

一类 *N*-磺酰酰胺含氮稠杂环类化合物及其应用

本申请要求申请日为 2023 年 10 月 20 日的中国专利申请 2023113669427 的优先权、2023 年 12 月 22 日的中国专利申请 2023117838674 的优先权、2024 年 3 月 7 日的中国专利申请 2024102622351 的优先权、2024 年 9 月 11 日的中国专利申请 2024112753956 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明属于药物领域，进一步属于具有成药性的 p53 Y220C 口袋结合剂药物领域，具体涉及一类 *N*-磺酰酰胺含氮稠杂环类化合物及其应用。

背景技术

TP53 基因的蛋白产物 (p53) 是迄今为止被认为的最重要的肿瘤抑制因子之一。与 *RB1*、*CDKN2A* 和 *PTEN* 在肿瘤中通过纯合缺失丢失不同，*TP53* 经常发现有体细胞错义突变 (Alexandrova E M et al. p53 loss-of-heterozygosity is a necessary prerequisite for mutant p53 stabilization and gain-of-function in vivo. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2661-e2661)。然而，迄今为止，靶向 p53 突变在临床治疗上尚未得到验证 (Levine A J. Targeting therapies for the p53 protein in cancer treatments. *Annu Rev Cancer Biol*, 2019, 3: 21-34)。 *TP53* 突变细胞积累高水平的突变 p53 蛋白，对野生型 (WT) p53 及其同源蛋白 p63 和 p73 产生显性负效应，使之失去对细胞周期和凋亡的正常调节功能 (Boettcher S et al. A dominant-negative effect drives selection of *Tp53* missense mutations in myeloid malignancies. *Science*, 2019, 365(6453): 599-604)。条件性调控小鼠组织中 p53 表达的实验结果表明，在不同的小鼠模型中，p53 表达的恢复可通过细胞凋亡抑制淋巴瘤和肉瘤生长 (Christophorou M A et al. Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 718-726; Martins C.P., Brown-Swigart L., Evan G.I. Modeling the Therapeutic Efficacy of p53 Restoration in Tumors. *Cell*. 2006;127:1323-1334)，为利用 p53 正常功能的恢复进行肿瘤治疗提供了理论依据。除了在具有完整的 *Tp53* 基因型的肿瘤中提升野生型 p53 活性之外，在表达突变型 p53 的肿瘤中恢复其野生型蛋白功能也是一种有前景的癌症治疗策略 (Yu X et al. Allele-specific p53 mutant reactivation. *Cancer cell*, 2012, 21(5): 614-625; Chen S et al. Arsenic trioxide rescues structural p53 mutations through a cryptic allosteric site. *Cancer cell*, 2021, 39(2): 225-239. e8)。

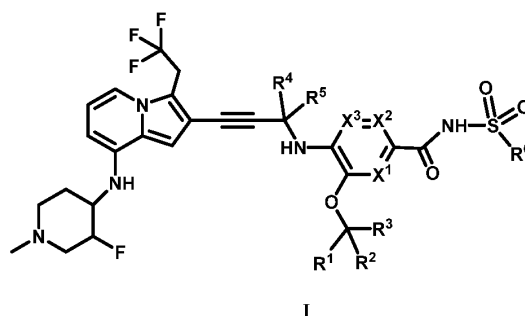
野生型 p53 的核心结构域是不稳定的，具有较低的热力学和动力学稳定性，允许在折叠和未折叠状态之间快速循环。突变型 p53 中这些核心区域残基的突变导致其热力学和动力学不稳定性增强，从而使核心 DNA 结合域失去 DNA 结合活性。这些效应可用于设计选择性结合 p53 蛋白天然状态的配体，以逆转这些突变导致的热力学和动力学变性 (Zhang S et al. Advanced Strategies for Therapeutic Targeting of Wild-Type and Mutant p53 in Cancer. *Biomolecules*. 2022,12(4):548)。值得注意的是，Y220C 这个特殊的突变介导了一个远离 DNA 结合核心结构域的表面口袋的形成 (Joerger A C et al. Structural

basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(41): 15056-15061), 这使其成为治疗具有这种突变的肿瘤的理想靶点。到目前为止, 已经开发了許多 Y220C 口袋结合剂来稳定该 p53 突变体并重新激活其转录活性, 但是效力有限 (Boeckler F M, et al. Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105(30): 10360-10365; Guiley K Z et al. A small molecule reacts with the p53 somatic mutant Y220C to rescue wild-type thermal stability. *Cancer Discov*, 2022: CD-22)。因此, 对于 p53 Y220C 突变的肿瘤患者, 迫切需要更强亲和力且更具有成药性的 p53 Y220C 口袋结合剂。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是现有的 p53 Y220C 口袋结合剂的成药性差, 为此, 而本发明提供了一类 *N*-磺酰酰胺含氮稠杂环类化合物及其应用。该类化合物能够提升 p53 Y220C 结合 DNA 的能力, 且对胃癌细胞为代表的癌症细胞增殖具有较佳的抑制活性。

本发明提供了一种如式 I 所示的含氮化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药;



I

其中,

X¹、X² 和 X³ 各自独立地选自 CH 和 N;

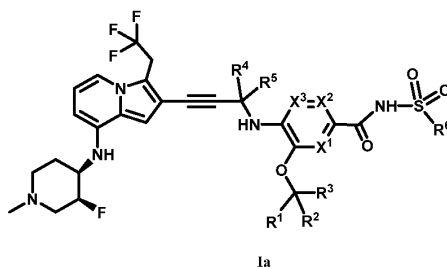
R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 各自独立地选自氢和氘;

R⁶ 为 -(CH₂)_nR⁷;

n 为 0、1、2 或 3;

R⁷ 选自 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基和 C3-C6 环烷基。

作为一个优选的技术方案, 所述的如式 I 所示的含氮化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药为如式 Ia 所示的含氮化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药;



其中,

X^1 、 X^2 和 X^3 各自独立地选自 CH 或 N;

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 各自独立地选自氢或氘;

R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$;

n 为 0、1、2 或 3;

R^7 选自 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基或 C3-C6 环烷基。

作为一个优选的技术方案, X^1 为 N; X^2 为 CH 或 N; X^3 为 CH。

作为一个优选的技术方案, X^1 为 N; X^2 和 X^3 为 CH。

作为一个优选的技术方案, R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$; n 为 0 或 1; R^7 选自 C1-C3 烷基、氘代 C1-C3 烷基、卤代 C1-C3 烷基或 C3-C6 环烷基。

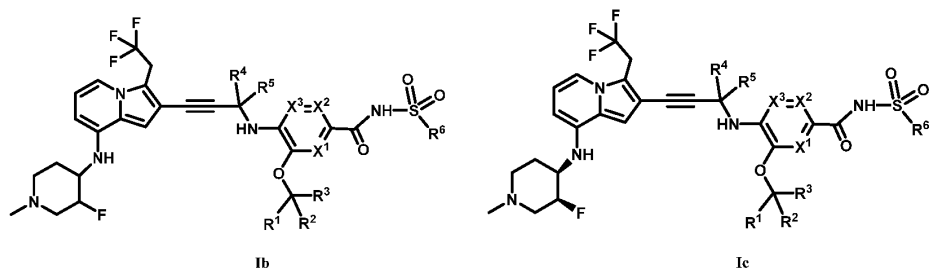
作为一个优选的技术方案, R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$; n 为 0 或 1; R^7 选自 $-CH_3$ 、 $-CD_3$ 、 $-CF_3$ 、环丙基。

作为一个优选的技术方案, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 各自独立地选自氢或氘, 且其中至少有一个为氘。

作为一个优选的技术方案, R^1 、 R^2 和 R^3 为氘; R^4 和 R^5 为氢。

作为一个优选的技术方案, R^1 、 R^2 和 R^3 为氢; R^4 和 R^5 为氘。

作为一个优选的技术方案, 通式 I 为通式 Ib 或 Ic;



式 Ib 和 Ic 中, 为 或 ;

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地选自氢和氘;

R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$;

n 为 0 或 1;

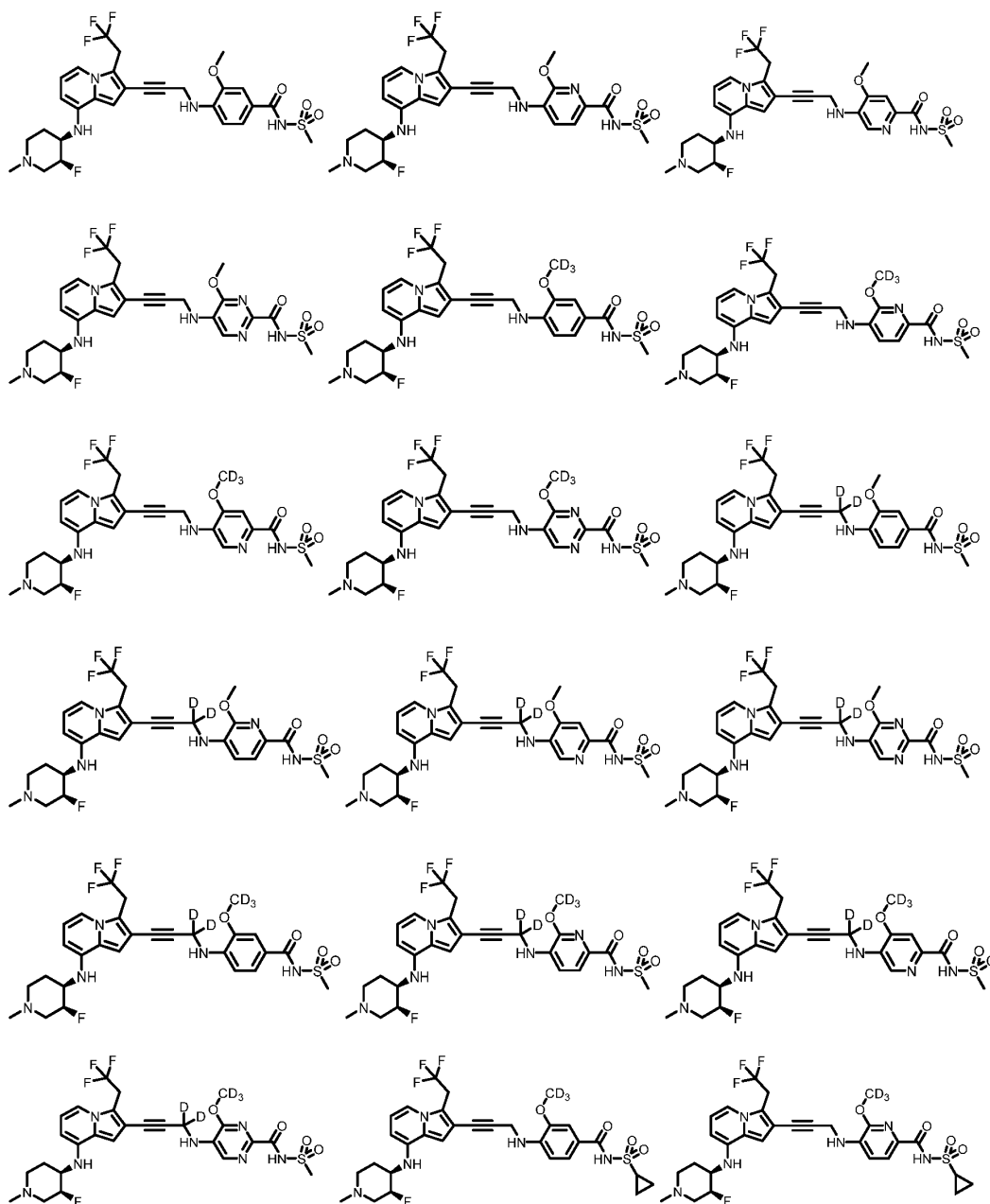
R⁷选自 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基和 C3-C6 环烷基。

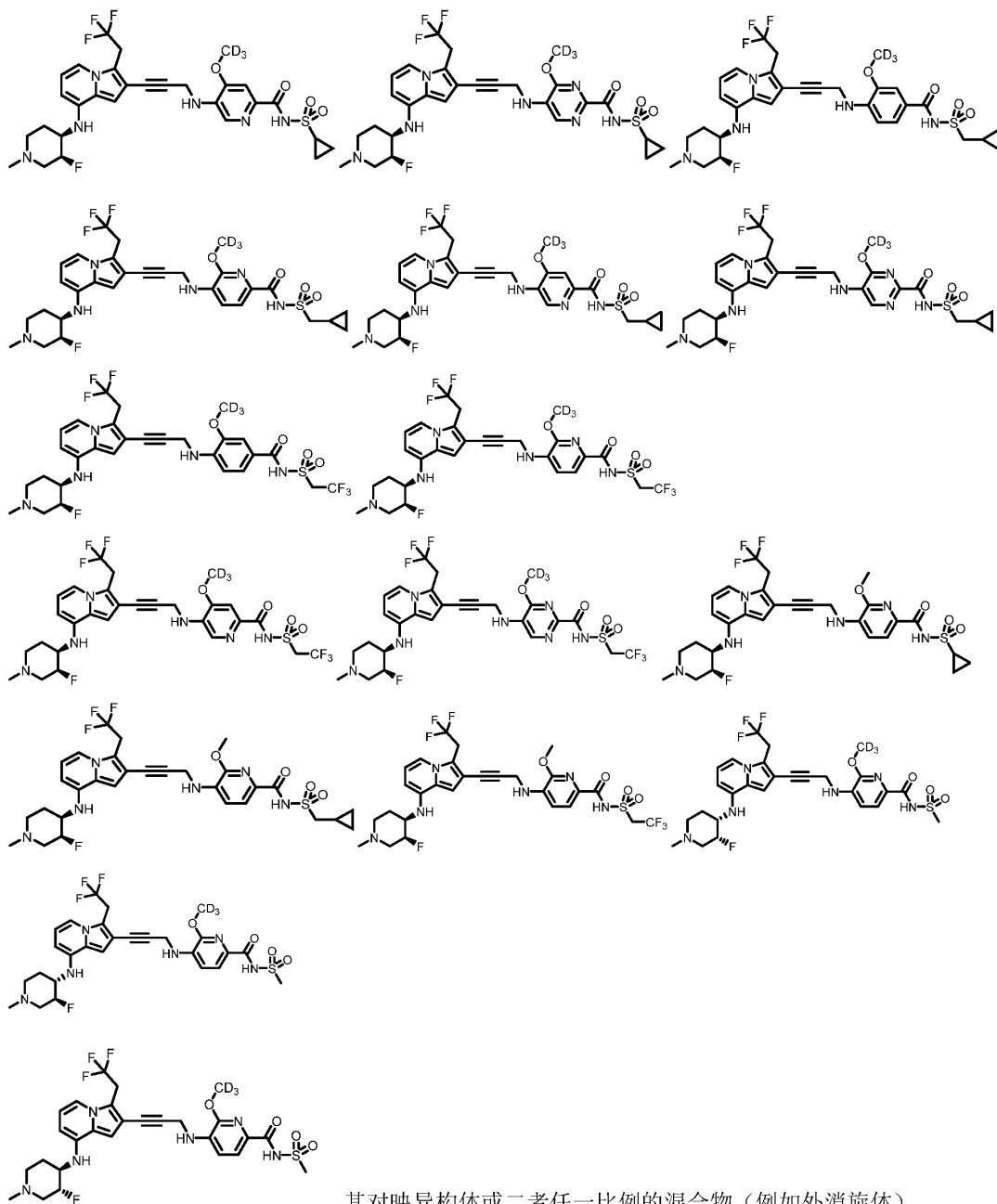
较佳地， 选自-OCH₃ 和-OCD₃;

R⁴ 和 R⁵ 选自氢;

R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$; n 为 0 或 1; R^7 选自 $-CH_3$ 、 $-CD_3$ 、 $-CF_3$ 或环丙基。

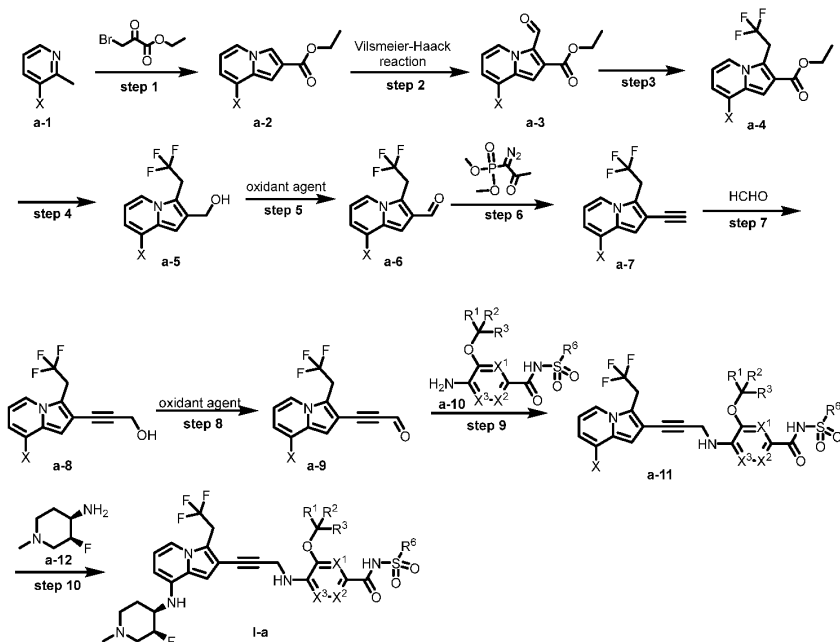
作为优选的技术方案，式I化合物选自如下化合物：





本发明还提供了如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐的制备方法。包括如下几种方法：

方法一：



第一步：化合物 **a-1** 与溴代丙酮酸乙酯发生关环芳构化反应得到化合物 **a-2**；其中，X 选自 Cl、Br、I；

第二步：化合物 **a-2** 发生 Vilsmeier-Haack 反应得到化合物 **a-3**；

第三步：化合物 **a-3** 与氟化试剂反应得到化合物 **a-4**；所述氟化试剂可以为氟磺酰基二氟乙酸甲酯、(三苯基磷鎓基)二氟乙酸内盐、四丁基氟化铵；

第四步：化合物 **a-4** 在还原剂的作用下发生酯基还原反应得到化合物 **a-5**；所述还原剂可以为硼氢化钠、硼氢化锂、四氢锂铝或二异丁基氢化铝；

第五步：化合物 **a-5** 在氧化剂的作用下氧化得到化合物 **a-6**，所述氧化剂可以为 Dess-Martin 试剂、Swern 氧化试剂、氯铬酸吡啶盐、二氧化锰、三氧化硫/吡啶；

第六步：化合物 **a-6** 与 Gilbert 试剂反应生成化合物 **a-7**；

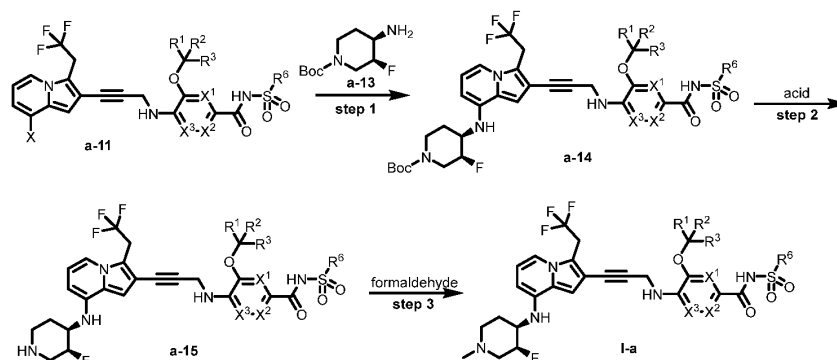
第七步：化合物 **a-7** 与甲醛在金属试剂催化下反应得到化合物 **a-8**；所述金属试剂可以为含 Cu 的试剂，如六氟磷酸四乙腈亚铜；

第八步：化合物 **a-8** 在氧化剂的作用下氧化成醛 **a-9**，所述氧化剂可以为 Dess-Martin 试剂、Swern 氧化试剂、氯铬酸吡啶盐、二氧化锰、三氧化硫/吡啶；

第九步：化合物 **a-9** 与化合物 **a-10** 发生还原胺化反应，生成化合物 **a-11**； R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 X^1 、 X^2 、 X^3 的定义同前所述；

第十步：化合物 **a-11** 与胺 **a-12** 发生金属试剂催化的偶联反应得到化合物 (I-a)；所述金属试剂可以为含 Pd 或 Cu 的试剂，如 Brettphos Pd G3、Brettphos Pd G4、碘化亚铜。

方法二：

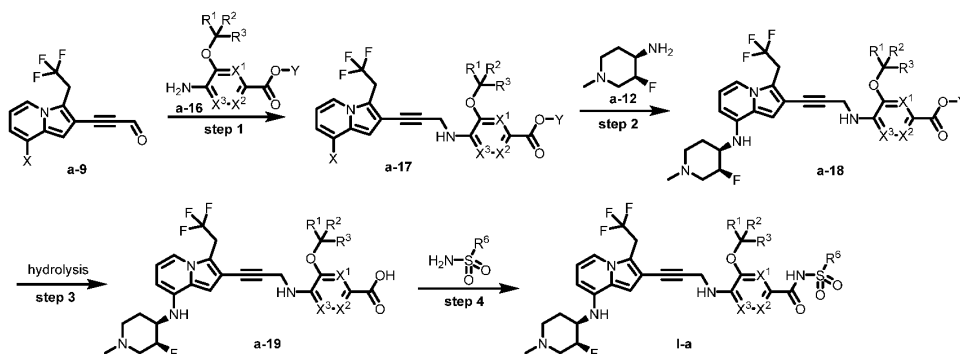


第一步：化合物 **a-11** 与胺 **a-13** 发生金属试剂催化的偶联反应得到化合物 **a-14**；其中，X 选自 Cl、Br、I；R¹、R²、R³、R⁶、X¹、X²、X³ 的定义同前所述；所述金属试剂可以为含 Pd 或 Cu 的试剂，如 Brettphos Pd G3、Brettphos Pd G4、碘化亚铜；

第二步：化合物 **a-14** 在酸性条件下脱除 Boc 保护剂，得到化合物 **a-15**；所述酸性条件可以是在无机酸（如 HCl、HBr、H₂SO₄）、有机酸（如三氟乙酸）、路易斯酸（如溴化锌）或其它试剂（如三甲基碘硅烷）存在下进行；

第三步：化合物 a-15 与甲醛发生还原胺化反应，生成化合物 (I-a)。

方法三:



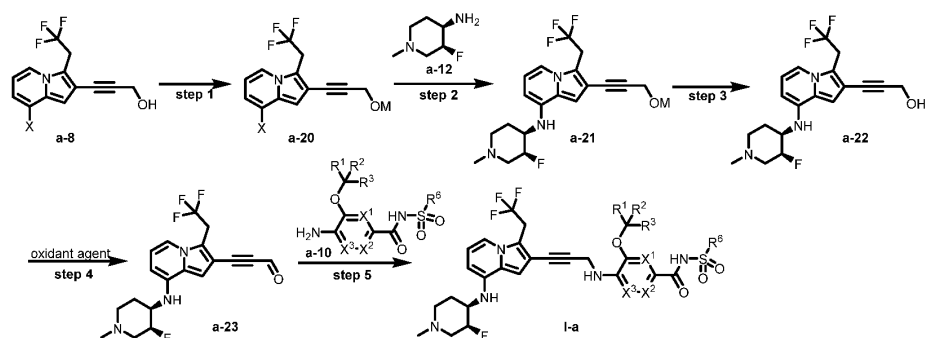
第一步：化合物 a-9 与化合物 a-16 发生还原胺化反应，生成化合物 a-17；其中，X 选自 Cl、Br、I；Y 选自 C₁-C₄ 烷基；R¹、R²、R³、X¹、X²、X³ 的定义同前所述；

第二步：化合物 a-17 与胺 a-12 发生金属试剂催化的偶联反应得到化合物 a-18；所述金属试剂可以为含 Pd 或 Cu 的试剂，如 Brettphos Pd G3、Brettphos Pd G4、碘化亚铜；

第三步：化合物 **a-18** 在酸性或碱性条件下发生水解反应生成 **a-19**；所述酸性条件可以是无机酸（如 HCl、HBr、H₂SO₄）或有机酸（如三氟乙酸）；所述碱性条件可以是无机碱（如 LiOH、NaOH、KOH）；

第四步：化合物 **a-19** 与磺酰胺 $\text{H}_2\text{NS}(\text{O})_2\text{R}^6$ 发生缩合反应生成化合物 **(I-a)**；其中， R^6 的定义同前所述。

方法四：



第一步：化合物 **a-8** 与合适的保护剂进行羟基保护反应生成化合物 **a-20**；其中，X 选自 Cl、Br、I；M 为保护基，如三甲基硅基、叔丁基二甲基硅基、甲氧基甲基、叔丁氧基羰基、2-四氢吡喃基；所述保护剂可以为三甲基氯硅烷、叔丁基二甲基氯硅烷、氯甲基甲醚、二碳酸二叔丁酯、3,4-二氢-2H-吡喃；

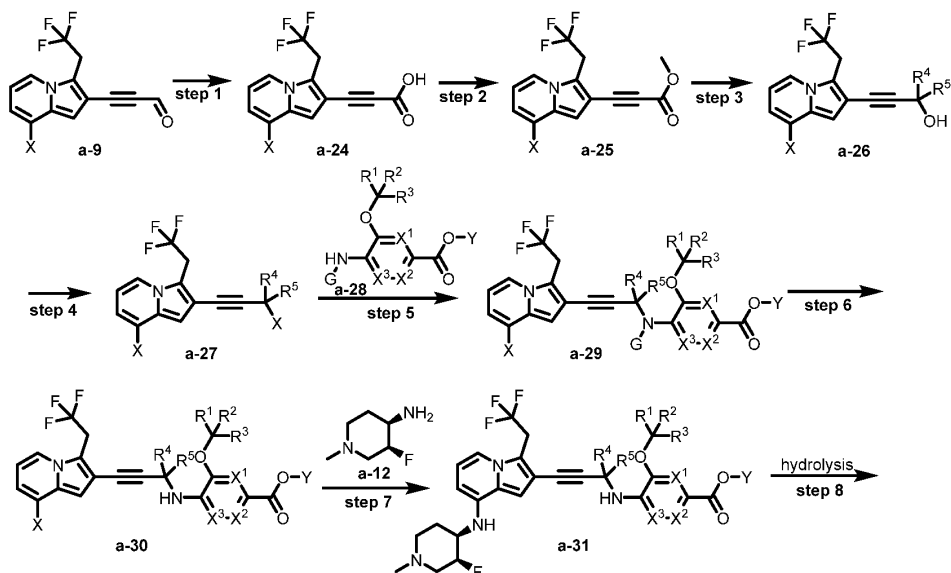
第二步：化合物 a-20 与胺 a-12 发生金属试剂催化的偶联反应得到化合物 a-21；所述金属试剂可以为含 Pd 或 Cu 的试剂，如 Brettphos Pd G3、Brettphos Pd G4、碘化亚铜；

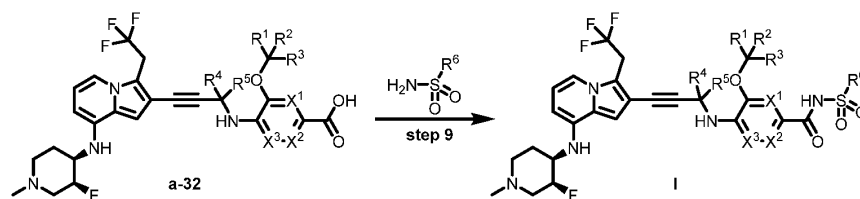
第三步：化合物 **a-21** 在酸性或碱性条件下脱除保护基生成 **a-22**；所述酸性条件可以是无机酸（如 HF、HCl、HBr、H₂SO₄）或有机酸（如三氟乙酸）；所述碱性条件可以是无机碱（如 LiOH、NaOH、KOH）或有机碱（四正丁基氟化铵）；

第四步：化合物 **a-22** 在氧化剂的作用下发生氧化反应得到化合物 **a-23**，所述氧化剂可以为 Dess-Martin 试剂、Swern 氧化试剂、氯铬酸吡啶盐、二氧化锰、三氧化硫/吡啶；

第五步：化合物 **a-23** 与磺酰胺 **a-10** 发生还原胺化反应，生成化合物 **(I-a)**；其中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 X^1 、 X^2 、 X^3 的定义同前所述；

方法五：





第一步：化合物 a-9 通过 Pinnick 氧化反应得到化合物 a-24；其中，X 选自 Cl、Br、I；

第二步：化合物 a-24 通过酯化反应得到化合物 a-25；

第三步：化合物 a-25 通过还原反应在得到化合物 a-26；所述还原剂可以为含硼氢化钠（锂）或氢化锂铝试剂等，以及他们的氘代试剂；R⁴、R⁵ 的定义同前所述；

第四步：化合物 a-26 通过卤化反应生成化合物 a-27；其中，X 选自 Cl、Br、I；

第五步：化合物 a-27 与 a-28 通过亲核取代反应得到化合物 a-29；其中，R¹、R²、R³、X¹、X²、X³ 的定义同前所述；G 为保护基，如对甲基苯磺酰基，叔丁氧基羰基；Y 选自 C₁-C₄ 烷基；

第六步：化合物 a-29 脱除保护基 G 得到 a-30；

第七步：化合物 a-30 与胺 a-12 发生金属试剂催化的偶联反应得到化合物 a-31；所述金属试剂可以为含 Pd 或 Cu 的试剂，如 Brettphos Pd G3、Brettphos Pd G4、碘化亚铜；

第八步：化合物 a-31 在酸性或碱性条件下发生水解反应生成 a-32；所述酸性条件可以是无机酸（如 HCl、HBr、H₂SO₄）或有机酸（如三氟乙酸）；所述碱性条件可以是无机碱（如 LiOH、NaOH、KOH）；

第九步：化合物 a-32 与磺酰胺 H₂NS(O)₂R⁶ 发生缩合反应生成化合物 (I)；其中，R⁶ 的定义同前所述。

本发明还提供了一种药物组合物，其包括如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐（例如有效治疗量）以及药用辅料。

本发明还提供了一种如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐、或所述的药物组合物在制备 p53 突变体口袋结合剂或治疗和/或预防与 p53 突变体相关的疾病的药物中的应用。

优选的技术方案中，所述应用满足以下条件中的一个或多个：

- (1) 所述的 p53 突变体在氨基酸 220 处具有突变，例如为 p53 Y220C；
- (2) 所述的口袋结合剂增加 p53 突变体与 DNA 结合的能力；
- (3) 所述的与 p53 突变体相关的疾病为癌症，例如乳腺癌、胃癌、肺癌或卵巢癌。

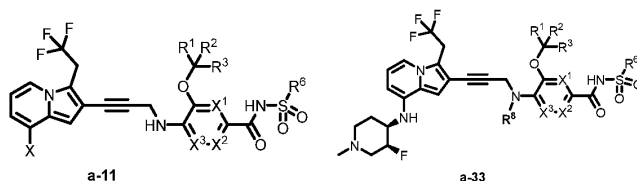
本发明还提供了一种如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐、或所述的药物组合物在制备治疗和/或预防癌症的药物中的应用。

所述的癌症例如乳腺癌、胃癌、肺癌或卵巢癌。

本发明还提供了一种治疗和/或预防癌症的治疗方法，其特征在于，其向患者施用治疗有效量的如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐。

所述的癌症均可同前所述。

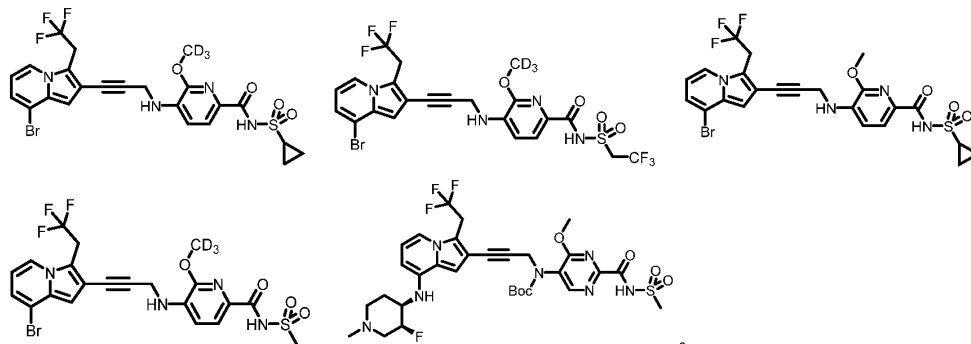
本发明还提供了一种式 **a-11** 或 **a-32** 所示的化合物（可制备上述的如式 I 所示的化合物）；



其中，X 为卤素（例如 Br）；R⁸ 为氨基保护剂（例如-Boc）；

X¹、X² 和 X³、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶ 的定义均同前所述。

所述的式 **a-11** 或 **a-32** 所示的化合物优选为如下任一化合物；



术语“药学上可接受”是指相对无毒、安全、适合于患者使用。

术语“药学上可接受的盐”是指化合物与药学上可接受的酸或碱反应得到的盐。当化合物中含有相对酸性的官能团时，可以通过在合适的惰性溶剂中用足量的药学上可接受的碱与化合物接触的方式获得碱加成盐。当化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在合适的惰性溶剂中用足量的药学上可接受的酸与化合物接触的方式获得酸加成盐。具体可参见 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth, 2011, 2nd Revised Edition)。

术语“溶剂合物”是指化合物与溶剂（包括但不限于：水、甲醇、乙醇等）结合形成的物质。溶剂合物分为化学计量类溶剂合物和非化学计量类溶剂合物。

术语“药学上可接受的盐的溶剂合物”是指化合物与药学上可接受的酸或碱、溶剂（包括但不限于：水、甲醇、乙醇等）结合形成的物质。其中，溶剂的数量可以是化学计量的，也可以是非化学计量的。

基团末端的“-”是指该基团通过该位点与分子其余部分相连。例如，CH₃-C(=O)-是指乙酰基。

当基团价键上带有波浪线“”时，例如在“”中，波浪线表示该基团与分子其它部分的连接点

术语“卤素”是指氟、氯、溴或碘。

术语“烷基”是指具有指定碳原子数（例如，C₁-C₆）的、直链或支链的、u 的一价烃基。烷基包括但不限于：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、正己基等。

术语“烷氧基”是指基团 R^X-O- ， R^X 的定义同术语“烷基”。烷氧基包括但不限于：甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基等。

术语“治疗有效量”是指给予患者的、足以有效治疗疾病的量。治疗有效量将根据化合物种类、疾病种类、疾病的严重程度、患者的年龄等变化，但可由本领域技术人员视情况调整。

术语“药用辅料”是指除活性药物成分以外，包含在药物制剂中的所有物质，一般分为赋形剂和附加剂两大类。具体可参见《中华人民共和国药典（2020 年版）》、Handbook of Pharmaceutical Excipients (Paul J Sheskey, Bruno C Hancock, Gary P Moss, David J Goldfarb, 2020, 9th Edition)。

术语“治疗”是指消除病因或缓解症状。

术语“预防”是指降低发生疾病的风险。

术语“患者”是指需要接受治疗或预防疾病的任何动物，通常是哺乳动物，例如人类。哺乳动物包括但不限于：牛、马、羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、猴、人类等。

术语“PG”表示保护基，如 Boc 保护基等。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：本发明的化合物能够提升 p53 Y220C 结合 DNA 的能力，且对胃癌细胞为代表的癌症细胞增殖具有较佳的抑制活性。

附图说明

图 1 为测试例九小鼠 NUGC-3 人源胃癌异种移植瘤模型药效学评价实验中对照组和各实验组的肿瘤生长曲线；

图 2 为测试例九小鼠 NUGC-3 人源胃癌异种移植瘤模型药效学评价实验中对照组和各实验组的小鼠相对体重变化曲线；

图 3 为测试例十大鼠 NUGC-3 人源胃癌异种移植瘤模型药效学评价实验中对照组和各实验组的肿瘤生长曲线；

图 4 为测试例十大鼠 NUGC-3 人源胃癌异种移植瘤模型药效学评价实验中对照组和各实验组的大鼠相对体重变化曲线。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。除非另有说明，否则本申请公开的实际操作将采用本领域技术范围内的有机合成、细胞生物学、细胞培养和分子生物学的常规技术。

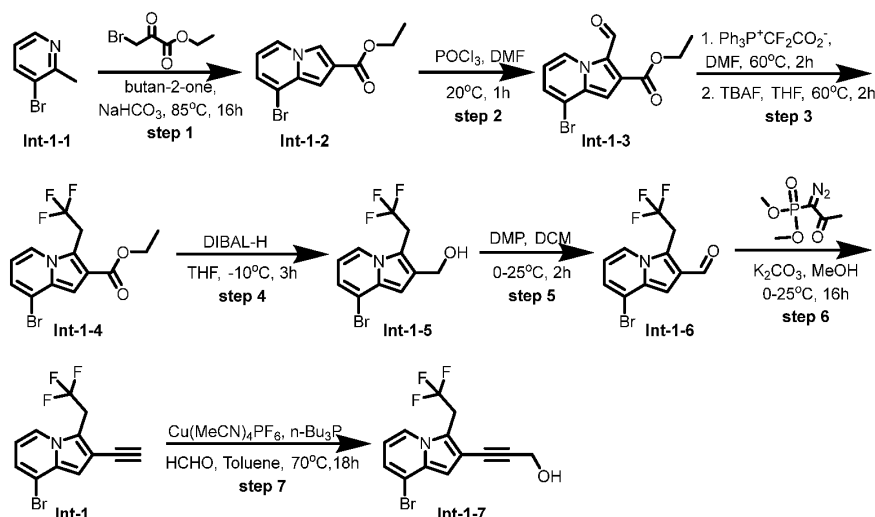
各实施例中， ^1H NMR 由 BRUKER AVANCE NEO 400 MHz, JNM-ECZ400s 型核磁共振仪记录，化学位移以 δ (ppm) 表示；液质联用 (LCMS) 由 Shimadzu LC-20AD, Agilent 1260 型和 Agilent 1200 型质谱仪记录；制备 HPLC 分离使用 WATERS Autop, Shimadzu LC20AR 型号液相色谱仪

缩写

BrettPhos Pd G3	Methanesulfonato(2-Dicyclohexylphosphino-3,6-dimethoxy-2',4',6'-tri-i-propyl-1,1'-biphenyl)(2'-amino-1,1'-biphenyl-2-yl)palladium(II)	(2-二环己基膦)-3,6-二甲氧基-2',4',6'-三异丙基-1,1'-联苯)(2'-氨基-1,1'-联苯-2-基)甲磺酸钯(II)
BrettPhos Pd G4	Methanesulfonato(2-Dicyclohexylphosphino-3,6-dimethoxy-2',4',6'-tri-i-propyl-1,1'-biphenyl)(2'-methylamino-1,1'-biphenyl-2-yl)palladium(II)	(2-二环己基膦)-3,6-二甲氧基-2',4',6'-三异丙基-1,1'-联苯)(2'-甲基氨基-1,1'-联苯-2-基)甲磺酸钯(II)
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonyldiimidazole	<i>N,N'</i> -羰基二咪唑
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene	1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯
DCM	Dichloromethane	二氯甲烷
DIBAL-H	Diisobutylaluminium hydride	二异丁基氢化铝
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
DMP	Dess-Martin periodinane	戴斯-马丁氧化剂
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
EtOAc	Ethyl acetate	乙酸乙酯
EDCI	1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbonyldiimide hydrochloride	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐
HATU	2-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate	2-(7-偶氮苯并三氮唑)- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脲六氟磷酸酯
MTBE	<i>tert</i> -Butyl methyl ether	甲基叔丁基醚
MeOH	Methanol	甲醇
NaBH ₃ CN	Sodium cyanoborohydride	氰基硼氢化钠
Na ₂ SO ₄	Sodium sulfate	硫酸钠
NMP	<i>N</i> -methyl pyrrolidone	<i>N</i> -甲基吡咯烷酮
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II)	1,1'-双(二苯基膦)二茂铁二氯化钯
PE	Petroleum ether	石油醚
Ruphos	2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-di-iso-propoxy-1,1'-biphenyl	2-二环己基膦-2',6'-二异丙氧基-1,1'-联苯

SGC	Silica gel column chromatography	硅胶柱层析
TBAF	Tetrabutylammonium fluoride	四丁基氟化铵
TEA	Triethylamine	三乙胺
THF	Tetrahydrofuran	四氢呋喃

中间体 Int-1 和 Int-1-7 的制备



步骤1: 8-溴吡啶-2-羧酸乙酯

将 3-溴-2-甲基-吡啶 **Int-1-1** (500 mg, 2.91 mmol)、3-溴丙酮酸乙酯 (850 mg, 4.36 mmol) 和碳酸氢钠 (561 mg, 6.69 mmol) 在丁酮 (5 mL) 中的混合体系于 85°C 搅拌 16 小时, 然后浓缩至干并用 SGC (PE 中加 0-10% EtOAc) 方法纯化, 得到灰色固体 8-硝基吡啶-2-羧酸乙酯 **Int-1-2** (190 mg, 产率 24.4%)。LCMS 计算值 $C_{11}H_{11}BrNO_2$ $[M+H]^+$: $m/z = 268.0/270.0$; 检测值: 267.9/269.9; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.87-7.83 (m, 1H), 7.03-6.99 (m, 1H), 6.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.43 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.37 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.40 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

步骤2: 8-溴-3-甲酰基吡啶-2-羧酸乙酯

在 0°C 下, 将 8-溴吡啶-2-羧酸乙酯 **Int-1-2** (5.34 g, 19.9 mmol) 的 DCM (130 mL) 溶液滴加到三氯氧磷 (5.19 g, 33.8 mmol) 的 DMF (130 mL) 溶液中。混合体系在 20°C 下搅拌 1 小时, 然后用饱和碳酸氢钠水溶液 (300 mL) 缓慢淬灭并用 DCM (200 mL) 萃取。合并分离的有机层, 用硫酸钠干燥, 过滤并浓缩至干。残留物用 SGC (PE 中加 0-10% EtOAc) 纯化, 得到黄色胶状物 8-溴-3-甲酰基吡啶-2-羧酸乙酯 **Int-1-3** (10.6 g, 粗品)。LCMS 计算值 $C_{12}H_{11}BrNO_3$ $[M+H]^+$: $m/z = 296.0/298.0$; 检测值: 295.9/297.9。

步骤3: 8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-羧酸乙酯

将 8-溴-3-甲酰基吡啶-2-羧酸乙酯 **Int-1-3** (8.50 g, 15.8 mmol) 和 2,2-二氟-2-(三苯基磷鎓基)乙酸乙酯 (11.2 g, 31.5 mmol) 在 DMF (120 mL) 中的混合体系在 60°C 下搅拌 2 小时。向混合体系中加入 TBAF (47.3 mL, 47.3 mmol, 1M 四氢呋喃溶液)。将反应混合体系在 60°C 下搅拌 2 小时, 然后用水 (100 mL) 稀释并用 MTBE (100 mL $\times$ 3) 萃取。合并有机层, 用硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩至干。残留物用

SGC(PE 中加 0-5% EtOAc)方法纯化, 得到白色固体 8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-羧酸乙酯 **Int-1-4**(2.40 g, 产率 43.4%)。LCMS 计算值 $C_{13}H_{12}BrF_3NO_2$ $[M+H]^+$: $m/z = 350.0/352.0$; 检测值: 349.9/351.9; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.89 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.56 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.40 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.25 (q, $J = 10.0$ Hz, 2H), 1.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)。

步骤 4: (8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基) 甲醇

向 8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-羧酸乙酯 **Int-1-4**(4.10 g, 11.7 mmol)在 THF(120 mL)中的混合体系中加入 DIBAL-H(35.1 mL, 35.1 mmol, 1M 甲苯溶液)。将反应物在 $-10^\circ C$ 下搅拌 3 小时, 得到黄色溶液。将反应液倒入饱和氯化铵水溶液(200 mL)中, 然后加入水(200 mL)并用 EtOAc(150 mL $\times$ 3)萃取混合体系。合并有机层, 用硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩至干。残留物通过 SGC(PE 中加 0-5% EtOAc)方法纯化, 得到白色固体[8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基]甲醇 **Int-1-5**(3.55 g, 产率 98.4%)。LCMS 计算值 $C_{11}H_{10}BrF_3NO$ $[M+H]^+$: $m/z = 308.0/310.0$; 检测值: 307.9/309.9; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.85 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.70 (br s, 1H), 6.50 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.84 (s, 2H), 3.83 (q, $J = 10.4$ Hz, 2H)。

步骤 5: 8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-甲醛

在 $0^\circ C$ 下向[8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基]甲醇 **Int-1-5**(3.55 g, 11.5 mmol)的 DCM(400 mL)溶液加入 DMP(7.33 g, 17.2 mmol)。反应体系升至室温并搅拌 2 小时。将反应液倒入饱和碳酸氢钠水溶液中(20 mL), 然后加入水(200 mL), 用 DCM(100 mL $\times$ 3)萃取。合并有机层, 用硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩至干。残留物用 SGC(PE 中加 0-7% EtOAc)方法纯化, 得到白色固体 8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-甲醛 **Int-1-6**(2.70 g, 产率 76.5%)。LCMS 计算值 $C_{11}H_8BrF_3NO$ $[M+H]^+$: $m/z = 306.0/308.0$; 检测值: 305.9/307.9。

步骤 6: 8-溴-2-乙炔基-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶

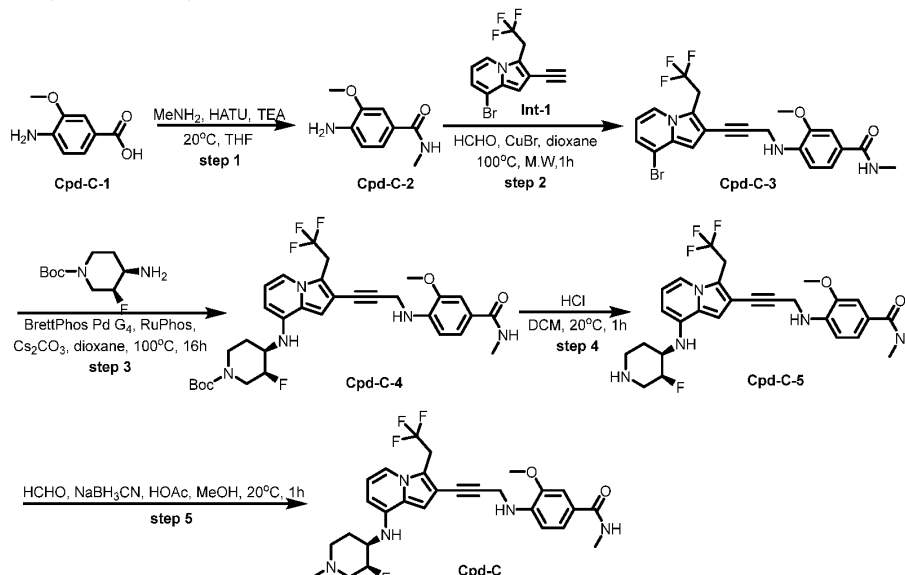
在 $0^\circ C$ 下, 向(1-重氮基-2-氧代丙基)膦酸二甲酯(470 mg, 2.45 mmol)和碳酸钾(451 mg, 3.27 mmol)在甲醇(15 mL)中的混合体系中加入 8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-甲醛 **Int-1-6**(500 mg, 1.63 mmol)。反应体系升至室温并搅拌 16 小时。用水(50 mL)稀释反应液并用 EtOAc(50 mL $\times$ 3)萃取。合并有机层, 用硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩至干。残留物通过 SGC(PE 中加 0-3% EtOAc)方法纯化, 得到白色固体 8-溴-2-乙炔基-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶 **Int-1**(380 mg, 产率 77.0%)。LCMS 计算值 $C_{12}H_8BrF_3N$ $[M+H]^+$: $m/z = 302.0/304.0$; 检测值: 301.9/303.9; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.52 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.83 (q, $J = 10.0$ Hz, 2H), 3.25 (s, 1H)。

步骤 7: 3-[8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基]丙-2-炔-1-醇

氮气保护下, 将六氟磷酸四乙腈亚铜(123 mg, 0.33 mmol)和三丁基膦(268 mg, 1.32 mmol)溶于甲苯(15 mL)中, 反应混合体系在 $70^\circ C$ 下搅拌 30 分钟。然后加入 8-溴-2-乙炔基-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶 **Int-1**(1.00 g, 3.31 mmol)、甲醛水溶液(0.18 mL, 6.62 mmol, 含量 36%-38%)。混合体系在 $70^\circ C$ 下搅拌过夜。TLC 检测反应完成后, 真空浓缩混合体系, 残留物通过 SGC(PE 中加 0-15% EtOAc)方法纯化, 得到白色固体 3-[8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基]丙-2-炔-1-醇 **Int-1-7**(843 mg, 产率 76.7%)。LCMS

计算值 $C_{13}H_{10}BrF_3NO$ $[M+H]^+$: $m/z = 332.0/334.0$; 检测值: 332.3/334.3; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.38 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.68 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.34 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.34 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.20-4.11 (m, 2H).

Cpd-C: 4-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺



步骤1: 4-氨基-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺

0°C下, 向 4-氨基-3-甲氧基苯甲酸 **Cpd-C-1** (7.52 g, 45.0 mmol)、甲胺溶液 (6.71 g, 54.0 mmol, 含量 25%)、三乙胺 (18.8 mL, 135 mmol) 的 THF (45 mL) 溶液中加入 HATU (18.8 g, 49.5 mmol)。反应在 20°C 下搅拌 2 小时。将反应混合物减压浓缩。残留物通过 SGC (DCM 中加 0-4% MeOH) 方法纯化, 得到白色固体 4-氨基-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺 **Cpd-C-2** (6.08 g, 产率 75.0%)。LCMS 计算值 $C_9H_{13}N_2O_2$ $[M+H]^+$: $m/z = 181.1$; 检测值: 181.2.

步骤2: 4-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺

向 8-溴-2-乙炔基-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶 **Int-1** (600 mg, 1.99 mmol) 和 4-氨基-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺 **Cpd-C-2** (716 mg, 3.97 mmol) 在 1,4-二氧六环 (12 mL) 中的混合物加入甲醛水溶液 (497 mg, 5.96 mmol, 含量 36%-38%) 和溴化亚铜 (567 mg, 3.97 mmol)。反应在 100°C 下微波辐射搅拌 1 小时。残留物通过 SGC (DCM 中加 0-30% EtOAc) 方法纯化, 得到黄色固体 4-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺 **Cpd-C-3** (480 mg, 产率 48.9%)。LCMS 计算值 $C_{22}H_{20}BrF_3N_3O_2$ $[M+H]^+$: $m/z = 494.1/496.1$; 检测值: 494.2/496.2.

步骤3: (3*S*,4*R*)-3-氟-4-((2-(3-((2-甲氧基-4-(甲基氨基甲酰)苯基)胺基)丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-8-基)胺基)哌啶-1-羧酸叔丁酯

氮气保护下, 将 4-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺 **Cpd-C-3** (1.35 g, 2.73 mmol)、(3*S*,4*R*)-4-氨基-3-氟哌啶-1-羧酸叔丁酯 (1.19 g, 5.46 mmol)、

BrettPhos Pd G4(0.50 g, 0.55 mmol)、Ruphos(0.25 g, 0.55 mmol)和碳酸铯(1.78 g, 5.46 mmol)在 1,4-二氧六环(50 mL)中的混合物于 100°C 搅拌 16 小时。反应混合物用 EtOAc(200 mL)稀释并用水(100 mL)、饱和食盐水(100 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。残留物通过 SGC(DCM 中加 0-50% EtOAc)纯化,得到黄色固体(3*S*,4*R*)-3-氟-4-((2-(3-((2-甲氧基-4-(甲胺基甲酰)苯基)胺基)丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)咪唑啉-8-基)胺基)哌啶-1-羧酸叔丁酯 **Cpd-C-4**(1.00 g, 产率 58.0%)。LCMS 计算值 $C_{32}H_{38}F_4N_5O_4$ $[M+H]^+$: $m/z = 632.3$; 检测值: 632.5。

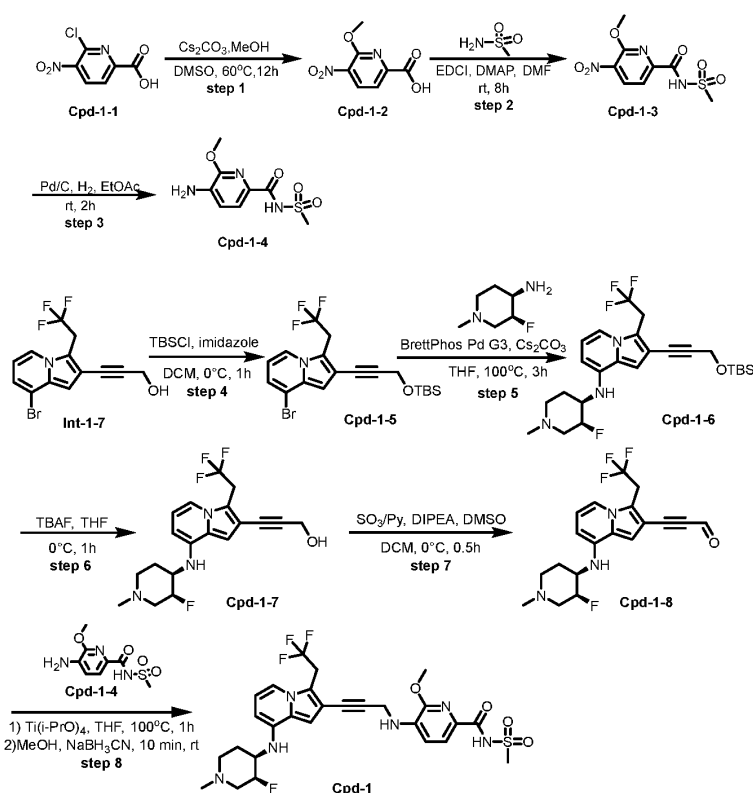
步骤 4: 4-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)咪唑啉-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺

在 0°C 下,向 (3*S*,4*R*)-3-氟-4-((2-(3-((2-甲氧基-4-(甲胺基甲酰)苯基)胺基)丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)咪唑啉-8-基)胺基)哌啶-1-羧酸叔丁酯 **Cpd-C-4**(1.00 g, 1.58 mmol)的 DCM(16 mL)溶液中加入盐酸(7.92 mL, 31.7 mmol, 4N 1,4-二氧六环溶液)。混合物转移至室温搅拌 1 小时。将混合物浓缩至干,用水(30 mL)稀释并用饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 到 7-8。水相用 DCM(100 mL $\times$ 2)萃取,合并的有机相用无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩得到黄色固体 4-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)咪唑啉-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺 **Cpd-C-5**(450 mg, 粗品)。粗品直接用于下一步反应。LCMS 计算值 $C_{27}H_{30}F_4N_5O_2$ $[M+H]^+$: $m/z = 532.2$; 检测值: 532.4。

步骤 5: 4-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)咪唑啉-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺

室温下,向 4-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)咪唑啉-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺 **Cpd-C-5**(450 mg, 0.85 mmol)、醋酸(0.02 mL, 0.42 mmol)、甲醛水溶液(212 mg, 2.54 mmol, 含量 36%-38%)的甲醇(20 mL)溶液中加入氰基硼氢化钠(160 mg, 2.54 mmol),反应物在室温下搅拌 1 小时。向反应混合物中滴加饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 到 7-8。水相用 EtOAc(100 mL $\times$ 3)萃取,合并有机相并用饱和食盐水洗(50 mL $\times$ 3),无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩。残留物通过制备纯化得到白色固体 4-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)咪唑啉-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-3-甲氧基-*N*-甲基苯甲酰胺 **Cpd-C**(119 mg, 产率 25.2%)。LCMS 计算值 $C_{28}H_{32}F_4N_5O_2$ $[M+H]^+$: $m/z = 546.2$; 检测值: 546.2; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.08 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.51 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.90 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 5.85 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 49.8$ Hz, 1H), 4.23 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.92 (q, $J = 10.7$ Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.54 (d, $J = 27.9$ Hz, 1H), 3.02 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 2.75 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H), 2.28-2.14 (m, 4H), 2.07 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H), 1.97 (ddd, $J = 24.0, 12.0, 3.2$ Hz, 1H), 1.67 (dd, $J = 12.7, 2.7$ Hz, 1H)。

实施例 1: 5-[3-[8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)咪唑啉-2-基]丙-2-炔基胺基]-6-甲氧基-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺(**Cpd-1**, 即化合物 1)



步骤1: 6-甲氧基-5-硝基吡啶-2-羧酸

将6-氯-5-硝基吡啶-2-羧酸 **Cpd-1-1** (4.00 g, 19.7 mmol) 和碳酸铯 (12.8 g, 39.4 mmol) 在 DMSO/MeOH (40 mL, 1 : 1) 的混合物中于 60°C 搅拌 12 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物倒入到冰水 (50 mL) 并用 1N 盐酸调 pH 至 5, 用 EtOAc (30 mL $\times$ 3) 萃取。合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩至干。残留物用 SGC (DCM 中加 0-5% MeOH) 方法纯化, 得到 6-甲氧基-5-硝基吡啶-2-羧酸 **Cpd-1-2** (2.80 g, 产率 71.7%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: $m/z = 199.0$; 检测值: 199.1。

步骤2: 6-甲氧基-N-(甲基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺

将 6-氯-5-硝基吡啶-2-羧酸 **Cpd-1-2** (3.20 g, 16.2 mmol)、甲磺酰胺 (1.54 g, 16.2 mmol)、EDCI (4.65 g, 24.3 mmol) 和 4-二甲胺基吡啶 (3.94 g, 32.4 mmol) 在 DMF (30 mL) 的混合物于室温下搅拌 8 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物倒入水 (100 mL) 中, 并用 EtOAc (30 mL $\times$ 3) 萃取。合并有机层, 用饱和食盐水 (30 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩至干。残留物用 SGC (DCM 中加 0-5% MeOH) 方法纯化, 得到 6-甲氧基-N-(甲基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-1-3** (2.20 g, 产率 49.5%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: $m/z = 276.0$; 检测值: 276.1。

步骤3: 5-氨基-6-甲氧基-N-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺

在氢气氛围下, 将钯碳 (1.60 g, 5% 含量) 和 6-甲氧基-N-(甲基磺酰)-5-硝基吡啶酰胺 **Cpd-1-3** (800 mg, 2.91 mmol) 的 EtOAc (15 mL) 溶液在室温下搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到

所需化合物。将反应混合物过滤并减压浓缩至干。残留物用 SGC(DCM 中加 0-5% MeOH)方法纯化, 得到 5-氨基-6-甲氧基-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-1-4**(500 mg, 产率 70.1%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_8H_{12}N_3O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 246.1$; 检测值: 246.0。

步骤 4: 8-溴-2-(3-((叔丁基二甲基硅基)氧代)丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶

在 0°C 下, 将叔丁基二甲基氯硅烷(68.0 mg, 451 μmol)分批加入到 3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醇 **Int-1-7**(100 mg, 302 μmol)和咪唑(61.3 mg, 901 μmol)的 DCM(5 mL)溶液中。反应液在 0°C 下继续搅拌 0.5 小时, 然后过滤去除固体。将滤液减压浓缩得到残余物并用 SGC(PE 中加入 0-30% EtOAc)方法纯化, 得到 8-溴-2-(3-((叔丁基二甲基硅基)氧代)丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶 **Cpd-1-5**(134 mg, 产率 99.7%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{19}H_{24}BrF_3NOSi$ $[M+H]^+$: $m/z = 446.1/448.1$; 检测值: 446.0/448.0。

步骤 5: 2-(3-((叔丁基二甲基硅基)氧代)丙-1-炔-1-基)-*N*-((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-8-胺

在氩气保护下, 将 8-溴-2-(3-((叔丁基二甲基硅基)氧代)丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶 **Cpd-1-5**(134 mg, 301 μmol)、(3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺(79.3 mg, 601 μmol)、BrettPhos Pd G3 (54.4 mg, 60.0 μmol)和碳酸铯(195 mg, 598 μmol)的 THF(10 mL)混合体系在 100°C 下搅拌 2 小时。将反应混合体系冷至室温并过滤, 减压浓缩。残留物用 SGC(DCM 中加 0-7% 甲醇)方法纯化, 得到 2-(3-((叔丁基二甲基硅基)氧代)丙-1-炔-1-基)-*N*-((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-8-胺 **Cpd-1-6**(82.1 mg, 产率 54.9%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{25}H_{36}F_4N_3OSi$ $[M+H]^+$: $m/z = 498.3$; 检测值: 498.0。

步骤 6: 3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醇

在 0°C 下, 将 TBAF(0.20 mL, 0.20 mmol, 1M 四氢呋喃溶液)滴加到 2-(3-((叔丁基二甲基硅基)氧代)丙-1-炔-1-基)-*N*-((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-8-胺 **Cpd-1-6**(82.1 mg, 165 μmol)的 THF(5 mL)溶液中。反应液在 0°C 下继续搅拌 1 小时, LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。反应液用饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)淬灭, 并用 EtOAc(50 mL $\times$ 3)萃取。合并有机层, 用硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩至干。残留物用 SGC(DCM 中加 0-5% MeOH)方法纯化, 得到 3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醇 **Cpd-1-7**(57.0 mg, 产率 90.2%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{19}H_{22}F_4N_3O$ $[M+H]^+$: $m/z = 384.2$; 检测值: 384.1。

步骤 7: 3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙炔醛

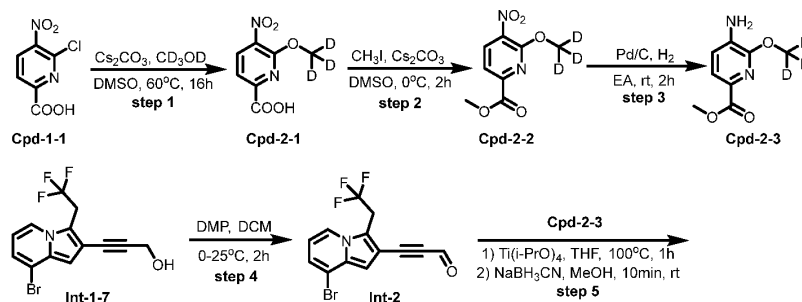
在 0°C 下, 将三氧化硫吡啶(780 mg, 4.90 mmol)的 DMSO(1 mL)溶液滴加到 3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醇 **Cpd-1-7**(625 mg, 1.63 mmol)、DMSO(1.20 mL, 16.3 mmol)和二异丙基乙胺(1.50 mL, 8.15 mmol)的 DCM(20 mL)溶液中。反应液在 0°C 下继续搅拌 0.5 小时, LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。反应液用饱和碳酸氢钠水溶液(100 mL)淬灭, 并用 EtOAc(100 mL $\times$ 3)萃取。合并有机层, 用硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩至干。残留物用 SGC(DCM 中加 0-5% MeOH)方法纯化, 得到 3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-

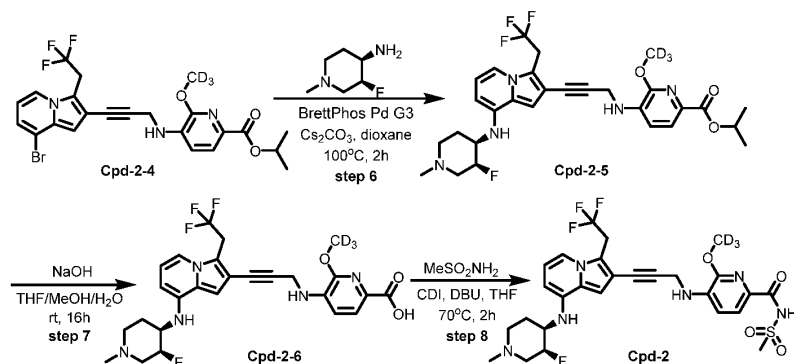
3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙炔醛 **Cpd-1-8** (550 mg, 产率 88.6%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{19}H_{20}F_4N_3O$ $[M+H]^+$: $m/z = 382.2$; 检测值: 382.1。

步骤 8: 5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙)-2-炔-1-基)胺基)-6-甲氧基-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺

将 3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙炔醛 **Cpd-1-8** (50.0 mg, 131 μ mol)、5-氨基-6-甲氧基-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-1-4** (38.6 mg, 157 μ mol) 和钛酸四异丙酯 (112 mg, 393 μ mol) 在 THF (1 mL) 的混合物于 100°C 搅拌 1 小时, 然后将混合溶液冷却到 0°C 缓慢加入 MeOH (0.5 mL) 和氨基硼氢化钠 (12.4 mg, 197 μ mol), 反应液升至室温并继续搅拌 10 分钟。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物倒入到冰水 (5 mL) 中并用 EtOAc (20 mL $\times$ 3) 萃取。合并有机层, 用饱和碳酸氢钠水溶液 (20 mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。残留物用 SGC (DCM 中加 0-3% MeOH) 方法纯化得到黄色固体状粗品, 粗品通过制备纯化得到 5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙)-2-炔-1-基)胺基)-6-甲氧基-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-1** (14.8 mg, 产率 18.5%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{27}H_{31}F_4N_6O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 611.2$; 检测值: 611.9; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.70 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.53 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.81 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.18 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.85 (d, $J = 49.1$ Hz, 1H), 4.29 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.16 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.68 (q, $J = 10.1$ Hz, 2H), 3.59-3.43 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.24 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.94 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.37-2.21 (m, 4H), 2.16 (t, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.02 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 1.93 (td, $J = 12.2, 3.5$ Hz, 1H)。

实施例 2: 5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙)-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 (Cpd-2, 即化合物 2)





步骤1: 6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基吡啶-2-羧酸

在氮气保护下, 将 6-氯-5-硝基吡啶-2-羧酸 **Cpd-1-1**(20.0 g, 98.7 mmol)、碳酸铯(96.5 g, 296 mmol)和氘代甲醇(4.27 g, 118 mmol)的 DMSO(200 mL)混合物在 60°C 下搅拌 16 小时。经 LCMS 检测反应完成后, 混合物用水(100 mL)稀释并用 1N 盐酸调节 pH 至 3, 过滤混合物以收集沉淀, 滤饼在真空下干燥, 得到 6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基吡啶-2-羧酸 **Cpd-2-1**(12.0 g, 粗品, 黄色固体)。粗产物直接用于下一步反应。LCMS 计算值 C₇H₄D₃N₂O₅ [M+H]⁺: m/z = 202.1; 检测值: 201.9.

步骤2: 6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基吡啶-2-羧酸甲酯

在氮气保护下, 将 6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基吡啶-2-羧酸 **Cpd-2-1**(12.0 g, 59.7mmol)和碳酸铯(58.4 g, 179 mmol)的 DMSO(120 mL)化合物在 0°C 下搅拌 0.5 小时。然后将碘甲烷(9.32 g, 179 mmol)加入到反应混合物中并在 0°C 下搅拌 2 小时。经 LCMS 检测反应完成后, 将反应混合物倒入冰-氯化铵水溶液(1000 mL)中, 并用 EtOAc(1000 mL × 2)萃取, 合并有机层用无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩, 得到粗品。残余物通过 SGC(PE 中加 0-20% EtOAc)方法纯化, 得到 6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基吡啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-2-2**(10.0 g, 产率 70.1%, 黄色固体)。LCMS 计算值 C₈H₆D₃N₂O₅ [M+H]⁺: m/z = 216.1; 检测值: 215.9.

步骤3: 5-氨基-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-羧酸甲酯

将 6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基吡啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-2-2**(10.0 g, 46.5mmol)溶解在 EtOAc(100 mL)中, 加入钯碳(9.90 g, 5%含量), 所得混合物在室温下氢气氛围中搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。过滤并浓缩, 得到 5-氨基-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-2-3**(8.20 g, 产率 90.5%, 黄色固体)。LCMS 计算值 C₈H₈D₃N₂O₃ [M+H]⁺: m/z = 186.1; 检测值: 186.2; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.88 (s, 2H), 3.75 (s, 3H).

步骤4: 3-[8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基]丙-2-炔醛

向冰浴下的 3-[8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基]丙-2-炔-1-醇 **Int-1-7**(6.80 g, 20.5 mmol) 的 DCM(120 mL)溶液中缓慢分批加入 DMP(17.4 g, 41.0 mmol)。混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)淬灭反应并用 DCM 萃取(30 mL × 3), 合并有机相后真空浓缩, 残余物通过 SGC(PE 中加 0-15%EtOAc)方法纯化, 得到 3-[8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基]丙-2-炔醛 **Int-2**(5.70 g, 产率 84.3%, 灰色固体)。LCMS 计算值 C₁₃H₈BrF₃NO [M+H]⁺: m/z = 330.0/332.0; 检测值: 330.2/332.2; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.47 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H),

6.90 (s, 1H), 6.78 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.31 (q, $J = 10.7$ Hz, 2H)。

步骤5: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸异丙酯

在氮气保护下, 将 3-[8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基]丙-2-炔醛 **Int-2** (200 mg, 606 μ mol)、5-氨基-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-2-3** (135 mg, 730 μ mol) 和钛酸四异丙酯 (517 mg, 1.82 mmol) 的 THF (2 mL) 溶液在 100°C 下搅拌 1 小时。将反应物冷却至 25°C, 加入 MeOH (2 mL) 和氰基硼氢化钠 (57.1 mg, 0.91 mmol) 并继续搅拌 10 分钟。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用水 (20 mL) 稀释并用 EtOAc (20 mL $\times$ 3) 萃取。合并的有机层用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩。残余物通过 SGC (PE 中加 0-25% EtOAc) 方法纯化, 得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸异丙酯 **Cpd-2-4** (190 mg, 产率 59.4%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{23}H_{19}D_3BrF_3N_3O_3$ $[M+H]^+$: $m/z = 527.1/529.1$; 检测值: 526.9/529.0。

步骤6: 5-((3-(8-(((3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸异丙酯

在氮气保护下, 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸异丙酯 **Cpd-2-4** (170 mg, 322 μ mol)、(3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺 (85.1 mg, 645 μ mol)、Brettphos Pd G3 (58.3 mg, 64.3 μ mol) 和碳酸铯 (210 mg, 644 μ mol) 的 1,4-二氧六环 (2 mL) 溶液在封管中 100°C 搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。过滤反应混合物, 滤液减压浓缩。粗产物通过制备纯化, 得到 5-((3-(8-(((3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸异丙酯 **Cpd-2-5** (90.0 mg, 产率 48.1%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{29}H_{31}D_3F_4N_5O_3$ $[M+H]^+$: $m/z = 579.3$; 检测值: 579.0。

步骤7: 5-((3-(8-(((3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸

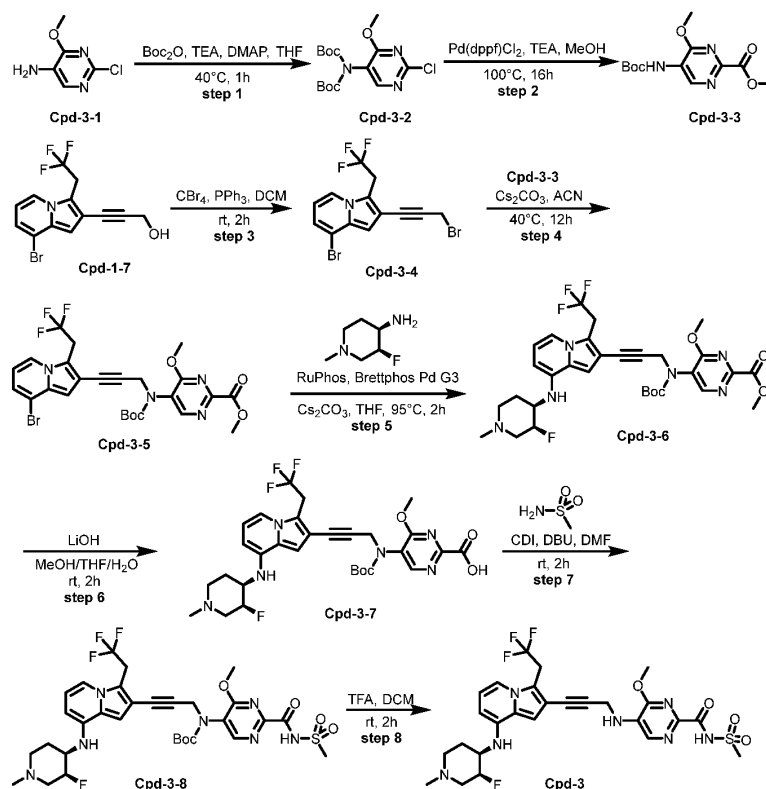
5-((3-(8-(((3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸异丙酯 **Cpd-2-5** (40.0 mg, 69.2 μ mol)、氢氧化钠 (8.28 mg, 207 μ mol) 在 THF (0.4 mL)、MeOH (0.2 mL) 和水 (0.1 mL) 的混合物在室温下搅拌 16 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物减压浓缩, 水稀释后用稀盐酸调 pH 至 5, 过滤, 残留物用 SGC (DCM 中加 0-3% MeOH) 方法纯化得到粗品, 再经制备纯化得到 5-((3-(8-(((3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸 **Cpd-2-6** (5.50 mg, 产率 15.0%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{26}H_{25}D_3F_4N_5O_3$ $[M+H]^+$: $m/z = 537.2$; 检测值: 537.0; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.64 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.79 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.69 (q, $J = 10.5$ Hz, 2H), 3.62-3.54 (m, 1H), 3.32-3.23 (m, 1H), 3.01 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 2.62-2.48 (m, 1H), 2.46-2.39 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.00-1.87 (m, 2H)。

步骤8: 5-((3-(8-(((3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)

胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺

将 5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-羧酸 **Cpd-2-6** (210 mg, 392 μ mol) 和 CDI (127 mg, 784 μ mol) 的 THF (8 mL) 溶液在氩气保护下于 70°C 搅拌 1 小时, 然后冷却至室温。向反应液中加入甲磺酰胺 (74.5 mg, 784 μ mol), 搅拌 10 分钟, 再加入 DBU (120 μ L, 789 μ mol), 70°C 下继续搅拌 1 小时。将混合物浓缩, 加水 (30 mL), 水相用 EtOAc (50 mL $\times$ 3) 萃取。合并的有机相用盐水 (50 mL $\times$ 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩。残留物经制备纯化得到 5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-2** (50.0 mg, 产率 20.8%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{27}H_{28}D_3F_4N_6O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 614.2$; 检测值: 614.4; 1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.85 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.51 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J = 49.6$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.05 (s, 1H), 3.95 (q, $J = 10.7$ Hz, 2H), 3.65-3.46 (m, 1H), 3.06 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.84 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 2.37-2.23 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.13 (t, $J = 11.3$ Hz, 1H), 2.04-1.92 (m, 1H), 1.75-1.64 (m, 1H).

实施例 3: 5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 (**Cpd-3**, 即化合物 3)



步骤 1: (叔丁氧羰基)(2-氯-4-甲氧基吡啶-5-基)氨基甲酸叔丁酯

在氮气保护下,将 2-氯-4-甲氧基嘧啶-5-胺 **Cpd-3-1**(5.00 g, 3.13 mmol)、二碳酸二叔丁酯(14.4 g, 6.57 mmol)、三乙胺(15.8 g, 15.7 mmol)和 4-二甲基氨基吡啶(383 mg, 3.13 mmol)的 THF(50 mL)混合物在 40°C 搅拌 1 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗,并检测到所需化合物。将反应混合物用水(100 mL)稀释并用 EtOAc(50 mL × 3)萃取。合并的有机层用饱和食盐水(50 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩。残余物通过 SGC(PE 中加 0-5% EtOAc)方法纯化,得到(叔丁氧羰基)(2-氯-4-甲氧基嘧啶-5-基)氨基甲酸叔丁酯 **Cpd-3-2**(4.80 g, 产率 42.5%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{15}H_{23}ClN_3O_5$ $[M+H]^+$: $m/z = 360.1$; 检测值: 360.2。

步骤 2: 5-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基嘧啶-2-甲酸甲酯

在一氧化碳气体氛围下,将(叔丁氧羰基)(2-氯-4-甲氧基嘧啶-5-基)氨基甲酸叔丁酯 **Cpd-3-2**(4.30 g, 11.9 mmol)、Pd(dppf)Cl₂(1.72 g, 2.38 mmol)和三乙胺(3.61 g, 35.7 mmol)的 MeOH(43 mL)混合物在 100°C 下搅拌 16 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗,并检测到所需化合物。将反应液过滤,反应液减压浓缩,残留物用水(100 mL)稀释,用 EtOAc(100 mL × 3)萃取。合并的有机层用饱和食盐水(50 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩。残余物通过 SGC(PE 中加 0-20% EtOAc)方法纯化,得到 5-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基嘧啶-2-甲酸甲酯 **Cpd-3-3**(2.00 g, 产率 59.0%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{12}H_{18}N_3O_5$ $[M+H]^+$: $m/z = 284.1$; 检测值: 284.1。

步骤 3: 8-溴-2-(3-溴丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶

在室温下,将 3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醇 **Cpd-1-7**(2.00 g, 6.02 mmol)和三苯基膦(3.16 g, 12.0 mmol)溶于 DCM(30 mL)中并搅拌 10 分钟,然后加入四溴化碳(3.00 g, 9.03 mmol)。反应液在室温下搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗,并检测到所需化合物。反应液用水(50 mL)稀释并用 EtOAc(50 mL × 3)萃取。合并的有机层用饱和食盐水(50 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩。残余物通过 SGC(PE 中加 0-10% EtOAc)方法纯化,得到 8-溴-2-(3-溴丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶 **Cpd-3-4**(1.55 g, 产率 53.0%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{13}H_9Br_2F_3N$ $[M+H]^+$: $m/z = 393.9/395.9/397.9$; 检测值: 394.0/396.0/398.0。

步骤 4: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)(叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸甲酯

在氮气保护下,将 8-溴-2-(3-溴丙-1-炔-1-基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶 **Cpd-3-4**(1.37 g, 3.46 mmol)、5-((叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基嘧啶-2-甲酸甲酯 **Cpd-3-3**(980 mg, 3.46 mmol)和碳酸铯(1.88 g, 13.8 mmol)的乙腈(20 mL)混合体系于 40°C 搅拌 12 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗,并检测到所需化合物。反应液冷却至室温并过滤,滤液减压浓缩。残余物通过 SGC(PE 中加 0-25% EtOAc)方法纯化,得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)(叔丁氧羰基)氨基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-3-5**(1.60 g, 产率 65.1%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{25}H_{25}BrF_3N_4O_5$ $[M+H]^+$: $m/z = 597.1/599.1$; 检测值: 597.2/599.2。

步骤 5: 5-((叔丁氧羰基)(3-(8-(((3S,4R)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸甲酯

在氮气保护下, 将 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)(叔丁氧基羰基)氨基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-3-5**(1.35 g, 2.26 mmol)、(3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺(448 mg, 3.39 mmol)、Brettphos Pd G3(205 mg, 226 μ mol)、Ruphos(211 mg, 452 μ mol)和碳酸铯(1.47 g, 4.52 mmol)的 THF(20 mL)混合体系于 95°C 封管中搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。反应液冷却至室温并过滤, 滤液减压浓缩。残余物通过 SGC(DCM 中加 0-5% MeOH)方法纯化, 得到 5-((叔丁氧基羰基)(3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-3-6**(1.20 g, 粗品, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{31}H_{37}F_4N_6O_5$ $[M+H]^+$: $m/z = 649.3$; 检测值: 649.2。

步骤 6: 5-((叔丁氧基羰基)(3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸

在室温下, 将 5-((叔丁氧基羰基)(3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-3-6**(1.20 g, 1.85 mmol)溶于 THF(8 mL)和 MeOH(8 mL)的混合溶剂中, 加入水(2 mL)和氢氧化锂(443 mg, 18.5 mmol)。体系在室温下搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。反应液用 1.0 N 的 HCl 调节的 pH 至 4, 加水(20 mL)稀释并用 DCM(20 mL $\times$ 3)萃取。合并有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到 5-((叔丁氧基羰基)(3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸 **Cpd-3-7**(400 mg, 粗品, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{30}H_{35}F_4N_6O_5$ $[M+H]^+$: $m/z = 635.3$; 检测值: 635.5。

步骤 7: (3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)(4-甲氧基-2-((甲基磺酰)胺基甲酰基)嘧啶-5-基)氨基甲酸叔丁酯

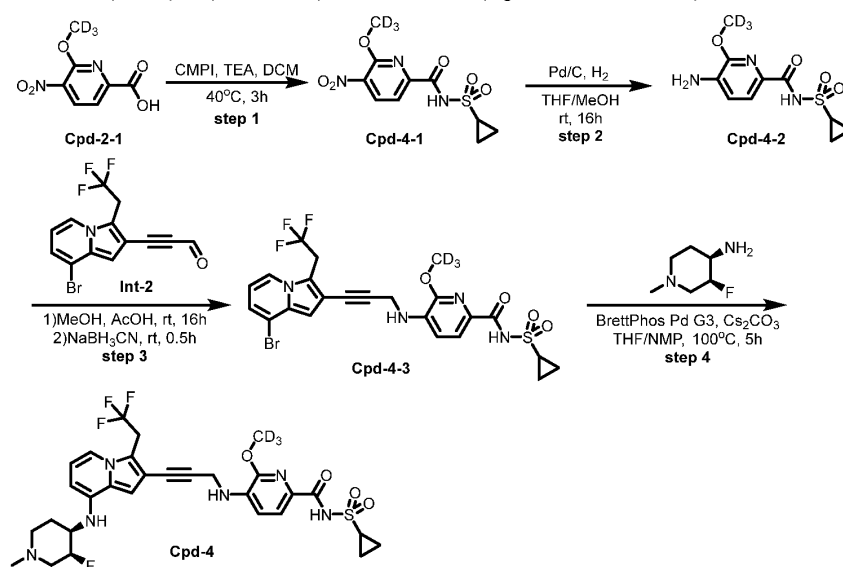
将 5-((叔丁氧基羰基)(3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基嘧啶-2-羧酸 **Cpd-3-7**(260 mg, 410 μ mol)和 CDI(133 mg, 820 μ mol)的 DMF(4 mL)溶液于 90°C 搅拌 2 小时。反应液冷却到室温, 然后加入甲基磺酰胺(78.0 mg, 820 μ mol)和 DBU(206 mg, 820 μ mol)。反应液在 90°C 下继续搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。反应液冷却到室温, 加水(50 mL)稀释, 用 DCM(50 mL $\times$ 3)萃取。合并的有机层用饱和食盐水(50 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩。残余物通过 Prep-HPLC 纯化得到 (3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)(4-甲氧基-2-((甲基磺酰)胺基甲酰基)嘧啶-5-基)氨基甲酸叔丁酯 **Cpd-3-8**(100 mg, 粗品, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{31}H_{38}F_4N_7O_6S$ $[M+H]^+$: $m/z = 711.3$; 检测值: 711.6。

步骤 8: 5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基-N-(甲基磺酰)嘧啶-2-甲酰胺

在 0°C 下, 将三氟乙酸(1 mL)加入到(3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)(4-甲氧基-2-((甲基磺酰)胺基甲酰基)嘧啶-5-基)氨基甲酸叔丁酯 **Cpd-3-8**(100 mg, 141 μ mol)的 DCM(3 mL)溶液中。反应液缓慢升至室温并搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料

完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应液滴加入饱和碳酸氢钠溶液(10 mL)和冰水(15 mL)的混合物中, 并用 DCM(10 mL × 3)萃取。合并的有机层用饱和食盐水(50 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩。残余物通过 Prep-HPLC 纯化得到 5-((3-(8-(((3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-4-甲氧基-*N*-(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-3**(8.05 mg, 产率 8.8%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{26}H_{30}F_4N_7O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 612.2$; 检测值: 612.2; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.05 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.80-6.70 (m, 1H), 6.52 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.64 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.87 (d, $J = 52.8$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 4.02-3.90 (m, 2H), 3.60 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.18-3.08 (m, 1H), 2.91 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.05-1.94 (m, 1H), 1.78-1.67 (m, 1H), 1.23 (s, 2H)。

实施例 4: *N*-(环丙基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*, 4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺(**Cpd-4**, 即化合物 4)



步骤 1: *N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基- d_3)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺

在室温下, 往 6-(甲氧基- d_3)-5-硝基吡啶-2-甲酸 **Cpd-2-1**(2.20 g, 10.9 mmol)、2-氯-1-甲基吡啶碘化物(3.35 g, 13.1 mmol)的二氯甲烷(40 mL)溶液依次加入环丙基磺酰胺(1.33 g, 10.9 mmol)和三乙胺(3.32 g, 32.8 mmol)。反应混合物在 40°C 下搅拌 3 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物减压浓缩, 残留物用水(100 mL)稀释, 并用 1N 盐酸水溶液调节 pH 到 2。析出的固体经过滤、水(100 mL)洗和无水硫酸钠干燥, 得到 *N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基- d_3)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-4-1**(1.00 g, 粗品, 黄色固体)。粗产物直接用于下一步反应。LCMS 计算值 $C_{10}H_7D_3N_3O_6S$ $[M-H]^+$: $m/z = 303.1$; 检测值: 303.2。

步骤 2: 5-氨基-*N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺

在室温下, 将 *N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基- d_3)-5-硝基-吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-4-1**(1.00 g, 3.29 mmol, 粗品)和钯碳(350 mg, 5%含量)在 THF(15 mL)和 MeOH(15 mL)的混合体系于氢气氛围下搅拌 16 小时。

LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物过滤并减压浓缩, 得到 5-氨基-*N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-4-2**(730 mg, 粗品, 黄色固体)。粗产物直接用于下一步反应。LCMS 计算值 C₁₀H₉D₃N₃O₄S [M-H]⁻: m/z = 273.1; 检测值: Found: 273.3.

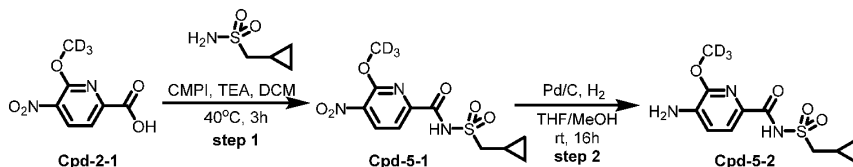
步骤 3: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-*N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺

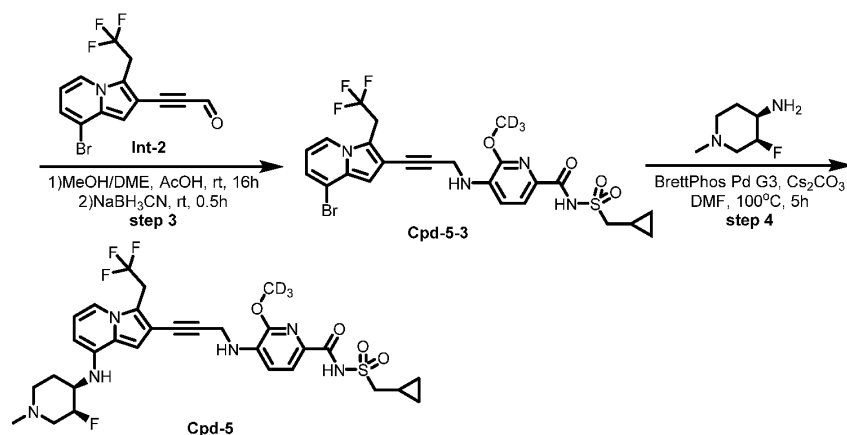
将 3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醛 **Int-2**(500 mg, 1.51 mmol)、*N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-4-2**(395 mg, 1.44 mmol)和醋酸(91.0 mg, 1.51 mmol)溶于 MeOH(6 mL)和 DCM(4 mL)的混合溶剂中, 体系在室温下搅拌 16 小时。然后加入 NaBH₃CN(286 mg, 4.54 mmol), 体系继续搅拌 0.5 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用水(40 mL)稀释, 过滤收集滤饼。滤饼用甲醇打浆纯化, 得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-*N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-4-3**(560 mg, 产率 62.8%, 黄色固体)。LCMS 计算值 C₂₃H₁₆BrD₃F₃N₄O₄S [M-H]⁻: m/z = 586.1/588.1; 检测值: 586.2/588.2.

步骤 4: *N*-(环丙基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺

在氩气保护下, 将 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-*N*-(环丙基磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-4-3**(560 mg, 950 μmol)、(3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺(252 mg, 1.90 mmol)、BrettPhos Pd G3(86.3 mg, 100 μmol)和碳酸铯(620 mg, 1.90 mmol)的 THF(13 mL)和 NMP(1.3 mL)的混合体系在 100°C 下在封管中搅拌 5 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用水(50 mL)稀释并用 EtOAc(20 mL × 3)萃取。合并有机层并用水(40 mL)、饱和食盐水(40 mL)洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩。残留物经 Prep-HPLC 纯化得到产物 *N*-(环丙基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-4**(42.4 mg, 产率 6.80%, 黄色固体)。LCMS 计算值 C₂₉H₃₀D₃F₄N₆O₄S [M+H]⁺: m/z = 640.2; 检测值: 640.1; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.88 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.76 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.83 (d, *J* = 49.2 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.99-3.91 (m, 2H), 3.62-3.49 (m, 1H), 3.13-3.01 (m, 2H), 2.84-2.82 (m, 1H), 2.33-2.21 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.15-2.10 (m, 1H), 2.03-1.93 (m, 1H), 1.71-1.67 (m, 1H), 1.19-1.15 (m, 2H), 1.09-1.04 (m, 2H).

实施例 5: *N*-(环丙基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺(**Cpd-5**, 即化合物 5)





步骤1: *N*-((环丙基甲基)磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基甲基吡啶酰胺

在室温下, 往 6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基吡啶-2-甲酸 **Cpd-2-1** (2.40 g, 11.9 mmol) 和 2-氯-1-甲基吡啶碘化物 (3.35 g, 13.1 mmol) 的 DCM (80 mL) 混合体系中依次加入 (环丙基甲基) 磺酰胺 (1.69 g, 12.5 mmol)、三乙胺 (3.62 g, 35.8 mmol)。反应混合物在 40°C 下搅拌 3 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物减压浓缩, 残留物用水 (100 mL) 稀释, 1N 盐酸水溶液调节 pH 到 2 并用 DCM (100 mL × 3) 萃取。合并有机层, 用水 (50 mL) 和饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩。残留物用 SGC (DCM 中加 0-5% MeOH) 纯化, 得到 *N*-((环丙基甲基)磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-5-1** (1.10 g, 产率 29.0%, 白色固体)。LCMS 计算值 C₁₁H₉D₃N₃O₆S [M-H]⁻: m/z = 317.1; 检测值: 316.9。

步骤2: 5-氨基-*N*-((环丙基甲基)磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺

在室温下, 将 *N*-((环丙基甲基)磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)-5-硝基甲基吡啶酰胺 **Cpd-5-1** (1.10 g, 3.46 mmol) 和钯碳 (550 mg, 10% 含量) 在 THF (20 mL) 和 MeOH (30 mL) 中的混合体系于氢气氛围下搅拌 16 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物过滤并减压浓缩, 得到 5-氨基-*N*-((环丙基甲基)磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-5-2** (970 mg, 粗品, 黄白色固体)。粗产物直接用于下一步反应。LCMS 计算值 C₁₁H₁₁D₃N₃O₄S [M-H]⁻: m/z = 287.1; 检测值: Found: 287.1。

步骤3: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-*N*-((环丙基甲基)磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺

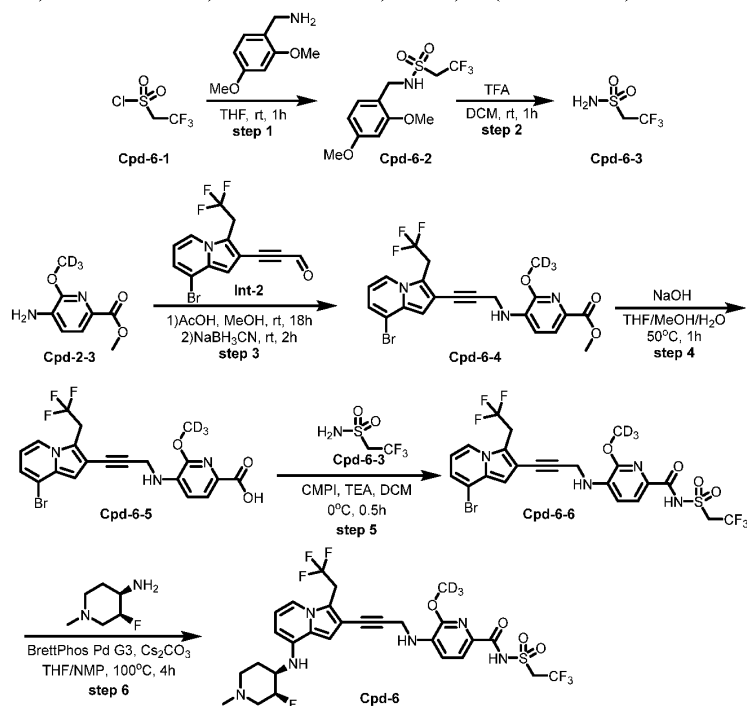
将 3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醛 **Int-2** (500 mg, 1.51 mmol)、*N*-((环丙基甲基)磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-5-2** (416 mg, 1.44 mmol)、醋酸 (86.6 mg, 1.44 mmol) 和硫酸钠 (1.02 g, 7.21 mmol) 在 MeOH (20 mL) 和 1,2-二氯乙烷 (20 mL) 中的混合体系于室温下搅拌 16 小时。然后加入 NaBH₃CN (181 mg, 2.89 mmol), 体系在室温下继续搅拌 0.5 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用水 (40 mL) 稀释并用 DCM (100 mL × 3) 萃取。合并有机层, 用水 (50 mL) 和饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩, 残留物用 SGC (PE 中加 0-70% EtOAc) 方法纯化, 得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-*N*-((环丙基甲基)磺酰)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-5-3** (390 mg, 产率 44.9%, 黄色固体)。LCMS 计算值

$C_{24}H_{20}BrD_3F_3N_4O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 602.1/604.1$; 检测值: 602.3/604.3.

步骤 4: *N*-(环丙基甲基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺

在氩气保护下, 将 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-*N*-(环丙基甲基磺酰)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-5-3** (390 mg, 650 μ mol)、(3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺 (171 mg, 1.29 mmol)、BrettPhos Pd G3 (58.7 mg, 60.0 μ mol) 和碳酸铯 (422 mg, 1.29 mmol) 的 DMF (12 mL) 混合体系在 100°C 下搅拌 5 小时, LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用水 (50 mL) 稀释, 用 1N 盐酸水溶液调节 pH 到 8 并用 EtOAc/THF (2 : 1, 30 mL $\times$ 3) 萃取。合并有机层并用水 (40 mL)、饱和食盐水 (40 mL) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩。残留物经 Prep-HPLC 纯化得到产物 *N*-(环丙基甲基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-5** (81.2 mg, 产率 19.1%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{30}H_{32}D_3F_4N_6O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 654.3$; 检测值: 654.7; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.86 (s, 1H), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.77 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.51 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.86 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J = 49.2$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.98-3.90 (m, 2H), 3.62-3.48 (m, 1H), 3.43 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.08-3.03 (m, 1H), 2.86-2.82 (m, 1H), 2.33-2.21 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.15-2.09 (m, 1H), 2.03-1.93 (m, 1H), 1.72-1.66 (m, 1H), 1.09-1.00 (m, 1H), 0.59-0.54 (m, 2H), 0.34-0.30 (m, 2H).

实施例 6: *N*-(2,2,2-三氟乙基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺 (**Cpd-6**, 即化合物 6)



步骤 1: *N*-(2,4-二甲氧基苄基)-2,2,2-三氟乙烷-1-磺酰胺

在室温下, 将 2,2,2-三氟乙烷-1-磺酰氯 **Cpd-6-1**(750 mg, 4.11 mmol)滴加入 2,4-二甲氧基苄胺(1.37 g, 8.22 mmol)的 THF(20 mL)溶液中, 体系搅拌 1 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。反应液减压浓缩, 得到的残留物用 SGC(DCM 中加 0-1% MeOH)方法纯化得到 *N*-(2,4-二甲氧基苄基)-2,2,2-三氟乙烷-1-磺酰胺 **Cpd-6-2**(1.20 g, 产率 93.2%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{11}H_{14}F_3NNaO_4S$ $[M+Na]^+$: $m/z = 336.1$; 检测值: 336.1.

步骤 2: 2,2,2-三氟乙烷-1-磺酰胺

将 *N*-(2,4-二甲氧基苄基)-2,2,2-三氟乙烷-1-磺酰胺 **Cpd-6-2**(1.45 g, 4.63 mmol)溶于 DCM(15 mL)中, 缓慢加入三氟乙酸(15 mL), 体系在室温下搅拌 1 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。反应液减压浓缩得到 2,2,2-三氟乙烷-1-磺酰胺 **Cpd-6-3**(851 mg, 产率 99.1%, 紫色固体)。粗产物直接用于下一步反应。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.50 (s, 2H), 4.26 (q, $J = 10.0$ Hz, 2H).

步骤 3: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸甲酯

将 3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醛 **Int-2**(700 mg, 2.33 mmol)、5-氨基-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-2-3**(432 mg, 2.33 mmol)和醋酸(280 mg, 4.67 mmol)的 MeOH(20 mL)混合体系在室温下搅拌 16 小时。然后加入 $NaBH_3CN$ (440 mg, 7.00 mmol), 体系在室温下继续搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用水(40 mL)稀释并用 DCM(100 mL $\times$ 3)萃取。合并有机层, 用水(50 mL)和饱和食盐水(50 mL)洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩, 残留物用 SGC(PE 中加 0-70% EtOAc)方法纯化, 得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-6-4**(625 mg, 产率 53.7%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{21}H_{15}D_3BrF_3N_3O_3$ $[M+H]^+$: $m/z = 499.1/501.1$; 检测值: 499.0/501.0.

步骤 4: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸

将 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸甲酯 **Cpd-6-4**(300 mg, 600 μ mol)和氢氧化钠(72.1 mg, 1.80 mmol)溶于 THF(9 mL)、MeOH(6 mL)和水(1 mL)的混合溶剂中, 体系在 50°C 下搅拌 1 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物减压浓缩, 加水(20 mL)稀释后用 1N 盐酸调 pH 至 5。固体过滤收集并干燥, 得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸 **Cpd-6-5**(246 mg, 产率 84.4%, 白色固体)。LCMS 计算值 $C_{20}H_{13}D_3BrF_3N_3O_3$ $[M+H]^+$: $m/z = 485.1/487.1$; 检测值: 485.0/487.0.

步骤 5: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)-*N*-((2,2,2-三氟乙基)磺酰)吡啶-2-甲酰胺

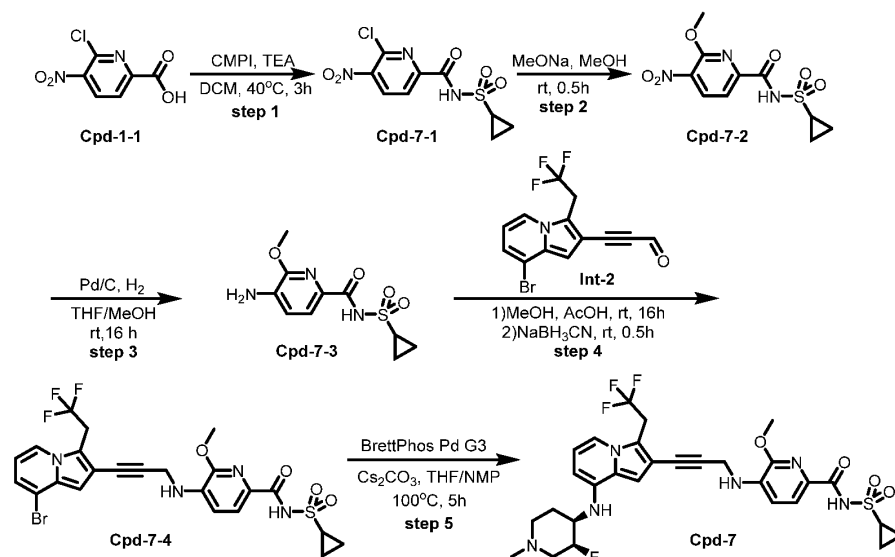
在 0°C 下, 将三乙胺(0.21 mL, 1.48 mmol)加入到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-羧酸 **Cpd-6-5**(240 mg, 490 μ mol)、2,2-三氟乙烷-1-磺酰胺 **Cpd-6-3**(242 mg, 1.48 mmol)和 2-氯-1-甲基吡啶碘化物(316 mg, 1.24 mmol)的 DCM(40 mL)混合体系中。反应液在 0°C 下搅拌 30 分钟。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。反应液用 DCM(100

mL)稀释并依次用 0.5N 盐酸水溶液(50 mL)、碳酸氢钠饱和水溶液(50 mL)和饱和食盐水(50 mL)洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤并减压浓缩。残留物用 SGC(DCM 中加 0-8% MeOH)方法纯化,得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)-N-((2,2,2-三氟乙基)磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-6-6**(160 mg, 产率 51.3%, 白色固体)。LCMS 计算值 $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{D}_3\text{BrF}_6\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: $m/z = 630.0/632.0$; 检测值: 629.9/631.9。

步骤 6: N-((2,2,2-三氟乙基)磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺

在氩气保护下,将 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)-N-((2,2,2-三氟乙基)磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-6-6**(160 mg, 250 μmol)、(3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺(67.0 mg, 510 μmol)、BrettPhos Pd G3(23.0 mg, 30.0 μmol)和碳酸铯(165 mg, 510 μmol)的 THF(13 mL)和 NMP(1.3 mL)混合体系于 100°C 下封管中搅拌 4 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗,并检测到所需化合物。将反应混合物用水(50 mL)稀释并用 EtOAc(20 mL $\times$ 3)萃取。合并有机层并用水(40 mL)、盐水(40 mL)洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤并减压浓缩。残留物用 SGC(DCM 中加 0-8% MeOH)纯化,得到产物 N-((2,2,2-三氟乙基)磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-6**(14.0 mg, 产率 8.09%, 白色固体)。LCMS 计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{D}_3\text{F}_7\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: $m/z = 682.2$; 检测值: 682.5; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.53 (s, 1H), 7.64 (dd, $J = 16.0, 6.9$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.53 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 6.50-6.33 (m, 1H), 5.90 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.81 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.09 (d, $J = 47.1$ Hz, 1H), 4.70-4.33 (m, 2H), 4.26 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 3.97 (d, $J = 10.4$ Hz, 2H), 3.89-3.76 (m, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.49-2.45 (m, 2H), 2.26-2.16 (m, 1H), 1.97-1.88 (m, 1H)。

实施例 7: N-(环丙基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺(**Cpd-7**, 即化合物 7)



步骤 1: 6-氯-N-(环丙基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺

在室温下, 往 6-氯-5-硝基吡啶-2-甲酸 **Cpd-1-1** (5.00 g, 24.7 mmol)、2-氯-1-甲基吡啶碘化物 (7.57 g, 29.6 mmol) 在 DCM (50 mL) 中的混合体系依次加入环丙基磺酰胺 (3.59 g, 29.6 mmol)、三乙胺 (7.49 g, 74.1 mmol)。反应体系在 40°C 下搅拌 3 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物减压浓缩, 残留物用水 (100 mL) 稀释, 并用 1N 盐酸水溶液调节 pH 到 2。析出的固体经过滤、水洗和干燥, 得到 6-氯-N-(环丙基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7-1** (8.90 g, 粗品, 白色固体)。粗产物直接用于下一步反应。LCMS 计算值 $C_9H_7ClN_3O_5S$ $[M-H]^-$: $m/z = 304.0/306.0$; 检测值: 303.9/305.9。

步骤 2: N-(环丙基磺酰)-6-甲氧基-5-硝基吡啶-2-甲酰胺

在室温下, 往 6-氯-N-(环丙基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7-1** (8.90 g, 29.1 mmol) 的甲醇 (90 mL) 溶液中滴加甲醇钠的甲醇溶液 (16.2 mL, 87.3 mmol, 5.4 mol/L)。反应液在室温下搅拌 30 分钟。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用 1N 盐酸水溶液淬灭并调节 pH 到 2, 析出的固体经过滤、水洗和干燥, 得到 N-(环丙基磺酰)-6-甲氧基-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7-2** (6.70 g, 粗品, 白色固体)。粗产物直接用于下一步反应。LCMS 计算值 $C_{10}H_{10}N_3O_6S$ $[M-H]^-$: $m/z = 300.0$; 检测值: 300.0。

步骤 3: 5-氨基-N-(环丙基磺酰)-6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺

在室温下, 将 N-(环丙基磺酰)-6-甲氧基-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7-2** (6.70 g, 22.2 mmol) 和钯碳 (3.30 g, 5% 含量) 在 THF (200 mL) 和 MeOH (130 mL) 的混合体系于室温下氢气氛围中搅拌 16 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物过滤并减压浓缩, 得到 5-氨基-N-(环丙基磺酰)-6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7-3** (6.20 g, 粗品, 白色固体)。粗产物直接用于下一步反应。LCMS 计算值 $C_{10}H_{12}N_3O_4S$ $[M-H]^-$: $m/z = 270.1$; 检测值: 270.1。

步骤 4: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-N-(环丙基磺酰)-6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺

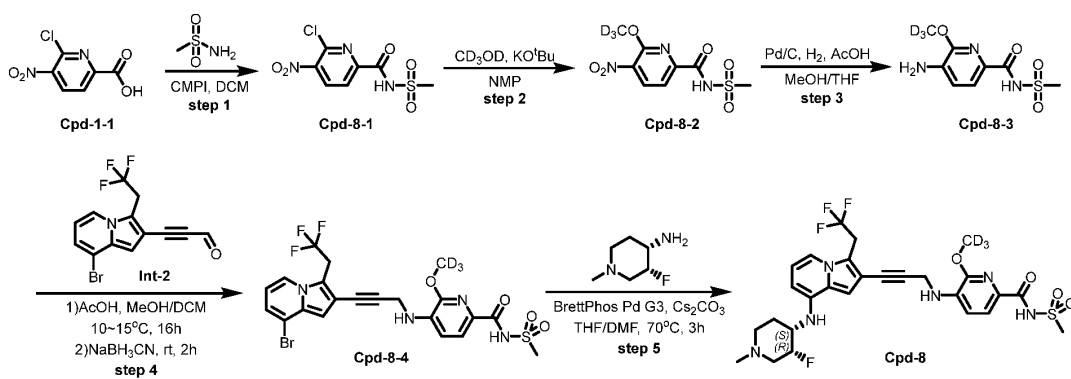
将 3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-醛 **Int-2** (1.00 g, 3.03 mmol)、5-氨基-N-(环丙基磺酰)-6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7-3** (820 mg, 3.03 mmol) 和醋酸 (180 mg, 3.03 mmol) 在 MeOH (15 mL) 中的混合体系在室温下搅拌 16 小时。然后加入 $NaBH_3CN$ (570 mg, 9.09 mmol), 体系在室温下继续搅拌 2 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用饱和碳酸氢钠水溶液 (50 mL) 淬灭并用 EtOAc (20 mL $\times$ 3) 萃取, 合并有机层并用水 (40 mL)、饱和食盐水 (40 mL) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩。残留物用二氯甲烷打浆纯化, 得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-N-(环丙基磺酰)-6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7-4** (500 mg, 产率 28.2%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_{23}H_{21}BrF_3N_4O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 585.0/587.0$; 检测值: 585.3/587.3。

步骤 5: N-(环丙基磺酰)-5-((3-(8-((3S,4R)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺

在氩气保护下, 将 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-N-(环丙基磺酰)-

6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7-4** (500 mg, 850 μmol)、(3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺 (226 mg, 1.71 mmol)、BrettPhos Pd G3 (77.4 mg, 10.0 μmol) 和碳酸铯 (557 mg, 1.71 mmol) 的 THF (15 mL) 和 NMP (1.5 mL) 混合体系于 100°C 下封管中搅拌 5 小时。LCMS 检测表明原料完全消耗, 并检测到所需化合物。将反应混合物用水 (50 mL) 稀释并用 EtOAc (20 mL $\times$ 3) 萃取。合并有机层并用水 (40 mL)、饱和食盐水 (40 mL) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩。残留物用 Prep-HPLC 纯化得到产物 *N*-(环丙基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-甲氧基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-7** (46.1 mg, 产率 8.3%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{F}_4\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: $m/z = 637.2$; 检测值: 637.1; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.83 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.76 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.51 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.86 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J = 48.6$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 4.00-3.91 (m, 2H), 3.62-3.49 (m, 1H), 3.11-3.03 (m, 2H), 2.84-2.82 (m, 1H), 2.33-2.21 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.15-2.09 (m, 1H), 2.03-1.93 (m, 1H), 1.71-1.67 (m, 1H), 1.19-1.15 (m, 2H), 1.10-1.04 (m, 2H)。

实施例 8: *N*-(甲基磺酰)-5-((3-(8-(((3*R*,4*S*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺 (**Cpd-8**, 即化合物 8)



步骤 1: 6-氯-*N*-(甲基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺

搅拌下, 向 6-氯-5-硝基吡啶-2-甲酸 **Cpd-1-1** (50.0 g, 247 mmol) 和二氯甲烷 (500 mL) 的悬浮液中加入 2-氯-1-甲基吡啶碘化物 (95.0 g, 372 mmol) 和甲磺酰基胺 (35.0 g, 368 mmol), 体系搅拌 10 分钟后滴加三乙胺 (100 g, 988 mmol), 滴加完毕升温至回流, 继续反应约 5 小时。冷却浓缩, 残余物用水 (250 mL) 稀释, 并用浓盐酸调至 pH = 2, 大量黄色固体析出。混合物常温搅拌过夜, 抽滤, 水 (250 mL) 淋洗滤饼, 滤饼于 50°C 下真空烘料得 6-氯-*N*-(甲基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-1** (68.0 g, 产率 98.5%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $\text{C}_7\text{H}_5\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: $m/z = 278.0$; 检测值: 278.1。

步骤 2: 6-(甲氧基- d_3)-*N*-(甲基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺

氩气保护下, 将 6-氯-*N*-(甲基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-1** (45.0 g, 161 mmol), 氘代甲醇 (17.4 g, 482 mmol) 溶于无水 *N*-甲基吡咯烷酮 (450 mL), 体系降温至 -15-0°C, 滴加 1M 的叔丁醇钾四氢呋喃溶液 (338 mL, 338 mmol), 滴加完毕后, 体系控温 -10~0°C 反应 40 分钟, 然后滴加 4N 盐酸 (135 mL) 终止反应。体系减压浓缩, 搅拌下滴加水 (1.62 L), 有大量黄色固体产生, 过滤, 滤饼用水 (500 mL)

和甲基叔丁基醚(500 mL)淋洗, 滤饼经乙腈水重结晶得到产品 6-(甲氧基- d_3)- N -(甲基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-2**(30.0 g, 产率 67.0%, 黄色固体)。LCMS 计算值 $C_8H_7D_3N_3O_6S$ $[M+H]^+$: $m/z = 279.0$; 检测值: 279.2。

步骤 3: 5-氨基-6-(甲氧基- d_3)- N -(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺

将 6-(甲氧基- d_3)- N -(甲基磺酰)-5-硝基吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-2**(30.0 g, 108 mmol)与四氢呋喃(600 mL)及醋酸(3.24 g, 53.9 mmol)混合搅拌形成溶液, 再加入甲醇(600 mL), 氩气置换后加入钯碳(3.00 g, 10%含量), 氩气置换成氢气, 室温反应 12 小时。硅藻土过滤, 四氢呋喃淋洗滤饼, 合并滤液, 浓缩。残余物浓缩干燥得到产物 5-氨基-6-(甲氧基- d_3)- N -(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-3**(26.0 g, 产率 97.1%, 灰白色固体), 无需进一步处理直接下一步。LCMS 计算值 $C_8H_9D_3N_3O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 249.1$; 检测值: 249.2。

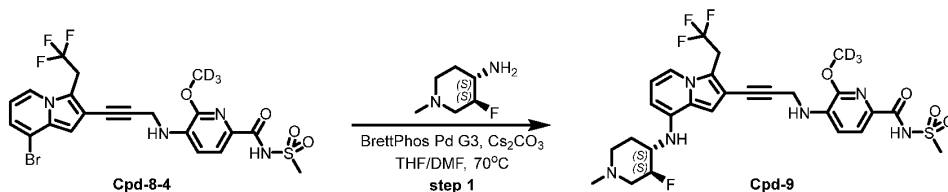
步骤 4: 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)- N -(甲基磺酰)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺

往 5-氨基-6-(甲氧基- d_3)- N -(甲基磺酰)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-3**(7.20 g, 29.0 mmol)、醋酸(3.14 g, 58.0 mmol)加入甲醇(100 mL)和二氯甲烷(100 mL)的混合溶剂, 待溶清, 加入 **Int-2**(10.1 g, 30.5 mmol), 体系在 10~15°C 下搅拌 16 小时, 体系出现大量浑浊, 然后加入氰基硼氢化钠(6.00 g, 87.1 mmol), 体系继续搅拌 2 小时。将体系浓缩, 加甲醇(100 mL), 室温下滴加水(100 mL), 然后室温搅拌 2 小时, 过滤, 滤饼用水(50 mL)和甲基叔丁基醚(100 mL)淋洗, 油泵真空下干燥得到 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)- N -(甲基磺酰)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-4**(12.9 g, 产率 79.0%, 类白色固体)。LCMS 计算值 $C_{21}H_{16}D_3BrF_3N_4O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 562.0/564.0$; 检测值: 562.2/564.2。

步骤 5: N -(甲基磺酰)-5-((3-(8-(((3*R*,4*S*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺

在氩气保护下, 将 5-((3-(8-溴-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)- N -(甲基磺酰)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-4**(1.80 g, 3.20 mmol)、(3*R*,4*S*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺(500 mg, 3.80 mmol)、BrettPhos Pd G3(600 mg, 662 μ mol)和碳酸铯(3.44 g, 10.6 mmol)的四氢呋喃(20 mL)和 N,N -二甲基甲酰胺(10 mL)的混合体系在 70°C 下搅拌 3 小时。体系冷却浓缩, 残余物经硅胶柱层析纯化(MeOH: DCM = 1: 24)得到产物 N -(甲基磺酰)-5-((3-(8-(((3*R*,4*S*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8**(830 mg, 产率 42.3%, 灰白色固体)。LCMS 计算值 $C_{27}H_{28}D_3F_4N_6O_4S$ $[M+H]^+$: $m/z = 614.2$; 检测值: 614.4; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.83 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.75 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 6.52 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.84 (d, $J = 49.3$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.95 (q, $J = 10.8$ Hz, 2H), 3.56 (d, $J = 28.9$ Hz, 1H), 3.07 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H), 2.85 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.40-2.09 (m, 5H), 2.05-1.91 (m, 1H), 1.69 (dd, $J = 13.2, 4.0$ Hz, 1H)。

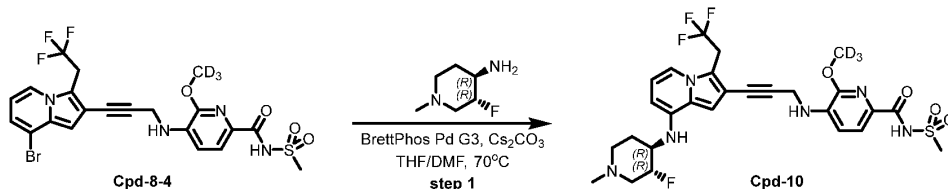
实施例 9: N -(甲基磺酰)-5-((3-(8-(((3*S*,4*S*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基- d_3)吡啶-2-甲酰胺

2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺(Cpd-9, 即化合物 9)

步骤 1: *N*-(甲磺酰基)-5-((3-(8-(((3*S*,4*S*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺

在氩气保护下, 将 5-((3-(8-溴-3,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-*N*-(甲磺酰基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-4** (1.80 g, 3.20 mmol)、(3*S*,4*S*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺 (400 mg, 3.02 mmol)、BrettPhos Pd G3 (600 mg, 662 μmol) 和碳酸铯 (3.44 g, 10.6 mmol) 的四氢呋喃 (20 mL) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (10 mL) 的混合体系在 70°C 下搅拌 3 小时。体系冷却浓缩, 残余物经硅胶柱层析纯化 (MeOH : DCM = 1 : 24) 得到产物 *N*-(甲磺酰基)-5-((3-(8-(((3*S*,4*S*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-9** (500 mg, 产率 26.9%, 棕色固体)。LCMS 计算值 C₂₇H₂₈D₃F₄N₆O₄S [M+H]⁺: *m/z* = 614.2; 检测值: 614.4; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.85 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.74 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.86 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.57 (dtd, *J* = 49.6, 9.3, 4.7 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.95 (q, *J* = 10.7 Hz, 2H), 3.49 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 3.10 (p, *J* = 5.4 Hz, 1H), 2.77-2.62 (m, 1H), 2.24 (s, 3H), 2.19-1.90 (m, 3H), 1.61-1.39 (m, 1H)。

实施例 10: *N*-(甲磺酰基)-5-((3-(8-(((3*R*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺(Cpd-10, 即化合物 10)



步骤 1: *N*-(甲磺酰基)-5-((3-(8-(((3*R*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺

在氩气保护下, 将 5-((3-(8-溴-3,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-*N*-(甲磺酰基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-8-4** (1.80 g, 3.20 mmol)、(3*R*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-胺 (500 mg, 3.78 mmol)、BrettPhos Pd G3 (600 mg, 662 μmol) 和碳酸铯 (3.44 g, 10.6 mmol) 的四氢呋喃 (20 mL) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (10 mL) 的混合体系在 70°C 下搅拌 3 小时。体系冷却浓缩, 残余物经硅胶柱层析纯化 (MeOH : DCM = 1 : 24) 得到产物 *N*-(甲磺酰基)-5-((3-(8-(((3*R*,4*R*)-3-氟-1-甲基哌啶-4-基)胺基)-3-(2,2,2-三氟乙基)吡啶-2-基)丙-2-炔-1-基)胺基)-6-(甲氧基-*d*₃)吡啶-2-甲酰胺 **Cpd-10** (1.12 g, 产率 57.0%, 棕色固体)。LCMS 计算值 C₂₇H₂₈D₃F₄N₆O₄S [M+H]⁺: *m/z* = 614.2; 检测值: 614.4; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ

10.89 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.81-6.78 (m, 2H), 6.51 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.86 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.57 (dtd, $J = 49.6, 9.2, 4.8$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.95 (q, $J = 10.7$ Hz, 2H), 3.59-3.41 (m, 1H), 3.10 (dt, $J = 10.9, 5.7$ Hz, 1H), 2.77-2.59 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.17-1.83 (m, 3H), 1.62-1.38 (m, 1H).

生物评价

一. 生化活性实验：化合物促进 p53 Y220C 突变体与 DNA 结合的活性测试

均相时间分辨荧光 (HTRF) 实验用于测量化合物对 p53 Y220C 突变体的再激活作用。用于 HTRF 实验的重组 His 标记的 p53 Y220C (94-312) 在大肠杆菌中表达。并通过 Ni-NTA 柱纯化至 90% 纯度。用于 HTRF 实验的生物素标记的 DNA 由康龙化成合成，具体序列为 5'-ATTAGGCATGTCTAGGCATGTCTAGG-3'。

使用荧光共振能量转移 (FRET) 测量重组 His 标记的 p53 Y220C 蛋白和生物素标记的 DNA 的结合。对于 FRET 实验，通过检测与 Eu 缀合的抗 His 抗体 (Cisbio, 61HI2KLA) 和结合在生物素标记的 DNA 分子上的 d2 缀合链霉亲和素 (Cisbo, 610SADLF) 之间相互作用的荧光来测量 p53 突变体和 DNA 序列之间的结合。化合物制备成 2 mM 母液，并在 DMSO 中按 1:3 连续稀释 10 个浓度。将每个 200 倍工作浓度化合物依次稀释至 4 倍工作浓度。使用 Echo 将 4 μ L 化合物溶液逐行转移至 384 测定板，每列包含 2 个重复。将 4 μ L p53 溶液加入到检测板中。将 4 μ L 生物素 DNA 溶液加入到检测板中，然后将 4 μ L 检测溶液 (His-Eu 抗体和链霉亲和素-d2) 加入到检测板的每个孔中。将测定板温育过夜并避光。在 BMG (BMG LRBTECH) 上读取荧光。

计算每个孔的比率(比率_665nm/615nm -比率_背景)。活性%计算如下:

$$C = (Ave_Ac - Ave_Ba) / (Ave_Dc - Ave_Bd)$$
$$R \text{ 数据} = (A - Ave_Ba - C * D) / (D - Ave_Bd) * (Ave_Dc - Ave_Bd)$$
$$\text{活性}\% = R \text{ 数据} / Ave_VC * 100.$$

A: 样品在 665nm 处的荧光强度;
D: 样品在 615nm 处的荧光强度;
Ba: 平板背景在 665nm 处的荧光强度;
Bd: 平板背景在 615nm 处的荧光强度;
Dc: HIS-Eu 背景在 615nm 处的荧光强度;
Ac: 链霉亲和素-d2 背景在 665nm 处的荧光强度;
VC: DMSO 处理组。

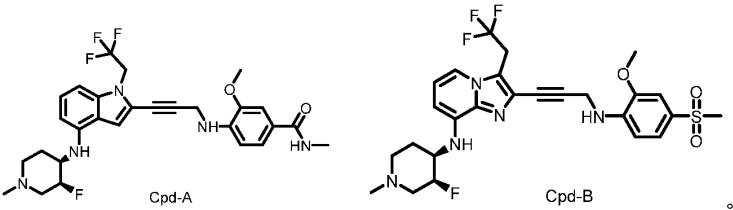
利用 Graphpad 8.0 将活性%和化合物浓度的对数拟合为非线性回归 (剂量反应-变量斜率)，计算 SC₁₅₀。

表 1: 化合物促进 p53 Y220C 突变体与 DNA 结合的活性

化合物编号	SC ₁₅₀ (nM)
-------	------------------------

Cpd-A	10
Cpd-B	15
Cpd-C	4.6
Cpd-1	1.0
Cpd-2	0.58
Cpd-3	0.74
Cpd-4	0.35
Cpd-5	1.1
Cpd-6	1.7
Cpd-7	0.64

Cpd-A 选自 WO2021061643A1；Cpd-B 选自 WO2022213975A1；



以上数据显示，本发明实施例化合物对于促进 p53 Y220C 突变体与 DNA 结合具有良好的活性，且明显优于参考化合物。

二．细胞活性实验：NUGC-3 细胞的增殖抑制活性测试

根据细胞中脱氢酶的活性，评估了化合物对人胃腺癌细胞系的抗增殖作用，该活性与活细胞的数量有良好的相关性。将细胞系 NUGC-3（JCRB, JCRB0822）培养在补充有 10%（v/v）胎牛血清（BI, 04-002-1A）的 RPMI 1640（Invitrogen, 11875-085）培养基中。根据美国典型培养物收藏中心的标准说明培养细胞系。通过短串联重复谱鉴定细胞系。

在增殖实验中，将 1000 个 NUGC-3 细胞接种在每孔 200 μL 培养基中的 96 孔平底透明 TC 处理板（Corning, 3903）中，并在培养基中过夜培养恢复状态。按递增的浓度梯度添加化合物，DMSO 处理作为阳性对照。处理 5 天后，将平板平衡至室温 30 分钟，并通过添加细胞计数试剂盒-8 试剂（MCE, HY-K0301）测量活细胞数。在 Enspire（Perkin elme）上测量吸光度。各组的相对存活率表示为相对于阳性对照组的百分比变化，然后使用程序 XLFit（IDBS）拟合到四参数 logit 非线性曲线。

表 2：化合物对 NUGC-3 细胞的增殖抑制活性

化合物编号	NUGC-3 IC ₅₀ (μM)
Cpd-A	0.78
Cpd-B	0.36
Cpd-C	0.23
Cpd-1	0.10

Cpd-2	0.058
Cpd-4	0.097
Cpd-5	0.081
Cpd-6	0.19
Cpd-7	0.070
Cpd-8	0.34
Cpd-9	0.55
Cpd-10	0.90

以上数据显示，本发明实施例化合物对于 NUGC-3 细胞增殖具有良好的抑制活性，且明显优于参考化合物。

三．代谢酶相关的药物间相互作用评价

（一）单浓度下 CYP 酶的抑制活性测试

- 1. 实验目的：测试化合物在单浓度下对 CYP 系列酶的抑制效应。
- 2. 实验仪器与试剂：

肝微粒体：

种属	性别	供应商	货号	批次	存储
人	混合	康宁	452117	38298	-80 °C

试剂：

化合物	供应商	货号	储存
特非那定	西格玛奥德里奇	T9652	4 °C
甲苯磺丁脲	西格玛奥德里奇	T0891	4 °C
磷酸氢二钾	国药集团	20032117	室温
还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸	上海昂一生物科技有限公司	N99640-100MG	-20 °C
非那西丁	西格玛奥德里奇	101690303	室温
双氯芬酸	西格玛奥德里奇	D6899-10G	室温
美芬妥英	Glpbio	GC14486	-20 °C
右美沙芬	西格玛奥德里奇	D9684-5G	室温
咪达唑仑	国家食品药品检定研究院	PVJT-0H9Z	室温
睾酮	阿达玛斯试剂	171265	室温
安非他酮	开曼化学公司	10488	-20 °C
阿莫地喹	Abmole	M5412	-20 °C
β-蔡黄酮	西格玛奥德里奇	N5757-1G	4 °C
磺胺苯唑	西格玛奥德里奇	S0758-1G	4 °C
苊基尼尔烷醇	上海源野生物科技有限公司	Y43177-5mg	室温

奎尼丁	Internation-Laboratory-USA	1311468-5G	室温
酮康唑	西格玛奥德里奇	K1003-100MG	4 °C

3. 实验方法:

将 8.71 g K₂HPO₄ 溶解在 950 mL 水中。用 HCl 溶液调节 pH 至 7.4。用水调节至终体积 1000mL。通过 0.45 μm 过滤器过滤缓冲液。保存在 4°C 冰箱中以备将来使用。用 DMSO 配制特非那定/甲苯磺丁脲（各 1 mg/mL）储备液。将上述储备液用乙腈稀释，制成含有 5/10 ng/mL（特非那定/甲苯磺丁脲）的猝灭液。

阳性对照工作液:

CYP 酶	抑制剂	储备液浓度 (mM)	工作液浓度 (mM)	孵育浓度 (μM)	储备液体积 (μL)	总体积 (μL)	格式
1A2	β-萘黄酮	10	2	10	10	50	5 合一
2C9	磺胺苯唑	10	2	10	10		
2C19	苄基尼尔烷醇	5	1	5	10		
2D6	奎尼丁	10	2	10	10		
3A4/5	酮康唑	10	2	10	10	50	单独
	酮康唑	2	2	10	50		

底物工作液:

CYP 酶	底物	储备液浓度 (mM)	工作液浓度 (mM)	孵育浓度 (μM)	储备液体积 (μL)	总体积 (μL)	格式
1A2	非那西丁	250	50	50	2	10	5 合一
2C9	双氯芬酸	50	10	10	2		
2C19	美芬妥英	225	45	45	2		
2D6	右美沙芬	25	5	5	2		
3A4/5	咪达唑仑	12.5	2.5	2.5	2	5	单独
	睾酮	50	50	50	5		

使用前将肝微粒体在 37°C 水浴中解冻。配制肝微粒体工作液（体系终浓度 0.5mg/mL）。用磷酸盐缓冲液配制 5 mM NADPH 工作溶液。用 DMSO 将上述储备液配制成 2 mM 工作溶液。

将 238.5 μL 肝微粒体工作溶液添加到 1.1 mL 管中。加入 1.5 μL 测试化合物/对照工作液/DMSO，吹打数次混匀。37°C 振荡水浴预孵育 5 分钟。预孵育后，加入 60 μL NADPH 工作液，吹打数次混匀。37°C 振荡水浴孵育 10 分钟。孵育后，立即加入 500 μL 淬灭液，涡旋 1 分钟。将所有样品在 4°C 下以 4,000 rpm 离心 15 分钟。分装 300 μL 上述上清液用于进一步 LC-MS/MS 分析。

4. 数据处理方法及结果:

使用测试化合物或对照化合物的代谢物形成与基质对照相比来计算抑制百分数（%抑制）。

表 3: 化合物对 CYP 酶的抑制活性*

化合物编号	抑制率(%)					
	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 (咪达唑仑)	CYP3A4/5 (睾酮)
Cpd-A	12	38	42	5.5	83	ND
Cpd-B	0.56	21	31	3.6	61	75
Cpd-C	18	43	67	9.5	79	ND
Cpd-1	NI	6.7	NI	1.6	9.8	3.7
Cpd-2	NI	8.9	8.4	7.2	8.7	NI

*化合物终浓度为 10 μM；ND：未检测；NI：无抑制

以上数据显示，本发明实施例化合物对 CYP 系列酶抑制活性较弱，药物间相互作用的风险显著低于参考化合物。

（二）CYP3A4/5 酶多浓度抑制曲线测定

- 1. 实验目的：测定化合物对 CYP3A4/5 酶的浓度抑制曲线。
- 2. 实验仪器与材料：

肝微粒体：

种属	性别	供应商	货号	批次	存储
人	混合	康宁	452117	38298	-80 °C

试剂：

化合物	供应商	货号	储存
特非那定	西格玛奥德里奇	T9652	4 °C
甲苯磺丁脲	西格玛奥德里奇	T0891	4 °C
磷酸氢二钾	国药集团	20032117	室温
还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸	上海昂一生物科技有限公司	N99640-100MG	-20 °C
咪达唑仑	国家食品药品检定研究院	PVJT-0H9Z	室温
睾酮	阿达玛斯试剂	171265	室温
酮康唑	西格玛奥德里奇	K1003-100MG	4 °C

3. 实验方法：

将 8.71 g K₂HPO₄ 溶解在 950 mL 水中。用 HCl 溶液调节 pH 至 7.4。用水调节至终体积 1000mL。通过 0.45 μm 过滤器过滤缓冲液。保存在 4℃冰箱中以备将来使用。用 DMSO 配制特非那定/甲苯磺丁脲（各 1 mg/mL）储备液。将上述储备液用乙腈稀释，制成含有 5/10 ng/mL（特非那定/甲苯磺丁脲）的猝灭液。

阳性对照工作液：

CYP 酶	抑制剂	储备液浓度	工作液浓度	孵育浓度	储备液体积	总体积(μL)
-------	-----	-------	-------	------	-------	---------

		(mM)	(mM)	(μM)	(μL)	
3A4/5	酮康唑	10	2	10	10	50
	酮康唑	2	2	10	50	50

底物工作液：

CYP 酶	底物	储备液浓度 (mM)	工作液浓度 (mM)	孵育浓度 (μM)	储备液体积 (μL)	总体积(μL)
3A4/5	咪达唑仑	12.5	2.5	2.5	2	10
	睾酮	50	50	50	5	5

使用前将肝微粒体在 37°C 水浴中解冻。配制肝微粒体工作液（体系终浓度 0.5mg/mL）。用磷酸盐缓冲液配制 5 mM NADPH 工作溶液。用 DMSO 将上述储备液配制成 2 mM 工作溶液。乙腈稀释上述储备液（4 倍稀释，6 个非零浓度）。

将 238.5 μL 肝微粒体工作溶液添加到 1.1 mL 管中。加入 1.5 μL 测试化合物/对照工作液/DMSO，吹打数次混匀。37°C 振荡水浴预孵育 5 分钟。预孵育后，加入 60 μL NADPH 工作液，吹打数次混匀。37°C 振荡水浴孵育 10 分钟。孵育后，立即加入 500 μL 淬灭液，涡旋 1 分钟。将所有样品在 4°C 下以 4,000 rpm 离心 15 分钟。分装 300 μL 上述上清液用于进一步 LC-MS/MS 分析。

4. 数据处理方法及结果：

使用 Graph Pad Prism 计算半数抑制浓度（IC₅₀）。

表 4：化合物对 CYP3A4/5 酶的抑制活性

化合物编号	CYP3A4/5 IC ₅₀ (μM) (咪达唑仑)	CYP3A4/5 IC ₅₀ (μM) (睾酮)
Cpd-A	2.3	0.89
Cpd-B	5.8	3.2
Cpd-C	3.8	ND
Cpd-1	>50	>50
Cpd-2	>50	>50

ND：未检测

以上数据显示，本发明实施例化合物对 CYP3A4/5 酶无明显抑制活性，药物间相互作用的风险显著低于参考化合物。

四. 体外代谢稳定性评价：肝微粒体代谢稳定性研究：

1. 实验目的：评价被试化合物在人/大鼠/小鼠肝微粒体中的代谢稳定性。

2. 实验试剂与材料：

试剂：

试剂名称	生产厂家	货号	保存条件
特非那丁（Terfenadine）	Sigma-Aldrich	T9652	2-8 °C

甲苯磺丁脲 (Tolbutamide)	Sigma-Aldrich	T0891	2-8 °C
磷酸二氢钾 (K ₂ HPO ₄)	SCR	20032117	RT
还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH)	ACROS	328742500	-20 °C

材料:

实验材料名称	性别	生产厂家	货号	保存条件
人肝微粒体	男女混合	Corning	452117	-80 °C
大鼠肝微粒体	雄性	BioreclamationIVT	M00001	-80 °C
小鼠肝微粒体	雄性	BioreclamationIVT	M00501	-80 °C

3.实验方法:

待测化合物与阳性对照化合物(右美沙芬作为对照化合物)分别溶解于 DMSO 中制备成浓度为 10mM 的储备液,将上述储备液用 DMSO 稀释成 200 μM 工作液。将 8.709 g 磷酸氢二钾(K₂HPO₄)溶解在 950 mL 水中,用盐酸调节溶液 pH 值至 7.4,然后加水定容至 1000 mL。使用 0.22 μm 滤膜过滤后置于 4 度冰箱保存备用。各种属肝微粒体(蛋白浓度 20 mg/mL)在 37 度水浴中融化后,分别用磷酸缓冲溶液稀释得到蛋白浓度为 0.629 mg/mL 的肝微粒体工作液。用上述磷酸缓冲液配制成 5 mM 的 NADPH 溶液备用。用 DMSO 配制 1 mg/mL terfenadine/tolbutamide 的储备液,然后用 50% 甲醇/50% 乙腈的混合溶液稀释成含 5/10 ng/mL (terfenadine/tolbutamide) 内标的反应终止液。

取 238.5 μL 的不同种属肝微粒体工作液加入 1.1 mL 微量管中,分别加入 1.5 μL 的待测化合物工作液或阳性对照化合物(右美沙芬)工作液(200 μM),混匀后在 37 度水浴锅中预孵育 5 min。加入 60 μL NADPH 溶液启动反应,充分混匀后,在反应后的 0,5,15,30 和 60 分钟时间点,分别移取 30 μL 反应液加入到 300 μL 的反应终止液中。将所有时间点的样品剧烈涡旋 1 分钟后于 4000 rpm 在 4 °C 条件下离心 15 分钟。取 100 μL 上清液加入 100 μL 纯净水混合均匀后进 LC-MS/MS 分析。

4.数据处理方法:

通过化合物剩余量的百分率的自然对数与时间作图测得斜率 (ke),并根据一级动力学公式计算 T_{1/2} 和内在清除率 (CL_{int}):

化合物剩余率计算如下:

$$\% \text{剩余率} = \frac{\text{各个时间点化合物峰面积与内标峰面积比值}}{\text{初始T0时间点峰面积与内标峰面积比值}} \times 100$$

$$\text{内在清除率 } CL_{int} (\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}) = 0.693 \times 1000 / T_{1/2} / \text{蛋白浓度} (0.5 \text{ mg protein}/\text{mL})$$

表 5: 化合物在人/大鼠/小鼠肝微粒体中的代谢稳定性

化合物编号	种属	In vitro t _{1/2} (min)	In vitro Clint (μL/min/mg protein)
Cpd-A	人	41	33.6
	大鼠	30	46.1
	小鼠	27	50.7

Cpd-C	人	49	28.3
	大鼠	23	61.5
	小鼠	17	83.9
Cpd-1	人	136	7.3
	大鼠	28	35.0
	小鼠	72	13.7
Cpd-2	人	>256	<5.4
	大鼠	119	11.7
	小鼠	110	12.6

以上数据显示，本发明实施例化合物在多个种属的肝微粒体中具有很高的代谢稳定性，且明显优于参考化合物。

五、体外代谢稳定性评价：肝细胞代谢稳定性测试

- 1. 实验目的：测定化合物在人/大鼠/小鼠肝细胞中的代谢稳定性。
- 2. 实验材料：

种属	品系	性别	供应商
人	N/A	混合	BioIVT
大鼠	Sprague Dawley	雄性	BioIVT
小鼠	ICR/CD-1	雄性	BioIVT

3 试验设计

3.1 化合物工作液的制备

将受试物和对照药维拉帕米粉末用 DMSO 配置成高浓度储备液，使用前用 50%乙腈/水稀释到 100 μM 的工作液，受试物和维拉帕米的终浓度为 1 μM。

3.2 肝细胞的制备

- 1) 混合 49.5 mL Williams’ Medium E 和 0.5 mL GlutaMAX 作为孵育液。将肝细胞复苏液和孵育液于使用前置于 37°C 水浴中至少预热 15 分钟。
- 2) 取一管超低温保存的肝细胞，确保肝细胞在复苏之前仍处于低温冰冻状态。将肝细胞迅速置于 37° C 水浴中并轻摇直至所有冰晶全部分散，喷洒 70%乙醇后转移至生物安全柜中。
- 3) 将肝细胞小管的内容物倾入盛有 50 mL 复苏培养基的离心管中，将其于 100 g 离心 10 分钟。离心后，吸出复苏培养基并加入足量孵育培养基得到细胞密度约 1.5×10⁶ 个细胞/mL 的细胞混悬液。
- 4) 用 Cellometer Vision 对肝细胞进行计数及确定活细胞密度，肝细胞成活率必须大于 75%。利用孵育培养基稀释肝细胞混悬液至活细胞密度为 0.5×10⁶ 个细胞/mL。
- 5) 将一部分密度为 0.5×10⁶ 个细胞/mL 的肝细胞混悬液开水煮沸灭活 5 分钟作为阴性对照。细胞灭活后，便于考察非细胞酶系介导的底物转化。

3.3 试验方法

- 1) 转移 198 μL 活细胞或者灭活细胞的混悬液到 96 孔深孔板，将深孔板置于涡旋上于孵箱中预热 10 分钟。活细胞进行双平行孵育，灭活细胞进行单平行孵育。
- 2) 每孔加入 2 μL 100 μM 受试物或维拉帕米进行反应起始，将深孔板放回孵箱涡旋器上。
- 3) 孵育样品，分别于 0、15、30、60、90 和 120 分钟，取 25 μL 混悬液，加入 150 μL 含内标的乙腈（200 nM 阿普唑仑、200 nM 拉贝洛尔、2 μM 酮洛芬、200 nM 咖啡因）终止反应。涡旋 10 分钟，于 3220 g、4°C 条件离心 30 分钟，离心完成后取 100 μL 上清液和 100 μL 超纯水混匀用于 UPLC-MS/MS 分析检测。

4 数据分析

所有的数据计算均通过 Microsoft Excel 软件进行。通过提取离子图谱检测峰面积。通过对母药消除百分比的自然对数与时间进行线性拟合，检测母药的体外半衰期 ($t_{1/2}$)。

体外半衰期 ($t_{1/2}$) 通过斜率计算：

$$\text{in vitro } t_{1/2} = 0.693/k$$

体外固有清除率（单位 $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ 个细胞）用下列公式计算：

$$\text{in vitro CLint} = kV/N$$

V = 每孔孵育体积（0.2 mL）；

N = 每孔细胞的数量（ 0.1×10^6 个细胞）

表 6：化合物在人/大鼠/小鼠肝细胞中的代谢稳定性

化合物编号	种属	In vitro $t_{1/2}$ (min)	In vitro CLint ($\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells)
Cpd-A	人	61	22.7
	大鼠	73	19.0
	小鼠	164	8.5
Cpd-B	人	82	16.8
	大鼠	22	63.8
	小鼠	7	197.9
Cpd-C	人	75	18.4
	大鼠	88	15.7
	小鼠	44	31.8
Cpd-1	人	>511	<2.7
	大鼠	>511	<2.7
	小鼠	>511	<2.7
Cpd-2	人	>511	<2.7
	大鼠	>511	<2.7
	小鼠	>511	<2.7

以上数据显示，本发明实施例化合物在人/大鼠/小鼠的肝细胞中具有很高的代谢稳定性，且明显优于参考化合物。

六. 心脏安全性评价：hERG 钾离子通道的抑制活性测试

1. 实验目的：

应用手动膜片钳技术评估测试化合物是否对电压门控钾离子通道 hERG 有潜在抑制作用。此实验通过检测化合物 5 个浓度对 hERG 通道电流的影响，得到化合物的量效曲线并计算出 IC₅₀。

2. 实验仪器和试剂：

实验材料	提供商（货号）
6 cm 细胞培养皿	上海华雅思创生物科技有限公司（150462）
3.5 cm 细胞培养皿	上海华雅思创生物科技有限公司（150460）
透析胎牛血清	上海博哈生物科技有限公司（BS-0005-500）
DMSO	北京索莱宝科技有限公司（D8371）
DMEM 培养基	赛默飞世尔科技（中国）有限公司（10569044）
HEPES	赛默飞世尔科技（中国）有限公司（15630080）
胰蛋白酶	赛默飞世尔科技（中国）有限公司（12604）
磷酸盐缓冲液（不含钙镁离子）	北京索莱宝科技有限公司（D1040）
青霉素-链霉素溶液	赛默飞世尔科技（中国）有限公司（15140122）
MEM 非必需氨基酸溶液	赛默飞世尔科技（中国）有限公司(11140050)
遗传霉素（G418）	赛默飞世尔科技（中国）有限公司（11811031）
杀稻瘟菌素	赛默飞世尔科技（中国）有限公司（R21001）
多聚赖氨酸	赛默飞世尔科技（中国）有限公司（P4832）
多菲莱德	北京伊普瑞斯技术开发有限公司（D525700）
强力霉素	西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公（D9891）
二氧化碳培养箱	赛默飞世尔科技（中国）有限公司(Thermo371)
玻璃电极拉制仪	日本 NARISHIGE 公司(PC-10 Puller)
微操定位器	青岛森泉光电有限公司(MC1000e)
灌流系统	美国 ALA 公司(VM8 型重力给药系统)
真空泵	德国 Chemvak 公司(V300)
渗透压仪	雅森公司(Osmo310)

3. 实验方法：

细胞系和细胞培养：稳定表达 hERG 离子通道的 HEK293 细胞株（货号：K1236）购自 Invitrogen 公司。该细胞株被培养在含有 85%DMEM，10%透析胎牛血清，0.1 mM 非必需氨基酸溶液，100 U/mL 青霉素-链霉素溶液，25 mM HEPES，5 µg/mL 杀稻瘟菌素和 400µg/mL 遗传霉素的培养基中。待细胞密度增长至培养皿底面积的 40%~80%时，通过胰蛋白酶进行消化，每周传代三次。在实验前，细胞

按照 5×10^5 的密度培养在 3.5 cm 培养皿中, 加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 强力霉素诱导 48 小时, 然后将细胞进行消化, 接种在玻片上以备后续的手动膜片钳的实验。

溶液配制: 细胞外液 (以 mM 为单位): 132 氯化钠, 4 氯化钾, 3 氯化钙, 0.5 氯化镁, 11.1 葡萄糖和 10 HEPES (采用氢氧化钠将 pH 调至 7.35)。细胞内液 (以 mM 为单位): 10 EGTA, 10 HEPES, 10 氯化钾, 10 氯化钠, 110 氟化钾 (采用氢氧化钾将 pH 调至 7.2)。溶液渗透压控制在 280~300 mOsmol/kg 之间。溶液在使用前需要过滤并放在 4℃ 保存。

待测化合物溶液配制: 按照标准操作规程, 待测化合物用 DMSO 溶解并配制成终浓度为 10 mM 的储备液。将储备液以 DMSO 为溶剂以 1:3 比例梯度稀释成其他三个中间浓度溶液, 浓度分别为 (mM): 3.33, 1.11 和 0.37。实验开始前, 用细胞外液将待测化合物梯度中间溶液再次按 1: 1000 的比例稀释成一系列浓度的工作溶液, 30 μM 的工作液使用 10 mM 的储备液以 1:333.33 倍配置成工作液, 其终浓度分别为 (μM): 30, 10, 3.33, 1.11 和 0.37。DMSO 在工作溶液中的含量为 0.1-0.3% (体积比)。5 个不同浓度梯度 30, 10, 3.33, 1.11, 0.37 μM 的工作溶液用于测定化合物对 hERG 通道的潜在抑制作用并用拟合量效曲线和计算 IC₅₀。

实验流程: 将培养皿中载有 HEK293 细胞的小玻片放置于显微操作台的灌流槽中。在 Olympus IX71 或 IX73 倒置显微镜下将合适的细胞调置于视野中央, 使用 $\times 10$ 倍物镜找到玻璃电极的尖端, 并置于视野的中央。然后使用微操纵器下移电极, 同时调整粗焦螺旋, 使电极慢慢接近细胞。当快接近细胞时, 转换为 $\times 40$ 倍物镜进行观察, 通过微操纵器微调档, 使电极逐渐接近细胞的表面。给予负压, 使电极尖与细胞膜之间形成电阻高于 $1\text{G}\Omega$ 的封接。在电压钳模式下对瞬时电容电流 C_{fast} 进行补偿。然后重复给予短促的负压进行破膜, 最终形成全细胞记录模式。在膜电位钳制于 -60 mV 的条件下, 对缓慢电容电流 C_{slow} , 细胞膜电容 (C_m) 和输入膜电阻 (R_a) 分别进行补偿。细胞稳定后, 将钳制电压改为 -90 mV, 采样频率设置为 20 kHz, 过滤频率为 10 kHz。漏电流的检测条件为钳制电压转为 -80 mV, 时程 500 ms。hERG 电流测试方法如下: 施加 4.8 秒去极化命令电压将膜电位从 -80 mV 去极化至 +30 mV, 然后瞬间施加 5.2 秒的复极化电压使膜电位降至 -50 mV 以去除通道失活, 从而得以观察到 hERG 尾电流。尾电流的峰值为 hERG 电流的大小。用于检测待测化合物的 hERG 电流在给药前均被持续记录 120 秒以评估受试细胞产生 hERG 电流的稳定性。只有在评价标准接受范围以内的稳定细胞才能进入后续化合物检测。待测化合物对 hERG 电流抑制作用的测试: 首先将在含 0.1% DMSO 的细胞外液中测定得到的 hERG 电流作为检测基线。在 hERG 电流保持稳定至少 5 分钟后将含有待测化合物的溶液从低浓度到高浓度依次灌注于细胞周围。每次灌流结束后等待约 5 分钟以使化合物充分作用于细胞并同步记录 hERG 电流。待记录电流趋于稳定后记录最后 5 个 hERG 电流值, 并取其平均值作为其最终在特定浓度下的电流值。在测试完化合物后, 加入 450 nM 多菲莱德至同一个细胞上, 将其电流完全抑制, 作为该细胞的阳性对照。同时, 阳性化合物多菲莱德在测试药实验结束前后用同一膜片钳系统进行同步检测, 以确保整个检测系统的可靠性和灵敏性。以上测试步骤将在两个单独测试细胞上重复进行 ($n=2$)。

4. 数据处理方法及结果:

数据质控标准: 初始封接电阻大于 1 GΩ; 串联电阻小于 15MΩ 并且串联电阻电压误差小于 5 mV; 检测电压下的漏电流小于该条件下电流值的 50%; 尾电流大于预脉冲的平台电流大小, 初始尾电流值大于 250 pA; 破膜电阻 Ra 小于 15MΩ; 尾电流每分钟的衰减率低于 2.5%。

数据分析: 只有满足以上标准的数据, 方可按以下步骤进行分析:

注: 数据由 PatchMaster 软件输出。

灌注空白溶剂或化合物梯度溶液后, 稳定得到的 5 个连续电流值, 求取平均值, 分别作为“尾电流大小_{空白}”和“尾电流大小_{化合物}”。

电流抑制百分率通过以下公式进行计算。

尾电流抑制率 = $(1 - \frac{\text{尾电流大小}_{\text{化合物}} - \text{尾电流大小}_{\text{阳性药}}}{\text{尾电流大小}_{\text{空白}} - \text{尾电流大小}_{\text{阳性药}}}) \times 100$

量效曲线通过 Graphpad Prism 8.0 软件进行拟合并计算 IC₅₀ 值。

表 7: 化合物对 hERG 的抑制活性

化合物编号	hERG IC ₅₀ (μM)
Cpd-A	19
Cpd-B	5.5
Cpd-C	1.4
Cpd-1	>30
Cpd-2	>30

以上数据显示, 本发明实施例化合物具有较低的 hERG 抑制引起的潜在心脏毒性风险, 且安全性明显优于参考化合物。

七. 小鼠体内药代动力学研究

1. 实验目的: 测试化合物在 CD-1 小鼠体内的药代动力学。

2. 实验仪器和材料:

动物: CD-1 小鼠 (雄性)

仪器:

仪器名称	厂家	仪器编号
API4000 Qtrap-Shimadzu 20AT	AB Sciex/Shimadzu	TW-017-0002
大型台式冷冻离心机	Eppendorf	TW-007-0017
电子天平	Sartorius	TW-001-0013
移液工作站	Sptlabtech	TW-013-0016
旋涡振荡器	DRAGON LAB	TW-005-0013
高通量组织研磨器	宁波新芝生物科技股份有限公司	TW-011-0002

试剂:

名称	厂家	货号	批号
乙腈	Sigma-Aldrich	34851	F222M7L201
甲醇	Sigma-Aldrich	75851G	WXBD8013V
DMSO	Fisher Scientific	D159-4	186403
甲酸	Sigma-Aldrich	F112034	G2122206
PBS	Shanghai Basal Media	B310KJ	H211017

溶媒：
静脉注射：40%HP-β-CD 水溶液；灌胃：0.2%HPC+0.5%Tween80 水溶液。

3. 实验方法：

6 只雄性小鼠。在给药前一天傍晚进行禁食处理，自由饮水。小鼠实验过程自由饮食饮水，静脉注射或灌胃给药，给药后观察动物状态并记录异常表现。静脉注射后分别于 0.0833、0.25、1、2、4、8 和 24 小时眼眶取血；灌胃后分别于 0.25、0.5、1、2、4、6、8 和 24 小时眼眶取血。取血浆样品 20 μL，加入 250 μL 的乙腈（含有地塞米松作为内标）来沉淀蛋白质，4℃，4000 rpm 离心 20 分钟，取 180 μL 上清液于 96 孔板与 180 μL 含 0.1%甲酸的水溶液混合，再取 10 μL 样品用于 LC-MS/MS 检测。

4. 数据处理方法及结果：

采用内标法建立标准曲线，理论标准曲线浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标（测试化合物峰面积/内标峰面积）。使用线性回归方法（加权因子 1/X²），R²>0.9900。通过标准曲线计算未知样品。通过 WinNonlin 8.2 软件的非房室分析模型计算药动力学的参数，并在报告中呈现，参数包括 Clint，C_{max} 和 AUC 等。

表 8：化合物在 CD-1 小鼠中的药代动力学参数

化合物编号	IV 1 mg/kg		PO 10 mg/kg	
	Clint (mL/min/kg)	AUC _{0-t} (hr*μM)	C _{max} (μM)	AUC _{0-t} (hr*μM)
Cpd-A	18	1.7	2.2	10.4
Cpd-2	15	1.7	5.9	15.7

以上数据显示，本发明实施例化合物在小鼠体内具有较低的清除率和较高的口服暴露量，且优于参考化合物。

八. 大鼠体内药代动力学研究

1. 实验目的：测试化合物在 SD 大鼠体内的药代动力学。

2. 实验仪器和材料：

动物：SD 大鼠（雄性）

仪器：

仪器名称	厂家	仪器编号
API4000 Qtrap-Shimadzu 20AT	AB Sciex/Shimadzu	TW-017-0002

大型台式冷冻离心机	Eppendorf	TW-007-0017
移液工作站	Sptlabtech	TW-013-0016
旋涡振荡器	DRAGON LAB	TW-005-0013
高通量组织研磨器	宁波新芝生物科技股份有限公司	TW-011-0002

试剂:

名称	厂家	货号	批号
乙腈	Sigma-Aldrich	34851	WXBD8733V
甲醇	Sigma-Aldrich	75851G	P2478457
DMSO	Fisher Scientific	D4540	BCCH3267
甲酸	Sigma-Aldrich	F112034	B2320164
PBS	Shanghai Basal Media	B310KJ	K211007

溶媒:

静脉注射: 40%HP-β-CD 水溶液; 灌胃: 0.2%HPC+0.5%Tween80 水溶液。

3. 实验方法:

6 只雄性大鼠。在给药前一天傍晚进行禁食处理, 自由饮水。大鼠实验过程自由饮食饮水, 静脉注射或灌胃给药, 给药后观察动物状态并记录异常表现。静脉注射后分别于 0.0833、0.25、1、2、4、8 和 24 小时颈静脉穿刺采血; 灌胃后分别于 0.25、0.5、1、2、4、6、8 和 24 小时颈静脉穿刺采血。取血浆样品 50 μL, 加入 500 μL 的乙腈 (含有地塞米松作为内标) 来沉淀蛋白质, 4℃, 4000 rpm 离心 20 分钟, 取 300 μL 上清液于 96 孔板与 300 μL 屈臣氏水溶液混合, 再取 5 μL 样品用于 LC-MS/MS 检测。

4. 数据处理方法及结果:

采用内标法建立标准曲线, 理论标准曲线浓度为横坐标, 峰面积比为纵坐标 (测试化合物峰面积/内标峰面积)。使用线性回归方法 (加权因子 1/X²), R²>0.9900。通过标准曲线计算未知样品。通过 WinNonlin 8.2 软件的非房室分析模型计算药动力学的参数, 并在报告中呈现, 参数包括 C_{lint}、C_{max} 和 AUC 等。

表 9: 化合物在 SD 大鼠中的药代动力学参数

化合物编号	IV 1 mg/kg		PO 10 mg/kg	
	C _{lint}	AUC _{0-t}	C _{max}	AUC _{0-t}
	(mL/min/kg)	(hr*μM)	(μM)	(hr*μM)
Cpd-A	7.1	4.2	3.2	35.8
Cpd-2	3.3	8.4	8.9	58.4

以上数据显示, 本发明实施例化合物在大鼠体内具有较低的清除率和较高的口服暴露量, 且明显优于参考化合物。

九. NUGC-3 人源胃癌异种移植瘤小鼠模型的体内药效实验

1. 实验目的：测试化合物在 NUNU 雌小鼠人源胃癌（NUGC-3）皮下异种移植瘤模型中的体内药效学活性。

2. 实验材料：

动物：6-8 周龄雌性 NUNU 小鼠；

试剂：

试剂名称	供应商	货号	批号
青霉素-链霉素双抗	Gibco	15240-062	2441816
Trypsin-EDTA	Gibco	25200-072	2756239
RPMI-1640	Gibco	C22400500BT	6123180
DPBS	Corning	21-031-CVC	21031095
FBS	Dongling	FBSV500	A22JV
Matrigel	Corning	354234	3012001
冰醋酸	Alfa Aesar	36289	U02F788
Tween80	Sigma	P1754	WXBD4333V
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Leyan	1083196	Lg0913304311
Solutol	Sigma	42966	BCCJ5912

Cpd-A 溶媒：0.2% HPC, 0.5% Tween80 in water (w/v/v)；

Cpd-2 溶媒：5% DMSO/10% Solutol HS 15/85% pH 4.65±0.10 acetate buffer。

3.实验方案：

细胞培养：NUGC-3 细胞培养在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中。

造模和分组：收集指数生长期的 NUGC-3 细胞（5×10⁶），以 0.2 mL PBS 和基质胶（1:1）重悬后用于 NUNU 小鼠右侧皮下接种，建立皮下移植瘤模型。细胞接种后每日观察小鼠的健康状态以及肿瘤生长情况。在接种后第 5 天，选取 36 只动物，开始分组，入组动物肿瘤体积约 150.0 mm³。实验分为 6 组，每组 6 只小鼠，并开始给药（见表 10）。

4.实验设计：表 10 是药效实验的分组和给药信息。G1 组小鼠一天一次口服给药溶媒对照（5% DMSO/10% Solutol HS 15/85% pH 4.65±0.10 acetate buffer），共给药 19 天。G2 组小鼠一天一次口服给药 Cpd-A，剂量为 50 mg/kg，共给药 19 天。G3 组小鼠一天一次口服给药 Cpd-A，剂量为 100 mg/kg，共给药 19 天。G4 组小鼠一天一次口服给药 Cpd-2，剂量为 25 mg/kg，共给药 19 天。G5 组小鼠一天一次口服给药 Cpd-2，剂量为 50 mg/kg，共给药 19 天。G6 组小鼠一天一次口服给药 Cpd-2，剂量为 100 mg/kg，共给药 19 天。

表 10. NUGC-3 异种移植瘤小鼠模型的体内药效实验设计

组别	N	化合物	剂量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药途径	给药频次 (post grouping)
G1	6	Vehicle	--	10	PO	QD*19 Days

G2	6	Cpd-A	50	10	PO	QD*19 Days
G3	6	Cpd-A	100	10	PO	QD*19 Days
G4	6	Cpd-2	25	10	PO	QD*19 Days
G5	6	Cpd-2	50	10	PO	QD*19 Days
G6	6	Cpd-2	100	10	PO	QD*19 Days

5.实验观察和结果判断:

实验观察：每天监测动物的健康状况及死亡情况，例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响如行为活动，摄食摄水量，体重变化，外观体征或其它不正常情况。基于各组动物数量记录组内动物死亡数和副作用。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积 (mm³)=0.5×(肿瘤长径 × 肿瘤短径²)。在研究过程中，整个给药过程以及肿瘤和体重测量均在超净工作台中进行。

数据处理：肿瘤体积抑制率 TGI(%)：TGI%=(1-ΔT/ΔC)×100%；其中，ΔC 为对照组肿瘤体积 C_i-C₀，C₀ 为分组时对照组的平均肿瘤体积，C_i 为治疗后对照组的平均肿瘤体积；ΔT 为治疗组肿瘤体积 T_i-T₀，T₀ 为分组时治疗组的平均肿瘤体积，T_i 为治疗后治疗组的平均肿瘤体积。

统计分析：肿瘤体积及动物体重结果以 Mean (平均值)±SEM (平均标准误差) 表示。不同组间的肿瘤体积进行统计比较分析。所有统计分析在 GraphPad Prism 8.0.中完成，用 one-way ANOVA 方法比较各组间肿瘤体积或者瘤重有无显著性差异，其中 $p \geq 0.05$ 为无显著性差异， $p < 0.05$ 为具有显著性差异， $p < 0.001$ 为具有极显著性差异。

6.实验结果:

小鼠 NUGC-3 人源胃癌异种移植瘤模型药效学评价实验中对对照组和各实验组的肿瘤生长曲线如图 1 所示，该模型中小鼠相对体重变化情况如图 2 所示。实验终点时各组动物的平均肿瘤体积、肿瘤体积抑制率 TGI (%) 和比较结果见表 11。

分组后第 19 天，G1 (Vehicle) 组平均肿瘤体积为 1482.2 mm³，G2 (Cpd-A, 50 mg/kg, QD)、G3 (Cpd-A, 100 mg/kg, QD)、G4 (Cpd-2, 25 mg/kg, QD)、G5 (Cpd-2, 50 mg/kg, QD) 和 G6 (Cpd-2, 100 mg/kg, QD) 组平均肿瘤体积分别为 1208.1 mm³，399.1 mm³，615.1 mm³，202.2 mm³ 和 102.5 mm³，相应的肿瘤体积抑制率 TGI 分别为：20.6%、81.3%、65.1%、96.1%和 103.6%。统计学分析显示 G3、G4、G5 和 G6 均显著小于 Vehicle 组的平均肿瘤体积 (p 值均<0.05)；其中 G5 和 G6 组相比 Vehicle 组平均肿瘤体积差异极显著 (p 值均<0.001)。以上结果表明，化合物 Cpd-A 在 100 mg/kg 高剂量下在小鼠体内表现出良好的抑制 NUGC-3 移植瘤增殖的活性，Cpd-2 在各测试剂量下在小鼠体内均表现良好的抑制 NUGC-3 移植瘤增殖的活性，并且具有剂量相关性。同时，Cpd-2 在更低的给药剂量下（如 50 mg/kg, QD），其肿瘤抑制活性（TGI=96.1%）优于二倍化合物 Cpd-A 剂量（100 mg/kg, QD）下的肿瘤抑制活性（TGI=81.3%），显示出 Cpd-2 具有比 Cpd-A 更优的抗肿瘤活性。

表 11. NUGC-3 异种移植瘤小鼠模型的体内药效实验结果

组别	肿瘤体积 (mm ³)	TGI (%) ^a	p value ^b
----	-------------------------	----------------------	------------------------

	(at 19 days)	(at 19 days)	
G1: Vehicle	1,482.2 ± 333.8	--	--
G2: Cpd-A, 50 mg/kg	1,208.1 ± 320.9	20.6	0.8127
G3: Cpd-A, 100 mg/kg	399.1 ± 106.3	81.3	0.0037
G4: Cpd-2, 25 mg/kg	615.1 ± 157.6	65.1	0.0243
G5: Cpd-2, 50 mg/kg	202.2 ± 57.9	96.1	0.0006
G6: Cpd-2, 100 mg/kg	102.5 ± 42.1	103.6	0.0003

备注：

- a. $TGI\ (\%) = [1 - (T_{19} - T_0) / (V_{19} - V_0)] \times 100$
- b. 各给药组平均肿瘤体积和 G1 组 Vehicle 平均肿瘤体积比较分析的 *p* 值
- 十. NUGC-3 人源胃癌异种移植瘤大鼠模型的体内药效实验

1. 实验目的：测试化合物在 B-Rag2/IL2rg KO SD 雌大鼠人源胃癌（NUGC-3）皮下异种移植瘤模型中的体内药效学活性。

2. 实验材料：

动物：7-9 周龄雌性 B-Rag2/IL2rg KO SD 大鼠；

试剂：

试剂名称	供应商	货号	批号
磷酸盐缓冲液(PBS)	BasalMedia	B310KJ	L211110
RPMI-1640培养基	BasalMedia	L210KJ	D211212
胰酶	BasalMedia	S310KJ	B121201
Fetal Bovine Serum	ExcellBio	FSP500	012C-0530A
青霉素-链霉素 双抗溶液 100X	BasalMedia	S110JV	H121101
基质胶	CORNING	354234	3012001
Solutol HS15	美仑生物	MB1809	A0413D
醋酸	Taicang Hushi	NA	20180322
醋酸钠	Sigma-Aldrich	S2889	WXBD3974v
超纯水	广州屈臣氏	NA	NA
DMSO	Sigma-Aldrich	V900090	WXBF1310V

溶媒：5% DMSO/10% Solutol HS 15/85% pH 4.65±0.10 acetate buffer；

3.实验方案：

细胞培养：NUGC-3 细胞培养在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中。

造模和分组：收集指数生长期的 NUGC-3 细胞 (1×10^7)，以 0.2 mL PBS 和基质胶 (1:1) 重悬后用于 B-Rag2/IL2rg KO SD 大鼠右侧皮下接种，建立皮下移植瘤模型。细胞接种后每日观察大鼠的健康状态以及肿瘤生长情况。在接种后第 10 天，选取 24 只动物，开始分组，入组动物肿瘤体积约 199.0

mm³。实验分为 4 组，每组 6 只大鼠，并开始给药 (见表 12)。

4.实验设计：表 12 是药效实验的分组和给药信息。G1 组大鼠一天一次口服给药溶媒对照 (5% DMSO/10% Solutol HS 15/85% pH 4.65±0.10 acetate buffer)，共给药 28 天。G2 组大鼠一天一次口服给药 Cpd-2，剂量为 6.25 mg/kg，共给药 28 天。G3 组大鼠一天一次口服给药 Cpd-2，剂量为 12.5 mg/kg，共给药 28 天。G4 组大鼠一天一次口服给药 Cpd-2，剂量为 25 mg/kg，共给药 28 天。

表 12. NUGC-3 异种移植瘤大鼠模型的体内药效实验设计

组别	N	化合物	给药剂量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药途径	给药频次
G1	6	Vehicle	--	10	PO	QD × 28 days
G2	6	Cpd-2	6.25	10	PO	QD × 28 days
G3	6	Cpd-2	12.5	10	PO	QD × 28 days
G4	6	Cpd-2	25	10	PO	QD × 28 days

5.实验观察和结果判断：

实验观察：每天监测动物的健康状况及死亡情况，例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响如行为活动，摄食摄水量，体重变化，外观体征或其它不正常情况。基于各组动物数量记录组内动物死亡数和副作用。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积 (mm³)=0.5 × (肿瘤长径 × 肿瘤短径²)。在研究过程中，整个给药过程以及肿瘤和体重测量均在超净工作台中进行。

数据处理：肿瘤体积抑制率 TGI_{Tv}(%)：TGI_{Tv}% = (1-ΔT/ΔC) × 100%；其中，ΔC 为对照组肿瘤体积 C_t-C₀，C₀ 为分组时对照组的平均肿瘤体积，C_t 为治疗后对照组的平均肿瘤体积；ΔT 为治疗组肿瘤体积 T_t-T₀，T₀ 为分组时治疗组的平均肿瘤体积，T_t 为治疗后治疗组的平均肿瘤体积。

统计分析：肿瘤体积及动物体重结果以 Mean (平均值)±SEM (平均标准误差) 表示。不同组间的肿瘤体积进行统计比较分析。所有统计分析在 <https://d2k.bio/Efficacy/Invivo> 中完成，用 wilcox.test nominal 方法比较各组间肿瘤体积或者瘤重有无显著性差异，其中 $p \geq 0.05$ 为无显著性差异， $p < 0.05$ 为具有显著性差异， $p < 0.01$ 为具有极显著性差异。

6.实验结果：

大鼠 NUGC-3 人源胃癌异种移植瘤模型药效学评价实验中对照组和各实验组的肿瘤生长曲线如图 3 所示，该模型中大鼠相对体重变化情况如图 4 所示。实验终点时各组动物的平均肿瘤体积、肿瘤体积抑制率 TGI (%)和比较结果见表 13。

分组后第 28 天，G1 (Vehicle) 组平均肿瘤体积为 2946.2 mm³，G2 (Cpd-2, 6.25 mg/kg, QD)、G3 (Cpd-2, 12.5 mg/kg, QD) 和 G4 (Cpd-2, 25 mg/kg, QD) 组平均肿瘤体积分别为 395.0 mm³、119.2 mm³ 和 70.1 mm³，相应的肿瘤体积抑制率 TGI 分别为 92.9%、102.9%和 104.7%。统计学分析显示 G2, G3 和 G4 组相比 Vehicle 组平均肿瘤体积差异极显著 (p 值均<0.01)。以上结果表明，Cpd-2 在各测试剂量下在大鼠体内均表现出良好的抑制 NUGC-3 移植瘤增殖的活性，并且具有剂量相关性。

表 13. NUGC-3 异种移植瘤大鼠模型的体内药效实验结果

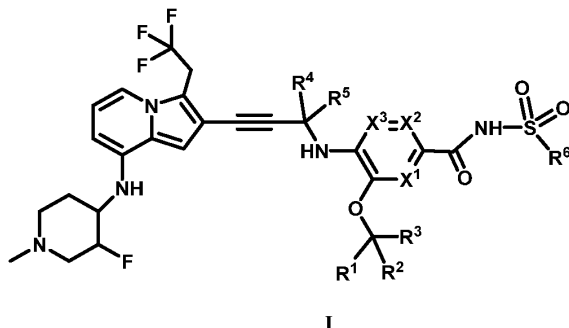
组别	肿瘤体积 (mm ³) (Mean ±SEM) (at 28 days)	TGI _{TV} (%) (at 28 days)	<i>p</i> value ^a
G1: Vehicle, QD×28days, p.o.	2946.2 ± 167.4	/	/
G2: Cpd-2, 6.25 mg/kg, QD×28days, p.o.	395.0 ± 63.1	92.9	0.0022
G3: Cpd-2, 12.5 mg/kg, QD×28days, p.o.	119.2 ± 10.2	102.9	0.0022
G4: Cpd-2, 25 mg/kg, QD×28days, p.o.	70.1 ± 14.9	104.7	0.0022

备注：

各给药组平均肿瘤体积和 G1 组 Vehicle 平均肿瘤体积比较分析的 *p* 值。

权利要求

1. 一种如式 **I** 所示的含氮化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药；



其中，

X^1 、 X^2 和 X^3 各自独立地选自 CH 和 N；

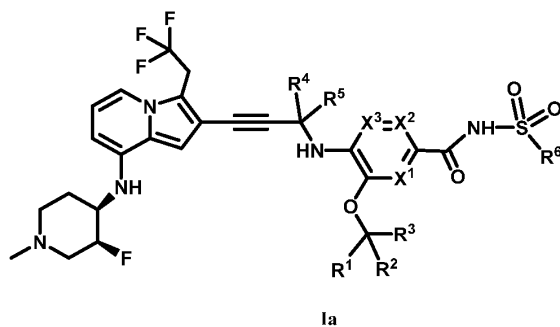
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 各自独立地选自氢和氘；

R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$ ；

n 为 0、1、2 或 3；

R^7 选自 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基和 C3-C6 环烷基。

2. 如权利要求 1 所述的如式 **I** 所示的化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药，其特征在于：如式 **I** 所示的含氮化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药为如式 **Ia** 所示的含氮化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药；



其中，

X^1 、 X^2 和 X^3 各自独立地选自 CH 或 N；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 各自独立地选自氢或氘；

R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$ ；

n 为 0、1、2 或 3；

R^7 选自 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基或 C3-C6 环烷基。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药，其特征在于：

X^1 为 N； X^2 为 CH 或 N； X^3 为 CH；

或者， X^1 为 N； X^2 和 X^3 为 CH。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的如式 I 所示的化合物、所示的化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药，其特征在于：

R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$ ；

n 为 0 或 1；

R^7 选自 C1-C3 烷基、氘代 C1-C3 烷基、卤代 C1-C3 烷基或 C3-C6 环烷基。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的如式 I 所示的化合物、所示的化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药，其特征在于：

R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$ ；

n 为 0 或 1；

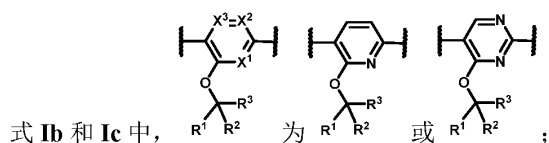
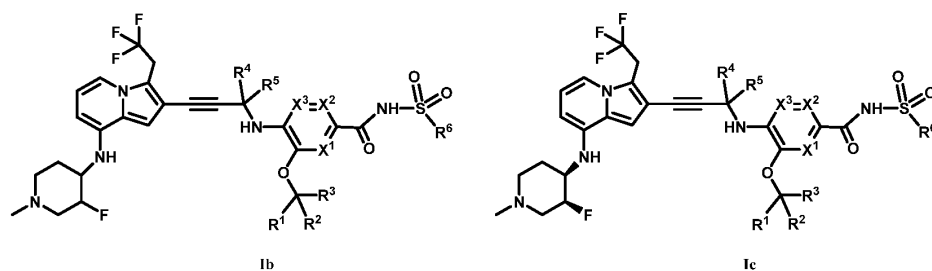
R^7 选自 $-CH_3$ 、 $-CD_3$ 、 $-CF_3$ 或环丙基。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的一种如式(I)所示的化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药，其特征在于：

R^1 、 R^2 和 R^3 为氘， R^4 和 R^5 为氢；

或者， R^1 、 R^2 和 R^3 为氢， R^4 和 R^5 为氘。

7. 如权利要求 1 所述的如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药，其特征在于：通式 I 为通式 Ib 或 Ic；



R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 各自独立地选自氢或氘；

R^6 为 $-(CH_2)_nR^7$ ；

n 为 0 或 1；

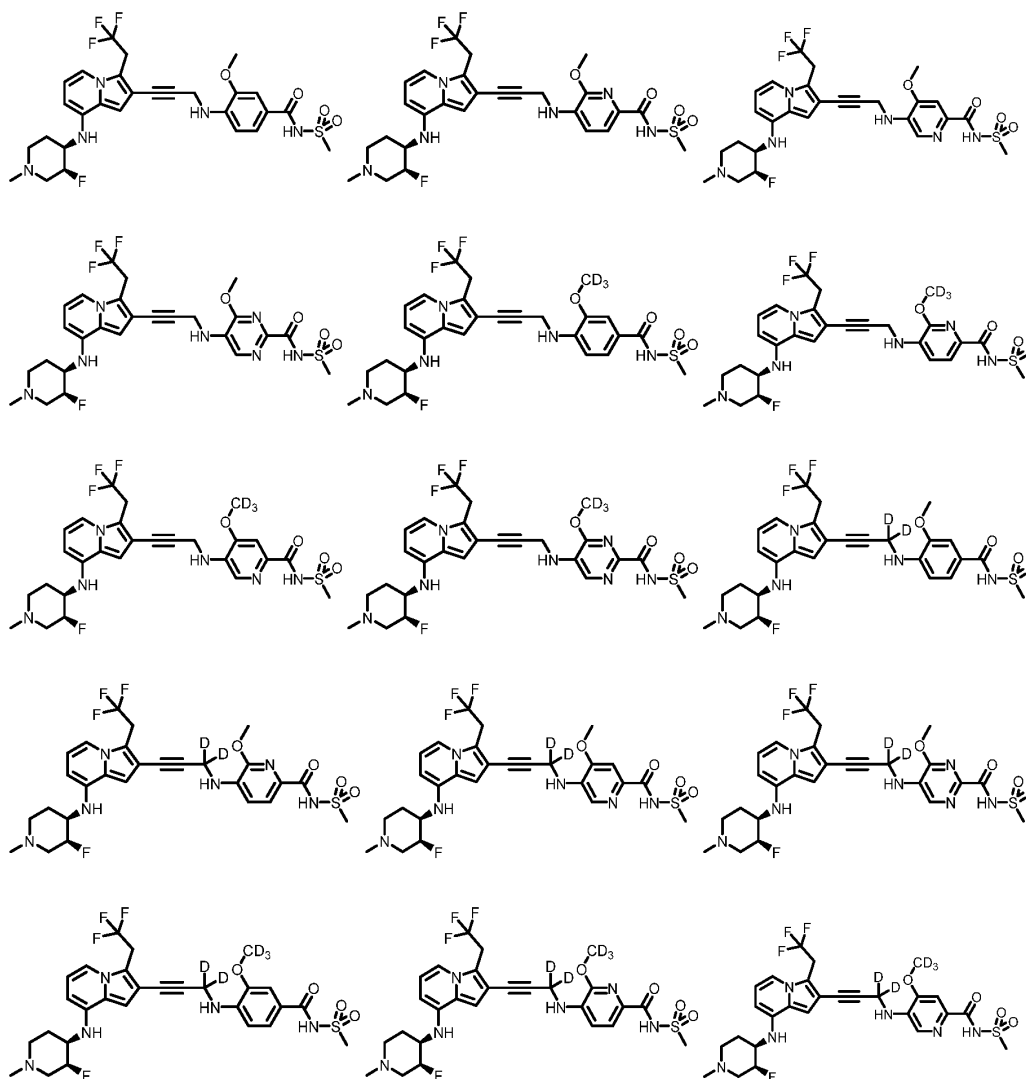
R⁷选自 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基和 C3-C6 环烷基；

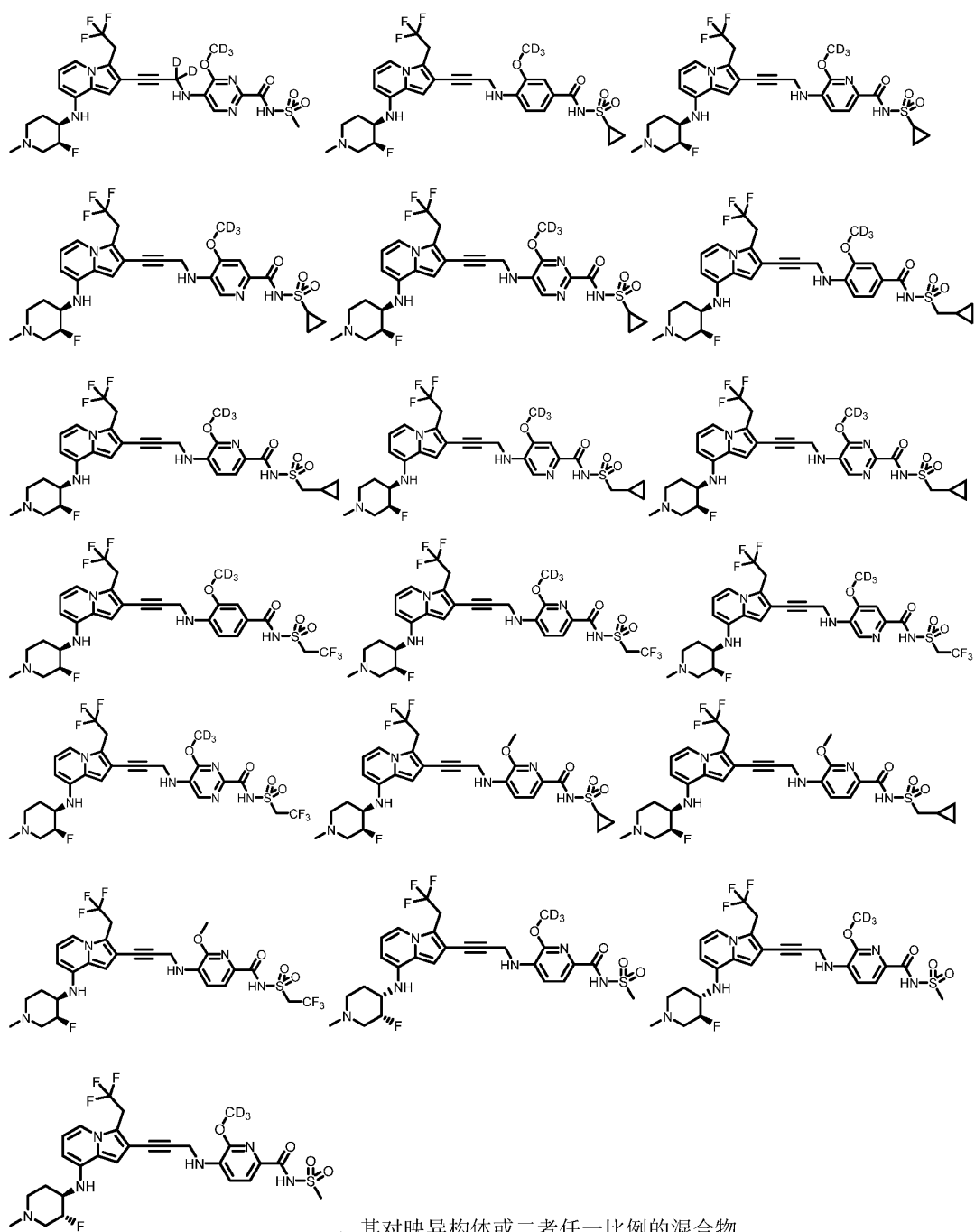
较佳地，式 **Ib** 和 **Ic** 中， 选自 -OCH₃ 和 -OCD₃；

R⁴ 和 R⁵ 选自氢；

R⁶ 为 -(CH₂)_nR⁷；n 为 0 或 1；R⁷ 选自 -CH₃、-CD₃、-CF₃ 或环丙基。

8. 如权利要求 1 所述的一种如式(I)所示的化合物、其同位素标记物、其溶剂化物、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的盐的溶剂化物或其前药，其特征在于，式(I)化合物选自如下化合物：





，其对映异构体或二者任一比例的混合物。

9. 一种药物组合物, 其包括如权利要求 1-8 中任一项所述的如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐以及药用辅料。

10. 一种如权利要求 1-8 中任一项所述的如式 1 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐、或权利要求 9 所述的药物组合物在制备 p53 突变体口袋结合剂或治疗和/或预防与 p53 突变体相关的疾病的药物中的应用。

11. 如权利要求 10 所述的应用, 其特征在于, 其满足以下条件中的一个或多个:

(1) 所述的 p53 突变体在氨基酸 220 处具有突变, 例如为 p53 Y220C;

(2) 所述的口袋结合剂增加 p53 突变体与 DNA 结合的能力;

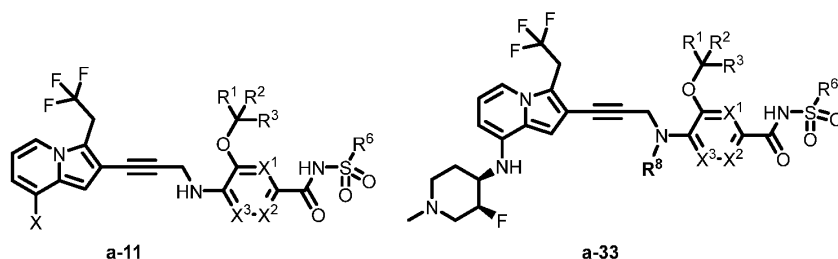
和 (3) 所述的与 p53 突变体相关的疾病为癌症, 例如乳腺癌、胃癌、肺癌或卵巢癌。

12. 一种如权利要求 1-8 中任一项所述的如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐、或权利要求 8 所述的药物组合物在制备治疗和/或预防癌症的药物中的应用。

13. 如权利要求 12 所述的应用, 所述的癌症为乳腺癌、胃癌、肺癌或卵巢癌。

14. 一种治疗和/或预防癌症的治疗方法, 其特征在于, 其向患者施用治疗有效量的如权利要求 1-8 中任一项所述的如式 I 所示的化合物、其同位素标记物、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐。

15. 一种式 a-11 或 a-32 所示的化合物;



其中, X 为卤素; R⁸ 为氨基保护剂;

X¹、X² 和 X³、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的定义均如权利要求 1-8 中任一项所述;

所述的式 a-11 或 a-32 所示的化合物优选为如下任一化合物;

