(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109641890 B
(45)授权公告日 2022.04.26

(21)申请号 201780051039.8
(22)申请日 2017.07.11
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109641890 A
(43)申请公布日 2019.04.16
(66)本国优先权数据
PCT/CN2016/090022 2016.07.14 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2017/092506 2017.07.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/010637 EN 2018.01.18
(73)专利权人 浙江迈同生物医药有限公司
地址 311215 浙江省杭州市萧山区经济技术开发区耕文路168号1701室
(72)发明人 杨继斌
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
代理人 何箏 孙倩
(51)Int.Cl.
C07D 417/14(2006.01)
A61K 31/4436(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
(56)对比文件
WO 2015/006591 A1,2015.01.15
WO 2016/065980 A1,2016.05.06
WO 2010/139953 A1,2010.12.09
WO 2016/052697 A1,2016.04.07
German Lopez-Valdez et al..Convenient access to isoindolinones via carbamoyl radical cyclization. Synthesis of cichorine and 4-hydroxyisoindolin-1-one natural products.《Tetrahedron》.2011,第67卷第2693-2701页.
审查员 陈敬浪
权利要求书5页 说明书74页 附图15页

(54)发明名称

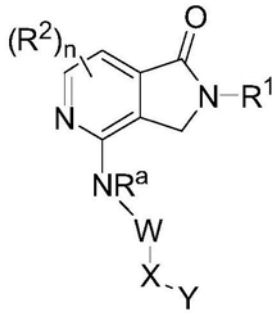
异柠檬酸脱氢酶(IDH)抑制剂

(57)摘要

本申请公开了抑制α-KG转化为D-2-HG的化合物,其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或立体异构体,以及包含所述化合物的药物组合物。所述化合物和所述药物组合物能够有效地治疗IDH相关的疾病,包括癌症。

CN 109641890 B

1.一种式(Ia)所示的化合物：



式（Ia）

或其药学上可接受的盐，

其中，

W为亚甲基、亚乙基或亚丙基；

X为C_{6-12}芳基；

Y为卤素、氰基、C_{1-12}烷基、C_{6-12}芳基、C_{1-12}烷氧基、C_{6-12}芳氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元饱和或不饱和杂环烷基、-C(O)OR^b、-C(O)NR^cR^d，上述基团可以任选地被下组中的一个或多个单取代或者独立地多取代：卤素、羟基、氰基、C_{1-12}烷基、C_{2-12}链烯基、C_{2-12}炔基、C_{5-10}芳基、C_{1-12}烷氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元杂环烷基、或3-10元杂芳基、C_{5-10}芳氧基；

R^1为C_{1-12}烷基、3-10元饱和或不饱和环烷基、C_{6-12}芳烷基、C_{1-6}烷氧基-C_{1-6}烷基、C_{1-12}羟烷基或C_{1-6}烷氧基-C_{6-12}芳烷基；

R^2为氢、-NR^gR^h、-C(O)OR^b或-C(O)NR^cR^d；

R^a、R^b、R^c、R^d、R^g和R^h独立地选自氢、C_{1-12}烷基、3-10元饱和或不饱和环烷基、C_{6-12}芳基，上述基团可以任选地被以下单取代或者独立地多取代：卤素、羟基、氰基、C_{1-12}烷基、C_{2-12}链烯基、C_{2-12}炔基、C_{5-10}芳基、C_{1-12}烷氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元杂环烷基、或3-10元杂芳基、C_{5-10}芳氧基；

任选地，R^c和R^d与它们所结合的氮原子一起形成4-至8-元杂环基，所述4-至8-元杂环基任选地包含一个或多个其他杂原子，所述其他杂原子选自N、S和O，

任选地，R^g和R^h与它们所结合的氮原子一起形成4-至8-元杂环基，所述4-至8-元杂环基任选地包含一个或多个其他杂原子，所述其他杂原子选自N、S和O；

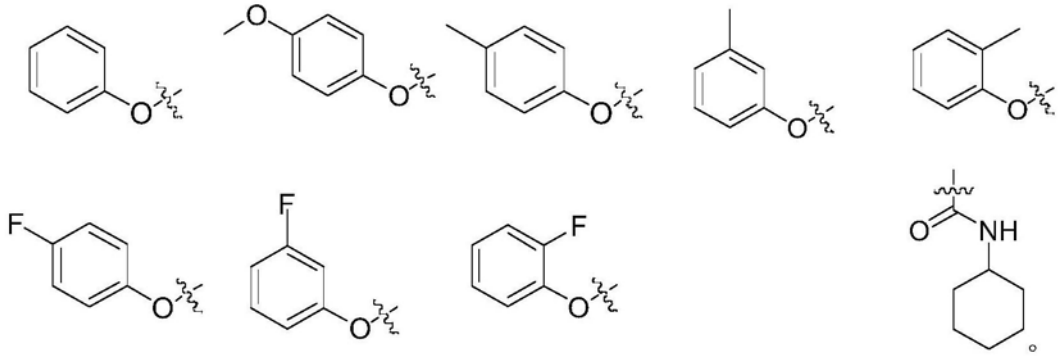
n为0、1或2。

2.根据权利要求1所述的化合物，其中R^a是氢。

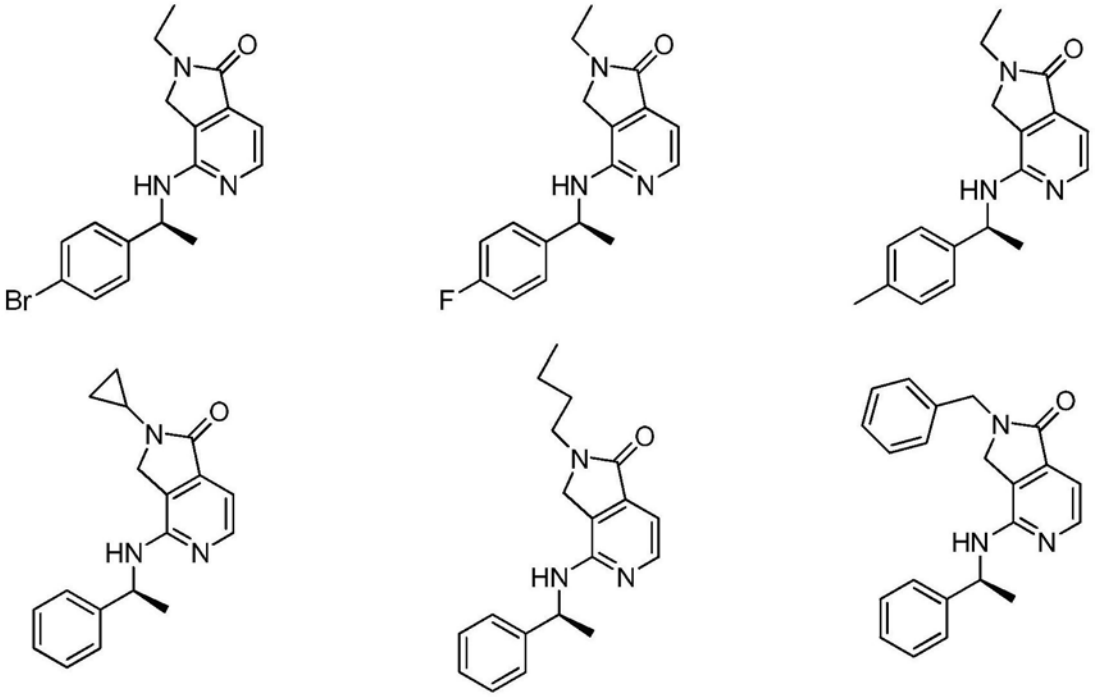
3.根据权利要求1所述的化合物，其中W是支链C_{1-3}亚烷基。

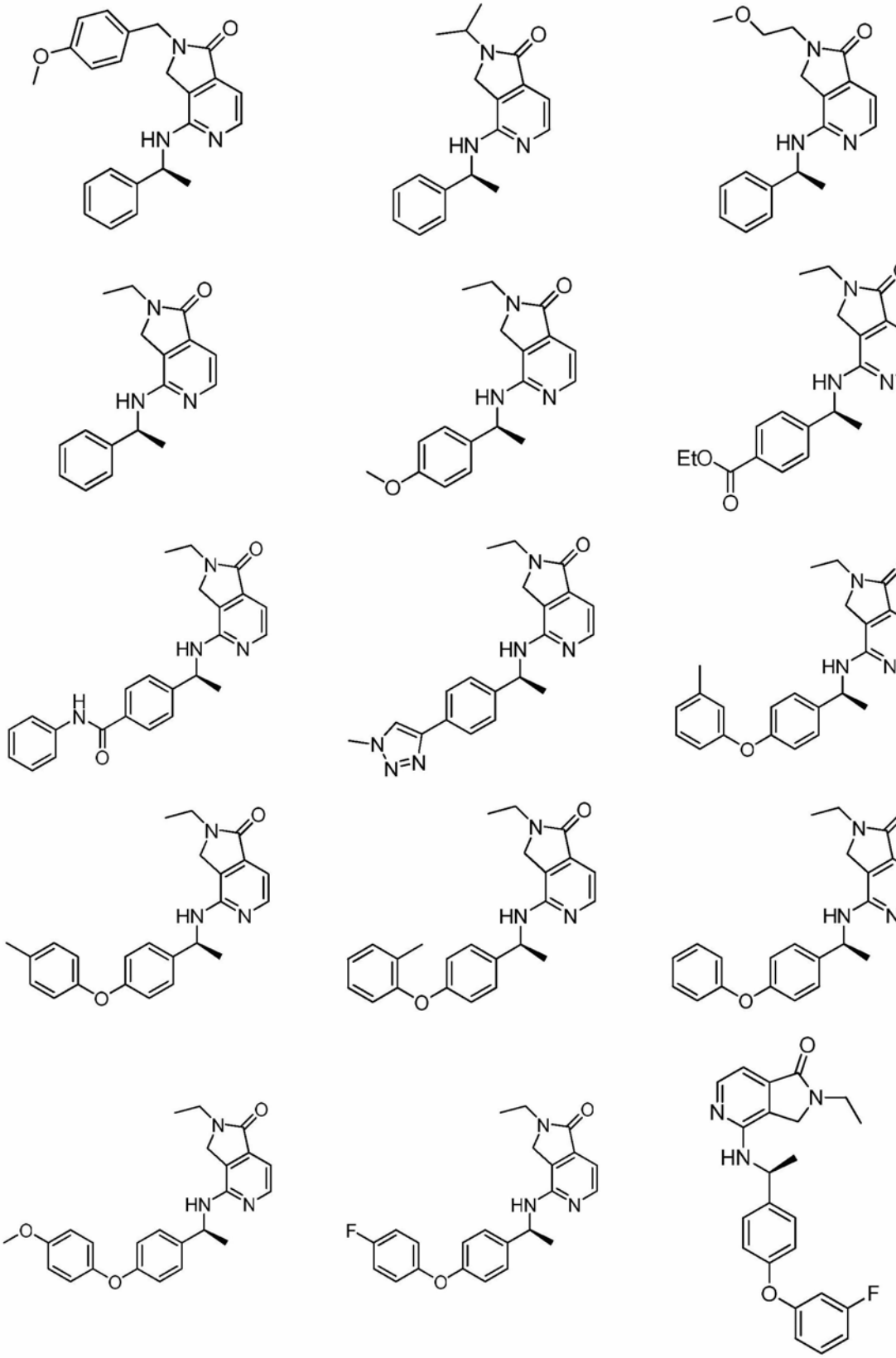
4.根据权利要求3所述的化合物，其中X是苯基。

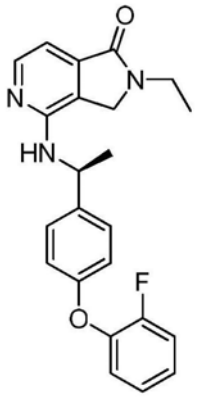
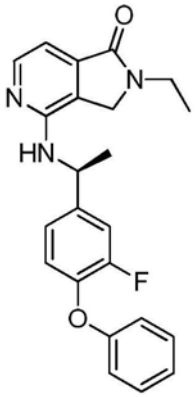
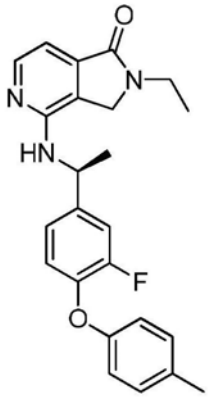
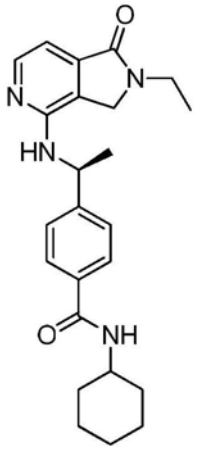
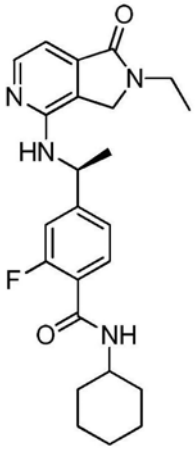
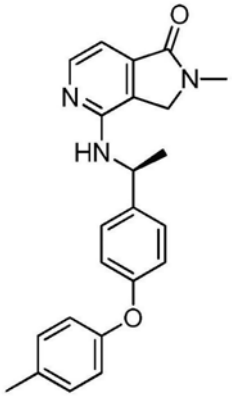
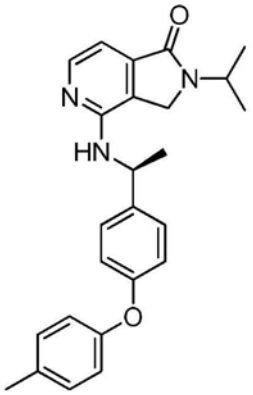
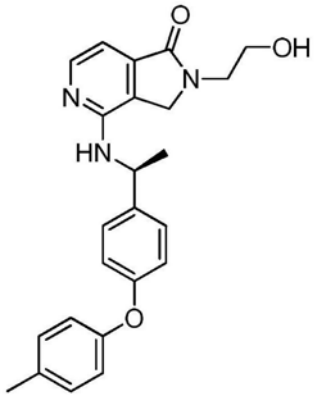
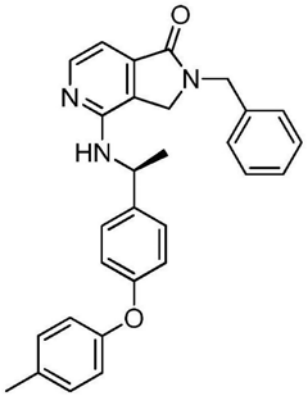
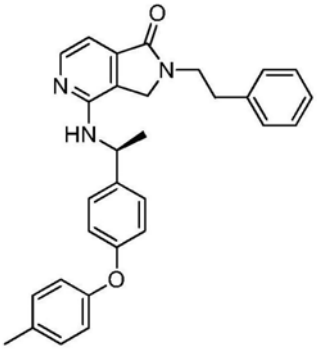
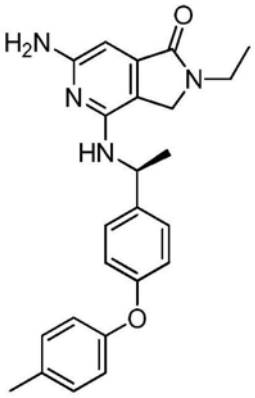
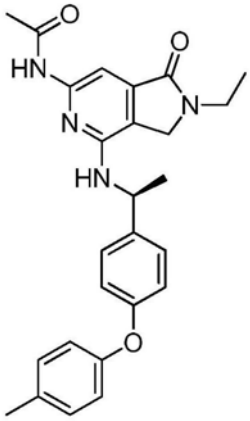
5.根据权利要求1所述的化合物，其中Y选自下组：

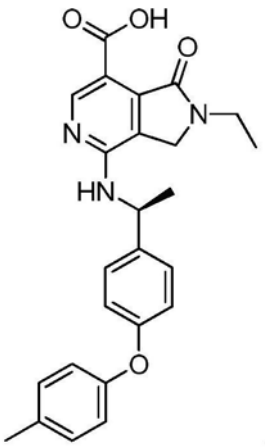


6.一种化合物,其选自下组:







。

7.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-6中任一项所述的一种或多种化合物、其药学上可接受的盐作为第一活性成分,以及药学上可接受的运载体。

8.根据权利要求1-6中任一项所述的一种或多种化合物、其药学上可接受的盐或根据权利要求7所述的药物组合物在制备用于治疗疾病的药物中的用途,其中所述疾病是与α-KG转变为D-2-HG相关的疾病。

9.根据权利要求8所述的用途,其中所述疾病是癌症。

10.根据权利要求1-6中任一项所述的一种或多种化合物、其药学上可接受的盐或根据权利要求7所述的药物组合物在制备用于抑制α-KG转化为D-2-HG的药物中的用途。

11.根据权利要求1-6中任一项所述的一种或多种化合物、其药学上可接受的盐或根据权利要求7所述的药物组合物在制备用于抑制突变体IDH、野生型IDH或上述两者的药物中的用途。

异柠檬酸脱氢酶(IDH)抑制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及化合物,所述化合物抑制α-酮戊二酸(α-KG)向2-羟基戊二酸(2-HG)(如D-2-HG)的转化;包含所述化合物作为活性成分的药物组合物;以及所述化合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗与α-KG向D-2-HG转化相关的疾病。

背景技术

[0002] 异柠檬酸脱氢酶(IDH)是三羧酸(TCA)循环中细胞呼吸的必需酶,其催化异柠檬酸的氧化脱羧,从而产生阿尔法-酮戊二酸(α-酮戊二酸,α-KG)和CO_2。在人体中,IDH 以三种亚型存在:IDH3催化柠檬酸循环的第三步,同时在线粒体中将NAD^+转化为NADH。IDH1和IDH2亚型在柠檬酸循环环境以外催化相同反应,并使用NADP+代替NAD+作为辅因子。它们位于胞质溶质以及线粒体和过氧化物酶体中。

[0003] 在多种脑肿瘤中发现了IDH1的特异性突变,包括星形细胞瘤、少突神经胶质瘤和多形性胶质母细胞瘤,在几乎所有由低级胶质瘤发展出来的继发性胶质母细胞瘤病例中都发现了突变,但在原发性高级多形性胶质母细胞瘤中很少发现突变。肿瘤具有 IDH1突变的患者存活期较长[“An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme”,Parsons,D.W.等人,Science,(2008);“Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors”,Balss,J.等人,Acta Neuropathol,(2008);Bleeker,F.E.等人, “IDH1 mutations at residue p.R132(IDH1(R132))occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors”,Hum Mutat,(2009)]。IDH1和IDH2的突变发生在p53 突变和1p/19q染色体丢失之前,并被认为是胶质瘤发生的第一事件[“IDH1mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas”,Watanabe, T.等人,Am J Pathol,(2009);“Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas”,Suzuki,H.等人,Nat Genet,(2015);“Comprehensive,Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas”,Brat,D.J.等人,N Engl J Med, (2015)]。此外,在高达20%的细胞遗传学正常的急性髓性白血病(AML)中发现了IDH2和IDH1的突变[“Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome”,Mardis,E.R.等人,N Engl J Med,(2009)]。根据一些独立的后续研究,在细胞遗传学正常的AML中IDH1和IDH2的突变率约为20%[“Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome”,Mardis,E.R.等人,N Engl J Med,(2009);“Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia”,Thol,F.等人,Blood,(2010);“Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value”,Abbas,S.等人,Blood,(2010);“The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status”,Green,C.L.等人,Blood,(2010);“IDH1 mutations are detected

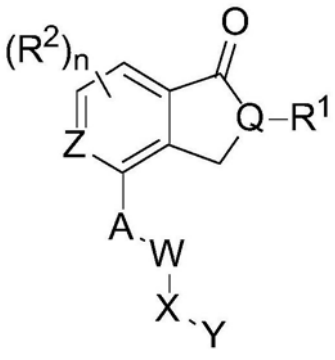
in 6.6%of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60years and unmutated NPM1 status",Schnittger,S.等人,Blood,(2010);"Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia",N Engl J Med,(2013)]。在其他类型的癌症中,包括在75%的软骨肉瘤["IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours",Amary,M.F.等人,J Pathol,(2011);"Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2",Amary,M.F.等人,Nat Genet,(2011)],10-23%的肝内胆管癌["Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase IDH1and IDH2in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping", Borger,D.R.等人,Oncologist,(2012);"Mutations in isocitrate dehydrogenase 1and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas",Wang,P.等人,Oncogene,(2012)],以及一些血管免疫母细胞性T 细胞淋巴瘤和黑素瘤的患者["The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers",Sjoblom,T.等人,Science,(2006)]中,也报道了IDH的突变。到目前为止,IDH1和IDH2是人类癌症中最常发生突变的代谢酶基因。

[0004] 已知这些突变能进一步将α-KG转化为2-HG(例如D-2-HG)。D-2-HG会累积至非常高的浓度,从而抑制依赖于α-酮戊二酸的酶的功能。这会导致DNA和组蛋白的高甲基化状态,从而导致能激活癌基因以及使肿瘤抑制基因失活的各种基因表达。最终,这可能会导致上文公开的癌症类型["The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers",Sjoblom,T.等人,Science,(2006)]。

[0005] 因此,需要开发出一种抑制α-KG转化为D-2-HG的过程的抑制剂。

[0006] 发明概述

[0007] 在一个方面,本公开提供了一种式(I)所示的化合物:

[0008] 

式(I)

[0009] 或其药学上可接受的盐、酯、水合物、溶剂化物或立体异构体。

[0010] 在另一个方面,本公开提供了一种用于制备式(I)所示化合物的方法。

[0011] 在另一个方面,本公开还提供了一种药物组合物,其包含一种或多种式(I)所示的化合物,其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或立体异构体。

[0012] 在又一个方面,本公开提供了式(I)所示化合物、其药学上可接受的盐、水合物、溶

剂化物或立体异构体，或本公开所述药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗与α-KG向D-2-HG转化相关的疾病，例如癌症。

[0013] 在又一个方面，本公开提供了一种抑制α-KG向D-2-HG转化的方法。

[0014] 在另一个方面，本公开提供了用于治疗与α-KG向D-2-HG转化相关的疾病的方法，所述方法是通过使用式(I)所示化合物、其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或立体异构体或本公开所述药物组合物进行的。

[0015] 在另一个方面，本公开提供了一种抑制突变体IDH、野生型IDH或上述两者的方法，所述方法是通过使用式(I)所示化合物、其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或立体异构体或本公开所述药物组合物进行的。

附图说明

[0016] 图1显示了由野生型和突变体IDH1/2催化而进行的代表性反应。

[0017] 图2A显示了亲代HT1080细胞和过表达Flag标记的D-2-HG DH的稳定的HT1080 中2-HG的细胞内水平通过GC-MS分析测得(修改自“'D-2-hydroxyglutarate is essential for maintaining oncogenic property of mutant IDH-containing cancer cells but dispensable for cell growth',Ma,S.等人,Oncotarget,(2015)”)。

[0018] 图2B显示了通过D-2-HG标准物进一步证实了2-HG峰，通过使用主碎片m/z 433 进行定量。

[0019] 图3显示了对IDH1-R132H、IDH1-R132C和IDH1-WT蛋白中的每一个进行的考马斯染色。

[0020] 图4A显示了本公开的示例性化合物的底物(本公开的示例性化合物)的剩余百分比(%)的自然对数(即，Ln(剩余%))与在小鼠肝微粒体中孵育时间的函数。

[0021] 图4B显示了本公开的示例性化合物的Ln(剩余%)与在大鼠肝微粒体中孵育时间的函数。

[0022] 图4C显示了本公开的示例性化合物的Ln(剩余%)与在狗肝微粒体中孵育时间的函数。

[0023] 图4D显示了本公开的示例性化合物的Ln(剩余%)与在猴肝微粒体中孵育时间的函数。

[0024] 图4E显示了本公开的示例性化合物的Ln(剩余%)与在人肝微粒体中孵育时间的函数。

[0025] 图5显示了本公开的示例性化合物的Ln(剩余%)与在小鼠血浆中孵育时间的函数。

[0026] 图6显示了在向ICR小鼠施用了10mg·kg^{-1}的口服(p.o.)单剂量的本公开的示例性化合物后，平均血浆浓度与时间的函数。

[0027] 图7显示了在向ICR小鼠施用了2mg·kg^{-1}的静脉内注射(i.v.)单剂量的本公开的示例性化合物后，平均血浆浓度与时间的函数。

[0028] 图8A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132H的酶活性与化合物16的浓度对数的函数。

[0029] 图9A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132H的酶活性与化合物21的浓度对数的函

数。

[0030] 图10A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132H的酶活性与化合物22的浓度对数的函数。

[0031] 图11A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132H的酶活性与化合物23的浓度对数的函数。

[0032] 图12A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132H的酶活性与化合物24的浓度对数的函数。

[0033] 图13A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132H的酶活性与化合物31的浓度对数的函数。

[0034] 图14A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132C的酶活性与化合物16的浓度对数的函数。

[0035] 图15A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132C的酶活性与化合物21的浓度对数的函数。

[0036] 图16A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132C的酶活性与化合物22的浓度的对数函数。

[0037] 图17A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132C的酶活性与化合物23的浓度对数的函数。

[0038] 图18A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132C的酶活性与化合物24的浓度对数的函数。

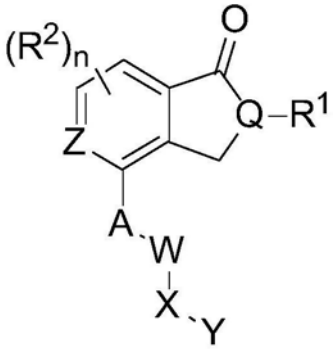
[0039] 图19A-C显示了一式三份测试的IDH1 R132C的酶活性与化合物31的浓度对数的函数。

[0040] 图20显示了在用10μM的化合物1-20中的每一种和阴性对照(DMSO)处理后 D-2-HG的浓度。

[0041] 发明详述

[0042] 化合物

[0043] 在一个方面,本发明提供了式(I)所示的化合物:

[0044] 

式（I）

[0045] 以及其药学上可接受的盐、酯、水合物、溶剂化物或立体异构体，

[0046] 其中，

[0047] Z和Q独立地选自C和N；

[0048] A为O、S或NR^a；

[0049] W为直链或支链C_{1-6}亚烷基；

[0050] X为C_{6-12}芳基、C_{6-12}杂芳基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元饱和或不饱和杂环烷基；

[0051] Y为卤素、氰基、C_{1-12}烷基、C_{6-12}芳基、C_{1-12}烷氧基、C_{6-12}芳氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元饱和或不饱和杂环烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、-C(O)OR^b、-C(O)NR^cR^d，上述基团可以任选地被下组中的一个或多个单取代或者独立地多取代：卤素、羟基、氰基、C_{1-12}烷基、C_{2-12}链烯基、C_{2-12}炔基、C_{5-10}芳基、C_{1-12}烷氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元杂环烷基、或3-10元杂芳基、C_{5-10}芳氧基；

[0052] R^1是C_{1-12}烷基、3-10元饱和或不饱和环烷基、C_{6-12}芳烷基、烷氧基烷基、羟烷基、烷氧基芳烷基或-NR^eR^f；

[0053] R^2是氢、-NR^gR^h、-C(O)OR^b或-C(O)NR^cR^d；

[0054] R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f、R^g和R^h独立地选自氢、C_{1-12}烷基、3-10元饱和或不饱和环烷基、C_{6-12}芳基，上述基团可以任选地被以下单取代或者独立地多取代：卤素、羟基、氰基、C_{1-12}烷基、C_{2-12}链烯基、C_{2-12}炔基、C_{5-10}芳基、C_{1-12}烷氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元杂环烷基、或3-10元杂芳基、C_{5-10}芳氧基；

[0055] 任选地，R^c和R^d与它们所结合的氮原子一起形成4-至8-元杂环基，所述4-至8-元杂环基任选地包含一个或多个其他杂原子，所述其他杂原子选自N、S和O，

[0056] 任选地，R^g和R^h与它们所结合的氮原子一起形成4-至8-元杂环基，所述4-至8-元杂环基任选地包含一个或多个其他杂原子，所述其他杂原子选自N、S和O；

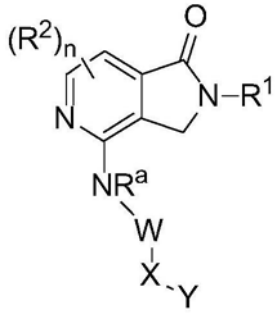
[0057] n为0、1或2。

[0058] 在一些实施方案中，Z为N。

[0059] 在一些实施方案中，Q为N。

[0060] 在一些实施方案中，A为NR^a。在一些实施方案中，A为NH。

[0061] 在一些实施方案中，本方面所述化合物由式(Ia)表示：

[0062] 

式（Ia）

[0063] 以及其药学上可接受的盐、酯、水合物、溶剂化物或立体异构体，

[0064] 其中，

[0065] W为直链或支链C_{1-6}亚烷基；

[0066] X为C_{6-12}芳基、C_{6-12}杂芳基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元饱和或不饱和杂环烷基；

[0067] Y为卤素、氰基、C_{1-12}烷基、C_{6-12}芳基、C_{1-12}烷氧基、C_{6-12}芳氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元饱和或不饱和杂环烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、-C(O)OR^b、-C(O)

NR^cR^d，上述基团可以任选地被下组中的一个或多个单取代或者独立地多取代：卤素、羟基、氰基、C_{1-12}烷基、C_{2-12}链烯基、C_{2-12}炔基、C_{5-10}芳基、C_{1-12}烷氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元杂环烷基、或3-10元杂芳基、C_{5-10}芳氧基；

[0068] R^1为C_{1-12}烷基、3-10元饱和或不饱和环烷基、C_{6-12}芳烷基、烷氧基烷基、羟烷基、烷氧基芳烷基或$-NR^eR^f$；

[0069] R^2为氢、$-NR^gR^h$、$-C(O)OR^b$或$-C(O)NR^cR^d$；

[0070] R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f、R^g和R^h独立地选自氢、C_{1-12}烷基、3-10元饱和或不饱和环烷基、C_{6-12}芳基，上述基团可以任选地被以下单取代或者独立地多取代：卤素、羟基、氰基、C_{1-12}烷基、C_{2-12}链烯基、C_{2-12}炔基、C_{5-10}芳基、C_{1-12}烷氧基、3-10元饱和或不饱和环烷基、3-10元杂环烷基、或3-10元杂芳基、C_{5-10}芳氧基；

[0071] 任选地，R^c和R^d与它们所结合的氮原子一起形成4-至8-元杂环基，所述4-至8-元杂环基任选地包含一个或多个其他杂原子，所述其他杂原子选自N、S和O，

[0072] 任选地，R^g和R^h与它们所结合的氮原子一起形成4-至8-元杂环基，所述4-至8-元杂环基任选地包含一个或多个其他杂原子，所述其他杂原子选自N、S和O；

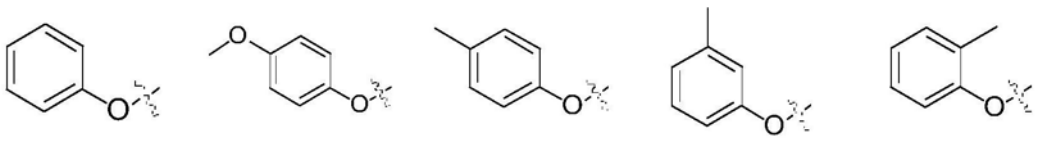
[0073] n为0、1或2。

[0074] 在一些实施方案中，式(I)中的A为NR^a。在一些实施方案中，式(I)或式(Ia) 中的R^a是氢。

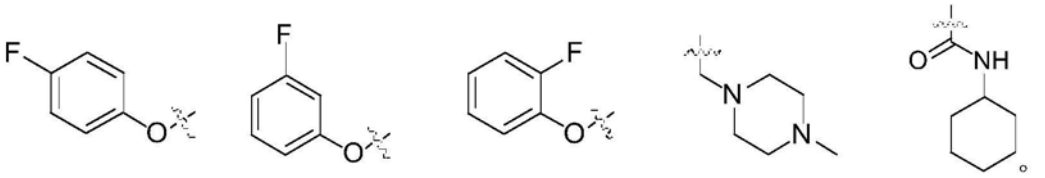
[0075] 在一些实施方案中，式(I)或式(Ia)中的W为支链C_{1-3}亚烷基。在一些实施方案中，式(I)或式(Ia)中的W为亚甲基、亚乙基或亚丙基。在一些实施方案中， W为1,1-亚乙基、1,2-亚乙基、1,1-亚丙基、1,2-亚丙基、1,3-亚丙基或2,2-亚丙基。在一些实施方案中，W为1,1-亚乙基。

[0076] 在一些实施方案中，式(I)或式(Ia)中的X为C_{6-12}芳基或C_{6-12}杂芳基。在一些实施方案中，X为苯基、吡啶基或吡唑基。

[0077] 在一些实施方案中，式(I)或式(Ia)中的Y选自下组：



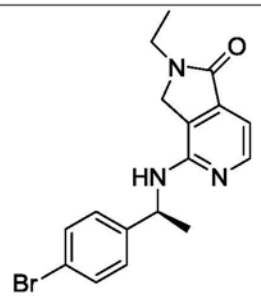
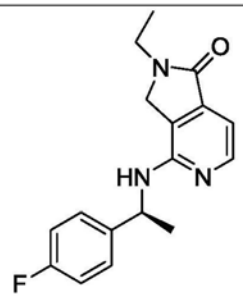
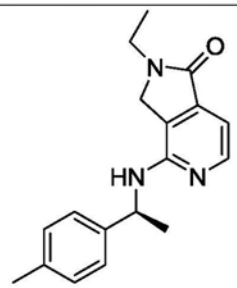
[0078]



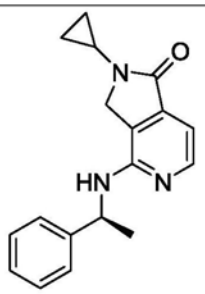
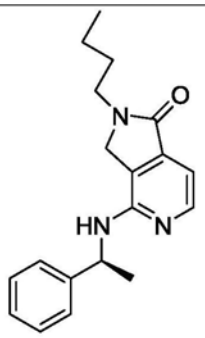
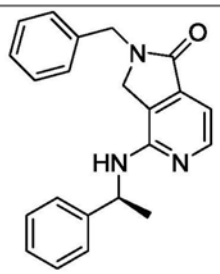
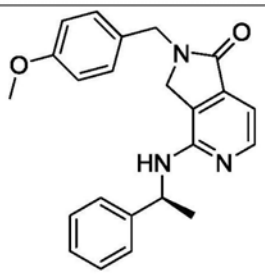
[0079] 在一些实施方案中，本公开所述化合物可以具有(R)-构型、(S)-构型或其混合物。

[0080] 特别地，本公开所述式(I)或式(Ia)所示的化合物可以是如下化合物1-37：

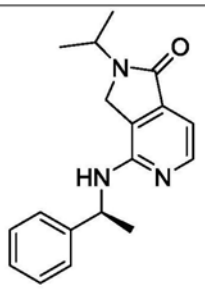
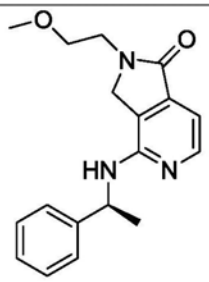
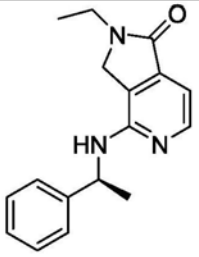
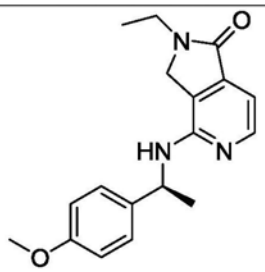
[0081]

化合物编号	结构和命名
1	
	(S)-4-(1-(4-溴苯基)乙基氨基)-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
2	
	(S)-2-乙基-4-(1-(4-氟苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
3	
	(S)-2-乙基-4-(1-对甲苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

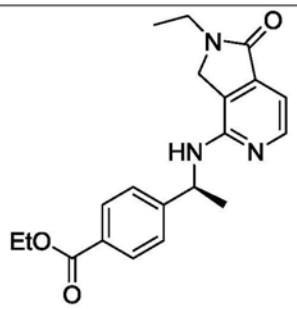
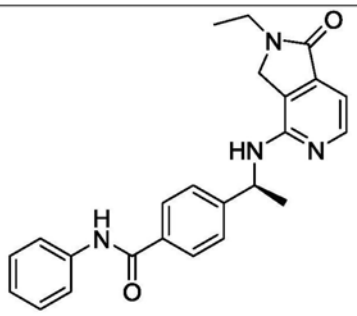
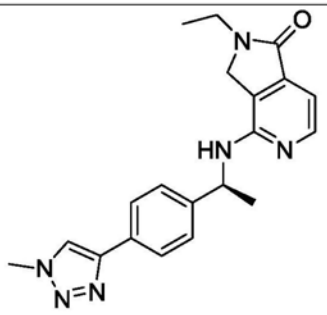
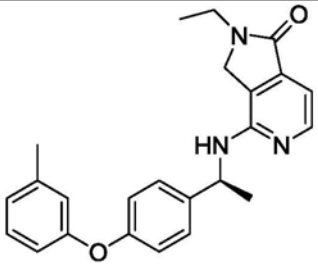
[0082]

4	
	(S)-2-环丙基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
5	
	(S)-2-丁基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
6	
	(S)-2-苄基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
7	
	(S)-2-(4-甲氧基苄基)-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

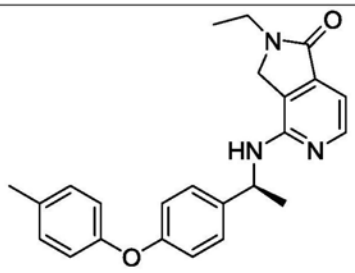
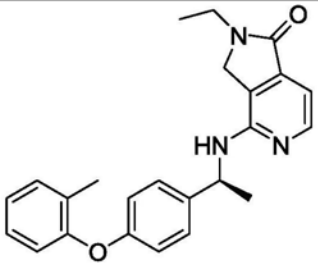
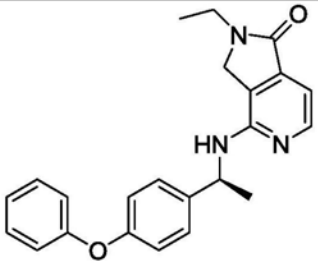
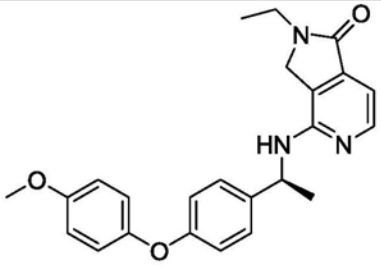
[0083]

8	
	(S)-2-异丙基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
9	
	(S)-2-(2-甲氧基乙基)-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
10	
	(S)-2-乙基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
11	
	(S)-2-乙基-4-(1-(4-甲氧基苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

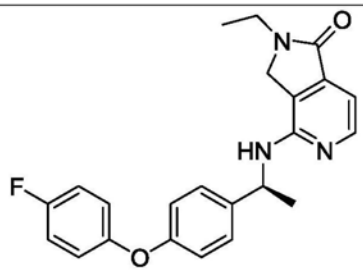
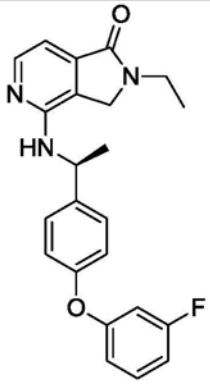
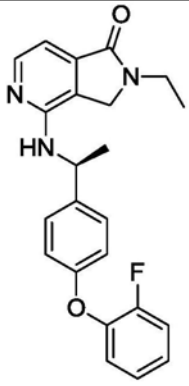
[0084]

12	
	(S)-4-(1-(2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-4-基氨基)乙基)苯甲酸乙酯
13	
	(S)-4-(1-(2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-4-基氨基)乙基)-N-苯基苯甲酰胺
14	
	(S)-2-乙基-4-(1-(4-(1-甲基-1H-1,2,3-三唑-4-基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
15	

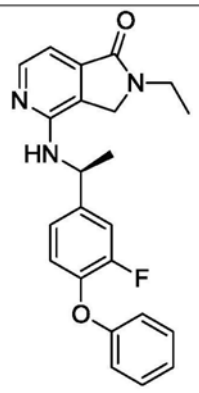
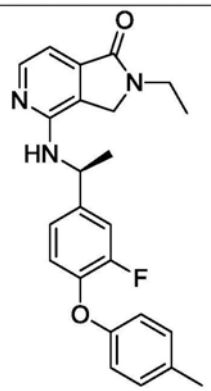
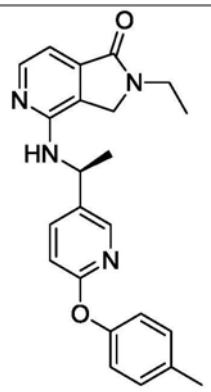
[0085]

	(S)-2-乙基-4-(1-(4-(间-甲苯基氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
16	
	（S)-2-乙基-4-（1-（4-（对-甲苯基氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
17	
	(S)-2-乙基-4-(1-(4-(邻-甲苯基氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
18	
	(S)-2-乙基-4-(1-(4-苯氧基苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
19	

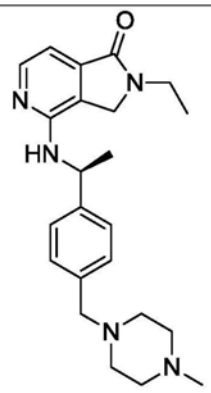
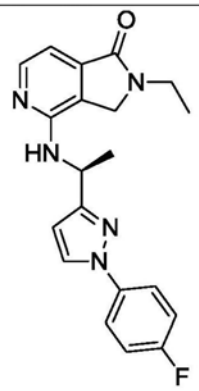
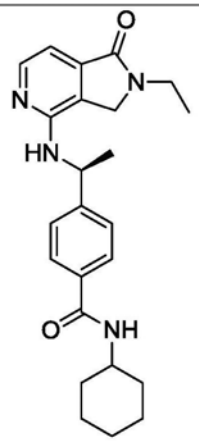
[0086]

	(S)-2-乙基-4-(1-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
20	
	(S)-2-乙基-4-(1-(4-(4-氟苯氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
21	
	(S)-2-乙基-4-((1-(4-(3-氟苯氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
22	
	(S)-2-乙基-4-((1-（4-(2-氟苯氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

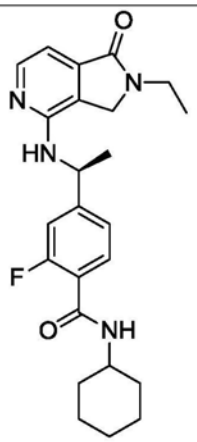
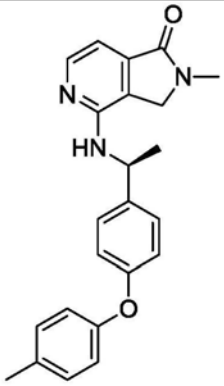
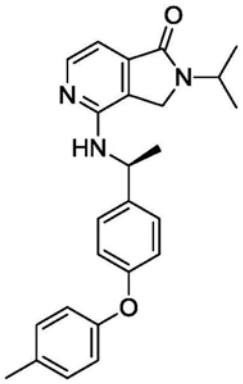
[0087]

23	
	(S)-2-乙基-4-((1-(3-氟-4-苯氧基苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
24	
	(S)-2-乙基-4-((1-(3-氟-4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
25	
	(S)-2-乙基-4-((1-(6-(对-甲苯基氧基)吡啶-3-基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

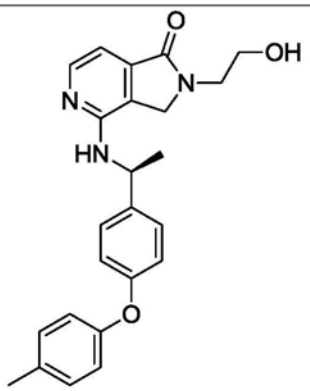
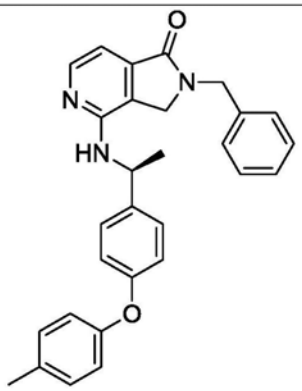
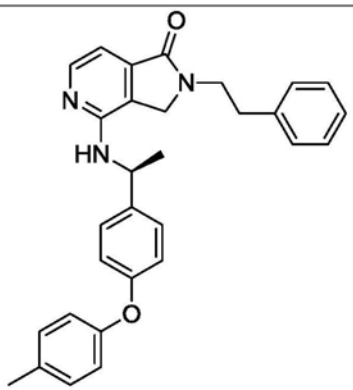
[0088]

26	
	(S)-2-乙基-4-((1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
27	
	(S)-2-乙基-4-((1-(1-(4-氟苯基)-1H-吡唑-3-基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
28	
	(S)-N-环己基-4-(1-((2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-4-基)氨基)乙基)苯甲酰胺

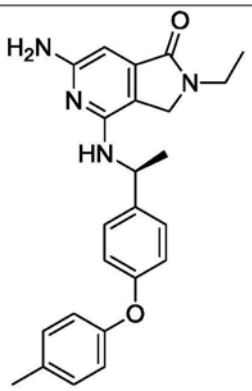
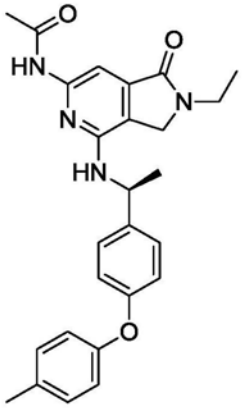
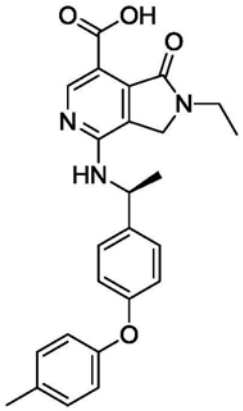
[0089]

29	
	(S)-N-环己基-4-(1-((2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-4-基)氨基)乙基)-2-氟苯
30	
	(S)-2-甲基-4-((1-(4-（对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
31	
	(S)-2-异丙基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0090]

32	
	(S)-2-(2-羟乙基)-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
33	
	(S)-2-苄基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
34	
	(S)-2-苯乙基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0091]

35	
	(S)-6-氨基-2-乙基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮
36	
	(S)-N-(2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-6-基)乙酰胺
37	
	(S)-2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-7-羧酸

[0092] 为简洁起见，对于在单个实施方案的上下文中所公开的本公开的各种特征，也可以以单独的形式或者以任何合适的子组合的形式提供。

[0093] 当用来指代化学基团时，本文使用的术语“取代的”是指所述化学基团具有一个或多个氢原子，所述一个或多个氢原子被除去并且被取代基取代。本文使用的术语“取代基”

具有本领域已知的普通含义，是指与母体基团共价连接的或者在适当的条件下与其稠合的化学部分。本文使用的术语“任选地被取代的”是指所述化学基团可能不具有取代基(即未取代的)或者可能具有一个或多个取代基(即取代的)。应当理解，在给定原子处的取代受化合价的限制。

[0094] 本文使用的术语“C_{i-j}”表示碳原子数的范围，其中i和j是整数，并且所述碳原子数的范围包括端点(即i和j)和其间的每个整数点，并且其中i∈{1、2、3、4、5、6、 7、8、9或10}，j大于i，j∈{2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、 35、36、37、38、39或40}。例如，C_{1-6}表示1-6个碳原子的范围，包括一个碳原子、两个碳原子、三个碳原子、四个碳原子、五个碳原子和六个碳原子。

[0095] 本文使用的术语“烷基”不管是作为另一术语的一部分还是独立地使用，都是指饱和或不饱和的烃基基团，其可以是直链或支链。术语“C_{i-j}烷基”是指具有i至j个碳原子的烷基。在一些实施方案中，烷基基团含有1至12、1至8、1至6、1至4、1至3 或1至2个碳原子。饱和的烷基基团的实例包括，但不限于，如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基的化学基团；如2-甲基-1-丁基、正戊基、 3-戊基、正己基、1,2,2-三甲基丙基等的高级同系物。不饱和烷基基团的实例包括，但不限于，如乙烯基、正丙烯基、异丙烯基、正丁烯基、仲丁烯基、乙炔基、丙炔-1- 基、丙炔-2-基等的化学基团。

[0096] 本文使用的术语“亚烷基”不管是作为另一术语的一部分还是独立地使用，都是指二价烷基。亚烷基基团的实例包括，但不限于，亚甲基、1,1-亚乙基、1,2-亚乙基、1,1- 亚丙基、1,2-亚丙基、1,3-亚丙基、2,2-亚丙基等。

[0097] 本文使用的术语“芳基”或“芳族”，不管是作为另一术语的一部分还是独立地使用，都是指在形成环的碳原子之间具有交替的双键和单键的单环或多环碳环环系基团。在一些实施方案中，所述芳基环系在一个或多个环中具有5至12、5至10、或5至8、 6至12、6至10或6至8个碳原子。芳基基团的实例包括，但不限于，如苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等的化学基团。

[0098] 本文使用的术语“芳烷基”或“芳基烷基”不管是作为另一术语的一部分还是独立地使用，都是指具有式-烷基-芳基的基团。术语“C_{i-j}芳烷基”是指总碳数为i至j的芳烷基。在一些实施方案中，烷基部分具有1至6、1至4、1至3或1至2个碳原子。在一些实施方案中，所述芳烷基基团具有6-12、6-11、6-10、6-9、6-8或6-7个碳原子。芳烷基基团的实例包括，但不限于，各种-烷基-苯和-烷基-萘。

[0099] 本文使用的术语“烯基”是指具有一个或多个双键的直链或支链烃链。术语“C_{i-j}烯基”是指总碳数为i至j的烯基。在一些实施方案中，所述烯基基团具有2-12、2-11、 2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4或2-3个碳原子。烯基基团的实例包括，但不限于，烯丙基、丙烯基、2-丁烯基、3-己烯基、3-辛烯基等。任选地，双键碳中的其中一个可以是所述烯基取代基的连接点。

[0100] 本文使用的术语“炔基”是指具有一个或多个三键的直链或支链烃链。术语“C_{i-j}炔基”是指总碳数为i至j的炔基。在一些实施方案中，所述炔基基团具有2-12、2-11、 2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4或2-3个碳原子。炔基基团的实例包括，但不限于，乙炔基、炔丙基、3-己炔基等。任选地，三键碳中的其中一个可以是所述炔基取代基的连接点。

[0101] 本文使用的术语“环烷基”不管是作为另一术语的一部分还是独立地使用，都是指

非芳族环状烃，包括环化的烷基和/或烯基基团。环烷基基团可以包括单环或多环(例如，具有2、3或4个稠环)基团和螺环。在一些实施方案中，所述环烷基是饱和环烷基。术语“i-j元环烷基”是指具有i至j个成环成员的环烷基。环烷基基团可以具有 3、4、5、6、7、8个成环碳(C_{3-8})。环烷基基团的实例包括，但不限于，环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环戊烯基、环己烯基、环己二烯基、环庚三烯基等。在一些实施方案中，本文使用的环烷基可以与一个或多个芳环稠合(即，具有共同键)，例如环戊烷、环己烷等的苯并或噻吩基衍生物。在一些实施方案中，含有稠合芳环的环烷基基团可以通过任何成环原子连接，所述成环原子包括所述稠合芳环的成环原子。

[0102] 本文使用的术语“杂环烷基”是指环烷基基团，其中环系中的至少一个环原子是杂原子，并且其余环原子是碳原子。术语“i-j元杂环烷基”是指具有i至j个成环成员的杂环烷基。另外，所述环也可以具有一个或多个双键，但不具有完全共轭的系统。在一些实施方案中，杂环烷基是饱和的杂环烷基。杂原子的实例包括，但不限于，氧、硫、氮、磷等。在一些实施方案中，杂环烷基具有3至8、3至6、或4至6个成环碳。杂环烷基的实例包括，但不限于，氮杂环丁烷、氮丙啶、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。

[0103] 本文使用的术语“碳环基”是指任何环系，其中所有环原子都是碳并且其含有3至12个环碳原子、3至10个碳原子、3至8个碳原子以及4至8个碳原子。碳环基基团可以是饱和的或部分不饱和的，但并不包括芳香环。碳环基基团的实例包括单环、双环和三环环系。其他碳环基基团包括桥环系(例如双环[2,2,1]庚烯基)。碳环基基团的具体实例是环烷基。

[0104] 本文使用的术语“杂环基”是指这样的碳环基：其中一个或多个(例如1、2或3 个)环原子被杂原子代替，所述杂原子包括，但不限于，氧、硫、氮、磷等。杂环基基团的具体实例是一个或多个环原子被杂原子代替的环烷基。含有一个杂原子的示例性杂环基基团包括吡咯烷、四氢呋喃和哌啶，含有两个杂原子的示例性杂环基基团包括吗啉和哌嗪。杂环基基团的另一个具体实例是一个或多个环原子被杂原子代替的环烯基基团。

[0105] 本文使用的术语“烷氧基”不管是作为另一术语的一部分还是独立地使用，都是指具有式-O-烷基的基团。术语“C_{i-j}烷氧基”是指烷氧基基团的烷基部分具有i至j个碳原子。在一些实施方案中，烷基部分具有1至6、1至5、1至4、1至3或1至2个碳原子。烷氧基基团的实例包括，但不限于，甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如，正丙氧基和异丙氧基)、叔丁氧基等。

[0106] 本文使用的术语“芳基氧基”是指具有式-O-芳基的基团，其中芳基基团如先前公开所示。“C_{i-j}芳基氧基”是指芳基氧基基团的芳基部分具有i至j个碳原子。在一些实施方案中，芳基部分具有5至10、5至8或5至6个碳原子。

[0107] 本文使用的术语“n元”，其中n是整数，通常与环系组合使用来描述所述环系中成环原子的数目。例如，哌啶基是6元杂环烷基环的实例，吡唑基是5元杂芳基环的实例，吡啶基是6元杂芳基环的实例，以及1,2,3,4-四氢-萘是10元环烷基基团的实例。

[0108] 本文使用的术语“杂芳基”是指这样的芳基基团：其中芳香环中的至少一个环原子是杂原子，并且其余环原子是碳原子。术语“i-j元杂芳基”是指具有i至j个成环成员的杂芳基。杂原子的实例包括，但不限于，氧、硫、氮、磷等。在一些实施方案中，杂芳基可以具有5至10、5至8、或5至6个成环成员。在一些实施方案中，杂芳基是5元或6元杂芳基。杂芳基的实例包括，但不限于，呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-低级烷基吡咯基、吡啶基-N-氧化物、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、吲哚基等。

[0109] 在一些实施方案中，5元杂芳基可以是拥有具有五个环原子的环的杂芳基，其中一个或多个(例如，1、2或3个)环原子可以独立地选自N、O、P和S。示例性的5 元杂芳基为噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、异噻唑基、异恶唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,3,4-三唑基、四唑基、1,2,3-噻二唑基、1,2,4- 噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、1,2,3-恶二唑基、1,2,4-恶二唑基、1,3,4-恶二唑基等。

[0110] 在一些实施方案中，6元杂芳基可以是拥有具有六个环原子的环的杂芳基，其中一个或多个(例如，1、2或3个)环原子可以独立地选自N、O、P和S。示例性的6 元杂芳基为吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基和哒嗪基。

[0111] 本文使用的术语“卤代”和“卤素”是指选自氟、氯、溴和碘的原子。

[0112] 本文使用的术语“氰基”是指具有式-CN的基团。

[0113] 本文使用的术语“羟基”是指具有式-OH的基团。

[0114] 本文使用的术语“化合物”旨在包括所示结构的所有立体异构体(例如，对映异构体和非对映异构体)、几何异构体、互变异构体和同位素。除非另有说明，否则本文中通过名称或结构被鉴定为一种特定的互变异构形式的化合物应当包括其他互变异构形式。

[0115] 本文公开的化合物可以是不对称的(例如，具有一个或多个立体中心)。除非另有说明，否则应当包括所有的立体异构体，例如对映异构体和非对映异构体。可以将含有不对称取代的碳原子的本公开的化合物分离成光学活性的或外消旋的形式。关于如何从光学惰性的起始材料制备光学活性形式的方法是本领域已知的，例如通过拆分外消旋混合物或通过立体选择性的合成。在本文公开的化合物中也可以存在许多烯烃、碳-碳双键等的几何异构体，并且所有这些稳定的异构体都包括在本公开内容中。公开了本申请化合物的顺式和反式几何异构体，并且可以将其分离成异构体的混合物或分离的异构形式。

[0116] 在一些实施方案中，本文公开的化合物具有(R)-构型。在一些实施方案中，本文公开的化合物具有(S)-构型。

[0117] 本文公开的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式包括质子性互变异构体，其是具有相同经验式和总电荷的异构质子化态。示例性的质子互变异构体包括酮-烯醇对，酰胺-亚胺酸对，内酰胺-内酰亚胺对，烯胺-亚胺对和质子可以占据杂环系的两个或更多个位置的环状形式，例如1H-和3H-咪唑，1H-、2H-和4H-1,2,4-三唑，1H- 和2H-异吲哚，以及1H-和2H-吡唑。互变异构形式可以是平衡的或者通过适当的取代被空阻锁定成一个形式。

[0118] 本文公开的化合物还可以包括存在于中间体或最终化合物中的原子的所有同位素。同位素包括具有相同原子序数但不同质量数的原子。例如，氢的同位素包括氕、氘和氚。在一些实施方案中，所述氢的同位素是氕和氘。

[0119] 本公开的化合物还可以用作药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或代谢物的形式。所述药学上可接受的盐包括无机酸和有机酸的碱金属盐，所述酸包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、苹果酸、乙酸、草酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、富马酸、琥珀酸、马来酸、水杨酸、苯甲酸、苯乙酸、扁桃酸。当本公开的化合物包含酸性官能团(如羧基)时，则本领域技术人员熟知合适的药学上可接受的羧酸阳离子，包括碱、碱土、铵、季铵阳离子。

[0120] 除非另有说明，否则“IDH”或“野生型IDH”是指催化异柠檬酸向α-KG转化的正常的IDH酶。示例性的正常的IDH酶包括：

[0121] 人IDH1蛋白(NCBI登记号:O75874.2,SEQ ID NO:1)

[0122] 1 mskkisggsv vemqgdemtr iiwelikekl ifpyveldlh sydlgienrd atndqvtkda

[0123] 61 aeaikkhnvg vkcatitpde krveefklkq mwkspngtir nilggtvfre aiickniprl

[0124] 121 vsgwvkpiii grhaygdqyr atdfvvpgpg kveitytpsd gtqkvtylvh nfeegggvam

[0125] 181 gmynqdksie dfahssfqma lskgwplyls tkntilkkyd grfkdifqei ydkqyksqfe

[0126] 241 aqkiwyehrl iddmvaqamk seggfiwack nydgdvqsds vaqgygslgm mtsvlvcpdg

[0127] 301 ktveaeaahg tvtrhyrmyq kgqetstnpi asifawtrgl ahrakldnnk elaffanale

[0128] 361 evsietieag fmtkdlaaci kglpnvqrsd ylntfefmdk lgenlkikla qakl

[0129] 人IDH2蛋白(NCBI登记号:P48735.2,SEQ ID NO:2)

[0130] 1 magylrvvrs lcrasgsrpa wapaaltapt sqeqprrhya dkrikvakpv vemdgdemtr

[0131] 61 iiwqfikekl ilphvdiqlk yfdlglpnrd qtddqvtids alatqkysva vkcatitpde

[0132] 121 arveefklkk mwkspngtir nilggtvfre piickniprl vpgwtkpiti grhahgdqyk

[0133] 181 atdfvadrag tfkmvftpkd gsgvkewevy nfpaggvgmg myntdesisg fahscfqyai

[0134] 241 qkkwplymst kntilkaydg rfkdifqeif dkhyktdfdk nkiwyehrli ddmvaqvlks

[0135] 301 sggfvwackn ydgdvqsdil aqgfgslglm tsvlvcpdgk tieaeaahgt vtrhyrehqk

[0136] 361 grptstnpia sifawtrgle hrgkldgnqd lirfaqmlek vcvetvesga mtkdlagcih

[0137] 421 glsnvklneh flnttdfldt iksnldralg rq

[0138] 本文使用的术语“IDH的突变”是指IDH酶的任何突变,其使得“IDH突变体”、“突变体IDH”或“突变的IDH”能够催化α-KG转化为D-2-HG。在一些实施方案中,“突变体IDH”能催化α-KG向D-2-HG的转化以及异柠檬酸向α-KG的转化。这些突变包括但不限于IDH1中的R132H、R132C、R132G、R132L、R132S;或IDH2中的R172K、R172M、R172W。

[0139] 在一些实施方案中,本公开的化合物抑制α-KG向D-2-HG的转化。在一些实施方案中,本公开的化合物抑制异柠檬酸向α-KG的转化。在一些实施方案中,本公开的化合物抑制α-KG向D-2-HG的转化以及异柠檬酸向α-KG的转化。在一些实施方案中,本公开的化合物可以选择性地抑制α-KG向D-2-HG的转化,但不抑制异柠檬酸向α-KG的转化。

[0140] 在一些实施方案中,本公开的化合物抑制突变体IDH。在一些实施方案中,本公开的化合物抑制野生型IDH。在一些实施方案中,本公开的化合物抑制突变体IDH和野生型IDH。在一些实施方案中,本公开的化合物可以选择性地抑制突变体IDH但不抑制野生型IDH。

[0141] 在一些实施方案中,本公开的化合物抑制野生型IDH和/或突变体IDH,IC_{50}值为0.01-1000μM,优选0.01-500μM、0.01-100μM、0.01-80μM、0.01-50μM、0.01-40μM、0.01-30μM或0.01-20μmM,更优选0.01-10μM、0.01-5μM或0.01-1μM。

[0142] 本文使用的术语“选择性地抑制”是指化合物对野生型IDH的IC_{50}至少比化合物对IDH突变体的IC_{50}高2倍、3倍、4倍、5倍,优选10倍、20倍、30倍或50倍。

[0143] 合成方法

[0144] 在下面的一般合成方案中说明了本文所提供的化合物(包括其盐、酯、水合物或溶剂化物或立体异构体)的合成。本文所提供的化合物可以使用任何已知的有机合成技术制得,并且可以根据多种可能的合成途径中的任何一种合成,因此这些方案仅是说明性的,并不旨在限制可用于制备化合物的其他可能的方法。此外,方案中的步骤用于更好地说明,并

且可以根据需要进行更改。实施例中化合物的实施方案是在中国合成的，用于研究目的并可能会提交给管理机构。

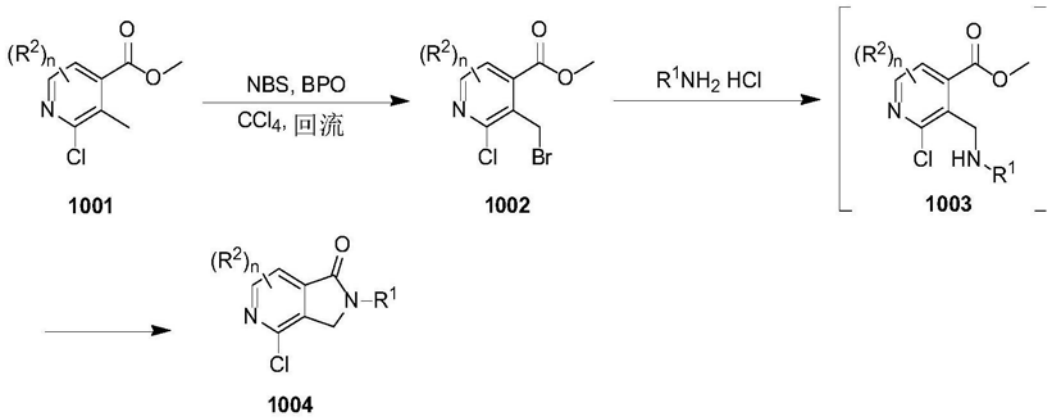
[0145] 用于制备本公开化合物的反应可在合适的溶剂中进行，有机合成领域的技术人员可以方便地对这些溶剂进行选择。合适的溶剂可以在进行反应的温度(例如，从溶剂的冻结温度至溶剂的沸腾温度的温度)下基本上不与原料(反应物)、中间体或产物发生反应。可以在一种溶剂或超过一种溶剂的混合物中进行给定的反应。技术人员可以根据特定的反应步骤选择用于特定反应步骤的合适的溶剂。

[0146] 本公开化合物的制备可以涉及各种化学基团的保护和去保护。本领域技术人员可以很容易地确定是否需要保护和去保护以及选择适当的保护基团。保护基团的化学性质可以在例如T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed.,Wiley&Sons,Inc.,New York(1999)中找到，其通过引用并入本文。

[0147] 可以根据本领域已知的任何合适方法来监测反应。例如，可以通过光谱手段，如核磁共振光谱(例如，^{1}H或^{13}C)、红外光谱、分光光度法(例如，UV-可见光)、质谱，或通过色谱方法，如高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱(LCMS)或薄层色谱(TLC)法，来监测产物的形成。本领域技术人员可以通过多种方法纯化化合物，包括高效液相色谱法(HPLC)(“Preparative LC-MS Purification:Improved Compound Specific Method Optimization”Karl F.Blom,Brian Glass,Richard Sparks, Andrew P.Combs J.Combi.Chem.2004,6(6),874-883，其通过引用整体并入本文) 和正相二氧化硅色谱法。

[0148] 可以如方案1至5中所示合成式(Ia)的中间体化合物，可以如方案6至11中所示合成式(Ia)的化合物。

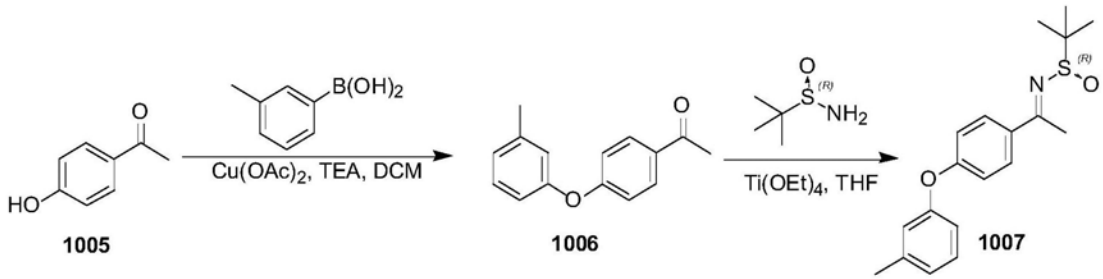
[0149] 方案1:式(Ia)的中间体的合成

[0150] 

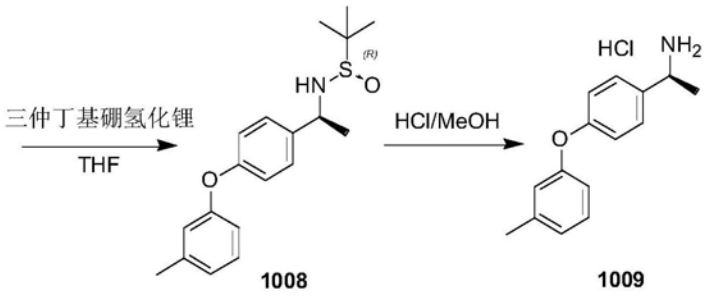
[0151] 步骤1:使化合物1001与NBS和BPO在CCl_4中反应，得到化合物1002，其中 R^2的定义如上所述。

[0152] 步骤2:在存在Cs_2CO_3的条件下使化合物1002与R^1NH_2·HCl反应，得到化合物1004，其中R^1的定义如上所述。

[0153] 方案2:式(Ia)的中间体的合成



[0154]



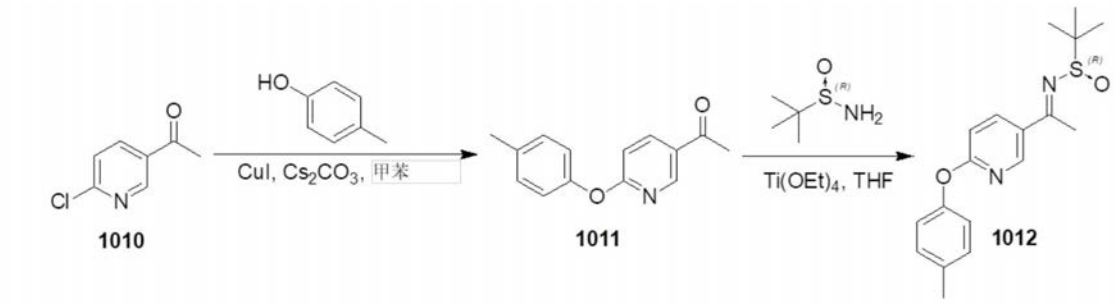
[0155] 步骤1:使DCM中的化合物1005与间-甲苯基硼酸、$Cu(OAc)_2$和TEA反应,得到化合物1006。

[0156] 步骤2:在存在$Ti(OEt)_4$的条件下,使THF中的化合物1006与(R)-(+)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺反应,得到化合物1007。

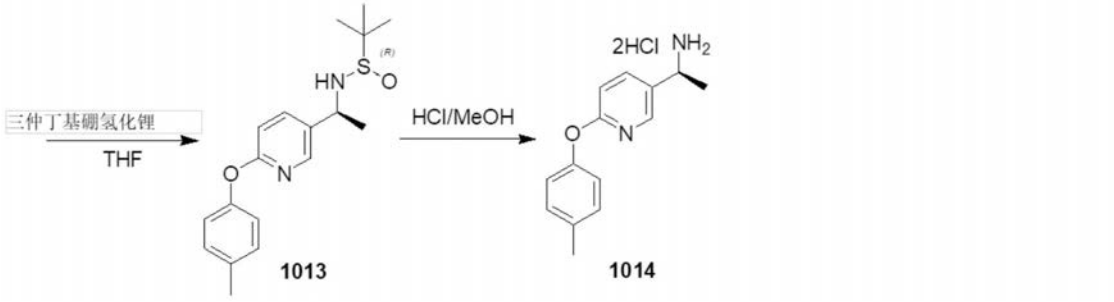
[0157] 步骤3:使无水THF中的化合物1007与三仲丁基硼氢化锂(L-selectride)反应,得到化合物1008。

[0158] 步骤4:使MeOH中的化合物1008与HCl/MeOH反应,得到化合物1009。

[0159] 方案3:式(Ia)的中间体的合成



[0160]



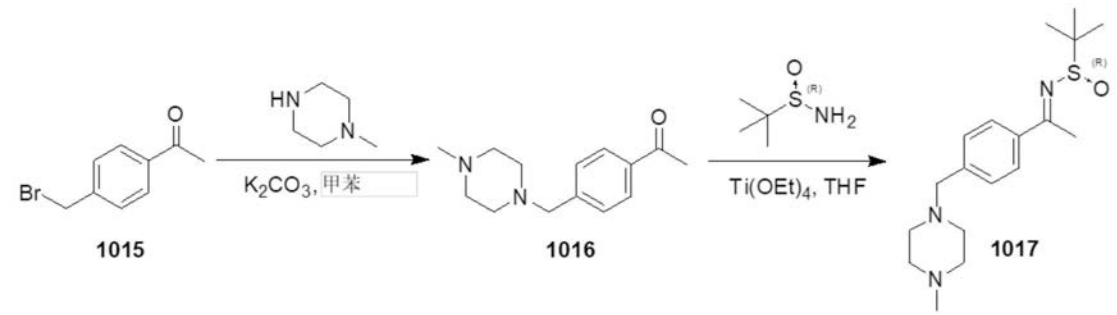
[0161] 步骤1:使甲苯中的化合物1010与对-甲酚、CuI和Cs_2CO_3反应,得到化合物1011。

[0162] 步骤2:在存在$Ti(OEt)_4$的条件下使THF中的化合物1011与(R)-(+)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺反应,得到化合物1012。

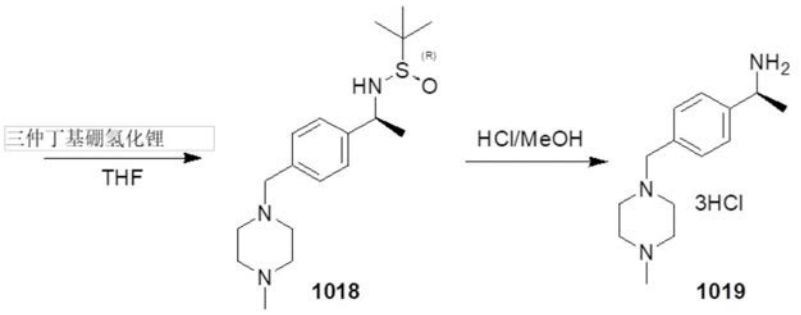
[0163] 步骤3:使无水THF中的化合物1012与三仲丁基硼氢化锂反应,得到化合物1013。

[0164] 步骤4:使MeOH中的化合物1013与HCl/MeOH反应,得到化合物1014。

[0165] 方案4:式(Ia)的中间体的合成



[0166]



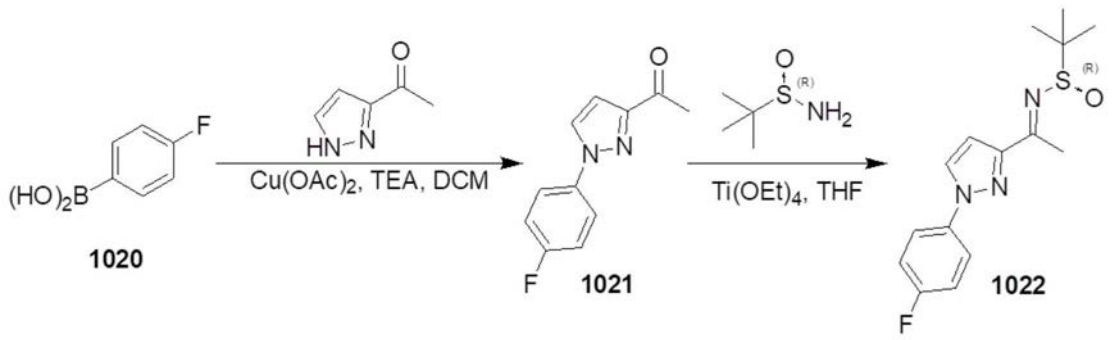
[0167] 步骤1:使甲苯中的化合物1015与1-甲基哌嗪和K_2CO_3反应,得到化合物1016。

[0168] 步骤2:在存在$Ti(OEt)_4$的条件下使THF中的化合物1016与(R)-(+)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺反应,得到化合物1017。

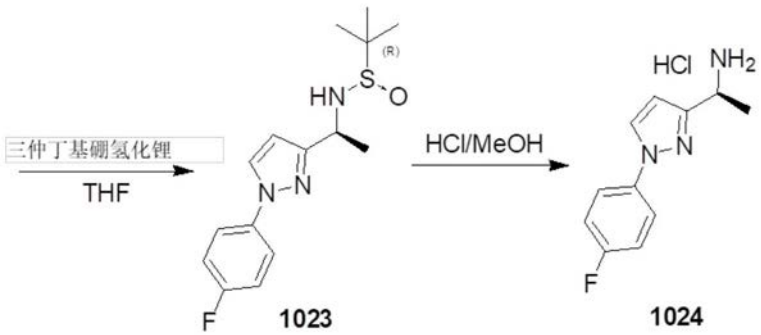
[0169] 步骤3:使无水THF中的化合物1017与三仲丁基硼氢化锂反应,得到化合物1018。

[0170] 步骤4:使MeOH中的化合物1018与HCl/MeOH反应,得到化合物1019。

[0171] 方案5:式(Ia)的中间体的合成



[0172]



[0173] 步骤1:使DCM中的化合物1020与(4-氟苯基)硼酸、$Cu(OAc)_2$和TEA反应,得到化合物1021。

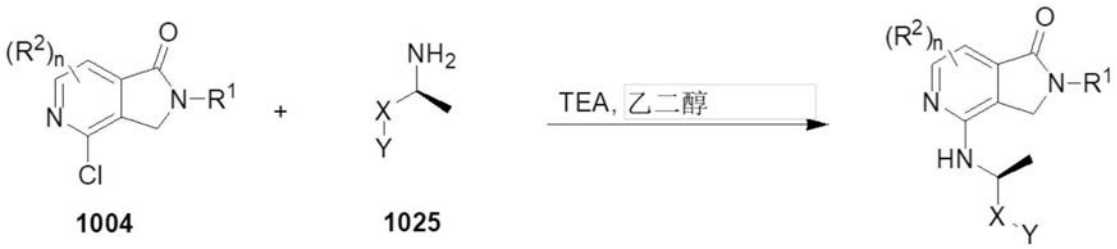
[0174] 步骤2:在存在$Ti(OEt)_4$的条件下使THF中的化合物1021与(R)-(+)-2-甲基-2-丙

烷亚磺酰胺反应，得到化合物1022。

[0175] 步骤3：使无水THF中的化合物1022与三仲丁基硼氢化锂反应，得到化合物1023。

[0176] 步骤4：使MeOH中的化合物1023与HCl/MeOH反应，得到化合物1024。

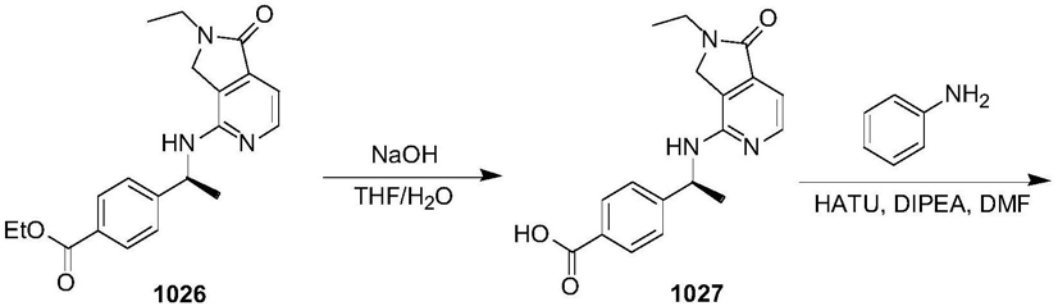
[0177] 方案6：式(Ia)化合物的合成

[0178] 

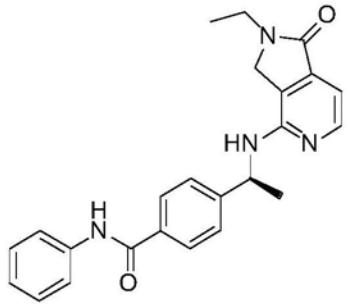
1004 1025

[0179] 使乙二醇中的化合物1004与化合物1025和TEA反应，得到目标化合物，其中 R^1、R^2、X和Y的定义如上所述。

[0180] 方案7：式(Ia)化合物的合成

[0181] 

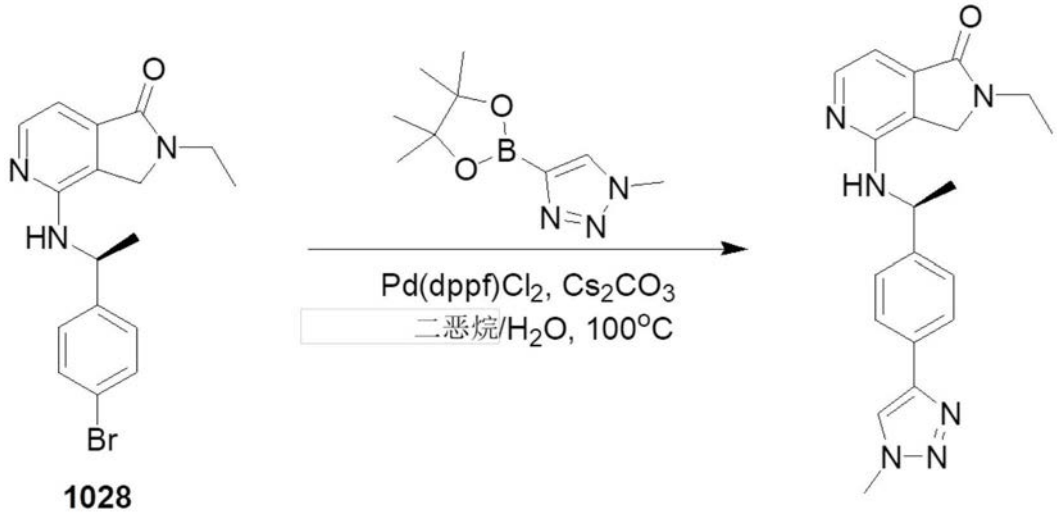
1026 1027



[0182] 步骤1：使THF中的化合物1026与水中的NaOH反应，得到化合物1027。

[0183] 步骤2：使DMF中的化合物1027与苯胺、DIPEA和HATU反应，得到目标化合物。

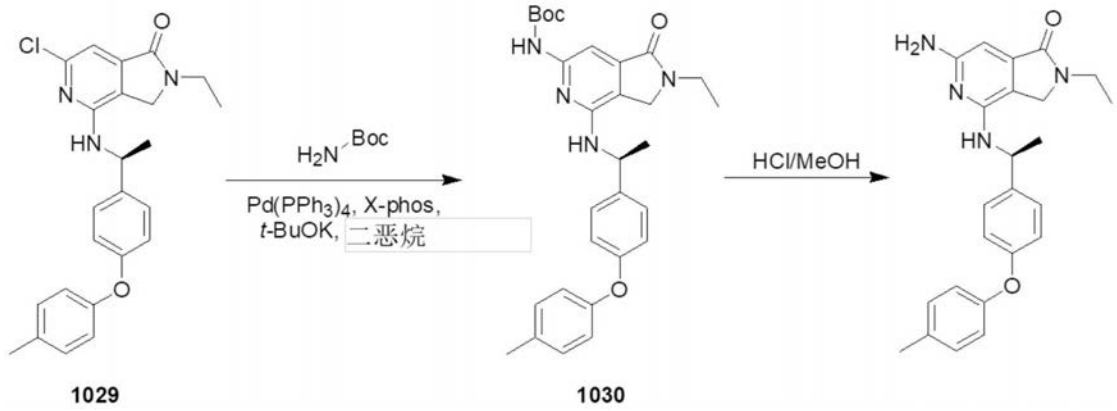
[0184] 方案8：式(Ia)化合物的合成

[0185] 

1028

[0186] 使二恶烷/H_2O中的化合物1028与水中的1-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1H-1,2,3-三唑、Cs_2CO_3和Pd(dppf)Cl_2反应,得到目标化合物。

[0187] 方案9:式(Ia)化合物的合成

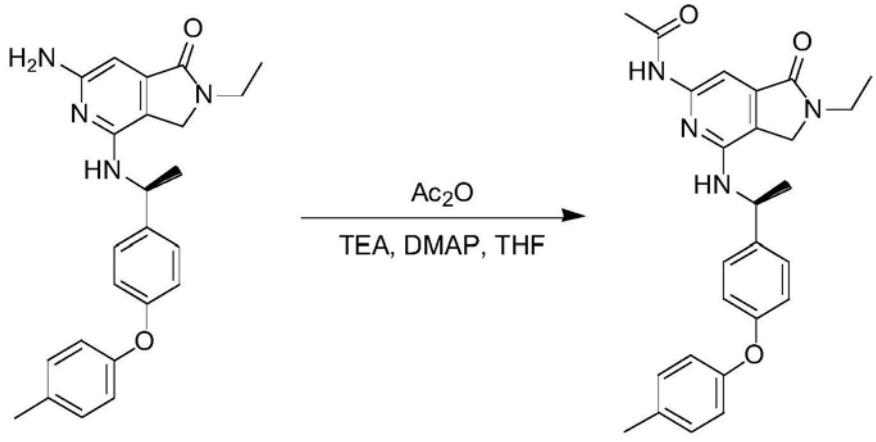
[0188] 

1029 1030

[0189] 步骤1:使二恶烷中的化合物1029与氨基甲酸叔丁酯、t-BuOK、Pd$(PPh_3)_4$和X-phos反应,得到化合物1030。

[0190] 步骤2:使MeOH中的化合物1030与HCl/MeOH反应,得到目标化合物。

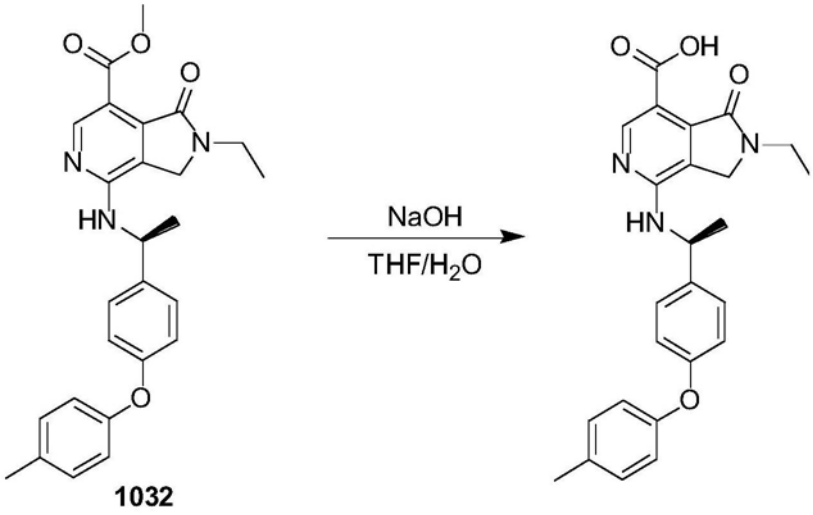
[0191] 方案10:式(Ia)化合物的合成

[0192] 

1031

[0193] 使THF中的化合物1031与Ac_2O、TEA和DMAP反应,得到目标化合物。

[0194] 方案11:式(Ia)化合物的合成

[0195] 

[0196] 使THF中的化合物1032与水中的NaOH反应，得到目标化合物。

[0197] 药物组合物

[0198] 本公开提供了药物组合物，所述药物组合物包含至少一种本文公开的化合物。在一些实施方案中，所述药物组合物包含超过一种本文公开的化合物。在一些实施方案中，所述药物组合物包含一种或多种本文公开的化合物，以及药学上可接受的运载体。

[0199] 所述药学上可接受的运载体是本领域的常规药物运载体，其可以以药学领域熟知的方式制得。在一些实施方案中，本文公开的化合物可以与药学上可接受的运载体混合以用于制备药物组合物。

[0200] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指这样的化合物、材料、组合物和/或剂型：其在合理的医学判断范围内适合用于与人和动物的组织接触而无过多毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。在一些实施方案中，药学上可接受的化合物、材料、组合物和/或剂型是指用于动物(更特别地，用于人) 的由管理机构(例如美国食品和药物管理局、中国食品药品管理局或欧洲药品管理局) 批准的或通常在公认的药典(例如美国药典、中国药典或欧洲药典)中列出的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0201] 本文使用的术语“药学上可接受的运载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料，其涉及将本文提供的化合物从一个位置、体液、组织、器官(内部或外部)或身体的一部分携带或运输至另一个位置、体液、组织、器官或身体的一部分。药学上可接受的运载体可以是媒介物、稀释剂、赋形剂或可用于接触动物的组织而无过多毒性或副作用的其他材料。示例性的药学上可接受的运载体包括糖、淀粉、纤维素、麦芽、黄蓍胶、明胶、林格氏溶液、海藻酸、等渗盐水、缓冲剂等。可用于本公开的药学上可接受的运载体包括本领域通常已知的运载体，例如在“Remington Pharmaceutical Sciences”Mack Pub.Co., New Jersey(1991)中公开的运载体，该文章通过引入并入本文。

[0202] 可用作药学上可接受的运载体的材料的一些实例包括：(1)糖，如乳糖，葡萄糖和蔗糖；(2)淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3)纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠，乙基纤维素和醋酸纤维素；(4)粉末状黄蓍胶；(5)麦芽；(6)明胶；(7)滑石粉；(8)赋形剂，如可可脂和栓剂蜡；(9)油，如花生油，棉籽油，红花油，芝麻油，橄榄油，玉米油和豆油；(10)二醇，如丙二醇；(11)多元醇类，如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇；(12)酯，如油酸乙酯和月

桂酸乙酯;(13) 琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17) 等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)醇,如乙醇和丙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)药物制剂中使用的其他无毒相容物质,如丙酮。

[0203] 所述药物组合物可以含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。

[0204] 药物组合物的形式取决于许多标准,包括,但不限于,施用途径、疾病程度或施用剂量。

[0205] 所述药物组合物可以被配制成用于口服施用、鼻腔施用、直肠施用、经皮施用、静脉内施用或肌肉内施用。根据所需的施用途径,可以将所述药物组合物配制成以下形式:片剂、胶囊、丸剂、糖锭、粉末、颗粒、小袋剂、扁囊剂、锭剂、悬浮液、乳剂、溶液、糖浆、气溶胶(固体的形式或者在液体介质中)、喷雾、软膏、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶、贴片、吸入剂或栓剂。

[0206] 通过采用本领域已知的方法,可以将所述药物组合物配制成使得在施用给患者后能快速、持续或延迟释放活性成分。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制成持续释放形式。本文使用的术语“持续释放形式”是指从药物组合物中释放出活性剂,使得其能够在延长的时间段内(延长释放)或者在某个位点(控制释放)在受试者中(主要在所述受试者的胃肠道中)被生物吸收。在一些实施方案中,所述延长的时间段可以是约1小时至24小时、2小时至12小时、3小时至8小时、4小时至6小时、1至 2天或更长。在某些实施方案中,所述延长的时间段为至少约4小时,至少约8小时,至少约12小时或至少约24小时。所述药物组合物可以配制成片剂的形式。例如,活性剂的释放速率不仅可以通过所述活性剂在胃肠液中的溶解并且随后以不依赖于pH 的方式从片剂或药丸中扩散出来来进行控制,而且还会受所述片剂的崩解和侵蚀的物理过程的影响。在一些实施方案中,在以下文献中中所公开的聚合物材料可用于持续释放:“Medical Applications of Controlled Release,”Langer和Wise(编辑),CRC出版社,Boca Raton,Florida(1974);“Controlled Drug Bioavailability,”Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball(编辑),Wiley,New York(1984);Ranger 和Peppas,1983,J Macromol.Sci.Rev.Macromol Chem.23:61;还有Levy等人,1985, Science 228:190;During等人,1989,Ann.Neurol.25:351;Howard等人,1989,J. Neurosurg.71:105。以上参考文献通过引用整体并入本文。

[0207] 在某些实施方案中,所述药物组合物包含约0.01mg至约1000mg的本文所提供的化合物(例如,约0.01mg至约10mg、约0.1mg至约10mg、约1mg至约10mg、约5mg至约10mg、约5mg至约20mg、约5mg至约30mg、约5mg至约40mg、约5mg至约50mg、约10mg至约100mg、约20mg至约100mg、约30mg至约100 mg、约40mg至约100mg、约50mg至约100mg、约50mg至约200mg、约50mg至约300mg、约50mg至约400mg、约50mg至约500mg、约100mg至约200mg、约100mg至约300mg、约100mg至约400mg、约100mg至约500mg、约200mg 至约500mg、约300mg至约500mg、约400mg至约500mg、约500mg至约1000mg、约600mg至约1000mg、约700mg至约1000mg、约800mg至约1000mg、或者约 900mg至约1000mg)。每位受试者每天的合适剂量可以是约5mg至约500mg,优选地,约5mg至约50mg,约50mg至约100mg,或者约50mg至约500mg。

[0208] 在某些实施方案中,可以将所述药物组合物配制成单位剂型,每剂含有以下量的本文公开的化合物:约0.01mg至约10mg、约0.1mg至约10mg、约1mg至约10mg、约5mg至约10mg、约5mg至约20mg、约5mg至约30mg、约5mg至约40mg、约5mg至约50mg、约10mg至约100mg、

约20mg至约100mg、约30mg至约100 mg、约40mg至约100mg、约50mg至约100mg、约50mg至约200mg、约50mg 至约300mg、约50mg至约400mg、约50mg至约500mg、约100mg至约200mg、约100mg至约300mg、约100mg至约400mg、约100mg至约500mg、约200mg至约500mg、约300mg至约500mg、约400mg至约500mg、约500mg至约1000mg、约600mg至约1000mg、约700mg至约1000mg、约800mg至约1000mg、或约900 mg至约1000mg。术语“单位剂型”是指物理上离散的单位，其适合用作用于人受试者和其他哺乳动物的单位剂量，每个单位含有预定量的活性物质，所述预定量经过计算能与合适的药物运载体一起产生所需的治疗效果。

[0209] 在一些实施方案中，所述药物组合物包含一种或多种本文公开的化合物作为第一活性成分，并且还包含第二活性成分。所述第二活性成分可以是本领域已知的任何抗癌剂。用于治疗癌症或肿瘤的抗癌剂的代表性实例可以包括，但不限于，细胞信号转导抑制剂(例如，伊马替尼、吉非替尼、硼替佐米、厄洛替尼、索拉非尼、舒尼替尼、达沙替尼、伏立诺他、拉帕替尼、替西罗莫司、尼罗替尼、依维莫司、帕唑帕尼、曲妥珠单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、雷珠单抗、培加他尼、帕尼单抗等)，有丝分裂抑制剂(例如紫杉醇、长春新碱、长春碱等)，烷化剂(例如顺铂、环磷酰胺、色氨酸、卡莫司汀等)，抗代谢物(例如，甲氨蝶呤、5-FU等)，嵌入(intercalating) 抗癌剂(例如，放线菌素、蒽环霉素、博来霉素、丝裂霉素-C等)，拓扑异构酶抑制剂(例如，伊立替康、托泊替康、替尼泊苷等)，免疫治疗剂(例如，白细胞介素、干扰素等)和抗激素剂(例如他莫昔芬、雷洛昔芬等)。在一些实施方案中，所述第二活性剂是以下中的一种或多种：依鲁替尼、维奈妥拉(Venetoclax)、甲磺酸伊马替尼、盐酸尼洛替尼、博苏替尼、达沙替尼、依托泊苷、磷酸氟达拉滨、帕纳替尼、硫酸长春新碱、甲氨蝶呤、环磷酰胺、洛莫司汀、替尼泊苷、替莫唑胺、福莫司汀、卡莫司汀、贝伐单抗、Picibanil、氟尿嘧、美法仑(Melphalan)、盐酸吉西他滨。

[0210] 治疗方法

[0211] 本公开提供了一种治疗与IDH相关的疾病的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的一种或多种化合物、其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或立体异构体，或者本文公开的药物组合物。

[0212] 在一些实施方案中，所述一种或多种化合物、其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或立体异构体，或者本文公开的药物组合物，经由肠胃外途径或非肠胃外途径进行施用。在一些实施方案中，所述一种或多种化合物、其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或立体异构体，或者所述药物组合物，通过以下方式进行施用：口服施用、经口施用、口腔施用、经鼻施用、鼻内施用、经粘膜施用、表皮施用、透皮施用、皮肤施用、眼部施用、肺部施用、舌下施用、直肠施用、阴道施用、局部施用、皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、动脉内施用、鞘内施用、囊内施用、腹膜内施用、心内施用、皮内施用、腹膜内施用、经气管内施用、表皮下施用、关节内施用、囊下施用、蛛网膜下施用、脊柱内或胸骨内施用。

[0213] 本文提供的化合物可以以纯的形式施用，与其他活性成分组合施用或以本公开的药物组合物的形式施用。在一些实施方案中，本文提供的化合物可以同时或依次与本领域已知的一种或多种抗癌剂组合施用于有需要的受试者。在一些实施方案中，所述施用以每天一次、一天两次、一天三次、或每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次进行。

[0214] 在某些实施方案中，本公开提供了所述化合物、其药学上可接受的盐、水合物、溶

剂化物或立体异构体，或者本公开的药物组合物在制备用于治疗与α-KG转化为 D-2-HG相关的疾病的药物中的用途。在某些实施方案中，本公开提供了所述化合物、其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或立体异构体，或者本公开的药物组合物在制备用于治疗与突变体IDH相关的疾病的药物中的用途。

[0215] 在某些实施方案中，与α-KG转化为D-2-HG相关的疾病是与突变体IDH相关的疾病，包括癌症。

[0216] 特别地，所述癌症包括但不限于，白血病、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、软骨肉瘤、胆管癌、骨肉瘤、淋巴瘤、肺癌、腺瘤、骨髓瘤、肝细胞癌、肾上腺皮质癌、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、脑癌、食道癌、骨癌、睾丸癌、皮肤癌、肾癌、间皮瘤、神经母细胞瘤、甲状腺癌、头颈癌、食道癌、眼癌、前列腺癌、鼻咽癌或口腔癌。在一些实施方案中，所述癌症是白血病、胶质母细胞瘤或胆管癌。

[0217] 本公开的化合物及其药物组合物可用于预防或治疗哺乳动物(尤其是人)中与α-KG转化为D-2-HG相关的任何疾病或病症的发作或发展。在一些实施方案中，本公开的化合物及其药物组合物可用于预防或治疗哺乳动物(尤其是人)中与突变体 IDH相关的任何疾病或病症的发作或发展。

[0218] 在这种情况下，本发明还提供了一种筛选适合用本公开的化合物或药物组合物单独地或与其他成分(例如第二活性成分，如抗癌剂)组合治疗的患者的方法。所述方法包括对来自患者的肿瘤样品进行测序并检测所述患者中D-2-HG的积累或检测所述患者中IDH的突变状态。

实施例

[0219] 下面进一步解释了本公开的一般方法。可以通过本领域已知的方法制备本公开的化合物。以下说明了本公开的优选的化合物的详细制备方法。然而，它们决不限制本公开化合物的制备方法。

[0220] 合成实施例

[0221] 以下实施例所示的化合物的结构通过核磁共振(NMR)或/和质谱(ESI)进行表征。NMR的位移(δ)以10^{-6}(ppm)为单位给出。在Varian Mercury VX 400光谱仪上以四甲基硅烷(TMS)作为内标，在二甲基亚砜-d_6(DMSO-d_6)或$CDCl_3$中记录了^{1}H-NMR光谱。

[0222] 使用Agilent 1260-6230 TOF LC-MS质谱仪进行了ESI-HRMS的测量。

[0223] 使用Phenomen C18柱(4.6mm*150mm,0.4μm)在Agilent 1200LC上进行了高效液相色谱(HPLC)的测量。

[0224] 使用烟台黄海的HSGF254硅胶板进行了薄层色谱分析。用于薄层色谱分析(TLC)的硅胶板为0.15mm～0.2mm。用于通过TLC分离和纯化产物的硅胶板为0.4mm～0.5mm。

[0225] 纯化的色谱柱以所述硅胶为运载体(200～300目，烟台黄海公司生产)。

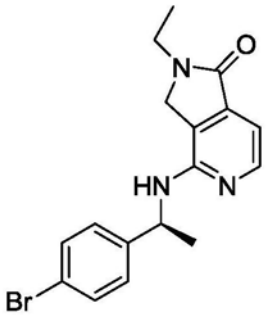
[0226] 本公开的已知起始材料可以通过使用或根据本领域已知的方法合成，或者可以从Alfa Aesar、Langcaster、TCI、Aldrich、Bepharm和Scochem购得。

[0227] 除非另有说明，否则实施例中的反应均在氩气或氮气氛下进行。氩气或氮气氛是指反应烧瓶与体积约为1L的氩气或氮气球连接。氢化通常在真空下进行，充满氢气，并重复三次。除非另有说明，否则实施例中的反应温度为环境温度，即20℃～30℃。

[0228] 通过TLC监测实施例中所示的反应进程。用于所述反应的洗脱液系统包括二氯甲烷-甲醇系统和石油醚-乙酸乙酯系统。根据化合物的不同极性调节溶剂的体积比。

[0229] 用于纯化化合物的柱色谱洗脱系统以及TLC的洗脱系统包括二氯甲烷-甲醇系统和石油醚-乙酸乙酯系统。根据化合物的不同极性调节溶剂的体积比。可加入少量碱性或酸性试剂如三乙胺和乙酸用于调节。

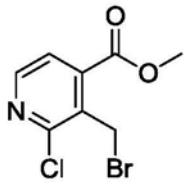
[0230] 合成实施例1

[0231] 

(S)-4-(-(4-溴苯基)乙基氨基)-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0232] 根据方案1和6制得了本公开的化合物1。

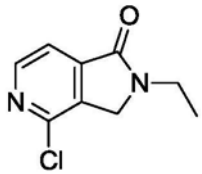
[0233] 步骤1

[0234] 

3-(溴甲基)-2-氯异烟酸甲酯

[0235] 向2-氯-3-甲基异烟酸甲酯(6.00g,32.32mmol)的CCl_4(30mL)溶液中加入 NBS(6.06g,33.94mmol)和BPO(780mg,3.23mmol)。加完后,将反应混合物加热回流3小时。TLC表明原料已经耗尽。然后,将其冷却至环境温度,过滤除去所得沉淀,用CCl_4(5mL)洗涤。将滤液真空浓缩,得到粗产物3-(溴甲基)-2-氯异烟酸甲酯,为黄色油状物,其不经进一步纯化用于下一步骤。

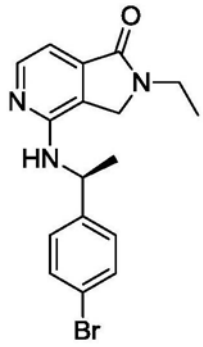
[0236] 步骤2

[0237] 

4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0238] 将上述粗产物溶于THF(50mL)中。将乙胺盐酸盐(2.64g,32.32mmol)和 Cs_2CO_3(42.12g,129.28mmol)加入到反应混合物中。将其在环境温度下搅拌12h。TLC表明原料已经耗尽。过滤除去固体,用乙酸乙酯(10mL)洗涤,并将滤液真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯=2:1进行洗脱),得到所需产物,为浅黄色固体(2.31g,两步中的产率为36.2%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$) δ8.51(d,J=4.8Hz,1H),7.64(d,J=4.8Hz,1H),4.40(s,2H),3.67(q,J=7.2Hz, 2H),1.28(t,J=7.2Hz,3H)。

[0239] 步骤3

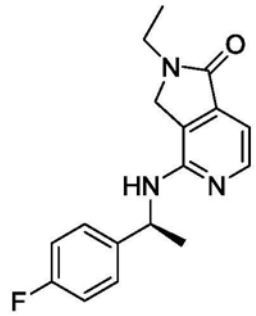
[0240] 

(*S*)-4-((1-(4-溴苯基)乙基)氨基)-2-乙基-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0241] 向4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮(150mg,0.76mmol)的乙二醇(15mL)溶液中加入(S)-1-(4-溴苯基)乙胺(229mg,1.14mmol)和TEA(232mg,2.29mmol)。将反应混合物加热至150℃并搅拌5h。将其冷却至环境温度并用30mL 的水稀释,用乙酸乙酯(25mL x 2)萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过制备型TLC(DCM:MeOH=20:1)纯化粗产物,得到所需产物,为白色固体(80mg,产率为29.1%)。

[0242] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.13(d,J=5.1Hz,1H),7.30(d,J=7.5Hz,2H), 7.04(d,J=7.5Hz,2H),6.84(d,J=5.1Hz,1H),5.24(br,1H),4.72-4.52(m,1H), 4.21(s,2H),3.40(q,J=7.1Hz,2H),2.05(s,3H),1.54(d,J=6.6Hz,3H),1.14 (t,J=7.1Hz,3H).ESI-MS m/z 360.1[M+H]。

[0243] 合成实施例2

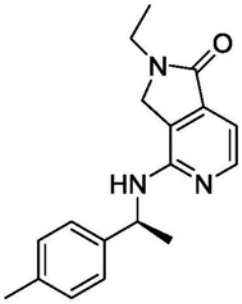
[0244] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-氟苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0245] 根据方案1和6制得了本公开的化合物2。合成的方法与合成实施例1类似,不同之处在于用(S)-1-(4-氟苯基)乙胺代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。

[0246] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.14(d,J=5.4Hz,1H),7.42-7.31(m,2H), 7.27-7.09(m,2H),6.99(d,J=5.4Hz,1H),5.28(br,1H),4.61-4.41(m,1H),4.15 (s,2H),3.51(q,J=7.2Hz,2H),2.35(s,3H),1.58(d,J=6.7Hz,3H),1.12(t, J=7.2Hz,3H).ESI-MS m/z 300.1[M+H]。

[0247] 合成实施例3

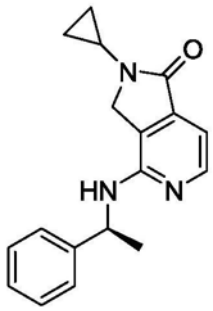
[0248] 

(S)-2-乙基-4-(1-对-甲苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0249] 根据方案1和6制得了本公开的化合物3。合成的方法与合成实施例1类似，不同之处在于用(S)-1-(4-甲基苯基)乙胺代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。

[0250] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.14(d,J＝5.2Hz,1H),7.22(d,J＝7.8Hz,2H), 7.07(d,J＝7.8Hz,2H),6.94(d,J＝5.2Hz,1H),5.27(br,1H),4.69-4.42(m,1H), 4.12(s,2H),3.56(q,J＝7.4Hz,2H),2.25(s,3H),1.52(d,J＝6.7Hz,3H),1.16 (t,J＝7.4Hz,3H).ESI-MS m/z 296.2[M+H]。

[0251] 合成实施例4

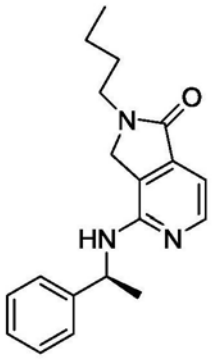
[0252] 

(S)-2-环丙基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0253] 根据方案1和6制得了本公开的化合物4。合成的方法与合成实施例1类似，不同之处在于用环丙胺盐酸盐代替了乙醇胺盐酸盐，用(S)-1-苯基乙胺代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。

[0254] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.12(d,J＝5.2Hz,1H),7.31(d,J＝7.5Hz,2H), 7.24(t,J＝7.5Hz,2H),7.20-7.13(m,1H),6.91(d,J＝5.1Hz,1H),5.30(p,J＝ 7.0Hz,1H),4.54(d,J＝7.5Hz,1H),4.07(s,2H),2.81(h,J＝4.7,3.6Hz,1H),1.52 (d,J＝6.7Hz,3H),0.88-0.69(m,4H).ESI-MS m/z 294.2[M+H]。

[0255] 合成实施例5

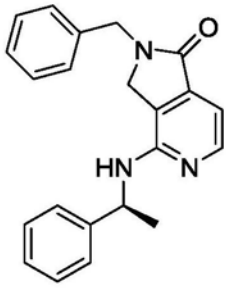
[0256] 

(S)-2-丁基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0257] 根据方案1和6制得了本公开的化合物5。合成的方法与合成实施例1类似，不同之处在于用正丁胺盐酸盐代替了乙醇胺盐酸盐，用(S)-1-苯基乙胺代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。

[0258] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.14(d,J＝5.2Hz,1H),7.37(d,J＝7.6Hz,2H), 7.22(t,J＝7.5Hz,2H),7.12(d,J＝7.0Hz,1H),6.95(d,J＝5.2Hz,1H),5.41-5.22 (m,1H),4.07(s,2H),3.62(t,J＝7.4Hz,2H),1.61-1.68(m,2H),1.35-1.42(m, 2H),0.95(t,J＝7.4Hz,3H).ESI-MS m/z 310.2[M+H]。

[0259] 合成实施例6

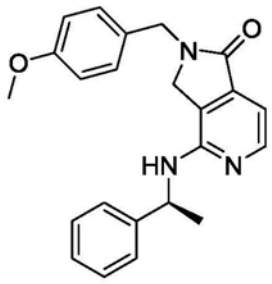
[0260] 

(S)-2-苄基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0261] 根据方案1和6制得了本公开的化合物6。合成的方法与合成实施例1类似，不同之处在于用苄胺代替了乙醇胺盐酸盐，用(S)-1-苯基乙胺代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。

[0262] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.14(d,J＝5.2Hz,1H),7.37-7.11(m,10H), 7.09-6.94(m,1H),5.23(q,J＝7.1Hz,1H),4.69(d,J＝2.7Hz,2H),4.09(s,2H), 1.53(s,3H).ESI-MS m/z 344.2[M+H]。

[0263] 合成实施例7

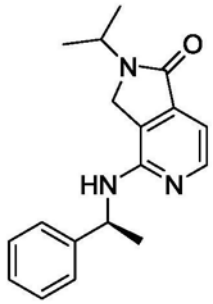
[0264] 

(S)-2-(4-甲氧基苄基)-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0265] 根据方案1和6制得了本公开的化合物7。合成的方法与合成实施例1类似，不同之处在于用4-甲氧基苄胺代替了乙醇胺盐酸盐，用(S)-1-苯基乙胺代替了(S)-1-(4- 溴苯基)乙胺。

[0266] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.14(d,J＝5.1Hz,1H),7.31-7.15(m,5H),7.14 -7.08(m,2H),7.01-6.95(m,1H),6.82-6.74(m,2H),5.26(p,J＝6.9Hz,1H), 4.61(d,J＝2.5Hz,2H),4.17(s,2H),3.95(s,2H),3.71(d,J＝1.9Hz,3H),1.49 (d,J＝6.6Hz,3H).ESI-MS m/z 374.2[M+H]。

[0267] 合成实施例8

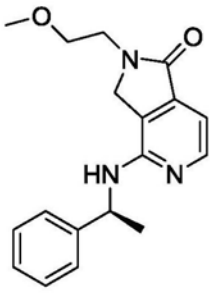
[0268] 

(S)-2-异丙基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0269] 根据方案1和6制得了本公开的化合物8。合成的方法与合成实施例1类似，不同之处在于用异丙胺代替了乙醇胺盐酸盐，用(S)-1-苯基乙胺代替了(S)-1-(4-溴苯基) 乙胺。

[0270] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.13(d,J＝5.7Hz,1H),7.34(d,J＝7.6Hz,2H), 7.26(t,J＝7.5Hz,2H),7.18(d,J＝7.0Hz,1H),6.94(d,J＝5.1Hz,1H),5.32(p, J＝7.2Hz,1H),4.68-4.49(m,2H),4.07(s,2H),1.54(d,J＝6.8Hz,3H),1.18(d, J＝6.7Hz,6H).ESI-MS m/z 296.2[M+H]。

[0271] 合成实施例9

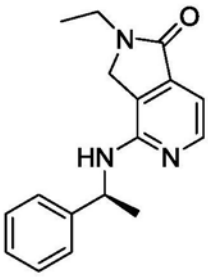
[0272] 

(S)-2-(2-甲氧基乙基)-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0273] 根据方案1和6制得了本公开的化合物9。合成的方法与合成实施例1类似，不同之处在于用2-甲氧基乙胺代替了乙醇胺盐酸盐，用(S)-1-苯基乙胺代替了(S)-1-(4- 溴苯基)乙胺。

[0274] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.15(d,J＝5.2Hz,1H),7.33(d,J＝7.7Hz,2H), 7.26(d,J＝6.8Hz,2H),7.23-7.13(m,1H),6.96(d,J＝5.2Hz,1H),5.32(p,J＝ 7.1Hz,1H),4.38(d,J＝7.4Hz,1H),4.27(s,2H),3.70(t,J＝5.1Hz,2H),3.53 (t,J＝5.0Hz,2H),3.27(s,3H),1.54(d,J＝6.7Hz,3H).ESI-MS m/z 312.2[M+H]。

[0275] 合成实施例10

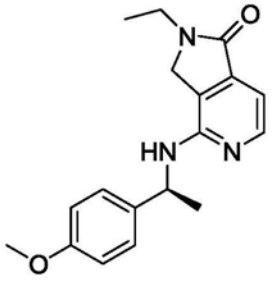
[0276] 

(S)-2-乙基-4-(1-苯基乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0277] 根据方案1和6制得了本公开的化合物10。合成的方法与合成实施例1类似,不同之处在于用(S)-1-苯基乙胺代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。

[0278] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.15(d,J=5.1Hz,1H),7.32(t,J=8.8Hz,2H), 7.30(s,2H),7.19(t,J=6.9Hz,2H),6.96(d,J=5.1Hz,1H),5.32(p,J=6.6Hz, 1H),4.46(s,1H),4.13(d,J=3.0Hz,2H),3.57(q,J=7.1Hz,2H),1.54(d,J=6.7 Hz,3H),1.17(t,J=7.1Hz,3H).ESI-MS m/z 282.2[M+H]。

[0279] 合成实施例11

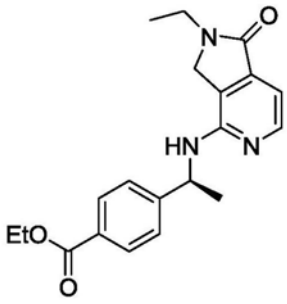
[0280] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-甲氧基苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0281] 根据方案1和6制得了本公开的化合物11。合成的方法与合成实施例1类似,不同之处在于用(S)-1-(4-甲氧基苯基)乙胺代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。

[0282] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.22(d,J=5.1Hz,1H),7.32(d,J=8.6Hz,2H), 7.02(d,J=5.2Hz,1H),6.87(d,J=8.6Hz,2H),5.33(p,J=6.9Hz,1H),4.49(s, 1H),4.18(s,2H),3.79(s,3H),3.64(q,J=7.3Hz,2H),1.59(d,J=6.8Hz,3H), 1.29-1.23(m,3H).ESI-MS m/z 312.2[M+H]。

[0283] 合成实施例12

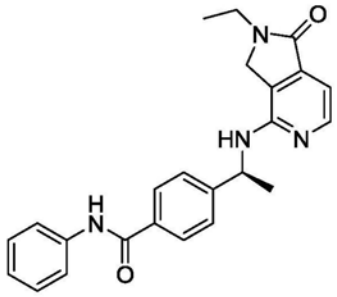
[0284] 

(S)-4-(1-(2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-4-基氨基)乙基)苯甲酸乙酯

[0285] 根据方案1和6制得了本公开的化合物12。合成的方法与合成实施例1类似,不同之处在于用(S)-4-((1-氨基)乙基)苯甲酸乙酯代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。

[0286] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.16(d,J＝5.1Hz,1H),8.00(dd,J＝16.5,8.2Hz, 2H),7.43(t,J＝9.1Hz,2H),7.01(d,J＝5.1Hz,1H),5.41(p,J＝6.6Hz,1H),4.70 (d,J＝5.7Hz,1H),4.34(q,J＝7.1Hz,2H),4.24(d,J＝5.2Hz,2H),3.63(q,J＝ 7.2Hz,2H),1.58(t,J＝7.6Hz,3H),1.36(t,J＝7.1Hz,3H),1.24(t,J＝7.2Hz,3H). ESI-MS m/z 354.2[M+H]。

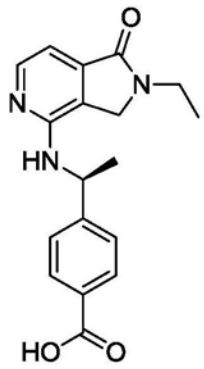
[0287] 合成实施例13

[0288] 

(S)-4-(1-(2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-4-基氨基)乙基)-N-苯基苯甲酰胺

[0289] 从化合物12开始,根据方案7制得了本公开的化合物13。

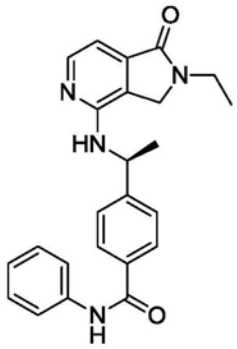
[0290] 步骤1

[0291] 

[0292] (*S*)-4-(1-((2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-4-基)氨基)乙基)苯甲酸

[0293] 向化合物12(500mg,1.41mmol)的THF溶液(10mL)中加入NaOH(141mg, 3.54mmol)的水溶液(5mL)。将反应混合物在环境温度下搅拌5h。TLC表明反应完成。浓缩混合物以除去大部分THF,用水(10mL)稀释,并通过加入2N的HCl 溶液酸化至pH 7。过滤收集所得的沉淀物,用水(5mL)洗涤并在75℃下真空干燥,得到所需产物,为白色固体(330mg,产率为71.7%)。

[0294] 步骤2

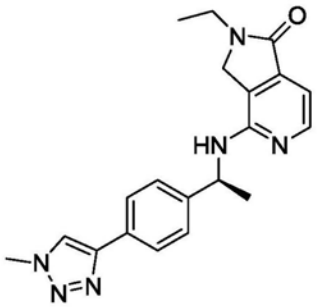
[0295] 

(*S*)-4-(1-((2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-4-基)氨基)乙基)-*N*-苯基苯甲酰胺

[0296] 向(S)-4-(1-((2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-4-基)氨基)乙基)苯甲酸(320mg,0.98mmol)的DMF溶液(10mL)中加入苯胺(110mg,1.18mmol)，DIPEA(254mg,1.97mmol)和HATU(559mg,1.47mmol)。加完后,将其在环境温度下搅拌10h。TLC表明反应完成。通过真空浓缩除去溶剂,并将残余物溶于乙酸乙酯(20mL)中,用水(15mL x 2)和盐水(15mL)洗涤。浓缩分离得到的有机层,并通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用DCM:MeOH=30:1洗脱),得到所需产物,为白色固体(120mg,产率为30.5%)。

[0297] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.18(d,J=5.1Hz,1H),7.92(s,1H),7.81(d, J=8.2Hz,2H),7.63(d,J=7.8Hz,2H),7.48(d,J=8.2Hz,2H),7.36(t,J=7.9Hz, 2H),7.14(t,J=7.4Hz,1H),7.03(d,J=5.2Hz,1H),5.49-5.37(m,1H),4.63 (d,J=6.3Hz,1H),4.25(d,J=2.6Hz,2H),3.64(q,J=7.2Hz,2H),3.31-3.23 (m,1H),1.61(d,J=6.9Hz,3H),1.25(t,J=7.3Hz,3H).ESI-MS m/z 401.2[M+H]。

[0298] 合成实施例14

[0299] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-(1-甲基-1H-1,2,3-三唑-4-基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

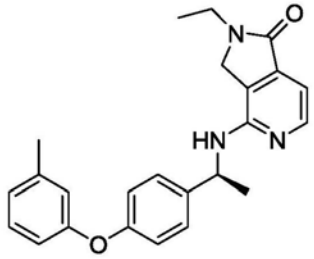
[0300] 从化合物1开始,根据方案8制得了本公开的化合物14。

[0301] 向化合物1(400mg,1.11mmol)的二恶烷/H_2O溶液(15mL+5mL)中加入 1-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷)-2-基)-1H-1,2,3-三唑(348mg, 1.67mmol)、Cs_2CO_3(724mg,2.22mmol)和Pd(dppf)Cl_2(162mg,0.22mmol)。将反应混合物在100℃下搅拌4h。TLC表明反应完成。通过真空浓缩除去溶剂,并将残余物溶于乙酸乙酯(20mL)中,用水(15mL)和盐水(15mL)洗涤。浓缩分离得到的有机层,并通过制备型TLC(DCM:MeOH=20:1)纯化粗产物,得到所需产物,为白色固体(150mg,产率为37.3%)。

[0302] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.20(d,J=5.2Hz,1H),7.77(d,J=8.1Hz,2H), 7.71(s,

1H),7.45(d,J＝8.1Hz,2H),7.03(d,J＝5.2Hz,1H),5.40(p,J＝6.8Hz, 1H),4.66(s,1H),4.23(d,J＝5.7Hz,2H),4.12(d,J＝10.2Hz,3H),3.68-3.59 (m,2H),1.62(d,J＝6.8Hz,3H),1.24(t,J＝7.2Hz,3H).ESI-MS m/z 363.2[M+H]。

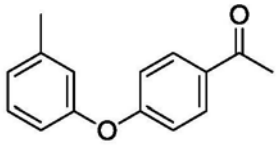
[0303] 合成实施例15

[0304] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-(间甲苯基氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0305] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物15。

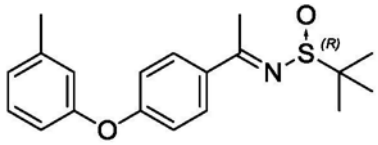
[0306] 步骤1

[0307] 

1-(4-(间-甲苯基氧基)苯基)乙酮

[0308] 向1-(4-羟基苯基)乙酮(3.00g,22.03mmol)的DCM溶液(30mL)中加入间- 甲苯基硼酸(4.50g,33.10mmol)、$Cu(OAc)_2$(8.00g,44.07mmol)和TEA(11.15 g,110.17mmol)。加完后,将混合物在环境温度下搅拌12h。TLC表明耗尽了1-(4- 羟基苯基)乙酮。过滤除去固体,用DCM(10mL)洗涤,并且滤液用水(30mL)洗涤。将分离得到的有机层真空浓缩,并用硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯＝20:1洗脱),得到所需产物,为浅黄色固体(2.00g,产率为40.1%)。

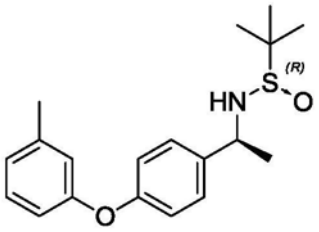
[0309] 步骤2

[0310] 

(R_S)-2-甲基-*N*-(1-(4-(间甲苯基氧基)苯基)亚乙基)丙烷-2-亚磺酰胺

[0311] 向1-(4-(间-甲苯氧基)苯基)乙酮(1.50g,6.63mmol)的THF溶液(20mL)中加入(R)-(+)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺(1.21g,9.94mmol)和$Ti(OEt)_4$(4.54g,19.89 mmol)。将反应混合物加热回流16h。TLC表明原料已经耗尽。将其冷却至环境温度,然后倒入水性的饱和NaCl溶液(50mL)中。过滤除去所得固体,用乙酸乙酯(10 mL)洗涤。用乙酸乙酯(40mL)萃取滤液。将分离的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到粗产物(1.60g,产率为73.3%),其不经进一步纯化用于下一步骤。

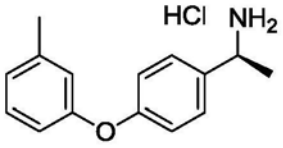
[0312] 步骤3

[0313] 

(R_S)-2-甲基-*N*-((*S*)-1-(4-(间-甲苯基氧基)苯基)乙基)丙烷-2-亚磺酰胺

[0314] 将(R_S)-2-甲基-N-(1-(4-(间-甲苯氧基)苯基)亚乙基)丙烷-2-亚磺酰胺(800mg,2.30 mmol)和无水THF(10mL)的混合物冷却至-50℃,在N_2下搅拌的条件下,在-50℃下将三仲丁基硼氢化锂(1M,4.6ml,4.60mmol)滴加到混合物中。将混合物搅拌 1h,然后温热至环境温度。完成后,将反应用水(50mL)淬灭,用乙酸乙酯(60mL) 萃取。将分离得到的有机层真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯=1:10洗脱),得到所需产物(500mg,产率为62.1%),为黄色固体。

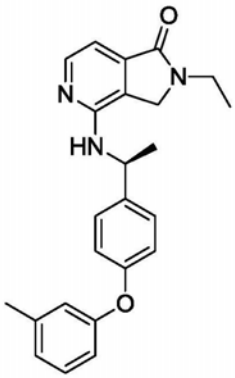
[0315] 步骤4

[0316] 

(*S*)-1-(4-(间-甲苯氧基)苯基)乙胺盐酸盐

[0317] 向(R_S)-2-甲基-N-((S)-1-(4-(间-甲苯氧基)苯基)乙基)丙烷-2-亚磺酰胺(450mg,1.28 mmol)的MeOH溶液(5mL)中加入HCl/MeOH(4M,3.2mL,12.80mmol)。加完后,在环境温度下将其搅拌16h。在真空下除去MeOH。将乙酸乙酯(10mL)加入到残余物中并搅拌30min。在真空下除去乙酸乙酯,然后将MTBE(10mL)加入到残余物中并搅拌1h。过滤收集产物,用MTBE(5mL)洗涤,真空干燥以得到所需产物,为灰白色固体(310mg,产率为86.6%)。

[0318] 步骤5

[0319] 

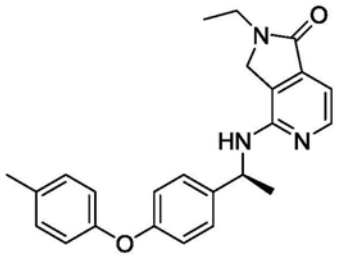
(*S*)-2-乙基-4-((1-(4-(间-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0320] 向在合成实施例1中得到的4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮(120 mg,0.61mmol)的乙二醇溶液(10mL)中加入(S)-1-(4-(间-甲苯氧基)苯基)乙胺盐酸盐(208mg,0.92mmol)和TEA(185mg,1.83mmol)。将反应混合物加热至150℃并搅拌5h。将其冷却至环境温度并用30mL的水稀释,用乙酸乙酯(20mL x 2)萃取。将合并的有机层用硫酸

钠干燥，过滤并浓缩。通过制备型TLC(DCM:MeOH= 20:1)纯化粗产物，得到所需产物，为白色固体(78mg，产率为26.4%)。

[0321] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.23(d,J=5.1Hz,1H),7.36(d,J=8.5Hz,2H), 7.20(t,J=7.8Hz,1H),7.04(d,J=5.2Hz,1H),6.96(d,J=8.6Hz,2H),6.91(d, J=7.6Hz,1H),6.86-6.75(m,2H),5.46-5.31(m,1H),4.49(s,1H),4.21(d,J =2.4Hz,2H),3.65(q,J=7.3Hz,2H),2.32(s,3H),1.61(d,J=6.8Hz,3H),1.25 (t,J=7.3Hz,3H).ESI-MS m/z 388.2[M+H]。

[0322] 合成实施例16

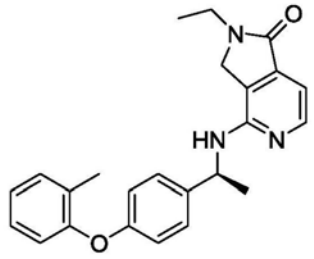
[0323] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0324] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物16。合成的方法与合成实施例15类似，不同之处在于用对-甲苯基硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

[0325] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.23(d,J=5.1Hz,1H),7.34(d,J=8.5Hz,2H), 7.13(d,J=8.2Hz,2H),7.04(d,J=5.2Hz,1H),6.92(dd,J=13.5,8.5Hz,4H),5.37 (p,J=6.6Hz,1H),4.50(s,1H),4.20(d,J=1.6Hz,2H),3.65(q,J=7.3Hz,2H), 2.33(s,3H),1.60(d,J=6.8Hz,3H),1.25(t,J=7.3Hz,3H).ESI-MS m/z 388.2 [M+H]。

[0326] 合成实施例17

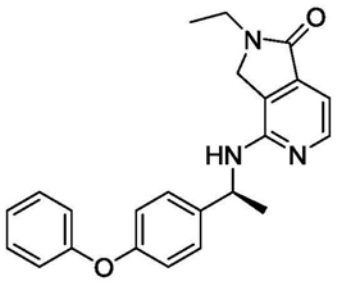
[0327] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-(邻-甲苯基氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0328] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物17。合成的方法与合成实施例15类似，不同之处在于用邻-甲苯基硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

[0329] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.23(d,J=5.2Hz,1H),7.33(d,J=8.6Hz,2H), 7.26(dd,J=8.7,6.1Hz,1H),7.20-7.11(m,2H),7.06(dd,J=12.4,6.1Hz,2H), 6.88(t,J=9.2Hz,2H),5.37(p,J=6.7Hz,1H),4.48(s,1H),4.20(d,J=1.5Hz, 2H),3.65(q,J=7.3Hz,2H),2.36(d,J=6.0Hz,2H),2.23(s,3H),1.59(t,J=9.8 Hz,3H),1.25(t,J=7.3Hz,3H).ESI-MS m/z 388.2[M+H]。

[0330] 合成实施例18

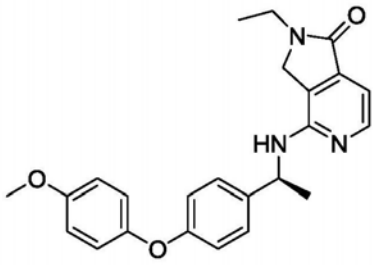
[0331] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-苯氧基苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0332] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物18。合成的方法与合成实施例15类似，不同之处在于用苯硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

[0333] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.23(d,J＝5.1Hz,1H),7.41-7.28(m,4H),7.10 (t,J＝7.4Hz,1H),7.04(d,J＝5.2Hz,1H),6.98(dd,J＝11.8,8.3Hz,4H),5.39 (p,J＝7.0Hz,1H),4.48(s,1H),4.21(s,2H),3.65(q,J＝7.3Hz,2H),1.61(d, J＝6.8Hz,3H),1.25(t,J＝7.2Hz,3H).ESI-MS m/z 374.2[M+H]。

[0334] 合成实施例19

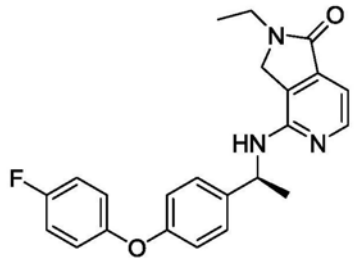
[0335] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0336] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物19。合成的方法与合成实施例15类似，不同之处在于用4-甲氧基苯硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

[0337] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.22(d,J＝5.1Hz,1H),7.32(d,J＝8.6Hz,2H), 7.04(d,J＝5.2Hz,1H),6.96(d,J＝9.0Hz,2H),6.88(dd,J＝11.4,8.8Hz,4H),5.36 (p,J＝6.9Hz,1H),4.49(s,1H),4.19(s,2H),3.80(s,3H),3.65(q,J＝7.2Hz, 2H),1.60(d,J＝6.8Hz,3H),1.25(t,J＝7.2Hz,3H).ESI-MS m/z 404.2[M+H]。

[0338] 合成实施例20

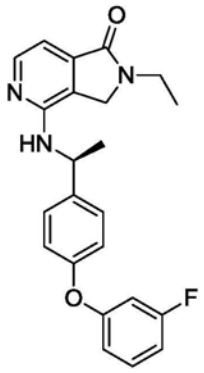
[0339] 

(S)-2-乙基-4-(1-(4-(4-氟苯氧基)苯基)乙基氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0340] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物20。合成的方法与合成实施例15类似，不同之处在于用4-氟苯硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

[0341] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.23(d,J＝5.1Hz,1H),7.35(d,J＝8.5Hz,2H), 7.08-6.89(m,7H),5.43-5.33(m,1H),4.41(s,1H),4.20(s,2H),3.66(q,J＝7.2Hz,2H),1.60(d,J＝6.8Hz,3H),1.26(t,J＝7.3Hz,3H).ESI-MS m/z 392.2 [M+H]。

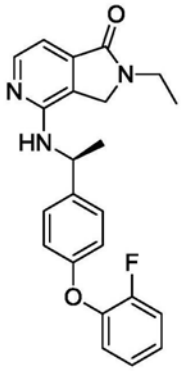
[0342] 合成实施例21

[0343] 

(*S*)-2-乙基-4-((1-(4-(3-氟苯氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0344] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物21。化合物21的合成和表征方法与合成实施例15类似,不同之处在于用3-氟苯硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

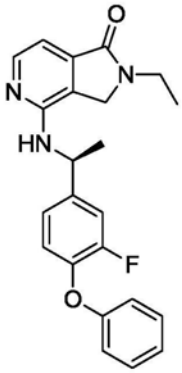
[0345] 合成实施例22

[0346] 

(*S*)-2-乙基-4-((1-(4-(2-氟苯氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0347] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物22。化合物22的合成和表征方法与合成实施例15类似,不同之处在于用2-氟苯硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

[0348] 合成实施例23

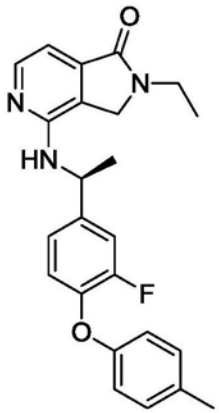
[0349] 

(*S*)-2-乙基-4-((1-(3-氟-4-苯氧基苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0350] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物23。化合物23的合成和表征方法与合成实

施例15类似，不同之处在于用1-(3-氟-4-羟基苯基)乙酮代替了1-(4-羟基苯基)乙酮，用苯硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

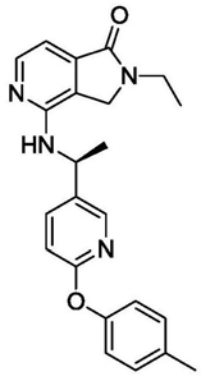
[0351] 合成实施例24

[0352] 

[0353] (*S*)-2-乙基-4-((1-(3-氟-4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0354] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物24。化合物24的合成和表征方法与合成实施例15类似，不同之处在于用1-(3-氟-4-羟基苯基)乙酮代替了1-(4-羟基苯基)乙酮，用对-甲苯基硼酸代替了间-甲苯基硼酸。

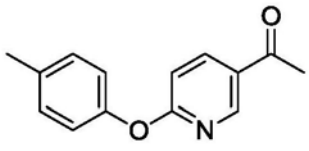
[0355] 合成实施例25

[0356] 

(*S*)-2-乙基-4-((1-(6-(对-甲苯基氧基)吡啶-3-基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0357] 根据方案1、3和6制得了本公开的化合物25。

[0358] 步骤1

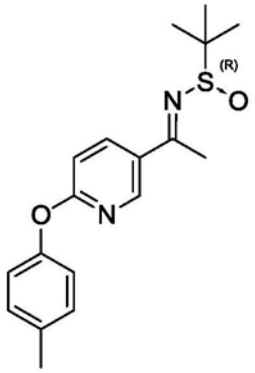
[0359] 

1-(6-(对-甲苯基氧基)吡啶-3-基)乙酮

[0360] 向1-(6-氯吡啶-3-基)乙酮(2.00g，12.85mmol)的甲苯溶液(20mL)中加入对-甲酚(2.09g，19.28mmol)、CuI(450mg，2.57mmol)和Cs_2CO_3(8.38g，25.71mmol)。将反应混合物加热回流5h。TLC表明反应完成。过滤除去固体，用甲苯(5mL)洗涤。用饱和的$NaHCO_3$水性溶

液(15mL)和盐水(15mL)洗涤滤液。浓缩分离得到的有机层,并用硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯=6:1洗脱),得到所需产物,为白色固体(1.80g,产率为61.6%)。

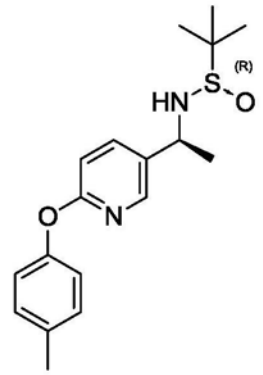
[0361] 步骤2

[0362] 

(R_S)-2-甲基-N-(1-(6-(对-甲苯基氧基)吡啶-3-基)亚乙基)丙烷-2-亚磺酰胺

[0363] 向1-(6-(对-甲苯氧基)吡啶-3-基)乙酮(1.50g,6.60mmol)的THF溶液(20mL) 中加入(R)-(+)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺(1.20g,9.90mmol)和Ti(OEt)$_4$(4.52g,19.80mmol)。将反应混合物加热回流16h。TLC表明原料已经耗尽。将其冷却至环境温度,然后倒入饱和的NaCl水性溶液(50mL)中。过滤除去所得固体,用乙酸乙酯(10 mL)洗涤。用乙酸乙酯(40mL)萃取滤液。将分离得到的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到粗产物(1.70g,产率为77.9%),其不经进一步纯化用于下一步骤。

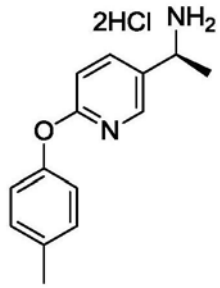
[0364] 步骤3

[0365] 

(R_S)-2-甲基-*N*-((*S*)-1-(6-(对-甲苯基氧基)吡啶-3-基)乙基)丙烷-2-亚磺酰胺

[0366] 将(R_S)-2-甲基-N-(1-(6-(对-甲苯氧基)吡啶-3-基)亚乙基)丙烷-2-亚磺酰胺(800mg, 2.42mmol)和无水THF(10mL)的混合物冷却至-50℃,在N_2下搅拌的条件下,在 -50℃将三仲丁基硼氢化锂(1M,4.6ml,4.60mmol)滴加到混合物中。将混合物搅拌1h,然后温热至环境温度。完成后,将反应用水(50mL)淬灭,用乙酸乙酯(60 mL)萃取。将分离得到的有机层真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯=1:10洗脱),得到所需产物(500mg,产率为62.1%),为黄色固体。

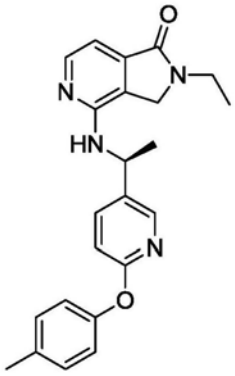
[0367] 步骤4

[0368] 

(*S*)-1-(6-(对-甲苯氧基)吡啶-3-基)乙胺二盐酸盐

[0369] 向(R_S)-2-甲基-N-((S)-1-(6-(对-甲苯氧基)吡啶-3-基)乙基)丙烷-2-亚磺酰胺(450 mg,1.35mmol)的MeOH溶液(5mL)中加入HCl/MeOH(4M,3.4mL,13.50mmol)。加完后,在环境温度下将其搅拌16h。在真空下除去MeOH。将乙酸乙酯(10mL) 加入到残余物中并搅拌30min。在真空下除去乙酸乙酯,然后将MTBE(10mL)加入到残余物中并搅拌1h。过滤收集产物,用MTBE(5mL)洗涤,真空干燥,得到所需产物,为灰白色固体(310mg,产率为76.0%)。

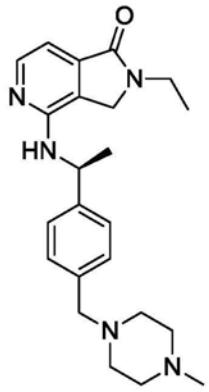
[0370] 步骤5

[0371] 

(*S*)-2-乙基-4-((1-(6-(对-甲苯基氧基)吡啶-3-基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0372] 向4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮(120mg,0.61mmol)的乙二醇溶液(10mL)中加入(S)-1-(4-(对-甲苯氧基)苯基)乙胺盐酸盐(276mg,0.92mmol) 和TEA(247mg,2.44mmol)。将反应混合物加热至150℃并搅拌5h。将其冷却至环境温度并用30mL的水稀释,用乙酸乙酯(20mL x 2)萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过制备型TLC(DCM:MeOH=20:1)纯化粗产物,得到化合物25,为白色固体(60mg,25.3%),通过NMR和MS对其进一步进行表征。

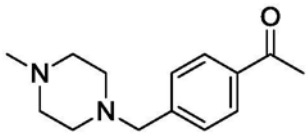
[0373] 合成实施例26

[0374] 

(*S*)-2-乙基-4-((1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0375] 根据方案1、4和6制得了本公开的化合物26。

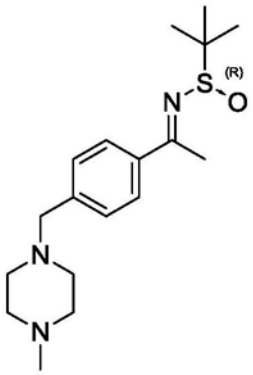
[0376] 步骤1

[0377] 

1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙酮

[0378] 向1-(4-(溴甲基)苯基)乙酮(5.00g,23.47mmol)的甲苯溶液(50mL)中加入 1-甲基哌嗪(2.35g,23.47mmol)和K_2CO_3(3.89g,28.16mmol)。加完后,将其在70℃下3h。TLC表明反应完成。过滤除去固体,用甲苯(5mL)洗涤。真空浓缩滤液,并用硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯=3:1洗脱),得到所需产物(2.80g,产率为51.4%),为浅黄色油状物。

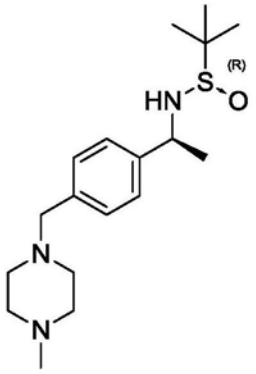
[0379] 步骤2

[0380] 

(R_S)-2-甲基-*N*-(1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)亚乙基)丙烷-2-亚磺酰胺

[0381] 向1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙酮(1.50g,6.46mmol)的THF溶液(20mL)中加入(R)-(+)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺(1.17g,9.68mmol)和$Ti(OEt)_4$(4.42g,19.37mmol)。将反应混合物加热回流16h。TLC表明原料已经耗尽。将其冷却至环境温度,然后倒入饱和的NaCl水性溶液(50mL)中。过滤除去所得固体,用乙酸乙酯(10mL)洗涤。用乙酸乙酯(40mL)萃取滤液。将分离得到的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到粗产物(1.70g,产率为78.5%),其不经进一步纯化用于下一步骤。

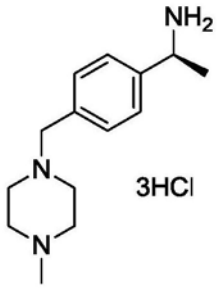
[0382] 步骤3

[0383] 

(*R*$_S$)-2-甲基-N-((S)-1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙基)丙烷-2-亚磺酰胺

[0384] 将(R$_S$)-2-甲基-N-(1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)亚乙基)丙烷-2-亚磺酰胺(800 mg,2.38mmol)和无水THF(10mL)的混合物冷却至-50℃,在N_2下搅拌的条件下,在-50℃将三仲丁基硼氢化锂(1M,4.8ml,4.76mmol)滴加到混合物中。将混合物搅拌1h,然后温热至环境温度。完成后,将反应用水(50mL)淬灭,用乙酸乙酯(60 mL)萃取。将分离得到的有机层真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用DCM: MeOH=20:1洗脱),得到所需产物(550mg,产率为68.3%),为黄色固体。

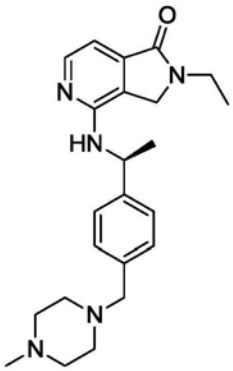
[0385] 步骤4

[0386] 

(*S*)-1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙胺三盐酸盐

[0387] 向(R$_S$)2-甲基-N-((S)-1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙基)丙烷-2-亚磺酰胺 (450mg,1.33mmol)的MeOH溶液(5mL)中加入HCl/MeOH(4M,3.3mL,13.30 mmol)。加完后,在环境温度下将其搅拌16h。在真空下除去MeOH。将乙酸乙酯 (10mL)加入到残余物中并搅拌30min。在真空下除去乙酸乙酯,然后将MTBE(10 mL)加入到残余物中并搅拌1h。过滤收集产物,用MTBE(5mL)洗涤,真空干燥,得到所需产物,为灰白色固体(350mg,产率为76.6%)。

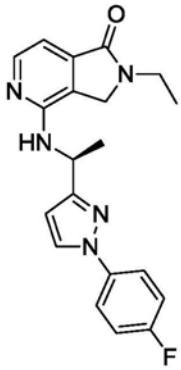
[0388] 步骤5

[0389] 

(*S*)-乙基-4-((1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0390] 向4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮(120mg,0.61mmol)的乙二醇溶液(10mL)中加入(S)-1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)乙胺三盐酸盐(314 mg,0.92mmol)和TEA(247mg,2.44mmol)。将反应混合物加热至150℃并搅拌 5h。将其冷却至环境温度并用30mL的水稀释,用乙酸乙酯(20mL x 2)萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过制备型TLC(DCM:MeOH=20:1) 纯化粗产物,得到化合物26,为白色固体(52mg,21.7%),通过NMR和MS对其进一步进行表征。

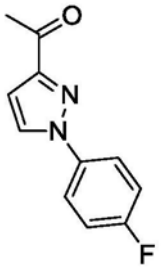
[0391] 合成实施例27

[0392] 

(*S*)-2-乙基-4-((1-(1-(4-氟苯基)-1*H*-吡唑-3-基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0393] 根据方案1、5和6制得了本公开的化合物27。

[0394] 步骤1

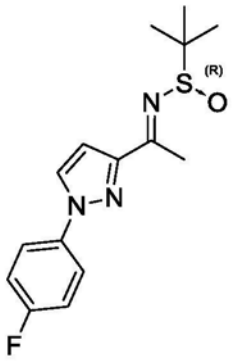
[0395] 

1-(1-(4-氟苯基)-1*H*-吡唑-3-基)乙酮

[0396] 向1-(1H-吡唑-3-基)乙酮(5.00g,45.41mmol)的DCM溶液(50mL)中加入(4- 氟苯基)硼酸(9.53g,68.11mmol)、$Cu(OAc)_2$(16.50g,90.82mmol)和TEA(22.97 g,227.04mmol)。

加完后，在环境温度下将其搅拌12h。TLC表明1-(1H-吡唑-3-基) 乙酮已经耗尽。过滤除去固体，用DCM(20mL)洗涤，并用水(50mL)洗涤滤液。真空浓缩分离得到的有几层，并用硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯＝5:1 洗脱)，得到所需产物，为浅黄色固体(3.1g，产率为33.4％)。

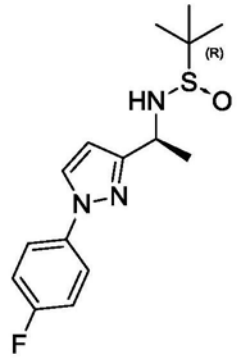
[0397] 步骤2

[0398] 

(*R*S)-*N*-(1-(1-(4-氟苯基)-1*H*-吡唑-3-基)亚乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺

[0399] 向1-(1-(4-氟苯基)-1H-吡唑-3-基)乙酮(1.50g,7.35mmol)的THF溶液(20mL) 中加入(R)-(+)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺(1.34g,11.02mmol)和$Ti(OEt)_4$(5.03g,22.04mmol)。将反应混合物加热回流16h。TLC表明原料已经耗尽。将其冷却至环境温度，然后倒入饱和的NaCl水性溶液(50mL)中。过滤除去所得固体，用乙酸乙酯(10 mL)洗涤。用乙酸乙酯(40mL)萃取滤液。将分离得到的有机层用硫酸钠干燥，过滤并浓缩，得到粗产物(1.90g，产率为84.2％)，其不经进一步纯化用于下一步骤。

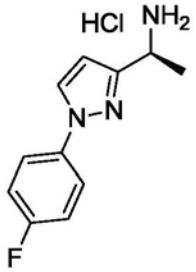
[0400] 步骤3

[0401] 

(*R*S)-*N*-((*S*)-1-(1-(4-氟苯基)-1*H*-吡唑-3-基)乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺

[0402] 将(R_S)-N-(1-(1-(4-氟苯基)-1H-吡唑-3-基)亚乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(800 mg，2.60mmol)和无水THF(10mL)的混合物冷却至-50℃，在N_2下搅拌的条件下，在-50℃将三仲丁基硼氢化锂(1M,5.2ml,5.20mmol)滴加到混合物中。将混合物搅拌1h，然后温热至环境温度。完成后，将反应用水(50mL)淬灭，用乙酸乙酯(60 mL)萃取。将分离得到的有机层真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯＝1:15洗脱)，得到所需产物(360mg，产率为44.7％)，为黄色固体。

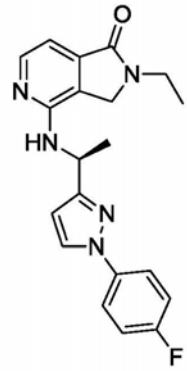
[0403] 步骤4

[0404] 

(*S*)-1-(1-(4-氟苯基)-1*H*-吡唑-3-基)乙胺盐酸盐

[0405] 向(R_S)-N-((S)-1-(1-(4-氟苯基)-1H-吡唑-3-基)乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(360 mg,1.16mmol)的MeOH溶液(5mL)中加入HCl/MeOH(4M,2.9mL,11.60mmol)。加完后,在环境温度下将其搅拌16h。在真空下除去MeOH。将乙酸乙酯(10mL) 加入到残余物中并搅拌30min。在真空下除去乙酸乙酯,然后将MTBE(10mL)加入到残余物中并搅拌1h。过滤收集产物,用MTBE(5mL)洗涤,真空干燥,得到所需产物,为灰白色固体(240mg,产率为85.3%)。

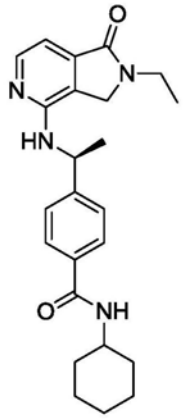
[0406] 步骤5

[0407] 

(*S*)-2-乙基-4-((1-(1-(4-氟苯基)-1*H*-吡唑-3-基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0408] 向4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮(120mg,0.61mmol)的乙二醇溶液(10mL)中加入(S)-1-(1-(4-氟苯基)-1H-吡唑-3-基)乙胺盐酸盐(221mg,0.92mmol)和TEA(185mg,1.83mmol)。将反应混合物加热至150℃并搅拌5h。将其冷却至环境温度并用30mL的水稀释,用乙酸乙酯(20mL x 2)萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过制备型TLC(DCM:MeOH=20:1)纯化粗产物,得到化合物27,为白色固体(40mg,17.9%),通过NMR和MS对其进一步进行表征。

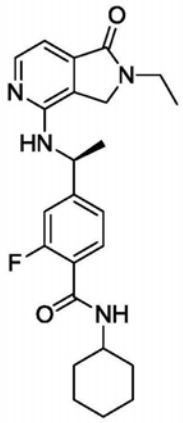
[0409] 合成实施例28

[0410] 

(*S*)-*N*-环己基-4-(1-((2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-4-基）氨基）乙基）苯甲酰胺

[0411] 从化合物12开始，根据方案7制得了本发明所述化合物28。合成和表征的方法与合成实施例13类似，不同之处在于用环己胺代替苯胺。

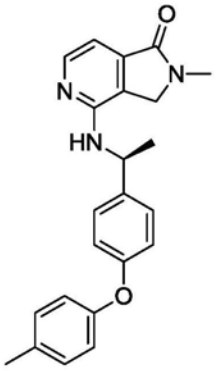
[0412] 合成实施例29

[0413] 

(*S*)-*N*-环己基-4-(1-((2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-4-基)氨基)乙基)-2-氟苯

[0414] 根据方案1、6和7制得了本公开的化合物29。用于制备化合物29的起始化合物 (类似于方案7中所示的1026)的合成如实施例1中所示，不同之处在于用(S)-乙基 -2-氟-4-((1-氨基)乙基)-苯甲酸酯代替了(S)-1-(4-溴苯基)乙胺。如合成实施例13中所示，使用所得的起始化合物制得了化合物29，不同之处在于用环己胺代替了苯胺，并且通过NMR和MS进一步对其进行了表征。

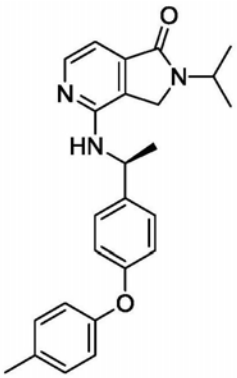
[0415] 合成实施例30

[0416] 

(*S*)-2-甲基-4-((1-（4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0417] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物30。合成的方法类似于合成实施例15，不同之处在于用对-甲苯基硼酸代替了间-甲基硼酸，用4-氯-2-甲基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮代替了4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮，所述4-氯-2-甲基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮的获得如合成实施例1中所示，不同之处在于用甲胺代替了乙胺盐酸盐。通过NMR和MS进一步表征了化合物30。

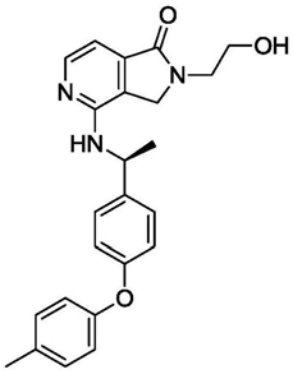
[0418] 合成实施例31

[0419] 

(*S*)-2-异丙基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0420] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物31。合成的方法类似于合成实施例15，不同之处在于用对-甲苯基硼酸代替了间-甲基硼酸，用4-氯-2-异丙基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮代替了4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮，所述4-氯-2-异丙基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮的获得如合成实施例1中所示，不同之处在于用异丙胺代替了乙胺盐酸盐。通过NMR和MS进一步表征了化合物31。

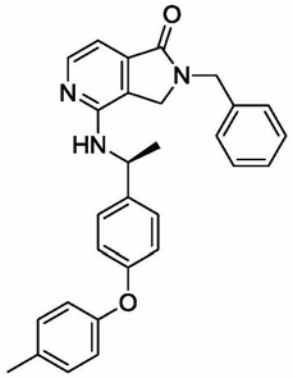
[0421] 合成实施例32

[0422] 

(*S*)-2-(2-羟乙基)-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0423] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物32。合成的方法类似于合成实施例15，不同之处在于用对-甲苯基硼酸代替了间-甲基硼酸，用4-氯-2-(2-羟乙基)-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮代替了4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮，如合成实施例1中所示获得所述4-氯-2-(2-羟乙基)-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1- 酮，不同之处在于用2-羟基乙胺代替了乙胺盐酸盐。通过NMR和MS进一步表征了化合物32。

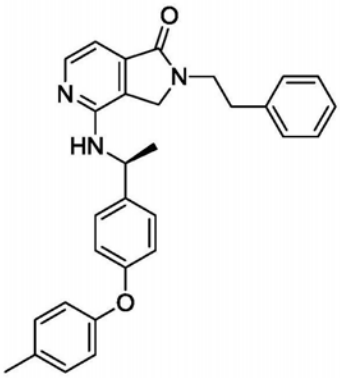
[0424] 合成实施例33

[0425] 

(*S*)-2-苄基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0426] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物33。合成的方法类似于合成实施例15，不同之处在于用对-甲苯基硼酸代替了间-甲基硼酸，用4-氯-2-苄基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮代替了4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮，如合成实施例1中所示获得所述4-氯-2-苄基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮，不同之处在于用苄胺代替了乙胺盐酸盐。通过NMR和MS进一步表征了化合物33。

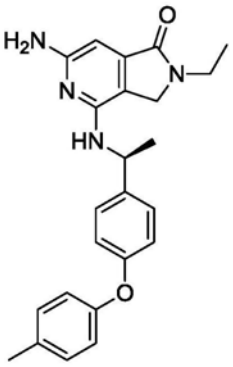
[0427] 合成实施例34

[0428] 

(*S*)-2-苯乙基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0429] 根据方案1、2和6制得了本公开的化合物34。合成的方法类似于合成实施例15，不同之处在于用对-甲苯基硼酸代替了间-甲基硼酸，用4-氯-2-苯乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]-吡啶-1-酮代替了4-氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并-[3,4-c]吡啶-1-酮，如合成实施例1中所示获得所述4-氯-2-苯乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]-吡啶-1-酮，不同之处在于用苯乙胺代替了乙胺盐酸盐。通过NMR和MS进一步表征了化合物34。

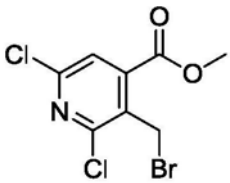
[0430] 合成实施例35

[0431] 

(*S*)-6-氨基-2-乙基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0432] 根据方案1、2、6和9制得了本公开的化合物35。

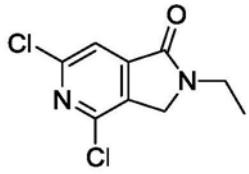
[0433] 步骤1

[0434] 

3-(溴甲基)-2,6-二氯异烟酸甲酯

[0435] 向2,6-二氯-3-甲基异烟酸甲酯(10.00g,45.44mmol)的CCl_4溶液(100mL) 中加入NBS(8.90g,49.99mmol)和BPO(550mg,2.27mmol)。加完后，将反应混合物加热回流4h。TLC表明原料已经耗尽。然后，将其冷却至环境温度，过滤除去所得沉淀，用CCl_4(10mL)洗涤。将滤液真空浓缩，得到粗产物，为黄色固体，其不经进一步纯化用于下一步骤。

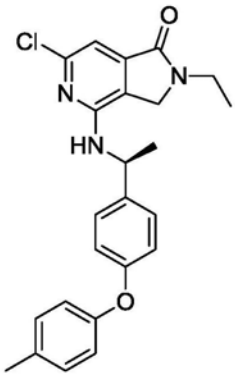
[0436] 步骤2

[0437] 

4,6-二氯-2-乙基-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0438] 将上述粗产物溶于THF(100mL)中。将乙胺盐酸盐(3.71g,45.44mmol)和 Cs_2CO_3 (59.23g,181.77mmol)加入到反应混合物中。将其在环境温度下搅拌12h。TLC表明原料已经耗尽。过滤除去固体,用乙酸乙酯(15mL)洗涤,并真空浓缩滤液。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯=2:1洗脱),得到所需产物,为黄色固体(5.40g,两步中的产率为51.4%)。

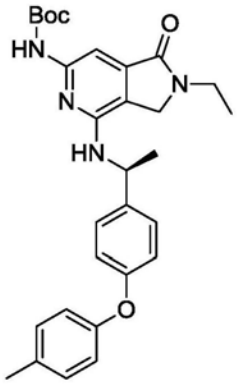
[0439] 步骤3

[0440] 

(*S*)-6-氯-2-乙基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-1-酮

[0441] 向4,6-二氯-2-乙基-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮(4.00g,17.31mmol)的乙二醇溶液(40mL)中加入(S)-1-(4-(对甲苯氧基)苯基)乙胺(5.12g,22.50mmol) 和TEA(2.63g,25.97mmol)。将反应混合物加热至150℃并搅拌7h。将其冷却至环境温度并用80mL的水稀释,用乙酸乙酯(100mL x 2)萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用DCM:MeOH=30:1 洗脱),得到所需产物(3.20g,产率为43.8%)。

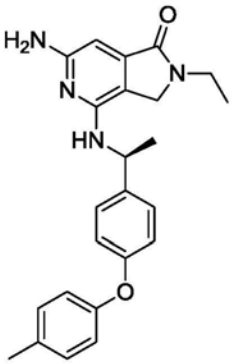
[0442] 步骤4

[0443] 

(*S*)-叔丁基-(2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4]-c]吡啶-6-基)氨基甲酸酯

[0444] 向(S)-6-氯-2-乙基-4-((1-(4-(对-甲苯氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并 [3,4-c]吡啶-1-酮(2.00g,4.74mmol)的二恶烷溶液(20mL)中加入氨基甲酸叔丁酯(1.11g,9.50mmol)、t-BuOK(1.42g,12.67mmol)、$Pd(PPh_3)_4$(548mg,0.47 mmol)和X-phos(226mg,0.47mmol)。将其在N_2气氛下在80℃加热5h。TLC 表明反应完成。通过真空浓缩除去溶剂,将残余物溶于DCM(150mL)中,用水(100 mL x 2)和盐水(100mL)洗涤。浓缩分离得到的有机层,并通过硅胶柱色谱法(用 DCM:MeOH=30:1洗脱)纯化粗产物,得到所需产物,为黄色固体(1.50g,产率为63.0%)。

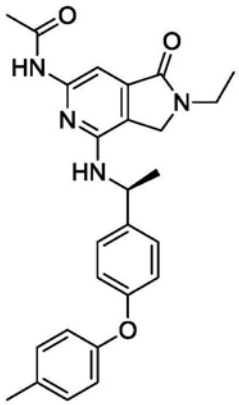
[0445] 步骤5

[0446] 

(*S*)-6-氨基-2-乙基-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-c]吡啶-1-酮

[0447] 向(S)-叔丁基(2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H- 吡咯烷[3,4-c]吡啶-6-基)氨基甲酸酯(1.00g,1.99mmol)的MeOH溶液(15mL)中加入HCl/MeOH(4M,5.0mL,19.90mmol)。将其在环境温度下搅拌5h。将溶剂真空浓缩并将粗产物溶于DCM(50mL)中,用饱和$NaHCO_3$水性溶液(30mL)和盐水(30mL)洗涤。将分离得到的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到化合物 35,为白色固体(530mg,产率为66.2%),通过NMR和MS进一步对其进行表征。

[0448] 合成实施例36

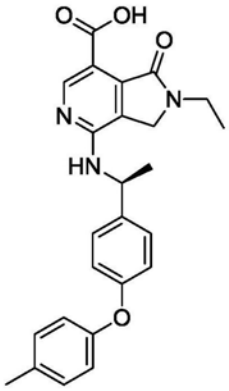
[0449] 

(*S*)-N-(2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-6-基)乙酰胺

[0450] 从化合物35开始,根据方案10制得了本公开的化合物36。

[0451] 向化合物35(200mg,0.50mmol)的THF溶液(10mL)中加入Ac_2O(76mg, 0.75mmol)、TEA(101mg,0.99mmol)和DMAP(6mg,0.05mmol)。加完后,将其在环境温度下搅拌5h。TLC表明反应完成。通过真空浓缩除去溶剂,并将残余物溶于DCM(20mL)中,用水(10mL x 2)和盐水(10mL)洗涤。浓缩分离得到的有机层,并通过制备型TLC(DCM:MeOH=10:1)纯化粗产物,得到化合物36,为白色固体(40mg,产率为18%),通过NMR和MS对其进一步表征。

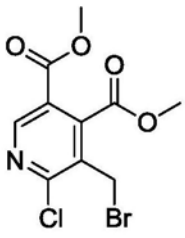
[0452] 合成实施例37

[0453] 

(*S*)-2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-7-羧酸

[0454] 根据方案1、2、6和11制得了本公开的化合物37。

[0455] 步骤1

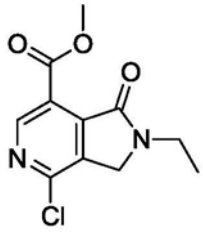
[0456] 

5-(溴甲基)-6-氯吡啶-3,4-二甲酸二甲酯

[0457] 向6-氯-5-甲基吡啶-3,4-二甲酸二甲酯(5.00g,20.52mmol)的CCl_4溶液(30mL)

中加入NBS(4.02g,22.57mmol)和BPO(249mg,1.03mmol)。加完后,将反应混合物加热回流3h。TLC表明原料已经耗尽。然后,将其冷却至环境温度,过滤除去所得沉淀,用CCl_4(5mL)洗涤。将滤液真空浓缩,得到粗产物,为黄色固体,其不经进一步纯化用于下一步骤。

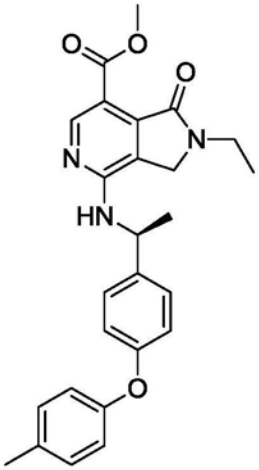
[0458] 步骤2

[0459] 

4-氯-2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-7-羧酸甲酯

[0460] 将上述粗产物溶于THF(150mL)中。将乙胺盐酸盐(1.67g,20.52mmol)和 Cs_2CO_3(26.75g,82.09mmol)加入到反应混合物中。将其在环境温度下搅拌12h。TLC表明原料已经耗尽。过滤除去固体,用乙酸乙酯(10mL)洗涤,并将滤液真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用石油醚:乙酸乙酯=2:1洗脱),得到所需产物,为浅黄色固体(3.20g,两步中的产率为61.2%)。

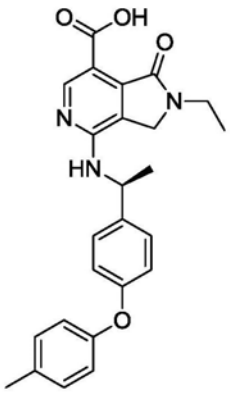
[0461] 步骤3

[0462] 

[0463] (*S*)-2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-7-羧酸甲酯

[0464] 向4-氯-2-乙基-1-氧代-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]吡啶-7-羧酸甲酯(1.10g,4.32 mmol)的乙二醇溶液(20mL)中加入(S)-1-(4-(对-甲苯氧基)苯基)乙胺盐酸盐(1.71g, 6.48mmol)和TEA(874mg,8.64mmol)。将反应混合物加热至150℃并搅拌5h。将其冷却至环境温度并用50mL的水稀释,用乙酸乙酯(80mL x 2)萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物(用DCM:MeOH =20:1洗脱),得到所需产物,为白色固体(1.20g,产率为62.4%)。

[0465] 步骤4

[0466] 

(*S*)-2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯基氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1*H*-吡咯并[3,4-*c*]吡啶-7-羧酸

[0467] 向(S)-2-乙基-1-氧代-4-((1-(4-(对-甲苯氧基)苯基)乙基)氨基)-2,3-二氢-1H-吡咯并[3,4-c]]吡啶-7-羧酸甲酯(300mg,0.67mmol)溶解在THF中的溶液(15mL)中加入NaOH(54mg,1.35mmol)的水溶液(5mL)。加完后,将其在环境温度下搅拌5 h。TLC表明反应完成。通过真空浓缩除去有机溶剂,并用水(10mL)稀释残余物,将MTBE(8mL)加入到混合物中并搅拌10min。然后通过萃取除去有机层,通过加入2N的HCl水性溶液将水层酸化至pH为7。过滤收集所得沉淀物,用水(5mL) 洗涤,真空干燥,得到化合物37,为白色固体(90mg,产率为31.0%),通过NMR 和MS对其进一步进行表征。

[0468] 生物学评估

[0469] 试验1:野生型和突变体IDH蛋白的纯化

[0470] IDH1蛋白的纯化

[0471] 本公开提供了在大肠杆菌中纯化突变体和野生型重组IDH1蛋白的方法。

[0472] 将含有野生型或突变体人IDH1的cDNA序列的pSJ3质粒转化到BL21菌株中。将单个菌落在5ml LB培养基中于37℃培养过夜。将5ml起始培养物在2L LB培养基中扩增直至培养物密度达到OD600为0.5-0.6。用0.5mM IPTG在20℃过夜诱导蛋白质的表达。通过离心收集细胞并重悬于补充有蛋白酶抑制剂PMSF的TBS缓冲液 (50mM Tris pH7.5,150mM NaCl)中。通过超声处理制备细胞裂解物并通过离心清除沉淀。将上清液上样到镍琼脂糖凝胶(Ni Separose 4B)(购自GE Lifescience)柱中。用30mM咪唑的TBS溶液洗涤柱子,并用300mM咪唑的TBS溶液洗脱IDH蛋白质。通过Amicon 3,000Da MWCO过滤装置过滤出咪唑。在-80℃下将蛋白质储存在含有10%甘油的TBS溶液中。通过使用来自Shanghai Sangon的Bradford试剂盒完成对蛋白质浓度的定量。

[0473] IDH2蛋白的纯化

[0474] 鉴于其N-末端的线粒体靶向信号,IDH2蛋白是不溶的,不能从大肠杆菌中纯化得到。本公开提供了一种通过利用昆虫细胞中的杆状病毒来表达和纯化IDH2蛋白的新方法。也可以使用同样的技术表达和纯化类似于IDH1(R132)突变体的人IDH2 (R172K或R172S)突变体。

[0475] 另一种纯化IDH2蛋白的方法是使用人293-F悬浮细胞建立稳定的细胞来表达野生型和突变体IDH2,然后进行亲和及离子交换纯化。

[0476] 试验2:肝微粒体中的代谢稳定性测定

[0477] 小鼠、大鼠、狗、猴和人的肝微粒体购自Corning Inc.,并在使用前在-60℃下储存。乙腈和NADPH购自Honeywell International Inc.(新泽西,美国)和Roche Inc. (巴塞尔,瑞士)。咪达唑仑用作阳性对照,购自中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control)(北京,中国)。

[0478] 将每种试验化合物或对照化合物咪达唑仑以1μM的预设初始浓度与0.5mg·mL^{-1}(针对试验化合物)或0.2mg·mL^{-1}(针对对照)的小鼠,大鼠,狗,猴或人肝微粒体的PBS溶液(100mM,pH 7.4)在37℃水浴中共孵育,所述PBS溶液含有3mM $MgCl_2$。通过加入NADPH至终浓度为1mM起始反应。每种反应混合物的最终体积为 0.2ml,所有反应均一式两份进行。在每个设定的时间点(0、5、15、30和60min),将小等分样(例如,20μl)从反应系统转移到含有乙腈的冰冷的内标(internal standard, IS)中以淬灭该反应并沉淀蛋白质。涡旋并以3700rpm离心10min后,将上清液注入LC-MS/MS进行分析。

[0479] 在测定化合物从其初始浓度消失的消除半衰期($T_{1/2}$)的基础上,估算体外微粒体清除率。计算每种化合物(试验或对照化合物)与IS的峰面积比。绘制Ln(%对照)相对于孵育时间(min)的曲线,并计算线性拟合线的斜率。根据以下等式计算药物清除速率常数k(min^{-1})、$T_{1/2}$(min)和体外内在清除率CL_{int}(mL·min^{-1}·mg^{-1}蛋白质):

[0480] k=-斜率

[0481] $T_{1/2}=0.693/k$

[0482] $CL_{int}=k/C_{蛋白质}$

[0483] 其中$C_{蛋白质}$(mg·mL^{-1})是孵育系统中微粒体蛋白的浓度。

[0484] 试验3:小鼠血浆中的代谢稳定性测定

[0485] 空白的雄性/雌性小鼠血浆由3D BioOptima(苏州,中国)提供,并在使用前新鲜收集。乙腈购自Honeywell International Inc.(新泽西,美国)。

[0486] 将每种试验化合物以2μM的预设初始浓度与小鼠血浆在37℃水浴中共孵育2h,每个孵育混合物的终体积为0.3mL。在每个设定的时间点(0、15、30、60、120min),将来自血浆样品的小等分试样(每份20μL)转移到微量离心管中,然后加入到含有乙腈的200μL IS中用于蛋白质沉淀。涡旋并以3700rpm离心10min后,将上清液注入LC-MS/MS进行分析。所有孵育均一式两份进行。通过使用以下等式计算体外化合物稳定性:

[0487] $$稳定性 = \frac{C_t}{C_0} \times 100\%$$

[0488] 其中C_t为孵育后0.5、1、1.5和2h时样品与IS的面积比,C_0为孵育前0h时样品与IS的面积比。

[0489] 试验4:体内药代动力学测定

[0490] 在口服(p.o.)和静脉内(i.v.)施用后,在ICR小鼠(雄性,6-8周,20.0-25.3g) 中评估了本公开的化合物的药代动力学性质。

[0491] ICR小鼠购自维通利华实验动物技术有限公司(Vital River Laboratory Technology Co.,Ltd.)(北京,中国),饲养在具有灭菌铺垫物的固体底部的聚丙烯笼中,保持在湿度为40%至70%,20至25℃室温,换气10至20次/小时,并有12小时的明/ 暗循环的房间中(研究活动需要中断除外)。使用来自上海SLAC实验动物有限公司 (上海,中国)的无菌饮食和无菌水饲喂小鼠。所有动物在收到后都进行了检查并让其适应至少3天。根据总体

的健康状况、体重或其他合适的相关数据，仅选择看起来健康的小鼠用于研究。通过耳缺口鉴定每组中的各个动物。

[0492] 在治疗前将小鼠禁食过夜，但始终可以自由饮水。在给药前，对每只小鼠进行称重，并使用下面的公式计算每只小鼠的实际剂量体积：

[0493] 剂量体积(mL)＝[名义剂量(mg·kg^{-1})/剂量浓度(mg·mL^{-1})]×动物的体重(kg)相应地记录下实际体重和实际剂量体积。

[0494] 对于每个试验组，使用了9只小鼠，并且对不同组中的小鼠分别给予单次口服(p.o.)剂量的试验化合物(10mg·kg^{-1})，或单次静脉内(i.v.)剂量(2mg·kg^{-1})。在预定时间点(例如，给药前，给药后5min、15min、30min、1h、2h、4h、8h、12h 和24h)将血液样品(例如，至少120μg)收集到EDTA-K_2管中。对每只小鼠在三个不连续的时间点收集血液样品，并用三只小鼠在每个时间点进行取样。将收集到的样品以5500rpm离心10min以获得血浆样品，随后通过LC-MS/MS测量。通过线性回归分析处理血浆浓度相对于时间的数据。使用Pharsight Phoenix 6.3的非隔室模型计算所有药代动力学参数。

[0495] 试验5:化合物对IDH的抑制和选择性的生物化学测定

[0496] 本公开提供了一种生化测定方法，用于通过直接检测IDH的酶活性来检测化合物对于IDH的抑制和选择性。

[0497] 图1显示了由野生型和突变体IDH1/2催化的反应。野生型IDH酶在催化产生α-KG的反应时可将$NADP^+$转化为NADPH。突变体IDH酶在催化产生D-2-HG的反应时可将NADPH转化为$NADP^+$。因此可以通过监测NADPH水平的变化来测量野生型和突变体IDH1/2的活性:在由野生型IDH1/2催化的反应中，新产生的NADPH马上被偶联的心肌黄酶-刃天青反应利用，以产生发荧光的(在544nm激发，590nm发射处)试卤灵(resorufin)，从而间接地监测NADPH;而在由突变体IDH1/2催化的反应中，由于NADPH是发荧光的(在340nm激发，460nm发射处)，因此直接监测NADPH。通过监测反应中NADPH水平的变化，可以快速有效地测定酶活性，也可以测定化合物的IC_{50}。

[0498] 将试验化合物在DMSO中制成50mM的储备溶液并储存在-20℃。将每种试验化合物的储备溶液进一步稀释以获得浓度分别为200μM、100μM、50μM、25μM、12.5 μM、6.25μM和3.125μM的100×储备溶液，用于最终在试验当天使用。

[0499] 对野生型IDH1的抑制作用:

[0500] 通过以下步骤制得溶液A:组合1M Tris-HCl pH7.5(300μL)、5M NaCl(450 μL)、1M $MgCl_2$(150μL)、1M DTT(15μL)、20mg/mL BSA(37.5μL)、50mM NADP(20μL)、80mM的异柠檬酸(20μL)、100mM的刃天青(20μL)和0.1 单位/μL的心肌黄酶(50μL)，然后加入去离子水至终体积为15mL。

[0501] 通过以下步骤制得反应缓冲液:组合1M Tris-HCl pH7.5(200μL)、5M NaCl (300μL)、1M $MgCl_2$(100μL)、1M DTT(10μL)和20mg/mL BSA(25μL)，然后加入去离子水至终体积为10mL。

[0502] 通过将所述反应缓冲液(5mL)与107μM的野生型IDH1(0.37μL)组合，制得溶液B。

[0503] 将148μL的溶液A加入到96孔板P1的每个样品孔中，然后将2μL的各浓度的试验化合物溶液和2μL的DMSO(阴性对照/空白)分别加入到各个样品孔中。分别将50μL的溶液B加入到具有试验化合物的每个样品孔中以及仅具有DMSO的一个样品孔中，并将50μL的反应缓

冲液加入到仅具有DMSO的另一个样品孔中。将P1放入BioTek Synergy H4酶标仪(BioTek Instruments Inc.,威努斯基,美国)中,程序设定如下:37℃,摇动板5秒,运行动力学模式,总检测时间为20分钟,检测间隔为40秒,检测模式为荧光(544nm激发,590nm发射)。输出数据,计算试验化合物的相对酶活性和半数最大抑制浓度(IC_{50})。将相对酶活性计算成是每个孔在发射 590处的读数相对于时间的斜率的绝对值(其表示由野生型IDH1催化的NADPH的产生速率)。绘制剂量-应答曲线并通过拟合计算IC_{50}。可以根据化合物对IDH酶活性的效应来评估每种试验化合物对IDH的抑制和选择性。

[0504] 对突变体IDH1(R132H或R132C)的抑制作用:

[0505] 通过以下步骤制得溶液A:组合1M Tris-HCl pH7.5(300μL)、5M NaCl(450 μL)、1M $MgCl_2$(150μL)、1M DTT(15μL)、20mg/mL BSA(37.5μL)、20mM NADPH(20μL)和0.5mMα-KG(40μL),然后加入去离子水至终体积为15mL。

[0506] 通过以下步骤制得反应缓冲液:组合1M Tris-HCl pH 7.5(200μL)、5M NaCl (300μL)、1M $MgCl_2$(100μL)、1M DTT(10μL)和20mg/mL BSA(25μL),然后加入去离子水至终体积为10mL。

[0507] 通过将所述反应缓冲液(5mL)与192μM的IDH1-R132H(5.21μL)或107μM 的IDH1-R132C(4.67μL)组合,制得溶液B。

[0508] 将148μL的溶液A加入到96孔板P1的每个样品孔中,然后将2μL的各浓度的试验化合物溶液和2μL的DMSO(阴性对照/空白)分别加入到各个样品孔中。分别将50μL的溶液B加入到具有试验化合物的每个样品孔中以及仅具有DMSO的一个样品孔中,并将50μL的反应缓冲液加入到仅具有DMSO的另一个样品孔中。将P1放入BioTek Synergy H4酶标仪(BioTek Instruments Inc.,威努斯基,美国)中,程序设定如下:37℃,摇动板5秒,运行动力学模式,总检测时间为20分钟,检测间隔为40秒,检测模式为荧光(340nm激发,460nm发射)。输出数据,计算试验化合物的相对酶活性和半数最大抑制浓度(IC_{50})。将相对酶活性计算成是每个孔在发射 460处的读数相对于时间的斜率的绝对值(其表示通过由IDH1调节的对NADPH的利用而进行的α-KG到2-HG的转化率)。绘制剂量-应答曲线并通过拟合计算IC_{50}。可以根据化合物对IDH酶活性的效应来评估每种试验化合物对IDH的抑制和选择性。

[0509] 试验6:针对化合物对IDH的抑制作用和选择性的基于细胞的测定法

[0510] 本公开还提供了一种基于细胞的方法,用于测定化合物在人纤维瘤细胞系HT1080和胆管癌细胞系HCCC 9810中对IDH的抑制和选择性,所述HT1080和HCCC 9810分别含有内源杂合的IDH1 R132C和R132H突变并积累有D-2-HG。肿瘤来源的IDH突变体失去了产生α-KG的正常活性,并获得了产生D-2-HG的新活性。D-2-HG 是在IDH突变的肿瘤样品中特异性升高的代谢物。其在正常组织中的浓度可忽略不计,并且在正常组织中不具有任何已知的生理功能。因为突变体IDH1和IDH2获得了在正常细胞中不具有功能的新的催化活性,因此突变体IDH酶的抑制剂应该会有效抑制表达突变体IDH的肿瘤细胞的生长,但不影响正常细胞的生长。因此,该方法可用于筛选对具有突变体IDH的细胞具有高特异性并且对正常细胞具有低毒性的化合物。

[0511] 通过用有效的IDH抑制剂处理HT1080和HCCC 9810细胞,阻断了D-2-HG的合成,并且通过由D-2-HG脱氢酶催化的氧化反应而降低了D-2-HG的浓度。因此,本公开的化合物对IDH的抑制活性和选择性可以通过细胞代谢物中D-2-HG的减少来测得。

[0512] 为了进行基于细胞的IDH抑制剂测定,在补充有10％FBS的DMEM中培养 HT1080和HCCC 9810细胞(或带有不同的IDH突变的其他细胞系)。用各种不同浓度的本公开的化合物处理细胞。在处理后的各个时间点(4-24小时),除去细胞培养上清液,用PBS洗涤细胞一次或两次。通过以下步骤提取细胞代谢物:向细胞中加入 80％的甲醇(在-80℃下预冷却过),在4℃温度下提取60min,离心除去任何不溶性组分。将代谢物(来自前一步骤的澄清上清液)冻干并在含有20mg/ml O-甲氧基胺 HCl的吡啶中重构,并在70℃下孵育40分钟。冷却至室温后,以4:7的体积比加入 MTBSTFA(N-叔丁基二甲基甲硅烷基-N-甲基三氟乙酰胺,Sigma Aldrich)(例如,将20μL的MTBSTFA加入到35μL的20mg/ml O-甲氧基胺HCl溶液中),在70℃下衍生30分钟。通过Agilent 7890A-5750 GC/MS系统分析衍生出的代谢物(包括 D-2-HG)。将1μl衍生出的代谢物注入Agilent 7890A-5750中进行D-2-HG浓度的分析。GC柱箱的温度设定为从140℃至260℃(10℃/min),从260℃至310℃(8℃/min),并在310℃保持5min。载气的流速为1ml/min。质谱仪以70eV的电子轰击(EI)模式进行操作。将D-2-HG对内源性谷氨酸进行基准化。

[0513] 不同化合物浓度条件下的IDH的酶活性以此化合物浓度条件下的D-2-HG水平与阴性对照条件下的D-2-HG水平相比的相对值表示,然后据此计算化合物的IC_{50}值和评估化合物的抑制性和选择性。

[0514] 试验7:针对化合物对IDH的抑制作用和选择性的改进的基于细胞的测定法

[0515] 本公开还提供了针对化合物对IDH的抑制作用和选择性的改进的基于细胞的测定法,所述方法涉及在HT1080和HCCC9810细胞中稳定地过表达D-2-HG脱氢酶。

[0516] 根据先前的报道,D-2-HG脱氢酶的过表达会降低HT1080细胞中D-2-HG的半衰期(图2A和2B)["D-2-hydroxyglutarate is essential for maintaining oncogenic property of mutant IDH-containing cancer cells but dispensable for cell growth",Ma,S.等人, Oncotarget,(2015)],从而使得细胞更敏感于突变体IDH1抑制剂对D-2-HG合成的阻断。这会大大提升这种基于细胞的测定法的灵敏度和准确性。在改进的基于细胞的测定法中,所有其他步骤如实验6中所公开的那样进行。

[0517] 试验8:对IDH突变细胞的非贴壁依赖性生长的抑制

[0518] 众所周知,非贴壁依赖性细胞生长是癌细胞的基本性质。非贴壁依赖性生长的能力与体内肿瘤细胞的致瘤和转移潜能紧密相关。

[0519] 先前的工作显示,HT1080中突变体IDH1的缺失对正常培养条件下的细胞增殖影响不大,但会强烈抑制具有IDH1 R132C突变的HT1080细胞系的非贴壁依赖性生长 ["D-2-hydroxyglutarate is essential for maintaining oncogenic property of mutant IDH-containing cancer cells but dispensable for cell growth",Ma,S.等人, Oncotarget, (2015)]。突变体IDH1的缺失也消除了HT1080细胞中D-2-HG的产生。在本公开中,非贴壁依赖性生长(在软琼脂中形成细胞集落)也被用作方便且有用的体外测定法,用于测定化合物在肿瘤抑制中的活性。

[0520] 使用本公开的化合物来处理IDH-突变的癌细胞系,如含有IDH1 R132C的HT1080和含有IDH1 R132H的HCCC9810,并测试这些化合物是否会影响软琼脂中的细胞生长。将化合物加入到软琼脂以及软琼脂上方的培养基中,化合物的浓度高于由试验5 和6中的结果计算得到的每种化合物的IC_{50}值。通过显微镜观察集落形成。在实验结束时,将软琼脂平板

用结晶紫染色,从而看到细胞集落以进行定量。在软琼脂测定法中证实,IDH1的抑制能阻碍非贴壁依赖性生长,这为测定突变体IDH抑制剂在肿瘤抑制中的活性提供了有用、有效且方便的测定法。该测定法特别有用,因为对突变体 IDH1的抑制不影响正常培养条件下HT1080细胞的生长。

[0521] 试验9:在患者来源的异种移植模型中对IDH突变体肿瘤生长的抑制作用

[0522] 先前的工作通过异种移植实验表明,抑制突变体IDH R132C可以阻碍HT1080的肿瘤生长["D-2-hydroxyglutarate is essential for maintaining oncogenic property of mutant IDH-containing cancer cells but dispensable for cell growth",Ma,S.等人, Oncotarget,(2015)]。在本文中使用患者来源的异种移植小鼠(PDX)模型作为方便且有用的体内测定法,用于测定化合物在肿瘤抑制中的活性。作为初步实验,已经从具有IDH1的R132H突变的Bt142神经胶质瘤的脑干细胞系建立了IDH1突变的神经胶质瘤PDX模型["An in vivo patient-derived model of endogenous IDH1-mutant glioma", Luchman,H.A.等人,Neuro Oncol,(2012)]。该小鼠模型用于测试本公开的化合物在抑制具有IDH1 R132H突变的神经胶质瘤中的功效。本公开的化合物在异种移植模型中抑制了带有IDH1 R132H突变的肿瘤的生长。

[0523] 工作实施例

[0524] 实施例1:IDH1 WT/R132H/R132C蛋白的纯化

[0525] 将pSJ3-IDH1-R132H、pSJ3-IDH1-R132C和pSJ3-IDH1-WT质粒分别转化到BL21 菌株中。根据生物学评价部分的试验1中所公开的方法诱导和纯化IDH1 WT/R132H/R132C蛋白。通过Bradford测定法确定了每种纯化蛋白质的浓度。图3显示了IDH1-R132H、IDH1-R132C和IDH1-WT蛋白中每一种的考马斯染色,其证明了蛋白质的成功表达和纯化。

[0526] 实施例2:体外代谢稳定性研究

[0527] 2.1肝微粒体中的代谢稳定性

[0528] 在该研究中,根据生物学评价部分的试验2中所公开的方法,在小鼠、大鼠、狗、猴和人的肝微粒体中评估了化合物的代谢稳定性。咪达唑仑用作阳性对照。

[0529] 每个实验独立地一式两份进行(分别表示为#1和#2),并且对于示例性化合物 16所获得的数据示于表1-5和图4A-4E 中。表6中显示了化合物16的代谢稳定性结果与阳性对照结果的比较总结。表6中显示的所有结果是来自两个独立实验的结果的平均值。

[0530] 表1:化合物16在小鼠肝微粒体中的代谢稳定性

[0531]

孵育时间(min)	峰面积比		平均峰面积比	剩余百分比%		Ln(剩余百分比%)		Ln平均值(剩余百分比%)
	#1	#2		#1	#2	#1	#2	
0	1.94	1.72	1.83	100	100	4.61	4.61	4.61
5	1.71	1.62	1.67	88.1	94.2	4.48	4.55	4.51
15	1.41	1.39	1.40	72.7	80.8	4.29	4.39	4.34
30	0.601	0.753	0.677	31.0	43.8	3.43	3.78	3.61
60	0.206	0.206	0.206	10.6	12.0	2.36	2.48	2.42

[0532]

	$K(min^{-1})$	$T_{1/2}(min)$	$CL_{int}(\mu L \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1})$
#1	0.0387	17.9	77.4
#2	0.0364	19.1	72.7
平均值	0.0375	18.5	75.1

[0533] 表2:化合物16在大鼠肝微粒体中的代谢稳定性

[0534]

孵育时间（min）	峰面积比		平均峰面积比	剩余百分比%		Ln（剩余百分比%）		Ln 平均值(剩余百分比%)
	#1	#2		#1	#2	#1	#2	
0	1.80	1.17	1.49	100	100	4.61	4.61	4.61
5	1.62	1.30	1.46	90.0	111	4.50	4.71	4.61
15	1.07	1.08	1.08	59.4	92.3	4.09	4.53	4.31

[0535]

30	0.645	0.736	0.691	35.8	62.9	3.58	4.14	3.86
60	0.252	0.282	0.267	14.0	24.1	2.64	3.18	2.91

[0536]

	$K(min^{-1})$	$T_{1/2}(min)$	$CL_{int}(\mu L \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1})$
#1	0.0333	20.8	66.5
#2	0.0253	27.4	50.7
平均值	0.0293	24.1	58.6

[0537] 表3:化合物16在狗肝微粒体中的代谢稳定性

[0538]

孵育时间（min）	峰面积比		平均峰面积比	剩余百分比%		Ln（剩余百分比%）		Ln 平均值(剩余百分比%)
	#1	#2		#1	#2	#1	#2	
0	1.66	1.92	1.79	100	100	4.61	4.61	4.61
5	1.74	2.03	1.89	105	106	4.65	4.66	4.66
15	1.57	1.64	1.61	94.6	85.4	4.55	4.45	4.50
30	1.27	1.46	1.37	76.5	76.0	4.34	4.33	4.33
60	0.877	0.936	0.907	52.8	48.8	3.97	3.89	3.93

[0539]

	$K(min^{-1})$	$T_{1/2}(min)$	$CL_{int}(\mu L \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1})$
#1	0.0115	60.3	23.0
#2	0.0126	55.0	25.2
平均值	0.0120	57.6	24.1

[0540] 表4:化合物16在猴肝微粒体中的代谢稳定性

[0541]

孵育时间（min）	峰面积比		平均峰面积比	剩余百分比%		Ln（剩余百分比%）		Ln 平均值(剩余百分比%）
	#1	#2		#1	#2	#1	#2	
0	1.89	1.87	1.88	100	100	4.61	4.61	4.61
5	1.25	1.36	1.31	66.1	72.7	4.19	4.29	4.24
15	0.614	0.662	0.638	32.5	35.4	3.48	3.57	3.52

[0542]

30	0.237	0.229	0.233	12.5	12.2	2.53	2.51	2.52
60	0.0403	0.0386	0.0395	2.13	2.06	0.757	0.725	0.741

[0543]

	$K(min^{-1})$	$T_{1/2}(min)$	$CL_{int}(\mu L \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1})$
#1	0.0635	10.9	127
#2	0.0651	10.7	130
平均值	0.0643	10.8	129

[0544] 表5:化合物16在人肝微粒体中的代谢稳定性

[0545]

孵育时间（min）	峰面积比		平均峰面积比	剩余百分比%		Ln（剩余百分比%）		Ln 平均值(剩余百分比%）
	#1	#2		#1	#2	#1	#2	
0	2.01	2.00	2.01	100	100	4.61	4.61	4.61
5	1.75	1.81	1.78	87.1	90.5	4.47	4.51	4.49
15	1.32	1.38	1.35	65.7	69.0	4.18	4.23	4.21
30	1.04	1.01	1.03	51.7	50.5	3.95	3.92	3.93
60	0.527	0.507	0.517	26.2	25.4	3.27	3.23	3.25

[0546]

	$K(min^{-1})$	$T_{1/2}(min)$	$CL_{int}(\mu L \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1})$
#1	0.0218	31.8	43.6
#2	0.0229	30.3	45.8
平均值	0.0224	31.0	44.7

[0547] 表6:化合物16在来自不同物种的肝微粒体中的代谢稳定性结果与阳性对照结果的比较总结

[0548]

样品	物种	$k（min^{-1}）$	$T_{1/2}$（min）	$CL_{int,(\mu L \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1})}$
化合物 16	小鼠	0.0375	18.5	75.1
	大鼠	0.0293	24.1	58.6
	狗	0.0120	57.6	24.1

[0549]

	猴	0.0643	10.8	129
	人	0.0224	31.0	44.7
阳性对照	小鼠	0.0964	7.19	482
	大鼠	0.174	3.98	871
	狗	0.140	4.94	702
	猴	0.211	3.29	1053
	人	0.0612	11.3	306

[0550] 结果表明,化合物16在不同物种的肝微粒体中表现出不同的代谢稳定性,体外清除从快到慢为:猴、小鼠、大鼠、人和狗(即,猴>小鼠>大鼠>人>狗)。与阳性对照咪达唑仑相比,化合物16在人肝微粒体中的清除较缓慢,这表明化合物16在人肝微粒体中具有中等的稳定性。

[0551] 2.2血浆中的代谢稳定性

[0552] 在该研究中,根据生物学评价部分的试验3中所公开的方法评估了化合物在小鼠血浆中的代谢稳定性。

[0553] 每个实验独立地一式两份进行(分别表示为#1和#2)。对于示例性化合物16所获得的结果示于表7和图5中。

[0554] 表7:化合物16在小鼠血浆中的代谢稳定性

[0555]

孵育时间(min)	峰面积比		平均峰面积比	剩余百分比%		Ln(剩余百分比%)		Ln 平均值(剩余百分比%)
	#1	#2		#1	#2	#1	#2	
0	4.38	4.54	4.46	100	100	4.61	4.61	4.61
15	4.37	4.79	4.58	99.8	106	4.60	4.66	4.63
30	4.16	4.62	4.39	95.0	102	4.55	4.62	4.59
60	4.31	4.49	4.40	98.4	98.9	4.59	4.59	4.59
120	4.60	4.27	4.44	105	94.1	4.65	4.54	4.60

[0556]

	K(min^{-1})	$T_{1/2}$(min)
#1	NA	NA

[0557]

#2	0.000737	940
平均值	**0.000737**	**940**

[0558] 结果显示化合物16的平均剩余百分比在2小时内高于98.5%,表明化合物16在小鼠血浆中能保持稳定达至少2小时。

[0559] 实施例3:体内药代动力学研究

[0560] 根据生物学评估部分的试验4中所公开的方法,在ICR小鼠(雄性,6-8周, 20.0-

25.3g,维通利华实验动物技术有限公司)中进行了化合物的药代动力学(PK) 研究,所述ICR小鼠被施用了10mg·kg^{-1}的单次p.o.剂量或2mg·kg^{-1}的单次i.v.剂量。

[0561] 每个实验独立地一式三份进行。绘制在向ICR小鼠p.o.施用了10mg·kg^{-1}以后示例性化合物23的血浆浓度与时间的函数(图6)。绘制在向ICR小鼠i.v.注射了2mg·kg^{-1}以后示例性化合物23的血浆浓度与时间的函数(图7)。每个数据代表了三次实验的平均血浆浓度,误差棒表示均值标准误差(SEM)。

[0562] 对于p.o.和i.v.施用,将化合物23的PK参数分别示于表8A和8B中。

[0563] 表8A:p.o.施用给ICR小鼠的化合物23的PK参数

[0564]

PK参数	10mg·kg^{-1}的p.o.剂量
C_{max} (ng·mL^{-1})	1178
T_{max} (h)	0.25
K_{el} (h^{-1})	0.385
$T_{1/2}$ (h)	1.8
AUC_{0-t} (ng·h·mL^{-1})	2886
AUC_{0-inf} (ng·h·mL^{-1})	2917
$AUMC_{0-t}$ (ng·h^2·mL^{-1})	7099
$AUMC_{0-inf}$ (ng·h^2·mL^{-1})	7550
MRT_{PO} (h)	2.6
F(%)	44

[0565] 表8B:i.v.施用给ICR小鼠的化合物23的PK参数

[0566]

PK 参数	**2 mg·kg^{-1} 的 i.v.剂量**
K_{el} (h^{-1})	0.244

[0567]

$T_{1/2}$ (h)	2.8
AUC_{0-t} (ng·h·mL^{-1})	1302
AUC_{0-inf} (ng·h·mL^{-1})	1311
$AUMC_{0-t}$ (ng·h^2·mL^{-1})	1138
$AUMC_{0-inf}$ (ng·h^2·mL^{-1})	1283
MRT_{IV} (h)	0.98
CL (mL·kg^{-1}·min^{-1})	25.4
Vd_{ss} (L·kg^{-1})	1.49

[0568] 实施例4:化合物抑制了IDH1 R132H和IDH1 R132C的活性

[0569] 根据生物学评价部分的试验5评估了化合物的IDH抑制活性。每种化合物对突变体IDH1 R132H/R132C抑制作用的试验以一式三份进行。对于IDH1 R132H,将示例性化合物16、21、22、23、24和31的酶活性以化合物浓度的对数函数作图,分别示于图8A-8C、9A-9C、10A-

10C、11A-11C、12A-12C和13A-13C中。化合物16、21、22、23、24和31对IDH1 R132H的IC_{50}值小于1.0μM。对于IDH1 R132C，将示例性化合物16、21、22、23、24和31的酶活性以化合物浓度的对数函数作图，分别示于图14A-14C,15A-15C、16A-16C、17A-17C、18A-18C和19A-19C中。化合物16、21、22、23、24和31对IDH1 R132C的IC_{50}值小于1.5μM。化合物对IDH1 R132C 的IC_{50}值示于表9中。

[0570] 表9:化合物对IDH1 R132C的IC_{50}值

[0571]

化合物编号	IDH1 R132C IC_{50}
1	10-15 μM
2	10-15 μM
3	10-15 μM
4	10-15 μM
5	10-15 μM
6	10-15 μM
7	10-15 μM

[0572]

8	10-15 μM
9	10-15 μM
10	10-15 μM
11	10-15 μM
12	10-15 μM
13	10-15 μM
14	10-15 μM
15	≤1.5 μM
16	≤1.5 μM
17	≤1.5 μM
18	≤1.5 μM
19	≤1.5 μM
20	1.5-10 μM
21	≤1.5 μM
22	≤1.5 μM
23	≤1.5 μM
24	≤1.5 μM
31	≤1.5 μM

[0573] 还进行了化合物对野生型IDH1抑制作用的试验。它表明,在试验浓度(0.03125 μM至2μM)下,化合物对野生型IDH1未显示出抑制作用。

[0574] 传统的化疗通常对患者具有一般非特异性和毒性作用。在本实施例中测试的化合物显示在靶向突变体IDH方面具有比靶向野生型IDH更高的特异性。这种更高的特异性使得能够使用相对低剂量的化合物,以避免因对内源性野生型酶的抑制而引起的副作用。因此,靶向突变体IDH使得在药物设计和加工方面具有了灵活性。

[0575] 实施例5:化合物抑制了IDH1 R132C产生D-2-HG的活性

[0576] 在35mm平板中培养HT1080细胞,并用化合物1-37中的每一种以10μM处理 12h,并根据生物学评估部分的试验6中所公开的方法分析D-2-HG的浓度。图20显示了在用一些化合物处理后的D-2-HG的浓度。

[0577] 还根据生物学评价部分的试验7中所公开的方法,用改进的基于细胞的测定法评估了化合物的D-2-HG抑制活性。将过表达D-2-HG脱氢酶的HT1080细胞培养在 35mm平板中,并用化合物1-37中的每一种分别以0.5μM、1μM、2.5μM和5μM的浓度处理12h,并且分析了D-2-HG的浓度。表10中显示了示例性化合物16、21-24 和31在不同浓度下对HT1080细胞中D-

2-HG的抑制率。

[0578] 表10化合物16、21-24和31在不同浓度下对HT1080细胞中D-2-HG的抑制率

[0579]

化合物编号	对 HT1080 细胞中 D-2-HG 的抑制率（%）			
	0.5 μM	1 μM	2.5 μM	5 μM
16	51	60.2	67	82.2
21	20.2	18.7	43.1	76.1
22	36.3	53.3	72.3	87.8
23	12.5	30.7	68.3	76.7
24	45.5	54.6	72.1	92.1
31	36.9	57.8	68.7	89.1

[0580] 结果显示，化合物有效抑制了IDH1 R132C产生D-2-HG的活性，并且化合物的抑制活性随着化合物浓度的增加而增加。在5μM的浓度下，所有示例性化合物都显示出了大于70％的抑制活性。

[0581] 实施例6：化合物抑制了HT1080细胞的非贴壁依赖性生长

[0582] 将HT1080细胞培养在35mm平板中并在指数生长期收获，并根据生物学评估部分的试验8中的描述将其用于软琼脂中。本公开的化合物能抑制IDH-突变的癌细胞的非贴壁依赖性生长。

[0583] 实施例7：化合物抑制了PDX模型中IDH突变的肿瘤的生长

[0584] 根据生物学评价部分的试验9中的描述进行了动物试验。本公开的化合物能抑制PDX模型中带有IDH1 R132H突变的肿瘤的生长。

[0585] 参考文献

[0586] 1.Parsons,D.W.等人,An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.Science, 2008.321(5897):p.1807-12.

[0587] 2.Balss,J.等人,Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors.Acta Neuropathol,2008. 116(6):p.597-602.

[0588] 3.Bleeker,F.E.等人,IDH1 mutations at residue p.R132(IDH1(R132))occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors.Hum Mutat, 2009.30(1):p.7-11.

[0589] 4.Hartmann,C.等人,Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age:a study of 1,010diffuse gliomas.Acta Neuropathol, 2009.118(4):p.469-74.

[0590] 5.Watanabe,T.等人,IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas.Am J Pathol,2009.174(4):p.1149-53.

[0591] 6.Mardis,E.R.等人,Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med,2009.361(11):p.1058-66.

[0592] 7.Thol,F.等人,Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.Blood,2010.116(4):p.614-6.

[0593] 8.Abbas,S.等人,Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia:prevalence and prognostic value.Blood,2010.116(12):p. 2122-6.

[0594] 9.Green,C.L.等人,The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status.Blood,2010.116(15):p.2779-82.

[0595] 10.Schnittger,S.等人,IDH1 mutations are detected in 6.6%of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60years and unmutated NPM1 status.Blood, 2010.116(25):p.5486-96.

[0596] 11.Marcucci,G.等人,IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia:a Cancer and Leukemia Group B study.J Clin Oncol,2010.28(14):p.2348-55.

[0597] 12.Paschka,P.等人,IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication.J Clin Oncol,2010.28(22):p. 3636-43.

[0598] 13.Ho,P.A.等人,Molecular alterations of the IDH1 gene in AML:a Children's Oncology Group and Southwest Oncology Group study.Leukemia,2010.24 (5):p.909-13.

[0599] 14.Amary,M.F.等人,IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours.J Pathol,2011.224(3): p.334-43.

[0600] 15.Amary,M.F.等人,Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2.Nat Genet,2011.43(12):p.1262-5.

[0601] 16.Borger,D.R.等人,Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase(IDH) 1and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping.Oncologist,2012.17(1):p. 72-9.

[0602] 17.Wang,P.等人,Mutations in isocitrate dehydrogenase 1and 2occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas.Oncogene,2012.

[0603] 18.Sjoblom,T.等人,The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science,2006.314(5797):p.268-74.

[0604] 19.Dang,L.,S.Jin,and S.M.Su,IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia.Trends Mol Med,2010.16(9):p.387-97.

[0605] 20.Suzuki,H.等人,Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas.Nat Genet,2015.47(5):p.458-68.

[0606] 21.Brat,D.J.等人,Comprehensive,Integrative Genomic Analysis of

Diffuse Lower-Grade Gliomas.N Engl J Med,2015.372(26):p.2481-98.

[0607] 22.Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.N Engl J Med, 2013.368(22):p.2059-74.

[0608] 23.Zhao,S.等人,Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha.Science,2009.324(5924):p.261-5.

[0609] 24.Dang,L.等人,Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate.Nature,2009. 462(7274):p.739-44.

[0610] 25.Xu,W.等人,Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of [alpha]-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases.Cancer Cell,2011.19(1):p.17-30.

[0611] 26.Wang,P.等人,Oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate Inhibits ALKBH DNA Repair Enzymes and Sensitizes IDH Mutant Cells to Alkylating Agents.Cell Rep, 2015.13(11):p.2353-61.

[0612] 27.Ma,S.等人,D-2-hydroxyglutarate is essential for maintaining oncogenic property of mutant IDH-containing cancer cells but dispensable for cell growth.Oncotarget,2015.6(11):p.8606-20.

[0613] 28.Luchman,H.A.等人,An in vivo patient-derived model of endogenous IDH1-mutant glioma.Neuro Oncol,2012.14(2):p.184-91.

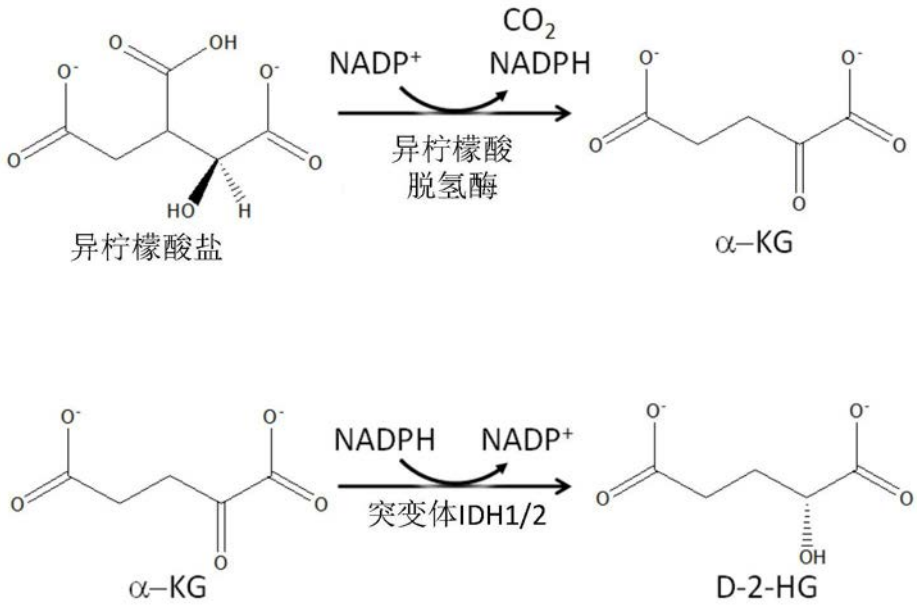

CO2
NADP+
NADPH
异柠檬酸
脱氢酶
异柠檬酸盐
α–KG
NADPH
NADP+
突变体IDH1/2
α–KG
D-2-HG

图1

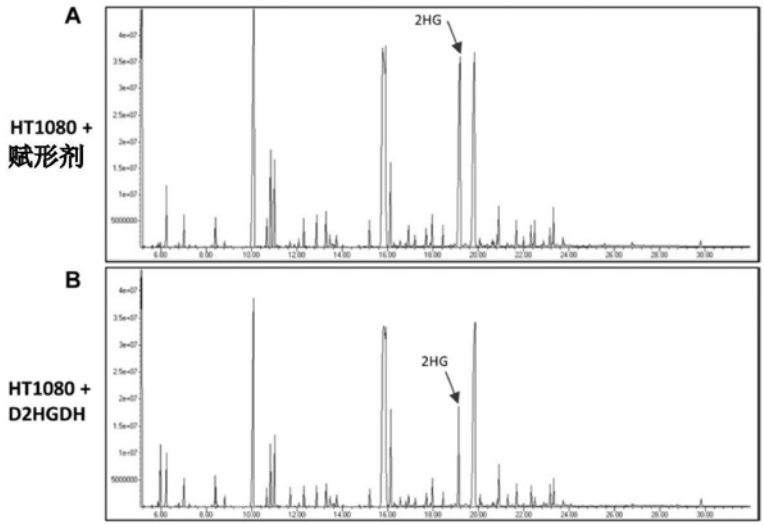

A
2HG
HT1080 +
赋形剂
B
2HG
HT1080 +
D2HGDH

图2A

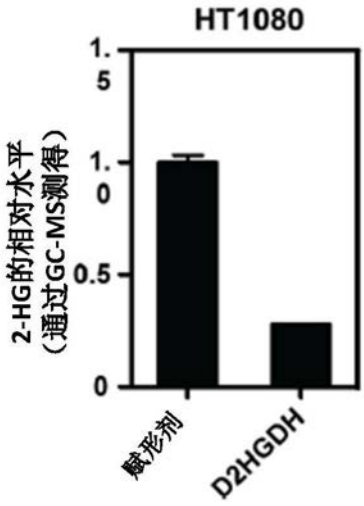

HT1080
2-HG的相对水平
（通过GC-MS测得）
1.5
1.0
0.5
0
威胁剂
D2HGDH

图2B

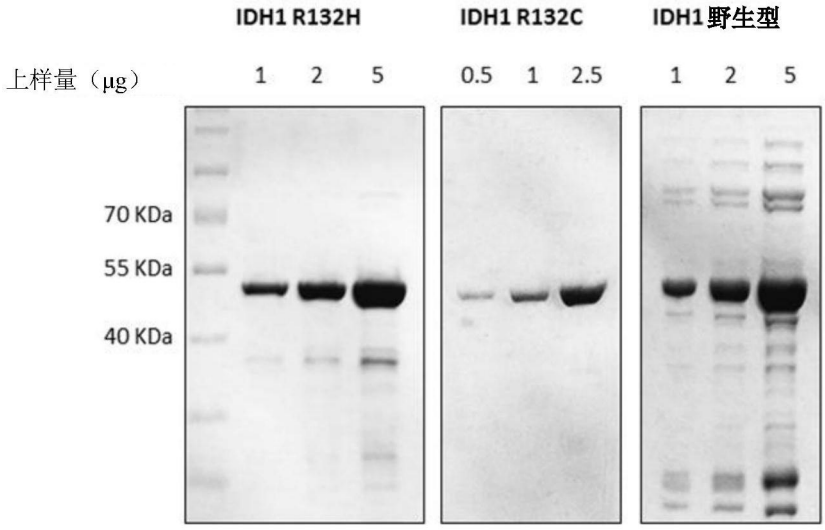

IDH1 R132H
IDH1 R132C
IDH1野生型
上样量（μg）
1 2 5
0.5 1 2.5
1 2 5
70 KDa
55 KDa
40 KDa

图3

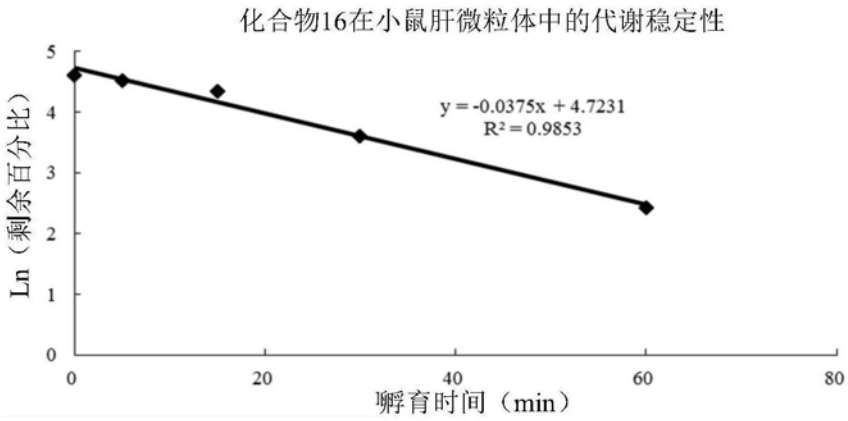

化合物16在小鼠肝微粒体中的代谢稳定性
y = -0.0375x + 4.7231
R² = 0.9853
Ln（剩余百分比）
孵育时间（min）
0
1
2
3
4
5
0
20
40
60
80

图4A

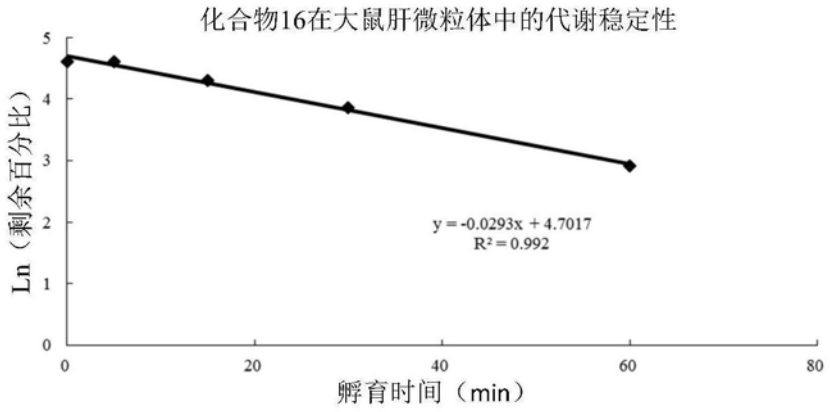

化合物16在大鼠肝微粒体中的代谢稳定性
y = -0.0293x + 4.7017
R² = 0.992
Ln（剩余百分比）
孵育时间（min）
0
1
2
3
4
5
0
20
40
60
80

图4B

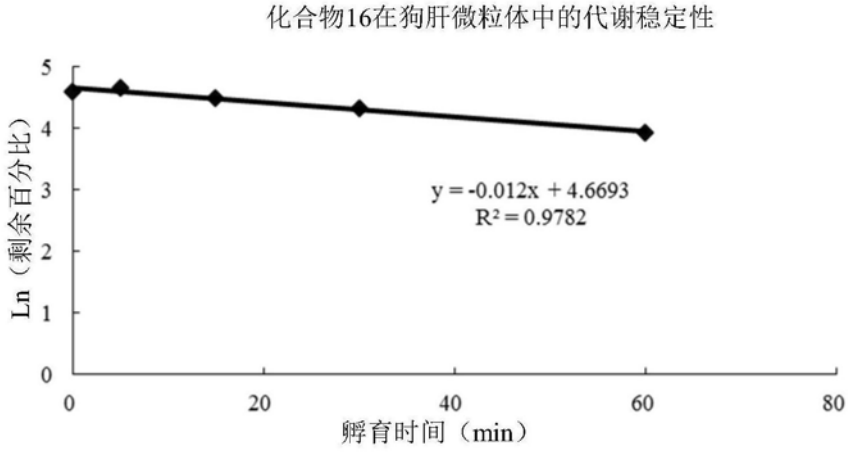

化合物16在狗肝微粒体中的代谢稳定性
y = -0.012x + 4.6693
R² = 0.9782
Ln（剩余百分比）
孵育时间（min）
0
1
2
3
4
5
0
20
40
60
80

图4C

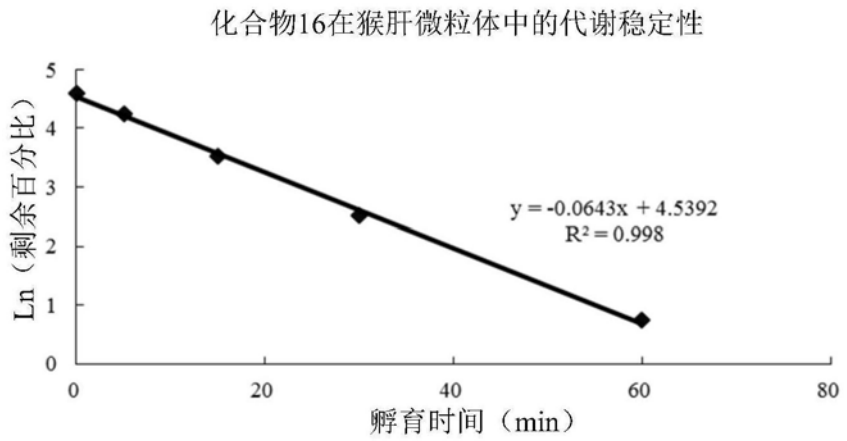

化合物16在猴肝微粒体中的代谢稳定性
Ln（剩余百分比）
y = -0.0643x + 4.5392
R² = 0.998
孵育时间（min）

图4D

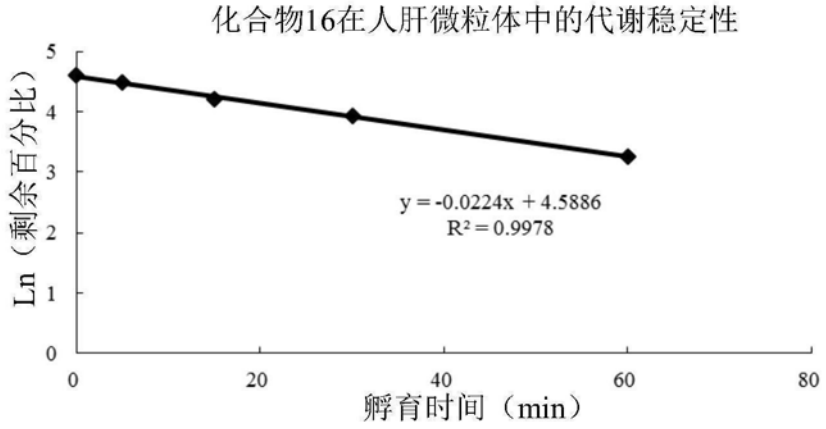

化合物16在人肝微粒体中的代谢稳定性
Ln（剩余百分比）
y = -0.0224x + 4.5886
R² = 0.9978
孵育时间（min）

图4E

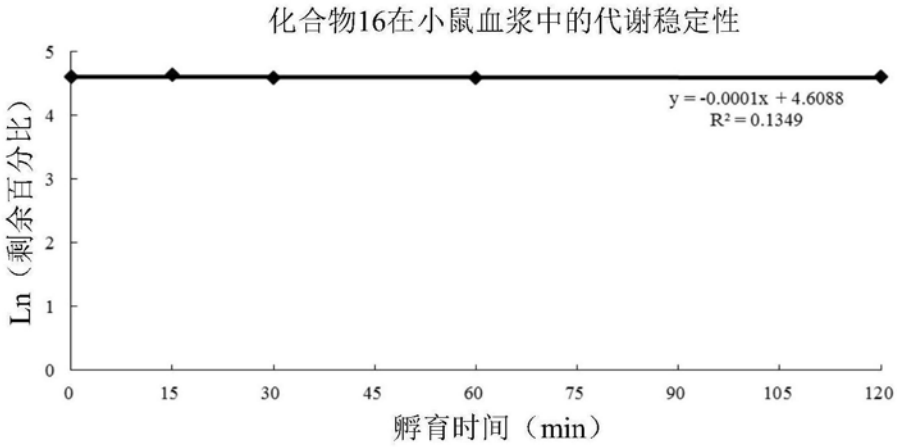

化合物16在小鼠血浆中的代谢稳定性
Ln（剩余百分比）
y = -0.0001x + 4.6088
R² = 0.1349
孵育时间（min）

图5

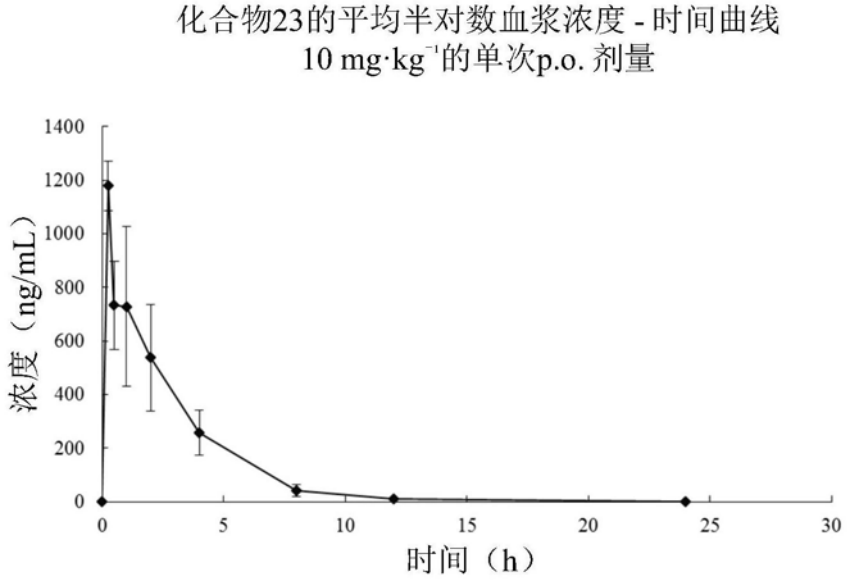

化合物23的平均半对数血浆浓度 - 时间曲线
10 mg·kg⁻¹的单次p.o. 剂量
浓度（ng/mL）
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（h）

图6

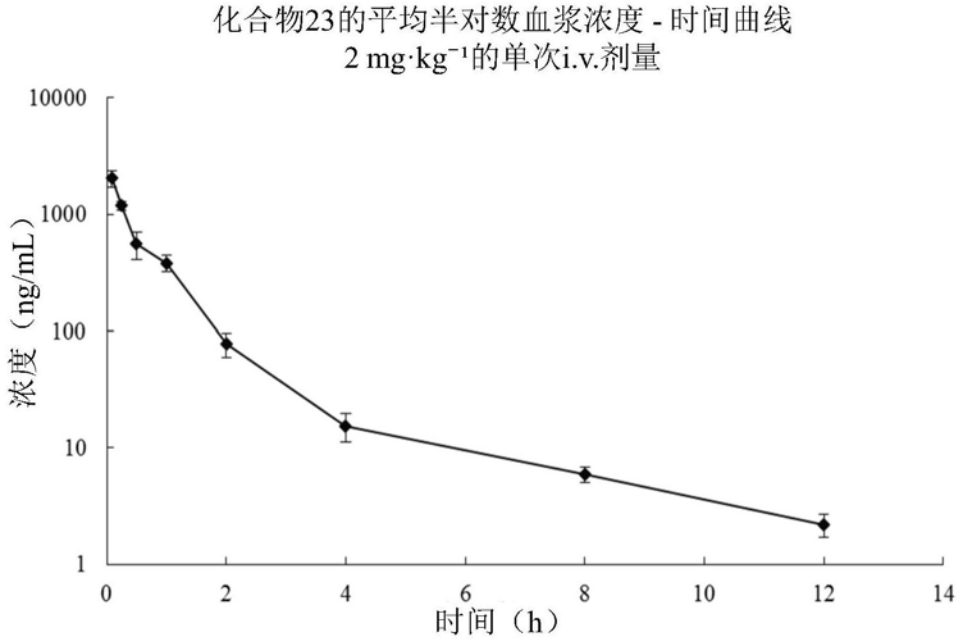

化合物23的平均半对数血浆浓度 - 时间曲线
2 mg·kg⁻¹的单次i.v.剂量
浓度（ng/mL）
10000
1000
100
10
1
0
2
4
6
8
10
12
14
时间（h）

图7

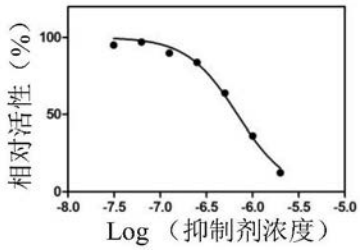


图8A

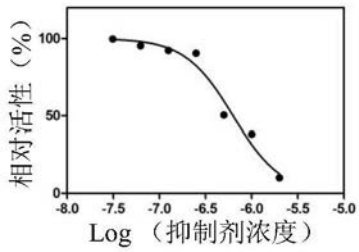


图8B

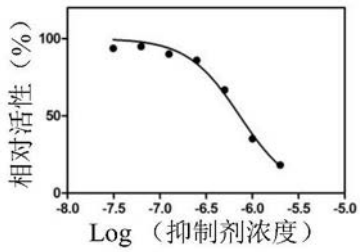


图8C

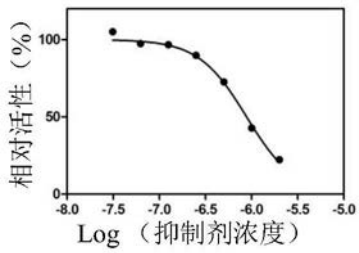


图9A

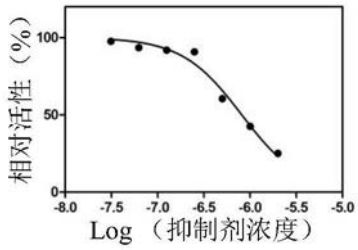


图9B

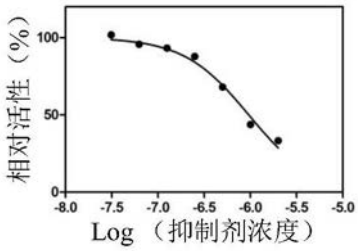


图9C

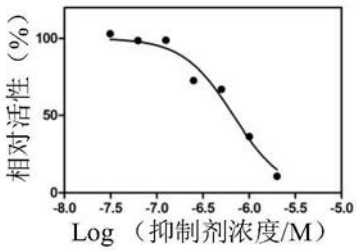


图10A

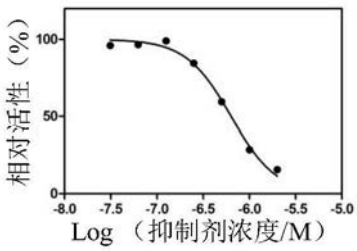


图10B

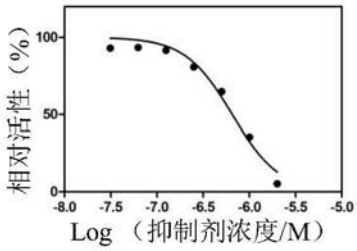


图10C

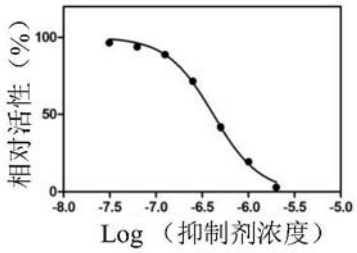


图11A

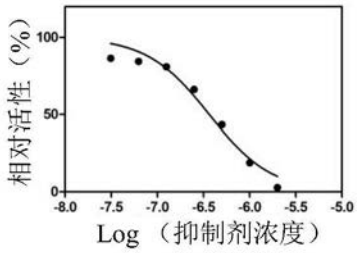


图11B

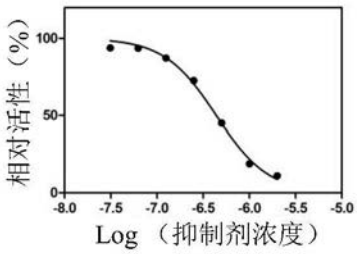


图11C

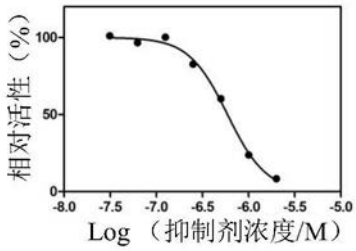


图12A

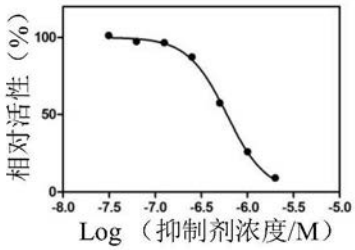


图12B

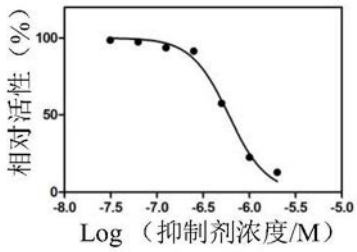


图12C

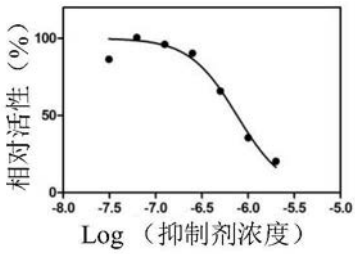


图13A

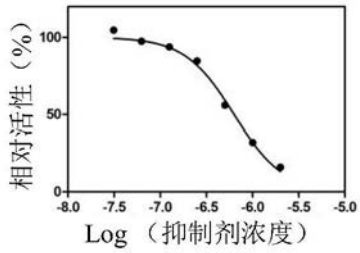


图13B

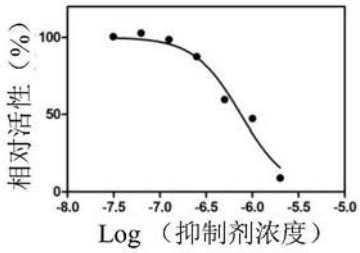


图13C

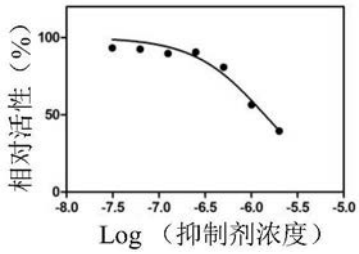


图14A

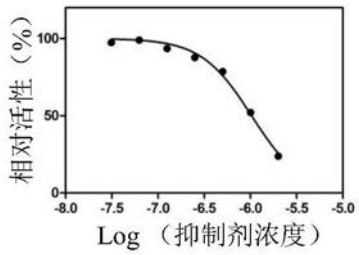


图14B

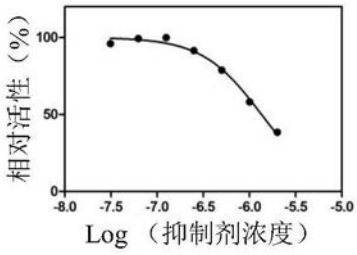


图14C

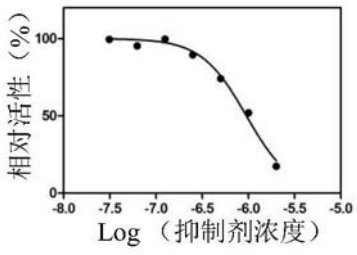


图15A

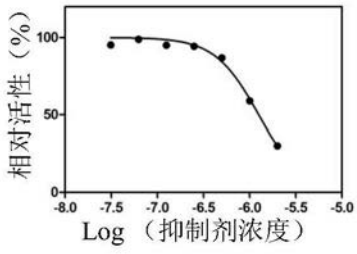


图15B

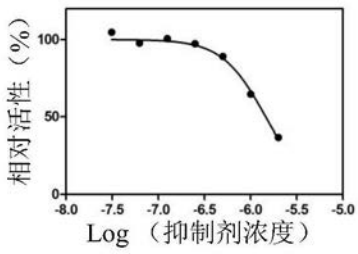


图15C

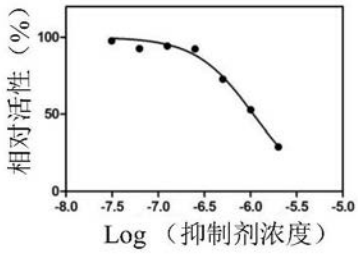


图16A

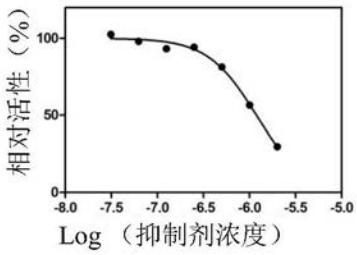


图16B

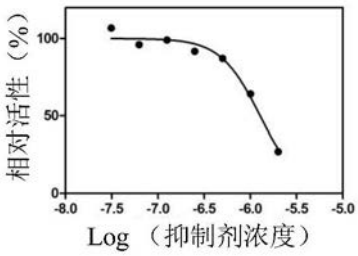


图16C

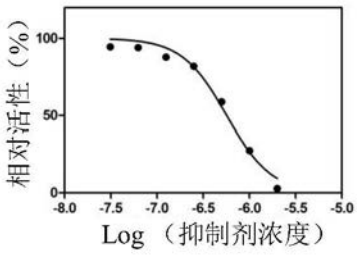


图17A

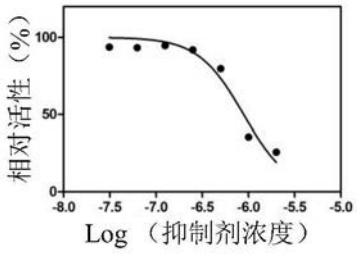


图17B

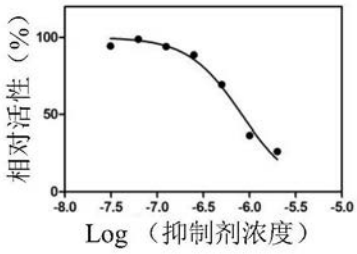


图17C

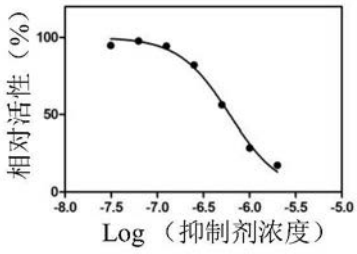


图18A

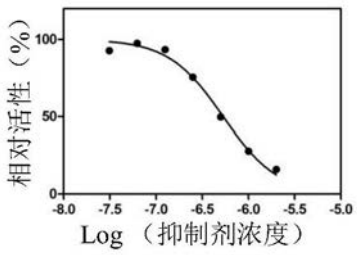


图18B

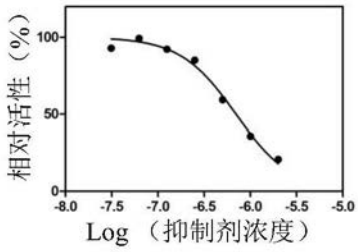


图18C

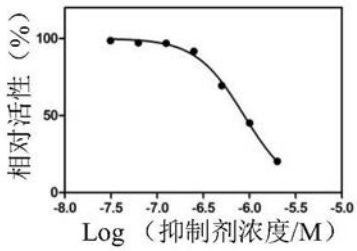


图19A

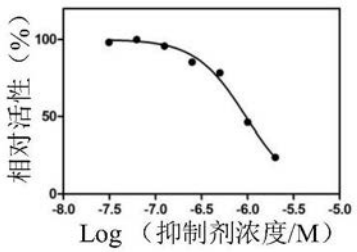


图19B

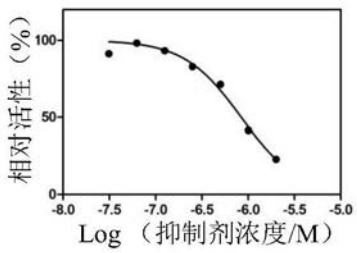


图19C

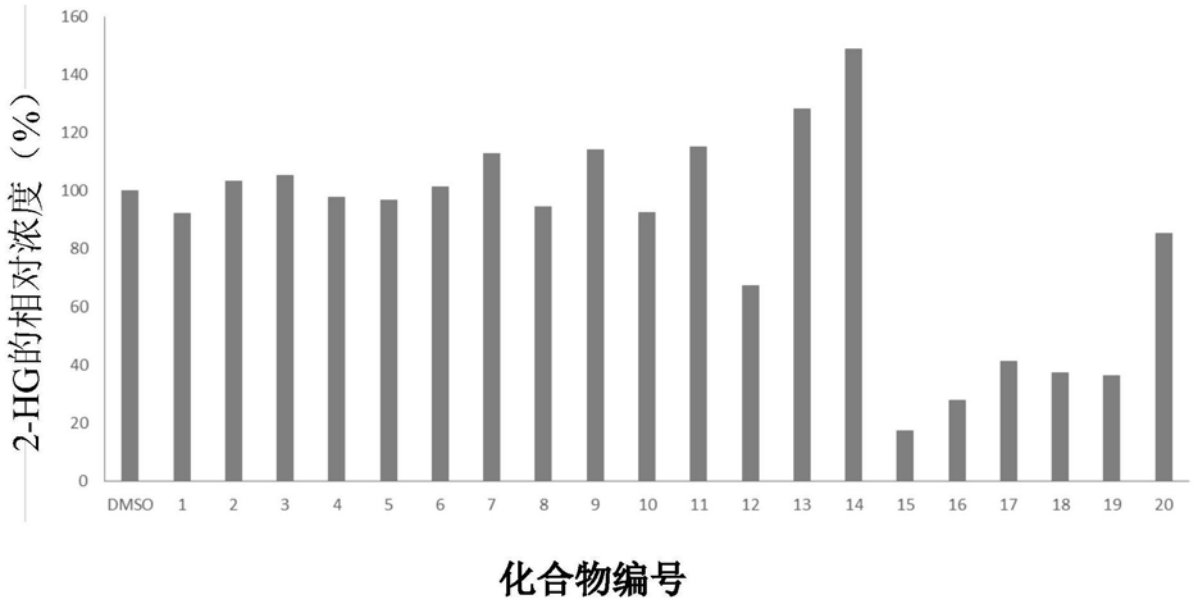

2-HG的相对浓度（%）
160
140
120
100
80
60
40
20
0
DMSO
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
化合物编号

图20