



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104144931 B

(45)授权公告日 2018.04.10

(21)申请号 201380007006.5

(22)申请日 2013.01.25

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104144931 A

(43)申请公布日 2014.11.12

(30)优先权数据
61/591,521 2012.01.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.07.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2013/050052 2013.01.25

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/110198 EN 2013.08.01

(73)专利权人 蒙特利尔大学
地址 加拿大魁北克

(72)发明人 居伊·索瓦若 伊夫·加鲁
瑞金·鲁埃尔
斯特凡娜·金格拉斯
伊曼·法里斯

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 余刚 张英

(51)Int.Cl.
C07D 487/04(2006.01)
A61K 31/519(2006.01)
A61K 31/5377(2006.01)
A61K 35/12(2015.01)
A61P 7/00(2006.01)
C12N 5/0789(2010.01)

(56)对比文件
WO 03037898 A1,2003.05.08,摘要,权利要求1,10-11,说明书第41-43页具体化合物7-11,第45页化合物1-2,第47-51页TABLE1中32个具体化合物.

WO 2009004329 A1,2009.01.08,说明书第45页表格化合物2-1至2-6,化合物3-1和6-1.

WO 2008079965 A1,2008.07.03,全文.(续)

审查员 刘健颖

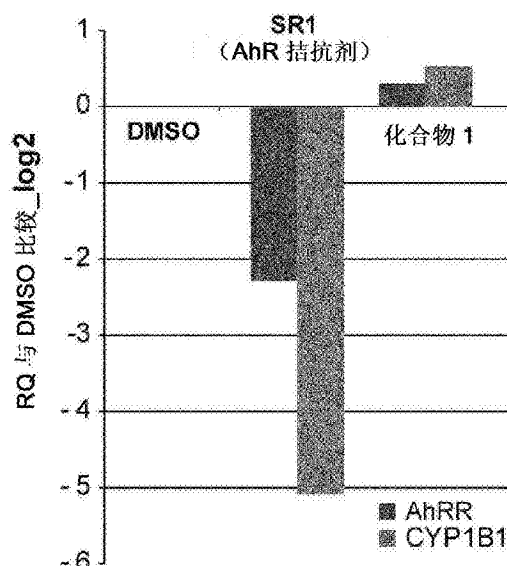
权利要求书15页 说明书59页 附图7页

(54)发明名称

嘧啶并[4,5-b]吡啶衍生物及其在造血干细胞的扩增中的应用

(57)摘要

提供了嘧啶并[4,5-b]吡啶衍生物。这些化合物可用于扩增造血干细胞群,特别是人类造血干细胞群。所述化合物也可用于涉及造血干细胞的疾病的药物治疗中。



CN 104144931 B

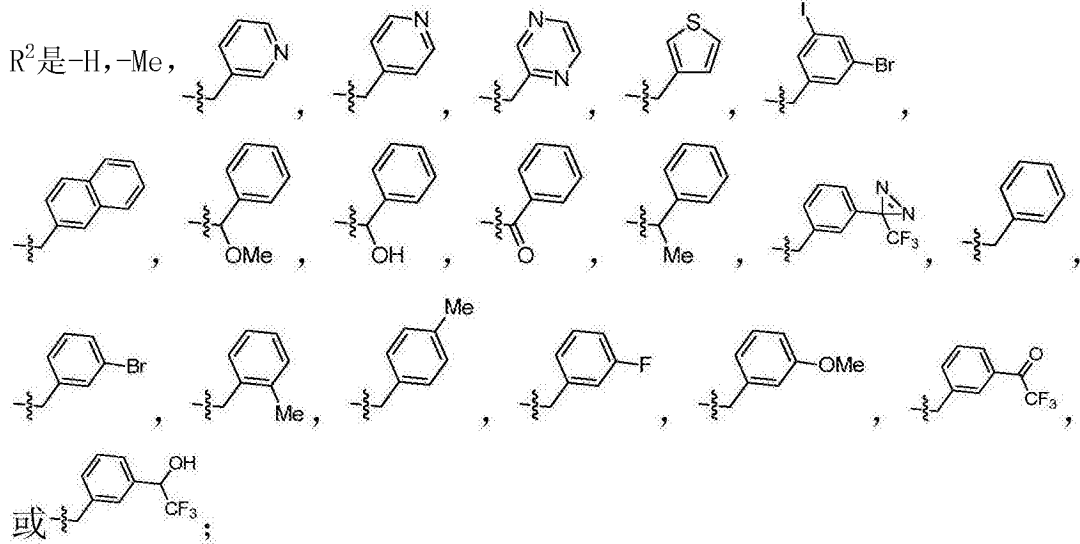
[转续页]

[接上页]

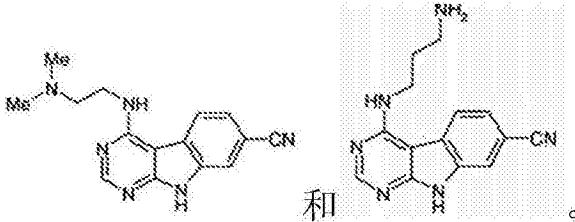
(56)对比文件

John C. Reader等.Structure-Guided Evolution of Potent and Selective CHK1 Inhibitors through Scaffold Morphing.《Journal of medicinal chemistry》.2011,第54卷第8328-8342页.

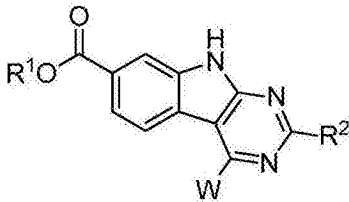
Yue-Mei Zhang等.Synthesis of pyrimido [4,5-b]indoles and benzo[4,5]furo[2,3-d] pyrimidines via palladium-catalyzed intramolecular arylation.《Tetrahedron letters》.2002,第43卷第8235-8239页.



条件是所述通式II的化合物不是



2. 一种式IIA的化合物

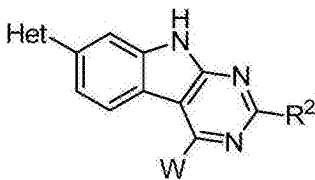


IIA

或其盐,

其中R¹是Me或Et并且W和R²各自是根据权利要求1中所限定的。

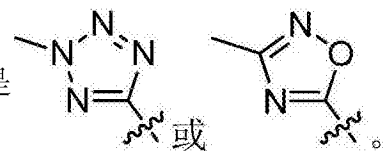
3. 一种通式IIB的化合物



IIB

或其盐,

其中W和R²各自是根据权利要求1中所限定的,并且Het是



4. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物,其中,R²是苄基。

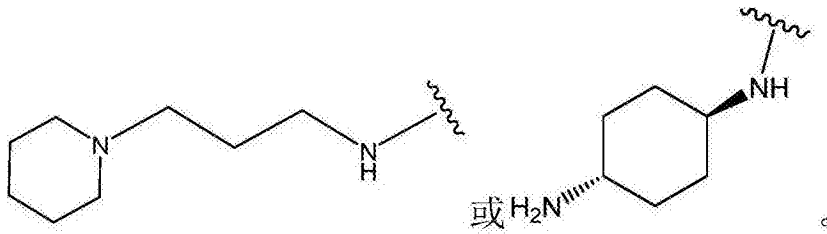
5. 根据权利要求1所述的化合物,其中:

Z是CO₂Me或2-甲基-2H-四唑-5-基;

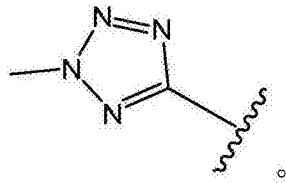
R²是苄基或H。

6. 根据权利要求5所述的化合物,其中,R²是H。

7. 根据权利要求5所述的化合物,其中,W是



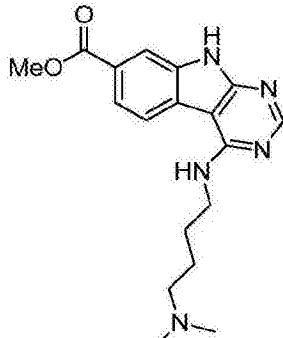
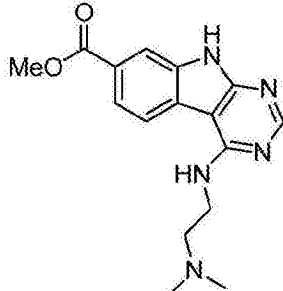
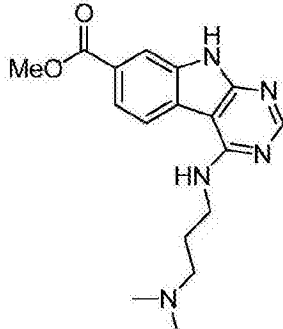
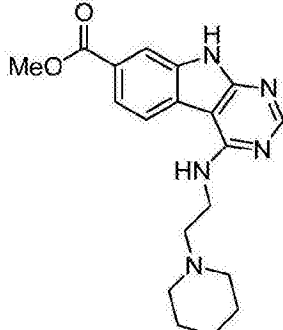
8. 根据权利要求7所述的化合物,其中,Z是

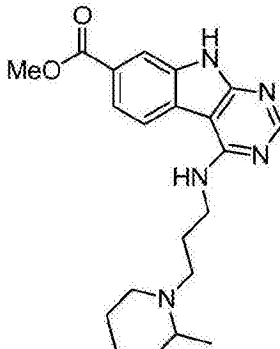
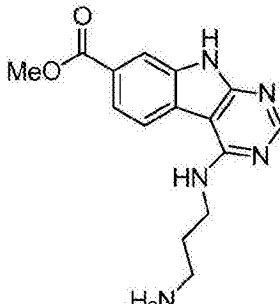
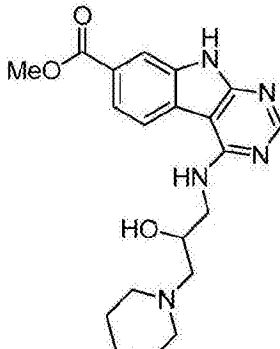
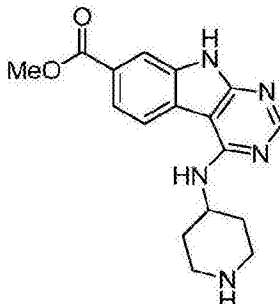


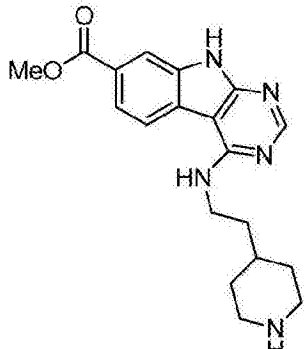
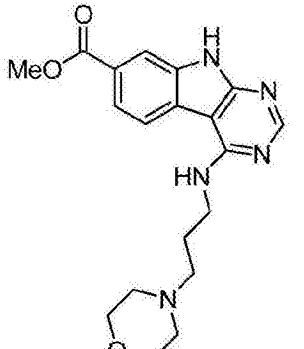
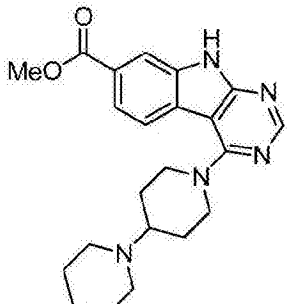
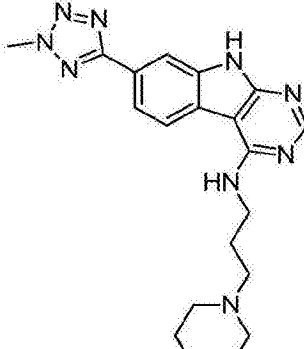
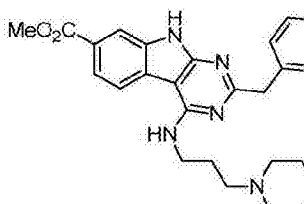
9. 根据权利要求8所述的化合物,其中,R²是H。

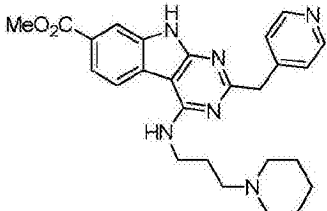
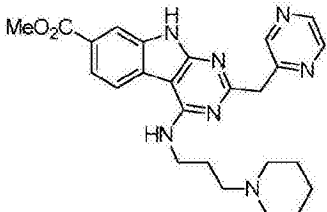
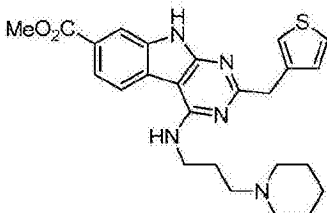
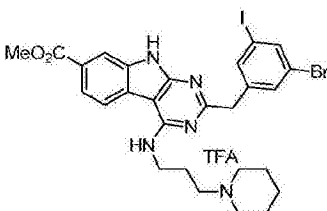
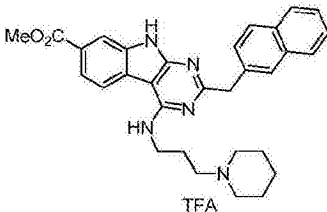
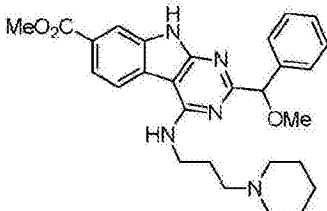
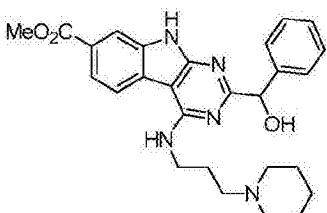
10. 一种化合物,所述化合物是:

化合物号码	结构
1	
2	

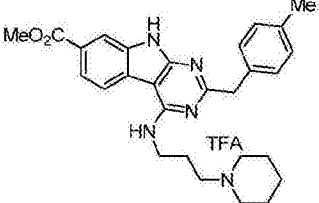
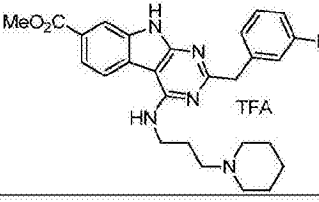
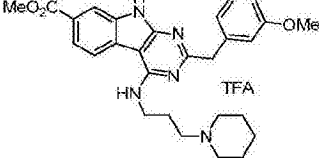
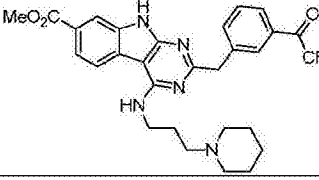
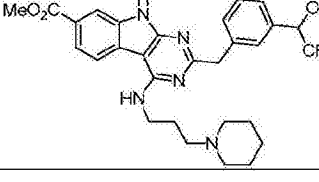
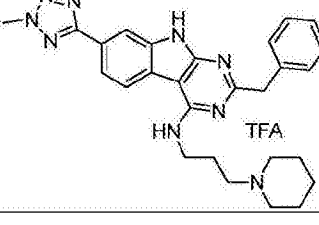
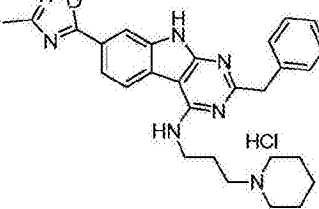
<p>3</p>	
<p>4</p>	
<p>5</p>	
<p>6</p>	

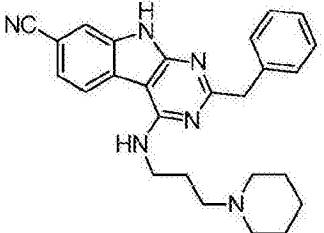
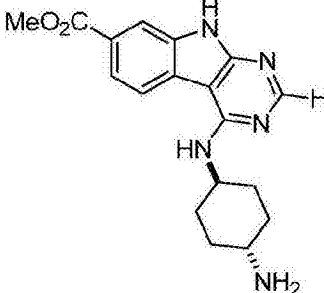
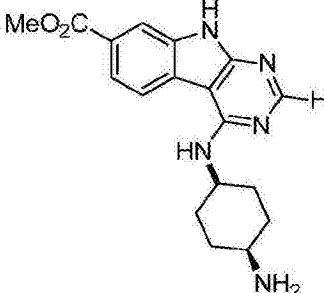
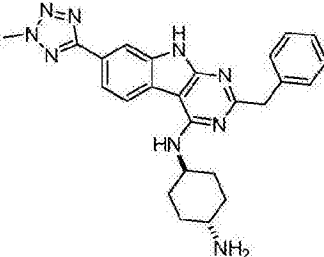
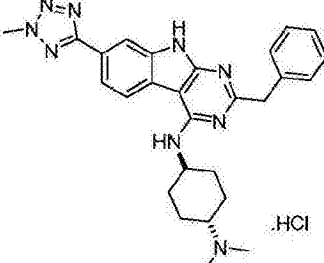
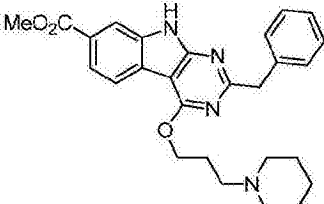
<p>7</p>	
<p>8</p>	
<p>9</p>	
<p>10</p>	

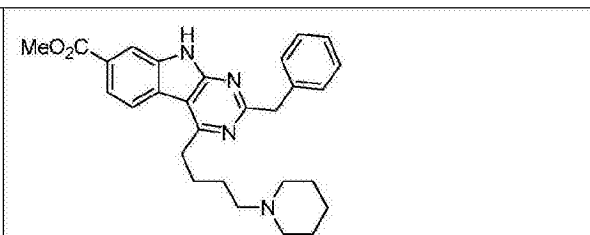
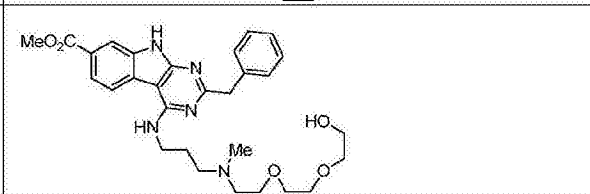
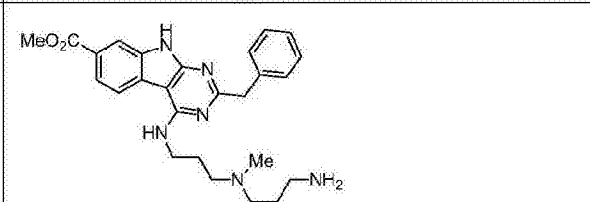
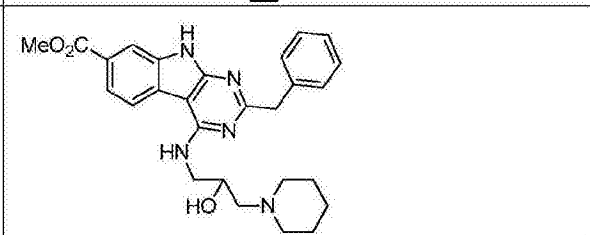
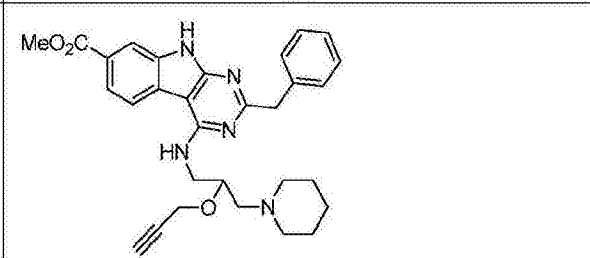
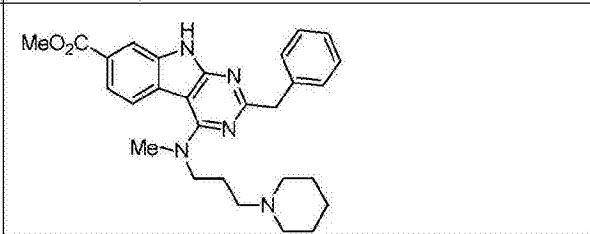
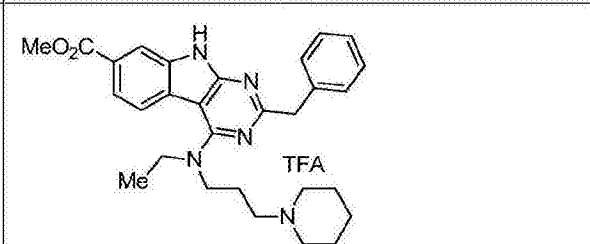
11	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3CCCN4CCCCC4</chem>
12	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3CCCN4CCOCC4</chem>
13	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3N4CCCCC4N5CCCCC5</chem>
14	 <chem>C1=NC2=NC(=N1)C=C2c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3CCCN4CCCCC4</chem>
15	 <chem>ClC(Cl)c1ccc2c(c1)c3c[nH]c2N3Cc4cccnc4CCCN5CCCCC5</chem>

16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	

23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	

30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	

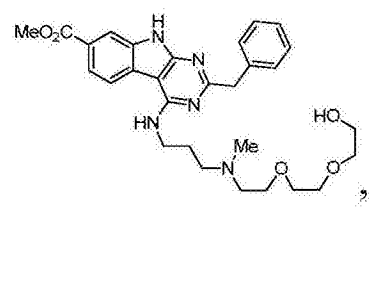
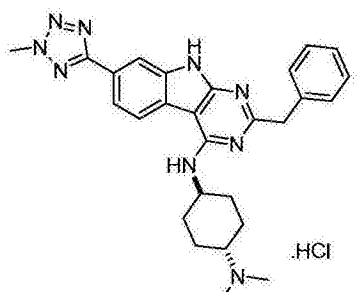
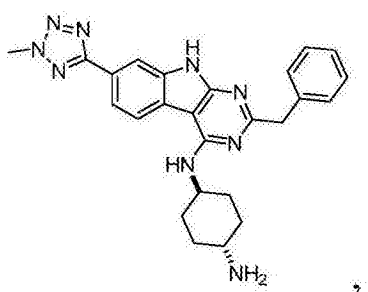
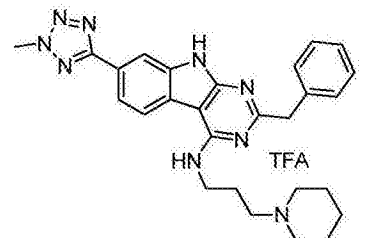
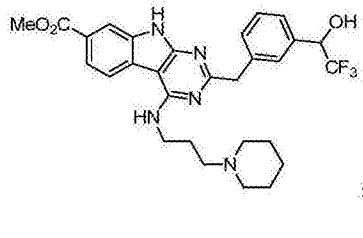
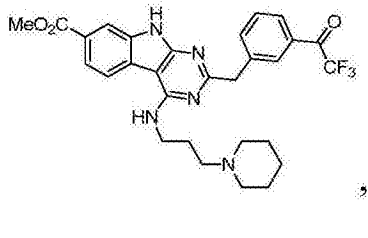
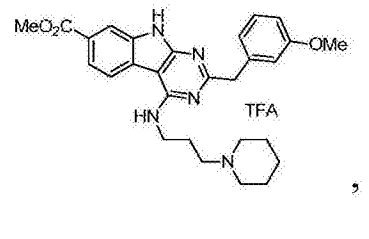
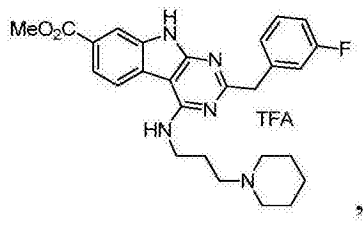
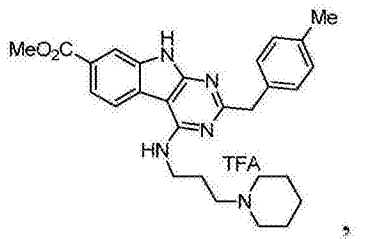
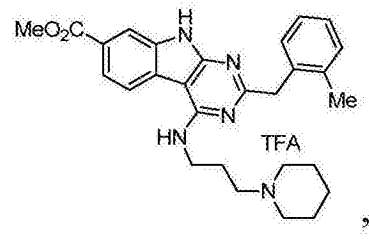
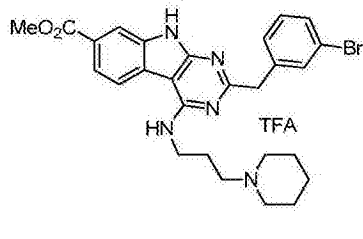
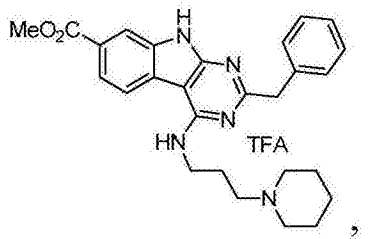
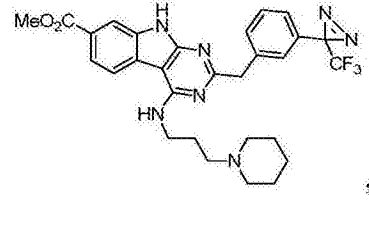
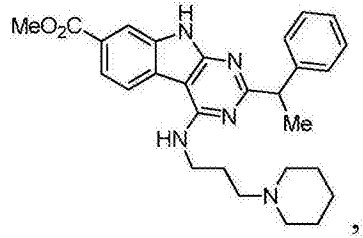
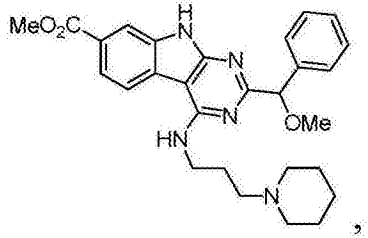
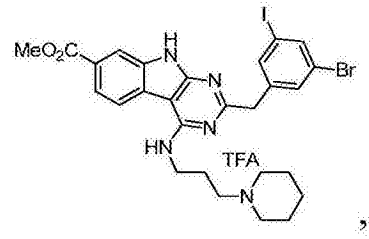
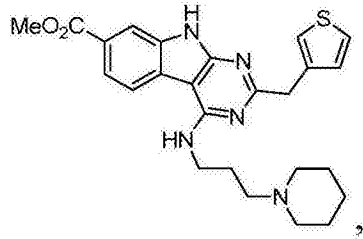
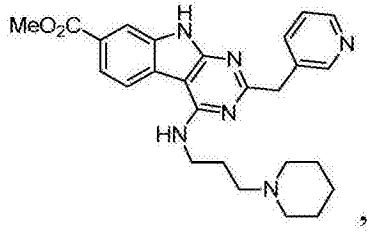
37	
38	
39	
40	
41	
42	

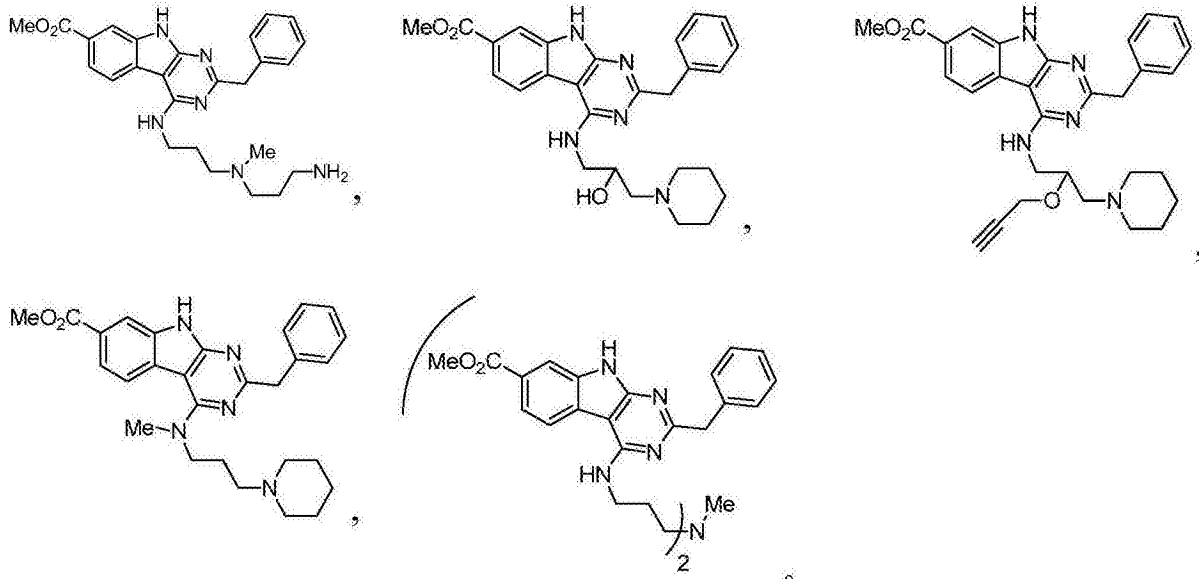
43	
44	
45	
46	
47	
48	
49	

50	
51	
52	
53	
54	
55	

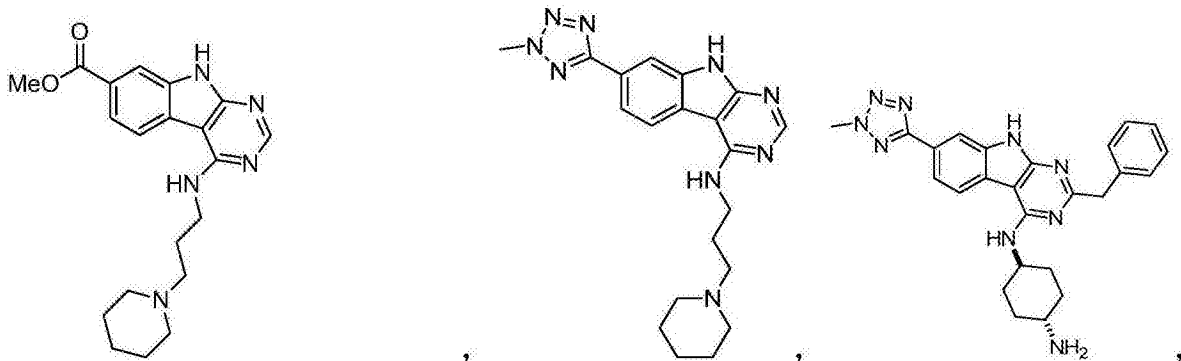
或化合物1-18的盐、化合物21-25的盐、化合物33-34的盐、化合物37-40的盐、化合物42-48的盐和化合物50-55的盐。

11. 一种化合物, 所述化合物是:





12. 一种化合物,所述化合物是:



或其盐。

13. 一种包括根据权利要求1至12的任一项中所限定的化合物或其盐、和药用载体的药物组合物。

14. 包括根据权利要求1至12的任一项中所限定的化合物或其盐的试剂在制备用于增加干细胞和/或祖细胞的药物中的应用,其中体外或离体地使起始细胞群体与所述试剂接触。

15. 根据权利要求14所述的应用,所述应用是离体的。

16. 根据权利要求14或15所述的应用,包括使所述起始细胞群体与至少一种细胞扩增因子接触。

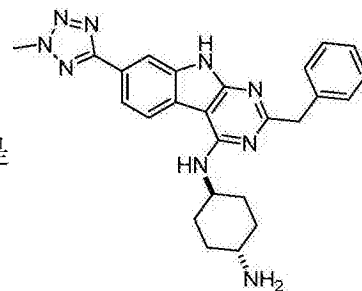
17. 根据权利要求14或15所述的应用,其中,起始细胞群体包含从动员的外周血 (mPB)、骨髓 (BM) 或脐带血 (UCB) 收获的CD34+细胞。

18. 至少一种根据权利要求1至12的任一项中所限定的化合物或其盐可选地与至少一种细胞扩增因子一起在制备用于扩增造血干细胞的药物中的应用,其中在至少一种所述化合物或其盐的存在下,体外或离体地培养起始细胞群体。

19. 根据权利要求13所述的药物组合物,所述药物组合物适合于静脉内注射。

20. 一种用于增加干细胞和/或祖细胞的试剂盒,包括根据权利要求1至12的任一项中所限定的化合物或其盐和使用说明书。

21. 一种用于扩增造血干细胞的试剂盒,包括根据权利要求1至12的任一项中所限定的化合物或其盐和使用说明书,可选地,所述试剂盒包括至少一种细胞扩增因子。



22. 根据权利要求12所述的化合物,其中,所述化合物的盐是

的氢溴酸盐。

23. 根据权利要求14或18所述的应用,其中,所述起始细胞群体由一个或两个脐带血单元纯化的CD34+细胞组成。

24. 根据权利要求23所述的应用,其中,在所述化合物存在下,将所述起始细胞群体培养2天至21天。

25. 根据权利要求14或18所述的应用,给予所述起始细胞群体在1nM和3000nM之间的浓度的所述化合物。

26. 根据权利要求16或18所述的应用,其中,所述细胞扩增因子是白细胞介素-3 (IL-3)、粒巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、促血小板生成素 (TPO)、FMS样酪氨酸激酶3配体 (FLT3-L)、干细胞因子 (SCF)、白细胞介素-6 (IL-6) 或它们的组合。

27. 根据权利要求26所述的应用,其中,所述细胞扩增因子是SCF、FLT3-L、TPO、IL-6或它们的组合。

28. 根据权利要求18所述的应用,其中,所述至少一种细胞扩增因子是StemRegenin 1 (SR1)。

嘧啶并[4,5-b]吡啶衍生物及其在造血干细胞的扩增中的应用

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求2012年1月27日提交的美国临时申请号61/591,521的优先权利益。将该申请的全部内容结合于此以供参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及嘧啶并[4,5-b]吡啶衍生物。并且,本发明涉及嘧啶并[4,5-b]吡啶衍生物用于扩增造血干细胞的应用。此外,本发明涉及包含造血干细胞的疾病的治疗。

背景技术

[0004] 造血干细胞(HSC)的主要来源是骨髓和脐带血(UCB)。HSC被用于移植位点(自体的或同种异体的),其构成用于实现患者的治愈的最有效的治疗策略之一,所述患者患有恶性血液病、骨髓衰竭性贫血(bone marrow failure conditions)、多种全球性关心的先天性疾病(例如,镰刀状细胞贫血症和地中海贫血)和自身免疫疾病如狼疮。然而,由于不能充分地离体扩大这些细胞,使程序安全和成功,这种救命的或生命-改进的治疗的机会不可用于在世界各地成千上万的人。更具体地,因为没有发现人类白细胞抗原(HLA)完全相同的捐赠者,对于每3个患者,一个将放弃移植的机会。另外部分的患者将不可以简单地获得移植,因为太少的HSC可供成功的移植的嫁接(也就是,脐带血或自体的)使用。骨髓移植的安全和有效性直接地取决于HSC的数目和可用于嫁接的祖细胞。可注入的越多,血液系统恢复的更迅速,并且由于粒细胞的缺少的感染的危险的窗口或由于血小板的缺少的出血的危险的窗口更小。提供足够的HSC的挑战进一步升级,其中如在主要的遗传性血液病的基因治疗的背景中(世界各地的发病率和死亡率的主要遗传原因)优选非骨髓抑制的调理。

[0005] 在成年人中,HSC主要存在于骨髓中,且必须将其动员,以便在通过血浆分离置换法收集,用于自体的或同种异体的造血干细胞移植(HSCT)之前进入循环。足够数目的CD34+细胞的收集,(HSC)的替代标志是最重要的,因为CD34+细胞的剂量影响造血恢复的成功和比率。几个报告表明,更高注入的CD34+细胞剂量是改良的存活的独立预测。

[0006] 两个最通常使用的动员方案是粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和G-CSF增强型化学疗法。当与G-CSF一起给予时,由2008年,美国食品和药品监督管理局(FDA)和加拿大卫生部2011年批准的普乐沙福,CXCR4拮抗剂提高HSC的动员。然而,因为白血病细胞的动员,所以在患有白血病的患者中普乐沙福被禁忌。估计利用当前使用的动员方案不能获得足够数目的CD34+细胞/kg影响达到15%的患者(在疾病之间变化)。经常,通过正常的和癌干细胞存在于骨髓和因而,可能被动员的事实,限制自体HSCT在恶性血液病中的应用。

[0007] 具有BM或mPBSC的同种异体HSCT是另一个移植备选方案。然而,约三分之一至四分之一的这种类型的移植合格的患者不能找到适当的捐赠者。对于获得移植的那些,由于移植物抗宿主疾病,复发或移植物排斥;和长时期的免疫缺陷的危险,存在高频率的移植相关的死亡率。可替换地,已经显示脐带血作为同种异体HSCT中的有效的选择。然而,典型地,单

一的CB单元为成年患者用于迅速的和有效的造血恢复提供不充足的HSC。

[0008] 支持由鼠重建试验测量的鼠或人类HSC数目的细胞因子-介导的短期维持乃至适度的增加的体外条件通常伴随后来类型的祖细胞群的更稳健的增加。最近,在含有其他因子如纤维母细胞生长因子(FGF)、胰岛素生长因子结合蛋白、血管生成素类生长因子和多效生长因子的培养中描述了鼠和人类HSC的更显著的增加。然而,这些后来的报告迄今为止是孤独的且等待独立的证明。体外利用标准的细胞因子获得的HSC的短期增加也是不可避免的,随后是最终的HSC消耗。

[0009] 人类HSC扩增的替代策略涉及利用基质元素或可溶的形态发生配体(例如,刺激Notch、Wnt和Hedgehog路径)、具体的细胞内信号通路的靶向操作(PGE2、ROS、p38和MAPK抑制剂)或具体的转录因子的操作(例如,Hox、Hlf)的它们的培养。用于HSC的离体扩增的其他临床途径包含利用:i) 嘌呤衍生物(StemRegenin 1)(SR1),芳烃受体拮抗剂(Boitano, AE et al. "Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells" *Science* 329:1345-1348.2010); ii) 山竹醇(Garcinol),组蛋白乙酰转移酶抑制剂(Nishino, T et al. "Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by Garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase" *PLoS ONE* 6(9):e24298.2011); 和 iii) NR-101,非肽基小分子c-MPL激动剂(Nishino et al. "Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL" *Exp. Hem.* 2009;37:1364-1377)的孵育。SR1的特征提供低分子量(LMW)化合物具有促进HSC扩增的能力的原理的证明。

[0010] 临床研究强调不仅需要执行的移植的持久性,而且需要最小化移植后有用的粒细胞水平出现的时间的重要性,所述时间,反过来,取决于注入的细胞的短期再繁衍的数目。与未处理的细胞相比,到目前为止,临床上没有证明利用细胞因子的培养中扩张的骨髓或脐带血细胞的移植的造血恢复的有用的加速。具有利用动员的Notch配体扩增的细胞的试验的早期结果首先显示用于任何(甚至适度的)祖细胞扩增策略的潜在的临床效用(Delaney et al. "Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution" *Nat. Med.* 16(2):232-236.2010)。然而,通过需要在来自体内的扩增步骤期间利用动员的Delta-1融合蛋白和通过对干细胞的有记录的作用的缺乏(影响似乎限于更多分化型祖细胞)限制这种途径。临床试验中的其他途径包括:i) StemEx,利用未处理的UCB细胞的共注入的,利用铜螯合剂四乙基五胺(TEPA)和细胞因子培养的UCB细胞的组合;阶段I结果显示,与先前的报告相比,没有改进到嗜中性粒细胞或血小板嫁接的时间(de Lima M et al. "Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase 1/11 clinical trial" *Bone Marrow Transplant.* 2008;41(9):771-778); 和16-16二甲基前列腺素E2(PGE2),用于改进UCBT在阶段I试验中的归巢。

[0011] 因而,需要用于增加造血干细胞和祖细胞的扩增的新的策略。本领域中已知用于那个方面的某些嘧啶并[4,5-b]吡啶衍生物;例如,在WO 2003/037898;WO 2004/058764;WO 1998/042708;WO 1997/002266;WO 2000/066585;WO 1993/020078;WO 2006/116733;WO 2008/055233;WO 2010/006032;WO 1995/019970;WO 2005/037825;和WO 2009/004329中公开它们。然而,这些文献没有公开根据本发明的嘧啶并[4,5-b]吡啶衍生物或它们在造血干

细胞和祖细胞的扩增中的应用。

附图说明

[0012] 图1:化合物不通过芳烃(AhR)途径作用。利用DMSO、SR1[AhR拮抗剂1000nM],和化合物1[500nM]将动员了的外周血CD34(+)细胞培养12小时,收获细胞和进行AhR-应答基因(CYP1B1和AhRR)的实时定量RT-PCR。化合物1不同于SR1,不抑制AhR-下游靶基因,表明,它的功能独立于AhR途径。

[0013] 图2:化合物1的作用是可逆的。洗涤利用化合物1(以绿色显示)或媒介(DMSO,以蓝色显示)培养7天的动员了的外周血CD34(+)细胞,且将其再次接种在具有或没有化合物添加物的新鲜培养基中(分别地,实线对虚线)。将细胞培养另外的8天和检测CD34+CD45RA-的百分比。当洗掉化合物1时,观察到CD34+CD45RA-百分比的迅速减少,指示,它的作用是可逆的。

[0014] 图3:F1t3、SCF、和TPO是化合物1介导的干细胞扩增需要的。在生长因子(F1t3+SCF+TPO)的存在或缺少的情况下,将动员了的外周血CD34(+)细胞培养7天。在缺少任何生长因子时,CD34+CD45RA-细胞计数较低,表明,它们对观察到的作用的需要。

[0015] 图4:A)化合物1减少CD34+动员的外周血细胞的分化。如通过FACS分析确定的,与DMSO处理的对照细胞相比,化合物1能够扩增CD34+细胞群。SR1与化合物1协同保持扩增的培养细胞CD34+,表明,利用组合的分化的抑制甚至更加显著。B)化合物1减少CD34+脐带血细胞的分化。C)化合物40减少CD34+脐带血细胞的分化。D)化合物40对CD34+细胞分化的遏制表现剂量依赖性作用。

[0016] 图5:A)化合物1离体扩增动员了的外周血-来源的CD34+和CD34+CD45RA-细胞群。尽管在DMSO和化合物1处理的细胞中,总的细胞计数相同,但是CD34+群体超过DMSO的两倍。同样地,化合物1处理的组中CD34+CD45RA-群体超过对DMSO中的三倍。利用与SR1的共同处理增强这种观察。B)化合物1在7-天孵育期间增强脐带血来源的CD34+和CD34+CDRA-细胞的扩增。C)化合物1在12-天孵育期间对脐带血来源的CD34+和CD34+CDRA-细胞的体外扩增表现积极的作用。

[0017] 图6:在媒介(DMSO)、SR1、化合物1、和化合物1和SR1的组合的存在的情况下,将CD34+mPB细胞培养十天。将50,000和500,000处理的细胞的成果移植到NSG老鼠中,和在移植后13周之后,进行骨髓分析,以评价人类造血移植成活率。在任何给予细胞剂量上,利用化合物1处理的CD34+mPB细胞移植比DMSO处理的好。有趣的是,BM中的人类CD45+细胞的百分比在NSG老鼠中是最高的,与单个化合物相比,其接收利用组合(化合物1+SR1)处理的细胞。

[0018] 图7:A)化合物1扩增的细胞能够在NSG老鼠中重建人类造血细胞。将利用媒介(DMSO)、SR1、化合物1和组合处理的5,000CD34+CB细胞的成果移植到免疫功能不全的NSG老鼠中。在移植后8周之后,除了DMSO之外,骨髓分析在所有处理组中显示了人类CD45+嫁接。利用组合(化合物1+SR1)处理的细胞显示最高的嫁接水平。B)在12天体外孵育期间,化合物40阻止能够嫁接NSG老鼠骨髓的人类造血细胞的损失。

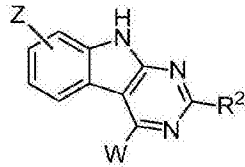
[0019] 图8:如通过流式细胞术测量的,利用流加培养方法的生物反应器中的原发细胞显型(CD34⁺、CD34⁺CD90⁺和CD34⁺CD45RA⁺)的扩增。FB对照=没有化合物40的流加培养,Cpd40=

具有化合物40的流加培养。

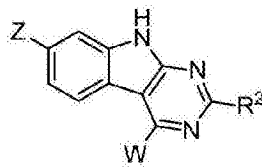
发明内容

[0020] 发明人已经发现了某些嘧啶并[4,5-b]咪唑衍生物。这些化合物对扩增造血干细胞群是有用的,特别是人类造血干细胞群。化学物在涉及造血干细胞的疾病的治疗中也是有用的。

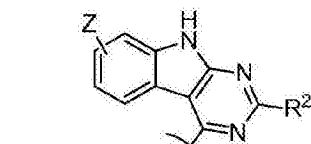
[0021] 根据一个方面,本发明提供下列通式I、II、III、IV、V和VI的化合物:



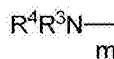
I



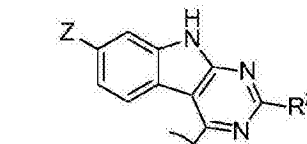
II



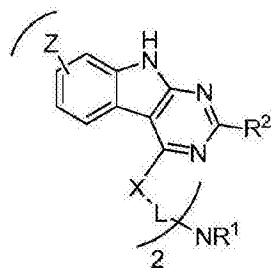
[0022]



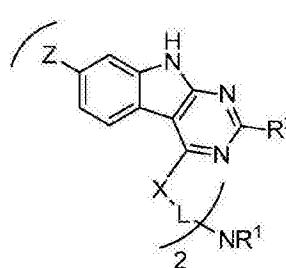
III



IV



V



VI

[0023] 上述通式I、II、III、IV、V和VI中的取代基,即,Z、W、L、Li、X、X₁、R¹、R²、R³、R⁴和m与本文下面限定的相同。

[0024] 根据一个方面,本发明提供了包括通式I、II、III、IV、V和VI的化合物的药物组合物。

[0025] 根据一个方面,本发明提供了通式I、II、III、IV、V和VI的化合物用于扩增造血干细胞的应用。在本发明的实施方式中,造血干细胞是人类细胞。

[0026] 根据一个方面,本发明提供一种用于增加造血干细胞或祖细胞的方法,所述方法包括在通式I、II、III、IV、V或VI的化合物的存在下,培养起始细胞群体。在本发明的实施方式中,起始细胞群体是体内、体外或离体的。同样,在本发明的实施方式中,起始细胞群体包括从动员了的外周血(mPB)、骨髓(BM)或脐带血(UCB)收获的CD34⁺细胞。此外,在根据本发明的方法的实施方式中,可选地,在通式I、II、III、IV、V和VI的化合物的存在下,连同作为生物学的或另外的小分子的至少一种细胞扩增因子,进行起始细胞群体的培养。

[0027] 根据一个方面,本发明提供了根据本发明的方法扩增的细胞群体,更具体地,利用

根据本发明的化合物扩增的细胞群体。在实施方式中,本发明提供了根据本发明的方法扩增的造血干细胞,更具体地,利用根据本发明的化合物扩增的造血干细胞。

[0028] 根据一个方面,本发明提供了治疗受试者的造血紊乱/恶性肿瘤、自身免疫疾病和/或遗传性免疫缺陷疾病的方法,所述方法包括给予需要这样的治疗的受试者利用通式 I、II、III、IV、V 或 VI 的化合物扩增的造血干细胞或通式 I、II、III、IV、V 或 VI 的化合物。

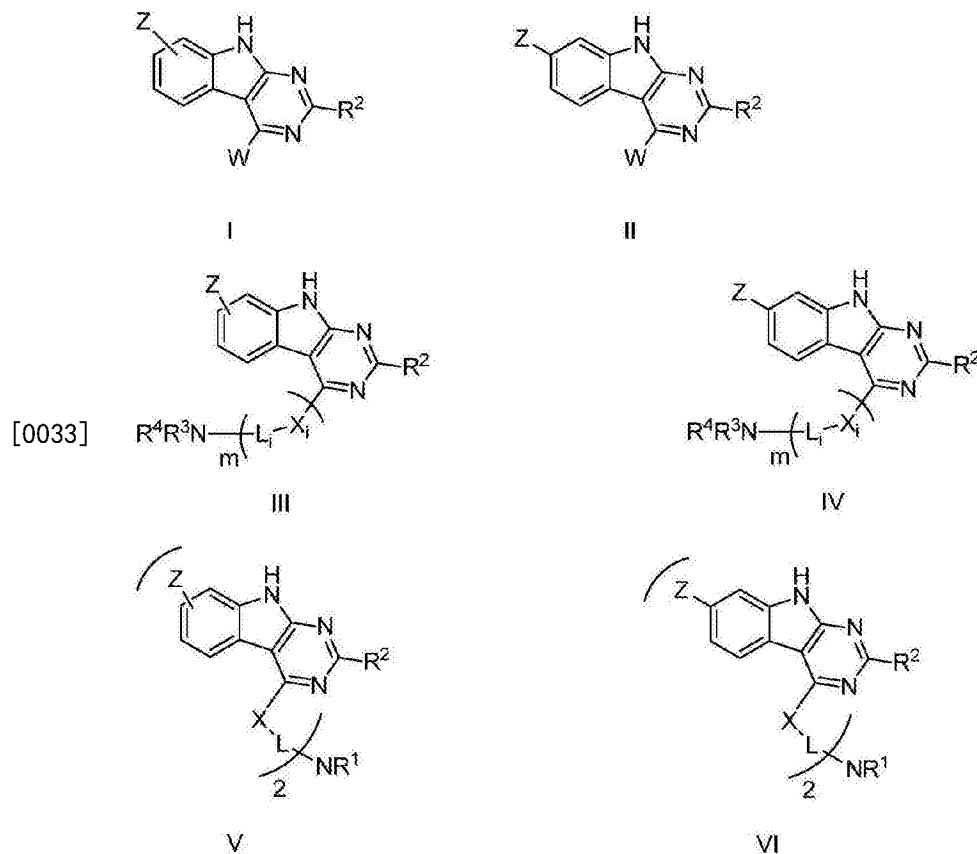
[0029] 在本发明的实施方式中,造血紊乱/恶性肿瘤、自身免疫疾病和/或遗传性免疫缺陷病包括骨髓衰竭性贫血、多种全球性关心的先天性疾病(例如,镰刀状细胞贫血症和地中海贫血)、狼疮、急性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增殖性疾病、骨髓增生异常综合征、多发性骨髓瘤、非-霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、再生障碍性贫血、纯红细胞再生障碍、血红蛋白尿、范科尼贫血、地中海贫血、镰刀状细胞贫血、威斯科特-奥尔德里奇综合征、新陈代谢的先天性缺陷(例如,尤其是戈谢病)。

[0030] 根据一个方面,本发明提供了一种用于增加干细胞或祖细胞或用于扩增造血干细胞的试剂盒,所述试剂盒包括通式 I、II、III、IV、V 或 VI 的化合物和使用说明书。在本发明的实施方式中,试剂盒包括至少一种细胞扩增因子,其是生物的或另外的小分子。

具体实施方式

[0031] 发明人已经发现了某些嘧啶并[4,5-b]吡啶衍生物。这些化合物可用于扩增造血干细胞群,具体地,人类造血干细胞群。化合物也可用于涉及造血干细胞的疾病的治疗。

[0032] 根据本发明的化合物具有下面显示的通式 I、II、III、IV、V 或 VI。这样的化合物的盐或前药也在根据本发明的化合物的范围内。



[0034] 在通式I、II、III、IV、V和VI中,取代基如下面概述的限定。

[0035] Z是:1) -P(O)(OR¹)(OR¹)、2) -C(O)OR¹、3) -C(O)NHR¹、4) -C(O)N(R¹)R¹、5) -C(O)R¹、6) -CN、7) -SR¹、8) -S(O)₂NH₂、9) -S(O)₂NHR¹、10) -S(O)₂N(R¹)R¹、11) -S(O)R¹、12) -S(O)₂R¹、13) -L、14) 可选地利用1、2、或3个R^A或R¹取代基取代的-苄基、15) 可选地用连接在L和杂芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代的-L-杂芳基、16) 可选地用连接在L和杂环基团的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代的-L-杂环基、17) 可选地用连接在L和杂芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代的-L-芳基、18) 可选地用一个或更多个R^A或R¹取代基取代的-杂芳基、或19) 可选地用一个或更多个R^A或R¹取代基取代的-芳基。在这个列表中,如果它不存在,则每一个取代基可选地连接到L基团上;并且,当将(R¹)和R¹连接到氮原子上时,可选地,它们与氮原子结合在一起,以形成3至7-元环,其可选地包含选自N、O和S的一个或更多个其他杂原子,可选地用一个或更多个R¹或R^A取代环。

[0036] W是H、卤素或通过N、O、S或C原子连接到分子的嘧啶并咪唑核心上的基团。可选地,W包括至少一个部分,其是具有1至20个碳原子的饱和的、不饱和的、线性的、支链的和/或环状烷基和/或杂烷基。同样,可选地,所述部分包括至少一个其他杂原子,其是N、O或S。如技术人员应该明白的,根据本发明的化合物的化学结构中的W可属于本领域通用的化学基团的多个类别。

[0037] 更具体地,W是:1) -H、2) -卤素、3) -OR¹、4) -L-OH、5) -L-OR¹、6) -SR¹、7) -CN、8) -P(O)(OR¹)(OR¹)、9) -NHR¹、10) -N(R¹)R¹、11) -L-NH₂、12) -L-NHR¹、13) -L-N(R¹)R¹、14) -L-SR¹、15) -L-S(O)R¹、16) -L-S(O)₂R¹、17) -L-P(O)(OR¹)(OR¹)、18) -C(O)OR¹、19) -C(O)NH₂、20) -C(O)NHR¹、21) -C(O)N(R¹)R¹、22) -NHC(O)R¹、23) -NR¹C(O)R¹、24) -NHC(O)OR¹、25) -NR¹C(O)OR¹、26) -OC(O)NH₂、27) -OC(O)NHR¹、28) -OC(O)N(R¹)R¹、29) -OC(O)R¹、30) -C(O)R¹、31) -NHC(O)NH₂、32) -NHC(O)NHR¹、33) -NHC(O)N(R¹)R¹、34) -NR¹C(O)NH₂、35) -NR¹C(O)NHR¹、36) -NR¹C(O)N(R¹)R¹、37) -NHS(O)₂R¹、38) -NR¹S(O)₂R¹、39) -S(O)₂NH₂、40) -S(O)₂NHR¹、41) -S(O)₂N(R¹)R¹、42) -S(O)R¹、43) -S(O)₂R¹、44) -OS(O)₂R¹、45) -S(O)₂OR¹、46) 可选地利用1、2或3个R^A或R¹取代基取代的-苄基、47) 可选地用连接在L和杂芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代的-L-杂芳基、48) 可选地用连接在L和杂环基团的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代的-L-杂环基、49) 可选地用连接在L和芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代的-L-芳基、50) -L-NR¹(R¹)、51) -L-) ₂NR¹、52) -L-(N(R¹)-L)_n-N(R¹)R¹、53) -L-(N(R¹)-L)_n-杂芳基,可选地用连接在L和杂芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代所述杂芳基、54) -L-(N(R¹)-L)_n-杂环基,可选地用连接在L和杂环基团的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代所述杂环基、55) -L-(N(R¹)-L)_n-芳基,可选地用连接在L和杂芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代所述芳基、56) -O-L-N(R¹)R¹、57) -O-L-杂芳基,可选地用连接在L和杂芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代所述杂芳基、58) -O-L-杂环基,可选地用连接在L和杂环基团的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代所述杂环基、59) -O-L-芳基,可选地用连接在L和芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代所述芳基、60) -O-L-) ₂NR¹、61) -O-L-(N(R¹)-L)_n-N(R¹)R¹、62) -O-L-(N(R¹)-L)_n-杂芳基,可选地用连接在L和杂芳基的任何一个或两者上的一个或更多个R^A或R¹取代基取代所述杂芳基、

63) $-O-L-(N(R^1)-L)_n$ -杂环基, 可选地用连接在L和杂环基团的任何一个或两者上的一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述杂环基、64) $-O-L-(N(R^1)-L)_n$ -芳基, 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述芳基、65) $-S-L$ -杂芳基, 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述杂芳基、66) $-S-L$ -杂环基, 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述杂环基、67) $-S-L$ -芳基, 可选地用连接在L和芳基的任何一个或两者上的一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述芳基、68) $-S-L)_2NR^1$ 、69) $-S-L-(N(R^1)-L)_n-N(R^1)R^1$ 、70) $-S-L-(N(R^1)-L)_n$ -杂芳基, 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述杂芳基、71) $-S-L-(N(R^1)-L)_n$ -杂环基, 可选地用一个或更多个 R^A 取代基取代所述杂环基、72) $-S-L-(N(R^1)-L)_n$ -芳基, 可选地用一个或更多个 R^A 取代基取代所述芳基、73) $-NR^1(R^1)$ 、74) $-(N(R^1)-L)_n-N(R^1)R^1$ 、75) $-N(R^1)L)_2-NR^1$ 、76) $-(N(R^1)-L)_n-N(R^1)R^A$ 、77) $-(N(R^1)-L)_n$ -杂芳基, 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述杂芳基、78) $-(N(R^1)-L)_n$ -杂环基, 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述杂环基、79) $-(N(R^1)-L)_n$ -芳基, 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代所述芳基、80) -杂芳基, 可选地用一个或更多个 R^A 取代基取代所述杂芳基、或81) -芳基, 可选地用一个或更多个 R^A 取代基取代所述芳基。在这个列表中, 如果它不存在, 可选地, 将每一个取代基连接到L基团上; 并且, 当两个 R^1 存在于相同的氮原子上时, 则每一个 R^1 取代基独立地选自此后描述的 R^1 值的列表; 并且n是等于任意0、1、2、3、4、或5的整数; 并且, 当将 (R^1) 和 R^1 连接到氮原子上时, 可选地, 它们与氮原子结合在一起, 以形成3至7-元环, 其可选地包含选自N、O和S的一个或更多个其他杂原子, 可选地用一个或更多个 R^1 或 R^A 取代环。

[0038] L是: 1) $-C_{1-6}$ 烷基、2) $-C_{2-6}$ 烯基、3) $-C_{2-6}$ 炔基、4) $-C_{3-7}$ 环烷基、5) $-C_{3-7}$ 环烯基、6) 杂环基、7) $-C_{1-6}$ 烷基- C_{3-7} 环烷基、8) $-C_{1-6}$ 烷基-杂环基、9) 芳基、或10) 杂芳基。在这个列表中, 可选地用一个或两个 R^A 取代基各自独立地取代烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环基、芳基和杂芳基基团。

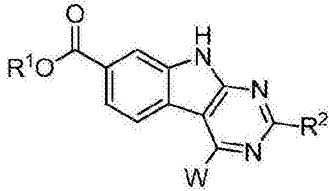
[0039] R^1 是: 1) -H、2) $-C_{1-6}$ 烷基、3) $-C_{2-6}$ 烯基、4) $-C_{2-6}$ 炔基、5) $-C_{3-7}$ 环烷基、6) $-C_{3-7}$ 环烯基、7) $-C_{1-5}$ 全氟化的、8) -杂环基、9) -芳基、10) -杂芳基、11) -苄基、或12) 5-[(3aS, 4S, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩[3,4-d]咪唑-4-基]戊酰基。在这个列表中, 可选地用1、2或3个 R^A 或 R^1 取代基各自独立地取代烷基、烯基、炔基、环烯基、全氟化的烷基、杂环基、芳基、杂芳基和苄基基团。

[0040] R^2 是: 1) -H、2) $-C_{1-6}$ 烷基、3) $-SR^1$ 、4) $-C(O)R^1$ 、5) $-S(O)R^1$ 、6) $-S(O)_2R^1$ 、7) 可选地用1、2或3个 R^A 或 R^1 取代基取代的-苄基、8) 可选地用连接在L和杂芳基的任何一个或两者上的一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代的-L-杂芳基、9) 可选地用连接在L和杂环基团的任何一个或两者上的一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代的-L-杂环基、10) 可选地用连接在L和芳基的任何一个或两者上的一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代的-L-芳基、11) 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代的-杂芳基、或12) 可选地用一个或更多个 R^A 或 R^1 取代基取代的-芳基。在这个列表中, 如果它不存在, 可选地, 将每一个取代基连接到L基团上。

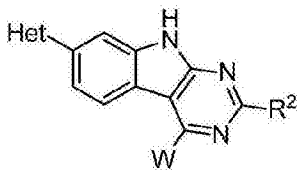
[0041] R^A 是: 1) -卤素、2) $-CF_3$ 、3) $-OH$ 、4) $-OR^1$ 、5) $-L-OH$ 、6) $-L-OR^1$ 、7) $-OCF_3$ 、8) $-SH$ 、9) $-SR^1$ 、10) $-CN$ 、11) $-NO_2$ 、12) $-NH_2$ 、13) $-NHR^1$ 、14) $-NR^1R^1$ 、15) $-L-NH_2$ 、16) $-L-NHR^1$ 、17) $-L-NR^4R^1$ 、18) $-L-SR^1$ 、19) $-L-S(O)R^1$ 、20) $-L-S(O)_2R^1$ 、21) $-C(O)OH$ 、22) $-C(O)OR^1$ 、23) $-C(O)NH_2$ 、24) $-C(O)NHR^1$ 、25) $-C(O)N(R^1)R^1$ 、26) $-NHC(O)R^1$ 、27) $-NR^1C(O)R^1$ 、28) $-NHC(O)OR^1$ 、29) $-NR^1C(O)OR^1$ 、30) $-OC(O)NH_2$ 、31) $-OC(O)NHR^1$ 、32) $-OC(O)N(R^1)R^1$ 、33) $-OC(O)R^1$ 、34) $-C(O)R^1$ 、35) $-NHC(O)$

NH₂、36) -NHC(O)NHR¹、37) -NHC(O)N(R¹)R¹、38) -NR¹C(O)NH₂、39) -NR¹C(O)NHR¹、40) -NR¹C(O)N(R¹)R¹、41) -NHS(O)₂R¹、42) -NR¹S(O)₂R¹、43) -S(O)₂NH₂、44) -S(O)₂NHR¹、45) -S(O)₂N(R¹)R¹、46) -S(O)R¹、47) -S(O)₂R¹、48) -OS(O)₂R¹、49) -S(O)₂OR¹、50) -苄基、51) -N₃、或52) -C(-N=N-)(CF₃)。在该列表中,可选地用1、2或3个R^A或R¹取代基取代苄基。

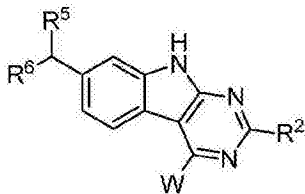
[0042] 在本发明的实施方式中,化合物具有下面示出的通式IIA、IIB、IIC、IVA或VIA。这样的化合物的盐或前药也在根据本发明的化合物的范围内。



IIA

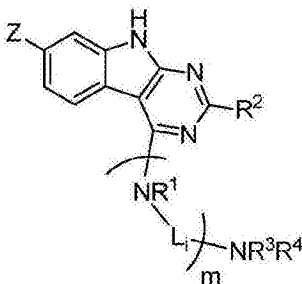


IIB

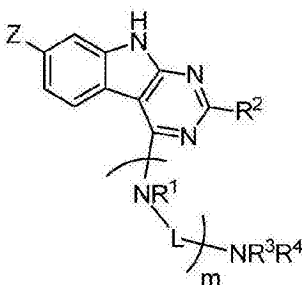


[0043]

IIC



IVA



VIA

[0044] 在根据上述通式IIA的化合物的本发明的实施方式中, R^1 、W和 R^2 各自如上文所限定的。

[0045] 在根据上述通式IIB的化合物的本发明的实施方式中, W和 R^2 各自如上文所限定的, 并且Het是可选地用如本文上面限定的一个或更多个 R^1 或 R^A 取代的3至7-元杂环。

[0046] 在根据上述通式IIC的化合物的本发明的实施方式中, W和 R^2 各自如上文所限定的; R^5 和 R^6 是相同的或不同的, 并且各自独立地是如上文所限定的L, 或它们与C结合在一起, 以形成可选地包含选自N、O和S的一个或更多个杂原子的5至7-元环, 并且可选地用一个或更多个 R^1 或 R^A 取代环。在进一步的实施方式中, 环是5-元环并且杂原子是氮原子。仍然在进一步的实施方式中, 环包含四个氮原子。仍然在进一步的实施方式中, R^2 是苄基。

[0047] 在根据上述通式IVA的化合物的本发明的实施方式中, W、L、 R^1 和 R^2 各自如上文所限定的。同并且, m、Li、 R^3 和 R^4 各自如上文所限定的。

[0048] 在根据上述通式VIA的化合物的本发明的实施方式中, Z是 CO_2Me 或2-甲基-2H-四氮唑-5-基; R^2 是苄基、3-噻吩甲基或3-吡啶甲基; 和W是 $NH-L-N(R^1)R^1$, 其中L是 C_{2-4} 烷基并且 R^1 是 C_{1-4} 烷基或(R^1)和 R^1 与它们连接的氮原子结合在一起, 以形成3至7-元环, 其可选地包含选自N、O和S的一个或更多个其他杂原子, 可选地用一个或更多个 R^1 或 R^A 取代环。

[0049] 在本发明的实施方式中, 本发明的化合物是此处下面的表2中描述的化合物1至55。这样的化合物的盐或前药也在根据本发明的化合物的范围内。

[0050] 在本发明的进一步实施方式中, 本发明的化合物具有在此处下面的表2中描述的式。这样的化合物的盐或前药也在根据本发明的化合物的范围内。

[0051] 定义:

[0052] 除非另有说明, 否则应用下列定义:

[0053] 除非上下文另外清晰地指出, 否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包含相应的复数参考。

[0054] 如此处使用的, 术语“包括”是指跟随单词“包括”的要素的列表是必须的或强制性的, 但是, 其他要素是可选的并且可以存在或可以不存在。

[0055] 如此处使用的, 术语“由...组成”是指包含且限于跟随短语“由...组成”的任何事物。因而, 短语“由...组成”表明列出的要素是必须的或强制性的, 并且表明不可能存在其他要素。

[0056] 如此处使用的, 术语“烷基”是指包含具有规定数目的碳原子的支链的和直链的饱和脂肪族烃基, 例如, 将 C_{1-6} 烷基中的 C_{1-6} 限定为包含在线性或分支的饱和布置中具有1、2、3、4、5、或6个碳的基团。如上述限定的 C_{1-6} 烷基的实例包括, 但不限于, 甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、戊基和己基。

[0057] 如此处使用的, 术语“环烷基”是指其中具有规定数目的碳原子的单环饱和的脂肪族烃基团, 例如, 将 C_{3-7} 环烷基中的 C_3-C_7 限定为包含在单环饱和的布置中具有3、4、5、6或7个碳的基团。如上述限定的 C_3-C_7 环烷基的实例包含, 但不限于, 环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。

[0058] 如此处使用的, 术语“烯基”是指不饱和直链或支链烃基团, 其中具有规定数目的碳原子, 并且其中至少两个碳原子通过双键彼此结合, 并具有E或Z区域化学性和它的组合。例如, 将 C_2-C_6 烯基中的 C_2-C_6 限定为包含在直链或支链布置中具有2、3、4、5或6个碳, 至少两

个碳原子通过双键结合在一起的基团。 C_2 - C_6 烯基的实例包含,但不限于,次乙基(乙烯基)、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基等。

[0059] 如此处使用的,术语“炔基”是指其中具有规定数目的碳原子并且其中至少两个碳原子通过三键结合在一起的不饱和、直链烃基团。例如,将 C_2 - C_4 炔基限定为包含在链中具有2、3或4个碳原子,至少两个碳原子通过三键结合在一起的基团。这样的炔基的实例包含,但不限于,乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基,等等。

[0060] 如此处使用的,术语“环烯基”是指其中具有规定数目的碳原子的单环饱和脂肪族烃基团,例如,将 C_3 - C_7 环烯基中的 C_3 - C_7 限定为包含在单环布置中具有3、4、5、6或7个碳的基团。上述限定的 C_3 - C_7 环烯基的实例包含,但不限于,环戊烯基、环己烯基等。

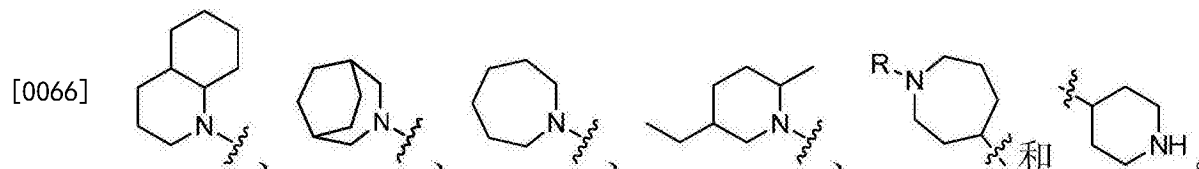
[0061] 如此处使用的,术语“卤代”或“卤素”是指氟、氯、溴或碘。

[0062] 如此处使用的,术语“卤代烷基”是指如上述限定的烷基,其中可相继地通过卤素原子取代每一个氢原子。卤代烷基的实例包含,但不限于, CH_2F 、 CHF_2 和 CH_3 。

[0063] 如此处使用的,术语“芳基”,单独的或与另一个自由基组合,是指含有6个碳原子的碳环芳香族单环基团,其可被进一步稠合到第二5-或6-元碳环基团上,其可以是芳香族的、饱和的或不饱和的。芳基的实例包含,但不限于,苯基、二氢茛基、1-萘基、2-萘基、四氢萘基等。可在环烷基环或芳香环上的适当的位置上,将芳基连接至另一个基团上。

[0064] 如此处使用的,术语“杂芳基”是指可达10个原子的单环或双环体系,其中至少一个环是芳香族的,且含有选自O、N和S组成的组的1至4个杂原子。可经由环碳原子或一个杂原子连接杂芳基。杂芳基的实例包含,但不限于,噻吩基、苯并咪唑基、苯并[b]噻吩基、咪唑基、苯并咪唑基、吡喃基、异苯并咪唑基、苯并吡喃基、咕吨基、2H-吡咯基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吲哚基(indoliziny)l)、异吲哚基、3H-吲哚基、吲哚基、吲唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、二氮杂萘基(naphthyridinyl)、喹啉基、喹唑啉基、噌啉基(cinnolinyl)、蝶啶基、异噻唑基、异苯并二氢吡喃基、苯并二氢吡喃基、异噁唑基、呋呋基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、噻唑[4,5-b]-吡啶、四唑基、噁二唑基(oxadiazolyl)、噻二唑基、噻吩基和荧光素(fluorescein)衍生物。

[0065] 如此处使用的,术语“杂环”、“杂环的”或“杂环基”是指含有选自O、N和S组成的组的1至4杂原子的3、4、5、6或7元非-芳香族环体系。杂环的实例包含,但不限于,吡咯烷基、四氢咪唑基、哌啶基、3,5-二甲基哌啶基、吡咯啉基、哌嗪基、咪唑烷基、吗啉基、咪唑啉基、吡唑啉基、吡唑啉基等,其中与环的连接可以在如下文描述的环的氮原子上或碳原子上。



[0067] 如此处使用的,术语“可选地用一个或多个取代基取代的”或其等价术语“可选地用至少一个取代基取代的”是指情况的随后描述的事件可能会出现或可能不会出现,并且是指描述包含出现事件或情况的实例和其中不出现的实例。该定义是指从零至五个取代基。

[0068] 如此处使用的,术语“受试者”或“患者”是指人类和非人类哺乳动物如灵长类、猫、狗、猪、牛、羊、山羊、马、兔、大鼠、小鼠等。

[0069] 如果取代基它们自身与此处描述的合成方法不相容,则可利用对在这些方法中使用的反应条件稳定的适当的保护基团(PG)保护取代基。可在方法的反应顺序的适当的点上去除保护基团,以提供期望的中间或目标化合物。本领域的技术人员熟知适当的保护基团和利用这样的适当的保护基团用于保护和去保护不同的取代基的方法;可在T.Greene and P.Wuts, "Protecting Groups in Chemical Synthesis" (4th ed.), John Wiley&Sons, NY (2007) 中发现它的实施例,将其全部内容结合于此以供参考。贯穿使用的保护基团的实例包含,但不限于,Fmoc、Bn、Boc、CBz和COCF₃。在某些实施例中,可特异性地选择在此处描述的方法中使用的反应条件下是反应的取代基。在这些情况下,反应条件将选定的取代基转变成另一个取代基,其在此处描述的方法中的中间化合物中是有用的或是目标化合物中的期望的取代基。

[0070] 如此处使用的,术语“药用盐”是指酸和碱加成盐。

[0071] 如此处使用的,术语“药用酸加成盐”是指保留游离碱的生物学效能和性能的那些盐,其不是生物学上的或相反是不期望的,并且其由无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,和有机酸如醋酸、三氟乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、反丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、苦杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等形成。

[0072] 如此处使用的,术语“药用碱加成盐”是指保留游离酸的生物学效能和性能的那些盐,其不是生物学上的或相反是不期望的。可从无机碱或有机碱至游离酸的加成来制备这些盐。衍生自无机碱的盐包含,但不限于,钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝盐等。衍生自有机碱的盐包含,但不限于,伯、仲、和叔铵的盐、包含天然存在的取代的铵的取代的铵、环状铵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、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己基胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴青霉素(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡萄糖胺、甲葡萄糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。

[0073] 根据本发明的化合物或它们的药用盐可含有一个或更多个不对称中心、手性轴和手性平面,因此可产生对映异构体、非对映体、和其他立体异构形式并且可根据绝对的立体化学限定,如(R)-或(S)-,或如用于氨基酸的(D)-或(L)-。本发明倾向于包含所有这样可能的同分异构体,以及,它们的外消旋的和光学纯的形式。可利用手性合成单体或手性试剂来制备光学活性的(+)和(-)、(R)-和(S)-、或(D)-和(L)-同分异构体,或利用传统的技术,如反相HPLC拆分。可制备外消旋混合物,和此后将其分成个体光学异构体或可通过手性合成制备这些光学同分异构体。可通过本领域的技术人员已知的方法拆分对映异构体,例如,通过非对映异构盐的形成,然后,可通过结晶化、气液或液相色谱法、一个对映异构体与对映异构体特异性试剂的选择性反应分离所述非对映异构盐。本领域的技术人员也应该明白,通过分离技术将期望的对映异构体转变成另一个化学实体,然后,需要附加的步骤形成期望的对映体形式。可利用光学地活性的试剂、基质、催化剂、或溶剂通过不对称合成,或通过不对称转化将一个对映异构体转变成另一个合成可替换地具体的对映异构体。

[0074] 根据本发明的某些化合物可作为差向异构体的混合物而存在。差向异构体是指在存在于各自的化合物中的两个或更多立体中心的仅一个上具有相反构造的非对映异构体。

[0075] 根据本发明的化合物可以以两性离子形式存在并且本发明包含这些化合物的两

性离子形式和它的混合物。

[0076] 另外,根据本发明的化合物也可以以含水的和无水的形式存在。包含此处描述的任何通式的化合物的水合物。在进一步的实施方式中,根据此处描述的任何通式的化合物是一水合物。在本发明的实施方式中,此处描述的化合物包括按重量计约10%或更少、约9%或更少、约8%或更少、约7%或更少、约6%或更少、约5%或更少、约4%或更少、约3%或更少、约2%或更少、约1%或更少、约0.5%或更少、约0.1%或更少的水。在其他实施方式中,此处描述的化合物包括按重量计约0.1%或更多、约0.5%或更多、约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、约5%或更多、或约6%或更多的水。

[0077] 以前药的形式制备、纯化、和/或处理化合物可能是方便的或期望的。因而,如此处使用的,术语“前药”涉及当使其新陈代谢(例如,在体内)时,产生期望的活性化合物的化合物。典型地,前药是无活性的,或比期望的活性化合物少的活性,但是可提供有利的处理、给药、或新陈代谢性能。除非另外指出,否则对具体的化合物的参考也包含其前药。

[0078] 如此处使用的,术语“EC50”是指与媒介培养(DMSO)相比,引起CD34+CD45RA-细胞计数50%增加的浓度。

[0079] 如此处使用的,术语“造血干细胞”或“HSC”是指具有允许它们分化成功能性成熟细胞如粒细胞(例如,前髓细胞、中性粒细胞、嗜酸细胞、嗜碱性粒细胞)、红细胞(例如,网织红细胞、红细胞)、凝血细胞(例如,原巨核细胞、产生巨核细胞的血小板、血小板)、和单核细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞)的多能性,和在维持它们的多能性时能够再生的细胞。

[0080] HSC是起始细胞群体的部分。可选地,从身体或含有造血起源的细胞的身体的器官获得这些细胞。这样的来源包含未分级的骨髓、脐带、外周血、肝脏、胸腺、淋巴和脾脏。对于具有造血干细胞特性的细胞,可以本领域的技术人员已知的方式富集所有上述的天然的或未分级的血液制品。

[0081] 如此处使用的,术语“起始细胞群体”是指识别包括从上述提到的多个来源中的一个收获的HSC的细胞群,如本领域已知的。起始细胞群体可富含CD34+细胞,意味着,基于细胞表面标志CD34+的存在选择细胞群。例如,可利用流式细胞术和荧光标记的抗-CD34抗体检测和计数CD34+细胞。此外,起始细胞群体可直接地用于扩增或冷冻和存储,用于后来时间点的应用。

[0082] 在造血作用期间,HSC首先分支成祖阶段,分支成骨髓世系和淋巴世系,然后分别地分化成髓细胞样干细胞(混合的集落形成细胞,CFU-GEMM)和分化成淋巴干细胞。进一步地,髓细胞样干细胞经由红系爆式形成细胞(erythroid burst forming cells)(BFU-E)和红系集落形成细胞(CFU-E)分化成红细胞,经由巨核细胞集落形成细胞(CFU-MEG)分化成凝血细胞,经由粒细胞-巨噬细胞集落形成细胞(CFU-GM)分化成单核细胞、中性粒细胞和嗜碱性粒细胞,和经由嗜曙红集落形成细胞(CFU-Eo)分化成嗜曙红细胞,同时淋巴干细胞经由T淋巴祖细胞分化成T细胞和经由B淋巴祖细胞分化成B细胞。通过在多种细胞因子的存在下,它们在软琼脂、半固体甲基纤维素培养基等上形成的克隆的性能鉴定这些髓细胞样干细胞和来源于它们的多种造血祖细胞。

[0083] 本发明也包含根据本发明和此处限定的化合物,或其盐,在制备用于治疗遭受下列非限制性的疾病列表的患者的药物中的应用:遭受上述提及的疾病或身免疫疾病的受试者(或患者)的自体的或同种异体的移植或治疗。恶性血液病/疾病和先天性疾病的实例可

包含,但不限于,急性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性骨髓白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增殖性疾病、骨髓增生异常增和征、多发性骨髓瘤、非-霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、再生障碍性贫血、纯红细胞再生障碍、血红蛋白尿、范科尼贫血、地中海贫血、镰刀状细胞贫血、威斯科特-奥尔德里奇综合征、先天性代谢缺陷(例如,尤其是戈谢病)。可得益于移植的免疫学疾病的实例很多并且包括多发性硬化、狼疮、某些形式或关节炎、重症综合性免疫缺陷等。

[0084] 因而,本发明包含给予遭受任何一种上述提及的疾病/恶性肿瘤的患者利用根据本发明的化合物扩增的HSC。

[0085] 此外,如所描述的化合物和组合物可用于下列非限制性的位点:自体的或同种异体的移植或遭受上述提及的疾病或自身免疫的疾病的受试者(或患者)的治疗。恶性血液病/疾病和先天性疾病的实例可包含,但不限于,急性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性骨髓白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增殖性疾病、骨髓增生异常综合征、多发性骨髓瘤、非-霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、再生障碍性贫血、纯红细胞再生障碍、血红蛋白尿、范科尼贫血、地中海贫血、镰刀状细胞贫血、威斯科特-奥尔德里奇综合征、先天性代谢缺陷(例如,尤其是戈谢病)。可得益于移植的免疫学疾病的实例很多并且包含多发性硬化、狼疮、某些形式或关节炎、重症综合性免疫缺陷等。

[0086] 因而,本发明包含给予遭受任何一种上述提及的疾病/恶性肿瘤的患者利用根据本发明的化合物扩增的HSC。

[0087] 本发明也包含的是在利用根据本发明和此处描述的方法扩增之后获得的细胞群体。可从成年人、脐带血、胎儿或胚胎来源收获造血干细胞和祖细胞。利用本发明的方法的细胞扩增可引起祖细胞数目的增加,例如,其在加速至嗜中性粒细胞和血小板嫁接的时间中是有用的。这样的方法包括:利用能够增加HSC的数目的试剂培养包括HSC的起始群体。起始群体可富有感兴趣的细胞表面标记或它的组合(例如,CD34+、CD34+CD45RA+/-)。

[0088] 用于扩增HSC的方法

[0089] 因此,本发明涉及用于扩增造血干细胞的方法,包括(a)提供包括造血干细胞的起始细胞群体和(b)在用于扩增造血干细胞的适当的条件下,离体培养所述起始细胞群体。

[0090] 因此,本发明涉及用于扩增造血干细胞的方法,包括(a)提供包括造血干细胞的起始细胞群体和(b)在用于扩增造血干细胞的适当的条件下,离体培养所述起始细胞群体。

[0091] 在一个具体的实施方式中,所述用于扩增造血干细胞的方法,包括(a)提供包括造血干细胞的起始细胞群体和(b)在本发明的化合物或组合物的存在下,离体培养所述起始细胞群体。

[0092] 首先使细胞群体经受富集或纯化步骤,包含基于具体的细胞标记的细胞的负和/或正选择,以便提供起始细胞群体。基于具体的细胞标记用于分离所述起始细胞群体的方法可利用荧光活化细胞分选技术(FACS)也叫做流式细胞术或与具体的细胞表面标记相互作用的抗体或配体结合的固体或不可溶解的基质。例如,可使细胞与含有抗体的固体基质(例如,玻璃珠柱、烧瓶、磁性颗粒)接触,和去除任何未结合的细胞。当使用包括磁性或顺磁性玻璃珠的固体基质时,可容易地通过磁力分离器分离结合到玻璃珠上的细胞。

[0093] 在一个实施方式中,所述起始细胞群体富有CD34+细胞。用于在CD34+细胞中富集血细胞群体的方法包含通过Miltenyi Biotec(CD34+直接分离试剂盒,Miltenyi Biotec,

Bergisch, Gladbach, Germany) 或通过Baxter (Isolex 3000) 商业化的试剂盒。

[0094] 来自单胎的脐带血的量经常不够治疗成人或年龄较大的儿童。利用本发明的化合物或组合物的扩增方法的一个优势是,它能够使仅来自一个脐带血单元的足够量的造血干细胞的生产成为可能。

[0095] 因此,在一个实施方式中,起始细胞群体来源于已经富有CD34+细胞的新生脐带血细胞。在一个相关的实施方式中,所述起始细胞群体来源于一个或两个脐带血单元。

[0096] 在另一个实施方式中,起始细胞群体来源于已经富有CD34+细胞的人类动员了的外周血细胞。在一个相关实施方式中,所述起始细胞群体来源于仅从一个患者分离的人类动员了的外周血细胞。

[0097] 优选地,所述起始细胞群体可含有至少50%CD34+细胞,在某些实施方式中,超过90%的CD34+细胞。

[0098] 将取决于起始细胞群体、期望的最终细胞数目、和期望的HSC的最终比例改变用于造血干细胞扩增的起始细胞群体的培养条件。

[0099] 在一个具体的实施方式中,具体地,利用来自富有CD34+细胞的脐带血细胞的起始细胞群体,培养条件包括用于HSC扩增的,本领域通常已知的其他细胞扩增因子类细胞因子和生长因子的应用。这样的细胞因子和生长因子可能是生物分子或小分子和它们包含,但不限于,IL-1、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、GM-CSF、SCF、Flt3-L、促血小板生成素(TPO)、红细胞生成素、和它的类似物。如此处使用的,“类似物”包含如同天然存在的形式具有生物活性的细胞因子和生长因子的任何结构变体,包含但不限于,当与天然存在的形式或细胞因子受体激动剂如对TPO受体的激动剂抗体(例如,如在专利公开WO 2007/145227中详述的VB22B sc (Fv) 2,等)时,具有增强的或减少的生物活性的变体。选择细胞因子和生长因子组合,以扩增HSC和祖细胞,同时限制最终分化的细胞的产生。在一个具体的实施例中,从由SCF、Flt3-L和TPO组成的组选择一种或更多细胞因子和生长因子。

[0100] 已经通过(Kishimoto, Ann. review of Imm. 23:1 2005) 描述人类IL6或白细胞介素-6,也称为B细胞刺激因子2且是市场上可买到的。(Smith, M A et al., ACTA Haematologica, 105, 3:143, 2001) 已经描述了人类SCF或干细胞因子,也称为c-kit配体,肥大细胞生长因子或青灰因子(Steel factor)且是市场上可买到的。Flt3-L或FLT-3配体,也称为FL是结合到flt3-受体上的因子。(Hannum C, Nature 368 (6472):643-8) 已经描述了它,且是市场上可买到的。(Kaushansky K (2006) .N. Engl. J. Med. 354 (19):2034-45) 已经描述了TPO或促血小板生成素,也称为巨核细胞生长因子(MGDF) 或c-Mpl配体,且是市场上可买到的。

[0101] 不仅通过将它们加到培养基中,而且通过将它们固定到用于培养的基质或支撑物的表面上使用上述提到的化学成分和生物成分,具体地说,通过将要使用的成分溶于适当的溶剂,利用合成的溶液涂覆基质或支撑物,和然后洗掉过多的成分。可将使用的这样的成分添加到初步涂有物质的基质或支撑物上,其中所述物质结合到成分上。

[0102] 可在按照组合物的天然培养基、半合成培养基或合成培养基中进行HSC的扩增,和按照形状,可能是固体培养基、半固体培养基或液体培养基,和用于造血干细胞和/或造血祖细胞培养的任何营养培养基,利用上述描述的细胞扩增因子的混合物增补所述培养基。这样的培养基一般包括钠、钾、钙、镁、磷、氯、氨基酸、维生素、细胞因子、荷尔蒙、抗生素、血

清、脂肪酸、糖类等等。在培养中,如情况需要,可单一地或以组合的形式合并其他化学成分或生物成分。被合并培养基中的这样的成分可能是胎牛血清、人血清、马血清、胰岛素、转铁蛋白、乳铁蛋白、胆固醇、乙醇胺、亚硒酸钠、硫代甘油、2-巯基乙醇、牛血清白蛋白、丙酮酸钠、聚乙二醇、各种维生素、各种氨基酸、琼脂、琼脂糖、胶原蛋白、甲基纤维素、各种细胞因子、各种生长因子等等。适于扩增HSC的方法的这样的基础培养基的实施例包含,但不限于,StemSpan™无血清扩增培养基(加拿大,温哥华,干细胞技术)、StemSpan™H3000-限定的培养基(加拿大,温哥华,干细胞技术)、CellGro™、SCGM(德国,弗莱堡,CellGenix)、StemPro™-34SFM(Invitrogen)、达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)、Ham's营养混合物H12混合物F12,McCoy's 5A培养基、伊格尔极限必须培养基(EMEM)、aMEM培养基(a改良伊格尔极限必须培养基)、RPMI1640培养基、伊斯考夫改良达尔伯克培养基(IMDM)、StemPro34(Invitrogen)、X-VIVO 10(Cambrex)、X-VIVO 15(Cambrex)和Stemline II(Sigma-Aldrich)。

[0103] 在一个实施方式中,在适于HSC扩增的浓度下,在所述起始细胞群体的扩增方法期间,给予本发明的化合物或组合物。在一个具体的实施方式中,给予包括在1到3000nmol之间或例如在1到100nmol之间的浓度的所述化合物或组合物。

[0104] 在其中起始细胞群体基本上由来自一个或两个脐带血单元,或来自动员了的PB细胞或来自收获的骨髓的CD34+富有的细胞组成的一个具体的实施例中,使细胞在用于HSC扩增的条件下生长,例如,在2到21天之间和/或直到获得指示的成倍扩增和特征细胞群体。在一个具体的实施方式中,使细胞在用于HSC扩增的条件下离体生长不超过21天、12天、10天或7天。

[0105] 然后,可洗涤细胞群体,以去除本发明的化合物或组合物和/或细胞培养的任何其他成分,且在适当的细胞悬浮培养基中重悬,用于短期使用或在长期存储培养基中重悬,例如,适于低温保存的培养基。

[0106] 可选地,在初步涂有细胞外基质或细胞粘附分子之后,可在通常用于动物细胞培养的培养容器中培养HSC和/或造血祖细胞,如有盖培养基、烧瓶、塑料袋、Teflon™袋。用于这样的涂覆的材料可以是胶原蛋白1至XIX、纤连蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白1至12、氮、固生蛋白、血小板反应蛋白、血管假性血友病因子、骨桥蛋白、纤维蛋白原、各种弹性蛋白、各种蛋白聚糖、各种钙粘素、桥粒芯粘着蛋白(desmocolin)、桥粒芯蛋白、各种整联蛋白、E-选择素、P-选择素、L-选择素、免疫球蛋白超家族、人工基底膜、聚-D-赖氨酸、聚-L-赖氨酸、几丁质、壳聚糖、琼脂糖凝胶、海藻酸凝胶、水凝胶或它的片段。这样的涂覆材料可以是具有人工修饰的氨基酸序列的重组材料。可通过利用可机械地控制培养基组成、pH等和获得高密度培养的生物反应器培养造血干细胞和/或造血祖细胞(Schwartz R M, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,88:6760,1991;Koller M R, Bone Marrow Transplant,21:653,1998;Koller, M R, Blood,82:378,1993;Astori G, Bone Marrow Transplant,35:1101,2005)。

[0107] 本发明进一步提供具有扩增的HSC的细胞群体,可通过或通过上述描述的扩增方法获得。在一个具体的实施方式中,在适合于给予哺乳动物宿主的药用培养基中重悬这样的细胞群体,因此,提供治疗组合物。

[0108] 本发明进一步提供用于哺乳动物受试者的自体或同种异体干细胞移植的具有扩

增的HSC的细胞群体或它的组合物。

[0109] 例如,此处提到的受试者是骨髓捐赠者或具有或处在耗尽的或有限的血细胞水平的危险中的个体。可选地,受试者是在骨髓收获之前的骨髓捐赠者或在骨髓收获之后的骨髓捐赠者。可选地,受试者是骨髓移植的接受者。此处描述的方法在具有有限的骨髓储备的受试者中特别有用,如上了年级的受试者或先前暴露于免疫耗减治疗或脊髓移植治疗如化疗(例如,用于治疗白血病或淋巴瘤)的受试者。可选地,与对照血细胞水平相比,受试者具有减少的血细胞水平或处于发展减少的血细胞水平的危险中。如此处使用的,术语对照血细胞水平指的是,在改变受试者血细胞水平的事件之前或在实际缺少所述事件中的受试者的血细胞的平均水平。改变受试者的血细胞水平的事件包含,例如,贫血、创伤、化疗、骨髓移植和放射治疗。例如,受试者具有贫血或由于,例如,创伤的失血。

[0110] 除了通过本发明的方法扩增的造血干细胞和/或造血祖细胞之外,移植物还可以是含有缓冲溶液、抗生素、药物的组合物。

[0111] 例如,在化疗、放射治疗或骨髓移植之前、同时、或之后,将扩增的HSC群体或包括具有扩增的HSC的细胞群体的组合物给予受试者。可选地,受试者消耗,例如,特征是骨髓减少或耗尽的骨髓的先天的、遗传的或获得的综合征相关的骨髓。因而,可选地,受试者是需要造血作用的受试者。可选地,受试者是骨髓捐赠者或是具有或处于耗尽的骨髓的危险中的受试者。

[0112] 造血干细胞处理作为化疗或放射治疗的补充治疗是有用的。例如,将HSC集中到外周血内和然后从将经历化疗的受试者分离,和在治疗之后,归还细胞。因而,受试者是经历或预期经历免疫细胞耗减治疗如化疗、放射治疗或担任骨髓移植的捐赠者的受试者。骨髓是体内最多产的组织之一和因此,是经常首先被化疗药物和辐射损害的器官。结果是,在化疗或放射治疗期间迅速地破坏血细胞产生,和必须终止化疗或辐射,以允许造血细胞在再次利用化疗治疗患者之前补充血细胞供应。因此,如此处描述的,可选地,将通过此处描述的方法制造的HSC或血细胞给予需要额外的血细胞的这样的受试者。

[0113] 与能够在体内、体外、或离体(例如,小分子、抗体等)增强HSC的增殖的治疗剂和可选地,至少一种药用赋形剂或载体联合,提供通过上述描述的本发明的化合物或组合物扩增的HSCs。能够增强HSC增殖的治疗剂意味着:对TPO受体的激动剂抗体(例如,在专利公开WO 2007/145227详述的VB22B_{sc}(Fv)₂,等等);细胞因子如SCF、IL-6、Flt-3配体、TPO或TPO模仿的(例如,如在WO/2007/022269;WO/2007/009120;WO/2004/054515;WO/2003/103686;WO/2002/085343;WO/2002/049413;WO/2001/089457;WO/2001/039773;WO/2001/034585;WO/2001/021180;WO/2001/021180;WO/2001/017349;WO/2000/066112;WO/2000/035446;WO/2000/028987;WO/2008/028645等中描述的);粒细胞集落刺激因子(G-CSF);粒巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);前列腺素或前列腺素受体激动剂(例如,如在专利公开WO/2008/073748中详述的,前列腺素E2受体-1(EP-1)激动剂、前列腺素E2受体-2(EP-2)激动剂、前列腺素E2受体-3(EP-3)激动剂和前列腺素E2受体-4(EP-4)激动剂);四乙基五胺(TEPA);Notch-配体(Delta-1);和/或WNT激动剂。另外,利用间充质干细胞(MSCs)培养干细胞阻止移植物抗宿主疾病(GVHD)且可帮助干细胞扩增。

[0114] 药用是指不是生物学上的或相反是不期望的材料,也就是,可在不引起不期望的生物效应或以有害的方式与其中含有的药物组合物的其他成分相互作用的情况下,将材料

给予受试者或细胞。选择载体或赋形剂,以最小化活性组分的降解和最小化受试者或细胞的不利的副作用。

[0115] 以用于此处描述的方法的任何传统的方式配制组合物。给药是经由技术人员已知的有效的任何途径。例如,口服、非肠道(例如,静脉内注射)、通过肌肉注射、通过腹腔内注射、经皮肤地、体外地、鼻内地或局部地给予组合物。

[0116] 给药的优选的方法是静脉内注射。灌输的细胞的数目将考虑到因素如性别、年龄、体重、疾病或紊乱的类型、紊乱的阶段、细胞群体中期望细胞的百分比和产生治疗利益需要的细胞的量。在一个具体实施方式中,通过静脉内注射给予组合物和包括至少 $\geq 0.3 \times 10^5 \text{CD}34^+/\text{kg}$ 或 $> 2 \times 10^6 \text{CD}34^+$ 脐带血和 $2.5 \times 10^5 \text{CD}34^+/\text{kg}$ 或更多骨髓或动员了的外周血细胞。在一个具体的实施方式中,注射的细胞是来源于从单胎的脐带血细胞扩增的所有的细胞。

[0117] 例如,在白血病的治疗的情况中,可通过滴注将扩增的造血干细胞和/或造血祖细胞注入利用抗癌药物、全身辐射或免疫抑制药预治疗的患者,用于癌细胞的消灭或用于供体细胞嫁接的助长。适当地,通过负责人选择要治疗的疾病、预治疗和细胞移植方法。可根据移植治疗中使用的普通的试验判断这样的移植的造血干细胞和/或造血祖细胞在接受者中的嫁接、造血作用的恢复、移植的副作用和移植的治疗作用的存在。

[0118] 如上述描述的,本发明使得扩增造血干细胞和/或造血祖细胞,和通过利用扩增的HSC短期内安全地和容易地执行移植治疗成为可能。

[0119] 此处也提供的是包括填充有一种或更多此处描述的成分的一个或多个容器的试剂盒。可选地,这样的试剂盒包括需要或期望的溶液和缓冲液。可选地,试剂盒包含通过上述描述的方法制造的干细胞的扩增的群体或可含有用于制造HSC的扩增的群体的容器或组合物。具体地,本发明提供用于扩增离体造血干细胞的试剂盒,包括在发明内容中限定的化合物和这样的化合物在HSC扩增的方法中的使用的说明,和可选地,一种或更多细胞扩增因子,或用于细胞生长的培养基,具体地,用于如上述描述的HSC生长的培养基。试剂盒可进一步包括用于监视细胞的生长的抗体,如抗-CD34、抗-CD38和/或抗-CD45RA抗体。在一个具体的实施方式中,这样的试剂盒进一步包含选自IL6、FLT3-L、SCF和TPO组成的组的一种或更多细胞扩增因子。可选地,与这样的包装或试剂盒相关的是使用说明书。

[0120] 体内应用:也提供用于提供有效量的本发明的化合物的试剂盒,以增加受试者的HSC,包括在一段时间上供使用的化合物的一个或多个剂量,其中试剂盒中本发明的化合物的剂量的总数等于足够增加受试者的HSC的有效量。一段时间是从约一天至几天或几周或数月。因而,一段时间是从至少约5、6、7、8、10、12、14、20、21、30或60天或更多或一天和180天之间的任何数目的天数。

[0121] 生物学实验

[0122] 筛选实验:

[0123] 为了鉴定新的公认的HSC自我更新的激动剂,我们改编了高通量基础的-筛选试验,以检验初级人类动员了的CD34+细胞上的小分子化合物(5280低分子量化合物)的库。应该明白,相同的途径适用于来自本领域的技术人员已知的各种来源的CD34+细胞,以分离CD34+细胞。利用鼠抗人CD34+APC(来自BD单抗)染色单核细胞,和随后,利用抗-APC磁性微球(MicroBeads)(来自MACS,Miltenyi Biotec)磁性标记。利用AutoMACS柱保留磁性地标

记的细胞。我们的研究以在利用白细胞介素-6、促血小板生成素、F1t-3配体、和干细胞因子补充的培养基中培养的动员了的外周血-来源的CD34+CD45RA-细胞将促进单核细胞(MNC)的扩增,伴随CD34+CD45RA-群体的减少和HSC消耗的事实为基础。因此,阻止这种损失的低分子量化合物能够充当HSC扩增的激动剂。

[0124] 在384-孔平板中,在含有1 μ m的检验化合物或0.1%DMSO(媒介)的50 μ l培养基中培养2000CD34+细胞/孔。在试验的开始上和7-天孵育之后,确定CD34+CD45RA-细胞的比例。与对照相比(DMSO),如通过CD34+CD45RA-细胞的成比例的增加确定的,首先检验的不同的化学背景的5280化合物的六个促进CD34+CD45RA-细胞扩增,和十七(17)个增强分化。在第二次筛选中,再次分析CD34+CD45RA-细胞群体的六个化合物促进的扩增。这些六个化合物中的四个充当芳烃受体(AhR)拮抗剂,显示促进huCD34+细胞的离体扩增的作用机理(与SR1相同)。在7-天孵育期间,显示剩余的两个化合物(确定为不是芳烃受体(AhR)拮抗剂)促进包含CD34+细胞的MNC的扩增。那些两个剩余的化合物中的一个被鉴定为化合物1(表2)。

[0125] 下列生物实验用于评价本发明的化合物对造血干细胞扩增的作用。培养基:在媒介(DMSO)、阳性对照(SR1)、或本发明的化合物或化合物的组合的存在的情况下,使用的培养培养基由无-血清培养基组成,利用下列重组细胞因子补充所述培养基:白细胞介素-6、促血小板生成素、F1t-3配体、和干细胞因子,每一个以100ng/ml的最终浓度。细胞培养:如通过流式细胞术确定的,最初收获的CD34+细胞纯度超过90%。CD34+CD45RA-亚群体达到高于70%的纯度。以40,000细胞/ml接种细胞且在37 $^{\circ}$ C下以5%CO₂孵育7至12天。对于长期培养,利用无血清培养基接种来自动员了的PB的200,000CD34+细胞/ml,其中在500nM的载体(DMSO)、阳性对照、或本发明的化合物的存在下,以白细胞介素-6、促血小板生成素、F1t-3配体、和干细胞因子补充所述培养基,每一个以100ng/ml的最终浓度。在离体培养10天之后,化合物1(表2)促进MNCs超过7-倍的扩增、CD34+细胞超过输入值(0天)5-倍增加,和几乎超过用于媒介确定的值4-倍增加。在离体培养10天之后,与利用媒介(DMSO)培养的细胞(22.8 \pm 0.9%)相比,化合物1-处理的细胞保留高的CD34扩增水平(65.8 \pm 5.5%)。此外,与媒介处理的相比(4.7 \pm 0.4%),只有化合物1-处理的细胞保留最高的CD34+CD45RA-群体的表达(24.8 \pm 0.9%)。与媒介相比,利用化合物1培养的CD34+CD45RA-的数几乎增加3-倍,和超过输入的数的7-倍。最后,以剂量效应形式分析本发明的化合物(浓度范围是从1nM至5000nM),以确定与媒介条件相比,产生50%的CD34+CD45RA-数目增加的有效浓度。在表2中显示结果。

[0126] 化合物1没有通过芳烃(AhR)途径作用(图1)

[0127] 我们接下来证明,化合物1对原始CD34+CD45RA-原始造血细胞的影响在培养中是迅速可逆的。在图2中最好的显示这种影响,其中在化合物1的存在的情况下,将CD34+动员了的外周血细胞培养到7天。在那个时间上,通过洗涤细胞去除化合物1。绿色虚线显示,CD34+CD45RA-细胞的按比例减少紧随对照的培养的比例(DMSO:实心蓝线和虚线),然而,纵观2周培养(实心绿线),在化合物1的存在下供养的细胞保留更多的原始显型。这些结果清晰地指示,在无化合物暴露的2天内,如在对照培养中看到的,细胞已经获得分化标记。因而,化合物1对原始人类细胞的影响是迅速可逆的。

[0128] 化合物1不是分裂素(促细胞分裂剂)(图3)

[0129] 我们也显示,在缺少生长因子的情况下,化合物1不能独立地引发细胞增殖。图3中

显示的这些结果指示,类似于利用芳烃受体(SR1)的拮抗剂观察的,在缺少3个列出的生长因子的任何一个的情况下,即,F1t3、TPO和SCF,化合物1不能诱导细胞增殖。这指示,类似于SR1,化合物1对原始HSC显型离体的供养的影响不是由于对这个群体的促有丝分裂影响,而是由于对细胞分化的阻止的影响。

[0130] 化合物1和化合物40都阻止细胞分化且与AhR拮抗剂协同作用(图4)

[0131] 我们也利用细胞学分析和流式细胞术评价化合物1以及它的有效的衍生物之一化合物40对细胞分化的影响。两种类型的研究显示,化合物1和它的衍生物化合物40阻止细胞分化。在图4显示FACS结果。图4A图示化合物1对动员了的外周血细胞分化的影响。在7天扩增之后,将相对纯的($>85\%$ CD34+)动员了的外周血暴露于对照(DMSO)或化合物1或SR1或化合物1+SR1。结果强烈指示,在对照培养中,细胞迅速地释放CD34细胞表面表达,然而,通过引入最优水平的SR1和化合物1部分地废除这种影响。有趣地是,SR1和化合物1在维持细胞表面上的CD34表达中起协同作用。对于在图4B的脐带血样本和与图4C的化合物40一起重复这些观察。

[0132] 除了这点,我们显示,化合物1或化合物40对具有更多原始显型的细胞的影响是最显著的。例如,CD34+CD45RA⁻细胞(图4A至4C的底部图左上角四分之一)在利用化合物1或40补充的培养中比它们在SR1或在对照培养中更多。在这些培养中再次观察到化合物1或化合物40加SR1的叠加效应。

[0133] 图4D提供指示化合物40在阻止原始人类HSC富集的群体的表面上的CD34标记的消失中的效能的剂量-反应曲线。记录随着化合物的不同的剂量而变化的CD34的表达。

[0134] 化合物1和40离体扩增人类HSC显型(图5)

[0135] 图5显示,不仅化合物1而且化合物40在短期和长期培养中离体扩增人类HSC显型。图5A显示,在利用CD34+动员了的外周血(mPB)开始和供养12天的培养中,总的细胞技术在输入上增加约20倍。扩增的水平也相同,无论是利用化合物1、SR1、化合物1+SR1、还是对照DMSO开始培养。最显著地是,观察到化合物1对更多的CD34+CD45RA细胞亚群体的影响,在化合物1的存在下所述群体扩增约10倍和在化合物1+SR1的存在下扩增约十五倍。这种观察连同图4中呈现的结果强烈地表明,化合物1对细胞增殖没有影响,但是阻止CD34+CD45RA细胞的分化,在更多的成熟细胞为代价引起它们的纯扩增。图5B的结果指示,化合物1将在七天周期上引起CD34+CD45RA⁻脐带血细胞的30-40-倍扩增,然而在DMSO的存在下这些细胞扩增约十五倍(对照)。图5C显示类似的结果,但是培养的时间延长至十二天和通过化合物40取代化合物1。再次,如在左图指示的,总的细胞扩增相同,无论细胞暴露于DMSO(对照)、SR1、化合物40或化合物40加SR1。更加令人印象深刻的是,在利用化合物40补充的培养中在12天通过80倍扩增更多原始的CD34+CD45RA⁻细胞,然而这些细胞在利用SR1开始的培养中扩增稍微少于20-倍,显示这个化合物在芳烃抑制剂拮抗剂上的优越性。

[0136] 总之,这些结果显示,化合物1和化合物40对CD34⁺和更原始CD34⁺CD45RA⁻群体的扩增具有主要的影响,两者都具有来源于动员了的外周血或脐带血细胞的CD34⁺。

[0137] 利用传统的培养集落形成单位(CFU-C)实验检验扩增的细胞的离体功能性。在传统的条件下,将未处理的细胞或利用DMSO、阳性对照或本发明的化合物孵育的细胞接种在甲基纤维素培养基中。作为实施例,化合物1(表2,实施例1)扩增许多多潜能造血祖细胞。利用化合物1处理10天的1000CD34+mPB细胞的甲基纤维素培养导致多向粒细胞、红细胞、巨噬

细胞和巨核细胞 (GEMM克隆) 超过输入细胞的5-倍增加和与对照细胞相比, 导致10倍增加。这表明, 此处描述的化合物1也促进多潜能祖细胞的扩增。

[0138] 利用NSG老鼠模型评价化合物1对培养的mPB HSC的影响。

[0139] 接下来, 我们评价化合物1和化合物40对离体扩增十至十二天且引入NSG老鼠模型的脐带血和动员了的外周血人类HSC的影响。这些试验的目的是证实, 也在长期重新注入的骨髓干细胞/祖细胞上观察到我们的化合物对图4和5显示的原始HSC显型的影响。图6显示在移植后十三周评价的人类细胞的骨髓的重建。对于动员了的血液, 在图6A中呈现50,000和500,000细胞的成果。如这里显示的, 如在NSG老鼠模型中评价的, 在扩增人类干细胞中, HSC激动剂SR1一致地比DMSO(对照)好。再次, 化合物1在这些试验中好像优于SR1。如在体外培养中看到的, 化合物1和SR1在这些试验中显示协同作用(图6)。

[0140] 化合物1和40对利用NSG老鼠模型评价的培养的脐带血(CB)HSC的影响(图7)

[0141] 图7显示对在NSG老鼠模型中体内评价的培养的脐带血人类HSC的影响。图7A中的结果指示, 当与对照培养比较时, 化合物1对人类细胞的重建活性具有明显作用。在短期培养中完成这些试验, 也就是, 7天。最重要地, 图7B指示, 当利用1500CD34+细胞时, 与对于DMSO对照的2%相比, 化合物40具有10%的重建的平均水平的相当重要的作用。这个试验中化合物40的作用大于化合物1(图7A)可能是由于在图7B中描述的试验中使用的较长的培养时期。在接下来的部分中, 利用较长的培养时期(12至16天)提供更确定的体内试验。

[0142] 化合物1和40对利用NSG老鼠模型评价的培养的脐带血(CB)HSC的影响(图8)

[0143] Zandstra等人最近证明了, 叫做流加培养的新的方法优化引起人类HSC扩增的体外条件(美国专利号US7,795,024)。我们想证实, 本发明的化合物是否对这些先前优化的流加培养条件起作用。对于这些研究, 我们跟随利用流加培养+化合物40 12天或16天体外培养, 评价脐带血-来源的造血干细胞(HSC)的扩增。基于人类细胞到免疫缺陷老鼠的嫁接评价HSC数。

[0144] 如图8显示的, 直到至少16天, 化合物40的添加(Cpd40)对包含CD34+CD45RA-细胞的所有检验的群体的扩增提供主要的作用。这个作用在12-16天时间点中是最显著的, 清晰地证明流加培养(图8中的FB)和化合物40的协同作用。

[0145] 此外, 将新近富集的CD34+细胞和12或16天扩增的细胞移植到雌性NOD/SCID/IL-2R γ c-无效(NSG)老鼠中, 在移植之前, 已经将其在亚致命地(250拉德)辐照24h。通过尾静脉内注射注射细胞。在确定的时间点上(3周、9周、和16周), 将动物处死, 和从两个胫骨和两个股骨收获骨髓。将骨髓弄空红细胞和通过流式细胞术评价, 以量化人类细胞的嫁接。如果 $\geq 0.5\%$ 的细胞是人类CD45和人类HLA-ABC阳性的, 则将细胞记录为嫁接阳性。在评价的每一个时间点上, 将某些动物运送用于独立的组织学分析。

[0146] 如下面表1显示的, 在晚的16-周时间点上, 存在每一个条件的嫁接的剂量反应。有限稀释分析显示, 通过流加培养+化合物40 12天培养产生最高的HSC扩增(18.4-倍)。这显著地高于通过流加培养(分批进料)对照12天培养产生的扩增(8.1-倍)。与16天培养相比, 利用12天培养, 两种条件产生更高的扩增。这些结果提供在化合物40和在流加培养条件中它的活性的存在的情况下, 体外纯人类HSC扩增的明确的证明(图8+表1)。

[0147] 表1:16周有限稀释嫁接数据总结

[0148]

条件	HSC 的频率	TNC 扩增	0 天 HSC 等值	纯HSC扩增*
0 天新鲜的	1/6115	NA	1/6115	NA
12 天流加培养 (分批进料)	1/117676	156	1/754.3	8.1
12 天流加培养+ Cpd 40	1/54548	164	1/332.6	18.4
16 天流加培养	1/635952	413	1/1539.8	4
16 天流加培养+ Cpd 40	1/323585	495	1/653.7	9.4

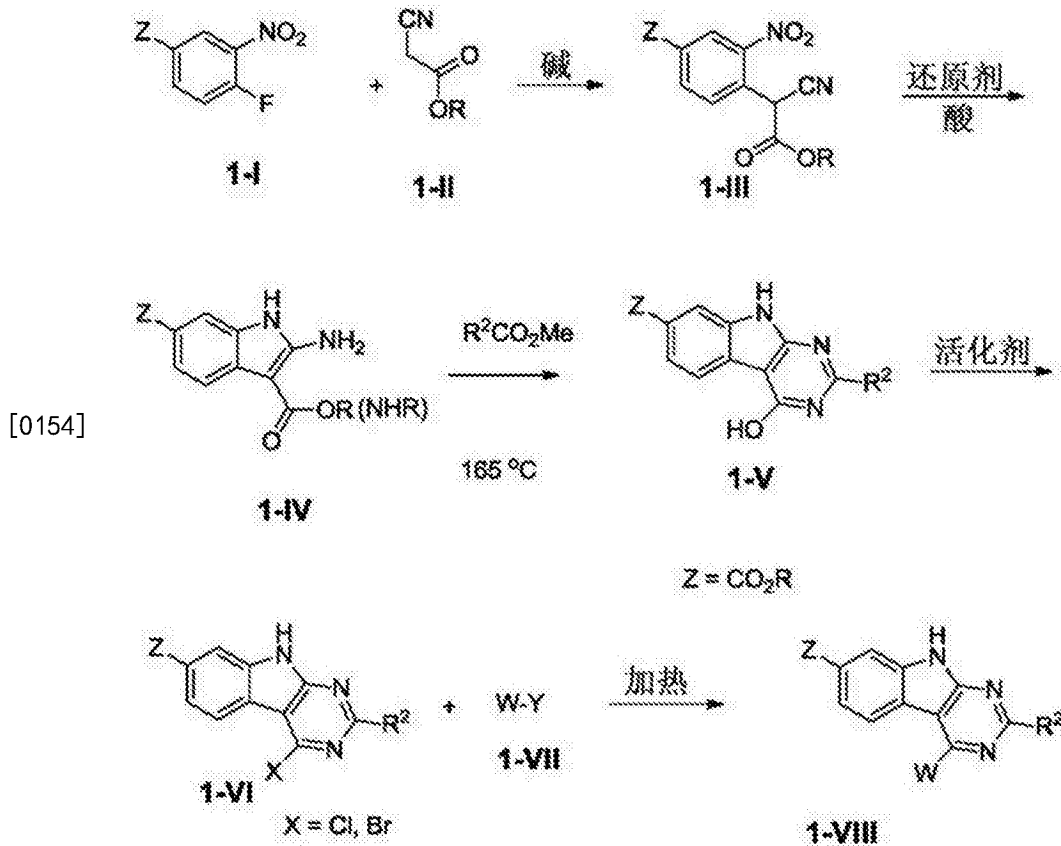
[0149] *纯HSC扩增 = (#HSC 0天) / (#HSC 12天或16天); 利用在16周, 在NSG老鼠中的有限稀释分析 (LDA) 测量的。

[0150] 合成方法

[0151] 下面概述的合成方法涉及本发明的实施方式, 其中取代基Z是在嘧啶并咪唑核的7-位置上。如技术人员应该明白的, 可执行相似的合成方法, 具有技术人员显然可见的变化, 对于本发明的实施例, 其中取代基Z是在不同的位置上, 如, 例如, 在5、8或6-位置上, 具体地在6-位置上。

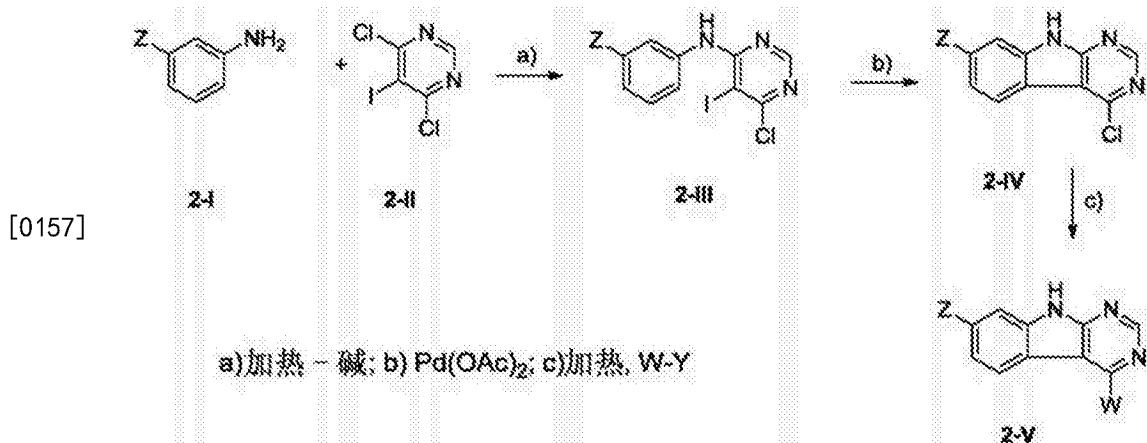
[0152] 方案1描述常见前体 (1-VI) 到本发明的化合物的合成。在第一步骤中, 在碱的存在下, 如, 但不限于, 氢氧化钠, 利用氰基乙酸烷基酯1-II处理芳基氟化物1-I。然后, 在乙酸中, 利用还原剂, 如, 但不限于, 锌粉处理合成的产物1-III, 以提供氨基咪唑1-IV, 在利用甲酰胺和甲酸铵的处理上其被转变成嘧啶1-V。利用试剂如三氯氧磷或三溴氧磷处理化合物1-V, 以提供反应中间产物1-VI, 利用胺1-VII处理该产物, 以提供本发明的化合物1-VIII。

[0153] 方案1



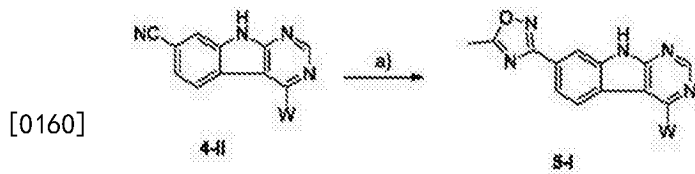
[0155] 方案2描述化合物2-V的制备。在具有或没有碱 (Morsin M. et al. Chemistry-A European Journal, 2009, vol. 15, #6, pp. 1468-1477) 或钯催化剂的情况下, 进行4,6-二氯-5-碘嘧啶2-II和相应的苯胺、苯胺或苯硫酚2-I的反应, 以给予中间产物2-III。利用Pd(OAc)₂将合成的中间产物2-III转变成三环加合物2-IV (Zhang M. et al. Tetrahedron Letters, 2002, vol. 43, p. 8235)。最后, 根据此处下面概述的实施例1, 获得本发明的化合物2-V。

[0156] 方案2



[0158] 方案3: 利用羟胺, 然后利用二甲基乙酰胺二甲缩醛处理化合物4-II (Tully W.R. et al. Journal of Medicinal Chemistry, 1991, vol. 34, p. 2060)。这产生化合物5-I。

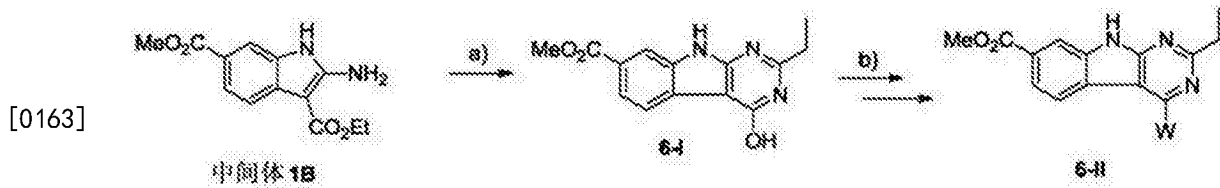
[0159] 方案3



a) 1- NH_2OH , 2- DMA 乙腈

[0161] 方案4: 在HCl/二噁烷中利用丙腈处理中间体1B(此处下面的实施例1), 随后是碱处理, 以提供甲基2-乙基-4-羟基-9H-咪唑并[4,5-b]吡啉-7-羧酸盐(6-I)。然后, 根据为实施例1描述的程序, 获得化合物6-II。

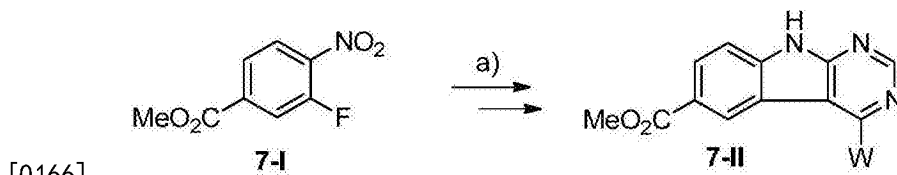
[0162] 方案4



a) HCl, 丙腈; b) 参见实施例1

[0164] 方案5: 从甲基3-氟-4-硝基苯甲酸盐7-I开始, 和根据实施例1的程序, 获得化合物7-II。

[0165] 方案5



a) 参见实施例1

实施例

[0167] 常规

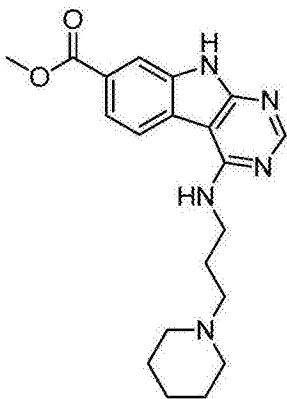
[0168] 报道的HPLC保留时间是用于利用下列条件的反相HPLC (Agilent, 1200系列) 溶剂A: MeOH:H₂O:TFA (5:95:0.05); 溶剂B: MeOH:H₂O:TFA (95:5:0.05); 流量: 3.0 mL/min; 2.0分钟内梯度0至100%; 柱: Zorbax C18, 3.5微米, 4.6x 30mm; 波长220nm。

[0169] 在来自安捷伦科技公司的6210G1969A LC/MSD TOF光谱仪上或在来自安捷伦科技公司的Quadrupole LC/MS Model G6120B上记录质谱, 其利用下列条件: 溶剂A: AcCN:H₂O:HCOOH (5:95:0.05); 溶剂B: AcCN:H₂O:HCOOH (95:5:0.05); 2.0分钟内梯度0至100%; 流量: 0.3 mL/min; 柱: Zorbax C18, 3.5微米, 2.1x 30mm; 波长220nm。

[0170] 实验程序

[0171] 实施例1

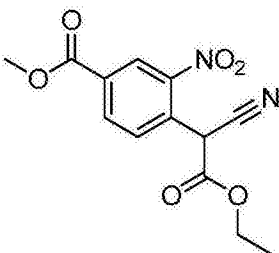
[0172]



[0173] 4-((3-(哌啶1-基)丙基)氨基)-9H-吡啶并[4,5-b]吲哚-7-羧酸甲酯

[0174] 中间体1A

[0175]

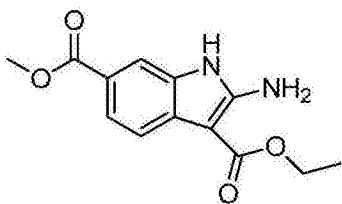


[0176] 4-(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代乙基)-3-硝基苯甲酸甲酯

[0177] 在0℃,将2-氰基乙酸乙酯(10.9mL,102mmol)缓慢地加入到N,N-二甲基甲酰胺(125mL)中的氢化钠(4.10g,102mmol)的60%悬浮液中,以产生灰色悬浮液。将混合物在0℃搅拌15分钟,并且添加甲基4-氟-3-硝基苯甲酸酯(10.2g,51mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(125mL)溶液。在0℃,将合成的深红色混合物搅拌30分钟且在室温3小时。利用1N HCl(40mL)和乙酸乙酯(40mL)稀释反应混合物。利用乙酸乙酯(3×50mL)萃取分开的水层。组合有机层且在无水硫酸钠上干燥、过滤和浓缩,以提供残渣(26g),通过快速-色谱分析法将其纯化(以100%己烷开始和逐步地添加乙酸乙酯增量,到包括100%乙酸乙酯),以提供14.9g的标题化合物。LCMS m/z 291.0 (M-H)⁻,保留时间(在分析的HPLC上)=1.76分钟。

[0178] 中间体1B

[0179]

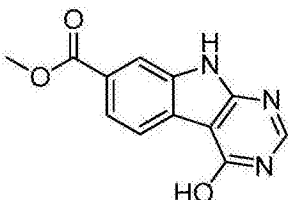


[0180] 3-乙基-6-甲基-2-氨基-1H-吲哚-3,6-二羧酸酯

[0181] 在500mL圆底烧瓶中,在乙酸(255mL)中,添加甲基4-(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代乙基)-3-硝基苯甲酸酯(14.9g,51.0mmol)和锌粉(16.7g,255mmol),以产生灰色悬浮液。在氮气氛围上,在室温下,在35分钟上完成锌的添加,其是相当放热的。在100℃下将混合物加热15小时。允许混合物冷却,通过硅藻土过滤和利用乙酸乙酯冲洗。蒸发提供残渣,在二氯甲烷-己烷中将其磨碎,并且在过滤后,提供6.3g的标题化合物。LCMS m/z 263.2 (M+H)⁺,保留时间(在分析性HPLC上)=1.90分钟。

[0182] 中间体1C

[0183]

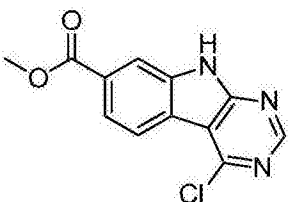


[0184] 4-羟基-9H-吡啶并[4,5-b]吲哚-7-羧酸甲酯

[0185] 在100mL圆底烧瓶中,添加3-乙基6-甲基2-氨基-1H-吲哚-3,6-二羧酸酯(1.1g, 4.19mmol)、甲酸铵(0.53g, 8.39mmol)、和甲酰胺(16.7mL, 419mmol),以产生黄褐色悬浮液,将其加热到165℃,加热12小时。允许混合物冷却至室温,和添加水。过滤合成的沉淀物、风干和在高度真空下过夜干燥,以提供1.1g的标题化合物。LCMS m/z 244.2 (M+H)⁺,保留时间(在分析性HPLC上)=1.51分钟。

[0186] 中间体1D

[0187]

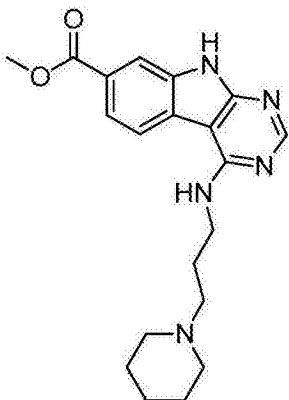


[0188] 4-氯-9H-吡啶并[4,5-b]吲哚-7-羧酸甲酯

[0189] 在100mL圆底烧瓶中,将4-羟基-9H-吡啶并[4,5-b]吲哚-7-羧酸甲酯(1.1g, 4.5mmol)和三氯氧磷(15mL, 161mmol)的混合物加热到90℃,加热16小时,冷却至室温,和在减压下蒸发。将残渣悬浮在二氯甲烷(20mL)中,和通过硅藻土过滤。蒸发提供作为橙色固体的标题化合物(360mg)。LCMS m/z 262.0 (M+H)⁺,保留时间(在分析性HPLC上)=2.02分钟。

[0190] 实施例1

[0191]

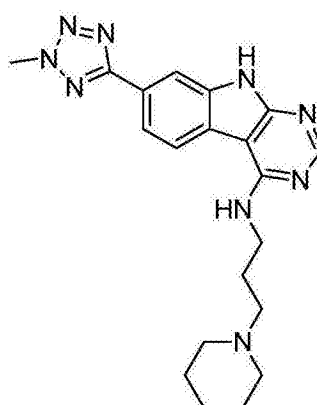
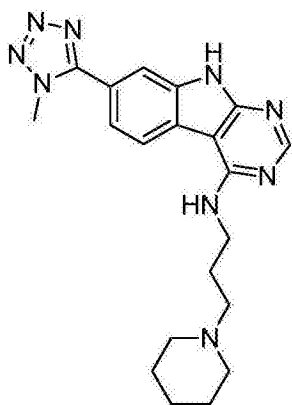


[0192] 4-((3-(哌啶1-基)丙基)氨基)-9H-吡啶并[4,5-b]吲哚-7-羧酸甲酯

[0193] 在2-5mL微波玻璃小瓶中,添加在甲醇(2mL)中的4-氯-9H-吡啶并[4,5-b]吲哚-7-羧酸甲酯(86mg, 0.33mmol),三乙胺(0.09mL, 0.66mmol)和3-(哌啶-1-基)丙烷-1-胺(0.078mL, 0.49mmol),且在微波反应器中,将混合物加热至140℃,加热15分钟。允许混合物冷却至室温和在减压下蒸发。将原材料溶解在N,N-二甲基甲酰胺中,且在反相Zorbax SB-C18柱21.2x 100mm上纯化,和利用MeOH-水-0.1%TFA洗脱。梯度:等度20%4分钟,然后,在15分钟上,到100%MeOH梯度。作为三氟乙酸盐获得标题化合物(根据本领域的技术人员已知的标准程序制备相应的自由碱和HCl盐)。LCMS m/z 368.2 (M+H)⁺,保留时间(在分析的

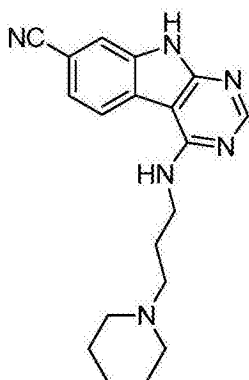
HPLC上) = 1.38分钟。

[0194] 实施例14



[0196] 7-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-N-(3-(哌啶1-基)丙基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-4-胺和7-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-N-(3-(哌啶1-基)丙基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-4-胺

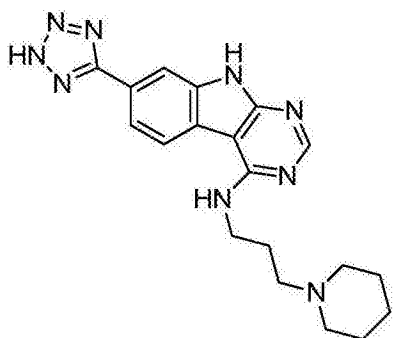
[0197] 中间体14A



[0199] 4-((3-(哌啶1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-7-腈

[0200] 从4-氟-3-硝基苯甲腈开始,根据实施例1中描述的程序制备中间体2A。

[0201] 中间体14B

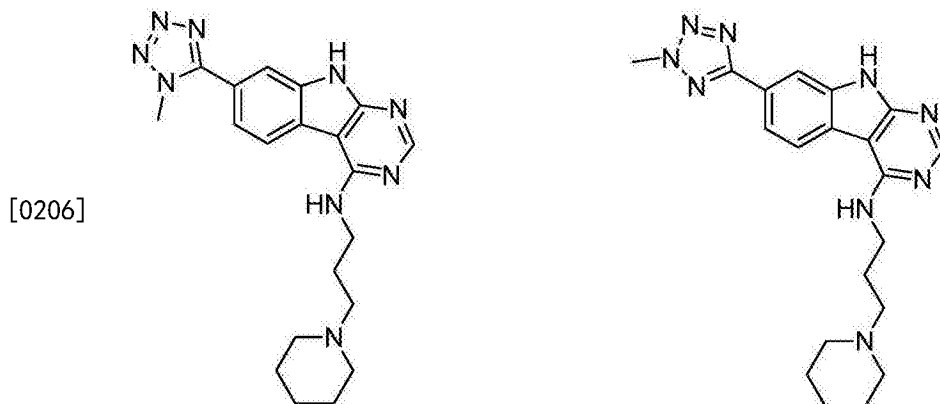


[0203] N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-7-(2H-四唑-5-基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-4-胺

[0204] 在2-5mL微波玻璃小瓶中,在(三氟甲基)苯(2mL)中添加4-((3-(哌啶1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-7-腈(47.5mg,0.142mmol)和三正丁基叠氮化锡(409μl,1.491mmol),以便产生黄褐色悬浮液。将玻璃小瓶放置在微波中,且加热到180℃,加热30分钟。将混合物浓缩至干燥和添加MeOH(3mL)随后HCl 4M的二噁烷溶液(1.07mL,4.26mmol),以获得黄色溶液。向合成的溶液中,添加二乙醚(3mL)。在20℃搅拌16小时。在Buchner上收

集获得的固体。利用二乙醚 (3×1mL) 和己烷 (3×1mL) 洗涤块状物,且在高度真空下,在30℃干燥固体,直到恒重,以提供作为HCl盐的56mg的标题化合物。LCMS m/z 378.2 (M+H)⁺,保留时间(在分析的HPLC上)=1.30分钟。

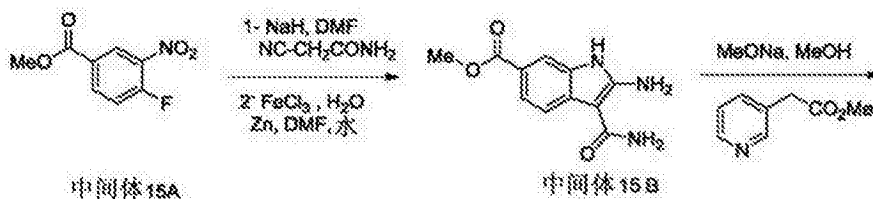
[0205] 实施例14



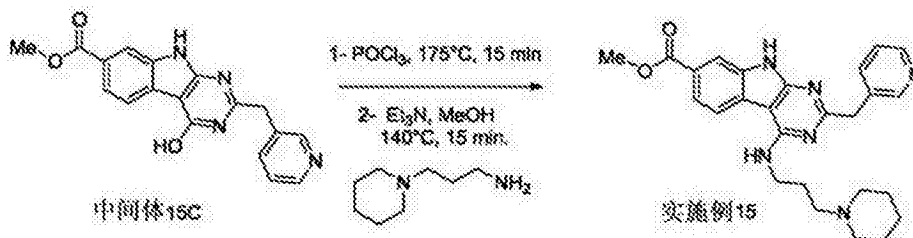
[0207] 7-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-4-胺和7-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-4-胺

[0208] 在25mL圆底烧瓶中,在四氢呋喃(2mL)和甲醇(0.5mL)中,添加N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-7-(2H-四唑-5-基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-4-胺盐酸盐(43mg,0.10mmol)和N,N-二异丙基乙胺(36μl,0.21mmol),以产生黄褐色悬浮液。然后,添加三甲基硅烷化重氮甲烷(Trimethylsilyldiazomethane)2M的己烷溶液(260μl,0.52mmol)。在20℃下将合成的稀薄的黄色悬浮液搅拌3小时,和添加醋酸(59μl,1.04mmol)。继续搅拌30分钟和在真空下去除溶剂,以提供残渣,通过快速-色谱分析法纯化(以100%二氯甲烷开始和逐渐地添加二氯甲烷:甲醇:28%wt.含水氢氧化胺(90:10:1)增量,以包括100%二氯甲烷:甲醇:28%wt.含水氢氧化胺(90:10:1))。获得的第一洗脱产物是7-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-4-胺(19mg)。LCMS m/z 392.2 (M+H)⁺,保留时间(在分析性HPLC上)=1.44分钟。第二洗脱产物是7-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-4-胺(5mg)。LCMS m/z 392.2 (M+H)⁺,保留时间(在分析行HPLC上)=1.27分钟。

[0209] 实施例15



[0210]



[0211] 将NaH(3.41g,85mmol)分批添加到DMF(53mL)中的2-氰基乙酰胺(7.18g,85mmol)

的冷溶液中。在室温30分钟之后,逐滴地添加在15mL DMF中的4-氟-3-硝基苯甲酸甲酯(8.5g,42.7mmol)的溶液。在3小时之后,添加冰、水和12mLHCl(10%)的混合物。过滤合成的固体,利用水冲洗和在高度真空下过夜干燥,以产生9.1g的4-(2-氨基-1-氰-2-氧乙基)-3-硝基苯甲酸甲酯:¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 3.93(s,3H) 5.78(s,1H) 7.77(s,1H) 7.91(d,J=7.83Hz,1H) 8.04(s,1H) 8.39(dd,J=8.02,1.76Hz,1H) 8.56(d,J=1.56Hz,1H)。

[0212] 将氯化铁六水合物(1.540g,5.70mmol)和锌(1.242g,19.00mmol)加到在DMF(4.75mL)和水(4.75mL)中的上述制备的粗糙的氰-胺基化合物(0.5g,1.900mmol)的溶液中,以产生黄色悬浮液。在放热之后,将混合物加热到100℃,加热45分钟,和然后缓慢地冷却至20℃,且搅拌22小时。过滤固体,利用DMF(3×3mL)洗涤和利用水(40mL)稀释滤液,同时在0℃搅拌。过滤固体和利用水(2×5mL)洗涤块状物。固体通常含有杂质。利用EtOAc(3×50mL)萃取水层和利用水(50mL)和然后利用卤水(30mL)洗涤合并的有机层。在无水MgSO₄上干燥有机层,过滤和浓缩,以产生287mg作为棕色的固体,利用丙酮(6mL)处理该固体,以产生固体悬浮液,利用己烷(5mL)稀释该悬浮液。然后,收集固体和在高度真空下,在40℃下干燥,直到恒重,以产生作为灰白色固体的中间体15B 2-氨基-3-氨基甲酰-1H-吡啶-6-羧酸甲酯(162mg,36.6%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 3.80(s,3H) 6.62(br.s.,2H) 7.04-7.18(m,2H) 7.53-7.63(m,2H) 7.72(s,1H) 10.80(s,1H);MS m/z 232.2(M+H)⁺;HPLC ca.96%,RT=1.37分钟。

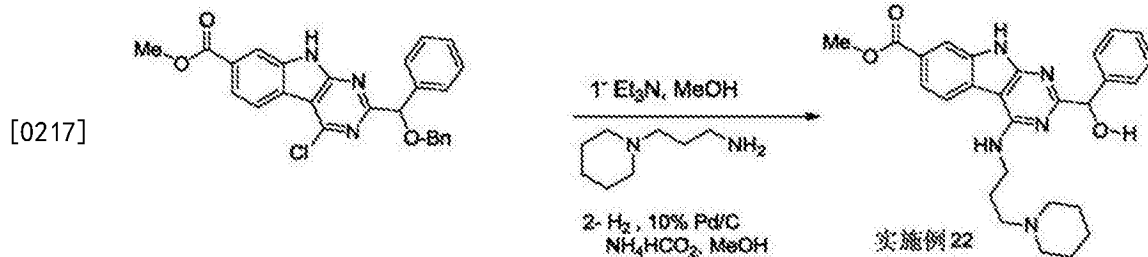
[0213] 将中间体15B(0.100g,0.429mmol)、2-(吡啶-3-基)醋酸甲酯(0.130g,0.858mmol)和甲醇钠25%wt的MeOH(0.196mL)溶液在甲醇(0.954mL)中的混合物放在微波炉中,且加热到140℃,加热45分钟。在冷却之后,添加AcOH(0.050mL,0.879mmol),和将合成的浆体在20℃搅拌1小时。过滤固体,利用MeOH(3×0.5mL)洗涤,在高度真空下,在20℃干燥,直到恒重,以产生作为棕色固体的中间体15C:4-羟基-2-(吡啶-3-亚甲基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(82mg,57.2%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 3.87(s,3H) 4.09(s,2H) 7.34-7.40(m,1H) 7.79(dt,J=8.1,1.8Hz,1H) 7.83(dd,J=8.2,1.2Hz,1H) 7.99(d,J=0.8Hz,1H) 8.02(d,J=8.2Hz,1H) 8.48(dd,J=4.9,1.4Hz,1H) 8.60(d,J=2.0Hz,1H) 12.49(br.s.,2H);MS m/z 335.2(M+H)⁺;HPLC 95.2%@220nm和92.8%@254nm,RT=1.42分钟。

[0214] 将4-羟基-2-(吡啶-3-亚甲基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.050g,0.150mmol)在POCl₃(0.948mL,10.17mmol)中的混合物放置在玻璃小瓶中,且在微波炉中加热到175℃,加热15分钟。在冷却之后,将反应混合物倒入冰水(19mL),然后通过50%含水NaOH(2.7mL)的缓慢添加碱化到pH8,和最后利用EtOAc(20mL)稀释,过滤固体(氯化物的第一次收获)和利用EtOAc(20mL)萃取水层和在无水MgSO₄上干燥合并的有机层,过滤和浓缩至干燥,以提供另外的35mg期望的氯化物衍生物的收获。直接在下一个步骤中使用4-氯-2-(吡啶-3-亚甲基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(53mg,100%产量)的组合分离的收获。

[0215] 将4-氯-2-(吡啶-3-亚甲基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.053g,0.150mmol)、3-(哌啶-1-基)丙烷-1-胺(0.072mL,0.451mmol)和三乙胺(0.063mL,0.451mmol)在MeOH(2.5mL)中的混合物放置在玻璃小瓶中,且在微波炉中加热至140℃,加热15分钟。在冷却和溶剂的蒸发之后,通过快速色谱分析法纯化残渣,以产生23mg黄色油和固体,利用CH₃CN(3mL)稀释且搅拌30分钟。过滤固体和利用CH₃CN(2×0.5mL)洗涤,然后在高

度真空下,在30℃干燥,直到恒重,以提供作为黄褐色固体的实施例15的化合物:4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(吡啶-3-亚甲基)-9H-咪唑并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(11mg,16%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.31-1.44(m,2H) 1.44-1.56(m,4H) 1.71-1.86(m,2H) 2.17-2.47(m,6H) 3.56-3.66(m,2H) 3.88(s,3H) 4.08(s,2H) 7.28-7.34(m,1H) 7.43(t,J=5.5Hz,1H) 7.76(dt,J=7.8,2.0Hz,1H) 7.81(dd,J=8.2,1.4Hz,1H) 7.99(d,J=1.4Hz,1H) 8.35(d,J=8.2Hz,1H) 8.41(dd,J=4.7,1.6Hz,1H) 8.59(d,J=2.0Hz,1H) 12.08(s,1H);MS m/z 459.2(M+H)⁺;HPLC>99.5%,RT=1.43分钟。

[0216] 实施例22



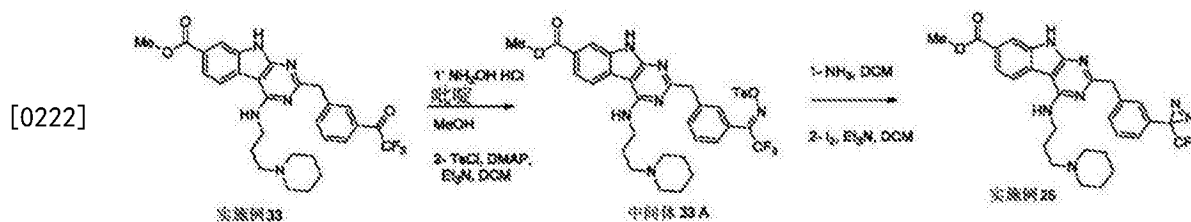
[0218] 将2-((苄氧基)(苯基)甲基)-4-氯-9H-咪唑并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(如实施例5描述制备的,0.228g,0.498mmol)、3-(哌啶-1-基)-1-胺(0.158mL,0.996mmol)和三乙胺(0.173mL,1.245mmol)在MeOH(3.8mL)中的混合物放置在微波炉中,且加热到140℃,加热30分钟。在冷却至室温之后,将混合物浓缩至干燥和通过快速色谱分析法纯化残渣,以提供作为浅黄色固体的2-((苄氧基)(苯基)甲基)-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-咪唑并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(172mg,61.3%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.29-1.42(m,2H) 1.42-1.56(m,4H) 1.72-1.91(m,2H) 2.18-2.47(m,6H) 3.66(tt,J=13.2,6.6Hz,2H) 3.88(s,3H) 4.54(d,J=11.7Hz,1H) 4.64(d,J=12.1Hz,1H) 5.50(s,1H) 7.21-7.43(m,8H) 7.51(t,J=5.9Hz,1H) 7.57(d,J=7.0Hz,2H) 7.82(dd,J=8.2,1.2Hz,1H) 8.00(d,J=1.2Hz,1H) 8.38(d,J=8.2Hz,1H) 12.22(s,1H);HRMS m/z 564.2979(M+H)⁺;HPLC 99.6%,RT=2.02分钟。

[0219] 在甲醇中,在氢下,在Pd-C 10%wt.(50%湿重)(0.159g,0.075mmol)和甲酸铵(0.235g,3.73mmol)的存在下,在衍生物2-((苄氧基)(苯基)甲基)-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-咪唑并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.042g,0.075mmol)上进行苄基的氢解作用。在55℃搅拌26小时之后,在硅藻土上过滤反应混合物,利用MeOH冲洗,和在旋转蒸发仪上浓缩至干燥,以产生133mg的残渣,通过利用Zorbax SB-C18柱21.2x 150mm的RP HPLC纯化残渣,利用MeOH-水-0.1%TFA洗脱,以提供作为白色固体的TFA盐的21.9mg的实施例22(50%产量):2-((羟基)(苯基)甲基)-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-咪唑并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯:¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.30-1.43(m,1H) 1.52-1.73(m,3H) 1.79(br.d,J=14.5Hz,2H) 1.96-2.09(m,2H) 2.54(s,1H) 2.74-2.89(m,2H) 3.11(dt,J=10.4,5.4Hz,2H) 3.38(d,J=12.1Hz,2H) 3.71-3.77(m,2H) 3.88(s,3H) 5.63(s,1H) 7.19-7.26(m,1H) 7.27-7.35(m,2H) 7.48-7.56(m,2H) 7.62(t,J=5.9Hz,1H) 7.85(dd,J=8.2,1.4Hz,1H) 8.03(d,J=1.4Hz,1H) 8.38(d,J=8.2Hz,1H) 8.92(br.s.,1H) 12.21(s,1H);HRMS m/z 474.2511(M+H)⁺;HPLC>99%,RT=1.68分钟。

[0220] 将戴斯-马丁高碘烷试剂(22.67mg,0.053mmol)加到2-((羟基)(苯基)甲基)-4-((3-

(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(实施例22的化合物)和TFA(15.7mg,0.027mmol)在DCM(1000 μ L,15.54mmol)的混合物中,以产生淡橙色溶液。在1h之后,蒸发溶剂,和通过快速色谱分析法纯化残渣,以提供作为嫩黄色固体的实施例23:2-苯甲酰-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(10mg,79%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 1.27-1.36(m,2H)1.36-1.48(m,4H)1.74-1.88(m,2H)2.14-2.44(m,6H)3.52-3.68(m,2H)3.91(s,3H)7.54(t,J=7.8Hz,2H)7.69(t,J=7.4Hz,1H)7.76(t,J=5.1Hz,1H)7.90(dd,J=8.2,1.4Hz,1H)7.94(d,J=7.0Hz,2H)8.10(d,J=1.4Hz,1H)8.52(d,J=8.2Hz,1H)12.43(s,1H);HRMS m/z 472.2342(M+H)⁺;HPLC 97.1%@220nm and 98.9%@254nm,RT=1.86分钟。

[0221] 实施例25



[0223] 在MeOH(4.00mL)和吡啶(0.666mL)中,将盐酸羟胺(0.08g,1.2mmol)加入到4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟乙酰基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(实施例33的化合物)(0.285g,0.515mmol)中,以产生黄色溶液。在60℃下加热5天之后,将混合物浓缩至干燥,且将残渣溶解到DCM(75mL)和MeOH(15mL)中,和利用饱和NaHCO₃(20mL)洗涤该溶液。利用CH₂Cl₂(50mL)和MeOH(10mL)的混合物将水层萃取两次,和在无水MgSO₄上干燥合并的有机层,过滤和浓缩至干燥,以产生作为灰白色固体的4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-(异亚硝基)乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(293mg,100%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 1.32-1.43(m,2H)1.44-1.56(m,4H)1.76-1.87(m,2H)2.23-2.44(m,6H)3.57-3.67(m,2H)3.88(s,3H)4.04-4.12(m,2H)7.25-7.33(m,1H)7.34-7.46(m,2H)7.50(m,J=7.6,4.1Hz,1H)7.55(d,J=7.4Hz,1H)7.81(dd,J=8.2,1.2Hz,1H)7.99(d,J=1.2Hz,1H)8.36(d,J=8.2Hz,1H)12.07(d,J=3.5Hz,1H);MS m/z 569.2(M+H)⁺;HPLC>95%,RT=1.88分钟。

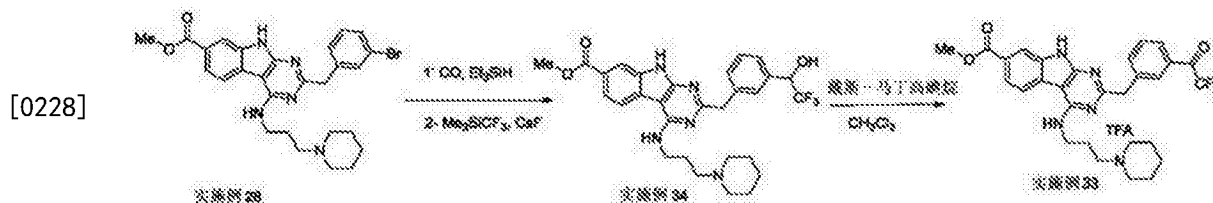
[0224] 将对甲苯磺酰氯(0.048g,0.251mmol)分批加到4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-(异亚硝基)乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.130g,0.229mmol)、4-二甲基氨基吡啶(2.79mg,0.023mmol)和三乙胺(0.038mL,0.274mmol)在DCM(10.00mL)的冷混合物中,以产生白色悬浮液。在室温1小时之后,利用DCM(10mL)稀释琥珀色溶液和利用水洗涤(3 \times 10mL)。在无水MgSO₄上干燥有机层,过滤和浓缩至干燥,以产生作为黄褐色泡沫的4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-(甲苯磺酰)亚氨基)乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(188mg,99%产量):MS m/z 723.2(M+H)⁺;HPLC>89%,RT=2.09分钟。

[0225] 向冷却至-78℃的4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-(甲苯磺酰)亚氨基)乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.188g,0.260mmol)的DCM(5.00mL)溶液中,添加氨(1.689mL,78mmol)并且密封管,且温热至20℃。反应混合物随着时间变蓝和在3.5小时之后,它被再次冷却至-78℃,和然后利用隔膜+氮出口将其缓慢地温热

至20℃,以蒸发大部分的氨。在3.5小时之后,在Buchner上过滤反应混合物,以去除大部分的对甲苯磺酸铵盐,利用DCM(3×1.5mL)洗涤固体和将滤液浓缩至干燥,以产生黄色泡沫,通过快速色谱分析法纯化,以提供作为白色泡沫的4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(3-(三氟甲基)二氮杂环丙烷-3-基苄基)-9H-嘌呤并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(115mg,78%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.31-1.43(m,2H) 1.50(五个一组,J=5.3Hz,4H) 1.80(dt,J=14.1,7.0Hz,2H) 2.32(m,J=6.7,6.7Hz,6H) 3.58-3.67(m,2H) 3.88(s,3H) 3.93(br.d,J=7.4Hz,1H) 4.05(br.d,J=8.6Hz,1H) 4.07(s,2H) 7.32-7.43(m,3H) 7.47(m,J=6.3Hz,1H) 7.59(s,1H) 7.81(dd,J=8.4,1.2Hz,1H) 7.99(d,J=1.2Hz,1H) 8.35(d,J=8.4Hz,1H) 12.07(s,1H);MS m/z 568.2(M+H)⁺;HPLC>94%,RT=1.72分钟。

[0226] 将碘(0.028g,0.111mmol)加入到4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(3-(三氟甲基)二氮杂环丙烷-3-基苄基)-9H-嘌呤并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.060g,0.106mmol)和三乙胺(0.044mL,0.317mmol)在DCM(2mL)中的混合物中,以产生黄色溶液。在15分钟之后,在减压下蒸发溶剂,以产生残渣,通过快速色谱分析法纯化,以提供95mg的黄色泡沫。将泡沫溶于DCM(15mL)和利用sat.NaHCO₃(10mL)洗涤。在无水MgSO₄上干燥有机层,过滤和浓缩至干燥,以作为淡黄色固体提供实施例25的化合物:4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(3-(三氟甲基)-3H-二氮杂环丙烷-3-基苄基)-9H-嘌呤并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(50mg,84%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.36(m,J=5.1Hz,2H) 1.48(五个一组,J=5.5Hz,4H) 1.76(五个一组,J=7.0Hz,2H) 2.30(br.t,J=6.5,6.5Hz,6H) 3.54-3.67(m,2H) 3.88(s,3H) 4.09(s,2H) 7.14(d,J=7.8Hz,1H) 7.26(s,1H) 7.38-7.47(m,2H) 7.52(d,J=7.4Hz,1H) 7.81(d,J=8.2Hz,1H) 7.99(s,1H) 8.35(d,J=8.2Hz,1H) 12.06(s,1H);HRMS m/z 566.2497(M+H)⁺;HPLC 94.5%@220nm和92.9%@254nm,RT=2.05分钟。

[0227] 实施例33和34



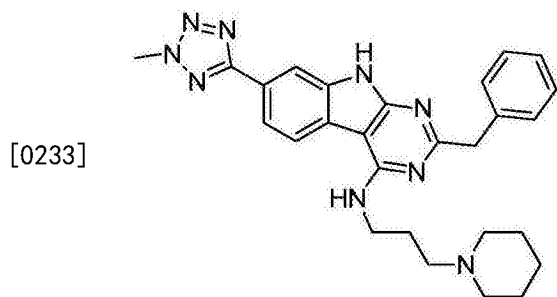
[0229] 将CO充入2-(3-溴代苄基)-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘌呤并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(如针对实施例15制备的,0.090g,0.168mmol),三乙基硅烷(0.054mL,0.336mmol)和PdCl₂(dppf)(6.14mg,8.39μmol)的溶液中,并且在95℃将混合物过夜加热。通过制备型HPLC纯化粗糙的混合物,以产生作为固体的44mg羰基化产物:¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.28-1.40(m,1H) 1.50-1.72(m,3H) 1.73-1.84(m,2H) 1.95-2.06(m,2H) 2.74-2.87(m,2H) 3.03-3.12(m,2H) 3.33-3.41(m,2H) 3.88(s,3H) 4.20(s,2H) 7.46-7.60(m,2H) 7.73(d,J=7.83Hz,1H) 7.79(d,J=7.43Hz,1H) 7.84(dd,J=8.22,1.57Hz,1H) 7.91(s,1H) 8.01(d,J=1.17Hz,1H) 8.37(d,J=8.61Hz,1H) 8.92(br.s.,1H) 10.00(s,1H) 12.16(s,1H)。

[0230] 将三甲基(三氟甲基)硅烷(0.7mL,3.5mmol)加入到冷却至0℃的2-(3-甲酰苄基)-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘌呤并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.260g,0.535mmol)和氟化铯(5.69mg,0.037mmol)的混合物中。在室温下搅拌2天之后,在2mL水中添加浓缩HCl

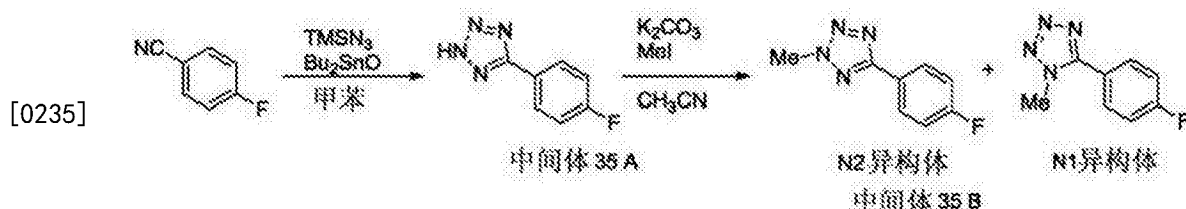
(0.5mL),且搅拌15min。利用乙酸乙酯稀释混合物,利用固体 Na_2CO_3 中和,使相分离和利用EA将水层萃取2次。利用水洗合并的有机层,在无水 MgSO_4 上干燥,过滤和去除溶剂,以产生残渣,通过制备型HPLC纯化,以产生126mg相应的TFA盐: $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.24-1.43 (m, 1H) 1.49-1.73 (m, 4H) 1.73-1.82 (m, 2H) 1.97-2.07 (m, 2H) 2.80 (q, $J=11.70\text{Hz}$, 2H) 3.02-3.12 (m, 2H) 3.36-3.42 (m, 2H) 3.88 (s, 3H) 4.10 (s, 2H) 5.12 (q, $J=7.17\text{Hz}$, 1H) 6.81 (br. s., 1H) 7.30-7.35 (m, 2H) 7.36-7.42 (m, 1H) 7.48-7.58 (m, 2H) 7.84 (dd, $J=8.41, 1.37\text{Hz}$, 1H) 8.01 (s, 1H) 8.37 (d, $J=8.61\text{Hz}$, 1H) 8.95 (br. s., 1H) 12.17 (s, 1H); MS m/z 554.2 (M+H)⁺; HPLC RT 2.142分钟。

[0231] 将戴斯-马丁高碘烷 (56.5mg, 0.133mmol) 加入到DCM (753 μL) 中的4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-(羟乙基)苄基)-9H-咪唑并[4,5-b]吡啉-7-羧酸甲酯 (20mg, 0.036mmol) 的溶液中,以产生白色悬浮液。在20 $^\circ\text{C}$ 搅拌1小时之后,通过快速色谱分析法纯化混合物,以产生作为黄色固体的实施例33,4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟乙酰基)苄基)-9H-咪唑并[4,5-b]吡啉-7-羧酸甲酯: DMSO-d_6 中的 $^1\text{H NMR}$ 与期望的产物一致,但是由于水合物形式的存在更复杂;HRMS m/z 554.2384 (M+H)⁺; HPLC > 95%, RT=1.76和1.87分钟(酮+水合物)。

[0232] 实施例35



[0234] 中间体35B:N2异构体前体



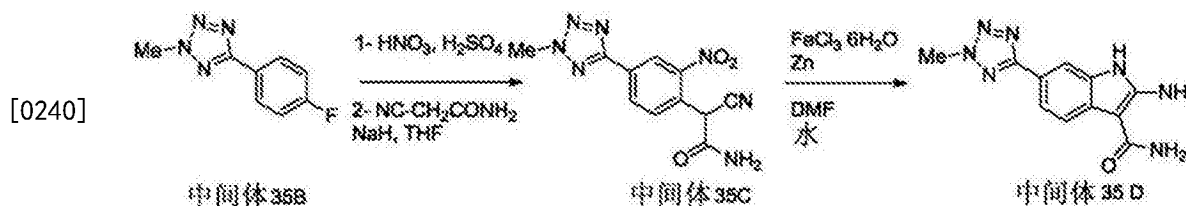
[0236] 将对氟苯甲腈 (5g, 41.3mmol)、二丁基氧化锡 (2.055g, 8.26mmol)、和三甲基硅烷叠氮化物 (8.22mL, 61.9mmol) 在甲苯 (165mL) 中的混合物加热至100 $^\circ\text{C}$,且搅拌16.5小时。在冷却至室温之后,利用NaOH 1M (83mL) 萃取有机层,和利用EtOAc (2 \times 85mL) 洗涤水层。利用HCl 2M (41.3mL) 将水层酸化至pH2。利用EtOAc (200mL然后100mL) 将含水混合物萃取两次,并且利用卤水 (60mL) 洗涤合并的有机层,在无水 MgSO_4 上干燥、过滤和浓缩至干燥,以提供作为白色固体的中间体 (5-(4-氟苯基)-2H-四唑, 6.61g, 98%产量): $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ ppm 7.42-7.53 (m, 2H) 8.04-8.14 (m, 2H); MS m/z 165.2 (M+H)⁺; HPLC > 99.5%, RT=1.96分钟。

[0237] 将5-(4-氟苯基)-2H-四唑 (6.61g, 40.3mmol)、 K_2CO_3 (6.68g, 48.3mmol)、和碘甲烷 (3.02mL, 48.3mmol) 在乙腈 (115mL) 中的混合物加热至回流(实际82 $^\circ\text{C}$),加热一小时。在冷却之后,将混合物浓缩至干燥,并且在水 (75mL) 和EtOAc (100mL) 之间分配残渣。使层分离,

利用EtOAc (50mL) 向后萃取有机层和利用水 (50mL) 和卤水 (50mL) 洗涤组合的有机层。在无MgSO₄上干燥有机层、过滤和浓缩,以产生9.5g在静置上凝固的无色油。通过快速色谱分析法纯化残渣,以产生2种主要产品:作为白色固体的N2异构体的中间体35B:5-(4-氟苯基)-2-甲基-2H-四唑 (5.09g,70.9%产量):在4.42ppm上的甲基和芳香质子之间没有观察到NOE;¹H NMR (400MHz,DMSO-d₆) δppm 4.42 (s,3H) 7.33-7.45 (m,2H) 8.03-8.14 (m,2H);MS m/z 179.2 (M+H)⁺;HPLC>99.5%,RT=1.75分钟。

[0238] 作为白色固体的N1异构体:5-(4-氟苯基)-1-甲基-1H-四唑 (1.87g,26.1%产量):在4.16ppm上的甲基和在7.89-7.97ppm上的两个芳香质子之间观察到的NOE证实了该结构;¹H NMR (400MHz,DMSO-d₆) δppm 4.16 (s,3H) 7.43-7.53 (m,2H) 7.89-7.97 (m,2H);MS m/z 179.2 (M+H)⁺;HPLC>99.5%,RT=1.29分钟。

[0239] 中间体35C和D

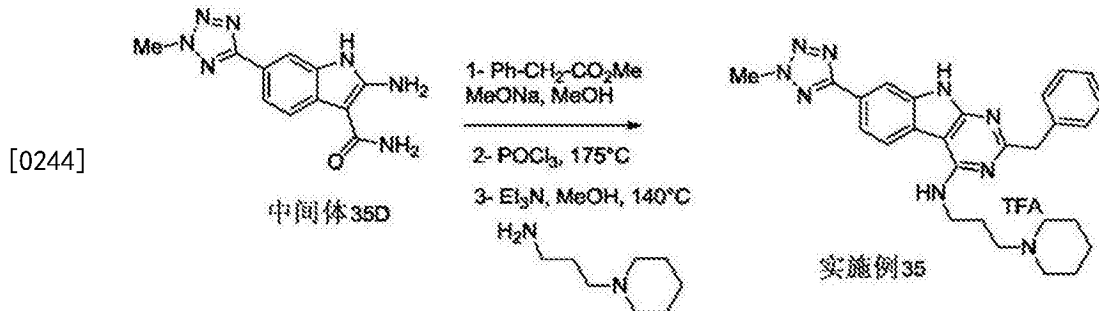


[0241] 将中间体35B (5-(4-氟苯基)-2-甲基-2H-四唑,1g,5.61mmol) 在硫酸 (16.45mL,309mmol) 中的溶液冷却至0℃,然后逐滴添加发烟硝酸 (0.288mL,6.17mmol)。在2.5小时之后,添加更多的发烟硝酸 (0.065mL,1.403mmol) 和允许混合物加热至20℃。在5小时之后,将混合物倒入2:1冰水混合物中 (150mL),导致白色悬浮液的形成。在30分钟之后,过滤固体,利用水洗涤 (4×10mL,直到洗涤的中性pH),在高度真空下,在25℃干燥,直到恒重:作为灰白色固体的5-(4-氟-3-硝基苯基)-2-甲基-2H-四唑 (1.16g,93%产量):¹H NMR (400MHz,DMSO-d₆) δppm 4.47 (s,3H) 7.81 (dd,J=11.2,8.8Hz,1H) 8.44 (ddd,J=8.7,4.2,2.3Hz,1H) 8.68 (dd,J=7.2,2.2Hz,1H);MS m/z 224.2 (M+H)⁺;HPLC 98.3%,RT=1.72分钟。

[0242] 将2-氰基乙酰胺 (0.888g,10.56mmol) 在DMF (2.268mL) 中的溶液加入到氢氧化钠60%wt的矿物油 (0.443g,11.08mmol) 在DMF (5.67mL) 中的悬浮液中,以产生灰色悬浮液。在冷却至0℃之后 (注意:氢气体逸出),在0℃将合成的混合物搅拌30分钟。然后,添加5-(4-氟-3-硝基苯基)-2-甲基-2H-四唑 (1.15g,5.15mmol) 在DMF (2.3mL) 中的溶液,以产生深紫色溶液。在3小时之后,将反应混合物缓慢地倒入冰水混合物 (33.0mL) 和浓缩HCl (0.952mL) 中。将合成的黄色浆体搅拌30分钟,过滤固体,利用水洗涤 (3×5mL) 和然后利用己烷 (2×5mL) 洗涤,在高度真空下40℃干燥,直到恒重,以产生作为黄色固体的2-氰基-2-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-2-硝基苯基) 乙酰胺 (1.41g,95%产量):¹H NMR (400MHz,DMSO-d₆) δppm 4.49 (s,3H) 5.77 (s,1H) 7.77 (s,1H) 7.95 (d,J=8.2Hz,1H) 8.03 (s,1H) 8.51 (dd,J=8.2,1.8Hz,1H) 8.70 (d,J=1.8Hz,1H);MS m/z 288.1 (M+H)⁺;HPLC 96.4%@220nm,RT=1.31分钟。

[0243] 将氯化铁六水合物 (2.82g,10.44mmol) 和锌 (2.276g,34.8mmol) 分批加到2-氰基-2-(4-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-2-硝基苯基) 乙酰胺 (1g,3.48mmol) 在DMF (4.75mL) 和水 (4.75mL) 的混合物中,以产生黄色悬浮液,将其加热至100℃,加热1.25小时。然后,将混合物冷却至20℃,利用MeOH (50.0mL) 稀释,在硅藻土上过滤和在减压下浓缩至实际20mL (以去

除大部分的MeOH)。然后,利用水(50mL)和EtOAc(100mL)稀释混合物,强烈地搅拌和过滤。利用EtOAc(2×50mL)萃取水层和利用饱和NaHCO₃(50mL)和卤水(30mL)洗涤合并的有机层。在无水MgSO₄上干燥有机层,过滤和浓缩,以产生489mg紫色固体,利用快速色谱分析法纯化该固体,以给出紫色固体2-氨基-6-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-1H-吡啶-3-甲酰胺(356mg, 39.7%产量):¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δppm 4.38(s, 3H) 6.57(s, 2H) 7.01(s, 2H) 7.61-7.69(m, 2H) 7.81(s, 1H) 10.77(s, 1H); MS m/z 258.2 (M+H)⁺; HPLC ca. 78%, RT=1.34分钟。



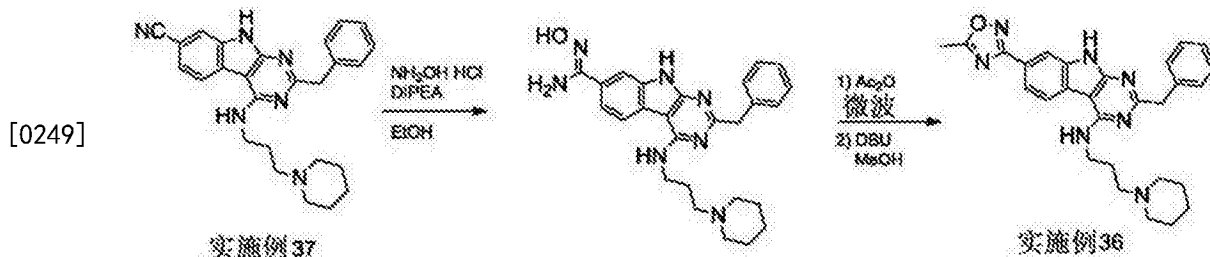
[0245] 将微波管中的中间体35D(2-氨基-6-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-1H-吡啶-3-甲酰胺, 0.35g, 1.361mmol)、甲基2-乙酸苯酯(0.288mL, 2.041mmol)和MeOH(0.467mL)中的甲氧基钠25%wt.和甲醇(3.03mL)的混合物放置在微波炉中,且加热至140°C,加热一小时。在冷却至室温之后,利用水(1mL)和AcOH(4mL)稀释,将混合物搅拌30分钟,以允许结晶。过滤固体,利用MeOH(5×1mL)洗涤,在高度真空下,在40°C干燥,直到恒重,以提供棕色固体2-苄基-7-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-4-醇(220mg, 45.2%产量)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δppm 4.03(s, 2H) 4.43(s, 3H) 7.24-7.29(m, 1H) 7.34(t, J=7.8Hz, 2H) 7.37-7.43(m, 2H) 7.92(dd, J=8.0, 1.4Hz, 1H) 8.04-8.10(m, 2H) 12.38(s, 1H) 12.47(s, 1H); MS m/z 358.2 (M+H)⁺; HPLC 82.9%, RT=1.89分钟。

[0246] 在2-5mL微波小瓶中,添加粗产物2-苄基-7-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-4-醇(0.220g, 0.616mmol)和POCl₃(3.90mL, 41.9mmol),以给出棕色悬浮液。将玻璃小瓶放置在微波炉中,且加热至175°C,加热15分钟,然后允许冷却。然后,将反应混合物倒入水和冰混合物中(80mL),通过NaOH 50%wt(11mL)和然后EtOAc(80mL)的缓慢添加碱化至pH8。过滤某些固体和使层分离。利用EtOAc(80mL)萃取水层和在无水MgSO₄上干燥有机层,过滤和浓缩至干燥,以给出相应的氯代衍生物:作为棕色固体的2-苄基-4-氯-7-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶(189mg, 82%产量)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δppm 4.31(s, 2H) 4.46(s, 3H) 7.20-7.26(m, 1H) 7.28-7.39(m, 4H) 8.09(dd, J=8.2, 1.2Hz, 1H) 8.21-8.25(m, 1H) 8.39(d, J=8.2Hz, 1H) 12.93(s, 1H); MS m/z 376.2 (M+H)⁺; HPLC 95.6%, RT=2.30分钟。

[0247] 在微波炉中,在140°C,将上述描述制备的2-苄基-4-氯-7-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶(0.050mg, 0.133mmol)和Et₃N(0.037mL, 0.266mmol)和3-(哌啶-1-基)丙烷-1-胺(0.033mL, 0.200mmol)在MeOH(0.6mL)中的混合物加热25分钟。在冷却和溶剂的蒸发之后,通过RP-HPLC纯化残渣(MeOH-水(0.5%TFA)20%至100%MeOH,)以提供55mg的实施例35:2-苄基-7-(2-甲基-2H-四唑-5-基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-4-胺2,2,2-三氟醋酸酯:¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.27-1.41(m, 1H) 1.53-1.72(m, 3H) 1.79(d, J=13.69Hz, 2H) 1.98-2.09(m, 2H) 2.75-2.87(m, 2H) 3.09(dt, J=

10.27, 5.23Hz, 2H) 3.39 (d, J=11.35Hz, 2H) 3.69 (q, J=5.87Hz, 2H) 4.09 (s, 2H) 4.44 (s, 3H) 7.18-7.24 (m, 1H) 7.31 (t, J=7.63Hz, 2H) 7.35-7.42 (m, 2H) 7.51 (br. s., 1H) 7.93 (dd, J=8.22, 1.17Hz, 1H) 8.11 (d, J=1.17Hz, 1H) 8.43 (d, J=8.22Hz, 1H) 9.04 (br. s., 1H) 12.15 (s, 1H); HPLC 99% at 254nm, Rt 2.063分钟; HRMS m/z 482.2817 (M+H)⁺.

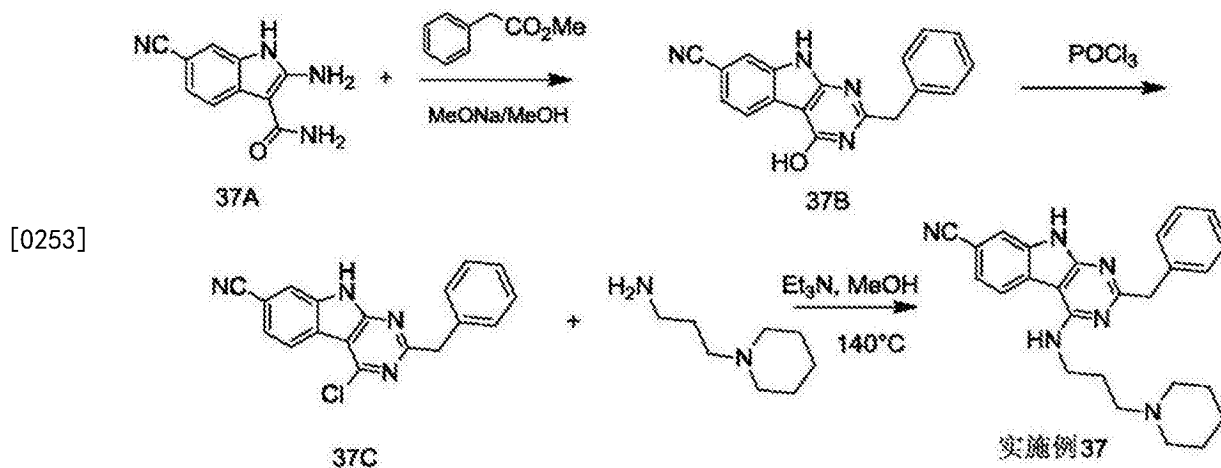
[0248] 实施例36 (来自氰化物的甲基噁二唑)



[0250] 将盐酸羟胺 (32.7mg, 0.471mmol) 加入到实施例37 (2-苄基-4-(3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7腈, 50mg, 0.118mmol) 在EtOH (1.5mL) 中的溶液中, 之后加入DIPEA (84μL, 0.483mmol), 以产生淡黄色悬浮液。在室温下搅拌2.5天和在75°C下搅拌6小时之后, 蒸发溶剂和添加水 (3mL) 和在搅拌30min之后, 收集固体, 利用水 (3×1mL) 洗涤和在高度真空下, 在35°C干燥固体材料, 直到恒重, 以产生作为黄褐色固体的 (Z)-2-苄基-N'-羟基-4-(3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7甲酰亚胺酰胺-HCl (53mg, 0.107mmol, 91%产量); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.58-1.85 (m, 6H) 1.98-2.10 (m, 2H) 2.69-2.90 (m, 2H) 2.94-3.15 (m, 2H) 3.34-3.46 (m, 2H) 3.59-3.74 (m, 2H) 4.05 (s, 2H) 5.84 (br. s., 2H) 7.15-7.24 (m, 1H) 7.29 (t, J=7.4Hz, 3H) 7.37 (d, J=7.4Hz, 2H) 7.55 (dd, J=8.2, 1.2Hz, 1H) 7.72 (d, J=1.2Hz, 1H) 8.25 (d, J=8.6Hz, 1H) 9.47 (d, J=7.4Hz, 1H) 9.56 (s, 1H) 11.88 (s, 1H); HRMS m/z 458.2662 (M+H)⁺. HPLC 95.4% @220nm 和 97.4% @254nm, RT=1.40分钟。

[0251] 将无水醋酸 (0.917mL, 9.72mmol) 加入到 (Z)-2-苄基-N'-羟基-4-(3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7甲酰亚胺酰胺, HCl (0.040g, 0.081mmol) 中, 以产生黄褐色悬浮液, 并且通过微波将混合物加热至140°C, 加热30分钟。然后, 蒸发溶剂, 和通过快速色谱分析法纯化残渣, 以产生36mg (85%产量) 的作为黄褐色固体的 1-(2-苄基-7-(5-甲基-1,2,4-二唑基-3-基)-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-9-基)乙酮, 立即将其溶入甲醇 (2.3mL), 且利用DBU (0.021mL, 0.138mmol) 处理。将合成的黄色溶液加热至回流, 加热30分钟, 然后冷却至0°C, 同时搅拌1小时。过滤固体, 和利用冷的MeOH (2×0.5mL) 洗涤, 在高度真空下, 40°C干燥, 直到恒重, 以提供作为黄褐色固体的实施例36: 2-苄基-7-(5-甲基-1,2,4-二唑基-3-基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-4-胺 (20mg, 51.3%产量); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.38 (m, J=4.7Hz, 2H) 1.50 (五个一组, J=5.5Hz, 4H) 1.80 (五个一组, J=6.9Hz, 2H) 2.18-2.45 (m, 6H) 2.67 (s, 3H) 3.57-3.70 (m, 2H) 4.04 (s, 2H) 7.15-7.22 (m, 1H) 7.27 (m, J=7.6, 7.6Hz, 2H) 7.34 (t, J=5.9Hz, 1H) 7.36-7.40 (m, 2H) 7.83 (dd, J=8.2, 1.4Hz, 1H) 8.01 (d, J=1.4Hz, 1H) 8.39 (d, J=8.2Hz, 1H) 12.02 (br. s., 1H); HRMS m/z 482.2663 (M+H)⁺. HPLC 99.3%, RT=1.79分钟。

[0252] 实施例37

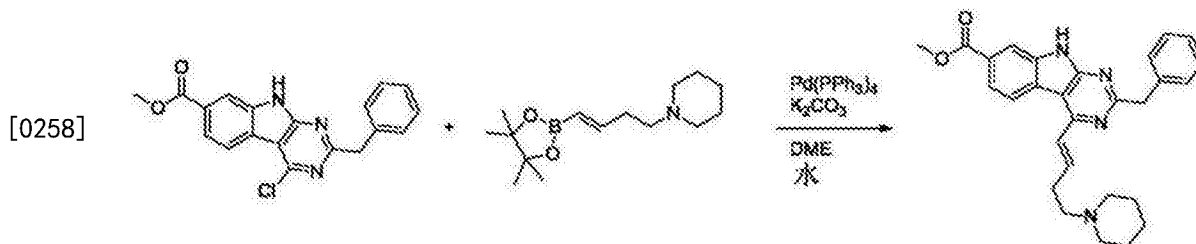


[0254] 在微波管中,将2-氨基-6-氰-1H-吡啶-3-甲酰胺(0.172g,0.859mmol)、甲基2-乙酸苯酯(0.303mL,2.148mmol)和MeOH中的甲氧基钠30%wt(0.403mL,2.148mmol)在甲醇(2.82mL)中的橙色混合物在140℃加热45分钟。然后,添加2-苯基乙酸甲酯(0.151mL,1.074mmol)和MeOH中的甲氧基钠30%wt(0.201mL,1.074mmol)的新的负载并且将玻璃小瓶放置在微波中,且再次在140℃下加热45分钟。然后,在冷却至室温之后,添加AcOH(0.197mL,3.44mmol)且在20℃将合成的浆体搅拌1小时。过滤固体,利用MeOH(3×1mL)洗涤且在高真空下,在20℃下干燥,直到恒重,以产生作为黄褐色固体的中间体37B:2-苄基-4-羟基-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-腈(182mg,70.5%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)δppm 4.03(s,2H)7.22-7.29(m,1H)7.30-7.36(m,2H)7.36-7.43(m,2H)7.58(dd,J=8.2,1.4Hz,1H)7.82-7.87(m,1H)8.05(d,J=8.2Hz,1H)12.59(br.s.,2H);MS m/z 301.2(M+H)⁺;HPLC 94.2%@220nm and 91.3%@254nm;RT=1.90分钟。

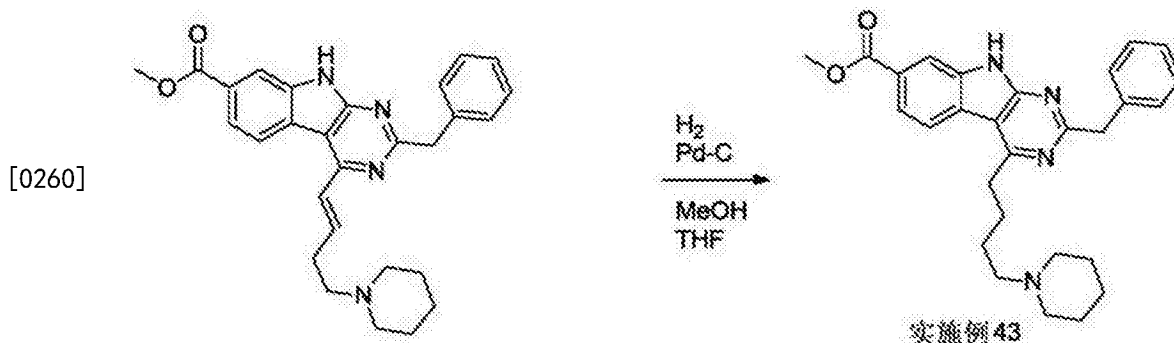
[0255] 将2-苄基-4-羟基-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-腈(中间体37B,0.180g,0.599mmol)和三氯化磷(3.63mL,39.0mmol)的红色混合物加热至95℃,且搅拌16小时。在旋转蒸发器上浓缩至干燥之后,将合成的深红色泡沫悬浮在饱和NaHCO₃(10mL)中,且搅拌30分钟。收集固体和利用水(3×1mL)洗涤,在高真空下,在40℃下干燥,直到恒重,以产生作为黄褐色固体的中间体37C:2-苄基-4-氯-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-腈(190mg,99%产量),立即将其用于下一个步骤:MS m/z 319.2(M+H)⁺;HPLC 95.0%@220nm and 92.3%@254nm,RT=2.28分钟。

[0256] 通过微波,将2-苄基-4-氯-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-腈(中间体37C,0.190g,0.596mmol)、3-(哌啶-1-基)丙烷-1-胺(0.142mL,0.894mmol)和三乙胺(0.208mL,1.490mmol)在MeOH(4.50mL)中的混合物加热至140℃,加热30分钟。然后,将其浓缩至干燥,以给出346mg的橙色固体,通过快速色谱分析法纯化该固体,以给出176mg的黄色固体,将其悬浮在乙醚中(7mL),且在20℃搅拌1小时。过滤固体,利用乙醚(3×1mL)洗涤,和在高真空下,在30℃下干燥,直到恒重,以提供实施例37的作为淡黄色固体的2-苄基-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-腈(172mg,68.0%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)δppm 1.30-1.43(m,2H)1.43-1.57(m,4H)1.80(m,J=5.5Hz,2H)2.18-2.47(m,6H)3.62(q,J=6.4Hz,2H)4.04(s,2H)7.15-7.22(m,1H)7.27(m,J=7.4,7.4Hz,2H)7.33-7.39(m,2H)7.47(t,J=5.7Hz,1H)7.62(dd,J=8.2,1.2Hz,1H)7.79(d,J=1.2Hz,1H)8.43(d,J=8.2Hz,1H)12.19(s,1H);HRMS m/z 425.2448(M+H)⁺;HPLC>99%,RT=1.68分钟。

[0257] 实施例43

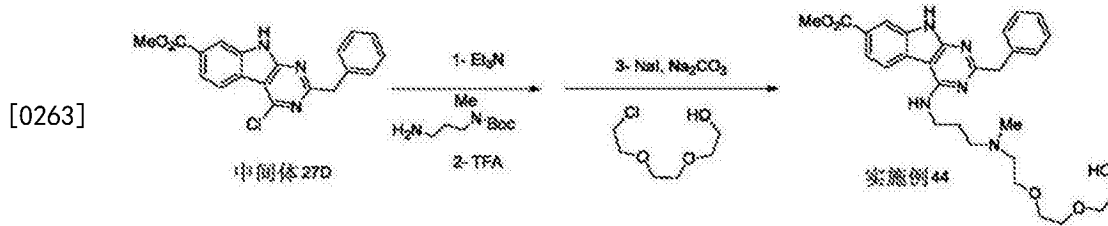


[0259] 在2-5mL微波玻璃小瓶中,添加2-苄基-4-氯-9H-吡啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸甲酯(0.100g,0.284mmol)、(E)-1-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-dioxaborolan-2-基)3-丁烷-1-基)哌啶(0.113g,0.426mmol)、碳酸钾(0.106g,0.768mmol)和Pd(Ph3P)4(0.05g,0.044mmol)。以N₂(3真空+回填循环)净化玻璃小瓶。添加DME(2.84mL)和水(0.398mL),并且以N₂(以真空+回填)冲洗玻璃小瓶,然后,将其加热至110℃,同时搅拌24小时。在冷却之后,在减压下,将混合物浓缩至干燥,并且通过快速色谱分析法纯化残渣,以产生作为淡黄色固体的(E)-甲基2-苄基-4(4-(哌啶-1-基))1-丁烷-1-基-9H-吡啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸酯(55mg,0.121mmol,42.6%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.41(s,2H)1.50-1.61(m,4H)2.30-2.47(m,4H)2.53-2.59(m,2H)2.59-2.70(m,2H)3.91(s,3H)4.27(s,2H)7.16-7.24(m,1H)7.29(t,J=7.6Hz,2H)7.34-7.43(m,4H)7.88(dd,J=8.2,1.4Hz,1H)8.07(d,J=1.4Hz,1H)8.41(d,J=8.2Hz,1H)12.48(s,1H);HRMS m/z 455.2442(M+H)⁺;HPLC 100%@220nm and 99.4%@254nm,RT=1.84分钟。



[0261] 利用氢将(E)-甲基2-苄基-4(4-(哌啶-1-基))1-丁烷-1-基-9H-吡啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸酯(20mg,0.044mmol)和Pd-C 10%wt.(50%wet)(23.41mg)在MeOH(2mL)和THF(2mL)中的混合物处理17小时。利用DCM(3mL)稀释反应混合物,过滤,利用MeOH(2×2mL)和然后利用DCM(2×2mL)冲洗,并且浓缩至干燥,以给出19mg的淡黄色固体,通过快速色谱分析法纯化该固态,以产生白色固体(14mg),利用CH₃CN(2mL)处理该白色固体。在20℃将白色悬浮液搅拌1小时之后,过滤固体,利用CH₃CN(1×1mL)洗涤并且在高真空下在40℃下干燥,直到恒重,以提供作为白色固体的实施例43的化合物,2-苄基-4(4-(哌啶-1-基))丁基-9H-吡啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸甲酯(14.4mg,71.7%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.36(m,J=5.5Hz,2H)1.45(五个一组,J=5.5Hz,4H)1.57(五个一组,J=7.3Hz,2H)1.83(dt,J=14.9,7.4Hz,2H)2.18-2.31(m,6H)3.20-3.28(m,2H)3.91(s,3H)4.26(s,2H)7.16-7.22(m,1H)7.28(t,J=7.4Hz,2H)7.32-7.38(m,2H)7.90(dd,J=8.2,1.2Hz,1H)8.09(d,J=1.2Hz,1H)8.25(d,J=8.2Hz,1H)12.48(br.s.,1H);HRMS m/z 457.2598(M+H)⁺;HPLC>99.5%,RT=1.75分钟。

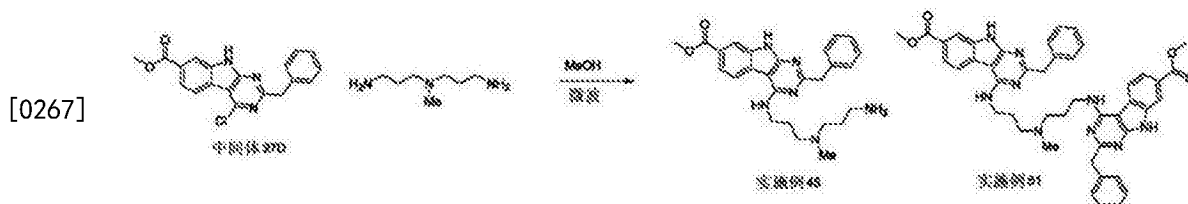
[0262] 实施例44



[0264] 在140℃,微波炉中,将2-苄基-4-氯-9H-嘧啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸盐(0.100g, 0.284mmol)、Et₃N(0.079mL, 0.569mmol)和叔丁基(3-氨基丙基)(甲基)氨基甲酸甲酯(0.080g, 0.426mmol)在MeOH(1mL)中的混合物加热40分钟。在减压下去除溶剂,并且通过快速色谱分析法纯化残渣,以给出0.092mg的粗Boc衍生物,其被直接地用于下一步骤。将TFA(1.0mL, 12.98mmol)逐滴加入到2-苄基-4-((3-叔丁氧羰基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸甲酯(0.092g, 0.183mmol)的冷的悬浮液中,且允许混合物在30分钟上温热至室温。在利用甲苯稀释之后,在减压下去除溶剂,然后,利用EtOAc稀释残渣,以产生85mg直接用于下一个步骤的固体:HRMS m/z 404.2091 (M+H)⁺。

[0265] 在丙酮(0.2mL)中,在70℃加热2-苄基-4-((3-甲氨基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸盐2,2,2-三氟醋酸甲酯(0.020g, 0.039mmol)、碳酸钠(8.81mg, 0.083mmol)、碘化钠(1.448mg, 9.66μmol)和2-(2-(2-氯代乙氧基)乙氧基)乙醇(6.46μl, 0.044mmol)的混合物。在15小时之后,添加2-(2-(2-氯代乙氧基)乙氧基)乙醇(6.46μl, 0.044mmol)的第二部分,和再次在70℃将混合物加热15小时。在冷却至室温之后,利用EtOAc稀释混合物,利用水洗涤,在无水MgSO₄上干燥,过滤,和蒸发溶剂,以给出残渣,通过快速色谱分析法纯化,以提供9mg的实施例44:¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.74-1.85(m, 2H) 2.25(br. s., 3H) 2.55(br. s., 2H) 3.32-3.36(m, 4H) 3.39-3.46(m, 6H) 3.51(t, J=5.87Hz, 2H) 3.64(q, J=6.52Hz, 2H) 3.88(s, 3H) 4.04(s, 2H) 4.53(br. s., 1H) 7.18(t, J=7.40Hz, 1H) 7.28(t, J=7.63Hz, 2H) 7.37(d, J=7.04Hz, 2H) 7.55(t, J=5.28Hz, 1H) 7.82(dd, J=8.22, 1.17Hz, 1H) 7.99(s, 1H) 8.27(d, J=8.22Hz, 1H) 12.05(s, 1H); HRMS m/z 536.2855 (M+H)⁺; HPLC RT 2.035分钟。

[0266] 实施例45和51



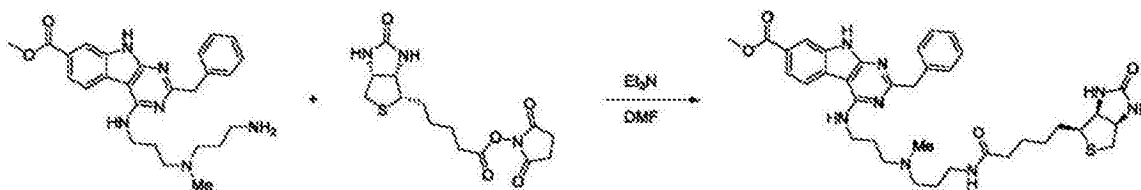
[0268] 在2-5mL微波玻璃小瓶中,添加在MeOH中(2.000mL, 49.4mmol)的2-苄基-4-氯-9H-嘧啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸甲酯(0.050g, 0.142mmol)、和N1-(3-氨基丙基)-N1-甲基丙烷-1,3-二元胺(0.115mL, 0.711mmol),以给出黄褐色悬浮液。将玻璃小瓶放置在微波中,且加热至140℃,加热30min。在30分钟之后,在旋转蒸发仪上将混合物浓缩至干燥,和通过快速色谱分析法纯化残渣,和从CH₃CN冻干,以提供两种不同的产物:作为单-N-烷基化的产物的实施例45:作为白色固体的4-((3-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)2-苄基-9H-嘧啶并[4,5-b]吡咯-7-羧酸甲酯(44mg, 67.2%产量);¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.44(dt, J=

13.8, 6.6Hz, 2H) 1.72 (dt, J=13.7, 6.8Hz, 2H) 2.11 (s, 3H) 2.24-2.30 (m, 2H) 2.33 (t, J=6.7Hz, 2H) 2.47 (br. s., 2H) 3.51-3.61 (m, 2H) 3.76-3.85 (m, 3H) 3.97 (s, 2H) 7.08-7.15 (m, 1H) 7.17-7.24 (m, 2H) 7.27-7.34 (m, 2H) 7.50 (t, J=5.3Hz, 1H) 7.76 (dd, J=8.2, 1.6Hz, 1H) 7.92 (d, J=1.6Hz, 1H) 8.20 (d, J=8.2Hz, 1H); MS m/z 461.2 (M+H)⁺; HPLC >99%, RT=1.63 分钟。

[0269] 作为二-烷基化的产物的实施例51: 作为淡黄色固体的4,4'-(((甲基脲二基)二(丙烷-3,1-二基))二(脲二基))二(2-苄基-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸二甲酯) (3.7mg, 6.71% 产量): ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.18-1.29 (m, 4H) 1.79-1.91 (m, 4H) 2.25 (s, 3H) 3.58-3.71 (m, 4H) 3.84 (s, 6H) 3.97 (s, 4H) 7.07-7.16 (m, 2H) 7.22 (t, J=7.4Hz, 4H) 7.29-7.34 (m, 4H) 7.53 (t, J=5.3Hz, 2H) 7.77 (dd, J=8.2, 1.4Hz, 2H) 7.96 (d, J=1.4Hz, 2H) 8.22 (d, J=8.2Hz, 2H) 12.01 (s, 2H); MS m/z 776.3 (M+H)⁺; HPLC 94.6% @220nm and 93.8% @254nm, RT=2.01 分钟。

[0270] 实施例52

[0271]



实施例 45

实施例 52

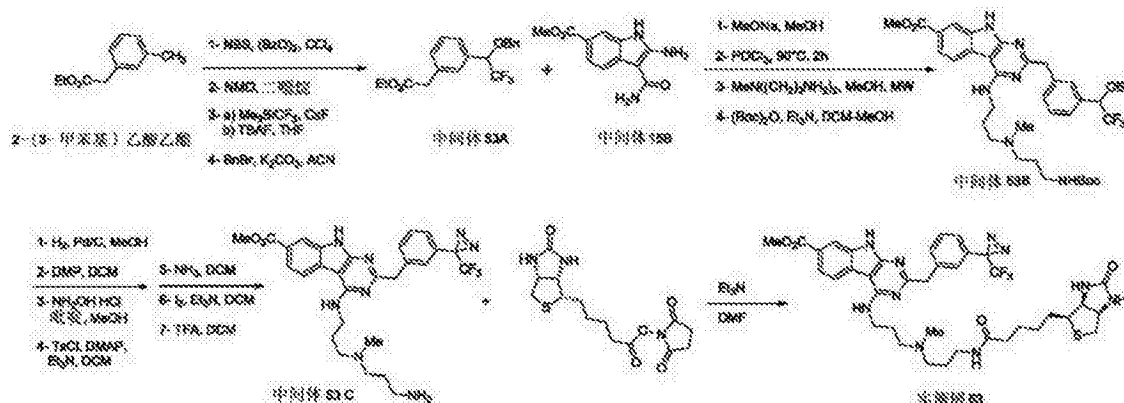
[0272] 将2,5-二氧代吡咯烷-1-基-5-((3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯(12.01mg, 0.035mmol) 加入到4-((3-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)2-苄基-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(实施例45, 15mg, 0.033mmol) 和三乙胺(6.81μL, 0.049mmol) 在DMF(750μL, 9.69mmol) 中的溶液中, 以产生淡黄色溶液。在20℃搅拌1小时之后, 将混合物浓缩至干燥, 并且通过快速色谱分析法纯化残渣, 以给出淡黄色泡沫。将泡沫悬浮在Et₂O(1mL) 中, 且搅拌30分钟, 和收集固体, 利用Et₂O(2×0.5mL) 洗涤和在高度真空下, 在20℃干燥, 直到恒重, 以产生作为黄色固体的实施例52的化合物: 2-苄基-4-((3-(甲基)(3-(5-((3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩[3,4-d]咪唑-4-基)戊烷氨基)丙基)氨基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(17mg, 76% 产量): ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.17-1.34 (m, 3H) 1.36-1.51 (m, 2H) 1.51-1.64 (m, 3H) 1.78 (dt, J=13.5, 6.6Hz, 2H) 2.02 (t, J=7.4Hz, 2H) 2.17 (s, 3H) 2.32 (t, J=7.0Hz, 2H) 2.40 (t, J=6.7Hz, 2H) 2.55 (d, J=12.3Hz, 1H) 2.77 (dd, J=12.3, 5.1Hz, 1H) 2.99-3.11 (m, 3H) 3.58-3.68 (m, 2H) 3.88 (s, 3H) 4.04 (s, 2H) 4.08 (m, J=4.9, 4.9, 2.3Hz, 1H) 4.26 (dd, J=7.6, 5.3Hz, 1H) 6.34 (s, 1H) 6.40 (s, 1H) 7.14-7.22 (m, 1H) 7.27 (t, J=7.4Hz, 2H) 7.37 (d, J=7.0Hz, 2H) 7.54 (t, J=5.5Hz, 1H) 7.74 (t, J=5.5Hz, 1H) 7.82 (dd, J=8.2, 1.6Hz, 1H) 7.99 (d, J=1.6Hz, 1H) 8.27 (d, J=8.2Hz, 1H) 12.05 (s, 1H); MS m/z 687.3 (M+H)⁺; HPLC >99.5%, RT=1.70 分钟。

[0273] 实施例53

[0274] 从商业的2(3-甲基)醋酸乙酯制备中间体53A。然后, 如用于实施例15、45和47描述的, 将其转变成中间体53B。然后, 根据用于实施例25提供的描述来研制吡丙因部分。最后

的步骤基于实施例52。

[0275]



[0276] 使2-(间甲苯基)醋酸乙酯(4.8g, 26.9mmol)、NBS(5.27g, 29.6mmol)和过氧化苯甲酰(0.110g, 0.454mmol)的混合物在 CCl_4 (28mL)中回流。在5小时之后,将反应冷却至 5°C ,过滤和去除溶剂。利用乙酸乙酯-己烷,通过快速色谱分析法的纯化产生3.8g相应的溴代苯基衍生物: ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm} 1.19(t, $J=6.70\text{Hz}$, 3H) 3.67(s, 2H) 4.09(q, $J=6.70\text{Hz}$, 2H) 4.69(s, 2H) 7.15-7.25(m, 1H) 7.27-7.42(m, 3H);将该材料直接用于下一个步骤。

[0277] 将2-(3-(溴甲基)苯基)醋酸乙酯(8.11g, 31.5mmol)和4-甲基吗啡啉4-氧化物水合物(5.54g, 47.3mmol)在1,4-二噁烷(110mL)中的混合物加热至 100°C ,加热1.5小时。在冷却至室温之后,将溶剂的体积减少至一半,和然后利用 $\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc}$ (1:1, 120mL)稀释,利用水(50mL)洗涤和利用 EtOAc (60mL)萃取水层。利用水($2\times 50\text{mL}$),然后,利用卤水(50mL)洗涤合并的有机层。在无水 MgSO_4 上干燥有机层,过滤和浓缩,以产生4.72g淡黄色油,通过快速色谱分析法将其纯化,以提供作为淡黄色油的2-(3-甲酰苯基)醋酸酯(2.91g, 48%产量): ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm} 1.19(t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H) 3.81(s, 2H) 4.09(q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H) 7.52-7.65(m, 2H) 7.79-7.85(m, 2H) 10.00(s, 1H);MS m/z 207.2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$;HPLC 99%, $\text{RT}=1.67$ 分钟。

[0278] 将三甲基(三氟甲基)硅烷(3.13mL, 21.20mmol)加入到冷却至 $0-5^\circ\text{C}$ 的乙基2-(3-甲酰苯基)醋酸盐(2.91g, 15.14mmol)和氟化铯(0.161g, 1.060mmol)在DMF(20.19mL)中的混合物中。在搅拌1.5小时之后,添加TBAF 1M在THF(15.14mL)中的溶液。在 $0-5^\circ\text{C}$ 搅拌产生的黄色溶液,和在30分钟之后,将混合物倒入水中(150mL)和利用MTBE($1\times 150\text{mL}$,然后 $2\times 100\text{mL}$)萃取。利用水($1\times 150\text{mL}$,然后 $1\times 100\text{mL}$)和卤水(100mL)洗涤组合的有机层,和然后,在无水 MgSO_4 上干燥有机层,过滤和浓缩,以产生3.84g的淡橙色油,通过快速色谱分析法纯化,以产生作为无色的油的2-(3-(2,2,2-三氟-1-羟乙基)苯基)醋酸乙酯(663mg, 16%产量): ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm} 1.17(t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H) 3.68(s, 2H) 4.08(q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H) 5.13(q, $J=7.4\text{Hz}$, 1H) 6.82(s, 1H) 7.24-7.31(m, 1H) 7.37(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H);MS m/z 263.1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$;HPLC 93.7% $@220\text{nm}$, $\text{RT}=1.82$ 分钟。

[0279] 将苄基溴(0.330mL, 2.78mmol)加入到2-(3-(2,2,2-三氟-1-羟乙基)苯基)醋酸乙酯(0.648g, 2.471mmol)和 K_2CO_3 (1.059g, 7.66mmol)在乙腈(17.00mL)中的混合物中,并且搅拌混合物,同时加热至回流($75-80^\circ\text{C}$),24小时。在冷却和浓缩至干燥之后,通过快速色谱分

析法纯化残渣,以产生中间体53A:作为无色油的2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)醋酸乙酯(686mg,79%产量):MS m/z 353.2 (M+H)⁺;HPLC 99.7%,RT=2.19分钟。

[0280] 添加中间体15B(0.310g,1.329mmol)、2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)醋酸乙酯(0.679g,1.927mmol)和中间体53A和MeOH(0.524mL)中的甲氧基钠30%wt.在甲醇(3.23mL)的混合物,以产生稀薄的棕色悬浮液,在微波装置中将其加热至140℃,加热1小时。在冷却和利用MeOH(0.75mL)和AcOH(0.167mL,2.92mmol)稀释之后,在20℃,将产生的悬浮液搅拌2小时。然后,收集固体,并且利用MeOH(4×0.5mL)洗涤,然后在高度真空下,在40℃干燥,直到恒重,以提供作为黄褐色固体的2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)-4-羟基-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(399mg,57.6%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 3.87(s,3H)4.09(s,2H)4.45-4.57(m,2H)5.23(q,J=7.2Hz,1H)7.20-7.29(m,5H)7.36-7.51(m,3H)7.52(s,1H)7.84(dd,J=8.2,1.4Hz,1H)8.01(d,J=1.4Hz,1H)8.03(d,J=8.2Hz,1H)12.46(br.s.,1H)12.56(br.s.,1H);MS m/z 522.2 (M+H)⁺;HPLC 92.7%@220nm and 91.7%@254nm,RT=2.20分钟。

[0281] 将2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)-4-羟基-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.395g,0.757mmol)在三氯化磷(6mL,64.4mmol)中的混合物加热至90℃,加热2小时,然后在冷却之后,将其浓缩至干燥,以产生650mg的棕色泡沫,将其悬浮在饱和NaHCO₃(15mL)中,且搅拌1小时。过滤固体,利用水(3×2mL)洗涤且在高真空下,在40℃干燥,直到恒重,以提供作为黄褐色固体的2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)-4-氯-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(375mg,92%产量)且同样被用于下一个步骤:MS m/z 540.2 (M+H)⁺;HPLC 92%,RT 2.51分钟。

[0282] 在微波炉中,将2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)-4-氯-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.375g,0.695mmol)和N1-(3-氨基丙基)-N1-甲基丙烷-1,3-二胺(0.784mL,4.86mmol)在MeOH(9.83mL,243mmol)中的混合物加热至140℃,加热30分钟。然后,在减压下浓缩至干燥之后,通过快速色谱分析法纯化产生的棕色油,以提供作为黄色泡沫的4-((3-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯:¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 1.48(dt,J=14.0,6.9Hz,2H)1.75(五个一组,J=6.7Hz,2H)2.14(s,3H)2.24-2.42(m,4H)2.52-2.60(m,2H)3.61(q,J=6.3Hz,2H)3.88(s,3H)4.10(s,2H)4.49(s,2H)5.17(q,J=7.0Hz,1H)7.18-7.30(m,5H)7.31-7.36(m,1H)7.39(t,J=7.6Hz,1H)7.44-7.53(m,2H)7.58(t,J=5.3Hz,1H)7.84(dd,J=8.2,1.4Hz,1H)8.00(d,J=1.4Hz,1H)8.28(d,J=8.2Hz,1H);MS m/z 649.3 (M+H)⁺;HPLC 97.6%@220nm and 95.5%@254nm,RT=1.96分钟。

[0283] 将二叔丁基-碳酸氢钠(0.124mL,0.533mmol)在DCM(1mL)中的溶液缓慢地加入到4-((3-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.288g,0.444mmol)和三乙胺(0.074mL,0.533mmol)在DCM(3mL)和MeOH(2mL)中的混合物中,以产生黄色溶液。在20℃搅拌45分钟之后,将溶液浓缩至干燥,以产生373mg黄色泡沫,通过快速色谱分析法纯化该泡沫,以提供作为黄色泡沫的中间体53B,2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)-4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(306mg,92%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 1.33(s,9H)1.52(dt,J=14.1,7.0Hz,2H)1.67-1.81

(m, 2H) 2.12 (s, 3H) 2.28 (t, J=7.2Hz, 2H) 2.34 (t, J=6.8Hz, 2H) 2.92 (q, J=6.7Hz, 2H) 3.54-3.67 (m, 2H) 3.88 (s, 3H) 4.10 (s, 2H) 4.49 (s, 2H) 5.17 (q, J=6.8Hz, 1H) 6.76 (t, J=5.5Hz, 1H) 7.16-7.30 (m, 5H) 7.31-7.36 (m, 1H) 7.39 (t, J=7.6Hz, 1H) 7.43-7.51 (m, 2H) 7.53 (t, J=5.3Hz, 1H) 7.83 (dd, J=8.4, 1.4Hz, 1H) 8.00 (d, J=1.4Hz, 1H) 8.27 (d, J=8.2Hz, 1H) 12.06 (s, 1H); MS m/z 749.3 (M+H)⁺; HPLC 97.7%, RT=2.06分钟。

[0284] 在20℃, 利用氢将2-(3-(1-(苄氧基)-2,2,2-三氟乙基)苄基)-4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.306g, 0.409mmol)和Pd-C 10%wt (50%wet) (0.304g, 0.143mmol)在MeOH(9.92mL)中的混合物处理22小时。然后, 在硅藻土上过滤反应混合物, 利用MeOH(2×10mL)和DCM: MeOH(1:1, 2×10mL)冲洗块状物, 然后在旋转蒸发仪上浓缩至干燥, 以产生226mg油, 通过快速色谱分析法纯化, 以提供作为白色泡沫的4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-羟乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(202mg, 75%产量): ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.33 (s, 9H) 1.48-1.62 (m, 2H) 1.71-1.85 (m, 2H) 2.16 (s, 3H) 2.25-2.35 (m, 2H) 2.39 (t, J=6.8Hz, 2H) 2.86-3.00 (m, 2H) 3.56-3.70 (m, 2H) 3.88 (s, 3H) 4.06 (s, 2H) 5.01-5.14 (m, 1H) 6.77 (m, J=6.3Hz, 2H) 7.30 (d, J=4.7Hz, 2H) 7.36-7.42 (m, 1H) 7.49 (s, 1H) 7.51-7.57 (m, 1H) 7.82 (dd, J=8.2, 1.2Hz, 1H) 7.99 (d, J=1.2Hz, 1H) 8.26 (d, J=8.2Hz, 1H) 12.06 (br. s., 1H); MS m/z 659.2 (M+H)⁺; HPLC > 97%, RT=1.90分钟。

[0285] 在20℃, 将4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-羟乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.200g, 0.304mmol)和戴斯-马丁高碘烷试剂(0.567g, 1.336mmol)在DCM(7.50mL)中的混合物搅拌一小时。在蒸发至干燥之后, 通过快速色谱分析法纯化残渣, 以提供作为黄色泡沫的4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟乙酰基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(181mg, 91%产量): DMSO-d₆中的¹H NMR与期望的产物一致, 但是由于水合物形式的存在更复杂: MS m/z 657.3 (M+H)⁺; HPLC 96.0% @220nm和95.3% @254nm, RT 1.87和1.96(酮+水合物)分钟。

[0286] 在微波炉中, 将4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟乙酰基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.180g, 0.274mmol)、盐酸羟胺(0.023g, 0.329mmol)和吡啶(0.355mL)在MeOH(1.9mL)中的混合物加热至65℃, 加热48小时。在反应混合物至干燥的浓缩之后, 利用饱和NaHCO₃(15mL)洗涤残渣的溶液, 在无水MgSO₄上干燥有机层, 过滤和浓缩至干燥, 以提供作为淡黄色泡沫的4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-(异亚硝基)乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(184mg, 100%产量): MS m/z 672.3 (M+H)⁺; HPLC 96.0% @220nm and 91.4% @254nm, RT=2.01分钟。

[0287] 将Ts-Cl(0.060g, 0.315mmol)分批加入到4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-(异亚硝基)乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.184g, 0.274mmol)、DMAP(3.35mg, 0.027mmol)和三乙胺(0.048mL, 0.342mmol)在DCM(12mL)中的混合物中, 以产生黄褐色溶液。在1小时之后, 利用DCM(12mL)稀释反应混合物, 利用水(3×12mL)洗涤, 并且在无水MgSO₄上干燥有机层, 过滤和浓缩至干

燥,以提供作为黄褐色泡沫的4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-((甲苯磺酰)亚氨基)乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(217mg,96%产量):MS m/z 826.2 (M+H)⁺;HPLC 93.2%@220nm and 91.3%@254nm, RT=2.20分钟。

[0288] 将4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(2,2,2-三氟-1-((甲苯磺酰)亚氨基)乙基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.217g,0.263mmol)在DCM(5.07mL)中的溶液冷却至-78℃,并且将氨(1.7mL,79mmol)压缩到密封管中。允许混合物缓慢地温热至20℃,且搅拌3小时。在再次冷却至-78℃之后,利用具有气体出口的隔膜装配密封的管,并且缓慢地温热至20℃,以蒸发氨。在3小时之后,将混合物浓缩至干燥,然后通过快速色谱分析法纯化,以提供作为白色泡沫的4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(3-三氟甲基)重叠吡啶-3-基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(139mg,79%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.34(s,9H) 1.52-1.62(m,2H) 1.72-1.89(m,2H) 2.08-2.25(m,3H) 2.30-2.44(m,4H) 2.94(q,J=6.4Hz,2H) 3.64(q,J=6.5Hz,2H) 3.88(s,3H) 3.93(d,J=8.4Hz,1H) 4.04(d,J=8.4Hz,1H) 4.08(s,2H) 6.78(br.s.,1H) 7.31-7.41(m,2H) 7.44-7.50(m,1H) 7.54(t,J=5.5Hz,1H) 7.59(s,1H) 7.83(dd,J=8.4,1.4Hz,1H) 7.99(d,J=1.4Hz,1H) 8.27(d,J=8.4Hz,1H) 12.07(s,1H);MS m/z 671.4 (M+H)⁺;HPLC 98.6%@220nm和96.4%@254nm,RT=1.91分钟。

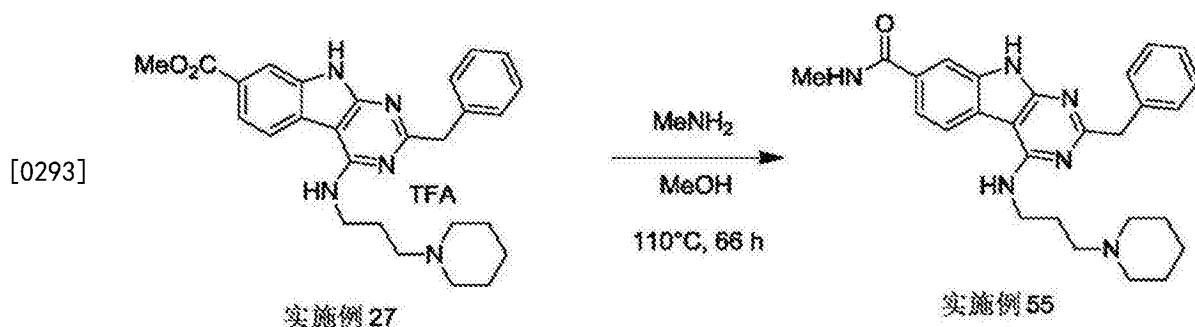
[0289] 将碘(27.8mg,0.110mmol)加入到5mL圆底烧瓶中,避光保存且预充满4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(3-三氟甲基)重叠吡啶-3-基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(70mg,0.104mmol)和三乙胺(43.6μL,0.313mmol)在DCM(2mL)中的混合物,以产生淡黄色溶液。在20℃搅拌15分钟之后,蒸发溶剂和通过快速色谱分析法纯化残渣,以产生作为淡黄色泡沫的4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(3-三氟甲基)-3H-二氮杂环丙烷-3-基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(65mg,0.097mmol,93%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 1.33(s,9H) 1.53(dt,J=13.8,7.0Hz,2H) 1.70-1.82(m,2H) 2.15(br.s.,3H) 2.24-2.34(m,2H) 2.34-2.42(m,2H) 2.87-2.98(m,2H) 3.55-3.66(m,2H) 3.88(s,3H) 4.10(s,2H) 6.76(br.s.,1H) 7.14(d,J=8.2Hz,1H) 7.27(s,1H) 7.43(t,J=7.8Hz,1H) 7.49-7.58(m,2H) 7.83(dd,J=8.2,1.4Hz,1H) 7.99(d,J=1.4Hz,1H) 8.27(d,J=8.2Hz,1H) 12.06(s,1H);MS m/z 669.2 (M+H)⁺;HPLC 97.6%@220nm和97.3%@254nm,RT=2.18分钟。

[0290] 将三氟乙酸(0.400mL,5.19mmol)加入到4-((3-((3-((叔丁氧羰基)氨基)丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(3-三氟甲基)-3H-二氮杂环丙烷-3-基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(0.064g,0.096mmol)在DCM(4mL)中的溶液中,以产生淡黄色溶液。在20℃搅拌30分钟之后,利用DCM(15mL)稀释反应混合物,利用饱和NaHCO₃(10mL)洗涤,和利用DCM(10mL)向后萃取水层。在无水MgSO₄上干燥组合的有机层,过滤和浓缩至干燥,以提供作为淡黄色泡沫的中间体53C:4-((3-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(3-三氟甲基)-3H-二氮杂环丙烷-3-基)苄基)-9H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-7-羧酸甲酯(45mg,83%产量):HRMS m/z 569.2601 (M+H)⁺;HPLC 97.1%@220nm和96.9%@254nm,RT=1.96分钟。

[0291] 将2,5-二氧代吡咯烷-1-基-5-((3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩[3,4-d]咪

唑-4-基)戊酸盐(29.2mg,0.085mmol)加入到4-((3-((3-氨基(甲基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(3-三氟甲基)-3H-二氮杂环丙烷-3-基)苄基)-9H-咪唑并[4,5-b]咪唑-7-羧酸甲酯(45mg,0.079mmol)和三乙胺(16.55 μ L,0.119mmol)在DMF(750 μ L)中的混合物中,以产生黄色溶液。在20 $^{\circ}$ C搅拌30分钟之后,在高度真空下,将反应混合物浓缩至淡橙色油,并且通过快速色谱分析法纯化残渣,以产生56mg的白色固体,从CH₃CN将其冻干,以提供作为白色固体的实施例53的化合物:4-((3-(甲基(3-(5-((3aS,4S,6aR)-2-氧六氢-1H-噻吩[3,4-d]咪唑-4-基)戊烷氨基)丙基)氨基)丙基)氨基)-2-(3-(3-三氟甲基)-3H-二氮杂环丙烷-3-基)苄基)-9H-咪唑并[4,5-b]咪唑-7-羧酸甲酯(51mg,0.064mmol,81%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 1.18-1.34(m,3H)1.35-1.50(m,3H)1.50-1.64(m,3H)1.70-1.82(m,2H)2.02(t,J=7.4Hz,2H)2.15(s,3H)2.26-2.34(m,2H)2.37(t,J=6.7Hz,2H)2.55(d,J=12.5Hz,1H)2.77(dd,J=12.1,5.1Hz,1H)2.99-3.10(m,3H)3.56-3.66(m,2H)3.88(s,3H)4.03-4.14(m,1H)4.10(s,2H)4.26(dd,J=7.6,5.3Hz,1H)6.34(s,1H)6.39(s,1H)7.14(d,J=7.4Hz,1H)7.28(s,1H)7.44(t,J=7.8Hz,1H)7.52(d,J=7.8Hz,1H)7.56(t,J=5.3Hz,1H)7.73(t,J=5.5Hz,1H)7.83(dd,J=8.2,1.4Hz,1H)8.00(d,J=1.4Hz,1H)8.28(d,J=8.2Hz,1H)12.07(s,1H);HRMS m/z 795.3368(M+H)⁺;HPLC 95.4%@220nm和96.2%@254nm,RT=2.06分钟。

[0292] 实施例55

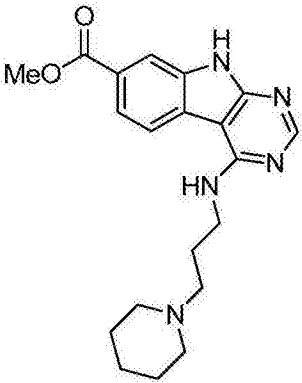


[0294] 将甲胺2M中的2-苄基-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-咪唑并[4,5-b]咪唑-7-羧酸甲酯(实施例27,0.030g,0.066mmol)在MeOH(10.00mL)中的溶液放置在密封的管中,且加热至110 $^{\circ}$ C,加热66小时,然后,将混合物冷却至20 $^{\circ}$ C,浓缩至干燥和通过快速色谱分析法纯化,以提供28mg的无色油,将其悬浮在乙醚中(2mL)。在搅拌产生的悬浮液2小时之后,在Buchner上收集固体,利用乙醚(2 \times 0.5mL)洗涤块状物,和在高度真空下,在40 $^{\circ}$ C干燥产物,直到恒重,以提供作为白色固体的实施例55:甲基2-苄基-N-甲基-4-((3-(哌啶-1-基)丙基)氨基)-9H-咪唑并[4,5-b]咪唑-7-甲酰胺(23mg,77%产量):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 1.38(m,J=5.1Hz,2H)1.50(五个一组,J=5.5Hz,4H)1.80(五个一组,J=7.0Hz,2H)2.22-2.41(m,6H)2.81(d,J=4.3Hz,3H)3.58-3.68(m,2H)4.03(s,2H)7.15-7.21(m,1H)7.27(m,J=7.4,7.4Hz,3H)7.34-7.40(m,2H)7.70(dd,J=8.2,1.4Hz,1H)7.90(d,J=1.4Hz,1H)8.27(d,J=8.2Hz,1H)8.46(q,J=4.3Hz,1H)11.96(s,1H);HRMS m/z 457.2708(M+H)⁺;HPLC>99.5%@220nm和98.9%@254nm,RT=1.53分钟。

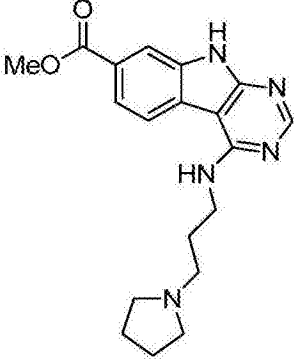
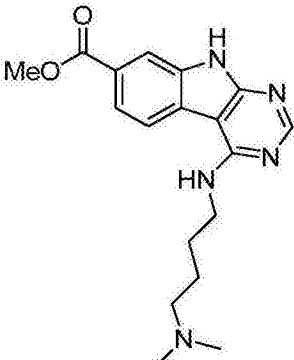
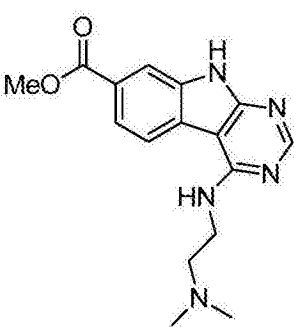
[0295] 报道的HPLC保留时间用于利用下列条件的反相HPLC(Agilent,1200系列)溶剂A:MeOH:H₂O:TFA(5:95:0.05);溶剂B:MeOH:H₂O:TFA(95:5:0.05);流量:3.0mL/min;2.0分钟内梯度0至100%B;柱:ZorbaxC18,3.5微米,4.6 \times 30mm;波长220nm。

[0296] 表2. 实施例的结构、分析性HPLC保留时间、LCMS数据和生物学数据

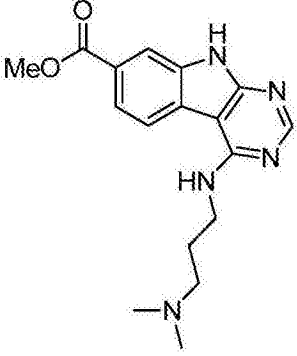
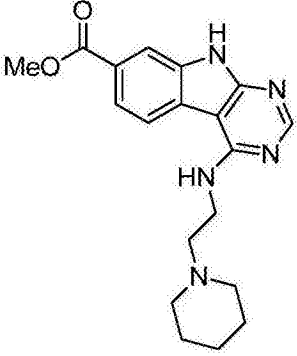
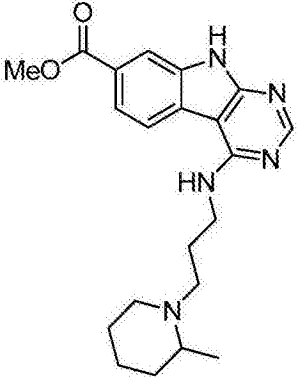
[0297]

化合物号	结构	分析性 HPLC R _T (min)	MS m/z (M+H) ⁺	生物学数据 (EC ₅₀) [*]
1		1.38	368.2	C

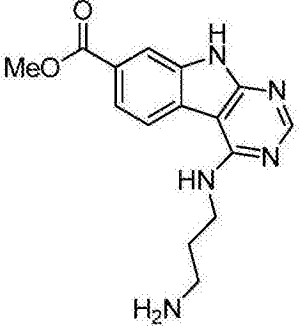
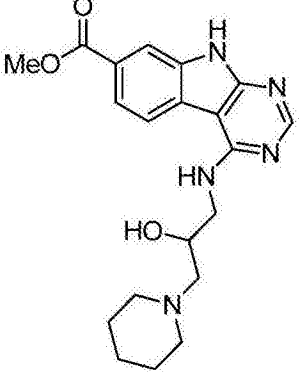
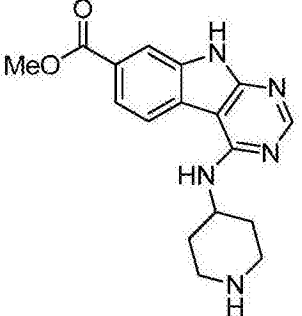
[0298]

2		1.35	354.2	D
3		1.55	342.2	C
4		1.30	314.2	D

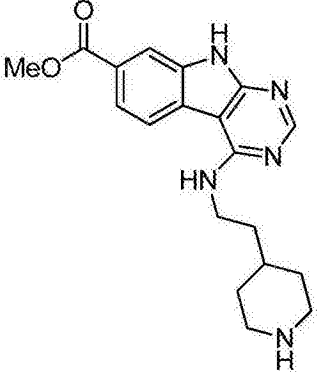
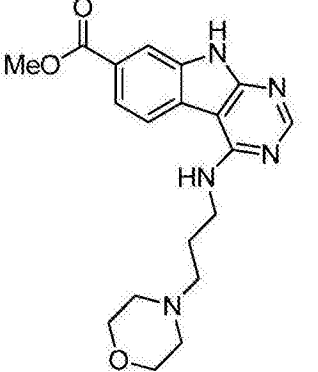
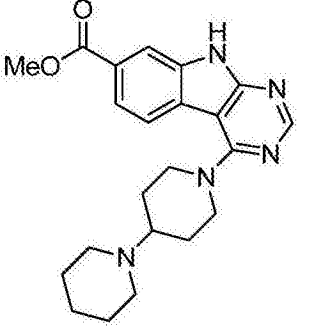
[0299]

5	 <chem>CN(C)CCCNc1nc2c(c1)c3ccc(cc32)C(=O)OC</chem>	1.29	328.2	B
6	 <chem>C1CCNCC1Nc2nc3c(c2)c4ccc(cc43)C(=O)OC</chem>	1.41	354.2	C
7	 <chem>CC1CCN(C)CC1Nc2nc3c(c2)c4ccc(cc43)C(=O)OC</chem>	1.43	382.2	D

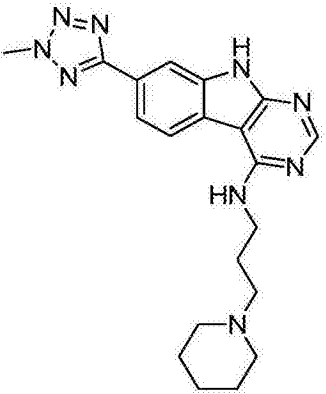
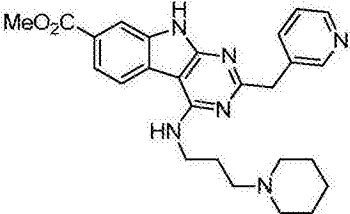
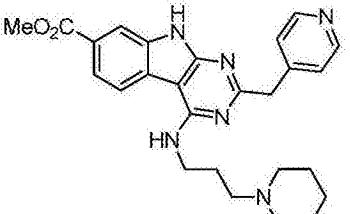
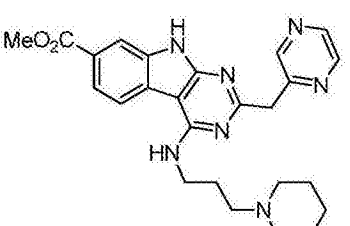
[0300]

8	 <chem>CCCCNC1=NC2=C(N1)C=CC=C2C(=O)OC</chem>	1.34	300.2	C
9	 <chem>CC(O)CN1CCCN1C2=NC3=C(N2)C=CC=C3C(=O)OC</chem>	1.35	384.2	C
10	 <chem>C1CCNCC1N2=NC3=C(N2)C=CC=C3C(=O)OC</chem>	1.34	326.2	B

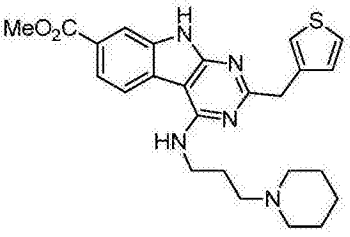
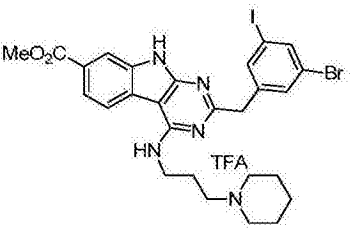
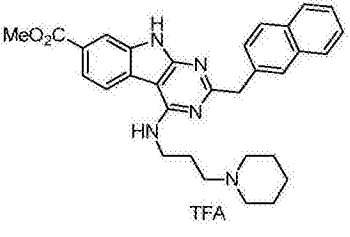
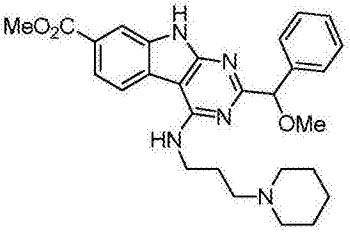
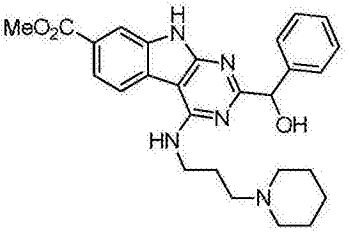
[0301]

11	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncn3N2NCCC4CCNCC4</chem>	1.40	354.2	C
12	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncn3N2NCCC4CCOCC4</chem>	1.29	370.2	A
13	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncn3N2N(C4CCNCC4)CC5CCNCC5</chem>	1.45	394.2	D

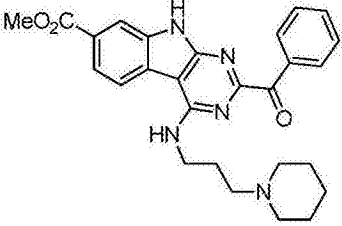
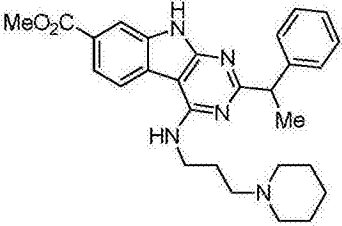
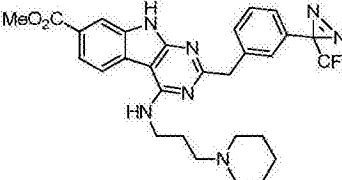
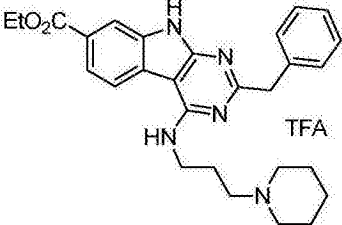
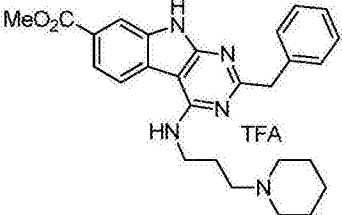
[0302]

14		1.44	392.2	D
15		1.43	459.2	E
16		1.78	459.2518	C
17		1.54	460.2	B

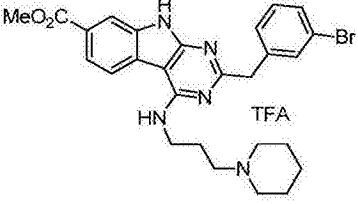
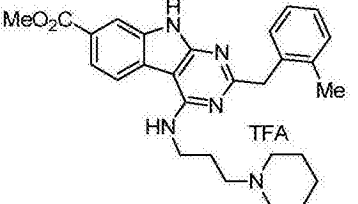
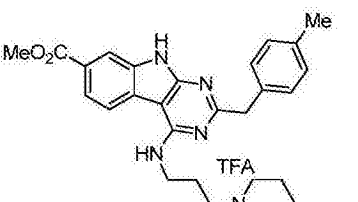
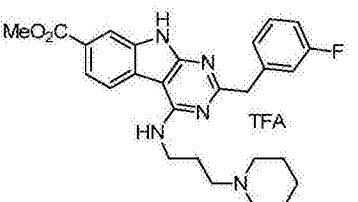
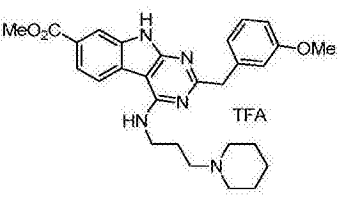
[0303]

18		2.068	464.2145	E
19		2.349	662.063	E
20		2.206	508.2707	D
21		1.78	488.2665	E
22		1.68	474.2511	F

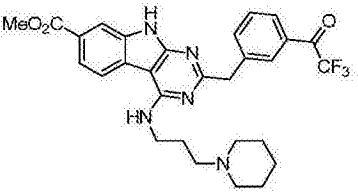
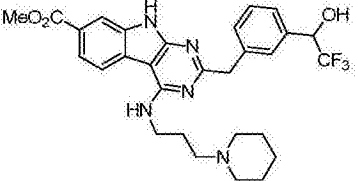
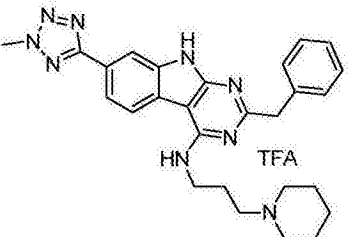
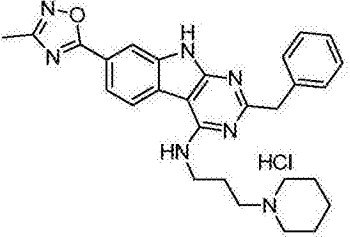
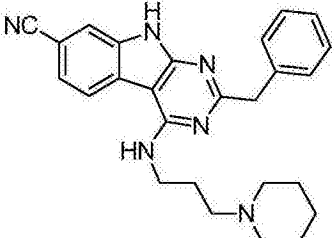
[0304]

23		2.129	472.234 2	F
24		2.083	472.272 4	E
25		2.05	566.249 7	E
26		2.152	472.273 3	F
27		2.052	458.259 8	E

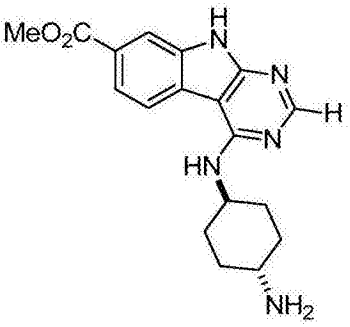
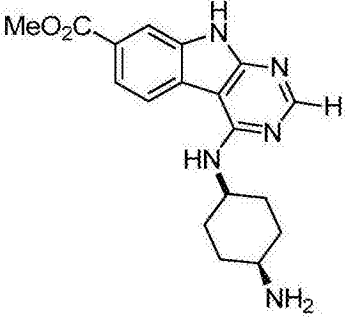
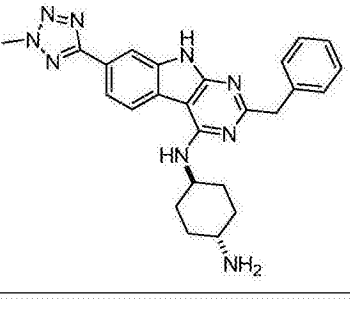
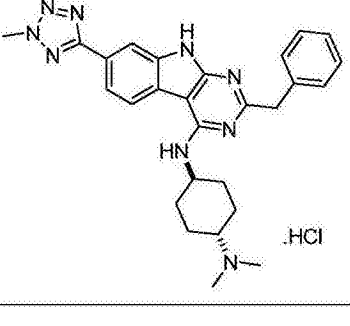
[0305]

28		2.194	538.167 0	E
29		2.142	472.275 6	E
30		2.142	472.274 0	E
31		2.112	476.249 9	E
32		2.070	488.269 0	E

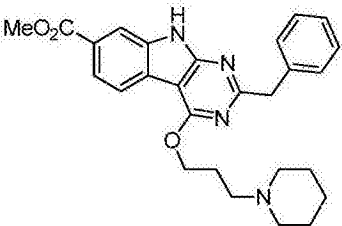
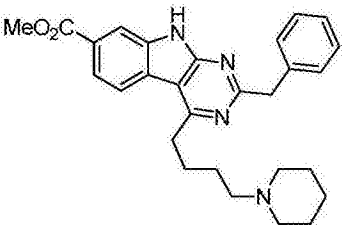
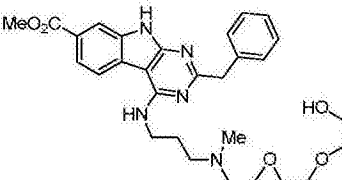
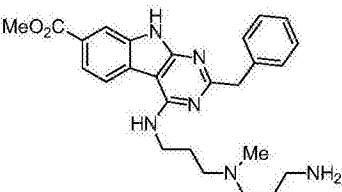
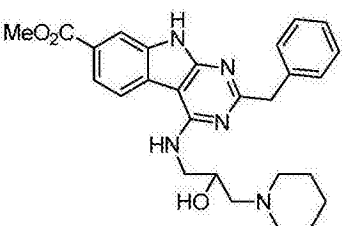
[0306]

33		1.761.87 (水合物)	554.238 4	E
34		2.142	554.2	E
35		2.063	482.28	E
36		1.79	482.266 3	F
37		1.68	425.244 8	C

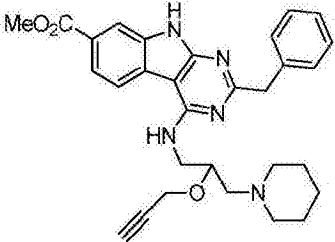
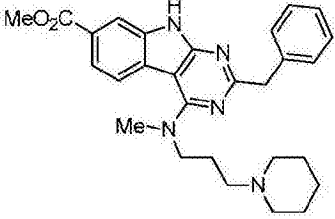
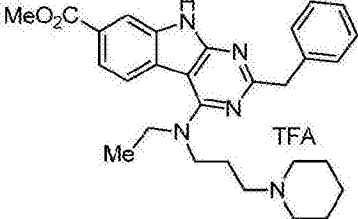
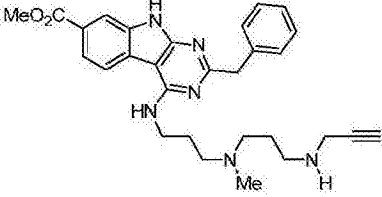
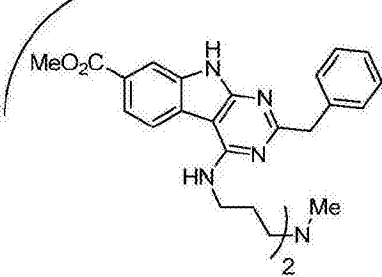
[0307]

38		1.44	340.2	D
39		1.38	340.2	C
40		1.72	454.2	E
41		1.71	482.278 5	E

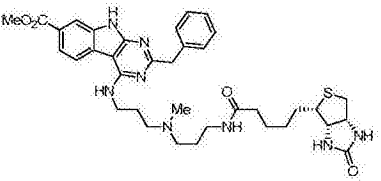
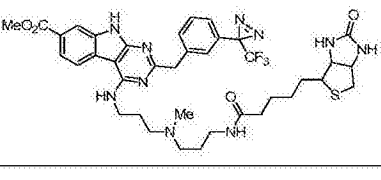
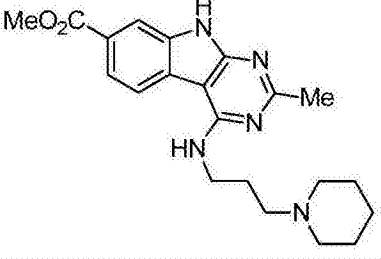
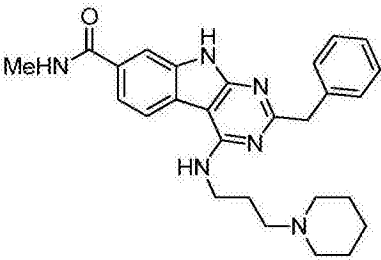
[0308]

42		1.92	459.239 2	B
43		1.75	457.259 8	F
44		2.035	536.286 7	E
45		1.63	461.2	E
46		1.70	474.247 6	E

[0309]

47		1.85	512.263 2	E
48		1.74	472.271 7	E
49		2.161	586.283 9	A
50		1.65	499.282 3	F
51		2.01	776.3	E

[0310]

52		1.70	687.3	C
53		2.06	795.336 8	F
54		1.46	382.2	A
55		1.53	457.270 8	A

[0311] 将EC₅₀限定为,与媒介培养基(DMSO)相比,导致CD34+CD45RA-细胞计数50%增加的浓度。*EC₅₀:A>1000nM;B=500-1000nM;C=250-500nM;D=100-250;E=<100nM;F=显示>1.3倍扩增的化合物。

[0312] 离体功能分析:

[0313] 利用传统的培养菌落形成单位(CFU-C)实验检验扩增的细胞的离体功能性。在传统的条件下,将未处理的细胞或利用DMSO、阳性对照或本发明的化合物孵育的细胞接种到甲基纤维素培养基中。作为实例,化合物1(表2,实施例1)扩增许多多潜能造血祖细胞。利用化合物1处理的1000CD34+mPB细胞的甲基纤维素培养10天导致多向粒细胞红细胞、巨噬细胞和巨核细胞(GEMM克隆)超过输入细胞5-倍增加,并且与对照细胞相比,10倍增加。这表明化合物1促进多潜能祖细胞的扩增。

[0314] 体内功能分析:

[0315] 利用本发明的化合物培养的CD34+mPB细胞嫁接免疫缺陷菌株NOD重症联合免疫缺陷伽玛(immunodeficient strain NOD scid gamma) (NSG) 老鼠。将利用化合物1(表2, 实施例1) 或媒介对照条件孵育10天的2,000,000和500,000CD34+mPB细胞的成果移植到NSG老鼠中。在移植后8周之后, 利用对人CD45的抗体检验NSG骨髓中的人造血细胞重建。利用化合物1而不是利用媒介处理的细胞能够嫁接NSG老鼠。此外, 也证实人类骨髓和淋巴隔间的重建, 因为骨髓细胞分别对人类CD33+和CD19+是阳性的。这些结果显示, 利用化合物1扩增的CD34+mPB不仅有助于嫁接而且保留体内多向种群恢复潜能。

[0316] 化合物的组合:

[0317] 利用本发明的化合物培养的CD34+mPB细胞嫁接免疫缺陷菌株NOD重症联合免疫缺陷伽玛(NSG) 老鼠。将利用化合物1(表2, 实施例1) 或媒介对照条件孵育10天的2,000,000和500,000CD34+mPB细胞的成果移植到NSG老鼠中。在移植后8周之后, 利用对人CD45的抗体检验NSG骨髓中的人造血细胞重建。利用化合物1而不是利用媒介处理的细胞能够嫁接NSG老鼠。此外, 也证实人类骨髓和淋巴隔间的重建, 因为骨髓细胞分别对人类CD33+和CD19+是阳性的。这些结果表明, 利用化合物1扩增的CD34+mPB不仅有助于嫁接而且保留体内多向种群恢复潜能。

[0318] 应该理解, 此处描述的实施例和实施方式仅用于说明的目的, 并且将建议本领域技术人员进行根据其的各种改变或变化并且它们均被包括在本公开内容和所附权利要求的范围内。

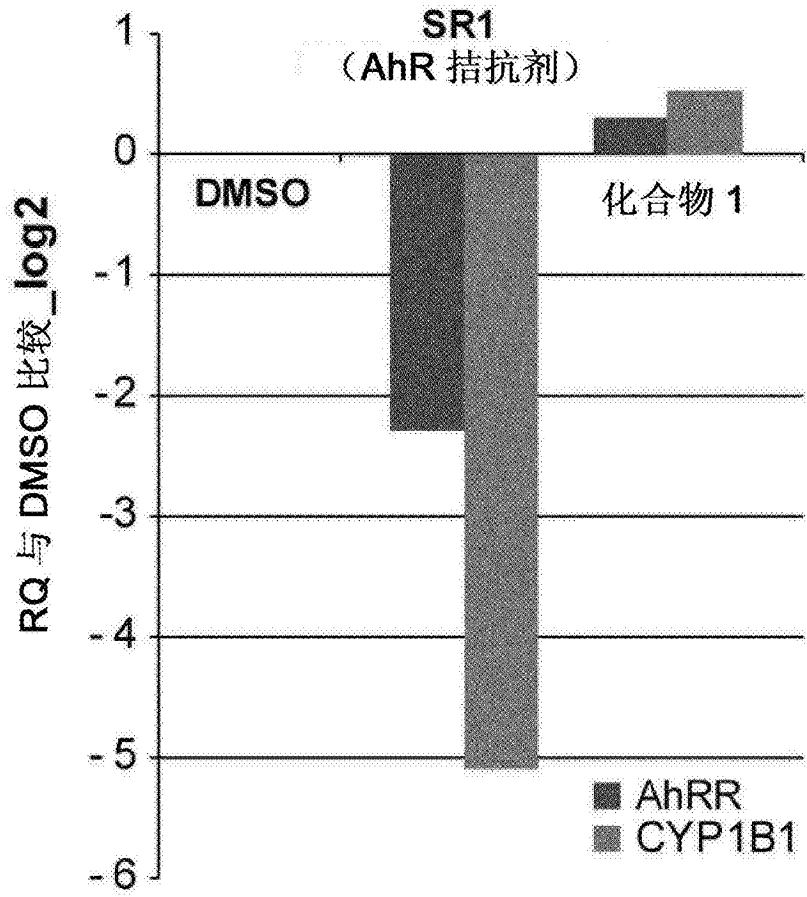


图1

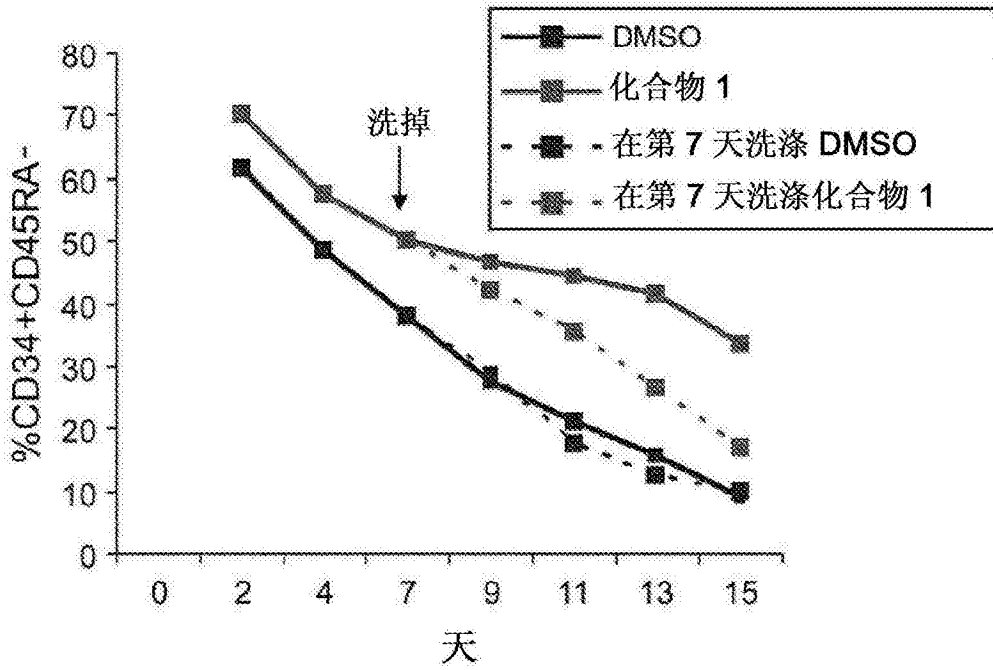


图2

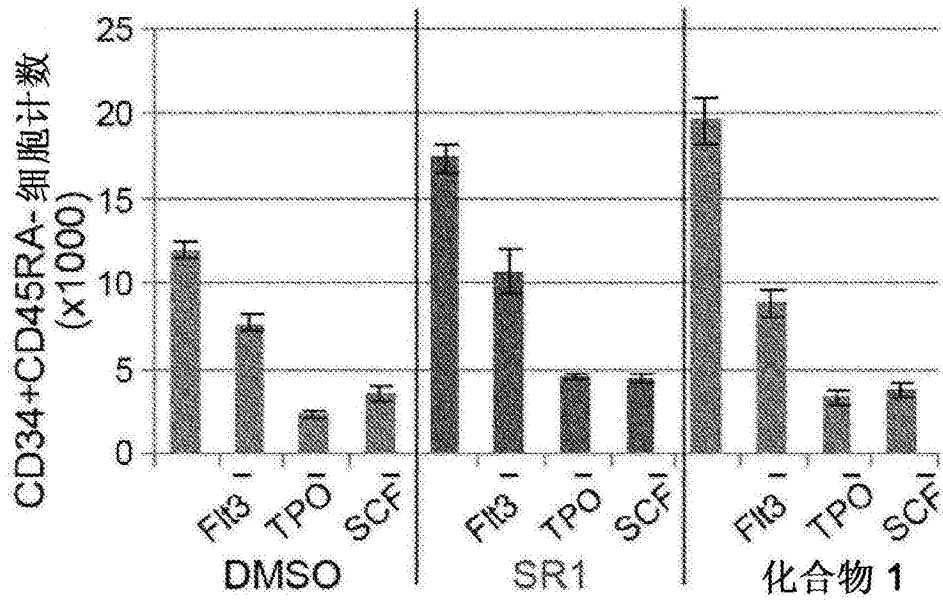


图3

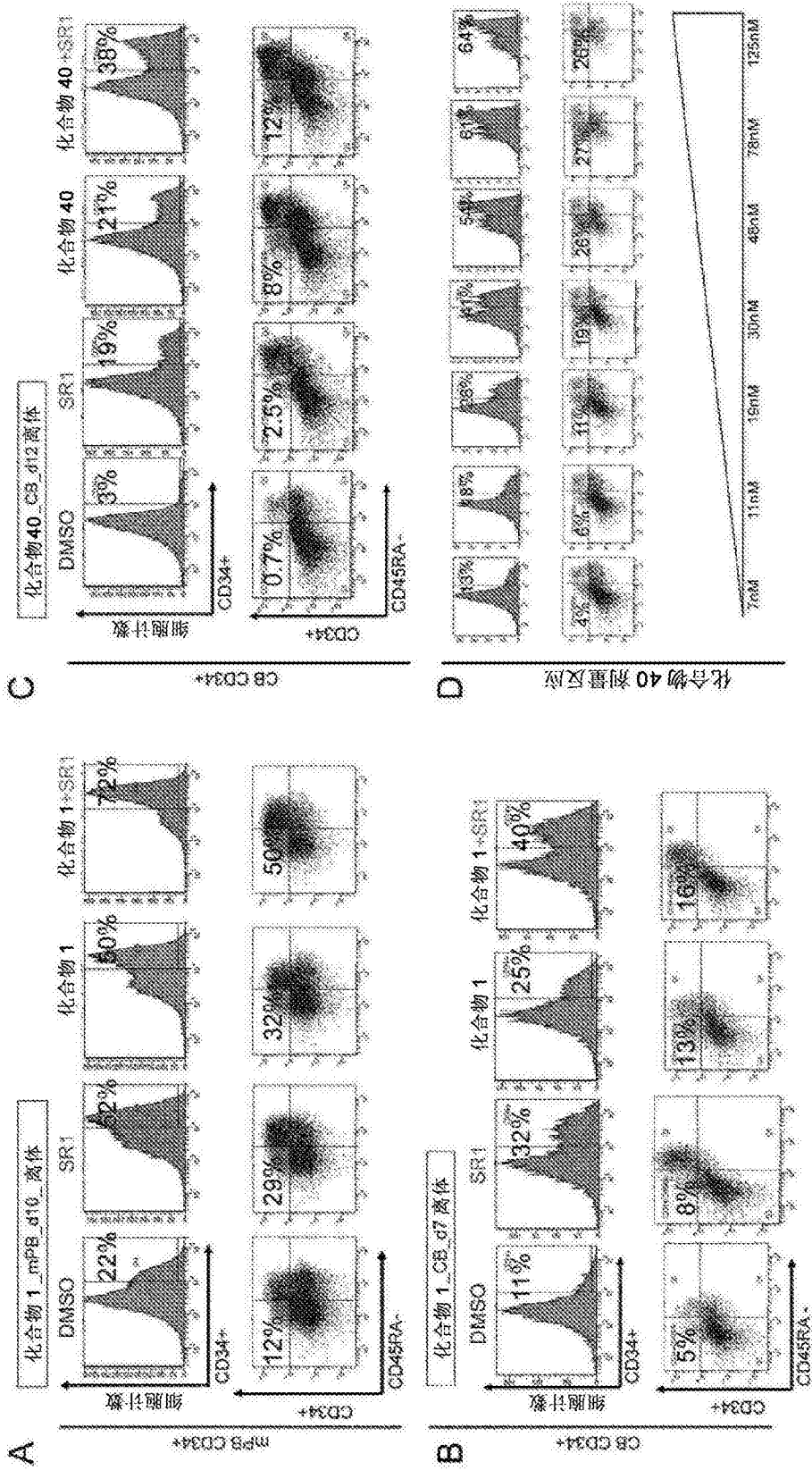


图4

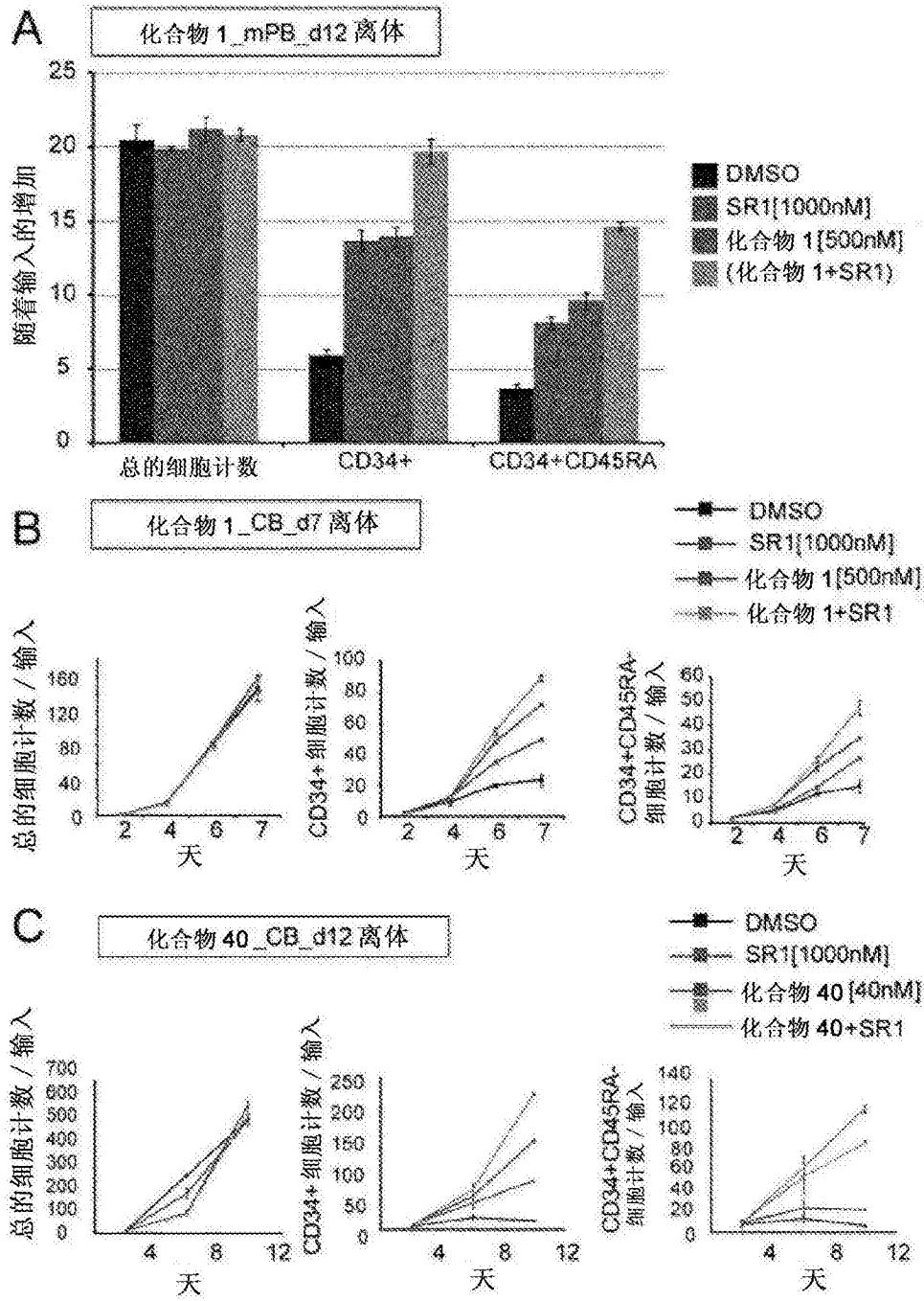


图5

化合物1_mPB_d10_体内

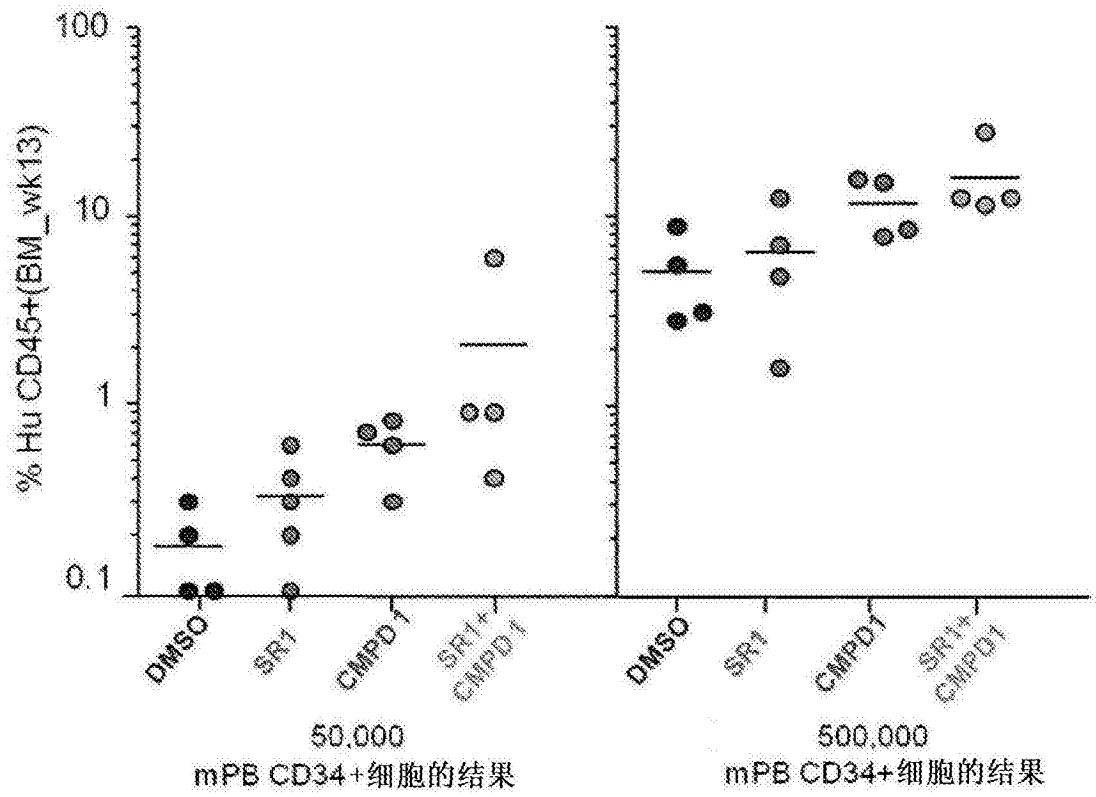


图6

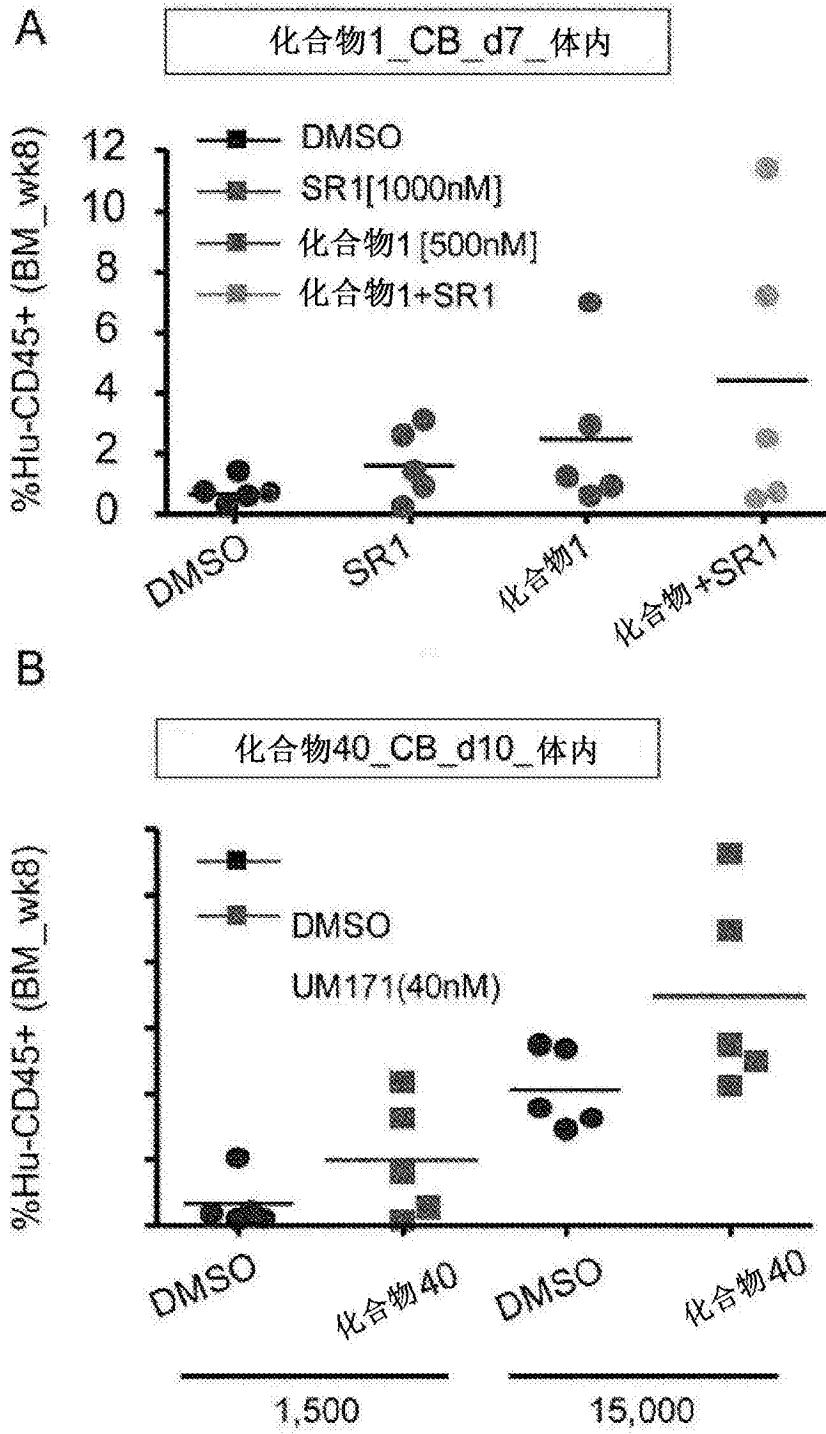


图7

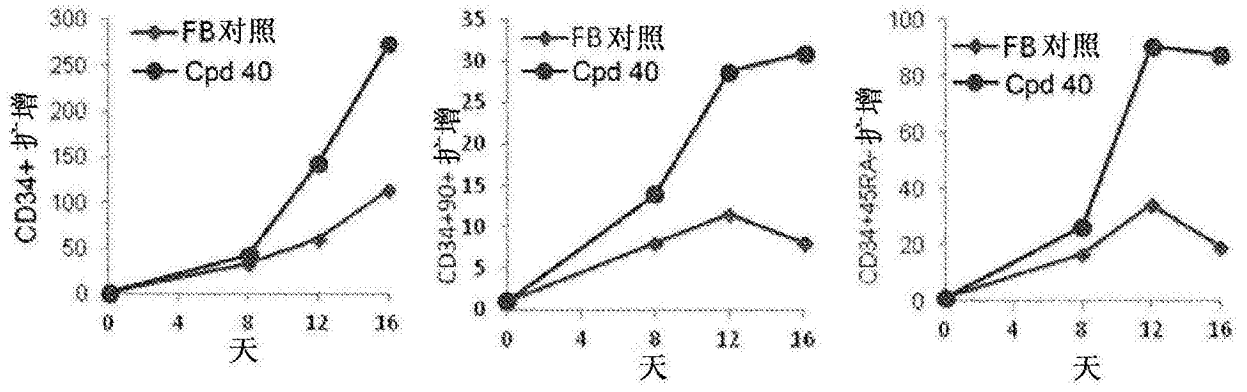


图8