



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118922188 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 08

(21) 申请号 202280089678.4

(22) 申请日 2022.12.08

(30) 优先权数据

63/287,479 2021.12.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/052224 2022.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/107603 EN 2023.06.15

(71) 申请人 奇尼塔公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 G·库马拉维尔 M·麦克唐奈

彭海若

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 徐志明

(51) Int.Cl.

A61K 31/4402 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

A61K 31/4409 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

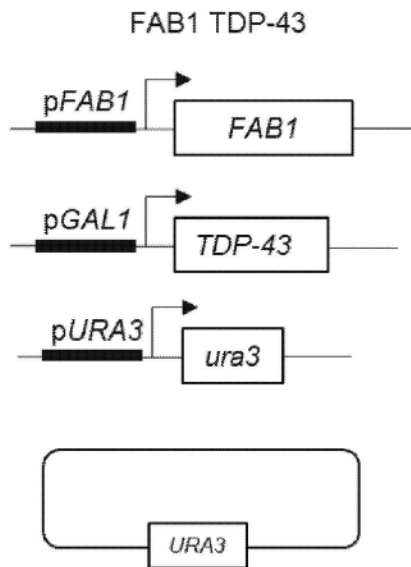
权利要求书15页 说明书115页 附图4页

(54) 发明名称

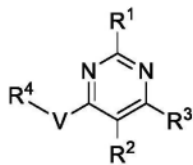
嘧啶及其使用方法

(57) 摘要

公开了可用于治疗神经障碍的包含嘧啶基核的化合物和药物组合物。本文所述的化合物,单独或与其他药物活性剂组合,可用于治疗或预防神经疾病,包括FTLD-TDP、慢性创伤性脑病、ALS、阿尔茨海默病、LATE或额颞叶变性。



1. 式I的化合物:



式 I

或其药学上可接受的盐,

其中

V是-NH-、-NR<sup>5</sup>-、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>NR<sup>5</sup>-、-O-、-CO-或-CHOH-;

R<sup>1</sup>是任选取代的吗啉-4-基、吡啶-4-基、吡啶-3-基、任选取代的2-氧代-吡咯烷-1-基、任选取代的哌啶-1-基或任选取代的哒嗪-4-基;

R<sup>2</sup>是卤素、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基、任选取代的C<sub>2-9</sub>杂芳基、任选取代的2-氧代-吡咯烷-1-基、-(CO)NR<sup>7a</sup>R<sup>7b</sup>、-P(O)R<sup>7c</sup>R<sup>7d</sup>或-S(O)<sub>k</sub>R<sup>7e</sup>;和R<sup>3</sup>是任选取代的吡啶-2-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡唑-1-基、任选取代的吡唑-3-基、任选取代的哒嗪-3-基、任选取代的嘧啶-4-基或任选取代的C<sub>6-10</sub>芳基;或R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>与它们连接的环一起组合以形成任选取代的C<sub>4-12</sub>杂芳基;

n是1、2、3、4、5或6;

k是0、1或2;

R<sup>4</sup>是任选取代的吡啶-4-基、任选取代的1-甲基吡啶-1-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的1-甲基哌啶-3-基、任选取代的哒嗪-3-基或-NHR<sup>8</sup>;

R<sup>5</sup>是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

R<sup>6</sup>是H或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

R<sup>7a</sup>和R<sup>7b</sup>各自独立地是H或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基;或R<sup>7a</sup>和R<sup>7b</sup>与它们连接的氮原子一起组合以形成任选取代的C<sub>2-9</sub>杂环基;

R<sup>7c</sup>、R<sup>7d</sup>和R<sup>7e</sup>各自独立地是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基或羟基;和

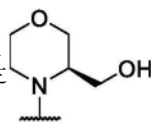
R<sup>8</sup>是任选取代的苯基或任选取代的C<sub>3-6</sub>环烷基。

2. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是任选取代的吗啉-4-基。

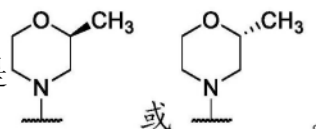
3. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是任选取代的吡啶-4-基。

4. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是任选取代的吡啶-3-基。

5. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是

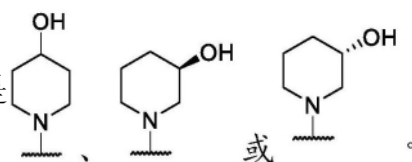


6. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是

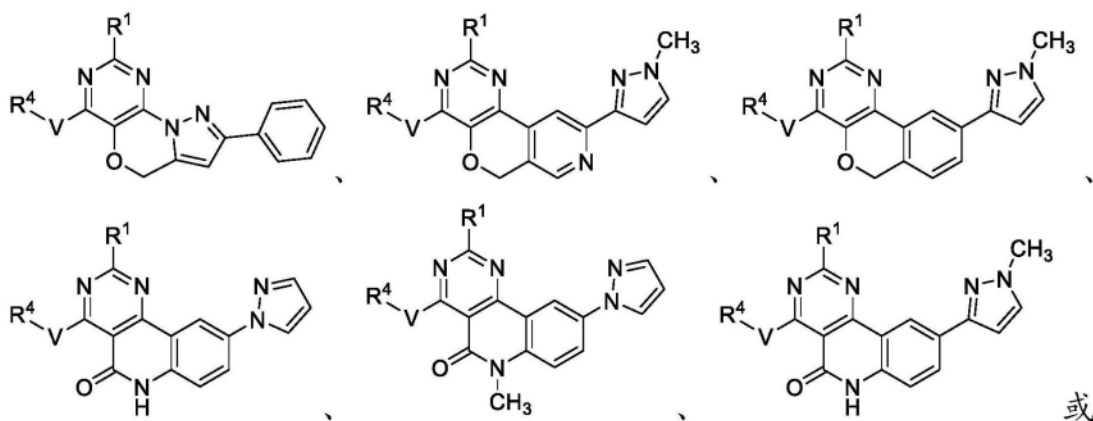


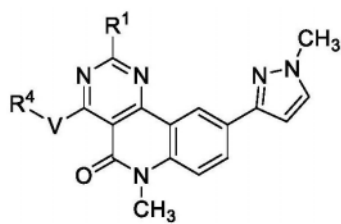
7. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是吗啉-4-基。

8. 如权利要求1所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是任选取代的哌啶-1-基。

9. 如权利要求1所述的化合物,其中 $R^1$ 是  。

10. 如权利要求1至9任一项所述的化合物,其中V是-NH-。
11. 如权利要求1至9任一项所述的化合物,其中V是-CH<sub>2</sub>NH-。
12. 如权利要求1至9任一项所述的化合物,其中V是-O-。
13. 如权利要求1至9任一项所述的化合物,其中V是-CO-。
14. 如权利要求1至9任一项所述的化合物,其中V是-CHOH-。
15. 如权利要求1至9任一项所述的化合物,其中V是-NR<sup>5</sup>-。
16. 如权利要求1至9任一项所述的化合物,其中V是-CH<sub>2</sub>NR<sup>5</sup>-。
17. 如权利要求10所述的化合物,其中 $R^4$ 是-NHR<sup>8</sup>。
18. 如权利要求11所述的化合物,其中 $R^8$ 是任选取代的C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基。
19. 如权利要求12所述的化合物,其中 $R^8$ 是环丙基。
20. 如权利要求11所述的化合物,其中 $R^8$ 是任选取代的苯基。
21. 如权利要求14所述的化合物,其中 $R^8$ 是苯基。
22. 如权利要求20或21所述的化合物,其中 $R^4$ 是任选取代的吡啶-4-基、任选取代的1-甲基吡啶-1-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的1-甲基哌啶-3-基、任选取代的咪唑-3-基。
23. 如权利要求22所述的化合物,其中 $R^4$ 是任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的1-甲基哌啶-3-基、任选取代的咪唑-3-基。
24. 如权利要求23所述的化合物,其中 $R^4$ 是任选取代的吡啶-4-基或任选取代的吡啶-3-基。
25. 如权利要求24所述的化合物,其中 $R^4$ 是吡啶-4-基或吡啶-3-基。
26. 如权利要求1至25任一项所述的化合物,其中 $R^2$ 和 $R^3$ 与它们连接的环一起组合以形成任选取代的C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>杂芳基。
27. 如权利要求26所述的化合物,其中 $R^2$ 和 $R^3$ 与它们连接的环一起组合以形成任选取代的C<sub>4</sub>-C<sub>9</sub>杂芳基。
28. 如权利要求27所述的化合物,其中所述化合物具有以下结构:





29. 如权利要求1至25任一项所述的化合物,其中 $R^2$ 是卤素、 $-(CH_2)_nOH$ 、任选取代的 $C_{1-6}$ 烷氧基、任选取代的 $C_2-C_9$ 杂芳基、任选取代的2-氧代-吡咯烷-1-基、 $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$ 、 $-P(O)R^{7c}R^{7d}$ 或 $-S(O)_kR^{7e}$ 。

30. 如权利要求29所述的化合物,其中 $R^2$ 是任选取代的 $C_{1-6}$ 烷氧基、任选取代的 $C_2-C_9$ 杂芳基、任选取代的2-氧代-吡咯烷-1-基、 $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$ 、 $-P(O)R^{7c}R^{7d}$ 或 $-S(O)_kR^{7e}$ 。

31. 如权利要求30所述的化合物,其中 $R^2$ 是任选取代的 $C_{1-6}$ 烷氧基。

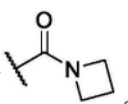
32. 如权利要求31所述的化合物,其中 $R^2$ 是 $-OCH_3$ 。

33. 如权利要求30所述的化合物,其中 $R^2$ 是 $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$ 。

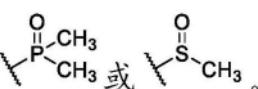
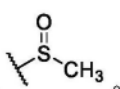
34. 如权利要求29所述的化合物,其中 $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 各自独立地是任选取代的 $C_1-C_6$ 烷基。

35. 如权利要求30所述的化合物,其中 $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 各自是甲基。

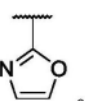
36. 如权利要求29所述的化合物,其中 $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 与它们连接的氮原子一起组合以形成任选取代的 $C_2-C_9$ 杂环基。

37. 如权利要求36所述的化合物,其中 $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$ 是 。

38. 如权利要求30所述的化合物,其中 $R^2$ 是 $-P(O)R^{7c}R^{7d}$ 或 $-S(O)_kR^{7e}$ 。

39. 如权利要求38所述的化合物,其中 $R^2$ 是  或 。

40. 如权利要求30所述的化合物,其中 $R^2$ 是任选取代的 $C_2-C_9$ 杂芳基。

41. 如权利要求40所述的化合物,其中 $R^2$ 是 。

42. 如权利要求29所述的化合物,其中 $R^2$ 是卤素。

43. 如权利要求36所述的化合物,其中 $R^2$ 是Cl。

44. 如权利要求29所述的化合物,其中 $R^2$ 是 $-(CH_2)_nOH$ 。

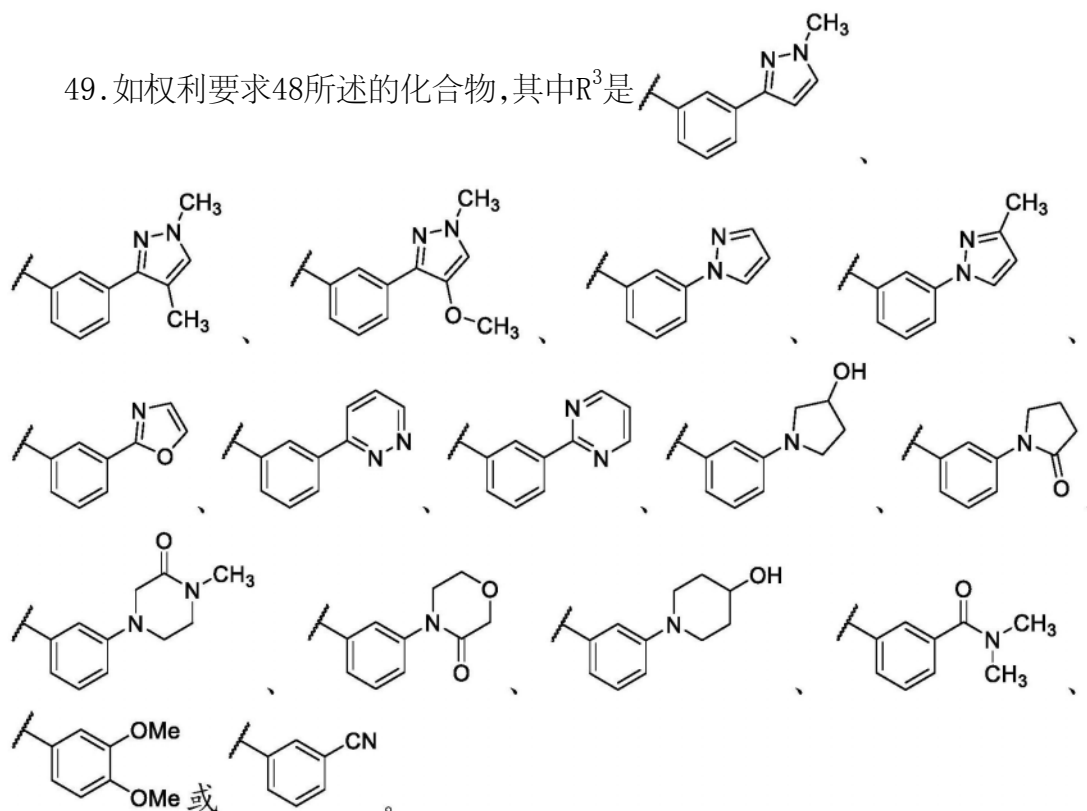
45. 如权利要求44所述的化合物,其中n是1。

46. 如权利要求29至45任一项所述的化合物,其中 $R^3$ 是任选取代的吡啶-2-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡啶-1-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的噻嗪-3-基、任选取代的噻啶-4-基或任选取代的 $C_6-C_{10}$ 芳基。

47. 如权利要求46所述的化合物,其中 $R^3$ 是任选取代的吡啶-3-基、任选取代的吡啶-4-基或任选取代的 $C_6-C_{10}$ 芳基。

48. 如权利要求47所述的化合物,其中 $R^3$ 是任选取代的 $C_6$ 芳基。

49. 如权利要求48所述的化合物,其中R<sup>3</sup>是



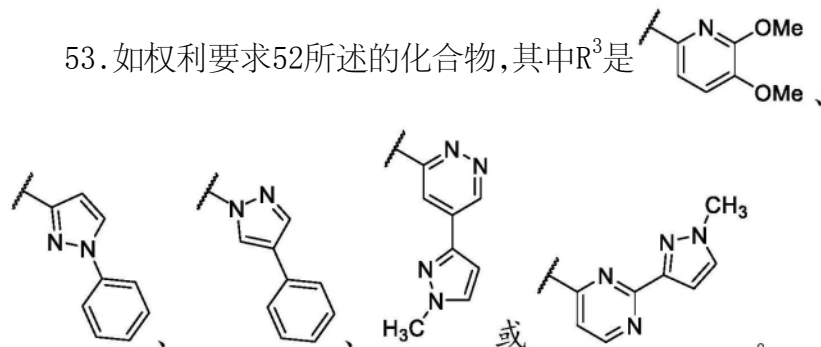
50. 如权利要求47所述的化合物,其中R<sup>3</sup>是任选取代的吡啶-3-基或任选取代的吡啶-4-基。

51. 如权利要求50所述的化合物,其中R<sup>3</sup>是

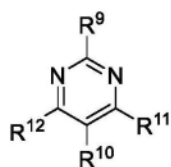


52. 如权利要求46所述的化合物,其中R<sup>3</sup>是任选取代的吡啶-2-基、任选取代的吡唑-1-基、任选取代的吡唑-3-基、任选取代的咪唑-3-基或任选取代的嘧啶-4-基。

53. 如权利要求52所述的化合物,其中R<sup>3</sup>是



54. 式II的化合物:



式 II

或其药学上可接受的盐，

其中

R<sup>9</sup>是任选取代的吗啉-4-基、任选取代的吗啉-3-基烷氧基、任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基、任选取代的1-甲基哌嗪-2-基或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基；

R<sup>10</sup>是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基、-(CO)NR<sup>7a</sup>R<sup>7b</sup>、-P(O)R<sup>7c</sup>R<sup>7d</sup>或-S(O)<sub>k</sub>R<sup>7e</sup>；

R<sup>7a</sup>和R<sup>7b</sup>各自独立地是H或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基；或R<sup>7a</sup>和R<sup>7b</sup>与它们连接的氮原子一起组合以形成任选取代的C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂环基；

R<sup>7c</sup>、R<sup>7d</sup>和R<sup>7e</sup>各自独立地是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基或羟基；

k是0、1或2；

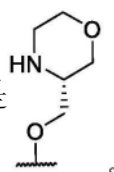
R<sup>11</sup>是任选取代的吗啉-4-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡唑-4-基、任选取代的1H-咪唑-2-基、任选取代的喹啉-6-基或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基；和

R<sup>12</sup>是任选取代的1-甲基哌嗪-2-酮基、任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基、任选取代的N-(吡啶-3-基甲基)胺、任选取代的N-(吡啶-4-基)胺或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基。

55. 如权利要求54所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是吗啉-4-基。

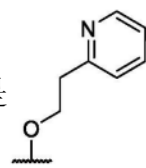
56. 如权利要求54所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是任选取代的吗啉-3-基烷氧基。

57. 如权利要求56所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是



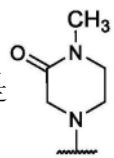
58. 如权利要求54所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基。

59. 如权利要求58所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是



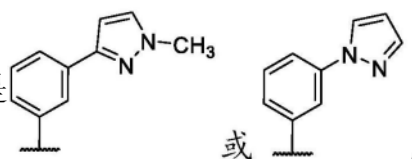
60. 如权利要求54所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是任选取代的1-甲基哌嗪-2-基。

61. 如权利要求60所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是



62. 如权利要求54所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基。

63. 如权利要求62所述的化合物，其中R<sup>9</sup>是

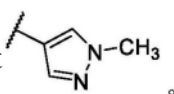


64. 如权利要求54至63任一项所述的化合物，其中R<sup>10</sup>是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基。

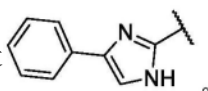
65. 如权利要求54至64任一项所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是吗啉-4-基。

66. 如权利要求54至64任一项所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是吡啶-4-基。

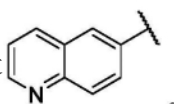
67. 如权利要求54至64任一项所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是任选取代的吡唑-4-基。

68. 如权利要求67所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是 。

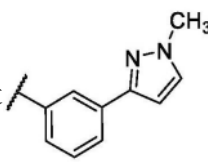
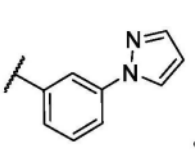
69. 如权利要求54至64任一项所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是任选取代的1H-咪唑-2-基。

70. 如权利要求69所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是 。

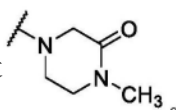
71. 如权利要求54至64任一项所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是任选取代的喹啉-6-基。

72. 如权利要求71所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是 。

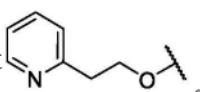
73. 如权利要求54至64任一项所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基。

74. 如权利要求73所述的化合物,其中R<sup>11</sup>是  或 。

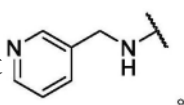
75. 如权利要求54至74任一项所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是任选取代的1-甲基哌嗪-2-酮基。

76. 如权利要求75所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是 。

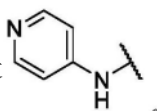
77. 如权利要求54至74任一项所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基。

78. 如权利要求77所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是 。

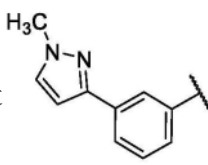
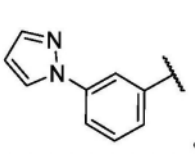
79. 如权利要求54至74任一项所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是任选取代的N-(吡啶-3-基甲基)胺。

80. 如权利要求79所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是 。

81. 如权利要求54至74任一项所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是任选取代的N-(吡啶-4-基)胺。

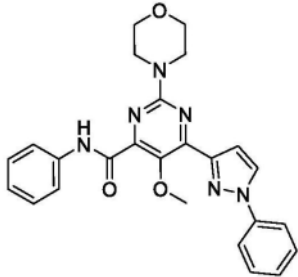
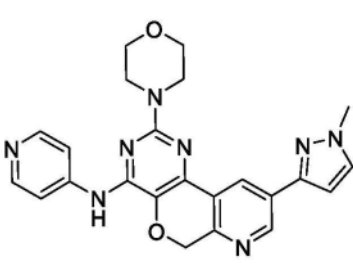
82. 如权利要求81所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是 。

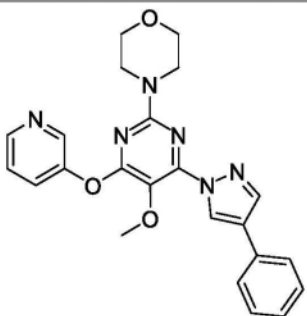
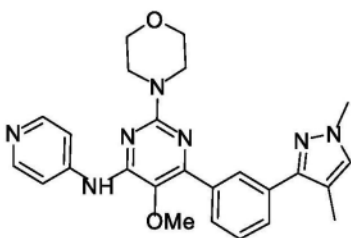
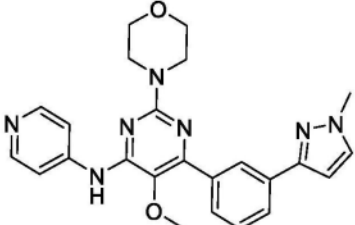
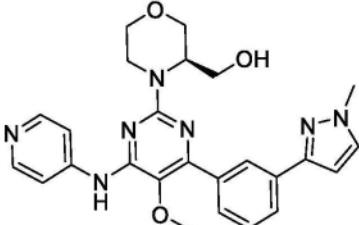
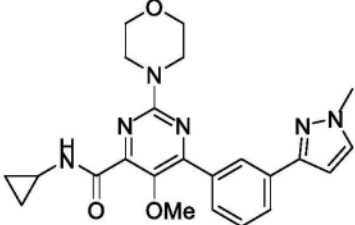
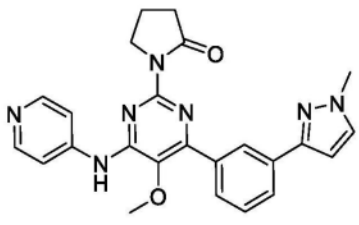
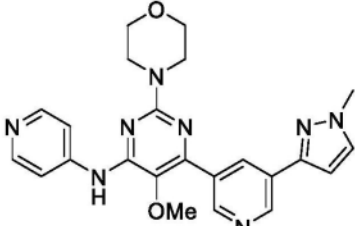
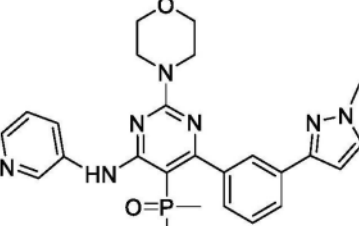
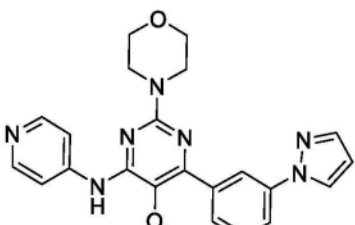
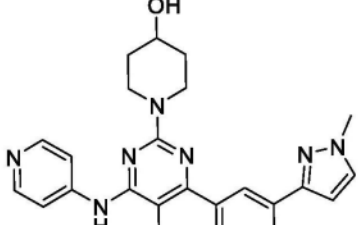
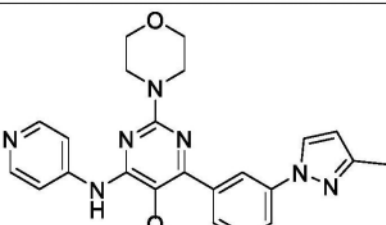
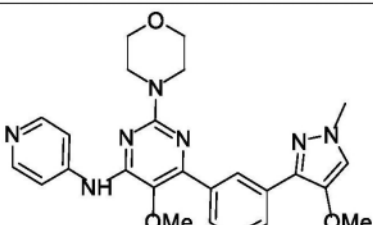
83. 如权利要求54至74任一项所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基。

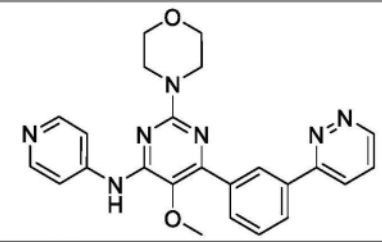
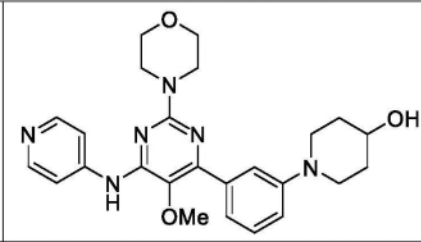
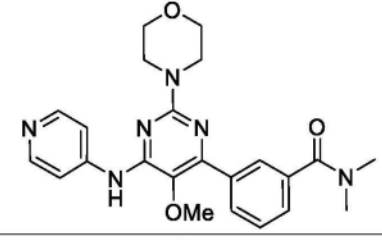
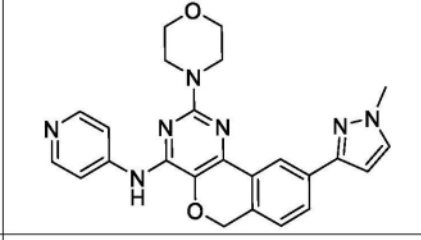
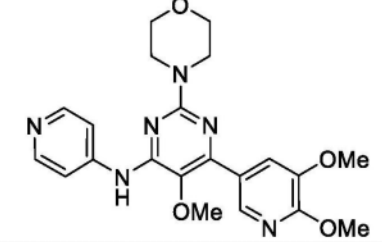
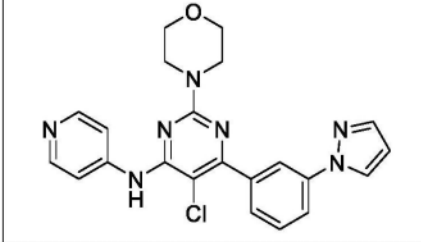
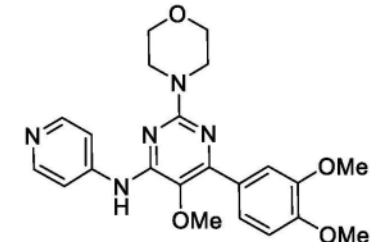
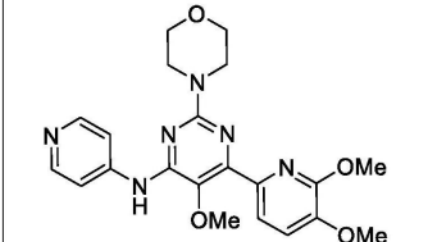
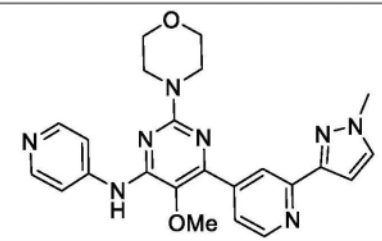
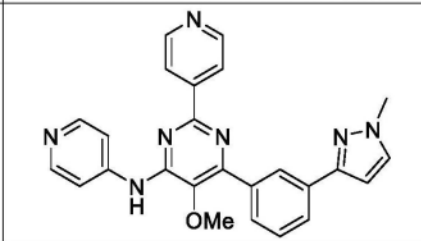
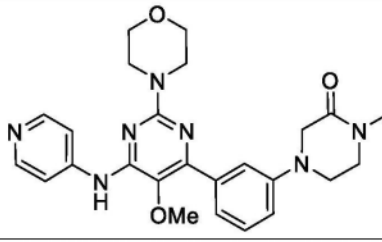
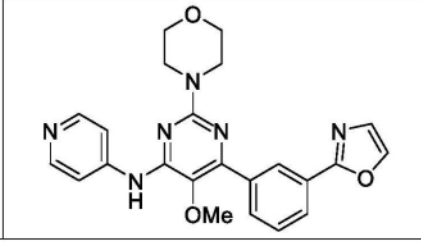
84. 如权利要求83所述的化合物,其中R<sup>12</sup>是  或 。

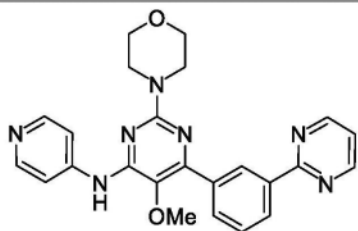
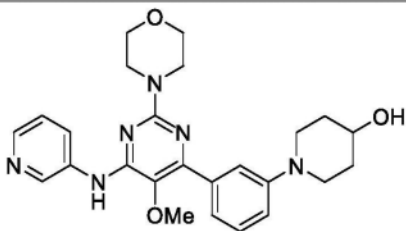
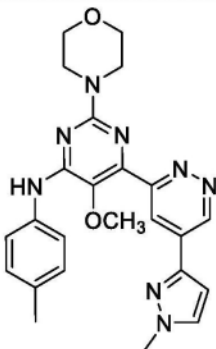
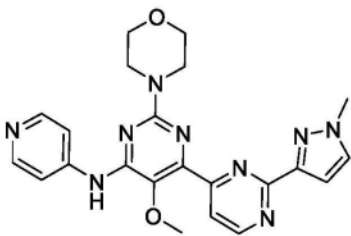
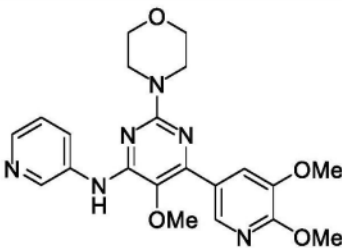
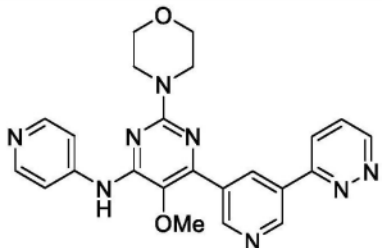
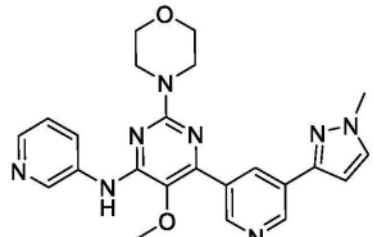
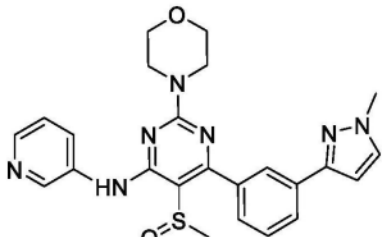
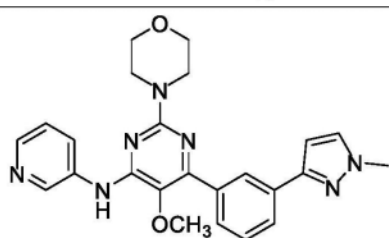
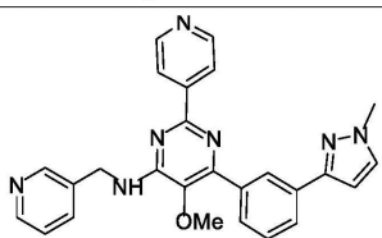
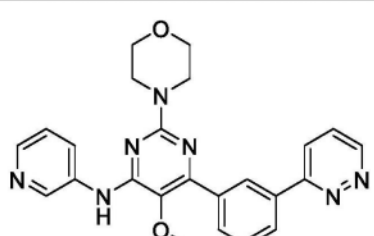
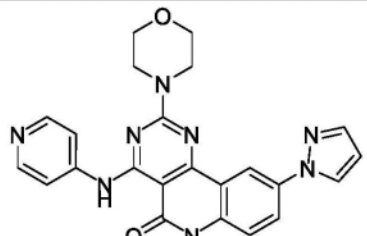
85. 一种化合物, 其具有表1中化合物1-78任一个的结构。

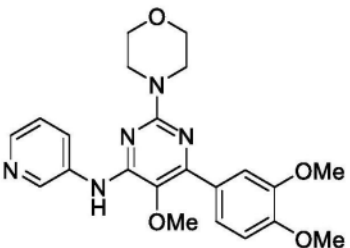
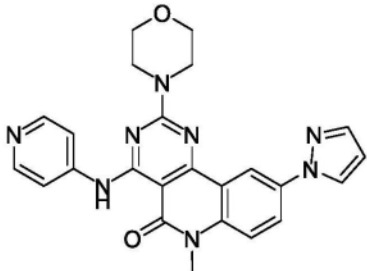
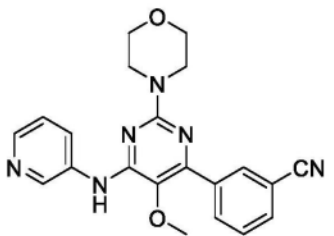
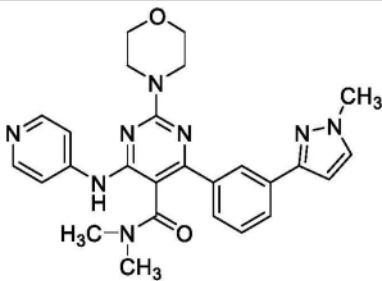
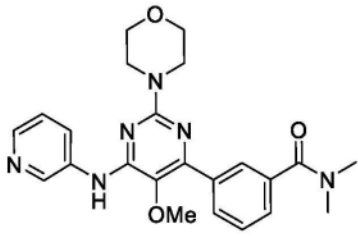
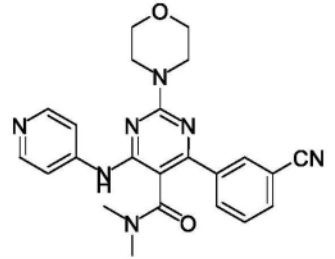
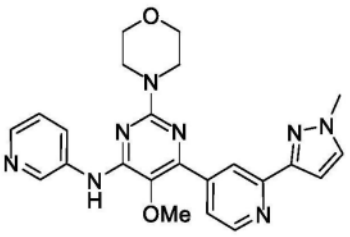
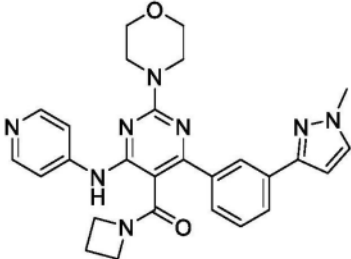
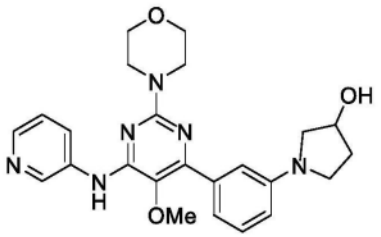
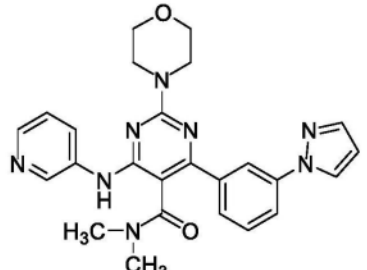
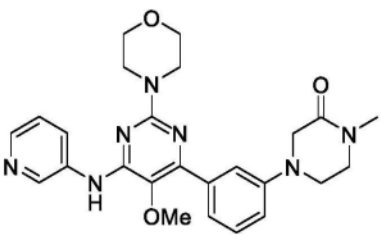
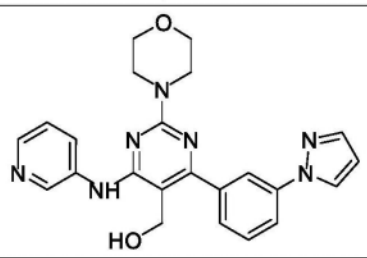
86. 一种具有以下结构的化合物:

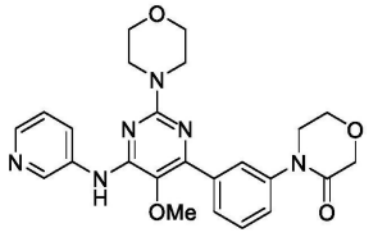
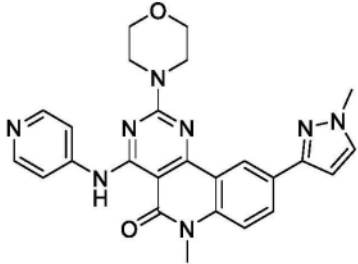
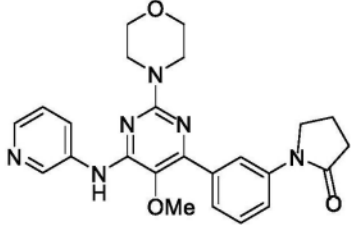
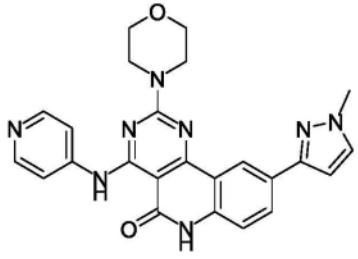
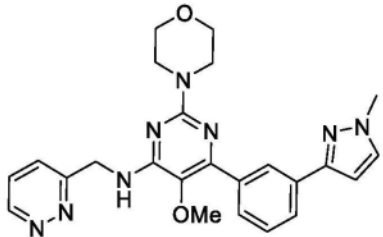
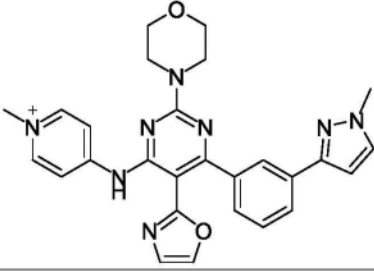
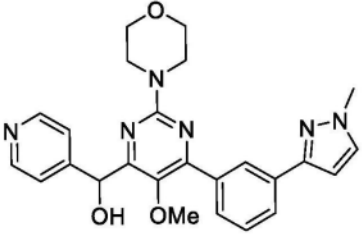
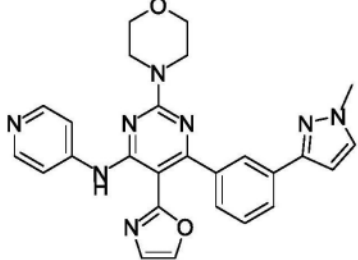
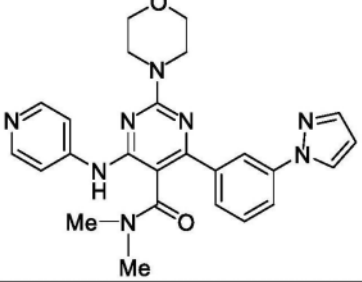
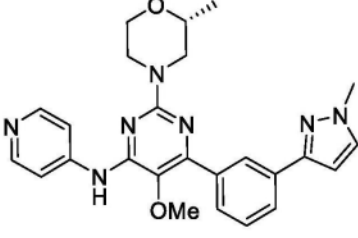
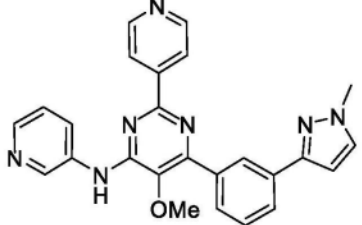
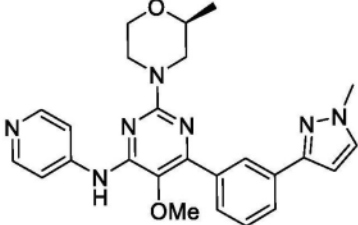
|   |                                                                                   |    |                                                                                    |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 |  | 40 |  |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------|

|   |                                                                                     |    |                                                                                      |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 |    | 41 |    |
| 3 |    | 43 |    |
| 6 |    | 44 |    |
| 7 |   | 45 |   |
| 8 |  | 46 |  |
| 9 |  | 47 |  |

|    |                                                                                     |    |                                                                                      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 |    | 48 |    |
| 11 |    | 49 |    |
| 12 |    | 50 |    |
| 13 |   | 51 |   |
| 14 |  | 53 |  |
| 15 |  | 54 |  |

|    |                                                                                     |    |                                                                                      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 16 |    | 55 |    |
| 17 |    | 56 |    |
| 18 |   | 57 |   |
| 19 |  | 59 |  |
| 20 |  | 62 |  |
| 21 |  | 64 |  |

|    |                                                                                     |    |                                                                                      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 22 |    | 65 |    |
| 23 |    | 66 |    |
| 24 |    | 67 |   |
| 25 |  | 68 |  |
| 26 |  | 69 |  |
| 27 |  | 70 |  |

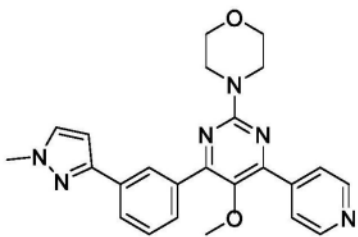
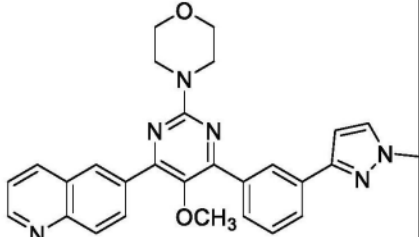
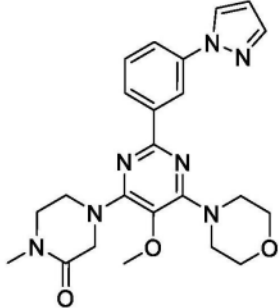
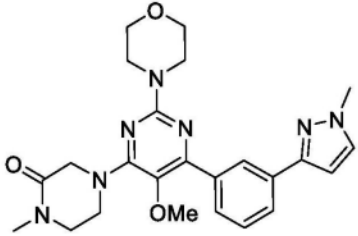
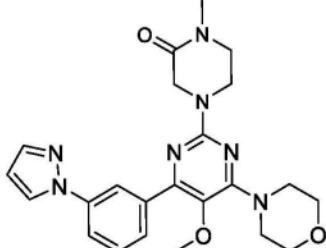
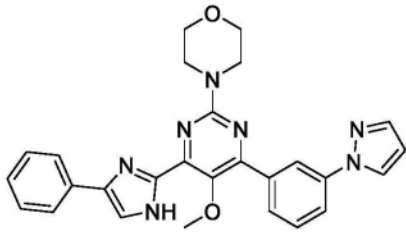
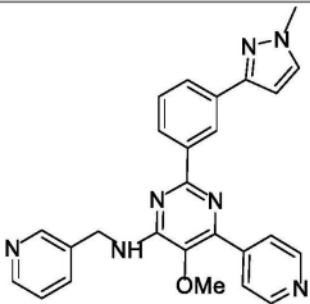
|    |                                                                                     |    |                                                                                      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 28 |    | 71 |    |
| 29 |    | 72 |    |
| 31 |    | 73 |    |
| 32 |  | 74 |  |
| 33 |  | 75 |  |
| 34 |  | 76 |  |

|    |  |    |  |
|----|--|----|--|
| 35 |  | 77 |  |
| 38 |  | 78 |  |
| 39 |  |    |  |

或其药学上可接受的盐。

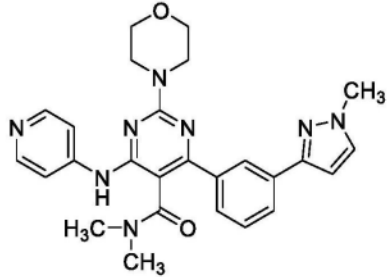
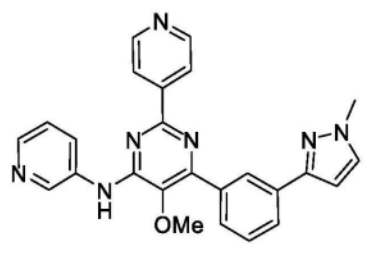
87. 一种具有以下结构的化合物：

|   |  |    |  |
|---|--|----|--|
| 4 |  | 42 |  |
| 5 |  | 52 |  |

|    |                                                                                   |    |                                                                                      |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 30 |  | 58 |    |
| 36 |  | 60 |    |
| 37 |  | 61 |    |
|    |                                                                                   | 63 |  |

或其药学上可接受的盐。

88. 一种具有以下结构的化合物

|    |                                                                                     |    |                                                                                      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 66 |  | 34 |  |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|

或其药学上可接受的盐。

89. 一种药物组合物, 其包含权利要求1至87任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂。

90. 一种治疗有需要的受试者的神经障碍的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1至88任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或者权利要求89所述的药物组合物。

91. 如权利要求90所述的方法,其中所述神经障碍是FTLD-TDP、慢性创伤性脑病、ALS、阿尔茨海默病、LATE或额颞叶变性。

92. 如权利要求90所述的方法,其中所述神经障碍是ALS。

93. 一种抑制细胞中与蛋白质相关的毒性的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求1至88任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或者权利要求89所述的药物组合物接触。

94. 如权利要求93所述的方法,其中所述毒性是TDP-43相关毒性。

95. 如权利要求93所述的方法,其中所述毒性是C9orf72相关毒性。

96. 一种在表达PIKfyve蛋白的细胞中抑制PIKfyve的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求1至88任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或者权利要求89所述的药物组合物接触。

97. 如权利要求93至96任一项所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物神经细胞。

98. 如权利要求93至97任一项所述的方法,其中所述细胞在受试者中。

99. 如权利要求98所述的方法,其中所述受试者患有神经障碍。

## 嘧啶及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及杂芳烃及其用于患者(如人类患者)的神经障碍的治疗性治疗的用途。

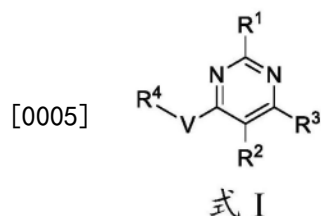
### 背景技术

[0002] 对引起疾病的分子扰动的不完全理解以及稳健模型系统的有限储备导致无法产生针对常见和进行性神经障碍(如ALS和FTD)的成功的疾病改善疗法。在许多方面正在取得进展,以找到可以阻遏这些病症进展的药剂。然而,对于这些疾病中的大多数(如果不是全部),目前的疗法提供的缓解非常小。因此,需要开发可以改变神经退行性疾病的过程的疗法。更一般地,需要更好的用于治疗神经退行性疾病的方法和组合物,以改善受这些疾病折磨的那些人的生活质量。

### 发明内容

[0003] TDP-43是参与RNA剪接的核DNA/RNA结合蛋白。在病理性细胞应激下,TDP-43易位至细胞质并聚集成应激颗粒和相关的蛋白质包涵体。这些表型是退行性运动神经元的标志,并且在97%的所有ALS病例中发现。这种病理学的高度外显性质表明TDP-43广泛涉及到家族性和散发性ALS。此外,促进聚集的TDP-43突变与发生ALS的较高风险关联,表明蛋白质错误折叠和聚集是毒性的驱动因素。TDP-43毒性可以在酵母模型中重演,其中蛋白质诱导存活力缺陷并定位于应激颗粒。

[0004] 在一个方面,本公开提供了式I的化合物:



[0006] 或其药学上可接受的盐,

[0007] 其中

[0008] V是-NH-、-NR<sup>5</sup>-、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>NR<sup>5</sup>-、-O-、-CO-或-CHOH-;

[0009] R<sup>1</sup>是任选取代的吗啉-4-基、吡啶-4-基、吡啶-3-基、任选取代的2-氧代-吡咯烷-1-基、任选取代的哌啶-1-基或任选取代的哒嗪-4-基;

[0010] R<sup>2</sup>是卤素、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基、任选取代的C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂芳基、任选取代的2-氧代-吡咯烷-1-基、-(CO)NR<sup>7a</sup>R<sup>7b</sup>、-P(O)R<sup>7c</sup>R<sup>7d</sup>或-S(O)<sub>k</sub>R<sup>7e</sup>;和R<sup>3</sup>是任选取代的吡啶-2-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡唑-1-基、任选取代的吡唑-3-基、任选取代的哒嗪-3-基、任选取代的嘧啶-4-基或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基;或R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>与它们连接的环一起组合以形成任选取代的C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>杂芳基;

[0011] n是1、2、3、4、5或6;

[0012] k是0、1或2;

[0013]  $R^4$ 是任选取代的吡啶-4-基、任选取代的1-甲基吡啶-1-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的1-甲基哌啶-3-基、任选取代的哒嗪-3-基或-NHR<sup>8</sup>;

[0014]  $R^5$ 是任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

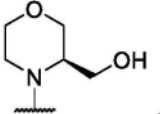
[0015]  $R^6$ 是H或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

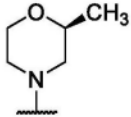
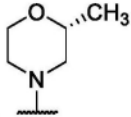
[0016]  $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 各自独立地是H或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;或 $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 与它们连接的氮原子一起组合以形成任选取代的C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂环基;

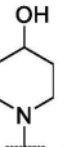
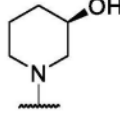
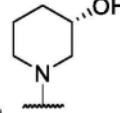
[0017]  $R^{7c}$ 、 $R^{7d}$ 和 $R^{7e}$ 各自独立地是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基或羟基;和

[0018]  $R^8$ 是任选取代的苯基或任选取代的C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基。

[0019] 在一些实施方式中, $R^1$ 是任选取代的吗啉-4-基。在一些实施方式中, $R^1$ 是任选取代的吡啶-4-基。在一些实施方式中, $R^1$ 是任选取代的吡啶-3-基。

[0020] 在一些实施方式中, $R^1$ 是  在一些实施方式中, $R^1$ 是

 或  在一些实施方式中, $R^1$ 是吗啉-4-基。在一些实施方式中, $R^1$ 是任选取

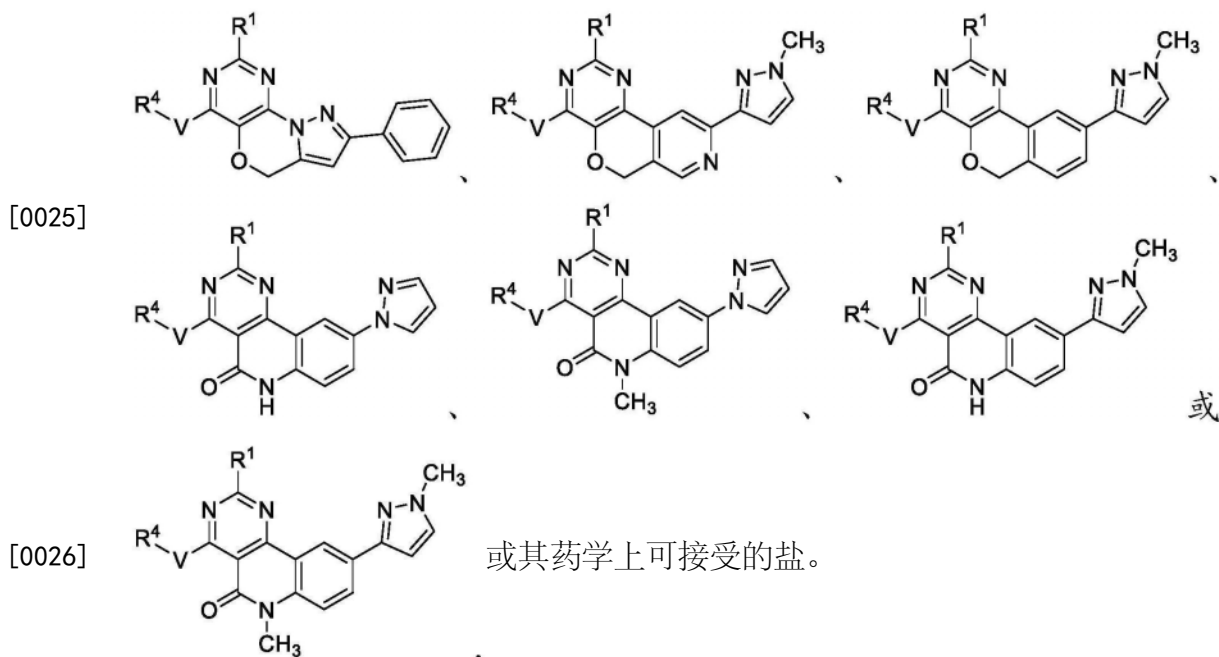
代的哌啶-1-基。在一些实施方式中, $R^1$ 是 、 或 。

[0021] 在一些实施方式中,V是-NH-。在一些实施方式中,V是-CH<sub>2</sub>NH-。在一些实施方式中,V是-O-。在一些实施方式中,V是-CO-。在一些实施方式中,V是-CHOH-。在一些实施方式中,V是-NR<sup>5</sup>-。在一些实施方式中,V是-CH<sub>2</sub>NR<sup>5</sup>-。

[0022] 在一些实施方式中, $R^4$ 是任选取代的吡啶-4-基、任选取代的1-甲基吡啶-1-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的1-甲基哌啶-3-基、任选取代的哒嗪-3-基。在一些实施方式中, $R^4$ 是任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的1-甲基哌啶-3-基、任选取代的哒嗪-3-基。在一些实施方式中, $R^4$ 是任选取代的吡啶-4-基或任选取代的吡啶-3-基。在一些实施方式中, $R^4$ 是吡啶-4-基或吡啶-3-基。

[0023] 在一些实施方式中, $R^2$ 和 $R^3$ 与它们连接的环一起组合以形成任选取代的C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>杂芳基。在一些实施方式中, $R^2$ 和 $R^3$ 与它们连接的环一起组合以形成任选取代的C<sub>4</sub>-C<sub>9</sub>杂芳基。

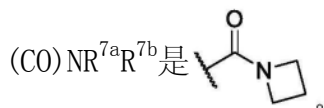
[0024] 在一些实施方式中,所述化合物具有以下结构:



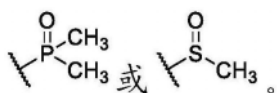
[0027] 在一些实施方式中,  $R^2$  是卤素、 $-(CH_2)_nOH$ 、任选取代的  $C_{1-6}$  烷氧基、任选取代的  $C_2-C_9$  杂芳基、任选取代的 2-氧代-吡咯烷-1-基、 $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$ 、 $-P(O)R^{7c}R^{7d}$  或  $-S(O)_kR^{7e}$ 。在一些实施方式中,  $R^2$  是任选取代的  $C_{1-6}$  烷氧基、任选取代的  $C_2-C_9$  杂芳基、任选取代的 2-氧代-吡咯烷-1-基、 $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$ 、 $-P(O)R^{7c}R^{7d}$  或  $-S(O)_kR^{7e}$ 。

[0028] 在一些实施方式中,  $R^2$  是任选取代的  $C_{1-6}$  烷氧基。在一些实施方式中,  $R^2$  是  $-OCH_3$ 。

[0029] 在一些实施方式中,  $R^2$  是  $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$ 。在一些实施方式中,  $R^{7a}$  和  $R^{7b}$  各自独立地是任选取代的  $C_1-C_6$  烷基。在一些实施方式中,  $R^{7a}$  和  $R^{7b}$  各自是甲基。在一些实施方式中,  $R^{7a}$  和  $R^{7b}$  与它们连接的氮原子一起组合以形成任选取代的  $C_2-C_9$  杂环基。在一些实施方式中,  $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$  是



[0030] 在一些实施方式中,  $R^2$  是  $-P(O)R^{7c}R^{7d}$  或  $-S(O)_kR^{7e}$ 。在一些实施方式中,  $R^2$  是



[0031] 在一些实施方式中,  $R^2$  是任选取代的  $C_2-C_9$  杂芳基。在一些实施方式中,  $R^2$  是



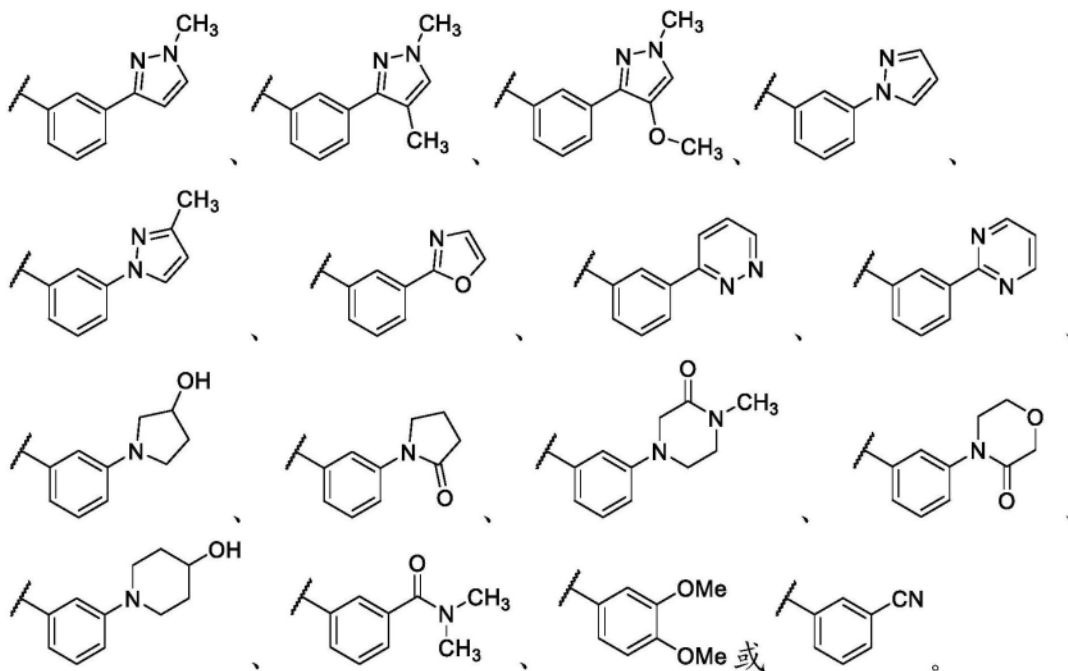
[0032] 在一些实施方式中,  $R^2$  是卤素。在一些实施方式中,  $R^2$  是 Cl。

[0033] 在一些实施方式中,  $R^2$  是  $-(CH_2)_nOH$ 。在一些实施方式中,  $n$  是 1、2 或 3。在一些实施方式中,  $n$  是 1。

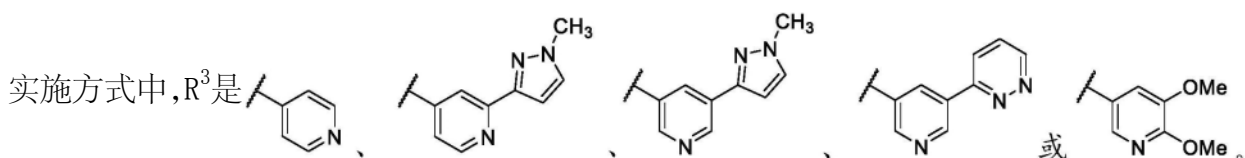
[0034] 在一些实施方式中,  $R^3$  是任选取代的吡啶-2-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡唑-1-基、任选取代的吡唑-3-基、任选取代的咪唑-3-基、任选取代的嘧啶-4-基或任选取代的  $C_6-C_{10}$  芳基。

[0035] 在一些实施方式中,  $R^3$  是任选取代的吡啶-3-基、任选取代的吡啶-4-基或任选取代的  $C_6-C_{10}$  芳基。

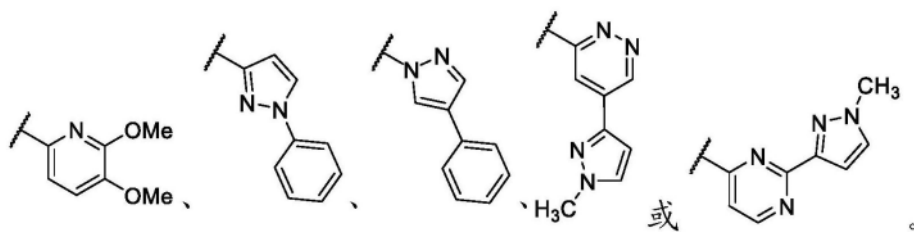
[0036] 在一些实施方式中,  $R^3$  是任选取代的  $C_6$  芳基。在一些实施方式中,  $R^3$  是



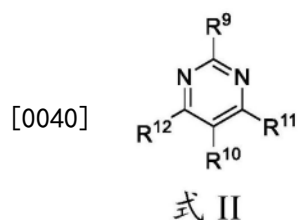
[0037] 在一些实施方式中,  $R^3$  是任选取代的吡啶-3-基或任选取代的吡啶-4-基。在一些



[0038] 在一些实施方式中,  $R^3$  是任选取代的吡啶-2-基、任选取代的吡啶-1-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的吡啶-4-基或任选取代的嘧啶-4-基。在一些实施方式中,  $R^3$  是



[0039] 在一个方面, 本公开提供了式II的化合物:



[0041] 或其药学上可接受的盐,

[0042] 其中

[0043]  $R^9$  是任选取代的吗啉-4-基、任选取代的吗啉-3-基、任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基、任选取代的1-甲基哌嗪-2-基或任选取代的  $C_6$ - $C_{10}$  芳基;

[0044]  $R^{10}$  是任选取代的  $C_{1-6}$  烷氧基、 $-(CO)NR^{7a}R^{7b}$ 、 $-P(O)R^{7c}R^{7d}$  或  $-S(O)_kR^{7e}$ ;

[0045]  $R^{7a}$  和  $R^{7b}$  各自独立地是 H 或任选取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基; 或  $R^{7a}$  和  $R^{7b}$  与它们连接的氮原子

一起组合以形成任选取代的C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂环基；

[0046] R<sup>7c</sup>、R<sup>7d</sup>和R<sup>7e</sup>各自独立地是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基或羟基；

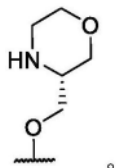
[0047] k是0、1或2；

[0048] R<sup>11</sup>是任选取代的吗啉-4-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡唑-4-基、任选取代的1H-咪唑-2-基、任选取代的喹啉-6-基或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基；和

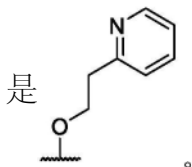
[0049] R<sup>12</sup>是任选取代的1-甲基哌嗪-2-酮基、任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基、任选取代的N-(吡啶-3-基甲基)胺、任选取代的N-(吡啶-4-基)胺或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基。

[0050] 在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是吗啉-4-基。

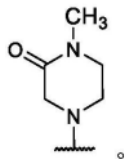
[0051] 在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是任选取代的吗啉-3-基烷氧基。在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是



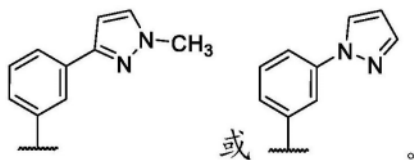
[0052] 在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基。在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是



[0053] 在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是任选取代的1-甲基哌嗪-2-基。在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是



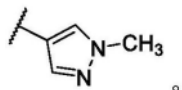
[0054] 在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基。在一些实施方式中，R<sup>9</sup>是



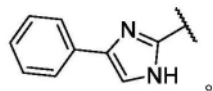
[0055] 在一些实施方式中，R<sup>10</sup>是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基。在一些实施方式中，R<sup>10</sup>是甲氧基。

[0056] 在一些实施方式中，R<sup>11</sup>是任选取代的吗啉-4-基。在一些实施方式中，R<sup>11</sup>是吗啉-4-基。在一些实施方式中，R<sup>11</sup>是任选取代的吡啶-4-基。在一些实施方式中，R<sup>11</sup>是吡啶-4-基。

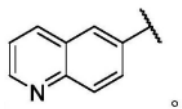
[0057] 在一些实施方式中，R<sup>11</sup>是任选取代的吡唑-4-基。在一些实施方式中，R<sup>11</sup>是



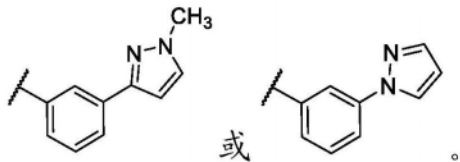
[0058] 在一些实施方式中，R<sup>11</sup>是任选取代的1H-咪唑-2-基。在一些实施方式中，R<sup>11</sup>是



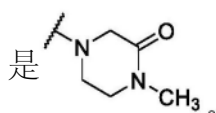
[0059] 在一些实施方式中,  $R^{11}$  是任选取代的喹啉-6-基。在一些实施方式中,  $R^{11}$  是



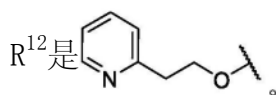
[0060] 在一些实施方式中,  $R^{11}$  是任选取代的  $C_6-C_{10}$  芳基。在一些实施方式中,  $R^{11}$  是



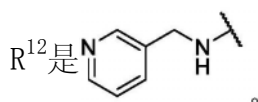
[0061] 在一些实施方式中,  $R^{12}$  是任选取代的1-甲基哌嗪-2-酮基。在一些实施方式中,  $R^{12}$  是



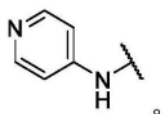
[0062] 在一些实施方式中,  $R^{12}$  是任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基。在一些实施方式中,



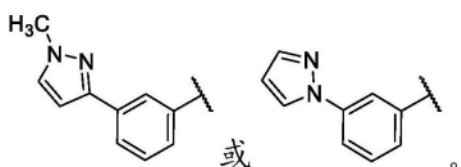
[0063] 在一些实施方式中,  $R^{12}$  是任选取代的N-(吡啶-3-基甲基)胺。在一些实施方式中,



[0064] 在一些实施方式中,  $R^{12}$  是任选取代的N-(吡啶-4-基)胺。在一些实施方式中,  $R^{12}$  是



[0065] 在一些实施方式中,  $R^{12}$  是任选取代的  $C_6-C_{10}$  芳基。在一些实施方式中,  $R^{12}$  是



[0066] 在一些实施方式中, 化合物具有表1中的化合物1-78任一种的结构, 或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中, 化合物具有表1中的化合物1-3、6-29、31-36、38-41、43-51、53-57、59、62和64-78任一种的结构, 或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中, 化合物具有表1中的化合物4、5、30、37、42、52、58、60、61和63任一种的结构, 或其药学上可接受的盐。

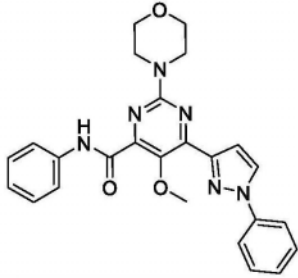
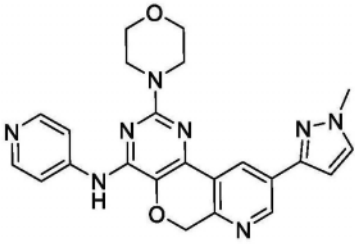
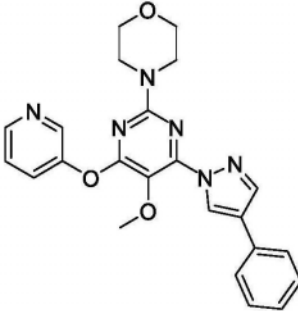
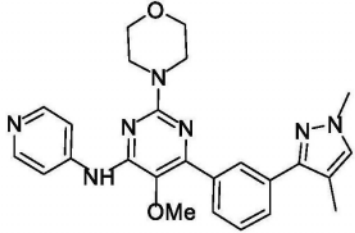
[0067] 在一个方面, 化合物具有表1中的化合物1-78任一种的结构, 或其药学上可接受的盐。

[0068] 在一个方面, 化合物具有表1中的化合物1-3、6-29、31-36、38-41、43-51、53-57、59、62和64-78任一种的结构, 或其药学上可接受的盐。

[0069] 在一个方面, 化合物具有表1中的化合物4、5、30、37、42、52、58、60、61和63任一种的结构, 或其药学上可接受的盐。

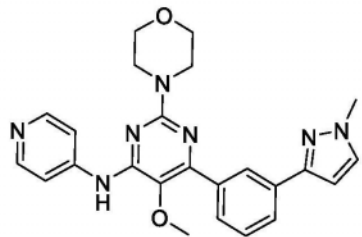
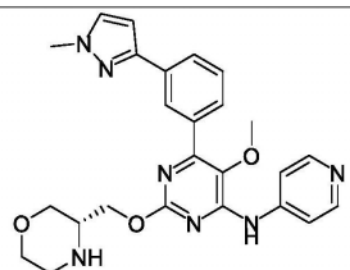
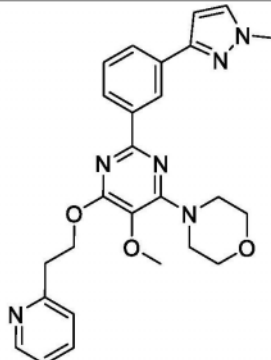
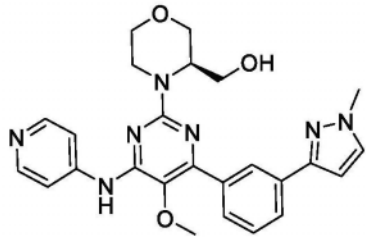
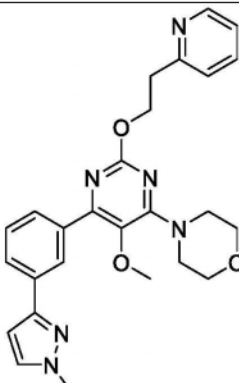
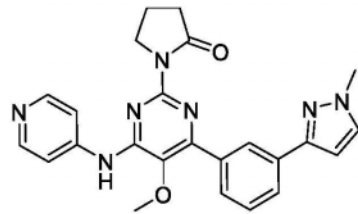
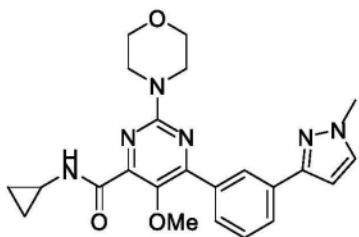
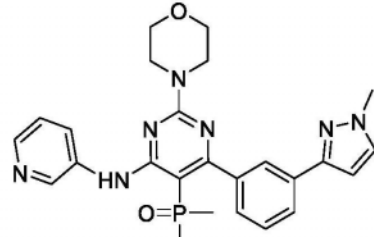
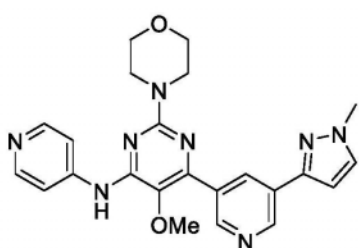
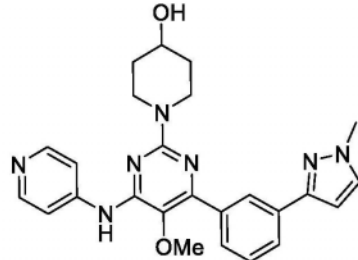
[0070] 在一个方面, 化合物具有表1中的化合物66和34任一种的结构, 或其药学上可接受的盐。

[0071] 表1.本发明的化合物

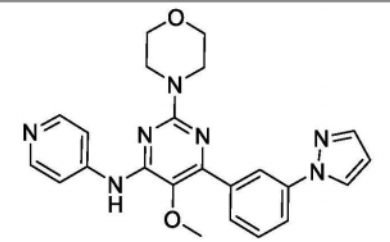
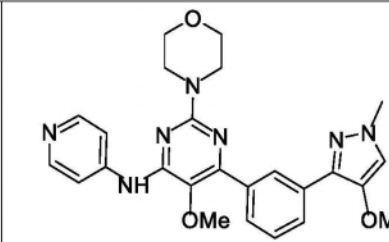
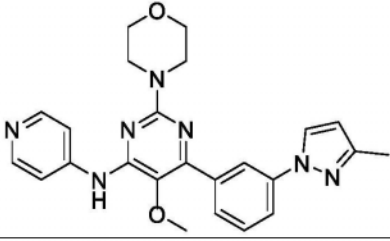
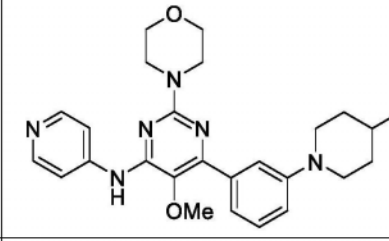
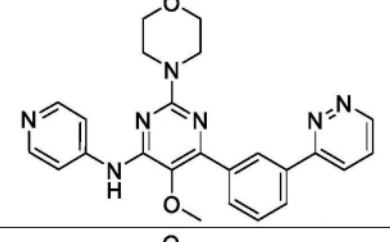
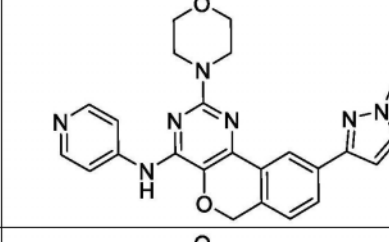
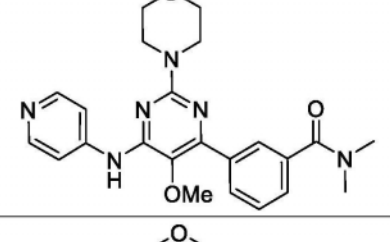
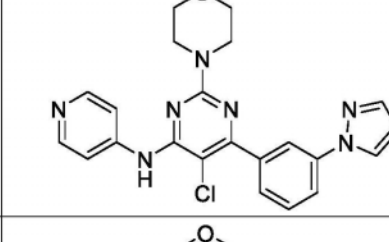
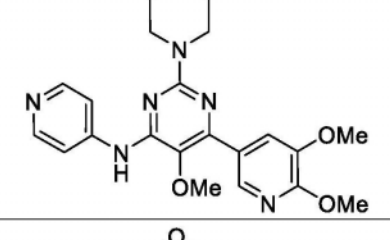
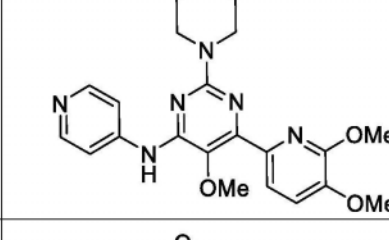
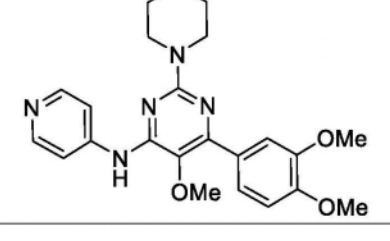
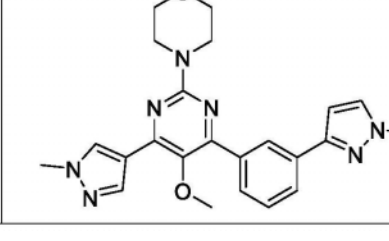
| No<br>. | 结构                                                                                | No<br>. | 结构                                                                                 |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1       |  | 40      |  |
| 2       |  | 41      |  |

[0072]

[0073]

|   |                                                                                     |    |                                                                                      |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 3 |    | 42 |    |
| 4 |    | 43 |    |
| 5 |   | 44 |   |
| 6 |  | 45 |  |
| 7 |  | 46 |  |

[0074]

|    |                                                                                     |    |                                                                                      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 8  |    | 47 |    |
| 9  |    | 48 |    |
| 10 |    | 49 |    |
| 11 |   | 50 |   |
| 12 |  | 51 |  |
| 13 |  | 52 |  |

[0075]

|    |  |    |  |
|----|--|----|--|
| 14 |  | 53 |  |
| 15 |  | 54 |  |
| 16 |  | 55 |  |
| 17 |  | 56 |  |
| 18 |  | 57 |  |
| 19 |  | 58 |  |

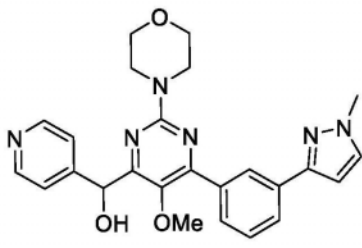
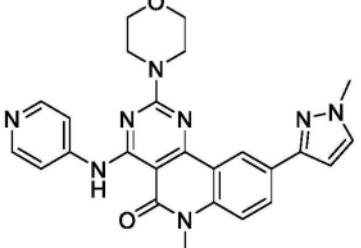
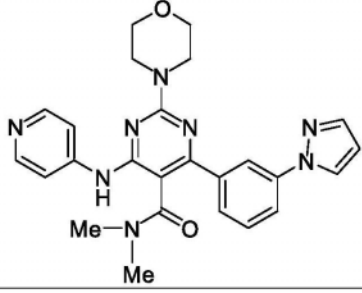
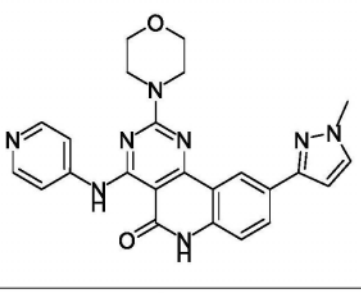
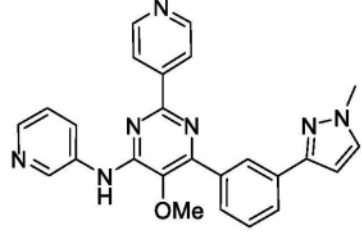
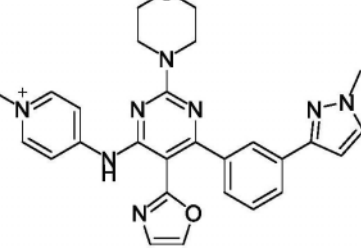
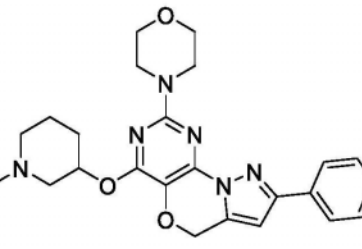
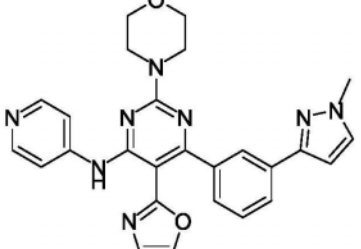
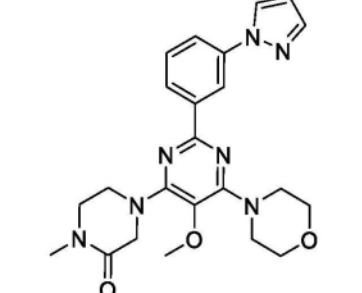
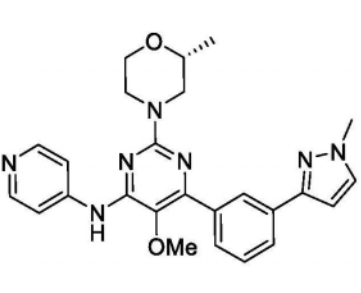
[0076]

|    |  |    |  |
|----|--|----|--|
| 20 |  | 59 |  |
| 21 |  | 60 |  |
| 22 |  | 61 |  |
| 23 |  | 62 |  |
| 24 |  | 63 |  |
| 25 |  | 64 |  |

[0077]

|    |  |    |  |
|----|--|----|--|
| 26 |  | 65 |  |
| 27 |  | 66 |  |
| 28 |  | 67 |  |
| 29 |  | 68 |  |
| 30 |  | 69 |  |
| 31 |  | 70 |  |

[0078]

|    |                                                                                     |    |                                                                                      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 32 |    | 71 |    |
| 33 |    | 72 |    |
| 34 |   | 73 |   |
| 35 |  | 74 |  |
| 36 |  | 75 |  |

|           |  |    |  |
|-----------|--|----|--|
| 37        |  | 76 |  |
| [0079] 38 |  | 77 |  |
| 39        |  | 78 |  |

[0080] 在一个方面,本发明提供了本发明的一些化合物合成中的中间体。中间体的非限制性实例包括表2中的化合物i-1至i-4。

[0081] 表2.

| No<br>.    | 结构 | No<br>. | 结构 |
|------------|----|---------|----|
| [0082] i-1 |    | i-3     |    |
| i-2        |    | i-4     |    |

[0083] 在一个方面,本发明的特征在于包含任何前述化合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0084] 在一个方面,本发明的特征在于一种治疗有需要的受试者的神经障碍(例如,额颞痴呆(FTLD-TDP)、慢性创伤性脑病、ALS、阿尔茨海默病、边缘优势型年龄相关性TDP-43脑病(LATE)或额颞叶变性)的方法。该方法包括施用有效量的任何前述化合物或药物组合物。

[0085] 在一个方面,本发明的特征在于抑制细胞(例如哺乳动物神经细胞)中与蛋白质

(例如TDP-43或C9orf72)相关的毒性的方法。该方法包括施用有效量的任何前述化合物或药物组合物。

[0086] 在一个方面,本发明的特征在于一种治疗有需要的受试者的TDP-43相关障碍或C9orf72相关障碍(例如,FTLD-TDP、慢性创伤性脑病、ALS、阿尔茨海默病、LATE或额颞叶变性)的方法。该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的化合物或含有一种或多种本文所述的化合物的药物组合物。在一些实施方式中,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的式I化合物或其药学上可接受的盐(例如,具有表1中的化合物1-3、6-29、31-36、38-41、43-51、53-57、59、62和64-78任一种的结构的化合物或其药学上可接受的盐)。在一些实施方式中,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的式II化合物或其药学上可接受的盐(例如,具有表1中的化合物4、5、30、37、42、52、58、60、61和63任一种的结构的化合物或其药学上可接受的盐)。在一些实施方式中,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的具有表1中的化合物1-78任一种的结构的化合物或其药学上可接受的盐。

[0087] 在一个方面,本发明的特征在于抑制PIKfyve的方法。该方法包括使细胞与有效量的任何前述化合物或药物组合物接触。在一些实施方式中,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的式I化合物或其药学上可接受的盐(例如,具有表1中的化合物1-3、6-29、31-36、38-41、43-51、53-57、59、62和64-78任一种的结构的化合物或其药学上可接受的盐)。在一些实施方式中,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的式II的化合物或其药学上可接受的盐(例如,具有表1中的化合物4、5、30、37、42、52、58、60、61和63任一种的结构的化合物或其药学上可接受的盐)。在一些实施方式中,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的具有表1中的化合物1-78的任一种的结构的化合物或其药学上可接受的盐。

[0088] 在另一个方面,本发明的特征在于治疗患者(如人类患者)的神经障碍的方法,所述患者基于TDP-43毒性被鉴定为可能受益于本发明化合物的治疗。在这方面,该方法可包括(i)确定患者表现出或倾向于发生TDP-43毒性,和(ii)向患者提供治疗有效量的本发明化合物。在一些实施方式中,患者先前已被确定表现出或倾向于发生TDP-43毒性,并且所述方法包括向患者提供治疗有效量的本发明化合物。例如,通过确定患者是否表达含有与TDP-43聚集和毒性相关的突变的TDP-43的突变体亚型,如选自Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D的突变,可以确定患者发生TDP-43聚集的易感性。例如,这可以通过测定从患者获得的样品分离的TDP-43亚型的氨基酸序列或通过测定从患者获得的样品分离的TDP-43基因的核酸序列来进行。在一些实施方式中,该方法包括从患者获得样品的步骤。

[0089] 在另外的方面,本发明的特征在于治疗患者(如人类患者)的神经病症的方法,所述患者基于TDP-43表达被鉴定为可能受益于本发明化合物的治疗。在这方面,该方法包括(i)确定患者表达具有与TDP-43聚集相关的突变(例如,选自Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D的突变)的TDP-43的突变体形式,和(ii)向患者提供治疗有效量的本发明化合物。在一些实施方式中,患者先前已被确定为表达具有与TDP-43聚集相关的突变(如Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S或N390D突变)的TDP-43的突变体形式,并且该方法包括向患者提供治疗有效量的本发明化合物。

[0090] 在另一个方面,本发明的特征在于通过(i)确定患者是否表现出或倾向于发生TDP-43聚集和(ii)如果患者表现出或倾向于发生TDP-43聚集,则将患者鉴定为可能受益于本发明化合物的治疗来确定患有神经障碍的患者(如人类患者)是否可能受益于本发明化

合物的治疗的方法。在一些实施方式中,所述方法还包括(iii)告知患者他或她是否可能受益于本发明化合物的治疗的步骤。例如,通过确定患者是否表达含有与TDP-43聚集和毒性相关的突变,如选自Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D的突变,的TDP-43的突变体亚型可以确定患者发生TDP-43聚集的易感性。例如,这可以通过测定从患者获得的样品分离的TDP-43亚型的氨基酸序列或通过测定从患者获得的样品分离的TDP-43基因的核酸序列来进行。在一些实施方式中,该方法包括从患者获得样品的步骤。

[0091] 在另一个方面,本发明的特征在于通过(i)确定患者是否表达具有与TDP-43聚集相关的突变(例如,选自Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D的突变)的TDP-43突变体和(ii)如果患者表达TDP-43突变体,则将患者鉴定为可能受益于本发明化合物的治疗,来确定患有神经障碍的患者(例如,人类患者)是否可能受益于本发明化合物的治疗的方法。在一些实施方式中,所述方法还包括(iii)告知患者他或她是否可能受益于本发明化合物的治疗的步骤。患者表达的TDP-43亚型可以通过例如从患者获得的样品分离的TDP-43蛋白,并使用本文所述的或本领域已知的分子生物学技术对蛋白进行测序来评估。在一些实施方式中,患者表达的TDP-43亚型通过分析患者在TDP-43基因座的基因型来确定,例如,通过对获自患者的样品中的TDP-43基因进行测序。在一些实施方式中,该方法包括从患者获得样品的步骤。

[0092] 在上述任何方面的一些实施方式中,通过向患者施用本发明的化合物来向患者提供本发明的化合物。在一些实施方式中,通过施用在体内转成本发明化合物的前药向患者提供本发明的化合物。

[0093] 在上述任何方面的一些实施方式中,所述神经障碍是神经肌肉障碍,如选自肌萎缩性侧索硬化、先天性肌无力综合征、先天性肌病、痉挛束颤综合征、杜氏肌营养不良症、糖原贮积病II型、遗传性痉挛性截瘫、包涵体肌炎、艾萨克综合征、卡恩斯-塞尔综合征、兰伯特-伊顿肌无力综合征、线粒体肌病、肌营养不良症、重症肌无力、肌强直性营养不良症、周围神经病变、脊髓和延髓肌萎缩症、脊髓性肌萎缩症、僵人综合征、Troyer综合征和格林-巴利综合征的神经肌肉障碍。在一些实施方式中,神经障碍是肌萎缩性侧索硬化。

[0094] 在上述任何方面的一些实施方式中,神经障碍选自额颞变性(也称为额颞叶变性和额颞痴呆)、阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆、皮质基底节变性、进行性核上性麻痹、关岛型帕金森综合征-痴呆-肌萎缩侧索硬化复合征、亨廷顿病、包涵体肌病伴早发性佩吉特病和额颞痴呆(IBMPPFD)、散发性包涵体肌炎、肌原纤维肌病、拳击手痴呆、慢性创伤性脑病、亚历山大病和遗传性包涵体肌病。

[0095] 在一些实施方式中,神经障碍是肌萎缩性侧索硬化,并且在向患者施用本发明的化合物后,患者表现出以下反应中的一种或多种或全部:

[0096] (i) 使用肌萎缩性侧索硬化功能评定量表(ALSFRS)或修订的ALSFRS(ALSFRS-R)评估的状况的改善,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内患者的ALSFRS或ALSFRS-R评分的改善(例如,将本发明的化合物初始施用给患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周,或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36

周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,患者的ALSFERS或ALSFERS-R评分改善);

[0097] (ii) 缓慢肺活量增加,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内患者的缓慢肺活量增加(例如,在将本发明的化合物初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用给患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,患者的缓慢肺活量增加);

[0098] (iii) 患者在重复神经刺激后表现出的递减反应(decremental response)的减少,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内观察到的减少(例如,将本发明的化合物初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的减少);

[0099] (iv) 肌肉力量的改善,如例如通过医学研究委员会肌肉测试量表评估的(如例如Jagtap等,Ann.Indian.Acad.Neurol.17:336-339(2014)中所述的,将其公开内容按引用并入作为参考,因为其涉及测量患者对神经疾病治疗的反应),如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内观察到的改善(例如,在将本发明的化合物初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的改善);

[0100] (v) 生活质量的改善,如例如使用肌萎缩性侧索硬化特异性生活质量(ALS特异性QOL)问卷评估的,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内观察到的患者生活质量的改善(例如,将本发明的化合物初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周内、约4周至约24周内、约8周至约20周、或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的受试者生活质量的改善);

[0101] (vi) 肌肉痉挛的频率和/或严重程度的降低,如在施用本发明的化合物后一天或多天、多周或多个月内痉挛频率和/或严重程度的降低(例如,将本发明的化合物初始施用

于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,痉挛频率和/或严重程度的降低);和/或

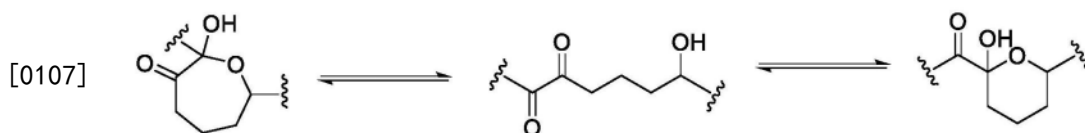
[0102] (vii) TDP-43聚集的减少,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内TDP-43聚集的减少(例如,将本发明的化合物初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,TDP-43聚集的减少)。

[0103] 化学术语

[0104] 应当理解,本文采用的术语是为了描述特定实施方式的目的,而不是限制性的。

[0105] 本领域技术人员将理解,本文所述的某些化合物可以以一种或多种不同的异构体(例如,立体异构体、几何异构体、互变异构体)和/或同位素(例如,其中一个或多个原子已被原子的不同同位素取代,如氢取代氘)形式存在。除非另有说明或从上下文中清楚,否则所描绘的结构可以被理解是单独或组合地表示任何这样的异构体或同位素形式。

[0106] 在一些实施方式中,本文描述的一种或多种化合物可以以不同的互变异构形式存在。如从上下文清楚的,除非明确排除,否则提及此类化合物涵盖所有此类互变异构形式。在一些实施方式中,互变异构形式由单键与相邻双键的交换和质子的伴随迁移产生。在某些实施方式中,互变异构形式可以是质子移变互变异构体,其是具有与参考形式相同的经验式和总电荷的异构质子化状态。具有质子移变互变异构形式的部分的实例是酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、酰胺-亚胺酸对、烯胺-亚胺对和其中质子可占据杂环系统的两个或更多个位置的环状形式,如1H-和3H-咪唑、1H-、2H-和4H-1,2,4-三唑、1H-和2H-异吡啶以及1H-和2H-吡唑。在一些实施方式中,互变异构形式可以平衡或通过适当的取代在空间上锁定成一种形式。在某些实施方式中,互变异构形式由缩醛互变产生,例如以下方案中所示的互变:



[0108] 本领域技术人员将理解,在一些实施方式中,可以根据本发明制备和/或利用本文所述的化合物的同位素。“同位素”是指具有相同原子序数但由核中不同数量的中子产生的不同质量数的原子。例如,氢的同位素包括氕和氘。在一些实施方式中,同位素取代(例如,用氘取代氢)可以改变分子的物理化学性质,如代谢和/或手性中心的外消旋化率。

[0109] 如本领域已知的,许多化学实体(特别是许多有机分子和/或许多小分子)可以采用各种不同的固体形式,如,例如无定形形式和/或结晶形式(例如,多晶型物、水合物、溶剂

化物等)。在一些实施方式中,此类实体可以以任何形式利用,包括任何固体形式。在一些实施方式中,此类实体以特定形式利用,例如以特定固体形式利用。

[0110] 在一些实施方式中,本文描述和/或描绘的化合物可以以盐形式提供和/或利用。

[0111] 在某些实施方式中,本文描述和/或描绘的化合物可以以水合物或溶剂化物形式提供和/或利用。

[0112] 在本说明书中的各处,本公开的化合物的取代基以群组或范围公开。本公开特别旨在包括这些群组和范围的成员的各个和每个单独亚组合。例如,术语“C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基”特别旨在单独地公开甲基、乙基、C<sub>3</sub>烷基、C<sub>4</sub>烷基、C<sub>5</sub>烷基和C<sub>6</sub>烷基。此外,当化合物包括以群组或范围公开取代基的多个位置时,除非另有说明,否则本公开旨在涵盖在每个位置含有成员的各个和每个单独亚组合的单独化合物和化合物组(例如,属和亚属)。

[0113] 在本文中,“任选取代的X”(例如,任选取代的烷基)形式的短语旨在等同于“X,其中X是任选取代的”(例如,“烷基,其中所述烷基是任选取代的”)。其不旨在表示特征“X”(例如烷基)本身是任选的。

[0114] 如本文所用,术语“酰基”表示通过如本文所定义的羰基与母体分子基团连接的如本文所定义的氢或烷基,并且示例是甲酰基(即羧基醛基)、乙酰基、三氟乙酰基、丙酰基和丁酰基。示例性未取代的酰基包括1至6个、1至11个或1至21个碳。

[0115] 如本文所用,术语“烷基”是指1至20个碳原子(例如,1至16个碳原子、1至10个碳原子或1至6个碳原子)的支链或直链一价饱和脂族烃基。亚烷基是二价烷基。

[0116] 如本文单独或与其他基团组合使用的,术语“烯基”是指具有碳-碳双键并且具有2至20个碳原子(例如,2至16个碳原子、2至10个碳原子、2至6个或2个碳原子)的直链或支链烃残基。

[0117] 如本文单独或与其他基团组合使用的,术语“炔基”是指具有碳-碳三键并且具有2至20个碳原子(例如,2至16个碳原子、2至10个碳原子、2至6个或2个碳原子)的直链或支链烃残基。

[0118] 如本文所用,术语“氨基”表示-N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub>,其中每个R<sup>N1</sup>独立地是H、OH、NO<sub>2</sub>、N(R<sup>N2</sup>)<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>OR<sup>N2</sup>、SO<sub>2</sub>R<sup>N2</sup>、SOR<sup>N2</sup>、N-保护基团、烷基、烷氧基、芳基、芳基烷基、环烷基、酰基(例如乙酰基、三氟乙酰基或本文所述的其他基团),其中这些所述R<sup>N1</sup>基团中的每一个可以任选地被取代;或两个R<sup>N1</sup>组合形成亚烷基或杂亚烷基,并且其中每个R<sup>N2</sup>独立地是H、烷基或芳基。本发明的氨基基团可以是未取代的氨基(即,-NH<sub>2</sub>)或取代的氨基(即,-N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub>)。

[0119] 如本文所用,术语“芳基”是指具有至少一个芳环的6至12个碳原子的芳族单碳环或多碳环基团。此类基团的实例包括但不限于苯基、萘基、1,2,3,4-四氢萘基、1,2-二氢萘基、茛满基和1H-茛基。

[0120] 如本文所用,术语“芳基烷基”表示被芳基取代的烷基。示例性未取代的芳基烷基具有7至30个碳(例如7至16个或7至20个碳),如C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基C<sub>6-10</sub>芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基C<sub>6-10</sub>芳基或C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基C<sub>6-10</sub>芳基),如,苯甲基和苯乙基。在一些实施方式中,烷基和芳基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对于相应基团所定义的取代基取代。

[0121] 如本文所用,术语“叠氮基”表示-N<sub>3</sub>基团。

[0122] 如本文所用,术语“氰基”表示CN基团。

[0123] 如本文所用,术语“碳环基”是指非芳族C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>单环、双环或三环结构,其中环由碳

原子形成。碳环基结构包括环烷基和不饱和碳环基。

[0124] 如本文所用,术语“环烷基”是指3至10个,优选3至6个碳原子的饱和、非芳族、单价单碳环或多碳环基团。该术语进一步由诸如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、降冰片基和金刚烷基的基团来示例。

[0125] 如本文所用,术语“卤代”意指氟(氟代)、氯(氯代)、溴(溴代)或碘(碘代)基团。

[0126] 如本文所用,术语“杂烷基”是指如本文所定义的烷基,其中一个或多个组成碳原子已被氮、氧或硫替代。在一些实施方式中,杂烷基可以进一步被1、2、3或4个如本文针对烷基所述的取代基取代。杂烷基的实例是“烷氧基”,如本文所用,其是指烷基-0- (例如甲氧基和乙氧基)。杂亚烷基是二价杂烷基。

[0127] 如本文所用,术语“杂烯基”是指如本文所定义的烯基,其中一个或多个组成碳原子已被氮、氧或硫替代。在一些实施方式中,杂烯基可以进一步被1、2、3或4个如本文针对烯基所述的取代基取代。杂烯基的实例是“烯氧基”,如本文所用,其是指烯基-0-。亚杂烯基是二价杂烯基。

[0128] 如本文所用,术语“杂炔基”是指如本文所定义的炔基,其中一个或多个组成碳原子已被氮、氧或硫替代。在一些实施方式中,杂炔基可以进一步被1、2、3或4个如本文针对炔基所述的取代基取代。杂炔基的实例是“炔氧基”,如本文所用,其是指炔基-0-。亚杂炔基是二价杂炔基。

[0129] 如本文所用,术语“杂芳基”是指5至12个原子的单环或多环基团,其具有至少一个芳环并含有一个、两个、三个或四个选自N、O和S的环杂原子,其余的环原子是C。杂芳基的一个或两个环碳原子可被羰基替代。杂芳基的实例是吡啶基(例如吡啶-2-基、吡啶-3-基和吡啶-4-基)、吡唑基(例如吡唑-1-基和吡唑-3-基)、嘧啶基(例如嘧啶-4-基)、哒嗪基(例如哒嗪-3-基)、苯并噁唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、咪唑基、噁唑基和噻唑基。

[0130] 如本文所用,术语“杂芳基烷基”表示被杂芳基取代的烷基。示例性未取代的杂芳基烷基基团是7至30个碳(例如,7至16个或7至20个碳,如C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂芳基或C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂芳基)。在一些实施方式中,烷基和杂芳基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文针对相应基团所定义的取代基取代。

[0131] 如本文所用,术语“杂环基”表示具有3至12个原子的单环或多环基团,其具有至少一个含有一个、两个、三个或四个选自N、O或S的环杂原子的环并且没有芳族环。杂环基的实例包括但不限于吗啉基(例如吗啉-4-基)、硫代吗啉基、呋喃基、哌嗪基、哌啶基(例如哌啶-1-基)、吡喃基、吡咯烷基(例如吡咯烷-1-基)、四氢吡喃基、四氢呋喃基和1,3-二噁烷基。杂环基可以是芳族或非芳族的。芳族杂环基也称是杂芳基。

[0132] 如本文所用,术语“杂环基烷基”表示被杂环基取代的烷基。示例性的未取代的杂环基烷基基团为7至30个碳(例如,7至16或7至20个碳,如C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂环基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂环基,或C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂环基)。在一些实施方式中,烷基和杂环基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文针对相应基团所定义的取代基取代。

[0133] 如本文所用,术语“羟基”表示-OH基团。

[0134] 如本文所用,术语“N-保护基团”表示旨在在合成程序期间保护氨基免于不期望的的那些基团。常用的N-保护基团公开于Greene,“Protective Groups in Organic Synthesis”,第3版(John Wiley&Sons,New York,1999)。N-保护基团包括酰基、芳酰基或氨

基甲酰基,如甲酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻硝基苯氧基乙酰基、 $\alpha$ -氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基和手性助剂,如保护或未保护的D、L或D,L-氨基酸,如丙氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸;含磺酰基的基团,如苯磺酰基和对甲苯磺酰基;氨基甲酸酯形成基团,如苄氧基羰基、对-氯苄氧基羰基、对-甲氧基苄氧基羰基、对-硝基苄氧基羰基、2-硝基苄氧基羰基、对-溴苄氧基羰基、3,4-二甲氧基苄氧基羰基、3,5-二甲氧基苄氧基羰基、2,4-二甲氧基苄氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、2-硝基-4,5-二甲氧基苄氧基羰基、3,4,5-三甲氧基苄氧基羰基、1-(对-联苯基)-1-甲基乙氧基羰基、 $\alpha,\alpha$ -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧基羰基、二苯甲氧基羰基、叔丁氧基羰基、二异丙基甲氧基羰基、异丙氧基羰基、乙氧基羰基、甲氧基羰基、烯丙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、苯氧基羰基、4-硝基苯氧基羰基、苄基-9-甲氧基羰基、环戊氧基羰基、金刚烷基氧基羰基、环己氧基羰基和苯基硫代羰基、芳烷基,如苯甲基、三苯基甲基和苄基氧甲基和甲硅烷基,如三甲基甲硅烷基。优选的N-保护基团是烯丙氧基羰基(alloc)、甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、丙氨酰基、苯基磺酰基、苄基、叔丁氧基羰基(Boc)和苄氧基羰基(Cbz)。

[0135] 如本文所用,术语“硝基”表示 $\text{NO}_2$ 基团。

[0136] 如本文所用,术语“氧杂芳基”表示具有至少一个桥环氧原子的杂芳基。

[0137] 如本文所用,术语“氧杂环基”表示具有至少一个桥环氧原子的杂环基。

[0138] 如本文所用,术语“硫醇”表示-SH基团。

[0139] 烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、碳环基(例如环烷基)、芳基、杂芳基和杂环基可以是取代的或未取代的。当被取代时,除非另有说明,否则通常存在1至4个取代基。取代基包括,例如:芳基(例如,取代的和未取代的苯基)、碳环基(例如,取代的和未取代的环烷基)、卤素(例如,氟)、羟基、氧代、杂烷基(例如,取代的和未取代的甲氧基、乙氧基或硫代烷氧基)、杂芳基、杂环基、氨基(例如, $\text{NH}_2$ 或单烷基氨基或二烷基氨基)、叠氮基、氰基、硝基或硫醇基。芳基、碳环基(例如环烷基)、杂芳基和杂环基也可以被烷基(未取代和取代的,如芳基烷基(例如取代和未取代的苄基))取代。

[0140] 本发明的化合物可以具有一个或多个不对称碳原子,并且可以以光学纯的对映异构体、对映异构体的混合物的形式存在,如,例如外消旋物、光学纯的非对映异构体、非对映异构体的混合物、非对映异构体的外消旋物或非对映异构体的外消旋物的混合物。光学活性形式可以例如通过拆分外消旋物、通过不对称合成或不对称色谱法(使用手性吸附剂或洗脱剂的色谱法)获得。也就是说,某些公开的化合物可以以各种立体异构形式存在。立体异构体是仅在其空间排列上不同的化合物。对映异构体是镜像不可重叠的立体异构体的对,最常见的原因是它们含有作为手性中心的不对称取代的碳原子。“对映异构体”意指彼此是镜像且不可重叠的一对分子中的一种。非对映异构体是不作为镜像相关的立体异构体,最常见的是因为它们含有两个或更多个不对称取代的碳原子并且代表围绕一个或多个手性碳原子的取代基的构型。化合物的对映异构体可以例如通过使用一种或多种众所周知的技术和方法(如,例如手性色谱法和基于其的分离方法)将对映异构体从外消旋物分离来制备。本领域技术人员可以容易地确定用于从外消旋混合物中分离本文所述的化合物的对映异构体的适当技术和/或方法。“外消旋物”或“外消旋混合物”意指含有两种对映异构体的化合物,其中此类混合物不显示光学活性;即,它们不旋转偏振光的平面。“几何异构

体”意指取代基原子相对于碳-碳双键、环烷基环或桥连双环系统的取向不同的异构体。碳-碳双键的每一侧上的原子(H除外)可以呈E(取代基在碳-碳双键的相对侧上)或Z(取代基在同一侧上定向)构型。“R”、“S”、“S\*”、“R\*”、“E”、“Z”、“顺式”和“反式”表示相对于核心分子的构型。某些公开的化合物可以阻转异构体形式存在。阻转异构体是由围绕单键的受阻旋转产生的立体异构体,其中对于旋转的空间应力屏障足够高以允许构象异构体的分离。本发明的化合物可以通过异构体特异性合成或从异构体混合物中拆分而制备成单独的异构体。常规拆分技术包括使用光学活性酸形成异构体对中每种异构体的游离碱的盐(随后分级结晶和再生游离碱),使用光学活性胺形成异构体对中每种异构体的酸形式的盐(随后分级结晶和再生游离酸),使用光学纯的酸、胺或醇形成异构体对中每种异构体的酯或酰胺(随后色谱分离和除去手性助剂),或使用各种熟知的色谱方法拆分起始材料或最终产物的异构体混合物。当所公开的化合物的立体化学被命名或通过结构描绘时,命名或描绘的立体异构体相对于其它立体异构体是至少60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、99重量%或99.9重量%。当单一对映异构体被命名或通过结构描绘时,所描绘或命名的对映异构体是至少60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、99重量%或99.9重量%光学纯的。当单一非对映异构体被命名或通过结构描绘时,所描绘或命名的非对映异构体是至少60%、70%、80%、90%、99%或99.9重量%纯的。光学纯度百分比是对映异构体的重量与对映异构体的重量加上其光学异构体的重量的比率。按重量计的非对映异构体纯度是一种非对映异构体的重量与所有非对映异构体的重量的比率。当所公开的化合物的立体化学被命名或通过结构描述时,所命名或描述的立体异构体相对于其他立体异构体是至少60%、70%、80%、90%、99%或99.9%摩尔分数纯的。当单一对映异构体被命名或通过结构描述时,所描述或命名的对映异构体是至少60%、70%、80%、90%、99%或99.9%摩尔分数纯的。当单一非对映异构体被命名或通过结构描述时,所描述或命名的非对映异构体是至少60%、70%、80%、90%、99%或99.9%摩尔分数纯的。按摩尔分数计的纯度百分比是对映异构体的摩尔数与对映异构体的摩尔数加上其光学异构体的摩尔数的比率。类似地,摩尔分数的纯度百分比是非对映异构体的摩尔数与非对映异构体的摩尔数加上其异构体的摩尔数的比率。当所公开的化合物被命名或通过结构描述而没有指吸立体化学,并且该化合物具有至少一个手性中心时,应当理解,该名称或结构涵盖不含相应光学异构体的化合物的任一对映异构体、化合物的外消旋混合物或相对于其相应光学异构体富含一种对映异构体的混合物。当所公开的化合物被命名或通过结构描述而没有指示立体化学并且具有两个或更多个手性中心时,应当理解,该名称或结构涵盖不含其他非对映异构体的非对映异构体、不含其他非对映异构体对的多个非对映异构体、非对映异构体的混合物、非对映异构体对的混合物、其中一种非对映异构体相对于其他非对映异构体富集的非对映异构体的混合物或其中一种或多种非对映异构体相对于其他非对映异构体富集的非对映异构体的混合物。本发明包括所有这些形式。

[0141] 定义

[0142] 在本申请中,除非上下文另有明确说明,(i)术语“一个”可以理解是意指“至少一个”;(ii)术语“或”可以理解是意指“和/或”;(iii)术语“包含(comprising)”和“包括(including)”可以理解为涵盖逐项列出的组分或步骤,无论是单独呈现还是与一个或多个另外的组分或步骤一起呈现;和(iv)术语“约”和“大约”可以理解为允许标准变化,如本领域

域普通技术人员将理解的;以及(v)在提供范围的情况下,包括端点。

[0143] 如本文所用,术语“施用”是指向受试者或系统施用组合物(例如,如本文所述的化合物、复合物或包括化合物或复合物的制备物)。可以通过任何适当的途径向动物受试者(例如,向人)施用。例如,在一些实施方式中,施用可以是支气管(包括通过支气管滴注)、口腔、肠内、皮间(interdermal)、动脉内、皮内(intradermal)、胃内、髓内、肌内、鼻内、腹膜内、鞘内、静脉内、心室内、粘膜、鼻、口服、直肠、皮下、舌下、局部、气管(包括通过气管内滴注)、透皮、阴道和玻璃体。

[0144] 如本文所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方式中,“动物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方式中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人动物。在一些实施方式中,非人动物是哺乳动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方式中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类和/或蠕虫。在一些实施方式中,动物可以是转基因动物、基因工程动物和/或克隆。

[0145] 如本文所用,术语“大约”和“约”各自旨在涵盖如本领域普通技术人员将理解的适合于相关背景的正常统计变化。在某些实施方式中,术语“大约”或“约”各自是指在所述值的任一方向上(大于或小于)落在25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值的范围,除非另有说明或另外从上下文中显而易见(例如,其中这样的数字将超过可能值的100%)。

[0146] 如果一个事件或实体的存在、水平和/或形式与另一个事件或实体的存在、水平和/或形式相关,如该术语在本文中所使用的,两个事件或实体彼此“相关”。例如,如果特定实体(例如,多肽)的存在、水平和/或形式与疾病、病症或病况的发生率和/或易感性相关(例如,在相关群体中),则认为该特定实体与特定疾病、病症或病况相关。

[0147] 如本文所用,术语“益处”和“响应”在受试者的情况中可互换使用,如经历用于治疗神经障碍的疗法的人类受试者,例如肌萎缩性侧索硬化、额颞变性(也称为额颞叶变性和额颞痴呆)、阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆、皮质基底节变性、进行性核上性麻痹、关岛型痴呆帕金森综合征ALS复合征、亨廷顿病、包涵体肌病伴早发性佩吉特病和额颞痴呆(IBMPFD)、散发性包涵体肌炎、肌原纤维肌病、拳击手痴呆、慢性创伤性脑病、亚历山大病和遗传性包涵体肌病。术语“益处”和“响应”是指受试者病症的任何临床改善。在经历使用本文所述的组合物和方法对神经障碍的治疗的受试者的情况下(例如,在经历使用本文所述的含FYVE型锌指的磷酸肌醇激酶(PIKfyve)抑制剂(如抑制性小分子、抗体、其抗原结合片段或干扰RNA分子)对本文所述的神经障碍(如肌萎缩性侧索硬化)的治疗的人类受试者的情况下)的示例性益处包括减缓和停止疾病进展,以及抑制与疾病相关的一种或多种症状。特别地,在经历用本发明化合物治疗肌萎缩性侧索硬化的患者(例如,人类患者)的情况下,临床“益处”和“响应”的示例是(i)在施用本发明化合物后如使用肌萎缩性侧索硬化功能评定量表(ALSFRS)或修订的ALSFRS(ALSFRS-R)评估的受试者病症的改善,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内受试者的ALSFRS或ALSFRS-R评分的改善(例如,将本发明的化合物初始施用于受试者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于受试者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11

周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,受试者的ALSFRS或ALSFRS-R评分的改善);(ii)施用本发明的化合物后受试者的缓慢肺活量增加,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内受试者的缓慢肺活量增加(例如,在将本发明的化合物初始施用于受试者后约1天至约48周内(例如,将本发明的化合物初始施用于受试者后约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于受试者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,受试者的缓慢肺活量增加);(iii)在重复神经刺激后受试者表现出的递减反应的减少,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内观察到的减少(例如,将本发明的化合物初始施用于受试者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于受试者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的减少);(iv)受试者的肌肉力量的改善,如例如通过医学研究委员会肌肉测试量表评估的(如例如Jagtap等,Ann.Indian.Acad.Neurol.17:336-339(2014)中所述的,将其公开内容按引用并入本文作为参考,因为其涉及测量患者对神经疾病治疗的反应),如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内观察到的改善(例如,在将本发明的化合物初始施用于受试者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于受试者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的改善);(v)受试者的生活质量的改善,如例如使用肌萎缩性侧索硬化特异性生活质量(ALS特异性QOL)问卷评估的,如在施用本发明化合物后一天或多天、多周或多个月内观察到的患者生活质量的改善(例如,将本发明的化合物初始施用于受试者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周内、约4周至约24周内、约8周至约20周、或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于受试者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的受试者生活质量的改善);和(vi)受试者呈现的肌肉痉挛的频率和/或严重程度的降低,如在施用本发明的化合物后一天或多天、多周或多个月内痉挛频率和/或严重程度的降低(例如,将本发明的化合物初始施用于受试者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、

约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如将本发明的化合物初始施用于受试者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,痉挛频率和/或严重程度降低)。

[0148] 如本文所用,术语“剂型”是指用于施用于受试者的活性化合物(例如,治疗剂或诊断剂)的物理离散单位。每个单位含有预定量的活性剂。在一些实施方式中,这样的量是适合于根据给药方案施用的单位剂量(或其整体分数),所述给药方案已被确定是在施用于相关群体时(即,用治疗给药方案)与期望的或有益的结果相关。本领域普通技术人员理解的是:施用于特定受试者的治疗组合物或化合物的总量由一位或多位主治医师确定,并且可以涉及施用多个剂型。

[0149] 如本文所用,术语“给药方案”是指单独施用于受试者的一组单位剂量(通常多于一个),通常间隔一段时间。在一些实施方式中,给定的治疗化合物具有推荐的给药方案,其可涉及一个或多个剂量。在一些实施方式中,给药方案包括多个剂量,每个剂量彼此间隔相同长度的时间段;在一些实施方式中,给药方案包括多个剂量和分隔单个剂量的至少两个不同时间段。在一些实施方式中,给药方案内的所有剂量具有相同的给药量。在一些实施方式中,给药方案内的不同剂量具有不同的量。在一些实施方式中,给药方案包括第一给药量的第一剂量,然后是不同于第一给药量的第二给药量的一个或多个另外的剂量。在一些实施方式中,给药方案包括第一给药量的第一剂量,随后是与第一给药量相同的第二给药量的一个或多个另外的剂量。在一些实施方式中,给药方案与在相关群体中施用时的期望或有益结果相关(即,是治疗性给药方案)。

[0150] 在本发明方法的实践中,“有效量”的任何一种本发明化合物或任何本发明化合物或其药学上可接受的盐的组合通过本领域已知的任何常规和可接受的方法单独或组合施用。

[0151] 如本文所用,术语“药物组合物”表示含有与药学上可接受的赋形剂一起配制的本文所述的化合物的组合物,并且经政府管理机构批准作为用于治疗哺乳动物疾病的治疗方案的一部分制造或销售。药物组合物可以配制例如用于以单位剂型(例如片剂、胶囊、囊片、软胶囊或糖浆)口服施用;用于局部施用(例如,作为乳膏、凝胶、洗剂或软膏);用于静脉内施用(例如,作为不含颗粒栓子的无菌溶液并且在适合于静脉内使用的溶剂系统中);或在任何其它药学上可接受的制剂中。

[0152] 如本文所用,“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述的化合物之外的任何成分(例如,能够悬浮或溶解活性化合物的溶媒),并且具有在患者中基本上无毒和非炎性的性质。赋形剂可包括例如:抗粘附剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(着色剂)、润肤剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或涂层、调味剂、芳香剂、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂和水合水。示例性赋形剂包括但不限于:丁基化羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(磷酸氢钙)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交联维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露糖醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟

基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羟基乙酸淀粉钠、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和本糖醇。

[0153] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指式(I)化合物的任何药学上可接受的盐。例如,本文所述的任何化合物的药学上可接受的盐包括在合理的医学判断范围内、适用于与人和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应并且与合理的利益/风险比相称的那些。药学上可接受的盐是本领域熟知的。例如,药学上可接受的盐描述于:Berge等, *J. Pharmaceutical Sciences* 66:1-19, 1977和 *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* (编辑P.H. Stahl和C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008。盐可以在本文所述化合物的最终分离和纯化期间原位制备,或者通过使游离碱基团与合适的有机酸反应单独制备。

[0154] 本发明的化合物可以具有可电离基团,以便能够制备为药学上可接受的盐。这些盐可以是涉及无机酸或有机酸的酸加成盐,或者在本发明化合物的酸性形式的情况下,盐可以由无机碱或有机碱制备。通常,化合物作为药学上可接受的盐制备或使用,所述药学上可接受的盐作为药学上可接受的酸或碱的加成产物制备。合适的药学上可接受的酸和碱以及制备合适的盐的方法是本领域熟知的。盐可以由药学上可接受的非毒性酸和碱制备,包括无机和有机酸和碱。

[0155] 术语“PIKfyve”和“含FYVE型锌指的磷酸肌醇激酶”在本文中可互换使用,并且是指例如在人类受试者中催化磷脂酰肌醇3-磷酸的磷酸化以产生磷脂酰肌醇3,5-二磷酸的酶。术语“PIKfyve”和“含FYVE型锌指的磷酸肌醇激酶”不仅指PIKfyve的野生型形式,而且指野生型PIKfyve蛋白的变体和编码其的核酸。编码PIKfyve的基因可以以NCBI参考序列号NG\_021188.1获得。野生型形式的人PIKfyve的示例性转录物序列可以以NCBI参考序列号NM\_015040.4、NM\_152671.3和NM\_001178000.1获得。人PIKfyve的野生型形式的示例性蛋白质序列可以以NCBI参考序列号NP\_055855.2、NP\_689884.1和NP\_001171471.1获得。

[0156] 如本文所用,术语“PIKfyve抑制剂”是指物质,如式I的化合物。这种类型的抑制剂可以例如通过特异性结合PIKfyve酶(例如,由于抑制剂对PIKfyve活性位点的亲和力)竞争性抑制PIKfyve活性,从而阻止、阻碍或停止PIKfyve的一种或多种内源性底物进入酶的活性位点中。抑制PIKfyve酶的活性的PIKfyve抑制剂的其他实例包括可以在远离活性位点的位点处结合PIKfyve并且通过在抑制剂结合时酶的空间构象的变化来减弱内源性底物与PIKfyve活性位点的结合的物质。除了涵盖调节PIKfyve活性的物质之外,术语“PIKfyve抑制剂”是指在体内降低PIKfyve mRNA转录物的浓度和/或稳定性的物质,以及抑制功能性PIKfyve酶的翻译的那些。

[0157] 术语“纯的”意指基本上纯的或不含不想要的组分(例如,细胞裂解物的其他化合物和/或其他组分)、材料污染、混合物或缺陷。

[0158] 代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐(lactobionate)、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸

盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐和戊酸盐。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙和镁,以及非毒性的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺和乙胺。

[0159] 多种临床指标可用于将患者鉴定是处于发生特定神经疾病的“风险中”。处于发生神经疾病(如肌萎缩性侧索硬化、额颞变性、阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆、皮质基底节变性、进行性核上性麻痹、关岛型痴呆帕金森综合征ALS复合征、亨廷顿病、包涵体肌病伴早发性佩吉特病和额颞痴呆(IBMFD)、散发性包涵体肌炎、肌原纤维肌病、拳击手痴呆、慢性创伤性脑病、亚历山大病和遗传性包涵体肌病)的“风险中”的患者(例如人类患者)的实例包括(i)表现出或倾向于表现TAR-DNA结合蛋白(TDP)-43聚集的受试者,和(ii)表达含有与TDP-43聚集和毒性相关的突变(如选自Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D的突变)的TDP-43突变体形式的受试者。例如,在根据本文所述的组合物和方法首次施用PIKfyve抑制剂之前,处于发生肌萎缩性侧索硬化的“风险中”的受试者可以表现出这些特征中的一种或两种。

[0160] 如本文所用,术语“TAR-DNA结合蛋白-43”和“TDP-43”可互换使用,并且是指例如在人类受试者中参与调节HIV-1转录和囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)前mRNA转录物的可变剪接的转录阻遏蛋白。术语“TAR-DNA结合蛋白-43”和“TDP-43”不仅指TDP-43的野生型形式,还指野生型TDP-43蛋白的变体和编码它们的核酸。野生型形式的人TDP-43的氨基酸序列和相应的mRNA序列分别以NCBI参考序列号NM\_007375.3和NP\_031401.1提供。

[0161] 本文所用的术语“TAR-DNA结合蛋白-43”和“TDP-43”包括,例如,具有与NCBI参考序列No.NP\_031401.1的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列的人TDP-43蛋白的形式(例如,与NCBI参考序列No.NP\_031401.1的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%相同)和/或相对于野生型TDP-43蛋白含有一个或多个置换、插入和/或缺失(例如,一个或多个保守和/或非保守氨基酸置换,如多达5、10、15、20、25或更多个保守或非保守氨基酸置换)的人TDP-43蛋白的形式。例如,可以针对如本文所述的神经障碍(如肌萎缩性侧索硬化、额颞变性、阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆、皮质基底节变性、进行性核上性麻痹、关岛型痴呆帕金森综合征ALS复合征、亨廷顿病、包涵体肌病伴早发性佩吉特病和额颞痴呆(IBMFD)、散发性包涵体肌炎、肌原纤维肌病、拳击手痴呆、慢性创伤性脑病、亚历山大病和遗传性包涵体肌病)进行治疗的患者包括表达具有与升高的TDP-43聚集和毒性相关的突变的TDP-43形式的人类患者,如选自Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D的突变。类似地,本文所用的术语“TAR-DNA结合蛋白-43”和“TDP-43”包括,例如,编码具有与NCBI参考序列No.NM\_007375.3的核酸序列至少85%相同的核酸序列(例如,与NCBI参考序列No.NM\_007375.3的氨基酸序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%相同)的mRNA转录物的人TDP-43基因的形式。

[0162] 如本文所用,术语“受试者”是指可以施用根据本发明的组合物的任何生物体,例如用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。典型的受试者包括任何动物(例如哺乳动物,如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人类)。受试者可以寻求或需要治疗、要求治疗、正在接受治

疗、将来接受治疗或是由受过训练的专业人员针对特定疾病或病症护理的人或动物。

[0163] “治疗方案”是指在相关群体中的施用与期望的或有益的治疗结果相关的给药方案。

[0164] 术语“治疗有效量”意指根据治疗给药方案向患有或易患疾病、障碍和/或病症的群体施用足量以治疗疾病、病症和/或病状的量。在一些实施方式中,治疗有效量是降低疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状的发生率和/或严重程度的量和/或延迟其发作的量。本领域普通技术人员将理解,术语“治疗有效量”实际上不需要在特定个体中实现成功的治疗。相反,治疗有效量可以是当施用于需要这种治疗的患者时在大量受试者中提供特定的所需药理学反应的量。特别理解的是,实际上,特定的受试者对于“治疗有效量”可能是“难治的”。仅举一个实例,难治的受试者可能具有低生物利用度,使得不能获得临床功效。在一些实施方式中,提及治疗有效量可以是提及在一种或多种特定组织(例如,受疾病、障碍或病症影响的组织)或流体(例如,血液、唾液、血清、汗液、泪液、尿液等)中测量的量。本领域普通技术人员将理解,在一些实施方式中,治疗有效量可以以单剂量配制和/或施用。在一些实施方式中,治疗有效量可以多个剂量配制和/或施用,例如作为给药方案的部分。

## 附图说明

[0165] 图1是显示对照TDP-43酵母模型(FAB1 TDP-43)产生方法的示意图。通过将人TDP-43基因和GAL1启动子整合到酵母基因组中产生了对照酵母TDP-43模型。人PIKFYVE的酵母直系同源物是FAB1。

[0166] 图2是显示产生人源化PIKFYVE TDP-43酵母模型(PIKFYVE TDP-43)的方法的示意图。FAB1基因通过与G418抗性盒的同源重组(*fab1::G418<sup>R</sup>*) (图2)。将PIKFYVE克隆到含URA3的质粒上携带的GPD启动子的下游,并引入*fab1::G418R ura3*菌株中。然后将pGAL7-TDP-43构建体引入“人源化”酵母菌株中并评估细胞毒性。

[0167] 图3是从基于流式细胞术的FAB1 TDP-43的存活力测定产生的直方图。

[0168] 图4是从基于流式细胞术的PIKFYVE TDP-43的存活力测定产生的直方图。在TDP-43诱导后,不可存活的细胞(最右边的群体)显著增加,在PIKFYVE TDP-43中比在FAB1 TDP-43菌株中具有更显著的作用(参见图3)。

[0169] 图5是在APY0201的存在下,从基于流式细胞术的FAB1 TDP-43的存活力测定产生的直方图的覆盖图。

[0170] 图6是在APY0201的存在下,从基于流式细胞术的PIKFYVE TDP-43的存活力测定产生的直方图的覆盖图。

[0171] 图7是比较PIKFYVE TDP-43的细胞保护功效与测试化合物的PIKfyve抑制活性的散点图。

## 具体实施方式

[0172] 本发明特征在于用于治疗神经障碍的组合物和方法,所述神经障碍如肌萎缩性侧索硬化和其他神经肌肉障碍,以及额颞变性、阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆、皮质基底节变性、进行性核上性麻痹、关岛型痴呆帕金森综合征ALS复合征、亨廷顿病、包涵体肌病伴早发性佩吉特病和额颞痴呆(IBMFD)、散发性包涵体肌炎、肌原纤维肌病、拳击手痴呆、

慢性创伤性脑病、亚历山大病和遗传性包涵体肌病等。特别地,本发明提供了含FYVE型锌指的磷酸肌醇激酶(PIKfyve)的抑制剂,其可以施用于患者(例如人类患者)以治疗或预防神经障碍,如一种或多种前述病症。在治疗性治疗的情况下,可以向患者施用PIKfyve抑制剂以减轻障碍的一种或多种症状和/或纠正与疾病相关的潜在分子病理学,如抑制或预防TAR-DNA结合蛋白(TDP)-43的聚集。

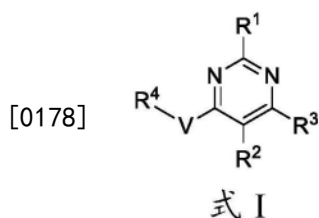
[0173] 本文的公开部分地基于PIKfyve抑制调节细胞中的TDP-43聚集的发现。抑制TDP-43聚集在患有神经障碍的患者中发挥有益作用。许多病理状况与TDP-43促进的聚集和毒性相关,如肌萎缩性侧索硬化、额颞变性、阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆、皮质基底节变性、进行性核上性麻痹、关岛型痴呆帕金森综合征ALS复合征、亨廷顿病、IBMPFD、散发性包涵体肌炎、肌原纤维肌病、拳击手痴呆、慢性创伤性脑病、亚历山大病和遗传性包涵体肌病。不受机制的限制,通过施用PIKfyve抑制剂,例如,由于PIKfyve抑制剂诱导的TDP-43聚集的遏制,可以治疗患有与TDP-43聚集和毒性相关的疾病的患者。

[0174] 很可能对如本文所述的PIKfyve抑制有反应的患者包括具有TDP-43聚集或有发生TDP-43聚集风险的患者,如表达与TDP-43聚集和体内毒性相关的TDP-43突变体形式的患者。与升高的TDP-43聚集和毒性相关的TDP-43中的此类突变的实例包括Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D等。因此,本文所述的组合物和方法提供了能够鉴定可能响应PIKfyve抑制剂疗法的患者的额外临床益处,以及相应地治疗这些患者的方法。

[0175] 以下部分提供了可以与本文公开的组合物和方法结合使用的示例性PIKfyve抑制剂的描述。以下部分另外提供了各种示例性施用途径的描述和可用于递送这些物质以治疗神经障碍的药物组合物。

[0176] PIKfyve抑制剂

[0177] 本文所述的示例性PIKfyve抑制剂包括式I的化合物:



[0179] 或其药学上可接受的盐,

[0180] 其中

[0181] V是-NH-、-NR<sup>5</sup>-、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>NR<sup>5</sup>-、-O-、-CO-或-CHOH-;

[0182] R<sup>1</sup>是任选取代的吗啉-4-基、吡啶-4-基、吡啶-3-基、任选取代的2-氧代-吡咯烷-1-基、任选取代的哌啶-1-基或任选取代的哒嗪-4-基;

[0183] R<sup>2</sup>是卤素、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基、任选取代的C<sub>2-9</sub>杂芳基、任选取代的2-氧代-吡咯烷-1-基、-(CO)NR<sup>7a</sup>R<sup>7b</sup>、-P(O)R<sup>7c</sup>R<sup>7d</sup>或-S(O)<sub>k</sub>R<sup>7e</sup>;和R<sup>3</sup>是任选取代的吡啶-2-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡唑-1-基、任选取代的吡唑-3-基、任选取代的哒嗪-3-基、任选取代的嘧啶-4-基或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基;或R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>与它们附接的环一起组合以形成任选取代的C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>杂芳基;

[0184] n是1、2、3、4、5或6;

[0185] k是0、1或2;

[0186]  $R^4$ 是任选取代的吡啶-4-基、任选取代的1-甲基吡啶-1-鎓-4-基、任选取代的吡啶-3-基、任选取代的1-甲基哌啶-3-基、任选取代的哒嗪-3-基或-NHR<sup>8</sup>;

[0187]  $R^5$ 是任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

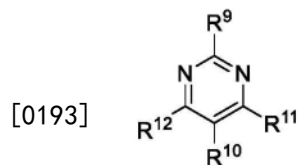
[0188]  $R^6$ 是H或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

[0189]  $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 各自独立地是H或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;或 $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 与它们附接的氮原子一起组合以形成任选取代的C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂环基;

[0190]  $R^{7c}$ 、 $R^{7d}$ 和 $R^{7e}$ 各自独立地是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基或羟基;和

[0191]  $R^8$ 是任选取代的苯基或任选取代的C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基。

[0192] 本文所述的示例性PIKfyve抑制剂还包括式II的化合物:



式 II

[0194] 或其药学上可接受的盐,

[0195] 其中

[0196]  $R^9$ 是任选取代的吗啉-4-基、任选取代的吗啉-3-基烷氧基、任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基、任选取代的1-甲基哌嗪-2-基或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基;

[0197]  $R^{10}$ 是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基、-(CO)NR<sup>7a</sup>R<sup>7b</sup>、-P(O)R<sup>7c</sup>R<sup>7d</sup>或-S(O)<sub>k</sub>R<sup>7e</sup>;

[0198]  $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 各自独立地是H或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;或 $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 与它们附接的氮原子一起组合以形成任选取代的C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>杂环基;

[0199]  $R^{7c}$ 、 $R^{7d}$ 和 $R^{7e}$ 各自独立地是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷氧基或羟基;

[0200] k是0、1或2;

[0201]  $R^{11}$ 是任选取代的吗啉-4-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的吡啶-4-基、任选取代的1H-咪唑-2-基、任选取代的喹啉-6-基或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基;和

[0202]  $R^{12}$ 是任选取代的1-甲基哌嗪-2-酮基、任选取代的2-(吡啶-2-基)烷氧基、任选取代的N-(吡啶-3-基甲基)胺、任选取代的N-(吡啶-4-基)胺或任选取代的C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基。

[0203] 治疗方法

[0204] 抑制PIKfyve活性和TDP-43聚集以治疗神经障碍

[0205] 使用本文所述的组合物和方法,可以向患有神经障碍的患者施用PIKfyve抑制剂,如本文所述的小分子,以治疗障碍和/或抑制与障碍相关的一种或多种症状。可以使用本文所述的组合物和方法治疗的示例性神经障碍是但不限于肌萎缩性侧索硬化、额颞变性、阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆、皮质基底节变性、进行性核上性麻痹、关岛型痴呆帕金森综合征ALS复合征、亨廷顿病、IBMPFD、散发性包涵体肌炎、肌原纤维肌病、拳击手痴呆、慢性创伤性脑病、亚历山大病和遗传性包涵体肌病,以及神经肌肉疾病,如先天性肌无力综合征、先天性肌病、痉挛性肌颤综合征、杜氏肌营养不良症、糖原贮积病II型、遗传性痉挛性截瘫、包涵体肌炎、艾萨克综合征、卡恩斯-塞尔综合征、兰伯特-伊顿肌无力综合征、线粒体肌病、肌营养不良症、重症肌无力、肌强直性肌营养不良症、周围神经病变、脊髓和延髓肌萎缩症、脊髓性肌萎缩症、僵人综合征、Troyer综合征和格林-巴利综合征。

[0206] 本公开部分地基于以下发现:PIKfyve抑制剂(如本文所述的药剂)能够减弱TDP-43毒性。TDP-43促进的毒性与各种神经疾病相关。PIKfyve抑制剂调节TDP-43聚集的发现提供了重要的治疗益处。使用PIKfyve抑制剂,如本文所述的PIKfyve抑制剂,可以以补救疾病的潜在分子病因的方式治疗患有神经障碍或处于发生这种病症的风险中的患者。不受机制的限制,例如,通过抑制促进病理的TDP-43聚集,本文所述的组合物和方法可用于治疗或预防此类神经病症。

[0207] 另外,本文所述的组合物和方法提供了能够鉴定和治疗可能响应PIKfyve抑制剂疗法的患者的有益特征。例如,在一些实施方式中,如果患者被鉴定为可能响应这种形式的治疗,则向患者(例如,患有或处于发生本文所述的神经疾病(如肌萎缩性侧索硬化)的风险中的人类患者)施用PIKfyve抑制剂。可以基于例如对TDP-43聚集的易感性来鉴定患者。在一些实施方式中,基于患者表达的TDP-43的亚型,鉴定患者可能响应于PIKfyve抑制剂治疗。例如,表达具有选自Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D等突变的TDP-43亚型的患者,相对于不表达这些TDP-43亚型的患者,更可能发生TDP-43促进的聚集和毒性。使用本文所述的组合物和方法,患者可以基于表达这种TDP-43亚型鉴定为可能响应PIKfyve抑制剂疗法,并且可以随后施用PIKfyve抑制剂以治疗或预防一种或多种神经障碍,如本文所述的一种或多种神经障碍。

[0208] 评估患者响应

[0209] 本领域已知和本文所描述的多种方法可用于确定患有神经障碍的患者(例如,处于发生TDP-43聚集风险的患者,如表达具有与升高的TDP-43聚集和毒性相关的突变的TDP-43突变体形式的患者,例如选自Q331K、M337V、Q343R、N345K、R361S和N390D的突变)是否有利地响应于PIKfyve抑制。例如,用本文所述的PIKfyve抑制剂成功治疗患有神经疾病(如肌萎缩性侧索硬化)的患者可以通过以下来传导信号:

[0210] (i) 使用肌萎缩性侧索硬化功能评定量表(ALSFRS)或修订的ALSFRS(ALSFRS-R)评估的病症改善,如在施用PIKfyve抑制剂后一天或多天、多周或多个月内患者的ALSFRS或ALSFRS-R评分的改善(例如,在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如PIKfyve抑制剂初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,患者的ALSFRS或ALSFRS-R评分的改善);

[0211] (ii) 缓慢肺活量的增加,如在施用PIKfyve抑制剂后一天或多天、多周或多个月内患者的缓慢肺活量的增加(例如,在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,患者的缓慢肺活量的增加);

[0212] (iii) 患者在重复神经刺激后表现出的递减反应的减少,如在施用PIKfyve抑制剂后一天或多天、多周或多个月内观察到的减少(例如,在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的减少);

[0213] (iv) 肌肉力量的改善,如例如通过医学研究委员会肌肉测试量表评估的(如例如 Jagtap等,Ann.Indian.Acad.Neurol.17:336-339(2014)中所述的,将其公开内容按引用并入本文中作为参考,因为其涉及测量患者对神经疾病治疗的响应),如在施用PIKfyve抑制剂后一天或多天、多周或多个月内观察到的改善(例如,在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的改善);

[0214] (v) 生活质量的改善,如例如使用肌萎缩性侧索硬化特异性生活质量(ALS特异性 QOL)问卷评估的,如在施用PIKfyve抑制剂后一天或多天、多周或多个月内观察到的患者生活质量的改善(例如,在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周内、约4周至约24周内、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,观察到的受试者生活质量的改善);

[0215] (vi) 肌肉痉挛的频率和/或严重程度的降低,如在施用PIKfyve抑制剂后一天或多天、多周或多个月内痉挛频率和/或严重程度的降低(例如,在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,在约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,痉挛频率和/或严重程度的降低);

[0216] (vii) TDP-43聚集的减少,如在施用PIKfyve抑制剂后一天或多天、多周或多个月内TDP-43聚集的减少(例如,在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后约1天至约48周内(例如,约2天至约36周、约4周至约24周、约8周至约20周或约12周至约16周内)或更长时间内,如在PIKfyve抑制剂初始施用于患者后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、3周、4周、5周、6周、

7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周或更长时间内,TDP-43聚集的减少)。

[0217] 组合制剂及其用途

[0218] 本发明的化合物可以与一种或多种治疗剂组合。特别地,治疗剂可以是治疗或预防性地治疗本文所述的任何神经障碍的治疗剂。

[0219] 组合疗法

[0220] 本发明的化合物可以单独使用或与治疗神经障碍或与其相关的症状的其他药剂组合使用,或与其他类型的治疗组合使用以治疗、预防任何神经障碍和/或降低任何神经障碍的风险。在组合治疗中,当单独施用时,一种或多种治疗化合物的剂量可以从标准剂量减少。例如,剂量可以从药物组合和排列经验地确定,或可以通过等效线图分析推导(例如,Black等,Neurology 65:S3-S6,2005)。在这种情况下,当组合时,化合物的剂量应提供治疗效果。

[0221] 药物组合物

[0222] 本发明的化合物优选配制成药物组合物,用于以适于体内施用的生物相容形式施用于人类受试者。因此,在另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含与合适的稀释剂、载体或赋形剂混合的本发明的化合物。

[0223] 本发明的化合物可以以游离碱的形式、以盐、溶剂化物的形式和作为前药使用。所有形式都在本发明的范围内。根据本发明的方法,如本领域技术人员理解的,所描述化合物或其盐、溶剂化物或前药可以根据所选择的施用途径以多种形式施用于患者。本发明的化合物可以例如通过口服、肠胃外、口腔、舌下、鼻、直肠、贴剂、泵或透皮施用来施用,并相应地配制药物组合物。肠胃外施用包括静脉内、腹膜内、皮下、肌内、经上皮、鼻、肺内、鞘内、直肠和局部施用模式。肠胃外施用可以通过在选定的时间段内连续输注来进行。

[0224] 本发明的化合物可以例如与惰性稀释剂或与可吸收的可食用载体一起口服施用,或者可以将其包封在硬壳或软壳明胶胶囊中,或者可以将其压制成片剂,或者可以将其直接与饮食的食物掺合。对于口服治疗施用,本发明的化合物可以与赋形剂掺合并以可摄取片剂、口含片、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆和薄片剂的形式使用。

[0225] 本发明的化合物也可以肠胃外施用。可以在适当地与表面活性剂混合的水中制备本发明化合物的溶液。也可以在甘油、液体聚乙二醇、DMSO及其混合物(具有或不具有醇)中以及在油中制备分散体。在通常的储存和使用条件下,这些制剂可含有防腐剂以防止微生物生长。用于选择和制备合适制剂的常规程序和成分描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences(2003,第20版)和The United States Pharmacopeia:The National Formulary(USP 24NF 19),1999年出版。

[0226] 适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,所述形式必须是无菌的,并且必须是达到可以通过注射器容易地施用的程度的流体。

[0227] 用于经鼻施用的组合物可以方便地配制成气溶胶、滴剂、凝胶和粉剂。气溶胶制剂通常包括活性物质在生理学上可接受的水性或非水性溶剂中的溶液或细悬浮液,并且通常

以无菌形式以单剂量或多剂量的量存在于密封容器中,所述密封容器可以采取药筒或再填充的形式以与雾化装置一起使用。或者,密封容器可以是单体分配装置,如单剂量鼻吸入器或装配有计量阀的气溶胶分配器,其旨在在使用后丢弃。当剂型包含气溶胶分配器时,它含有推进剂,其可以是压缩气体,如压缩空气,或有机推进剂,如氟氯烃。气溶胶剂型也可以采取泵-雾化器的形式。适于口腔或舌下施用的组合物包括片剂、锭剂和软锭剂,其中活性成分与载体(如糖、阿拉伯胶、黄蓍胶、明胶和甘油)一起配制。用于直肠施用的组合物方便地是含有常规栓剂基质(如可可脂)的栓剂形式。

[0228] 本发明的化合物可以单独或与如本文所述的药学上可接受的载体组合施用于动物,例如人类,所述药学上可接受的载体的比例由化合物的溶解度和化学性质、所选择的施用途径和标准药学实践来决定。

[0229] 剂量

[0230] 本发明化合物和/或包含本发明化合物的组合物的剂量可以根据许多因素而变化,如化合物的药效学性质;施用模式;接受者的年龄、健康和体重;症状的性质和程度;治疗的频率和同时治疗的类型(如果有的话);以及化合物在待治疗动物中的清除率。本领域技术人员可以基于上述因素确定适当的剂量。本发明的化合物可以最初以合适的剂量施用,该剂量可以根据临床反应按照需要进行调整。通常,当将本发明的化合物以例如0.05mg至3000mg(以固体形式测量)的日剂量施用于患者时,可以获得令人满意的结果。剂量范围包括例如10-1000mg。

[0231] 或者,可以使用患者的体重计算剂量。例如,施用于患者的化合物或其药物组合物的剂量可以在0.1-50mg/kg的范围内。

[0232] 以下实施例旨在说明本发明。它们并不意味着以任何方式限制本发明。

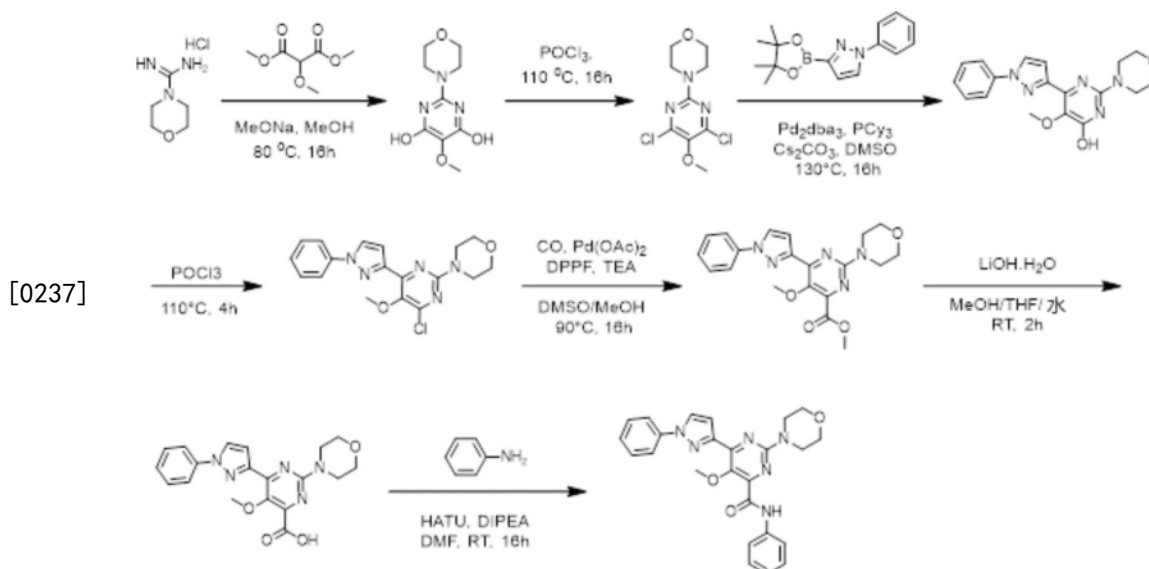
[0233] 实施例

| 缩写         |                                                    |
|------------|----------------------------------------------------|
| BINAP      | (2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘)                            |
| CO         | 一氧化碳                                               |
| DCM        | 二氯甲烷                                               |
| DIPEA      | 二异丙基乙胺                                             |
| DMAc       | N,N-二甲基乙酰胺                                         |
| [0234] DMF | N,N-二甲基甲酰胺                                         |
| DMSO       | 二甲亚砜                                               |
| DPPF       | 1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁                                   |
| EDCI       | 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺                             |
| HATU       | (1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓 3-氧化物六氟磷酸盐 |
| HOBt       | 羟基苯并三唑                                             |

[0235]

|                                                                  |                                                          |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| LAH                                                              | 氢化铝锂                                                     |
| LDA                                                              | 二异丙基氨基锂                                                  |
| mW                                                               | 微波                                                       |
| NCS                                                              | N-氯代琥珀酰亚胺                                                |
| NIS                                                              | N-碘代琥珀酰亚胺                                                |
| NMP                                                              | N-甲基-2-吡咯烷酮                                              |
| NMR                                                              | s-单峰、d-二重峰、t-三重峰、dd-双二重峰、td-三重二重峰、bs-宽单峰、m-多重峰、q-四重峰。    |
| PCy3                                                             | 三环己基膦                                                    |
| Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>                                          | [1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)                                |
| Pd(dppf)Cl <sub>2</sub> : DCM                                    | [1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II), 与二氯甲烷复合                       |
| Pd(Pt-bu <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                             | 双(三-叔-丁基膦)钯(0)                                           |
| Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>                                 | 三(二亚苺基丙酮)二钯(0)                                           |
| Pin <sub>2</sub> B <sub>2</sub> /B <sub>2</sub> Pin <sub>2</sub> | 双(频那醇合)二硼                                                |
| prep-HPLC                                                        | 制备规模高效液相色谱                                               |
| prep-TLC                                                         | 制备型薄层色谱                                                  |
| RT                                                               | 室温                                                       |
| Ru-Phos                                                          | 2-二环己基膦-2',6'-二异丙氧基联苯                                    |
| TEA                                                              | 三乙胺                                                      |
| THF                                                              | 四氢呋喃                                                     |
| TrixiePhos                                                       | rac-2-(二-叔-丁基膦)-1,1'-联萘                                  |
| XantPhos                                                         | 4,5-双(二苯基膦)-9,9-二甲基咕吨                                    |
| X-Phos                                                           | 2-二环己基膦-2',4',6'-三异丙基联苯                                  |
| XPhos-Pd G2                                                      | 氯(2-二环己基膦-2',4',6'-三异丙基-1,1'-联苯)[2-(2'-氨基-1,1'-联苯)]钯(II) |

[0236] 实施例1.5-甲氧基-2-吗啉代-N-苯基-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-甲酰胺(化合物1)的合成:



[0238] 步骤1:5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4,6-二醇的合成。

[0239] 向MeOH (35mL) 中的盐酸吗啉-4-甲脒 (2g, 12.1mmol) 和2-甲氧基丙二酸二甲酯 (1.95g, 12.1mmol) 溶液中加入MeONa (MeOH中的30%溶液, 6.8mL, 36.3mmol)。添加后, 将反应混合物在80℃下搅拌17h, 然后浓缩, 得到5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4,6-二醇 (2.5g, 91%), 为棕色固体, 其不经进一步纯化直接用于下一步骤。

[0240] 步骤2:4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0241] 将5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4,6-二醇 (2.5g, 11mmol) 和磷酰氯 (25mL) 的混合物在110℃下搅拌16h, 然后浓缩。将所得残留物用乙酸乙酯/水 (20mL/20mL) 稀释, 并用乙酸乙酯 (20mL) 萃取两次。将合并的有机相用盐水 (30mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将获得的粗产物通过快速柱色谱 (Biotage, 40g硅胶; 用石油醚中20%至40%的乙酸乙酯洗脱) 纯化, 得到4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉 (1.5g, 51.6%), 为浅黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 264.1  $[M+H]^+$ 。

[0242] 步骤3:5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-醇的合成。

[0243] 将二甲亚砜 (20mL) 中的4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉 (0.14g, 0.53mmol)、1-苯基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑 (0.16g, 0.58mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯 (49mg, 0.053mmol)、三环己基膦 (30mg, 0.1mmol) 和碳酸铯 (0.34g, 1.06mmol) 的混合物在氮气氛, 130℃下搅拌16h。将反应冷却且将混合物用乙酸乙酯 (20mL) 稀释并通过硅藻土垫过滤。将滤液用水 (40mL) 萃取, 并将水相冻干, 得到5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-醇 (0.15g, 80%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 354.1  $[M+H]^+$ 。

[0244] 步骤4:4-(4-氯-5-甲氧基-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0245] 将5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-醇 (0.15g, 0.42mmol) 和磷酰氯 (8mL) 的混合物在110℃下搅拌16h。将混合物浓缩, 将残留物用乙酸乙酯/水 (20mL/20mL) 稀释, 并用乙酸乙酯 (20mL) 萃取两次。将合并的有机相用盐水 (30mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。通过快速色谱 (Biotage, 40g硅胶, 用石油醚中的20%至40%乙酸乙酯洗脱) 纯化残留物, 得到4-(4-氯-5-甲氧基-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-2-基)吗啉 (0.11g, 70.6%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 372.1  $[M+H]^+$ 。

[0246] 步骤5:5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-羧酸甲酯的合成。

[0247] 将4-(4-氯-5-甲氧基-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-2-基)吗啉(100mg, 0.27mmol)、三乙胺(82mg, 0.81mmol)、乙酸钡(II)(6mg, 0.03mmol)和1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁(30mg, 0.06mmol)在甲醇(4mL)和二甲亚砜(6mL)中的溶液在一氧化碳气氛下在80℃下搅拌16h。冷却至室温后,将反应混合物通过硅藻土过滤。将滤液用乙酸乙酯(30mL)稀释,用水(20mL×3)和盐水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物通过用乙酸乙酯洗脱的硅胶柱色谱纯化,得到5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-羧酸甲酯(25mg, 23.4%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 396.1  $[M+H]^+$ 。

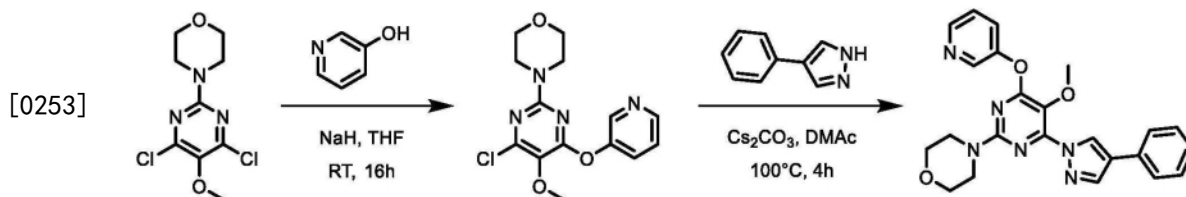
[0248] 步骤6:5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-羧酸的合成。

[0249] 向5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-羧酸甲酯(20mg, 0.05mmol)在四氢呋喃/甲醇/水(4mL/1mL/1mL)中的溶液加入氢氧化锂一水合物(4mg, 0.1mmol)并将反应混合物在室温下搅拌2h。将其浓缩并将残留物用水(5mL)稀释,用2N HCl水溶液将pH调节至3~4并用乙酸乙酯(10mL)萃取两次。将合并的有机相经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-羧酸(15mg, 78.7%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 382.2  $[M+H]^+$ 。

[0250] 步骤7:5-甲氧基-2-吗啉代-N-苯基-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-甲酰胺的合成。

[0251] 向5-甲氧基-2-吗啉代-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-羧酸(15mg, 0.039mmol)和苯胺(4mg, 0.039mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的溶液加入HATU(15mg, 0.047mmol)和DIPEA(10mg, 0.08mmol)。将所得反应混合物在室温下搅拌16h。将混合物过滤,并将滤液通过制备型HPLC纯化,得到5-甲氧基-2-吗啉代-N-苯基-6-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-甲酰胺(4.3mg, 24.2%),为白色固体。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.62 (s, 1H), 8.68 (d,  $J=2.6$ Hz, 1H), 7.97 (d,  $J=7.7$ Hz, 2H), 7.73 (d,  $J=7.6$ Hz, 2H), 7.56 (t,  $J=8.0$ Hz, 2H), 7.38 (t,  $J=7.8$ Hz, 3H), 7.22 (d,  $J=2.5$ Hz, 1H), 7.14 (t,  $J=7.4$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.76 (d,  $J=5$ Hz, 4H), 3.71 (d,  $J=4.9$ Hz, 4H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 457.1  $[M+H]^+$ 。

[0252] 实施例2.4-(5-甲氧基-4-(4-苯基-1H-吡唑-1-基)-6-(吡啶-3-基氧基)嘧啶-2-基)吗啉(化合物2)的合成:



[0254] 步骤1:4-(4-氯-5-甲氧基-6-(吡啶-3-基氧基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

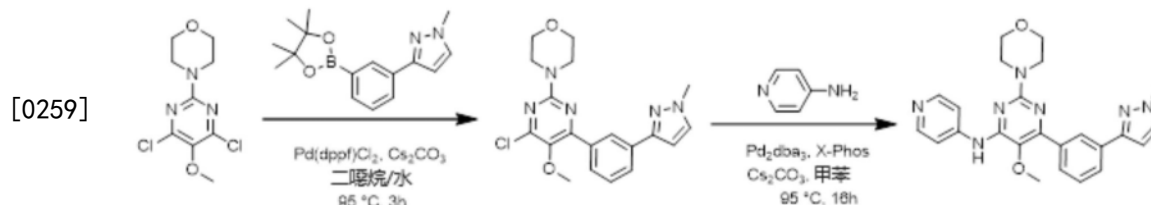
[0255] 在0℃下,向吡啶-3-醇(0.18g, 1.9mmol)在四氢呋喃(20mL)中的溶液分批加入氢氧化钠(矿物油中60%, 0.11g, 2.85mmol)。添加后,将混合物升温并在室温下搅拌20min。然后加入4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉(0.5g, 1.9mmol)在四氢呋喃(10mL)中的溶液。将所得混合物在搅拌下加热至回流16h。将其冷却,用乙酸乙酯/水(20mL/20mL)稀释并用乙酸乙酯(20mL×2)萃取。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将获得的粗产物通过快速色谱(Biotage, 40g硅胶,用石油醚中的50%至70%乙酸乙酯洗脱)

纯化,得到4-(4-氯-5-甲氧基-6-(吡啶-3-基氧基)嘧啶-2-基)吗啉(0.46g,75.4%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 323.1  $[M+H]^+$ 。

[0256] 步骤2:4-(5-甲氧基-4-(4-苯基-1H-吡唑-1-基)-6-(吡啶-3-基氧基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0257] 将N,N-二甲基乙酰胺(6mL)中的4-(4-氯-5-甲氧基-6-(吡啶-3-基氧基)嘧啶-2-基)吗啉(40mg,0.12mmol)、4-苯基-1H-吡唑(18mg,0.12mmol)和碳酸铯(80mg,0.24mmol)的混合物在100℃下搅拌4h。将所得混合物通过硅藻土垫过滤并浓缩。将残留物进行制备型HPLC,得到4-(5-甲氧基-4-(4-苯基-1H-吡唑-1-基)-6-(吡啶-3-基氧基)嘧啶-2-基)吗啉(12.5mg,23.6%),为白色固体。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.94 (s, 1H), 8.60 (d,  $J=2.7$ Hz, 1H), 8.50 (dd,  $J=4.7, 1.3$ Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.85-7.73 (m, 3H), 7.54 (d,  $J=4.7$ Hz, 1H), 7.43 (t,  $J=7.7$ Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.58 (d,  $J=4$ Hz, 4H), 3.49 (bs, 4H), LCMS (ESI)  $m/z$ : 431.1  $[M+H]^+$ 。

[0258] 实施例3.5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物3)的合成:



[0260] 步骤1:4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉的制备。

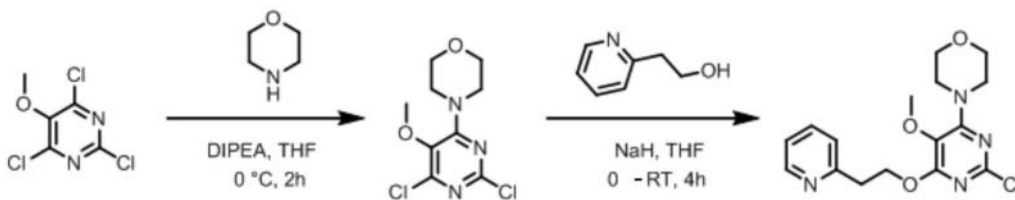
[0261] 将1,4-二噁烷/水(20mL/4mL)中的4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉(0.2g,0.76mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(0.21g,0.76mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(62mg,0.075mmol)和碳酸铯(0.62g,1.89mmol)的混合物在氩气氛下在95℃下搅拌3h。将其浓缩,残留物用水(20mL)稀释并用乙酸乙酯(20mL×2)萃取。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。得到的粗产物通过快速色谱(Biotage,40g硅胶,用乙酸乙酯中的石油醚20%至40%洗脱)纯化,得到4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(0.15g,51.3%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 385.8/387.8  $[M+H]^+$ 。

[0262] 步骤2:5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

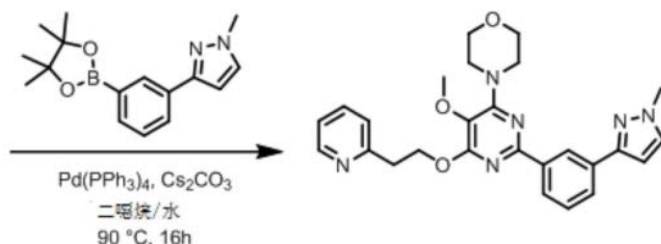
[0263] 将甲苯(15mL)中的4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(80mg,0.21mmol)、吡啶-4-胺(20mg,0.21mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(19mg,0.02mmol)、XPhos(20mg,0.04mmol)和碳酸铯(0.17g,0.52mmol)的混合物在氩气氛下在95℃下搅拌16h。将其浓缩,残留物用水(20mL)稀释并用二氯甲烷(20mL×2)萃取。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。残留物进行制备型HPLC,得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(17.8mg,19%),为白色固体。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.36 (s, 1H), 8.44-8.42 (m, 3H), 7.91-7.86 (m, 4H), 7.77 (d,  $J=2.2$ Hz, 1H), 7.52 (t,  $J=7.6$ Hz, 1H), 6.71 (d,  $J=2.2$ Hz, 1H), 3.90 (s,

3H), 3.70 (s, 8H), 3.45 (s, 3H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 443.9  $[M]^+$ .

[0264] 实施例4.4- (5-甲氧基-2- (3- (1-甲基-1H-吡唑-3-基) 苯基) -6- (2- (吡啶-2-基) 乙氧基) 嘧啶-4-基) 吗啉 (化合物4) 的合成:



[0265]



[0266] 步骤1: 4- (2,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-4-基) 吗啉的合成。

[0267] 向2,4,6-三氯-5-甲氧基嘧啶 (0.4g, 1.88mmol) 和吗啉 (0.16g, 1.88mmol) 在四氢呋喃 (20mL) 中的溶液加入N,N-二异丙基乙胺 (0.48g, 3.77mmol)。并将反应混合物在室温下搅拌2h。将其浓缩并将所得粗产物通过柱色谱 (在硅胶上) 纯化, 得到4- (2,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-4-基) 吗啉 (0.49g, 98%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 264.0  $[M+H]^+$ 。

[0268] 步骤2: 4- (2-氯-5-甲氧基-6- (2- (吡啶-2-基) 乙氧基) 嘧啶-4-基) 吗啉的合成。

[0269] 在0 °C下, 向2- (吡啶-2-基) 乙-1-醇 (0.19g, 1.52mmol) 在四氢呋喃 (20mL) 中的溶液分批加入氢化钠 (60%, 91mg, 2.28mmol)。添加后, 将混合物在0 °C下搅拌30min, 然后在相同温度下逐滴添加在四氢呋喃 (4mL) 中的4- (2,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-4-基) 吗啉 (0.4g, 1.52mmol)。将所得混合物升温并在室温下搅拌4h, 然后用乙酸乙酯/水 (20mL/20mL) 稀释并用乙酸乙酯萃取 (20mL  $\times$  2)。将合并的有机相用盐水 (30mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将获得的粗产物通过快速色谱 (Biotage, 40g硅胶, 用DCM中的20%至40% 7N氨甲醇洗脱) 纯化, 得到4- (2-氯-5-甲氧基-6- (2- (吡啶-2-基) 乙氧基) 嘧啶-4-基) 吗啉 (0.26g, 48.9%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 351.1  $[M+H]^+$ 。 (Rt: 1.81min.)

[0270] 还获得位置异构体4- (6-氯-5-甲氧基-2- (2- (吡啶-2-基) 乙氧基) 嘧啶-4-基) 吗啉 (0.14g, 26.3%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 351.1  $[M+H]^+$ ; (Rt = 1.68min)。通过NOESY证实了这两种异构体。

[0271] 步骤3: 4- (5-甲氧基-2- (3- (1-甲基-1H-吡唑-3-基) 苯基) -6- (2- (吡啶-2-基) 乙氧基) 嘧啶-4-基) 吗啉的合成。

[0272] 将二噁烷/水 (20mL/4mL) 中的4- (2-氯-5-甲氧基-6- (2- (吡啶-2-基) 乙氧基) 嘧啶-4-基) 吗啉 (0.1g, 0.28mmol)、1-甲基-3- (3- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 苯基) -1H-吡唑 (81mg, 0.28mmol)、四 (三苯基膦) 钯 (33mg, 0.03mmol) 和碳酸铯 (0.23g, 0.71mmol) 的混合物在90 °C下搅拌16h。将所得混合物过滤并浓缩。残留物进行制备型HPLC, 得到4- (5-甲氧基-2- (3- (1-甲基-1H-吡唑-3-基) 苯基) -6- (2- (吡啶-2-基) 乙氧基) 嘧啶-4-基) 吗啉 (28.7mg, 21.7%), 为白色固体。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.69 (t, J =

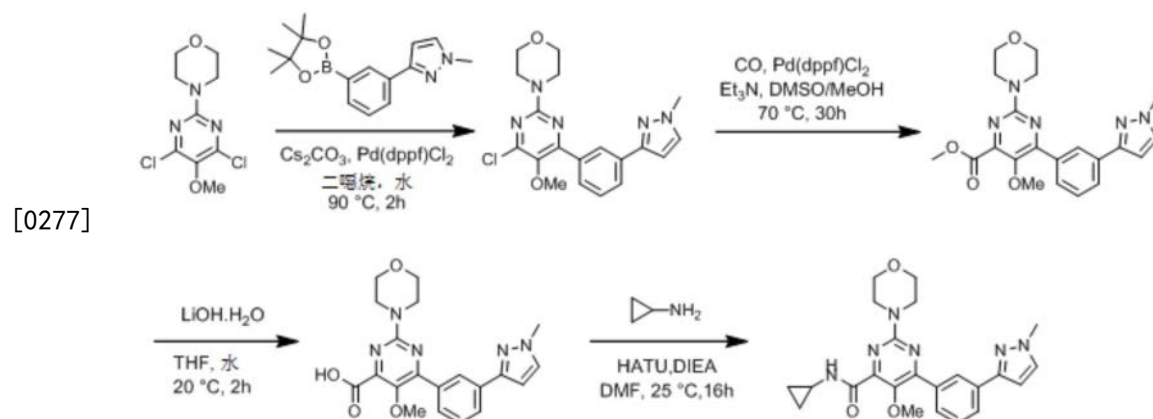
1.6Hz, 1H), 8.57 (d,  $J=4.0$ Hz, 1H), 8.25 (dt,  $J=4.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.88 (dt,  $J=4.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.61 (td,  $J=7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.45 (t,  $J=8$ Hz, 1H), 7.41 (d,  $J=1.6$ Hz, 1H), 7.32 (d,  $J=7.8$ Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J=7.0, 5.4$ Hz, 1H), 6.62 (d,  $J=2.2$ Hz, 1H), 4.93 (t,  $J=6.6$ Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.83 (s, 8H), 3.59 (s, 3H), 3.37 (t,  $J=6.6$ Hz, 2H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 473.3  $[M+H]^+$ .

[0273] 实施例5.4- (5-甲氧基-6- (3- (1-甲基-1H-吡唑-3-基) 苯基) -2- (2- (吡啶-2-基) 乙氧基) 嘧啶-4-基) 吗啉 (化合物5) 的合成:

[0274] 根据以上实施例4中所描述的方案合成以下化合物:

| No.      | 结构 | NMR, MS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0275] 5 |    | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 8.55 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 8.37 (t, $J=1.6$ Hz, 1H), 7.88 (td, $J=12.0, 4.0$ Hz, 2H), 7.59 (td, $J=7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J=6.6, 5.0$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 4.73 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (d, $J=3.6$ Hz, 8H), 3.41 (s, 3H), 3.33 (t, $J=6.9$ Hz, 2H); LCMS (ESI) $m/z$ : 472.8 $[M]^+$ . |

[0276] 实施例6.N-环丙基-5-甲氧基-6- (3- (1-甲基-1H-吡唑-3-基) 苯基) -2-吗啉代嘧啶-4-甲酰胺 (化合物6) 的合成:



[0278] 步骤1: 4- (4-氯-5-甲氧基-6- (3- (1-甲基-1H-吡唑-3-基) 苯基) 嘧啶-2-基) 吗啉的合成。

[0279] 向4- (4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基) 吗啉 (0.26g, 0.984mmol) 和1-甲基-3- (3- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 苯基) -1H-吡唑 (0.28g, 0.984mmol) 在二噁烷/水 (10mL/2mL) 中的溶液加入碳酸铯 (0.64g, 1.97mmol) 和[1,1'-双(二苯基膦基)二茂

铁]二氯化钼(II) (0.073g, 0.1mmol)。将所得混合物在90℃下搅拌2h, 然后倒入冰水中并用乙酸乙酯萃取(15mL×3)。将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥并蒸发至干。将得到的粗产物在硅胶上(石油醚/乙酸乙酯=20:1)进行色谱分离, 得到目标产物(200mg, 53%), 为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 385.8/387.8  $[M]^+$ 。

[0280] 步骤2:5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸甲酯的合成。

[0281] 将甲醇/二甲亚砜(10mL/5mL)中的4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(0.2g, 0.52mmol)、三乙胺(0.16g, 1.56mmol)和[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(II)(0.04g, 0.05mmol)的混合物在一氧化碳下在75℃下搅拌16h。将反应混合物浓缩,并将得到的粗产物通过柱色谱(在硅胶上,使用石油醚/乙酸乙酯=2:1)纯化,得到目标产物,为黄色固体(0.12g, 56%)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 410.1  $[M+H]^+$ 。

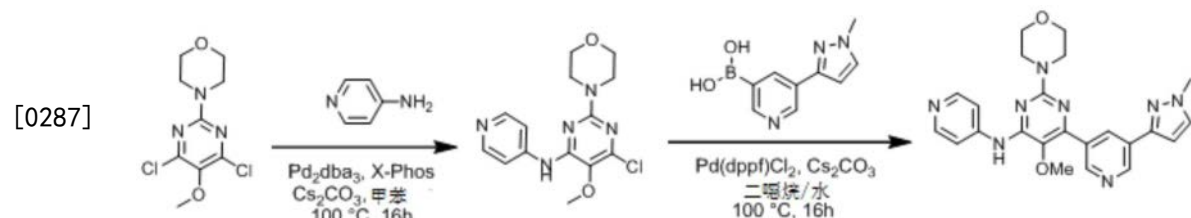
[0282] 步骤3:5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸的合成。

[0283] 将水(1mL)/四氢呋喃(4mL)中的5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸甲酯(0.12g, 0.29mmol)和氢氧化锂水合物(0.025g, 0.58mmol)的混合物在25℃下搅拌5h。将其浓缩, 得到目标产物(0.1g, 86%), 为黄色固体。LCMS (ESI) m/z: 396.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0284] 步骤4:N-环丙基-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-甲酰胺的合成。

[0285] 将5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸(120mg, 0.3mmol)、环丙胺(52mg, 0.91mmol)、N,N-二异丙基乙胺(120mg, 0.91mmol)和1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(171mg, 0.45mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的溶液在25℃搅拌2h。将所得混合物过滤并浓缩。将残留物进行制备型HPLC(SunFire C18, 4.6\*50mm, 3.5μm柱, XBridge C18 3.5μm 4.6x50mm柱, 流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵水溶液), 得到目标产物, 为白色固体(42.6mg, 32%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.65(d, J=4.5Hz, 1H), 8.41(t, J=1.5Hz, 1H), 7.97-7.86(m, 2H), 7.77(d, J=2.2Hz, 1H), 7.53(t, J=7.8Hz, 1H), 6.73(d, J=2.2Hz, 1H), 3.90(s, 3H), 3.70(d, J=3.6Hz, 8H), 3.48(d, J=6.2Hz, 3H), 2.83(pent, J=4.1Hz, 1H), 0.76-0.69(m, 2H), 0.59-0.49(m, 2H); LCMS(ESI)m/z: 435.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0286] 实施例7.5-甲氧基-6-(5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物7)的合成:



[0288] 步骤1:6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

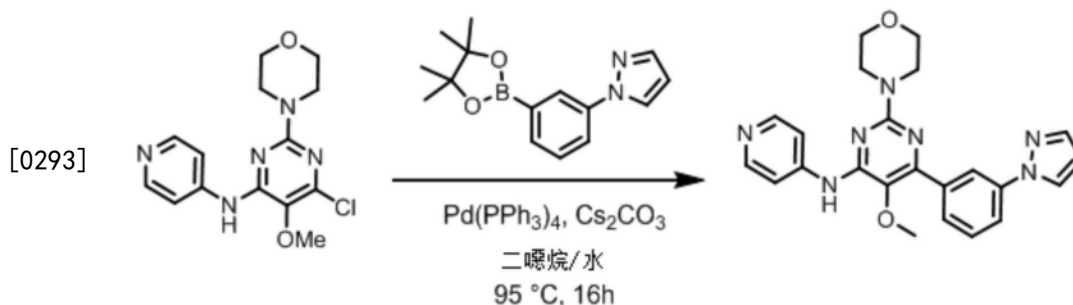
[0289] 将甲苯 (25mL) 中的4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉 (0.5g, 1.89mmol)、吡啶-4-胺 (0.16g, 1.7mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯 (0.17g, 0.19mmol)、X-Phos (0.18g,

0.38mmol)和碳酸铯(1.54g,4.73mmol)的混合物在100℃在氮气氛下搅拌16h。将混合物浓缩,将残留物用水(20mL)稀释并用二氯甲烷萃取(20mL×2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得粗产物通过快速色谱(用乙酸乙酯中的30%至60%石油醚洗脱)纯化,得到6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.2g,36.7%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 321.8  $[M]^+$ 。

[0290] 步骤2:5-甲氧基-6-(5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0291] 将1,4-二噁烷/水(15mL/3mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(80mg,0.25mmol)、(5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-3-基)硼酸(60.7mg,0.3mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(20mg,0.025mmol)和碳酸铯(0.2g,0.62mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌16h。将反应混合物浓缩,然后加入水(20mL)并将混合物用乙酸乙酯萃取(20mL×2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物进行制备型HPLC,得到5-甲氧基-6-(5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(45mg,40.5%),为白色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.44 (s, 1H), 9.07-9.06 (m, 2H), 8.69 (s, 1H), 8.43 (d,  $J$ =6.1Hz, 2H), 7.89 (d,  $J$ =6.2Hz, 2H), 7.83 (d,  $J$ =2.0Hz, 1H), 6.87 (d,  $J$ =2.1Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.71 (s, 8H), 3.49 (s, 3H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 444.8  $[M]^+$ 。

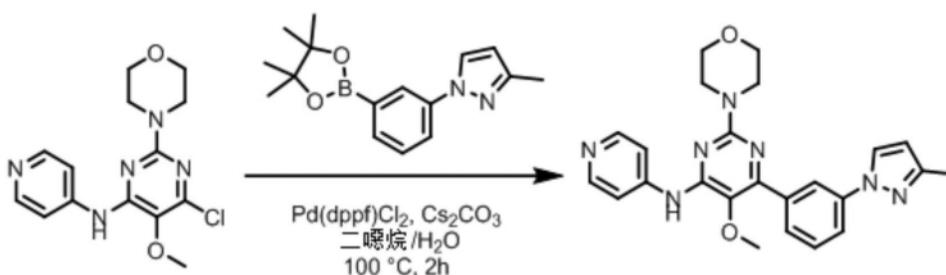
[0292] 实施例8.6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物8)的合成:



[0294] 将1,4-二噁烷/水(5mL/1mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(40mg,0.12mmol)、1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(33.6mg,0.12mmol)、四(三苯基膦)钯(14mg,0.012mmol)和碳酸铯(0.1g,0.31mmol)的混合物在氮气氛,95℃下搅拌16h。将反应混合物浓缩,然后用水(10mL)稀释并用乙酸乙酯萃取(10mL×2)。将合并的有机相用盐水(10mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物通过制备型HPLC纯化,得到6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(17.8mg,33.3%),为白色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.42 (s, 1H), 8.56 (d,  $J$ =2.4Hz, 1H), 8.48 (d,  $J$ =1.8Hz, 1H), 8.43 (d,  $J$ =6.1Hz, 2H), 7.99-7.86 (m, 4H), 7.79 (d,  $J$ =1.6Hz, 1H), 7.63 (t,  $J$ =7.9Hz, 1H), 6.62-6.55 (m, 1H), 3.71 (s, 8H), 3.48 (s, 3H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 430.2  $[M+H]^+$ 。

[0295] 实施例9.5-甲氧基-6-(3-(3-甲基-1H-吡唑-1-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物9)的合成:

[0296]



[0297] 将6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(100mg, 0.28mmol)、3-甲基-1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(48mg, 0.32mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)(20mg, 0.0028mmol)和碳酸铯(209mg, 0.84mmol)在二噁烷(5mL)和水(0.5mL)中的溶液在氮气氛围, 100℃下搅拌2h。然后加入水(20mL)并将混合物用乙酸乙酯萃取(50mL×3)。将有机层干燥并浓缩, 得到粗产物。然后通过制备型TLC(石油醚:乙酸乙酯50:1至10:1)纯化, 得到4-(3-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-7-(吡啶-4-基)-1H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-5-基)吗啉(23.4mg, 34%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.45(s, 1H), 8.42(dd, J=4.6, 2.8Hz, 4H), 7.94-7.85(m, 4H), 7.59(t, J=7.9Hz, 1H), 3.71(s, 8H), 3.47(s, 3H), 2.29(s, 3H); LCMS(ESI) m/z: 443.9[M]<sup>+</sup>。

[0298] 实施例10.5-甲氧基-2-吗啉代-6-(3-(吡嗪-3-基)苯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物10)、3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-N,N-二甲基苯甲酰胺(化合物11)和6-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物12)的合成:

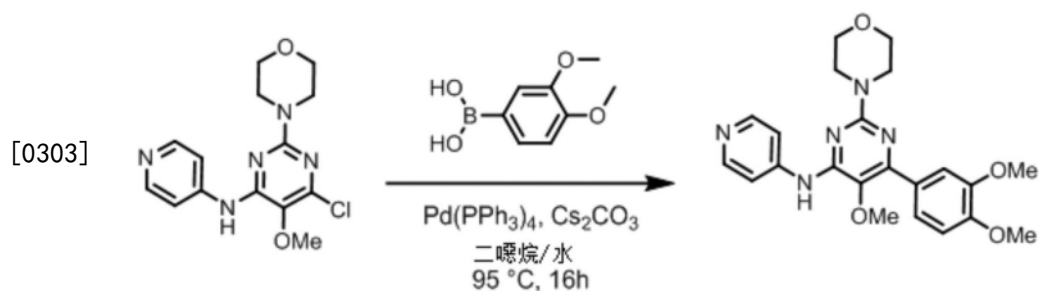
[0299] 根据以上实施例9中的方案合成以下化合物。

[0300]

| No. | 结构 | NMR, MS |
|-----|----|---------|
|-----|----|---------|

|           |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10        |  | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.49 (s, 1H), 9.26 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.44 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 8.26 (dd, <i>J</i> = 16.9, 8.5 Hz, 2H), 8.18 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 7.93 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H), 7.84 (dd, <i>J</i> = 8.6, 4.7 Hz, 1H), 7.72 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 3.72 (s, 8H), 3.49 (s, 3H); LCMS (ESI) <i>m/z</i> : 441.8 [M] <sup>+</sup> . |
| [0301] 11 |  | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.36 (s, 1H), 8.42 (d, <i>J</i> = 6.1 Hz, 2H), 8.09 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H), 7.63 – 7.46 (m, 2H), 3.69 (s, 8H), 3.45 (s, 3H), 2.99 (d, <i>J</i> = 20.3 Hz, 6H). LCMS (ESI) <i>m/z</i> : 435.4 [M+H] <sup>+</sup> .                                                                                         |
| 12        |  | <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.37 (s, 1H), 8.48 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 8.41 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H), 7.88 (dd, <i>J</i> = 5.9, 4.2 Hz, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.70 (s, 8H), 3.52 (s, 3H). LCMS (ESI) <i>m/z</i> : 424.8 [M+H] <sup>+</sup> .                                                                                                                            |

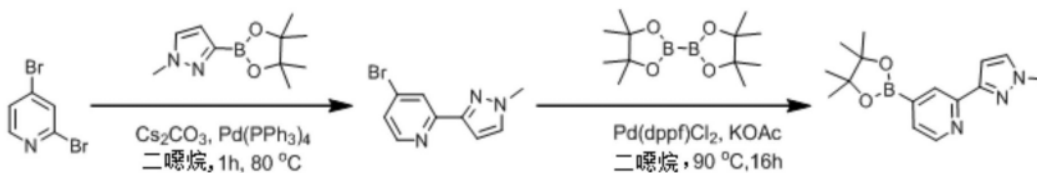
[0302] 实施例11.6- (3,4-二甲氧基苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物13)的合成:



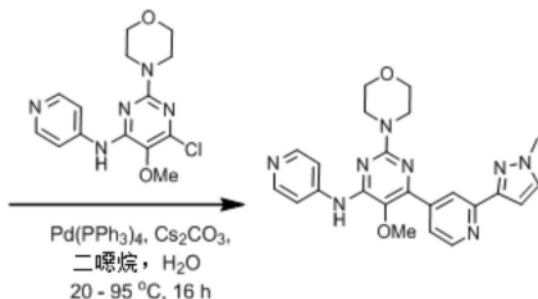
[0304] 将1,4-二噁烷/水(10mL/2mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(55mg,0.17mmol)、(3,4-二甲氧基苯基)硼酸(37.6mg,0.20mmol)、四(三苯基膦)钯(20mg,0.017mmol)和碳酸铯(0.14g,0.43mmol)的混合物在氩气氛下在95℃下搅拌16h。将反应混合物浓缩,用水(15mL)稀释并用乙酸乙酯萃取(15mL×2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物通过制备型HPLC纯化,得到6-(3,4-二甲氧基苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(63.9mg,88.9%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.29(s,1H),8.40(d,*J*=6.3Hz,2H),7.87(dd,*J*=4.9,1.4Hz,2H),7.78(s,2H),7.09(d,*J*=9.1Hz,1H),3.82(d,*J*=6.7Hz,6H),3.70(d,*J*=3.0Hz,8H),3.49(s,3H);LCMS(ESI)*m/z*:424.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0305] 实施例12.5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-2-吗啉代-N-(吡

啉-4-基)嘧啶-4-胺(化合物14)的合成:



[0306]



[0307] 步骤1:4-溴-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶的合成。

[0308] 将水(3mL)和二噁烷(30mL)中的2,4-二溴吡啶(472mg,2mmol)、1-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(416mg,2mmol)、四(三苯基膦)钯(347mg,0.3mmol)和碳酸铯(1.956g,6mmol)的混合物在氩气氛下在80℃下搅拌16h。将反应混合物冷却并浓缩。将所得粗产物通过硅胶柱色谱纯化(甲醇/二氯甲烷=0%-3%),得到4-溴-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶(450mg,61%),为黄色油状物。LCMS(ESI)m/z:238.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0309] 步骤2:2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)吡啶的合成。

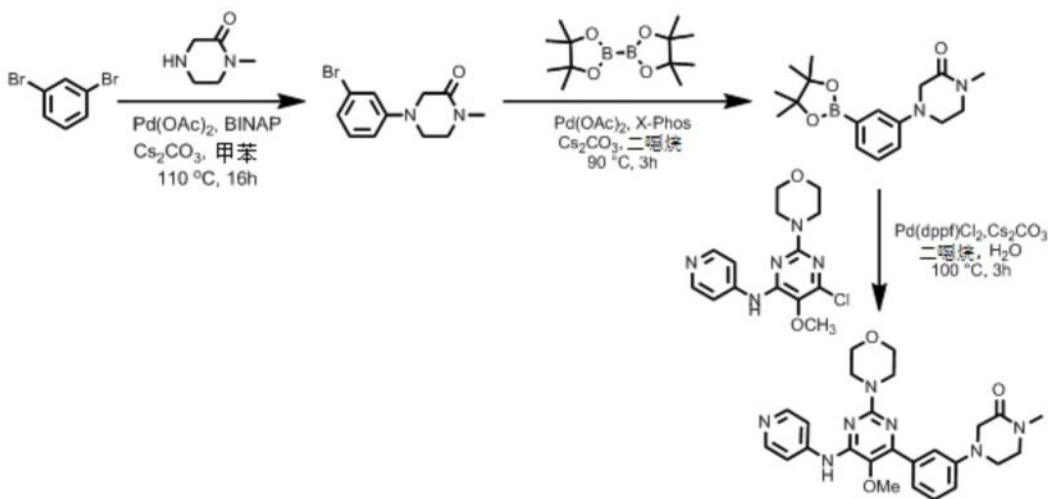
[0310] 将二噁烷(10mL)中的4-溴-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶(95mg,0.4mmol)、双(频哪醇合)二硼(122mg,0.48mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(II)二氯甲烷络合物(33mg,0.04mmol)和乙酸钾(118mg,1.2mmol)的混合物在90℃下搅拌16h。将所得混合物直接用于下一步骤。LCMS(ESI)m/z:286.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0311] 步骤3:5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0312] 将6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(128mg,0.4mmol)、四(三苯基膦)钯(46mg,0.04mmol)、碳酸铯(391mg,1.2mmol)和水(0.5mL)的混合物加入来自上述步骤的反应混合物中,并将所得混合物在氩气下在95℃下搅拌16h。将其浓缩并通过制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um 21.2x250mm 120A,流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵)纯化,得到5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(76.1mg,34%),为黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.43(bs,1H),8.70(d,J=5.2Hz,1H),8.52(s,1H),8.43(d,J=6.3Hz,2H),7.87(d,J=6.4Hz,1H),7.80(d,J=2.4Hz,1H),7.83-7.79(m,2H),6.85(d,J=2.2Hz,1H),3.94(s,3H),3.71(s,8H),3.50(s,3H)。LCMS(ESI)m/z:445.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0313] 实施例13.4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮(化合物15)的合成:

[0314]



[0315] 步骤1: 4-(3-溴苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮的合成。

[0316] 将甲苯 (25mL) 中的 1-甲基哌嗪-2-酮 (1g, 8.76mmol)、1,3-二溴苯 (6.2g, 26.28mmol)、碳酸铯 (11.42g, 35.04mmol)、乙酸钯(II) (0.39g, 1.75mmol) 和 1,1'-联萘-2,2'-二苯基膦 (1.64g, 2.63mmol) 的混合物在 100°C 下搅拌 16h。将反应混合物浓缩, 并将残留物进行硅胶柱色谱 (石油醚: 乙酸乙酯 = 2:1), 得到 4-(3-溴苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮 (1.5g, 64%), 为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 269.1  $[M+H]^+$ 。

[0317] 步骤2: 1-甲基-4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌嗪-2-酮的合成。

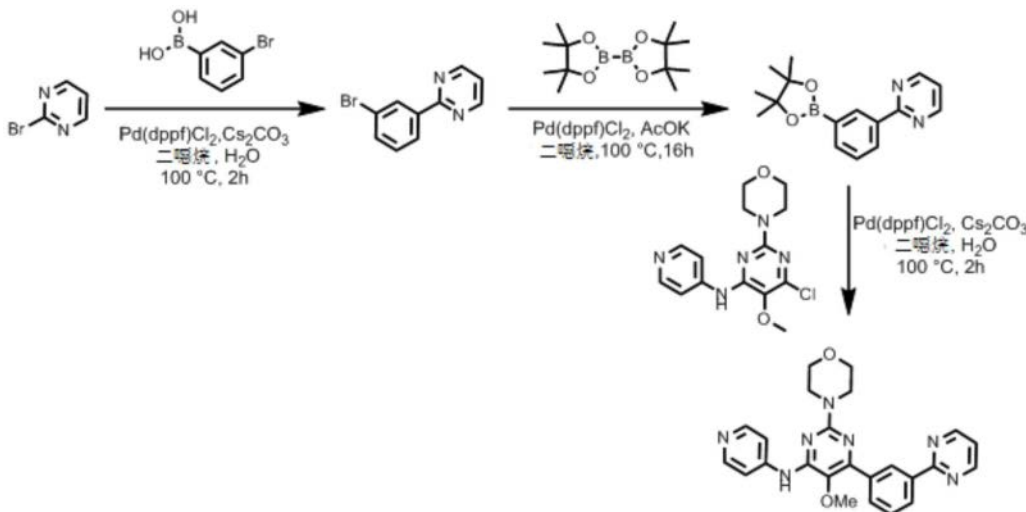
[0318] 将 1,4-二噁烷 (15mL) 中的 4-(3-溴苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮 (0.4g, 1.49mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷) (0.57g, 2.23mmol)、乙酸钾 (0.37g, 3.72mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0) (0.14g, 0.15mmol) 和 2-(二环己基膦)-2',4',6'-三异丙基联苯 (0.11g, 0.23mmol) 的混合物在 85°C 下搅拌 4h。然后将反应混合物过滤, 将滤液浓缩, 并将由此得到的粗产物通过硅胶柱色谱 (石油醚: 乙酸乙酯 = 10:1) 纯化, 得到 1-甲基-4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌嗪-2-酮 (0.3g, 64%), 为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 317.1  $[M+H]^+$ 。

[0319] 步骤3: 4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮的合成。

[0320] 向 6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺 (0.1g, 0.31mmol) 和 1-甲基-4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌嗪-2-酮 (0.14g, 0.44mmol) 在 1,4-二噁烷/水 (5mL/1mL) 中的溶液中加入碳酸铯 (0.2g, 0.62mmol) 和 [1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II) (0.022g, 0.03mmol)。将所得混合物在 90°C 下搅拌 2h 并倒入冰水中。将水性介质用乙酸乙酯萃取 (15mL\*3), 将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥并浓缩。所获得的粗产物通过制备型 HPLC (SunFire C18, 4.6\*50mm, 3.5 $\mu$ m 柱。使用的洗脱系统是在 1.5min 内 2ml/min 的 5%-95% 梯度, 溶剂是乙腈/0.01% 碳酸氢铵水溶液) 纯化, 获得 4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮 (51.3mg, 35%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.34 (s, 1H), 8.41 (d,  $J$  = 6.2Hz, 2H), 7.88 (d,  $J$  = 6.4Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 7.6Hz, 1H), 7.37 (t,  $J$  = 7.9Hz, 1H), 7.09 (d,  $J$  = 8.2Hz, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.69 (d,  $J$  = 3.3Hz, 8H), 3.54 (t,  $J$  = 8Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 3.45 (s,

3H), 2.91 (s, 3H). LCMS (ESI)  $m/z$ : 475.8  $[M]^+$ .

[0321] 实施例14.5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6-(3-(嘧啶-2-基)苯基)嘧啶-4-胺(化合物16)的合成:



[0322]

[0323] 步骤1:2-(3-溴苯基)嘧啶的合成。

[0324] 将2-溴嘧啶(300mg, 2.0mmol)、(3-溴苯基)硼酸(400mg, 2.1mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(240mg, 0.28mmol)和碳酸铯(1960mg, 6.0mmol)在1,4-二噁烷(20mL)和水(2mL)中的溶液在氮气氛, 100℃下搅拌2h。然后加入水(20mL)并将混合物用乙酸乙酯萃取(50mL×3)。将合并的有机层干燥并浓缩。由此获得的粗产物通过制备型TLC(石油醚:乙酸乙酯50:1至10:1)纯化, 获得2-(3-溴苯基)嘧啶(210mg, 47%), 为黄色油状物。LCMS (ESI)  $m/z$ : 234.8  $[M+H]^+$ 。

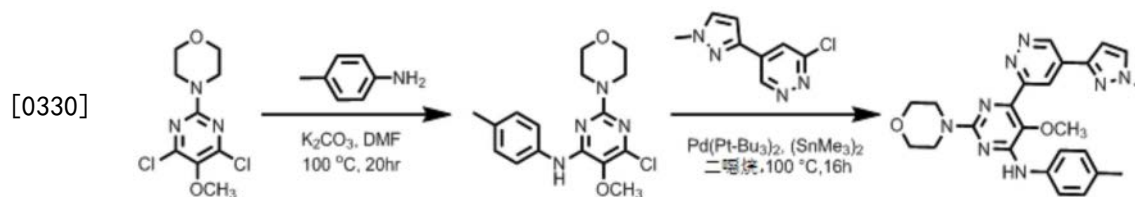
[0325] 步骤2:2-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)嘧啶的合成。

[0326] 在25℃下, 向二噁烷(20mL)中的2-(3-溴苯基)嘧啶(200mg, 0.9mmol)的溶液中加入双(频哪醇合)二硼(300mg, 1.2mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(II)(82mg, 0.09mmol)和乙酸钾(877mg, 2.7mmol)。将反应混合物在氮气氛, 100℃下搅拌16h并浓缩。所得残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的2%甲醇), 得到2-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)嘧啶(180mg, 71.0%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 283.2  $[M+H]^+$ 。

[0327] 步骤3:5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6-(3-(嘧啶-2-基)苯基)嘧啶-4-胺的合成。

[0328] 将6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(100mg, 0.28mmol)、2-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)嘧啶(48mg, 0.32mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(II)(20mg, 0.0028mmol)和碳酸铯(209mg, 0.84mmol)在1,4-二噁烷(5mL)和水(0.5mL)中的溶液在氮气氛, 100℃下搅拌2h。将水(20mL)加入混合物中, 并将其用乙酸乙酯萃取(50mL×3)。将有机层干燥, 浓缩, 并将所得粗产物通过制备型TLC(石油醚:乙酸乙酯50:1至10:1)纯化, 得到5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6-(3-(嘧啶-2-基)苯基)嘧啶-4-胺(13.4mg, 11%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.40 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.95 (d,  $J$ =4.8Hz, 2H), 8.52-8.42 (m, 3H), 8.16 (d,  $J$ =7.9Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$ =6.1Hz, 2H), 7.68 (t,  $J$ =7.8Hz, 1H), 7.49 (t,  $J$ =4.8Hz, 1H), 3.72 (s, 8H), 3.47 (s, 3H). LCMS (ESI)  $m/z$ : 441.8  $[M]^+$ 。

[0329] 实施例15.5-甲氧基-6-(5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)哒嗪-3-基)-2-吗啉代-N-(对甲苯基)嘧啶-4-胺(化合物17)的合成:



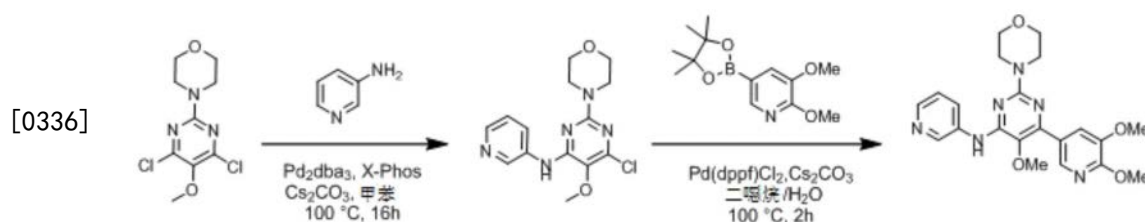
[0331] 步骤1:6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(对-甲苯基)嘧啶-4-胺的合成。

[0332] 向4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉(530mg, 2.0mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中的溶液加入对-甲苯胺(214mg, 2.0mmol)和碳酸钾(556mg, 4.0mmol)。将混合物在100℃下搅拌20h,然后用水(15mL)淬灭并用乙酸乙酯萃取(20mL\*3)。合并有机层,用盐水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。残留物通过硅胶快速色谱(石油醚:乙酸乙酯=75:25)纯化,得到6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(对-甲苯基)嘧啶-4-胺,为黄色固体(340mg, 50.5%)。LCMS (ESI) m/z: 335.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0333] 步骤2:5-甲氧基-6-(5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)哒嗪-3-基)-2-吗啉代-N-(对-甲苯基)嘧啶-4-胺的合成。

[0334] 将1,4-二噁烷(4mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(对-甲苯基)嘧啶-4-胺(0.1g, 0.3mmol)、3-氯-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)哒嗪(0.1g, 0.51mmol)、六甲基二锡烷(0.17g, 0.51mmol)和双(三叔丁基膦)钯(0)(0.03g, 0.06mmol)的混合物在氮气氛, 100℃下搅拌16h。将混合物浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(SunFire C18, 4.6\*50mm, 3.5μm柱。使用的洗脱系统是在1.5min内以2mL/min的5%-95%梯度,和溶剂是乙腈/0.01%碳酸氢铵水溶液),得到5-甲氧基-6-(5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)哒嗪-3-基)-2-吗啉代-N-(对-甲苯基)嘧啶-4-胺,为黄色固体(3.4mg, 2.5%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.64 (d, J=2.1Hz, 1H), 8.45 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.76 (d, J=2.4Hz, 1H), 7.60 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.16 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.01 (d, J=2.4Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.75 (s, 8H), 3.63 (s, 3H), 2.33 (s, 3H)。LCMS (ESI) m/z: 459.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0335] 实施例16.6-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(化合物18)的合成:



[0337] 步骤1:6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0338] 将甲苯(25mL)中的4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉(0.5g, 1.89mmol)、吡啶-3-胺(0.16g, 1.7mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0.17g, 0.19mmol)、2-(二环己基膦基)-2',4',6'-三异丙基联苯(0.18g, 0.38mmol)和碳酸铯(1.54g, 4.73mmol)的混合物在氮气氛, 100℃下搅拌16h。将反应混合物浓缩,将残留物用水(20mL)稀释并用二氯甲烷萃取(20mL\*2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。对所得残留物进行快速色谱(用乙酸乙酯中的30%至60%石油醚洗脱),得到6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-

N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺 (0.2g, 36.7%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 321.8  $[M]^+$ 。

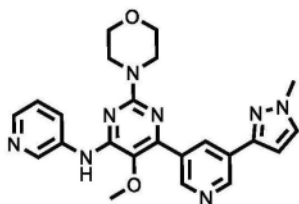
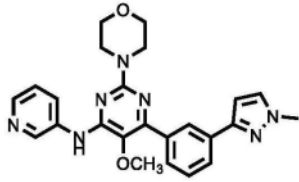
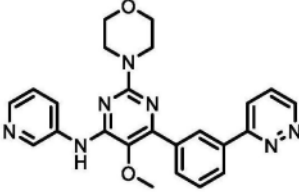
[0339] 步骤2: 6-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0340] 将1,4-二噁烷/水 (15mL/3mL) 中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺 (80mg, 0.25mmol)、2,3-二甲氧基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)吡啶 (79.5mg, 0.3mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钨(II)二氯甲烷络合物 (20mg, 0.025mmol) 和碳酸铯 (0.2g, 0.62mmol) 的混合物在氮气氛, 100°C 下搅拌16h。将反应混合物浓缩, 将残留物用水 (20mL) 稀释, 并将混合物用乙酸乙酯萃取 (20mL  $\times$  2)。将合并的有机相用盐水 (20mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将所得残留物进行制备型HPLC, 得到6-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺 (27.6mg, 26%), 为白色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.17 (s, 1H), 8.98 (d,  $J=2.6\text{Hz}$ , 1H), 8.47 (d,  $J=1.8\text{Hz}$ , 1H), 8.22 (d,  $J=4.7\text{Hz}$ , 1H), 8.18 (d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 7.89 (d,  $J=1.8\text{Hz}$ , 1H), 7.36 (dd,  $J=8.3, 4.6\text{Hz}$ , 1H), 3.94 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.66 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 8H), 3.54 (s, 3H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 424.8  $[M]^+$ 。

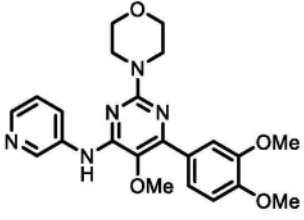
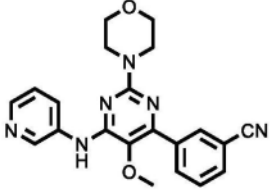
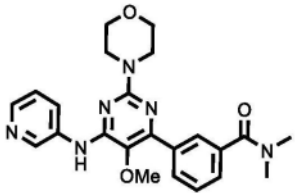
[0341] 实施例17. 化合物19-24的合成

[0342] 根据以上实施例16中所描述的方案合成以下化合物: 5-甲氧基-6-(5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺 (化合物19)、5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺 (化合物20)、5-甲氧基-2-吗啉代-6-(3-(哒嗪-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺 (化合物21)、6-(3,4-二甲氧基苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺 (化合物22)、3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯甲腈 (化合物23) 和3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)-N,N-二甲基苯甲酰胺 (化合物24)。

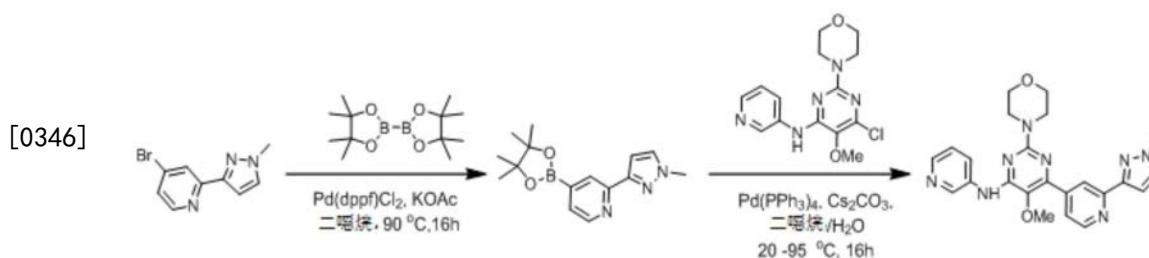
[0343]

| No. | 结构                                                                                  | NMR, MS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19  |    | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ 9.25 (s, 1H), 9.06 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 8.99 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.69 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.30 – 8.22 (m, 1H), 8.21 – 8.16 (m, 1H), 7.83 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J = 8.3, 4.7$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.67 (d, $J = 4$ Hz, 8H), 3.51 (s, 3H). LCMS (ESI) $m/z$ : 445.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ . |
| 20  |    | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ 9.18 (s, 1H), 9.00 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.22 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 7.94-7.82 (m, 2H), 7.77 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J = 8.2, 4.6$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.67 (d, $J = 6.1$ Hz, 8H), 3.47 (s, 3H). LCMS (ESI) $m/z$ : 443.8 $[\text{M}]^+$ .                 |
| 21  |  | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ 9.26 (dd, $J = 4.9, 1.4$ Hz, 1H), 9.19 (s, 1H), 9.00 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.27 (dd, $J = 8.7, 1.4$ Hz, 1H), 8.25 – 8.15 (m, 4H), 7.83 (dd, $J = 8.6, 4.9$ Hz, 1H), 7.70 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J = 8.3, 4.7$ Hz, 1H), 3.67 (d, $J = 2.7$ Hz, 8H), 3.51 (s, 3H). LCMS (ESI) $m/z$ : 441.8 $[\text{M}]^+$ .           |

[0344]

|    |                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 22 |   | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 9.11 (s, 1H), 8.99 (d, $J$ = 2.2 Hz, 1H), 8.26 – 8.17 (m, 2H), 7.73 (dd, $J$ = 4.3, 2.5 Hz, 2H), 7.37 (dd, $J$ = 8.2, 4.7 Hz, 1H), 7.08 (d, $J$ = 9.1 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.66 (d, $J$ = 8.1 Hz, 8H), 3.50 (s, 3H). LCMS (ESI) $m/z$ : 423.8 $[\text{M}]^+$ .                                                                                           |
| 23 |   | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 9.24 (s, 1H), 8.98 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 8.37 (d, $J$ = 11.1 Hz, 2H), 8.24 (d, $J$ = 3.5 Hz, 1H), 8.18 (d, $J$ = 8.1 Hz, 1H), 7.96 (d, $J$ = 7.7 Hz, 1H), 7.73 (t, $J$ = 7.8 Hz, 1H), 7.37 (dd, $J$ = 8.3, 4.7 Hz, 1H), 3.66 (d, $J$ = 4.3 Hz, 8H), 3.49 (s, 3H). LCMS (ESI) $m/z$ : 389.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ .                                                    |
| 24 |  | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 9.18 (s, 1H), 8.98 (d, $J$ = 2.2 Hz, 1H), 8.23 (d, $J$ = 4.5 Hz, 1H), 8.21 – 8.14 (m, 1H), 8.09 (dd, $J$ = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 8.02 (d, $J$ = 1.5 Hz, 1H), 7.57 (t, $J$ = 7.7 Hz, 1H), 7.50 (dt, $J$ = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.37 (dd, $J$ = 8.3, 4.7 Hz, 1H), 3.65 (d, $J$ = 7.5 Hz, 8H), 3.47 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 2.97 (s, 3H). LCMS (ESI) $m/z$ : 434.9 $[\text{M}]^+$ . |

[0345] 实施例18.5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(化合物25)的合成:



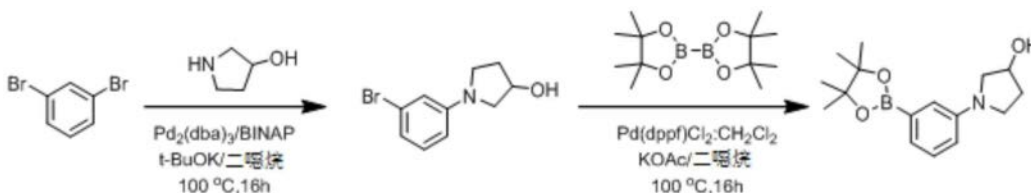
[0347] 步骤1: 2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)吡啶的合成。

[0348] 将1,4-二噁烷(8mL)中的4-溴-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶(71mg, 0.3mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(91mg, 0.36mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(24mg, 0.03mmol)和乙酸钾(88mg, 0.01mmol)的混合物在90℃下搅拌16h。将反应混合物冷却并直接用于下一步骤中。LCMS (ESI)  $m/z$ : 279.1  $[\text{M}-4]^+$ 。

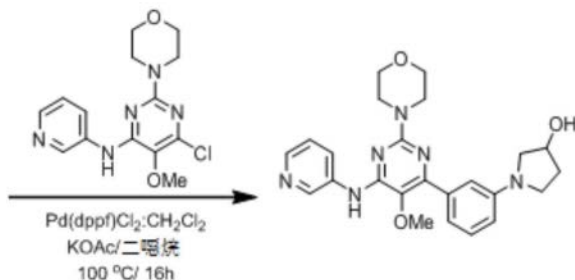
[0349] 步骤2:5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0350] 向来自步骤1的混合物中加入6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(96mg, 0.3mmol)、四(三苯基膦)钯(35mg, 0.03mmol)、碳酸铯(293mg, 0.9mmol)和水(1mL), 并将所得混合物在氩气氛下在95℃下搅拌16h。然后将其浓缩并进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um 21.2x250mm 120A, 流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵), 得到5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(34.6mg, 19%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.27(s, 1H), 8.99(d, J=2.4Hz, 1H), 8.69(d, J=5.2Hz, 1H), 8.52(s, 1H), 8.25(dd, J=4.6, 1.3Hz, 1H), 8.20(ddd, J=8.4, 2.3, 1.5Hz, 1H), 7.82(dd, J=5.2, 1.6Hz, 1H), 7.80(d, J=2.2Hz, 1H), 7.39(dd, J=8.3, 4.7Hz, 1H), 6.85(d, J=2.2Hz, 1H), 3.94(s, 3H), 3.67(d, J=4.5Hz, 8H), 3.52(s, 3H)。LCMS(ESI)m/z:444.8[M]<sup>+</sup>。

[0351] 实施例19.1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吡咯烷-3-醇(化合物26)的合成:



[0352]



[0353] 步骤1:1-(3-溴苯基)吡咯烷-3-醇的合成。

[0354] 将1,4-二噁烷(40mL)中的1,3-二溴苯(2.34g, 10.0mmol)、吡咯烷-3-醇(870mg, 10.0mmol)、三(二亚苄基丙酮)-二钯(0)(458mg, 0.5mmol)、1,1'-联萘基-2,2'-二苯基膦(622mg, 1.0mmol)和叔丁醇钾(2.24g, 20.0mmol)的混合物在氮气气氛, 100℃下搅拌16h。然后将混合物倒入水中, 用二氯甲烷萃取(200mL\*2)。将合并的有机相浓缩, 并将所得残留物进行硅胶柱色谱(石油醚中的70%乙酸乙酯), 得到1-(3-溴苯基)吡咯烷-3-醇(1.3g, 46%), 为灰色固体。LCMS(ESI)m/z:241.6/243.8[M+H]<sup>+</sup>。

[0355] 步骤2:1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吡咯烷-3-醇的合成。

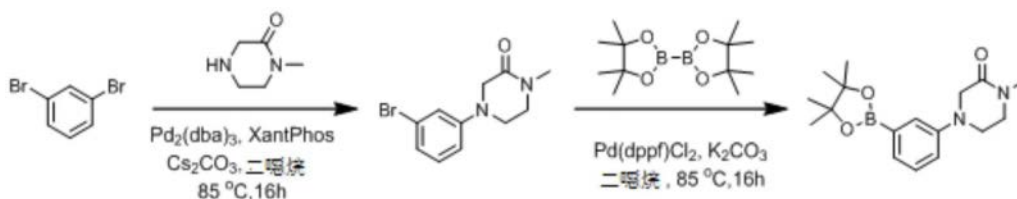
[0356] 将1,4-二噁烷(40mL)中的1-(3-溴苯基)吡咯烷-3-醇(1.2g, 5.0mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(2.54g, 10.0mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(408mg, 0.5mmol)和乙酸钾(980mg, 10.0mmol)的混合物在氮气气氛, 100℃下搅拌16h。将所得混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取(150mL\*2)。将合并的有机相浓缩并进行硅胶柱色谱(石油醚中的60%乙酸乙酯), 得到1-

(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吡咯烷-3-醇(1.4g,97%),为棕色油状物。LCMS (ESI)  $m/z$ : 289.9  $[M]^+$ 。

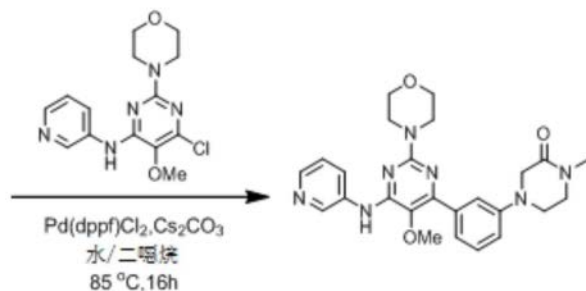
[0357] 步骤3: 1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吡咯烷-3-醇的合成。

[0358] 将二噁烷(5mL)和水(0.5mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(100mg, 0.38mmol)、1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吡咯烷-3-醇(136mg, 0.47mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(25mg, 0.03mmol)和碳酸铯(201mg, 0.62mmol)的混合物在氮气氛围, 100℃下搅拌16h。然后将混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取(100mL\*2)。将合并的有机相浓缩并进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的15%甲醇), 然后进行制备型HPLC(柱Xbridge 21.2\*250mm C18, 10 $\mu$ m, 流动相A: 水(10mmol/L碳酸氢铵) B: 乙腈), 得到1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吡咯烷-3-醇(60.3mg, 42%), 为灰白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.11 (s, 1H), 8.99 (d,  $J$ =1.9Hz, 1H), 8.20 (t,  $J$ =5.9Hz, 2H), 7.36 (dd,  $J$ =8.2, 4.7Hz, 1H), 7.26 (d,  $J$ =5.5Hz, 2H), 7.19 (s, 1H), 6.60 (d,  $J$ =3.4Hz, 1H), 4.97 (d,  $J$ =3.6Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.65 (d,  $J$ =9.8Hz, 8H), 3.49-3.42 (m, 4H), 3.37 (d,  $J$ =7.5Hz, 2H), 3.11 (d,  $J$ =9.1Hz, 1H), 2.10-2.03 (m, 1H), 1.93 (d,  $J$ =3.5Hz, 1H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 448.8  $[M]^+$ 。

[0359] 实施例20.4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮(化合物27)的合成:



[0360]



[0361] 步骤1: 4-(3-溴苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮的合成。

[0362] 将1,4-二噁烷(10mL)中的1,3-二溴苯(1000mg, 4.24mmol)、1-甲基哌嗪-2-酮(320.2mg, 2.82mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(250mg, 0.28mmol)、2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基联苯(260mg, 0.56mmol)和碳酸铯(2700mg, 8.46mmol)的混合物在氩气氛围下在85℃下搅拌16h。然后将混合物过滤并将滤液浓缩。将残留物进行制备型TLC(二氯甲烷/甲醇=10/1), 得到4-(3-溴苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮(550mg, 50%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 271.0  $[M+H]^+$ 。

[0363] 步骤2: 1-甲基-4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌嗪-2-酮的合成。

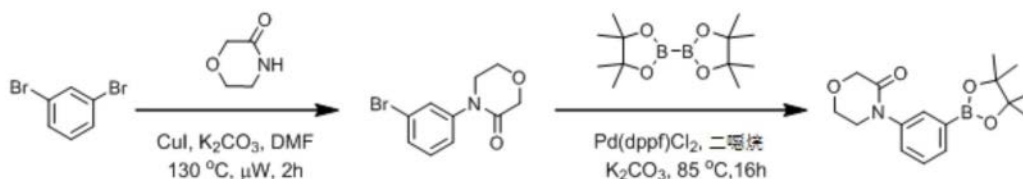
[0364] 将1,4-二噁烷(5mL)中的4-(3-溴苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮(230mg, 0.85mmol)、4,

4,4',4'',5,5,5'',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(324mg,1.28mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)(58mg,0.08mmol)和碳酸钾(351mg,2.55mmol)的混合物在氩气氛下在85℃下搅拌16h。将所得混合物过滤,并将滤液浓缩。将残留物进行制备型TLC(二氯甲烷/甲醇=10/1),得到1-甲基-4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌嗪-2-酮(150mg,55%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 317.2  $[M+H]^+$ 。

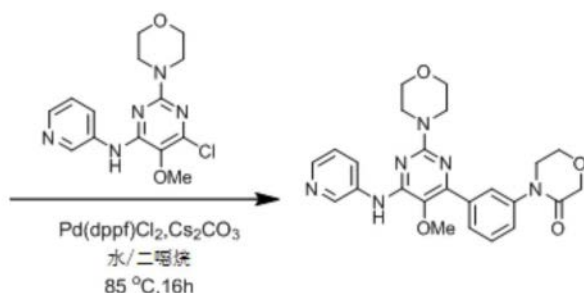
[0365] 步骤3: 4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮的合成。

[0366] 将1,4-二噁烷(5mL)和水(0.5mL)中的1-甲基-4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌嗪-2-酮(95mg,0.3mmol)、6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(100mg,0.3mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)(21mg,0.03mmol)和碳酸铯(195mg,0.6mmol)的混合物在氩气氛下在85℃下搅拌16h。将水(50mL)加入反应混合物中,并将其用乙酸乙酯萃取(50mL×3)。将合并的有机层干燥并浓缩。将所得残留物进行制备型HPLC,得到4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)-1-甲基哌嗪-2-酮(18mg,13%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.14(s, 1H), 9.00(s, 1H), 8.20(d,  $J$ =9.4Hz, 2H), 7.56(s, 1H), 7.47(d,  $J$ =7.2Hz, 1H), 7.36(t,  $J$ =7.8Hz, 2H), 7.08(d,  $J$ =7.8Hz, 1H), 3.80(s, 2H), 3.65(d,  $J$ =8.9Hz, 8H), 3.53(d,  $J$ =5.7Hz, 2H), 3.46(s, 5H), 2.91(s, 3H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 475.8  $[M]^+$ 。

[0367] 实施例21. 4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吗啉-3-酮(化合物28)的合成:



[0368]



[0369] 步骤1: 4-(3-溴苯基)吗啉-3-酮的合成。

[0370] 将DMF(8mL)中的1,3-二溴苯(1.4g,5.94mmol)、吗啉-3-酮(500mg,4.95mmol)、碘化亚铜(95mg,0.5mmol)和碳酸钾(1.4g,9.9mmol)的混合物在130℃在微波辐射下搅拌2h。将所得混合物过滤,并将滤液浓缩。然后将残留物进行制备型TLC(二氯甲烷/甲醇=10/1),得到4-(3-溴苯基)吗啉-3-酮(800mg,53%),为无色油状物。LCMS (ESI)  $m/z$ : 258.0  $[M+H]^+$ 。

[0371] 步骤2: 4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吗啉-3-酮的合成。

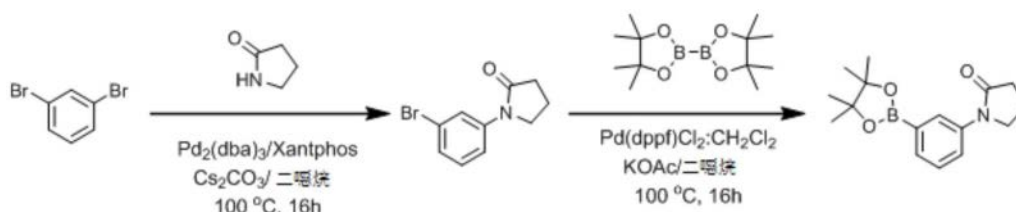
[0372] 将二噁烷(5mL)中的4-(3-溴苯基)吗啉-3-酮(330mg,1.28mmol)、4,4,4',4'',5,5,5'',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(489mg,1.93mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)(58mg,0.08mmol)和碳酸钾(351mg,2.55mmol)的混合物在氩气氛下在85℃下搅拌16h。将所得混合物过滤,并将滤液浓缩。将残留物进行制备型TLC(二氯甲烷/甲醇=10/1),得到4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吗啉-3-酮(150mg,55%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 317.2  $[M+H]^+$ 。

基)二茂铁]二氯钯(II) (95mg, 0.13mmol) 和碳酸钾(529mg, 3.84mmol) 的混合物在氩气氛下在85℃下搅拌16h。将混合物过滤, 并将滤液浓缩。残留物进行制备型TLC(二氯甲烷/甲醇=10/1), 得到4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吗啉-3-酮(250mg, 64%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 304.3  $[M+H]^+$ 。

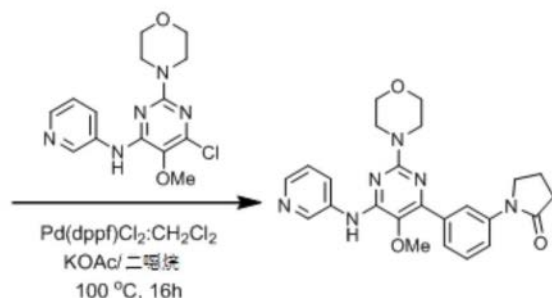
[0373] 步骤3: 4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吗啉-3-酮的合成。

[0374] 将二噁烷(5mL) 和水(0.5mL) 中的4-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吗啉-3-酮(91mg, 0.3mmol)、6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(100mg, 0.3mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(II) (21mg, 0.03mmol) 和碳酸铯(195mg, 0.6mmol) 的混合物在氩气氛下在85℃下搅拌16h。将水(50mL) 加入反应混合物中, 并将其用乙酸乙酯萃取(50mL  $\times$  3)。将合并的有机层干燥并浓缩。将由此获得的粗产物通过制备型HPLC纯化, 得到4-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吗啉-3-酮(32mg, 23%), 为白色固体。 $^1H$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.15(s, 1H), 8.98(d,  $J=2.3$ Hz, 1H), 8.20(dd,  $J=14.7, 6.9$ Hz, 2H), 8.05(s, 1H), 7.94(d,  $J=7.4$ Hz, 1H), 7.57-7.47(m, 2H), 7.37(dd,  $J=8.3, 4.6$ Hz, 1H), 4.24(s, 2H), 4.05-3.98(m, 2H), 3.83-3.78(m, 2H), 3.65(d,  $J=7.6$ Hz, 8H), 3.50(s, 3H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 462.8  $[M]^+$ 。

[0375] 实施例22.1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吡咯烷-2-酮(化合物29)的合成:



[0376]



[0377] 步骤1: 1-(3-溴苯基)吡咯烷-2-酮的合成。

[0378] 将二噁烷(40mL) 中的1,3-二溴苯(2.34g, 10.0mmol)、吡咯烷-2-酮(850mg, 10.0mmol)、乙酸钯(112mg, 0.5mmol)、4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基咕吨(578mg, 1.0mmol) 和碳酸铯(6.5g, 20.0mmol) 的混合物在氩气氛, 100℃下搅拌16h。将所得混合物倒入水中并用二氯甲烷萃取(200mL  $\times$  2)。将合并的有机相浓缩, 并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚中的70%乙酸乙酯), 得到1-(3-溴苯基)吡咯烷-2-酮(1.1g, 46%), 为灰色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 240.8/242.8  $[M+H]^+$ 。

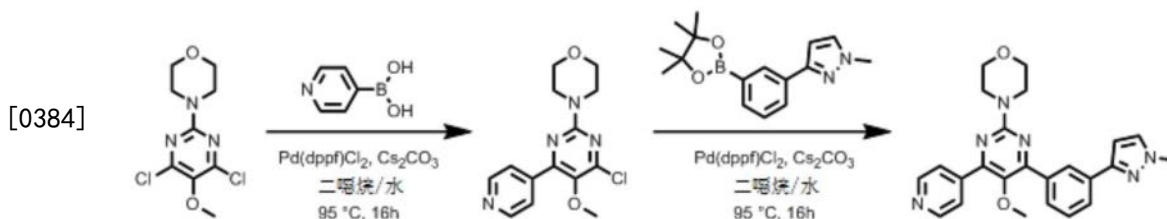
[0379] 步骤2: 1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吡咯烷-2-酮的合成。

[0380] 将二噁烷(40mL)中的1-(3-溴苯基)吡咯烷-2-酮(1.0g, 4.1mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(2.0g, 8.2mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(334mg, 0.41mmol)和乙酸钾(804mg, 8.2mmol)的混合物在氮气氛, 100℃下搅拌16h。将所得混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取(150mL\*2)。将合并的有机相浓缩, 并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚中的50%乙酸乙酯), 获得1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吡咯烷-2-酮(1.2g), 为浅黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 287.9  $[M+H]^+$ 。

[0381] 步骤3: 1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吡咯烷-2-酮的合成。

[0382] 将6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(100mg, 0.38mmol)、1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)吡咯烷-2-酮(135mg, 0.47mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(25mg, 0.03mmol)和碳酸铯(201mg, 0.62mmol)、二噁烷(5mL)和水(0.5mL)的混合物在氮气氛, 100℃下搅拌16h。将所得混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取(100mL\*2)。将合并的有机相浓缩, 将残留物首先进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的15%甲醇), 然后进行制备型HPLC(柱Xbridge 21.2\*250mm C18, 10um, 流动相A: 水(10mmol/L碳酸氢铵) B: 乙腈), 得到1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)吡咯烷-2-酮(36.4mg, 26.1%), 为灰色固体。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.17 (s, 1H), 8.99 (d,  $J=2.1$ Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.25-8.17 (m, 2H), 7.80 (d,  $J=7.7$ Hz, 1H), 7.72 (d,  $J=7.6$ Hz, 1H), 7.49 (t,  $J=8.0$ Hz, 1H), 7.37 (dd,  $J=8.3, 4.7$ Hz, 1H), 3.89 (t,  $J=7.0$ Hz, 2H), 3.65 (d,  $J=7.8$ Hz, 8H), 3.49 (s, 3H), 2.54 (d,  $J=8.0$ Hz, 2H), 2.13-2.05 (m, 2H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 446.9  $[M+H]^+$ 。

[0383] 实施例23.4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基)嘧啶-2-基)吗啉(化合物30)的合成:



[0385] 步骤1: 4-(4-氯-5-甲氧基-6-(吡啶-4-基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

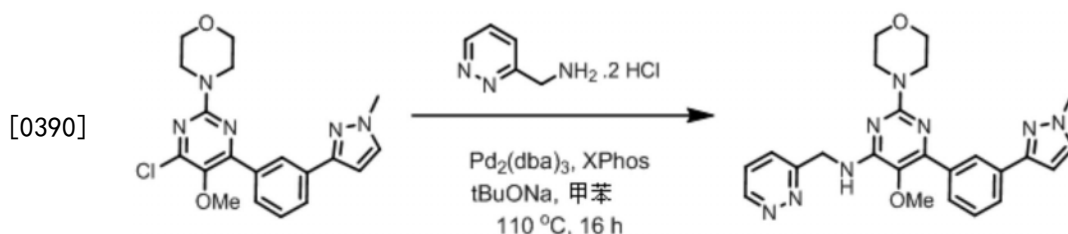
[0386] 将1,4-二噁烷/水(20mL/3mL)中的4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉(0.45g, 1.70mmol)、吡啶-4-基硼酸(0.21g, 1.70mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.14g, 0.17mmol)和碳酸铯(1.39g, 4.26mmol)的混合物在氮气氛, 95℃下搅拌16h。将其浓缩并将残留物用水(20mL)稀释并用二氯甲烷萃取(20mL\*2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。残留物通过快速色谱纯化(用乙酸乙酯中的30%至60%石油醚洗脱), 得到4-(4-氯-5-甲氧基-6-(吡啶-4-基)嘧啶-2-基)吗啉(0.2g, 38.4%), 为浅黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 307.1  $[M+H]^+$ 。

[0387] 步骤2: 4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0388] 将1,4-二噁烷/水(8mL/1mL)中的4-(4-氯-5-甲氧基-6-(吡啶-4-基)嘧啶-2-基)

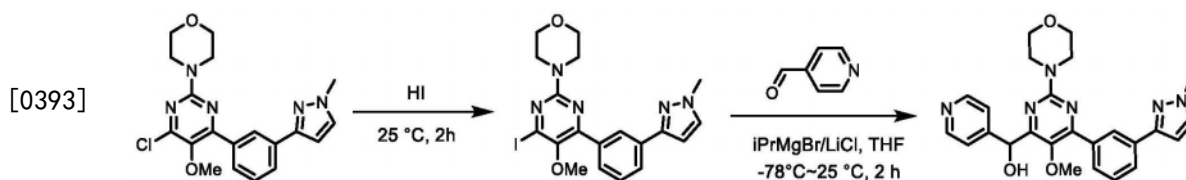
吗啉(100mg, 0.33mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(92.8mg, 0.33mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(27mg, 0.033mmol)和碳酸铯(0.27g, 0.82mmol)的混合物在95℃下搅拌16h。将其浓缩, 将残留物用水(20mL)稀释并用乙酸乙酯萃取(20mL×2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。通过制备型HPLC(碱)纯化残留物, 得到4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基)嘧啶-2-基)吗啉(40.8mg, 28.9%), 为黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.76(d, J=5.8Hz, 2H), 8.43(s, 1H), 8.00(d, J=6.0Hz, 2H), 7.92(dd, J=7.8, 1.6Hz, 2H), 7.77(d, J=2.1Hz, 1H), 7.55(t, J=7.8Hz, 1H), 6.74(d, J=2.2Hz, 1H), 3.91(s, 3H), 3.78(d, J=5.0Hz, 4H), 3.72(d, J=4.8Hz, 4H), 3.28(s, 3H)。LCMS(ESI)m/z: 429.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0389] 实施例24.5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺(化合物31)的合成



[0391] 将甲苯(5mL)中的4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(150mg, 0.390mmol)、吡啶-3-基甲胺·2HCl(71mg, 0.390mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(30mg, 0.05mmol)、X-Phos(56mg, 0.06mmol)和叔丁醇钠(75mg, 0.780mmol)的混合物在氮气氛, 110℃下搅拌16h。然后将反应用水(15mL)淬灭并用乙酸乙酯萃取(20mL×3)。将合并的有机层用盐水(30mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。对残留物进行制备型HPLC, 得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺(25.3mg, 14.2%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.12(dd, J=4.7, 1.6Hz, 1H), 8.37(s, 1H), 7.88-7.74(m, 4H), 7.62(ddd, J=10.1, 8.5, 3.2Hz, 2H), 7.47(t, J=7.7Hz, 1H), 6.69(d, J=2.2Hz, 1H), 4.84(d, J=5.9Hz, 2H), 3.90(s, 3H), 3.53(d, J=4Hz, 4H), 3.49(d, J=4Hz, 4H), 3.45(s, 3H); LCMS(ESI)m/z: 459.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0392] 实施例25.(5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)(吡啶-4-基)甲醇(化合物32)的合成:



[0394] 步骤1: 4-(4-碘-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

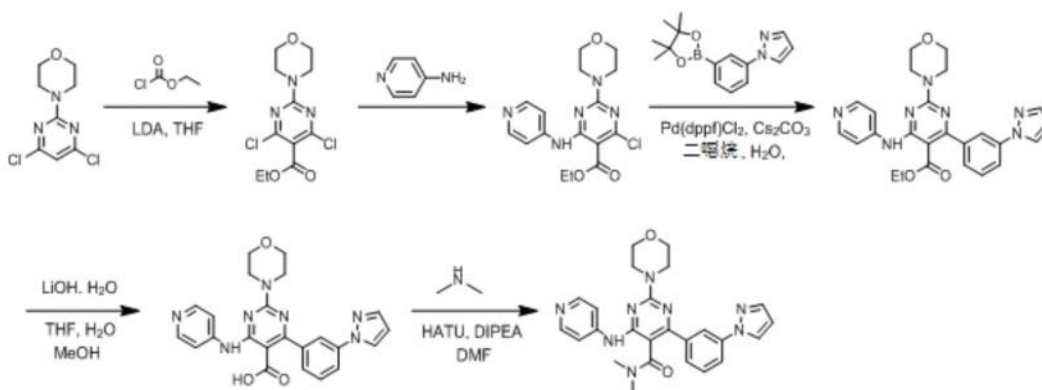
[0395] 将4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(0.3g, 0.78mmol)在碘化氢(5mL)中的溶液在氩气氛下在25℃下搅拌2h。将反应用水(10mL)淬灭并用乙酸乙酯萃取(25mL×3)。将合并的有机层浓缩, 并通过硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=2:1)纯化, 得到4-(4-碘-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-嘧啶-2-

基)吗啉(0.3g,54%),为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 477.1  $[M+H]^+$ 。

[0396] 步骤2: (5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)(吡啶-4-基)甲醇的合成。

[0397] 在氮气氛,  $-78^{\circ}\text{C}$ 下将异丙基氯化镁(四氢呋喃中1.3M, 0.65mL, 0.84mmol)加入无水四氢呋喃(3mL)中的4-(4-碘-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(100mg, 0.21mmol)溶液中。将反应混合物在 $-78^{\circ}\text{C}$ 下搅拌30min,然后在相同温度下加入四氢呋喃(1.0mL)中的异烟醛(90mg, 0.84mmol)。将反应混合物升温并在室温下搅拌2h。然后将其用氯化铵水溶液(5mL)淬灭并用乙酸乙酯萃取(20mL\*3)。将合并的有机层用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到粗产物。然后将其通过制备型HPLC(SunFire C18, 4.6\*50mm, 3.5 $\mu\text{m}$ 柱XBridge C18 3.5 $\mu\text{m}$  4.6x50mm柱。所用洗脱系统是在1.5min内2ml/min的5%-95%梯度,溶剂是乙腈/0.01%碳酸氢铵水溶液)纯化,得到(5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)(吡啶-4-基)甲醇(34.3mg, 36%),为白色固体。 $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.54(dd,  $J=4.5, 1.6\text{Hz}$ , 2H), 8.37(t,  $J=1.5\text{Hz}$ , 1H), 7.93-7.82(m, 2H), 7.76(d,  $J=2.2\text{Hz}$ , 1H), 7.52(t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.49-7.44(m, 2H), 6.72(d,  $J=2.3\text{Hz}$ , 1H), 6.11(bs, 1H), 5.97(s, 1H), 3.89(d,  $J=8.1\text{Hz}$ , 3H), 3.74-3.63(m, 8H), 3.36(s, 3H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 458.5  $[M]^+$ 。

[0398] 实施例26. N,N-二甲基-2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(化合物33)的合成:



[0399]

[0400] 步骤1: 4,6-二氯-2-吗啉代-嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0401] 在 $-70^{\circ}\text{C}$ 下将LDA的溶液(THF中2.0M, 1.92mL)逐滴加入无水THF(10mL)中的4-(4,6-二氯嘧啶-2-基)吗啉(750mg, 3.20mmol)溶液中,并将所得混合物在氮气氛下搅拌1h。然后通过注射器加入氯甲酸乙酯(670mg, 6.17mmol),并将混合物在 $-70^{\circ}\text{C}$ 下再搅拌2h,并在 $20^{\circ}\text{C}$ 下搅拌30min。将反应混合物倒入冰水(15mL)中,将水相用乙酸乙酯(15mL\*3)萃取。将合并的有机相用盐水(10mL)洗涤,用无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩,得到粗产物。将其通过快速柱纯化(ISCO 20g二氧化硅,石油醚中0-20%乙酸乙酯,20min内的梯度),得到4,6-二氯-2-吗啉代-嘧啶-5-羧酸乙酯(900mg, 92%),为白色固体。

[0402] 步骤2: 4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0403] 在 $0^{\circ}\text{C}$ 下向DMSO(10mL)中的吡啶-4-胺(120mg, 1.28mmol)溶液中加入NaH(131mg, 3.27mmol)。将混合物升温并在 $20^{\circ}\text{C}$ 下搅拌0.5h并再次冷却至 $0^{\circ}\text{C}$ 。加入4,6-二氯-2-吗啉代-嘧啶-5-羧酸乙酯(500mg, 1.63mmol)在DMSO(5mL)中的溶液,将混合物升温并在 $20^{\circ}\text{C}$ 搅

拌2h。然后将混合物倒入饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(15mL)中并用乙酸乙酯萃取(15mL\*3)。将合并的有机相用盐水(10mL)洗涤,用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(500mg,84%),为黄色固体。

[0404] 步骤3:2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0405] 在氮气氛围下,向4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(400mg,1.10mmol)在二噁烷(8mL)和H<sub>2</sub>O(1.4mL)中的溶液加入1-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑(297mg,1.10mmol)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.07g,3.30mmol)和Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(80mg,110umol)。将所得混合物在100℃下搅拌2h,然后冷却至15℃并倒入冰水(10mL)中。将水相用乙酸乙酯萃取(15mL×3),将合并的有机相用盐水(10mL)洗涤,用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到粗产物。然后将其通过快速柱色谱纯化(ISCO 40g二氧化硅,石油醚中的0-80%乙酸乙酯,20min内的梯度),得到2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(300mg,58%),为黄色固体。

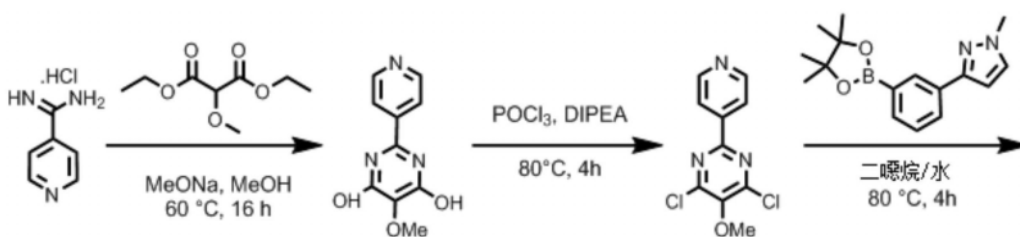
[0406] 步骤4:2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸的合成。

[0407] 向2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(250mg,530umol)在MeOH(0.5mL)和THF(1mL)和H<sub>2</sub>O(0.5mL)中的溶液加入LiOH·H<sub>2</sub>O(67mg,1.59mmol)。将混合物在20℃下搅拌12h并浓缩。然后将其用水(1mL)稀释,并将水相用乙酸乙酯萃取(1mL\*3)。然后用饱和柠檬酸溶液使水相的pH达到~5,并通过过滤收集所得沉淀物和干燥,得到2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(130mg,55%),为淡黄色固体。

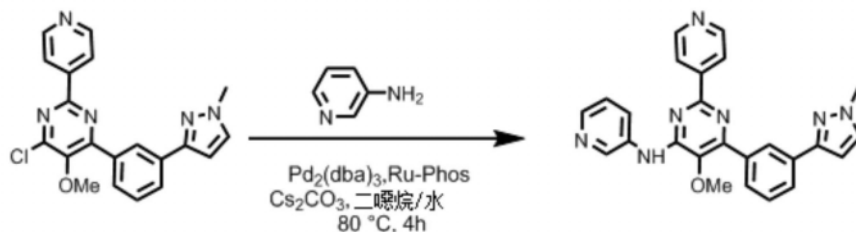
[0408] 步骤5:N,N-二甲基-2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺的合成。

[0409] 向2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(80mg,180umol)在DMF(1mL)中的溶液添加N-甲基甲胺(2.0M,90uL)、HATU(69mg,180umol)和DIPEA(70mg,541umol)。将所得混合物在20℃下搅拌2h。通过使其进行制备型HPLC(Waters Xbridge BEH C18 100\*30mm\*10um柱;0.05%氨溶液中的10%-50%乙腈和10mM碳酸氢铵水溶液,8min梯度)分离DMF中的粗产物,得到N,N-二甲基-2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(31mg,36%),为浅黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)δ 9.15(bs,1H),8.49(d,J=6.3Hz,2H),8.11(s,1H),7.99(d,J=2.4Hz,1H),7.86(d,J=7.9Hz,1H),7.77(d,J=1.5Hz,1H),7.66(bs,2H),7.60-7.46(m,2H),6.52(t,J=1.9Hz,1H),3.94(s,4H),3.84(t,J=4.8Hz,4H),2.88(s,3H),2.42(s,3H)。LCMS(ESI C25H26N8O2)[M+H]<sup>+</sup>:471.1。

[0410] 实施例27.5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物34)的合成:



[0411]



[0412] 步骤1:5-甲氧基-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4,6-二醇的合成。

[0413] 将异烟酰胺盐酸盐 (2g, 12.7mmol)、甲醇 (10mL) 和甲醇中的甲醇钠 (25% wt, 4.6mL, 25.4mmol) 的混合物加热至回流30min, 然后加入2-甲氧基丙二酸二乙酯 (2.4g, 12.7mmol)。将所得混合物再回流5h。然后将反应混合物冷却, 倒入冰/水 (~50mL) 中, 并使用2N HCl酸化以得到沉淀。将其通过过滤收集并风干, 得到5-甲氧基-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4,6-二醇 (1.5g, 54%), 为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 220.1  $[M+H]^+$ 。

[0414] 步骤2:4,6-二氯-5-甲氧基-2-(吡啶-4-基)嘧啶的合成。

[0415] 向磷酰氯 (30mL) 中的5-甲氧基-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4,6-二醇 (1g, 4.56mmol) 的混合物中加入N,N-二异丙基乙胺 (2.0mL)。将所得混合物在90°C下搅拌5h。蒸发挥发物并进一步与甲苯 (2×100mL) 共沸。将所得残留物进行快速色谱 (石油醚/乙酸乙酯=2:1), 得到4,6-二氯-5-甲氧基-2-(吡啶-4-基)嘧啶 (0.2g, 17%), 为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 256.1  $[M+H]^+$ 。

[0416] 步骤3:4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶的合成。

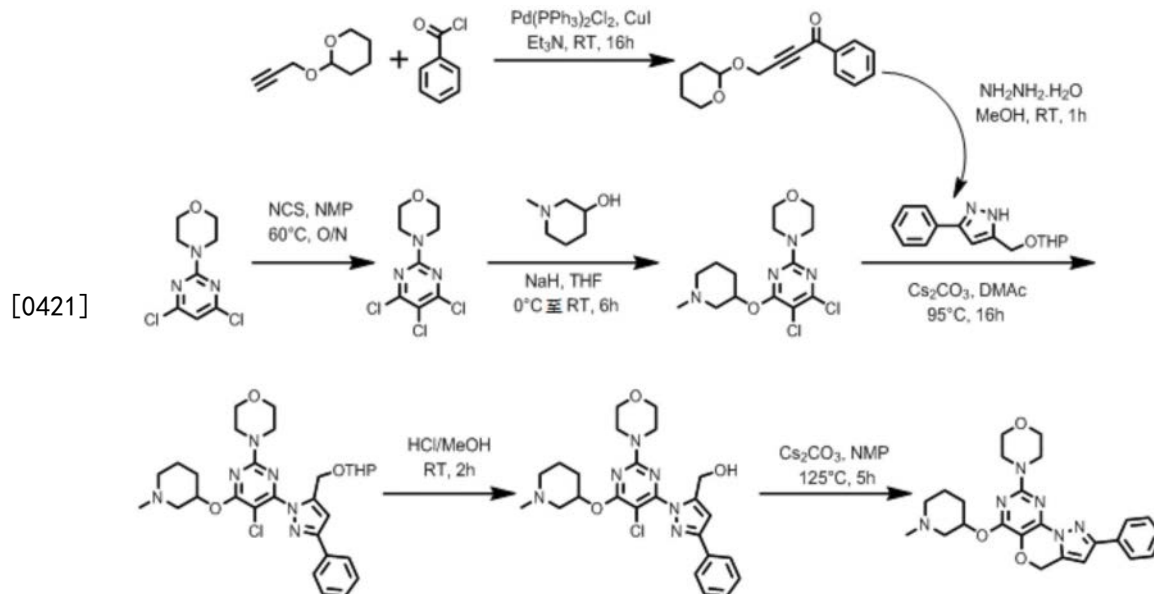
[0417] 向4,6-二氯-5-甲氧基-2-(吡啶-4-基)嘧啶 (0.2g, 0.78mmol) 和1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑 (0.2g, 0.7mmol) 在二噁烷/水 (5mL/1.5mL) 中的溶液加入碳酸铯 (0.51g, 1.56mmol) 和[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II) (0.058g, 0.08mmol), 并将所得混合物在90°C下搅拌2h。然后将混合物倒入冰水中并用乙酸乙酯萃取 (15mL×3)。将有机层用盐水洗涤, 干燥并浓缩。将所得粗产物通过硅胶快速色谱 (石油醚/乙酸乙酯=10:1) 纯化, 得到4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶 (100mg, 34%), 为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 378.1  $[M+H]^+$ 。

[0418] 步骤4:5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺甲酸盐的合成。

[0419] 将甲苯 (4mL) 中的4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶 (0.08g, 0.2mmol)、吡啶-3-胺 (0.04g, 0.42mmol)、碳酸铯 (0.21g, 0.64mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0) (0.02g, 0.02mmol) 和2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基-1,1'-联苯 (0.015g, 0.03mmol) 的混合物在100°C下搅拌4h。将其浓缩; 粗产物溶于DMF中并进行制备型HPLC (SunFire C18, 4.6×50mm, 3.5μm柱。使用的洗脱系统是在1.5min内2ml/min的5%-

95%梯度,溶剂是乙腈/0.01%碳酸氢铵水溶液),得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺,为黄色固体(38.6mg,42%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ 9.63(s,1H),9.11(d,J=2.4Hz,1H),8.76(dd,J=4.5,1.5Hz,2H),8.54(t,J=1.5Hz,1H),8.36-8.33(m,3H),8.20(dd,J=4.5,1.6Hz,2H),8.04-8.02(m,1H),7.95-7.93(m,1H),7.79(d,J=2.2Hz,1H),7.61(t,J=7.8Hz,1H),7.49(dd,J=8.2,4.7Hz,1H),6.78(d,J=2.2Hz,1H),3.93(d,J=6.6Hz,3H),3.63(s,3H)。LCMS(ESI)m/z:435.8[M+H]<sup>+</sup>。

[0420] 实施例28.4-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)-2-吗啉代-8-苯基-6H-吡唑并[1,5-d]嘧啶并[5,4-b][1,4]噁嗪(化合物35)的合成:



[0422] 步骤1a:1-苯基-4-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丁-2-炔-1-酮的合成。

[0423] 将三乙胺(15mL)中的2-(丙-2-炔-1-基氧基)四氢-2H-吡喃(1.0g,7.13mmol)、苯甲酰氯(1.0g,7.13mmol)、碘化亚铜(67mg,0.36mmol)和双(三苯基膦)氯化钯(II)(50mg,0.07mmol)的混合物在 $25^\circ\text{C}$ 下搅拌16h。过滤反应混合物,并将滤液浓缩,得到标题化合物(1.2g,69%),为黄色固体。LCMS(ESI)m/z:245.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0424] 步骤1b:3-苯基-5-(((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)甲基)-1H-吡唑的合成。

[0425] 将甲醇(15mL)中的1-苯基-4-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丁-2-炔-1-酮(1g,4.1mmol)和水合肼(1mL)的混合物在 $25^\circ\text{C}$ 下搅拌2h。将反应混合物浓缩,所得粗产物通过硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=2:1)纯化,得到标题化合物(0.6g,57%),为黄色固体。LCMS(ESI)m/z:259.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0426] 步骤1:4-(4,5,6-三氯嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0427] 在室温下向1-甲基-2-吡咯烷酮(100mL)中的4-(4,6-二氯嘧啶-2-基)吗啉(5g,21.3mmol)溶液中逐份加入N-氯代琥珀酰亚胺(5.7g,42.7mmol)。将所得混合物在 $60^\circ\text{C}$ 下搅拌16h。将其冷却,将混合物用乙酸乙酯/水(20mL/20mL)稀释,分离有机层并将水层用乙酸乙酯(20mL $\times$ 2)萃取。将合并的有机相用盐水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物进行快速色谱(Biotage,40g硅胶;用石油醚中的20%至30%乙酸乙酯洗脱),得到4-(4,5,6-三氯嘧啶-2-基)吗啉(5.1g,89.7%),为灰白色固体。

[0428] 步骤2: 4-(4,5-二氯-6-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0429] 在0℃下向四氢呋喃(20mL)中的1-甲基哌啶-3-醇(0.45g, 3.91mmol)溶液中逐份添加氢化钠(60%, 0.23g, 5.87mmol)。加入后, 将反应混合物在0℃下搅拌30min, 然后逐滴添加四氢呋喃(10mL)中的4-(4,5,6-三氯嘧啶-2-基)吗啉(1g, 3.91mmol)溶液。将所得混合物升温并在室温下搅拌16h。然后将其用乙酸乙酯/水(20mL/20mL)稀释, 分离有机层, 并将水层用乙酸乙酯萃取(20mL×2)。将合并的有机相用盐水(30mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。由此得到的粗产物通过快速色谱(Biotage, 40g硅胶, 用石油醚中的20%至40%的乙酸乙酯洗脱)纯化, 得到4-(4,5-二氯-6-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)嘧啶-2-基)吗啉(1.2g, 88.7%), 为白色固体。LCMS (ESI) m/z: 347.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0430] 步骤3: 4-(5-氯-4-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)-6-(3-苯基-5-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)甲基)-1H-吡唑-1-基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0431] 将N,N-二甲基乙酰胺(25mL)中的4-(4,5-二氯-6-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)嘧啶-2-基)吗啉(0.5g, 1.45mmol)、3-苯基-5-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)甲基)-1H-吡唑(0.37g, 1.45mmol)和碳酸铯(0.94g, 2.89mmol)的混合物在95℃搅拌16h。将反应冷却, 将混合物用乙酸乙酯/水(20mL/20mL)稀释, 分离有机层, 并将水层用乙酸乙酯(20mL×2)萃取。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。对残留物进行快速色谱(Biotage, 40g硅胶, 用二氯甲烷中的15%至30%的甲醇: 二氯甲烷=1:10洗脱), 得到4-(5-氯-4-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)-6-(3-苯基-5-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)甲基)-1H-吡唑-1-基)嘧啶-2-基)吗啉(0.4g, 48.6%), 为白色固体。LCMS (ESI) m/z: 569.2 [M+H]<sup>+</sup>。

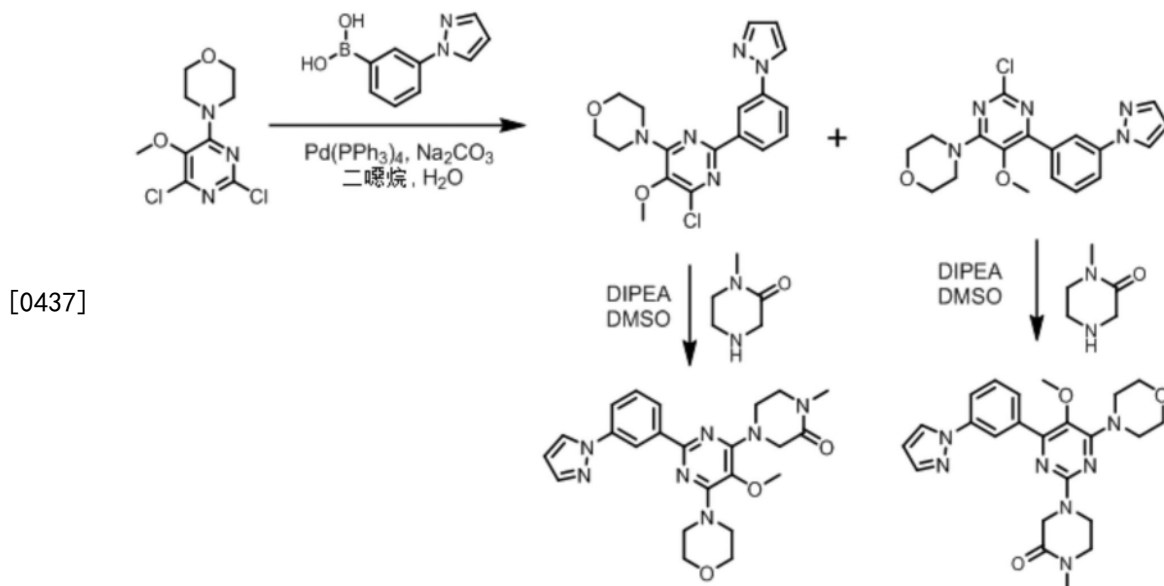
[0432] 步骤4: (1-(5-氯-6-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)-3-苯基-1H-吡唑-5-基)甲醇的合成。

[0433] 向甲醇(20mL)中的4-(5-氯-4-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)-6-(3-苯基-5-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)甲基)-1H-吡唑-1-基)嘧啶-2-基)吗啉(0.4g, 0.7mmol)溶液中加入盐酸(甲醇中3.0M, 2mL), 并将所得混合物在室温下搅拌2h。将反应混合物浓缩, 将残留物用二氯甲烷(10mL)稀释, 并使用碳酸氢钠溶液将介质的pH增加至高于7。分离有机层, 水层用二氯甲烷萃取(20mL×2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到(1-(5-氯-6-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)-3-苯基-1H-吡唑-5-基)甲醇(0.28g, 82.6%), 为白色泡沫。LCMS (ESI) m/z: 485.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0434] 步骤5: 4-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)-2-吗啉代-8-苯基-6H-吡唑并[1,5-d]嘧啶并[5,4-b][1,4]噁嗪的合成。

[0435] 将NMP(3mL)中的(1-(5-氯-6-((1-甲基哌啶-3-基)氧基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)-3-苯基-1H-吡唑-5-基)甲醇(0.11g, 0.23mmol)和碳酸铯(0.15g, 0.46mmol)的混合物在125℃下搅拌5h。将所得反应混合物过滤, 并将滤液进行制备型HPLC(Boston pHlex ODS10um21.2x250mm 120A, 流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵), 得到目标化合物(1.1mg, 1%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.63(s, 1H), 9.11(d, J=2.4Hz, 1H), 8.76(dd, J=4.5, 1.5Hz, 2H), 8.54(t, J=1.5Hz, 1H), 8.36-8.33(m, 3H), 8.20(dd, J=4.5, 1.6Hz, 2H), 8.04-8.02(m, 1H), 7.95-7.93(m, 1H), 7.79(d, J=2.2Hz, 1H), 7.61(t, J=7.8Hz, 1H), 7.49(dd, J=8.2, 4.7Hz, 1H), 6.78(d, J=2.2Hz, 1H), 3.93(d, J=6.6Hz, 3H), 3.63(s, 3H)。LCMS (ESI) m/z: 435.8 [M+H]<sup>+</sup>。

[0436] 实施例29.4-[5-甲氧基-6-吗啉代-2-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-4-基]-1-甲基-哌嗪-2-酮(化合物36)和4-[5-甲氧基-4-吗啉代-6-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-2-基]-1-甲基-哌嗪-2-酮(化合物37)的合成:



[0438] 步骤1:4-[2-氯-5-甲氧基-6-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-4-基]吗啉和4-[6-氯-5-甲氧基-2-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-4-基]吗啉的合成。

[0439] 在氮气氛下向二噁烷(1mL)和H<sub>2</sub>O(0.1mL)中的4-(2,6-二氯-5-甲氧基-嘧啶-4-基)吗啉(500mg,1.89mmol)溶液中加入1-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑(511mg,1.89mmol)、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(2M,2.84mL)和Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(219mg,189μmol),并将所得混合物在100℃下搅拌24h。然后将混合物过滤,并将滤液进行制备型HPLC(Waters Xbridge Prep OBD C18 150\*40mm\*10μm柱;0.04%氨水溶液中的30-70%乙腈,8分钟梯度),得到4-[2-氯-5-甲氧基-6-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-4-基]吗啉(170mg)和4-[6-氯-5-甲氧基-2-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-4-基]吗啉(40mg),为黄色固体。LCMS(ESI)m/z:372.1[M+H]<sup>+</sup>(两种异构体)。

[0440] 步骤2:4-[5-甲氧基-6-吗啉代-2-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-4-基]-1-甲基-哌嗪-2-酮(化合物37)的合成。

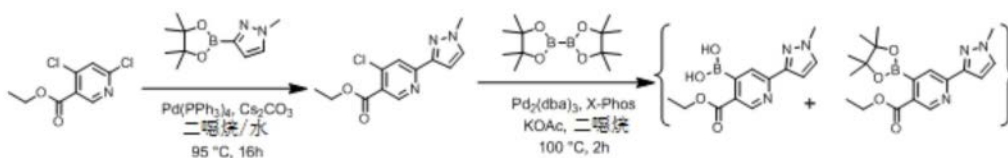
[0441] 向DMSO(3mL)中的4-[6-氯-5-甲氧基-2-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-4-基]吗啉(170mg,457μmol)溶液中加入1-甲基哌嗪-2-酮(157mg,1.37mmol)和DIPEA(177mg,1.37mmol)。将所得混合物在110℃下搅拌12h。然后将水(5mL)加入反应混合物中,并将其用乙酸乙酯萃取(3mL\*2)。将合并的有机层用盐水(5mL)洗涤并经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。浓缩,然后使残留物进行制备型HPLC(Waters Xbridge BEH C18100\*25mm\*5μm柱;在10mM碳酸氢铵水溶液中的40%-75%乙腈,10分钟梯度),得到4-[5-甲氧基-6-吗啉代-2-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-4-基]-1-甲基-哌嗪-2-酮(86mg,42%),为浅黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.57(s,1H),8.27(d,J=7.9Hz,1H),8.03(d,J=2.4Hz,1H),7.82-7.73(m,2H),7.51(t,J=8Hz,1H),6.51(t,J=2.1Hz,1H),4.41(s,2H),4.02(t,J=5.3Hz,2H),3.89-3.72(m,8H),3.65(s,3H),3.52(t,J=5.4Hz,2H),3.04(s,3H)。LCMS(ESI)(C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>)[M+H]<sup>+</sup>:450.1。

[0442] 步骤3:4-[5-甲氧基-4-吗啉代-6-(3-吡唑-1-基苯基)嘧啶-2-基]-1-甲基-哌嗪-

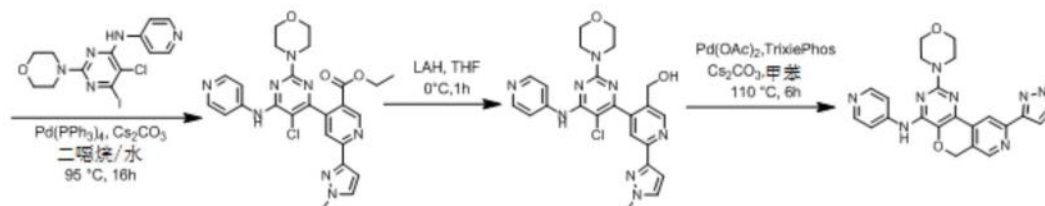
2-酮(化合物38)的合成:

[0443] 根据针对化合物37所描述的方案合成化合物38,并分离为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$  8.31 (t, J=2.0Hz, 1H), 8.00 (d, J=2.2Hz, 1H), 7.92 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.82-7.73 (m, 2H), 7.52 (t, J=8.0Hz, 1H), 6.49 (t, J=2.1Hz, 1H), 4.41 (s, 2H), 4.09 (bs, 2H), 3.82 (m, 8H), 3.46 (t, J=5.2Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 3.05 (s, 3H). LCMS (ESI) (C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>) [M+H]<sup>+</sup>: 450.2。

[0444] 实施例30.9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-吡啶并[4', 3':4,5]吡喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺(化合物38)的合成:



[0445]



[0446] 步骤1:4-氯-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)烟酸乙酯的合成。

[0447] 向1,4-二噁烷/水(50mL/10mL)中的4,6-二氯烟酸乙酯(3g, 13.63mmol)的混合物中加入1-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(2.84g, 13.63mmol)、碳酸铯(8.88g, 27.27mmol)和四(三苯基膦)钯(0.95g, 0.82mmol)。将反应混合物在氩气氛下在100℃下搅拌4h。然后将其过滤,用水稀释并用乙酸乙酯萃取(50mL×3)。将有机层合并,浓缩,并进行硅胶柱(石油醚:乙酸乙酯=2:1)纯化,得到4-氯-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)烟酸乙酯(2g, 55%),为黄色固体。LCMS (ESI) m/z: 266.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0448] 步骤2:(5-(乙氧基羰基)-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)硼酸和6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)烟酸乙酯的合成。

[0449] 将1,4-二噁烷(15mL)中的4-氯-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)烟酸乙酯(1.28g, 4.82mmol)、4,4,4',4',5,5,5'-七甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(6.12g, 24.09mmol)、乙酸钾(1.28g, 13.01mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(0.44g, 0.48mmol)和2-(二环己基膦基)-2',4',6'-三异丙基联苯(0.34g, 0.72mmol)的混合物在100℃下搅拌4h。将混合物过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇=10:1),得到(5-(乙氧基羰基)-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)硼酸和6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)烟酸乙酯的混合物(0.9g, 68%),为黄色固体。LCMS (ESI) m/z: 276.1 [M+H]<sup>+</sup>, 358.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0450] 步骤3:4-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)烟酸乙酯的合成。

[0451] 向N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中的5-氯-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.3g, 0.72mmol)和来自步骤2的混合物[(5-(乙氧基羰基)-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)硼酸和6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)烟酸乙酯](0.69g, 2.51mmol)的溶液中加入磷酸三钾(0.56g, 2.51mmol)和1,1'-双

(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.05g,0.07mmol)。将所得混合物在100℃下搅拌3h。将反应混合物过滤,将滤液用水(30mL)稀释并用乙酸乙酯萃取(20mL\*3)。浓缩有机层,并将残留物进行硅胶快速色谱(二氯甲烷:甲醇=10:1),得到4-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)烟酸乙酯,为黄色固体(0.13g,35%)。LCMS(ESI)m/z:521.3[M+H]<sup>+</sup>。

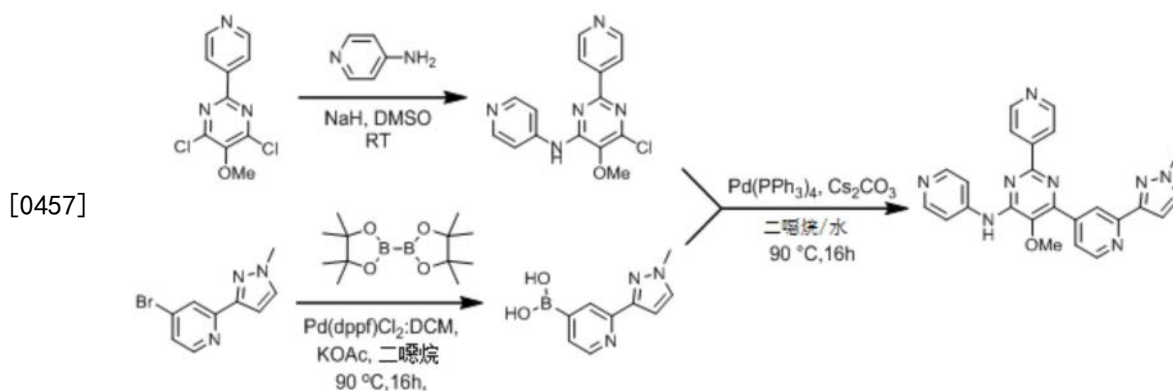
[0452] 步骤4: 4-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-3-基)甲醇的合成。

[0453] 在氮气氛,0℃下将氢化铝锂(THF中1.0M,2.56mL,2.56mmol)加入无水四氢呋喃(5mL)中的4-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)烟酸乙酯(130mg,0.25mmol)溶液中。然后将混合物升温并在25℃下搅拌1.5h。然后通过冰浴冷却下小心加入硫酸钠十水合物淬灭反应。向反应混合物中加入四氢呋喃(50mL),搅拌15min,滤出所得固体。将滤液浓缩,并将所得残留物进行硅胶快速色谱(二氯甲烷:甲醇=10:1),得到4-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-3-基)甲醇(50mg,80%),为黄色固体。LCMS(ESI)m/z:479.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0454] 步骤5: 9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-吡啶并[4',3':4,5]吡喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺的合成。

[0455] 向甲苯(2.5mL)中的((4-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-3-基)甲醇(0.06g,0.13mmol)的混合物中加入碳酸铯(0.08g,0.25mmol)、乙酸钯(II)(0.006g,0.03mmol)和外消旋-2-二叔丁基膦-1,1'-联萘(0.026g,0.06mmol)。将反应混合物在氩气氛下在110℃下搅拌5h。将所得混合物过滤以除去固体,将滤液浓缩并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um 21.2x250mm 120A,流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-吡啶并[4',3':4,5]吡喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺,为灰白色固体(4.0mg,7%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ9.45(s,1H),8.58(s,1H),8.41(d,J=6.1Hz,2H),8.35(s,1H),7.87(d,J=6.2Hz,2H),7.80(d,J=2.2Hz,1H),6.84(d,J=2.1Hz,1H),5.37(s,2H),3.96(s,3H),3.73(d,J=8.5Hz,8H)。LCMS(ESI)m/z:443.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0456] 实施例31.5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-N,2-二(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物39)的合成:



[0458] 步骤1: 6-氯-5-甲氧基-N,2-二(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0459] 将二甲亚砜中的吡啶-4-胺(0.11g,1.2mmol)和氢化钠(0.06g,2.4mmol)的混合物在25℃下搅拌0.5h。向混合物中加入4,6-二氯-5-甲氧基-2-(吡啶-4-基)嘧啶(0.31g,

1.2mmol), 并将反应混合物在25℃下再搅拌2h。然后将混合物倒入冰水中并用乙酸乙酯萃取(15mL\*3)。将合并的有机相用盐水洗涤, 经硫酸钠干燥并浓缩。将粗产物通过硅胶快速色谱(二氯甲烷: 甲醇=20:1)纯化, 得到6-氯-5-甲氧基-N,2-二(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(70mg, 18%), 为黄色固体。LCMS (ESI) m/z: 314.1 [M+H]<sup>+</sup>。

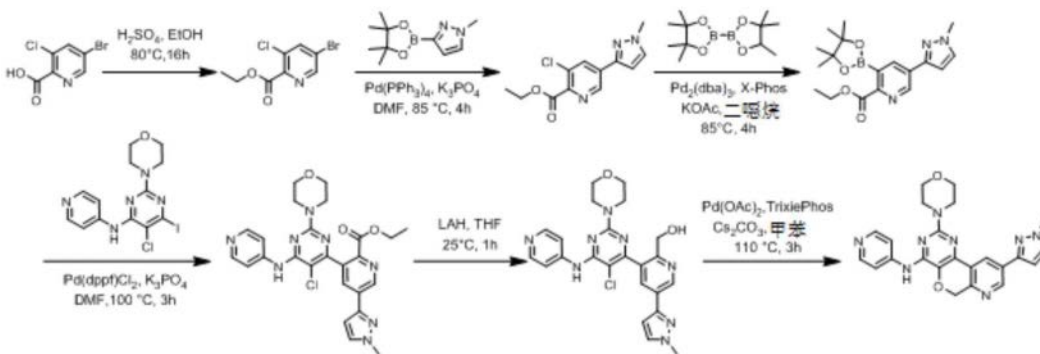
[0460] 步骤2: (2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)硼酸的合成。

[0461] 向1,4-二噁烷(7mL)中的4-溴-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶(0.08g, 0.34mmol)和4,4,4',4'',5,5,5',5''-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(0.11g, 0.44mmol)的溶液中加入乙酸钾(0.067g, 0.68mmol)和1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.025g, 0.034mmol)。将所得混合物在90℃下搅拌16h并冷却。该反应混合物不经进一步纯化直接用于下一步骤。LCMS (ESI) m/z: 204.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0462] 步骤3: 5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-N,2-二(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0463] 向来自步骤2的混合物中加入5mL的1,4-二噁烷/水(4mL/1mL), 随后加入6-氯-5-甲氧基-N,2-二(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.08g, 0.25mmol)、碳酸铯(0.16g, 0.5mmol)和四(三苯基膦)钯(0.03g, 0.025mmol)。将所得反应混合物在氩气氛下在90℃下搅拌16h并浓缩。然后将残留物进行制备型HPLC(BOSTON Phlex ODS10um21.2x250mm 120A, 流动相乙腈/0.1%碳酸氢铵), 得到5-甲氧基-6-(2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶-4-基)-N,2-二(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺, 为灰白色固体(3.7mg, 3%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.86 (s, 1H), 8.80 (dd, J=8.3, 3.7Hz, 3H), 8.61 (s, 1H), 8.55 (d, J=6.3Hz, 2H), 8.26 (dd, J=4.5, 1.5Hz, 2H), 8.05 (dd, J=4.9, 1.5Hz, 2H), 7.96 (dd, J=5.1, 1.7Hz, 1H), 7.83 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.89 (d, J=2.2Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.67 (s, 3H)。LCMS (ESI) m/z: 437.3 [M+H]<sup>+</sup>。

[0464] 实施例32.9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-吡啶并[3',2':4,5]吡喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺(化合物40)的合成:



[0466] 步骤1: 5-溴-3-氯吡啶甲酸乙酯的合成。

[0467] 向乙醇(50mL)中的5-溴-3-氯吡啶甲酸(5g, 21.2mmol)溶液中加入硫酸(0.1mL)。将反应混合物在80℃下搅拌16h并浓缩。将残留物用乙酸乙酯(100mL)溶解, 过滤并浓缩, 得到5-溴-3-氯吡啶甲酸乙酯, 为黄色油状物(3.5g, 63%)。LCMS (ESI) m/z: 264.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0468] 步骤2: 3-氯-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)吡啶甲酸乙酯的合成。

[0469] 向N,N-二甲基甲酰胺(25mL)中的5-溴-3-氯吡啶甲酸乙酯(1.5g, 5.67mmol)的混合物中加入1-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(1.06g, 5.10mmol)、磷酸三钾(0.66g, 0.57mmol)和四(三苯基膦)钯(0.66g, 0.57mmol)。将所得反应

混合物在氮气氛, 85℃下搅拌4h。然后将反应混合物冷却, 过滤, 将滤液用水稀释并用乙酸乙酯 (50mL×3) 萃取。将有机层合并, 浓缩, 并将残留物进行硅胶柱色谱 (石油醚: 乙酸乙酯 = 2:1), 得到3-氯-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡啶甲酸乙酯, 为黄色固体 (1g, 66%)。LCMS (ESI) m/z: 266.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0470] 步骤3: 5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 吡啶甲酸乙酯的合成。

[0471] 将1,4-二噁烷 (15mL) 中的3-氯-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡啶甲酸乙酯 (1.28g, 4.82mmol)、4,4,4',4',5,5,5'-七甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷) (6.12g, 24.09mmol)、乙酸钾 (1.28g, 13.01mmol)、三(二亚苺基丙酮) 二钪 (0) (0.44g, 0.48mmol) 和 2-(二环己基膦基)-2',4',6'-三异丙基联苯 (0.34g, 0.72mmol) 的混合物在85℃下搅拌4h。将所得混合物过滤, 将滤液浓缩, 并将残留物进行硅胶柱色谱 (二氯甲烷: 甲醇 = 10:1), 得到5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 吡啶甲酸乙酯, 为黄色固体 (0.9g, 68%)。LCMS (ESI) m/z: 276.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0472] 步骤4: 3-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基) 嘧啶-4-基)-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡啶甲酸乙酯的合成。

[0473] 向N,N-二甲基甲酰胺 (10mL) 中的5-氯-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基) 嘧啶-4-胺 (0.3g, 0.72mmol) 和5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 吡啶甲酸乙酯 (0.9g, 2.51mmol) 的溶液中加入磷酸三钾 (0.53g, 2.51mmol) 和1,1'-双(二苺基膦基) 二茂铁-二氯化钪 (II) 二氯甲烷络合物 (0.05g, 0.07mmol)。将所得混合物在100℃下搅拌3h并冷却。将其过滤以除去固体, 将滤液用水 (30mL) 稀释并用乙酸乙酯萃取 (20mL×3)。将合并的有机相浓缩, 并将残留物进行硅胶快速色谱 (二氯甲烷: 甲醇 = 10:1), 得到3-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基) 嘧啶-4-基)-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡啶甲酸乙酯, 为黄色固体 (0.11g, 29%)。LCMS (ESI) m/z: 521.3 [M+H]<sup>+</sup>。

[0474] 步骤5: (3-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基) 嘧啶-4-基)-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡啶-2-基) 甲醇的合成。

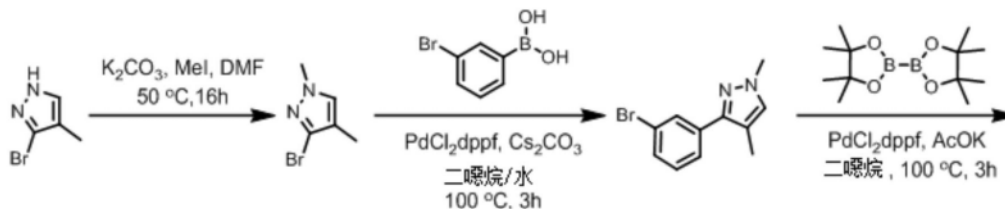
[0475] 在0℃下, 将氢化铝锂的溶液 (THF中1.0M, 2.56mL, 2.56mmol) 加入无水四氢呋喃 (5mL) 中的3-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基) 嘧啶-4-基)-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡啶甲酸乙酯 (130mg, 0.25mmol) 溶液中, 并将混合物在氮气氛, 25℃下搅拌1.5h。然后通过冰浴冷却下小心加入硫酸钠十水合物淬灭反应混合物。将其用THF (50mL) 进一步稀释, 搅拌15min, 过滤并收集滤液。浓缩, 然后将残留物进行硅胶快速色谱 (二氯甲烷: 甲醇 = 10:1), 得到 (3-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基) 嘧啶-4-基)-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡啶-2-基) 甲醇 (60mg, 50%), 为黄色固体。LCMS (ESI) m/z: 479.3 [M+H]<sup>+</sup>。

[0476] 步骤6: 9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-吡啶并[3',2':4,5]吡喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺的合成。

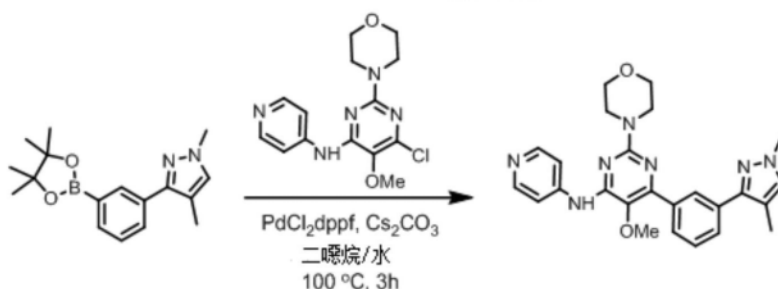
[0477] 向甲苯 (2.5mL) 中的 (3-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基) 嘧啶-4-基)-5-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 吡啶-2-基) 甲醇 (0.045g, 0.09mmol) 的混合物中加入碳酸铯 (0.06g, 0.19mmol)、乙酸钪 (II) (0.004g, 0.02mmol) 和外消旋-2-二叔丁基膦基-1,1'-联萘 (0.019g, 0.05mmol)。将混合物在氩气氛下在110℃下搅拌5h。然后将混合物过滤, 并将滤液浓缩。将残留物进行制备型HPLC (BOSTON pHlex ODS10um21.2x250mm 120A, 流动相是乙腈/

0.1%碳酸氢铵),得到9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-吡啶并[3',2':4,5]吡喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺,为灰白色固体(10.0mg,24%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.42(s,1H),9.01(d,J=2.1Hz,1H),8.60(d,J=2.1Hz,1H),8.40(d,J=6.2Hz,2H),7.87(d,J=6.4Hz,2H),7.83(d,J=2.2Hz,1H),6.93(d,J=2.3Hz,1H),5.35(s,2H),3.94(s,3H),3.73(d,J=4.0Hz,8H)。LCMS(ESI)m/z:443.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0478] 实施例33.6-(3-(1,4-二甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物41)的合成:



[0479]



[0480] 步骤1:3-溴-1,4-二甲基-1H-吡唑的合成。

[0481] 在0℃下向四氢呋喃(25mL)中的3-溴-4-甲基-1H-吡唑(800mg,5mmol)和碳酸钾(1.3g,10mmol)的溶液中逐滴加入碘甲烷(710mg,5mmol),并将所得反应混合物在0℃下搅拌0.5小时。然后将其过滤,并将滤液浓缩。将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸酯=1:4)纯化,得到3-溴-1,4-二甲基-1H-吡唑(700mg,80%),为白色固体。LCMS(ESI)m/z:175.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0482] 步骤2:3-(3-溴苯基)-1,4-二甲基-1H-吡唑的合成。

[0483] 将1,4-二噁烷/水(5mL/1mL)中的3-溴-1,4-二甲基-1H-吡唑(194mg,0.82mmol)、(3-溴苯基)硼酸(165mg,0.82mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(66mg,0.082mmol)和碳酸铯(668mg,2.05mmol)的混合物在氩气氛下在90℃下搅拌16h。将混合物浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸酯=10:1),得到3-(3-溴苯基)-1,4-二甲基-1H-吡唑,为白色固体(140mg,64%)。LCMS(ESI)m/z:251.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0484] 步骤3:1,4-二甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑的合成。

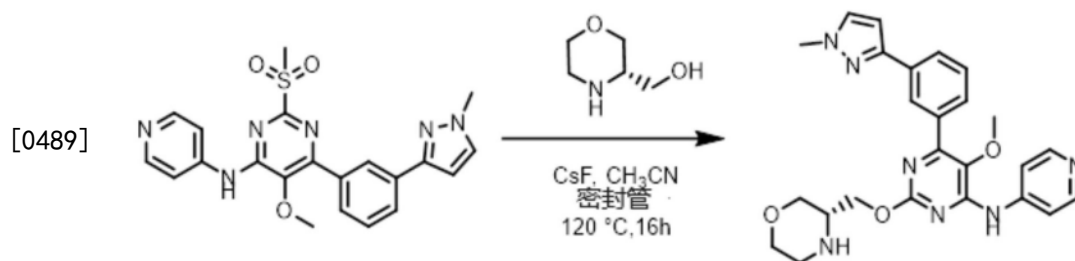
[0485] 将1,4-二噁烷(5mL)中的3-(3-溴苯基)-1,4-二甲基-1H-吡唑(140mg,0.52mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(21mg,0.026mmol)、乙酸钾(153mg,1.56mmol)和双(频哪醇合)二硼(172mg,3.7mmol)的混合物在110℃下搅拌16h。将混合物过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸酯=4:1),得到1,4-二甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑,为浅黄色油状物(100mg,61%)。LCMS(ESI)m/z:299.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0486] 步骤4:6-(3-(1,4-二甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-

4-基)嘧啶-4-胺的合成。

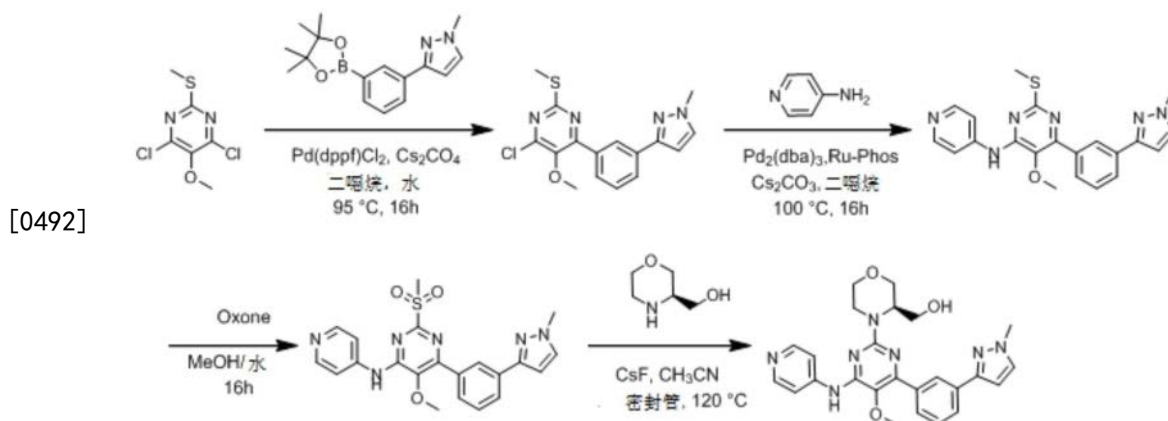
[0487] 将1,4-二噁烷(5mL)与水(1mL)中的1,4-二甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(100mg,0.31mmol)、6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(100mg,0.31mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钼(II)二氯甲烷络合物(25mg,0.03mmol)和碳酸铯(245mg,0.75mmol)的混合物在氩气氛下在90℃下搅拌16h。将反应混合物过滤,并将滤液进行制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2x250mm, 10um,流动相乙腈/水(10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )],得到6-(3-(1,4-二甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(20.0mg,14%),为黄色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ 9.38(s, 1H), 8.41(s, 2H), 8.37(s, 1H), 7.96(d,  $J=7.3\text{Hz}$ , 1H), 7.90(s, 2H), 7.77(d,  $J=7.6\text{Hz}$ , 1H), 7.57(s, 1H), 7.54(s, 1H), 3.84(s, 3H), 3.70(s, 8H), 3.48(s, 3H), 2.23(s, 3H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 458.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0488] 实施例34. (R)-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(吗啉-3-基甲氧基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物42)的合成:



[0490] 将无水乙腈(4mL)中的2-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(60mg,0.14mmol)、(S)-吗啉-3-基甲醇(97mg,0.82mmol)、氟化铯(63mg,0.41mmol)的混合物在密封管中在120℃下搅拌16小时。将反应混合物过滤,浓缩并通过制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um 21.2x250mm 120A。流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵)纯化,得到(R)-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(吗啉-3-基甲氧基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(17.2mg,0.036mmol,产率:26%),为白色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ 9.60(s, 1H), 8.52-8.40(m, 3H), 7.98-7.87(m, 4H), 7.78(d,  $J=2.2\text{Hz}$ , 1H), 7.56(t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 6.73(d,  $J=2.2\text{Hz}$ , 1H), 4.21(d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 3.91(s, 3H), 3.84(dd,  $J=10.8, 2.8\text{Hz}$ , 1H), 3.68(d,  $J=10.9\text{Hz}$ , 1H), 3.51(s, 3H), 3.40(dd,  $J=14.0, 6.7\text{Hz}$ , 1H), 3.26(d,  $J=10.2\text{Hz}$ , 1H), 3.15(s, 1H), 2.79(d,  $J=13.1\text{Hz}$ , 2H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 474.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0491] 实施例35. (R)-(4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)吗啉-3-基)甲醇(化合物43)的合成:



[0493] 步骤1:4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)嘧啶的合成。

[0494] 将1,4-二噁烷/水(40mL/4mL)中的4,6-二氯-5-甲氧基-2-(甲硫基)嘧啶(1g, 4.46mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(1.26g, 4.44mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.36g, 0.44mmol)和碳酸铯(3.6g, 11mmol)的混合物在氮气氛, 95℃下搅拌16h。将反应混合物过滤, 并将滤液浓缩。将残留物进行硅胶色谱(用石油醚中的20%至40%乙酸乙酯洗脱), 得到4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)嘧啶(0.75g, 48.6%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 347.0  $[M+H]^+$ 。

[0495] 步骤2:5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0496] 将无水1,4-二噁烷(40mL)中的4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)嘧啶(0.66g, 1.91mmol)、吡啶-4-胺(0.18g, 1.91mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0.17g, 0.19mmol)、2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基联苯(0.18g, 0.38mmol)和碳酸铯(1.55g, 4.77mmol)的混合物在氮气氛, 100℃下搅拌16h。将反应混合物过滤, 浓缩, 并将残留物进行硅胶色谱(用二氯甲烷中的20%-40%的7N氨甲醇洗脱), 得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.6g, 78.2%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 405.1  $[M+H]^+$ 。

[0497] 步骤3:5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

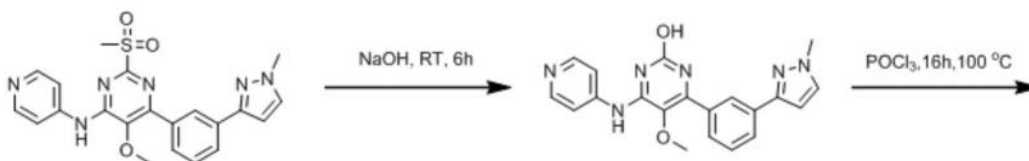
[0498] 在0℃下向甲醇(15mL)中的5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.53g, 1.31mmol)溶液中逐滴加入水(7.5mL)中的过硫酸氢钾制剂(oxone)(1.61g, 2.62mmol)溶液。加入后, 将反应混合物在室温下搅拌3小时, 并通过过滤收集所得沉淀。将固体进一步分散在碳酸氢钠水溶液中并在室温下搅拌20min。通过过滤再次收集所得固体, 用水洗涤并真空干燥, 得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.4g, 70%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 437.1  $[M+H]^+$ 。

[0499] 步骤4:(R)-(4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)吗啉-3-基)甲醇的合成。

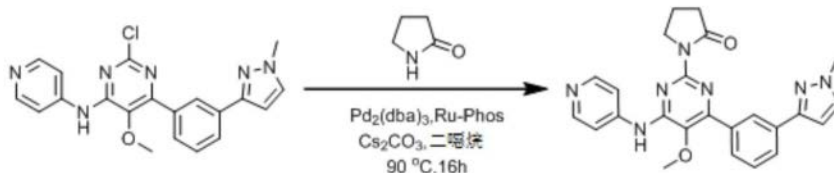
[0500] 将无水乙腈(2mL)中的2-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-

(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(50mg,0.11mmol)、(R)-吗啉-3-基甲醇(80mg,0.69mmol)、氟化铯(52mg,0.34mmol)的混合物在密封管中在120℃下搅拌16h。将反应混合物过滤以除去固体,将滤液浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um21.2×250mm 120A。流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到(R)-(4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)吗啉-3-基)甲醇(4mg,7.7%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ9.32(s,1H),8.45(s,1H),8.38(d,J=6.2Hz,2H),7.93-7.81(m,4H),7.77(d,J=2.1Hz,1H),7.52(t,J=7.7Hz,1H),6.71(d,J=2.2Hz,1H),4.91(t,J=5.1Hz,1H),4.39(s,1H),4.26(d,J=13.8Hz,1H),4.11(d,J=11.2Hz,1H),4.00-3.90(m,4H),3.79(d,J=5.7Hz,1H),3.57-3.40(m,6H),3.16(t,J=16.3Hz,1H)。LCMS(ESI)m/z:474.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0501] 实施例36.1-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)吡咯烷-2-酮(化合物44)的合成:



[0502]



[0503] 步骤1:5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-醇的合成。

[0504] 将2.0M氢氧化钠(5mL)中的5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(180mg,0.413mmol)的溶液在氮气氛,室温下搅拌6h。将混合物用水研磨,通过过滤收集所得沉淀,并真空干燥,得到5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-醇(152mg,88.64%),为白色固体。LCMS(ESI)m/z:375.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0505] 步骤2:2-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

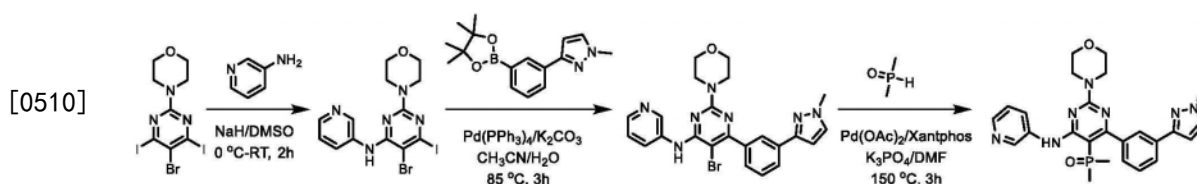
[0506] 将磷酸氯(4mL)中的5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-醇(132mg,0.353mmol)的溶液在氮气氛,100℃下搅拌16h。将混合物冷却并通过加入饱和碳酸氢钠水溶液中中和。相分离,且水相用20mL二氯甲烷萃取。将合并的有机相经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物进行硅胶色谱,用石油醚中的0%至63%乙酸乙酯的线性梯度洗脱,得到2-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(40mg,25.95%),为白色固体。LCMS(ESI)m/z:393.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0507] 步骤3:1-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-2-基氨基)嘧啶-2-基)吡咯烷-2-酮的合成。

[0508] 将无水1,4-二噁烷(6mL)中的2-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(40mg,0.102mmol)、吡咯烷-2-酮(13mg,0.153mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(9mg,0.01mmol)、2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基联苯(9mg,

0.02mmol)和碳酸钾(84mg,0.255mmol)的混合物在氮气氛,90℃下搅拌16h。将混合物过滤以除去固体,将滤液浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um 21.2×250mm 120A,流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到1-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)吡咯烷-2-酮(8.1mg,18.04%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ10.17(s,1H),8.64(s,2H),8.54(d,J=6.4Hz,2H),8.51(s,1H),7.94(dd,J=15.3,7.8Hz,2H),7.78(d,J=2.2Hz,1H),7.58(t,J=7.8Hz,1H),6.74(d,J=2.2Hz,1H),4.08(t,J=7.0Hz,2H),3.91(s,3H),3.56(s,3H),2.61(t,J=8.0Hz,2H),2.10-2.04(m,2H)。LCMS(ESI)m/z:442.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0509] 实施例37.二甲基(4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-5-基)氧化膦(化合物45)的合成:



[0511] 步骤1:5-溴-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0512] 在0℃下向二甲基亚砜(15mL)中的吡啶-3-胺(376mg,4.0mmol)的混合物中加入氢氧化钠(320mg,8.0mmol)。将混合物升温并在28℃下搅拌20min,然后加入4-(5-溴-4,6-二碘嘧啶-2-基)吗啉(2.0g,4.0mmol)。在28℃下继续搅拌另外30min,然后将混合物倒入稀盐酸(用碎冰冷却)中。将形成的沉淀通过过滤收集并在真空下干燥,得到5-溴-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(500mg,24.2%)。LCMS(ESI)m/z:461.9/464.9[M+H]<sup>+</sup>。

[0513] 步骤2:5-溴-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺的合成。

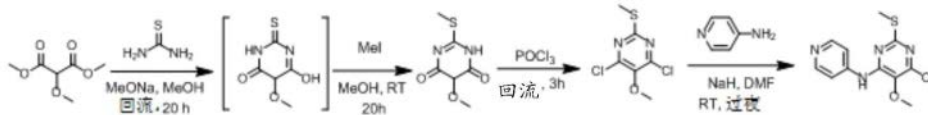
[0514] 向乙腈/水(15mL/3mL)中的1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(0.28g,0.97mmol)的混合物中加入5-溴-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(0.5g,1.1mmol)、碳酸钾(0.37g,2.71mmol)和四(三苯基膦)钯(0.13g,0.11mmol)。将所得反应混合物在氩气氛下在85℃下搅拌3h并冷却。将其过滤以除去固体,将滤液浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇=15:1),得到5-溴-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺,为黄色固体(0.12g,23%)。LCMS(ESI)m/z:492.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0515] 步骤3:二甲基(4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-5-基)氧化膦的合成。

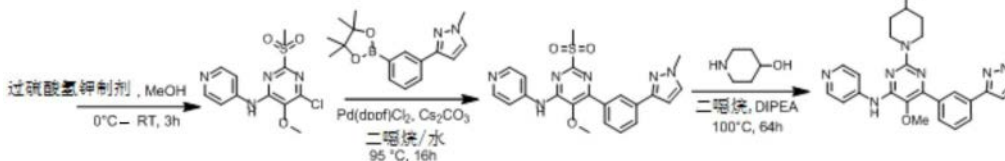
[0516] 向N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的二甲基氧化膦(0.023g,0.29mmol)的混合物中加入5-溴-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(0.12g,0.24mmol)、磷酸三钾(0.062g,0.29mmol)、乙酸钯(II)(0.006g,0.024mmol)和4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基咕吨(0.028g,0.048mmol)。将所得混合物在氩气氛下在150℃下搅拌3h并冷却。将混合物过滤以除去固体,将滤液浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um 21.2×250mm120A,流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到二甲基(4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-5-基)氧化膦(2.6mg,2%),为灰白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ11.97(s,1H),8.71(d,J=2.4Hz,1H),8.24

(d, J=4.7Hz, 1H), 7.99(d, J=8.5Hz, 1H), 7.90(d, J=7.9Hz, 1H), 7.75(d, J=1.9Hz, 2H), 7.48(t, J=7.7Hz, 1H), 7.39(dd, J=8.2, 4.7Hz, 1H), 7.28(d, J=7.6Hz, 1H), 6.77(d, J=2.2Hz, 1H), 3.88(s, 3H), 3.70(d, J=4.7Hz, 4H), 3.64(s, 4H), 1.36(s, 3H), 1.33(s, 3H). LCMS (ESI) m/z: 490.2 [M+H]<sup>+</sup>.

[0517] 实施例38.1-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)哌啶-4-醇(化合物46)的合成



[0518]



[0519] 步骤1:6-羟基-5-甲氧基-2-硫酮基-2,5-二氢嘧啶-4(3H)-酮的合成。

[0520] 向甲醇(50mL)中的硫脲(4.7g, 61.7mmol)和2-甲氧基丙二酸二甲酯(10g, 61.7mmol)的溶液中加入甲醇钠溶液(甲醇中30%溶液, 11.6mL, 61.7mmol)。加入后, 将反应混合物在80°C下搅拌20h。将其冷却并不经进一步纯化直接用于下一步骤。LCMS (ESI) 174.7 [M+H]<sup>+</sup>。

[0521] 步骤2:5-甲氧基-2-(甲硫基)嘧啶-4,6(1H,5H)-二酮的合成。

[0522] 向来自上述步骤的反应混合物中逐滴加入碘甲烷(10.5g, 74mmol)。加入后, 将反应混合物在室温下搅拌20h并浓缩。将残留物用水(30mL)研磨, 通过过滤收集沉淀, 将固体用水(30mL)洗涤并真空干燥, 得到5-甲氧基-2-(甲硫基)嘧啶-4,6(1H,5H)-二酮(7.5g, 两步64.7%), 为白色固体。LCMS (ESI) 188.7 [M+H]<sup>+</sup>。

[0523] 步骤3:4,6-二氯-5-甲氧基-2-(甲硫基)嘧啶的合成。

[0524] 将5-甲氧基-2-(甲硫基)嘧啶-4,6(1H,5H)-二酮(7g, 37.2mmol)和磷酰氯(50mL)的混合物在110°C下搅拌3h并浓缩。在剧烈搅拌下将残留物缓慢倒入温水(~40°C)中。加入后, 将混合物用乙酸乙酯(50mL)萃取两次。将合并的有机相用盐水(50mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将残留物进行硅胶柱色谱(用石油醚中的20%至40%乙酸乙酯洗脱), 得到4,6-二氯-5-甲氧基-2-(甲硫基)嘧啶(7g, 84%), 为白色固体。LCMS (ESI) m/z: 224.9 [M+H]<sup>+</sup>。

[0525] 步骤4:6-氯-5-甲氧基-2-(甲硫基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0526] 在0°C下, 向N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中的吡啶-4-胺(0.28g, 3mmol)的溶液中逐份加入氢化钠(60%, 0.18g, 4.5mmol)。加入后, 将混合物在室温下搅拌30分钟并再次冷却至0°C。然后滴加N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的4,6-二氯-5-甲氧基-2-(甲硫基)嘧啶(0.7g, 3.13mmol)溶液。将反应混合物升温至室温并再搅拌16h。将其用乙酸乙酯和水(20mL/20mL)稀释, 分离有机层, 并将水层用乙酸乙酯(20mL)萃取两次。将合并的有机相经硫酸钠干燥, 过滤并将滤液浓缩。将残留物进行硅胶柱色谱(用二氯甲烷中的5%至15%的7N氨甲醇洗脱), 得到6-氯-5-甲氧基-2-(甲硫基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.4g, 47.3%), 为棕色固体。LCMS (ESI) m/z: 282.8 [M+H]<sup>+</sup>。

[0527] 步骤5:6-氯-5-甲氧基-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0528] 在0℃下向甲醇(15mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-(甲磺基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.4g, 1.42mmol)的溶液中滴加水(8mL)中的过硫酸氢钾制剂(1.74g, 2.8mmol)溶液。加入后,将反应混合物在室温下搅拌3h。然后其用碳酸氢钠水溶液中和至pH=7-8,并将所得固体通过过滤收集,用水洗涤并真空干燥,得到6-氯-5-甲氧基-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.25g, 56.3%),为棕色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 314.7  $[M+H]^+$ 。

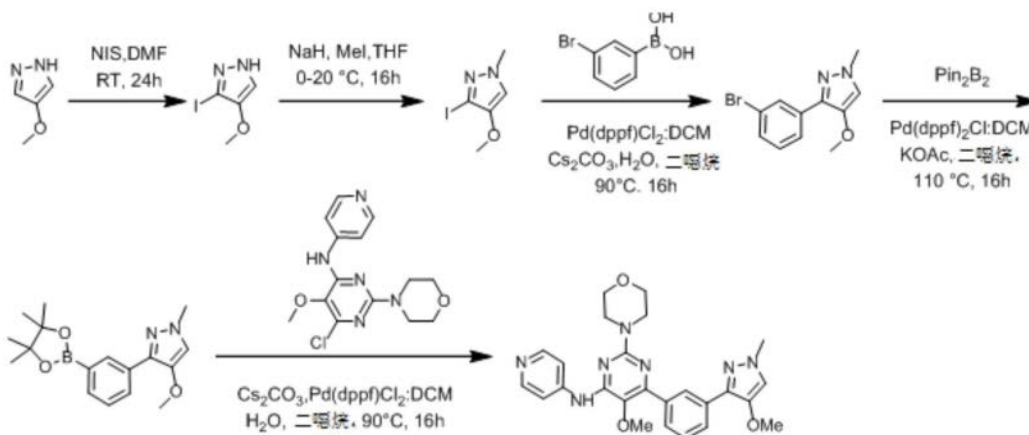
[0529] 步骤6: 5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0530] 将1,4-二噁烷/水(25mL/4mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.25g, 0.8mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(0.23g, 0.8mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(65mg, 0.08mmol)和碳酸铯(0.65g, 2mmol)的混合物在氮气氛围, 95℃下搅拌16h。将所得反应混合物浓缩,用水(20mL)稀释并用乙酸乙酯萃取(20mL×2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。对残留物进行硅胶柱色谱(用二氯甲烷中的5%至15%的7N氨甲醇洗脱),得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.18g, 51.6%),为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 437.1  $[M+H]^+$ 。

[0531] 步骤7: 1-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)哌啶-4-醇的合成。

[0532] 将1,4-二噁烷(5mL)中的5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(80mg, 0.18mmol)、哌啶-4-醇(37mg, 0.36mmol)和N,N-二异丙基乙胺(71mg, 0.55mmol)的混合物在100℃下搅拌64h。将反应混合物浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(碱),得到1-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)哌啶-4-醇(6.5mg, 8%),为白色固体。 $^1H$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.29 (s, 1H), 8.47-8.35 (m, 3H), 7.87 (dt,  $J=7.0, 5.0$ Hz, 4H), 7.77 (d,  $J=2.2$ Hz, 1H), 7.52 (t,  $J=7.8$ Hz, 1H), 6.70 (d,  $J=2.2$ Hz, 1H), 4.72 (d,  $J=4.3$ Hz, 1H), 4.28 (d,  $J=13.6$ Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.73 (s, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.26 (t,  $J=10.2$ Hz, 2H), 1.82 (s, 2H), 1.39 (d,  $J=9.5$ Hz, 2H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 458.3  $[M+H]^+$ 。

[0533] 实施例39.5-甲氧基-6-(3-(4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物47)的合成:



[0534]

[0535] 步骤1: 3-碘-4-甲氧基-1H-吡唑的合成。

[0536] 将N,N-二甲基甲酰胺(50mL)中的4-甲氧基-1H-吡唑(600mg,6.0mmol)、N-碘代琥珀酰亚胺(1.08g,4.8mmol)的混合物在氮气氛围,25℃下搅拌24h。将反应混合物过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=12:78),得到3-碘-4-甲氧基-1H-吡唑(800mg,60%),为白色固体。LCMS (ESI) m/z:225.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0537] 步骤2:3-碘-4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑的合成。

[0538] 在0℃下,向四氢呋喃(25mL)中的3-碘-4-甲氧基-1H-吡唑(800mg,3.57mmol)的溶液中逐份加入氢化钠(60%,171.36mg,4.28mmol)。加入后,将混合物再搅拌30min。然后将其过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=1:4),得到3-碘-4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑(194mg,19%),为白色固体。LCMS (ESI) m/z:239.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0539] 步骤3:3-(3-溴苯基)-4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑的合成。

[0540] 将1,4-二噁烷/水(5mL/1mL)中的3-碘-4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑(194mg,0.82mmol)、(3-溴苯基)硼酸(165mg,0.82mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)二氯甲烷络合物(66mg,0.082mmol)和碳酸铯(668mg,2.05mmol)的混合物在氩气氛围下在90℃下搅拌16h。浓缩混合物,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=10:1),得到3-(3-溴苯基)-4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑(140mg,64%),为白色固体。LCMS (ESI) m/z:269.0 [M+H]<sup>+</sup>。

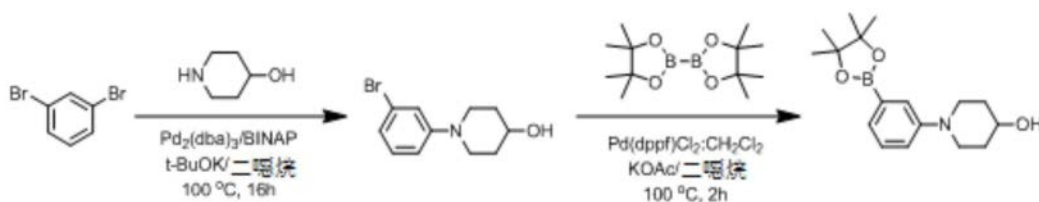
[0541] 步骤4:4-甲氧基-1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑的合成。

[0542] 将1,4-二噁烷(5mL)中的3-(3-溴苯基)-4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑(140mg,0.52mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钡(II)二氯甲烷络合物(21mg,0.026mmol)、乙酸钾(153mg,1.56mmol)和双(频哪醇合)二硼(172mg,3.7mmol)的混合物在110℃下搅拌16h。将混合物过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=4:1),得到4-甲氧基-1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑,为淡黄色油状物(100mg,61%)。LCMS (ESI) m/z:315.3 [M+H]<sup>+</sup>。

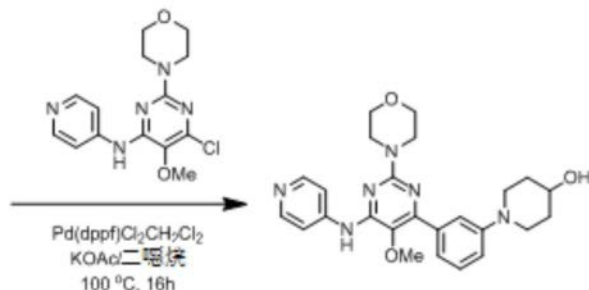
[0543] 步骤5:5-甲氧基-6-(3-(4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0544] 将1,4-二噁烷(5mL)和水(1mL)中的4-甲氧基-1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(100mg,0.31mmol)、6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(100mg,0.31mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钡(II)二氯甲烷络合物(25mg,0.03mmol)和碳酸铯(245mg,0.75mmol)的混合物在氩气氛围下在90℃下搅拌16h。将反应混合物过滤,并将滤液进行制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10μm,流动相乙腈/水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>和NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)],得到5-甲氧基-6-(3-(4-甲氧基-1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(58.8mg,40%),为黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.35(s,1H),8.63(s,1H),8.41(d,J=6.2Hz,2H),7.91(t,J=7.6Hz,2H),7.88(d,J=6.3Hz,2H),7.63(s,1H),7.50(t,J=7.8Hz,1H),3.82(s,3H),3.78(s,3H),3.71(d,J=1.8Hz,8H),3.47(s,3H)。LCMS (ESI) m/z:474.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0545] 实施例40.1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)哌啶-4-醇(化合物48)的合成:



[0546]



[0547] 步骤1:1-(3-溴苯基)哌啶-4-醇的合成。

[0548] 将1,4-二噁烷(40mL)中的1,3-二溴苯(2.34g,10.0mmol)、哌啶-4-醇(870mg,10.0mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(458mg,0.5mmol)、1,1'-联萘-2,2'-二苯基膦(622mg,1.0mmol)和叔丁醇钾(2.24g,20.0mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌16h。将混合物倒入水中并用二氯甲烷萃取(200mL\*2)。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的10%甲醇),得到1-(3-溴苯基)哌啶-4-醇(300mg,12%),为红色油状物。LCMS (ESI)  $m/z$ : 255.9/257.9  $[M+H]^+$ 。

[0549] 步骤2:1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌啶-4-醇的合成。

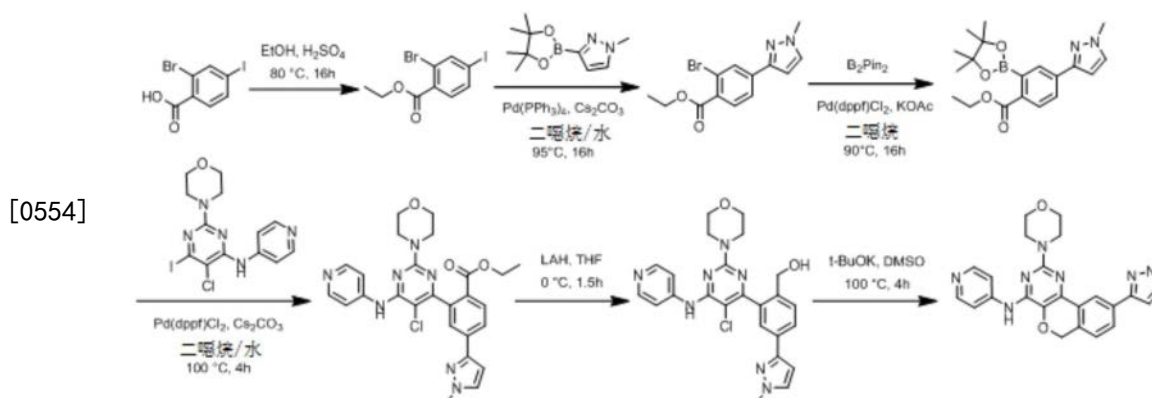
[0550] 将二噁烷(10mL)中的1-(3-溴苯基)哌啶-4-醇(275mg,1.1mmol)、4,4,4',4',5,5',5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(559mg,2.2mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(90mg,0.11mmol)和乙酸钾(216mg,2.2mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌4h。将混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取(150mL\*2)。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的5%甲醇),得到1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌啶-4-醇(250mg,74.5%),为棕色油状物。LCMS (ESI)  $m/z$ : 304.2  $[M+H]^+$ 。

[0551] 步骤3:1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)哌啶-4-醇的合成。

[0552] 将二噁烷(6mL)和水(0.6mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(160mg,0.5mmol)、1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌啶-4-醇(227mg,0.75mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(41mg,0.05mmol)和碳酸铯(325mg,1.0mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌2h。将混合物倒入水中并用二氯甲烷萃取(100mL\*2)。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的15%甲醇)和制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10um,流动相乙腈/水(10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )],得到1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)哌啶-4-醇(45.5mg,19.6%),为浅黄色固体。 $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.29 (s, 1H), 8.40 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 2H), 7.87 (d,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H), 7.58 (s, 1H), 7.39 (d,  $J=7.7\text{Hz}$ , 1H), 7.31 (t,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H), 7.06 (dd,  $J=8.2, 2.0\text{Hz}$ , 1H), 4.69 (d,  $J=4.3\text{Hz}$ , 1H),

3.70-3.67 (m, 9H), 3.58-3.53 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 2.93-2.86 (m, 2H), 1.86-1.81 (m, 2H), 1.53-1.44 (m, 2H); LCMS (ESI)  $m/z$ : 463.2  $[M+H]^+$ .

[0553] 实施例41.9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-异色烯并[4,3-d]嘧啶-4-胺(化合物49)的合成:



[0555] 步骤1:2-溴-4-碘苯甲酸乙酯的合成。

[0556] 向乙醇(100mL)中的2-溴-4-碘苯甲酸(5g, 15.3mmol)溶液中加入硫酸(5mL), 并将反应混合物在80℃下搅拌16h。将混合物浓缩, 并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚中的5%至10%乙酸乙酯), 得到2-溴-4-碘苯甲酸乙酯(5.3g, 97.8%), 为黄色油状物。LCMS (ESI)  $m/z$ : 355.0, 357.0  $[M+H]^+$ 。

[0557] 步骤2:2-溴-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯甲酸乙酯的合成。

[0558] 将1,4-二噁烷/水(50mL/5mL)中的2-溴-4-碘苯甲酸乙酯(2g, 5.63mmol)、1-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(1g, 4.8mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.46g, 0.56mmol)和碳酸铯(4.6g, 14.1mmol)的混合物在氩气氛下在85℃下搅拌16h。将其浓缩, 将残留物用水(20mL)稀释并用二氯甲烷萃取(20mL×2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将残留物进行快速色谱(用石油醚中的30%至60%乙酸乙酯洗脱), 得到2-溴-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯甲酸乙酯(1.45g, 83.6%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 310.6  $[M+H]^+$ 。

[0559] 步骤3:4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯甲酸乙酯的合成。

[0560] 将1,4-二噁烷(25mL)中的2-溴-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯甲酸乙酯(1.1g, 3.57mmol)、双(频哪醇合)二硼(1.36g, 5.36mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.29g, 0.36mmol)和乙酸钾(0.87g, 8.92mmol)的混合物在90℃下搅拌16h。然后将混合物浓缩, 并将残留物进行快速色谱(用石油醚中的30%至60%的乙酸乙酯洗脱), 得到4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯甲酸乙酯(1g, 78.7%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 357.1  $[M+H]^+$ 。

[0561] 步骤4:2-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯甲酸乙酯的合成。

[0562] 向1,4-二噁烷/水(7mL/2mL)中的5-氯-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.26g, 0.62mmol)和4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯甲酸乙酯(0.27g, 0.75mmol)的溶液中添加碳酸铯(0.41g, 1.25mmol)和[1,

1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(II) (0.044g, 0.06mmol)。将混合物在氩气氛下在90℃下搅拌2h并冷却。将其倒入冰水中,并将混合物用乙酸乙酯萃取(15mL\*3)。将合并的有机层用盐水洗涤,经硫酸钠干燥并浓缩。使残留物进行硅胶快速色谱(二氯甲烷:甲醇=10:1),得到2-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯甲酸乙酯(0.19g, 59%),为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 520.3  $[M+H]^+$ 。

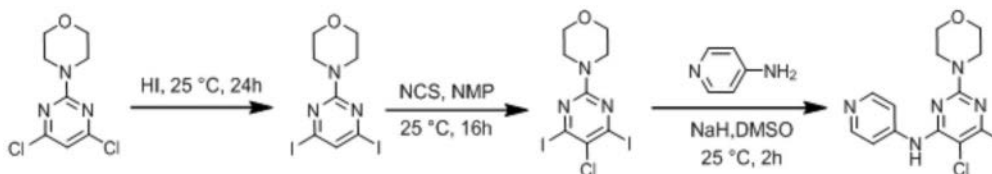
[0563] 步骤5: (2-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)甲醇的合成。

[0564] 在0℃下,将氢化铝锂的溶液(THF中1.0M, 2.56mL, 2.56mmol)加入无水四氢呋喃(8mL)中的2-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯甲酸乙酯(190mg, 0.37mmol)溶液中,且将所得混合物升温和在氮气下在25℃下搅拌1.5h。然后通过冰浴冷却下小心加入硫酸钠十水合物淬灭反应。向反应混合物中加入四氢呋喃(50mL),搅拌15分钟,过滤,且固体用四氢呋喃(50mL)洗涤,收集滤液。将合并的滤液浓缩,得到(2-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)甲醇(140mg, 80%),为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 478.3  $[M+H]^+$ 。

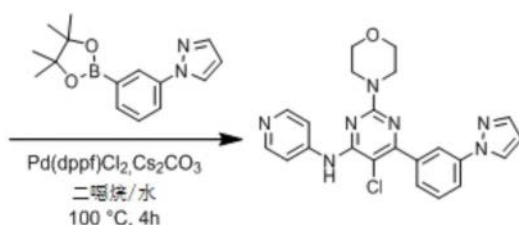
[0565] 步骤6: 9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-异色烯并[4,3-d]嘧啶-4-胺的合成。

[0566] 将二甲亚砜(6mL)中的(2-(5-氯-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-4-基)-4-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)甲醇(0.11g, 0.23mmol)和叔丁醇钾(0.92mL, 0.92mmol, 在四氢呋喃中)的混合物在100℃下搅拌4h。然后将混合物过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um; 21.2x250mm 120A, 流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到9-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-6H-异色烯并[4,3-d]嘧啶-4-胺(12.7mg, 13%),为黄色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.32 (s, 1H), 8.39 (d,  $J$ =6.1Hz, 3H), 7.88 (dd,  $J$ =9.1, 3.2Hz, 3H), 7.77 (d,  $J$ =2.1Hz, 1H), 7.38 (d,  $J$ =7.9Hz, 1H), 6.78 (d,  $J$ =2.2Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.75 (d,  $J$ =4.6Hz, 4H), 3.72 (d,  $J$ =4.7Hz, 4H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 442.3  $[M+H]^+$ 。

[0567] 实施例42.6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-氯-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物50)的合成:



[0568]



[0569] 步骤1: 4-(4,6-二碘嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0570] 将4-(4,6-二氯嘧啶-2-基)吗啉(3g, 12.8mmol)和氢碘酸(30mL)的混合物在25℃下搅拌24h。将反应混合物过滤,将固体溶于二氯甲烷和乙酸乙酯中,用水洗涤并浓缩。将残

留物进行硅胶柱色谱(用二氯甲烷:甲醇=10:1洗脱),得到4-(4,6-二碘嘧啶-2-基)吗啉,为黄色固体(2.5g,47%)。LCMS (ESI)  $m/z$ :418.1  $[M+H]^+$ 。

[0571] 步骤2:4-(5-氯-4,6-二碘嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0572] 向1-甲基-2-吡咯烷酮(40mL)中的4-(4,6-二碘嘧啶-2-基)吗啉(2.5g,6mmol)的溶液中逐份加入N-氯代琥珀酰亚胺(1.6g,12mmol)。加入后,将反应混合物在25℃下搅拌16h。将其用乙酸乙酯/水(20mL/20mL)稀释,分离有机层,并将水层用乙酸乙酯(20mL)萃取两次。将合并的有机相用盐水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物进行柱色谱(Biotage,40g硅胶,用石油醚中的20%至30%乙酸乙酯洗脱),得到4-(5-氯-4,6-二碘嘧啶-2-基)吗啉(1.8g,67%),为灰白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ :452.1  $[M+H]^+$ 。

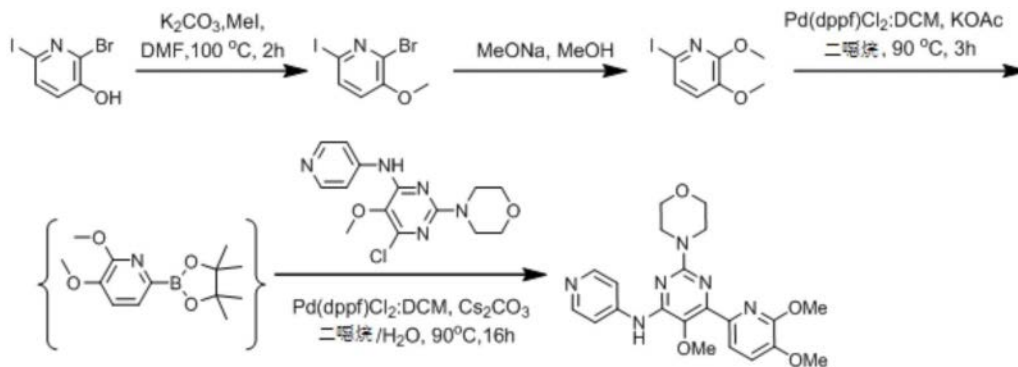
[0573] 步骤3:5-氯-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0574] 将二甲亚砜(5mL)中的吡啶-4-胺(0.21g,2.22mmol)和氢化钠(0.177g,4.43mmol)的混合物在25℃下搅拌0.5h。向所得混合物中加入4-(5-氯-4,6-二碘嘧啶-2-基)吗啉(1g,2.22mmol)并继续搅拌另外2h。然后将混合物倒入冰水中,用乙酸乙酯萃取(15mL\*3)。将合并的有机层用盐水洗涤,经硫酸钠干燥并浓缩。将残留物进行硅胶色谱(二氯甲烷:甲醇=20:1),得到5-氯-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(400mg,43%),为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ :418.1  $[M+H]^+$ 。

[0575] 步骤4:6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-氯-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0576] 在室温下向1,4-二噁烷/水(1.5mL/0.4mL)中的5-氯-6-碘-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.05g,0.12mmol)和1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(0.035g,0.13mmol)的溶液中加入碳酸铯(0.078g,0.24mmol)和1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.007g,0.01mmol)。将所得混合物加热并在90℃下搅拌2h。将其浓缩并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um 21.2×250mm 120A,流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-氯-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺,为黄色固体(28.3mg,54%)。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.25(s,1H), 8.57(d,  $J$ =2.5Hz,1H), 8.46(d,  $J$ =6.3Hz,2H), 8.13(s,1H), 7.96(dt,  $J$ =7.3, 2.1Hz,1H), 7.83-7.79(m,2H), 7.78(d,  $J$ =1.6Hz,1H), 7.64-7.59(m,2H), 6.59-6.56(m,1H), 3.68(s,8H)。LCMS (ESI)  $m/z$ :434.3  $[M+H]^+$ 。

[0577] 实施例43.6-(5,6-二甲氧基吡啶-2-基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物51)的合成:



[0579] 步骤1:2-溴-6-碘-3-甲氧基吡啶的合成。

[0580] 将DMF (40mL) 中的2-溴-6-碘吡啶-3-醇 (1g, 3.36mmol)、碘甲烷 (955mg, 6.72mmol)、碳酸钾 (464mg, 3.36mmol) 的溶液在氮气氛, 100℃下搅拌2h。将混合物冷却至室温, 用水 (30mL) 处理并搅拌0.5h。通过过滤分离所得沉淀并干燥, 得到2-溴-6-碘-3-甲氧基吡啶 (0.92g, 87.5%), 为棕色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 313.9  $[M+H]^+$ 。

[0581] 步骤2: 6-碘-2,3-二甲氧基吡啶的合成。

[0582] 将无水甲醇 (30mL) 中的2-溴-6-碘-3-甲氧基吡啶 (0.92g, 2.94mmol)、甲醇钠 (320mg, 5.9mmol) 的溶液在氮气氛, 100℃下搅拌2h。将混合物冷却至室温, 然后在饱和碳酸氢钠水溶液和二氯甲烷之间分配。将有机相用水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将残留物进行硅胶柱色谱, 用石油醚中的0%至10%乙酸乙酯的线性梯度洗脱, 得到6-碘-2,3-二甲氧基吡啶 (664mg, 85.1%), 为棕色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 266.0  $[M+H]^+$ 。

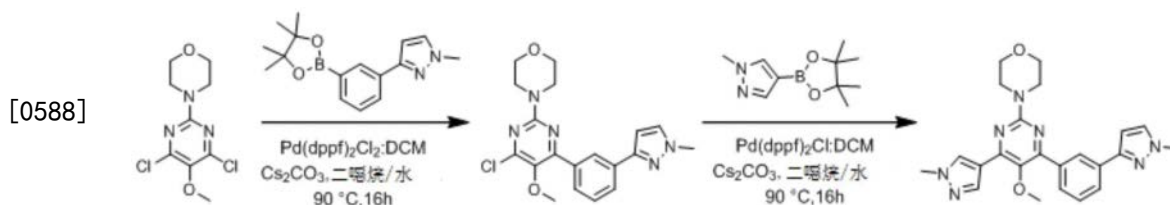
[0583] 步骤3: 3-二甲氧基-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 吡啶的合成。

[0584] 将无水1,4-二噁烷 (10mL) 中的6-碘-2,3-二甲氧基吡啶 (200mg, 0.75mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷) (230mg, 0.9mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物 (61mg, 0.075mmol) 和乙酸钾 (180mg, 1.5mmol) 的溶液在氮气氛, 90℃下搅拌16h。反应混合物不经进一步纯化直接用于下一步骤。LCMS (ESI)  $m/z$ : 266.0  $[M+H]^+$ 。

[0585] 步骤4: 6-(5,6-二甲氧基吡啶-2-基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基) 嘧啶-4-胺的合成。

[0586] 向来自上述步骤的反应混合物中加入6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基) 嘧啶-4-胺 (50mg, 0.156mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II):二氯甲烷络合物 (12mg, 0.015mmol)、碳酸钾 (146mg, 0.45mmol) 和水 (1mL)。将所得混合物在氮气氛, 90℃下搅拌16h。然后将其过滤以除去固体; 将滤液浓缩, 并将残留物进行制备型HPLC (BOSTON pHlex ODS10um 21.2×250mm 120A。流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵), 得到6-(5,6-二甲氧基吡啶-2-基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基) 嘧啶-4-胺 (20.6mg, 31.2%), 为黄色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.31 (s, 1H), 8.40 (s, 2H), 7.88 (d,  $J$ =4.6Hz, 2H), 7.70 (d,  $J$ =8.1Hz, 1H), 7.41 (d,  $J$ =8.2Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.69 (d,  $J$ =6.4Hz, 8H), 3.65 (s, 3H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 425.2  $[M+H]^+$ 。

[0587] 实施例44.4- (5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 苯基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基) 嘧啶-2-基) 吗啉 (化合物52) 的合成:



[0589] 步骤1: 4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基) 苯基) 嘧啶-2-基) 吗啉的合成。

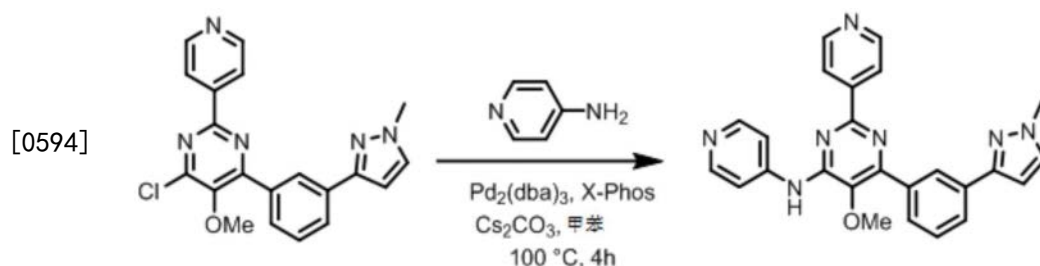
[0590] 将1,4-二噁烷/水 (5mL/1mL) 中的4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基) 吗啉 (90mg, 0.341mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 苯基)-1H-吡

唑(88mg,0.31mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钡(II)二氯甲烷络合物(25mg,0.03mmol)和碳酸铯(245mg,0.75mmol)的混合物在氩气氛,90℃下搅拌16h。将混合物过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸酯=3:1),得到4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(80mg,61%),为白色固体。LCMS(ESI)  $m/z$ :386.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0591] 步骤2:4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

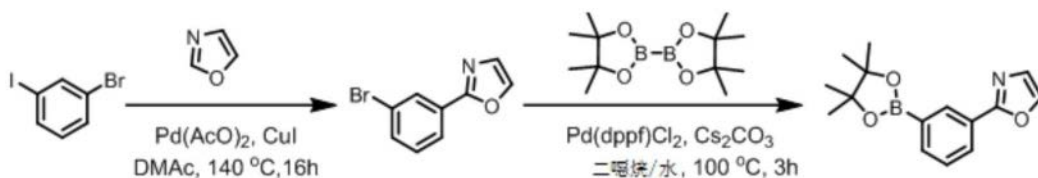
[0592] 将1,4-二噁烷/水(5mL/1mL)中的4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(118mg,0.3mmol)、1-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(62mg,0.3mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钡(II)二氯甲烷络合物(25mg,0.03mmol)和碳酸铯(245mg,0.75mmol)的混合物在氩气氛,90℃下搅拌16h。将混合物过滤,将滤液浓缩,并且将残留物进行制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10μm,流动相乙腈/水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>和NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)],得到4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)嘧啶-2-基)吗啉(15.3mg,12%),为淡黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.48(s,1H),8.42(s,1H),8.15(s,1H),7.89(d,J=7.8Hz,2H),7.77(d,J=2.2Hz,1H),7.53(t,J=7.8Hz,1H),6.74(d,J=2.2Hz,1H),3.94(s,3H),3.91(s,3H),3.75(d,J=4.8Hz,4H),3.71(d,J=4.7Hz,4H),3.40(s,3H)。LCMS(ESI)  $m/z$ :432.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0593] 实施例45.5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N,2-二(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物53)的合成:

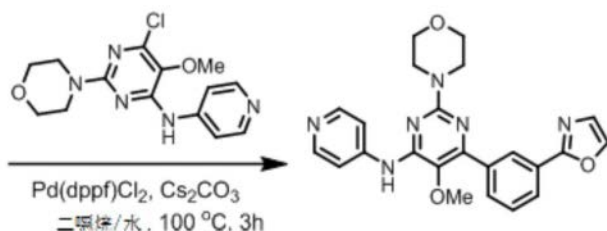


[0595] 将甲苯(4mL)中的4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶(0.08g,0.2mmol)、吡啶-4-胺(0.04g,0.42mmol)、碳酸铯(0.21g,0.64mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(0.02g,0.02mmol)和2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基-1,1'-联苯(0.015g,0.03mmol)的混合物在100℃下搅拌4h。将反应混合物浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10μm21.2×250mm 120A,流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N,2-二(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺,为黄色固体(8.8mg,10%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.79(dd,J=4.5,1.5Hz,2H),8.54(t,J=1.9Hz,2H),8.53(d,J=1.4Hz,1H),8.27(dd,J=4.5,1.6Hz,2H),8.05(dd,J=4.8,1.5Hz,2H),8.03(d,J=7.9Hz,1H),7.95(d,J=7.8Hz,1H),7.79(d,J=2.2Hz,1H),7.62(t,J=7.8Hz,1H),6.78(d,J=2.2Hz,1H),6.07(s,1H),3.92(s,3H),3.62(s,3H)。LCMS(ESI)  $m/z$ :435.8[M+H]<sup>+</sup>。

[0596] 实施例46.5-甲氧基-2-吗啉代-6-(3-(噁唑-2-基)苯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物54)的合成



[0597]



[0598] 步骤1: 2-(3-(溴苯基)呋唑)的合成。

[0599] 将N,N-二甲基乙酰胺 (25mL) 中的1-溴-3-碘苯 (0.5g, 1.77mmol)、呋唑 (0.12g, 1.77mmol)、乙酸钯 (0.04g, 0.18mmol)、碘化铜(I) (0.068g, 0.36mmol) 的混合物在氩气氛, 140℃下搅拌16h。将反应混合物浓缩, 将残留物用水 (20mL) 稀释并用二氯甲烷萃取 (20mL × 2)。将合并的有机相用盐水 (20mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。残留物通过快速色谱 (用石油醚中的30%至60%乙酸乙酯洗脱) 纯化, 得到2-(3-(溴苯基)呋唑) (0.3g, 76.7%), 为油状物。LCMS (ESI) m/z: 223.8 [M+H]<sup>+</sup>。

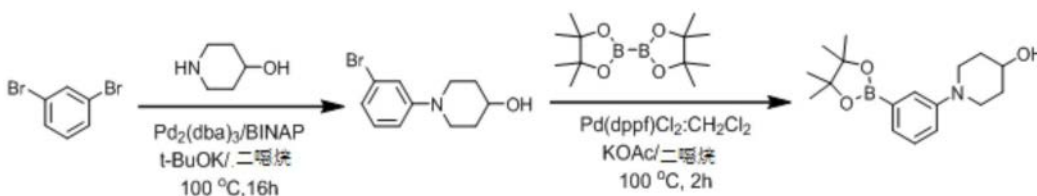
[0600] 步骤2: 2-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)呋唑的合成。

[0601] 将1,4-二噁烷/水 (10mL × 2mL) 中的2-(3-(溴苯基)呋唑) (250mg, 1.12mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷) (320mg, 1.12mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(II)二氯甲烷络合物 (92mg, 0.112mmol) 和碳酸铯 (1.08g, 3.36mmol) 的混合物在氩气氛, 100℃下搅拌3h。将混合物浓缩, 将残留物用水 (20mL) 稀释并用乙酸乙酯 (20mL × 2) 萃取。将合并的有机相用盐水 (20mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将残留物通过制备型HPLC (碱) 纯化, 得到2-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)呋唑 (180mg, 59%), 为白色固体。LCMS (ESI) m/z: 271.9 [M+H]<sup>+</sup>。

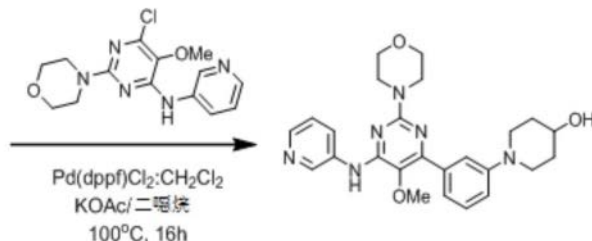
[0602] 步骤3: 5-甲氧基-2-吗啉代-6-(3-(呋唑-2-基)苯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0603] 将1,4-二噁烷/水 (15mL/3mL) 中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺 (100mg, 0.31mmol)、2-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)呋唑 (84mg, 0.31mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物 (25mg, 0.031mmol) 和碳酸铯 (0.3g, 0.93mmol) 的混合物在氩气氛, 100℃下搅拌3h。将混合物浓缩, 将残留物用水 (20mL) 稀释并用乙酸乙酯萃取 (20mL × 2)。将合并的有机相用盐水 (20mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将残留物进行制备型HPLC (碱), 得到5-甲氧基-2-吗啉代-6-(3-(呋唑-2-基)苯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺 (23.4mg, 17%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.41 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.42 (s, 2H), 8.27 (s, 1H), 8.17 (d, J = 7.7Hz, 1H), 8.09 (d, J = 7.6Hz, 1H), 7.89 (s, 2H), 7.69 (t, J = 7.7Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 3.71 (s, 8H), 3.48 (s, 3H)。LCMS (ESI) m/z: 430.8 [M+H]<sup>+</sup>。

[0604] 实施例47.1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)哌啶-4-醇 (化合物55) 的合成:



[0605]



[0606] 步骤1:1-(3-溴苯基)哌啶-4-醇的合成。

[0607] 将1,4-二噁烷(40mL)中的1,3-二溴苯(2.34g,10.0mmol)、哌啶-4-醇(870mg,10.0mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(458mg,0.5mmol)、1,1'-联萘基-2,2'-二苯基膦(622mg,1.0mmol)和叔丁醇钾(2.24g,20.0mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌16h。然后将混合物倒入水中并用二氯甲烷萃取(200mL\*2)。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的10%甲醇),得到1-(3-溴苯基)哌啶-4-醇(300mg,12%),为红色油状物。LCMS (ESI)  $m/z$ : 255.9/257.9[M+H]<sup>+</sup>。

[0608] 步骤2:1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌啶-4-醇的合成。

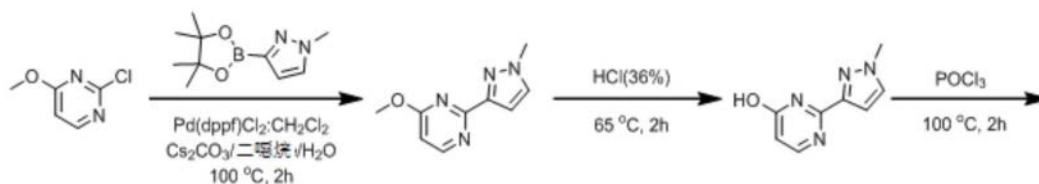
[0609] 将1,4-二噁烷(10mL)中的1-(3-溴苯基)哌啶-4-醇(275mg,1.1mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(559mg,2.2mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(90mg,0.11mmol)和乙酸钾(216mg,2.2mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌4h。然后将混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取(150mL\*2)。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的5%甲醇),得到1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌啶-4-醇(250mg,74.5%),为棕色油状物。LCMS (ESI)  $m/z$ : 304.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0610] 步骤3:1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)哌啶-4-醇的合成。

[0611] 将1,4-二噁烷/水(5mL/0.5mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(100mg,0.38mmol)、1-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)哌啶-4-醇(136mg,0.47mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(25mg,0.03mmol)和碳酸铯(201mg,0.62mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌16h。然后将混合物倒入水中并用二氯甲烷萃取(100mL\*2)。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的15%甲醇),得到不纯的产物,将其进一步进行制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10um,流动相乙腈/水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>和NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)],得到1-(3-(5-甲氧基-2-吗啉代-6-(吡啶-3-基氨基)嘧啶-4-基)苯基)哌啶-4-醇(23.5mg,16%),为灰白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.12(s,1H),8.99(s,1H),8.34-8.16(m,2H),7.58(s,1H),7.35(m,3H),7.05(d,J=7.9Hz,1H),4.71(d,J=4.1Hz,1H),3.71-3.37(m,14H),2.90(t,J=11.2Hz,2H),1.84(d,J=11.2Hz,2H),1.50(d,J=9.5Hz,2H);LCMS (ESI)  $m/z$ :

463.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0612] 实施例48.5-甲氧基-2'-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-4,4'-联嘧啶-6-胺(化合物56)的合成:



[0613]



[0614] 步骤1:4-甲氧基-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶的合成。

[0615] 将二噁烷/水(50mL/6.0mL)中的2-氯-4-甲氧基嘧啶(1.44g,10.0mmol)、1-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(2.08g,10.0mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(163mg,0.2mmol)和碳酸铯(6.5g,20.0mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌2h。将所得混合物倒入水中并用乙酸乙酯萃取(200mL\*2)。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚中的50%乙酸乙酯),得到4-甲氧基-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶(1.2g,63%),为粘性液体。LCMS (ESI) m/z:191.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0616] 步骤2:2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-醇的合成。

[0617] 将4-甲氧基-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶(1g,5.2mmol)和浓盐酸(10.0mL)的混合物在65℃下搅拌2h。将混合物倒入碎冰中,用固体碳酸氢钠碱化并用二氯甲烷萃取(150mL\*5)。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的20%甲醇),得到2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-醇(650mg,54.7%),为灰色固体。LCMS (ESI) m/z:177.0 [M+H]<sup>+</sup>。

[0618] 步骤3:4-氯-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶的合成。

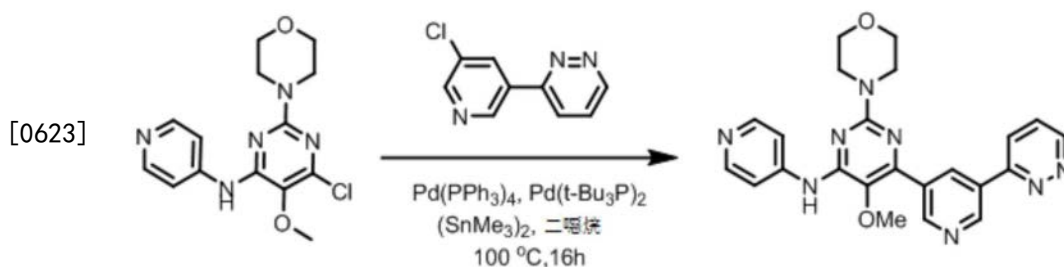
[0619] 将2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-醇(600mg,3.4mmol)和磷酸氯(10.0mL)的混合物在100℃下搅拌2h。将混合物浓缩,将残留物倒入碎冰中并用二氯甲烷(200mL×3)萃取。将合并的有机相浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的5%甲醇),得到4-氯-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶(450mg,58.1%),为灰色固体。LCMS (ESI) m/z:194.9/196.9 [M+H]<sup>+</sup>。

[0620] 步骤4:5-甲氧基-2'-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-4,4'-联嘧啶-6-胺的合成。

[0621] 将二噁烷(6mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(150mg,0.46mmol)、1,1,1,2,2,2-六甲基二锡烷(229mg,0.7mmol)和双(三苯基膦)氯化钯(II)(28mg,0.04mmol)的混合物在氮气氛,100℃下搅拌2h。向所得混合物中加入4-氯-2-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)嘧啶(90mg,0.46mmol)和双(三叔丁基膦)钯(20mg,0.04mmol)并在100℃下继续搅拌另外2h。将其浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷的10%甲醇),然后进

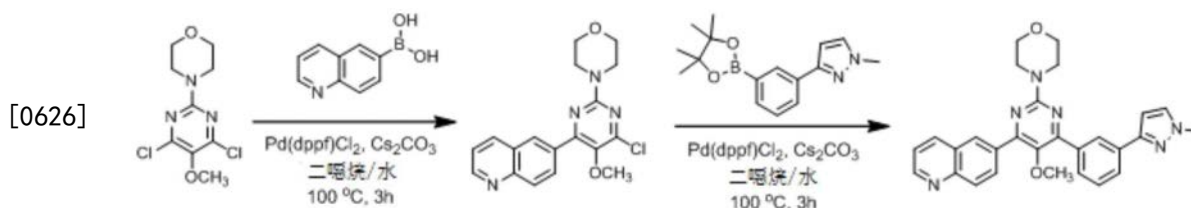
行制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10um,流动相乙腈/水(10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )],得到5-甲氧基-2'-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)-4,4'-联嘧啶-6-胺(9.5mg,4.5%),为黄色固体。 $^1\text{H}$  NMR(400MHz,DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.46(s,1H),8.97(d,J=5.1Hz,1H),8.44(d,J=6.3Hz,2H),7.92-7.88(m,2H),7.83(m,2H),6.95(d,J=2.2Hz,1H),3.96(s,3H),3.80(s,3H),3.69(s,8H);LCMS(ESI)m/z:445.8[M+H] $^+$ 。

[0622] 实施例49.5-甲氧基-2-吗啉代-6-(5-(哒嗪-3-基)吡啶-3-基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物57)的合成。



[0624] 将无水1,4-二噁烷(10mL)中的6-氯-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(100mg,0.31mmol)、3-(5-氯吡啶-3-基)哒嗪(70mg,0.36mmol)、四(三苯基膦)钯(34mg,0.06mmol)、双(三叔丁基膦)钯(0)(30mg,0.03mmol)和六甲基二锡烷(153mg,0.46mmol)溶液在氩气氛,100℃下搅拌16小时。将所得混合物过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um21.2×250mm 120A.流动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到5-甲氧基-2-吗啉代-6-(5-(哒嗪-3-基)吡啶-3-基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(12.7mg,9.26%),为黄色固体。 $^1\text{H}$  NMR(400MHz,DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.45(s,1H),9.39(d,J=2.2Hz,1H),9.32(dd,J=4.0,1.8Hz,2H),9.09(t,J=2.1Hz,1H),8.42(dd,J=10.3,3.2Hz,3H),7.89(dd,J=7.7,5.8Hz,3H),3.72(s,8H),3.53(s,3H).LCMS(ESI)m/z:443.1[M+H] $^+$ 。

[0625] 实施例50.4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(喹啉-6-基)嘧啶-2-基)吗啉(化合物58)的合成:



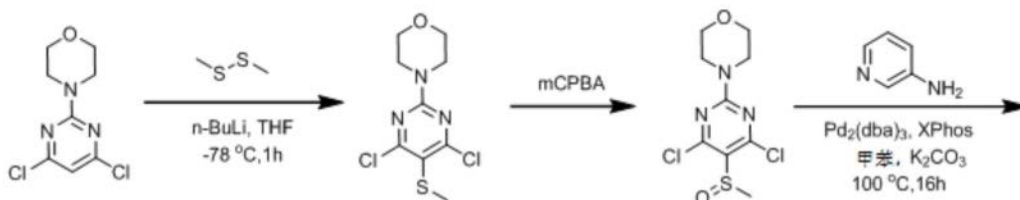
[0627] 步骤1:4-(4-氯-5-甲氧基-6-(喹啉-6-基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0628] 将1,4-二噁烷/水(20mL/3mL)中的4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉(0.4g,1.70mmol)、喹啉-6-基硼酸(0.29g,1.70mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.14g,0.17mmol)和碳酸铯(1.39g,4.26mmol)的混合物在100℃下搅拌2h。将反应混合物浓缩,并将残留物用水(20mL)稀释并用二氯甲烷萃取(20mL×2)。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。对残留物进行快速色谱(用石油醚中的30%至60%的乙酸乙酯洗脱),得到4-(4-氯-5-甲氧基-6-(喹啉-6-基)嘧啶-2-基)吗啉(0.2g,33.1%),为淡黄色固体。LCMS(ESI)m/z:356.8[M+H] $^+$ 。

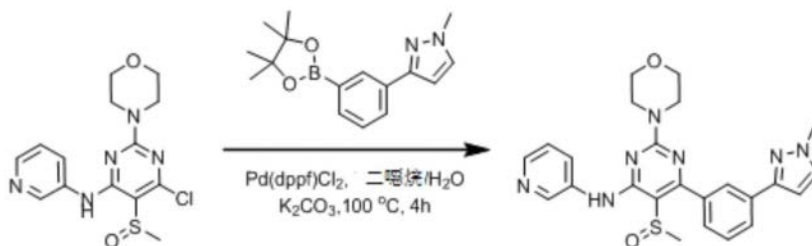
[0629] 步骤2:4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(喹啉-6-基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0630] 将1,4-二噁烷/水(10mL/2mL)中的4-(4-氯-5-甲氧基-6-(喹啉-6-基)嘧啶-2-基)吗啉(200mg,0.56mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(160mg,0.56mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(46mg,0.056mmol)和碳酸铯(0.54g,1.68mmol)的混合物在100℃下搅拌32h。将混合物浓缩,将残留物用水(20mL)稀释并用乙酸乙酯(20mL×2)萃取。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得残留物进行制备型HPLC(碱),得到4-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(喹啉-6-基)嘧啶-2-基)吗啉(59.6mg,22.3%),为黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.99(d,J=4.1Hz,1H),8.76(s,1H),8.57(d,J=8.0Hz,1H),8.48(s,1H),8.44(m,1H),8.15(d,J=8.9Hz,1H),7.98-7.91(m,2H),7.78(d,J=2.0Hz,1H),7.56(t,J=7.7Hz,1H),6.76(d,J=2.1Hz,1H),3.92(s,3H),3.81(d,J=4.1Hz,4H),3.75(d,J=4.0Hz,4H),3.27(s,3H)。LCMS(ESI)m/z:478.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0631] 实施例51.6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-5-(甲基亚磺酰基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(化合物59)的合成:



[0632]



[0633] 步骤1:4-(4,6-二氯-5-(甲硫基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0634] 在-78℃向四氢呋喃(20mL)中的4-(4,6-二氯嘧啶-2-基)吗啉(2.4g,10.2mmol)溶液中加入正丁基锂(8mL,20.4mmol)。将所得混合物在-78℃下搅拌1h,然后加入1,2-二甲基二硫烷(964mg,10.2mmol),并将其在-78℃下再搅拌1h。然后将反应用水(15mL)淬灭并将混合物用乙酸乙酯萃取(20mL×3)。将有机层合并,用盐水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物进行硅胶快速色谱(石油醚:乙酸乙酯=75:25),得到4-(4,6-二氯-5-(甲硫基)嘧啶-2-基)吗啉,为黄色油状物(1.2g,42.5%)。LCMS(ESI)m/z:279.9[M+H]<sup>+</sup>。

[0635] 步骤2:4-(4,6-二氯-5-(甲基亚磺酰基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0636] 向二氯甲烷(10mL)中的4-(4,6-二氯-5-(甲硫基)嘧啶-2-基)吗啉(250mg,0.896mmol)溶液中加入3-氯苯过氧酸(154mg,0.89mmol),并将所得混合物在室温下搅拌8h。然后将反应用水(15mL)淬灭并将混合物用乙酸乙酯萃取(20mL×3)。将有机层合并,用盐水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物进行硅胶快速色谱(石油醚:乙酸乙酯=75:25),得到4-(4,6-二氯-5-(甲基亚磺酰基)嘧啶-2-基)吗啉,为黄色固体。(215mg,81.1%)。LCMS(ESI)m/z:296.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0637] 步骤3:6-氯-5-(甲基亚磺酰基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺的合成。

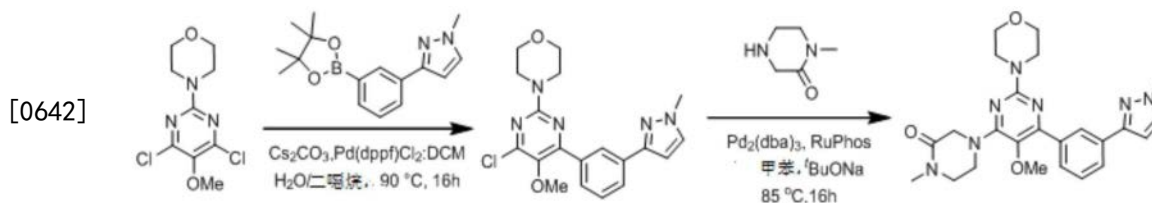
[0638] 将甲苯(10mL)中的4-(4,6-二氯-5-(甲基亚磺酰基)嘧啶-2-基)吗啉(215mg,

0.726mmol)、吡啶-3-胺(68mg,0.726mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(30mg,0.05mmol)、2-(二环己基膦基)-2',4',6'-三异丙基联苯(56mg,0.06mmol)和碳酸钾(201mg,1.45mmol)的混合物在85℃下搅拌16h。然后将反应用水(15mL)淬灭并用乙酸乙酯萃取(20mL\*3)。将有机层合并,用盐水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物进行硅胶快速色谱(石油醚:乙酸乙酯=75:25),得到6-氯-5-(甲基亚磺酰基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺,为黄色固体(180mg,70.3%)。LCMS(ESI)m/z:354.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0639] 步骤4:6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-5-(甲基亚磺酰基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0640] 向1,4-二噁烷(5mL)和水(5mL)中的6-氯-5-(甲基亚磺酰基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(180mg,0.508mmol)的溶液中加入1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(224mg,0.792mmol)、碳酸钾(147mg,1.05mmol)和二氯[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]钯(II)二氯甲烷络合物(50mg,0.196mmol)。将所得混合物在90℃下搅拌2h。将所得混合物过滤,用水(10mL)稀释并用乙酸乙酯萃取(10mL\*3)。将有机层合并,用盐水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物进行制备型HPLC(0.05%碳酸氢铵:乙腈=5%~95%),得到6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-5-(甲基亚磺酰基)-2-吗啉代-N-(吡啶-3-基)嘧啶-4-胺(26.6mg,28.5%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ10.32(s,1H),8.78(d,J=2.4Hz,1H),8.31(dd,J=4.6,1.2Hz,1H),8.04(ddd,J=8.3,2.6,1.5Hz,1H),7.92-7.81(m,2H),7.76(d,J=2.2Hz,1H),7.52-7.33(m,3H),6.76(d,J=2.3Hz,1H),3.90(s,3H),3.74(s,4H),3.67(s,4H),2.98(s,3H)。LCMS(ESI)m/z:475.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0641] 实施例52.4-(5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)-1-甲基哌嗪-2-酮(化合物60)的合成:



[0643] 步骤1:4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

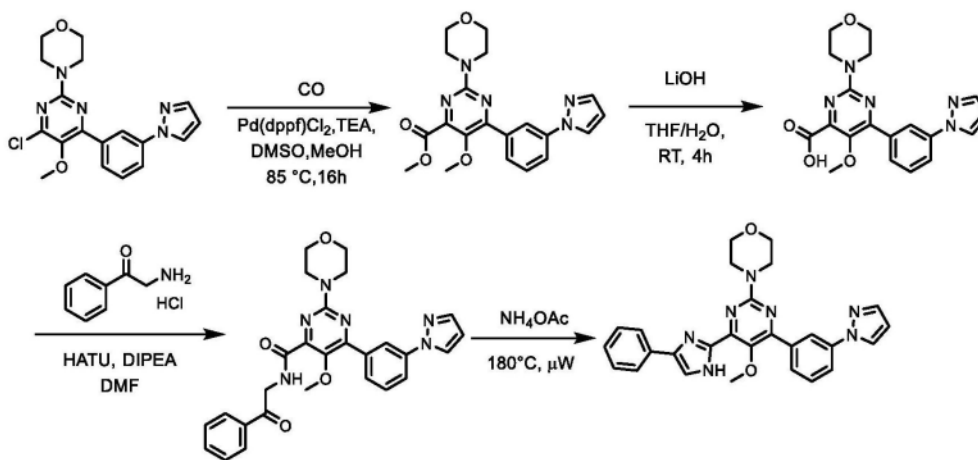
[0644] 将在1,4-二噁烷/水(20mL/4mL)中的4-(4,6-二氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉(782mg,3mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(852mg,3mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(245mg,0.3mmol)和碳酸铯(2445mg,7.5mmol)在氩气氛,90℃下搅拌16h。将反应混合物过滤以除去固体,将滤液浓缩,并将残留物进行硅胶柱色谱(石油醚:乙酸酯=3:1),得到4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-2-基)吗啉(523mg,45%),为白色固体。LCMS(ESI)m/z:386.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0645] 步骤2:4-(5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)-1-甲基哌嗪-2-酮的合成。

[0646] 将甲苯(10mL)中的4-(4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)嘧啶-

2-基)吗啉(153.5mg,0.4mmol)、1-甲基哌嗪-2-酮(45mg,0.4mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(37mg,0.04mmol)、2-二环己基膦基-2',6'-二-异丙氧基-1,1-联苯(37mg,0.08mmol)和叔丁醇钠(115mg,4.14mmol)的混合物在氩气氛,85℃下搅拌16h。将反应混合物过滤以除去固体,将滤液浓缩,并将残留物进行制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10um,流动相乙腈/水(10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )],得到4-(5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代嘧啶-4-基)-1-甲基哌嗪-2-酮(64mg,34.5%),为白色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ 8.29(s,1H),7.84-7.74(m,3H),7.47(t, $J=7.7\text{Hz}$ ,1H),6.70(d, $J=2.1\text{Hz}$ ,1H),4.26(s,2H),4.00(t, $J=5.3\text{Hz}$ ,2H),3.90(s,3H),3.65(d, $J=2.3\text{Hz}$ ,8H),3.46(t, $J=5.3\text{Hz}$ ,2H),3.31(s,3H),2.89(s,3H)。LCMS (ESI)  $m/z$ :464.4[M+H] $^+$ 。

[0647] 实施例53.4-(4-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-6-(4-苯基-1H-咪唑-2-基)嘧啶-2-基)吗啉(化合物61)的合成:



[0649] 步骤1:6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸甲酯的合成。

[0650] 向二甲亚砜(8mL)和甲醇(10mL)中的4-(4-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-6-氯-5-甲氧基嘧啶-2-基)吗啉(400mg,1.08mmol)溶液中添加乙酸钯(II)(20mg,0.088mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁(244mg,0.44mmol)和三乙胺(266mg,2.64mmol),并将反应混合物在85℃,一氧化碳气氛下搅拌16小时。将混合物用二氯甲烷萃取(20mL\*2)并用水洗涤(10mL\*2)。将有机层经硫酸钠干燥,过滤并将滤液浓缩。然后将残留物进行硅胶柱色谱(二氯甲烷中的3%甲醇),得到6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸甲酯(130mg,30%)。LCMS (ESI)  $m/z$ :395.9[M+H] $^+$ 。

[0651] 步骤2:6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸的合成。

[0652] 在0℃下向四氢呋喃(5mL)和水(1mL)中的6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4-甲酸甲酯(130mg,0.3mmol)溶液中加入一水合氢氧化锂(25mg,0.6mmol)并将反应混合物在室温下搅拌1h。然后通过加入水(10mL)淬灭混合物,然后过滤混合物以除去固体。将滤液用二氯甲烷萃取(10mL\*3),将合并的有机相经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残留物通过硅胶快速色谱(甲醇:二氯甲烷=1:8)纯化,得到6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸(110mg,90%),为黄色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ :381.8[M+H] $^+$ 。

[0653] 步骤3:6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(2-氧代-2-苯基乙

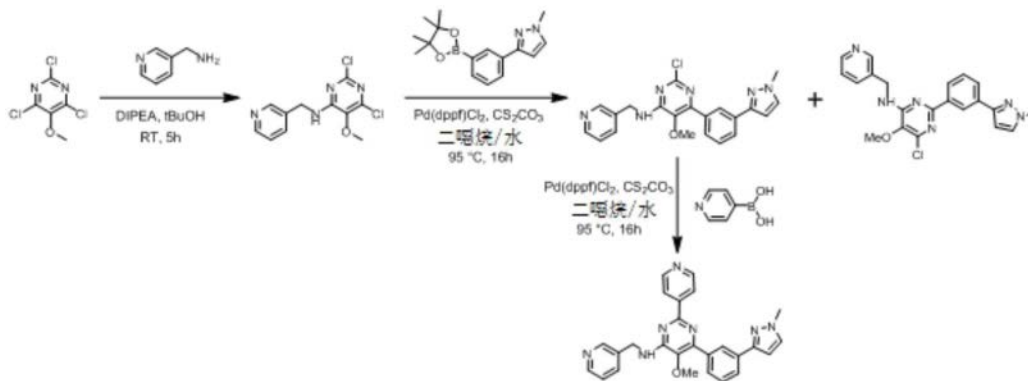
基) 嘧啶-4-甲酰胺的合成。

[0654] 向N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中的6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代嘧啶-4-羧酸(110mg, 0.27mmol)和2-氨基-1-苯基乙-1-酮(40mg, 0.30mmol)的搅拌溶液中加入0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四乙基脲六氟磷酸盐(150mg, 0.4mmol)和N,N-二异丙基乙胺(130mg, 1mmol)。将所得混合物在20℃下搅拌16h并浓缩。将残留物进行快速色谱(二氯甲烷:甲醇=50:1), 得到6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(2-氧代-2-苯基乙基)嘧啶-4-甲酰胺(125mg, 90%), 为白色固体。LCMS (ESI) m/z: 498.7 [M+H]<sup>+</sup>。

[0655] 步骤4: 4-(4-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-6-(4-苯基-1H-咪唑-2-基)嘧啶-2-基)吗啉的合成。

[0656] 将6-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-2-吗啉代-N-(2-氧代-2-苯基乙基)嘧啶-4-甲酰胺(125mg, 0.24mmol)和乙酸铵(500mg, 5.5mmol)的溶液在180℃, 氩气氛下搅拌2h。将其冷却并将混合物用乙酸乙酯(25mL)稀释并用水(25mL)洗涤。将有机层经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下浓缩。将残留物进行硅胶快速色谱(石油醚:乙酸乙酯=1:1), 得到4-(4-(3-(1H-吡唑-1-基)苯基)-5-甲氧基-6-(4-苯基-1H-咪唑-2-基)嘧啶-2-基)吗啉(4.3mg, 4%), 为黄色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.88 (s, 1H), 8.59 (d, J=2.4Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.94 (d, J=8.0Hz, 3H), 7.80 (s, 1H), 7.65 (t, J=7.9Hz, 1H), 7.41 (t, J=7.6Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 3.86 (s, 4H), 3.74 (d, J=4.6Hz, 4H), 3.70 (s, 3H)。LCMS (ESI) m/z: 479.7 [M+H]<sup>+</sup>。

[0657] 实施例53.5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物62)的合成:



[0658]

[0659] 步骤1: 2,6-二氯-5-甲氧基-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺的合成。

[0660] 将叔丁醇(15mL)中的2,4,6-三氯-5-甲氧基嘧啶(0.45g, 2.11mmol)、吡啶-3-基甲胺(0.23g, 2.11mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.55g, 4.22mmol)的混合物在室温下搅拌5h。将其浓缩并将残留物进行柱色谱(Biotage, 40g硅胶, 用在二氯甲烷中的5%至15%的7N氨甲醇洗脱), 得到2,6-二氯-5-甲氧基-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺(0.39g, 65%), 为棕色固体。LCMS (ESI) m/z: 284.8 [M+H]<sup>+</sup>。

[0661] 步骤2: 2-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺和6-氯-5-甲氧基-2-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺的合成。

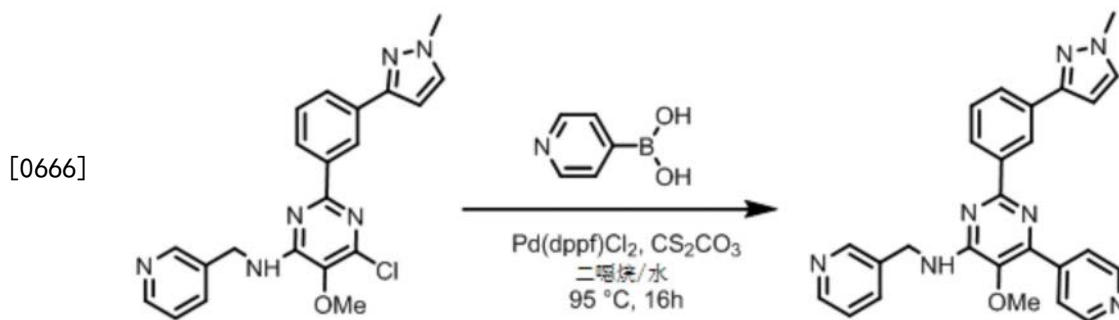
[0662] 将1,4-二噁烷/水(25mL/4mL)中的2,6-二氯-5-甲氧基-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-

4-胺 (0.35g, 1.23mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑 (314mg, 1.1mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(II)二氯甲烷络合物 (100mg, 0.12mmol) 和碳酸铯 (1g, 3.07mmol) 的混合物在 95℃ 下搅拌 16h。将其浓缩, 将残留物用水 (20mL) 稀释并用乙酸乙酯萃取 (20mL × 2)。将合并的有机相用盐水 (20mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将残留物进行制备型 HPLC (碱), 得到 2-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺 (50mg, 11.2%) 和 6-氯-5-甲氧基-2-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺 (100mg, 22.4%), 为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 407.1  $[M+H]^+$ 。

[0663] 步骤3: 5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

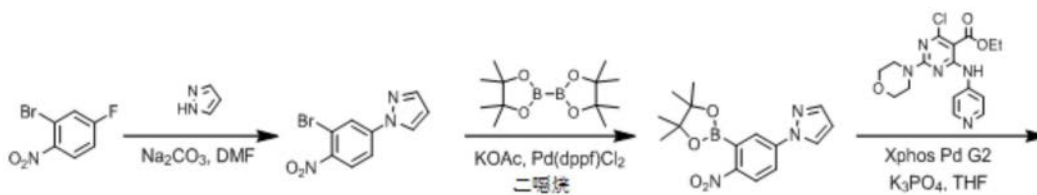
[0664] 将 1,4-二噁烷/水 (5mL/1mL) 中的 2-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺 (40mg, 0.098mmol)、吡啶-4-基硼酸 (15mg, 0.12mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(II)二氯甲烷络合物 (10mg, 0.01mmol) 和碳酸铯 (0.08g, 0.25mmol) 的混合物在 95℃ 下搅拌 16h。将混合物浓缩, 并将残留物进行制备型 HPLC (碱), 得到 5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)-2-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺 (5.9mg, 13.4%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.77-8.66 (m, 3H), 8.62-8.54 (m, 1H), 8.48 (t,  $J$ =1.6Hz, 1H), 8.28 (dd,  $J$ =4.5, 1.6Hz, 2H), 8.04-7.99 (m, 1H), 7.93 (dd,  $J$ =7.8, 1.4Hz, 1H), 7.78 (d,  $J$ =7.8, 1Hz, 1H), 7.53 (t,  $J$ =7.8Hz, 1H), 7.42 (d,  $J$ =2.2Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J$ =7.8, 4.8Hz, 1H), 6.63 (d,  $J$ =2.3Hz, 1H), 5.95 (t,  $J$ =6.0Hz, 1H), 4.89 (d,  $J$ =6.0Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.57 (s, 3H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 450.1  $[M+H]^+$ 。

[0665] 实施例 54.5-甲氧基-2-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)-6-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺 (化合物 63) 的合成:

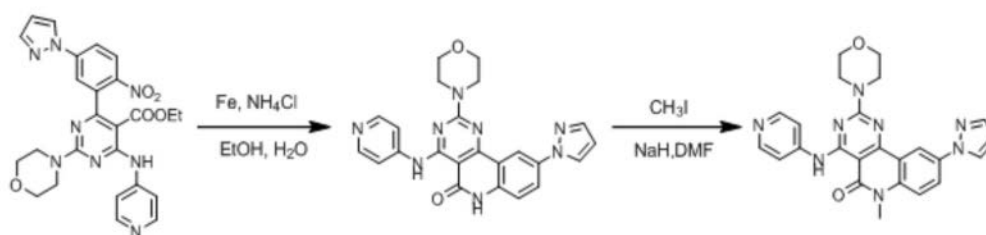


[0667] 将 1,4-二噁烷/水 (8mL/1mL) 中的 6-氯-5-甲氧基-2-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-4-胺 (70mg, 0.17mmol)、吡啶-4-基硼酸 (25mg, 0.21mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(II)二氯甲烷络合物 (14mg, 0.02mmol) 和碳酸铯 (0.14g, 0.43mmol) 的混合物在 95℃ 下搅拌 16h。将混合物浓缩, 并将残留物进行制备型 HPLC (碱), 得到 5-甲氧基-2-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-N-(吡啶-3-基甲基)-6-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺 (22.9mg, 30%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.80-8.73 (m, 3H), 8.70 (s, 1H), 8.44 (dd,  $J$ =4.8, 1.5Hz, 1H), 8.33 (t,  $J$ =6.1Hz, 1H), 8.23 (d,  $J$ =7.8Hz, 1H), 8.04 (dd,  $J$ =4.6, 1.5Hz, 2H), 7.90 (d,  $J$ =7.9, 1H), 7.85 (d,  $J$ =7.8Hz, 1H), 7.78 (d,  $J$ =2.2Hz, 1H), 7.48 (t,  $J$ =7.7Hz, 1H), 7.37 (dd,  $J$ =7.8, 4.8Hz, 1H), 6.73 (d,  $J$ =2.2Hz, 1H), 4.77 (d,  $J$ =6.0Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.60 (s, 3H)。LCMS (ESI)  $m/z$ : 450.1  $[M+H]^+$ 。

[0668] 实施例55.2-吗啉代-9-吡唑-1-基-4-(4-吡啶基氨基)-6H-嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(化合物64)和6-甲基-2-吗啉代-9-吡唑-1-基-4-(4-吡啶基氨基)嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(化合物65)的合成:



[0669]



[0670] 步骤1:1-(3-溴-4-硝基-苯基)吡唑的合成。

[0671] 向DMF (20mL) 中的2-溴-4-氟-1-硝基苯 (2g, 9.09mmol) 溶液中加入1H-吡唑 (619mg, 9.09mmol) 和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2.41g, 22.73mmol)。将所得混合物在100℃下搅拌12h, 然后冷却至15℃并倒入冰水 (50mL) 中。将水相用乙酸乙酯萃取 (50mL\*3), 将合并的有机相用盐水 (10mL) 洗涤, 经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 过滤并浓缩。对残留物进行快速柱色谱 (ISCO 40g 二氧化硅, 石油醚中的0-30% 乙酸乙酯, 20min内的梯度), 得到1-(3-溴-4-硝基-苯基)吡唑 (1.3g, 53%), 为黄色固体。

[0672] 步骤2:1-[4-硝基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼烷-2-基)苯基]吡唑的合成。

[0673] 向二噁烷 (10mL) 中的1-(3-溴-4-硝基-苯基)吡唑 (1.15g, 4.29mmol) 溶液中加入4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (1.31g, 5.15mmol)、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (314mg, 429μmol) 和 $\text{KOAc}$  (1.26g, 12.87mmol)。将所得混合物在80℃下搅拌12h。然后将其过滤以除去固体, 并将滤液浓缩, 得到粗产物。将其通过快速柱色谱纯化 (ISCO 40g 二氧化硅, 石油醚中的0-50% 乙酸乙酯, 20min内的梯度), 得到1-[4-硝基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑 (1g, 74%), 为黄色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$  8.29 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 1H), 8.05 (d,  $J=2.6\text{Hz}$ , 1H), 7.91-7.76 (m, 3H), 6.59-6.52 (m, 1H), 1.28 (s, 12H)。

[0674] 步骤3:2-吗啉代-4-(2-硝基-5-吡唑-1-基-苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酸乙酯的合成。

[0675] 在氮气气氛下向THF (5mL) 中的4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酸乙酯 (200mg, 550μmol) 溶液中加入1-[4-硝基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑 (208mg, 660μmol)、 $\text{K}_3\text{PO}_4$  (350mg, 1.65mmol) 和[2-(2-氨基苯基)苯基]-氯钯、二环己基-[2-(2,6-二甲氧基苯基)苯基]磷烷 (43mg, 55μmol)。将混合物在80℃下搅拌4h, 然后冷却至15℃, 然后倒入冰水 (15mL) 中。将水相用乙酸乙酯萃取 (15mL\*3), 将合并的有机相用盐水 (10mL) 洗涤, 经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 过滤并浓缩。对残余物进行快速柱色谱 (ISCO 10g 二氧化硅, 石油醚中的0-100% 乙酸乙酯, 20min内的梯度), 得到2-吗啉代-4-(2-硝基-5-吡

唑-1-基-苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(340mg,60%),为黄色固体。

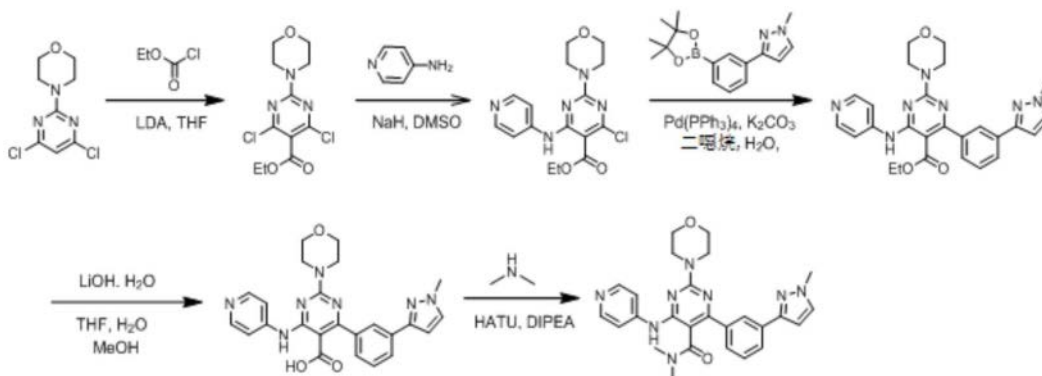
[0676] 步骤4:2-吗啉代-9-吡唑-1-基-4-(4-吡啶基氨基)-6H-嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮的合成。

[0677] 向EtOH(3mL)和H<sub>2</sub>O(1mL)中的2-吗啉代-4-(2-硝基-5-吡唑-1-基-苯基)-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(230mg,445μmol)溶液中添加Fe(249mg,4.45mmol)和NH<sub>4</sub>Cl(238mg,4.45mmol)。将混合物在80℃下搅拌8h,并通过过滤除去铁粉。然后将滤液浓缩,得到2-吗啉代-9-吡唑-1-基-4-(4-吡啶基氨基)-6H-嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(150mg,粗品),为黑色固体。将粗产物(30mg)通过制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10μm,流动相乙腈/水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>和NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)]纯化,得到2-吗啉代-9-吡唑-1-基-4-(4-吡啶基氨基)-6H-嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(2mg,4.75μmol),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ12.34(s,1H),8.75(d,J=2.4Hz,1H),8.58(d,J=2.4Hz,1H),8.50(d,J=5.4Hz,2H),8.13(dd,J=8.9,2.6Hz,1H),7.81-7.66(m,3H),7.48(d,J=8.7Hz,1H),6.59(s,1H),3.80-3.79(m,4H),3.78(d,J=4.4Hz,4H)。LCMS(ESI C23H20N8O2)[M+H]<sup>+</sup>:441.1。

[0678] 步骤5:6-甲基-2-吗啉代-9-吡唑-1-基-4-(4-吡啶基氨基)嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮的合成。

[0679] 在0℃下向DMF(1mL)中的2-吗啉代-9-吡唑-1-基-4-(4-吡啶基氨基)-6H-嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(100mg,227μmol)的溶液中加入NaH(18mg,454μmol,油中的60%悬浮液)。将混合物升温并在25℃下搅拌0.5h。然后将碘甲烷(32mg,227μmol)加入混合物中,并将其在25℃下再搅拌2h。然后将混合物倒入0℃的冰水(2mL)中,过滤并将滤液浓缩,得到粗产物。然后将其溶于DMF(1mL)中,使其静置一天,然后通过过滤除去形成的固体,用H<sub>2</sub>O(1mL\*2)洗涤,并将合并的滤液浓缩,得到6-甲基-2-吗啉代-9-吡唑-1-基-4-(4-吡啶基氨基)嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(9mg,8%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ12.21(bs,1H),8.68(bs,1H),8.56-8.33(m,3H),8.09-7.95(m,1H),7.80(s,1H),7.61(bs,2H),7.48(bs,1H),6.58(bs,1H),4.08-3.38(m,11H)。LCMS(ESI C24H22N8O2)[M+H]<sup>+</sup>:455.1。

[0680] 实施例56.N,N-二甲基-4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(化合物66)的合成:



[0681]

[0682] 步骤1:4,6-二氯-2-吗啉代-嘧啶-5-甲酸乙酯的合成。

[0683] 在-70℃至-60℃,氮气氛围下,将LDA(THF中2M,17.94mL)的溶液逐滴加入无水THF(70mL)中的4-(4,6-二氯嘧啶-2-基)吗啉(7g,29.90mmol)溶液中,并将混合物搅拌1h。然后通过注射器加入氯甲酸乙酯(8.68g,79.98mmol),并将混合物在-70℃至-60℃下再搅拌2h。使内容物升温至25℃并再搅拌0.5h。然后将其倒入冰水(100mL)中,并将水相用乙酸乙酯萃

取(100mL\*3)。将合并的有机相用盐水(50mL)洗涤,用无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残留物进行快速柱色谱(ISCO 40g二氧化硅,石油醚中的0-20%乙酸乙酯,20min内的梯度),得到4,6-二氯-2-吗啉代-嘧啶-5-羧酸乙酯(8.4g,92%),为白色固体。

[0684] 步骤2:4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0685] 在0℃下向DMSO(15mL)中的吡啶-4-胺(0.96g,10.20mmol)溶液中加入NaH(392mg,9.80mmol,60%悬浮液)。将混合物在20℃下搅拌0.5h,再次冷却至0℃,然后加入4,6-二氯-2-吗啉代-嘧啶-5-羧酸乙酯(1.5g,4.90mmol)。将混合物在20℃下再搅拌2h,然后倒入冰水(30mL)中。将水相用乙酸乙酯萃取(30mL\*3),将合并的有机相用盐水(10mL)洗涤,经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并浓缩。将残留物进行快速柱色谱(ISCO 20g二氧化硅,石油醚中的0-100%乙酸乙酯,20min内的梯度),得到4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(850mg),为浅黄色固体。LCMS(ESI)m/z:364.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0686] 步骤3:4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0687] 向二噁烷(7mL)和 $\text{H}_2\text{O}$ (0.7mL)中的4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(500mg,1.37mmol)溶液中加入1-甲基-3-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑(586mg,2.06mmol)、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ (570mg,4.12mmol)和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (159mg,137 $\mu\text{mol}$ )。将所得混合物在100℃,氮气氛围下搅拌3h。将反应混合物过滤,并将滤液真空浓缩。向残留物中加入10mL水,并将含水混合物用乙酸乙酯萃取(10mL\*2)。将合并的有机层用盐水(10mL)洗涤并经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥和浓缩。将残留物进行快速柱色谱(ISCO 20g二氧化硅,石油醚中的0至87%乙酸乙酯,20min内的梯度),得到4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(520mg,78%),为浅黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d) $\delta$ 8.51(d,J=6.3Hz,2H),7.93-7.80(m,2H),7.69-7.61(m,2H),7.49-7.33(m,3H),6.56(d,J=2.3Hz,1H),4.04-3.86(m,9H),3.80(bs,4H),0.76(t,J=7.2Hz,3H);LCMS(ESI)m/z:486.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0688] 步骤4:4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸的合成。

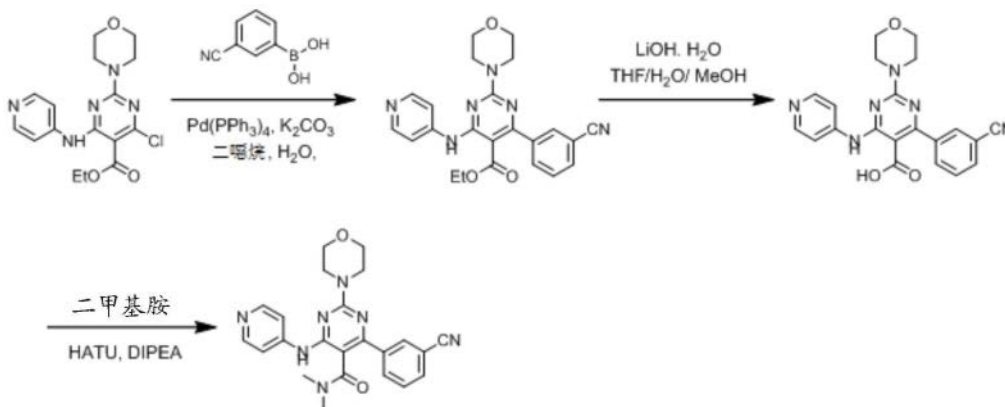
[0689] 向THF(4mL)、MeOH(2mL)和 $\text{H}_2\text{O}$ (2mL)中的4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(500mg,1.03mmol)溶液中加入 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 溶液(129mg,3.09mmol)。将混合物在25℃下搅拌12h并浓缩。将残留物用5mL  $\text{H}_2\text{O}$ 稀释,并在0℃下将饱和柠檬酸水溶液加入混合物中,直至PH=3~4。通过过滤收集所得沉淀,用水洗涤并真空干燥,得到4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(450mg,96%),为黄色固体。LCMS(ESI)m/z:458.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0690] 步骤5:N,N-二甲基-4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺的合成。

[0691] 向4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(120mg,262 $\mu\text{mol}$ )和N,N-二甲基胺(THF中2M,1mL)的混合物中加入HATU(120mg,315 $\mu\text{mol}$ )和DIPEA(102mg,787 $\mu\text{mol}$ )。将混合物在20℃下搅拌2h,然后加入1mL水。将混合物用乙酸乙酯萃取(3mL\*2),将合并的有机层用盐水(1mL)洗涤并经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥和浓缩。将残留物进行制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10 $\mu\text{m}$ ,流动相乙腈/水(10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 和 $\text{NH}_3\cdot$

H<sub>2</sub>O)], 得到N,N-二甲基-4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(51mg, 40%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$  8.47 (d, J=5.8Hz, 2H), 8.14-8.09 (m, 1H), 7.97 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.77-7.66 (m, 2H), 7.61 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.51-7.44 (m, 1H), 7.42 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.59 (d, J=2.3Hz, 1H), 4.06-3.89 (m, 7H), 3.88-3.79 (m, 4H), 2.85 (s, 3H), 2.37 (s, 3H). LCMS (ESI) (C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) [M+H]<sup>+</sup>: 485.3。

[0692] 实施例57.4-(3-氰基苯基)-N,N-二甲基-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(化合物67)的合成:



[0693]

[0694] 步骤1: 4-(3-氰基苯基)-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0695] 向二噁烷(5mL)和H<sub>2</sub>O(0.5mL)中的4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(400mg, 1.10mmol)溶液中加入(3-氰基苯基)硼酸(242mg, 1.65mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(456mg, 3.30mmol)和Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(127mg, 110 $\mu$ mol)。将混合物在100℃, 氮气氛下搅拌3h。然后过滤, 将滤液浓缩, 并将残留物用5mL水稀释。将水相用乙酸乙酯萃取(5mL\*2), 将合并的有机层用盐水(5mL)洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。将残留物进行快速柱色谱(ISCO 20g二氧化硅, 石油醚中的0-80%乙酸乙酯, 20min内的梯度), 得到4-(3-氰基苯基)-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(250mg, 53%), 为黄色固体。LCMS (ESI) m/z: 431.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0696] 步骤2: 4-(3-氰基苯基)-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸的合成。

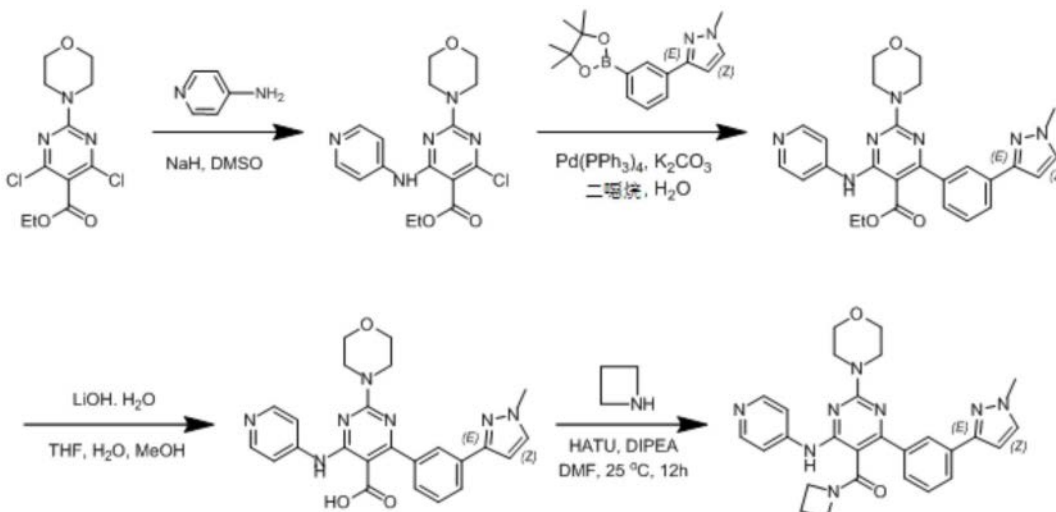
[0697] 向THF(2mL)、MeOH(1mL)和H<sub>2</sub>O(1mL)中的4-(3-氰基苯基)-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(240mg, 558 $\mu$ mol)溶液中加入LiOH·H<sub>2</sub>O(70mg, 1.67mmol)。将混合物在25℃下搅拌12h并浓缩。在0℃下向残留物中加入3mL水和饱和柠檬酸水溶液直至pH=4。过滤收集所得沉淀, 用水洗涤并真空干燥, 得到4-(3-氰基苯基)-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(220mg, 98%), 为黄色固体。LCMS (ESI) m/z: 403.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0698] 步骤3: 4-(3-氰基苯基)-N,N-二甲基-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺的合成。

[0699] 向4-(3-氰基苯基)-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(110mg, 273 $\mu$ mol)和N,N-二甲基胺(THF中2M, 1mL)的混合物中加入HATU(125mg, 328 $\mu$ mol)和DIPEA(106mg, 820 $\mu$ mol)。将混合物在25℃下搅拌2h并浓缩。将残留物进行制备型HPLC(Phenomenex C18 75\*30mm\*3 $\mu$ m柱; 10mM氢氧化铵水溶液中的10-55%乙腈, 8min梯度), 得到4-(3-氰基苯基)-N,N-二甲基-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(8mg, 7%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$  8.77 (s, 1H), 8.50 (d, J=5.8Hz, 2H), 8.11 (t, J=1.5Hz, 1H), 7.87 (td, J=8.2, 1.4Hz, 1H), 7.77 (td, J=7.8, 1.4Hz, 1H), 7.57-7.51 (m, 3H), 3.93 (bs, 4H), 3.86-

3.81 (m, 4H), 2.89 (s, 3H), 2.38 (s, 3H). LCMS (ESI) (C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>) [M+H]<sup>+</sup>: 430.3。

[0700] 实施例58. 氮杂环丁烷-1-基-[4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-基]甲酮(化合物68)的合成:



[0701]

[0702] 步骤1: 4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0703] 在0℃下向DMSO (30mL) 中的吡啶-4-胺 (154mg, 1.63mmol) 溶液中逐份加入NaH (131mg, 3.27mmol, 60%悬浮液)。然后将混合物在25℃下搅拌0.5h, 然后在0℃下将4,6-二氯-2-吗啉代-嘧啶-5-羧酸乙酯 (500mg, 1.63mmol) 加入上述混合物中。将所得混合物在25℃下搅拌2h, 然后在0℃下倒入饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (30mL) 中, 并将水相用乙酸乙酯萃取 (30mL\*3)。将合并的萃取物用盐水 (20mL) 洗涤, 用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。将残留物进行快速色谱 (ISCO 40g二氧化硅, 石油醚中的0-56%乙酸乙酯, 20min内的梯度), 得到4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯 (1.66g, 28%), 为黄色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 10.82 (s, 1H), 8.46 (d, J=6.1Hz, 2H), 7.49 (d, J=6.2Hz, 2H), 4.36 (q, J=7.1Hz, 2H), 3.86-3.72 (m, 8H), 1.39 (t, J=7.2Hz, 3H)。

[0704] 步骤2: 4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0705] 向二噁烷 (15mL) 和H<sub>2</sub>O (1.5mL) 中的4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯 (1g, 2.06mmol) 溶液中加入1-甲基-3-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑 (879mg, 2.47mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (855mg, 6.18mmol) 和Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (238mg, 206μmol)。将所得混合物在100℃, 氮气氛下搅拌3h。然后将反应混合物用水稀释并用乙酸乙酯萃取 (20mL\*2)。将合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。将残留物进行快速色谱 (ISCO 20g二氧化硅, 石油醚中的0-77%乙酸乙酯, 20min内的梯度), 得到4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯 (600mg, 60%), 为浅黄色固体。LCMS (ESI) m/z: 486.3 [M+H]<sup>+</sup>。

[0706] 步骤3: 4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸的合成。

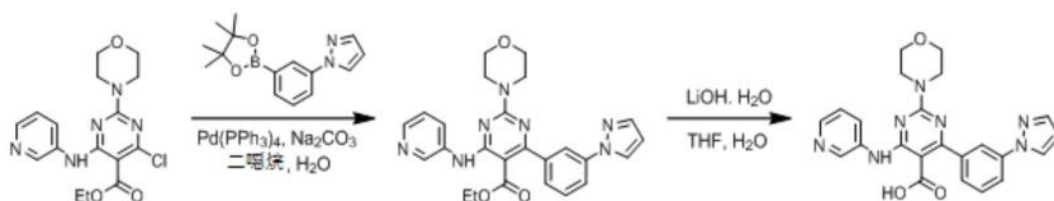
[0707] 向THF (4mL)、MeOH (2mL) 和H<sub>2</sub>O (2mL) 中的4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯 (200mg, μmol) 溶液中加入LiOH·H<sub>2</sub>O (52mg, 1.24mmol)。将混合物在25℃下搅拌12h并浓缩。将残留物用5mL H<sub>2</sub>O稀释, 并在0℃下向混合

物中加入饱和柠檬酸水溶液直至pH=5~6。将所得沉淀物过滤并真空干燥,得到粗产物(300mg)。将150mg该产物通过制备型HPLC(Waters Xbridge Prep OBD C18 150\*40mm\*10um;10mM碳酸氢铵水溶液中的5%-45%乙腈,8min梯度)纯化,得到化合物4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酸(78mg,41%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ 11.00-10.64(m,1H),8.50-8.42(m,2H),7.84(s,1H),7.81(td,J=1.5,7.4Hz,1H),7.74(d,J=2.1Hz,1H),7.72-7.67(m,2H),7.45-7.35(m,2H),6.71(d,J=2.3Hz,1H),3.88(s,3H),3.85-3.78(m,4H),3.71(d,J=4.1Hz,4H)。LCMS(ESI)(C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>) [M+H]<sup>+</sup>:458.1。

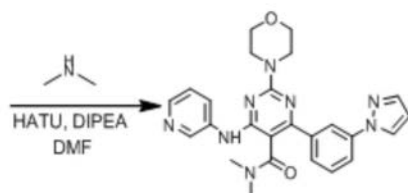
[0708] 步骤4:氮杂环丁烷-1-基(4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-5-基)甲酮的合成。

[0709] 向DMF(2mL)中的4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(150mg,327.88umol)溶液中加入氮杂环丁烷(423mg,7.41mmol)、HATU(150mg,393umol)和DIPEA(127mg,984umol)。将混合物在25℃下搅拌2h,并将整个混合物进行制备型HPLC(Waters Xbridge Prep OBD C18 150\*40mm\*10um柱;10mM氢氧化铵水溶液中的25-55%乙腈,8min梯度),得到氮杂环丁烷-1-基(4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-吗啉代-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-5-基)甲酮(78mg,48%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d) $\delta$ 9.79(s,1H),8.48(d,J=6.3Hz,2H),8.18(t,J=1.6Hz,1H),7.99(td,J=7.8,1.3Hz,1H),7.73-7.60(m,3H),7.52-7.45(m,1H),7.42(d,J=2.3Hz,1H),6.61(d,J=2.3Hz,1H),4.04-3.93(m,8H),3.90-3.73(m,5H),3.42-3.27(m,2H),2.07-1.99(m,2H)。LCMS(ESI)(C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) [M+H]<sup>+</sup>:497.3。

[0710] 实施例59.N,N-二甲基-2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(化合物69)的合成:



[0711]



[0712] 步骤1:2-吗啉代-4-(3-吡唑-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0713] 向二噁烷(5mL)和H<sub>2</sub>O(0.5mL)中的4-氯-2-吗啉代-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(500mg,1.37mmol)溶液中加入1-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑(371mg,1.37mmol)、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(159mg,137umol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(570mg,4.12mmol)。将混合物在100℃,氮气氛围下搅拌3h,然后用10mL水稀释,并将含水混合物用乙酸乙酯萃取(5mL\*3)。将合并的有机层用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。对残留物进行快速柱色谱(ISCO 12g二氧化

硅,石油醚中的0-60%乙酸乙酯,30min梯度),得到2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(500mg,46%),为黄色油状物。LCMS (ESI)  $[M+H]^+$ :472.2。

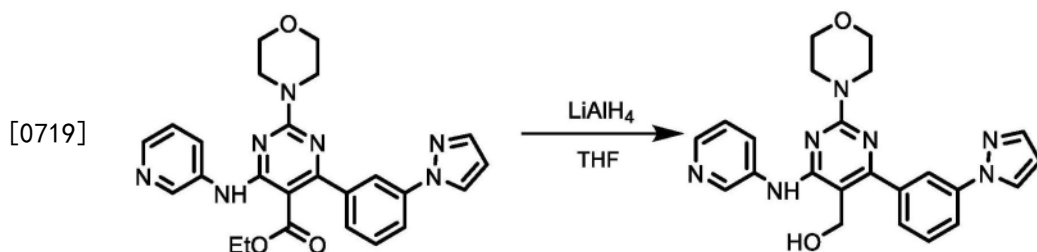
[0714] 步骤2:2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸的合成。

[0715] 在0℃下向THF(4mL)和MeOH(2mL)中的2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(500mg,530 $\mu$ mol)溶液中加入H<sub>2</sub>O(2mL)中的LiOH·H<sub>2</sub>O(67mg,1.59mmol)溶液。然后将混合物升温并在20℃下搅拌3h和浓缩。然后将其用8mL水稀释,并将混合物用乙酸乙酯(5mL\*3)萃取。弃去有机相,并在冰浴条件下用饱和柠檬酸水溶液处理水相直至pH=5。通过过滤收集形成的固体,并减压干燥,得到2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(150mg,64%),为黄色固体。LCMS (ESI)  $[M+H]^+$ :444.1。

[0716] 步骤3:N,N-二甲基-2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺的合成。

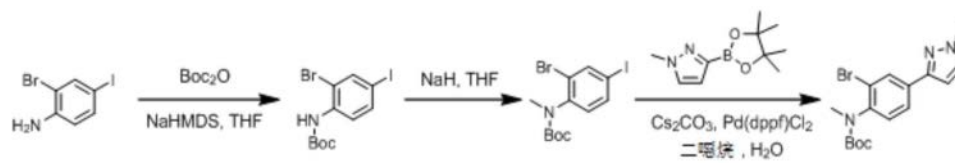
[0717] 向DMF(2mL)中的2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(120mg,271 $\mu$ mol)溶液中加入N-甲基甲胺(2M,406 $\mu$ L)、HATU(123mg,406 $\mu$ L)和DIPEA(105mg,812 $\mu$ mol)。将混合物在20℃下搅拌14h并浓缩。将残留物进行制备型HPLC[Welch Xtimate C18 21.2×250mm,10 $\mu$ m,流动相乙腈/水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>和NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)],得到N,N-二甲基-2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(82mg,65%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)  $\delta$ 8.95(d,J=2.4Hz,1H),8.56(s,1H),8.32(d,1H,J=3.6Hz),8.09(s,1H),7.99(s,1H),7.84(q,J=1.4Hz,2H),7.58(s,1H),7.53-7.52(m,1H),7.52-7.51(m,1H),7.29-7.28(m,1H),6.51(s,1H),3.89(s,4H),3.80-3.78(m,4H),2.88(s,3H),2.45(s,3H)。LCMS (ESI C25H26N8O2)  $[M+H]^+$ :471.2。

[0718] 实施例60.[2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-基]甲醇(化合物70)的合成。

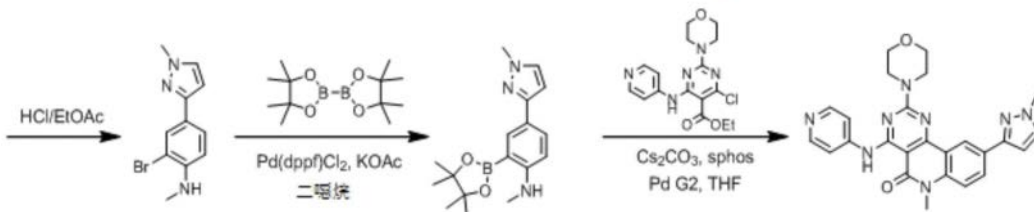


[0720] 在20℃下向THF(3mL)中的2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(210mg,445 $\mu$ mol)溶液中逐份添加LiAlH<sub>4</sub>(34mg,891 $\mu$ mol)。将所得混合物在20℃下搅拌12h。然后在0℃下用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O(2当量)淬灭反应,并将混合物升温和在20℃下搅拌30min。将所得非均相混合物过滤以除去固体,并将滤液浓缩。然后对残留物进行制备型HPLC(Phenomenex luna C1880\*40mm\*3 $\mu$ m柱;0.04%盐酸水溶液中的8-28%乙腈,7min梯度),然后再次经历另外的制备型HPLC条件(Phenomenex luna C1880\*40mm\*3 $\mu$ m柱;0.04%盐酸水溶液中的18-33%乙腈,6min梯度),得到[2-吗啉代-4-(3-吡啶-1-基苯基)-6-(3-吡啶基氨基)嘧啶-5-基]甲醇(17mg,8%),为浅黄色粘性液体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,甲醇-d)  $\delta$ =9.37(d,J=1.6Hz,1H),8.80(d,J=8.4Hz,1H),8.71(d,J=5.6Hz,1H),8.38(s,1H),8.11-8.05(m,3H),7.82(d,J=1.6Hz,1H),7.76-7.74(m,1H),7.62-7.60(m,1H),6.62(t,J=2.0Hz,1H),4.62(s,2H),3.83-3.79(m,8H)。LCMS (ESI C23H23N7O2)  $[M+H]^+$ :430.0。

[0721] 实施例61.6-甲基-9-(1-甲基吡唑-3-基)-2-吗啉代-4-(4-吡啶基氨基)嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(化合物71)的合成:



[0722]



[0723] 步骤1:N-(2-溴-4-碘-苯基)氨基甲酸叔丁酯的合成。

[0724] 在0℃下向THF (40mL) 中的2-溴-4-碘-苯胺 (4g, 13.43mmol) 溶液中加入NaHMDS (1M, 20.14mL)。将混合物在0℃下搅拌30min,然后在0℃下滴加THF (10mL) 中的Boc<sub>2</sub>O (3.22g, 14.77mmol) 溶液。将混合物在25℃下搅拌2h,并将饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (80mL) 小心地加入烧瓶中。将所得混合物用乙酸乙酯萃取 (20mL\*3),将合并的有机层用盐水 (15mL) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。对残余物进行快速柱色谱 (ISCO 20g二氧化硅,石油醚中的0-3%乙酸乙酯,10min梯度),得到N-(2-溴-4-碘-苯基)氨基甲酸叔丁酯 (3g, 56%),为黄色固体。LCMS (ESI)m/z: 397.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0725] 步骤2:N-(2-溴-4-碘-苯基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯的合成。

[0726] 在0℃下向THF (40mL) 中的N-(2-溴-4-碘-苯基)氨基甲酸叔丁酯 (3g, 7.54mmol) 溶液中逐份加入NaH (361mg, 9.04mmol, 油中的60%悬浮液)。将所得非均相混合物在0℃下搅拌30min,然后加入CH<sub>3</sub>I (2.14g, 15.07mmol)。将混合物升温并在25℃下搅拌2h,然后加入50mL饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液。然后将所得混合物用乙酸乙酯萃取 (30mL\*2),将合并的有机层用盐水 (3mL) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩,得到N-(2-溴-4-碘-苯基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯 (3g, 96%),为黄色油状物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 7.95 (s, 1H), 7.62 (d, J=8.0Hz, 1H), 6.95 (d, J=8.3Hz, 1H), 3.13 (s, 3H), 1.36 (s, 9H)。

[0727] 步骤3:N-[2-溴-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-N-甲基氨基甲酸叔丁酯的合成。

[0728] 向二噁烷 (20mL) 和H<sub>2</sub>O (2mL) 中的N-(2-溴-4-碘-苯基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯 (1.7g, 4.13mmol) 溶液中加入1-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)吡唑 (858mg, 4.13mmol)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.69g, 8.25mmol) 和Pd (dppf) Cl<sub>2</sub> (301mg, 412μmol)。将所得混合物在80℃、氩气氛下搅拌5h。然后将其用40mL水稀释,并将混合物用乙酸乙酯萃取 (20mL\*3)。将合并的有机层用盐水 (15mL) 洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。将残余物进行快速柱色谱 (ISCO 20g二氧化硅,石油醚中的0-30%乙酸乙酯,20min梯度),得到N-[2-溴-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-N-甲基氨基甲酸叔丁酯 (900mg, 59%),为黄色油状物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 8.05 (s, 1H), 7.70 (dd, J=8.1, 1.6Hz, 1H), 7.38-7.26 (m, 1H), 7.22 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.53 (d, J=2.0Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 1.35 (s, 9H)。

[0729] 步骤4:2-溴-N-甲基-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯胺的合成。

[0730] 将HCl/EtOAc (4M, 580μL) 中的N-[2-溴-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-N-甲基氨基甲酸叔丁酯 (850mg, 2.32mmol) 溶液在25℃下搅拌2h并浓缩。将残留物溶于水 (5mL) 中,然后

在0℃下用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液碱化。将所得混合物用乙酸乙酯萃取(10mL\*2),将合并的有机层用盐水(5mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩,得到2-溴-N-甲基-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯胺(600mg,97%),为黄色油状物。LCMS (ESI) m/z: 266.2 [M+H]<sup>+</sup>。

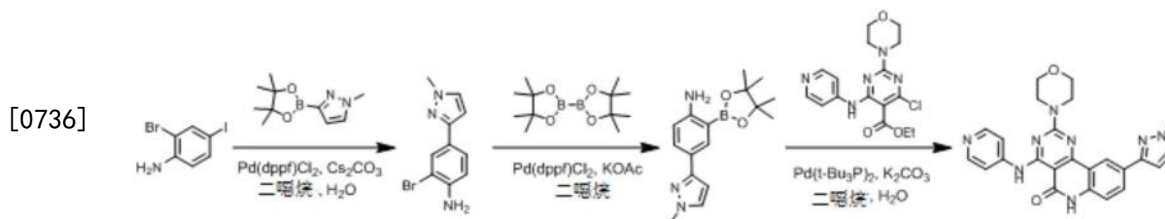
[0731] 步骤5:N-甲基-4-(1-甲基吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯胺的合成。

[0732] 向二噁烷(10mL)中的4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(687mg,2.71mmol)溶液中加入2-溴-N-甲基-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯胺(600mg,2.25mmol)、Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(165mg,225umol)和AcOK(443mg,4.51mmol)。将所得混合物在80℃氩气氛下搅拌5h,然后用20mL水稀释。然后将其用乙酸乙酯萃取(10mL\*3),将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。然后对残留物进行快速柱色谱(ISCO 20g二氧化硅,石油醚中的30%-100%乙酸乙酯,30min梯度),得到N-甲基-4-(1-甲基吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯胺(400mg,57%),为黄色油状物。LCMS (ESI) m/z: 314.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0733] 步骤6:6-甲基-9-(1-甲基吡唑-3-基)-2-吗啉代-4-(4-吡啶基氨基)嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮的合成。

[0734] 向THF(3mL)中的4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(140mg,384umol)和N-甲基-4-(1-甲基吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯胺(132mg,423umol)溶液中加入[2-(2-氨基苯基)苯基]-氯-钯;二环己基-[2-(2,6-二甲氧基苯基)苯基]磷烷(27mg,38umol)和K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(245mg,1.15mmol)。将所得反应混合物在80℃氩气氛下搅拌4h并浓缩。然后将残留物进行制备型HPLC(Phenomenex Luna C18 75\*30mm\*3um柱;0.05%甲酸水溶液中的10%-50%乙腈,8min梯度),得到6-甲基-9-(1-甲基吡唑-3-基)-2-吗啉代-4-(4-吡啶基氨基)嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(3mg,1.40%),为浅黄色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,甲醇-d<sub>4</sub>) δ8.96(s,1H),8.40(d,J=6.1Hz,2H),8.02(d,J=8.9Hz,1H),7.78(d,J=5.8Hz,2H),7.67(s,1H),7.48(d,J=8.5Hz,1H),6.68(d,J=2.3Hz,1H),4.03-4.01(m,6H),3.85-3.83(m,5H),3.68(s,3H)。LC-MS:(ESI C25H24N8O2) m/z: 469.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0735] 实施例62.N-[2-(4-氧代-1-苯基-1,3,8-三氮杂螺[4.5]癸-8-基)乙基]萘-2-甲酰胺(化合物72)的合成



[0737] 步骤1:2-溴-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯胺的合成。

[0738] 向二噁烷(10mL)和H<sub>2</sub>O(1mL)中的2-溴-4-碘-苯胺(1.2g,4.03mmol)溶液中加入1-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)吡唑(838mg,4.03mmol)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(2.62g,8.06mmol)和Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(295mg,403umol)。在氩气氛下,将混合物在80℃下搅拌5h。然后将其用20mL水稀释并用乙酸乙酯萃取(10mL\*3)。将合并的有机层用盐水(10mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。对残留物进行快速柱色谱(ISCO 20g二氧化硅,石油醚中的0-30%乙酸乙酯,20min梯度),得到2-溴-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯胺(620mg,61%),为黄色油状

物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$  7.87 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.53 (dd, J=8.3, 1.8Hz, 1H), 7.34 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.79 (d, J=8.3Hz, 1H), 6.41 (d, J=2.1Hz, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.94 (s, 3H); LCMS (ESI) m/z: 253.9 [M+H]<sup>+</sup>。

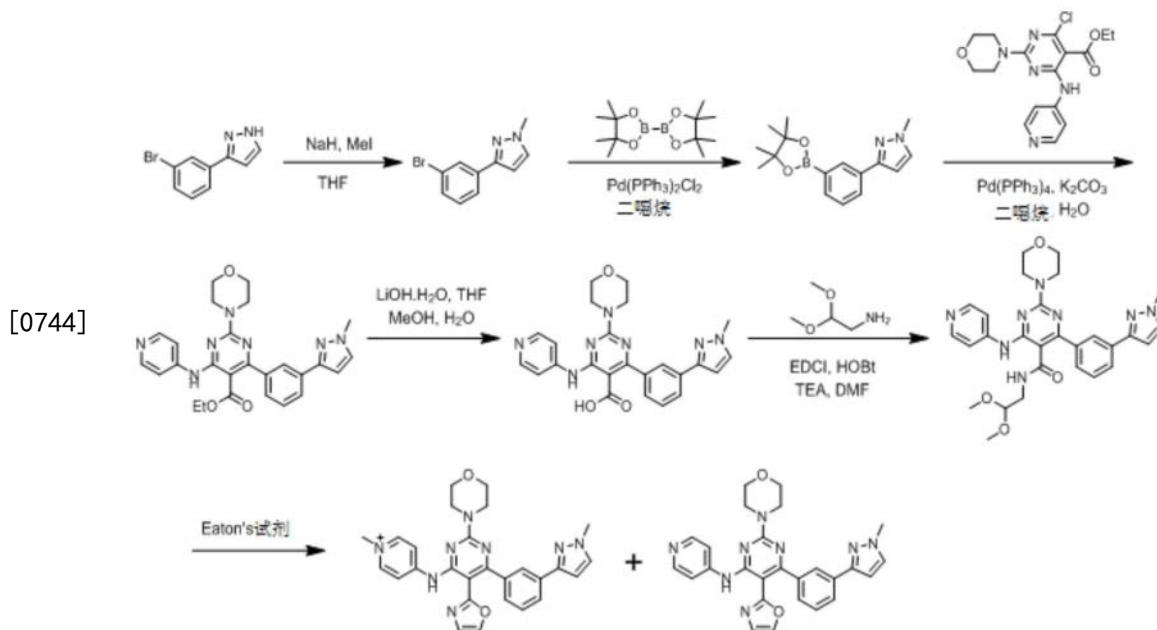
[0739] 步骤2: 4-(1-甲基吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯胺的合成。

[0740] 向二噁烷(10mL)中的4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(725mg, 2.86mmol)溶液中加入2-溴-4-(1-甲基吡唑-3-基)苯胺(600mg, 2.38mmol)、Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>(174mg, 238 $\mu$ mol)和KOAc(584mg, 5.95mmol)。将混合物在90℃氩气氛下搅拌15h, 然后用20mL水稀释。将其用乙酸乙酯萃取(20mL\*3), 将合并的有机相用盐水洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。对残留物进行快速柱色谱(ISCO 20g二氧化硅, 石油醚中的0-100%乙酸乙酯, 20min梯度), 得到4-(1-甲基吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯胺(400mg, 56%), 为黄色油状物。LCMS (ESI) m/z: 300.2 [M+H]<sup>+</sup>。

[0741] 步骤3: 9-(1-甲基吡唑-3-基)-2-吗啉代-4-(4-吡啶基氨基)-6H-嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮的合成。

[0742] 向THF(2mL)中的4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(200mg, 549 $\mu$ mol)和4-(1-甲基吡唑-3-基)-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯胺(181mg, 605 $\mu$ mol)溶液中加入[2-(2-氨基苯基)苯基]-氯-钯;二环己基-[2-(2,6-二甲氧基苯基)苯基]磷烷(40mg, 55 $\mu$ mol)和K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(350mg, 1.65mmol)。将反应混合物在80℃氩气氛下搅拌4h并浓缩。将残留物进行制备型HPLC(Waters Xbridge Prep OBD C18 150\*40mm\*10 $\mu$ m柱; 0.05%氢氧化铵和10mM碳酸氢钠水溶液中的25%-65%乙腈, 8min梯度), 得到9-(1-甲基吡唑-3-基)-2-吗啉代-4-(4-吡啶基氨基)-6H-嘧啶并[5,4-c]喹啉-5-酮(7mg, 3%), 为浅黄色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.36 (s, 1H), 11.83 (s, 1H), 8.75 (d, J=2.0Hz, 1H), 8.48 (d, J=6.0Hz, 2H), 8.04 (dd, J=8.6, 1.9Hz, 1H), 7.80-7.74 (m, 3H), 7.38 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.00-3.76 (m, 7H), 3.79 (t, J=4.4Hz, 4H)。LC-MS: (ESI C24H22N8O2) m/z: 455.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0743] 实施例63.6-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-N-(1-甲基吡啶-1-鎓-4-基)-2-吗啉代-5-噁唑-2-基-嘧啶-4-胺(化合物73)和6-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-5-噁唑-2-基-N-(4-吡啶基)嘧啶-4-胺(化合物74)的合成:



[0745] 步骤1:3-(3-溴苯基)-1-甲基-吡唑的合成。

[0746] 在0℃下向DMF (35mL) 中的3-(3-溴苯基)-1H-吡唑 (5g, 19.50mmol) 溶液中逐份加入NaH (1.17g, 29.25mmol, 油中的60%悬浮液), 并将混合物在0℃下搅拌0.5h。然后在氩气氛下, 在0℃下将MeI (4.15g, 29.25mmol) 滴加到混合物中, 并在25℃下继续搅拌12h。在0℃下将反应用H<sub>2</sub>O (10mL) 淬灭, 并将混合物用乙酸乙酯萃取 (30mL\*2)。将合并的有机层用盐水 (30mL) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。将残留物进行快速柱色谱 (ISCO 20g二氧化硅, 石油醚中的0-17%乙酸乙酯, 20min梯度), 得到3-(3-溴苯基)-1-甲基-吡唑 (1.6g, 34%), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ7.99 (t, J=1.6Hz, 1H), 7.74 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.44 (dd, J=7.9, 0.9Hz, 1H), 7.40 (d, J=2.2Hz, 1H), 7.32-7.24 (m, 1H), 6.55 (d, J=2.2Hz, 1H), 3.97 (s, 3H); LCMS (ESI) m/z: 237.0 [M+H]<sup>+</sup>。

[0747] 步骤2:1-甲基-3-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑的合成。

[0748] 向二噁烷 (30mL) 中的3-(3-溴苯基)-1-甲基-吡唑 (1.6g, 6.75mmol) 溶液中加入4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (2.57g, 10.12mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.99g, 20.25mmol) 和Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (474mg, 675μmol)。将混合物在80℃氩气氛下搅拌12h。然后将混合物过滤以除去固体, 并将滤液浓缩。将残留物用30mL水稀释, 并将其用乙酸乙酯萃取 (30mL\*2)。将合并的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。对残留物进行快速柱色谱 (ISCO 20g二氧化硅, 石油醚中的0-27%乙酸乙酯, 20min梯度), 得到1-甲基-3-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑 (730mg, 30%), 为无色油状物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ8.12 (s, 1H), 7.85 (td, J=7.8, 1.5Hz, 1H), 7.66 (td, J=7.4, 1.1Hz, 1H), 7.32 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.29 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.56-6.46 (m, 1H), 3.87 (d, J=0.9Hz, 3H), 1.28 (s, 12H); LCMS (ESI) m/z: 285.1 [M+H]<sup>+</sup>。

[0749] 步骤3:4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯的合成。

[0750] 向二噁烷 (7mL) 和H<sub>2</sub>O (0.7mL) 中的4-氯-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧

酸乙酯(500mg, 1.37mmol)溶液中加入1-甲基-3-[3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基]吡唑(586mg, 2.06mmol)、 $K_2CO_3$ (570mg, 4.12mmol)和 $Pd(PPh_3)_4$ (159mg, 137 $\mu$ mol)。将混合物在100℃氮气氛下搅拌3h并浓缩。将残留物用10mL水稀释并将混合物用乙酸乙酯萃取(10mL\*2)。将合并的有机层用盐水(10mL)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥并浓缩。将所得残余物进行快速柱色谱(ISCO 20g二氧化硅,石油醚中的0-87%乙酸乙酯,20min梯度),得到4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(520mg, 78%),为浅色固体。 $^1H$  NMR(400MHz, 氯仿-d)  $\delta$ 8.51(d, J=6.3Hz, 2H), 7.93-7.80(m, 2H), 7.69-7.61(m, 2H), 7.49-7.33(m, 3H), 6.56(d, J=2.3Hz, 1H), 4.04-3.86(m, 9H), 3.80(bs, 4H), 0.76(t, J=7.2Hz, 3H); LCMS(ESI) m/z: 486.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0751] 步骤4: 4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸的合成。

[0752] 向THF(4mL)、MeOH(2mL)和 $H_2O$ (2mL)中的4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸乙酯(500mg, 1.03mmol)溶液中加入 $LiOH \cdot H_2O$ (130mg, 3.09mmol)。将混合物在25℃下搅拌12h并浓缩。在0℃下向残留物中加入5mL  $H_2O$ 和饱和柠檬酸水溶液中,直至达到pH=3~4。通过过滤收集所得沉淀,用水冲洗且真空干燥,得到4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(450mg),为黄色固体。LCMS(ESI) m/z: 458.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0753] 步骤5: N-(2,2-二甲氧基乙基)-4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺的合成。

[0754] 向DMF(2mL)中的4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-羧酸(200mg, 437 $\mu$ mol)溶液中加入2,2-二甲氧基乙胺(46mg, 437 $\mu$ mol)、EDCI(109mg, 568 $\mu$ mol)、HOBt(77mg, 568 $\mu$ mol)和TEA(133mg, 1.31mmol)。将所得混合物在25℃下搅拌12h,然后用3mL水稀释。然后将其用(二氯甲烷/甲醇:10/1)(5mL\*3)萃取,将合并的有机层用盐水(3mL)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥,并浓缩。将粗产物进行快速柱色谱(ISCO 10g二氧化硅,二氯甲烷中的0-15%甲醇,20min梯度),得到N-(2,2-二甲氧基乙基)-4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(80mg, 34%),为浅黄色固体。LCMS(ESI) m/z: 545.2[M+H]<sup>+</sup>。

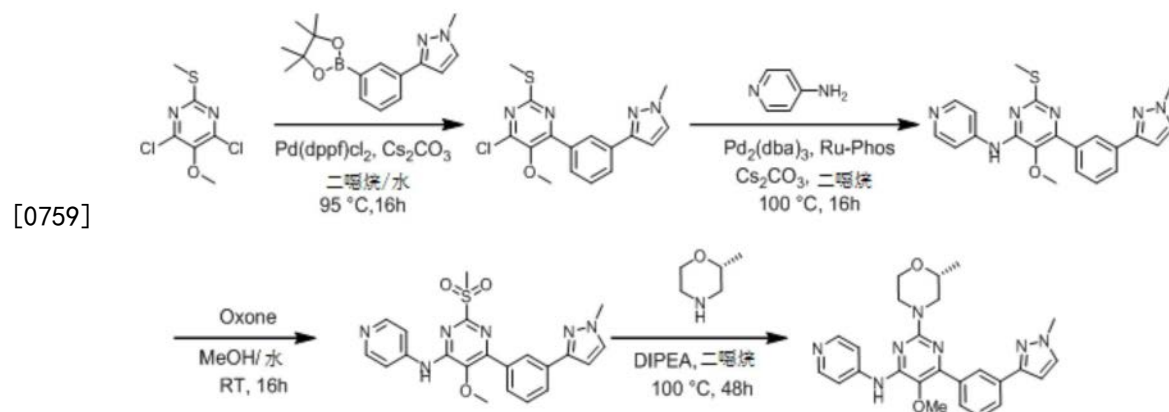
[0755] 步骤6: 6-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-N-(1-甲基吡啶-1-鎓-4-基)-2-吗啉代-5-噁唑-2-基-嘧啶-4-胺和6-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-5-噁唑-2-基-N-(4-吡啶基)嘧啶-4-胺的合成。

[0756] 将N-(2,2-二甲氧基乙基)-4-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-6-(4-吡啶基氨基)嘧啶-5-甲酰胺(60mg, 110 $\mu$ mol)和Eaton's试剂(4.56g, 19.16mmol)的混合物在80℃、氮气氛下搅拌4h。然后在0℃下将反应混合物用25mL饱和 $NaHCO_3$ 水溶液处理,然后加入15mL水。将所得混合物用(二氯甲烷/甲醇:10/1)萃取(20mL\*2),将合并的有机层用盐水(15mL)洗涤,经 $Na_2SO_4$ 干燥并浓缩。将残留物进行制备型HPLC(Waters Xbridge BEH C18 100\*30mm\*10 $\mu$ m柱; 10mM碳酸氢铵水溶液中的45-65%乙腈, 8min梯度),得到6-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-N-(1-甲基吡啶-1-鎓-4-基)-2-吗啉代-5-噁唑-2-基-嘧啶-4-胺(17mg, 30%),为白色固体。 $^1H$  NMR(400MHz, 氯仿-d)  $\delta$ 7.84-7.78(m, 1H), 7.74(s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.33(d, J=2.3Hz, 1H), 7.31(dd, J=3.3, 1.6Hz, 1H), 7.29(s, 1H), 7.09(s, 1H), 7.06(d, J=

7.3Hz, 2H), 6.81 (d,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 6.43 (d,  $J=2.3\text{Hz}$ , 1H), 3.98-3.86 (m, 7H), 3.81-3.75 (m, 4H), 3.58 (s, 3H). LCMS (ESI) (C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)  $[M+H]^+$ : 495.3。该产物通过2D NMR实验证实。

[0757] 然而,在后处理期间,当不存在甲醇时,获得化合物6-[3-(1-甲基吡唑-3-基)苯基]-2-吗啉代-5-噁唑-2-基-N-(4-吡啶基)嘧啶-4-胺(11mg, 13%),为棕色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  11.23 (s, 1H), 8.60-8.23 (m, 1H), 7.93-7.77 (m, 4H), 7.65-7.55 (m, 2H), 7.40 (t,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 7.35-7.27 (m, 2H), 6.57 (d,  $J=2.3\text{Hz}$ , 1H), 4.02-3.90 (m, 7H), 3.85-3.76 (m, 4H). LCMS (ESI) (C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)  $[M+H]^+$ : 481.3。

[0758] 实施例64. (R)-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(2-甲基吗啉代)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(化合物75)的合成:



[0760] 步骤1:4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)嘧啶的合成。

[0761] 将1,4-二噁烷/水(60mL/8mL)中的4,6-二氯-5-甲氧基-2-(甲硫基)嘧啶(1.8g, 8.04mmol)、1-甲基-3-(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯基)-1H-吡唑(2.28g, 8.04mmol)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁-二氯化钯(II)二氯甲烷络合物(0.33g, 0.40mmol)和碳酸铯(6.5g, 20.1mmol)混合物在95°C氮气氛下搅拌16h。将反应混合物过滤,并将滤液浓缩。将残留物进行硅胶色谱(用石油醚中20%至40%乙酸乙酯洗脱),得到4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)嘧啶(1.8g, 64.7%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 347.0  $[M+H]^+$ 。

[0762] 步骤2:5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0763] 将无水1,4-二噁烷(75mL)中的4-氯-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)嘧啶(1.7g, 4.91mmol)、吡啶-4-胺(0.46g, 4.91mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0.45g, 0.49mmol)、2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基联苯(0.46g, 0.98mmol)和碳酸铯(4g, 12.3mmol)的混合物在100°C氮气氛下搅拌16h。将混合物过滤并将滤液浓缩。将残留物进行硅胶色谱(用二氯甲烷中含0.5%7N氨甲醇的5%至15%的甲醇洗脱),得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲硫基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(1.5g, 75.6%),为白色固体。LCMS (ESI)  $m/z$ : 405.1  $[M+H]^+$ 。

[0764] 步骤3:5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0765] 在0°C下向甲醇(40mL)中的5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲

巯基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(1.3g,3.22mmol)溶液中滴加水(20mL)中的过硫酸氢钾制剂(3.95g,6.43mmol)溶液。添加后,将反应混合物在室温下搅拌3h。过滤所得沉淀,将所得固体分散在碳酸氢钠水溶液中并在室温下搅拌20min。通过过滤收集所得固体,用水洗涤并真空干燥,得到5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(0.93g,66.2%),为白色固体。LCMS (ESI)m/z:437.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0766] 步骤4: (R)-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(2-甲基吗啉代)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺的合成。

[0767] 将无水1,4-二噁烷(10mL)中的5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(甲基磺酰基)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(150mg,0.34mmol)、(R)-2-甲基吗啉(69.6mg,0.69mmol)、N,N-二异丙基乙胺(0.13g,1.03mmol)的混合物在100℃氮气氛下搅拌48h。将反应混合物过滤,将滤液浓缩,并将残留物进行制备型HPLC(BOSTON pHlex ODS10um 21.2×250mm 120A。移动相是乙腈/0.1%碳酸氢铵),得到(R)-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(2-甲基吗啉代)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺(12.7mg,8.2%),为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.37(s,1H),8.47-8.38(m,3H),7.91-7.73(m,4H),7.77(d,J=2.1Hz,1H),7.53(t,J=7.7Hz,1H),6.71(d,J=2.2Hz,1H),4.46-4.30(m,2H),3.98-3.87(m,4H),3.55(t,J=10.3Hz,2H),3.45(s,3H),2.99(t,J=10.7Hz,1H),2.69-2.62(m,1H),1.18(d,J=6.2Hz,3H)。LCMS (ESI)m/z:458.2[M+H]<sup>+</sup>。

[0768] 根据上述方案合成以下化合物:

[0769]

| 化合物 No.<br>名称                                                             | 结构 | NMR, MS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 76<br><br>(S)-5-甲氧基-6-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-2-(2-甲基吗啉代)-N-(吡啶-4-基)嘧啶-4-胺 |    | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 9.34 (s, 1H), 8.48-8.37 (m, 3H), 7.91-7.73 (m, 4H), 7.77 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H), 7.52 (t, $J$ = 7.7 Hz, 1H), 6.71 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H), 4.46-4.30 (m, 2H), 3.98-3.84 (m, 4H), 3.54 (t, $J$ = 10.1 Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.98 (t, $J$ = 10.8 Hz, 1H), 2.71-2.60 (m, 1H), 1.18 (d, $J$ = 6.2 Hz, 3H). LCMS (ESI) $m/z$ : 458.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ .                                                    |
| 77<br><br>(S)-1-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)哌啶-3-醇 |    | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 9.35 (s, 1H), 8.45-8.40 (m, 3H), 7.93-7.84 (m, 4H), 7.77 (d, $J$ = 2.3 Hz, 1H), 7.52 (t, $J$ = 7.8 Hz, 1H), 6.70 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H), 4.92 (d, $J$ = 3.9 Hz, 1H), 4.48-4.43 (m, 1H), 4.32-4.27 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.51-3.47 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.07-3.01 (m, 1H), 2.92-2.84 (m, 1H), 1.94-1.89 (m, 1H), 1.78-1.72 (m, 1H), 1.48-1.35 (m, 2H). LCMS (ESI) $m/z$ : 458.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ . |
| 78<br><br>(R)-1-(5-甲氧基-4-(3-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)苯基)-6-(吡啶-4-基氨基)嘧啶-2-基)哌啶-3-醇 |    | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 9.37 (s, 1H), 8.46-8.40 (m, 3H), 7.94-7.82 (m, 4H), 7.77 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H), 7.52 (t, $J$ = 7.7 Hz, 1H), 6.70 (d, $J$ = 2.2 Hz, 1H), 4.92 (d, $J$ = 4.3 Hz, 1H), 4.48-4.42 (m, 1H), 4.32-4.27 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.53-3.46 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.08-3.01 (m, 1H), 2.93-2.84 (m, 1H), 1.94-1.88 (m, 1H), 1.79-1.73 (m, 1H), 1.43-1.36 (m, 2H). LCMS (ESI) $m/z$ : 458.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ . |

[0770] 实施例65.PIKfyve抑制活性

[0771] PIKfyve生物化学测定。生物化学PIKfyve抑制测定由Carna Biosciences根据基于Promega ADP-Glo<sup>TM</sup>激酶测定的专有方法进行。使用杆状病毒表达系统将全长人PIKfyve [具有NCBI参考序列号NP\_055855.2中所示序列的蛋白质的1-2098(末端)氨基酸和S696N、L932S、Q995L、T998S、S1033A和Q1183K]表达为N-末端GST-融合蛋白(265kDa)。通过使用谷胱甘肽琼脂糖色谱纯化GST-PIKfyve,并用于ADP-Glo<sup>TM</sup>激酶测定(Promega)中。通过加入测试化合物溶液、底物溶液、ATP溶液和激酶溶液(各自是4×终浓度)来建立反应。用测定缓冲液(50mM MOPS, 1mM DTT, pH7.2)制备反应,混合,并在黑色384孔聚苯乙烯板中在室温下孵

育1小时。然后加入ADP-Glo™试剂40分钟,随后加入激酶检测试剂另外40分钟。通过在发光板阅读仪上检测相对光单位来评估激酶活性。样品从10μM至3nM一式两份运行。通过将对照孔(+PIKfyve,无化合物)设定为0%抑制并将背景(无PIKfyve)的读数设定为100%抑制来分析数据,然后计算每种测试溶液的%抑制。通过拟合四参数逻辑曲线,从浓度对抑制百分比曲线计算IC<sub>50</sub>值。

[0772] PIKfyve EEA1测定。PIKfyve活性的遗传学或药理学破坏导致内体囊泡的扩大。该放大用作PIKfyve抑制剂的常规分类的PIKfyve抑制的替代读出。用在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中稀释的化合物处理在96孔测定板中生长的U2OS细胞。处理3小时后,将细胞用多聚甲醛固定,用磷酸盐缓冲盐水中的0.2% Triton-X透化并针对EEA1染色。在二抗染色期间,还用CellMask™Deep Red和Hoechst将细胞染色以分别检测细胞质和细胞核。使用高内容物成像仪(high content imager)以40X放大倍数使内体结构可视化。使用在用有效参考化合物APY0201处理的细胞的图像上训练的整合EEA1斑点尺寸、强度和纹理的线性分类器算法分析图像。通过减去DMSO信号并计算相对于最大APY0201活性的活性百分比来计算化合物活性。然后通过逻辑回归从浓度对抑制百分比数据计算IC<sub>50</sub>值。

[0773] PIKfyve抑制测定的结果总结在下表3中。

[0774] 表3.PIKfyve抑制

[0775]

| 化合物 No. | PIKfyve 生物化学<br>IC <sub>50</sub> (μM)* | PIKfyve EEA1<br>IC <sub>50</sub> (μM)* |
|---------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 1       | +++                                    | +                                      |
| 2       | +++                                    | +                                      |
| 3       | nt                                     | +++                                    |
| 4       | nt                                     | +                                      |
| 5       | nt                                     | +                                      |
| 6       | +++                                    | +                                      |
| 7       | ++++                                   | +++                                    |
| 8       | ++++                                   | ++                                     |
| 9       | ++++                                   | +++                                    |
| 10      | +++                                    | ++                                     |
| 11      | +++                                    | +                                      |
| 12      | ++++                                   | ++                                     |
| 13      | ++++                                   | ++                                     |
| 14      | ++++                                   | +++                                    |
| 15      | +++                                    | ++                                     |
| 16      | ++++                                   | +++                                    |
| 17      | ++++                                   | +++                                    |
| 18      | nt                                     | +                                      |
| 19      | +++                                    | ++                                     |
| 20      | nt                                     | ++                                     |
| 21      | nt                                     | +                                      |
| 22      | nt                                     | +                                      |
| 23      | nt                                     | +                                      |
| 24      | nt                                     | +                                      |
| 25      | nt                                     | ++                                     |
| 26      | nt                                     | +                                      |
| 27      | nt                                     | +                                      |
| 28      | nt                                     | +                                      |
| 29      | nt                                     | +                                      |
| 30      | +++                                    | +                                      |
| 31      | nt                                     | +                                      |
| 32      | ++                                     | +                                      |
| 33      | +++                                    | ++                                     |
| 34      | nt                                     | +++                                    |
| 35      | nt                                     | +                                      |
| 36      | nt                                     | +                                      |
| 37      | nt                                     | +                                      |
| 38      | +++                                    | ++                                     |

[0776]

|    |      |     |
|----|------|-----|
| 39 | ++++ | +++ |
| 40 | +++  | +++ |
| 41 | +++  | ++  |
| 42 | nt   | +   |
| 43 | nt   | +   |
| 44 | +    | -   |
| 45 | nt   | +   |
| 46 | ++   | -   |
| 47 | +++  | ++  |
| 48 | nt   | ++  |
| 49 | +++  | ++  |
| 50 | nt   | ++  |
| 51 | nt   | ++  |
| 52 | nt   | +   |
| 53 | nt   | +++ |
| 54 | nt   | +++ |
| 55 | nt   | +   |
| 56 | nt   | ++  |
| 57 | ++++ | ++  |
| 58 | nt   | ++  |
| 59 | nt   | +   |
| 60 | nt   | +   |
| 61 | nt   | +   |
| 62 | ++++ | ++  |
| 63 | nt   | +   |
| 64 | nt   | +   |
| 65 | +++  | +   |
| 66 | ++++ | ++  |
| 67 | nt   | +   |
| 68 | ++++ | +++ |
| 69 | nt   | +   |
| 70 | nt   | +   |
| 71 | nt   | ++  |
| 72 | nt   | +++ |
| 73 | nt   | +   |
| 74 | +++  | ++  |

[0777] \*++++代表<10nM;+++代表10-100nM;++代表100-1000nM;+代表1-10 $\mu$ M;-代表>10 $\mu$ M;nt代表未测试

[0778] 实施例66.在FAB1 TDP-43和PIKfyve TDP-43酵母细胞中评估TDP-43毒性的存活力测定。

[0779] 表达人PIKfyve的TDP-43酵母模型的产生。根据标准Gateway克隆方案(Invitrogen,Life Technologies)将人PIKFYVE(“进入克隆”)克隆到pAG416GPDccdB(“目的载体”)中。在大肠杆菌中扩增所得pAG416GPD-PIKFYVE质粒,并通过限制性消化和Sanger测序确认质粒身份。使用基于乙酸锂/聚乙二醇的转化将上述PIKFYVE质粒引入ura3基因营

养缺陷型的且缺失调节外源性外排泵(一种主要外排泵)和FAB1的两种转录因子的BY4741酵母菌株,PIKFYVE的酵母直系同源物(MATa,snq2::KILeu2;pdr3::Klura3;pdr1::NATMX;fab1::G418<sup>R</sup>,his3;leu2;ura3;met15;LYS2+) (图2)。将转化的酵母铺板在含有缺乏尿嘧啶(CSM-ura)并含有2%葡萄糖的完全合成培养基的固体琼脂平板上。回收携带对照或PIKFYVE TDP-43质粒的单个菌落。将含有在GAL1启动子转录控制下的野生型TDP-43并含有潮霉素抗性基因作为选择标记的质粒转化到fab1::G418<sup>R</sup> pAG416GPD-PIKFYVE酵母菌株(图1)中。在缺乏抗生素的培养基中过夜恢复后,将转化的酵母铺板在含有2%葡萄糖和200 µg/mL G418的CSM-ura上。进一步评估多个独立分离株的细胞毒性和TDP-43表达水平。

[0780] 存活力测定。使用碘化丙啶活力测定评估具有野生型酵母FAB1基因和TDP-43的对照酵母菌株(“FAB1 TDP-43”,携带空pAG416质粒)和“PIKFYVE TDP-43”酵母菌株的毒性。将两种酵母菌株从固体CSM-ura/2%葡萄糖琼脂平板转移到3mL液体CSM-ura/2%葡萄糖培养基中,在30℃下通气6-8小时。然后将酵母培养物在3mL CSM-URA/2%棉子糖中稀释至600nm波长处0.005的光密度(OD<sub>600</sub>),并在通气下在30℃下生长过夜至0.3-0.8的OD<sub>600</sub>。将对数期过夜培养物在含有2%棉子糖或半乳糖的CSM-ura中稀释至0.005的OD<sub>600</sub>,并将150µL分配到平底96孔板的每个孔中。将在100%二甲亚砜(DMSO)中配制的化合物在DMSO中连续稀释,并使用多通道移液管将1.5µL稀释的化合物转移至96孔板。还评估含单独DMSO的孔作为化合物效应的对照。测试的浓度范围是15µM至0.11µM。将培养物立即混合以确保化合物分布,并将覆盖的板在30℃下在静止的潮湿培养箱中孵育24小时。

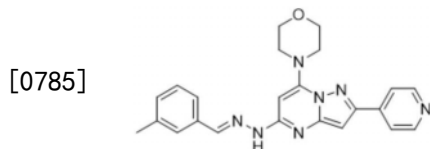
[0781] 孵育完成后,使用碘化丙啶(PI)对死亡/垂死细胞染色来测定培养物的存活力。制备PI的工作溶液,其中对于每个板,将1µL的10mM PI加入10mL的CSM-ura(棉子糖或半乳糖)中。将最终的PI溶液(50µL/孔)分配到新圆底96孔板的每个孔中。然后将过夜96孔测定板用多通道移液管混合,并将50µL转移到含有PI的板中。然后将该板在黑暗中以30℃下孵育30分钟。然后使用台式流式细胞仪(Miltenyi MACSquant)评估红色荧光(B2通道)、前向散射和侧向散射(具有以下设置:温和混合、高流速、快速测量、10,000个事件)。然后使用DMSO处理的棉子糖和半乳糖培养物作为对照,针对“PI阳性”或“PI阴性”对强度直方图进行门控。含有棉子糖或半乳糖的培养物的DMSO对照用于确定细胞死亡增加的窗口,并且将该差异设定为100。对所有化合物进行类似的门控,然后与该最大窗口进行比较,以确定PI阳性细胞的减少百分比。然后通过拟合逻辑回归曲线对化合物计算证明存活力的浓度依赖性增强的IC50值。

[0782] 在两种菌株中诱导TDP-43后,FAB1 TDP-43和PIKFYVE TDP-43均显著增加了不存活的细胞(最右边的群体),在PIKFYVE TDP-43中具有更显著的作用(图3和4)。

[0783] PIKfyve抑制在PIKfyve TDP-43模型中遏制毒性。生物化学PIKFyve抑制测定由Carna Biosciences根据基于Promega ADP-Glo<sup>TM</sup>激酶测定的专有方法进行。使用杆状病毒表达系统将全长人PIKFYVE[登录号NP\_055855.2的1-2098(末端)氨基酸和S696N、L932S、Q995L、T998S、S1033A和Q1183K]表达为N-末端GST-融合蛋白(265kDa)。通过使用谷胱甘肽琼脂糖层析纯化GST-PIKFYVE并用于ADP-Glo<sup>TM</sup>激酶测定(Promega)中。通过加入测试化合物溶液、底物溶液、ATP溶液和激酶溶液(各自是4×终浓度)来建立反应。用测定缓冲液(50mM MOPS,1mM DTT,pH7.2)制备反应,混合,并在黑色384孔聚苯乙烯板中在室温下孵育1小时。然后加入ADP-Glo<sup>TM</sup>试剂40分钟,然后加入激酶检测试剂另外40分钟。通过在发光板

阅读仪上检测相对光单位来评估激酶活性。样品从10 $\mu$ M至3nM一式两份运行。通过将对照孔(+PIKfyve, 无化合物) 设定为0%抑制并将背景(无PIKfyve) 的读数设定为100%抑制来分析数据, 然后计算每种测试溶液的%抑制。通过拟合四参数逻辑曲线, 从浓度vs %抑制曲线计算IC<sub>50</sub>值。

[0784] APY0201 (一种已知的PIKFYVE抑制剂) 在FAB1 TDP-43 (图5) 和PIKFYVE TDP-43 (图6) 中的活性。在一定范围的化合物浓度下, FAB1 TDP-43中的活细胞没有增加, 如通过碘化丙啶阳性细胞的最右侧群体减少的缺乏所证明的 (仅显示0.23 $\mu$ M)。在PIKFYVE TDP-43模型中, 0.23 $\mu$ M减少了碘化丙啶阳性死细胞的群体, 表明PIKFYVE抑制改善了TDP-43毒性。0.5mM至小于100nM的浓度范围提供了增加的存活力。



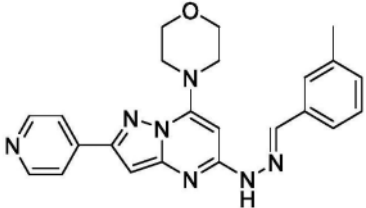
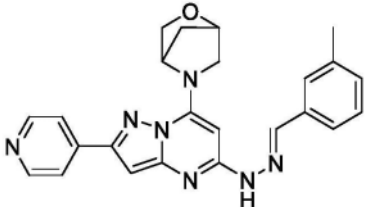
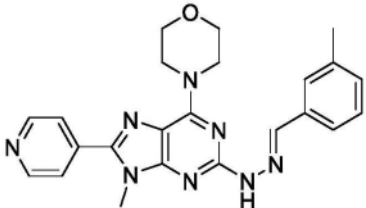
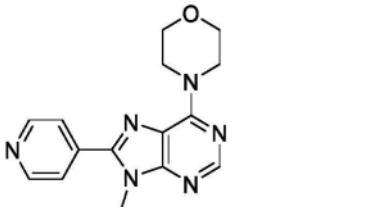
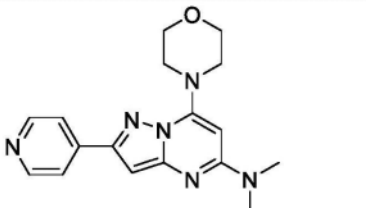
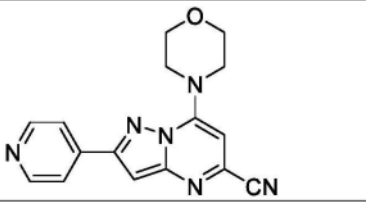
[0786] APY201

[0787] 在生物化学PIKFYVE测定 (具有全长PIKfyve的ADP-Glo™) 中测试了一组化合物, 并测定IC<sub>50</sub> (nM) (参见下表)。还在FAB1和PIKFYVE TDP-43酵母模型中测试了相同的化合物。将它们的活性在本文中报告为“活性”或“无活性”。在生物化学测定中具有低纳摩尔效力的化合物在PIKFYVE TDP-43酵母模型中具有活性。在生物化学测定中效能较低或无活性的化合物在PIKFYVE TDP-43模型中无活性。将在生物化学或PIKFYVE TDP-43测定中无活性的化合物用在该测定中测试的最高浓度作图。

[0788]

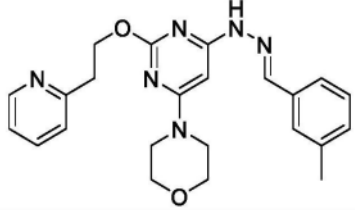
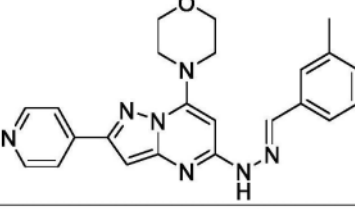
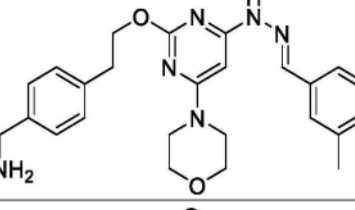
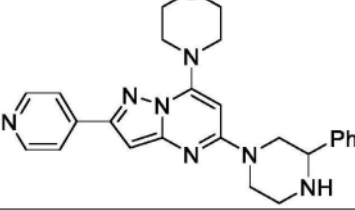
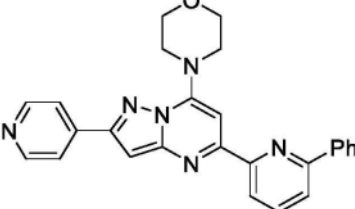
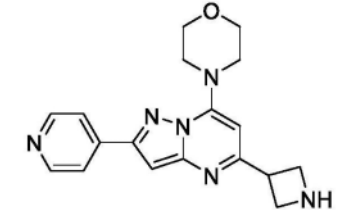
| 结构 | PIKfyve IC <sub>50</sub><br>(nM) | FAB1 TDP-43<br>(活性/无活性) | PIKfyve<br>TDP-43<br>(活性/无活性) |
|----|----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
|----|----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|

[0789]

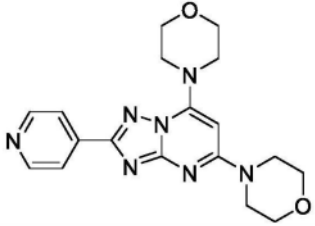
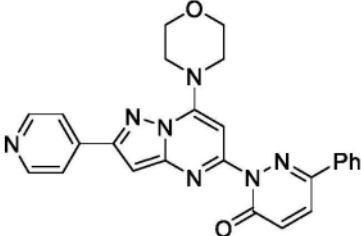
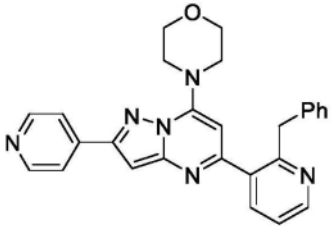
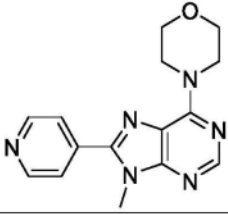
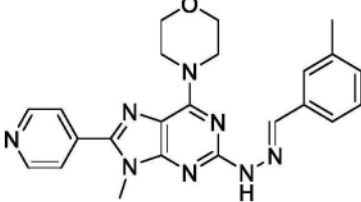
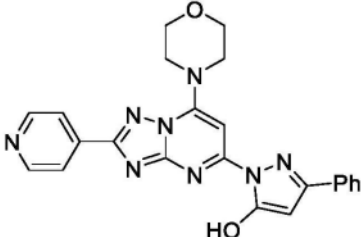
|                                                                                     |        |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----|-----|
|    | 7.5    | 无活性 | 活性  |
|    | 12     | 无活性 | 活性  |
|    | 4.9    | 无活性 | 活性  |
|   | 640    | 无活性 | 无活性 |
|  | 2007   | 无活性 | 无活性 |
|  | >10000 | 无活性 | 无活性 |

[0790] 生物化学和功效测定。在PIKfyve激酶结构域结合测定 (nanobret) 和PIKFYVE TDP-43酵母菌株中评估了较大组的PIKfyve抑制剂。IC<sub>50</sub>值 (μM) 作图。基于来自nanobret测定的分箱效力将数据点格式化,如图例中所示 (图7)。下面是图7中绘制的化合物及其生物化学和PIKFYVE TDP-43IC<sub>50</sub>值的表。

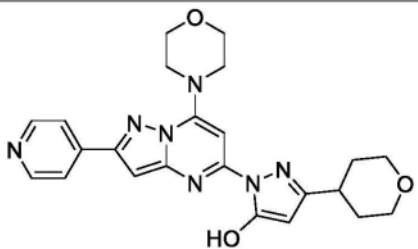
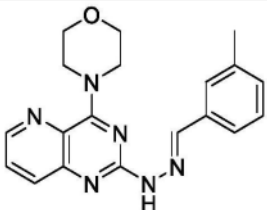
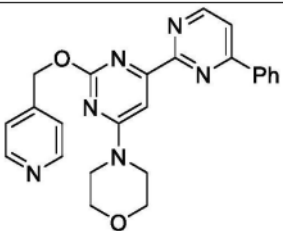
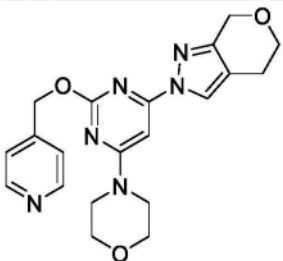
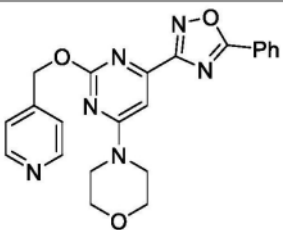
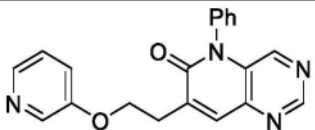
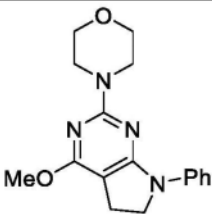
[0791]

| 结构                                                                                  | PIKFYVE 生物化学<br>(IC <sub>50</sub> , μM) | PIKFYVE TDP-43<br>(IC <sub>50</sub> , μM) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
|    | 0.003                                   | 0.450                                     |
|    | 0.001                                   | 1.390                                     |
|    | 0.007                                   | 1.120                                     |
|   | 2.660                                   | >15                                       |
|  | 0.014                                   | 0.230                                     |
|  | 8.020                                   | >15                                       |

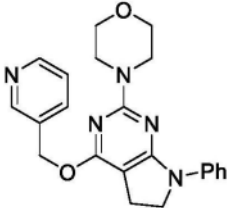
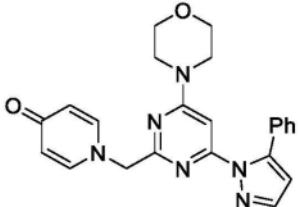
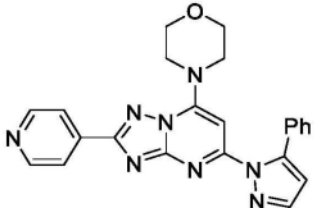
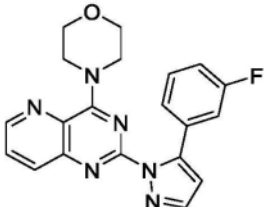
[0792]

|                                                                                     |       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
|    | 9.200 | >15   |
|    | 0.295 | >15   |
|    | 1.090 | >15   |
|   | 0.640 | >15   |
|  | 0.005 | 4.720 |
|  | 0.018 | 0.693 |

[0793]

|                                                                                     |       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
|    | 0.253 | 9.105 |
|    | 0.018 | 8.214 |
|    | 0.032 | 1.447 |
|   | 1.343 | >15   |
|  | >10   | >15   |
|  | >10   | >15   |
|  | 0.085 | 4.273 |

[0794]

|                                                                                    |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
|   | 0.042 | 2.685 |
|   | >10   | >15   |
|   | 0.767 | >15   |
|  | >10   | 5.754 |

[0795] 其他实施方式

[0796] 在不脱离本发明的范围和精神的情况下,所描述的发明的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。尽管已经结合具体实施方式描述了本发明,但是应当理解,所要求保护的本发明不应不适当地限于这些具体实施方式。实际上,对于本领域技术人员显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修改旨在在本发明的范围内。

[0797] 其他实施方式在权利要求中。

## FAB1 TDP-43

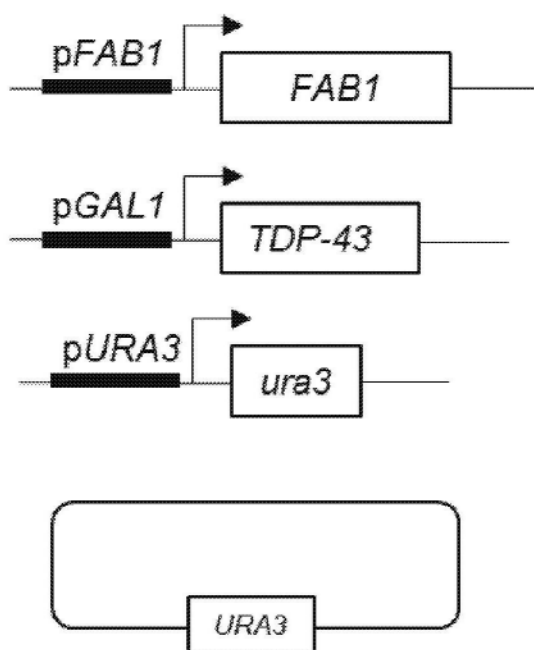


图1

## PIKFYVE TDP-43

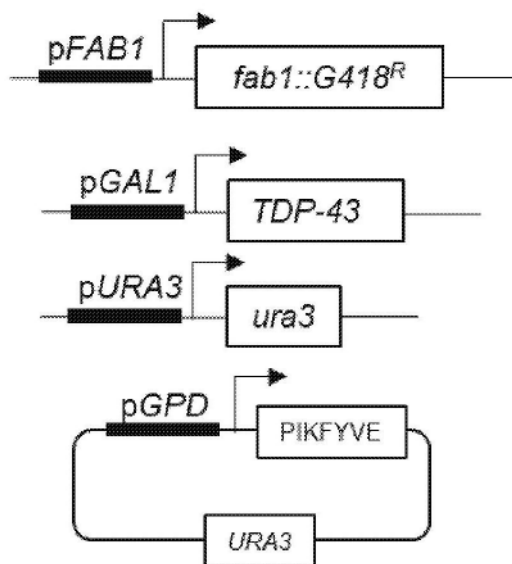


图2

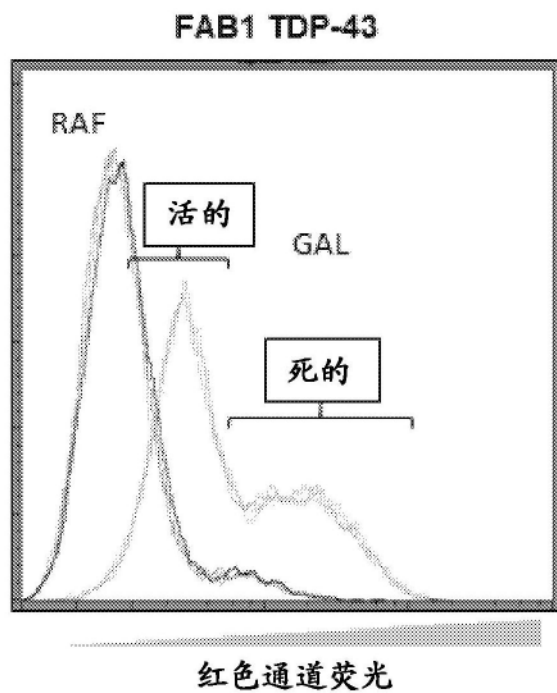


图3

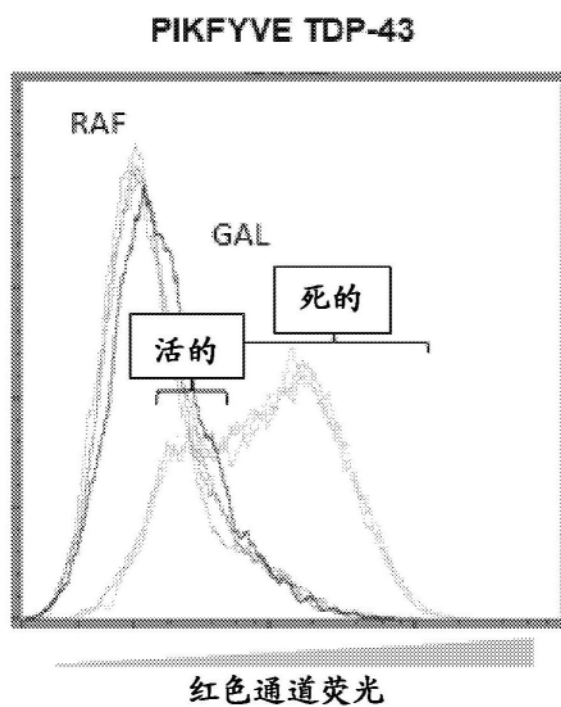
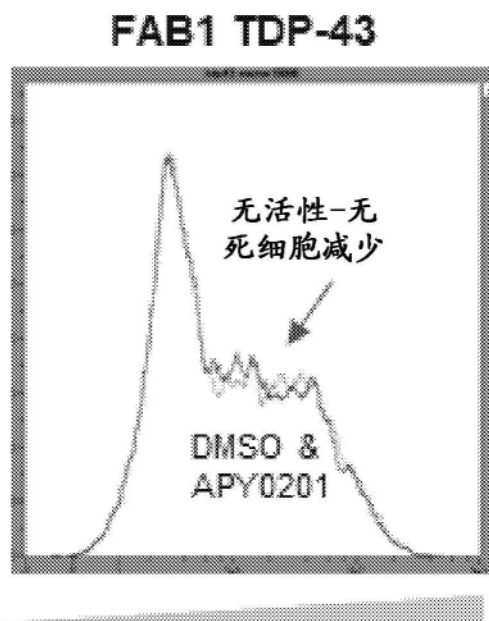
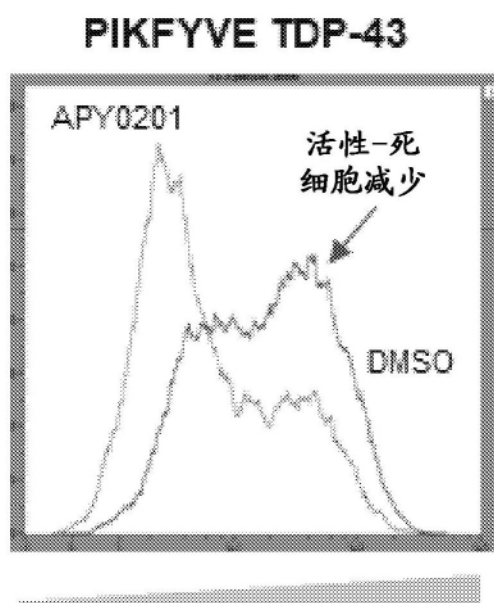


图4



红色通道荧光

图5



红色通道荧光

图6

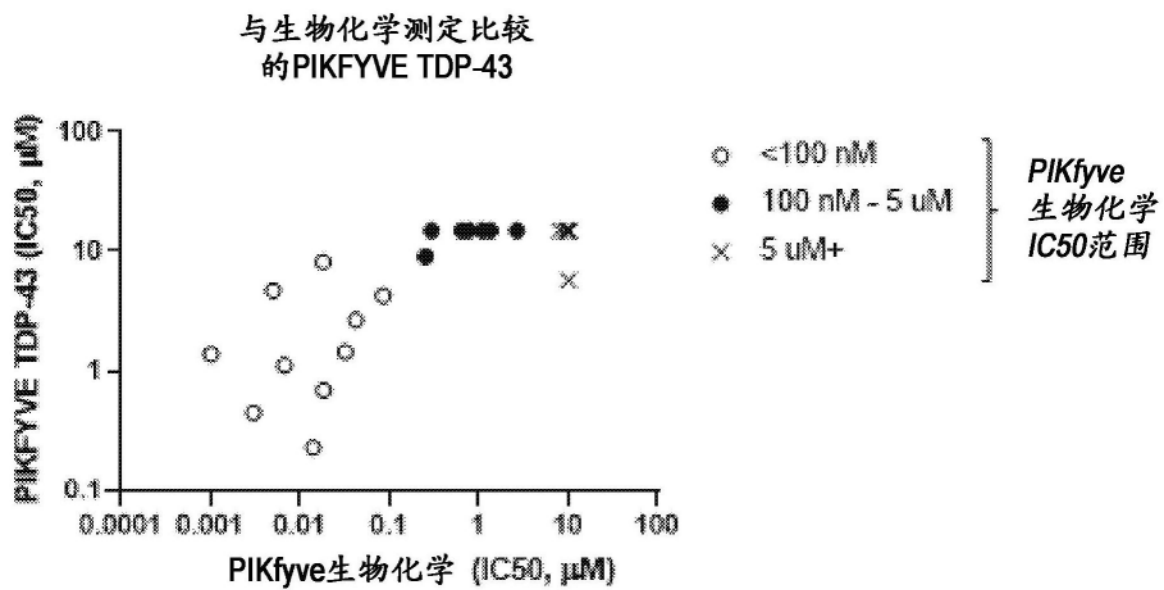


图7