



(10) 授权公告号 CN 115109075 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202210758386.7

(22) 申请日 2017.12.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115109075 A

(43) 申请公布日 2022.09.27

(30) 优先权数据
62/435283 2016.12.16 US

(62) 分案原申请数据
201780078017.0 2017.12.08

(73) 专利权人 伊莱利利公司
地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 R.A. 鲍尔 S.L. 布莱特
T.P. 伯克霍尔德 R. 吉尔摩
P.J. 哈恩 Z. 兰科维奇

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 王琳 初明明

(51) Int.Cl.
C07D 498/04 (2006.01)
A61K 31/5365 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2017019429 A1, 2017.02.02
CN 110072867 B, 2022.07.08
审查员 周磊

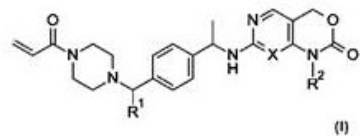
权利要求书1页 说明书44页

(54) 发明名称

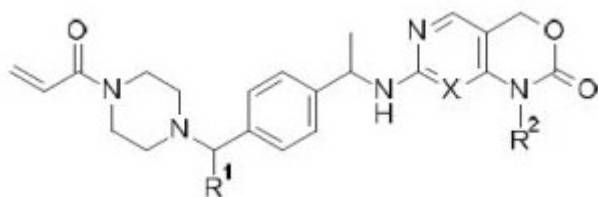
突变体IDH1和IDH2抑制剂

(57) 摘要

本申请涉及作为突变体IDH1和IDH2抑制剂的7-苯基乙基氨基-4H-嘧啶并[4,5-D][1,3]噁嗪-2-酮化合物。如本文所定义的化合物或含有该化合物的药物组合物,用于治疗IDH1或IDH2突变体癌症并具有结构(I)。



1. 具有下式的化合物:



其中:

R^1 为 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 或 $-\text{CH}_2$ -环丙基;

R^2 为 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$;

X为CH;或

其可药用盐。

2. 如权利要求1所述的化合物, 其是

7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-2-酮, 异构体1;

7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-2-酮, 异构体2;

或其可药用盐。

3. 药物组合物, 其包含权利要求1的化合物或其可药用盐和可药用载体。

4. 如权利要求1或权利要求2所述的化合物或其可药用盐用于制备药物的用途, 所述药物用于治疗表达突变体IDH1或突变体IDH2的癌症, 所述癌症是: 神经胶质瘤、恶性胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质细胞瘤、副神经节瘤、纤维肉瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤(AITL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、B细胞急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、甲状腺癌、结肠直肠癌、急性髓性白血病(AML)、黑素瘤、前列腺癌、软骨肉瘤或胆管癌。

5. 如权利要求4所述的用途, 其中所述表达突变体IDH1或突变体IDH2的癌症是纤维肉瘤、急性髓性白血病、神经胶质瘤或恶性胶质瘤。

6. 如权利要求1或权利要求2所述的化合物或其可药用盐用于制备药物的用途, 所述药物用于治疗表达突变体IDH1或突变体IDH2的癌症, 所述癌症是多形性恶性胶质瘤。

突变体IDH1和IDH2抑制剂

[0001] 本申请为一项发明专利申请的分案申请,其母案的申请日为2017年12月8日、申请号为201780078017.0 (PCT/US2017/065246)、发明名称为“作为突变体IDH1和IDH2抑制剂的7-苯基乙基氨基-4H-嘧啶并[4,5-D][1,3]噁嗪-2-酮化合物”。

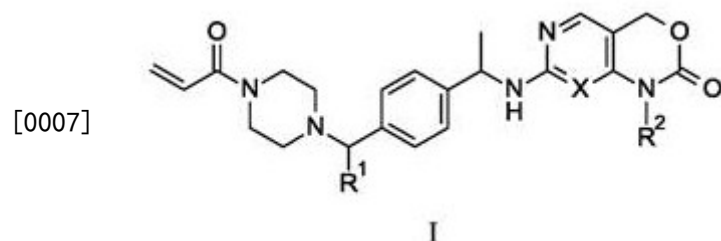
[0002] 在柠檬酸(三羧酸或Krebs)循环中,异柠檬酸脱氢酶(IDH)蛋白是重要的酶。柠檬酸循环对于许多生化途径来说是非常重要的,并且是最早确定的细胞代谢的组成部分之一。

[0003] 异柠檬酸脱氢酶催化异柠檬酸氧化脱羧成为 α -酮戊二酸(即,2-氧代戊二酸)。这些酶属于两个不同的亚类,其中一类使用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD(+))作为电子受体,另一类使用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP(+))。已经报道了三种哺乳动物异柠檬酸脱氢酶:一种NAD(+)依赖型异柠檬酸脱氢酶,即一种定位于线粒体基质的多亚基酶,和两种NADP(+)依赖型异柠檬酸脱氢酶,其中一种是线粒体型的,另一种主要是细胞溶质型的。每种NADP(+)依赖型同功酶都是二聚体。IDH1基因编码的蛋白是在细胞质和过氧化物酶体中发现的NADP(+)依赖型异柠檬酸脱氢酶。所述细胞质酶在细胞质NADPH产生的过程中具有显著作用。IDH1在许多物种和缺乏完整柠檬酸循环的有机体中表达。

[0004] 最近,已经在几种类型的癌症中发现IDH1中的突变,以及相关的同工型IDH2。突变被发现出现于沿着蛋白序列的特定氨基酸上,并且被杂合表达,与功能的获得一致。这些突变出现在功能保留的残基上,并且IDH1和IDH2的突变形式的生化研究表明正常功能的丧失,异柠檬酸向 α -酮戊二酸的可逆转化。这些突变的结果是允许 α -酮戊二酸(α KG)向2-羟基戊二酸(2HG)的新(或新生形)转化。结果,隐藏IDH1或IDH2的突变形式的癌细胞,形成基本上更高浓度的2HG。高水平的2HG导致阻碍细胞分化,这可以通过突变体IDH1或IDH2抑制来逆转。

[0005] 申请PCT/US2016/043264公开了突变体IDH1的共价抑制剂。进一步需要选择性抑制突变体IDH1和IDH2酶的化合物来治疗各种癌症。进一步需要选择性抑制相对于野生型IDH1和IDH2显示新生活性的突变体IDH1和IDH2酶的化合物来治疗各种癌症。本发明提供式I或Ia的化合物,其是突变体IDH1和IDH2的抑制剂。式I或Ia化合物是选择性抑制突变体IDH1和IDH2的共价抑制剂。

[0006] 本发明的一个方面提供了下式的突变体IDH1和IDH2酶抑制剂化合物:



[0008] 其中:

[0009] R^1 是 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 或 $-\text{CH}_2$ -环丙基;

[0010] R^2 是 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$;

[0011] X是N或CH;或

或Ia的化合物或其可药用盐,所述癌症是:神经胶质瘤、恶性胶质瘤、多形性恶性胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质细胞瘤、副神经节瘤、纤维肉瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤(AITL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、B细胞急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、甲状腺癌、结肠直肠癌、急性髓性白血病(AML)、黑素瘤、前列腺癌、软骨肉瘤或胆管癌。

[0031] 本发明的进一步方面提供了用于治疗表达突变体IDH1或突变体IDH2的癌症的式I或Ia的化合物或其可药用盐,所述癌症是:纤维肉瘤、急性髓性白血病、神经胶质瘤或恶性胶质瘤。

[0032] 本发明的另一个方面提供了式I或Ia的化合物或其可药用盐用于制备药物的用途,所述药物用于治疗表达突变体IDH1或突变体IDH2的癌症,所述癌症是:神经胶质瘤、恶性胶质瘤、多形性恶性胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质细胞瘤、副神经节瘤、纤维肉瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤(AITL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、B细胞急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、甲状腺癌、结肠直肠癌、急性髓性白血病(AML)、黑素瘤、前列腺癌、软骨肉瘤或胆管癌。

[0033] 本发明的进一步的方面提供了式I或Ia的化合物或其可药用盐用于制备药物的用途,所述药物用于治疗表达突变体IDH1或突变体IDH2的癌症,所述癌症是:纤维肉瘤、急性髓性白血病、神经胶质瘤或恶性胶质瘤。

[0034] 术语“患者”是指哺乳动物,“哺乳动物”包括但不限于人。

[0035] “治疗有效量”是指式I或Ia的化合物或其可药用盐的剂量,或含有所述化合物或其可药用盐的药物组合物的剂量,这种剂量为抑制癌症患者的突变体IDH1或突变体IDH2所必需,能够解除对于分化的阻碍,同时实现抑制肿瘤细胞生长,并且消除患者的癌症或减缓或抑制患者癌症的发展。式I或Ia的化合物或其可药用盐的预期剂量在1 mg/患者/天至2000 mg/患者/天的范围内。优选剂量预期在5 mg/患者/天至1800 mg/患者/天的范围内。最优选剂量预期在40 mg/患者/天至1600 mg/患者/天的范围内。医师考虑疾病的阶段和严重程度,以及个体患者的具体需要和响应,确定治疗患者所需要的确切剂量以及治疗时间的长短。虽然以每天为基础来表示剂量,但为了给患者提供最佳治疗益处,并且控制或改善任何药物相关的毒性,可以调节给药剂量。除了日剂量之外,每天两次(B.I.D.)给药、每天三次(T.I.D.)给药、每隔一天给药(Q2D)、五天时间内每隔一天给药而后两天不用给药(T.I.W.)或每隔两天给药(Q3D)都是合适的给药方式。

[0036] 术语“治疗”旨在包括全面介入患者患有的癌症,例如,给予活性化合物,以便减轻、减缓或逆转一或多种症状,并且即使不能实际上消除癌症,也要延迟癌症的发展。

[0037] 术语-CH₂CH(CH₃)₂表示2-甲基丙基,术语-CH₂CH₂OCH₃表示2-甲氧基乙基,且术语-CH₂-环丙基表示环丙基甲基。

[0038] 优选,使用可药用载体,将式I或Ia的化合物或其可药用盐配制为药物组合物,并且通过各种途径给药。优选,口服给予这种组合物。这种药物组合物和制备它们的方法在本领域是众所周知的。参见,例如,REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, L.V. Allen, 编者, 第22版, Pharmaceutical Press, 2012。

[0039] 在一个具体实施方案中,所述药物组合物含有7- {[(1S) -1- {4- [(1S) -1- (4-丙烯酰基哌嗪-1-基) -2-环丙基乙基] 苯基} 乙基] 氨基} -1-乙基-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮或其可药用盐,以及可药用载体,任选含有其它治疗组分,尤其是一般用于

治疗癌症或特定癌症类型的组分。

[0040] 式I或Ia的化合物或可药用盐,可以与一或多种其它治疗剂同时给予,或在给予一或多种其它治疗剂之前或之后给予。式I或Ia的化合物或可药用盐,当与一或多种其它治疗剂一起给予时,可以通过相同或不同的给药途径单独给予,或在与其它治疗剂相同的药物组合物中一起给予。如果给予一或多种附加治疗剂,则可以同时、分开或顺序给予每个治疗剂。

[0041] 式I或Ia的化合物能够与许多无机和有机酸反应,形成可药用酸加成盐。这种可药用盐和制备它们的常规方法在本领域是众所周知的。参见,例如,P. Stahl等人, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge等人, “Pharmaceutical SALTs”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, 1977年1月。

[0042] 式I或Ia的化合物或其可药用盐,可以通过本领域已知的各种方法以及如下所述的方法来制备。为了制备式I或Ia的化合物或其可药用盐,可以将具体合成步骤用不同的顺序组合。

[0043] 另外,在下述制备中描述的某些中间体可以含有一个或多个氮保护基。应理解,保护基可如本领域技术人员所理解的,根据待进行的具体反应条件和具体转化而变化。保护和去保护条件是技术人员众所周知的,并且描述于文献(参见例如“*Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis*”, 第五版, Peter G.M. Wuts和Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2014)中。

[0044] 按照IUPAC命名式I或Ia的化合物,也可以按照CAS命名,其它名称可以用于清楚地鉴定式I或Ia的化合物或其可药用盐。

[0045] 应该理解,可以将式I或Ia的化合物描述为单一立体异构体。存在两个手性中心,产生四种非对映异构体。本文使用的单一立体异构体旨在还包括立体异构体的混合物,其包括命名的或描述的式I或Ia的化合物。本文中,(R)-和(S)-的Cahn-Ingold-Prelog符号可以用于指代具体立体异构体。可以使用对映体纯或富集的起始原料,通过立体有择合成来制备具体立体异构体。起始原料、中间体或包括式I或Ia的化合物的外消旋混合物的具体立体异构体,可以利用本领域众所周知的技术来拆分,例如,在Stereochemistry of Organic Compounds, E. I. Eliel 和 S. H. Wilen (Wiley 1994) 以及 Enantiomers, Racemates and Resolutions, J., Jacques, A. Collet 和 S. H. Wilen (Wiley 1991) 中所得到的那些技术,包括手性固定相色谱、酶拆分,或为此目的所形成的非对映异构体(例如,非对映异构体盐)的色谱或分级结晶。对于具有具有所有所示立体中心的构型的式I或Ia的化合物,“基本上对映体纯的”是指异构体纯度大于90%对映体过量。在另一个实施方案中,式I或Ia的化合物的异构体纯度大于95%对映体过量。在仍另一个实施方案中,式I或Ia的化合物的异构体纯度大于98%对映体过量。在又另一个实施方案中,式I或Ia的化合物的异构体纯度大于99%对映体过量。认为所有立体异构体(单独地和包括式I或Ia的化合物的非对映异构体混合物)都包括在本发明的范围内。名称“异构体1”和“异构体2”和“非对映异构体1”和“非对映异构体2”是指分别从手性色谱法第一和第二洗脱的化合物,且如果手性色谱法在合成早期开始,则相同名称适用于随后的中间体和实施例。

[0046] 在式I或Ia的化合物的合成中,作为最初起始原料所使用的化合物是众所周知的

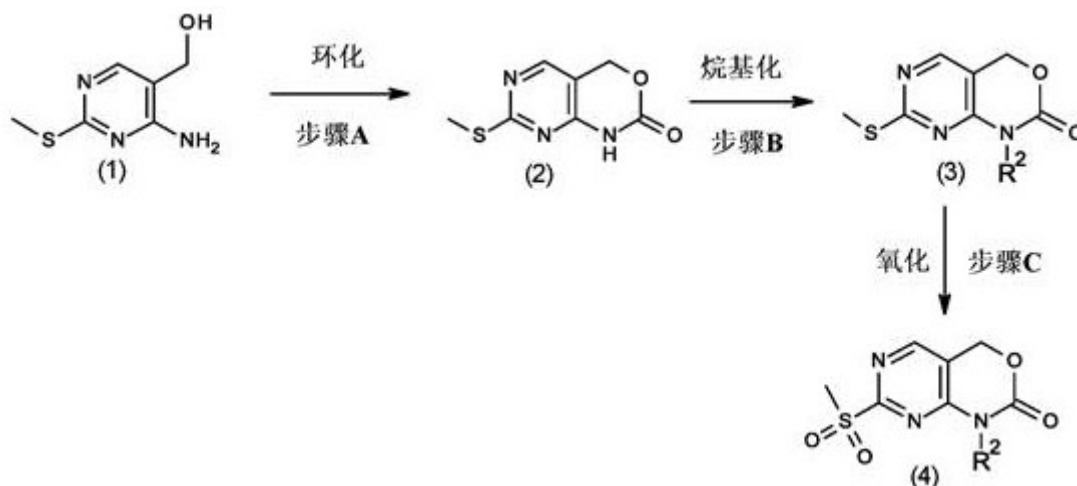
化合物,不能商购时,可以通过本领域普通技术人员通常使用的标准方法或在一般参考文献中得到的方法,使用所提供的具体参考文献来容易地合成。

[0047] 已知的工艺和方法的例子包括在一般参考文献中所描述的那些工艺和方法,例如,Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, 第1-10卷, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 第5版, Michael B. Smith and Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 第4版, 部分B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey and Richard J. Sundberg, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000,等等,以及其中引用的参考文献。

[0048] 某些缩写定义如下:“ACN”是指乙腈;“ α KG”是指 α -酮戊二酸或2-酮戊二酸;“alloc”是指烯丙氧基羰基;“ATCC”是指美国模式培养物保藏所;“BCA”是指二辛可宁酸;“BSA”是指牛血清白蛋白;“CDI”是指1,1'-羰基二咪唑;“DCC”是指1,3-二环己基碳二亚胺;“DCM”是指二氯甲烷;“DEAD”是指偶氮二甲酸二乙基酯;“DIAD”是指偶氮二甲酸二异丙基酯;“DIC”是指二异丙基碳二亚胺;“DIPEA”是指二异丙基乙胺或N-乙基-N-异丙基-丙-2-胺;“DMAP”是指二甲基氨基吡啶;“DMF”是指二甲基甲酰胺;“DMSO”是指二甲亚砜;“DTT”是指二硫苏糖醇;“EDC”是指EDAC、EDCI或1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;“EDTA”是指乙二胺四乙酸;“EGTA”是指乙二醇四乙酸;“EtOAc”是指乙酸乙酯;“EtOH”是指乙醇;“Ex”是指实施例;“HATU”是指(二甲基氨基)-N,N-二甲基(3H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-基氧基)甲烷亚铵(methaniminium)六氟磷酸盐;“HBTU”是指2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐;“2HG”是指2-羟基戊二酸;“d₅-3HG”是指3-羟基-1,5-戊二-2,2,3,4,4-d₅酸;“HILIC”是指亲水相互作用液相色谱;“HOAt”是指1-羟基-7-偶氮苯并三唑;“HOBt”是指1-羟基苯并三唑水合物;“HPLC”是指高效液相色谱;“IC₅₀”是指产生对药剂而言可能的最大抑制响应的50%的该药剂浓度;“mCPBA”是指间氯过苯甲酸;“MeOH”是指甲醇;“NADP⁺和NADPH”分别是指烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的氧化和还原形式;“NMP”是指N-甲基-2-吡咯烷酮;“PG”是指保护基;“Prep”是指制备例;“PyBOP”是指苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷子基-磷六氟磷酸盐;“PyBrop”是指溴-三吡咯烷子基磷六氟磷酸盐;“rpm”是指每分钟转数;“(R)-RUCY®-XylBINAP”是指RuCl[(R)-daipena][(R)-xylbinap;“S_NAr”是指亲核芳族化合物取代;“TEA”是指三乙胺;“TFA”是指三氟乙酸;“THF”是指四氢呋喃;和“Tris”是指三(羟基甲基)氨基甲烷。

[0049] 式I或Ia的化合物或其可药用盐,可以用本领域已知的各种方法制备,下面的方案、制备例和实施例举例说明了其中的一些方法。所描述的每个途径的具体合成步骤可以以不同的方式组合,或与不同方案的步骤结合,制备式I或Ia的化合物或其可药用盐。可以使用本领域众所周知的常规方法,回收下面方案中的每个步骤的产物,包括提取/萃取、蒸发、沉淀、色谱、过滤、研磨和结晶。在下面的方案中,除非另作说明,否则,所有的取代基如以前所定义。对本领域普通技术人员来说,很容易得到所述试剂和起始原料。

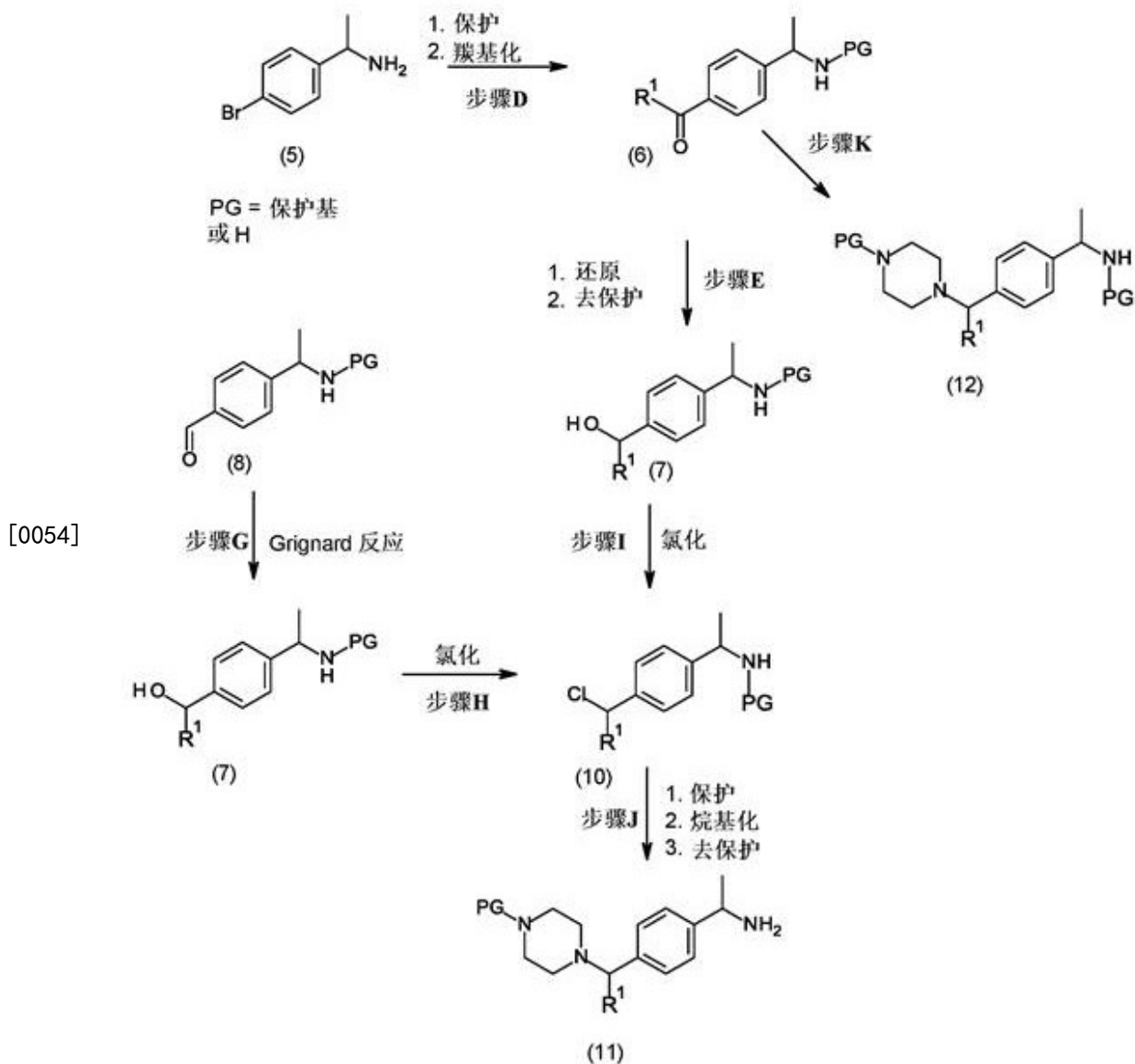
[0050] 方案1



[0051]

[0052] 在方案1中,经过一系列反应,得到1-取代的7-(甲磺酰基)-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噻嗪-2-酮, (4), 步骤C的产物,其中 R^2 如先前所定义。“PG”是为氨基或氧基团开发的保护基,例如,氨基甲酸酯、酰胺或酯。例如,在标准氨基甲酰化条件下,使用三光气和有机碱,例如,DIPEA或TEA,在大约-30至-35℃的温度下,5-羟基甲基4-氨基-2-甲基硫烷基-嘧啶可以被环化为噻嗪-2-酮,得到化合物(2),即步骤A的产物。或者,可以使用羰基二卤化物或羰基二-拟卤化物,例如,CDI、光气或双光气,代替三光气,完成氨基甲酰化。在溶剂(例如,NMP)中,在无机碱(例如, K_2CO_3)的存在下,在大约50-65℃的温度下,可以使用合适的取代的烷基卤,例如,碘试剂,将噻嗪的胺烷基化,得到化合物(3),即步骤B的产物。或者,可以使用合适的醇,例如,MeOH,进行Mitsunobu反应,使噻嗪的胺烷基化。Mitsunobu反应在本领域是众所周知的反应,在溶剂(例如,THF)中,使用三苯基膦和偶氮二甲酸酯,例如,DIAD或DEAD,可以使羟基转化为离去基团,该离去基团被多种亲核试剂(例如,氨基甲酸酯)置换得到化合物(3)。在本领域众所周知的条件下,例如,mCPBA或过一硫酸钾,在大约10至25℃的温度下,在溶剂(例如,ACN或DCM)中,可以将所述硫化物氧化为砜,得到化合物(4),即步骤C的产物。

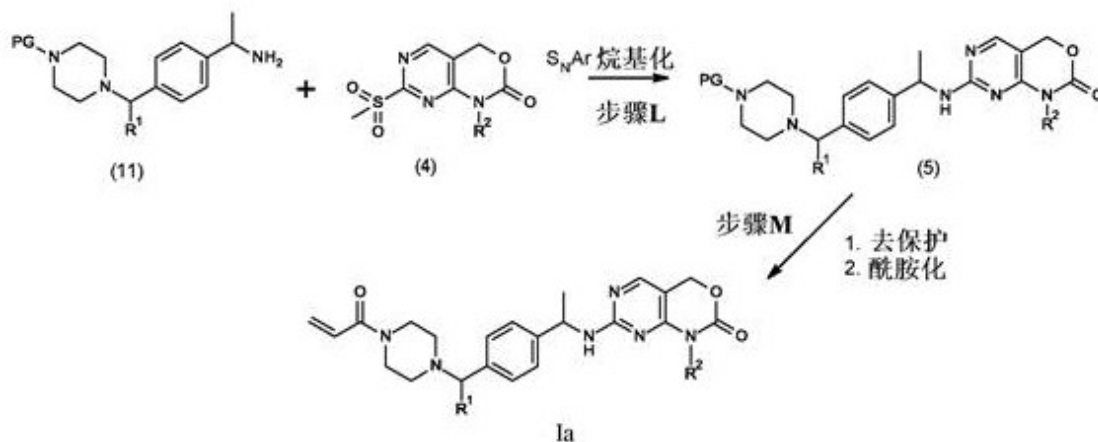
[0053] 方案2



[0055] 在方案2中,使用本领域技术人员熟知的方法,可以在几个步骤中由芳基卤化物如溴化物(5)产生(4-(1-氨基乙基)苯基)甲醇(7)。胺可以在步骤D的子步骤1中保护,其中“PG”是为氨基如酰胺开发的保护基团。受保护的芳基溴化合物(5)可以在锂烷基化条件下转化为酮,得到步骤D的子步骤2中的芳基酮(6)。然后可以在步骤E的子步骤1中在溶剂(诸如MeOH)中使用还原剂(如硼氢化钠)还原该酮。可以在该步骤(步骤E的子步骤2)或在合成的稍后时间点将胺脱保护,得到化合物(7)。或者,化合物(6)可以在还原胺化中直接转化为化合物(12),所述还原胺化在溶剂(如THF)中使用异丙醇钛(IV)并加热至约60℃,然后冷却并加入MeOH和还原剂(例如氰基硼氢化钠),得到化合物(12)。化合物(7)可以在标准卤化条件下,在溶剂(如DCM)中,使用卤化剂(如亚硫酰氯或POCl₃),转化为苄基卤化物(如氯化物),得到步骤I的化合物(10)。如果需要,可以保护化合物(10)并在步骤J中烷基化。例如,胺(10)可以在步骤J的子步骤1中使用保护基团如(三氟乙酰基或CBZ)保护。此类保护基是本领域中熟知和理解的。或者,化合物10可由醛,化合物(8)制备。化合物(8)可以通过在溶剂(如DCM)中,在诸如戴斯-马丁高碘烷等条件下氧化相应的苄醇来制备,得到醛(8)。可以在步骤G中对醛进行Grignard反应,得到化合物(7)。来自步骤G的化合物(7)可以在步骤H中

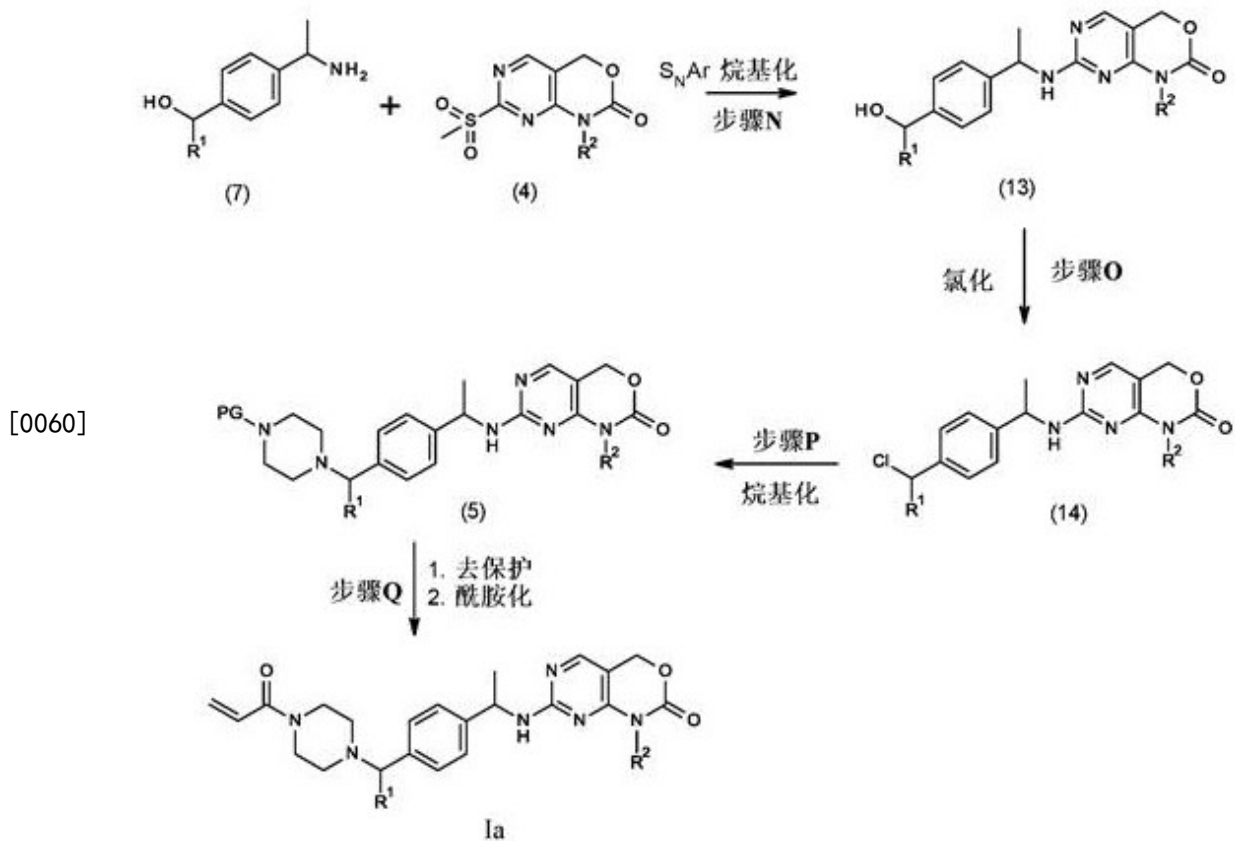
氯化,得到如上对步骤I所述的化合物(10)。化合物(10)的氯化物可以用单保护的哌嗪在两步、一锅法中置换。并不总是需要保护1-苯乙胺,但如果选择保护,有利的是在1-苯乙胺上使用不同于哌嗪胺产物(11),步骤J,子步骤1的保护基,以便在所期望的步骤中选择性地去保护一个或另一个PG。例如,在溶剂(例如,DCM)中,在大约0-5℃的温度下,使用有机碱,例如,TEA,可以使1-苯乙胺与三氟乙酸酐反应,得到步骤J的子步骤1的保护的胺产物。本领域技术人员会理解,可以在胺如CBZ上使用其它保护基团。然后,在本领域技术人员众所周知的条件下,可以完成氯化物的置换。例如,氯化物可以被保护的或未保护的哌嗪置换,使用无机碱如 K_2CO_3 并利用KI或NaI作为亲核催化剂来加速反应。可以在诸如ACN的溶剂中将混合物加热至约60-80℃,得到步骤J的子步骤2的保护的化合物(11)。1-苯乙胺上的保护基团可以用碱(如氢氧化钾水溶液)除去,得到步骤J的子步骤3的化合物(11)。

[0056] 方案3



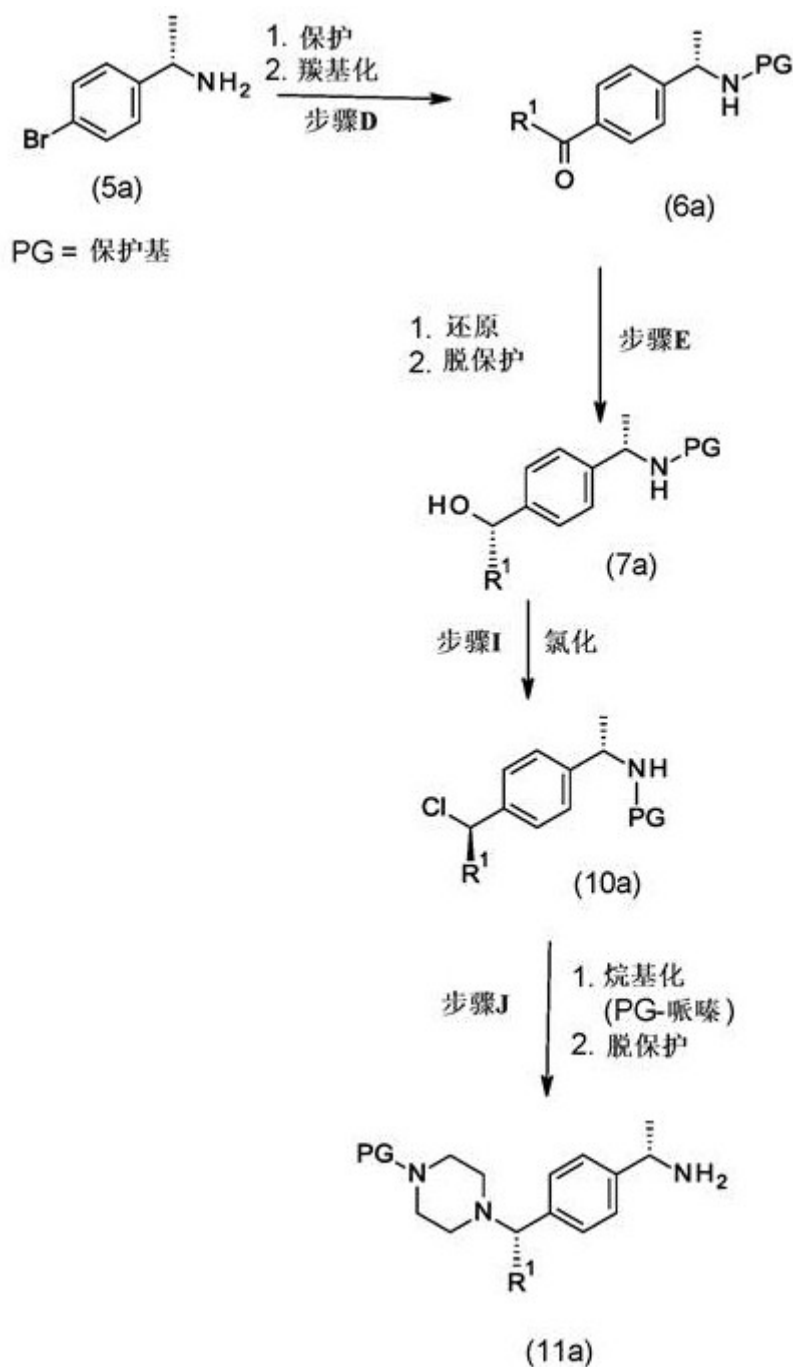
[0058] 在方案3中,化合物(11)可以与化合物(4),方案1 在使用有机碱(例如,DIPEA、CsF)以促进该反应,溶剂(例如,DMSO)和大约70-80℃的温度的 S_NAr 反应中反应,得到步骤L的产物。在步骤M的子步骤1中,使用酸,例如,二噁烷和MeOH中的HCl或DCM中的TFA,可以将叔丁氧基保护的哌嗪脱保护,而alloc保护的哌嗪,可以在钨源(例如,催化的四(三苯基膦)钨(0))的存在下,在溶剂(例如,THF)中,使用柔和的亲核试剂(例如,双甲酮),进行脱保护,得到步骤M的子步骤1的脱保护的哌嗪。在步骤M的子步骤2中,在大约-50至-78℃的温度下,在存在或不存在有机碱,例如,TEA的条件下,如果胺是酸式盐,在溶剂(例如,DCM)中,可以用丙烯酰氯将哌嗪酰胺化,得到式Ia的化合物。或者,在溶剂(例如,DMF)中,使用偶合试剂(例如,EDC)和添加剂(例如,HOBt),可以使用丙烯酸与合适的胺,进行酰胺偶合。本领域技术人员会认识到,对于羧酸和胺反应形成酰胺,存在着许多方法和试剂。例如,在偶合试剂的存在下,在存在或不存在有机碱(例如,DIPEA或TEA)的条件下,合适的胺和丙烯酸反应,可以提供式Ia的化合物。其它偶合试剂包括碳二亚胺(例如,DCC、DIC)或羰基二咪唑(例如,CDI)。其它酰胺偶合添加剂,例如,HOBt,也可以用于促进该反应。另外,可以使用非亲核的阴离子的脲鎓盐或磷盐,例如,HBTU、HATU、PyBOP和PyBrOP,代替更常规的偶合试剂。为了促进所期望的酰胺化反应,可以使用添加剂,例如,DMAP。

[0059] 方案4



[0061] 或者,在方案4中,方案2的化合物(7)的脱保护产物的胺可以如方案3步骤L中所述在 S_NAr 烷基化中与化合物(4)反应,得到化合物13。羟基可以如步骤I,方案2中所述进行氯化,得到步骤O的化合物14。如方案2,步骤11,子步骤2中所述,化合物(14)的氯可以用哌嗪在烷基化中置换,得到化合物(5)。可以将保护的哌嗪脱保护,然后如方案3步骤M中所述将哌嗪酰胺化,得到式Ia的化合物。

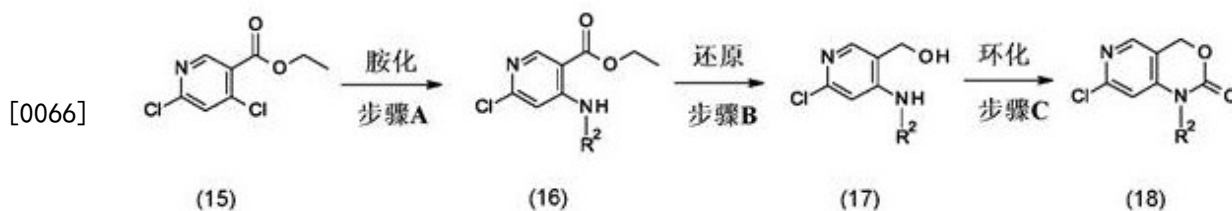
[0062] 方案5



[0063]

[0064] 在方案5中,可以使用本领域技术人员熟知的方法,从手性芳基卤化物如溴化物(5a)经过几个步骤产生手性(4-(1-氨基乙基)苯基)甲醇(7a)。胺可以在步骤D的子步骤1中保护,其中“PG”是为氨基如酰胺开发的保护基团。可以在锂羰基化条件下将芳基溴化物(5a)转化为酮,得到步骤D的子步骤2中的芳基酮(6a)。然后可以在溶剂(如EtOH)中使用手性还原剂(如(*R*)-RUCY-XylBINAP)不对称还原酮,提供步骤E的子步骤1中的化合物7a。化合物(7a)可在标准卤化条件下在溶剂(如叔丁基醚)中使用卤化剂(如苯甲酰氯)转化为手性苄基卤化物(如氯化物),得到步骤I的化合物(10a)。化合物(10a)首先在碱(如碳酸氢钠)存在下,在溶剂(如乙腈)中与保护的哌嗪(PG-哌嗪)反应,得到步骤J的子步骤1中的保护形式。然后,将保护形式用碱(如氢氧化钾水溶液)在溶剂(如EtOH)中脱保护,得到步骤J的子步骤2的化合物(11a)。

[0065] 方案6

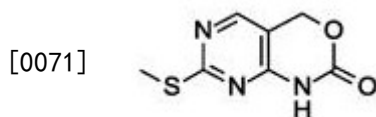


[0067] 在方案6中,一系列反应产生1-取代的-7-氯-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-2-酮(18),步骤C的产物,其中R²如前所定义。例如,4,6-二氯吡啶-3-甲酸乙酯(15)可在标准条件下与胺反应,得到在溶剂(如乙腈)中的6-氯-4-(氨基)吡啶-3-甲酸酯(16)。在溶剂(如THF)中使用氢化物试剂(如氢化铝锂)还原化合物(16)中的酯基,得到(4-氨基-6-氯-3-吡啶基)甲醇(17)。诸如17的化合物可以在标准氨基甲酰化条件下在约-20℃的温度下使用三光气和有机碱(如DIPEA或TEA)环化成噁嗪-2-酮,得到化合物(18),步骤C的产物。或者,可以使用羰基二卤物或羰基二-拟卤化物(如CDI、光气或双光气)代替三光气来完成氨基甲酰化。如以上方案2或5中所示制备或如任一方案的替代方案中所述制备的化合物11可在标准烷基化条件下与化合物18反应。然后如上文方案3或4中所述将所得中间体化合物脱保护并酰胺化,得到式I的化合物,其中X为CH。

[0068] 在任选的步骤中,在合适的溶剂中,在标准条件下,合适的式I或Ia的游离碱与合适的可药用酸反应,可以形成式I或Ia的化合物的可药用盐。另外,当氮保护基脱保护时,可以同时形成这种盐。这种盐的形成在本领域为大家所熟知和了解。参见,例如,Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., 等人, "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); 以及Berge, S.M., 等人, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977)。本领域普通技术人员可以理解,式I或Ia的化合物容易转变为可药用盐和可以作为可药用盐进行分离。

[0069] 制备例1

[0070] 7-甲基硫烷基-1,4-二氢嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮

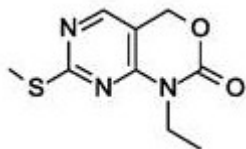


[0072] 在-30℃,用15分钟将三光气(859 g, 2.9 mol)加入到(4-氨基-2-甲基硫烷基-嘧啶-5-基)甲醇(900 g, 5.26 mol)的THF(22.5 L)溶液中。用1小时加入DIPEA(2.449 g, 18.92 mol),同时保持反应温度在-35和-30℃之间。然后,将该反应混合物倾倒在冰水(30 L)中,并加入2-甲基四氢呋喃(10 L)。用水和盐水洗涤有机相。用Na₂SO₄干燥有机相,并浓缩至干。使粗品与石油醚/EtOAc(1:1)一起形成浆液,过滤,浓缩,得到黄色固体,其不用进一步纯化继续使用(890.5 g, 1.62 mol, 83%纯度, 86%产率)。MS(m/z): 198(M+H)。

[0073] 制备例2

[0074] 1-乙基-7-(甲硫基)-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮

[0075]

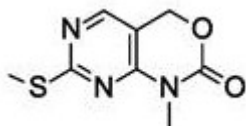


[0076] 在室温下,向7-甲基硫烷基-1,4-二氢嘧啶并[4,5-d][1,3]噻嗪-2-酮(280 g, 1.42 mol)的NMP(2.24 L)溶液中加入 K_2CO_3 (294.2 g, 2.13 mol)和乙基碘(336.3 g, 1.99 mol)。将该混合物在50℃下搅拌16小时,而后用DCM(3 L)和水(6 L)稀释。分离有机相,用水和盐水洗涤,并浓缩至干,得到粗品标题化合物(286 g, 1.27 mol, 83%纯度, 91%产率)。MS (m/z): 226 (M+H)。

[0077] 制备例3

[0078] 1-甲基-7-甲基硫烷基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噻嗪-2-酮

[0079]

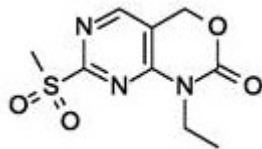


[0080] 在环境温度下,向三苯基膦(1.61 g, 6.08 mmol)和7-甲基硫烷基-1,4-二氢嘧啶并[4,5-d][1,3]噻嗪-2-酮(1.00 g, 5.07 mmol)的THF(25 mL)溶液中加入MeOH(0.248 mL, 6.08 mmol),而后逐滴加入DIAD(1.21 mL, 6.08 mmol)。搅拌过夜之后,真空除去溶剂,并将得到的黄色油用硅胶色谱纯化(40-50%, EtOAc/己烷),得到标题化合物的白色固体(1.08 g, 5.11 mmol, 定量)。MS (m/z): 212 (M+H)。

[0081] 制备例4

[0082] 1-乙基-7-(甲基磺酰基)-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噻嗪-2-酮

[0083]



[0084] 用20分钟向1-乙基-7-(甲磺基)-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噻嗪-2-酮(286 g, 1.24 mol)的ACN(2.8 L)和水(1.4 L)的搅拌溶液中加入固体过一硫酸钾(1526 g, 2.48 mol),并将得到的混合物在10-20℃下搅拌16小时。过滤该反应混合物,并将所获得的滤饼用DCM洗涤。将合并的滤液和DCM用5% Na_2SO_3 、水和盐水洗涤。用 Na_2SO_4 干燥有机相,浓缩,提供标题化合物(133.8 g, 93%纯度, 41%产率)。MS (m/z): 258 (M+H)。

[0085] 基本上通过制备例4的方法制备下列化合物。

[0086] 表1

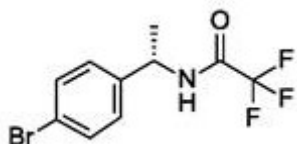
[0087]

制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
5	1-甲基-7-甲基磺酰基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噻嗪-2-酮		244

[0088] 制备例6

[0089] N-[(1S)-1-(4-溴苯基)乙基]-2,2,2-三氟-乙酰胺

[0090]

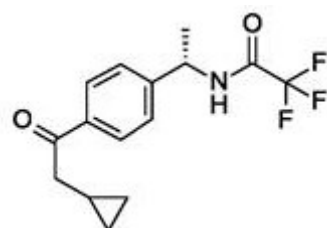


[0091] 在5℃下将三氟乙酸酐(165mL, 1.17mol)滴加到(1S)-1-(4-溴苯基)乙胺(213g, 1.06mol)的ACN(1.3L)溶液中,然后在1小时内滴加TEA(326mL, 2.34mol)。30分钟后,加入水(3L)和盐水(1L),形成无色沉淀。将浆液搅拌15分钟,然后过滤固体,用水和己烷洗涤,通过气流干燥,然后在40℃下真空干燥,得到标题化合物(290 g, 92%)。¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1.44 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz), 4.98 (dddd, 1H, *J* = 7.6, 7.1, 7.1, 7.1 Hz), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.55 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 9.91 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz)。

[0092] 制备例7

[0093] *N*-[(1S)-1-[4-(2-环丙基乙酰基)苯基]乙基]-2,2,2-三氟-乙酰胺

[0094]



[0095] 在-78℃将正丁基锂(2.5 M的己烷溶液, 53 mL, 130 mmol)滴加至*N*-[(1S)-1-(4-溴苯基)乙基]-2,2,2-三氟-乙酰胺(18.00 g, 60.79 mmol)的THF(600 mL)溶液中以保持内部温度低于-70℃。加入完成后,将混合物在-78℃搅拌45分钟,然后加入作为THF(10 mL)中的溶液的2-环丙基-*N*-甲氧基-*N*-甲基-乙酰胺(11.4 g, 79.6 mmol)。将混合物在-78℃搅拌45分钟,加入饱和氯化铵水溶液,并将混合物温热至室温。分离各层并将有机层经无水硫酸钠干燥,过滤,并在减压下浓缩。向固体中加入少量DCM并将混合物短暂加热以溶解固体。将混合物浓缩至即将沉淀之前,然后在剧烈搅拌下滴加己烷(150 mL),得到无色固体。过滤收集固体,用少量己烷洗涤,并减压干燥,得到标题化合物(13.82 g, 76%),为无色固体。MS (*m/z*): 298.3 (*M*-H)。

[0096] 基本上通过制备例7的方法制备下列化合物。

[0097] 表2

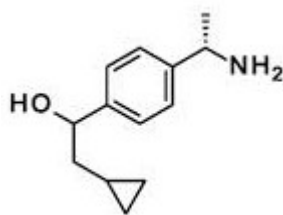
[0098]

制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (<i>m/z</i>) (<i>M</i> +H)
8	2,2,2-三氟- <i>N</i> -[(1S)-1-[4-(3-甲氧基丙酰基)苯基]乙基]乙酰胺,		304

[0099] 制备例9

[0100] 1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙醇

[0101]

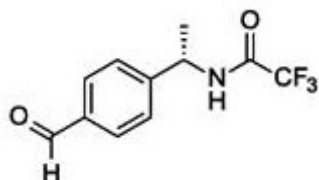


[0102] 将硼氢化钠 (0.1411 g, 2当量, 3.729 mmol,) 加入至在冰水浴中冷却的N-[(1S)-1-[4-(2-环丙基乙酰基)苯基]乙基]-2,2,2-三氟-乙酰胺 (558 mg, 1.86 mmol) 的 MeOH (15 mL) 溶液中。将混合物搅拌大约2.5小时, 然后加入氢氧化钾 (800 mg, 14.2 mmol) 的水 (3 mL) 溶液。将混合物在室温搅拌大约20小时。将混合物浓缩并在DCM和水之间分配。将有机层用饱和氯化钠水溶液洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到标题化合物 (354 mg, 1.38 mmol, 74%), 为白色固体。该物质不经进一步纯化而使用。ES/MS (m/z): 189.0 (M-OH)。

[0103] 制备例10

[0104] 2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-(4-甲酰基苯基)乙基]乙酰胺

[0105]

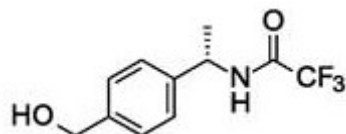


[0106] 将戴斯-马丁高碘烷 (20.9 g, 49.3 mmol) 加入至2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-[4-(羟基甲基)苯基]乙基]乙酰胺 (11.1 g, 44.9 mmol) 的DCM (450 mL) 0℃溶液中。将反应混合物搅拌过夜并温热至室温。将反应混合物用额外的DCM稀释并用饱和NaHCO₃水溶液、饱和Na₂S₂O₃水溶液和盐水洗涤。将合并的有机物干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩, 得到残余物, 将其通过硅胶色谱法纯化, 用0-50% EtOAc/己烷的梯度洗脱, 得到标题化合物, 为白色固体 (9.5 g, 39 mmol, 86%)。ES/MS (m/z): 244 (M-H)。

[0107] 制备例10a

[0108] 2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-[4-(羟基甲基)苯基]乙基]乙酰胺

[0109]

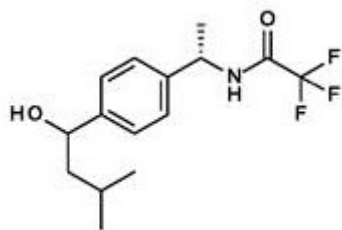


[0110] 将三氟乙酸酐 (12 mL, 85.4 mmol) 加入至[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]甲醇 (10.8 g, 71.4 mmol) 的CH₂Cl₂ (150 mL) 0℃溶液中。10分钟后, 用30分钟滴加三乙胺 (24 mL, 172 mmol) 的CH₂Cl₂ (8 mL) 溶液, 除去冷却浴并将反应搅拌过夜。将反应混合物真空浓缩, 用额外的CH₂Cl₂稀释, 并用1 N HCl水溶液和水洗涤。将有机相干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。将粗物质通过硅胶色谱法纯化, 用0-50% EtOAc/己烷的梯度洗脱, 得到标题化合物, 为白色固体 (11.1 g, 44.9 mmol, 63%)。ES/MS (m/z): 246 (M-H)。

[0111] 制备例11

[0112] 2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-[4-(1-羟基-3-甲基-丁基)苯基]乙基]乙酰胺

[0113]



[0114] 向在冰水浴中冷却的2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-(4-甲酰基苯基)乙基]乙酰胺 (1.72 g, 7.01 mmol) 的THF (35 mL) 溶液中加入异丁基溴化镁 (2 M 的乙醚溶液, 7.0 mL, 14.0 mmol) 并搅拌大约30分钟。将混合物用饱和氯化铵水溶液淬灭并在EtOAc和水之间分配。将有机层用饱和氯化钠水溶液洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到标题化合物, 为油 (1.40 g, 4.15 mmol, 59%), 其不经进一步纯化而使用。ES/MS (m/z): 302.0 (M-H)。

[0115] 基本上通过制备例11的方法制备下列化合物。

[0116] 表3

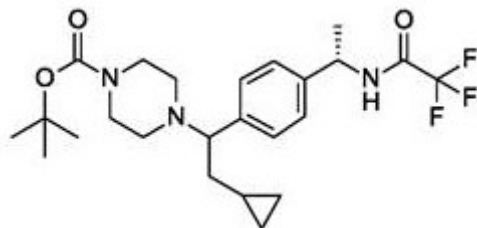
[0117]

制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
12	2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-[4-(1-羟基丙基)苯基]乙基]乙酰胺		293 (M+NH ₄ ⁺)

[0118] 制备例13

[0119] 4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[0120]

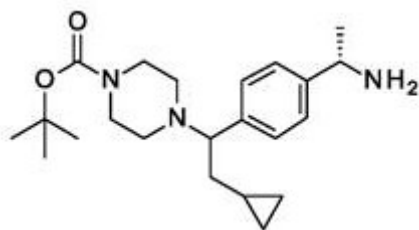


[0121] 将异丙醇钛 (IV) (60 mL, 200 mmol) 加入至N-[(1S)-1-[4-(2-环丙基乙酰基)苯基]乙基]-2,2,2-三氟-乙酰胺 (12.0 g, 40.1 mmol) 和哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (17.9 g, 96.1 mmol) 的THF (80 mL) 溶液中并将混合物在60℃搅拌过夜。将混合物冷却至室温并加入MeOH (80 mL), 然后分批加入氰基硼氢化钠 (5.3 g, 80 mmol)。将混合物在室温搅拌8小时, 然后加入水和MeOH并将混合物在室温搅拌过夜。将混合物过滤以除去固体, 并用MeOH和水冲洗固体。将滤液部分浓缩以除去大部分MeOH, 并将残余物用EtOAc (2x) 萃取。经无水硫酸钠干燥合并的有机萃取物, 过滤, 并在减压下浓缩。将粗物质通过柱色谱法纯化, 用0%至30% EtOAc在溶剂B中的梯度洗脱, 其中溶剂B是1:1己烷:DCM, 得到标题化合物 (10.5 g, 56%), 为无色固体。MS (m/z): 470.3 (M+H)。

[0122] 制备例14

[0123] 4-[1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[0124]



[0125] 将氢氧化钾水溶液 (5 M, 69 mL, 350 mmol) 加入至 4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (32.24 g, 68.67 mmol) 的 EtOH (350 mL) 溶液并将得到的混合物在室温搅拌 4 小时。减压除去 EtOH 并向残余物中加入饱和碳酸氢钠水溶液并将混合物用 DCM 萃取。经无水硫酸钠干燥合并的有机萃取物, 过滤并在减压下浓缩, 得到标题化合物 (24.33 g, 96.5% 纯度, 含 3.5% 残余 DCM, 92% 产率), 为无色粘性油。MS (m/z): 374.3 (M+H)。

[0126] 基本上通过制备例 14 的方法制备下列化合物。

[0127] 表 4

[0128]

制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
15	4-[1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-3-甲基-丁基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯		376
16	4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 异构体 1		348
17	4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 异构体 2		348

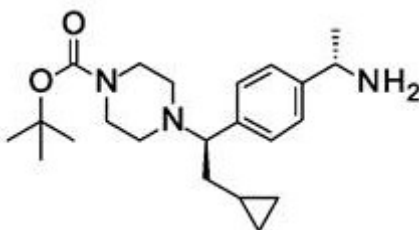
[0129] 替代制备例 14

[0130] 将氢氧化钾 (1.28 g, 22.9 mmol) 的水 (4 mL) 溶液加入至 4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (2.15 g, 4.58 mmol) 的 EtOH (23 mL) 溶液并将混合物在室温搅拌。大约 6 小时后, 将混合物浓缩。将残余物在 DCM 和饱和碳酸氢钠溶液之间分配。将有机层用水和饱和氯化钠水溶液洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到标题化合物, 为油, 其不经纯化而使用 (1.73 g, 4.49 mmol, 98%)。ES/MS (m/z): 374.2 (M+H)。

[0131] 制备例 18

[0132] 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体 1

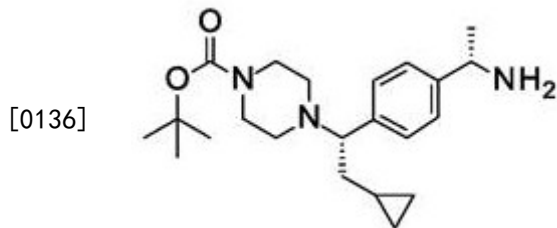
[0133]



[0134] 制备例 19

[0135] 4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯,

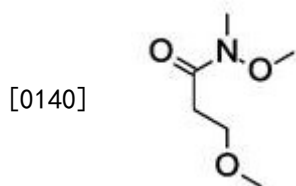
非对映异构体2



[0137] 将4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体1和4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体2的1:1混合物(3.23 g)溶解于MeOH (40 mL)并使用以下条件通过制备型手性HPLC色谱法分离成单独的非对映异构体: 柱Chiralpak AD, 20 μ m, (8 x 33 cm); 注射体积10 mL; 洗脱液100% MeOH, 含0.2% DMEA; 检测波长220 nm; 流速400 mL/min。制备12, 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体1, 从第一洗脱峰获得, 为澄清的粘稠油(1.50 g, 46%, >99% de)。MS (m/z): 374.3 (M+H)。制备13, 4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体2, 从第二洗脱峰获得, 为澄清的粘稠油(1.46 g, 45%, >98.2% de)。MS (m/z): 374.3 (M+H)。

[0138] 制备例20

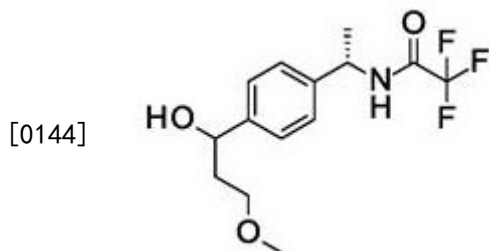
[0139] N,3-二甲氧基-N-甲基-丙酰胺



[0141] 用1,1'-羰基二咪唑(103 g, 635.2 mmol)缓慢分批处理3-甲氧基丙酸(62 g, 577.7 mmol)的DCM (1200 mL)溶液并在室温搅拌2小时。加入N,0-二甲基羟胺盐酸盐(62 g, 635.6 mmol)并将混合物在室温搅拌过夜。将混合物用水(2 $\times$)、0.1M aq HCl (2 $\times$)和用饱和碳酸氢钠水溶液(2 $\times$)洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并浓缩至干,得到粗物质。将粗物质在硅胶上进行色谱分离,用20-40% 丙酮的己烷溶液的梯度洗脱。将所得油真空干燥过夜,得到标题化合物(69.5g, 81.7%)。¹H NMR (CDCl₃) δ 2.72 (t, 2H), 3.2 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.7 (m, 5H)。

[0142] 制备例21

[0143] 2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-[4-(1-羟基-3-甲氧基-丙基)苯基]乙基]乙酰胺

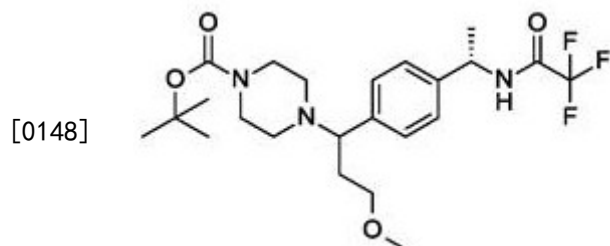


[0145] 将2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-[4-(3-甲氧基丙酰基)苯基]乙基]乙酰胺 (23.62 g,

73.98 mmol, 95质量%) 溶解于MeOH (700 mL) 并用硼氢化钠(5.6 g, 150 mmol) 处理。在室温搅拌2小时后, 将混合物用饱和氯化铵水溶液处理并蒸发MeOH。将所得物质在水和EtOAc之间分配, 分离并将合并的有机物经Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩至干。将粗物质在硅胶上进行色谱分离, 用40% EtOAc的己烷溶液洗脱, 得到标题化合物, 为白色固体(17.82g, 79%)。MS (m/z): 306 (M+H)。

[0146] 制备例22

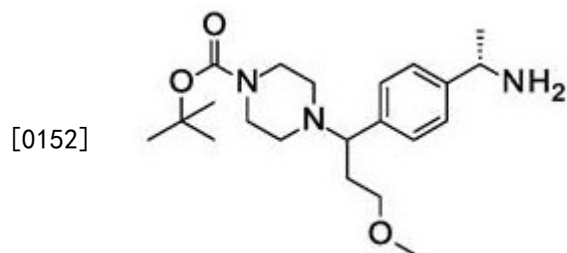
[0147] 4-[3-甲氧基-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯



[0149] 将2,2,2-三氟-N-[(1S)-1-[4-(1-羟基-3-甲氧基-丙基)苯基]乙基]乙酰胺(21.76g, 71.27 mmol) 溶解于DCM (350mL) 并冷却至-10℃。滴加亚硫酸氯(26.12 g, 16 mL, 219.6 mmol) 并将反应搅拌2小时。将混合物浓缩至干, 再溶解于DCM, 并再浓缩。将粗物质溶解于ACN (300 mL) 并加入哌嗪-1-甲酸叔丁酯(26.55 g, 142.6 mmol)、碳酸钾(39.5 g, 286 mmol) 和碘化钾(12.0 g, 72.3 mmol)。将混合物加热至80℃保持72小时。将所得白色固体过滤并用EtOAc洗涤。将合并的滤液用氯化铵水溶液洗涤, 用硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。将粗物质在硅胶上进行色谱分离, 用40-80% EtOAc的己烷溶液的梯度洗脱, 得到标题化合物, 为白色泡沫(29.63g, 88%)。MS (m/z): 474 (M+H)。

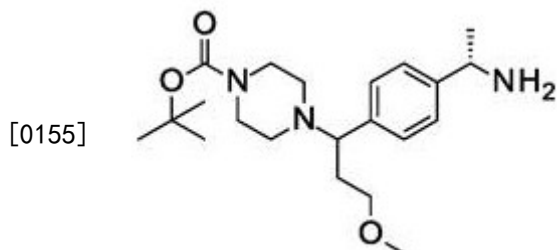
[0150] 制备例23

[0151] 4-[1-[4-(1S)-1-氨基乙基]苯基]-3-甲氧基-丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体1



[0153] 制备例24

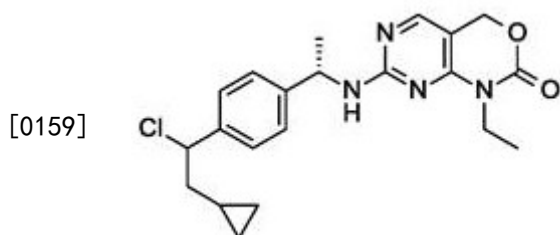
[0154] 4-[1-[4-(1S)-1-氨基乙基]苯基]-3-甲氧基-丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体2



[0156] 向4-[3-甲氧基-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]-乙基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(29.60 g, 62.5 mmol)的EtOH (310 mL)溶液中加入氢氧化钾水溶液(63 mL, 5 M)。将溶液在室温搅拌4小时,然后将混合物浓缩至干。将粗残余物用水和饱和碳酸氢钠水溶液处理并用DCM (3×)萃取。将合并的有机萃取物经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到标题化合物(23.6g),将其溶解于MeOH (236 mL)并使用以下条件通过手性SFC色谱法分离成单独的非对映异构体:柱:Lux Cellulose-1, (5 x 25 cm);注射体积:1 mL/2.5分钟,洗脱液15% MeOH/CO₂,检测波长230 nm;流速300 g/min;柱温:40℃;BPR Setpoint:100巴;BPR 温度:40℃。制备例28的标题化合物由第一洗脱峰获得,为澄清粘稠黄色油(10.1 g, 42.8%, 96.6% de)。MS (m/z): 378 (M+H)。制备例29的化合物作为第二洗脱峰分离,为澄清粘稠黄色油(10.3 g, 43.6%, 95.2% de)。MS (m/z): 378 (M+H)。

[0157] 制备例25

[0158] 7-[[[(1S)-1-[4-(1-氯-2-环丙基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮



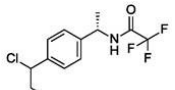
[0160] 将亚硫酰氯(0.23 mL, 3.219 mmol)加入至7-[[[(1S)-1-[4-(2-环丙基-1-羟基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮 (432 mg, 1.03 mmol)和碳酸钾(741 mg, 5.37 mmol)在DCM (20 mL)中的混合物中并将混合物在室温搅拌20分钟。将混合物经硅藻土过滤并浓缩,得到标题化合物(518 mg, 1.07 mmol, 100%),为白色泡沫,其不经进一步纯化而使用。ES/MS (m/z): 401.2/403.2 (M+H)。

[0161] 基本上通过制备例25的方法制备下列化合物。

[0162] 表5

[0163]

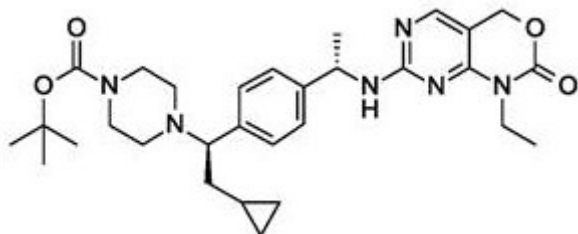
制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
26	N-[(1S)-1-[4-(1-氯-2-环丙基-乙基)苯基]乙基]-2,2,2-三氟-乙酰胺		318
27	N-[(1S)-1-[4-(1-氯-3-甲基-丁基)苯基]乙基]-2,2,2-三氟-乙酰胺		320

28	N-[(1S)-1-[4-(1-氯丙基)苯基]乙基]-2,2,2-三氟-乙酰胺		311 (M+NH ₄)
----	---	---	--------------------------

[0164] 制备例29

[0165] 4-[(1R)-2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[0166]

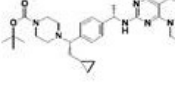
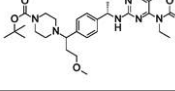
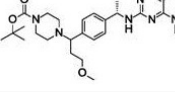
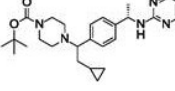
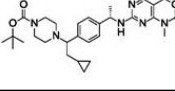
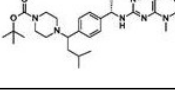
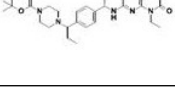


[0167] 向4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (864 mg, 3.35 mmol) 和1-乙基-7-(甲基磺酰基)-1,4-二氢-2H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮 (1.14 g, 3.05 mmol) 的DMSO (15 mL) 溶液中加入CsF (1.39 g, 9.15 mmol) 和DIPEA (0.80 mL, 4.6 mmol)。将混合物在60℃搅拌1.5小时。将混合物冷却至室温,用EtOAc稀释,并用水 (2×) 洗涤。将合并的含水洗涤液用EtOAc萃取并将合并的有机萃取物干燥(Na₂SO₄),过滤并浓缩至干。将所得粗产物通过硅胶色谱法纯化,用55%至95% EtOAc的己烷溶液的梯度洗脱,得到标题化合物,为无色固体 (1.47 g, 88%)。MS (m/z): 551.3 (M+H)。

[0168] 基本上通过制备例29的方法制备下列化合物。

[0169] 表6

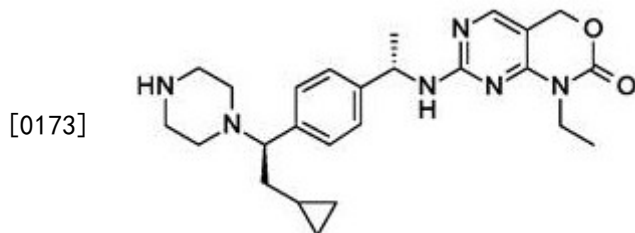
[0170]

制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
30	4-[(1S)-2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯,		551
31	4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]-3-甲氧基-丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(非对映异构体1)		555
32	4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]-3-甲氧基-丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(非对映异构体2)		555
33	4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(1-甲基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(非对映异构体1)		537
34	4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(1-甲基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(非对映异构体2)		537
35	4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]-3-甲基-丁基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯		553
36	4-[(1R/S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 异构体1		525

37	4-[(1R/S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 异构体2		525
38	7-[[[(1S)-1-[4-(2-环丙基-1-羟基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮		383

[0171] 制备例39

[0172] 7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-环丙基-1-哌嗪-1-基-乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮



[0174] 在40℃将盐酸(95 mL, 5.5 M在异丙醇中, 520 mmol)滴加至4-[(1R)-2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(29.45 g, 53.48 mmol)的EtOAc (570 mL) 溶液中。将混合物在室温搅拌3小时, 然后加入水(300 mL)。分离各层并将有机层用水(2 × 150 mL)萃取。通过加入5N NaOH将合并的含水萃取物的pH调节至pH 10, 导致形成无色固体。过滤收集固体, 用水洗涤, 并风干, 得到标题化合物(25.18 g, 99%), 为无色固体。MS (m/z): 451.2 (M+H)。

[0175] 基本上通过制备例39的方法制备下列化合物。

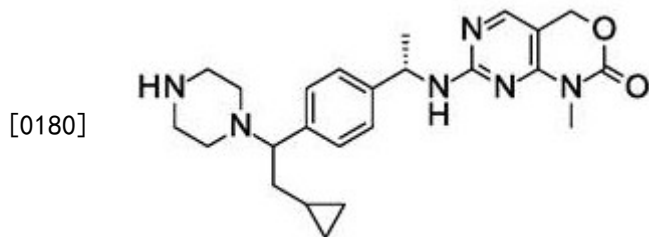
[0176] 表7

[0177]

制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
40	7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-哌嗪-1-基-乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮		451

[0178] 制备例41

[0179] 7-[[[(1S)-1-[4-(2-环丙基-1-哌嗪-1-基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮, 非对映异构体1

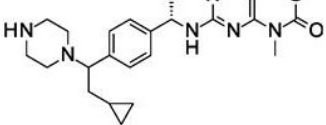
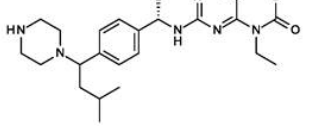
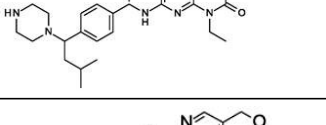
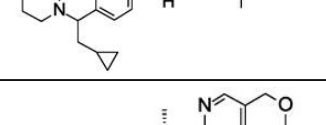
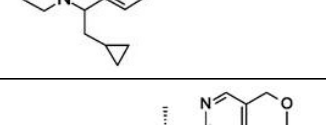
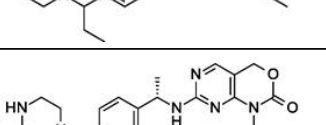
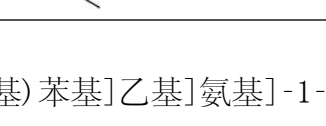


[0181] 将4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(1-甲基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体1 (245 mg, 0.46 mmol) 溶解于DCM (2.5 mL)。加入TFA (0.7 mL, 9 mmol) 并将反应在室温搅拌90分钟。将混合物用20%K₂CO₃水溶液淬灭并用DCM (3×) 萃取。将合并的有机萃取物经Na₂SO₄干燥, 过滤并在

高真空下过夜浓缩至干,得到标题化合物,为白色泡沫(196 mg, 88.5%)。MS (m/z): 437 (M+H)。

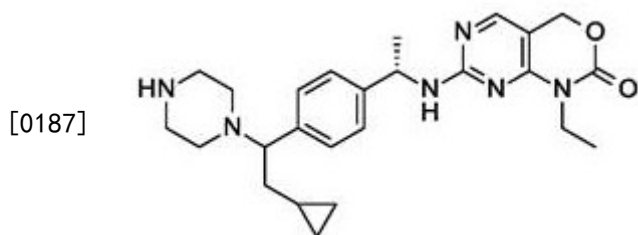
[0182] 基本上通过制备例41的方法制备下列化合物。

[0183] 表8

[0184]	制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
	42	7-[[[(1S)-1-[4-(2-环丙基-1-哌嗪-1-基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮, 非对映异构体2]		437
	43	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-(3-甲基-1-哌嗪-1-基-丁基)苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮, 异构体1]		453
	44	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-(3-甲基-1-哌嗪-1-基-丁基)苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮, 异构体2]		453
	45	7-[[[(1S)-1-[4-(2-环丙基-1-哌嗪-1-基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-2-酮, 异构体1]		436
	46	7-[[[(1S)-1-[4-(2-环丙基-1-哌嗪-1-基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-2-酮, 异构体2]		436
	47	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-哌嗪-1-基丙基]苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮, 异构体1]		425
	48	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-哌嗪-1-基丙基]苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮, 异构体2]		425

[0185] 制备例49

[0186] 7-[[[(1S)-1-[4-(2-环丙基-1-哌嗪-1-基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮



[0188] 将7-[[[(1S)-1-[4-(1-氯-2-环丙基-乙基)苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮 (518 mg, 1.07 mmol)、碳酸钾(445 mg, 3.217 mmol)、碘化钠

(161 mg, 1.07 mmol)和哌嗪 (277 mg, 3.22 mmol)于ACN (3 mL)中的混合物在密封的小瓶中加热至70℃。约8小时后,将混合物冷却至室温,用 EtOAc稀释,通过硅藻土过滤并浓缩。将粗物质在硅胶上纯化,用1%至7% 3 M NH₃/MeOH的DCM溶液的梯度洗脱,得到标题化合物(306 mg, 0.66 mmol, 62%),为白色固体。ES/MS (m/z): 451.2 (M+H)。

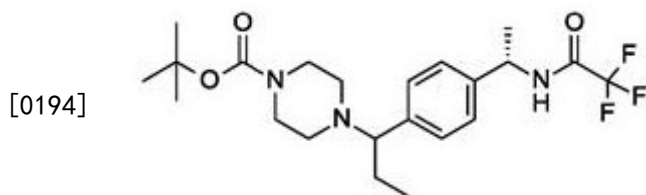
[0189] 基本上通过制备例49的方法使用适当的保护的哌嗪制备下列化合物。

[0190] 表9

制备例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
50	4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯		470
51	4-[3-甲基-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]丁基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯		472
52	4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯		444

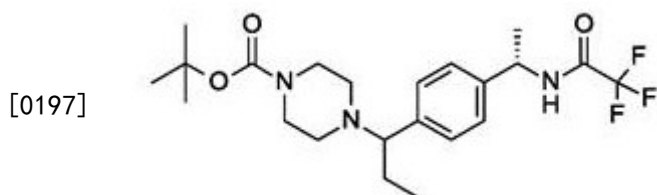
[0192] 制备例53

[0193] 4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 异构体1



[0195] 制备例54

[0196] 4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 异构体2

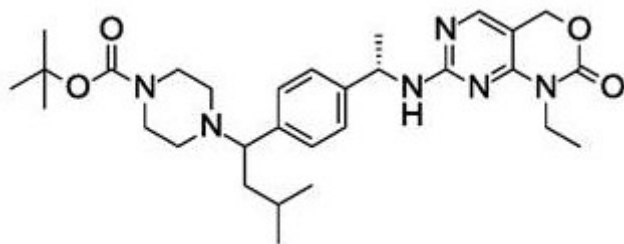


[0198] 将4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]乙基]-苯基]丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(29.2 g, 65.8 mmol)溶解于MeOH (584 mL)并通过手性SFC色谱法使用以下条件拆分: 柱: Chiralpak AD-H, 5x25 cm;洗脱液85/15 CO₂/MeOH(含0.5% 二甲基乙胺);流速300 g/min;检测波长230 nm;柱温 40℃;BPR Setpoint 100巴;40℃溶剂温度。异构体1作为第一洗脱峰分离(14.15 g, 31.9 mmol)。ES/MS (m/z): 444 (M+H)。异构体2作为第二洗脱峰分离(13.87 g, 31.3 mmol)。ES/MS (m/z): 444 (M+H)。

[0199] 制备例55

[0200] 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]-3-甲基-丁基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 异构体1

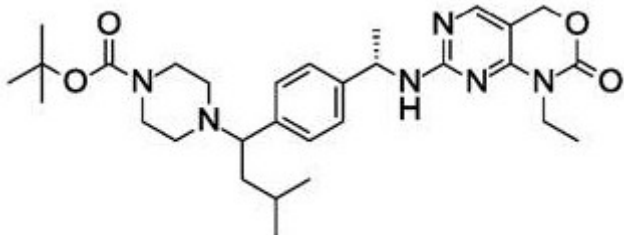
[0201]



[0202] 制备例56

[0203] 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]-3-甲基-丁基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 异构体2

[0204]

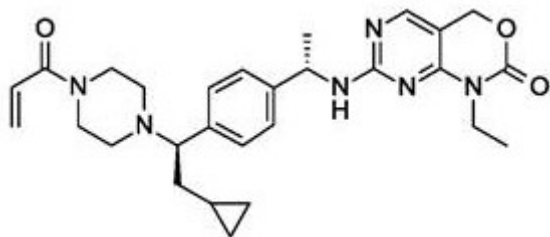


[0205] 将4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]-3-甲基-丁基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (2.6 g, 4.70 mmol) 溶解于4:1异丙醇:氯仿 (50 mL) 并通过手性SFC色谱法使用以下条件拆分: 柱: Chiralpak AD-H, 5x25 cm; 注射体积1 mL; 洗脱液75/25 CO₂/IPA (含0.5% 二甲基乙胺); 流速280 g/min; 检测波长240 nm; 柱温 40°C; BPR Setpoint 100巴; 40 °C溶剂温度。制备例45作为第一洗脱峰分离 (1.02 g, 1.89 mmol)。ES/MS (m/z): 553.4 (M+H)。制备例46作为第二洗脱峰分离 (1.05 g, 1.90 mmol)。ES/MS (m/z): 553.4 (M+H)。

[0206] 实施例1

[0207] 7-[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮

[0208]

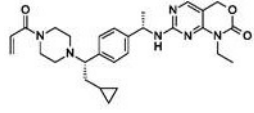
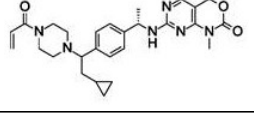
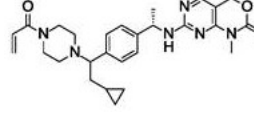
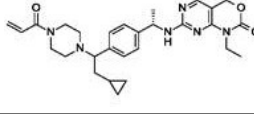
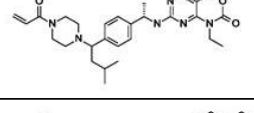
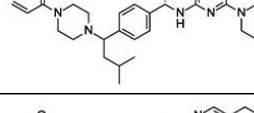
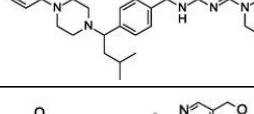
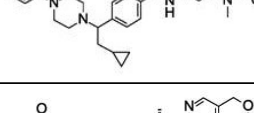
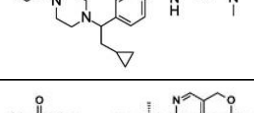
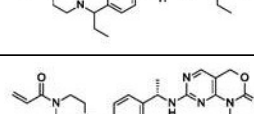
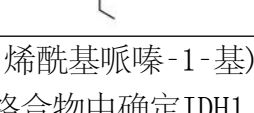


[0209] 在-78°C将丙烯酰氯 (305 μ L, 3.75 mmol, 于2 mL DCM中) 滴加至7-[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-环丙基-1-哌嗪-1-基-乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮 (1.73 g, 3.26 mmol) 的DCM溶液中。在-78°C下2分钟后, 加入几滴MeOH, 随后加入饱和碳酸氢钠水溶液并将混合物温热至室温。加入DCM, 分离各层, 并将水层用DCM萃取。将合并的有机萃取物干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩至干。将所得粗产物通过硅胶色谱法纯化 (25%至40%溶剂A在溶剂B中的溶液, 其中溶剂A是10% MeOH/丙酮且溶剂B是己烷), 得到标题化合物, 为无色固体 (1.16 g, 70%)。MS (m/z): 505.3 (M+H)。

[0210] 基本上通过实施例1的方法制备下列化合物。

[0211] 表11

[0212]

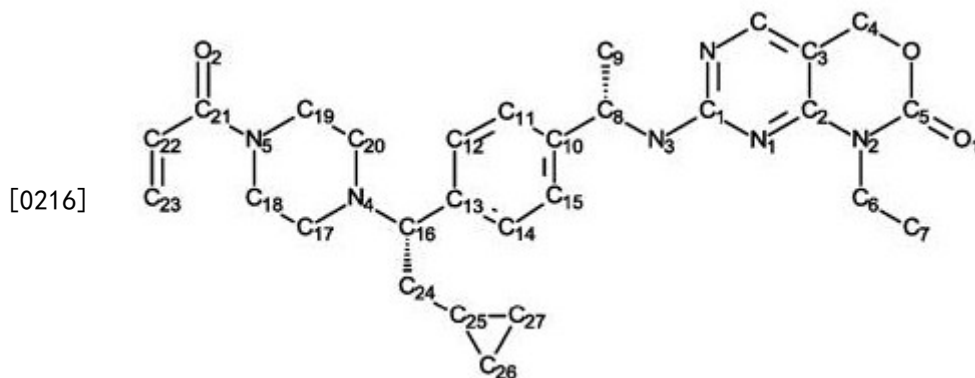
实施例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
2	7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮		505
3	7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮, 非对映异构体1		491
4	7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮, 非对映异构体2		491
5	7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮		505
6	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-[3-甲基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)丁基]苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮		507
7	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-[3-甲基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)丁基]苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮, 异构体1		507
8	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-[3-甲基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)丁基]苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮, 异构体2		507
9	7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁唞-2-酮, 异构体1		490
10	7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁唞-2-酮, 异构体2		490
11	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)丙基]苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮, 异构体1		479
12	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)丙基]苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮, 异构体2		479

[0213] 在与7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮的络合物中确定IDH1 X-射线晶体结构。

[0214] 在与7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁唞-2-酮的络合物中IDH1的晶体结构由在Argonne National Laboratory, Argonne, IL 60439处的Advanced Photon Source处运行的同步加速器光束线APS 31-ID处收集的X-射线衍射数据确定。具有R132H突变的IDH1蛋白可从多种来源商购获得。或者,可以通过本领域技术人员熟知和常规使用的技术从含有

突变的市售细胞系中分离IDH1 R132H蛋白。从以15mg/ml的浓度在含有10mM HEPES pH 7.5、150mM氯化钠、10%甘油、5mM二硫苏糖醇和2 mM 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮]的缓冲液中用具有突变R132H的IDH1蛋白在21℃平衡的坐式托盘(sitting drop tray)获得晶体,并与等体积的含有100mM Bis Tris pH5、5%DMSO、22%PEG 3350和200mM硫酸铵的储备溶液(reservoir solution)混合。将晶体在含有3 mM的7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮]的溶液中浸泡过夜,然后转移到补充有22%乙二醇的溶液中并快速冷冻用于数据收集。用波长为0.9793Å的X-射线辐射收集到2.8Å分辨率的衍射数据。晶体属于空间群P4₃2₁2,晶胞参数a=82.74Å,b=82.74Å,c=299.4Å,α=β=γ=90°。该结构由分子置换确定,并含有一个IDH1的二聚体分子。在对IDH1蛋白建模后计算的电子密度差图对于7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮]的两个结合分子具有清晰的密度。

[0215] 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮]的立体化学由电子密度测定,且7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮]的两个分子均被建模且共络合物结构被细化为Rwork=0.192和Rfree=0.228的R因子。



[0217] 表12

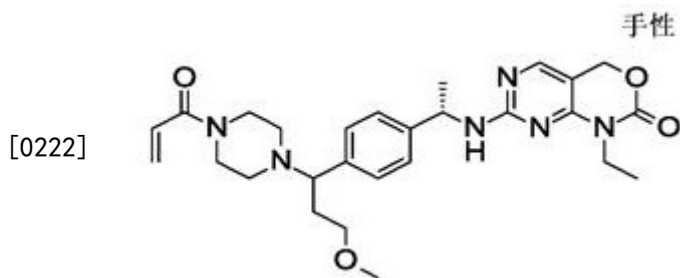
[0218] 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮]的坐标。

[0219]

原子	X	Y	Z
O2	48.364	1.353	-2.648
C21	49.136	0.711	-1.964
C22	48.932	-0.779	-1.799
C23	47.694	-1.239	-2.530
N5	50.174	1.294	-1.330
C18	50.422	2.738	-1.428
C17	51.848	3.008	-1.849
C19	51.126	0.603	-0.449
C20	52.568	0.906	-0.834
N4	52.797	2.388	-0.868
C16	54.242	2.810	-1.061
C24	55.094	2.321	0.113
C25	56.411	3.091	0.050
C27	57.062	3.523	1.306
C26	56.432	4.534	0.413
C13	54.761	2.408	-2.428
C12	55.212	1.125	-2.730
C11	55.701	0.819	-3.988
C14	54.812	3.365	-3.432
C15	55.295	3.057	-4.691
C10	55.742	1.778	-4.997
C8	56.243	1.464	-6.405
C9	55.107	1.279	-7.400
N3	57.128	0.291	-6.469
C1	58.372	0.310	-5.968
N	59.104	-0.809	-6.086
N1	58.775	1.474	-5.441
C2	60.041	1.523	-5.009
N2	60.425	2.651	-4.254
C6	59.506	3.796	-4.105
C7	58.569	3.631	-2.901
C5	61.546	2.595	-3.438
O1	61.736	3.358	-2.523
O	62.437	1.605	-3.629
C4	62.347	0.684	-4.739
C3	60.923	0.429	-5.132
C	60.369	-0.717	-5.655

[0220] 实施例13

[0221] 1-乙基-7-[[(1S) -1-[4-[3-甲氧基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基) 丙基] 苯基] 乙基] 氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3] 噁嗪-2-酮, 非对映异构体1



[0223] 将4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-乙基-2-氧代-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]-3-甲氧基-丙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.372 g, 2.473 mmol)溶解于DCM (15 mL)并加入TFA (10 mL, 15.08 g, 132.3 mmol)。将反应搅拌1小时,然后浓缩至干。将粗物质溶解于DCM (12 mL)和DIPEA (1.25 mL, 7.17 mmol)并将混合物冷却至-78度。滴加丙烯酰氯(0.18 mL, 0.20 g, 2.2 mmol)。10分钟后,加入几滴甲醇以淬灭剩余的丙烯酰氯并将反应浓缩至干(冷)。将粗物质在硅胶上进行色谱分离,用50-70% 丙酮的己烷溶液的梯度洗脱,得到标题化合物,为白色泡沫(867mg, 73%)。MS (m/z): 509 (M+H)

[0224] 基本上通过实施例13的方法制备下列化合物。

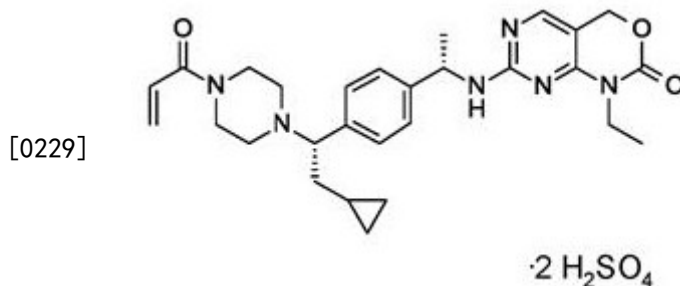
[0225] 表13

[0226]

实施例编号	化学名称	结构	ES/MS (m/z) (M+H)
14	1-乙基-7-[[[(1S)-1-[4-[3-甲氧基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)丙基]苯基]乙基]氨基]-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮, 非对映异构体2		509

[0227] 实施例15

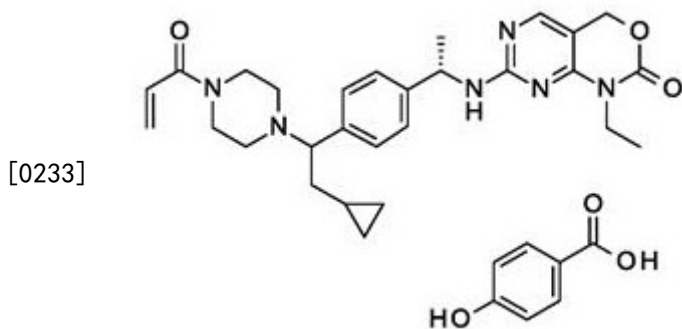
[0228] 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮二硫酸盐



[0230] 将7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮 (188 mg)置于5mL丙酮中,同时在1000rpm/60℃下搅拌。样品是一种清晰的溶液。滴加45μL硫酸(稀释到2mL丙酮中)。数滴之后产生浓稠的白色浆料。加入一半硫酸后,浆料稠度改变。第二半硫酸的加入缓慢滴加进行。在转化成亮白色自由流动的固体浆料之前,浆料略微胶化。30分钟后对板热切断,并将样品冷却至室温,得到浓稠的白色固体浆料。通过真空过滤分离白色固体。得到的滤饼是亮白色固体。将样品在空气流下在过滤器上就地干燥20分钟,然后在70℃真空烘箱中干燥过夜。回收266mg(96.9% 产率)。

[0231] 实施例16

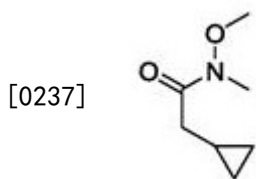
[0232] 7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮 4-羟基苯甲酸



[0234] 将4-羟基苯甲酸 (0.023 g, 0.165 mmol) 加入至7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮 (84 mg, 0.165 mmol) 的二氯甲烷 (5 mL) 溶液中。搅拌5分钟后,在氮气流下缓慢蒸发溶剂。将得到的固体在真空下进一步干燥,得到 7-[[[(1S)-1-[4-[2-环丙基-1-(4-丙-2-烯酰基哌嗪-1-基)乙基]苯基]乙基]氨基]-1-乙基-4H-嘧啶并[4,5-d][1,3]噁嗪-2-酮 4-羟基苯甲酸盐 (105 mg, 0.1617 mmol), 为白色固体。MS (m/z): 423.2 (M+H)。

[0235] 制备例57

[0236] 2-环丙基-N-甲氧基-N-甲基乙酰胺

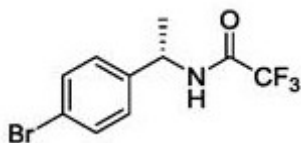


[0238] 向搅拌的500mL圆底烧瓶中加入二氯甲烷 (160 mL, 8体积) 和1,1'-羰基二咪唑 (35.63g, 1.1当量)。将非均相混合物冷却至15℃并在控制内部温度低于20℃的速率下向混合物中加入2-环丙基乙酸 (20.0g, 1.0当量) 的二氯甲烷 (40 mL, 2体积) 溶液。将所得溶液温热至25℃并搅拌2小时。然后将溶液冷却至15℃并向其中分批加入N,O-二甲基羟胺盐酸盐 (21.43g, 1.1当量), 保持内部温度低于20℃。将所得非均相混合物温热至25℃并搅拌15小时。然后将反应混合物用水 (160 mL, 8体积) 稀释并搅拌15分钟。停止搅拌并分离下层水层。将得到的水层用二氯甲烷再萃取两次 (100 mL, 5体积 x 2) 并合并有机层。将合并的有机层用1.5 N HCl (100 mL, 5体积 x 2) 洗涤两次。然后将有机层用10%碳酸氢钠水溶液 (100 mL, 5体积 x 2) 洗涤两次。然后将有机层用水 (100 mL, 5体积) 洗涤, 随后用饱和氯化钠水溶液 (100 mL, 5体积) 洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥 (1.0% w/w)。过滤物料并用二氯甲烷 (20 mL, 1体积) 洗涤, 然后真空浓缩。将所得固体在高真空下干燥5小时, 得到标题化合物 (25.9g, 90.5% 产率)。ES/MS m/z 144.1 (M+H)。

[0239] 制备例6的替代合成

[0240] (S)-N-(1-(4-溴苯基)乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺

[0241]

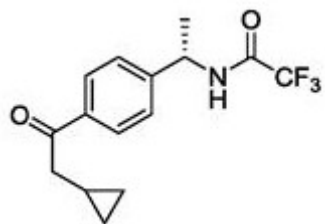


[0242] 向搅拌的250mL圆底烧瓶中加入二氯甲烷(100 mL, 10体积), 然后加入(S)-(-)-1-(4-溴苯基)乙基胺(10.0g, 1.0当量)。将溶液冷却至0℃并向冷却的溶液中缓慢加入三氟乙酸酐(13.12g, 1.25当量), 保持内部温度低于5℃。将得到的非均相混合物在0℃下搅拌2小时, 此时缓慢加入三甲胺(12.64g, 2.5当量), 保持内部温度低于5℃。将混合物再搅拌1小时, 然后通过加入水(30 mL, 3体积)淬灭。使双相混合物温热至25℃并搅拌30分钟。然后分离各层并将水层用二氯甲烷(50 mL, 5体积 x 2)进一步萃取两次。将合并的有机层用饱和氯化钠水溶液(50 mL, 5体积)洗涤并经无水硫酸钠(1wt%)干燥。将干燥的溶液过滤并用二氯甲烷(10 mL, 1体积)洗涤并将溶液真空浓缩, 得到粗白色固体。在25℃将粗固体在石油醚(100 mL, 10体积)中浆化2小时并通过过滤收集固体。在真空下在40℃干燥湿固体8小时, 得到标题化合物(13.3 g, 90% 产率)。ES/MS m/z 295.3 (M+H)。

[0243] 制备例58

[0244] (S)-N-(1-(4-(2-环丙基乙酰基)苯基)乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺

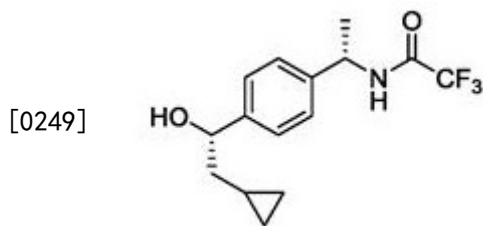
[0245]



[0246] 向具有顶部搅拌的10L反应容器中加入甲基叔丁基醚(1500 mL, 15体积)。向搅拌的溶液中加入(S)-N-(1-(4-溴苯基)乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺(100g, 1.0当量)。将非均相混合物在25℃搅拌30分钟, 然后加入四氢呋喃(500 mL, 5体积)。将所得非均相溶液冷却至-83℃。将正丁基锂(297 mL, 2.2当量)缓慢加入到溶液中, 保持温度低于-78℃, 并将所得溶液在-83℃搅拌1.5小时。向冷却的溶液中加入2-环丙基-N-甲氧基-N-甲基乙酰胺(53.19g, 1.1当量)的甲基叔丁基醚(200 mL, 2体积)溶液, 保持内部温度低于-78℃。将所得溶液在-83℃搅拌1.5小时, 此时将溶液温热至-30℃并通过加入饱和氯化铵水溶液(5 L, 5体积)淬灭。将淬灭的反应混合物温热至25℃并分离各层。将水层用甲基叔丁基醚(500 mL, 5体积)萃取。将合并的有机层用水(500 mL, 5体积)洗涤, 随后用饱和氯化钠水溶液(500 mL, 5体积)洗涤, 然后经无水硫酸钠(50g, 0.5% w/w)干燥。过滤物料并用甲基叔丁基醚(50 mL, 0.5体积)洗涤。将所得溶液真空浓缩直到剩余大约1体积的溶液。将石油醚(1500 mL, 15体积)加入到浓缩混合物并将所得浆料在低于30℃下搅拌2小时。通过过滤收集固体并在40℃真空干燥8小时, 得到标题化合物(65.9 g, 67% 产率)。ES/MS m/z 298.0 (M-H)。

[0247] 制备例59

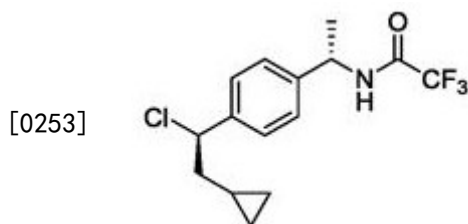
[0248] N-((S)-1-(4-((S)-2-环丙基-1-羟基乙基)苯基)乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺



[0250] 向氢化器反应器中加入绝对乙醇 (7.89 kg, 10体积)。向搅拌的溶液中加入(S)-N-(1-(4-(2-环丙基乙酰基)苯基)乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺 (1.0 kg, 1.0当量)。向该溶液中加入叔丁醇钾溶液(1.0 M 在*t*BuOH中, 0.41 kg, 0.5体积),保持内部温度低于30℃。然后向该溶液中加入(*R*)-RUCY®-XylBINAP (0.0675 kg, 0.017当量)。将氢化器用氢气吹扫两次,同时在25℃下搅拌。吹扫后,将溶液在4.5kg氢气压力和25℃下搅拌5小时。5小时后,将溶液放空,然后在42℃下真空浓缩成油。将油溶于甲基叔丁基醚(11.115 kg, 15体积),然后在45℃下真空浓缩成油。将油溶解于甲基叔丁基醚(11.115 kg, 15体积),然后在45℃下真空浓缩成油。在25℃下向该油中加入甲基叔丁基醚(22.23 kg, 30体积)。将所得溶液用水 (15.0 kg, 15体积)洗涤,然后用NaCl水溶液(5.4kg NaCl在15.0 L 水中)洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥 (1.5kg, 1.5 w/w),然后过滤并用甲基叔丁基醚(1.112 kg, 1.5体积)洗涤。向过滤的溶液中加入活性炭 (0.3 kg, 0.3 w/w)并将混合物搅拌并在40℃加热2小时。然后将混合物过滤并用甲基叔丁基醚(1.112 kg, 1.5体积)洗涤。将过滤的溶液在45℃下真空浓缩成油。将油溶解于石油醚(9.84 kg, 15体积)并在45℃下真空浓缩成油。将油溶解于石油醚(9.84 kg, 15体积)并在45℃下真空浓缩成油。向油中加入石油醚(19.68 kg, 30体积)并将混合物在30℃搅拌3小时并通过过滤收集所得固体并用石油醚(9.84 kg, 15体积)洗涤。将分离的固体在40℃下真空干燥5小时,得到标题化合物(0.79 kg, 79%)。ES/MS *m/z* 300.0 (M-H)。

[0251] 制备例60

[0252] *N*-(*S*)-1-(4-((*R*)-1-氯-2-环丙基乙基)苯基)乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺

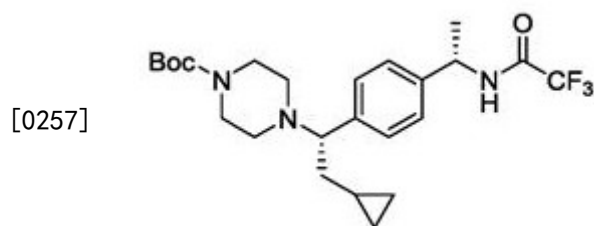


[0254] 向反应器中加入甲基叔丁基醚(4.45 kg, 6体积)和*N*-(*S*)-1-(4-((*S*)-2-环丙基-1-羟基乙基)苯基)乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺 (1.0 kg, 1.0当量)。将溶液冷却至10℃并向其中缓慢加入1-甲酰基吡咯烷(0.066 kg, 0.2当量),保持内部温度低于13℃。然后向该溶液中缓慢加入苯甲酰氯(0.56 kg, 1.2当量),保持内部温度低于13℃。将所得溶液温热至25℃并搅拌至多36小时(可在反应过程中监测反应,并且如果其停止,可额外加入1-甲酰基吡咯烷和苯甲酰氯)。然后将完成的反应在40℃下真空浓缩成油。将油冷却至15℃,然后用10% 碳酸氢钠水溶液(22.0 kg, 20体积)淬灭并在25℃搅拌3小时。向两相混合物中加入石油醚(6.56 kg, 10体积)。分离有机层。将水层用石油醚(6.56 kg, 10体积)萃取。将合并的有机层用10% 碳酸氢钠水溶液(5.0 L, 5体积)洗涤3次。然后将有机层用水 (5.0

L, 5体积) 洗涤, 随后用盐水 (5.0 L, 5体积) 洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥 (0.5 kg, 0.5 w/w)。然后将混合物过滤并用石油醚 (0.33 kg, 0.5体积) 洗涤。将滤液在40℃下真空浓缩成油。将油溶解于乙腈 (3.93 kg, 5体积) 并在40℃下真空浓缩成油。将油溶解于乙腈 (3.93 kg, 5体积) 并在40℃下真空浓缩成油。将油溶解于乙腈 (7.86 kg, 10体积), 并将得到的标题化合物的溶液粗品用于下一步骤。ES/MS m/z 318.0 (M-H)。

[0255] 制备例61

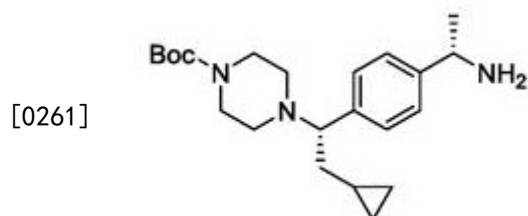
[0256] 4-((S)-2-环丙基-1-(4-((S)-1-(2,2,2-三氟乙酰胺基)乙基)苯基)乙基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯



[0258] 向先前得到的*N*-((*S*)-1-(4-((*R*)-1-氯-2-环丙基乙基)苯基)乙基)-2,2,2-三氟乙酰胺的溶液中加入*N*-Boc-哌嗪 (0.924 kg, 1.5当量), 随后加入碳酸氢钠 (1.1 kg, 4.0当量)。将得到的混合物加热至85℃保持60小时。注意: 每24小时对反应进行取样, 并且在每个样品取出后, 向反应中加入额外量的*N*-Boc-哌嗪 (0.31kg, 0.5当量)。一旦完成, 将反应在45℃下真空浓缩, 得到油。将该油用水 (10.0kg, 10体积) 和甲基叔丁基醚 (7.41kg, 10体积) 稀释。分离所得两相混合物, 并用甲基叔丁基醚 (7.41 kg, 10体积) 萃取水层。将合并的有机层用30%柠檬酸 (5.0 L, 5体积) 萃取5次。将合并的水层用石油醚 (6.56 kg, 10体积) 洗涤两次。通过在15℃下加入碳酸钠 (约25.0kg, 25w/w) 使水层达到pH 9。用甲基叔丁基醚 (7.41kg, 10体积) 萃取碱化的水层。将合并的有机层用水 (5.0L, 5体积) 和盐水 (5.0L, 5体积) 洗涤。有机层经无水硫酸钠 (0.5 kg, 50% w/w) 干燥。将混合物过滤并用甲基叔丁基醚 (0.37 kg, 0.5体积) 洗涤。在40℃下将滤液真空浓缩成油。将所得油溶解于绝对乙醇 (3.95 kg, 5体积) 并将标题化合物的粗溶液直接用于下一步骤。ES/MS m/z 374.3 (M+H- CF_3CO)。

[0259] 制备例62

[0260] 4-((S)-1-(4-((S)-1-氨基乙基)苯基)-2-环丙基乙基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯



[0262] 向先前得到的4-((*S*)-2-环丙基-1-(4-((*S*)-1-(2,2,2-三氟乙酰胺基)乙基)苯基)乙基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯的溶液中加入绝对乙醇 (3.7 kg, 3.7 w/w)。将溶液冷却至20℃并向其中加入1 M 氢氧化钾水溶液 (0.168 kg KOH于3.0 kg 水中)。将得到的混合物在25℃搅拌 10小时, 然后通过缓慢加入30%柠檬酸水溶液 (5.0kg, 5w/w) 淬灭, 保持内部温度低于30℃。向淬灭的溶液中加入甲基叔丁基醚 (7.41 kg, 7.41 w/w)。分离各层并将有机层

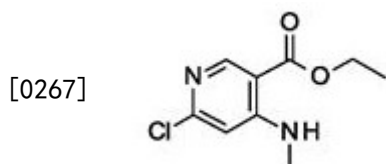
用30%柠檬酸水溶液(5.0 kg, 5 w/w)萃取。在15℃下加入碳酸钠(约 25.0 kg, 25 w/w)使水层达到pH 8。将碱化的水层用乙酸乙酯(7.41 kg, 7.41 w/w)萃取两次。将合并的有机层用水(5.0 kg, 5 w/w)洗涤,然后用盐水(5.0 kg, 5 w/w)洗涤。有机层经无水硫酸钠(0.5 kg, 50wt%)干燥,然后过滤并用乙酸乙酯(0.37 kg, 0.37 w/w)洗涤。将溶液在45℃下真空浓缩成油。将所得油溶解于异丙醇(2 L, 2体积),并将所得溶液在45℃下真空浓缩成油。将所得油溶解于异丙醇(1.2 L, 1.2体积)并将标题化合物的粗溶液直接用于下一步纯化步骤。ES/MS m/z 374.2 (M+H)。

[0263] 向1000 mL圆底烧瓶中加入4-((S)-1-(4-((S)-1-氨基乙基)苯基)-2-环丙基乙基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(30.0 g, 1.0当量)的异丙醇(270 mL, 9体积)溶液。向在20-30℃的搅拌的溶液中加入L-二苯甲酰酒石酸(L-DBTA, 34.5 g, 1.2当量)。将溶液在20-30℃搅拌2-4小时。将所得浆料在20-30℃搅拌8-12小时。向轻质浆料中加入MTBE(300 mL, 10体积)。将所得浆料搅拌并在20-30℃下经12-16小时增稠。然后通过过滤收集固体并用MTBE(150 mL, 5体积)洗涤。将固体在减压下在45-55℃干燥12小时,得到4-((S)-1-(4-((S)-1-氨基乙基)苯基)-2-环丙基乙基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯L-二苯甲酰酒石酸盐,为白色固体(48.8 g, 83% 产率, >98:2 dr)。

[0264] 向搅拌的1000 mL圆底烧瓶中加入4-((S)-1-(4-((S)-1-氨基乙基)苯基)-2-环丙基乙基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯L-二苯甲酰酒石酸盐(40.0 g, 1.0当量),随后加入二氯甲烷(400 mL, 10体积)。在15-25℃向搅拌的溶液中加入10% Na_2CO_3 水溶液(足以使pH达到8-10,约 6-8体积)。将两相混合物在15-25℃下搅拌1小时,然后在分液漏斗中分离各层。向有机层中加入DMSO(240 mL, 6体积)。将溶液在低于40℃下在减压下浓缩以除去二氯甲烷。然后将游离碱化的4-((S)-1-(4-((S)-1-氨基乙基)苯基)-2-环丙基乙基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯的DMSO溶液直接用于下一步骤中。

[0265] 制备例63

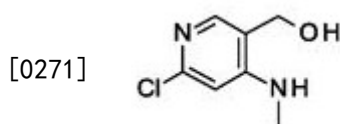
[0266] 6-氯-4-(甲基氨基)吡啶-3-甲酸乙酯



[0268] 在0℃将甲基胺(16 mL, 11.6 mol/L于水中, 186 mmol)滴加至4,6-二氯吡啶-3-甲酸乙酯(20 g, 92 mmol)的乙腈(300 mL)溶液。经2 h将反应混合物温热至室温。向反应混合物中加入水和乙酸乙酯并将水层用乙酸乙酯萃取。将合并的有机萃取物经无水 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩至干。将所得粗物质通过硅胶色谱法(0-100% EtOAc/己烷)纯化,在浓缩合适的级分后得到6-氯-4-(甲基氨基)吡啶-3-甲酸乙酯,为白色固体(10.46 g, 52.14 mmol, 57% 产率)。MS (m/z): 201 (M+H)。

[0269] 制备例64

[0270] [6-氯-4-(甲基氨基)-3-吡啶基]甲醇

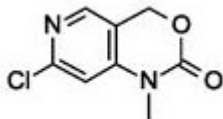


[0272] 在0℃将6-氯-4-(甲基氨基)吡啶-3-甲酸乙酯(10.46g, 52.14mmol)的THF(100mL)溶液滴加到氢化铝锂的混合物(78.2 mL, 1.0 mol/L 在THF中, 78.2 mmol)中。将反应混合物经1.5 h温热至室温。向反应混合物中依次加入水(3 mL)、15% NaOH水溶液(3 mL), 然后加入水(9 mL)。搅拌后, 将反应混合物经硅藻土垫过滤。将滤液用水稀释并用二氯甲烷萃取。将合并的有机萃取物经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩至干, 得到[6-氯-4-(甲基氨基)-3-吡啶基]甲醇, 为浅黄色固体(2.78 g, 27% 产率)。将硅藻土滤饼进一步用甲醇洗涤并将滤液浓缩至干。收集来自滤饼的固体并与二氯甲烷一起搅拌并通过硅藻土过滤。将滤液与来自甲醇洗涤液的残余物合并, 将物质浓缩至干并保留物质。向来自过滤的收集的固体中加入4:1 氯仿: 异丙醇并将混合物搅拌过夜。将混合物经硅藻土垫过滤, 将滤液与保留的残余物合并并浓缩至干, 得到额外量的[6-氯-4-(甲基氨基)-3-吡啶基]甲醇, 为浅黄色固体(5.07 g, 56% 产率)。[6-氯-4-(甲基氨基)-3-吡啶基]甲醇的总回收率为7.85 g, 83% 产率)。MS (m/z): 173 (M+H)。

[0273] 制备例65

[0274] 7-氯-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-2-酮

[0275]

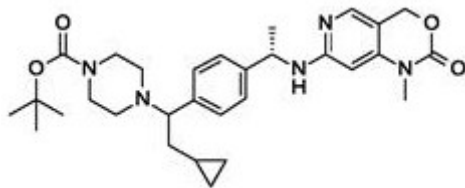


[0276] 在-20℃将三光气(6.04 g, 20.4 mmol)加入至[6-氯-4-(甲基氨基)-3-吡啶基]甲醇(5.07 g, 29.1 mmol)和DIPEA(51.2 mL, 291 mmol)的THF(100 mL)溶液。移去冷浴并将混合物温热至室温。30分钟后, 加入水并将混合物用二氯甲烷萃取。将合并的有机萃取物经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩至干。将所得粗物质通过硅胶色谱法(0-100% EtOAc/己烷)纯化, 在浓缩合适的级分后得到7-氯-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-2-酮, 为橙色固体(5.13 g, 24.5 mmol, 84% 产率)。MS (m/z): 199 (M+H)。

[0277] 制备例66

[0278] 4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(1-甲基-2-氧代-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-7-基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯, 非对映异构体1

[0279]



[0280] 在氮气下向4-[1-[4-[(1S)-1-氨基乙基]苯基]-2-环丙基-乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.30 g, 3.48 mmol)、7-氯-1-甲基-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-2-酮(864 mg, 4.35 mmol)和碳酸铯(2.27 g, 6.96 mmol)的甲苯(17.4 mL)的溶液中加入二氯[1,3-双(2,6-二-3-戊基苯基)咪唑-2-亚基](3-氯吡啶基)钯(II)(291 mg, 0.348 mmol)并将混合物在75℃加热过夜。冷却至室温后, 将混合物通过硅胶塞过滤并用乙酸乙酯洗脱。将滤液在减压下浓缩并将获得的残余物通过硅胶色谱法(20-100% EtOAc/己烷)纯化。通过硅胶色谱法(50-100% 甲基叔丁基醚/己烷)再纯化混合的级分并将来自两个柱的合并的纯级分浓缩, 得到4-[2-环丙基-1-[4-[(1S)-1-[(1-甲基-2-氧代-4H-吡啶并[4,3-d][1,3]噁嗪-7-

基)氨基]乙基]苯基]乙基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯,非对映异构体1,为灰白色泡沫(1.312 g, 2.400 mmol, 69% 产率)。MS (m/z): 536 (M+)。

[0281] 癌症越来越多地被认为是疾病的异质性累积,它的起始和发展是由一或多种在细胞和组织微环境中调节DNA修复、基因稳定性、细胞增殖、细胞死亡、粘附、血管生成、侵入和转移病变的基因的功能异常引起的。“癌症”基因的变异或异常的功能可以起因于天然存在的DNA多态性、基因组复制数的变化(通过扩增、消除、染色体丧失或复制)、基因和染色体结构的变化(通过染色体易位、反转或导致基因表达失调的其它重排)和点突变。癌性肿瘤可以由一种异常基因功能引起,并且被相同的异常基因功能所保持,或由其它异常基因功能保持和加剧发展。

[0282] 除了上述遗传性染色体畸变以外,每种癌症还可以包括基因组的后天修饰,包括DNA甲基化、基因组印记和通过乙酰化、甲基化或磷酸化对组蛋白修饰。后天修饰可以在恶性肿瘤的诱导和/或保持中起一定作用。

[0283] 已经汇编了人类癌症中的细胞遗传畸变的大量目录,并且在线保持和经常更新(参见The Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer在the US National Cancer Institute (NCI) Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) Web site)。Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project保持了所有与肿瘤生成有关的人类基因的详细在线的“癌症基因统计(Cancer Gene Census)”,以及人类癌症中的体细胞突变的COSMIC(Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)数据库。包含大量与各种癌症有关的细胞遗传变化的信息的其它渠道,是Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology。

[0284] 已知和通常使用活检、免疫(球蛋白)分型及其它试验来诊断癌性恶性肿瘤。除了高分辨染色体显带和先进的染色体成像技术之外,可以通过细胞遗传分析来确定所怀疑的癌症病例中的染色体畸变,例如,原位杂交荧光(FISH)、核型分析、光谱核型分析(SKY)、复合FISH(M-FISH)、对比基因组杂交(CGH)、单核苷酸多态性阵列(SNP Chips)及本领域技术人员已知和使用的其它诊断和分析试验。

[0285] 已经在多种癌性肿瘤类型中鉴定了IDH1和IDH2的突变,包括但不限于:神经胶质瘤、多形性恶性胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质细胞瘤、副神经节瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、B细胞急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、甲状腺癌、结肠直肠癌、急性髓性白血病(AML),Dang等人,*Trends Mol. Med.*, 2010, 16:387-397;Ward等人,*Oncogene*, 2012, 31(19):2491-2498;黑素瘤,Shibata等人,*Am. J. Pathol.*, 2010, 178(3):1395-1402;前列腺,Flaherty等人,*J. Clin. Oncol.*, 2014, 32(suppl.4;Abstract 213);Cairns等人,*Cancer Discovery*, 2013, 3:730-741;软骨肉瘤和胆管癌,Balss等人,*Acta Neuropathol.*, 2012, 124:883-891;Cairns等人,*Cancer Discovery*, 2013, 3:730-741;血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤(AITL),Cairns等人,*Blood*, 2012. 119(8):1901-1903。在下列活性位点的具体残基上或附近已经发现突变:IDH1的G97D、R100、R132H、R132C、R132S、R132V、R132G、V71I、R132L和G123R,Dang等人,*Trends Mol. Med.*, 2010, 16:387-397;Ward等人,2012和补充表2。

[0286] 已经表明,IDH1和IDH2的突变形式具有使 α -酮戊二酸还原为2-羟基戊二酸的新生活性(获得功能)。2-羟基戊二酸的内源性产生是对映体专一的,结果产生D-对映异构体(还称为(R)对映异构体)。通常,细胞具有低水平的2-羟基戊二酸,而证据表明,携带IDH1或

IDH2突变的细胞显著地升高2-羟基戊二酸的水平。在携带突变的肿瘤和带有突变体IDH1或IDH2的患者的血浆中,检测到显著升高水平的2-羟基戊二酸。高水平的2-羟基戊二酸与过甲基化表型有关,导致分化受到阻碍,增加了肿瘤生成。

[0287] 特定不可逆的共价抑制剂的活性是通过它与靶标(IDH1或IDH2)的结合(用 K_i 定义)和共价键形成的最大潜在速率(用 K_{inact} 定义)确定的。这两个因素不是分离的要素,而是合作产生共价键形成的预期效果。这可以由下列3点来说明。

[0288] 首先,亲电试剂(例如,丙烯酰胺),相对于亲核试剂(例如,半胱氨酸),位置必须适当,在有机化学中是共价键形成的基本成分。亲核试剂接近亲电试剂时,必须具有精确的角度和距离,以便形成共价键。亲电试剂简单地接近亲核试剂,不足以形成共价键。

[0289] 第二,当为了使抑制剂与酶的结合稳定而在包含氢键部分的核(例如,定位核(orienting core))上结合反应性基团时,技术人员必须考虑如何使定位核与靶标结合,以及根据上述最佳角度和距离,相对于亲核试剂如何安置亲电试剂。此外,亲电试剂简单地接近亲核试剂,不足以形成共价键。定位核的变化可以影响抑制剂化合物形成共价键的能力。

[0290] 第三,当一起考虑上述两点时,在定位核上仅仅存在亲电试剂部分不足以表明会形成共价键。

[0291] 下列体外和体内研究证明了所试验的式I或Ia的化合物针对各种具体癌细胞系列的突变体IDH1和IDH2蛋白抑制活性和效果。这些试验是本领域技术人员通常公认的表明人类临床治疗活性的试验。在公开的研究中,认为抑制突变体IDH1或IDH2新生蛋白能够有效抵御其它突变体IDH1和IDH2新生蛋白。证明突变体IDH1或IDH2抑制活性和效果的试验可以如下充分地进行,或通过得到类似数据的类似试验来进行。

[0292] 下列试验的结果表明,举例说明和试验的化合物用作IDH1和IDH2突变体抑制剂,并且可以用于治疗表达突变体IDH1或IDH2的癌症。

[0293] IDH1和IDH2突变体酶的生化试验

[0294] IDH1-R132H、IDH1-R132C、IDH2-R172K和IDH2-R140Q突变体酶催化 α KG转化为2HG。使用在线固相提取和质谱,分析2HG。利用与6460三重四极质谱仪(G6460A Agilent)连接的RapidFire®仪器,进行这种分析。

[0295] 使包含N端His标签的IDH1突变体(R132H和R132C)和IDH2突变体(R140Q和R172K)蛋白在大肠杆菌(*E. coli*)中表达,并使用镍亲和色谱纯化。在包含100mM Tris-HCl缓冲剂、1mM DTT、0.005% TRITON™ X-100、120mM NaCl的V底96孔聚丙烯板中,进行酶检测。对于IDH1 R132H,包括 α -酮戊二酸、NADPH和 $MnCl_2$,最后浓度分别为300 μ M、2.5 μ M和300 μ M。对于IDH1 R132C,包括 α -酮戊二酸、NADPH和 $MnCl_2$,最后浓度分别为100 μ M、10 μ M和100 μ M。对于IDH2 R172K,包括 α -酮戊二酸、NADPH和 $MnCl_2$,最后浓度分别为150 μ M、10 μ M和150 μ M。对于IDH2 R140Q,包括 α -酮戊二酸、NADPH和 $MnCl_2$,最后浓度分别为3000 μ M、10 μ M和100 μ M。最终pH值=7.0。将溶于DMSO储备溶液中的试验化合物在反应混合物中稀释,最终DMSO浓度为4%。以剂量-响应形式检验化合物。通过加入酶,使试验开始。使用下列最终浓度的酶:IDH1 R132H,2 nM;IDH1 R132C,0.5 nM;IDH2 R172K,1.2 nM;IDH2 R140Q,1.2 nM。90分钟之后,加入含有作为质谱分析和定量反应产物的内标的3-羟基-1,5-戊二-2,2,3,4,4- d_5 酸(5 d_5 -3HG)的ACN(50:50),淬灭该反应。使用强阴离子交换柱色谱(Phenomenex Strata-X-A SecurityGuard),将淬灭的样品中的2-羟基戊二酸(2HG)分离,利用6460三重四极质谱仪

(G6460A Agilent), 进行质谱分析。使用校准曲线(使用已知的2HG浓度形成), 将检测的2HG信号转变成分析物浓度。对于检验的每个化合物, 使用DMSO对照样品作为0%抑制, 没有酶的对照物作为100%抑制, 计算%抑制。使用4参数方程, 由不同化合物浓度的各个%抑制值获得 IC_{50} 值。使用Activity Base (IDBS) 或Screener (Genedata) 数据分析程序, 进行这些计算。

[0296] 该试验的结果表明, 举例说明和检验的化合物针对IDH1/R132H和IDH1/R132C抑制突变体IDH1活性以及针对IDH2/R140Q和IDH2/R172K抑制突变体IDH2活性。

[0297] 基本上如上所述, 检验下列实施例, 显示出针对突变体IDH1和突变体IDH2的活性, 如下面表14所示。

[0298] 表14

实施例#	IDH1/R132H IC_{50} (μ M)	IDH1/R132C IC_{50} (μ M)	IDH2/R140Q IC_{50} (μ M)	IDH2/R172K IC_{50} (μ M)
1	0.00569 ± 0.000766 , n=3	0.00431 ± 0.000895 , n=3	0.113	0.0328
2	0.00627 ± 0.00127 , n=3	0.00371 ± 0.00126 , n=3	0.0369	0.0115
3	0.0111 ± 0.0035 , n=2	0.0156 ± 0.0075 , n=2	0.0648	0.0156
4	0.0137 ± 0.0030 , n=2	0.00869 ± 0.00280 , n=2	0.0811	0.028
5	0.00276	0.00249		
6	0.00491	0.00505		
7	0.00638	<0.00508	0.0743	0.0224
8	<0.00508	<0.00508	0.046	0.017
9	0.00743 ± 0.00188 , n=2	0.0151 ± 0.0024 , n=2		
10	0.0139 ± 0.0017 , n=2	0.0165 ± 0.0019 , n=2		
11	0.00978 ± 0.00038 , n=2	0.0156 ± 0.0034 , n=2	0.0543	0.02
12	0.0294 ± 0.0331 , n=2	0.0390 ± 0.0629 , n=2	0.134	0.0263
13	0.0124 ± 0.0105 , n=2	0.0166 ± 0.0055 , n=2	0.239	0.039
14	0.0190 ± 0.0224 , n=2	0.0186 ± 0.0176 , n=2	0.746	0.162

[0299]

[0300] 平均值 $\pm$ 平均标准偏差。

[0301] 野生型IDH1和IDH2酶的生化试验

[0302] IDH1和IDH2酶催化异柠檬酸转化为 α KG。使含有N端His标签的野生型IDH1

(National Center for Biotechnology Information, Accession: NP_001269316.1) 和 IDH2 (National Center for Biotechnology Information, Accession: EAX02082.1) 蛋白在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达, 并使用镍亲和色谱纯化。在包含 100 mM Tris-HCl 缓冲剂 (pH 7.5)、1 mM DTT、0.005% TRITON™ X-100、120 mM NaCl 的 V 形底 96 孔聚丙烯板中, 进行酶测定。对于 IDH1 野生型试验, 包括异柠檬酸、 NADP^+ 和 MnCl_2 , 浓度分别为 85 μM 、50 μM 和 20 μM 。对于 IDH2 野生型试验, 包括异柠檬酸、 NADP^+ 和 MnCl_2 , 浓度分别为 30 μM 、50 μM 和 10 μM 。将溶于 DMSO 储备溶液中的抑制剂在反应混合物中稀释, 最终 DMSO 浓度为 4%。加入含有作为质谱分析内标的 d6-2-酮戊二酸 (d6- αKG) 的 ACN (50:50), 停止 (淬灭) 酶试验。将十微升反应混合物与 100 μL 水、50 μL 1 M 的 O-苄基羟胺 (在吡啶缓冲剂中 (8.6% 吡啶, pH 5)) 和 50 μL 1 M 的 N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) (在吡啶缓冲剂中) 混合。在室温下衍生化一小时之后, 用 600 μL 的 EtOAc 提取样品。取出 400 μL 上层, 在加热下、在氮气氛围中干燥, 并与 100 μL 的 MeOH/水 (1:1) 重构。将 10 μL 衍生化的样品注入到由 Shimadzu Prominence 20A HPLC 系统和 The Thermo Quantum Ultra™ 三重四极质谱仪组成的 LC-MS 系统上。在 Waters XBridge™ C18 柱 (2.1 x 50 mm, 3.5 μm) 上分离分析物, 流速: 0.6 mL/分钟。流动相 A 是 0.1% 甲酸/水, 流动相 B 是 MeOH。使用校准曲线 (使用已知的 αKG 浓度形成), 将检测的 αKG 信号转变成分析物浓度。对于检验的每个化合物, 使用 DMSO 对照样品作为 0% 抑制, 没有酶的对照物作为 100% 抑制, 计算 % 抑制。使用 4 参数方程, 由不同化合物浓度的各个 % 抑制值获得 IC_{50} 值。使用 Activity Base (IDBS) 或 Screener (Genedata) 数据分析程序, 进行这些计算。

[0303] 该试验的结果表明, 举例说明和检验的化合物相比于 IDH1 R132H 或 R132C 突变体酶抑制 IDH1 野生型酶的活性较差, 并且相比于 IDH2 R140Q 或 R172K 突变体酶抑制 IDH2 野生型酶的活性较差。

[0304] 基本上如上所述, 检验下列表 15 中的实施例, 并且其相比于突变体酶, 抑制野生型酶的活性较差。

[0305] 表 15

[0306]

实施例#	IDH1 野生型 IC_{50} (μM)	IDH2 野生型 IC_{50} (μM)
1	0.0854 $\pm$ 0.107, n=2	0.801 $\pm$ 0.745, n=2
2	0.105 $\pm$ 0.113, n=2	0.884 $\pm$ 0.748, n=2
3	0.425	3.37
4	0.302	3.7
6	0.0549	0.493
7	0.233	1.53
8	0.237	1.62
11	0.345	2.08
12	0.277	3.22
13	0.456	7.03
14	0.392	7.4

[0307] IDH1 (R132H) 生化跳跃 (Jump) 稀释试验

[0308] 用 100% DMSO, 将冷冻干燥的实施例化合物重构为 10 mM 或 100 mM, 并保持在室温, 直到进行试验。利用本领域技术人员众所周知的和通常使用的方法, 表达和纯化 IDH1

(R132H)-His蛋白。试验试剂包括下列试剂： α -酮戊二酸(Sigma Cat# K1875), MnCl_2 -Fisher Scientific Cat# M87-100, NADPH-Sigma-Aldrich Cat# N7505, Tris-HCl (Invitrogen, Cat#15567-027), NaCl (Sigma, S3014), 二硫苏糖醇(Sigma, D5545) 和TRITON™ X100 (Peirce, 28314)。NAD(P)H-Glo™ 试剂盒得自于Promega (G9061)。

[0309] 自始至终所使用的试验缓冲剂包括: 100 mM Tris-HCl (pH7.0)、120 mM NaCl、1 mM DTT、0.005% TRITON™ X-100和2% DMSO (从加入试验化合物开始)。在试验缓冲剂中, 使用1.5 nM IDH1 (R132H)、1 mM α -酮戊二酸、1mM MnCl_2 和15 μ M NADPH, 培养化合物的剂量响应(在Echo555上制备), 测定每个化合物的 IC_{50} 值。将该反应在室温下培养2小时, 然后使用6-环丙基-5-(异喹啉-5-基)-2-[(3R)-4-(3-甲氧基丙酰基)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶-3-甲腈(10 μ M), 使反应停止。使用NAD(P)H-Glo™ 试剂盒, 按照供应商的说明, 测定NADPH浓度。在Envision(Perkin Elmer; 0.1 sec/Luminescence Mirror/Lum700 WL400-700过滤器)上, 读出荧光信号。在随后的跳跃稀释实验中, 将相当于 $10 \times \text{IC}_{50}$ 值的浓度的化合物预先用100 nM IDH1 (R132H) 培养。化合物的浓度始终大于或等于酶浓度。在室温下2小时之后, 将该混合物稀释(1:100)到含有 α -酮戊二酸(10 mM)、 MnCl_2 (10 mM)和NADPH(15 μ M)的溶液中。这个最终的酶反应含有1 nM IDH1 (R132H)和 $0.1 \times [\text{IC}_{50}]$ 。在室温下培养2小时之后, 按照上面的说明, 使用6-环丙基-5-(异喹啉-5-基)-2-[(3R)-4-(3-甲氧基丙酰基)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶-3-甲腈和NAD(P)H-Glo™ 试剂盒, 测定NADPH浓度。三个对照物包括: 1) 在预培养和酶测定中, 含有 $10 \times \text{IC}_{50}$ 化合物的“ $10 \times$ 对照物”, 只不过在最后的测定酶活性的试验中, 使用1 mM α -酮戊二酸、1mM MnCl_2 和15 μ M NADPH, 2) 在预培养和酶测定中, 含有DMSO来代替化合物的“最大活性对照物”, 3) 在预培养中, 含有DMSO来代替化合物的“ $0.1 \times$ 对照物”, 和在酶测定中, 含有 $0.1 \times \text{IC}_{50}$ 的化合物。包括缺少酶的“最小活性对照物”, 但换句话说等于“最大活性对照物”。使用1 mM α -酮戊二酸、1mM MnCl_2 和15 μ M NADPH, 进行第二组最大和最小活性对照。一式三份地检验每个试验条件, 对于最大活性对照(10 mM)和最小活性对照(10 mM), 进行32个平行测定, 而对于最大活性对照(1 mM)和最小活性对照(1 mM), 进行16个平行测定。

[0310] 相对于含有15 μ M的NADPH的最小活性对照, 使用所观察到的信号的百分比降低, 测定每个实验/对照产生的NADP(产物)的浓度。将最小活性对照(1 mM和10 mM)和最大活性对照(1 mM和10 mM)平均, 分别计算标准偏差。将每个跳跃稀释物和 $0.1 \times$ 对照的信号乘以15, 然后除以最小活性对照(10 mM)孔的平均数。从15中减去这个数值, 计算NADP(μ M产物)。相同的计算用于 $10 \times$ 对照, 但使用最小活性对照(1 mM)。平均数乘以15, 然后除以相应的最小活性对照(1 mM和10 mM), 由此计算最大活性对照(1 mM和10 mM)的产物的 μ mole。每个孔的 μ M NADP除以平均最大活性对照(1 mM或10 mM), 然后乘以100, 以确定化合物的跳跃稀释物、 $10 \times$ 对照和 $0.1 \times$ 对照的% IDH活性。对于 $10 \times$ 对照, 合格化合物必须显示<30%的活性, 表明预先培养浓度足以用化合物使酶饱和。另外, 对于 $0.1 \times$ 对照, 化合物必须显示>70-80%的活性, 证明在 $0.1 \times$ /稀释的化合物浓度下, 没有抑制。

[0311] 基本上如上所述, 检验实施例化合物, 并且在该试验中, 显示出IDH1/R132H的%恢复数据。与稀释之后2小时不抑制酶的、具有%恢复的技术化合物相反, 举例说明和检验的本发明化合物在稀释之后2小时抑制酶。该试验的数据显示, 检验的本发明化合物按照与共价抑制突变体IDH1一致的方式起作用, 这是由于抑制剂的稀释不会引起酶活性的恢复。

[0312] IDH1突变体抑制剂的基于细胞的试验

[0313] 为了检验IDH1突变体R132C的细胞抑制,使用纤维肉瘤细胞系HT1080(购买于ATCC)。为了检验R132H突变的基于细胞的抑制情况,通过本领域技术人员众所周知和常规使用的方法用表达R132H突变体酶的DNA结构稳定地转染U87MG神经胶质瘤细胞系(ATCC)。

[0314] HT1080细胞试验:

[0315] 在用化合物处理之前18-24小时,将一万五千个细胞铺板在聚D-lys涂布的96孔板中(15,000个细胞/孔)。在化合物处理之前四个小时,除去正常培养基,并用不含谷氨酰胺的培养基代替,由此使细胞处于谷氨酰胺饥饿状态。饥饿之后,用不同浓度的试验化合物(20 μ M至1nM;或0.2 μ M至0.01 nM)处理细胞,所述试验化合物溶于不含谷氨酰胺、含有最后浓度为0.2%的DMSO的培养基中。将最初的化合物在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂条件下培养1小时。1小时之后,加入谷氨酰胺,最终浓度为2 mM,然后将处理的细胞在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂条件下进一步培养18小时。培养18小时之后,分析细胞溶解产物中的胞内2HG和 α KG。除去培养基并向细胞中加入含有25mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、1mM EDTA、1 mM EGTA/1% TRITONTM-X 100的缓冲剂之后,制备溶解产物。将等分的溶解产物加入到作为内标的d₆- α KG和d₅-3HG的混合物中,并在N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和吡啶的存在下,用O-苄基羟胺处理混合物。然后,用EtOAc提取分析衍生物,干燥,而后用50% MeOH/水重构。使用反相色谱(C18柱),将所述制备的样品注入到HPLC中,分离2HG和 α KG衍生物(和相应的内标)。使用6460三重四极质谱仪(G6460A Agilent),进行样品分析。使用校准曲线外推的 α KG/d₆- α KG的比例和2HG/d₅-3HG的比例,将检测的2HG和 α KG信号转变成分析物浓度。将计算的2HG或 α KG浓度相对于最大和最小参比(在用化合物处理细胞期间,在存在谷氨酰胺和没有谷氨酰胺的情况下获得)归一化之后,获得每个单一样品的抑制百分数。使用S形的剂量-响应4参数方程,由各个%抑制获得IC₅₀值。使用Activity Base(IDBS)或Screener(Genedata)数据分析程序,自动进行这些计算。

[0316] 该试验的结果表明,检验的表15中的实施例抑制2-羟基戊二酸的产生,这表示在该试验中,抑制细胞中的突变体IDH1 R132C。野生型IDH1产生的代谢物 α KG,没有受到抑制剂的影响,这表明,在该试验中,在细胞中,相对于野生型IDH1,所述化合物对于突变体IDH1具有选择性。得到的下列实施例的IC₅₀值示于表16中。对于那些其中抑制曲线没有达到50%的试验,所检验的最高浓度被示出(例如IC 50> 20 μ M或> 0.2 μ M)。

[0317] 表16

[0318]

实施例#	HT1080 (R132C, 2-羟基戊二酸) IC ₅₀ (μ M)	HT1080 (R132C, α KG) IC ₅₀ (μ M)
1	0.000698 $\pm$ 0.000352, n=7	>20.0
2	0.00128 $\pm$ 0.00100, n=8	>20.0
3	0.00127 $\pm$ 0.00044, n=2	>0.200
4	0.00334 $\pm$ 0.00140, n=2	>0.200
5	0.000623 $\pm$ 0.000745, n=2	>20.0
6	0.00112 $\pm$ 0.00052, n=4	19.2
7	0.000625 $\pm$ 0.000182, n=2	>0.200
8	0.000775 $\pm$ 0.0000981, n=2	>0.200
9	0.00275 $\pm$ 0.00046, n=3	>20.0

10	0.00391 $\pm$ 0.00259, n=3	>20.0
11	0.00104 $\pm$ 0.00050, n=4	>20.0
12	0.00272 $\pm$ 0.00330, n=4	>20.0
13	0.000987 $\pm$ 0.000009, n=2	>20.0
14	0.00138 $\pm$ 0.00015 n=3	>20.0

[0319] 平均值 $\pm$ 平均标准偏差。

[0320] U87MG/IDH1R132H细胞试验

[0321] 在用化合物处理之前18-24小时,将细胞铺板在聚D-lys涂布的96孔板中(12,000个细胞/孔)。在化合物处理之前四个小时,除去常规培养基,并用不含谷氨酰胺的培养基代替,由此使细胞处于谷氨酰胺饥饿状态。饥饿之后,用不同浓度的试验化合物(20 μ M至1nM)处理细胞,所述试验化合物溶于不含谷氨酰胺、含有最后浓度为0.2%的DMSO的培养基中。将最初的化合物在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂条件下培养1小时。1小时之后,加入谷氨酰胺,最终浓度为2 mM,然后将处理的细胞在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂条件下进一步培养18小时。在除去培养基并用细胞溶解缓冲剂(25mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA/1% TRITON™-X 100)处理之后获得的细胞溶解产物中,分析胞内2HG。在-80 $^{\circ}$ C下保存细胞溶解产物,直到处理为止。为了提取分析物,将等分的解冻的溶解产物转入深的96孔板中,并用冷的含有d₅-3HG的MeOH(作为内标)处理,而后用氯仿和水(1:4:3:2)处理。分离之后,收集上面的物相,注入到HPLC中,使用与MS/MS检测连接的亲水相互作用(HILIC)色谱,在6460三重四极质谱仪中,分离2HG(和内标)。将计算的2HG浓度相对于最大和最小参比(在用化合物处理细胞期间,在存在谷氨酰胺和没有谷氨酰胺的情况下获得)归一化之后,获得每个单一样品的抑制百分数。使用S形的剂量-响应4参数方程,由各个%抑制获得IC₅₀值。使用Activity Base (IDBS)或Screener (Genedata)数据分析程序,自动进行这些计算。

[0322] 基本上如上所述,检验下列实施例,并且在该试验中,在U87MG细胞中,针对突变体IDH1/R132H显示出抑制活性,如下面表17所示。

[0323] 表17

[0324]

实施例#	U87MG (IDH1/R132H 2-羟基戊二酸 IC ₅₀ (μ M))
1	0.000209 $\pm$ 0.000100, n=6
2	0.000406 $\pm$ 0.000375, n=8
3	0.000426 $\pm$ 0.000188, n=2
4	0.000805 $\pm$ 0.000187, n=2
5	0.000295 $\pm$ 0.00200, n=2
6	0.000379 $\pm$ 0.000202, n=2
7	0.000356 $\pm$ 0.000178, n=2
8	0.000432 $\pm$ 0.000016, n=2
9	0.000388 $\pm$ 0.000703, n=2
10	0.000529 $\pm$ 0.000356, n=2
11	0.000258 $\pm$ 0.000209, n=3
12	0.00135 $\pm$ 0.00151, n=4
13	0.000267 $\pm$ 0.000227, n=2

14	0.000353 ± 0.000483, n=2
----	--------------------------

[0325] 平均值+平均标准偏差。

[0326] 体内2-羟基戊二酸试验

[0327] 为了体内检验IDH1抑制剂,在植入HT1080细胞(携带R132C突变体IDH1的纤维肉瘤)或TB08细胞(携带R132H突变体IDH1的继发性恶性胶质瘤)之后,使皮下异种移植肿瘤生长在无胸腺的裸鼠(20-22g, Harlan Laboratories)中。使小鼠不限量地摄取食物和水,并且在植入细胞之前,适应新环境1周。将肿瘤细胞(HT1080)或肿瘤片段(TB08)植入到右后肋中。对于HT1080,植入 5.0×10^6 个细胞,所述细胞在与基质胶的1:1混合物中,最终体积0.2ml。对于TB08,将外植肿瘤样品产生的肿瘤片段直接植入到后肋中。每周用卡钳测定肿瘤体积两次,并使用 $0.536 \times L \times W^2$ 计算肿瘤体积,其中,L=长度,和W=宽度。当肿瘤体积达到150-400 mm³时,将动物随机放入各个组中(每个组:n=3-6个),并给予IDH1抑制剂或媒介物对照物。对于IDH1抑制剂,将化合物配制在含有1%羟乙基纤维素/0.25% TweenTM 80/0.05% 消泡剂或10%阿拉伯胶(含有1.1 mol当量的HCl)的媒介物中。将化合物浴超声处理,获得悬浮液。以毫克每千克(mpk)为基础,通过口服填喂法给予化合物,最终体积为0.2ml。为了测定2HG的抑制,每天给予化合物两次(BID),给予3天(剂量总数=6)。化合物处理之后,用异氟烷麻醉和颈部脱位方法,使小鼠安乐死。切除肿瘤,放进贴标签的管中,并立即在液氮中冷冻。将肿瘤保存在-80℃下,用于处理。

[0328] 制备肿瘤溶解产物

[0329] 在分子等级的水中,制备XY Lite缓冲剂,并且含有下列组分:25mM Tris,pH7.5, 150mM NaCl,1% TRITONTM X-100,1mM EDTA,1 mM EGTA。向XY Lite(40 ml)中加入800μl的Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(HaltTM蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物,不含EDTA, Thermo Scientific,Cat# 78441)。将样品涡旋,而后在冰上冷却。将橙色盖的A溶解管贴上标签,并放到位于冰上的管架上。将陶钵和研棒放在干冰中,冷却。将2×2英寸正方形的铝箔放置在研钵的底部。将肿瘤样品转入预先冷却的研钵中的正方形箔片上。加入液氮(大约5 ml),蒸发,使肿瘤超冷冻。将另一片箔片放置在肿瘤上,并用陶瓷研棒将肿瘤破碎成小块。将破碎的肿瘤快速转入溶解管中。将冰冷的XY Lite(500μL)加入到每个管中,并封盖。然后,在FastPrep-24MP Biomedicals上,旋转两次(每次35秒钟),处理肿瘤,速度设定于5。然后,在Beckman Microfuge R中,在4℃,在14,000 rpm下,将样品离心30分钟。将上清液转入预先冷却的96孔深孔板中。弃置小粒。

[0330] 蛋白试验

[0331] 首先,将XY缓冲剂(145μl)加入到非灭菌的96孔圆底Corning板中,形成蛋白试验稀释板。向其中加入肿瘤溶解产物(5μL),并轻轻地混合。将板保持在冰上。BSA标准物(Thermo Scientific cat. 23209,2 mg/mL)的系列稀释方案设定如下:将五个0.5mL管放置在管架上,并将XY缓冲剂(60μL)加入到每个管中。将储备溶液BSA(60μl)加入到第一个管中,并涡旋。从第一个管中取出60μl转入下一个管中,涡旋,等等,直到稀释系列如下完成为止:管1=储备溶液BSA,管2-5是1:2系列稀释物,管6=单独的XY缓冲剂。按照生产商的说明书,将Thermo BCA蛋白试验试剂混合。将混合的BCA试剂(200μl)加入到每个样品中,并培养15分钟。在SOFTmax Pro板读数器上,读出蛋白试验结果。基于蛋白试验结果,将合适数量的XY缓冲剂加入到每个肿瘤溶解产物中,形成5mg/mL的最终蛋白浓度。将所有的样品贴标签,

并在-80℃下保存。

[0332] 肿瘤溶解产物的代谢物分析

[0333] 通过肿瘤异种移植的液相色谱-质谱 (LC-MS) 分析,测定IDH1抑制对于全部2HG和 α KG的浓度的体内影响。在LC-MS分析之前,该方法使用O-苄基羟胺衍生化。将十微升的各个肿瘤溶解产物放入深孔的96孔板中,并与含有10 μ M d₅-3HG和10 μ M d₆- α KG的100 μ L内标溶液混合。将50 μ L的1M O-苄基羟胺(在吡啶缓冲剂中,8.6%吡啶,pH5)和50 μ L的1M N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)(在吡啶缓冲剂中)加入到每个样品中。将衍生化反应在室温下进行一个小时。使用Beckman Biomek FX液体处理器,将600 μ L的EtOAc加入到每个样品中。将板密封,涡旋5分钟,然后在4000 rpm下,在Eppendorf 5810R离心机上离心5分钟。将400 μ L上层转入新的96孔板中。将样品在加热下、在氮气氛围中、在50℃下干燥,并用100 μ L的MeOH/水(1:1)重构。将一微升的衍生化样品注入到由Shimadzu Prominence 20A HPLC系统和Thermo Quantum Ultra™ 三重四极质谱仪组成的LC-MS系统上。在Water XBridge™ C18柱(2.1 x 50 mm,3.5 μ m)上分离分析物,流速:0.6 mL/分钟。流动相A是0.1%甲酸/水,流动相B是MeOH。梯度分布是:0分钟,5% B;3分钟,100% B;4.00分钟,100% B;4.1分钟,5% B;5.50分钟,停止。质谱仪使用HESI-II探头,在阳离子选择的反应监控方式下运行。通过绘制出分析物浓度相对于分析物/内标峰面积比的图,建立校准曲线,并利用Xcalibur™ 软件,使用1/浓度重量,进行数据的二次拟合。由校准曲线来反演计算未知的分析物浓度。LC-MS试验的代谢物数据用nmol/mg蛋白表示。媒介物处理组中的平均2HG水平用于测定0%抑制对照物。然后,相对于媒介物对照物,测定每个抑制剂处理的动物的%抑制。利用JMP软件分析数据,测定每个给药组的平均%抑制、标准偏差和标准误差。

[0334] 证明示范化合物和测试化合物在IDH1突变体异种移植小鼠中体内抑制2-羟基戊二酸的数据示于下面表18中。

[0335] 表18

[0336]

异种移植模型	处理或实施例编号	剂量	小鼠 (n)	2HG, 平均 % 抑制	标准偏差	平均标准误差
TB08 (R132H)	媒介物	0 mpk	5	0	30.3	13.55
TB08 (R132H)	1	1 mpk	5	21.4	21	9.38
TB08 (R132H)	1	2 mpk	5	16.1	30.3	13.6
TB08 (R132H)	1	4 mpk	5	41.5	26	11.6
TB08 (R132H)	1	8 mpk	5	78.8	1.8	0.8
TB08 (R132H)	1	16 mpk	5	92.1	1.8	0.8
TB08 (R132H)	1	32 mpk	5	95.8	0.7	0.3
异种移植模型	处理或实施例编号	剂量	小鼠数量	2HG, 平均 % 抑制	标准偏差	平均标准误差
TB08 (R132H)	媒介物	0 mpk	5	0	39.2	17.5
TB08 (R132H)	2	1 mpk	5	37.4	13.3	5.9
TB08 (R132H)	2	2 mpk	5	23.9	16.2	7.2
TB08 (R132H)	2	4 mpk	5	63.7	12.1	5.4
TB08 (R132H)	2	8 mpk	5	80.95	6.27	2.8
TB08 (R132H)	2	16 mpk	5	92.97	2.63	1.1
TB08 (R132H)	2	32 mpk	5	96.88	0.68	0.3
异种移植模型	处理或实施例编号	剂量	小鼠数量	2HG, 平均 % 抑制	标准偏差	平均标准误差

TB08 (R132H)	媒介物	0.00 mpk	5	0	24.4	10.9
TB08 (R132H)	8	10.0 mpk	5	60.36	10.06	4.5
TB08 (R132H)	7	10.0 mpk	5	69.56	9.15	4.1
TB08 (R132H)	4	10.0 mpk	5	61.82	14.4	6.4
TB08 (R132H)	3	10.0 mpk	5	87.26	3.95	1.77
TB08 (R132H)	14	10.0 mpk	5	86.71	5.27	2.36
异种移植模型	处理或实施例编号	剂量	小鼠数量	2HG, 平均 % 抑制	标准偏差	平均标准误差
TB08 (R132H)	媒介物	0.00 mpk	5	0	26.87	12.02
TB08 (R132H)	11	10.0 mpk	5	90.63	4.5	2.01
异种移植模型	处理或实施例编号	剂量	小鼠数量	2HG, 平均 % 抑制	标准偏差	平均标准误差
TB08 (R132H)	媒介物	0.00 mpk	5	0	39.6	17.7
TB08 (R132H)	13	10.0 mpk	5	86.3	3.7	1.67
TB08 (R132H)	12	10.0 mpk	5	94.16	0.66	0.3