



(10) 授权公告号 CN 111465603 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 09

(21) 申请号 201880081002.4

(22) 申请日 2018.12.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111465603 A

(43) 申请公布日 2020.07.28

(30) 优先权数据
17208420.4 2017.12.19 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.15

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/085364 2018.12.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/121596 EN 2019.06.27

(73) 专利权人 勃林格殷格翰国际有限公司
地址 德国殷格翰

(72) 发明人 N·海涅 C·艾克麦尔
K·格拉赫 U·格罗斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102131389 A, 2011.07.20
WO 2009155551 A1, 2009.12.23
JP 2008518969 A, 2008.06.05
EP 2688874 A1, 2014.01.29
CA 2585279 A1, 2006.06.08

审查员 李迪

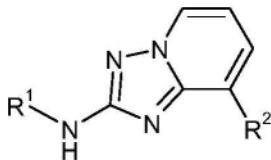
权利要求书8页 说明书76页 附图1页

(54) 发明名称

作为 γ -分泌酶调节剂的三唑并吡啶

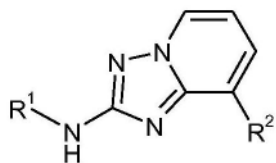
(57) 摘要

本发明涉及式II的三唑并吡啶以及它们作为 γ -分泌酶调节剂的用途。特别地,本发明涉及干扰 γ -分泌酶和/或其底物并因此调节A β 肽的形成的化合物。因此,这些化合物可以用于治疗A β 相关病理,例如阿尔茨海默病。



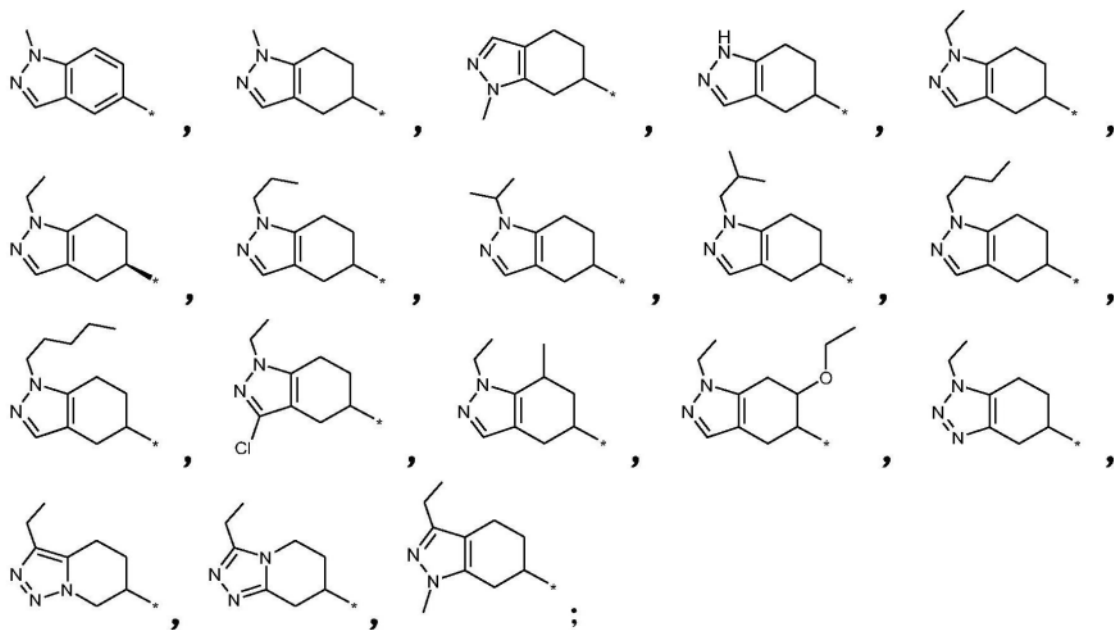
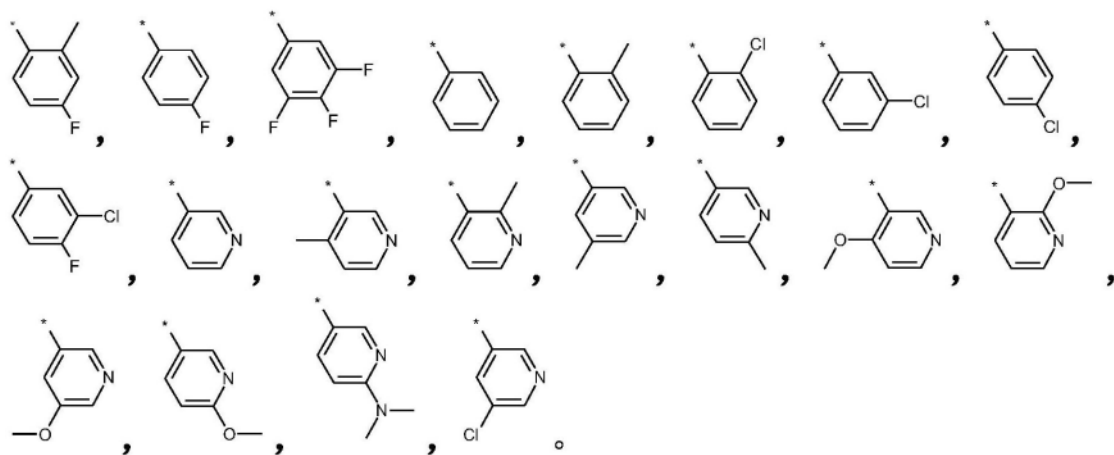
II

1. 式II的化合物



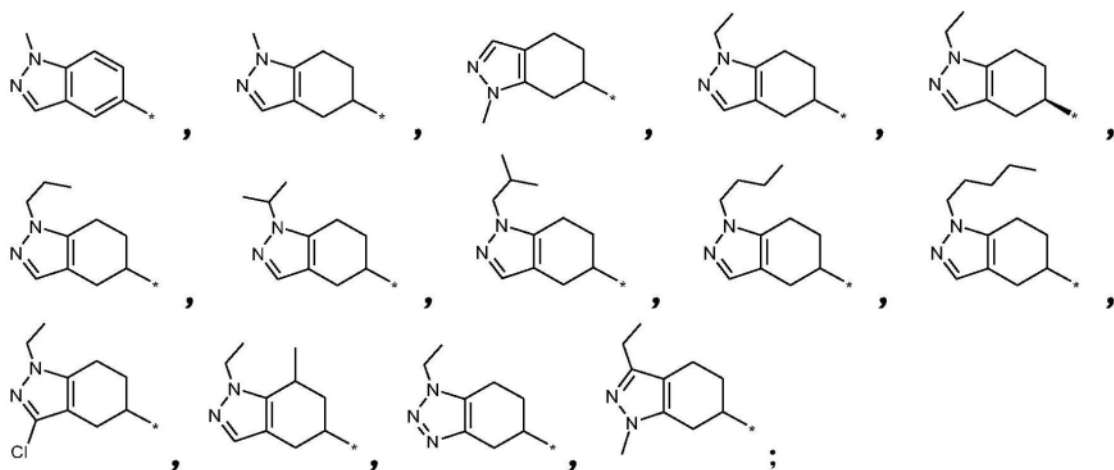
II

其中

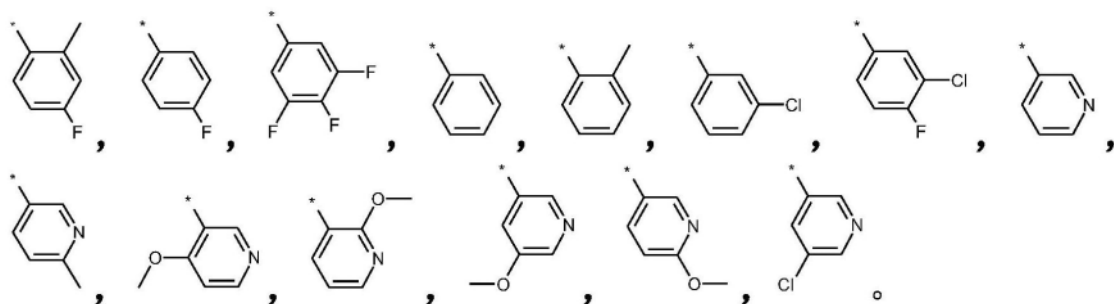
R¹表示R²表示

2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中

R¹表示

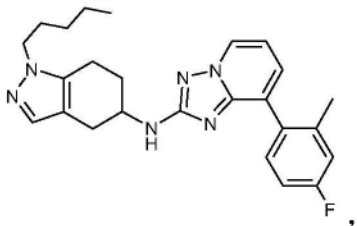
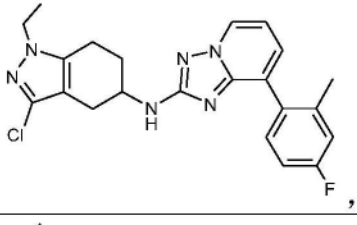
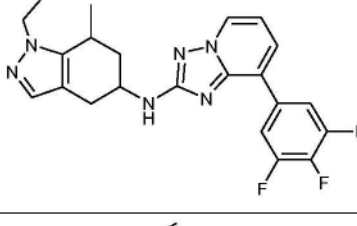
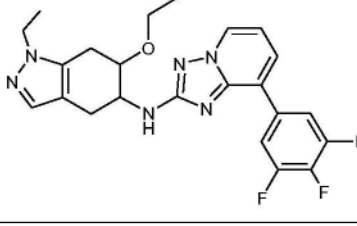
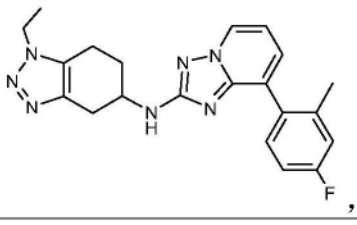
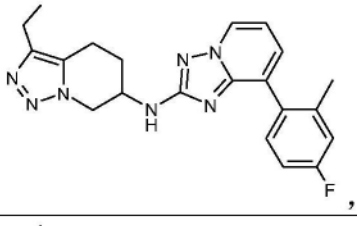
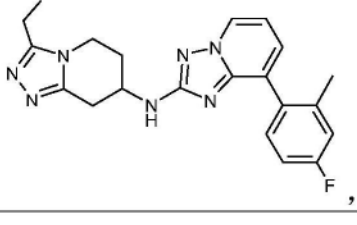


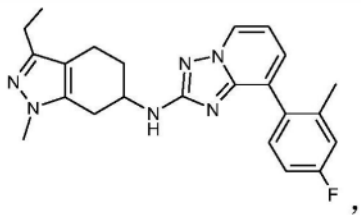
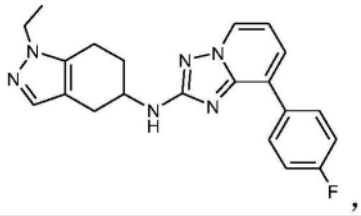
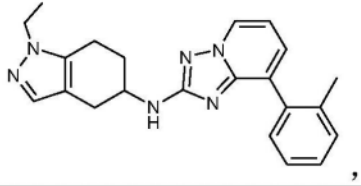
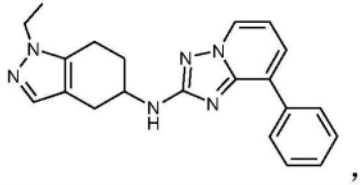
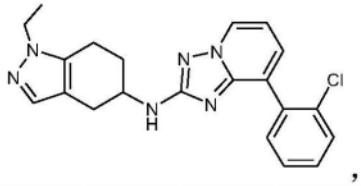
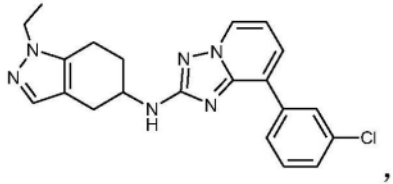
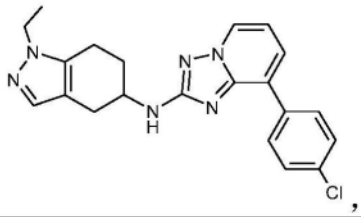
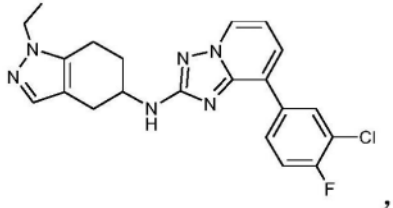
R^2 表示

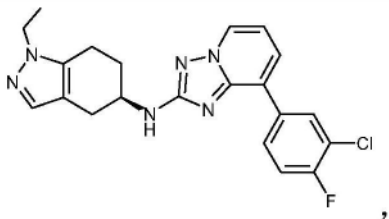
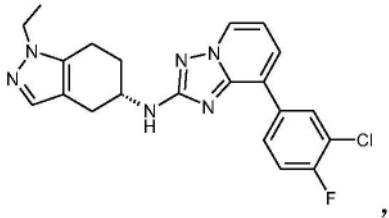
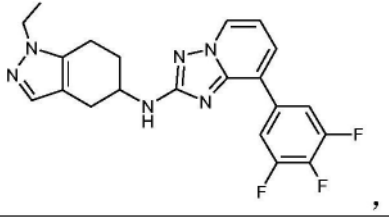
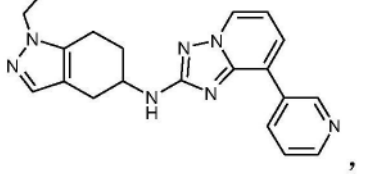
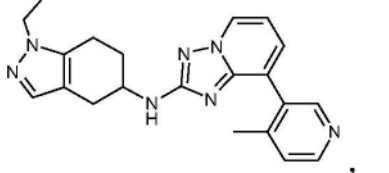
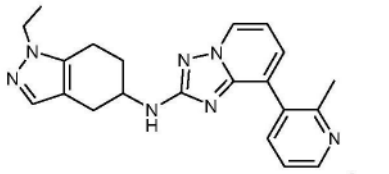
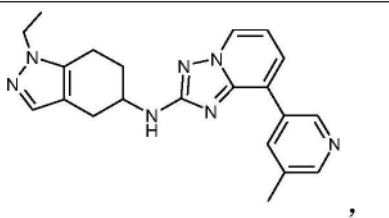
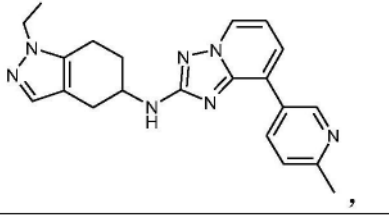


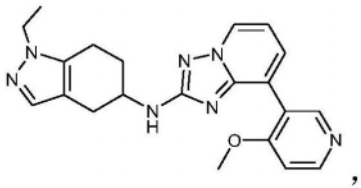
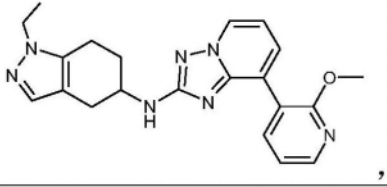
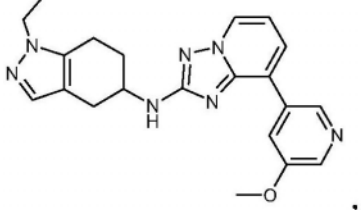
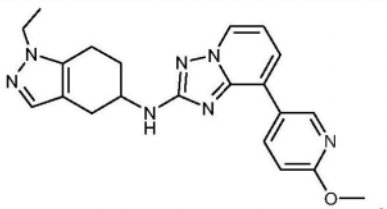
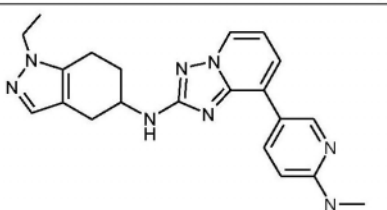
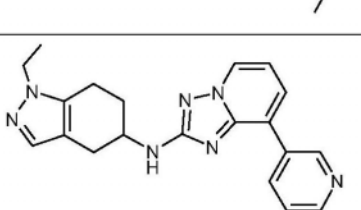
3. 根据权利要求1或2的任一项所述的化合物,其中所述化合物选自以下

实施例 编号	结构
9	
10	
40	

实施例 编号	结构
47	
48	
49	
50	
51	
52	
53	

实施例 编号	结构
54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	
61	

实施例 编号	结构
R-61	
S-61	
62	
63	
64	
65	
66	
67	

实施例 编号	结构
68	
69	
70	
71	
72	
73	

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物的药学上可接受的盐。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的化合物在制备 γ -分泌酶调节剂中的用途。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述 γ -分泌酶调节剂用于治疗和/或预防选自以下的疾病、紊乱或状况:唐氏综合征, $A\beta$ -淀粉样血管病,大脑淀粉样血管病,轻度认知功能障碍,阿尔茨海默病,记忆丧失,混合型血管起源的痴呆,变性起源的痴呆,早老性痴呆,老年性痴呆,青光眼和干性年龄相关性黄斑变性。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述阿尔茨海默病选自阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状,阿尔茨海默病相关的神经变性,以及弥漫性莱维小体类型的阿尔茨海默病。

8. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的化合物与药物上可接受的佐剂的混合物。

9. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的化合物与药物上可接受的稀释剂的混合物。

10. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的化合物与药物上可接受的载体的混合物。

作为 γ -分泌酶调节剂的三唑并吡啶

[0001] 本发明涉及三唑并吡啶以及它们作为 γ -分泌酶调节剂的用途。特别是,本发明涉及干扰 γ -分泌酶和/或其底物并因此调节A β 肽的形成的化合物。因此,这些化合物可以用于治疗A β 相关病理,例如阿尔茨海默病。

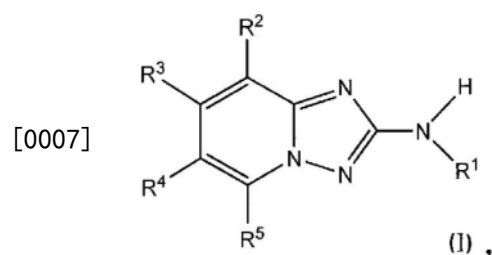
[0002] 阿尔茨海默病(AD)是痴呆的最普遍形式。这种神经退行性疾病的特征在于两种主要病理, β -淀粉样蛋白沉积和神经原纤维缠结。临床上,AD的特征是记忆力、认知、推理、判断力和定向力的丧失。随着疾病的发展,会丧失其它能力,直到发生多种认知功能的全面损害。这些认知丧失是逐渐发生的,但通常会导致严重的损伤并最终在4至12年内死亡。

[0003] β -淀粉样蛋白沉积主要由聚集态A β 肽形成。A β 肽由淀粉样前体蛋白(APP)通过分别涉及 β -分泌酶和 γ -分泌酶的两个独立的蛋白质水解事件形成。经由 γ -分泌酶在蛋白质水解的位点产生的可变性导致A β 物质具有可变的长度,其最主要的形式是A β 38、A β 40和A β 42。分泌的A β 然后聚集成低聚物,低聚物进一步聚集以最终形成在AD患者大脑中检测到的A β 蛋白沉积。普遍认为聚集的低聚物是导致AD患者大脑中检测到的神经变性的关键神经毒剂。在由 γ -分泌酶产生的各种A β 物质中,已经证明A β 42是最容易聚集的以及最具神经毒性的A β 物质。此外,人类遗传学强烈支持A β 42作为AD发病机理的关键调节剂的关键作用。已知超过150种引起家族性AD的突变是由产生的A β 42/A β 40肽的比率增加或A β 的内在聚集倾向性增加引起的。基于该知识,认为旨在降低A β 42含量的治疗途径是有前途的。

[0004] β -淀粉样蛋白沉淀核血管淀粉样血管病的特征在于,患有21三体综合征(唐氏综合征)的患者的大脑,荷兰型淀粉样变性的遗传性脑出血(HCHWA-D),和其它神经退行性疾病。

[0005] γ -分泌酶抑制剂完全抑制APP以及 γ -分泌酶의其它底物的裂解。这种抑制作用导致同时抑制所有A β 物质的产生。与 γ -分泌酶抑制剂相反, γ -分泌酶调节剂优先阻断神经毒性A β 42物质的产生,同时不抑制APP裂解以及由此的所有A β 物质的产生。此外, γ -分泌酶调节剂不抑制其它 γ -分泌酶底物的裂解,由此减少可能产生的副作用。

[0006] W02009/155551公开了通式(I)的化合物



[0008] 其为用于治疗骨髓增生性疾病和阿尔茨海默病的JAK激酶抑制剂。W02009/155551中公开的具体实施例展示苯基或5元或6元杂芳基作为式(I)的R¹。此外,实施例263、293和302展示稠合的杂芳基取代基作为R¹(表1)。

[0009] 表1:W02009/155551中展现稠合的杂芳基取代基作为式(I)的R¹的实施例

	在 WO2009/155551 中的实施例编号	结构
[0010]	263	
	293	
	302	

[0011] W02009/155551的实施例263、293和302显示高度的非选择性激酶抑制作用(表2和表6),包括来自FGFR家族、VEGFR家族和PDGFR家族以及FAK的酪氨酸激酶的抑制作用。另外,这些化合物也会抑制某些丝氨酸/苏氨酸激酶例如Aurora A。

[0012] 已经证明甚至更多FGFR家族或VEGFR家族的选择性激酶抑制剂在临床试验中具有心血管副作用和肾毒性(血管闭塞和高血压)。(Doux fils J,Haguet H,Mullier F,Chatelain C,Graux C and Dogné JM:Association between BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia and cardiovascular events,major molecular response,and overall survival:A systematic review and meta-analysis.JAMA Oncol.2016;5:625-632.Hayman SR,Leung N,Grande JP and Garovic VD:VEGF inhibition,hypertension,and renal toxicity.Curr Oncol Rep.2012;14:285-294.)

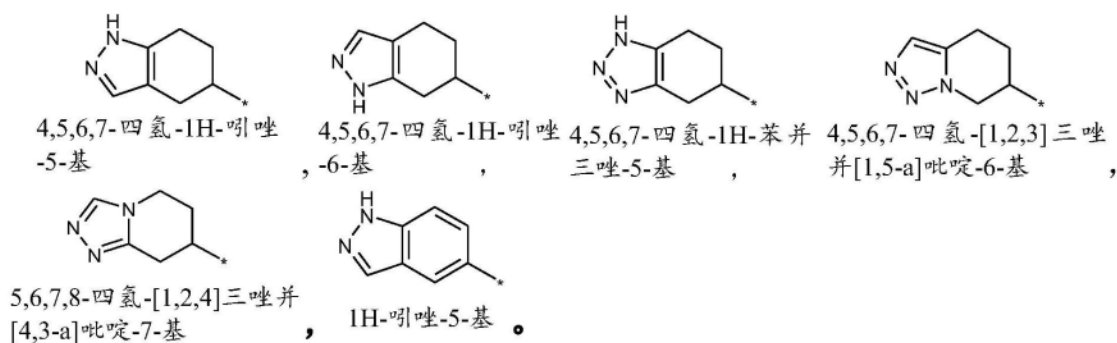
[0013] 而且,小鼠心肌细胞中FAK的失活导致心肌肥大和纤维化。(Peng Xl,Kraus MS,Wei H,Shen TL,Pariat R,Alcaraz A,Ji G,Cheng L,Yang Q,Kotlikoff MI,Chen J,Chien K,Gu H and Guan JL.Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice.J Clin Invest.2006;116:217-227.)

[0014] 此外,Aurora A激酶抑制剂I期临床试验中证明了众多副作用,包括血小板减少、中性粒细胞减少、口腔炎、腹泻。(Cervantes A,Elez E,Roda D,Ecsedy J,Macarulla T,Venkatakrishnan K,Rosello S,et al.Phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic study of MLN8237,an investigational,oral,selective Aurora A kinase inhibitor,in patients with advanced solid tumors.Clin Cancer Res.2012;18:4764-4774.)

[0015] 因此,这些数据表明,抑制FGFR/VEGFR家族、FAK或Aurora A的激酶的化合物(例如W02009/155551的实施例263、293和302)将表现出众多不期望的副作用。

[0016] 本发明的化合物在上位上包括在W02009/155551的式(I)中。本发明的化合物与W02009/155551中明确公开的实施例263、293和302的结构差异在于,它们包含取代的4,5,6,7-四氢-1H-吡唑、4,5,6,7-四氢-1H-苯并三唑、5,6,7,8-四氢-[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡啶、4,5,6,7-四氢-[1,2,3]三唑并[1,5-a]吡啶、或1H-吡唑代替苯并咪唑基、1,3-二氢吡啶-2-酮-5-基或2,3-二氢-异吡啶-1-酮-5-基部分。

[0017]



[0018] 结构差异出乎意料地导致对下述激酶的选择性增加: ABL1, AURKA (Aurora A), CDK5/p35, CSF1R (FMS), FGFR1, FLT4 (VEGFR3), LYN B, MAP4K2 (GCK), PDGFRA (PDGFR α), PTK2 (FAK), RET, RPS6KB1 (p70S6K), FGFR2, KDR (VEGFR2), 或 MAP4K4 (HGK)。另外, 已经出乎意料地发现所述化合物是 γ -分泌酶的强效调节剂 (表2、4a、6和7), 而W02009/155551的具体实施例263、293和302并未显示 γ -分泌酶的任何调节 (实施例293, 302) 或显示相当差的调节 (实施例263) (表4b)。

[0019] 表2: 激酶活性的总结-W02009/155551的参比化合物263、293和302与本发明的所选化合物的比较 (表6和表7的概述)。

[0020]

实施例编号	测试的激酶														
	ABL1	AURKA (Aurora A)	CDK5/p35	CSF1R (FMS)	FGFR1	FGFR2	FLT4 (VEGFR3)	KDR (VEGFR2)	LYN B	MAP4K2 (GCK)	MAP4K4 (HGK)	PDGFRA (PDGFRα)	PTK2 (FAK)	RET	RPS6KB1 (p70S6K)
WO09155551 的化合物 263	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
WO09155551 的化合物 293	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
WO09155551 的化合物 302	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
9	+	+	+	++	-	+	++	-	-	+	-	+	-	-	-
10	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
44	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
56	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
57	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
59	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

[0021]

实施例编号	测试的激酶												
	ABL1	AURKA (Aurora A)	CDK5/p35	CSF1R (FMS)	FGFR1	FGFR2	FLT4 (VEGFR3)	KDR (VEGFR2)	LYN B	MAP4K2 (GCK)	MAP4K4 (HGK)	PDGFRA (PDGFR α)	PTK2 (FAK)
R-61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S-61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
68	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-
71	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
73	-	++	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-

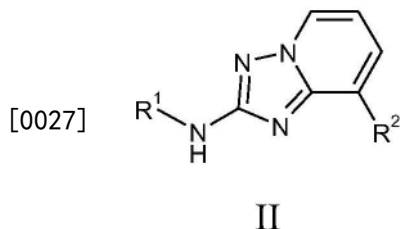
[0022] 表2中“++”、“+”和“-”的解释：“++”是指在10 μ mol化合物浓度的>80%抑制；“+”是指在10 μ mol化合物浓度的80-40%抑制；“-”是指在10 μ mol化合物浓度的<40%抑制。

[0023] 因此,目标技术问题是提供 γ -分泌酶的有效调节剂,其相对于以下激酶具有选择性:ABL1,AURKA (Aurora A),CDK5/p35,CSF1R (FMS),FGFR1,FLT4 (VEGFR3),LYN B,MAP4K2 (GCK),PDGFRA (PDGFR α),PTK2 (FAK),RET,RPS6KB1 (p70S6K),FGFR2,KDR (VEGFR2),或MAP4K4 (HGK)。

[0024] 根据本发明,已经出乎意料地发现本申请公开的化合物是 γ -分泌酶的强效和选择性的调节剂。

[0025] 由于本发明化合物对 γ -分泌酶的强效调节以及相对于ABL1,AURKA (Aurora A)、CDK5/p35、CSF1R (FMS)、FGFR1、FLT4 (VEGFR3)、LYN B、MAP4K2 (GCK)、PDGFRA (PDGFR α)、PTK2 (FAK)、RET、RPS6KB1 (p70S6K)、FGFR2、KDR (VEGFR2)、或MAP4K4 (HGK)的增加的选择性,预期本发明的化合物在以下两方面都是有效的:在体内模型中;以及在功效和不良影响之间具有足够的窗口,所述不良影响例如为肾毒性、血小板减少、中性粒细胞减少、口腔炎、腹泻或心血管事件。因此,本发明的化合物必然更适合人类使用。

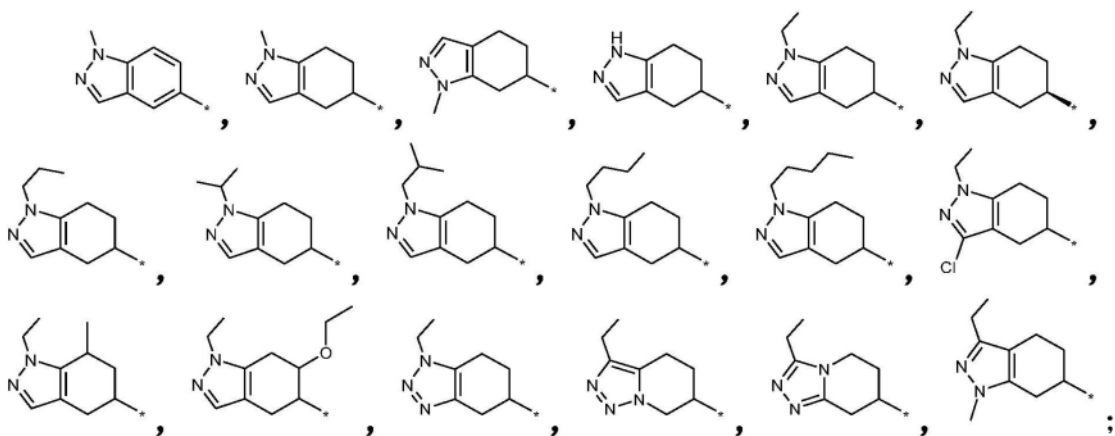
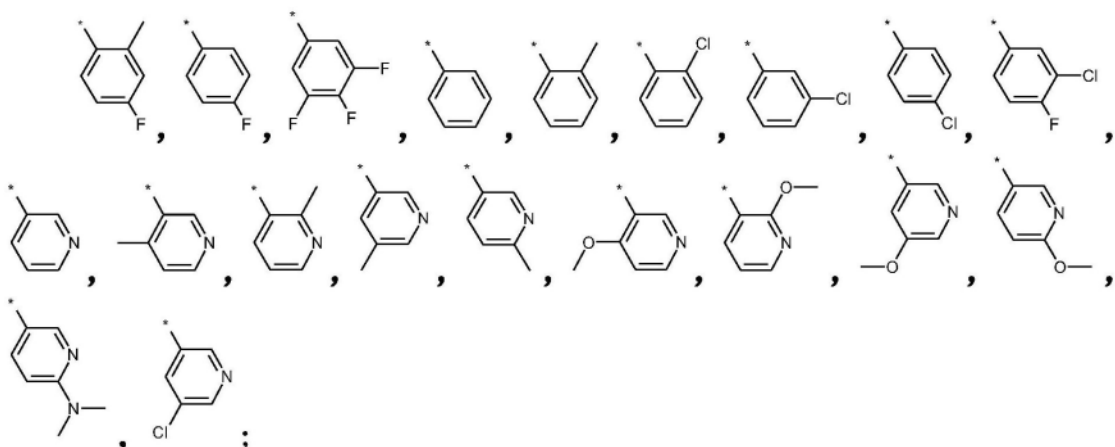
[0026] 本发明提供新型的式II的三唑并吡啶



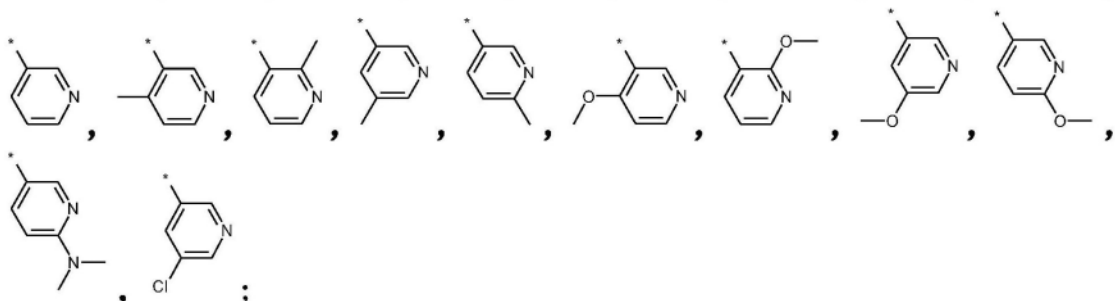
[0028] 其中

[0029] R¹表示

[0030]

[0031] R^2 表示

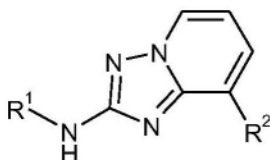
[0032]



[0033] 或其盐,特别是其药学上可接受的盐。

[0034] 在另一种实施方式中,本发明提供新型的式II的三唑并吡啶

[0035]



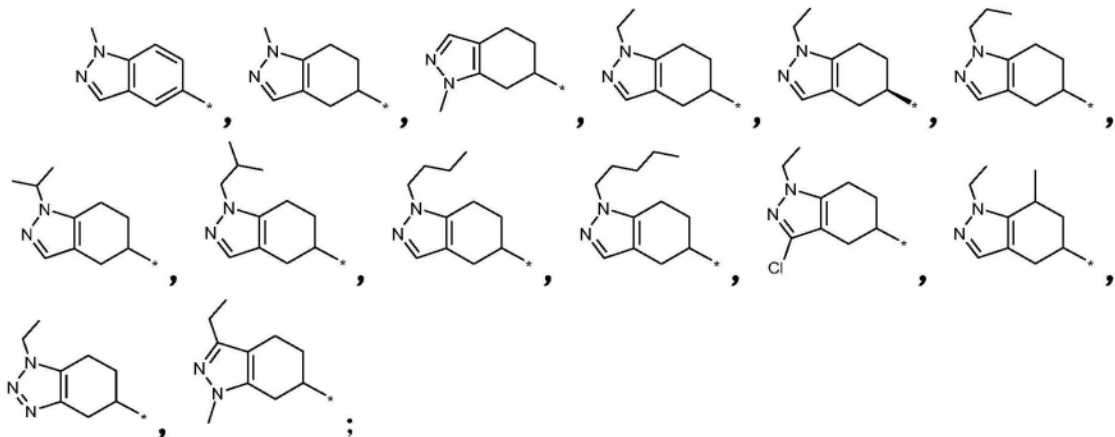
[0036]

II

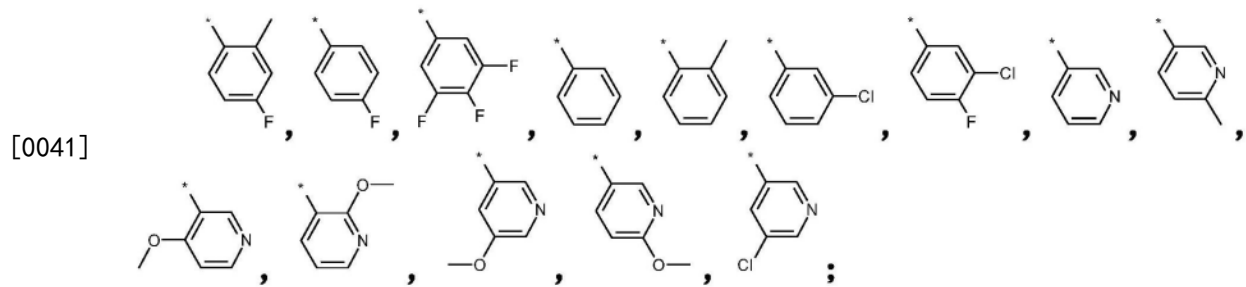
[0037] 其中

[0038] R^1 表示

[0039]



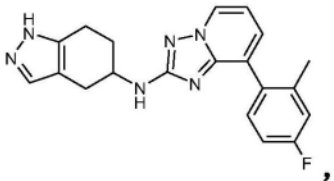
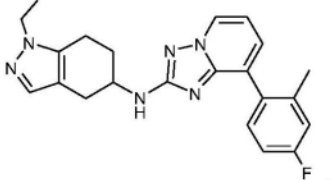
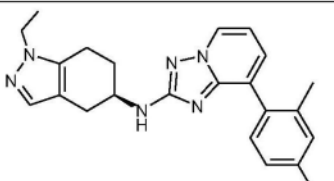
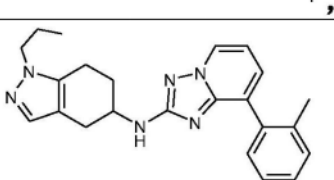
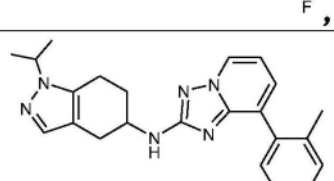
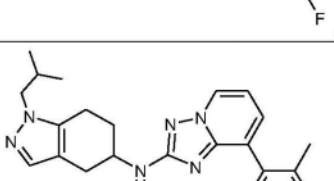
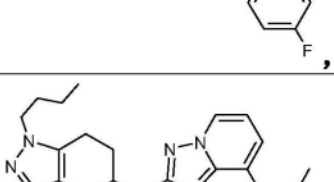
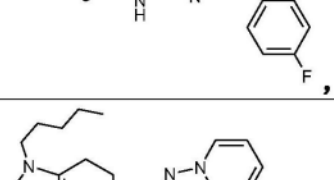
[0040] R^2 表示



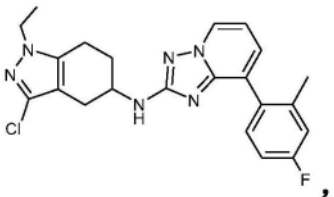
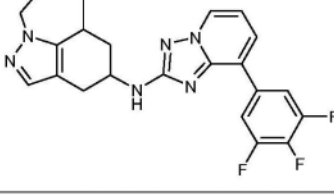
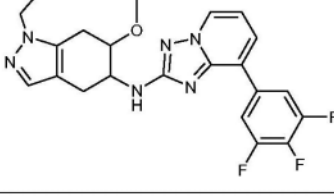
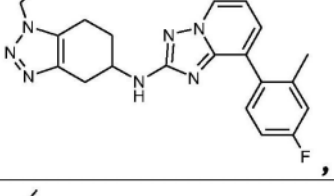
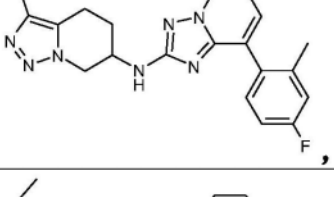
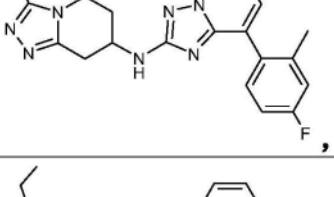
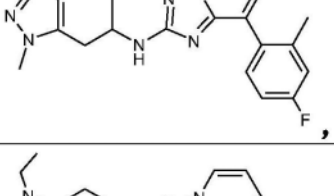
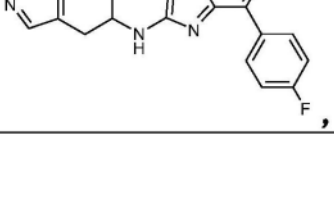
[0042] 或其盐,特别是其药学上可接受的盐。

[0043] 其它优选的是以下化合物:

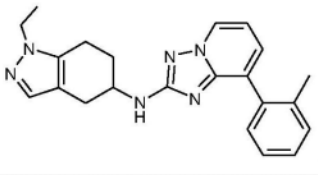
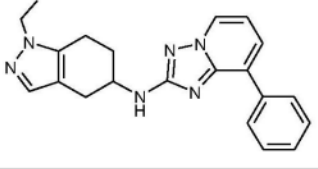
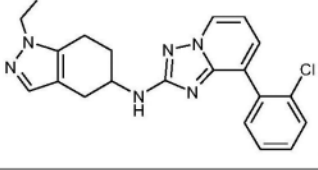
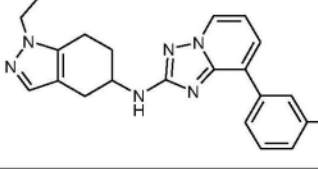
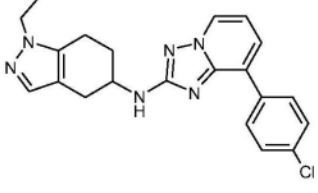
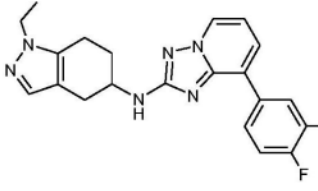
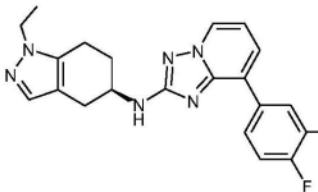
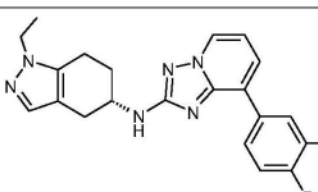
实施例编号	结构
9	
10	
40	

实施例编号	结构
41	
42	
R-42	
43	
44	
45	
46	
47	

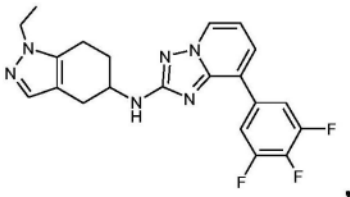
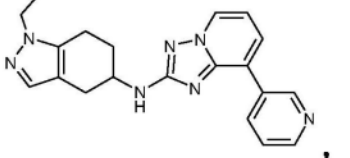
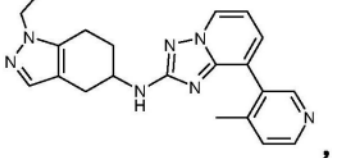
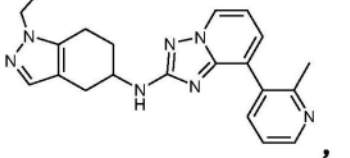
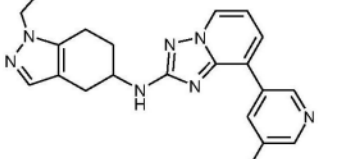
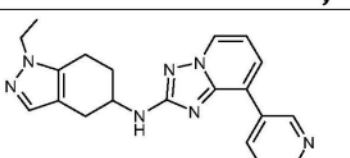
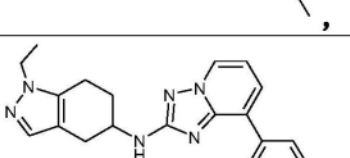
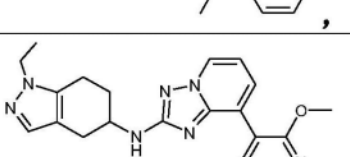
[0045]

实施例编号	结构
48	
49	
50	
51	
52	
53	
54	
55	

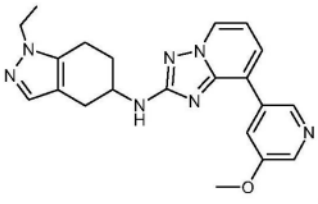
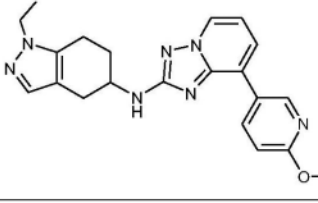
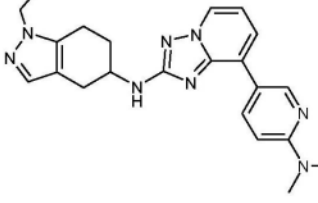
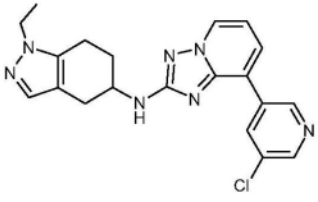
[0046]

实施例编号	结构
56	
57	
58	
59	
60	
61	
R-61	
S-61	

[0047]

实施例编号	结构
62	
63	
64	
65	
66	
67	
68	
69	

[0048]

实施例编号	结构
70	
71	
72	
73	

[0050] 或其药学上可接受的盐。

附图说明

[0051] 图1显示化合物R-61的X-射线结构。

[0052] 一般定义

[0053] 根据本申请的公开内容和上下文,本申请未特别限定的术语应该被赋予本领域技术人员将会赋予它们的定义。

[0054] 如果本发明的化合物以化学名称和化学式表示,如有不符之处则以化学式为准。

[0055] 星号可以用于子式以表示下述键,其连接至核心分子或按定义其所键合至的取代基。

[0056] 立体化学:

[0057] 除非特别指出,否则在整个说明书和所附权利要求书中,给定的化学式或名称应包括互变异构体及其所有立体异构体、光学异构体和几何异构体(例如,对映异构体,非对映异构体,E/Z异构体等)和消旋体,以及不同比例的单独对映异构体的混合物,非对映异构体的混合物,或其中存在上述异构体和对映异构体的上述任何形式的混合物,以及盐,包括其药学上可接受的盐。

[0058] 盐:

[0059] 短语“药学上可接受的”在本申请用于表示下述那些化合物、材料、组合物、和/或剂型,它们在合理的医学判断范围内适宜与人类和动物的组织接触,而无过度毒性、刺激

性、过敏反应或其它问题或并发症,且具有合理的收益/风险比。

[0060] 本申请使用的“药学上可接受的盐”是指公开的化合物的衍生物,其中母体化合物与酸或碱形成盐。

[0061] 与包含碱性部分的母体化合物形成药学上可接受的盐的酸的实例包括无机酸或有机酸,例如苯磺酸,苯甲酸,柠檬酸,乙磺酸,富马酸,龙胆酸,氢溴酸,氢氯酸,马来酸,苹果酸,丙二酸,扁桃酸,甲磺酸,4-甲基-苯磺酸,磷酸,水杨酸,琥珀酸,硫酸或酒石酸。

[0062] 阳离子以及与包含酸性部分的母体化合物形成药学上可接受的盐的碱的实例包括: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , L-精氨酸, 2,2'-亚氨基二乙醇, L-赖氨酸, N-甲基-D-葡萄糖胺或三(羟基甲基)-氨基甲烷。

[0063] 本发明的药学上可接受的盐可以由包含碱性部分或酸性部分的母体化合物通过常规化学方法合成。通常,此类盐可以如下制备:使游离酸或游离碱形式的这些化合物与足够量的适宜碱或酸在水中或在有机稀释剂中反应,所述有机稀释剂例如为醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇、或乙腈、或其混合物。除了上述那些的其它酸的盐、例如用于纯化或分离本发明化合物的盐(例如三氟乙酸盐)也构成本发明的一部分。

[0064] 实验部分

[0065] 缩写列表

[0066] DCM 二氯甲烷

[0067] DIPEA 二异丙基胺

[0068] DMF 二甲基甲酰胺

[0069] DMSO 二甲基亚砷

[0070] HCl 盐酸

[0071] HPLC 高压液相色谱

[0072] MPLC 中压液相色谱

[0073] NH_3 氨

[0074] PE 石油醚

[0075] psi 磅每平方英寸

[0076] RT 室温

[0077] R_t 保留时间

[0078] TFA 三氟乙酸

[0079] THF 四氢呋喃

[0080] 分析HPLC-方法

[0081] 使用以下洗脱剂:包含0.1% NH_3 的水(洗脱剂A),乙腈(洗脱剂B),和包含0.1%三氟乙酸的水(洗脱剂C)。流动相“水0.1%TFA”如下制备:将1mL商购TFA溶液添加至999mL水中。类似地,流动相“水0.1% NH_3 ”如下制备:将4mL商购氢氧化铵浓溶液(25wt%)添加到996mL水中。

[0082] 方法1:带有DA-检测器和MS-检测器的Agilent 1200, Waters XbridgeC18, 3.0x30mm, 2.5 μm , 60 $^\circ\text{C}$;梯度:0.00-0.20min, 97%洗脱剂A在洗脱剂B中(流速2.2mL/min), 0.20-1.20min, 3%至100%洗脱剂B(流速2.2mL/min), 1.20-1.25min, 100%洗脱剂B(流速2.2mL/min), 1.25-1.40min, 100%洗脱剂B(流速3.0mL/min)。

[0083] 方法2:带有DA-检测器和MS-检测器的Agilent 1200,Sunfire C18,3.0x 30mm, 2.5 μ m,60℃;梯度:0.00-0.20min,97%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速2.2mL/min),0.20-1.20min,3%至100%洗脱剂B(流速2.2mL/min),1.20-1.25min,100%洗脱剂B(流速2.2mL/min),1.25-1.40min,100%洗脱剂B(流速3.0mL/min)。

[0084] 方法3:带有DA-检测器和MS-检测器的Waters Acquity,WatersXBridge BEH C18, 2.1x 30mm,1.7 μ m,60℃;梯度:0.00-0.20min,95%洗脱剂A在洗脱剂B中(流速1.3mL/min), 0.02-1.00min,5%至100%洗脱剂B(流速1.3mL/min),1.00-1.10min,100%洗脱剂B(流速1.3mL/min)。

[0085] 方法4:带有DA-检测器和MS-检测器的Waters Alliance,WatersXBridge C18, 4.6x 30mm,3.5 μ m,60℃;梯度:0.00-0.20min,97%洗脱剂A在洗脱剂B中(流速5.0mL/min), 0.20-1.60min,3%至100%洗脱剂B(流速5.0mL/min),1.60-1.70min,100%洗脱剂B(流速5.0mL/min)。

[0086] 方法5:带有DA-检测器和MS-检测器的Waters Acquity,Sunfire C18,2.1x 30mm, 2.5 μ m,60℃;梯度:0.00-0.02min,99%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速1.3mL/min),0.02-1.00min,1%至100%洗脱剂B(流速1.3mL/min),1.00-1.10min,100%洗脱剂B(流速1.3mL/min),1.10-1.15min,99%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速1.3mL/min),1.15-2.00min,99%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速1.3mL/min)。

[0087] 方法6:带有DA-检测器和MS-检测器的Waters Acquity,Sunfire C18,2.1x 30mm, 2.5 μ m,60℃;梯度:0.00-0.02min,99%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速1.5mL/min),0.02-1.00min,1%至100%洗脱剂B(流速1.5mL/min),1.00-1.10min,100%洗脱剂B(流速1.5mL/min)。

[0088] 方法7:带有DA-检测器和MS-检测器的Waters Acquity,WatersXBridge BEH C18, 2.1x 30mm,1.7 μ m,60℃;梯度:0.00-0.02min,99%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速1.6mL/min), 0.02-1.00min,1%至100%洗脱剂B(流速1.6mL/min),1.00-1.10min,100%洗脱剂B(流速1.6mL/min)。

[0089] 方法8:带有3100MS检测器的Waters Acquity,Waters Xbridge C18,3.0x 30mm, 2.5 μ m,60℃;梯度:0.00-1.30min,97%洗脱剂A在洗脱剂B中(流速1.5mL/min),1.30-1.50min,1%洗脱剂A在洗脱剂B中(流速1.5mL/min),1.50-1.60min,0.1%至95%洗脱剂A在洗脱剂B中(流速1.5mL/min)。

[0090] 方法9:带有DA-检测器和MS-检测器的Agilent 1100,Sunfire C18,3.0x 30mm, 2.5 μ m,60℃;梯度:0.00-1.20min,98%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速2.0mL/min),1.20-1.40min,2%至100%洗脱剂B(流速2.0mL/min)。

[0091] 方法10:带有DAD、CTC自动取样器和Waters MS-检测器的Agilent1100,Waters Sunfire C18,3.0x 30mm,3.5 μ m,60℃;梯度:0.00-0.30min,98%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速2.0mL/min),0.30-1.50min,2%至100%洗脱剂B(流速2.0mL/min),1.50-1.60min,100%洗脱剂B(流速2.0mL/min)。

[0092] 方法11:带有DA-检测器和MS-检测器的Waters Acquity,WatersSunfire C18, 3.0x 30mm,2.5 μ m,60℃;梯度:0.00-1.30min,95%洗脱剂C在洗脱剂B中(流速1.5mL/min), 1.30-1.50min,5%至100%洗脱剂B(流速1.5mL/min)。

[0093] 方法12:带有DA-检测器和MS-检测器的Waters Acquity, Waters XBridge C18, 3.0x 30mm, 2.5 μ m, 60 $^{\circ}$ C; 梯度:0.00-1.20min, 95%洗脱剂A在洗脱剂B中(流速1.5mL/min), 1.20-1.40min, 5%至100%洗脱剂B(流速1.5mL/min), 1.40-1.45min, 98%A在洗脱剂B中(流速1.5mL/min)。

[0094] 方法13:带有DAD和ELSD的Agilent 1260SFC, Daicel Chiralpak[®] AY-H, 4.6x 250mm, 5 μ m, 40 $^{\circ}$ C, 流动相:洗脱剂A:超临界CO₂, 洗脱剂B:包含20mM氨的乙醇, 0.00-10.00min, 梯度A:B 85:15, 流速4mL/min, 系统背压2175psi。

[0095] 方法14:带有DAD和ELSD的Agilent 1260SFC, Daicel Chiralpak[®] IF, 4.6x 250mm, 5 μ m, 40 $^{\circ}$ C, 流动相:洗脱剂A:超临界CO₂, 洗脱剂B:包含20mM氨的乙醇, 0.00-10.00min, 梯度A:B 60:40, 流速4mL/min, 系统背压2175psi。

[0096] 方法15:带有DA-检测器和MS-检测器的Agilent 1260SFC, Daicel Chiralpak[®] IA, 4.6x 250mm, 5 μ m, 40 $^{\circ}$ C, 流动相:洗脱剂A:超临界CO₂, 洗脱剂B:包含20mM氨的乙醇, 0.00-10.00min, 梯度A:B 75:25, 流速4mL/min, 系统背压2175psi。

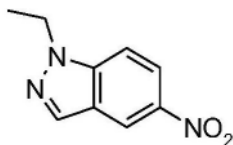
[0097] 一般分析

[0098] 所有反应均使用商业级试剂和溶剂进行。使用TopSpin 3.2p16软件在Bruker AVANCE IIIHD 400MHz仪器上记录NMR波谱。化学位移以 δ 单位以相比于内标三甲基硅烷处于低场的份每一百万份(ppm)给出。选择的数据按以下方式报告:化学位移, 多重性, 耦合常数(J), 积分。分析薄层色谱(TLC)使用Merck硅胶60F254板进行。使用短波紫外光将所有化合物可视化。使用液相色谱质谱仪(LCMS)获得低分辨率质谱图, 该LCMS由与Agilent 6130四极质谱仪(电喷雾正电离)耦合的Agilent 1100系列LC组成。在Waters QTOF G2-Si波谱仪上确定高分辨率质量。除非另有说明, 否则所有中间体和最终化合物的纯度通过LCMS使用方法(1-12)之一确定为>95%, 其在参考文献中详细描述。对映体纯度通过超临界流体色谱在带有DA检测和ELS检测的Agilent 1260SFC上使用方法(13-15)之一确定, 其在参考文献中详细描述。旋光度通过Perkin Elmer 343旋光仪确定。比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ 以deg cm³ g⁻¹dm⁻¹给出。

[0099] 合成过程

[0100] 通用过程A:制备中间体12a-c和12e-g。将相应的硝基吡啶11a-d(1.0当量)、烷基卤化物(1.0当量)和K₂CO₃(2当量)在DMF中的混合物在60 $^{\circ}$ C搅拌3h。在冷却至室温之后, 将混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取3次。将合并的有机层干燥并减压浓缩。将粗制残余物通过制备反相HPLC纯化。

[0101]

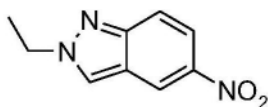


[0102] 1-乙基-5-硝基-1H-吡啶(12a)。根据通用过程A使用硝基吡啶11a和碘乙烷制备。12a与区域异构体2-乙基-5-硝基-2H-吡啶(HPLC分析, 方法1)的比率为2:1。

[0103] 12a在后处理过程中沉淀并且通过过滤收集。收率:332mg(57%)。LCMS(ESI⁺), 对于C₉H₈N₃O₂, 计算值为[M+H]⁺m/z 192.0773, 实测值为192.2。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.83(d, J=2.2Hz, 1H), 8.40(s, 1H), 8.22(dd, J=9.3, 2.2Hz, 1H), 4.53(q, J=7.3Hz, 2H), 1.43

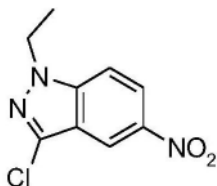
(t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC(方法1): $R_t=0.89\text{min}$ 。

[0104]



[0105] 2-乙基-5-硝基-2H-吡唑。区域异构体副产物2-乙基-5-硝基-2H-吡唑通过制备HPLC从剩余的母液分离。收率:193mg (33%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₉H₈N₃O₂, 计算值为[M+H]⁺m/z 192.0773, 实测值为192.2。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.87 (d, J=2.2Hz, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.01 (dd, J=9.4, 2.3Hz, 1H), 7.78 (d, J=9.4Hz, 1H), 4.54 (q, J=7.3Hz, 2H), 1.54 (t, J=7.3Hz, 3H)。

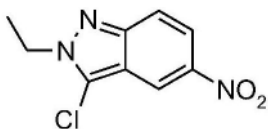
[0106]



[0107] 3-氯-1-乙基-5-硝基-1H-吡唑 (12b)。根据通用过程A使用硝基吡唑11b和碘乙烷制备。12b与区域异构体3-氯-2-乙基-5-硝基-2H-吡唑的比率 (HPLC分析, 方法11) 为:87:13。

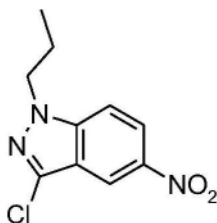
[0108] 12b. 收率:5.68g (83%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₉H₈ClN₃O₂, 计算值为[M+H]⁺m/z 226.0383, 实测值为226.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.60 (dd, J=2.2, 0.5Hz), 8.31 (dd, J=9.3, 2.2Hz, 1H), 8.00 (dd, J=9.3, 0.5Hz, 1H), 4.51 (q, J=7.2Hz, 2H), 1.43 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC(方法1): $R_t=0.95\text{min}$ 。

[0109]



[0110] 3-氯-2-乙基-5-硝基-2H-吡唑。收率:0.78g (11%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₉H₈ClN₃O₂, 计算值为[M+H]⁺m/z 226.0383, 实测值为226.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.65 (dd, J=2.3, 0.6Hz, 1H), 8.07 (dd, J=9.5, 2.2Hz, 1H), 7.85 (dd, J=9.5, 0.6Hz, 1H), 4.55 (q, J=7.3Hz, 2H), 1.51 (t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC(方法1): $R_t=0.87\text{min}$ 。

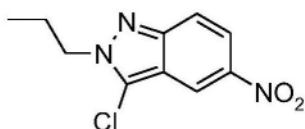
[0111]



[0112] 3-氯-1-丙基-5-硝基-1H-吡唑 (12c)。根据通用过程A使用硝基吡唑11b和正丙基碘化物制备。12c与区域异构体3-氯-2-正丙基-5-硝基-2H-吡唑的比率 (HPLC分析, 方法2) 为:88:12。

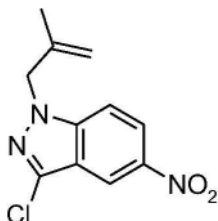
[0113] 12c. 收率:960mg (79%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₀H₁₀ClN₃O₂, 计算值为[M+H]⁺m/z 240.0540, 实测值为240.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.60 (d, J=2.2Hz, 1H), 8.31 (dd, J=9.4, 2.2Hz, 1H), 8.01 (d, J=9.4Hz, 1H), 4.45 (t, J=6.9Hz, 2H), 1.86 (m, 2H), 0.84 (t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC(方法2): $R_t=1.15\text{min}$ 。

[0114]



[0115] 3-氯-2-正丙基-5-硝基-2H-吡唑。并未分离这种较少的区域异构体。HPLC (方法2): $R_t = 1.10 \text{ min}$ 。

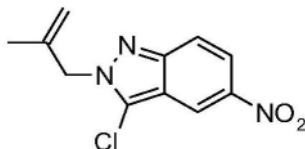
[0116]



[0117] 3-氯-1-(2-甲基-烯丙基)-5-硝基-1H-吡唑 (12e)。根据通用过程A使用硝基吡唑 11b和3-溴-2-甲基丙烯制备。12e与区域异构体3-氯-2-(2-甲基-烯丙基)-5-硝基-2H-吡唑的比率(HPLC分析,方法1)为:92:8。

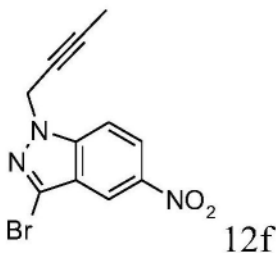
[0118] 12e. 收率:1.14g (90%)。LCMS (ESI^+), 对于 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_2$, 计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 252.0540, 实测值为252.0。 ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.61 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 8.32 (dd, $J=9.3, 2.0\text{Hz}$, 1H), 7.95 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.93 (s, 1H), 4.71 (s, 1H), 1.63 (s, 3H)。HPLC (方法1): $R_t = 1.09 \text{ min}$ 。

[0119]



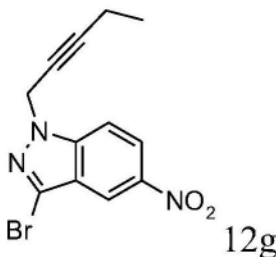
[0120] 3-氯-2-(2-甲基-烯丙基)-5-硝基-2H-吡唑。并未分离这种较少的区域异构体。HPLC (方法1): $R_t = 1.04 \text{ min}$ 。

[0121]

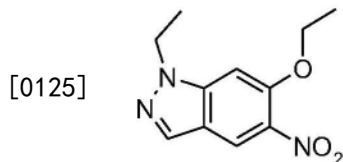


[0122] 3-溴-1-丁-2-炔基-5-硝基-1H-吡唑 (12f)。根据通用过程A使用硝基吡唑 11c和1-溴-2-丁炔制备。仅观察到一种区域异构体。收率:1.17g (96%)。LCMS (ESI^+), 对于 $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{BrN}_3\text{O}_2$, 计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 293.9878, 实测值为294.0。 ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.50 (dd, $J=2.1, 0.4\text{Hz}$, 1H), 8.37 (dd, $J=9.3, 2.2\text{Hz}$, 1H), 8.02 (dd, $J=9.3, 0.4\text{Hz}$, 1H), 5.40 (q, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 1.80 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 3H)。HPLC (方法11): $R_t = 0.97 \text{ min}$ 。

[0123]

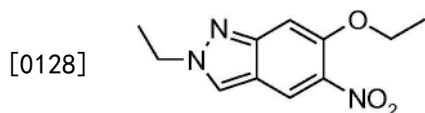


[0124] 3-溴-1-戊-2-炔基-5-硝基-1H-吡唑 (12g)。根据通用过程A使用硝基吡唑11c和1-溴-2-戊炔制备。仅观察到一种区域异构体。收率:1.18g (93%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₁H₉BrN₃O₂, 计算值为[M+H]⁺m/z 308.0035, 实测值为308.0。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.50 (d, J=2.0Hz, 1H), 8.37 (dd, J=9.3, 2.1Hz, 1H), 8.02 (d, J=9.3Hz, 1H), 5.42 (t, J=2.2Hz, 2H), 2.15-2.23 (m, 2H), 1.03 (t, J=7.5Hz, 3H)。HPLC (方法11): R_t=1.04min。



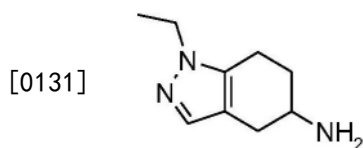
[0126] 6-乙氧基-1-乙基-5-硝基-1H-吡唑 (12h)。根据通用过程A使用硝基吡唑11d和碘乙烷制备。12h与区域异构体6-乙氧基-2-乙基-5-硝基-2H-吡唑的比率 (HPLC分析, 方法3) 为:1.7:1。

[0127] 12h. 收率:255mg (56%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₁H₁₃N₃O₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 236.1035, 实测值为236.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.37 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 4.44 (q, J=7.2Hz, 2H), 4.27 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.39 (t, J=7.2Hz, 3H), 1.39 (t, J=7.1Hz, 3H)。HPLC (方法3): R_t=0.55min。



[0129] 6-乙氧基-2-乙基-5-硝基-2H-吡唑。收率:126mg (28%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₁H₁₃N₃O₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 236.1035, 实测值为236.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.57 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 4.45 (q, J=7.3Hz, 2H), 4.18 (q, J=7.0Hz, 2H), 1.50 (t, J=7.3Hz, 3H), 1.35 (t, J=7.0Hz, 3H)。HPLC (方法3): R_t=0.50min。

[0130] 通用过程B:制备中间体13a-h。向相应的硝基/氨基吡唑12a-h (1.0当量) 在MeOH的溶液中添加Nishimura催化剂 (Nishimura催化剂购自Umicore AG&Co.KG, 63457 Hanau-Wolfgang, Germany, 产品编号68 2562 1666, CAS编号39373-27-8)。将混合物在室温氢化 (4巴氢气气氛) 6-53h, 过滤并减压浓缩。粗产物通过制备反相HPLC纯化。



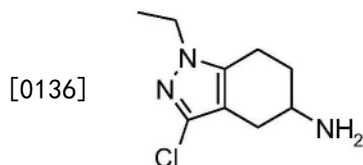
[0132] 1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺 (13a)。根据通用过程B从硝基吡唑12b制备 (反应时间11h)。为实现完全脱卤, 将催化剂换作为钯炭 (在4巴氢气气氛和室温, 另外的反应时间为1h)。收率:2.85g (69%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₉H₁₅N₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 166.1344, 实测值为166.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 7.08 (s, 1H), 3.93 (q, J=7.3Hz, 2H), 2.90-2.98 (m, 1H), 2.50-2.71 (m, 3H), 2.05-2.12 (m, 1H), 1.82-1.90 (m, 1H), 1.54 (br s, 2H), 1.44-1.55 (m, 1H), 1.25 (t, J=7.3Hz, 3H)。注意:NH₂质子不可见。HPLC (方法4): R_t=0.64min。

[0133] 制备手性分离:使外消旋胺13a (27g, 163mmol) 进行制备手性SFC分离 (Thar SFC-80, Chiralpak AD-H, 25x 3cm, 5μm, 流动相:洗脱剂A:超临界CO₂, 洗脱剂B:包含0.1%浓氨

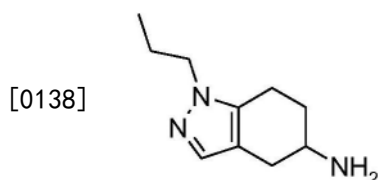
水溶液的异丙醇,梯度A:B 75:25,流速65g/min,波长220nm,系统背压100巴)。R-13a: $R_t=2.19\text{min}$ 。S-13a: $R_t=2.84\text{min}$ 。

[0134] R-13a:收率:9.21g (34%)。对映体纯度(方法13):98.7%ee。已经通过化合物R-61的X-射线结构指认立体中心(sterogenic center)的(R)-构型。

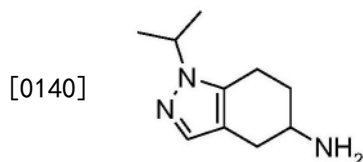
[0135] S-13a:收率:8.37g (31%)。对映体纯度(方法13):97.8%ee。



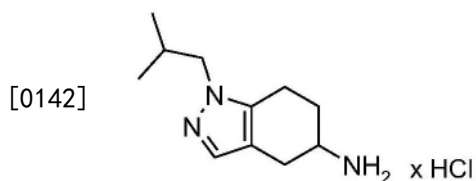
[0137] 3-氯-1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(13b)。根据通用过程B从硝基吡唑12b制备(反应时间24h)。收率:140mg (18%)。LCMS (ESI⁺),对于C₉H₁₄ClN₃,计算值为[M+H]⁺m/z 200.0955,实测值为200.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ3.92 (q, J=7.2Hz, 2H), 2.95-3.03 (m, 1H), 2.64-2.74 (m, 1H), 2.50-2.58 (m, 2H), 1.96-2.04 (m, 1H), 1.80-1.88 (m, 1H), 1.45-1.57 (m, 1H), 1.26 (t, J=7.2Hz, 3H)。注意:NH₂信号不可见。HPLC(方法1): $R_t=0.74\text{min}$ 。



[0139] 1-丙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(13c)。根据通用过程B从硝基吡唑12c制备(反应时间7h)。收率:250mg (35%)。LCMS (ESI⁺),对于C₁₀H₁₇N₃,计算值为[M+H]⁺m/z 180.1501,实测值为180.2。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ7.09 (s, 1H), 3.85 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.90-2.98 (m, 1H), 2.50-2.70 (m, 3H), 2.05-2.12 (m, 1H), 1.82-1.90 (m, 1H), 1.69 (m, 2H), 1.66 (br s, 2H), 1.44-1.54 (m, 1H), 0.81 (t, J=7.4Hz, 3H)。HPLC(方法1): $R_t=0.74\text{min}$ 。

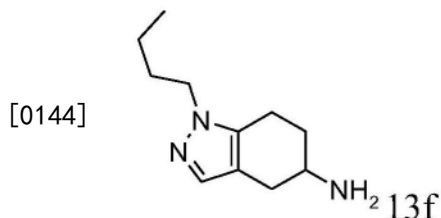


[0141] 1-异丙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(13d)。根据通用过程B从氨基吡唑12d制备(反应时间6h)。收率:540mg (56%)。LCMS (ESI⁺),对于C₁₀H₁₇N₃,计算值为[M+H]⁺m/z 180.1501,实测值为180.3。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ7.10 (s, 1H), 4.33 (sept, J=6.6Hz, 1H), 2.90-2.98 (m, 1H), 2.51-2.73 (m, 3H), 2.04-2.12 (m, 1H), 1.82-1.91 (m, 1H), 1.44-1.55 (m, 1H), 1.33 (d, J=6.6Hz, 3H), 1.30 (d, J=6.6Hz, 3H)。注意:NH₂信号不可见。HPLC(方法1): $R_t=0.70\text{min}$ 。

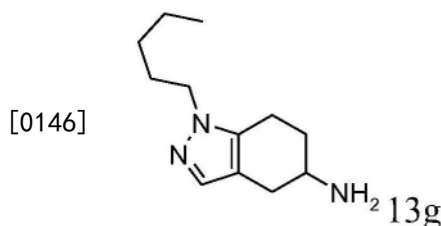


[0143] 1-异丁基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(13e)。根据通用过程B从硝基吡唑12e制备(反应时间4h)。但是,为实现完全脱卤,将催化剂换作为钯炭(在4巴氢气气氛和室温,

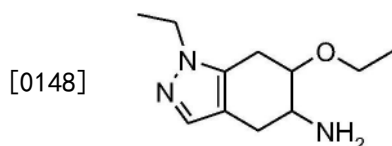
另外的反应时间为16h)。收率:1.07g, HCl盐(量)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₁H₁₉N₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 194.1657, 实测值为194.3。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.08 (br s, 3H, NH₃⁺), 7.22 (s, 1H), 3.73 (d, J=7.3Hz, 2H), 3.29-3.40 (m, 1H, 部分被水信号遮挡), 2.82-2.90 (m, 1H), 2.72-2.80 (m, 1H), 2.56-2.69 (m, 1H), 2.43-2.51 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.08-2.16 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 1.74-1.86 (m, 1H), 0.833 (d, J=6.6Hz, 3H), 0.831 (d, J=6.6Hz, 3H)。HPLC (方法1): R_t=0.77min。



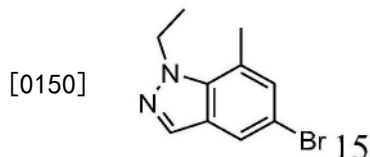
[0145] 1-丁基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(13f)。根据通用过程B从硝基吡唑12f制备(反应时间45min)。为实现完全脱卤,将催化剂换作为钯炭(在4巴氢气气氛和50℃,另外的反应时间为1h)。收率:505mg, (66%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₁H₁₉N₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 194.1657, 实测值为194.2。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ7.09 (s, 1H), 3.89 (t, J=7.1Hz, 2H), 2.89-2.98 (m, 1H), 2.57-2.71 (m, 2H), 2.45-2.56 (m, 1H), 2.04-2.13 (m, 1H), 1.82-1.90 (m, 1H), 1.60-1.70 (m, 2H), 1.44-1.55 (m, 1H), 1.18-1.29 (m, 2H), 0.87 (t, J=7.4Hz, 3H)。注意: NH₂信号不可见。HPLC (方法4): R_t=0.76min。



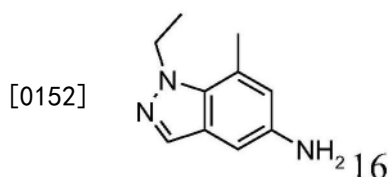
[0147] 1-戊基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(13g)。根据通用过程B从硝基吡唑12g制备(反应时间4h)。收率:465mg, (59%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₂H₂₁N₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 208.1814, 实测值为208.0。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ7.09 (s, 1H), 3.88 (t, J=7.1Hz, 2H), 2.89-2.98 (m, 1H), 2.57-2.70 (m, 2H), 2.45-2.56 (m, 1H, 主要被DMSO信号遮挡), 2.04-2.13 (m, 1H), 1.81-1.90 (m, 1H), 1.61-1.71 (m, 2H), 1.43-1.55 (m, 1H), 1.15-1.33 (m, 4H), 0.85 (t, J=7.1Hz, 3H)。注意: NH₂信号不可见。HPLC (方法3): R_t=0.46min。



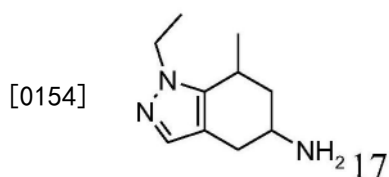
[0149] 6-乙氧基-1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(13h)。根据通用过程B从硝基吡唑12h制备(反应时间24h)。收率:31mg (11%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₁H₁₉N₃O, 计算值为[M+H]⁺m/z 210.1606, 实测值为210.2。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ7.01 (s, 1H), 3.95 (q, J=7.3Hz, 2H), 3.62-3.67 (m, 1H), 3.45-3.62 (m, 2H), 3.06-3.11 (m, 1H), 2.67-2.79 (m, 2H), 2.48-2.56 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.27-2.35 (m, 1H), 1.44 (broad s, 2H), 1.26 (t, J=7.3Hz, 3H), 1.12 (t, J=7.0Hz, 3H)。HPLC (方法3): R_t=0.33min。



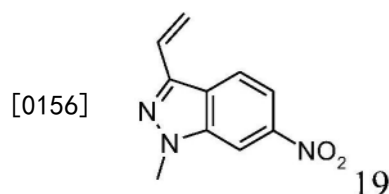
[0151] 5-溴-1-乙基-7-甲基-1H-吡唑(15)。在0°-5℃向5-溴-7-甲基-1H-吡唑14(2.4g, 10.9mmol)在DMF(25mL)的混合物中添加氢化钠(525.0mg, 55%在矿物油中, 12.0mmol)。在搅拌20min制备, 添加碘乙烷(874.8μL, 10.9mmol)。在搅拌30min之后, 将反应混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取3次。将合并的有机相用Na₂SO₄干燥并减压浓缩。将剩余物通过制备反相HPLC纯化, 得到15。收率: 800mg (31%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₀H₁₁BrN₂, 计算值为[M+H]⁺m/z 239.01839, 实测值为239.0。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.00 (s, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.28 (m, 1H), 4.58 (q, J=7.2Hz, 2H), 2.70 (s, 3H), 1.37 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC (方法4): R_t=1.23min。



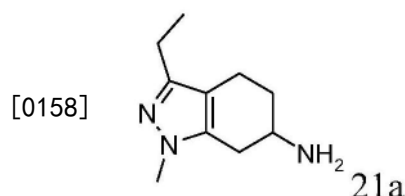
[0153] 1-乙基-7-甲基-1H-吡唑-5-基胺(16)。在氩气气氛下向溴吡唑15(800.0mg, 3.3mmol)、二苯甲酮亚胺(673.7μL, 4.0mmol)和叔丁醇钠(643.1mg, 6.7mmol)在甲苯(15mL)的混合物加入Xantphos(38.7mg, 67μmol)和三(二亚苄基丙酮)钯(0)(61.3mg, 67μmol)。将反应混合物在130℃搅拌1d。在冷却至室温之后, 添加TFA以使反应混合物酸化。继续搅拌1h, 然后加入水并分离有机相。随后将水相碱化并用乙酸乙酯萃取3次。将合并的有机相用Na₂SO₄干燥, 过滤并减压浓缩。将剩余物通过制备反相HPLC纯化, 得到16。收率: 374mg, TFA盐(39%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₀H₁₃N₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 176.1188, 实测值为176.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ7.65 (s, 1H), 6.55 (m, 2H), 4.66 (br s, 2H), 4.46 (q, J=7.1Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 1.31 (t, J=7.1Hz, 3H)。注意:¹H NMR波谱从游离碱的样品获得。HPLC (方法5): R_t=0.30min。



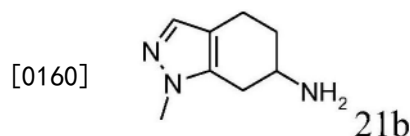
[0155] 1-乙基-7-甲基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(17)。向氨基吡唑16(作为TFA盐得到, 374mg, 1.3mmol)在甲醇(15mL)的混合物中加入PL-HCO₃MP离子交换树脂(1.96mmol/g装载量, 150-300μm粒度), 直到pH为碱性。将混合物过滤并减压浓缩, 得到作为游离碱的16, 将其根据通用过程B直接氢化(反应时间2d), 得到17。收率: 230mg (94%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₀H₁₇N₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 180.1501, 实测值为180.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ7.09 (s, 1H), 4.02 (q, J=7.2Hz, 1H), 4.01 (q, J=7.2Hz, 1H), 2.86-2.97 (m, 1H), 2.75-2.84 (m, 1H), 2.53-2.60 (m, 1H), 1.96-2.04 (m, 2H), 1.15-1.23 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 3H), 1.24 (d, J=6.6Hz, 3H)。注意:NH₂信号不可见。仅解释主要的顺式非对映异构体。HPLC (方法4): R_t=0.67min。



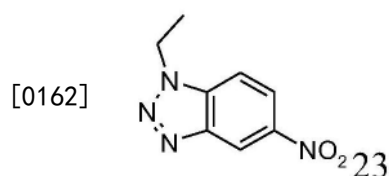
[0157] 1-甲基-6-硝基-3-乙烯基-1H-吡唑(19)。将3-溴-1-甲基-6-硝基-1H-吡唑18 (100.0mg, 391 μ mol)、乙烯基硼酸频哪醇酯(72.9 μ L, 430 μ mol)、碳酸钠溶液(2N在水中, 0.39mL, 781 μ mol)和双(三苯基膦)氯化钯(II) (8.2mg, 12 μ mol)在1,4-二氧杂环己烷/甲醇混合物(4mL/2mL)中的混合物在90℃在氩气气氛下搅拌4h。在冷却至室温之后,将反应混合物倒入水中。将沉淀的产物19通过过滤收集并减压干燥。收率:64mg (81%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₀H₉N₃O₂, 计算值为[M+H]⁺m/z 204.0773, 实测值为204.2。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.71 (m, 1H), 8.24 (m, 1H), 7.98 (dd, J=8.9, 2.0Hz, 1H), 7.06 (dd, J=18.0, 11.5Hz, 1H), 6.15 (dd, J=18.0, 1.0Hz, 1H), 5.56 (dd, J=11.5, 1.0Hz, 1H), 4.18 (s, 3H)。HPLC(方法1): 保留时间=0.97min。



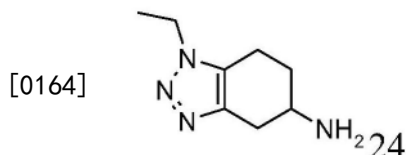
[0159] 3-乙基-1-甲基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-6-基胺(21a)。根据通用过程B从硝基吡唑19制备(在50-80℃的反应时间为7h,然后在50℃在50巴氢气气氛下反应时间为18h)。收率:10mg (38%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₀H₁₇N₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 180.1501, 实测值为180.2。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 3.54 (s, 3H), 2.97-3.05 (m, 1H), 2.40 (q, J=7.5Hz, 2H), 2.33-2.46 (m, 2H), 2.24-2.35 (m, 1H), 2.10-2.19 (m, 1H), 1.73-1.83 (m, 1H), 1.33-1.44 (m, 1H), 1.09 (t, J=7.5Hz, 3H)。HPLC(方法1): R_t=0.70min。



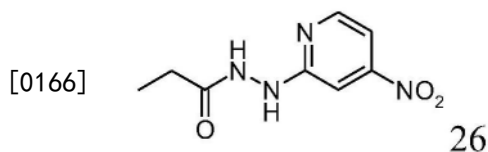
[0161] 1-甲基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-6-基胺(21b)。向1-甲基-1H-吡唑-6-基胺20 (200mg, 1.4mmol)在甲醇(10mL)的溶液中加入浓HCl水溶液(186 μ L, 1.6mmol)和钯(10%在炭上, 20mg)。将混合物在50巴在50℃氢化16h。在冷却至室温之后,将反应混合物过滤并减压浓缩。使剩余物吸收进DMF中并通过制备反相HPLC纯化,得到产物21b。收率:59mg (29%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₈H₁₃N₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 152.1188, 实测值为152.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 7.14 (s, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.90-2.99 (m, 1H), 2.38-2.60 (m, 4H, 部分被DMSO信号遮挡), 1.90-1.98 (m, 1H), 1.56-1.68 (m, 1H)。注意:NH₂信号不可见。HPLC(方法4): R_t=0.57min。



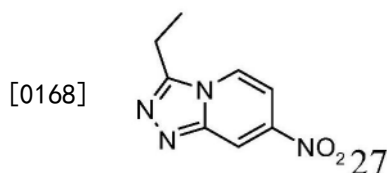
[0163] 1-乙基-5-硝基-1H-苯并三唑(23)。将2-氟-5-硝基-苯胺22(5.0g, 32.03mmol)溶解在干燥DMSO(50mL)中,用乙基胺(2MTHF溶液, 56mL, 112.10mmol)在密封烧瓶中处理并在120℃加热。在2天之后,将反应混合物冷却至室温,加入乙酸(20mL),然后加入NaNO₂(2M水溶液, 19.2mL, 38.4mmol)。继续搅拌20min,然后用HCl(1M水溶液)将反应混合物酸化至pH=2,加入水并将混合物用乙酸乙酯萃取。将有机相用MgSO₄干燥并减压浓缩。将剩余物通过制备MPLC(硅胶,环己烷/乙酸乙酯,梯度0-45%乙酸乙酯,历时40min)纯化,得到产物23。收率:2.87g(47%)。LCMS(ESI⁺),对于C₈H₈N₄O₂,计算值为[M+H]⁺m/z 193.0726,实测值为193.0。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ9.03(m, 1H), 8.40(dd, J=9.2, 2.0Hz, 1H), 8.16(m, 1H), 4.84(q, J=7.4Hz, 2H), 1.55(t, J=7.4Hz, 3H)。HPLC(方法3):R_t=0.44min。



[0165] 1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-苯并三唑-5-基胺(24)。根据通用过程B从硝基苯并三唑23制备(反应时间2d)。收率:800mg(66%)。LCMS(ESI⁺),对于C₈H₁₄N₄,计算值为[M+H]⁺m/z 167.1297,实测值为167.1。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ4.14-4.23(m, 2H), 3.05-3.13(m, 1H), 2.77-2.84(m, 1H), 2.67-2.76(m, 1H), 2.53-2.63(m, 1H), 2.25-2.33(m, 1H), 1.83-1.92(m, 1H), 1.50-1.62(m, 1H), 1.35(t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC(方法3):R_t=0.22min。



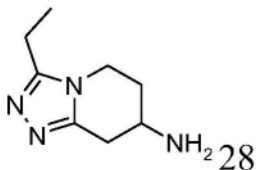
[0167] 丙酸N'-(4-硝基-吡啶-2-基)-酰肼(26)。向(4-硝基-吡啶-2-基)-肼25(2.31g, 8.14mmol)和DIPEA(5.39mL, 32.56mmol)在THF的混合物中逐滴加入丙酰氯(0.78mL, 8.95mmol)在THF中的溶液。在室温搅拌15min之后,加入几滴水,将反应混合物减压浓缩。使剩余物悬浮在水中并用TFA酸化。将悬浮液过滤并通过制备HPLC纯化,得到产物26。收率:1.7g(量)。LCMS(ESI⁺),对于C₈H₁₀N₄O₃,计算值为[M+H]⁺m/z 211.0831,实测值为211.2。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ9.87(s, 1H), 9.05(br s, 1H), 8.37(dd, J=5.4, 0.4Hz, 1H), 7.34(dd, J=5.4, 2.0Hz, 1H), 7.14(dd, J=2.0, 0.4Hz, 1H), 2.22(q, J=7.6Hz, 2H), 1.07(t, J=7.6Hz, 3H)。HPLC(方法6):R_t=0.31min。



[0169] 3-乙基-7-硝基-[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡啶(27)。向26(1.70g, 8.09mmol)在THF(30mL)的混合物中加入Burgess试剂(5.78g, 24.26mmol)。在65℃搅拌3d之后,将混合物减压浓缩。使剩余物吸收进MeOH/水的混合物中,用TFA酸化,并通过制备反相HPLC纯化。收率:954mg(61%)。LCMS(ESI⁺)calculated for C₈H₈N₄O₂[M+H]⁺m/z 193.0726,实测值为193.2。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.78(dd, J=2.2, 0.8Hz, 1H), 8.64(dd, J=7.6, 0.8Hz, 1H), 7.63(dd, J=7.6, 2.2Hz, 1H), 3.18(q, J=7.5Hz, 2H), 1.40(t, J=7.5Hz, 3H)。HPLC(方法6):R_t=

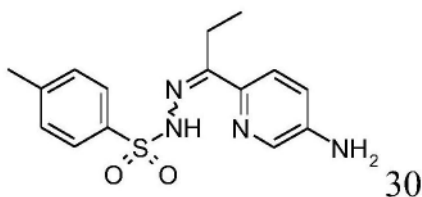
0.32min。

[0170]



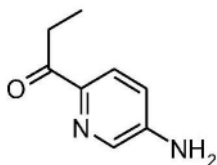
[0171] 3-乙基-5,6,7,8-四氢-[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡啶-7-基胺(28)。根据通用过程B从硝基三唑并吡啶27制备(反应时间16h)。收率:185mg (54%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₈H₁₄N₄, 计算值为[M+H]⁺m/z 167.1297, 实测值为167.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ3.89-3.97 (m, 1H), 3.73-3.80 (m, 1H), 3.22-3.28 (m, 1H), 2.87-2.94 (m, 1H), 2.63 (q, J=7.5Hz, 1H), 2.49 (q, J=7.5Hz, 1H), 1.90-1.99 (m, 1H), 1.69-1.79 (m, 2H), 1.21 (t, J=7.5Hz, 3H)。HPLC (方法3): R_t=0.10min。

[0172]



[0173] 对-甲苯磺酸[1-(5-氨基-吡啶-2-基)-(亚丙基)]-酰肼(30), E/Z-异构体。

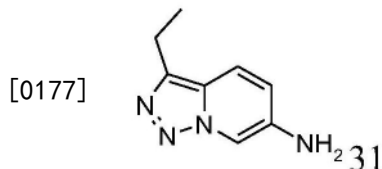
[0174]



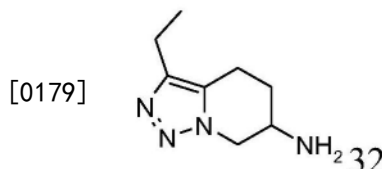
[0175] i) 1-(5-氨基-吡啶-2-基)-丙-1-酮。在氩气气氛下向乙基溴化镁在乙醚的溶液(3M, 13.8mL, 41.4mmol)中缓慢加入5-氨基吡啶-2-甲腈29(1.0g, 8.4mmol)在乙醚(192mL)中的混合物。将混合物在回流下搅拌6h, 然后在室温搅拌16h。将反应混合物倒在与浓HCl(15mL)混合的冰(77g)上, 在室温搅拌90min并在40℃搅拌16h。然后将反应混合物制成碱性, 直到用NaOH水溶液(4N)制成pH 9, 并用乙醚萃取3次。将合并的有机相用MgSO₄干燥, 减压浓缩并通过制备反相HPLC纯化, 得到产物。收率: 206mg (16%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₈H₁₀N₂O, 计算值为[M+H]⁺m/z 151.0871, 实测值为151.0。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ7.95 (d, J=2.7Hz, 1H), 7.70 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.94 (dd, J=8.6, 2.7Hz, 1H), 6.20 (br s, 2H), 3.00 (q, J=7.4Hz, 2H), 1.04 (t, J=7.4Hz, 3H)。HPLC (方法3): R_t=0.29min。

[0176] ii) 对-甲苯磺酸[1-(5-氨基-吡啶-2-基)-(亚丙基)]-酰肼(30), E/Z-异构体。在室温向对-甲苯磺酰肼(272.8mg, 1.5mmol)在MeOH(3mL)的混合物中逐份添加1-(5-氨基-吡啶-2-基)-丙酮-1-酮(200.0mg, 1.3mmol)。添加另一部分的对-甲苯磺酰肼(173.6mg, 0.9mmol)并继续搅拌6h。将反应混合物通过制备反相HPLC纯化, 得到产物30作为可分离的E-异构体和Z-异构体。收率:E-30: 212mg (50%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₅H₁₈N₄O₂S, 计算值为[M-H]⁻m/z 317.1072, 实测值为317.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ10.40 (s, 1H), 7.85 (d, J=2.7Hz, 1H), 7.77-7.81 (m, 2H), 7.48 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.38-7.42 (m, 2H), 6.88 (dd, J=8.6, 2.7Hz, 1H), 5.62 (br s, 2H), 2.75 (q, J=7.5Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 0.93 (t, J=7.5Hz, 3H)。¹³C NMR (101MHz, (CD₃)₂SO) δ158.4, 145.5, 143.1, 141.4, 136.3, 134.2, 129.4, 127.4, 120.8, 120.1, 21.0, 18.3, 10.4。HPLC (方法3): R_t=0.26min。收率: Z-30: 212mg (50%)。LCMS (ESI⁺),

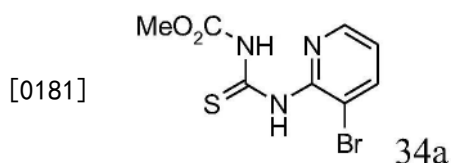
对于 $C_{15}H_{18}N_4O_2S$, 计算值为 $[M+H]^+m/z$ 319.1229, 实测值为319.1。 ^1H NMR (400MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 14.2 (s, 1H), 7.99 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.70-7.73 (m, 2H), 7.42 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.35-7.40 (m, 2H), 7.03 (dd, $J=8.8, 2.8$ Hz, 1H), 6.10 (br s, 2H), 2.51 (q, $J=7.3$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 0.97 (t, $J=7.3$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (101MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 147.5, 145.8, 143.1, 139.3, 136.5, 132.9, 129.5, 127.0, 125.0, 120.0, 27.4, 21.0, 11.9。HPLC (方法3): $R_t=0.53$ min。



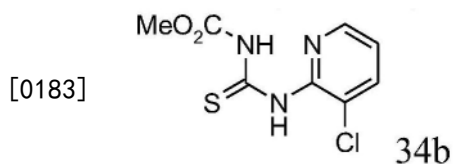
[0178] 3-乙基-[1,2,3]三唑并[1,5-a]吡啶-6-基胺 (31)。将酰肼Z-30 (240mg, 0.75mmol) 溶解在吗啉 (0.66mL, 7.54mmol) 中并在100℃搅拌4h。在冷却至室温之后, 将反应混合物直接通过制备反相HPLC纯化, 得到产物31。收率: 84mg (69%)。LCMS (ESI^+), 对于 $C_8H_{10}N_4$, 计算值为 $[M+H]^+m/z$ 163.0984, 实测值为163.0。 ^1H NMR (400MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 7.99 (dd, $J=1.7, 0.7$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J=9.3, 0.7$ Hz, 1H), 6.87 (dd, $J=9.4, 1.7$ Hz, 1H), 5.36 (br s, 2H), 2.84 (q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.26 (t, $J=7.6$ Hz, 3H)。HPLC (方法3): $R_t=0.30$ min。



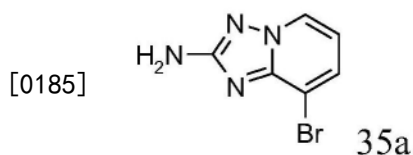
[0180] 3-乙基-4,5,6,7-四氢-[1,2,3]三唑并[1,5-a]吡啶-6-基胺 (32)。向氨基三唑并吡啶31 (84mg, 518 μ mol) 在甲醇 (5mL) 的溶液中加入钯 (10%在炭上, 25mg)。将混合物在0.5巴在室温氢化16h, 然后过滤并减压浓缩。使剩余物吸收进DMF并通过制备反相HPLC纯化, 得到产物32。收率: 20mg (23%)。LCMS (ESI^+), 对于 $C_8H_{14}N_4$, 计算值为 $[M+H]^+m/z$ 167.1297, 实测值为167.1。 ^1H NMR (400MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 4.32 (m, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.27-3.33 (m, 1H, 大部分被水信号遮挡), 2.81 (m, 1H), 2.58-2.67 (m, 1H), 2.53 (q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.86-1.94 (m, 1H), 1.77 (br s, 2H), 1.60-1.70 (m, 1H), 1.15 (t, $J=7.6$ Hz, 3H)。HPLC (方法3): $R_t=0.25$ min。



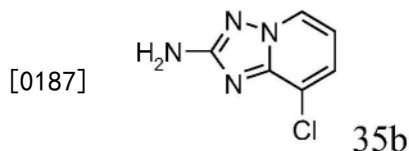
[0182] 1-(3-溴-吡啶-2-基)-3-乙氧甲酰基-硫脲 (34a)。在5℃将异氰酸基甲酸乙酯 (52.5g, 397mmol) 逐滴添加到2-氨基-3-溴吡啶 (33a) (66g, 378mmol) 在DCM (660mL) 的溶液中。在室温搅拌16h之后, 将反应混合物减压浓缩, 得到粗产物, 将其用PE洗涤并干燥。收率: 105g (87%)。LCMS (ESI^+), 对于 $C_9H_{10}BrN_3O_2S$, 计算值为 $[M+H]^+m/z$ 303.9755, 实测值为304.0。 ^1H NMR (400MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 11.43 (br s, 2H), 8.49 (dd, $J=4.6, 1.5$ Hz, 1H), 8.17 (dd, $J=7.9, 1.5$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J=7.9, 4.7$ Hz, 1H), 4.23 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.27 (t, $J=7.1$ Hz, 3H)。TLC (硅胶, PE/EE 3:1): $R_f=0.4$ 。



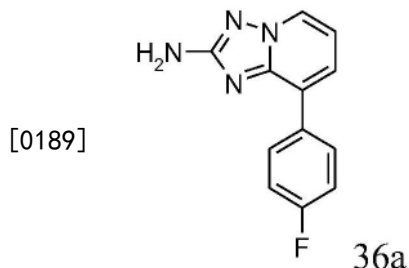
[0184] 1-(3-氯-吡啶-2-基)-3-乙氧甲酰基-硫脲(34b)。通过针对合成34a所描述的类似的过程从2-氨基-3-氯吡啶(33b)(3.16g, 25mmol)开始在DMF中制备。收率:6.11g(96%)。LCMS(ESI⁺), 对于C₉H₁₀ClN₃O₂S, 计算值为[M+H]⁺_{m/z} 260.0261, 实测值为260.1。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ11.45(br s, 1H), 11.42(br s, 1H), 8.45(dd, J=4.7, 1.4Hz, 1H), 8.04(dd, J=8.0, 1.4Hz, 1H), 7.42(dd, J=8.0, 4.7Hz, 1H), 4.23(q, J=7.1Hz, 2H), 1.27, (t, J=7.1Hz, 3H)。HPLC(方法1)R_t=0.64min。



[0186] 8-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(35a)。将DIPEA(128.2g, 984mmol)和羟胺盐酸盐(115.1g, 1.64mol)在乙醇/甲醇的混合物(400mL/400mL)的悬浮液中添加1-(3-溴-吡啶-2-基)-3-乙氧甲酰基-硫脲(34a)(105.0g, 328mmol)。在室温搅拌2h之后,将反应混合物加热回流18h。在冷却至室温之后,收集沉淀物,用水和EE洗涤并干燥,得到产物(35a)。收率:55g(75%)。LCMS(ESI⁺), 对于C₆H₅BrN₄, 计算值为[M+H]⁺_{m/z} 212.9776, 实测值为213.1。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.58(dd, J=6.6, 0.7Hz, 1H), 7.73(dd, J=7.6, 0.7Hz, 1H), 6.81(dd, J=7.5, 6.7Hz, 1H), 6.24(br s, 2H)。TLC(硅胶, DCM/MeOH 10:1):R_f=0.5。

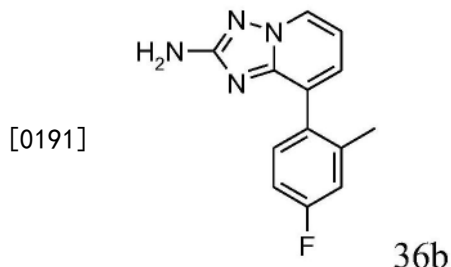


[0188] 8-氯-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(35b)。通过针对合成35a所描述的类似的过程从1-(3-氯-吡啶-2-基)-3-乙氧甲酰基-硫脲(34b)(6.1g, 23.5mmol)开始制备。收率:2.95g(74%)。LCMS(ESI⁺), 对于C₆H₅ClN₄, 计算值为[M+H]⁺_{m/z} 169.0281, 实测值为169.0。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.54(dd, J=6.7, 0.8Hz, 1H), 7.59(d, J=7.7, 0.8Hz, 1H), 6.86(dd, J=7.7, 6.7Hz, 1H), 6.22(br s, 2H)。HPLC(方法1)R_t=0.57min。

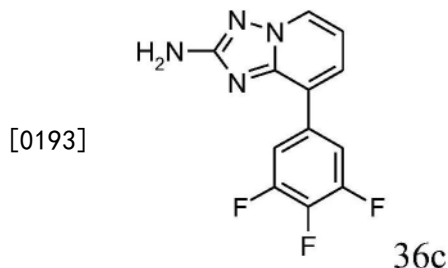


[0190] 8-(4-氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(36a)。将8-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(35a)(10g, 45mmol)、4-氟-苯基硼酸(12.61g, 89mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)(2.93g, 4mmol)和碳酸钠溶液(2N在水中, 44.6mL, 89mmol)在1,4-二氧杂环己烷(200mL)中的混合物在110℃在氮气气氛下搅拌12h。将反应混

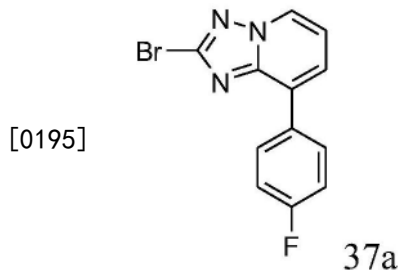
合物用水稀释并用乙酸乙酯萃取。将有机层用 Na_2SO_4 干燥并减压浓缩。将剩余物通过制备 MPLC (硅胶, PE/乙酸乙酯 20:1) 纯化, 得到产物 (36a)。收率: 8.6g (80%)。LCMS (ESI^+), 对于 $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{FN}_4$, 计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{m/z}}$ 229.0889, 实测值为 229.1。 ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.54 (dd, $J=6.7, 1.0\text{Hz}$, 1H), 8.14-8.21 (m, 2H), 7.70 (dd, $J=7.3, 1.0\text{Hz}$, 1H), 7.29-7.37 (m, 2H), 6.97 (dd, $J=7.3, 6.7\text{Hz}$, 1H), 6.12 (s, 2H)。TLC (硅胶, PE/乙酸乙酯 10:1): $R_f=0.5$ 。HPLC (方法 3) $R_t=0.43\text{min}$ 。



[0192] 8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺 (36b)。通过针对合成 36a 所描述的类似的过程从 4-氟-2-甲基-苯基硼酸 (27.74g, 178mmol) 和 8-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺 (35a) (20g, 89mmol) 开始制备。收率: 17g (75%)。LCMS (ESI^+), 对于 $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{FN}_4$, 计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{m/z}}$ 243.1046, 实测值为 243.1。 ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.56 (dd, $J=6.7, 1.0\text{Hz}$, 1H), 7.31-7.36 (m, 1H), 7.30 (dd, $J=7.3, 1.0\text{Hz}$, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.94 (dd, $J=7.3, 6.7\text{Hz}$, 1H), 6.00 (s, 2H), 2.17 (s, 3H)。TLC (硅胶, PE/乙酸乙酯 4:1): $R_f=0.5$ 。HPLC (方法 3) $R_t=0.43\text{min}$ 。

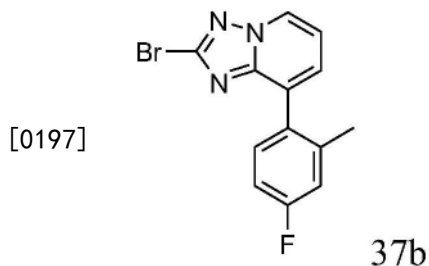


[0194] 8-(3,4,5-三氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺 (36c)。通过针对合成 36a 所描述的类似的过程从 3,4,5-三氟-苯基硼酸 (1.5g, 8.5mmol)、8-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺 (35a) (1.8g, 8.5mmol) 和二氯甲烷络合的 [1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯 (II) (1:1) (0.7g, 0.85mmol) 开始制备。收率: 1.03g (45%)。LCMS (ESI^+), 对于 $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{F}_3\text{N}_4$, 计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{m/z}}$ 265.0701, 实测值为 265.1。 ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.61 (dd, $J=6.6, 0.8\text{Hz}$, 1H), 8.23-8.32 (m, 2H), 7.90 (dd, $J=7.6, 0.8\text{Hz}$, 1H), 7.00 (dd, $J=7.5, 6.8\text{Hz}$, 1H), 6.24 (br s, 2H)。HPLC (方法 6): $R_t=0.51\text{min}$ 。

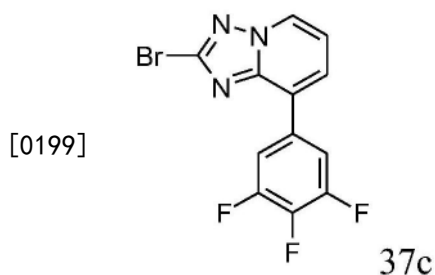


[0196] 2-溴-8-(4-氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶 (37a)。将叔-硝基丁烷 (8.35g,

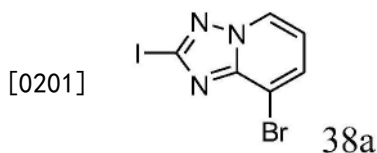
78.76mmol)和溴化铜(II)(17.77g,78.76mmol)在乙腈(180mL)中的混合物加热至60℃,按一次一小份添加8-(4-氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(36a)(8.60g,35.8mmol)。在完成添加之后,将混合物加热至75℃并保持1h。添加另外部分的叔-硝基丁烷和溴化铜(II),将混合物加热至75℃冰保持另外一小时。将混合物冷却至室温,加入水并用DCM萃取。将有机相用盐水洗涤,用MgSO₄干燥,过滤并减压浓缩,得到粗物质,将其通过MPLC(硅胶,PE/乙酸乙酯8:1)纯化,得到产物(37a)。收率:6.17g(59%)。LCMS(ESI⁺),对于C₁₂H₇BrFN₃,计算值为[M+H]⁺m/z 291.9886,实测值为292.0。¹H NMR(400MHz,(CD₃)₂SO) δ8.95(dd,J=6.7,1.0Hz,1H),8.11-8.17(m,2H),7.99(dd,J=7.4,1.0Hz,1H),7.34-7.43(m,2H),7.36(dd,J=7.4,6.7Hz,1H)。TLC(硅胶,PE/乙酸乙酯4:1):R_f=0.5。



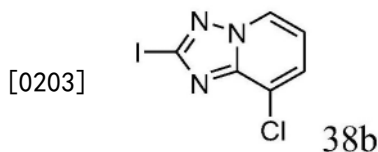
[0198] 2-溴-8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶(37b)。向8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(36b)(15g,62mmol)在氢溴酸(47%水溶液,70.8mL,62mmol)的0℃混合物中添加亚硝酸钠水溶液(10.68g在150mL水中,155mmol)。在搅拌2h之后,添加溴化亚铜(I)(8.88g,62mmol)。在0℃搅拌4h之后,将反应混合物用乙酸乙酯(50mL)和水(20mL)稀释。将有机相分离,用Na₂SO₄干燥,过滤并减压浓缩,得到粗物质,将其通过MPLC(硅胶,PE/乙酸乙酯9:1)纯化,得到产物(37b)。收率:10.0g(53%)。LCMS(ESI⁺),对于C₁₃H₉BrFN₃,计算值为[M+H]⁺m/z 306.0042,实测值为306.0。¹H NMR(400MHz,(CD₃)₂SO) δ8.98(dd,J=6.9,0.8Hz,1H),7.65(dd,J=7.2,0.8Hz,1H),7.39(m,1H),7.34(dd,J=7.2,6.9Hz,1H),7.24(m,1H),7.15(m,1H),2.16(s,3H)。TLC(硅胶,PE/乙酸乙酯1:1):R_f=0.6。



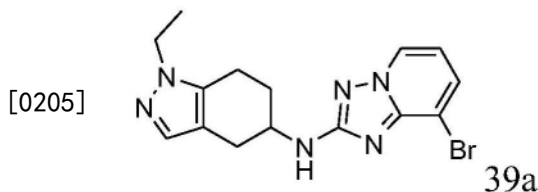
[0200] 2-溴-8-(3,4,5-三氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶(37c)。在-5℃向8-(3,4,5-三氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(36c)(1.22g,4.6mmol)和NaNO₂(955mg,4.31mmol)在冰水(~1mL)的混合物中逐滴添加氢溴酸(48%在水中,11.2mL,99mmol)。完成添加之后,将反应混合物缓慢升温至室温,然后回流1天。在冷却至室温之后,将沉淀物滤除并通过制备反相HPLC纯化,得到产物(37c)。收率:627mg(42%)。LCMS(ESI⁺),对于C₁₂H₅BrF₃N₃,计算值为[M+H]⁺m/z 327.9697,实测值为328.0。¹H NMR(400MHz,(CD₃)₂SO) δ9.02(dd,J=6.8,0.8Hz,1H),8.11-8.20(m,3H),7.39(m,1H)。HPLC(方法6):R_t=0.75min。



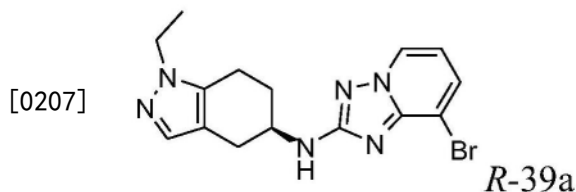
[0202] 8-溴-2-碘-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶(38a)。根据文献过程(Menet, C.J.M.; Blanc, J.; Hodges, A.J.; Burli, R.W.; Breccia, P.; Blackaby, W.P.; VanRompae, L.J.C.; Fletcher, S.R. [1,2,4]Triazolo[1,5-a]pyridines as JAKinhibitors. WO 2010010184)从8-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(35a) (5.0g, 23.47mmol)开始制备。收率: 4.35g (57%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₆H₃BrIN₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 323.8633, 实测值为323.9。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.96 (dd, J=6.8, 0.8Hz, 1H), 8.01 (dd, J=7.6, 0.8Hz, 1H), 7.12 (dd, J=7.5, 6.9Hz, 1H)。HPLC (方法5): Rt=0.52min。



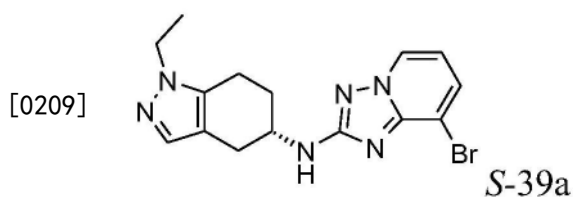
[0204] 8-氯-2-碘-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶(38b)。在室温向亚硝酸钠(7.8g, 112.7mmol)和碘化钾(23.4g, 140.9mmol)在水(30mL)的混合物中添加对-甲苯磺酸一水合物(42.9g, 225.4mmol)在乙腈(500mL)的混合物, 然后添加8-氯-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(35b) (9.5g, 56.4mmol)。在50℃搅拌2h之后, 将反应混合物用水稀释, 添加硫代硫酸钠, 直到变色持续。将混合物用DCM萃取两次, 将合并的有机相减压浓缩。将剩余物用水研磨, 过滤并干燥, 得到产物(38b)。收率: 13.34g (85%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₆H₃ClIN₃, 计算值为[M+H]⁺m/z 279.9138, 实测值为279.9。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.94 (dd, J=6.8, 0.9Hz, 1H), 7.88 (dd, J=7.7, 0.9Hz, 1H), 7.19 (dd, J=7.7, 6.8Hz, 1H)。HPLC (方法1): Rt=0.77min。



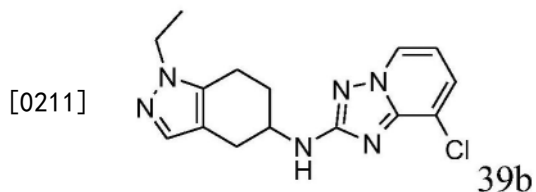
[0206] (8-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基)-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(39a)。用微波辐射将8-溴-2-碘-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶(38a) (200mg, 617μmol)、1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺(13a) (245mg, 1.48mmol)和氟化铯(131mg, 864μmol)在DMSO(2.5mL)中的混合物在130-160℃加热10h。在冷却至室温之后, 将沉淀物滤出并丢弃。使滤液吸收进乙酸乙酯和水中, 并用乙酸乙酯萃取3次。将合并的有机相用硫酸钠干燥并减压浓缩。将残余物通过制备反相HPLC纯化, 得到产物(39a)。收率: 86mg, TFA盐(29%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₁₅H₁₇BrN₆, 计算值为[M+H]⁺m/z 361.0776, 实测值为361.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.64 (dd, J=6.6, 0.8Hz, 1H), 7.75 (dd, J=7.7, 0.8Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.94 (very br s, 1H), 6.81 (dd, J=7.7, 6.6Hz, 1H), 3.98 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.81-3.90 (m, 1H), 2.76-2.91m, 2H, 2.61-2.72 (m, 1H), 2.41-2.51 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.10-2.18 (m, 1H), 1.75-1.87 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC (方法6): Rt=0.91min。



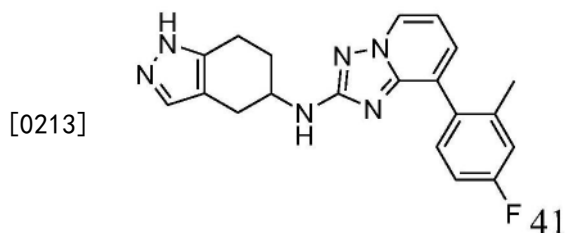
[0208] (R) - (8-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基) - (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基) - 胺 (R-39a)。按照与外消旋39a的制备类似的方法从手性R-13a和38a开始制备。收率:550mg (46%)。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.64 (dd, J=6.6, 0.8Hz, 1H), 7.75 (dd, J=7.7, 0.8Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.94 (very br s, 1H), 6.81 (dd, J=7.7, 6.6Hz, 1H), 3.98 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.81-3.90 (m, 1H), 2.76-2.91 (m, 2H), 2.61-2.72 (m, 1H), 2.41-2.51 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.10-2.18 (m, 1H), 1.75-1.87 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC (方法4): R_t=0.91min。



[0210] (S) - (8-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基) - (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基) - 胺 (S-39a)。按照与外消旋39a的制备类似的方法从手性S-13a和38a开始制备。收率:206mg (62%)。HPLC (方法5): R_t=0.91min。



[0212] (8-氯-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基) - (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基) - 胺 (39b)。将1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基胺 (13a) (1.57g, 9.48mmol)、8-氯-2-碘-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶 (38b) (2.65g, 9.48mmol)、[1,3-双(2,6-二-3-戊基苯基)咪唑-2-亚基] (3-氯吡啶基) 二氯化钪 (II) (280.0mg, 325.0μmol) 和叔丁醇钠 (3.65g, 37.93mmol) 在1,4-二氧杂环己烷 (40mL) 中的混合物在100℃在氩气气氛下搅拌3h。在冷却之后,将反应混合物倒入冰水中并用乙酸乙酯萃取3次。将合并的有机相用硫酸钠干燥并减压浓缩。将剩余物用乙醚研磨,得到产物 (39b)。收率:1.55g (51%)。LCMS (ESI⁺), 对于 C₁₅H₁₇ClN₆, 计算值为[M+H]⁺ m/z 317.1281, 实测值为317.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.61 (dd, J=6.7, 0.8Hz, 1H), 7.61 (dd, J=7.8, 0.9Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.91 (d, J=7.6Hz, 1H), 6.87 (dd, J=7.7, 6.7Hz, 1H), 3.97 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.80-3.92 (m, 1H), 2.75-2.91 (m, 2H), 2.60-2.73 (m, 1H), 2.41-2.51 (m, 1H), 2.10-2.19 (m, 1H), 1.75-1.87 (m, 1H), 1.28 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC (方法1): R_t=0.85min。



[0214] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(41)。向4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-胺二盐酸盐(52mg, 245 μ mol)、2-溴-8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶(37b)(50mg, 163 μ mol)和Cs₂CO₃(213mg, 653 μ mol)在甲苯(2mL)的混合物中加入[1,3-双(2,6-二-3-苯基苯基)咪唑-2-亚基](3-氯吡啶基)二氯化钡(II)(6.5mg, 8 μ mol)。将反应混合物在110℃搅拌5天。向反应混合物中加入1,4-二氧杂环己烷(1mL)和水(0.1mL)并在120℃继续搅拌16h。在冷却至室温之后,将反应混合物减压浓缩,使其吸收进1,4-二氧杂环己烷中,过滤通过Al₂O₃,并通过制备反相HPLC纯化,得到产物(41)。收率:3mg(5%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₀H₁₉FN₆,计算值为[M+H]⁺ m/z 363.1733,实测值为363.2。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.99(dd, J=6.8, 1.1Hz, 1H), 7.64(dd, J=7.3, 1.1Hz, 1H), 7.53(s, 1H), 7.44(m, 1H), 7.32(m, 1H), 7.26(m, 1H), 7.16(m, 1H), 2.99-3.17(m, 2H), 2.83-2.94(m, 1H), 2.66-2.73(m, 1H), 2.22(s, 3H), 2.14-2.21(m, 1H), 1.85-1.94(m, 1H), 1.51-1.62(m, 1H)。注意:两个NH信号都不可见。HPLC(方法1):R_t=0.94min。

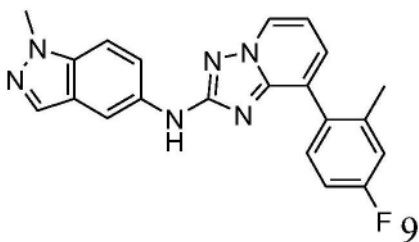
[0215] 通用过程C-1:制备最终化合物42-45、47、48、50、51、53-55:在氩气气氛下向2-卤代-三唑并吡啶37a-c(1当量)、胺13a-g、21a、24或28(2当量)和叔丁醇钠(4当量)在脱气1,4-二氧杂环己烷(0.2M)的混合物中添加Johnphos(0.1当量)和三-(二亚苄基丙酮)二钯(0)(0.1当量)。将反应混合物脱气,再次置于在氩气气氛下,并在80℃搅拌4-16h。在冷却至室温之后,将反应混合物过滤,并通过制备反相HPLC纯化,得到所需产物。

[0216] 通用过程C-2:制备最终化合物40、(R)-42、46、49和52:用微波辐射将2-卤代三唑并吡啶38b或37c(1当量)、胺R-13a、13f、17、21b或32(1当量)和氟化铯(5当量)在DMSO(0.1-0.3M)中的混合物在130-160℃加热10h。在冷却至室温之后,将沉淀物滤出并丢弃。使滤液吸收进乙酸乙酯和水中,并用乙酸乙酯萃取3次。将合并的有机相用硫酸钠干燥并减压浓缩。将残余物通过制备反相HPLC纯化,得到所需产物。

[0217] 通用过程D-1:制备最终化合物56-63、65、68-69:在氩气气氛下向氯三唑并吡啶39b(1当量)、相应的芳基硼酸(2当量)和K₃PO₄(2当量)在THF/水混合物(0.1M, v/v 10:1)的混合物中添加氯化-(2-二环己基磷基-2',6'-二甲氧基-1,1'-联苯)-[2-(2'-氨基-1,1'-联苯)]钯(II)(0.1当量)。将反应混合物脱气,再次置于在氩气气氛下,并在120℃加热16h。在冷却至室温之后,将混合物过滤并通过制备反相HPLC纯化,得到产物。

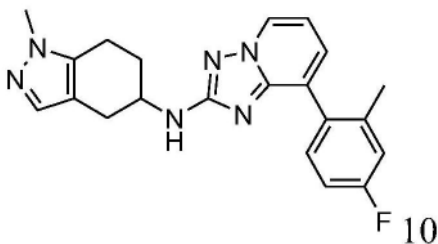
[0218] 通用过程D-2:制备最终化合物R-61、S-61、64、66和70-73:在氩气气氛下向溴三唑并吡啶39a(1当量)、相应的(杂)芳基硼酸或其酯(1.1当量)在1,4-二氧杂环己烷/甲醇混合物(0.05M, v/v 2:1)的混合物中添加碳酸钠水溶液(2M, 4当量)和与二氯甲烷络合(1:1)的[1,1'-双(二苯基磷基)二茂铁]二氯化钯(II)(0.03当量)。将反应混合物在90℃加热16h。在冷却至室温之后,将混合物过滤并通过制备反相HPLC纯化,得到产物。

[0219]



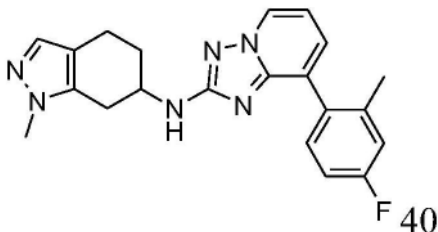
[0220] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-胺(9)。在氩气气氛下将醋酸钨(8mg, 36 μ mol)和X-Phos(17mg, 36 μ mol)添加到2-卤代-三唑并吡啶37b(110mg, 359 μ mol)和1-甲基-1H-咪唑-5-基胺(58mg, 395 μ mol)在1,4-二氧杂环己烷(5mL)的混合物中。在140 $^{\circ}$ C(微波辐射)放置45min之后,将混合物冷却至室温,加入另一部分1-甲基-1H-咪唑-5-基胺(15mg, 102 μ mol)。将反应混合物在微波辐射下在140 $^{\circ}$ C加热另外45min,然后冷却至室温并用TFA酸化。将混合物过滤并减压浓缩。将剩余物通过制备反相HPLC纯化,得到化合物9。收率:87mg, TFA salt(50%)。LCMS(ESI $^{+}$),对于C₂₁H₁₇FN₆,计算值为[M+H] $^{+}$ m/z373.1577,实测值为373.1。 ^{1} H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ 9.65(s, 1H), 8.84(dd, J=6.6, 0.9Hz, 1H), 8.16(m, 1H), 7.94(s, 1H), 7.38-7.56(m, 4H), 7.22(m, 1H), 7.13(m, 1H), 7.08(dd, J=7.3, 6.6Hz, 1H), 4.00(s, 3H), 2.22(s, 3H)。HPLC(方法5):R_t=0.70min。

[0221]



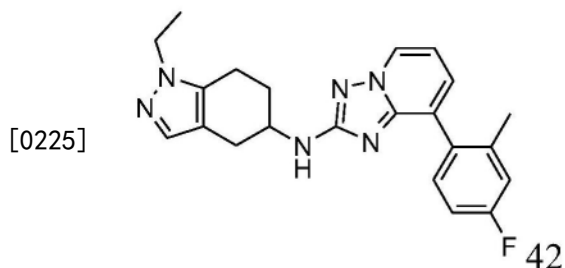
[0222] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-甲基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑-5-基)-胺(10)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b和1-甲基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑-5-基胺(作为二盐酸盐,来源:Chemizon,订单号006-002,CAS编号1228878-82-7)制备。收率:100mg(41%)。HRMS(ESI $^{+}$),对于C₂₁H₂₁FN₆,计算值为[M+H] $^{+}$ m/z 377.1890,实测值为377.1892。 ^{1} H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.63(dd, J=6.7, 1.1Hz, 1H), 7.30-7.37(m, 1H), 7.32(dd, J=7.3, 1.1Hz, 1H), 7.17(m, 1H), 7.10(s, 1H), 7.05-7.12(m, 1H), 6.95(dd, J=7.3, 6.7Hz, 1H), 6.65(d, J=7.6Hz, 1H), 3.74-3.85(m, 1H), 3.64(s, 3H), 2.68-2.87(m, 2H), 2.56-2.68(m, 1H), 2.37-2.46(m, 1H), 2.18(s, 3H), 2.07-2.17(m, 1H), 1.70-1.82(m, 1H)。HPLC(方法1):R_t=0.98min。

[0223]

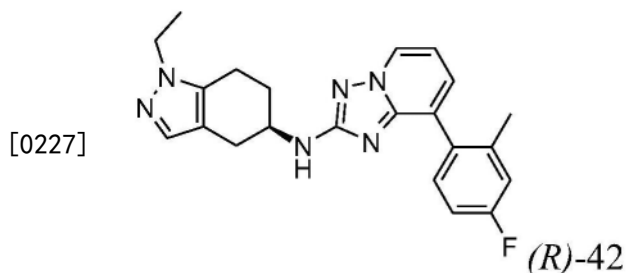


[0224] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-甲基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑-6-基)-胺(40)。根据通用过程C-2使用三唑并吡啶37b和胺21b(1当量)通过在微波辐射下在160 $^{\circ}$ C加热6h制备。收率:29mg, TFA盐(20%)。LCMS(ESI $^{+}$),对于C₂₁H₂₁FN₆,计

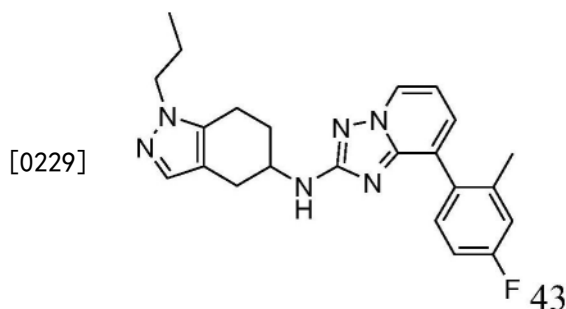
算值为 $[M+H]^+_{m/z}$ 377.1890,实测值为377.2。 ^1H NMR (400MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 8.65 (dd, $J=6.6$, 1.0Hz, 1H), 7.35 (dd, $J=7.3$, 1.1Hz, 1H), 7.32-7.37 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.98 (dd, $J=7.3$, 6.6Hz, 1H), 6.78 (br s, 1H), 3.87-3.96 (m, 1H), 3.63 (s, 3H, 部分被水信号遮挡), 3.01-3.08 (m, 1H), 2.41-2.63 (m, 3H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.19 (s, 3H), 1.96-2.05 (m, 1H), 1.64-1.76 (m, 1H)。HPLC (方法5): $R_t=0.57$ min。



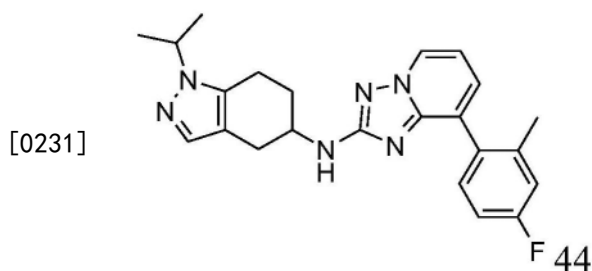
[0226] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-[8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺 (42)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b和胺13a制备。收率: 35mg (50%)。LCMS (ESI^+), 对于 $C_{22}H_{23}FN_6$, 计算值为 $[M+H]^+_{m/z}$ 391.2046, 实测值为391.2。 ^1H NMR (400MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 8.63 (dd, $J=6.7$, 1.1Hz, 1H), 7.31-7.36 (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.95 (dd, $J=7.3$, 6.7Hz, 1H), 6.67 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 3.95 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.75-3.86 (m, 1H), 2.73-2.88 (m, 2H), 2.57-2.68 (m, 1H), 2.38-2.46 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.08-2.17 (m, 1H), 1.70-1.82 (m, 1H), 1.27 (t, $J=7.2$ Hz, 3H)。HPLC (方法1): $R_t=1.01$ min。



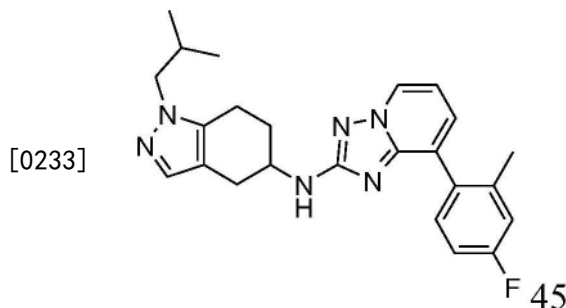
[0228] (R)-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-[8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺 ((R)-42)。根据通用过程C-2使用三唑并吡啶37b和手性胺R-13a制备。收率: 508mg (80%)。HRMS (ESI^+), 对于 $C_{22}H_{23}FN_6$, 计算值为 $[M+H]^+_{m/z}$ 391.2046, 实测值为391.2050。 ^1H NMR (400MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 8.63 (dd, $J=6.7$, 1.1Hz, 1H), 7.31-7.36 (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.95 (dd, $J=7.3$, 6.7Hz, 1H), 6.67 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 3.95 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.75-3.86 (m, 1H), 2.73-2.88 (m, 2H), 2.57-2.68 (m, 1H), 2.38-2.46 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.08-2.17 (m, 1H), 1.70-1.82 (m, 1H), 1.27 (t, $J=7.2$ Hz, 3H)。HPLC (方法5): $R_t=0.56$ min。对映体纯度 (方法15): 97.0% ee。比旋度: $[\alpha]_D^{20}=+5.1^\circ$ (c 0.396mg/mL, MeOH)。



[0230] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-丙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(43)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b和胺13c制备。收率: 29mg (48%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₃H₂₅FN₆, 计算值为[M+H]⁺m/z 405.2203, 实测值为405.3。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.63 (dd, J=6.6, 1.0Hz, 1H), 7.30-7.36 (m, 1H), 7.32 (dd, J=7.3, 1.0Hz, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.06-7.12 (m, 1H), 6.95 (dd, J=7.3, 6.6Hz, 1H), 6.68 (d, J=7.6Hz, 1H), 3.87 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.74-3.84 (m, 1H), 2.73-2.88 (m, 2H), 2.56-2.68 (m, 1H), 2.37-2.47 (m, 1H), 2.08-2.17 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 1.65-1.75 (m, 1H), 1.70 (sext, J=7.2Hz, 2H), 0.83 (t, J=7.4Hz, 3H)。HPLC (方法1): R_t=1.05min。

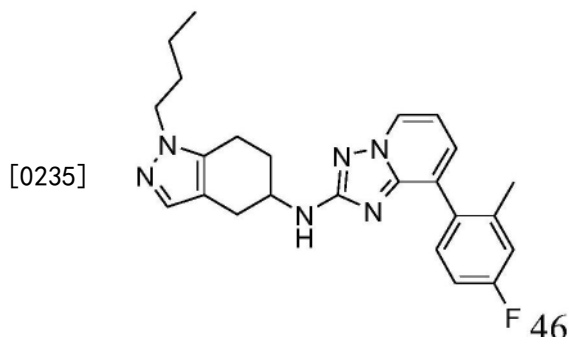


[0232] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-异丙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(44)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b和胺13d制备。收率: 28mg (45%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₃H₂₅FN₆, 计算值为[M+H]⁺m/z 405.2203, 实测值为405.3。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.62 (dd, J=6.6, 1.0Hz, 1H), 7.30-7.36 (m, 1H), 7.32 (dd, J=7.3, 1.0Hz, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.06-7.12 (m, 1H), 6.95 (dd, J=7.3, 6.6Hz, 1H), 6.68 (d, J=7.5Hz, 1H), 4.35 (sept, J=6.6Hz, 1H), 3.75-3.86 (m, 1H), 2.74-2.87 (m, 2H), 2.58-2.69 (m, 1H), 2.37-2.46 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.08-2.17 (m, 1H), 1.70-1.82 (m, 1H), 1.34 (d, J=6.6Hz, 3H), 1.32 (d, J=6.6Hz, 3H)。HPLC (方法1): R_t=1.04min。

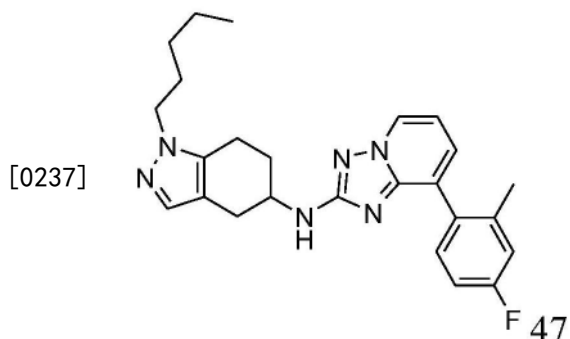


[0234] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-异丁基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(45)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b和胺13e制备。收率: 27mg (42%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₅H₂₉FN₆, 计算值为[M+H]⁺m/z 433.2516, 实测值为419.3。¹H

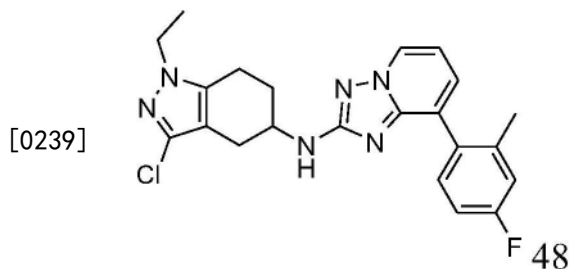
NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.63 (dd, $J=6.7, 1.2\text{Hz}$, 1H), 7.30-7.36 (m, 1H), 7.32 (dd, $J=7.3, 1.2\text{Hz}$, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.95 (dd, $J=7.3, 6.7\text{Hz}$, 1H), 6.67 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 3.75-3.85 (m, 1H), 3.72 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.81-2.89 (m, 1H), 2.71-2.81 (m, 1H), 2.55-2.65 (m, 1H), 2.37-2.47 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.00-2.16 (m, 2H), 1.68-1.81 (m, 1H), 0.83 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 6H)。HPLC (方法12): $R_t=0.85\text{min}$ 。



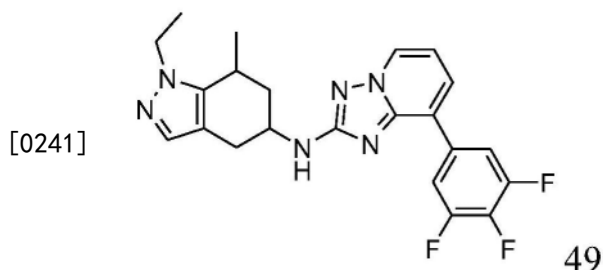
[0236] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-丁基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-胺 (46)。根据通用过程C-2使用三唑并吡啶37b和胺13f制备。收率: 109mg (80%)。LCMS (ESI^+), 对于 $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{FN}_6$, 计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 419.2359, 实测值为419.2。 ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.64 (dd, $J=6.6, 1.1\text{Hz}$, 1H), 7.32-7.37 (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.06-7.12 (m, 1H), 6.98 (dd, $J=7.2, 6.6\text{Hz}$, 1H), 6.72 (br s, 1H, 差积分), 3.93 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.76-3.86 (m, 1H), 2.73-2.88 (m, 2H), 2.57-2.68 (m, 1H), 2.39-2.47 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.08-2.18 (m, 1H), 1.72-1.83 (m, 1H), 1.62-1.72 (m, 1H), 1.20-1.30 (m, 2H), 0.88 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H)。HPLC (方法11): $R_t=0.80\text{min}$ 。



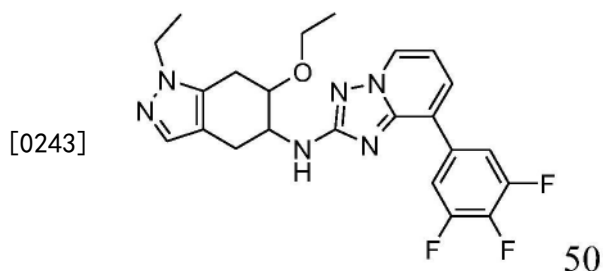
[0238] [8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-戊基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-胺 (47)。根据通用过程C-2使用三唑并吡啶37b和胺13g制备。收率: 101mg (71%)。LCMS (ESI^+), 对于 $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{FN}_6$, 计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 433.25160, 实测值为433.3。 ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.64 (dd, $J=6.6, 1.2\text{Hz}$, 1H), 7.35 (dd, $J=7.2, 1.2\text{Hz}$, 1H), 7.31-7.37 (m, 1H), 7.15-7.20 (m, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.06-7.12 (m, 1H), 6.97 (dd, $J=7.2, 6.6\text{Hz}$, 1H), 6.71 (br s, 1H, 差积分), 3.92 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H, 部分被水信号遮挡), 2.81-2.88 (m, 1H), 2.73-2.81 (m, 1H), 2.57-2.68 (m, 1H), 2.39-2.47 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.08-2.17 (m, 1H), 2.73-2.83 (m, 1H), 1.64-1.73 (m, 2H), 1.17-1.35 (m, 4H), 0.85 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。HPLC (方法11): $R_t=0.86\text{min}$ 。



[0240] (3-氯-1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑-5-基)-[8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(48)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b和胺13b(1当量)制备。收率:16mg(15%)。LCMS(ESI^+),对于 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClFN}_6$,计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{m/z}}$ 425.1657,实测值为425.2。 ^1H NMR(400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.64(dd, $J=6.6, 1.0\text{Hz}$, 1H), 7.31-7.36(m, 2H), 7.17(m, 1H), 7.05-7.12(m, 1H), 6.96(dd, $J=7.4, 6.6\text{Hz}$, 1H), 6.75(d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 3.94(q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.80-3.90(m, 1H), 2.70-2.84(m, 2H), 2.58-2.70(m, 1H), 2.31-2.39(m, 1H), 2.18(s, 3H), 2.05-2.13(m, 1H), 1.73-1.85(m, 1H), 1.27(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。HPLC(方法1): $R_t=1.09\text{min}$ 。

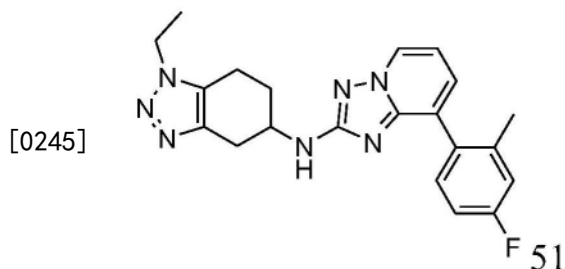


[0242] (1-乙基-7-甲基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑-5-基)-[8-(3,4,5-三氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(49)。根据通用过程C-2使用三唑并吡啶37c和胺17(1当量)通过在160°C在微波辐射下加热6h制备。收率:18mg(9%)。LCMS(ESI^+),对于 $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_6$,计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{m/z}}$ 427.1858,实测值为427.1。 ^1H NMR(400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.67(m, 1H), 8.23-8.32(m, 2H), 7.92(m, 1H), 7.16(s, 1H), 6.95-7.03(m, 2H), 4.07(q, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 4.06(q, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 3.68-3.79(m, 1H), 3.02-3.11(m, 1H), 2.87-2.95(m, 1H), 2.29-2.43(m, 2H), 1.43-1.53(m, 1H), 1.33(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.28(d, $J=6.7\text{Hz}$, 3H)。注意:仅指认了主要的顺式非对映异构体。HPLC(方法4): $R_t=1.25\text{min}$ 。

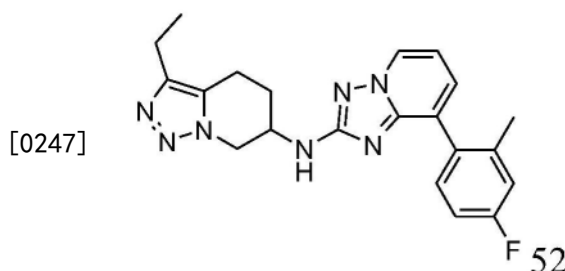


[0244] (6-乙氧基-1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑-5-基)-[8-(3,4,5-三氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(50)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37c和胺13h(1当量)制备。收率:11mg(17%)。LCMS(ESI^+),对于 $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$,计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{m/z}}$ 457.1964,实测值为457.2。 ^1H NMR(400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.68(dd, $J=6.7, 0.9\text{Hz}$, 1H), 8.23-8.32(m, 2H), 7.92(dd, $J=7.5, 0.9\text{Hz}$, 1H), 7.14(s, 1H), 7.01(dd, $J=7.5, 6.7\text{Hz}$, 1H), 6.70(d, $J=$

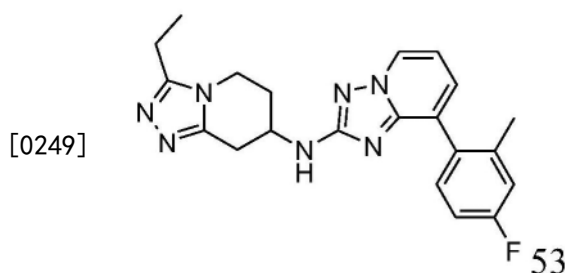
7.7Hz, 1H), 4.02-4.09 (m, 2H), 3.98 (q, J=7.4Hz, 2H), 3.48-3.63 (m, 2H), 2.93-3.03 (m, 1H), 2.79-2.89 (m, 1H), 2.70 (m, 2H), 1.29 (t, J=7.3Hz, 3H), 1.07 (t, J=7.1Hz, 3H)。注意: 仅指认了主要的非对映异构体。HPLC (方法3): $R_t=0.70\text{min}$ 。



[0246] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-苯并三唑-5-基)-[8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺 (51)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b和胺24 (1当量) 制备。收率: 90mg (59%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₂FN₇, 计算值为[M+H]⁺m/z 392.1999, 实测值为392.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.65 (dd, J=6.7, 1.0Hz, 1H), 7.30-7.37 (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.98 (dd, J=7.3, 6.7Hz, 1H), 6.80 (br s, 1H), 4.22 (q, J=7.3Hz, 2H), 3.90-3.98 (m, 1H), 2.97-3.06 (m, 1H), 2.78-2.88 (m, 1H), 2.61-2.74 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.07-2.16 (m, 1H), 1.79-1.91 (m, 1H), 1.37 (t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC (方法7): $R_t=0.50\text{min}$ 。

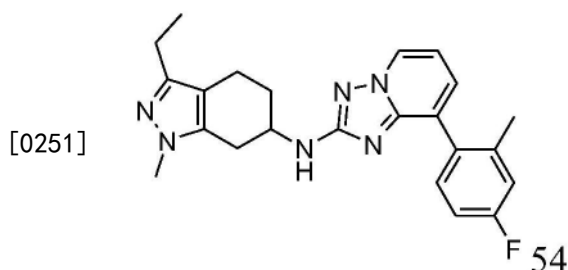


[0248] (3-乙基-4,5,6,7-四氢-[1,2,3]三唑并[1,5-a]吡啶-6-基)-[8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺 (52)。根据通用过程C-2使用三唑并吡啶37b和胺32 (1当量) 通过在160°C在微波辐射下加热3h制备。收率: 9mg, TFA盐 (16%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₂FN₇, 计算值为[M+H]⁺m/z 392.1999, 实测值为392.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.68 (dd, J=6.7, 1.0Hz, 1H), 7.37 (dd, J=7.3, 1.0Hz, 1H), 7.32-7.36 (m, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.09 (m, 1H), 7.00 (dd, J=7.3, 6.7Hz, 1H), 4.53 (dd, J=12.2, 4.3Hz, 1H), 4.32 (dd, J=12.6, 6.2Hz, 1H), 4.12-4.20 (m, 1H), 2.89-2.99 (m, 1H), 2.71-2.81 (m, 1H), 2.55 (q, J=7.7Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.06-2.15 (m, 1H), 1.95-2.05 (m, 1H), 1.16 (t, J=7.7Hz, 3H)。HPLC (方法3): $R_t=0.59\text{min}$ 。

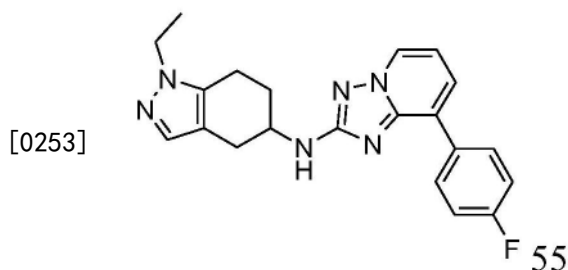


[0250] (3-乙基-5,6,7,8-四氢-[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡啶-7-yl)-[8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺 (53)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b

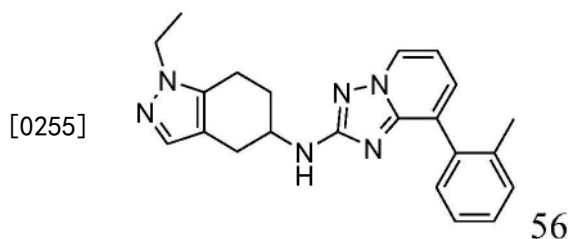
和胺28 (1当量) 制备。收率: 15mg (26%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₂FN₇, 计算值为[M+H]⁺m/z 392.1999, 实测值为392.3。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.66 (dd, J=6.6, 1.1Hz, 1H), 7.35 (dd, J=7.3, 1.1Hz, 1H), 7.32-7.37 (m, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.98 (dd, J=7.3, 6.7Hz, 1H), 6.91 (d, J=6.8Hz, 1H), 3.98-4.11 (m, 2H), 3.84-3.93 (m, 1H), 3.15 (dd, J=16.4, 5.0Hz, 1H), 2.87 (dd, J=16.4, 7.5Hz, 1H), 2.63 (q, J=7.5Hz, 2H), 2.18-2.27 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 1.97-2.09 (m, 1H), 1.22 (t, J=7.5Hz, 3H)。HPLC (方法6): R_t=0.46min。



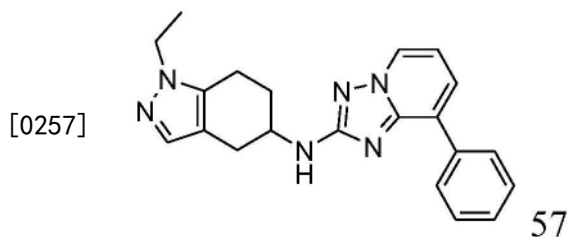
[0252] (3-乙基-1-甲基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-6-基)-[8-(4-氟-2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺 (54)。根据通用过程C-1使用三唑并吡啶37b和胺21a (1当量) 制备。收率: 77mg (58%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₃H₂₅FN₆, 计算值为[M+H]⁺m/z 405.2203, 实测值为405.3。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.65 (dd, J=6.7, 1.2Hz, 1H), 7.35 (dd, J=7.2, 1.2Hz, 1H), 7.32-7.37 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 6.97 (dd, J=7.2, 6.7Hz, 1H), 6.78 (br, 1H), 3.84-3.94 (m, 1H, 大部分被水信号遮挡), 3.58 (s, 3H), 2.96-3.05 (m, 1H), 2.35-2.57 (m, 3H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.45 (q, J=7.6Hz, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.96-2.05 (m, 1H), 1.65-1.76 (m, 1H), 1.15 (t, J=7.6Hz, 3H)。HPLC (方法1): R_t=1.04min。



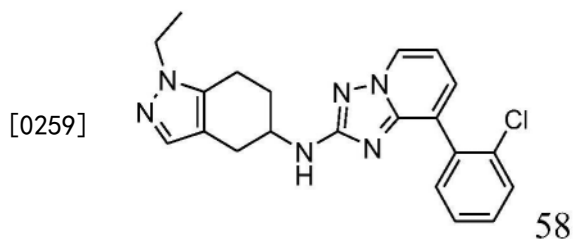
[0254] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-[8-(4-氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺 (55)。根据通用过程C-2使用三唑并吡啶37a和胺13a (1当量) 通过在120-160℃在微波辐射下加热9h制备。收率: 115mg (作为TFA盐获得, 69%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₁FN₆, 计算值为[M+H]⁺m/z 377.1890, 实测值为377.2。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.62 (dd, J=6.6, 1.1Hz, 1H), 8.14-8.20 (m, 2H), 7.73 (dd, J=7.4, 1.1Hz, 1H), 7.29-7.36 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 6.99 (dd, J=7.4, 6.6Hz, 1H), 3.99 (q, J=7.3Hz, 2H), 3.85-3.93 (m, 1H), 2.77-2.93 (m, 2H), 2.62-2.73 (m, 1H), 2.45-2.52 (m, 1H, 大部分被DMSO信号遮挡), 2.13-2.22 (m, 1H), 1.76-1.88 (m, 1H), 1.30 (t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC (方法5): R_t=0.61min。



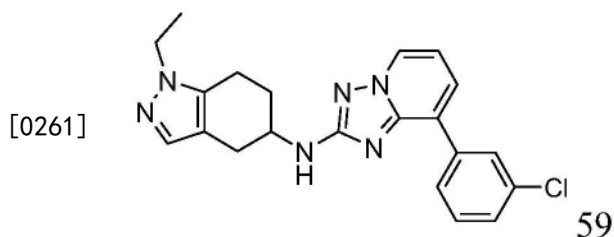
[0256] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-[8-(2-甲基-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(56)。根据通用过程D-1使用三唑并吡啶39b和2-甲基-苯基硼酸(1.5当量)通过在甲苯中在80℃加热3h制备。收率:22mg(59%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₂H₂₄N₆,计算值为[M+H]⁺m/z 373.2141,实测值为373.2。1H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.64(dd, J=6.6, 1.1Hz, 1H), 7.35(dd, J=7.3, 1.1Hz, 1H), 7.23-7.33(m, 4H), 7.16(s, 1H), 6.98(dd, J=7.3, 6.6Hz, 1H), 6.69(br s, 1H), 3.96(q, J=7.2Hz, 2H), 3.77-3.86(m, 1H), 2.73-2.87(m, 2H), 2.58-2.69(m, 1H), 2.39-2.47(m, 1H), 2.17(s, 3H), 2.08-2.17(m, 1H), 1.71-1.83(m, 1H), 1.27(t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC(方法2):R_t=0.89min。



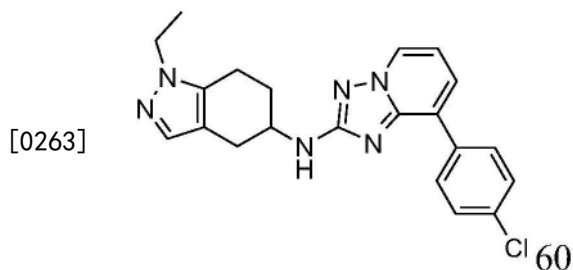
[0258] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-(8-苯基-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基)-胺(57)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和苯基硼酸制备。收率:26mg(72%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₁H₂₂N₆,计算值为[M+H]⁺m/z 359.1984,实测值为359.2。1H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.64(dd, J=6.6, 1.0Hz, 1H), 8.09-8.13(m, 2H), 7.74(dd, J=7.5, 1.0Hz, 1H), 7.47-7.53(m, 2H), 7.38-7.44(m, 1H), 7.16(s, 1H), 7.00(dd, J=7.5, 6.6Hz, 1H), 6.85(d, J=7.5Hz, 1H), 3.98(q, J=7.2Hz, 2H), 3.82-3.92(m, 1H), 2.77-2.93(m, 2H), 2.60-2.72(m, 1H), 2.43-2.51(m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.13-2.23(m, 1H), 1.73-1.87(m, 1H), 1.29(t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC(方法9):R_t=0.64min。



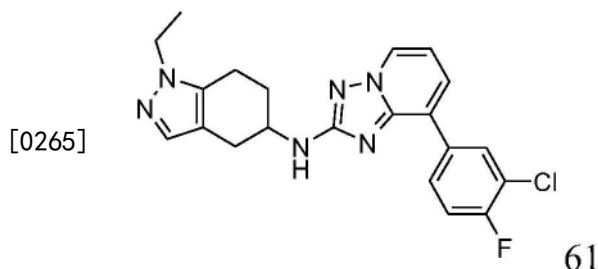
[0260] [8-(2-氯-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(58)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和2-氯-苯基硼酸制备。收率:12mg(30%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₁H₂₁ClN₆,计算值为[M+H]⁺m/z 393.1594,实测值为393.2。1H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.66(dd, J=6.6, 1.1Hz, 1H), 7.56-7.60(m, 1H), 7.55-7.51(m, 1H), 7.41-7.47(m, 2H), 7.41(dd, J=7.3, 1.1Hz, 1H), 7.12(s, 1H), 6.97(dd, J=7.3, 6.7Hz, 1H), 6.70(d, J=7.4Hz, 1H), 3.95(q, J=7.2Hz, 2H), 3.75-3.85(m, 1H), 2.73-2.88(m, 2H), 2.58-2.69(m, 1H), 2.38-2.47(m, 1H), 2.08-2.18(m, 1H), 1.70-1.83(m, 1H), 1.27(t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC(方法8):R_t=0.83min。



[0262] [8-(3-氯-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(59)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和3-氯-苯基硼酸制备。收率:21mg(53%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₁H₂₁ClN₆,计算值为[M+H]⁺_{m/z} 393.1594,实测值为393.3。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.68(d, J=6.7, 0.9Hz, 1H), 8.31(m, 1H), 8.06(m, 1H), 7.83(dd, J=7.5, 0.9Hz, 1H), 7.54(m, 1H), 7.46-7.50(m, 1H), 7.15(s, 1H), 7.00(t, J=7.5, 6.7Hz, 1H), 6.93(d, J=7.4Hz, 1H), 3.97(q, J=7.1Hz, 2H), 3.80-3.91(m, 1H), 2.76-2.93(m, 2H), 2.60-2.71(m, 1H), 2.43-2.50(m, 1H), 2.14-2.23(m, 1H), 1.73-1.86(m, 1H), 1.28(t, J=7.1Hz, 3H)。HPLC(方法9):R_t=0.75min。

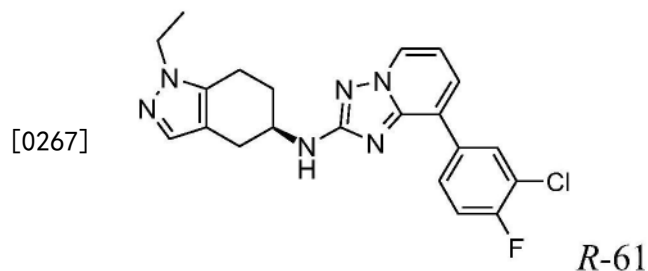


[0264] [8-(4-氯-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(60)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和4-氯-苯基硼酸制备。收率:16mg(41%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₁H₂₁ClN₆,计算值为[M+H]⁺_{m/z} 393.1594,实测值为393.3。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.65(dd, J=6.6, 1.0Hz, 1H), 8.16-8.20(m, 2H), 7.78(dd, J=7.5, 1.0Hz, 1H), 7.54-7.58(m, 2H), 7.15(s, 1H), 7.00(dd, J=7.5, 6.6, 1H), 6.89(d, J=7.6Hz, 1H), 3.97(q, J=7.3Hz, 2H), 3.81-3.92(m, 1H), 2.76-2.91(m, 2H), 2.61-2.72(m, 1H), 2.42-2.49(m, 1H), 2.13-2.22(m, 1H), 1.72-1.84(m, 1H), 1.28(t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC(方法9):R_t=0.75



[0266] [8-(3-氯-4-氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(61)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和3-氯-4-氟-苯基硼酸制备。收率:16mg(38%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₁H₂₀ClFN₆,计算值为[M+H]⁺_{m/z} 411.1500,实测值为411.2。¹H NMR(400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.65(dd, J=6.6, 1.0Hz, 1H), 8.48(dd, J=7.4, 2.3Hz, 1H), 8.14(m, 1H), 7.82(dd, J=7.5, 1.0Hz, 1H), 7.55(m, 1H), 7.15(s, 1H), 6.99(dd, J=7.5, 6.6Hz, 1H), 6.88(d, J=7.5Hz, 1H), 3.97(q, J=7.2Hz, 2H), 3.81-3.91(m, 1H), 2.85-

2.93 (m, 1H), 2.76-2.85 (m, 1H), 2.60-2.71 (m, 1H), 2.44-2.52 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.14-2.23 (m, 1H), 1.75-1.86 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC (方法8): $R_t = 0.94\text{min}$ 。



[0268] (R)-[8-(3-氯-4-氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-胺 (R-61)。根据通用过程D-2使用手性卤代三唑并吡啶R-39a和3-氯-4-氟-苯基硼酸制备。收率:232mg (57%)。HRMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₀ClFN₆, 计算值为[M+H]⁺ m/z 411.1500, 实测值为411.1500。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.65 (dd, J=6.6, 1.0Hz, 1H), 8.48 (dd, J=7.4, 2.3Hz, 1H), 8.14 (m, 1H), 7.82 (dd, J=7.5, 1.0Hz, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.99 (dd, J=7.5, 6.6Hz, 1H), 6.88 (d, J=7.5Hz, 1H), 3.97 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.81-3.91 (m, 1H), 2.85-2.93 (m, 1H), 2.76-2.85 (m, 1H), 2.60-2.71 (m, 1H), 2.44-2.52 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.14-2.23 (m, 1H), 1.75-1.86 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC (方法4): $R_t = 1.22\text{min}$ 。对映体纯度 (方法14): 97.4% ee。比旋度: $[\alpha]_D^{20} = +6.5^\circ$ (c 0.4mg/mL, MeOH)。

[0269] 化合物R-61的晶体数据

[0270] 化合物R-61的单晶 (C₂₁H₂₀ClFN₆·0.5CH₃OH) 在甲醇中生长。将适宜的晶体涂上Paratone N油, 使其悬浮在一个小的纤维圈中, 并将其放置在Rigaku AFC11R Cu Kα (1.5418 Å) 衍射仪上的在100K的冷却N₂气流中。在数据收集过程中使晶体保持在100K。使用Olex2 (Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J., Howard, J.A.K. & Puschmann, H.J. Appl. Cryst. 2009, 42, 339-341.) 使用ShelXT (Sheldrick, G.M. Acta Cryst. 2015, A71, 3-8.) 结构解析程序使用直接方法拆分结构, 使用ShelXL (Sheldrick, G.M. Acta Cryst. 2008, A64, 112-122.) 精修包使用最小二乘解精修结构。CCDC [1578256] 包含本文的补充晶体学数据。这些数据可从www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif免费从剑桥晶体学数据中心获取。关于数据收集和结构精确化的其它细节列于表3、3a-3e。

[0271] 表3. 化合物R-61的晶体结构的数据收集和结构精修细节

[0272]

标识码	CCDC [1578256]
经验式	C _{21.5} H ₂₂ ClFN ₆ O _{0.5}
式量	426.90
温度/K	100.15
晶系	单斜晶体
空间群	P21
a/Å	7.10926(16)
b/Å	15.4984(2)
c/Å	18.5987(3)
$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	94.4689(19)
$\gamma/^\circ$	90
体积/Å ³	2043.01(6)
Z	4
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.388
$\mu/\text{mm l}$	1.933
F(000)	892.0
辐射	CuK α ($\lambda=1.54184$)
数据收集的 2θ 范围/ $^\circ$	7.434 至 129.036
衍射指标范围	$-8 \leq h \leq 8, -17 \leq k \leq 18, -21 \leq l \leq 21$
衍射点收集	43736
独立衍射点	6072 [Rint=0.0775, Rsigma=0.0339]
数据限制性参数	6072/1/546

[0273]

基于 F2 的 GOOF 值	1.113
对于可观测衍射点的残差因子 R 值 [$I \geq 2\sigma(I)$]	R1=0.0845, wR2=0.2256
对于全部衍射点的残差因子 R 值	R1=0.0863, wR2=0.2317
精修后残余电子密度的峰、谷值/e Å ⁻³	0.71/-0.63
Flack 参数	0.02(3)

[0274] 表3a:数据的分数原子坐标($\times 10^4$)和等效各向同性位移参数($\text{\AA}^2 \times 10^3$)。 U_{eq} 定义为正交化 U_{ij} 张量轨迹的1/3

[0275]

原子	x	y	z	U(eq)
C110	9873(2)	5287.4(10)	1486.3(9)	42.8(5)
C11	2907(3)	3836.5(10)	3404.6(10)	47.8(6)
F101	5779(6)	5532(2)	1311(2)	40.4(10)
O201	-9025(7)	11861(3)	4730(3)	43.1(12)
F1	7006(7)	3742(3)	3728(3)	53.2(12)
N6	2475(8)	8169(3)	2625(3)	31.4(12)
N102	15899(8)	-2077(4)	-78(3)	33.2(12)
N105	11469(8)	638(4)	1782(3)	32.0(12)
N106	9895(8)	930(3)	2102(3)	30.1(12)
N104	10796(8)	2052(4)	1473(3)	30.2(11)
N101	17263(8)	-1483(4)	72(3)	32.2(12)
N103	13417(8)	1365(3)	1002(3)	31.0(12)
N4	1747(8)	7122(4)	3363(3)	31.8(12)
N5	947(8)	8486(4)	2949(3)	32.0(12)
N3	-775(8)	7858(4)	3858(3)	36.4(13)
N2	-4726(8)	10648(4)	4840(3)	35.3(13)
N1	-6499(9)	10542(4)	4508(4)	46.0(15)
C102	14597(9)	-797(4)	207(3)	30.3(13)
C11	2936(9)	7361(4)	2874(3)	30.3(14)
C103	13329(9)	-70(4)	400(3)	31.3(14)
C101	14292(9)	-1657(4)	2(3)	31.1(14)
C118	4900(10)	4118(4)	1627(3)	33.0(14)
C116	7327(10)	3053(4)	1937(3)	32.5(14)
C10	625(9)	7820(4)	3399(3)	29.7(13)
C117	5421(10)	3291(4)	1830(3)	34.1(15)
C110	11913(9)	1349(4)	1409(3)	30.3(14)
C111	9496(9)	1766(4)	1910(3)	30.2(13)
C16	5196(10)	6107(4)	2922(3)	31.7(14)
C12	4575(10)	6953(4)	2634(3)	32.8(15)
C112	7839(10)	2167(4)	2146(3)	32.5(14)
C13	5545(10)	7409(5)	2141(4)	36.6(15)
C7	-3571(10)	9993(4)	4685(3)	33.2(14)
C104	14475(9)	593(4)	857(3)	30.8(14)

[0276]

原子	x	y	z	U(eq)
C4	-1620(10)	8685(4)	4040(4)	34.1(15)
C14	5018(10)	8229(5)	1906(4)	37.0(15)
C2	-4609(10)	9427(4)	4242(4)	35.8(15)
C15	3467(10)	8626(4)	2144(3)	35.2(15)
C107	16554(9)	-700(4)	248(3)	31.4(14)
C106	17635(10)	92(4)	461(4)	35.7(15)
C17	7110(10)	5936(5)	3089(3)	36.8(15)
C5	-920(11)	8975(5)	4800(4)	42.0(16)
C119	6270(10)	4729(4)	1516(3)	34.7(15)
C115	8804(10)	427(5)	2506(3)	34.4(15)
C114	7226(10)	800(5)	2743(4)	37.7(15)
C108	19250(10)	-1754(4)	132(4)	35.3(15)
C105	16274(10)	857(4)	492(4)	35.3(15)
C19	6416(11)	4523(5)	3468(4)	40.4(17)
C21	3901(10)	5459(5)	3040(3)	35.0(15)
C121	8696(10)	3687(4)	1820(3)	33.2(14)
C113	6754(10)	1655(5)	2566(4)	36.7(15)
C120	8182(10)	4508(4)	1620(3)	35.2(15)
C20	4498(11)	4658(4)	3300(4)	37.8(16)
C6	-1543(11)	9907(5)	4940(4)	41.2(16)
C8	-4269(11)	11443(5)	5220(4)	39.5(16)
C201	-9458(12)	12058(6)	3993(4)	49.2(18)
C3	-3774(10)	8619(5)	3954(4)	41.6(17)
C18	7714(11)	5148(5)	3366(4)	41.1(17)
C9	-4005(11)	12187(5)	4709(4)	41.1(16)
C1	-6427(11)	9797(5)	4142(5)	48.0(18)
C109	19744(12)	-2215(7)	834(5)	58(2)

[0277] 表3b:数据的各向异性位移参数($\text{\AA}^2 \times 10^3$)。各向异性位移因子指数采取以下形式: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + 2hka^*b^* U_{12} + \dots]$

[0278]

原子	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
Cl10	45.5(10)	25.9(9)	56.7(10)	2.9(7)	2.9(8)	-1.1(7)
Cl1	54.6(12)	28.0(9)	62.1(11)	5.9(7)	11.4(9)	-1.8(8)
F101	52(2)	25(2)	44(2)	1.3(15)	0.3(17)	11.8(17)
O201	41(3)	32(3)	56(3)	-8(2)	1(2)	7(2)
F1	63(3)	35(3)	61(3)	16(2)	3(2)	17(2)
N6	36(3)	21(3)	39(3)	2(2)	5(2)	1(2)
N102	31(3)	26(3)	42(3)	-2(2)	0(2)	-2(2)
N105	33(3)	26(3)	38(3)	1(2)	3(2)	3(2)
N106	33(3)	22(3)	35(2)	0(2)	2(2)	1(2)
N104	28(3)	22(3)	41(3)	1(2)	3(2)	0(2)

[0279]

原子	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
N101	31(3)	22(3)	44(3)	-4(2)	5(2)	-1(2)
N103	29(3)	19(3)	45(3)	2(2)	3(2)	-1(2)
N4	29(3)	24(3)	42(3)	-1(2)	2(2)	2(2)
N5	33(3)	22(3)	41(3)	3(2)	3(2)	4(2)
N3	39(3)	24(3)	47(3)	6(2)	12(2)	4(2)
N2	35(3)	28(3)	42(3)	-3(2)	-2(2)	-1(2)
N1	34(3)	34(3)	70(4)	-16(3)	3(3)	1(3)
C102	33(3)	21(3)	36(3)	0(2)	1(2)	-2(3)
C11	33(3)	20(3)	37(3)	1(2)	-1(3)	0(3)
C103	33(3)	24(3)	37(3)	2(2)	1(3)	4(3)
C101	28(3)	27(3)	38(3)	-2(2)	2(3)	-5(3)
C118	31(3)	32(4)	35(3)	-3(3)	-3(2)	7(3)
C116	36(4)	25(3)	37(3)	-2(3)	1(3)	4(3)
C10	30(3)	19(3)	39(3)	1(2)	-4(3)	3(3)
C117	38(4)	29(3)	36(3)	-4(3)	2(3)	0(3)
C110	33(3)	19(3)	38(3)	-3(2)	1(3)	-2(2)
C111	30(3)	25(3)	35(3)	-1(2)	0(3)	4(3)
C16	38(4)	25(3)	33(3)	-2(2)	1(3)	3(3)
C12	40(4)	25(3)	34(3)	-2(3)	2(3)	2(3)
C112	32(3)	26(3)	39(3)	-1(3)	2(3)	-1(3)
C13	40(4)	30(4)	40(3)	0(3)	5(3)	1(3)
C7	39(4)	21(3)	39(3)	3(3)	3(3)	-1(3)
C104	30(3)	22(3)	40(3)	-1(2)	1(3)	-1(2)
C4	35(4)	20(3)	47(3)	6(3)	6(3)	6(3)
C14	39(4)	31(4)	41(3)	4(3)	0(3)	2(3)
C2	35(4)	23(3)	50(3)	-4(3)	4(3)	-1(3)
C15	39(4)	26(3)	41(3)	5(3)	4(3)	-1(3)
C107	31(3)	26(3)	37(3)	2(3)	4(3)	1(3)
C106	31(3)	27(4)	49(3)	-2(3)	4(3)	-1(3)
C17	43(4)	28(4)	39(3)	-1(3)	3(3)	4(3)
C5	43(4)	29(4)	52(4)	-1(3)	-9(3)	5(3)
C119	41(4)	25(3)	37(3)	-4(3)	0(3)	9(3)
C115	38(4)	28(4)	37(3)	3(3)	3(3)	-1(3)
C114	40(4)	33(4)	40(3)	1(3)	6(3)	-3(3)
C108	32(3)	27(4)	46(3)	-3(3)	2(3)	2(3)
C105	38(4)	25(3)	43(3)	0(3)	5(3)	-1(3)
C19	51(4)	28(4)	42(3)	6(3)	0(3)	16(3)
C21	37(4)	32(4)	36(3)	-8(3)	2(3)	4(3)
C121	35(4)	28(4)	36(3)	-1(3)	-1(3)	6(3)
C113	36(4)	31(4)	43(3)	-2(3)	6(3)	1(3)
C120	45(4)	25(4)	35(3)	-2(3)	5(3)	0(3)
C20	48(4)	27(4)	39(3)	1(3)	6(3)	4(3)
C6	48(4)	25(4)	49(4)	-3(3)	-8(3)	2(3)

[0280]

原子	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
C8	50(4)	22(3)	46(4)	-3(3)	-1(3)	1(3)
C201	46(4)	39(4)	62(4)	-10(4)	-1(4)	-2(3)
C3	37(4)	28(4)	60(4)	-14(3)	4(3)	0(3)
C18	41(4)	40(4)	41(3)	-1(3)	-3(3)	8(3)
C9	45(4)	30(4)	48(4)	0(3)	-1(3)	-5(3)
C1	35(4)	36(4)	73(5)	-17(4)	0(3)	2(3)
C109	40(5)	73(6)	62(5)	19(4)	8(4)	12(4)

[0281]

表3c:数据的键长

[0282]

原子	原子	长度/Å		原子	原子	长度/Å
C110	C120	1.736(7)		C118	C117	1.379(10)
C11	C20	1.724(8)		C118	C119	1.385(10)
F101	C119	1.341(8)		C116	C117	1.403(10)
O201	C201	1.414(10)		C116	C112	1.465(10)
F1	C19	1.358(8)		C116	C121	1.412(10)
N6	N5	1.374(8)		C111	C112	1.430(9)
N6	C11	1.365(8)		C16	C12	1.471(10)
N6	C15	1.379(8)		C16	C17	1.397(10)
N102	N101	1.351(8)		C16	C21	1.391(10)
N102	C101	1.334(9)		C12	C13	1.385(9)
N105	N106	1.384(8)		C112	C113	1.390(9)
N105	C110	1.353(8)		C13	C14	1.385(10)
N106	C111	1.368(9)		C7	C2	1.378(10)
N106	C115	1.366(8)		C7	C6	1.489(11)
N104	C110	1.360(8)		C104	C105	1.549(9)
N104	C111	1.352(8)		C4	C5	1.529(10)
N101	C107	1.363(8)		C4	C3	1.531(10)
N101	C108	1.469(9)		C14	C15	1.366(10)
N103	C110	1.357(8)		C2	C3	1.502(9)
N103	C104	1.451(8)		C2	C1	1.413(10)
N4	C11	1.342(8)		C107	C106	1.486(10)
N4	C10	1.350(8)		C106	C105	1.535(10)
N5	C10	1.359(8)		C17	C18	1.381(11)
N3	C10	1.362(8)		C5	C6	1.540(10)
N3	C4	1.465(8)		C119	C120	1.400(10)
N2	N1	1.370(9)		C115	C114	1.364(10)
N2	C7	1.350(9)		C114	C113	1.400(11)
N2	C8	1.445(9)		C108	C109	1.506(11)
N1	C1	1.342(10)		C19	C20	1.391(11)
C102	C103	1.505(9)		C19	C18	1.362(11)
C102	C101	1.399(10)		C21	C20	1.387(10)
C102	C107	1.395(10)		C121	C120	1.368(10)

[0283]

原子	原子	长度/Å		原子	原子	长度/Å
C11	C12	1.428(9)		C8	C9	1.514(10)
C103	C104	1.527(9)				

[0284] 表3d:数据的键长

[0285]

原子	原子	原子	角度/°		原子	原子	原子	角度/°
N5	N6	C15	124.3(6)		C111	C112	C116	121.3(6)
C11	N6	N5	110.9(5)		C113	C112	C116	123.2(6)
C11	N6	C15	124.7(6)		C113	C112	C111	115.5(6)
C101	N102	N101	104.6(5)		C12	C13	C14	122.8(7)
C110	N105	N106	100.6(5)		N2	C7	C2	107.5(6)
C111	N106	N105	110.9(5)		N2	C7	C6	126.1(6)
C115	N106	N105	124.3(5)		C2	C7	C6	126.5(6)
C115	N106	C111	124.7(6)		N103	C104	C103	113.4(5)
C111	N104	C110	102.8(5)		N103	C104	C105	108.7(5)
N102	N101	C107	112.5(5)		C103	C104	C105	111.0(5)
N102	N101	C108	119.4(5)		N3	C4	C5	111.1(6)
C107	N101	C108	127.4(6)		N3	C4	C3	110.0(6)
C110	N103	C104	122.0(5)		C5	C4	C3	111.5(6)
C11	N4	C10	102.6(5)		C15	C14	C13	121.1(6)
C10	N5	N6	100.1(5)		C7	C2	C3	122.4(6)
C10	N3	C4	121.0(5)		C7	C2	C1	105.2(6)
N1	N2	C8	119.1(6)		C1	C2	C3	132.4(7)
C7	N2	N1	111.5(5)		C14	C15	N6	116.4(6)
C7	N2	C8	128.9(6)		N101	C107	C102	106.1(6)
C1	N1	N2	105.2(6)		N101	C107	C106	127.3(6)
C101	C102	C103	134.1(6)		C102	C107	C106	126.6(6)
C107	C102	C103	121.4(6)		C107	C106	C105	109.5(5)
C107	C102	C101	104.5(6)		C18	C17	C16	121.3(7)
N6	C11	C12	118.8(6)		C4	C5	C6	110.8(6)
N4	C11	N6	109.6(5)		F101	C119	C118	120.4(6)
N4	C11	C12	131.4(6)		F101	C119	C120	119.7(6)
C102	C103	C104	109.4(5)		C118	C119	C120	119.9(6)
N102	C101	C102	112.3(6)		C114	C115	N106	116.9(6)
C117	C118	C119	119.9(6)		C115	C114	C113	120.9(6)
C117	C116	C112	120.1(6)		N101	C108	C109	111.1(6)
C117	C116	C121	117.7(6)		C106	C105	C104	110.9(5)
C121	C116	C112	122.2(6)		F1	C19	C20	119.0(7)
N4	C10	N5	116.7(6)		F1	C19	C18	119.3(7)
N4	C10	N3	121.9(5)		C18	C19	C20	121.7(6)
N5	C10	N3	121.3(5)		C20	C21	C16	120.9(7)
C118	C117	C116	121.3(6)		C120	C121	C116	121.1(6)
N105	C110	N104	116.5(5)		C112	C113	C114	122.6(6)

[0286]

原子	原子	原子	角度/°		原子	原子	原子	角度/°
N105	C110	N103	121.8(6)		C119	C120	Cl10	119.1(5)
N103	C110	N104	121.7(5)		C121	C120	Cl10	120.9(6)
N106	C111	C112	119.4(6)		C121	C120	C119	120.1(6)
N104	C111	N106	109.3(5)		C19	C20	Cl1	120.2(5)
N104	C111	C112	131.2(6)		C21	C20	Cl1	121.0(6)
C17	C16	C12	120.6(6)		C21	C20	C19	118.8(7)
C21	C16	C12	121.2(6)		C7	C6	C5	108.3(6)
C21	C16	C17	118.2(6)		N2	C8	C9	112.2(6)
C11	C12	C16	120.7(6)		C2	C3	C4	109.1(6)
C13	C12	C11	116.2(6)		C19	C18	C17	119.1(7)
C13	C12	C16	123.1(6)		N1	C1	C2	110.7(7)

[0287] 表3e:数据的氢原子坐标($\text{\AA} \times 10^4$)和各向同性位移参数($\text{\AA}^2 \times 10^3$)

[0288]

原子	x	y	z	U(eq)
H201	-8340	11419	4766	65
H103	13762	1860	821	37
H3	-1178	7379	4049	44
H10A	12296	-297	674	38
H10B	12760	207	-45	38
H101	13077	-1913	-72	37
H118	3602	4269	1563	40
H117	4472	2874	1899	41
H13	6617	7150	1955	44
H104	14880	317	1330	37
H4	-1223	9128	3691	41
H14	5748	8520	1574	44
H15	3093	9188	1986	42
H10C	18571	212	107	43
H10D	18322	6	940	43
H17	8014	6370	3011	44
H5A	474	8939	4856	50
H5B	-1431	8585	5158	50
H115	9128	-155	2618	41
H114	6438	475	3031	45
H10E	20069	-1241	101	42
H10F	19483	-2142	-274	42
H10G	15917	1065	-3	42
H10H	16912	1335	767	42
H21	2591	5567	2942	42
H121	9997	3540	1881	40
H113	5646	1895	2740	44
H6A	-1362	10039	5462	49

原子	x	y	z	U(eq)
H6B	-776	10318	4678	49
H8A	-3095	11363	5535	47
H8B	-5294	11587	5530	47
H20A	-8292	12074	3745	74
H20B	-10081	12622	3951	74
H20C	-10301	11615	3773	74
H3A	-4205	8545	3439	50
[0289] H3B	-4195	8112	4223	50
H18	9019	5043	3484	49
H9A	-3149	12011	4347	62
H9B	-3466	12681	4982	62
H9C	-5229	12349	4468	62
H1	-7457	9553	3856	58
H10I	18959	-2732	859	87
H10J	19517	-1830	1237	87
H10K	21078	-2381	864	87

[0290] 精修模型描述

[0291] 限制数—1,约束条件数-未知。

[0292] 细节:

[0293] 1.Fixed Uiso

[0294] 在1.2倍的:所有C(H)基团,所有C(H,H)基团,所有N(H)基团

[0295] 在1.5倍的:所有C(H,H,H)基团,所有O(H)基团

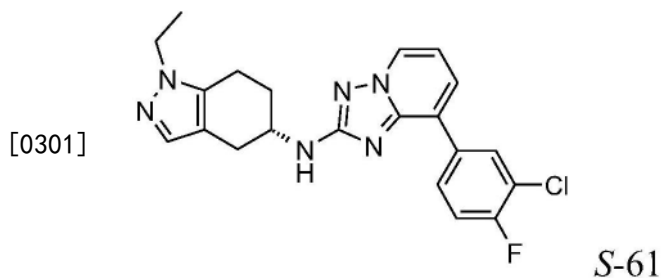
[0296] 2.a用骑跨坐标(riding coordinates)精修的叔CH:C104(H104),C4(H4)

[0297] 2.b用骑跨坐标精修的仲CH₂:C103(H10A,H10B),C106(H10C,H10D),C5(H5A,H5B),C108(H10E,H10F),C105(H10G,H10H),C6(H6A,H6B),C8(H8A,H8B),C3(H3A,H3B)

[0298] 2.c用骑跨坐标精修的芳族/酰胺H:N103(H103),N3(H3),C101(H101),C118(H118),C117(H117),C13(H13),C14(H14),C15(H15),C17(H17),C115(H115),C114(H114),C21(H21),C121(H121),C113(H113),C18(H18),C1(H1)

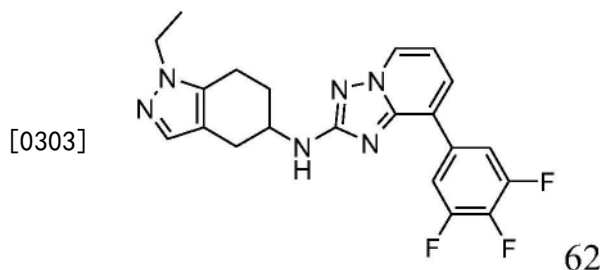
[0299] 2.d限定为旋转基团的理想化Me:C201(H20A,H20B,H20C),C9(H9A,H9B,H9C),C109(H10I,H10J,H10K)

[0300] 2.e限定为旋转基团的理想化四面体OH:O201(H201)

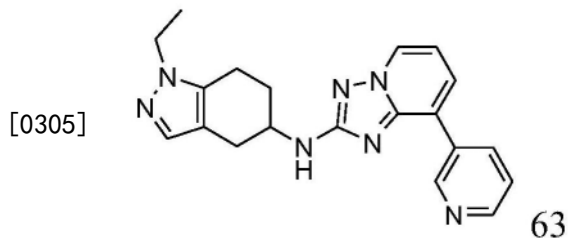


[0302] (S)-[8-(3-氯-4-氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-胺(S-61)。根据通用过程D-2使用手性卤代三唑并吡啶S-39a和3-

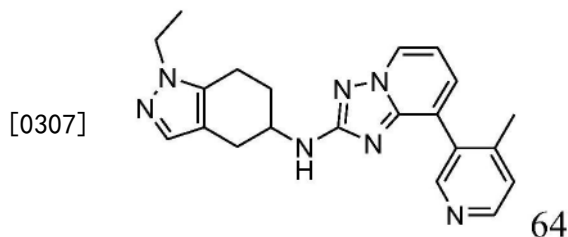
氯-4-氟-苯基硼酸制备。收率:108mg (71%)。HRMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₀ClFN₆, 计算值为[M+H]⁺ m/z 411.1500, 实测值为411.1502。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.65 (dd, J=6.6, 1.0Hz, 1H), 8.47 (dd, J=7.4, 2.3Hz, 1H), 8.14 (m, 1H), 7.82 (dd, J=7.5, 1.0Hz, 1H), 7.54 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.99 (dd, J=7.5, 6.6Hz, 1H), 6.86 (d, J=7.5Hz, 1H), 3.97 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.81-3.91 (m, 1H), 2.85-2.93 (m, 1H), 2.76-2.85 (m, 1H), 2.60-2.71 (m, 1H), 2.44-2.52 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.14-2.23 (m, 1H), 1.75-1.86 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC (方法5): R_t=0.65min。对映体纯度 (方法14): 97.9% ee。比旋度: [α]_D²⁰ = -7.5° (c 0.4mg/mL, MeOH)。



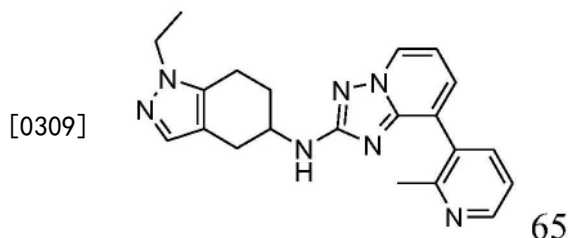
[0304] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-[8-(3,4,5-三氟-苯基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺 (62)。根据通用过程D-2使用卤代三唑并吡啶39a和3,4,5-三氟-苯基硼酸使用作为催化剂的双(三苯基膦)氯化钯(II)制备。收率:14mg (19%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₁₉F₃N₆, 计算值为[M+H]⁺ m/z 413.1702, 实测值为413.1。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.69 (dd, J=6.6, 0.9Hz, 1H), 8.23-8.32 (m, 2H), 7.92 (dd, J=7.6, 0.9Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.01 (dd, J=7.4, 6.8Hz, 1H), 6.93 (d, J=7.4Hz, 1H), 3.97 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.82-3.92 (m, 1H), 2.85-2.92 (m, 1H), 2.77-2.85 (m, 1H), 2.61-2.71 (m, 1H), 2.44-2.54 (m, 1H), 2.14-2.22 (m, 1H), 1.76-1.87 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC (方法3): R_t=0.67min。



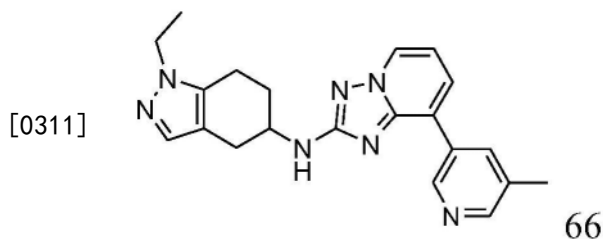
[0306] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-(8-吡啶-3-基-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基)-胺 (63)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和吡啶-3-基硼酸制备。收率:26mg (72%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₀H₂₁N₇, 计算值为[M+H]⁺ m/z 360.1937, 实测值为360.3。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ 9.30 (d, J=2.1Hz, 1H), 8.69 (dd, J=6.6, 0.9Hz, 1H), 8.59 (dd, J=4.8, 1.7Hz, 1H), 8.50 (m, 1H), 7.85 (dd, J=7.4, 0.9Hz, 1H), 7.53 (dd, J=8.0, 4.8Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.03 (dd, J=7.4, 6.6Hz, 1H), 6.90 (d, J=7.5Hz, 1H), 3.97 (q, J=7.3Hz, 2H), 3.82-3.92 (m, 1H), 2.76-2.92 (m, 2H), 2.61-2.71 (m, 1H), 2.44-2.50 (m, 1H), 2.12-2.20 (m, 1H), 1.73-1.86 (m, 1H), 1.28 (t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC (方法9): R_t=0.39min。



[0308] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-[8-(4-甲基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(64)。根据通用过程D-2使用卤代三唑并吡啶39a和4-甲基-吡啶-3-基硼酸频哪醇酯制备。收率:12mg(12%)。LCMS(ESI^+),对于 $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7$,计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ 374.2,实测值为374.2。 ^1H NMR(400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.69(dd, $J=6.7, 1.0\text{Hz}$, 1H), 8.48-8.52(m, 2H), 7.44(dd, $J=7.3, 1.0\text{Hz}$, 1H), 7.39-7.43(m, 1H), 7.12(s, 1H), 6.99(dd, $J=7.3, 6.7\text{Hz}$, 1H), 6.72(d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 3.95(q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.75-3.87(m, 1H), 2.72-2.90(m, 2H), 2.56-2.69(m, 1H), 2.38-2.47(m, 1H), 2.24(s, 3H), 2.07-2.17(m, 1H), 1.71-1.83(m, 1H), 1.27(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。HPLC(方法5): $R_t=0.35\text{min}$ 。

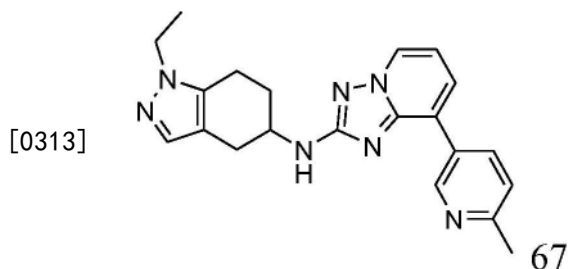


[0310] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-[8-(2-甲基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(65)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和2-甲基-吡啶-3-基硼酸制备。收率:13mg(34%)。LCMS(ESI^+),对于 $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7$,计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ 374.2093,实测值为374.3。 ^1H NMR(400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.68(d, $J=6.7, 1.0\text{Hz}$, 1H), 8.50(dd, $J=4.8, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.73(dd, $J=7.7, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.43(dd, $J=7.3, 1.0, 1\text{H}$), 7.32(dd, $J=7.7, 4.9\text{Hz}$, 1H), 7.13(s, 1H), 6.99(dd, $J=7.7, 3, 6.7\text{Hz}$, 1H), 6.79(d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 3.95(q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.74-3.85(m, 1H), 2.73-2.87(m, 2H), 2.57-2.69(m, 1H), 2.38-2.46(m, 1H), 2.37(s, 3H), 2.08-2.18(m, 1H), 1.69-1.81(m, 1H), 1.26(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。HPLC(方法9): $R_t=0.38\text{min}$ 。

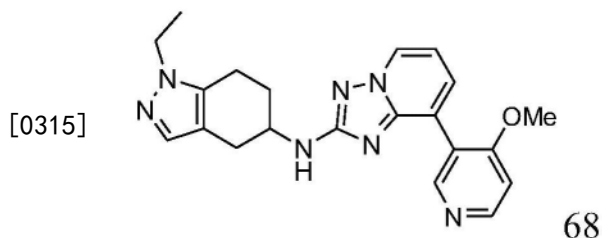


[0312] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-[8-(5-甲基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(66)。根据通用过程D-2使用卤代三唑并吡啶39a和5-甲基-吡啶-3-基硼酸(1.5当量)制备。收率:4mg(11%)。LCMS(ESI^+),对于 $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7$,计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ 374.2093,实测值为374.2。 ^1H NMR(400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9.18(d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 8.68(dd, $J=6.6, 1.0\text{Hz}$, 1H), 8.50-8.48(m, 1H), 8.45-8.43(m, 1H), 7.85(dd, $J=7.5, 1.1\text{Hz}$, 1H), 7.15(s, 1H), 7.02(dd, $J=7.5, 6.7\text{Hz}$, 1H), 6.85(br s, 1H), 3.97(q, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 3.92-3.82

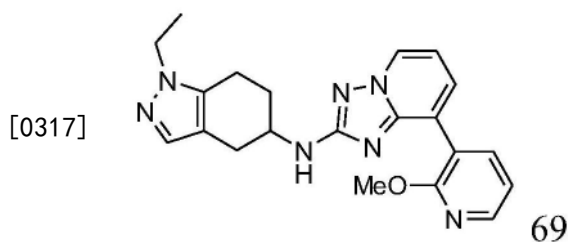
(m, 1H), 2.85-2.92 (m, 1H), 2.76-2.85 (m, 1H), 2.61-2.72 (m, 1H), 2.45-2.55 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.41 (s, 3H), 2.13-2.21 (m, 1H), 1.75-1.87 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC(方法5): $R_t=0.36\text{min}$ 。



[0314] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-[8-(6-甲基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(67)。根据通用过程D-1使用氯三唑并吡啶39b和6-甲基-吡啶-3-基硼酸(1.5当量)制备。收率:36mg(98%)。LCMS(ESI^+),对于 $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7$,计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{m/z}}$ 374.2093,实测值为374.3。 ^1H NMR(400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9.50(d, J=1.5Hz, 1H), 9.00(m, 1H), 8.74(dd, J=6.6, 0.9Hz, 1H), 8.00(dd, J=7.6, 0.8Hz, 1H), 7.88(m, 1H), 7.17(s, 1H), 7.08(dd, J=7.4, 6.6Hz, 1H), 6.92(br, 1H), 3.98(q, J=7.2Hz, 2H), 3.87-3.96(m, 1H), 2.78-2.94(m, 2H), 2.62-2.73(m, 1H), 2.71(s, 3H), 2.44-2.52(m, 1H, 大部分被DMSO信号遮挡), 2.13-2.33(m, 1H), 1.78-1.89(m, 1H), 1.29(t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC(方法10): $R_t=0.74\text{min}$ 。

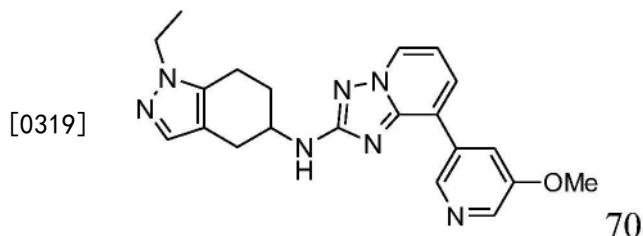


[0316] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-[8-(4-甲氧基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(68)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和4-甲氧基-吡啶-3-基硼酸制备。收率:26mg(66%)。LCMS(ESI^+),对于 $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}$,计算值为 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{m/z}}$ 390.2042,实测值为390.123。 ^1H NMR(400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.94(dd, J=2.4, 0.6Hz, 1H), 8.60(dd, J=6.7, 1.1Hz, 1H), 8.44(dd, J=8.7, 2.4Hz, 1H), 7.74(dd, J=7.4, 1.1Hz, 1H), 7.14(s, 1H), 6.98(dd, J=7.4, 6.7Hz, 1H), 6.94(dd, J=8.7, 0.6Hz, 1H), 6.76(d, J=7.6Hz, 1H), 3.97(q, J=7.3Hz, 2H), 3.84-3.93(m, 1H), 3.91(s, 3H), 2.76-2.92(m, 2H), 2.60-2.72(m, 1H), 2.43-2.49(m, 1H), 2.12-2.21(m, 1H), 1.75-1.87(m, 1H), 1.29(t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC(方法10): $R_t=0.96\text{min}$ 。

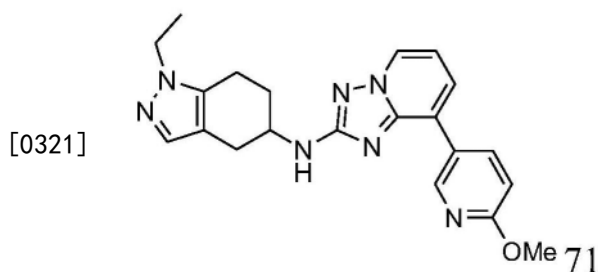


[0318] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑-5-基)-[8-(2-甲氧基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(69)。根据通用过程D-1使用卤代三唑并吡啶39b和2-甲氧基-

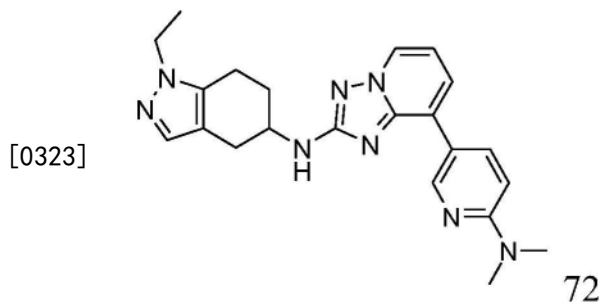
吡啶-3-基硼酸制备。收率:21mg (53%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₃N₇O, 计算值为[M+H]⁺m/z 390.2042, 实测值为390.1278。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.60 (dd, J=6.7, 1.1Hz, 1H), 8.21 (dd, J=4.9, 1.9Hz, 1H), 8.06 (dd, J=7.4, 1.9Hz, 1H), 7.58 (dd, J=7.4, 1.1Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.10 (dd, J=7.4, 4.9Hz, 1H), 6.95 (dd, J=7.4, 6.7Hz, 1H), 6.69 (d, J=7.3Hz, 1H), 3.96 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.78-3.85 (m, 1H), 2.73-2.90 (m, 2H), 2.58-2.69 (m, 1H), 2.39-2.48 (m, 1H), 2.09-2.19 (m, 1H), 1.71-1.83 (m, 1H), 1.27 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC(方法10):R_t=0.96min。



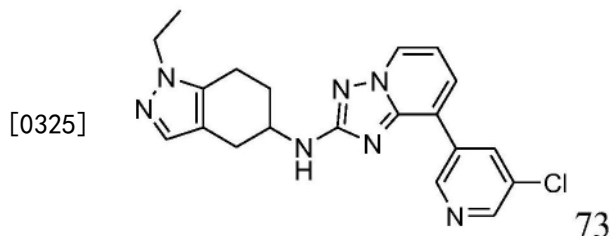
[0320] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-[8-(5-甲氧基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(70)。根据通用过程D-2使用卤代三唑并吡啶39a和5-甲氧基-吡啶-3-基硼酸(1.7当量)制备。收率:43mg (65%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₃N₇O, 计算值为[M+H]⁺m/z 390.2042, 实测值为390.2。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.96 (d, J=1.6Hz, 1H), 8.68 (dd, J=6.7, 0.6Hz, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.23 (m, 1H), 7.92 (dd, J=7.5, 0.6Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.02 (dd, J=7.5, 6.7Hz, 1H), 6.84 (br s, 1H), 3.97 (q, J=7.3Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.84-3.92 (m, 1H), 2.86-2.94 (m, 1H), 2.76-2.86 (m, 1H), 2.60-2.72 (m, 1H), 2.45-2.52 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.13-2.22 (m, 1H), 1.77-1.88 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.3Hz, 3H)。HPLC(方法5):R_t=0.40min。



[0322] (1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-[8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基]-胺(71)。根据通用过程D-2使用卤代三唑并吡啶39a和6-甲氧基-吡啶-3-基硼酸(1.7当量)制备。收率:29mg (56%)。LCMS (ESI⁺), 对于C₂₁H₂₃N₇O, 计算值为[M+H]⁺m/z 390.2042, 实测值为390.3。¹H NMR (400MHz, (CD₃)₂SO) δ8.94 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.60 (dd, J=6.6, 1.0Hz, 1H), 8.44 (dd, J=8.8, 2.5Hz, 1H), 7.74 (dd, J=7.4, 1.0Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.98 (dd, J=7.4, 6.6Hz, 1H), 6.94 (d, J=8.8Hz, 1H), 6.76 (d, J=7.6Hz, 1H), 3.97 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.84-3.93 (m, 1H), 2.85-2.93 (m, 1H), 2.76-2.85 (m, 1H), 2.61-2.72 (m, 1H), 2.43-2.52 (m, 1H, 部分被DMSO信号遮挡), 2.12-2.21 (m, 1H), 1.75-1.87 (m, 1H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 3H)。HPLC(方法5):R_t=0.53min。



[0324] [8-(6-(2-甲基氨基-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基)-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-胺(72)。根据通用过程D-2使用卤代三唑并吡啶39a和6-二甲基氨基-吡啶-3-基硼酸制备。收率:8mg(9%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₂H₂₆N₈,计算值为[M+H]⁺m/z 403.2359,实测值为403.3。¹H NMR(400MHz,(CD₃)₂SO) δ8.96(m,1H),8.55(d,J=6.5Hz,1H),8.37-8.44(m,1H),7.95(s,1H),7.74(m,1H),7.15(s,1H),6.97(m,1H),6.72(br,1H),3.97(q,J=7.2Hz,2H),3.86-3.94(m,1H),3.14(s,6H),2.85-2.93(m,1H),2.76-2.85(m,1H),2.43-2.51(m,1H),2.15-2.21(m,1H),1.77-1.88(m,1H),1.29(t,J=7.2Hz,3H)。HPLC(方法5):R_t=0.39min。



[0326] [8-(5-氯-吡啶-3-基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基)-(1-乙基-4,5,6,7-四氢-1H-吲唑-5-基)-胺(73)。根据通用过程D-2使用卤代三唑并吡啶39a和5-氯-吡啶-3-基硼酸(1.6当量)制备。收率:54mg(81%)。LCMS(ESI⁺),对于C₂₀H₂₀ClN₇,计算值为[M+H]⁺m/z 394.1546,实测值为394.2。¹H NMR(400MHz,(CD₃)₂SO) δ9.28(d,J=1.9Hz,1H),8.75(dd,J=2.3,2.3Hz,1H),8.71(dd,J=6.7,0.9Hz,1H),8.64(d,J=2.3Hz,1H),7.96(dd,J=7.5,0.9Hz,1H),7.15(s,1H),7.03(dd,J=7.5,6.7Hz,1H),6.92(br s,1H),3.97(q,J=7.2Hz,2H),3.91-3.83(m,1H),2.85-2.93(m,1H),2.77-2.85(m,1H),2.71-2.61(m,1H),2.52-2.45(m,1H,部分被DMSO信号遮挡),2.22-2.14(m,1H),1.87-1.76(m,1H),1.29(t,J=7.2Hz,3H)。HPLC(方法5):R_t=0.56min。

[0327] 生物数据

[0328] 针对抑制Aβ₄₂产生的筛选使用稳定表达人类APP695亚型的H4神经胶质瘤细胞进行,该细胞在Dulbecco改良的Eagles培养基(DMEM)GlutaMAX中生长,并补充了10%胎牛血清和250μg/mL的Zeocine。将细胞铺板至接近融合。待试验化合物接受为在100%DMSO中的10mM原料。最初在100%DMSO中产生一系列稀释,然后将其在细胞培养基中稀释200倍,使得测试的浓度范围为30μM至0.1nM,且最终DMSO浓度为0.5%。将稀释的化合物与细胞在培养箱中在37℃和5%CO₂孵育22小时。在孵育后,使用由Meso Scale Discovery(Catalog编号L21CA-1)提供的Aβ₄₂特异性电化学发光测定从细胞上清液中测量Aβ₄₂水平。Aβ₄₂水平的测量根据根据制造商协议进行。

[0329] Aβ总水平同样使用由Meso Scale Discovery(Catalog编号L21ZA-1)提供的特异

性电化学发光根据制造商协议确定。为了确认优先抑制A β ₄₂的化合物,确定比率A β _总IC₅₀/A β ₄₂IC₅₀,其中该比率越高,对A β ₄₂的抑制作用相比于A β _总的特异性就越大。

[0330] 表4a:基于H4神经胶质瘤细胞中A β ₄₂细胞的IC₅₀值以及相比于A β _总的选择性比率两者,编入实验部分的实施例的活性。

[0331]

实施例编号	A β ₄₂ IC ₅₀ [μ M]	比率A β _总 IC ₅₀ /A β ₄₂ IC ₅₀
9	1.26	3
10	0.38	27
40	>30	1
41	4.57	1
42	0.07	23
R-42	0.04	254
43	0.06	48
44	0.43	64
45	3.40	4
46	2.77	4
47	>30	1
48	0.75	22
49	0.95	15
50	21.70	1
51	2.20	2
52	0.74	2
53	1.39	1
54	3.13	10
55	0.18	120
56	0.16	49
57	0.07	104
58	0.06	34
59	0.04	49
60	0.06	113
61	0.02	152
R-61	0.009	1098
S-61	0.194	42
62	0.03	128
63	0.35	85
64	0.73	41
65	0.68	44
66	0.20	154
67	0.67	45
68	0.12	241

69	0.50	60
70	0.20	60
71	0.09	332
72	0.05	538
73	0.04	420

[0332] γ 分泌酶调节剂是选择性地降低 $A\beta_{42}$ 水平同时使 $A\beta_{\text{总}}$ 水平保持不变的化合物,因此是显示对于 $A\beta_{42}$ 降低的高选择性(针对比率 $A\beta_{\text{总}}IC_{50}/A\beta_{42}IC_{50}$ 的较高值)的化合物。

[0333] 表4b:在与表4a中化合物相同的测定中获得的最接近现有技术化合物(WO2009/155551中的实施例263、293和302)的活性,基于H4神经胶质瘤细胞中 $A\beta_{42}$ 细胞的 IC_{50} 值以及相比于 $A\beta_{\text{总}}$ 的选择性比率两者。

[0334]	在 WO2009/155551 中的 实施例编号	$A\beta_{42} IC_{50} [\mu M]$	比率 $A\beta_{\text{总}} IC_{50}/A\beta_{42} IC_{50}$
	263	6	2
	293	7	1
	302	>10	1

[0335] Thermo Fisher Scientific SelectScreen™生化激酶分析服务Z'-LYTE™筛选方案和测定条件

[0336] 测定理论

[0337] Z'-LYTE生化测定采用基于荧光的耦合酶形式,并且基于磷酸化和非磷酸化肽对蛋白水解裂解的差异敏感性。肽底物用两个荧光团(每个末端一个,构成FRET对)标记。在原初反应中,激酶将ATP的 γ -磷酸转移至合成的FRET-肽中的单个酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基。在次级反应中,位点特异性蛋白酶识别并裂解非磷酸化的FRET-肽。FRET-肽的磷酸化抑制了显影剂的裂解。裂解破坏FRET-肽上的供体(即,香豆素)和受体(即,荧光素)荧光团之间的FRET,而未切割的磷酸化FRET-肽会维持FRET。比率计方法计算在400nm激发供体荧光团之后供体发射与受体发射的比率(发射比率=香豆素发射(445nm)/荧光素发射(520nm)),该方法用于定量化反应进度,如以下方程所示。这种用于定量化反应进程的比率计方法的显著优势是消除了FRET-肽浓度和信号强度的孔与孔之间的差异。因此,测定在低百分比磷酸化产生非常高的Z'-因子值(>0.7)。裂解的和未裂解的FRET-肽都有助于荧光信号,因此有助于发射比率。FRET-肽的磷酸化程度可以从发射比率计算。如果FRET-肽是磷酸化的(即,无激酶抑制),则发射比率将保持低水平;如果FRET-肽是非磷酸化的(即,激酶抑制),则发射比率将较高。

[0338] Z'-LYTE测定条件

[0339] 试验化合物

[0340] 将试验化合物在孔中的1%DMSO(最终)中筛选。对于10点滴定,从客户选择的起始浓度进行3倍系列稀释。

[0341] 肽/激酶混合物

[0342] 将所有肽/激酶混合物在适宜的激酶缓冲液中稀释至2X工作浓度(参见完整说明书的激酶特异性测定条件部分)。

[0343] ATP溶液

[0344] 将所有ATP溶液在激酶缓冲液(50mM HEPES pH 7.5, 0.01%BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$,

1mM EGTA)中稀释至4X工作浓度。ATP Km设备之前使用Z'-LYTE测定确定。

[0345] 显影剂溶液

[0346] 将显影剂在显影剂缓冲液中稀释(参见完整说明书的激酶特异性测定条件-直接和级联部分)。

[0347] 10X新型PKC脂质混合物:2mg/ml磷脂酰丝氨酸,0.2mg/ml DAG在20mM HEPES中,pH 7.4,0.3%CHAPS。

[0348] 对于5mL 10X新型PKC脂质混合物:

[0349] 1.添加10mg磷脂酰丝氨酸(Avanti Polar Lipids Part#8400032C或840039C)和1mg DAG(Avanti Polar Lipids Part#800811C)到玻璃管中。

[0350] 2.通过在氮气流下蒸发至澄清薄膜将氯仿从脂质混合物中移除。在确保脂质溶液的最大表面积的角度继续旋转管将促使生成最薄的膜。

[0351] 3.添加5mL悬浮缓冲液,20mM HEPES,0.3%CHAPS,pH 7.4,到干燥的脂质混合物中。

[0352] 4.温和加热至50-60℃并保持1-2分钟,并以短间隔涡旋,直到脂质溶解成澄清或稍微浑浊的溶液。通常在2-3个加热/涡旋循环之后,脂质处于溶液中。

[0353] 5.冷却至室温,等分分装成一次性体积并将其在-20℃储存。

[0354] 测定方案

[0355] 具有条形码的Corning低体积NBS,黑色384-孔板(Corning Cat.#4514)

[0356] 1.100nL-100X试验化合物在100%DMSO中

[0357] 2. 2.4μL-激酶缓冲液

[0358] 3. 5μL-2X肽/激酶混合物

[0359] 4.2.5μL-4X ATP溶液

[0360] 5.30-秒板振荡

[0361] 6.在室温的60-分钟激酶反应孵育

[0362] 7.5μL-显影剂溶液

[0363] 8.30-秒板振荡

[0364] 9.在室温的60-分钟显影反应孵育

[0365] 10.在荧光板阅读器上阅读并分析数据

[0366] Z'-LYTE测定对照

[0367] 对于每一种激酶制备以下对照,其位于与激酶相同的板上:

[0368] 0%磷酸化对照(100%抑制对照)

[0369] 最大发射比率由0%磷酸化对照(100%抑制对照)确立,该对照不包含ATP且因此不表现出激酶活性。该对照在显影反应中得到100%裂解的肽。

[0370] 100%磷酸化对照

[0371] 100%磷酸化对照由与肽底物序列相同的合成磷酸化肽组成,该对照经设计以允许计算磷酸化百分比。该对照在显影反应中产生极低百分比的裂解肽。0%磷酸化和100%磷酸化对照允许计算在具体反应孔中实现的百分比磷酸化。对照孔不包括任何激酶抑制剂。

[0372] 0%抑制对照

[0373] 屏幕中的最小发射比率由0%抑制对照(包含活性激酶)确定。该对照经设计以在激酶反应中产生10-50%*磷酸化肽。

[0374] *级联测定可以产生至多70%的磷酸化肽。

[0375] 已知抑制剂

[0376] 在与激酶相同的平板上针对每种单独的激酶运行已知的抑制剂对照标准曲线(10点滴定),以确保将激酶在先前确定的预期IC50范围内进行抑制。

[0377] 针对测定的试验化合物的每种浓度,准备了以下对照:

[0378] 显影反应干扰

[0379] 显影反应干扰通过比较以下两者建立:不包含ATP的试验化合物对照孔,相比于0%磷酸化对照(其不包含试验化合物)。无干扰化合物的期望值应为100%。标记了90%至110%之外的任何值。

[0380] 试验化合物荧光干扰

[0381] 试验化合物荧光干扰通过比较以下两者确定:不包含激酶/肽混合物的试验化合物对照孔(零肽对照),相比于0%抑制对照。无荧光化合物的预期值应该为0%。标记>20%的任何值。

[0382] Z'-LYTE数据分析

[0383] 以下方程式用于每组数据点:

	方程
背景荧光校正	$FI_{\text{样品}} - FI_{\text{TCFI 对照}}$
发射比率 (使用针对背景荧光校正的值)	$\frac{\text{香豆素发射}(445\text{nm})}{\text{荧光素发射}(520\text{nm})}$
%磷酸化	$\left\{ 1 - \frac{(\text{发射比率} \times F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_{0\%} - C_{100\%}) + [\text{发射比率} \times (F_{100\%} - F_{0\%})]} \right\} \times 100$
[0384] %抑制	$\left\{ 1 - \frac{\% \text{磷酸化}_{\text{样品}}}{\% \text{磷酸化}_{0\% \text{抑制对照}}} \right\} \times 100$
Z' (使用发射比率值)	$1 - \frac{3 \times Stdev_{0\% \text{磷酸化对照}} + 3 \times Stdev_{0\% \text{抑制}}}{\text{平均值}_{0\% \text{磷酸化对照}} - \text{平均值}_{0\% \text{抑制}}}$
数据点之间的差异 (仅单点)	$ \% \text{抑制}_{\text{点1}} - \% \text{抑制}_{\text{点2}} $
显影反应干扰(DRI) (无 ATP 对照)	$\frac{\text{发射比率}_{\text{DRI 对照}}}{\text{发射比率}_{0\% \text{磷酸化对照}}}$
试验化合物荧光干扰(TCFI) (检查香豆素发射和荧光素发射两者)	$\frac{FI_{\text{TCFI 对照}}}{FI_{0\% \text{抑制剂对照}}}$

[0385] FI=荧光强度

[0386] $C_{100\%}$ = 100%磷酸化对照的平均香豆素发射信号

- [0387] $C_{0\%}=0\%$ 磷酸化对照的平均香豆素发射信号
- [0388] $F_{100\%}=100\%$ 磷酸化对照的平均荧光素发射信号
- [0389] $F_{0\%}=0\%$ 磷酸化对照的平均荧光素发射信号
- [0390] DRI=显影反应干扰
- [0391] TCFI=试验化合物荧光干扰
- [0392] 绘图软件
- [0393] SelectScreen 激酶酶谱筛选服务使用来自 IDBS 的 XLfit。剂量响应曲线是与模型号码 205 (S-型剂量响应模型) 拟合的曲线。如果曲线的底部不在 -20% 抑制和 20% 抑制之间拟合, 将其设置于 0% 抑制。如果曲线的上部不在 70% 抑制和 130% 抑制之间拟合, 将其设置于 100% 抑制。
- [0394] 激酶特异性测定条件-直接形式
- [0395] ABL1
- [0396] 2X ABL1/Tyr 02 混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA。最终 10 μ L 激酶反应由以下组成: 0.29-1.26ng ABL1 和 2 μ M Tyr 02 在 50mM HEPES pH 7.5 中, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA。在 1 小时激酶反应孵育之后, 添加 5 μ L 显影剂 A 的 1:128 稀释液。
- [0397] AURKA (Aurora A)
- [0398] 2X AURKA (Aurora A) / 丝氨酸 (Ser) / 苏氨酸 (Thr 01) 混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA。最终 10 μ L 激酶反应由以下组成: 0.91-8.56ng AURKA (Aurora A) 和 2 μ M Ser/Thr 01 在 50mM HEPES pH 7.5 中, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA。在 1 小时激酶反应孵育之后, 添加 5 μ L 显影剂 A 的 1:4096 稀释液。
- [0399] CDK5/p35
- [0400] 2X CDK5/p35/Ser/Thr 12 混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA。最终 10 μ L 激酶反应由以下组成: 0.14-1.3ng CDK5/p35 和 2 μ M Ser/Thr 12 在 50mM HEPES pH 7.5 中, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA。在 1 小时激酶反应孵育之后, 添加 5 μ L 显影剂 A 的 1:4096 稀释液。
- [0401] CSF1R (FMS)
- [0402] 2X CSF1R (FMS) / Tyr 01 混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA。最终 10 μ L 激酶反应由以下组成: 0.2-40ng CSF1R (FMS) 和 2 μ M Tyr 01 在 50mM HEPES pH 7.5 中, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA。在 1 小时激酶反应孵育之后, 添加 5 μ L 显影剂 B 的 1:256 稀释液。
- [0403] FGFR1
- [0404] 2X FGFR1/Tyr 04 混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 4mM $MnCl_2$, 1mM EGTA, 2mM DTT。最终 10 μ L 激酶反应由以下组成: 0.44-2.45ng FGFR1 和 2 μ M Tyr 04 在 50mM HEPES pH 7.5 中, 0.01% BRIJ-35, 10mM $MgCl_2$, 2mM $MnCl_2$, 1mM EGTA, 1mM DTT。在 1 小时激酶反应孵育之后, 添加 5 μ L 显影剂 B 的 1:64 稀释液。
- [0405] FGFR2
- [0406] 2X FGFR2/Tyr 04 混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-

35, 10mM MgCl_2 , 4mM MnCl_2 , 1mM EGTA, 2mM DTT。最终10 μL 激酶反应由以下组成: 0.19-1.99ng FGFR2和2 μM Tyr 04在50mM HEPES pH 7.5中, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 2mM MnCl_2 , 1mM EGTA, 1mM DTT。在1小时激酶反应孵育之后, 添加5 μL 显影剂B的1:64稀释液。

[0407] FLT4 (VEGFR3)

[0408] 2X FLT4 (VEGFR3) /Tyr 04混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 4mM MnCl_2 , 1mM EGTA, 2mM DTT。最终10 μL 激酶反应由以下组成: 2-10.5ng FLT4 (VEGFR3) 和2 μM Tyr 04在50mM HEPES pH 7.5中, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 2mM MnCl_2 , 1mM EGTA, 1mM DTT。在1小时激酶反应孵育之后, 添加5 μL 显影剂B的1:64稀释液。

[0409] KDR (VEGFR2)

[0410] 2X KDR (VEGFR2) /Tyr 01混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。最终10 μL 激酶反应由以下组成: 1-30ng KDR (VEGFR2) 和2 μM Tyr 01在50mM HEPES pH 7.5中, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。在1小时激酶反应孵育之后, 添加5 μL 显影剂B的1:256稀释液。

[0411] LYN B

[0412] 2X LYN B/Tyr 02混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。最终10 μL 激酶反应由以下组成: 0.85-14.8ng LYN B和2 μM Tyr 02在50mM HEPES pH 7.5中, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。在1小时激酶反应孵育之后, 添加5 μL 显影剂A的1:128稀释液。

[0413] MAP4K2 (GCK)

[0414] 2X MAP4K2 (GCK) /Ser/Thr 07混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。最终10 μL 激酶反应由以下组成: 0.11-3ng MAP4K2 (GCK) 和2 μM Ser/Thr 07在50mM HEPES pH 7.5中, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。在1小时激酶反应孵育之后, 添加5 μL 显影剂A的1:45000稀释液。

[0415] MAP4K4 (HGK)

[0416] 2X MAP4K4 (HGK) /Ser/Thr 07混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。最终10 μL 激酶反应由以下组成: 0.36-1.82ng MAP4K4 (HGK) 和2 μM Ser/Thr 07在50mM HEPES pH 7.5中, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。在1小时激酶反应孵育之后, 添加5 μL 显影剂A的1:45000稀释液。

[0417] PDGFRA (PDGFR α)

[0418] 2X PDGFRA (PDGFR α) /Tyr 04混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 4mM MnCl_2 , 1mM EGTA, 2mM DTT。最终10 μL 激酶反应由以下组成: 1.54-22.6ng PDGFRA (PDGFR α) 和2 μM Tyr 04在50mM HEPES pH 7.5中, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 2mM MnCl_2 , 1mM EGTA, 1mM DTT。在1小时激酶反应孵育之后, 添加5 μL 显影剂B的1:64稀释液。

[0419] PTK2 (FAK)

[0420] 2X PTK2 (FAK) /Tyr 07混合物在以下中液体制备: 50mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。最终10 μL 激酶反应由以下组成: 12.5-100ng PTK2 (FAK) 和2 μM Tyr 07在50mM HEPES pH 7.5中, 0.01% BRIJ-35, 10mM MgCl_2 , 1mM EGTA。在1小时激酶

反应孵育之后,添加5μL显影剂B的1:16稀释液。

[0421] RET

[0422] 2X RET/Tyr 02混合物在以下中液体制备:50mM HEPES pH 7.5,0.01%BRIJ-35,10mM MgCl₂,1mM EGTA。最终10μL激酶反应由以下组成:0.49-3.64ng RET和2μM Tyr 02在50mM HEPES pH 7.5中,0.01%BRIJ-35,10mM MgCl₂,1mM EGTA。在1小时激酶反应孵育之后,添加5μL显影剂A的1:128稀释液。

[0423] RPS6KB1 (p70S6K)

[0424] 2X RPS6KB1 (p70S6K) /Ser/Thr 07混合物在以下中液体制备:50mM HEPES pH 7.5,0.01%BRIJ-35,10mM MgCl₂,1mM EGTA。最终10μL激酶反应由以下组成:2.87-17.7ng RPS6KB1 (p70S6K) 和2μM Ser/Thr 07在50mM HEPES pH 7.5中,0.01%BRIJ-35,10mM MgCl₂,1mM EGTA。在1小时激酶反应孵育之后,添加5μL显影剂A的1:45000稀释液。

[0425] 表5:激酶ATP Km Bins和抑制剂验证的表

[0426] 下表给出了关于每种激酶的规格和数据。在距ATP Km app最近的ATPbin确定已知抑制剂针对每种激酶的代表性IC50值,除了用星号(*)表示的那些情况,在这些情况中IC50值在100μM ATP确定。

[0427]

激酶	Z'-Lyte 底物	ATP Km app [μM]	ATP Bin (μM)	抑制剂	IC ₅₀ [nM]
ABL1	Tyr 02	12	10	Tyrphostin AG1478	421
AURKA (Aurora A)	Ser/Thr 01	10	10	星孢菌素	3.72
CDK5/p35	Ser/Thr 12	8	10	星孢菌素	4.69
CSF1R (FMS)	Tyr 01	450	500	Tyrphostin AG1478	4420
FGFR1	Tyr 04	20	25	星孢菌素	8.36
FGFR2	Tyr 04	1	5	星孢菌素	3.03
FLT4 (VEGFR3)	Tyr 04	3.8	5	星孢菌素	4.54
KDR (VEGFR2)	Tyr 01	78	75	星孢菌素	5.98
LYN B	Tyr 02	25	25	Tyrphostin AG1478	242
MAP4K2 (GCK)	Ser/Thr 07	109	100	星孢菌素	0.655
MAP4K4 (HGK)	Ser/Thr 07	12.7	10	星孢菌素	1.21
PDGFRA (PDGFRα)	Tyr 04	9	10	星孢菌素	5.25
PTK2 (FAK)	Tyr 07	45	50	星孢菌素	60.5
RET	Tyr 02	11	10	星孢菌素	3.18
RPS6KB1	Ser/Thr 07	17	10	星孢菌素	2.74

[0428]

激酶	Z'-Lyte 底物	ATP Km app [μM]	ATP Bin (μM)	抑制剂	IC ₅₀ [nM]
(p70S6K)					

[0429] 表6:在结构上最接近的现有技术化合物(W009/155551中的实施例263、293和302)的激酶抑制,即为在与相应激酶的Michaelis-Menten常数 K_m (K_m app)匹配的ATP浓度测试的 $10\mu\text{mol/L}$ 化合物浓度时的平均%抑制

[0430]

WO09/155551 中的实施例编 号	化 合 物 浓 度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有 >80% 抑 制的激酶数
	[nM]			平均值	
263	10000	K_m app	ABL1	99	15/15
	10000	K_m app	AURKA (Aurora A)	99	
	10000	K_m app	CDK5/p35	83	
	10000	K_m app	CSF1R (FMS)	93	
	10000	K_m app	FGFR1	99	
	10000	K_m app	FGFR2	102	
	10000	K_m app	FLT4 (VEGFR3)	103	
	10000	K_m app	KDR (VEGFR2)	99	
	10000	K_m app	LYN B	98	
	10000	K_m app	MAP4K2 (GCK)	98	
	10000	K_m app	MAP4K4 (HGK)	98	
	10000	K_m app	PDGFRA (PDGFR α)	86	
	10000	K_m app	PTK2 (FAK)	101	
	10000	K_m app	RET	96	
	10000	K_m app	RPS6KB1 (p70S6K)	93	
293	10000	K_m app	ABL1	97	15/15
	10000	K_m app	AURKA (Aurora A)	89	
	10000	K_m app	CDK5/p35	90	
	10000	K_m app	CSF1R (FMS)	90	
	10000	K_m app	FGFR1	93	
	10000	K_m app	FGFR2	90	
	10000	K_m app	FLT4 (VEGFR3)	94	
	10000	K_m app	KDR (VEGFR2)	98	
	10000	K_m app	LYN B	89	
	10000	K_m app	MAP4K2 (GCK)	94	
	10000	K_m app	MAP4K4 (HGK)	95	
	10000	K_m app	PDGFRA (PDGFR α)	88	
	10000	K_m app	PTK2 (FAK)	94	
	10000	K_m app	RET	94	
	10000	K_m app	RPS6KB1	85	

[0431]

WO09/155551 中的实施例编 号	化 合 物 浓 度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有 >80% 抑 制的激酶数
	[nM]			平均值	
			(p70S6K)		
302	10000	Km app	ABL1	104	15/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	98	
	10000	Km app	CDK5/p35	88	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	95	
	10000	Km app	FGFR1	97	
	10000	Km app	FGFR2	98	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	96	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	101	
	10000	Km app	LYN B	97	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	99	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	99	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	89	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	86	
	10000	Km app	RET	98	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	86	

[0432] 表7:本发明所选化合物的激酶抑制,即为在与相应激酶的Michaelis-Menten常数 Km(Km app)匹配的ATP浓度测试的10 μ mol/L化合物浓度时的平均%抑制

[0433]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有 <40% 抑 制的激酶数
	[nM]			平均值	
9	10000	Km app	ABL1	63	7/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	57	
	10000	Km app	CDK5/p35	42	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	82	
	10000	Km app	FGFR1	35	
	10000	Km app	FGFR2	46	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	86	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	30	
	10000	Km app	LYN B	18	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	43	

[0434]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	6	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	59	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	7	
	10000	Km app	RET	39	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	3	
10	10000	Km app	ABL1	1	13/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	4	
	10000	Km app	CDK5/p35	44	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	42	
	10000	Km app	FGFR1	15	
	10000	Km app	FGFR2	14	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	22	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	-2	
	10000	Km app	LYN B	17	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	8	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	37	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	8	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	13	
	10000	Km app	RET	18	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	2	
40	10000	Km app	ABL1	9	13/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	13	
	10000	Km app	CDK5/p35	61	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	25	
	10000	Km app	FGFR1	27	
	10000	Km app	FGFR2	17	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	16	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	-10	
	10000	Km app	LYN B	20	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	13	

[0435]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	45	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	5	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	18	
	10000	Km app	RET	18	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	19	
42	10000	Km app	ABL1	19	15/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	-2	
	10000	Km app	CDK5/p35	39	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	34	
	10000	Km app	FGFR1	16	
	10000	Km app	FGFR2	26	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	31	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	-3	
	10000	Km app	LYN B	19	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	21	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	37	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	12	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	26	
	10000	Km app	RET	29	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	6	
R-42	10000	Km app	ABL1	14	14/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	3	
	10000	Km app	CDK5/p35	39	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	31	
	10000	Km app	FGFR1	16	
	10000	Km app	FGFR2	30	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	36	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	10	
	10000	Km app	LYN B	26	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	25	

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	56	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	18	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	28	
	10000	Km app	RET	23	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	22	
43	10000	Km app	ABL1	17	14/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	-17	
	10000	Km app	CDK5/p35	36	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	28	
	10000	Km app	FGFR1	15	
	10000	Km app	FGFR2	14	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	11	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	-3	
	10000	Km app	LYN B	22	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	9	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	40	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	16	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	19	
	10000	Km app	RET	26	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	3	
44	10000	Km app	ABL1	13	13/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	7	
	10000	Km app	CDK5/p35	25	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	43	
	10000	Km app	FGFR1	20	
	10000	Km app	FGFR2	22	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	43	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	3	
	10000	Km app	LYN B	21	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	26	

[0436]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	37	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	5	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	15	
	10000	Km app	RET	20	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	12	
45	10000	Km app	ABL1	24	14/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	-13	
	10000	Km app	CDK5/p35	8	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	40	
	10000	Km app	FGFR1	9	
	10000	Km app	FGFR2	16	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	33	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	-10	
	10000	Km app	LYN B	15	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	24	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	2	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	30	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	20	
	10000	Km app	RET	30	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	7	
46	10000	Km app	ABL1	10	14/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	14	
	10000	Km app	CDK5/p35	34	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	24	
	10000	Km app	FGFR1	21	
	10000	Km app	FGFR2	26	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	29	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	3	
	10000	Km app	LYN B	23	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	19	

[0437]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	48	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	25	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	24	
	10000	Km app	RET	26	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	6	
47	10000	Km app	ABL1	3	15/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	10	
	10000	Km app	CDK5/p35	13	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	15	
	10000	Km app	FGFR1	21	
	10000	Km app	FGFR2	21	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	13	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	6	
	10000	Km app	LYN B	21	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	11	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	32	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	10	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	19	
	10000	Km app	RET	23	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	12	
48	10000	Km app	ABL1	13	14/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	-14	
	10000	Km app	CDK5/p35	38	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	15	
	10000	Km app	FGFR1	18	
	10000	Km app	FGFR2	22	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	19	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	2	
	10000	Km app	LYN B	22	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	16	

[0438]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	50	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	19	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	24	
	10000	Km app	RET	18	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	15	
49	10000	Km app	ABL1	15	14/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	-14	
	10000	Km app	CDK5/p35	7	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	34	
	10000	Km app	FGFR1	9	
	10000	Km app	FGFR2	31	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	33	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	8	
	10000	Km app	LYN B	25	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	17	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	54	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	29	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	32	
	10000	Km app	RET	22	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	33	
51	10000	Km app	ABL1	6	15/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	8	
	10000	Km app	CDK5/p35	23	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	9	
	10000	Km app	FGFR1	5	
	10000	Km app	FGFR2	28	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	15	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	-10	
	10000	Km app	LYN B	7	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	22	

[0439]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	-8	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	14	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	27	
	10000	Km app	RET	2	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	1	
54	10000	Km app	ABL1	12	15/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	18	
	10000	Km app	CDK5/p35	18	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	27	
	10000	Km app	FGFR1	-3	
	10000	Km app	FGFR2	25	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	38	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	5	
	10000	Km app	LYN B	15	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	27	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	25	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	30	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	14	
	10000	Km app	RET	15	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	1	
55	10000	Km app	ABL1	21	13/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	15	
	10000	Km app	CDK5/p35	13	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	34	
	10000	Km app	FGFR1	12	
	10000	Km app	FGFR2	13	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	42	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	12	
	10000	Km app	LYN B	27	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	30	

[0440]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	51	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	16	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	8	
	10000	Km app	RET	21	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	11	
56	10000	Km app	ABL1	20	12/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	27	
	10000	Km app	CDK5/p35	52	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	58	
	10000	Km app	FGFR1	20	
	10000	Km app	FGFR2	19	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	35	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	6	
	10000	Km app	LYN B	19	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	16	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	48	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	21	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	15	
	10000	Km app	RET	27	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	1	
57	10000	Km app	ABL1	11	12/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	7	
	10000	Km app	CDK5/p35	26	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	72	
	10000	Km app	FGFR1	23	
	10000	Km app	FGFR2	22	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	43	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	18	
	10000	Km app	LYN B	20	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	13	

[0441]

[0442]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	58	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	29	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	16	
	10000	Km app	RET	21	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	14	
59	10000	Km app	ABL1	19	13/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	-21	
	10000	Km app	CDK5/p35	28	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	42	
	10000	Km app	FGFR1	22	
	10000	Km app	FGFR2	11	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	39	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	-8	
	10000	Km app	LYN B	22	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	22	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	57	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	5	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	16	
	10000	Km app	RET	29	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	6	
R-61	10000	Km app	ABL1	3	15/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	-8	
	10000	Km app	CDK5/p35	25	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	18	
	10000	Km app	FGFR1	15	
	10000	Km app	FGFR2	12	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	21	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	2	
	10000	Km app	LYN B	17	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	3	

[0443]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	24	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	18	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	16	
	10000	Km app	RET	20	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	3	
S-61	10000	Km app	ABL1	13	15/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	-21	
	10000	Km app	CDK5/p35	10	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	18	
	10000	Km app	FGFR1	13	
	10000	Km app	FGFR2	13	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	24	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	-15	
	10000	Km app	LYN B	8	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	12	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	11	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	13	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	23	
	10000	Km app	RET	23	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	22	
63	10000	Km app	ABL1	15	12/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	29	
	10000	Km app	CDK5/p35	47	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	48	
	10000	Km app	FGFR1	18	
	10000	Km app	FGFR2	16	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	32	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	8	
	10000	Km app	LYN B	13	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	14	

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	48	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	20	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	13	
	10000	Km app	RET	20	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	3	
67	10000	Km app	ABL1	11	14/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	6	
	10000	Km app	CDK5/p35	35	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	29	
	10000	Km app	FGFR1	21	
	10000	Km app	FGFR2	30	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	33	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	15	
	10000	Km app	LYN B	20	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	14	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	49	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	20	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	27	
	10000	Km app	RET	24	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	23	
68	10000	Km app	ABL1	28	11/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	39	
	10000	Km app	CDK5/p35	44	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	66	
	10000	Km app	FGFR1	23	
	10000	Km app	FGFR2	28	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	52	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	18	
	10000	Km app	LYN B	22	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	28	

[0444]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	42	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	23	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	28	
	10000	Km app	RET	28	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	17	
69	10000	Km app	ABL1	13	15/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	25	
	10000	Km app	CDK5/p35	28	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	8	
	10000	Km app	FGFR1	20	
	10000	Km app	FGFR2	1	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	16	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	8	
	10000	Km app	LYN B	15	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	9	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	39	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	17	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	24	
	10000	Km app	RET	16	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	31	
70	10000	Km app	ABL1	15	11/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	51	
	10000	Km app	CDK5/p35	58	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	83	
	10000	Km app	FGFR1	18	
	10000	Km app	FGFR2	12	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	28	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	12	
	10000	Km app	LYN B	22	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	7	

[0445]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	56	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	17	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	14	
	10000	Km app	RET	32	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	-3	
71	10000	Km app	ABL1	24	11/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	42	
	10000	Km app	CDK5/p35	53	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	62	
	10000	Km app	FGFR1	19	
	10000	Km app	FGFR2	27	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	62	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	17	
	10000	Km app	LYN B	24	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	26	
	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	16	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	21	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	30	
	10000	Km app	RET	30	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	23	
73	10000	Km app	ABL1	21	8/15
	10000	Km app	AURKA (Aurora A)	85	
	10000	Km app	CDK5/p35	56	
	10000	Km app	CSF1R (FMS)	79	
	10000	Km app	FGFR1	32	
	10000	Km app	FGFR2	26	
	10000	Km app	FLT4 (VEGFR3)	50	
	10000	Km app	KDR (VEGFR2)	8	
	10000	Km app	LYN B	31	
	10000	Km app	MAP4K2 (GCK)	49	

[0446]

实施例编号	化合物浓度	测 试 的 [ATP]	测试的激酶	%抑制	具有<40%抑制的激酶数
	[nM]			平均值	
[0447]	10000	Km app	MAP4K4 (HGK)	74	
	10000	Km app	PDGFRA (PDGFR α)	23	
	10000	Km app	PTK2 (FAK)	25	
	10000	Km app	RET	62	
	10000	Km app	RPS6KB1 (p70S6K)	24	

[0448] 治疗用途/使用方法

[0449] 本发明涉及用于治疗疾病、紊乱或状况的化合物,其中具有治疗作用的 γ -分泌酶 I 的调节包括但不限于治疗和/或预防可能受 $A\beta$ 肽的形成的影响的所有那些状况或疾病。根据本发明的另一方面,本发明的化合物用于治疗和/或预防选自以下清单的疾病、紊乱或状况:唐氏综合征, $A\beta$ -淀粉样血管病, 大脑淀粉样血管病, MCI (“轻度认知功能障碍”), 阿尔茨海默病, 记忆丧失, 阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状, 阿尔茨海默病相关的神经变性, 弥漫性莱维小体类型的阿尔茨海默病, 混合型血管起源的痴呆, 变性起源的痴呆, 早老性痴呆, 老年性痴呆, 青光眼和干性年龄相关性黄斑变性。

[0450] 本发明的另一方面涉及治疗上述疾病和状况的方法,所述方法包括将有效量的本发明化合物施用于人类。

[0451] 本发明的化合物的适用日剂量可以为 0.1 至 2000mg。实际药学上有效的量或治疗剂量将取决于本领域技术人员已知的因素,例如患者的年龄和体重、给药途径和疾病严重程度。在任何情况中,原料药施用的剂量和方式允许待递送的药学上有效的量对于患者的状况而言是适宜的。

[0452] 药物组合物

[0453] 用于施用本发明的化合物的适宜制剂对于本领域技术人员而言是明显的,其包括例如片剂、丸剂、胶囊、栓剂、锭剂、含片、溶液、糖浆、酏剂、散剂、注射剂、吸入剂、粉剂等。药学上活性的化合物的含量可以在以下范围中变化:0.1 至 95wt.%, 优选为 5.0 至 90wt.%, 基于整个组合物。

[0454] 适宜的片剂可以例如如下获得:将本发明化合物与已知赋形剂例如惰性稀释剂、载体、崩解剂、佐剂、表面活性剂、粘合剂和/或润滑剂混合物,和将所得混合物压制以形成片剂。

化合物R-61的X射线结构



图1