

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 11 月 17 日 (17.11.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/180334 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 487/04 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2016/081669

(22) 国际申请日:

2016 年 5 月 11 日 (11.05.2016)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

201510242552.8 2015 年 5 月 12 日 (12.05.2015) CN
201610286399.3 2016 年 4 月 29 日 (29.04.2016) CN

(71) 申请人: 杭州和正医药有限公司 (HANGZHOU HERTZ PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市杭州经济技术开发区 6 号大街 452 号 2 号楼 B1917 室, Zhejiang 310018 (CN)。

(72) 发明人: 周星露 (ZHOU, Xinglu); 中国浙江省杭州市杭州经济技术开发区 6 号大街 452 号 2 号楼 B1917 室, Zhejiang 310027 (CN)。 刘兴国 (LIU, Xingguo); 中国浙江省杭州市杭州经济技术开发区 6 号大街 452 号 2 号楼 B1917 室, Zhejiang 310027 (CN)。 戈震 (GE, Zhen); 中国浙江省杭州市杭州经济技术开发区 6 号大街 452 号 2 号楼 B1917 室, Zhejiang 310027 (CN)。

(74) 代理人: 杭州天勤知识产权代理有限公司 (HANGZHOU TIANQIN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国浙江省杭州市西湖区竞舟路 1 号筑品金座 501 室, Zhejiang 310013 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: DUAL-SITE IRREVERSIBLE BRUTON'S TYROSINE KINASE INHIBITOR, COMPOSITION AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 双位点不可逆布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂、组合物及其应用

(57) Abstract: The present invention provides a dual-site irreversible Bruton's tyrosine kinase inhibitor, a composition and application thereof. The composition of the present invention has an anti-proliferation effect on tumor cell strains such as A549, SGC7901, MCF-7, HL-60 and PC9-IR, and can be applied to a medicine for treating solid tumors or blood cancer related to human or animal cell proliferation; the composition of the present invention has better pharmacokinetic property, and can be applied to oral administration to treat the solid tumors, the blood cancer or autoimmune diseases related to the human or animal cell proliferation; and the composition of the present invention has the characteristic of dual-site reaction.

(57) 摘要: 本发明提供了一种双位点不可逆布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂、组合物及其应用。本发明化合物对 A549、SGC7901、MCF-7、HL-60、PC9-IR 等肿瘤细胞株具有抗增殖抑制作用, 可应用于治疗人或动物细胞增殖性相关的实体瘤或血癌的药物中; 本发明化合物具有较好的药代动力学性质, 可应用于口服治疗人或动物细胞增殖性相关的实体瘤或血癌或者罹患自身免疫性疾病; 本发明化合物具有双位点的反应特性。



WO 2016/180334 A1

双位点不可逆布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂、组合物及其应用

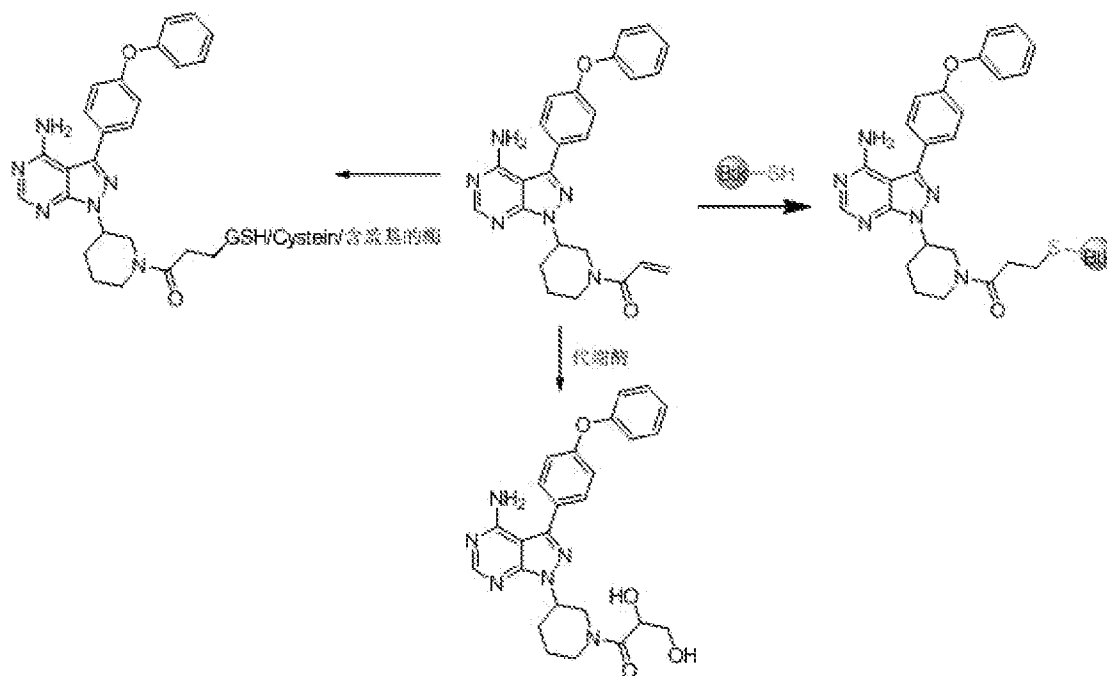
技术领域

本发明属于医药领域，具体是一种双位点不可逆布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂、组合物及其应用。

背景技术

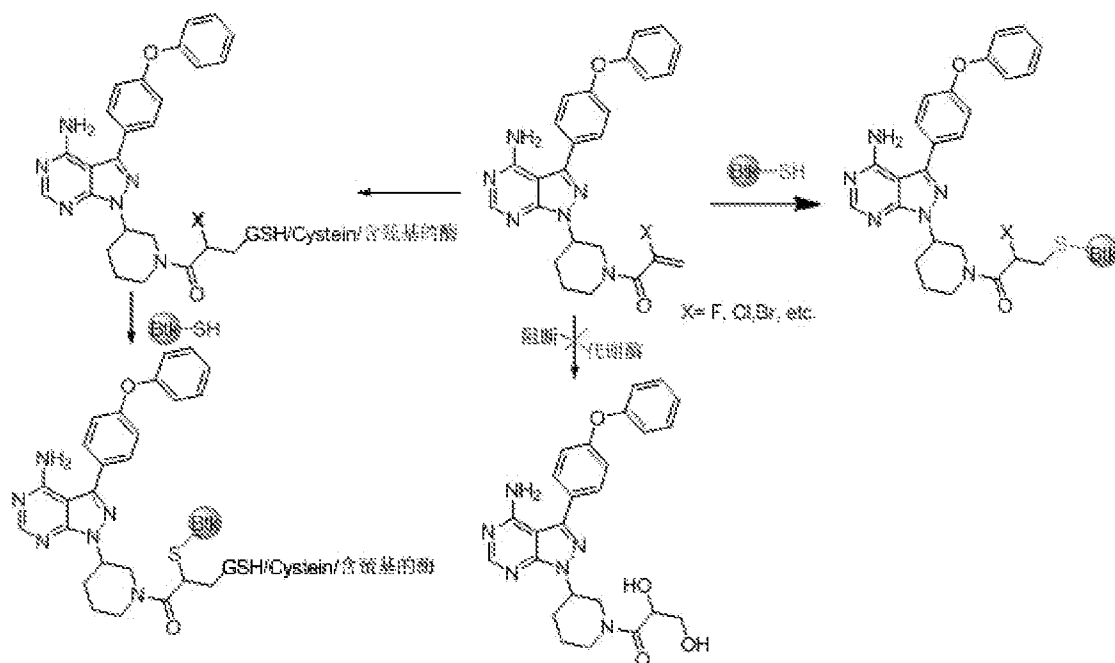
小分子共价抑制剂 (covalent inhibitors)，也称不可逆抑制剂 (irreversible inhibitors)，是通过共价键与靶蛋白残基发生不可逆结合，从而发挥其生物学功能的一类抑制剂。共价抑制剂药物在过去的几十年里对人类健康做出了重要贡献。相对于非共价抑制剂，共价抑制剂通过与靶蛋白以共价键结合增强了与靶标的亲和性，这是共价抑制剂表现其高生物活性的根本原因。近年来，由于非共价靶向抗肿瘤药物特别是大量针对激酶的替尼类药物耐药的产生，使人们又更多地关注共价抑制剂药物。近年来，许多大型制药公司均开展了针对特定酶靶点的共价抑制剂的研发，目前已有部分共价抑制剂进入临床试验，包括阿法替尼、卡那替尼、来那替尼等。其中，阿法替尼已于2013年7月12日被美国FDA正式批准用于治疗表皮生长因子受体(EGFR)基因突变的转移性非小细胞肺癌，成为首个被FDA批准的治疗肺癌的不可逆抑制剂新药。此外，抗病毒的共价药物也是近年来的研究热点，并且已取得了很大的进展，例如，2011年FDA已批准了两个抗丙型肝炎病毒共价抑制剂药物，即特拉匹韦 (Telaprevir) 和波普瑞韦 (Boceprevir)。这些研究证明了不可逆抑制剂可有效用于疾病的治疗。

布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, Btk)，一种非受体酪氨酸激酶 Tec 家族的成员，是在除了 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞之外的所有造血细胞类型中表达的关键信号酶。Btk 在连接细胞表面 B 细胞受体 (B-cell receptor, BCR) 刺激至下游细胞内应答的 B 细胞信号传导途径中扮演至关重要的角色。Btk 是 B 细胞发育、激活、信号传导和存活的关键调节物。另外，Btk 在众多其他造血细胞信号传导途径中起作用，例如在巨噬细胞中的 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 和细胞因子受体介导的 TNF- α 产生、在肥大细胞中的免疫球蛋白 E 受体 (Fc ϵ R1) 信号传导、在 B-谱系淋巴样细胞中抑制 Fas/APO-1 细胞凋亡的信号传导以及胶原刺激的血小板聚集。参见例如 C.A. Jeffries 等，J. Bio. Chem. (2003) 278: 26258-26264、N. J. Horwood 等，J. Exp. Med. (2003) 197: 1603-1611。近年来研究显示，Btk 信号通路是目前非霍奇金淋巴瘤 (NHL)，特别是慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、B 细胞淋巴瘤及自身免疫疾病临床研究中的新热点。小分子 Btk 抑制剂通过作用于 BCR 信号通路，与 Btk 结合而抑制 Btk 自身磷酸化，阻止 Btk 的激活，从而阻断细胞传导并诱导细胞凋亡。Btk 抑制剂选择性强，毒副作用低，特别是伊布替尼的上市，被 FDA 定为“突破性”新药，其研究开发前景广阔。伊布替尼与 Btk 酶半胱氨酸 (Cys481) 残基的巯基发生反应，并形成共价键，使 Btk 酶失活而发挥疗效。然而，伊布替尼在给药过程中，易被代谢 (被代谢酶氧化代谢成双羟化产物或者被其他含巯基的酶、半胱氨酸、谷胱甘肽等进攻而失活) 而影响药效 (见下式)，其临床给药剂量达到了 560mg/天，而使病人负担加重，因此仍需发展一类更为高效的 BTK 抑制剂用于相关疾病的治疗。



发明内容

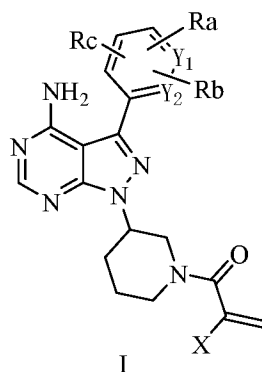
本发明的目的在于提供新颖的、未见文献报道的双位点 BTK 不可逆抑制剂或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物。基于伊布替尼的体内代谢途径分析，假如在伊布替尼的 α, β -不饱和双键的近端引入卤素原子，使得其代谢位点被占据而阻断双键被代谢酶所双羟化，进而提高其体内的代谢稳定性。更为重要的是，由于卤素原子的引入，使得新分子具有了双反应位点，在体内（或者细胞内）被其他含巯基的酶、半胱氨酸、谷胱甘肽等后，仍然具有一个可与 Btk 酶半胱氨酸（Cys481）残基的巯基发生反应的位点--- α 卤代的酰胺基团（见下式），进而起到活性增强的效果。



由于伊布替尼在水中的溶解度较低，在其芳香环中引入氮原子，可以提高其水溶解性。

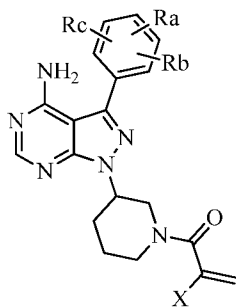
本发明采用如下的技术方案：

本发明所提供的布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂，其具有通式 I 的结构：



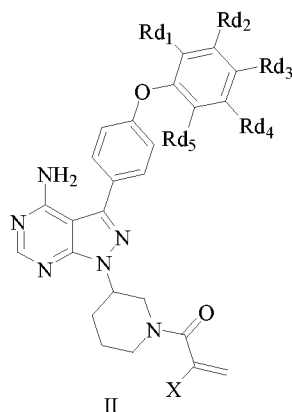
或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：Ra, Rb, Rc 独立选自 H、卤素、-CF₃、-CN、-NO₂、OH、NH₂、-L-C₁-C₆ 的烷基、-L-C₁-C₆ 的烯基、-L-取代或非取代的杂芳基、或-L-取代或非取代的芳基，其中 L 是键、O、S、-S(=O)、-S(=O)₂、NH、C(O)、CH₂、-NHC(O)O、-NHC(O)或-C(O)NH，X 选自氟、氯或溴，Y₁, Y₂ 独立选自 C、N。

本发明所提供的 BTK 抑制剂具有如下结构：



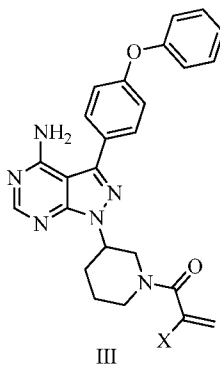
或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：Ra, Rb, Rc 独立选自 H、卤素、-CF₃、-CN、-NO₂、OH、NH₂、-L-C₁-C₆ 的烷基、-L-C₁-C₆ 的烯基、-L-取代或非取代的杂芳基、或-L-取代或非取代的芳基，其中 L 是键、O、S、-S(=O)、-S(=O)₂、NH、C(O)、CH₂、-NHC(O)O、-NHC(O)或-C(O)NH，X 选自氟、氯或溴。

更进一步地，本发明优选的化合物具有通式(II)结构：



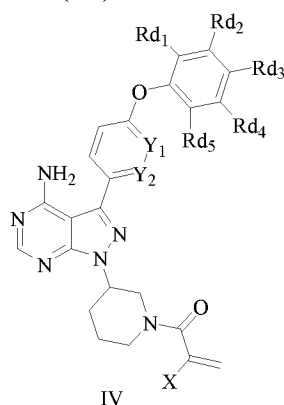
或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：Rd₁、Rd₂、Rd₃、Rd₄、Rd₅ 独立是 H、卤素、-CF₃、-CN、-NO₂、-OH、C₁-C₃ 的烷氧基、或-NH₂，X 选自氟、氯或溴。

更进一步地，本发明优选的化合物具有通式(III)结构：



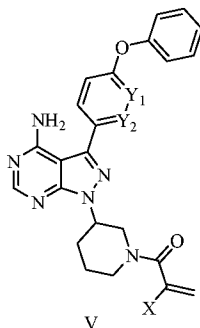
或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：X选自氟、氯或溴。

本发明所提供的 BTK 抑制剂具有通式(IV)结构：



或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：Rd₁、Rd₂、Rd₃、Rd₄、Rd₅独立地是 H、卤素、-CF₃、-CN、-NO₂、-OH、C₁-C₃ 的烷氧基、或-NH₂，X 选自氟、氯或溴，Y₁、Y₂ 独立选自 C、N，且 Y₁、Y₂ 至少有一个选自 N。

更进一步地，本发明优选的化合物具有通式(V)结构：



或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：X 选自氟、氯或溴，Y₁、Y₂ 独立选自 C、N，且 Y₁、Y₂ 至少有一个选自 N。

术语说明：本文所用术语“芳基”是指 5 到 12 个碳原子的全碳单环或稠合多环基团，具有完全共轭的 π 电子系统。芳环的非限制性实例有：苯环、萘环和蒽环。芳环可以是无取代或取代的。芳环的取代基选自卤素、硝基、氨基、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、卤代 C₁-C₆ 烷基、卤代 C₁-C₆ 烷氧基、C₃-C₆ 环烷基、卤代 C₃-C₆ 环烷基；

本文所用术语“杂芳基”指 5 到 12 个环原子的不饱和的环基团，具有完全共轭的 π 电子系

统,相当于上述“芳基”中一个或多个碳被杂原子例如氧、氮、硫等置换。杂芳环可以是单环,也可以是双环,即通过两个环稠合而成。具体的杂环芳基(杂芳基)可以是:吡啶基,嘧啶基,吡嗪基,异恶唑基,异噻唑基,吡唑基,噻唑基,恶唑基和咪唑基等。杂环芳基可以是无取代或取代的。杂环芳基的取代基选自卤素、硝基、氨基、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、卤代 C_1 - C_6 烷基、卤代 C_1 - C_6 烷氧基、 C_3 - C_6 环烷基、卤代 C_3 - C_6 环烷基;

本文所用术语“烷氧基”是指-O-烷基基团,其中烷基如上所定义。本文所用“烷氧基”的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基和叔丁氧基。“烷氧基”还包括取代烷氧基。烷氧基可任选被卤素取代一次或多次。

术语“烯基”是指一类烷基,其中烷基的起始的两个原子形成双键,该双键不是芳香基的组成部分。也就是说,烯基始于原子- $C(R_1)=C(R_2)-R_3$,其中 R_1 、 R_2 、 R_3 是指烯基的其余部分, R_1 、 R_2 、 R_3 可以相同或不同。烯基部分可以是支链、直链或环状的(在此情况下,它也会被称为“环烯基”)。根据结构,烯基可以是单价基团或双价基团(即亚烯基)。烯基可以是任选取代的。烯基的非限制性实例包括- $CH=CH_2$ 、- $C(CH_3)=CH_2$ 、- $CH=CHCH_3$ 、- $C(CH_3)=CHCH_3$ 。亚烯基包括但不限于- $CH=CH-$ 、- $C(CH_3)=CH-$ 、- $CH=CHCH_2-$ 、- $CH=CHCH_2CH_2-$ 和- $C(CH_3)=CHCH_2-$ 。烯基可以具有2-10个碳原子。烯基也可以说具有2-6个碳原子的“低级烯基”。

术语“药学可接受衍生物”是指所选化合物的盐或溶剂合物。

本文所用术语“溶剂合物”是指由溶质(例如:本发明的通式(I)~通式(V)化合物)和溶剂形成的可变化学计量的复合物。为了本发明的目的,所述溶剂不能干扰溶质的生物学活性。合适的溶剂的实例包括但不限于水、甲醇、乙醇和乙酸。优选使用的溶剂为药学可接受溶剂。合适的药学可接受溶剂包括但不限于水、乙醇和乙酸。更优选地,所用溶剂为水。

本发明采用本领域技术人员所熟知的方法可以制备本发明所述化合物的盐。所述的盐可以是有机酸盐、无机酸盐等,所述的有机酸盐包括枸橼酸盐、富马酸盐、草酸盐、苹果酸盐、乳酸盐、樟脑磺酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐等;所述的无机酸盐包括氢卤酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐等。例如,与低级烷基磺酸,如甲磺酸,三氟甲磺酸等可形成甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐;与芳基磺酸,如苯磺酸或对甲苯磺酸等可形成对甲苯磺酸盐、苯磺酸盐;与有机羧酸,如乙酸,富马酸,酒石酸,草酸,马来酸,苹果酸,琥珀酸或柠檬酸等可形成相应的盐;与氨基酸,如谷氨酸或天冬氨酸可形成谷氨酸盐或天冬氨酸盐。与无机酸,如氢卤酸(如氢氟酸、氢溴酸、氢碘酸、氢氯酸),硝酸,碳酸,硫酸或磷酸等也可形成相应的盐。

本发明的第二个目的是提供一种药物组合物,所述药物组合物包含至少一种活性组分以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂,所述的活性组分可以是本发明的 BTK 抑制剂化合物、所述化合物的光学异构体、所述化合物或其光学异构体在药学上可接受的盐、所述化合物或其光学异构体的溶剂合物中的任意一种或任意多种。

所述载体包括药学领域的常规稀释剂,赋形剂,填充剂,粘合剂,湿润剂,崩解剂,吸收促进剂,表面活性剂,吸附载体,润滑剂等,必要时还可以加入香味剂,甜味剂等。本发明药物可以制成片剂,粉剂,粒剂,胶囊,口服液及注射用药等多种形式,上述各剂型的药物均可以按照药学领域的常规方法制备。

另一方面,本发明提供的是使用本文公开的通式(I)~通式(V)所述的化合物及其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物来抑制布鲁顿酪氨酸激酶(Btk)活性或者治疗从布鲁顿酪氨酸激酶(Btk)活性的抑制中获益的疾病、障碍或病症。

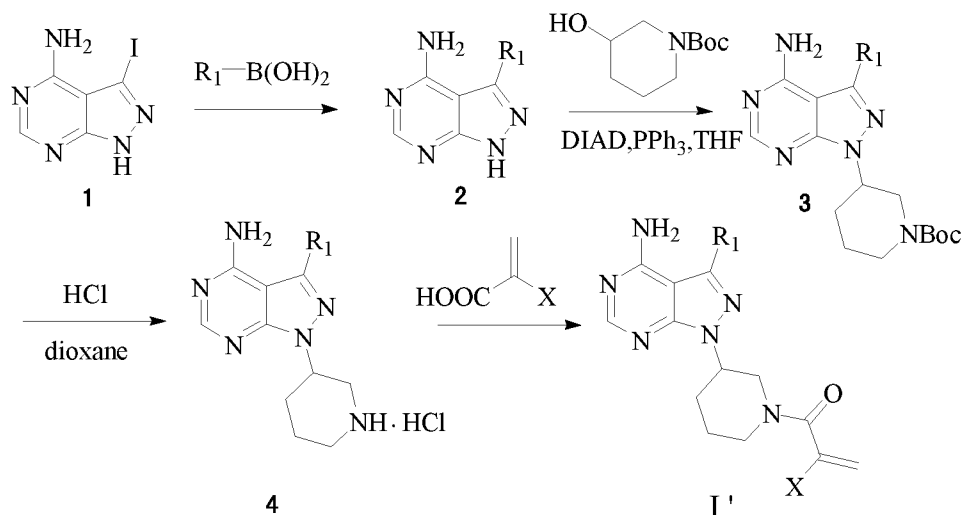
在进一步优选的方案中,本文提供的是通过给予有需要的治疗者一种含有治疗有效量的至

少一种化合物的组合物、从而抑制所述受治疗者的布鲁顿酪氨酸激酶活性的方法，其中所述化合物的结构式为通式(I)~通式(V)。在一些实施方式中，有需要的受治疗者罹患自身免疫性疾病，例如炎症肠病、关节炎、狼疮、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、骨关节炎、斯蒂尔病(Still's disease)、青少年关节炎、糖尿病、重症肌无力症、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、奥德甲状腺炎(Ord's thyroiditis)、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、类风湿性关节炎综合征(Sjögren's syndrome)、多发性硬化症、传染性神经元炎(Guillain-Barré syndrome)、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森病(Addison's disease)、视性眼阵挛-肌阵挛综合征、强制性脊椎炎、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、自身免疫性肝炎、乳糜泻(coeliac disease)、古德帕斯特综合征(Goodpasture's syndrome)、特发性血小板减少性紫癜、视神经炎、硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、莱特尔综合征(Reiter's syndrome)、高安动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎、温型自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、银屑病、全身脱毛、贝赫切特病(Behçet's disease)、慢性疲劳、家族性自主神经功能异常、子宫内膜异位、间质性膀胱炎、神经肌强直、硬皮病或外阴痛。

在进一步的实施方式中，有需要的受治疗者罹患癌症。在一个实施方式中，所述癌症是B细胞增生性疾病，例如弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤/瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞性骨髓瘤、浆细胞瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、纵膈(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)/白血病或淋巴瘤样肉芽肿病。

本发明还提供本发明所述的化合物或其可药用盐在制备BTK抑制剂中的应用，特别是在制备治疗细胞增生疾病中的应用。所述的细胞增生疾病包括癌症。换言之，本发明还提供通式(I)~通式(V)所述的化合物、及其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物单独或和其他药物联合使用在治疗增生类疾病(如癌症)中的应用。能和本发明所提供的化合物或其可药用盐联合使用的抗肿瘤药包括但并非限定至少一种以下种类：有丝分裂抑制剂(如长春碱、长春地辛和长春瑞宾)；微管蛋白分解抑制剂(如泰素)；烷基化试剂(如顺铂、卡铂和环磷酰胺)；抗代谢物(如5-氟尿嘧啶、替加氟、甲氨蝶呤、阿糖胞苷和羟基脲)；可插入抗生素(如阿霉素、丝裂霉素和争光霉素)；酶(如天门冬氨酶)；拓扑异构酶抑制剂(如依托泊苷和喜树碱)；生物反应调节剂(如干扰素)。

本发明还提供了制备通式(I')及其药学可接受衍生物的方法，以如下方案所示的合成路线合成：



如上述合成路线所示, 化合物 1 (参考 WO2012158795 的方法制备) 与 $R_1B(OH)_2$ 在磷酸钾、钯催化剂及合适的溶剂或混合溶剂如二氧六环/水存在下, 回流反应, 得到的化合物 2 在三苯基磷、DIAD 及合适溶剂如 THF 存在下, 与 Boc 保护的 3-羟基哌啶反应得到化合物 3, 随后在酸性条件下水解制备关键中间体 4。该关键中间体 DCC 及合适溶剂如 DCM 存在下, 与取代丙烯酸片段缩合反应, 得到通式(I')化合物。上式中, R_1 的结构与上文中通式(I)~通式(V)所述的化合物对应, 可根据实际需要选择适当的取代硼酸。例如常用的取代硼酸包括但不限于 4-苯氧基苯硼酸、4-(4-甲氧基苯氧基)苯硼酸、4-(3-甲氧基苯氧基)苯硼酸、4-(3,4-二甲氧基苯氧基)苯硼酸、4-(4-氟苯氧基)苯硼酸、4-(4-氯苯氧基)苯硼酸、6-苯氧基吡啶-3-基硼酸、6-(2-氟苯氧基)吡啶-3-基硼酸、6-(4-氟苯氧基)吡啶-3-基硼酸等等。

本发明发明人通过实验证实, 本发明化合物对 A549、SGC7901、MCF-7、PC-9、HL-60 等肿瘤细胞株具有抗增殖抑制作用, 可应用于治疗人或动物细胞增殖性相关的实体瘤或血癌的药物中。

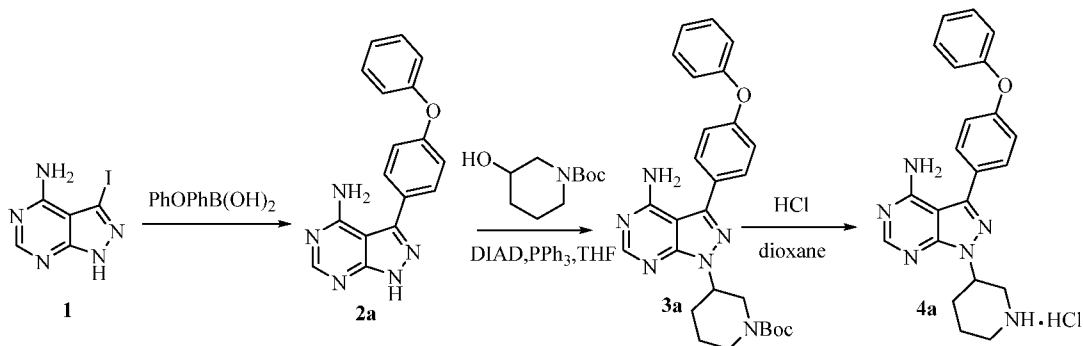
本发明发明人通过实验证实, 本发明化合物具有较好的药代动力学性质, 可应用于口服治疗人或动物细胞增殖性相关的实体瘤或血癌或者罹患自身免疫性疾病。

本发明发明人通过实验证实, 本发明化合物具有双位点的反应特性。

具体实施方式

下面通过实施例来说明本发明的可实施性, 本领域的技术人员应当理解, 根据现有技术的教导, 对相应的技术特征进行修改或替换, 仍然属于本发明要求保护的范围。

实施例 1. 关键中间体 4a 的制备



步骤 1. 3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物 2a) 的合成

将3-碘-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺(化合物1)(2.61g, 10mmol)、4-苯氧基苯硼酸(3.85g, 18mmol)和磷酸钾(5.375g, 25mmol)依次加入单颈瓶中, 加入1,4-二氧六环(40mL)和水(10mL), 氮气保护下, 加入三苯基磷钼(1.76g, 1.5mmol), 回流反应24h。反应完毕冷却至室温, 搅拌过夜, 析出黄色沉淀, 抽滤, 水洗(50ml*3), 干燥24小时后得黄色固体2.18g, 为3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物2a), 产率72%, LC-ESI-MS: $[M+H]=304.2$ 。

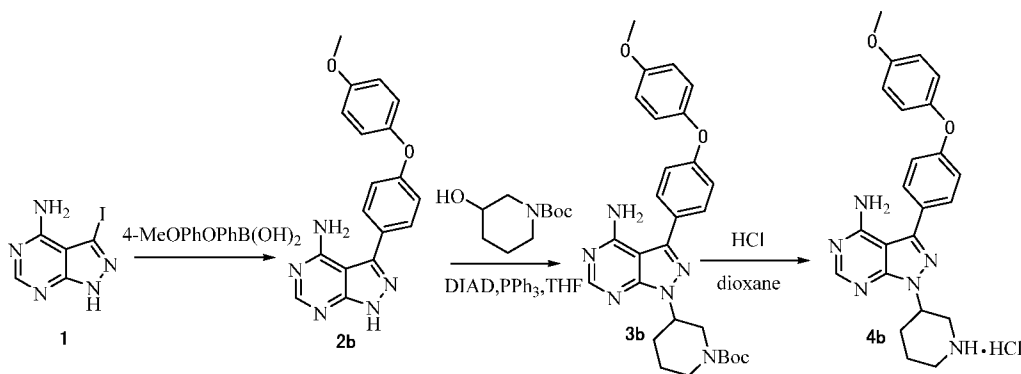
步骤2. 3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物3a)的合成

将3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物2a) (2.12g, 7mmol)、3-羟基哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.55g, 7.7mmol)、三苯基磷(2.75g, 10.5mmol)和偶氮二异丁腈(2.12g, 10.5mmol)溶于THF(250ml)中, 室温反应12h(TLC薄层层析监测反应是否完全)。反应完毕后, 减压回收溶剂。向剩余反应混合物中加入100乙酸乙酯, 用100ml*3饱和碳酸钠溶液萃取有机层3次, 合并有机相, 饱和氯化钠洗1次后, 无水硫酸钠干燥。减压回收溶剂得到棕色固体1.12g, 产率33%, LC-ESI-MS: $[M+H]=487.3$ 。

步骤3. 3-(4-苯氧基苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐(化合物4a)的合成

将3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物3a) (0.97g, 2mmol)溶解于15ml二氧六环, 滴加10ml 2N HCl, 室温搅拌过夜。减压回收溶剂得到的粗品用甲醇重结晶, 得到类白色固体4a(0.56g, 产率66%, LC-ESI-MS: $[M+H]=387.1$)。

实施例 2. 关键中间体 4b 的制备



步骤 1. 3-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物 2b)的合成

合成步骤参考实施例1步骤1. 用类似于化合物2a的合成方法, 从4-(4-甲氧基苯氧基)苯硼酸(4.39g, 18mmol)制备化合物2b (2.56g, 产率77%), LC-ESI-MS: $[M+H]=334.1$ 。

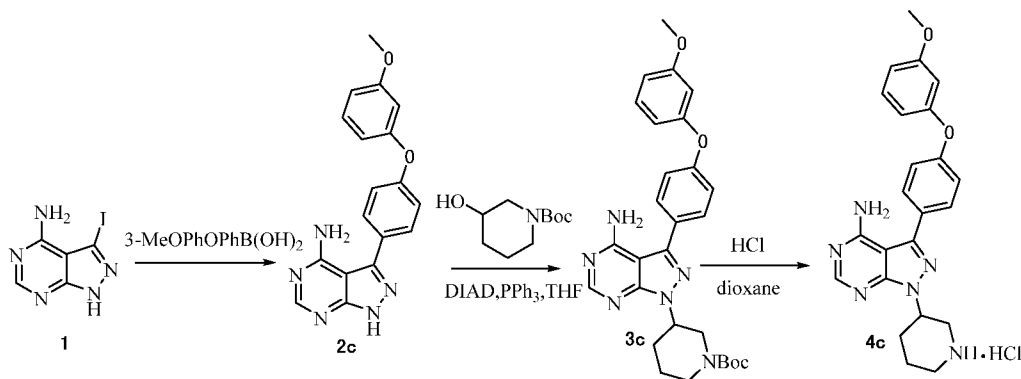
步骤2. 3-(4-氨基-3-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物3b)的合成

合成步骤参考实施例1步骤2. 用类似于化合物3a的合成方法制备化合物3b (1.26g, 产率35%), LC-ESI-MS: $[M+H]=516.2$ 。

步骤3. 3-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐(化合物4b)的合成

合成步骤参考实施例1步骤3. 用类似于化合物4a的合成方法制备化合物4b (0.59, 产率65%, LC-ESI-MS: $[M+H]=417.3$)。

实施例 3. 关键中间体 4c 的制备



步骤 1. 3-(4-(3-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物 2c) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 1. 用类似于化合物 2a 的合成方法, 从 4-(3-甲氧基苯氧基)苯硼酸 (4.39g, 18mmol) 制备化合物 2c (2.49g, 产率 75%, LC-ESI-MS: $[M+H]=334.1$).

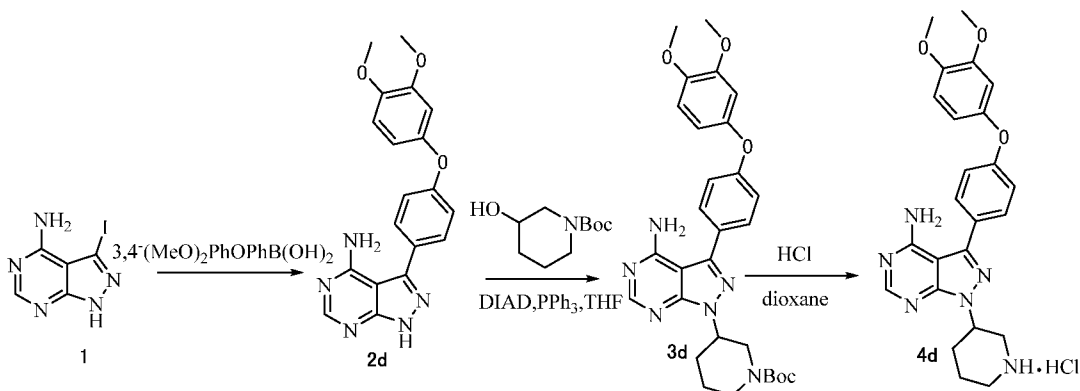
步骤 2. 3-(4-氨基-3-(4-(3-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物 3c) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 2. 用类似于化合物 3a 的合成方法制备化合物 3c (1.25g, 产率 35%), LC-ESI-MS: $[M+H]=517.2$.

步骤 3. 3-(4-(3-甲氧基苯氧基)苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐 (化合物 4c) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 3. 用类似于化合物 4a 的合成方法制备化合物 4c (0.61g, 产率 68%, LC-ESI-MS: $[M+H]=417.3$).

实施例 4. 关键中间体 4d 的制备



步骤 1. 3-(4-(3,4-二甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物 2d) 的合成
合成步骤参考实施例 1 步骤 1. 用类似于化合物 2a 的合成方法, 从 4-(3,4-二甲氧基苯氧基)苯硼酸 (4.93g, 18mmol) 制备化合物 2d (2.62g, 产率 72%), LC-ESI-MS: $[M+H]=367.1$.

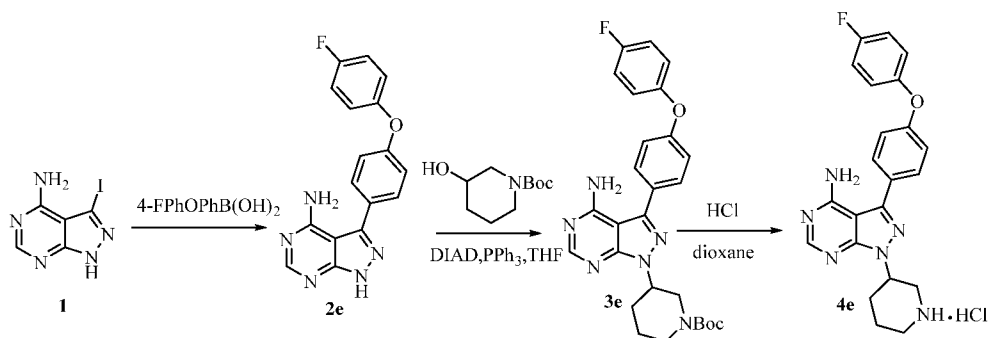
步骤 2. 3-(4-氨基-3-(4-(3,4-二甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物 3d) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 2. 用类似于化合物 3a 的合成方法制备化合物 3d (1.04g, 产率 30%), LC-ESI-MS: $[M+H]=547.3$.

步骤 3. 3-(4-(3,4-二甲氧基苯氧基)苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐 (化合物 4d) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 3. 用类似于化合物 4a 的合成方法制备化合物 4d (0.53g, 产率 64%, LC-ESI-MS: $[M+H]=447.1$).

实施例 5. 关键中间体 4e 的制备



步骤 1. 3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物 2e) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 1. 用类似于化合物 2a 的合成方法, 从 4-(4-氟苯氧基)苯硼酸 (4.18g, 18mmol) 制备化合物 2e (2.37g, 产率 74%), LC-ESI-MS: $[M+H]=322.4$ 。

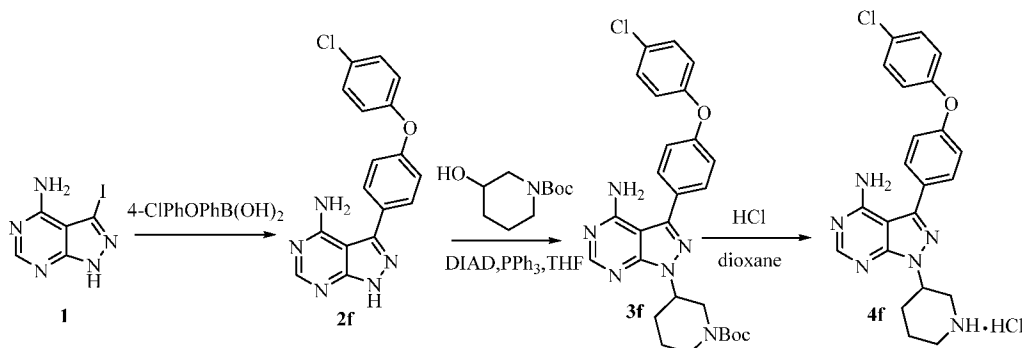
步骤 2. 3-(4-氨基-3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物 3e) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 2. 用类似于化合物 3a 的合成方法制备化合物 3e (1.30g, 产率 37%), LC-ESI-MS: $[M+H]=504.2$ 。

步骤 3. 3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐 (化合物 4e) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 3. 用类似于化合物 4a 的合成方法制备化合物 4e (0.65g, 产率 74%, LC-ESI-MS: $[M+H]=405.1$)。

实施例 6. 关键中间体 4f 的制备



步骤 1. 3-(4-(4-氯苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物 2f) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 1. 用类似于化合物 2a 的合成方法, 从 4-(4-氯苯氧基)苯硼酸 (4.46g, 18mmol) 制备化合物 2f (2.29g, 产率 68%), LC-ESI-MS: $[M+H]=338.1$ 。

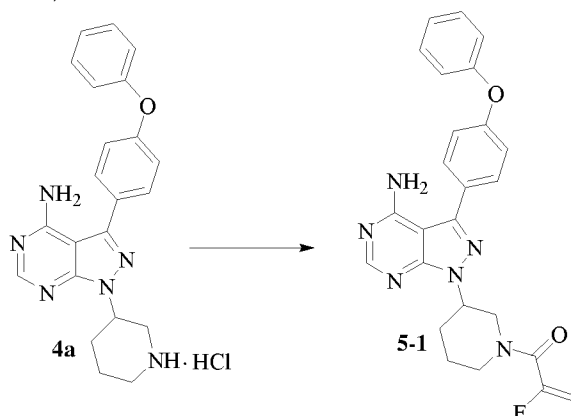
步骤 2. 3-(4-氨基-3-(4-(4-氯苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物 3f) 的合成

合成步骤参考实施例 1 步骤 2. 用类似于化合物 3a 的合成方法制备化合物 3f (1.46g, 产率 40%), LC-ESI-MS: $[M+H]=521.2$ 。

步骤 3. 3-(4-(4-氯苯氧基)苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐 (化合物 4f) 的合成

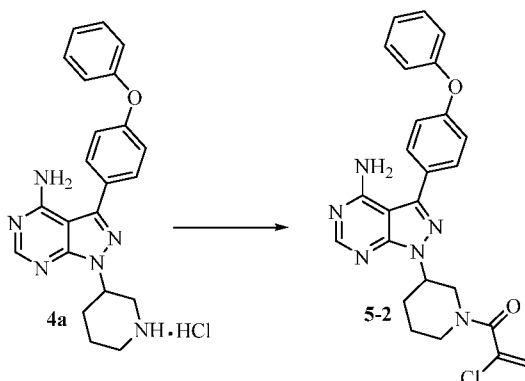
合成步骤参考实施例 1 步骤 3. 用类似于化合物 4a 的合成方法制备化合物 4f (0.72g, 产率 79%, $[M+H]=421.2$)。

实施例 7. 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氟丙基

-2-烯-1-酮的制备 (化合物 5-1)

化合物 **4a**(548mg, 1.3mmol), 2-氟丙烯酸(117mg, 1.3mmol)溶于 5ml 二氯甲烷, 室温滴加 DCC(267mg, 1.3mmol)的二氯甲烷(5ml)溶液, 回流反应 4 小时。反应结束后, 冷却至室温, 抽滤, 滤液浓缩后, 柱层析分离(石油醚: 乙酸乙酯: 三乙胺=2: 1: 0.1)得白色固体 207mg, 产率 35%, LC-ESI-MS: $[M+H]=459.2$ 。

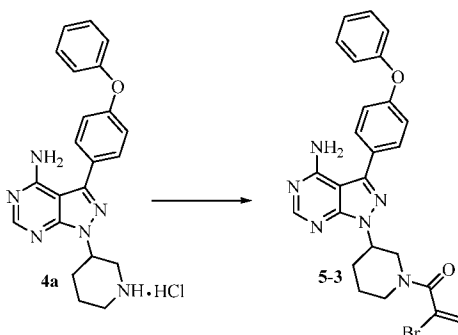
$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.34 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.39 (m, 2H, ArH), 7.16 (m, 3H, ArH), 7.08 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.12 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.30 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.18 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.66 (m, 0.5H, piperidine), 4.44 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.76 (m, 0.5H, piperidine), 3.47 (m, 0.5H, piperidine), 3.17 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.81 (m, 0.5H, piperidine), 2.30 (m, 2H, piperidine), 1.75 (m, 2H, piperidine)。

实施例 8. 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-2)

合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸制备化合物 5-2(257mg, 产率 42%, LC-ESI-MS: $[M+H]=475.2$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.40 (m, 2H, ArH), 7.17 (m, 3H, ArH), 7.09 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 5.67 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.62 (m, 2H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.93 (m, 1H, piperidine), 4.68 (m, 0.5H, piperidine), 4.52 (m, 0.5H, piperidine), 4.13 (m, 0.5H, piperidine), 3.98 (m, 0.5H, piperidine), 3.80 (m, 0.5H, piperidine), 3.50 (m, 0.5H, piperidine), 3.23 (m, 0.5H, piperidine), 2.91 (m, 0.5H, piperidine), 2.30 (m, 2H, piperidine), 1.77 (m, 2H, piperidine)。

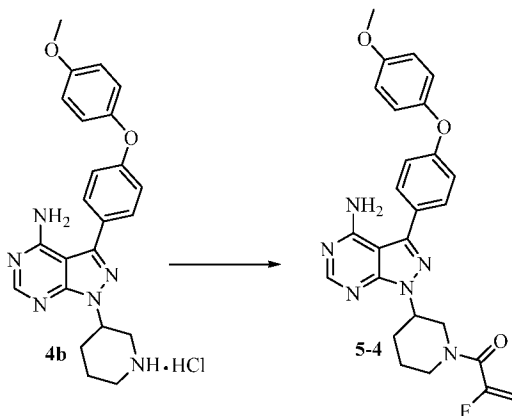
实施例 9. 1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-3)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸制备化合物 5-3(225mg，产率 33%，LC-ESI-MS: $[M+H]=519.2$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.64 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.40 (m, 2H, ArH), 7.16 (m, 3H, ArH), 7.09 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.05 (s, 1H, $-\text{NH}_2$), 5.79 (m, 3H, $-\text{C}=\text{CH}_2$, $-\text{NH}_2$), 4.93 (m, 1H, piperidine), 4.66 (m, 0.5H, piperidine), 4.51 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.97 (m, 0.5H, piperidine), 3.77 (m, 0.5H, piperidine), 3.22 (m, 0.5H, piperidine), 3.11 (m, 0.5H, piperidine), 2.91 (m, 0.5H, piperidine), 2.28 (m, 2H, piperidine), 1.71 (m, 2H, piperidine).

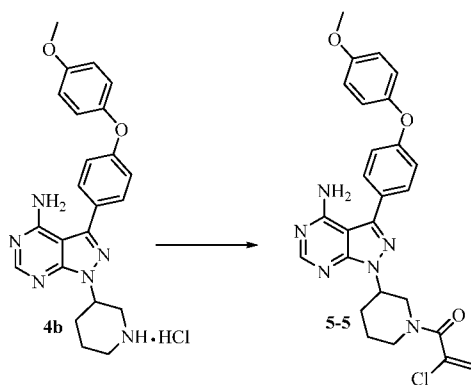
实施例 10. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氟丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-4)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为化合物 4b，制备化合物 5-4(212mg，产率 33%，LC-ESI-MS: $[M+H]=489.2$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.35 (s, 1H, ArH), 7.66 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.38 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.17 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.08 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.15 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.31 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.18 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.66 (m, 0.5H, piperidine), 4.44 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.76 (m, 0.5H, piperidine), 3.62 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.47 (m, 0.5H, piperidine), 3.17 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.81 (m, 0.5H, piperidine), 2.30 (m, 2H, piperidine), 1.75 (m, 2H, piperidine).

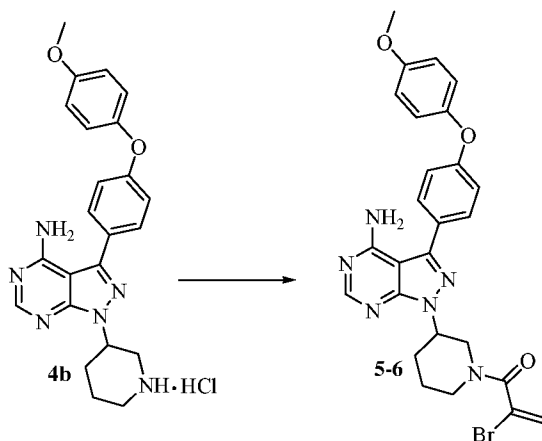
实施例 11. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-5)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为化合物 4b，将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸，制备化合物 5-5(212mg，产率 38%，LC-ESI-MS： $[M+H]=505.1$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.38 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.17 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.09 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.03 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.24 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.07 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.01 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.87 (m, 1H, piperidine), 4.62 (m, 0.5H, piperidine), 4.39 (m, 0.5H, piperidine), 4.22 (m, 0.5H, piperidine), 3.77 (m, 0.5H, piperidine), 3.68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.45 (m, 0.5H, piperidine), 3.14 (m, 0.5H, piperidine), 2.86 (m, 0.5H, piperidine), 2.78 (m, 0.5H, piperidine), 2.28 (m, 2H, piperidine), 1.74 (m, 2H, piperidine).

实施例 12. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-6)

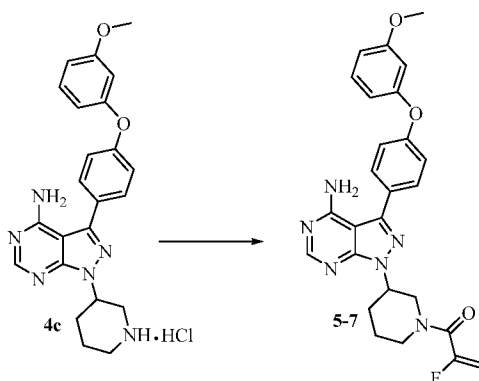


合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为化合物 4b，将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸，制备化合物 5-6(234mg，产率 33%，LC-ESI-MS： $[M+H]=551.1$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.36 (s, 1H, ArH), 7.66 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.39 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.17 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.09 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.18 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.33 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.19 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.12 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.96 (m, 1H, piperidine), 4.68 (m, 0.5H, piperidine), 4.45 (m, 0.5H, piperidine), 4.16 (m, 0.5H, piperidine), 3.77 (m, 0.5H, piperidine), 3.65 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.48 (m, 0.5H, piperidine), 3.18 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.81 (m, 0.5H, piperidine), 2.31 (m, 2H, piperidine), 1.75 (m, 2H, piperidine).

实施例 13. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(3-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-

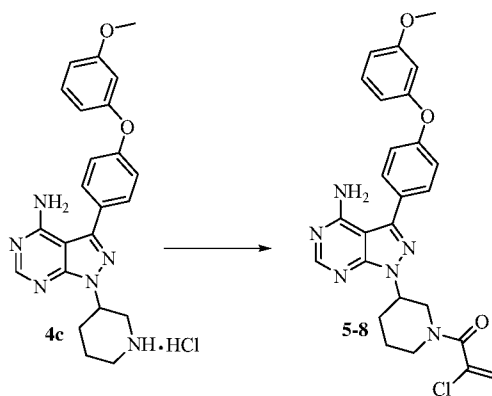
基)-2-氟丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-7)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为 4c，制备化合物 5-7(205mg，产率 32%，LC-ESI-MS: $[M+H]=489.2$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.63 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.12 (m, 1H, ArH), 7.05 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.52 (m, 2H, ArH), 6.39 (s, 1H, ArH), 6.14 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.27 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.06 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.03 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.91 (m, 1H, piperidine), 4.62 (m, 0.5H, piperidine), 4.40 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.73 (m, 0.5H, piperidine), 3.64 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.13 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.80 (m, 0.5H, piperidine), 2.17 (m, 2H, piperidine), 1.77 (m, 2H, piperidine)。

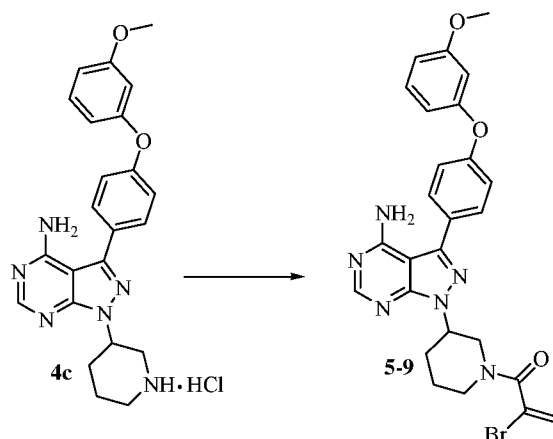
实施例 14. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(3-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-8)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为 4c，将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸，制备化合物 5-8(272mg，产率 41%，LC-ESI-MS: $[M+H]=505.2$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.36 (s, 1H, ArH), 7.64 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.16 (m, 1H, ArH), 7.05 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.53 (m, 2H, ArH), 6.38 (s, 1H, ArH), 6.14 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.32 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.16 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.63 (m, 0.5H, piperidine), 4.40 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.73 (m, 0.5H, piperidine), 3.66 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.13 (m, 0.5H, piperidine), 2.85 (m, 0.5H, piperidine), 2.83 (m, 0.5H, piperidine), 2.27 (m, 2H, piperidine), 1.76 (m, 2H, piperidine)。

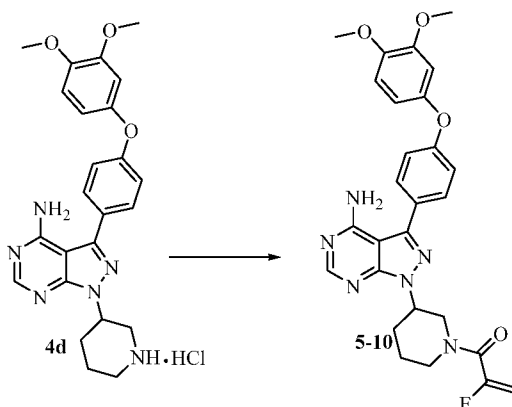
实施例 15. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(3-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-9)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为 4c，将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸，制备化合物 5-9(222mg，产率 31%，LC-ESI-MS: $[M+H]=551.1$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.36 (s, 1H, ArH), 7.64 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.13 (m, 1H, ArH), 7.05 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.52 (m, 2H, ArH), 6.38 (s, 1H, ArH), 6.14 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.27 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.03 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.91 (m, 1H, piperidine), 4.62 (m, 0.5H, piperidine), 4.40 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.76 (m, 0.5H, piperidine), 3.67 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.44 (m, 0.5H, piperidine), 3.13 (m, 0.5H, piperidine), 2.85 (m, 0.5H, piperidine), 2.77 (m, 0.5H, piperidine), 2.33 (m, 2H, piperidine), 1.77 (m, 2H, piperidine).

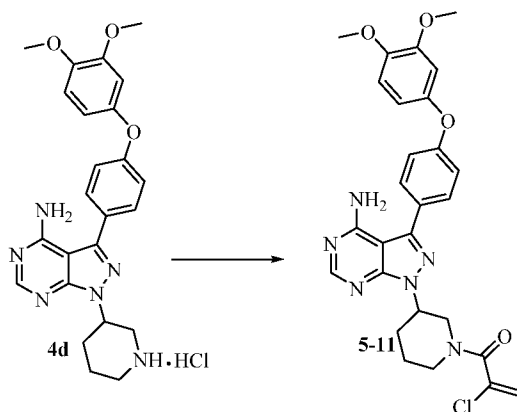
实施例 16. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(3,4-二甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氟丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-10)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为 4d，制备化合物 5-10(211mg，产率 31%，LC-ESI-MS: $[M+H]=519.2$)。

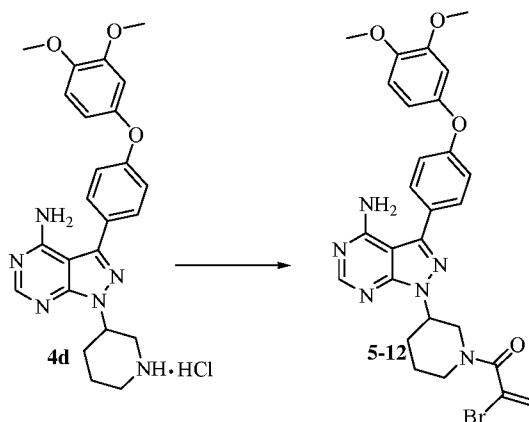
$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.63 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.05 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.62 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.41 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.27 (s, 1H, ArH), 5.96 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.27 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.06 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.03 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.91 (m, 1H, piperidine), 4.62 (m, 0.5H, piperidine), 4.40 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.74 (m, 3.5H, $-\text{OCH}_3$, piperidine), 3.66 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.12 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.85 (m, 0.5H, piperidine), 2.17 (m, 2H, piperidine), 1.75 (m, 2H, piperidine).

实施例 17. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(3,4-二甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶

-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-11)

合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4d, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸, 制备化合物 5-11(232mg, 产率 33%, LC-ESI-MS: $[M+H]=535.2$).

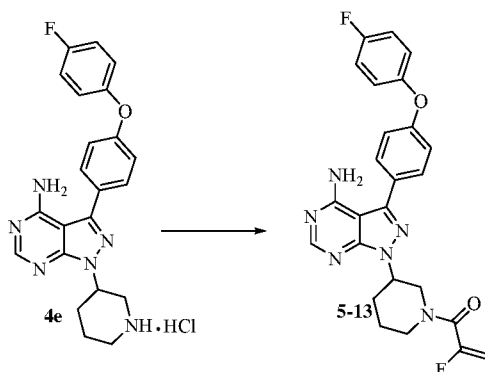
$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.64 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.04 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.62 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.42 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.27 (s, 1H, ArH), 5.96 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.27 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.06 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.06 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.61 (m, 0.5H, piperidine), 4.40 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 3.5H, $-\text{OCH}_3$, piperidine), 3.66 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.12 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.75 (m, 0.5H, piperidine), 2.31 (m, 2H, piperidine), 1.73 (m, 2H, piperidine).

实施例 18. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(3,4-二甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-12)

合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4d, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸, 制备化合物 5-12(197mg, 产率 26%, LC-ESI-MS: $[M+H]=581.1$).

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.63 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.05 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.62 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.40 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.27 (s, 1H, ArH), 6.08 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.27 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.06 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.03 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.91 (m, 1H, piperidine), 4.62 (m, 0.5H, piperidine), 4.45 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 3.5H, $-\text{OCH}_3$, piperidine), 3.66 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.12 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.76 (m, 0.5H, piperidine), 2.27 (m, 2H, piperidine), 1.75 (m, 2H, piperidine).

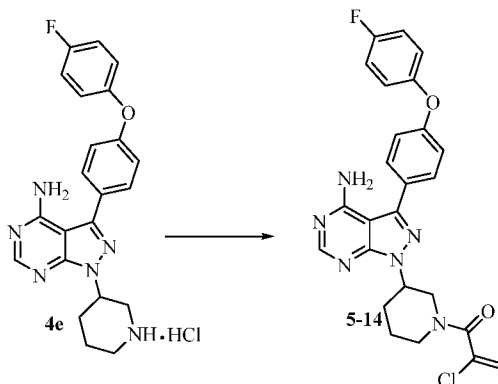
实施例 19. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氟丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-13)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4e, 制备化合物 5-13(223mg, 产率 36%, LC-ESI-MS: $[M+H]=477.2$).

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.35 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.47 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.25 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.02 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.12 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.31 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.18 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.66 (m, 0.5H, piperidine), 4.44 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 0.5H, piperidine), 3.44 (m, 0.5H, piperidine), 3.19 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.75 (m, 0.5H, piperidine), 2.30 (m, 2H, piperidine), 1.77 (m, 2H, piperidine).

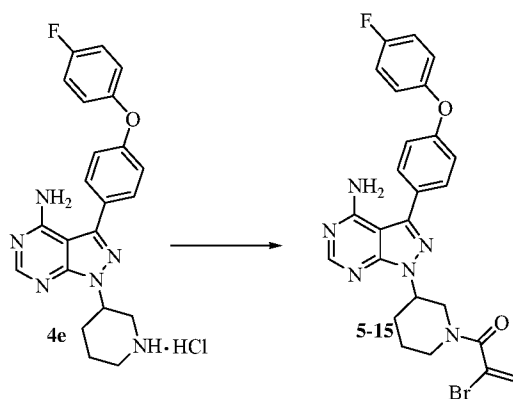
实施例 20. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-14)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4e, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸, 制备化合物 5-14(254mg, 产率 40%, LC-ESI-MS: $[M+H]=493.1$).

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.47 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.25 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.02 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.12 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.32 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.19 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.65 (m, 0.5H, piperidine), 4.44 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 0.5H, piperidine), 3.44 (m, 0.5H, piperidine), 3.19 (m, 0.5H, piperidine), 2.89 (m, 0.5H, piperidine), 2.77 (m, 0.5H, piperidine), 2.32 (m, 2H, piperidine), 1.76 (m, 2H, piperidine).

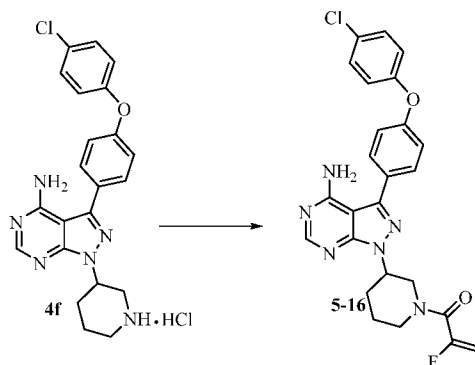
实施例 21. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-15)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为 4e，将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸，制备化合物 5-15(213mg，产率 30%，LC-ESI-MS: $[M+H]=538.1$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.36 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.47 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.24 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.06 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.09 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.31 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.18 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.63 (m, 0.5H, piperidine), 4.44 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 0.5H, piperidine), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.19 (m, 0.5H, piperidine), 2.87 (m, 0.5H, piperidine), 2.79 (m, 0.5H, piperidine), 2.31 (m, 2H, piperidine), 1.72 (m, 2H, piperidine)。

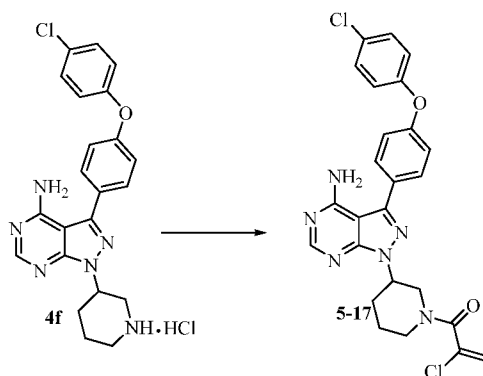
实施例 22. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-氯苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氟丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-16)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为 4f，制备化合物 5-16(211mg，产率 33%，LC-ESI-MS: $[M+H]=493.1$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.43 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.11 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.89 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.02 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.26 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.13 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.01 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.66 (m, 0.5H, piperidine), 4.44 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.73 (m, 0.5H, piperidine), 3.44 (m, 0.5H, piperidine), 3.19 (m, 0.5H, piperidine), 2.86 (m, 0.5H, piperidine), 2.73 (m, 0.5H, piperidine), 2.30 (m, 2H, piperidine), 1.74 (m, 2H, piperidine)。

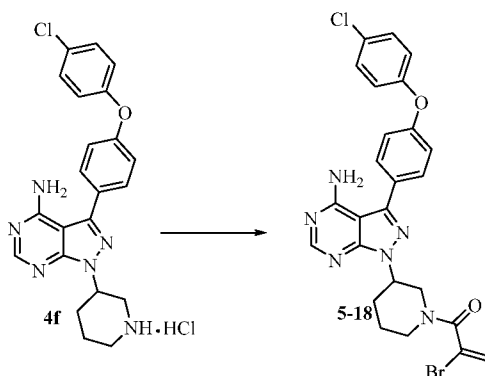
实施例 23. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-氯苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-17)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4f, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸, 制备化合物 5-17(245mg, 产率 37%, LC-ESI-MS: $[M+H]=509.1$).

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.43 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.11 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.89 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.02 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.19 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.00 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.66 (m, 0.5H, piperidine), 4.44 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.73 (m, 0.5H, piperidine), 3.44 (m, 0.5H, piperidine), 3.19 (m, 0.5H, piperidine), 2.86 (m, 0.5H, piperidine), 2.77 (m, 0.5H, piperidine), 2.31 (m, 2H, piperidine), 1.74 (m, 2H, piperidine).

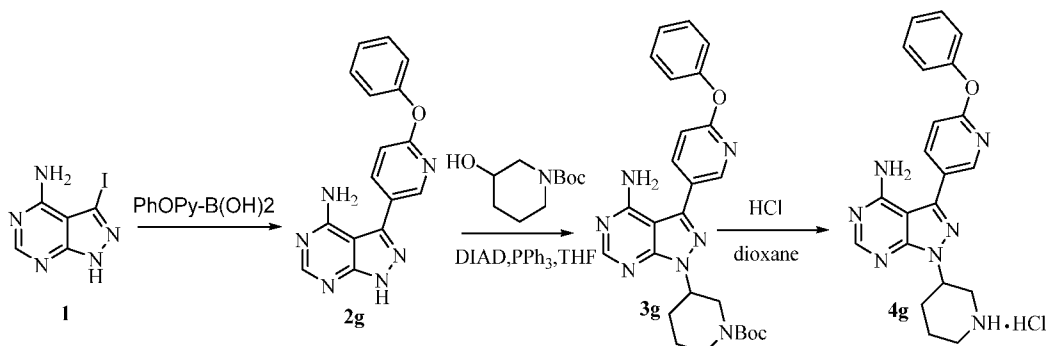
实施例 24. 1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-氯苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-18)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4f, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸, 制备化合物 5-18(226mg, 产率 31%, LC-ESI-MS: $[M+H]=554.1$).

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.37 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.43 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.11 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.89 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.12 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.19 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.12 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.00 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.66 (m, 0.5H, piperidine), 4.40 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 0.5H, piperidine), 3.39 (m, 0.5H, piperidine), 3.19 (m, 0.5H, piperidine), 2.89 (m, 0.5H, piperidine), 2.74 (m, 0.5H, piperidine), 2.27 (m, 2H, piperidine), 1.75 (m, 2H, piperidine).

实施例 25. 关键中间体 4g 的制备



步骤1. 3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺(化合物 2g)的合成

合成步骤参考实施例1步骤1. 用类似于化合物2a的合成方法, 从6-苯氧基吡啶-3-基硼酸 (4.46g, 18mmol)制备化合物2g (2.25g, 产率67%), LC-ESI-MS: $[M+H]=305.1$ 。

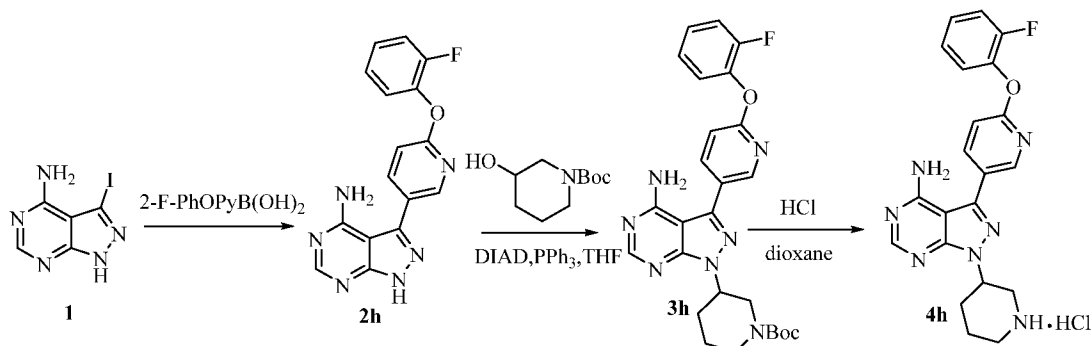
步骤2. 3-(4-氨基-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物3g)的合成

合成步骤参考实施例1步骤2. 用类似于化合物3a的合成方法制备化合物3g (1.40g, 产率40%), LC-ESI-MS: $[M+H]=488.2$ 。

步骤3. 3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐(化合物4g)的合成

合成步骤参考实施例1步骤3. 用类似于化合物4a的合成方法制备化合物4g (0.71g, 产率80%, LC-ESI-MS: $[M+H]=388.2$)。

实施例 26. 关键中间体 4h 的制备



步骤1. 3-(6-(2-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺(化合物 2h)的合成

合成步骤参考实施例1步骤1. 用类似于化合物2a的合成方法, 从6-(2-氟苯氧基)吡啶-3-基硼酸 (4.46g, 18mmol)制备化合物2h (2.31g, 产率68%), LC-ESI-MS: $[M+H]=323.1$ 。

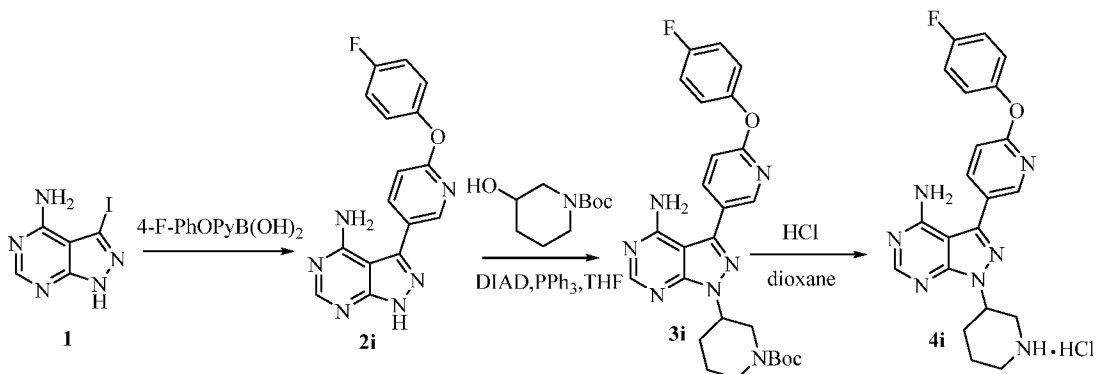
步骤2. 3-(4-氨基-3-(6-(2-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物3h)的合成

合成步骤参考实施例1步骤2. 用类似于化合物3a的合成方法制备化合物3h (1.40g, 产率40%), LC-ESI-MS: $[M+H]=506.1$ 。

步骤3. 3-(6-(2-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐(化合物4h)的合成

合成步骤参考实施例1步骤3. 用类似于化合物4a的合成方法制备化合物4h (0.67g, 产率77%, LC-ESI-MS: $[M+H]=406.2$)。

实施例 27. 关键中间体 4i 的制备



步骤 1. 3-(6-(4-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺(化合物 2i)的合成

合成步骤参考实施例1步骤1. 用类似于化合物2a的合成方法, 从6-(4-氟苯氧基)吡啶-3-基硼酸 (4.46g, 18mmol)制备化合物2i (2.32g, 产率68%), LC-ESI-MS: $[M+H]=323.1$ 。

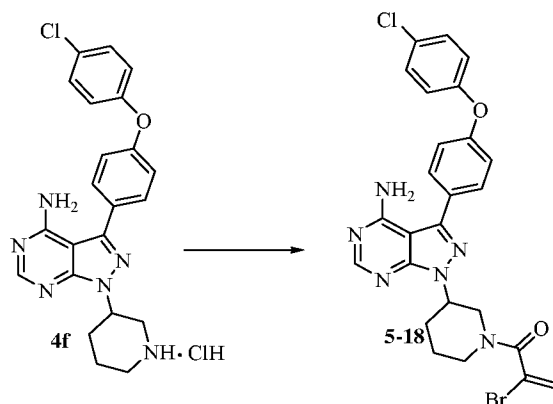
步骤2. 3-(4-氨基-3-(6-(4-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物3i)的合成

合成步骤参考实施例1步骤2. 用类似于化合物3a的合成方法制备化合物3i (1.32g, 产率38%), LC-ESI-MS: $[M+H]=506.2$ 。

步骤3. 3-(6-(4-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐(化合物4i)的合成

合成步骤参考实施例1步骤3. 用类似于化合物4a的合成方法制备化合物4i (0.68g, 产率78%, LC-ESI-MS: $[M+H]=406.2$)。

实施例 28. 1-(3-(4-氨基-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-19)

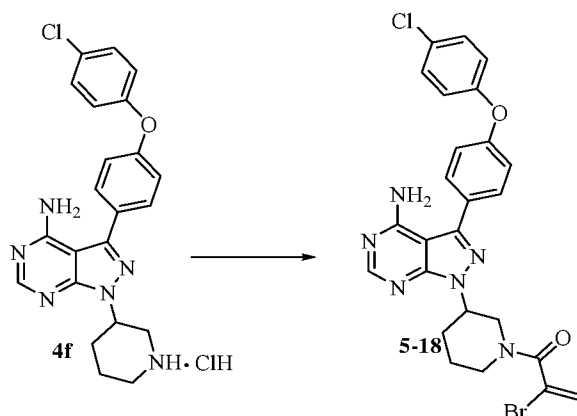


合成步骤参考实施例7. 用类似于化合物5-1的合成方法, 将化合物4a替换为4g, 将2-氟丙烯酸替换为2-溴丙烯酸, 制备化合物5-19 (202mg, 产率30%, LC-ESI-MS: $[M+H]=520.1$)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.50 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 8.35 (s, 1H, ArH), 8.03 (dd, 1H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, ArH), 7.42 (td, 2H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, ArH), 7.23 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.18 (dd, 2H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, ArH), 7.08 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 6.04 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.19 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.10 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.05 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.91 (m, 1H, piperidine), 4.63 (m, 0.5H, piperidine), 4.45 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 0.5H, piperidine), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.17 (m, 0.5H, piperidine), 2.85 (m, 0.5H,

piperidine), 2.77 (m, 0.5H, piperidine), 2.30 (m, 2H, piperidine), 1.73 (m, 2H, piperidine).

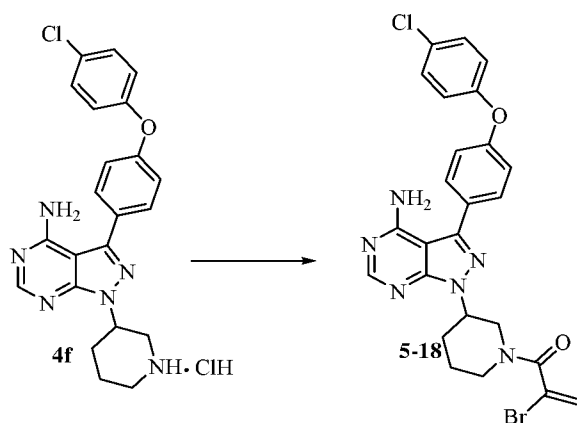
实施例 29. 1-(3-(4-氨基-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-20)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4g, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸, 制备化合物 5-20 (214mg, 产率 35%, LC-ESI-MS: [M+H]=476.2)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.51 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 8.36 (s, 1H, ArH), 8.05 (dd, 1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, ArH), 7.44 (td, 2H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, ArH), 7.24 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.20 (dd, 2H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, ArH), 7.11 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 5.98 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.21 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.11 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.06 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.63 (m, 0.5H, piperidine), 4.43 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.74 (m, 0.5H, piperidine), 3.42 (m, 0.5H, piperidine), 3.17 (m, 0.5H, piperidine), 2.82 (m, 0.5H, piperidine), 2.75 (m, 0.5H, piperidine), 2.31 (m, 2H, piperidine), 1.73 (m, 2H, piperidine).

实施例 30. 1-(3-(4-氨基-3-(6-(2-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-21)

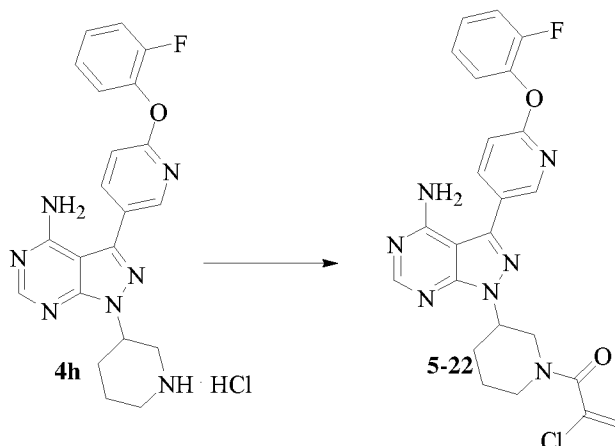


合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4h, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸, 制备化合物 5-21 (227mg, 产率 29%, LC-ESI-MS: [M+H]=538.1)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.51 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 8.39 (s, 1H, ArH), 8.06 (dd, 1H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, ArH), 7.37 (dd, 2H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, ArH), 7.17 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 6.94 (m, 2H, ArH), 6.00 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.21 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.11 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.03 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.60 (m, 0.5H, piperidine), 4.42 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.72 (m, 0.5H, piperidine), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.13

(m, 0.5H, piperidine), 2.82 (m, 0.5H, piperidine), 2.70 (m, 0.5H, piperidine), 2.31 (m, 2H, piperidine), 1.75 (m, 2H, piperidine).

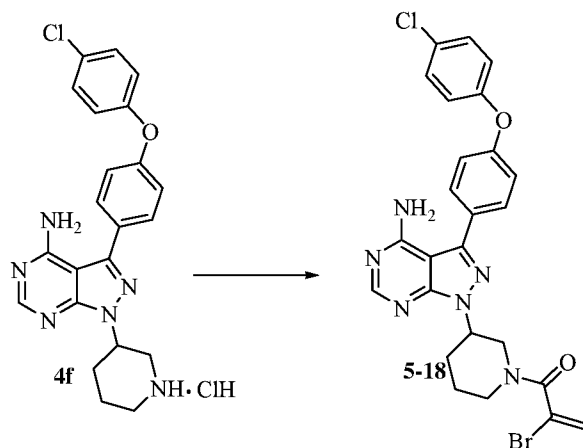
实施例 31. 1-(3-(4-氨基-3-(6-(2-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-22)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4h, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸, 制备化合物 5-22 (201mg, 产率 31%, LC-ESI-MS: [M+H]=494.1)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.52 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 8.39 (s, 1H, ArH), 8.05 (dd, 1H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, ArH), 7.37 (dd, 2H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, ArH), 7.15 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 6.94 (m, 2H, ArH), 5.92 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.21 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.12 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.06 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.91 (m, 1H, piperidine), 4.63 (m, 0.5H, piperidine), 4.41 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 0.5H, piperidine), 3.44 (m, 0.5H, piperidine), 3.16 (m, 0.5H, piperidine), 2.81 (m, 0.5H, piperidine), 2.75 (m, 0.5H, piperidine), 2.32 (m, 2H, piperidine), 1.74 (m, 2H, piperidine).

实施例 32. 1-(3-(4-氨基-3-(6-(4-氯苯氧基)吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-23)

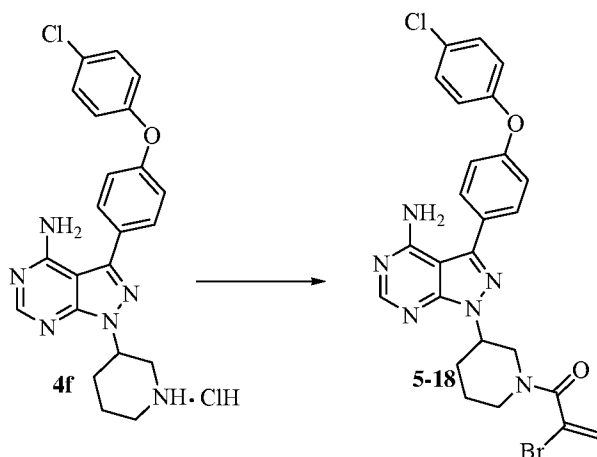


合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4i, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸, 制备化合物 5-23 (234mg, 产率 30%, LC-ESI-MS: [M+H]=538.1)。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.41 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 8.28 (s, 1H, ArH), 7.96 (dd, 1H, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, ArH), 7.01 (m, 5H, ArH), 5.84 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.29 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.13 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.03 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.61 (m, 0.5H,

piperidine), 4.44 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.74 (m, 0.5H, piperidine), 3.41 (m, 0.5H, piperidine), 3.13 (m, 0.5H, piperidine), 2.82 (m, 0.5H, piperidine), 2.68 (m, 0.5H, piperidine), 2.32 (m, 2H, piperidine), 1.75 (m, 2H, piperidine).

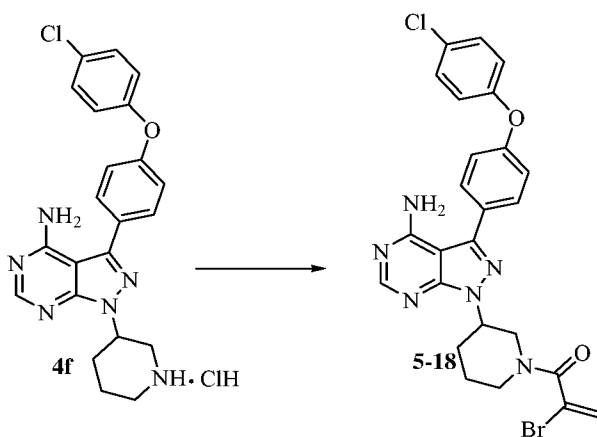
实施例 33. 1-(3-(4-氨基-3-(6-(4-氟苯氧基)吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-24)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4i, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸, 制备化合物 5-24 (205mg, 产率 31%, LC-ESI-MS: [M+H]=494.1)。

¹H-NMR (δ, CDCl₃): 8.41 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 8.28 (s, 1H, ArH), 7.97 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, ArH), 7.01 (m, 5H, ArH), 5.92 (s, 2H, -NH₂), 5.21 (d, 0.5H, *J* = 4.0 Hz, -C=CH₂), 5.12 (d, 0.5H, *J* = 4.0 Hz, -C=CH₂), 5.06 (d, 1H, -C=CH₂), 4.99 (m, 1H, piperidine), 4.65 (m, 0.5H, piperidine), 4.41 (m, 0.5H, piperidine), 4.17 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 0.5H, piperidine), 3.43 (m, 0.5H, piperidine), 3.16 (m, 0.5H, piperidine), 2.83 (m, 0.5H, piperidine), 2.71 (m, 0.5H, piperidine), 2.33 (m, 2H, piperidine), 1.74 (m, 2H, piperidine).

实施例 34. 1-(3-(4-氨基-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氟丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物 5-25)

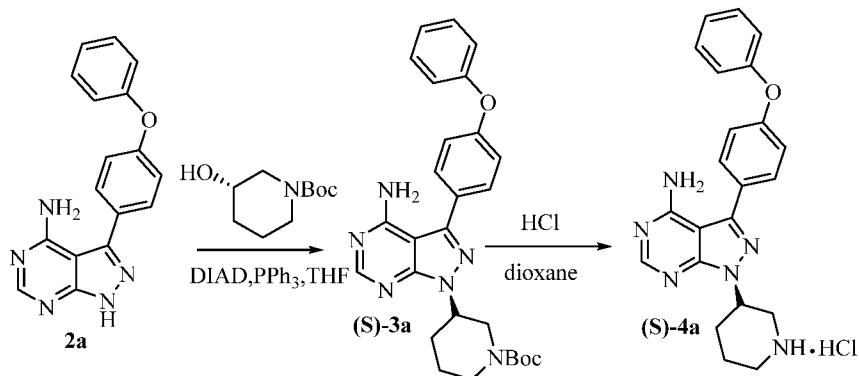


合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将化合物 4a 替换为 4g, 制备化合物 5-25 (195mg, 产率 33%, LC-ESI-MS: [M+H]=460.2)。

¹H-NMR (δ, CDCl₃): 8.51 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 8.36 (s, 1H, ArH), 8.05 (dd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, ArH), 7.43 (td, 2H, *J*₁ = 7.6 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, ArH), 7.26 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 7.21 (dd, 2H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, ArH), 7.12 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 5.99 (s, 2H, -NH₂), 5.21 (d,

0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.11 (d, 0.5H, $J = 4.0$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 5.06 (d, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.65 (m, 0.5H, piperidine), 4.39 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.72 (m, 0.5H, piperidine), 3.42 (m, 0.5H, piperidine), 3.17 (m, 0.5H, piperidine), 2.83 (m, 0.5H, piperidine), 2.76 (m, 0.5H, piperidine), 2.32 (m, 2H, piperidine), 1.77 (m, 2H, piperidine).

实施例 35. 手性关键中间体 (S)-4a 的制备



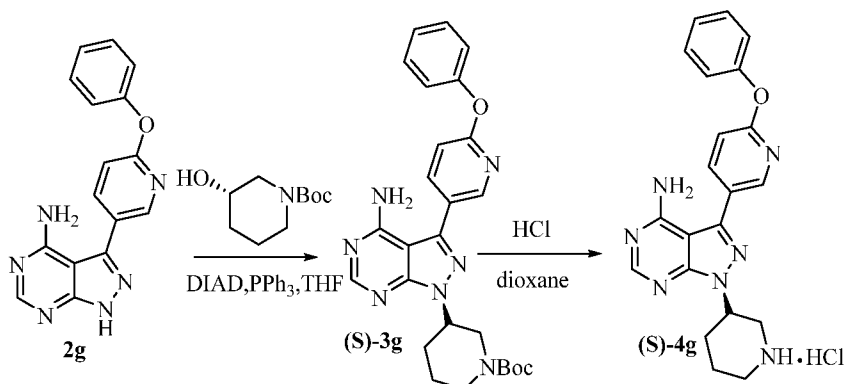
步骤1. (S)-3-(4-氨基-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物(S)-3a)的合成

合成步骤参考实施例1步骤2. 以手性纯的(S)-3-羟基N-Boc哌啶为原料, 用类似于化合物3a的合成方法制备化合物(S)-3a (产率51%), LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]=487.1$ 。

步骤2. (S)-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐(化合物(S)-4a)的合成

合成步骤参考实施例1步骤3. 用类似于化合物4a的合成方法制备化合物(S)-4a (产率75%, LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]=387.3$)。

实施例 36. 手性关键中间体 (S)-4g 的制备



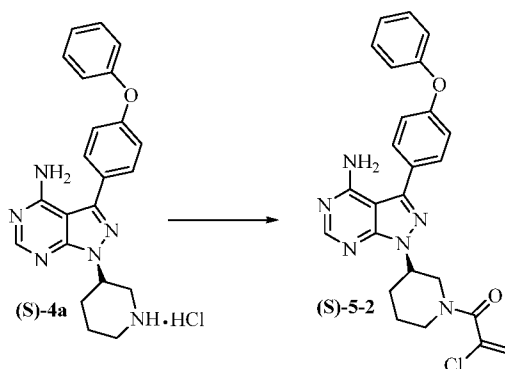
步骤1. (S)-3-(4-氨基-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物(S)-3g)的合成

合成步骤参考实施例1步骤2. 以手性纯的(S)-3-羟基N-Boc哌啶为原料, 用类似于化合物3a的合成方法制备化合物(S)-3g (1.40g, 产率40%), LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]=488.2$ 。

步骤2. 3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺盐酸盐(化合物(S)-4g)的合成

合成步骤参考实施例1步骤3. 用类似于化合物4a的合成方法制备化合物(S)-4g (0.71g, 产率80%, LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]=388.2$)。

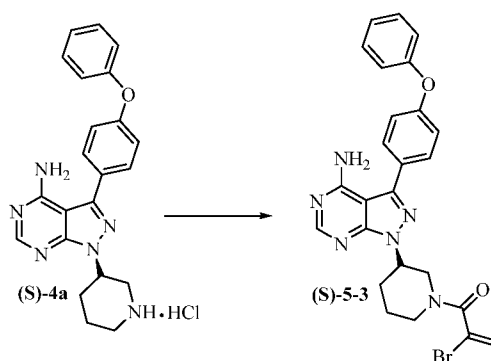
实施例 37 (S)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物(S)-5-2)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸制备化合物 5-2 (312mg, 产率 51%, LC-ESI-MS: $[M+H]=475.2$).

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.36 (s, 1H, ArH), 7.64 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.41 (m, 2H, ArH), 7.16 (m, 3H, ArH), 7.10 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 5.66 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.61 (m, 2H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.70 (m, 0.5H, piperidine), 4.52 (m, 0.5H, piperidine), 4.15 (m, 0.5H, piperidine), 3.99 (m, 0.5H, piperidine), 3.82 (m, 0.5H, piperidine), 3.51 (m, 0.5H, piperidine), 3.24 (m, 0.5H, piperidine), 2.92 (m, 0.5H, piperidine), 2.33 (m, 2H, piperidine), 1.79 (m, 2H, piperidine).

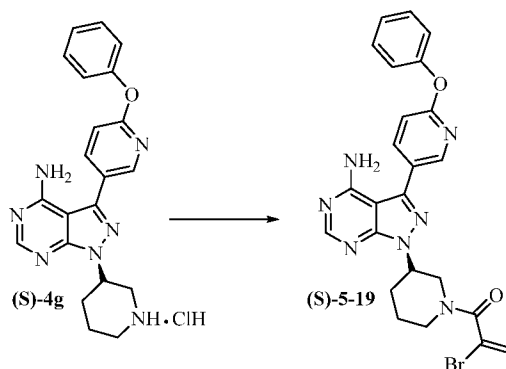
实施例 38. (S)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物(S)-5-3)



合成步骤参考实施例 7. 用类似于化合物 5-1 的合成方法, 将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸制备化合物 5-3 (225mg, 产率 33%, LC-ESI-MS: $[M+H]=519.2$).

$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 8.35 (s, 1H, ArH), 7.63 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.39 (m, 2H, ArH), 7.14 (m, 3H, ArH), 7.10 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 6.04 (s, 1H, $-\text{NH}_2$), 5.78 (m, 3H, $-\text{C}=\text{CH}_2$, $-\text{NH}_2$), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.66 (m, 0.5H, piperidine), 4.52 (m, 0.5H, piperidine), 4.13 (m, 0.5H, piperidine), 3.97 (m, 0.5H, piperidine), 3.78 (m, 0.5H, piperidine), 3.21 (m, 0.5H, piperidine), 3.11 (m, 0.5H, piperidine), 2.92 (m, 0.5H, piperidine), 2.26 (m, 2H, piperidine), 1.72 (m, 2H, piperidine).

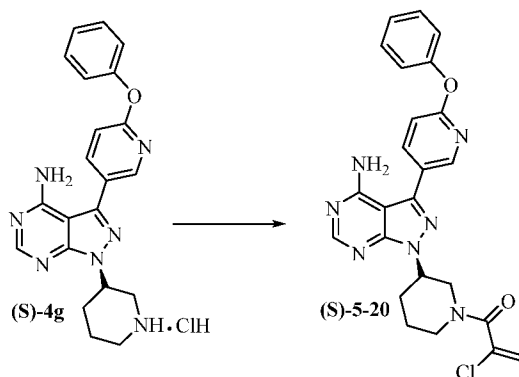
实施例 39. (S)-1-(3-(4-氨基-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-溴丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物(S)-5-19)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为(S)-4g，将 2-氟丙烯酸替换为 2-溴丙烯酸，制备化合物(S)-5-19 (242mg，产率 36%，LC-ESI-MS: [M+H]=520.2)。

¹H-NMR (δ, CDCl₃): 8.52 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 8.36 (s, 1H, ArH), 8.03 (dd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, ArH), 7.421 (td, 2H, *J*₁ = 7.6 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, ArH), 7.21 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 7.19 (dd, 2H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, ArH), 7.09 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 6.06 (s, 2H, -NH₂), 5.18 (d, 0.5H, *J* = 4.0 Hz, -C=CH₂), 5.10 (d, 0.5H, *J* = 4.0 Hz, -C=CH₂), 5.05 (d, 1H, -C=CH₂), 4.91 (m, 1H, piperidine), 4.63 (m, 0.5H, piperidine), 4.45 (m, 0.5H, piperidine), 4.11 (m, 0.5H, piperidine), 3.75 (m, 0.5H, piperidine), 3.44 (m, 0.5H, piperidine), 3.17 (m, 0.5H, piperidine), 2.85 (m, 0.5H, piperidine), 2.79 (m, 0.5H, piperidine), 2.32 (m, 2H, piperidine), 1.72 (m, 2H, piperidine)。

实施例 40. (S)-1-(3-(4-氨基-3-(6-苯氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-氯丙基-2-烯-1-酮的制备(化合物(S)-5-20)



合成步骤参考实施例 7。用类似于化合物 5-1 的合成方法，将化合物 4a 替换为(S)-4g，将 2-氟丙烯酸替换为 2-氯丙烯酸，制备化合物(S)-5-20 (300mg，产率 49%，LC-ESI-MS: [M+H]=476.1)。

¹H-NMR (δ, CDCl₃): 8.52 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 8.37 (s, 1H, ArH), 8.05 (dd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, ArH), 7.45 (td, 2H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, ArH), 7.26 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.22 (dd, 2H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, ArH), 7.12 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 5.99 (s, 2H, -NH₂), 5.23 (d, 0.5H, *J* = 4.0 Hz, -C=CH₂), 5.11 (d, 0.5H, *J* = 4.0 Hz, -C=CH₂), 5.06 (d, 1H, -C=CH₂), 4.92 (m, 1H, piperidine), 4.63 (m, 0.5H, piperidine), 4.43 (m, 0.5H, piperidine), 4.12 (m, 0.5H, piperidine), 3.74 (m, 0.5H, piperidine), 3.42 (m, 0.5H, piperidine), 3.18 (m, 0.5H, piperidine), 2.81 (m, 0.5H, piperidine), 2.77 (m, 0.5H, piperidine), 2.34 (m, 2H, piperidine), 1.73 (m, 2H, piperidine)。

实施例 41. 体外 Btk 激酶抑制活性和体外抗肿瘤活性测试

本发明化合物的体外 Btk 激酶抑制活性测定方法：

将药物溶于 DMSO 中制成 10 mM 的储备液，并稀释至 50x 的测试浓度药液备用，测试浓度以 3 被梯度稀释，分别为 25 nM, 8.33 nM, 2.78 nM, 0.93 nM, 0.31 nM, 0.10 nM。在 96 孔板里加入 10 μ L 50x 药物备用液，再加入 90 μ L 1x 激酶缓冲液，在振荡器上震荡 10 分钟。从 96 孔板各孔取 5 μ L 转移至 384 孔板，384 孔板里设 2 复孔。激酶反应：准备 2.5x 激酶缓冲液：将酶加入 1x 激酶基础缓冲液中。准备 2.5x 短肽溶液：将 FAM 标记的短肽和 ATP 加入 1x 激酶基础缓冲液中。在加有 5 μ L 药液 384 孔板中，加入 10 μ L 2.5x 激酶缓冲液，室温孵育 10 分钟。在 384 孔板中加入 10 μ L 2.5x 短肽溶液，28 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。加入 25 μ L 终止液停止反应。读数，并计算化合物对酶的抑制率，拟合计算出 BTK 激酶的 IC₅₀。

选用不同的实体瘤和白血病细胞株对所合成的化合物进行了体外抗肿瘤活性的测定：

细胞株：人肺癌细胞 (A549、PC9)、人乳腺癌细胞(MCF7)、人胃癌细胞 (SGC7901)、急性前髓细胞性白血病细胞(HL60)、人肺癌细胞吉非替尼耐药细胞 (PC9-IR)。

培养基：A549: RPMI 1640 +胎牛血清

MCF7: DMEM+胎牛血清

SGC7901: RPMI 1640 +新生牛血清

HL60: RPMI 1640+胎牛血清

PC9: DMEM+胎牛血清

PC9-IR: DMEM+胎牛血清

药物配制方法：将药物溶于 DMSO 中制成 10 mM 的储备液，并按一定比例稀释得到 5 个不同浓度（测试浓度 100x）。

肿瘤细胞体外培养：

将所选取的六株肿瘤细胞 A549、MCF7、SGC7901、HL60、PC9、PC9-IR，于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育，待细胞密度长到 70~90%时传代(贴壁细胞用 Duck's EDTA 消化后传代)，用于以后实验所需。

肿瘤细胞 A549、MCF7、SGC7901、HL60、PC9、PC9-IR，在 96 孔板上种入 4000 个/200 μ L/孔，于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育过夜。每孔加入化合物 2 μ L，终浓度为 50 μ M, 10 μ M, 2 μ M, 0.4 μ M, 0.08 μ M 共同于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 72 小时，以 DMSO(2%)为对照组。72 小时后，加入 20 μ L CCK-8 溶液，置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中 4 小时。用加了相应量细胞培养液和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。用酶标仪在 450nm 测定吸光度 (OD 值)，所得数据用于计算 IC₅₀。

细胞抑制率的计算公式为：细胞抑制率% = [(对照组 OD 值-空白组 OD 值)- (用药组 OD 值-空白组 OD 值)] / (对照细胞 OD 值-空白组 OD 值) $\times$ 100%，用 CalcuSyn 软件计算求得半数抑制浓度(IC₅₀)。

表 1 部分化合物对 BTK 激酶抑制活性和体外肿瘤细胞增殖抑制活性

Compd.	BTK (IC ₅₀ , nM)	肿瘤细胞抑制活性(IC ₅₀ , μ M)					
		A549	SGC-7901	MCF-7	PC-9	HL-60	PC9-IR
伊布替尼	2.1	9.64	15.52	21.77	0.023	15.96	0.75
化合物 5-1	4.9	8.23	10.11	18.91	0.032	12.21	4.45
化合物 5-2	2.0	4.44	2.89	12.22	0.018	6.01	0.72
化合物 5-3	2.3	5.47	3.47	13.36	0.022	4.18	1.09
化合物 5-4	3.9	8.11	13.27	18.21	0.025	13.52	5.66
化合物 5-5	3.1	7.29	12.33	21.20	0.020	5.26	4.56

化合物 5-6	3.5	6.58	10.12	16.21	0.028	8.33	1.22
化合物 5-13	6.9	7.23	4.98	15.12	0.029	16.31	2.87
化合物 5-14	2.0	4.22	4.05	12.98	0.016	5.71	2.98
化合物 5-15	3.5	6.05	4.95	15.98	0.025	8.62	1.61
化合物 5-16	5.9	8.12	5.20	17.23	0.031	17.32	1.75
化合物 5-17	2.1	5.68	3.22	14.87	0.011	2.58	0.98
化合物 5-18	3.4	6.85	3.66	13.26	0.035	4.93	4.59
化合物 5-19	14	0.95	4.56	15.22	N.T.	4.46	0.44
化合物 5-20	12	2.52	4.48	14.89	N.T.	9.98	1.49
化合物 5-21	28	1.24	8.89	16.23	N.T.	12.25	1.23
化合物 5-22	33	3.38	7.89	16.25	N.T.	11.53	2.37
化合物 5-23	298	0.90	8.78	14.59	N.T.	7.79	0.81
化合物 5-24	277	2.04	8.13	15.82	N.T.	7.25	1.65
化合物(S)-5-2	1.9	1.33	2.67	14.36	0.05	6.01	0.70
化合物(S)-5-3	2.1	3.89	3.05	11.36	0.036	4.18	1.11
化合物(S)-5-19	11	1.05	3.51	13.21	N.T.	3.41	0.44
化合物(S)-5-20	10	2.23	2.38	15.46	N.T.	8.91	1.36

N.T.为未测试。

从表 1 中数据可以看出,所有的化合物对 BTK 都具有明显的抑制活性,活性均小于 10nM,与阳性对照伊布替尼活性相当,说明在丙烯酰胺的 α 位引入卤素对其活性基本没有影响,仍然表现出强效的 BTK 激酶抑制活性。但是,在细胞水平上,所测试的化合物 5-1~5-6 和 5-13~5-24 均表现出比阳性对照更为强效的肿瘤细胞增殖抑制活性,不仅仅对实体瘤细胞活性更强 (A549、SGC-7901、MCF-7、PC-9),且对血液瘤细胞 (HL-60) 同样如此。譬如,化合物 5-2 在 SGC-7901 细胞上活性高了 5 倍。同时,所有化合物在 PC9-IR (吉非替尼耐药的 PC-9 细胞株) 中同样显示出强效的肿瘤细胞增殖抑制活性。因此,本发明所涉及的可用作 BTK 抑制剂具有广阔的抗肿瘤应用前景。

实施例 42. 溶解度试验

称取研成细粉的受试化合物 100mg,分别于 25℃±2℃在一定量的溶剂 (1ml, 3ml, 10ml, 100ml) 中,每隔 5 分钟强力振摇 30 秒钟;观察 30 分钟内的溶解情况,如无可见溶质,视为完全溶解。

实验结果显示,化合物 5-3 在 100ml 溶剂时仍有部分未溶解,参照中国药典的定义,属于极微溶解。而化合物 5-19 在 100ml 溶剂时完全溶解,在 10ml 时有小部分未溶解,属于微溶,比化合物 5-3 明显提高。说明芳香环氮原子的引入明显提高了化合物的溶解度。

实施例 43. 体外双位点不可逆抑制剂性质的表征:

首先,采用化合物 5-3 预处理重组 Btk 后,用不含抑制剂的培养基重复洗涤,其活性不会恢复 (参见例如 J.B. Smaill 等, J.Med.Chem. 1999,42, 1803)。其次,通过质谱,观察到了主要质谱峰对应化合物 5-3 和 Btk 之间的共价复合物的分子量之比为 1:1 (化合物 4:518,道尔顿,重组 Btk 激酶结合域: 33487;复合物预测值为 34005,实测值为 34005)。

其次,采用化合物 5-3 与半胱氨酸共孵溶 3 小时后,经 HPLC-MS 检测,发现大部分化合物 5-3 转变为被两个半胱氨酸加成的产物,经检测体系中存在目标产物 (5-3 的反应体系, LC-ESI-MS: [M+H] 681)。因此,所测试的化合物具有被双分子含巯基化合物加成的能力,这

也阐明了此类化合物虽然在体外 Btk 激酶抑制活性与阳性药伊布替尼相当,但是在细胞层面上能明显优于伊布替尼。

实施例 44. 口服药代动力学实验

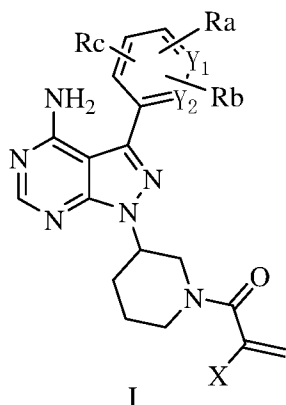
以伊布替尼为参比,分别考察了化合物5-2、5-3和5-19在大鼠体内的药代动力学性质,具体方法如下:以SD大鼠为实验动物,灌胃给药20mg/kg,尾静脉静注给药5mg/kg。灌胃给药的尾静脉取血时间点为0.17, 0.33, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24小时;静脉给药取血时间点为0.05, 0.1, 0.17, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24小时。取全血0.3ml,离心后取血浆0.1ml采用LC-MS进行分析。结果表明,化合物5-2、5-3和5-19的口服生物利用度分别为25%、17%和19%,而伊布替尼的生物利用度为12%,因此化合物5-2、5-3和5-19在体内的稳定性较伊布替尼有了明显的显著提高。其原因可能在于丙烯酰胺的 α 位引入卤素引入后,在不影响药物吸收的前提下,使得双键的代谢速率受到一定程度的抑制,进而提高了血药浓度而提高生物利用度。

实施例 45: 使用化合物 5-2 和 5-19 治疗类分湿性关节炎

在 Balb/c 小鼠中,通过给予抗胶原蛋白抗体和脂多糖诱导关节炎(Nandakumar 等, Am. J. Pathol. 2003, 163:1827-1837)。具体方法如下:在第0天,在雌性 Balb/c 小鼠静脉内注射 100mg/kg 抗 II 型胶原蛋白的 Chemico mAb 合剂,在第1天,腹膜内注射 1.25mg/kg 脂多糖。在第2天至12天,按 10mg/kg 的化合物 5-2 和 5-19,每天口服给药1次。结果表明,化合物 5-2 和 5-19 均具有明显的体内抗类分湿性关节炎的作用,具体来讲,模型组中出现的炎性细胞浸润、滑膜增生、炎性肉芽组织形成,坏死组织出现等现象在化合物 5-2 和 5-19 治疗后得到明显改善。

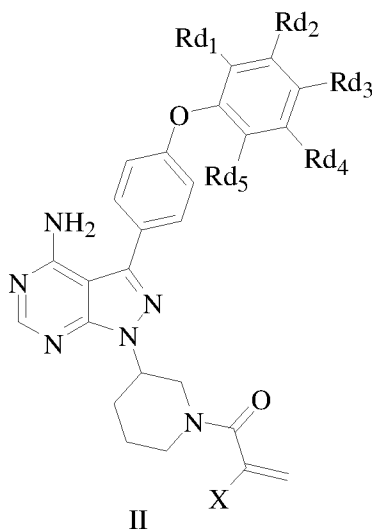
权利要求书

1. 一种布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂，其特征在于，其具有通式 I 的结构：



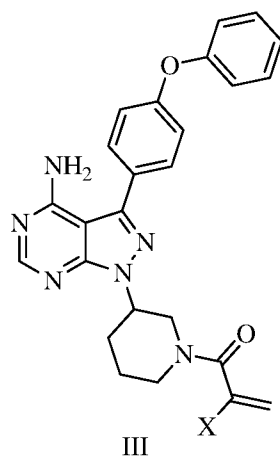
或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：Ra, Rb, Rc 独立选自 H、卤素、-CF₃、-CN、-NO₂、OH、NH₂、-L-C₁-C₆ 的烷基、-L-C₁-C₆ 的烯基、-L-取代或非取代的杂芳基、或-L-取代或非取代的芳基，其中 L 是键、O、S、-S(=O)、-S(=O)₂、NH、C(O)、CH₂、-NHC(O)O、-NHC(O)或-C(O)NH，X 选自氟、氯或溴，Y₁, Y₂ 独立选自 C、N。

2. 一种布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂，其特征在于，其具有通式 II 的结构：



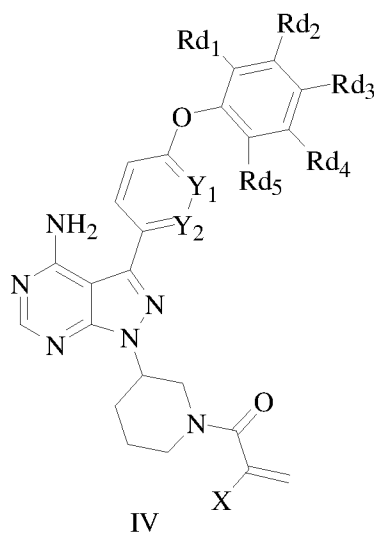
或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：Rd₁、Rd₂、Rd₃、Rd₄、Rd₅ 独立地是 H、卤素、-CF₃、-CN、-NO₂、-OH、C₁-C₃ 的烷氧基或-NH₂，X 选自氟、氯或溴。

3. 一种布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂，其特征在于，其具有通式 III 的结构：



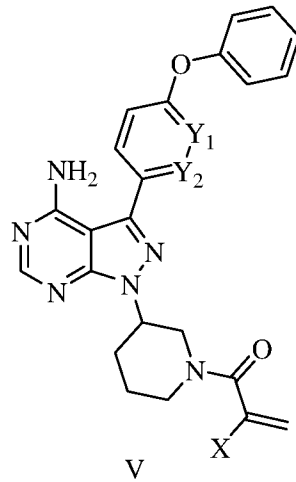
或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：X 选自氟、氯或溴。

4. 一种布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂，其特征在于，其具有通式 IV 的结构：



或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：Rd₁、Rd₂、Rd₃、Rd₄、Rd₅ 独立地是 H、卤素、-CF₃、-CN、-NO₂、-OH、C₁-C₃ 的烷氧基、或-NH₂，X 选自氟、氯或溴，Y₁、Y₂ 独立选自 C、N，Y₁、Y₂ 至少有一个选自 N。

5. 一种布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂，其特征在于，其具有通式 V 的结构：



或其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中：X 选自氟、氯或溴，Y₁, Y₂ 独立选自 C、N，Y₁, Y₂ 至少有一个选自 N。

6. 一种药物组合物，所述药物组合物包含至少一种活性组分以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂，所述活性组分是如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂化合物、所述化合物的光学异构体、所述化合物或其光学异构体在药学上可接受的盐、所述化合物或其光学异构体的溶剂合物中的任意一种或任意多种。

7. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂化合物及其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物在制备治疗除干眼症外的从布鲁顿酪氨酸激酶活性的抑制中获益的疾病、障碍或病症药物中的应用。

8. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂化合物及其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物在制备单独或和其他药物联合使用治疗细胞增生疾病药物中的应用。

9. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂化合物及其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物在制备单独或和其他药物联合使用治疗癌症药物中的应用。

10. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂化合物及其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物在制备单独或和其他药物联合使用治疗除干眼症外的自身免疫性疾病药物中的应用。

11. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂化合物及其光学异构体或其药学上可接受的盐或溶剂合物在制备单独或和其他药物联合使用治疗红斑狼疮药物中的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/081669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 487/04 (2006.01) i; A61K 31/519 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 35/02 (2006.01) i; A61P 37/00 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; SIPOABS; CAPLUS; REGISTRY: lupus erythematosus, pyrazolopyrimidines, kinases, Btk, bruton, tyrosine, pyrazolo, pyrimidine, proliferat+ , cancer, tumour, immun+, inflammat+ , lupus, structural search based on claims 1-5

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104844609 A (HANGZHOU HERTZ PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 19 August 2015 (19.08.2015), claims 1-7	1-11
X	WO 2014187319 A1 (JIANGSU MEDOLUTION LTD.), 27 November 2014 (27.11.2014), description, paragraphs 0009 and 0037-0038, and embodiment 1	1-9
X	CN 102159214 A (PHARMACYCLICS INC.), 17 August 2011 (17.08.2011), description, paragraphs 0003-0046 and 0078	1-9
Y	CN 104211703 A (JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.; JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 17 December 2014 (17.12.2014), description, paragraphs 0006-0007	10, 11
Y	WO 2014187319 A1 (JIANGSU MEDOLUTION LTD.), 27 November 2014 (27.11.2014), description, paragraphs 0009 and 0037-0038, and embodiment 1	10, 11
Y	CN 102159214 A (PHARMACYCLICS INC.), 17 August 2011 (17.08.2011), description, paragraphs 0003-0046 and 0078	10, 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 August 2016 (09.08.2016)	Date of mailing of the international search report 22 August 2016 (22.08.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Ying Telephone No.: (86-10) 62084463

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/081669

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104844609	19 August 2015	None	
WO 2014187319 A1	27 November 2014	US 2016120868 A1	05 May 2016
		EP 2999702 A1	30 March 2016
		CN 105408334 A	16 March 2016
CN 102159214 A	17 August 2011	EP 2307025 A2	13 April 2011
		US 2014079690 A1	20 March 2014
		US 8883803 B2	11 November 2014
		AU 2009270856 B2	25 July 2013
		CA 2730930 C	13 January 2015
		EP 2307025 A4	30 November 2011
		AU 2009270856 A8	03 March 2011
		US 2011224235 A1	15 September 2011
		MX 2011000661 A	25 May 2011
		CA 2730930 A1	21 January 2010
		JP 2011528376 A	17 November 2011
		US 2016000792 A1	07 January 2016
		JP 2014012719 A	23 January 2014
		JP 5369183 B2	18 December 2013
		US 2013005746 A1	03 January 2013
		WO 2010009342 A2	21 January 2010
		US 9107924 B2	18 August 2015
		US 2013012525 A1	10 January 2013
		AU 2009270856 A1	21 January 2010
		US 9278100 B2	08 March 2016
		CN 105362277 A	02 March 2016
		WO 2010009342 A3	14 May 2010
CN 104211703 A	17 December 2014	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/081669

A. 主题的分类		
C07D 487/04(2006.01)i; A61K 31/519(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07D, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS;DWPI;SIPOABS;CAPLUS;REGISTRY:布鲁顿, 酪氨酸, 激酶, 红斑狼疮, 免疫, 炎症, 癌症, 增生, 增殖, pyrazolopyrimidines, kinases, Btk, bruton, tyrosine, pyrazolo, pyrimidine, proliferat+, cancer, tumour, immun+, inflammat+, lupus 基于权利要求1-5的结构式检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 104844609 A (杭州和正医药有限公司) 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19) 权利要求1-7	1-11
X	WO 2014187319 A1 (JIANGSU MEDOLUTION LTD) 2014年 11月 27日 (2014 - 11 - 27) 说明书第0009段, 0037-0038段, 实施例1	1-9
X	CN 102159214 A (药品循环公司) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 说明书第0003-0046段, 0078段	1-9
Y	CN 104211703 A (江苏先声药物研究有限公司 江苏先声药业有限公司) 2014年 12月 17日 (2014 - 12 - 17) 说明书0006-0007段	10, 11
Y	WO 2014187319 A1 (JIANGSU MEDOLUTION LTD) 2014年 11月 27日 (2014 - 11 - 27) 说明书第0009段, 0037-0038段, 实施例1	10, 11
Y	CN 102159214 A (药品循环公司) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 说明书第0003-0046段, 第0078段	10, 11
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 8月 9日		2016年 8月 22日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		王影
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62084463

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/081669

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	104844609	A	2015年 8月 19日	无	
WO	2014187319	A1	2014年 11月 27日	US	2016120868 A1 2016年 5月 5日
				EP	2999702 A1 2016年 3月 30日
				CN	105408334 A 2016年 3月 16日
CN	102159214	A	2011年 8月 17日	EP	2307025 A2 2011年 4月 13日
				US	2014079690 A1 2014年 3月 20日
				US	8883803 B2 2014年 11月 11日
				AU	2009270856 B2 2013年 7月 25日
				CA	2730930 C 2015年 1月 13日
				EP	2307025 A4 2011年 11月 30日
				AU	2009270856 A8 2011年 3月 3日
				US	2011224235 A1 2011年 9月 15日
				MX	2011000661 A 2011年 5月 25日
				CA	2730930 A1 2010年 1月 21日
				JP	2011528376 A 2011年 11月 17日
				US	2016000792 A1 2016年 1月 7日
				JP	2014012719 A 2014年 1月 23日
				JP	5369183 B2 2013年 12月 18日
				US	2013005746 A1 2013年 1月 3日
				WO	2010009342 A2 2010年 1月 21日
				US	9107924 B2 2015年 8月 18日
				US	2013012525 A1 2013年 1月 10日
				AU	2009270856 A1 2010年 1月 21日
				US	9278100 B2 2016年 3月 8日
				CN	105362277 A 2016年 3月 2日
				WO	2010009342 A3 2010年 5月 14日
CN	104211703	A	2014年 12月 17日	无	