

作为 Syk 和 VEGFR2 双靶点抑制剂的 1H-吡唑衍生物及应用

本发明主张如下优先权：

PCT/CN2020/076414，2020 年 02 月 24 日。

技术领域

本发明涉及脾酪氨酸激酶(Syk) 和血管内皮生长因子 2(VEGFR2)双靶点抑制剂，具体涉及式(I)所示化合物或其药学上可接受的盐，及其在制备脾酪氨酸激酶(Syk) 和血管内皮生长因子 2(VEGFR2)双抑制剂相关药物中的应用。

背景技术

蛋白激酶(最大家族的人类激酶)包括超过 500 种蛋白。脾酪氨酸激酶(Syk)为 Syk 家族酪氨酸激酶的一员，且为早期 B-细胞发育以及成熟 B-细胞活化、信号转导和存活的调节子。

Syk 为非受体酪氨酸激酶，其在多种细胞类型中的免疫受体-介导的和整联蛋白-介导的信号转导中起着重要作用，包括 B 细胞、巨噬细胞、单核细胞、肥大细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、T 细胞、自然杀伤细胞(natural killer cells)、血小板和破骨细胞。本申请中描述的免疫受体包括典型的免疫受体和免疫受体样分子。典型的免疫受体包括 B-细胞和 T-细胞抗原受体以及多种免疫球蛋白受体(Fc 受体)。免疫受体样分子为结构上与免疫受体相关的或参与类似信号转导路径，且其主要涉及非适应性免疫(non-adaptive immune)功能(包括嗜中性粒细胞活化、自然杀伤细胞识别和破骨细胞活性)。整联蛋白是细胞表面受体，其在白细胞粘连和先天和后天免疫性二者的活化中起着关键作用。

配体结合导致免疫受体和整联蛋白二者的活化，其导致 Src 家族激酶被活化，和受体-相关的跨膜适配体的细胞质表面中的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAMs)的磷酸化。Syk 结合至该适配体的磷酸化的 ITAM 基序，导致 Syk 的活化以及随后的磷酸化和下游信号转导路径的活化。

Syk 对于通过 B-细胞受体(BCR)信号转导的 B-细胞活化是关键的。Syk 一旦结合至磷酸化的 BCR，其被活化，因此在 BCR 活化后引起早期信号转导事件。通过 BCR 的 B-细胞信号转导可以导致大范围的生物输出，其又依赖于 B-细胞的发育阶段。BCR 信号的强度和持续时间必须被精确调节。异常的 BCR-介导的信号转导可以造成 B-细胞活化失调和/或致病性自体抗体的形成，从而导致多种自身免疫性疾病和/或炎性疾病。缺乏 Syk 的小鼠表现出 B-细胞成熟受损、免疫球蛋白产生降低、危害 T-细胞-非依赖性免疫响应，和对于 BCR 刺激的持续的钙信号的显著减弱。

大量的证据支持了 B-细胞和人免疫体系在自身免疫性疾病和/或炎症性疾病的发病机制中的作用。开发用于减少 B-细胞的基于蛋白的治疗(如 Rituxan)代表了一种治疗多种自身免疫性疾病和炎症性疾病的方法。已知自体抗体和它们得到的免疫复合物在自身免疫性疾病和/或炎症性疾病中起到致病作用。对于这些抗体的致病响应依赖于通过 Fc 受体的信号转导，其反过来又依赖于 Syk。由于 Syk 在 B-细胞

活化中的作用以及 FcR 依赖性信号转导, Syk 的抑制剂可以用作 B-细胞介导的致病性活性(包括自体抗体产生)的抑制剂。因此, 细胞中 Syk 酶的活性的抑制被提出可以通过其对自体抗体产生上的作用而治疗自身免疫性疾病。

Syk 也在 FCεRI 介导的肥大细胞脱粒和嗜嗜红细胞活化中起着重要作用。因此, Syk 涉及于变态反应性疾病(包括哮喘)。Syk 结合至 FCεRI 的磷酸化的 γ 链(通过其 SH2 域), 且其对于下游信号转导非常关键。Syk 缺乏的肥大细胞表明缺乏脱粒、花生四烯酸和细胞因子分泌。这也还表明了于肥大细胞中抑制 Syk 活性的药理试剂。在哮喘的动物模型中, 使用 Syk 反义寡核苷酸的治疗抑制抗原-诱导的嗜酸粒细胞和嗜中性粒细胞的浸润。Syk 缺乏的嗜酸粒细胞也显示出响应 FCεRI 刺激的活化受损。因此, Syk 的小分子抑制剂会用于治疗过敏诱导的炎症性疾病(包括哮喘)。

Syk 还表达于肥大细胞和单核细胞, 已经显示出对于这些细胞的功能是重要的。例如, 小鼠中 Syk 缺乏与 IgE-介导的肥大细胞活性受损(其为 TNF- α 和其他炎性细胞因子释放的显著减少)相关。Syk 激酶抑制剂也已经显示出在细胞测试中抑制肥大细胞脱粒。

VEGFR2, 也称为 KDR 或 Flk-1, 被确定为 VEGF 和 VEGFC 的受体, 是内皮细胞祖细胞的早期标记物, 其表达仅限于体内内皮细胞。VEGFR2 被证明是血管生成和病理状况(例如癌症和糖尿病性视网膜病)发展的主要信号转导者。已有研究表明表明, 抗 VEGF 可以对促炎因子的表达和激活产生抑制作用, 从而减轻眼表炎症。VEGFR2 通过其强大的酪氨酸激酶活性转导血管生成的主要信号。但是, 与其他代表性的酪氨酸激酶受体不同, VEGFR2 并不使用 Ras 途径作为主要的下游信号传导, 而是使用磷脂酶 C 蛋白激酶 C 途径来表达有丝分裂原激活蛋白(MAP)激酶激活和 DNA 合成。因此, 抑制 VEGFR2 活性及其下游信号传导是治疗涉及血管生成及炎症等疾病的重要靶标。

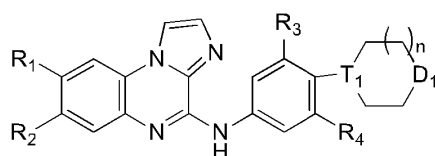
在肿瘤等疾病中, 血管新生是疾病发展过程中的重要步骤。如果能抑制血管新生, (Folkman, 2002, 血管生成在肿瘤生长和转移中的作用, *Semin Oncol.* 29 (6 Suppl 16): 15-8; Witmer et al., 2003), 眼病中的血管内皮生长因子和血管生成, *Prog Retin Eye Res.* 22: 1-29。血管内皮生长因子是一种分泌性血管生成的促有丝分裂原, *Science*, 246: 1306-1309; 血管内皮生长因子是诱导血管新生的关键因子。Ferrara 等, 2003, VEGF 及其受体的生物学, *自然医学* 9: 9-22)。VEGFR2 蛋白分子由细胞外区, 跨膜区和胞质区三部分组成。VEGF 能与 VEGFR2 的细胞外区相结合, 这一结合可诱导 VEGFR2 胞质区酪氨酸激酶基团的磷酸化, 从而启动细胞内的信号传递, 引起血管内皮细胞的增生, 迁移和血管形成, 并阻止血管内皮细胞的纠正。针对 VEGFR2 在促进血管新生信号传递过程中的关键性作用, 抑制 VEGF 与 VEGFR2 的结合达到阻止血管新生, 抑制炎症的作用。血管生成异常与许多疾病的病理学有关, 包括癌症、年龄相关性黄斑变性(AMD)、增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)和眼表炎症(DED)等疾病。血小板反应蛋白-1(TSP-1) 在微血管内皮细胞中通过 CD36 调节 VEGFR-2 信号传导, VEGF-A 通过与 VEGFR-2 结合并诱导其自身磷酸化来启动血管生成, 并促进 Syk 磷酸化。Syk 的激活又会进一步使 VEGFR-2 的 y1175 残基磷酸化并介导内皮细胞迁移, 在 VEGF-A 缺失的情况下, TSP-1-CD36 复合物促进 Fyn 活化, 使血管生成开关返回“关闭”位置。

因此, Syk 和 VEGFR-2 活性的抑制可用于治疗变态反应性疾病、自身免疫性疾病和炎症疾病,

包括但不限于干眼症及过敏性结膜炎、视网膜炎性疾病，年龄相关性黄斑变性（AMD）、增殖性糖尿病视网膜病变（PDR）和早产儿视网膜病变（ROP），癌症、类风湿性关节炎、肾小球肾炎，多发性血管炎（multiple vasculitides）、特发性血小板减少性紫癜（ITP）、重症肌无力、变应性鼻炎、慢性阻塞性肺病（COPD）、成人呼吸窘迫综合征（ARDS）和哮喘等。

发明内容

本发明提供了式（I）所示化合物或其药学上可接受的盐，



(I)

其中，

R_1 和 R_2 各自独立地选自 H 和吡唑基，且 R_1 和 R_2 不同时为吡唑基或 H；

R_3 和 R_4 各自独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、C₁₋₃ 烷基和 C₁₋₃ 烷氧基，所述 C₁₋₃ 烷基和 C₁₋₃ 烷氧基任选被 1、2 或 3 个卤素取代；

T_1 选自 CH 和 N；



D_1 选自 -O-、-C(R₅)(R₆)-、-N(R₇)- 和

R_5 和 R_6 各自独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH 和 C₁₋₃ 烷基，所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个卤素取代；

或者， R_5 和 R_6 与它们共同连接的碳原子一起形成氧杂环丁烷基；

R_7 选自 H、 和 C₁₋₃ 烷基，所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个卤素取代；

R_8 选自 H 和 -C(=O)-C₁₋₃ 烷基；

n 选自 1 和 2。

本发明的一些方案中，上述 R_1 选自 H、 和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_2 选自 H、 和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_3 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、CH₃ 和 CH₃O，其他变量

如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₄ 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、CH₃ 和 CH₃O，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₅ 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂ 和 CH₃，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₅ 选自 H、F、Cl、Br、I、OH 和 CH₃，其他变量如本发明所定义。

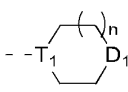
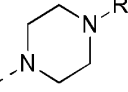
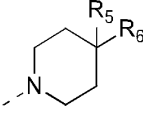
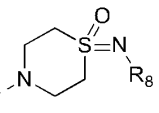
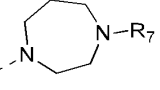
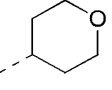
本发明的一些方案中，上述 R₆ 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂ 和 CH₃，其他变量如本发明所定义。

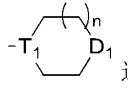
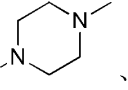
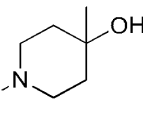
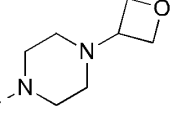
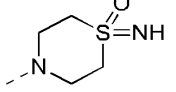
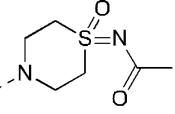
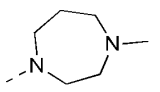
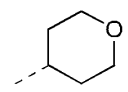
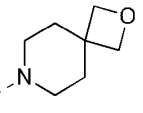
本发明的一些方案中，上述 R₆ 选自 H、F、Cl、Br、I、OH 和 CH₃，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₅ 和 R₆ 与它们共同连接的碳原子一起形成 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₇ 选自 H、CH₃ 和 ，其他变量如本发明所定义。

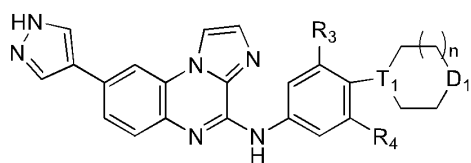
本发明的一些方案中，上述 R₈ 选自 H 和 -C(=O)-CH₃，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述  选自 、、、、 和 ，其中，R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 如本发明所定义，其他变量如本发明所定义。

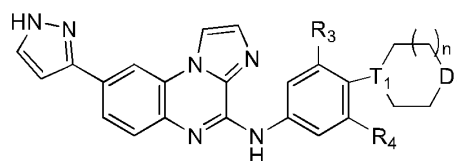
本发明的一些方案中，上述  选自 、、、、、、、 和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明还有一些方案由上述变量任意组合而来。

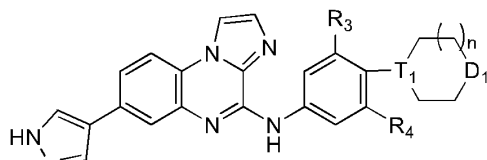
本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自，



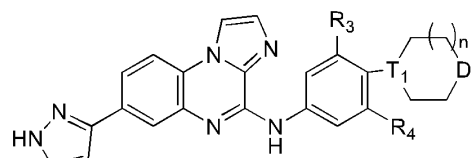
(I-1)



(I-2)



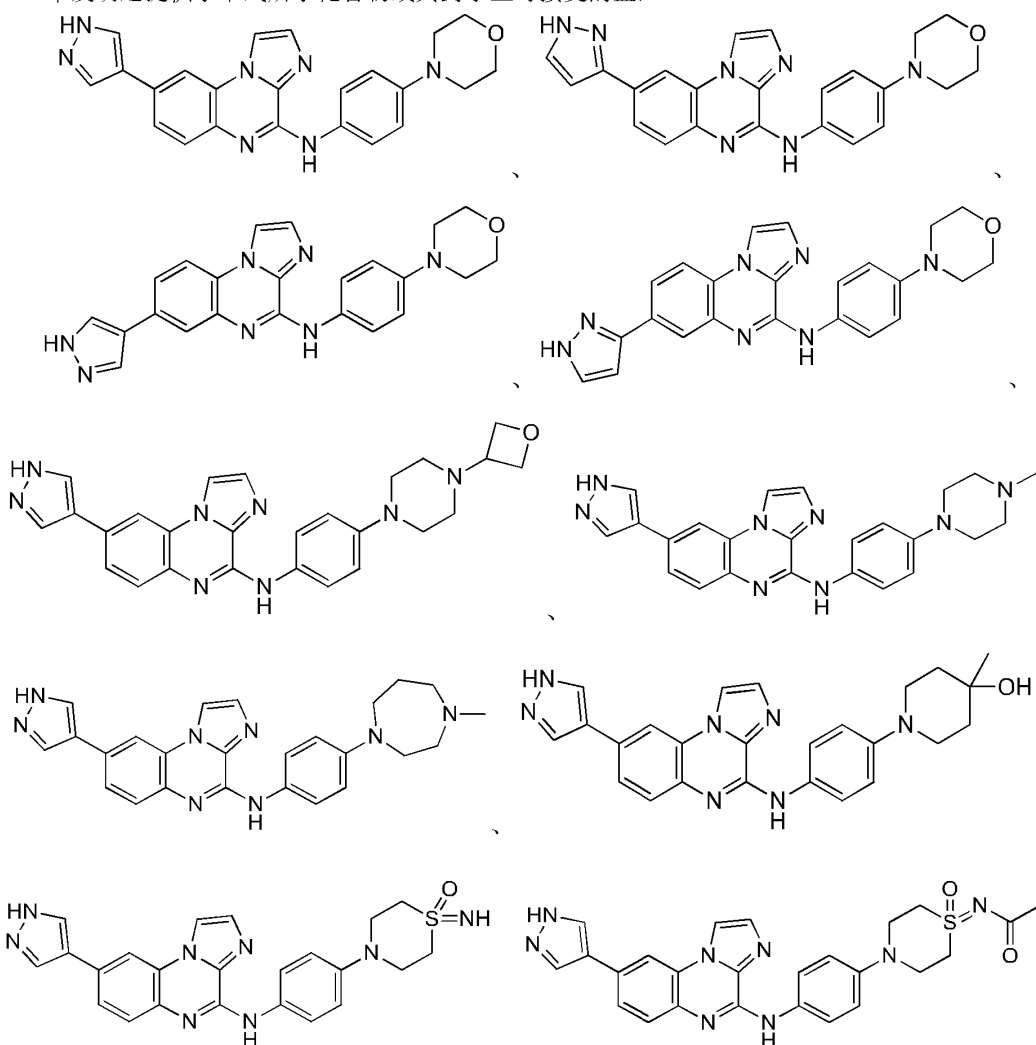
(I-3)

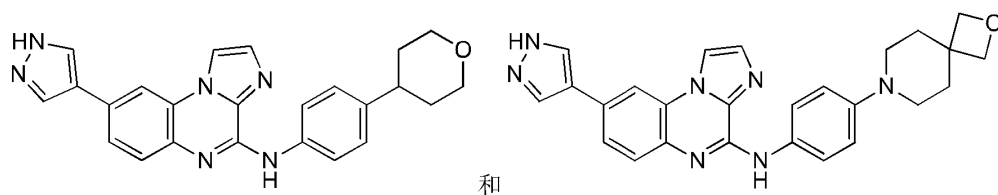


(I-4)

其中, R_3 、 R_4 、 T_1 、 D_1 和 n 如本发明所定义。

本发明还提供了下式所示化合物或其药学上可接受的盐,





本发明还提供了上述化合物或其药学上可接受的盐在制备脾酪氨酸激酶（Syk）和血管内皮生长因子 2（VEGFR2）双抑制剂相关药物上的应用。

本发明的一些方案中，上述的应用，其特征在于，所述脾酪氨酸激酶（Syk）和血管内皮生长因子 2（VEGFR2）双靶点抑制剂相关药物是用于治疗治疗变态反应性疾病、自身免疫性疾病和炎性疾病，如干眼症及过敏性结膜炎、视网膜炎性疾病，年龄相关性黄斑变性（AMD）、增殖性糖尿病视网膜病变（PDR）和早产儿视网膜病变（ROP），癌症、类风湿性关节炎、肾小球肾炎，多发性血管炎（multiple vasculitides）、特发性血小板减少性紫癜（ITP）、重症肌无力、变应性鼻炎、慢性阻塞性肺病（COPD）、成人呼吸窘迫综合征（ARDS）和哮喘。

技术效果

本发明化合物作为一类脾酪氨酸激酶（Syk）和血管内皮生长因子 2（VEGFR2）双抑制剂，展示了良好的 Syk 和 VEGFR2 双抑制活性，展现出了非常好的靶向特异性，无其他偏离靶标选择性问题，对 CYP450 酶 5 种主要亚型（CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4）均无明显抑制作用，在东莨菪碱诱导的小鼠干眼症模型中展现出了具有统计学意义的显著性药效，而且本发明化合物眼血比高，适合眼部给药，开发前景很大。

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照普通的含义去理解。当本文中出现商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

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

术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的盐，由本发明发现的具有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、有机胺或镁盐或类似的盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物接触的方式获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括无机酸盐，所述无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸，碳酸氢根，磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸等；以及有机酸盐，所述有机酸包括如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸和甲磺酸等类似的酸；还包括氨基酸（如精氨酸等）

的盐，以及如葡萄糖醛酸等有机酸的盐。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团，从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下，这样的盐的制备方法是：在水或有机溶剂或两者的混合物中，经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。

本发明的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本发明设想所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、(-)- 和 (+)-对映体、(R)- 和 (S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本发明的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本发明的范围之内。

除非另有说明，术语“对映异构体”或者“旋光异构体”是指互为镜像关系的立体异构体。

除非另有说明，术语“顺反异构体”或者“几何异构体”系由因双键或者成环碳原子单键不能自由旋转而引起。

除非另有说明，术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心，并且分子间为非镜像的关系的立体异构体。

除非另有说明，“(+)”表示右旋，“(-)”表示左旋，“(±)”表示外消旋。

除非另有说明，用楔形实线键 () 和楔形虚线键 () 表示一个立体中心的绝对构型，用直形实线键 () 和直形虚线键 () 表示立体中心的相对构型，用波浪线 () 表示楔形实线键 () 或楔形虚线键 ()，或用波浪线 () 表示直形实线键 () 或直形虚线键 ()。

除非另有说明，术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于 100%，并且，该异构体或对映体的含量大于等于 60%，或者大于等于 70%，或者大于等于 80%，或者大于等于 90%，或者大于等于 95%，或者大于等于 96%，或者大于等于 97%，或者大于等于 98%，或者大于等于 99%，或者大于等于 99.5%，或者大于等于 99.6%，或者大于等于 99.7%，或者大于等于 99.8%，或者大于等于 99.9%。

除非另有说明，术语“异构体过量”或“对映体过量”指两种异构体或两种对映体相对百分数之间的差值。例如，其中一种异构体或对映体的含量为 90%，另一种异构体或对映体的含量为 10%，则异构体或对映体过量 (ee 值) 为 80%。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的(R)-和(S)-异构体以及 D 和 L 异构体。如果想得到本发明某化合物的一种对映体，可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备，其中将所得非对映体混合物分离，并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者，当分子中含有碱性官能团（如氨基）或酸性官能团（如羧基）时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分，然后回收得到纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合（例如由胺生成氨基甲酸盐）。本发明的化合物可以在一个或多个

个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如，可用放射性同位素标记化合物，比如氚 (^3H)，碘-125 (^{125}I) 或 C-14 (^{14}C)。又例如，可用重氢取代氢形成氘代药物，氘与碳构成的键比普通氢与碳构成的键更坚固，相比于未氘代药物，氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本发明的化合物的所有同位素组成的变换，无论放射性与否，都包括在本发明的范围之内。

术语“被取代的”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，取代基可以包括重氢和氢的变体，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧（即=O）时，意味着两个氢原子被取代。氧取代不会发生在芳香基上。术语“任选被取代的”是指可以被取代，也可以不被取代，除非另有规定，取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

当任何变量（例如 R）在化合物的组成或结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。因此，例如，如果一个基团被 0-2 个 R 所取代，则所述基团可以任选地至多被两个 R 所取代，并且每种情况下的 R 都有独立的选项。此外，取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

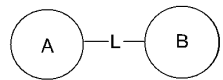
当一个连接基团的数量为 0 时，比如 $-(\text{CRR})_0-$ ，表示该连接基团为单键。

当一个取代基数量为 0 时，表示该取代基是不存在的，比如 $-\text{A}-(\text{R})_0$ 表示该结构实际上是 $-\text{A}$ 。

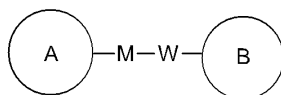
当一个取代基为空缺时，表示该取代基是不存在的，比如 $\text{A}-\text{X}$ 中 X 为空缺时表示该结构实际上是 A 。

当其中一个变量选自单键时，表示其连接的两个基团直接相连，比如 $\text{A}-\text{L}-\text{Z}$ 中 L 代表单键时表示该结构实际上是 $\text{A}-\text{Z}$ 。

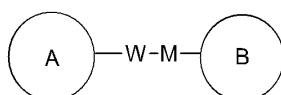
当一个取代基的键可以交叉连接到一个环上的两个以上原子时，这种取代基可以与这个环上的任意原子相键合，例如，结构单元  或  表示其取代基 R 可在环己基或者环己二烯上的任意一个位置发生取代。当所列举的取代基中没有指明其通过哪一个原子连接到被取代的基团上时，这种取代基可以通过其任何原子相键合，例如，吡啶基作为取代基可以通过吡啶环上任意一个碳原子连接到被取代的基团上。

当所列举的连接基团没有指明其连接方向，其连接方向是任意的，例如， 中

连接基团 L 为 $-\text{M}-\text{W}-$ ，此时 $-\text{M}-\text{W}-$ 既可以按与从左往右的读取顺序相同的方向连接环 A 和环 B 构成



，也可以按照与从左往右的读取顺序相反的方向连接环 A 和环 B 构成

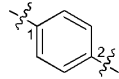


。所述连接基团、取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定

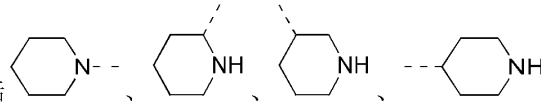
的化合物的情况下才是被允许的。

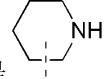
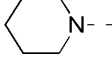
除非另有规定,当某一基团具有一个或多个可连接位点时,该基团的任意一个或多个位点可以通过化学键与其他基团相连。当该化学键的连接方式是不定位的,且可连接位点存在 H 原子时,则连接化学键时,该位点的 H 原子的个数会随所连接化学键的个数而对应减少变成相应价数的基团。所述位点与其他基团连接的化学键可以用直形实线键(—)、直形虚线键(---)、或波浪线(~~~~)表示。

例如-OCH₃ 中的直形实线键表示通过该基团中的氧原子与其他基团相连; 中的直形虚线键表示

通过该基团中的氮原子的两端与其他基团相连; 中的波浪线表示通过该苯基基团中的 1 和

2 位碳原子与其他基团相连; 表示该哌啶基上的任意可连接位点可以通过 1 个化学键与其他

基团相连,至少包括 这 4 种连接方式,即使-N-上

画出了 H 原子,但是 仍包括 这种连接方式的基团,只是在连接 1 个化学键时,该

位点的 H 会对应减少 1 个变成相应的一价哌啶基。

除非另有规定,术语“卤代素”或“卤素”本身或作为另一取代基的一部分表示氟、氯、溴或碘原子。

除非另有规定,术语“C₁₋₃ 烷基”用于表示直链或支链的由 1 至 3 个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述 C₁₋₃ 烷基包括 C₁₋₂ 和 C₂₋₃ 烷基等;其可以是一价(如甲基)、二价(如亚甲基)或者多价(如叔甲基)。C₁₋₃ 烷基的实例包括但不限于甲基(Me)、乙基(Et)、丙基(包括 *n*-丙基和异丙基)等。

除非另有规定,术语“C₁₋₃ 烷氧基”表示通过一个氧原子连接到分子的其余部分的那些包含 1 至 3 个碳原子的烷基基团。所述 C₁₋₃ 烷氧基包括 C₁₋₂、C₂₋₃、C₃ 和 C₂ 烷氧基等。C₁₋₃ 烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基(包括正丙氧基和异丙氧基)等。

除非另有规定,C_{n-n+m} 或 C_n-C_{n+m} 包括 *n* 至 *n+m* 个碳的任何一种具体情况,例如 C₁₋₁₂ 包括 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、和 C₁₂,也包括 *n* 至 *n+m* 中的任何一个范围,例如 C₁₋₁₂ 包括 C₁₋₃、C₁₋₆、C₁₋₉、C₃₋₆、C₃₋₉、C₃₋₁₂、C₆₋₉、C₆₋₁₂、和 C₉₋₁₂ 等;同理,*n* 元至 *n+m* 元表示环上原子数为 *n* 至 *n+m* 个,例如 3-12 元环包括 3 元环、4 元环、5 元环、6 元环、7 元环、8 元环、9 元环、10 元环、11 元环、和 12 元环,也包括 *n* 至 *n+m* 中的任何一个范围,例如 3-12 元环包括 3-6 元环、3-9 元环、5-6 元环、5-7 元环、6-7 元环、6-8 元环、和 6-10 元环等。

除非另有说明,当化合物中存在双键结构,如碳碳双键、碳氮双键和氮氮双键,且双键上的各个原子均连接有两个不同的取代基时(包含氮原子的双键中,氮原子上的一对孤对电子视为其连接的一

个取代基), 如果该化合物中双键上的原子与其取代基之间用  表示, 则表示该化合物的 (Z) 型异构体、(E) 型异构体或两种异构体的混合物。

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

本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构, 如果本发明涉及化合物的绝对构型, 则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。例如单晶X射线衍射法(SXRD), 把培养出的单晶用Bruker D8 venture衍射仪收集衍射强度数据, 光源为CuK α 辐射, 扫描方式: ϕ/ω 扫描, 收集相关数据后, 进一步采用直接法(Shelxs97)解析晶体结构, 便可以确证绝对构型。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。

本发明采用下述缩略词: Syk 代表酪氨酸激酶; VEGFR2 代表血管内皮生长因子受体 2; VEGF 代表血管内皮生长因子; CD36 代表血小板反应蛋白受体; DTT 代表 1,4-二巯基苏糖醇; ATP 代表 5'-三磷酸腺苷; MgCl₂ 代表氯化镁; MnCl₂ 代表氯化锰; EDTA 代表乙二胺四乙酸; HEPES Buffer 代表 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液; HTRF 代表高通量药物筛选; DMSO 代表二甲基亚砜; DIEA 代表 N,N-二异丙基乙胺; CDI 代表 N,N-羰基二咪唑; Pd(dppf)Cl₂ 代表 1,1'-双二苯基膦二茂铁二氯化钯; NaOH 代表氢氧化钠; psi 代表压力单位; KOH 代表氢氧化钾; BOC 代表叔丁氧羰基是一种胺保护基团; HLM 代表人肝微粒体; NADPH 代表还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸; SEM 代表 2-(三甲基硅烷基)乙氧甲基; 室温代表 15~30 摄氏度。

化合物依据本领域常规命名原则或者使用 ChemDraw®软件命名, 市售化合物采用供应商目录名称。

附图说明

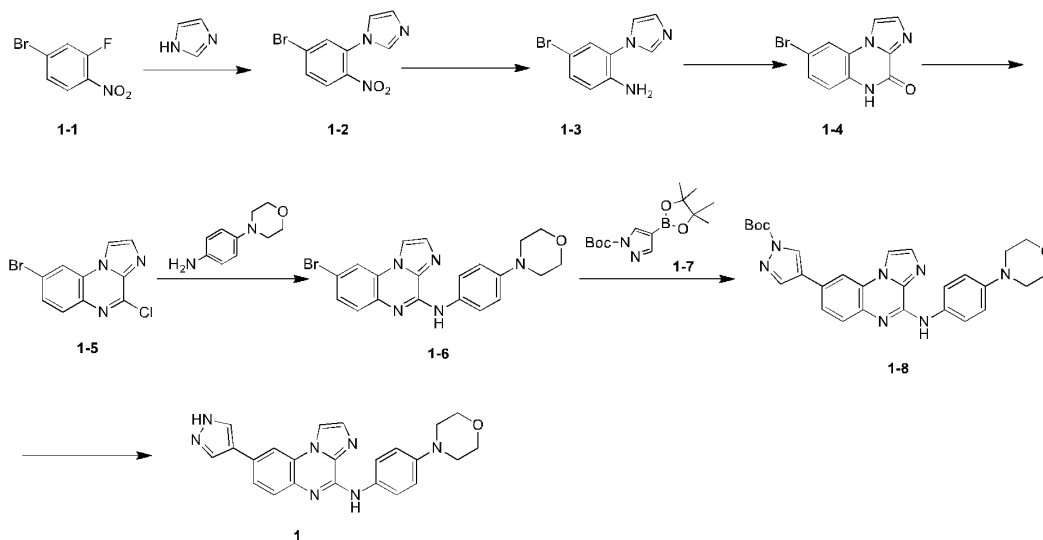
图 1 为造模后第 7 天和第 12 天泪液分泌量。注: PRE(D-1)表示造模前一天, D7 表示第 7 天, D12 表示第 12 天; p 表示显著性差异。

图 2 为造模后第 7 天和第 12 天角膜荧光染色评分。注: PRE(D-1)表示造模前一天, D7 表示第 7 天, D12 表示第 12 天; p 表示显著性差异。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行详细描述, 但并不意味着对本发明任何不利限制。本文已经详细地描述了本发明, 其中也公开了其具体实施方式, 对本领域的技术人员而言, 在不脱离本发明精神和范围的情况下针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进行将是显而易见的。

实施例 1: 化合物 1 的制备



步骤 1: 1-2 合成

向 4-溴-2-氟-1-硝基苯 (5 克, 22.73 毫摩尔) 的乙腈 (100 毫升) 的溶液中, 加入咪唑 (1.55 克, 22.73 毫摩尔), DIEA (2.94 克, 22.73 毫摩尔)。反应液在 90 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液浓缩, 加入水 (100 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取两次。合并有机相, 干燥过滤浓缩后得到化合物 1-2。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.12 (d, J =8.5 Hz, 1H), 8.04 (d, J =2.0 Hz, 1H), 7.98 - 7.93 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.09 (s, 1H)。

步骤 2: 1-3 合成

向化合物 1-2 (4.00 克, 14.92 毫摩尔) 的乙醇 (240 毫升) 的溶液中, 加入二水合氯化亚锡 (20.2 克, 89.52 毫摩尔)。90 摄氏度下搅拌 3 小时。反应液减压浓缩, 加入乙酸乙酯 (300 毫升), 用饱和碳酸氢钠溶液中和至 pH=9 有白色固体析出。滤除析出的固体。滤液加入水 (100 毫升), 用乙酸乙酯 (100 毫升) 萃取两次。合并有机相, 饱和食盐水 (200 毫升) 洗涤, 无水硫酸钠干燥过滤浓缩后得到化合物 1-3。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.79 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.30 (dd, J =2.4, 8.7 Hz, 1H), 7.24 (d, J =2.3 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.83 (d, J =8.5 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H)。

步骤 3: 1-4 合成

氮气保护下, 在化合物 1-3 (1.1 克, 4.62 毫摩尔) 的二氯苯 (20 毫升) 中加入 CDI (749.18 毫克, 4.62 毫摩尔)。在 190 摄氏度下搅拌 2 小时。反应液冷却至室温后过滤, 滤饼干燥后得到化合物 1-4。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 11.95 (s, 1H), 8.61 (d, J =1.0 Hz, 1H), 8.45 (d, J =2.0 Hz, 1H), 7.62 - 7.54 (m, 2H), 7.34 - 7.25 (m, 1H)。

步骤 4: 1-5 合成

向三氯氧磷 (5 毫升) 中加入化合物 1-4 (300 毫克, 1.14 毫摩尔) 和二甲基苯胺 (621.65 毫克, 5.13

毫摩尔)。在 110 摄氏度下搅拌 1.5 小时。反应液浓缩, 用饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH 至 9 有固体析出, 将析出的固体过滤, 滤饼干燥后得到化合物 **1-5**。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 9.01 (s, 1H), 8.80 (d, J =2.0 Hz, 1H), 7.95 (d, J =8.8 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.84 (dd, J =2.0, 8.8 Hz, 1H)。

步骤 5: **1-6** 合成

向化合物 **1-5** (270.0 毫克, 955.68 微摩尔) 的异丙醇 (3 毫升) 中加入 4-吗啉苯胺 (170.33 毫克, 955.68 微摩尔) 和 DIEA (148.21 毫克, 1.15 毫摩尔)。反应液在 100 摄氏度下搅拌 32 小时。反应液过滤, 滤饼干燥后得到化合物 **1-6**。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 9.65 (s, 1H), 8.74 (d, J =1.0 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.99 (d, J =9.0 Hz, 2H), 7.59 - 7.55 (m, 2H), 7.08 - 6.91 (m, 3H), 3.78 - 3.72 (m, 4H), 3.10 - 3.05 (m, 4H)。

步骤 6: **1-8** 合成

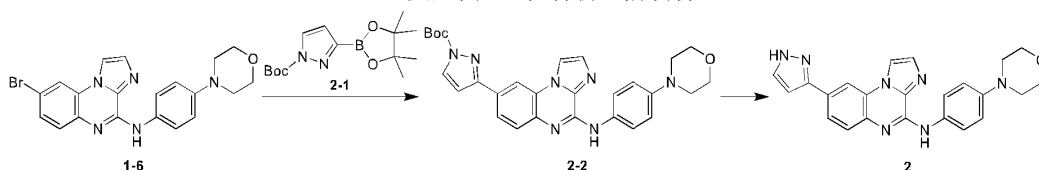
向 1,4-二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中加入化合物 **1-6** (100 毫克, 235.69 微摩尔), 化合物 **1-7** (83.19 毫克, 282.83 微摩尔), 碳酸钾 (97.72 毫克, 707.07 微摩尔) 和 Pd(dppf)Cl_2 (17.25 毫克, 23.57 微摩尔)。氮气保护下, 反应液 80 摄氏度搅拌 4 小时。向反应液加入水 (15 毫升), 用乙酸乙酯 (15 毫升) 萃取两次。合并有机相, 饱和食盐水 (20 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩后得到化合物 **1-8**。

步骤 7: **1** 合成

向化合物 **1-8** (110.0 毫克, 215.02 微摩尔) 的二氯甲烷 (1 毫升) 溶液中加入三氟乙酸 (1.54 克, 13.51 毫摩尔)。在 25 摄氏度下搅拌 1 小时。反应液用氨水调节 pH 至 8, 加入水 (10 毫升), 用二氯甲烷 (10 毫升) 萃取两次。合并有机相用饱和食盐水 (10 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩。粗品加入 3 毫升丙酮, 加热至 60 摄氏度搅拌 0.5 小时后降至室温, 过滤, 真空干燥得到化合物 **1**。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.81 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.23 (s, 2H), 7.92 (d, J =8.8 Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.77 - 7.72 (m, 1H), 7.71 - 7.63 (m, 1H), 7.07 (d, J =8.8 Hz, 2H), 3.79 - 3.76 (m, 4H), 3.16 (br. s., 4H); MS (ESI) m/z : 412 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 2: 化合物 **2** 的制备



步骤 1: **2-2** 合成

向 1,4-二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中加入化合物 **1-6** (140 毫克, 329.96 微摩尔), 化合物 **2-1** (116.47 毫克, 395.95 微摩尔), 碳酸钾 (45.60 毫克, 329.96 微摩尔) 和 Pd(dppf)Cl_2 (24.14 毫克, 33 微摩尔)。氮气保护下, 反应液 80 摄氏度搅拌 4 小时。向反应液加入水 (15 毫升), 用乙酸乙酯 (15 毫升) 萃取两次。合并有机相, 饱和食盐水 (20 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩后得

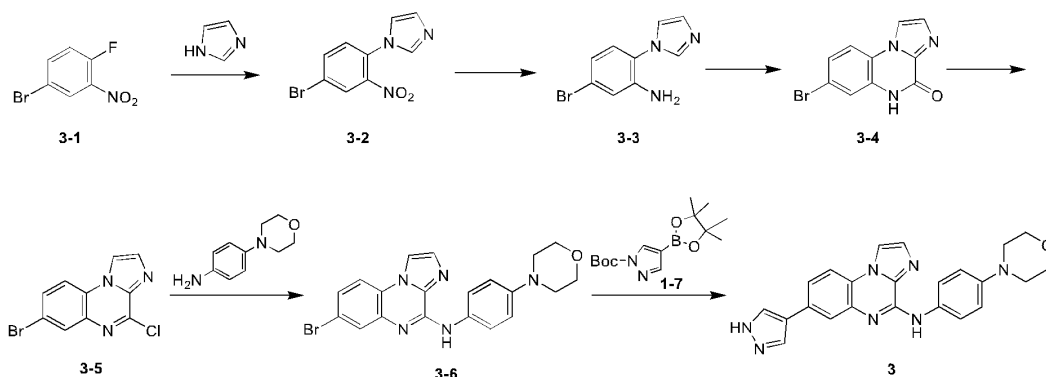
到化合物 **2-2**。MS (ESI) m/z : 512 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: **2** 合成

向化合物 **2-2** (150.0 毫克, 293.22 微摩尔) 的二氯甲烷 (1 毫升) 溶液中加入三氟乙酸 (23.10 克, 202.57 毫摩尔)。在 25 摄氏度下搅拌 2 小时。反应液用氨水调节 pH 至 8, 加入水 (10 毫升), 用二氯甲烷 (20 毫升) 萃取两次。合并有机相用饱和食盐水 (10 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩。粗品经高效液相色谱制备分离 (色谱柱: 3-Phenomenex Luna C18 75×30 mm×3 μ m; 流动相: [水 (0.1% 三氟乙酸) - 乙腈]; B (乙腈) %: 45%-75%, 7 min) 纯化得到化合物 **2** (三氟乙酸盐)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.76 (br. s., 1H), 8.81 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.06 - 7.90 (m, 3H), 7.81 - 7.63 (m, 3H), 7.01 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 3.77 (br. s., 4H), 3.12 (br. s., 2H); MS (ESI) m/z : 412 $[M+H]^+$ 。

实施例 3: 化合物 **3** 的制备



步骤 1: **3-2** 合成

向 4-溴-1-氟-2-硝基苯 (10 克, 45.45 毫摩尔) 的乙腈 (200 毫升) 的溶液中, 加入咪唑 (3.09 克, 45.45 毫摩尔), DIEA (5.87 克, 45.45 毫摩尔)。反应液在 90 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液浓缩, 加入水 (100 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取两次。合并有机相, 用饱和食盐水 (50 毫升) 洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩后得到化合物 **3-2**。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.19 - 8.09 (m, 1H), 7.86 (dd, $J=2.3, 8.5$ Hz, 1H), 7.67 - 7.56 (m, 1H), 7.39 - 7.34 (m, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.05 (t, $J=1.3$ Hz, 1H)。

步骤 2: **3-3** 合成

向化合物 **3-2** (7.30 克, 27.23 毫摩尔) 的乙醇 (350 毫升) 的溶液中, 加入二水合氯化亚锡 (36.87 克, 163.38 毫摩尔)。80 摄氏度下搅拌 3 小时。反应液减压浓缩, 加入乙酸乙酯 (300 毫升), 用饱和碳酸氢钠溶液中和至 pH=9 有白色固体析出。滤除析出的固体。滤液加入水 (100 毫升), 用乙酸乙酯 (100 毫升) 萃取两次。合并有机相, 饱和食盐水 (300 毫升) 洗涤, 无水硫酸钠干燥过滤浓缩后得到化合物 **3-3**。

步骤 3: **3-4** 合成

氮气保护下，在化合物 **3-3** (1.64 克, 6.89 毫摩尔) 的二氯苯 (40 毫升) 中加入 CDI (2.23 克, 13.78 毫摩尔)。在 190 摄氏度下搅拌 2 小时。反应液冷却至室温后过滤，滤饼干燥后得到化合物 **3-4**。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.54 (d, J =1.0 Hz, 1H), 8.08 (d, J =8.5 Hz, 1H), 7.60 (d, J =1.3 Hz, 1H), 7.52 (d, J =2.0 Hz, 1H), 7.47 (dd, J =2.1, 8.7 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H)。

步骤 4: **3-5** 合成

向三氯氧磷 (10 毫升) 中加入化合物 **3-4** (800 毫克, 3.03 毫摩尔) 和二甲基苯胺 (1.66 克, 13.70 毫摩尔)。在 110 摄氏度下搅拌 1.5 小时。反应液浓缩，用饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH 至 9 有固体析出，将析出的固体过滤，滤饼干燥后通过柱层析纯化 (硅胶, 石油醚/乙酸乙酯=100/1 to 2:1) 后得到化合物 **3-5**。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.98 (s, 1H), 8.41 (d, J =8.8 Hz, 1H), 8.25 (d, J =1.8 Hz, 1H), 7.99 (dd, J =2.0, 8.8 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H)。

步骤 5: **3-6** 合成

向化合物 **3-5** (230.0 毫克, 814.10 微摩尔) 的异丙醇 (5 毫升) 中加入 4-吗啉苯胺 (174.12 毫克, 976.92 微摩尔) 和 DIEA (126.26 毫克, 976.92 微摩尔)。反应液在 100 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液过滤，滤饼干燥后得到化合物 **3-6**。

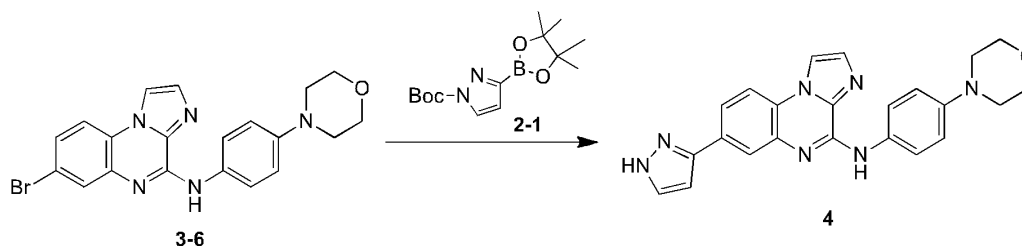
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.72 (s, 1H), 8.68 (d, J =1.3 Hz, 1H), 8.13 (d, J =8.8 Hz, 1H), 8.00 (d, J =9.0 Hz, 2H), 7.80 (d, J =2.3 Hz, 1H), 7.71 (d, J =1.3 Hz, 1H), 7.52 (dd, J =2.1, 8.7 Hz, 1H), 6.95 (d, J =9.0 Hz, 2H), 3.79 - 3.70 (m, 4H), 3.12 - 3.00 (m, 4H)。

步骤 6: **3** 合成

向 1,4-二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中加入化合物 **3-6** (90 毫克, 212.12 微摩尔)，化合物 **1-7** (74.87 毫克, 254.54 微摩尔)，碳酸钾 (87.95 毫克, 636.36 微摩尔) 和 Pd(dppf)Cl_2 (15.52 毫克, 21.21 微摩尔)。氮气保护下，反应液 80 摄氏度搅拌 4 小时。向反应液加入水 (15 毫升)，用乙酸乙酯 (15 毫升) 萃取两次。合并有机相，饱和食盐水 (20 毫升) 洗涤两次，无水硫酸钠干燥，过滤、浓缩。粗品通过高效液相色谱制备分离 (色谱柱: 3-Phenomenex Luna C18 75 $\times$ 30 mm $\times$ 3 μm ; 流动相: [水 (0.1% 三氟乙酸) - 乙腈]; B (乙腈) %: 45%-75%, 7 min) 纯化得到化合物 **3** (三氟乙酸盐)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.74 (s, 1H), 8.25 - 8.12 (m, 3H), 8.01 - 7.87 (m, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.70 (d, J =8.3 Hz, 1H), 7.08 (d, J =8.3 Hz, 2H), 3.79 (d, J =4.3 Hz, 4H), 3.17 (br. s., 4H); MS (ESI) m/z : 412 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

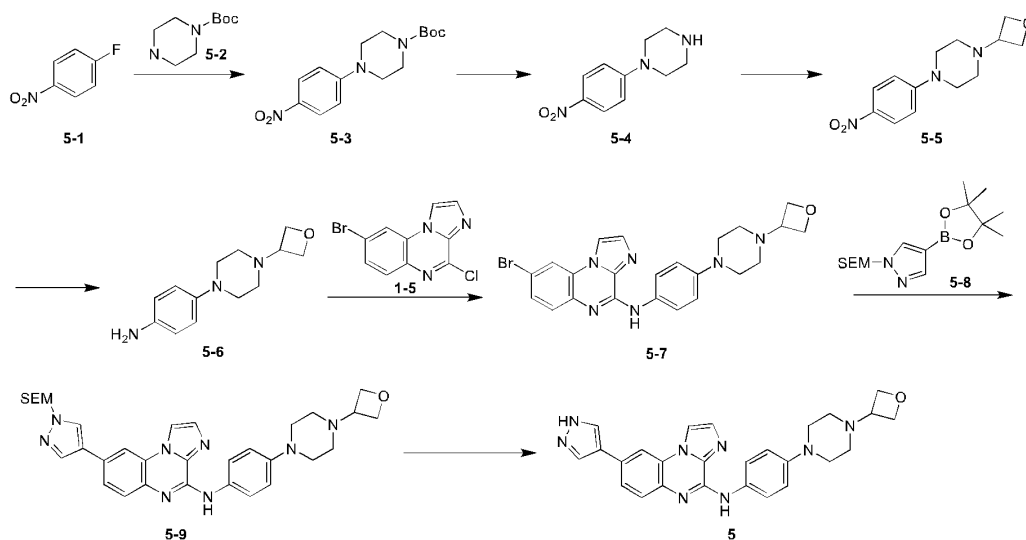
实施例 4: 化合物 4 的制备



向 1,4-二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中加入化合物 **3-6** (100 毫克, 235.69 微摩尔), 化合物 **2-1** (83.19 毫克, 282.83 微摩尔), 碳酸钾 (97.72 毫克, 707.07 微摩尔) 和 Pd(dppf)Cl₂ (17.25 毫克, 23.57 微摩尔)。氮气保护下, 反应液 90 摄氏度搅拌 4 小时。向反应液加入水 (20 毫升), 用乙酸乙酯 (20 毫升) 萃取两次。合并有机相, 饱和食盐水 (20 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩。粗品通过高效液相色谱制备分离 (色谱柱: 3-Phenomenex Luna C18 75×30 mm×3 μm; 流动相: [水 (0.1% 三氟乙酸)-乙腈]; B (乙腈) %: 45%-75%, 7min) 纯化得到化合物 **4** (三氟乙酸盐)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.76 (s, 1H), 8.24 (d, J=8.5 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.88 (dd, J=1.6, 8.4 Hz, 1H), 7.82 - 7.73 (m, 2H), 7.10 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.85 (d, J=2.3 Hz, 1H), 3.79 (br. s., 4H), 3.22 - 3.13 (m, 4H); MS (ESI) m/z: 412 [M+H]⁺.

实施例 5：化合物 5 的制备



步骤 1: 5-3 合成

向对氟硝基苯 (2 克, 14.17 毫摩尔) 的 DMSO (20 毫升) 的溶液中, 加入碳酸钾 (5.88 克, 42.52 毫摩尔), 哌嗪-1-羧酸叔丁酯 (3.96 克, 21.26 毫摩尔)。反应液在 80 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液浓缩, 加入水 (100 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相, 干燥过滤浓缩后得到化合物 **5-3**。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.06 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.01 (d, J=9.6 Hz, 2H), 3.47 (s, 8H), 1.42 (s, 9H).

步骤 2: 5-4 合成

将化合物 **5-3** (4.2 克, 13.67 毫摩尔) 少量分批加入盐酸二氧六环溶液 (4 M, 59.81 毫升) 中, 室温条件下搅拌 16 小时。反应液减压浓缩后得到化合物 **5-4** (盐酸盐粗品), 直接用于下步反应。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.45 (br, 1H), 8.11 (d, J=9.6 Hz, 2H), 7.10 (d, J=9.6 Hz, 2H), 3.67-3.69 (m, 4H), 3.20-3.22 (m, 4H).

步骤 3: 5-5 合成

氮气保护下, 在化合物 **5-4** (3.4 克, 盐酸盐) 的乙醇 (40 毫升) 溶液中加入乙酸钠 (4.04 克, 49.22 毫摩尔), 室温条件下搅拌 1 小时后加入氧杂环丁酮 (1.77 克, 14.61 毫摩尔) 和氯化锌 (4.47 克, 32.81 毫摩尔), 室温条件下搅拌 2 小时后再加入氰基硼氢化钠 (3.09 克, 49.22 毫摩尔)。在 40 摄氏度下搅拌 16 小时。向反应液加入水 (150 毫升), 用乙酸乙酯 (100 毫升) 萃取三次。合并有机相, 饱和食盐水 (80 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩后得到化合物 **5-5**。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.05 (d, J =9.6 Hz, 2H), 7.03 (d, J =9.2 Hz, 2H), 4.45-4.57 (m, 5H), 3.47 (br, 4H), 2.38-2.22 (br, 4H)。

步骤 4: 5-6 合成

氮气保护下, 在化合物 **5-5** (4.2 克, 15.95 毫摩尔) 的甲醇 (150 毫升) 溶液中加入钯碳 (0.5 克, 2.25 毫摩尔), 用氢气球置换三次。在氢气条件下, 反应液室温搅拌 16 个小时。反应液过滤, 滤液浓缩干燥后得到化合物 **5-6**。

MS (ESI) m/z : 234 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 5: 5-7 合成

向化合物 **1-5** (1.0 克, 3.54 毫摩尔) 的异丙醇 (10 毫升) 溶液中加入化合物 **5-6** (991 毫克, 4.25 毫摩尔) 和 DIEA (686 毫克, 5.31 毫摩尔)。反应液在 100 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液降至室温后, 过滤, 滤饼干燥后得到化合物 **5-7**。

步骤 6: 5-9 合成

向 1,4-二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中加入化合物 **5-7** (200 毫克, 417 微摩尔), 化合物 **5-8** (135.3 毫克, 417 微摩尔), 碳酸钾 (173 毫克, 1.25 毫摩尔) 和 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (30.53 毫克, 41.72 微摩尔)。氮气保护下, 反应液 100 摄氏度搅拌 16 小时。向反应液加入水 (30 毫升), 用乙酸乙酯 (15 毫升) 萃取三次。合并有机相, 饱和食盐水 (20 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩后得到化合物 **5-9**。

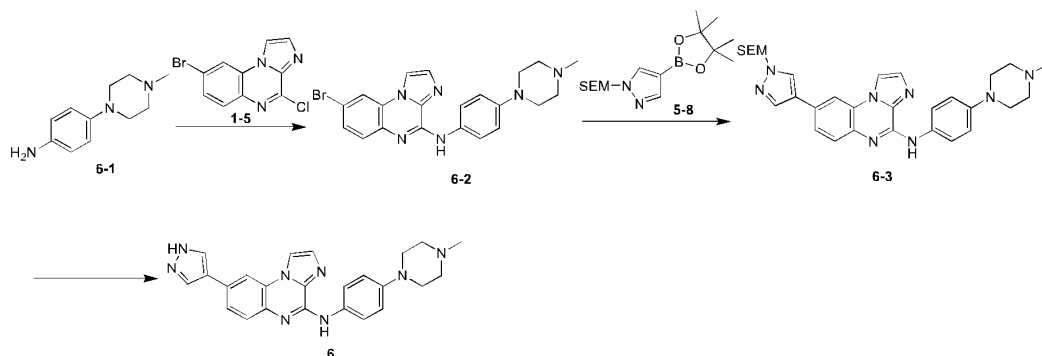
MS (ESI) m/z : 597 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 7: 5 合成

向化合物 **5-9** (350 毫克, 586.5 微摩尔) 的四氢呋喃 (10 毫升) 溶液中加入四丁基氟化铵 (153 毫克, 586.5 微摩尔) 和乙二胺 (70.5 毫克, 1.17 毫摩尔)。反应液在 75 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用氢氧化钠溶液调节 pH 至 8, 加入水 (10 毫升), 用二氯甲烷 (10 毫升) 萃取两次。合并有机相用饱和食盐水 (10 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩。粗品通过硅胶柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=10%~100%) 分离得到化合物 **5**。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.44 (s, 1H), 8.74 (d, J =1.0 Hz, 1H), 8.39 (d, J =1.6 Hz, 1H), 8.22 (s, 2H), 8.00 (d, J =9.0 Hz, 3H), 7.75 - 7.68 (m, 2H), 7.63 (d, J =8.5 Hz, 1H), 6.96 (d, J =9.0 Hz, 2H), 4.61 - 4.52 (m, 2H), 4.48 (t, J =6.1 Hz, 3H), 3.20 - 3.03 (m, 4H), 2.42 (br t, J =4.7 Hz, 4H); MS (ESI) m/z : 467 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 6: 化合物 6 的制备



步骤 1: 6-2 合成

向化合物 **1-5** (0.5 克, 1.77 毫摩尔) 的二甲亚砜 (7 毫升) 溶液中加入化合物 **6-1** (338.55 毫克, 1.77 毫摩尔) 和 DIEA (1.14 克, 8.85 毫摩尔)。反应液在 120 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液降至室温后, 加入 50 毫升水中, 固体析出, 过滤, 滤饼用 10 毫升异丙醇打浆, 过滤干燥后得到化合物 **6-2**。

步骤 2: 6-3 合成

向 1,4-二氧六环 (12 毫升) 和水 (3 毫升) 中加入化合物 **6-2** (400 毫克, 914.63 毫摩尔), 化合物 **5-8** (1.19 克, 3.66 毫摩尔), 碳酸钾 (379.23 毫克, 2.74 毫摩尔) 和 Pd(dppf)Cl₂ (66.92 毫克, 91.46 微摩尔)。氮气保护下, 反应液 100 摄氏度搅拌 16 小时。向反应液加入水 (100 毫升), 用乙酸乙酯 (150 毫升) 萃取三次。合并有机相, 饱和食盐水 (100 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩。粗品通过硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇, 甲醇: 0%~10%) 分离后得到化合物 **6-3**。

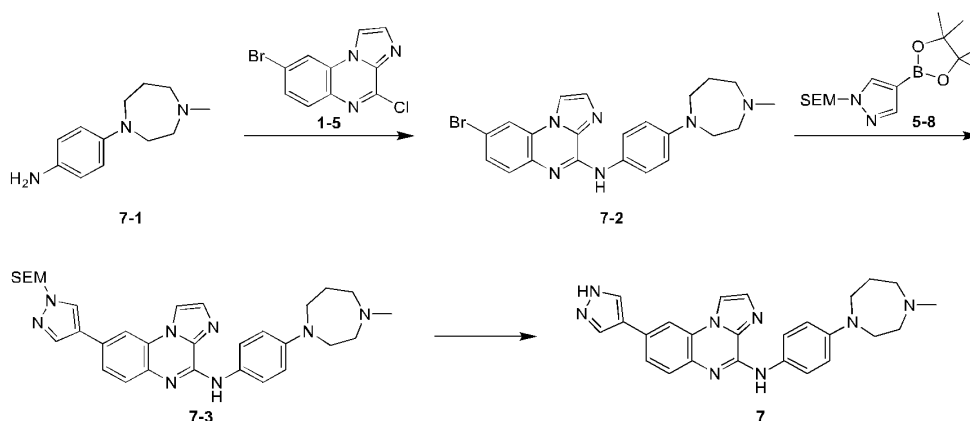
MS (ESI) m/z: 555 [M+H]⁺。

步骤 3: 6 合成

将化合物 **6-3** (280 毫克, 504.72 微摩尔) 加入到盐酸二氧六环 (4 M, 5 毫升)。反应液在 25 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用 2 M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 8, 加入水 (10 毫升), 用二氯甲烷 (10 毫升) 萃取两次。合并有机相用饱和食盐水 (10 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩。粗品加入 3 毫升丙酮, 搅拌 0.5 小时后, 过滤, 滤饼干燥后得到化合物 **6**。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.80 (br s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 8.03 (s, 1H), 7.94 (br s, 2H), 7.87 - 7.81 (m, 1H), 7.79 - 7.68 (m, 1H), 7.11 (br d, J=8.9 Hz, 2H), 5.52 (s, 1H), 3.84 (br d, J=11.3 Hz, 3H), 3.51 (br d, J=11.0 Hz, 4H), 2.83 (br d, J=4.4 Hz, 4H); MS (ESI) m/z: 425 [M+H]⁺。

实施例 7: 化合物 7 的制备



步骤 1: 7-2 合成

向化合物 **1-5** (0.5 克, 1.77 毫摩尔) 的二甲亚砜 (7 毫升) 溶液中加入化合物 **7-1** (362.85 毫克, 1.77 毫摩尔) 和 DIEA (1.14 克, 8.85 毫摩尔)。反应液在 120 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液降至室温后, 加入 50 毫升水中, 固体析出, 过滤, 滤饼用 10 毫升异丙醇打浆, 过滤干燥后得到化合物 **7-2**。

步骤 2: 7-3 合成

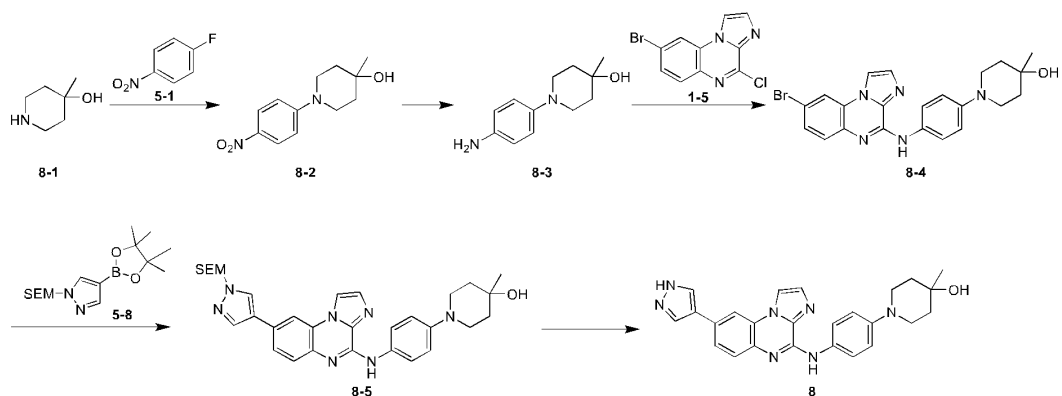
向 1,4-二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中加入化合物 **7-2** (123 毫克, 272.51 微摩尔), 化合物 **5-8** (441.87 毫克, 1.36 毫摩尔), 碳酸钾 (112.99 毫克, 817.53 微摩尔) 和 Pd(dppf)Cl₂ (19.94 毫克, 27.25 微摩尔)。氮气保护下, 反应液 100 摄氏度搅拌 16 小时。向反应液加入水 (50 毫升), 用乙酸乙酯 (100 毫升) 萃取三次。合并有机相, 饱和食盐水 (50 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩。粗品通过硅胶柱层析 (二氯甲烷: 甲醇=0%~10%) 分离后得到化合物 **7-3**。MS (ESI) m/z: 569 [M+H]⁺。

步骤 3: 7 合成

将化合物 **7-3** (127 毫克, 223.28 微摩尔) 加入到盐酸二氧六环 (4 M, 5 毫升)。反应液在 25 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用 2 M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 8, 加入水 (10 毫升), 用二氯甲烷 (10 毫升) 萃取两次。合并有机相用饱和食盐水 (10 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩。粗品通过硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇, 甲醇: 0%~20%) 分离后得到化合物 **7**。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.20 (br s, 1H), 9.17 (d, J=1.1 Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 8.19 (s, 1H), 7.96 - 7.68 (m, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.96 (br d, J=8.8 Hz, 2H), 3.96 - 3.74 (m, 2H), 3.74 - 3.60 (m, 1H), 3.56 - 3.34 (m, 5H), 3.31 - 3.03 (m, 2H), 2.81 (d, J=4.8 Hz, 3H); MS (ESI) m/z: 439 [M+H]⁺。

实施例 8: 化合物 8 的制备



步骤 1: 8-2 合成

向化合物 **5-1** (1 克, 7.09 毫摩尔) 的 DMSO (20 毫升) 的溶液中, 加入碳酸钾 (2.94 克, 21.26 毫摩尔), 化合物 **8-1** (1.06 克, 9.21 毫摩尔)。反应液在 100 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液浓缩, 加入水 (50 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相, 干燥过滤浓缩后得到化合物 **8-2**。MS (ESI) m/z : 237 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 8-3 合成

氮气保护下, 在化合物 **8-2** (1.5 克, 15.95 毫摩尔) 的乙醇 (8 毫升) 和水 (2 毫升) 溶液中加入氯化铵 (1.19 克, 22.22 毫摩尔) 和铁粉 (2.48 克, 44.44 毫摩尔)。反应液在 100 摄氏度的条件下搅拌 16 个小时。反应液过滤, 滤液加入水 (50 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相, 干燥过滤浓缩干燥后得到化合物 **8-3**。MS (ESI) m/z : 207 $[M+H]^+$ 。

步骤 3: 8-4 合成

向化合物 **1-5** (0.5 克, 1.77 毫摩尔) 的二甲亚砷 (7 毫升) 溶液中加入化合物 **8-3** (401.63 毫克, 1.95 毫摩尔) 和 DIEA (1.14 克, 8.85 毫摩尔)。反应液在 120 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液降至室温后, 加入 50 毫升水中, 固体析出, 过滤, 滤饼用 10 毫升异丙醇打浆, 过滤干燥后得到化合物 **8-4**。

步骤 4: 8-5 合成

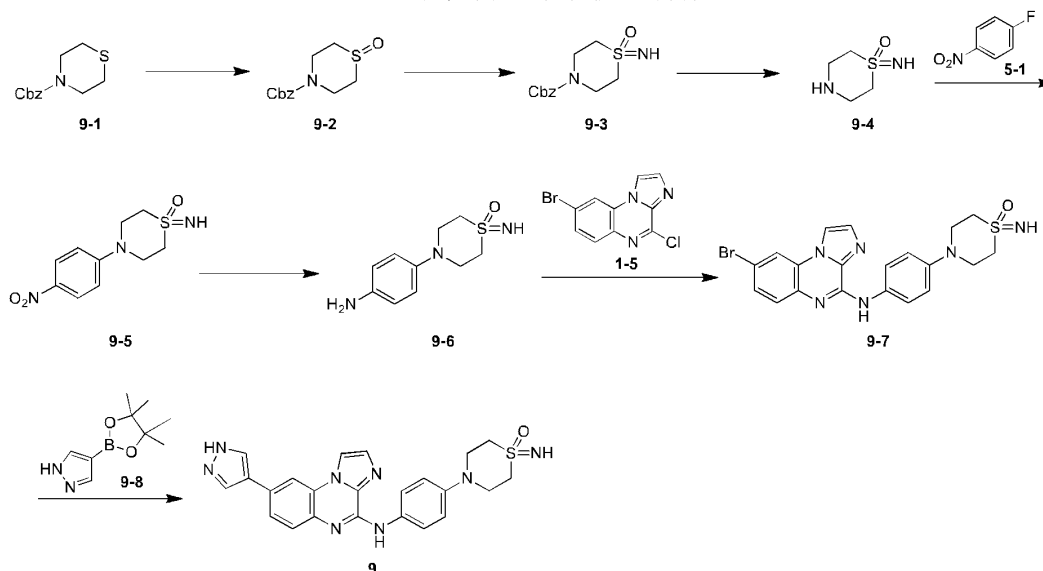
向 1,4-二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中加入化合物 **8-4** (340 毫克, 751.64 微摩尔), 化合物 **5-8** (731.26 毫克, 2.25 毫摩尔), 碳酸钾 (311.65 毫克, 2.25 毫摩尔) 和 $Pd(dppf)Cl_2$ (55 毫克, 75.16 微摩尔)。氮气保护下, 反应液 100 摄氏度搅拌 16 小时。向反应液加入水 (50 毫升), 用二氯甲烷 (100 毫升) 萃取三次。合并有机相, 饱和食盐水 (50 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩。粗品通过硅胶柱层析 (二氯甲烷/四氢呋喃, 四氢呋喃: 0%~100%) 分离后得到化合物 **8-5**。MS (ESI) m/z : 570 $[M+H]^+$ 。

步骤 5: 8 合成

将化合物 **8-5** (350 毫克, 614.28 微摩尔) 加入到盐酸二氧六环 (4 M, 5 毫升)。反应液在 25 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用 2 M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 8, 加入水 (10 毫升), 用二氯甲烷 (10 毫升) 萃取两次。合并有机相用饱和食盐水 (10 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩。粗品通过硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇, 甲醇: 0%~20%) 分离后得到化合物 **8**。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 12.71 - 12.02 (m, 1H), 10.29 (br s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.37 (br d, $J=7.5$ Hz, 2H), 8.29 (s, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.84 (br d, $J=8.4$ Hz, 3H), 7.80 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 3.24 - 2.97 (m, 1H), 2.67 (s, 1H), 1.80 (br s, 3H), 1.49 - 0.33 (m, 6H); MS (ESI) m/z : 440 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 9：化合物 9 的制备



步骤 1：9-2 合成

将化合物 9-1 (45 克, 189.62 毫摩尔) 的甲醇 (500 毫升) 和水 (200 毫升) 的溶液冷却至 0 摄氏度, 加入高碘酸钠 (44.61 克, 208.58 毫摩尔)。反应液在 20 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液过滤, 滤饼用乙酸乙酯 (50 毫升) 洗涤三次。合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩后得到化合物 9-2。

步骤 2：9-3 合成

在氮气保护条件下, 向化合物 9-2 (20 克, 78.95 毫摩尔) 的二氯甲烷 (300 毫升) 溶液中加入三氯乙酰胺 (17.85 克), 醋酸铯 (523.43 毫克), 氧化镁 (12.73 克), 二乙酰氧基碘苯 (38.15 克) 和碳酸钾 (54.56 克)。反应液在 20 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液过滤, 滤饼用二氯甲烷 (100 毫升) 洗涤三次。合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩, 粗品通过硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯, 乙酸乙酯: 0%~50%) 分离纯化后得到化合物 9-3。

步骤 3：9-4 合成

将化合物 9-3 (16.0 克) 加入到氢溴酸 (45%, w/v) 乙酸溶液 (60 毫升) 中。反应液在 20 摄氏度下搅拌 10 小时。反应液用 2 M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 8, 加入水 (100 毫升), 用二氯甲烷 (150 毫升) 萃取三次。合并有机相用饱和食盐水 (100 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩, 得到化合物 9-4。

步骤 4：9-5 合成

向化合物 5-1 (1 克, 7.09 毫摩尔) 的 DMSO (10 毫升) 的溶液中, 加入碳酸钾 (2.94 克, 21.26 毫摩尔), 化合物 9-4 (1.14 克, 8.50 毫摩尔)。反应液在 100 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液浓缩, 加入

水 (50 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩后得到化合物 **9-5**。MS (ESI) m/z : 256 $[M+H]^+$ 。

步骤 5: 9-6 合成

氮气保护下, 在化合物 **9-5** (1.0 克, 3.92 毫摩尔) 的乙醇 (20 毫升) 和水 (5 毫升) 溶液中加入氯化铵 (1.05 克, 19.59 毫摩尔) 和铁粉 (1.09 克, 19.59 毫摩尔)。反应液在 90 摄氏度的条件下搅拌 1 个小时。反应液过滤, 滤液加入水 (50 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩后得到化合物 **9-6**。MS (ESI) m/z : 226 $[M+H]^+$ 。

步骤 6: 9-7 合成

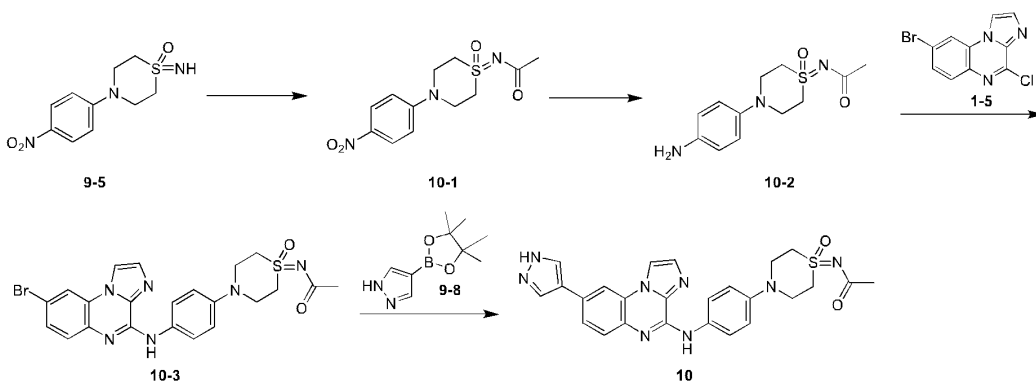
向化合物 **1-5** (376.18 毫克, 1.33 毫摩尔) 的二甲亚砷 (10 毫升) 溶液中加入化合物 **9-6** (0.3 克, 1.33 毫摩尔) 和 DIEA (516.25 毫克, 3.99 毫摩尔)。反应液在 120 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液降至室温后, 加入 50 毫升水中, 固体析出, 过滤, 滤饼用 10 毫升异丙醇打浆, 过滤干燥后得到化合物 **9-7**。

步骤 7: 9 合成

向 1,4-二氧六环 (8 毫升) 和水 (2 毫升) 中加入化合物 **9-7** (200 毫克, 424.29 微摩尔), 化合物 **9-8** (164.66 毫克, 848.58 微摩尔), 碳酸钾 (175.92 毫克, 1.27 毫摩尔) 和 $Pd(dppf)Cl_2$ (31.05 毫克, 42.43 微摩尔)。氮气保护下, 反应液 100 摄氏度搅拌 16 小时。向反应液加入水 (50 毫升), 用二氯甲烷 (100 毫升) 萃取三次。合并有机相, 饱和食盐水 (50 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩。粗品通过高效液相色谱制备分离 (色谱柱: 3-Phenomenex Luna C18 75×30 mm×3 μm ; 流动相: [水 (0.1% 三氟乙酸) - 乙腈]; B (乙腈) %: 45%-75%, 7 min) 纯化得到化合物 **9** (三氟乙酸盐)。

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.75 (br s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.32 (s, 2H), 8.14 (s, 1H), 7.97 (br d, J =7.5 Hz, 2H), 7.83-7.89 (m, 1H), 7.76-7.81 (m, 1H), 7.18 (br d, J =9.0 Hz, 2H), 4.28 (br d, J =14.6 Hz, 4H), 4.08 (br d, J =13.6 Hz, 2H), 3.76 (br t, J =10.8 Hz, 2H), 3.59-3.67 (m, 2H); MS (ESI) m/z : 459 $[M+H]^+$ 。

实施例 10: 化合物 10 的制备



步骤 1: 10-1 合成

将化合物 **9-5** (0.5 克, 1.96 毫摩尔) 的二氯甲烷 (10 毫升) 的溶液中加入三乙胺 (817.81 微升) 和

乙酰氯 (209.65 微升)。反应液在 25 摄氏度下搅拌 2 小时。向反应液加入水 (50 毫升), 用二氯甲烷 (100 毫升) 萃取三次。合并有机相, 饱和食盐水 (50 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩得到化合物 **10-1**。

步骤 5: **10-2** 合成

氮气保护下, 在化合物 **10-1** (0.5 克, 1.68 毫摩尔) 的乙醇 (20 毫升) 和水 (5 毫升) 溶液中加入氯化铵 (449.76 毫克) 和铁粉 (469.55 毫克)。反应液在 90 摄氏度的条件下搅拌 1 个小时。反应液过滤, 滤液加入水 (50 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相, 干燥过滤浓缩干燥后得到化合物 **10-2**。MS (ESI) m/z : 268 $[M+H]^+$ 。

步骤 6: **10-3** 合成

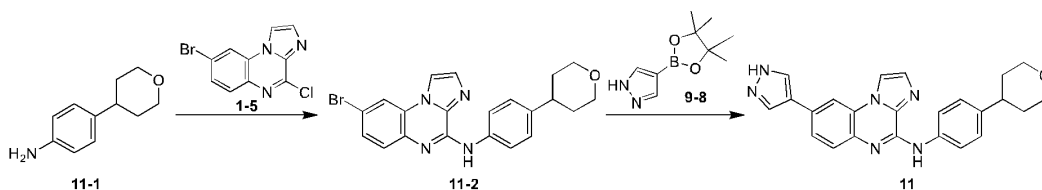
向化合物 **1-5** (211.35 毫克) 的二甲亚砜 (10 毫升) 溶液中加入化合物 **10-2** (0.2 克) 和 DIEA (390.91 微升)。反应液在 120 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液降至室温后, 加入 50 毫升水中, 固体析出, 过滤, 滤饼用 10 毫升异丙醇打浆, 过滤干燥后得到化合物 **10-3**。

步骤 7: **10** 合成

向 1,4-二氧六环 (8 毫升) 和水 (2 毫升) 中加入化合物 **10-3** (200 毫克), 化合物 **9-8** (151.18 毫克), 碳酸钾 (161.52 毫克) 和 $Pd(dppf)Cl_2$ (28.50 毫克)。氮气保护下, 反应液 100 摄氏度搅拌 16 小时。向反应液加入水 (50 毫升), 用二氯甲烷 (100 毫升) 萃取三次。合并有机相, 饱和食盐水 (50 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩, 粗品通过硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇, 甲醇: 0%~10%) 分离纯化后得到化合物 **10**。

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.01 (br s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.33 (br s, 1H), 8.09 (br d, J =9.0 Hz, 2H), 7.72-7.78 (m, 2H), 7.64 (d, J =8.5 Hz, 1H), 7.07 (br d, J =9.0 Hz, 2H), 3.87-3.95 (m, 2H), 3.59-3.68 (m, 3H), 3.41 (br d, J =11.3 Hz, 2H), 3.31 (br s, 2H), 1.99 (s, 3H); MS (ESI) m/z : 501 $[M+H]^+$ 。

实施例 11: 化合物 **11** 的制备



步骤 1: **11-2** 合成

氮气保护下, 化合物 **1-5** (300 毫克, 1.06 毫摩尔) 和化合物 **11-1** (225.85 毫克, 1.27 毫摩尔) 混合后在 120 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液降至室温后, 加入 10 毫升二氯甲烷和 2 毫升甲醇, 搅拌 15 分钟后过滤, 收集滤饼, 真空干燥后得到化合物 **11-2**。MS (ESI) m/z : 423, 425 $[M+H]^+$ 。

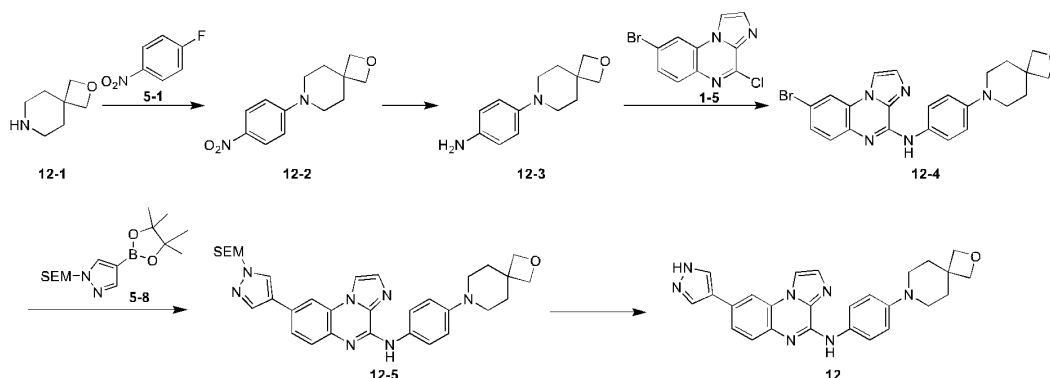
步骤 2: **11** 合成

向 1,4-二氧六环 (4 毫升) 和水 (1 毫升) 中加入化合物 **11-2** (100 毫克), 化合物 **9-8** (236 毫克), 碳酸钾 (97.75 毫克) 和 $Pd(dppf)Cl_2$ (17.29 毫克)。氮气保护下, 反应液 100 摄氏度搅拌 16 小时。向反

应液加入水（20 毫升），用二氯甲烷（30 毫升）萃取三次。合并有机相，饱和食盐水（30 毫升）洗涤两次，无水硫酸钠干燥，过滤、浓缩。粗品通过硅胶柱层析（二氯甲烷/甲醇，甲醇：0%~10%）分离纯化后得到化合物 **11**。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 10.61 (br s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.32 (s, 2H), 8.12 (s, 1H), 8.00 (br d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.84-7.91 (m, 1H), 7.76-7.82 (m, 1H), 7.33 (br d, $J=8.4$ Hz, 2H), 5.75 (s, 1H), 3.96 (br d, $J=10.5$ Hz, 2H), 3.45 (td, $J=10.7, 3.6$ Hz, 2H), 2.73-2.84 (m, 1H), 1.64-1.78 (m, 4H); MS (ESI) m/z : 411 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 12：化合物 12 的制备



步骤 1：12-2 合成

向化合物 **5-1** (0.5 克) 的 DMSO (20 毫升) 的溶液中，加入碳酸钾 (1.47 克)，化合物 **12-1** (585.89 毫克)。反应液在 100 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液浓缩，加入水 (50 毫升)，用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤浓缩后得到化合物 **12-2**。MS (ESI) m/z : 249 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 2：12-3 合成

氮气保护下，在化合物 **12-2** (0.8 克) 的乙醇 (8 毫升) 和水 (2 毫升) 溶液中加入氯化铵 (603.26 毫克) 和铁粉 (1.26 克)。反应液在 100 摄氏度的条件下搅拌 16 个小时。反应液过滤，滤液加入水 (50 毫升)，用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤浓缩后得到化合物 **12-3**。MS (ESI) m/z : 219 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 3：12-4 合成

向化合物 **1-5** (200 毫克) 的异丙醇 (2 毫升) 溶液中加入化合物 **12-3** (154.53 毫克) 和 DIEA (123.30 微升)。反应液在 120 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液降至室温后，加入水 (50 毫升)，用乙酸乙酯 (50 毫升) 萃取三次。合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤浓缩。粗品通过硅胶柱层析（二氯甲烷/四氢呋喃，四氢呋喃：0%~20%）分离纯化后得到化合物 **12-4**。MS (ESI) m/z : 464, 466 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 4：12-5 合成

向 1,4-二氧六环 (8 毫升) 和水 (2 毫升) 中加入化合物 **12-4** (126.54 毫克)，化合物 **5-8** (441.87 毫克)，碳酸钾 (112.99 毫克) 和 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (19.94 毫克)。氮气保护下，反应液 100 摄氏度搅拌 16 小时。向反应液加入水 (50 毫升)，用二氯甲烷 (100 毫升) 萃取三次。合并有机相，饱和食盐水 (50

毫升)洗涤两次,无水硫酸钠干燥,过滤、浓缩。粗品通过硅胶柱层析(二氯甲烷/四氢呋喃,四氢呋喃:0%~100%)分离后得到化合物 **12-5**。MS (ESI) m/z: 582 [M+H]⁺。

步骤 5: **12** 合成

将化合物 **12-5** (50 毫克)加入到盐酸二氧六环 (4 M, 5 毫升)。反应液在 25 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用 2 M 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 8, 加入水 (10 毫升), 用二氯甲烷 (10 毫升) 萃取两次。合并有机相用饱和食盐水 (10 毫升) 洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩后得到化合物 **12**。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.14 (br, 1H), 8.84 - 8.86 (m, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.42 (d, J=8.9 Hz, 2H), 8.27 (s, 1H), 7.87 - 7.62 (m, 3H), 7.33 - 7.10 (m, 2H), 6.67 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 3.98-3.91 (m, 4H), 3.71 (s, 4H), 0.98 - 0.68 (m, 4H); MS (ESI) m/z: 452 [M+H]⁺。

生物测试数据:

实验例 1: 化合物对 Syk 激酶抑制作用体外测试(酶学实验)

实验目的

通过 HTRF 检测底物和酶的相互作用, 以化合物的 IC₅₀ 值为指标, 来评价化合物对 Syk 激酶的抑制作用。

实验材料

Syk 激酶 (Invitrogen, PV3857)

DTT (Sigma#43815)

ATP (Sigma#A7699)

MgCl₂ (Sigma#63020)

MnCl₂ (Sigma#M1787)

EDTA (Invitrogen#15575-020)

HEPES Buffer (Invitrogen#15630-080)

HTRF® KinEASE™ TK (Cisbio#62TK0PEC, 20000 tests)

Low volume, 384-well, white polystyrene plate (Greiner#784075)

384 Well Microplates (Greiner#781946)

离心机 (Eppendorf #5810R)

移液器 (Eppendorf)

移液管 (Greiner)

移液枪 (Eppendorf)

Mutidorp 加样器

POD 810 Plate Assembler 全自动微孔板预处理系统

Envision Reader

实验步骤和方法:

a) 化合物稀释与打板

- 1) 化合物粉末称重, 溶解与一定量 DMSO 中, 初始浓度为 10 mM。
- 2) 将化合物浓度稀释到 0.74 mM, 使用 POD18 进行打板, 每孔 135 nL, 化合物起始浓度为 10 μ M, 11 个浓度点, 3 倍递减梯度稀释。
- b) 酶与底物反应阶段
 - 1) 实验缓冲液稀释准备, 将试剂盒内 5 $\times$ HTRF Buffer 稀释至 1 $\times$, 加入指定量的 DTT 和 $MgCl_2$ 溶液备用。
 - 2) 用 1 $\times$ HTRF Buffer 配制 SYK 酶反应溶液, 使 SYK 激酶最终反应浓度为 0.0156 ng/ μ L。
 - 3) 配制 TK-Substrate-biotin/ATP 混合液, 使最终底物浓度控制在 0.2 μ M。ATP 浓度控制在 2 μ M。
 - 4) 使用 Mutidorp 加样器加样, SYK 酶溶液和 TK-Substrate-biotin/ATP 混合液每孔各加 5 μ L, 23 液孵育 1 小时。
- c) 检测阶段:
 - 1) 向试剂盒检测缓冲液中加入 13.33 mL 乙二胺四乙酸溶液, 加入指定量 Eu 标记的抗体和 XL-665, 配置好检测液。
 - 2) 使用 Mutidorp 加样器加样, 每孔 10 μ L 检测液, 23 液孵育 1 小时。使其终止酶和底物混合液的反应。
 - 3) 离心后在 Envision 上进行读值。
- d) 分析数据: 用 XL-Fit 来分析数据, 计算化合物的 IC_{50} 值。

实验结果

实验结果见表 1。

实验例 2: 化合物对 VEGFR2 激酶抑制作用体外测试(酶学实验)

实验目的

VEGFR2 激酶检测试剂盒旨在使用 Kinase-Glo[®]MAX 作为检测试剂来测量 VEGFR2 激酶活性, 以化合物的 IC_{50} 值为指标, 进行化合物筛选和分析。

实验方法和步骤

ADP-GLO[™]激酶分析是一种发光激酶测定由激酶形成的二磷酸腺苷的分析反应; ADP 转化为 ATP, 即通过超 Glo[™]荧光素酶转化为光信号。发光信号与 ADP 数量和激酶活性呈正相关。这种分析方法非常适合于测定化合物的活性, 使其成为初步筛选和激酶选择性分析的理想选择。ADP-Glo[™]激酶分析法可用于监测几乎所有 ADP 生成酶(如激酶或 ATPase)的活性:

- 1) 在激酶缓冲液中稀释酶、底物、ATP 和抑制剂;
- 2) 384 孔板: 1 μ L 抑制剂或 (5%二甲基亚砷溶液), 2 μ L 的 KDR 酶, 2 μ L 基质/ATP 混合物;
- 3) 室温孵育 60 分钟;
- 4) 添加 5 μ L ADP-GLO[™]试剂;
- 5) 室温下孵育 40 分钟;
- 6) 加入 10 μ L 激酶检测试剂;

7) 室温孵育 30 分钟;

8) 记录发光 (积分时间 0.5-1 秒)。数据显示为相对光单位 (rlu), 直接与 ATP 的产生量相关。每一个激酶量的 ATP 转化为 ADP 的百分数与相应的信号背景比之间的相关性。

9) 数据分析: (a) 用 50 μ M 的 ATP 滴定 KDR 酶, 显示 KDR 酶产生的发光信号; (b) 用 1.5 ng 的 KDR 产生 staurosporine 剂量反应, 以确定抑制剂 IC₅₀ 值。

实验结果: 结果见表 1:

表 1 本发明化合物抑制 Syk 酶和抑制 VEGFR2 酶实验数据

化合物编号	抑制 Syk 酶 IC ₅₀ (nM)	抑制 VEGFR2 酶 IC ₅₀ (nM)
化合物 1	15	23
化合物 2	125	31
化合物 5	17	19
化合物 6	50	44
化合物 7	34	42
化合物 8	30	31
化合物 9	23	22
化合物 10	11	41
化合物 11	34	56
化合物 12	315	88

结果表明: 结果显示本发明化合物对脾酪氨酸激酶 (Syk) 和血管内皮生长因子 2 (VEGFR2) 均有显著的抑制作用。

实验例 3: 化合物对六十七个非靶点激酶的活性抑制试验(酶学实验)

实验目的

为考察化合物对靶点抑制的特异性, 本研究在 Eurofins kinaseProfiler™ 平台上检测受试化合物 1 对相关通路非靶点激酶的活性和选择性作用进行了测试, 以 IC₅₀ 值为指标, 进行化合物筛选和分析。

实验方法和步骤

化合物 1 对每个选中激酶的检测均使用 Eurofins 标准的 Kinase Profiler™ 实验流程, 该流程遵循相关的标准操作规程。分析了受试化合物 1 对包括 Abl(h)、B-Raf(h)、BTK(h)和 JAK(h)等在内的 67 个激酶的抑制活性 IC₅₀ 值。

实验结果: 实验结果见表 2:

表 2 化合物 1 对六十七个非靶点激酶的活性抑制 IC₅₀

激酶名称	IC ₅₀ (nM)	激酶名称	IC ₅₀ (nM)
	化合物 1		化合物 1
Abl(h)	152	JNK1 α 1(h)	1172
ACTR2(h)	>10,000	JNK2 α 2(h)	>10,000

BRK(h)	775	JNK3(h)	279
B-Raf(h)	91	PDGFR α (h)	2702
CDK2/cyclinA(h)	>10,000	MAPK1(h)	>10,000
CDK4/cyclinD3(h)	>10,000	MAP4K4(h)	63
CDK6/cyclinD3(h)	>10,000	MAPKAP-K2(h)	>10,000
CSK(h)	>10,000	MEK1(h)	>10,000
CHK1(h)	>10,000	MEK2(h)	>10,000
CK1 ϵ (h)	385	MKK4(m)	>10,000
FGFR1(h)	847	MKK6(h)	>10,000
FGFR3(h)	>10,000	mTOR(h)	>10,000
Flt1(h)	104	mTOR/FKBP12(h)	>10,000
Fyn(h)	373	MSK1(h)	>10,000
IKK α (h)	946	PKA(h)	>10,000
IKK β (h)	>10,000	PKB α (h)	>10,000
Flt3(h)	12	ROCK-II(h)	499
Aurora-B(h)	232	Ret(h)	756
BTK(h)	1039	Ros(h)	>10,000
c-kit (h)	2843	Rse(h)	>10,000
cSRC(h)	367	SAPK2a(h)	>10,000
EGFR(h)	>10,000	SAPK2b(h)	>10,000
ErbB2(h)	>10,000	SAPK3(h)	>10,000
FAK(h)	469	SAPK4(h)	>10,000
FGFR2(h)	>10,000	Src(1-530)(h)	827
Hck(h)activated	418	Src(T341M)(h)	1006
Itk(h)	1849	TGFBR1(h)	>10,000
JAK1(h)	663	Tie2 (h)	2059
JAK2(h)	141	TrkA(h)	112
JAK3(h)	550	Txk(h)	227
Lck(h) activated	1311	TYK2(h)	117
Lyn(h)	934	Yes(h)	204
IR(h)	>10,000		

结果表明：本发明化合物展现出了非常好的靶向特异性，无其他偏离靶标选择性问题。

实验例 4：化合物对体外细胞色素 P450 酶抑制评价

实验目的

为考察化合物对人肝微粒体 CYP450 酶的活性，本研究采用 LC-MS/MS 法测定化合物 1 对人肝细胞 CYP450 酶 5 种主要亚型（CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4）抑制作用进行了测试，以 IC₅₀ 值为指标，进行化合物筛选和分析。

实验方法和步骤

- 1) 制备测试化合物和标准抑制剂工作溶液（100×）；
- 2) 将微粒体从-80℃冰箱中取出，在冰上解冻，贴上日期标签，使用后立即放回冰箱；
- 3) 向相应的孔中加入 20 微升的基质溶液；
- 4) 向空白孔中加入 20 微升磷酸缓冲盐溶液；
- 5) 将 2 微升试验化合物和阳性对照工作液加入相应的孔中；
- 6) 向无抑制剂孔和空白孔中添加 2 微升溶剂；
- 7) 制备人肝微粒体工作液；
- 8) 将 158 微升 HLM 工作液加入孵育板的所有孔中；
- 9) 在 37℃ 水浴中预热板子约 10 分钟；
- 10) 制备 NADPH 辅因子溶液；
- 11) 向所有孵育孔中添加 20 微升 NADPH 辅因子；
- 12) 在 37℃ 水浴条件下，将所有 CYP 混合培养 10 分钟；
- 13) 在时间点，通过添加 400 微升冷溶液（200 ng/mL 甲苯磺丁脲的乙腈溶液 和 200 ng/mL Labetalol 的乙腈溶液）来终止反应；
- 14) 样品以 4000 转/分的转速离心 20 分钟以沉淀蛋白质；
- 15) 将 200 微升上清液移入 100 微升高效液相色谱水中，摇匀 10 分钟；
- 16) 开始进行 LC/MS/MS 分析。

实验结果

实验结果见表 3：

表 3

CYPs	IC ₅₀ (μM)
	化合物 1
CYP1A2	>50
CYP2C9	>50
CYP2C19	>50
CYP2D6	>50
CYP3A4-M	>50

结果表明：本发明化合物对 CYP450 酶 5 种主要亚型（CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4）均无明显抑制作用。

实验例 5：小鼠眼部给药药代动力学评价

实验目的

为考察化合物眼部给药后体内暴露量的眼血比，本研究采用 LC-MS/MS 法测定化合物 1 在小鼠眼部给药后角膜和血浆中的暴露量进行了测试，以相同时间点的药物浓度为指标，进行化合物筛选和分析。

实验方法和步骤

C57BL/6 小鼠，体重 18-20 g，适应 3-5 天后，随机分为 4 组，每组三只，滴眼给药，左右眼各 5 μ L。

受试动物（C57BL/6 小鼠）给药前不禁食。实验前后和实验过程中均自由饮水。

滴眼给药后，于 1 h、3 h 于隐静脉取血 0.05 mL 左右，商品化 EDTA-K2 抗凝后，移至离心机离心。隐静脉取血后异氟烷麻醉采集角膜，每个时间点，同组内的小鼠血浆和角膜混合在一起检测。

血浆和角膜的处理方式：

血浆：30 min 内转移到 4℃，3200 g，10 min 条件下离心分离血浆，每只取 20 μ L 血浆。每个时间点同组内的小鼠血浆混合在一起检测。

角膜：取下角膜，用预冷的生理盐水漂洗两次后用擦手纸轻轻擦干，再放入 1.5 mL 的离心管，使用分析天平，通过去皮法称量，最后称出体重。每个时间点同组内的小鼠角膜混合在一起检测。

角膜匀浆方法：1 g 角膜加入 9 mL 预冷的甲醇: 15 mM 磷酸缓冲溶液=1:2，使用超声波细胞破碎仪（2 号振幅杆，振幅 50%，工作 5 s，停 5 s，超声 3 min）。

实验结果

实验结果见表 4:

表 4 化合物 1 的小鼠滴眼给药血浆和角膜药物浓度及眼血比

	化合物 1	
给药剂量	0.1 mg/动物	
时间点（小时）	1 小时	3 小时
角膜药物浓度（nmol/kg）	6670	2910
血浆药物浓度（nM）	10.4	6.8
眼血比	641	427

结果表明：本发明化合物眼血比高，适合眼部给药。

实施例6：皮下注射东莨菪碱诱导的小鼠干眼症模型的药效试验

实验目的

干眼症又称为角结膜干燥症，是一种较为多发的眼科疾病，多因泪液质或量或者动力学异常所引发的眼表损伤或泪膜不稳定现象。干眼症临床多伴有眼痒、干涩以及眼部异物感等症状，对患者的视力、生活质量均有严重影响。本试验旨在采用皮下注射东莨菪碱诱导的小鼠干眼症模型，通过滴眼给予小鼠溶媒和化合物 1，评估化合物 1 对于干眼症模型的改善情况，探索供试品的有效剂量。

实验方法和步骤

从20只雌性C57BL/6J小鼠中选择12只动物，按试验前各动物泪液测试结果进行分成2组。每组6只动物。

试验第1~12天，皮下注射氢溴酸东莨菪碱溶液诱导小鼠干眼症，4次/天，0.1 mL/只/次，两次注射间隔 3 ± 0.5 h。

试验第1~12天，双眼滴眼给予动物溶媒，和0.5%的化合物1（即5 mg/mL），4次/天，3 μ L/眼/次，两次给药间隔 3 ± 0.5 h。注意须在滴眼给药前给予造模剂（第7天和第12天检查除外）。

在造模前，第7天和第12天对所有试验动物进行泪液测试，角膜荧光染色评分。其中第7天和第12天的泪液测试检查在第二次给药后30分钟进行，角膜荧光染色评分检查需在第三次给药后30分钟进行。

试验第13天，第2组动物前三只于给药后1 h，先进行血样采集，之后进行安乐死，采集眼球后收集角膜；第2组动物后三只于给药后3 h，先进行血样采集，之后进行安乐死，采集眼球后收集角膜。

将造模当天设计为试验第1天。

给药制剂

1) 称量需要量的供试品到一合适的容器内。

2) 向上述容器中加入需要体积的25% (w/v) 2-羟丙基- β -环糊精和0.2%(v/v)蓖麻油灭菌注射用水溶液，持续搅拌直至目视均一，如果需要可在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热和/或者超声。测量并记录pH值，如果需要可用合适浓度的盐酸或氢氧化钠调节其pH值，使其在7.0至7.5之间。

3) 配制后的供试品在层流净化罩下，使用0.22 μm 的GV过滤膜过滤到无菌容器后分装使用。

配好的给药制剂将避光储存在 2°C 至 8°C 冰箱中，并在2天内使用。在给药前至少30分钟，将配制好的给药制剂从冰箱内取出平衡至室温。

造模制剂

1) 称量需要量的造模剂到一合适的容器内。

2) 向上述容器中加入需求体积的生理盐水，涡旋直至目视造模剂溶解。

3) 在层流净化罩下，用0.22 μm 的GV过滤膜过滤制剂到无菌的容器内。

配制后的给药制剂将避光储存在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，并在7天内使用。在给药前至少30分钟，将配制好的给药制剂从冰箱内取出平衡至室温。

实验结果

泪液分泌量测试

1) 称量约1 g 酚红粉末于合适容器中；

2) 添加生理盐水 20~30 mL，不断混匀，直至溶液饱和；

3) 将饱和溶液通过滤纸过滤到另一干净容器中；

4) 将棉线放入已过滤好的试剂中，浸泡 5~10 min；

5) 取出浸泡的棉线，烘干备用。尽量于五天内用完。

在实验动物正式造模前，至少有2天，每天一次的适应性泪液测试。

分别在造模前，第7天和第12天的第二次给药后至少30分钟后，对所有实验动物双眼进行泪液分

泌量测试。先对每只动物的左眼进行测量，所有实验动物左眼的泪液分泌量测试结束后，再重新对每只动物的右眼进行测量。

测试过程中尽量一次性用镊子将酚红棉线插入小鼠待测眼靠近外眦下眼睑内，即刻开始计时 30 秒，取出棉线，用游标卡尺进行测量泪液痕迹的长度。当测试过程中，棉线掉落时，则需等待动物静止 10 分钟以上，再进行第二次测量。造模后第 7 天和第 12 天泪液分泌量实验结果见图 1。

角膜荧光染色检查

分别在造模前，第 7 天和第 12 天第三次给药后至少 30 分钟后，对所有实验动物进行角膜荧光染色评分。每只动物先左眼后右眼进行评分。

先通过移液器向待测眼角膜上滴注大约 1 μ L 1% 的荧光素钠，将待测眼上下眼睑闭合几次，用生理盐水冲洗角膜数次后，用手持式裂隙灯对待测眼进行角膜荧光染色评分。

评分标准为：将动物角膜分为 5 个区域，分别为上，下，鼻侧，颞侧以及中央区域，每个区域都是 0~3 分，对每个区域进行评分，单眼分数为五个区域分数的总和。0 分，无着染；1 分，轻微着染，点状着染且数量少于 5；2 分，中度着染，点状着染但无斑块性着染；3 分，重度着染，明显荧光斑块。组间比较采用各组眼评分总和的平均值进行比较。造模后第 7 天和第 12 天角膜荧光染色评分结果见图 2。

结果表明：本发明化合物在东莨菪碱诱导的小鼠干眼症模型中展现出了具有统计学意义的显著性药效。