



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111978311 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 31

(21) 申请号 201910425587.3	A61K 31/433 (2006.01)
(22) 申请日 2019.05.21	A61K 31/427 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111978311 A	A61K 31/422 (2006.01)
(43) 申请公布日 2020.11.24	A61K 31/415 (2006.01)
(73) 专利权人 中国科学院上海有机化学研究所 地址 200032 上海市徐汇区零陵路345号	A61P 29/00 (2006.01)
(72) 发明人 谭立 李盈 秦赢 李德康	A61P 1/16 (2006.01)
(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266 专利代理师 马思敏 徐迅	A61P 25/28 (2006.01)
(51) Int. Cl.	A61P 9/10 (2006.01)
C07D 413/04 (2006.01)	A61P 9/00 (2006.01)
C07D 403/04 (2006.01)	A61P 31/04 (2006.01)
C07D 417/04 (2006.01)	A61P 31/02 (2006.01)
C07D 207/06 (2006.01)	A61P 31/12 (2006.01)
C07D 207/08 (2006.01)	A61P 1/18 (2006.01)
C07D 241/06 (2006.01)	(56) 对比文件
C07D 241/04 (2006.01)	CN 101674826 A, 2010.03.17
A61K 31/4245 (2006.01)	CN 102316735 A, 2012.01.11
A61K 31/40 (2006.01)	CN 107108492 A, 2017.08.29
A61K 31/41 (2006.01)	CN 107530350 A, 2018.01.02
	EP 3362450 A1, 2018.08.22
	WO 2017064217 A1, 2017.04.20
	STN.1794154-28-1 et al.《STN》.2015, 第1-7页.
	审查员 刘宁宁
	权利要求书5页 说明书40页 附图3页

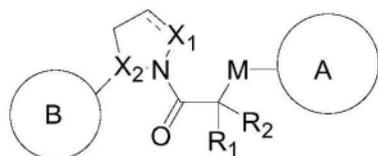
(54) 发明名称

一类细胞程序性坏死抑制剂及其制备方法和用途

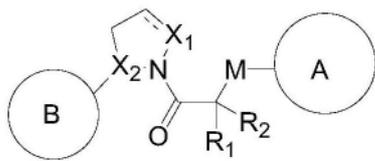
(57) 摘要

本发明提供了一类细胞程序性坏死抑制剂及其制备方法和用途,具体地,本发明提供了一种如式I所示的化合物,及包含其的组合物。所述的化合物可以用于制备预防和/或治疗涉及细胞死亡和/或炎症的疾病的药物组合物。

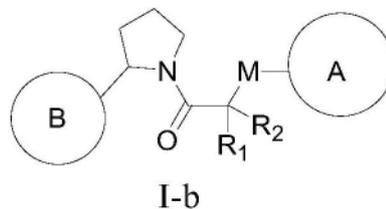
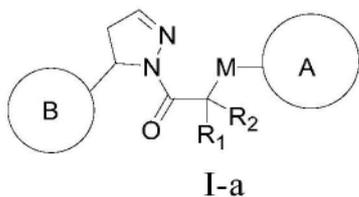
CN 111978311 B



1. 一种如下式 (I) 所示的化合物, 或其药学上可接受的盐,



所述的式 I 化合物具有选自下组 I-a 或 I-b 所示的结构:



所述的化合物选自下表:

化合物编号	化学结构	化合物编号	化学结构
QY-1-98		QY-4-6	
QY-2-25		QY-4-7	
QY-2-26		QY-4-8	
QY-2-38		QY-4-11	
QY-2-39		QY-4-12	

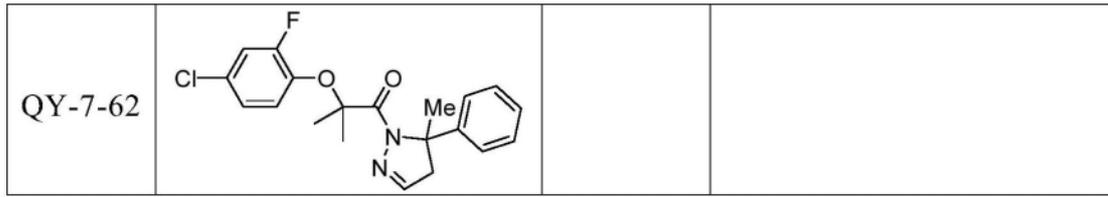
QY-2-52		QY-4-27	
QY-2-53		QY-4-32	
QY-2-55		QY-4-35	
QY-2-75		QY-4-39	
QY-2-76		QY-4-66	
QY-2-77		QY-4-67	
QY-2-79		QY-4-69	
QY-2-100		QY-4-75	
QY-3-11		QY-4-78	

QY-3-17		QY-4-87	
QY-3-26		QY-4-88	
QY-3-27		QY-4-96	
QY-3-28		QY-4-99	
QY-3-29		QY-5-21	
QY-3-36		QY-5-22	
QY-3-39		QY-5-83	
QY-3-46		QY-6-47	
QY-3-81		QY-6-60	
QY-3-94		QY-6-61	

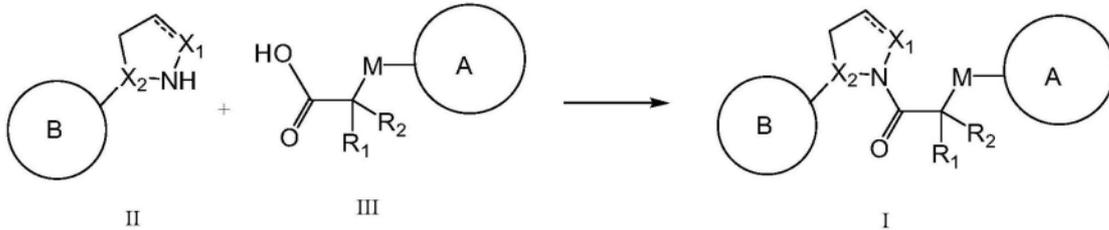
QY-3-95		QY-6-62	
QY-3-96		QY-6-83	
QY-3-99		QY-6-84	
QY4-2		QY-7-50	
ZSQ-13-57		XHJ-3-22	
		ZSQ-13-56	

2. 一种如下式所示的化合物:

QY-2-78		QY-6-63	
QY-7-7		QY-7-60	



3. 如权利要求1所述的化合物的制备方法,其特征在于,所述方法包括步骤:



在惰性溶剂中,用式II化合物和式III化合物反应,得到式I化合物。

4. 一种药物组合物,其特征在于,所述的药物组合物包括 (a) 治疗有效量的如权利要求1-2任一中所述的化合物、或其药学上可接受的盐;和 (b) 药学上可接受的载体。

5. 如权利要求4所述的药物组合物,其特征在于,所述的疾病或病症选自下组:炎性疾病、感染性疾病、缺血性或退行性相关疾病、组织损伤。

6. 如权利要求1所述的式I化合物的用途,其特征在于,用于制备治疗或预防与细胞程序性坏死和/或人受体相互作用蛋白1激酶 (RIPK1) 活性或表达量相关的疾病或病症的药物组合物;所述的疾病或病症选自下组:炎性疾病、感染性疾病、缺血性或退行性相关疾病、组织损伤。

一类细胞程序性坏死抑制剂及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及小分子化合物领域,具体地,本发明提供了一种结构新颖的抑制细胞程序性坏死和/或人受体相互作用蛋白1激酶(RIPK1)抑制剂,及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 在发育与衰老的过程中,人体内总是伴随着细胞增殖与死亡的动态调节。细胞的主动性死亡在正常发育、抵抗病原微生物入侵、维持内环境稳态等生理活动中不可或缺,其失调往往导致发育畸形、免疫系统疾病、神经退行性疾病及癌症等多种疾病,乃至个体的死亡。因此,对细胞程序性死亡进行干预,对于疾病治疗研究有着重要的意义。凋亡是首个被阐明的细胞程序性死亡机制,近年来,细胞程序性坏死成为细胞死亡领域的新热点。已有多项研究报道,在多种退行性疾病(如阿尔茨海默氏症(AD)、多发性硬化症(MS)、肌萎缩脊髓侧索硬化症(ALS)、视网膜退行性疾病等)、炎症(肠炎、风湿性关节炎、银屑病等)、缺血再灌注损伤(脑梗、心肌梗死等)以及病原体感染等多种疾病中,都伴随有细胞程序性坏死这一重要病理特征。此外,细胞程序性坏死还参与肿瘤微环境的调控:肺癌细胞能诱导血管壁特定细胞发生程序性坏死,以便通过循环系统并发生转移;坏死小体(Necrosome)的主要成分在胰腺癌中的高表达,能诱导趋化因子CXCL1的表达进而抑制机体的免疫响应。因此,抑制细胞程序性坏死的发生,被公认有助于多种疾病的治疗与缓解。

[0003] 研究表明,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)是刺激体内细胞发生程序性坏死的主要途径之一,其下游信号通路也是当前机制最为明确的坏死信号通路。在经典的TNF- α 诱导细胞坏死过程中,TNF- α 首先结合受体TNFR1,诱导其三聚化并招募胞内一系列因子——包括TRADD、TRAF2、RIPK1、cIAP1/2等多个蛋白,进而形成信号复合物I。复合物I能招募并激活IKK α /IKK β /IKK γ 复合物以及NF- κ B通路,并在解离后部分进入胞质,形成新的蛋白复合物IIa,再通过FADD或TRADD招募procaspase-8等蛋白,以激活下游的半胱天冬酶caspase-3与caspase-7并介导凋亡的发生。在FADD缺失或caspase抑制剂用药的情况下,TNF- α 诱导激活的激酶蛋白RIPK1会与RIPK3结合形成新的复合物IIb,并诱导后者的磷酸化激活,从而磷酸化下游底物MLKL以促使其寡聚,最终扰乱细胞膜的结构并导致坏死的发生。

[0004] 多个衔接蛋白、泛素连接酶、去泛素化酶和激酶蛋白参与调控着TNF- α 诱导细胞程序性坏死的下游信号通路。例如:E3泛素连接酶cIAP对RIPK1的K63泛素化能抑制后者的激活及坏死的进程;去泛素化酶CYLD可以剪切RIPK1的K63泛素链,进而激活RIPK1激酶活性并促进坏死小体的形成,最终实现对细胞坏死的正向调控作用;衔接蛋白SPATA2促进CYLD去泛素化酶活性,并抑制NF- κ B和MAPK信号通路,进而正向调控程序性坏死;激酶蛋白TAK1通过磷酸化RIPK1的Ser321位点抑制后者激酶活性,进而负向调控程序性坏死,而去泛素化酶A20(TNF- α induced protein 3)、衔接蛋白TAB2(TAK1binding protein 2)等多个调控因子也参与到此调控过程;激酶蛋白TBK1则通过磷酸化RIPK1的Thr189位点抑制后者的激活,在衰老过程中TBK1的失活性突变也是ALS、FTD等神经退行性疾病的重要致病风险;衔接蛋白Optineurin(OPTN)通过抑制RIPK1激酶活性负向调控程序性坏死,而在ALS中丧失OPTN则

可能促发进行性髓鞘形成障碍和轴突退行性病变。由此可见, TNF- α 诱导细胞程序性坏死的信号通路网络中, 多个调控组件的功能性异常都通过RIPK1激酶这一核心调控因子的激活来介导程序性坏死的发生。

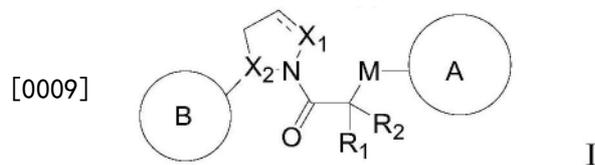
[0005] 因此, RIPK1激酶被公认是细胞程序性坏死相关疾病的潜在治疗靶标。首创型RIPK1抑制剂Necrostatin-1 (Nec-1) 及其类似物在临床前研究中, 已经对多种退行性疾病、炎症、癌症等疾病展示出明确的疗效。例如, 对AD、ALS、MS、帕金森氏症 (PD)、亨廷顿氏症 (PD) 炎性肠病、老年性黄斑变性等具有缓解作用; 对银屑病、色素性视网膜炎、炎症性肠病、自身免疫性疾病、蛙皮素诱导的急性胰腺炎和败血症/全身炎症反应综合症 (SIRS) 具有保护作用; 能有效缓解缺血性脑损伤、缺血性心肌损伤、视网膜缺血/再灌注损伤、视网膜脱离诱导的感光细胞坏死、青光眼、肾缺血再灌注损伤、顺铂诱导的肾损伤和创伤性脑损伤; 至少部分缓解由RIPK1依赖性细胞凋亡、坏死或细胞因子生成所相关的其他疾病, 包括血液和实体器官恶性肿瘤、细菌感染和病毒感染 (包括结核病、流感等) 和溶酶体贮积症 (尤其是戈谢病)。当前, Nec-1衍生物已进入治疗ALS和AD的临床试验当中; 另一类RIPK1抑制剂GSK2982772也正处于治疗多种自身免疫性疾病的临床试验当中。然而, 现有的程序性坏死抑制剂均存在着不同程度的缺陷, 如活体抑制活性仍不够理想、药代性质不佳、口服生物利用度低等, 还有一些无法透过血脑屏障进入中枢神经系统, 或是因不能有效抑制鼠源RIPK1而难以实施临床前动物试验, 这些缺点均限制了其进一步的研究与临床应用。

[0006] 因此, 研发出具有临床应用价值的高特异性、高活性并且具有血脑屏障穿透性的小分子RIPK1激酶活性抑制剂, 是目前治疗细胞程序性坏死相关疾病治疗研究中的难点与热点。在现有的RIPK1激酶抑制剂基础上, 本领域中仍然需要更多化学结构更新颖、药代药效性质更突出的新型RIPK1抑制剂, 以作为预防和治疗涉及细胞死亡和/或炎症疾病的候选药物。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种化学结构新颖、药代药效性质更突出的新型RIPK1抑制剂, 以作为预防和治疗涉及细胞死亡和/或炎症疾病的候选药物。

[0008] 本发明的第一方面, 提供了一种如下式 (I) 所示的化合物, 或其药学上可接受的盐,



[0010] 式中:

[0011] 虚线为化学键或无;

[0012] M选自下组: S、O或NH;

[0013] X₁选自下组: CR₂、NR、O、S、CR、N;

[0014] X₂选自下组: CR、N;

[0015] R选自下组: H、D、C1-C4烷基;

[0016] R₁、R₂各自独立地选自下组: H、C1-C4烷基; 或R₁、R₂共同形成取代或未取代的-

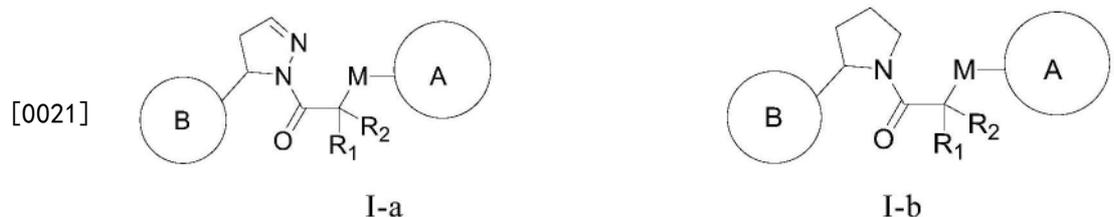
$(\text{CH}_2)_n$ -结构;其中,n为1、2、3或4;

[0017] A环为选自下组的基团:取代或未取代的C6-C10芳基、取代或未取代的5-12元杂芳基;

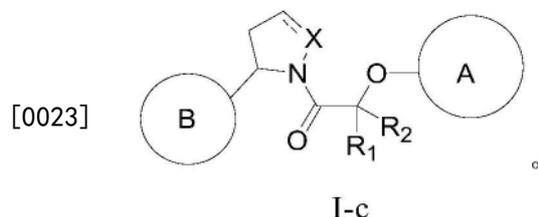
[0018] B环为选自下组的基团:取代或未取代的C6-C10芳基、取代或未取代的5-12元杂芳基;

[0019] 其中,所述的取代指基团上的氢原子被一个或者多个(例如2个、3个、4个等)选自下组的取代基所取代:卤素、氘代、C1-C6烷氧基、卤代的C1-C6烷氧基、甲基砜基、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}_2$ 、氧代($=\text{O}$)、 $-\text{CN}$ 、羟基、 $-\text{NH}_2$ 、羧基、C2-C6酰胺基($-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{Rc})_2$ 或 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})(\text{Rc})$, R_c为H或C1-C5的烷基)、C1-C6烷基-(C2-C6酰胺基)、或取代或未取代的选自下组的基团:C1-C6烷基、C3-C8环烷基、C1-C6胺基、C6-C10芳基、具有1-3个选自N、S和O的杂原子的5-10元杂芳基、具有1-3个选自N、S和O的杂原子的5-12元杂环基、 $-(\text{CH}_2)-\text{C6-C10芳基}$ 、 $-(\text{CH}_2)-$ (具有1-3个选自N、S和O的杂原子的5-10元杂芳基),且所述的取代基选自下组:卤素、C1-C6烷基、C1-C6烷氧基、氧代、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、C6-C10芳基、C1-C6胺基、C2-C6酰胺基、具有1-3个选自N、S和O的杂原子的5-10元杂芳基。

[0020] 在另一优选例中,所述的式I化合物具有选自下组I-a或I-b所示的结构:



[0022] 在另一优选例中,所述的式I化合物具有下式I-c所示的结构:

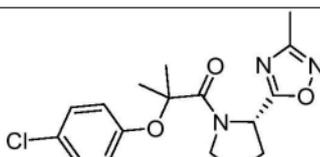
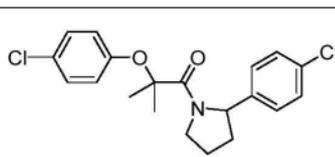


[0024] 在另一优选例中,所述的A环选自下组:苯基、5-7元杂芳基;和/或

[0025] 所述的B环选自下组:苯基、5-7元杂芳基。

[0026] 在另一优选例中,所述的A环为苯基。

[0027] 在另一优选例中,所述的化合物选自下表:

化合物编号	化学结构	化合物编号	化学结构
[0028] QY-1-98		QY-4-6	

[0029]

QY-2-25		QY-4-7	
QY-2-26		QY-4-8	
QY-2-27		QY-4-11	
QY-2-34		QY-4-12	
QY-2-38		QY-4-14	
QY-2-39		QY-4-27	
QY-2-52		QY-4-32	
QY-2-53		QY-4-35	
QY-2-54		QY-4-39	

[0030]

QY-2-55		QY-4-66	
QY-2-56		QY-4-67	
QY-2-75		QY-4-69	
QY-2-76		QY-4-70	
QY-2-77		QY-4-75	
QY-2-78		QY-4-78	
QY-2-79		QY-4-87	
QY-2-100		QY-4-88	

QY-2-103		QY-4-96	
QY-2-104		QY-4-99	
QY-3-4		QY-5-1	
QY-3-11		QY-5-4	
QY-3-17		QY-5-21	
QY-3-26		QY-5-22	
QY-3-27		QY-5-79	
QY-3-28		QY-5-83	
QY-3-29		QY-5-85	
QY-3-35		QY-6-47	

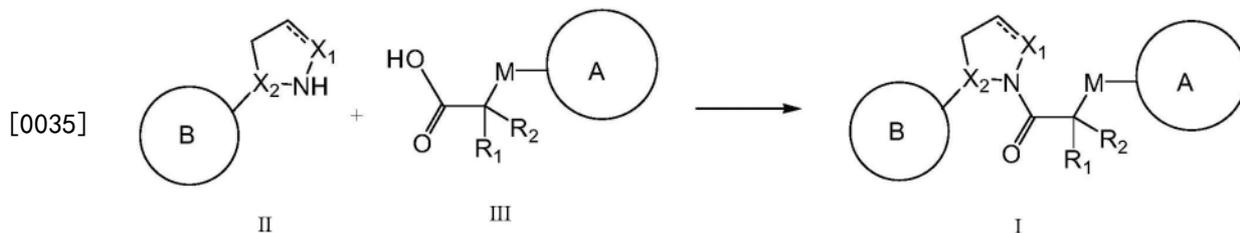
[0031]

[0032]

QY-3-36		QY-6-60	
QY-3-39		QY-6-61	
QY-3-46		QY-6-62	
QY-3-51		QY-6-63	
QY-3-65		QY-6-83	
QY-3-81		QY-6-84	
QY-3-86		QY-7-7	
QY-3-94		QY-7-50	
QY-3-95		QY-7-60	

QY-3-96		QY-7-62	
QY-3-99		XHJ-3-22	
QY4-1		ZSQ-13-56	
QY4-2		ZSQ-13-57	

[0034] 本发明的第二方面,提供了如本发明第一方面所述的化合物的制备方法,所述方法包括步骤:



[0036] 在惰性溶剂中,用式II化合物和式III化合物反应,得到式I化合物。

[0037] 在另一优选例中,所述的惰性溶剂为二氯甲烷。

[0038] 在另一优选例中,所述的反应在HATU和DIEA存在下进行。

[0039] 本发明的第三方面,提供了一种药物组合物,所述的药物组合物包括(a)治疗有效量的如本发明第一方面所述的化合物、或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物;和(b)药学上可接受的载体。

[0040] 在另一优选例中,所述的疾病或病症选自下组:炎性疾病、感染性疾病、缺血性或退行性相关疾病、组织损伤。

[0041] 在另一优选例中,所述炎症性、感染性、缺血性或退行性相关疾病选自:全身炎症综合征、对乙酰氨基酚引起的肝损伤、急性胰腺炎、炎症性肠病、脓毒血症、沙门氏菌感染、李斯特菌感染、牛痘病毒感染、阿尔茨海默病、缺血性心肌病、缺血性脑卒中、动脉粥样硬化。

[0042] 在另一优选例中,所述组织损伤包括:肝损伤、肝中毒或肝细胞坏死。

[0043] 本发明的第四方面,提供了如本发明第一方面所述的式I化合物的用途,其用于制

备治疗或预防与细胞程序性坏死和/或人受体相互作用蛋白1激酶(RIPK1)活性或表达量相关的疾病或病症的药物组合物。

[0044] 在另一优选例中,所述的RIPK1激酶为野生型,或RIPK1S161A。

[0045] 在另一优选例中,所述的疾病或病症选自下组:炎性疾病、感染性疾病、缺血性或退行性相关疾病、组织损伤。

[0046] 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。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0047] 图1为实施例2中化合物对TNF诱导的细胞程序性坏死的影响;

[0048] 图2为实施例3中化合物QY-1-98对TNF α 诱导的FADD deficient Jurkat细胞程序性坏死通路中关键蛋白的影响;

[0049] 图3为实施例4中化合物QY-1-98对RIPK1(1-330)蛋白的热稳定性的影响测试结果;

[0050] 图4为实施例5中测试化合物QY-1-98对RIPK1(1-330)蛋白的激酶活性的影响测试结果;

[0051] 图5为实施例6中化合物RIPK1第161位丝氨酸突变为丙氨酸(S161A)对化合物的影响测试结果;

[0052] 图6为实施例7中化合物RIPK1第161位丝氨酸突变为谷氨酸对化合物的影响测试结果。

具体实施方式

[0053] 本发明人经过长期而深入的研究,筛选得到了一类结构新颖的细胞程序性坏死抑制剂。所述的细胞程序性坏死抑制剂具有优异的RIPK1抑制活性,因此可以用于制备预防和/或治疗涉及细胞死亡和/或炎症的疾病的药物组合物。基于上述发现,发明人完成了本发明。

[0054] 术语

[0055] 除非明确另外指出,根据本发明和本文所用的术语具有以下含义:

[0056] 如本文所用,术语“C1-C4烷基”指具有1~4个碳原子的直链或支链烷基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基等,或类似基团。

[0057] 如本文所用,术语“C3-C8环烷基”指具有1~8个碳原子的环状烷基,例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基。

[0058] 如本文所用,术语“C1-C6烷氧基”指上文定义的C1-C6烷基,其通过氧原子连接至分子的剩余部分。优选地,C1-C6烷氧基可包括甲氧基、乙氧基和异丙氧基。

[0059] 如本文所用,术语“C1-C6胺基”指上文定义的C1-C6烷基,其通过氮原子连接至分子的剩余部分。优选地,烷基氨基可包括二甲基氨基和二乙基氨基。

[0060] 术语“卤素”指F、Cl、Br和I。

[0061] 术语“卤代烷基”指被卤素取代的C1-C3的烷基。优选地,卤代烷基为三氟甲基、二

氟甲基、三氟甲氧基。这里“C1-C3烷基”指具有1~3个碳原子的直链或支链烷基,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基。

[0062] 术语“芳基”指C6-C18芳族基团,例如苯基或萘基,未被取代、被一个或者多个(例如2、3、4或5个)选自以下的原子或基团取代的芳基:卤素、硝基、羟基、氨基、氰基、卤代烷基、取代或未取代的C1-C6烷基、取代或未取代的C3-C8环烷基、取代或未取代的C1-C6烷氧基、取代或未取代的C1-C6烷胺基、取代或未取代的C1-C6羧基、取代或未取代的C1-C6酯基、取代或未取代的C2-C6烷酰基、取代或未取代的C2-C6烷酰胺基。

[0063] 术语“杂芳基”指5-12元芳族基团,其包含一个或多个选自氮、氧和硫的杂原子。杂芳基可包括吡啶、吡嗪、嘧啶、噻吩、呋喃、异噻唑、异噻唑、吡唑、咪唑。此类基团可以未被取代、被一个或者多个(例如2、3、4或5个)选自以下的原子或基团取代的杂芳基:卤素、硝基、羟基、氨基、氰基、卤代烷基、取代或未取代的C1-C6烷基、取代或未取代的C3-C8环烷基、取代或未取代的C1-C6烷氧基、取代或未取代的C1-C6烷胺基、取代或未取代的C1-C6羧基、取代或未取代的C1-C6酯基、取代或未取代的C2-C6烷酰基、取代或未取代的C2-C6烷酰胺基。

[0064] 术语“杂环”或“杂环基”指5-12元非芳族基团(包括饱和的、部分饱和的或不饱和的基团),其包含一个或多个选自氮、氧和硫的杂原子,具有单环或稠环(包括桥环体系和螺环体系。在稠环体系中,一个或多个环可以是环烷基、芳基或杂芳基。在一实施例中,杂环基团的氮原子和/或硫原子任选地被氧化,以提供N-氧化物、亚磺酰基和磺酰基部分。“杂环基”及其稠和类似物的例子包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、咪唑烷基、2,3-二氢呋喃(2,3-b)并吡啶基、苯并噁嗪基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、二氢吲哚基等。该术语也包括非芳香性的部分不饱和的单环,如通过氮原子连接的2-或4-吡啶酮或N-取代的-(1H,3H)-嘧啶-2,4-二酮类(N-取代的尿嘧啶)。

[0065] 本发明中,术语“含有”、“包含”或“包括”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此,术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

[0066] 本发明中,术语“药学上可接受的”成分是指适用于人和/或动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应),即有合理的效益/风险比的物质。

[0067] 本发明中,术语“有效量”指治疗剂治疗、缓解或预防目标疾病或状况的量,或是表现出可检测的治疗或预防效果的量。对于某一对象的精确有效量取决于该对象的体型和健康状况、病症的性质和程度、以及选择给予的治疗剂和/或治疗剂的组合。因此,预先指定准确的有效量是没用的。然而,对于某给定的状况而言,可以用常规实验来确定该有效量,临床医师是能够判断出来的。

[0068] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”指本发明化合物与酸或碱所形成的适合用作药物的盐。药学上可接受的盐包括无机盐和有机盐。一类优选的盐是本发明化合物与酸形成的盐。适合形成盐的酸包括但不限于:盐酸、氢溴酸、氢氟酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸,甲酸、乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苦味酸、甲磺酸、苯甲磺酸,苯磺酸等有机酸;以及天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸。

[0069] 本发明中的一些化合物可能用水或各种有机溶剂结晶或重结晶,在这种情况下,可能形成各种溶剂化物。本发明的溶剂合物包括化学计量的溶剂化物如水合物等,也包括在用低压升华干燥法制备时形成的包含可变量水的化合物。

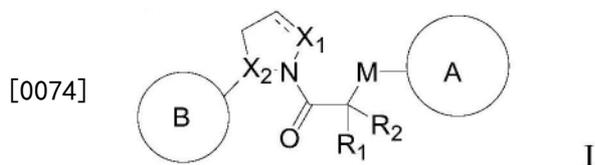
[0070] 本文所用的术语“前药”指当给药至生物系统时由于一种或多种自发的化学反应、

一种或多种酶催化化学反应和/或一种或多种代谢化学反应而产生“药物”物质(生物学活性化合物)的任意化合物。其还包括本发明的化合物的生物可降解的聚合物衍生物,例如如 Int. J. Pharm. 115, 61-67 (1995) 所述。

[0071] 本发明还包括本发明化合物的所有合适的同位素变体。本发明化合物的同位素变体被定义为其中至少一个原子被具有相同原子数但原子质量不同于自然界中常见的原子质量的原子替代的那些。可并入本发明化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟和氯的同位素,分别例如 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 和 ^{36}Cl 。本发明的一些同位素变体,例如,其中并入放射性同位素(例如 ^3H 或 ^{14}C)的那些,被用于药物和/或底物组织分布研究。氚代的,即, ^3H ,和碳-14,即, ^{14}C ,同位素是特别优选的,因为它们易于制备和检测。此外,用同位素(例如氘,即, ^2H)的取代,可提供由增加的代谢稳定性引起的一些治疗优势,例如,增加的体内半衰期或降低的剂量需求并因此在一些情况下可能是优选的。本发明化合物的同位素变体通常可通过常规操作制备,例如使用适当的同位素变体的合适试剂,通过示例性的方法或下文实验部分中描述的制备。

[0072] 式I化合物及其制备

[0073] 本发明提供了一种如下式(I)所示的化合物,或其药学上可接受的盐,



[0075] 式中:

[0076] 虚线为化学键或无;

[0077] M选自下组:S、O或NH;

[0078] X_1 选自下组:CR₂、NR、O、S、CR、N;

[0079] X_2 选自下组:CR、N;

[0080] R选自下组:H、D、C1-C4烷基;

[0081] R_1 、 R_2 各自独立地选自下组:H、C1-C4烷基;或 R_1 、 R_2 共同形成取代或未取代的-(CH₂)_n-结构;其中,n为1、2、3或4;

[0082] A环为选自下组的基团:取代或未取代的C6-C10芳基、取代或未取代的5-12元杂芳基;

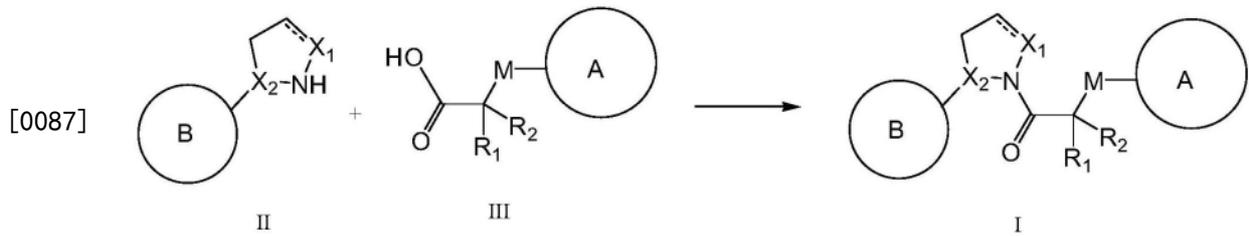
[0083] B环为选自下组的基团:取代或未取代的C6-C10芳基、取代或未取代的5-12元杂芳基;

[0084] 其中,所述的取代指基团上的氢原子被一个或者多个(例如2个、3个、4个等)选自下组的取代基所取代:卤素、氘代、C1-C6烷氧基、卤代的C1-C6烷氧基、甲基砜基、-S(=O)₂NH₂、氧代(=O)、-CN、羟基、-NH₂、羧基、C2-C6酰胺基(-C(=O)-N(Rc)₂或-NH-C(=O)(Rc), Rc为H或C1-C5的烷基)、C1-C6烷基-(C2-C6酰胺基)、或取代或未取代的选自下组的基团:C1-C6烷基、C3-C8环烷基、C1-C6胺基、C6-C10芳基、具有1-3个选自N、S和O的杂原子的5-10元杂芳基、具有1-3个选自N、S和O的杂原子的5-12元杂环基、-(CH₂)_n-C6-C10芳基、-(CH₂)_n- (具有1-3个选自N、S和O的杂原子的5-10元杂芳基),且所述的取代基选自下组:卤素、C1-C6烷基、C1-C6烷氧基、氧代、-CN、-NH₂、-OH、C6-C10芳基、C1-C6胺基、C2-C6酰胺基、具有1-3个

选自N、S和O的杂原子的5-10元杂芳基。

[0085] 优选的化合物如实施列表1中所示。

[0086] 本发明的化合物可以通过以下方法制备：



[0088] 在惰性溶剂中,用式II化合物和式III化合物反应,得到式I化合物。

[0089] 在另一优选例中,所述的惰性溶剂为二氯甲烷。

[0090] 在另一优选例中,所述的反应在HATU和DIEA存在下进行。

[0091] 药物组合物和施用方法

[0092] 由于本发明化合物具有优异的对RIPK1的激活活性,因此本发明化合物及其各种晶型,药学上可接受的无机或有机盐,水合物或溶剂合物,以及含有本发明化合物为主要活性成分的药物组合物可用于治疗、预防以及缓解由乙肝病毒所导致的疾病。根据现有技术,本发明化合物可用于治疗以下疾病:炎症性疾病、感染性疾病、缺血性或退行性相关疾病、组织损伤。

[0093] 本发明的药物组合物包含安全有效量范围内的本发明化合物或其药理上可接受的盐及药理上可以接受的赋形剂或载体。其中“安全有效量”指的是:化合物的量足以明显改善病情,而不至于产生严重的副作用。通常,药物组合物含有0.1-1000mg本发明化合物/剂,更佳地,含有0.5-500mg本发明化合物/剂。较佳地,所述的“一剂”为一个胶囊或药片。

[0094] “药学上可以接受的载体”指的是:一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质,它们适合于人使用,而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能和本发明的化合物以及它们之间相互掺和,而不明显降低化合物的药效。药学上可以接受的载体部分例子有纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、纤维素乙酸酯等)、明胶、滑石、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等)、多元醇(如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如吐温)、润湿剂(如十二烷基硫酸钠)、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热原水等。

[0095] 本发明化合物或药物组合物的施用方式没有特别限制,代表性的施用方式包括(但并不限于):口服、直肠、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)、和局部给药。特别优选的施用方式是口服。

[0096] 用于口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,活性化合物与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合,如柠檬酸钠或磷酸二钙,或与下述成分混合:(a) 填料或增容剂,例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸;(b) 粘合剂,例如,羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶;(c) 保湿剂,例如,甘油;(d) 崩解剂,例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、和碳酸钠;(e) 缓溶剂,例如石蜡;(f) 吸收加速剂,例如,季胺化合物;(g) 润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(h) 吸附剂,例如,高岭土;和(i) 润滑剂,例如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,或其混合物。胶囊剂、片剂和丸剂中,剂型也可包含

缓冲剂。

[0097] 固体剂型如片剂、糖丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可采用包衣和壳材制备,如肠衣和其它本领域公知的材料。它们可包含不透明剂,并且,这种组合物中活性化合物或化合物的释放可以延迟的方式在消化道内的某一部分中释放。可采用的包埋组分的实例是聚合物物质和蜡类物质。必要时,活性化合物也可与上述赋形剂中的一种或多种形成微胶囊形式。

[0098] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆或酞剂。除了活性化合物外,液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂,如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,例知,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺以及油,特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油或这些物质的混合物等。

[0099] 除了这些惰性稀释剂外,组合物也可包含助剂,如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香料。

[0100] 除了活性化合物外,悬浮液可包含悬浮剂,例如,乙氧基化异十八烷醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、甲醇铝和琼脂或这些物质的混合物等。

[0101] 用于肠胃外注射的组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、悬浮液或乳液,和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

[0102] 用于局部给药的本发明化合物的剂型包括软膏剂、散剂、贴剂、喷射剂和吸入剂。活性成分在无菌条件下与生理上可接受的载体及任何防腐剂、缓冲剂,或必要时可能需要的推进剂一起混合。

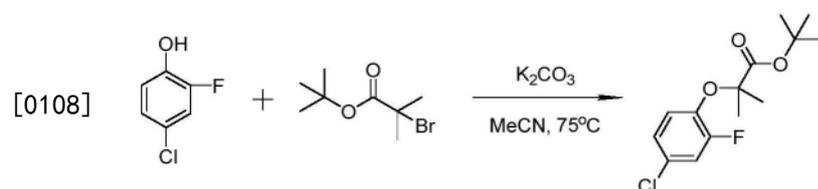
[0103] 本发明化合物可以单独给药,或者与其他药学上可接受的化合物联合给药。

[0104] 使用药物组合物时,是将安全有效量的本发明化合物适用于需要治疗的哺乳动物(如人),其中施用剂量为药学上认为的有效给药剂量,对于60kg体重的人而言,日给药剂量通常为0.2~1000mg,优选0.5~500mg。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0105] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0106] 合成实施例

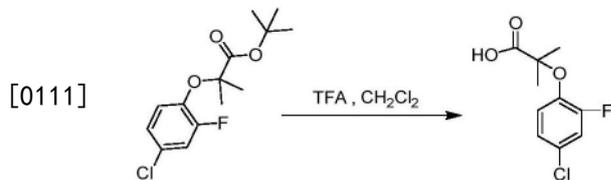
[0107] 方法1:化合物QY-7-34的合成:



[0109] tert-butyl 2-(4-chloro-2-fluorophenoxy)-2-methylpropanoate:将2-溴代异丁酸叔丁酯(1.06g,4.8mmol)溶解于10ml乙腈中,室温条件下,加入无水碳酸钾(942mg,6.8mmol),在30ml耐压瓶中混合搅拌均匀,4-氯-2-氟苯酚(500mg,3.4mmol)逐滴滴加至悬浊液中,搅拌均匀。缓慢升温至75°C,剧烈搅拌8小时。待反应完成后,旋干蒸发仪除去乙腈,加入10ml乙酸乙酯溶解,转移至分液漏斗中,10ml蒸馏水洗,乙酸乙酯萃取(20ml*3),合并

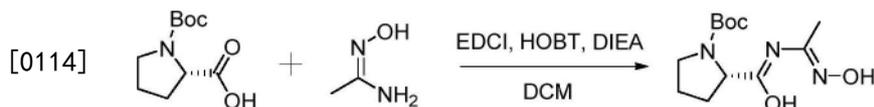
有机相,饱和氯化钠洗(10ml*2),得有机相经无水硫酸钠干燥,过滤并旋干除去溶剂,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-25%)得485mg无色透明油状液体,产率50%。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ7.47(m, 1H), 7.21(m, 1H), 6.97(t, J=8.9Hz, 1H), 1.50(s, 6H), 1.40(s, 9H)。

[0110] 中间体QY-4-56的合成:



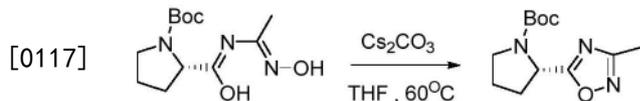
[0112] 2-(4-chloro-2-fluorophenoxy)-2-methylpropanoic acid:将QY-7-34(485mg, 1.68mmol)溶解于5ml二氯甲烷中,转移至15ml耐压瓶中,室温条件下,滴加三氟乙酸1ml至反应液中,混合搅拌均匀。LC-MS实时监测,5小时反应完成,转移至100ml圆底烧瓶,加入30ml二氯甲烷,旋干蒸发仪除去溶剂;C18反相色谱柱分离纯化(水:乙腈=0-80%)得370mg白色固体,产率95%。MS(ESI)m/z 231(M-H)。

[0113] 化合物QY-7-35的合成:



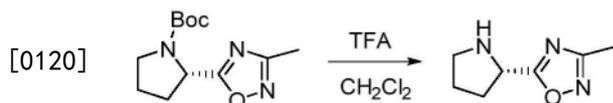
[0115] 3-(S,Z)-1-(tert-butoxycarbonyl)-N-((E)-1-(hydroxyimino)ethyl)pyrrolidine-2-carbimi dic acid:30ml耐压瓶中,依次加入20ml二氯甲烷,1-羟基苯并三唑(503mg,3.72mmol),搅拌溶解,加入Boc-L-脯氨酸(800mg,3.7mmol),N-羟基乙脒(330mg,4.4mmol),室温条件下搅拌20min,加入EDCI(1.06g,5.6mmol),逐滴滴加N,N-二异丙基乙胺(961mg,7.4mmol)至反应液中,室温条件下剧烈搅拌3小时。LC-MS实时监测,待反应物消耗完毕,加入20ml蒸馏水,搅拌后转移至分液漏斗中,二氯甲烷萃取(20ml*3),合并有机相,饱和碳酸氢钠洗(10ml*1),饱和氯化钠洗(10ml*2),得有机相经无水硫酸钠干燥,过滤并旋干除去有机溶剂,硅胶柱层析分离纯化(二氯甲烷:2M氨甲醇=0-10%)得556mg白色固体,产率55%。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ4.28(m, 1H), 3.41-3.26(m, 2H), 2.27-2.13(m, 1H), 1.84(m, 3H), 1.76(s, 3H), 1.40(s, 3.5H), 1.31(s, 3.5H)。MS(ESI)m/z 272(M+H)。

[0116] 化合物QY-7-40的合成:



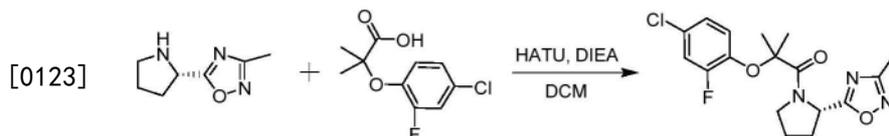
[0118] 将化合物QY-7-35(244mg,0.90mmol)溶解于4ml四氢呋喃中,在15ml耐压瓶中混合搅拌均匀,室温条件下加入碳酸铯(586mg,1.80mmol),氮气置换保护,缓慢升温至60°C,剧烈搅拌2小时。TLC监测至原料反应完,旋干蒸发仪除去四氢呋喃,加入10ml乙酸乙酯溶解,硅藻土抽滤除去碳酸铯,乙酸乙酯(20ml*3),甲醇(5ml*2)冲洗硅藻土,得有机相经旋转蒸发仪除去,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-70%)得190mg无色透明油状液体,产率83%。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ5.04-4.94(m, 1H), 3.54-3.35(m, 2H), 2.40-2.33(m, 1H), 2.33(s, 3H), 1.94(m, 3H), 1.38(s, 3.5H), 1.20(s, 5.5H)。MS(ESI)m/z 198(M+H)。

[0119] 化合物QY-1-95的合成:



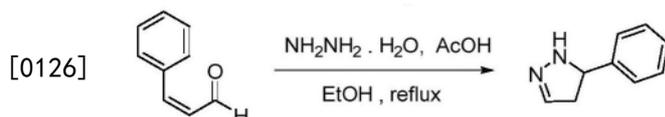
[0121] 将QY-7-40 (100mg, 0.39mmol) 溶解于3ml二氯甲烷中,转移至8ml耐压瓶中,室温条件下,滴加三氟乙酸0.3ml至反应液中,混合搅拌均匀。LC-MS实时监测,2.5小时反应完全,转移至100ml圆底烧瓶中,加入20ml二氯甲烷,旋干蒸发仪除去溶剂;C18反相色谱柱分离纯化(水:乙腈=0-80%)得54mg淡黄色油状液体,产率90%。MS (ESI) m/z 154 (M+H) +.

[0122] 化合物QY-3-27的合成:



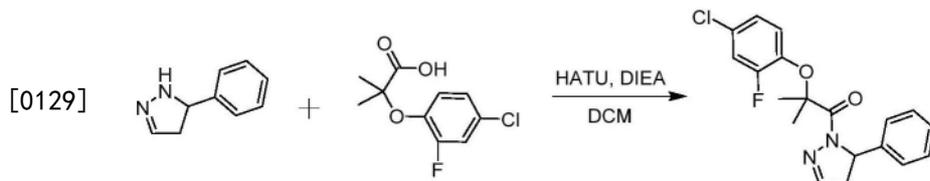
[0124] (S)-2-(4-chloro-2-fluorophenoxy)-2-methyl-1-(2-(3-methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)pyrrolidin-1-yl)propan-1-one: QY-1-95 (54mg, 0.35mmol) 在8ml耐压瓶内溶解于1ml二氯甲烷中,加入HATU (160mg, 0.42mmol), 将QY-4-56 (90mg, 0.39mmol) 溶解于1ml二氯甲烷中,滴加入搅拌均匀的反应液中;冰浴条件下滴加N,N-二异丙基乙胺 (137mg, 1.1mmol), 搅拌10min, 逐渐恢复至室温后搅拌反应4小时。LC-MS实时监测,待反应完成后,加入5ml二氯甲烷稀释反应液,转移至分液漏斗中,5ml蒸馏水洗,二氯甲烷萃取(5ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗(5ml*2),后处理得有机相经无水硫酸钠干燥,过滤并旋干除去二氯甲烷,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-30%)得90mg淡黄色透明油状液体,产率70%。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.51 (m, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 5.26 (dd, J=8.5, 4.6Hz, 1H), 3.86-3.74 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.27-2.18 (m, 1H), 1.96 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.46 (s, 3H). MS (ESI) m/z 368 (M+H) +.

[0125] 方法2: 化合物ZSQ-13-49的合成:



[0127] 4-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole: 将182mg水合肼及4ml无水乙醇加入15ml耐压瓶中混合搅拌均匀,冰浴条件下缓慢滴加乙酸 (216mg, 3.6mmol) 至乙醇溶液中,搅拌十分钟;将肉桂醛 (400mg, 3.0mmol) 溶解于2ml无水乙醇中冰浴条件下缓慢滴至反应液中,加热回流搅拌3.5小时。LC-MS实时监测至反应物消耗完全,旋转蒸发仪除去乙醇,加5ml乙酸乙酯稀释反应液,饱和碳酸氢钠调节PH至中性,转移至分液漏斗,蒸馏水洗(4ml*2),乙酸乙酯萃取(5ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗(5ml*2),后处理得有机相经无水硫酸钠干燥,过滤并旋干除去乙酸乙酯,C18反相色谱柱分离纯化(水:乙腈=0-80%)得294mg黄色油状液体,产率67%。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.39-7.34 (m, 5H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 4.74 (t, J=10.0Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 2.75 (m, 1H). MS (ESI) m/z 147 (M+H) +.

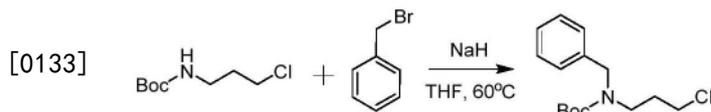
[0128] 化合物ZSQ-13-56的合成:



[0130] 2-(4-chloro-2-fluorophenoxy)-2-methyl-1-(5-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)propan-1-one: ZSQ-13-49 (30mg, 0.2mmol) 溶解于1ml二氯甲烷后加入8ml耐压瓶中,加入HATU(114mg, 0.3mmol), 将QY-4-56(46mg, 0.2mmol) 溶解于1ml二氯甲烷中,滴加入搅拌均匀的反应液中;冰浴条件下滴加N,N-二异丙基乙胺(77mg, 0.6mmol), 逐渐恢复至室温后搅拌反应3.5小时。LC-MS实时监测,待反应物消耗完毕,加入5ml二氯甲烷稀释反应液,转移至分液漏斗,4ml蒸馏水洗,二氯甲烷萃取(5ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗涤(5ml*2),无水硫酸钠干燥有机相,过滤并旋干除去二氯甲烷,C18反相色谱柱分离纯化(水:乙腈=30%-90%)得27mg淡黄色透明油状液体,产率37%。¹HNMR(400MHz, DMSO) δ 7.41(m, 1H), 7.34-7.24(m, 4H), 7.07(dd, J=5.2, 3.1Hz, 2H), 6.95(m, 1H), 6.71(t, J=9.0Hz, 1H), 5.36(m, 1H), 3.43-3.35(m, 1H), 2.62(m, 1H), 1.64(s, 3H), 1.62(s, 3H)。MS(ESI)m/z 361(M+H)+。

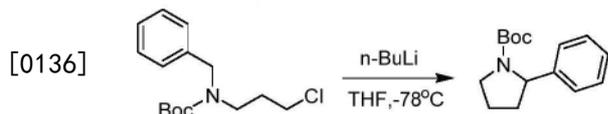
[0131] 方法3:

[0132] 化合物QY-7-36的合成:



[0134] tert-butyl benzyl (3-chloropropyl) carbamate: 将N-Boc-3-氯丙基胺(1.0g, 5.2mmol)混匀至10ml四氢呋喃中,加至30ml耐压瓶搅拌;氢化钠(190mg, 4.8mmol)溶解于5ml四氢呋喃中,0°C条件下逐滴加入悬浊液中,冰浴条件下搅拌15min后将溴化苄(680mg, 4.0mmol)缓慢滴加至反应液中,逐渐升温至60°C后搅拌8h,停止反应。冰浴条件下滴加蒸馏水淬灭反应,待反应液搅拌至淡黄色澄清透明后停止搅拌,转至旋转蒸发器除去四氢呋喃,加入10ml乙酸乙酯稀释反应体系,转移至分液漏斗,10ml蒸馏水洗后加乙酸乙酯萃取(15ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗涤(10ml*2),无水硫酸钠干燥,过滤并旋蒸除去乙酸乙酯,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-25%)得325mg无色透液体,产率29%。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 7.38-7.21(m, 5H), 4.38(s, 2H), 3.59(t, J=6.4Hz, 2H), 3.24(s, 2H), 1.89(m, 2H), 1.43(s, 9H)。MS(ESI)m/z 228(M+H)+。

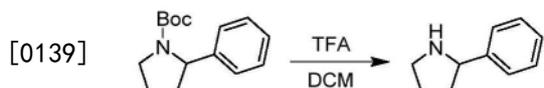
[0135] 化合物QY-7-41的合成:



[0137] tert-butyl 2-phenylpyrrolidine-1-carboxylate: 将8ml超干四氢呋喃加入盛有QY-7-36(293mg, 1.0mmol)的30ml耐压瓶中,搅拌混合均匀,将反应体系转移至丙酮干冰浴中冷却至-78°C,缓慢逐滴加入正丁基锂(2.5M溶液0.66ml, 1.7mmol),反应液由无色透明逐变为橙黄色溶液,搅拌0.5h后移至室温继续搅拌2.5h;LC-MS实时监测至反应物消耗完全,滴加冰水淬灭反应,待反应液由澄清至悬浊再变为淡黄色澄清透明后,旋蒸除去四氢呋喃

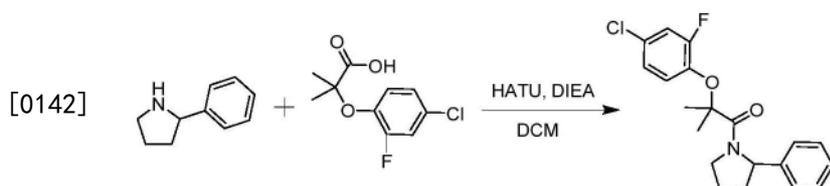
喃,加入10ml乙酸乙酯稀释反应液,转移至分液漏斗,15ml蒸馏水洗后加乙酸乙酯萃取(15ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗涤(10ml*2),无水硫酸钠干燥,过滤萃取液并旋蒸除去乙酸乙酯,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-20%)得138mg淡黄色油状液体,产率56%。MS (ESI) m/z 192 (M+H)⁺。

[0138] 化合物QY-7-43的合成:



[0140] 2-phenylpyrrolidine:将QY-7-41 (60mg, 0.24mmol) 溶解于1ml二氯甲烷中,转移至8ml耐压瓶中,室温条件下,滴加三氟乙酸0.1ml至反应液中,混合搅拌均匀。LC-MS实时监测,2小时原料消耗完全,转移至100ml圆底烧瓶中,加入20ml二氯甲烷,旋干蒸发仪除去溶剂,得到粗产品直接进行下一步反应。MS (ESI) m/z 148 (M+H)⁺。

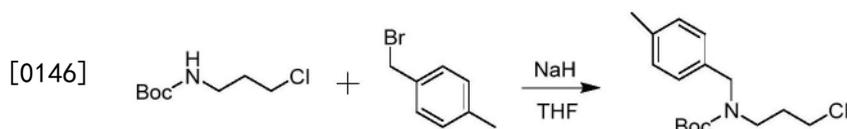
[0141] 化合物QY-3-99的合成:



[0143] 2-(4-chloro-2-fluorophenoxy)-2-methyl-1-(2-phenylpyrrolidin-1-yl)propan-1-one:

[0144] 在8ml耐压瓶中将QY-7-43 (50mg, 0.34mmol) 溶解于1ml二氯甲烷,加入HATU (155mg, 0.41mmol),将QY-4-56 (79mg, 0.34mmol) 溶解于2ml二氯甲烷中,滴加入搅拌均匀的反应液中;室温条件下滴加N,N-二异丙基乙胺 (110mg, 0.85mmol),继续搅拌反应4小时。LC-MS实时监测反应,待反应物消耗完全,加入5ml二氯甲烷稀释反应液,转移至分液漏斗,10ml蒸馏水洗,二氯甲烷萃取(10ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗涤(5ml*2),无水硫酸钠干燥有机相,过滤并旋蒸除去二氯甲烷,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-25%)得55mg淡黄色油状液体,产率45%。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.53 (m, 1H), 7.29 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.22-7.09 (m, 4H), 6.79 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.07 (dd, J=8.1, 4.3Hz, 1H), 3.88-3.74 (m, 2H), 2.18-2.08 (m, 1H), 1.97-1.61 (m, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.48 (s, 3H)。MS (ESI) m/z 362 (M+H)⁺

[0145] 方法4:

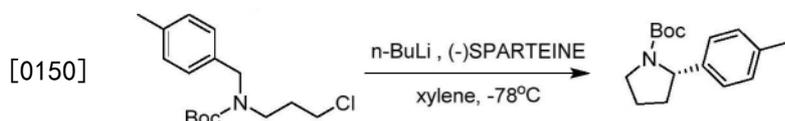


[0147] 化合物QY-5-12的合成:

[0148] tert-butyl (3-chloropropyl) (4-methylbenzyl) carbamate:在30ml耐压瓶中将N-Boc-3-氯丙基胺 (628mg, 3.2mmol) 搅拌混匀于6ml四氢呋喃中;氢化钠 (173mg, 4.3mmol) 溶解于4ml四氢呋喃中,0°C条件下逐滴加入以上悬浊液中,冰浴条件下搅拌15min,对甲基溴化苄 (400mg, 2.1mmol) 缓慢滴加至反应液中,逐渐升温至60°C,薄层色谱监测反应,继续搅拌8h后停止反应。冰浴条件下滴加冰水淬灭反应,待反应液搅拌至淡黄色澄清透明后停止搅拌,转至旋转蒸发仪除去四氢呋喃,加入10ml乙酸乙酯稀释反应体系,转移至分液漏

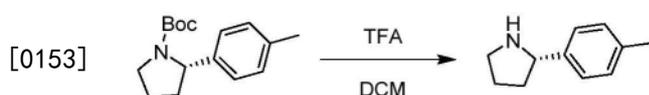
斗,10ml蒸馏水洗后加乙酸乙酯萃取(15ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗涤(10ml*2),无水硫酸钠干燥,过滤并旋蒸除去乙酸乙酯,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-25%)得304mg淡黄色透明液体,产率47%。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ7.06 (q, J=8.1Hz, 4H), 4.26 (s, 2H), 3.51 (t, J=6.4Hz, 2H), 3.14 (s, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.85-1.76 (m, 2H), 1.34 (s, 9H). MS (ESI) m/z 242 (M+H)⁺.

[0149] 化合物QY-5-16的合成:



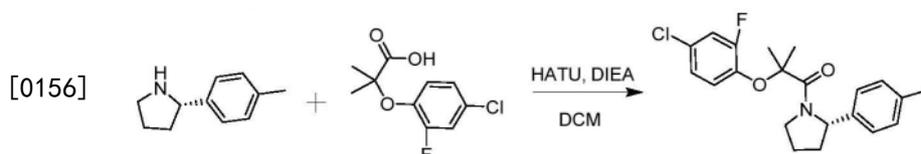
[0151] tert-butyl (S)-2-(p-tolyl)pyrrolidine-1-carboxylate:将6ml超干二甲苯加入盛有(-)鹰爪豆碱(280mg, 1.2mmol)的30ml耐压瓶中,将反应体系转移至丙酮干冰浴中冷却至-78°C,缓慢加入正丁基锂(0.6ml 2.5M溶液, 1.5mmol),保持相同温度下搅拌10min,后逐滴滴加含有QY-5-12(300mg, 1.0mmol)4ml超干二甲苯溶液,反应液由无色透明变为淡黄色悬浊液,-78°C搅拌0.5h后移至室温继续搅拌3h;LC-MS实时监测至反应物消耗完全,滴加冰水淬灭反应,待反应液由澄清至悬浊再变为淡黄色澄清透明后,加入10ml乙酸乙酯稀释反应液,加入10ml蒸馏水洗后加乙酸乙酯萃取(15ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗涤(10ml*2),无水硫酸钠干燥,过滤萃取液并旋蒸除去乙酸乙酯和二甲苯,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-25%)得116mg无色透明油状液体,产率44%。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ7.11 (d, J=7.7Hz, 2H), 7.03 (d, J=7.0Hz, 2H), 4.83-4.63 (m, 1H), 3.56-3.39 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.23 (m, 1H), 1.84-1.59 (m, 3H), 1.38 (s, 4H), 1.10 (s, 5H). MS (ESI) m/z 206 (M+H)⁺.

[0152] 化合物QY-5-20的合成:



[0154] (S)-2-(p-tolyl)pyrrolidine:将QY-5-16(116mg, 0.44mmol)溶解于2ml二氯甲烷中,转移至8ml耐压瓶中,室温条件下,滴加三氟乙酸0.2ml至反应液中,混合搅拌均匀.LC-MS实时监测,1.5小时原料消耗完全,转移至100ml圆底烧瓶中,加入30ml二氯甲烷,旋干蒸发仪除去溶剂,重复以上操作除去三氟乙酸,得到粗产品直接进行下一步反应.MS (ESI) m/z 162 (M+H)⁺.

[0155] 化合物QY-5-22的合成:



[0157] (S)-2-(4-chloro-2-fluorophenoxy)-2-methyl-1-(2-(p-tolyl)pyrrolidin-1-yl)propan-1-one:在8ml耐压瓶中将QY-5-20(0.22mmol)溶解于2ml二氯甲烷,加入HATU(127mg, 0.33mmol),将QY-4-56(78mg, 0.33mmol)溶解于2ml二氯甲烷中,滴加入搅拌均匀的反应液中;冰浴条件下缓慢滴加N,N-二异丙基乙胺(86mg, 0.67mmol),继续搅拌反应4小时.LC-MS实时监测反应,待反应物消耗完全,加入5ml二氯甲烷稀释反应液,转移至分液漏斗,

10ml蒸馏水洗,二氯甲烷萃取(15ml*3),合并有机相,饱和氯化钠洗涤(10ml*2),无水硫酸钠干燥有机相,过滤并旋蒸除去二氯甲烷,硅胶柱层析分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=0-25%)得46mg淡黄色油状液体,产率56%。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ7.52 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.09 (d, J=7.9Hz, 2H), 6.98 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.78 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.03 (dd, J=8.0, 4.4Hz, 1H), 3.86-3.69 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.09 (m, 1H), 1.92-1.59 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H). MS (ESI) m/z 376 (M+H)⁺.

[0158] 通过替换不同的合成底物,得到如下表中所示的化合物:

化合物编号	化学结构	化合物编号	化学结构
[0159] QY-1-98		QY-4-6	
QY-2-25		QY-4-7	

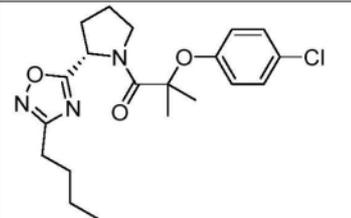
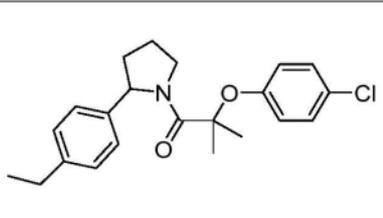
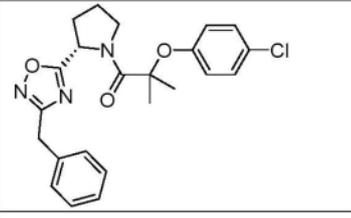
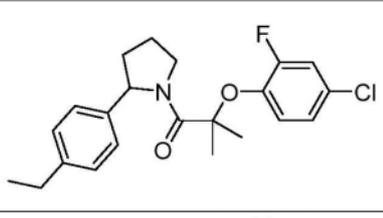
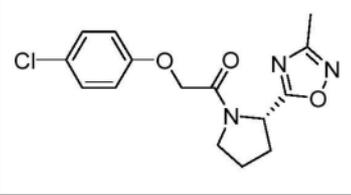
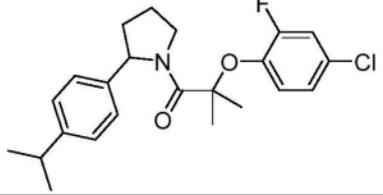
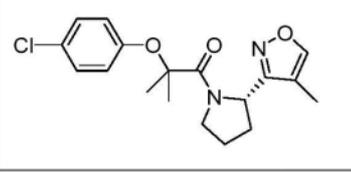
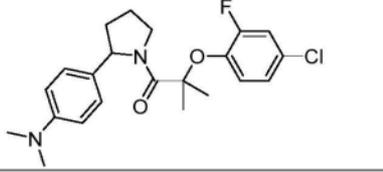
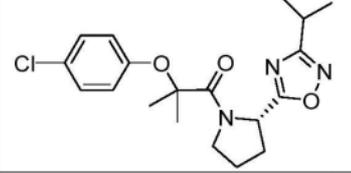
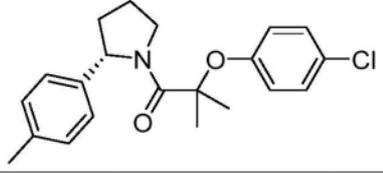
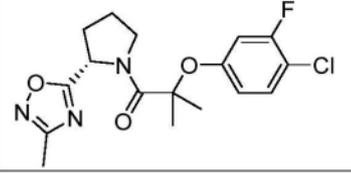
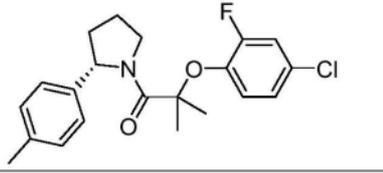
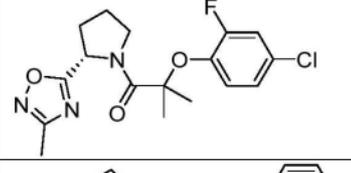
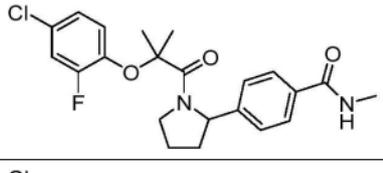
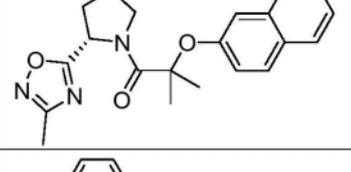
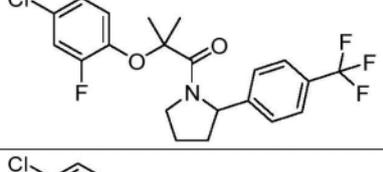
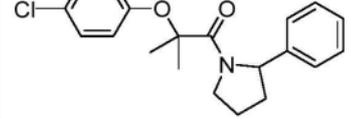
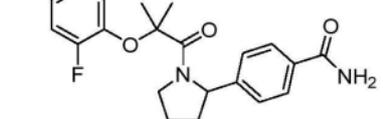
[0160]

QY-2-26		QY-4-8	
QY-2-27		QY-4-11	
QY-2-34		QY-4-12	
QY-2-38		QY-4-14	
QY-2-39		QY-4-27	
QY-2-52		QY-4-32	
QY-2-53		QY-4-35	
QY-2-54		QY-4-39	

[0161]

QY-2-55		QY-4-66	
QY-2-56		QY-4-67	
QY-2-75		QY-4-69	
QY-2-76		QY-4-70	
QY-2-77		QY-4-75	
QY-2-78		QY-4-78	
QY-2-79		QY-4-87	
QY-2-100		QY-4-88	

[0162]

QY-2-103		QY-4-96	
QY-2-104		QY-4-99	
QY-3-4		QY-5-1	
QY-3-11		QY-5-4	
QY-3-17		QY-5-21	
QY-3-26		QY-5-22	
QY-3-27		QY-5-79	
QY-3-28		QY-5-83	
QY-3-29		QY-5-85	

QY-3-35		QY-6-47	
QY-3-36		QY-6-60	
QY-3-39		QY-6-61	
QY-3-46		QY-6-62	
[0163] QY-3-51		QY-6-63	
QY-3-65		QY-6-83	
QY-3-81		QY-6-84	
QY-3-86		QY-7-7	

[0164]			

[0165] 化合物测试数据:

[0166] QY-1-98

[0167] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.36-7.21 (m, 2H), 6.99-6.84 (m, 2H), 5.29-5.21 (m, 1H), 3.81-3.66 (m, 2H), 2.34 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 3H), 2.25-2.16 (m, 1H), 1.92 (m, 2H), 1.83-1.75 (m, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.46 (s, 3H); ESI-MS m/z 350.1 (M+H) $^+$.

[0168] QY-2-25

[0169] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.32-7.24 (m, 2H), 7.00 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 6.87 (m, 2H), 5.25 (dd, $J=8.4, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.82-3.72 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.23-2.16 (m, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.82-1.74 (m, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.45 (s, 3H); ESI-MS m/z 316.1 (M+H) $^+$.

[0170] QY-2-26

[0171] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.10 (m, 2H), 6.95-6.87 (m, 2H), 5.25 (d, $J=3.9\text{Hz}$, 1H), 3.79 (m, 2H), 2.33 (d, $J=4.9\text{Hz}$, 3H), 2.26-2.18 (m, 1H), 1.99-1.90 (m, 2H), 1.82-1.75 (m, 1H), 1.48 (s, 3H), 1.42 (s, 3H); ESI-MS m/z 334.1 (M+H) $^+$.

[0172] QY-2-27

[0173] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 6.89 (m, 4H), 5.25 (dd, $J=8.4, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.83 (m, 2H), 2.95 (m, 6H), 2.35 (s, 3H), 2.28-2.20 (m, 1H), 2.00-1.89 (m, 2H), 1.80 (m, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.41 (s, 3H); ESI-MS m/z 359.2 (M+H) $^+$.

[0174] QY-2-34

[0175] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.55 (s, 2H), 7.33-7.26 (m, 2H), 6.86-6.78 (m, 2H), 5.26 (dd, $J=7.9, 3.4\text{Hz}$, 1H), 3.60-3.51 (m, 2H), 2.11 (dd, $J=7.1, 3.7\text{Hz}$, 1H), 2.04-1.87 (m, 2H), 1.83 (m, 1H), 1.50 (s, 6H); ESI-MS m/z 367.1 (M+H) $^+$.

[0176] QY-2-38

[0177] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.33-7.26 (m, 2H), 6.86-6.80 (m, 2H), 5.27 (dd, $J=8.0, 2.5\text{Hz}$, 1H), 3.67 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.07-2.00 (m, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.80 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.49 (s, 3H); ESI-MS m/z 379.0 (M+H) $^+$.

[0178] QY-2-39

[0179] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.71 (d, $J=3.2\text{Hz}$, 1H), 7.60 (d, $J=3.2\text{Hz}$, 1H), 7.34-7.27 (m, 2H), 6.90-6.81 (m, 2H), 5.43 (dd, $J=8.1, 2.7\text{Hz}$, 1H), 3.70 (dd, $J=9.5, 4.6\text{Hz}$, 2H), 2.17-2.07 (m, 1H), 1.98 (m, 2H), 1.87-1.81 (m, 1H), 1.53 (s, 3H), 1.50 (s, 3H); ESI-MS m/z 351.1 (M+H) $^+$.

[0180] QY-2-52

[0181] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.35-7.25 (m, 2H), 7.11 (m, 1H), 6.90-6.78 (m, 2H), 5.35 (m, 1H), 3.69 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 2H), 2.30 (m, 3H), 2.14-2.04 (m, 1H), 1.97-1.87 (m, 2H), 1.80 (dd, $J=13.0, 6.6\text{Hz}$, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.50 (s, 3H); ESI-MS m/z 365.1 (M+H) $^+$.

[0182] QY-2-53

[0183] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.33-7.26 (m, 2H), 6.79 (m, 2H), 5.99 (s, 1H), 5.22 (dd, $J=8.2, 3.1\text{Hz}$, 1H), 3.65 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.00 (m, 2H), 1.88-1.80 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 1.49 (s, 3H); ESI-MS m/z 349.1 (M+H) $^+$.

[0184] QY-2-54

[0185] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 6.84 (m, 4H), 5.25 (dd, $J=8.4, 4.4\text{Hz}$, 1H), 3.84 (td, $J=6.8, 2.5\text{Hz}$, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.28-2.20 (m, 1H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 1H), 1.44 (s, 3H), 1.39 (s, 3H); ESI-MS m/z 346.2 (M+H) $^+$.

[0186] QY-2-55

[0187] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.81-7.72 (m, 2H), 7.03-6.94 (m, 2H), 5.24 (dd, $J=8.4, 4.7\text{Hz}$, 1H), 3.72-3.56 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.21-2.14 (m, 1H), 1.88 (m, 2H), 1.79-1.72 (m, 1H), 1.57 (s, 3H), 1.52 (s, 3H); ESI-MS m/z 341.1 (M+H) $^+$.

[0188] QY-2-56

[0189] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.65-7.56 (m, 4H), 7.44 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 7.33 (m, 1H), 6.99-6.93 (m, 2H), 5.27 (dd, $J=8.4, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.84-3.73 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.25-2.16 (m, 1H), 1.92 (m, 2H), 1.84-1.76 (m, 1H), 1.54 (s, 3H), 1.50 (s, 3H); ESI-MS m/z 392.1 (M+H) $^+$.

[0190] QY-2-75

[0191] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.58 (d, J=8.9Hz, 2H), 6.69 (d, J=8.9Hz, 2H), 5.24 (dd, J=8.4, 4.5Hz, 1H), 3.71 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.20 (m, 1H), 1.91 (m, 2H), 1.82-1.74 (m, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.46 (s, 3H); ESI-MS m/z 442.0 (M+H)⁺.

[0192] QY-2-76

[0193] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.32-7.24 (m, 2H), 6.96 (d, J=9.1Hz, 2H), 5.25 (dd, J=8.5, 4.5Hz, 1H), 3.81-3.68 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.24-2.17 (m, 1H), 1.97-1.88 (m, 2H), 1.82-1.76 (m, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.47 (s, 3H); ESI-MS m/z 400.1 (M+H)⁺.

[0194] QY-2-77

[0195] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.06 (d, J=8.2Hz, 2H), 6.80-6.73 (m, 2H), 5.26-5.22 (m, 1H), 3.77 (d, J=4.9Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.21-2.16 (m, 1H), 1.98-1.87 (m, 2H), 1.79 (m, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.42 (s, 3H); ESI-MS m/z 330.2 (M+H)⁺.

[0196] QY-2-78

[0197] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.37 (m, 2H), 7.11 (d, J=7.4Hz, 1H), 6.98-6.95 (m, 2H), 6.95-6.90 (m, 4H), 5.25 (d, J=4.0Hz, 1H), 3.83 (d, J=6.7Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.26-2.20 (m, 1H), 2.00-1.91 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.44 (s, 3H); ESI-MS m/z 408.2 (M+H)⁺.

[0198] QY-2-79

[0199] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.31 (t, J=8.2Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 6.91 (t, J=2.2Hz, 1H), 6.84 (m, 1H), 5.24 (dd, J=8.4, 4.9Hz, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.26-2.18 (m, 1H), 1.97-1.88 (m, 2H), 1.78 (m, 1H), 1.53 (s, 3H), 1.45 (s, 3H); ESI-MS m/z 350.1 (M+H)⁺.

[0200] QY-2-100

[0201] ^1H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.25-7.19 (m, 2H), 6.86-6.80 (m, 2H), 5.28 (dd, J=8.8, 4.5Hz, 1H), 3.85-3.75 (m, 2H), 2.24-2.14 (m, 1H), 2.11-2.01 (m, 2H), 1.94-1.88 (m, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.09-0.99 (m, 4H); ESI-MS m/z 376.1 (M+H)⁺.

[0202] QY-2-103

[0203] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.36-7.26 (m, 2H), 6.94-6.85 (m, 2H), 5.24 (m, 1H), 3.72 (m, 2H), 2.73-2.67 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 1.96-1.86 (m, 2H), 1.81-1.73 (m, 1H), 1.67-1.59 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.34 (m, 2H), 0.90 (t, J=7.4Hz, 3H); ESI-MS m/z 392.1 (M+H)⁺.

[0204] QY-2-104

[0205] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.37-7.22 (m, 5H), 7.18-7.13 (m, 2H), 6.86-6.78 (m, 2H), 5.23 (dd, J=8.3, 5.2Hz, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.75 (s, 1H), 3.63 (s, 1H), 2.20 (m, 1H), 1.89 (d, J=5.6Hz, 2H), 1.79-1.71 (m, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.41 (s, 3H); ESI-MS m/z 426.1 (M+H)⁺.

[0206] QY-3-4

[0207] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.32-7.29 (m, 2H), 6.95-6.89 (m, 2H), 5.18 (dd, J=8.4, 3.8Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 3.79-3.61 (m, 2H), 2.32 (d, J=7.0Hz, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.08-2.01 (m, 2H), 1.95 (m, 1H); ESI-MS m/z 321.9 (M+H)⁺.

[0208] QY-3-11

[0209] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.33-7.27 (m, 2H), 6.86-6.79 (m, 2H), 5.97 (d, J=0.7Hz, 1H), 5.14 (dd, J=8.1, 3.2Hz, 1H), 3.66 (s, 2H), 2.37 (d, J=0.6Hz, 3H), 2.02 (m, 1H), 1.89-1.72 (m, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.49 (s, 3H); ESI-MS m/z 349.1 (M+H)⁺.

[0210] QY-3-17

[0211] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.35-7.25 (m, 2H), 6.94-6.86 (m, 2H), 5.25 (dd, J=8.4, 4.8Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.11-3.01 (m, 1H), 2.25-2.16 (m, 1H), 1.96-1.87 (m, 2H), 1.77 (m, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.27 (d, J=1.3Hz, 3H), 1.25 (d, J=1.3Hz, 3H); ESI-MS m/z 378.1 (M+H)⁺.

[0212] QY-3-26

[0213] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.47 (t, J=8.9Hz, 1H), 6.92 (m, 1H), 6.75 (m, 1H), 5.24 (dd, J=8.4, 4.9Hz, 1H), 3.84-3.61 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.23 (dd, J=12.6, 8.3Hz, 1H), 1.98-1.89 (m, 2H), 1.77 (m, 1H), 1.55 (s, 3H), 1.46 (s, 3H); ESI-MS m/z 368.2 (M+H)⁺.

[0214] QY-3-27

[0215] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.51 (m, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 5.26 (dd, J=8.5, 4.6Hz, 1H), 3.86-3.74 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.27-2.18 (m, 1H), 1.96 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.46 (s, 3H); ESI-MS m/z 368.2 (M+H)⁺.

[0216] QY-3-28

[0217] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.86 (d, J=8.1Hz, 2H), 7.77 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.51-7.45 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.20-7.13 (m, 2H), 5.28 (dd, J=8.3, 5.2Hz, 1H), 3.91-3.63 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.24-2.16 (m, 1H), 1.94-1.86 (m, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.52 (s, 3H); ESI-MS m/z 366.1 (M+H)⁺.

[0218] QY-3-29

[0219] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.29 (m, 5H), 7.11-7.05 (m, 2H), 6.84-6.74 (m, 2H), 5.06 (dd, J=8.1, 4.2Hz, 1H), 3.84-3.67 (m, 2H), 2.09 (m, 1H), 1.87-1.57 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 344.1 (M+H)⁺.

[0220] QY-3-35

[0221] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.42-7.31 (m, 2H), 7.01-6.86 (m, 2H), 5.13 (dd, J=8.0, 5.5Hz, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.09 (m, 1H), 2.02-1.95 (m, 2H), 1.78 (d, J=6.6Hz, 1H), 1.38-1.30 (m, 2H), 1.23 (m, 2H); ESI-MS m/z 348.2 (M+H)⁺.

[0222] QY-3-36

[0223] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.39 (m, 4H), 5.15 (dd, J=7.9, 4.6Hz, 1H), 4.16 (s, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.31-2.23 (m, 1H), 2.09 (s, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.39 (s, 3H); ESI-MS m/z 366.1 (M+H)⁺.

[0224] QY-3-39

[0225] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.34-7.24 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 7.01 (m, 1H), 6.90-6.76 (m, 4H), 5.02 (dd, J=8.1, 4.3Hz, 1H), 3.82 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.07 (s, 1H), 1.71 (m, 2H), 1.67-1.55 (m, 1H), 1.56-1.53 (s, 3H), 1.50 (s, 3H); ESI-MS m/z 358.1 (M+H)⁺.

[0226] QY-3-46

[0227] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.33-7.24 (m, 2H), 6.87-6.76 (m, 2H), 5.19 (m, 1H),

3.66(d, J=3.7Hz, 2H), 2.31(s, 3H), 2.27-1.87(m, 7H), 1.63(d, J=5.7Hz, 5H); ESI-MS m/z 376.1(M+H)⁺.

[0228] QY-3-51

[0229] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.40-7.31(m, 2H), 6.89-6.83(m, 2H), 5.34(dd, J=8.5, 4.7Hz, 1H), 4.62(s, 2H), 3.80-3.70(m, 2H), 3.19(s, 4H), 2.29-2.20(m, 1H), 1.94(m, 3H), 1.51(s, 3H), 1.48(s, 3H), 1.25(t, J=5.9Hz, 6H); ESI-MS m/z 421.2(M+H)⁺.

[0230] QY-3-65

[0231] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.37-7.28(m, 2H), 6.93-6.86(m, 2H), 5.35(dd, J=8.7, 4.2Hz, 1H), 3.80-3.70(m, 2H), 3.04(s, 3H), 2.98(s, 3H), 2.28-2.20(m, 1H), 2.00-1.88(m, 3H), 1.51(s, 3H), 1.45(s, 3H); ESI-MS m/z 407.1(M+H)⁺.

[0232] QY-3-81

[0233] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.65(d, J=2.6Hz, 1H), 7.30(dd, J=8.9, 2.6Hz, 1H), 6.97(d, J=8.9Hz, 1H), 5.26(m, 1H), 3.74(m, 2H), 2.34(s, 3H), 2.23(m, 1H), 1.93(m, 2H), 1.83-1.76(m, 1H), 1.55(s, 3H), 1.48(s, 3H); ESI-MS m/z 384.0(M+H)⁺.

[0234] QY-3-86

[0235] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.22-7.14(m, 2H), 6.83-6.75(m, 2H), 5.15(dd, J=8.4, 4.3Hz, 1H), 3.64-3.54(m, 2H), 2.85(s, 3H), 2.31(s, 3H), 2.15-2.06(m, 1H), 1.96-1.73(m, 3H), 1.33(s, 6H); ESI-MS m/z 363.2(M+H)⁺.

[0236] QY-3-94

[0237] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.32-7.24(m, 1H), 7.09(dd, J=8.8, 2.7Hz, 1H), 6.72(d, J=8.8Hz, 1H), 5.25(dd, J=8.5, 4.6Hz, 1H), 3.76-3.65(m, 2H), 2.34(s, 3H), 2.18(s, 3H), 2.05-1.94(m, 1H), 1.94-1.84(m, 2H), 1.82-1.73(m, 1H), 1.51(s, 3H), 1.45(s, 3H); ESI-MS m/z 364.1(M+H)⁺.

[0238] QY-3-95

[0239] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.09(d, J=2.1Hz, 1H), 6.87-6.81(m, 2H), 5.25(dd, J=8.5, 4.4Hz, 1H), 3.82-3.74(m, 5H), 2.33(s, 3H), 2.26-2.17(m, 1H), 1.97-1.78(m, 3H), 1.44(s, 3H), 1.42(s, 3H); ESI-MS m/z 380.1(M+H)⁺.

[0240] QY-3-96

[0241] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.88(d, J=2.6Hz, 1H), 7.34(dd, J=8.8, 2.6Hz, 1H), 6.83(d, J=8.8Hz, 1H), 5.25(dd, J=8.5, 4.7Hz, 1H), 3.79-3.63(m, 2H), 2.50(s, 3H), 2.34(s, 3H), 2.26-2.17(m, 1H), 1.93(m, 2H), 1.78(m, 1H), 1.56(s, 3H), 1.48(s, 3H); ESI-MS m/z 364.1(M+H)⁺.

[0242] QY-3-99

[0243] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.53(m, 1H), 7.29(t, J=7.4Hz, 2H), 7.22-7.09(m, 4H), 6.79(t, J=9.0Hz, 1H), 5.07(dd, J=8.1, 4.3Hz, 1H), 3.88-3.74(m, 2H), 2.18-2.08(m, 1H), 1.97-1.61(m, 3H), 1.58(s, 3H), 1.48(s, 3H); ESI-MS m/z 362.0(M+H)⁺.

[0244] QY-4-1

[0245] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.93(s, 1H), 7.11(s, 1H), 5.25(dd, J=8.3, 5.5Hz, 1H), 3.90(m, 1H), 3.58(m, 1H), 2.33(s, 3H), 2.28(m, 1H), 1.99-1.93(m, 2H), 1.79(m, 1H),

1.62 (s, 3H), 1.44 (s, 3H); ESI-MS m/z 418.0 (M+H)⁺.

[0246] QY-4-2

[0247] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.48 (d, J=8.1Hz, 2H), 5.22 (dd, J=8.4, 4.2Hz, 1H), 3.99 (dd, J=9.8, 4.5Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.25 (dd, J=9.9, 5.7Hz, 1H), 2.07-1.98 (m, 2H), 1.91-1.85 (m, 1H), 1.48 (s, 3H), 1.33 (s, 3H); ESI-MS m/z 386.1 (M+H)⁺.

[0248] QY-4-6

[0249] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.39-7.30 (m, 4H), 7.12 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.82-6.74 (m, 2H), 5.03 (dd, J=8.1, 4.6Hz, 1H), 3.81-3.65 (m, 2H), 2.14-2.06 (m, 1H), 1.88-1.56 (m, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 378.0 (M+H)⁺.

[0250] QY-4-7

[0251] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.36-7.29 (m, 2H), 7.15-7.07 (m, 4H), 6.81-6.75 (m, 2H), 5.05 (dd, J=8.1, 4.5Hz, 1H), 3.82-3.66 (m, 2H), 2.12-2.04 (m, 1H), 1.86-1.56 (m, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 362.1 (M+H)⁺.

[0252] QY-4-8

[0253] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.32 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.08 (d, J=7.9Hz, 2H), 6.96 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.81-6.75 (m, 2H), 5.02 (dd, J=8.0, 4.3Hz, 1H), 3.81-3.63 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.10-2.00 (m, 1H), 1.87-1.55 (m, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 358.1 (M+H)⁺.

[0254] QY-4-11

[0255] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.26 (d, J=9.0Hz, 2H), 6.76 (d, J=9.0Hz, 2H), 5.32 (dd, J=7.5, 4.2Hz, 1H), 4.14 (s, 3H), 3.82-3.70 (m, 2H), 2.24-2.12 (m, 2H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.48 (s, 3H), 1.38 (s, 3H); ESI-MS m/z 350.1 (M+H)⁺.

[0256] QY-4-12

[0257] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.36-7.27 (m, 2H), 6.91-6.82 (m, 2H), 5.35 (dd, J=8.2, 3.8Hz, 1H), 4.33 (s, 3H), 3.80-3.68 (m, 2H), 2.21-2.11 (m, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.73-1.66 (m, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.43 (s, 3H); ESI-MS m/z 350.1 (M+H)⁺.

[0258] QY-4-14

[0259] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.30 (t, J=8.7Hz, 2H), 5.22 (dd, J=8.4, 4.3Hz, 1H), 4.01 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.11-1.83 (m, 4H), 1.47 (s, 3H), 1.32 (s, 3H); ESI-MS m/z 370.1 (M+H)⁺.

[0260] QY-4-27

[0261] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.37-7.31 (m, 2H), 7.15-7.06 (m, 3H), 6.83-6.76 (m, 3H), 5.20 (dd, J=8.2, 4.1Hz, 1H), 3.81-3.74 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.15-1.69 (m, 4H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 358.1 (M+H)⁺.

[0262] QY-4-32

[0263] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.47-7.33 (m, 3H), 7.29-7.21 (m, 2H), 6.98-6.90 (m, 1H), 6.87-6.79 (m, 2H), 5.34 (dd, J=8.3, 3.6Hz, 1H), 3.89-3.70 (m, 2H), 2.19-1.69 (m, 4H), 1.60 (s, 3H), 1.47 (s, 3H); ESI-MS m/z 378.0 (M+H)⁺.

[0264] QY-4-35

[0265] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.37-7.20 (m, 4H), 7.08 (t, $J=3.9\text{Hz}$, 2H), 6.83-6.73 (m, 2H), 5.03 (dd, $J=8.1, 4.8\text{Hz}$, 1H), 3.86-3.63 (m, 2H), 2.11 (m, 1H), 1.89-1.57 (m, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.50 (s, 3H); ESI-MS m/z 378.0 (M+H) $^+$.

[0266] QY-4-39

[0267] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.38-7.25 (m, 3H), 7.01 (m, 2H), 6.88-6.76 (m, 3H), 5.06 (dd, $J=8.1, 4.4\text{Hz}$, 1H), 3.83-3.67 (m, 2H), 2.15-2.06 (m, 1H), 1.90-1.58 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.49 (s, 3H); ESI-MS m/z 362.1 (M+H) $^+$.

[0268] QY-4-66

[0269] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.00 (d, $J=2.7\text{Hz}$, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.08 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 6.95 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 6.74 (d, $J=9.1\text{Hz}$, 1H), 5.01 (dd, $J=8.0, 4.6\text{Hz}$, 1H), 3.77-3.62 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.12-2.04 (m, 1H), 1.93-1.62 (m, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.57 (s, 3H); ESI-MS m/z 383.2 (M+H) $^+$.

[0270] QY-4-67

[0271] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.74 (d, $J=2.6\text{Hz}$, 1H), 7.60 (dd, $J=9.0, 2.6\text{Hz}$, 1H), 7.10 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 6.99 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 6.72 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 5.03 (dd, $J=8.0, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.76-3.62 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.14-2.05 (m, 1H), 1.89-1.58 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.52 (s, 3H); ESI-MS m/z 426.0 (M+H) $^+$.

[0272] QY-4-69

[0273] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.69 (m, 1H), 7.52 (m, 4H), 7.16 (m, 1H), 6.76 (t, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 5.07 (dd, $J=8.1, 5.1\text{Hz}$, 1H), 3.92-3.75 (m, 2H), 2.17 (m, 1H), 1.91-1.61 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.49 (s, 3H); ESI-MS m/z 387.2 (M+H) $^+$.

[0274] QY-4-70

[0275] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.51 (m, 1H), 7.20 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.13 (m, 1H), 6.83-6.76 (m, 2H), 6.66 (m, 2H), 5.05 (dd, $J=8.1, 4.2\text{Hz}$, 1H), 3.80 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.17-2.08 (m, 1H), 1.89-1.61 (m, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.47 (s, 3H); ESI-MS m/z 392.1 (M+H) $^+$.

[0276] QY-4-75

[0277] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.51 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.09 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 6.98 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 6.78 (t, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 5.03 (dd, $J=8.0, 4.4\text{Hz}$, 1H), 3.87-3.70 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.13-2.07 (m, 1H), 1.93-1.59 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 376.1 (M+H) $^+$.

[0278] QY-4-78

[0279] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.52 (dd, $J=11.0, 2.6\text{Hz}$, 1H), 7.30-7.25 (m, 1H), 7.15 (m, 3H), 7.02 (m, 1H), 6.83 (t, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 5.26 (dd, $J=8.2, 4.4\text{Hz}$, 1H), 3.83 (m, 2H), 2.21-2.12 (m, 1H), 1.81 (m, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.46 (s, 3H); ESI-MS m/z 380.1 (M+H) $^+$.

[0280] QY-4-87

[0281] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.51 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 7.02 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 6.84 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 6.75 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 5.02 (dd, $J=8.0, 4.4\text{Hz}$, 1H), 3.86-3.70 (m, 5H), 2.13-2.05 (m, 1H), 1.92-1.61 (m, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 392.2 (M+H) $^+$.

[0282] QY-4-88

[0283] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.78 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.32 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.24-7.21 (m, 1H), 6.79 (m, 1H), 5.09 (dd, J=8.1, 5.0Hz, 1H), 3.91-3.76 (m, 2H), 2.19 (m, 1H), 1.93-1.60 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.47 (s, 3H); ESI-MS m/z 387.1 (M+H)⁺.

[0284] QY-4-96

[0285] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.34-7.29 (m, 2H), 7.11 (d, J=8.1Hz, 2H), 6.98 (d, J=8.1Hz, 2H), 6.81-6.76 (m, 2H), 5.03 (dd, J=8.1, 4.1Hz, 1H), 3.80-3.65 (m, 2H), 2.58 (q, J=7.5Hz, 2H), 2.10-2.01 (m, 1H), 1.88-1.57 (m, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.18 (t, J=7.6Hz, 3H); ESI-MS m/z 372.1 (M+H)⁺.

[0286] QY-4-99

[0287] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.52 (m, 1H), 7.17-7.10 (m, 3H), 7.00 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.78 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.05 (dd, J=8.0, 4.2Hz, 1H), 3.87-3.72 (m, 2H), 2.57 (q, J=7.6Hz, 2H), 2.14-2.05 (m, 1H), 1.80 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.18 (t, J=7.6Hz, 3H); ESI-MS m/z 390.0 (M+H)⁺.

[0288] QY-5-1

[0289] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.52 (m, 1H), 7.15 (d, J=8.1Hz, 2H), 7.12 (dd, J=2.5, 1.6Hz, 1H), 7.01 (d, J=8.1Hz, 2H), 6.79 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.06 (dd, J=8.1, 4.1Hz, 1H), 3.86-3.70 (m, 2H), 2.86 (m, 1H), 2.15-2.05 (m, 1H), 1.98-1.61 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.20 (d, J=6.9Hz, 6H); ESI-MS m/z 404.2 (M+H)⁺.

[0290] QY-5-4

[0291] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.51 (m, 1H), 7.12 (m, 4H), 6.76 (t, J=9.0Hz, 2H), 5.03 (dd, J=8.0, 4.3Hz, 1H), 3.79 (m, 2H), 2.97 (s, 6H), 2.09 (m, 1H), 1.87-1.58 (m, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 405.1 (M+H)⁺.

[0292] QY-5-21

[0293] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.34-7.29 (m, 2H), 7.08 (d, J=7.8Hz, 2H), 6.96 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.81-6.76 (m, 2H), 5.02 (dd, J=8.0, 4.3Hz, 1H), 3.81-3.64 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.09-2.02 (m, 1H), 1.86-1.56 (m, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 358.1 (M+H)⁺.

[0294] QY-5-22

[0295] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.52 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.09 (d, J=7.9Hz, 2H), 6.98 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.78 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.03 (dd, J=8.0, 4.4Hz, 1H), 3.86-3.69 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.09 (m, 1H), 1.92-1.59 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 376.2 (M+H)⁺.

[0296] QY-5-79

[0297] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.38 (d, J=4.5Hz, 1H), 7.74 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.21-7.15 (m, 3H), 6.79 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.08 (dd, J=8.0, 4.8Hz, 1H), 3.90-3.73 (m, 2H), 2.78 (d, J=4.5Hz, 3H), 2.20-2.12 (m, 1H), 1.92-1.59 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 419.1 (M+H)⁺.

[0298] QY-5-83

[0299] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.66 (d, J=8.1Hz, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.35 (d, J=

8.1Hz, 2H), 7.22-7.19 (m, 1H), 6.81 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.12 (dd, J=8.1, 4.8Hz, 1H), 3.90-3.77 (m, 2H), 2.23-2.14 (m, 1H), 1.95-1.61 (m, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.47 (s, 3H); ESI-MS m/z 430.0 (M+H)⁺.

[0300] QY-5-85

[0301] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.93 (s, 1H), 7.79 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.53 (dd, J=11.0, 2.6Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.22-7.16 (m, 3H), 6.79 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.08 (dd, J=8.1, 4.8Hz, 1H), 3.89-3.74 (m, 2H), 2.16 (dd, J=12.4, 7.2Hz, 1H), 1.92-1.60 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 405.1 (M+H)⁺.

[0302] QY-6-47

[0303] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.40 (m, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.11 (d, J=7.9Hz, 2H), 6.98-6.92 (m, 3H), 6.70 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.31 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 2.63-2.57 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.61 (s, 3H); ESI-MS m/z 375.0 (M+H)⁺.

[0304] QY-6-60

[0305] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.53 (m, 1H), 7.14-7.03 (m, 2H), 6.85-6.77 (m, 3H), 5.05 (dd, J=8.1, 4.6Hz, 1H), 3.82 (m, 2H), 2.19-2.10 (m, 1H), 1.92-1.61 (m, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.49 (s, 3H); ESI-MS m/z 398.1 (M+H)⁺.

[0306] QY-6-61

[0307] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.52 (dd, J=11.0, 2.6Hz, 1H), 7.35 (dt, J=10.7, 8.5Hz, 1H), 7.18-7.09 (m, 2H), 7.01-6.95 (m, 1H), 6.77 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.03 (dd, J=8.1, 4.7Hz, 1H), 3.89-3.73 (m, 2H), 2.18-2.09 (m, 1H), 1.92-1.60 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 398.2 (M+H)⁺.

[0308] QY-6-62

[0309] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.52 (m, 1H), 7.20-7.08 (m, 5H), 6.77 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.06 (dd, J=8.0, 4.6Hz, 1H), 3.87-3.72 (m, 2H), 2.17-2.09 (m, 1H), 1.93-1.59 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 380.1 (M+H)⁺.

[0310] QY-6-63

[0311] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ8.42 (d, J=4.5Hz, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.57 (dd, J=8.6, 1.0Hz, 1H), 7.08 (d, J=7.9Hz, 2H), 6.97 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.79 (t, J=8.5Hz, 1H), 5.02 (dd, J=8.0, 4.5Hz, 1H), 3.83-3.65 (m, 2H), 2.78 (t, J=4.8Hz, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.11-1.66 (m, 4H), 1.58 (s, 3H), 1.53 (s, 3H); ESI-MS m/z 399.1 (M+H)⁺.

[0312] QY-6-83

[0313] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.35-7.26 (m, 4H), 7.23-7.19 (m, 1H), 7.10-7.06 (m, 2H), 6.83-6.76 (m, 2H), 5.06 (dd, J=8.1, 4.2Hz, 1H), 3.81-3.68 (m, 2H), 2.12-2.04 (m, 1H), 1.87-1.57 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 344.1 (M+H)⁺.

[0314] QY-6-84

[0315] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ7.53 (m, 1H), 7.29 (t, J=7.3Hz, 2H), 7.22-7.09 (m, 4H), 6.79 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.07 (dd, J=8.1, 4.3Hz, 1H), 3.86-3.75 (m, 2H), 2.20-2.10 (m, 1H), 1.91-1.60 (m, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 362.1 (M+H)⁺.

[0316] QY-7-7

[0317] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.52 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 6.77 (t, J=9.0Hz, 1H), 3.87-3.70 (m, 2H), 2.13-2.05 (m, 1H), 1.91-1.58 (m, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.48 (s, 3H); ESI-MS m/z 384.2(M+H)⁺.

[0318] XHJ-3-22

[0319] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.52 (m, 1H), 7.19-7.13 (m, 1H), 7.09 (d, J=8.1Hz, 2H), 6.98 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.78 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.03 (dd, J=8.0, 4.4Hz, 1H), 3.89-3.69 (m, 2H), 2.10 (m, 1H), 1.93-1.69 (m, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H).

[0320] ZSQ-13-56

[0321] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.41 (m, 1H), 7.35-7.24 (m, 4H), 7.11-7.03 (m, 2H), 6.95 (m, 1H), 6.71 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.36 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 1.63 (d, J=7.7Hz, 6H).

[0322] ZSQ-13-57

[0323] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.41 (m, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.18-7.08 (m, 4H), 6.97 (m, 1H), 6.70 (t, J=9.0Hz, 1H), 5.38 (dd, J=11.7, 4.7Hz, 1H), 3.39-3.33 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 1.62 (d, J=7.4Hz, 6H).

[0324] 生物测试例1 RIPK1抑制剂细胞程序性坏死抑制活性测试

[0325] 所采用的生物测试方案为:化合物对TNF诱导的FADD (Fas相关死亡结构域) 缺失的Jurkat细胞和L929细胞程序性坏死的影响。

[0326] 为了在细胞水平上验证本发明中的化合物对细胞程序性坏死的抑制作用,选取与RIP1通路有紧密相关性的细胞类型,即FADD deficient Jurkat细胞(人源外周血白血病T细胞株)和L929细胞,分别采用两种不同的刺激方式:单独使用肿瘤坏死因子(TNF α),或者将TNF α 与线粒体衍生的半胱氨酸天冬氨酸激活剂(SMAC)联用,通过检测化学发光值来计算细胞活力,从而得出化合物抑制细胞程序性坏死的生物活性。

[0327] 方法:FADD deficient Jurkat细胞:体外培养FADD deficient Jurkat细胞(人源外周血白血病T细胞株),生长至对数生长期后,收集细胞,1000rpm离心5min,弃上清,调整细胞浓度至 2.5×10^5 /mL,将细胞接种至384孔板中,每孔40 μ l。在相应的孔中加入使用细胞培养基稀释的Smac (50nM) 和化合物各5 μ L,37度预处理1h后,刺激组每孔加入细胞培养基稀释的TNF α (50ng/mL) 5 μ L,对照组加入培养基5 μ L。放置细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中培养14h后,每孔加入15 μ l Cell Titer-Glo溶液,室温孵育30min,检测化学发光值(luminescence)以衡量细胞内ATP水平。以未刺激DMSO对照孔为100%细胞活力。L929细胞:外培养L929细胞(小鼠成纤维细胞)消化后稀释至 6.25×10^4 /ml,将细胞接种到384孔板中,每孔40 μ l。放置细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中培养12小时。在相应的孔中加入使用细胞培养基稀释的Smac (500nM) 和化合物各5 μ L,37度预处理1h后,刺激组每孔加入细胞培养基稀释的TNF α (500ng/mL) 5 μ L,对照组加入培养基5 μ L,放置细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中培养14h后,每孔加入15 μ l Cell Titer-Glo溶液,室温孵育30min,检测化学发光值(luminescence)以衡量细胞内ATP水平。以未刺激DMSO对照孔为100%细胞活力。运用Prism Graphpad统计软件计算化合物EC₅₀值。

[0328] 表1 RIPK1抑制剂细胞程序性坏死抑制活性测试结果

[0329]

化合物编号	EC ₅₀ (μM)			
	FADD ^{-/-} Jurkat cells (human)		L929 cells (mouse)	
	TNFα	TNFα+SM164	TNFα	TNFα+SM164
7-Cl-O-Nec-1(Nec-1s)	0.076	0.337	0.155	0.924
QY-1-98	0.128	1.528	0.213	1.289
QY-2-100	2.244	>10	2.48	>10
QY-2-103	>10	>10	>10	>10
QY-2-104	>10	>10	>10	>10
QY-2-25	6.179	>10	2.67	>10
QY-2-26	0.417	>10	0.182	0.982
QY-2-27	9.383	>10	>10	>10
QY-2-34	>10	>10	>10	>10
QY-2-38	1.698	>10	1.547	>10
QY-2-39	1.063	>10	1.904	8.919
QY-2-52	0.464	2.24	0.419	2.37
QY-2-53	0.199	1.344	0.172	1.173
QY-2-54	>10	>10	6.19	>10
QY-2-55	0.14	2.218	0.025	0.233
QY-2-56	>10	>10	2.115	>10
QY-2-75	0.608	5.152	2.452	>10
QY-2-76	>10	3.962	>10	>10
QY-2-77	7.904	>10	4.259	>10
QY-2-78	0.127	>10	>10	>10
QY-2-79	2.028	8.925	0.212	1.618
QY-3-11	0.389	3.271	0.404	1.567
QY-3-17	3.908	>10	5.377	52.41
QY-3-26	0.111	1.275	0.196	1.236
QY-3-27	0.056	0.849	0.133	0.792
QY-3-28	5.552	>10	0.878	4.085
QY-3-29	0.035	0.664	0.047	0.157
QY-3-35	10.52	>10	160.4	>10
QY-3-36	0.983	8.355	2.25	9.404
QY-3-39	0.712	5.282	0.386	1.477
QY-3-4	>10	>10	>10	59.13

	QY-3-46	0.789	5.826	2.013	>10
	QY-3-51	59.24	>10	>10	>10
	QY-3-65	>10	>10	>10	>10
	QY-3-81	0.326	1.962	0.704	2.723
	QY-3-86	13.46	8.676	>10	>10
	QY-3-94	0.516	2.955	1.411	5.225
	QY-3-95	0.102	1.141	0.135	1.004
	QY-3-96	2.789	9.223	>10	>10
	QY-3-99	0.061	0.444	0.062	0.244
	QY-4-1	10.34	>10	12.7	>10
	QY-4-11	0.061	1.706	>10	>10
	QY-4-12	0.607	5.886	1.608	9.534
	QY-4-14	17.97	40.59	5.89	>10
	QY-4-2	1.061	7.726	3.946	16.91
	QY-4-27	2.901	>10	3.666	>10
	QY-4-3	>10	>10	>10	>10
	QY-4-32	0.712	2.676	0.52	1.648
	QY-4-35	4.088	>10	3.703	>10
	QY-4-39	0.274	1.186	0.189	0.675
	QY-4-6	0.116	0.776	0.065	0.292
	QY-4-66	0.544	2.188	0.392	1.277
	QY-4-67	1.332	5.159	1.385	3.927
	QY-4-69	1.541	9.381	0.65	3.627
[0330]	QY-4-7	0.126	0.852	0.111	0.652
	QY-4-70	>10	>10	1.776	>10
	QY-4-75	0.083	0.704	0.043	0.188
	QY-4-78	0.205	1.104	0.156	0.724
	QY-4-8	0.091	0.568	0.05	0.139
	QY-4-87	2.375	>10	2.395	>10
	QY-4-88	0.746	4.003	1.155	3.096
	QY-4-96	1.465	6.933	2.096	8.128
	QY-4-99	1.447	9.203	2.507	9.121
	QY-5-1	>10	>10	>10	>10
	QY-5-21	0.093	0.696	0.0599	0.208
	QY-5-22	0.098	0.683	0.062	0.262
	QY-5-4	>10	>10	>10	>10
	QY-5-79	9.229	1.062	>10	>10
	QY-5-83	1.291	7.724	8.752	>10
	QY-5-85	5.345	>10	>10	>10
	QY-6-47	0.005	0.09	0.018	0.049
	QY-6-48	>10	0.153	>10	>10
	QY-6-60	0.017	0.707	0.13	0.402
	QY-6-61	0.012	0.379	0.075	0.218
	QY-6-62	0.003	0.117	0.044	0.174
	QY-6-63	4.292	>10	3.15	7.805
	QY-6-83	0.056	0.613	0.04	0.323
	QY-6-84	0.027	0.439	0.025	0.216
	QY-7-7	0.005	0.2	0.001	0.024
[0331]	XHJ-3-22	0.177	1.457	0.04	0.302
	ZSQ13-56	0.049	0.424	0.028	0.201
	ZSQ13-57	0.026	0.37	0.01	0.112

[0332] 生物测试例2化合物对TNF诱导的FADD (Fas相关死亡结构域) 缺失的Jurkat细胞和L929细胞程序性坏死的影响

[0333] 为了在细胞水平上验证本发明中的化合物对细胞程序性坏死的抑制作用,选取与RIP1通路有紧密相关性的细胞类型,即FADD deficient Jurkat细胞(人源外周血白血病T细胞株)和L929细胞,分别采用两种不同的刺激方式:单独使用肿瘤坏死因子(TNF α),或者将TNF α 与线粒体衍生的半胱氨酸天冬氨酸激活剂(SMAC)联用,通过检测化学发光值来计算细胞活力,从而得出化合物抑制细胞程序性坏死的生物活性。

[0334] 研究发现,caspase活性受到抑制时,诱导细胞凋亡的细胞因子也可以诱导细胞坏死。例如,在小鼠L929(小鼠纤维肉瘤细胞)中,TNF α 刺激细胞发生坏死;使用广谱的Caspase抑制剂Z-VAD-FMK抑制Caspase活性后,TNFR1、FasR1和TRAIL信号通路都可以诱导Jurkat(人类T细胞株)发生细胞坏死,细胞坏死的过程中依赖丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(RIPK1)的激酶活性;Caspase-8的激活需要被FADD(Fas-associated death domain)招募,在缺乏FADD的Jurkat细胞中,使用TNF α 刺激也导致细胞发生坏死。此外研究表明,线粒体内膜间隙蛋白类似物Smac可加速坏死过程,采用高剂量的TNF,Smac类似物和泛caspase抑制剂z-VAD-FMK在体外共同诱导坏死的方法可能会绕过或者掩盖线粒体在坏死执行中的作用。

[0335] 所采用的的生物测试方案为:化合物对TNF诱导的FADD (Fas相关死亡结构域) 缺失的Jurkat和L929(鼠源) 细胞程序性坏死的影响。

[0336] 为了在细胞水平上验证本发明中的化合物对细胞程序性坏死的抑制作用,选取FADD deficient Jurkat细胞(人源外周血白血病T细胞株)和L929细胞(小鼠成纤维细胞),将TNF与SMAC用,通过检测化学发光值来计算细胞活力,从而得出化合物抑制细胞程序性坏死的生物活性。

[0337] 实验条件及过程:

[0338] FADD deficient Jurkat细胞:体外培养FADD deficient Jurkat细胞(人源外周血白血病T细胞株),生长至对数生长期后,收集细胞,1000rpm离心5min,弃上清,调整细胞浓度至 2.5×10^5 /mL,将细胞接种至384孔板中,每孔 $40 \mu\text{l}$ 。在相应的孔中加入使用细胞培养基稀释的Smac(50nM)和化合物各 $5 \mu\text{L}$,37度预处理1h后,刺激组每孔加入细胞培养基稀释的TNF α (50ng/mL) $5 \mu\text{L}$,对照组加入培养基 $5 \mu\text{L}$,放置细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂)中培养14h后,每孔加入 $15 \mu\text{l}$ Cell Titer-Glo溶液,室温孵育30min,检测化学发光值(luminescence)以衡量细胞内ATP水平。以未刺激DMSO对照孔为100%细胞活力。

[0339] L929细胞:外培养L929细胞(小鼠成纤维细胞)消化后稀释至 6.25×10^4 /ml,将细胞接种到384孔板中,每孔 $40 \mu\text{l}$ 。放置细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂)中培养12小时。在相应的孔中加入使用细胞培养基稀释的Smac(500nM)和化合物各 $5 \mu\text{L}$,37度预处理1h后,刺激组每孔加入细胞培养基稀释的TNF α (500ng/mL) $5 \mu\text{L}$,对照组加入培养基 $5 \mu\text{L}$,放置细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂)中培养14h后,每孔加入 $15 \mu\text{l}$ Cell Titer-Glo溶液,室温孵育30min,检测化学发光值(luminescence)以衡量细胞内ATP水平。以未刺激DMSO对照孔为100%细胞活力。

[0340] 结果如图1中所示。结果显示,本发明化合物能够有效改善TNF诱导的FADD (Fas相关死亡结构域) 缺失的Jurkat细胞和L929细胞程序性坏死。

[0341] 生物测试例3化合物QY-1-98对TNF α 诱导的FADD deficient Jurkat细胞程序性坏死通路中关键蛋白的影响

[0342] 由TNF α 诱导的Necroptosis是通过被称作Necrosome (ComplexIIb)的复合物介导信号传递的,这个复合物包括TRADD, FADD, Caspase-8, RIPK1, RIPK3和MLKL。RIPK1的激酶活性被证明在调控细胞程序性坏死过程中发挥关键性作用。在细胞程序性坏死过程中, RIPK1会发生自磷酸化激活,其中第166位的丝氨酸是主要的磷酸化位点之一。细胞程序性坏死发生后,寡聚化的MLKL转移到细胞膜,通过钙流入的方式介导细胞死亡。

[0343] 为了验证本发明中的化合物是否通过抑制RIPK1的活性来抑制细胞程序性死亡,并检测细胞程序性坏死通路下游蛋白的激活,使用TNF α 刺激FADD deficient Jurkat发生程序性坏死,同时使用本发明中的化合物处理细胞,一段时间后收集细胞并使用western blot检测RIPK1的磷酸化和MLKL的寡聚化。

[0344] 实验条件及过程:体外培养FADD deficient Jurkat细胞(人源外周血白血病T细胞株),生长至对数生长期后,收集细胞,1000rpm离心5min,弃上清,调整细胞浓度至 1×10^6 /mL。在12孔细胞培养板中,每孔加入1ml细胞,每孔加入0.2 μ L浓度为50mM药物的DMSO溶液或纯DMSO对照,预处理1个小时。刺激组每组加入0.5 μ L浓度为100 μ g/ml的TNF α (PBS溶液),放置细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)中培养4小时后,3000rpm离心3min收集细胞并使用预冷PBS溶液清洗两遍。尽量去除上清,向细胞沉淀中加入200 μ L RIPA细胞裂解液,置于4度摇床裂解30min后,15000rpm 4度离心15min,取上清的细胞裂解液。使用BCA蛋白定量试剂盒检测每组蛋白含量,并使用PIPA裂解液调齐蛋白量,使终体积为100 μ L。样品进行western-blot鉴定。

[0345] Western-blot:向100 μ L细胞裂解液中加入25 μ L 5*蛋白loading buffer,95度加热10min。待样品冷却后,使用SDS-PAGE(9%)凝胶60V进行电泳,30min后切换至120V直至前沿条带电泳至凝胶底端。使用turbo半干转系统,恒定电流0.2A转移80分钟,将凝胶中的蛋白转移至孔径大小为0.2 μ L的PC膜上。转移后的PC膜置于5%脱脂奶粉(TBST溶液)封闭2H,使用相应的一抗在4 $^{\circ}$ C孵育12H。TBST清洗3次,每次10min。使用相应二抗室温孵育2H。TBST清洗三次,每次10min。使用ECL发光液孵育并检测发光信号。

[0346] 图2显示了化合物QY-1-98对TNF α 诱导的FADD deficient Jurkat细胞程序性坏死通路中关键蛋白的影响。实验结果表明化合物QY-1-98能够抑制RIPK1的磷酸化,同时也能抑制MLKL的寡聚化,两者共同说明化合物QY-1-98能够抑制细胞程序性坏死中关键蛋白的激活。

[0347] 生物测试例4化合物QY-1-98对RIPK1(1-330)蛋白的热稳定性的影响测试结果。

[0348] 我们通过研究蛋白质的热稳定性来分析RIPK1蛋白与化合物之间的相互作用。小分子配体会通过结合蛋白来稳定蛋白,提高蛋白的T_m值。通过测试化合物对蛋白热稳定性的影响可以间接判断化合物与蛋白之间的相互作用。RIPK1蛋白包含激酶结构域(1-312)、中间结构域(312-582)和死亡结构域(582-669),体外纯化的RIPK1(1-330)蛋白包含所有激酶结构域。

[0349] 所采用的生物测试方案为使用protein thermal shift assay测试化合物QY-1-98对RIPK1(1-330)蛋白的热稳定性的影响,使用已知的RIPK1抑制剂Nec-1s作为对照。

[0350] 实验条件及过程:在昆虫细胞中表达纯化RIPK1(1-330)蛋白(终浓度2 μ M),与相应浓度的化合物、SYRO Orange Protein gel stain dye(终浓度5X)混合,终体积10 μ L加入384孔板中,每组至少设置3个副孔。室温放置2H,应用7500Fast Real-Time PCR System,通

过差示扫描量热法测试蛋白热稳定性,温度设置为25°C-95°C,0.015°C/s。protein thermal shift software分析数据。

[0351] 图3显示了化合物QY-1-98对RIPK1 (1-330) 蛋白的热稳定性的影响测试结果。实验结果表明化合物QY-1-98能够显著提高RIPK1 (1-330) 蛋白的热稳定性,证明化合物QY-1-98和RIPK1 (1-330) 蛋白在体外可以直接结合。

[0352] 生物测试例5化合物QY-1-98对RIPK1 (1-330) 蛋白的激酶活性的影响

[0353] 体外激酶反应的过程与底物浓度有关,底物竞争性的抑制剂的作用效果会随底物浓度的变化而剧烈变化,而底物非竞争抑制剂的效果并不随底物浓度的变化而变化。激酶的ATP竞争型抑制剂通过与ATP竞争结合位点来抑制激酶活性,由于ATP结合位点的保守性,ATP竞争型激酶抑制剂通常特异性较差。相反,ATP非竞争型激酶抑制剂一般具有较高的特异性。

[0354] 所采用的的生物测试方案:测试化合物QY-1-98对RIPK1 (1-330) 蛋白的激酶活性的影响。体外纯化的RIPK1 (1-330) 蛋白保留完的激酶活性域,并且保持着良好的激酶活性。通过本发明中的化合物在不同浓度的ATP环境中抑制RIPK1激酶活性的 IC_{50} ,得出化合物与RIPK1的结合方式。使用已知的RIPK1ATP非竞争型抑制剂Nec-1s作为对照。

[0355] 实验条件及过程:在384孔板中分别加入终浓度为2 μ M的RIPK1 (1-330) 蛋白和相应浓度的ATP(1X kinase buffer),终浓度5 μ L,每组至少设置3个副孔,37度反应2H。加入5 μ L ADP-Glo试剂,该试剂用于停止激酶反应并且去除反应体系中残留的ATP。室温静置40min。加入10 μ L Kinase Detection Reagent,该试剂用于将ADP转变为ATP并且在体系中引入检测ATP的luciferase和luciferin。室温反应1H。使用7500Fast Real-Time PCR System检测luminescence。运用Prism Graphpad统计软件计算化合物抑制激酶反应的 IC_{50} 。

[0356] 图4显示了测试化合物QY-1-98对RIPK1 (1-330) 蛋白的激酶活性的影响结果。实验结果表明化合物QY-1-98能够在体外抑制RIPK1 (1-330) 蛋白激酶活性,且 IC_{50} 随ATP浓度的增加并无明显变化,本专利中的化合物可能是一类ATP非竞争型激酶抑制剂

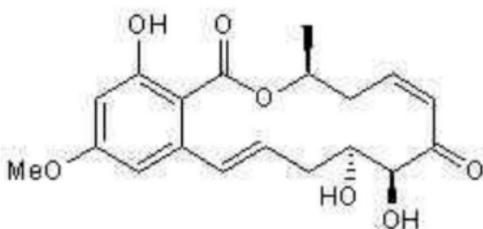
[0357] 生物测试例6 RIPK1第161位丝氨酸突变为丙氨酸(S161A)对化合物的影响

[0358] Nec-1s结合在RIPK1 N-lope和C-lope之间的一个疏水口袋,通过范德华力、疏水相互作用和氢键紧密结合。其中RIPK1第161位的丝氨酸与Nec-1s的吡啶环形成氢键相互作用。将第161位的丝氨酸突变为丙氨酸后,Nec-1s与RIPK1的结合作用大幅减弱。

[0359] 本实验所采用的的生物测试方案为测试RIPK1第161位丝氨酸突变为丙氨酸对化合物QY-1-98活性的影响。实验通过两方面进行验证,一方面,293T细胞过表达RIPK1后,RIPK1会发生自磷酸化激活,此时检测小分子抑制RIPK1磷酸化的活性。另一方面,RIPK1敲除后回补RIPK1 (S161A) 的鼠源MEFs细胞,使用TNF α 和5z7 (TAK1抑制剂) 能够诱导细胞产生RIPK1依赖的细胞凋亡,此时检测化合物抑制细胞死亡的效果。

[0360] 5z7的结构如下式所示:

[0361]



[0362] 实验条件及过程:1、293T细胞过表达RIPK1实验:在PcDNA载体上构建N端3X FLAG的RIPK1质粒。293T细胞消化后,稀释至 8×10^5 /ml,在12孔细胞培养板中,每孔加入1ml细胞,放置细胞培养箱(37°C,5%CO₂)中培养12小时后,进行转染。在100μL的无血清培养基中,分别加入1μg RIPK1质粒或空载、3μL PEI转染试剂,混匀后室温静置15分钟后将其缓慢滴入12孔板中。放置细胞培养箱中培养12h。吸去上层培养基,使用预冷PBS温和的洗涤细胞两次,防止细胞被吹起。吸去PBS,使用400μL预冷RIPA裂解液在四度摇床裂解30min。细胞裂解液15000rpm 4度离心15min后去上清,加入2X蛋白loading buffer,95度加热10min。冷却后使用SDS-PAGE凝胶(9%)电泳后western-blot进行检测。2、化合物抑制RIPK1(S161A)细胞死亡的检测:S161A MEFs细胞消化后稀释至 6.25×10^4 /ml,将细胞接种到384孔板中,每孔40μl。放置细胞培养箱(37°C,5%CO₂)中培养12小时。在相应的孔中加入使用细胞培养基稀释的为5z7(3μM)和化合物(100μM)5μL,37度预处理1h后,刺激组每孔加入细胞培养基稀释的TNFα(500ng/mL)5μL,对照组加入培养基5μL,放置细胞培养箱(37°C,5%CO₂)中培养14h后,每孔加入15μl Cell Titer-Glo溶液,室温孵育30min,检测化学发光值(luminescence)以衡量细胞内ATP水平。以未刺激DMSO对照孔为100%细胞活力。每组至少设置三个副孔。

[0363] 结果如图5所示,实验结果表明RIPK1第161位丝氨酸突变为丙氨酸后,化合物QY-1-98仍能抑制细胞程序性坏死。

[0364] 生物测试例7化合物RIPK1第161位丝氨酸突变为谷氨酸对化合物的影响

[0365] RIPK1的第161位丝氨酸突变为谷氨酸可以模拟RIPK1的磷酸化,RIPK1始终处于激活构象。而Nec-1只能作用于RIPK1的未激活构象。

[0366] 本实验所采用的的生物测试方案为测试化合物RIPK1第161位丝氨酸突变为谷氨酸对化合物活性的影响。实验通过两方面进行验证。一方面,使用本发明的化合物处理敲除RIPK1后回补RIPK1(S161E)的鼠源MEFs细胞,western-blot检测RIPK1的磷酸化状态,另一方面,检测本发明的化合物对上述S161E细胞发生的RIPK1依赖的细胞凋亡是否有抑制效果。

[0367] 实验条件及过程:1、S161E MEFs细胞消化后稀释至 1.5×10^5 /ml,将细胞接种到6孔板中,每孔2ml。放置细胞培养箱(37°C,5%CO₂)中培养12小时。在孔中分别加入0.4μL的化合物4-8(50mM in DMSO)或Nec-1s(50μM in DMSO),对照组加入DMSO 0.4μL,37度预处理1h,每孔加入1μL TNFα(100μg/ml)放置细胞培养箱(37°C,5%CO₂)中培养2h。弃上清,使用PBS清洗细胞两遍,尽量去除残留PBS,向细胞中加入150μL RIPA细胞裂解液,置于4度摇床裂解30min后,15000rpm 4度离心15min,取上清的细胞裂解液。使用BCA蛋白定量试剂盒检测每组蛋白含量,并使用PIPA裂解液调齐蛋白量,使终体积为100μL。样品进行western-blot鉴定。2、化合物抑制RIPK1(S161E)细胞死亡的检测:S161E MEFs细胞消化后稀释至 6.25×10^4 /ml,将细胞接种到384孔板中,每孔40μl。放置细胞培养箱(37°C,5%CO₂)中培养12小时。在相应的孔中加入使用细胞培养基稀释的为5z7(3μM)和化合物(100μM)5μL,37度预处理1h后,刺激组每孔加入细胞培养基稀释的TNFα(500ng/mL)5μL,对照组加入培养基5μL,放置细胞培养箱(37°C,5%CO₂)中分别培养5h、10h、20h后,每孔加入15μl Cell Titer-Glo溶液,室温孵育30min,检测化学发光值(luminescence)以衡量细胞内ATP水平。以未刺激DMSO对照孔为100%细胞活力。每个时间点、每种化合物至少设置三个副孔。

[0368] 结果如图6所示,实验结果表明RIPK1第161位丝氨酸突变为谷氨酸后,化合物QY-4-8仍能抑制细胞程序性坏死。

[0369] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

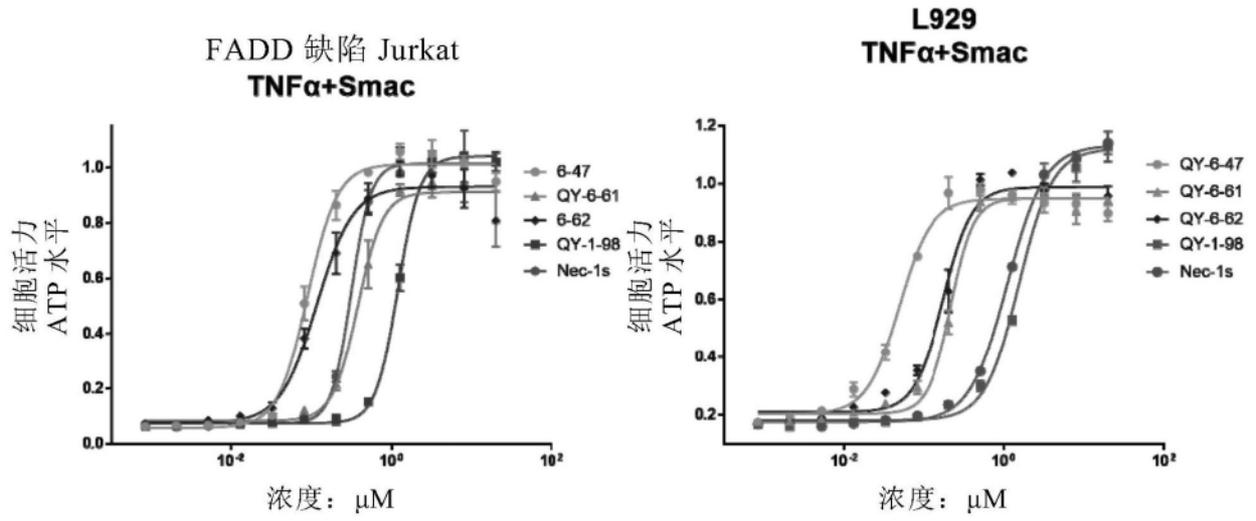


图1

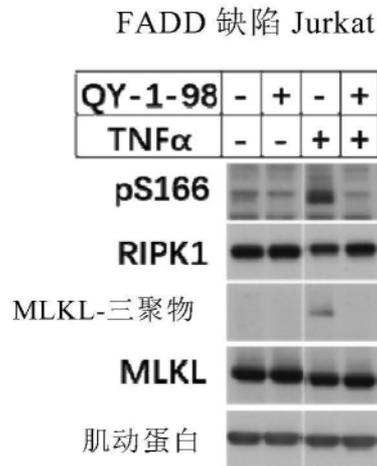


图2

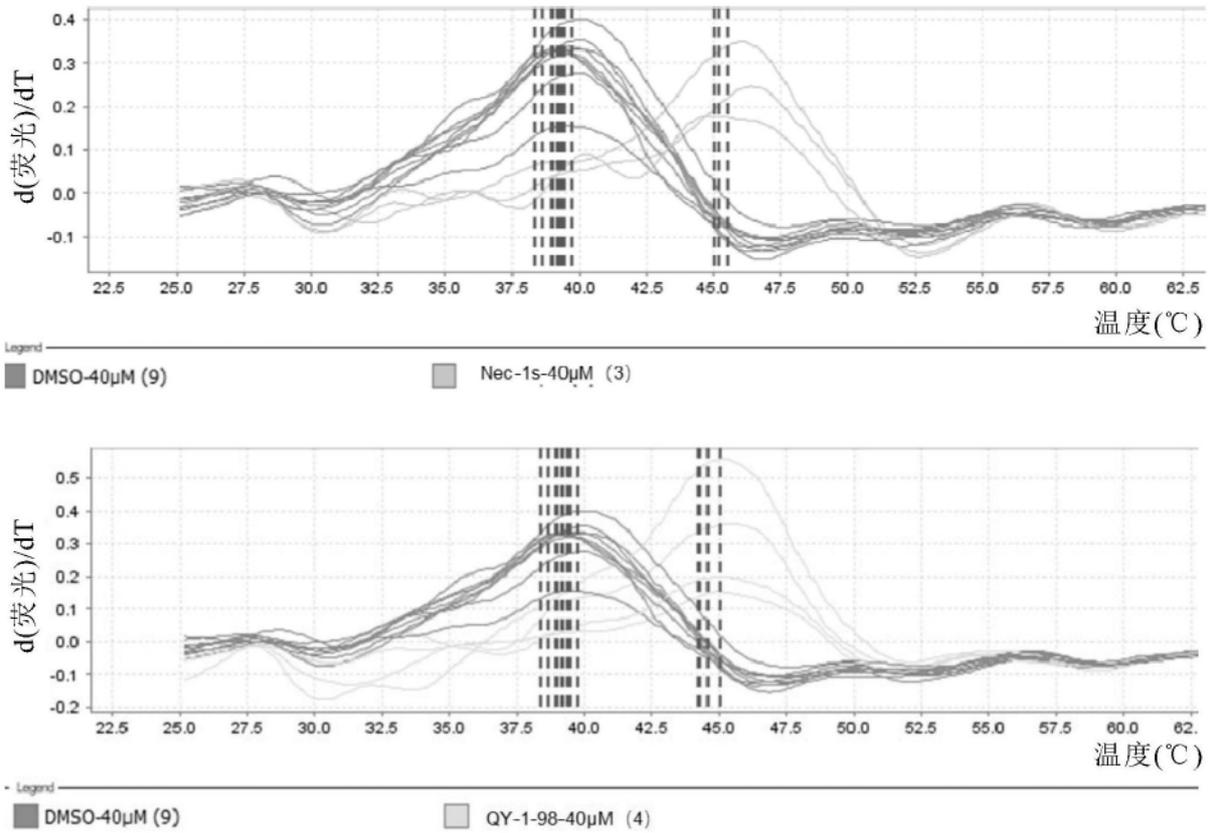


图3

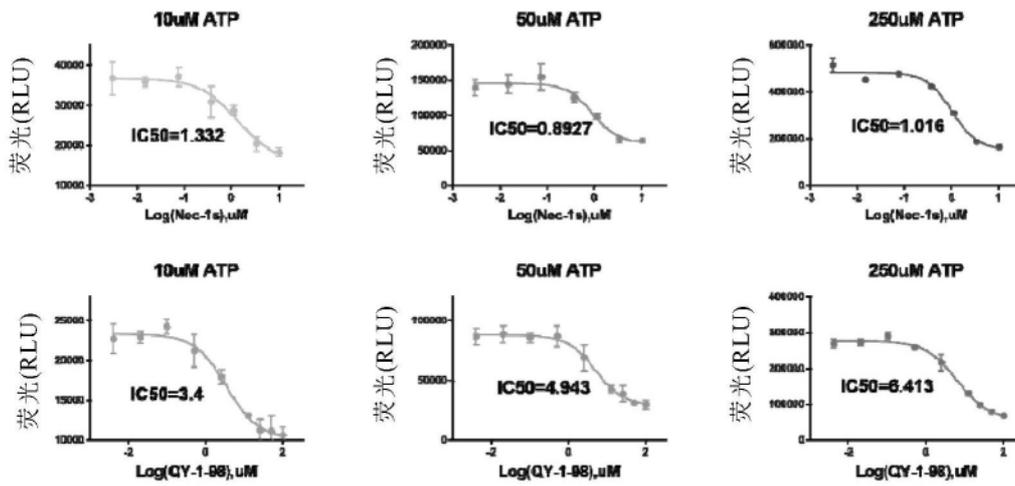


图4

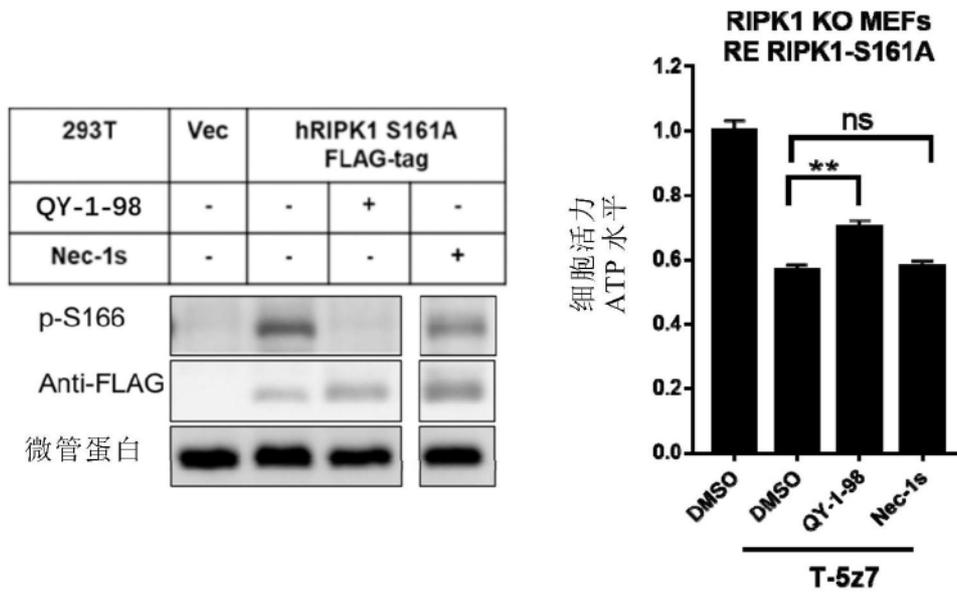


图5

RIPK1 KO RE-161E Mefs

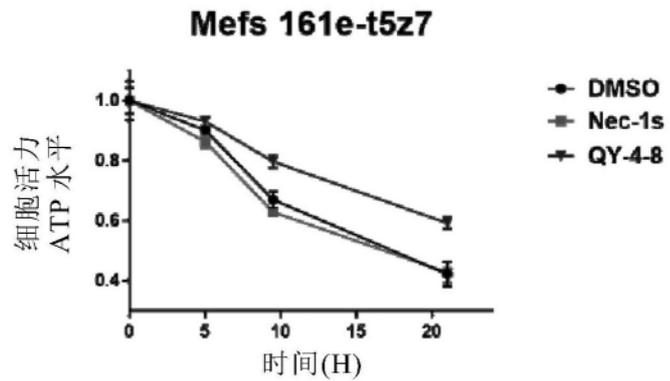
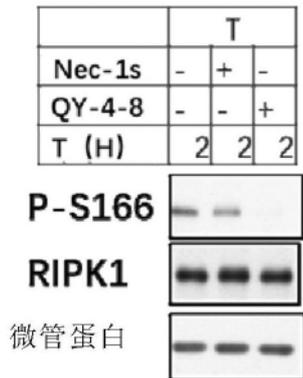


图6