



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102898426 A

(43) 申请公布日 2013.01.30

(21) 申请号 201210461087.3

(22) 申请日 2012.11.15

(71) 申请人 江苏先声药业有限公司

地址 210042 江苏省南京市玄武区玄武大道  
699 号-18

申请人 江苏先声药物研究有限公司

(72) 发明人 吴刚 沈晗 朱新荣

(51) Int. Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 31/4545 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

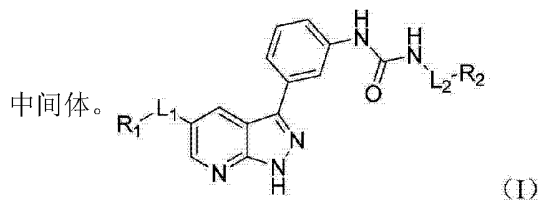
权利要求书 4 页 说明书 26 页

### (54) 发明名称

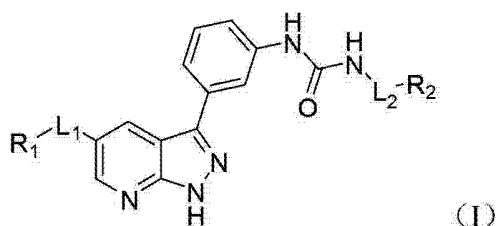
抑制 IGF-1R 酪氨酸激酶活性的吡啶并吡唑  
类衍生物

### (57) 摘要

本发明涉及一类具有式(I)结构的吡啶并吡  
唑衍生物或其药学上可接受的盐及其用途。本发  
明还涉及该类化合物的制备方法及其化合物的



1. 结构如式 I 所示的化合物或其药学上可接受的盐：



其中

$L_1$  和  $L_2$  独立地是键、 $-S(O)_n-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $C_1-C_{10}$  亚烷基或 2-10 元杂亚烷基，其中  $n$  选自 0-2 的整数；

$R_1$ 、 $R_2$  独立地选自  $C_3-C_7$  环烷基、3-7 元杂环烷基、 $C_6-C_{10}$  芳基、 $C_5-C_{10}$  杂芳基，其中， $C_3-C_7$  环烷基、 $C_3-C_7$  元杂环烷基可选进一步被氧化，或  $C_3-C_7$  环烷基、3-7 元杂环烷基、 $C_6-C_{10}$  芳基、 $C_5-C_{10}$  杂芳基可选进一步被一个或多个选自  $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-COOH$ 、氰基、卤素、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  的烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$  的环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基、 $-L_3-C(X_1)$ 、 $R_3$ 、 $-L_3-OR_4$ 、 $-L_3-NR_5R_6$  或  $-L_3-S(O)_mR_7$  的取代基所取代，其中

(a)  $L_3$  是键、未取代的  $C_1-C_{10}$  亚烷基或未取代的 2-10 元杂亚烷基；

(b)  $X_1$  选自  $=S$ 、 $=O$  或  $=NR_8$ ，其中  $R_8$  选自氢、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  的烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 2-10 元杂烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$  的环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基；

(c)  $R_3$ 、 $R_7$  独立地选自氢、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$  环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的芳基或  $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基、 $-OR_4$  或  $-NR_5R_6$ ；

(d)  $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$  独立地选自氢、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 2-10 元杂烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$  环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基或  $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基，

其中  $R_5$  和  $R_6$  任选地与它们所连接的氮合在一起形成未取代的 3-7 元杂环烷基或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基；

(e)  $m$  选自 0-2 的整数；

(f)  $R_9$  是氧化或选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的 2-10 元杂烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$  环烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基或  $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基；

(g)  $R_{10}$  选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的 2-10 元杂烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$  环烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基或  $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基；

(h)  $R_{11}$  是氧化或选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、未取代的  $C_1-C_{10}$  烷基、未取代的 2-10 元杂烷基、未取代的  $C_3-C_7$  环烷基、未取代的 3-7 元杂环烷基、未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基或芳基或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基；

(i)  $R_{12}$  选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、未取代的  $C_1-C_{10}$  烷基、未取代的 2-10 元杂烷基、未取代的  $C_3-C_7$  环烷基、未取代的 3-7 元杂环烷基、未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基。

2. 权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中

$L_1$  和  $L_2$  是键;

$R_1$ 、 $R_2$  独立地选自苯基、五元杂芳基, 其中, 苯基、五元杂芳基可选进一步被一个或多个选自  $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-COOH$ 、氰基、卤素、 $R_9$ - 取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  的烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的  $C_3-C_7$  的环烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ - 取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基、 $R_{10}$ - 取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基、 $-L_3-C(X_1)R_3$ 、 $-L_3-OR_4$ 、 $-L_3-NR_5R_6$  或  $-L_3-S(O)_mR_7$  的取代基所取代,  $L_3$ 、 $X_1$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $m$ 、 $R_7$  如权利要求 1 所定义。

3. 权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中

$L_1$  和  $L_2$  是键;

$R_1$  选自苯基、吡啶基、呋喃基;

$R_2$  选自苯基;

其中, 苯基、吡啶基、呋喃基可选进一步被一个或多个选自  $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-COOH$ 、氰基、卤素、 $R_9$ - 取代或未取代的  $C_1-C_6$  的烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的  $C_3-C_6$  的环烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的 3-6 元杂环烷基、 $R_{10}$ - 取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基、 $R_{10}$ - 取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基、 $-L_3-C(X_1)R_3$ 、 $-L_3-OR_4$ 、 $-L_3-NR_5R_6$  或  $-L_3-S(O)_mR_7$  的取代基所取代,

其中

(a)  $L_3$  是键、未取代的  $C_1-C_4$  亚烷基;

(b)  $X_1$  选自  $=O$ ;

(c)  $R_3$ 、 $R_7$  独立地选自氢、 $R_9$ - 取代或未取代的  $C_1-C_6$  烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的  $C_3-C_6$  环烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的 3-6 元杂环烷基、 $R_{10}$ - 取代或未取代的芳基或  $R_{10}$ - 取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基、 $-OR_4$  或  $-NR_5R_6$ ;

(d)  $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$  独立地选自氢、 $R_{11}$ - 取代或未取代的  $C_1-C_6$  烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的 2-6 元杂烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的  $C_3-C_6$  环烷基、 $R_9$ - 取代或未取代的 3-6 元杂环烷基、 $R_{10}$ - 取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基或  $R_{10}$ - 取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基,

其中  $R_5$  和  $R_6$  任选地与它们所连接的氮合在一起形成未取代的 3-6 元杂环烷基;

(e)  $m$  选自 0-2 的整数;

(f)  $R_9$  是氧代或选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、未取代的  $C_1-C_6$  烷基、未取代的 2-6 元杂烷基、未取代的  $C_3-C_6$  环烷基、未取代的 3-6 元杂环烷基、未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基;

(g)  $R_{10}$  选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、未取代的  $C_1-C_6$  烷基、未取代的 2-6 元杂烷基、未取代的  $C_3-C_6$  环烷基、未取代的 3-6 元杂环烷基、未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基。

4. 权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中

$L_1$  和  $L_2$  独立地是键;

$R_1$  选自苯基、吡啶基、呋喃基, 其中, 苯基、吡啶基、呋喃基可选进一步被一个或多个选自卤素、 $R_9$ - 取代或未取代的  $C_1-C_6$  烷基或  $-L_3-C(X_1)R_3$  的取代基所取代。

其中

(a)  $L_3$  是键、未取代的  $C_1-C_4$  亚烷基；

(b)  $X_1$  选自  $=O$ ；

(c)  $R_3$  独立地选自  $-NR_5R_6$ ；

(d)  $R_5$ 、 $R_6$  独立地选自氢、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1-C_6$  烷基，或者  $R_5$  和  $R_6$  任选地与它们所连接的氮合在一起形成未取代的 3-6 元杂环烷基；

(e)  $R_9$  选自未取代的 3-6 元杂环烷基；

$R_2$  选自苯基，其中，苯基可选进一步被一个或多个选自卤素、卤代甲基、 $C_1-C_6$  烷基、 $C_1-C_6$  烷氧基、苯氧基所取代。

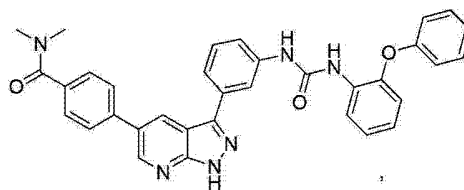
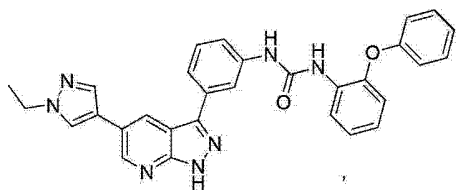
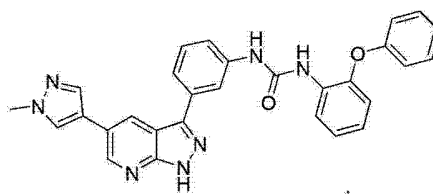
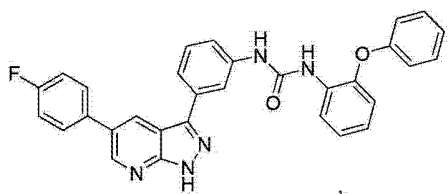
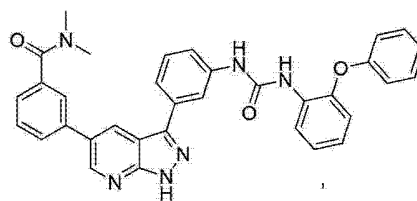
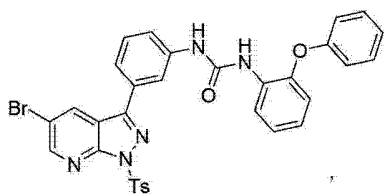
5. 权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐，其中

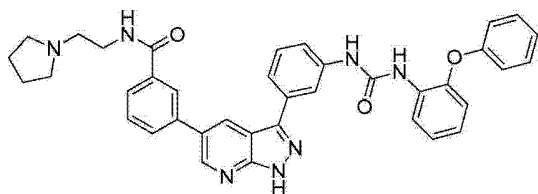
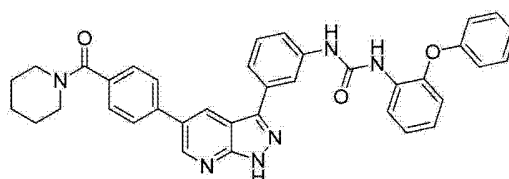
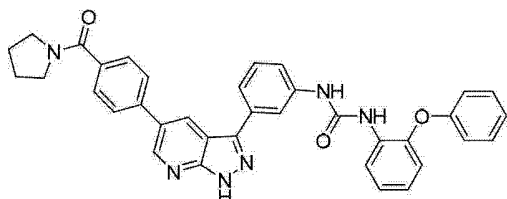
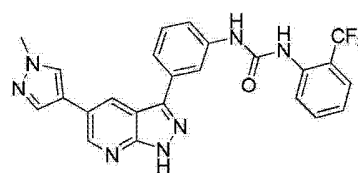
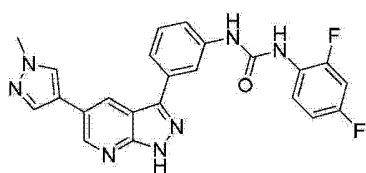
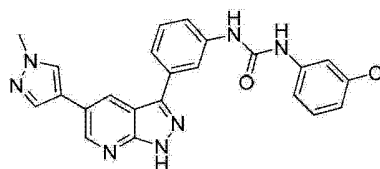
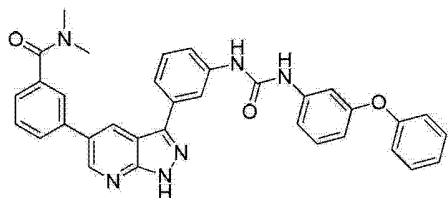
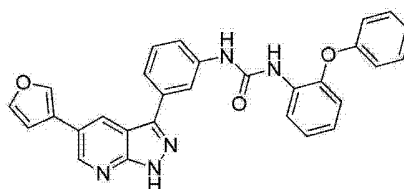
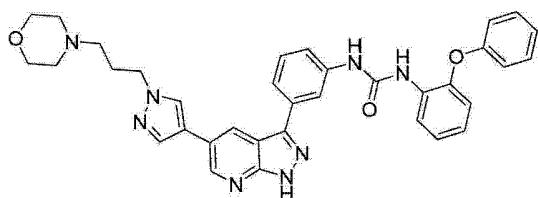
$L_1$  和  $L_2$  独立地是键；

$R_1$  选自苯基、吡唑基、呋喃基，其中，苯基、吡唑基、呋喃基可选进一步被一个或多个选自卤素、甲基、乙基、二甲胺基羰基、吡咯烷-1-羰基、哌啶-1-羰基、3-吗啉丙基、N-(2-(吡咯烷-1-基)乙基)氨基羰基所取代；

$R_2$  选自苯基，其中，苯基可选进一步被一个或多个选自卤素、卤代甲基、苯氧基所取代。

6. 化合物或其药学上可接受的盐，所述化合物选自：





7. 权利要求1至6中任一项的化合物或盐在制备用于治疗有机体中蛋白激酶相关疾病的药物中的用途。

8. 根据权利要求7所述用途,其中所述蛋白激酶相关疾病选自血管内皮生长因子受体相关的疾病、表皮生长因子受体相关的疾病、血小板衍生生长因子受体相关的疾病、胰岛素样生长因子受体相关的疾病或胎肝激酶相关的疾病。

9. 根据权利要求7所述用途,其中所述蛋白激酶相关疾病选自鳞状细胞癌、星形细胞癌、卡波济氏肉瘤、成胶质细胞癌、肺癌、膀胱癌、头和颈癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、神经胶质瘤、结肠直肠癌、肝癌、肾癌、泌尿生殖道癌、胰腺癌或胃肠癌。

10. 根据权利要求7所述用途,其中所述蛋白激酶相关疾病选自糖尿病、过度增殖性疾病、血管发生、炎症性疾病、免疫性疾病或心血管疾病。

## 抑制 IGF-1R 酪氨酸激酶活性的吡啶并吡唑类衍生物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一些新的吡啶并吡唑衍生物或其药学上可接受的盐及其用途。本发明还涉及该类化合物的制备方法以及该类化合物的中间体。

### 背景技术

[0002] 蛋白酪氨酸激酶(Protein Tyrosine Kinases, PTKs)在正常细胞的信号传导机制中具有重要作用,其异常表达将导致许多疾病尤其是肿瘤的产生,因而通过抑制酪氨酸激酶活性,从而恢复生理平衡可以作为一种新的治疗手段。过去十余年里,人们已成功研发了多个基于酪氨酸激酶信号通路的全新癌症治疗药物,同时酪氨酸激酶抑制剂(Tyrosine Kinases Inhibitors, TKIs)具有分子量小、口服有效和耐受性好的特点,已被批准用于多类肿瘤的治疗,如:肺癌、乳腺癌、肾癌、胰腺癌,以及胃肠道癌症和慢性白血病等。

[0003] IGF-1R的中文全称为胰岛素样生长因子1受体,是一个2型酪氨酸激酶跨膜受体,其与IR有近60%的同源性。它的基因定位于15q25-26, DNA全长约100kb,有21个外显因子。它含有约2674个氨基酸,其结构包括2个 $\alpha$ 亚基和2个 $\beta$ 亚基,二者经二硫键连接。 $\alpha$ 亚基位于细胞外,有与配体结合的半胱氨酸区; $\beta$ 亚基可在受体被激活后将信号转导到胞内。

[0004] 能够与IGF-1R结合的配体有两种,即IGF-1和IGF-2,它们与受体结合后可激活受体,并引发一系列的生物学效应。IGF-1和IGF-2与IGF-1R的 $\alpha$ 亚基结合后,可使 $\beta$ 亚基自身磷酸化,激活磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)通路和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路。其中,PI3K/Akt通路的激活能够促进肿瘤细胞的非停泊性生长(anchorage independent growth, AIG),与恶性肿瘤的转移密切相关。同时,MAPK通路可将信号传至核内,启动与细胞增殖有关的靶基因转录,发挥促进细胞增殖、浸润和转移的效应。在一些细胞中,IGF-1R可引起信号转导并使转录活化蛋白(STAT)激活因子磷酸化,抑制细胞增殖和凋亡。此外,IGF-1R的信号转导还可引起细胞的恶性化以及细胞粘附性的改变。

[0005] IGF-1R激活在细胞增殖方面有以下重要作用:(1)可促进有丝分裂;(2)是某些类型细胞转化表型建立和维持的前提及肿瘤发生所必备;(3)可减少肿瘤细胞凋亡。由此导致或加速肿瘤形成和进展。IGF-1R参与了肿瘤的发生发展,其过度表达可建立细胞转化表型,SV40T抗原或激活的ras或两者结合易使3T3细胞转化,而不能使IGF-1R基因破坏的缺陷细胞发生转化(Baserga R. Growth Hom IGF Res, 2000, 10 Suppl A:S43)。许多临床及实验研究显示了IGF-1R在恶性转化中的重要作用,IGF-1R基因敲除的胎鼠中建立的成纤维细胞系(R-)不能被一些常见癌基因中的任何一种转化,包括SV40T抗原,激活的Ras和牛乳头瘤病毒E5蛋白。而重新介入有功能的受体,有会使R-对这些癌基因的恶性转化作用敏感(Morrioe A, De Angelis T, Baserga R. Viro, 1995, 69 (9):5300-5303)。IGF-1R的过表达产生一种配体依赖的转化表型,包括裸鼠中肿瘤的形成(Navarro M, Barenton B, Garandel V, et al. Endocrinology, 1997, 138 (12):5210-5219)。

[0006] 肿瘤细胞的转移是一个非常复杂的过程,它涉及到肿瘤细胞间的解聚、移行、黏附、细胞外基质的降解和重塑等诸多环节。Dun 等(Dunn SE, Ehrlich M, Sharp N JH. *Cancer Res*, 1998, 58 (15):3353-3361)通过研究发现乳腺癌细胞的黏附、浸润和转移与 IGF-1R 有关,通过转染技术阻断转移性乳癌细胞株中 IGF-1R 活化后,这种转移性乳癌细胞株对胶原的黏附降低了 88%,对胶原的侵入降低了 75%;将这种细胞种植到乳房后,肺脏、肝脏和淋巴结等处转移灶的出现明显减少。Long 等(Long L, Rubin R, Brodt P, et al. *Exp Cell Res*, 1998, 238:116-121)通过研究发现,在肺癌细胞中过度表达的 IGF-1R 能增加癌细胞的增殖活性,并增加其在肝癌细胞内浸润和克隆形成的能力。

[0007] 近年来研究发现 IGF-1R 在恶性肿瘤细胞扩散和转移中的主要机制为:(1)上调肿瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)的表达,促进肿瘤血管的形成及肿瘤的生长、转移(Bermont L, Lamielle F, Fauconnet S, et al. *Int J Cancer*, 2000, 85 (1):117)。(2)上调尿激酶型纤溶酶原活化因子(uPA)及金属蛋白酶(MMP)表达水平,促进细胞外基质(ECM)的降解、促进肿瘤细胞的转移(Dunn SE, Torres JV, Oh Js. *Cancer Res*, 2001, 61 (4):1367-1374)。(3)促进肿瘤细胞内钙黏蛋白、纤黏连蛋白、层黏连蛋白等黏附分子的合成,增加其对内皮、基底膜的黏附性,从而促进肿瘤细胞转移。

[0008] IGF-1R 在恶性神经系统肿瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、肝癌等多种恶性肿瘤组织中呈高表达状态,其酪氨酸激酶活性也有所增强(Surmacz E. *Onco gene*, 2003, 22:6589-6597; Leroith D, Roberts CT. *Cancer Lett*, 2003, 195:127-137)。Jerome 等(Jerome L, Shiry L. *Semin Oncol*, 2004, 31:54-63)研究表明,IGF-1R 在乳腺癌中有高表达和高活性,IGF-1R 介导乳腺正常或恶性的细胞有丝分裂等功能。周吉辉等(范子笼, 杨冬华. 癌症, 2000, 19 (2):150-155)报道应用 RT-PCR 技术证实胎肝内存在 IGF-1RmRNA 的表达,说明 IGF-1R 对胎肝的正常分化发育具有生理调节作用,而 IGF-1R 在胎肝及正常肝组织的表达均低于癌旁肝组织及肝癌组织,IGF-1R 的过量表达(非基因突变)是配基依赖性细胞转化的基础,可能是引起肝细胞恶性转化的重要原因。子宫内膜腺癌中 IGF-1R 的表达,显著高于正常组和良性增生内膜,可能是 IGF-1R 通过与配体结合,并通过与下游底物分子(如 IRS-1、MAPK 等)的相互作用,通过与细胞癌基因(如:c-myc、c-mycb、c-src 等)的协同表达(Brys M, Semezuk A. *Gynecol Oncol*, 2004, 98 (1):173-180),促使胞内一系列蛋白发生磷酸化,进而诱导核内某些基因的表达,最终导致细胞癌变。BRCA1 是一个抑癌基因, Qin 等(Qin H, Sun Y, Benveniste EN. *J Biol Chem*, 1999, 274 (41):29130-29137)研究表明在一些细胞表面表现出抑制 IGF-1R 活性,提示 BRCA1 的活性可抑制 IGF-1R 表达,变异的 BRCA1 缺失转录活性,其抑 IGF-1R 的能力也减弱。Girnita 等(Girnita L, Girnita A, Larsson O, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (14):8247-8252)发现 p53 基因通过 Mdm2 间接下调 IGF-1R 的表达,抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞的凋亡。以上均说明高表达的 IGF-1R 参与了恶性肿瘤的发生与发展。

[0009] 目前针对 IGF-1R 酪氨酸激酶抑制剂有苯并吡唑类(W02006080450、W02003078402A1、W02008/074749A1、JP4257389、JP2009108069A、W02009/013126A1、FR2831537A1、W02007056155A1、W02003035065A1、W02004063151A2、W02008046802A1、CN200680024227.3、W02008021369A2)、嘧啶(吡啶)并吡唑类(W02007/009773A1、W002076986、W003080064A1、W02007/068619A1、W02007099166A1)、吡嗪(吡啶)并

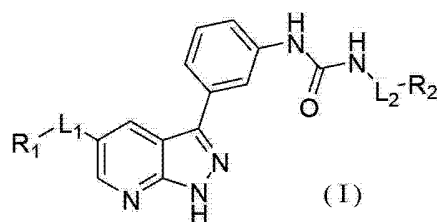
吡唑类(WO2008150799A1、WO2005037836A2、WO2005044270A1)、嘧啶并吡咯类(WO02092599A1、WO2004043962A1、WO200107275A1、WO2000017202A1、WO2009020990A1、WO2007115620A2)、吡唑并吡咯类(WO2007/009898A1、WO2007/138017A1、WO2007/068637A1、WO2007099171A2)、吡啶并吡咯类(WO2008060907A2、WO2005095399A2、WO2004098520A2、US20070129364、WO2009100282A1、US20070032512)、三嗪类(WO2009111531A1、WO2008131050A1、WO2007056170A2、WO2009015254A1、WO2008005956A2)、喹啉类(US05650415、WO2005087743A1、WO2007029107A1、WO2007029106A1)、吡唑类(WO2008086128A2)、噻唑类(WO2008079873A2、WO2008124757A1、WO2009011871A2)、吡咯类(WO03/035614A2、WO03/035615A2、WO03/035616A2、WO2005/009373A2、WO2005009957A1)、吲哚酮类(WO2000055159A2、WO2008145398A1、WO2004/014851A2、WO2000056710A1、WO2004/014300A2)、嘧啶类(WO2006021454A2、US20090149469、WO2006074057A2、WO2003018021A1、WO2007031745A1、WO2003048133A1)等。这些化合物全部被描述为用于治疗 IGF-1R 的酪氨酸激酶抑制剂。

## 发明内容

[0010] 本发明涉及一类新型吡啶并吡唑类衍生物,它们表现出对蛋白激酶的活性具有调节作用,同时对肿瘤细胞的增殖具有抑制能力。此外,本发明还涉及公开化合物的制备方法及其中间体。

[0011] 本发明提供了具有式 I 结构的化合物或其药学上可接受的盐:

[0012]



[0013] 其中

[0014]  $L_1$  和  $L_2$  独立地是键、 $-S(O)_n-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $C_1-C_{10}$  亚烷基或 2-10 元杂亚烷基,其中  $n$  选自 0-2 的整数;

[0015]  $R_1$ 、 $R_2$  独立地选自  $C_3-C_7$  环烷基、3-7 元杂环烷基、 $C_6-C_{10}$  芳基、 $C_5-C_{10}$  杂芳基,其中,  $C_3-C_7$  环烷基、 $C_3-C_7$  元杂环烷基可选进一步被氧代,或  $C_3-C_7$  环烷基、3-7 元杂环烷基、 $C_6-C_{10}$  芳基、 $C_5-C_{10}$  杂芳基可选进一步被一个或多个选自  $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-COOH$ 、氰基、卤素、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  的烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$  的环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基、 $-L_3-C(X_1)R_3$ 、 $-L_3-OR_4$ 、 $-L_3-NR_5R_6$  或  $-L_3-S(O)_mR_7$  的取代基所取代,其中

[0016] (a)  $L_3$  是键、未取代的  $C_1-C_{10}$  亚烷基或未取代的 2-10 元杂亚烷基;

[0017] (b)  $X_1$  选自  $=S$ 、 $=O$  或  $=NR_8$ ,其中  $R_8$  选自氢、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  的烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 2-10 元杂烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$  的环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6-C_{10}$  芳基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5-C_{10}$  杂芳基;

[0018] (c)  $R_3$ 、 $R_7$  独立地选自氢、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3-C_7$



环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的芳基或  $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基、 $-OR_4$  或  $-NR_5R_6$ ；

[0019] (d)  $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$  独立地选自氢、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_{10}$  烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 2-10 元杂烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3$ - $C_7$  环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基或  $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基，

[0020] 其中  $R_5$  和  $R_6$  任选地与它们所连接的氮合在一起形成未取代的 3-7 元杂环烷基或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基；

[0021] (e)  $m$  选自 0-2 的整数；

[0022] (f)  $R_9$  是氧代或选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_{10}$  烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的 2-10 元杂烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_3$ - $C_7$  环烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基或  $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基；

[0023] (g)  $R_{10}$  选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_{10}$  烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的 2-10 元杂烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_3$ - $C_7$  环烷基、 $R_{11}$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基或  $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基；

[0024] (h)  $R_{11}$  是氧代或选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、未取代的  $C_1$ - $C_{10}$  烷基、未取代的 2-10 元杂烷基、未取代的  $C_3$ - $C_7$  环烷基、未取代的 3-7 元杂环烷基、未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基或  $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基；

[0025] (i)  $R_{12}$  选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、未取代的  $C_1$ - $C_{10}$  烷基、未取代的 2-10 元杂烷基、未取代的  $C_3$ - $C_7$  环烷基、未取代的 3-7 元杂环烷基、未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基或  $R_{12}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基。

[0026] 进一步，本发明提供的结构如式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐中，

[0027]  $L_1$  和  $L_2$  进一步地是键。

[0028] 本发明中的  $R_1$ 、 $R_2$  进一步地可独立地选自苯基、五元杂芳基，其中，苯基、五元杂芳基可选进一步被一个或多个选自  $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-COOH$ 、氰基、卤素、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_{10}$  的烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3$ - $C_7$  的环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-7 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基、 $-L_3-C(X_1)R_3$ 、 $-L_3-OR_4$ 、 $-L_3-NR_5R_6$  或  $-L_3-S(O)_mR_7$  的取代基所取代， $L_3$ 、 $X_1$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $m$ 、 $R_7$  如上所定义；

[0029]  $R_1$  再进一步地可选自苯基、吡唑基、呋喃基；

[0030]  $R_2$  再进一步地可选自苯基；

[0031] 其中，苯基、吡唑基、呋喃基可选进一步被一个或多个选自  $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-COOH$ 、氰基、卤素、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_6$  的烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3$ - $C_6$  的环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-6 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基、 $-L_3-C(X_1)R_3$ 、 $-L_3-OR_4$ 、 $-L_3-NR_5R_6$  或  $-L_3-S(O)_mR_7$  的取代基所取代，

[0032] 其中

[0033] (a)  $L_3$  是键、未取代的  $C_1$ - $C_4$  亚烷基；

[0034] (b)  $X_1$  选自  $=O$ ；

[0035] (c)  $R_3$ 、 $R_7$  独立地选自氢、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3$ - $C_6$

环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-6 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的芳基或  $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基、 $-OR_4$  或  $-NR_5R_6$ ；

[0036] (d)  $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$  独立地选自氢、 $R_{11}$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 2-6 元杂烷基、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_3$ - $C_6$  环烷基、 $R_9$ -取代或未取代的 3-6 元杂环烷基、 $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基或  $R_{10}$ -取代或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基，

[0037] 其中  $R_5$  和  $R_6$  任选地与它们所连接的氮合在一起形成未取代的 3-6 元杂环烷基；

[0038] (e)  $m$  选自 0-2 的整数；

[0039] (f)  $R_9$  是氧代或选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、未取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基、未取代的 2-6 元杂烷基、未取代的  $C_3$ - $C_6$  环烷基、未取代的 3-6 元杂环烷基、未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基；

[0040] (g)  $R_{10}$  选自羟基、羧基、氨基、氰基、卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、未取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基、未取代的 2-6 元杂烷基、未取代的  $C_3$ - $C_6$  环烷基、未取代的 3-6 元杂环烷基、未取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基或未取代的  $C_5$ - $C_{10}$  杂芳基；

[0041]  $R_1$  更进一步地可选自苯基、吡啶基、呋喃基，其中，苯基、吡啶基、呋喃基可选进一步被一个或多个选自卤素、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基或  $-L_3-C(X_1)R_3$  的取代基所取代。

[0042] 其中

[0043] (a)  $L_3$  是键、未取代的  $C_1$ - $C_4$  亚烷基；

[0044] (b)  $X_1$  选自 =O；

[0045] (c)  $R_3$  独立地选自  $-NR_5R_6$ ；

[0046] (d)  $R_5$ 、 $R_6$  独立地选自氢、 $R_9$ -取代或未取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基，或者  $R_5$  和  $R_6$  任选地与它们所连接的氮合在一起形成未取代的 3-6 元杂环烷基；

[0047] (e)  $R_9$  选自未取代的 3-6 元杂环烷基；

[0048]  $R_2$  更进一步地可选自苯基，其中，苯基可选进一步被一个或多个选自卤素、卤代甲基、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基、苯氧基所取代；

[0049]  $R_1$  更优选地选自苯基、吡啶基、呋喃基，其中，苯基、吡啶基、呋喃基可选进一步被一个或多个选自卤素、甲基、乙基、二甲胺基羰基、吡咯烷-1-羰基、哌啶-1-羰基、3-吗啉丙基、N-(2-(吡咯烷-1-基)乙基)氨基羰基所取代；

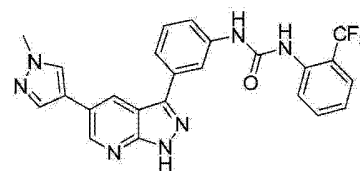
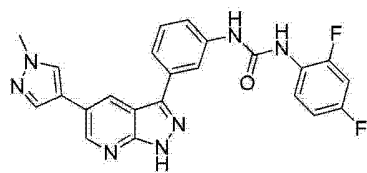
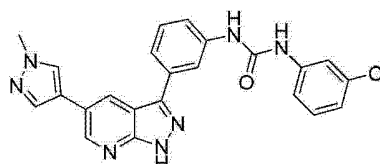
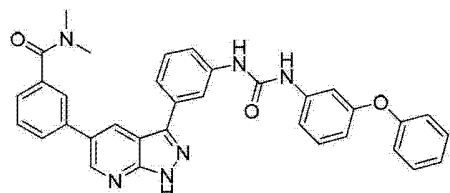
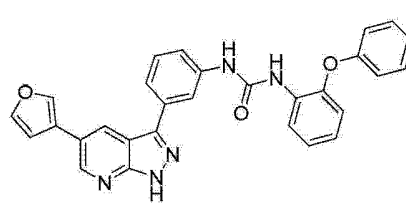
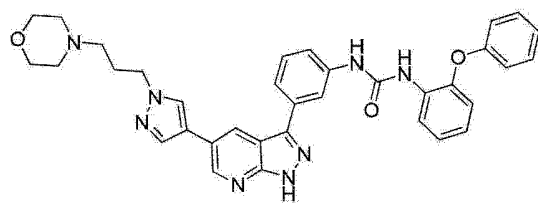
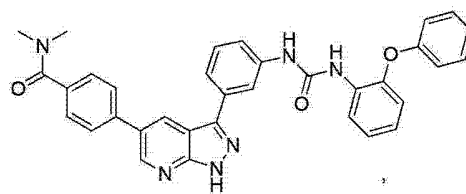
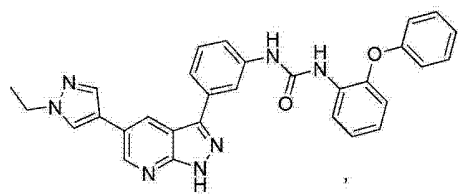
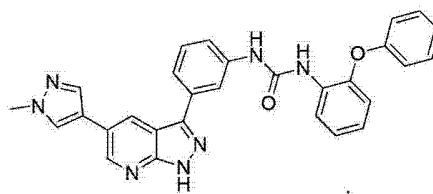
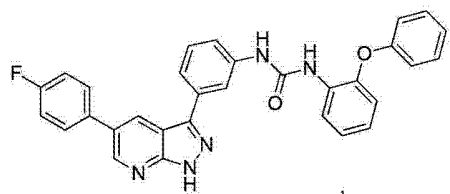
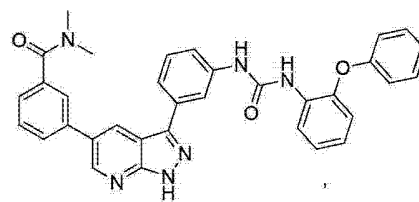
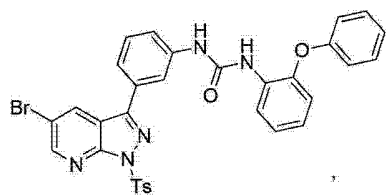
[0050]  $R_2$  更优选地选自苯基，其中，苯基可选进一步被一个或多个选自卤素、卤代甲基、苯氧基所取代；

[0051] 本发明中的“可选进一步被……基团所取代”是指前面所指的各基团可以“被……基团所取代”，也可以不“被……基团所取代”。

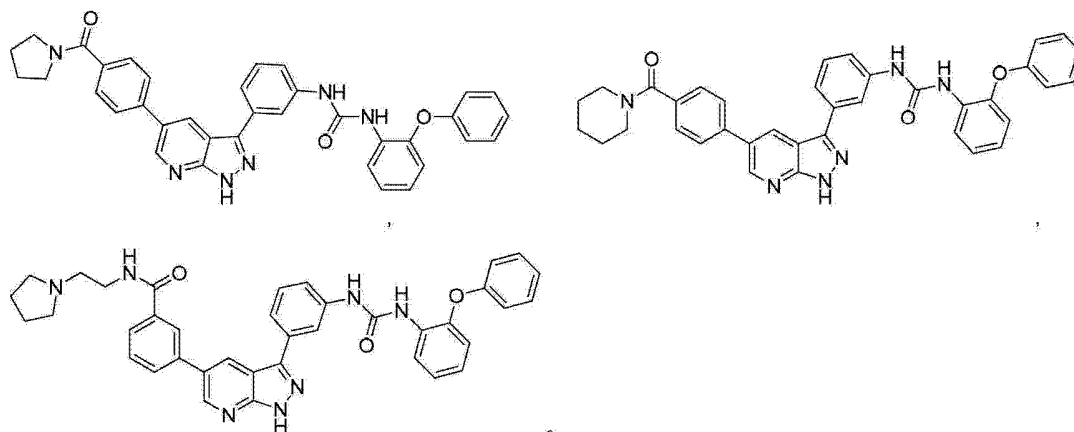
[0052] 在一些实施方案中，“被一个或多个基团取代”是指在指定的原子或基团中的一个、两个、三个或四个氢原子分别被指定范围的基团中选出的相同或不同的基团替换。

[0053] 本发明通式(I)所示的化合物优选化合物包括，但不限于：

[0054]



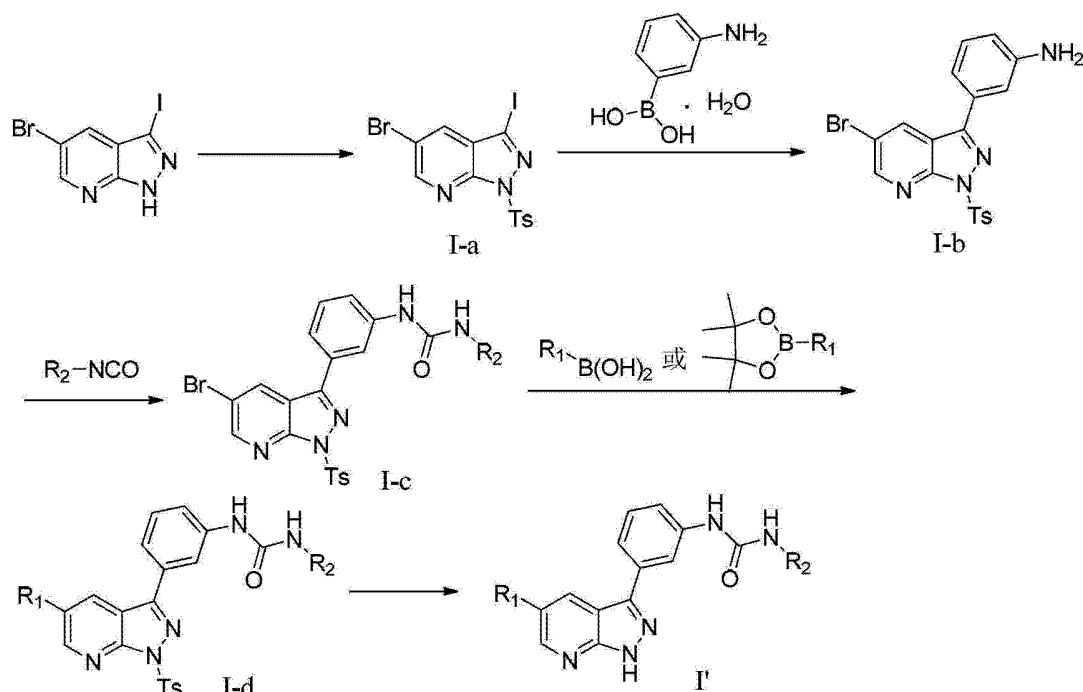
[0055]



[0056] 本发明化合物的合成方法

[0057] 本发明通式(I')表示的化合物或其盐主要通过路线A来合成：

[0058]



[0059] 其中, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 如前所述, 5-溴-3-碘-1H-吡唑[3,4-b]吡啶与对甲苯磺酰氯反应生成式(I-a), 式(I-a)与3-氨基苯硼酸进行偶联得到式(I-b), 式(I-b)与R<sub>2</sub>-NCO反应生成式(I-c), 式(I-c)与R<sub>1</sub>-B(OH)<sub>2</sub>或R<sub>1</sub>取代的硼酸频哪醇酯偶联生成式(I-d), 式(I-d)在碱性条件下脱Ts得到式(I')类化合物。

[0060] 所选的偶联催化剂包括(但不限于)二(三苯基膦)二氯化钯、四三苯基膦钯、醋酸钯、(dppf)PdCl<sub>2</sub>等, 优选四三苯基膦钯。

[0061] 本发明涉及的通式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐, 可应用于制备用于治疗有机体中蛋白激酶相关疾病的药物。

[0062] 作为优选, 所述蛋白激酶相关疾病选自血管内皮生长因子受体相关的疾病、表皮生长因子受体相关的疾病、血小板衍生生长因子受体相关的疾病、胰岛素样生长因子受体相关的疾病或胎肝激酶相关的疾病。

[0063] 作为优选, 所述蛋白激酶相关疾病选自鳞状细胞癌、星形细胞癌、卡波济氏肉瘤、

成胶质细胞癌、肺癌、膀胱癌、头和颈癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、神经胶质瘤、结肠直肠癌、肝癌、肾癌、泌尿生殖道癌、胰腺癌或胃肠癌。

[0064] 作为优选,所述蛋白激酶相关疾病选自糖尿病、过度增殖性疾病、血管发生、炎症性疾病、免疫性疾病或心血管疾病。

[0065] 定义

[0066] 本文所用的缩写词具有其化学和生物学领域的常规含义。

[0067] 除非另外说明,在说明书和权利要求中使用的以下术语具有下面讨论的含义:

[0068] 术语“烷基”本身或作为另一个取代基的一部分是指直链(即不分支)或支链或环状的烃基或其组合,它们可以是完全饱和、单或多不饱和的,并且可包括具有指定的碳原子数(即  $C_1$ - $C_{10}$  是指 1 至 10 个碳)的二价和多价基团。饱和烃基的实例包括但不限于如下基团,诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基,以及例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基等的同系物和异构体。不饱和烃基是具有一个或多个双键或三键的基团。不饱和烃基的实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-和 3-丙炔基、3-丁炔基和高级的同系物和异构体。

[0069] 术语“亚烷基”本身或作为另一个取代基的一部分是指衍生自烷基的二价基团,例如,不限于  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH=CHCH_2-$ 、 $-CH_2C\equiv CCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH(CH_2CH_2CH_3)CH_2$ 。在本发明中,烃基(或亚烃基)通常具有 1-24 个碳原子,具有 10 个或更少碳原子的基团是优选的。“低级烃基”或“低级亚烃基”是短链烃基或亚烃基,通常具有 8 个或更少的碳原子。

[0070] 术语“杂烷基”本身或与另一个术语相组合是指稳定的直链或支链或环状烃基或其组合,它们由至少一个碳原子和至少一个选自 O、N、P、Si 和 S 的杂原子所组成,其中氮、磷和硫原子可任选地被氧化并且氮杂原子可任选地被季铵化。杂原子 O、N、P、S 和 Si 可位于杂烷基的任何内部位置或位于该烷基与分子的其余部分相连接的位置。其实例包括但不限于  $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ 、 $-CH=CH-O-CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-CH=N-OCH_3$ 、 $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 、 $O-CH_3$ 、 $-O-CH_2-CH_3$  和  $-CN$ 。最多可以有两个或三个连续的杂原子,例如  $-CH_2-NH-OCH_3$  和  $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ 。类似地术语“杂亚烷基”本身或作为另一个取代基的一部分是指衍生自杂烷基的二价基团,例如,不限于  $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$  和  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 。对于杂亚烷基,杂原子还可以在链末端的任一端或两端(例如,亚烷基氧代、亚烷基二氧化、亚烷基氨基、亚烷基二氨基等)。对于亚烷基和杂亚烷基连接基而言,连接基结构式的书写方向对于连接基的方向没有任何暗示。例如式  $-C(O)OR'$  同时表示  $-C(O)OR'$  和  $-R'OC(O)-$  如上所述,本文所用的杂烷基包括通过杂原子与分子的其余部分相连接的那些基团,例如  $-C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-OR'$ 、 $-SR'$  和 / 或  $-SO_2R'$ 。当在提到“杂烷基”之后又提到具体的杂烷基诸如  $-NR'R''$  等时,应当理解术语杂烷基和  $-NR'R''$  并不是重复的或互相排斥的。相反,列举具体的杂烷基是为了增加清楚性。因此,在本文中,术语“杂烷基”不应该解释为不包括具体的杂烷基诸如  $-NR'R''$  等。

[0071] 术语“环烷基”和“杂环烷基”本身或与其它术语的组合分别代表“烷基”和“环烷基”的环状形式。另外,对于杂环烷基,杂原子可位于杂环与分子的其余部分相连接的位置。环烷基的实例包括但不限于环戊基、环己基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚基等。杂环烷

基的实例包括但不限于 1-(1, 2, 5, 6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基等。术语“亚环烷基”和“亚杂环烷基”分别是指环烷基和杂环烷基的二价衍生物。

[0072] 术语“卤代”或“卤素”本身或作为另一个取代基的一部分是指氟、氯、溴或碘原子。另外，术语诸如“卤代烷基”包括单卤代烷基和多卤代烷基。例如，术语“卤代(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基”包括但不限于三氟甲基、2, 2, 2-三氟乙基、4-氯丁基、3-溴丙基等。

[0073] 术语“芳基”是指多不饱和的芳香族的烃取代基，它们可以是单环或稠合在一起或共价连接的多环（优选 1-3 个环）。术语“杂芳基”是指含有 1-4 个（在多环的情况中，是指在每一个单独的环中）选自 N、O 和 S 的杂原子的芳基（或环），其中氮和硫原子任选地被氧化，并且氮原子任选地被季铵化。杂芳基可通过碳或杂原子连接到分子的其余部分上。芳基和杂芳基的非限制性实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吡啶基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-喹啉基和 6-喹啉基。所有上述芳基和杂芳基环的取代基均可选自以下所述的可接受的取代基。术语“亚芳基”和“亚杂芳基”分别是指芳基和杂芳基的二价基团。

[0074] 在杂烷基、杂环烷基或杂芳基包括成员的具体数目（例如“3-7 元”）的情况下，术语“成员”是指碳或杂原子。

[0075] 本文所用的术语“氧代”是指与碳原子通过双键结合的氧。

[0076] 所有的上述术语（例如“烷基”、“杂烷基”、“环烷基”和“杂环烷基”、“芳基”、“杂芳基”及其二价基团衍生物）均包括所述基团的取代和未取代的形式。下面提供各种类型基团的优选取代基。

[0077] 烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基一价和二价衍生物基团（包括通常被称作亚烷基、链烯基、杂亚烷基、杂链烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基）的取代基可以是一个或多个选自但不限于下列的基团： $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ ，卤素、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-C(O)NR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)OR'$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$  和  $-NO_2$ ，其数量范围为 0 至  $(2m'+1)$ ，其中  $m'$  是所述基团中碳原子的总数。 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$  和  $R''''$  均优选独立地是指氢、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基（例如被 1-3 个卤素取代的芳基）、取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基或芳基烷基。当本发明化合物包括一个以上的 R 基团、例如当存在一个以上的这些基团时，所有的 R 基团均独立地选自  $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$  和  $R''''$  基团。当  $R'$  和  $R''$  与相同氮原子相连接时，它们可与氮原子合在一起形成 4-、5-、6- 或 7- 元的环。例如， $-NR'R''$  还包括但不限于 1-吡咯烷基和 4-吗啉基。从取代基的以上讨论来看，本领域技术人员将会理解，术语“烷基”包括与氢基团之外的基团相结合的碳原子，例如卤代烷基（例如  $-CF_3$  和  $-CH_2CF_3$ ）和酰基（例如  $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$  等）。

[0078] 与以上关于烷基所述的取代基相类似，芳基和杂芳基（及其二价衍生物）的示例

性取代基是多种多样的并且选自例如：卤素、 $-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、卤素、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-C(O)NR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)OR'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$  和  $-NO_2$ 、 $-R'$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、氟代 (C1-C4) 烷基氧代和氟代 (C1-C4) 烷基，其数量范围为零至芳环系上开放价键的总数；并且其中  $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$  和  $R''''$  优选独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。当本发明化合物包括一个以主的 R 基团、例如当存在一个以上的这些基团时，所有的 R 基团均独立地选自  $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$  和  $R''''$  基团。

[0079] “药学上可接受的盐”表示保留母体化合物的生物有效性和性质的那些盐。这类盐包括：

[0080] (1) 与酸成盐，通过母体化合物的游离碱与无机酸或有机酸的反应而得，无机酸例如(但不限于) 盐酸、氢溴酸、硝酸、磷酸、偏磷酸、硫酸、亚硫酸和高氯酸等，有机酸例如(但不限于) 乙酸、丙酸、丙烯酸、草酸、(D) 或 (L) 苹果酸、富马酸、马来酸、羟基苯甲酸、 $\gamma$ -羟基丁酸、甲氧基苯甲酸、邻苯二甲酸、甲磺酸、乙磺酸、萘-1-磺酸、萘-2-磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、扁桃酸、琥珀酸或丙二酸等。

[0081] (2) 存在于母体化合物中的酸性质子被金属离子代替或者与有机碱配位化合所生成的盐，金属例子例如碱金属离子、碱土金属离子或铝离子，有机碱例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲基葡糖胺等。

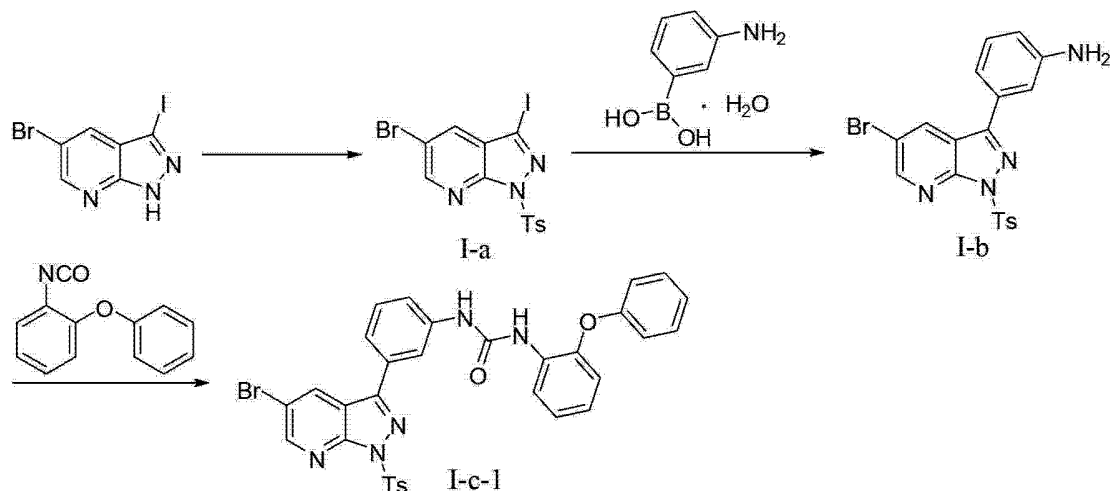
## 具体实施方式

[0082] 给出下列制备例和实施例，使本领域技术人员能够更清楚地理解和实施本发明。它们不应被解释为限制本发明的范围，仅仅是其例证和代表。

[0083] 合成实施例

[0084] 实施例 1：1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1)

[0085]



[0086] 步骤 1

[0087] 2.00g (6.17mmol) 5-溴-3-碘-1H-吡唑[3,4-b]吡啶溶于 25mL 二氯甲烷中，加

入 1.41g (7.4mmol) 对甲苯磺酰氯, 1g 50%NaOH 水溶液, 再加入 10mL 水, 0.1g (0.31mmol) 四丁基溴化铵, 室温反应 24 小时后, 倒入水中, 分液, 水相再用二氯甲烷萃取一次后, 合并有机相, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液加入 100~200 目硅胶制砂, 柱层析, 经石油醚:乙酸乙酯=1:1 洗脱得到 2.55g (86%) 的 5-溴-3-碘-1-对甲苯磺酰基-1H-吡啶 [3,4-b] 吡啶 (I-a), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.89 (d, 1H, -ArH), 8.37 (d, 1H, -ArH), 7.94 (d, 2H, 2×-ArH), 7.46 (d, 2H, 2×-ArH), 2.36 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>);

[0088] ESI-MS: 477.8 [M+H]<sup>+</sup>.

[0089] 步骤 2

[0090] 向 2.55g (5.33mmol) 5-溴-3-碘-1-对甲苯磺酰基-1H-吡啶 [3,4-b] 吡啶 (I-a), 1g (6.45mmol) 3-氨基苯硼酸一水合物, 0.44g (0.54mmol) (dppf)PdCl<sub>2</sub> 的混合物中加入 120mL 乙腈, 15mL 2M. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液, 升温至 80℃ 反应 18 小时, 浓缩除去乙腈, 残留物加入适量水, 二氯甲烷萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液加入 100~200 目硅胶制砂, 柱层析, 经石油醚:乙酸乙酯=2:1 洗脱, 得到 0.4g (17%) 3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡啶 [3,4-b] 吡啶-3-基) 苯胺 (I-b), 为白色固体。

[0091] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.88 (d, 1H, -ArH), 8.79 (d, 1H, -ArH), 7.95 (d, 2H, 2×-ArH), 7.44 (d, 2H, 2×-ArH), 7.14~7.24 (m, 3H, 3×-ArH), 6.75 (d, 1H, -ArH), 5.39 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 2.34 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>);

[0092] ESI-MS: 443.0 [M+H]<sup>+</sup>, 464.9 [M+Na]<sup>+</sup>.

[0093] 步骤 3

[0094] 0.37g (0.83mmol) 3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡啶 [3,4-b] 吡啶-3-基) 苯胺 (I-b) 溶于 10ml 四氢呋喃中, 加入 0.23mL (1.27mmol) 2-苯氧基苯异氰酸酯, 室温反应 16 小时, 加入 100~200 目硅胶, 浓缩制砂, 柱层析得 0.42g (75%) 标题化合物, 为白色固体。

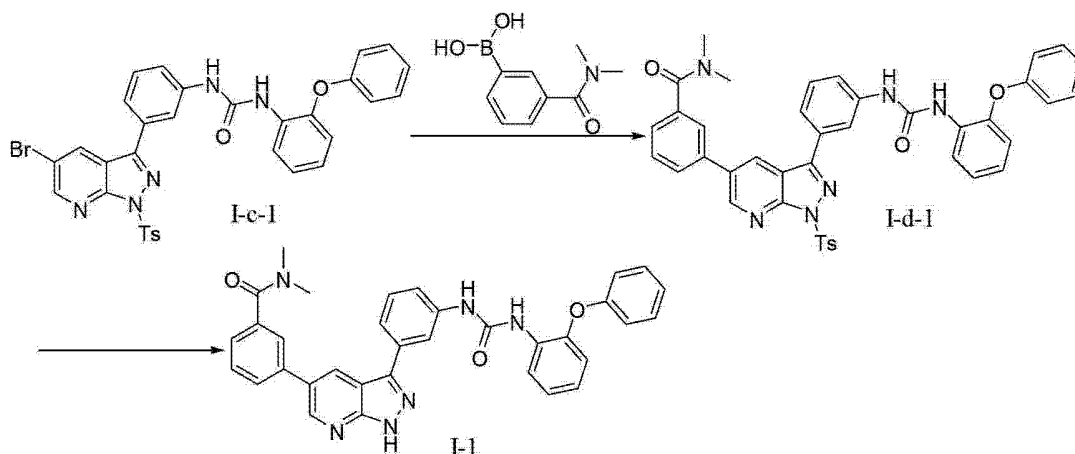
[0095] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.58 (s, 1H, -NH-), 8.91 (d, 1H, -ArH), 8.87 (d, 1H, -ArH), 8.54 (s, 1H, -NH-), 8.33 (d, 1H, -ArH), 8.04 (s, 1H, -ArH), 7.97 (d, 2H, 2×-ArH), 7.70 (d, 1H, -ArH), 7.67 (d, 1H, -ArH), 7.42~7.51 (m, 5H, 5×-ArH), 7.13~7.20 (m, 2H, 2×-ArH), 7.09 (d, 2H, 2×-ArH), 6.99 (t, 1H, -ArH), 6.88 (d, 1H, -ArH), 2.34 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>);

[0096] ESI-MS: 654.0 [M+H]<sup>+</sup>, 677.9 [M+Na]<sup>+</sup>.

[0097] 实施例 2: N,N-二甲基-3-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1H-吡啶 [3,4-b] 吡啶-5-基) 苯甲酰胺 (I-1)

[0098]





## [0099] 步骤 1

[0100] 向 30mg (0.045mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1), 10mg(0.052mmol) 3-(二甲氨基甲酰基)苯硼酸, 3mg (4.27  $\mu$ mol) 二(三苯基膦)二氯化钯的混合物中加入 5ml DMF (N,N-二甲基甲酰胺, 下同), 0.1ml 2M.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液, 120 $^\circ\text{C}$  反应 0.5 小时, 浓缩除去 DMF, 残留物加入适量水, 二氯甲烷萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液加入 100~200 目硅胶, 浓缩制砂, 柱层析, 经二氯甲烷: 甲醇 = 100:1 洗脱得 30mg (91%) N,N-二甲基-3-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酰胺(I-d-1), 为白色固体。

[0101] ESI-MS: 723.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## [0102] 步骤 2

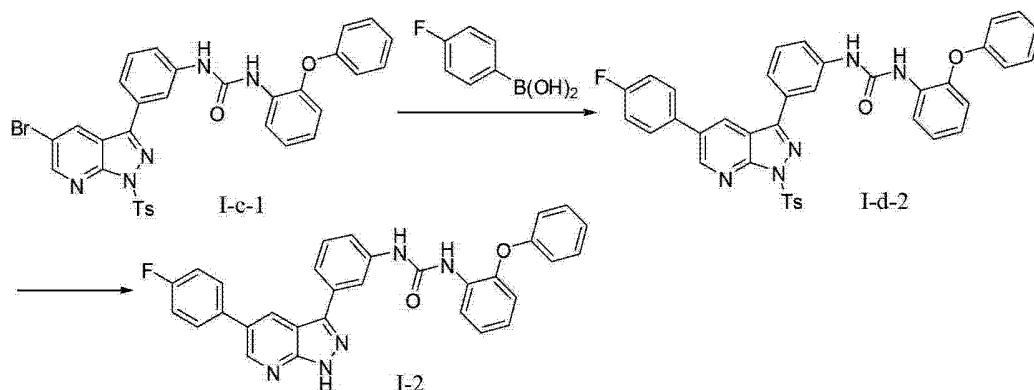
[0103] 30mg(0.042mmol) N,N-二甲基-3-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酰胺(I-d-1) 溶于 2ml 甲醇中, 加入 0.1ml 2M. NaOH 水溶液, 50 $^\circ\text{C}$  反应 0.5 小时, 加入 100~200 目硅胶, 浓缩制砂, 柱层析, 经二氯甲烷: 甲醇 = 50:1 洗脱得 9mg (38%) 的标题化合物(I-1), 为白色固体。

[0104]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13.90 (s, 1H, -NH-), 9.45 (s, 1H, -NH-), 8.91 (s, 1H, -ArH), 8.74 (s, 1H, -ArH), 8.47 (s, 1H, -NH-), 8.33 (d, 1H, -ArH), 8.27 (s, 1H, -ArH), 7.92 (d, 1H, -ArH), 7.84 (brs, 1H, -ArH), 7.73 (s, 1H, -ArH), 7.59 (t, 1H, -ArH), 7.40~7.46 (m, 5H, 5 $\times$ -ArH), 7.12~7.18 (m, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.07 (d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 6.97 (t, 1H, -ArH), 6.86 (d, 1H, -ArH), 3.00 (d, 6H,  $-(\text{CH}_3)_2$ );

[0105] ESI-MS: 569.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 591.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; 567.2  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

[0106] 实施例 3: 1-(3-(5-(4-氟苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-2)

[0107]



## [0108] 步骤 1

[0109] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 30mg (0.045mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑 [3,4-b] 吡啶-3-基) 苯基)-3-(2-苯氧基苯基) 脲(I-c-1) 与 8mg (0.055mmol) 4-氟苯硼酸反应得到 18mg (60%) 的 1-(3-(5-(4-氟苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑 [3,4-b] 吡啶-3-基) 苯基)-3-(2-苯氧基苯基) 脲(I-d-2), 为白色固体。

## [0110] 步骤 2

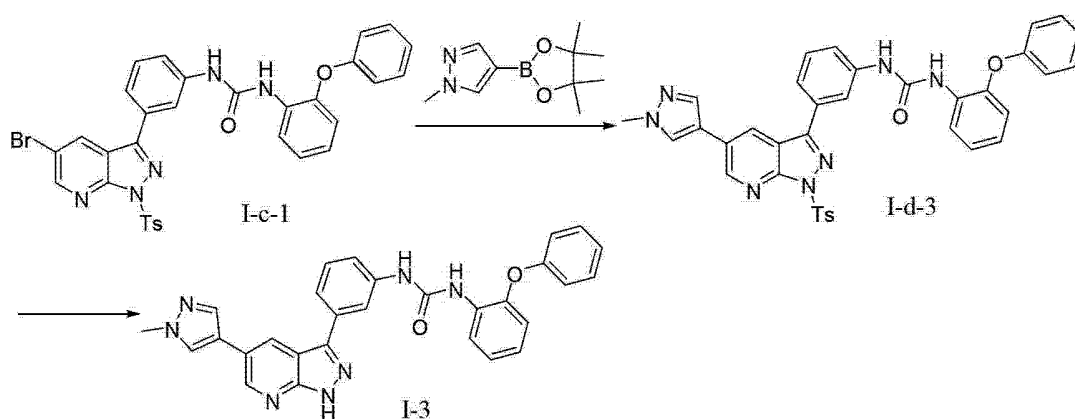
[0111] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 18mg (0.027mmol) 1-(3-(5-(4-氟苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑 [3,4-b] 吡啶-3-基) 苯基)-3-(2-苯氧基苯基) 脲(I-d-2) 反应得 11mg (79%) 标题化合物(I-2), 为白色固体。

[0112] <sup>1</sup>H NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.88(s, 1H, -NH-), 9.44(s, 1H, -NH-), 8.87(s, 1H, -ArH), 8.71(s, 1H, -ArH), 8.48(s, 1H, -NH-), 8.34(d, 1H, -ArH), 8.28(s, 1H, -ArH), 7.89(t, 2H, 2×-ArH), 7.72(brs, 1H, -ArH), 7.33~7.46(m, 6H, 6×-ArH), 7.12~7.18(m, 2H, 2×-ArH), 7.07(d, 2H, 2×-ArH), 6.98(t, 1H, -ArH), 6.86(d, 1H, -ArH);

[0113] ESI-MS: 516.1 [M+H]<sup>+</sup>, 514.2 [M-H]<sup>-</sup>.

[0114] 实施例 4: 1-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑 [3,4-b] 吡啶-3-基) 苯基)-3-(2-苯氧基苯基) 脲(I-3)

## [0115]



## [0116] 步骤 1

[0117] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 30mg (0.046mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑 [3,4-b] 吡啶-3-基) 苯基)-3-(2-苯氧基苯基) 脲(I-c-1) 与 12mg (0.055mmol) 1-甲基吡唑-4-硼酸频哪醇酯反应得到 35mg (87%) 的 1-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑 [3,4-b] 吡啶-3-基) 苯基)-3-(2-苯

氧基苯基) 脲(I-d-3), 为白色固体。

[0118] 步骤 2

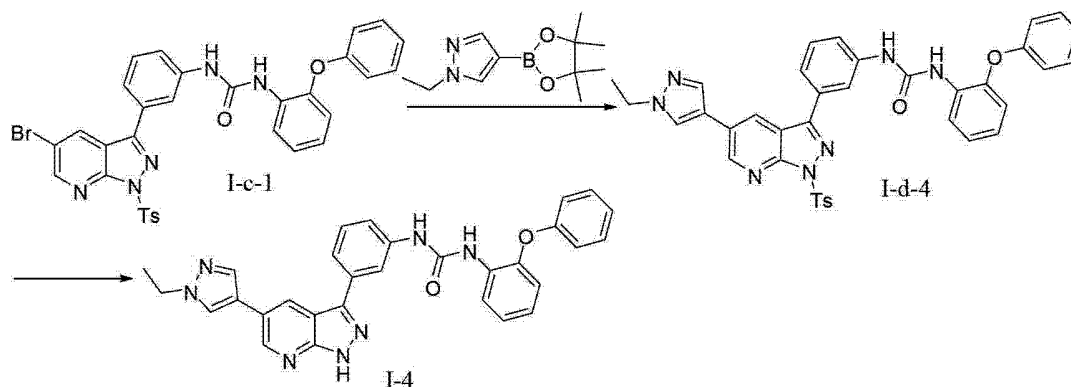
[0119] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 35mg (0.053mmol) 1-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-d-3) 反应得 20mg (75%) 的标题化合物(I-3), 为白色固体。

[0120]  $^1\text{H}$  NMR(500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.75(s, 1H, -NH-), 9.45(s, 1H, -NH-), 8.85(d, 1H, -ArH), 8.63(s, 1H, -ArH), 8.49(s, 1H, -NH-), 8.35(d, 1H, -ArH), 8.30(s, 1H, -ArH), 8.25(s, 1H, -ArH), 8.05(s, 1H, -ArH), 7.69(d, 1H, -ArH), 7.41~7.46(m, 4H, 4 $\times$ -ArH), 7.11~7.18(m, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.08(d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 6.98(t, 1H, -ArH), 6.87(d, 1H, -ArH), 3.90(s, 3H, -CH<sub>3</sub>);

[0121] ESI-MS: 502.3[M+H]<sup>+</sup>.

[0122] 实施例 5: 1-(3-(5-(1-乙基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-4)

[0123]



[0124] 步骤 1

[0125] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 30mg (0.046mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1) 与 12mg (0.055mmol) 1-乙基吡唑-4-硼酸频哪醇酯反应得 23mg (75%) 1-(3-(5-(1-乙基-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-d-4), 为白色固体。

[0126] 步骤 2

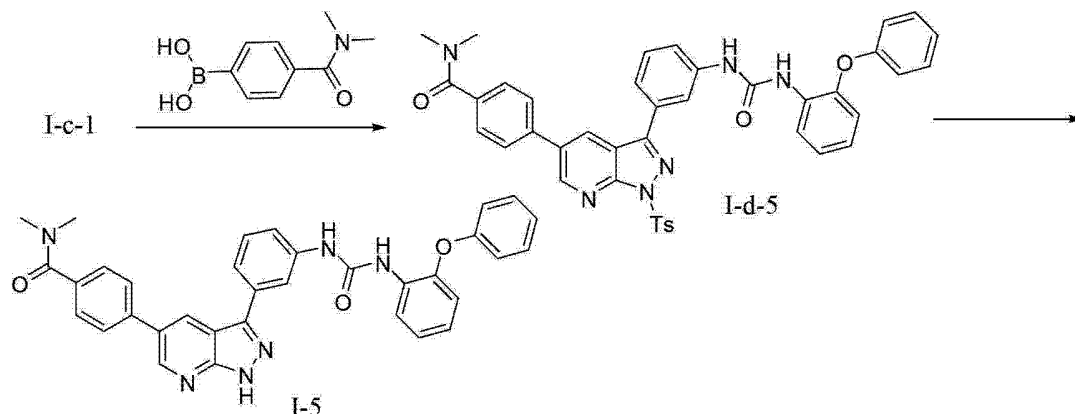
[0127] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 23mg (0.034mmol) 1-(3-(5-(1-乙基-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-d-4) 反应得 16mg (90%) 的标题化合物(I-4), 为白色固体。

[0128]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.81(s, 1H, -NH-), 9.50(s, 1H, -NH-), 8.88(s, 1H, -ArH), 8.66(s, 1H, -ArH), 8.55(s, 1H, -NH-), 8.40(s, 1H, -ArH), 8.37(d, 1H, -ArH), 8.25(s, 1H, -ArH), 8.09(s, 1H, -ArH), 7.70(bs, 1H, -ArH), 7.42~7.47(m, 4H, 4 $\times$ -ArH), 7.12~7.20(m, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.09(d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 6.99(t, 1H, -ArH), 6.88(d, 1H, -ArH), 4.21(q, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.45(t, 3H, -CH<sub>3</sub>);

[0129] ESI-MS: 516.2[M+H]<sup>+</sup>.

[0130] 实施例 6: N,N-二甲基-4-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酰胺(I-5)

[0131]



[0132] 步骤 1

[0133] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 32mg (0.05mmol) 1-(3-(5-溴-1-(4-(二甲氨基甲酰基)苯磺酰基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1)与 11.6mg (0.06mmol) 4-(二甲氨基甲酰基)苯硼酸反应得 29mg (80%) N,N-二甲基-4-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1-(4-(二甲氨基甲酰基)苯磺酰基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酰胺(I-d-5), 为白色固体。

[0134] 步骤 2

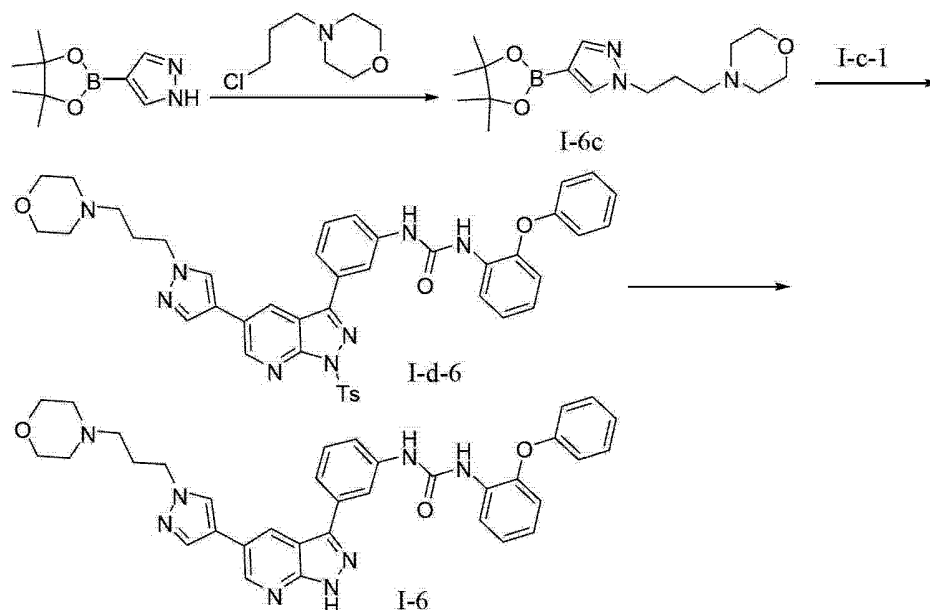
[0135] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 29mg (0.04mmol) N,N-二甲基-4-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1-(4-(二甲氨基甲酰基)苯磺酰基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酰胺(I-d-5)反应得 16mg (70%) 的标题化合物(I-5), 为白色固体。

[0136]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  13.97 (s, 1H, -NH-), 9.49 (s, 1H, -NH-), 8.95 (d, 1H, -ArH), 8.80 (d, 1H, -ArH), 8.53 (s, 1H, -NH-), 8.36 (dd, 1H, -ArH), 8.31 (s, 1H, -ArH), 7.94 (d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.73~7.76 (m, 1H, 2 $\times$ -ArH), 7.57 (d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.40~7.49 (m, 4H, 4 $\times$ -ArH), 7.11~7.19 (m, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.08 (d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.00 (t, 1H, -ArH), 6.84 (d, 1H, -ArH), 3.03 (d, 6H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>);

[0137] ESI-MS: 569.2 [M+H]<sup>+</sup>.

[0138] 实施例 7: 1-(3-(5-(1-(3-吗啉丙基)-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-6)

[0139]



## [0140] 步骤 1

[0141] 100mg (0.52mmol) 吡唑-4-硼酸频那醇酯溶于 3mL DMF, 加入 101mg (0.62mmol) 4-(3-氯丙基)吗啉, 92mg (0.28mmol) 碳酸铯, 升温至 80℃ 反应 4 小时, 浓缩除去 DMF, 残留物加入适量水, 二氯甲烷萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液加入 100~200 目硅胶, 浓缩制砂, 柱层析, 经二氯甲烷: 甲醇 = 25:1 洗脱得 14mg (8%) 1-(3-吗啉丙基)吡唑-4-硼酸频那醇酯(I-6c), 为白色固体。

[0142] ESI-MS: 322.2[M+H]<sup>+</sup>.

## [0143] 步骤 2

[0144] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 24mg (0.036mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1) 与 14mg (0.044mmol) 1-(3-吗啉丙基)吡唑-4-硼酸频那醇酯(I-6c) 反应得 16mg (57%) 1-(3-(5-(1-(3-吗啉丙基)-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-d-6), 为白色固体。

[0145] ESI-MS: 768.9[M+H]<sup>+</sup>, 767[M-H]<sup>-</sup>.

## [0146] 步骤 3

[0147] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 16mg (0.021mmol) 1-(3-(5-(1-(3-吗啉丙基)-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-d-6) 反应得 10mg (78%) 的标题化合物(I-6), 为白色固体。

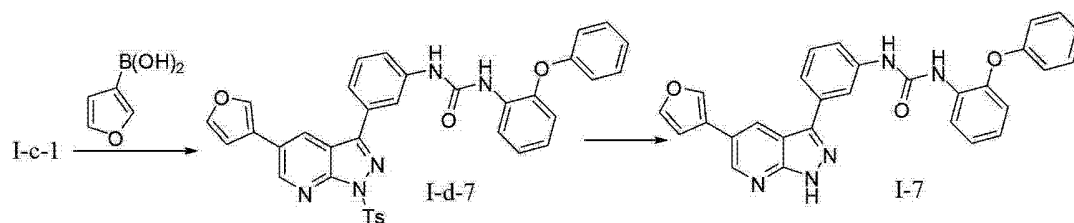
[0148] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.81 (s, 1H, -NH-), 9.51 (s, 1H, -NH-), 8.88 (d, 1H, -ArH), 8.66 (s, 1H, -ArH), 8.54 (s, 1H, -NH-), 8.39 (s, 1H, -ArH), 8.37 (d, 1H, -ArH), 8.27 (s, 1H, -ArH), 8.10 (s, 1H, -ArH), 7.70 (s, 1H, -ArH), 7.42~7.47 (m, 4H, 4×-ArH), 7.12~7.20 (m, 2H, 2×-ArH), 7.09 (d, 2H, 2×-ArH), 6.99 (t, 1H, -ArH), 6.88 (d, 1H, -ArH), 4.20 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.58 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), 2.35 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.30 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.01 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-);

[0149] ESI-MS: 615.2[M+H]<sup>+</sup>.

[0150] 实施例 8: 1-(3-(5-(呋喃-3-基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯

氧基苯基) 脲(I-7)

[0151]



[0152] 步骤 1

[0153] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 20mg (0.03mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1) 与 4mg (0.036mmol) 呋喃-3-硼酸反应得 23mg (78%) 1-(3-(5-(呋喃-3-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-d-7), 为白色固体。

[0154] 步骤 2

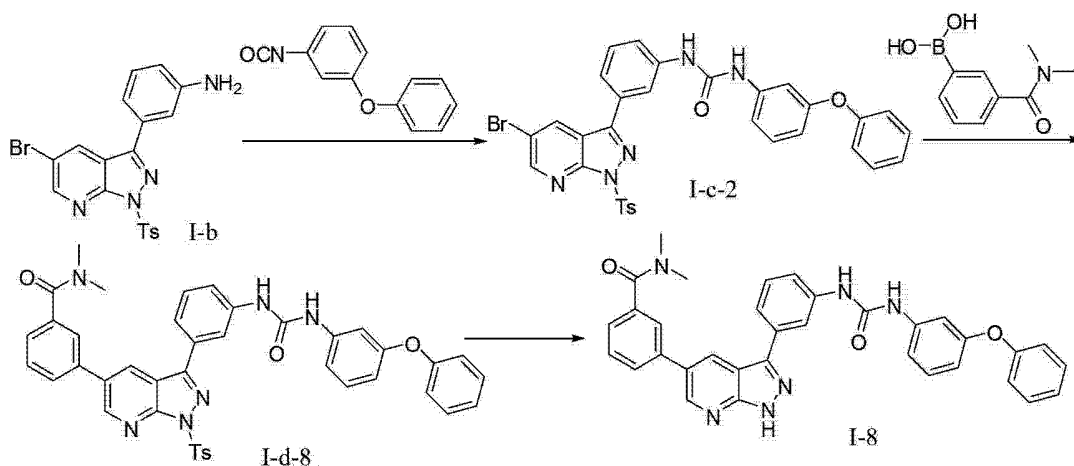
[0155] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 23mg (0.036mmol) 1-(3-(5-(呋喃-3-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-d-7) 反应得 16mg (92%) 的标题化合物(I-7), 为白色固体。

[0156]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13.87(s, 1H, -NH-), 9.49(s, 1H, -NH-), 8.93(s, 1H, -ArH), 8.71(s, 1H, -ArH), 8.54(s, 1H, -NH-), 8.40(s, 1H, -ArH), 8.37(d, 1H, -ArH), 8.27(s, 1H, -ArH), 7.85(s, 1H, -ArH), 7.71(brs, 1H, -ArH), 7.42~7.48(m, 4H, 4 $\times$ -ArH), 7.23(s, 1H, -ArH), 7.18(q, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.09(d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 6.99(t, 1H, -ArH), 6.88(d, 1H, -ArH);

[0157] ESI-MS: 488.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 486.1  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

[0158] 实施例 9 :N,N-二甲基-3-(3-(3-(3-(3-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酰胺(I-8)

[0159]



[0160] 步骤 1

[0161] 使用实施例 1, 步骤 3 的方法, 35mg(0.079mmol) 3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯胺(I-b) 与 25mg (0.12mmol) 3-苯氧基苯异氰酸酯反应得 42mg (81%) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(3-苯氧基苯基)脲(I-c-2), 为白色固体。

[0162] ESI-MS: 654.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## [0163] 步骤 2

[0164] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 42mg (0.06mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(3-苯氧基苯基)脲(I-c-2)与 3-(二甲氨基甲酰基)苯硼酸反应得 51mg 的 N,N-二甲基-3-(3-(3-(3-(3-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酰胺(I-d-8)粗品, 为白色固体。

## [0165] 步骤 3

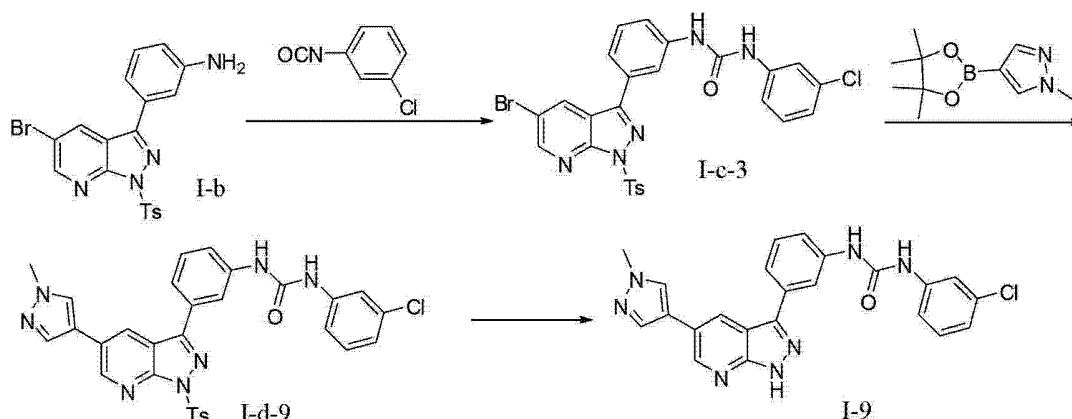
[0166] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 46mg N,N-二甲基-3-(3-(3-(3-(3-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酰胺(I-d-8)粗品反应得 8.8mg (24%, 步骤 2 和 3 的总收率) 的标题化合物(I-8), 为白色固体。

[0167]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.89 (s, 1H, -NH-), 8.91 (d, 1H, -ArH), 8.86 (s, 1H, -NH-), 8.83 (s, 1H, -NH-), 8.74 (s, 1H, -ArH), 8.22 (s, 1H, -ArH), 7.91 (d, 1H, -ArH), 7.84 (s, 1H, -ArH), 7.74 (d, 1H, -ArH), 7.57 (t, 1H, -ArH), 7.38~7.49 (m, 5H, 5 $\times$ -ArH), 7.29 (m, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.13~7.19 (m, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.05 (d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 6.63 (d, 1H, -ArH), 3.00 (d, 6H, (-C $H_3$ ) $_2$ );

[0168] ESI-MS: 569.1 [M+H] $^+$ , 567.1 [M-H] $^-$ .

[0169] 实施例 10: 1-(3-氯苯基)-3-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-9)

## [0170]



## [0171] 步骤 1

[0172] 使用实施例 1, 步骤 3 的方法, 30mg (0.067mmol) 3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯胺(I-b)与 12  $\mu$ l (0.1mmol) 间氯苯异氰酸酯反应得 31mg (77%) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(3-氯苯基)脲(I-c-3), 为白色固体。

[0173] ESI-MS: 593.8 [M-H] $^-$ .

## [0174] 步骤 2

[0175] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 31mg (0.052mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(3-氯苯基)脲(I-c-3)与 13mg (0.063mmol) 1-甲基吡唑-4-硼酸频那醇酯反应得 26mg (84%) 1-(3-氯苯基)-3-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-d-9), 为白色固体。

体。

[0176] ESI-MS:619.9[M+Na]<sup>+</sup>, 596.0[M-H]<sup>-</sup>.

[0177] 步骤 3

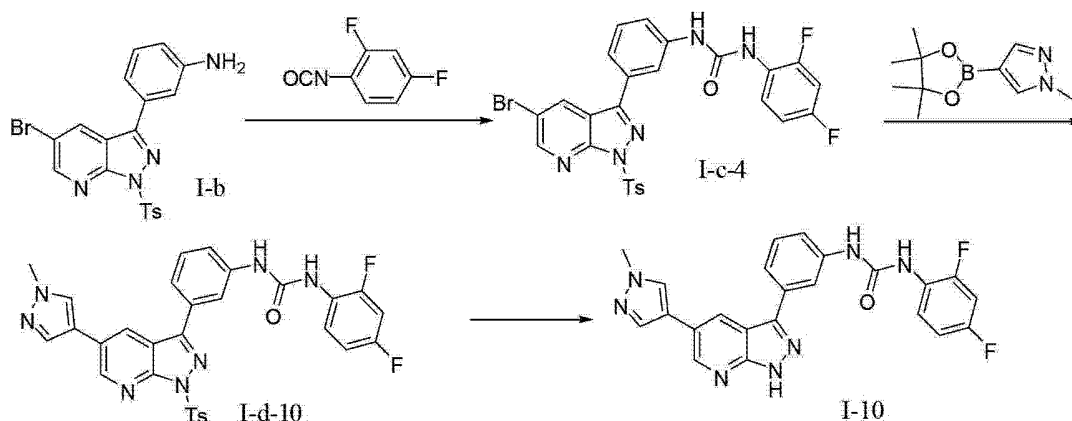
[0178] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 26mg (0.044mmol) 1-(3-氯苯基)-3-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-d-9) 反应得 14mg (73%) 的标题化合物(I-9), 为白色固体。

[0179] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.81(s, 1H, -NH-), 9.01(s, 1H, -NH-), 8.98(s, 1H, -NH-), 8.87(s, 1H, -ArH), 8.65(s, 1H, -ArH), 8.33(s, 1H, -ArH), 8.23(s, 1H, -ArH), 8.08(s, 1H, -ArH), 7.76(s, 1H, -ArH), 7.73(d, 1H, -ArH), 7.55(d, 1H, -ArH), 7.47(t, 1H, -ArH), 7.34(d, 2H, 2×-ArH), 7.05(d, 1H, -ArH), 3.92(s, 3H, -CH<sub>3</sub>);

[0180] ESI-MS:444.1[M+H]<sup>+</sup>.

[0181] 实施例 11: 1-(2,4-二氟苯基)-3-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-10)

[0182]



[0183] 步骤 1

[0184] 使用实施例 1, 步骤 3 的方法, 30mg(0.067mmol)3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯胺(I-b)与 12 μl(0.1mmol)2,4-二氟苯异氰酸酯反应得 14.5mg (35%) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2,4-二氟苯基)脲(I-c-4), 为白色固体。

[0185] ESI-MS:598.0[M+H]<sup>+</sup>.

[0186] 步骤 2

[0187] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 38mg (0.064mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2,4-二氟苯基)脲(I-c-4) 与 16mg (0.076mmol) 1-甲基吡唑-4-硼酸频那醇酯反应得 19mg (50%) 1-(2,4-二氟苯基)-3-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-d-10), 为白色固体。

[0188] ESI-MS:622.0[M+Na]<sup>+</sup>, 598[M-H]<sup>-</sup>.

[0189] 步骤 3

[0190] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 19mg (0.032mmol) 1-(2,4-二氟苯基)-3-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)



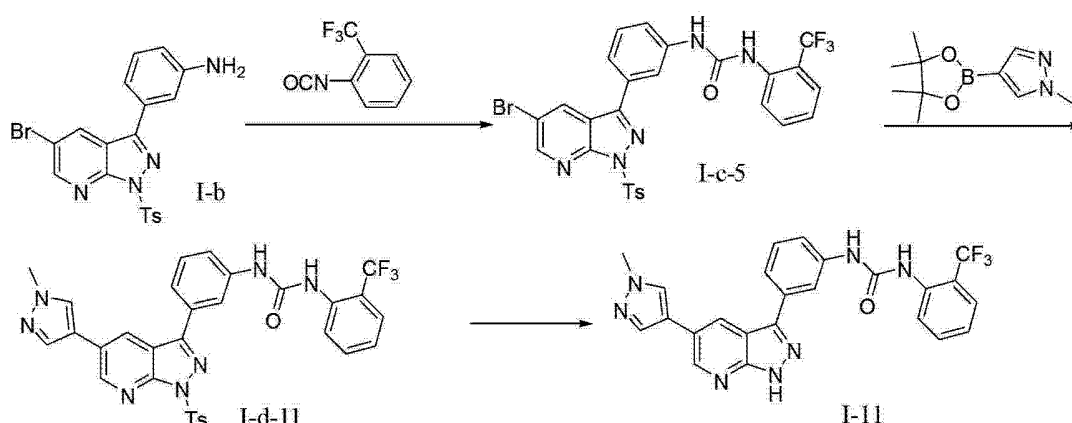
苯基)脲(I-d-10)反应得 10mg (71%) 的标题化合物(I-10), 为白色固体。

[0191]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.81(s, 1H, -NH-), 9.22(s, 1H, -NH-), 8.87(d, 1H, -ArH), 8.65(s, 1H, -ArH), 8.58(s, 1H, -NH-), 8.33(s, 1H, -ArH), 8.24(s, 1H, -ArH), 8.11~8.17(m, 1H, -ArH), 8.07(s, 1H, -ArH), 7.73(d, 1H, -ArH), 7.49(s, 1H, -ArH), 7.47(m, 1H, -ArH), 7.34(t, 1H, -ArH), 7.08(t, 1H, -ArH), 3.91(s, 3H, -CH<sub>3</sub>);

[0192] ESI-MS: 446.1 [M+H]<sup>+</sup>.

[0193] 实施例 12: 1-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-三氟甲基苯基)脲(I-11)

[0194]



[0195] 步骤 1

[0196] 使用实施例 1, 步骤 3 的方法, 61mg (0.14mmol) 3-(5-溴-1-(4-氨基苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯胺(I-b)与 31  $\mu$ l (0.21mmol) 2-三氟甲基苯异氰酸酯反应得 46mg (53%) 1-(3-(5-溴-1-(4-氨基苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-三氟甲基苯基)脲(I-c-5), 为白色固体。

[0197] 步骤 2

[0198] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 60mg (0.09mmol) 1-(3-(5-溴-1-(4-氨基苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-三氟甲基苯基)脲(I-c-5)与 24mg (0.11mmol) 1-甲基吡唑-4-硼酸频那醇酯反应得 49mg (81%) 1-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-(4-氨基苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-三氟甲基苯基)脲(I-d-11), 为白色固体。

[0199] 步骤 3

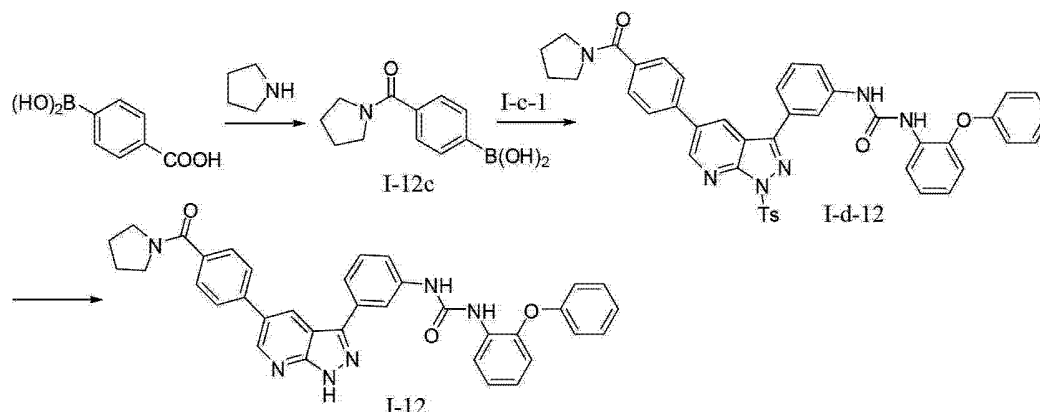
[0200] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 60mg (0.09mmol) 1-(3-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-(4-氨基苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-三氟甲基苯基)脲(I-d-11)反应得 30mg (66%) 的标题化合物, 为白色固体。

[0201]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.82(s, 1H, -NH-), 9.60(s, 1H, -NH-), 8.87(s, 1H, -ArH), 8.66(s, 1H, -ArH), 8.34(s, 1H, -ArH), 8.27(s, 1H, -ArH), 8.16(s, 1H, -NH-), 8.07(s, 1H, -ArH), 8.04(d, 1H, -ArH), 7.65~7.75(m, 3H, 3  $\times$  -ArH), 7.47~7.53(m, 2H, 2  $\times$  -ArH), 7.31(t, 1H, -ArH), 3.91(s, 3H, -CH<sub>3</sub>);

[0202] ESI-MS: 478.0 [M+H]<sup>+</sup>.

[0203] 实施例 13 : 1-(2-苯氧基苯基)-3-(3-(5-(4-(吡咯烷-1-羰基)苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-12)

[0204]



[0205] 步骤 1

[0206] 20mg (0.12mmol) 4-羧基苯硼酸溶于 2mL DMF, 加入 20  $\mu$ L (0.24mmol) 吡咯烷, 46mg (0.12mmol) HATU, 室温反应 18 小时, 浓缩除去 DMF, 残留物加入适量水, 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液加入 100~200 目硅胶, 浓缩制砂, 柱层析, 经二氯甲烷: 甲醇=10:1 洗脱, 得 21mg (80%) 4-(吡咯烷-1-羰基)苯硼酸(I-12c)。

[0207] 步骤 2

[0208] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 115mg (0.17mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1) 与 46mg (0.21mmol) 4-(吡咯烷-1-羰基)苯硼酸(I-12c) 反应得 22mg (15%) 1-(2-苯氧基苯基)-3-(3-(5-(4-(吡咯烷-1-羰基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-d-12), 为白色固体。

[0209] 步骤 3

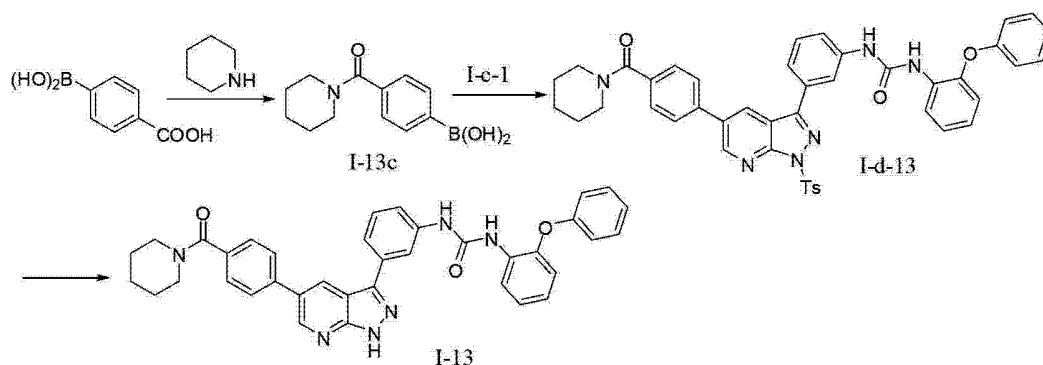
[0210] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 22mg (0.029mmol) 1-(2-苯氧基苯基)-3-(3-(5-(4-(吡咯烷-1-羰基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-d-12) 反应得 10mg (57%) 标题化合物, 为白色固体。

[0211]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.91 (s, 1H, -NH-), 9.45 (s, 1H, -NH-), 8.94 (d, 1H, -ArH), 8.79 (d, 1H, -ArH), 8.49 (s, 1H, -NH-), 8.35 (dd, 1H, -ArH), 8.31 (s, 1H, -ArH), 7.92 (dd, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.72~7.74 (m, 1H, -ArH), 7.67 (dd, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.40~7.46 (m, 4H, 4 $\times$ -ArH), 7.11~7.18 (m, 2H, 2 $\times$ -ArH), 7.07 (d, 2H, 2 $\times$ -ArH), 6.99 (ddd, 1H,  $J=1.55$ , -ArH), 6.86 (dd, 1H, -ArH), 3.45~3.52 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.84~1.91 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-);

[0212] ESI-MS: 593.3 [M-H]<sup>-</sup>.

[0213] 实施例 14 : 1-(2-苯氧基苯基)-3-(3-(5-(4-(哌啶-1-羰基)苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-13)

[0214]



[0215] 步骤 1

[0216] 50mg (0.3mmol) 4-羧基苯硼酸与 35  $\mu$  L (0.6mmol) 哌啶反应得 66mg (94%) 的 4-(哌啶-1-羰基)苯硼酸(I-13c)。

[0217] 步骤 2

[0218] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 96mg (0.15mmol) 的 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1)与 41mg (0.17mmol) 的 4-(哌啶-1-羰基)苯硼酸(I-13c)反应得 18mg (16%) 的 1-(2-苯氧基苯基)-3-(3-(5-(4-(哌啶-1-羰基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-d-13), 为白色固体。

[0219] 步骤 3

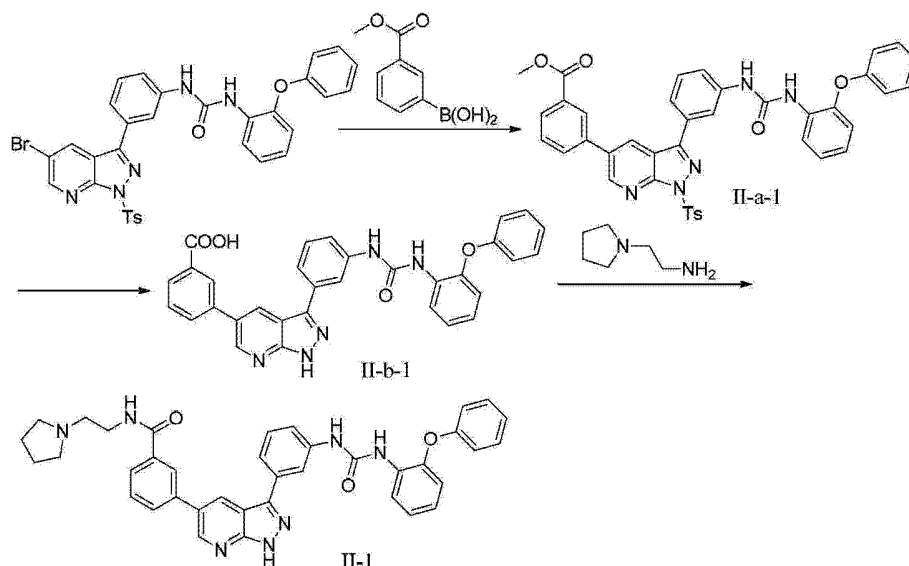
[0220] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 18mg (0.023mmol) 1-(2-苯氧基苯基)-3-(3-(5-(4-(哌啶-1-羰基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)脲(I-d-13)反应得 9mg (60%) 的标题化合物, 为白色固体。

[0221]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13.90 (s, 1H, -NH-), 9.45 (s, 1H, -NH-), 8.93 (d, 1H, -ArH), 8.79 (d, 1H, -ArH), 8.48 (s, 1H, -NH-), 8.35 (dd, 1H, -ArH), 8.30 (s, 1H, -ArH), 7.93 (d, 2H, 2  $\times$  -ArH), 7.72~7.74 (m, 1H, -ArH), 7.52 (d, 2H, 2  $\times$  -ArH), 7.46 (t, 2H, 2  $\times$  -ArH), 7.42 (t, 2H, 2  $\times$  -ArH), 7.11~7.18 (m, 2H, 2  $\times$  -ArH), 7.08 (d, 2H, 2  $\times$  -ArH), 6.98 (t, 1H, -ArH), 6.86 (dd, 1H, -ArH), 3.32~3.58 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.64 (bs, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.54 (bs, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ );

[0222] ESI-MS: 609.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

[0223] 实施例 15: 3-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)-N-(2-(吡咯烷-1-基)乙基)苯甲酰胺(II-1)

[0224]



## [0225] 步骤 1

[0226] 使用实施例 3, 步骤 1 的方法, 30mg (0.046mmol) 1-(3-(5-溴-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-3-基)苯基)-3-(2-苯氧基苯基)脲(I-c-1)与 10mg (0.055mmol) 反应得 45mg (83%) 3-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酸甲酯(II-a-1), 为白色固体。

[0227] ESI-MS: 708 [M-H]<sup>-</sup>.

## [0228] 步骤 2

[0229] 使用实施例 3, 步骤 2 的方法, 25mg (0.035mmol) 3-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1-对甲苯磺酰基-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酸甲酯(II-a-1)反应得 12mg (63%) 的 3-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酸(II-b-1), 为淡黄色固体。

[0230] ESI-MS: 540.0 [M-H]<sup>-</sup>.

## [0231] 步骤 3

[0232] 12mg (0.022mmol) 3-(3-(3-(3-(2-苯氧基苯基)脲基)苯基)-1H-吡唑[3,4-b]吡啶-5-基)苯甲酸(II-b-1)溶于 2mL DMF, 加入 4 μL (0.033mmol) 1-(2-氨基乙基)吡咯烷, 6 μL (0.044mmol) 三乙胺, 10mg (0.026mmol) HATU, 室温反应 17 小时, 浓缩除去 DMF, 残留物加入适量水, 二氯甲烷萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液加入 100~200 目硅胶, 浓缩制砂, 柱层析, 经二氯甲烷: 甲醇 = 20:1 得 6.5mg (25%) 标题化合物, 为白色固体。

[0233] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.98 (s, 1H, -NH-), 9.51 (s, 1H, -NH-), 8.98 (d, 1H, -ArH), 8.79 (d, 1H, -ArH), 8.67 (t, 1H, -NH-), 8.52 (s, 1H, -NH-), 8.35 (dd, 1H, -ArH), 8.29 (d, 2H, 2×-ArH), 8.03 (d, 1H, -ArH), 7.92 (d, 1H, -ArH), 7.73 (t, 1H, -ArH), 7.63 (t, 1H, -ArH), 7.41~7.48 (m, 4H, 4×-ArH), 7.12~7.19 (m, 2H, 2×-ArH), 7.08 (d, 2H, 2×-ArH), 6.98 (t, 1H, -ArH), 6.87 (dd, 1H, -ArH), 3.46 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-), 2.70 (brs, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-), 2.60 (brs, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.71 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-);

[0234] ESI-MS: 638.2 [M+H]<sup>+</sup>, 636.2 [M-H]<sup>-</sup>.

## [0235] 生物学实施例

[0236] 采用下列试验甄别具有最佳程度的所需活性的那些化合物。

[0237] 实施例 16 :体外生化水平抑制蛋白激酶(PK) 活性实验

[0238] 材料与方法 :IGF1R、Flt-3、VEGFR-2、PDGFR- $\beta$  和 c-Kit 激酶,来源于 millipore 或 Invitrogen ;HTRF KinEASE TK kit (Cisbio 公司);384 孔板(Greiner 公司);ATP (sigma 公司),  $MgCl_2$  (sigma) 公司;PHERAstar FS 多功能酶标仪(BMG 公司);低速离心机 (Staitexiangyi 公司);恒温箱(Binder 公司)。

[0239] 化合物溶解及保存 :视溶解性用 DMSO 将受试化合物配置成 0.5-10mmol/L 的母液,分装后 -20℃ 保存 ;

[0240] 化合物工作液的配制 :测试前将分装的化合物从冰箱取出,用纯 DMSO 稀释到 50× 所需浓度 ;然后用去离子水将化合物稀释至 4× 所需浓度 ;

[0241] 1.33×Enzymatic buffer 的配制 :将 5×Enzymatic buffer 来源于(HTRF kit) 用去离子水稀释到 1.33×, 并且加入 1.33× 终浓度的相应成分 :1.33mmol/L DTT 和 1.33mmol/L  $MgCl_2$  ;

[0242] 激酶工作液的配制 :用 1.33×Enzymatic buffer 将 IGF1R 稀释到 2× 所需终浓度 0.04ng/ $\mu$ L ;

[0243] 底物工作液的配制 :用 1.33×Enzymatic buffer 将 substrate-biotin (来源于 HTRF kit) 和 ATP (10mM) 稀释为 4× 所需终浓度的混合液 ;

[0244] 检测工作液的配制 :用 HTRF detection buffer 将 16.67 $\mu$ mol/L 的 Streptavidin-XL665 稀释到 4× 所需终浓度,然后与等体积的 Antibody-Cryptate 混合(均来源于 HTRF kit)。

[0245] 酶反应步骤 :向低体积 384 微孔板的每个孔中加入 4 $\mu$ L 的激酶工作液,同时加入 4 $\mu$ L 的 1.33×Enzymatic buffer 作为阴性对照(Negative);向孔加入 2 $\mu$ L 的化合物工作液,同时加入 2 $\mu$ L 的 8%DMSO 水溶液作为零化合物浓度对照(即阳性对照, Positive);于 25℃ (或 30℃) 孵育 5-10min ;向孔中加入 2 $\mu$ L 底物工作液启动酶反应,于 25℃ (或 30℃) 振荡反应 15-60min。

[0246] HTRF 试剂检测步骤 :向孔加入 8 $\mu$ L 的检测工作液终止反应 ;25℃ 反应 1h ;

[0247] HTRF 信号的读取 :采用 PHERAstar FS 读数检测信号,仪器相应设置如下 :

[0248]

#### Optic module HTRF®

[0249] Integration delay(lag time)50 $\mu$ s

[0250] Integration time 400 $\mu$ s

[0251] Number of flashes 200

[0252] 对于每孔读出的原始数据,比值 =665nm/620nm ;

[0253] 抑制率的计算 :

[0254]

$$\text{抑制率}\% = \left(1 - \frac{\text{试验组比值} - \text{阴性对照组比值}}{\text{阳性对照组比值} - \text{阴性对照组比值}}\right) \times 100\%$$

[0255]  $C_{50}$  值的计算 :以化合物浓度的对数为横坐标,抑制率为纵坐标,在 GraphPad Prism 5 中,拟合非线性曲线 :log(inhibitor) vs. response--Variable slope, 求出酶活抑制率为 50% 时的待测化合物浓度即  $IC_{50}$ 。

[0256] 实验结果 : IGF1R 激酶活性半数抑制浓度 ( $IC_{50}$  nM)

[0257] 本发明提供结构如式 I 及式 II 所示化合物对 IGF-1R 激酶活性的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 见表 1 :

[0258] 表 1 化合物对 IGF-1R 激酶活性的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )

[0259]

化合物	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7	I-8	I-9	I-10
活性强度	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
化合物	I-11	I-12	I-13	II-1						
活性强度	++	+++	+++	+++						

[0260]  $IC_{50} < 500 \text{ nM}+++; 500-5000 \text{ nM}++; > 5000 \text{ nM}+$ 。

[0261] 实施例 17: 本发明提供的化合物抑制肿瘤细胞增殖的测定方法 (MTT 法)

[0262] 试剂和仪器 :

[0263] RPMI 1640 培养基 (RPMI 1640+10% 胎牛血清 + HEPES 3.5g/L+NaHCO<sub>3</sub> 2.2g/L+ 青霉素 0.13g/L+ 链霉素 0.15g/L) ;

[0264] 高糖 DMEM 培养基 (DMEM+10% 小牛血清 + HEPES 3.5g/L+NaHCO<sub>3</sub> 2.2g/L+ 青霉素 0.13g/L+ 链霉素 0.15g/L) ;

[0265] MC COYS 5-A 培养基 (MC COYS 5-A+10% 胎牛血清 + HEPES 3.5g/L+NaHCO<sub>3</sub> 2.2g/L+ 青霉素 0.13g/L+ 链霉素 0.15g/L) ;

[0266] 胰蛋白酶 ; MTT (美国 Amresco 公司产品) ; 酶标仪 (TECAN infinite M200)

[0267] 人多发性骨髓瘤细胞株 (RPMI-8226) ; 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 ;

[0268] 人横纹肌肉瘤细胞株 (A673) ; 用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 ;

[0269] 人结肠癌细胞株 (HT29) 用 10% 胎牛血清的 MC COYS 5-A 培养基, 于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

[0270] 接种 : 取处于指数生长期, 状态良好的细胞一瓶, 加入适量胰蛋白酶消化液, 消化使贴壁细胞脱落, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 (或 DMEM 或 5A) 培养液配成细胞悬液, 计数, 用完全培养基以贴壁细胞 5000cell/well、贴壁细胞 10000cell/well 密度接入 96 孔板中 ;

[0271] 培养 : 将培养板转入恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 在 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 24 小时。24h 后, 换无血清培养基, 向细胞中加入梯度稀释的化合物, 使终浓度为 10000nM 起, 3 倍稀释 8 个浓度, 3 复孔, 药物作用 30min 后加入刺激因子 IGF1 (10ng/ml), 每组设 3 个平行孔, 培养 72 小时。

[0272] 染色 : 将 MTS 加入 96 孔板中, 加入量为实验体系的 1/10, 置于培养箱中孵育 4 小时, 测定 : 酶标仪设定波长为 490nm, 测定 96 孔板每孔吸光值, 记录结果并计算细胞生长抑制率, 以判断受试药物的抗肿瘤活性。

[0273] 细胞生长抑制率以及  $IC_{50}$  的计算：

[0274]

$$\text{生长抑制率} = \frac{\text{对照组平均 OD 值} - \text{给药组平均 OD 值}}{\text{对照组平均 OD 值}} \times 100\%$$

[0275] 同时根据各浓度的生长抑制率,采用以化合物浓度的对数同 Logit 线性回归,

[0276] 求出抑制生长率为 50%时的待测化合物浓度即  $IC_{50}$ ,取三次平均值。

[0277] 试验结果:本发明实施例 2 至 14 中制备的化合物对多种肿瘤细胞的增殖具有抑制作用,经统计分析,效果显著( $P < 0.05$ ),其  $IC_{50}$  均在  $10^{-5} \text{mol/L}$  以下。

[0278] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。