



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112209933 A

(43) 申请公布日 2021.01.12

(21) 申请号 202010656855.5

(22) 申请日 2020.07.09

(66) 本国优先权数据

201910629933.X 2019.07.12 CN

(71) 申请人 正大天晴药业集团股份有限公司

地址 222062 江苏省连云港市郁州南路369号

(72) 发明人 张寅生 徐胜 任景 王庆璘

汪杰 施伟 王晓金

(51) Int. Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书17页

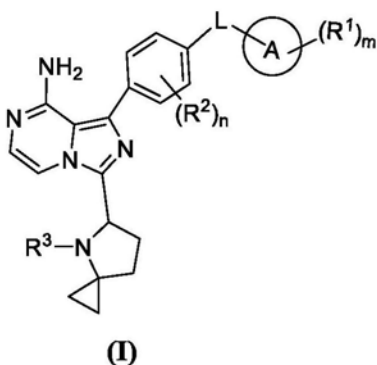
(54) 发明名称

含有4-氮杂螺庚烷的BTK抑制剂

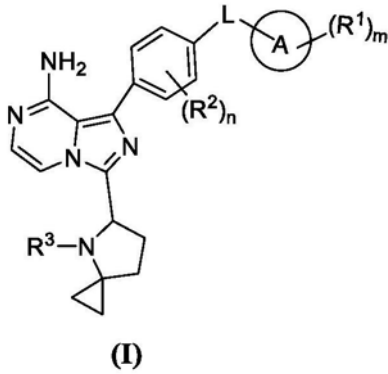
(57) 摘要

本申请属于药物化学领域,涉及含有4-氮杂螺庚烷的BTK抑制剂,具体涉及式(I)化合物或其药物上可接受的盐、其制备方法、含有该化合物的药物组合物,及其在治疗BTK相关疾病中的用

途。



1. 式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐,



其中,

环A选自5-10元杂芳基或C<sub>6-10</sub>芳基;

R<sup>1</sup>独立地选自卤素、羟基、氨基、氰基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>烷基、5-10元杂芳基、5-10元杂环烷基、C<sub>6-10</sub>芳基或C<sub>6-10</sub>环烷基,所述C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>烷基、5-10元杂芳基、5-10元杂环烷基、C<sub>6-10</sub>芳基或C<sub>6-10</sub>环烷基任选地被羟基、氨基、氰基、卤素或卤代C<sub>1-6</sub>烷基取代;

m选自0、1、2、3、4、5或6;

L选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-O-、-NH-、-S-、-C(O)O-、-OC(O)-、-S(O)<sub>2</sub>O-或-OS(O)<sub>2</sub>-;

R<sup>2</sup>独立地选自卤素、羟基、氨基、氰基、C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>烷氧基,所述C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>烷氧基任选被卤素取代;

n选自0、1、2、3或4;

R<sup>3</sup>选自氢、R<sup>a</sup>S(O)<sub>2</sub>-、(R<sup>a</sup>O)<sub>2</sub>P(O)-或R<sup>a</sup>C(O)-;

其中R<sup>a</sup>选自C<sub>2-6</sub>炔基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基、C<sub>1-6</sub>烷基NH-、(C<sub>1-6</sub>烷基)<sub>2</sub>N-、3-6元杂环烷基、5-10元杂芳基或C<sub>6-10</sub>芳基,上述R<sup>a</sup>任选地被(C<sub>1-6</sub>烷基)<sub>2</sub>N-、C<sub>1-6</sub>烷基NH-、羟基、氨基、卤素或氰基取代。

2. 如权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其中环A选自苯基或5-6元杂芳基;任选地,其中环A选自6元杂芳基;任选地,其中环A选自6元含氮杂芳基;任选地,其中环A选自吡啶基。

3. 如权利要求1-2所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其中R<sup>1</sup>独立地选自卤素、氰基、C<sub>1-3</sub>烷氧基、C<sub>1-3</sub>烷基、5-6元杂芳基、5-6元杂环烷基、C<sub>6-10</sub>芳基或C<sub>6-10</sub>环烷基,所述C<sub>1-3</sub>烷氧基、C<sub>1-3</sub>烷基、5-6元杂芳基、5-6元杂环烷基、C<sub>6-10</sub>芳基或C<sub>6-10</sub>环烷基任选地被氰基、卤素或卤代C<sub>1-3</sub>烷基取代;任选地,其中R<sup>1</sup>独立地选自卤素、C<sub>1-3</sub>烷基或C<sub>6-10</sub>芳基,所述C<sub>1-3</sub>烷基或C<sub>6-10</sub>芳基任选地被卤素或卤代C<sub>1-3</sub>烷基取代;任选地,其中R<sup>1</sup>独立地选自氟、氯、溴、卤代甲基或任选被卤素取代的苯基;任选地,其中R<sup>1</sup>独立地选自三氟甲基或任选被氟取代的苯基;

任选地,其中m选自0、1、2、3或4;任选地,其中m选自0、1或2;任选地,其中m选自0或1。

4. 如权利要求1-3任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其中L选自-C(O)NH-或-NHC(O)-;任选地,其中L选自-C(O)NH-。

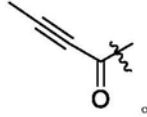
5. 如权利要求1-4任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其中R<sup>2</sup>独立地选自卤素、羟基、氨基、氰基、C<sub>1-3</sub>烷基或C<sub>1-3</sub>烷氧基;任选地,其中R<sup>2</sup>独立地选自氟、氯或溴;任选地,其中R<sup>2</sup>独立地选自氟;

任选地,其中n选自0、1或2;任选地,其中n选自0或1。

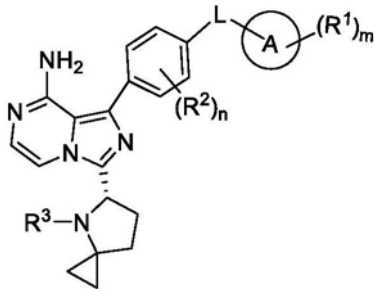
6. 如权利要求1-5任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其中R<sup>3</sup>选自R<sup>a</sup>C(0)-;

任选地,其中R<sup>a</sup>选自C<sub>2-6</sub>炔基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>3-6</sub>环烷基或3-6元杂环烷基;任选地,其中R<sup>a</sup>选自C<sub>2-3</sub>炔基或C<sub>2-3</sub>烯基;任选地,其中R<sup>a</sup>选自丙炔基;

任选地,其中R<sup>3</sup>选自

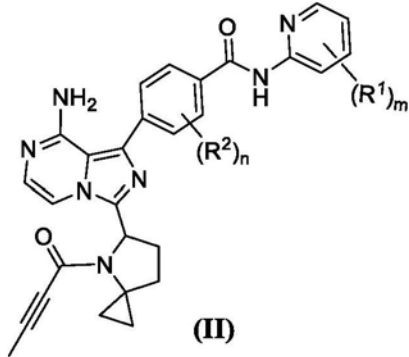


7. 如权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,选自式(I-1)化合物或其药学上可接受的盐,

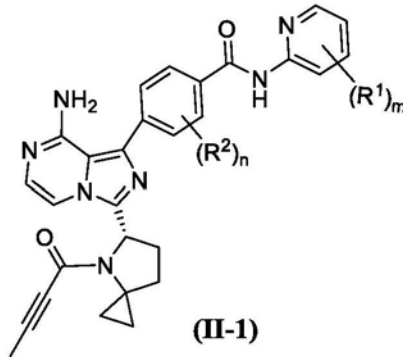


(I-1)

8. 如权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,选自式(II)或式(II-1)化合物或其药学上可接受的盐,

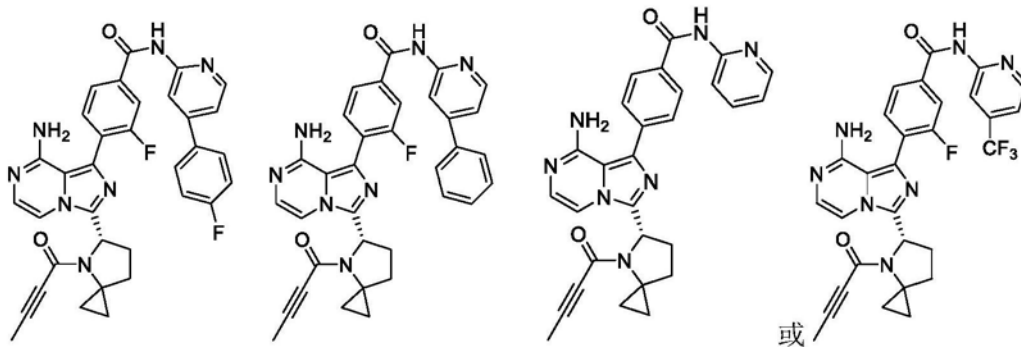


(II)



(II-1)

9. 以下化合物或其药学上可接受的盐:



10. 权利要求1-9任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或者治疗与BTK相关疾病的药物中的用途,任选地,其中所述BTK相关疾病选自自身免疫性疾病、炎症疾

病或癌症。

## 含有4-氮杂螺庚烷的BTK抑制剂

## 技术领域

[0001] 本申请涉及含有4-氮杂螺庚烷的BTK抑制剂、其制备方法、含有该化合物的药物组合物、以及其在治疗BTK相关疾病中的用途。

## 背景技术

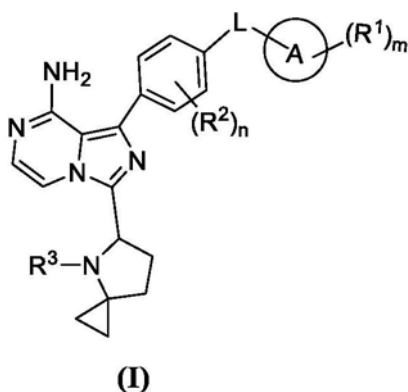
[0002] 布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 主要在B细胞中表达, 分布于淋巴系统、造血及血液系统, 是非受体型酪氨酸激酶Tec家族中一员, 该家族成员还包括TEC、ITK/TSK/EMT和BMX, 在结构上具有高度同源性。BTK在连接细胞表面B细胞受体 (B-cell receptor) 刺激至下游细胞内应答的B细胞信号传导途径中起至关重要作用, 是B细胞发育、激活、信号传导和存活的关键调节物。近年来有关B细胞特别是针对B细胞非霍奇金性淋巴瘤和类风湿关节炎的研究发现, BTK往往会出现异常表达。

[0003] 基于BTK信号传导通路开发小分子靶向药物为B细胞类肿瘤如白血病、多发性骨髓瘤及B细胞类免疫疾病的治疗提供一条全新的途径。目前上市的不可逆抑制剂, 比如依鲁替尼, 其BTK结合位点往往会发生突变, 导致药物活性下降从而产生耐药性, 因此临床上需要更多的BTK抑制剂, 且对BTK具有较高的选择性, 从而避免脱靶效应所带来的毒副作用。

[0004] 发明详述

[0005] 本申请涉及式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐,

[0006]



[0007] 其中,

[0008] 环A选自5-10元杂芳基或C<sub>6-10</sub>芳基;

[0009] R<sup>1</sup>独立地选自卤素、羟基、氨基、氰基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>烷基、5-10元杂芳基、5-10元杂环烷基、C<sub>6-10</sub>芳基或C<sub>6-10</sub>环烷基, 所述C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>1-6</sub>烷基、5-10元杂芳基、5-10元杂环烷基、C<sub>6-10</sub>芳基或C<sub>6-10</sub>环烷基任选地被羟基、氨基、氰基、卤素或卤代C<sub>1-6</sub>烷基取代;

[0010] m选自0、1、2、3、4、5或6;

[0011] L选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-O-、-NH-、-S-、-C(O)O-、-OC(O)-、-S(O)<sub>2</sub>O-或-O-S(O)<sub>2</sub>-;

[0012] R<sup>2</sup>独立地选自卤素、羟基、氨基、氰基、C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>烷氧基, 所述C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>烷氧基任选被卤素取代;

[0013] n选自0、1、2、3或4;

[0014]  $R^3$ 选自氢、 $R^aS(O)_2-$ 、 $(R^aO)_2P(O)-$ 或 $R^aC(O)-$ ;

[0015] 其中 $R^a$ 独立地选自 $C_{2-6}$ 炔基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{3-6}$ 环烷基、 $(C_{1-6}$ 烷基)NH-、 $(C_{1-6}$ 烷基) $_2$ N-、3-6元杂环烷基、5-10元杂芳基或 $C_{6-10}$ 芳基,上述 $R^a$ 任选地被 $(C_{1-6}$ 烷基) $_2$ N-、 $(C_{1-6}$ 烷基)NH-、羟基、氨基、卤素或氰基取代。

[0016] 在一些实施方案中,环A选自苯基或5-6元杂芳基;在一些实施方案中,环A选自6元杂芳基;在一些实施方案中,环A选自6元含氮杂芳基;在一些实施方案中,环A选自吡啶基。

[0017] 在一些实施方案中, $R^1$ 独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-3}$ 烷氧基、 $C_{1-3}$ 烷基、5-6元杂芳基、5-6元杂环烷基、 $C_{6-10}$ 芳基或 $C_{6-10}$ 环烷基,所述 $C_{1-3}$ 烷氧基、 $C_{1-3}$ 烷基、5-6元杂芳基、5-6元杂环烷基、 $C_{6-10}$ 芳基或 $C_{6-10}$ 环烷基任选地被氰基、卤素或卤代 $C_{1-3}$ 烷基取代;在一些实施方案中, $R^1$ 独立地选自卤素、 $C_{1-3}$ 烷基或 $C_{6-10}$ 芳基,所述 $C_{1-3}$ 烷基或 $C_{6-10}$ 芳基任选地被卤素或卤代 $C_{1-3}$ 烷基取代;在一些实施方案中, $R^1$ 独立地选自氟、氯、溴、卤代甲基或任选被卤素取代的苯基;在一些实施方案中, $R^1$ 独立地选自三氟甲基或任选被氟取代的苯基。

[0018] 在一些实施方案中,m选自0、1、2、3或4;在一些实施方案中,m选自0、1或2;在一些实施方案中,m选自0或1。

[0019] 在一些实施方案中,L选自-C(O)NH-或-NHC(O)-;在一些实施方案中,L选自-C(O)NH-。

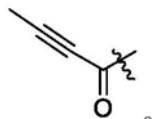
[0020] 在一些实施方案中, $R^2$ 独立地选自卤素、羟基、氨基、氰基、 $C_{1-3}$ 烷基或 $C_{1-3}$ 烷氧基;在一些实施方案中, $R^2$ 独立地选自氟、氯或溴;在一些实施方案中, $R^2$ 独立地选自氟。

[0021] 在一些实施方案中,n选自0、1或2;在一些实施方案中,n选自0或1。

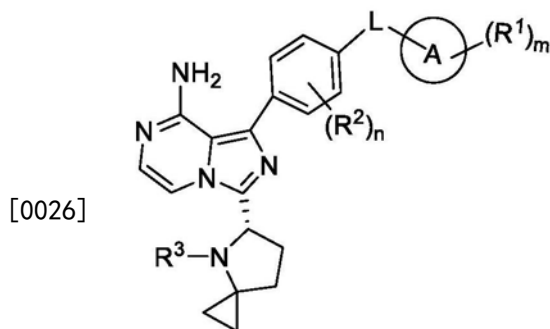
[0022] 在一些实施方案中, $R^3$ 选自 $R^aC(O)-$ 。

[0023] 在一些实施方案中, $R^a$ 独立地选自 $C_{2-6}$ 炔基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{3-6}$ 环烷基或3-6元杂环烷基;在一些实施方案中, $R^a$ 独立地选自 $C_{2-3}$ 炔基或 $C_{2-3}$ 烯基;在一些实施方案中, $R^a$ 选自丙炔基。

[0024] 在一些实施方案中, $R^3$ 选自



[0025] 在一些实施方案中,本申请的式(I)化合物或其药学上可接受的盐选自式(I-1)化合物或其药学上可接受的盐,



(I-1)

[0027] 其中,环A、L、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、m、n如上定义。

[0028] 在一些实施方案中,本申请的式(I)化合物或其药学上可接受的盐选自式(II)或



原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧代(即=O)时,意味着两个氢原子被取代,氧代不会发生在芳香基上。

[0042] 术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生,该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。例如,乙基“任选”被卤素取代,指乙基可以是未被取代的( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ )、单取代的(如 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ )、多取代的(如 $\text{CHFCH}_2\text{F}$ 、 $\text{CH}_2\text{CHF}_2$ 等)或完全被取代的( $\text{CF}_2\text{CF}_3$ )。本领域技术人员可理解,对于包含一个或多个取代基的任何基团,不会引入任何在空间上不可能存在和/或不能合成的取代或取代模式。

[0043] 本文中的 $\text{C}_{m-n}$ ,是该部分具有给定范围中的整数个碳原子。例如“ $\text{C}_{1-6}$ ”是指该基团可具有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子。

[0044] 当任何变量(例如R)在化合物的组成或结构中出现一次以上时,其在每一种情况下的定义都是独立的。例如,如果一个基团含2个R,则每个R都有独立的选项。

[0045] 术语“卤”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0046] 术语“羟基”指-OH基团。

[0047] 术语“氨基”指 $-\text{NH}_2$ 基团。

[0048] 术语“氰基”指-CN基团。

[0049] 术语“烷基”是指通式为 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 的烃基。该烷基可以是直链或支链的。例如,术语“ $\text{C}_{1-6}$ 烷基”指含有1至6个碳原子的烷基(例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、新戊基、己基、2-甲基戊基等)。类似地,烷氧基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基磺酰基和烷硫基的烷基部分(即烷基)具有上述相同定义。

[0050] 术语“烷氧基”指-O-烷基。

[0051] 术语“烯基”是指由碳原子和氢原子组成的直链或支链的具有至少一个双键的不饱和脂肪族烃基。烯基的非限制性实例包括但不限于乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、异丁烯基、1,3-丁二烯基等。

[0052] 术语“炔基”是指由碳原子和氢原子组成的直链或支链的具有至少一个三键的不饱和脂肪族烃基。炔基的非限制性实例包括但不限于乙炔基( $-\text{C}\equiv\text{CH}$ )、1-丙炔基( $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$ )、2-丙炔基( $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ )、1,3-丁二炔基( $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$ )等。

[0053] 术语“环烷基”指完全饱和的并且可以以呈单环、桥环或螺环存在的碳环。除非另有指示,该碳环通常为3至10元环。环烷基非限制性实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、降冰片基(双环[2.2.1]庚基)、双环[2.2.2]辛基、金刚烷基等。

[0054] 术语“杂环烷基”是指完全饱和的并且可以以单环、桥环或螺环存在的环状基团。除非另有指示,该杂环通常为含有1至3个独立地选自硫、氧和/或氮的杂原子(优选1或2个杂原子)的3至7元环。3元杂环烷基的实例包括但不限于环氧乙烷基、环硫乙烷基、环氮乙烷基,4元杂环烷基的非限制性实例包括但不限于吡啶基、噁丁环基、噻丁环基,5元杂环烷基的实例包括但不限于四氢呋喃基、四氢噻吩基、吡咯烷基、异噁唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、噻唑烷基、咪唑烷基、四氢吡唑基,6元杂环烷基的实例包括但不限于哌啶基、四氢吡喃基、四氢噻喃基、吗啉基、哌嗪基、1,4-噁噻烷基、1,4-二氧六环基、硫代吗啉基、1,3-二噻烷基、1,4-二噻烷基,7元杂环烷基的实例包括但不限于氮杂环庚烷基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基。优选为具有5或6个环原子的单环杂环烷基。



[0055] 术语“芳基”是指具有共轭的 $\pi$ 电子体系的全碳单环或稠合多环的芳香环基团。例如,芳基可以具有6-20个碳原子,6-14个碳原子或6-12个碳原子。芳基的非限制性实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基和1,2,3,4-四氢化萘等。

[0056] 术语“杂芳基”是指单环或稠合多环体系,其中含有至少一个选自N、O、S的环原子,其余环原子为C,并且具有至少一个芳香环。优选的杂芳基具有单个4至8元环,尤其是5至8元环,或包含6至14个,尤其是6至10个环原子的多个稠合环。杂芳基的非限制性实例包括但不限于吡咯基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、噁唑基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、喹啉基、异喹啉基、四唑基、三唑基、三嗪基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、异吲哚基等。

[0057] 术语“治疗”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状,且包括:

[0058] (i) 抑制疾病或疾病状态,即遏制其发展;

[0059] (ii) 缓解疾病或疾病状态,即使该疾病或疾病状态消退。

[0060] 术语“预防”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以预防疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状,包括:预防疾病或疾病状态在哺乳动物中出现,特别是当这类哺乳动物易患有该疾病状态,但尚未被诊断为已患有该疾病状态时。

[0061] 术语“治疗有效量”意指(i) 治疗或预防特定疾病、病况或障碍,(ii) 减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状,或(iii) 预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本申请化合物的用量。构成“治疗有效量”的本申请化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待被治疗的哺乳动物的年龄而改变,但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本公开内容而确定。

[0062] 术语“药学上可接受的”,是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言,它们在可靠的医学判断的范围之内,适用于与人类和动物的组织接触使用,而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

[0063] 作为药学上可接受的盐,例如,可以提及金属盐、铵盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与碱性或者酸性氨基酸形成的盐等。

[0064] 术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。

[0065] 术语“药学上可接受的辅料”是指对有机体无明显刺激作用,而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些辅料。合适的辅料是本领域技术人员熟知的,例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等。

[0066] 词语“包括(comprise)”或“包含(comprise)”及其英文变体例如comprises或comprising应理解为开放的、非排他性的意义,即“包括但不限于”。

[0067] 本申请的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在,并且所有这样的形式包含于本申请的范围之内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能垒互变的不同能量的结构异构体。例如,质子互变异构体(也称为质子转移互变异构体)包括经由质子迁移的互变,如酮-烯醇及亚胺-烯胺异构化。质子互变异构体的具体实例是咪唑部分,其中质子可在两个环氮间迁移。价互变异构体包括通过一些成键电子的重组的互变。

[0068] 本申请还包括与本文中记载的那些相同的,但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本申请化合物。可结

合到本申请化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素,诸如分别为<sup>2</sup>H、<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>13</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、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I和<sup>36</sup>Cl等。

[0069] 某些同位素标记的本申请化合物(例如用<sup>3</sup>H及<sup>14</sup>C标记的那些)可用于化合物和/或底物组织分布分析中。氚化(即<sup>3</sup>H)和碳-14(即<sup>14</sup>C)同位素对于由于它们易于制备和可检测性是尤其优选的。正电子发射同位素,诸如<sup>15</sup>O、<sup>13</sup>N、<sup>11</sup>C和<sup>18</sup>F可用于正电子发射断层扫描(PET)研究以测定底物占有率。通常可以通过与公开于下文的方案和/或实施例中的那些类似的下列程序,通过同位素标记试剂取代未经同位素标记的试剂来制备同位素标记的本申请化合物。

[0070] 此外,用较重同位素(诸如氘(即<sup>2</sup>H))取代可以提供某些由更高的代谢稳定性产生的治疗优点(例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求),并且因此在某些情形下可能是优选的,其中氘取代可以是部分或完全的,部分氘取代是指至少一个氢被至少一个氘取代。

[0071] 本申请化合物可以是不对称的,例如,具有一个或多个立体异构体。除非另有说明,所有立体异构体都包括,如对映异构体和非对映异构体。本申请的含有不对称碳原子的化合物可以以光学活性纯的形式或外消旋形式被分离出来。光学活性纯的形式可以从外消旋混合物拆分,或通过使用手性原料或手性试剂合成。

[0072] 本申请的药物组合物可通过将本申请的化合物与适宜的药学上可接受的辅料组合而制备,例如可配制成固态、半固态、液态或气态制剂,如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、膏剂、乳剂、悬浮剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球及气溶胶等。

[0073] 给予本申请化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的典型途径包括但不限于口服、直肠、局部、吸入、肠胃外、舌下、阴道内、鼻内、眼内、腹膜内、肌内、皮下、静脉内给药。

[0074] 本申请的药物组合物可以采用本领域众所周知的方法制造,如常规的混合法、溶解法、制粒法、制糖衣药丸法、磨细法、乳化法、冷冻干燥法等。

[0075] 在一些实施方案中,药物组合物是口服形式。对于口服给药,可以通过将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的辅料混合,来配制该药物组合物。这些辅料能使本申请的化合物被配制成片剂、丸剂、锭剂、糖衣剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、浆剂、悬浮剂等,用于对患者的口服给药。

[0076] 可以通过常规的混合、填充或压片方法来制备固体口服组合物。例如,可通过下述方法获得:将所述的活性化合物与固体辅料混合,任选地碾磨所得的混合物,如果需要则加入其它合适的辅料,然后将该混合物加工成颗粒,得到了片剂或糖衣剂的核心。适合的辅料包括但不限于:粘合剂、稀释剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、甜味剂或矫味剂等。

[0077] 药物组合物还可适用于肠胃外给药,如合适的单位剂型的无菌溶液剂、混悬剂或冻干产品。

[0078] 本文所述的通式I化合物的所有施用方法中,每天给药的剂量为0.01到200mg/kg体重,以单独或分开剂量的形式。

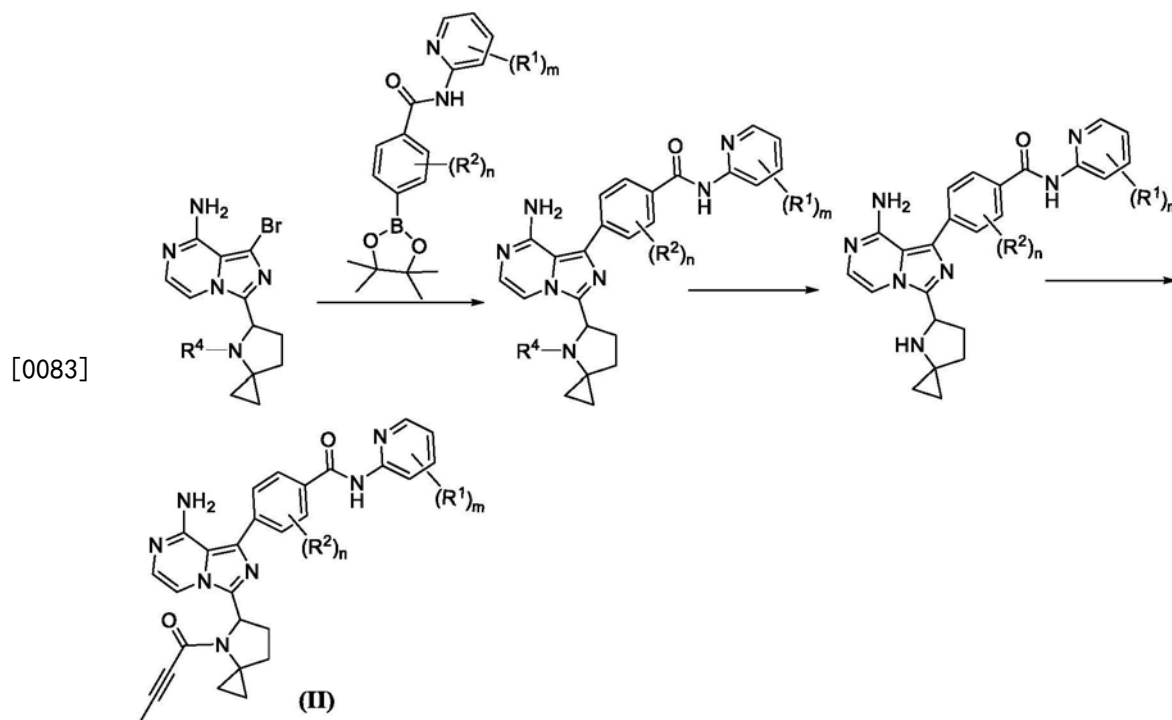
[0079] 本申请的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备,包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式,优选的实施方式包括但不限于本申请的实施例。

[0080] 本申请具体实施方式的化学反应是在合适的溶剂中完成的,所述的溶剂须适合于

本申请的化学变化及其所需的试剂和物料。为了获得本申请的化合物,有时需要本领域技术人员在已有实施方式的基础上对合成步骤或者反应流程进行修改或选择。

[0081] 本领域合成路线规划中的一个重要考量因素是为反应性官能团(如本申请中的氨基)选择合适的保护基,例如,可参考Greene's Protective Groups in Organic Synthesis(4th Ed).Hoboken,New Jersey:John Wiley&Sons,Inc.

[0082] 在一些实施方案中,本申请通式(II)的化合物可以由有机合成领域技术人员通过以下路线用本领域的已有方法来制备:



[0084] 其中, $R^1$ 、 $R^2$ 、 $m$ 或 $n$ 定义同前, $R^4$ 为氨基保护基,选自Cbz(苄氧基羰基)或Boc(叔丁氧基羰基)。

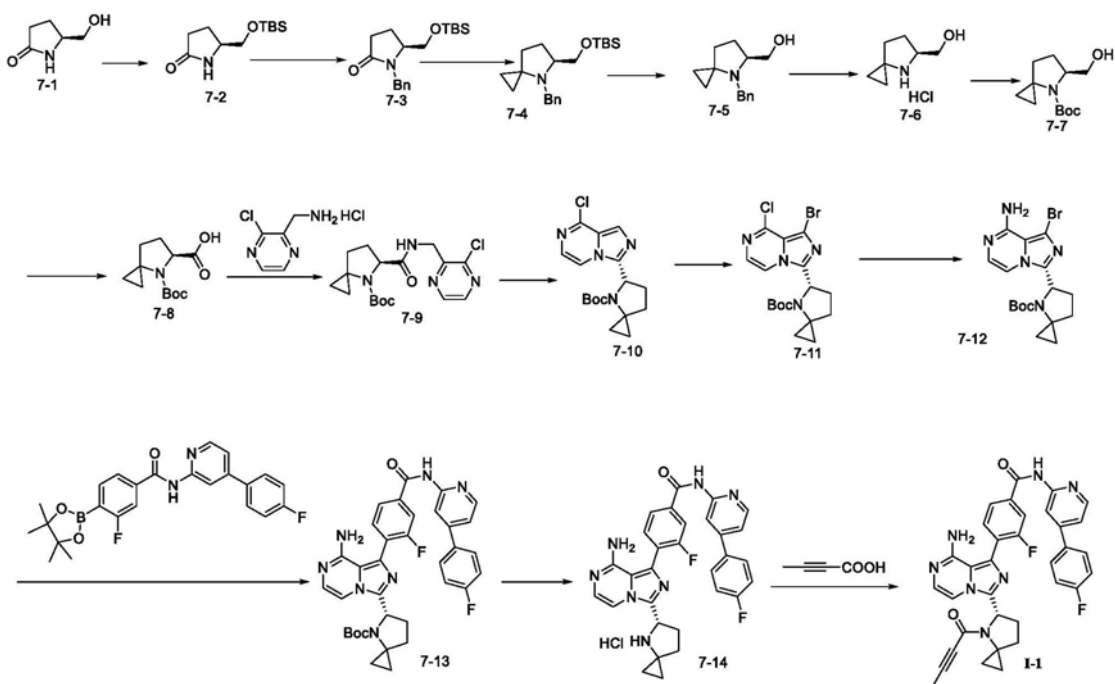
[0085] 本申请采用下述缩略词:

[0086] PE代表石油醚;EA代表乙酸乙酯;DMSO代表二甲基亚砷;DMF代表N,N-二甲基甲酰胺;DCM代表二氯甲烷;TBSCl代表叔丁基二甲基氯硅烷;Boc<sub>2</sub>O代表二碳酸二叔丁酯;NBS代表N-溴代琥珀酰亚胺;MeOH代表甲醇;DTT代表二硫苏糖醇;EGTA代表乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸;HATU代表2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯。

[0087] 为清楚起见,进一步用实施例来阐述本发明,但是实施例并非限制本申请的范围。本申请所使用的所有试剂是市售的,无需进一步纯化即可使用。

### 具体实施方式

[0088] 实施例1:(S)-4-(8-氨基-3-(4-(丁-2-炔酰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)-3-氟-N-(4-(4-氟苯基)吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物I-1)的制备



[0089]

[0090] 步骤1: (S)-5-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)吡咯烷-2-酮(中间体7-2)

[0091] 向反应瓶中加入中间体7-1 (50g) 并溶于DCM (500mL) 中, 0℃下加入咪唑 (59.1g), 维持温度加入TBSCl (2.21g), 继续0℃反应, 反应完成后, 将反应液溶加入到500ml饱和食盐水中, 甲基叔丁基醚萃取, 有机相用5%柠檬酸溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩无需进一步纯化得化合物7-2 (106.2g)。MS (ESI, [M+H]<sup>+</sup>) m/z: 230.5。

[0092] 步骤2: (S)-1-苄基-5-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)吡咯烷-2-酮(中间体7-3)

[0093] 向反应瓶中加入钠氢 (63.9g), 后加入四氢呋喃 (1000mL), 0℃下氮气保护下, 向瓶内滴加中间体7-2 (100g), 维持温度反应约1h, 后向体系中加入溴化苄 (71mL) 室温反应, 反应完成后, 将反应液溶缓慢加入到2L冰水中, 甲基叔丁基醚萃取, 有机相用饱和食盐水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩柱层析纯化(展开剂: PE:EA=100:50) 得化合物7-3 (124.56g)。

[0094] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.51-6.97 (m, 5H), 4.71 (d, J=15.2Hz, 1H), 4.12 (d, J=15.3Hz, 1H), 3.78-3.62 (m, 1H), 3.61-3.51 (m, 1H), 3.49 (dd, J=8.7, 4.0Hz, 1H), 2.36 (dt, J=17.6, 9.1Hz, 1H), 2.27-2.14 (m, 1H), 2.08-1.95 (m, 1H), 1.77 (m, 1H), 0.84 (s, 9H), -0.01 (d, J=7.3Hz, 6H)。MS (ESI, [M+H]<sup>+</sup>) m/z: 320.2。

[0095] 步骤3: (S)-4-苄基-5-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷(中间体7-4)

[0096] 向干燥反应瓶中加入四氢呋喃 (1000mL), 后氮气保护下加入乙基溴化镁 (310mL), -70℃降温, 达温后向瓶内滴加钛酸四异丙酯 (92mL), 维持温度反应约1h, 后向体系中加入7-3 (100g) 室温反应, 反应完成后, 将反应液溶缓慢加入到1L冰水中, 抽滤除去黑色固体不溶物, 甲基叔丁基醚萃取, 有机相用饱和食盐水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得化合物7-4粗品 (110.52g)。

[0097] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.41-7.13 (m, 5H), 3.68 (d, J=13.9Hz, 1H), 3.50 (d, J

=13.9Hz, 1H), 3.39-3.32 (m, 2H), 2.92 (m, 1H), 2.01 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.52 (m, 1H), 0.86-0.82 (m, 1H), 0.79 (s, 9H), 0.54-0.33 (m, 3H), -0.10 (d, J=10.5Hz, 6H).

[0098] HR-MS (ESI, [M+H]<sup>+</sup>) m/z: 332.2377

[0099] 步骤4: (S)-(4-苄基-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基) 甲醇 (中间体7-5)

[0100] 将粗品中间体7-4 (100g) 加入到反应瓶中, 用四氢呋喃 (1000mL) 溶解后加入四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液 (302mL, 1mol/L) 40°C 反应, 反应完成后, 将反应体系浓缩, 后用甲基叔丁基醚与饱和食盐水萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩柱层析纯化 (展开剂: DCM:MeOH = 100:5) 得化合物7-5 (16.18g)。

[0101] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.46-7.08 (m, 5H), 4.13 (s, 1H), 3.69 (dd, J=14.1, 3.9Hz, 1H), 3.52 (dd, J=14.1, 3.7Hz, 1H), 3.31-3.22 (m, 1H), 3.16 (t, J=9.5Hz, 1H), 2.92 (q, J=6.6Hz, 1H), 1.97 (m, 2H), 1.67 (tt, J=11.7, 5.2Hz, 1H), 1.50 (t, J=9.9Hz, 1H), 0.81 (h, J=10.7, 10.2Hz, 1H), 0.46 (h, J=6.1, 5.4Hz, 2H), 0.42-0.32 (m, 1H). MS (ESI, [M+H]<sup>+</sup>) m/z: 218.5.

[0102] 步骤5: (S)-(4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基) 甲醇盐酸盐 (中间体7-6)

[0103] 将化合物7-5 (15g) 加入到反应瓶中, 加入甲醇 (150mL), 浓盐酸 (22.63mL), 后加入还原钨碳 (1.086g), 氢气置换3-4次后, 通过氢气球保持氢气氛围, 30°C 反应, 反应完成后, 将反应体系浓缩, 除干水分得化合物7-6 (12.51g)

[0104] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.84 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 3.79-3.46 (m, 3H), 2.08 (h, J=6.3Hz, 1H), 1.93 (m, 2H), 1.81 (m, 1H), 1.17 (m, 2H), 0.76 (s, 2H).

[0105] 步骤6: (S)-5-(羟甲基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-4-羧酸叔丁酯 (中间体7-7)

[0106] 将化合物7-6 (12g) 加入到反应瓶中, 后用DCM (150mL) 溶解并降温到0°C, 向体系中加入三乙胺 (29.2mL), 后加入Boc<sub>2</sub>O (17.65mL)。维持温度反应, 反应结束后用甲基叔丁基醚与饱和食盐水萃取。无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩后得到化合物7-7 (19.86g)

[0107] 步骤7: (S)-4-(叔丁氧基羰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-羧酸 (中间体7-8)

[0108] 反应瓶内加入化合物7-7 (19.86g), 后加入乙腈 (40mL), 四氯化碳 (40mL) 体系溶解后加入高碘酸钠的水溶液 (47.4g, 60mL), 保持反应温度维持0°C, 后加入三氯化钨一水合物 (833mg), 维持室温反应。反应结束后向体系中加入饱和食盐水500mL, 用DCM萃取3次, 合并有机相, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得到化合物7-8 (17.56g)

[0109] 步骤8: (S)-4-苄基-N-((3-氯吡嗪-2-基) 甲基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-甲酰胺 (中间体7-9)

[0110] 将化合物7-8 (17.56g) 加入到反应瓶内, 加入 (3-氯吡嗪-2-基) 甲胺盐酸盐 (12.72g), 用DCM (200mL) 溶解后加入三乙胺 (23.42mL), 随后加入HATU (17g) 将混合物室温反应。反应结束, 向反应体系中加入甲基叔丁基醚稀释, 用碳酸氢钠饱和溶液500mL洗涤两次。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化 (展开剂: PE:EA = 100:20) 得到化合物7-9 (12.78g)

[0111] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.62 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.44 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.32 (t, J=5.4Hz, 1H), 4.61 (dd, J=16.4, 5.8Hz, 1H), 4.48 (dd, J=16.4, 5.1Hz, 1H), 4.35 (dd, J=8.7, 3.5Hz, 1H), 2.24-2.09 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.58 (d, J=10.4Hz, 1H), 1.42 (d, J=22.1Hz, 1H), 1.29 (s, 9H), 0.46 (d, J=7.2Hz, 2H). MS (ESI, [M+Na]

+)  $m/z$ : 389.11.

[0112] 步骤9: (S)-5-(8-氯咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-4-羧酸叔丁酯(中间体7-10)

[0113] 反应瓶内加入化合物7-9 (12g) 0℃下, N<sub>2</sub>保护下, 加入乙酸乙酯(120mL), DMF (7.46mL), 后向体系中逐滴加入三氯氧磷(20.96mL) 室温反应。反应结束后, 将反应体系缓慢加入到氨水的冰水溶液中, 搅拌中和反应, 后用甲基叔丁基醚萃取反应体系, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后得到化合物7-10 (8.62g)

[0114] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.43 (d, J=5.0Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.44 (d, J=5.1Hz, 1H), 5.53 (dd, J=7.5, 4.3Hz, 1H), 2.34 (m, 2H), 2.07-1.78 (m, 2H), 1.58 (s, 2H), 1.16 (s, 9H), 0.72-0.47 (m, 2H). MS (ESI, [M+H]<sup>+</sup>)  $m/z$ : 349.14.

[0115] 步骤10: (S)-5-(1-溴-8-氯咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-4-羧酸叔丁酯(中间体7-11)

[0116] 反应瓶内, 依次加入化合物7-10 (3.9g)、DMF (40mL) 及NBS (2.69g), N<sub>2</sub>保护下, 将混合物加热60℃反应。反应结束后体系冷至室温, 向反应液中加入乙酸乙酯200mL和饱和硫代硫酸钠水溶液20mL, 后用饱和食盐水萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩柱层析纯化(展开剂: PE:EA=100:10) 得到化合物7-11 (1.51g)。MS (ESI, [M+Na]<sup>+</sup>)  $m/z$ : 451.03

[0117] 步骤11: (S)-5-(8-氨基-1-溴咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-4-羧酸叔丁酯(中间体7-12)

[0118] 耐压密封反应瓶中加入化合物7-11 (1.5g), 氨的异丙醇溶液, (32.5ml, 2mol/L), 将混合物加热至120℃。反应结束后冷却到室温, 浓缩后柱层析纯化(展开剂: PE:EA=100:10), 得到化合物7-12 (440mg)

[0119] MS (ESI, [M+H]<sup>+</sup>)  $m/z$ : 408.16。

[0120] 步骤12: (S)-5-(8-氨基-1-(2-氟-4-((4-(4-氟苯基)吡啶-2-基)氨基甲酰基)苯基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-4-羧酸叔丁酯(中间体7-13)

[0121] 反应瓶内加依次入化合物7-12 (150mg), 3-氟-N-(4-(4-氟苯基)吡啶-2-基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯甲酰胺 (210mg), 碳酸钾 (177mg), [1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡 (65.5mg)、然后加入1,4-二氧六环 (5mL), 水 (1mL), 氮气置换3-4次, 加热到80℃反应, 反应结束后冷却至室温, 加入饱和食盐水稀释体系, 并用DCM萃取2-3次。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化(展开剂: DCM:MeOH=100:3) 得到化合物7-13 (136mg)。

[0122] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.08 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.49 (d, J=5.2Hz, 1H), 8.05 (d, J=4.6Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.86 (dd, J=8.4, 5.3Hz, 2H), 7.76 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.62 (t, J=7.8Hz, 1H), 7.53 (d, J=5.3Hz, 1H), 7.41 (t, J=8.6Hz, 2H), 7.11 (d, J=5.1Hz, 1H), 6.20 (s, 2H), 5.46 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 1.99 (m, 2H), 1.59 (s, 2H), 1.04 (s, 9H), 0.63 (d, J=10.4Hz, 1H), 0.54 (d, J=10.1Hz, 1H). MS (ESI, [M+H]<sup>+</sup>)  $m/z$ : 638.56

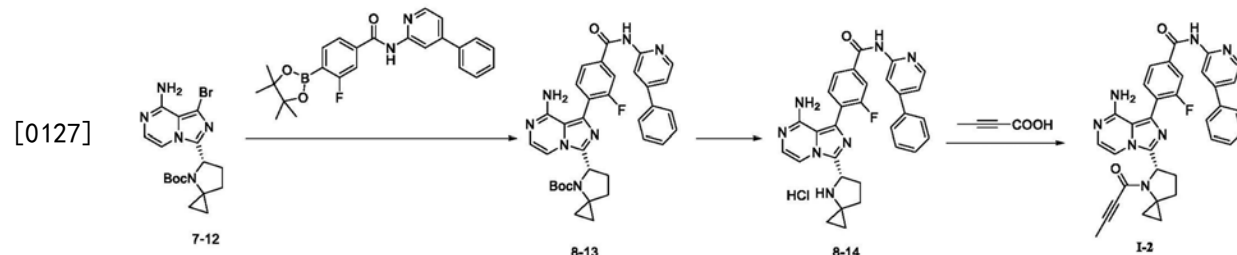
[0123] 步骤13: (S)-4-(8-氨基-3-(4-(丁-2-炔酰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-3-氟-N-(4-(4-氟苯基)吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物I-1)

[0124] 反应瓶内加入化合物7-13 (120mg) 加入盐酸的甲醇溶液 (20%-30%, 3mL), 50℃反应约5-10min后浓缩, 干燥到恒重得到化合物7-14; 继续向反应瓶内加入, HATU (79mg), 2-丁

炔酸 (15.82mg), 用DCM溶解后加入三乙胺 (0.105mL), 室温反应。反应结束后加入饱和碳酸氢钠稀释, 后用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化 (展开剂:DCM:MeOH=100:3) 得到化合物I-1 (125mg)

[0125]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.09 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.49 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 8.10-8.01 (m, 2H), 7.92-7.80 (m, 3H), 7.65 (t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.53 (d,  $J=5.3$ , 1H), 7.41 (t,  $J=8.7\text{Hz}$ , 2H), 7.22-7.09 (m, 1H), 6.21-6.00 (m, 2H), 5.93-5.68 (m, 1H), 2.49-2.31 (m, 2H), 2.07-1.93 (m, 2H), 1.92-1.81 (m, 2H), 1.81-1.74 (m, 1H), 1.59 (s, 2.4H), 0.72-0.55 (m, 1.6H). HR-MS (ESI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )  $m/z$ : 604.2297.

[0126] 实施例2: (S)-4-(8-氨基-3-(4-(丁-2-炔酰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-3-氟-N-(4-苯基吡啶-2-基)苯甲酰胺 (化合物I-2) 的制备



[0128] 步骤1: (S)-5-(8-氨基-1-(2-氟-4-((4-苯基吡啶-2-基)氨基甲酰基)苯基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-4-羧酸叔丁酯 (中间体8-13)

[0129] 向反应瓶内依次加入化合物7-12 (200mg), (2-氟-4-((4-苯基吡啶-2-基)氨基甲酰基)苯基)硼酸 (232mg), 碳酸钾 (136mg), [1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯 (87mg), 然后加入1,4-二氧六环 (5mL), 水 (1mL), 氮气置换3-4次, 加热到80°C反应, 反应结束后冷却至室温, 加入饱和食盐水稀释体系, 并用DCM萃取2-3次。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化 (展开剂:DCM:MeOH=100:3) 得到化合物8-13 (136mg)。

[0130]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.07 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.50 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 8.08-8.00 (m, 2H), 7.80 (d,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 7.74 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 7.66-7.56 (m, 4H), 7.55-7.46 (m, 2H), 7.10 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 6.03 (s, 2H), 5.49-5.41 (m, 1H), 2.41-2.10 (m, 2H), 2.07-1.90 (m, 2H), 1.60 (s, 2H), 1.03 (s, 9H), 0.68-0.49 (m, 2H). MS (ESI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )  $m/z$ : 620.34.

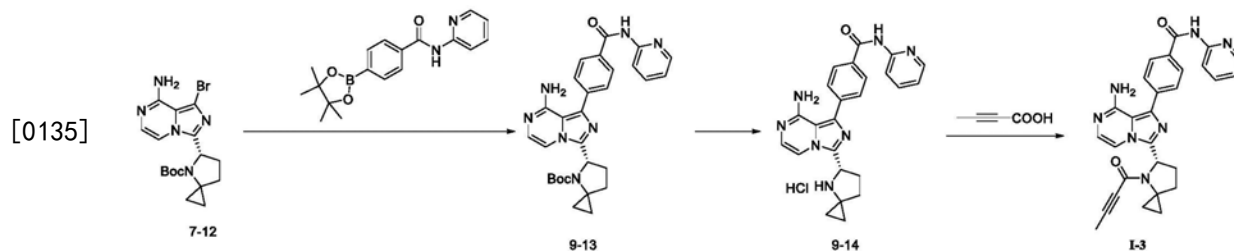
[0131] 步骤2: (S)-4-(8-氨基-3-(4-(丁-2-炔酰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-3-氟-N-(4-苯基吡啶-2-基)苯甲酰胺 (化合物I-2)

[0132] 反应瓶内加入化合物8-13 (180mg) 加入盐酸的甲醇溶液 (20%-30%, 3mL), 50°C反应约5-10min后浓酸, 干燥到恒重得到化合物8-14; 继续向反应瓶内加入, HATU (121mg), 2-丁炔酸 (24.42mg), 用DCM溶解后加入三乙胺 (118mg), 室温反应。反应结束后加入饱和碳酸氢钠稀释, 后用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化 (展开剂:DCM:MeOH=100:3) 得到化合物I-2 (105mg)

[0133]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.08 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.50 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 8.10-8.00 (m, 2H), 7.87 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 7.83-7.77 (m, 2H), 7.65 (t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.60-7.54 (m, 2H), 7.55-7.50 (m, 2H), 7.25-7.09 (m, 1H), 6.07 (d,  $J=24.7\text{Hz}$ , 2H), 5.95-5.68 (m, 1H), 2.48-2.30 (m, 2H), 2.05-1.93 (m, 2H), 1.94-1.82 (m, 2H), 1.81-1.74 (m, 1H), 1.59 (s,

2.4H), 0.73-0.54 (m, 1.6H). HR-MS (ESI,  $[M+H]^+$ )  $m/z$ : 586.2384.

[0134] 实施例3: (S)-4-(8-氨基-3-(4-(丁-2-炔酰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-N-(吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物I-3)的制备



[0136] 步骤1: (S)-5-(8-氨基-1-(4-(吡啶-2-基氨基甲酰基)苯基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-4-羧酸叔丁酯(中间体9-13)

[0137] 向反应瓶内加依次入化合物7-12 (200mg), N-(吡啶-2-基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯甲酰胺 (159mg), 碳酸钾 (243mg), [1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯 (35.8mg), 然后加入1,4-二氧六环 (5mL), 水 (1mL), 氮气置换3-4次, 加热到80 °C 反应, 反应结束后冷却至室温, 加入饱和食盐水稀释体系, 并用DCM萃取2-3次。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化(展开剂: DCM: MeOH = 100: 5) 得到化合物9-13 (178mg)。

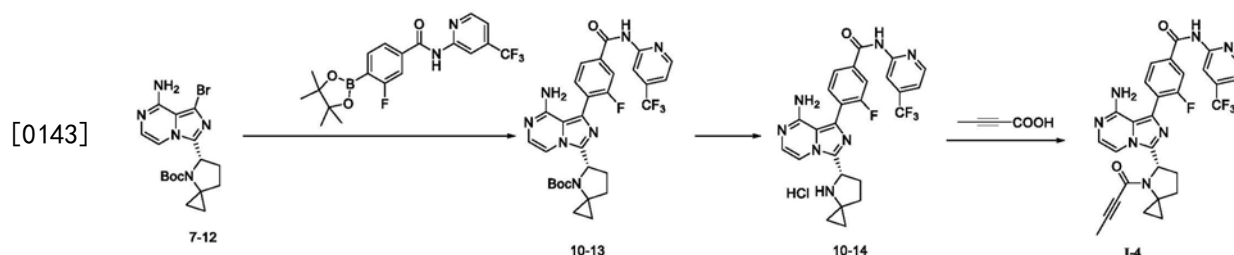
[0138]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.82 (s, 1H), 8.41 (d,  $J=4.8\text{Hz}$ , 1H), 8.23 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 8.20-8.08 (m, 2H), 7.87 (t,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H), 7.73 (d,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H), 7.19 (t,  $J=6.2\text{Hz}$ , 1H), 7.12 (dd,  $J=5.1, 1.6\text{Hz}$ , 1H), 6.13 (s, 2H), 5.45 (s, 1H), 2.43-2.11 (m, 2H), 2.08-1.86 (m, 2H), 1.61 (s, 2H), 1.03 (s, 9H), 0.73-0.47 (m, 2H). MS (ESI,  $[M+H]^+$ )  $m/z$ : 526.5.

[0139] 步骤2: (S)-4-(8-氨基-3-(4-(丁-2-炔酰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-N-(吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物I-3)

[0140] 反应瓶内加入化合物9-13 (166mg), 加入甲醇 (5mL), 加入盐酸的二氧六环溶液 (4M, 4mL), 50 °C 反应约1h后浓缩, 干燥到恒重得到化合物9-14; 继续向反应瓶内加入HATU (126mg)、2-丁炔酸 (25.4mg), 用DCM溶解后加入三乙胺 (0.169ml), 室温反应。反应结束后加入饱和碳酸氢钠稀释, 后用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化(展开剂: DCM: MeOH = 100: 3) 得到化合物I-3 (86mg)

[0141]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.83 (s, 1H), 8.51-8.37 (m, 1H), 8.23 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 8.18 (d,  $J=7.9\text{Hz}$ , 2H), 7.94-7.84 (m, 2H), 7.77 (d,  $J=8.3\text{Hz}$ , 2H), 7.26-7.07 (m, 2H), 6.36-6.01 (m, 2H), 5.99-5.64 (m, 1H), 2.48-2.32 (m, 2H), 2.05-1.95 (m, 2H), 1.95-1.89 (m, 1H), 1.90-1.73 (m, 2H), 1.60 (s, 2H), 0.75-0.54 (m, 2H). MS (ESI,  $[M+H]^+$ )  $m/z$ : 492.4.

[0142] 实施例4: (S)-4-(8-氨基-3-(4-(丁-2-炔酰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-3-氟-N-(4-(三氟甲基)吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物I-4)的制备





[0144] 步骤1: (S)-5-(8-氨基-1-(2-氟-4-((4-(三氟甲基)吡啶-2-基)氨基甲酰基)苯基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-4-羧酸叔丁酯(中间体10-13)

[0145] 向反应瓶内依次加入化合物7-12(200mg), 3-氟-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)-N-(4-(三氟甲基)吡啶-2-基)苯甲酰胺(215mg), 碳酸钾(243mg), [1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(35.4mg), 然后加入1,4-二氧六环(5mL), 水(1mL), 氮气置换3-4次, 加热到80°C反应, 反应结束后冷却至室温, 加入饱和食盐水稀释体系, 并用DCM萃取2-3次。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化(展开剂:DCM:MeOH=100:5)得到化合物10-13(248mg)。

[0146]  $^1\text{H}$  NMR(500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 11.44(s, 1H), 8.72(d,  $J=5.1\text{Hz}$ , 1H), 8.57(s, 1H), 8.09-7.94(m, 2H), 7.73(d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 7.62(t,  $J=7.7\text{Hz}$ , 1H), 7.58(d,  $J=5.1\text{Hz}$ , 1H), 7.11(d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 6.02(s, 2H), 5.55-5.27(m, 1H), 2.43-2.08(m, 2H), 2.07-1.82(m, 2H), 1.59(s, 2H), 1.03(s, 9H), 0.67-0.45(m, 2H). MS(ESI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )  $m/z$ :612.5.

[0147] 步骤2: (S)-4-(8-氨基-3-(4-(丁-2-炔酰基)-4-氮杂螺[2.4]庚烷-5-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-3-氟-N-(4-(三氟甲基)吡啶-2-基)苯甲酰胺(化合物I-4)

[0148] 反应瓶内加入化合物10-13(230mg), 加入甲醇(5mL), 加入盐酸的二氧六环溶液(4M, 4.7mL), 50°C反应约1h后浓缩, 干燥到恒重, 得到化合物10-14; 继续向反应瓶内加入HATU(148mg)、2-丁炔酸(29.7mg), 用DCM溶解后加入三乙胺(0.197ml), 室温反应。反应结束后加入饱和碳酸氢钠稀释, 后用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩后柱层析纯化(展开剂:DCM:MeOH=100:3)得到化合物I-4(110mg)

[0149]  $^1\text{H}$  NMR(500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 11.46(s, 1H), 8.72(d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 8.57(s, 1H), 8.09-7.98(m, 2H), 7.89-7.76(m, 1H), 7.66(t,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H), 7.62-7.52(m, 1H), 7.20-7.09(m, 1H), 6.19-5.95(m, 2H), 5.92-5.68(m, 1H), 2.48-2.29(m, 2H), 2.07-1.93(m, 2H), 1.93-1.70(m, 3H), 1.59(s, 2H), 0.73-0.53(m, 2H). MS(ESI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )  $m/z$ :578.4.

[0150] 试验例1: 体外活性

[0151] 1.1 BTK抑制活性筛选

[0152] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将350ng/ $\mu\text{L}$ 的BTK(WT)母液进行稀释, 按每孔加入6 $\mu\text{L}$  1.67 $\times$ 的0.0334ng/ $\mu\text{L}$ 的工作液(终浓度为0.02ng/ $\mu\text{L}$ ), 用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中, 使化合物终浓度为1000nM-0.244nM, 4倍梯度, 共7个浓度, 同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶, 加溶媒DMSO), 设2个复孔。酶与化合物或溶媒反应30min后, 将用激酶缓冲液配制好的5 $\times$ 的100 $\mu\text{M}$  ATP(终浓度为20 $\mu\text{M}$ )与5 $\times$ 的0.5 $\mu\text{M}$ 底物(终浓度为0.1 $\mu\text{M}$ , ULight-poly GT), 按1:1混合, 按每孔4 $\mu\text{L}$ 加入孔中; 封板膜封板以后, 室温反应2h后, 每孔加入5 $\mu\text{L}$  4 $\times$ 的40mM EDTA(终浓度为10mM), 室温5min, 再每孔加入5 $\mu\text{L}$  4 $\times$ 的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Ab), 室温孵育1小时; PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发620nm, 发射665nm), 采用四参数拟合, 计算IC50。

[0153] 1.2 BTK(C481S)抑制活性筛选

[0154] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、2mM DTT、1mM EGTA、0.01% Tween 20)将50ng/ $\mu\text{L}$ 的BTK(C481S)母液进行稀释, 按每孔加入6 $\mu\text{L}$  1.67 $\times$ 的0.25ng/ $\mu\text{L}$ 的工作液(终浓度为0.15ng/ $\mu\text{L}$ ), 用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中, 使化合物终浓度为

1000nM-0.244nM,4倍梯度,共7个浓度,同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶,加溶媒DMSO),设2个复孔。酶与化合物或溶媒反应30min后,将用激酶缓冲液配制好的5×的250μM ATP(终浓度为50μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM,ULight-poly GT),按1:1混合,按每孔4μL加入孔中;封板膜封板以后,室温反应2h后,每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM),室温5min,再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM,Ab),室温孵育1小时;PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发620nm,发射665nm),采用四参数拟合,计算IC50。

[0155] 1.3 EGFR(epidermal growth factor receptor)抑制活性筛选

[0156] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl<sub>2</sub>、2mM DTT、1mM EGTA、0.01%Tween 20)将50ng/μL的EGFR(WT)母液进行稀释,按每孔加入6μL 1.67×的0.01336ng/μL的工作液(终浓度为0.008ng/μL),用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中,使化合物终浓度为1000nM-0.48nM,4倍梯度,共7个浓度,同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶,加溶媒DMSO),设2个复孔。酶与化合物或溶媒反应10min后,将用激酶缓冲液配制好的5×的25μM ATP(终浓度为5μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM,ULight-poly GT),按1:1混合后按每孔4μL加入孔中;封板膜封板以后,室温反应2h后,每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM),室温5min,再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eu-anti-phospho-tyrosine antibody),室温孵育1小时,PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm,发射665nm),采用四参数拟合,计算IC50。

[0157] 1.4 TEC抑制活性筛选

[0158] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl<sub>2</sub>、2mM DTT、1mM EGTA、0.01%Tween 20)将50ng/μL的TEC母液进行稀释,按每孔加入6μL 1.67×的0.01336g/μL的工作液(终浓度为0.008ng/μL),用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中,使化合物终浓度为1000nM-0.24nM,4倍梯度,共7个浓度,同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶,加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后,将用激酶缓冲液配制好的5×的50μM ATP(终浓度为10μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM,ULight-poly GT),按1:1混合后按每孔4μL加入孔中;封板膜封板以后,室温反应2h后,每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM),室温5min,再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eu-anti-phospho-tyrosine antibody),室温孵育1小时;PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm,发射665nm),采用四参数拟合,计算IC50。

[0159] 1.5 ITK(Interleukin-2-inducible T-cell kinase)抑制活性筛选

[0160] 用激酶缓冲液(50mM HEPES、10mM MgCl<sub>2</sub>、2mM DTT、1mM EGTA、0.01%Tween 20)将50ng/μL的ITK母液进行稀释,按每孔加入6μL 1.67×的0.0835g/μL的工作液(终浓度为0.05ng/μL),用纳升加样仪将DMSO溶解的不同化合物加入到孔中,使化合物终浓度为1000nM-0.24nM,4倍梯度,共7个浓度,同时设空白对照空(不含酶)与阴性对照孔(含酶,加溶媒DMSO)。酶与化合物或溶媒反应30min后,将用激酶缓冲液配制好的5×的50μM ATP(终浓度为10μM)与5×的0.5μM底物(终浓度为0.1μM,ULight-poly GT),按1:1混合后按每孔4μL加入孔中;封板膜封板以后,室温反应2h后,每孔加入5μL 4×的40mM EDTA(终浓度为10mM),室温5min,再每孔加入5μL 4×的8nM检测试剂(终浓度为2nM, Eu-anti-phospho-tyrosine antibody),室温孵育1小时;PE Envision多功能酶标仪进行读板(激发320nm,发

射665nm),采用四参数拟合,计算IC50。

[0161] 1.6化合物对TMD-8细胞的增殖抑制作用

[0162] 取处于指数生长期状态良好的TMD-8细胞,收集细胞至离心管,低速台式离心机,1500转/min,离心3min,弃上清,加入2mL种板培养基(RPMI基础培养基+5%FBS+0.05mM 2-巯基乙醇)进行细胞重悬。使用细胞计数仪计数,取所需量的细胞调整密度至 $5 \times 10^4$ 个/mL,使用排枪接种于96孔板上,100 $\mu$ L/孔,置于37 $^{\circ}$ C、含5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的细胞培养箱中培养。培养24h后,使用纳升加样仪进行化合物加样,每一浓度设置2个复孔,以不加化合物的细胞作为阴性对照,72小时后加CCK-8,10 $\mu$ L/孔,4小时后,Envision酶标仪450nm处检测其吸光值,四参数分析,拟合量效曲线,计算IC50。

[0163] 上述测试结果见表1。

[0164] 表1

化合物编号	BTK(WT)	C481S-BTK	EGFR	ITK	TEC	TMD-8
	IC50(nM)					
<b>I-1</b>	2	72	947	459	11	0.89
<b>I-2</b>	1.2	43	292	137	6.3	0.49
<b>I-3</b>	2.2	>1000	>1000	>1000	6.3	8.9
<b>I-4</b>	1.1	243	>1000	802	3.3	6.1

[0166] 试验例2:小鼠体内药代动力学实验

[0167] ICR小鼠,体重18~22g,适应3~5天后,随机分组,每组9只,按10mg/kg剂量分别灌胃相关化合物,1mg/kg剂量分别静注相关化合物。受试动物(ICR小鼠)给药前禁食12h,给药后4h给食物,实验前后和实验过程中均自由饮水。灌胃给药后于0.25(15min)、0.5(30min)、1、2、4、6、8、10、24h眼眶取血约0.1mL,静注给药后于0.083(5min)、0.167(10min)、0.5(30min)、1、2、6、8、10、24h眼眶取血约0.1mL,每只小鼠采集3~4个时间点,每个时间点3只小鼠,采集全血置于含EDTA-K2和氟化钠离心管中,30min内转移到4 $^{\circ}$ C,4000rpm $\times$ 10min条件下离心分离血浆。收集全部血浆后立即于-20 $^{\circ}$ C保存待测。吸取20 $\mu$ L待测血浆样品和标曲样品,加入300 $\mu$ L含内标(地西洋20mg/mL)的乙腈溶液,振荡混匀5min,13000rpm离心10min,取上清80 $\mu$ L,加入80 $\mu$ L超纯水稀释,混匀,吸取1 $\mu$ L用于LC/MS/MS测定,记录色谱图。通过小鼠体内药物动力学实验评估本发明化合物的口服、静注暴露量,结果见表2。

[0168] 表2

参数	单位	I-4	I-4	I-3	I-3
		(ig-10mg/kg)	(iv-1mg/kg)	(ig-10mg/kg)	(iv-1mg/kg)
AUC(0-t)	μg/L*h	206	44.2	129	16.2
AUC(0-∞)	μg/L*h	206	44.2	129	16.2
MRT(0-t)	h	4.02	0.490	2.45	0.290
t1/2z	h	3.49	0.460	1.18	0.410
Vz	L/kg	NA	14.4	NA	34.8
CLz	L/h/kg	NA	21.6	NA	58.5
Tmax	h	1.000	NA	0.250	NA
Cmax	μg/L	46.0	NA	105	NA
绝对生物利用度 F%		46.6%		79.6%	

[0170] 注:NA表示未做检测。

[0171] 试验例3:体内药效研究

[0172] OCI-LY10(人弥漫大B细胞淋巴瘤)小鼠皮下移植瘤,浓度 $1 \times 10^8$ /ml\*0.1ml/只,在无菌条件下,接种于NOD-SCID小鼠右侧腋窝下(接种时接种部位剃毛)。皮下移植瘤接种后待肿瘤体积至100-300mm<sup>3</sup>左右将动物分组:

[0173] 模型组:溶媒6只;化合物I-3:50mg/kg,bid,i.g 6只。

[0174] 按10ml/kg的体积分别灌胃给予溶媒或药物,每日2次,连续给药23天。每周测2-3次瘤体积,同时称鼠重,记录数据;每日观察动物表现。待全部给药结束后,处死动物,剥瘤称重。

[0175] 使用下面公式计算肿瘤体积和抑瘤率:

[0176] 肿瘤体积(TV) = (长×宽<sup>2</sup>)/2。

[0177] 抑瘤率(tumor growth inhibition,TGI) = (1-治疗组瘤重量/模型组瘤重量) × 100%。

[0178] 表3化合物对小鼠OCI-LY10移植瘤的疗效

组别	d0 天 TV (mm <sup>3</sup> )	d21 天 TV (mm <sup>3</sup> )	d23 天 TV (mm <sup>3</sup> )	TGI (%)
	平均值±SD	平均值±SD	平均值±SD	
模型组	179±35	1752±210	2050±248	-
I-3 组	177±19	650±277	651±290	77.7%

[0180] 实验材料:

[0181] SCID小鼠,雌性,6-8周,北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司,许可证号SCXK(京)2016-0006,动物合格证编号:1100111911008632。

[0182] 弥漫大B细胞淋巴瘤细胞株OCI-LY10(上海拜力生物科技有限公司)。

[0183] OCI-LY10培养于IMDM培养基(GIBCO,美国),含20%胎牛血清FBS(GIBCO,美国)。培养于含5%CO<sub>2</sub>的℃培养箱。

[0184] 基质胶Matrigel(美国BD公司)。

[0185] 试验化合物的配制:无水乙醇:吐温80:NS(V/V)为10:10:80,4℃存贮。

[0186] 建立人弥漫大B细胞淋巴瘤OCI-LY10 SCID小鼠皮下移植瘤模型:

[0187] 收集对数生长期的肿瘤细胞,计数后重悬于IMDM培养基中,1:1加入Matrigel,调整细胞悬液浓度至 $4 \times 10^7$ /ml。在SCID小鼠右侧背部皮下接种肿瘤细胞, $4 \times 10^6$ /0.1ml/鼠。

[0188] 待肿瘤平均体积达到约 $167\text{mm}^3$ 时,选取肿瘤体积 $119.39\text{--}214.10\text{mm}^3$ 的动物,根据肿瘤平均体积采用随机法将动物分组。分组当日记为Day 0,并按照平均体重开始给药。实验期间每周测定两次动物体重和肿瘤大小。

[0189] 表4

动物数	实验组	给药途径	给药剂量 (mg/kg)	给药体积 (ml/kg)	给药浓度 (mg/ml)	给药频率
[0190] 8	溶媒	灌胃(i.g.)	NA	10	NA	BID×21
8	I-4	灌胃(i.g.)	25	10	2.5	BID×21

[0191] 抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增值率T/C(%),计算公式为: $T/C(\%) = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ 。(T<sub>RTV</sub>:治疗组RTV;C<sub>RTV</sub>:溶媒对照组RTV);

[0192] 相对肿瘤体积(relative tumor volume,RTV),计算公式为: $RTV = V_t/V_0$ 。其中V<sub>0</sub>为分笼给药时(即Day 0)测量所得肿瘤体积,V<sub>t</sub>为每一次测量时的肿瘤体积。

[0193] 荷瘤动物的体重变化(%)计算如下:(测量时体重-分组时体重)/分组时体重×100%。

[0194] 实验结果见表5。

[0195] 表5

动物数	实验组	剂量 mg/kg	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> ,Mean±SEM)		T/C (%) Day 21	肿瘤重量 (g, Mean±SEM)
			Day 0	Day 21		
[0196] 8	溶媒	NA	166.96 ± 10.11	652.92 ± 35.66	N/A	0.294 ± 0.027
8	I-4	25	168.46 ± 9.55	72.18 ± 7.77***	10.95%	0.081 ± 0.009***

[0197] \*\*\*:p<0.001与溶媒组相比。