（7）在细胞板四周每孔中加入 100 微升培养基，向其它孔中加入 80 微升细胞悬液，放入含 5% CO_2 的 37℃培养箱中培养过夜。

（8）取所需的细胞量和培养基于新的 T75 培养瓶中继续培养。

加药：

（1）用 DMSO 将待测化合物配制成 10 毫摩尔溶液：

（2）对化合物进行 9 个浓度梯度，3 倍稀释，即从 6 毫摩尔到 2.7 微摩尔设置双复孔实验，向中间板中加入 78 微升培养基，再按照相应位置转移 2 微升每孔的梯度稀释化合物至中间板，混匀后，转移 20 微升每孔到细胞板中，转移到细胞板中的化合物终浓度为 30 微摩尔到 13.7 纳摩尔。细胞板置于二氧化碳培养箱中再培养 3 天。

1) 读板、分析数据：

（1）加 CTG 并读板：向细胞板的每个孔中加入 20 微升 CellTiter Glo，避光震荡 10 min；

（2）在 Victor Nivo 上读板；

数据分析：

利用方程式**(Sample-Min)/(Max-Min)*100%**将原始数据换算成抑制率，IC_{50} 的值即可通过四参数进行曲线拟合得出（GraphPad Prism 中"log(inhibitor) vs. response -- Variable slope" 模式得出）。

实验结果：

化合物	**HCT116 细胞抗增殖活性 IC_{50} (nM)**
化合物 1	102.6
化合物 3	138
化合物 9	105
化合物 11	123
化合物 12	112
化合物 13	138

实验结论：本发明化合物具有较好的 HCT116 细胞抗增殖活性。

实验例 3：A375 ($BRAF^{V600E}$) 抗增殖活性实验

实验材料：

细胞株 A375（购自普诺赛）、DMEM 培养基，盘尼西林/链霉素抗生素购自维森特，胎牛血清购自 Biosera。CellTiter-glo（细胞活率化学发光检测试剂）试剂购自 Promega。

实验步骤：

将 A375 细胞种于白色 96 孔板中，80 微摩尔细胞悬液每孔，其中包含 2000 个 A375 细胞。细胞

板置于二氧化碳培养箱中过夜培养。将待测化合物用排枪进 3 倍稀释至第 9 个浓度，即从 6 毫摩尔稀释至 0.91 微摩尔，设置双复孔实验。向中间板中加入 78 微摩尔培养基，再按照对应位置，转移 2 微摩尔每孔的梯度稀释化合物至中间板，混匀后转移 20 微摩尔每孔到细胞板中。转移到细胞板中的化合物浓度范围是 30 微摩尔至 4.57 纳摩尔。细胞板置于二氧化碳培养箱中培养 5 天。另准备一块细胞板，在加药当天读取信号值作为最大值（下面方程式中 Max 值）参与数据分析。向此细胞板每孔加入 25 微摩尔细胞活率化学发光检测试剂，室温孵育 10 分钟使发光信号稳定。采用多标记分析仪读数。加入化合物的细胞板结束孵育后，向细胞板中加入每孔 25 微摩尔的细胞活率化学发光检测试剂，室温孵育 10 分钟使发光信号稳定。采用多标记分析仪读数。

数据分析：

利用方程式**(Sample-Min)/(Max-Min)*100%**将原始数据换算成抑制率，IC_{50} 的值即可通过四参数进行曲线拟合得出（GraphPad Prism 中"log (inhibitor) vs. response -- Variable slope" 模式得出）。

实验结果：

化合物	**A375 细胞抗增殖活性 IC_{50} (nM)**
化合物 1	15
化合物 3	13
化合物 9	14
化合物 11	16
化合物 12	16
化合物 13	17

实验结论：本发明化合物具有较好的 **A375** 细胞抗增殖活性。

实验例 4：Colo205 ($BRAF^{V600E}$) 抗增殖活性实验

实验材料：

细胞株 COLO205（购自普诺赛）、RPMI1640 培养基，盘尼西林/链霉素抗生素购自维森特，胎牛血清购自 Biosera。CellTiter-glo（细胞活率化学发光检测试剂）试剂购自 Promega。

实验方法：

COLO205 细胞抗增殖实验：

将 COLO205 细胞种于白色 96 孔板中，80 微摩尔细胞悬液每孔，其中包含 3000 个 COLO205 细胞。细胞板置于二氧化碳培养箱中过夜培养。将待测化合物用排枪进 3 倍稀释至第 9 个浓度，即从 200 微摩尔稀释至 0.03 微摩尔，设置双复孔实验。向中间板中加入 78 微摩尔培养基，再按照对应

位置，转移 2 微摩尔每孔的梯度稀释化合物至中间板，混匀后转移 20 微摩尔每孔到细胞板中。转移到细胞板中的化合物浓度范围是 1 微摩尔至 0.15 纳摩尔。细胞板置于二氧化碳培养箱中培养 3 天。另准备一块细胞板，在加药当天读取信号值作为最大值（下面方程式中 Max 值）参与数据分析。向此细胞板每孔加入 25 微摩尔细胞活率化学发光检测试剂，室温孵育 10 分钟使发光信号稳定。采用多标记分析仪读数。加入化合物的细胞板结束孵育后，向细胞板中加入每孔 25 微摩尔的细胞活率化学发光检测试剂，室温孵育 10 分钟使发光信号稳定。采用多标记分析仪读数。

数据分析：

利用方程式**(Sample-Min)/(Max-Min)*100%**将原始数据换算成抑制率，IC_{50} 的值即可通过四参数进行曲线拟合得出（GraphPad Prism 中"log (inhibitor) vs. response -- Variable slope" 模式得出）。

实验结果：

化合物	**Colo205 细胞抗增殖活性 IC_{50} (nM)**
化合物 3	16
化合物 9	14
化合物 11	16
化合物 12	21
化合物 13	21

实验结论：本发明化合物具有较好的 **Colo205** 细胞抗增殖活性。

实验例 5：Calu-6($Kras^{Q61K}$) ERK 磷酸化抑制试验

实验材料：

试剂耗材：

试剂	品牌货号	批次号
人 ERK 磷酸化蛋白高灵敏检测试剂盒	Cisbio-64AERPEH	11B
RPMI1640 培养基	Gibco-22400089	2025384
胎牛血清	Hyclone-SV30087.03	RB35950
96 HTRF 微孔板	Cisbio-66PL96025	N°03
96 微孔板	COSTAR-3599	NA
DMSO	Sigma-D2650-100 毫升	RNBG4295

0.05% Trypsin-EDTA	Gibco-25300-062	1897369

主要仪器：

仪器	生产厂家	型号
生物安全柜	AIRTECH	BSC-1304IIA2
二氧化碳培养箱	Thermo	311
细胞计数仪	BECKMAN	Vi-cellXR
酶标仪	PerkinElmer	Envision
离心机	Eppendorf	Centrifuge 5810R

化合物信息(其它化合物来源于 L1000 配置的化合物母液)

细胞信息：

细胞名称	培养条件	来源	货号
Calu6	1640+10%FBS	ATCC	ATCC-HTB-56

实验步骤和方法：

1) 复苏细胞并培养至对数生长期，用胰酶消化，种 96 孔板，每孔 30000 细胞数，放入培养箱中孵育过夜。

2) 将 DMSO 溶解的梯度化合物 1 微升加入 96 孔板中，放回至培养箱中孵育 1 小时。

3) 取出细胞板，将培养基倾去，每孔加入 50 微升细胞裂解液（含 1%的封闭肽）。

4) 500 转混匀裂解液板，室温孵育裂解 30 分钟。

5) 按照 1:1:38 的比例配制试剂盒中的抗体混合液。

6) 每孔转移 16 微升细胞裂解液至 HTRF 板中，随后加入配置好的抗体混合液 4 微升。

7) 孵育过夜后用 Envision 读板，根据 ratio（Ex665/Ex615 荧光强度的比值）得到拟合的曲线并根据 Graphpad 的四参数拟合公式 Y=Bottom + (Top-Bottom)/(1+10^((Log EC_{50}-X)*HillSlope))计算得出 EC_{50}。

实验结果：

化合物	**Calu-6 ERK 磷酸化抑制活性 IC_{50} (nM)**
化合物 1	5.879
化合物 2	13.08
化合物 3	3.98

化合物 4	6.36
化合物 5	6.92
化合物 7	4.39
化合物 9	3.99
化合物 10	3.03
化合物 11	6.51
化合物 12	6.91
化合物 13	7.84

实验结论：本发明化合物具有较好的 Calu-6 ERK 磷酸化抑制活性。

实验例 6 小鼠、和犬单次静脉与口服给药的药代动力学研究

实验目的：

本实验旨在研究供试化合物单次口服给药后，化合物在小鼠和犬体内的药代动力学情况。

样品收集与制备：

静脉注射或口服给药后，采集血液样本，记录实际采血时间。血样采集以后，立即转移至贴有标签的含 K2-EDTA 的离心管中，随后离心处理后取血浆。将血浆转移至预冷的离心管，在干冰中速冻，并储存在-70±10℃超低温冰箱中，直到进行 LC-MS/MS 分析。

药代动力学数据分析：

使用药动学软件，以非房室模型对化合物的血浆药物浓度数据进行处理。达峰浓度(C_{max})和达峰时间(T_{max})以及可定量末时间，从血药浓度-时间图中直接获得。 使用对数线性梯形法计算下列药代动力学参数：半衰期（$T_{1/2}$），表观分布容积（V_{dss}）以及清除率（Cl），0 点到末端时间点时间-血浆浓度曲线下面积（AUC_{0-last}）。

1. **小鼠单次静脉与口服给药的药代动力学数据**

小鼠单次静脉给药给予本发明化合物的药代动力学参数

化合物编号	剂量(毫克/千克/天)	清除率 Cl (毫升 / 千 克 / 分钟)	表观分布容积 V_{dss} (升/千克)	暴露量 AUC_{0-last} (纳摩尔·小时)	半衰期（$T_{1/2}$）（小时）
1	0.5	10.3	0.4	1320	1.16

3	0.5	19.0	0.656	695	2.18
9	0.5	7.03	0.297	1957	1.26
11	0.5	13.8	0.422	944	1.17

小鼠单次口服给药本发明化合物的药代动力学参数

化合物编号	剂量(毫克/千克/天)	最大血药浓度 C_{max} (纳摩尔/升)	达峰时间 T_{max} (小时)	暴露量（$AUC_{0\text{-}last}$ ）(纳摩尔·小时)
1	50	73437	1	197287
3	50	156000	1	310913
4	50	181500	1	433603
5	50	90500	0.75	223560
9	50	124000	1.5	514818
10	50	34550	1.0	57799
11	50	157000	0.75	405618

实验结论：本发明化合物在小鼠中口服吸收较好，暴露量较高。

2.犬单次静脉与口服给药的药代动力学数据

犬单次静脉和口服给药本发明化合物的药代动力学参数

犬 PK 参数		化合物 3
静脉注射	剂量(毫克/千克/天)	2
	清除率 (毫升/千克/分钟)	1.34
	表观分布容积(升/千克)	0.112
	暴露量 AUC (纳摩尔·小时)	37698
	半衰期（$T_{1/2}$）（小时）	4.3
口服	剂量(毫克/千克/天)	10
	最大血药浓度 (纳摩尔)	26700

	达峰时间 (小时)	3.00
	暴露量 $AUC_{0\text{-}last}$ (纳摩尔·小时):	112684
	口服生物利用度 (%)	59.8

实验结论：本发明化合物在犬中口服吸收较好，清除率较低，暴露量较高，具有较好的生物利用度。

实验例 7：人源肺癌 Calu-6 细胞皮下异种移植肿瘤 BALB/c 裸小鼠模型的体内药效学实验

实验材料：

1.1 实验动物及饲养环境

1.1.1 实验动物

种属：小鼠

品系：BALB/c 裸小鼠

到货周龄：6-8 周龄

性别：雌性

1.1.2 饲养环境

动物在 SPF 级动物房以 IVC（独立送风系统，恒温恒湿）笼具饲养（每笼 3-5 只）

温度：20-26℃

湿度：40-70 %

1.2 肿瘤组织或细胞信息

细胞：人肺癌Calu-6细胞体外培养，EMEM培养基中加0.2 Units/毫升牛胰岛素，10%胎牛血清，37℃5%CO_2 孵箱培养。一周两次用胰酶-EDTA进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为80%-90%，数量到达要求时，收取细胞，计数，接种。

1.3 其它试剂信息

名称	生产厂家	货号	保存条件
胎牛血清	Hyclone	SV30087.03	-20℃
Trypsin	Gibco	25200-072	-20℃
EMEM 培养基	ATCC	ATCC30-2003	2-8℃

1.4 仪器信息

名称	生产厂家	型号
二氧化碳培养箱	赛莫飞世尔（Thermo Fisher）	Heracell240i
低温高速离心机	艾本德（Eppendorf）	5810R
分析天平	赛多利斯（Sartorius）	SECURA225D-1CN

普通天平	常州天之平仪器设备有限公司	EL-2KJ
数显游标卡尺	三丰	0~150 mm

实验方法与步骤：

2.1 肿瘤细胞接种

细胞接种：将0.2毫升 Calu-6细胞（1:1与基质胶配比）皮下接种于每只小鼠的右后背，肿瘤平均体积达到173mm^{3}时开始分组给药。

2.2 分组

表 1 实验动物分组及给药方案

组别	N[1]	化合物治疗	剂量 (毫克/千克)	给药体积参数 (微升/克)[2]	给药途径	给药频次
1	6	溶剂对照组[3]	-	10	口服（PO）	每天一次（QD）
2	6	化合物 1	50	10	口服（PO）	每天一次（QD）
3	6	化合物 3	50	10	口服（PO）	每天一次（QD）
4	6	化合物 4	50	10	口服（PO）	每天一次（QD）
5	6	化合物 9	50	10	口服（PO）	每天一次（QD）
6	6	化合物 11	50	10	口服（PO）	每天一次（QD）

注：1: 每组小鼠数目；2: 给药体积参数：根据小鼠体重10 μL/g。如果体重下降超过15%，则停药，直到体重恢复到10%以内再给药；3：0.5%MC（甲基纤维素）。

2.3 肿瘤测量和实验指标

每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为：$V = 0.5a \times b^2$，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。

化合物的抑瘤疗效用 TGI (%)或相对肿瘤增殖率 T/C(%)评价。相对肿瘤增殖率 T/C（%）= T_{RTV} / C_{RTV} × 100%（T_{RTV}：治疗组 RTV 平均值；C_{RTV}：阴性对照组 RTV 平均值）。根据肿瘤测量的结果计算出相对肿瘤体积（relative tumor volume，RTV），计算公式为 RTV = V_t / V_0，其中 V_0 是分组给药时（即 D0）测量所得肿瘤体积，V_t 为某一次测量时的肿瘤体积，T_{RTV} 与 C_{RTV} 取同一天数据。

TGI (%)，反映肿瘤生长抑制率。TGI (%)=[1-(某处理组给药结束时平均瘤体积－该处理组开始给药时平均瘤体积)/(溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积－溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积)]×100%。

2.5 统计分析

统计分析基于试验结束时RTV的数据运用SPSS软件进行分析。组间比较用one-way ANOVA进行分析，方差不齐（F值有显著性差异），应用Games-Howell法进行检验。$p < 0.05$认为有显著性差异。

3. 实验结果

3.1 受试物对人肺癌裸鼠皮下移植肿瘤生长的抑制作用

本实验评价了受试物在人肺癌异种移植瘤模型中的药效，以溶剂对照组为参照。各组在不同时间点的肿瘤体积如**错误!未找到引用源。**所示。给药组化合物 1，TGI 为 107%、化合物 3 TGI 为 110%、化合物 9 TGI 为 108%以及化合物 11TGI 为 109%，有显著抑瘤作用（$P<0.01$）。

3.2 体重变化情况

小鼠体重、状态未见明显异常。受试物对小鼠体重的影响见图 2。

实验结论：

本发明化合物对人肺癌 Calu-6 细胞皮下异种移植瘤模型荷瘤鼠生长有显著的抑制作用。