



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112225734 B

(45) 授权公告日 2021.12.07

(21) 申请号 202011153732.6

(22) 申请日 2020.10.23

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112225734 A

(43) 申请公布日 2021.01.15

(66) 本国优先权数据  
PCT/CN2019/113216 2019.10.25 CN

(73) 专利权人 南京瑞捷医药科技有限公司  
地址 211112 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号9号楼7层

(72) 发明人 张军波 朱曙灏 齐晓昕

(74) 专利代理机构 北京邦中知识产权代理有限公司 11827  
代理人 付佳

(51) Int.Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/4545 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

审查员 刘长娥

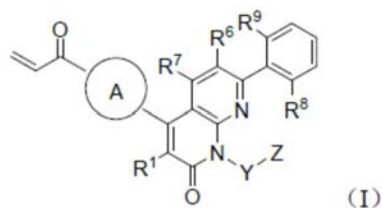
权利要求书2页 说明书49页

(54) 发明名称

KRAS G12C抑制剂及其用途

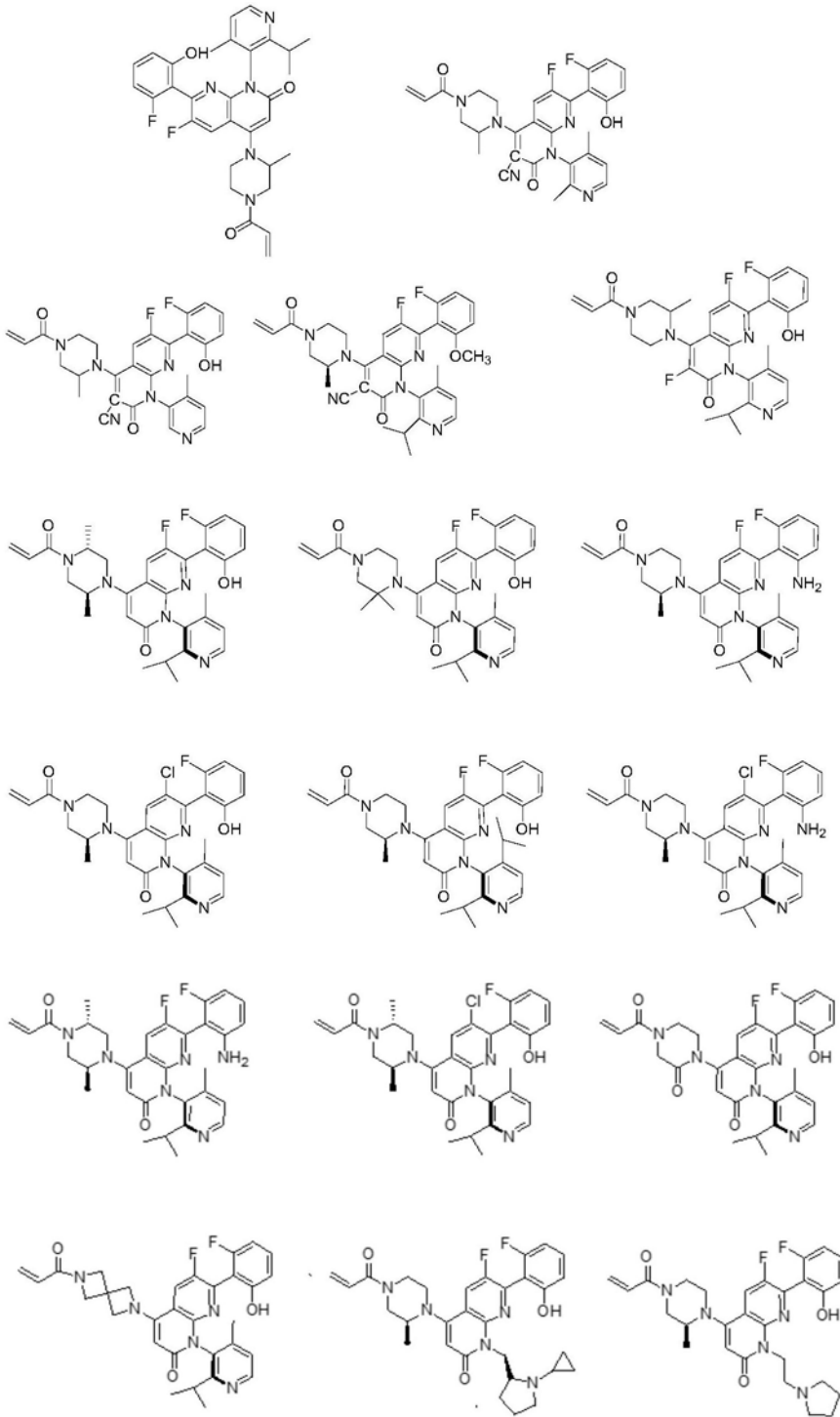
(57) 摘要

本发明涉及KRAS G12C抑制剂及其用途,具体地,本发明提供一种式(I)所示化合物,或其立体异构体,或其阻转异构体,或其药学上可接受的盐,或其互变异构体,或其前药。



1. 一种式 (I) 所示化合物, 或其立体异构体, 或其阻转异构体, 或其药学上可接受的盐, 或其互变异构体:

所述的式 (I) 化合物为选自以下结构之一的化合物:



2. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述的药物组合物包括 (1) 如权利要求1所述的化合物; 和 (2) 药学上可接受的载体。

3. 一种如权利要求1所述的化合物的用途, 其特征在于, 用于制备药物组合物, 所述的药物组合物用于: (ii) 抑制或逆转肿瘤对抗肿瘤药物的多药耐药性; (iii) 抑制P-糖蛋白;

和/或(iv)增强抗肿瘤药物的抗肿瘤活性。

4.如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的肿瘤包括对抗肿瘤药物产生多药耐药性的肿瘤。

5.如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的肿瘤选自下组:肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、血液系统恶性肿瘤、口腔癌,或其组合。

6.如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的抗肿瘤药物包括长春新碱。

7.如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的肿瘤为P-糖蛋白高表达肿瘤。

8.如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的多药耐药性是由P-糖蛋白高表达引起的多药耐药性。

9.如权利要求5所述的用途,其特征在于,所述的口腔癌包括口腔表皮样癌。

10.如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的药物组合物用于:(ii)抑制或逆转肿瘤对抗肿瘤药物的多药耐药性;

所述的肿瘤为P-糖蛋白高表达肿瘤;

所述的肿瘤为口腔表皮样癌;

所述的抗肿瘤药物为长春新碱。

## KRAS G12C抑制剂及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物领域,具体地,本发明涉及KRAS G12C抑制剂。

### 背景技术

[0002] RAS代表一组紧密相关的189个氨基酸(分子量21kDa)的单体球状蛋白,其与质膜相关,并结合GDP或GTP。RAS作为分子开关。当RAS含有结合的GDP时,它处于静止或关闭状态,并且处于“非活动状态”。响应细胞暴露于某些促进生长刺激时,RAS被诱导将其结合的GDP转换成GTP。与GTP结合后,RAS被“打开”,并且能够与其它蛋白(其“下游目标”)相互作用和激活其它蛋白。RAS蛋白本身具有非常低的内在能力,无法将GTP水解回GDP,从而使其自身处于关闭状态。关闭RAS需要称为GTPase激活蛋白(GAPs)的外在蛋白,该蛋白与RAS相互作用并大大加快GTP向GDP的转化。RAS中影响其与GAP相互作用或将GTP转换回GDP的能力的任何突变都将导致蛋白质的活化时间延长,从而导致细胞信号延长,使其继续生长和分裂。因为这些信号导致细胞生长和分裂,所以过度活跃的RAS信号可能最终导致癌症。

[0003] 在结构上,RAS蛋白包含一个G结构域,该结构域负责RAS的酶促活性-鸟嘌呤核苷酸结合和水解(GTPase反应)。它还包含一个称为CAAX盒的C末端延伸,可进行翻译后修饰,并负责将蛋白质靶向膜。G结构域的大小约为21-25kDa,它包含一个磷酸盐结合环(P-环)。P-环为核苷酸在蛋白质中结合的口袋,这是具有保守氨基酸残基((甘氨酸12、苏氨酸26和赖氨酸16))的结构域的刚性部分,对于核苷酸结合和水解至关重要。G域还包含所谓的Switch I(残基30-40)和Switch II(残基60-76)区域,这两个区域都是蛋白质的动态部分,由于它们在能够在静止和负载状态间转换,其通常被称为“弹簧负载”机制。关键相互作用是苏氨酸35和甘氨酸60形成的氢键,具有GTP的 $\gamma$ -磷酸酯,其分别使Switch 1和Switch 2区域保持其活性构象。GTP水解并释放出磷酸盐后,这两个松弛为非活性的GDP构象。

[0004] RAS亚家族最著名的成员是HRAS,KRAS和NRAS,主要是因为它们与多种类型的癌症有关。RAS的三个主要同工型(HRAS,NRAS或KRAS)基因中的任何一种突变都是人类肿瘤发生中最常见。发现人类肿瘤中约有30%携带RAS基因突变。值得注意的是,KRAS突变在25-30%的肿瘤中检测到。相比之下,在NRAS和HRAS家族成员中发生的致癌突变率要低得多(分别为8%和3%)。在P环的残基G12和G13以及残基Q61处发现了最常见的KRAS突变。G12C是KRAS基因的频繁突变(甘氨酸12突变为半胱氨酸)。已经在大约13%的癌症发生,大约43%的肺癌发生以及大约100%的MYH相关性息肉病(家族性结肠癌综合征)中发现了这种突变。

[0005] 作为前沿靶点,KRAS G12C突变蛋白受到了广泛关注。Araxes(Wellspring的子公司)与Janssen Biotech签订了独家协议,共同开发一流的抗肿瘤药物,是最早进入KRAS抑制剂领域的公司之一。它分别在2013年和2016年开发了ARS-853和ARS-1620化合物。近年来,它还为KRAS G12C抑制剂申请了多项专利,例如W02016164675和W02016168540。ARS-853化合物显示出良好的细胞活力,但它们的药代动力学性能很差,这不适合用于评估动物模型在体内的药效学。Ars-1620对KRAS G12C具有高效率 and 选择性,可在体内实现快速,持续的靶标作用,从而诱导肿瘤消退。这项研究提供的体内证据表明ARS-1620代表了新一代

KRAS G12C特异性抑制剂,具有巨大的治疗潜力。2019年5月,Wellspring宣布FDA已批准ARS-3248的IND应用。Janssen全权负责该化合物的临床开发。7月26日,JNJ-74699157 (ARS-3248) 在临床试验中进行了I期临床试验注册(NCT04006301) 和选择具有晚期实体瘤的KRAS G12C阳性患者进行为期4年的研究。

[0006] 在2019年7月25日,Medshine Discovery Int还发布了KRAS G12C抑制剂的专利。最早的优先日期是2018年1月。其它候选KRAS G12C抑制剂包括Mirati疗法的MRTX-849和Boehringer Ingelheim的BI-2852等。本发明进一步提供了一系列化合物作为KRAS G12C抑制剂。

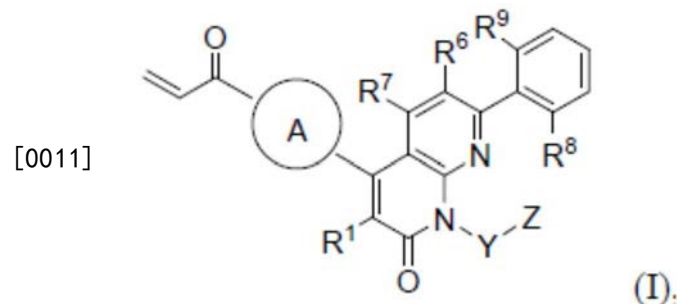
[0007] 肿瘤的多药耐药性能够显著降低肿瘤对抗肿瘤药物的敏感性,从而降低了抗肿瘤药物对肿瘤的杀伤效果,现有的临床药物中缺乏有效的抑制或逆转肿瘤对抗肿瘤药物的多药耐药性的药物,因此,开发抑制或逆转肿瘤对抗肿瘤药物的多药耐药性的药物成为当今研究的热点。

[0008] 因此,本领域需要开发一种能够有效抑制或逆转肿瘤对抗肿瘤药物的多药耐药性的药物,从而提高抗肿瘤药物对肿瘤的治疗效果。

### 发明内容

[0009] 本发明提供了一种调节G12C突变体KRAS、HRAS和/或NRAS蛋白的化合物,或其立体异构体,或其药学上可接受的盐,或其互变异构体,或其前药。在某些实施例中,本发明所述的化合物起亲电试剂的作用,能够与KRAS、HRAS或NRAS G12C突变蛋白的12位半胱氨酸残基形成共价键。本发明还提供本发明所述的化合物治疗各种疾病或病症,例如癌症(优选地为对抗肿瘤药物产生多药耐药性的肿瘤)的方法。

[0010] 在本发明的一个方面,提供一种式(I)所示化合物,或其立体异构体,或其阻转异构体,或其药学上可接受的盐,或其互变异构体,或其前药:



[0012] 在本发明的另一方面,提供一种药物组合物,所述的药物组合物包含一种或多种本发明所述的式(I)所示化合物和药学上可接受的载体。

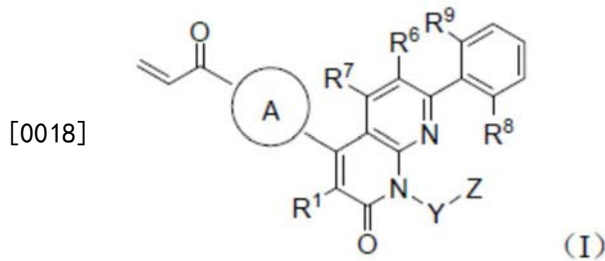
[0013] 在本发明的另一方面,提供一种抑制细胞中的KRAS G12C的方法,所述的方法包括步骤:将细胞与式(I)所示化合物接触。

[0014] 在本发明的另一方面,提供一种治疗受试者癌症的方法,所述的方法包括步骤:对受试者施用治疗有效量的式(I)所示化合物。

[0015] 在本发明的另一方面,提供一种本发明所述的式(I)所示化合物在治疗受试者的癌症中的用途。

[0016] 具体地:

[0017] 本发明提供一种式(I)所示化合物,或其立体异构体,或其阻转异构体,或其药学上可接受的盐,或其互变异构体,或其前药:



[0019] 其中:

[0020]  $R^1$ 是H、CN、F、Cl、 $C_{1-6}$ 烷基;

[0021]  $R^6$ 和 $R^7$ 各自独立地为H、F或Cl;

[0022]  $R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为H、F、Cl、OH、CN或 $NH_2$ ;

[0023] 环A为取代或未取代的4-7元环或在环上具有一个杂原子或两个杂原子的双环、桥环、稠合或螺合6-11元环,所述的取代的取代基各自独立地选自烷基、或环烷基;

[0024] Y为 $(CH_2)_p$ , p为0到6之间的任何整数;

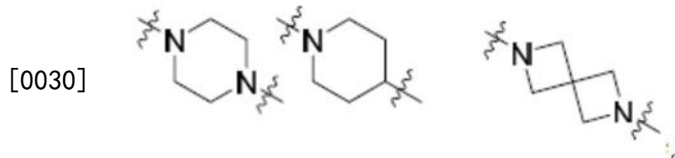
[0025] Z为在环上具有一个或两个杂原子的取代或未取代的4-7元环,所述取代的取代基各自独立地选自烷基或环烷基。

[0026] 优选地,环A为取代或未取代的5-7元杂环烷环,所述的6元杂环烷环的环具有2个N杂原子,所述的取代是指5-7元杂环烷环的1个或2个氢原子被选自下组的取代基所取代: $C_{1-4}$ 烷基、或 $C_{3-6}$ 环烷基。

[0027] 优选地,环A为取代或未取代的哌嗪环,所述的6元杂环烷环的环具有2个N杂原子,所述的取代是指哌嗪环的1个或2个氢原子被选自下组的取代基所取代: $C_{1-4}$ 烷基、或 $C_{3-6}$ 环烷基。

[0028] 优选地,环A为取代或未取代的哌嗪环。

[0029] 优选地,环A选自单取代或二取代的



[0031] 优选地, $R^1$ 是H、CN、F、Cl、 $C_{1-6}$ 烷基。

[0032] 优选地, $R^6$ 和 $R^7$ 各自独立地为H、F或Cl。

[0033] 优选地, $R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为H、F、Cl、OH、CN或 $NH_2$ 。

[0034] 优选地, p为0、1或2。

[0035] 优选地, Z为取代或未取代的4-7元杂环。

[0036] 优选地, Z为取代或未取代的吡咯环或吡啶环。

[0037] 优选地, $R^1$ 为H、CN或F。

[0038] 优选地, $R^6$ 为H、F或Cl。

[0039] 优选地, $R^7$ 为H。

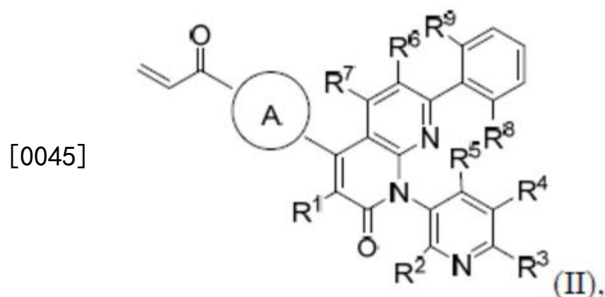
[0040] 优选地, $R^8$ 为H、OH或 $NH_2$ 。

[0041] 优选地,  $R^9$  是 F。

[0042] 优选地, Z 为取代或未取代的 5-7 元杂芳基, 所述的取代是指 5-7 元杂芳基的 1、2 个或 3 个氢原子被选自下组的取代基所取代: C1-C4 烷基、或 C3-C6 环烷基。

[0043] 优选地, Z 为取代或未取代的吡啶基, 所述的取代是指吡啶基的 1、2 个或 3 个氢原子被选自下组的取代基所取代: C<sub>1-4</sub> 烷基、或 C<sub>3-6</sub> 环烷基。优选地, 所述的取代指基团上的一个或多个 (优选为 1、2、3、或 4 个) 氢原子被选自下组的取代基所取代: C<sub>1-4</sub> 烷基、或 C<sub>3-6</sub> 环烷基。

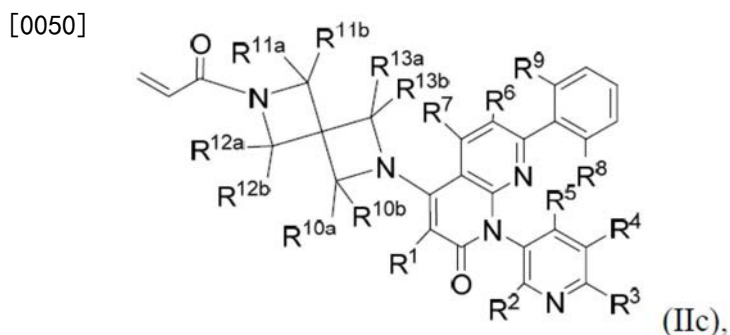
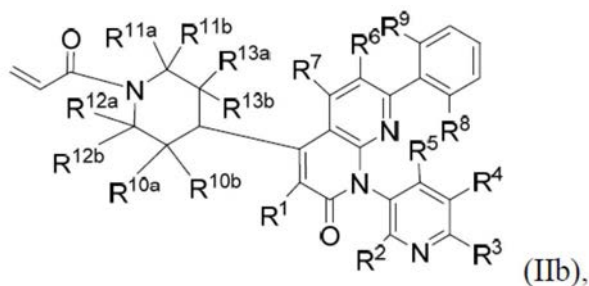
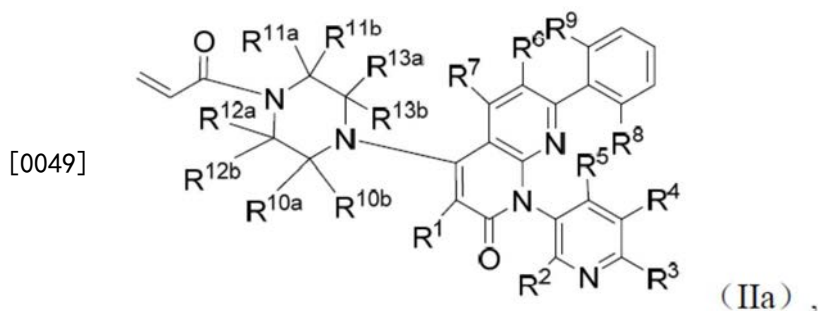
[0044] 在一些实施方案中, 该化合物具有以下结构 (II),



[0046] 其中:

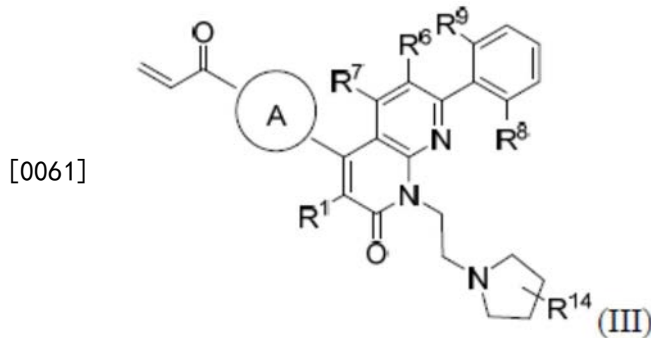
[0047]  $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  和  $R^5$  各自独立地为 H、C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>1-6</sub> 烷氧基、C<sub>3-6</sub> 环烷基、C<sub>2-6</sub> 烯基或 C<sub>2-6</sub> 炔基;

[0048] 在一些实施方案中, 所述的化合物具有式 (IIa)、式 (IIb) 或式 (IIc) 所示的结构:

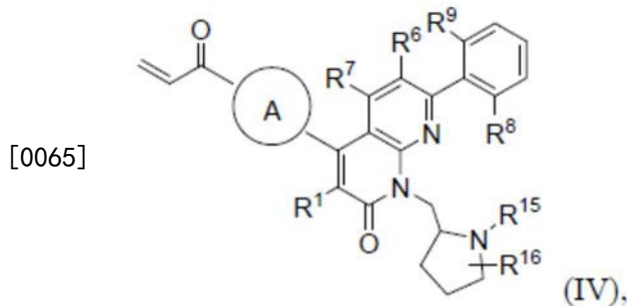


[0051] 其中,  $R^{10a}$ 、 $R^{10b}$ 、 $R^{11a}$ 、 $R^{11b}$ 、 $R^{12a}$ 、 $R^{12b}$ 、 $R^{13a}$  和  $R^{13b}$  各自为 H, 卤素或 C<sub>1-3</sub> 烷基;

- [0052]  $R^1$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 和 $R^9$ 如上所定义。
- [0053] 优选地， $R^2$ 和 $R^5$ 各自独立地是 $C_{1-3}$ 烷基、氢。
- [0054] 优选地， $R^3$ 和 $R^4$ 是H。
- [0055] 优选地， $R^2$ 和 $R^5$ 各自独立地是H、异丙基或Me。
- [0056] 优选地， $R^3$ 和 $R^4$ 是H。
- [0057] 优选地， $R^{10a}$ 、 $R^{10b}$ 、 $R^{11a}$ 、 $R^{11b}$ 各自独立地为H或 $CH^3$ ， $R^{12a}$ 、 $R^{12b}$ 、 $R^{13a}$ 和 $R^{13b}$ 为H。
- [0058] 优选地， $R^1$ 是H、CN或F， $R^2$ 和 $R^5$ 各自独立地是H、i-Pr或Me， $R^3$ 和 $R^4$ 是H， $R^6$ 是H、F或Cl， $R^7$ 是H， $R^8$ 是H、OH或 $NH_2$ ， $R^9$ 是F。
- [0059] 优选地，所述的烷基为甲基、乙基、丙基或丁基。
- [0060] 在某些实施方案中，所述的化合物具有以下结构(III)，

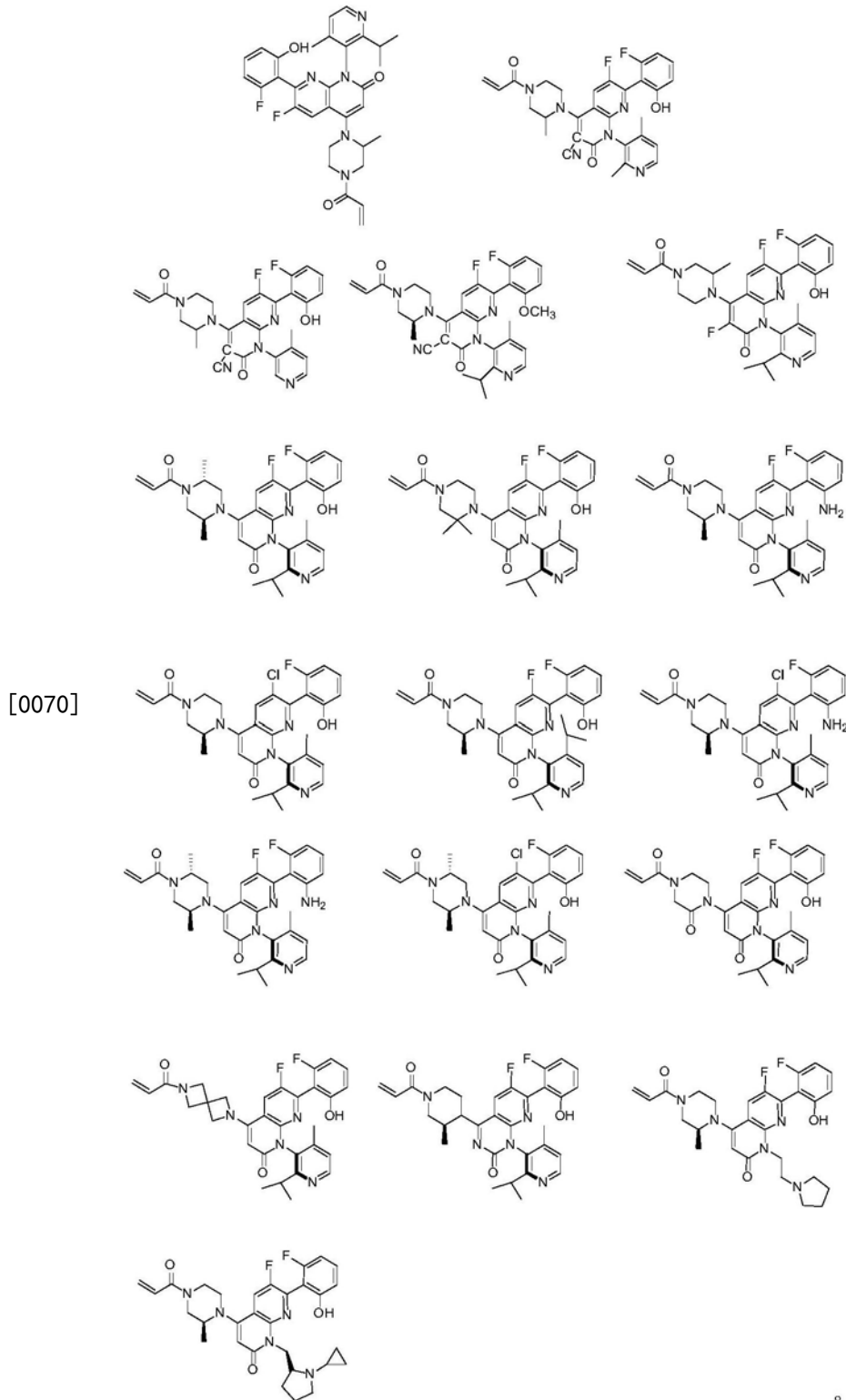


- [0062]  $R^{14}$ 是H、F、Cl、CN或烷基。
- [0063] 优选地，其中环A为取代或未取代的哌嗪环， $R^1$ 为H、CN或F， $R^6$ 是H、F或Cl， $R^7$ 是H， $R^8$ 是H、OH或 $NH_2$ ， $R^9$ 是F， $R^{14}$ 是H。
- [0064] 在某些实施方案中，其中化合物具有式(IV)所示的结构：



- [0066]  $R^{15}$ 是烷基或环烷基；
- [0067]  $R^{16}$ 是H、F、Cl、CN、烷基或环烷基。
- [0068] 优选地，环A为取代或未取代的哌嗪环， $R^1$ 为H、CN或F， $R^6$ 为H、F或Cl， $R^7$ 为H， $R^8$ 为H、OH或 $NH_2$ ， $R^9$ 为F， $R^{15}$ 为Me、Et或环丙烷， $R^{16}$ 为H。
- [0069] 优选地，所述的式(I)化合物为选自以下结构之一的化合物：





[0071] 本发明所述的化合物可以是药学上可接受的盐的形式。可以将本发明所述的化合物制备成组合物(如药物组合物),所述的组合物包含本发明所述的化合物和药学上可接受的载体。

[0072] 本发明还提供一种体外抑制细胞中的KRAS G 12C的方法,所述的方法包括步骤:将细胞与本发明所述的化合物或组合物接触。

[0073] 本发明还提供一种治疗受试者癌症的方法,所述的方法包括步骤:对受试者施用

治疗有效量的本发明所述的化合物或组合物。

[0074] 本发明还提供一种本发明所述的式 (I) 所示化合物,或其立体异构体,或其阻转异构体,或其药学上可接受的盐,或其互变异构体,或其前药的用途,用于制备药物组合物,所述的药物组合物用于:(i) 预防和/或治疗肿瘤;(ii) 抑制或逆转肿瘤对抗肿瘤药物的多药耐药性;(iii) 抑制P-糖蛋白;(iv) 增强抗肿瘤药物的抗肿瘤活性的;和/或(v) 抑制KRAS G12C。

[0075] 在一些实施方案中,所述肿瘤选自下组:肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、血液系统恶性肿瘤、口腔癌,或其组合。

[0076] 在一些实施方案中,所述的口腔癌包括口腔表皮样癌,优选为人口腔表皮样癌。

[0077] 在一些实施方案中,所述的肿瘤包括对抗肿瘤药物产生多药耐药性的肿瘤。

[0078] 在一些实施方案中,所述的抗肿瘤药物包括长春新碱。

[0079] 在一些实施方案中,所述的肿瘤为P-糖蛋白高表达肿瘤。

[0080] 在一些实施方案中,所述的多药耐药性是由P-糖蛋白引起的多药耐药性。

[0081] 在一些实施方案中,所述的多药耐药性是由P-糖蛋白高表达引起的多药耐药性。

[0082] 在一些实施方案中,所述的抑制P-糖蛋白包括抑制P-糖蛋白的表达。

[0083] 在一些实施方案中,所述的P-糖蛋白为肿瘤P-糖蛋白。

[0084] 在一些实施方案中,所述的组合物还包括其它药物活性化合物。

[0085] 在一些实施方案中,其它药物活性化合物是卡非佐米或阿糖胞苷。

[0086] 在一些实施方案中,所述的药物组合物包括长春新碱。

[0087] 本发明还提供一种药物组合物,所述的药物组合物包括长春新碱和本发明所述的式 (I) 所示化合物,或其立体异构体,或其阻转异构体,或其药学上可接受的盐,或其互变异构体,或其前药。

[0088] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。

## 具体实施方式

[0089] 本发明开发了一种式 (I) 所示化合物,所述的式 (I) 所示化合物能够抑制KRAS G12C,且本发明所述的式 (I) 所示化合物对多药耐药性肿瘤具有优异的治疗效果。

[0090] 术语

[0091] 除非另有定义,否则本文中所有的技术和科学术语的含义与本发明所属领域普通技术人员普遍理解的含义相同。

[0092] 如本文所用,术语“包括”、“包含”与“含有”可互换使用,不仅包括开放式定义,还包括半封闭式、和封闭式定义。换言之,所述术语包括了“由……构成”、“基本上由……构成”。

[0093] 缩写:本文中字母缩写及其含义如下表A所示:

[0094] 表A

[0095]

AcOH	醋酸
Aq或aq。	水溶液
BOC 或 Boc	叔丁氧羰基
cpme	环戊基甲基醚
DCE	1,2-二氯乙烷
DAB CO	1,4-二氮杂环[2.2.2]辛烷
DCM	二氯甲烷
DMA	N, N-二甲基乙酰胺
DMAP	4-二甲基氨基吡啶

[0096]

DME	1,2-二甲氧基乙烷
DMF	N, N-二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
Dppf, DPPF或dppf	1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁
eq或eq或equiv	当量
ESI或ES	电喷雾电离
Et	乙基
Et <sub>2</sub> O	乙醚
EtOAc	乙酸乙酯
g	克
h	小时
HPLC	高效液相色谱法
i-Pr	异丙基
iPr <sub>2</sub> NEt或DIPEA	N-乙基乙基二异丙胺 (Hiinig's碱)
KHMDS	六乙基二硅氮化钾
KOAc	醋酸钾
Lawesson's试剂	2,4-双(4-甲氧基苯基)-2,4-二硫代-1,3,2,4-二硫代双氧萘 2,4-双-(4-甲氧基苯基)-1,3-二硫-2,4-双二苯砷4-二膦烷 -2,4-二硫化物
LC MS, LCMS, LC-MS或 LC/MS	液相色谱-质谱法
LG	离去基团(例如卤素、甲磺酸、三氟甲磺酸)
LHMDS或LiHMDS	六乙基二硅叠氮化锂
m/z	质量/电荷
Me	甲基
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
Met	交叉耦合的金属种类(例如MgX, ZnX, SnR <sub>3</sub> , SiR <sub>3</sub> , B (OR) <sub>2</sub> )
mg	毫克
min	分钟
ml	毫升
NaHMDS	六乙基二硅叠氮化钠
NBS	N-溴琥珀酰亚胺
n-BuLi	正丁基锂
NCS	N-氯琥珀酰亚胺
NMR	核磁共振
Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	三(二亚苄基丙酮)二钯(O)

Pd (dppf) Cl <sub>2</sub> ·DCM	[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II), 与二氯甲烷络合
Pd (PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	四(三苯基膦)钯(O)
RT或rt	室温
Sat或satd.	饱和的
SFC	超临界流体色谱
THF	四氢呋喃
UV	紫外线
t-BuOH	叔丁醇
FBS	胎牛血清
P/S	青霉素链霉素
Xantphos	4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽
CS <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	碳酸铯
PE	石油
EA	乙酸乙酯

## [0098] 定义

[0099] 除非另有说明,否则本文中使用的以下术语和短语旨在具有以下含义。如果没有特定定义,则不应将特定术语或短语视为不确定或不清楚,而应根据一般含义来理解。当商品名称出现在本发明中时,是指相应的商品或其活性成分。如本文所用,术语“药学上可接受的”指那些化合物,材料,组合物和/或剂型在可靠的医学判断范围内并且适合与人和动物组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症,并具有合理的获益/风险比。

[0100] 在描述本发明的上下文中(尤其是在权利要求的上下文中)术语“一”,“一个”和类似指代的使用应被解释为涵盖单数和复数,除非另有说明。否则本文中数值范围的叙述仅旨在用作分别指代落入该范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独值都被并入说明书中,就好像它是本文单独引用。除非另外要求,否则本文提供的任何和所有示例或示例性语言(例如“例如”)的使用旨在更好地说明本发明,而不是对本发明范围的限制。说明书中的任何叙述都不应解释为指示任何未要求保护的要素对于实施本发明必不可少。

[0101] 如本文所用,术语“烷基”是指直链和支链C<sub>1-6</sub>烃基,包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2,2-二甲基丙基、正己基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基和2-乙基丁基。术语“C<sub>m-n</sub>”是指烷基具有“m”至“n”个碳原子。术语“亚烷基”是指具有取代基的烷基。烷基(例如甲基)或亚烷基(例如-CH<sub>2</sub>-)基团可以被一个或多个,通常是1-3个独立选择的基团取代,例如卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、羟基、烷氧基、硝基、氰基、烷基氨基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>2-6</sub>炔基、-NC、氨基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>2-6</sub>炔基、NC、-CO<sub>2</sub>H、CO<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>烷基、-OCOC<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>3-8</sub>环烷基、C<sub>3-8</sub>杂环烷基、C<sub>5-8</sub>芳基和C<sub>5-8</sub>杂芳基。

[0102] 如本文所用,术语“烯基”和“炔基”分别表示包括双键或三键的烷基。

[0103] 如本文所用,术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

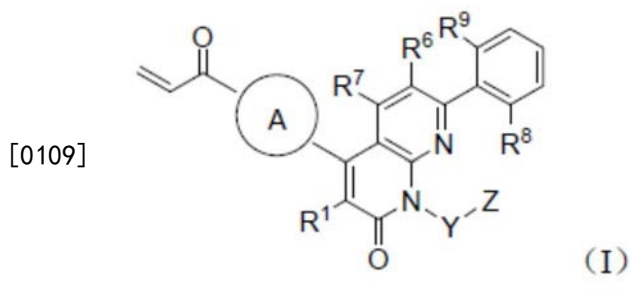
[0104] 如本文所用,术语“烷氧基”定义为-OR,其中R是烷基。

[0105] 除非另有说明,否则取代的取代基各自独立地选自F、C1、CN、C1-3烷基、C1-3烷基、C3-5环烷基、C2-4烯基或C2-4炔基。术语“杂环烷环”是指完全饱和的或部分不饱和的的环(包含但不限于如5-7元单环),其中至少有一个杂原子(如N、O、S)存在于至少有一个碳原子的环中。当杂环前有元数限定时,指的是杂环的环原子个数,例如5-7元杂环指的是具有5-7个环原子的杂环。每个含有杂原子的杂环上可以带有一个或多个(如1,2,3或4个)杂原子,这些杂原子各自独立地选自氮原子、氧原子或硫原子。典型的单环杂环烷环包括但不限于哌啶环、哌嗪环,或类似基团。

[0106] 语“杂芳基”指具有一个到多个(优选为1、2、3或4个)杂原子的芳族杂环系基团,其可以是单环(单环的)或者稠合在一起或共价地连接的多环(二环的、三环的或多环的),每个含有杂原子的杂环上可以带有一个或多个(如1、2、3、4个)各自独立选自下组的杂原子:氧、硫和氮。当杂芳基前有元数限定时,指的是杂芳基的环原子个数,例如5-7元杂芳基指的是具有5-7个环原子的杂芳基,代表性的例子包括但不限于:吡咯基、吡唑基,或类似基团。

[0107] 化合物

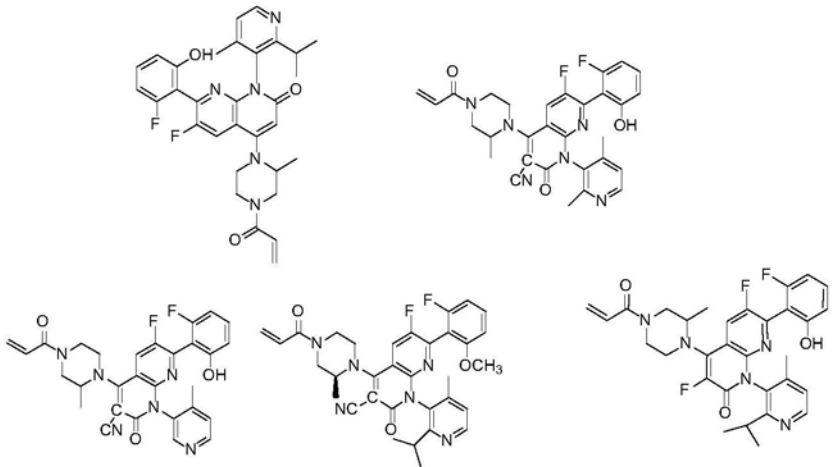
[0108] 如本文所用,“本发明化合物”、“本发明所述的化合物”、“式(I)所示化合物”可互换使用,指具有式(I)所示化合物,或其立体异构体,或其阻转异构体,或其药学上可接受的盐,或其互变异构体,或其前药:



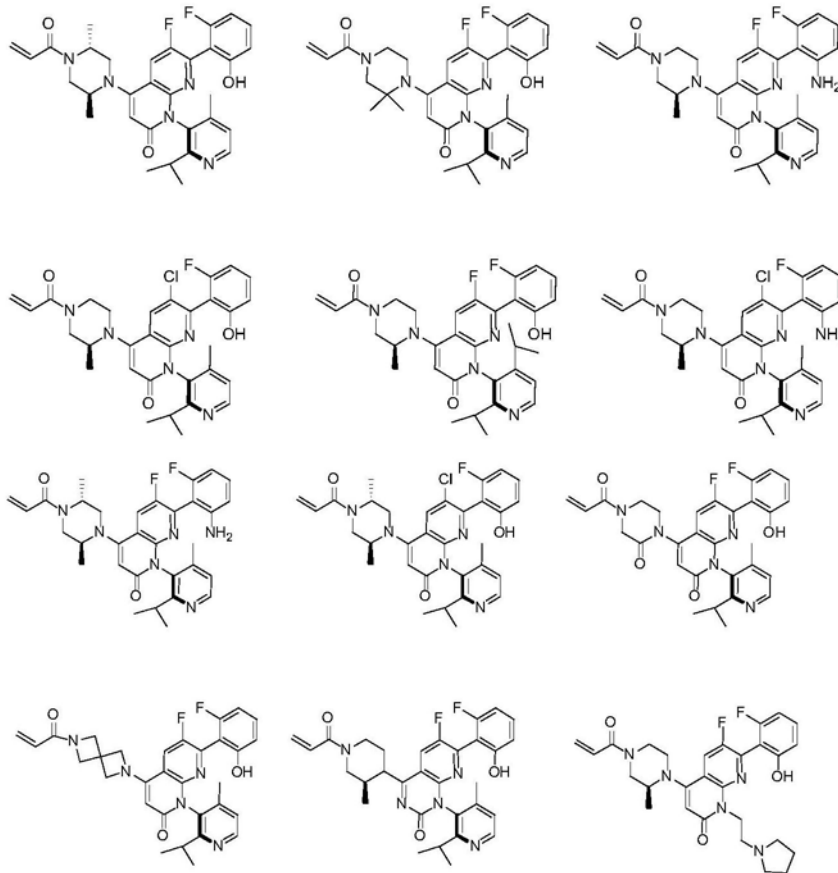
[0110] 具体地,所述的式(I)所示化合物如上所述。

[0111] 本发明化合物优选为如本发明实施例中的具体化合物。

[0112] 代表性地,本发明化合物选自下组:



[0113]



[0114]

[0115] 本文提供了具有式 (Ia) - (Ic) 结构之一的KRAS抑制剂。

[0116] 本发明公开的化合物包括所有药学上可接受的同位素标记的化合物,其中本发明公开的化合物的一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或原子序数不同于自然界通常发现的原子质量或原子序数的原子取代。可以掺入本发明所述的化合物中的同位素的例子包括氢、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素,例如<sup>2</sup>H、<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>17</sup>O、<sup>18</sup>O

<sup>31</sup>P、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>18</sup>F和<sup>36</sup>Cl。这些放射性标记的化合物通过表征例如作用部位或作用方式或对药理学上重要作用部位的结合亲和力,可用于帮助确定或测量化合物的有效性。本公开内容的某些同位素标记的化合物,例如掺入放射性同位素的化合物可用于药物和/或底物组织分布研究。放射性同位素氚,即“<sup>3</sup>H和碳-14,即,考虑到它们的易于结合和易于检测的手段,对于该目的而言是特别有用的。

[0117] 用较重的同位素(例如氘),即“<sup>2</sup>H”,可能会因更高的代谢稳定性(例如,体内半衰期延长或剂量要求降低)而具有某些治疗优势,因此在某些情况下是优选的。

[0118] 用正电子发射同位素(例如<sup>11</sup>C、<sup>18</sup>F、<sup>15</sup>O和<sup>13</sup>N)替代可用于正电子发射断层扫描(PET)研究中,以检查底物受体的占有率。结构(I)的同位素标记的化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过类似于下文所述的制备和实施例中描述的那些方法来制备,使用适当的同位素标记的试剂来代替先前使用的非标记试剂。

[0119] 本文公开的化合物可以立体异构体(即仅在原子的空间排列上不同的异构体)的形式存在,包括旋光异构体和构象异构体(或构象异构体)。本文公开的化合物包括所有立体异构体,既是纯的单独的立体异构体制备物,又是各自的富集制备物,并且此类立体异构体的外消旋混合物以及可以根据本领域技术人员已知的方法分离的单独的非对映异构体和对映异构体。另外,本文公开的化合物包括化合物的所有互变异构形式。

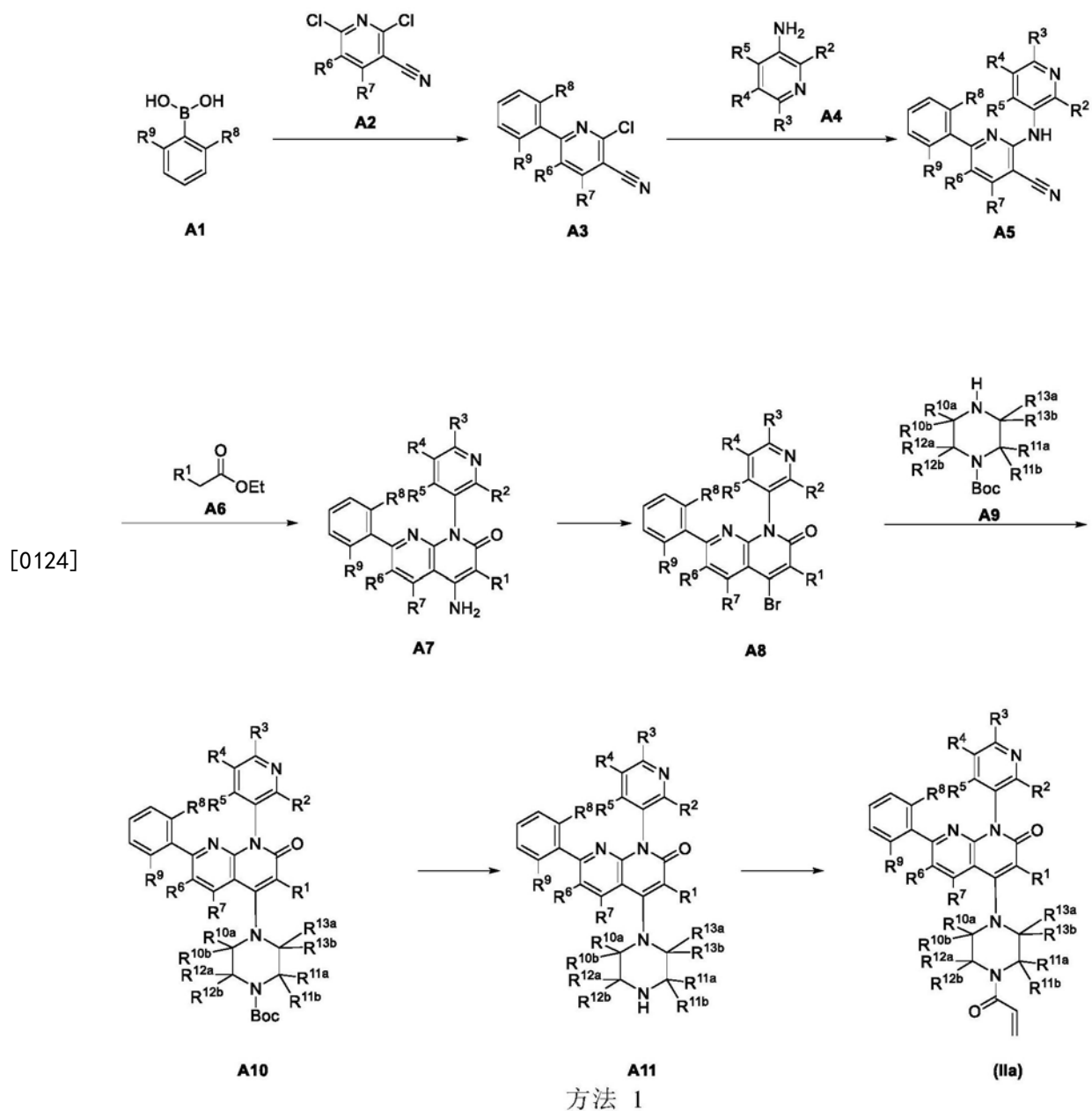
[0120] 本文公开的某些化合物可以以阻转异构体存在,其是构象立体异构体,当由于与分子的其他部分的空间相互作用而阻止或大大减缓围绕分子中单键的旋转时出现。本文公开的化合物包括所有的阻转异构体,既是纯的单独的阻转异构体制备物,又是各自的富集制备物,或者是各自的非特异性混合物。如果围绕单键的旋转势垒足够高,并且构象之间的相互转化足够慢,则可以允许分离异构体。

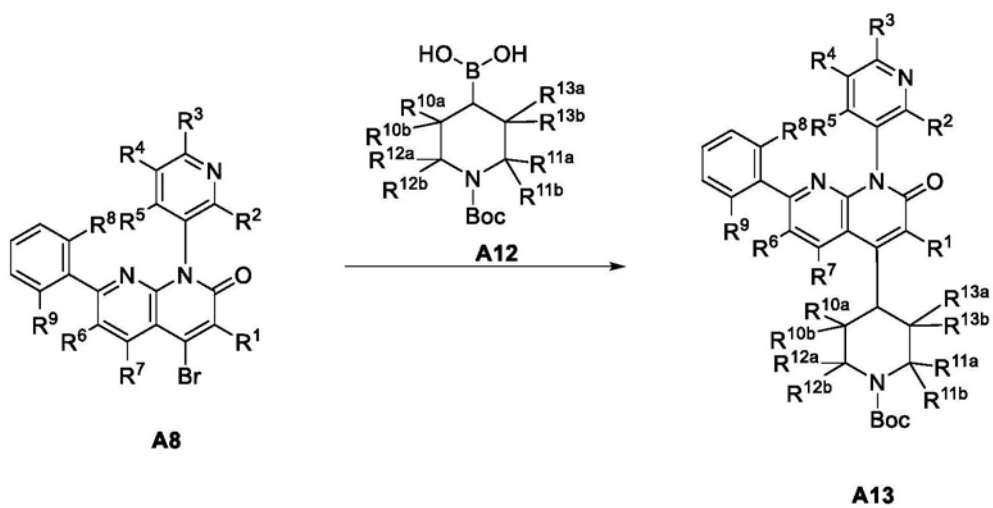
[0121] 化合物的制备方法

[0122] 本文公开的化合物可以通过许多特定方法合成。概述特定合成路线的示例和以下通用方案旨在为普通熟练的合成化学工作者提供指导,本领域技术人员将很容易理解溶剂,浓度,试剂,保护基,合成步骤的顺序,时间,温度等可以根据需要在普通技术人员的技术和判断范围内进行修改。

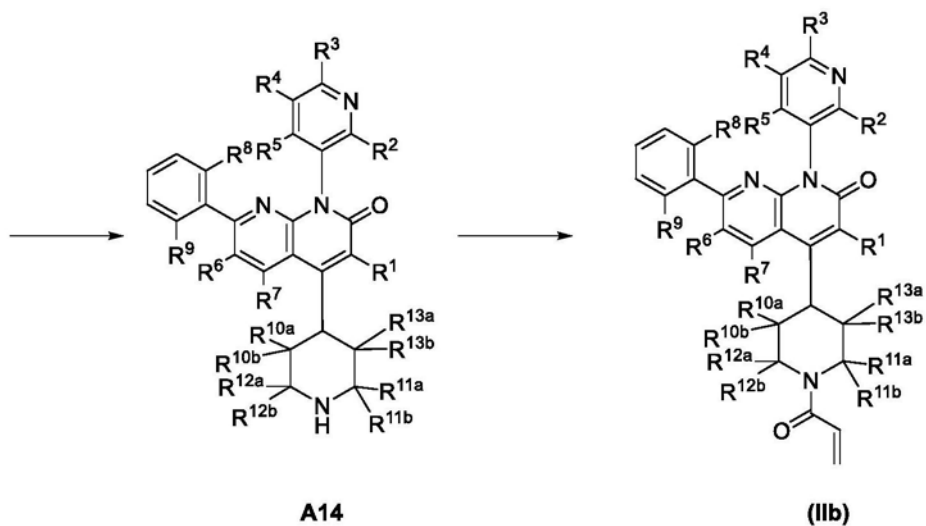
[0123] 如本文所公开的式(IIa)化合物可以如方法1中所述合成:





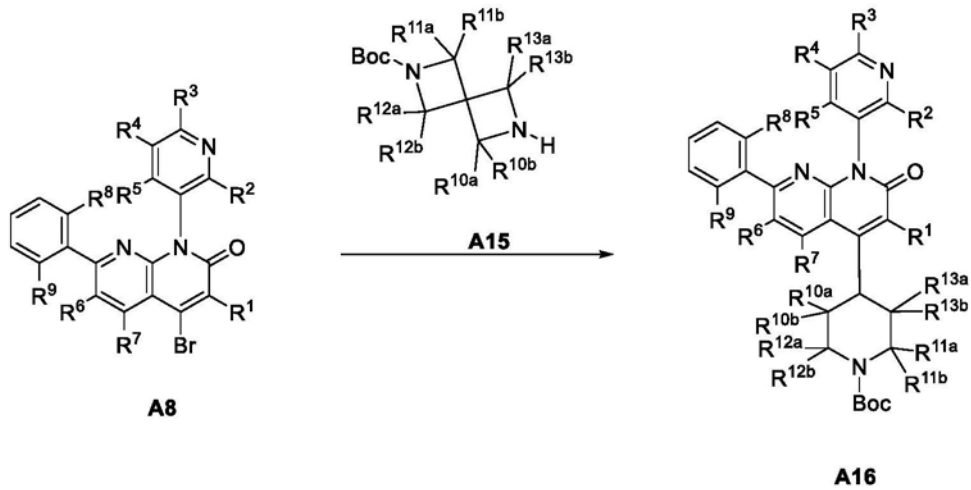


[0126]

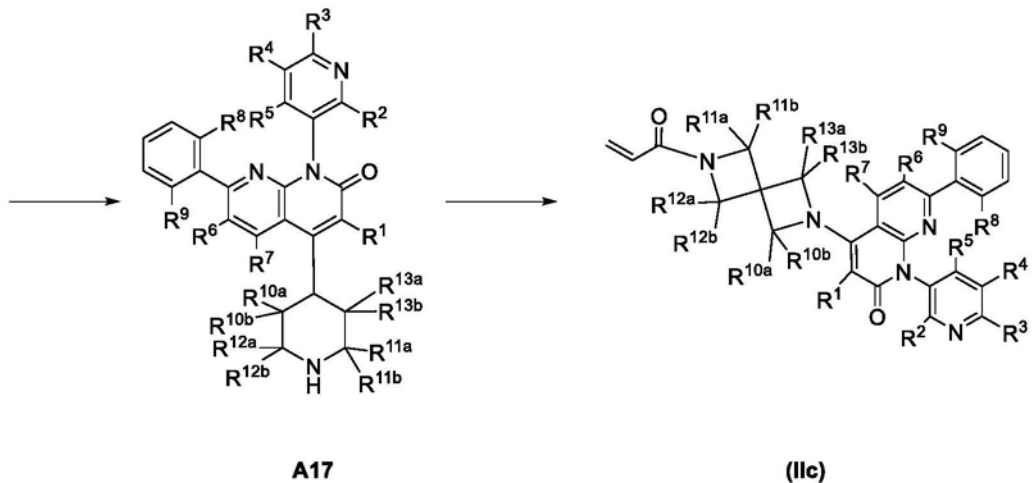


方法 2

[0127] 如本文所公开的式 (IIc) 化合物可以如方法3中所述合成:



[0128]



[0129] 用途

[0130] 本发明还提供一种本发明化合物的用途,用于制备药物组合物,所述的药物组合物用于:(i) 预防和/或治疗肿瘤;(ii) 抑制或逆转肿瘤对抗肿瘤药物的多药耐药性;(iii) 抑制P-糖蛋白;(iv) 制备增强抗肿瘤药物的抗肿瘤活性的药物;和/或(v) 抑制KRAS G12C优选地,所述肿瘤选自下组:肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、血液系统恶性肿瘤、口腔癌,或其组合。

[0131] 代表性地,所述的口腔癌包括口腔表皮样癌,优选为人口腔表皮样癌。

[0132] 优选地,所述的肿瘤包括对抗肿瘤药物产生多药耐药性的肿瘤。

[0133] 优选地,所述的抗肿瘤药物包括长春新碱。

[0134] 优选地,所述的肿瘤为P-糖蛋白高表达肿瘤。

[0135] 优选地,所述的多药耐药性是由P-糖蛋白引起的多药耐药性。

[0136] 优选地,所述的多药耐药性是由P-糖蛋白高表达引起的多药耐药性。

[0137] 优选地,所述的抑制P-糖蛋白包括抑制P-糖蛋白的表达。

[0138] 优选地,所述的P-糖蛋白为肿瘤P-糖蛋白。

[0139] 优选地,所述的组合物还包括其它药物活性化合物。

[0140] 优选地,其它药物活性化合物是卡非佐米或阿糖胞苷。

[0141] 药物组合物,剂量和给药途径

[0142] 本文还提供了药物组合物,其包含本文所公开的化合物以及药学上可接受的载体,例如稀释剂或载体。本发明的化合物和药物组合物中的化合物是以有效量给药以达到其预期目的。化合物的施用在下面更详细地描述。

[0143] 合适的药物制剂可由本领域技术人员根据给药途径和所需剂量来确定。参见例如,Reming-ton's Pharmaceutical Sciences,1435-712(18th ed.,Mack Publishing Co, Easton,Pa.,1990)。制剂可影响所施用药剂的物理状态,稳定性,体内释放速率和体内清除速率。可以根据给药途径,体重,体表面积或器官大小来计算合适的剂量。本领域普通技术人员无需过多实验即可常规地确定治疗剂量,特别是根据本文公开的剂量信息和测定方法以及可通过动物或动物获得的药代动力学数据。

[0144] 术语“药学上可接受的”是指当施用于动物或人时不会产生不利的,变态的或其他不良反应的分子实体和组合物。如本文所用,“药学上可接受的”包括任何和所有的溶剂,分散介质,包衣,抗菌剂和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂等。用于药物活性物质的此类赋形剂在本领域中是众所周知的。除非任何常规介质或试剂与治疗组合物不相容,否则考虑将其用于治疗组合物中。也可以将其它活性成分掺入组合物中。在示例性实施方案中,所述制剂可包含玉米糖浆固体,高油酸红花油、椰子油、大豆油、L-亮氨酸、磷酸钙三碱、L-酪氨酸、L-脯氨酸、L-赖氨酸乙酸酯、DATEM(乳化剂)、L-谷氨酰胺、L-缬氨酸、磷酸氢二钾、L-异亮氨酸、L-精氨酸、L-丙氨酸、甘氨酸、L-天冬酰胺一水合物、L-丝氨酸、柠檬酸钾、L-苏氨酸、柠檬酸钠、氯化镁、L-组氨酸、L-蛋氨酸、抗坏血酸、碳酸钙、L-谷氨酸、L-胱氨酸二盐酸盐、L-色氨酸、L-天冬氨酸、氯化胆碱、牛磺酸、肌醇、硫酸亚铁、抗坏血酸棕榈酸酯、硫酸锌、 $\alpha$ -生育酚醋酸盐、氯化钠、烟酰胺、生育酚、泛酸钙、硫酸铜、盐酸硫胺素盐酸盐、维生素A棕榈酸酯、硫酸锰、核黄素、叶酸、 $\beta$ -胡萝卜素、碘化钾、叶绿醌、生物素、硒酸钠、铬镧氯化物、钼酸钠、维生素D3和氰基钴胺素。

[0145] 本发明所述的化合物可以药学上可接受盐的形式存在于药物组合物中。如本文所用,“药学上可接受的盐”包括例如碱加成盐和酸加成盐。

[0146] 药学上可接受的碱加成盐可以与金属或胺,例如碱金属和碱土金属或有机胺形成。化合物的药学上可接受的盐也可以与药学上可接受的阳离子一起制备。合适的药学上可接受的阳离子是本领域技术人员众所周知的,包括碱、碱土金属、铵和季铵阳离子。碳酸盐或碳酸氢盐也是可以的。用作阳离子的金属的实例是钠、钾、镁、铵、钙或三价铁等。合适的胺的例子包括异丙胺、三甲胺、组氨酸、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、N-甲基葡糖胺和普鲁卡因。

[0147] 药学上可接受的酸加成盐包括无机或有机酸盐。合适的酸盐的实例包括盐酸盐、甲酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、水杨酸盐、硝酸盐、磷酸盐。其他合适的药学上可接受的盐是本领域技术人员众所周知的,并且包括例如甲酸、乙酸、柠檬酸、草酸、酒石酸或扁桃酸或盐酸、氢溴酸、硫酸或磷酸;与有机羧酸、磺酸、磺酸或磷酸或N-取代的氨基磺酸、例如乙酸、三氟乙酸(TFA)、丙酸、乙醇酸、琥珀酸、马来酸、羧基马来酸、甲基马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、乳酸、草酸、葡萄糖酸、葡糖二酸、葡糖醛酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、水杨

酸、4-氨基水杨酸、2-苯氧基苯甲酸、2-乙酰氧基苯甲酸、烟酸或异烟酸；以及氨基酸，例如自然界中蛋白质合成所涉及的20个 $\alpha$ 氨基酸，例如谷氨酸或天冬氨酸，以及苯乙酸、甲磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-甲基苯磺酸、萘2-磺酸、萘1,5-二磺酸、2-或3-磷酸甘油酸酯、葡萄糖-6-磷酸、N-环己基氨基磺酸(形成环酰胺)或与其他酸性有机化合物(如抗坏血酸)结合使用。

[0148] 包含本文公开的化合物的药物组合物可以以常规方式制造，例如，通过常规混合，溶解，制粒，包糖衣，悬浮乳化，包囊，包埋或冻干方法。合适的制剂取决于选择的给药途径。

[0149] 对于口服给药，可以通过以下方式容易制备合适的组合物：将本文公开的化合物与药学上可接受的赋形剂例如本领域众所周知的载体组合。此类赋形剂和载体使本发明化合物能够配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆剂、混悬剂等，以待治疗的患者口服给药。口服使用的药物制剂可通过以下方法获得：将本文公开的化合物与固体赋形剂一起加入，任选地研磨所得混合物，并在需要时加入合适的助剂后处理颗粒混合物，以获得片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂包括例如填充剂和纤维素制剂。如果需要，可以加入崩解剂。药学上可接受的成分对于各种类型的制剂都是众所周知的，并且可以是例如粘合剂(例如、天然或合成聚合物)、润滑剂、表面活性剂、甜味剂和调味剂、涂料、防腐剂、染料、增稠剂、助剂、抗微生物剂，各种配方类型的抗氧化剂和载体。

[0150] 当口服施用治疗有效量的本文公开的化合物时，该组合物通常为固体(例如，片剂、胶囊、丸剂、粉剂或锭剂)或液体制剂(例如，水性制剂)的形式。。

[0151] 当以片剂形式给药时，组合物可以另外包含功能性固体和/或固体载体，例如明胶或佐剂。片剂、胶囊剂和散剂可包含按重量计约1至约95%的化合物，优选约15至约90%的化合物。

[0152] 当以液体或悬浮液形式给药时，可以添加功能性液体和/或液体载体，例如水，石油或动植物来源的油。组合物的液体形式可以进一步包含生理盐水溶液、糖醇溶液、葡萄糖或其他糖溶液或乙二醇。当以液体或悬浮液形式给药时，该组合物可包含按重量计约0.5%至约90%的本文公开的化合物，优选约1至约50%的化合物。在一个实施例中，液体载体是非水的或基本上非水的。对于液体形式的给药，该组合物可以作为快速溶解的固体制剂提供，以在给药前立即溶解或悬浮。

[0153] 当通过静脉内，皮肤或皮下注射施用治疗有效量的本文公开的化合物时，该组合物为无热原的肠胃外可接受的水溶液形式。在适当考虑pH，等渗性，稳定性等情况下，制备此类肠胃外可接受的溶液在本领域技术范围内。除了本文公开的化合物之外，用于静脉内，皮肤或皮下注射的优选组合物通常还包含等渗赋形剂。这样的组合物可以制备成以游离碱或药理学上可接受的盐在水中的溶液的形式给药，所述盐与合适的表面活性剂例如羟丙基纤维素混合。分散液也可以在甘油，液态聚乙二醇及其混合物和油中制备。在常规的储存和使用条件下，这些制剂可以任选地包含防腐剂以防止微生物的生长。

[0154] 注射用组合物可包括无菌水溶液，悬浮液或分散液以及用于临时制备无菌注射液，悬浮液或分散液的无菌粉末。在所有实施方案中，该形式必须是无菌的并且必须是流动的，使得容易注射。它必须在生产和储存条件下稳定，并且必须抗污染，通过可选地包含防腐剂来发挥抗微生物(例如细菌和真菌)作用。载体可以是溶剂或分散介质，其包含例如水，乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)，合适的混合物和植物油。在一个实施

例中,载体是非水的或基本上非水的。可以例如通过使用包衣例,通过在分散体的实施方案中维持化合物所需的粒度来维持适当的流动性,以及通过使用表面活性剂(如卵磷脂)来维持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来预防微生物的作用,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多实施方案中,将优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以延长可注射组合物的吸收。

[0155] 通过将所需量的活性化合物在适当的溶剂中与所需的上文列举的各种其他成分结合在一起,然后过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物包含基本分散介质和以上列举的那些所需的其他成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的实施方案中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。也可以制备缓释或缓释制剂,以实现与胃肠道中体液接触的活性化合物的受控释放,并在血浆中提供基本恒定和有效水平的活性化合物。例如,释放可以通过溶解,扩散和离子交换中的一种或多种来控制。另外,缓释方法可通过胃肠道内的饱和或限制性途径增强吸收。例如,为此目的,该化合物可以包埋在生物可降解聚合物,水溶性聚合物或两者的混合物以及任选合适的表面活性剂的聚合物基质中。在这种情况下,包埋可以意味着将微粒结合到聚合物基质中。还可通过已知的分散或乳剂包衣技术通过包封分散的微粒或乳化的微滴来获得控释制剂。

[0156] 为了通过吸入给药,使用合适的推进剂,本发明的化合物以气雾剂形式从加压包装或喷雾器中方便地递送。在加压气雾剂的实施方案中,剂量单位可以通过提供阀以递送计量的量来确定。可以配制用于吸入器或吹入器的例如明胶的胶囊和药筒,其中含有化合物和合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0157] 可以将本文公开的化合物配制成用于通过注射(例如通过推注或连续输注)进行肠胃外给药的形式。注射用制剂可以以单位剂型(例如在安瓿中或在多剂量容器中)和添加的防腐剂存在。该组合物可以采取诸如在油性或水性载体中的悬浮液,溶液或乳液的形式,并且可以包含诸如悬浮剂,稳定剂和/或分散剂的配制剂。

[0158] 肠胃外给药的药物制剂包括水溶性形式的化合物的水溶液。另外,化合物的悬浮液可以制备为合适的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油或合成脂肪酸酯。水性注射悬浮液可以包含增加悬浮液粘度的物质。任选地,悬浮液还可以包含合适的稳定剂或增加化合物的溶解度并允许制备高浓度溶液的试剂。或者,本组合物可以是粉末形式,以便在使用前与合适的媒介物(例如无菌无热原的水)一起配制。

[0159] 本文公开的化合物也可以配制成直肠组合物,例如栓剂或保留灌肠剂(例如,含有常规栓剂基质)。除了前述的制剂外,这些化合物还可以配制成长效制剂。这种长效制剂可以通过植入(例如皮下或肌内)或肌内注射来施用。因此,例如,可以将化合物配制成合适的聚合或疏水材料(例如在可接受的油中的乳液)或离子交换树脂,或作为微溶衍生物,例如,作为微溶盐。

[0160] 特别地,本文公开的化合物可以以包含赋形剂例如淀粉或乳糖的片剂的形式经口,经颊或舌下给药,或者以胶囊或胚珠的形式单独或与赋形剂混合形式给药,或以含有调味剂或着色剂的悬浮液的形式给药。此类液体制剂可以与药学上可接受的添加剂一起制

备。化合物也可以肠胃外注射,例如静脉内、肌肉内、皮下或冠状内注射。肠胃外给药时,该化合物最好以无菌水溶液形式使用,该水溶液可以包含其他物质,例如盐或糖醇(例如甘露醇)或葡萄糖,以使溶液与血液等渗。

[0161] 对于兽医用途,根据正常兽医实践,以适当可接受的制剂形式施用本文公开的化合物。兽医可以轻松确定最适合特定动物的给药方案和给药途径。

[0162] 在一些实施方案中,使用本文公开的化合物单独或与另一种药剂组合或常规用于治疗此类疾病的干预措施来治疗KRAS相关病症的所有必要组分可以包装在试剂盒中。

[0163] 具体地,本发明提供了一种用于疾病的治疗干预的试剂盒,其包括包装好的药物,其包括本文公开的化合物以及用于制备所述药物的可递送形式的缓冲液和其他组分,和/或用于递送的装置。这些药物和/或与本文公开的化合物联合治疗中使用的任何药物,和/或与药物一起包装的疾病的治疗说明书。产品说明可以固定在任何有形的介质中,例如印刷纸或计算机可读的磁性或光学介质中,或者可以参考远程计算机数据源,例如可以通过互联网访问的万维网页面的指令。

[0164] “治疗有效量”是指有效治疗或预防治疗对象的疾病发展或减轻其症状的量。有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其是根据本文提供的详细公开内容。

[0165] 通常,“治疗有效剂量”是指导致获得所需效果的化合物的量。例如,在一个优选的实施方案中,与对照相比,治疗有效量的本文公开的化合物使KRAS活性降低至少5%,至少10%,至少15%,至少20%,至少25%,至少30%,至少35%,至少40%,至少45%,至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%或至少90%。

[0166] 化合物的给药量取决于所治疗的受试者,受试者的年龄,健康状况,性别和体重以及同时治疗的种类(如果有的话),的严重程度,所需效果的,方式和治疗的频率以及开药医生的判断。给药频率还可以取决于对动脉血氧压的药效学作用。然而,如本领域技术人员所理解和确定的,最合适的剂量可以适合个体受试者,而无需过度实验。这通常涉及调整标准剂量(例如,如果患者体重低,则减少剂量)。

[0167] 尽管个体需求变化,但是确定化合物有效量的最佳范围在本领域技术范围内。为了在本文所述的病症和疾病的治疗或预防中向人施用给药,例如,本发明化合物的典型剂量可以为约0.05mg/kg/天至约50mg/kg/天,对于例如至少0.05mg/kg,至少0.08mg/kg,至少0.1mg/kg,至少0.2mg/kg,至少0.3mg/kg,至少0.4mg/kg或至少0.5mg/kg,并且优选50mg/kg或更少,40mg/kg或更少,30mg/kg或更少,20mg/kg或更少,或10mg/kg或更少,可以是约2.5mg/day (0.5mg/kg $\times$ 5kg) 至约5000mg/day (例如50mg/kg $\times$ 100kg)。例如,化合物的剂量可以是约0.1mg/kg/天至约50mg/kg/天,约0.05mg/kg/天至约10mg/kg/天,约0.05mg/kg/天至约5. mg/kg/天,约0.05mg/kg/天至约3mg/kg/天,约0.07mg/kg/天至约3mg/kg/天,约0.09mg/kg/天至约3mg/公斤/天,约0.05mg/kg/天至约0.1mg/kg/天,约0.1mg/kg/天至约1mgkg/天,约1mg/kg/天至约10mgkg/天,约1mgkg/天每天约5毫克/公斤/天,约1毫克/公斤/天至约3毫克/公斤/天,约3毫克/天至约500毫克/天,5mg/天至约250mg/天,约10mg/天至约100mg/天,约3mg/天至约10mg/天,或约100mg/天至约250mg/天。这样的剂量可以单剂量给予或可以分成多剂量。

[0168] 生物测定数据

[0169] 对于本发明的化合物,采用以下测定条件:

[0170] 1. KRAS G12C\_偶合核苷酸交换法

[0171] 将含有G12C和C118A氨基酸取代基和N端His-tag的纯化的GDP偶合的KRAS蛋白(aa 1-169)在分析缓冲液(50mM HEPES PH=7.4, 0.01%BSA))中与化合物剂量反应滴定预孵育30分钟。

[0172] 化合物预孵育后,将纯化的SOS蛋白(aa 564-1049)和GTP添加到测定孔中,并孵育2小时。为了确定对SOS介导的核苷酸交换的抑制程度,将cRAF RBD,谷胱甘肽供体和镍螯合受体微珠添加到测定孔中并孵育2小时。然后读取Envision上的AlphaLisa信号,并使用实施例中所所述的模型分析数据以计算IC50值。

[0173] 2. pERK细胞内WB(蛋白印迹)分析

[0174] 在化合物处理前2天,NCI-H358(ATCC)细胞在含有10%FBS和1%P/S的RPMI1640培养基(Gibco)中培养。细胞接种到384孔板中,并在化合物处理前夜在5%CO2的37°C下孵育。将化合物剂量响应滴定液在生长培养基中稀释,添加至细胞培养板的适当孔中,然后在37°C,5%CO2下孵育3小时。化合物处理后,将细胞在室温下固定,用PBS洗涤,渗透,室温下在封闭缓冲液中孵育。除去封闭缓冲液并添加一抗,兔抗pERK,鼠抗GAPDH后,用PBST洗涤细胞。然后,添加二抗后,将细胞在室温避光孵育。用PBST洗涤后,将细胞板上下颠倒离心并用Odyssey CLx扫描。使用实施例中的模型分析数据以计算IC50值。

[0175] 表1化合物的生化和细胞活性

[0176]

化合物编号	偶联交换IC50 (μM)	NCI-H 358 IC50 (nM)
I2	1852	986
I3	446.1	178
I4	601.8	213

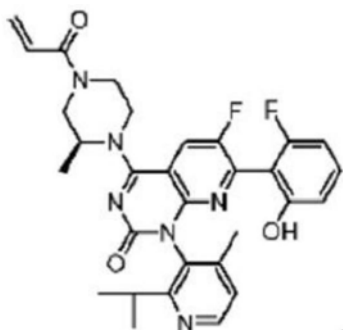
[0177] 本发明主要的优异技术效果

[0178] 本发明意外开发了一种式(I)所示化合物,本发明所述的化合物能够抑制KRAS G12C,且对多药耐药性肿瘤具有优异的治疗效果。

[0179] 实施例

[0180] 根据以下实施例可以更好地理解本发明。然而,对于本领域技术人员而言,容易理解,在实施例中描述的内容仅旨在说明本发明,而不是限制权利要求中详细描述的本发明。

[0181] 在本实施例中,化合物AMG510的参见W02018217651A1方法制备:



[0182]

式 AMG510 化合物

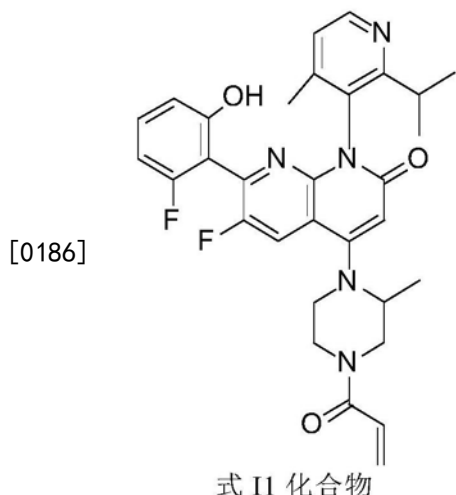
[0183] 实施例1式I1化合物的制备

[0184] 式I1化合物

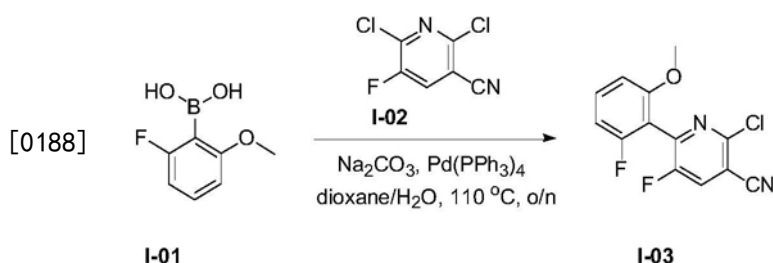
[0185] 4-(4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-异丙基-



## 4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮 (I1化合物)



## [0187] 步骤1:化合物I-03的制备

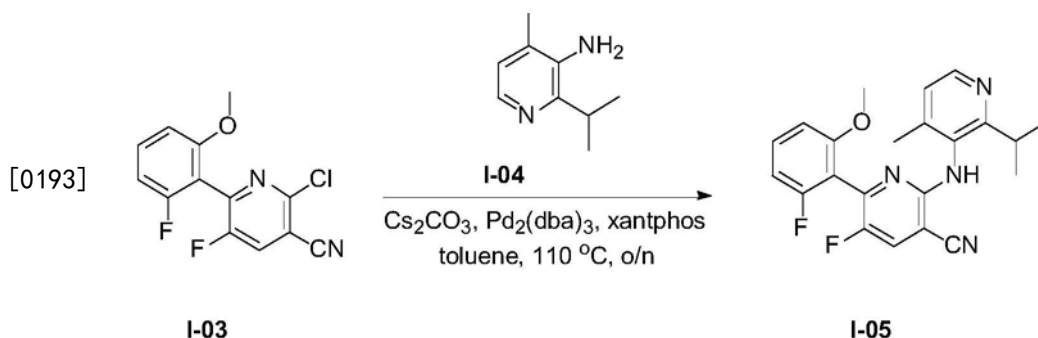


[0189] 在氮气下,向化合物I-01 (10.0g, 52.36mmol) 在1,4-二恶烷/H<sub>2</sub>O (100/10mL) 中的溶液中加入化合物I-02 (13.3g, 78.53mmol), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (16.6g, 157.08mmol) 和Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (6.1g, 5.24mmol), 将反应混合物加热至110 °C并搅拌过夜。

[0190] 通过LC-MS检测反应完成。将混合物冷却至室温,并用水 (50mL) 淬灭,将溶液用EA (50mL×3) 萃取。合并的有机层用盐水 (50mL) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到粗品。粗品通过硅胶色谱法纯化 (PE:EA=10:1), 得到化合物I-03 (3.6g, 24.5%产率), 为白色固体。

[0191] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.77 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.63-7.57 (m, 1H), 7.08 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.01 (t, J=8.8Hz, 1H), 3.80 (s, 3H) .

## [0192] 步骤2:化合物I-05的制备



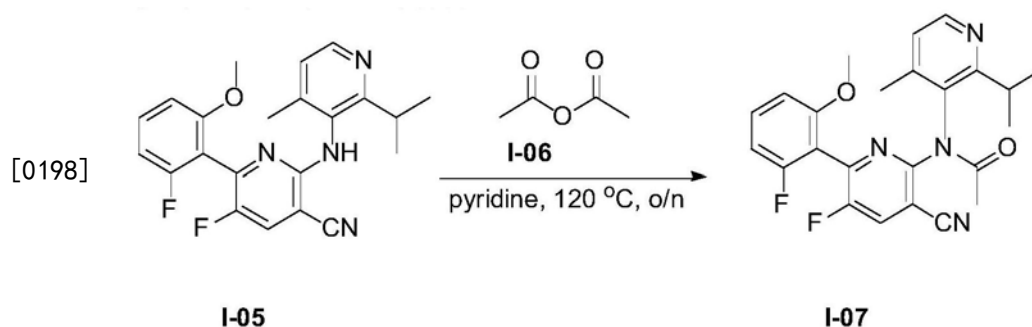
[0194] 在氮气下,向化合物I-03 (3.6g, 12.86mmol) 在甲苯 (50mL) 中的溶液中加入化合物I-04 (2.3g, 15.43mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (12.6g, 38.58mmol), xantphos (1.5g, 2.58mmol) 和Pd<sub>2</sub> (dba)<sub>3</sub> (1.2g, 1.29mmol), 将反应混合物加热至110 °C并搅拌过夜。

[0195] 通过LC-MS检测反应完成。将混合物冷却至室温,并用水 (100mL) 淬灭,将溶液用EA

(50mL×3) 萃取。合并的有机层用盐水 (50mL) 洗涤, 经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 过滤并浓缩, 得到粗品。粗品通过硅胶色谱法纯化 (PE:EA=2:1), 得到黄色固体的化合物 I-05 (1.5g, 30.0% 产率)。

[0196] MS Calcd.: 394.4; MS Found: 395.4 [M+H]<sup>+</sup>.

[0197] 步骤3: 化合物 I-07 的制备

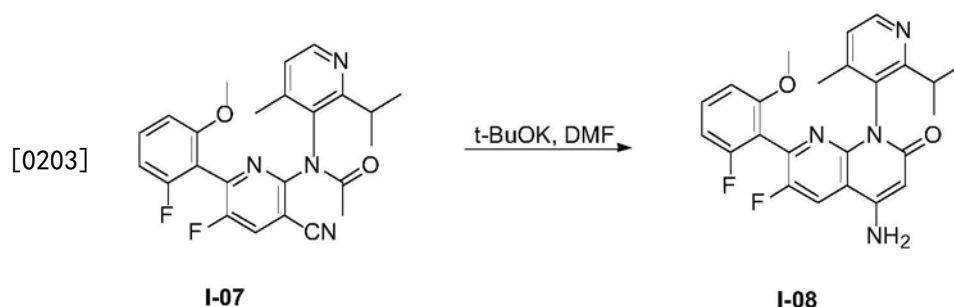


[0199] 向化合物 I-05 (800.0mg, 3.0mmol) 的吡啶 (10mL) 溶液中加入化合物 I-06 (10mL)。将反应混合物加热至 130℃ 并搅拌 24 小时。

[0200] 通过 LC-MS 检测反应完成。将混合物倒入 50mL 水中, 并将产物用 EA (50mL×3) 萃取。有机层用水 (50mL×2) 和 50mL 盐水洗涤, 然后经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥。过滤后, 减压除去溶剂。将残余物干燥, 得到棕色油状的化合物 I-07 (800mg, 粗品)。

[0201] MS Calcd.: 436.5; MS Found: 437.4 [M+H]<sup>+</sup>.

[0202] 步骤4: 化合物 I-08 的制备

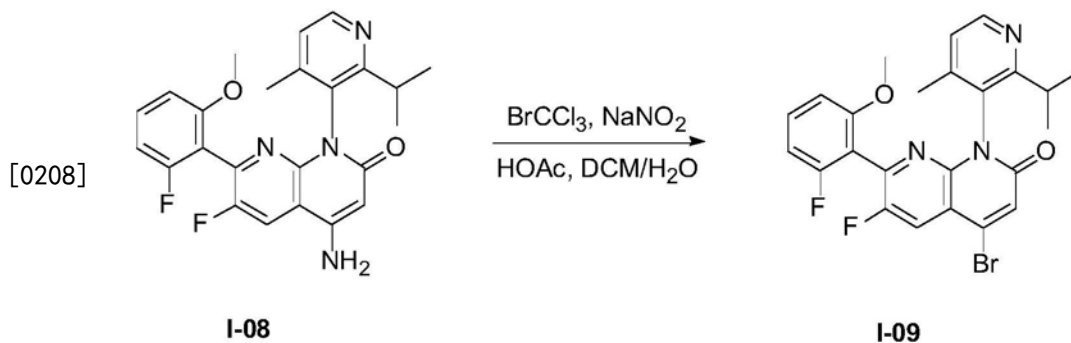


[0204] 向化合物 I-07 (500.0mg, 1.15mmol) 的 DMF (10mL) 溶液中加入 t-BuOK (257.0mg, 2.29mmol)。将反应混合物在室温搅拌 2 小时。

[0205] 通过 LC-MS 检测反应完成。将混合物倒入 50mL 水中, 并将产物用 EA (50mL×3) 萃取。有机层用水 (50mL×2) 和 50mL 盐水洗涤, 然后经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥。过滤后, 减压除去溶剂。残余物通过硅胶色谱法纯化 (PE:EA=5:1-1:2), 得到红色固体的化合物 I-08 (320.0mg, 64.0% 产率)。

[0206] MS Calcd.: 436.5; MS Found: 437.4 [M+H]<sup>+</sup>.

[0207] 步骤5: 化合物 I-09 的制备

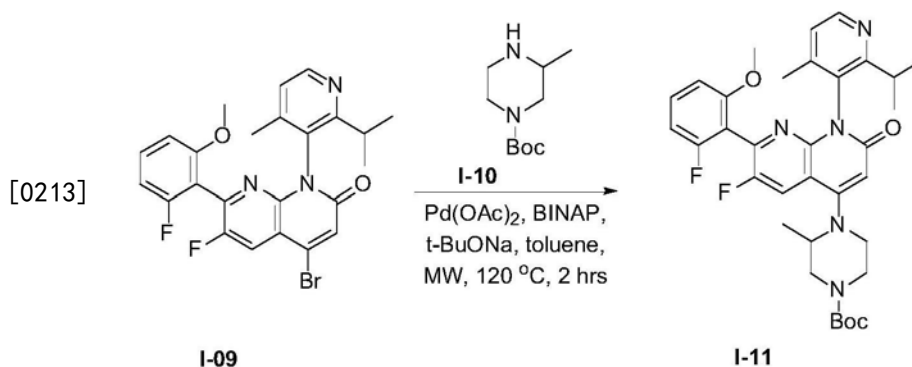


[0209] 在冰水浴下和氮气下,向化合物I-08 (2800.0mg, 0.64mmol) 的DCM/H<sub>2</sub>O (10/10mL) 溶液中加入BrCCl<sub>3</sub> (381.0mg, 1.93mmol) 和NaNO<sub>2</sub> (443.0mg, 6.42mmol)。将反应混合物在35℃下搅拌4小时。然后向混合物中加入HOAc (385.0mg, 6.42mmol)。将混合物在室温下搅拌16小时。

[0210] 通过LC-MS检测反应完成。用水 (40mL) 稀释反应,并用DCM (40mL×3) 萃取。合并的有机层用盐水 (20mL×2) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。残余物通过硅胶色谱法纯化 (PE:EA=5:1-2:1),得到黄色固体的化合物I-09 (130.0mg, 40.5%产率)。

[0211] MS Calcd.:500.3;MS Found:502.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0212] 步骤6:化合物I-11的制备

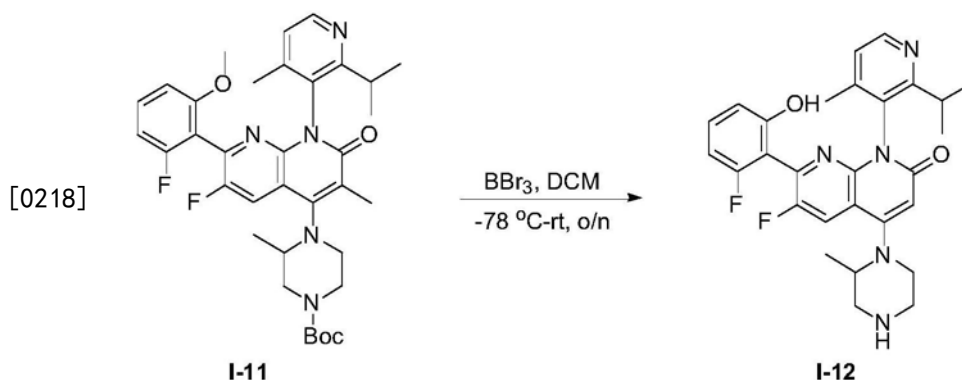


[0214] 在小瓶中加入化合物I-09 (300.0mg, 0.60mmol), 化合物I-10 (360.0mg, 1.80mmol), t-BuONa (173.0mg, 1.80mmol), BINAP (187.0mg, 0.30mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (135.0mg, 0.60mmol) 和甲苯 (8mL)。将密封的小瓶在120℃的微波中照射2小时。

[0215] 通过LC-MS检测反应完成。将反应物用水 (20mL) 稀释,并用EA (20mL×2) 萃取。合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。残余物通过HPLC法纯化,得到黄色固体的化合物I-11 (40.0mg, 10.8%产率)。

[0216] MS Calcd.:619.7;MS Found:620.5[M+H]<sup>+</sup>。

[0217] 步骤7:化合物I-12的制备

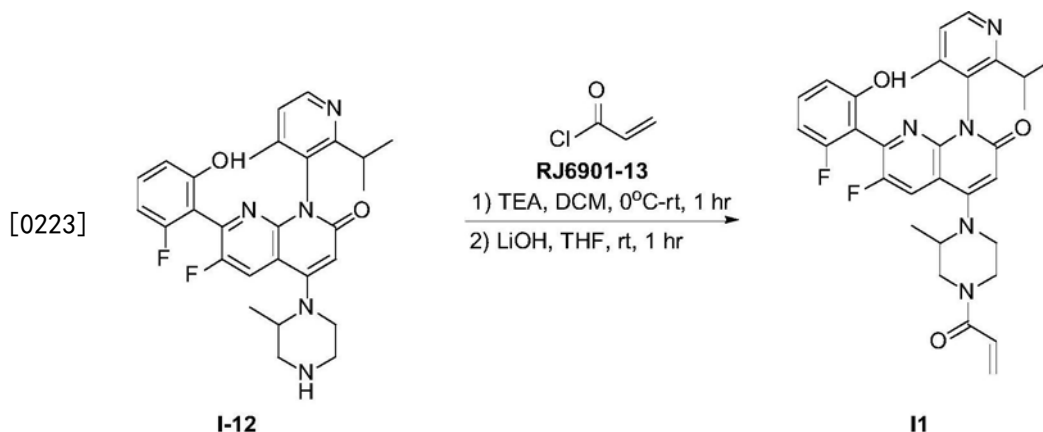


[0219] 在-78℃下向化合物I-11 (30.0mg, 0.06mmol) 的DCM (5mL) 溶液中加入BBr<sub>3</sub> (0.3mL, 1M)。使反应混合物升温至室温, 并搅拌16小时。

[0220] 通过LC-MS检测反应完成。用水 (20mL) 将反应混合物淬灭。将混合物用DCM (15mL × 2) 萃取。合并的水相通过Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液碱化至pH=7-8, 水层用DCM (15mL × 2) 萃取。有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩, 得到黄色固体的化合物I-12 (40.0mg)。

[0221] MS Calcd.: 505.6; MS Found: 506.5 [M+H]<sup>+</sup>。

[0222] 步骤8: 式I1化合物的制备



[0224] 在氮气和0℃下, 向化合物I-12 (40.0mg, 0.08mmol) 的DCM (5mL) 溶液中加入TEA (30.0mg, 0.30mmol) 和丙烯酰氯 (21.0mg, 0.24mmol)。使反应混合物升温至室温保持1小时。将反应物用水 (10mL) 稀释, 并用DCM (10mL × 2) 萃取。将合并的有机层真空浓缩。将残余物溶解在THF/H<sub>2</sub>O (5/1mL) 中, 并加入LiOH (6.0mg, 0.24mmol)。将混合物在室温搅拌2小时。

[0225] 通过LC-MS检测反应完成。将混合物真空浓缩并通过HPLC法纯化, 得到黄色固体的化合物I1 (20.0mg, 45.5%产率)

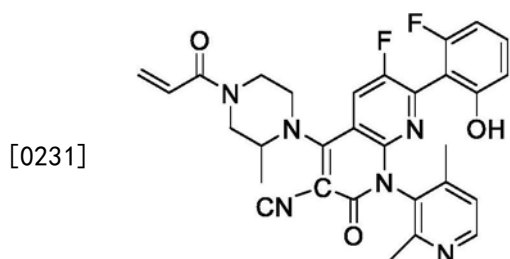
[0226] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.37 (d, J=6.8Hz, 1H), 8.65 (dd, J=1.2, 4.4Hz, 1H), 8.00 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.25-7.20 (m, 2H), 6.71-6.66 (m, 3H), 6.44-6.39 (m, 1H), 6.33 (d, J=3.2Hz, 1H), 5.82 (d, J=10.4, 1H), 4.58-4.52 (m, 0.5H), 4.38-4.24 (m, 0.5H), 4.13-3.46 (m, 5H), 3.12-3.06 (m, 1H), 2.73-2.54 (m, 1H), 2.06 (s, 1.5H), 1.99 (s, 1.5H), 1.26-1.18 (m, 6H), 1.04 (d, J=6.8Hz, 3H)。

[0227] MS Calcd.: 559.6; MS Found: 559.9 [M+H]<sup>+</sup>。

[0228] 实施例2式I2化合物的制备

[0229] 式I2化合物

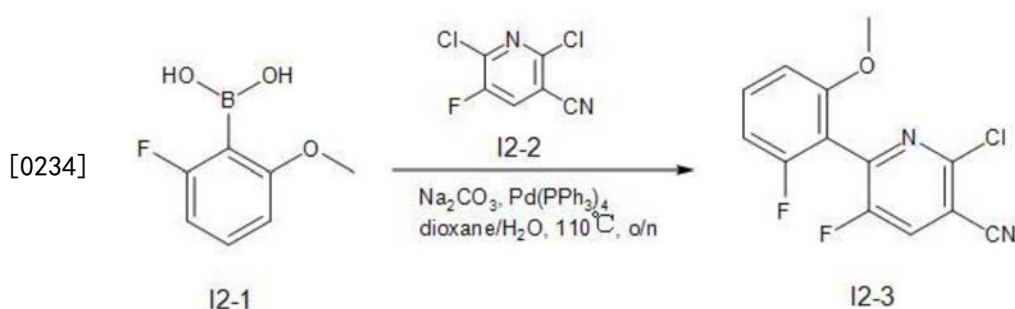
[0230] 4-(4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-1-(2,4-二甲基吡啶-3-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-3-异氰基-1,8-萘啶-2(1H)-酮(I2)



式 I2 化合物

[0232] 制备方法:

[0233] 步骤1:I2-3的合成

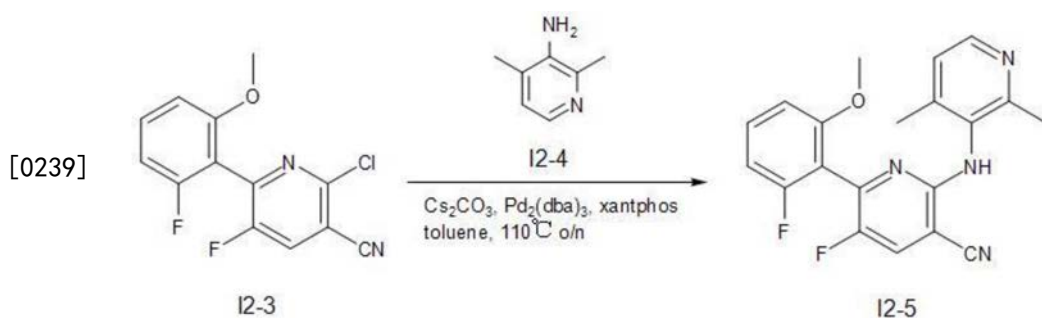


[0235] 在氮气条件下,向I2-1(10.0g,52.36mmol)的1,4-二恶烷/H<sub>2</sub>O(100mL/10mL)溶液中加入化合物I2-2(13.3g,78.53mmol),Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(16.6g,157.08mmol)和Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(6.1g,5.24mmol)。将反应混合物加热至110℃,并搅拌过夜。

[0236] 通过LC-MS检测反应混合物。将反应混合物冷却至室温,用水(50mL)淬灭,并用EA(50mLx3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。残余物通过硅胶色谱(PE:EA=10:1)纯化,得到化合物I2-3(3.6g,24.5%产率),为白色固体。

[0237] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ:8.77(d,J=8.4Hz,1H),7.63-7.57(m,1H),7.08(d,J=8.4Hz,1H),7.01(t,J=8.8Hz,1H),3.80(s,3H)。

[0238] 步骤2:I2-5的合成:



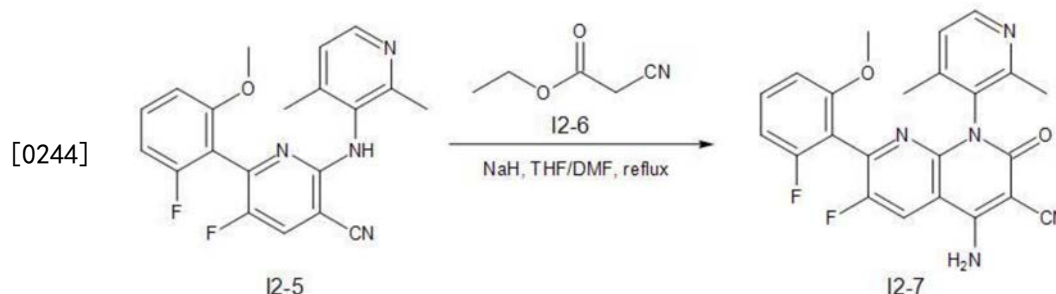
[0240] 在氮气条件下向化合物I2-3(3.6g,12.86mmol)甲苯(50mL)溶液中加入化合物I2-4(2.4g,19.29mmol),CS<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(12.6g,38.58mmol),xantphos(2.98g,5.14mmol)和Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>(2.35g,2.57mmol)。将反应混合物加热至110℃,并搅拌过夜。

[0241] 通过LC-MS检测反应混合物。将反应混合物冷却至室温,用水(100mL)淬灭,并用EA(50mLx3)进行萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。残余物通过硅胶色谱法(PE/EA=4/1)纯化,得到化合物I2-5(3.8g,80.8%产率),黄色固体。MS计

算值:366.1;MS测定值:367.4[M+H]<sup>+</sup>。

[0242] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.83 (s, 1H), 8.25 (d, J=8.8Hz, 1H), 8.16 (d, J=4.8Hz, 1H), 7.47-7.41 (m, 1H), 7.10 (d, J=4.8Hz, 1H), 6.94 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.87 (t, J=8.8Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.15 (s, 3H)。

[0243] 步骤3: I2-7的合成

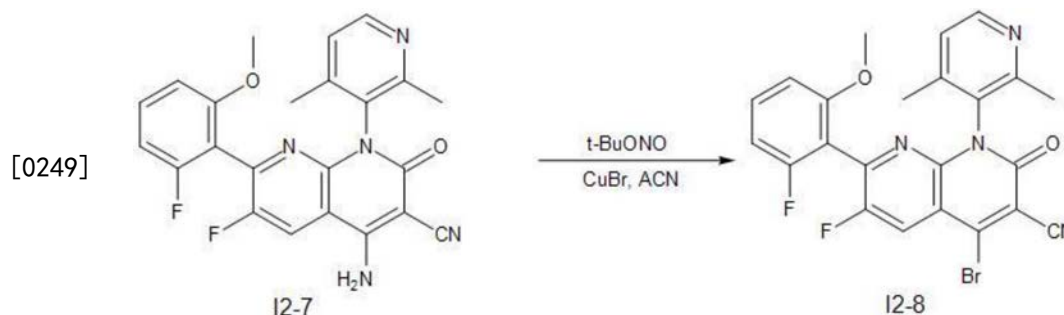


[0245] 在0℃下,向化合物I2-5 (1.1g, 3.0mmol) 的THF/DMF (30mL/10mL) 溶液中加入NaH (1.2g, 30.0mmol)。搅拌30分钟后,将化合物I2-6 (3.4g, 30.0mmol) 缓慢加入上述混合物中。然后将反应混合物加热至80℃,并搅拌过夜。

[0246] 通过LC-MS检测反应混合物。用水 (100mL) 淬灭反应混合物,并搅拌30分钟。将悬浮液过滤。用水 (30mL×3) 洗涤滤饼,干燥,得到黄色固体化合物I2-7 (1.3g, 粗品)。

[0247] MS计算值:433.1;MS测定值:434.4[M+H]<sup>+</sup>。

[0248] 步骤4:合成I2-8

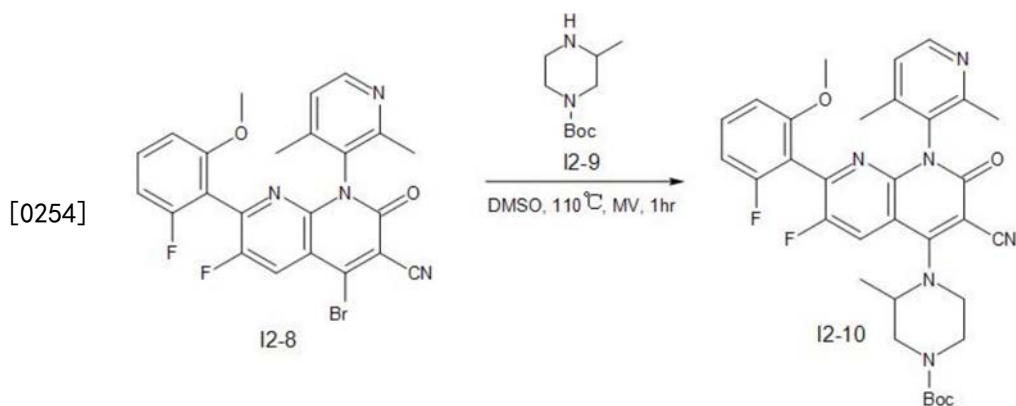


[0250] 在冰水浴和氮气条件下中,向化合物I2-7 (500mg, 1.154mmol) ACN (40mL) 溶液中添加CuBr (495mg, 3.461mmol) 和t-BuNO<sub>2</sub> (594mg, 5.768mmol)。将反应混合物在室温搅拌4小时。

[0251] 通过LC-MS检测反应混合物。用水 (40mL) 稀释反应混合物,并用EA (40mL×3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (20mL×2) 洗涤,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。残余物通过硅胶色谱法纯化 (PE/EA=5/1),得到化合物I2-8 (300mg, 52.3%产率),为黄色固体。

[0252] MS计算值:496.0;MS测定值:497.3[M+H]<sup>+</sup>

[0253] 步骤5: I2-10合成

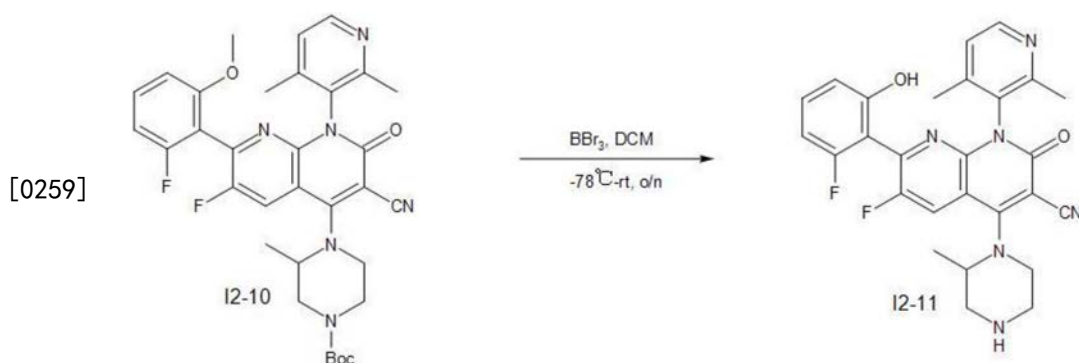


[0255] 小瓶中加入化合物I2-8 (200mg, 0.402mmol), DMSO (5mL), 3-甲基哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (241mg, 1.206mmol) 和DIEA (156mg, 1.206mmol)。将密封的小瓶在微波中以110°C辐照1小时。

[0256] 通过LC-MS检测反应混合物。将反应冷却至室温, 用水 (20mL) 稀释, 并用EA (20mL × 2) 萃取。将合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过硅胶色谱法 (PE/EA=5/1) 纯化, 得到化合物I2-10 (120mg, 48.4%产率), 为黄色固体。

[0257] MS计算值: 616.2; MS测定值: 617.7 [M+H]<sup>+</sup>。

[0258] 步骤6: I2-11合成

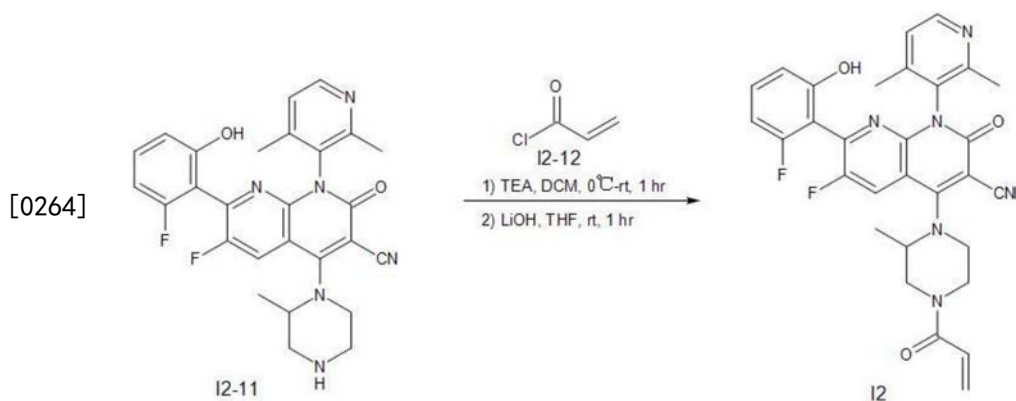


[0260] 在-78°C下向化合物I2-10 (150mg, 0.29mmol) DCM (5mL) 溶液中加入BBr<sub>3</sub> (0.2mL) 使反应混合物升温至室温并搅拌过夜。

[0261] 通过LC-MS检测反应混合物。用水 (10mL) 淬灭反应混合物, 并用DCM (15mL × 2) 萃取。合并的有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩, 得到为黄色固体的化合物12-11 (60mg, 粗品)。

[0262] MS计算值: 502.2; MS测定值: 503.6 [M+H]<sup>+</sup>

[0263] 步骤7: I2合成



[0265] 在0℃和氮气条件下,向化合物I2-11 (50mg,0.10mmol) DCM (5mL) 溶液中加入TEA (30mg,0.30mmol) 和丙烯酰氯 (27mg,0.30mmol)。使反应混合物升温至室温1小时。将反应物用H<sub>2</sub>O (10mL) 稀释,并用DCM (10mLx2) 萃取。将合并的有机层真空浓缩。将残余物溶于THF/H<sub>2</sub>O (5mL/1mL), 然后加入LiOH (7mg,0.30mmol)。将反应混合物在室温搅拌2小时。

[0266] 通过LC-MS检测反应混合物。将反应混合物真空浓缩。将残余物通过TLC (MeOH/DCM = 1/20) 纯化,得到化合物I2 (25mg,45.5%产率),黄色固体。

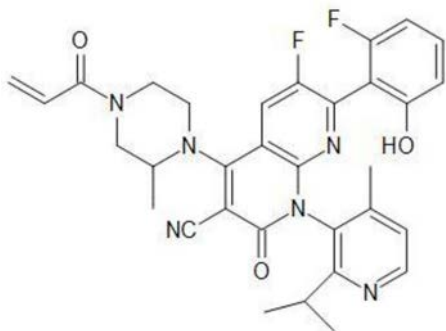
[0267] MS计算值:556.2;MS测定值:557.2 [M+H]。

[0268] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.33 (d, J=4.4Hz, 1H), 8.25 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.30-7.21 (m, 2H), 6.95-6.81 (m, 1H), 6.67-6.57 (m, 2H), 6.33 (d, J=16.0Hz, 1H), 5.84 (dd, J=10.4, 1.6Hz, 1H), 4.60-4.38 (m, 2H), 4.29-4.03 (m, 3H), 3.76-3.30 (m, 2H), 2.26 (s, 1.6H), 2.14 (s, 1.4H), 2.12 (s, 1.4H), 2.01 (s, 1.6H), 1.45-1.29 (m, 3H)。

[0269] 实施例3式I3化合物的制备

[0270] 式I3化合物

[0271] 4-(4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-3-异氰基-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-yl)-1,8-萘啶-2(1H)-酮

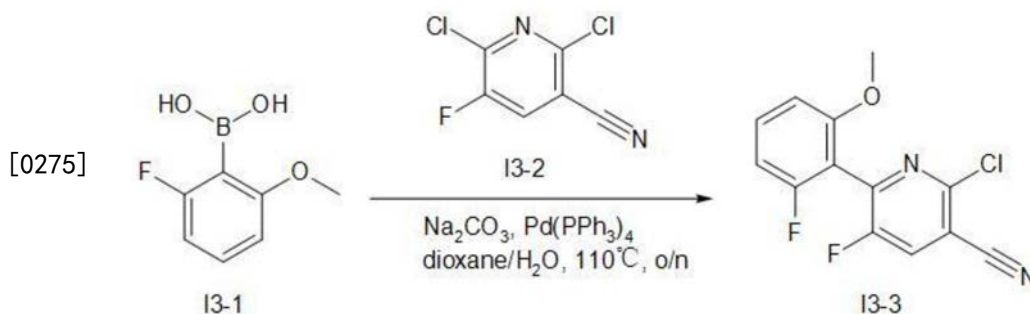


[0272]

式 I3 化合物

[0273] 制备方法

[0274] 步骤1:合成I3-3



[0275]

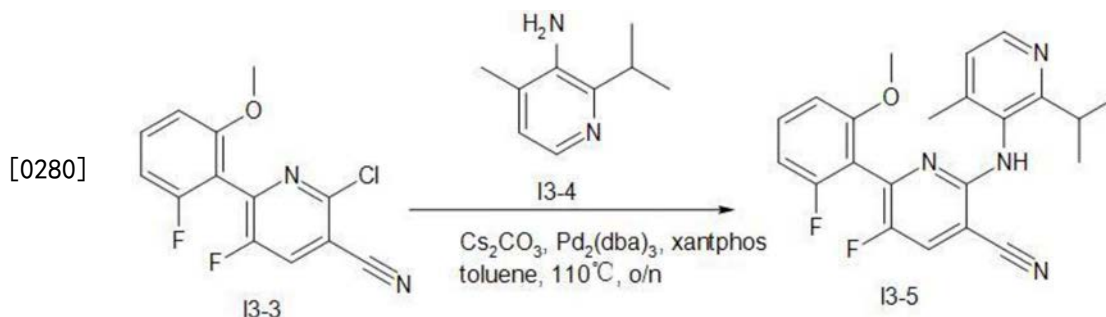
[0276] 向化合物I3-1 (10g,52.36mmol) 二恶烷/H<sub>2</sub>O (100mL/10mL) 溶液中加入化合物I3-2 (10.68g,62.83mmol), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (16.6g,157.08mmol) 和Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (6.1g,5.24mmol)。将所得混合物在110℃下搅拌过夜。

[0277] 将反应混合物冷却至室温,用H<sub>2</sub>O (100mL) 稀释,并用EA (200mLx2) 萃取。将合并的有机层用盐水 (100mLx2) 洗涤,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。残留物通过快速硅胶色谱纯化 (PE/EA=10/1), 得到化合物I3-3 (4.96g,收率为34%),黄色固体。

[0278] MS计算值:280;MS测定值:281 [M+H]<sup>+</sup>。



[0279] 步骤2:合成I3-5:

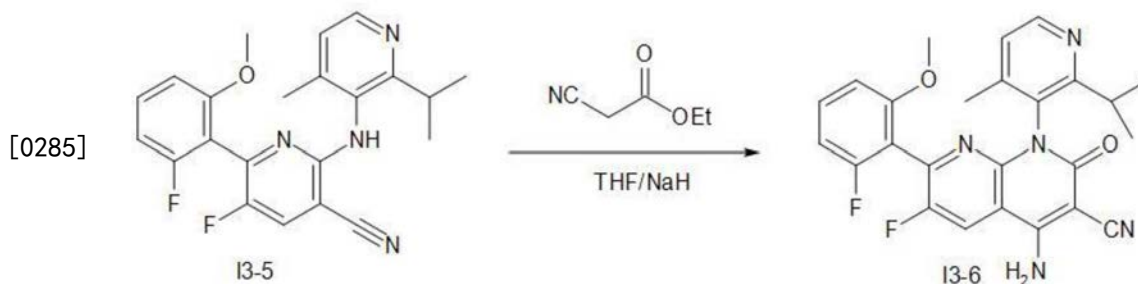


[0281] 向化合物I3-3 (2g, 7.13mmol) 的甲苯 (30mL) 溶液中添加化合物I3-4 (1.39g, 9.26mmol),  $\text{CS}_2\text{CO}_3$  (6.97g, 21.39mmol), xantphos (1.65g, 2.85mmol) 和  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (1.31g, 1.43mmol)。所得到混合物在 $\text{N}_2$ 条件下于 $110^\circ\text{C}$ 将混合物搅拌过夜。

[0282] 将反应混合物冷却至室温并浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱纯化 (PE/EA=6/1-3/1), 得到化合物I3-5 (2.52g, 90%收率), 黄色油。

[0283] MS计算值: 394; MS测定值: 395  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0284] 步骤3:合成I3-6:

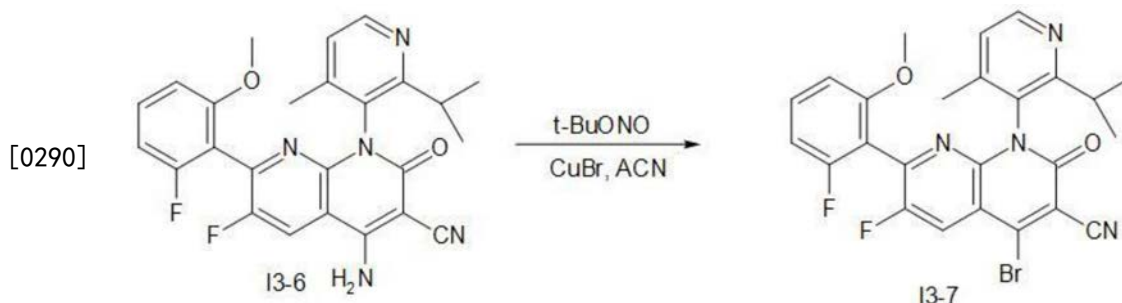


[0286] 在 $0^\circ\text{C}$ 条件下, 向化合物I3-5 (0.50g, 1.27mmol) 的THF (20mL) 溶液中加入NaH (508mg, 12.7mmol)。在此温度下搅拌反应混合物30分钟, 并加入2-氰基乙酸乙酯 (1.43g, 12.7mmol)。然后将混合物在 $80^\circ\text{C}$ 搅拌过夜。

[0287] 将反应混合物冷却至室温, 用 $\text{H}_2\text{O}$  (10mL) 稀释, 并用EA (15mLx2) 萃取。合并的有机层用盐水 (20mLx2), 经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 过滤并浓缩。残留物通过快速反相硅胶色谱纯化 (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ =5%-95%, 254nm, 30分钟), 得到化合物I3-6 (140mg, 24%收率), 黄色固体。

[0288] MS计算值: 461; MS测定值: 462  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0289] 步骤4:合成I3-7:



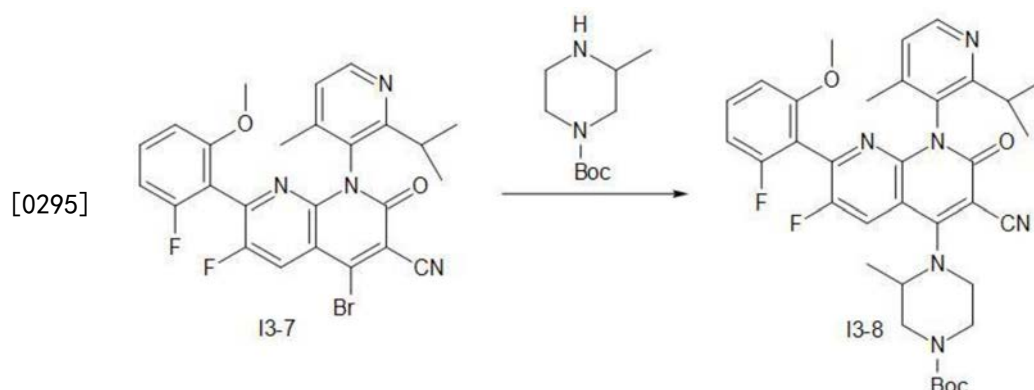
[0291] 在冰水浴中, 向化合物I3-6 (200mg, 1.818mmol) 的ACN (20mL) 中的溶液中加入CuBr (311mg, 2.17mmol) 和t-BuNO<sub>2</sub> (224mg, 2.17mmol)。将反应混合物在室温搅拌过夜。

[0292] 将反应物用 $\text{H}_2\text{O}$  (15mL) 稀释, 并用EA (20mLx2) 萃取。将合并的有机层用盐水

(20mLx2) 洗涤,用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱纯化(PE/EA=5/1),得到化合物I3-7(91mg,40%产率),为黄色固体。

[0293] MS计算值:524;MS测定值:525 [M+H]<sup>+</sup>。

[0294] 步骤5:合成I3-8:

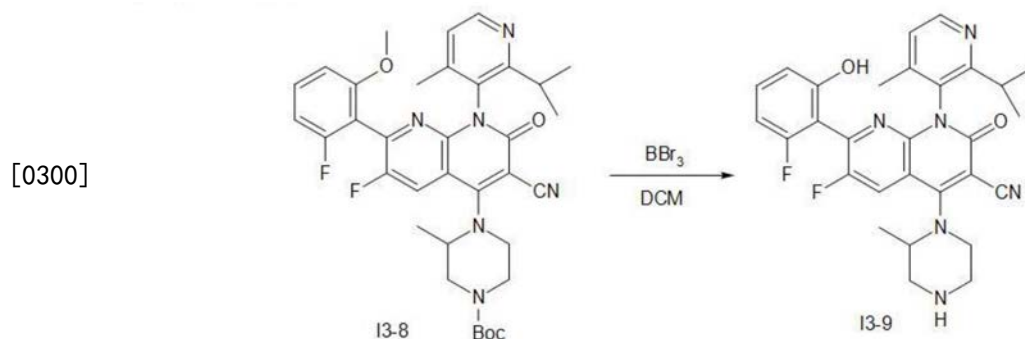


[0296] 向化合物I3-7(150mg,0.29mmol)的DMF(10mL)中的溶液中加入3-甲基哌嗪-1-羧酸叔丁酯(85.8mg,0.43mmol)和DIEA(112.2mg,0.87mmol)。将反应混合物加热至110℃保持3h。

[0297] 将反应冷却至室温,用 $\text{H}_2\text{O}$ (20mL)稀释,并用EA(20mLx2)萃取。将合并的有机层用盐水(20mL)洗涤,用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩。残余物通过快速硅胶色谱纯化(PE/EA=5/1),得到化合物I3-8(120mg,收率65%),为白色固体。

[0298] MS计算值:644;MS测定值:645 [M+H]<sup>+</sup>。

[0299] 步骤6:合成I3-9:



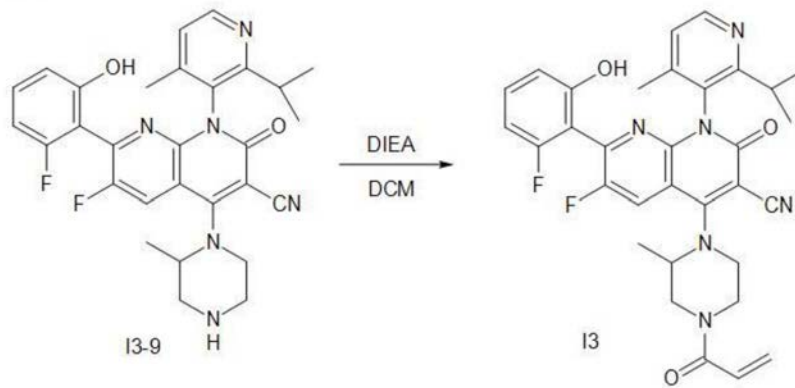
[0301] 在0℃条件下,向化合物I3-8(50mg,0.08mmol)的DCM(5mL)溶液中添加 $\text{BBr}_3$ (0.2mL)。将反应混合物在室温搅拌过夜。

[0302] 用 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液将反应混合物的pH值调节至>7,然后用DCM(15mLx2)萃取。将合并的有机相用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤浓缩得到黄色固体的化合物I3-9(38mg,92%产率)。

[0303] MS计算值:530;MS测定值:531 [M+H]<sup>+</sup>。

[0304] 步骤7:合成I3:

[0305]



[0306] 在0℃条件下,向化合物I3-9(20mg,0.04mmol)的DCM(5mL)溶液中添加DIEA(10.3mg,0.08mmol)和丙烯酰氯(3.4mg,0.08mmol)。将反应混合物在室温搅拌1小时。

[0307] 将反应物用H<sub>2</sub>O(5mL)稀释,并用DCM(10mLx2)萃取。将合并的有机层用盐水(10mLx2)洗涤,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。残余物通过Pre-HPLC法纯化,得到化合物I3(3mg,13.6%产率),为黄色固体。

[0308] MS计算值:584.2;MS测定值:585.0[M+H]<sup>+</sup>。

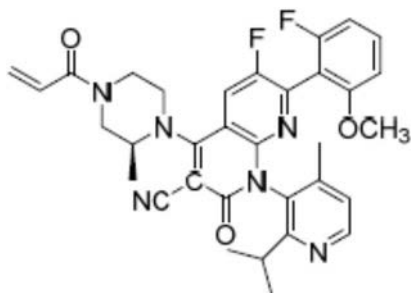
[0309] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,CD<sub>3</sub>OD) δ:8.33-8.31(m,1H),8.14(d,J=9.2Hz,1H),7.17-7.10(m,2H),6.85-6.74(m,1H),6.55-6.46(m,2H),6.23(d,J=16.4Hz,1H),5.75(d,J=10.4Hz,1H),4.51-4.34(m,2H),4.29-3.96(m,3H),3.66-3.51(m,2H),1.98(s,1.5H),1.95-1.89(m,1H),1.84(s,1.5H),1.28-1.23(m,3H),1.11-1.03(m,3H),0.93-0.78(m,3H)。

[0310] 实施例4式I4化合物

[0311] 式I4化合物

[0312] 4-((S)-4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-氟-7-(2-氟-6-甲氧基苯基)-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-2-氧-1,2-二氢-1,8-萘啶-3-腈

[0313]



LCMS(ESI) m/z (M+1): 599.2

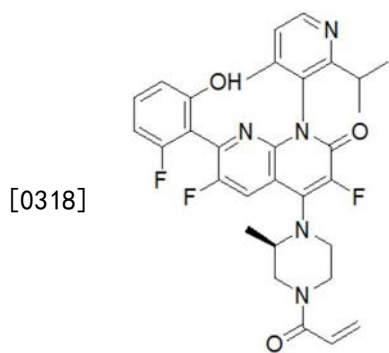
式I4化合物

[0314] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0315] 实施例5:式I5化合物

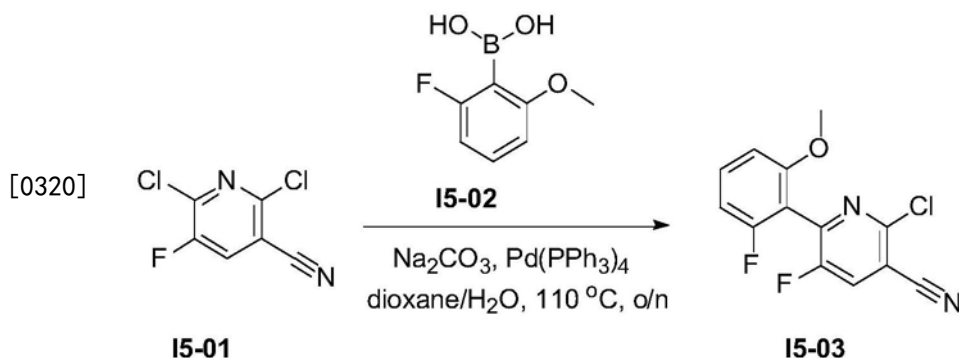
[0316] 式I5化合物

[0317] 4-(4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-3,6-二氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



式I5化合物

[0319] 步骤1: I5-03的合成

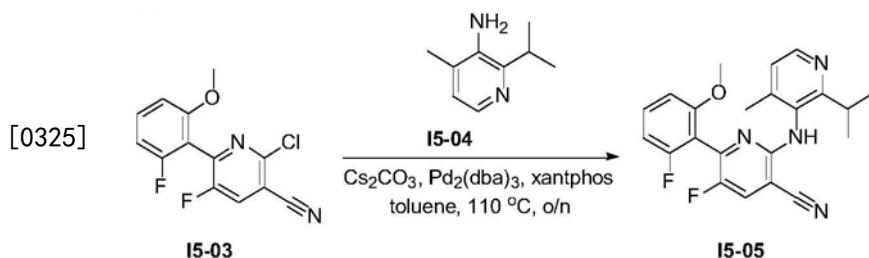


[0321] 向化合物I5-01 (10g, 52.36mmol) 的二恶烷/H<sub>2</sub>O (100mL/10mL) 溶液中加入化合物I5-02 (10.68g, 62.83mmol), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (16.6g, 157.08mmol) 和Pd (pph<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (6.1g, 5.24mmol)。将所得混合物在110℃下搅拌过夜。

[0322] 用H<sub>2</sub>O (100mL) 稀释反应液, 并用EA (200mL × 2) 萃取。合并的有机层用盐水 (100mL × 2) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过硅胶色谱纯化 (PE/EA=10/1), 得到黄色固体的化合物I5-03 (4.96g, 34%产率)。

[0323] MS Calcd.: 280; MS Found: 281 [M+H]<sup>+</sup>。

[0324] 步骤2: I5-05的合成

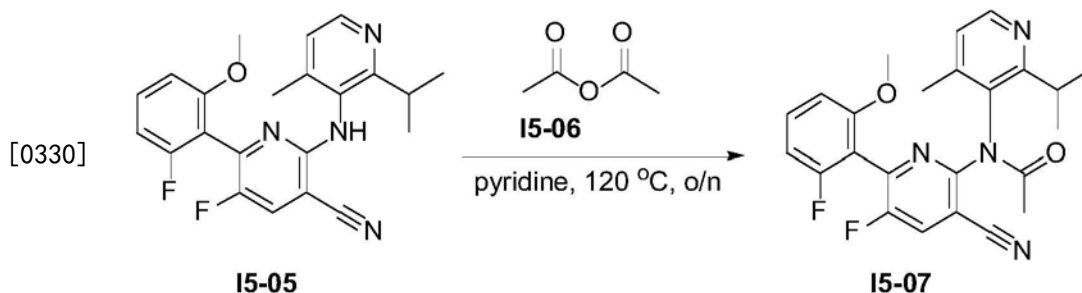


[0326] 向化合物I5-03 (2g, 7.13mmol) 在甲苯 (30mL) 中的溶液中加入化合物I5-04 (1.39g, 9.26mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.97g, 21.39mmol), xantphos (1.65g, 2.85mmol) 和Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (1.31g, 1.43mmol)。将所得混合物在N<sub>2</sub>和110℃下搅拌过夜。

[0327] 将反应浓缩, 并将残余物通过硅胶色谱法纯化 (PE/EA=6/1-3/1), 得到黄色固体化合物I5-05 (2.52g, 90%收率)。

[0328] MS Calcd.: 394; MS Found: 395 [M+H]<sup>+</sup>。

[0329] 步骤3: I5-07的合成

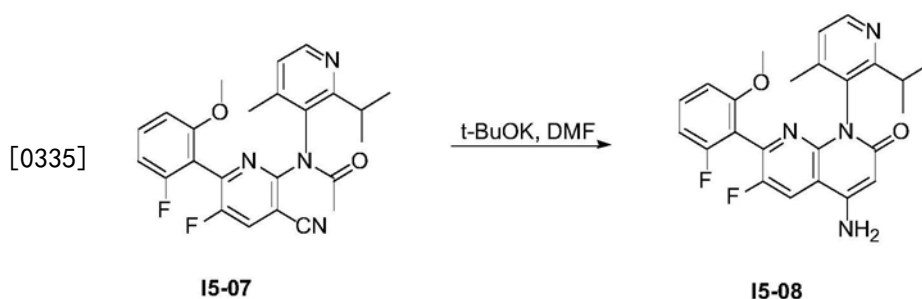


[0331] 向化合物15-05 (2.6g, 6.77mmol) 的吡啶 (20mL) 溶液中添加化合物15-06 (20mL)。将反应混合物加热至130℃并搅拌24小时。

[0332] 通过LC-MS检测反应完成。将混合物倒入50mL水中, 并将产物用EA (50mL×3) 萃取。有机层用水 (50mL×2) 和50mL盐水洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。过滤后, 减压除去溶剂。将残余物干燥, 得到棕色油状的化合物15-07 (3.6g)。

[0333] MS Calcd.: 436; MS Found: 437 [M+H]<sup>+</sup>。

[0334] 步骤4: 15-08的合成

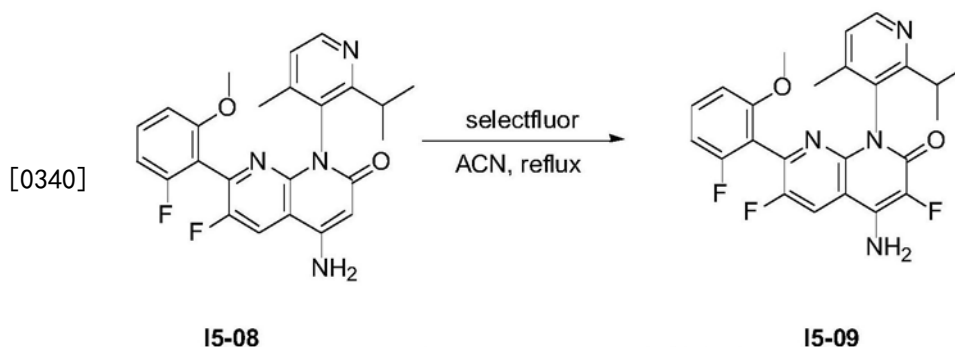


[0336] 向化合物15-07 (2.88g, 6.6mmol) 的DMF (20mL) 溶液中加入t-BuOK (2.26g, 19.8mmol)。将反应混合物在室温搅拌2小时。

[0337] 通过LC-MS检测反应完成。将混合物倒入50mL水中, 并将产物用EA (50mL×3) 萃取。有机层用水 (50mL×2) 和50mL盐水洗涤, 然后经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。过滤后, 减压除去溶剂。残余物通过硅胶色谱法纯化 (PE/EA=5/1-1/2), 得到黄色固体的化合物15-08 (1.22g, 42%产率)。

[0338] MS Calcd.: 436; MS Found: 437 [M+H]<sup>+</sup>。

[0339] 步骤5: 15-09的合成



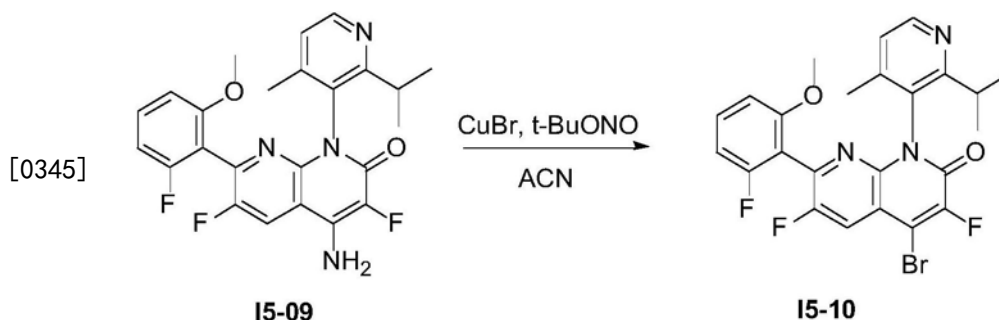
[0341] 向化合物15-08 (800mg, 1.83mmol) 在ACN (20mL) 中的溶液中添加selectfluor (779.3mg, 2.2mmol)。将反应混合物加热至80℃过夜。

[0342] 将反应物用水 (20mL) 稀释, 并用EA (20mL×2) 萃取。合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。残余物通过反相硅胶色谱法纯化 (ACN/H<sub>2</sub>O=5%-95%),

254nm, 30分钟), 得到黄色固体的化合物I5-09 (185mg, 22%产率)。

[0343] MS Calcd.: 454; MS Found: 455 [M+H]<sup>+</sup>.

[0344] 步骤6: I5-10的合成

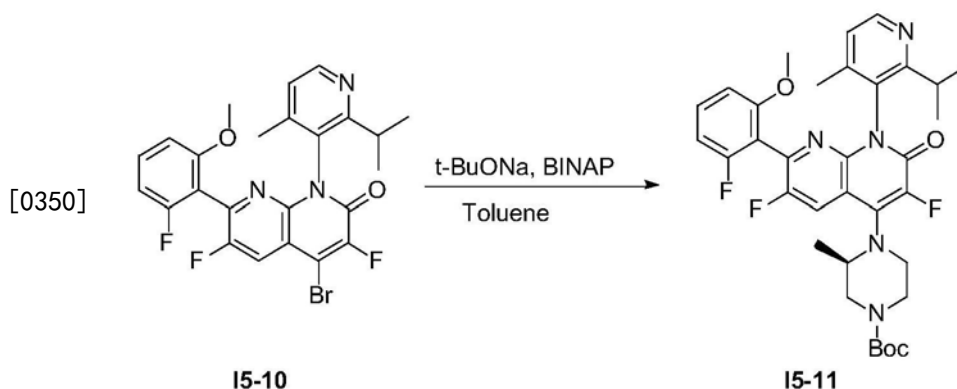


[0346] 在0℃下, 向化合物I5-09 (185mg, 0.41mmol) 的ACN (15mL) 溶液中加入CuBr (294mg, 2.05mmol) 和t-BuONO (211.4mg, 2.05mmol)。将反应混合物在室温搅拌过夜。

[0347] 将反应物用水 (15mL) 稀释, 并用EA (20mL × 2) 萃取。合并的有机层用盐水 (20mL × 2) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。残余物通过反相硅胶色谱法纯化 (ACN/H<sub>2</sub>O = 5% - 95%, 254nm, 30分钟), 得到黄色固体的化合物I5-10 (27mg, 13%产率)。

[0348] MS Calcd.: 518; MS Found: 519 [M+H]<sup>+</sup>.

[0349] 步骤7: I5-11的合成

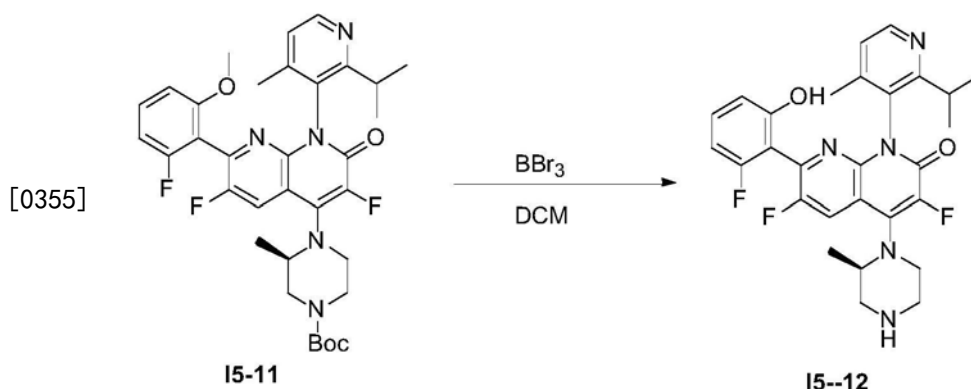


[0351] 在小瓶中加入化合物I5-10 (170mg, 0.33mmol), 3-甲基哌嗪-1-甲酸(R)-叔丁基酯 (132mg, 0.66mmol), t-BuONa (95mg, 0.99mmol), BINAP (103mg, 0.17mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (74mg, 0.33mmol) 和甲苯 (5mL)。将密封的小瓶在120℃的微波中照射2小时。

[0352] 将反应物用水 (20mL) 稀释, 并用EA (20mL × 2) 萃取。合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过反相硅胶色谱法纯化 (ACN/H<sub>2</sub>O = 5% - 95%, 254nm, 30分钟), 得到黄色固体的化合物I5-11 (31.4mg, 15%产率)。

[0353] MS Calcd.: 637; MS Found: 638 [M+H]<sup>+</sup>.

[0354] 步骤8: I5-12的合成

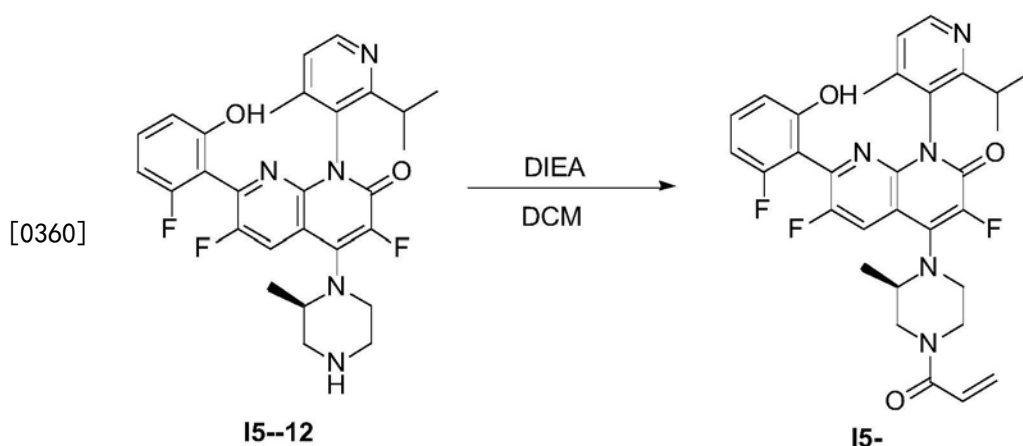


[0356] 在-78℃下向化合物I5-11 (50mg, 0.08mmol) 的DCM (5mL) 溶液中加入BBr<sub>3</sub> (0.3mL, 1M)。将反应混合物升温至室温, 并搅拌2小时。

[0357] 用水 (20mL) 淬灭反应混合物。将混合物用DCM (15mL × 2) 萃取。合并的水相通过Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液碱化至pH=7-8, 水层用DCM (15mL × 2) 萃取。有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩, 得到为黄色固体的化合物I5-12 (40mg)。

[0358] MS Calcd.: 523; MS Found: 524 [M+H]<sup>+</sup>。

[0359] 步骤9: I5的合成



[0361] 在氮气下和0℃下, 向化合物I5-12 (30mg, 0.06mmol) 的DCM (5mL) 溶液中加入TEA (9.1mg, 0.09mmol) 和丙烯酰氯 (12mg, 0.13mmol)。使反应混合物升温至室温1小时。

[0362] 将反应物用水 (10mL) 稀释, 并用DCM (10mL × 2) 萃取。将合并的有机层真空浓缩。将残余物溶解在THF/H<sub>2</sub>O (5/1mL) 中, 并加入LiOH · H<sub>2</sub>O (8mg, 0.18mmol)。将混合物在室温搅拌反应2小时。

[0363] 将反应溶液真空浓缩, 并通过HPLC法纯化, 得到固体化合物I5 (3mg, 11%产率)。

[0364] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.09 (d, J=5.2Hz, 1H), 8.67 (d, J=4.8Hz, 1H), 8.22 (brs, 0.5H), 7.24-7.22 (m, 2H), 6.71-6.62 (m, 2.5H), 6.42-6.38 (m, 1H), 5.82-5.79 (m, 1H), 5.36-5.33 (m, 1H), 3.72-3.69 (m, 1H), 3.53-3.40 (m, 1H), 3.28-3.19 (m, 1H), 2.27-2.17 (m, 1H), 2.05-1.98 (m, 4H), 1.31-1.17 (m, 6H), 1.04 (d, J=6.8Hz, 3H), 0.88 (t, J=6.8Hz, 3H)。

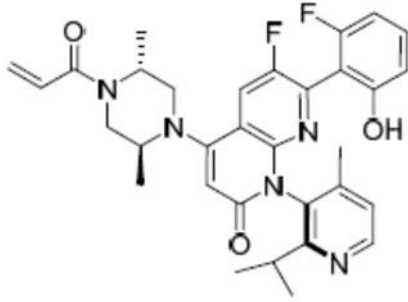
[0365] MS Calcd.: 577; MS Found: 578 [M+H]<sup>+</sup>。

[0366] 实施例6: 式I6化合物

[0367] 式I6化合物

[0368] 4-((2S,5R)-4-丙烯酰基-2,5-二甲基哌嗪-1-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-

1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0369]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 574.3

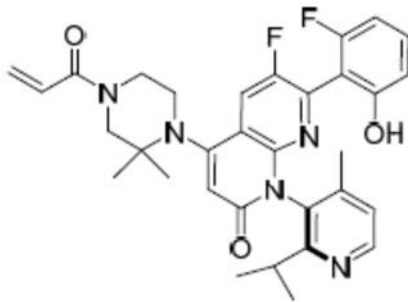
式I6化合物

[0370] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0371] 实施例7:式I7化合物

[0372] 式I7化合物

[0373] 4-(4-丙烯酰基-2,2-二甲基哌嗪-1-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0374]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 574.3

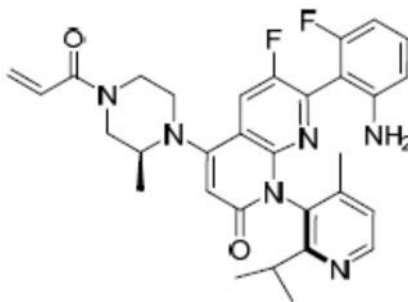
式I7化合物

[0375] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0376] 实施例8:式I8化合物

[0377] 式I8化合物

[0378] 4-((S)-4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-7-(2-氨基-6-氟苯基)-6-氟-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0379]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 559.3

式I8化合物

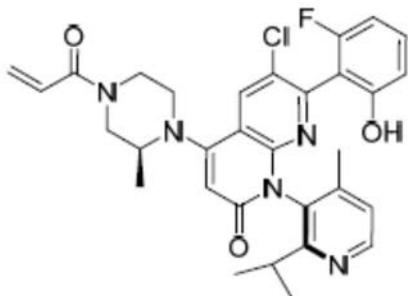


[0380] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0381] 实施例9:式I9化合物

[0382] 式I9化合物

[0383] 4-((S)-4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-氯-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0384]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 576.2

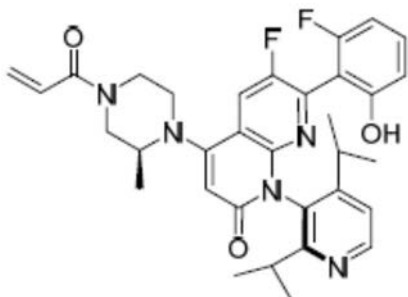
式I9化合物

[0385] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0386] 实施例10:式I10化合物

[0387] 式I10化合物

[0388] 4-((S)-4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-1-(2,4-二异丙基吡啶-3-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0389]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 588.3

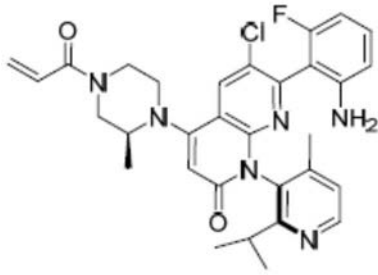
式I10化合物

[0390] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0391] 实施例11:式I11化合物

[0392] 式I11化合物

[0393] 4-((S)-4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-7-(2-氨基-6-氟苯基)-6-氯-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0394]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 575.2

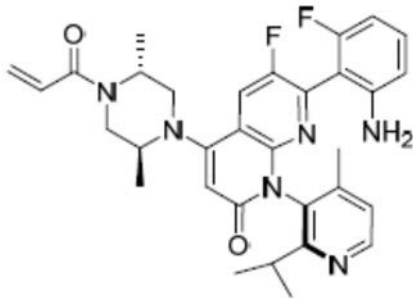
式I11化合物

[0395] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0396] 实施例12:式I12化合物

[0397] 式I12化合物

[0398] 4-((2S,5R)-4-丙烯酰基-2,5-二甲基哌嗪-1-基)-7-(2-氨基-6-氟苯基)-6-氟-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0399]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 573.3

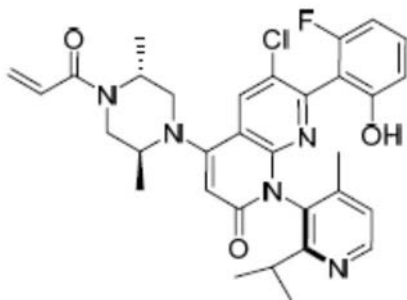
式I12化合物

[0400] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0401] 实施例13:式I13化合物

[0402] 式I13化合物

[0403] 4-((2S,5R)-4-丙烯酰基-2,5-二甲基哌嗪-1-基)-6-氯-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0404]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 590.2

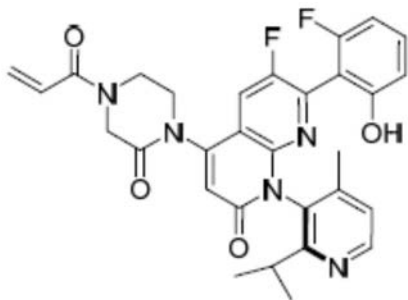
式I13化合物

[0405] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0406] 实施例14:式I14化合物

[0407] 式I14化合物

[0408] 4-(4-丙烯酰基-2-氧代哌嗪-1-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0409]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 560.2

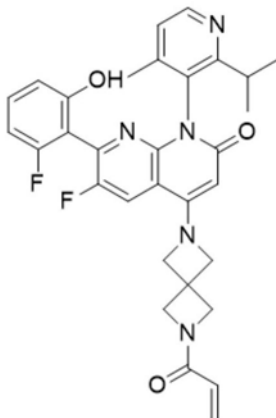
式I14化合物

[0410] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0411] 实施例15:式I15化合物

[0412] 式I15化合物

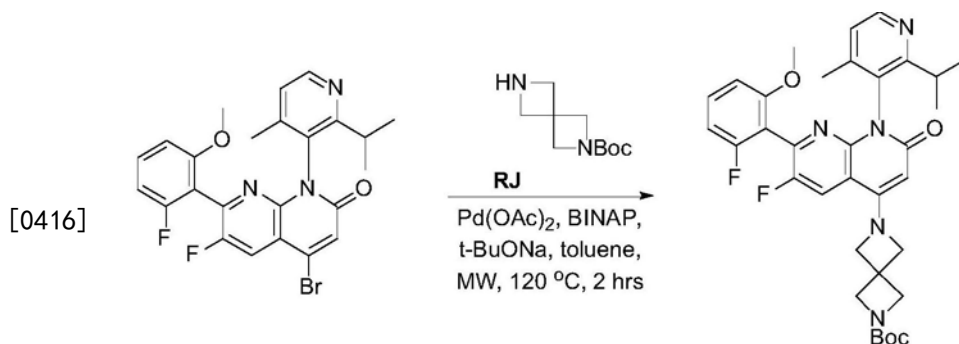
[0413] 4-(6-丙烯酰基-2,6-二氮杂螺[3.3]庚-2-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0414]

式I15化合物

[0415] 步骤1:I15-02的合成



[0416]

I15-01

I15-02

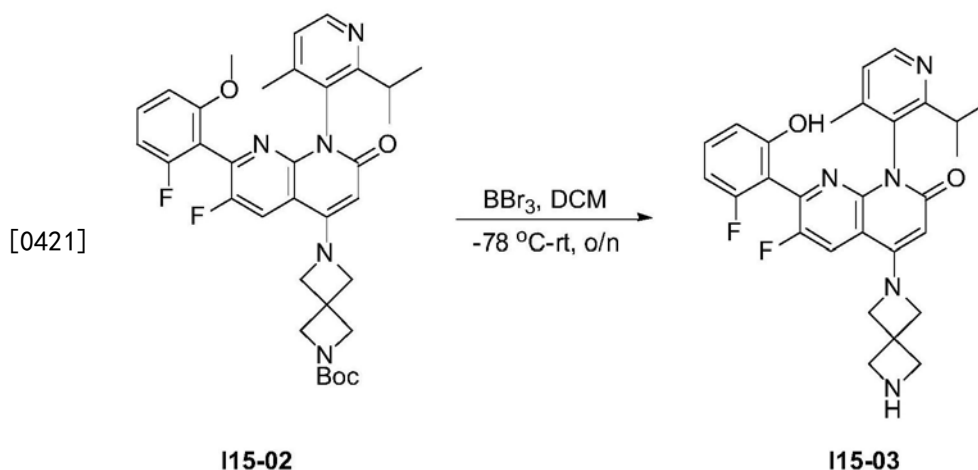
[0417] 在小瓶中装入化合物I15-01 (100.0mg, 0.20mmol), 化合物RJ (231.0mg, 0.80mmol), t-BuONa (96.0mg, 0.80mmol), BINAP (62.0mg, 0.10mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (45.0mg,

0.20mmol) 和甲苯 (3mL)。将密封的小瓶在120℃的微波中照射2小时。

[0418] 通过LC-MS检测反应完成。将反应物用水 (20mL) 稀释,并用EA (20mL×2) 萃取。合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。通过HPLC法纯化残余物,得到黄色固体的化合物I15-02 (100.0mg,80.9%产率)。

[0419] MS Calcd.:617.7;MS Found:618.4[M+H]<sup>+</sup>。

[0420] 步骤2:I15-03的合成

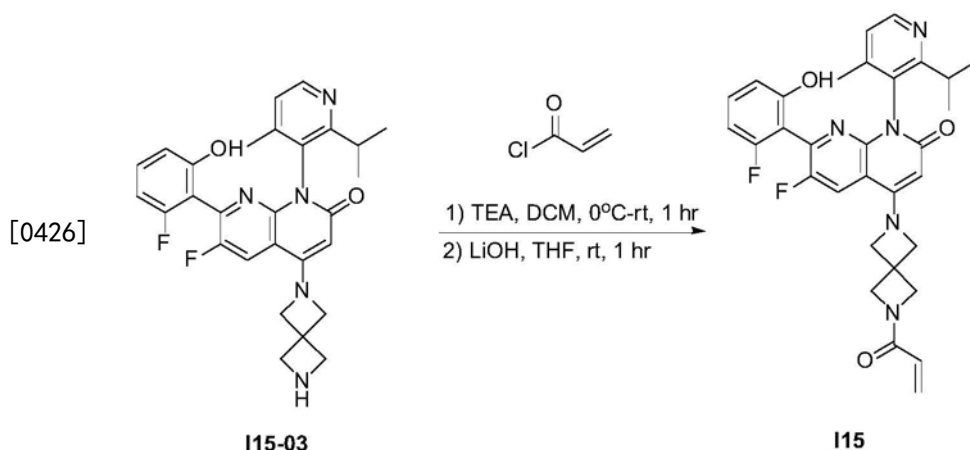


[0422] 在-78℃下向化合物I15-02 (10.0mg,0.16mmol) 的DCM (10mL) 溶液中加入BBr<sub>3</sub> (1.6mL,1M)。使反应混合物升温至室温,并搅拌16小时。

[0423] 通过LC-MS检测反应完成。用水 (20mL) 淬灭反应混合物。将混合物用DCM (15mL×2) 萃取。合并的水相通过Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液碱化至pH=7-8,水层用DCM (15mL×2) 萃取。有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到黄色固体的化合物I15-03 (80.0mg)。

[0424] MS Calcd.:503.5;MS Found:504.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0425] 步骤3:I15的合成



[0427] 在氮气和0℃下向化合物I15-03 (80.0mg,0.16mmol) 的DCM (5mL) 溶液中加入TEA (48.0mg,0.48mmol) 和丙烯酰氯 (43.0mg,0.48mmol)。使反应混合物升温至室温进行1小时。将反应物用水 (10mL) 稀释,并用DCM (10mL×2) 萃取。将合并的有机层真空浓缩。将残余物溶解在THF/H<sub>2</sub>O (5/1mL) 中,并加入LiOH (24.0mg,0.48mmol)。将混合物在室温搅拌2小时。

[0428] 通过LC-MS检测反应完成。将混合物真空浓缩并通过HPLC法纯化,得到白色固体的化合物I15 (5.8mg,6.6%产率)。

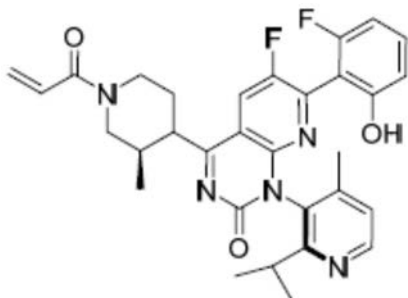
[0429]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.32 (brs, 1H), 8.62 (d,  $J=4.2\text{Hz}$ , 1H), 7.89 (d,  $J=10.0\text{Hz}$ , 1H), 7.25-7.19 (m, 2H), 6.67 (t,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 6.39 (dd,  $J=1.6, 16.8\text{Hz}$ , 1H), 6.24-6.17 (m, 1H), 5.75 (dd,  $J=1.6, 10.0\text{Hz}$ , 1H), 5.68 (s, 1H), 4.55-4.37 (m, 8H), 2.68-2.61 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.20 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H), 1.02 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H).

[0430] MS Calcd.: 557.6; MS Found: 558.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

[0431] 实施例16: 式I16化合物

[0432] 式I16化合物

[0433] 4-((3R)-1-丙烯酰基-3-甲基哌啶-4-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-异丙基-4-甲基吡啶-3-基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-2(1H)-酮



[0434]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 560.6

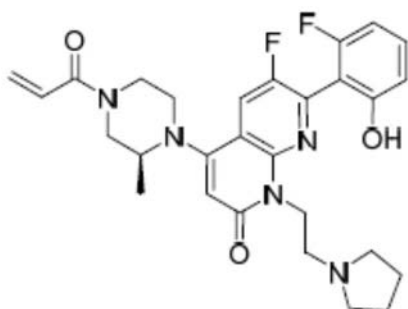
式I16化合物

[0435] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0436] 实施例17: 式I17化合物

[0437] 式I17化合物

[0438] 4-((S)-4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1-(2-(吡咯烷-1-基)乙基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0439]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 524.6

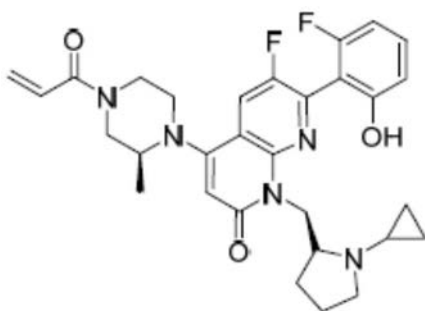
式I17化合物

[0440] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0441] 实施例18: 式I18化合物

[0442] 式I18化合物

[0443] 4-((S)-4-丙烯酰基-2-甲基哌嗪-1-基)-1-(((R)-1-环丙基吡咯烷-2-基)甲基)-6-氟-7-(2-氟-6-羟基苯基)-1,8-萘啶-2(1H)-酮



[0444]

LCMS(ESI)  $m/z$  (M+1): 550.6

式 I18 化合物

[0445] 通过参考实施例1的制备方法并改变相应试剂制备而得。

[0446] 实施例19KRAS G12C偶联核苷酸交换测定

[0447] 1. 实验目的: 评估化合物对SOS1介导的核苷酸交换的抑制作用。

[0448] 2. 试剂, 消耗品和仪器

[0449]

试剂	供应商
KRAS G12C (aa 1-169)	国内
cRAF RBD (aa 1-149)	国内
SOS1 (aa 564-1049)	国内
镍螯合物受体	Perkin Elmer
谷胱甘肽供体	Perkin Elmer
HEPES	Life Technologies
Milli-Q水	西格玛
MgCl <sub>2</sub>	西格玛
GTP	西格玛
GDP	西格玛
DTT (DL-二硫苏糖醇)	西格玛

[0450]

乙二胺四乙酸 (EDTA)	Invitrogen
消耗品	供应商
Topseal A	Perkin Elmer
96孔板	Nunc
384测定板	Corning
NAP-5色谱柱	GE
仪器	供应商
读板器	Perkin Elmer
离心机	Eppendorf
多通道移液器	Eppendorf/Sartorius

[0451] 3. 化合物信息与处理

[0452] 表2化合物信息和处理

Entry	化合物编号	Stock Conc. (mM)	Start Conc. (nM)	稀释倍数
[0453] 1	I2	10	100000	3
2	I3	10	100000	3
3	I4	10	100000	3

## [0454] 4. 实验程序

[0455] a) 在1mM Mg<sub>2</sub>+缓冲液中预孵育KRAS G12C和GDP 30分钟,然后使用10mM Mg<sub>2</sub>+缓冲液终止测定。

[0456] b) 通过色谱柱将KRAS G12C-GDP进行脱盐,然后使用Brandford方法测试KRAS G12C-GDP的浓度。

[0457] c) 将化合物在DMSO中稀释3倍(11个点)。然后将2μL化合物转移到38μL分析缓冲液中以得到化合物溶液。

[0458] d) 将4μL指定浓度的KRASG12C-GDP添加到384测定板上。

[0459] e) 将2μL化合物溶液(在步骤c中制备)转移到测定板上,并在25℃条件下与酶预孵育15分钟。

[0460] f) 将4μL SOS1和GTP混合物添加到测定孔中,并孵育2小时。

[0461] g) 加入10μL cRAF RBD,谷胱甘肽供体和镍螯合受体混合物加入到分析孔中。

[0462] h) 以1000RPM离心1分钟,在25℃孵育2h。

[0463] i) 在Envision上读取AlphaLisa信号。

[0464] j) 使用公式分析原始数据(参考如下“5.数据分析”)。

## [0465] 5. 数据分析

[0466] a) 对于每个筛选板,计算DMSO的平均数据和标准偏差(SD),作为高对照和低对照。

[0467] b) 化合物孔的抑制百分率(% inh) = 100 \* (平均高对照 - cpd孔) / (平均高对照 - 平均低对照)。

[0468] c) 具有低对照和高对照数据的测定稳健性分析:

[0469]  $S/B = \text{平均高对照} / \text{平均低对照}$ 。

[0470]  $CV\% (\text{低对照}) = 100 * (\text{SD低对照} / \text{平均低对照})$ 。

[0471]  $CV\% (\text{高对照}) = 100 * (\text{SD高对照} / \text{平均高对照})$ 。

[0472]  $Z' = 1 - 3 * (\text{SD低位对照} + \text{SD高位对照}) / (\text{AVE高对照} - \text{AVE低对照})$ 。

[0473] d) 根据非线性回归方程拟合cpd IC<sub>50</sub>。

[0474]  $Y = \text{底部} + (\text{顶部} - \text{底部}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$ 。

[0475] X: 化合物浓度的对数。

[0476] Y: 抑制百分比(% inh)。

[0477] 顶部和底部: 与Y单位相同。

[0478] logIC<sub>50</sub>: 与X相同的log单位。

[0479] HillSlope: 坡度系数或坡度。

[0480] 表3分析总结

	化合物编号	IC50 (nM)
[0481]	I2	1852
	I3	446.1
	I4	601.8

[0482] 实施例20:pERK细胞内WB测定

[0483] 1. 实验目的: 评估化合物对KRAS G12C突变的NCI-H358人非小细胞肺癌细胞的增殖抑制作用

[0484] 2. 试剂, 消耗品和仪器

	材料	供应商
	H358	ATCC
	RPMI1640培养基	Gibco
	EQFBS	Transgene
	TrypLE™Express酶 (1X), 无酚红	Gibco
	青霉素链霉素	Gibco
	IRDye800CW山羊抗兔IgG (H+L) (0.5mg)	LI-COR
	IRDye680RD山羊抗小鼠IgG (H+L) (0.5mg)	LI-COR
[0485]	磷酸化p44/42 MAPK (T202/Y204) 兔单克隆抗体	CST
	GAPDH (D4C6R) 小鼠单克隆抗体	CST
	DPBS	LI-COR
	PBS	Solarbio
	Tween-20	Solarbio
	甲醇 (HPLC级)	Honeywell
	T75烧瓶	Corning
	384孔黑色/透明板	Corning



	实验仪器	供应商
	CO2孵化器	赛默飞世尔
	Echo550液体处理器	ThermoFisher
[0486]	Countess™II自动化细胞计数器	Invitrogen
	Odyssey CLx	LI-COR
	离心机	Eppendorf
	多通道移液器	Eppendorf
	Apricot Tips (50uL)(Apricot,050-384-EZ-NS)	Apricot Designs

## [0487] 3. 化合物信息与处理

Entry	化合物	Stock Conc. (mM)	Start Conc. (mM)	稀释倍数	最终浓缩 (nM)
[0488] 1	I2	10	2	3	10000
2	I3	10	2	3	10000
3	I4	10	2	3	10000

## [0489] 4. 实验程序

## [0490] 4.1 细胞培养

[0491] a) 第1天,将种子细胞放入T75烧瓶中,如下表所示:

细胞系	基本成长培养基	细胞#T75	生长周期
[0492] NCI-H358	RPMI1640+10%FBS+1%P/S	3.5-4x10 <sup>6</sup>	2天

[0493] b) 第3天,除去培养基,并用DPBS冲洗一次,

[0494] c) 在室温 (RT) 或37°C 下用2mL TrypLE™Express酶对细胞进行胰蛋白酶消化,直至细胞分离。

[0495] d) 加入5mL新鲜培养基,悬浮细胞,然后在室温以1000rpm离心5分钟。

[0496] e) 丢弃上清液,并用5mL新鲜培养基重悬细胞,通过Cell countess I对细胞进行计数。

[0497] f) 将细胞接种回T75烧瓶中进行进一步培养,或放入测定板中进行细胞内Western分析。

## [0498] 4.2 pERK细胞内Western分析

[0499] a) 在384孔板中接种细胞,并在37°C,5%CO<sub>2</sub>中孵育过夜。[0500] b) 通过Echo 550加入200nL系列稀释的化合物(最终0.5%DMSO),在37°C,5%CO<sub>2</sub>中孵育细胞3小时。

- [0501] c) 在室温下固定细胞。  
 [0502] d) 用40 $\mu$ L PBS洗涤一次,然后渗透细胞。  
 [0503] e) 用40 $\mu$ L/孔PBS洗涤一次。  
 [0504] f) 加入封闭缓冲液,在室温下孵育。  
 [0505] g) 去除封闭缓冲液并添加一抗,兔抗pERK,小鼠抗GAPDH。  
 [0506] h) 用40 $\mu$ L/孔PBST洗涤,共3次。  
 [0507] i) 加入二抗,在室温下避光孵育。  
 [0508] j) 用40 $\mu$ L/孔PBST洗涤,共3次。  
 [0509] k) 以1000rpm离心1分钟,然后用Odyssey CLx对孔板进行扫描。

#### [0510] 5. 数据分析

- [0511] a) 使用DMSO对照数据进行测定稳定性检查:  
 [0512] 相对信号 = 信号值(总通道800) / 信号值(总通道700)。  
 [0513]  $H = Ave(DMSO), L = Ave(化合物)$ 。  
 [0514]  $SD(H) = STDEV(DMSO), SD(L) = STDEV(化合物)$ 。  
 [0515]  $CV\%(DMSO) = 100 * (SD_H / Ave_H), CV\%(化合物) = 100 * SD_L / Ave_L$ 。  
 [0516]  $Z' = 1 - 3 * (SD_H + SD_L) / (Ave_H - Ave_L)$ 。  
 [0517] 相对pERK =  $(Sample - Ave_L) / (Ave_H - Ave_L)$ 。

- [0518] b) 根据非线性回归方程拟合cpdIC<sub>50</sub>:

$$[0519] Y = \text{底部} + (\text{顶部} - \text{底部}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))})$$

- [0520] X: cpd浓度对数。

- [0521] Y: Ave(相对pERK)。

- [0522] 顶部和底部: 与Y相同单位。

- [0523] logIC<sub>50</sub>: 与X相同的log单位:

- [0524] HillSlope: 坡度系数或坡度

#### [0525] 6. 结果

- [0526] 本发明化合物对NCI-H358细胞的抗增殖活性IC<sub>50</sub>示于表4。

- [0527] 表4

Entry	化合物编号	Start conc.(nM)	IC <sub>50</sub> (nM)
[0528] 1	I2	10000	986
2	I3	10000	178
3	I4	10000	213

- [0529] 实施例21考察本发明的化合物对肿瘤多药耐药性的逆转作用

- [0530] 测试化合物: 本发明实施例的式AMG510和式I1-I18化合物。

- [0531] 亲本细胞KB细胞为人口腔表皮样癌细胞;

- [0532] P-糖蛋白(P-gp)高表达细胞(KB<sub>v200</sub>)是以KB细胞为亲本,通过诱变剂甲基磺酸乙酯刺激,然后在培养液中加入浓度递增的长春新碱诱导而得,对长春新碱具有耐药性。

- [0533] 实验方法分别将亲本细胞KB细胞和P-gp高表达细胞KBV200细胞接种于96孔板中(5000个/孔),细胞贴壁完全以后,将长春新碱分浓度梯度加入相应孔中,加药体积差异用

磷酸盐缓冲液 (PBS) 补齐, 72 小时后, 每孔加入 0.5mg/ml 的噻唑蓝 (MTT) 10 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时后, 吸去培养液, 晾干后每孔加入 50 $\mu$ l 的二甲基亚砜 (DMSO) 溶解结晶, 酶标仪 570nm 处测量 OD 值; 将不同化合物分别与梯度浓度的长春新碱组合后, 重复上述过程, 每个浓度设置 3 个复孔, 重复 3 次, 求出 Mean  $\pm$  SD, 并用 Graphpad Prism 软件计算各组 IC<sub>50</sub> (半数抑制浓度, 即达到 50% 抑制效果时抑制剂的浓度), 结果如表 5 所示。

[0534] 表 5 不同化合物与长春新碱联合应用对对 KB 细胞和 KBV200 细胞的抑制

	药物	IC <sub>50</sub>	
		KB 细胞 (nM)	KBV <sub>200</sub> 细胞 ( $\mu$ M)
[0535]	长春新碱	27.51 $\pm$ 1.7	1.78 $\pm$ 0.13
	长春新碱 + 式 AMG510 化合物 (1 $\mu$ M)	3.9 $\pm$ 0.2	1.17 $\pm$ 0.09
	长春新碱 + 式 I1 化合物 (1 $\mu$ M)	22.3 $\pm$ 1.2	0.17 $\pm$ 0.01
	长春新碱 + 式 I2 化合物 (1 $\mu$ M)	24.1 $\pm$ 1.4	1.03 $\pm$ 0.08
	长春新碱 + 式 I3 化合物 (1 $\mu$ M)	19.6 $\pm$ 1.3	0.81 $\pm$ 0.06
	长春新碱 + 式 I4 化合物 (1 $\mu$ M)	20.5 $\pm$ 1.2	0.92 $\pm$ 0.05
	长春新碱 + 式 I5 化合物 (1 $\mu$ M)	22.6 $\pm$ 1.1	0.54 $\pm$ 0.03
	长春新碱 + 式 I6 化合物 (1 $\mu$ M)	23.8 $\pm$ 1.5	0.41 $\pm$ 0.02
	长春新碱 + 式 I7 化合物 (1 $\mu$ M)	19.9 $\pm$ 1.4	0.61 $\pm$ 0.04
	长春新碱 + 式 I8 化合物 (1 $\mu$ M)	22.5 $\pm$ 1.1	0.79 $\pm$ 0.05
[0536]	长春新碱 + 式 I9 化合物 (1 $\mu$ M)	24.1 $\pm$ 1.5	0.62 $\pm$ 0.04
	长春新碱 + 式 I10 化合物 (1 $\mu$ M)	23.6 $\pm$ 1.3	0.49 $\pm$ 0.02
	长春新碱 + 式 I11 化合物 (1 $\mu$ M)	20.7 $\pm$ 1.3	0.78 $\pm$ 0.03
	长春新碱 + 式 I12 化合物 (1 $\mu$ M)	18.8 $\pm$ 1.5	0.86 $\pm$ 0.06
	长春新碱 + 式 I13 化合物 (1 $\mu$ M)	17.6 $\pm$ 1.4	0.72 $\pm$ 0.03
	长春新碱 + 式 I14 化合物 (1 $\mu$ M)	22.2 $\pm$ 1.1	0.81 $\pm$ 0.05
	长春新碱 + 式 I15 化合物 (1 $\mu$ M)	23.5 $\pm$ 1.5	0.93 $\pm$ 0.07
	长春新碱 + 式 I16 化合物 (1 $\mu$ M)	21.4 $\pm$ 1.4	0.81 $\pm$ 0.06
	长春新碱 + 式 I17 化合物 (1 $\mu$ M)	18.2 $\pm$ 1.7	0.97 $\pm$ 0.07
	长春新碱 + 式 I18 化合物 (1 $\mu$ M)	19.3 $\pm$ 1.6	1.05 $\pm$ 0.08

[0537] 从表 5 中可以得出, 本发明的化合物能够逆转 P-gp 高表达的 KB<sub>V200</sub> 对长春新碱的耐药性, 特别是本发明式 I1 化合物能够显著抑制 KB<sub>V200</sub> 细胞对长春新碱的多药耐药性。

[0538] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已, 并不用于限制本申请, 对于本领域的技术人员来说, 本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内, 所作的任何修

改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。