



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106146511 A

(43) 申请公布日 2016. 11. 23

(21) 申请号 201510158304. 5

(22) 申请日 2015. 04. 03

(71) 申请人 安润医药科技(苏州)有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号生物纳米科技园 A3 栋 401 室

(72) 发明人 洪健 许忻 乐小勇

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

代理人 薛琦 余化鹏

(51) Int. Cl.

C07D 487/04(2006. 01)

A61K 31/519(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/02(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

权利要求书10页 说明书61页

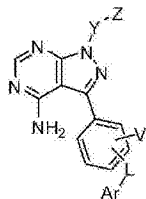
(54) 发明名称

吡唑并嘧啶衍生物、制备方法、药物组合物及用途

(57) 摘要

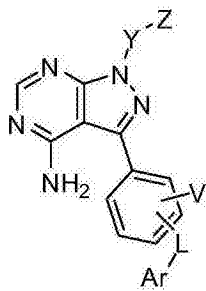
本发明公开了吡唑并嘧啶衍生物、制备方法、药物组合物及用途。本发明提供了一种如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物。本发明的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物对布鲁顿酪氨酸激酶 (Btk) 具有良好的抑制活性,尤其对肿瘤细胞的生长具有良好的体内体外抑制

活性,有良好的市场化前景。



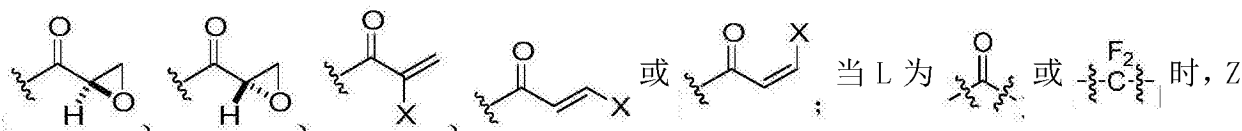
I

1. 一种如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物,

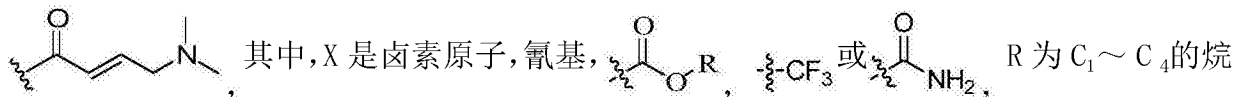


I

其中:L 是 O、S、 $\begin{matrix} \text{H}_2 \\ | \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 、 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 、 $\begin{matrix} \text{H} \\ | \\ \text{---N---} \\ | \end{matrix}$ 或 $\begin{matrix} \text{F}_2 \\ | \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$, 当 L 为 O、S、 $\begin{matrix} \text{H}_2 \\ | \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 或 $\begin{matrix} \text{H} \\ | \\ \text{---N---} \\ | \end{matrix}$ 时, Z 是



为 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 或 $\begin{matrix} \text{F}_2 \\ | \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 时, Z 为 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 、 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 、 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 、 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 、 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 、 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---C---} \\ | \end{matrix}$ 或 $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{---S---} \\ | \end{matrix}$ 或



基;

Ar 是取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基;所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的“取代”是指被一个或多个选自卤素原子、氰基、取代或未取代的烷基、烷氧基、烯基、炔基和芳基的取代基所取代,所述的“取代或未取代的烷基”中所述的“取代”是指被一个或多个卤素原子所取代,当存在多个取代基时,所述的取代基相同或不同;

V 是氢原子或氟原子;

Y 是取代或未取代的亚烷基、环烷基或杂环烷基;所述的“取代或未取代的亚烷基”中所述的取代是指被杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基、 $C_1 \sim C_6$ 的烷氧基、 $C_1 \sim C_6$ 的烷硫基和 $C_1 \sim C_6$ 的烷氨基中的一个或多个所取代。

2. 如权利要求 1 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物,其特征在于:

V 是氢原子;

和/或,

当 X 为卤素原子时,所述的卤素原子为氟原子、氯原子或溴原子;

和/或,

当 R 为 $C_1 \sim C_4$ 的烷基时,所述的“ $C_1 \sim C_4$ 的烷基”为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基;

和 / 或,

当所述的 Y 中所述的“取代或未取代的亚烷基”中所述的取代是指被杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基所取代时,所述的“杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基”为杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个卤素原子所取代时,所述的“卤素原子”为氟原子、氯原子或溴原子;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个取代或未取代的烷基所取代时,所述的“取代或未取代的烷基”为取代或未取代的 $C_1 \sim C_4$ 的烷基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个取代或未取代的烷基所取代,且所述的“取代或未取代的烷基”中所述的取代是指被卤素原子所取代时,所述的卤素原子为氟原子、氯原子或溴原子;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个烷氧基所取代时,所述的“烷氧基”为 $C_1 \sim C_4$ 的烷氧基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个烯基所取代时,所述的“烯基”为 $C_2 \sim C_4$ 的烯基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个炔基所取代时,所述的“炔基”为 $C_2 \sim C_4$ 的炔基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个芳基所取代时,所述的“芳基”为 $C_5 \sim C_{10}$ 的芳基;

和 / 或,

当所述的 Ar 是取代或未取代的芳基时,所述的“取代或未取代的芳基”为“取代或未取代的 $C_5 \sim C_{10}$ 的芳基”;

和 / 或,

当所述的 Ar 是取代或未取代的杂芳基时,所述的“取代或未取代的杂芳基”为杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_9$ 的杂芳基;

当 Y 是取代或未取代的亚烷基时,所述的“取代或未取代的亚烷基”为取代或未取代的 $C_1 \sim C_6$ 的亚烷基;

和 / 或,

当 Y 是环烷基时,所述的环烷基为 $C_4 \sim C_7$ 的环烷基;

和 / 或,

当 Y 是杂环烷基时,所述的杂环烷基为杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基。

3. 如权利要求 2 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物,其特征在于:

当所述的 Y 中所述的“取代或未取代的亚烷基”中所述的取代是指被杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基所取代时,所述的“杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基”为吡咯烷基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个取代或未取代的 $C_1 \sim C_4$ 的烷基所取代时,所述的“取代的 $C_1 \sim C_4$ 的烷基”为三氟甲基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个取代或未取代的 $C_1 \sim C_4$ 的烷基所取代时,所述的“未取代的 $C_1 \sim C_4$ 的烷基”为甲基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个 $C_1 \sim C_4$ 的烷氧基所取代时,所述的“ $C_1 \sim C_4$ 的烷氧基”为甲氧基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个 $C_2 \sim C_4$ 的烯基所取代时,所述的“ $C_2 \sim C_4$ 的烯基”为乙烯基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个 $C_2 \sim C_4$ 的炔基所取代时,所述的“ $C_2 \sim C_4$ 的炔基”为乙炔基;

和 / 或,

当所述的“取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的取代是指被一个或多个 $C_5 \sim C_{10}$ 的芳基所取代时,所述的“ $C_5 \sim C_{10}$ 的芳基”为苯基;

和 / 或,

当所述的 Ar 是取代或未取代的 $C_5 \sim C_{10}$ 的芳基时,所述的“取代或未取代的 $C_5 \sim C_{10}$ 的芳基”为取代或未取代的苯基;

和 / 或,

当所述的 Ar 是杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_9$ 的杂芳基时,所述的“杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_9$ 的杂芳基”为杂原子为氮原子、杂原子数为 1 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_5$ 的杂芳基;

和 / 或,

当 Y 是取代或未取代的 $C_1 \sim C_6$ 的亚烷基时,所述的“取代或未取代的 $C_1 \sim C_6$ 的亚烷基”为取代或未取代的亚甲基;

当 Y 是 $C_4 \sim C_7$ 的环烷基时,所述的“ $C_4 \sim C_7$ 的环烷基”为 $C_5 \sim C_6$ 的环烷基;

和 / 或,

当 Y 是杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基时,所述的“杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基”为杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基。

4. 如权利要求 3 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物,其特征在于:

当所述的 Ar 是取代或未取代的苯基时,所述的“取代的苯基”为被一个或多个氟原子取代的苯基、被一个或多个甲基取代的苯基、被一个或多个氰基取代的苯基、被一个或多个三氟甲基取代的苯基、被一个或多个甲氧基取代的苯基、被一个或多个乙烯基取代的苯基、被一个或多个乙炔基取代的苯基或者被一个或多个苯基取代的苯基;

和 / 或,

当所述的 Ar 是为杂原子为氮原子、杂原子数为 1 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_5$ 的杂芳基时,所述的“杂原子为氮原子、杂原子数为 1 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_5$ 的杂芳基”为取代或未取代的吡啶基;

和 / 或,

当 Y 是取代或未取代的亚甲基时,所述的“取代的亚甲基”为吡咯烷基取代的亚甲基;

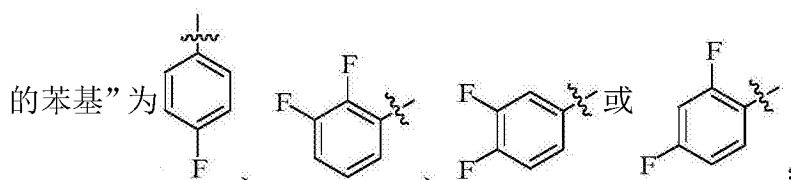
当 Y 是 $C_5 \sim C_6$ 的环烷基时,所述的“ C_6 的环烷基”为环己基;

和 / 或,

当 Y 是杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基时,所述的“杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基”为吡咯烷基或哌啶基。

5. 如权利要求 4 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物,其特征在于:

当所述的 Ar 是被一个或多个氟原子取代的苯基时,所述的“被一个或多个氟原子取代



和 / 或,

当所述的 Ar 是被一个或多个甲基取代的苯基时,所述的“被一个或多个甲基取代的苯基”为 4- 甲基苯基;

和 / 或,

当所述的 Ar 是被一个或多个氰基取代的苯基时,所述的“被一个或多个氰基取代的苯基”为 2- 氰基苯基;

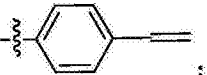
和 / 或,

当所述的 Ar 是被一个或多个三氟甲基取代的苯基时,所述的“被一个或多个三氟甲基取代的苯基”为 4- 三氟甲基苯基;

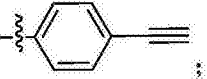
和 / 或,

当所述的 Ar 是被一个或多个甲氧基取代的苯基时,所述的“被一个或多个甲氧基取代的苯基”为 3- 甲氧基苯基;

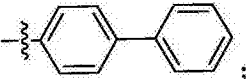
和 / 或,

当所述的 Ar 是被一个或多个乙烯基取代的苯基时,所述的“被一个或多个乙烯基取代的苯基”为  ;

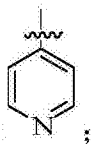
和 / 或,

当所述的 Ar 是被一个或多个乙炔基取代的苯基时,所述的“被一个或多个乙炔基取代的苯基”为  ;

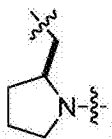
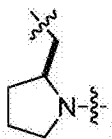
和 / 或,

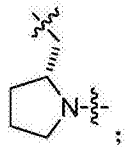
当所述的 Ar 是被一个或多个苯基取代的苯基时,所述的“被一个或多个苯基取代的苯基”为  ;

和 / 或,

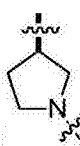
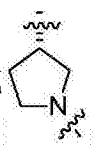
当所述的 Ar 是取代或未取代的吡啶基时,所述的“未取代的吡啶基”为  ;

和 / 或,

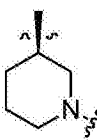
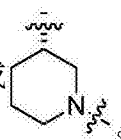
当 Y 是吡咯烷基取代的亚甲基时,所述的“吡咯烷基取代的亚甲基”为  或  ;





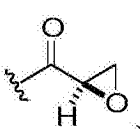
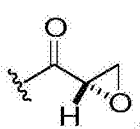
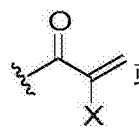
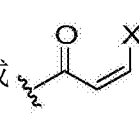
和 / 或,

当 Y 是吡咯烷基时,所述的“吡咯烷基”为  或  ;

和 / 或,

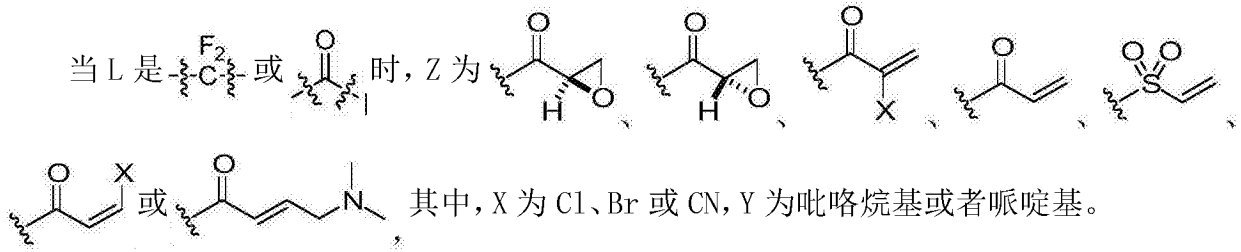
当 Y 是哌啶基时,所述的“哌啶基”为  或  ;

6. 如权利要求 1 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物,其特征在于:

当 L 是 O、S、 或  时,Z 为  或  或  或  , 其中,

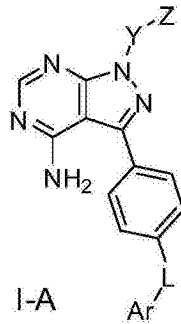
X 为 Cl、Br 或 CN, Y 为吡咯烷基或者哌啶基;

和 / 或,



7. 如权利要求 1 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物, 其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物, 其特征在于:

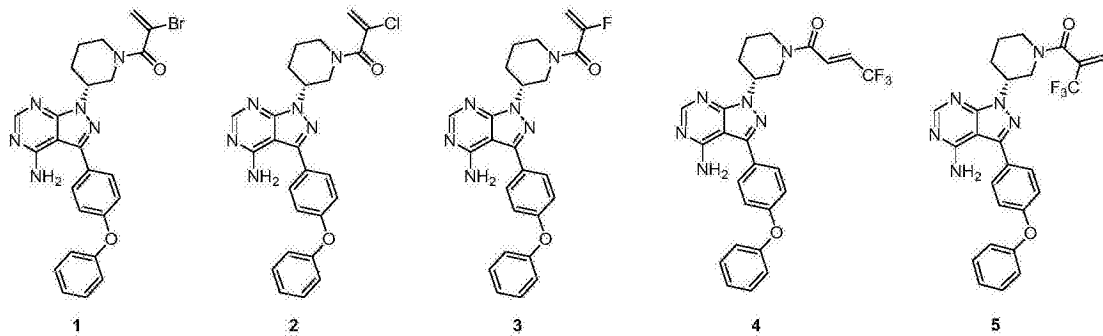
所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物, 为如式 I-A 所示的化合物:

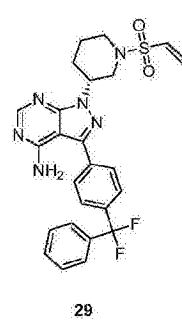
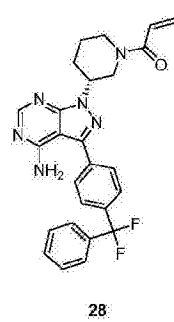
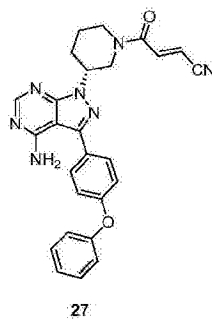
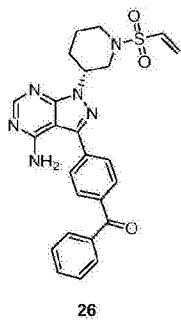
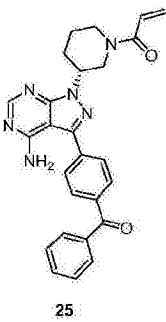
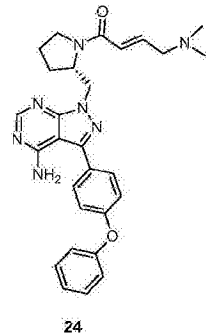
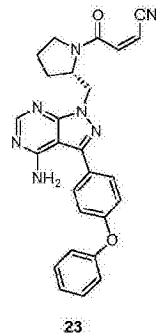
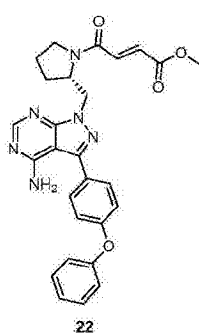
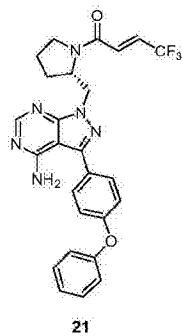
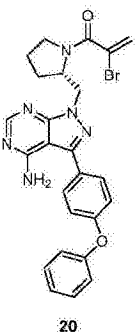
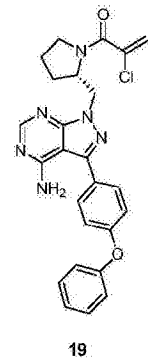
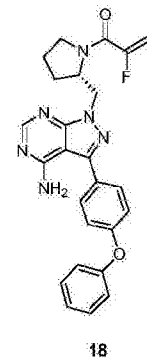
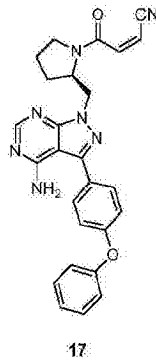
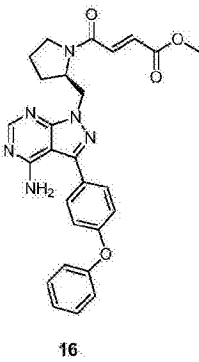
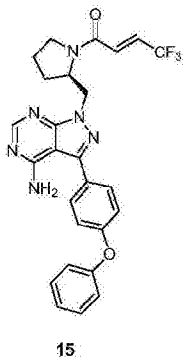
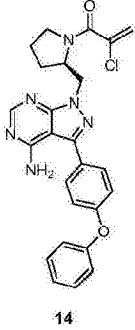
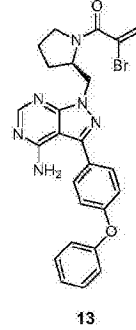
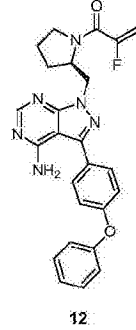
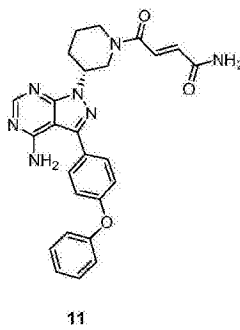
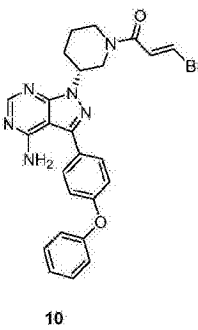
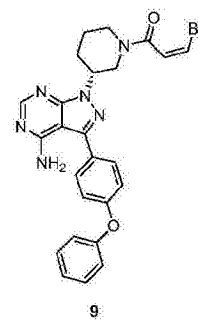
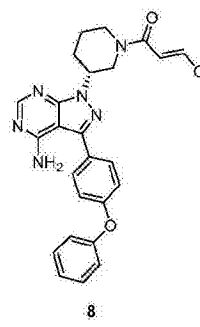
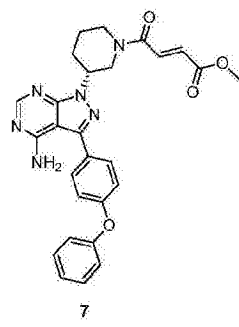
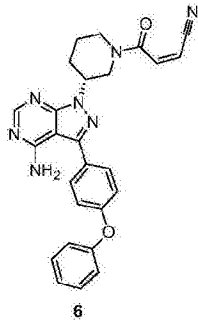


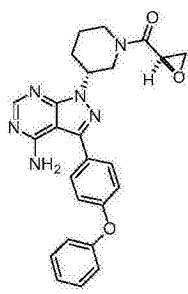
其中, Ar 的定义如权利要求 1 ~ 5 任一项所述, L 的定义如权利要求 1 或 6 所述, Y 的定义如权利要求 1 ~ 6 任一项所述, Z 的定义如权利要求 1、2 或 6 任一项所述, V 的定义如权利要求 1 或 2 所述。

8. 如权利要求 7 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物, 其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物, 其特征在于:

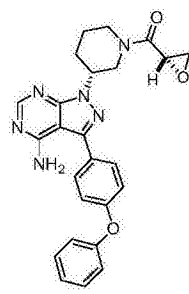
本发明中, 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物, 为如下任一化合物:



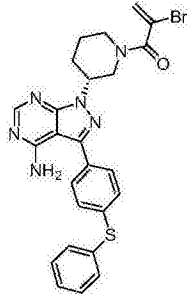




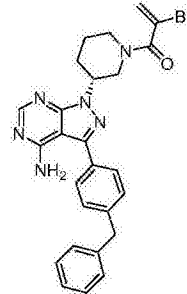
30



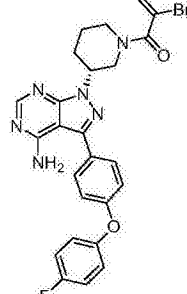
31



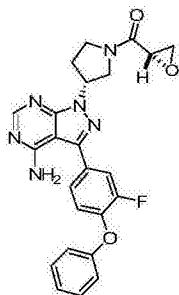
32



33



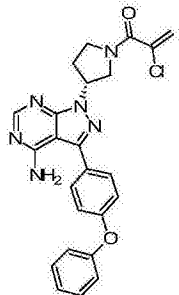
34



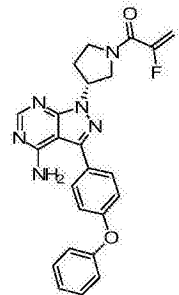
35



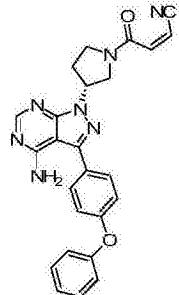
36



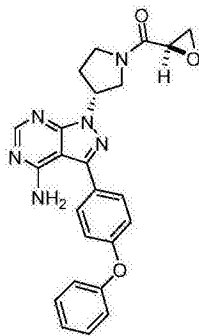
37



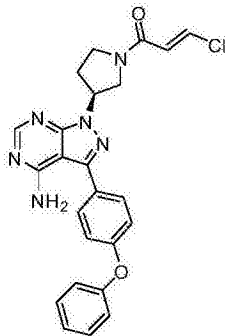
38



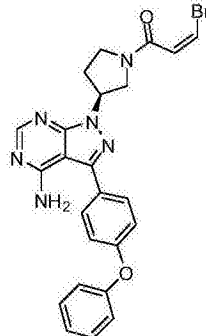
39



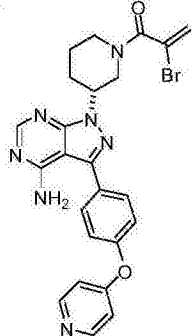
40



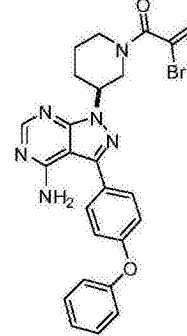
41



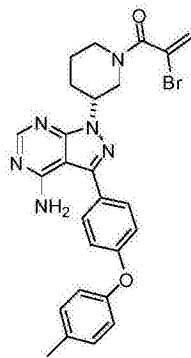
42



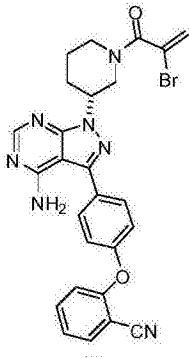
43



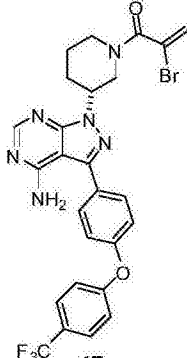
44



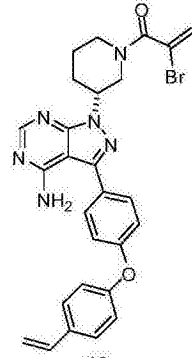
45



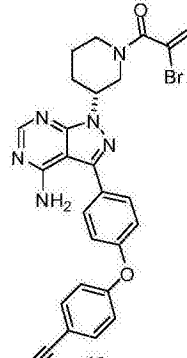
46



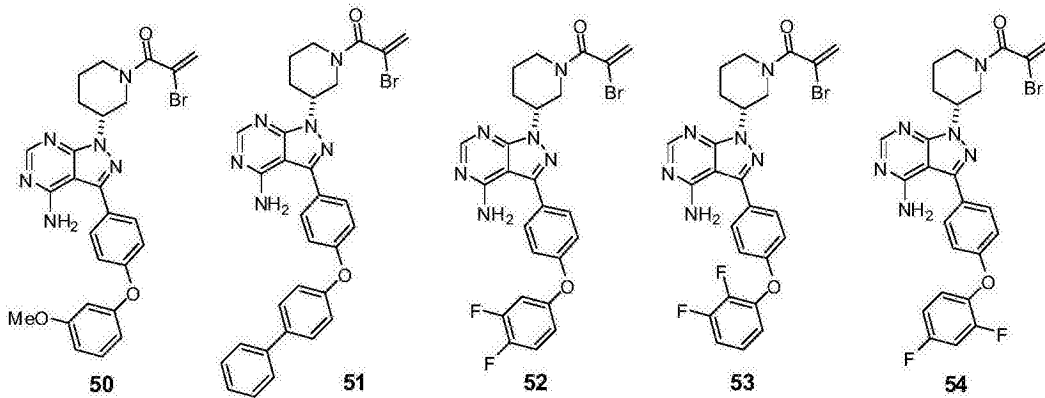
47



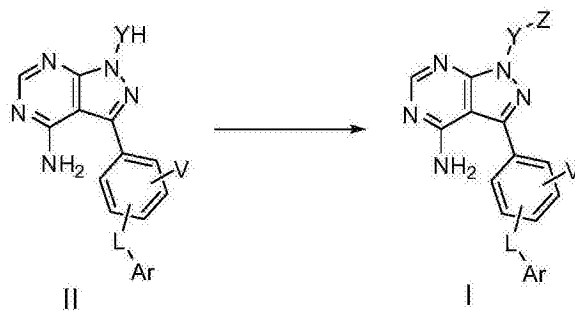
48



49



9. 如权利要求 1 ~ 8 任一项所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物的制备方法, 其特征在于其包括以下步骤: 将化合物 II 与酸 ZOH 进行偶联反应, 得到如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物即可;



其中, Ar 的定义如权利要求 1 ~ 5 任一项所述, L 的定义如权利要求 1 或 6 所述, Y 的定义如权利要求 1 ~ 6 任一项所述, Z 的定义如权利要求 1、2 或 6 任一项所述, V 的定义如权利要求 1 或 2 所述。

10. 如权利要求 1 ~ 8 任一项所述的如式 I 所示的任一化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体、溶剂合物、活性代谢产物及前体药物在制备药物中的用途, 单独给药, 或者与其它治疗剂联合用药。

11. 如权利要求 1 ~ 8 任一项所述的如式 I 所示的任一化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体、溶剂合物、活性代谢产物及前体药物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗 / 或预防哺乳动物的与化合物用于抑制布鲁顿氏酪氨酸激酶活性或用于治疗受益于布鲁顿氏酪氨酸激酶活性抑制的疾病、病症或病状的用途。

12. 权利要求 10 ~ 11 所述的用途, 其所述的抑制布鲁顿酪氨酸激酶活性用于治疗癌症, 包括但不限于实体肿瘤和血液癌症。

13. 权利要求 10 ~ 11 所述的用途, 其所述的抑制布鲁顿酪氨酸激酶活性用于治疗炎症性疾病或疾病状态、免疫类疾病或疾病状态、过度增生类疾病或疾病状态以及变性类疾病或疾病状态。

14. 一种药物组合物, 其包含活性化合物以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂; 所述的活性化合物为权利要求 1 ~ 8 任一项所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物, 其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物和前体药物中的一种或多种。

15. 如权利要求 14 所述的药物组合物, 其特征在于: 所述的药物组合物的剂型包括但不限于水成液分散体、自乳化分散体、固溶体、脂质体分散剂、气雾剂、固体剂型、散剂、即释

制剂、控释制剂、速溶制剂、片剂、胶囊剂、丸剂、缓释制剂、延释制剂、脉动释放制剂、多颗粒制剂和混合的即时和控释制剂。

吡唑并嘧啶衍生物、制备方法、药物组合物及用途

技术领域

[0001] 本发明具体涉及吡唑并嘧啶衍生物、制备方法、药物组合物及用途。

背景技术

[0002] 布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, Btk), 一种非受体酪氨酸激酶 Tec 家族的成员, 是在除了 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞之外的所有造血细胞类型中表达的关键信号酶。Btk 在连接细胞表面 B 细胞受体 (B-cell receptor, BCR) 刺激至下游细胞内应答的 B 细胞信号传导途径中扮演至关重要的角色。

[0003] Btk 是 B 细胞发育、激活、信号传导和存活的关键调节物 (Kurosaki, *Curr Op Imm*, 2000, 276-281; Schaeffer 和 Schwartzberg, *Curr Op Imm* 2000, 282-288)。另外, Btk 在众多其它造血细胞信号传导途径中起作用, 例如在巨噬细胞中的 Toll 样受体 (Toll likereceptor, TLR) 和细胞因子受体介导的 TNF- α 产生、在肥大细胞中的免疫球蛋白 E 受体 (Fc ϵ RI) 信号传导、在 B- 谱系淋巴样细胞中抑制 Fas/APO-1 细胞凋亡的信号传导以及胶原刺激的血小板聚集。参见例如 C. A. Jeffries 等 (2003), *Journal of Biological Chemistry* 278 :26258-26264; N. J. Horwood 等 (2003), *The Journal of Experimental Medicine* 197 :1603-1611; Iwaki 等 (2005), *Journal of Biological Chemistry* 280(48) : 40261-40270; Vassilev 等 (1999), *Journal of Biological Chemistry* 274(3) :1646-1656; Quek 等 (1998), *Current Biology* 8(20) :1137-1140。

[0004] 目前 BTK 靶向性抑制剂已开始用于肿瘤治疗, 但其抑制活性和药效还不够显著, 临床上需要使用较大剂量, 常见副作用包括血小板减少、腹泻、中粒细胞减少症、贫血和上呼吸道感染等, 因而仍然需要进一步研发活性或药理学特性较之更好的化合物, 作为更新的、改进的或更高效的 BTK 受体抑制剂, 从而能够更深入地了解该类药物与 BTK 靶蛋白之间的关系以及发挥其抗肿瘤作用机理, 这些对肿瘤临床治疗都具有非常重要的意义。

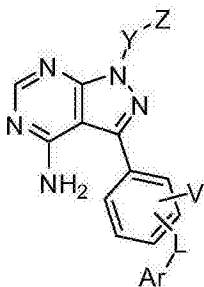
发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是为了克服现有技术中布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂的生物活性和药效不够明显、使用剂量较大、副作用大等缺陷而提供了吡唑并嘧啶衍生物、制备方法、药物组合物及用途。本发明的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物对布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 具有良好的抑制活性, 尤其对肿瘤细胞的生长具有良好的体内体外抑制活性, 有良好的市场化前景。

[0006] 本发明人通过深入研究发现, 式 I 结构的吡唑并嘧啶衍生物具有有效的 Btk 不可逆抑制作用。

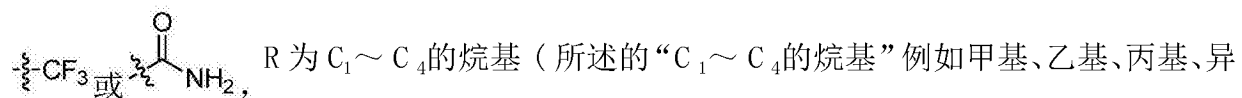
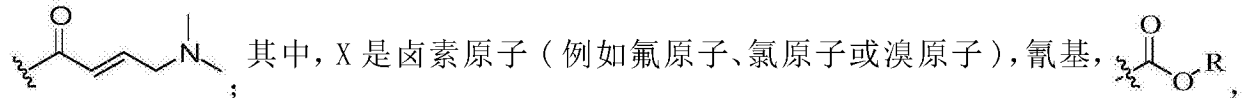
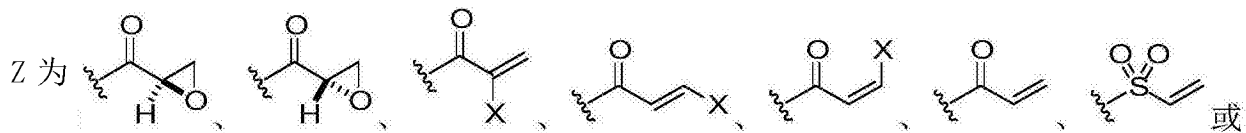
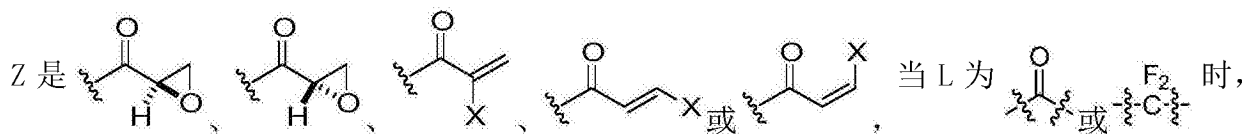
[0007] 本发明提供了一种如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物, 其立体异构体、溶剂合物、药学上可接受的盐、活性代谢产物或前体药物,

[0008]



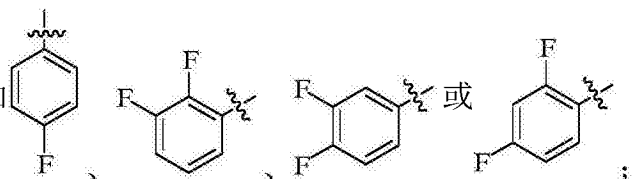
I

[0009] 其中:L是O、S、 $\text{-}\overset{\text{H}_2}{\text{C}}\text{-}$ 、 $\text{-}\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{-}$ 、 $\text{-}\overset{\text{H}}{\text{N}}\text{-}$ 或 $\text{-}\overset{\text{F}_2}{\text{C}}\text{-}$, 当L为O、S、 $\text{-}\overset{\text{H}_2}{\text{C}}\text{-}$ 或 $\text{-}\overset{\text{H}}{\text{N}}\text{-}$ 时,

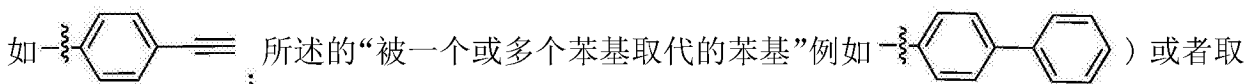
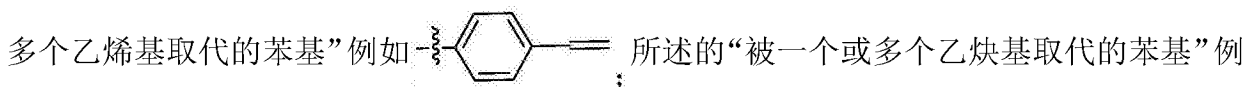


[0010] Ar是取代或未取代的芳基(优选“取代或未取代的C₅~C₁₀的芳基”;所述的“取代或未取代的C₅~C₁₀的芳基”优选取代或未取代的苯基;所述的“取代的苯基”可以为被一个或多个氟原子取代的苯基、被一个或多个甲基取代的苯基、被一个或多个氰基取代的苯基、被一个或多个三氟甲基取代的苯基、被一个或多个甲氧基取代的苯基、被一个或多个乙炔基取代的苯基、被一个或多个乙炔基取代的苯基, 或者被一个或多个苯基取代的苯基;所

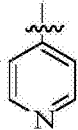
述的“被一个或多个氟原子取代的苯基”例如



所述的“被一个或多个甲基取代的苯基”例如4-甲基苯基;所述的“被一个或多个氰基取代的苯基”例如2-氰基苯基;所述的“被一个或多个三氟甲基取代的苯基”例如4-三氟甲基苯基;所述的“被一个或多个甲氧基取代的苯基”例如3-甲氧基苯基;所述的“被一个或多个乙炔基取代的苯基”例如



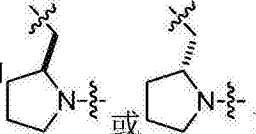
代或未取代的杂芳基（所述的“取代或未取代的杂芳基”优选杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_9$ 的杂芳基；所述的“杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_9$ 的杂芳基”优选杂原子为氮原子、杂原子数为 1 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_5$ 的杂芳基，所述的“杂原子为氮原子、杂原子数为 1 个的取代或未取代的 $C_3 \sim C_5$

的杂芳基”优选取代或未取代的吡啶基；所述的“未取代的吡啶基”例如 )；所述的“取

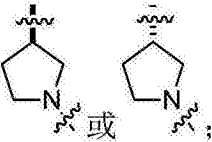
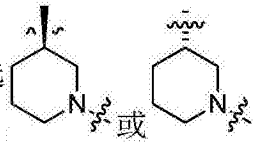
代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基”中所述的“取代”是指被一个或多个选自卤素原子（例如氟原子、氯原子或溴原子）、氰基、取代或未取代的烷基（优选取代或未取代的 $C_1 \sim C_4$ 的烷基，所述的“未取代的烷基 $C_1 \sim C_4$ 的烷基”优选甲基，所述的“取代的 $C_1 \sim C_4$ 的烷基”优选三氟甲基）、烷氧基（优选 $C_1 \sim C_4$ 的烷氧基，所述的“ $C_1 \sim C_4$ 的烷氧基”优选甲氧基）、烯基（优选 $C_2 \sim C_4$ 的烯基，所述的“ $C_2 \sim C_4$ 的烯基”优选乙烯基）、炔基（优选 $C_2 \sim C_4$ 的炔基，所述的“ $C_2 \sim C_4$ 的炔基”优选乙炔基）和芳基（优选 $C_5 \sim C_{10}$ 的芳基，所述的“ $C_5 \sim C_{10}$ 的芳基”优选苯基）的取代基所取代，所述的“取代或未取代的烷基”中所述的“取代”是指被一个或多个卤素原子（例如氟原子、氯原子或溴原子）所取代（所述的“取代的烷基”优选三氟甲基），当存在多个取代基时，所述的取代基可以相同或不同；

[0011] V 是氢或氟原子；


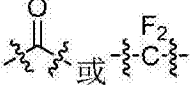

[0012] Y 是取代或未取代的亚烷基（优选取代或未取代的 $C_1 \sim C_6$ 的亚烷基，所述的“取代或未取代的 $C_1 \sim C_6$ 的亚烷基”优选取代或未取代的亚甲基，所述的“取代的亚甲基”优

选吡咯烷基取代的亚甲基；所述的“吡咯烷基取代的亚甲基”例如 )、环烷

基（优选 $C_4 \sim C_7$ 的环烷基，所述的“ $C_4 \sim C_7$ 的环烷基”优选 $C_5 \sim C_6$ 的环烷基；所述的“ C_6 的环烷基”例如环己基）或杂环烷基（优选杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基，所述的“杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基”优选杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基；所述的“杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基”优选吡咯烷基或者哌啶基；所述的“吡咯

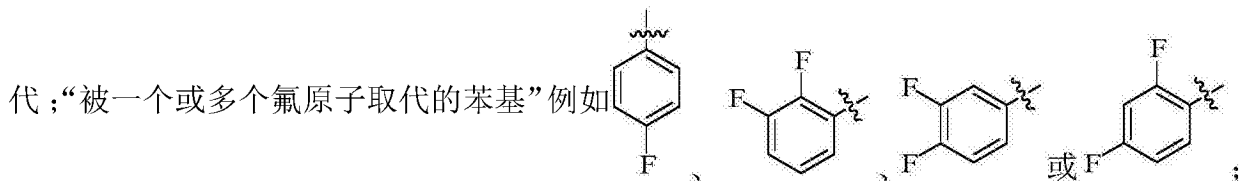
烷基”优选  所述的“哌啶基”优选 )；所述的“取代或未取

代的亚烷基”中所述的取代是指被“杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 $C_4 \sim C_7$ 的杂环烷基”（优选杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基，所述的“杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 $C_4 \sim C_5$ 的杂环烷基”为吡咯烷基）、 $C_1 \sim C_6$ 的烷氧基、 $C_1 \sim C_6$ 的烷硫基和 $C_1 \sim C_6$ 的烷氨基中的一个或多个所取代。

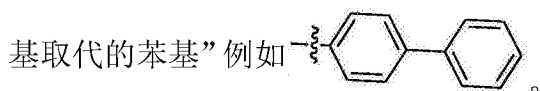
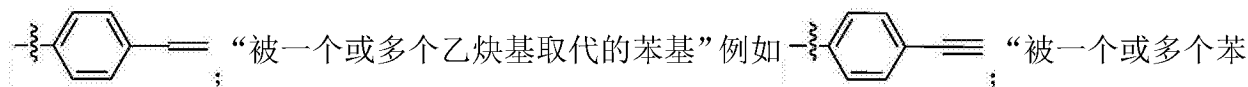
[0013] 本发明中，所述的 L 优选 O、S、 或 ，进一步优选 O、S 和 。

[0014] 本发明中，所述的 Ar 优选取代或未取代的芳基，所述的“取代或未取代的芳基”优

选“取代或未取代的 C₅~C₁₀的芳基”；所述的“取代或未取代的 C₅~C₁₀的芳基”优选取代或未取代的苯基；所述的“取代的苯基”优选被一个或多个选自氟原子、氯原子、溴原子、三氟甲基、氰基、甲基、甲氧基、乙烯基 ($\text{---}\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$)、乙炔基 ($\text{---}\text{C}\equiv\text{CH}$) 和苯基的取代基所取代；

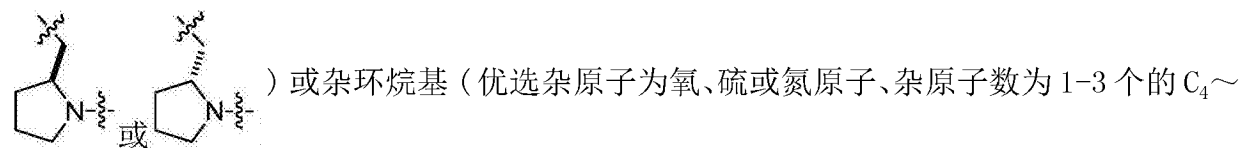


“被一个或多个甲基取代的苯基”例如 4-甲基苯基；“被一个或多个氰基取代的苯基”例如 2-氰基苯基；“被一个或多个三氟甲基取代的苯基”例如 4-三氟甲基苯基；“被一个或多个甲氧基取代的苯基”例如 3-甲氧基苯基；“被一个或多个乙烯基取代的苯基”例如

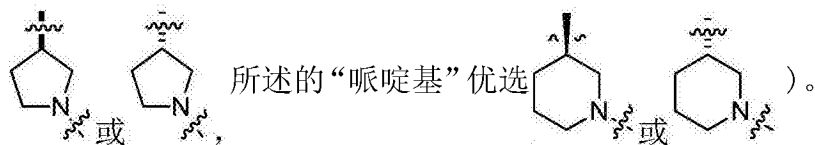


[0015] 本发明中,所述的 V 优选为氢。

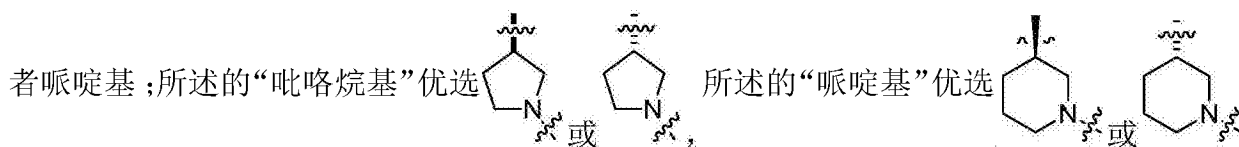
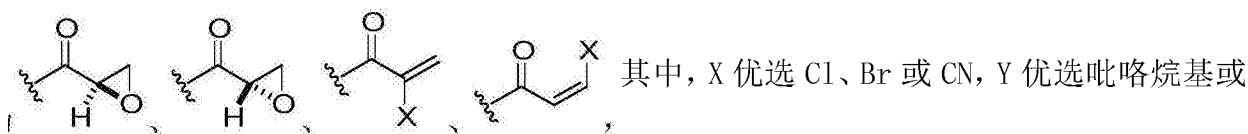
[0016] 本发明中,所述的 Y 优选取代或未取代的亚烷基 (优选取代或未取代的 C₁~C₆的亚烷基,所述的“取代或未取代的 C₁~C₆的亚烷基”优选取代或未取代的亚甲基,所述的“取代的亚甲基”优选吡咯烷基取代的亚甲基;所述的“吡咯烷基取代的亚甲基”例如



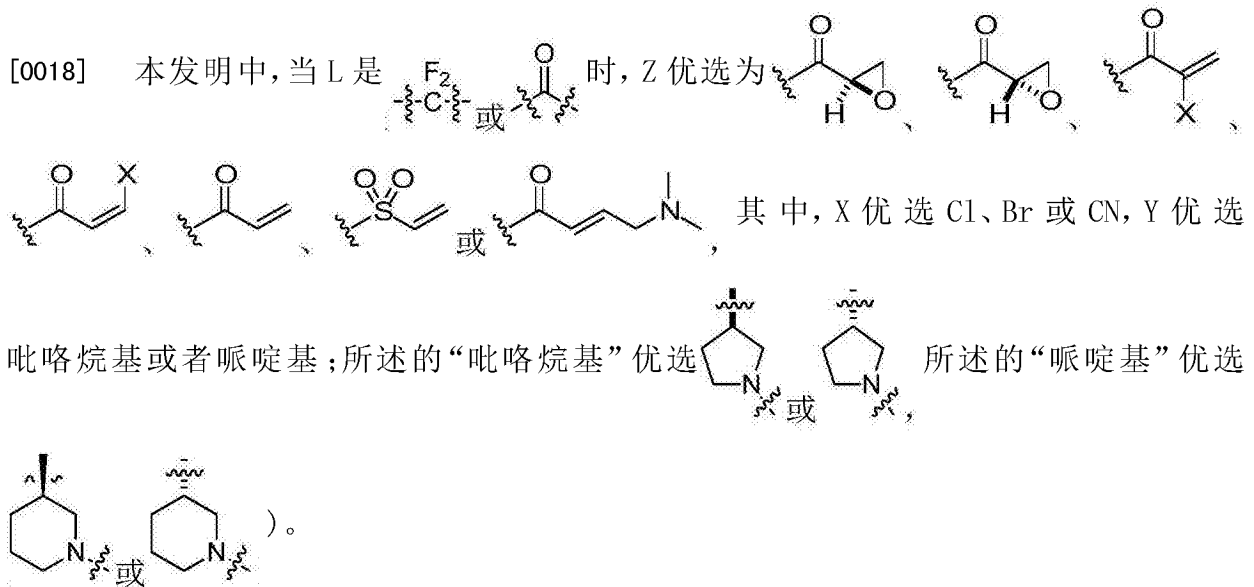
C₇的杂环烷基,所述的“杂原子为氧、硫或氮原子、杂原子数为 1-3 个的 C₄~C₇的杂环烷基”优选杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 C₄~C₅的杂环烷基;所述的杂原子为氮原子、杂原子数为 1-2 个的 C₄~C₅的杂环烷基优选吡咯烷基或者哌啶基;所述的“吡咯烷基”优选



[0017] 本发明中,当 L 是 O、S、 $\text{---}\overset{\text{H}_2}{\text{C}}\text{---}$ 或 $\text{---}\overset{\text{H}}{\text{N}}\text{---}$ 时, Z 优选为

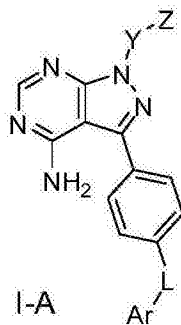


)。



[0019] 本发明中,所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,优选如式 I-A 的化合物:

[0020]



[0021] 其中, Ar、L、Y、Z 和 V 的定义均同上所述。

[0022] 本发明中,所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物,进一步优选如下任一化合物:

[0023] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 1);

[0024] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-氯丙-2-烯-1-酮(化合物 2);

[0025] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-氟丙-2-烯-1-酮(化合物 3);

[0026] (R,E)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-4,4,4-三氟-丁-2-烯-1-酮(化合物 4);

[0027] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-三氟甲基丙-2-烯-1-酮(化合物 5);

[0028] (R,Z)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物 6);

[0029] (R,E)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-4-氧代丁-2-烯酸甲酯(化合物 7);

- [0030] (R,E)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-3-氯丙-2-烯-1-酮(化合物8)；
- [0031] (R,Z)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-3-溴丙-2-烯-1-酮(化合物9)；
- [0032] (R,E)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-3-溴丙-2-烯-1-酮(化合物10)；
- [0033] (R,E)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-4-氧代丁-2-烯酰胺(化合物11)；
- [0034] (R)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-2-氟丙-2-烯-1-酮(化合物12)；
- [0035] (R)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物13)；
- [0036] (R)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-2-氯丙-2-烯-1-酮(化合物14)；
- [0037] (R,E)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-4,4,4-三氟丁-2-烯-1-酮(化合物15)；
- [0038] (R,E)-4-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯酸甲酯(化合物16)；
- [0039] (R,Z)-4-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物17)；
- [0040] (S)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-2-氟丙-2-烯-1-酮(化合物18)；
- [0041] (S)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-2-氯丙-2-烯-1-酮(化合物19)；
- [0042] (S)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物20)；
- [0043] (S,E)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-4,4,4-三氟丁-2-烯-1-酮(化合物21)；
- [0044] (S,E)-4-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯酸甲酯(化合物22)；
- [0045] (S,Z)-4-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物23)；
- [0046] (S,E)-1-[2-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]甲基]四氢吡咯-1-基]-4-(二甲氨基)丁-2-烯-1-酮(化合物24)；
- [0047] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]丙-2-烯-1-酮(化合物25)；
- [0048] (R)-[4-[4-氨基-1-(1-(乙烯砜)哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-基]苯基](苯基)甲酮(化合物26)；
- [0049] (R,E)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌

啉-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物 27)；

[0050] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-(二氟(苯基)甲基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]丙-2-烯-1-酮(化合物 28)；

[0051] (R)-3-[4-(二氟(苯基)甲基)苯基]-1-(1-(乙烯砜)哌啶-3-基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基(化合物 29)；

[0052] [(R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基]((R)-环氧乙烷-2-基)甲酮(化合物 30)；

[0053] [(R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基]((S)-环氧乙烷-2-基)甲酮(化合物 31)；

[0054] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯硫基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 32)；

[0055] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苄基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 33)；

[0056] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 34)；

[0057] [(R)-3-(4-氨基-3-(3-氟-4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基)四氢吡咯-1-基]((S)-环氧乙烷-2-基)甲酮(化合物 35)；

[0058] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 36)；

[0059] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-2-氯丙-2-烯-1-酮(化合物 37)；

[0060] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-2-氟丙-2-烯-1-酮(化合物 38)；

[0061] (R,Z)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物 39)；

[0062] [(R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基)四氢吡咯-1-基]((R)-环氧乙烷-2-基)甲酮(化合物 40)；

[0063] (S,E)-1-[3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基)四氢吡咯-1-基]-3-氯丙-2-烯-1-酮(化合物 41)；

[0064] (S,Z)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-3-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 42)；

[0065] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-(吡啶-4-氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 43)；

[0066] (S)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 44)；

[0067] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-对甲苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]-哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 45)；

[0068] (R)-2-[4-[4-氨基-1-[1-(2-溴丙烯酰基)哌啶-3-基]-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-3-基]苯氧基]苯腈(化合物 46)；

[0069] (R)-1-[-3-[4-氨基-3-(4-(4-三氟甲基苯氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物47);

[0070] (R)-1-[-3-[4-氨基-3-(4-(4-乙烯基苯氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物48);

[0071] (R)-1-[-3-[4-氨基-3-(4-(4-乙炔基苯氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物49);

[0072] (R)-1-[-3-[4-氨基-3-(4-(3-甲氧基苯氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物50);

[0073] (R)-1-[-3-[4-氨基-3-(4-(联苯-4-氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物51);

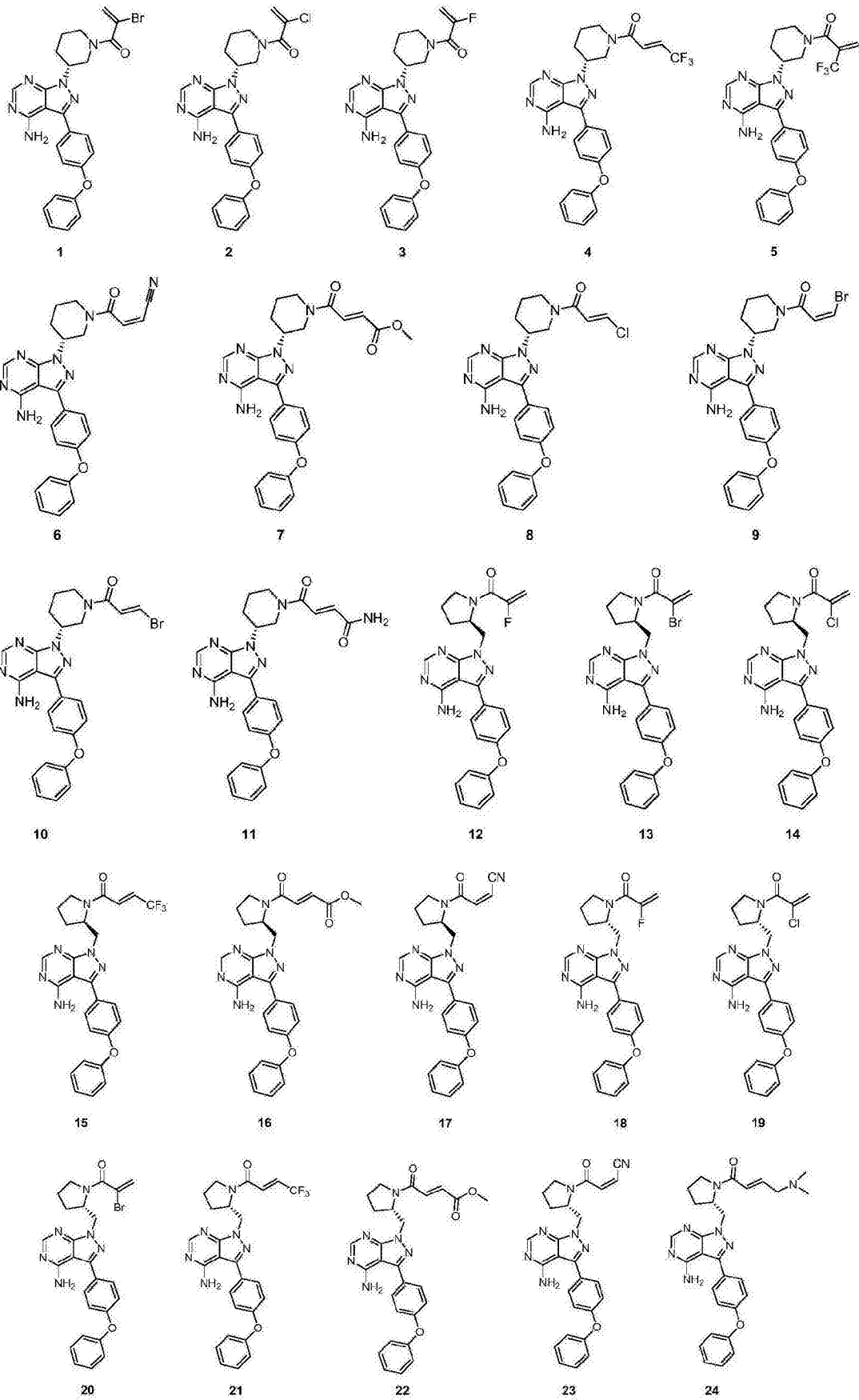
[0074] (R)-1-[-3-[4-氨基-3-(4-(3,4-二氟苯氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物52);

[0075] (R)-1-[-3-[4-氨基-3-(4-(2,3-二氟苯氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物53);

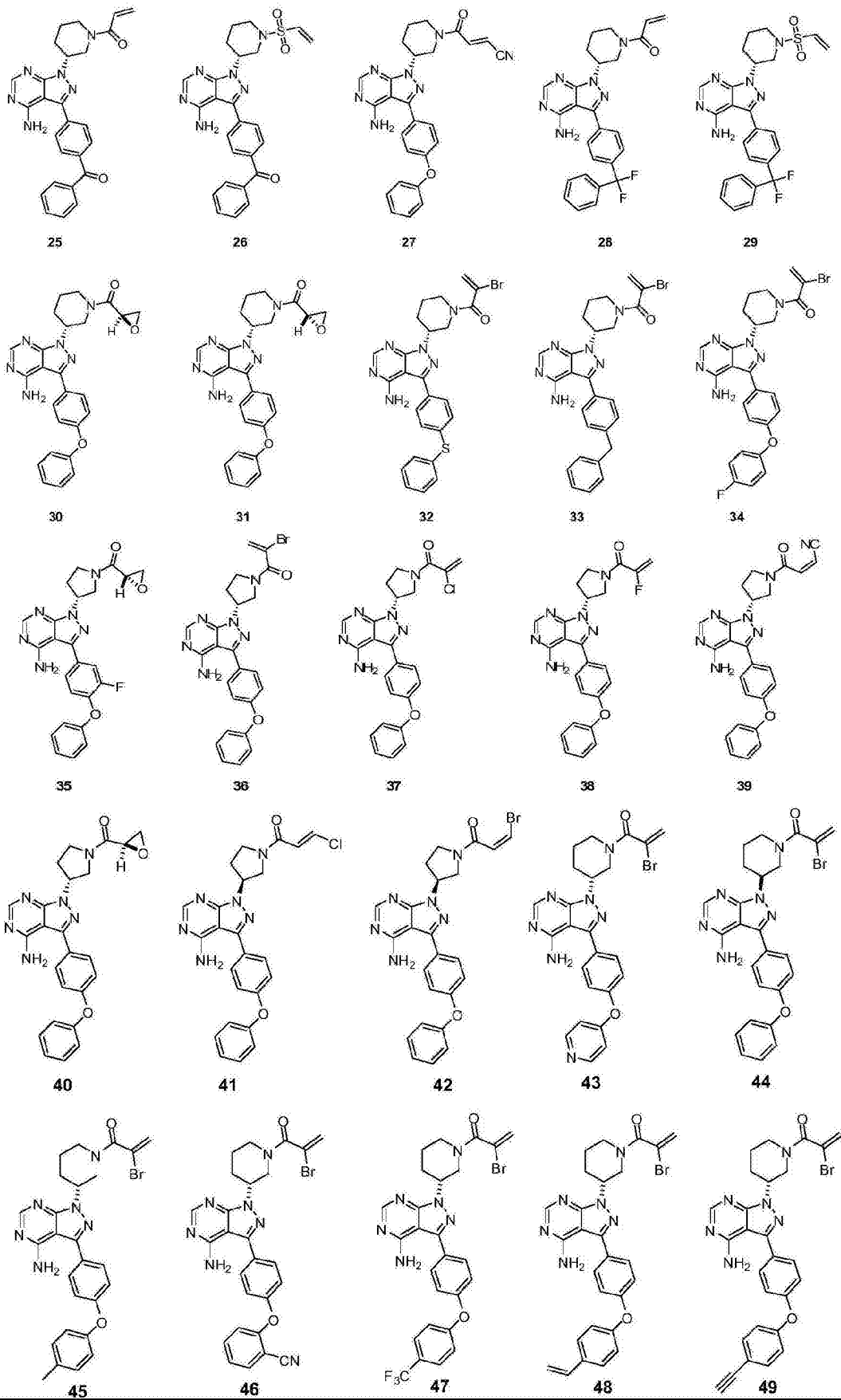
[0076] (R)-1-[-3-[4-氨基-3-(4-(2,4-二氟苯氧基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物54);

[0077] 其具体结构如下所示:

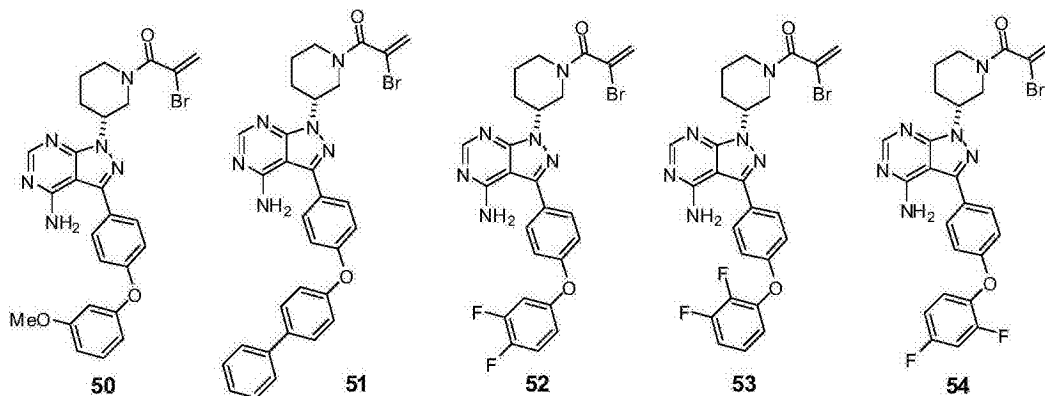
[0078]



[0079]



[0080]



[0081] 本发明中,所述的术语“烷基”为包括具有指定碳原子数目的支链或直链的饱和脂肪族烃基;如在“ C_1-C_{10} 烷基”中定义为包括在直链或者支链结构中具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或者10个碳原子的基团。例如,“ C_1-C_{10} 烷基”具体包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基和癸基等。

[0082] 本发明中,所述的术语“烷氧基”表示烷基与氧原子连接后的生成基团,即“ $RO-$ ”,R为烷基。

[0083] 本发明中,所述的术语“烷硫基”表示烷基与硫原子连接后的生成基团,即“ $RS-$ ”,R为烷基。

[0084] 本发明中,所述的术语“烷氨基”表示“ NH_3 ”中的一个氢被烷基取代后的氨基。

[0085] 本发明中,所述的术语“亚烷基”(包括单独使用及包含在其它基团中时)意指包括1~20个碳原子的支链和直链的亚饱和脂肪族烃基,优选1~10个碳原子,更优选1~8个碳原子,比如亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚异丙基、亚正丁基、亚叔丁基、亚异丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基、亚癸基、亚(4,4-二甲基戊基)、亚(2,2,4-三甲基戊基)、亚十一烷基、亚十二烷基,及它们的各种异构体。

[0086] 本发明中,所述的术语“环烷基”指全碳单环或多环基团,优选3~20个碳所形成的1~3个环的环烷基,更优选3~10个碳,例如:环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸烷或环十二烷基。

[0087] 本发明中,所述的术语“杂环烷基”在此单独或作为另一个基团的一部分使用时,指包含1~4个杂原子(如氮、氧和硫中的一种或多种)的4~12元单环或多环基团,其中每个环可以含有一个或多个双键,但没有一个环具有完全共轭的 π 电子体系。此外,任何杂环烷基环可以稠合于环烷基、芳基、杂芳基或杂环烷基环上。在此定义范围内的杂环烷基包括但不限于:噁唑啉、氧环丁基、吡喃基、四氢吡喃基、氮杂环丁烷基、1,4-二噁烷基、六氢氮杂草基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、吗啉基、硫代吗啉基、二氢咪唑基、二氢吡啶基、二氢吡啶基、二氢咪唑基、二氢噁二唑基、二氢噁唑基、二氢吡嗪基、二氢吡唑基、二氢吡啶基、二氢嘧啶基、二氢吡咯基、二氢四唑基、二氢噻二唑基、二氢噻唑基、二氢噻吩基、二氢三唑基、二氢氮杂环丁烷基、四氢咪唑基和四氢噻吩基及其N-氧化物。杂环烷基可以经其中的碳原子或者杂原子与其他基团进行连接。

[0088] 本发明中,所述的术语“烯基”是指含有指定数目碳原子和至少一个碳碳双键的直链、支链或者环状非芳香烃基。优选存在一个碳碳双键,并且可以存在高达四个非芳香碳碳双键。由此,“ $C_2 \sim C_{12}$ 烯基”是指具有2~12个碳原子的烯基。“ $C_2 \sim C_4$ 烯基”是指具有

2~4个碳原子的烯基,包括乙烯基、丙烯基、2-甲基-丙烯基、1-丁烯基和2-丁烯基。烯基的直链、支链或者环部分可以含有双键。

[0089] 本发明中,所述的术语“炔基”是指含有指定数目碳原子和至少一个碳碳三键的直链、支链或者环状烃基。其中可以存在高达三个碳碳三键。由此,“C₂~C₁₂炔基”是指具有2~12个碳原子的炔基。“C₂~C₄炔基”是指具有2~4个碳原子的炔基,包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基和2-丁炔基等。

[0090] 本发明中,所述的术语“芳基”是指任何稳定的在各环中可高达7个原子的单环或者双环碳环,其中至少一个环是芳香环;上述芳基单元的实例包括苯基、萘基、四氢萘基、2,3-二氢化茚基、联苯基、菲基、蒽基或者茚基(acenaphthyl)。可以理解,在芳基取代基是二环取代基,且其中一个环是非芳香环的情况下,连接是通过芳环进行的。

[0091] 本发明中,所述的术语“杂芳基”表示各环中可高达7个原子的稳定单环或者二环,其中至少一个环是芳香环并且含有1-4个选自O、N、和S的杂原子;在此定义范围内的杂环芳基包括但不限于:吡啶基、咪唑基、噁唑基、噻吩基、吡唑基、吡啶基、吡咯基、苯并三唑基、呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、噻啉基、异噻啉基、噁唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、四氢噻啉。正如以下杂环的定义一样,“杂环芳基”还应当理解为包括任何含氮杂芳基的N-氧化物衍生物。在其中杂环芳基取代基是二环取代基并且一个环是非芳香环或者不包含杂原子的情况下,可以理解,连接分别通过芳环或者通过包含环的杂原子进行。

[0092] 本发明中,所述的确定了碳数范围的“C_{x1-y1}”的烷基(x1和y1为整数)、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,如“C₁₋₁₂烷基”,均表示未包含取代基的C₁₋₁₂烷基。

[0093] 本发明中,所述的术语“卤素”表示氟、氯、溴、碘或砹。

[0094] 本发明中,所述的术语“氰基”表示 $\text{—}\overset{\ominus}{\text{C}}\text{N}^{\oplus}$ 。

[0095] 对于各个变量,上述基团的任意组合也在本文考虑之中。可以理解的是:本文所提供的化合物上的取代基和取代模式可以由本领域普通技术人员进行选择,以便提供化学上稳定的、且可以使用本领域已知的技术以及本文阐述的技术合成的化合物。

[0096] 使用本领域技术人员已知的标准合成技术或使用本领域已知的合成方法与本文描述的合成方法组合,可以合成如式I所示的吡啶并嘧啶衍生物中任一个的化合物。另外,本文给出的溶剂、温度和其它反应条件可以根据本领域技术而改变。作为进一步的指导,也可以利用以下的合成方法。

[0097] 在某些实施方式中,本文提供的是如式I所示的吡啶并嘧啶衍生物的制备方法及其使用方法。在某些实施方式中,本文描述的化合物可以使用以下合成的方案合成,也可以使用与下述类似的方法,通过选择适当的起始原料来合成目标化合物。

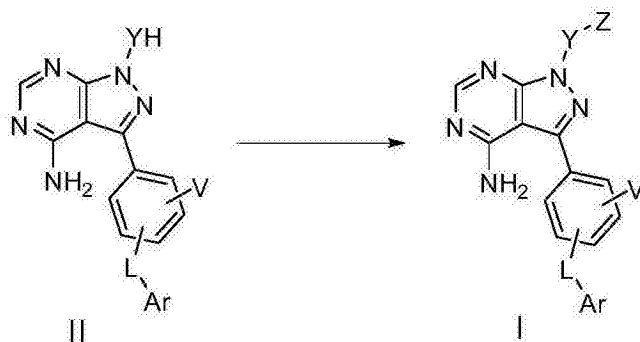
[0098] 用于合成本文描述的化合物的起始原料可以被合成或可以从商业来源获得。本文描述的化合物,和其它相关具有不同取代基的化合物可以使用本领域技术人员已知的技术和原料合成,例如在Paquette的《Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis》(Wiley 2009), March的《Advanced Organic Chemistry》第四版,(Wiley1992); Carey和Sundberg的《Advanced Organic Chemistry》第四版, A卷和B卷(Plenum 2000,2001); Green和Wuts的《Protective Groups in Organic Synthesis》第三版,(Wiley1999);

Fieser 和 Fieser 的《Reagents for Organic Synthesis》第 1-17 卷 (John Wiley and Sons, 1991);《Organic Reactions》第 1-40 卷 (John Wiley and Sons, 1991), 以及 Larock 的《Comprehensive Organic Transformations》(VCH Publishers Inc., 1999) (通过引用将其全部结合到本文中)。制备本文公开的化合物的一般方法可以来自本领域已知的反应, 并且该反应可以通过由本领域技术人员所认为适当的试剂和条件修改, 以合成目标化合物分子。以下的合成方法可以作为基础指导利用。

[0099] 每个反应结束后, 反应产物可以使用常规技术进行后处理 (分离和纯化), 包括但不限于过滤、蒸馏、结晶、色谱等方法。这些产物可以使用常规分析方法进行表征, 包括物理常数和图谱数据 (m. p、HPLC、LC-MS、NMR 和旋光度等)。本文描述的化合物可以使用本文描述的合成方法制备为单一异构体。

[0100] 本发明还提供了所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物的制备方法, 其采用以下步骤: 将化合物 II 与酸 ZOH 进行偶联反应, 得到如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物即可;

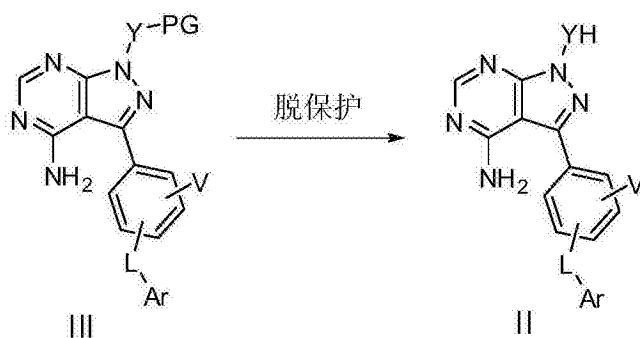
[0101]



[0102] 其中, Ar、L、Y、Z 和 V 的定义均同上所述; 所述的偶联反应可以采用本领域中该类反应的常规方法和条件。

[0103] 本发明中, 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物的制备方法, 其进一步包括以下步骤: 将化合物 III 与酸进行脱去保护基的反应, 得到所述的化合物 II 即可;

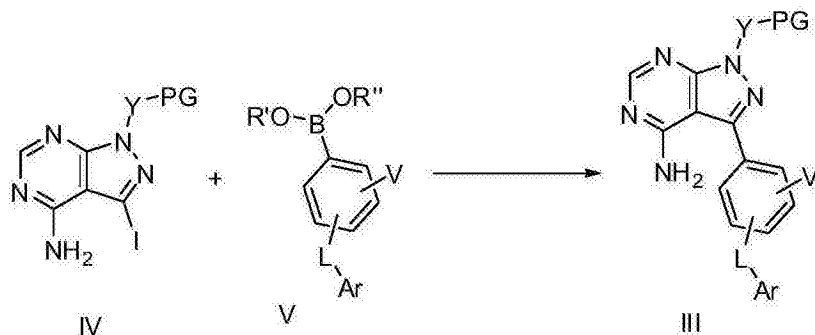
[0104]



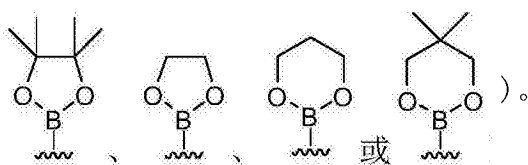
[0105] 其中, Ar、L、Y 和 V 的定义均同上所述; PG 为保护基团, 可以是 Boc (叔丁氧羰基)、Cbz (苄氧羰基) 或 Troc (三氯乙氧羰基), 优选 Boc (叔丁氧羰基)。所述的脱去保护基的反应可以采用本领域中该类反应的常规方法和条件。

[0106] 本发明中, 所述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物的制备方法, 其进一步包括以下步骤: 在钯催化下, 将化合物 IV 与化合物 V 进行 Suzuki 偶联反应, 得到所述的化合物 III 即可;

[0107]



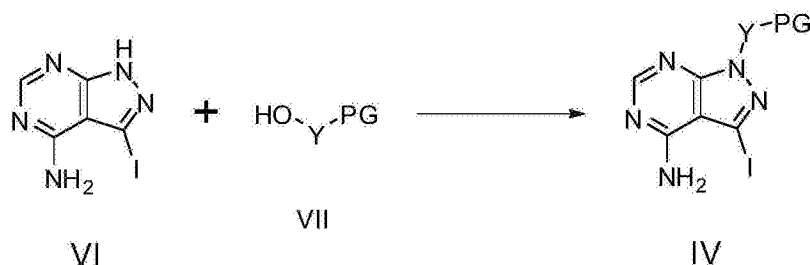
[0108] 其中, Ar、L、Y、V 和 PG 的定义均同上所述;R' 和 R" 各自独立的为 H 或烷基 (例如 C₁~C₄ 的烷基, 所述的“C₁~C₄ 的烷基”例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基;或者 R'、R" 以及他们之间的氧原子、硼原子共同形成环状结构 (例如



[0109] 所述的 Suzuki 偶联可以采用本领域中该类反应的常规方法和条件。

[0110] 本发明中, 所述的如式 I 所示的吡啶并嘧啶衍生物的制备方法, 其进一步包括以下步骤: 将化合物 VI 与化合物 V 进行 Mitsunobu 反应, 得到所述的化合物 IV 即可;

[0111]

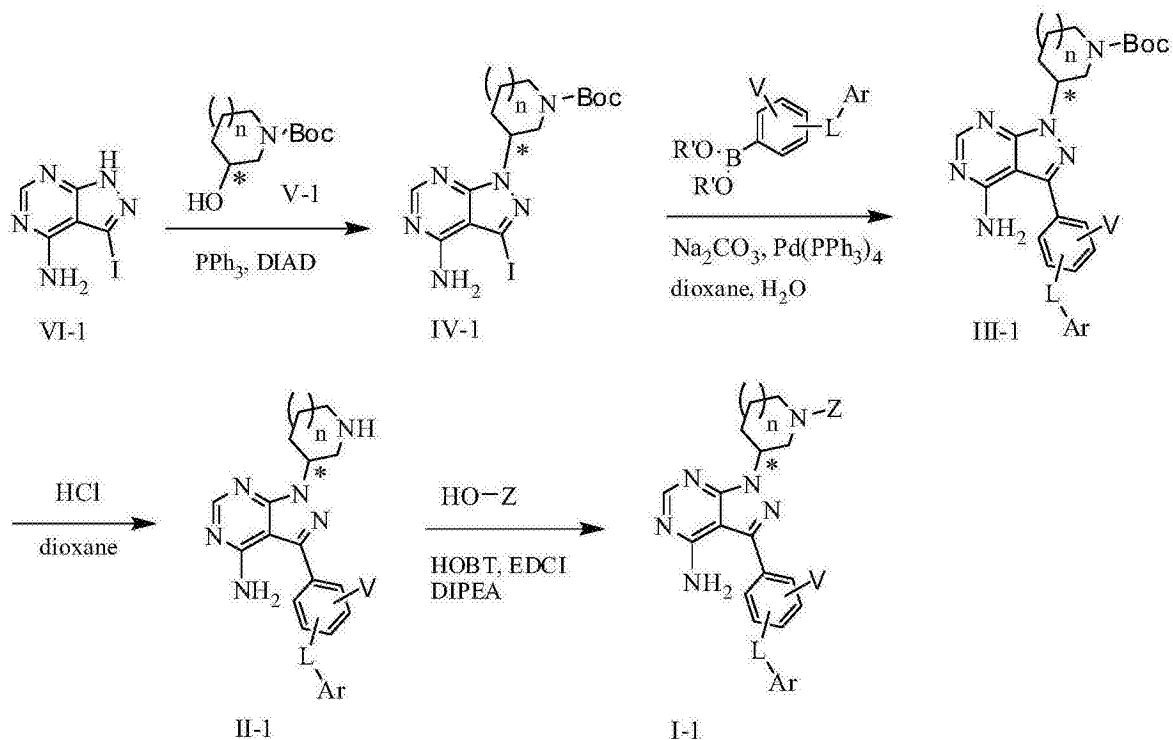


[0112] 其中, Y 的定义同上所述; 所述的 Mitsunobu 反应可以采用本领域中该类反应的常规方法和条件。

[0113] 本发明中, 所述的如式 I 所示的吡啶并嘧啶衍生物的制备方法, 例如方法 1 或方法 2,

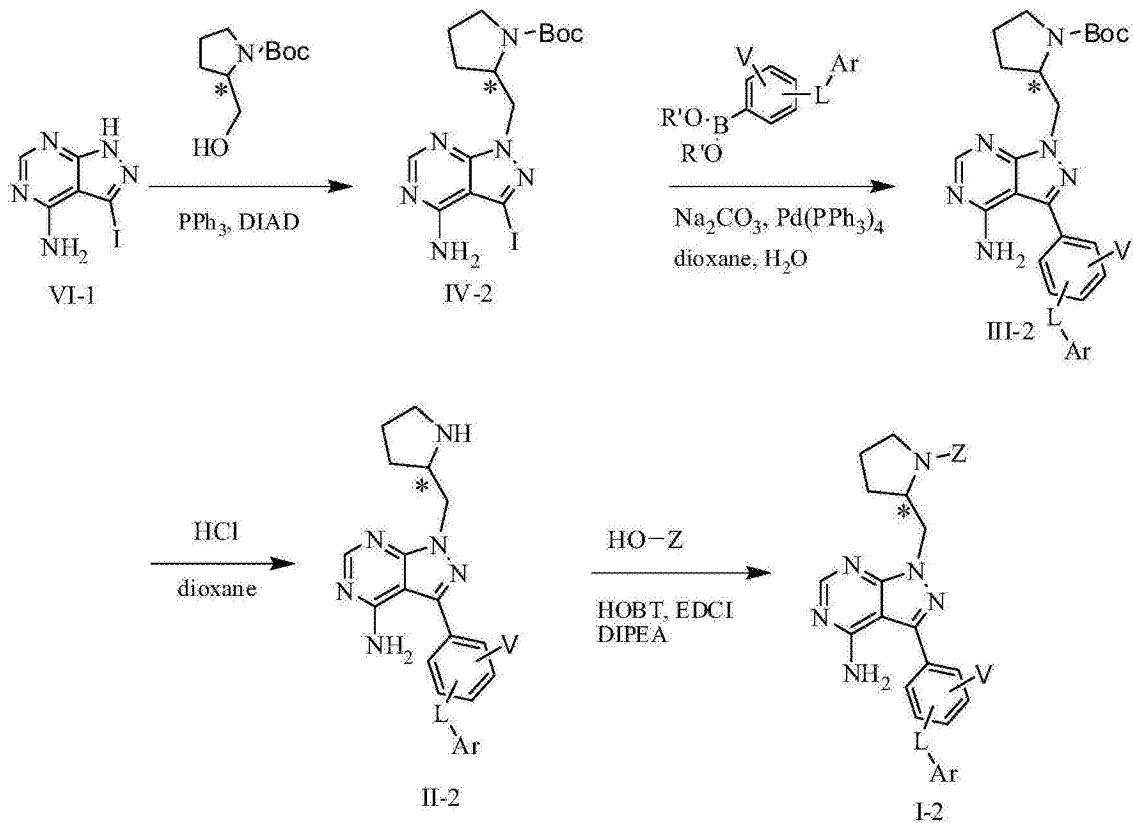
[0114] 方法 1 包括以下步骤: 3-碘-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物 VI-1) 通过 Mitsunobu 反应分别与 (R) 或 (S)-N-Boc-3-羟基哌啶、以及 (R) 或 (S)-N-Boc-3-羟基吡咯偶联, 得到 Boc 保护的中间体化合物 IV-1。然后, 适当取代的苯基硼酸在碱性条件下进行钯金属催化交叉偶联进行反应, 生成中间体化合物 III-1。用酸去保护后再与 Z 酸偶联, 从而完成合成得到目标化合物 I-1。

[0115]



[0116] 方法 2 包括以下步骤:3-碘-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺(化合物 VI-1)通过 Mitsunobu 反应与 (R) 或 (S)-N-Boc-脯氨酸偶联,得到 Boc 保护的中间体 IV-2。然后,适当取代的苯基硼酸在碱性条件下进行钯金属催化交叉偶联进行反应,生成中间体 III-2。用酸去保护后再与 Z 酸偶联,从而完成合成得到目标化合物 I-2。

[0117]



[0118] 使用本文描述的合成方法,以及本领域已知的那些方法,以好的收率和纯度获得

本文公开的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物。按照本文公开的方法制备的化合物通过本领域已知的常规方法纯化,例如过滤、重结晶、色谱、蒸馏及其组合。

[0119] 本发明还提供了所述的如式 I 所示的任一化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体、溶剂合物、活性代谢产物及前体药物在制备药物中的用途,可以单独给药,或者与其它治疗剂联合用药。所述的药物用于治疗 and / 或预防哺乳动物(包括人)的与抑制布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)活性或用于治疗受益于布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)活性抑制的疾病、病症或病状。所述的药物可以单独给药,或者与其它治疗剂联合用药。联合用药包括但不限于阿霉素、更生霉素、博来霉素、长春碱、顺铂、阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿考达唑;阿克罗宁;阿多来新;阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸阿美葱醌;氨鲁米特;安吡啶;阿那曲唑;安曲霉素;门冬酰胺酶;曲林菌素;阿扎胞苷;阿扎替派;阿佐霉素;巴马司他;苯佐替派;比卡鲁胺;盐酸比生群;二甲磺酸双奈法德;比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素 C;卡鲁唑酮;卡醋胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;克拉屈滨;甲磺酸克立那托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎呱宁;甲磺酸地扎呱宁;地吡酮;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸曲他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;氯苯乙酰胺;盐酸法倔唑;法扎拉滨;芬维 A 胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷嗪酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸伊达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;白细胞介素 II(包括重组白细胞介素 II 或 rIL2)、干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -1a;干扰素 γ -1b;异丙铂;盐酸伊立替康;醋酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索葱醌;马索罗酚;美登素;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美仑孕酮;美法仑;美诺立尔;巯嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啶;美妥替派;米丁度胺;米托卡星;丝裂红素;米托洁林;米托马星;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托葱醌;麦考酚酸;诺考达唑;诺拉霉素;奥马铂;奥昔舒仑;培门冬酶;培利霉素;奈莫司汀;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗葱醌;普卡霉素;普洛美坦;吡吩姆钠;紫菜霉素;泼尼莫司汀;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑咪啉;利波腺苷;洛太米特;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;磷乙酰天冬氨酸钠;司帕霉素;盐酸锗螺胺;螺莫司汀;链黑菌素;链佐星;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;替加氟;盐酸替洛葱醌;替莫泊芬;替尼泊苷;替罗昔隆;鞣内酯;硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤、塞替派;噻唑咪林;替拉扎明;枸橼酸托瑞米芬;醋酸曲托龙;醋酸 7-甲诺酮;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;葡萄糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;尿嘧啶氮芥;乌瑞替派;代普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春西醇;长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星、米托葱酮、紫杉醇、丙卡巴肼、赛替派、血管生成抑制剂、喜树碱、地塞米松、阿司匹林、乙酰氨基酚、吡咪美辛、布洛芬、酮洛芬、美洛昔康、皮质类固醇和肾上腺皮质类固醇。

[0120] 本发明中,所述的受益于布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)活性抑制的疾病、病症或病状包括但不限于癌症、炎症性疾病或疾病状态、免疫类疾病或疾病状态、过度增生类疾病或

疾病状态以及变性类疾病或疾病状态。

[0121] 本发明中,所述的炎症性疾病或疾病状态、免疫类疾病或疾病状态包括但不限于哮喘症、炎症性肠病(包括克隆氏病及溃疡性结肠炎)、阑尾炎、眼睑炎、细支气管炎、支气管炎、滑囊炎、宫颈炎、胆管炎、胆囊炎、结肠炎、结膜炎、膀胱炎、泪腺炎、皮炎、皮肤炎、脑炎、心内膜炎、子宫内膜炎、肠炎、小肠结肠炎、上髌炎、附睾炎、筋膜炎、纤维组织炎、胃炎、胃肠炎、肝炎、化脓性汗腺炎、喉炎、乳腺炎、脑膜炎、脊髓炎、心肌炎、肌炎、肾炎、卵巢炎、睾丸炎、骨炎、耳炎、胰腺炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、肋膜炎、静脉炎、肺炎(pneumonitis 或 pneumonia)、直肠炎、前列腺炎、肾盂肾炎、鼻炎、输卵管炎、窦炎、口炎、滑膜炎、腱炎、扁挑体炎、葡萄膜炎、阴道炎、血管炎、外阴炎、HIV、成人呼吸窘迫综合症、骨吸收病、慢性阻塞性肺病、慢性肺炎、炎性皮肤病、特异性皮炎、囊性纤维变性、败血症性休克、脓毒症、内毒素性休克、血液动力性休克、脓毒病综合症、局部缺血后再灌注损伤、银屑病、纤维变性疾病、恶病质、移植物抗宿主疾病的移植排斥、自身免疫病、异种免疫病状或疾病、辐射损伤、哮喘、富氧性肺损伤、微生物感染和微生物感染综合症。

[0122] 所述的自身免疫疾病,包括但不限于类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、骨关节炎、斯提耳病、幼年型关节炎、狼疮、糖尿病、重症肌无力、桥本氏甲状腺炎、奥德氏甲状腺炎、格雷夫斯病、干燥综合征、多发性硬化、格林-巴利综合征、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森氏病、眼球斜视痉挛综合征、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、自身免疫性肝炎、腹部疾病、古德帕斯彻氏综合征、特发性血小板减少性紫癜、视神经炎、硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、莱特尔氏综合征、高安动脉炎、颞动脉炎、温抗体型自身免疫性溶血性贫血、韦格纳氏肉芽肿病、牛皮癣、全身毛发脱落、贝切特氏病、慢性疲劳、自主神经机能异常、子宫内膜异位症、间质性膀胱炎、神经性肌强直、硬皮病及外阴痛。

[0123] 所述的异种免疫病状或疾病,包括但不限于移植物抗宿主疾病、移植、输血、过敏反应、过敏症(例如,对植物花粉、胶乳、药物、食物、昆虫毒素、动物毛发、动物皮屑、尘螨或蟑螂等过敏)、I型超敏反应、过敏性结膜炎、过敏性鼻炎及特应性皮炎。

[0124] 本发明中,所述的癌症包括但不限于头部癌、甲状腺癌、颈癌、眼癌、皮肤癌、口腔癌、咽喉癌、食道癌、胸癌、骨癌、血癌、骨髓癌、肺癌、结肠癌、乙状结肠癌、直肠癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、脑癌、肠癌、心脏癌、肾上腺癌、皮下组织癌、淋巴癌、色素瘤、恶性神经胶质瘤、B细胞增生性疾病。所述的B细胞增生性疾病例如弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤/瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞性骨髓瘤、浆细胞瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤/白血病或淋巴瘤样肉芽肿病。

[0125] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含活性化合物以及任选地,一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂;所述的活性化合物为所述的如式I所示的吡唑并嘧啶衍生物、其药学上可接受的盐、其立体异构体、溶剂合物、活性代谢产物和前体药物中的一种或多种。

[0126] 所述的药物组合物可以使用一种或多种药学上可接受的载体以常规的方式配制,所述载体包括赋形剂和辅料,其有利于将活性化合物加工为可以药用的制剂。适当的制剂

取决于选择的给药途径。任何熟知的技术、载体和赋形剂可以被适当使用,并且如本领域所理解的。

[0127] 本发明中所述的药物组合物是指本文描述的化合物例中任一个的化合物与其它化学组分例如载体、稳定剂、抗氧化剂、崩解剂、稀释剂、分散剂、填充剂、矫味剂、悬浮剂、助流剂、增溶剂、表面活性剂、湿润剂、增稠剂和 / 或赋形剂形成的混合物。所述的药物组合物有利于活性化合物给予生物体。在实践本文提供的治疗或使用方法中,以药物组合物将治疗有效量的本文描述的活性化合物给予患有待治疗的疾病、障碍或病症的哺乳动物。优选地,所述哺乳动物是人。治疗有效量可以变化很大,取决于疾病的严重程度、受治疗者的年龄和相对健康状况、使用的化合物的功效等其它因素。所述的活性化合物可以单独使用或者与作为混合物的组分的一种或多种治疗药联合使用。

[0128] 药物组合物将包括至少一种本文描述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物中的一个化合物,以游离酸或游离碱的形式作为活性成分,或以药物可接受的盐形式作为活性成分。另外,本文描述的方法和药物组合物包括使用 N-氧化物、晶体形式(也称为多晶型)、以及这些具有相同类型的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物的活性代谢物。在一些情况下,如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物可以互变异构体存在。所有的互变异构体包括在本文提供的化合物的范围内。另外,本文描述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物能以非溶剂化物以及溶剂化物的形式与药物可接受的溶剂如水、乙醇等一起存在。本文提供的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物的溶剂化物形式也被认为在此公开。

[0129] 本发明描述的药物组合物可以通过多种给药途径给予受治疗者,所述给药途径包括但不限于口服、肠胃外(例如静脉内、皮下、肌肉)、鼻内、口腔含化、局部、直肠或经皮给药途径。本发明描述的药物组合物的剂型包括但不限于水成液分散体、自乳化分散体、固溶体、脂质体分散剂、气雾剂、固体剂型、散剂、即释制剂、控释制剂、速溶制剂、片剂、胶囊剂、丸剂、缓释制剂、延释制剂、脉动释放制剂、多颗粒制剂和混合的即时和控释制剂。

[0130] 用于口服的药物制剂可以通过将一种或多种固体赋形剂与一种或多种本文描述的化合物混合而获得,任选地磨碎得到的混合物,如果需要,在加入合适的辅料后进行混合物制粒,以获得片剂或锭剂芯。合适的赋形剂包括例如填充剂如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;等等,例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP 或聚维酮)或磷酸钙。如果需要,可以加入崩解剂,例如交联交联羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐如海藻酸钠。

[0131] 可以口服使用的药物制剂包括由明胶制造的推入式胶囊、以及由明胶和增塑剂例如甘油或山梨醇制造的软的密封胶囊。所述推入式胶囊能包含活性成分,其混合于填料如乳糖、粘合剂如淀粉和 / 或润滑剂如滑石粉或硬脂酸镁,和任选的稳定剂。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬浮在合适的液体中,例如脂肪油、液状石蜡或液体聚乙二醇。另外,可以加入稳定剂。用于口服给药的所有制剂应该是适合这种给药的剂型。

[0132] 在一些实施方式中,本文公开的固体剂型可以片剂形式(包括混悬片剂、速溶片剂、咀嚼崩解片剂、速崩片剂、泡腾片剂或胶囊形片剂),丸剂、散剂(包括无菌包装的散剂,非必需散剂或泡腾散剂),胶囊剂(包括软胶囊剂或硬胶囊剂,例如用动物来源的明胶制造的胶囊或者用植物来源的 HPMC 制造的胶囊或“分散型胶囊”)、固体分散体、固溶体、生物可

蚀性剂型、控制释放制剂、脉动释放剂型、多颗粒剂型、小药丸、颗粒剂或气雾剂。在其它实施方式中,所述药物制剂是粉末形式的。在又一些实施方式,所述药物制剂是片剂形式的,包括但不限于速溶片剂。另外,本文描述的药物制剂可以作为单一胶囊剂或以多胶囊剂型用药。在一些实施方式中,药物制剂以两个、或三个、或四个胶囊剂或片剂用药。

[0133] 药物组合物将包括至少一种本文描述的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物中任一个的化合物的制剂,适合肌内、皮下或静脉内注射,可以包括生理可接受的无菌水或非水的溶液剂、分散体、混悬剂或乳剂、和无菌粉针剂,所述无菌粉针剂用于重新配制无菌注射溶液剂或分散体。合适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或溶媒的实例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油、克列莫(cremophor)等)、其合适的混合物、植物油(如橄榄油)和注射用有机酯如油酸乙酯。可以维持适当的流动性,例如通过使用包衣如卵磷脂;分散体时,通过维持所需的颗粒大小;和通过使用表面活性剂。适合用于皮下注射的制剂也可以包含添加剂如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂确保防止微生物生长,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸,等等。也可以根据需要,包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。延长可注射药物形式的吸收可以通过使用延迟吸收剂带来,例如单硬脂酸铝和明胶。

[0134] 本申请还涉及在制药领域中公知的用于包括眼内的、鼻内的和耳内的输送的各种药物组合物。药物配方包括所述的活性化合物的水性眼用溶液,其可以诸如滴眼剂的水溶性形式存在,或以结冷胶或水凝胶;眼用软膏;眼用混悬液,例如微粒,悬浮在液体载体介质中的包含药物的小聚合粒子,脂溶性制剂,和微球;以及眼用嵌入剂。为了稳定性和舒适性,这些合适的药物制剂最经常和优选地制造成无菌的、等渗的和缓冲的制剂。药物组合物也包括滴剂和喷雾剂,其常在许多方面模拟鼻分泌物来确保正常纤毛作用的维持。正如本领域的技术人员公知的那样,合适的制剂最常和优选地是等渗的,保持 pH 值 5.5 到 6.5 的轻度缓冲的,且最经常和优选地包括抗菌性防腐剂和适当的药物稳定剂。用于耳内转运的药物制剂包括悬浮液和在耳内局部应用的软膏。用于这些耳用制剂的普通溶剂包括甘油和水。可以经过口服、胃肠道外(静脉内、肌肉内、皮下等)、经肺部、局部、皮肤等给药方式施用于哺乳动物,例如人。本发明化合物的人剂量可以大约为 0.1mg 至大约 1000mg 范围。

[0135] 在不违背本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0136] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0137] 本发明中,室温指环境温度,为 10°C ~ 25°C。

[0138] 本发明的积极进步效果在于:本发明的如式 I 所示的吡唑并嘧啶衍生物对布鲁顿酪氨酸激酶具有良好的抑制作用,对肿瘤细胞的生长具有良好的体内体外抑制活性,有良好的市场化前景。

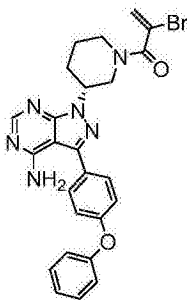
具体实施方式

[0139] 下面通过具体化合物制备实施例和生物学实例来进一步阐述该发明,这些实施例主要用于更详细的具体地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0140] 1. 化合物制备部分:

[0141] 实施例 1:(R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 1)的合成

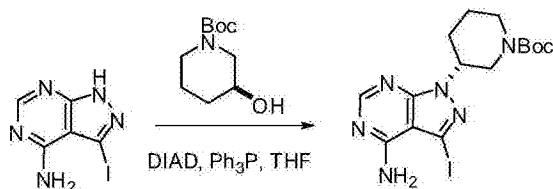
[0142]



[0143] 化合物 1

[0144] a. (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶的合成

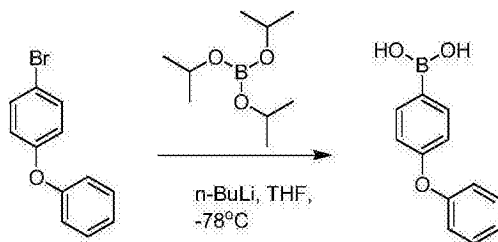
[0145]



[0146] 将 4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶(10g, 38mmol), (S)-1-Boc-3-羟基哌啶(17g, 85mmol), 三苯基膦(20g, 76mmol) 加入三口瓶中, 加入 THF(120ml), 降温至 0℃, 滴加偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD)(15.2g, 76mmol) 和四氢呋喃(THF)(30ml) 混合液, 约 1h 滴加完毕, 缓慢升至室温反应过夜。将反应液旋干, 加水, 乙酸乙酯萃取, 干燥, 浓缩后柱层析纯化得产物 (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶(13.5g, 收率 80%)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.38(s, 1H), 6.02(bs, 2H), 4.82-4.64(m, 1H), 4.31-4.02(m, 2H), 3.44-3.20(m, 1H), 2.95-2.65(m, 1H), 2.25-2.08(m, 2H), 1.95-1.58(m, 2H), 1.42(s, 9H)。

[0147] b. 4-苯氧基苯基硼酸的合成

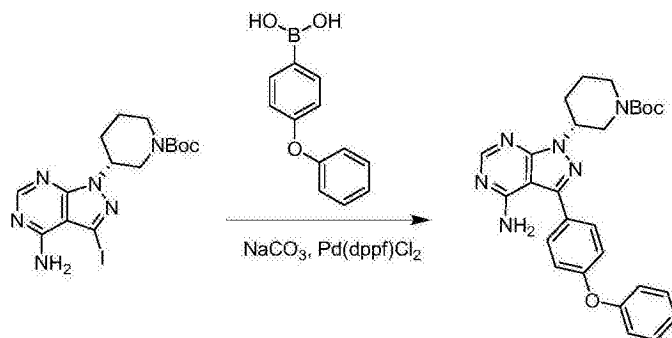
[0148]



[0149] 将 4-溴联苯醚(100g, 0.402mol) 溶于无水 THF(800mL) 中, 氮气保护下, 冷却至 -78℃, 滴加正丁基锂(n-BuLi)(177mL, 0.442mol), 温度保持 -65℃ 以下, 搅拌 1h 后, 继续保持温度 -60℃, 滴加硼酸三异丙酯(90g, 0.482mol), 缓慢升至 0℃, 搅拌 3h。冰浴下加入水(300mL) 搅拌过夜。反应液浓缩去除有机相, 用 12N 浓盐酸 PH 调至 1~2, 析出固体, 过滤干燥得产品(77g, 产率 90%)。¹H-NMR(d-DMSO, 400MHz, δ ppm): 8.0(s, 2H), 7.80(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.41(t, J = 7.6Hz, 2H), 7.16(t, J = 7.2Hz, 1H), 7.03(d, J = 8.4Hz, 2H), 6.94(d, J = 8.4Hz, 2H)。

[0150] c. (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶的合成

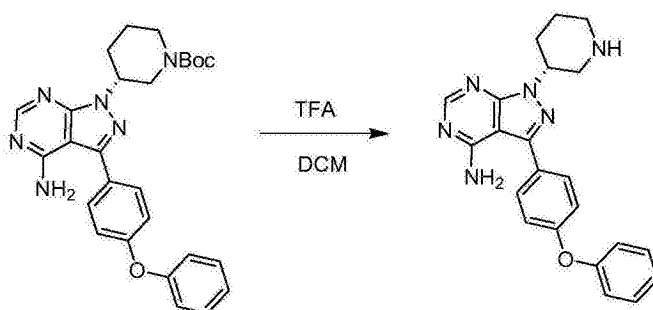
[0151]



[0152] 在三口瓶中加入 (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶 (12.8g, 29mmol), 4-苯氧基苯基硼酸 (6.8g, 32mmol), PdCl₂(dppf) (0.5g, 0.69mmol), 碳酸钠 (6.1g, 58mmol), 1,4-二氧六环 (160ml) 和水 (40ml), 氮气置换后, 升温至 80°C 反应过夜。点板确认反应完成后, 过滤, 旋干, 加水, 乙酸乙酯萃取, 干燥, 浓缩后柱层析纯化得产品 (8.5g, 产率 60%)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.38(s, 1H), 7.64(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.42-7.38(m, 2H), 7.24-7.04(m, 5H), 6.18(br, 2H), 4.86-4.81(m, 1H), 4.18-4.04(m, 1H), 3.72-3.68(m, 1H), 3.18-3.01(m, 1H), 2.84-2.78(m, 1H), 2.36-2.18(m, 1.5H), 2.08-1.84(m, 1.5H), 1.78-1.68(m, 1H), 1.44(s, 9H)。

[0153] d. (R)-3-(4-苯氧苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨的合成

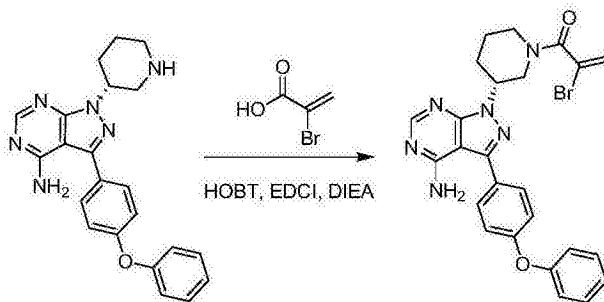
[0154]



[0155] 在反应瓶中, (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶 (8g, 16.4mmol) 加入到三氟乙酸 (40ml) 和二氯甲烷 (40ml) 混合溶液中, 室温反应过夜。点板 (TLC) 确认反应完成后, 用饱和 Na₂CO₃ 溶液中和至 pH 为 7-8 后, 用二氯甲烷 (DCM) 萃取, 有机相合并, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化得产品 (5.4g, 收率 85%)。¹H-NMR(d-DMSO, 400MHz, δ ppm): 8.25(s, 1H), 7.67(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.44(t, J = 8.4Hz, 2H), 7.17 ~ 7.30(m, 5H), 4.78(m, 1H), 3.31 ~ 3.40(m, 1H), 3.22 ~ 3.30(m, 1H), 3.17 ~ 3.21(m, 1H), 3.00 ~ 3.10(m, 1H), 2.60 ~ 2.75(m, 1H), 1.99 ~ 2.18(m, 2H), 1.59 ~ 1.83(m, 2H)。

[0156] (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮 (化合物 1)

[0157]



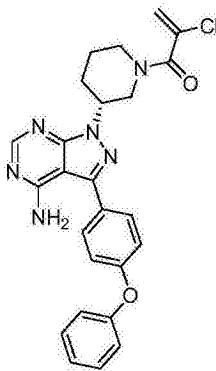
化合物 1

[0158] 将 (R)-3-(4-苯氧苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并 [3,4-D] 嘧啶-4-氨基 (193mg, 0.5mmol), 2-溴丙烯酸 (88mg, 0.58mmol), 1-羟基苯并三唑 (HOBT) (95mg, 0.7mmol) 和 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDCI) (134mg, 0.7mmol), 溶于无水 DCM (10ml) 中, 加入二异丙基乙胺 (DIEA) (271mg, 2.1mmol), 室温下搅拌 8h。加入乙酸乙酯稀释后水洗, 水相再用乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后, 浓缩柱层析纯化得化合物 1 (195mg, 产率 75%)。

[0159] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm): 8.38 (s, 1H), 7.64 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.46-7.38 (m, 2H), 7.22-7.16 (m, 3H), 7.08 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 6.08-6.02 (s, 1H), 5.92-5.86 (m, 1H), 4.94-4.98 (m, 1H), 4.66-4.64 (m, 0.5H), 4.48-4.52 (m, 0.5H), 4.14-4.11 (m, 0.5H), 3.96-3.99 (m, 0.5H), 3.78-3.76 (m, 0.5H), 3.54-3.50 (m, 0.5H), 3.24-3.21 (m, 0.5H), 2.94-2.90 (m, 0.5H), 2.38-2.34 (m, 2H), 2.08-2.04 (m, 1H), 1.86-1.82 (m, 1H)。

[0160] 实施例 2: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-氯丙-2-烯-1-酮 (化合物 2) 的合成

[0161]

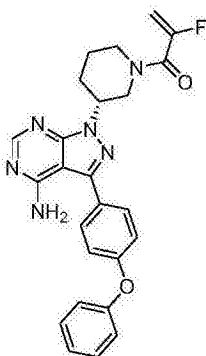


化合物 2

[0162] 与化合物 1 的制备类似的方法, 以 2-氯丙烯酸为原料, 可以制得化合物 2 (72% 产率)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm): 8.28 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 8\text{Hz}$, 2H), 7.41 (t, $J = 8\text{Hz}$, 2H), 7.24-7.08 (m, 5H), 5.71-5.64 (m, 2H), 4.98-4.90 (m, 1H), 4.72-4.66 (m, 0.5H), 4.58-4.52 (m, 0.5H), 4.18-4.12 (m, 0.5H), 3.99-3.95 (m, 0.5H), 3.80-3.78 (m, 0.5H), 3.57-3.52 (m, 0.5H), 3.33-3.28 (m, 0.5H), 2.96-2.90 (m, 0.5H), 2.42-2.25 (m, 2H), 2.09-2.01 (m, 1H), 1.85-1.77 (m, 1H)。

[0163] 实施例 3: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧

啉-1-基]哌啉-1-基]-2-氟丙-2-烯-1-酮(化合物3)的合成
[0164]

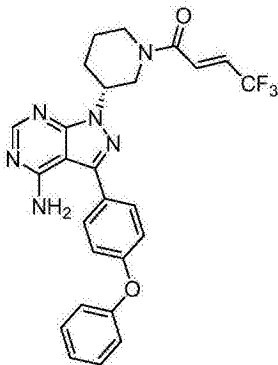


化合物 3

[0165] 与化合物 1 的制备类似的方法,以 2-氟丙烯酸为原料,可以制得化合物 3(68%产率)。¹H-NMR(CDCl₃,400MHz, δ ppm):8.28(s,1H),7.62(d,J=8Hz,2H),7.41(t,J=8Hz,2H),7.24-7.08(m,5H),5.71-5.64(m,2H),4.98-4.90(m,1H),4.72-4.66(m,0.5H),4.58-4.52(m,0.5H),4.18-4.12(m,0.5H),3.99-3.95(m,0.5H),3.80-3.78(m,0.5H),3.57-3.52(m,0.5H),3.33-3.28(m,0.5H),2.96-2.90(m,0.5H),2.42-2.25(m,2H),2.09-2.01(m,1H),1.85-1.77(m,1H)。

[0166] 实施例 4:(R,E)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啉-1-基]哌啉-1-基]-4,4,4-三氟-丁-2-烯-1-酮(化合物4)的合成

[0167]

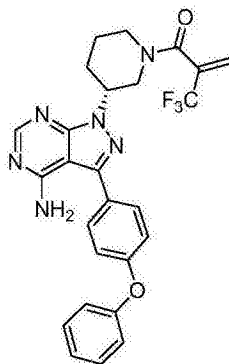


化合物 4

[0168] 与化合物 1 的制备类似的方法,以反式-4,4,4-三氟丁烯酸为原料,可以制得化合物 4(69%产率)。¹H-NMR(CDCl₃,400MHz, δ ppm):8.38(s,1H),7.64(d,J=8.4Hz,2H),7.38-7.34(m,2H),7.21-7.14(m,3H),7.08(d,J=8.4Hz,2H),7.03-6.95(m,1H),6.75-6.64(m,1H),5.53-5.51(br,2H),4.91-4.78(m,1.5H),4.41-4.36(m,0.5H),4.14-4.12(m,0.5H),3.96-3.92(m,0.5H),3.74-3.70(m,0.5H),3.52-3.48(m,0.5H),3.34-3.29(m,0.5H),3.26-3.18(m,0.5H),2.52-2.46(m,1H),2.32-2.22(m,1H),2.16-2.02(m,2H)。

[0169] 实施例 5:(R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啉-1-基]哌啉-1-基]-2-三氟甲基丙-2-烯-1-酮(化合物5)的合成

[0170]

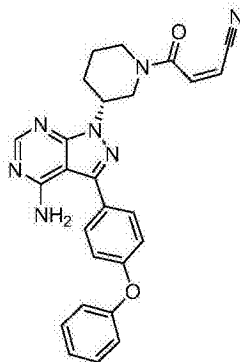


化合物 5

[0171] 与化合物 1 的制备类似的方法,以 2-(三氟甲基)丙烯酸为原料,可以制得化合物 5(58%产率)。¹H-NMR(CDCl₃,400MHz, δ ppm):8.34(s,1H),7.61(d,J=8.4Hz,2H),7.41-7.39(m,2H),7.20-7.14(m,3H),7.08(d,J=8.4Hz,2H),6.06-6.03(m,1H),5.73-5.69(m,1H),4.95-4.86(m,1H),4.80-4.61(m,1H),4.12-4.06(m,0.5H),3.92-3.84(m,0.5H),3.78-3.71(m,0.5H),3.61-3.52(m,0.5H),3.34-3.26(m,0.5H),2.98-2.88(m,0.5H),2.42-2.26(m,2H),2.08-2.01(m,1H),1.86-1.72(m,1H)。

[0172] 实施例 6:(R,Z)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物 6)的合成

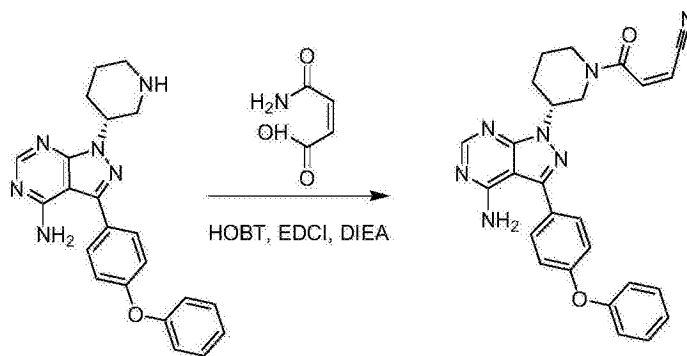
[0173]



化合物 6

[0174] a. (R,Z)-4-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)-1-哌啶基)-4-氧-2-丁烯腈的合成

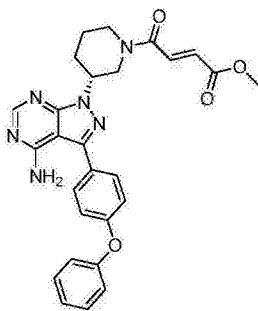
[0175]



[0176] 将 (R)-3-(4-苯氧苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨基 (193mg, 0.5mmol), 马来酰胺酸 (67mg, 0.58mmol), 1-羟基苯并三唑 (HOBT) (95mg, 0.7mmol) 和 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDCI) (134mg, 0.7mmol), 溶于无水 DCM (10ml) 中, 加入二异丙基乙胺 (DIEA) (271mg, 2.1mmol), 室温下搅拌 8h。加入乙酸乙酯稀释后水洗, 水相再用乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后, 浓缩柱层析纯化得化合物 6 (140mg, 产率 60%)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.34 (s, 1H), 7.61 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.41-7.37 (m, 2H), 7.20-7.14 (m, 3H), 7.08 (d, J = 8.0Hz, 2H), 6.99-6.93 (t, 1H, J = 11.6Hz), 5.77 (d, J₁ = 11.6Hz, 0.5H), 5.70 (d, J₁ = 11.6Hz, 0.5H), 4.93-4.89 (m, 1.5H), 4.46-4.42 (m, 0.5H), 4.00-3.86 (m, 1H), 3.52-3.51 (m, 0.5H), 3.50-3.48 (m, 0.5H), 3.33-3.31 (m, 0.5H), 3.18-3.12 (m, 0.5H), 2.48-2.36 (m, 2H), 2.12-2.07 (m, 1H), 1.86-1.78 (m, 1H)。ESI-MS (m/z): 466.2 [M+H]⁺。

[0177] 实施例 7: (R,E)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-4-氧代丁-2-烯酸甲酯 (化合物 7) 的合成

[0178]

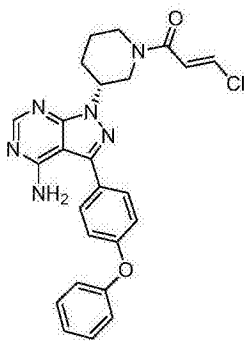


化合物 7

[0179] 与化合物 1 的制备类似的方法, 以富马酸单甲酯为原料, 可以制得化合物 7 (66% 产率)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.38 (s, 1H), 7.62 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.41-7.24 (m, 3H), 7.21-7.17 (m, 3H), 7.09 (d, J = 8.4Hz, 2H), 6.95 (d, J = 15.6Hz, 0.5H), 6.75 (d, J = 15.6Hz, 0.5H), 4.92-4.79 (m, 1.5H), 4.43-4.37 (m, 0.5H), 4.14-4.10 (m, 0.5H), 4.03-3.95 (m, 0.5H), 3.92-3.88 (m, 0.5H), 3.81 (s, 3H), 3.49-3.46 (m, 0.5H), 3.27-3.24 (m, 0.5H), 3.11-3.06 (m, 0.5H), 2.42-2.21 (m, 2H), 2.10-2.02 (m, 1H), 1.81-1.68 (m, 1H)。

[0180] 实施例 8: (R,E)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]-3-氯丙-2-烯-1-酮 (化合物 8) 的合成

[0181]

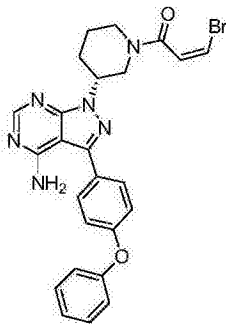


化合物 8

[0182] 与化合物 1 的制备类似的方法,以反-3-氯丙烯酸为原料,可以制得化合物 8(67% 产率)。¹H-NMR(d-DMSO, 400MHz, δ ppm): 8.42(s, 1H), 7.63(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.42-7.36(m, 2H), 7.29-7.12(m, 4H), 7.08(d, J = 8.4Hz, 2H), 6.76-6.66(m, 1H), 5.92-5.88(br, 2H), 4.87-4.84(m, 1.5H), 4.48-4.45(m, 0.5H), 4.12-4.08(m, 0.5H), 4.02-3.98(m, 0.5H), 3.87-3.84(m, 0.5H), 3.42-3.38(m, 0.5H), 3.28-3.12(m, 0.5H), 3.06-2.98(m, 0.5H), 2.42-2.33(m, 2H), 2.12-1.98(m, 2H)。

[0183] 实施例 9:(R,Z)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-3-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 9)的合成

[0184]

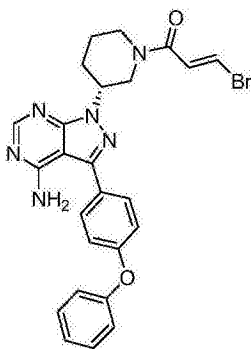


化合物 9

[0185] 与化合物 1 的制备类似的方法,以顺-3-溴丙烯酸为原料,可以制得化合物 9(63% 产率)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.39(s, 1H), 7.64(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.42-7.36(m, 2H), 7.20-7.16(m, 3H), 7.06(d, J = 8.4Hz, 2H), 6.84-6.78(m, 1H), 6.60(d, J = 8.0Hz, 0.5H), 6.53(d, J = 8.0Hz, 0.5H), 5.61-5.59(br, 2H), 4.95-4.92(m, 1.5H), 4.89-4.85(m, 0.5H), 4.18-4.06(m, 0.5H), 3.96-3.82(m, 1H), 3.48-3.42(m, 0.5H), 3.24-3.18(m, 0.5H), 2.98-2.94(m, 0.5H), 2.42-2.22(m, 2H), 2.06-1.98(m, 2H)。

[0186] 实施例 10:(R,E)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-3-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 10)的合成

[0187]

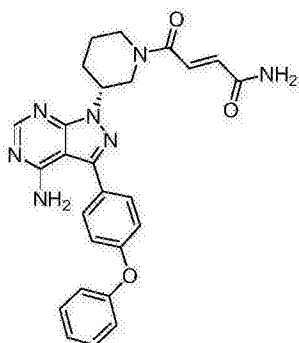


化合物 10

[0188] 与化合物 1 的制备类似的方法,以反-3-溴丙烯酸为原料,可以制得化合物 10(62%产率)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.40(s, 1H), 7.64(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.58-7.54(m, 1H), 7.46-7.38(m, 2H), 7.19-7.14(m, 3H), 7.08(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.02-6.90(m, 1H), 5.52-5.51(br, 2H), 4.87-4.68(m, 1.5H), 4.45-4.41(m, 0.5H), 4.06-4.02(m, 0.5H), 3.97-3.93(m, 0.5H), 3.87-3.84(m, 0.5H), 3.46-3.42(m, 0.5H), 3.32-3.21(m, 0.5H), 3.18-3.06(m, 0.5H), 2.44-2.41(m, 1H), 2.36-2.26(m, 1H), 2.03-1.96(m, 2H)。

[0189] 实施例 11:(R,E)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-4-氧代丁-2-烯酰胺(化合物 11)的合成

[0190]



[0191]

化合物 11

[0192] a. (E)-4-氨基-4-氧代-2-丁烯酸甲酯的合成

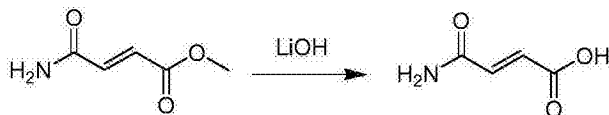
[0193]



[0194] 将富马酸单甲酯(15g, 115mmol)溶于甲苯 20ml 中,加入二氯亚砷(20ml),加热回流 4 小时,浓缩。冰浴下,将 NH₃的 THF 溶液(80ml)滴加到上述制备的酰氯中,滴加完毕,室温反应 1h。用柠檬酸水溶液洗涤至 pH 等于 6,乙酸乙酯萃取,有机相再用饱和 NaHCO₃洗涤,干燥,浓缩得到 (E)-4-氨基-4-氧代-2-丁烯酸甲酯(8.9g, 产率 60%)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 6.95(d, J = 15.2Hz, 1H), 6.84(d, J = 15.6Hz, 1H), 5.88-5.84(m, 1H), 5.83-5.81(m, 1H), 3.82(s, 3H)。

[0195] a. (E)-4-氨基-4-氧代-2-丁烯酸的合成

[0196]



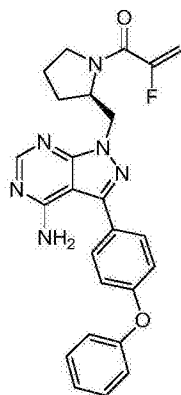
[0197] 将 (E)-4-氨基-4-氧代-2-丁烯酸甲酯 (4g, 31mmol) 溶于甲醇 (40ml), 加入 LiOH (1.4g, 62mmol) 和水 (2ml), 室温搅拌 4h。浓缩, 加入 2M HCl 调节 pH 等于 3, 乙酸乙酯萃取两遍, 合并有机相, 干燥, 浓缩, 得 (E)-4-氨基-4-氧代-2-丁烯酸 (2.7g, 产率 75%)。ESI-MS (m/z): 116.1 [M+H]⁺。

[0198] c. (R,E)-4-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)-1-哌啶基)-4-氧代-2-丁烯酰胺的合成

[0199] 与化合物 1 的制备类似的方法, 以 (E)-4-氨基-4-氧代-2-丁烯酸为原料, 可以制得化合物 11 (60% 产率)。¹H-NMR (d-DMSO, 400MHz, δ ppm): 8.36 (s, 1H), 7.62 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.48-7.36 (m, 3H), 7.18-7.12 (m, 3H), 7.07 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.02-6.88 (m, 1H), 5.83-5.81 (br, 2H), 4.87-4.81 (m, 1.5H), 4.51-4.48 (m, 0.5H), 4.21-4.19 (m, 0.5H), 4.17-4.15 (m, 0.5H), 3.87-3.84 (m, 0.5H), 3.38-3.34 (m, 0.5H), 3.26-3.19 (m, 0.5H), 2.98-2.96 (m, 0.5H), 2.42-2.38 (m, 1H), 2.34-2.28 (m, 1H), 2.06-1.98 (m, 1H), 1.78-1.72 (m, 1H)。ESI-MS (m/z): 484.7 [M+H]⁺。

[0200] 实施例 12: (R)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-2-氟丙-2-烯-1-酮 (化合物 12) 的合成

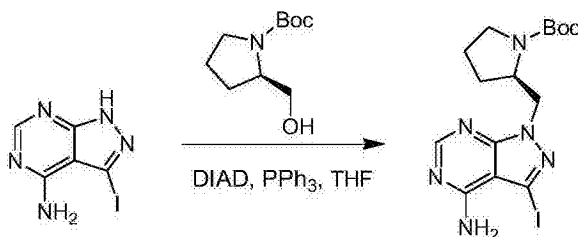
[0201]



化合物 12

[0202] a. (R)-1-Boc-2-((4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)甲基)四氢吡咯的合成

[0203]

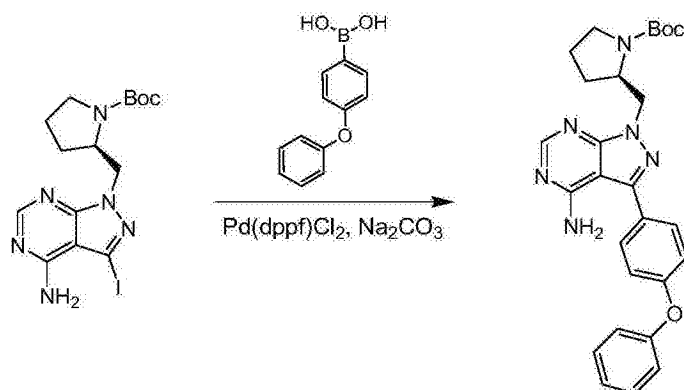


[0204] 将 4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶 (10g, 38mmol), Boc-D-脯氨酸

(17.1g, 85mmol), 三苯基膦 (20g, 76mmol) 加入三口瓶中, 加入 THF (120ml), 降温至 0℃, 滴加 DIAD (15.2g, 76mmol) 和 THF (30ml) 混合液, 约 1h 滴加完毕, 缓慢升至室温反应过夜。将反应液旋干, 加水, 乙酸乙酯萃取, 干燥, 浓缩后柱层析纯化得产物 (R)-1-Boc-2-((4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)甲基)四氢吡咯 (11g, 收率 65%)。ESI-MS(m/z): 445.2[M+H]⁺。

[0205] b. (R)-1-Boc-2-((4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)甲基)四氢吡咯的合成

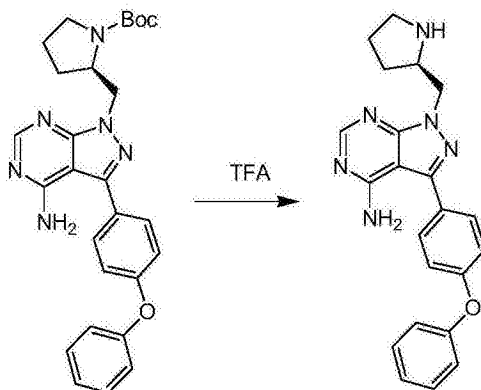
[0206]



[0207] 在三口瓶中加入 (R)-1-Boc-2-((4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)甲基)四氢吡咯 (12.9g, 29mmol), 4-苯氧基苯基硼酸 (6.8g, 32mmol), Pd(dppf)Cl₂ (0.5g, 0.69mmol), 碳酸钠 (6.1g, 58mmol), 1,4-二氧六环 (160ml) 和水 (40ml), 氮气置换后, 升温至 80℃ 反应过夜。点板确认反应完成后, 过滤, 旋干, 加水, 乙酸乙酯萃取, 干燥, 浓缩后柱层析纯化得产品 (9.2g, 产率 65%)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.34(s, 1H), 7.64(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.41-7.37(m, 2H), 7.17-7.13(m, 3H), 7.09-7.07(m, 2H), 4.61-4.34(m, 3H), 3.40-3.26(m, 2H), 1.84-1.78(m, 4H), 1.42(s, 9H)。

[0208] c. (R)-3-(4-苯氧苯基)-1-(四氢吡咯-2-甲基基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨基的合成

[0209]

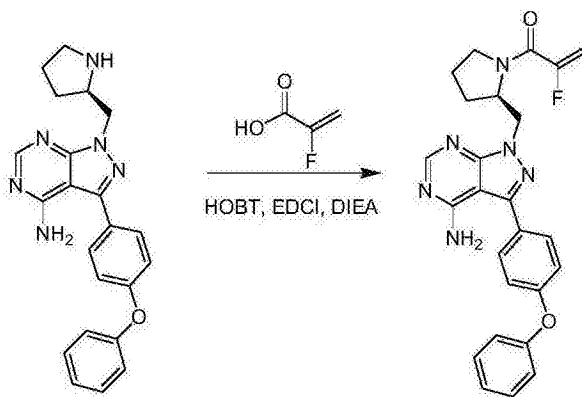


[0210] 在反应瓶中, (R)-1-Boc-2-((4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)甲基)四氢吡咯 (7.98g, 16.4mmol) 加入到三氟乙酸 (40ml) 和二氯甲烷 (40ml) 混合溶液中, 室温反应过夜。点板确认反应完成后, 用饱和 Na₂CO₃ 溶液中和至 pH 为 7-8 后, 用 DCM 萃取, 有机相合并, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化得产品 (5.1g, 收率 80%)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm) : 8.26 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 7.06 (m, 4H), 4.86-4.77 (m, 2H), 4.32-4.30 (m, 1H), 3.52-3.46 (m, 1H), 3.36-3.32 (m, 1H), 2.22-2.18 (m, 1H), 2.06-1.96 (m, 2H), 1.86-1.78 (m, 1H)。

[0211] d. (R)-1-(2-((4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)甲基)四氢吡咯-1-基)-2-氟丙烯-1-酮的合成

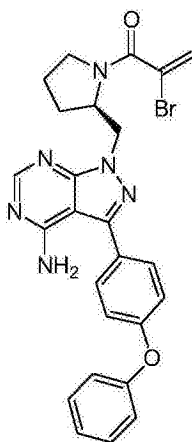
[0212]



[0213] 将 (R)-3-(4-苯氧苯基)-1-(四氢吡咯-2-甲基基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨基 (193mg, 0.5mmol), 2-氟丙烯酸 (52mg, 0.58mmol), HOBT (95mg, 0.7mmol) 和 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDCI) (134mg, 0.7mmol), 溶于无水 DCM (10ml) 中, 加入 DIEA (271mg, 2.1mmol), 室温下搅拌 8h。加入乙酸乙酯稀释后水洗, 水相再用乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后, 浓缩柱层析纯化得化合物 12 (160mg, 产率 70%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm) : 8.36 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.46-7.42 (m, 2H), 7.28-7.22 (m, 3H), 7.16 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 5.46 (dd, $J_1 = 46.4\text{Hz}$, $J_2 = 3.2\text{Hz}$, 1H), 5.12 (dd, $J_1 = 15.6\text{Hz}$, $J_2 = 2.8\text{Hz}$, 1H), 4.75-4.71 (m, 3H), 3.67-3.65 (m, 1H), 3.58-3.56 (m, 1H), 1.86-1.82 (m, 2H), 1.78-1.68 (m, 2H)。

[0214] 实施例 13 : (R)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮 (化合物 13) 的合成

[0215]



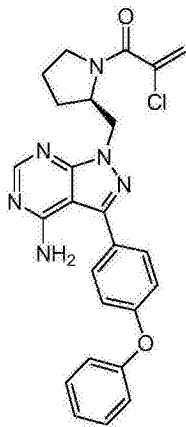
化合物 13

[0216] 与化合物 12 的制备类似的方法, 以 2-溴丙烯酸为原料, 可以制得化合物 13 (58% 产率)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm) : 8.30 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.40-7.38 (m,

2H), 7.20-7.13(m, 3H), 7.08(d, J = 8.4Hz, 2H), 5.98(d, J = 2Hz, 1H), 5.81(d, J = 2Hz, 1H), 4.72-4.68(m, 3H), 3.68-3.62(m, 1H), 3.52-3.48(m, 1H), 2.02-1.94(m, 2H), 1.92-1.86(m, 2H)。

[0217] 实施例 14:(R)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-2-氯丙-2-烯-1-酮(化合物 14)的合成

[0218]

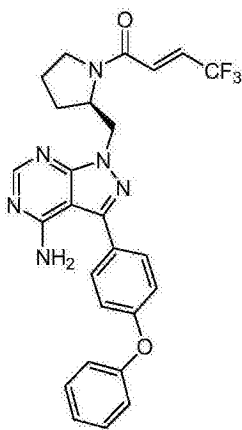


化合物 14

[0219] 与化合物 14 的制备类似的方法,以 2-氯丙烯酸为原料,可以制得化合物 13(52%产率)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm):8.31(s, 1H), 7.61(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.39(t, J = 8Hz, 2H), 7.22-7.08(m, 5H), 5.68(d, J = 2Hz, 1H), 5.63(d, J = 2Hz, 1H), 4.77-4.66(m, 3H), 3.58-3.57(m, 1H), 3.45-3.43(m, 1H), 2.11-2.04(m, 1H), 1.92-1.88(m, 3H)。

[0220] 实施例 15:(R,E)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-4,4,4-三氟丁-2-烯-1-酮(化合物 15)的合成

[0221]

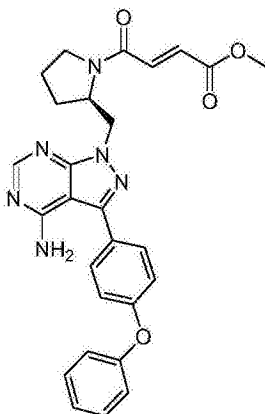


化合物 15

[0222] 与化合物 12 的制备类似的方法,以反式-4,4,4-三氟丁烯酸为原料,可以制得化合物 15(67%产率)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm):8.38(s, 1H), 7.66(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.38-7.32(m, 2H), 7.19-7.15(m, 3H), 7.08(d, J = 8.4Hz, 2H), 6.82-6.78(m, 1H), 6.69-6.67(m, 1H), 5.52-5.50(br, 2H), 4.78-4.67(m, 2H), 4.64-4.59(m, 1H), 3.76-3.69(m, 1H), 3.56-3.48(m, 1H), 2.10-2.05(m, 2H), 1.78-1.66(m, 2H)。

[0223] 实施例 16 : (R, E)-4-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯酸甲酯(化合物 16)的合成

[0224]

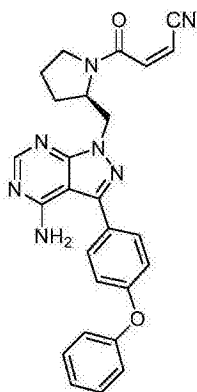


化合物 16

[0225] 与化合物 12 的制备类似的方法, 以富马酸单甲酯为原料, 可以制得化合物 16 (70% 产率)。¹H-NMR (d-DMSO, 400MHz, δ ppm) : 8.28 (s, 1H), 7.60 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.40-7.36 (m, 2H), 7.22-7.08 (m, 5H), 6.98 (d, J = 15.2Hz, 0.5H), 6.83 (d, J = 15.2Hz, 1H), 6.60 (d, J = 15.2Hz, 0.5H), 4.71-4.68 (m, 2H), 4.39-4.36 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.72-3.67 (m, 1H), 3.59-3.56 (m, 1H), 2.16-2.04 (m, 2H), 2.01-1.94 (m, 2H)。

[0226] 实施例 17 : (R, Z)-4-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物 17)的合成

[0227]

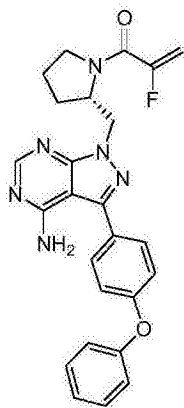


化合物 17

[0228] 与化合物 12 的制备类似的方法, 以马来酰胺酸为原料, 可以制得化合物 17 (65% 产率)。¹H-NMR (d-DMSO, 400MHz, δ ppm) : 8.36 (s, 1H), 7.62 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.42-7.38 (m, 2H), 7.20-7.16 (m, 5H), 6.95 (d, J = 11.6Hz, 0.5H), 6.82 (d, J = 11.2Hz, 0.5H), 5.76 (d, J = 11.2Hz, 0.5H), 5.62-5.69 (m, 2.5H), 4.81-4.78 (m, 1H), 4.77-4.68 (m, 1H), 4.56-4.52 (m, 1H), 3.78-3.72 (m, 1H), 3.48-3.42 (m, 1H), 2.02-1.98 (m, 2H), 1.86-1.78 (m, 2H)。

[0229] 实施例 18 : (S)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-2-氟丙-2-烯-1-酮(化合物 18)的合成

[0230]

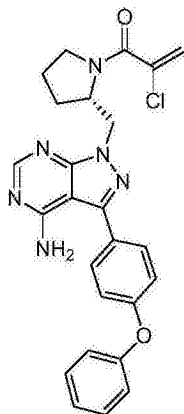


化合物 18

[0231] 与化合物 12 的制备类似的方法,以 Boc-L-脯氨酸和 2-氟丙烯酸为原料,可以制得化合物 18(68%产率)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.42(s, 1H), 7.62(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.44-7.38(m, 2H), 7.18-7.12(m, 3H), 7.06(d, J = 8.4Hz, 2H), 5.48(d, J = 48Hz, 1H), 5.14(d, J = 2.4Hz, 1H), 4.75-4.67(m, 2.5H), 4.52-4.48(m, 0.5H), 3.65-3.60(m, 1H), 3.50-3.48(m, 1H), 1.96-1.88(m, 2H), 1.86-1.68(m, 2H)。

[0232] 实施例 19:(S)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]-2-氯丙-2-烯-1-酮(化合物 19)的合成

[0233]

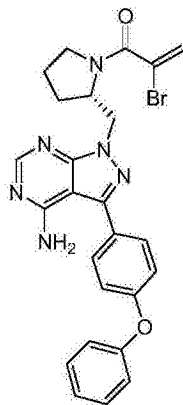


化合物 19

[0234] 与化合物 18 的制备类似的方法,以 2-氯丙烯酸为原料,可以制得化合物 19(64%产率)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.34(s, 1H), 7.62(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.44-7.38(m, 2H), 7.28-7.20(m, 3H), 7.10(d, J = 8.4Hz, 2H), 5.68(d, J = 2.4Hz, 1H), 5.64(d, J = 2.4Hz, 1H), 4.82-4.68(m, 3H), 3.58-3.52(m, 1H), 3.48-3.42(m, 1H), 2.14-2.10(m, 1H), 1.95-1.78(m, 3H)。

[0235] 实施例 20:(S)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 20)的合成

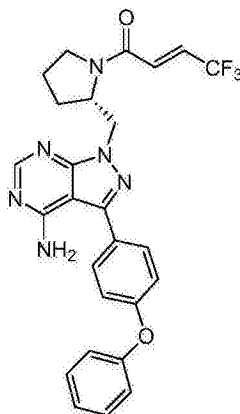
[0236]



化合物 20

[0237] 与化合物 18 的制备类似的方法,以 2-溴丙烯酸为原料,可以制得化合物 20 (64% 产率)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm) :8.29(s, 1H), 7.59(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.44-7.40(m, 2H), 7.23-7.19(m, 3H), 7.09(d, J = 8.4Hz, 2H), 6.00(d, J = 2Hz, 1H), 5.83(d, J = 2Hz, 1H), 4.77-4.64(m, 3H), 3.58-3.56(m, 1H), 3.50-3.46(m, 1H), 2.12-2.04(m, 1H), 1.94-1.86(m, 3H)。

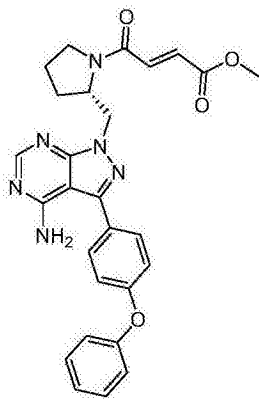
[0238] 实施例 21 : (S,E)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-4,4,4-三氟丁-2-烯-1-酮(化合物 21)的合成
[0239]



化合物 21

[0240] 与化合物 18 的制备类似的方法,以反式-4,4,4-三氟丁烯酸为原料,可以制得化合物 21 (64% 产率)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm) :8.41(s, 1H), 7.68(d, J = 8.4Hz, 2H), 7.46-7.38(m, 2H), 7.24-7.09(m, 5H), 6.88-6.82(m, 1H), 6.78-6.67(m, 1H), 5.54-5.52(br, 2H), 4.78-4.68(m, 2H), 4.44-4.42(m, 1H), 3.76-3.67(m, 1H), 3.52-3.45(m, 1H), 2.16-2.08(m, 2H), 1.78-1.62(m, 2H)。

[0241] 实施例 22 : (S,E)-4-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯酸甲酯(化合物 22)的合成
[0242]

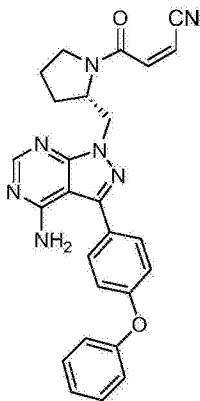


化合物 22

[0243] 与化合物 18 的制备类似的方法,以富马酸单甲酯为原料,可以制得化合物 22(70%产率)。¹H-NMR(d-DMSO, 400MHz, δ ppm): 8.23(s, 1H), 7.64(dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 22.4$ Hz, 2H), 7.46-7.42(m, 2H), 7.21-7.12(m, 5H), 6.69-6.63(m, 1H), 6.11(d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.63-4.61(m, 1H), 4.47-4.43(m, 1H), 4.29-4.24(m, 1H), 3.58(s, 3H), 3.52-3.48(m, 2H), 2.06-1.98(m, 3H), 1.86-1.82(m, 1H)。

[0244] 实施例 23:(S,Z)-4-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物 23)的合成

[0245]

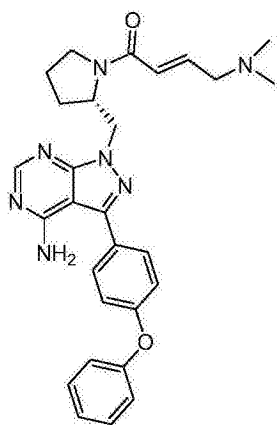


化合物 23

[0246] 与化合物 18 的制备类似的方法,以马来酰胺酸为原料,可以制得化合物 23(64%产率)。¹H-NMR(CDC1₃, 400MHz, δ ppm): 8.32(s, 1H), 7.61(d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 7.39-7.36(m, 2H), 7.15-7.06(m, 5H), 6.92(d, $J = 11.2$ Hz, 0.5H), 6.82(d, $J = 11.2$ Hz, 0.5H), 5.76(d, $J = 11.2$ Hz, 0.5H), 5.59(d, $J = 11.2$ Hz, 0.5H), 4.77-4.72(m, 1H), 4.66-4.50(m, 1H), 4.42-4.38(m, 1H), 3.72-3.64(m, 1H), 3.48-3.44(m, 1H), 2.15-1.94(m, 4H)。

[0247] 实施例 24:(S,E)-1-[2-[(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基]四氢吡咯-1-基]-4-(二甲氨基)丁-2-烯-1-酮(化合物 24)的合成

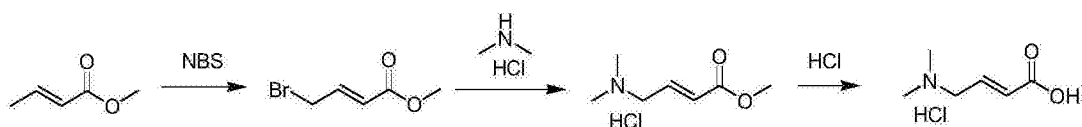
[0248]



化合物 24

[0249] a. 4-二甲氨基巴豆酸盐的合成

[0250]



[0251] 在 500ml 的单口瓶中加入化合物巴豆酸甲酯 (20g, 200mmol), 用四氯化碳 (200ml) 溶解, 搅拌下加入偶氮二异丁腈 (AIBN) (66mg, 0.4mmol) 和 N-溴代丁二酰亚胺 (NBS) (39.1g, 220mmol), 反应液在加热回流中反应 6h, 冷却, 过滤除去固体, 滤液用水洗 (20ml × 3), 无水 Na₂SO₄干燥后, 过滤旋干得到黄色的油状物 4-溴巴豆酸甲酯 (34g), 该化合物不用纯化直接用于下一步反应。

[0252] 在 500ml 的单口瓶中加入化合物 4-溴巴豆酸甲酯 (34g, 190mmol), 用 THF 溶解, 搅拌下加入二甲胺的盐酸盐 (18.5g, 230mmol) 和 Et₃N (74.2ml, 530mmol), 室温下搅拌反应过夜, 4-溴巴豆酸甲酯完全反应后, 蒸除溶剂, 剩余的黄色油状物加入异丙醇 (200ml) 中, 滴加 4M 的 HCl/dioxane 溶液调节 pH ≤ 2, 析出白色固体, 过滤, 滤饼用 THF 洗涤, 干燥得白色固体 4-二甲氨基巴豆酸甲酯盐酸盐 (10g, 30% 产率)。¹H-NMR (d-DMSO, 400MHz, δ ppm): 6.89-6.92 (m, 1H), 6.30 (d, J = 16Hz, 1H), 3.91 (d, J = 8Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.72 (s, 6H)。

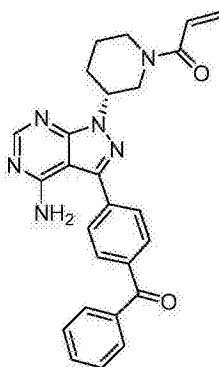
[0253] 在 250ml 的单口瓶中加入化合物 4-二甲氨基巴豆酸甲酯盐酸盐 (10g, 56mmol), 加入 6N 的盐酸水溶液 (100ml), 回流反应 6h, 反应液旋干得白色固体 4-二甲氨基巴豆酸盐盐酸盐 (9.0g, 98% 产率)。¹H-NMR (d-DMSO, 400MHz, δ ppm): 6.75-6.81 (m, 1H), 6.18 (d, J = 16Hz, 1H), 3.89 (d, J = 8Hz, 2H), 2.74 (s, 6H)。

[0254] b. (S,E)-1-(2-((4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)四氢吡咯-1-基)-4-(二甲氨基)-2-丁烯-1-酮的合成

[0255] 与化合物 18 的制备类似的方法, 以 4-二甲氨基巴豆酸盐盐酸盐为原料, 可以制得化合物 24 (64% 产率)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.32 (s, 1H), 7.78-7.67 (m, 2H), 7.36-7.28 (m, 2H), 7.18-7.05 (m, 5H), 6.83-6.77 (m, 1H), 6.55-6.32 (m, 1H), 4.64-4.58 (m, 2H), 4.38-4.32 (m, 1H), 3.64-3.52 (m, 2H), 3.32-3.18 (m, 1H), 3.02-2.98 (m, 1H), 2.48 (s, 6H), 2.02-1.74 (m, 4H)。

[0256] 实施例 25: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧

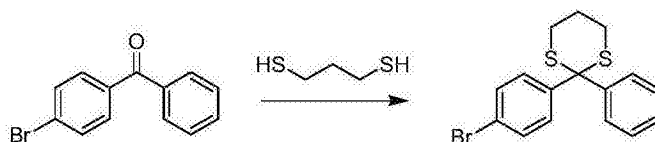
啶-1-基]哌啶-1-基]丙-2-烯-1-酮(化合物 25)的合成
[0257]



化合物 25

[0258] a. 2-(4-溴苯)-2-苯-1,3-二硫环己烷的合成

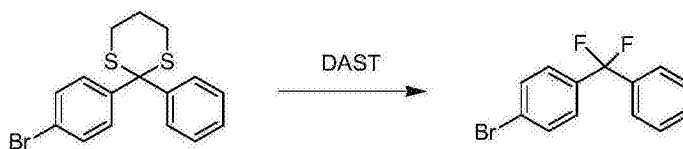
[0259]



[0260] 将 4-溴苯甲酰苯(10g, 38mmol), 丙二硫醇(5g, 46mmol), 对甲苯磺酸(1.1g, 6.4mmol)溶于甲苯(50ml)中, 回流反应 12h, 旋干有机溶剂, 加入石油醚打浆, 过滤得产品(11g, 82%产率)。ESI-MS(m/z): 350.9[M+H]⁺。

[0261] b. 1-溴-4-(二氟(苯)甲基)苯的合成

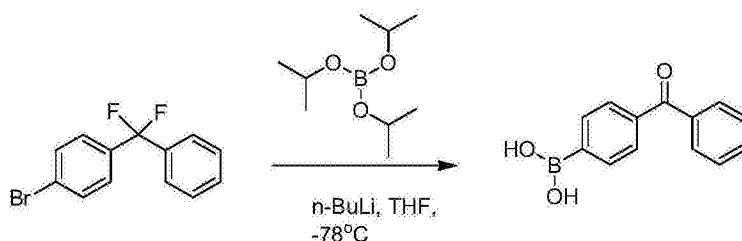
[0262]



[0263] 将 2-(4-溴苯)-2-苯-1,3-二硫环己烷(5g, 14mmol)溶于无水二氯甲烷(50ml)中, 室温滴加 DAST(4ml, 32mmol), 滴毕过夜搅拌反应, TLC 监测, 反应结束后, 加入饱和氯化钠溶液, 无水硫酸钠干燥有机相, 旋干, 柱层析纯化得产品(2.8g, 71%)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 7.55(d, J = 8.8Hz, 2H), 7.48-7.46(m, 2H), 7.44-7.41(m, 3H), 7.37(d, J = 8.8Hz, 2H)。¹⁹F-NMR:(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): -88.9。

[0264] c. 4-苯甲酰基苯硼酸的合成

[0265]



[0266] 将 1-溴-4-(二氟(苯)甲基)苯(2g, 7.1mmol)溶于无水 THF(20mL)中, 氮气保护下, 冷却至 -78°C, 滴加正丁基锂(n-BuLi)(3.1mL, 7.8mmol), 温度保持 -65°C 以下, 搅拌

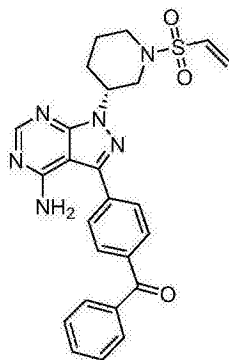
1h后,继续保持温度 -60°C ,滴加硼酸三异丙酯(1.5g,7.8mmol),缓慢升至 0°C ,搅拌3h。冰浴下加入水(10mL)搅拌过夜。反应液浓缩去除有机相,用12N浓盐酸PH调至1~2,析出固体,过滤干燥得产品(1.5g,产率95%)。ESI-MS(m/z):227.1[M+H]⁺。

[0267] d. (R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯-1-基)-2-丙烯-1-酮的合成

[0268] 与化合物1的制备类似的方法,以4-苯甲酰基苯硼酸和丙烯酸为原料,可以制得化合物25(62%产率)。¹H-NMR(CDCl₃,400MHz,δ ppm):8.40(s,1H),7.98(d,J=8.4Hz,2H),7.84-7.80(m,4H),7.65-7.61(m,1H),7.54-7.51(m,2H),6.62-6.58(m,1H),6.34-6.28(m,1H),5.68-5.62(m,3H),4.96-4.94(m,1H),4.86-4.84(m,0.5H),4.68-4.64(m,0.5H),4.24-4.20(m,0.5H),4.12-4.08(m,0.5H),3.74-3.71(m,0.5H),3.41-3.38(m,0.5H),3.22-3.19(m,0.5H),2.98-2.96(m,0.5H),2.42-2.38(m,2H),2.18-2.02(m,2H)。ESI-MS(m/z):453.2[M+H]⁺。

[0269] 实施例26:(R)-[4-[4-氨基-1-(1-(乙烯磺)哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-基]苯基](苯基)甲酮(化合物26)的合成

[0270]

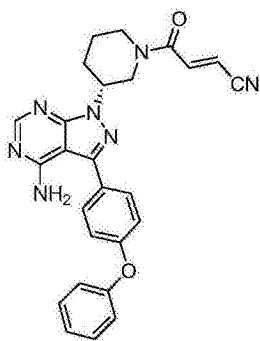


化合物26

[0271] 与化合物25的制备类似的方法,以乙烯基磺酰氯为原料,可以制得化合物26(53%产率)。¹H-NMR(CDCl₃,400MHz,δ ppm):8.40(s,1H),7.98(d,J=8.4Hz,2H),7.91-7.84(m,4H),7.64-7.60(m,1H),7.54-7.50(m,2H),6.51-6.44(m,1H),6.28-6.24(d,J=16.8Hz,1H),6.08-6.03(m,1H),5.72(br,2H),5.06-5.04(m,1H),4.03-4.00(m,1H),3.84-3.81(m,1H),3.34-3.31(m,1H),2.72-2.68(m,1H),2.28-2.22(m,2H),2.20-2.18(m,2H)。

[0272] 实施例27:(R,E)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物27)的合成

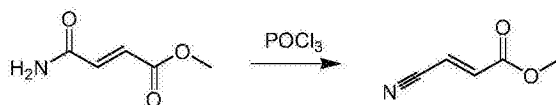
[0273]



化合物 27

[0274] a. (E)- 氰基丙烯酸甲酯的合成

[0275]



[0276] (E)-4-氨基-4-氧代-2-丁烯酸甲酯 (3.18g, 25mmol) 溶于吡啶 (27ml) 中, 冰浴下滴加三氯氧磷 (3.48ml, 36mmol), 搅拌 1h 后, 恢复至室温搅拌 1h, TLC 显示反应完毕后, 加入冰块, 搅拌 0.5h, DCM 萃取 3 次, 有机相用 2M HCl 洗涤, 最后用 NaHCO₃ 洗涤, 有机相浓缩, 柱层析纯化得产品 (1g, 36% 产率)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 6.71 (d, J = 16.4Hz, 1H), 6.48 (d, J = 16.4Hz, 1H), 3.83 (s, 3H)。

[0277] b. (E)-3-氰基-丙烯酸合成

[0278]



[0279] (E)-3-氰基丙烯酸甲酯 (1.4g, 13mmol) 溶于 THF (5ml) 中, 加入甲醇 (6ml), LiOH (2.28g, 95mmol) 和水 (2ml)。10 摄氏度搅拌 3h 后, 反应完毕, 加入 2M HCl 调节 pH 等于 3, 乙酸乙酯萃取, 有机相干燥, 浓缩得到产品 (945mg, 产率 75%)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 9.29 (s, 1H), 6.72 (d, J = 16.4Hz, 1H), 6.56 (d, J = 16.4Hz, 1H)。

[0280] c. (R,E)-4-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯-1-

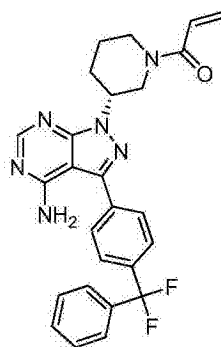
[0281] 基)-4-氧代-2-丁烯腈的合成

[0282] 与化合物 1 的制备类似的方法, 以 (E)-3-氰基-丙烯酸为原料, 可以制得化合物 27 (56% 产率)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.39 (s, 1H), 7.61 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.41-7.37 (m, 2H), 7.31-7.19 (dd, J₁ = 16Hz, J₂ = 42Hz, 1H), 7.17-7.14 (m, 3H), 7.08 (d, J = 8.4Hz, 2H), 6.49 (d, J = 16Hz, 0.5H), 6.43 (d, J = 16Hz, 0.5H), 5.79-5.72 (br, 2H), 4.90-4.86 (m, 1H), 4.82-4.78 (m, 0.5H), 4.38-4.35 (m, 0.5H), 4.12-4.06 (m, 0.5H), 3.93-3.89 (m, 1H), 3.52-3.46 (m, 0.5H), 3.32-3.28 (m, 0.5H), 3.18-3.12 (m, 0.5H), 2.52-2.38 (m, 1H), 2.32-2.22 (m, 1H), 2.12-2.01 (m, 1H), 1.82-1.68 (m, 1H)。ESI-MS (m/z): 466.6 [M+H]⁺。

[0283] 实施例 28: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-(二氟(苯基)甲基)苯基)-1H-吡唑并

[3, 4-d] 嘧啶 -1-基] 哌啶 -1-基] 丙 -2-烯 -1-酮 (化合物 28) 的合成

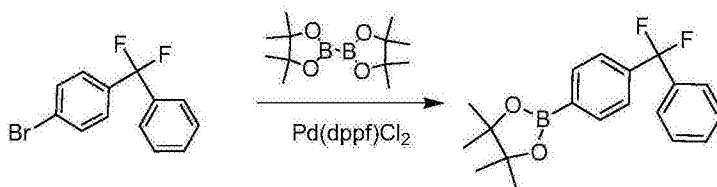
[0284]



化合物 28

[0285] a. 2-(4-(二氟(苯基)甲基)苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷的合成

[0286]



[0287] 将 1-溴-4-(二氟(苯)甲基)苯 (3.76g, 13mmol) 溶于二甲氧基乙烷 (DME) (100ml) 和二甲基亚砜 (DMSO) (5ml) 中, 氮气保护下, 加入 [1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁] 二氯化钯 (II) ($\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$) (960mg, 1.3mmol), 80℃条件下反应过夜, TLC 监测, 反应结束后, 加入二氯甲烷和水萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 柱层析纯化得产品 (2.1g, 产率 47.9%)。 ^{19}F -NMR (400MHz, CDCl_3 , δ ppm) : -89.67。 ^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm) : 7.85 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.52-7.47 (m, 4H), 7.43-7.39 (m, 3H), 1.34 (s, 12H)。

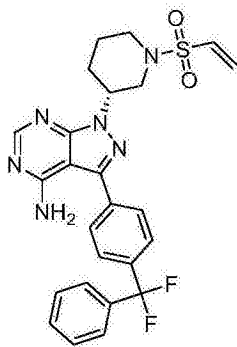
[0288] b. (R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-(二氟(苯基)甲基)苯基)-1H-吡啶并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-2-丙烯-1-酮的合成

[0289] 与化合物 1 的制备类似的方法, 以 2-(4-(二氟(苯基)甲基)苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷和丙烯酸为原料, 可以制得化合物 28 (61% 产率)。

[0290] ^{19}F -NMR (400MHz, CDCl_3 , δ ppm) : -89.3。 ^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm) : 8.38 (s, 1H), 7.78-7.68 (m, 4H), 7.58-7.54 (m, 2H), 7.45-7.39 (m, 3H), 6.68-6.50 (m, 1H), 6.36-6.28 (m, 1H), 5.73-5.53 (m, 3H), 4.88-4.85 (m, 1.5H), 4.61-4.52 (m, 0.5H), 4.28-4.22 (m, 0.5H), 4.08-3.96 (m, 0.5H), 3.76-3.68 (m, 0.5H), 3.36-3.32 (m, 0.5H), 3.21-3.18 (m, 0.5H), 2.94-2.88 (m, 0.5H), 2.41-2.28 (m, 2H), 2.04-1.92 (m, 1H), 1.88-1.78 (m, 1H)。ESI-MS (m/z) : 475.5 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 。

[0291] 实施例 29: (R)-3-[4-(二氟(苯基)甲基)苯基]-1-(1-(乙烯基)哌啶-3-基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-氨 (化合物 29) 的合成

[0292]

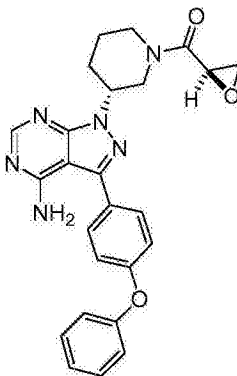


化合物 29

[0293] 与化合物 28 的制备类似的方法,以乙烯基磺酰氯为原料,可以制得化合物 29(53 % 产率)。¹⁹F-NMR(400MHz, CDCl₃, δ ppm): -89.41。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.38(s, 1H), 7.70(dd, J₁ = 8.0Hz, J₂ = 20.4Hz, 4H), 7.54-7.52(m, 2H), 7.46-7.44(m, 3H), 6.45-6.42(dd, J₁ = 16.8Hz, J₂ = 10.0Hz, 1H), 6.24(d, J = 16.8Hz, 1H), 6.03(d, J = 10.0Hz, 1H), 5.52-5.49(br, 2H), 5.04-5.01(m, 1H), 4.00-3.96(m, 1H), 3.82-3.79(m, 1H), 3.28-3.23(m, 1H), 2.75-2.69(m, 1H), 2.23-2.19(m, 2H), 1.98-1.88(m, 2H)。ESI-MS(m/z): 511.5[M+H]⁺。

[0294] 实施例 30: [(R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基]((R)-环氧乙烷-2-基)甲酮(化合物 30)的合成

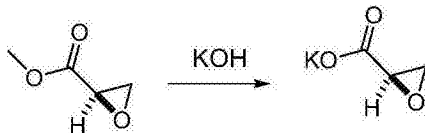
[0295]



化合物 30

[0296] a. (R)-环氧乙烷-2-羧酸钾的合成

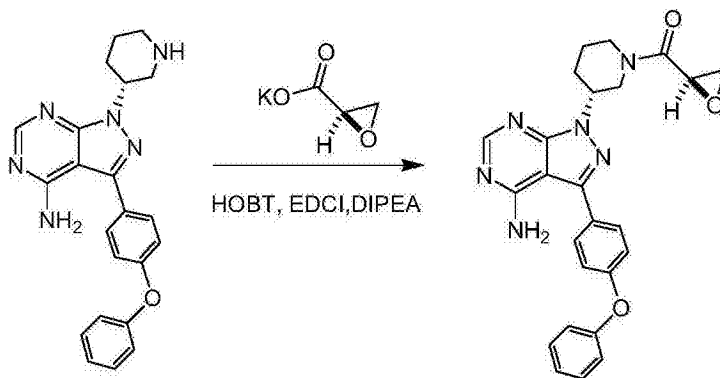
[0297]



[0298] 将 (R)-缩水甘油酸甲酯(1.0g, 9.8mmol)溶于乙醇(8ml)和 H₂O(1ml),加入 KOH(0.66g, 12mmol)。室温下搅拌 2 小时,点板原料反应完全,溶液直接旋干得淡黄色固体,直接用于下一步。

[0299] b. [(R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶-1-基]((R)-环氧乙烷-2-基)甲酮(化合物 30)的合成

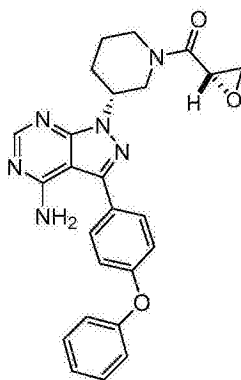
[0300]



[0301] 将 (R)-3-(4-苯氧基苯基)-1-(哌啶-3-基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨基 (307mg, 0.79mmol) 和 (R)-环氧乙烷-2-羧酸钾 (200mg, 1.6mmol), 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDCI) (167mg, 0.87mmol) 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt) (118mg, 0.87mmol) 溶于 DMF (5ml) 溶剂中, 然后加入 N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA) (307mg, 2.38mmol)。42℃ 下反应 2 小时, 点板原料消失。冷却后水洗, 乙酸乙酯萃取 (5ml×3), 有机相干燥后旋干, 柱层析纯化得化合物 30 (190mg, 产率 52%)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.37 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.41-7.37 (m, 2H), 7.17-7.14 (m, 3H), 7.08 (d, J = 8.4Hz, 2H), 5.50-5.48 (br, 2H), 4.89-4.71 (m, 1H), 4.53-4.37 (m, 0.5H), 4.34-4.30 (m, 0.5H), 4.22-4.16 (m, 0.5H), 3.90-3.80 (m, 0.5H), 3.68-3.64 (m, 1H), 3.47-3.41 (m, 0.5H), 3.31-3.20 (m, 0.5H), 3.02-2.98 (m, 2H), 2.91-2.86 (m, 1H), 2.47-2.34 (m, 1H), 2.28-2.25 (m, 1H), 2.02-1.98 (m, 1H), 1.80-1.74 (m, 1H)。

[0302] 实施例 31: [(R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基]((S)-环氧乙烷-2-基)甲酮 (化合物 31) 的合成

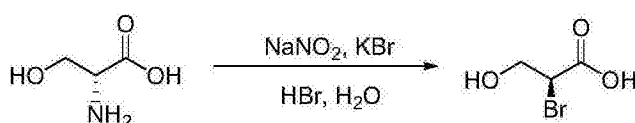
[0303]



化合物 31

[0304] a. (S)-2-溴-3-羟基丙酸的合成

[0305]

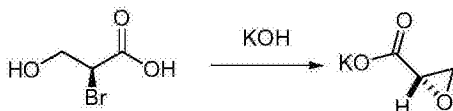


[0306] D-丝氨酸 (1.0g, 9.5mmol) 和 KBr (4.0g, 33mmol) 在水溶液 (8ml) 中搅拌至全溶,

室温下加入 HBr (4.1g, 21mmol, 质量浓度为 47% 的水溶液, 所述的质量浓度是指溴化氢的质量占溴化氢水溶液总质量的百分比), 溶液降温至 -12°C , 然后将 NaNO_2 (0.72g, 11mmol) 分批次缓慢加入, 每次加入溶液成棕褐色, 搅拌反应至褪色再次加入, 历经 2 小时加完, 恢复至 0°C , 搅拌反应过夜。反应液以乙醚萃取 ($5\text{ml} \times 3$), 有机相干燥后旋干得油状化合物 (S)-2-溴-3-羟基丙酸 (1.0g, 产率 63%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm): 4.24 (dd, $J_1 = 5.6\text{Hz}$, $J_2 = 8.0\text{Hz}$, 1H), 3.80 (dd, $J_1 = 8.0\text{Hz}$, $J_2 = 11.2\text{Hz}$, 1H), 3.67 (dd, $J_1 = 5.6\text{Hz}$, $J_2 = 11.2\text{Hz}$, 1H)。

[0307] b. (S)-环氧乙烷-2-羧酸钾的合成

[0308]



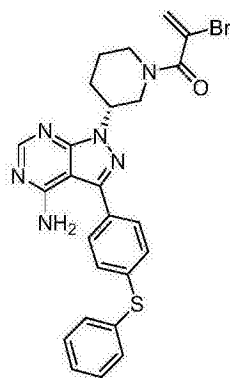
[0309] (S)-2-溴-3-羟基丙酸 (1.0g, 5.9mmol) 溶于无水乙醇 (8ml), 反应液降到 -20°C , 在氮气保护下缓慢滴加 KOH (0.63g, 11.3mmol) 的无水乙醇溶液, 反应液在 -20°C -0°C 下反应过夜。旋蒸除去大多数乙醇, 加入无水乙醚 (8ml) 有固体析出, 过滤, 有机相静置有固体析出, 再次过滤, 收集白色固体得产物 (0.3g, 产率 40%)。

[0310] c. ((R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)((S)-环氧乙烷-2-基)甲酮的合成

[0311] 与化合物 30 的制备类似的方法, 以 (S)-环氧乙烷-2-羧酸钾为原料, 可以制得化合物 31 (36% 产率)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm): 8.37 (s, 1H), 7.66-7.63 (m, 2H), 7.41-7.37 (m, 2H), 7.18-7.14 (m, 3H), 7.09-7.07 (m, 2H), 5.57-5.54 (br, 2H), 4.89-4.78 (m, 1.5H), 4.58-4.55 (m, 0.5H), 4.05-4.00 (m, 0.5H), 3.88-3.84 (m, 0.5H), 3.74-3.68 (m, 1H), 3.32-3.26 (m, 0.5H), 3.22-3.15 (m, 0.5H), 2.81-2.72 (m, 0.5H), 2.44-2.40 (m, 0.5H), 2.38-2.22 (m, 2H), 2.00-1.92 (m, 1H), 1.78-1.72 (m, 3H)。

[0312] 实施例 32: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯硫基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 32) 的合成

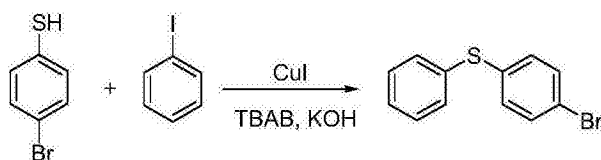
[0313]



化合物 32

[0314] a. (4-溴苯基)(苯基)硫烷的合成

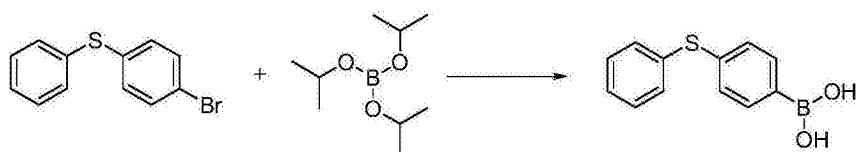
[0315]



[0316] 向对溴苯硫酚 (5.0g, 26mmol) 和碘苯 (2.7g, 13mmol), 四丁基溴化铵 (TBAB) (4.3g, 13mmol), KOH(1.1g, 20mmol) 的水 (50ml) 溶液中加入 CuI (0.05g, 0.26mmol), 85°C 下反应过夜。碘苯基本反应完, 水洗, 乙酸乙酯萃取 (30ml×3), 有机相干燥后旋干, 柱层析纯化得产物 (2.8g, 产率 80%)。ESI-MS(m/z): 264.9[M+H]⁺。

[0317] b. 4-(苯硫基)苯硼酸的合成

[0318]



[0319] 氮气保护下, 将 (4-溴苯基)(苯基)硫烷 (1.0g, 3.8mmol) 的无水 THF (10ml) 溶液降到 -70°C, 缓慢滴加 n-BuLi (2.1ml, 4.2mmol), 滴加完后搅拌反应 15min, 加入硼酸异丙酯 (0.86g, 4.6mmol), 撤去干冰浴, 0°C 下反应 30min, 溶液变浑浊, 有白色固体析出, 反应 3h 后加入水 (6ml), 反应过夜。再次加入水 (8ml), 以浓 HCl 调 pH = 1-2, EA (8ml×3) 萃取, 有机相干燥后旋干, 加入石油醚洗涤, 过滤收集得产物 (0.75g, 产率 86%)。

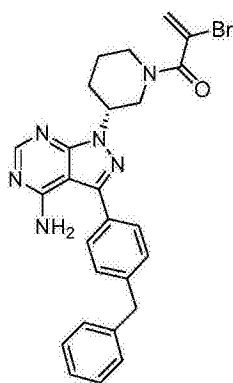
[0320] ¹H-NMR (d-DMSO, 400MHz, δ ppm) : 8.11 (s, 2H), 7.74 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.39-7.35 (m, 4H), 7.23 (d, J = 8.0Hz, 2H), 6.56 (s, 1H)。

[0321] c. 1-[(3R)-3-[4-氨基-3-(4-苯硫基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基]-1-哌啶基]-2-溴丙烯-1-酮的合成

[0322] 与化合物 1 的制备类似的方法, 以 4-(苯硫基)苯硼酸为原料, 可以制得化合物 32 (45% 产率)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, δ ppm) : 8.37 (s, 1H), 7.60 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.48-7.46 (m, 2H), 7.42-7.34 (m, 5H), 6.04-6.01 (s, 1H), 5.85-5.78 (m, 1H), 5.46-5.38 (br, 2H), 4.96-4.91 (m, 1H), 4.68-4.62 (m, 0.5H), 4.53-4.47 (m, 0.5H), 4.17-4.11 (m, 0.5H), 3.99-3.94 (m, 0.5H), 3.79-3.71 (m, 0.5H), 3.52-3.45 (m, 0.5H), 3.22-3.17 (m, 0.5H), 2.93-2.87 (m, 0.5H), 2.35-2.22 (m, 2H), 2.02-1.98 (m, 1H), 1.80-1.75 (m, 1H)。

[0323] 实施例 33: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮 (化合物 33) 的合成

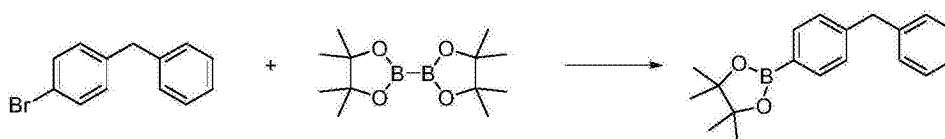
[0324]



化合物 33

[0325] a. 4-苄基苯硼酸频呐醇酯的合成

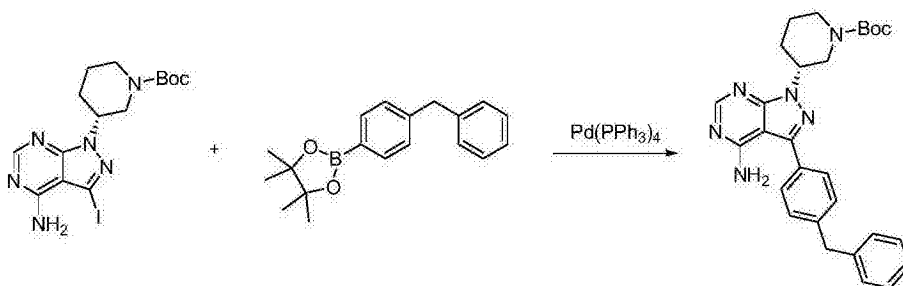
[0326]



[0327] 50ml 单口烧瓶中, 加入 4-溴二苯基甲烷 (2.5g, 10mmol), 联硼酸频那醇酯 (3.885g, 15mmol), KOAc (3.1g, 31mmol), DME (65ml), DMSO (3.3ml)。N₂置换 3 次, 加入催化剂 Pd(dppf)Cl₂ (740mg, 0.5mmol)。N₂置换 3 次, 加热至 80℃, 回流过夜, 原料反应完。反应液过硅藻土, 加水, EA 萃取, 有机相干燥, 浓缩, 柱层析纯化产物 (2.87g, 产率 97%)。ESI-MS(m/z): 295. 2。

[0328] b. (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-(4-苄基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶的合成

[0329]



[0330] 500ml 单口瓶中, 加入 (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)哌啶 (2.6g, 5.9mmol), 4-苄基苯硼酸频呐醇酯 (1.2g, 5.9mmol), Na₂CO₃ (2.31g, 31mmol), 二甲氧基乙烷 (DME) (150ml), H₂O (30ml)。N₂置换 3 次, 加入催化剂四三苯基膦钯 (Pd(PPh₃)₄) (0.23g, 0.3mmol), N₂置换 3 次。加热至 80℃, 回流过夜, 原料反应完。反应体系为橙色澄清溶液。旋除大部分溶剂, 加水, DCM 萃取, 有机相干燥, 浓缩, 柱层析纯化得产物 (2.1g, 产率 75%)。¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 8.28(s, 1H), 7.62-7.57(m, 2H), 7.54-7.52(m, 2H), 7.30-7.22(m, 2H), 7.19-7.14(m, 3H), 5.66-5.55(br, 2H), 4.78-4.73(m, 1H), 4.32-4.05(m, 2H), 3.98-4.01(m, 2H), 3.40-3.26(m, 1H), 2.79-2.71(m, 1H), 2.18-2.11(m, 2H), 1.82-1.81(m, 1H), 1.63-1.60(m, 1H), 1.36(s, 9H)。

[0331] c. (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苄基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶

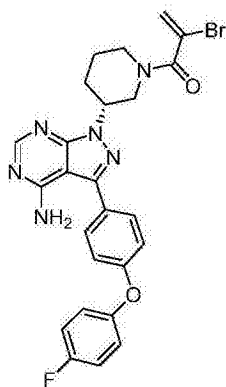
啉-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物33)的合成

[0332] 与化合物1的制备类似的方法,以(R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-(4-苄基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啉-1-基)哌啉为原料,可以制得化合物33(40%产率)。

[0333] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm): 8.36(s, 1H), 7.60(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.37-7.31(m, 4H), 7.23-7.22(m, 3H), 6.03-6.03(m, 1H), 5.84-5.78(m, 1H), 5.56-5.49(br, 2H), 4.93-4.91(m, 1H), 4.69-4.65(m, 0.5H), 4.52-4.49(m, 0.5H), 4.17-4.11(m, 0.5H), 4.05(s, 2H), 4.01-3.94(m, 0.5H), 3.79-3.70(m, 0.5H), 3.48-3.45(m, 0.5H), 3.18-3.18(m, 0.5H), 2.89-2.85(m, 0.5H), 2.35-2.23(m, 2H), 1.80-1.59(m, 2H)。

[0334] 实施例34:(R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啉-1-基]哌啉-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物34)的合成

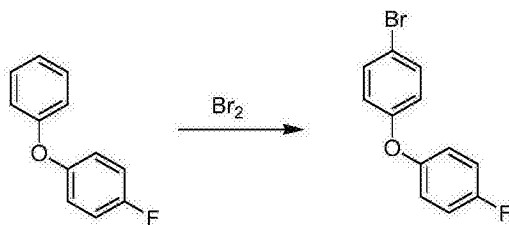
[0335]



化合物34

[0336] a. 1-(4-溴苯氧基)-4-氟苯的合成

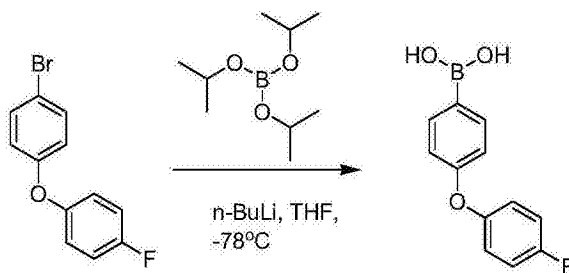
[0337]



[0338] 将4-氟二苯醚(30g, 0.16mol)和几粒碘溶于 CS_2 (300ml)中,冰浴下缓慢滴加溴素(10ml, 0.19mol),室温搅拌反应过夜,浓缩,柱层析纯化得产品(28g, 64%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, δ ppm): 7.46-7.42(m, 2H), 7.10-6.97(m, 4H), 6.88-6.84(m, 2H)。

[0339] b. 4-(4-氟苯氧基)苯基硼酸的合成

[0340]



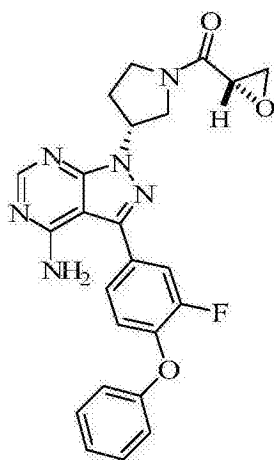
[0341] 将 1-(4-溴苯氧基)-4-氟苯 (10g, 37mmol) 溶于无水 THF (80mL) 中, 氮气保护下, 冷却至 -78°C , 滴加 $n\text{-BuLi}$ (16.4mL, 41mmol), 温度保持 -65°C 以下, 搅拌 1h 后, 继续保持温度 -60°C , 滴加硼酸三异丙酯 (8.3g, 44.4mmol), 缓慢升至 0°C , 搅拌 3h。冰浴下加入水 (30mL) 搅拌过夜。反应液浓缩去除有机相, 用 12N 浓盐酸 PH 调至 1~2, 析出固体, 过滤干燥得产品 (6.4g, 产率 75%)。ESI-MS(m/z): 233.1[M+H]⁺。

[0342] c. (R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-(4-氟苯氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)-1-哌啶基)-2-溴丙烯-1-酮的合成

[0343] 与化合物 1 的制备类似的方法, 以 4-苯氧基苯基硼酸为原料, 可以制得化合物 34 (41% 产率)。ESI-MS(m/z): 537.1[M+H]⁺。

[0344] 实施例 35: [(R)-3-(4-氨基-3-(3-氟-4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)四氢吡咯-1-基]((S)-环氧乙烷-2-基)甲酮 (化合物 35) 的合成

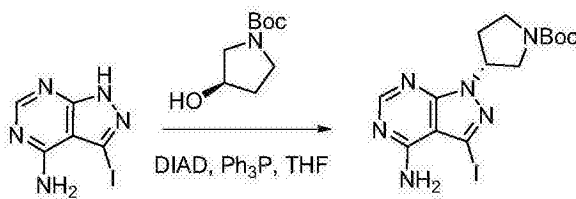
[0345]



化合物 35

[0346] a. (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯的合成

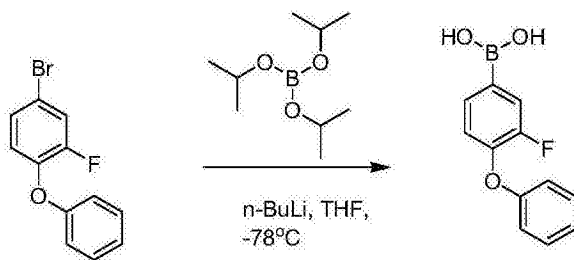
[0347]



[0348] 将 4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶 (10g, 38mmol), (R)-1-Boc-3-羟基吡咯 (16g, 85mmol), 三苯基磷 (20g, 76mmol) 加入三口瓶中, 加入 THF (120ml), 降温至 0°C , 滴加偶氮二甲酸二异丙酯 (DIAD) (15.2g, 76mmol) 和 THF (30ml) 混合液, 约 1h 滴加完毕, 缓慢升至室温反应过夜。将反应液旋干, 加水, 乙酸乙酯萃取, 干燥, 浓缩后柱层析纯化得产物 (13.8g, 收率 84%)。ESI-MS(m/z): 431.1[M+H]⁺。

[0349] b. 3-氟-4-苯氧基苯基硼酸的合成

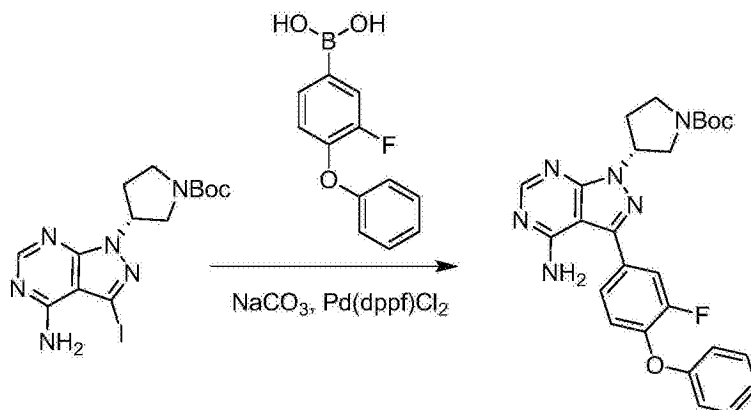
[0350]



[0351] 与化合物 34 的制备类似的方法,以 4-溴-2-氟-1-苯氧基苯为原料,可以制得 3-氟-4-苯氧基苯基硼酸。ESI-MS(m/z):233.1[M+H]⁺。

[0352] b. (3R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-(3-氟-4-苯氧基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯的合成

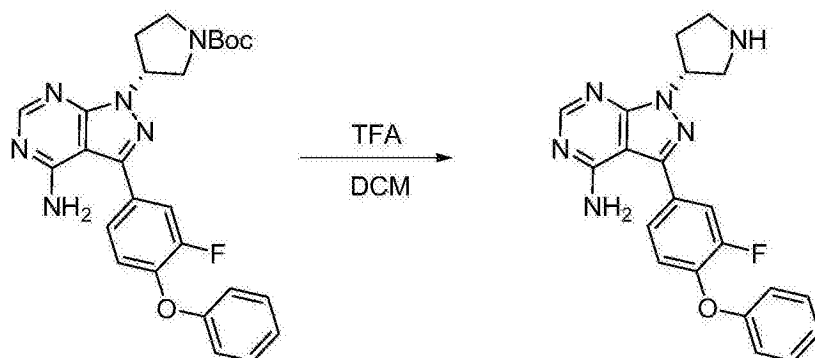
[0353]



[0354] 在三口瓶中加入 (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯 (12.5g, 29mmol), 3-氟-4-苯氧基苯基硼酸 (7.4g, 32mmol), Pd(dppf)Cl₂ (0.5g, 0.69mmol), 碳酸钠 (6.1g, 58mmol), 1,4-二氧六环 (160ml) 和水 (40ml), 氮气置换后,升温至 80℃ 反应过夜。点板确认反应完成后,过滤,旋干,加水,乙酸乙酯萃取,干燥,浓缩后柱层析纯化得产品 (8.8g, 产率 62%)。ESI-MS(m/z):491.2[M+H]⁺。

[0355] c. (R)-3-(3-氟-4-苯氧基)-1-(吡咯-3-基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨的合成

[0356]

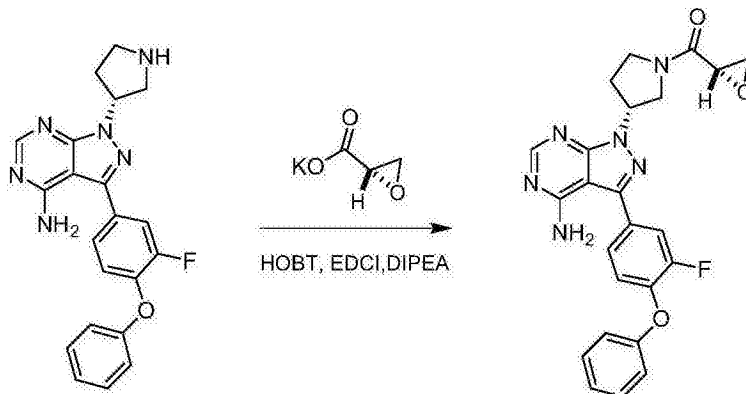


[0357] 在反应瓶中, (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-(3-氟-4-苯氧基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯 (7.3g, 14.8mmol) 加入到三氟乙酸 (40ml) 和二氯甲烷 (40ml) 混合溶液中, 室温反应过夜。点板确认反应完成后,用饱和 Na₂CO₃ 溶液中和至 pH 为 7-8 后,

用 DCM 萃取, 有机相合并, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化得产品 (4.96g, 收率 86%)。ESI-MS(m/z): 391.2[M+H]⁺。

[0358] d. ((R)-3-(4-氨基-3-(3-氟-4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)-1-四氢吡咯基)((S)-环氧乙烷-2-基)甲酮(化合物 35)的合成

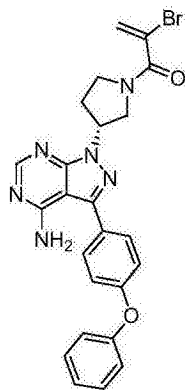
[0359]



[0360] 与化合物 31 的制备类似的方法, 以 (R)-3-(3-氟-4-苯氧基苯基)-1-(吡咯-3-基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨为原料, 可以制得化合物 35(43%产率)。ESI-MS(m/z): 461.2[M+H]⁺。

[0361] 实施例 36: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 36)的合成

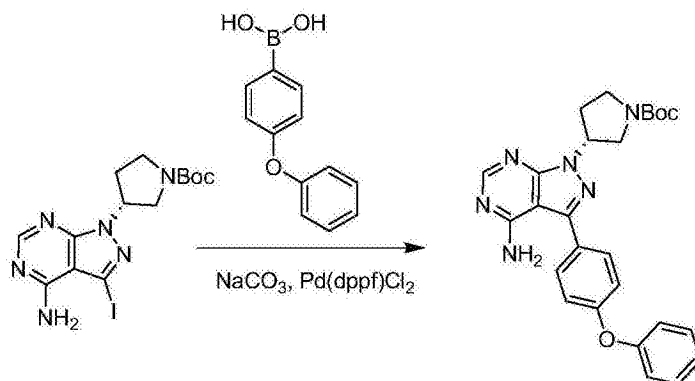
[0362]



化合物 36

[0363] a. (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯的合成

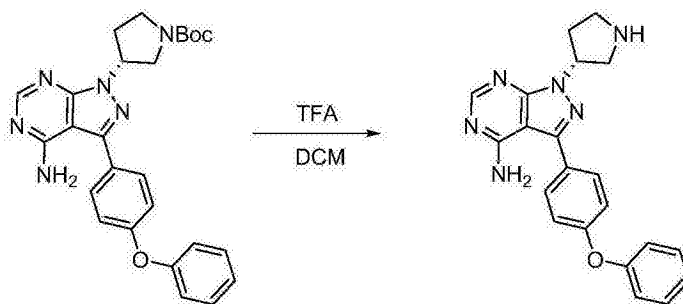
[0364]



[0365] 在三口瓶中加入 (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯 (12.5g, 29mmol), 4-苯氧基苯基硼酸 (6.8g, 32mmol), Pd(dppf)Cl₂ (0.5g, 0.69mmol), 碳酸钠 (6.1g, 58mmol), 1,4-二氧六环 (160ml) 和水 (40ml), 氮气置换后, 升温至 80℃ 反应过夜。点板确认反应完成后, 过滤, 旋干, 加水, 乙酸乙酯萃取, 干燥, 浓缩后柱层析纯化得产品 (8.6g, 产率 63%)。ESI-MS(m/z): 473.2[M+H]⁺。

[0366] b. (R)-3-(4-苯氧基)-1-(吡咯-3-基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨的合成

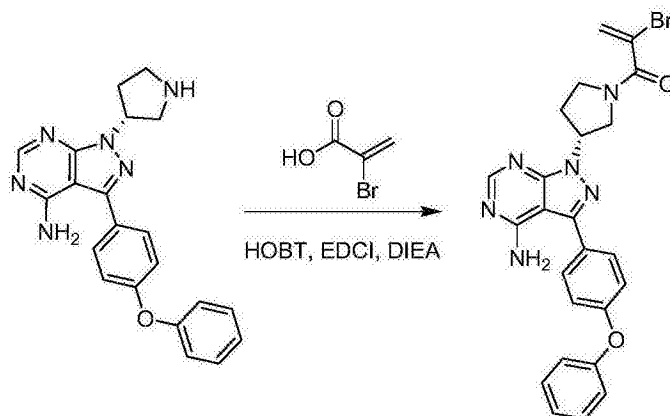
[0367]



[0368] 在反应瓶中, (R)-1-Boc-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)四氢吡咯 (7g, 14.8mmol) 加入到三氟乙酸 (40ml) 和二氯甲烷 (40ml) 混合溶液中, 室温反应过夜。点板确认反应完成后, 用饱和 Na₂CO₃ 溶液中和至 pH 为 7-8 后, 用 DCM 萃取, 有机相合并, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化得产品 (4.7g, 收率 86%)。ESI-MS(m/z): 373.2[M+H]⁺。

[0369] c. (R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)-1-四氢吡咯基)-2-溴丙烯-1-酮 (化合物 36) 的合成

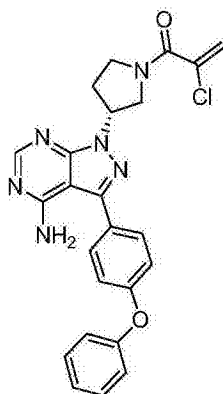
[0370]



[0371] 将 (R)-3-(4-苯氧苯基)-1-(吡咯-3-基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-4-氨基 (184mg, 0.5mmol), 2-溴丙烯酸 (88mg, 0.58mmol), HOBT (95mg, 0.7mmol) 和 EDCI (134mg, 0.7mmol), 溶于无水 DCM (10ml) 中, 加入 DIEA (271mg, 2.1mmol), 室温下搅拌 8h。加入乙酸乙酯稀释后水洗, 水相再用乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后, 浓缩柱层析纯化得产物 (177mg, 产率 71%)。ESI-MS (m/z): 505.1 [M+H]⁺。

[0372] 实施例 37: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-2-氯丙-2-烯-1-酮 (化合物 37) 的合成

[0373]

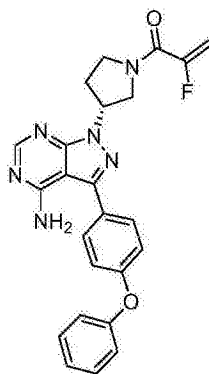


化合物 37

[0374] 与化合物 36 的制备类似的方法, 以 2-氯丙烯酸为原料, 可以制得化合物 37 (73% 产率)。ESI-MS (m/z): 461.1 [M+H]⁺。

[0375] 实施例 38: (R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-2-氟丙-2-烯-1-酮 (化合物 38) 的合成

[0376]

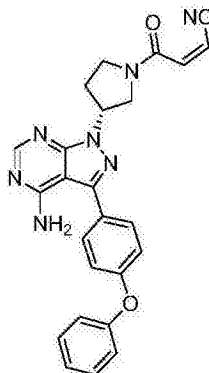


化合物 38

[0377] 与化合物 36 的制备类似的方法,以 2-氟丙烯酸为原料,可以制得化合物 38 (73% 产率)。ESI-MS (m/z): 445. 2[M+H]⁺。

[0378] 实施例 39: (R, Z)-4-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-4-氧代丁-2-烯腈(化合物 39)的合成

[0379]

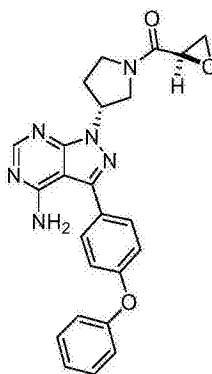


化合物 39

[0380] 与化合物 36 的制备类似的方法,以马来酰胺酸为原料,可以制得化合物 39 (73% 产率)。ESI-MS (m/z): 452. 2[M+H]⁺。

[0381] 实施例 40: [(R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)四氢吡咯-1-基][(R)-环氧乙烷-2-基]甲酮(化合物 40)的合成

[0382]

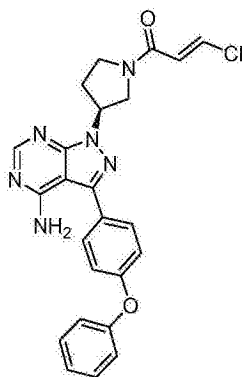


化合物 40

[0383] 与化合物 36 的制备类似的方法,以 (R)-环氧乙烷-2-羧酸钾为原料,可以制得化合物 40(72%产率)。ESI-MS(m/z):443.2[M+H]⁺。

[0384] 实施例 41:(S,E)-1-[3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)四氢吡咯-1-基]-3-氯丙-2-烯-1-酮(化合物 41)的合成

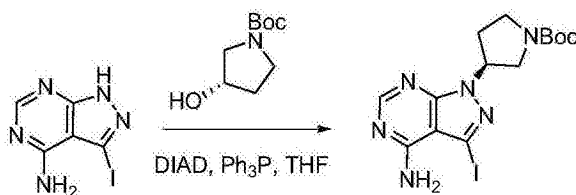
[0385]



化合物 41

[0386] a. (S)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)吡咯的合成

[0387]



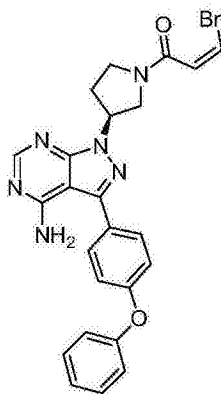
[0388] 将 4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶(12g,46mmol),(S)-1-Boc-3-羟基吡咯(19g,101mmol),三苯基膦(24g,92mmol)加入三口瓶中,加入 THF(120ml),降温至 0℃,滴加 DIAD(18.6g,76mmol)和 THF(30ml)混合液,约 1h 滴加完毕,缓慢升至室温反应过夜。将反应液旋干,加水,乙酸乙酯萃取,干燥,浓缩后柱层析纯化得产物(16g,收率 81%)。ESI-MS(m/z):431.1[M+H]⁺。

[0389] b. (S,E)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)-1-四氢吡咯基)-3-氯丙烯-1-酮的合成

[0390] 与化合物 36 的制备类似的方法,以 (S)-1-Boc-3-(4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-D]嘧啶-1-基)吡咯和 (E)-3-氯丙烯酸为原料,可以制得化合物 41(75%产率)。ESI-MS(m/z):461.2[M+H]⁺。

[0391] 实施例 42:(S,Z)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]四氢吡咯-1-基]-3-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 42)的合成

[0392]

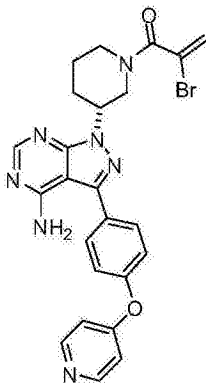


化合物 42

[0393] 与化合物 41 的制备类似的方法,以 (Z)-3-溴丙烯酸为原料,可以制得化合物 42(71%产率)。ESI-MS(m/z):505.2[M+H]⁺。

[0394] 实施例 43:(R)-1-[3-[4-氨基-3-(4-(吡啶-4-氧基)苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物 43)的合成

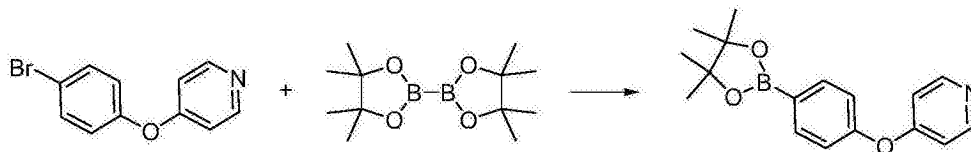
[0395]



化合物 43

[0396] a. 4-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯氧基)吡啶的合成

[0397]

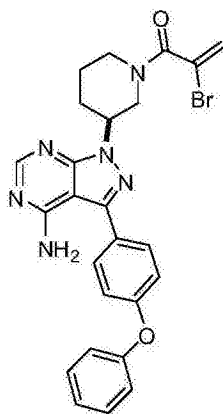


[0398] 50ml 单口烧瓶中,加入 4-(4-溴苯氧基)吡啶(2.5g,10mmol),联硼酸频那醇酯(3.9g,15mmol),KOAc(3.1g,31mmol),DME(65ml),DMSO(3.3ml)。N₂置换 3 次,加入催化剂 Pd(dppf)Cl₂(740mg,0.5mmol)。N₂置换 3 次,加热至 80℃,回流过夜,原料反应完。反应液过硅藻土,加水,EA 萃取,有机相干燥,浓缩,柱层析纯化产物(2.4g,产率 80%)。ESI-MS(m/z):298.2。

[0399] 与化合物 1 的制备类似的方法,以 4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶、4-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯氧基)吡啶和 2-溴丙烯酸为原料,可以制得化合物 43(66%产率)。ESI-MS(m/z):520.1[M+H]⁺。

[0400] 实施例 44:(S)-1-[3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧

啉-1-基]哌啉-1-基]-2-溴丙-2-烯-1-酮(化合物44)的合成
[0401]

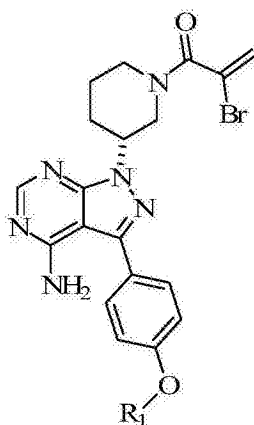


化合物44

[0402] 与化合物1的制备类似的方法,以4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶、(R)-1-Boc-3-羟基哌啉和2-溴丙烯酸为原料,可以制得化合物43(70%产率)。ESI-MS(m/z):519.1[M+H]⁺。

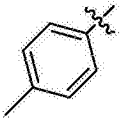
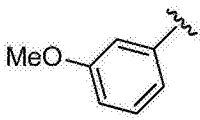
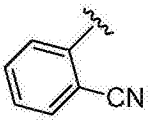
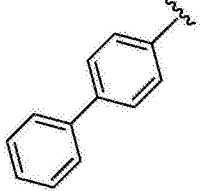
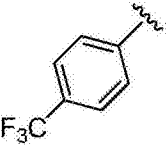
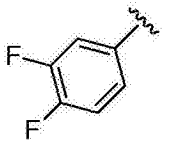
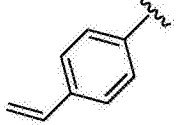
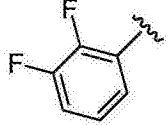
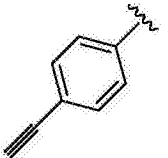
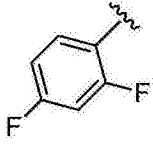
[0403] 实施例45-54:化合物45-54的合成

[0404]



化合物44-54

[0405]

化合物编号	R ₁	LC-MS	化合物	R ₁	LC-MS
45		533.1[M+H]	50		549.1[M+H]
46		544.1[M+H]	51		595.1[M+H]
47		587.1[M+H]	52		555.1[M+H]
48		545.1[M+H]	53		555.1[M+H]
49		543.1[M+H]	54		555.1[M+H]

[0406] 与化合物 1 的制备类似的方法,以 4-氨基-3-碘-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶、(S)-1-Boc-3-羟基哌啶和 2-溴丙烯酸为原料,可以制得化合物 45-54。

[0407] 2. 生物活性测试部分:

[0408] 生物实施例 1

[0409] 系列化合物在不同肿瘤细胞生长抑制试验 (CCK8 检测)

[0410] 一、细胞株:

[0411] L1210:鼠淋巴细胞白血病细胞株,DMEM+10% FBS;

[0412] WSU-DLCL2:人 B 淋巴细胞瘤细胞株,RPMI1640+10% FBS;

[0413] K562:人慢性髓原白血病细胞株,IMDM+10% FBS;

[0414] HL-60:人早幼粒白血病细胞株,IMDM+20% FBS;

[0415] 二、试剂与耗材:

[0416] CCK8 试剂盒;抗肿瘤化合物;DMSO。

[0417] 三、试验方法:

[0418] 1、细胞培养

[0419] 收集对数生长期细胞,计数,用完全培养基重新悬浮细胞,

[0420] 调整细胞浓度至合适浓度,接种 96 孔板,每孔接种 100 μ l 细胞悬液。

[0421] 细胞在 37℃, 100% 相对湿度, 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。

[0422] 2、相对抑制率实验

[0423] 收集对数生长期细胞, 计数, 用完全培养基重新悬浮细胞, 调整细胞浓度至合适浓度 (依照细胞密度优化试验结果确定), 接种 96 孔板, 每孔加 100 μl 细胞悬液。细胞在 37℃, 100% 相对湿度, 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。

[0424] 用培养基将待测化合物稀释至所设置的相应作用浓度, 按 25 μl/孔加入细胞。化合物作用终浓度从 10 μM 至 0 μM, 4 倍梯度稀释, 共 10 个浓度点。

[0425] 细胞置于 37℃, 100% 相对湿度, 5% CO₂ 培养箱中孵育 72 小时。

[0426] 吸弃培养基, 加入含 10% CCK-8 的完全培养基置于 37℃ 培养箱中孵育 2-4 小时。

[0427] 轻轻震荡后在 SpectraMax M5 Microplate Reader 上测定 450nm 波长处的吸光度, 以 650nm 处吸光度作为参比, 计算抑制率。

[0428] 数据处理及结果

[0429] 按下式计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率: 肿瘤细胞生长抑制率% = $[(Ac-As)/(Ac-Ab)] \times 100\%$

[0430] As: 样品的 OA (细胞 + CCK-8 + 待测化合物)

[0431] Ac: 阴性对照的 OA (细胞 + CCK-8 + DMSO)

[0432] Ab: 阳性对照的 OA (培养基 + CCK-8 + DMSO)

[0433] 运用软件 Graphpad Prism 5 并采用计算公式 $\log(\text{inhibitor})$ vs. response 进行 IC₅₀ 曲线拟合并计算出 IC₅₀ 值。

[0434] 表 1 实施例中部分化合物对不同肿瘤细胞生长抑制活性 (IC₅₀)

[0435]

Summary of IC ₅₀ (μM) -1				
化合物	L1210	WSU-DLCL2	K562	HL-60
实施例 1	2.095	0.7365	1.876	1.690
实施例 2	7.112	6.994	8.289	7.527
实施例 3	19.30	2.731	8.809	17.59
实施例 4	10.27	9.950	12.20	5.374
实施例 5	7.904	2.409	7.249	2.813
实施例 6	2.979	2.096	4.852	1.767
实施例 7	79.58	6.998	6.740	1.117
实施例 8	7.657	2.158	5.952	4.592
实施例 9	8.808	2.820	7.207	1.454
实施例 10	7.549	2.167	6.108	2.394
实施例 11	9.344	6.585	18.87	32.57
实施例 12	24.08	33.58	24.77	22.23
实施例 14	2.865	10.57	13.48	9.864
实施例 15	3.284	5.897	11.15	2.252
实施例 17	12.71	9.015	37.62	2.871
实施例 18	15.24	32.58	27.97	16.76
实施例 19	17.10	30.24	35.29	39.78
实施例 21	5.243	25.87	25.41	9.545
实施例 23	20.57	13.83	23.45	7.593

[0436]

实施例 24	11.90	12.57	25.91	21.80
实施例 25	37.26	14.79	35.41	32.48
实施例 26	8.725	5.053	5.057	5.341
实施例 27	2.674	6.075	8.649	0.8448
实施例 28	12.05	0.9953	30.67	35.25
实施例 29	8.478	8.849	9.631	3.843
实施例 30	17.08	0.769	3.426	16.14
实施例 31	21.26	1.189	4.202	20.39
实施例 32	1.769	1.632	2.910	8.675
实施例 33	3.888	3.784	3.784	15.27
依鲁替尼 (Ibrutinib)	20.69	0.2768	9.808	24.63

[0437] 生物实施例 2

[0438] 可以使用以下实验来测定本发明所述化合物对 Bruton's tyrosine kinase (BTK) 酶活性的抑制作用。

[0439] 体外激酶分析用 Cisbio 公司的 HTRF kinEASE TK kit, 操作步骤参照试剂盒说明书, 该方法在体外检测待测化合物对 BTK 酶活性的抑制作用。具体操作步骤如下:

[0440] 首先使用配置好的 1X kinase buffer 分别配制 2.5% 的 DMSO 溶液 (DMSO 浓度过高会对反应产生影响, 控制 DMSO 的终浓度为 1%), 然后用酶对应的 2.5% 的 DMSO 溶液稀释待测化合物至相应的测试浓度 (4X)。除对照孔外, 向所用反应孔中加入 4 μ L 的稀释好的待测化合物溶液, 向对照孔中加入 4 μ L 先前配制的 BTK 酶对应的 2.5% 的 DMSO 溶液。

[0441] 向所有反应孔中加入 2 μ L 先前配制好的 BTK 酶对应底物浓度的 TK-biotin substrate 溶液 (酶筛选时底物的用量见表 1)。

[0442] 向除阴性孔外的所有反应孔中加入 2 μ L 先前配制好的对应浓度的酶溶液 (酶的用量见表 1), 阴性孔用 2 μ L 酶对应 1X kinase buffer 补足体积。用封板膜封板, 混匀后室温孵育 10 分钟, 让化合物和酶充分作用结合。

[0443] 向所有反应孔中加入 2 μ L BTK 酶对应浓度的 ATP 溶液来启动激酶反应, BTK 的酶反应时间为 25 分钟 (酶筛选时对应的 ATP 浓度和反应时间见表 1)。

[0444] 在激酶反应结束前 5 分钟开始配制 BTK 检测液。使用试剂盒中的 detection buffer 分别配制两种酶对应浓度的 Streptavidin-XL665 和 TK antibody europium cryptate (1:100) 检测液 (酶筛选时对应的检测试剂浓度见表 1)。

[0445] 待激酶反应结束后,向所有反应孔中加入 5 μ L 稀释好的 Streptavidin-XL665,混匀后立即加入稀释好的 TK antibody europium cryptate 检测液。

[0446] 封板混匀,室温反应 1h 后,用 ENVISION(Perkinelmer) 仪器检测荧光信号 (320nm 刺激, 665nm, 615nm 发射)。通过全活性孔和背景信号孔计算出每个孔的抑制率,复孔取平均值,同时用专业的画图分析软件 PRISM 5.0 对每个待测化合物进行半数抑制活性 (IC_{50}) 的拟合。

[0447] 表 2,系列化合物对 BTK 酶的 IC_{50} 抑制活性测试

[0448]

化合物	IC_{50} 对 BTK 酶作用 (nM)
实施例 1	71.38
实施例 6	28.73
实施例 8	50.65
实施例 27	48.67
实施例 28	73.15
实施例 30	25.59
实施例 31	57.63
实施例 32	164.8
实施例 33	185.9
依鲁替尼 (Ibrutinib)	15.97

[0449] 生物实施例 3

[0450] 体内药效学评价

[0451] SCID Beige 小鼠,雌性,5 ~ 6 周龄,体重 18g \pm 2g,购自北京维通利华实验动物有限公司,SPF 级环境饲养。

[0452] 取对数生长期的 WSU-DLCL2 细胞,1000rpm 离心 5min,无血清培养基重悬,取 10 μ L 进行台盼蓝染色计数活细胞数 (细胞存活率 >90%),调整细胞密度为 1x10⁷ 个 / 0.2mL。取 4 只 5-6 周龄 SCID 小鼠,无菌条件下于左、右腋下各注射 WSU-DLCL2 细胞 1x10⁷ 个 / 侧 / 0.2mL,约两周即可看到明显的皮下瘤形成。待肿瘤大小生长到 300-500mm³ 时,小鼠安乐死,在无菌条件下将肿瘤剥离,置于 1640 培养基中,剪成 1-2mm³ 的瘤块 (每个皮下瘤大约可分成 20-30 个瘤块)。使用 12 号套管针将瘤块接种到 80 只 5-6 周龄 SCID 小鼠右腋下。

[0453] 当荷瘤小鼠肿瘤长到可测量的大小时,使用 SPSS 17.0 软件按照平均瘤体积均衡原则将小鼠随机分成 8 组。化合物实施例 1 和化合物实施例 2 以 90, 30, 10mg/kg, 每天灌胃给药;阳性对照药依鲁替尼以 30mg/kg, 每天灌胃给药,给药体积为 0.1ml/10g。每天给药一

次,连续给药 23 天,阴性对照组给等量溶剂(1% DMSO 的生理盐水溶液),给药期和恢复期间,每周测量小鼠体重和瘤径 2~3 次。根据测量数据计算肿瘤体积和相对肿瘤体积,肿瘤体积(Tumor Volume, TV)的计算公式为: $TV = 1/2 \times a \times b^2$,其中 a、b 分别表示肿瘤长径和短径。据测量结果计算出相对肿瘤体积(Relative tumor volume, RTV),计算公式为: $RTV = V_t/V_0$,其中 V_0 为试验开始时的肿瘤体积, V_t 为每次测量的肿瘤体积。抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增值率 T/C(%),计算公式如下: $T/C(\%) = TRTV/CRTV \times 100\%$, TRTV 为治疗组 RTV; CRTV 为阴性对照组 RTV, 相对肿瘤生长抑制率(抑瘤率) $\% = (1-T/C) \times 100\%$, 结果如表 3 所示。

[0454] 表 3: 本发明化合物对 WSU-DLCL2 裸小鼠移植瘤的治疗作用

[0455]

组别	剂量(mg/kg)	给药方式	RTV	抑瘤率(%)	T/C(%)
			d23		
Control	0	qd	12.30	---	---
依鲁替尼 (Ibrutinib)	30	qd	6.60	46.42	53.63
实施例 1	10	qd	6.54	49.29	53.20
实施例 1	30	qd	6.01	50.97	48.83
实施例 1	90	qd	8.05	34.64	65.44
实施例 6	10	qd	8.11	38.53	65.92
实施例 6	30	qd	7.40	44.12	60.12
实施例 6	90	qd	7.41	43.00	60.23