



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108137601 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680058727.2

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(22)申请日 2016.11.10

代理人 吴小明 王旭

(30)优先权数据

15194294.3 2015.11.12 EP

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/5025(2006.01)

2018.04.08

A61P 21/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/077190 2016.11.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/081111 EN 2017.05.18

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 凯瑟琳·多萝西·麦卡锡

弗里德里希·梅茨格

哈萨内·拉特尼

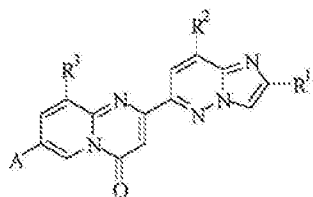
权利要求书7页 说明书46页

(54)发明名称

用于治疗肌萎缩性侧索硬化症的化合物

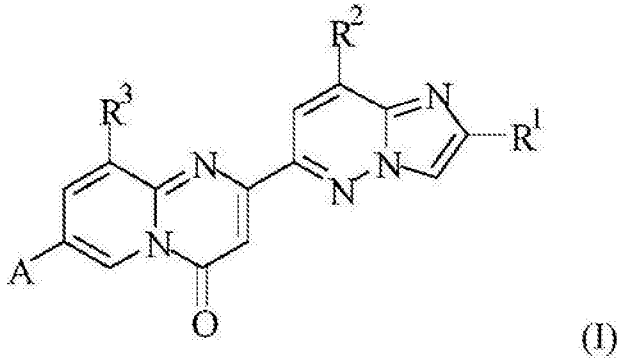
(57)摘要

本发明提供用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展的式(I)(I)的化合物及其药用盐,其中A、R¹、R²和R³是如本文所述的。本发明还涉及式(I)的化合物的制备,包含其的药物组合物和它们作为药物的用途。



(I)

1. 式 (I) 的化合物,



其中

R^1 是氢或 C_{1-7} -烷基;

R^2 是氢、氰基、 C_{1-7} -烷基、 C_{1-7} -卤代烷基或 C_{3-8} -环烷基;

R^3 是氢、 C_{1-7} -烷基或 C_{3-8} -环烷基;

A 是 N-杂环烷基或 $NR^{12}R^{13}$, 其中 N-杂环烷基包含 1 或 2 个氮环原子并且任选地被 1、2、3 或 4 个选自 R^{14} 的取代基取代;

R^{12} 是包含 1 个氮环原子的杂环烷基, 其中杂环烷基任选地被 1、2、3 或 4 个选自 R^{14} 的取代基取代;

R^{13} 是氢、 C_{1-7} -烷基或 C_{3-8} -环烷基;

R^{14} 独立地选自氢、 C_{1-7} -烷基、氨基、氨基- C_{1-7} -烷基、 C_{3-8} -环烷基和杂环烷基或者两个 R^{14} 一起形成 C_{1-7} -亚烷基;

前提条件是, 如果 A 是仅包含 1 个氮环原子的 N-杂环烷基, 则至少一个 R^{14} 取代基是氨基或氨基- C_{1-7} -烷基;

及其药用盐,

所述化合物及其药用盐用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 和/或延迟其进展。

2. 根据权利要求 1 所述的用于根据权利要求 1 的用途的化合物, 其中

R^1 是氢或 C_{1-7} -烷基;

R^2 是氢、氰基、 C_{1-7} -烷基、 C_{1-7} -卤代烷基或 C_{3-8} -环烷基;

R^3 是氢、 C_{1-7} -烷基或 C_{3-8} -环烷基;

A 是包含 1 或 2 个氮环原子的 N-杂环烷基, 其中 N-杂环烷基任选地被 1、2、3 或 4 个选自 R^{14} 的取代基取代;

R^{14} 独立地选自氢、 C_{1-7} -烷基、氨基、氨基- C_{1-7} -烷基、 C_{3-8} -环烷基和杂环烷基或者两个 R^{14} 一起形成 C_{1-7} -亚烷基;

前提条件是, 如果 A 是仅包含 1 个氮环原子的 N-杂环烷基, 则至少一个 R^{14} 取代基是氨基或氨基- C_{1-7} -烷基;

及其药用盐。

3. 根据权利要求 1 或 2 中任一项所述的用于根据权利要求 1 的用途的化合物, 其中 R^1 是 C_{1-7} -烷基。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用于根据权利要求 1 的用途的化合物, 其中 R^1 是甲基。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R²是氢或C₁₋₇-烷基。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R²是氢或甲基。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R³是氢或C₁₋₇-烷基。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R³是氢或甲基。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R¹²是任选地被1、2、3或4个选自R¹⁴的取代基取代的哌啶基。

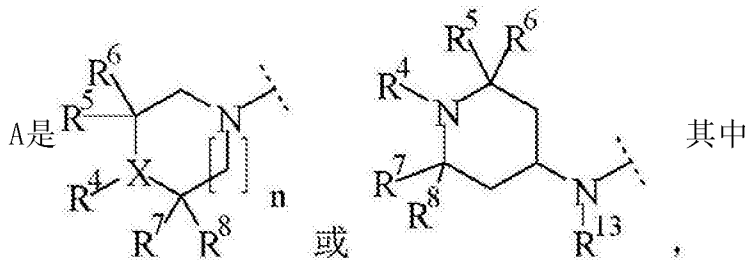
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R¹³是氢或C₁₋₇-烷基。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R¹³是氢或甲基。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R¹⁴独立地选自C₁₋₇-烷基和杂环烷基或者两个R¹⁴一起形成C₁₋₇-亚烷基。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中R¹⁴独立地选自甲基、乙基和吡咯烷基或者两个R¹⁴一起形成亚乙基。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中



X是N或CH;

R⁴是氢、C₁₋₇-烷基或-(CH₂)_m-NR⁹R¹⁰;

R⁵是氢或C₁₋₇-烷基;

R⁶是氢或C₁₋₇-烷基;

R⁷是氢或C₁₋₇-烷基;

R⁸是氢或C₁₋₇-烷基;

R⁹和R¹⁰独立地选自氢、C₁₋₇-烷基和C₃₋₈-环烷基;

R¹³是氢、C₁₋₇-烷基或C₃₋₈-环烷基;

n是0、1或2;

m是0、1、2或3;

或者R⁴和R⁵一起形成C₁₋₇-亚烷基;

或者R⁴和R⁷一起形成C₁₋₇-亚烷基;

或者R⁵和R⁶一起形成C₂₋₇-亚烷基;

或者R⁵和R⁷一起形成C₁₋₇-亚烷基;

或者R⁵和R⁹一起形成C₁₋₇-亚烷基；

或者R⁷和R⁸一起形成C₂₋₇-亚烷基；

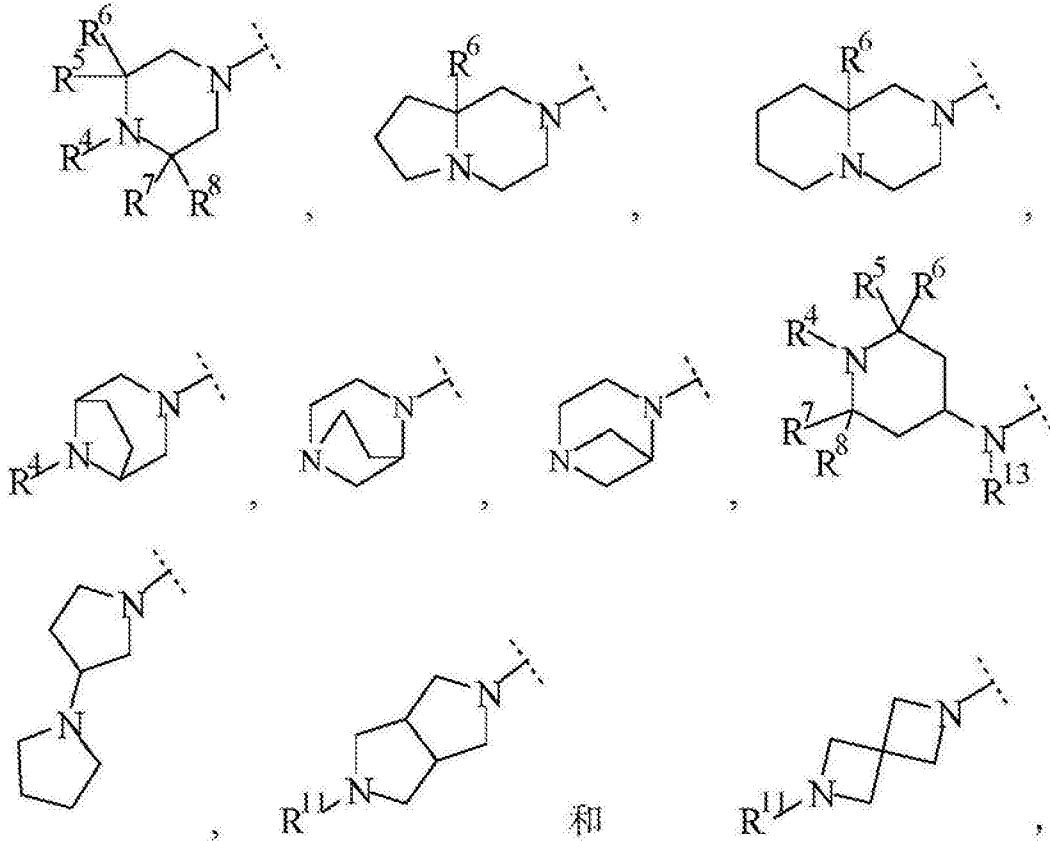
或者R⁷和R⁹一起形成C₁₋₇-亚烷基；

或者R⁹和R¹⁰一起形成C₂₋₇-亚烷基；

前提条件是,如果X是CH,则R⁴是-(CH₂)_m-NR⁹R¹⁰;并且

前提条件是,如果X是N并且R⁴是-(CH₂)_m-NR⁹R¹⁰,则m是2或3。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中A选自下组:



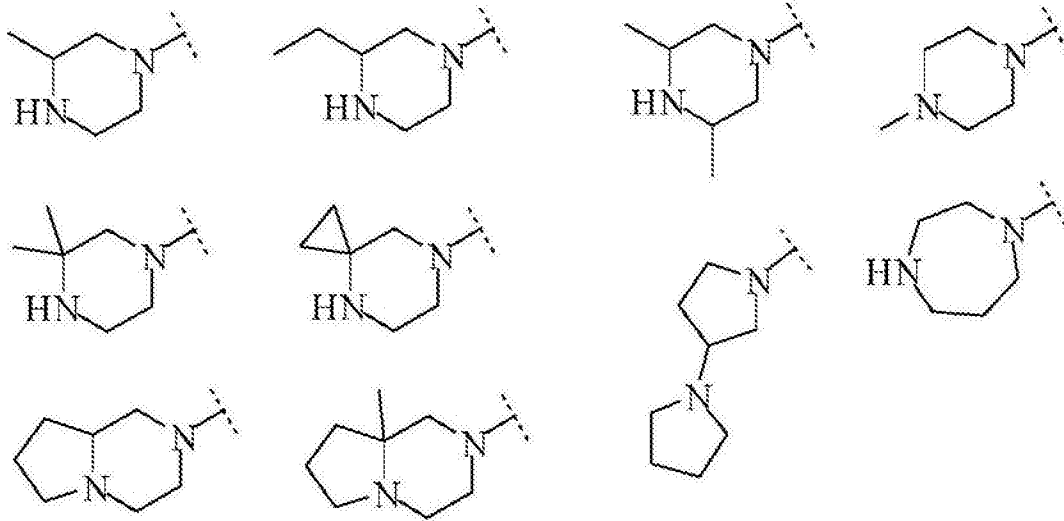
其中R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸和R¹³如权利要求1至30中任一项所限定,并且其中R¹¹是氢或C₁₋₇-烷基。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中A选自下组:哌嗪基、二氮杂环庚基、吡咯烷基和六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪基,每一个任选地被1、2、3或4个选自如权利要求1至32中任一项所限定的R¹⁴的取代基取代。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中A选自下组:哌嗪-1-基、1,4-二氮杂环庚烷-1-基、吡咯烷-1-基和六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2(1H)-基,每一个任选地被1或2个选自如权利要求1至16中任一项所限定的R¹⁴的取代基取代。

18. 根据权利要求1至15中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中A是NR¹²R¹³,其中R¹²和R¹³如权利要求1至15中任一项所述。

19. 根据权利要求1至17中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其中A选自下组:



20. 根据权利要求1至19中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其选自自由以下组成的组:

2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(8aS)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(8aR)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S,5R)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

啶-4-酮；

7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

7-[(8aS)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

7-[(8aR)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮；

9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(3R)-3-乙基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

及其药用盐。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的用于根据权利要求1的用途的化合物,其选自自由以下组成的组:

7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S,5R)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

及其药用盐。

22. 药物组合物,其包含:根据权利要求1-21中任一项所述的式(I)的化合物或其药用盐以及一种或多种药用赋形剂,所述药物组合物用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展。

23. 用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展的方法,所述方法包括向受试者施用如上所限定的根据权利要求1-21中任一项所述的式(I)的化合物或其药用盐。

24. 根据权利要求1-21中任一项所述的式(I)的化合物或其药用盐用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展的用途。

25. 根据权利要求1-21中任一项所述的式(I)的化合物或其药用盐用于制备药物的用途,所述药物用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展。

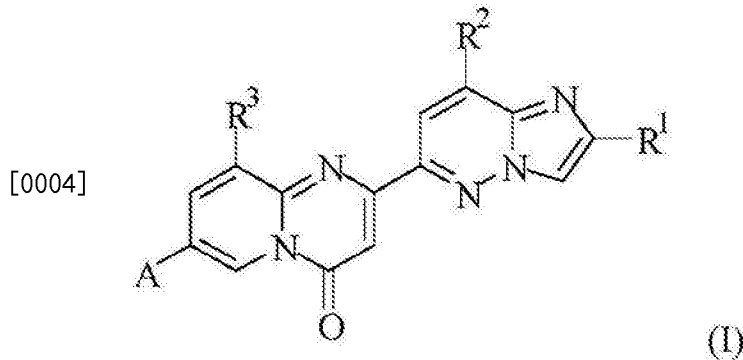
26. 如上所述的发明。

用于治疗肌萎缩性侧索硬化症的化合物

[0001] 简介

[0002] 本发明提供作为SMN2基因剪接调节剂的化合物,其用于治疗、预防神经肌肉障碍(特别是肌萎缩性侧索硬化症(ALS))和/或延迟其进展,它们的制备以及包含它们的药物组合物。

[0003] 特别地,本发明涉及式(I)的化合物及其药用盐,其用于治疗、预防和/或延迟肌萎缩性侧索硬化症(ALS),



[0005] 其中A、R¹、R²和R³如本文中所述。

背景技术

[0006] 神经肌肉障碍涵盖一系列的病况,包括神经病(后天获得的或遗传的)、肌营养不良、ALS、脊髓性肌萎缩(SMA)以及一系列非常罕见的肌肉障碍。神经肌肉障碍影响控制随意肌或肌肉内稳态的神经。当神经元变得不健康或死亡时,神经系统和肌肉之间的联系就会中断。因此,肌肉会变得无力和消瘦。肌无力可以导致颤搐、痉挛、疼痛以及关节和运动问题。有时候也会影响心脏功能和呼吸能力。进行性肌无力有很多原因,其可以发生在从婴儿到成人的任何时间。

[0007] 肌营养不良(MD)是神经肌肉障碍中的一个亚类。MD代表了一类遗传性肌肉病。有些形式影响儿童(如杜氏肌营养不良(Duchenne dystrophy))并且在20-30年内是致命的。其它类型出现在成年期并且是缓慢进展的,诸如面肩胛肱型肌营养不良(FSHD)。一些肌营养不良的基因已经被鉴定,包括杜氏肌营养不良(由肌营养不良蛋白基因突变引起)和青少年和成年发病的Miyoshi肌营养不良或其变异型、肢带型肌营养不良2B或LGMD-2B(由dysferlin基因突变引起)。存在“功能缺失”的突变,其阻止肌肉中相关蛋白的表达并且由此引起肌肉功能障碍。这些突变的小鼠模型是存在的,自发地来源于大自然或由相关基因的失活或缺失产生。这些模型可用于检测可能替代肌肉中缺失蛋白质和恢复正常肌肉功能的疗法。

[0008] 神经肌肉障碍也包括运动神经元疾病(MND),其属于归因于中枢神经系统的运动神经元的破坏以及降至肌肉萎缩和退化的运动神经元途径的退行性改变的一组神经病,并且不同于由除了运动神经元以外的神经元的破坏引起的其它神经退行性疾病如帕金森病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、橄榄体脑桥小脑萎缩

(olivopontocerebellar atrophy)等。美国国立神经病与卒中研究所(NINDS)认为运动神经元疾病(MND)是影响身体上部分或下部分中的神经的进行性、退行性疾病。根据NINDS的观点,有些是遗传的。一般而言,MND发生在中年。症状可能包括吞咽困难、肢体无力、言语不清、步态异常、面部无力和肌肉痉挛。在这些疾病的晚期,呼吸可能受到影响。大部分MND的病因是未知的,但是环境、中毒、病毒或遗传因素均是可疑的病因。MND的类型包括成人发病脊髓性肌萎缩(SMA)、也称为Lou Gehrig氏病的肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、也称为SMA 1型或称为韦-霍二氏病(Werdnig-Hoffman)的婴儿进行性脊髓性肌萎缩(SMA1)、也称为SMA2型的中间脊髓性肌萎缩(Intermediate Spinal Muscular Atrophy)(SMA2)、也称为SMA3型或库-韦二氏病(Kugelberg-Welander)的青少年脊髓性肌萎缩(SMA3)、也称为肯尼迪氏病或X连锁SBMA的脊髓延髓性肌萎缩(SBMA)。运动神经元疾病是其中运动神经元退变和死亡的病症。运动神经元(包括上运动神经元和下运动神经元)影响随意肌,刺激它们收缩。上运动神经元起源于大脑皮层并发出神经纤维穿过脑干和脊髓,并且参与控制下运动神经元。下运动神经元位于脑干和脊髓,并且发出神经纤维至肌肉。下运动神经元疾病是涉及下运动神经元退变的疾病。当下运动神经元退变时,其正常激活的肌纤维变得失去联系并且不能收缩,这引起肌无力和反射减弱。任一类型的神经元的缺失导致无力、肌肉萎缩(消瘦)和无痛性肌无力是MND的临床标志。

[0009] ALS是一种以脊髓、脑干、大脑皮层中的运动神经元的选择性和进展性的缺失为特征的致命性运动神经元疾病。其典型地导致进行性肌无力和神经肌肉性呼吸衰竭。大约2%的ALS与编码Cu/Zn超氧化物歧化酶1(SOD1)的基因中的点突变有关。ALS的该主要遗传原因的发现已为测试各种治疗可能性提供了基础。神经营养因子(NTF)的潜在的神经保护活性(防止神经元萎缩、轴索退化和细胞死亡等)在90年代早期引起了ALS治疗的极大希望。已经在ALS患者中评价了睫状神经营养因子(CNTF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)。在ALS患者中检测这些因子的理论依据是基于它们在胚胎运动神经元的发育期间或培养中、创伤性神经损伤或模拟ALS的动物模型(例如pmn或wobbler小鼠)中对自然发生的细胞死亡范例的营养或抗凋亡作用。不良副作用和有限的生物利用度已使得对它们的潜在临床益处的评估复杂化。应用神经营养蛋白的实际困难是这些蛋白均具有相对短的半衰期而神经退行性疾病是慢性的且需要长期治疗。

[0010] 一些出版物已经检查了SMN拷贝数与作为肌萎缩性侧索硬化症(ALS)中的风险因子的蛋白质的关系。SMN1基因的纯合缺失或突变导致脊髓性肌萎缩(SMA);SMA的严重程度由SMN2拷贝数调节。ALS和SMA之间有几个概念联系。首先,这两种病况具有相似的临床特征。它们都会导致运动神经元缺失导致的肌无力和行动障碍。这些病况既在严重程度谱上是不均匀的,还通常随着时间的推移逐渐恶化。重要的是,后期成年发病的SMA患者通常被误诊为ALS(Sanderson,Kissel,Kolb等人,Muscle Nerve.2015年7月;52(1):83-7.)。随着共同的临床特征,ALS和成人SMA具有相似的病理和形态特征,其表明疾病的常见发病机制。这些疾病足够相似,使得许多潜在的治疗已经在ALS和SMA两者中对效力进行了测试。因此,存在几个连接SMA和ALS的因素。许多注意力已经集中在确定ALS患者中的SMN蛋白质缺失以及SMN1和SMN2基因拷贝数。

[0011] SMN1的纯合缺失或突变通常是致死的(如在动物模型中已经检查过的)。人类具有称为SMN2的基因,其与SMN1的不同在于导致基因错误剪切的一个外显子核苷酸转换;并且,

只能从该基因产生低水平的全长功能性SMN蛋白。SMA来自SMN1的纯合缺失/突变并且具有至少一个SMN2基因拷贝。一般将SMN2基因的拷贝数视为SMA病程的调节剂。SMN1基因中的突变和SMN2基因的错误剪接导致患有SMA的人中低水平的功能性SMN蛋白。因此，SMA表现为运动神经元的缺失，最终导致肌无力，并且在严重的情况下导致呼吸衰弱、肌肉麻痹和死亡。这是婴儿和幼儿中最常见的遗传性死因。

[0012] 肌萎缩性侧索硬化症是一种退行性病症，其也引起运动神经元缺失，导致肌肉逐渐无力。例如，存在涉及ALS发病机理的多个基因，包括与ALS高度相关的基因，诸如SOD1、C9orf72和TDP-43。ALS还有几个其它的危险因素。它可以呈现出较低的运动神经元(LMN)体征和症状(肌无力、萎缩、束颤)以及上运动神经元(UMN)体征和症状(痉挛状态、反射亢进、异常呕反射)。虽然ALS的病理发生在脑和脊髓中，但是肌肉是受疾病中神经损伤影响的末端器官，因此，疾病进展的临床相关量度是肌无力和萎缩。由于其肌肉的进行性消瘦和麻痹，患者最终死于ALS。

[0013] 随着共同的临床特征，SMA和ALS共享相似的细胞形态。例如，ALS和SMA的一个共同细胞特征是snRNP功能障碍。snRNP是蛋白质和snRNA聚在一起以形成SMN复合物，从而有助于形成剪切体。剪切体对于剪切细胞中的各种mRNA是重要的。多个实验室已经检查了参与SMN复合物的snRNA和snRNP的水平，并且发现它们在ALS和SMA组织中减少(Ishihara等人, Hum Mol Genet. 2013年10月15日; 22(20): 4136-47.; Gerbino等人, Neurobiol Dis. 2013年7月; 55: 120-8.; Tsuiji等人, EMBO Mol Med. 2013年2月; 5(2): 221-3; Sun等人, Nat Commun. 2015年1月27日; 6: 6171.)。这表明，依赖于SMN蛋白的snRNP组装可能在ALS中存在功能障碍。

[0014] 另外，存在指向ALS中的SMN功能障碍的其它细胞特征，类似于SMA中发生的情况。Gem耗尽是SMA中的一个常见特征，其也是ALS中的特征。Gem在分子上由SMN蛋白的存在定义；gem也表示为创造剪切体。在ALS成纤维细胞和散发性ALS患者的脊髓运动神经元中，Gem计数较低。这也见于一些家族性ALS小鼠模型中(Shan等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 2010年9月14日; 107(37): 16325-30, Yamazaki等人, Cell Rep. 2012年10月25日; 2(4): 799-806., Tsuiji等人, EMBO Mol Med. 2013年2月; 5(2): 221-3; Ishihara等人, Hum Mol Genet. 2013年10月15日; 22(20): 4136-47., Turner等人, Neurobiol Aging. 2014年4月; 35(4): 906-15, Kariya等人, Hum Mol Genet. 2012年8月1日; 21(15): 3421-34)。

[0015] 除了疾病的共同形态特征之外，研究人员已经在具有最常见的遗传关联的ALS的细胞和动物模型中检查了SMN水平，以确定它们是否低于健康野生型对照。例如，具有TDP-43-siRNA的两种细胞类型中的SMN水平具有低于对照水平一半的SMN蛋白水平(Ishihara等人, Hum Mol Genet. 2013年10月15日; 22(20): 4136-47)。在另一项研究中，其中在SOD1-ALS模型的P30和P120处检测SMN蛋白水平，结果表明突变SOD1破坏SOD1小鼠的脊髓中的内源性和转基因SMN表达(Turner等人, Neurobiol Aging. 2014年4月; 35(4): 906-15)。在该研究的第二个实验中，在不同年龄的SOD1小鼠中检查SMN蛋白水平，在120天时，其中SOD1动物出现症状，SMN蛋白水平低于野生型。当通过引入具有8-9个拷贝的SMN1基因(正常内源性水平的2-3倍)的PrP-SMN转基因模型以在SOD1小鼠中过表达SMN时，SMN得以恢复而没有任何有害作用，即使其表达超过野生型。这些数据表明在ALS模型中恢复SMN蛋白具有一些有益效果，并且甚至可能SMN蛋白的过表达可能具有一些更有益的效果。

[0016] 最近的一项研究检查了运动神经元中SMN蛋白的过表达,其使用(DOX)-诱导的慢病毒以表达SMN,然后通过撤出营养因子启动细胞死亡。SMN蛋白在运动神经元中的过表达导致剂量依赖性的存活增加。这些数据表明,超过内源性(正常生理性)水平的SMN过表达也能够促进对照运动神经元的存活(Muela等人,NatMed出版中)。该研究还检查了来源于SOD1-ALS iPSC的MN以及WT对照系中的SMN水平,使用RFP对照或使用SMN dox诱导的慢病毒,并用0.5ug/mL dox处理细胞5天(Muela等人,NatMed出版中)。

[0017] 这项研究还表明SMN蛋白在ALS-SOD1 iPSC运动神经元模型中的过表达促进了存活(该模型的SMN拷贝数是未知的)。另外,还使用SOD1-ALS iPSC细胞和TDP43-47A iPSC细胞系,在两种来源于iPSC的ALS模型中测试了小分子SMN2剪接调节剂(SMN-C3,Naryshkin等人,Science (2014) :345 (6197) :688-693)。对于这些细胞系,SMN基因型也是未知的。SMN-C3能够以剂量依赖性方式使SMN水平提高达1.4倍。这是否转化为这些细胞系中存活的改善尚未被测试。这是SMN2剪接调节剂在ALS模型中进行测试的第一个证据。这项研究已经显示出SMN蛋白水平可以通过剪接调节剂增加的原理证明。

[0018] 这些先前的数据表明剪接调节剂可以增加来源于ALS的运动神经元中的SMN蛋白。此外,在ALS模型中增加SMN蛋白改善了疾病表型。例如,SMN的过表达(8-9个拷贝的人类SMN1)使疾病发作从78天延迟至84天(pk消瘦前的体重)并且在运动缺陷发病中延迟15%;然而,它没有延长寿命(Turner等人,Neurobiol Aging.2014年4月;35(4) :906-15。另外,运动神经元中SMN蛋白水平的上调赋予对表达突变SOD1的星形胶质细胞的退行性影响更大的抗性(Kariya等人,Hum Mol Genet.2012年8月1日;21(15) :3421-34。最后,在SOD1G86R小鼠中过表达SMN蛋白(8个拷贝的SMN2转基因,以2.5倍于SOD1小鼠进行表达)延迟了gem的缺失,并且防止脊髓运动神经元的特征性、侵袭性缺失且延迟疾病发作(Kariya等人,Hum Mol Genet.2012年8月1日;21(15) :3421-34。这些数据表明增加SMN蛋白赋予ALS模型益处。

[0019] 鉴于SMN蛋白上调改善ALS的动物和细胞模型两者中的结果的证据,检查ALS患者是否具有较低的SMN蛋白的基线水平也是有令人感兴趣的。很少发表关于ALS患者中的SMN蛋白的研究。Turner等人评价了散发性ALS患者的9个死后脊髓,并且通过蛋白质印迹(Western Blot)分析发现SMN蛋白水平大约是对照样品的一半(Turner等人Neurobiol Aging.2014年4月;35(4) :906-15。另一项研究发现,相较于对照,在两个ALS患者脊髓前角细胞中SMN蛋白水平降低,所述细胞具有2个拷贝的SMN1和1个拷贝的SMN2(Coovert等人,Hum.Mol.Genet.(1997)6(6) :1205-1214)。

[0020] 最后一组研究是关于ALS患者是否具有异常的SMN1或SMN2拷贝数,从而其可以导致较低水平的SMN蛋白。对于SMN拷贝数作为ALS风险因素的可能性已经进行了几项研究。最近,一项荟萃分析于2014年进行了八项独立研究,对2000多名ALS患者的合并ALS人群中SMN1和SMN2拷贝数的频率进行了评价。通过分析这些综合结果,他们发现ALS患者中SMN1拷贝数异常数量为1或3的频率高于对照组。他们没有发现SMN2拷贝数的频率存在任何差异(Wang等人,J Neurol Sci.2014年5月15日;340(1-2) :63-8。鉴于疾病的异质性和影响ALS的多种基因,值得注意的是,ALS患者具有异常SMN1拷贝数的频率较高。

[0021] 最后,一项研究主动检查了SMN1和SMN2拷贝数的组合基因型;以检查ALS患者是否具有可能比普通群体更低的组合基因型并因此可能产生较低水平的SMN蛋白。计算是基于理论预测公式,该公式等于1.0倍的SMN1拷贝数加上0.20倍的SMN2拷贝数。因此,2.2的值可

以等于2个SMN1拷贝和1个SMN2拷贝 (Veldink等人, Neurology. 2005 Sep 27; 65 (6) :820-5。有趣的是,在这项对242名ALS患者的研究中,相较于对照 (36% (n=175)), 预计61%的ALS患者具有基于其基因型的较低的组合拷贝数(≤ 2.2)。该值在统计学上不同于对照,表明组合的SMN1和SMN2基因拷贝数可能是疾病中的风险因素。

[0022] 来自ALS模型以及来自ALS患者的组织样本的大量证据和基因型信息表明, SMN蛋白调节ALS患者的表型。已经显示了SMN2剪接调节剂的原理证明, 并且其表明SMN蛋白水平可以得到提高 (尽管SMN基因型对于这些研究是未知的)。

[0023] 尽管对ALS遗传基础和病理生理学了解取得了进展, 但仍需要鉴别改变肌萎缩性侧索硬化症的病程的化合物。

[0024] 发明详述

[0025] 除非另外限定, 本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文中所述那些类似或等效的方法和材料可以用于实施或测试本发明, 但是以下描述合适的方法和材料。

[0026] 本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和参考文献均通过引用完整地结合。

[0027] 除非另外指出, 本申请中使用的命名法是基于IUPAC系统命名法。

[0028] 除非另外指出, 本文中的结构中的碳、氧、硫或氮原子上出现的任何开放的化合价表示氢的存在。

[0029] 不管所讨论的术语单独出现还是组合出现, 本文中所述的定义都适用。预期的是, 本文中所述的定义可被附加以形成化学相关组合, 如例如“杂环烷基芳基”、“卤代烷基杂芳基”、“芳基烷基杂环烷基”或“烷氧基烷基”。组合中最后的成员是与分子的其余部分连接的基团。组合中的其它成员以与文字顺序相反的次序附于所述结合基团, 例如组合氨基-C₁₋₇-烷基是指被氨基取代的C₁₋₇-烷基, 或者例如组合芳基烷基杂环烷基是指被经芳基取代的烷基取代的杂环烷基基团。

[0030] 术语“部分(moiety)”是指原子或化学键合原子的基团, 其通过一个或多个化学键与另一个原子或分子连接, 由此形成分子的一部分。例如, 式(I)的变量A、R¹、R²和R³是指通过共价键与式(I)的核心结构相连的部分。

[0031] 当指示取代基的数目时, 术语“一个或多个”是指从一个取代基到可能的最高取代数目的范围, 即由取代基取代一个氢至取代所有氢。

[0032] 术语“任选的”或“任选地”意为随后描述的事件或情况可以但不必需发生, 并且该描述包括事件或情况发生的情形和其不发生的情形。

[0033] 术语“取代基”是指替代母体分子上的氢原子的原子或原子团。

[0034] 术语“取代的”表示指定基团带有一个或多个取代基。在任何基团可以带有多个取代基并且提供多种可能的取代基的情况下, 取代基可以独立选择并且不需要是相同的。术语“未取代的”是指所指定的基团不带有取代基。术语“任选地取代的”是指所指定的基团是未取代的或被一个或多个独立地选自可能的取代基的组的取代基取代。当指示取代基的数目时, 术语“一个或多个”意味着从一个取代基到可能的最大取代数, 即由取代基取代一个氢至取代所有氢。

[0035] 术语“此发明的化合物”和“本发明的化合物”是指如本文中所公开的化合物及其立体异构体、互变异构体、溶剂化物和盐 (例如, 药用盐)。

[0036] 当本发明的化合物是固体时,本领域技术人员理解的是,这些化合物及其溶剂化物和盐可以以不同固体形式(特别是不同晶形)存在,所有这些形式都预期在本发明和指定的分子式的范围内。

[0037] 术语“药用盐”是指这样的盐,其在生物学或其他方面不是不合需要的。药用盐包括酸和碱加成盐。

[0038] 术语“药用酸加成盐”是指这样的药用盐,所述药用盐利用无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、碳酸、磷酸以及选自脂肪族、脂环族、芳香族、芳脂族、杂环、羧酸和磺酸类型的有机酸中的有机酸如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、葡糖酸、乳酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、天冬氨酸、抗坏血酸、谷氨酸、邻氨基苯甲酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、双羟萘酸、苯乙酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸和水杨酸形成。

[0039] 术语“药用碱加成盐”是指与有机或无机碱形成的那些药用盐。可用无机碱的实例包括钠盐、钾盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐和铝盐。源自药用有机无毒性碱的盐包括如下各项的盐:伯胺、仲胺和叔胺,取代的胺,包括天然存在的取代的胺,环胺和碱性离子交换树脂,如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二乙基氨基乙醇、三甲胺、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶和聚胺树脂。

[0040] 本文中使用的立体化学定义和约定一般按照S.P.Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (McGraw-Hill化学术语词典) (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 以及Elieil, E. 和Wilens, S., “Stereochemistry of Organic Compounds (有机化合物的立体化学)”, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。在描述具有旋光性的化合物时,前缀D和L或R和S用于指示分子关于其手性中心的绝对构型。与研究中的手性中心相连的取代基根据Cahn、Ingold和Prelog顺序法则排序。(Cahn等人, Angew. Chem. Inter. Edit. 1966, 5, 385; 勘误表511)。前缀D和L或(+)和(-)被用于指明化合物的平面偏振光的旋转标志,其中(-)或L指示化合物是左旋的。具有前缀(+)或D的化合物是右旋的。

[0041] 术语“手性中心”是指与四个不相同的取代基结合的碳原子。术语“手性的”是指与镜像不能重叠,而术语“非手性的”是指可与其镜像重叠的情况。手性分子具有光学活性,即,其能够使面偏振光的平面旋转。

[0042] 本发明的化合物可以具有一个或多个手性中心并且可以以光学纯的对映异构体、对映异构体的混合物如例如外消旋物、光学纯的非对映异构体、非对映异构体的混合物、非对映异构外消旋物或非对映异构外消旋物的混合物的形式存在。当化学结构中存在手性中心时,意欲的是,本发明包括与所述手性中心相关的所有立体异构体。

[0043] 术语“卤代”、“卤素”和“卤化物”在本文中可互换地使用并且是指氟、氯、溴或碘。卤素的一个特别的实例是氟。

[0044] 术语“烷基”表示1至12个碳原子的一价直链或支链饱和烃基。在特别的实施方案中,烷基具有1至7个碳原子,并且在更特别的实施方案中具有1至4个碳原子。烷基的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。烷基的特别的实例是甲基和乙基。

[0045] 术语“卤代烷基”表示烷基,其中所述烷基的至少一个氢原子已被相同或不同的卤

素原子(特别是氟原子)替代。卤代烷基的实例包括一氟-、二氟-或三氟-甲基、-乙基或-丙基,例如3,3,3-三氟丙基、2-氟乙基、2,2,2-三氟乙基、氟甲基或三氟甲基等。术语“全卤代烷基”表示这样的烷基,其中所述烷基的全部氢原子已被相同或不同的卤素原子替代。

[0046] 术语“二环的环体系”表示经由共同的单或双键彼此稠合的两个环(稠合(annellated)二环的环体系),经由一系列三个以上的共同原子彼此稠合的两个环(桥连的二环的环体系)或经由单个共同原子彼此稠合的两个环(螺二环的环体系)。二环的环体系可以是饱和的、部分不饱和的、不饱和的或芳族的。二环的环体系可以包含选自N、O和S的杂原子。

[0047] 术语“环烷基”是指具有3至10个环碳原子的饱和单环或二环烷基。在特别的实施方案中,环烷基是指具有3至8个环碳原子的一价饱和单环烷基。二环是指由共有-一个或多个碳原子的两个饱和碳环组成。特别的环烷基是单环的。单环的环烷基的实例是环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基。二环的环烷基的实例是二环[2.2.1]庚基或二环[2.2.2]辛基。环烷基的一个特别的实例是环丙基。

[0048] 术语“杂环烷基”表示3至9个环原子的饱和或部分不饱和单环、二环或三环的环体系,其包含1、2或3个选自N、O和S的环杂原子,其余的环原子是碳。在特别的实施方案中,杂环烷基是4至7个环原子的一价饱和单环环体系,其包含1、2或3个选自N、O和S的环杂原子,其余的环原子是碳。单环饱和杂环烷基的实例有氮杂环丙基、氧杂环丙基、氮杂环丁基、氧杂环丁基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢-噻吩基、吡唑烷基、咪唑烷基、~~噁~~唑烷基、异~~噁~~唑烷基、噻唑烷基、哌啶基、四氢吡喃基、四氢噻喃基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、1,1-二氧化-硫代吗啉-4-基、氮杂环庚基、二氮杂环庚基、高哌嗪基或氧杂氮杂环庚基。二环饱和杂环烷基的实例有8-氮杂-二环[3.2.1]辛基、奎宁环基、8-氧杂-3-氮杂-二环[3.2.1]辛基、9-氮杂-二环[3.3.1]壬基、3-氧杂-9-氮杂-二环[3.3.1]壬基或3-硫杂-9-氮杂-二环[3.3.1]壬基。部分不饱和的杂环烷基的实例有二氢呋喃基、咪唑啉基、二氢-~~噁~~唑基、四氢-吡啶基或二氢吡喃基。杂环烷基的特别的实例是1,4-二氮杂环庚基、六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪基、哌啶基、哌嗪基和吡咯烷基。杂环烷基的更特别的实例是六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪基和哌嗪基。

[0049] 术语“N-杂环烷基”是指含至少一个氮环原子的杂环烷基,并且其中杂环烷基与分子的其余部分的连接点是通过氮环原子。N-杂环烷基的特别的实例是1,4-二氮杂环庚基、六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪基、哌啶基、哌嗪基和吡咯烷基。N-杂环烷基的更特别的实例是六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪基和哌嗪基。

[0050] 本文中涉及化合物的术语“碱度(basicity)”被表示为共轭酸的酸度常数的负十进制对数($pK_a = -\log K_a$)。共轭酸的 pK_a 越大,碱越强($pK_a + pK_b = 14$)。在本申请中,如果原子或官能团适于接受质子并且如果计算的其共轭酸的 pK_a 至少是7,更特别地如果计算的其共轭酸的 pK_a 至少是7.8,最特别地如果计算的其共轭酸的 pK_a 至少是8,则所述原子或官能团被标为“碱性”。 pK_a 值通过电脑(in-silico)计算,如F.Milletti等人,J.Chem.Inf.Model(2007)47:2172-2181中所述。

[0051] 术语“亚烷基”表示1至7个碳原子的直链饱和二价烃基或3至7个碳原子的二价支链饱和烃基。亚烷基的实例包括亚甲基、亚乙基、亚丙基、2-甲基亚丙基、亚丁基、2-乙基亚丁基、亚戊基、亚己基。亚烷基的特别实例是亚乙基、亚丙基和亚丁基。

[0052] 术语“氨基”是指式-NR'R”的基团,其中R'和R”独立地是氢、烷基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基或如本文中所述。备选地,R'和R”与它们所连接的氮一起可以形成杂环烷基。术语“伯氨基”是指这样的基团,其中R'和R”都是氢。术语“仲氨基”是指这样的基团,其中R'是氢并且R”是除氢以外的基团。术语“叔氨基”是指这样的基团,其中R'和R”都不是氢。特别的仲胺和叔胺是甲胺、乙胺、丙胺、异丙胺、苯胺、苄胺、二甲胺、二乙胺、二丙胺和二异丙胺。

[0053] 术语“活性药物成分”(或“API”)表示药物组合物中具有特别生物学活性的化合物或分子。

[0054] 术语“药物组合物”和“药物制剂”(或“制剂”)可互换地使用并且是指被施用于有需要的哺乳动物(例如,人)的包含治疗有效量的活性药物成分以及药用赋形剂的混合物或溶液。

[0055] 术语“药用”表示可用于制备药物组合物的材料的属性,即通常是安全的,无毒性,并且在生物学和其他方面不是不合需要的,并且可用于兽医以及人类药物用途。

[0056] 术语“药用赋形剂”、“药用载体”和“治疗惰性赋形剂”可互换地使用并且是指药物组合物中不具有治疗活性并且对施用对象无毒性的任何药用成分,如用于配制药物产品的崩解剂、粘合剂、填充剂、溶剂、缓冲剂、张力剂、稳定剂、抗氧化剂、表面活性剂、载体、稀释剂或润滑剂。

[0057] 术语“个体”或“受试者”是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于,驯养动物(例如,牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴)、兔和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,所述个体或受试者是人。

[0058] 术语“治疗有效量”是指本发明的化合物或分子当施用于受试者时(i)治疗或预防特定疾病、病症或障碍,(ii)削弱、改善或消除特定疾病、病症或障碍的一种或多种症状,或(iii)预防或延迟本文中所述的特定疾病、病症或障碍的一种或多种症状的发生的量。治疗有效量将根据所述化合物、治疗的疾病状态、治疗的疾病的严重性、受试者的年龄和相对健康、给药途径和形式、主治医生或兽医的判断及其他因素而变化。

[0059] 术语疾病状态的“治疗”包括抑制所述疾病状态,即,阻止所述疾病状态或其临床症状的发展,或减轻所述疾病状态,即,使得所述疾病状态或其临床症状暂时或永久性的退去。

[0060] 术语“脊髓性肌萎缩”(或SMA)是指由两条染色体上SMN1基因的失活突变或缺失,从而导致SMN1基因功能丧失引起的疾病。

[0061] SMA的症状包括肌无力、肌张力低下、哭泣无力、咳嗽无力、跛行或摔倒倾向、吮吸或吞咽困难、呼吸困难、肺或咽喉中分泌物积累、用汗手紧握的拳头、舌头颤动/振动、常常倾向一侧的头部(即使在躺下时)、倾向于弱于臂部的腿部、经常呈“蛙腿”位置的腿部、摄食困难、对呼吸道感染敏感度提高、肠/膀胱无力、低于正常的体重、不能无支撑坐立、不能行走、不能爬行、和张力减退、反射消失、以及与前角细胞丧失相关的多发性先天性挛缩(关节挛缩)。

[0062] 术语“治疗脊髓性肌萎缩(SMA)”或“脊髓性肌萎缩(SMA)的治疗”包括以下效果中的一个或多个:(i)减小或改善SMA的严重度;(ii)延迟SMA的发作;(iii)抑制SMA的进展;(iv)减少受试者入院;(v)减少受试者的入院时长;(vi)增加受试者的存活;(vii)提高受试

者的生活质量；(viii)减少SMA相关症状的数目；(ix)减小或改善与SMA相关的一种或多种症状的严重度；(x)缩短与SMA相关的症状的持续时间；(xi)防止与SMA相关的症状的复发；(xii)抑制SMA症状的发展或发作；和/或(xiii)抑制与SMA相关的症状的进展。

[0063] 更特别的，术语“治疗SMA”表示以下有益效果中的一种或多种：(i)减小肌力损伤；(ii)增加肌力；(iii)减少肌萎缩；(iv)减少运动功能丧失；(v)增加运动神经元；(vii)减少运动神经元损失；(viii)使SMN不足的运动神经元免于退化；(ix)提高运动功能；(x)提高肺功能；和/或(xi)减小肺功能丧失。

[0064] 更详细地，术语“治疗SMA”是指人类婴儿或人类幼童无辅助坐立或人类婴儿、人类幼童、人类儿童或人类成人无辅助站立、无辅助行走、无辅助奔跑、无辅助呼吸、睡眠期间无辅助翻身或无辅助吞咽的功能性能力或所述功能性能力的保持。

[0065] 术语“产生全长SMN2小基因mRNA的EC_{1.5x}浓度”（或“EC_{1.5x}小基因”）被定义为有效地使全长SMN2小基因mRNA的量提高至与载体处理的细胞中的水平相比的1.5倍水平的测试化合物的浓度。

[0066] 术语“SMN蛋白表达的EC_{1.5x}浓度”（或“EC_{1.5x} SMN蛋白”）被定义为在SMA患者成纤维细胞中有效地产生与由载体对照产生的量相比的1.5倍量的SMN蛋白的测试化合物的浓度。

[0067] 术语“神经肌肉障碍”涵盖直接（通过内在的肌肉病理）或间接（通过神经病理）损害肌肉功能的疾病或病症。神经肌肉障碍的实例包括但不限于：

[0068] • 运动神经元疾病，如ALS（也称为Lou Gehrig氏病）、1型脊髓性肌萎缩（SMA1，韦-霍二氏病）、2型脊髓性肌萎缩（SMA2）、3型脊髓性肌萎缩（SMA3，库-韦二氏病）、脊髓延髓性肌萎缩（SBMA，也称为肯尼迪病和X-连锁的SBMA），

[0069] • 肌营养不良，如杜氏肌营养不良（DMD，也称为假肥大性肌营养不良）、贝克尔（Becker）肌营养不良（BMD）、埃-德二氏（Emery-Dreifuss）肌营养不良（EDMD）、肢带型肌营养不良（LGMD）、面肩胛肱型肌营养不良（FSH或FSHD，也称为朗-代二氏肌营养不良（Landouzy-Dejerine））、肌强直性肌营养不良（MMD，也称为斯坦纳特病（Steinert Disease））、眼咽肌营养不良（OPMD）、远端肌营养不良（DD，Miyoshi）、先天性肌营养不良（CMD），

[0070] • 肌肉代谢疾病，如磷酸化酶缺乏症（MPD或PYGM，也称为麦卡德尔病（McArdle Disease））、酸性麦芽糖酶缺乏症（AMD，也称为庞皮病（Pompe Disease））、磷酸果糖激酶缺乏症（也称为塔瑞病（Tarui Disease））、脱支酶缺乏症（DBD，也称为科里病（Cori Disease）或福布斯病（Forbes Disease））、线粒体肌病（MITO）、肉毒碱缺乏病（CD）、肉毒碱棕榈酰基转移酶缺乏症（CPT）、磷酸甘油酸激酶缺乏症、磷酸甘油酸变位酶缺乏症、乳酸脱氢酶缺乏症、肌腺苷酸脱氨酶缺乏症、肉毒碱棕榈酰基转移酶缺乏症（CPT）、磷酸甘油酸激酶缺乏症、磷酸甘油酸变位酶缺乏症、乳酸脱氢酶缺乏症、肌腺苷酸脱氨酶缺乏症；

[0071] • 外周神经疾病，如沙-马-图病（Charcot-Marie-Tooth Disease）（CMT，也称为遗传性运动和感觉神经病（HMSN）或腓骨肌萎缩（PMA）、弗里德赖希氏共济失调（Friedreich's Ataxia）（FA）、代-索二氏病（Dejerine-Sottas Disease）（DS），

[0072] • 炎性肌病，如皮肌炎（DM）、多发性肌炎（PM）、包涵体肌炎（IBM），

[0073] • 神经肌肉接头疾病，如重症肌无力（MG）、兰-伊二氏综合征（Lambert-Eaton Syndrome）（LES）、先天性肌无力综合征（CMS），

[0074] • 源于内分泌异常的肌病,如甲亢性肌病(HYPTM)、甲状腺功能减退性肌病(HYPOTM),

[0075] • 其它肌病,如先天性肌强直(MC,也叫汤姆森和贝克尔病(Thomsen and Becker Disease))、先天性肌强直病(PC)、中央轴空病(CCD)、纤维状肌病(NM),

[0076] • 肌管性肌病/中央核性肌病(MTM或CNM)、周期性麻痹(PP,两种形式:低血钾性和高血钾性)。

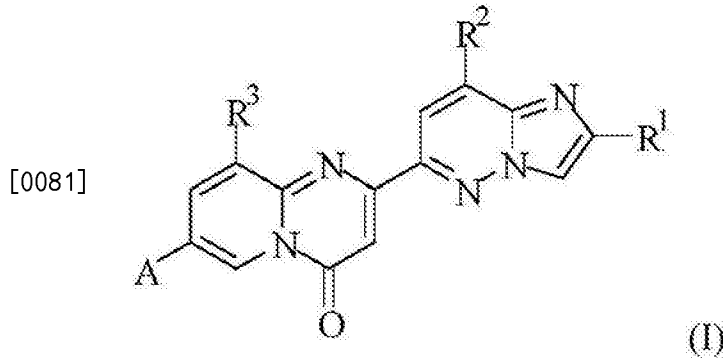
[0077] “MND”意指影响具有运动功能的神经元(即传导运动冲动的神经元)的疾病。这类神经元也被称为“运动神经元”。这些神经元非限制性地包括:发出支配骨骼肌纤维的 α 神经纤维的脊髓前角 α 神经元;发出支配梭外和梭内肌纤维的 β 神经纤维的脊髓前角 β 神经元;发出支配肌梭的梭内肌纤维的 γ 神经纤维(肌梭运动纤维)的脊髓前角 γ 神经元;供应除了传入冲动所起源的那些肌肉的肌肉的异侧神经元;供应传入冲动所起源的肌肉的同侧神经元;其细胞胞体位于脊髓腹侧灰柱且其终末端在骨骼肌的下周围神经元;接受来自中间神经元的冲动的周围神经元;以及从运动皮层传送冲动到脑神经运动核或脊髓腹侧灰柱的位于大脑皮层的上神经元。

[0078] 运动神经元病症的非限制性实例包括各种肌萎缩,诸如遗传性肌萎缩,包括遗传性脊髓性肌萎缩;急性婴儿脊髓性肌萎缩,诸如韦-霍二氏病;儿童的进行性肌萎缩,诸如近端型、远端型及延髓型;青少年或成年发病的脊髓性肌萎缩,包括近端型、肩胛型、面肩胛肱型和远端型;肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)和原发性侧索硬化症(PLS)。该术语还包括运动神经元损伤。

[0079] 术语“肌萎缩性脊髓侧索硬化症”(或“ALS”),也被称为Lou Gehrig氏病,是影响大脑皮层、脑干和脊髓的运动神经元的致命性疾病。虽然疾病的病因不明,但是有一个理论认为ALS中的神经细胞死亡是由过量的细胞外谷氨酸所引起的神经细胞过度兴奋的结果。谷氨酸是谷氨酸能神经元释放并摄入胶质细胞中的神经递质,在那里其被谷氨酰胺合成酶转化成谷氨酰胺,然后谷氨酰胺再次进入神经元并被谷氨酰胺酶水解以形成谷氨酸,由此补充神经递质池。在正常的脊髓和脑中,胞外液中的细胞外谷氨酸水平保持在较低的低微摩尔水平,因为部分功能是对神经元起支持作用的胶质细胞直接利用2型兴奋性氨基酸转运蛋白(EAAT2)吸收了谷氨酸。已鉴定出患有ALS的患者中正常EAAT2蛋白质的缺失对于该疾病的病理是重要的。EAAT2水平降低的一个解释是EAAT2被异常剪接。异常剪接产生了位于EAAT2蛋白质的C末端区域45至107个氨基酸的缺失的剪接变体。由于EAAT2的缺失或缺陷,细胞外谷氨酸得以积聚,引起神经元持续发射。谷氨酸的积聚对神经元细胞具有毒性效应,因为神经元的持续发射导致了细胞提早死亡。虽然关于ALS的病理已经了解了很多,但是对散发病例的发病机理和家族性ALS中突变SOD蛋白质的成因性质还是知之甚少。已经推测过许多模型,包括谷氨酸毒性、缺氧、氧化应激、蛋白质聚集、神经丝和线粒体异常。目前,对于ALS没有治疗方法,也没有已证明可有效预防或逆转疾病进程的疗法。最近食品药品监督管理局(FDA)已经批准了几种药物。迄今为止,治疗ALS的尝试已经涉及:用具有细胞保护效果的长链脂肪醇(参见美国专利号5,135,956)或用丙酮酸盐(参见美国专利号5,395,822)治疗神经元退化;和用谷氨酰胺合成酶阻断谷氨酸级联(参见美国专利5,906,976)治疗。例如,利鲁唑(Riluzole),一种谷氨酸释放抑制剂,在美国已经批准用于治疗ALS,并且看起来延长了至少一些ALS患者的生命达三个月。然而,一些报道已经指出即使利鲁唑治疗或多或少地

延长了存活时间,但是看起来还是没有提供患者的肌肉强度的任何改善。因此,利鲁唑效果的限制性在于治疗不改变患者的生命质量 (Borras-Blasco等人 (1998) Rev. Neurol, 27: 1021-1027)。

[0080] 详细地,本发明涉及式 (I) 的化合物,



[0082] 其中

[0083] R^1 是氢或 C_{1-7} -烷基;

[0084] R^2 是氢、氰基、 C_{1-7} -烷基、 C_{1-7} -卤代烷基或 C_{3-8} -环烷基;

[0085] R^3 是氢、 C_{1-7} -烷基或 C_{3-8} -环烷基;

[0086] A 是 N-杂环烷基或 $NR^{12}R^{13}$, 其中 N-杂环烷基包含 1 或 2 个氮环原子并且任选地被 1、2、3 或 4 个选自 R^{14} 的取代基取代;

[0087] R^{12} 是包含 1 个氮环原子的杂环烷基, 其中杂环烷基任选地被 1、2、3 或 4 个选自 R^{14} 的取代基取代;

[0088] R^{13} 是氢、 C_{1-7} -烷基或 C_{3-8} -环烷基;

[0089] R^{14} 独立地选自氢、 C_{1-7} -烷基、氨基、氨基- C_{1-7} -烷基、 C_{3-8} -环烷基和杂环烷基, 或者两个 R^{14} 一起形成 C_{1-7} -亚烷基;

[0090] 前提条件是如果 A 是包含仅 1 个氮环原子的 N-杂环烷基, 则至少一个 R^{14} 取代基是氨基或氨基- C_{1-7} -烷基;

[0091] 及其药用盐,

[0092] 其用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 和/或延迟其进展。

[0093] 本发明的特别的实施方案是式 (I) 的化合物及其药用盐, 其用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 和/或延迟其进展。

[0094] 此外, 要理解的是, 如本文中所公开的涉及具体的 A、 R^1 、 R^2 或 R^3 的每个实施方案可以与如本文中所公开的涉及另外的 A、 R^1 、 R^2 或 R^3 的任何其他实施方案相结合。

[0095] 本发明的一个特别的实施方案涉及式 (I) 的化合物, 其中

[0096] R^1 是氢或 C_{1-7} -烷基;

[0097] R^2 是氢、氰基、 C_{1-7} -烷基、 C_{1-7} -卤代烷基或 C_{3-8} -环烷基;

[0098] R^3 是氢、 C_{1-7} -烷基或 C_{3-8} -环烷基;

[0099] A 是包含 1 或 2 个氮环原子的 N-杂环烷基, 其中 N-杂环烷基任选地被 1、2、3 或 4 个选自 R^{14} 的取代基取代;

[0100] R^{14} 独立地选自氢、 C_{1-7} -烷基、氨基、氨基- C_{1-7} -烷基、 C_{3-8} -环烷基和杂环烷基, 或者两个 R^{14} 一起形成 C_{1-7} -亚烷基;

[0101] 前提条件是如果A是包含仅1个氮环原子的N-杂环烷基,则至少一个R¹⁴取代基是氨基或氨基-C₁₋₇-烷基;

[0102] 及其药用盐,

[0103] 其用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展。

[0104] 在本发明的一个特别的实施方案中,R¹是C₁₋₇-烷基,特别是甲基。

[0105] 在本发明的一个特别的实施方案中,R²是氢或C₁₋₇-烷基,特别是氢或甲基。

[0106] 在本发明的一个特别的实施方案中,R³是氢或C₁₋₇-烷基,特别是氢或甲基。

[0107] 在本发明的一个特别的实施方案中,R¹²是任选地被1、2、3或4个选自R¹⁴的取代基取代的哌啶基。

[0108] 在本发明的一个特别的实施方案中,R¹³是氢或C₁₋₇-烷基,特别是氢或甲基。

[0109] 在本发明的一个特别的实施方案中,R¹⁴独立地选自C₁₋₇-烷基和杂环烷基,或者两个R¹⁴一起形成C₁₋₇-亚烷基。

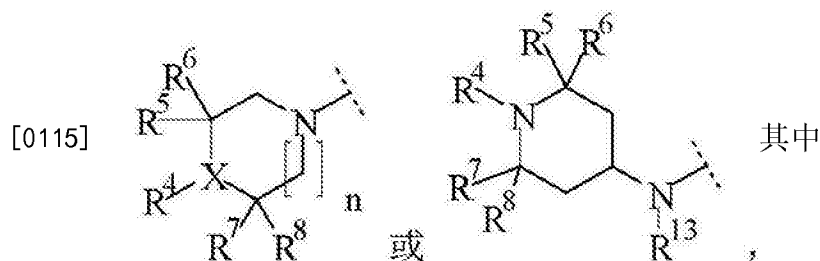
[0110] 在本发明的一个特别的实施方案中,R¹⁴独立地选自甲基、乙基和吡咯烷基,或者两个R¹⁴一起形成亚乙基。

[0111] 在本发明的一个特别的实施方案中,A是包含1或2个氮原子的饱和单环或二环的N-杂环烷基,并且任选地被1、2、3或4个选自R¹⁴的取代基取代。

[0112] 在本发明的一个特别的实施方案中,其中如本文中所限定的A中的N-杂环烷基或R¹²中的杂环烷基被1或2个选自R¹⁴的取代基取代。

[0113] 在本发明的一个特别的实施方案中,其中如本文中所限定的A中的N-杂环烷基进一步的特征在于一个环氮原子是碱性的。

[0114] 在本发明的一个特别的实施方案中,A是



[0116] X是N或CH;

[0117] R⁴是氢、C₁₋₇-烷基或-(CH₂)_m-NR⁹R¹⁰;

[0118] R⁵是氢或C₁₋₇-烷基;

[0119] R⁶是氢或C₁₋₇-烷基;

[0120] R⁷是氢或C₁₋₇-烷基;

[0121] R⁸是氢或C₁₋₇-烷基;

[0122] R⁹和R¹⁰独立地选自氢、C₁₋₇-烷基和C₃₋₈-环烷基;

[0123] R¹³是氢、C₁₋₇-烷基或C₃₋₈-环烷基;

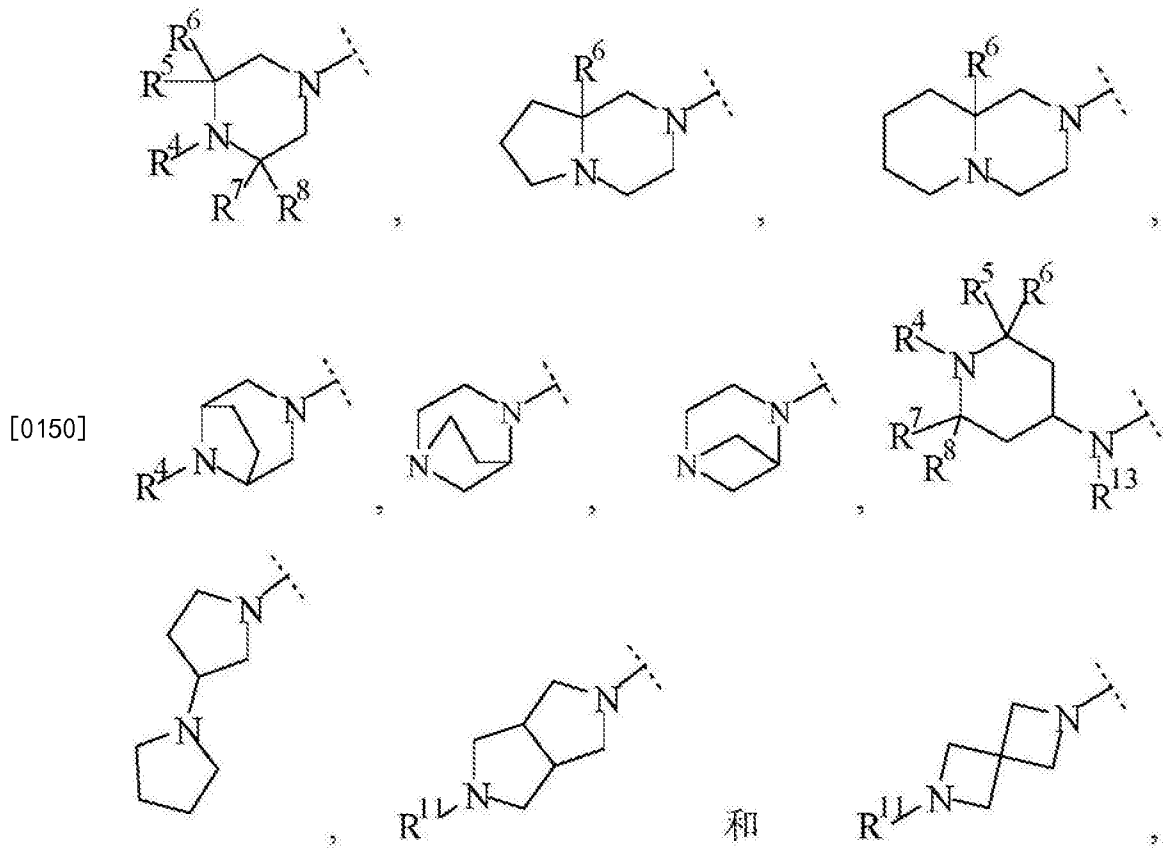
[0124] n是0、1或2;

[0125] m是0、1、2或3;

[0126] 或者R⁴和R⁵一起形成C₁₋₇-亚烷基;

[0127] 或者R⁴和R⁷一起形成C₁₋₇-亚烷基;

- [0128] 或者 R^5 和 R^6 一起形成 C_{2-7} -亚烷基；
- [0129] 或者 R^5 和 R^7 一起形成 C_{1-7} -亚烷基；
- [0130] 或者 R^5 和 R^9 一起形成 C_{1-7} -亚烷基；
- [0131] 或者 R^7 和 R^8 一起形成 C_{2-7} -亚烷基；
- [0132] 或者 R^7 和 R^9 一起形成 C_{1-7} -亚烷基；
- [0133] 或者 R^9 和 R^{10} 一起形成 C_{2-7} -亚烷基；
- [0134] 前提条件是,如果X是CH,则 R^4 是 $-(CH_2)_m-NR^9R^{10}$;并且
- [0135] 前提条件是,如果X是N并且 R^4 是 $-(CH_2)_m-NR^9R^{10}$,则m是2或3。
- [0136] 已经发现,当 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 中的至少一个不是氢时,脑穿透性(brain penetration)得到提高。
- [0137] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 中的至少一个不是氢。
- [0138] 在本发明的一个特别的实施方案中,X是N。
- [0139] 在本发明的一个特别的实施方案中,n是1。
- [0140] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^4 是氢、甲基或 $-(CH_2)_m-NR^9R^{10}$,更特别地是氢。
- [0141] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^5 是氢、甲基或乙基,更特别地是甲基。
- [0142] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^6 是氢或甲基,更特别地是氢。
- [0143] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^7 是氢或甲基。
- [0144] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^8 是氢。
- [0145] 在本发明的一个特别的实施方案中,m是0。
- [0146] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^4 和 R^5 一起形成亚丙基。
- [0147] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^5 和 R^6 一起形成亚乙基；
- [0148] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^9 和 R^{10} 一起形成亚丁基。
- [0149] 在本发明的一个特别的实施方案中,A选自以下的组：



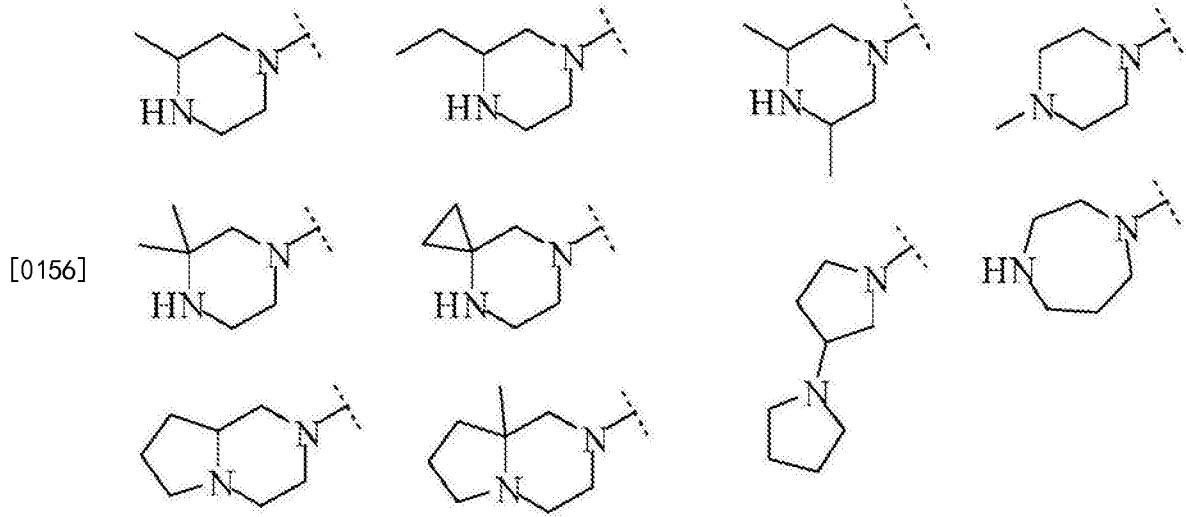
[0151] 其中 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^{13} 是如本文中所定义的并且其中 R^{11} 是氢或 C_{1-7} -烷基。

[0152] 在本发明的一个特别的实施方案中，A选自哌嗪基、二氮杂环庚基、吡咯烷基和六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪基的组，其中每一个任选地被1、2、3或4个选自如本文所定义的 R^{14} 的取代基取代。

[0153] 在本发明的一个特别的实施方案中，A选自哌嗪-1-基、1,4-二氮杂环庚烷-1-基、吡咯烷-1-基和六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2(1H)-基的组，其中每一个任选地被1或2个选自如本文所定义的 R^{14} 的取代基取代。

[0154] 在本发明的一个特别的实施方案中，其中A是 $NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 和 R^{13} 是如本文所述的。

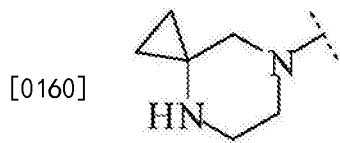
[0155] 在本发明的一个特别的实施方案中，A选自以下的组：



[0157] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^1 是甲基, R^2 是氢或甲基, R^3 是氢, 并且 A 是



[0159] 在本发明的一个特别的实施方案中, R^1 是甲基, R^2 是甲基, R^3 是氢, 并且 A 是



[0161] 本发明的特别的式 (I) 的化合物是选自由以下组成的组的那些:

[0162] 2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0163] 7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0164] 7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0165] 7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0166] 7-[(8aS)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0167] 7-[(8aR)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0168] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S,5R)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0169] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

- [0170] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0171] 7-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0172] 2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0173] 2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0174] 7-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0175] 7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0176] 7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0177] 7-[(8aS)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0178] 7-[(8aR)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0179] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0180] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0181] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0182] 2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0183] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0184] 7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0185] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0186] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0187] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0188] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;
- [0189] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-

甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0190] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0191] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0192] 2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0193] 7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0194] 9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0195] 9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0196] 7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0197] 7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0198] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0199] 7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0200] 7-[(3R)-3-乙基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0201] 及其药用盐。

[0202] 本发明的特别的式(I)的化合物是选自由以下组成的组的那些:

[0203] 7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0204] 7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0205] 7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0206] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S,5R)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0207] 7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0208] 7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0209] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0210] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0211] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0212] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0213] 7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0214] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮;

[0215] 及其药用盐。

[0216] 本发明的特别的式(I)的化合物是7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮或其药用盐。

[0217] 本发明的特别实施方案涉及7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮或其药用盐,其用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展。

[0218] 本发明的特别的式(I)的化合物是7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮或其药用盐。

[0219] 本发明的特别实施方案涉及7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮或其药用盐,其用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展。

[0220] 制备方法

[0221] 如上所定义的式(I)的化合物及其药用盐可以遵循本领域中已知的标准方法制备。

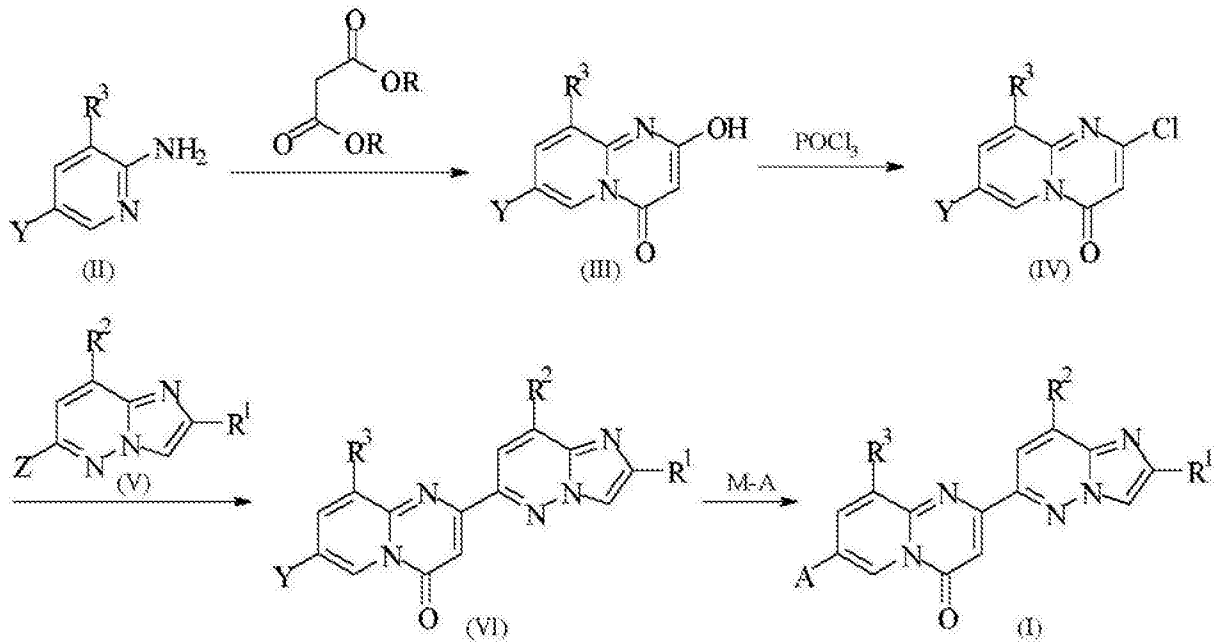
[0222] 如方案1中所示,可以将市售的式(II)的氨基-吡啶与丙二酸酯反应以提供式(III)的中间体,其中Y和R³是如本文中所限定的并且R是C₁₋₂-烷基,特别是甲基。然后将式(III)的化合物用氯化试剂(如POCl₃等)处理以提供式(IV)的化合物。然后在Suzuki交叉偶联反应中在存在催化剂(如(1,1'-双(二苯基膦)二茂铁)二氯化钯(II)(Pd(dppf)Cl₂)等)和碱(如K₂CO₃等)的情况下在合适的溶剂(如DMF等)中将式(IV)的化合物与式(V)的化合物(其中R¹和R²是如本文中所限定的并且Z是B(OH)₂或C₁₋₇-烷基硼酸酯如4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)反应以提供式(VI)的化合物。最后,将式(VI)的化合物与化合物M-A在:

[0223] a) 芳族亲核取代反应中(特别是如果Y是氟),通过在80°C至200°C的温度加热;或

[0224] b) Buchwald-Hartwig胺化反应中,在存在钯催化剂(例如四(三苯基膦)钯(Pd(PPh₃)₄)或二(二亚苄基丙酮)钯(Pd(dba)₂)的情况下,通过在20°C至100°C的温度加热;

[0225] 在溶剂(例如二甲亚砜(DMSO)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)或二甲基甲酰胺(DMF))中反应,从而提供式(I)的化合物,其中A是如本文中所限定的,M是氢、钠或钾,特别是氢,并且其中M经由A的氮原子与A相连。

[0226]



[0227] 方案1

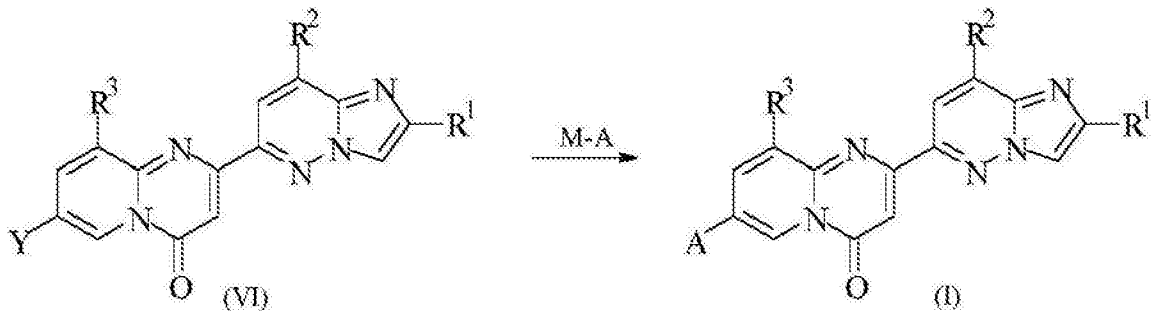
[0228] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备如上所限定的式(I)的化合物及其药用盐的方法,所述方法包括将式(VI)的化合物与化合物M-A在:

[0229] a) 芳族亲核取代反应中(特别是如果Y是氟),通过在80°C至200°C的温度加热;或

[0230] b) Buchwald-Hartwig胺化反应中,在存在钯催化剂(例如四(三苯基膦)钯($Pd(PPh_3)_4$)或二(二亚苺基丙酮)钯($Pd(dba)_2$))的情况下,通过在20°C至100°C的温度加热;

[0231] 在溶剂(例如二甲亚砜(DMSO)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)或二甲基甲酰胺(DMF))中反应,其中A、Y、 R^1 、 R^2 和 R^3 是如本文中所限定的,M是氢、钠或钾,特别是氢,并且其中M经由A的氮原子与A相连。

[0232]



[0233] 本发明的一个特别的实施方案涉及用于制备如上所限定的式(I)的化合物及其药用盐的方法,所述方法包括如上所述的式(VI)的化合物与式M-A的化合物之间通过在溶剂中加热进行的芳族亲核取代反应,其中A、 R^1 、 R^2 、 R^3 和Y是如以上所限定的,M是氢、钠或钾,并且其中M经由A的氮原子与A相连。

[0234] 本发明的一个特别的实施方案涉及用于制备如上所限定的式(I)的化合物及其药用盐的方法,其中所述芳族亲核取代反应在80°C至200°C的温度进行。

[0235] 本发明的一个特别的实施方案涉及用于制备如上所限定的式(I)的化合物及其药

用盐的方法,其中所述芳族亲核取代反应的溶剂选自二甲亚砜(DMSO)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)和二甲基甲酰胺(DMF)。

[0236] 本发明的一个特别的实施方案涉及用于制备如上所限定的式(I)的化合物及其药用盐的方法,其中M是氢。

[0237] 特别地,式(I)的化合物及其药用盐可以根据本文中实施例所述的方法制备。

[0238] 药物组合物

[0239] 另一个实施方案提供包含本发明的化合物和治疗惰性载体、稀释剂或药用赋形剂的药物组合物或药物,以及使用本发明的化合物制备此种组合物和药物的方法。

[0240] 以与良好医学实践相一致的方式对组合物进行配制、定剂量和给药。关于这点要考虑的因素包括治疗的具体病症、治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病因、药物递送位点、给药方法、给药时间安排和执业医师已知的其他因素。

[0241] 本发明的化合物可以通过任何合适的方式给药,所述方式包括口服给药、局部给药(包括含服和舌下给药)、直肠给药、阴道给药、透皮给药、肠胃外给药、皮下给药、腹膜内给药、肺内给药、皮内给药、鞘内给药和硬膜外给药和鼻内给药以及(如果需要用于局部治疗)病灶内给药。肠胃外注入包括肌肉内给药、静脉内给药、动脉内给药、腹膜内给药或皮下给药。

[0242] 本发明的化合物可以以任何方便的施用形式施用,所述形式例如是,片剂、粉剂、胶囊剂、溶液剂、分散剂、混悬剂、糖浆、喷雾剂、栓剂、凝胶剂、乳剂、贴剂等。此种组合物可以包含药物制剂中的常规组分,例如,稀释剂、载体、pH调节剂、防腐剂、增溶剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、增甜剂、着色剂、调味剂、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂、抗氧化剂及其他活性剂。其还可以包含其他有治疗价值的物质。

[0243] 典型的制剂通过将本发明的化合物与载体或赋形剂混合来制备。合适的载体和赋形剂是本领域技术人员已知的,并且被详细地描述于,例如,Ansel H.C.等人,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(Ansel药物剂型和药物递送系统)(2004)Lippincott,Williams&Wilkins,Philadelphia;Gennaro A.R.等人,Remington:The Science and Practice of Pharmacy(Remington:药学科学和实践)(2000)Lippincott,Williams&Wilkins,Philadelphia;和Rowe R.C,Handbook of Pharmaceutical Excipients(药物赋形剂手册)(2005)Pharmaceutical Press,Chicago。所述制剂还可以包含一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、湿润剂、润滑剂、乳化剂、助悬剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、助流剂、加工助剂、着色剂、增甜剂、加香剂、调味剂、稀释剂和其他已知的添加剂以提供药物(即,本发明的化合物或其药物组合物)的优雅外观或有助于药物产品(即,药品)的生产。

[0244] 本发明的化合物的可施用剂量可以在很大范围内变化并且当然将适合于各具体病例中的个体需要。通常,在口服给药的情况中,约0.01至1000mg/人的通式(I)的化合物的日剂量应当是合适的,但是当需要时也可以超过以上上限。

[0245] 合适的口服剂型的实例是含有与约30至90mg无水乳糖、约5至40mg交联羧甲纤维素钠、约5至30mg聚乙烯吡咯烷酮(PVP)K30和约1至10mg硬脂酸镁复合的约100mg至500mg本发明的化合物的片剂。将粉末成分首先混合在一起,然后将其与PVP的溶液混合。可以使用常规设备将所得的组合物干燥、制粒、与硬脂酸镁混合并且压缩成片剂形式。

[0246] 气溶胶制剂的一个实例可以通过以下方法制备：将例如10至100mg本发明的化合物溶解在合适的缓冲溶液（例如磷酸缓冲液）中，如果需要加入张力调节剂例如盐如氯化钠。可以例如使用0.2 μ m滤器将所述溶液过滤以除去杂质和污染物。

[0247] 用途

[0248] 如上所述，式(I)的化合物及其药用盐具有有价值的药理学性质并且被发现增强SMN1和/或SMN2的外显子7包含到由SMN1和/或SMN2基因转录的mRNA中，由此增加SMN蛋白在有此需要的人受试者中的表达。

[0249] 本发明的化合物可以单独地或与其他药物组合地用于治疗、预防神经肌肉障碍（特别是肌萎缩性侧索硬化症(ALS)）和/或延迟其进展。

[0250] 本发明的一个特别的实施方案涉及药物组合物，所述药物组合物包含如上所定义的式(I)的化合物或其药用盐和一种或多种药用赋形剂，其用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展。

[0251] 本发明的一个特别的实施方案涉及如上所定义的式(I)的化合物或其药用盐，其用于用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展的治疗活性物质。

[0252] 本发明的一个特别的实施方案涉及如上所定义的式(I)的化合物或其药用盐，其用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展。

[0253] 本发明的一个特别的实施方案涉及用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展的方法，所述方法包括向受试者施用如上所定义的式(I)的化合物或其药用盐。

[0254] 本发明的一个特别的实施方案涉及如上所定义的式(I)的化合物或其药用盐用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展的用途。

[0255] 本发明的一个特别的实施方案涉及如上所定义的式(I)的化合物或其药用盐用于制备药物的用途，所述药物用于治疗、预防肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或延迟其进展。此种药物包含如上所定义的式(I)的化合物或其药用盐。

实施例

[0256] 通过参考以下实施例将更全面地理解本发明。然而以下实施例不应被视为限制本发明的范围。

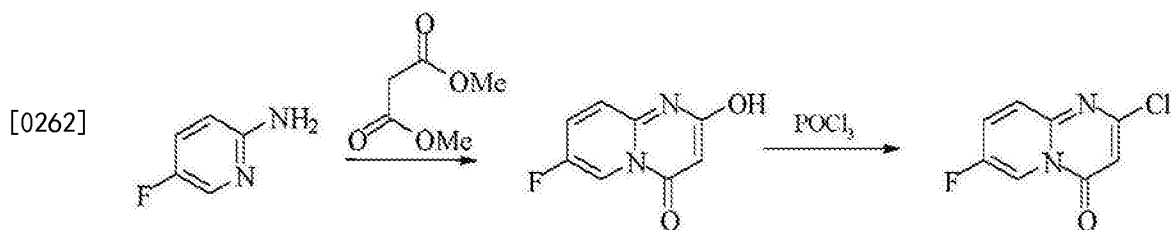
[0257] 使用的缩写

[0258] ACN:乙腈;CH₂Cl₂:二氯甲烷(DCM);DIPEA:二异丙基乙胺;DMA:二甲基乙酰胺;TEA:三乙胺;RT:室温;B₂(pin)₂:双(频哪醇)二硼;Pd(dppf)Cl₂:(1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁)二氯化钯(II);PPTS:对甲苯磺酸吡啶。

[0259] 中间体1

[0260] 7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

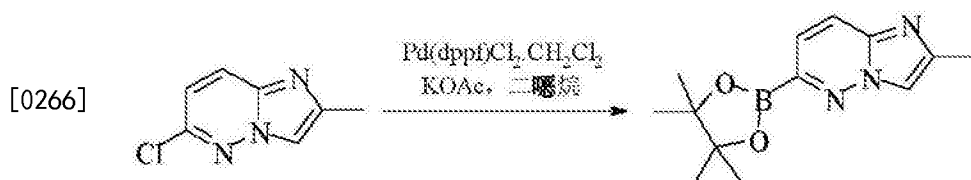
[0261] a) 2-氯-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮



[0263] 将2-氨基-5-氟吡啶 (11.20g, 0.10mol) 和丙二酸二甲酯 (57.0mL, 0.50mol) 的混合物在230℃加热1.5h。在冷却至室温后,将沉淀物过滤并用ACN洗涤 (3x) 从而提供7-氟-2-羟基-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮,为深色固体 (14g),将其直接用于下个步骤。MS m/z 181.3[M+H]⁺。

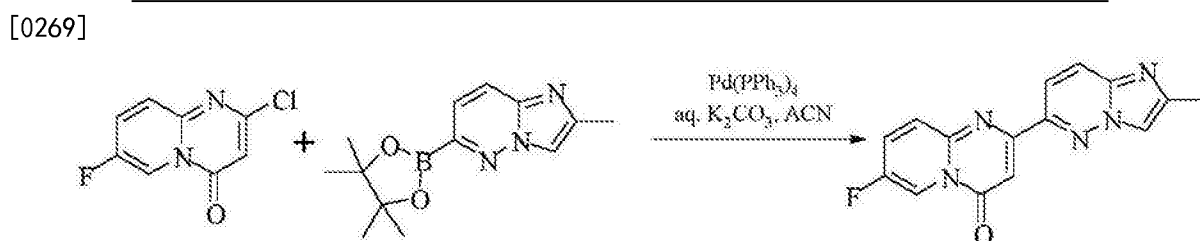
[0264] 将粗7-氟-2-羟基-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (14g, ~77mmol) 在POCl₃ (50mL) 和DIPEA (13.3mL, 77mmol) 中的深色混合物在110℃加热15小时。将溶剂除去并将深色剩余物用冰水处理,用水洗涤 (3x) 并干燥从而提供褐色固体。将粗制的褐色固体进行色谱分离 (5% MeOH, 在CH₂Cl₂中) 从而提供2-氯-7-氟-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮,为黄色固体 (9.84g, 50%, 2步), MS m/z 199.2[M+H]⁺。

[0265] b) 2-甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)咪唑并[1,2-b]哒嗪



[0267] 将6-氯-2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪 (900mg, 5.37mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷) (1.36g, 5.37mmol, 1.0当量)、K₂CO₃ (1.05g, 10.7mmol) 和Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (393mg, 0.54mmol) 在二噁烷 (50mL) 中的混合物除气并在N₂下在95℃加热。15小时后,将混合物用EtOAc稀释,通过硅藻土过滤并在真空下浓缩从而提供2-甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)咪唑并[1,2-b]哒嗪,将其直接用于下个步骤。

[0268] c) 7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮



[0270] 向2-氯-7-氟-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (750mg, 3.78mmol) 在ACN (36mL) 中的溶液加入2-甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)咪唑并[1,2-b]哒嗪 (1.17g, 4.53mmol, 当量:1.2)、Pd(PPh₃)₄ (218mg, 0.189mmol, 0.05当量) 和K₂CO₃的水溶液 (3.78mL, 7.55mmol, 2.0当量)。将混合物除气并在氩气下在105℃加热过夜。将反应冷却至RT,并过滤。将沉淀物用Et₂O洗涤然后用水洗涤,在真空中干燥从而提供250mg (22%) 的7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮,为淡褐色固体。MS m/z

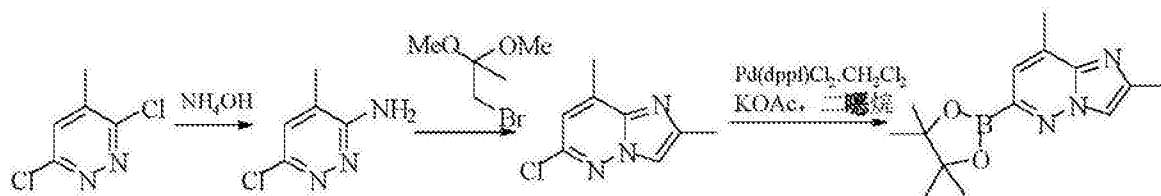
296.1 [M+H]⁺。

[0271] 中间体2

[0272] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0273] a) 2,8-二甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)咪唑并[1,2-b]哒嗪

[0274]



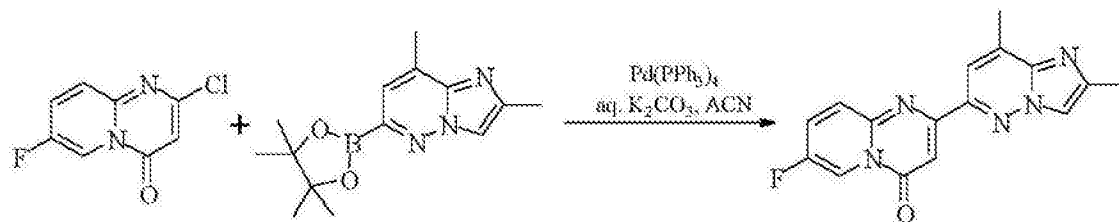
[0275] 在密封的烧瓶中,将3,6-二氯-4-甲基哒嗪(27g,161mmol)悬浮在氨水(25%,300mL)中。将反应混合物在110℃加热48小时(1小时后变成溶液)。在冷却至室温后,将反应倒入CH₂Cl₂中,并将有机相分离,用Na₂SO₄干燥,并在真空下浓缩,从而提供22.4g的作为区域异构体的混合物的6-氯-4-甲基-哒嗪-3-胺和6-氯-5-甲基-哒嗪-3-胺,将其直接用于下个步骤。

[0276] 将区域异构体6-氯-4-甲基-哒嗪-3-胺和6-氯-5-甲基-哒嗪-3-胺的混合物(22.4g)悬浮在2-丙醇(300mL)中。加入1-溴-2,2-二甲氧基丙烷(36.0g,26.6mL,193mmol,1.2当量)和PPTS(2.96g,11.6mmol,0.0725当量),并将所得的溶液在105℃加热过夜。在真空中除去溶剂并将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃洗涤。将有机相用Na₂SO₄干燥,在真空中浓缩并将粗制的淡褐色固体进行色谱分离(EtOAc/庚烷1/2-1/1)从而分开地提供6.1g的作为白色固体的6-氯-2,8-二甲基-咪唑并[1,2-b]哒嗪MS m/z 182.1[M+H]⁺(21%)和5.9g的作为白色固体的6-氯-2,7-二甲基-咪唑并[1,2-b]哒嗪MS m/z 182.1[M+H]⁺(20%)。

[0277] 将6-氯-2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪(0.9g,4.96mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷)(1.26g,4.96mmol,1.0当量)、KOAc(0.97g,9.91mmol)和Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂(363mg,0.49mmol)在二噁烷(50mL)中的混合物除气并在N₂下在110℃加热。15小时后,将混合物用EtOAc稀释,通过硅藻土过滤并在真空下浓缩从而提供2,8-二甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)咪唑并[1,2-b]哒嗪,将其直接用于下个步骤。

[0278] b) 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0279]



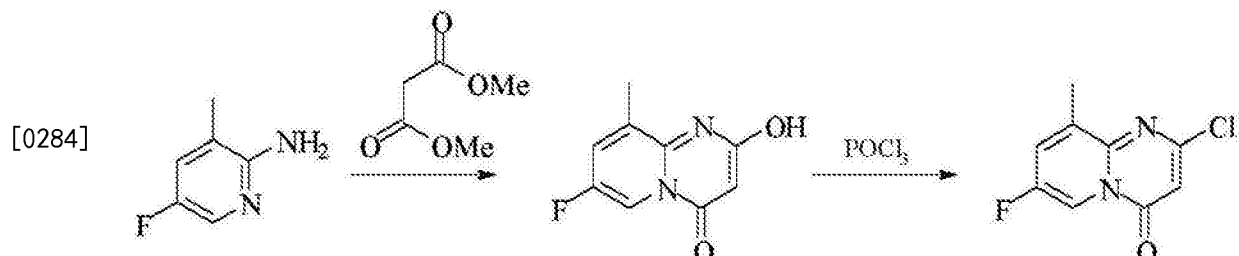
[0280] 向2-氯-7-氟-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(750mg,3.78mmol,上文中描述的)在ACN(36mL)中的溶液加入2,8-二甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)咪唑并[1,2-b]哒嗪(1.24g,4.53mmol,1.2当量)、Pd(PPh₃)₄(218mg,0.189mmol,0.05当量)和K₂CO₃的水溶液(3.78mL,7.55mmol,2.0当量)。将混合物除气并在氩气下在100℃加热6

小时。将反应冷却至RT,并过滤。将沉淀物用Et₂O洗涤然后用水洗涤,在真空中干燥从而提供700mg (60%)的2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮,为淡褐色固体。MS m/z 310.1[M+H]⁺。

[0281] 中间体3

[0282] 7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0283] a) 2-氯-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

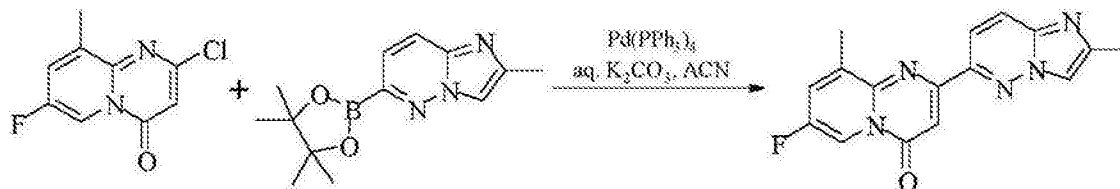


[0285] 将5-氟-3-甲基吡啶-2-胺(3.3g,26.2mmol)和丙二酸二甲酯(15.0mL,0.13mol,5.0当量)的混合物在210℃加热1.5小时。在冷却至室温后,将沉淀物过滤并用ACN洗涤(3x)从而提供7-氟-2-羟基-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮,为深色固体(2.3g),将其直接用于下个步骤。MS m/z 195.1[M+H]⁺。

[0286] 将粗制的7-氟-2-羟基-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(2.3g,11.8mmol)在POCl₃(7.7mL,82.9mmol)和DIEA(2.07mL,11.8mmol)中的混合物在110℃加热15小时。将溶剂除去并将剩余物用冰水处理,用水洗涤(3x)并干燥从而提供褐色固体。将粗制的褐色固体进行色谱分离(5%MeOH,在CH₂Cl₂中)从而提供2-氯-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮,为黄色固体(1.77g,70%,2步),MS m/z 213.1[M+H]⁺。

[0287] b) 7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0288]

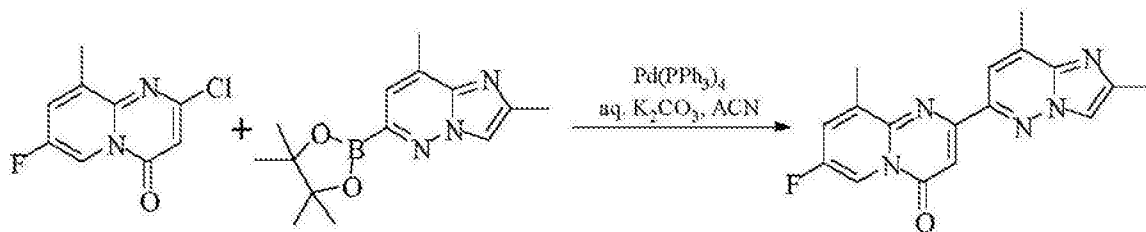


[0289] 向2-氯-7-氟-9-甲基-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(2.2g,10.3mmol)在ACN(80mL)中的溶液加入2-甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)咪唑并[1,2-b]哒嗪(3.22g,12.4mmol,1.2当量,上文中描述的)、Pd(Ph₃P)₄(1.20g,1.03mmol,0.1当量)和K₂CO₃的水溶液(10.3mL,20.7mmol,2.0当量)。将混合物除气并在氩气下在100℃加热6小时。将反应冷却至RT,并过滤。将沉淀物用Et₂O洗涤然后用水洗涤,在真空中干燥从而提供1.80g (56%)的7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮,为淡褐色固体。MS m/z 310.1[M+H]⁺。

[0290] 中间体4

[0291] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0292]

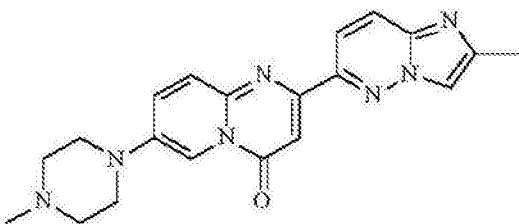


[0293] 向2-氯-7-氟-9-甲基-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(0.98g,4.61mmol,上文中描述的)在ACN(50mL)中的溶液加入2,8-二甲基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)咪唑并[1,2-b]哒嗪(1.51g,5.53mmol,1.2当量,上文中描述的)、Pd(PPh₃)₄(0.32g,0.277mmol,0.06当量)和K₂CO₃的水溶液(4.61mL,9.22mmol,2.0当量)。将混合物除气并在氩气下在100℃加热6小时。将反应冷却至RT,并过滤。将沉淀物用Et₂O和水洗涤,然后在真空中干燥从而提供0.89g(60%)的2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮,为淡褐色固体。MS m/z 324.4[M+H]⁺。

[0294] 实施例1

[0295] 2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0296]

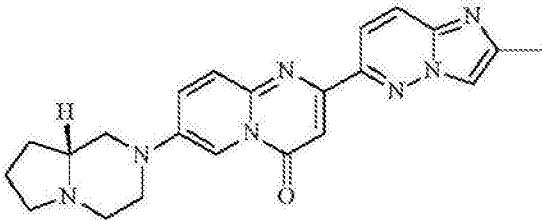


[0297] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;35mg,0.119mmol)和1-甲基哌嗪(47.5mg,0.474mmol,4当量)在DMSO(1mL)中在120℃搅拌过夜。LC-MS显示完全转化。在高真空下除去溶剂。将粗产物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至9/1)从而提供标题产物(25mg,56%),为淡黄色固体。MS m/z 376.3[M+H]⁺。

[0298] 实施例2

[0299] 7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0300]



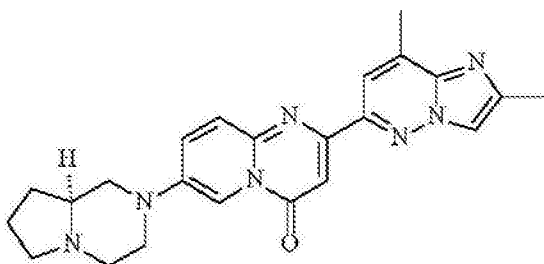
[0301] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;125mg,0.426mmol)和(R)-八氢吡咯并-[1,2-a]吡嗪(160mg,1.27mmol,3当量)在DMSO(5mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=98/2至95/5)从而提供标题产物(65mg,38%),为淡黄色固

体。MS m/z 402.5 $[M+H^+]$ 。

[0302] 实施例3

[0303] 7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0304]

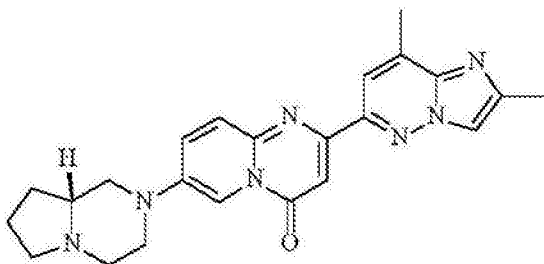


[0305] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;200mg,0.647mmol)和(S)-八氢吡咯并-[1,2-a]吡嗪(286mg,2.26mmol,3.5当量)在DMSO(5mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=98/2至95/5)从而提供标题产物(115mg,43%),为淡黄色固体。MS m/z 416.3 $[M+H^+]$ 。

[0306] 实施例4

[0307] 7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0308]

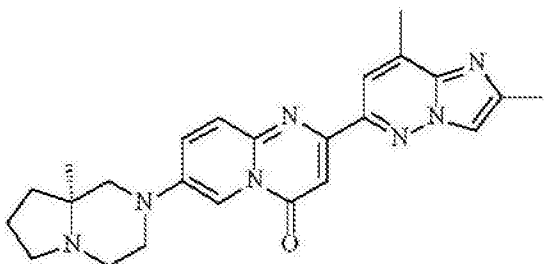


[0309] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;200mg,0.647mmol)、DIPEA(0.113mL,0.67mmol,1当量)和(R)-八氢吡咯并-[1,2-a]吡嗪(245mg,1.95mmol,3.0当量)在DMSO(2.5mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=98/2至95/5)从而提供标题产物(132mg,49%),为淡黄色固体。MS m/z 416.3 $[M+H^+]$ 。

[0310] 实施例5

[0311] 7-[(8aS)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0312]

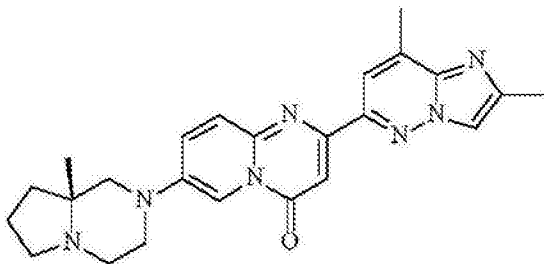


[0313] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;90mg,0.291mmol)、DIPEA(0.05mL,0.29mmol,1当量)和(S)-8a-甲基八氢吡咯并[1,2-a]吡嗪(81mg,0.58mmol,2.0当量)在DMSO(2.5mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(55mg,44%),为淡黄色固体。MS m/z 430.3[M+H⁺]

[0314] 实施例6

[0315] 7-[(8aR)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0316]

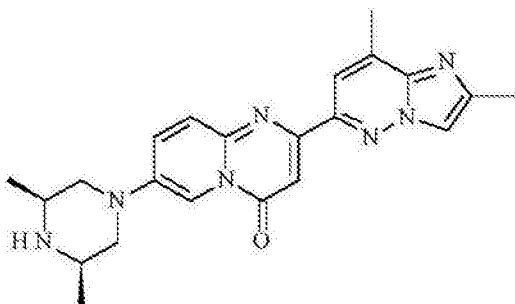


[0317] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;90mg,0.291mmol)、DIPEA(0.05mL,0.29mmol,1当量)和(R)-8a-甲基八氢吡咯并[1,2-a]吡嗪(81mg,0.58mmol,2.0当量)在DMSO(2.5mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(50mg,40%),为淡黄色固体。MS m/z 430.4[M+H⁺]

[0318] 实施例7

[0319] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-7-[(3S,5R)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0320]



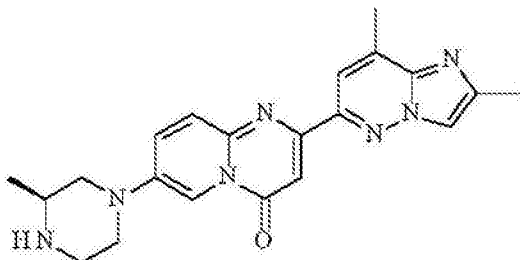
[0321] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;50mg,0.162mmol)和顺式-2,6-二甲基哌嗪(74mg,0.647mmol,4.0当量)在DMSO(1.5mL)中在110℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用

NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(32mg, 49%), 为淡黄色固体。MS m/z 404.4[M+H⁺]

[0322] 实施例8

[0323] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0324]

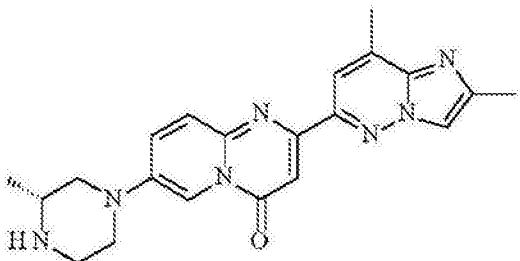


[0325] 在密封管中, 将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2; 33mg, 0.107mmol) 和(S)-2-甲基哌嗪(43mg, 0.427mmol, 4.0当量) 在DMSO(2mL) 中在120℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10) 从而提供标题产物(18mg, 43%), 为淡黄色固体。MS m/z 390.3[M+H⁺]

[0326] 实施例9

[0327] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0328]

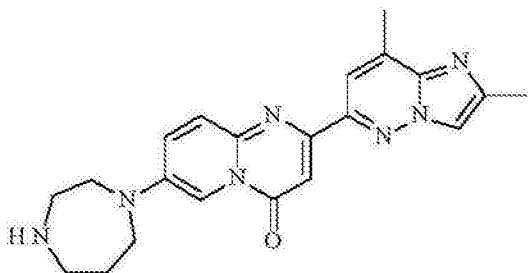


[0329] 在密封管中, 将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2; 85mg, 0.275mmol) 和(R)-2-甲基哌嗪(110mg, 1.10mmol, 4.0当量) 在DMSO(5mL) 中在120℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10) 从而提供标题产物(35mg, 33%), 为淡黄色固体。MS m/z 390.3[M+H⁺]

[0330] 实施例10

[0331] 7-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0332]

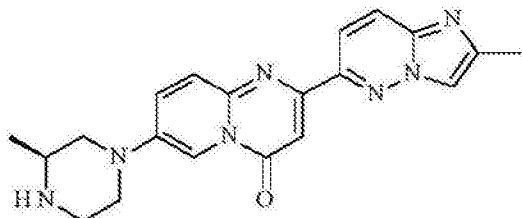


[0333] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]咪唑-4-酮(中间体2;33mg,0.107mmol)和1,4-二氮杂环庚烷(32mg,0.320mmol,3.0当量)在DMSO(2mL)中在120℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(20mg,48%),为淡黄色固体。MS m/z 390.3[M+H⁺]

[0334] 实施例11

[0335] 2-(2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]咪唑-4-酮

[0336]

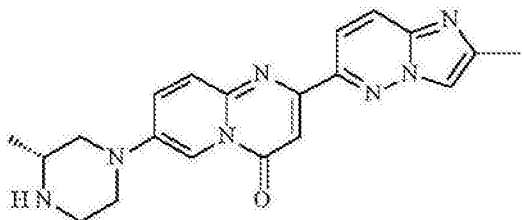


[0337] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]咪唑-4-酮(中间体1;50mg,0.169mmol)和(S)-2-甲基哌嗪(68mg,0.677mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在110℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(40mg,63%),为淡黄色固体。MS m/z 376.2[M+H⁺]

[0338] 实施例12

[0339] 2-(2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]咪唑-4-酮

[0340]



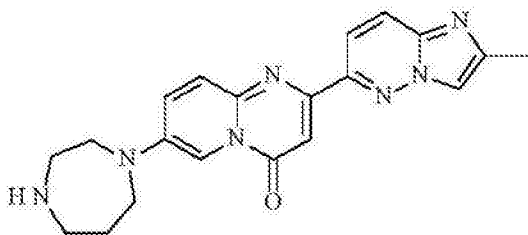
[0341] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]咪唑-4-酮(中间体1;50mg,0.169mmol)和(R)-2-甲基哌嗪(68mg,0.677mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在110℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(48mg,75%),为淡黄色固体。MS m/z

376.3[M+H⁺].

[0342] 实施例13

[0343] 7-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0344]

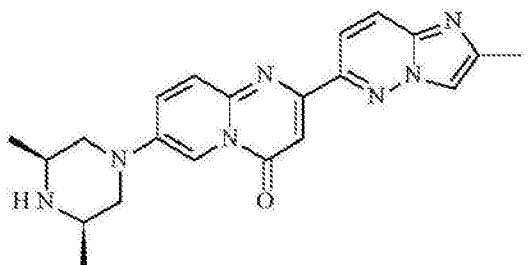


[0345] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;50mg,0.169mmol)和1,4-二氮杂环庚烷(68mg,0.677mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在110℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(41mg,65%),为淡黄色固体。MS m/z 376.2[M+H⁺].

[0346] 实施例14

[0347] 7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0348]

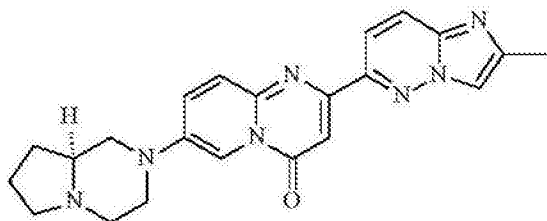


[0349] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;50mg,0.169mmol)和顺式-2,6-二甲基哌嗪(77mg,0.677mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在110℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(41mg,62%),为淡黄色固体。MS m/z 390.3[M+H⁺].

[0350] 实施例15

[0351] 7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-六氢-1H-吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0352]



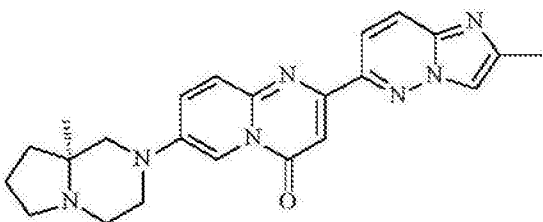
[0353] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]吡嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶

啉-4-酮(中间体1;50mg,0.169mmol)和(S)-八氢吡咯并[1,2-a]吡嗪(85mg,0.677mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(36mg,53%),为淡黄色固体。MS m/z 402.3[M+H⁺]

[0354] 实施例16

[0355] 7-[(8aS)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0356]

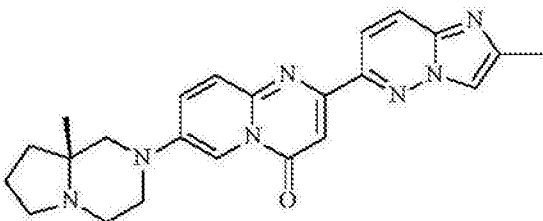


[0357] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;50mg,0.169mmol)和(S)-8a-甲基八氢吡咯并[1,2-a]吡嗪(95mg,0.677mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(45mg,64%),为淡黄色固体。MS m/z 416.3[M+H⁺]

[0358] 实施例17

[0359] 7-[(8aR)-8a-甲基-1,3,4,6,7,8-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0360]

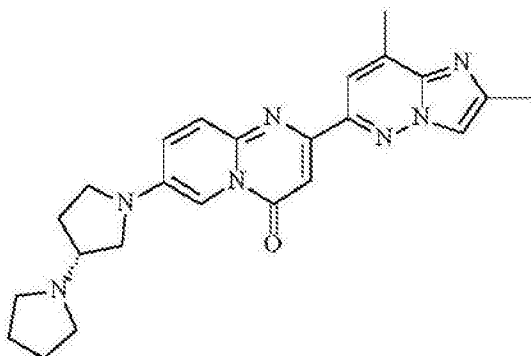


[0361] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;100mg,0.339mmol)和(R)-8a-甲基八氢吡咯并[1,2-a]吡嗪(190mg,1.35mmol,4.0当量)在DMSO(4mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(45mg,64%),为淡黄色固体。MS m/z 416.3[M+H⁺]

[0362] 实施例18

[0363] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0364]

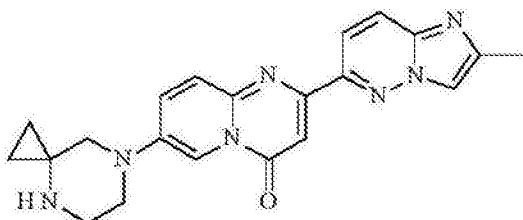


[0365] 在微波反应器中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;45mg,0.145mmol)、(R)-1,3'-联吡咯烷二盐酸盐(62mg,0.291mmol,2.0当量)和DIPEA(0.20mL,1.16mmol,8当量)在NMP(3mL)中在220℃搅拌1小时。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=98/2至90/10)从而提供标题产物(25mg,40%),为淡黄色固体。MS m/z 430.3[M+H⁺]。

[0366] 实施例19

[0367] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0368]

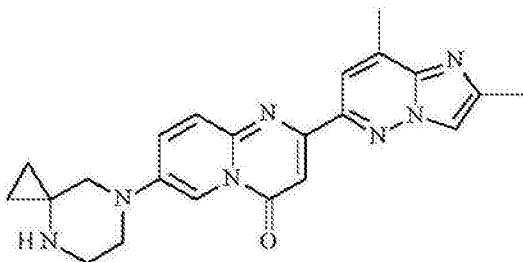


[0369] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;50mg,0.169mmol)、DIPEA(0.24mL,1.35mmol,8当量)和4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷二盐酸盐(62.7mg,0.339mmol,2.0当量)在DMSO(2mL)中在125℃搅拌2天。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(22mg,33%),为淡黄色固体。MS m/z 388.3[M+H⁺]。

[0370] 实施例20

[0371] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0372]

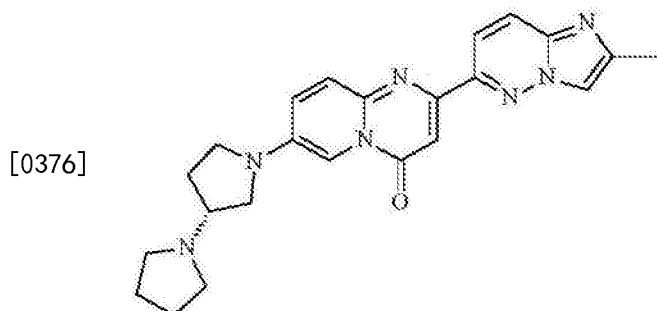


[0373] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;50mg,0.162mmol)、DIPEA(0.22mL,1.29mmol,4当量)和4,7-二氮杂螺

[2.5] 辛烷二盐酸盐 (32mg, 0.320mmol, 3.0当量) 在DMSO (2mL) 中在130℃搅拌48小时。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2至95/5) 从而提供标题产物 (12mg, 18%), 为淡黄色固体。MS m/z 402.3[M+H⁺]

[0374] 实施例21

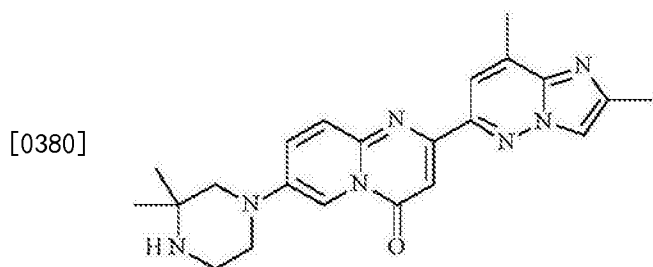
[0375] 2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮



[0377] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;40mg,0.135mmol)、DIPEA(0.19mL,1.08mmol,8当量)和(R)-1,3'-联吡咯烷二盐酸盐(58mg,0.271mmol,2.0当量)在DMSO(4mL)中搅拌并在微波中在220℃加热40分钟。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=98/2至90/10)从而提供标题产物(30mg,53%),为淡黄色固体。MS m/z 416.3[M+H⁺]

[0378] 实施例22

[0379] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

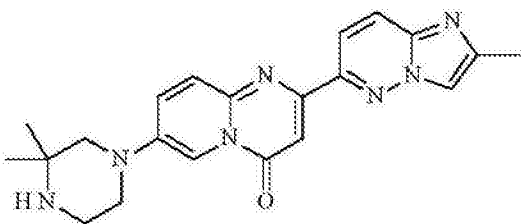


[0381] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;40mg,0.129mmol)和2,2-二甲基哌嗪(59mg,0.517mmol,4.0当量)在DMSO(1.6mL)中在130℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至9/1)从而提供标题产物(29mg,55%),为淡黄色固体。MS m/z 404.3[M+H⁺]

[0382] 实施例23

[0383] 7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0384]

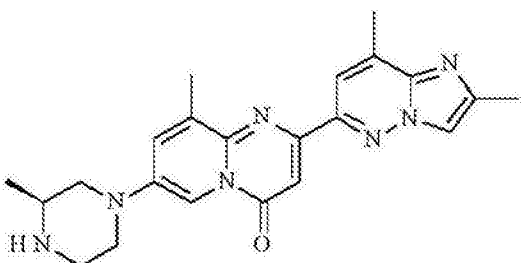


[0385] 在密封管中,将7-氟-2-(2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;40mg,0.135mmol)和2,2-二甲基哌嗪(62mg,0.542mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在130℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(26mg,49%),为淡黄色固体。MS m/z 390.3[M+H⁺]

[0386] 实施例24

[0387] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0388]

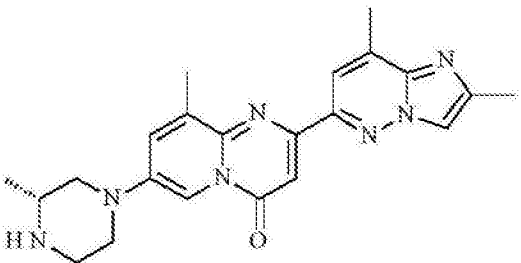


[0389] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体4;50mg,0.155mmol)和(S)-2-甲基哌嗪(62mg,0.619mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(45mg,72%),为淡黄色固体。MS m/z 404.3[M+H⁺]

[0390] 实施例25

[0391] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0392]



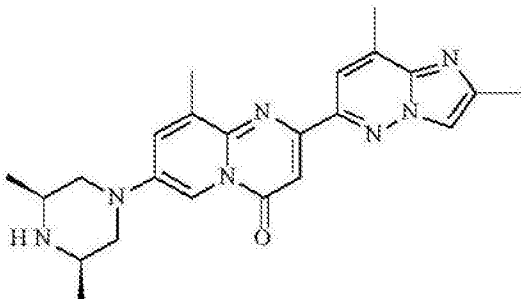
[0393] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体4;50mg,0.155mmol)和(R)-2-甲基哌嗪(62mg,0.619mmol,4.0当量)在DMSO(2mL)中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱

色谱法纯化 ($\text{SiO}_2, \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ 至 $90/10$) 从而提供标题产物 (40mg, 70%), 为淡黄色固体。MS m/z 404.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$ 。

[0394] 实施例26

[0395] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0396]

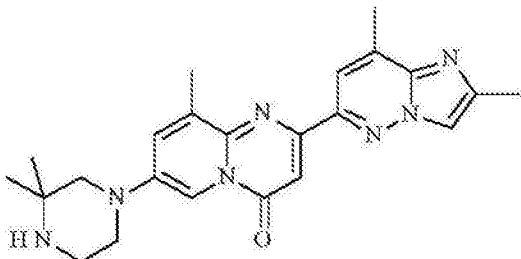


[0397] 在密封管中, 将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体4; 50mg, 0.155mmol) 和顺式-2,6-二甲基哌嗪(70mg, 0.619mmol, 4.0当量) 在DMSO(2mL) 中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于 CH_2Cl_2 中并用 NaHCO_3 的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用 Na_2SO_4 干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化 ($\text{SiO}_2, \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ 至 $90/10$) 从而提供标题产物 (26mg, 40%), 为淡黄色固体。MS m/z 418.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$ 。

[0398] 实施例27

[0399] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0400]

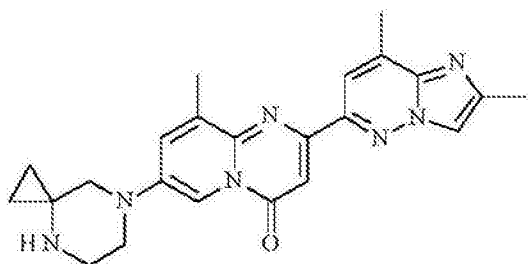


[0401] 在密封管中, 将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体4; 50mg, 0.155mmol) 和2,2-二甲基哌嗪(35mg, 0.309mmol, 2.0当量) 在DMSO(2mL) 中在125℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于 CH_2Cl_2 中并用 NaHCO_3 的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用 Na_2SO_4 干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化 ($\text{SiO}_2, \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ 至 $90/10$) 从而提供标题产物 (36mg, 56%), 为淡黄色固体。MS m/z 418.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$ 。

[0402] 实施例28

[0403] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0404]

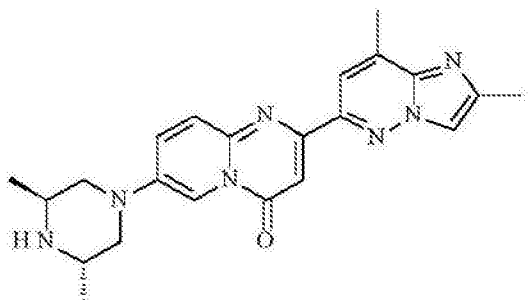


[0405] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]喹啶-6-基)-7-氟-9-甲基-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体4;50mg,0.155mmol)、DIPEA(0.21mL,1.24mmol,8当量)和4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷二盐酸盐(57mg,0.309mmol,2.0当量)在DMSO(2mL)中在125℃搅拌2天。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(17mg,26%),为淡黄色固体。MS m/z 416.3[M+H⁺]。

[0406] 实施例29

[0407] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]喹啶-6-基)-7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0408]

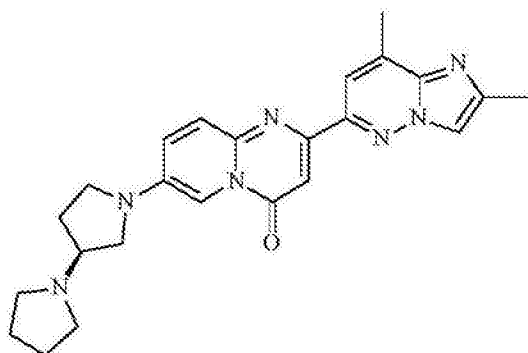


[0409] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]喹啶-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体2;50mg,0.162mmol)、TEA(0.18mL,1.29mmol,8当量)和(2S,6S)-2,6-二甲基哌嗪二盐酸盐(90mg,0.485mmol,3.0当量)在DMSO(2mL)中在140℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至9/1)从而提供标题产物(20mg,30%),为淡黄色固体。MS m/z 404.3[M+H⁺]。

[0410] 实施例30

[0411] 2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]喹啶-6-基)-7-[(3S)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0412]



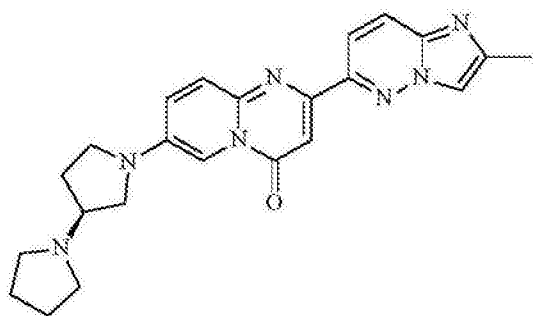
[0413] 在密封管中,将2-(2,8-二甲基咪唑并[1,2-b]喹啶-6-基)-7-氟-吡啶并[1,2-a]

嘧啶-4-酮(中间体2;50mg,0.162mmol)、DIPEA(0.22mL,1.29mmol,8当量)和(S)-1,3'-联吡咯烷二盐酸盐(103mg,0.485mmol,3.0当量)在NMP(2mL)中在140℃搅拌过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至9/1)从而提供标题产物(22mg,32%),为淡黄色固体。MS m/z 430.3[M+H⁺]

[0414] 实施例31

[0415] 2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-吡咯烷-1-基吡咯烷-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0416]

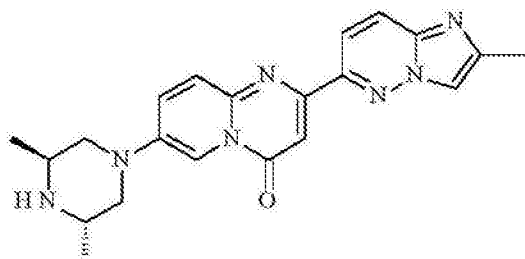


[0417] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;75mg,0.254mmol)、TEA(0.28mL,2.03mmol,8当量)和(S)-1,3'-联吡咯烷二盐酸盐(162mg,0.762mmol,3.0当量)在NMP(4mL)中搅拌并在微波中在220℃加热1小时。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(12mg,11%),为淡黄色固体。MS m/z 416.2[M+H⁺]

[0418] 实施例32

[0419] 7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0420]

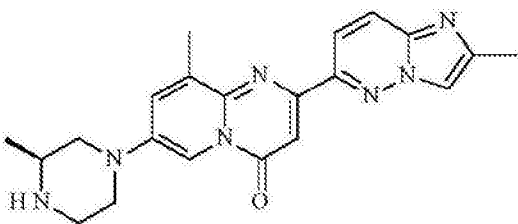


[0421] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;75mg,0.254mmol)、TEA(0.28mL,2.03mmol,8当量)和(2S,6S)-2,6-二甲基哌嗪二盐酸盐(143mg,0.762mmol,3.0当量)在DMSO(3mL)中搅拌并在140℃加热过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(10mg,10%),为淡黄色固体。MS m/z 390.3[M+H⁺]

[0422] 实施例33

[0423] 9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3S)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0424]

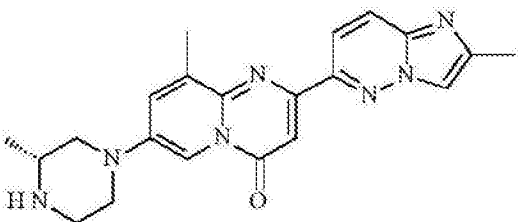


[0425] 在密封管中,将7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]喹啉-4-酮(中间体3;250mg,0.808mmol)和(S)-2-甲基哌嗪(405mg,4.04mmol,5.0当量)在DMSO(6mL)中搅拌并在130℃加热过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至85/15)从而提供标题产物(135mg,43%),为淡黄色固体。MS m/z 390.3[M+H⁺]

[0426] 实施例34

[0427] 9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-7-[(3R)-3-甲基哌嗪-1-基]吡啶并[1,2-a]喹啉-4-酮

[0428]

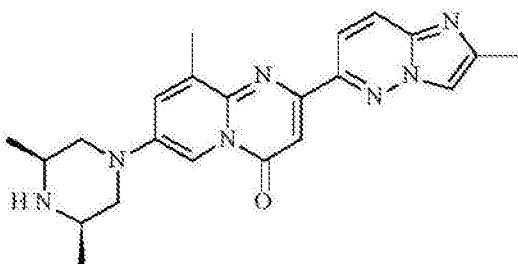


[0429] 在密封管中,将7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]喹啉-4-酮(中间体3;250mg,0.808mmol)和(R)-2-甲基哌嗪(405mg,4.04mmol,5.0当量)在DMSO(6mL)中搅拌并在130℃加热过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至85/15)从而提供标题产物(100mg,32%),为淡黄色固体。MS m/z 390.3[M+H⁺]

[0430] 实施例35

[0431] 7-[(3R,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]喹啉-4-酮

[0432]



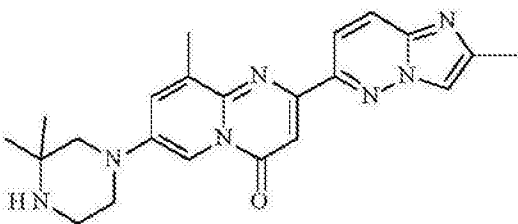
[0433] 在密封管中,将7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]喹啉-4-酮(中间体3;250mg,0.808mmol)和(2S,6R)-2,6-二甲基哌嗪(461mg,4.04mmol,5.0当量)在DMSO(6mL)中搅拌并在130℃加热过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至85/15)从而提供标题产物(101mg,

31%), 为淡黄色固体。MS m/z 404.3 $[M+H]^+$ 。

[0434] 实施例36

[0435] 7-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0436]

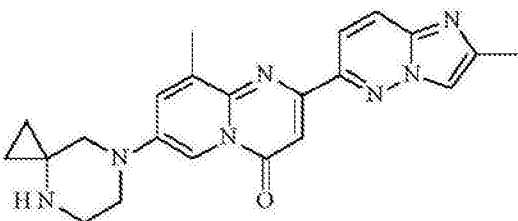


[0437] 在密封管中,将7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体3;250mg,0.808mmol)和2,2-二甲基哌嗪(461mg,4.04mmol,5.0当量)在DMSO(6mL)中搅拌并在130℃加热过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于 CH_2Cl_2 中并用 $NaHCO_3$ 的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用 Na_2SO_4 干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化($SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ 至 $85/15$)从而提供标题产物(120mg,36%),为淡黄色固体。MS m/z 404.3 $[M+H]^+$ 。

[0438] 实施例37

[0439] 7-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0440]

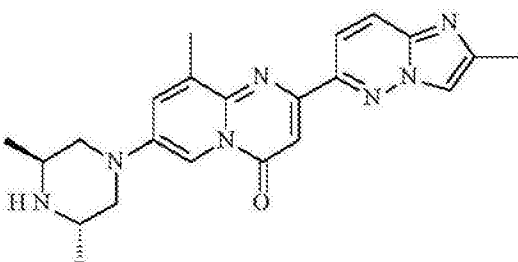


[0441] 在密封管中,将7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体3;125mg,0.404mmol)、 K_2CO_3 (223mg,1.62mmol,4当量)和4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷二盐酸盐(112mg,0.606mmol,1.5当量)在DMA(2mL)中搅拌并在130℃加热过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于 CH_2Cl_2 中并用 $NaHCO_3$ 的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用 Na_2SO_4 干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化($SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ 至 $90/10$)从而提供标题产物(75mg,46%),为淡黄色固体。MS m/z 402.2 $[M+H]^+$ 。

[0442] 实施例38

[0443] 7-[(3S,5S)-3,5-二甲基哌嗪-1-基]-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0444]



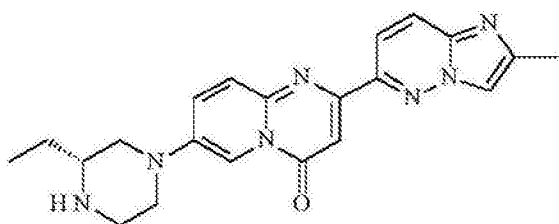
[0445] 在密封管中,将7-氟-9-甲基-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-

a]嘧啶-4-酮(中间体3;125mg,0.404mmol)、K₂CO₃(223mg,1.62mmol,4当量)和(2S,6S)-2,6-二甲基哌嗪二盐酸盐(113mg,0.606mmol,1.5当量)在DMA(2mL)中搅拌并在130℃加热过夜。在高真空下除去溶剂。将剩余物置于CH₂Cl₂中并用NaHCO₃的饱和水溶液洗涤。将有机层分离并用Na₂SO₄干燥并在真空中浓缩。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至90/10)从而提供标题产物(50mg,31%),为淡黄色固体。MS m/z 404.3[M+H⁺]

[0446] 实施例39

[0447] 7-[(3R)-3-乙基哌嗪-1-基]-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮

[0448]



[0449] 在密封管中,将7-氟-2-(2-甲基咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(中间体1;200mg,0.677mmol)、K₂CO₃(374mg,2.71mmol,4当量)和(R)-2-乙基哌嗪二盐酸盐(238mg,0.606mmol,1.5当量)在DMA(3mL)中在100℃搅拌4天。在高真空下除去溶剂。将粗制物通过柱色谱法纯化(SiO₂,CH₂Cl₂/MeOH=95/5至8/2)从而提供标题产物(168mg,64%),为淡黄色固体。MS m/z 390.2[M+H⁺]

[0450] 生物学测定

[0451] 为了更详细地描述并且有助于理解本说明书,提供以下非限制性生物学实施例以更全面地说明说明书的范围并且其不被视为具体地限定其范围。现在已知的或可以之后开发的本说明书的此种变化(其将在本领域技术人员确定的范围内)被认为落在本说明书的和如下文所要求保护的范围内。这些实施例举例说明了本文所述的某些化合物的体外和/体内测试并且证明了所述化合物通过增强SMN2的外显子7包含在由SMN2基因转录的mRNA中来治疗SMA的有用性。式(I)的化合物增强SMN2的外显子7包含在由SMN2基因转录的mRNA中并且提高了由SMN2基因产生的SMN蛋白的水平,并且因此可以用于治疗有此需要的人受试者中的SMA。这些实施例还举例说明了本文所述的某些化合物的体外和/体内测试并且证明了所述化合物增强SMN1的外显子7包含在由SMN1基因转录的mRNA中的有用性。因此,式(I)的化合物还增强了SMN1的外显子7包含在由SMN1基因转录的mRNA中并且提高由SMN1基因产生的SMN蛋白的水平。

[0452] 测定1

[0453] 培养细胞中的SMN2小基因mRNA剪接RT-qPCR测定

[0454] 将基于反转录-定量PCR(RT-qPCR)的测定用于量化含有SMN2外显子7的全长SMN2小基因(本文中被称为术语“FL SMN2mini”)mRNA在稳定转染有所述小基因并用测试化合物处理的HEK293H细胞系中的水平。使用的材料及各自来源列在下表1中。

[0455]

材料	来源
HEK293H 细胞	Life Technologies, Inc. (之前的 Invitrogen) 目录号 11631-017
Cells-To-Ct 裂解缓冲液	Life Technologies, Inc. (之前的 Applied Biosystems) 零件号 4399002

[0456]

DMEM	Life Technologies, Inc. (之前的 Invitrogen) 目录号 11960-044
96 孔平底板	Becton Dickinson 目录号 353072
RT-PCR 酶混合物	Life Technologies, Inc. (之前的 Applied Biosystems) 零件号 4388520
RT-PCR 缓冲液	Life Technologies, Inc. (之前的 Applied Biosystems) 零件号 4388519
AgPath-ID 一步式 RT-PCR 试剂盒	Life Technologies, Inc. (之前的 Applied Biosystems) 零件号 4387391
热循环仪	Life Technologies, Inc. (之前的 Applied Biosystems) 7900HT

[0457] 表1. 培养的细胞中的SMN2小基因mRNA剪接RT-qPCR测定中使用的材料及其各自来源。

[0458] 制备SMN2-A小基因构建体, 如在国际专利申请W02009/151546A1第145页第[00400]段至第147页第[00412]段中所述(包括其中的图1和图3)。

[0459] 将稳定转染有SMN2-A小基因构建体的HEK293H细胞(10,000个细胞/孔)接种在96孔平底板中的200 μ L细胞培养基(DMEM加上10%FBS以及200 μ g/mL潮霉素)中,并将所述平板立即涡旋以保证细胞适当的分散并且形成均匀细胞单层。允许细胞附着达6小时。将测试化合物在100%DMSO中连续稀释3.16倍以产生7个点的浓度曲线。将测试化合物的溶液(1 μ L, 200x, 在DMSO中)添加到各个包含细胞的孔中并将平板在细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 100%相对湿度)中温育24小时。为每个测试化合物浓度制备2个重复试样。然后将细胞在Cells-To-Ct裂解缓冲液中裂解并将溶解产物存储在-80 $^{\circ}$ C。

[0460] 使用W02014/209841A2第80页表1中指示的引物和探针来量化全长SMN2-A小基因和GAPDH mRNA。引物SMN正向A (SEQ ID NO.1) 杂交至外显子7中的核苷酸序列(核苷酸22至核苷酸40), 引物SMN反向A (SEQ ID NO.2) 杂交至萤火虫荧光素酶的编码序列中的核苷酸序列, SMN探针A (SEQ ID NO.3) 杂交至以下中的核苷酸序列: 外显子7(核苷酸50至核苷酸54)

和外显子8(核苷酸1至核苷酸21)。这三种寡核苷酸的组合只检测SMN1或SMN2小基因(RT-qPCR)而不检测内源的SMN1或SMN2基因。

[0461] 以0.4 μ M的终浓度使用SMN正向和反向引物。以0.15 μ M的终浓度使用SMN探针。以0.2 μ M的终浓度使用GAPDH引物并且以0.15 μ M的终浓度使用探针。

[0462] 通过将以下各项组合来制备SMN2-小基因GAPDH混合物(15 μ L总体积):7.5 μ L的2x RT-PCR缓冲液,0.4 μ L的25x RT-PCR酶混合物,0.75 μ L的20x GAPDH引物-探针混合物,4.0075 μ L的水,2 μ L的10倍稀释的细胞溶解产物,0.06 μ L的100 μ M SMN正向引物,0.06 μ L的100 μ M SMN反向引物,和0.225 μ L的100 μ M SMN探针。

[0463] 在以下温度进行PCR达指定的时间:步骤1:48 $^{\circ}$ C(15min);步骤2:95 $^{\circ}$ C(10min);步骤3:95 $^{\circ}$ C(15sec);步骤4:60 $^{\circ}$ C(1min);然后重复步骤3和4达总计40个循环。

[0464] 各反应混合物包含SMN2-A小基因和GAPDH引物/探针组(多重设计)两者,允许同时测量两种转录物的水平。

[0465] 使用改进的 $\Delta\Delta$ Ct方法(如在Livak和Schmittgen,Methods,2001,25:402-8中所述),由实时PCR数据确定相对于用载体对照处理的细胞的FL SMN2mini mRNA的丰度的增加。扩增效率E计算自单独对于FL SMN2mini和GAPDH的扩增曲线的斜率。然后,FL SMN2mini和GAPDH mRNA的丰度计算为 $(1+E)^{-Ct}$,其中Ct是各扩增子的阈值。将FL SMN2mini mRNA的丰度相对于GAPDH mRNA丰度进行归一化。然后将来自用测试化合物处理的样品的归一化的FL SMN2mini mRNA丰度除以来自用载体处理的细胞的归一化的FL SMN2mini mRNA丰度,以确定相对于载体对照的FL SMN2mini mRNA的水平。

[0466] 表2提供了针对全长SMN2小基因mRNA生产的EC_{1.5x}浓度,其获自根据以上程序对于本发明的具体化合物生成的7点浓度数据。

[0467] 本发明的具体化合物显示 $\leq 1\mu$ M的针对全长SMN2小基因mRNA生产的EC_{1.5x}浓度。

[0468] 更特别的本发明的化合物显示 $\leq 0.1\mu$ M的针对全长SMN2小基因mRNA生产的EC_{1.5x}浓度。

[0469] 最特别的本发明的化合物显示 $\leq 0.02\mu$ M的针对全长SMN2小基因mRNA生产的EC_{1.5x}浓度。

[0470]

实施例	EC _{1.5x} 小基因 (nM)	实施例	EC _{1.5x} 小基因 (nM)	实施例	EC _{1.5x} 小基因 (nM)
1	3.5	14	4.1	27	39.9
2	3.8	15	4	28	5
3	3.2	16	1.1	29	0.3
4	1.8	17	6.4	30	3
5	0.6	18	3.6	31	6.7
6	2.8	19	10.2	32	1.6
7	3.7	20	4.3	33	0.5
8	0.3	21	9.6	34	0.9
9	0.1	22	0.9	35	4.7
10	6.4	23	3.4	36	5
11	1.4	24	0.4	37	4.4
12	1.2	25	0.5	38	0.3
13	5	26	327	39	0.9

[0471] 表2. 针对全长SMN2小基因mRNA生产的EC_{1.5x}浓度。

[0472] 测定2

[0473] 培养的细胞中的SMN蛋白测定

[0474] 将SMN HTRF (均相时间分辨荧光) 测定用于量化用测试化合物处理的SMA患者成纤维细胞中的SMN蛋白的水平。使用的材料及各自来源列在下表3中。

[0475]

材料	来源
1 型 SMA 人细胞	GM03813 (Coriell Institute)
蛋白酶抑制剂混合物	Roche Applied Science 目录号 11836145001
抗-SMN d2	Blue cap Cisbio 目录号 63IDC002-SMN
抗-SMN kryptate	Red cap Cisbio 目录号 63IDC002-SMN
SMN 重构缓冲液	Cisbio 目录号 63IDC002-SMN-缓冲液
DMEM	Life Technologies (之前的 Invitrogen) 目录号 11960-044
RIPA 裂解缓冲液	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Thermo Scientific NP-40 Surfact-Amps 去垢剂溶液(Fisher Scientific, Pittsburgh/PA), 1% 脱氧胆酸钠
稀释缓冲液	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl
Envision 平板读数器	Perkin Elmer Model # 2103

[0476] 表3. 培养的细胞中的SMN蛋白测定中使用的材料及其来源。

[0477] 将细胞解冻并在DMEM-10%FBS中培养72小时。将细胞胰蛋白酶化,计数并重悬在DMEM-10%FBS中至25,000个细胞/mL的浓度。将细胞悬浮液以5,000个细胞/孔铺板于96孔微滴定平板中并且温育3至5小时。将测试化合物在100%DMSO中连续稀释3.16倍以生成7个点的浓度曲线。将1 μ L的测试化合物溶液转移至含细胞的孔中并将细胞在细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 100%相对湿度)中温育48小时。为每个测试化合物浓度设置三份重复样品。48小时后,将上清自孔中取出并将含有蛋白酶抑制剂的25 μ L的RIPA裂解缓冲液添加到孔中并在摇动的情况下在室温温育1小时。加入25 μ L的稀释剂,然后将35 μ L所得的溶胞产物转移至384孔板,其中每个孔含有5 μ L的抗体溶液(抗-SMN d2和抗-SMN kryptate在SMN重构缓冲液中的1:100稀释液)。将所述平板离心1分钟以使溶液来到孔的底部,然后在室温温育过夜。在EnVision多标记平板读数计(Perkin-Elmer)上测量平板的各个孔在665nm和620nm的荧光。

[0478] 通过用在665nm的信号除以在620nm的信号来计算每个样品、空白和载体对照孔的归一化的荧光信号。归一化信号解决了由于溶胞产物的基体效应(matrix effect)所致的可能的荧光猝灭。各样品孔的 ΔF 值(作为百分比值的SMN蛋白丰度的量度)通过以下方式计算:从各样品孔的归一化的荧光减去空白对照孔的归一化的平均荧光,然后用该差值除以空白对照孔的归一化的平均荧光,并将所得的值乘以100。各样品孔的 ΔF 值表示来自用测试化合物处理的样品的SMN蛋白丰度。将各样品孔的 ΔF 值除以载体对照孔的 ΔF 值以计算相对于载体对照的SMN蛋白丰度的倍数增加。表4提供了关于SMN蛋白表达的EC_{1.5x}浓度,其

获自根据以上程序关于本发明的具体化合物生成的7点浓度数据。

[0479] 本发明的具体化合物显示 $\leq 1\mu\text{M}$ 的针对SMN蛋白表达的 $\text{EC}_{1.5x}$ 浓度。

[0480] 更特别的本发明的化合物显示 $\leq 100\text{nM}$ 的针对SMN蛋白表达的 $\text{EC}_{1.5x}$ 浓度。

[0481] 最特别的本发明的化合物显示 $\leq 30\text{nM}$ 的针对SMN蛋白表达的 $\text{EC}_{1.5x}$ 浓度。

[0482] 表5提供了SMN蛋白的最大倍数增加,其获自根据以上程序关于本发明的具体化合物生成的7点浓度数据。

[0483] 本发明的具体化合物显示 >1.5 的最大倍数增加。

[0484] 更特别的本发明的化合物显示 >1.7 的最大倍数增加。

[0485] 最特别的本发明的化合物显示 >1.8 的最大倍数增加。

[0486]

实施例	$\text{EC}_{1.5x}$ SMN 蛋白 (nM)	实施例	$\text{EC}_{1.5x}$ SMN 蛋白 (nM)	实施例	$\text{EC}_{1.5x}$ SMN 蛋 白(nM)
1	10.8	14	17.6	27	126.5
2	19.8	15	21.2	28	49.7
3	25.6	16	3	29	2.1
4	15.7	17	20.2	30	13.6
5	4.1	18	25	31	27.7
6	11	19	29.8	32	4
7	15.5	20	37	33	4
8	5.9	21	68.7	34	4.4
9	2.5	22	13.8	35	19.5
10	22.8	23	23.9	36	34.4
11	7	24	4.7	37	45
12	7.5	25	11.9	38	3.1
13	3	26	1230	39	15.8

[0487] 表4.关于SMN蛋白表达的 $\text{EC}_{1.5x}$ 浓度。

[0488]

实施例	最大倍数增加	实施例	最大倍数增加	实施例	最大倍数增加
1	1.84	14	1.86	27	1.57
2	1.76	15	1.94	28	1.72
3	1.81	16	1.83	29	1.81
4	1.76	17	1.98	30	1.84
5	1.71	18	1.75	31	1.65
6	1.84	19	1.83	32	1.88
7	1.76	20	1.72	33	1.82
8	1.85	21	1.54	34	1.89
9	1.92	22	1.69	35	1.79
10	1.95	23	1.63	36	1.77
11	1.9	24	1.77	37	1.87
12	1.77	25	1.79	38	1.85
13	1.91	26	1.52	39	1.81

[0489] 表5.SMN蛋白的最大倍数增加。