



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115010711 A

(43) 申请公布日 2022.09.06

(21) 申请号 202210816319.6

(22) 申请日 2022.07.12

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72) 发明人 唐春雷 丁蕾 袁昕 姜虹羽  
项良华 范为正

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

专利代理师 张勇

(51) Int. Cl.

C07D 475/00 (2006.01)

C07D 487/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

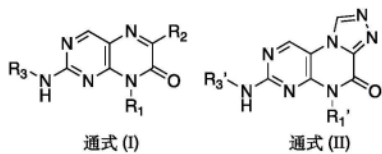
权利要求书2页 说明书22页

(54) 发明名称

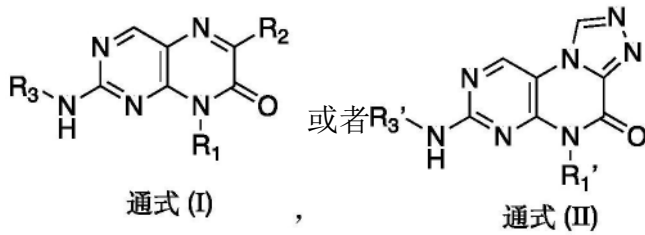
一种蝶啶7(8H)-酮类化合物及其在药学上的应用

(57) 摘要

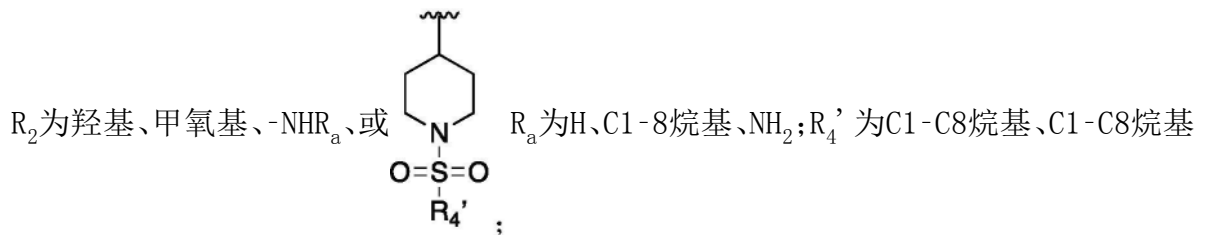
本发明公开了一种蝶啶7(8H)-酮类化合物及其在药学上的应用,属于医药领域。本发明蝶啶7(8H)-酮类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐具有通式(I)或(II)所示的结构,对CDK2激酶有较好的抑制活性,对HCT 116和MV4-11细胞系有一定程度上的抗肿瘤细胞增殖作用,可为CDK2小分子抑制剂研究提供参考,具有非常广阔的应用前景。



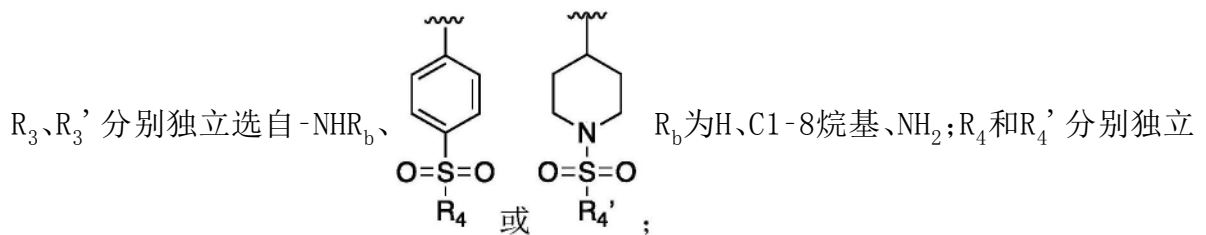
1. 具有通式 (I) 或 (II) 所示结构的蝶啶7 (8H) - 酮类化合物或其立体异构体或其药学上可接受的盐,



$R_1$ 、 $R_1'$  分别独立地选自未取代或卤素取代的C1-C8直链或支链烷基、未取代或卤素取代的C3-C6环烷基;



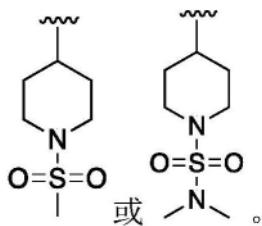
取代的伯氨基或仲氨基、C3-C6环烷基;



选自C1-C8烷基、C1-C8烷基取代的伯氨基或仲氨基、C3-C6环烷基。

2. 根据权利要求1所述的蝶啶7 (8H) - 酮类化合物或其立体异构体或其药学上可接受的盐,其特征在于, $R_1$ 、 $R_1'$  分别独立地选自丁基、戊烷基、吡喃基、吡咯烷基、环戊醇基、环戊烷基。

3. 根据权利要求1所述的蝶啶7 (8H) - 酮类化合物或其立体异构体或其药学上可接受的盐,其特征在于, $R_2$  选自甲氨基、乙氨基、羟基、甲氧基、二氟乙氨基、胍基、



4. 根据权利要求1所述的蝶啶7 (8H) - 酮类化合物或其立体异构体或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述药学上可接受的盐包括:钾盐、钠盐、盐酸盐、甲酸盐、三氟醋酸盐、磷酸盐和硫酸盐。

5. 一种药物组合物,其特征在于,含有权利要求1-4任一项所述的蝶啶7 (8H) - 酮类化合物或其立体异构体或其药学上可接受的盐。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物,其特征在于,还包括药学上可接受的辅料。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其特征在于,所述药学上可接受的辅料包括稀释

剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、吸收促进剂。

8. 权利要求1-4任一项所述的蝶啶7(8H)-酮类化合物或其立体异构体或其药学上可接受的盐在制备CDK抑制剂中的应用。

9. 权利要求1-4任一项所述的蝶啶类化合物或其立体异构体或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗癌症的药物中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在於,癌症包括:乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、表皮癌、肝癌、肺癌、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、鼻癌、头颈癌、前列腺癌、皮肤癌、髓系造血细胞肿瘤、甲状腺滤泡癌、源于间质细胞肿瘤、中枢或周围神经系统肿瘤、黑素瘤、神经胶质瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病、角化棘细胞瘤、甲状腺滤泡癌、卡波西肉瘤。

## 一种蝶啶7(8H)-酮类化合物及其在药学上的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种蝶啶7(8H)-酮类化合物及其在药学上的应用,属于医药领域。

### 背景技术

[0002] 癌症是威胁生命的最严重的疾病之一,其成因错综复杂,遗传因素导致的细胞遗传物质损伤或突变以及外界环境因素都有可能诱导其发生。癌症的治疗方法可以分为以放疗、化疗、手术治疗或者三种方式组合治疗为代表的传统疗法和以靶向治疗、免疫治疗为代表的现代疗法。在过去几十年中,传统治疗的效率随着科学技术的发展有所提高,但因其毒副作用大、患者耐受性差以及预后不良反应等缺点导致了其在临床应用上的局限性。因此,人们一直致力于研究更具特异性作用且更少副作用的临床药物,随着对癌症发病机制的深入研究及认识,一种特异性针对癌症关键蛋白的靶向治疗应运而生。传统的化学疗法通常通过干扰细胞分裂来靶向快速增殖的癌细胞,但这也非特异性地针对快速分裂的健康细胞从而产生众所周知的化疗副作用;分子靶向治疗作为一种革命疗法,旨在阻断参与肿瘤生长和发展的特定生物转导途径或关键癌症蛋白,干预细胞周期的调节或诱导细胞死亡,达到抗肿瘤的作用。用于分子靶向治疗的药物主要分为小分子、单克隆抗体、免疫治疗癌症疫苗和基因治疗。分子靶向药物通常表现出不同的功能和特性,根据靶点,它们作用于细胞表面抗原、生长因子、受体或信号转导途径,调节细胞周期进展、细胞凋亡、转移或血管生成。因此确定理想的靶点对于癌症分子靶向治疗的成功发展至关重要。人们对于肿瘤的发生与发展机制不断地研究与了解,目前已经深入到分子和基因水平,可供作为分子靶向治疗的靶标种类繁多、与日俱增,主要包括细胞周期蛋白、生长因子、信号分子、凋亡调节因子和促血管生成分子等。

[0003] 细胞周期作为细胞生命运行的一个基础进程,受到多种蛋白分子的调控。癌症最显著的病理表现就是细胞周期调节紊乱导致细胞分化和凋亡不受控制,造成细胞的无限增殖。随着对细胞周期调控分子机制的深入研究与认识,在众多参与调控肿瘤细胞周期的靶点中,促进细胞周期过渡的细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin Dependent Kinases,CDKs)成为了关键的癌症治疗靶点。

[0004] 作为CDKs家族的一员,细胞周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)与细胞周期蛋白结合可直接参与调控细胞周期。在真核细胞中,CDK2是一个关键的细胞周期调节因子;在G1/S期进程中,抑制转录因子(E2Fs)转录活性的成视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)是CDK2的关键底物。G1晚期(限制酶切点后),活化的CDK2-cyclin E复合物和CDK4/6-cyclin D复合物一起磷酸化pRb,释放并激活E2Fs,这启动了S期所需基因的转录。整个S期,CDK2-cyclinA复合物和CDK1-cyclinA/B复合物继续维持pRb的磷酸化,确保细胞周期进程。当细胞准备退出S期时,CDK2与cyclin A结合后磷酸化转录因子E2Fs,使其失活,从而阻止E2Fs持续活性引发的细胞凋亡。除pRb外,CDK2还控制多种转录因子的磷酸化,例如SMAD3、FOXO1以及上游结合因子(UBF)和Myc原癌基因蛋白等,它们在不同水平上参与细胞周期进程。除这些细胞周期靶点外,CDK2还参与哺乳动物DNA复制、适应性免疫应答、细胞分化和凋亡等过程。越来越

多的证据表明,CDK2是多种致癌信号的关键调节因子。据统计,CDK2在大约86%的癌症中出现过表达,其中包括肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、白血病、前列腺癌等肿瘤。关于各种具有特定分子亮点的人类癌症对CDK2抑制敏感性的研究,揭示了CDK2可能作为一个杰出的治疗靶点。例如,cyclin E1过表达的卵巢癌细胞、MYCN扩增的神经母细胞瘤细胞、KRAS突变的肺癌细胞,以及各种具有FBW7突变和细胞周期蛋白E1过表达的癌症细胞中,CDK2均可作为治疗靶点。在B细胞淋巴瘤和胶质母细胞瘤中,CDK2高度表达且是肿瘤细胞增殖所必需的。在对前列腺癌相关研究中发现,CDK2与癌细胞的转移显著相关。CDK2还可通过磷酸化和激活激酶受体在乳腺癌的发展中发挥作用。而CDK2的抑制可在AML患者的原始样本和细胞系中诱导分化。在cyclin D作为蛋白酶体降解靶点参与正常的泛素化过程中,泛素连接酶(E3)以AMBRA1蛋白作为其底物受体。而在人类肿瘤细胞中,AMBRA1蛋白往往会发生突变。Maiani E等人通过一系列分子生物学、细胞生物学和遗传学实验证明AMBRA1蛋白的缺失会导致cyclin D水平的上升,促进cyclin D-CDK2复合物的形成。随着时间的推移,已上市的CDK4/6抑制剂的抑制细胞增殖作用不可避免地受到原发性和获得性耐药的限制;而最新研究表明,CDK2与cyclin E和cyclin D结合形成复合物作为一种补偿机制激活了下游信号通路,理论上特异性靶向CDK2可以达到抗肿瘤细胞增殖的作用。这些都充分表明,CDK2是抗肿瘤药物研究的一个重要靶点。

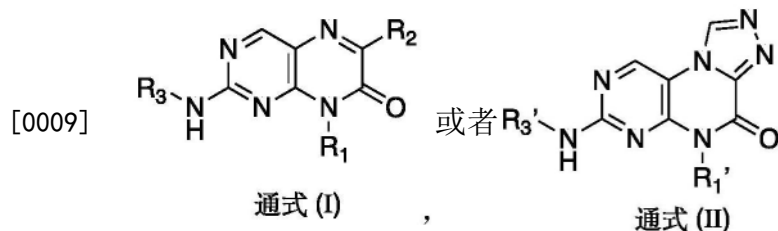
[0005] 随着对CDK2结构和功能的深入研究与认识,以及近几年CDK2在克服CDK4/6抑制剂耐药性问题中潜在能力的发现,极大地推动了CDK2小分子靶向抑制剂的设计与开发工作。虽然目前尚无特异性靶向CDK2抑制剂被正式批准上市,但是已经有一些小分子CDK2抑制剂处于临床研究阶段。目前正处于临床研究阶段的CDK2抑制剂大多数属于非选择性ATP竞争性抑制剂,主要作用于CDK2的ATP结合位点,与ATP竞争性结合CDK2,从而抑制其活性,即可有效阻止肿瘤细胞增殖或促进其凋亡。代表药物有氨基嘌呤类、吡啶并嘧啶类、氨基吡啶类和吡啶并喹啉类,它们在癌症治疗中都取得了一定的成果。除此之外,还有许多处于临床前研究阶段且对CDK2有较高的选择抑制活性的化合物,以嘌呤类、嘧啶类、吡啶类为主。

[0006] 基于CDK2活性在细胞周期调节中的重要性以及该信号通路在癌症发生发展中的关键作用,靶向抑制CDK2活性成为一种有潜力的治疗方式。为了更好地满足临床需求,治疗癌症,需要开发出新的疗效更好毒副作用更低的CDK2抑制剂。

## 发明内容

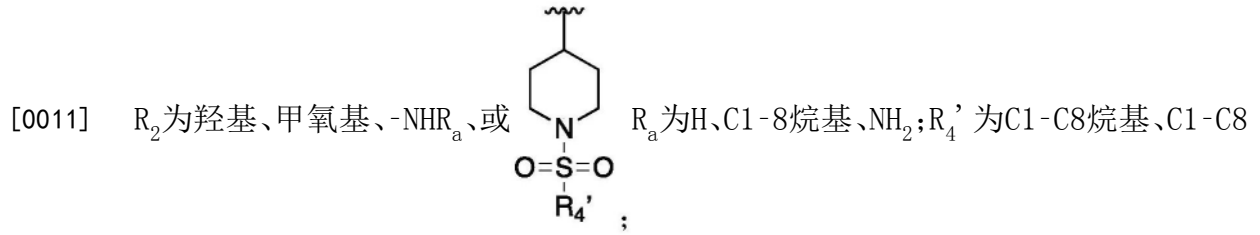
[0007] 为了解决上述问题,本发明将提供一种新型结构的CDK2抑制剂,并发现此类结构的化合物表现出优异的效果和作用,为癌症治疗提供更多的治疗途径。

[0008] 本发明的第一个目的在于具有通式(I)或者通式(II)所示结构的蝶啶7(8H)-酮类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐,

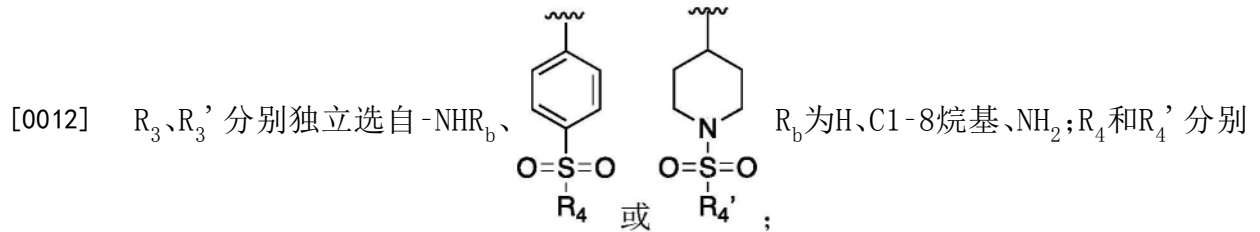


[0010] 其中, $R_1$ 、 $R_1'$ 分别独立地选自未取代或卤素取代的C1-C8直链或支链烷基、未取代

或卤素取代的C3-C6环烷基；



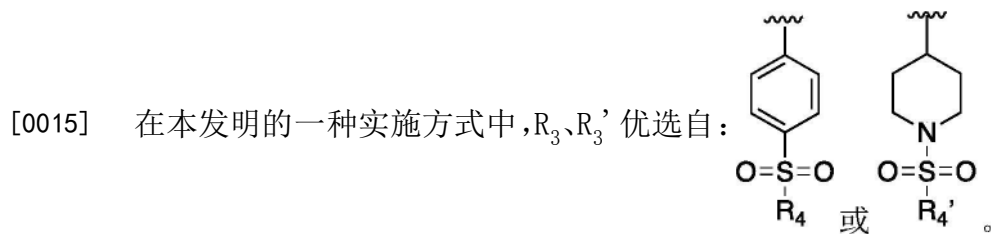
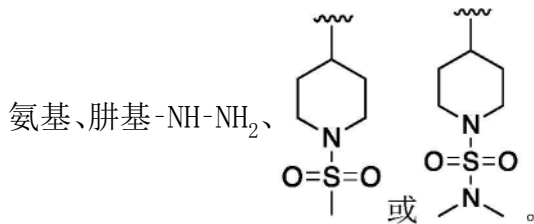
烷基取代的伯氨基或仲氨基、C3-C6环烷基；



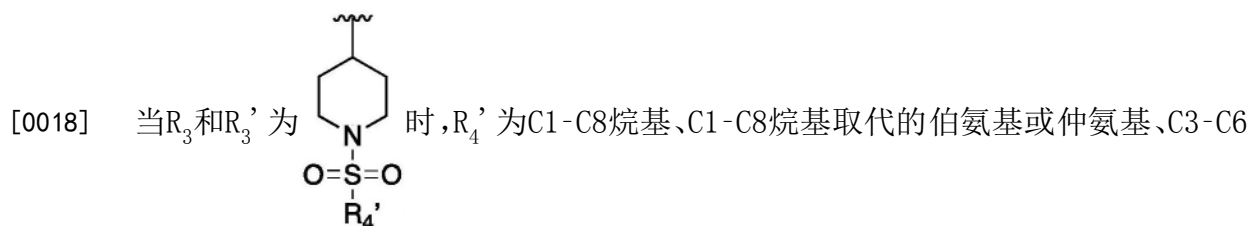
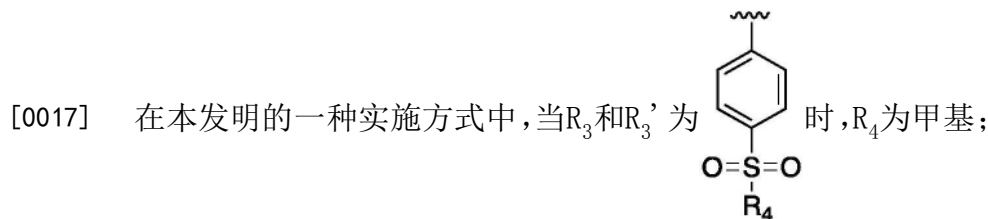
独立选自C1-8烷基、C1-8烷基取代的伯氨基或仲氨基、C3-C6环烷基。

[0013] 在本发明的一种实施方式中， $R_1$ 、 $R_1'$ 分别独立地优选丁基、戊烷基、吡喃基、吡咯烷基、环戊醇基、环戊烷基。

[0014] 在本发明的一种实施方式中， $R_2$ 具体优选：甲氨基、乙氨基、羟基、甲氧基、二氟乙



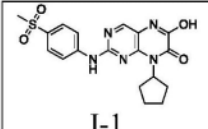
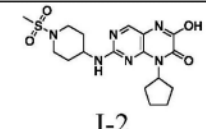
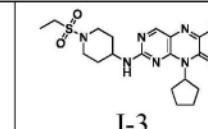
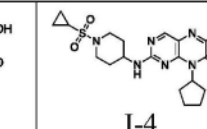
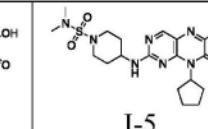
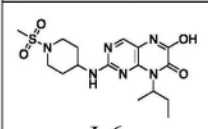
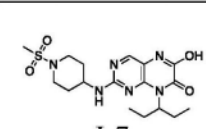
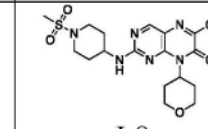
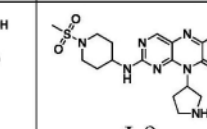
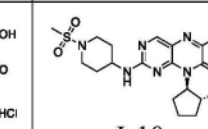
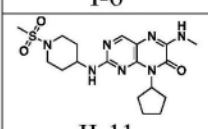
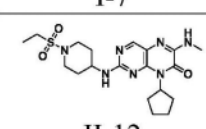
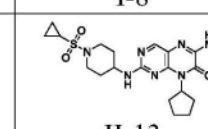
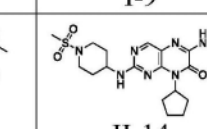
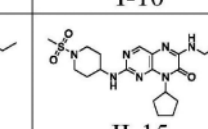
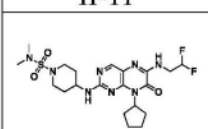
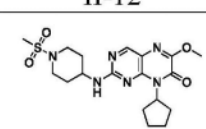
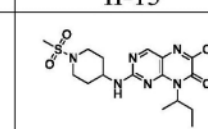
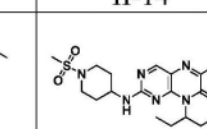
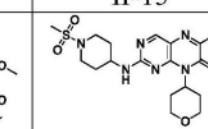
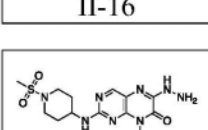
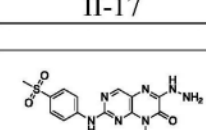
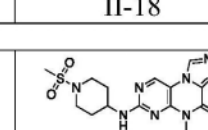
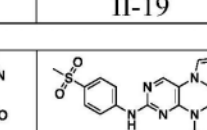
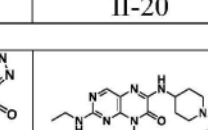
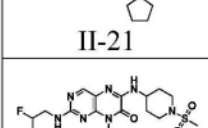
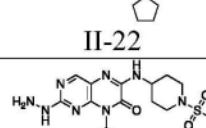
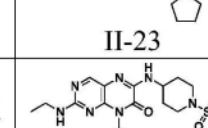
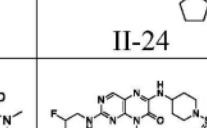
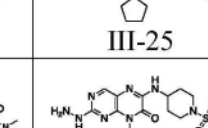
[0016] 在本发明的一种实施方式中， $R_4$ 、 $R_4'$ 优选C1-8烷基。



环烷基。

[0019] 在本发明的一种实施方式中,蝶啶7(8H)-酮类衍生物可以选自以下表1中具体化合物:

[0020] 表1

 I-1	 I-2	 I-3	 I-4	 I-5
 I-6	 I-7	 I-8	 I-9	 I-10
 II-11	 II-12	 II-13	 II-14	 II-15
 II-16	 II-17	 II-18	 II-19	 II-20
 II-21	 II-22	 II-23	 II-24	 III-25
 III-26	 III-27	 III-28	 III-29	 III-30

[0023] 在本发明的一种实施方式中,所述药学上可接受的盐包括:钾盐、钠盐、盐酸盐、甲酸盐、三氟醋酸盐、磷酸盐和硫酸盐等。

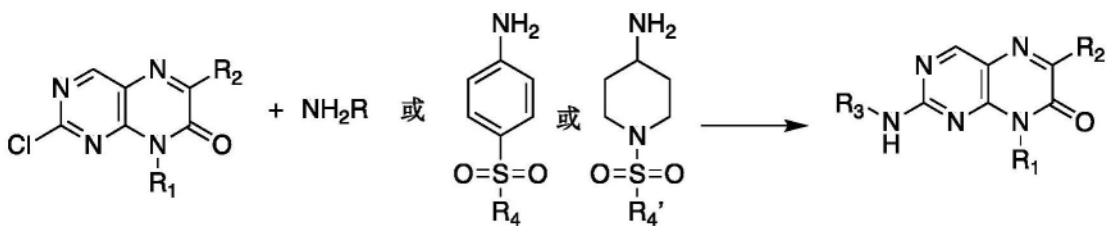
[0024] 本发明的第二个目的是提供一种组合物,含有上述蝶啶7(8H)-酮类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐。

[0025] 在本发明的一种实施方式中,所述组合物含有上述蝶啶7(8H)-酮类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的辅料。

[0026] 在本发明的一种实施方式中,所述药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物辅料,例如:稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、吸收促进剂、水等,填充剂如:淀粉、蔗糖、乳糖、微晶纤维素等;粘合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;润湿剂如甘油;崩解剂如羧甲基淀粉钠、羟丙纤维素、琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂如季胺化合物;表面活性剂如十六烷醇、十二烷基硫酸钠。

[0027] 在本发明的一种实施方式中,所述组合物包含上述蝶啶类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐以及至少一种药学可接受的赋形剂或载体。

[0028] 在本发明的一种实施方式中,上述蝶啶7(8H)-酮类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐的制备是通过以下反应式进行:



[0029]



[0030] 其中,以上反应式中, $R_1$ 和 $R_1'$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 和 $R_3'$ 、 $R_4$ 和 $R_4'$ 与上文定义相同; $R$ 为C1-C8烷。

[0031] 本发明的第三个目的是提供上述蝶啶7(8H)-酮类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐在制备CDK2抑制剂中的用途。

[0032] 本发明的第四个目的是提供上述蝶啶7(8H)-酮类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

[0033] 在本发明的一种实施方式中,所述癌症选自乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、表皮癌、肝癌、肺癌、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、鼻咽癌、头颈癌、前列腺癌、皮肤癌、髓系造血细胞肿瘤、甲状腺滤泡癌、源于间质细胞肿瘤、中枢或周围神经系统肿瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病、角化棘细胞瘤、甲状腺滤泡癌或卡波西肉瘤。

[0034] 有益效果:

[0035] 本发明蝶啶类衍生物或其立体异构体或其药学上可接受的盐对CDK2的抑制活性呈现非常好的CDK2的抑制活性,可以被用作CDK2的高效抑制剂。本发明要求保护的化合物具有很强的药效和对CDK2的选择性,这在开发适于用作CDK2抑制剂的药物方面是有利的,具有非常广阔的应用前景。

## 具体实施方式

[0036] 本发明所述“烷基”是指直链或支链饱和烃基基团。在一些实施方案中,烷基基团可具有1至10个碳原子(例如1至8个碳原子)。烷基基团的实例包括甲基(Me)、乙基(Et)、丙基(例如,正丙基和异丙基)、丁基(例如,正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基)、戊基基团(例如,正戊基、异戊基、新戊基)、己基(例如,正己基及其异构体)等。低级烷基基团一般最多有4个碳原子。低级烷基基团的实例包括甲基、乙基、丙基(例如正丙基和异丙基)和丁基基团(例如正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基)。在一个实施方案中一个烷基基团或两个或多个烷基基团可形成桥连的烷基基团。即其中烷基基团经另一个基团连接(特别显示于环状基团),通过烷基链桥连形成环,即形成桥连的稠合环。

[0037] 本发明所述“环烷基”是指非芳香碳环基团,包括环状烷基、链烯基和炔基基团。环烷基基团可以是单环(例如环己基)或多环(例如,包含稠合、桥连和/或螺环体系),其中碳原子位于环体系内部或外部。环烷基基团作为整体可具有3至14个环原子(例如,3至8个碳原子用于单环环烷基基团和7至14个碳原子用于多环环烷基基团)。环烷基基团的任何适宜



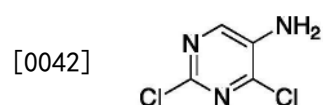
环上位置可与所定义的化学结构共价连接。环烷基基团的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环戊烯基、环己烯基、环己二烯基、环庚三烯基、冰片基、norpinyl、norcaryl、金刚烷基和螺[4.5]癸基,及其同系物、异构体等。

[0038] 本发明所述通式(I)和通式(II)化合物,还包括全部药学上可接受的同位素标记化合物,其中一个或多个原子被有相同原子数的原子替换,但原子质量或质量数与通常见于自然中的原子质量或质量数不同。适于包含在本发明通式(I)和通式(II)化合物中的同位素包括氢的同位素,例如 $^2\text{H}$ 和 $^3\text{H}$ ,碳的同位素,例如 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 和 $^{14}\text{C}$ ,氮的同位素,例如 $^{13}\text{N}$ 和 $^{15}\text{N}$ ,氧的同位素,例如 $^{15}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 和 $^{18}\text{O}$ 。

[0039] 用较重的同位素例如氘即 $^2\text{H}$ 取代可提供某些治疗优势,其有更好的代谢稳定性,例如,体内半衰期增加或降低了剂量需求,并因此在某些情况下优选。

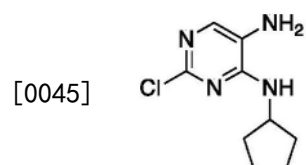
[0040] 以下将通过实施例详细描述本发明中化合物的合成方法。

[0041] 中间体A-0的制备



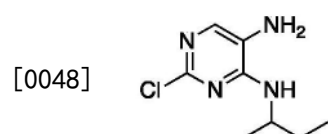
[0043] 将2,4-二氯-5-硝基嘧啶(30g, 154.7mmol)溶于DCM与MeOH的混合溶液中(300mL, 体积比1:1),分批加入铁粉(52g, 928.6mmol)和 $\text{NH}_4\text{Cl}$ (49.7g, 929.1mmol),升温至 $50^\circ\text{C}$ ,搅拌反应2h。TLC监测反应完成,趁热用硅藻土抽滤,冷却至室温。用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液调节反应液pH至9,然后加入水(150mL)并用DCM(150mL)萃取三遍,合并有机相,然后用饱和 $\text{NaCl}$ 水溶液洗涤、加入 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥、抽滤,滤液减压浓缩后得到的粗产物经硅胶柱层析[洗脱剂:DCM:MeOH=100:1(v/v)]分离纯化后得到淡黄色固体A-0(21g, 收率83.6%)。MS-ESI(m/z): 163.983[M+H] $^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 8.14(s, 1H), 6.12(s, 2H)。

[0044] 中间体A-1的制备



[0046] 将A-0(20g, 122.7mmol)溶于无水THF(200mL),室温下用恒压底液漏斗滴加TEA(31.0g, 306.7mmol)和环戊胺(26.1g, 306.7mmol)的混合溶液,滴毕移至 $60^\circ\text{C}$ 中回流搅拌4h。TLC监测反应完成,冷却至室温,反应液减压浓缩除去大部分溶剂,然后加入水(100mL)并用EA(150mL)萃取三遍,合并有机相,然后用饱和 $\text{NaCl}$ 水溶液洗涤、加入 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥、抽滤,滤液减压浓缩得淡黄色固体A-1(23g, 收率88.4%)。MS-ESI(m/z): 213.114[M+H] $^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 7.35(s, 1H), 6.66(d, J=6.8Hz, 1H), 4.95(s, 2H), 4.23(q, J=6.8Hz, 1H), 1.95(dt, J=12.6, 6.4Hz, 2H), 1.68(tq, J=10.5, 3.8, 3.3Hz, 2H), 1.60-1.52(m, 2H), 1.50-1.42(m, 2H)。

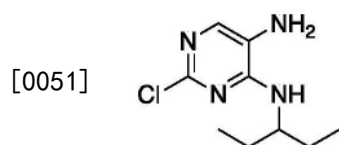
[0047] 中间体A-2的制备



[0049] 中间体A-2的制备方法参考A-1,区别是将环戊胺替换为丁胺,得淡黄色固体

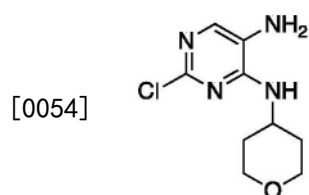
(11.3g, 收率92.1%)。MS-ESI (m/z) : 201.099 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.35 (s, 1H), 6.54 (d, J=7.7Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.99 (p, J=6.8Hz, 1H), 1.56-1.48 (m, 2H), 1.13 (d, J=6.5Hz, 3H), 0.87 (t, J=7.4Hz, 3H)。

[0050] 中间体A-3的制备



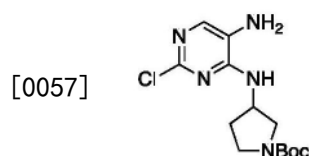
[0052] 中间体A-3的制备方法参考A-1, 区别是将环戊胺替换为戊胺, 得淡黄色固体 (11.6g, 收率88.2%)。MS-ESI (m/z) : 215.116 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.35 (s, 1H), 6.43 (d, J=8.2Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.91 (dt, J=7.8, 5.3Hz, 1H), 1.61-1.53 (m, 2H), 1.46 (dt, J=13.6, 7.4Hz, 2H), 0.85 (t, J=7.4Hz, 6H)。

[0053] 中间体A-4的制备



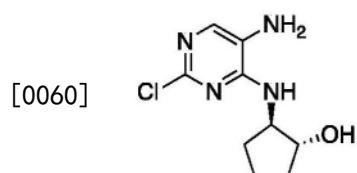
[0055] 中间体A-4的制备方法参考A-1, 区别是将环戊胺替换为四氢-2H-吡喃-4-胺, 得淡黄色固体 (11.9g, 收率85.2%)。MS-ESI (m/z) : 229.095 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.39 (s, 1H), 6.68 (d, J=7.2Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 4.05-4.01 (m, 1H), 3.90-3.85 (m, 2H), 3.43 (dd, J=11.7, 2.1Hz, 2H), 1.89-1.84 (m, 2H), 1.48 (td, J=11.8, 7.7Hz, 2H)。

[0056] 中间体A-5的制备



[0058] 中间体A-5的制备方法参考A-1, 区别是将环戊胺替换为3-氨基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯, 得淡黄色固体 (12.7g, 收率66.5%)。MS-ESI (m/z) : 314.154 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.42 (s, 1H), 6.89 (d, J=6.1Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.48-4.38 (m, 1H), 3.62-3.56 (m, 1H), 3.44-3.34 (m, 2H), 3.18-3.12 (m, 1H), 2.18-2.12 (m, 1H), 1.86 (dt, J=12.9, 6.4Hz, 1H), 1.41 (d, J=3.4Hz, 9H)。

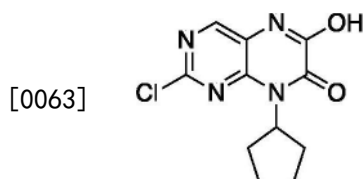
[0059] 中间体A-6的制备



[0061] 中间体A-6的制备方法参考A-1, 区别是将环戊胺替换为(1R,2R)-2-氨基环戊烷-1-醇, 得淡黄色固体 (10.5g, 收率81.8%)。MS-ESI (m/z) : 229.095 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.37 (s, 1H), 6.65 (d, J=6.7Hz, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.82 (d, J=4.3Hz, 1H), 4.06-4.00 (m, 1H), 3.95 (d, J=5.3Hz, 1H), 2.12-2.05 (m, 1H), 1.87 (ddd, J=12.8, 6.3, 2.2Hz,

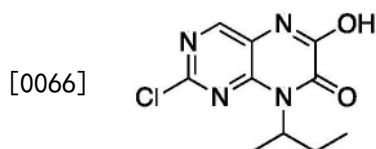
1H), 1.71-1.61 (m, 2H), 1.53-1.37 (m, 2H)。

[0062] 中间体A-7的制备



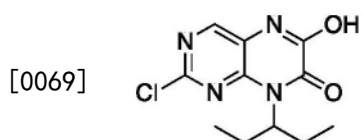
[0064] 在氮气保护条件下,将A-1 (15g, 70.1mmol) 和 $K_2CO_3$  (19.5g, 141.5mmol) 溶于丙酮 (150mL) 中,在冰浴条件下缓慢滴加草酰氯单己酯,控制温度不超过 $5^{\circ}C$ ,滴毕移至室温反应 2h。TLC监测反应完成,反应液抽滤,滤饼用丙酮 (50mL) 洗,滤液减压浓缩后得到棕褐色油状液体。将棕褐色油状物溶用EtOH (100mL) 转移至封管中,加入TEA (8.5g, 84.1mmol),升温至 $100^{\circ}C$ 反应4h。TLC监测反应完成,冷却至室温,有固体析出,抽滤,滤饼烘干得到白色固体A-7 (14.7g, 收率78.9%)。MS-ESI (m/z) : 267.090 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.30 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 5.48 (ddd, J=9.6, 7.5, 1.9Hz, 1H), 2.13-2.05 (m, 2H), 1.98 (td, J=6.0, 5.6, 3.1Hz, 2H), 1.83 (td, J=8.1, 7.3, 2.5Hz, 2H), 1.65-1.57 (m, 2H)。

[0065] 中间体A-8的制备



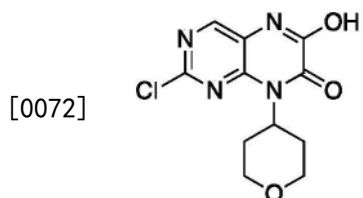
[0067] 中间体A-8的制备方法参考A-7,区别是将A-1替换为A-2,得白色固体 (9.4g, 收率73.7%)。MS-ESI (m/z) : 255.076 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.33 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 5.10 (q, J=7.2Hz, 1H), 2.11-2.04 (m, 1H), 1.88 (dt, J=14.0, 7.1Hz, 1H), 1.46 (d, J=6.9Hz, 3H), 0.82 (t, J=7.5Hz, 3H)。

[0068] 中间体A-9的制备



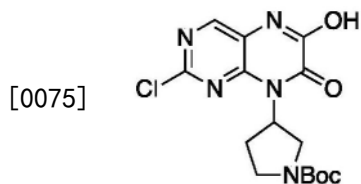
[0070] 中间体A-9的制备方法参考A-7,区别是将A-1替换为A-3,得白色固体 (9.7g, 收率77.5%)。MS-ESI (m/z) : 269.098 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.39 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 4.95 (s, 1H), 2.11 (s, 2H), 1.90-1.79 (m, 2H), 0.79 (t, J=7.5Hz, 6H)。

[0071] 中间体A-10的制备



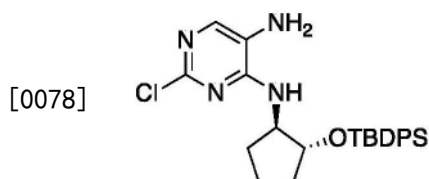
[0073] 中间体A-10的制备方法参考A-7,区别是将A-1替换为A-4,得白色固体 (9.6g, 收率77.6%)。MS-ESI (m/z) : 283.068 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.25 (s, 1H), 5.21 (td, J=8.0, 4.0Hz, 1H), 3.98 (dd, J=11.5, 4.5Hz, 2H), 3.45-3.39 (m, 2H), 2.66 (d, J=7.1Hz, 2H), 1.59-1.55 (m, 2H)。

[0074] 中间体A-11的制备



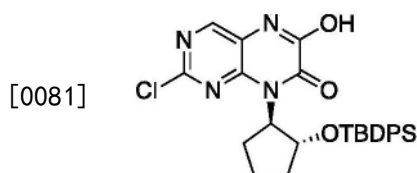
[0076] 中间体A-11的制备方法参考A-7,区别是将A-1替换为A-5,得白色固体(9.3g,收率79.3%)。MS-ESI (m/z) :368.059[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ12.27 (s, 1H) ,8.30 (s, 1H) ,3.75-3.42 (m, 4H) ,3.38 (t, J=8.6Hz, 1H) ,2.42 (d, J=9.6Hz, 1H) ,2.18 (dd, J=8.2, 5.2Hz, 1H) ,1.41 (d, J=11.0Hz, 9H) 。

[0077] 中间体A-12的制备



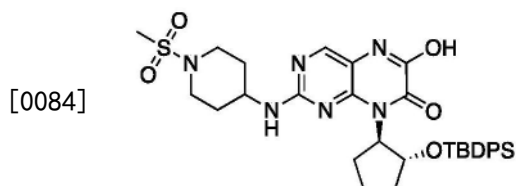
[0079] 将A-6 (8g, 35.1mmol) 溶于DCM (80mL) 中,加入咪唑 (6g, 87.75mmol) 和DMAP (0.5g, 4.1mmol),氮气保护。降温至0°C,滴加叔丁基二苯基氯硅烷 (10.6g, 38.6mmol),滴毕,升温至室温搅拌4h。TLC监测反应完成,反应液中加入水,用DCM萃取三遍,合并有机相,然后用饱和NaCl水溶液洗涤、加入Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、抽滤,滤液减压浓缩得到的粗产物经硅胶柱层析[洗脱剂:DCM:MeOH=150:1 (v/v)]分离纯化后得到深棕色固体A-12 (9.5g,收率58.1%)。MS-ESI (m/z) :467.223[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.62-7.59 (m, 4H) ,7.43-7.32 (m, 7H) ,6.55 (d, J=7.7Hz, 1H) ,4.86 (s, 2H) ,4.49-4.44 (m, 1H) ,4.15 (d, J=4.5Hz, 1H) ,2.12 (dt, J=8.9, 4.5Hz, 1H) ,1.74 (s, 1H) ,1.67-1.59 (m, 2H) ,1.52-1.46 (m, 2H) ,0.99 (s, 9H) 。

[0080] 中间体A-13的制备



[0082] 中间体A-13的制备方法参考A-7,区别是将A-1替换为A-12,得淡黄色固体(5.6g,收率62.7%)。MS-ESI (m/z) :521.176[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.17 (s, 1H) ,7.43-7.37 (m, 4H) ,7.32-7.23 (m, 5H) ,7.12 (s, 1H) ,5.45-5.40 (m, 1H) ,4.86 (s, 1H) ,2.08-2.04 (m, 1H) ,1.91 (d, J=7.4Hz, 2H) ,1.87-1.83 (m, 1H) ,1.77 (d, J=5.6Hz, 2H) ,0.92 (s, 9H) 。

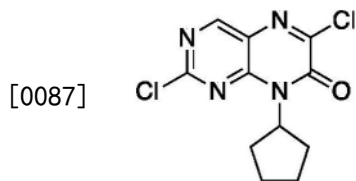
[0083] 中间体A-14的制备



[0085] 中间体A-14的制备方法参考I-2,区别是以A-13为原料,并且将4-甲磺基苯胺替换为1-甲磺基4-氨基吡啶,得白色固体(0.8g,收率62.8%)。MS-ESI (m/z) :663.308[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H

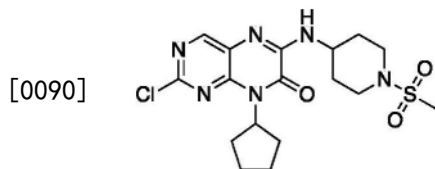
NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.71 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.41 (dd,  $J=7.3, 5.8$ Hz, 3H), 7.33-7.25 (m, 5H), 7.15 (d,  $J=7.6$ Hz, 2H), 5.52 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 3.67 (s, 1H), 3.52 (d,  $J=12.1$ Hz, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.88-2.71 (m, 3H), 2.09-1.96 (m, 2H), 1.84 (d,  $J=44.0$ Hz, 6H), 1.52 (d,  $J=11.8$ Hz, 2H), 0.91 (s, 9H)。

[0086] 中间体A-15的制备



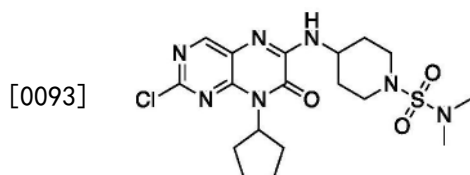
[0088] 将A-2 (5g, 18.8mmol)、 $\text{POCl}_3$  (20mL) 依次加入反应瓶, 回流反应4h。TLC监测反应完成, 冷却至室温, 减压浓缩除去大部分溶剂后, 将残留反应液缓慢滴加至冰水中, 有固体析出, 抽滤, 滤饼烘干得白色固体A-15 (4.2g, 收率78.4%)。MS-ESI (m/z): 285.044  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.95 (s, 1H), 5.84 (ddd,  $J=9.6, 7.6, 1.9$ Hz, 1H), 2.27-2.21 (m, 2H), 2.19-2.11 (m, 2H), 2.05-1.98 (m, 2H), 1.78-1.71 (m, 2H)。

[0089] 中间体A-16的制备



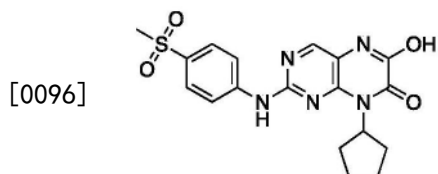
[0091] 将A-15 (2g, 7mmol) 溶于EtOH (20mL), 加入1-甲磺基4-氨基哌啶 (1.2g, 7mmol), 升温至40 $^\circ\text{C}$  搅拌2h。TLC监测反应完成, 反应液降温至室温, 有固体析出, 抽滤, 滤饼烘干得到白色固体A-16 (1.8g, 收率60.1%)。MS-ESI (m/z): 427.146  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.64 (s, 1H), 6.53 (d,  $J=7.9$ Hz, 1H), 5.81 (t,  $J=8.4$ Hz, 1H), 4.17-4.11 (m, 1H), 3.83 (d,  $J=12.4$ Hz, 2H), 2.99 (dd,  $J=12.6, 10.0$ Hz, 2H), 2.85 (s, 3H), 2.23 (dd,  $J=13.2, 4.3$ Hz, 4H), 2.16-2.11 (m, 2H), 2.03-1.97 (m, 2H), 1.77-1.71 (m, 4H)。

[0092] 中间体A-17的制备



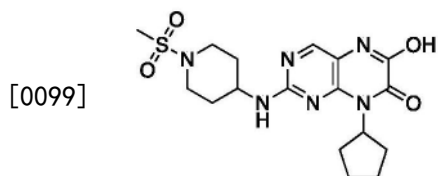
[0094] 化合物A-17的制备方法参考A-16, 区别是将1-甲磺基4-氨基哌啶替换为4-氨基-N,N-二甲基哌啶-1-磺酰胺, 得白色固体 (1.6g, 收率51.1%)。MS-ESI (m/z): 456.180  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.60 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.06 (d,  $J=20.0$ Hz, 2H), 2.82 (s, 6H), 2.10 (s, 4H), 1.95 (s, 2H), 1.64 (d,  $J=23.8$ Hz, 4H)。

[0095] 实施例1 8-环戊基-2-((4-(甲磺酰基)苯基)氨基)-5,8-二氢蝶呤-6,7-二酮 (I-1)



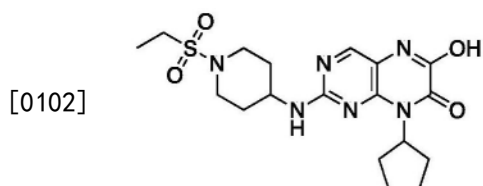
[0097] 将A-2 (1g, 3.8mmol) 溶于正丁醇 (10mL) 中, 依次加入4-甲磺基苯胺 (0.7g, 4.2mmol) 和对甲苯磺酸一水合物 (0.7g, 3.8mmol), 升温至120℃, 回流搅拌反应12h。TLC监测反应完成, 反应液冷却至室温, 抽滤得黄色固体, 经PE打浆得到淡黄色固体I-1化合物 (0.7g, 收率45.9%)。MS-ESI (m/z): 402.142 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.94 (d, J=8.9Hz, 2H), 7.83-7.80 (m, 2H), 5.65 (d, J=8.7Hz, 1H), 3.34 (s, 1H), 3.15 (s, 3H), 2.17 (dd, J=12.5, 7.5Hz, 2H), 1.96 (d, J=8.4Hz, 2H), 1.89-1.82 (m, 2H), 1.63 (q, J=6.1Hz, 2H)。

[0098] 实施例2 8-环戊基-6-羟基-2-((1-(甲磺酰)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮 (I-2)



[0100] 将A-2 (5g, 18.8mmol) 溶于DMSO (50mL) 中, 依次加入DIPEA (2.9g, 22.6mmol) 和1-甲磺基-4-氨基哌啶 (4.7g, 26.3mmol), 升温至100℃反应6h, 然后升温至110℃继续反应6h。TLC监测反应完成, 冷却至室温, 加入水, 用DCM萃取三遍, 合并有机相, 然后用饱和NaCl水溶液洗涤、加入Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、抽滤, 滤液减压得到的粗产物经硅胶柱层析[洗脱剂: DCM:MeOH=100:1 (v/v)] 分离纯化后得到白色固体I-2化合物 (4.2g, 收率54.7%)。MS-ESI (m/z): 409.150 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.74 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.13 (d, J=7.4Hz, 1H), 5.60 (t, J=8.7Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.54 (dt, J=12.7, 4.2Hz, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.84 (dd, J=11.5, 2.7Hz, 2H), 2.18 (t, J=7.3Hz, 2H), 1.98-1.92 (m, 4H), 1.77 (d, J=9.3Hz, 2H), 1.57 (dd, J=17.2, 8.0Hz, 4H)。

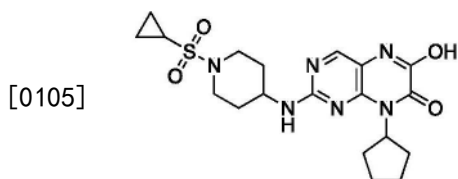
[0101] 实施例3 8-环戊基-2-((1-(乙基磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-6-羟基蝶呤-7(8H)-酮 (I-3)



[0103] 化合物I-3的制备方法参考化合物I-2, 区别是将1-甲磺基4-氨基哌啶替换为1-(乙基磺酰)哌啶-4-胺盐酸盐, 得白色固体I-3化合物 (0.76g, 收率47.4%)。MS-ESI (m/z): 423.127 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.75 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 5.60 (t, J=8.8Hz, 1H), 3.81 (s, 1H), 3.62-3.56 (m, 2H), 3.05 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.97-2.90 (m, 2H), 2.17 (d, J=10.3Hz, 2H), 1.96-1.89 (m, 4H), 1.81-1.74 (m, 2H), 1.60-1.49 (m, 4H), 1.22 (s, 3H)。

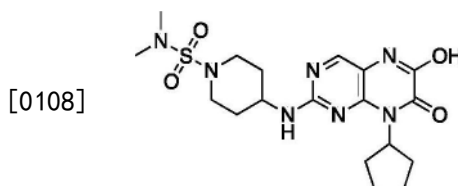
[0104] 实施例4 8-环戊基-2-((1-(环丙基磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-6-羟基蝶呤-7

(8H)-酮(I-4)



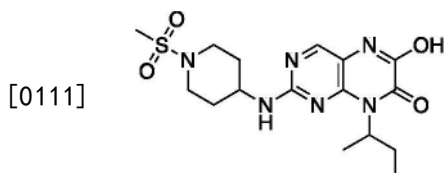
[0106] 化合物I-4的制备方法参考化合物I-2,区别是将1-甲磺基4-氨基哌啶替换为1-(环丙基磺酰基)哌啶-4-胺盐酸盐,得白色固体I-4化合物(0.7g,收率43.2%)。MS-ESI (m/z): 435.206 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.74 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.62-5.56 (m, 1H), 3.81 (s, 1H), 3.60 (d, J=12.0Hz, 2H), 2.97 (d, J=11.8Hz, 2H), 2.17 (d, J=7.9Hz, 2H), 1.94 (s, 4H), 1.78 (s, 2H), 1.60-1.53 (m, 4H), 1.30 (s, 2H), 0.99 (d, J=7.8Hz, 2H)。

[0107] 实施例5 4-((8-环戊基-6-羟基-7-氧代-7,8-二氢蝶呤-2-基)氨基)-N,N-二甲基哌啶-1-磺酰胺(I-5)



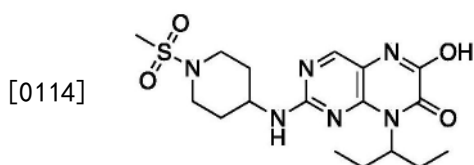
[0109] 化合物I-5的制备方法参考化合物I-2,区别是将1-甲磺基4-氨基哌啶替换为4-氨基-N,N-二甲基哌啶-1-磺酰胺盐酸盐,得淡黄色固体I-5化合物(0.74g,收率45.1%)。MS-ESI (m/z): 438.191 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.22 (s, 1H), 5.65 (d, J=8.8Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.69 (d, J=12.9Hz, 2H), 3.02 (d, J=10.6Hz, 2H), 2.85 (s, 6H), 2.26 (d, J=9.2Hz, 2H), 2.12 (d, J=10.3Hz, 4H), 1.92-1.88 (m, 2H), 1.69 (d, J=8.5Hz, 4H)。

[0110] 实施例6 8-(仲丁基)-6-羟基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(I-6)



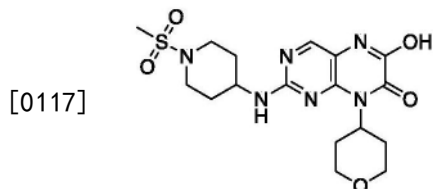
[0112] 化合物I-6的制备方法参考化合物I-2,区别是以A-8为原料,得淡黄色固体I-6化合物(0.8g,收率51.3%)。MS-ESI (m/z): 397.182 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.81 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 3.77 (s, 1H), 3.54 (dd, J=11.9, 3.7Hz, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.88-2.82 (m, 2H), 2.26-2.05 (m, 2H), 2.00-1.77 (m, 4H), 1.55 (t, J=11.0Hz, 2H), 1.46 (d, J=6.8Hz, 4H)。

[0113] 实施例7 6-羟基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-8-(戊烷-3-基)蝶呤-7(8H)-酮(I-7)



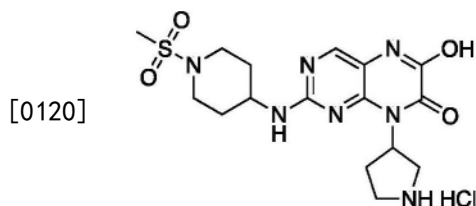
[0115] 化合物I-7的制备方法参考I-2,区别是以A-9为原料,得淡黄色固体I-7化合物(1g,收率52.2%)。MS-ESI (m/z) :411.203 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ11.87 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 5.19 (s, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.54 (d, J=11.8Hz, 2H), 2.88 (s, 5H), 2.18-1.80 (m, 6H), 1.55 (d, J=11.3Hz, 2H)。

[0116] 实施例8 6-羟基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-8-(四氢-2H-吡喃-4-基)蝶呤-7(8H)-酮(I-8)



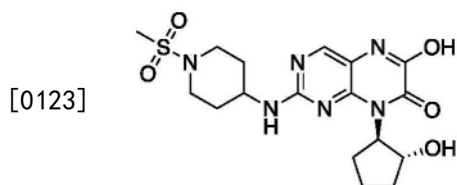
[0118] 化合物I-8的制备方法参考I-2,区别是以A-10为原料,得淡黄色固体I-8化合物(0.9g,收率48.3%)。MS-ESI (m/z) :425.217 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ10.80 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 5.29 (q, J=10.4, 9.3Hz, 1H), 3.99 (dd, J=11.5, 4.5Hz, 2H), 3.76 (s, 1H), 3.56 (dd, J=10.1, 6.1Hz, 2H), 3.42-3.36 (m, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.87-2.82 (m, 2H), 2.74 (dt, J=13.6, 6.8Hz, 2H), 2.02-1.95 (m, 2H), 1.58-1.50 (m, 4H)。

[0119] 实施例9 6-羟基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-8-(吡咯烷-3-基)蝶呤-7(8H)-一盐酸盐(I-9)



[0121] 将A-10(1g, 2.7mmol)溶于DMSO(10mL)中,依次加入DIPEA(0.4g, 3.3mmol)和1-甲磺基-4-氨基哌啶(0.7g, 3.8mmol),升温至100℃反应6h,然后升温至110℃继续反应6h。TLC监测反应完成,冷却至室温,加入水,用DCM萃取三遍,合并有机相,然后用饱和NaCl水溶液洗涤、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,减压浓缩,得到的粗产物经硅胶柱层析[洗脱剂:DCM:MeOH=50:1(v/v)]分离纯化后得中间体;中间体溶于HCl-MeOH(5mL),室温搅拌过夜。TLC监测反应完成,减压浓缩除溶剂,得白色固体I-9化合物(0.4g,收率33.3%)。MS-ESI (m/z) :410.179 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, Deuterium Oxide) δ7.98 (s, 1H), 6.04-5.99 (m, 1H), 3.88 (d, J=12.0Hz, 1H), 3.55-3.47 (m, 4H), 3.29-3.20 (m, 2H), 2.92-2.86 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.44 (dh, J=13.5, 4.2Hz, 2H), 2.19 (s, 2H), 1.97 (s, 1H), 1.62-1.55 (m, 2H)。

[0122] 实施例10 6-羟基-8-((1R,2R)-2-羟基环戊基)-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(I-10)

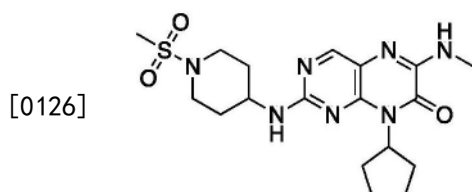


[0124] 将A-14(0.5g, 0.8mmol)溶于THF(5mL)中,加入四甲基氟化胺(0.2g, 2mmol),室温搅拌过夜。TLC监测反应完成,反应液减压浓缩除去大部分溶剂,加入水,用DCM萃取三遍,合



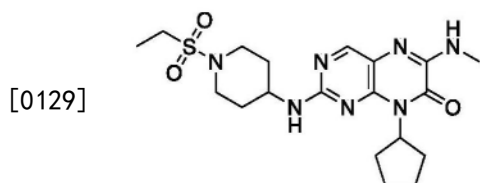
并有机相,然后用饱和NaCl水溶液洗涤、加入 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥、抽滤,滤液减压得到的粗产物经硅胶柱层析[洗脱剂:DCM:MeOH=100:1 (v/v)]分离纯化得到白色固体I-10化合物(0.22g,收率62.5%)。MS-ESI (m/z):425.173[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ11.75 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 5.35-5.28 (m, 1H), 4.79 (s, 1H), 4.76 (d, J=7.0Hz, 1H), 3.78 (s, 1H), 3.58-3.53 (m, 2H), 2.89 (s, 3H), 2.83 (dt, J=11.9, 3.2Hz, 2H), 2.15-2.02 (m, 2H), 1.99-1.93 (m, 2H), 1.84 (p, J=5.1, 4.4Hz, 2H), 1.73 (s, 1H), 1.55 (dq, J=18.2, 7.2, 6.3Hz, 3H)。

[0125] 实施例11 8-环戊基-6-(甲氨基)-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-11)



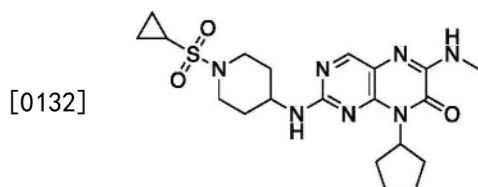
[0127] 将I-2 (0.5g, 1.2mmol)、 $\text{POCl}_3$  (5mL) 依次加入反应瓶,回流反应4h。TLC监测反应完成,冷却至室温,减压浓缩除去大部分溶剂后,将残留反应液缓慢滴加至冰水中,有固体析出,抽滤得滤饼;将滤饼与30%甲胺醇溶液(3mL)加入反应瓶中,回流反应6h。TLC监测反应完成,冷却至室温,反应液中加入水(10mL),用DCM(15mL)萃取三遍,合并有机相,然后用饱和NaCl水溶液洗涤、加入 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥、抽滤,滤液减压得到的粗产物经硅胶柱层析[洗脱剂:DCM:MeOH=200:1 (v/v)]分离纯化后得到黄色固体II-11化合物(0.34g,收率65.9%)。MS-ESI (m/z):422.143[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ8.34 (d, J=1.0Hz, 1H), 7.42 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.11 (d, J=7.8Hz, 1H), 5.74 (t, J=8.7Hz, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.55 (d, J=11.9Hz, 2H), 2.88 (d, J=0.9Hz, 3H), 2.85 (dd, J=11.4, 3.6Hz, 5H), 2.22 (s, 2H), 1.97 (d, J=11.5Hz, 4H), 1.81 (d, J=10.3Hz, 2H), 1.65-1.54 (m, 4H)。

[0128] 实施例12 8-环戊基-2-((1-(乙基磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-6-(甲氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-12)



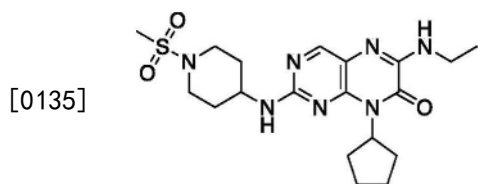
[0130] 化合物II-12的制备参考化合物II-11,区别是以I-3为原料,得黄色固体II-12化合物(0.09g,收率29.2%)。MS-ESI (m/z):436.239[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) δ8.48 (s, 1H), 6.21 (d, J=5.5Hz, 1H), 5.79-5.73 (m, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.05-3.97 (m, 1H), 3.80 (dd, J=12.5, 4.5Hz, 2H), 3.07 (d, J=5.0Hz, 3H), 3.06-2.98 (m, 4H), 2.34 (t, J=9.6Hz, 2H), 2.21-2.15 (m, 2H), 2.05 (s, 2H), 1.91 (t, J=4.9Hz, 2H), 1.73-1.65 (m, 4H), 1.27 (s, 3H)。

[0131] 实施例13 8-环戊基-2-((1-(环丙基磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-6-(甲氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-13)



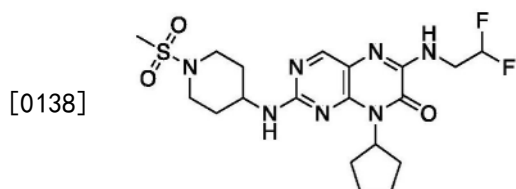
[0133] 化合物II-13的制备方法参考II-11,区别是以I-4为原料,得黄色固体II-13化合物(0.1g,收率32.4%)。MS-ESI (m/z): 448.235 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.48 (s, 1H), 6.21 (d, J=5.3Hz, 1H), 5.79-5.74 (m, 1H), 4.00 (d, J=8.1Hz, 1H), 3.82-3.77 (m, 2H), 3.12-3.06 (m, 5H), 2.19 (dd, J=13.1, 3.8Hz, 2H), 2.10-2.01 (m, 4H), 1.93-1.89 (m, 2H), 1.71 (dt, J=6.9, 2.8Hz, 4H), 1.23-1.21 (m, 2H), 1.04-1.02 (m, 2H)。

[0134] 实施例14 8-环戊基-6-(乙氨基)-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-14)



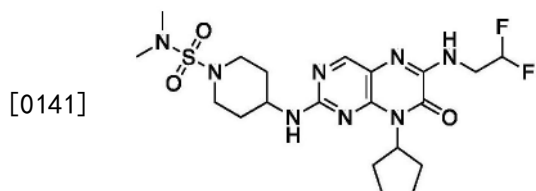
[0136] 化合物II-14的制备方法参考化合物II-11,区别是将甲胺醇溶液替换为乙胺醇溶液,得黄色固体II-14化合物(0.32g,收率60.3%)。MS-ESI (m/z): 436.234 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.33 (s, 1H), 7.36 (t, J=5.9Hz, 1H), 5.75 (dd, J=10.5, 7.0Hz, 1H), 3.55 (d, J=12.0Hz, 2H), 3.37-3.30 (m, 4H), 2.88 (s, 3H), 2.86 (d, J=2.7Hz, 1H), 2.25-2.17 (m, 2H), 1.97 (d, J=11.9Hz, 4H), 1.81 (t, J=4.8Hz, 2H), 1.64-1.53 (m, 4H), 1.15 (t, J=7.1Hz, 3H)。

[0137] 实施例15 8-环戊基-6-((2,2-二氟乙基)氨基)-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-15)



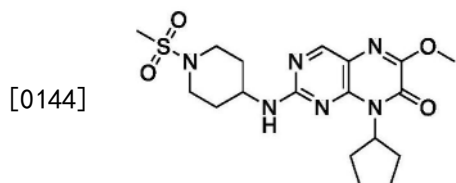
[0139] 化合物II-15和制备方法参考化合物II-11,区别是将甲胺醇溶液替换为二氟乙胺溶液,得白色固体II-15化合物(0.19g,收率55.4%)。MS-ESI (m/z): 472.200 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.45 (s, 1H), 6.36 (t, J=6.5Hz, 1H), 5.76 (d, J=8.9Hz, 1H), 5.06 (d, J=7.8Hz, 1H), 4.02-3.96 (m, 1H), 3.93-3.85 (m, 2H), 3.80 (d, J=12.3Hz, 2H), 3.00-2.94 (m, 2H), 2.85 (s, 3H), 2.36-2.30 (m, 2H), 2.23-2.18 (m, 2H), 2.07 (t, J=8.0Hz, 2H), 1.96-1.90 (m, 2H), 1.75-1.67 (m, 4H)。

[0140] 实施例16 4-((8-环戊基-6-((2,2-二氟乙基)氨基)-7-氧代-7,8-二氢蝶呤-2-基)氨基)-N,N-二甲基哌啶-1-磺酰胺(II-16)



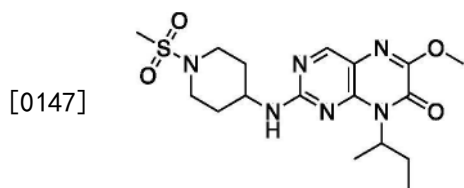
[0142] 化合物II-16的制备方法参考II-11,区别是以I-5为原料,且将甲胺醇溶液替换为二氟乙胺溶液,得淡黄色固体II-16化合物(0.08g,收率23.3%)。MS-ESI (m/z): 501.224 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.36 (s, 1H), 7.67 (d, J=6.2Hz, 1H), 6.19 (d, J=4.3Hz, 1H), 5.74 (t, J=9.0Hz, 1H), 3.86 (s, 1H), 3.72 (p, J=4.5Hz, 2H), 3.58 (d, J=12.5Hz, 2H), 2.97 (t, J=11.9Hz, 2H), 2.76 (s, 6H), 2.24 (s, 2H), 1.96 (d, J=15.9Hz, 4H), 1.84-1.78 (m, 2H), 1.66-1.53 (m, 4H)。

[0143] 实施例17 8-环戊基-6-甲氧基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-17)



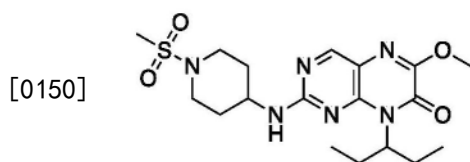
[0145] 将I-2(0.5g, 1.2mmol)、POCl<sub>3</sub>(5mL)依次加入反应瓶,回流反应4h。TLC监测反应完成,冷却至室温,减压浓缩除去大部分溶剂后,将残留反应液缓慢滴加至冰水中,有固体析出,抽滤得滤饼;将滤饼与DMF-DMA(8mL)加入反应瓶中,升温至120℃反应4h。TLC监测反应完成,冷却至室温,反应液滴加至冰水中,有固体析出,抽滤烘干后得白色固体II-17化合物(0.29g,收率56.1%)。MS-ESI (m/z): 423.171 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.47 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.57 (d, J=3.4Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 2.88 (d, J=1.6Hz, 3H), 2.83 (s, 1H), 2.22 (s, 2H), 1.97 (d, J=10.8Hz, 4H), 1.79 (s, 2H), 1.61 (d, J=9.5Hz, 4H)。

[0146] 实施例18 8-(仲丁基)-6-甲氧基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-18)



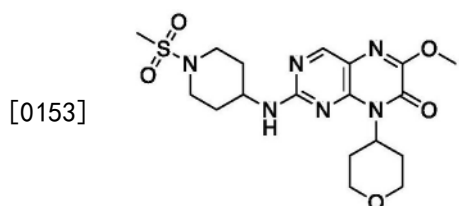
[0148] 化合物II-18的制备方法参考II-17,区别是以I-3为原料,得淡黄色固体II-18化合物(0.28g,收率54.6%)。MS-ESI (m/z): 411.198 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.47 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.84 (s, 1H), 3.59-3.53 (m, 2H), 2.89 (s, 5H), 2.14-1.87 (m, 4H), 1.61-1.54 (m, 2H), 1.50 (s, 3H)。

[0149] 实施例19 6-甲氧基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-8-(戊烷-3-基)蝶呤-7(8H)-酮(II-19)



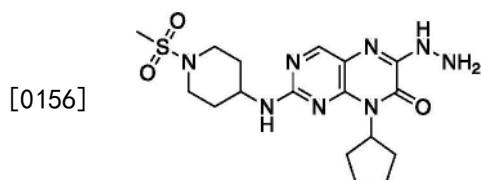
[0151] 化合物II-19的制备方法参考II-17,区别是以I-4为原料,得淡黄色固体II-19化合物(0.22g,收率53.2%)。MS-ESI (m/z): 425.179[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.49 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.56 (d, J=11.6Hz, 2H), 2.90 (s, 5H), 2.34 (s, 2H), 1.90 (d, J=66.9Hz, 4H), 1.58 (d, J=11.9Hz, 2H)。

[0152] 实施例20 6-甲氧基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-8-(四氢-2H-吡喃-4-基)蝶呤-7(8H)-酮(II-20)



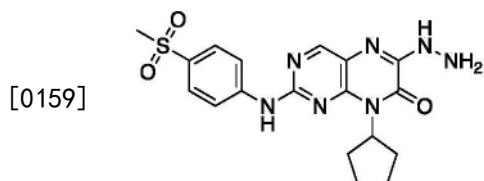
[0154] 化合物II-20的制备方法参考II-17,区别是以I-5为原料,得淡黄色固体II-20化合物(0.23g,收率55.7%)。MS-ESI (m/z): 439.136[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.47 (s, 1H), 7.60 (d, J=51.5Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 4.00 (dd, J=11.2, 4.4Hz, 2H), 3.89 (s, 4H), 3.59 (s, 2H), 3.42 (d, J=12.4Hz, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.85 (d, J=12.3Hz, 4H), 2.01 (d, J=19.3Hz, 2H), 1.58 (t, J=13.3Hz, 4H)。

[0155] 实施例21 8-环戊基-6-胍基-2-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-21)



[0157] 化合物II-21的制备方法参考化合物II-11,区别是将甲胺醇溶液替换为水合肼,得黄色固体II-21化合物(0.24g,收率46.4%)。MS-ESI (m/z): 423.214[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.36 (s, 1H), 7.17 (d, J=7.7Hz, 1H), 5.78-5.71 (m, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.55 (d, J=12.2Hz, 2H), 2.89 (s, 3H), 2.85 (dd, J=11.7, 2.7Hz, 2H), 2.21 (s, 2H), 1.97 (dd, J=10.3, 5.2Hz, 4H), 1.84-1.78 (m, 2H), 1.64-1.55 (m, 4H)。

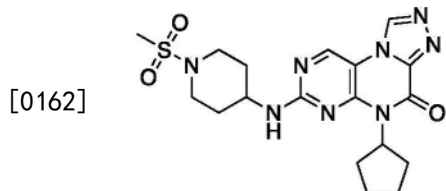
[0158] 实施例22 8-环戊基-6-胍基-2-((4-(甲磺酰基)苯基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(II-22)



[0160] 化合物II-22的制备方法参考化合物II-11,区别是以I-1为原料,且将甲胺醇溶液替换为水合肼,得黄色固体II-22化合物(0.23g,收率46.2%)。MS-ESI (m/z): 416.174[M+H]<sup>+</sup>;

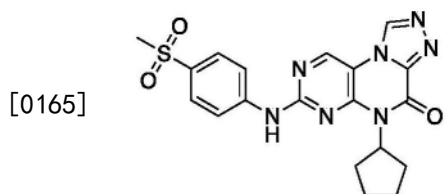
$^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 10.10 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.90 (dd,  $J=62.1, 8.5\text{Hz}$ , 4H), 5.78 (d,  $J=18.0\text{Hz}$ , 1H), 4.53 (s, 1H), 3.36 (s, 2H), 3.16 (s, 3H), 2.23 (s, 2H), 1.95 (d,  $J=42.5\text{Hz}$ , 4H), 1.66 (s, 2H)。

[0161] 实施例23 5-环戊基-7-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)-[1,2,4]三唑基[4,3-f]蝶呤-4(5H)-酮(II-23)



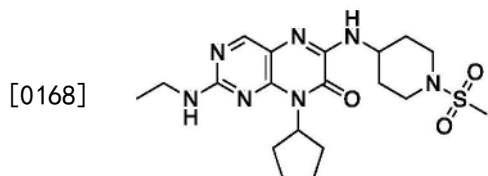
[0163] 将II-21 (0.18g, 0.4mmol) 溶于原甲酸三乙酯 (2mL) 中, 升温至80°C, 搅拌反应2h。TLC监测反应完成, 冷却至室温, 反应液缓慢滴加至冰水中, 有固体析出, 过滤, 滤饼烘干得白色固体II-23化合物 (0.12g, 收率65.2%)。MS-ESI (m/z): 433.209 [M+H]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.69 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.56 (d,  $J=11.9\text{Hz}$ , 2H), 2.92 (d,  $J=2.7\text{Hz}$ , 1H), 2.89 (d,  $J=3.4\text{Hz}$ , 3H), 2.86 (d,  $J=2.7\text{Hz}$ , 1H), 2.25 (s, 2H), 1.98 (d,  $J=12.4\text{Hz}$ , 4H), 1.83 (s, 2H), 1.60 (d,  $J=11.3\text{Hz}$ , 4H)。

[0164] 实施例24 5-环戊基-7-((4-(甲磺酰基)苯基)氨基)-[1,2,4]三唑并[4,3-f]蝶呤-4(5H)-酮(II-24)



[0166] 化合物II-24的制备方法参考化合物II-23, 区别是以II-22为原料, 得黄色固体II-24化合物 ((0.24g, 收率46.4%)。MS-ESI (m/z): 426.155 [M+H]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 10.48 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 7.99-7.83 (m, 4H), 5.83-5.75 (m, 1H), 3.18 (s, 3H), 2.27 (q,  $J=6.6\text{Hz}$ , 2H), 2.06-1.88 (m, 4H), 1.66 (q,  $J=6.1\text{Hz}$ , 2H)

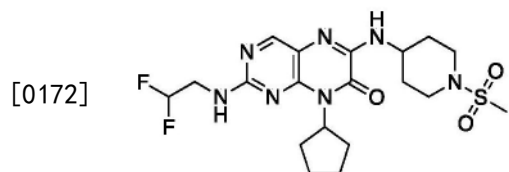
[0167] 实施例25 8-环戊基-2-(乙氨基)-6-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(III-25)



[0169] 将A-16 (0.5g, 1.2mmol) 溶于DMSO (5mL) 中, 加入乙胺醇 (1mL) 溶液, 升温至80°C 搅拌6h。TLC监测反应完成, 反应液冷却至室温, 滴加至冰水中, 有固体析出, 抽滤, 滤饼烘干得白色固体III-25化合物 ((0.24, 收率45.8%)。MS-ESI (m/z): 436.252 [M+H]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 8.29 (s, 1H), 7.25 (d,  $J=8.2\text{Hz}$ , 1H), 7.10 (s, 1H), 5.76 (t,  $J=8.7\text{Hz}$ , 1H), 3.98-3.91 (m, 1H), 3.54 (dd,  $J=9.8, 6.4\text{Hz}$ , 2H), 3.30 (dd,  $J=7.3, 5.9\text{Hz}$ , 2H), 2.90 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 2.88 (s, 3H), 2.84 (d,  $J=2.6\text{Hz}$ , 1H), 2.24 (s, 2H), 2.00-1.91 (m, 4H), 1.85-

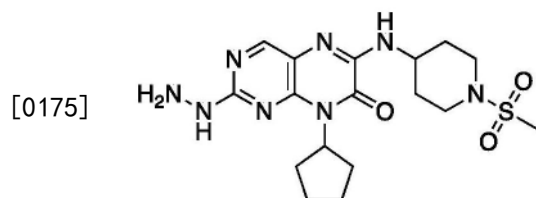
[0170] 1.78 (m, 2H), 1.71-1.60 (m, 4H), 1.13 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H)。

[0171] 实施例26 8-环戊基-2-((2,2-二氟乙基)氨基)-6-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(III-26)



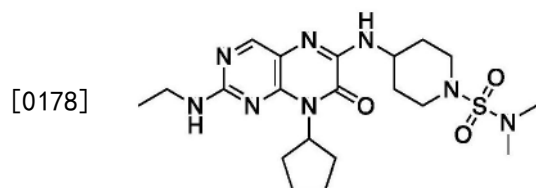
[0173] 化合物III-26的制备方法参考化合物III-25,区别是将乙胺醇溶液替换为二氟乙胺,得黄色固体III-26化合物(0.24g,收率46.4%)。MS-ESI (m/z): 472.218[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.34 (s, 1H), 7.46 (t, J=6.2Hz, 1H), 7.37 (d, J=8.3Hz, 1H), 5.78-5.72 (m, 1H), 4.01-3.93 (m, 1H), 3.75-3.66 (m, 2H), 3.55 (dd, J=9.7, 6.5Hz, 2H), 2.92-2.89 (m, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.87-2.84 (m, 1H), 2.23 (d, J=10.5Hz, 2H), 1.96 (tt, J=12.2, 8.0Hz, 4H), 1.87-1.80 (m, 2H), 1.73-1.60 (m, 4H)。

[0174] 实施例27 8-环戊基-2-胍基-6-((1-(甲磺酰基)哌啶-4-基)氨基)蝶呤-7(8H)-酮(III-27)



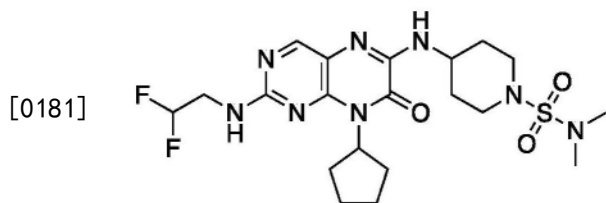
[0176] 化合物III-27的制备方法参考化合物III-25,区别是将乙胺醇溶液替换为水合肼,得黄色固体III-27化合物(0.22g,收率43.3%)。MS-ESI (m/z): 423.212[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.34 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.31 (d, J=8.2Hz, 1H), 5.84 (t, J=8.7Hz, 1H), 4.41 (s, 1H), 3.99-3.93 (m, 1H), 3.59-3.53 (m, 2H), 2.90 (d, J=2.6Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.84 (d, J=2.6Hz, 1H), 2.21 (t, J=9.9Hz, 2H), 2.02-1.91 (m, 4H), 1.83 (t, J=5.1Hz, 2H), 1.71-1.60 (m, 4H)。

[0177] 实施例28 4-((8-环戊基-2-(乙基氨基)-7-氧代-7,8-二氢蝶呤-6-基)氨基)-N,N-二甲基哌啶-1-磺酰胺(III-28)



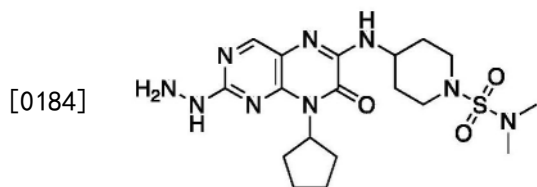
[0179] 化合物III-28的制备方法参考化合物III-25,区别是以A-17为原料,得黄色固体III-28化合物(0.25g,收率45.4%)。MS-ESI (m/z): 465.258[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.43 (s, 1H), 6.07 (d, J=7.8Hz, 1H), 5.85-5.79 (m, 1H), 4.07-4.01 (m, 1H), 3.75-3.69 (m, 2H), 3.51-3.45 (m, 2H), 3.11-3.04 (m, 2H), 2.85 (s, 6H), 2.34 (dd, J=12.4, 7.4Hz, 2H), 2.15 (dd, J=13.1, 3.7Hz, 2H), 2.06 (dq, J=7.9, 3.5, 2.3Hz, 2H), 1.90 (q, J=7.9, 6.7Hz, 2H)。

[0180] 实施例29 4-((8-环戊基-2-((2,2-二氟乙基)氨基)-7-氧代-7,8-二氢蝶呤-6-基)氨基)-N,N-二甲基哌啶-1-磺酰胺(III-29)



[0182] 化合物III-29的制备方法参考化合物III-25,区别是以A-17为原料,且将乙胺醇溶液替换为二氟乙胺,得黄色固体III-29化合物(0.28g,收率46.7%)。MS-ESI (m/z) : 501.245 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ8.46 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.78 (t, J=8.8Hz, 1H), 4.05 (dt, J=7.6, 3.7Hz, 1H), 3.91-3.83 (m, 2H), 3.75-3.70 (m, 2H), 3.11-3.04 (m, 2H), 2.85 (s, 6H), 2.31 (dd, J=12.6, 7.5Hz, 2H), 2.15 (dd, J=13.1, 3.7Hz, 2H), 2.09-2.03 (m, 2H), 1.95-1.88 (m, 2H), 1.74-1.62 (m, 4H)。

[0183] 实施例30 4-((8-环戊基-2-胍基-7-氧代-7,8-二氢蝶呤-6-基)氨基)-N,N-二甲基哌啶-1-磺酰胺(III-30)



[0185] 化合物III-30的制备方法参考化合物III-25,区别是以A-17为原料,且将乙胺醇溶液替换为水合肼,得黄色固体III-30化合物(0.28g,收率51.7%)。MS-ESI (m/z) : 452.240 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ8.50 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 6.16 (d, J=7.8Hz, 1H), 5.84 (t, J=8.8Hz, 1H), 4.09-4.03 (m, 1H), 3.73 (dd, J=10.7, 6.8Hz, 2H), 3.10-3.04 (m, 2H), 2.85 (s, 6H), 2.30 (dd, J=12.4, 7.5Hz, 2H), 2.16 (dd, J=13.2, 3.7Hz, 2H), 2.09-2.03 (m, 2H), 1.97-1.90 (m, 2H), 1.64 (dt, J=10.7, 2.2Hz, 4H)。

[0186] 实施例31化合物活性测定

[0187] 1. CDK2激酶抑制活性评价

[0188] ①化合物的配制:将化合物粉末溶解在100%DMSO中,配制成10mM的储存液。受试化合物测试浓度为500nM,复孔检测。在384孔板中用100%DMSO将储存液稀释100倍。用分液器Echo 550向目的板转移250nL的100倍终浓度的化合物。阴性对照孔和阳性对照孔中分别力口250nL的100%DMSO。

[0189] ②激酶的配制:配制1×Kinase buffer,用其配制2.5倍终浓度的激酶溶液。

[0190] ③在化合物孔和阳性对照孔分别加10μL的2.5倍终浓度的激酶溶液;在阴性对照孔中加10μL的2.5倍Kinase buffer。1000rpm离心30秒,振荡混匀后室温孵育10分钟。

[0191] ④用1×Kinase buffer配制25/15倍终浓度的ATP和Kinase substrate 22的混合溶液,取10μL加入到上述孔中,起始反应。将384孔板1000rpm离心30秒,振荡混匀后室温孵育30分钟。

[0192] ⑤终止反应:加入30μL终止检测液停止激酶反应,1000rpm离心30秒,振荡混匀后用酶标仪读取转化率。计算公式:抑制率% = ((阳性对照孔的转化率均值% - 待测化合物的转化率均值%) / (阳性对照孔的转化率均值% - 阴性对照孔的转化率均值%)) × 100。利用GraphPad Prism 5软件拟合量效曲线, X轴 = log[浓度], Y轴 = 抑制率%, 计算化合物对

CDK2-cyclin E激酶的 $IC_{50}$ 值,拟合公式: $Y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^{((LogIC_{50}-X)*HillSlope)})$ 。

[0193] 2.HCT 116和MV4-11细胞增殖抑制活性评价

[0194] ①HCT 116细胞:接种密度为每毫升 $5 \times 10^4$ 个,96孔板中加入细胞悬浮液(100 $\mu$ L),于培养箱中培养24h。去除培养基,加入稀释成不同浓度的待测化合物溶液(150 $\mu$ L),同时设置空白对照组(培养基)和阴性对照组(细胞和培养基),于培养箱中培养48h。去除培养基后加MTT溶液( $0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,100 $\mu$ L),于的培养箱中继续培养4h,去除MTT溶液,DMSO(100 $\mu$ L),振板后用酶标仪在570nm下读取吸光值。

[0195] ②MV4-11细胞:接种密度为每毫升 $1 \times 10^5$ 个,96孔板中细胞悬浮液(100 $\mu$ L),加入稀释成不同浓度的待测化合物(150 $\mu$ L),同时设置空白对照和阴性对照,于培养箱中培养72h。加入CCK-8溶液(10 $\mu$ L),于培养箱中培养4h,振板后用酶标仪在450nm下读取吸光值。

[0196] 采用GraphPad Prism 5软件计算不同浓度下的抑制率,根据抑制率曲线拟合对应的函数,计算 $IC_{50}$ 值。计算公式:细胞生长抑制率 $\% = 1 - (\text{实验孔吸光值} - \text{空白吸光值}) / (\text{阴性对照孔吸光值} - \text{空白吸光值}) \times 100$ 。

[0197] 本实施例公开了化合物的体外CDK2激酶抑制活性与部分抑制活性较好的化合物抗肿瘤细胞增殖活性检测结果,如表2和表3所示:

[0198] 表2不同蝶啶7(8H)-酮类化合物的体外CDK2激酶抑制活性检测结果

化合物	CDK2-cyclinE 激酶抑制率 (%)	化合物	CDK2-cyclinE 激酶抑制率 (%)
实施例 1	30	实施例 16	36
实施例 2	62	实施例 17	82
实施例 3	65	实施例 18	70
实施例 4	20	实施例 19	80
实施例 5	16	实施例 20	46
实施例 6	23	实施例 21	86
[0199] 实施例 7	39	实施例 22	67
实施例 8	9	实施例 23	14
实施例 9	4	实施例 24	2
实施例 10	43	实施例 25	34
实施例 11	46	实施例 26	35
实施例 12	45	实施例 27	27
实施例 13	9	实施例 28	43
实施例 14	20	实施例 29	38
实施例 15	51	实施例 30	27

[0200] 实施例2对CDK2的抑制活性优于实施例1,即较苯胺相比,在嘧啶2位引入哌啶胺更有助于提高化合物活性。实施例4、实施例5对CDK2激酶的抑制率小于实施例2、实施例3,说明在磺酰基上引入环丙基或N,N-二甲基时的抑制效果远不及链烷基。实施例17~22对CDK2的有较好的抑制活性,其中实施例17、实施例21最佳,分别为82%和86%。然而实施例25~30对CDK2的抑制活性均不高。

[0201] 表3部分抑制活性较好的化合物对CDK2激酶的 $IC_{50}$ 与抗肿瘤细胞增殖活性检测结



果

[0202]

化合物	IC <sub>50</sub> (μM)		
	CDK2-cyclinE	HCT 116	MV4-11
实施例 2	1.22	10.56	13.87
实施例 3	1.04	9.32	9.15
实施例 17	0.16	1.93	2.57
实施例 18	0.50	6.34	7.81
实施例 19	0.35	5.50	4.88
实施例 20	1.70	5.01	4.26
实施例 21	0.13	1.62	1.95
实施例 22	0.92	3.43	1.17

[0203] 细胞抗增殖实验的结果与激酶抑制活性结果具有一致性,基本成正相关关系,即对CDK2-cyclin E激酶有较好抑制效果的化合物,对肿瘤细胞也有较强的增殖抑制活性;侧面验证了抑制CDK2的激活可以抑制细胞增殖,达到抗肿瘤的作用。所测化合物对两种肿瘤细胞均有不同程度的细胞增殖抑制作用,其中实施例17 (IC<sub>50</sub>=1.93μM, 2.57μM)、实施例21 (IC<sub>50</sub>=1.62μM, 1.95μM) 和实施例22 (IC<sub>50</sub>=3.43μM, 1.17μM) 对人结肠癌细胞HCT 116和人髓系单核白血病细胞MV4-11的抗增殖活性较强。

[0204] 尽管本发明通过之前的特定实施例说明,但不应将其解释为受此限制;而是本发明涵盖之前公开的一般方面。可在不背离本发明的精神和范围下进行多种修饰并具有多种实施方案。