



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107840842 A

(43)申请公布日 2018.03.27

(21)申请号 201610833890.3

A61K 31/415(2006.01)

(22)申请日 2016.09.19

A61K 31/4155(2006.01)

(71)申请人 北京天诚医药科技有限公司

A61K 31/454(2006.01)

地址 102200 北京市昌平区科技园创新路7号2号楼2829号

A61P 35/00(2006.01)

(72)发明人 陈向阳 高英祥 孔祥龙

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 刘力

(51)Int.Cl.

C07D 403/04(2006.01)

C07D 401/04(2006.01)

C07D 401/06(2006.01)

C07D 403/06(2006.01)

C07D 231/14(2006.01)

权利要求书4页 说明书31页

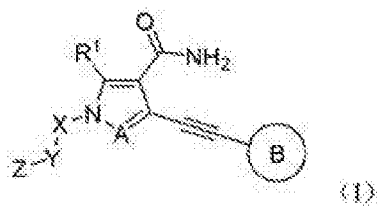
(54)发明名称

炔代杂环化合物、其制备方法及其在医药学上的应用

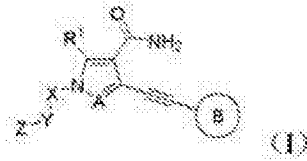
(57)摘要

本发明涉及作为FGFR抑制剂的炔代杂环化合物、其制备方法及其在医药学上的应用。具体而言,本发明涉及一种通式(I)所示的化合物及其可药用的盐、含有所述化合物或其可药用的盐的药物组合物、应用所述化合物或其可药用的盐治疗和/或预防FGFR相关性病症、特别是肿瘤的方法以及所述化合物或其可药用的盐的制备方法。本发明还涉及所述化合物或其可药用的盐或含有所述化合物或其可药用的盐的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防FGFR相关性病症、特别是肿瘤的药物中的用途。其中通式(I)的各取代基与说明书中的定义相同。

CN 107840842 A



1. 一种通式(I)所示的化合物:



其中:

A为N或CR²;

环B为苯环或5-6元杂芳环,其中所述苯环和杂芳环任选被一个或多个G¹所取代;

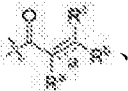

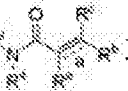
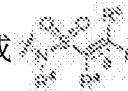
R¹独立地选自H、卤素、氰基、C₁₋₆烷基或-NHR³;

R²独立地选自H、卤素、氰基或C₁₋₆烷基,其中所述烷基任选被卤素、氰基、羟基或-OC₁₋₆烷基所取代;

R³独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基或3-6元杂环基,其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被卤素、氰基、-OR⁴、-NR⁵R⁶、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基或3-6元杂环基所取代;

X不存在或为C₁₋₆亚烷基;

Y不存在或选自C₃₋₈亚环烷基、3-8元亚杂环基、亚芳基或亚杂芳基,其中所述亚环烷基、亚杂环基、亚芳基和亚杂芳基任选被一个或多个G²所取代;

Z独立地选自氰基、-NR⁷CN、, ,  或 ;

键a为双键或三键;

当键a为双键时,R^a、R^b和R^c各自独立地选自H、氰基、卤素、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基或3-6元杂环基,其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个G³所取代;

R^a和R^b或R^b和R^c任选与它们连接的碳原子共同形成一任选含有杂原子的3-6元环;

当键a为三键时,R^a和R^c不存在,R^b独立地选自H、氰基、卤素、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基或3-6元杂环基,其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个G⁴所取代;

R⁷独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基或3-6元杂环基,其中所述烷基、环烷基和杂环基任选可被一个或多个G⁵所取代;

G¹、G²、G³、G⁴和G⁵各自独立地选自卤素、氰基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₈环烷基、3-8元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-10元杂芳基、-OR⁸、-OC(O)NR⁸R⁹、-C(O)OR⁸、-C(O)NR⁸R⁹、-C(O)R⁸、-NR⁸R⁹、-NR⁸C(O)R⁹、-NR⁸C(O)NR⁹R¹⁰、-S(O)_mR⁸或-NR⁸S(O)_mR⁹,其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氰基、C₁₋₆烷基、C₃₋₈环烷基、3-8元杂环基、-OR¹¹、-OC(O)NR¹¹R¹²、-C(O)OR¹¹、-C(O)NR¹¹R¹²、-C(O)R¹¹、-NR¹¹R¹²、-NR¹¹C(O)R¹²、-NR¹¹C(O)NR¹²R¹³、-S(O)_mR¹¹或-NR¹¹S(O)_mR¹²的取代基所取代;

R⁴、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²和R¹³各自独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₃₋₈环烷基、3-8元单环杂环基、单环杂芳基或苯基;且

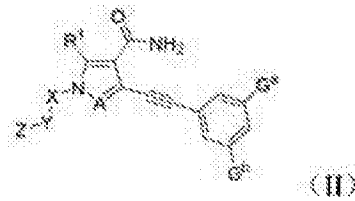
m为1或2;

或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中A为N或CH,优选为N。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中环B为苯环。

4. 根据权利要求1所述的化合物,其为以下通式(II)的化合物:



其中：

G^a 和 G^b 各自独立地选自H、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、3-8元杂环基、 $-OR^8$ 、 $-NR^8R^9$ 或 $-C(O)NR^8R^9$ ，其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个选自卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、3-8元杂环基、 $-OR^{11}$ 或 $-NR^{11}R^{12}$ 的取代基所取代，优选为 $-OC_{1-2}$ 烷基；

A、 R^1 、 R^8 、 R^9 、 R^{11} 、 R^{12} 、X、Y、Z的定义如权利要求1中所述。

5. 根据前述权利要求任一项所述的化合物，其中 R^1 独立地选自H、 $-NH_2$ 或 $-NHC_{1-6}$ 烷基，优选为H或 $-NH_2$ 。

6. 根据前述权利要求任一项所述的化合物，其中：

X不存在或为 C_{1-6} 亚烷基；

Y不存在或选自 C_{3-8} 亚环烷基或3-8元亚杂环基；

Z独立地选自氰基、 $-NR^7CN$ 、 或 ；

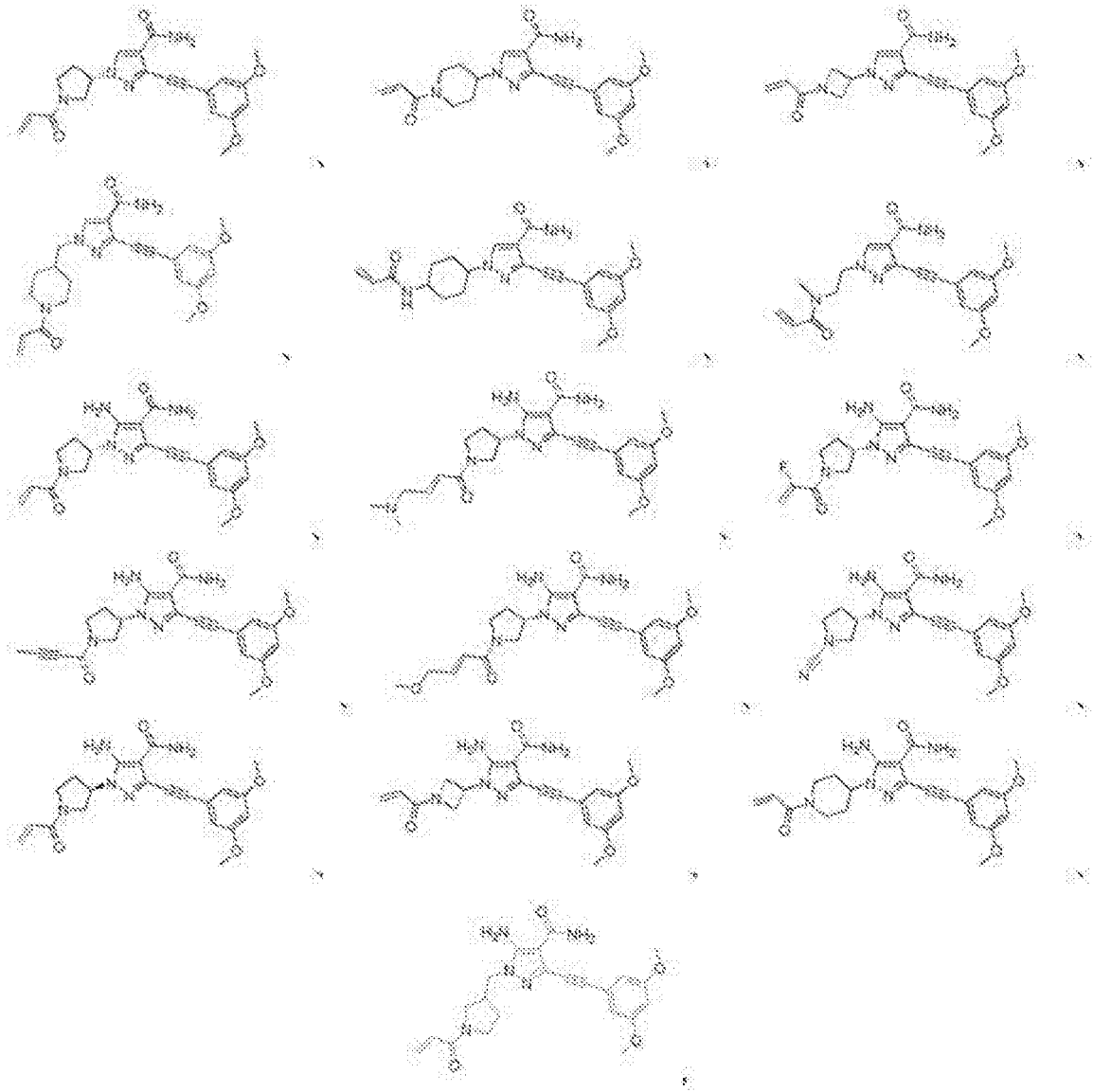
键a为双键或三键；

当键a为双键时， R^a 、 R^b 和 R^c 各自独立地选自H、氰基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基，其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个独立地选自卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、3-6元杂环基、 $-OR^8$ 或 $-NR^8R^9$ 的取代基所取代；

当键a为三键时， R^a 和 R^c 不存在， R^b 独立地选自H、氰基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基，其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个独立地选自卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、3-6元杂环基、 $-OR^8$ 或 $-NR^8R^9$ 的取代基所取代；

R^4 、 R^8 、 R^9 各自独立地选自H或 C_{1-6} 烷基。

7. 根据权利要求1所述的化合物，所述化合物选自：



或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式。

8. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-7任一项所述的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式和药学上可接受的载体和赋形剂。

9. 根据权利要求1-7任一项所述的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式或根据权利要求8所述的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防 FGFR 相关性疾病、优选为肿瘤(例如非小细胞肺癌、食管癌、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌和肝癌,更优选为肝癌、胃癌、非小细胞肺癌和膀胱癌)的药物中的用途。

10. 权利要求1-7任一项的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式或者权利要求8所述的药物组合物,其用作药物。

11. 一种治疗 FGFR 相关性疾病的方法,其包括给药有其需要的患者治疗有效量的根据权利要求1-7任一项所述的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其

混合物形式。

炔代杂环化合物、其制备方法及其在医药学上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种作为FGFR抑制剂的新的炔代杂环化合物或其可药用的盐；含有所述炔代杂环化合物或其可药用的盐的药物组合物；所述炔代杂环化合物或其可药用的盐的制备方法；所述炔代杂环化合物或其可药用的盐、或含有所述炔代杂环化合物或其可药用的盐的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防FGFR相关性病症、特别是肿瘤的药物中的用途；以及应用所述化合物或组合物治疗和/或预防FGFR相关性病症、特别是肿瘤的方法。

背景技术

[0002] 成纤维细胞生长因子受体 (Fibroblast Growth Factor Receptor, FGFR) 是一类受体酪氨酸激酶 (RTK), 结构上由膜外配体结合域、单一的跨膜域和膜内酪氨酸激酶域所组成, 主要包括FGFR1、FGFR2、FGFR3和FGFR4四种亚型。它与其配体, 成纤维细胞生长因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) 在细胞信号传递中起重要的调节作用。FGF作为细胞外刺激信号, 与FGFR膜外区结合, 引起其膜内酪氨酸激酶磷酸化, 从而激活下游的一系列信号通路, 对细胞的增殖、分化和转移等进行调控。

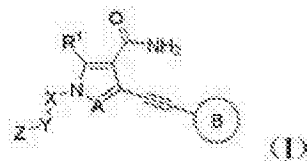
[0003] 多种肿瘤与FGF/FGFR表达及激活密切相关, 比如非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、子宫内膜癌、前列腺癌、宫颈癌、结肠癌、食管癌、骨髓瘤和黑色素瘤等 (Clin. Cancer Res. 2012, 18, 1855)。研究显示, FGFR1扩增占非小细胞肺癌的20%、FGFR2扩增占胃癌的~5%、FGFR3突变占非侵袭性膀胱癌的~70%和FGFR4在肝癌中的扩增等 (PloS One 2012, 7, e36713)。因此, 靶向FGFR的抑制剂的研发已成为抗肿瘤药物研究的前沿热点 (Drug Disc. Today 2014, 19, 51)。

[0004] 目前市场上已有一些非FGFR特异性药物, 比如Pfizer的sunitinib、Eisai的lenvatinib和Boehringer Ingelheim的nintedanib, 但还没有FGFR特异性抑制剂。进入临床的FGFR特异性抑制剂有HMPL-453、BGJ-398、LY-2874455、AZ-4547、JNJ-42756493、TAS-120、ARQ-087和BLU-554等。

[0005] 尽管FGFR抑制剂的开发吸引了众多生物制药公司的关注, 由于其在治疗多种恶性肿瘤所展示的前景, 仍需要开发新的化合物。经过不断努力, 本发明设计具有通式(I)所示的结构的化合物, 并发现具有此类结构的化合物表现出优异的效果和作用。

发明内容

[0006] 本发明提供作为FGFR抑制剂的一种通式(I)所示的化合物其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式:



其中:

A为N或CR²;

环B为苯环或5-6元杂芳环,其中所述苯环和杂芳环任选被一个或多个 G^1 所取代;


R^1 独立地选自H、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基或 $-NHR^3$;

R^2 独立地选自H、卤素、氰基或 C_{1-6} 烷基,其中所述烷基任选被卤素、氰基、羟基或 $-OC_{1-6}$ 烷基所取代;

R^3 独立地选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基,其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被卤素、氰基、 $-OR^4$ 、 $-NR^5R^6$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基所取代;

X不存在或为 C_{1-6} 亚烷基;

Y不存在或选自 C_{3-8} 亚环烷基、3-8元亚杂环基、亚芳基或亚杂芳基,其中所述亚环烷基、亚杂环基、亚芳基和亚杂芳基任选被一个或多个 G^2 所取代;

Z独立地选自氰基、 $-NR^7CN$ 、;

键a为双键或三键;

当键a为双键时, R^a 、 R^b 和 R^c 各自独立地选自H、氰基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基,其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个 G^3 所取代;

R^a 和 R^b 或 R^b 和 R^c 任选与它们连接的碳原子共同形成一任选含有杂原子的3-6元环;

当键a为三键时, R^a 和 R^c 不存在, R^b 独立地选自H、氰基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基,其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个 G^4 所取代;

R^4 独立地选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基,其中所述烷基、环烷基和杂环基任选可被一个或多个 G^5 所取代;

G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^4 和 G^5 各自独立地选自卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、3-8元杂环基、 C_{6-10} 芳基、5-10元杂芳基、 $-OR^8$ 、 $-OC(O)NR^8R^9$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-C(O)NR^8R^9$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-NR^8R^9$ 、 $-NR^8C(O)R^9$ 、 $-NR^8C(O)NR^9R^{10}$ 、 $-S(O)_mR^8$ 或 $-NR^8S(O)_mR^9$,其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、3-8元杂环基、 $-OR^{11}$ 、 $-OC(O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)OR^{11}$ 、 $-C(O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)R^{11}$ 、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-NR^{11}C(O)R^{12}$ 、 $-NR^{11}C(O)NR^{12}R^{13}$ 、 $-S(O)_mR^{11}$ 或 $-NR^{11}S(O)_mR^{12}$ 的取代基所取代;

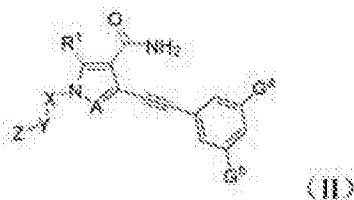
R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、3-8元单环杂环基、单环杂芳基或苯基;且

m为1或2。

[0007] 本发明的一个实施方案涉及上述通式(I)所示的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式,其中A为N或CH,优选为N。

[0008] 本发明的另一个实施方案涉及上述通式(I)所示的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式,其中环B为苯环。

[0009] 本发明的另一个实施方案涉及上述通式(I)所示的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式,其为通式(II)所述的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式:



其中：

G^a 和 G^b 各自独立地选自H、卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、3-8元杂环基、 $-OR^8$ 、 $-NR^8R^9$ 或 $-C(O)NR^8R^9$ ，其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个选自卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、3-8元杂环基、 $-OR^{11}$ 或 $-NR^{11}R^{12}$ 的取代基所取代，优选为 $-OC_{1-2}$ 烷基；

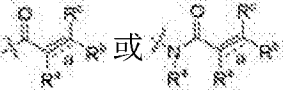
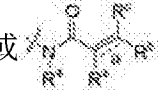
A、 R^1 、 R^8 、 R^9 、 R^{11} 、 R^{12} 、X、Y、Z的定义如权利要求1中所述。

[0010] 本发明的另一个实施方案涉及上述通式(I)所示的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式，其中 R^1 独立地选自H、 $-NH_2$ 或 $-NHC_{1-6}$ 烷基，优选为H或 $-NH_2$ 。

[0011] 本发明的另一个实施方案涉及上述通式(I)所示的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式，其中：

X不存在或为 C_{1-6} 亚烷基；

Y不存在或选自 C_{3-8} 亚环烷基或3-8元亚杂环基；

Z独立地选自氰基、 $-NR^7CN$ 、或；


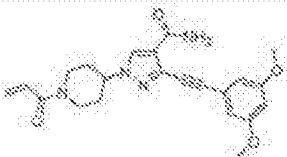
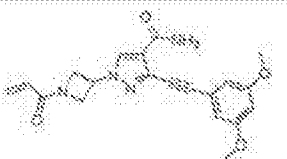

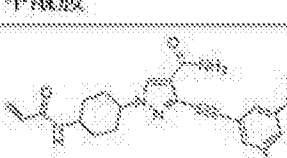

键a为双键或三键；

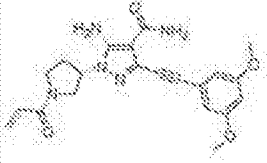
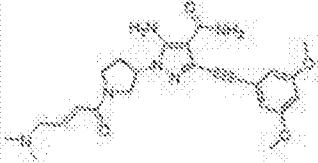
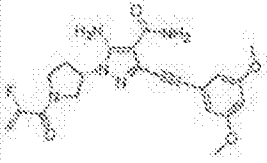
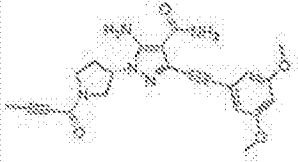
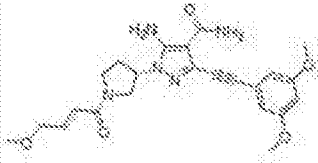

当键a为双键时， R^a 、 R^b 和 R^c 各自独立地选自H、氰基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基，其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个独立地选自卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、3-6元杂环基、 $-OR^8$ 或 $-NR^8R^9$ 的取代基所取代；

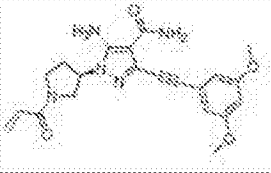
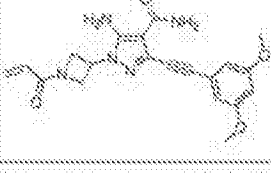
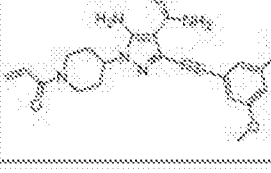

当键a为三键时， R^a 和 R^c 不存在， R^b 独立地选自H、氰基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或3-6元杂环基，其中所述烷基、环烷基和杂环基任选被一个或多个独立地选自卤素、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、3-6元杂环基、 $-OR^8$ 或 $-NR^8R^9$ 的取代基所取代；

R^4 、 R^8 、 R^9 各自独立地选自H或 C_{1-6} 烷基。

[0012] 本发明的一个实施方案涉及上述通式(I)所示的化合物，其中所述化合物选自：

化合物编号	化合物结构与命名
1.	 <p data-bbox="475 405 1361 479">(S)-1-(1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基-1H-吡啶-4-甲酰胺</p>
2.	 <p data-bbox="475 658 1361 745">1-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基-1H-吡啶-4-甲酰胺</p>
3.	 <p data-bbox="475 925 1361 1012">1-(1-丙烯酰基氮杂环丁烷-3-基)-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基-1H-吡啶-4-甲酰胺</p>
4.	 <p data-bbox="475 1191 1361 1279">1-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)甲基)-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基-1H-吡啶-4-甲酰胺</p>
5.	 <p data-bbox="475 1458 1361 1545">1-(4-丙烯酰基氨基环己基)-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基-1H-吡啶-4-甲酰胺</p>
6.	 <p data-bbox="475 1724 1361 1836">3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(2-(N-甲基丙烯酰基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-甲酰胺</p>

7.	 <p>(S)-1-(1-(丙烯酰基吡咯烷-3-基)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺</p>
8.	 <p>(S,E)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(4-(二甲氨基)丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺</p>
9.	 <p>(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(2-氯丙烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺</p>
10.	 <p>(S)-5-氨基-1-(1-(丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺</p>
11.	 <p>(S,E)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(4-甲氧基丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺</p>
12.	 <p>(S)-5-氨基-1-(1-氧基吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺</p>

13.	 <p>(R)-1-(1-(丙烯酰基吡咯烷-3-基)-5-氨基-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-咪唑-4-甲酰胺</p>
14.	 <p>1-(1-(丙烯酰基氮杂环丁烷-3-基)-5-氨基-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-咪唑-4-甲酰胺</p>
15.	 <p>1-(1-(丙烯酰基吡啶-4-基)-5-氨基-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-咪唑-4-甲酰胺</p>
16.	 <p>1-(1-(丙烯酰基吡咯烷-3-基)甲基)-5-氨基-3-(3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-咪唑-4-甲酰胺</p>

或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物形式。

[0013] 本发明化合物对FGFR的活性具有显著抑制效应。本发明化合物能够有效抑制FGFR1、FGFR2、FGFR3或FGFR4的活性，优选其抑制FGFR1、FGFR2、FGFR3或FGFR4的IC₅₀为100至1000nM，更优选IC₅₀小于100nM，最优选其IC₅₀小于10nM。特别是，本发明化合物对肿瘤细胞(例如Hep3B和RT4肿瘤细胞)的细胞增殖具有显著抑制效应，优选其IC₅₀为100至1000nM，更优选其IC₅₀小于100nM，最优选其IC₅₀小于10nM。

[0014] 因此本发明化合物可用于治疗或者预防FGFR相关性疾病，包括但不限于肿瘤和炎症性疾病，例如骨关节炎。本发明化合物可用于治疗或者预防FGFR相关性肿瘤，例如非小细胞肺癌、食管癌、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌和肝癌(例如肝细胞癌)，更具体为肝癌、胃癌、非小细胞肺癌和膀胱癌。因此，再一方面，本发明提供一种治疗或者预防FGFR介导的疾病(例如所述肿瘤)的方法，其包括给予有需要的患者治疗有效量的本发明所述化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物、或包含所述化合物的药物组合物。

[0015] 本发明的另一方面涉及作为药物或者医药用途的通式(I)所示的化合物或其前

药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物,其用于治疗或者预防FGFR介导的疾病,例如肿瘤或炎症性疾病,包括但不限于非小细胞肺癌、食管癌、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌和肝癌。

[0016] 本发明进一步涉及一种药物组合物,所述药物组合物包含本发明所述化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物及药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂。

[0017] 本发明的另一方面涉及通式(I)所示的化合物或其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体及其混合物、或所述药物组合物在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗或者预防FGFR介导的疾病,例如肿瘤和炎症性疾病。

[0018] 根据本发明,所述药物可以是任何药物剂型,包括但不限于片剂、胶囊剂、溶液剂、冻干制剂、注射剂。

[0019] 本发明的药物制剂可以以每剂量单位包含预定量的活性成分的剂量单位形式给药。这种单位可根据治疗的病症、给药方法和患者的年龄、体重和状况包含例如0.5毫克至1克,优选1毫克至700毫克,特别优选5毫克至300毫克的本发明的化合物,或药物制剂可以以每剂量单位包含预定量的活性成分的剂量单位形式给药。优选剂量单位制剂是包含如上指示的日剂量或分剂量或其相应分数的活性成分的那些。此外,可以使用制药领域中公知的方法制备这种类型的药物制剂。

[0020] 本发明药物制剂可适于通过任何所需的合适方法给药,例如通过经口(包括口腔或舌下)、直肠、经鼻、局部(包括口腔、舌下或经皮)、阴道或肠道外(包括皮下、肌内、静脉内或皮内)方法给药。可以使用制药领域中已知的所有方法通过例如将活性成分与一种或多种赋形剂或一种或多种辅助剂合并来制备这样的制剂。

具体实施方式

[0021] 除非有相反陈述,否则下列用在说明书和权利要求书中的术语具有下述含义。

[0022] 在本文中使用的表示方式“C_{x-y}”表示碳原子数的范围,其中x和y均为整数,例如C₃₋₈环烷基表示具有3-8个碳原子的环烷基,即具有3、4、5、6、7或8个碳原子的环烷基。还应理解,“C₃₋₈”还包含其中的任意亚范围,例如C₃₋₇、C₃₋₆、C₄₋₇、C₄₋₆、C₅₋₆等。

[0023] “烷基”指含有1至20个碳原子,例如1至18个碳原子、1至12个碳原子、1至8个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子的饱和的直链或支链的烃基基团。烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基和2-乙基丁基。所述烷基可以是取代的或未取代的。

[0024] “烯基”指含有至少一个碳碳双键和通常2至20个碳原子,例如2至8个碳原子、2至6个碳原子或2至4个碳原子的直链或支链的烃基基团。烯基的非限制性实例包括乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-甲基-2-丙烯基、1,4-戊二烯基和1,4-丁二烯基。所述烯基可以是取代的或未取代的。

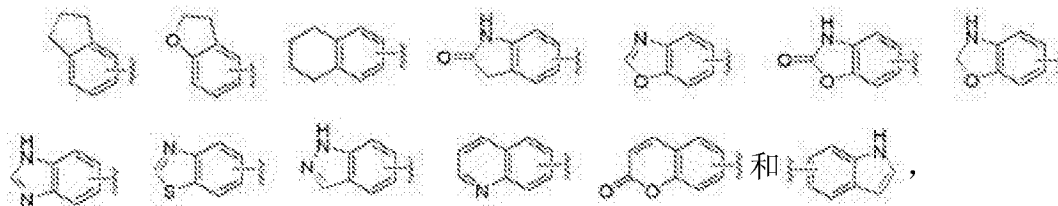
[0025] “炔基”指含有至少一个碳碳三键和通常2至20个碳原子,例如2至8个碳原子、2至6

个碳原子或2至4个碳原子的直链或支链的烃基基团。炔基的非限制性实例包括乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基和3-丁炔基。所述炔基可以是取代的或未取代的。

[0026] “环烷基”指含有3至14个碳环原子的饱和环形烃基取代基。环烷基可以是单碳环，通常含有3至7个碳环原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。环烷基可选择地可以是稠合到一起的双或三环，如十氢萘基。所述环烷基可以是取代的或未取代的。

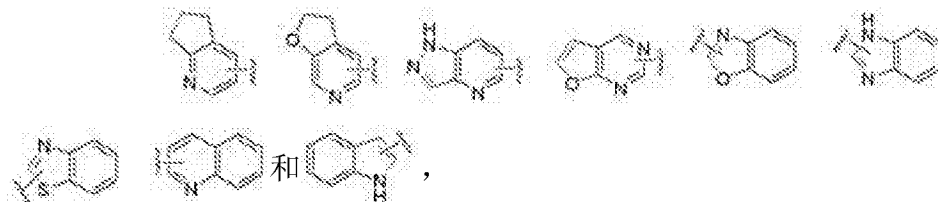
[0027] “杂环或杂环基”指饱和或部分不饱和的单环或多环环状基团，其包括3至20个环原子，例如可以是3至16个、3至14个、3至12个、3至10个、3至8个、3至6个或5至6个环原子，其中一个或多个环原子选自氮、氧或S(O)_m（其中m是整数0至2），但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包括3至12个环原子，更优选3至10个环原子，最优选5或6个环原子，其中1~4个是杂原子，更优选1~3个是杂原子，最优选1~2个是杂原子。单环杂环基的非限制性实例包含吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基和氮杂环丁烷基。多环杂环基包括稠合、桥接或螺多环杂环基。所述杂环或杂环基可以是取代的或未取代的。

[0028] “芳基”指含有6至14个碳原子的芳香族单环或稠合多环基团，优选为6至10元，例如苯基和萘基，最优选苯基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，非限制性实例包括：



所述芳基可以是取代的或未取代的。

[0029] “杂芳基或杂芳环”指包含5至14个环原子的杂芳族体系，其中1至4个环原子选自包括氧、硫和氮的杂原子。杂芳基优选为5至10元。更优选杂芳基是5元或6元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、吡唑基、咪唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，非限制性实例包括：



所述杂芳基可以是取代的或未取代的。

[0030] “卤素”指氟、氯、溴或碘。

[0031] “氰基”指-CN。

[0032] “任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

[0033] “取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为5个，更优选为1~3个氢原子彼此

独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻,取代基仅处在它们的可能的化学位置,本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定(通过实验或理论)可能或不可能的取代。例如,具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和(如烯属)键的碳原子结合时可能是不稳定的。所述取代基包括但不限于羟基、氨基、卤素、氰基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₈环烷基等。

[0034] “药物组合物”指含有一种或多种本文所述的化合物或其可药用的盐或前药以及其他组分例如可药用的载体和赋形剂的组合物。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0035] “异构体”指具有相同分子式但其原子结合的性质或顺序或其原子的空间排列不同的化合物称为“异构体”。其原子空间排列不同的异构体称为“立体异构体”。立体异构体包括光学异构体、几何异构体和构象异构体。

[0036] 本发明的化合物可以以光学异构体形式存在。根据手性碳原子周围取代基的构型,这些光学异构体是“R”或“S”构型。光学异构体包括对映异构体和非对映异构体。制备和分离光学异构体的方法是本领域中已知的。

[0037] 本发明的化合物也可以存在几何异构体。本发明考虑由碳-碳双键、碳-氮双键、环烷基或杂环基团周围的取代基的分布所产生的各种几何异构体和其混合物。碳-碳双键或碳-氮键周围的取代基指定为Z或E构型,环烷基或杂环周围的取代基指定为顺式或反式构型。

[0038] 本发明的化合物还可能显示互变异构现象,例如酮-烯醇互变异构。

[0039] 应该理解,本发明包括任何互变异构或立体异构形式和其混合物,并且不仅仅限于化合物的命名或化学结构式中所使用的任何一个互变异构或立体异构形式。

[0040] “同位素”是在本发明化合物中出现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那些原子。适合并入本发明化合物中的同位素的实例是氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯,分别例如但不限于²H、³H、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、¹⁸O、¹⁷O、³¹P、³²P、³⁵S、¹⁸F和³⁶Cl。本发明的同位素标记化合物通常可通过本领域技术人员已知的传统技术或通过所附实施例中描述的那些类似的方法使用适当的同位素标记的试剂代替非同位素标记的试剂来制备。这样的化合物具有各种潜在用途,例如作为测定生物活性中的标样和试剂。在稳定同位素的情况下,这样的化合物具有有利地改变生物、药理学或药代动力学性质的潜力。

[0041] “前药”是指本发明的化合物可以以前药的形式给予。前药是指在活体内的生理条件下例如通过氧化、还原、水解等(它们各自利用酶或在没有酶参与下进行)转化成本发明的生物活性化合物的衍生物。前药的实例是下述化合物:其中本发明的化合物中的氨基被酰化、烷基化或磷酸化,例如二十烷酰基氨基、丙氨酰氨基、新戊酰氧基甲基氨基,或其中羟基被酰化、烷基化、磷酸化或转化成硼酸盐,例如乙酰氧基、棕榈酰氧基、新戊酰氧基、琥珀酰氧基、富马酰氧基、丙氨酰氧基,或其中羧基被酯化或酰胺化,或其中巯基与选择性地靶向和/或向细胞的胞质溶胶递送药物的载体分子,例如肽形成二硫桥键。这些化合物可以由本发明的化合物根据公知方法制备。

[0042] “可药用的盐”或者“药学上可接受的盐”是指由可药用的碱或酸,包括无机碱或酸和有机碱或酸制成的盐。在本发明的化合物含有一个或多个酸性或碱性基团的情况下,本发明还包含它们相应的可药用盐。因此,含有酸性基团的本发明的化合物可以以盐形式存

在并可根椐本发明使用,例如作为碱金属盐、碱土金属盐或作为铵盐。这样的盐的更确切实例包括钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或与氨或有机胺,例如乙胺、乙醇胺、三乙醇胺或氨基酸的盐。含有碱性基团的本发明的化合物可以以盐形式存在并可根椐本发明以它们与无机或有机酸的加成盐的形式使用。合适的酸的实例包括盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、草酸、乙酸、酒石酸、乳酸、水杨酸、苯甲酸、甲酸、丙酸、特戊酸、丙二酸、琥珀酸、庚二酸、富马酸、马来酸、苹果酸、氨基磺酸、苯基丙酸、葡糖酸、抗坏血酸、异烟酸、柠檬酸、己二酸和本领域技术人员已知的其它酸。如果本发明的化合物在分子中同时含有酸性和碱性基团,本发明除所提到的盐形式外还包括内盐或内铵盐。各盐可通过本领域技术人员已知的常规方法获得,例如通过在溶剂或分散剂中使这些与有机或无机酸或碱接触或通过与其它盐阴离子交换或阳离子交换。

[0043] 因此,在本申请中当提及“化合物”、“本发明化合物”或“本发明所述化合物”时,包括所有所述化合物形式,例如其前药、稳定同位素衍生物、可药用的盐、异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体及其混合物。

[0044] 在本文中,术语“肿瘤”包括良性肿瘤和恶性肿瘤(例如癌症)。

[0045] 在本文中,术语“癌症”包括FGFR参与其发生的各种恶性肿瘤,包括但不限于非小细胞肺癌、食管癌、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌和肝癌(例如肝细胞癌),更具体为肝癌、胃癌、非小细胞肺癌和膀胱癌。

[0046] 在本文中,术语“炎症性疾病”是指FGFR参与其炎症发生的任何炎性疾病,例如骨关节炎。

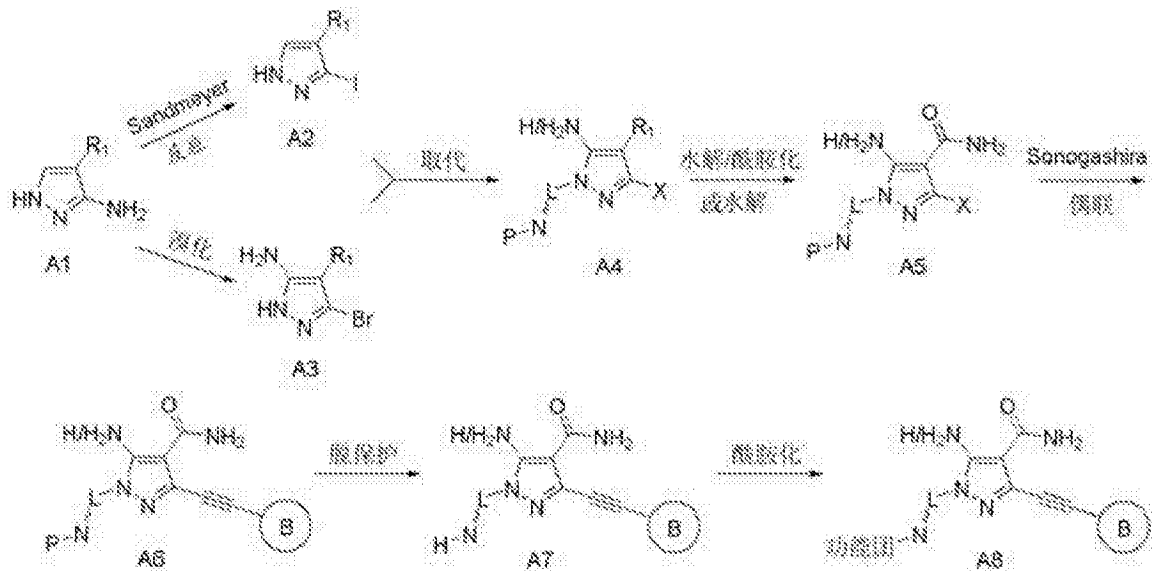
[0047] 在本文中,术语“治疗有效量”是指包括可有效抑制FGFR的功能和/或治疗或防止所述疾病的本发明化合物的量。

[0048] 合成方法

本发明还提供制备所述化合物的方法。本发明通式(I)所述化合物的制备,可通过以下示例性方法和实施例完成,但这些方法和实施例不应以任何方式被认为是对本发明范围的限制。也可通过本领域技术人员所知的合成技术合成本发明所述的化合物,或者综合使用本领域已知方法和本发明所述方法。每步反应所得的产物用本领域已知的分离技术得到,包括但不限于萃取、过滤、蒸馏、结晶、色谱分离等。合成所需的起始原料和化学试剂可以根据文献(可从SciFinder上查询)常规合成或购买。

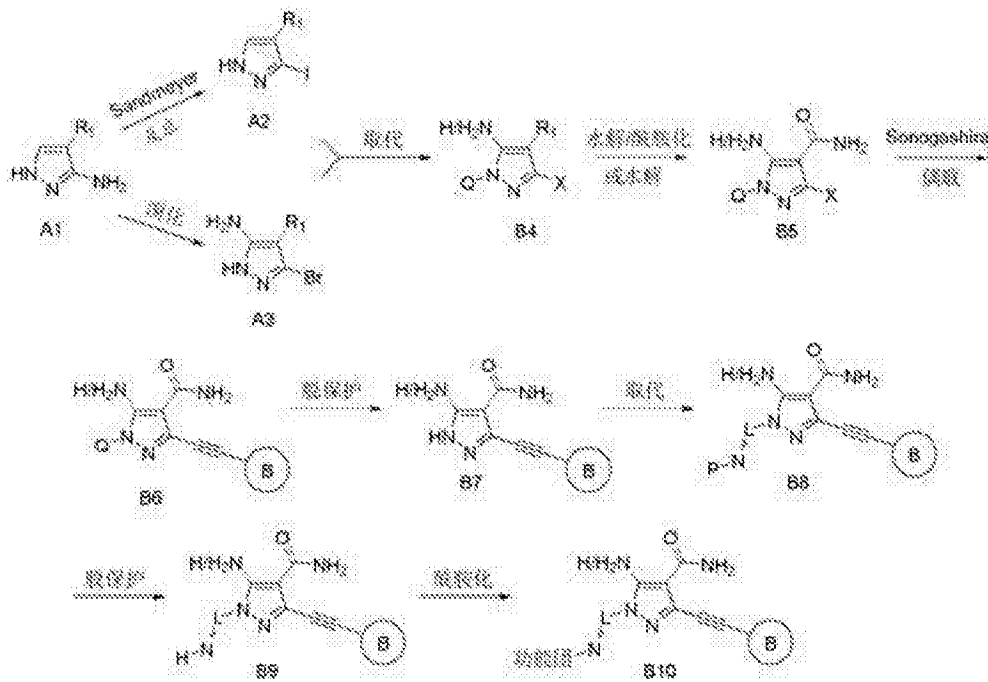
[0049] 本发明通式(I)所述吡啶类化合物可按照方法A所述路线合成:1)起始物A1通过桑德迈尔(Sandmeyer)反应得到A2,也可被溴化得到A3,其中的R₁可以是-CN或酯(-COOR,其中R为烷基);2)A2或A3与前体X-L~N-P(其中X为离去基团、L~N-P为含有带保护氨基的功能团、P为氨基的保护基)在碱催化下发生取代反应生成A4,也可与一帶有羟基的前体(HO-L~N-P)通过光延反应(Mitsunobu反应)得到A4;3)当A4的R₁是-CN,在NaOH/H₂O₂条件下水解成酰胺A5;当A4的R₁是酯(-COOR,其中R为烷基),先在碱性条件(比如LiOH)下水解成羧酸,然后酰胺化得到A5;4)A5与炔通过Sonogashira偶联得到A6;5)A6中氨基去保护得到A7;6)A7中的氨基被含有和激酶配体结合域内半胱氨酸残基起反应的功能团的化学试剂(例如BrCN、烯丙酰氯等)衍生化得到目标化合物A8。

[0050] 方法A:



另外也可以按照方法B所述路线合成,在第二步引入吡唑NH保护基Q,在第五步脱保护得到共同的中间体B7,B7的吡唑NH再与含有带保护氨基的不同前体反应取代反应,经过脱保护和衍生化,从而得到目标产物A8。

[0051] 方法B:



实施例

[0052] 化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或质谱(MS)来确定的。NMR的测定是用Bruker AVANCE-400或Varian Oxford-300核磁仪,测定溶剂为氘代二甲基亚砜(DMSO-*d*₆)、氘代氯仿(CDC1₃)、氘代甲醇(CD₃OD),内标为四甲基甲硅烷(TMS),化学位移是以10⁻⁶(ppm)作为单位给出。

[0053] MS的测定用Agilent SQD(ESI)质谱仪(生产商:Agilent,型号:6120)。

[0054] HPLC的测定使用安捷伦1200 DAD高压液相色谱仪(Sunfire C18,150×4.6mm,5μm

色谱柱)和Waters 2695-2996高压液相色谱仪(Gimini C18 150×4.6mm,5μm色谱柱)。

[0055] 薄层层析硅胶板使用青岛海洋GF254硅胶板,薄层色谱法(TLC)使用的硅胶板采用的规格是0.15mm~0.2mm,薄层层析分离纯化产品采用的规格是0.4mm~0.5mm硅胶板。

[0056] 柱层析一般使用青岛海洋200~300目硅胶为载体。

[0057] 本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成,或可购买自ABCR GmbH&Co. KG、Acros Organics、Aldrich Chemical Company、韶远化学科技(Accela ChemBio Inc.)、北京耦合化学品等公司。

[0058] 实施例中如无特殊说明,反应均在氩气氛或氮气氛下进行。

[0059] 氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氩气或氮气气球。

[0060] 氢气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氢气气球。

[0061] 加压氢化反应使用北京佳维科创科技有限公司GCD-500G高纯氢气发生器和BLT-2000中压氢化仪。

[0062] 氢化反应通常抽真空,充入氢气,反复操作3次。

[0063] 微波反应使用CEM Discover-SP型微波反应器。

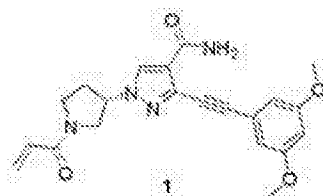
[0064] 实施例中如无特殊说明,反应的温度为室温,温度范围是20℃ - 30℃。

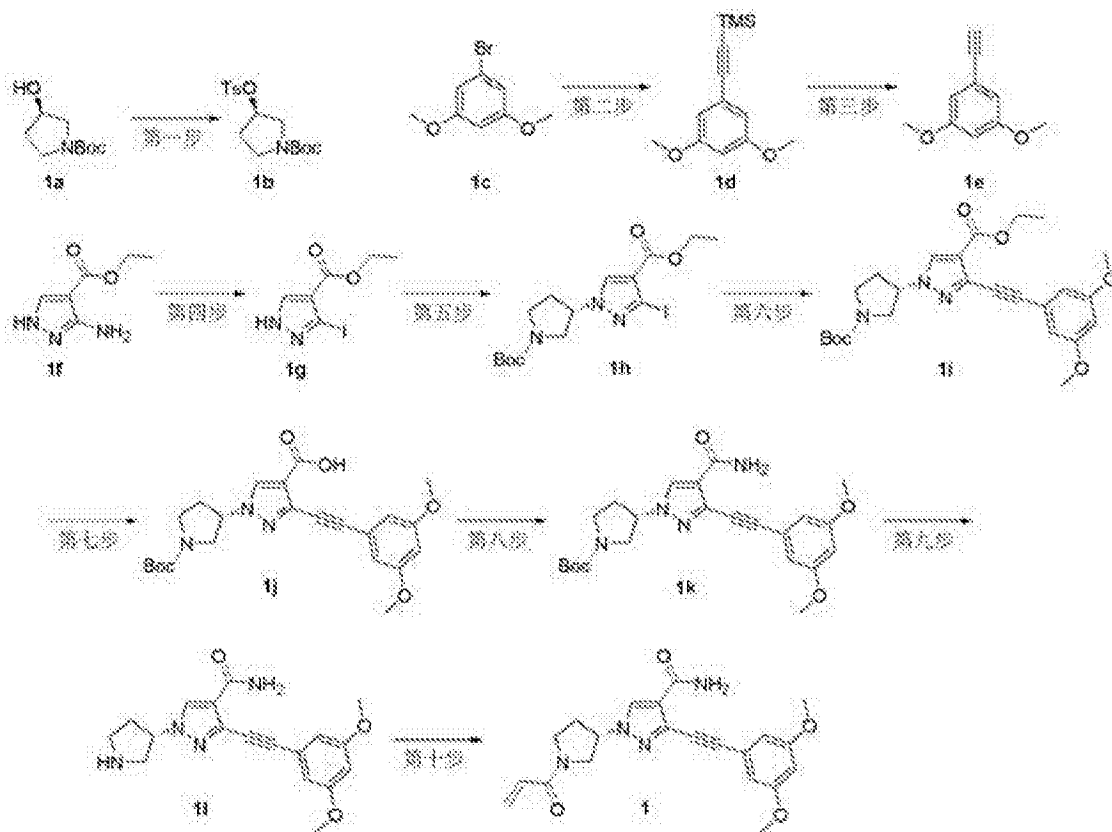
[0065] 实施例中的反应进程的监测采用薄层色谱法(TLC),反应所使用的展开剂的体系有A:二氯甲烷和甲醇体系;B:石油醚和乙酸乙酯体系,溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节。

[0066] 纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂的体系包括A:二氯甲烷和甲醇体系;B:石油醚和乙酸乙酯体系,溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节,也可以加入少量的三乙胺和酸性或碱性试剂等进行调节。

[0067] 实施例1

(S)-1-(1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺





第一步

(R)-3-(甲苯磺酰氧代)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯

将化合物(R)-3-羟基吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯1a(3.5g,18.7mmol)、三乙胺(5.25mL,37.9mmol)、4-二甲氨基吡啶(0.35g,2.87mmol)溶于二氯甲烷(50mL),加入对甲苯磺酰氯(5.4g,28.1mmol),将反应混合物在室温下搅拌12小时。加水(50mL)稀释,用乙酸乙酯(100mL×3)萃取。有机相合并后用无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,在减压下除去溶剂,残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯=2/1),得到目标产物(R)-3-(甲苯磺酰氧代)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯1b(6.0g,黄色油状物),产率:94%。

[0068] MS m/z (ESI): 364 [M+23]。

[0069] 第二步

((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)三甲基甲硅烷

将混合物1-溴-3,5-二甲氧基苯1c(6.51g,30mmol)、三甲基甲硅基乙炔(8.8g,90mmol)、二(三苯基膦)氯化钯(1.05g,1.5mmol)、碘化亚铜(0.56g,3.0mmol)、三乙胺(80mL)和N,N-二甲基甲酰胺(150mL)加热至80℃,并在氮气保护下搅拌12小时。将反应混合物冷却至室温,减压浓缩,残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚),得到目标产物((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)三甲基甲硅烷1d(6.2g,棕色固体),产率:88%。

[0070] MS m/z (ESI): 235 [M+1]。

[0071] 第三步

1-乙炔基-3,5-二甲氧基苯

将((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)三甲基甲硅烷1d(3.0g,12.8mmol)溶于甲醇(100mL),加入碳酸钾(3.5g,25.6mmol),并在室温下搅拌2小时。过滤,减压浓缩滤液,残余物用硅胶

柱层析纯化(石油醚),得到目标产物1-乙炔基-3,5-二甲氧基苯1e(2g,黄色固体),产率:96%。

[0072] 第四步

3-碘-1H-吡唑-4-甲酸乙酯

将3-氨基-1H-吡唑-4-甲酸乙酯1f(4.7g,30.3mmol)溶于浓盐酸(12M,40mL),并冷却至0℃,加入亚硝酸钠(4.25g,60mmol)溶液(7.5mL),搅拌5分钟,然后缓慢加入碘化钾(12.5g,75mmol)溶液(17.5mL),继续搅拌30分钟。将上述反应混合物倒入饱和硫代硫酸钠溶液(200mL),用乙酸乙酯(400mL×3)萃取。有机相合并后用无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,在减压下除去溶剂,残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 2/1),得到目标产物3-碘-1H-吡唑-4-甲酸乙酯1g(6.4g,浅黄色固体),产率:80%。

[0073] MS m/z (ESI): 267 [M+1]。

[0074] 第五步

(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-碘-1H-吡唑-4-甲酸乙酯

将3-碘-1H-吡唑-4-甲酸乙酯1g(4.5g,17mmol)、(R)-3-(甲苯磺酰氧代)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯1b(6.1g,17.8mmol)、碳酸铯(7.5g,20.4mmol)和N,N-二甲基甲酰胺(50mL)的混合物加热到80℃,搅拌3小时。将反应混合物冷却至室温,倒入饱和碳酸氢钠溶液(200mL)中,用乙酸乙酯(300mL×3)萃取。有机相合并后用无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,在减压下除去溶剂,残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 5/1到2/1),得到目标产物(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-碘-1H-吡唑-4-甲酸乙酯1h(3.1g,淡黄色固体),产率:42%。

[0075] MS m/z (ESI): 458 [M+23]。

[0076] 第六步

(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酸乙酯

将(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-碘-1H-吡唑-4-甲酸乙酯1h(1g,2.25mmol)、1-乙炔基-3,5-二甲氧基苯1e(0.75g,4.5mmol)、二(三苯基膦)氯化钯(175mg,0.25mmol)、碘化亚铜(95mg,0.5mmol)、三乙胺(12.5mL)和N,N-二甲基甲酰胺(12.5mL)的混合物加热到80℃,搅拌12小时。将反应混合物冷却至室温,在减压下除去溶剂,残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 2/1),得到目标产物(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酸乙酯1i(0.95g,黄色油状物),产率:90%。

[0077] MS m/z (ESI): 414 [M+1-56]。

[0078] 第七步

(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酸

将(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酸乙酯1i(0.30g,0.64mmol)溶于四氢呋喃(3mL),加入氢氧化钠溶液(4M,2mL),室温搅拌1小时。将反应混合物减压浓缩,残余物用盐酸(6M,1mL)酸化,用乙酸乙酯(10mL×3)萃取。有机相合并后用无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,在减压下除去溶剂,得到目标产

物(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶-4-甲酸1j(200mg,淡黄色油状物),产率:71%。

[0079] MS m/z (ESI): 386 [M+1-56]。

[0080] 第八步

(S)-3-(4-氨甲酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯

将(S)-1-(1-(叔丁氧基羰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶-4-甲酸1j(220mg,0.5mmol)、氯化铵(270mg,5mmol)、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HATU)(228mg,0.6mmol)、N,N-二异丙基乙胺(129mg,1mmol)和N,N-二甲基甲酰胺(5mL)的反应混合物在室温下搅拌过夜。加水稀释,用乙酸乙酯萃取。有机相合并后用无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,在减压下除去溶剂,残余物用薄层硅胶制备色谱纯化(二氯甲烷/甲醇 = 20/1),得到目标产物(S)-3-(4-氨甲酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯1k(140mg,白色固体),产率:64%。

[0081] MS m/z (ESI): 385 [M+1-56]。

[0082] 第九步

(S)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡啶-4-甲酰胺

将(S)-3-(4-氨甲酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯1k(50mg,0.11mmol)、盐酸(6M,5mL)和二氧六环(5mL)的反应混合物在室温下搅拌1小时。在减压下除去溶剂,得到目标产物(S)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡啶-4-甲酰胺1l(42mg,盐酸盐,粗品),产率:100%。

[0083] MS m/z (ESI): 341 [M+1]。

[0084] 第十步

(S)-1-(1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶-4-甲酰胺

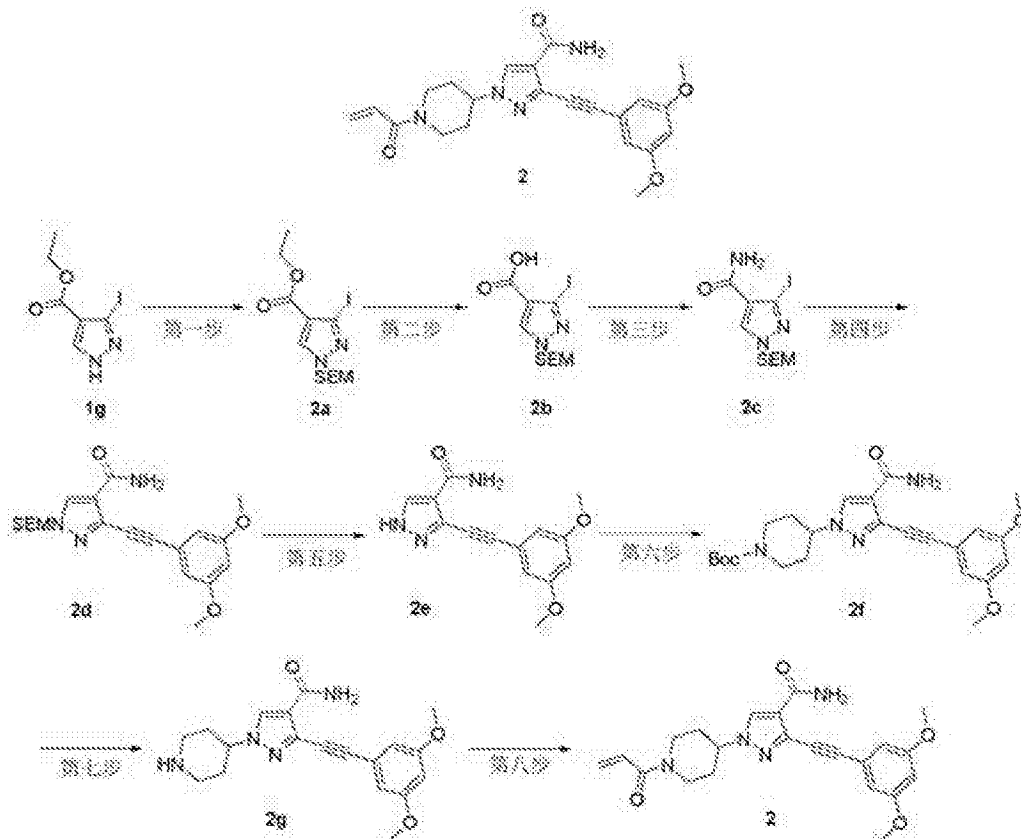
向(S)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡啶-4-甲酰胺盐酸盐1l(30mg,0.08mmol)、N,N-二异丙基乙胺(31mg,0.24mmol)和四氢呋喃(15mL)的混合物中滴加丙烯酰氯(11mg,0.12mmol)的四氢呋喃(5mL)溶液,将反应混合物在室温下搅拌30分钟。加水(30mL)淬灭,用乙酸乙酯萃取。有机相合并后用无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,在减压下除去溶剂,残余物用薄层硅胶制备色谱纯化(二氯甲烷/甲醇 = 20/1),得到目标产物(S)-1-(1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶-4-甲酰胺1(15mg,白色固体),产率:50%。

[0085] MS m/z (ESI): 395 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.10 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 6.96 (brs, 1H), 6.71 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.54 - 6.52 (m, 1H), 6.46 - 6.39 (m, 2H), 5.80 (brs, 1H), 5.76 - 5.72 (m, 1H), 5.01 - 4.92 (m, 1H), 4.13 - 4.00 (m, 2H), 3.90 - 3.75 (m, 8H), 2.62 - 2.44 (m, 2H)。

[0086] 实施例2

1-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶-4-甲酰胺



第一步

3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酸乙酯

将化合物3-碘-1H-吡唑-4-甲酸乙酯1g(2.01g, 7.5mmol)溶于四氢呋喃(80mL)并冷却至0℃,加入氢氧化钠(60%矿物油分散体,0.42g, 10.5mmol),室温下搅拌1小时。向反应混合物中加入2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基氯(1.76g, 10.5mmol),继续搅拌15小时。向反应混合物中加入饱和食盐水(100mL),用乙酸乙酯萃取(150mL×2)。有机相合并后用饱和食盐水洗涤(100mL),在减压下除去溶剂,残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 5/1到1/2),得到目标产物3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酸乙酯2a(2.6g, 无色油状物),产率:87%。

[0087] MS m/z (ESI): 397 [M+1]。

[0088] 第二步

3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酸

将化合物3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酸乙酯2a(2.6g, 6.5mmol)溶于四氢呋喃(40mL),加入氢氧化锂水溶液(1M, 13mL)并在室温下搅拌15小时。加水(20mL)稀释,用盐酸(1M)酸化至pH = 4-5,用乙酸乙酯萃取(50mL×3)。有机相合并后用饱和食盐水(100mL)洗涤,在减压下除去溶剂,干燥后得到目标产物3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酸2b(2.03g, 白色固体),产率:85%。

[0089] MS m/z (ESI): 391 [M+23]。

[0090] 第三步

3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将化合物3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酸2b(2.03g,

5.5mmol)、二异丙基乙基胺(2.13g, 16.5mmol)和N,N-二甲基甲酰胺(20mL)混合,依次加入0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HATU)(2.5g, 6.6mmol)和1-羟基苯并三唑(890mg, 6.6mmol),室温下搅拌1小时后加入固体氯化铵(1.47g, 27.5mmol),继续搅拌15小时。向反应混合物物中加入饱和食盐水(30mL),用乙酸乙酯萃取(50mL×3)。有机相合并后用饱和食盐水洗涤(100mL),在减压下除去溶剂后,残余物用硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇 = 20/1),得到目标产物3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2c(2.3g, 黄色油状物),产率:100%。

[0091] MS m/z (ESI): 368 [M+1]。

[0092] 第四步

3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将化合物3-碘-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2c(2.7g, 7.3mmol)、1-乙炔基-3,5-二甲氧基苯(1.78g, 11mmol)、三乙胺(2.2g, 21.9mmol)、二(三苯基磷)氯化钨(512mg, 0.73mmol)和无水四氢呋喃(70mL)混合,除氧,在氩气气氛下室温搅拌15小时。在减压下除去溶剂,残余物用硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯/石油醚 = 10/1至2/1)得到目标产物3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2d(1.5g, 黄色固体),产率:51%。

[0093] MS m/z (ESI): 402 [M+1]。

[0094] 第五步

3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2d(1.4g, 3.5mmol)、乙二胺(525mg, 8.75mmol)和四氢呋喃(30mL)混合,加入四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液(1M, 17.5mL, 17.5mmol)。加热回流15小时后,冷却至室温,加入饱和食盐水(20mL),用乙酸乙酯(100mL×3)萃取。有机相合并后用无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,在减压下除去溶剂,残余物用硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇 = 20/1),得到目标产物3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2e(600mg, 白色固体),产率:63%。

[0095] MS m/z (ESI): 272 [M+1]。

[0096] 第六步

4-(4-氨甲酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯

将化合物3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2e(180mg, 0.66mmol)、4-溴哌啶-1-甲酸叔丁基酯(264mg, 0.99mmol)、碳酸钾(182mg, 1.32mmol)和N,N-二甲基甲酰胺(10mL)混合后,加热到75℃,搅拌15小时。加入水(30mL),用乙酸乙酯(50mL×3)萃取。有机相合并后用饱和食盐水洗涤,并用无水硫酸钠干燥。过滤除去干燥剂,在减压下除去溶剂,残余物用硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇 = 20/1),得到目标产物4-(4-氨甲酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯2f(120mg, 黄色固体,含区域异构体),产率:40%。

[0097] MS m/z (ESI): 477 [M+23]。

[0098] 第七步

3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(哌啶-4-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将化合物4-(4-氨基酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯(120mg, 0.26mmol, 混合物)溶于乙醇(20mL), 加入氯化氢的乙醇溶液(4M, 1mL, 4mmol), 室温下搅拌15小时。在减压下除去溶剂, 残余物溶于甲醇(20mL)后, 用饱和碳酸氢钠溶液调节至pH = 8-9。再次在减压下除去溶剂后, 残余物用硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇 = 10/1), 得到目标产物3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(哌啶-4-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2g(25mg, 白色固体), 产率: 27%。

[0099] MS m/z (ESI): 355 [M+1]。

[0100] 第八步

1-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将化合物3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(哌啶-4-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2g(25mg, 0.07mmol)、烯丙酰氯(10mg, 0.11mmol)、固体碳酸氢钠(18mg, 0.21mmol)、水(2mL)和四氢呋喃(10mL)在0℃混合并在此温度下搅拌10小时。用乙酸乙酯(20mL×3)萃取, 有机相合并后用无水硫酸钠干燥, 过滤除去干燥剂, 在减压下除去溶剂, 残余物用硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇 = 10/1), 得到目标产物1-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺2(17mg, 白色固体), 产率: 60%。

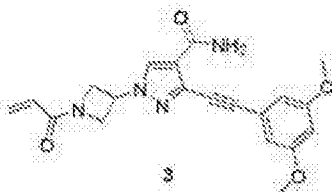
[0101] MS m/z (ESI): 409 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (s, 1H), 7.01 (brs, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.62 (dd, *J* = 16.8, 10.6 Hz, 1H), 6.55 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.33 (dd, *J* = 16.8, 1.5 Hz, 1H), 5.80 (brs, 1H), 5.76 (dd, *J* = 10.6, 1.6 Hz, 1H), 4.81 (brs, 1H), 4.40 (t, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.18 (brs, 1H), 3.82 (s, 6H), 3.26 (brs, 1H), 2.89 (brs, 1H), 2.42 - 2.25 (m, 2H), 2.08 - 2.00 (m, 2H)。

[0102] 参照实施例2的操作步骤合成了实施例3-6:

实施例3

1-(1-丙烯酰基氮杂环丁烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺



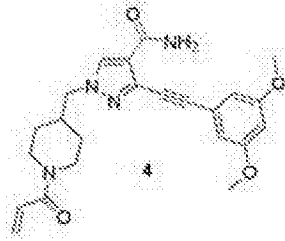
MS m/z (ESI): 381 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.43 (s, 1H), 7.30 (s, 2H), 6.73 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.60 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.38 (dd, *J* = 17.0, 10.3 Hz, 1H), 6.16 (dd, *J* = 17.0, 2.1 Hz, 1H), 5.73 (dd, *J* = 10.3, 2.1 Hz, 1H), 5.41 - 5.28 (m, 1H), 4.71 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.50 (dd, *J* = 9.2, 4.9 Hz, 1H), 4.46 - 4.36 (m, 1H), 4.20 (dd, *J* = 10.7, 4.8 Hz, 1H), 3.78 (s, 6H)。

[0103] 实施例4

1-((1-丙烯酰基哌啶-4-基)甲基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

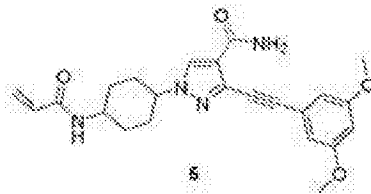
胺

MS m/z (ESI): 423 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.00 (s, 1H), 6.98 (brs, 1H), 6.72 (s, 2H), 6.61 - 6.54 (m, 2H), 6.28 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 5.87 (brs, 1H), 5.70 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.72 (brs, 1H), 4.04 (brs, 3H), 3.82 (s, 6H), 3.05 (brs, 1H), 2.64 (brs, 1H), 2.27 (brs, 1H), 1.69 (brs, 2H), 1.24 (brs, 2H)。

[0104] 实施例5

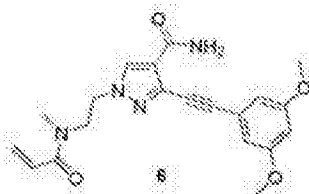
1-(4-丙烯酰基氨基环己基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

MS m/z (ESI): 423 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.25 (s, 1H), 6.77 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.58 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.38 (dd, $J = 17.1, 10.0$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 17.1, 2.0$ Hz, 1H), 5.68 (dd, $J = 10.1, 2.0$ Hz, 1H), 4.38 - 4.33 (m, 1H), 4.13 - 4.11 (m, 1H), 3.82 (s, 6H), 2.28 - 2.18 (m, 2H), 2.07 - 2.02 (m, 2H), 1.96 - 1.80 (m, 4H)。

[0105] 实施例6

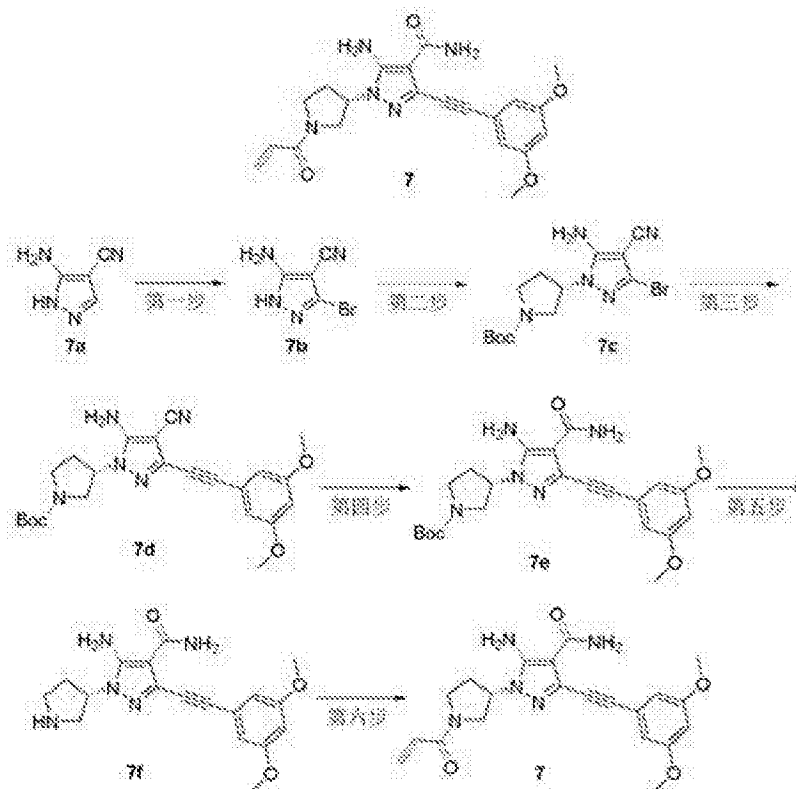
3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(2-(N-甲基丙烯酰基氨基)乙基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

MS m/z (ESI): 383 [M+1]

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.24 (s, 1H), 7.10 - 6.90 (m, 2H), 6.76 (s, 2H), 6.69 - 6.54 (m, 2H), 6.07 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 5.64 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 4.37 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.89 - 3.80 (m, 8H), 2.94 (s, 3H)。

[0106] 实施例7

(S)-1-(1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺



第一步

5-氨基-3-溴-1H-吡唑-4-甲腈

将化合物5-氨基-1H-吡唑-4-甲腈7a (20g, 185mmol) 溶于N,N-二甲基甲酰胺(200mL), 冷却至0℃, 分批加入N-溴代丁二酰亚胺(34g, 190mmol), 升至室温搅拌2小时。将反应液倒入亚硫酸钠溶液中, 用乙酸乙酯(200ml × 3) 萃取, 有机相合并后经无水硫酸钠干燥, 过滤除去干燥剂, 减压浓缩, 残余物用硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇 = 20/1), 得到目标产物5-氨基-3-溴-1H-吡唑-4-甲腈7b (32g, 黄色固体), 产率: 93%。

[0107] MS m/z (ESI): 187/189 [M+1]。

[0108] 第二步

(S)-3-(5-氨基-3-溴-4-氰基-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯

将5-氨基-3-溴-1H-吡唑-4-甲腈7b (10g, 53.8mmol)、3-(甲苯磺酰氧代)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯(22g, 64.5mmol)、碳酸铯(58g, 107.6mmol)和乙腈(250mL)的混合物加热到90℃反应4小时。冷却至室温, 过滤, 滤饼用二氯甲烷洗涤, 滤液合并后减压浓缩, 残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 5/1), 得到目标产物(S)-3-(5-氨基-3-溴-4-氰基-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯7c (5g, 黄色油状物), 产率: 26%。

[0109] MS m/z (ESI): 300/302 [M+56]。

[0110] 第三步

(S)-3-(5-氨基-4-氰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯

将(S)-3-(5-氨基-3-溴-4-氰基-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯7c (5g, 14.1mmol)、碘化亚铜(0.6g, 2.8mmol)、三乙胺(9mL)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(2g, 2.8mmol)和N,N-二甲基甲酰胺(150mL)的混合物在氩气保护下加热至80℃, 分批

加入1-乙炔基-3,5-二甲氧基苯(14g, 84.5mmol), 搅拌2小时。冷却至室温, 将反应液倒入水中, 用乙酸乙酯(200ml×3)萃取。有机相合并后经无水硫酸钠干燥, 过滤除去干燥剂, 减压浓缩, 残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 5/1), 得到目标产物(S)-3-(5-氨基-4-氰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯7d(5g, 棕色油状物), 产率: 81%。

[0111] MS m/z (ESI): 382 [M+1-56]。

[0112] 第四步

(S)-3-(5-氨基-4-氨甲酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯

将(S)-3-(5-氨基-4-氰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯7d(5g, 11.4mmol)、氢氧化钠(1.5g, 37.5mmol溶于水(2mL))、乙醇(50mL)和二甲基亚砜(10mL)的混合物冷却至0℃, 加入双氧水(20mL), 室温搅拌2小时。将反应液倒入亚硫酸钠溶液中, 用乙酸乙酯(100ml×3)萃取, 有机相合并后经无水硫酸钠干燥, 过滤除去干燥剂, 减压浓缩, 残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 1/1), 得到目标产物(S)-3-(5-氨基-4-氨甲酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯7e(5g, 棕色油状物), 产率: 96%。

[0113] MS m/z (ESI): 400 [M+1-56]。

[0114] 第五步

(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将化合物(S)-3-(5-氨基-4-氨甲酰基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-1-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯7e(5g, 11mmol)溶于二氯甲烷(100mL)中, 加入三氟乙酸(15mL), 室温搅拌2小时。减压浓缩, 得到目标产物(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺7f(7.1g, 棕色油状物, 三氟乙酸盐, 粗品), 产率: >100%, 产物不经纯化直接用于下一步反应。

[0115] MS m/z (ESI): 356 [M+1]。

[0116] 第六步

(S)-1-(1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将化合物(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺7f(7.1g, 11mmol, 三氟乙酸盐, 粗品)溶于四氢呋喃(50mL)中, 冷却至0℃, 先后加入碳酸氢钠饱和溶液(20mL)和丙烯酰氯(900mg, 10mmol), 搅拌30分钟。将反应液倒入水(100mL)中, 并用二氯甲烷(100ml×3)萃取。有机相合并后经无水硫酸钠干燥, 过滤除去干燥剂, 减压浓缩, 残余物用硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 1/2), 得到目标产物(S)-1-(1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺7(1.9g, 白色固体), 产率: 42%。

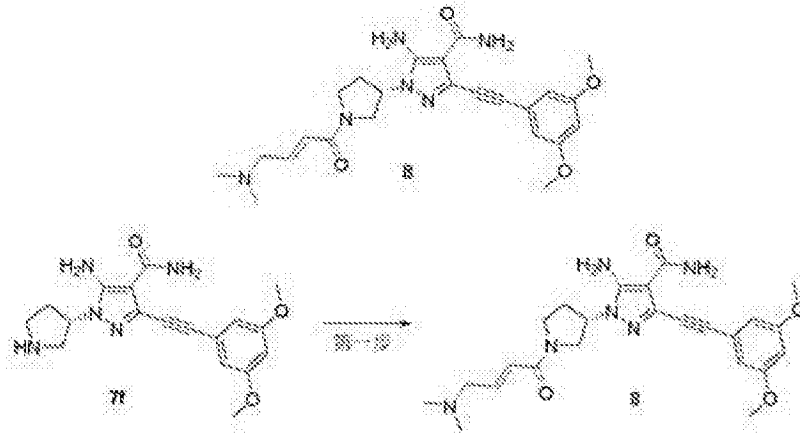
[0117] MS m/z (ESI): 410 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.18 (brs, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.69 - 6.55 (m, 3H), 6.20 - 6.14 (m, 1H), 5.72 - 5.67 (m, 1H), 5.03 - 4.91 (m, 1H), 4.01 - 3.96 (m, 1H), 3.84 - 3.70 (m, 7H), 3.66 - 3.60 (m, 1H), 3.55

- 3.48 (m, 1H), 2.36 - 2.21 (m, 2H)。

[0118] 实施例8

(S,E)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(4-(二甲氨基)丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺



第一步

(S,E)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(4-(二甲氨基)丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

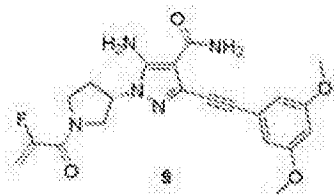
将(E)-4-(二甲氨基)丁-2-烯酸(23mg,0.14mmol)、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HATU)(64mg,0.17mmol)、(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺7f(50mg,0.14mmol)、N,N-二异丙基乙胺(2mL)和二氯甲烷(3mL)的反应混合物在室温下搅拌1小时。将反应液倒入水中,用二氯甲烷(20mL×3)萃取。有机相合并后经无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,减压浓缩,残余物用高效液相制备色谱纯化,得到目标产物(S,E)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(4-(二甲氨基)丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺8(2.4mg,白色固体,甲酸盐),产率:4%。

[0119] MS m/z (ESI): 467 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.27 (brs, 1H), 7.20 (brs, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.70 - 6.61 (m, 3H), 6.44 - 6.35 (m, 1H), 5.01 - 4.93 (m, 1H), 4.01 - 3.93 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.74 - 3.64 (m, 3H), 3.06 - 3.03 (m, 2H), 2.38 - 2.24 (m, 2H), 2.17 - 2.15 (m, 6H)。

[0120] 实施例9

(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(2-氟丙烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺





第一步

(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(2-氟丙烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

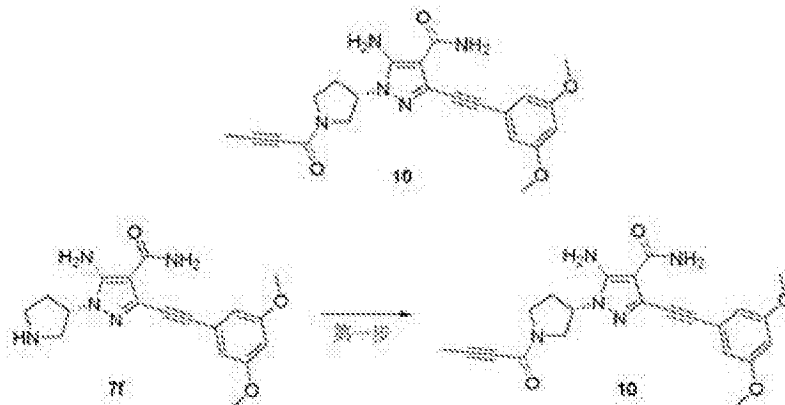
将化合物(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺7f (50mg, 0.14mmol)和2-氟丙烯酸(15mg, 0.17mmol)溶于二氯甲烷,加入N,N-二异丙基乙胺(54mg, 0.42mmol)和O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HATU)(69mg, 0.18mmol),室温搅拌2小时。加水(10mL)稀释反应混合物,用二氯甲烷(10mL×3)萃取,有机相合并后减压浓缩。残余物用薄层硅胶制备色谱纯化(二氯甲烷/甲醇=20/1),得到目标产物(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(2-氟丙烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺9(3.6mg, 白色固体),产率:6%。

[0121] MS m/z (ESI): 428 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.62 (t, $J = 2.5$ Hz, 2H), 6.47 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 5.39 (dd, $J = 47.2, 3.5$ Hz, 1H), 5.16 (ddd, $J = 16.6, 5.7, 3.5$ Hz, 1H), 4.86 - 4.81 (m, 1H), 4.02 - 3.91 (m, 2H), 3.87 - 3.72 (m, 2H), 3.71 (s, 6H), 2.34 - 2.23 (m, 2H)。

[0122] 实施例10

(S)-5-氨基-1-(1-(丁-2-炔酰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺



第一步

(S)-5-氨基-1-(1-(丁-2-炔酰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺7f (50mg, 0.14mmol)和2-丁炔酸(14mg, 0.17mmol)溶于二氯甲烷中,加入N,N-二异丙基乙胺(54mg, 0.42mmol)和O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HATU)(69mg, 0.18mmol),室温搅拌2小时。反应混合物用水(10mL)稀释,用二氯甲烷(10mL

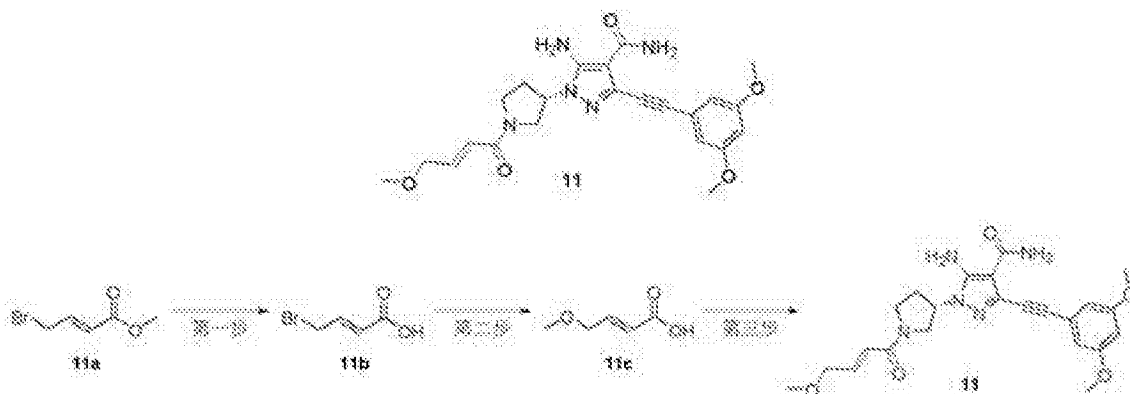
×3) 萃取, 有机相合并后减压浓缩。残余物用薄层硅胶制备色谱纯化(二氯甲烷/甲醇 = 20/1), 得到目标产物(S)-5-氨基-1-(1-(丁-2-炔酰基)吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺(5.1mg, 淡黄色固体), 产率: 9%。

[0123] MS m/z (ESI): 422 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.62 (t, $J = 2.1$ Hz, 2H), 6.47 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.85 - 4.81 (m, 1H), 4.01 - 3.86 (m, 2H), 3.77 - 3.62 (m, 7.5H), 3.54 - 3.46 (m, 0.5H), 2.32 - 2.27 (m, 2H), 1.95 - 1.93 (m, 3H)。

[0124] 实施例11

(S,E)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(4-甲氧基丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺



第一步

(E)-4-溴丁-2-烯酸

将(E)-4-溴丁-2-烯酸甲酯11a(3g, 16.8mmol)、氢氧化锂一水合物(1.1g, 25.3mmol)、四氢呋喃(50mL)和水(50mL)在0℃混合并继续搅拌2小时。反应结束后, 用石油醚洗去四氢呋喃, 水相用2M盐酸调节至 $\text{pH} = 1$, 然后用乙酸乙酯(100mL×2)萃取。有机相合并后在减压下除去溶剂, 得到目标产物(E)-4-溴丁-2-烯酸11b(2.3g, 黄色油状物), 产率83%。

[0125] MS m/z (ESI): 163 [M-1]。

[0126] 第二步

(E)-4-甲氧基丁-2-烯酸

将化合物(E)-4-溴丁-2-烯酸11b(100mg, 0.61mmol)溶于甲醇(5mL)后, 加入甲醇钠的甲醇溶液(30%, 0.55mL, 3.05mmol)并搅拌15小时。反应混合物在减压下除去溶剂后溶于水, 并用稀盐酸调节至 $\text{pH} = 1$, 然后用二氯甲烷萃取(10mL×3)。有机相合并后在减压下除去溶剂, 得到目标产物(E)-4-甲氧基丁-2-烯酸11c(50mg, 黄色油状物), 产率: 71%。

[0127] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.13 - 7.03 (m, 1H), 6.15 - 6.07 (m, 1H), 4.18 - 4.11 (m, 2H), 3.48 - 3.38 (s, 3H)。

[0128] 第三步

(S,E)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(1-(4-甲氧基丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将化合物(E)-4-甲氧基丁-2-烯酸11c(22mg, 0.19mmol)、二异丙基乙基胺(67mg, 0.52mmol)、(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-

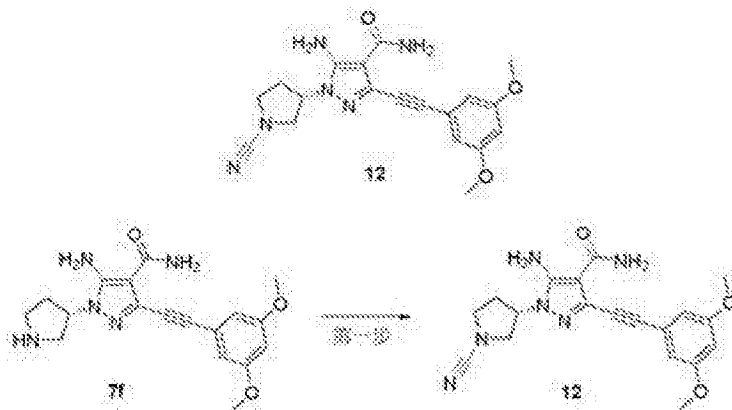
甲酰胺7f (50mg, 0.13mmol)、2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (72mg, 0.19mmol) 和N,N-二甲基甲酰胺(10mL) 混合并搅拌2小时。在减压下除去溶剂, 残余物溶于乙酸乙酯(30mL) 后依次用水和饱和食盐水洗涤。在减压下除去溶剂, 残余物用硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇 = 20/1) 得到目标产物(S,E)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基) 乙炔基)-1-(1-(4-甲氧基丁-2-烯酰基) 吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺11 (30mg, 白色固体), 产率:51%。

[0129] MS m/z (ESI): 454 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.98 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 6.86 (brs, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.39 (dd, *J* = 27.7, 16.0 Hz, 1H), 5.54 (brs, 1H), 4.73 - 4.70 (m, 1H), 4.14 - 4.12 (m, 2H), 4.05 - 4.00 (m, 2H), 3.95 - 3.93 (m, 1H), 3.82 (s, 6H), 3.77 - 3.68 (m, 1H), 3.43 (d, *J* = 10.1 Hz, 3H), 2.72 (brs, 0.5H), 2.54 (brs, 0.5H), 2.43 - 2.35 (m, 1H)。

[0130] 实施例12

(S)-5-氨基-1-(1-氰基吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基) 乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺



第一步

(S)-5-氨基-1-(1-氰基吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基) 乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

将化合物(S)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基) 乙炔基)-1-(吡咯烷-3-基)-1H-吡唑-4-甲酰胺7f (50mg, 0.14mmol) 溶于四氢呋喃(2mL), 加入三乙胺(1mL), 冷却至0℃, 加入溴化氰(17mg, 0.15mmol), 0℃搅拌2小时, 升至室温, 继续搅拌2小时。反应混合物减压浓缩, 残余物用薄层硅胶制备色谱纯化(二氯甲烷/甲醇 = 15/1), 得到目标产物(S)-5-氨基-1-(1-氰基吡咯烷-3-基)-3-((3,5-二甲氧基苯基) 乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺12 (18mg, 白色固体), 产率:34%。

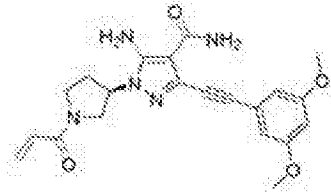
[0131] MS m/z (ESI): 381 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.77 (brs, 1H), 6.68 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 5.67 (brs, 1H), 4.79 - 4.73 (m, 1H), 3.84 - 3.73 (m, 9H), 3.61 - 3.53 (m, 1H), 2.53 - 2.43 (m, 1H), 2.37 - 2.26 (m, 1H)。

[0132] 参照实施例7的操作步骤合成了实施例13-16:

实施例13

(R)-1-(1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

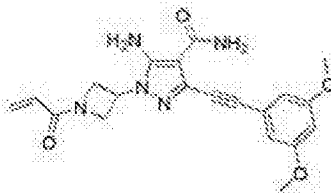


MS m/z (ESI): 410 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.73 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 6.71 - 6.60 (m, 1H), 6.58 (brs, 1H), 6.32 (dd, $J = 16.8, 1.7$ Hz, 1H), 5.84 - 5.74 (m, 1H), 5.04 - 4.91 (m, 1H), 4.09 (m, 0.5H), 3.98 (td, $J = 11.1, 4.0$ Hz, 1H), 3.91 (dd, $J = 7.8, 5.6$ Hz, 1H), 3.86 (dd, $J = 9.9, 4.4$ Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 3.73 - 3.63 (m, 0.5H), 2.47 (dd, $J = 13.2, 6.7$ Hz, 1H), 2.38 (dd, $J = 13.6, 7.0$ Hz, 1H)。

[0133] 实施例14

1-(1-丙烯酰基氮杂环丁烷-3-基)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

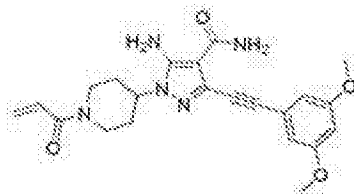


MS m/z (ESI): 396 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.75 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.60 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.45 - 6.28 (m, 2H), 5.80 (dd, $J = 10.1, 2.1$ Hz, 1H), 5.29 - 5.21 (m, 1H), 4.79 - 4.64 (m, 2H), 4.54 - 4.47 (m, 1H), 4.46 - 4.39 (m, 1H), 3.82 (s, 6H)。

[0134] 实施例15

1-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺

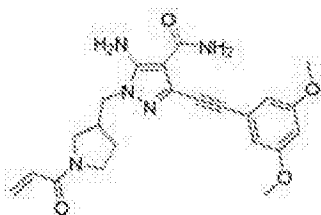


MS m/z (ESI): 424 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.88 - 6.78 (m, 1H), 6.73 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 6.58 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.24 (dd, $J = 16.8, 1.7$ Hz, 1H), 5.78 (dd, $J = 10.7, 1.7$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 4.47 - 4.36 (m, 1H), 4.30 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 3.32 - 3.24 (m, 1H), 2.91 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H), 2.02 (d, $J = 4.5$ Hz, 4H)。

[0135] 实施例16

1-((1-丙烯酰基吡咯烷-3-基)甲基)-5-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡唑-4-甲酰胺



MS m/z (ESI): 424 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.73 (s, 2H), 6.66 – 6.55 (m, 2H), 6.28 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 5.75 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.13 – 3.99 (m, 2H), 3.82 (s, 6H), 3.78 – 3.61 (m, 2H), 3.48 (dd, J = 14.8, 7.4 Hz, 1H), 3.39 – 3.34 (m, 1H), 2.94 – 2.75 (m, 1H), 2.20 – 2.02 (m, 1H), 1.94 – 1.71 (m, 1H)。

[0136] 生物学实验

FGFR的活性抑制测试

使用HTRF激酶检测试剂盒,通过检测激酶反应中底物的磷酸化水平来评估本发明的化合物对FGFR体外活性的影响

FGFR1的活性抑制测试

实验方法概述如下:

反应缓冲液包含以下组分:5倍稀释的enzymatic buffer/kinase 5X(Cisbio,货号为62EZBFDD)(主要成分为50mM HEPES,pH7.0)、5mM MgCl_2 和1mM DTT;人重组FGFR1催化结构域蛋白(氨基酸308-731)由公司自己纯化,用反应缓冲液稀释成0.6ng/uL的激酶溶液;底物反应溶液包括用反应缓冲液稀释成400nM的生物素标记的酪氨酸激酶底物(Cisbio,货号为62TK0PEC)和40uM ATP;检测液包括用检测缓冲液(Cisbio,货号为62SDBRDF)稀释成0.125ng/uL Eu^{3+} 标记的笼状抗体(Cisbio,货号为61T66KLB)、25nM链霉亲和素标记的XL665(Cisbio,货号为610SAXLB)。

[0137] 将化合物用DMSO溶解稀释至1mM,然后用DMSO进行4倍的系列稀释至最低浓度为0.061uM,每个浓度点再使用反应缓冲液稀释40倍。如果化合物 IC_{50} 值非常低,可以降低化合物的起始浓度。

[0138] 向384孔检测板(Thermo,货号为264706)中添加4uL化合物溶液和2uL的FGFR1激酶溶液,混合均匀后室温孵育15分钟;随后加入4uL底物反应溶液,将反应混合物在室温孵育60分钟;随后加入与反应等体积的10uL检测液终止反应,混合均匀后室温放置。60分钟后,磷酸化的产物同时被 Eu^{3+} 标记的笼状抗体(供体)和链霉亲和素标记的XL665抗体(受体)识别,在激光激发后,靠近的供体和受体发生能量共振转移,其从供体(620nm)转移至受体(665nm)的能量用酶标仪EnVision(Perkin Elmer)检测。665/620的比值与底物的磷酸化程度呈正相关,因此从而检测FGFR1激酶的活性。

[0139] 该实验中未加酶组作为100%抑制组,加酶但是未加化合物组作为0%抑制组。化合物对FGFR1活性的抑制百分比用以下公式计算:

$$\text{抑制百分比} = 100 - 100 * (\text{比值}_{\text{化合物}} - \text{比值}_{100\% \text{抑制}}) / (\text{比值}_{0\% \text{抑制}} - \text{比值}_{100\% \text{抑制}})$$

化合物的 IC_{50} 值由10个浓度点用Excel中XLfit软件通过以下公式来计算:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - X) * \text{slope factor})})$$

其中Y为抑制百分比, Bottom为S型曲线的底部平台值, Top为S型曲线的顶部平台值, X为待测化合物浓度的对数值, slope factor为曲线斜率系数。

[0140] FGFR2的活性抑制测试

实验方法概述如下:

反应缓冲液包含以下组分: 5倍稀释的enzymatic buffer/kinase 5X(Cisbio, 货号为62EZBFDD) (主要成分为50mM HEPES, pH7.0)、5mM MgCl₂和1mM DTT; 人重组FGFR2催化结构域蛋白(氨基酸400-821)购自义翘神州生物技术有限公司, 用反应缓冲液稀释成0.45ng/uL的激酶溶液; 底物反应溶液包括用反应缓冲液稀释成800nM的生物素标记的酪氨酸激酶底物(Cisbio, 货号为62TK0PEC)和50uM ATP; 检测液包括用检测缓冲液(Cisbio, 货号为62SDBRDF)稀释成0.125ng/uL Eu³⁺标记的笼状抗体(Cisbio, 货号为61T66KLB)、50nM链霉亲和素标记的XL665(Cisbio, 货号为610SAXLB)。

[0141] 将化合物用DMSO溶解稀释至1mM, 然后用DMSO进行4倍的系列稀释至最低浓度为0.061uM, 每个浓度点再使用反应缓冲液稀释40倍。如果化合物IC₅₀值非常低, 可以降低化合物的起始浓度。

[0142] 向384孔检测板(Thermo, 货号为264706)中添加4uL化合物溶液和2uL的FGFR2激酶溶液, 混合均匀后室温孵育15分钟; 随后加入4uL底物反应溶液, 将反应混合物在室温孵育60分钟; 随后加入与反应等体积的10uL检测液终止反应, 混合均匀后室温放置。60分钟后, 磷酸化的产物同时被Eu³⁺标记的笼状抗体(供体)和链霉亲和素标记的XL665抗体(受体)识别。在激光激发后, 靠近的供体和受体发生能量共振转移, 其从供体(620nm)转移至受体(665nm)的能量用酶标仪EnVision(Perkin Elmer)检测。665/620的比值与底物的磷酸化程度呈正相关, 因此从而检测FGFR2激酶的活性。

[0143] 该实验中未加酶组作为100%抑制组, 加酶但是未加化合物组作为0%抑制组。化合物对FGFR2活性抑制百分比用以下公式计算:

$$\text{抑制百分比} = 100 - 100 * (\text{比值}_{\text{化合物}} - \text{比值}_{100\% \text{抑制}}) / (\text{比值}_{0\% \text{抑制}} - \text{比值}_{100\% \text{抑制}})$$

化合物的IC₅₀值由10个浓度点用Excel中XLfit软件通过以下公式来计算:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - X) * \text{slope factor})})$$

其中Y为抑制百分比, Bottom为S型曲线的底部平台值, Top为S型曲线的顶部平台值, X为待测化合物浓度的对数值, slope factor为曲线斜率系数。

[0144] FGFR3的活性抑制测试

实验方法概述如下:

反应缓冲液包含以下组分: 5倍稀释的enzymatic buffer/kinase 5X(Cisbio, 货号为62EZBFDD) (主要成分为50mM HEPES, pH7.0)、5mM MgCl₂和1mM DTT; 人重组FGFR3催化结构域蛋白(氨基酸399-806)购自义翘神州生物技术有限公司, 用反应缓冲液稀释成0.3ng/uL的激酶溶液; 底物反应溶液包括用反应缓冲液稀释成1000nM的生物素标记的酪氨酸激酶底物(Cisbio, 货号为62TK0PEC)和90uM ATP; 检测液包括用检测缓冲液(Cisbio, 货号为62SDBRDF)稀释成0.125ng/uL Eu³⁺标记的笼状抗体(Cisbio, 货号为61T66KLB)、62.5nM链霉亲和素标记的XL665(Cisbio, 货号为610SAXLB)。

[0145] 将化合物用DMSO溶解稀释至1mM, 然后用DMSO进行4倍的系列稀释至最低浓度为

0.061 μ M,每个浓度点再使用反应缓冲液稀释40倍。如果化合物IC₅₀值非常低,可以降低化合物的起始浓度。

[0146] 向384孔检测板(Thermo,货号为264706)中添加4 μ L化合物溶液和2 μ L的FGFR3激酶溶液,混合均匀后室温孵育15分钟;随后加入4 μ L底物反应溶液,将反应混合物在室温孵育60分钟;随后加入与反应等体积的10 μ L检测液终止反应,混合均匀后室温放置。60分钟后,磷酸化的产物同时被Eu³⁺标记的笼状抗体(供体)和链霉亲和素标记的XL665抗体(受体)识别。在激光激发后,靠近的供体和受体发生能量共振转移,其从供体(620nm)转移至受体(665nm)的能量用酶标仪EnVision(Perkin Elmer)检测。665/620的比值与底物的磷酸化程度呈正相关,因此从而检测FGFR3激酶的活性。

[0147] 该实验中未加酶组作为100%抑制组,加酶但是未加化合物组作为0%抑制组。化合物对FGFR3活性抑制百分比用以下公式计算:

$$\text{抑制百分比} = 100 - 100 * (\text{比值}_{\text{化合物}} - \text{比值}_{100\% \text{抑制}}) / (\text{比值}_{0\% \text{抑制}} - \text{比值}_{100\% \text{抑制}})$$

化合物的IC₅₀值由10个浓度点用Excel中XLfit软件通过以下公式来计算:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - X) * \text{slope factor})})$$

其中Y为抑制百分比,Bottom为S型曲线的底部平台值,Top为S型曲线的顶部平台值,X为待测化合物浓度的对数值,slope factor为曲线斜率系数。

[0148] FGFR4的活性抑制测试

实验方法概述如下:

反应缓冲液包含以下组分:5倍稀释的enzymatic buffer/kinase 5X(Cisbio,货号为62EZBFDD)(主要成分为50mM HEPES,pH7.0)、5mM MgCl₂和1mM DTT;人重组FGFR4催化结构域蛋白(氨基酸460-802)购自清华大学蛋白质研究技术中心,用反应缓冲液稀释成0.5ng/ μ L的激酶溶液;底物反应溶液包括用反应缓冲液稀释成500nM的生物素标记的酪氨酸激酶底物(Cisbio,货号为62TK0PEC)和90 μ M ATP;检测液包括用检测缓冲液(Cisbio,货号为62SDBRDF)稀释成0.125ng/ μ L Eu³⁺标记的笼状抗体(Cisbio,货号为61T66KLB)、31.25nM链霉亲和素标记的XL665(Cisbio,货号为610SAXLB)。

[0149] 将化合物用DMSO溶解稀释至1mM,然后用DMSO进行4倍的系列稀释至最低浓度为0.061 μ M,每个浓度点再使用反应缓冲液稀释40倍。如果化合物IC₅₀值非常低,可以降低化合物的起始浓度。

[0150] 向384孔检测板(Thermo,货号为264706)中添加4 μ L化合物溶液和2 μ L的FGFR4激酶溶液,混合均匀后室温孵育15分钟;随后加入4 μ L底物反应溶液,将反应混合物在室温孵育60分钟;随后加入与反应等体积的10 μ L检测液终止反应,混合均匀后室温放置。60分钟后,磷酸化的产物同时被Eu³⁺标记的笼状抗体(供体)和链霉亲和素标记的XL665抗体(受体)识别。在激光激发后,靠近的供体和受体发生能量共振转移,其从供体(620nm)转移至受体(665nm)的能量用酶标仪EnVision(Perkin Elmer)检测。665/620的比值与底物的磷酸化程度呈正相关,因此从而检测FGFR4激酶的活性。

[0151] 该实验中未加酶组作为100%抑制组,加酶但是未加化合物组作为0%抑制组。化合物对FGFR4活性抑制百分比用以下公式计算:

$$\text{抑制百分比} = 100 - 100 * (\text{比值}_{\text{化合物}} - \text{比值}_{100\% \text{抑制}}) / (\text{比值}_{0\% \text{抑制}} - \text{比值}_{100\% \text{抑制}})$$

化合物的IC₅₀值由10个浓度点用Excel中XLfit软件通过以下公式来计算:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - X) * \text{slope factor})})$$

其中Y为抑制百分比, Bottom为S型曲线的底部平台值, Top为S型曲线的顶部平台值, X为待测化合物浓度的对数值, slope factor为曲线斜率系数。

化合物编号	IC ₅₀			
	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4
1	A	A	A	A
3	B	A	A	A
7	A	A	A	A
8	B	A	A	B
9	B	A	B	B
10	A	A	A	A
11	A	A	A	A
12	B	A	A	A
13	A	A	A	A
14	A	A	A	A
15	B	A	A	B
16	A	A	A	A

A < 100nM; B = 100至1000nM。

[0152] 本发明的实施例化合物对FGFR的活性具有显著抑制效应, 优选IC₅₀为100至1000nM, 更优选IC₅₀小于100nM。

[0153] Hep3B细胞增殖抑制的测定

使用发光细胞活力测试实验评估本发明的化合物对Hep3B肝癌细胞系细胞增殖的影响。

[0154] 实验方法概述如下:

CellTiter-Glo试剂(Promega, 货号为G7572)由CTG冻干粉和CTG缓冲液组成, 使用时将冻干粉溶解到缓冲液中即可。

[0155] 将化合物用DMSO(Sigma, 货号为D5879)溶解稀释至5mM, 然后用DMSO进行4倍的系列稀释至最低浓度为0.31uM, 每个浓度点再用不含FBS的DMEM培养基(ThermoFisher, 货号为11995073)稀释50倍。如果化合物IC₅₀值非常低, 可以降低化合物的起始浓度。

[0156] Hep3B细胞(来自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)在含有10%FBS(GBICO, 货号为10099-141)和100U/mL青链霉素混合液(ThermoFisher, 货号为15140122)的DMEM完全培养基中培养, 当细胞在培养容器中覆盖率达80-90%时, 用0.25%胰酶(含EDTA)(ThermoFisher, 货号为25200056)消化吹散后种植于白色384孔板(ThermoFisher, 货号为164610), 每孔1000细胞(27uL DMEM完全培养基), 然后把384孔板置于37°C、5%CO₂的培养箱中培养过夜(18-20小时)。

[0157] 过夜后每孔加入3uL DMEM稀释后的化合物, 轻轻离心混匀, 然后把384孔板置于37°C、5%CO₂的培养箱中继续培养, 72小时后取出于室温放置30分钟, 每孔加15uL平衡至室温的CTG试剂, 置于振荡器上轻轻震荡3分钟以确保细胞裂解充分, 放置10分钟使冷光信号稳定, 然后用EnVision(Perkin Elmer)读取冷光信号。

[0158] 其中, 加10uM Blueprint的BLU9931(Cancer Discovery 2015, 5, 424)组的冷光信号作为signal_{100%抑制}, 加0.2%DMSO组的冷光信号作为signal_{0%抑制}。

[0159] 化合物对Hep3B细胞增殖抑制的百分比可以用以下公式计算:

抑制百分比=100-100*(signal_{化合物}-signal_{100%抑制})/(signal_{0%抑制}-signal_{100%抑制})

化合物IC₅₀值由8个浓度点用XLfit(ID Business Solutions Ltd., UK)软件通过以下公式计算:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - X) * \text{slope factor}))})$$

其中Y为抑制百分比, Bottom为S型曲线的底部平台值, Top为S型曲线的顶部平台值, X为待测化合物浓度的对数值, slope factor为曲线斜率系数。

[0160] RT4细胞增殖抑制的测定

使用发光细胞活力测试实验评估本发明的化合物对RT4膀胱癌细胞系细胞增殖的影响。

[0161] 实验方法概述参照Hep3B细胞增殖抑制的测定方法, 其中RT4细胞(来自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)、阳性对照物为Taiho专利申请W02015008844A1中的实施例1((S)-1-(3-(4-氨基-3-((3,5-二甲氧基苯基)乙炔基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮)。

化合物编号	IC ₅₀	
	Hep3B	RT4
1	A	A
7	A	A
10	A	A
12	B	B

A<100nM; B = 100至1000nM。

[0162] 本发明的实施例化合物分别对Hep3B和RT4的细胞增殖具有显著抑制效应, 优选IC₅₀为100至1000nM, 更优选IC₅₀小于100nM。