



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118702697 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 27

(21) 申请号 202310264067.5

(22) 申请日 2023.03.18

(71) 申请人 山东新时代药业有限公司

地址 273400 山东省临沂市费县北外环路1号

(72) 发明人 张贵民 张浩 李光艳 姚景春 李蕊

(51) Int. Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

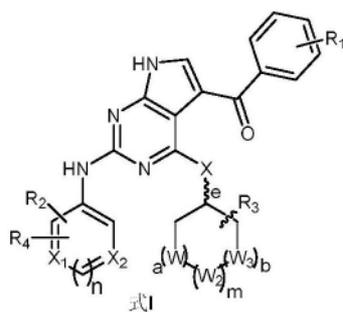
权利要求书6页 说明书37页

(54) 发明名称

苯甲酰基吡咯并嘧啶类衍生物及其用途和制备方法

(57) 摘要

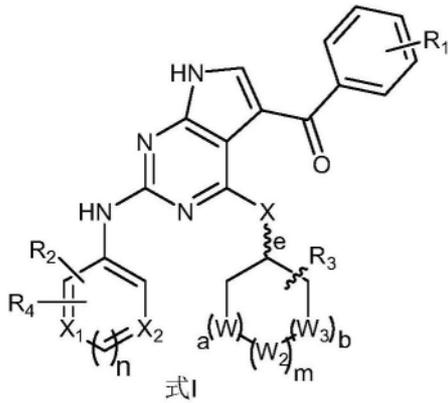
本发明涉及医药领域,为式I所示的一类苯甲酰基吡咯并嘧啶类衍生物及其应用。



是活性高、特异性

强的BTK抑制剂,能增强药物的活性和选择性,改善毒副作用和理化性质,同时应对治疗引起的耐药突变。所述化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐及其药物组合物在制备防治BTK相关疾病药物中的应用。一系列肿瘤细胞测试结果表明,本发明的化合物具有良好的抗BTK激酶活性。

1. 一种如式I所示的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐:



, 其中:

X为NH、C或O;

X1、X2、W、W2、W3分别独立地选自C、N、O;

a、b、m分别表示W、W2、W3的个数,分别独立的选自0或1或2或3;

n为0或1;

e为化学键,表示任意合理的构象;

R1选自H、卤素、C1-3烷基;R1的个数为1或2或3,R1位于苯环任意合理的位置;

R2选自取代或未取代的C1-6烷基、取代或未取代的C1-6烷氧基、取代或未取代的C3-8环烷基、取代或未取代的5-8元杂环基;所述取代基选自C1-6烷基、C1-6烷氧基、 $Rb-N^*-Ra$ 、5-8元杂环基,其中5-8元杂环基可进一步被C1-6烷基取代;

所述Ra、Rb分别独立地选自C1-6烷基;

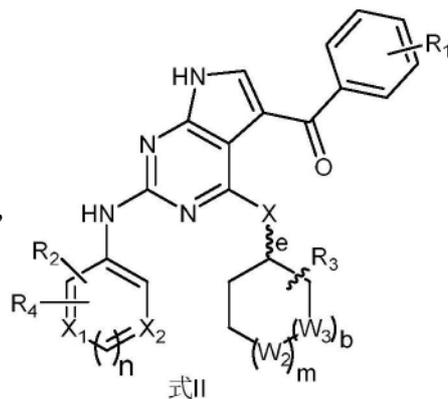
R3选自H、取代或未取代的C1-6烷基、-NHCORc、-C(=O)Rc、-NHS(O)2Rc;所述C1-6烷基的取代基选自OH、NH2、-OC(=O)Rc;所述Rc选C1-6烷基、C2-6烯基、C3-8环烷基;

R4选自H、卤素、C1-6烷基或C1-6烷氧基;

所述杂环基含有1-3个杂原子,所述杂原子选自N、O、S。

2. 如权利要求1所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐,其特征在于,W为

C,a为1,如式II所示,



其中,X为NH或O,b为1,m为0或1,W2、

W3分别独立选自C、N、O;R1选自H或卤素,R1的个数为1或2,R1位于苯环任意合理的位置;

X1、X2分别独立地选自C或N;

n为0或1;

R2选自取代或未取代的C1-6烷基、C3-6环烷基、取代或未取代的5-8元杂环基所述C1-6

烷基的取代基选自C1-4烷氧基、5-8元杂环基、 $\text{Rb-N}^*\text{-Ra}$ ，所述5-8元杂环基的取代基为C1-6烷基；

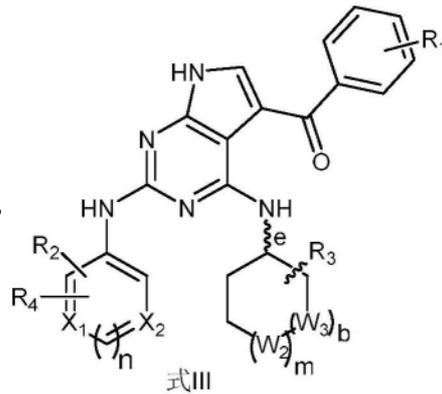
所述Ra、Rb分别独立地选自C1-4烷基；

R3选自H、取代或未取代的C1-4烷基、-NHCORc、-C(=O)Rc、-NHS(O)2Rc；所述Rc选C1-4烷基、C2-4烯基、C3-6环烷基，所述C1-6烷基的取代基选自OH、NH2；

R4选自H、卤素或C1-3烷氧基。

3. 如权利要求1所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐，其特征在于，W为

C，a为1，X为NH，如式III所示，



其中，b为1，m为0或1，W2、W3

分别独立选自C、N、O；

R1选自H或卤素，R1的个数为1或2，R1位于苯环任意合理的位置；

X1、X2分别独立地选自C或N；

n为0或1；

R2选自取代或未取代的C1-6烷基、C3-6环烷基、取代或未取代的5-8元杂环基所述C1-6烷基的取代基选自C1-4烷氧基、5-8元杂环基、 $\text{Rb-N}^*\text{-Ra}$ ，所述5-8元杂环基的取代基为C1-6烷基；

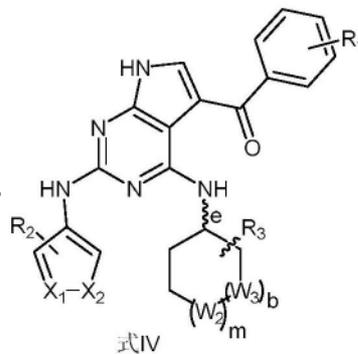
所述Ra、Rb分别独立地选自C1-4烷基；

R3选自H、取代或未取代的C1-4烷基、-NHCORc、-C(=O)Rc、-NHS(O)2Rc；所述Rc选C1-4烷基、C2-4烯基、C3-6环烷基，所述C1-6烷基的取代基选自OH、NH2；

R4选自H、卤素或C1-3烷氧基。

4. 如权利要求1所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐，其特征在于，R4

为H，n为0，W为C，a为1，X为N，如式IV所示，



其中，

R1选自H、卤素、C1-3烷基；

R2选自取代或未取代的C1-4烷基、取代或未取代的C1-4烷氧基；所述取代基选自C1-3

烷基、C1-3烷氧基、 $Rb-N^*-Ra$ 、5-8元杂环基；所述杂环基含有1-2个选自N、O、S的杂原子；所述Ra、Rb分别独立地选自C1-3烷基；

X1、X2、W2、W3分别独立地选自C、N、O；

b、m分别独立地为1或2；

R3选自取代或未取代的C1-3烷基，所述取代基为OH、NH<sub>2</sub>。

5. 如权利要求4所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐，其特征在于，X1、



其中，R1选自H、卤素，R1位于苯环的对位；R2

选自取代或未取代的C1-4烷基、取代或未取代的C1-4烷氧基；所述取代基选自C1-3烷基、 $Rb-N^*-Ra$ 、5-6元杂环基；所述杂环基含有1-2个选自N、O、S的杂原子；所述Ra、Rb分别独立地选自C1-3烷基；X1、X2为N；W2、W3为C；b、m分别独立地为1或2。

6. 如权利要求1所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐，选自以下化合物：

(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮；

(4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-甲氧基乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮；

(4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮；

(4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(3-吗啉丙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮；

(2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮；

(2-((1-(2-(二乙基氨基)乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮；

(2-((4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮；

(2-((4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-基)-2-甲氧基苯基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮；

N-((1s,4s)-4-((2-((3-氟-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺；

N-((1s,4s)-4-((2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;

(4-氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;

(4-氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((2-甲氧基-4-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(3,4-二氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;

(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;

(2-((1-环丁基-1H-吡唑-4-基)氨基)-4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮;

(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮;

(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮;

(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮;

(R)-1-(3-((2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮;

(R)-1-(3-((5-(2,4-二氟苯甲酰基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮;

N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丁酰胺;

N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)环丙烷甲酰胺;

(2-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;

(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;

(2-((4-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;

(2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;

N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)甲磺酰胺;

N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)乙酰胺;

N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,

3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙酰胺;

N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙烷-1-磺酰胺;

N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)环丙烷磺酰胺;

N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;

(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((5-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;

(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((5-异丙基-1H-吡唑-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;

(2-((5-环丙基-1H-吡唑-3-基)氨基)-4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;

N-((1r,4r)-4-((2-((3-氟-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;

N-((1r,4r)-4-((2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;

(3-氟苯基)(4-(((1r,4r)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;

N-((1r,4r)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;

(4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;

(R)-(4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢呋喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;

(S)-(4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢呋喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;

(1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酸甲酯;

(1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙酸甲酯;

((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)乙酸甲酯;

(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-吗啉苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;

(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮。

7.一种药物组合物,包含权利要求1-6中任一项所述化合物或其药学上可接受的盐,和一种或多种药学上可接受的药用辅料。

8. 如权利要求1-6中任一项所述化合物或其药学上可接受的盐或权利要求7所述的药物组合物,在制备防治BTK相关疾病药物中的用途。

9. 如权利要求8所述的用途,其特征在于,所述疾病为自身免疫性疾病或肿瘤。

10. 如权利要求9所述的用途,其特征在于,所述肿瘤选自造血或淋巴组织肿瘤、前列腺癌、胃癌。

## 苯甲酰基吡咯并嘧啶类衍生物及其用途和制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,内容包括一类苯甲酰基吡咯并嘧啶类衍生物及其制备方法;本发明还涉及所述化合物在制备抗癌药物中的应用。

### 背景技术

[0002] BTK,布鲁顿氏酪氨酸激酶,是B细胞受体(BCR)信号转导通路中的关键激酶,在不同类型恶性血液病中广泛表达,参与B细胞的增殖、分化与凋亡过程。由于BTK小分子抑制剂特异性非常好,在B细胞类恶性肿瘤及一些B细胞免疫类疾病的治疗显现出非常好的优势,BTK抑制剂也因此成为了血液瘤市场前景最好的药物。

[0003] Ibrutinib,是第一代共价BTK抑制剂,IC<sub>50</sub>为0.5nM。2013年,FDA批准用于治疗套细胞淋巴瘤,后相继批准慢性淋巴细胞白血病、华氏巨球蛋白血症、小淋巴细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、移植物宿主病,等。Ibrutinib还是存在诸多不足,如靶点的选择性问题,可能导致相关的出血、腹泻、皮疹、房颤等问题;再如由于BTK蛋白481位的半胱氨酸突变为丝氨酸,所带来的耐药问题等。

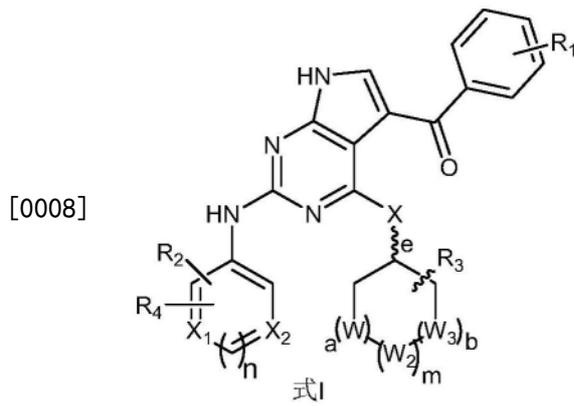
[0004] Acalabrutinib,是第二代共价BTK抑制剂,IC<sub>50</sub>为3nM,很大程度上改善了第一代BTK抑制剂的选择性问题。2017年获得FDA批准,用于治疗套细胞淋巴瘤,后获批了慢性淋巴细胞白血病的适应症。但尚无法解决Cys481突变引起的耐药问题。

[0005] Pirtobrutinib,是第三代BTK抑制剂,也是第一款非共价型BTK抑制剂首创新药。2023年获得FDA批准,用于三线及以上系统治疗(包括接受其他BTK抑制剂的治疗)的成人复发难治性套细胞淋巴瘤。与目前上市的共价BTK抑制剂不同,Pirtobrutinib不与C481产生共价结合,因此不会受到耐药C481突变对活性造成的抑制,有望克服共价BTK抑制剂的耐药性。

[0006] HCK是SRC家族激酶造血干细胞激酶,其异常活化会驱动血液恶性肿瘤的形成,研究表明HCK水平增高造成结直肠癌患者生存期缩短,抑制HK活性,可抑制肿瘤相关巨噬细胞的选择性活化及结肠癌异种移植瘤的生长。因此HCK可作为恶性实体瘤的治疗靶点。

### 发明内容

[0007] 本发明提供式I所示的化合物或其立体异构体或其药学上可接受的盐:



[0009] X为NH、C或O;

[0010] X1、X2、W、W2、W3分别独立地选自C、N、O;

[0011] a、b、m分别表示W、W2、W3的个数,分别独立的选自0或1或2或3;

[0012] n为0或1;

[0013] e为化学键,表示任意合理的构象;

[0014] R1选自H、卤素、C1-3烷基;R1的个数为1或2或3,R1位于苯环任意合理的位置;

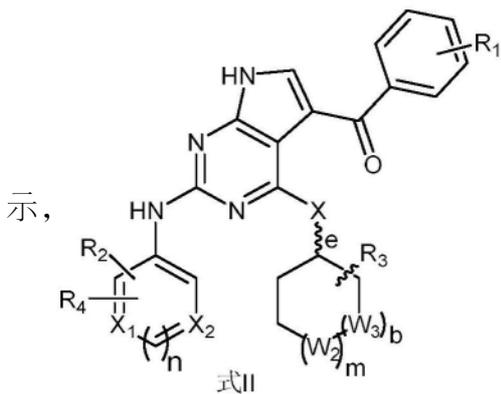
[0015] R2选自取代或未取代的C1-6烷基、取代或未取代的C1-6烷氧基、取代或未取代的C3-8环烷基、取代或未取代的5-8元杂环基;所述取代基选自C1-6烷基、C1-6烷氧基、 $\text{Rb-N}^*\text{-Ra}$ 、5-8元杂环基,其中5-8元杂环基可进一步被C1-6烷基取代;

[0016] 所述Ra、Rb分别独立地选自C1-6烷基;

[0017] R3选自H、取代或未取代的C1-6烷基、-NHCORc、-C(=O)Rc、-NHS(O)2Rc;所述C1-6烷基的取代基选自OH、NH2、-OC(=O)Rc;所述Rc选C1-6烷基、C2-6烯基、C3-8环烷基;R4选自H、卤素、C1-6烷基或C1-6烷氧基;

[0018] 所述杂环基含有1-3个杂原子,所述杂原子选自N、O、S。

[0019] 如式I所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐,W为C,a为1,如式II所示,



其中,X为NH或O,b为1,m为0或1,W2、W3分别独立选自

C、N、O;R1选自H或卤素,R1的个数为1或2,R1位于苯环任意合理的位置;X1、X2分别独立地选自C或N;

[0020] n为0或1;

[0021] R2选自取代或未取代的C1-6烷基、C3-6环烷基、取代或未取代的5-8元杂环基;

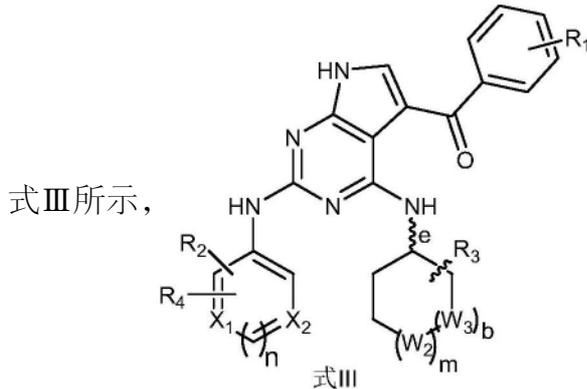
[0022] 所述C1-6烷基的取代基选自C1-4烷氧基、5-8元杂环基、 $\text{Rb}-\overset{*}{\text{N}}-\text{Ra}$ ，所述5-8元杂环基的取代基为C1-6烷基；

[0023] 所述Ra、Rb分别独立地选自C1-4烷基；

[0024] R3选自H、取代或未取代的C1-4烷基、 $-\text{NHCORc}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{Rc}$ 、 $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{Rc}$ ；所述Rc选C1-4烷基、C2-4烯基、C3-6环烷基，所述C1-6烷基的取代基选自OH、NH<sub>2</sub>；

[0025] R4选自H、卤素或C1-3烷氧基。

[0026] 如式I所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐，W为C，a为1，X为NH，如



其中，b为1，m为0或1，W<sub>2</sub>、W<sub>3</sub>分别独立选自C、N、

0；

[0027] R1选自H或卤素，R1的个数为1或2，R1位于苯环任意合理的位置；

[0028] X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>分别独立地选自C或N；

[0029] n为0或1；

[0030] R2选自取代或未取代的C1-6烷基、C3-6环烷基、取代或未取代的5-8元杂环基；

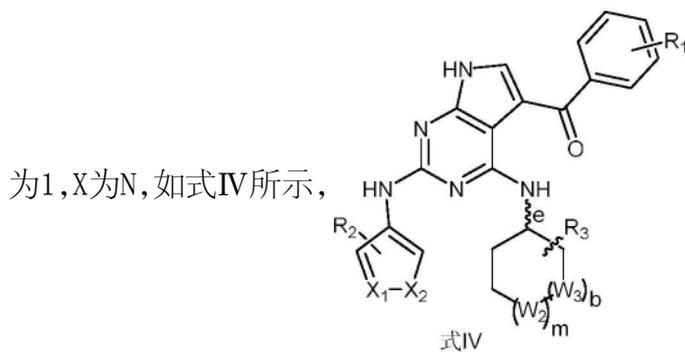
[0031] 所述C1-6烷基的取代基选自C1-4烷氧基、5-8元杂环基、 $\text{Rb}-\overset{*}{\text{N}}-\text{Ra}$ ，所述5-8元杂环基的取代基为C1-6烷基；

[0032] 所述Ra、Rb分别独立地选自C1-4烷基；

[0033] R3选自H、取代或未取代的C1-4烷基、 $-\text{NHCORc}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{Rc}$ 、 $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{Rc}$ ；所述Rc选C1-4烷基、C2-4烯基、C3-6环烷基，所述C1-6烷基的取代基选自OH、NH<sub>2</sub>；

[0034] R4选自H、卤素或C1-3烷氧基。

[0035] 如式I所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐，R4为H，n为0，W为C，a



其中，

[0036] R1选自H、卤素、C1-3烷基；

[0037] R2选自取代或未取代的C1-4烷基、取代或未取代的C1-4烷氧基；所述取代基选自

C1-3烷基、C1-3烷氧基、 $\text{Rb}-\overset{*}{\text{N}}-\text{Ra}$ 、5-8元杂环基；所述杂环基含有1-2个选自N、O、S的杂原子；

所述Ra、Rb分别独立地选自C1-3烷基；

[0038] X1、X2、W2、W3分别独立地选自C、N、O；

[0039] b、m分别独立地为1或2；

[0040] R3选自取代或未取代的C1-3烷基，所述取代基为OH、NH<sub>2</sub>。

[0041] 进一步地，R1选自H或卤素。

[0042] 如式IV所示所述的化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐，R1选自H、卤素，R1位于苯环的对位；R2选自取代或未取代的C1-4烷基、取代或未取代的C1-4烷氧基；所述取代基选自C1-3烷基、

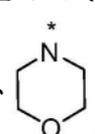
$\text{Rb}-\overset{*}{\text{N}}-\text{Ra}$ 、5-6元杂环基；所述杂环基含有1-2个选自N、O、S的杂原子；所述Ra、Rb分别独立地选自C1-3烷基；X1、X2为N；W2、W3为C；b、m分别独立地为1或2。

[0043] 进一步地，所述R1选自H、F、Br、I。

[0044] 在一些实施例中，所述R1为H或F。

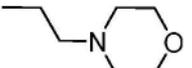
[0045] 进一步地，所述R2选自选自取代或未取代的C1-3烷基、取代或未取代的C1-3烷氧基、取代或未取代的C3-6环烷基、取代或未取代的5-6元杂环基；所述取代基选自C1-3烷基、C1-3烷氧基、 $\text{Rb}-\overset{*}{\text{N}}-\text{Ra}$ 、5-6元杂环基，其中5-6元杂环基可进一步被C1-3烷基取代；所述Ra、Rb分别独立地选自C1-3烷基。

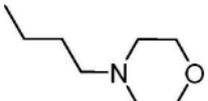
[0046] 进一步地，所述R2选自取代或未取代的C1-3烷基、C3-6环烷基、取代或未取代的5-6元杂环基；所述C1-3烷基的取代基选自C1-3烷氧基、5-6元杂环基、 $\text{Rb}-\overset{*}{\text{N}}-\text{Ra}$ ，所述5-6元杂环基的取代基为C1-烷基；所述Ra、Rb分别独立地选自C1-3烷基。

[0047] 进一步地，所述R2选自被取代的甲基、乙基、丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、哌啶基、哌嗪基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、四氢呋喃基、四氢吡咯基、四氢吡喃基、氧杂环丁烷；所述取代基选自甲基、乙基、丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-N

(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0048] 在一些实施例中，所述R2选自甲基、甲基哌嗪、环丙基、环丁基、乙基哌嗪基、

-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、、甲氧基、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、

-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>。

[0049] 在某些实施例中，式I所述化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐，选自以下化合物：(4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮；(4-氟苯基)(4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-甲氧基乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮；(4-氟苯基)(4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡唑-4-

基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(3-吗啉丙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮;(2-((1-(2-(二乙基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;(2-((4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮;(2-((4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-基)-2-甲氧基苯基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮;N-((1s,4s)-4-((2-((3-氟-4-(4-甲基哌啶-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;N-((1s,4s)-4-((2-((4-(4-乙基哌啶-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;(4-氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-(4-甲基哌啶-1-基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(4-氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((2-甲氧基-4-(4-(4-甲基哌啶-1-基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(3,4-二氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-甲基哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;(2-((1-环丁基-1H-吡啶-4-基)氨基)-4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮;(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮;(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮;(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮;(R)-1-(3-((2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮;(R)-1-(3-((5-(2,4-二氟苯甲酰基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮;N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丁酰胺;N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)环丙烷甲酰胺;(2-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌啶-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(2-((4-(4-甲基哌啶-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;(2-((4-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;(2-((4-(4-乙基哌啶-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)甲磺酰胺;N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)乙酰胺;N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(哌啶-1-基)

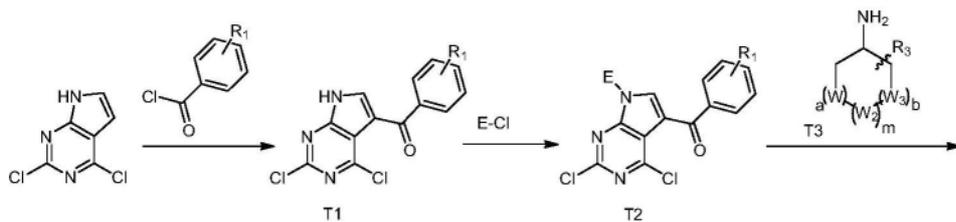
苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙酰胺;N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙烷-1-磺酰胺;N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)环丙烷磺酰胺;N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((5-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((5-异丙基-1H-吡唑-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;(2-((5-环丙基-1H-吡唑-3-基)氨基)-4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;N-((1r,4r)-4-((2-((3-氟-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;N-((1r,4r)-4-((2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;(3-氟苯基)(4-(((1r,4r)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;N-((1r,4r)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;(4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(R)-(4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢呋喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(S)-(4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢呋喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮。

[0050] 在某些实施例中,式I所述化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐,选自以下化合物:(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;(4-氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-甲氧基乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(3-吗啉丙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮;(2-((1-(2-(二乙基氨基)乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮;(2-((4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮;(2-((4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-基)-2-甲氧基苯基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮;N-((1s,4s)-4-((2-((3-氟-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;N-((1s,4s)-4-((2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺;(4-氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮;(4-氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((2-甲氧基-4-(4-

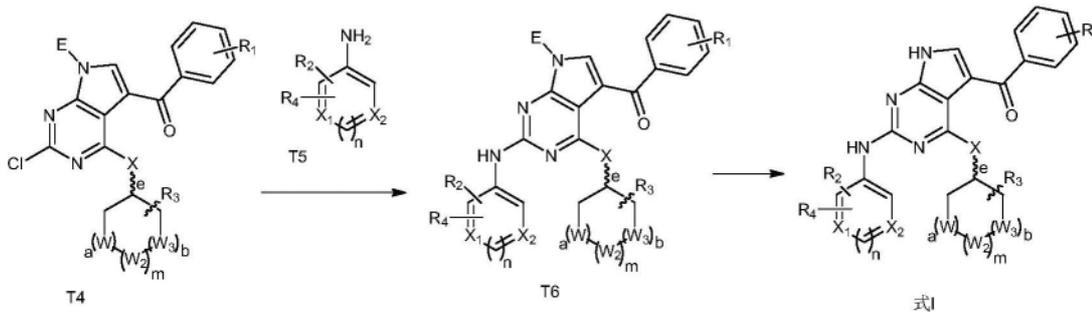
(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮; (3,4-二氟苯基)(4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮; (4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮; (2-((1-环丁基-1H-吡啶-4-基)氨基)-4-((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮; (R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮; (R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮; (R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮; (R)-1-(3-((2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮; (R)-1-(3-((5-(2,4-二氟苯甲酰基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮; N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丁酰胺; N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)环丙烷甲酰胺; (2-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮; (2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮; (2-((4-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮; (2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮; N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)甲磺酰胺; N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)乙酰胺; N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙酰胺; N-((1s,4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙烷-1-磺酰胺。

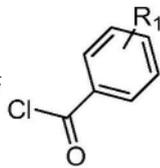
[0051] 在某些实施例中,式I所述化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐,选自以下化合物: (4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮; (4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-甲氧基乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮; (4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮; (4-氟苯基)(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(3-吗啉丙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮; (2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮; (2-((1-(2-(二乙基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮。

[0052] 本发明提供一种制备式I化合物的方法,包含其异构体、水合物、溶剂化物、其药学上可接受的盐及其前药的方法,包括如下步骤:



[0053]



[0054] 1) 2,4-二氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶与  反应得到T1化合物;优选该反

应在有机溶剂中进行,所述有机溶剂为极性溶剂;优选所述的有机溶剂为二氯甲烷、丙酮。

[0055] 2) 化合物T1与2-(三甲基硅烷基)乙氧甲基氯(SEM-Cl)在加热条件下反应得到T2化合物;优选地,该反应温度为30~60℃;

[0056] 该反应在有机溶剂中进行,所述有机溶剂:N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)、N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、乙二醇二甲醚、异丙醇、正丁醇、仲丁醇、叔丁醇中的至少的一种;

[0057] 该反应在碱性条件下进行,所述碱为无机碱或有机碱,其中无机碱选自氨、碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯,有机碱选自乙酸钠、三乙胺、二异丙基乙基胺、三乙烯二胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶、1,8-二氮杂二环十一碳-7-稀、N-甲基吗啉中至少一种;

[0058] 3) T2化合物与胺T3在加热条件下反应得到T4化合物;

[0059] 优选地,该反应温度为80~100℃;

[0060] 该反应是在有机溶剂和碱条件下进行,所述碱和有机溶剂独立选自步骤2)中的相关限定;

[0061] 4) T4化合物与胺T5在加热条件下反应得到T6化合物,优选地,该反应温度为100~130℃;该反应是在有机溶剂和碱条件下进行,所述碱和有机溶剂独立选自步骤2)中的相关限定;

[0062] 该反应为应用钯催化剂和有机膦配体的Buchwald-hartwig偶联反应,所用的钯催化剂选自醋酸钯、二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯、三(二亚苄基丙酮)二钯、四三苯基膦钯、双三苯基膦二氯化钯,所用的有机膦配体包含但不限于2-二环己基膦-2',4',6'-三异丙基联苯、1,1'-联萘-2,2'-双二苯基膦、2-二环己基膦-2',6'-二异丙氧基-1,1'-联苯;

[0063] 5) T6化合物在酸条件下脱三甲基硅基乙氧基甲基(SEM基团),其中所述酸为无机酸或有机酸,其中无机酸选自氢氯酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硝酸、亚硝酸、偏磷酸中至少一种,其中有机酸选自乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、羟基乙酸、氨基磺酸、对甲苯磺酰胺、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二酸、柠檬酸中至少一种;

[0064] 6) 步骤5所得产品在碱的条件下中和得到式I化合物;

[0065] 所述碱为无机碱或有机碱,其中无机碱选自氨、碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯,有机碱选自乙酸钠、三乙胺、二异丙基乙基胺、三乙烯二胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶、1,8-二氮杂二环十一碳-7-稀、N-甲基吗啉中至少一种。

[0066] 其中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、X、X1、X2、W、W2、W3、a、b、m、n、e如前文所定义,E为保护基,选自SEM基、苄氧羰基、对甲苯磺酰基、苯磺酰基、乙酰基、三氟乙酰基、苄甲氧羰基、苄基。

[0067] 本发明在于提供一种含有有效剂量的本发明化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐,和一种或多种药学上可接受的药用辅料制成的药物组合物。本发明化合物可单独或者与一种或一种以上药用载体制成不同剂型,例如片剂、丸剂、散剂、胶囊剂、颗粒剂、糖浆剂、乳剂、微乳剂或注射剂等,具体为如静脉输注、皮下输注、肌肉输注、腹腔内输注、透皮输注和直接输注到组织中,以供临床口服、注射或局部用药。

[0068] 当本发明的药物组合物以口服制剂的形式制备时,本领域已知的成分可以不受限制地用作药学上可接受的载体,只要它们不干扰活性成分的活性表达即可。载体可以包括,例如赋形剂、稀释剂、崩解剂、粘合剂、助流剂、表面活性剂、乳化剂、助悬剂、稀释剂等,但不限于此。

[0069] 当本发明的药物组合物以肠胃外剂型制备时,由于其施用通常绕过受试者对污染物的天然防御,因此肠胃外剂型通常是无菌的或能够在施用于受试者之前进行灭菌。肠胃外剂型包括但不限于,准备用于注射的溶液,准备溶解或悬浮在药学上可接受的媒介物中用于注射的干制品,准备用于注射的混悬液,以及乳液。可用于提供肠胃外剂型的合适载体/媒介物是本领域技术人员所熟知的,包括但不限于:注射用水USP;水媒介物,例如但不限于,氯化钠注射液、林格氏注射液、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液、以及乳酸林格氏注射液;水可混溶的媒介物,例如但不限于,乙醇、聚乙二醇、和聚丙二醇;和无水媒介物,例如但不限于,玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、和苯甲酸苄酯。

[0070] 在这些不同制剂中,本发明化合物的含量可以是0.1%-99.9%。本发明化合物的给药量可以是0.001-10000mg/kg/0.3天,根据临床需要可以适度调整。

[0071] 本发明所述的“药学上可接受的盐”是指药学上可接受的酸或碱加成盐,或其溶剂化物、水合物。

[0072] 本发明提供所述化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐及其药物组合物在制备防治BTK相关疾病药物中的应用。所述疾病包括自身免疫性疾病或肿瘤。所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎或狼疮或缓解中、重度新冠等;所述肿瘤为B细胞恶性肿瘤。一系列肿瘤细胞测试结果表明,本发明的化合物具有良好的抗BTK激酶活性,其 $IC_{50}$ 值均处于纳摩尔级,与阳性对照药Fenebrutinib(GDC-0853)、Nemtabrutinib(ARQ531)、Pirtobrutinib(Loxo-305)的活性相当,部分化合物明显优于阳性药。

[0073] 本发明提供所述化合物,其立体异构体,其前药,其代谢产物或其药学上可接受的

盐及其药物组合物在制备肿瘤药物中的应用。

[0074] 所述肿瘤为B细胞恶性肿瘤。

[0075] 所述肿瘤选自淋巴瘤、白血病、前列腺癌、胃癌。

[0076] 具体的,所述肿瘤选自弥漫大B淋巴瘤、慢性髓原白血病、套淋巴瘤、Burkitt's淋巴瘤、前列腺癌、胃癌。

[0077] 所述肿瘤选自造血或淋巴组织肿瘤。

[0078] 所述造血或淋巴组织肿瘤选自非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、骨髓增殖性肿瘤、骨髓增生异常综合征、前体淋巴细胞肿瘤或其他恶性造血组织肿瘤。

[0079] 所述非霍奇金淋巴瘤选自成熟B细胞淋巴瘤或前体淋巴细胞肿瘤。

[0080] 所述成熟B细胞肿瘤选自滤泡性淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、成熟B细胞肿瘤伴白血病行为、浆细胞肿瘤、其他特指的成熟B细胞肿瘤或淋巴瘤。

[0081] 所述弥漫大B细胞淋巴瘤选自原发纵隔大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、原发中枢神经系统弥漫大B细胞淋巴瘤、原发皮肤弥漫大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤。

[0082] 所述成熟B细胞肿瘤伴白血病行为选自慢性淋巴细胞白血病或小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤。

[0083] 所述浆细胞肿瘤选自浆细胞骨髓瘤、孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、浆细胞白血病、单克隆免疫球蛋白沉积病。

[0084] 所述其他特指的成熟B细胞肿瘤或淋巴瘤选自淋巴结边缘区淋巴瘤、胃黏膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤、胃或皮肤以外的结外边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤包括伯基特白血病、脾边缘区B细胞淋巴瘤、玻璃体视网膜淋巴瘤。

[0085] 所述前体淋巴细胞肿瘤选自前体B淋巴母细胞肿瘤。

[0086] 所述前体B淋巴母细胞肿瘤选自B淋巴母细胞白血病或B淋巴母细胞淋巴瘤。

[0087] 所述骨髓增殖性肿瘤选自慢性髓细胞性白血病。

[0088] 所述恶性造血组织肿瘤选自急性白血病、髓系白血病、慢性髓系白血病、淋巴细胞白血病。

[0089] 一系列肿瘤细胞测试结果表明:本发明提供了一类结构新颖的BTK抑制活性化合物,与现有的化合物相比,本发明的化合物具有更低的肿瘤细胞抑制浓度。本发明化合物对BTK激酶的抑制活性均在纳摩尔级别,具体在小于1nM的范围,部分化合物的抑制活性在0.01-0.1nM范围。

[0090] 本发明的BTK抑制剂具备优异的药物的活性和选择性,更低的毒副作用和较好的理化性质,同时发现应对HCK激酶,可协同治疗携带C481S耐药突变的淋巴瘤等肿瘤疾病。

[0091] 本发明提供一种治疗B细胞恶性肿瘤的方法,包括将治疗有效量的上述的所述化合物,其立体异构体或其药学上可接受的盐及其药物组合物施用于受试者或患者。

[0092] 本发明提供的化合物对BTK激酶具有优异的抑制活性。本发明提供的化合物具备极大的产业化和商品化前景以及市场价值,经济效益显著。

[0093] 虽然本文已经显示和描述了本发明的优选实施方案,但对本领域技术人员显而易见的是,此类实施方案仅通过举例的方式提供。现在,本领域技术人员会想到不背离本发明的许多改变、变化和替代。应理解的是,对本发明所述的本发明实施方案的各种替代可用于

实施本发明。所附权利要求旨在限定本发明范围,并且由此覆盖了在这些权利要求范围内的方法和结构及其等同形式。

#### [0094] 某些化学术语

[0095] 除非另有定义,否则本文所有科技术语具有的涵义与权利要求主题所属领域技术人员通常理解的涵义相同。除非另有说明,本文全文引用的所有专利、专利申请、公开材料通过引用方式整体并入本文。

[0096] 应理解,上述简述和下文的详述为示例性且仅用于解释,而不对本申请主题作任何限制。在本申请中,除非另有具体说明,否则使用单数时也包括复数。还应注意,除非另有说明,否则所用“或”、“或者”表示“和/或”。此外,所用术语“包括”以及其它形式,例如“包含”、“含”和“含有”都属非限制性描述。

[0097] 可在参考文献(包括Carey and Sundberg“ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY 4TH ED.”Vols.A(2000)and B(2001),Plenum Press,New York)中找到对标准化学术语的定义。除非另有说明,否则采用本领域技术范围内的常规方法,如质谱、NMR和药理学方法。除非提出具体定义,否则本文在分析化学、有机合成化学以及药物和药物化学的有关描述中采用的术语是本领域已知的。可在化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送,以及对患者的治疗中使用标准技术。例如,可利用厂商对试剂盒的使用说明,或者按照本领域公知的方式或本申请的说明来实施反应和进行纯化。通常可根据本说明书中引用和讨论的多个概要性和较具体的文献中的描述,按照本领域熟知的常规方法实施上述技术和方法。在本说明书中,可由本领域技术人员选择基团及其取代基以提供稳定的结构部分和化合物。

[0098] 当通过从左向右书写的常规化学式描述取代基时,该取代基也同样包括从右向左书写结构式时所得到的在化学上等价的取代基。举例而言, $\text{CH}_2\text{O}$ 等同于 $\text{OCH}_2$ 。

[0099] 本申请所述的“化合物”是指包括所有立体异构体、几何异构体、互变异构体和同位素。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取代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。本申请化合物还包括互变异构体形式。互变异构体形式来源于一个单键与相邻的双键交换并一起伴随一个质子的迁移。本申请的化合物还包括所有同位素的原子,无论是在中间体或最后的化合物。同位素的原子包括具有相同的原子数,但不同质量数。例如,氢的同位素包括氕和氘。也就是说,本申请的化合物包括部分氢或全部氢(H)被氚(T)和/或氘(D)所替代的化合物;还包括部分或全部 $^{12}\text{C}$ 被 $^{13}\text{C}$ 和/或 $^{14}\text{C}$ 替代的化合物;以及其他同位素(如N,O,P,S)之间替代的化合物,如 $^{14}\text{N}$ 与 $^{15}\text{N}$ ;  $^{18}\text{O}$ 与 $^{17}\text{O}$ ;  $^{31}\text{P}$ 与 $^{32}\text{P}$ ;  $^{35}\text{S}$ 与 $^{36}\text{S}$ 等。本文所述化合物可具有一个或多个立体异构中心,且各个异构中心可以以R或S构型或其组合的形式存在。类似地,本文所述化合物可具有一个或多个双键,且各双键可以以E(反式)或Z(顺式)构型或其组合的形式存在。一个特定的立体异构体、结构异构体、非对映异构体、对映异构体或差向异构体应被理解为包括所有可能的异构体,如立体异构体、结构异构体、非对映异构体、对映异构体或差向异构体及其混合物。因此,本文所述化合物包括所有构型上不同的立体异构体、结构异构体、非对映异构体、对映异构体或差向异构体形式以及其相应的混合物。用于转化特定立体异构体或使特定立体异构体保持原状的技术,以及拆分立体异构体混合物的技术是本领域熟知的,本领域技术人

员能够就具体情况选择适合的方法。

[0100] 术语“任选/任意”或“任选地/任意地”是指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,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。

[0101] 本文所用 $C_{1-3}$ 或C1-3是指该部分中具有1-3个碳原子,即基团包含1个碳原子,2个碳原子、3个碳原子。因此,举例而言“C1-3烷基”是指在有1-3个碳原子的烷基,即所述烷基选自甲基、乙基、丙基、异丙基。

[0102] 本文单独或组合使用的术语“烷基”是指任选取代的直链或任选取代的支链的脂肪族烃类。本文的“烷基”优选可具有1-10个碳原子,例如具有1-8个碳原子,或1-6个碳原子,或1-4个碳原子或1-3个碳原子。本文的烷基实施例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基等。

[0103] 本文组合使用的“烷基”包括与其他基团结合的烷基,例如烷氧基中的烷基。

[0104] 术语“5-12元杂芳环”是指环内具有4至11个碳原子和1至4个选自氮、氧和硫的杂原子的5元至12元共轭环系基团。除非本说明书中另外特别指明,否则杂芳基可为单环、双环、三环或更多环的环体系,还可以与上文所定义的环境基或杂环基稠合,条件是杂芳基经由芳香环上的原子通过单键与分子的其余部分连接。杂芳基中的氮、碳或硫原子可任选地被氧化;氮原子可任选地被季铵化。就本发明的目的而言,杂芳基优选为包含1至3个选自氮、氧和硫的杂原子的稳定的5元至12元芳香性基团。

[0105] 本文单独或组合使用的术语“卤素”选自F, Cl, Br, I。

[0106] 本文所用的术语“治疗”和其它类似的同义词包括缓解、减轻或改善疾病或病症症状,抑制疾病或病症,例如阻止疾病或病症的发展,缓解疾病或病症,使疾病或病症好转,缓解由疾病或病症导致的症状,或者中止疾病或病症的症状,预防其它症状,改善或预防导致症状的潜在代谢原因,此外,该术语包含预防的目的。该术语还包括获得治疗效果和/或预防效果。所述治疗效果是指治愈或改善所治疗的潜在疾病。此外,对与潜在疾病相关的一种或多种生理症状的治愈或改善也是治疗效果,例如尽管患者可能仍然受到潜在疾病的影响,但观察到患者情况改善。就预防效果而言,可向具有患特定疾病风险的患者施用所述组合物,或者即便尚未做出疾病诊断,但向出现该疾病的一个或多个生理症状的患者施用所述组合物。

[0107] 本文所使用术语“有效量”、“治疗有效量”或“药学有效量”是指服用后足以在某种程度上缓解所治疗的疾病或病症的一个或多个症状的至少一种活性物质(如本申请的化合物)的量。其结果可以为迹象、症状或病因的消减和/或缓解,或生物系统的任何其它所需变化。例如,用于治疗“有效量”是在临床上提供显著的病症缓解效果所需的包含本文公开化合物的组合物的量。可使用诸如剂量递增试验的技术测定适合于任意个体病例中的有效量。

[0108] 本文针对制剂、组合物或成分所用术语“可接受的”是指对接受治疗的受试者的一般健康情况没有长期的有害影响。

[0109] 本文所用术语“药学可接受的”是指不影响本申请化合物的生物活性或性质的物质(如载体或稀释剂),并且相对无毒,即该物质可施用于个体而不造成不良的生物反应或以不良方式与组合物中包含的任意组分相互作用。

[0110] 本文所用术语“药物组合物”是指本申请的化合物与至少一种药学可接受的物质

相混的混合物。所述药学可接受的物质包括但不限于载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂。

[0111] 本文所用术语“载体”是指相对无毒的物质,其有助于将本申请的化合物引入到细胞或组织中。

[0112] 本文所用术语“药学可接受的盐”是指保留了指定化合物的游离酸和游离碱的生物效力,并且在生物学或其它方面上没有不良作用的盐。本申请化合物还包括药学可以接受的盐。药学可接受的盐是指把母体化合物中的碱基基团转换成盐的形式。药学可接受的盐包括,但不仅限于,碱基基团例如胺(氨)基的无机或有机酸盐类。本申请药学可接受的盐可以由母体化合物合成,即母体化合物中的碱性基团与1-4当量的酸在一个溶剂系统中反应。合适的盐列举在Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p.1418和Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2(1977)中。

[0113] 除特别指示外,本申请中的盐指用有机酸/无机酸形成的酸式盐,以及用有机碱/无机碱形成的碱式盐。

[0114] “BTK”是指布鲁顿氏酪氨酸激酶。

[0115] 本文中,除非另有说明,这里提供的剂量和范围都是基于本发明化合物游离碱形式的分子量计算得到。

[0116] 文中的R<sub>1</sub>、NH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>等表述方式没有特殊说明下,等同于R<sub>1</sub>、NH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>。

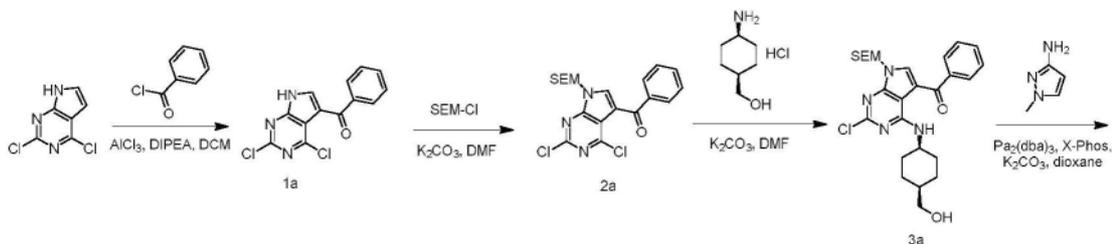
## 具体实施方式

[0117] 为了更清晰阐述本发明,在此列举一系列的实施例。这些实施例是例证性的,不应理解为对本发明的限制。

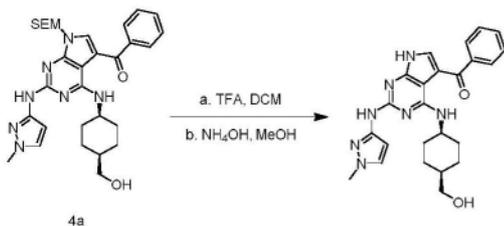
[0118] 本发明提供了制备相应化合物的方法,可以使用多种合成方法制备本文所述的化合物,包括下述实施例中所涉及的方法,本发明的化合物或者其药学上可接受的盐、异构体或水合物可以使用下述方法与有机化学合成领域已知的合成方法,或通过本领域技术人员理解对这些方法的变化方法合成,优选方法包括但不限于下述方法。

[0119] 实施例1

[0120] (4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮(DSB-001)



[0121]



[0122] 向250mL圆底烧瓶中加入2,4-二氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(5g)和二氯甲烷(150mL),冰水浴下搅拌下加入三氯化铝(14.15g),加毕,升温至室温搅拌0.5h,加入苯甲酰氯(9.2mL),升温至40°C搅拌24h。将反应液倒入冰水中,水相用二氯甲烷萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干,硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯8:1-3:1)分离得淡黄色固体1.99g(2,4-二氯-5-苯甲酰基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,中间体1a)。

[0123] 向100mL烧瓶中加入中间体1a(0.82g)、碳酸钾(1.2g)和DMF(20mL),油浴40°C搅拌下逐滴加入用DMF(20mL)稀释的SEM-C1(0.75mL),加毕,维持40°C搅拌2h。旋蒸蒸除大部分DMF,残余物用水悬浮,搅拌后抽滤,滤饼用水淋洗、烘干得白色固体0.77g(2,4-二氯-5-苯甲酰基-7-三甲基硅基乙氧基甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,中间体2a)。

[0124] 向250mL茄形瓶中加入中间体2a(0.47g)、DMF(20mL)、碳酸钾(0.62g)和顺式-4-氨基环己烷甲醇盐酸盐(0.28g),油浴90°C搅拌6h。旋蒸整除大部分DMF,体系加水,水相用乙酸乙酯(50mL×2)萃取,有机相饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,有机相旋干,经硅胶柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯10:1-5:1)得白色固体0.60g(2-氯-4-(4-(1s,4s)-4-羟甲基环己烷-1-氨基)-5-苯甲酰基-7-三甲基硅基乙氧基甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,中间体3a)。

[0125] 向250mL茄形瓶中加入中间体3a(200mg)、3-氨基-1-甲基-吡啶(50 $\mu$ L)、Pd2(dba)3(50mg)、X-phos(80mg)、碳酸钾(200mg),氮气保护下油浴110°C搅拌5h。反应液旋干,硅胶柱层析(二氯甲烷:甲醇50:1)分离得黄色固体350mg(2-(1-甲基-3-吡啶氨基)-4-(4-(1s,4s)-4-羟甲基环己烷-1-氨基)-5-苯甲酰基-7-三甲基硅基乙氧基甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,中间体4a)。

[0126] 向100mL茄形瓶中加入中间体4a(350mg)、二氯甲烷(10mL)和三氟乙酸(3mL),室温搅拌8h。反应液旋干,加入甲醇(10mL)和氨水(3mL),室温搅拌12h。体系倒入100mL水中,水相用二氯甲烷(50mL)萃取,二氯甲烷相旋干,经硅胶柱层析(二氯甲烷:甲醇30:1)分离得黄色固体160mg(4-(((1s,4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮。<sup>1</sup>H NMR(600MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ 12.23(s,1H),9.42-8.83(m,2H),7.78-7.73(m,2H),7.65-7.59(m,1H),7.57-7.50(m,3H),7.43(d,J=2.3Hz,1H),6.66(d,J=2.1Hz,1H),4.44(t,J=5.3Hz,1H),4.42-4.36(m,1H),3.74(s,3H),3.31-3.27(m,2H),1.89-1.80(m,2H),1.72-1.61(m,4H),1.58-1.48(m,1H),1.43-1.34(m,2H).MS/[M+H]<sup>+</sup>:446.2.

[0127] 实施例2-47采用通式I合成方法结合实施例1进行。

[0128]

实施例	名称	编号	氢谱数据	质谱数据 [M+H] <sup>+</sup>
2	(2-((4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-4-((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮	DSB-002	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.22 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 7.91 – 7.79 (m, 2H), 7.69 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.36 (t, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 6.94 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 4.96 – 4.75 (m, 1H), 4.45 – 4.38 (m, 1H), 3.75 – 3.68 (m, 2H), 3.32 – 3.28 (m, 2H), 2.79 (d, <i>J</i> = 3.9 Hz, 6H), 2.75 – 2.52 (m, 3H), 2.13 – 2.03 (m, 2H), 1.91 – 1.62 (m, 8H), 1.59 – 1.47 (m, 1H), 1.44 – 1.33 (m, 2H).	586.6
3	(1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并	DSB-003	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.12 (s, 1H), 8.98 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.87 – 7.80 (m, 2H), 7.66 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 2H), 7.42 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 7.35 (t, <i>J</i> =	614.3

[0129]

	[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙酸甲酯		8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 4.51 – 4.34 (m, 1H), 3.96 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.10 – 2.98 (m, 4H), 2.49 – 2.40 (m, 4H), 2.27 (q, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.91 – 1.84 (m, 2H), 1.81 – 1.73 (m, 1H), 1.73 – 1.65 (m, 2H), 1.65 – 1.58 (m, 2H), 1.54 – 1.45 (m, 2H), 0.96 (t, 3H).	
4	N-((1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺	DSB-004		613.3
5	N-((1s, 4s)-4-((2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺	DSB-005		627.4
6	(4-氟苯基)(4-((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮	DSB-006	$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 12.16 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 7.88 – 7.80 (m, 2H), 7.80 – 7.58 (m, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.40 – 7.30 (m, 2H), 7.15 – 6.81 (m, 2H), 4.43 – 4.37 (m, 1H), 3.71 – 3.61 (m, 3H), 3.61 – 3.31 (m, 7H), 3.26 – 3.12 (m, 2H), 3.11 – 2.82 (m, 4H), 2.74 (s, 3H), 2.07 – 1.89 (m, 2H), 1.89 – 1.80 (m, 2H), 1.76 – 1.59 (m, 6H), 1.58 – 1.49 (m, 1H), 1.44 –	641.4

[0130]

			1.34 (m, 2H).	
7	(3,4-二氟苯基)(4-((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮	DSB-007	$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) $\delta$ 12.11 (s, 1H), 8.88 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.82 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.69 – 7.54 (m, 2H), 7.51 (s, 2H), 4.44 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.42 – 4.27 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.31 – 3.25 (m, 2H), 1.90 – 1.79 (m, 2H), 1.73 – 1.58 (m, 4H), 1.55 – 1.50 (m, 1H), 1.44 – 1.32 (m, 2H).	482.2
8	(4-((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮	DSB-008	$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) $\delta$ 12.09 (s, 1H), 9.02 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.79 – 7.73 (m, 2H), 7.67 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.64 – 7.60 (m, 1H), 7.53 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 4.45 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.43 – 4.38 (m, 1H), 3.31 – 3.26 (m, 2H), 3.17 – 2.96 (m, 4H), 2.63 – 2.51 (m, 4H), 2.28 (s, 3H), 1.89 – 1.81 (m, 2H), 1.71 – 1.60 (m, 4H), 1.58 – 1.48 (m, 1H), 1.44 – 1.34 (m, 2H).	540.3
9	(4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((4-吗啉苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮	DSB-009	$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) $\delta$ 12.09 (s, 1H), 9.02 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.75 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.53 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.50 – 4.36 (m, 2H), 3.78 – 3.71 (m, 4H), 3.31 – 3.28 (m, 2H), 3.07 – 2.97 (m, 4H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.71 – 1.63 (m, 4H), 1.58 – 1.48 (m, 1H), 1.45 – 1.35 (m, 2H).	527.3

[0131]

10	(4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮	DSB-010	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.02 (s, 1H), 9.02 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.77 – 7.72 (m, 2H), 7.62 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.57 – 7.48 (m, 3H), 7.37 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H), 4.54 – 4.41 (m, 1H), 4.41 – 4.32 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.31 – 3.27 (m, 2H), 1.91 – 1.80 (m, 2H), 1.73 – 1.60 (m, 4H), 1.56 – 1.47 (m, 1H), 1.44 – 1.33 (m, 2H).	446.2
11	(2-((1-环丁基-1H-吡啶-4-基)氨基)-4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮	DSB-011	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.05 (s, 1H), 8.97 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.88 – 7.80 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.43 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H), 7.35 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 4.80 – 4.68 (m, 1H), 4.55 – 4.43 (m, 1H), 4.41 – 4.31 (m, 1H), 3.31 – 3.24 (m, 2H), 2.45 – 2.32 (m, 4H), 1.94 – 1.82 (m, 2H), 1.82 – 1.74 (m, 2H), 1.73 – 1.60 (m, 4H), 1.56 – 1.49 (m, 1H), 1.46 – 1.32 (m, 2H).	504.3
12	(4-氟苯基)(4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-甲氧基乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮	DSB-012	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.05 (s, 1H), 8.97 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.85 – 7.77 (m, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.41 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H), 7.35 (t, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 4.44 (t, <i>J</i> = 5.1 Hz, 1H), 4.41 – 4.29 (m, 1H), 4.18 (t, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H), 3.66 (t, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H), 3.31 – 3.27 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 1.91 – 1.81 (m, 2H), 1.73 – 1.61 (m, 4H), 1.58 – 1.48 (m, 1H), 1.44 – 1.33 (m, 2H).	508.2
13	(4-氟苯基)(4-	DSB-013	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.04 (s,	563.3

[0132]

	((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮		<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.04 (s, 1H), 8.97 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.85 – 7.80 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.35 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 4.44 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 4.43 – 4.33 (m, 1H), 4.15 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 3.61 – 3.51 (m, 4H), 3.30 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.69 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 2.45 – 2.33 (m, 4H), 1.94 – 1.82 (m, 2H), 1.72 – 1.61 (m, 4H), 1.58 – 1.48 (m, 1H), 1.44 – 1.34 (m, 2H).	
14	(4-氟苯基)(4-((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((1-(3-吗啉丙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮	DSB-014	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.04 (s, 1H), 8.96 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.85 – 7.79 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.38 – 7.32 (m, 2H), 4.44 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 4.41 – 4.34 (m, 1H), 4.06 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 3.57 (t, <i>J</i> = 4.5 Hz, 4H), 3.32 – 3.26 (m, 2H), 2.38 – 2.27 (m, 4H), 2.27 – 2.19 (m, 2H), 1.95 – 1.82 (m, 4H), 1.72 – 1.60 (m, 4H), 1.58 – 1.47 (m, 1H), 1.45 – 1.32 (m, 2H).	577.3
15	(2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-4-((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮	DSB-015	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.07 (s, 1H), 8.97 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.86 – 7.79 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 7.35 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 4.45 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 4.43 – 4.34 (m, 1H), 4.14 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 3.32 – 3.27 (m, 2H), 2.73 – 2.61 (m, 2H), 2.20 (s, 6H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.73 – 1.60 (m, 4H), 1.59 – 1.48 (m, 1H), 1.47 – 1.33 (m, 2H).	521.3
16	(2-((1-(2-(二乙基	DSB-016	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.01 (s,	531.3

[0133]

	氨基)乙基)-1H-吡唑-4-基)氨基)-4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮		<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 12.02 (s, 1H), 9.03 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.78 – 7.72 (m, 2H), 7.62 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.57 – 7.44 (m, 3H), 7.38 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H), 4.44 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 4.42 – 4.34 (m, 1H), 4.25 – 3.84 (m, 2H), 3.31 – 3.28 (m, 2H), 2.88 – 2.64 (m, 2H), 2.50 – 2.43 (m, 4H), 1.91 – 1.81 (m, 2H), 1.71 – 1.60 (m, 4H), 1.58 – 1.47 (m, 1H), 1.46 – 1.34 (m, 2H), 0.94 (s, 6H).	
17	N-((1r, 4r)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺	DSB-017	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 12.02 (s, 1H), 8.83 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H), 7.72 – 7.62 (m, 2H), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.16 (t, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 6.77 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.28 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 4.08 – 3.97 (m, 1H), 3.91 – 3.76 (m, 1H), 3.08 – 2.93 (m, 4H), 2.61 – 2.52 (m, 4H), 2.37 (s, 3H), 2.35 – 2.28 (m, 1H), 2.26 – 2.19 (m, 2H), 2.12 – 2.06 (m, 2H), 1.58 – 1.48 (m, 2H), 1.35 – 1.29 (m, 2H), 1.16 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 6H).	613.3
18	(4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((5-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮	DSB-018	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.72 (s, 1H), 11.79 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.82 – 7.73 (m, 2H), 7.63 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.54 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.45 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 4.43 – 4.29 (m, 1H), 3.32 – 3.28 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.76 – 1.62 (m, 4H), 1.60 – 1.49 (m, 1H), 1.47 – 1.33 (m, 2H).	446.2
19	(4-(((1s, 4s)-4-	DSB-019	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.92 (s,	474.3

[0134]

	(羟甲基)环己基)氨基)-2-((5-异丙基-1H-吡唑-3-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮		<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.62 (s, 1H), 11.84 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 7.82 – 7.73 (m, 2H), 7.63 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.55 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 4.60 – 4.43 (m, 1H), 4.43 – 4.27 (m, 1H), 3.08 – 2.82 (m, 1H), 1.97 – 1.82 (m, 2H), 1.74 – 1.62 (m, 4H), 1.59 – 1.50 (m, 1H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.25 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 6H).	
20	(2-((5-环丙基-1H-吡唑-3-基)氨基)-4-((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮	DSB-020	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.62 (s, 1H), 11.84 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.79 – 7.74 (m, 2H), 7.63 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.54 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.45 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 4.44 – 4.29 (m, 1H), 3.32 – 3.28 (m, 2H), 1.97 – 1.78 (m, 3H), 1.74 – 1.62 (m, 4H), 1.60 – 1.50 (m, 1H), 1.46 – 1.34 (m, 2H), 1.01 – 0.85 (m, 2H), 0.76 – 0.60 (m, 2H).	472.2
21	(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮	DSB-021	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.10 (s, 1H), 8.84 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.84 – 7.77 (m, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.45 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H), 7.38 – 7.31 (m, 2H), 6.93 – 6.47 (m, 1H), 6.14 – 5.89 (m, 1H), 5.71 – 5.32 (m, 1H), 4.27 – 4.17 (m, 1H), 3.93 – 3.81 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.67 – 3.57 (m, 1H), 3.58 – 3.35 (m, 1H), 3.32 – 2.97 (m, 1H), 2.17 – 2.03 (m, 1H), 1.93 – 1.80 (m, 1H), 1.80 – 1.64 (m, 1H), 1.64 – 1.52 (m, 1H).	489.2
22	(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-	DSB-022	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.13 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 7.89 (s,	574.3

[0135]

	(2-吗啉乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮		<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.18 (s, 1H), 7.86 – 7.76 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.35 (t, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 6.73 – 6.49 (m, 1H), 6.28 – 6.04 (m, 1H), 5.74 – 5.61 (m, 1H), 4.83 – 4.56 (m, 1H), 4.24 – 4.11 (m, 2H), 4.09 – 3.81 (m, 1H), 3.81 – 3.73 (m, 1H), 3.66 – 3.45 (m, 6H), 2.76 – 2.63 (m, 2H), 2.46 – 2.22 (m, 5H), 2.15 – 1.95 (m, 1H).	
23	(R)-1-(3-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((1-(2-吗啉乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮	DSB-023	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.18 (s, 1H), 8.93 – 8.76 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.65 – 7.55 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.41 – 7.24 (m, 3H), 6.72 – 6.52 (m, 1H), 6.22 – 6.09 (m, 1H), 5.74 – 5.59 (m, 1H), 4.81 – 4.58 (m, 1H), 4.11 – 3.82 (m, 1H), 3.82 – 3.71 (m, 4H), 3.65 – 3.43 (m, 2H), 2.45 – 2.27 (m, 1H), 2.16 – 1.91 (m, 1H).	475.2
24	(R)-1-(3-((2-((1-(2-(二甲基氨基)乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮	DSB-024	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.19 (s, 1H), 9.04 – 8.90 (m, 1H), 8.84 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.85 – 7.79 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.50 – 7.46 (m, 1H), 7.38 – 7.32 (m, 2H), 6.72 – 6.48 (m, 1H), 6.23 – 6.05 (m, 1H), 5.76 – 5.57 (m, 1H), 4.79 – 4.59 (m, 1H), 4.19 – 4.09 (m, 2H), 3.89 – 3.72 (m, 2H), 3.64 – 3.50 (m, 2H), 2.67 – 2.58 (m, 2H), 2.45 – 2.24 (m, 1H), 2.23 – 2.13 (m, 6H), 2.14 – 1.92 (m, 1H).	532.3
25	(R)-1-(3-((5-(2,4-二氟苯甲酰基)-2-((1-甲基-1H-吡啶-4-基)氨基)-7H-吡咯并	DSB-025	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.21 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.84 – 8.68 (m, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.67 (dd, <i>J</i> = 15.0, 8.3 Hz, 1H), 7.51 (d, <i>J</i> = 2.9 Hz, 1H), 7.46 – 7.37 (m,	493.2

[0136]

	[2,3-d]嘧啶-4-基)胺基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮		2H), 7.25 – 7.17 (m, 1H), 6.69 – 6.54 (m, 1H), 6.19 – 6.11 (m, 1H), 5.72 – 5.63 (m, 1H), 4.80 – 4.58 (m, 1H), 4.07 – 3.76 (m, 5H), 3.63 – 3.45 (m, 2H), 2.45 – 2.26 (m, 1H), 2.18 – 1.94 (m, 1H).	
26	N-((1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丁酰胺	DSB-026	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.13 (s, 1H), 8.86 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.88 – 7.83 (m, 2H), 7.81 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.66 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 2H), 7.44 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H), 7.39 – 7.32 (m, 2H), 6.84 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 2H), 4.33 – 4.10 (m, 1H), 3.91 – 3.62 (m, 1H), 3.11 – 2.98 (m, 4H), 2.49 – 2.41 (m, 4H), 2.23 (s, 3H), 2.06 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 1.91 – 1.83 (m, 2H), 1.82 – 1.75 (m, 2H), 1.72 – 1.57 (m, 4H), 1.56 – 1.44 (m, 2H), 0.84 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H).	613.3
27	N-((1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)环丙烷甲酰胺	DSB-027	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.13 (s, 1H), 8.89 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.09 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.89 – 7.82 (m, 2H), 7.67 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 2H), 7.44 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.36 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 6.85 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 2H), 4.29 – 4.18 (m, 1H), 3.84 – 3.69 (m, 1H), 3.15 – 2.96 (m, 4H), 2.56 – 2.51 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 1.94 – 1.83 (m, 2H), 1.83 – 1.74 (m, 2H), 1.73 – 1.59 (m, 5H), 0.68 – 0.56 (m, 4H).	611.3
28	(2-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)	DSB-028	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.19 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.69 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.65 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 7.63 – 7.56 (m, 2H), 7.41 – 7.26 (m, 3H), 6.85 (d, <i>J</i> = 9.1	530.3

[0137]

	-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基) 甲酮		Hz, 2H), 4.39 – 4.19 (m, 1H), 4.00 – 3.87 (m, 2H), 3.59 – 3.46 (m, 2H), 3.11 – 3.00 (m, 4H), 2.54 – 2.50 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 2.15 – 2.01 (m, 2H), 1.64 – 1.47 (m, 2H).	
29	(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮	DSB-029	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.11 (s, 1H), 8.83 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.75 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 7.72 – 7.58 (m, 3H), 7.53 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 6.85 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 4.33 – 4.20 (m, 1H), 4.00 – 3.88 (m, 2H), 3.59 – 3.46 (m, 2H), 3.11 – 2.99 (m, 4H), 2.49 – 2.41 (m, 4H), 2.23 (s, 3H), 2.14 – 2.00 (m, 2H), 1.69 – 1.43 (m, 2H).	512.3
30	(2-((4-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮	DSB-030	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.14 (s, 1H), 8.85 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.78 – 7.74 (m, 2H), 7.73 – 7.69 (m, 2H), 7.65 – 7.59 (m, 1H), 7.53 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 6.85 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 2H), 4.33 – 4.20 (m, 1H), 4.03 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H), 3.99 – 3.89 (m, 2H), 3.57 – 3.47 (m, 2H), 2.79 – 2.61 (m, 2H), 2.29 (s, 6H), 2.13 – 2.00 (m, 2H), 1.63 – 1.49 (m, 2H).	501.3
31	(2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(苯基)甲酮	DSB-031	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.11 (s, 1H), 8.84 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.75 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 7.71 – 7.59 (m, 3H), 7.54 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 6.85 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 4.32 – 4.21 (m, 1H), 3.98 – 3.90 (m, 2H), 3.55 – 3.51 (m, 2H), 3.10 – 3.01 (m, 4H), 2.51 – 2.46 (m, 4H), 2.37 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 2.14 – 2.00	526.3

[0138]

			(m, 2H), 1.60 – 1.51 (m, 2H), 1.03 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).	
32	N-((1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)甲磺酰胺	DSB-032		621.3
33	N-((1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)乙酰胺	DSB-033		585.3
34	N-((1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙酰胺	DSB-034		599.3
35	N-((1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)丙烷-1-磺酰胺	DSB-035		649.3
36	N-((1s, 4s)-4-((5-	DSB-036		647.3

[0139]

	(4-氟苯甲酰基)-2- ((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)环丙烷磺酰胺			
37	(4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢-2H-吡喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮	DSB-037		531.3
38	(R) - (4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢呋喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮	DSB-038		517.2
39	(S) - (4-氟苯基)(2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-4-((四氢呋喃-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮	DSB-039		517.2
40	N-((1r, 4r)-4-((2-((3-氟-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己	DSB-040	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 10.69 (s, 1H), 8.83 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.80 – 7.65 (m, 3H), 7.17 (t, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.03 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.84 (t, <i>J</i> = 9.1 Hz, 2H), 5.32 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 4.09 – 3.97 (m, 1H), 3.92 – 3.83 (m, 1H), 3.16 –	631.3

[0140]

	基) 异丁酰胺		3.04 (m, 4H), 2.80 – 2.62 (m, 4H), 2.43 (s, 3H), 2.37 – 2.30 (m, 1H), 2.29 – 2.23 (m, 2H), 2.13 – 2.06 (m, 2H), 1.60 – 1.50 (m, 2H), 1.40 – 1.31 (m, 2H), 1.17 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H).	
41	N-((1r, 4r)-4-((2-((4-(4-乙基哌嗪-1-基) 苯基) 氨基) -5-(4-氟苯甲酰基) -7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基) 氨基) 环己基) 异丁酰胺	DSB-041	$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 11.99 (s, 1H), 8.83 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.72 – 7.62 (m, 2H), 7.49 – 7.37 (m, 2H), 7.16 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.80 – 6.74 (m, 2H), 6.68 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.08 – 3.96 (m, 1H), 3.88 – 3.77 (m, 1H), 3.14 – 3.00 (m, 4H), 2.78 – 2.61 (m, 4H), 2.59 – 2.51 (m, 2H), 2.37 – 2.28 (m, 1H), 2.26 – 2.19 (m, 2H), 2.13 – 2.06 (m, 2H), 1.59 – 1.48 (m, 2H), 1.35 – 1.29 (m, 2H), 1.20 – 1.14 (m, 9H).	
42	(3-氟苯基)(4-((1r, 4r)-4-(羟甲基) 环己基) 氨基) -2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基) 苯基) 氨基) -7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基) 甲酮	DSB-042	$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ 12.14 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.61 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.60 – 7.50 (m, 3H), 7.50 – 7.40 (m, 2H), 6.83 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.43 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.12 – 3.89 (m, 1H), 3.31 – 3.25 (m, 2H), 3.10 – 3.00 (m, 4H), 2.55 – 2.52 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 2.20 – 2.10 (m, 2H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.50 – 1.38 (m, 1H), 1.34 – 1.20 (m, 2H), 1.15 – 1.00 (m, 2H).	
43	((1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基) -2-((4-(4-甲基哌嗪-1-	DSB-043	$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ 12.13 (s, 1H), 8.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.84 (dd, $J = 8.5, 5.6$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J =$	

[0141]

	基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)乙酸甲酯		9.0 Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.51 – 4.33 (m, 1H), 3.94 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.24 – 2.98 (m, 4H), 2.80 (s, 3H), 2.50 – 2.40 (m, 4H), 1.98 (s, 3H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 1.72 – 1.59 (m, 4H), 1.52 – 1.45 (m, 2H).	
44	(2-((4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-基)-2-甲氧基苯基)氨基)-4-(((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)(4-氟苯基)甲酮	DSB-044	$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 12.18 (s, 1H), 8.99 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.84 (dd, $J = 8.6, 5.6$ Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.35 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.18 (s, 1H), 6.65 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.49 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H), 4.45 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.42 – 4.27 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.77 – 3.64 (m, 2H), 3.30 – 3.28 (m, 2H), 2.99 – 2.67 (m, 1H), 2.66 – 2.60 (m, 2H), 2.57 – 2.50 (m, 6H), 2.06 – 1.93 (m, 2H), 1.88 – 1.79 (m, 2H), 1.72 – 1.61 (m, 6H), 1.55 – 1.47 (m, 1H), 1.43 – 1.33 (m, 2H).	
45	(1s, 4s)-4-((5-(4-氟苯甲酰基)-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酸甲酯	DSB-045	$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 12.12 (s, 1H), 8.98 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.88 – 7.80 (m, 2H), 7.66 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 4.51 – 4.34 (m, 1H), 3.95 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.11 – 2.98 (m, 4H), 2.49 – 2.42 (m, 4H), 2.24 (s, 3H), 1.94 – 1.86 (m, 2H), 1.81 – 1.73 (m, 1H), 1.73 – 1.65 (m, 2H), 1.65 – 1.57 (m, 2H), 1.56 – 1.47 (m, 2H), 1.02 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H).	

[0142]	46 (4-氟苯基)(4-((1s, 4s)-4-(羟甲基)环己基)氨基)-2-((2-甲氧基-4-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)苯基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲酮	DSB-046	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 12.32 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.89 – 7.81 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.40 – 7.33 (m, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 4.39 – 4.30 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.79 – 3.70 (m, 3H), 3.68 – 3.33 (m, 7H), 3.31 – 3.27 (m, 2H), 3.07 – 2.79 (m, 4H), 2.73 (s, 3H), 2.06 – 1.91 (m, 2H), 1.90 – 1.79 (m, 2H), 1.73 – 1.58 (m, 6H), 1.57 – 1.48 (m, 1H), 1.44 – 1.30 (m, 2H).	671.4
	47 N-((1s, 4s)-4-((2-((3-氟-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-5-(4-氟苯甲酰基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环己基)异丁酰胺	DSB-047		631.7

[0143] 实施例48BTK体外酶学实验

[0144] 1. 1X激酶缓冲液的制备

[0145] 1体积的5倍浓度的酶缓冲液用4体积的蒸馏水稀释；5mM氯化镁；1mM DTT；1mM MnCl<sub>2</sub>。

[0146] 2. 化合物活性测试方法

[0147] a) 使用Echo 655将化合物稀释液转移到检测板(784075, Greiner)的每个孔中；

[0148] b) 密封测定板, 将检测板以1000g离心1分钟；

[0149] c) 在1X激酶缓冲液中制备2X BTK；

[0150] d) 将5μl的2X BTK加入384孔检测板中；

[0151] e) 检测板在1000g离心30秒, 室温孵育15分钟；

[0152] f) 在1X激酶缓冲液中制备2XpolyE4Y1和ATP混合液；

[0153] g) 加入2X的2XpolyE4Y1和ATP混合液开始反应；

[0154] h) 检测板在1000g离心30秒。密封检测板, 室温孵育1小时；

[0155] i) 加入ADP-Glo试剂, 室温孵育1小时；

[0156] j) 加入激酶检测试剂, 室温孵育1小时；

[0157] k) 检测板在1000g离心30秒, 室温孵育1小时；

[0158] l) 在Envision 2104读板器上读取荧光信号。

[0159] 3. 数据分析

[0160] 3.1 检测每个孔的信号。

[0161] 3.2 抑制率计算如下：

[0162] %抑制率=100-(Signalcmpd-SignalAve\_PC)/(SignalAve\_VC-SignalAve\_PC)×100。

[0163] 3.3计算化合物的IC<sub>50</sub>值并绘制化合物的量效曲线:

[0164] 使用GraphPad 6.0把化合物浓度的对数对抑制率作非线性回归曲线(量效关系-可变斜率)来计算IC<sub>50</sub>值。

[0165]  $Y = \text{最低值} + (\text{最高值} - \text{最低值}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{斜率}))}$

[0166] X:抑制剂浓度的对数;Y:抑制率。

[0167] 3.4报告双重检验

[0168] 3.4.1一名检测人员完成报告后,另一名检测人员再次检查报告以确保数据分析正确。

[0169] 3.4.2数据从软件中导出并手动分析。

[0170] 3.4.2.1将比率转换为抑制率。所有的IC<sub>50</sub>值使用Prism GraphPad 6.0利用抑制率计算。

[0171] 3.4.2.2然后利用比值再次计算IC<sub>50</sub>值以检查分析结果的准确性。

[0172] 3.4.3用上述方法,测定本发明化合物对BTK激酶的活性。

[0173] 本发明化合物对BTK的激酶活性的测定结果如表1所示。

[0174] 表1化合物对BTK的激酶抑制活性IC<sub>50</sub>(nM)

[0175]

化合物编号	BTK
DSB-013	+++
DSB-016	+++
Nemtabrutinib (ARQ531)	++
Ibrutinib	+++

[0176] +表示小于等于100nM; ++表示小于等于10nM; +++表示小于等于1nM; nd表示未测试。

[0177] 本发明化合物对BTK激酶具有良好的抑制活性,其中表1所列化合物的IC<sub>50</sub>值均小于1nM,与阳性药相当。

[0178] 实施例49 HCK体外酶学实验

[0179] 1.1x倍浓度激酶缓冲液的制备

[0180] 1体积的5倍浓度的酶缓冲液用4体积的蒸馏水稀释;5mM氯化镁;1mM DTT;1mM MnCl<sub>2</sub>。

[0181] 2.化合物活性测试方法

[0182] a) 使用Echo 550将化合物稀释液转移到检测板(784075, Greiner)的每个孔中;

[0183] b) 密封测定板,将检测板以1000g离心1分钟;

[0184] c) 在1X激酶缓冲液中制备2X HCK;

[0185] d) 将5μl的HCK激酶加入384孔检测板(784075, Greiner)中;

- [0186] e) 检测板在1000g离心30秒,室温孵育10分钟;
- [0187] f) 在1X激酶缓冲液中加入2x TK-底物-生物素和ATP混合;
- [0188] g) 加入5 $\mu$ l的TK-底物-生物素和ATP混合物开始反应;
- [0189] h) 检测板在1000g离心30秒。密封检测板,室温孵育40分钟;
- [0190] i) 在HTRF检测缓冲液中制备4X Sa-XL 665;
- [0191] j) 在检测板的每个孔中加入5 $\mu$ l Sa-XL 665和5 $\mu$ l TK-antibody-Cryptate;
- [0192] k) 检测板在1000g离心30秒,室温孵育1小时;
- [0193] l) 在Envision 2104读板器上读取615nm(Cryptate)和665nm(XL665)的荧光信号。
- [0194] 3. 数据分析
- [0195] 3.1 计算每个孔的比值(665/615nm)。
- [0196] 3.2 抑制率计算如下:
- [0197] %抑制率 =  $100 - (\text{Signal}_{\text{cmpd}} - \text{Signal}_{\text{Ave\_PC}}) / (\text{Signal}_{\text{Ave\_VC}} - \text{Signal}_{\text{Ave\_PC}}) \times 100$ 。
- [0198] 3.3 计算化合物的IC50值并绘制化合物的量效曲线:
- [0199] 使用GraphPad 6.0把化合物浓度的对数对抑制率作非线性回归曲线(量效关系-可变斜率)来计算IC50值。
- [0200]  $Y = \text{最低值} + (\text{最高值} - \text{最低值}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{斜率}))}$
- [0201] X: 抑制剂浓度的对数; Y: 抑制率。
- [0202] 3.4 报告双重检验
- [0203] 3.4.1 一名检测人员完成报告后, 另一名检测人员再次检查报告以确保数据分析正确。
- [0204] 3.4.2 数据从软件中导出并手动分析。
- [0205] 3.4.2.1 将比率转换为抑制率。所有的IC50值首次使用Prism GraphPad 6.0利用抑制率计算。
- [0206] 3.4.2.2 然后利用比值再次计算IC50值以检查分析结果的准确性。
- [0207] 3.4.3 用上述方法, 测定本发明化合物对HCK激酶的活性。
- [0208] 本发明化合物对HCK的激酶活性的测定结果如表2所示。
- [0209] 表2 化合物对HCK的激酶抑制活性IC50 (nM)

化合物编号	HCK
DSB-013	+++
DSB-016	+++
Nemtabrutinib (ARQ531)	+
TG100572	+

- [0210]
- [0211] +表示小于等于100nM; ++表示小于等于10nM; +++表示小于等于1nM; nd表示未测试。

[0212] 本发明化合物对HCK激酶具有良好的抑制活性,其中表2所列化合物的IC50值均小于1nM,优于阳性药。

[0213] 实施例50BTK-C481S体外酶学实验

[0214] 方法同实施例48中BTK激酶活性筛选实验,用BTK-C481S激酶替换BTK激酶。结果如表3所示。

[0215] 表3化合物对BTK-C481S的激酶抑制活性 (IC50, nM)

[0216]

化合物编号	BTK-C481S
DSB-040	+++
DSB-041	+++
DSB-042	+++
DSB-017	+++
DSB-043	++
DSB-002	+++
DSB-044	+++
DSB-045	++
DSB-003	++
DSB-004	+++
DSB-047	+++
DSB-005	+++

[0217]

DSB-006	+++
DSB-046	+++
DSB-007	++++
DSB-008	+++
DSB-009	++
DSB-010	++++
DSB-011	+++
DSB-012	++++
DSB-013	++++
DSB-014	++++
DSB-015	++++
DSB-016	++++
DSB-001	++
DSB-018	+++
DSB-019	+++
DSB-020	+++
DSB-021	+++
DSB-022	+++
DSB-023	+++
DSB-024	+++
DSB-025	+++
DSB-026	+++
DSB-027	+++
DSB-028	+++
DSB-029	+++
DSB-030	+++
DSB-031	+++
DSB-032	+++
DSB-033	+++
DSB-034	+++

[0218]	DSB-035	+++
	DSB-036	+++
	DSB-037	+++
	DSB-038	+++
	DSB-039	+++
	Ibrutinib	++
	Fenebrutinib(GDC-0853)	++
	Nemtabrutinib(ARQ531)	+++
	Pirtobrutinib(Loxo-305)	+++

[0219] +表示小于等于100nM; ++表示小于等于10nM; +++表示小于等于1nM; ++++表示小于等于0.1nM; nd表示未测试。

[0220] 本发明化合物对BTK-C481S激酶具有良好的抑制活性,其中表3所列化合物的IC50值大部分小于1nM,其中部分化合物的抑制活性在0.01-0.1nM范围,优于阳性药Ibrutinib和Fenebrutinib(GDC-0853)。

[0221] 实施例51细胞增殖抑制实验

[0222] 1. 实验分组

[0223] 实验组(A<sub>s</sub>):细胞+培养基+药物+cck-8;对照组(A<sub>0</sub>):细胞+培养基+cck-8,无药物;空白组(A<sub>c</sub>):培养基+cck-8,无细胞、药物。

[0224] 2. 实验细胞株

[0225] TMD8,人弥漫大B淋巴瘤细胞;

[0226] K562,人慢性髓原白血病细胞;

[0227] Jeko-1,人套淋巴瘤细胞;

[0228] Raji,人Burkitt's淋巴瘤细胞;

[0229] CEM/C1,人急性淋巴细胞白血病细胞;

[0230] PC-3,人前列腺癌细胞;

[0231] DU145,人前列腺癌细胞;

[0232] LNCaP,人前列腺癌细胞;

[0233] BGC-283,人胃癌细胞。

[0234] 3. 细胞培养

[0235] 3.1 细胞复苏

[0236] 从液氮中取出上述细胞的冻存管,立即放入37°C温水中并快速晃动,直至冻存液完全溶解;将细胞冻存液转移到离心管中,加入约3ml培养液,轻轻吹打混匀并在1000r/min条件下离心5分钟;弃去上清液,加入适量培养液转移至培养瓶内进行培养。

[0237] 3.2 细胞传代

[0238] 待培养瓶中的细胞覆盖率达到80%-90%时,将原有培养液吸掉并加入适量的胰

酶;待细胞变圆后,将胰酶弃掉,加入适量的培养液并用移液枪吹打混匀;弃去适量的细胞悬液并加入等量的培养液,放到培养箱中继续培养。

[0239] 4. 药物对细胞株的影响

[0240] 取上述对数生长期细胞,用培养液调整密度为1500-20000个/ml,每孔100 $\mu$ l,接种于96孔板,最外周每孔加入200 $\mu$ l生理盐水。在培养箱中培养6-30小时后加入不同浓度的化合物,每个药物浓度3个复孔,给药100 $\mu$ l每孔。培养72h,然后加入CCK-8溶液,15 $\mu$ l/孔。继续培养2h后在450nm波长处用酶标仪检测吸光度值。抑制率% = [(A0-AS)/(A0-AC)] $\times$ 100%。用Prism GraphPad 5.0软件计算化合物对细胞的IC<sub>50</sub>值。

[0241] 表4化合物对TMD8的抗增殖活性 (IC<sub>50</sub>, nM)

化合物编号	IC <sub>50</sub>
DSB-040	+
DSB-041	+
DSB-042	+
DSB-017	+
DSB-043	+
DSB-002	++
[0242] DSB-044	+
DSB-045	+
DSB-003	+
DSB-004	+
DSB-047	++
DSB-005	++
DSB-006	++
DSB-046	++

[0243]

DSB-007	++
DSB-008	++
DSB-009	++
DSB-010	+++
DSB-011	+++
DSB-012	+++
DSB-013	+++
DSB-014	+++
DSB-015	+++
DSB-016	+++
DSB-001	+
DSB-018	+
DSB-019	+
DSB-020	+
DSB-021	++
DSB-022	+++
DSB-023	+++
DSB-024	+++
DSB-025	++
DSB-026	+++
DSB-027	+++
DSB-028	+++
DSB-029	++
DSB-030	++
DSB-031	+++
DSB-032	++
DSB-033	++
DSB-034	+++
DSB-035	+++
DSB-036	+

[0244]	DSB-037	+
	DSB-038	+
	DSB-039	+
	Ibrutinib	>100
	Nemtabrutinib(ARQ531)	>100
	Pirtobrutinib(Loxo-305)	>8000

[0245] +表示小于等于100nM; ++表示小于等于10nM; +++表示小于等于1nM; nd表示未测试。

[0246] 本发明化合物对TMD8具有良好的抗增殖活性,其中表4所列化合物的IC50值小于100nM,其中大部分化合物的抗增殖活性在0.1-10nM范围,优于阳性药。

[0247] 表5DSB-013、DSB-016和DSB-026的体外抗细胞增殖活性 (IC50, nM)

Compds	K562	Jeko-1	TMD8	Raji	CEM/C1	PC-3	DU145	LNCaP	BGC-823
	CML	MCL	DLBCL						
DSB-013	<0.001	<5	<1	<1	<6	≤520	<1	<5	≤140
DSB-016	<0.001	<5	<1	nd	nd	nd	nd	<0.1	nd
DSB-026	<1	<50	<1	nd	nd	≤190	nd	<0.1	nd
Ibrutinib	>1100	>3500	≥130	nd	≥3800	nd	nd	nd	nd
ARQ531	>280	>260	≥400	>1700	>1200	nd	nd	>1000	nd
LOXO-305	>9000	>3000	>8700	>2800	>1900	>10000	>10000	>10000	>10000
Dasatinib	nd	>200	nd	nd	>1200	>10000	nd	nd	nd
恩杂鲁胺	nd	nd	nd	nd	nd	≥80	nd	<20	nd

[0249] nd,表示未测试。