



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112480109 B

(45) 授权公告日 2022.04.01

(21) 申请号 202011278827.0

A61K 31/4985 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.16

审查员 闫娟娟

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112480109 A

(43) 申请公布日 2021.03.12

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72) 发明人 陈建忠 李刚剑 潘有禄

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司 33200

代理人 赵杭丽

(51) Int. Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

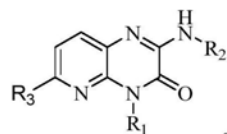
权利要求书2页 说明书15页

(54) 发明名称

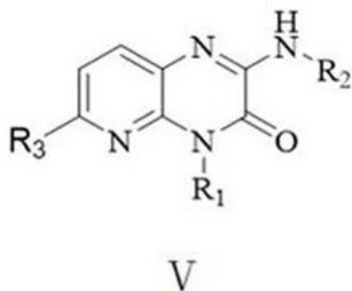
吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮类衍生物及其用途

(57) 摘要

本发明提供吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮类衍生物及其用途,所述吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮类衍生物的结构通式为式V,包括其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或晶型。本发明提供的化合物是成纤维细胞生长因子受体(FGFR)的活性配体,研究表明结构V所示化合物对KATOIII胃癌细胞(FGFR2扩增)和Huh-7肝癌细胞(FGFR4过表达)具有较好的抗增殖活性,作为FGFR抑制剂在制备治疗由FGFR异常激活导致肿瘤相关疾病的药物中应用。结构通式V如下:



1. 一种吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮类衍生物及其药学上可接受的盐,其特征在于,所述衍生物的结构通式V如下:



其中,

R_1 选自2-乙酸乙酯基、2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基;

R_2 选自3,5-二甲氧基苯基、2,6-二氯苯基、3,4,5-三甲氧基苯基、2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基;

R_3 选自氯、苯胺基、4-(4-甲基哌嗪)苯胺基、2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基。

2. 根据权利要求1所述的一种吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮类衍生物及其药学上可接受的盐,其特征在于,选自下述化合物:

(1) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-苯胺基-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(2) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(4) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(6) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(7) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-苯胺基-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(8) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(9) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(10) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(11) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(12) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(13) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(16) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-苯胺基-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮;

(17) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮。

3. 根据权利要求1所述的一种吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮类衍生物及其药学上可接受的盐,其特征是,所述的药学上可接受的盐为通式V表示的化合物与有机酸或无机酸形成的盐,或与卤烷形成的季铵盐,所述有机酸选用丙酸、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,所述无机酸选用盐酸、磷酸、硫酸、氢氟酸、氢溴酸,所述卤烷为氟、氯、溴或碘代烷烃。

4. 根据权利要求1所述的一种吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-3(4*H*)-酮类衍生物及其药学上可接受的盐在制备治疗由FGFR异常激活导致肿瘤相关疾病的药物中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述肿瘤相关疾病为胃癌、肝癌。

吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮类衍生物及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体地涉及一种以吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮为母核的化合物及其在药学上可接受盐、溶剂化物、水合物或晶型、及其这类化合物在制备FGFR异常激活导致肿瘤相关疾病的药物中的应用。

背景技术

[0002] 目前,恶性肿瘤是对人类生命产生严重威胁的重要因素之一。尽管近年来肿瘤检测和治疗方法和技术不断进步,但许多类型肿瘤的患者生存率仍然较低。因此,抗肿瘤研究在生命科学里仍然是一个极具挑战和意义重大的领域。受体酪氨酸激酶(RTK)是蛋白酪氨酸激酶(PTK)的一个分支,其结构通常包括胞外结合特殊配体的区域、跨膜区域和胞内激酶区域。RTK通过其胞外区域与相应的配体结合,配体结合后引起激酶低聚和胞内区域的酪氨酸残基磷酸化,继而刺激一系列细胞内信号级联反应,引起细胞内的许多生物化学反应而调控细胞的行为,如增殖、分化、凋亡等。受体型酪氨酸激酶包括表皮生长因子受体(EGFR)、血小板生长因子受体(PDGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、胰岛素受体(InsR)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)等。其中,FGFR与肿瘤的发生发展密切相关,已成为抗肿瘤药物研发的重要靶标蛋白。

[0003] FGFR在体内的相应配体是成纤维细胞生长因子(FGF),共有22种,作为配体的FGF与FGFR相互作用,传导细胞信号。成纤维细胞生长因子受体(FGFR)是一类高度保守的跨膜受体酪氨酸激酶,其主要包括5种FGFR,分别为4种高保守单跨膜的酪氨酸激酶受体 FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, 和虽能结合FGF却没有胞内激酶区域的FGFR5。FGFR 结构由三个重要的部分组成:(1)胞外区域,其由3个免疫球蛋白IgI, IgII, IgIII组成,其中Ig II 和Ig III构成了FGF结合的富含丝氨酸的区域;(2)单通道跨膜区域;(3)两个胞内激酶区域。

[0004] FGF作为分泌类糖蛋白通常存在于细胞外基质或者通过硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HPSGs)存在细胞表面。当需要信号传导时,FGF被肝素酶、蛋白酶和特异结合FGF的蛋白从细胞基质中释放出来,摆脱束缚的FGF配体在辅助因子HPSG的帮助下结合到FGFR上,形成三元复合物FGF-FGFR-HPSG,引导FGFR的二聚化,紧接着实现FGFR胞内靠近细胞膜的激酶区域的酪氨酸残基磷酸化。激活的FGFR主要通过两种途径实现信号的下游传导:(a)激活的FGFR磷酸化FGFR底物2(FRS2)、招募生长因子受体结合蛋白(GRB2),接着招募鸟嘌呤核苷酸交换因子,引起丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的激活;(b)生长因子受体结合蛋白(GRB2)激活的依赖信号通路。另外,磷脂酶C- γ (PLC- γ)可以不依赖大鼠肉瘤蛋白(Ras)结合到FGFR激酶区域的磷酸化酪氨酸上,进而水解磷脂酰肌醇二磷酸(PIP₂)为第二信使肌醇三磷酸(IP₃)和二酰基甘油(DAG),IP₃可以引起胞内钙离子释放激活下游信号通路,DAG激活蛋白激酶C(PKC),最终信号汇入MAPK通路中实现细胞的应答。需要指出的是,激活的FGFR也可以通过信号传导及转录激活蛋白(STAT)信号通路传导信号。FGF/FGFRs信号通路在体内许多生理生化过程中起到重要的作用,比如胚胎发育、体内代谢内环境平衡、组织修复和伤口愈合、血管生成以及一系列细胞的功能包括增殖、分化、凋亡和迁移等。

[0005] 然而研究表明FGF/FGFR信号通路的异常在许多种类型的癌症中与肿瘤的发生发展和抗肿瘤药物治疗过程的耐药性密切相关。在肿瘤的发生发展过程中,依赖配体和不依赖配体的FGF/FGFR信号异常导致肿瘤的可能机制为基因改变(受体扩增、突变和染色体异位)、自分泌和旁分泌信号、血管生成、上皮细胞间质转化和获得性耐药。FGFR1-4的扩增、突变和染色体异位在多种类型的肿瘤中被检测到,如乳腺癌、肺癌、膀胱癌、胃癌、前列腺癌等。

[0006] 由于FGF/FGFR信号通路的异常与肿瘤密切相关,科学家们已经研究了许多靶向FGF/FGFR的治疗药物,如小分子激酶抑制剂、单克隆抗体、FGF配体陷阱等,其中许多已经进入临床实验阶段。小分子激酶抑制剂是目前研究最多的一类,又可以分为多激酶靶点 FGFR抑制剂、FGFR1/2/3、FGFR4抑制剂、pan-FGFR抑制剂。多激酶靶点FGFR抑制剂通常对多个种类的酪氨酸激酶均具有很好的抑制作用,这就可能增加此类抑制剂的副作用风险,如高血压、高磷血症等。这里我们只介绍具有代表性的选择性的FGFR抑制剂。AZD4547和Infigratinib (BGJ398) 是FGFR1/2/3抑制剂,BLU9931和H3B-6527为FGFR4抑制剂,LY2874455、Erdafitinib (JNJ-42756493) 和PRN1371是pan-FGFR抑制剂。这类抑制剂通常含有一个含氮杂环母核结构,与三磷酸腺苷(ATP)结合口袋铰链区形成氢键,如吡唑、嘧啶、苯并嘧啶、苯并吡啶等,疏水的基团占据口袋着中的疏水空腔,如二甲氧基苯基、2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基等,亲水性基团伸向口袋外端的溶剂区,如哌嗪、羟基等。如果要获得不可逆的结合作用,通常需引入丙烯基朝向半胱氨酸,以期获得共价结合作用。

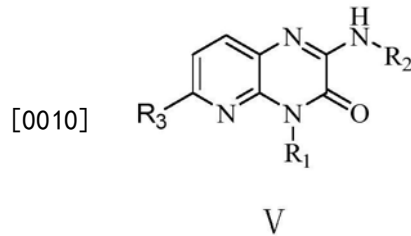
[0007] 选择性的FGFR抑制剂目前有许多已经进入临床实验阶段。AZD4547已经完成针对含有FGFR1扩增的鳞状细胞肺癌患者的临床I期实验,针对含有FGFR1扩增的晚期HER⁺乳腺癌和含有FGFR2扩增的胃食管癌患者的临床II期实验也已经完成,另外还有许多临床实验正在进行中(ClinicalTrials.gov,NCT01213160,NCT01824901)。Infigratinib (BGJ398) 也已经完成了针对含有FGFR改变的晚期实体瘤临床I期实验和针对FGFR2改变的晚期或转移性胆管癌的临床II期实验,此外,还有许多项临床实验正在进行中(ClinicalTrials.gov,NCT01004224,NCT01928459,NCT01975701,NCT02150967,NCT02160041,NCT02706691)。H3B-6527目前正在I临床实验,用于治疗晚期肝细胞癌和肝内胆管癌(ClinicalTrials.gov,NCT02834780),并且于2017被美国FDA批准为用于肝细胞癌的孤儿药。LY2874455也已经完成了对晚期实体瘤的I期临床实验(ClinicalTrials.gov,NCT01212107),并且对实体瘤患者具有好的治疗活性和耐受性,LY2874455联合Merestinib对复发性或者难治性急性骨髓性白血病的临床I期实验正在进行(ClinicalTrials.gov,NCT03125239)。PRN1371目前正在进行关于实体瘤治疗的I期临床实验(ClinicalTrials.gov,NCT02608125)。特别值得指出的是,2019年4月,Erdafitinib 作为第一个FGFR选择性抑制剂被美国FDA批准用于治疗局部晚期或者转移性尿路上皮癌成年患者,另外还有许多关于Erdafitinib的临床实验正在进行(ClinicalTrials.gov,NCT02952573,NCT03155620,NCT03210714,NCT02699606,NCT03238196,NCT02421185,NCT02365597)。

[0008] 临床上治疗癌症的过程中,肿瘤细胞可通过多种方式产生耐药,如改变药物靶标、外排药物、修复DNA损伤、抑制细胞死亡等。许多证据已经表明FGF/FGFR信号通路异常与许多抗肿瘤药物治疗过程中的耐药息息相关。随着FGFR抑制剂临床实验的进行与后续相关药

物的上市,肿瘤对选择性FGFR抑制剂的耐药也是不可避免的。因此,迫切需要持续开发出新的选择性FGFR抑制剂来满足当前的临床需求。

发明内容

[0009] 本发明的第一个目的是提供一种吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮类衍生物及其药学上可接受的盐,所述衍生物的结构通式V如下:



[0011] 其中:

[0012] R_1 选自2-乙酸乙酯基、2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基;

[0013] R_2 选自3,5-二甲氧基苯基、2,6-二氯苯基、3,4,5-三甲氧基苯基、2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基;

[0014] R_3 选自氯、苯胺基、4-(4-甲基哌嗪)苯胺基、2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基;

[0015] 所述衍生物包括其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或晶型。

[0016] 优选具体化合物如下:

[0017] (1) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-苯胺基-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0018] (2) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0019] (3) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0020] (4) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0021] (5) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0022] (6) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0023] (7) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-苯胺基-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0024] (8) 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0025] (9) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0026] (10) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0027] (11) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(3,4,5-三甲氧基

苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0028] (12) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0029] (13) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0030] (14) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-苯胺基-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0031] (15) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-苯胺基-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

[0032] (16) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-苯胺基-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮;

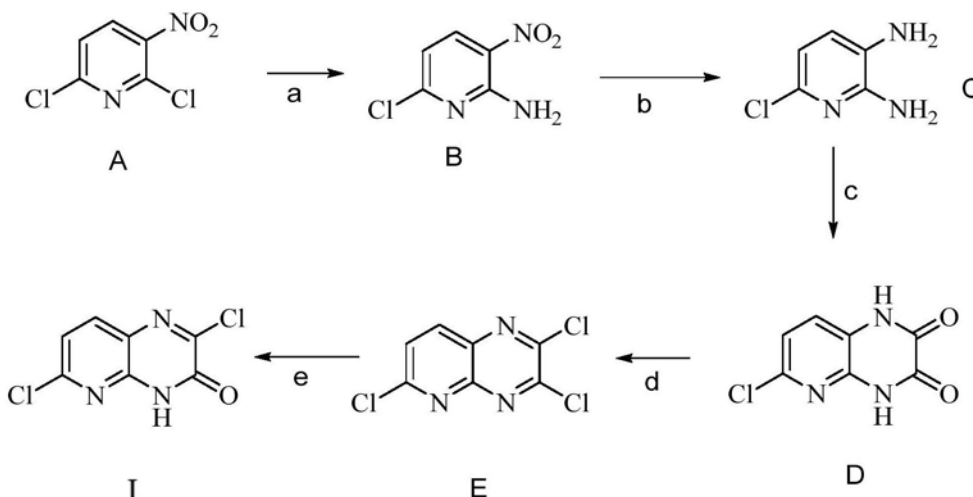
[0033] (17) 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮。

[0034] 及其上述具体化合物在药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或晶型。

[0035] 本说明书中所述“药学上可接受的盐”具体的可列举本发明所提供的化合物与丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸等有机酸形成的盐;或与盐酸、磷酸、硫酸、氢氟酸、氢溴酸等无机酸形成盐;或与卤烷形成的季铵盐,所述卤烷为氟、氯、溴或碘代烷烃。

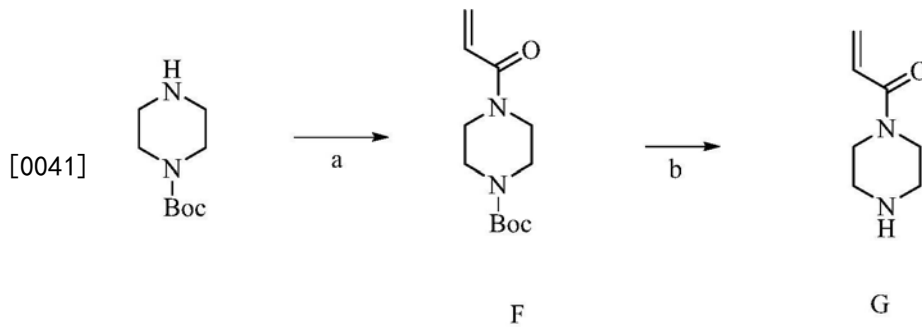
[0036] 本发明的第二个目的是提供一种吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮类衍生物及其药学上可接受盐、溶剂化物、水合物或晶型的制备方法,下面是本发明的一个优选的实施方案,包括以下技术方案:路线1、路线2、路线3、路线4及其盐、溶剂化物、水合物或晶型的制备方法。

[0037] (1) 路线1,式I化合物的制备方法:



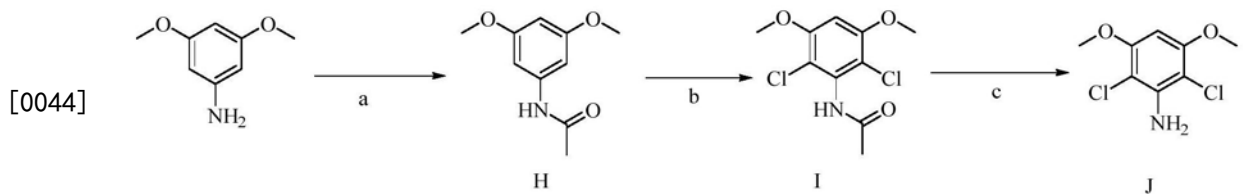
[0039] 反应条件:a) 1、氨气,乙醇,3小时;过夜反应,室温;b) 氯化铵,铁粉,乙酸乙酯/水,室温;c) 草酸,浓盐酸/水,100°C;d) 二氯亚砷,N,N-二甲基甲酰胺,二氯甲烷(DCM),45°C,6小时;e) 氢氧化锂,四氢呋喃/水(5:2),65°C。

[0040] (2) 路线2,化合物G的制备方法:



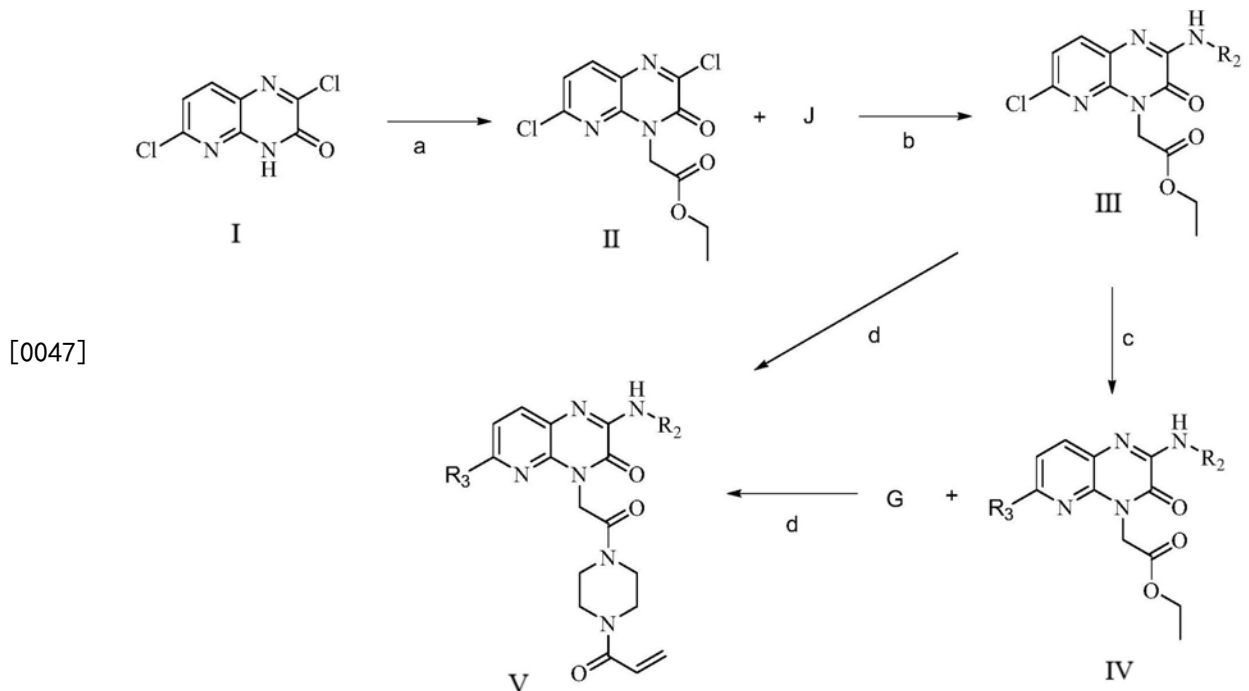
[0042] 反应条件:a) 丙烯酰氯, 二氯甲烷, 三乙胺, 0°C-室温;b) 三氟乙酸/二氯甲烷(1:1), 室温, 30分钟。

[0043] (3) 路线3, 化合物J的制备方法:



[0045] 反应条件:a) 乙酸酐, 甲苯, 25°C;b) SO_2Cl_2 , 乙腈, 0°C;c) 2N氢氧化钾, 乙醇。

[0046] (4) 路线4, 式V化合物的制备方法:



[0048] 反应条件:a) 溴乙酸乙酯, 碳酸钾, N,N-二甲基甲酰胺, 室温;b) $\text{R}_2\text{-NH}_2$, 醋酸钡, 4,5-双二苯基磷-9,9-二甲基氧杂蒽, 碳酸钾, 氩气, 1,4-二氧六环, 90°C;c) $\text{R}_3\text{-NH}_2$, 醋酸钡, 4,5-双二苯基磷-9,9-二甲基氧杂蒽, 叔丁醇钾, 氩气, 甲苯, 110°C;d) 氢氧化锂, 四氢呋喃/水, 室温;1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐, N,N-二异丙基乙胺, N,N-二甲基甲酰胺, 室温。

[0049] 其中, R_2 、 R_3 与上述通式V中的定义相同。

[0050] 药学上可接受盐、溶剂化物、水合物或晶型的制备:

[0051] 1.将化合物V溶于无水甲醇中,冰浴下加入适量的酸如丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸等有机酸,或盐酸、磷酸、硫酸、氢氟酸、氢溴酸等无机酸,旋干溶剂,得到其可药用酸加成盐;或将化合物V溶于无水乙醇中,加入等当量的氢氧化钠、碘化钾及卤代烃如碘甲烷,加热回流过夜,粗产物经丙酮重结晶纯化得到化合物V在药学上可接受的季铵盐。

[0052] 2.将化合物V溶于酸的水溶液中,向该体系中加入非酸性有机溶剂,通过结晶方法得到化合物V的溶剂化物或水合物。其中适宜的酸选自盐酸、硫酸、磷酸、柠檬酸、醋酸、氢溴酸、硝酸、甲酸、酒石酸、苯甲酸、苯乙酸、马来酸、草酸、三氟乙酸;非酸性有机溶剂选自乙醇、甲醇、乙腈、乙酸乙酯、四氢呋喃、乙醚、石油醚、异丙醇、正丁醇、N,N-二甲基甲酰胺。

[0053] 本发明的第三个目的是提供一种吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮类衍生物及其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或晶型在制备治疗由FGFR异常激活导致肿瘤相关疾病的药物中的应用。所述肿瘤相关疾病胃癌、肝癌等。

[0054] 本发明的第四个目的是提供一种吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮类衍生物及其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或晶型的药物组合物,并可进一步包含赋形剂、稀释剂及载体。本发明的化合物可以以未溶剂化的和与药学上可接受的溶剂(如水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇等)溶剂化的形式存在。通常,对于本发明的目的,认为溶剂化的形式等同于未溶剂化的形式。本发明的药物组合物可包括一种或多种本发明的化合物,典型的配方是通过混合本发明的化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物与载剂、赋形剂或稀释剂进行制备。适宜的载剂、赋形剂或稀释剂是本领域技术人员所熟知的,包括诸如碳水化合物、蜡、水溶性及/或可膨胀性聚合物、亲水性或疏水性物质、明胶、溶剂、水等物质。所述药物的剂型选用固体制剂或液体制剂,具体的为片剂、胶囊剂、散剂、溶液剂、糖浆剂、混悬剂或气雾剂。

[0055] 本发明的第五个目的是提供了FGFR2和FGFR4增殖活性测试的方法,该方法包括将结构V所示化合物对KATOIII胃癌细胞(FGFR2扩增)和Huh-7肝癌细胞(FGFR4过表达)的抗增殖活性,该化合物一般是FGFR抑制剂。

[0056] 本发明提供的化合物是FGFR抑制剂,该类化合物包括具有通式V所示结构的化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或晶型。本发明化合物是FGFR抑制剂,可制备治疗由FGFR异常激活引起的肿瘤相关疾病的药物,具有很好的药物开发前景。

具体实施方式

[0057] 本发明结合实施例作进一步的说明,具体实施例的目的是进一步说明本发明内容但不意味着对本发明进行限制。

[0058] 本发明具体实施例中使用的初始原料、反应试剂等均为市售产品。实施例30列举了化合物V-17的盐酸盐、季铵盐、一水合物的制备方法,其他化合物可以参考该方法,也可以采用本领域常用的方法形成其他盐。

[0059] 实施例1 6-氯-3-硝基吡啶-2-胺(B)的合成方法

[0060] 取原料2,6-二氯-3-硝基吡啶(A)9.2g于瓶中,加入200mL无水乙醇,在0℃条件下,通氨气3小时,反应体系由澄清变浑浊,颜色为黄棕色。通气完后,室温反应过夜。次日,将反应液倒入200mL水中,抽滤,滤饼用200mL冰水和200mL石油醚洗涤,得黄色固体B(15.2g),

产率88.0%。测得熔点:186-187℃,文献报道为:190-192℃。

[0061] 实施例2 6-氯吡啶-2,3-二胺(C)的合成方法

[0062] 将中间体B(1g,1.0equiv.)和氯化铵(620.6mg,2.0equiv.)称取到瓶中,加入乙酸乙酯(10mL)和水(6mL),随后加入铁粉(972.7mg,3.0equiv.),室温下反应24小时后,薄层色谱法(TLC)检测,反应完全。用硅藻土抽滤,水和乙酸乙酯洗涤滤饼,收集有机层,水层用乙酸乙酯萃取2次,合并有机层,干燥过滤,蒸干过柱,洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=50:1至30:1,得780.0mg棕色固体,产率93.7%。测得熔点:117-119℃,文献报道为:120-122℃。其中,乙酸乙酯的体积是原料质量的8-12倍,水的体积是原料质量的4-8倍。

[0063] 实施例3 6-氯-1,4-二氢吡啶并[2,3-b]吡嗪-2,3-二酮(D)的合成方法

[0064] 称取中间体C(776.4mg,1.0equiv.)和二水合草酸(1.0g,1.5equiv.)于瓶中,加入8 mL水和0.8mL浓盐酸,升温至100℃,反应6小时后停止。降温后,抽滤得到968.0mg中间体D,产率90.6%。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆): δ 12.53(s,1H),12.07(s,1H),7.47(d,J=8.1Hz,1H),7.23-7.17(m,1H)。

[0065] 实施例4 2,3,6-三氯吡啶并[2,3-b]吡嗪(E)的合成方法

[0066] 将中间体D(1.3g,1.0equiv.)加入瓶中,加入反应溶剂二氯甲烷(7mL),随后加入二氯亚砷(0.95mL,2.0equiv.),在氮气保护下,缓慢加入N,N-二甲基甲酰胺。然后升温至45℃,反应6小时后停止。加入冰水淬灭反应后,二氯甲烷萃取3次,饱和食盐水洗涤有机层3次,干燥,过滤,蒸干,过柱得1.4g略带粉色固体中间体E,产率90.7%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 8.37(d,J=8.7Hz,1H),7.79(d,J=8.7Hz,1H)。

[0067] 实施例5N-丙烯酰基-N-Boc-哌嗪(F)的合成

[0068] 称取原料1-Boc-哌嗪(200.0mg,1equiv.)于瓶中,加入无水的二氯甲烷2mL,随后加入三乙胺(297.5 μ L,2equiv.),将反应瓶放入冰浴中冷却,随后慢慢加入烯丙酰氯(130.2 μ L,1.5equiv.)。加毕,将反应体系移至室温继续反应过夜。次日,加水淬灭后,二氯甲烷萃取三次,干燥,过滤,蒸干,过柱得白色固体206.1mg,产率80.2%,熔点:75-76℃。¹H NMR(500 MHz,氯仿-d) δ 6.56(dd,J=16.8,10.6Hz,1H),6.32(dd,J=16.8,1.8Hz,1H),5.73(dd,J=10.6,1.8Hz,1H),3.66(s,2H),3.54(s,2H),3.48-3.42(m,4H),1.48(s,10H)。

[0069] 实施例6N-丙烯酰基哌嗪(G)的合成

[0070] 称取中间体F(56.1mg,0.23mmol)于瓶中,加入干燥的二氯甲烷(0.5mL)溶解,然后加入与二氯甲烷同体积的三氟乙酸(0.5mL),室温下反应30分钟,旋蒸掉大部分三氟乙酸,二氯甲烷溶解后,用饱和食盐水洗涤3次,蒸干过柱,得固体中间体G 25.1mg,产率 77.8%,熔点:54-56℃。后续做量大的反应也可以直接旋蒸干三氟乙酸,将产物储存于-20℃,用时取出。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 10.01(s,1H),6.52(dd,J=16.7,10.5Hz,1H),6.35(dd,J=16.7,1.7Hz,1H),5.81(dd,J=10.5,1.7Hz,1H),3.91(s,4H),3.23-3.17(m,4H)。¹³C NMR(126MHz,氯仿-d): δ 165.55,129.98,126.13,43.32。

[0071] 实施例7中间体2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺(J)的合成

[0072] 称取3,5-二甲氧基苯胺(3.5g,1equiv.)于瓶中,加入溶剂甲苯20ml,缓慢滴入乙酸酐2.5ml(1.05equiv.),维持反应体系在35-45℃。加完乙酸酐后,室温反应20小时。反应完成后,加入适量石油醚,抽滤,再用适量石油醚洗涤滤饼,干燥滤饼,得到粗产物N-(3,5-二甲氧基苯基)乙酰胺(H)4.4g,产率91.5%,测得熔点:155-156℃,文献值:157℃。

[0073] 在0℃氮气保护条件下,向含有N-(3,5-二甲氧基苯基)乙酰胺(4.4g)的乙腈(60ml)溶液中滴入二氯亚砷(2.0equiv.)。加毕,在冰浴中继续反应1小时,停止反应。缓慢加入饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应后,抽滤,滤饼用40ml水洗涤。滤液中加入40ml饱和碳酸氢钠溶液后,用乙酸乙酯萃取,TLC检测,含有少量产物,弃去。干燥滤饼得到N-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基)(I)粗品2.3g,产率39.3%。

[0074] 向含有N-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基)(I)(2.3g,1equiv.)的乙醇(45ml)溶液中加入2N氢氧化钾(24.5ml),升温至90℃,反应44小时。反应完成降至室温后,0℃冷却1小时析出更多固体,抽滤,先用冷的乙醇/水(1:1)洗涤,再用冷水洗涤至水显中性,干燥得2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺1.7g,白色固体,产率86.8%,可直接用于下一步反应。

[0075] 实施例8 2,6-二氯吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(I)的合成过程

[0076] 将中间体E(1.2g,1.0equiv.)加入到瓶中,加入反应溶剂四氢呋喃和水,比例为5:2,再加入氢氧化锂(245.2mg,2.0equiv.),随后升温至65℃,反应9小时后,薄层色谱法(TLC)检测,反应完毕,加入四氢呋喃和饱和食盐水,分层后得到四氢呋喃有机层,水层用四氢呋喃萃取多次,合并有机层,干燥过滤蒸干得到1.0g中间体I,产率90.4%。¹H NMR(500MHz,二甲基亚砷-d₆): δ 13.51(s,1H),8.21(d,J=8.4Hz,1H),7.47(d,J=8.3Hz,1H)。

[0077] 实施例9 2,6-二氯-4-(2-乙酰乙酯基)-3-羰基-4(3H)-吡啶并[2,3-b]吡嗪(II)的合成过程

[0078] 称取中间体I(1.2g,5.6mmol,1.0equiv.)于瓶中,加入溶剂N,N-二甲基甲酰胺(15mL),并加入碳酸钾(921.9mg,6.7mmol,1.2equiv.),随后加入溴乙酸乙酯(740.0 μ L,0.9mmol,6.7equiv.),室温下反应3小时后,薄层色谱法(TLC)检测已反应完全,加入饱和氯化钠溶液淬灭反应后,乙酸乙酯萃取3次,有机层用饱和食盐水洗涤3次,干燥,过滤,蒸干,过柱,洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯,得900.0mg中间体II,产率53.6%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 8.00(d,J=8.3Hz,1H),7.28(d,J=8.3Hz,1H),5.12(s,2H),4.20(q,J=7.1Hz,2H),1.25(t,J=7.1Hz,3H)。

[0079] 实施例10氨基取代的乙基-2-(6-氯-2-氨基-3-氧吡啶[2,3,b]吡嗪-4(3H)-基)-乙酯(III)的合成过程

[0080] 称取中间体II(1equiv.)、胺类(1.02equiv.)、醋酸钨(5mol%)、4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(10mol%)、碳酸钾(1.5equiv.)于施伦克反应管中,用橡胶塞塞住瓶口,抽真空氩气保护4次,随后加入反应溶剂二氧六环,90℃反应1小时,停止反应降温,薄层色谱法(TLC)检测,加入适量乙酸乙酯于反应液中,随后用饱和食盐水洗涤1次,再用乙酸乙酯萃取水相2次,合并有机层,干燥,过滤,蒸干,过柱,得重要中间体III。

[0081] 实施例11氨基和芳基取代的乙基-2-(6-氯-2-氨基-3-氧吡啶[2,3,b]吡嗪-4(3H)-基)-乙酯(IV)的合成过程

[0082] 取中间体III(1equiv.)、胺类(1.5equiv.)、醋酸钨(5mol%)、4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(10mol%)、叔丁醇钾(1.5equiv.)于Schlenk反应管中,用橡胶塞塞住瓶口,抽真空氩气保护4次,随后加入反应溶剂二氧六环,90℃反应1小时,停止反应降温,薄层色谱法(TLC)检测,加入适量乙酸乙酯于反应液中,随后用饱和食盐水洗涤1次,再用乙酸乙酯萃取水相2次,合并有机层,干燥,过滤,蒸干,过柱,得重要中间体IV。

[0083] 实施例12取代的4-(2-(4-丙基哌嗪-1-基)-2-乙羰基)-2-氨基吡啶[2,3,b]吡

嗪-3 (4H)-酮(V)的合成过程

[0084] 称取重要中间体IV (1.0equiv.)于瓶中,加入四氢呋喃和水,比例为4:1。随后,称取氢氧化锂(1.5equiv.),加入到反应溶液中,室温下反应,薄层色谱法(TLC)检测反应,约6h完成。然后旋蒸掉四氢呋喃,加入适量的水,用1N盐酸调节pH至2-3,乙酸乙酯萃取,干燥,过滤,蒸干,得到中间体酸类化合物。可不过柱纯化直接投下一步反应。若纯化,可用乙酸乙酯石油醚体系,额外加入乙酸,作为洗脱剂。

[0085] 称取上一步得到的中间体酸类化合物(1.0equiv.)、中间体G(1.5equiv.)、1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐(1.5equiv.)于瓶中,加入反应溶剂N,N-二甲基甲酰胺(1mL),随后加入N,N-二异丙基乙胺(1.5equiv.),室温条件下反应过夜,加水淬灭,乙酸乙酯萃取3次,有机层用饱和食盐水洗涤3次,干燥,过滤,蒸干,过柱,得到目标产物V。

[0086] 实施例13

[0087] 化合物4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-2),4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-5),4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-6),4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-8)的合成过程

[0088] 合成中间体III后,称取部分III(1.0equiv.)于瓶中,加入四氢呋喃和水,比例为4:1。随后,称取氢氧化锂(1.5equiv.),加入到反应溶液中,室温下反应,薄层色谱法(TLC)检测反应,约6h完成。然后旋蒸掉四氢呋喃,加入适量的水,用1N盐酸调节pH至2-3,乙酸乙酯萃取,干燥,过滤,蒸干,得到中间体含羧基类化合物。可不过柱纯化直接投下一步反应。若纯化,可用乙酸乙酯石油醚体系,额外加入乙酸,作为洗脱剂。

[0089] 称取上一步得到的含羧基类化合物(1.0equiv.)、中间体G(1.2equiv.)、1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐(1.2equiv.)于瓶中,加入反应溶剂N,N-二甲基甲酰胺(1mL),随后加入N,N-二异丙基乙胺(1.2equiv.),室温条件下反应过夜,加入乙酸乙酯稀释反应液,饱和食盐水洗涤一次,再用乙酸乙酯萃取水层多次,如果乙酸乙酯溶解性不好,可用二氯甲烷。合并有机层,干燥,过滤,蒸干,过柱,得到目标产物。

[0090] 实施例14 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-苯胺基-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-1)的合成方法

[0091] 化合物V-1根据实施例10方法制得。硅胶柱层析溶剂比例乙酸乙酯/石油醚=12/7至12/4,黄色固体(13.2mg,39.0%),熔点:168-169°C。纯度:96%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 8.04 (s,1H),7.60(d,J=8.5Hz,1H),7.28(d,J=7.8Hz,2H),7.22(t,J=7.8Hz,2H),7.14(s,2H),6.98(t,J=7.2Hz,1H),6.63-6.57(m,2H),6.51(dd,J=16.8,10.5Hz,1H),6.31(dd,J=16.7,1.9Hz,1H),5.75-5.69(m,1H),5.24(s,2H),3.83(s,6H),3.77(s,3H),3.77-3.47(m,8H)。

[0092] 实施例15 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-2)的合成方法

[0093] 化合物V-2根据实施例13方法制得。硅胶柱层析溶剂比例乙酸乙酯/石油醚=12/7至12/4,黄色固体(120.7mg,58.5%),熔点:175-177°C。纯度:96%。¹H NMR(500MHz,氯仿-

d) : δ 8.37 (s, 1H) , 7.79 (d, J=8.2Hz, 1H) , 7.24-7.18 (m, 3H) , 6.60 (dd, J=16.8, 10.5Hz, 1H) , 6.37 (dd, J=16.8, 1.9Hz, 1H) , 5.79 (dd, J=10.4, 1.9Hz, 1H) , 5.31 (s, 2H) , 3.98-3.61 (m, 17H) 。

[0094] 实施例16 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-3)的合成方法。

[0095] 化合物V-3根据实施例12方法制得。硅胶柱层析溶剂比例二氯甲烷/甲醇=100/1至25/1,黄色固体(35.9mg, 52.9%),熔点:185-187°C。纯度:96%。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) : δ 9.21 (s, 1H) , 9.10 (s, 1H) , 7.74 (d, J=8.5Hz, 1H) , 7.63 (s, 2H) , 7.43 (d, J=8.5Hz, 2H) , 6.87 (d, J=9.0Hz, 3H) , 6.73 (d, J=8.6Hz, 1H) , 6.21 (d, J=16.3Hz, 1H) , 5.82-5.74 (m, 1H) , 5.26 (s, 2H) , 3.84-2.78 (m, 25H) , 2.51 (s, 3H) 。

[0096] 实施例17 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-4)的合成方法

[0097] 化合物V-4根据实施例12方法制得。硅胶柱层析溶剂比例二氯甲烷/甲醇=40/1至20/1,黄色固体(26.0mg, 53.9%),熔点:178-180°C。纯度:98%。¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) : δ 8.08 (s, 1H) , 7.62 (d, J=8.5Hz, 1H) , 7.21 (d, J=8.7Hz, 2H) , 7.11 (d, J=2.2Hz, 2H) , 6.84 (d, J=8.9 Hz, 2H) , 6.74 (s, 1H) , 6.61-6.51 (m, 2H) , 6.35 (dd, J=16.8, 2.0Hz, 1H) , 6.19 (t, J=2.2Hz, 1H) , 5.77 (dd, J=10.5, 2.0Hz, 1H) , 5.23 (s, 2H) , 3.86-3.53 (m, 14H) , 3.18 (t, J=4.9Hz, 4H) , 2.81- 2.64 (m, 4H) , 2.42 (s, 3H) 。

[0098] 实施例18 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-5)的合成方法

[0099] 化合物V-5根据实施例13方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯=12/10至 12/8,白色固体(18.0mg, 85.8%),熔点:160-162°C。纯度:98%。¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) : δ 7.91 (s, 1H) , 7.72 (d, J=8.3Hz, 1H) , 7.44 (d, J=8.1Hz, 2H) , 7.27-7.22 (m, 1H) , 7.15 (d, J =8.2Hz, 1H) , 6.59 (dd, J=16.8, 10.5Hz, 1H) , 6.37 (dd, J=16.8, 1.8Hz, 1H) , 5.78 (dd, J=10.5, 1.9Hz, 1H) , 5.33 (s, 2H) , 3.97-3.62 (m, 8H) 。

[0100] 实施例19 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并 [2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-6)的合成方法

[0101] 化合物V-6根据实施例13方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯=12/10至 12/8,白色固体(26.7mg, 62.7%),熔点:168-170°C。纯度:96%。¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) : δ 8.39 (s, 1H) , 7.83 (d, J=8.2Hz, 1H) , 7.19 (d, J=8.2Hz, 1H) , 7.13 (d, J=2.2Hz, 2H) , 6.59 (dd, J=16.8, 10.5Hz, 1H) , 6.37 (dd, J=16.8, 1.9Hz, 1H) , 6.26 (t, J=2.2Hz, 1H) , 5.81-5.75 (m, 1H) , 5.28 (s, 2H) , 3.96-3.61 (m, 14H) 。

[0102] 实施例20 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-苯胺基-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-7)的合成方法

[0103] 化合物V-7根据实施例12方法制得。硅胶柱层析溶剂比例二氯甲烷/甲醇=150/1至80/1,黄色固体(26.5mg, 72.4%),熔点:176-178°C。纯度:97%。¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) : δ 8.14 (s, 1H) , 7.74 (d, J=8.0Hz, 1H) , 7.37-7.27 (m, 4H) , 7.13 (s, 2H) , 7.05 (q, J=7.5, 6.9Hz, 1H) , 6.70-6.53 (m, 3H) , 6.37 (dd, J=16.8, 4.2Hz, 1H) , 6.22 (s, 1H) , 5.83-5.76 (m, 1H) , 5.30 (s, 2H) , 3.90-3.57 (m, 14H) 。

[0104] 实施例21 4-(2-(4-丙烯酰哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)-6-氯-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-8)的合成方法

[0105] 化合物V-8根据实施例13方法制得。硅胶柱层析溶剂比例乙酸乙酯/石油醚=12/8,白色固体(31.4mg,74.1%),熔点:156-158℃。纯度:99%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 7.92(s,1H),7.72(d,J=8.3Hz,1H),7.14(d,J=8.2Hz,1H),6.64-6.55(m,2H),6.36(dd,J=16.8,1.8Hz,1H),5.78(dd,J=10.5,1.9Hz,1H),5.32(s,2H),3.96(s,6H),3.95-3.63(m,8H)。

[0106] 实施例22 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-9)的合成方法

[0107] 化合物V-9根据实施例10方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯=15/1至6/1,白色固体(76.8mg,61.6%),熔点:163-165℃。纯度:96%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 8.38(s,1H),7.87(d,J=8.2Hz,1H),7.23(d,J=8.2Hz,1H),7.15(d,J=2.2Hz,2H),6.27(t,J=2.2Hz,1H),5.21(s,2H),4.27(q,J=7.1Hz,2H),3.84(s,6H),1.32(t,J=7.1Hz,3H)。

[0108] 实施例23 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-10)的合成方法

[0109] 化合物V-10根据实施例10方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯=15/1至6/1,白色固体(15.6mg,9.2%),熔点:156-157℃。纯度:97%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 7.90(s,1H),7.72(d,J=8.2Hz,1H),7.44(d,J=8.1Hz,2H),7.25(t,J=8.1Hz,1H),7.17(d,J=8.3Hz,1H),5.23(s,2H),4.29(q,J=7.1Hz,2H),1.33(t,J=7.1Hz,3H)。

[0110] 实施例24 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯氨基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-11)的合成方法

[0111] 化合物V-11根据实施例11方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯/三乙胺=10/10/1,黄色固体(39.8mg,65.9%),熔点:181-183℃。纯度:98%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 8.11(s,1H),7.66(d,J=8.6Hz,1H),7.29-7.27(m,2H),7.23(s,2H),6.97-6.90(m,2H),6.62(d,J=8.6Hz,1H),6.49(s,1H),5.20(s,2H),4.24(q,J=7.1Hz,2H),3.91(s,6H),3.84(s,3H),3.26-3.20(t,J=5.0Hz,4H),2.66(t,J=5.0Hz,4H),2.41(s,3H),1.28(t,J=7.1Hz,3H)。

[0112] 实施例25 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-12)的合成方法

[0113] 化合物V-12根据实施例11方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯/三乙胺=10/10/1,黄色固体(47.7mg,69.6%),熔点:177-179℃。纯度:96%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 8.14(s,1H),7.71(d,J=8.6Hz,1H),7.29-7.25(m,2H),7.15(d,J=2.2Hz,2H),6.96-6.90(m,2H),6.60(d,J=8.6Hz,1H),6.45(s,1H),6.21(t,J=2.2Hz,1H),5.19(s,2H),4.23(q,J=7.1Hz,2H),3.83(s,6H),3.21(t,J=5.0Hz,4H),2.64-2.59(t,J=5.0Hz,4H),2.37(s,3H),1.28(t,J=7.1Hz,3H)。

[0114] 实施例26 4-(2-乙酰乙酯基)-6-氯-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-13)的合成方法

[0115] 化合物V-13根据实施例10方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯=8/

1至2/1,白色固体(10.0mg,7.0%),熔点:161-163℃。纯度:97%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 7.84 (s,1H),7.65(d,J=8.3Hz,1H),7.08(d,J=8.2Hz,1H),6.53(s,1H),5.15(s,2H),4.21(q,J=7.1 Hz,2H),3.90(s,6H),1.25(t,J=7.1Hz,3H)。

[0116] 实施例27 4-(2-乙酰乙酯基)-6-苯胺基-2-(3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-14)的合成方法

[0117] 化合物V-14根据实施例11方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯=8/1至3/1,白色固体(26.0mg,57.3%),熔点:174-176℃。纯度:96%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 8.10 (s,1H),7.69(d,J=8.6Hz,1H),7.35-7.30(m,2H),7.30-7.23(m,2H),7.08(d,J=2.2Hz,2H),6.99(tt,J=7.3,1.2Hz,1H),6.64(d,J=8.6Hz,1H),6.55(s,1H),6.15(t,J=2.2Hz,1H),5.14(s,2H),4.16(q,J=7.1Hz,2H),3.76(s,6H),1.25(t,J=7.1Hz,3H)。

[0118] 实施例28 4-(2-乙酰乙酯基)-6-苯胺基-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-15)的合成方法

[0119] 化合物V-15根据实施例11方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯=3/1至2/1,黄色固体(25.8mg,77.1%),熔点:168-170℃。纯度:99%。¹H NMR(400MHz,氯仿-d): δ 7.69(s,1H),7.60(d,J=8.6Hz,1H),7.41-7.36(m,2H),7.36-7.26(m,2H),7.04(tt,J=7.2,1.3 Hz,1H),6.72(s,1H),6.60(d,J=8.7Hz,1H),6.52(s,1H),5.23(s,2H),4.24(q,J=7.1Hz,2H),3.91(s,6H),1.28(t,J=7.2Hz,3H)。

[0120] 实施例29 4-(2-乙酰乙酯基)-6-苯胺基-2-(2,6-二氯苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-16)的合成方法

[0121] 化合物V-16根据实施例11方法制得。硅胶柱层析溶剂比例石油醚/乙酸乙酯=8/1至5/1,黄色固体(16.8mg,49.5%),熔点:161-162℃。纯度:96%。¹H NMR(400MHz,氯仿-d): δ 7.66(s,1H),7.62(d,J=8.6Hz,1H),7.43-7.29(m,6H),7.24-7.14(m,1H),7.06(tt,J=7.2,1.3 Hz,1H),6.64(d,J=8.6Hz,1H),6.60(s,1H),5.23(s,2H),4.24(q,J=7.1Hz,2H),1.28(t,J=7.1Hz,3H)。

[0122] 实施例30 4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮(V-17)的合成方法

[0123] 化合物V-17根据实施例11方法制得。硅胶柱层析溶剂比例二氯甲烷/甲醇=80/1至20/1,黄色固体(20.8mg,48.6%),熔点:173-175℃。纯度:98%。¹H NMR(500MHz,氯仿-d): δ 7.66(s,1H),7.56(d,J=8.6Hz,1H),7.26-7.23(m,2H),6.93-6.87(m,2H),6.55-6.48(m,3H),5.21(s,2H),4.24(q,J=7.1Hz,2H),3.93(s,6H),3.22-3.17(m,4H),2.62(t,J=5.0Hz,4H),2.37(s,3H),1.28(t,J=7.1Hz,3H)。

[0124] 实施例31化合物V-17的盐酸盐4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮盐酸盐(V-17A)、4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮季铵盐(V-17B)及4-(2-乙酰乙酯基)-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯胺基)-2-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺基)吡啶并[2,3-b]吡嗪-3(4H)-酮的一水合物(V-17C)的制备

[0125] a) 化合物V-17的盐酸盐V-17A的制备

[0126] 室温下,将化合物V-17(64.3mg,0.1mmol)溶于无水甲醇(2mL)中,冰浴下缓慢滴

加入饱和的氯化氢甲醇溶液(2mL),减压蒸除溶剂后,搅拌加入乙醚,析出黄色固体,过滤,乙醚洗涤,得化合物V-17的盐酸盐V-17A为黄色固体61.8mg,收率:91%。ESI-MS:m/z 676.17 [M⁺]

[0127] b) 化合物V-17的季铵盐V-17B的制备

[0128] 室温下,将化合物V-17(64.3mg,0.1mmol)溶于无水乙醇(2mL)中,加入等当量的氢氧化钠、碘化钾及碘甲烷,加热回流过夜后,减压旋干溶剂,粗产物用丙酮重结晶纯化得到化合物V-17的季铵盐V-17B为黄色固体31.4mg,收率:40.1%。ESI-MS:m/z 782.12[M⁺]

[0129] c) 化合物V-17的一水合物V-17C的制备

[0130] 室温下,将化合物V-17(64.3mg,0.1mmol)溶于1N盐酸溶液中,搅拌下缓慢滴加石油醚至溶液变浑浊,室温下放置至再无晶体析出,过滤得到化合物V-17的一水合物V-17C。元素分析(Elem. Anal.):C,54.55%;H,5.34%;Cl,10.73%;N,14.84%;O,14.53%。

[0131] 根据本实施例所述类似方法,可用于制备本发明化合物V药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或晶型,包括与丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸等有机酸形成的盐;或与盐酸、磷酸、硫酸、氢氟酸、氢溴酸等无机酸形成盐;或与卤烷形成的季铵盐,所述卤烷为氟、氯、溴或碘代烷烃。

[0132] 实施例32:药物组合物

[0133] 化合物V-17A 20g

[0134] 淀粉 140g

[0135] 微晶纤维素 60g

[0136] 按常规操作方法,将上述3种物质物理混合均匀后,装入明胶胶囊中,得到1000粒胶囊。

[0137] 实施例33:药物组合物

[0138] 化合物V-17A 50g

[0139] 淀粉 400g

[0140] 微晶纤维素 200g

[0141] 按常规操作方法,将上述3种物质物理混合均匀后,装入明胶胶囊中,得到1000粒胶囊。

[0142] 实施例34:抗增殖活性实验实施例

[0143] 实验材料:KATOIII型人胃癌细胞(FGFR2扩增)为半悬浮细胞,购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,培养液条件为RPMI1640+10%FBS+1%双抗。Huh-7型人肝癌细胞(FGFR4过表达)为贴壁细胞,购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,培养液条件为DMEM+10%FBS+1%双抗。细胞培养于含5%CO₂的37℃饱和湿度培养箱中常规培养。细胞计数试剂(CCK-8)为日本同仁,在4℃冰箱避光保存,用时分装。

[0144] 实验方法:a)将5000个处于对数生长期的KATOIII人胃癌细胞接种于96孔板,每孔培养液100μL,培养一天待细胞稳定后,加入50μL含药培养液,每个浓度设置三个复孔,并设定相应浓度的二甲基亚砷溶液作为对照组。加药后,将96孔板放入培养箱中继续培养4天。4天后,取出96孔板,每孔加入10μL CCK-8溶液,继续在培养箱中培养1-4小时,在酶标仪中测定每个孔的吸收值,测定波长为450nm。

[0145] b) 将6000个处于对数生长期的Huh-7人肝癌细胞接种于96孔板,每孔培养液100 μ L,然后在培养箱中培养一天待细胞稳定后,加入50 μ L含药培养液,每个浓度设置三个复孔,并设定相应浓度的二甲基亚砜溶液作为对照组。加药后,将96孔板放入培养箱中继续培养3天。3天后,取出96孔板,每孔加入10 μ L CCK-8溶液,继续在培养箱中培养1-4小时,在酶标仪中测定每个孔的吸收值,测定波长为450nm。

[0146] 化合物对肿瘤细胞增殖的抑制率通过以下公式计算得出:

[0147] 抑制率(%) = (OD对照孔-OD给药孔) / (OD对照孔-OD空白孔) \times 100%

[0148] OD对照孔:培养液、细胞、相应浓度的二甲基亚砜、CCK-8

[0149] OD给药孔:培养液、细胞、相应浓度的二甲基亚砜及化合物、CCK-8

[0150] OD空白孔:培养液、相应浓度的二甲基亚砜、CCK-8

[0151] IC₅₀值由四参数法估算得出。所有实验结果均来自于两次独立实验,结果展示为平均值 \pm 标准差。

[0152] 抗增殖活性测试结果:

[0153] 表1化合物V-1~V-17对KATOIII人胃癌细胞的抑制率(10 μ M)

编号	抑制率	编号	抑制率	编号	抑制率
V-1	90%	V-7	89%	V-13	43%
V-2	52%	V-8	44%	V-14	9%
V-3	5%	V-9	14%	V-15	49%
V-4	92%	V-10	13%	V-16	22%
V-5	53%	V-11	93%	V-17	95%
V-6	36%	V-12	95%		

[0154] 表2部分化合物对KATOIII人胃癌细胞IC₅₀(μ M)值

编号	IC ₅₀ (μ M)	编号	IC ₅₀ (μ M)	编号	IC ₅₀ (nM)
V-1	1.87 \pm 0.21	V-11	0.55 \pm 0.09	FIIN2	0.62 \pm 0.14
V-4	1.05 \pm 0.17	V-12	0.33 \pm 0.12		
V-7	1.31 \pm 0.30	V-17	0.15 \pm 0.07		

[0155] 注:N-[4-[3-(3,5-二甲氧基苯基)-3,4-二氢-7-[[4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯基]氨基]-2-氧代嘧啶并[4,5-D]嘧啶-1(2H)-基]甲基]苯基]-2-丙烯酰胺;FGFR抑制剂(FIIN2) IC₅₀(文献值)=1.9nM。

[0156] 表3化合物V-1~V-17对Huh-7肝癌细胞的抑制率(10 μ M)

编号	抑制率	编号	抑制率	编号	抑制率
V-1	84%	V-7	56%	V-13	5%
V-2	45%	V-8	7%	V-14	\times
V-3	\times	V-9	6%	V-15	\times
V-4	55%	V-10	3%	V-16	43%
V-5	\times	V-11	91%	V-17	93%
V-6	10%	V-12	85%		

[0157] 注: \times 表示没有抑制作用。

[0158] 表4部分化合物对Huh-7肝癌细胞IC₅₀(μ M)值

编号	IC ₅₀ (μM)	编号	IC ₅₀ (μM)	编号	IC ₅₀ (nM)
V-1	1.49±0.46	V-7	5.23±1.20	V-17	1.07±0.70
V-2	6.45±0.97	V-11	3.82±0.63	AZD4547	0.88±0.12
V-4	9.61±1.05	V-12	2.05±0.59		

[0159] 注:REL-N-[5-[2-(3,5-二甲氧基苯基)乙基]-1H-吡唑-3-基]-4-[(3R,5S)-3,5-二甲基-1-哌嗪基]苯甲酰胺 (AZD4547) IC₅₀ (文献值) = 0.28μM。

[0160] 实验结果表明,本发明化合物对KATOIII型人胃癌细胞 (FGFR2扩增) 和Huh-7肝癌细胞 (FGFR4过表达) 普遍具有较好的抗增殖活性,特别是化合物V-17对这两株细胞的IC₅₀值分别为0.15μM和1.07μM。同时,本发明化合物中R₁ R₂和R₃的不同对化合物的抗增殖活性有重要的影响。总体看来,本发明化合物是FGFR2和FGFR4的抑制剂,具有较好的药物开发前景。