



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118076604 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 24

(21) 申请号 202280063841.X

(22) 申请日 2022.09.22

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/120406 2021.09.24 CN

PCT/CN2022/089033 2022.04.25 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/076306 2022.09.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/046806 EN 2023.03.30

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 陈冬冬 F·戴伊 洪鑫 王晓卿

张志森 朱伟 邹舸

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 邵红 何茜

(51) Int.Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

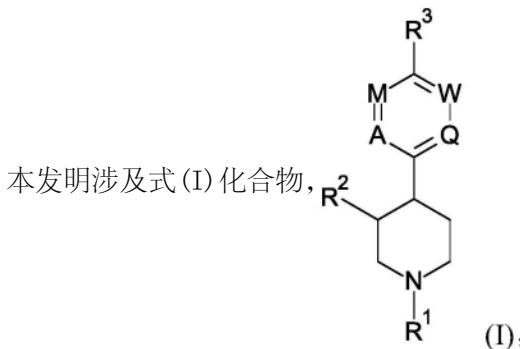
权利要求书8页 说明书72页

(54) 发明名称

用于治疗自身免疫性疾病的吡唑并[3,4-b]

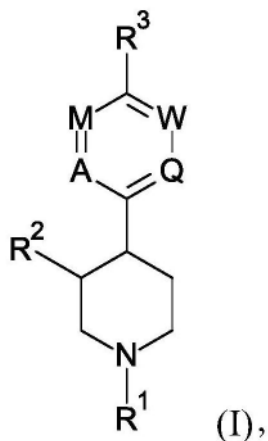
吡啶化合物

(57) 摘要

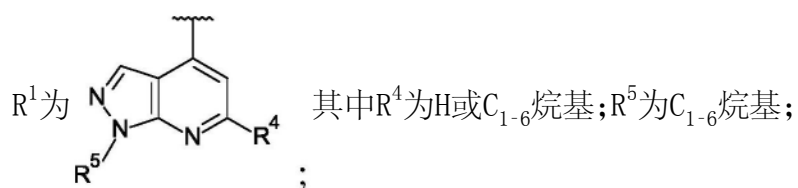


其中R¹至R³、A、M、W和Q如本文所述,及其药用盐,以及包含所述化合物的组合物和使用所述化合物的方法。

1. 一种式 (I) 化合物,



其中



R^2 为 H 或 C_{1-6} 烷基;

R^3 为哌嗪基、(C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基) 哌嗪基、3,4,4a,5,7,7a-六氢-2H-吡咯并[3,4-b][1,4]噁嗪基、4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷基、5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷基、氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基 (C_{1-6} 烷氧基) 哌啶基、氨基 (C_{1-6} 烷氧基) 吡咯烷基、氨基 (C_{1-6} 烷基) 氮杂环丁烷基或氨基卤代哌啶基;

A 为 N 或 CR^6 ; 其中 R^6 为 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷氧基;

M 为 N 或 CR^7 ; 其中 R^7 为 H 或 C_{1-6} 烷基;

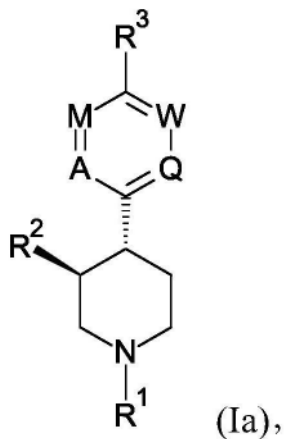
W 为 N 或 CH;

Q 为 N 或 CH;

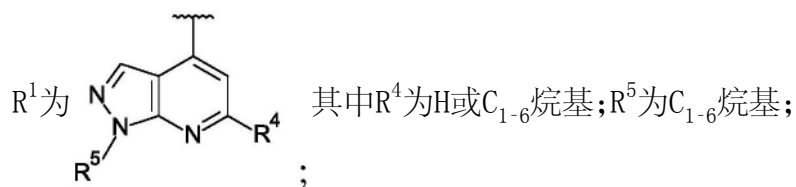
条件是 A、M、W 和 Q 中的不超过两者同时为 N;

或其药用盐。

2. 一种式 (Ia) 化合物,



其中



R²为H或C₁₋₆烷基;

R³为哌嗪基、(C₁₋₆烷氧基C₁₋₆烷基)哌嗪基、3,4,4a,5,7,7a-六氢-2H-吡咯并[3,4-b][1,4]噁嗪基、4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷基、5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷基、氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C₁₋₆烷氧基)哌啶基、氨基(C₁₋₆烷氧基)吡咯烷基、氨基(C₁₋₆烷基)氮杂环丁烷基或氨基卤代哌啶基;

A为N或CR⁶;其中R⁶为H、C₁₋₆烷基或C₁₋₆烷氧基;

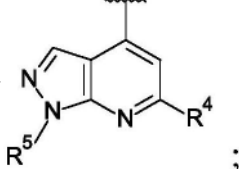
M为N或CR⁷;其中R⁷为H或C₁₋₆烷基;

W为N或CH;

Q为N或CH;

条件是A、M、W和Q中的不超过两者同时为N;

或其药用盐。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中R¹为  其中R⁴为C₁₋₆烷基;R⁵为

C₁₋₆烷基。

4. 根据权利要求3所述的化合物,其中R⁴为甲基;R⁵为甲基。

5. 根据权利要求3所述的化合物,其中A为CR⁶;其中R⁶为H或C₁₋₆烷基。

6. 根据权利要求5所述的化合物,其中A为CR⁶;其中R⁶为H或甲基。

7. 根据权利要求5所述的化合物,其中M为CR⁷;其中R⁷为H。

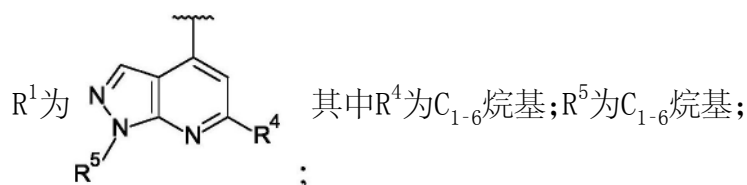
8. 根据权利要求7所述的化合物,其中W为CH。

9. 根据权利要求8所述的化合物,其中Q为N。

10. 根据权利要求9所述的化合物,其中R³为氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C₁₋₆烷氧基)吡咯烷基或哌嗪基。

11. 根据权利要求10所述的化合物,其中R³为6-氨基-1,4-氧氮杂环庚烷-4-基、3-氨基-4-甲氧基-吡咯烷-1-基或哌嗪-1-基。

12. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中



R²为H或C₁₋₆烷基;

R³为氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C₁₋₆烷氧基)吡咯烷基或哌嗪基;

A为CR⁶;其中R⁶为H或C₁₋₆烷基;

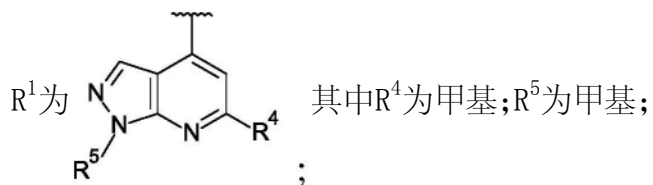
M为CR⁷;其中R⁷为H;

W为CH;

Q为N;

或其药用盐。

13. 根据权利要求13所述的化合物, 其中



R²为H或甲基;

R³为6-氨基-1,4-氧氮杂环庚烷-4-基、3-氨基-4-甲氧基-吡咯烷-1-基或哌嗪-1-基;

A为CR⁶;其中R⁶为H或甲基;

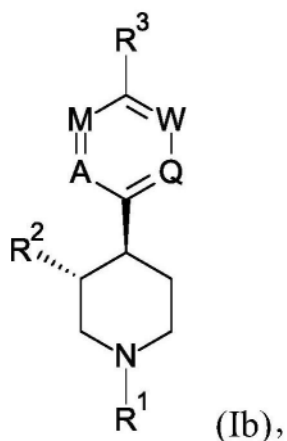
M为CR⁷;其中R⁷为H;

W为CH;

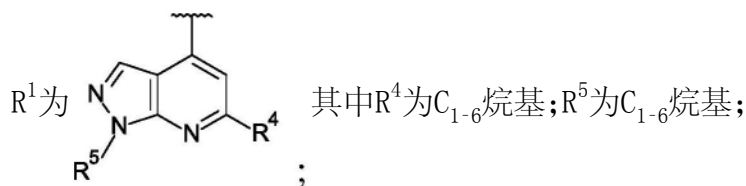
Q为N;

或其药用盐。

14. 一种式 (Ib) 化合物,



其中



R²为C₁₋₆烷基;

R³为哌嗪基、(C₁₋₆烷氧基C₁₋₆烷基)哌嗪基、4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷基、5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷基、氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C₁₋₆烷氧基)哌啶基、氨基(C₁₋₆烷氧基)吡咯烷基、氨基(C₁₋₆烷基)氮杂环丁烷基或氨基卤代哌啶基;

A为CH;

M为CH;

W为CH;

Q为N;

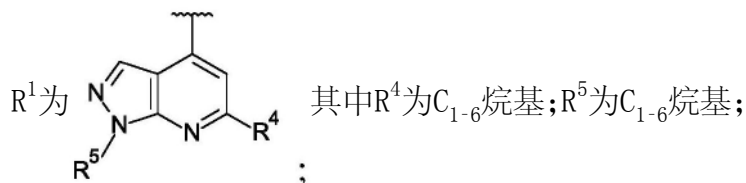
或其药用盐。

15. 根据权利要求14所述的化合物, 其中R⁴为甲基; R⁵为甲基; R²为甲基。

16. 根据权利要求14或15所述的化合物, 其中R³为氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的化合物, 其中R³为6-氨基-1,4-氧氮杂环庚烷-4-基。

18. 根据权利要求14所述的化合物, 其中



R²为C₁₋₆烷基;

R³为氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基;

A为CH;

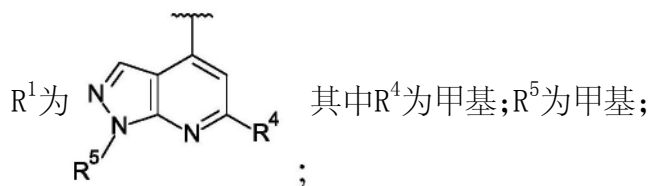
M为CH;

W为CH;

Q为N;

或其药用盐。

19. 根据权利要求18所述的化合物, 其中



R²为甲基;

R³为6-氨基-1,4-氧氮杂环庚烷-4-基;

A为CH;

M为CH;

W为CH;

Q为N;

或其药用盐。

20. 一种化合物, 其选自:

1,6-二甲基-4-[4-(4-哌嗪-1-基苯基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基嘧啶-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

1-甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

1-甲基-4-[4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

1,6-二甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

- 1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[4-(2-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-2-哌嗪-1-基-嘧啶-5-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
4-[4-(3-乙基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;
4-[4-(3-甲氧基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;
(3S,4R)-1-[6-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺;
4-[4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-3-甲基-2-吡啶基]-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;
(3S,4S)-1-[6-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-甲氧基-哌啶-4-胺;
1-甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1-甲基-4-[反式-3-甲基-4-(6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;
(3R,4R)-1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-4-甲氧基-吡咯烷-3-胺;
2-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷;
(6S)-4-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-1,4-氧氮杂环庚烷-6-胺;
4-[(3S,4R)-4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-3-甲基-2-吡啶基]-3-甲基-1-

哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;

4-[(3S,4R)-4-[5-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-7-基)-3-甲基-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;

(3R,4R)-1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺;

1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-甲基-氮杂环丁烷-3-胺;

(4aR,7aR)-6-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3,4,4a,5,7,7a-六氢-2H-吡咯并[3,4-b][1,4]噁嗪;

1,6-二甲基-4-[(3R,4S)-3-甲基-4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

1,6-二甲基-4-[(3S,4R)-3-甲基-4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

(3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-4-甲氧基-吡咯烷-3-胺;

4-[(3R,4S)-4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;

2-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷;

(3S,4S)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-甲氧基-哌啶-4-胺;

(6S)-4-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-1,4-氧氮杂环庚烷-6-胺;

(3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺;

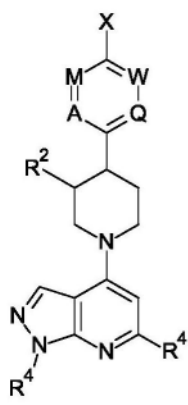
4-[(3R,4S)-4-[5-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-7-基)-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;以及

1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-甲基-氮杂环丁烷-3-胺;

或其药用盐。

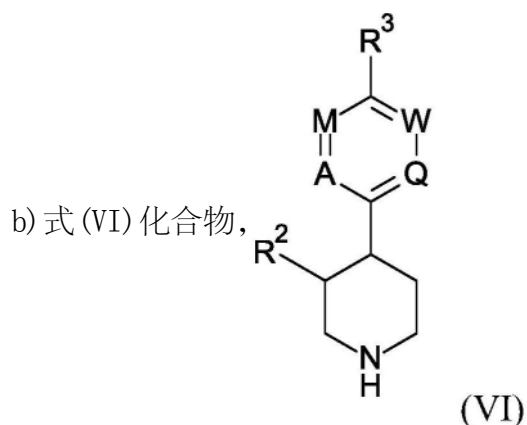
21.一种用于制备根据权利要求1至20中任一项所述的化合物的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 式(IV)化合物,

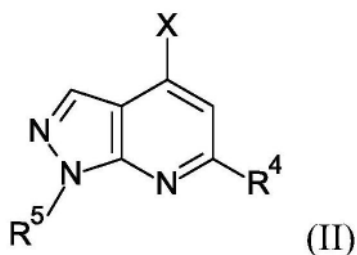


与 R^3 -H之间在催化剂和碱存在下的Buchwald-Hartwig C-N键形成

反应;



与式 (II) 化合物,



之间在催化剂和碱存在下的Buchwald-Hartwig C-N键形成

反应;

c) 式 (VI) 化合物与式 (II) 化合物在碱存在下的直接取代反应; 其中
X为卤素;

在步骤a) 和b) 中, 所述催化剂为RuPhos Pd G2或 $Pd_2(dba)_3/XantPhos$; 所述碱为 CS_2CO_3 或t-BuONa;

在步骤c) 中, 所述碱为DIPEA或CsF;

其中 R^1 至 R^5 、A、M、W和Q如权利要求1至19中任一项中所定义。

22. 根据权利要求1至20中任一项所述的化合物或药用盐, 其用作治疗活性物质。

23. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1至20中任一项所述的化合物以及治疗惰性载体。

24. 根据权利要求1至20中任一项所述的化合物用于治疗或预防系统性红斑狼疮或狼疮肾炎的用途。

25. 根据权利要求1至20中任一项所述的化合物用于制备药物的用途, 所述药物用于治疗或预防系统性红斑狼疮或狼疮肾炎。

26. 根据权利要求1至20中任一项所述的化合物用于制备药物的用途, 所述药物用于TLR7和TLR8和TLR9拮抗剂。

27. 根据权利要求1至20中任一项所述的化合物或药用盐, 其用于治疗或预防系统性红斑狼疮或狼疮肾炎。

28. 根据权利要求1至20中任一项所述的化合物或药用盐, 其根据权利要求21所述的方法制造。

29. 一种用于治疗或预防系统性红斑狼疮或狼疮肾炎的方法, 所述方法包括施用治疗有效量的如权利要求1至20中任一项中所定义的化合物。

30. 如前所述的本发明。

用于治疗自身免疫性疾病的吡唑并[3,4-b]吡啶化合物

[0001] 本发明涉及可用于哺乳动物的治疗和/或预防的有机化合物,并且尤其涉及可用于治疗系统性红斑狼疮或狼疮肾炎的TLR7和TLR8和TLR9的拮抗剂。

技术领域

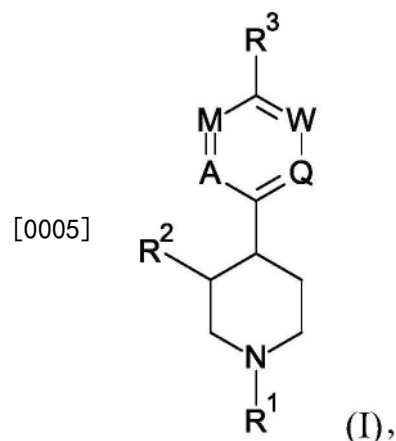
[0002] 自身免疫性结缔组织病(CTD)包括典型的自身免疫综合征,诸如系统性红斑狼疮(SLE)、原发性干燥综合征(pSjS)、混合性结缔组织病(MCTD)、皮炎/多发性肌炎(DM/PM)、类风湿关节炎(RA)和系统性硬化症(SSc)。除RA以外,对患者来说,没有真正有效且安全的治疗方法。SLE代表典型的CTD,其患病率为20-150/100,000,并在不同器官引起广泛的炎症和组织损伤,从皮肤和关节的常见症状到肾、肺或心力衰竭。传统上,SLE已使用非特异性抗炎药或免疫抑制剂进行治疗。但是,长期使用免疫抑制药物,例如,皮质类固醇仅部分有效,并伴有非预期毒性和副作用。贝利尤单抗是过去50年中唯一获得FDA批准的用于狼疮的药物,尽管仅对部分SLE患者具有适度延迟的疗效(Navarra, S.V.等人, Lancet 2011, 377, 721.)。其他生物制剂,诸如抗CD20 mAb、抗特定细胞因子的mAb或其可溶受体,在大多数临床研究中均失败了。因此,需要新型疗法,其在更大比例的患者群组中提供持续改善,并且对于在许多自身免疫以及自身炎症性疾病中的长期使用而言更安全。

[0003] Toll样受体(TLR)是模式识别受体(PRR)的重要家族,可以引发多种免疫细胞产生广泛的免疫应答。核内体TLR7、TLR8和TLR9作为天然的宿主防御传感器,可识别衍生自病毒、细菌的核酸;具体地,TLR7/TLR8和TLR9分别识别单链RNA(ssRNA)和单链CpG-DNA。然而,TLR7、TLR8、TLR9的异常核酸感测被认为是广泛的自身免疫性疾病和自身炎症性疾病的关键节点(Krieg, A.M.等人 Immunol. Rev. 2007, 220, 251. Jiménez-Dalmaroni, M.J.等人, Autoimmun Rev. 2016, 15, 1. Chen, J.Q.,等人 Clinical Reviews in Allergy & Immunology 2016, 50, 1.)。抗RNA和抗DNA抗体是SLE的公认诊断标志,并且这些抗体可以将自身RNA和自身DNA两者传递至内体。自身RNA复合物可以被TLR7和TLR8识别,而自身DNA复合物可以触发TLR9活化。实际上,在SLE(系统性红斑狼疮)患者中,自身RNA和自身DNA从血液和/或组织中的缺陷清除很明显。据报道,TLR7和TLR9在SLE组织中被上调,并分别与狼疮肾炎的慢性和活性有关。在SLE患者的B细胞中,TLR7表达与抗RNP抗体的产生相关,而TLR9表达与IL-6和抗dsDNA抗体水平相关。一致地,在狼疮小鼠模型中,抗RNA抗体需要TLR7,抗核小体抗体需要TLR9。另一方面,小鼠中TLR7或人TLR8的过度表达会促进自身免疫和自身炎症。此外,TLR8的活化特别有助于mDC/巨噬细胞的炎症性细胞因子分泌,嗜中性粒细胞胞外捕网过程(NETosis), Th17细胞的诱导和Treg细胞的抑制。除了描述的TLR9在促进B细胞自身抗体产生中的作用外, pDC中通过自身DNA活化TLR9还会导致诱导I型IFN和其他炎症性细胞因子。考虑到pDC和B细胞两者中TLR9的这些作用,它们都是自身免疫性疾病发病机理的关键因素,而且在许多自身免疫性疾病患者中大量存在可轻易活化TLR9的自身DNA复合物,在抑制TLR7和TLR8途径基础之上,它对于进一步阻断自身DNA介导的TLR9途径可能具有额外益处。总之,TLR7、TLR8和TLR9途径代表了治疗自身免疫性疾病和自身炎症性疾病的新治疗靶点,针对这些疾病,不存在有效的不含类固醇和无细胞毒性的口服药物,并且从非常上游就抑

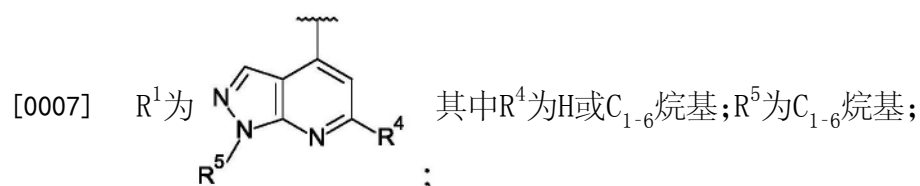
制了所有这些途径可能会带来令人满意的治疗效果。因此,我们发明了靶向和抑制TLR7、TLR8和TLR9的口服化合物,用于治疗自身免疫性疾病和自身炎症性疾病。

发明内容

[0004] 本发明涉及具有式(I)的新型化合物,



[0006] 其中



[0008] R^2 为H或 C_{1-6} 烷基;

[0009] R^3 为哌嗪基、(C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基)哌嗪基、3,4,4a,5,7,7a-六氢-2H-吡咯并[3,4-b][1,4]噁嗪基、4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷基、5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷基、氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C_{1-6} 烷氧基)哌啶基、氨基(C_{1-6} 烷氧基)吡咯烷基、氨基(C_{1-6} 烷基)氮杂环丁烷基或氨基卤代哌啶基;

[0010] A为N或 CR^6 ;其中 R^6 为H、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷氧基;

[0011] M为N或 CR^7 ;其中 R^7 为H或 C_{1-6} 烷基;

[0012] W为N或CH;

[0013] Q为N或CH;

[0014] 条件是A、M、W和Q中的不超过两者同时为N;

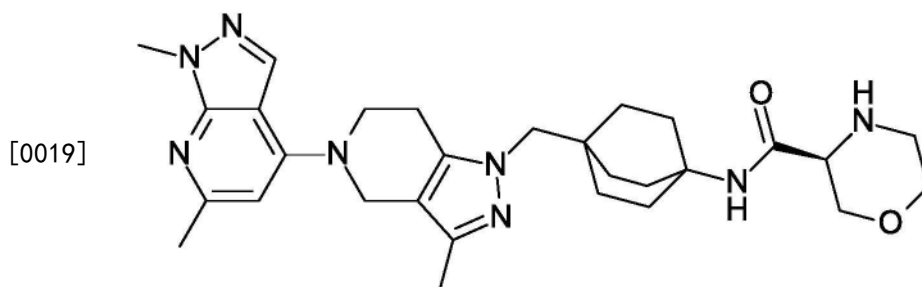
[0015] 或其药用盐。

[0016] 本发明的另一目的涉及式(I)或(Ia)的新型化合物。它们的制备、基于根据本发明所述的化合物的药物及其制备以及式(I)或(Ia)化合物作为TLR7和TLR8和TLR9拮抗剂的用途及用于治疗或预防系统性红斑狼疮或狼疮肾炎的用途。式(I)或(Ia)化合物显示出优异的TLR7和TLR8和TLR9拮抗活性。另外,式(I)或式(Ia)的化合物还显示出良好的细胞毒性、光毒性、溶解性、hPBMC、人微粒体稳定性和SDPK特征,以及低CYP抑制作用。

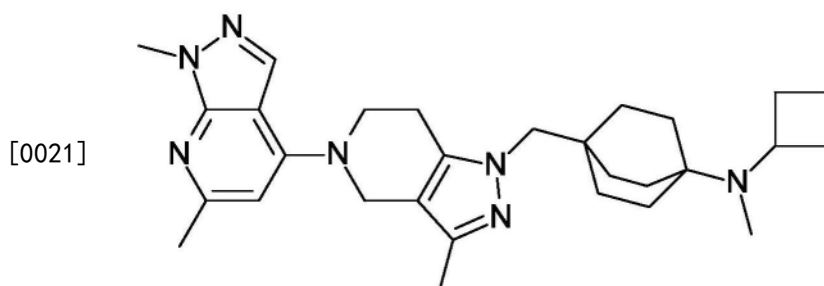
[0017] 诺华公司(Novartis)专利W02018047081公开了与本发明的化合物具有相同吡唑并[3,4-b]吡啶基部分的化合物,然而基于诺华公司专利中公开的信息,4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶的中心双环核和用双环[2,2,2]辛烷/双环[1,1,1]戊烷部分的末端取

代对于TLR7/8/9活性是必不可少的,这也被认为是与本发明的化合物相比的主要结构差异。另一方面,W02018047081中的化合物中的大多数显示出较差的TLR9活性。遗憾的是,少数具有相对改善的TLR9活性的化合物(诸如具有最佳TLR9活性的N79(如实例79))仍具有较差的人肝微粒体稳定性(参见表5)并因此具有不令人满意的PK曲线。

[0018] 另一项诺华公司专利W02019220390公开了化合物N8的多晶型物(如W02018047081中的实例8),该多晶型物被认为是其系列中的先导化合物并且被证明具有低得多的TLR9活性和类似的较差的人肝微粒体稳定性(参见表5)。



[0020] 化合物N8(hPBMCLTLR7/8/9拮抗剂IFN α 测定IC₅₀(μ M):0.004/0.166/4.28)



[0022] 化合物N79(hPBMCLTLR7/8/9拮抗剂IFN α 测定IC₅₀(μ M):0.004/0.136/0.064)

具体实施方式

[0023] 定义

[0024] 术语“C₁₋₆烷基”表示含有1至6个,特别是1至4个碳原子的饱和、直链或支链烷基,例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等。特别地,“C₁₋₆烷基”基团为甲基、乙基和正丙基。

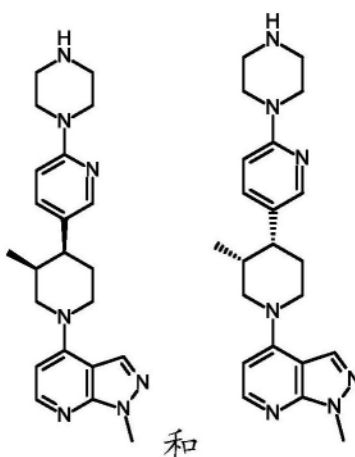
[0025] 术语“C₁₋₆烷氧基”表示C₁₋₆烷基-O-。

[0026] 术语“卤素”和“卤代”在本文中可互换使用,表示氟、氯、溴或碘。

[0027] 术语“卤代哌啶基”表示哌啶基,其中哌啶基的至少一个氢原子已被相同或不同的卤素原子,特别是氟原子取代。卤代哌啶基的实例包括氟吡咯烷基和二氟哌啶基。

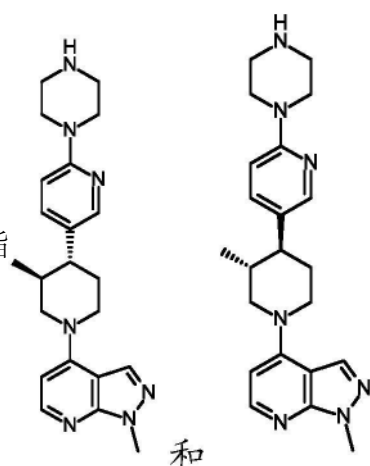
[0028] 术语“顺式”和“反式”表示分子或部分的相对立体化学。例如:

[0029] 作为顺式-异构体的实例18是指



的混合物；类似地，作

为反式-异构体的实例19是指



的混合物。

[0030] 术语“药用盐”表示在生物学上或其他方面不是不期望的盐。“药用盐”包括酸加成盐和碱加成盐两者。

[0031] “药用酸加成盐”是指与无机酸和有机酸形成的那些药用盐，所述无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、碳酸、磷酸等，所述有机酸可以选自脂肪族、脂环族、芳族、芳脂族、杂环、甲酸和磺酸类有机酸，诸如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、葡萄糖酸、乳酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、天冬氨酸、抗坏血酸、谷氨酸、邻氨基苯甲酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、双羟萘酸、苯乙酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、和水杨酸等。

[0032] 术语“药用碱加成盐”表示与有机或无机碱形成的那些药用盐。可接受的无机碱的实例包括钠、钾、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰和铝盐。衍生自药用有机无毒碱的盐包括伯胺、仲胺和叔胺，取代胺（包括天然存在的取代胺）、环胺和碱性离子交换树脂（诸如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二乙氨基乙醇、氨丁三醇、二环己胺，赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、哈胺 (hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶和多胺树脂）的盐。

[0033] 术语“药物活性代谢物”表示通过特定化合物或其盐在体内的代谢产生的药理活性产物。进入人体后，大多数药物均是化学反应的底物，可能改变其物理性质和生物学效应。这些通常影响本发明化合物极性的代谢转化改变了药物在体内分布和从体内排泄的方式。然而，在某些情况下，药物代谢是治疗效果所必需的。

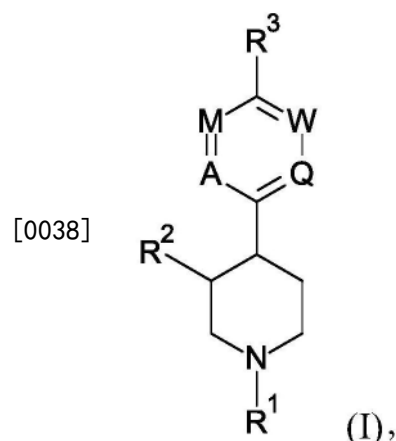
[0034] 术语“治疗有效量”是表示本发明的化合物或分子的量，当将其施用于受试者时，

(i) 治疗或预防特定疾病、病症或疾患, (ii) 减弱、改善或消除特定疾病、病症或疾患的一种或多种症状, 或 (iii) 预防或延迟本文所述的特定疾病、病症或疾患的一种或多种症状的发作。治疗有效量取决于化合物, 所治疗的疾病状态, 所治疗疾病的严重程度, 受试者的年龄和相对健康状况, 施用途和形式, 主治医学或兽医的判断和其他因素。

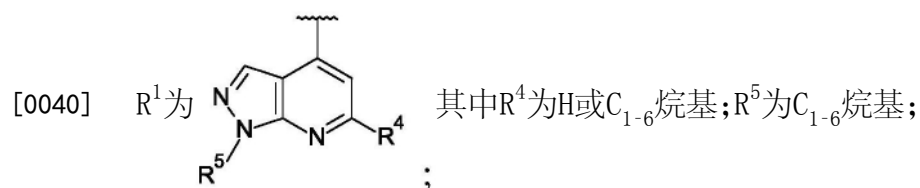
[0035] 术语“药物组合物”表示包含治疗有效量的活性药物成分和一起施用于有此需要的哺乳动物(例如人)的药用赋形剂的混合物或溶液。

[0036] TLR7和TLR8和TLR9的拮抗剂

[0037] 本发明涉及 (i) 一种式 (I) 化合物,



[0039] 其中



[0041] R^2 为 H 或 C_{1-6} 烷基;

[0042] R^3 为 哌嗪基、(C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基) 哌嗪基、3,4,4a,5,7,7a-六氢-2H-吡咯并[3,4-b][1,4]噁嗪基、4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷基、5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷基、氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基 (C_{1-6} 烷氧基) 哌啶基、氨基 (C_{1-6} 烷氧基) 吡咯烷基、氨基 (C_{1-6} 烷基) 氮杂环丁烷基或氨基卤代哌啶基;

[0043] A 为 N 或 CR^6 ; 其中 R^6 为 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷氧基;

[0044] M 为 N 或 CR^7 ; 其中 R^7 为 H 或 C_{1-6} 烷基;

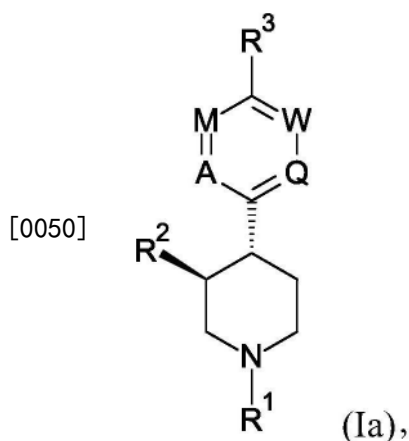
[0045] W 为 N 或 CH;

[0046] Q 为 N 或 CH;

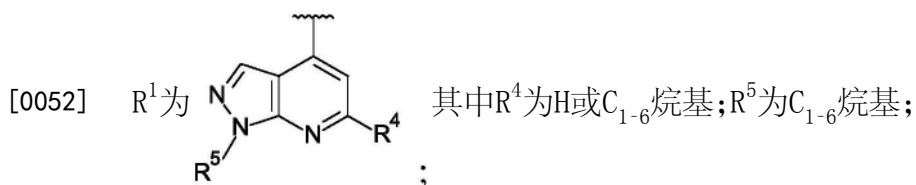
[0047] 条件是 A、M、W 和 Q 中的不超过两者同时为 N;

[0048] 或其药用盐。

[0049] 本发明的另一个实施例是 (ii) 具有式 (Ia) 的化合物,



[0051] 其中



[0053] R^2 为H或 C_{1-6} 烷基;

[0054] R^3 为哌嗪基、(C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基)哌嗪基、3,4,4a,5,7,7a-六氢-2H-吡咯并[3,4-b][1,4]噁嗪基、4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷基、5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷基、氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C_{1-6} 烷氧基)

[0055] 哌啶基、氨基(C_{1-6} 烷氧基)吡咯烷基、氨基(C_{1-6} 烷基)氮杂环丁烷基或氨基卤代哌啶基;

[0056] A为N或 CR^6 ;其中 R^6 为H、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷氧基;

[0057] M为N或 CR^7 ;其中 R^7 为H或 C_{1-6} 烷基;

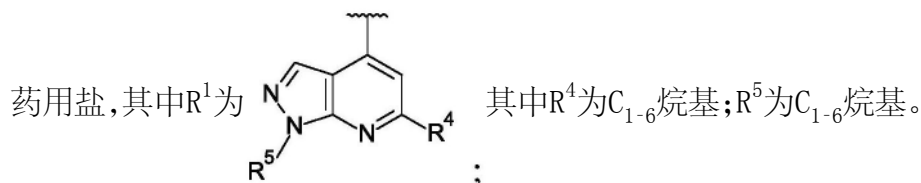
[0058] W为N或CH;

[0059] Q为N或CH;

[0060] 条件是A、M、W和Q中的不超过两者同时为N;

[0061] 或其药用盐。

[0062] 本发明的另一个实施例为(iii),其为根据(i)或(ii)的式(I)或(Ia)化合物,或其



[0063] 本发明的另一个实施例为(iv),其为根据(i)至(iii)中任一项所述的式(I)或(Ia)化合物,或其药用盐,其中 R^4 为甲基; R^5 为甲基。

[0064] 本发明的另一个实施例为(v),其为根据(i)至(iv)中任一项所述的式(I)或(Ia)化合物,其中A为 CR^6 ;其中 R^6 为H或 C_{1-6} 烷基。

[0065] 本发明的另一个实施例为(vi),其为根据(i)至(v)中任一项所述的式(I)或(Ia)化合物,或其药用盐,其中A为 CR^6 ;其中 R^6 为H或甲基。

[0066] 本发明的另一个实施例为(vii),其为根据(i)至(vi)中任一项所述的式(I)或

(Ia) 化合物,或其药用盐,其中M为CR⁷;其中R⁷为H。

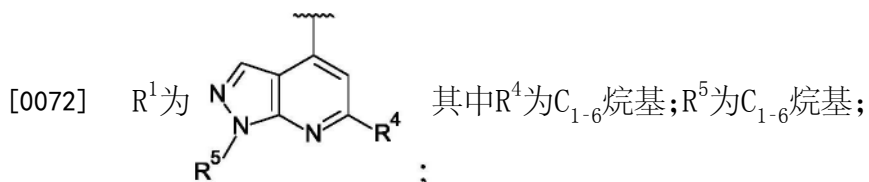
[0067] 本发明的另一个实施例为(viii),其为根据(i)至(vii)中任一项所述的式(I)或(Ia)化合物,或其药用盐,其中W为CH。

[0068] 本发明的另一个实施例为(ix),其为根据(i)至(viii)中任一项所述的式(I)或(Ia)化合物,或其药用盐,其中Q为N。

[0069] 本发明的另一个实施例为(x),其为根据(i)至(ix)中任一项所述的式(I)或(Ia)化合物,或其药用盐,其中R³为氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C₁₋₆烷氧基)吡咯烷基或哌嗪基。

[0070] 本发明的另一个实施例为(xi),其为根据(i)至(x)中任一项所述的式(I)或(Ia)化合物,或其药用盐,其中R³为6-氨基-1,4-氧氮杂环庚烷-4-基、3-氨基-4-甲氧基-吡咯烷-1-基或哌嗪-1-基。

[0071] 本发明的另一个实施例为(xii),其为根据(i)至(xi)中任一项的式(I)或(Ia)的化合物,其中



[0073] R²为H或C₁₋₆烷基;

[0074] R³为氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C₁₋₆烷氧基)吡咯烷基或哌嗪基;

[0075] A为CR⁶;其中R⁶为H或C₁₋₆烷基;

[0076] M为CR⁷;其中R⁷为H;

[0077] W为CH;

[0078]

[0079] Q为N;

[0080] 或其药用盐。

[0081] 本发明的进一步的实施例是(xiii)根据(i)至(xii)中任一项所述的式(I)或(Ia)化合物,其中



[0083] R²为H或甲基;

[0084] R³为6-氨基-1,4-氧氮杂环庚烷-4-基、3-氨基-4-甲氧基-吡咯烷-1-基或哌嗪-1-基;

[0085] A为CR⁶;其中R⁶为H或甲基;

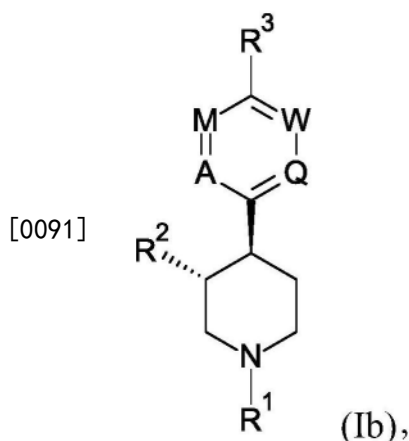
[0086] M为CR⁷;其中R⁷为H;

[0087] W为CH;

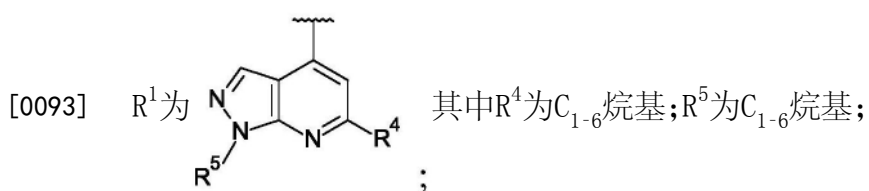
[0088] Q为N;

[0089] 或其药用盐。

[0090] 本发明的另一个实施例为(xiv), 其为式(Ib)化合物,



[0092] 其中



[0094] R²为C₁₋₆烷基;

[0095] R³为哌嗪基、(C₁₋₆烷氧基C₁₋₆烷基)哌嗪基、4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷基、5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷基、氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基、氨基(C₁₋₆烷氧基)哌啶基、氨基(C₁₋₆烷氧基)吡咯烷基、氨基(C₁₋₆烷基)氮杂环丁烷基或氨基卤代哌啶基;

[0096] A为CH;

[0097] M为CH;

[0098] W为CH;

[0099] Q为N;

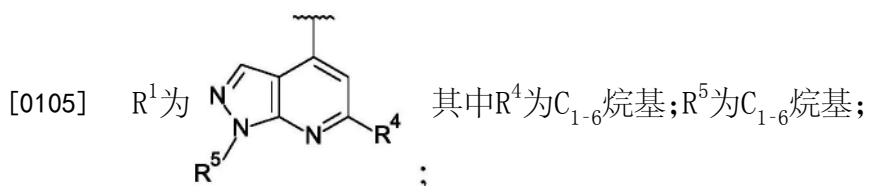
[0100] 或其药用盐。

[0101] 本发明的另一个实施例为(xv), 其为根据(xiv)的式(Ib)化合物, 其中R⁴为甲基; R⁵为甲基; R²为甲基。

[0102] 本发明的另一个实施例为(xvi), 其为根据(xiv)或(xv)的式(Ib)化合物, 其中R³为氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基。

[0103] 本发明的另一个实施例为(xvii), 其为根据(xiv)至(xvi)中任一项的式(Ib)化合物, 其中R³为6-氨基-1,4-氧氮杂环庚烷-4-基。

[0104] 本发明的另一个实施例为(xviii), 其为根据(xiv)至(xvii)中任一项的式(Ib)化合物, 其中



[0106] R²为C₁₋₆烷基;

[0107] R³为氨基-1,4-氧氮杂环庚烷基;

[0108] A为CH;

[0109] M为CH;

[0110] W为CH;

[0111] Q为N;

[0112] 或其药用盐。

[0113] 本发明的另一个实施例为(xix),其为根据(xiv)至(xviii)中任一项所述的式(Ib)化合物,其中



[0115] R²为甲基;

[0116] R³为6-氨基-1,4-氧氮杂环庚烷-4-基;

[0117] A为CH;

[0118] M为CH;

[0119] W为CH;

[0120] Q为N;

[0121] 或其药用盐。

[0122] 本发明的另一个实施例为式(I)或(Ia)或(Ib)化合物,其选自以下化合物:

[0123] 1,6-二甲基-4-[4-(4-哌嗪-1-基苯基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0124] 1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0125] 1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0126] 1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基嘧啶-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0127] 1-甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0128] 1-甲基-4-[4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0129] 1,6-二甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0130] 1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0131] 1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0132] 1,6-二甲基-4-[4-(2-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0133] 1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-2-哌嗪-1-基-嘧啶-5-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0134] 1,6-二甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0135] 4-[4-(3-乙基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;

- [0136] 4-[4-(3-甲氧基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0137] (3S,4R)-1-[6-[1-(1,6-二甲基吡啶并[3,4-b]吡啶-4-基)-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺;
- [0138] 4-[4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-3-甲基-2-吡啶基]-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0139] (3S,4S)-1-[6-[1-(1,6-二甲基吡啶并[3,4-b]吡啶-4-基)-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-甲氧基-哌啶-4-胺;
- [0140] 1-甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0141] 1-甲基-4-[反式-3-甲基-4-(6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0142] 1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0143] 1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0144] 1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0145] 1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0146] 1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0147] 1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0148] (3R,4R)-1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡啶并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-4-甲氧基-吡咯烷-3-胺;
- [0149] 2-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡啶并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷;
- [0150] (6S)-4-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡啶并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-1,4-氧氮杂环庚烷-6-胺;
- [0151] 4-[(3S,4R)-4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-3-甲基-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0152] 4-[(3S,4R)-4-[5-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-7-基)-3-甲基-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶;
- [0153] (3R,4R)-1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡啶并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺;
- [0154] 1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡啶并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-甲基-氮杂环丁烷-3-胺;
- [0155] (4aR,7aR)-6-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡啶并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-

4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3,4,4a,5,7,7a-六氢-2H-吡咯并[3,4-b][1,4]噁嗪;

[0156] 1,6-二甲基-4-[(3R,4S)-3-甲基-4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0157] 1,6-二甲基-4-[(3S,4R)-3-甲基-4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0158] (3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-4-甲氧基-吡咯烷-3-胺;

[0159] 4-[(3R,4S)-4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;

[0160] 2-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷;

[0161] (3S,4S)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-甲氧基-哌啶-4-胺;

[0162] (6S)-4-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-1,4-氧氮杂环庚烷-6-胺;

[0163] (3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺;

[0164] 4-[(3R,4S)-4-[5-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-7-基)-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶;以及

[0165] 1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-甲基-氮杂环丁烷-3-胺;

[0166] 或其药用盐。

[0167] 药物组合物和施用

[0168] 另一个实施例提供含有本发明化合物和治疗惰性载体,稀释剂或赋形剂的药物组合物或药物,以及使用本发明化合物制备此类组合物和药物的方法。在一个实例中,式(I)化合物可通过在环境温度在适当的pH和期望的纯度下与生理学上可接受的载体(即在所用剂量和浓度下对接受者无毒的载体)混合而配制为盖伦(galenical)施用形式。制剂的pH主要取决于化合物的具体用途和浓度,但是优选地在约3至约8的范围内。在一个实例中,将式(I)化合物在pH 5的乙酸盐缓冲液中配制。在另一个实施例中,式(I)化合物是无菌的。化合物可以例如作为固体或无定形组合物、作为冻干制剂或作为水溶液储存。

[0169] 以与良好医学实践一致的方式配制、计量和施用组合物。在这种情况下需要考虑的因素包括所治疗的特定疾患、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用的时间安排,以及执业医师已知的其他因素。待施用的化合物的“有效量”将由此类考虑因素决定,并且是抑制TLR7、TRL8、TRL9与相应刺激配体的相互作用,抑制由MYD88、IRF7、IRF5、NF κ B等介导的下游信号传导,导致I型干扰素和促炎细胞因子(如TNF α 、IL-6)的产生,以及各种免疫细胞的活化所需的最低量。例如,该量可以低于对正常细胞或哺乳动物整体有毒的量。

[0170] 在一个实例中,每剂量肠胃外施用的本发明化合物的药物有效量将在每天约0.001至1000mg/kg患者体重的范围内,另选地约0.001至1000mg/kg患者体重的范围内,通

常所用化合物的初始范围为0.3至15mg/kg/天。在另一个实施例中,口服单位剂型诸如片剂和胶囊优选地含有约0.1至约1000mg的本发明的化合物。

[0171] 本发明的化合物可通过任何适合的方式施用,包括口服、局部(包括颊和舌下)、直肠、阴道、经皮、肠胃外、皮下、腹膜内、肺内、皮内、鞘内和硬膜外和鼻内,以及(如果需要用于局部治疗)病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

[0172] 本发明化合物可以任何方便的施用形式施用,例如,片剂、粉剂、胶囊剂、溶液剂、分散剂、混悬剂、糖浆剂、喷雾剂、栓剂、凝胶剂、乳剂、贴剂等。此类组合物可以包含药物制剂中常规的组分,例如,稀释剂、载体、pH调节剂、甜味剂、填充剂和其他活性剂。

[0173] 通过混合本发明的化合物和载体或赋形剂来制备通常的制剂。适合的载体和赋形剂是本领域技术人员熟知的,并且在例如Ansel,Howard C.等人,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems.Philadelphia:Lippincott,Williams和Wilkins,2004;Gennaro,Alfonso R.等人Remington:The Science and Practice of Pharmacy.Philadelphia:Lippincott,Williams&Wilkins,2000;以及Rowe,Raymond C.Handbook of Pharmaceutical Excipients.Chicago,Pharmaceutical Press,2005中有详细描述。制剂还可以包含一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、润滑剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、抗氧化剂、不透明剂、助流剂、加工助剂、着色剂、甜味剂、加香剂、调味剂、稀释剂和其他已知的添加剂,以提供美观的药物(例如,本发明的化合物或其药物组合物)展示或有助于药物产品(例如,药物)的制备。

[0174] 合适的口服剂型的实例为含有约0.1至1000mg的本发明的化合物与约0.1至1000mg无水乳糖、约0.1至1000mg交联羧甲基纤维素钠、约0.1至1000mg聚乙烯吡咯烷酮(PVP)K30和约0.1至1000mg硬脂酸镁复合的片剂。首先将粉状成分混合在一起,然后与PVP溶液混合。可以将所得的组合物干燥、制粒、与硬脂酸镁混合并使用常规设备压制成片剂形式。可以通过将本发明的化合物(例如0.1mg至1000mg)溶解在合适的缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲液)中,如果需要的话加入增渗剂(例如诸如氯化钠的盐)来制备气溶胶制剂的实例。可以例如使用0.2微米的过滤器过滤溶液,以除去杂质和污染物。

[0175] 因此,实施例包括药物组合物,其包含式(I)化合物或者其立体异构体或药用盐。进一步实施例包括药物组合物,其包含式(I)化合物或者其立体异构体或药用盐以及药用载体或赋形剂。

[0176] 另一实施例包括药物组合物,其包含式(I)化合物,用于治疗自身免疫性疾病。另一实施例包括药物组合物,其包含式(I)化合物,用于治疗自身免疫性疾病。

[0177] 以下实施例说明了本发明的典型组合物,但仅作为其代表。

[0178] 组合物A

[0179] 本发明的化合物能以本身已知的方式用作活性成分来产生以下组成的片剂:

每个片剂

活性成分	200 mg
微晶纤维素	155 mg
[0180] 玉米淀粉	25 mg
滑石粉	25 mg
羟丙基甲基纤维素	<u>20 mg</u>
	425 mg

[0181] 组合物B

[0182] 本发明的化合物能以本身已知的方式用作活性成分来产生以下组成的胶囊：

每个胶囊

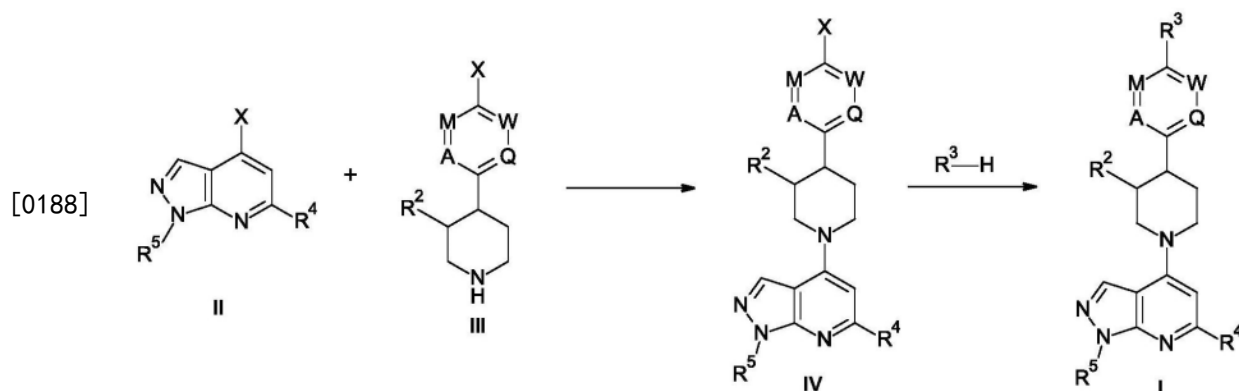
活性成分	100.0 mg
玉米淀粉	20.0 mg
[0183] 乳糖	95.0 mg
滑石粉	4.5 mg
硬脂酸镁	<u>0.5 mg</u>
	220.0 mg

[0184] 合成

[0185] 本发明的化合物可以通过任何常规方法制备。在以下方案和实例中提供了合成这些化合物及其原料的合适方法。除非另有说明，否则所有取代基，特别是 R^1 至 R^5 、A、M、W和Q如上文所定义。此外，除非另有明确说明，否则所有反应、反应条件、缩写和符号均具有有机化学领域普通技术人员众所周知的含义。

[0186] 制备式(I)或式(Ia)或式(Ib)化合物的一般合成路线如下所示。

[0187] 方案1

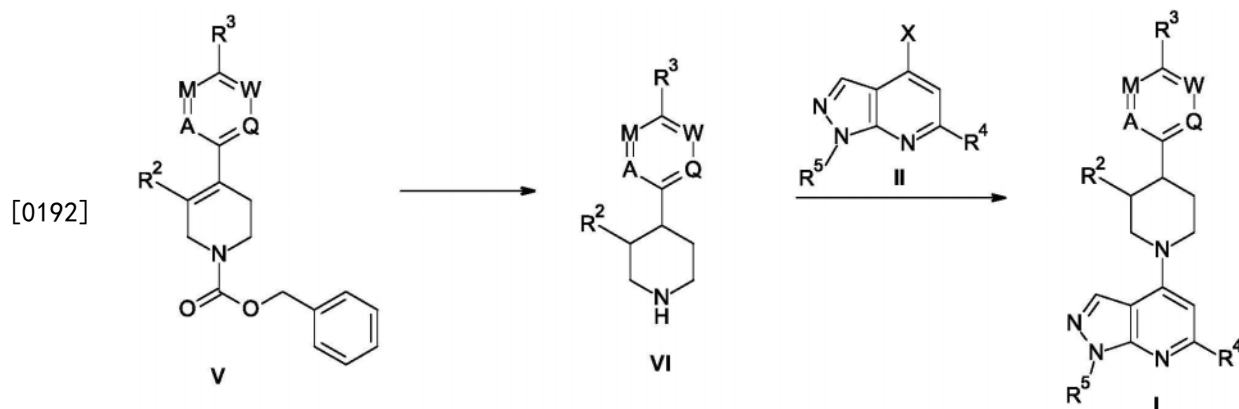


[0189] 其中X为卤素。

[0190] 式(II)化合物与(III)的偶联可通过在碱(诸如DIPEA或CsF)存在下在高温下直接取代,或经由Buchwald-Hartwig C-N键形成(参考文献:Acc.Chem.Res.1998,31,805-818; Chem.Rev.2016,116,12564-12649;Topics in Current Chemistry,2002,219,131-209;以

及其中引用的参考文献)与催化剂诸如RuPhos Pd G2、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{XantPhos}$ 和碱诸如 Cs_2CO_3 或 $t\text{-BuONa}$ 的偶联反应来实现,以提供式(IV)化合物。随后,式(IV)化合物与 $\text{R}^3\text{-H}$ 的偶联可以通过在利用催化剂诸如RuPhos Pd G2、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{XantPhos}$ 和碱诸如 Cs_2CO_3 或 $t\text{-BuONa}$ 的Buchwald-Hartwig C-N键形成条件下的直接偶联来实现,以提供式(I)化合物。在一些实施例中,式(IV)化合物和 $\text{R}^3\text{-H}$ 的偶联可以得到含有源自 $\text{R}^3\text{-H}$ 的保护基团(例如Boc或Cbz)的产物,其将在获得最终的式(I)化合物之前被除去。

[0191] 方案2



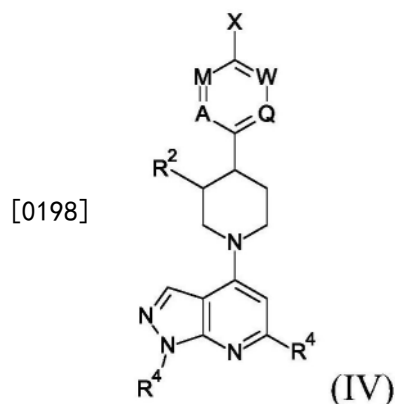
[0193] 其中X为卤素。

[0194] 式(VI)化合物可以通过式(V)化合物在催化剂(诸如 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 、 Pd/C 或Wilkinson催化剂)存在下,在氢气气氛下进行氢化反应来获得。Cbz基团也可以在相同的条件下脱保护。随后,式(VI)化合物与(II)的偶联可通过在碱(诸如DIPEA或CsF)存在下在高温下直接取代,或通过在利用催化剂诸如RuPhos Pd G2、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{XantPhos}$ 和碱诸如 Cs_2CO_3 或 $t\text{-BuONa}$ 的条件下的Buchwald-Hartwig C-N键形成来实现,以提供式(I)化合物。在一些实施例中,式(VI)化合物与(II)的偶联可得到含有源自(VI)的保护基团(例如Boc)的产物,其将在获得最终的式(I)化合物之前被除去。

[0195] 本发明的化合物可以作为非对映体或对映体的混合物获得,它们可以通过本领域熟知的方法分离,例如,(手性)HPLC或SFC。

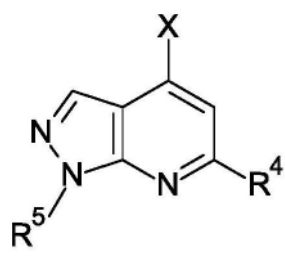
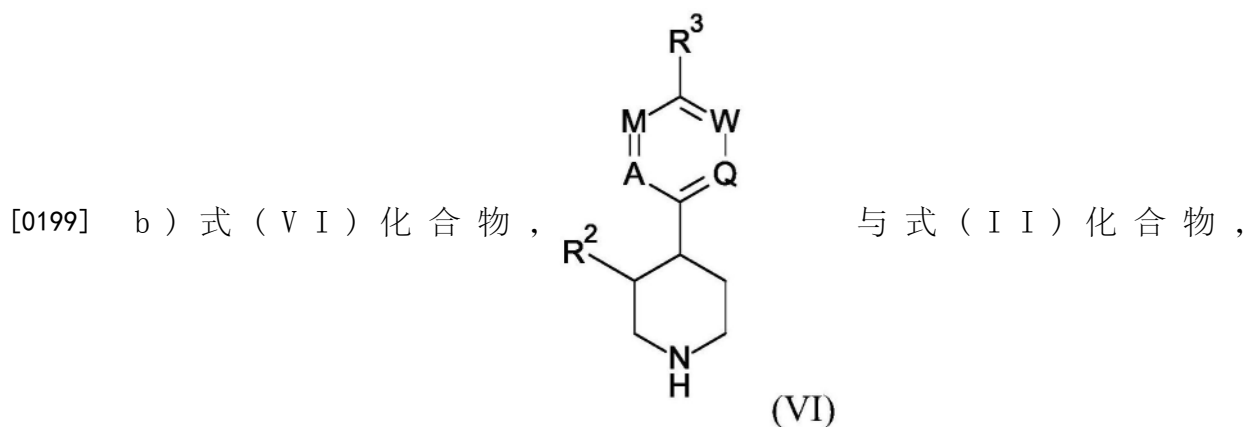
[0196] 本发明还涉及制备式(I)或式(Ia)化合物的方法,该方法包括以下步骤:

[0197] a) 式(IV)化合物,



与 $\text{R}^3\text{-H}$ 之间在催化剂和碱存在下的Buchwald-Hartwig C-N键

形成反应;



之间在催化剂和碱存在下的Buchwald-Hartwig C-N键形成反应;

[0200] c) 式 (VI) 化合物与式 (II) 化合物之间在碱存在下的直接取代反应;

[0201] 其中

[0202] 在步骤a) 和b) 中, 催化剂可以为, 例如, RuPhos Pd G2、Pd₂(dba)₃/XantPhos; 碱可以为, 例如, Cs₂CO₃或t-BuONa;

[0203] 在步骤c) 中, 碱可以为DIPEA或CsF。

[0204] 根据上述方法生产的式 (I) 或 (Ia) 的化合物也是本发明的目的。

[0205] 适应症和治疗方法

[0206] 本发明提供了可以用作TLR7和TLR8和TLR9拮抗剂的化合物, 其抑制通过TLR7和/或TLR8和/或TLR9的通路活化以及相应的下游生物学事件, 包括但不限于通过产生所有类型的细胞因子和各种形式的自身抗体介导的先天性和适应性免疫应答。因此, 本发明的化合物可用于在表达此类受体的所有类型的细胞中阻断TLR7和/或TLR8和/或TLR9, 所述细胞包括但不限于浆细胞样树突细胞、B细胞、T细胞、巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、角质形成细胞、上皮细胞。如此, 该化合物可用作系统性红斑狼疮和狼疮肾炎的治疗剂或预防剂。

[0207] 本发明提供了治疗或预防有需要的患者的系统性红斑狼疮和狼疮肾炎的方法。

[0208] 另一实施例包括治疗或预防需要这种治疗的哺乳动物中系统性红斑狼疮和狼疮肾炎的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的式 (I) 的化合物、其立体异构体、互变异构体、前药或药用盐。

[0209] 实例

[0210] 通过参考以下实例将更全面地理解本发明。然而, 它们不应被解释为限制本发明的范围。

[0211] 缩写

[0212] 通过参考以下实例将更全面地理解本发明。然而, 它们不应被解释为限制本发明的范围。

[0213] 本文使用的缩写如下:

- [0214] ACN:乙腈
- [0215] AIBN:偶氮二异丁腈
- [0216] Boc₂O:二碳酸二叔丁酯
- [0217] CbzCl:氯甲酸苄酯
- [0218] CyPF-t-Bu: [(R)-1-[(S)-2-(二环己基膦基)二茂铁基]乙基]二叔丁基膦
- [0219] DCM:二氯甲烷
- [0220] DEA:二乙胺
- [0221] DIPEA:N,N-二异丙基乙胺
- [0222] DMA:二甲基乙酰胺
- [0223] DMF:N,N-二甲基甲酰胺
- [0224] DMFDMA:N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛
- [0225] dtbbpy:4,4'-二叔丁基-2,2'-联吡啶
- [0226] EtOAc或EA:乙酸乙酯
- [0227] FA:甲酸
- [0228] HLM人肝微粒体
- [0229] IC₅₀:半抑制浓度
- [0230] Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)(PF₆):[4,4'-双(1,1-二甲基乙基)-2,2'-联吡啶-N1,N1']双[3,5-二氟-2-[5-(三氟甲基)-2-吡啶基-N]苯基-C]六氟磷酸铱(III)
- [0231] JackiePhos:双(3,5-双(三氟甲基)苯基)(2',4',6'-三异丙基-3,6-二甲氧基联苯-2-基)膦
- [0232] LCMS液相色谱—质谱
- [0233] MS:质谱
- [0234] [Pd(烯丙基)Cl]₂:氯化烯丙基钯(II)二聚体
- [0235] Pd₂(dba)₃:三(二亚苄基丙酮)二钯
- [0236] Pd[P(o-tol)₃]₂:双(三邻甲苯基膦)钯
- [0237] PE:石油醚
- [0238] prep-HPLC:制备型高效液相色谱
- [0239] rt:室温
- [0240] RuPhos Pd G2:氯(2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基-1,1'-联苯)[2-(2'-氨基-1,1'-联苯)]钯(II)第2代
- [0241] SFC:超临界流体色谱
- [0242] TCDI:1,1'-硫代羰基二咪唑
- [0243] TEA:三甲胺
- [0244] TFA:三氟乙酸
- [0245] Tf₂O:三氟甲磺酸酐
- [0246] THF:四氢呋喃
- [0247] TTMSS:1,1,1,3,3,3-六甲基-2-三甲基甲硅烷基-三硅烷
- [0248] v/v:体积比
- [0249] XantPhos:4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基氧杂蒽

[0250] 一般实验条件

[0251] 使用以下仪器之一通过快速色谱法纯化中间体和最终化合物:i) Biotage SP1系统和Quad 12/25Cartridge模块.ii) ISCO combi-flash色谱仪。硅胶品牌和孔径:i) KP-SIL 60 Å, 粒径:40-60µm; ii) CAS登录号:硅胶:63231-67-4, 粒径:47-60微米硅胶; iii) 青岛海洋化学有限公司的ZCX, 孔:200-300或300-400。

[0252] 中间体和最终化合物在反相色谱柱上通过制备型HPLC纯化, 反相色谱柱使用XBridge™ Prep-C18(5µm, OBD™ 30×100mm) 色谱柱, SunFire™ Prep-C18(5µm, OBD™ 30×100mm) 色谱柱, Phenomenex Synergi-C18(10µm, 25×150mm) 或Phenomenex Gemini-C18(10µm, 25×150mm)。Waters AutoP纯化系统(样品管理器2767, 泵2525, 检测器: Micromass ZQ和UV 2487, 溶剂系统: 乙腈和0.1% 氢氧化铵在水中的溶液; 乙腈和0.1% FA在水中的溶液, 或乙腈和0.1% TFA在水中的溶液)。或Gilson-281纯化系统(泵322, 检测器: UV 156, 溶剂系统: 乙腈和0.05% 氢氧化铵在水中的溶液; 乙腈和0.225% FA在水中的溶液; 乙腈和0.05% HCl在水中的溶液; 乙腈和0.075% TFA在水中的溶液; 或乙腈和水)。

[0253] 为了进行SFC手性分离, 中间体分离通过手性柱(Daicel chiralpak IC, 5µm, 30×250mm)、AS(10µm, 30×250mm) 或AD(10µm, 30×250mm), 使用Mettler Toledo Multigram III系统SFC、Waters 80Q制备型SFC或Thar 80制备型SFC, 溶剂系统: CO₂和IPA(0.5% TEA的IPA溶液) 或CO₂和MeOH(0.1% NH₃·H₂O的MeOH溶液), 背压100bar, 在254或220nm处检测UV。

[0254] 使用LC/MS(Waters™ Alliance 2795-Micromass ZQ、Shimadzu Alliance2020-Micromass ZQ或Agilent Alliance 6110-Micromass ZQ) 获得化合物的LC/MS光谱, LC/MS条件如下(运行时间3或1.5分钟):

[0255] 酸性条件I:A:0.1% TFA在H₂O中的溶液; B:0.1% TFA在乙腈中的溶液;

[0256] 酸性条件II:A:0.0375% TFA在H₂O中的溶液; B:0.01875% TFA在乙腈中的溶液;

[0257] 碱性条件I:A:0.1% NH₃·H₂O在H₂O中的溶液; B:乙腈;

[0258] 碱性条件II:A:0.025% NH₃·H₂O在H₂O中的溶液; B:乙腈;

[0259] 中性条件:A:H₂O; B:乙腈。

[0260] 质谱(MS): 通常仅报告表示母体质量的离子, 除非另有说明, 否则所引用的质量离子为正质量离子(MH)⁺。

[0261] 使用Bruker Avance 400MHz获得NMR谱。

[0262] 微波辅助反应在Biotage Initiator Sixty微波合成仪中进行。所有涉及对空气敏感的试剂的反应均在氩气或氮气气氛下进行。除非另有说明, 否则试剂按原样购自商业供应商, 未经进一步纯化。

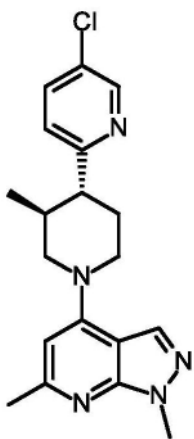
[0263] 制备实例

[0264] 以下实例旨在说明本发明的含义, 但绝不代表对本发明含义的限制:

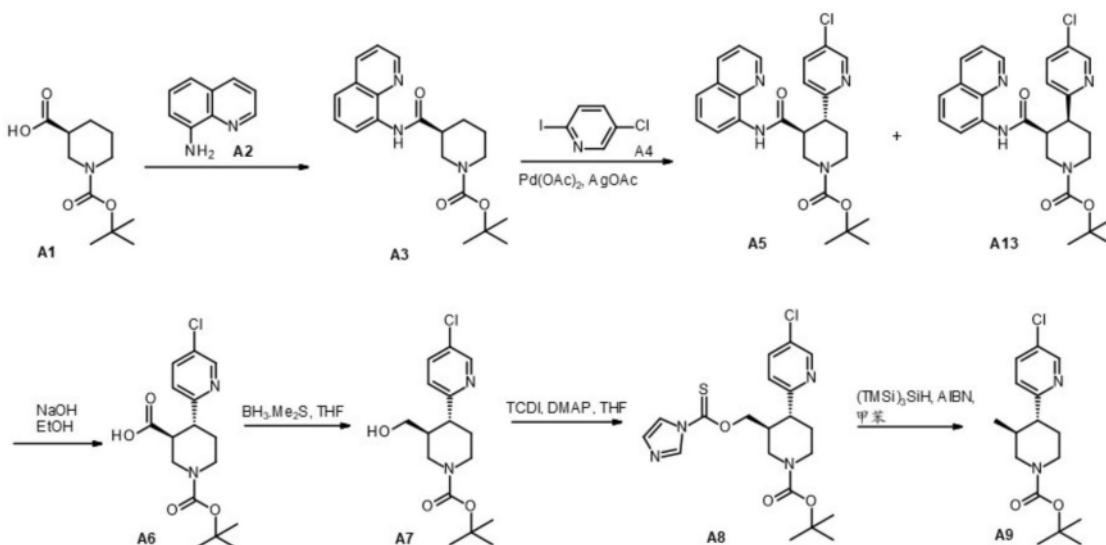
[0265] 中间体A

[0266] 4-[(3S, 4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶

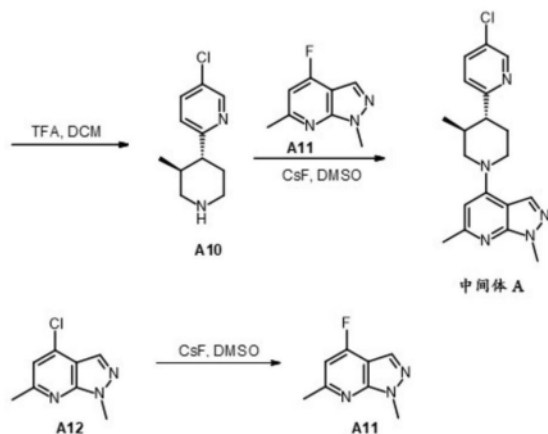
[0267]



[0268] 根据以下方案制备标题化合物:



[0269]



[0270] 步骤1: (3S)-3-(8-喹啉基氨基甲基酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A3)的制备

[0271] 向8-氨基喹啉(化合物A2, CAS: 578-66-5, 供应商: Accela, 69.17g, 479.78mmol)在DMF(1000mL)中的溶液加入HATU(190.60g, 501.59mmol)和DIPEA(233mL, 1309mmol)。将反应在0℃搅拌1h。然后加入(3S)-1-叔丁氧基羰基哌啶-3-羧酸(化合物A1, CAS: 88495-54-9, 供应商: Accela, 100.00g, 436.17mmol)。将反应在0℃搅拌15h。加入EtOAc(200mL)和冰水(50mL)并进行分离。水相用EtOAc(200mL)萃取两次。将合并的有机层用盐水(300mL)洗涤4次, 经Na₂SO₄干燥, 过滤, 并且在真空下浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化, 以EA/PE(1:5)的梯

度洗脱,以得到黄色固体状的化合物A3(120g)。MS:计算356(MH⁺),测量356(MH⁺)。

[0272] 步骤2: (3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-(8-喹啉基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A5)和(3S,4S)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-(8-喹啉基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A13)的制备

[0273] 将(3S)-3-(8-喹啉基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A3,50.00g,140.67mmol)、5-氯-2-碘-吡啶(化合物A4,CAS:244221-57-6,供应商:Bide Pharmatech,77.00g,322.18mmol)和Pd(OAc)₂(3.15g,14.07mmol)、AgOAc(46.70g,281.35mmol)的混合物用N₂脱气,且然后在N₂气氛下于110℃搅拌48h。冷却至室温后,过滤混合物。将滤液在真空下浓缩。将残余物通过闪蒸柱进一步纯化,以EA/PE(1/10至1/1)的梯度洗脱,以得到黄色油状的化合物A5(20.00g)和化合物A13(15.00g)。MS:计算467(MH⁺),测量467(MH⁺)。

[0274] 步骤3: (3S,4R)-1-叔丁氧基羰基-4-(5-氯-2-吡啶基)哌啶-3-羧酸(化合物A6)的制备

[0275] 向(3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-(8-喹啉基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A5,17.00g,36.41mmol)在乙醇(200mL)中的溶液中加入氢氧化钠(14.57g,364.22mmol),且然后在85℃搅拌16h。冷却至室温后,将反应混合物减压浓缩。将残余物用HCl(3M)中和至pH 6。混合物用DCM(300mL)萃取三次。将有机相在真空中浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA(5/1至1/1)的梯度洗脱,以得到黄色油状的化合物A6(11.50g)。MS:计算341(MH⁺),测量285(M-C₄H₈+H⁺)。

[0276] 步骤4: (3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-(羟甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A7)的制备

[0277] 在0℃,向(3S,4R)-1-叔丁氧基羰基-4-(5-氯-2-吡啶基)哌啶-3-羧酸(化合物A6,11.50g,33.74mmol)在THF(50mL)中的溶液中加入BH₃·Me₂S(13.5mL,134.98mmol)。加入后,将反应混合物在N₂气氛下于25℃进一步搅拌16h。除去挥发物,得到白色固体残余物,且然后加入甲醇(50mL)。搅拌30min后,浓缩反应混合物并再次加入甲醇(50mL)。然后用滴加10%柠檬酸处理残余物。将混合物用DCM(200mL)萃取三次。将合并的有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并且在真空中浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA(3/1)的梯度洗脱,以得到无色树胶状的化合物A7(8.00g)。MS:计算327(MH⁺),测量271(M-C₄H₈+H⁺)。

[0278] 步骤5: (3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-(咪唑-1-甲硫基氧甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A8)的制备

[0279] 向(3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-(羟甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A7,4.00g,12.24mmol)和TCDI(4.36g,24.48mmol)在THF(60mL)中的溶液中加入DMAP(299mg,2.45mmol)。将混合物在25℃搅拌3h。然后浓缩反应混合物,并将残余物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA(1/1)的梯度洗脱,以得到黄色油状的化合物A8(5.00g)。MS:计算437(MH⁺),测量437(MH⁺)。

[0280] 步骤6: (3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A9)的制备

[0281] 向(3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-(咪唑-1-甲硫基氧甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A8,5.00g,11.44mmol)在甲苯(250mL)中的混合物中加入三(三甲基硅基)硅烷(17mL,47.56mmol)和AIBN(1877mg,11.44mmol)。将混合物用N₂脱气10min,并在85℃搅拌

5h。冷却至室温后,将混合物在真空中浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA (5/1) 的梯度洗脱,并进行制备型HPLC,以得到黄色油状的化合物A9(两批化合物的混合物,4.00g)。MS: 计算311(MH⁺), 测量255(M-C₄H₈+H⁺)。

[0282] 步骤7: 5-氯-2-[(3S,4R)-3-甲基-4-哌啶基]吡啶(化合物A10)的制备

[0283] 在0℃,向(3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物A9, 4.00g, 12.87mmol)在DCM(20mL)中的溶液中加入TFA(31mL, 123.08mmol)。将混合物在25℃搅拌16h。将反应混合物在真空下浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化,以得到白色固体状的化合物A10(2.70g)。MS: 计算211(MH⁺), 测量211(MH⁺)。

[0284] 步骤8: 4-氟-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶(化合物A11)的制备

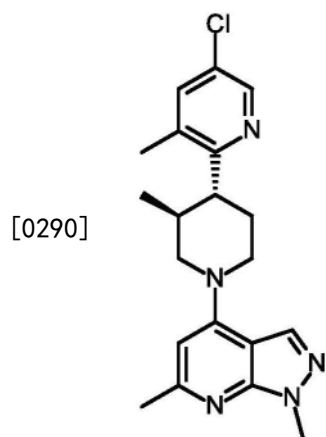
[0285] 将4-氯-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶(化合物A12, CAS: 19867-78-8, 供应商: PharmaBlock, 4.60g, 25.33mmol)和氟化铯(19.24mg, 126.64mmol)在DMSO(60mL)中的混合物在120℃搅拌18小时。冷却至室温后,将反应混合物加入至水(100mL)中,用EA(100mL)萃取三次。将合并的有机层用盐水(200mL)洗涤两次,经Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化,以得到白色固体状的化合物A11(4.00g, 含有一些化合物A12)。MS: 计算166(MH⁺), 测量166(MH⁺)。

[0286] 步骤9: 4-[(3S,4R)-4-(5-氯-2-吡啶基)-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶(中间体A)的制备

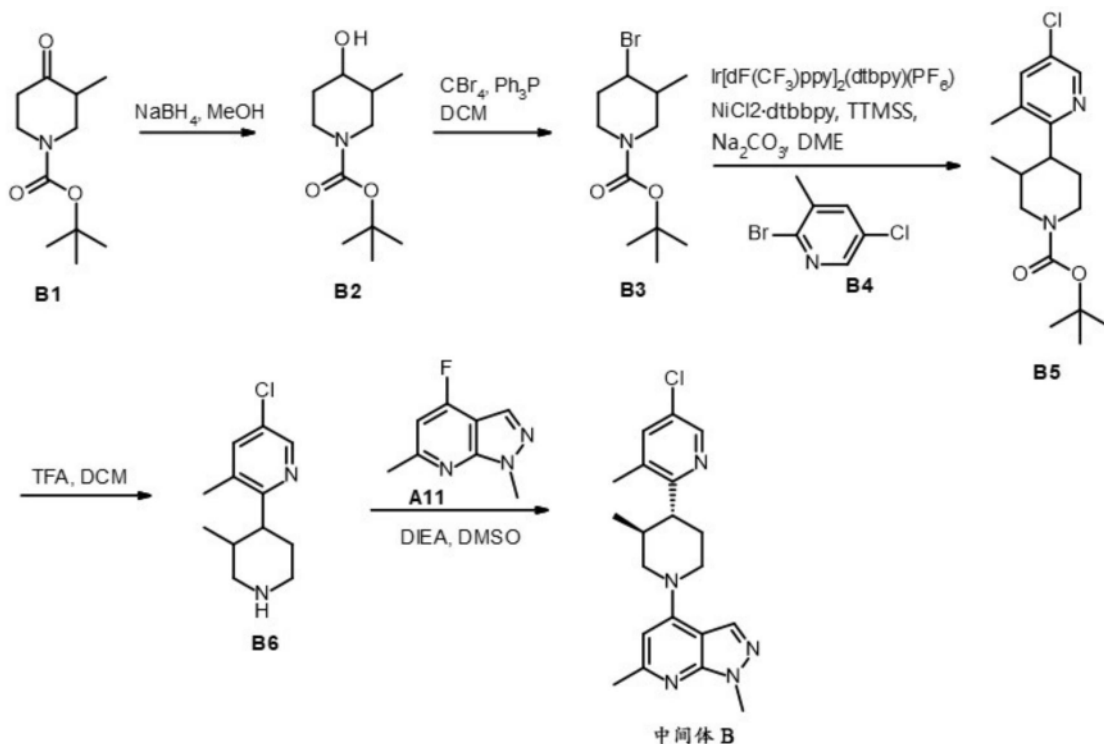
[0287] 向4-氟-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶(化合物A11, 2.12g, 12.81mmol)和5-氯-2-[(3S,4R)-3-甲基-4-哌啶基]吡啶(化合物A10, 2.70g, 12.81mmol)在DMSO(50mL)中的混合物中加入CsF(3.72mg, 64.07mmol)。将反应物在N₂气氛下于120℃搅拌12h。冷却至室温后,将反应混合物倒入冰水(200mL)中,并用EA(250mL)萃取三次。将合并的有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并且在真空下浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA (1/1) 的梯度洗脱,以得到粗产物,将其通过SFC进一步纯化(梯度: 在CO₂中的55% MeOH(0.05% DEA), 柱: Daicel Chiralpak IC, 250×30mm, 10μm),以得到白色固体状的中间体A(2.52g, 较慢洗脱)。MS: 计算356(MH⁺), 测量356(MH⁺)。

[0288] 中间体B

[0289] 4-[(3S,4R)-4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡啶并[3,4-b]吡啶



[0291] 根据以下方案制备标题化合物:



[0293] 步骤1: 4-羟基-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物B2)的制备

[0294] 在0℃,向3-甲基-4-氧代哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物B1,CAS:181269-69-2,供应商:PharmaBlock,50.00g,234.44mmol)在甲醇(500mL)中的溶液中分批加入NaBH₄(13.30g,351.67mmol)。在0℃搅拌1h,且然后在20℃搅拌2.5h后,将反应混合物用饱和氯化铵水溶液淬灭并在减压下浓缩以除去甲醇。然后将混合物用二氯甲烷萃取,将合并的有机层用硫酸钠干燥,过滤并浓缩,以获得淡黄色油状的化合物B2(50.40g)。

[0295] 步骤2: 4-溴-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物B3)的制备

[0296] 在20℃,向4-羟基-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物B2,45.00g,209.02mmol)在DCE(500mL)中的混合物中加入Ph₃P(71.27g,271.73mmol),然后在20℃加入CBr₄(110.91g,334.43mmol)。对烧瓶进行脱气处理,并用N₂吹扫四次。在N₂气氛下于25℃搅拌15h后,浓缩反应混合物,并且将残余物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA(100/0至100/5)的梯度洗脱,以得到淡黄色油状的化合物B3(35.00g)。

[0297] 步骤3: 4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物B5)的制备

[0298] 向配备有搅拌棒的1000mL小瓶中加入2-溴-5-氯-3-甲基-吡啶(化合物B4,CAS:65550-77-8,供应商:Accela,22.00g,106.55mmol)、4-溴-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物B3,38.53g,138.52mmol),Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbbpy)(PF₆)(0.85g,1.07mmol)、NiCl₂·dtbbpy(0.21g,0.530mmol)、TTMSS(26.50g,106.55mmol)、Na₂CO₃(22.59g,213.11mmol)和DME(500mL)。将小瓶密封并用氮气吹扫。搅拌混合物并用34W蓝色LED灯(7cm外)照射,用冷却风扇将反应温度保持在25℃达14h。过滤反应物,并用溶剂的混合物(DCM/MeOH=10/1,5mL)洗涤三次。浓缩滤液,并将残余物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA(5/1)的梯度洗脱,以获得淡黄色油状的化合物B5(7.00g)。MS: 计算325(MH⁺),测量269(M-C₄H₈+H⁺)。

[0299] 步骤4: 5-氯-3-甲基-2-(3-甲基-4-哌啶基)吡啶(化合物B6)的制备

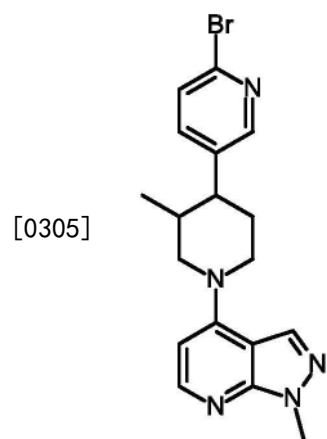
[0300] 在0℃,向4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物B5, 7.00g, 21.55mmol)在DCM(30mL)中的溶液中滴加TFA(10mL)。在20℃搅拌2h后,浓缩反应混合物,并将残余物溶解在DCM(50mL)中,并用饱和NaHCO₃溶液碱化。将混合物用DCM(40mL)萃取三次。将合并的有机层用50mL盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并浓缩,以得到淡黄色油状的化合物B6(4.80g)。MS: 计算225(MH⁺), 测量225(MH⁺)。

[0301] 步骤5: 4-[(3S, 4R)-4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(中间体B)的制备

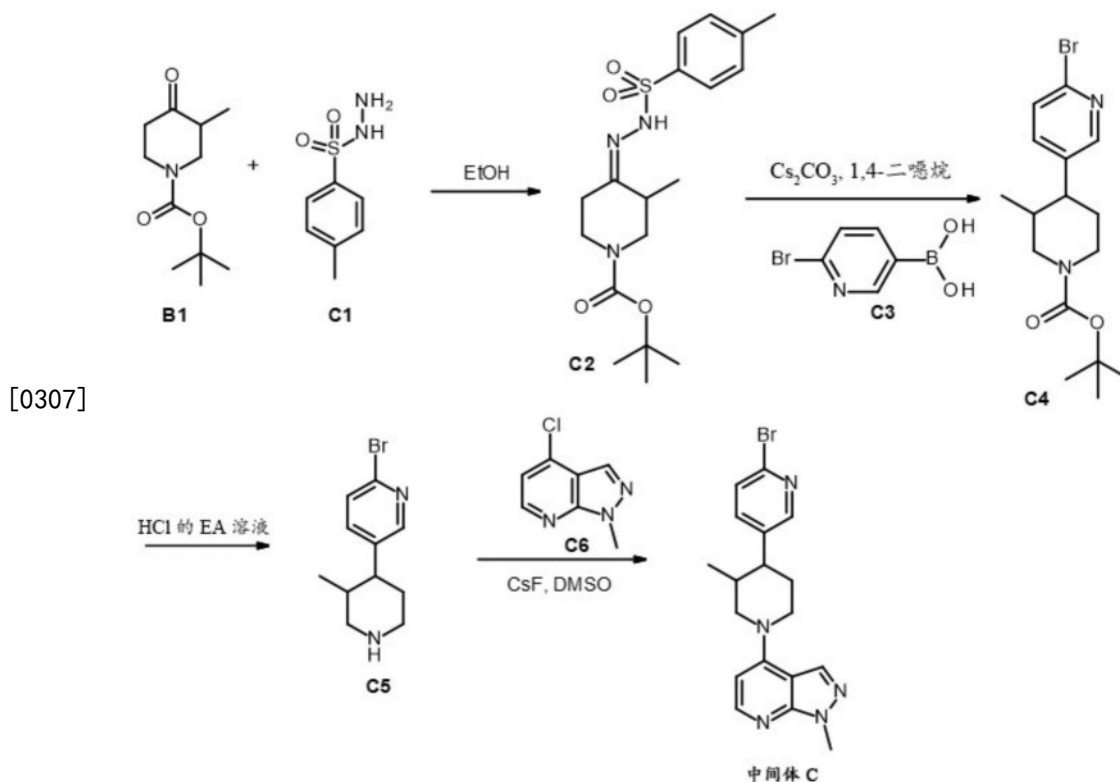
[0302] 向5-氯-3-甲基-2-(3-甲基-4-哌啶基)吡啶(化合物B6, 4.60g, 20.47mmol)和4-氟-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物A11, 3.72g, 22.52mmol)在DMSO(40mL)中的混合物中加入DIPEA(2.37g, 40.94mmol)。将反应物在N₂气氛下于120℃搅拌3h。冷却至室温后,将反应混合物倒入冰水(400mL)中,用EA(80mL)萃取3次。将合并的有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并且在真空下浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化,以EA/PE(1/1)的梯度洗脱,以得到浅棕色固体状的混合物(5.40g)。混合物继续通过SFC纯化(梯度: 在CO₂中的40% EtOH(0.1% NH₃H₂O), 柱: Daicel Chiralpak AD, 250×30mm, 10μm), 以获得淡黄色固体状的中间体B(2.10g)。MS: 计算370(MH⁺), 测量370(MH⁺)。

[0303] 中间体C

[0304] 4-[4-(6-溴-3-吡啶基)-3-甲基-1-哌啶基]-1-甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶



[0306] 根据以下方案制备标题化合物:



[0308] 步骤1:3-甲基-4-(对甲苯磺酰肼基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物C2)的制备

[0309] 向3-甲基-4-氧代哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物B1,CAS:181269-69-2,供应商:PharmaBlock,300mg,1.41mmol)在乙醇(10mL)中的溶液中加入4-甲基苯磺酰肼(化合物C1,341mg,1.83mmol)。将混合物在70℃搅拌3h。冷却至室温后,将混合物浓缩,以获得粗产物化合物C2(537mg),其无需进一步纯化即可用于下一步骤。MS:计算382(MH⁺),测量382(MH⁺)。

[0310] 步骤2:4-(6-溴-3-吡啶基)-3-甲基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物C4)的制备

[0311] 向3-甲基-4-(对甲苯磺酰肼基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物C2,537mg,1.41mmol)在1,4-二噁烷(5mL)中的溶液中加入(6-溴吡啶-3-基)硼酸(化合物C3,CAS:223463-14-7,供应商:Accela,369mg,1.83mmol)和Cs₂CO₃(1.38g,4.22mmol)。将混合物在N₂下在120℃搅拌16h。冷却至室温后,将混合物过滤,并且将固体用EA(10mL)洗涤两次。将合并的有机层浓缩并通过闪蒸柱纯化,以EA/PE(0%至70%)的梯度洗脱,以得到无色油状的所需产物C4(50mg)。MS:计算355(MH⁺),测量355(MH⁺)。

[0312] 步骤3:2-溴-5-(3-甲基-4-哌啶基)吡啶(化合物C5)的制备

[0313] 将4-(6-溴-3-吡啶基)-3-甲基-1-哌啶-甲酸叔丁酯(化合物C4,50mg,141μmol)与盐酸(1M的EA溶液,10mL,10mmol)在HCl中的混合物于室温搅拌2h。将混合物浓缩,以得到白色固体状的所需产物C5(41mg)。MS:计算255(MH⁺),测量255(MH⁺)。

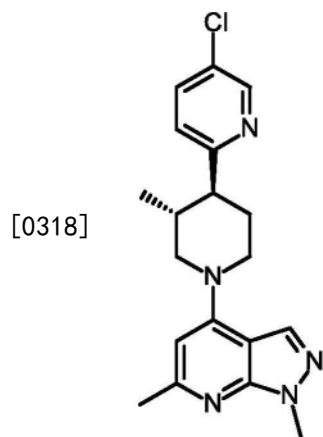
[0314] 步骤4:4-[4-(6-溴-3-吡啶基)-3-甲基-1-哌啶基]-1-甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(中间体C)的制备

[0315] 向4-氯-1-甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物C6,CAS:1268520-92-8,供应商:PharmaBlock,35mg,211μmol)和2-溴-5-(3-甲基-4-哌啶基)吡啶(化合物C5,41mg,141μmol)在DMSO(15mL)中的溶液中加入CsF(107mg,703μmol)。将反应混合物在130℃搅拌过夜。冷却至室温后,将反应物用EA稀释,用水(30mL)洗涤四次,用Na₂SO₄干燥,过滤并在真空下浓

缩。将残余物通过闪蒸柱纯化,以EA(具有10% MeOH)/PE(0%至70%)的梯度洗脱,以得到中间体C(42mg)。MS:计算386(MH⁺),测量386(MH⁺)。

[0316] 中间体D

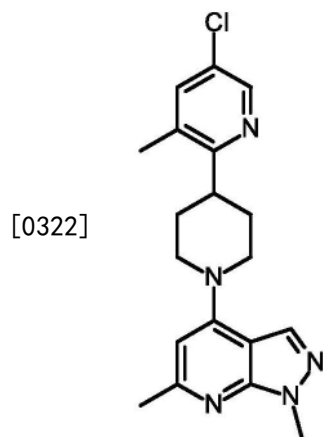
[0317] 4-[(3R,4S) -4-(5-氯-2-吡啶基)-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶



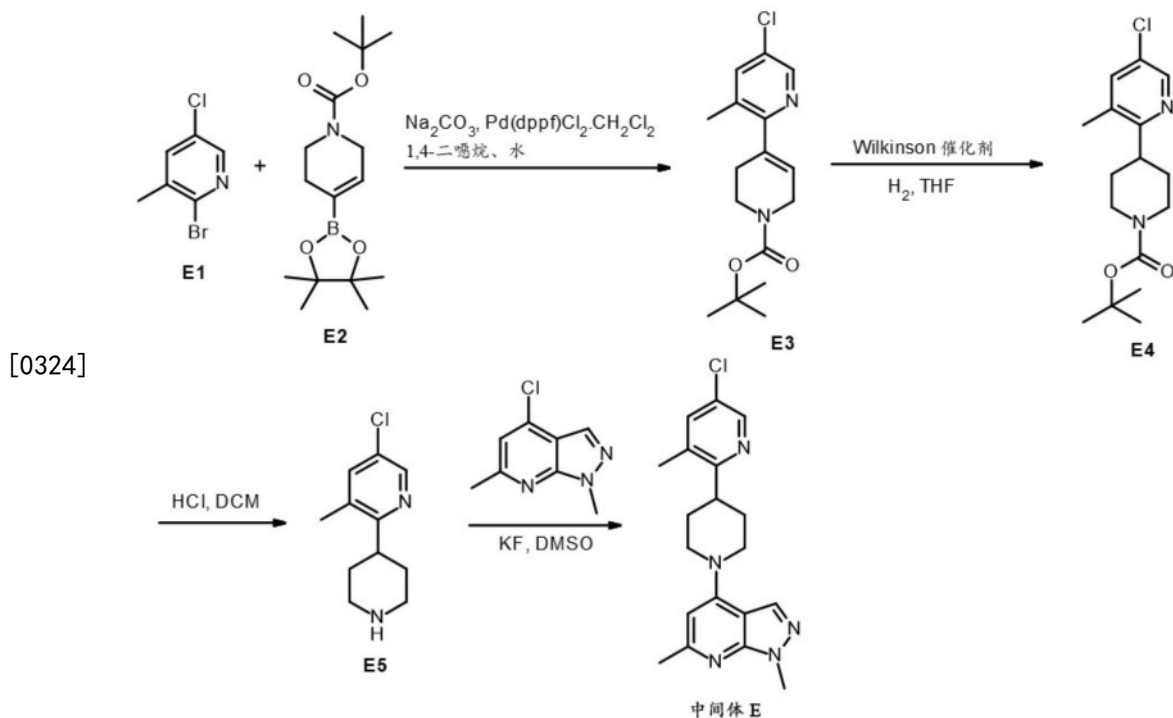
[0319] 类似于中间体A的制备,通过用化合物A13代替化合物A5制备标题化合物。获得白色固体状的中间体D。MS:计算356(MH⁺),测量356(MH⁺)。(注意:当中间体A13在乙醇中用氢氧化钠处理时,哌啶环上3位的立体中心从S构型异构化为R构型,以获得(3R,4S)-1-叔丁氧羰基-4-(5-氯-2-吡啶基)哌啶-3-羧酸。)

[0320] 中间体E

[0321] 4-[4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶



[0323] 根据以下方案制备标题化合物:



[0325] 步骤1: 4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物E3) 的制备

[0326] 向2-溴-5-氯-3-甲基-吡啶 (化合物E1, 15.00g, 72.65mmol) 和4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物E2, 24.71g, 79.91mmol) 在1,4-二噁烷 (400mL) 中的混合物中加入在水 (40mL) 中的碳酸钠 (15.40g, 145.30mmol) 和Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (5.93g, 7.26mmol)。将混合物在N₂气氛下于95℃搅拌16h。冷却至室温后,过滤混合物并用1,4-二噁烷 (10mL) 洗涤三次。浓缩滤液,将粗物质通过闪蒸柱纯化,以PE/EA (5/1至3/1) 的梯度洗脱,以得到黄色油状的化合物E3 (9.40g)。MS: 计算309(MH⁺), 测量309(MH⁺)。

[0327] 步骤2: 4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)吡啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物E4) 的制备

[0328] 向4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物E3, 6.00g, 19.43mmol) 在四氢呋喃 (120mL) 中的溶液中加入三(三苯基膦)氯化铑(I) (4.49g, 4.86mmol)。将烧瓶脱气并用H₂吹扫四次。将混合物在氢气气氛 (45psi) 下于60℃搅拌36h。将混合物在硅藻土上过滤,并将固体用甲醇 (5mL) 洗涤。在真空下除去溶剂,并将粗物质通过闪蒸柱纯化,以PE/EA (5/1至3/1) 的梯度洗脱,以得到灰白色固体状的化合物E4 (4.50g)。MS: 计算311(MH⁺), 测量311(MH⁺)。

[0329] 步骤3: 5-氯-3-甲基-2-(4-吡啶基)吡啶 (化合物E5) 的制备

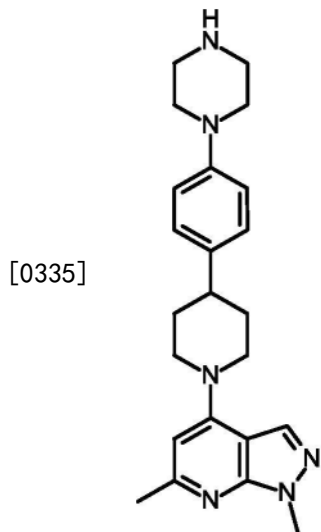
[0330] 在0℃,向4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)吡啶-1-甲酸叔丁酯 (化合物E4, 4.50g, 14.48mmol) 在DCM (50mL) 中的溶液中加入在二噁烷 (10mL) 中的HCl。在25℃搅拌16h后,在减压下浓缩反应混合物,以得到白色固体状的化合物E5 (3.56g)。MS: 计算211(MH⁺), 测量211(MH⁺)。

[0331] 步骤4: 4-[4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-1-吡啶基]-1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶 (中间体E) 的制备

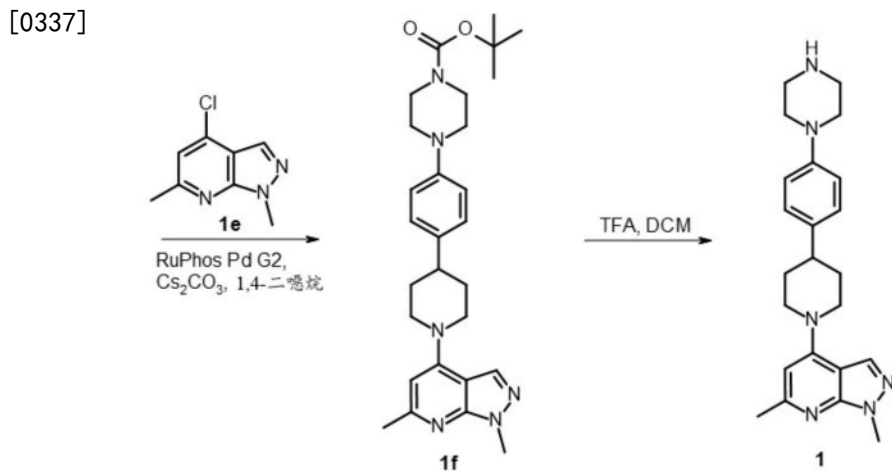
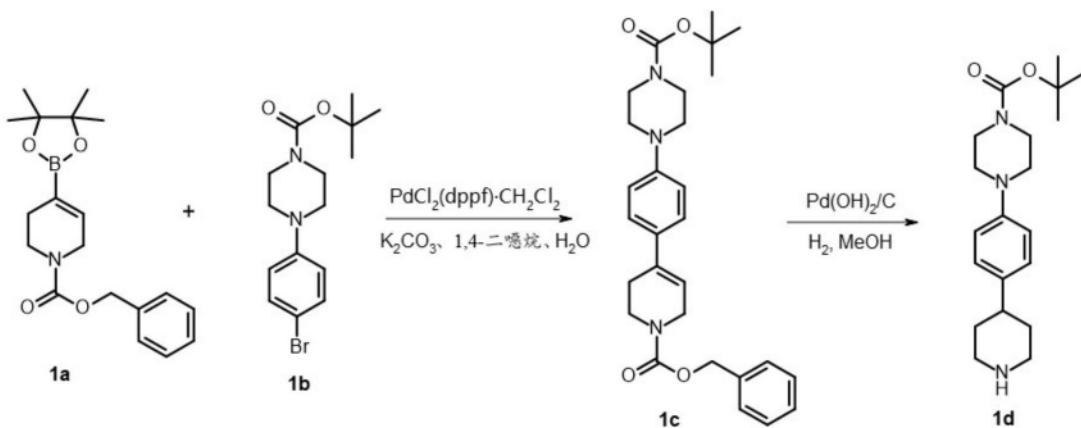
[0332] 向4-氯-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶 (1.15g, 6.33mmol) 和5-氯-3-甲基-2-

[0333] 实例1

[0334] 1,6-二甲基-4-[4-(4-哌嗪-1-基苯基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶



[0336] 根据以下方案制备标题化合物:



[0338] 步骤1:4-[4-(1-苄氧基羰基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基)苯基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物1c)的制备

[0339] 向4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3,6-二氢吡啶-1(2H)-甲酸苄酯(化合物1a,CAS:286961-15-7,供应商:Accela,100mg,291 μ mol)、4-(4-溴苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物1b,CAS:352437-09-3,供应商:Accela,99.4mg,291 μ mol)在1,4-二噁烷(5mL)和水(1mL)中的混合物中加入 K_2CO_3 (121mg,874 μ mol)和 $PdCl_2(dppf) \cdot CH_2Cl_2$ (24mg,29 μ mol)。向混合物中充入 N_2 ,并在100 $^{\circ}C$ 搅拌过夜。冷却至室温后,将混合物用 Na_2SO_4 干燥,过滤并将固体用EA(10mL)洗涤两次。将合并的有机相浓缩并通过闪蒸柱纯化,以EA/PE(0%至60%)的梯度洗脱,以获得化合物1c(83mg)。MS:计算478(MH^+),测量478(MH^+)。

[0340] 步骤2:4-[4-(4-哌啶基)苯基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物1d)的制备

[0341] 向4-[4-(1-苄氧基羰基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基)苯基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物1c,83mg,174 μ mol)在MeOH(10mL)中的混合物中加入 $Pd(OH)_2$ (10重量%的碳,12mg,87 μ mol)。将悬浮液用 H_2 吹扫3次,然后在氢气球下于室温搅拌过夜。将混合物过滤并浓缩,以得到粗产物化合物1d(60mg),其无需进一步纯化即可用于下一步骤。MS:计算346(MH^+),测量346(MH^+)。

[0342] 步骤3:4-[4-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-4-哌啶基]苯基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物1f)的制备

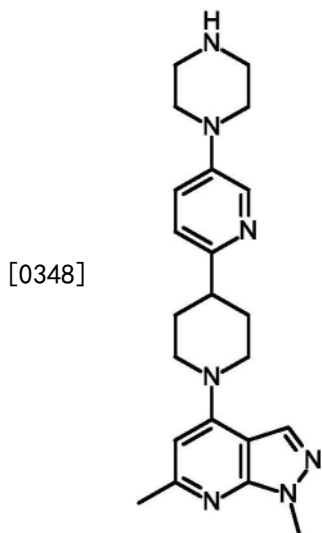
[0343] 向4-氯-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物1e,CAS:19867-78-8,供应商:PharmaBlock,24mg,130 μ mol)和4-[4-(4-哌啶基)苯基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物1d,30mg,87 μ mol)在1,4-二噁烷(2mL)中的混合物中加入 $RuPhos Pd G2$ (7mg,9 μ mol)和 Cs_2CO_3 (85mg,261 μ mol)。向混合物中充入 N_2 ,并在110 $^{\circ}C$ 搅拌过夜。冷却至室温后,将混合物过滤,并且将固体用EA(10mL)洗涤两次。将合并的有机相浓缩,并通过闪蒸柱纯化,以EA(具有10% MeOH)/PE(0%至60%)的梯度洗脱,以得到所需产物1f。MS:计算491(MH^+),测量491(MH^+)。

[0344] 步骤4:1,6-二甲基-4-[4-(4-哌嗪-1-基苯基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶的制备

[0345] 将化合物1f溶于DCM(10mL)和TFA(2mL)中,并在室温搅拌2h。将混合物浓缩并通过反向闪蒸柱纯化,以ACN/水(具有0.5% TFA)(0%至30%)的梯度洗脱,以得到黄色固体的实例1(36mg)。MS:计算391(MH^+),测量391(MH^+)。 ^1H NMR(400MHz,甲醇- d_4) δ = ^1H NMR(400MHz,甲醇- d_4) δ =8.36(s,1H),7.23-7.18(m,2H),7.01-6.96(m,2H),6.70(s,1H),4.60(br d, J =13.3Hz,2H),4.07(s,3H),3.56(br t, J =12.7Hz,2H),3.39-3.33(m,8H),3.01(tt, J =3.8,11.9Hz,1H),2.62(s,3H),2.14-2.07(m,2H),1.84(dq, J =3.9,12.7Hz,2H)。

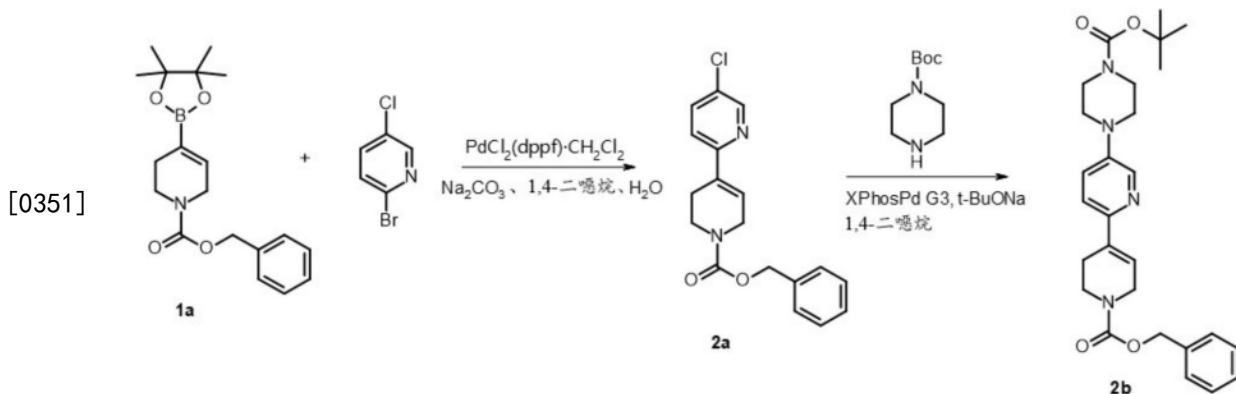
[0346] 实例2

[0347] 1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶



[0349] 类似于实例1的制备,通过使用4-[6-(1-苄氧基羰基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物2b)代替化合物1c制备标题化合物。获得实例2(44mg),为白色固体。MS:计算392(MH⁺),测量392(MH⁺)。 ¹H NMR(400MHz, CDC13) δ=8.22(d, J=2.4Hz, 1H), 7.90(s, 1H), 7.15(dd, J=2.6, 8.6Hz, 1H), 7.04(d, J=8.6Hz, 1H), 6.21(s, 1H), 4.23(br d, J=13.1Hz, 2H), 4.04(s, 3H), 3.25-3.09(m, 6H), 3.05-2.89(m, 5H), 2.53(s, 3H), 2.09-2.01(m, 2H), 1.98-1.86(m, 3H)。

[0350] 根据以下方案制备化合物2b:



[0352] 步骤1: 4-(5-氯-2-吡啶基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸苄酯(化合物2a)的制备

[0353] 在N₂下将2-溴-5-氯吡啶(CAS:40473-01-6,供应商:Accela,1.00g,5.2mmol)、4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸苄酯(化合物1a,1.80g,5.24mmol)和碳酸钠(1.20g,11.32mmol)在1,4-二噁烷(10mL)和水(1mL)中的溶液中加入PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂(380mg,0.52mmol)。将混合物在N₂下于80℃搅拌16h。冷却至室温后,过滤反应混合物,并在减压下浓缩滤液以除去溶剂,并将残余物通过闪蒸柱纯化,以EA/PE(1/5至1/0)的梯度洗脱,以得到棕色油状的化合物2a(1.50g)。MS:计算329(MH⁺),测量329(MH⁺)。

[0354] 步骤2:4-[6-(1-苄氧基羰基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物2b)的制备

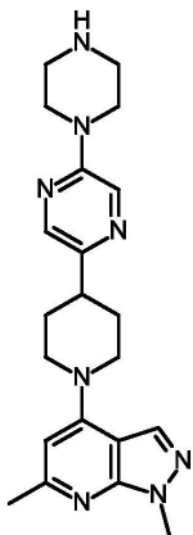
[0355] 在N₂下向4-(5-氯-2-吡啶基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸苄酯(化合物2a, 500mg, 1.52mmol)、哌嗪-1-甲酸叔丁酯(566mg, 3.04mmol)和叔丁醇钠(225mg, 2.34mmol)在1,4-二

噁烷(5mL)中的溶液中加入Xphos-Pd-G3(129mg, 0.15mmol)。将混合物在N₂下于100℃搅拌3h。冷却至室温后,将反应混合物在硅藻土上过滤,并将滤液在减压下浓缩以除去溶剂,并且将粗物质通过闪蒸柱纯化,以EA/PE(1/5至1/0)的梯度洗脱,以得到黄色固体状的化合物2b(223mg)。MS: 计算479(MH⁺), 测量479(MH⁺)。

[0356] 实例3

[0357] 1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶

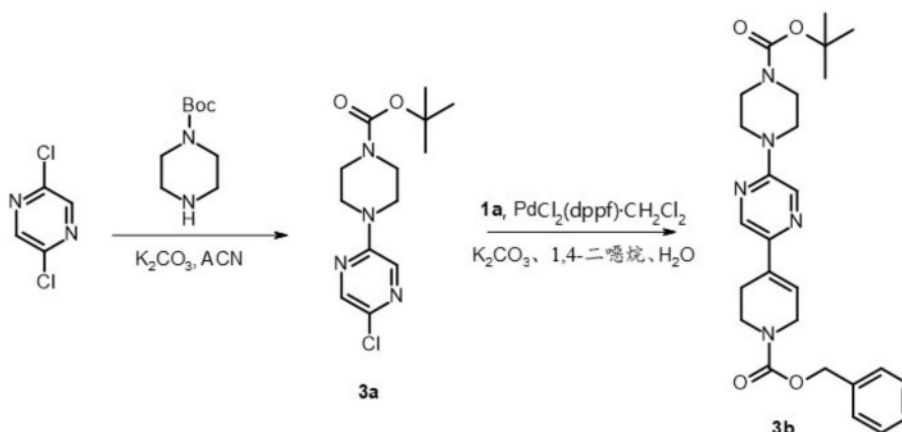
[0358]



[0359] 类似于实例1的制备,通过使用4-[5-(1-苄氧基羰基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基)吡嗪-2-基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物3b)代替化合物1c制备标题化合物。获得实例3(23mg),为白色固体。MS: 计算393(MH⁺), 测量393(MH⁺)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ=8.09-8.06(m, 1H), 8.01-7.98(m, 1H), 7.93-7.91(m, 1H), 6.24-6.22(m, 1H), 4.29-4.21(m, 2H), 4.07-4.04(m, 3H), 3.55-3.50(m, 4H), 3.27-3.18(m, 2H), 3.02-2.97(m, 4H), 2.97-2.89(m, 1H), 2.57-2.54(m, 3H), 2.07-1.93(m, 4H)。

[0360] 根据以下方案制备化合物3b:

[0361]



[0362] 步骤1: 4-(5-氯吡嗪-2-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物3a)的制备

[0363] 向2,5-二氯吡嗪(CAS:19745-07-4, 供应商:Accela, 2.00g, 13.42mmol)和哌嗪-1-甲酸叔丁酯(2.75g, 14.77mmol)在ACN(20mL)中的溶液中加入碳酸钾(2.78g, 20.14mmol)。将混合物在80℃搅拌16h。冷却至室温后,过滤反应混合物,并在减压下浓缩滤液以除去溶剂,并将残余物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA(10/1至3/1)的梯度洗脱,以得到淡黄色固体状的

化合物3a (1.50g, 5.02mmol)。MS: 计算299 (MH⁺), 测量299 (MH⁺)。

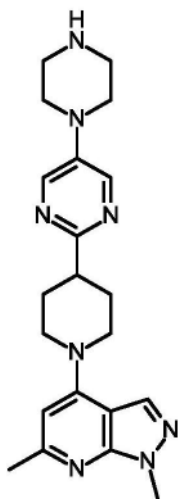
[0364] 步骤2: 4-[5-(1-苄氧基羰基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基)吡嗪-2-基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物3b)的制备

[0365] 向4-(5-氯吡嗪-2-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物3a, 1.45g, 4.85mmol)和4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸苄酯(化合物1a, 1.83g, 5.34mmol)在1,4-二噁烷(10mL)和水(1mL)中的混合物中加入K₂CO₃(1.34g, 9.71mmol)以及PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂(198mg, 0.24mmol)。将烧瓶脱气并用N₂吹扫四次。将混合物在N₂气氛下于90℃搅拌16h。冷却至室温后,将混合物用水(10mL)稀释,用EA(20mL)萃取三次。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩,以得到粗产物,该粗产物通过闪蒸柱纯化,以PE/EA(5/1至3/1)的梯度洗脱,以得到黄色固体状的化合物3b (1.50g)。MS: 计算480 (MH⁺), 测量480 (MH⁺)。

[0366] 实例4

[0367] 1,6-二甲基-4-[4-(5-哌嗪-1-基嘧啶-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶

[0368]

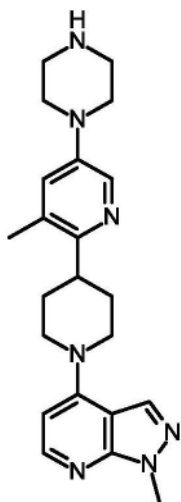


[0369] 类似于实例2的制备,通过使用5-溴-2-碘嘧啶(CAS:183438-24-6,供应商: Accela)代替2-溴-5-氯吡啶制备标题化合物。获得实例4(3.5mg),为白色固体。MS: 计算393 (MH⁺), 测量393 (MH⁺)。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ=8.40(s, 2H), 8.08(s, 1H), 6.40(s, 1H), 5.02-4.90(m, 2H), 4.33(br d, J=13.2Hz, 2H), 3.99(s, 3H), 3.26-3.20(m, 4H), 3.18-3.11(m, 1H), 3.03-2.95(m, 4H), 2.52(s, 3H), 2.13-1.94(m, 4H)。

[0370] 实例5

[0371] 1-甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶

[0372]

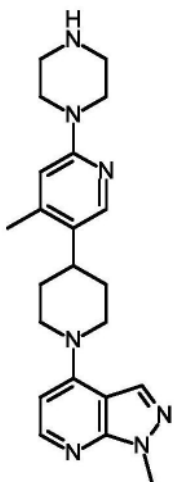


[0373] 类似于实例2的制备,通过使用2-溴-5-氯-3-甲基-吡啶(CAS:65550-77-8,供应商:Accela)和4-氯-1-甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(CAS:1268520-92-8,供应商:PharmaBlock)代替2-溴-5-氟吡啶和化合物1e制备标题化合物。获得实例5(29mg),为白色固体。MS:计算392(MH⁺),测量392(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.16(s,1H),8.10(d,J=5.9Hz,1H),7.96(d,J=2.7Hz,1H),7.21(d,J=2.7Hz,1H),6.50(d,J=5.9Hz,1H),4.41(br d,J=13.7Hz,2H),4.00(s,3H),3.41-3.33(m,2H),3.29-3.22(m,1H),3.18-3.10(m,4H),3.04-2.93(m,4H),2.40(s,3H),2.10-1.95(m,2H),1.88(br dd,J=1.5,12.5Hz,2H)。

[0374] 实例6

[0375] 1-甲基-4-[4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶

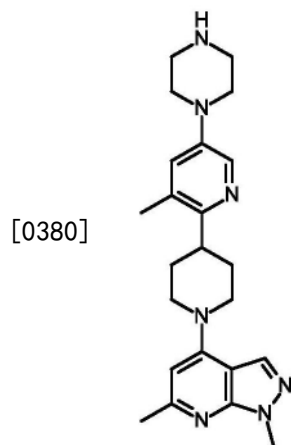
[0376]



[0377] 类似于实例1的制备,通过使用4-氯-1-甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(CAS:1268520-92-8,供应商:PharmaBlock)和4-(5-溴-4-甲基-2-吡啶基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(CAS:944582-92-7,供应商:Bide Pharmatech)代替化合物1e和化合物1b制备标题化合物。获得淡黄色固体状的实例6(35mg)。MS:计算392(MH⁺),测量392(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.45(s,1H),8.06(d,J=7.3Hz,1H),7.91(s,1H),7.21(s,1H),6.86(d,J=7.5Hz,1H),4.70-4.62(m,2H),4.08(s,3H),3.94-3.84(m,4H),3.65(br t,J=12.1Hz,2H),3.44-3.36(m,4H),3.35-3.24(m,1H),2.56(s,3H),2.14(br d,J=12.3Hz,2H),1.90(dq,J=3.5,12.6Hz,2H)。

[0378] 实例7

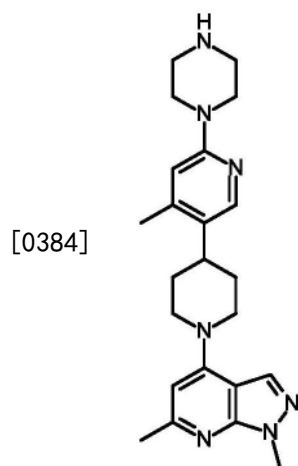
[0379] 1,6-二甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶



[0381] 类似于实例2的制备,通过使用2-溴-5-氯-3-甲基-吡啶(CAS:65550-77-8,供应商:Accela)代替2-溴-5-氯吡啶制备标题化合物。获得实例7(61mg),为白色固体。MS:计算406(MH⁺),测量406(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.07(s,1H),7.96(d,J=2.9Hz,1H),7.21(d,J=2.7Hz,1H),6.40(s,1H),4.37(br d,J=13.4Hz,2H),3.99(s,3H),3.35(br d,J=2.0Hz,1H),3.29-3.21(m,2H),3.15(br dd,J=3.9,6.1Hz,4H),3.02-2.94(m,4H),2.52(s,3H),2.40(s,3H),2.08-1.96(m,2H),1.89-1.80(m,2H)。

[0382] 实例8

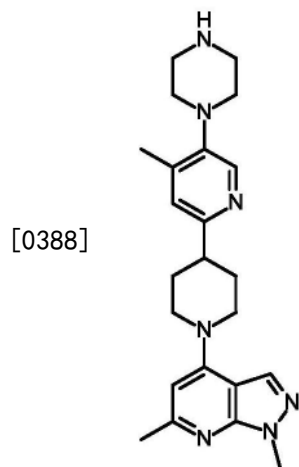
[0383] 1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶



[0385] 类似于实例1的制备,通过使用4-溴-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(CAS:1783407-55-5,供应商:Accela)和4-(5-溴-4-甲基-2-吡啶基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(CAS:944582-92-7,供应商:Bide Pharmatech)代替化合物1e和化合物1b制备标题化合物。获得实例8(32mg),为黄色固体。MS:计算406(MH⁺),测量406(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.27(s,1H),7.81(s,1H),7.07(s,1H),6.62(s,1H),4.54(br d,J=13.4Hz,2H),3.98(s,3H),3.82-3.73(m,4H),3.51(br t,J=12.6Hz,2H),3.35-3.25(m,4H),3.19-3.12(m,1H),2.53(s,3H),2.45(s,3H),2.03(br d,J=12.3Hz,2H),1.77(dq,J=3.5,12.6Hz,2H)。

[0386] 实例9

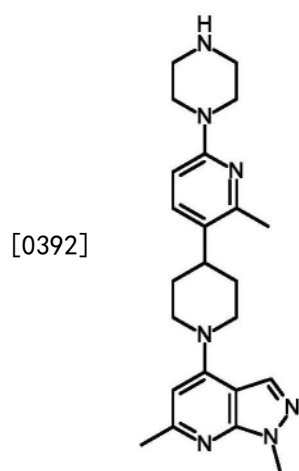
[0387] 1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶



[0389] 类似于实例3的制备,通过在步骤1中使用5-溴-2-氯-4-甲基吡啶 (CAS:778611-64-6, 供应商:Accela) 代替2,5-二氯吡啶,并用Buchwald偶联反应 (XantPhos, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, $t\text{-BuONa}$, 甲苯) 代替 $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ 反应 (K_2CO_3 , CAN) 制备标题化合物。获得实例9 (61mg), 为白色固体。MS: 计算406 (MH^+), 测量406 (MH^+)。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ =8.09 (d, $J=3.4\text{Hz}$, 2H), 7.18 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.37 (br d, $J=13.2\text{Hz}$, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.30-3.23 (m, 2H), 3.06-3.01 (m, 4H), 3.02-2.99 (m, 1H), 3.00-2.93 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.05-1.97 (m, 2H), 1.97-1.85 (m, 2H)。

[0390] 实例10

[0391] 1,6-二甲基-4-[4-(2-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶



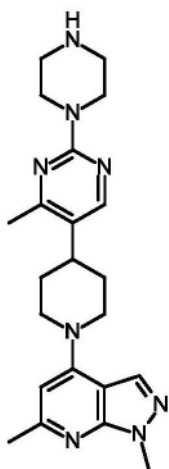
[0393] 类似于实例3的制备,通过在步骤1中使用3-溴-6-氟-2-甲基吡啶 (CAS:375368-83-5, 供应商:Accela) 代替2,5-二氯吡啶,并用(DIPEA, DMF) 代替 $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ 反应条件 (K_2CO_3 , CAN) 制备标题化合物。获得实例10 (7mg), 为白色固体。MS: 计算406 (MH^+), 测量406 (MH^+)。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ =8.10 (s, 1H), 7.42 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 6.61 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.38 (br d, $J=13.1\text{Hz}$, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.49-3.43 (m, 4H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.11-3.01 (m, 1H), 2.99-2.92 (m, 4H), 2.54 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 1.97-1.89 (m, 2H), 1.86-1.75 (m,

2H)。

[0394] 实例11

[0395] 1,6-二甲基-4-[4-(4-甲基-2-哌嗪-1-基-嘧啶-5-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶

[0396]

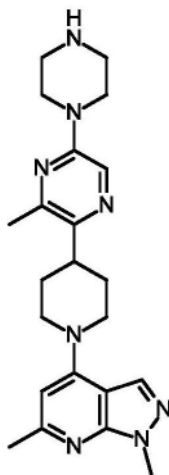


[0397] 类似于实例3的制备,通过使用5-溴-2-氯-4-甲基嘧啶 (CAS:633328-95-7,供应商:Accela) 代替2,5-二氯吡嗪制备标题化合物。获得实例11 (34mg),为白色固体。MS:计算407 (MH⁺),测量407 (MH⁺)。¹H NMR (400MHz, CDC13) δ = 8.10 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.27 (br d, J = 12.8Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.81-3.74 (m, 4H), 3.18 (dt, J = 2.6, 12.5Hz, 2H), 2.95-2.81 (m, 5H), 2.57 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.97-1.82 (m, 4H)。

[0398] 实例12

[0399] 1,6-二甲基-4-[4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶

[0400]

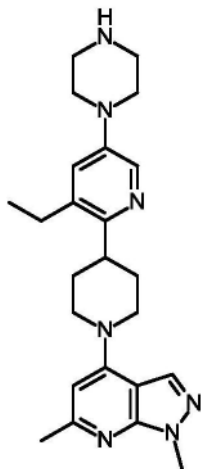


[0401] 类似于实例3的制备,通过使用2,5-二氯-3-甲基-吡嗪 (CAS:107378-41-6,供应商:Bide) 代替2,5-二氯吡嗪制备标题化合物。获得实例12 (16mg),为白色固体。MS:计算407 (MH⁺),测量407 (MH⁺)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ = 8.09 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.37 (br d, J = 13.3Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.59-3.50 (m, 4H), 3.39-3.34 (m, 1H), 3.32-3.28 (m, 1H), 3.28-3.17 (m, 1H), 3.00-2.88 (m, 4H), 2.54 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.07-1.94 (m, 2H), 1.93-1.82 (m, 2H)。

[0402] 实例13

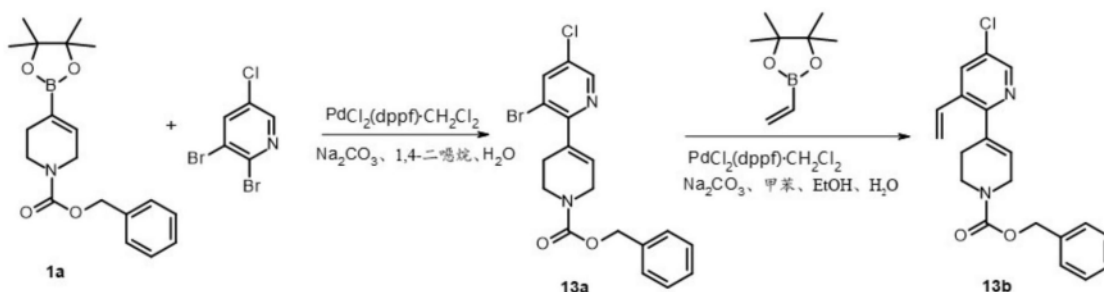
[0403] 4-[4-(3-乙基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶

[0404]

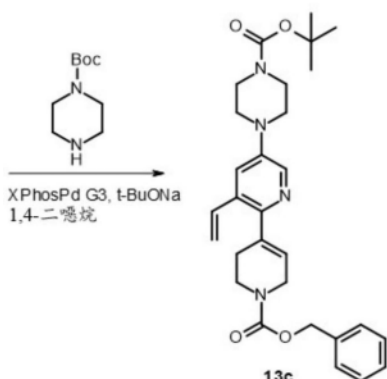


[0405] 类似于实例1的制备,通过使用4-[6-(1-苄氧基羰基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基)-5-乙烯基-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物13c)代替化合物1c制备标题化合物。获得实例13(5mg),为白色固体。MS:计算420(MH⁺),测量420(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.10(s,1H),7.99(d,J=2.8Hz,1H),7.22(d,J=2.8Hz,1H),6.42(s,1H),4.39(br d,J=13.4Hz,2H),4.01(s,3H),3.39-3.34(m,1H),3.32-3.23(m,2H),3.20-3.12(m,4H),3.04-2.95(m,4H),2.77(q,J=7.5Hz,2H),2.54(s,3H),2.18-2.02(m,2H),1.85(br d,J=11.1Hz,2H),1.28(t,J=7.5Hz,3H)。

[0406] 根据以下方案制备化合物13c:



[0407]



[0408] 步骤1:4-(3-溴-5-氯-2-吡啶基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸苄酯(化合物13a)的制备

[0409] 向4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲

酸苄酯(化合物1a, 2.53g, 7.37mmol)和2,3-二溴-5-氯吡啶(CAS:137628-17-2, 供应商: Accela, 2.00g, 7.37mmol)在1,4-二噁烷(10mL)和水(1mL)中的混合物中加入PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂(301mg, 0.37mmol)和Na₂CO₃(1.56g, 14.74mmol)。将混合物在N₂气氛下于80℃搅拌0.5h。冷却至室温后, 过滤混合物并将固体用1,4-二噁烷(15mL)洗涤三次并浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化, 以PE/EA(3/1)的梯度洗脱, 以获得淡黄色固体状的化合物13a(680mg, 1.67mmol)。MS: 计算407(MH⁺), 测量407(MH⁺)。

[0410] 步骤2: 4-(5-氯-3-乙烯基-2-吡啶基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸苄酯(化合物13b)的制备

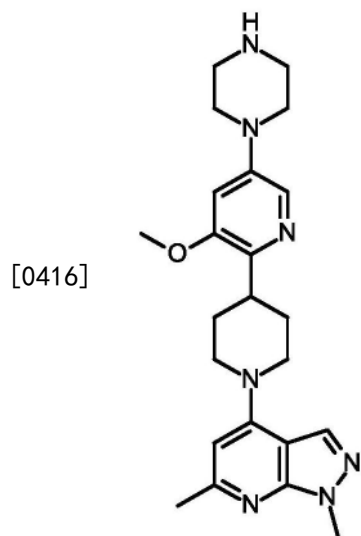
[0411] 向4-(3-溴-5-氯-2-吡啶基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸苄酯(化合物13a, 100mg, 0.25mmol)、乙烯基硼酸频哪醇酯(94mg, 0.61mmol)和Na₂CO₃(20mg, 0.490mmol)在甲苯(1mL)、乙醇(0.5mL)和水(0.5mL)中的混合物中加入PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂(20mg, 0.02mmol), 将混合物在N₂气氛下于100℃搅拌1h。将该反应重复四次(每次100mg化合物13c)。将合并的反应混合物过滤并用EtOH洗涤。浓缩滤液。将残余物通过闪蒸柱纯化, 以PE/EA(5/1至0/1)的梯度洗脱, 以得到淡黄色油状的化合物13b(260mg)。MS: 计算355(MH⁺), 测量355(MH⁺)。

[0412] 步骤3: 4-[6-(1-苄氧基羰基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基)-5-乙烯基-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物13c)的制备

[0413] 向哌嗪-1-甲酸叔丁酯(105mg, 0.56mmol)和4-(5-氯-3-乙烯基-2-吡啶基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-甲酸苄酯(化合物13b, 100mg, 0.28mmol)在1,4-二噁烷(2.5mL)中的混合物中加入Xphos-Pd-G3(24mg, 0.03mmol)和t-BuONa(67mg, 0.70mmol)。在N₂下于100℃搅拌1.5h后, 将反应混合物与另一批相同的混合物混合并处理, 且然后过滤混合物, 用EtOH洗涤并浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化, 以PE/EA(1/0至1/8)的梯度洗脱, 以获得淡黄色固体状的化合物13c(90mg)。MS: 计算505(MH⁺), 测量505(MH⁺)。

[0414] 实例14

[0415] 4-[4-(3-甲氧基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶

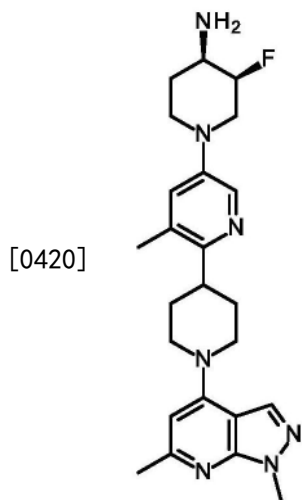


[0417] 类似于实例9的制备, 通过使用5-溴-2-氯-3-甲氧基-吡啶(CAS:286947-03-3, 供应商: Accela)代替5-溴-2-氯-4-甲基吡啶制备标题化合物。获得实例14(37mg), 为白色固

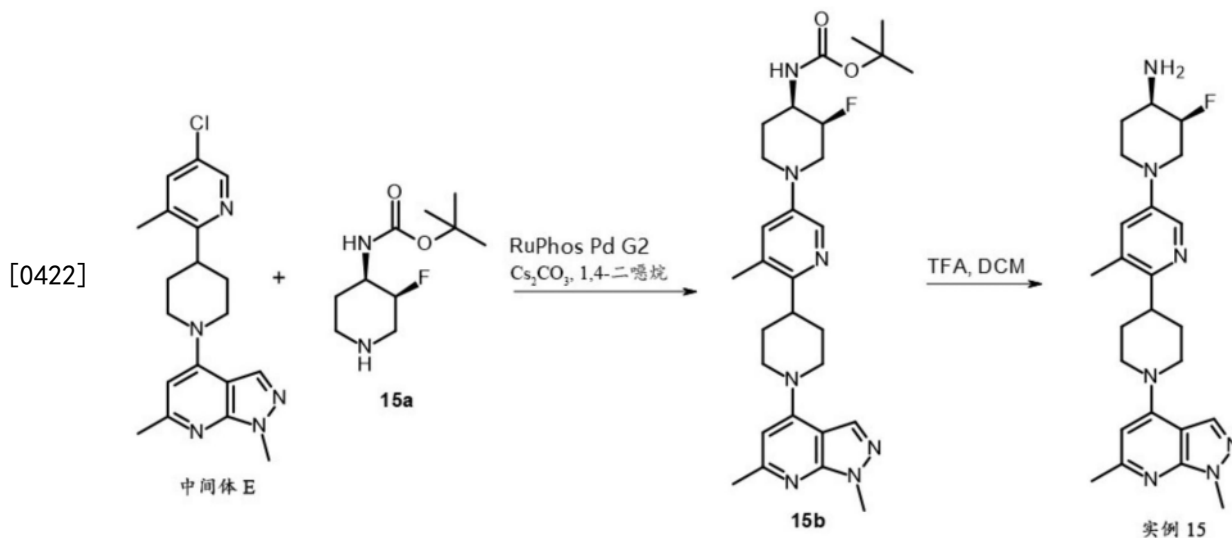
体。MS: 计算422 (MH⁺), 测量422 (MH⁺)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ = 8.09 (s, 1H), 7.70 (d, J = 2.3Hz, 1H), 6.99 (d, J = 2.3Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.37 (br d, J = 13.2Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.44 (tt, J = 3.9, 11.7Hz, 1H), 3.32-3.25 (m, 2H), 3.20 (dd, J = 4.0, 6.2Hz, 4H), 3.03-2.94 (m, 4H), 2.54 (s, 3H), 2.07-1.95 (m, 2H), 1.94-1.85 (m, 2H)。

[0418] 实例15

[0419] (3S, 4R) - 1 - [6 - [1 - (1, 6 - 二甲基吡唑并[3, 4-b]吡啶-4-基) - 4-哌啶基] - 5-甲基-3-吡啶基] - 3-氟-哌啶-4-胺



[0421] 根据以下方案制备标题化合物:



[0423] 步骤1: N - [(3S, 4R) - 1 - [6 - [1 - (1, 6 - 二甲基吡唑并[3, 4-b]吡啶-4-基) - 4-哌啶基] - 5-甲基-3-吡啶基] - 3-氟-4-哌啶基] 氨基甲酸叔丁酯 (化合物15b) 的制备

[0424] 向4-[4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-1-哌啶基]-1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶 (中间体E, 50mg, 0.14mmol) 和N-[(3S, 4R) - 3-氟-4-哌啶基] 氨基甲酸叔丁酯 (化合物15a, CAS: 1434126-99-4, 供应商: PharmaBlock, 40mg, 0.18mmol) 在1,4-二噁烷中的混合物中加入RuPhos Pd G2 (11mg, 0.014mmol) 和碳酸铯 (92mg, 0.28mmol)。将混合物加热至110℃过夜。冷却至室温后, 将固体滤出并用EA (10mL) 洗涤两次。将合并的有机层浓缩并通过闪蒸柱纯化, 以EA (具有10% MeOH) / PE (0至80%) 的梯度洗脱, 以得到化合物15b, 其直接用于下一

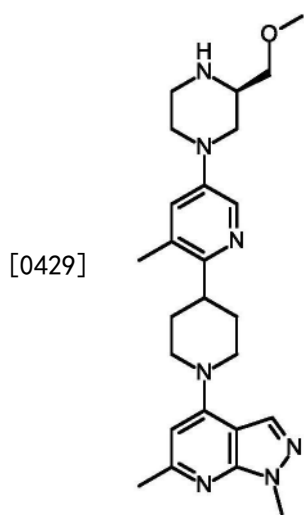
步骤。MS: 计算538 (MH⁺), 测量538 (MH⁺)。

[0425] 步骤2: (3S, 4R) -1-[6-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺(实例15)的制备

[0426] 将化合物15b在DCM (5mL) 和TFA (2mL) 中的混合物在室温搅拌2h。将混合物浓缩并通过反向闪蒸柱纯化, 以ACN/水(具有0.05% TFA) (0至30%) 的梯度洗脱, 以得到白色固体状的实例15 (56mg)。MS: 计算438 (MH⁺), 测量438 (MH⁺)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ=8.37 (s, 1H), 8.15 (d, J=2.9Hz, 1H), 8.02 (d, J=2.7Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.08 (d, J=49.2Hz, 1H), 4.76-4.61 (m, 2H), 4.48-4.34 (m, 1H), 4.16-4.03 (m, 4H), 3.76-3.59 (m, 4H), 3.43-3.25 (m, 1H), 3.24-3.09 (m, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 2.22-2.09 (m, 4H), 2.09-2.00 (m, 2H)。

[0427] 实例16

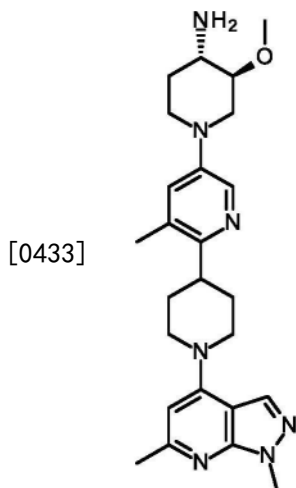
[0428] 4-[4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-3-甲基-2-吡啶基]-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶



[0430] 类似于实例15的制备, 通过使用(2R)-2-(甲氧基甲基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (CAS: 1023301-73-6, 供应商: PharmaBlock) 代替化合物15a来制备标题化合物。获得实例16 (58mg), 为白色固体。MS: 计算450 (MH⁺), 测量450 (MH⁺)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ=8.37 (s, 1H), 8.13 (d, J=2.8Hz, 1H), 7.73 (d, J=2.6Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.70-4.62 (m, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.98-3.90 (m, 2H), 3.72-3.57 (m, 6H), 3.52-3.46 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.36-3.27 (m, 1H), 3.20-3.06 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.14-2.03 (m, 4H)。

[0431] 实例17

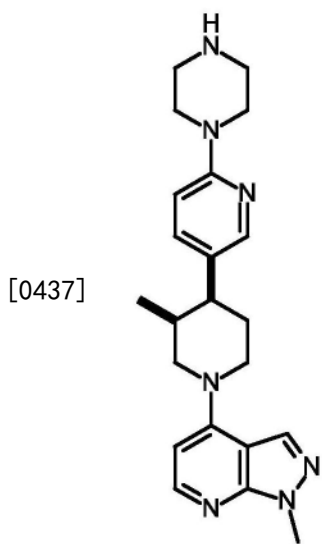
[0432] (3S, 4S) -1-[6-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-甲氧基-哌啶-4-胺



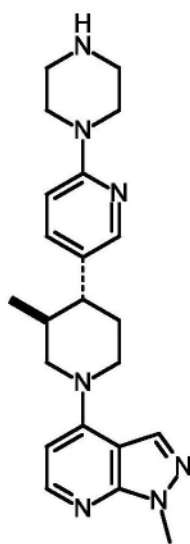
[0434] 类似于实例15的制备,通过使用N-[(3S,4S) -3-甲氧基-4-哌啶基]氨基甲酸叔丁酯(CAS:907544-19-8,供应商:PharmaBlock)代替化合物15a来制备标题化合物。获得实例17(50mg),为白色固体。MS: 计算450(MH⁺), 测量450(MH⁺)。 ¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ=8.37(s, 1H), 8.17(d, J=2.9Hz, 1H), 8.03(d, J=2.8Hz, 1H), 6.75(s, 1H), 4.74-4.65(m, 2H), 4.39-4.29(m, 1H), 4.08(s, 3H), 4.03-3.91(m, 1H), 3.75-3.60(m, 3H), 3.55(s, 3H), 3.41-3.32(m, 1H), 3.26-3.14(m, 1H), 3.00(dt, J=2.7, 12.8Hz, 1H), 2.72(dd, J=10.1, 12.5Hz, 1H), 2.64(s, 3H), 2.60(s, 3H), 2.21-2.09(m, 5H), 1.79(dq, J=4.6, 12.5Hz, 1H)。

[0435] 实例18和实例19

[0436] 1-甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶(实例18)和1-甲基-4-[反式-3-甲基-4-(6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶(实例19)



(实例 18)



(实例 19)

[0438] 类似于实例15的制备,通过使用哌嗪-1-甲酸叔丁酯和中间体C代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。通过制备HPLC分离实例18和实例19。

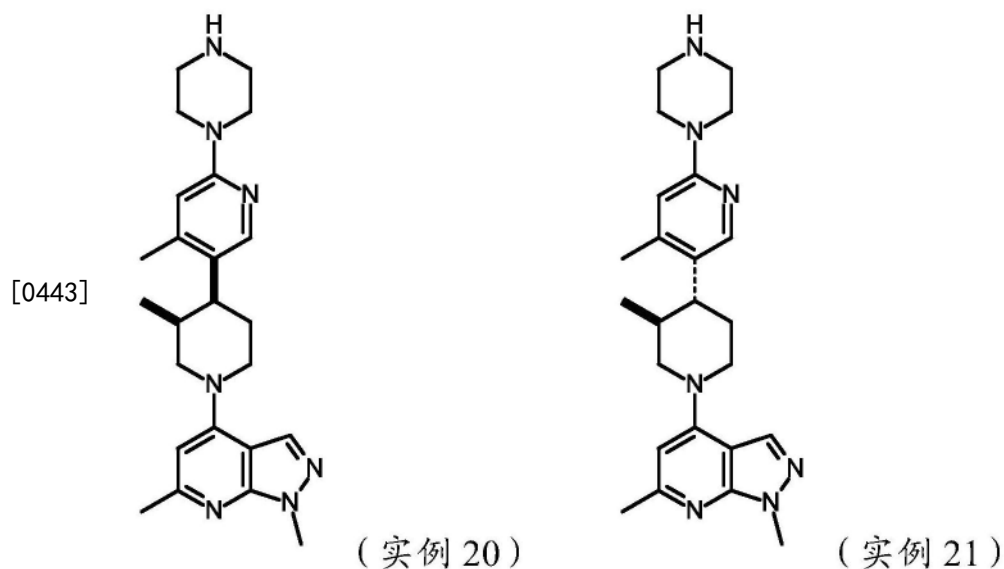
[0439] 获得淡黄色固体状的实例18 (6mg)。MS: 计算392 (MH⁺), 测量392 (MH⁺)。 ¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ=8.50 (s, 1H), 8.07-7.99 (m, 2H), 7.69 (dd, J=2.3, 8.9Hz, 1H), 7.05 (d, J=8.9Hz, 1H), 6.86 (d, J=7.6Hz, 1H), 4.70 (br d, J=13.7Hz, 1H), 4.54 (br d, J=

13.4Hz, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.85-3.77 (m, 5H), 3.68-3.54 (m, 1H), 3.39-3.33 (m, 5H), 2.46-2.28 (m, 2H), 1.98 (br dd, J=2.8, 13.8Hz, 1H), 0.72 (d, J=7.0Hz, 3H)。

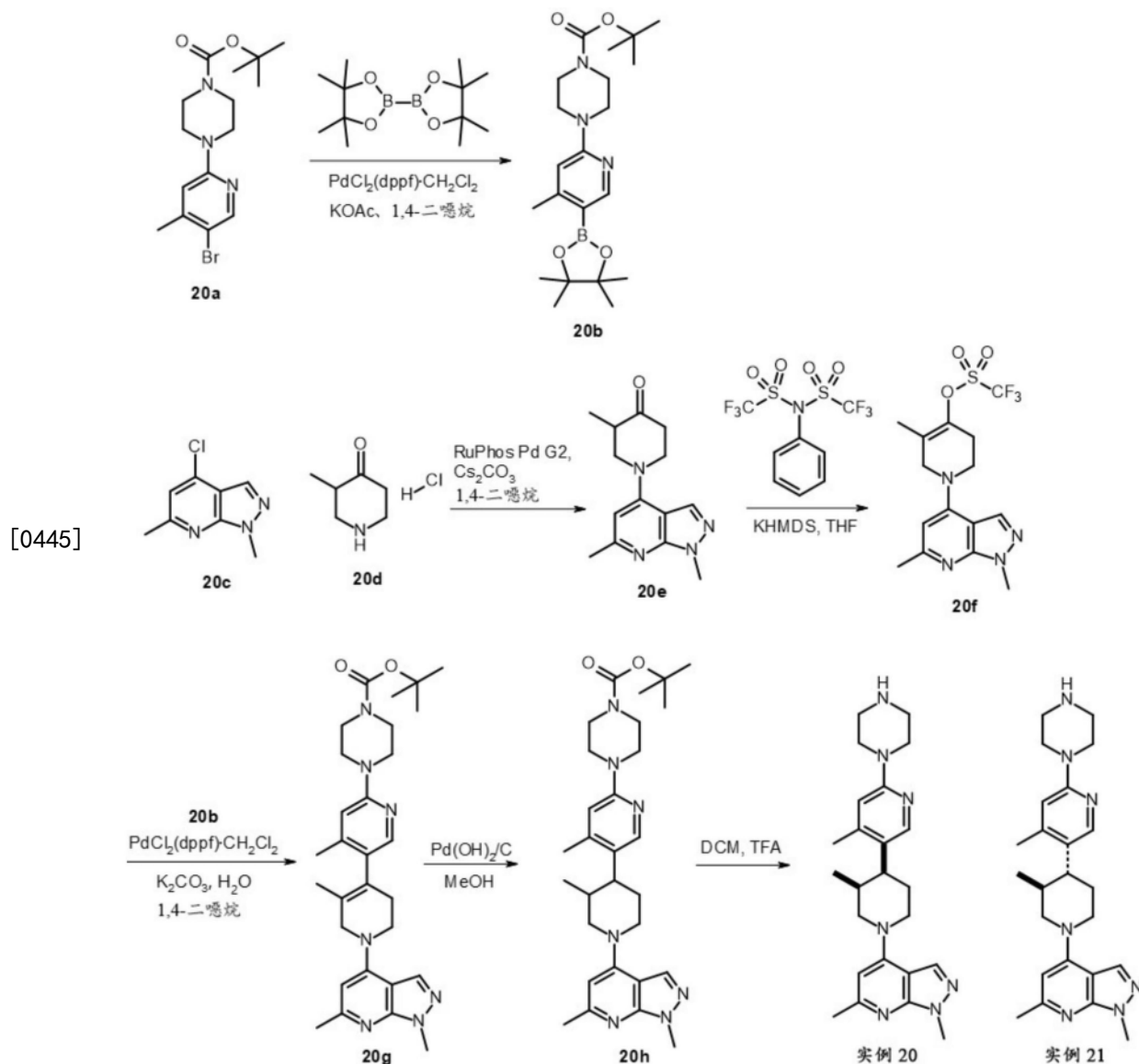
[0440] 获得淡黄色固体状的实例19 (8mg)。MS: 计算392 (MH⁺), 测量392 (MH⁺)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ=8.41 (s, 1H), 8.08-8.02 (m, 2H), 7.70 (dd, J=2.3, 9.0Hz, 1H), 7.07 (d, J=9.0Hz, 1H), 6.87 (d, J=7.5Hz, 1H), 4.65 (br d, J=13.8Hz, 1H), 4.55 (br d, J=12.8Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.85-3.78 (m, 4H), 3.66-3.53 (m, 1H), 3.38-3.33 (m, 4H), 3.28-3.23 (m, 1H), 2.65 (dt, J=4.0, 11.4Hz, 1H), 2.09-1.86 (m, 3H), 0.89 (d, J=6.5Hz, 3H)。通过2D-NMR证实了两个分子的相对构型。

[0441] 实例20和实例21

[0442] 1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶 (实例20) 和1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶 (实例21)



[0444] 根据以下方案制备标题化合物:



[0446] 步骤1: 4-[4-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-2-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物20b)的制备

[0447] 向4-(5-溴-4-甲基吡啶-2-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物20a, CAS: 944582-92-7, 供应商: Bide Pharmatech, 100mg, 281 μmol)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)(107mg, 421 μmol)在1,4-二噁烷(10mL)中的混合物中加入乙酸钾(83mg, 842 μmol)以及 $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (23mg, 28 μmol)。向混合物中充入 N_2 ,并在110 $^\circ\text{C}$ 搅拌过夜。冷却至室温后,将混合物滤出,并将固体用EA(10mL)洗涤两次。将合并的有机层浓缩,以得到粗产物化合物20b(113mg),其无需进一步纯化即可用于下一步骤。MS: 计算404(MH^+),测量404(MH^+)。

[0448] 步骤2: 1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-哌啶-4-酮(化合物20e)的制备

[0449] 向4-氯-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物20c, CAS: 19867-78-8, 供应商: PharmaBlock, 511mg, 2.82mmol)和3-甲基哌啶-4-酮盐酸盐(化合物20d, CAS: 4629-78-1, 供应商: PharmaBlock, 351mg, 2.35mmol)在1,4-二噁烷(20mL)中的混合物中加入RuPhos Pd

G2 (182mg, 235 μ mol) 和Cs₂CO₃ (2.29g, 7.04mmol)。向混合物中充入N₂,并在110℃搅拌过夜。冷却至室温后,将固体滤出并用EA (10mL) 洗涤两次。将合并的混合物浓缩并通过闪蒸柱纯化,以EA (具有10% MeOH) /PE (0%至80%) 的梯度洗脱,以得到黄色油状的所需产物20e (272mg)。MS: 计算259 (MH⁺), 测量259 (MH⁺)。

[0450] 步骤3: [1- (1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]三氟甲磺酸酯(化合物20f)的制备

[0451] 在-78℃下,向1- (1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-哌啶-4-酮(化合物20e, 200mg, 774 μ mol) 在THF (10mL) 中的溶液中加入KHMDS (0.5M的THF, 2.32mL, 1.16mmol), 并搅拌0.5h。然后加入1,1,1-三氟-N-苯基-N- (三氟甲基磺酰基) 甲磺酰胺 (415mg, 1.16mmol), 将反应混合物在-78℃再搅拌2h。在加热至室温后,将混合物通过闪蒸柱直接纯化,以EA (具有10% MeOH) /PE (0%至60%) 的梯度洗脱,以得到所需产物化合物20f (230mg)。MS: 计算391 (MH⁺), 测量391 (MH⁺)。

[0452] 步骤4: 4- [5- [1- (1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]-4-甲基-2-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物20g)的制备

[0453] 向[1- (1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]三氟甲磺酸酯(化合物20f, 50mg, 128 μ mol) 和4- [4-甲基-5- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-2-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物20b, 113mg, 280 μ mol) 在1,4-二噁烷 (5mL) 和水 (1mL) 中的混合物中加入K₂CO₃ (53mg, 384 μ mol) 以及PdCl₂ (dppf) • CH₂Cl₂ (21mg, 26 μ mol)。向混合物中充入N₂,并在100℃搅拌2h。冷却至室温后,将混合物用Na₂SO₄干燥,滤出固体并用EA (10mL) 洗涤两次。将合并的有机层浓缩,以得到粗产物化合物20g (66mg),其无需进一步纯化即可用于下一步骤。MS: 计算518 (MH⁺), 测量518 (MH⁺)。

[0454] 步骤5: 4- [5- [1- (1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-4-甲基-2-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物20h)的制备

[0455] 向含有4- [5- [1- (1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]-4-甲基-2-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物20g, 66mg, 128 μ mol) 的烧瓶中加入Pd (OH)₂ (10重量%的碳, 8.99mg, 64 μ mol) 和MeOH (10mL)。将悬浮液用H₂吹扫3次,然后在氢气球下于室温搅拌过夜。将混合物过滤并浓缩。将残余物通过闪蒸柱纯化,以EA (具有10% MeOH) /PE (0%至80%) 的梯度洗脱,以得到所需产物20h (25mg)。MS: 计算520 (MH⁺), 测量520 (MH⁺)。

[0456] 步骤6: 1,6-二甲基-4- [顺式-3-甲基-4- (4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶(实例20) 和1,6-二甲基-4- [反式-3-甲基-4- (4-甲基-6-哌嗪-1-基-3-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶(实例21) 的制备

[0457] 向4- [5- [1- (1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-4-甲基-2-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物20h, 25mg, 48 μ mol) 在DCM (10mL) 中的混合物中加入TFA (2mL)。在室温下搅拌2h后,将混合物浓缩并通过反向闪蒸柱纯化,以ACN/水 (具有0.5% TFA) (0%至30%) 的梯度洗脱,以得到所需产物。通过2D-NMR证实了实例20和实例21的结构。

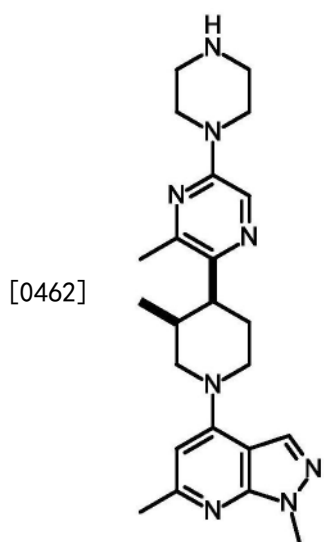
[0458] 获得淡黄色固体状的实例20 (9mg)。MS: 计算420 (MH⁺), 测量420 (MH⁺)。 ¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ = 8.45 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.71 (br d, J =

13.2Hz, 1H), 4.55 (br d, $J=13.7\text{Hz}$, 1H), 4.10 (s, 3H), 3.97-3.87 (m, 4H), 3.83 (br d, $J=11.9\text{Hz}$, 1H), 3.62 (br t, $J=12.4\text{Hz}$, 1H), 3.53 (td, $J=3.6, 12.9\text{Hz}$, 1H), 3.46-3.39 (m, 4H), 2.65 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.54-2.41 (m, 2H), 1.93-1.84 (m, 1H), 0.76 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H)。

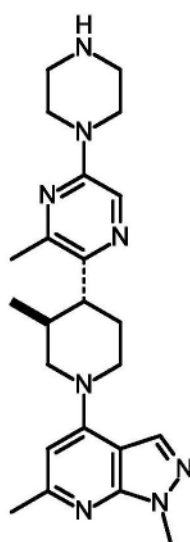
[0459] 获得淡黄色固体状的实例21 (2mg)。MS: 计算420 (MH^+), 测量420 (MH^+)。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) $\delta=8.24$ (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.56-4.43 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.73-3.68 (m, 4H), 3.54-3.43 (m, 1H), 3.28-3.23 (m, 4H), 3.20-3.13 (m, 1H), 2.83 (dt, $J=3.9, 11.5\text{Hz}$, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 2.10-1.99 (m, 1H), 1.99-1.92 (m, 1H), 1.76-1.65 (m, 1H), 0.81 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H)。

[0460] 实例22和实例23

[0461] 1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶 (实例22) 和1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-吡嗪-2-基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶 (实例23)



(实例22)



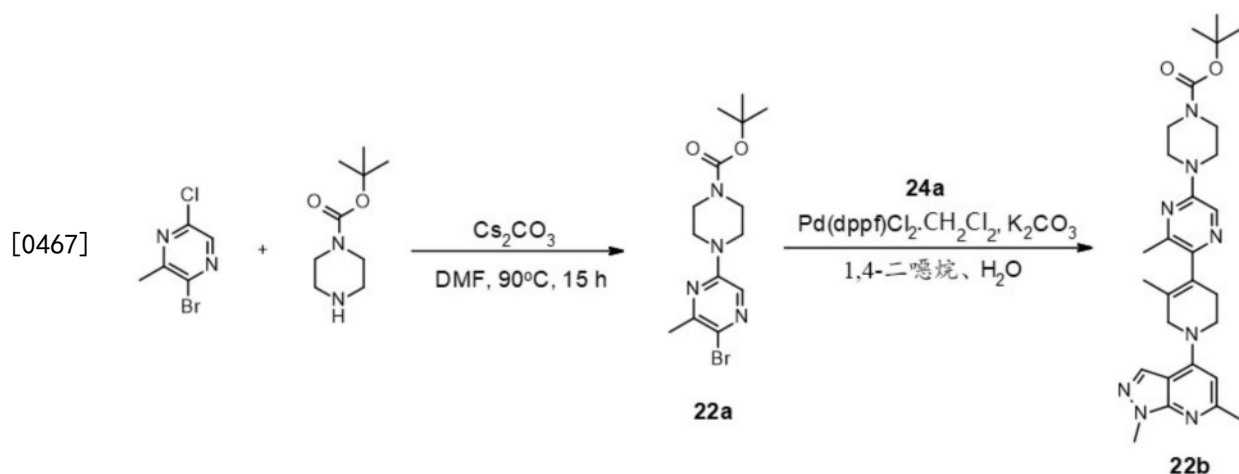
(实例23)

[0463] 类似于实例24和实例25的制备,通过使用4-[5-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]-6-甲基-吡嗪-2-基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (化合物22b) 代替化合物24c制备标题化合物。通过2D-NMR证实了实例22和实例23的结构。

[0464] 获得实例22 (1mg), 为黄色固体。MS: 计算421 (MH^+), 测量421 (MH^+)。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) $\delta=8.30$ (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.60 (br d, $J=13.8\text{Hz}$, 1H), 4.50 (br d, $J=12.3\text{Hz}$, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.87-3.80 (m, 5H), 3.59 (br s, 1H), 3.35-3.33 (m, 4H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.64-2.60 (m, 4H), 2.52 (s, 4H), 1.96 (br s, 1H), 0.85 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H)。

[0465] 获得实例23 (1mg), 为黄色固体。MS: 计算421 (MH^+), 测量421 (MH^+)。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) $\delta=8.37$ (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.51 (br d, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 4.43 (br d, $J=11.4\text{Hz}$, 1H), 4.09-4.06 (m, 3H), 3.90-3.80 (m, 5H), 3.79-3.68 (m, 1H), 3.60-3.53 (m, 1H), 3.36-3.35 (m, 1H), 3.34-3.32 (m, 3H), 2.62 (s, 3H), 2.56-2.43 (m, 5H), 1.93 (br d, $J=9.9\text{Hz}$, 1H), 0.72 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H)。

[0466] 根据以下方案制备化合物22b:



[0468] 步骤1:4-(5-溴-6-甲基-吡嗪-2-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物22a)的制备

[0469] 向2-溴-5-氯-3-甲基-吡嗪(200mg, 0.96mmol)在DMF(3mL)中的溶液中加入1-哌嗪-甲酸叔丁酯(180mg, 0.96mmol)和碳酸铯(314mg, 0.96mmol)。将反应混合物在 90°C 搅拌15h。冷却至室温后,过滤反应混合物,并在减压下浓缩滤液。将残余物通过闪蒸柱纯化,以MeOH/DCM(0%至10%)的梯度洗脱,以得到黄色油状的化合物22a(77mg)。MS: 计算357(MH^+), 测量357(MH^+)。

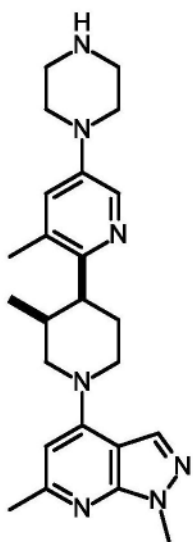
[0470] 步骤2:4-[5-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]-6-甲基-吡嗪-2-基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物22b)的制备

[0471] 向1,6-二甲基-4-[5-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-基]吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物24a, 95mg, 0.26mmol)在1,4-二噁烷(5mL)和水(1mL)中的溶液中加入4-(5-溴-6-甲基-吡嗪-2-基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物22a, 77mg, 0.22mmol)、 $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (18mg, 0.22mmol)和 K_2CO_3 (45mg, 0.32mmol)。将反应混合物在 N_2 气氛下于 90°C 搅拌2h。冷却至室温后,在减压下浓缩反应混合物,将残余物通过闪蒸柱纯化,以MeOH/DCM(0%至10%)的梯度洗脱,以得到棕色油状的化合物22b(130mg)。MS: 计算519(MH^+), 测量519(MH^+)。通过2D-NMR证实了实例22和实例23的结构。

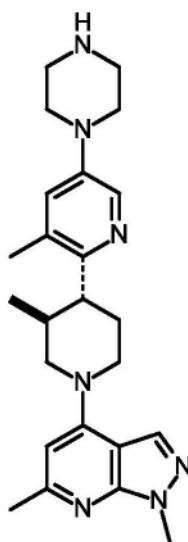
[0472] 实例24和实例25

[0473] 1,6-二甲基-4-[顺式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶(实例24)和1,6-二甲基-4-[反式-3-甲基-4-(3-甲基-5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶(实例25)

[0474]



(实例 24)



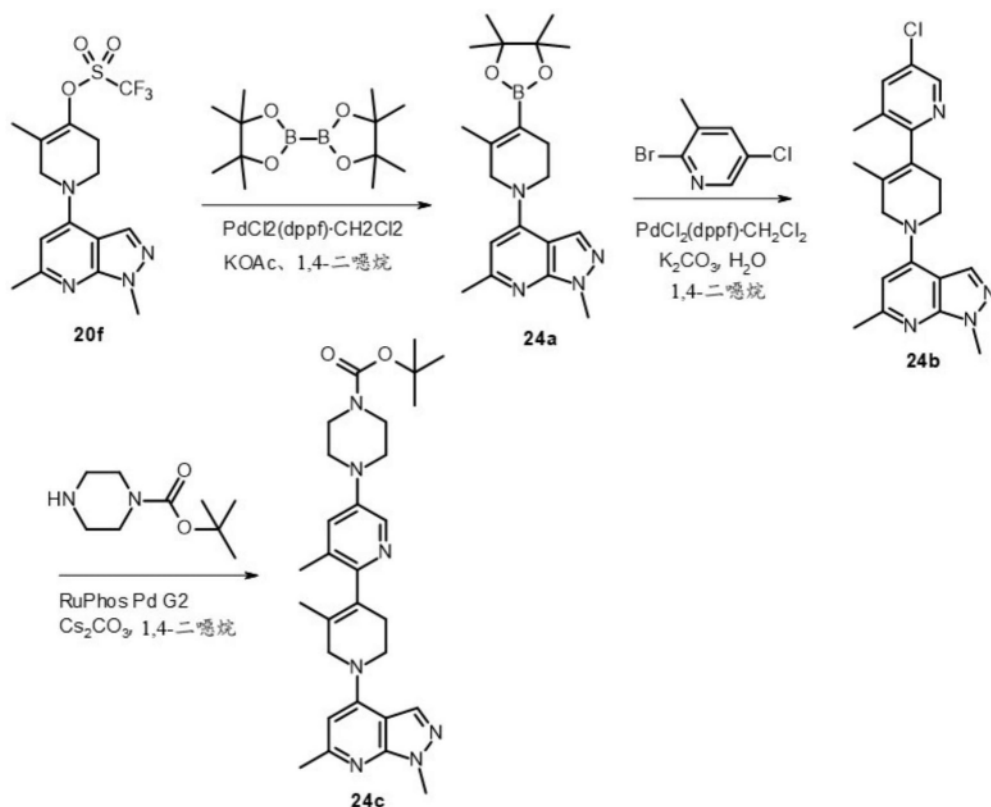
(实例 25)

[0475] 类似于实例20和实例21的制备,通过使用4-[6-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]-5-甲基-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物24c)代替化合物20g制备标题化合物。通过2D-NMR证实了实例24和实例25的结构。

[0476] 获得淡黄色固体状的实例24(16mg)。MS: 计算420 (MH⁺), 测量420 (MH⁺)。¹H NMR (500MHz, 甲醇-d₄) δ=8.42(s, 1H), 8.20-8.14(m, 1H), 7.99-7.91(m, 1H), 6.76(s, 1H), 4.70(br d, J=13.4Hz, 1H), 4.53(br d, J=13.3Hz, 1H), 4.09(s, 3H), 3.86(br d, J=13.6Hz, 2H), 3.73-3.60(m, 5H), 3.49-3.33(m, 4H), 2.76-2.61(m, 4H), 2.60-2.52(m, 4H), 2.03-1.93(m, 1H), 0.76(d, J=7.0Hz, 3H)。

[0477] 获得淡黄色固体状的实例25(8mg)。MS: 计算420 (MH⁺), 测量420 (MH⁺)。¹H NMR (500MHz, 甲醇-d₄) δ=8.33(s, 1H), 8.17(d, J=2.4Hz, 1H), 7.78(br s, 1H), 6.75(s, 1H), 4.67(br d, J=13.4Hz, 1H), 4.57(br d, J=14.6Hz, 1H), 4.08(s, 3H), 3.69-3.53(m, 6H), 3.44-3.36(m, 4H), 3.36-3.24(m, 1H), 2.63(s, 3H), 2.53(s, 3H), 2.45-2.35(m, 1H), 2.12-2.00(m, 2H), 0.88(d, J=6.6Hz, 3H)。

[0478] 根据以下方案制备化合物24c:



[0479]

[0480] 步骤1: 1,6-二甲基-4-[5-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-基]吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物24a)的制备

[0481] 向[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]三氟甲磺酸酯(化合物20f, 300mg, 0.768mmol)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)(292.72mg, 1.15mmol)在1,4-二噁烷(10mL)中的混合物中加入 $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (63mg, 0.077mmol)和乙酸钾(226mg, 2.31mmol)。向混合物中充入 N_2 ,并在90℃搅拌2h。冷却至室温后,将混合物过滤,并且将固体用EA(10mL)洗涤两次。将合并的有机层浓缩,以得到粗产物化合物24a(283mg),其无需进一步纯化即可用于下一步骤。MS: 计算369(MH^+), 测量369(MH^+)。

[0482] 步骤2: 4-[4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-1-基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物24b)的制备

[0483] 向1,6-二甲基-4-[5-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3,6-二氢-2H-吡啶-1-基]吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物24a, 283mg, 0.768mmol)和2-溴-5-氯-3-甲基-吡啶(CAS: 65550-77-8, 供应商: Accela, 175mg, 0.845mmol)在1,4-二噁烷(10mL)和水(2mL)中的混合物中加入 $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (31mg, 0.038mmol)以及 K_2CO_3 (212mg, 1.54mmol)。向混合物中充入 N_2 ,并在90℃搅拌过夜。冷却至室温后,将混合物用DCM(20mL)萃取三次,用 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩并通过闪蒸柱纯化,以EA/PE(0%至30%)的梯度洗脱,以获得所需产物化合物24b(260mg)。MS: 计算368(MH^+), 测量368(MH^+)。

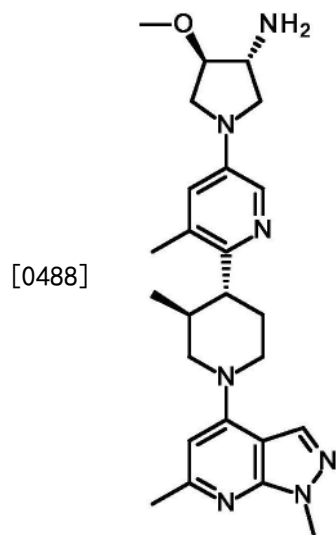
[0484] 步骤3: 4-[6-[1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-4-基]-5-甲基-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸叔丁酯(化合物24c)的制备

[0485] 向4-[4-(5-氯-3-甲基-2-吡啶基)-5-甲基-3,6-二氢-2H-吡啶-1-基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶(化合物24b, 130mg, 0.353mmol)和1-Boc-哌嗪(99mg, 0.530mmol)在

1,4-二噁烷(5mL)中的混合物中加入碳酸铯(230mg,0.707mmol)和RuPhos Pd G2(27mg,0.035mmol)。向混合物中充入N₂,并在110℃搅拌过夜。冷却至室温后,将固体滤出并用EA(10mL)洗涤两次。将合并的有机层浓缩并通过闪蒸柱纯化,以EA(具有10% MeOH)/PE(0%至80%)的梯度洗脱,以得到所需产物24c(136mg)。MS:计算518(MH⁺),测量518(MH⁺)。

[0486] 实例26

[0487] (3R,4R)-1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-4-甲氧基-吡咯烷-3-胺

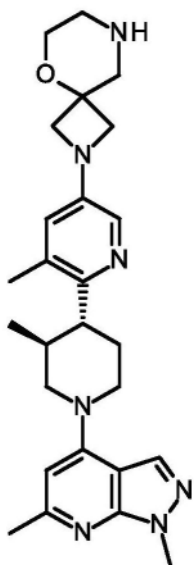


[0489] 类似于实例15的制备,通过使用N-[(3R,4R)-4-甲氧基吡咯烷-3-基]氨基甲酸叔丁酯(CAS:1932066-52-8,供应商:PharmaBlock)和中间体B代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例26(75mg)。MS:计算450(MH⁺),测量450(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.34(s,1H),7.85(d,J=2.50Hz,1H),7.58(d,J=2.50Hz,1H),6.77(s,1H),4.69(br d,J=14.01Hz,1H),4.59(br d,J=13.01Hz,1H),4.19(dt,J=5.63,2.94Hz,1H),4.09(s,3H),3.99(dt,J=6.25,3.38Hz,1H),3.87(dd,J=11.51,5.50Hz,1H),3.80(dd,J=11.26,6.25Hz,1H),3.68-3.58(m,1H),3.55(dd,J=11.26,3.25Hz,1H),3.51-3.42(m,4H),3.40-3.32(m,2H),2.64(s,3H),2.57(s,3H),2.44-2.33(m,1H),2.14-2.04(m,2H)0.90(d,J=6.50Hz,3H)。

[0490] 实例27

[0491] 2-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷

[0492]

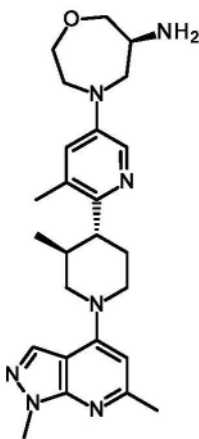


[0493] 类似于实例15的制备方法,通过使用5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷-8-羧酸叔丁酯(CAS:1251005-61-4,供应商:PharmaBlock)和中间体B代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例27 (65mg)。MS: 计算462 (MH⁺), 测量462 (MH⁺)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ=8.06 (s, 1H), 7.60 (d, J=2.5Hz, 1H), 6.78 (d, J=2.4Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.38 (br d, J=13.8Hz, 1H), 4.29 (br d, J=11.9Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.91 (d, J=8.0Hz, 2H), 3.74-3.63 (m, 4H), 3.02 (s, 3H), 2.99-2.96 (m, 1H), 2.92-2.87 (m, 1H), 2.84-2.80 (m, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.31 (br dd, J=6.5, 11.0Hz, 1H), 1.98-1.88 (m, 1H), 1.84-1.75 (m, 1H), , 0.77 (d, J=6.5Hz, 3H)。

[0494] 实例28

[0495] (6S)-4-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-1,4-氧氮杂环庚烷-6-胺

[0496]



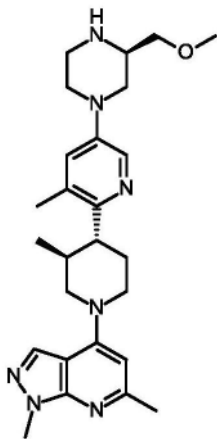
[0497] 类似于实例15的制备,通过使用N-[(6S)-1,4-氧氮杂环庚烷-6-基]氨基甲酸叔丁酯(CAS:2306247-11-8,供应商:PharmaBlock)和中间体B代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得淡黄色固体状的实例28 (75mg)。MS: 计算450 (MH⁺), 测量450 (MH⁺)。¹H NMR (500MHz, 甲醇-d₄) δ=8.39 (s, 1H), 8.11 (d, J=3.1Hz, 1H), 8.02 (d, J=2.6Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.73 (br d, J=10.4Hz, 1H), 4.63 (br d, J=12.4Hz, 1H), 4.20-4.09 (m, 5H), 4.05-3.98 (m, 1H), 3.95-3.80 (m, 5H), 3.75-3.62 (m, 2H), 3.47-3.34 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.63 (s, 3H),

2.54-2.45 (m, 1H) , 2.23-2.12 (m, 2H) , 0.95 (d, J=6.6Hz, 3H) 。

[0498] 实例29

[0499] 4-[(3S, 4R)-4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-3-甲基-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶

[0500]

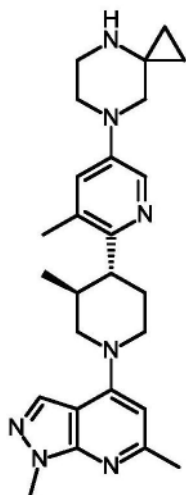


[0501] 类似于实例15的制备,通过使用(2R)-2-(甲氧基甲基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(CAS: 1023301-73-6, 供应商:PharmaBlock)和中间体B代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得黄色固体状的实例29(147mg)。MS: 计算464(MH⁺), 测量464(MH⁺)。¹H NMR(500MHz, 甲醇-d₄) δ=8.37 (s, 1H) , 8.21 (d, J=2.9Hz, 1H) , 8.11 (d, J=2.6Hz, 1H) , 6.81 (s, 1H) , 4.71 (br d, J=12.2Hz, 1H) , 4.65-4.58 (m, 1H) , 4.15-4.04 (m, 5H) , 3.77-3.70 (m, 1H) , 3.70-3.62 (m, 3H) , 3.54-3.49 (m, 1H) , 3.48-3.41 (m, 4H) , 3.38-3.31 (m, 3H) , 3.25 (br dd, J=10.3, 13.7Hz, 1H) , 2.66 (s, 3H) , 2.64-2.59 (m, 3H) , 2.53-2.44 (m, 1H) , 2.20-2.11 (m, 2H) , 0.92 (d, J=6.6Hz, 3H) 。

[0502] 实例30

[0503] 4-[(3S, 4R)-4-[5-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-7-基)-3-甲基-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶

[0504]



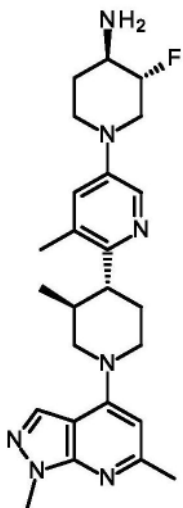
[0505] 类似于实例15的制备,通过使用4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-4-甲酸叔丁酯(CAS: 674792-08-6, 供应商:Accelea)和中间体B代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例30(42mg)。MS: 计算446(MH⁺), 测量446(MH⁺)。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ

=8.34 (s, 1H), 8.20 (d, J=2.3Hz, 1H), 7.97 (br s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.73-4.65 (m, 1H), 4.59 (br d, J=13.3Hz, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.74-3.69 (m, 2H), 3.68-3.59 (m, 1H), 3.58-3.49 (m, 4H), 3.45-3.33 (m, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.48-2.35 (m, 1H), 2.20-2.03 (m, 2H), 1.22-1.03 (m, 4H), 0.90 (d, J=6.6Hz, 3H)。

[0506] 实例31

[0507] (3R,4R)-1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺

[0508]

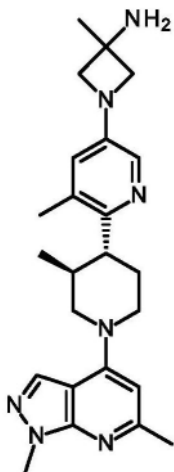


[0509] 类似于实例15的制备,通过使用N-[(3R,4R)-3-氟哌啶-4-基]氨基甲酸叔丁酯(CAS:1523530-29-1,供应商:PharmaBlock)和中间体B代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得淡黄色固体状的实例31(44mg)。MS:计算452 (MH⁺),测量452 (MH⁺)。¹H NMR (500MHz, 甲醇-d₄) δ=8.33 (s, 1H), 8.19 (d, J=2.7Hz, 1H), 7.89 (d, J=2.6Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.78-4.63 (m, 2H), 4.57 (br d, J=13.0Hz, 1H), 4.35-4.27 (m, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.98-3.88 (m, 1H), 3.66-3.57 (m, 1H), 3.57-3.46 (m, 1H), 3.37-3.31 (m, 2H), 3.08-2.97 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.44-2.34 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 1H), 2.13-2.02 (m, 2H), 1.82 (dq, J=4.3, 12.6Hz, 1H), 0.88 (d, J=6.6Hz, 3H)。

[0510] 实例32

[0511] 1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3-甲基-氮杂环丁烷-3-胺

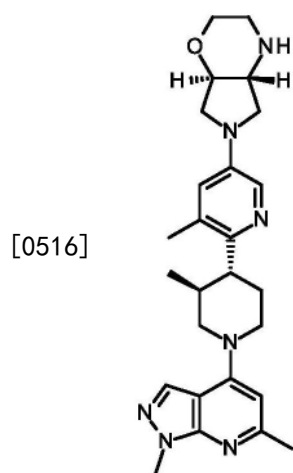
[0512]



[0513] 类似于实例15的制备,通过使用N-(3-甲基氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯盐酸盐氨基甲酸酯(CAS:1408076-37-8,供应商:PharmaBlock)和中间体B代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得淡黄色固体状的实例32(66mg)。MS:计算420(MH⁺),测量420(MH⁺)。¹H NMR(500MHz,甲醇-d₄) δ =8.33(s,1H),7.77(d,J=2.7Hz,1H),7.42(d,J=2.6Hz,1H),6.75(s,1H),4.67(br d,J=13.6Hz,1H),4.58(br d,J=13.1Hz,1H),4.17(d,J=8.9Hz,2H),4.12-4.06(m,5H),3.67-3.58(m,1H),3.37-3.31(m,2H),2.63(s,3H),2.54(s,3H),2.43-2.34(m,1H),2.12-2.05(m,2H),1.69(s,3H),0.88(d,J=6.6Hz,3H)。

[0514] 实例33

[0515] (4aR,7aR)-6-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-5-甲基-3-吡啶基]-3,4,4a,5,7,7a-六氢-2H-吡咯并[3,4-b][1,4]噁嗪

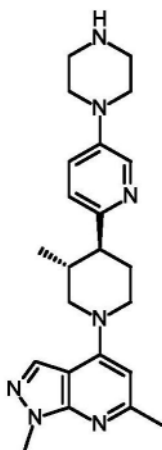


[0517] 类似于实例15的制备,通过使用(4aR,7aR)-八氢吡咯并[3,4-b]吗啉-4-甲酸叔丁酯(CAS:1932337-68-2,供应商:PharmaBlock)和中间体B代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得淡黄色固体状的实例33(66mg)。MS:计算462(MH⁺),测量462(MH⁺)。¹H NMR(500MHz,甲醇-d₄) δ =8.33(s,1H),7.83(d,J=2.9Hz,1H),7.56(d,J=2.6Hz,1H),6.75(s,1H),4.68(br d,J=13.3Hz,1H),4.64-4.52(m,1H),4.25(dd,J=3.7,13.1Hz,1H),4.21-4.12(m,1H),4.08(s,3H),4.04-3.97(m,1H),3.89-3.80(m,2H),3.63(dt,J=7.6,10.1Hz,2H),3.52(dd,J=2.1,13.3Hz,1H),3.49-3.44(m,1H),3.40(dd,J=4.2,12.9Hz,1H),3.37-3.32(m,3H),2.63(s,3H),2.56(s,3H),2.43-2.34(m,1H),2.14-2.07(m,2H),0.89(d,J=6.6Hz,3H)。

[0518] 实例35

[0519] 1,6-二甲基-4-[(3R,4S)-3-甲基-4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶

[0520]

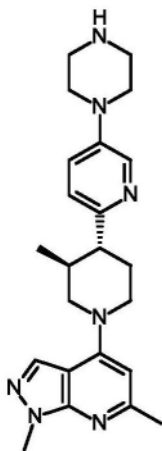


[0521] 类似于实例15的制备,通过使用哌嗪-1-甲酸叔丁酯和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例35 (5mg)。MS: 计算406 (MH^+), 测量406 (MH^+)。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ =8.35 (s, 2H), 8.05-7.85 (m, 1H), 7.77-7.62 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.67 (br d, J =13.4Hz, 1H), 4.60-4.51 (m, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.66-3.56 (m, 5H), 3.44-3.36 (m, 4H), 3.30-3.19 (m, 1H), 3.09-2.95 (m, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.33-2.19 (m, 1H), 2.17-1.99 (m, 2H), 0.90 (d, J =6.6Hz, 3H)。

[0522] 实例34

[0523] 1,6-二甲基-4-[(3S,4R)-3-甲基-4-(5-哌嗪-1-基-2-吡啶基)-1-哌啶基]吡唑并[3,4-b]吡啶

[0524]

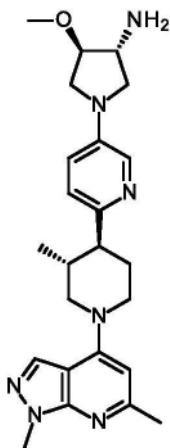


[0525] 类似于实例15的制备,通过使用哌嗪-1-甲酸叔丁酯和中间体A代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例34 (20mg)。MS: 计算406 (MH^+), 测量406 (MH^+)。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ =8.35 (s, 1H), 8.32 (d, J =2.9Hz, 1H), 7.82 (dd, J =2.9, 9.0Hz, 1H), 7.58 (d, J =8.8Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.69-4.62 (m, 1H), 4.55 (br dd, J =2.2, 13.9Hz, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.63-3.53 (m, 5H), 3.47-3.36 (m, 4H), 3.29-3.22 (m, 1H), 2.95 (dt, J =4.4, 11.2Hz, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.30-2.17 (m, 1H), 2.15-1.98 (m, 2H), 0.89 (d, J =6.6Hz, 3H)。

[0526] 实例36

[0527] (3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-4-甲氧基-吡咯烷-3-胺

[0528]

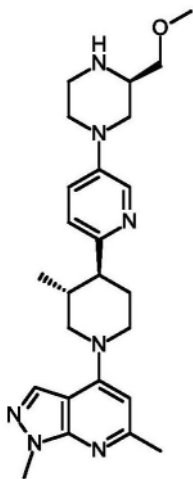


[0529] 类似于实例15的制备,通过使用N-[(3R,4R)-4-甲氧基吡咯烷-3-基]氨基甲酸叔丁酯(CAS:1932066-52-8,供应商:PharmaBlock)和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例36(28mg)。MS:计算436(MH⁺),测量436(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.35(s,1H),7.99(d,J=2.75Hz,1H),7.73-7.67(m,1H),7.67-7.60(m,1H),6.77(s,1H),4.71-4.63(m,1H),4.61-4.53(m,1H),4.24-4.15(m,1H),4.09(s,3H),4.00(td,J=3.2,6.3Hz,1H),3.89(dd,J=5.6,11.1Hz,1H),3.81(dd,J=6.3,11.3Hz,1H),3.62-3.54(m,2H),3.50-3.43(m,4H),3.29-3.22(m,1H),3.01(dt,J=4.3,11.4Hz,1H),2.64(s,3H),2.28-2.02(m,3H),0.90(d,J=6.5Hz,3H)。

[0530] 实例37

[0531] 4-[(3R,4S)-4-[5-[(3R)-3-(甲氧基甲基)哌嗪-1-基]-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶

[0532]

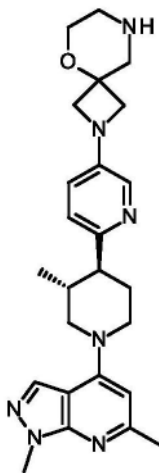


[0533] 类似于实例15的制备,通过使用(2R)-2-(甲氧基甲基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(CAS:1023301-73-6,供应商:PharmaBlock)和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例37(5mg)。MS:计算450(MH⁺),测量450(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.05(d,J=2.8Hz,1H),7.96(s,1H),7.33-7.27(m,1H),7.11(d,J=8.7Hz,1H),6.31(s,1H),4.27(br d,J=13.0Hz,1H),4.18(br d,J=13.6Hz,1H),3.89(s,3H),3.55(br t,J=12.7Hz,2H),3.46-3.34(m,2H),3.31(s,3H),3.17-3.09(m,3H),3.01-2.92(m,1H),2.88-2.72(m,2H),2.62-2.47(m,2H),2.43(s,3H),2.09-1.98(m,1H),1.86-1.75(m,2H),0.69(d,J=6.5Hz,3H)。

[0534] 实例38

[0535] 2-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷

[0536]

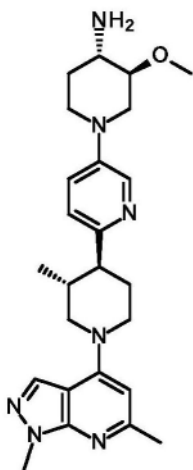


[0537] 类似于实例15的制备方法,通过使用5-氧杂-2,8-二氮杂螺[3.5]壬烷-8-羧酸叔丁酯(CAS:1251005-61-4,供应商:PharmaBlock)和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例38(11mg)。MS:计算448(MH⁺),测量448(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.07(s,1H),7.74(d,J=2.8Hz,1H),7.16(d,J=8.4Hz,1H),6.95(dd,J=2.8,8.4Hz,1H),6.42(s,1H),4.38(br d,J=12.8Hz,1H),4.29(br d,J=11.0Hz,1H),4.01(s,3H),3.94(d,J=8.0Hz,2H),3.70(br d,J=7.8Hz,4H),3.31-3.22(m,1H),3.02(s,2H),2.99-2.89(m,1H),2.85-2.77(m,2H),2.63-2.56(m,1H),2.54(s,3H),2.20-2.04(m,1H),1.98-1.87(m,2H),0.81(d,J=6.5Hz,3H)。

[0538] 实例39

[0539] (3S,4S)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-甲氧基-哌啶-4-胺

[0540]



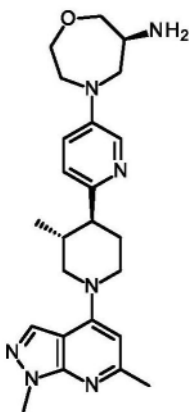
[0541] 类似于实例15的制备,通过使用N-[(3S,4S)-3-甲氧基-4-哌啶基]氨基甲酸叔丁酯(CAS:907544-19-8,供应商:PharmaBlock)和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例39(19mg)。MS:计算450(MH⁺),测量450(MH⁺)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ =8.37-8.36(m,1H),8.35(s,1H),8.07(dd,J=8.8,2.9Hz,1H),7.74

(d, $J=9.3\text{Hz}$, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.67 (br d, $J=14.3\text{Hz}$, 1H), 4.61-4.52 (m, 1H), 4.35 (br dd, $J=12.2, 3.4\text{Hz}$, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.98 (br d, $J=13.2\text{Hz}$, 1H), 3.64-3.57 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.40 (td, $J=10.0, 4.4\text{Hz}$, 1H), 3.29-3.14 (m, 2H), 2.95-3.10 (m, 2H), 2.74 (dd, $J=12.2, 10.3\text{Hz}$, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.29-2.04 (m, 4H), 1.81 (qd, $J=12.6, 4.7\text{Hz}$, 1H), 0.91 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H)。

[0542] 实例40

[0543] (6S)-4-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-1,4-氧氮杂环庚烷-6-胺

[0544]

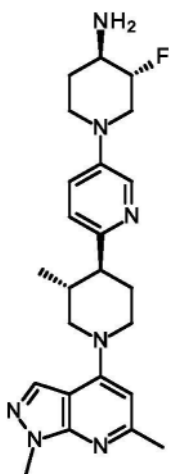


[0545] 类似于实例15的制备,通过使用N-[(6S)-1,4-氧氮杂环庚烷-6-基]氨基甲酸叔丁酯(CAS:2306247-11-8,供应商:PharmaBlock)和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例40(70mg)。MS:计算436(MH^+),测量436(MH^+)。 ^1H NMR (500MHz, 甲醇- d_4) $\delta=8.28$ (s, 1H), 8.18 (d, $J=2.7\text{Hz}$, 1H), 8.00 (dd, $J=2.8, 9.2\text{Hz}$, 1H), 7.75 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.60 (br d, $J=11.7\text{Hz}$, 1H), 4.49 (br d, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 4.10-3.97 (m, 5H), 3.95-3.88 (m, 1H), 3.84-3.78 (m, 2H), 3.77-3.68 (m, 3H), 3.64-3.47 (m, 2H), 3.27-3.21 (m, 1H), 3.01 (dt, $J=3.8, 11.5\text{Hz}$, 1H), 2.56 (s, 3H), 2.25-2.14 (m, 1H), 2.14-2.07 (m, 1H), 2.06-1.94 (m, 1H), 0.85 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H)。

[0546] 实例41

[0547] (3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-氟-哌啶-4-胺

[0548]



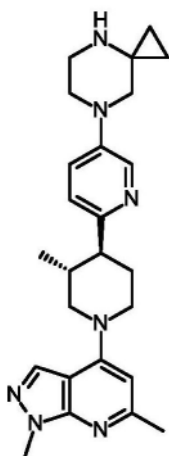
[0549] 类似于实例15的制备,通过使用N-[(3R,4R)-3-氟哌啶-4-基]氨基甲酸叔丁酯

(CAS:1523530-29-1, 供应商:PharmaBlock) 和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例41 (10mg)。MS: 计算438 (MH⁺), 测量438 (MH⁺)。¹H NMR (500MHz, 甲醇-d₄) δ=8.09-8.03 (m, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.30 (dd, J=3.0, 8.6Hz, 1H), 7.08 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 4.38-4.21 (m, 2H), 4.18-4.13 (m, 1H), 3.94-3.82 (m, 4H), 3.55 (br dd, J=1.3, 12.7Hz, 1H), 3.24-3.19 (m, 2H), 3.18-3.09 (m, 1H), 2.92-2.78 (m, 2H), 2.77-2.66 (m, 2H), 2.49 (dt, J=4.7, 11.1Hz, 1H), 2.09-1.89 (m, 2H), 1.86-1.76 (m, 2H), 1.52 (br dd, J=4.1, 12.4Hz, 1H), 1.24-1.14 (m, 1H), 0.68 (d, J=6.6Hz, 3H)。

[0550] 实例42

[0551] 4-[(3R,4S)-4-[5-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-7-基)-2-吡啶基]-3-甲基-1-哌啶基]-1,6-二甲基-吡唑并[3,4-b]吡啶

[0552]

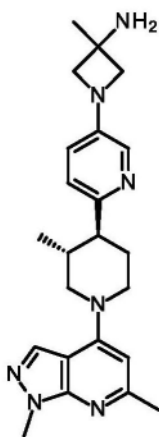


[0553] 类似于实例15的制备, 通过使用4,7-二氮杂螺[2.5]辛烷-4-甲酸叔丁酯 (CAS: 674792-08-6, 供应商:PharmaBlock) 和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例42 (19mg)。MS: 计算432 (MH⁺), 测量432 (MH⁺)。¹H NMR (500MHz, 甲醇-d₄) δ=7.99 (d, J=2.7Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.24 (dd, J=2.9, 8.7Hz, 1H), 7.07 (d, J=8.7Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.26 (br d, J=13.1Hz, 1H), 4.20-4.11 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.19-3.08 (m, 3H), 3.01-2.96 (m, 2H), 2.95 (s, 2H), 2.86-2.78 (m, 1H), 2.53-2.45 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.07-1.97 (m, 1H), 1.89-1.75 (m, 2H), 0.68 (d, J=6.6Hz, 3H), 0.59 (br d, J=8.4Hz, 4H)。

[0554] 实例43

[0555] 1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-二甲基吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-3-甲基-4-哌啶基]-3-吡啶基]-3-甲基-氮杂环丁烷-3-胺

[0556]



[0557] 类似于实例15的制备,通过使用N-(3-甲基氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯盐酸盐氨基甲酸酯(CAS:1408076-37-8,供应商:PharmaBlock)和中间体D代替化合物15a和中间体E制备标题化合物。获得白色固体状的实例43(33mg)。MS: 计算406(MH⁺), 测量406(MH⁺)。¹H NMR(500MHz, 甲醇-d₄) δ=8.24(s, 1H), 7.83(d, J=2.7Hz, 1H), 7.58(d, J=8.9Hz, 1H), 7.41(dd, J=2.9, 8.9Hz, 1H), 6.66(s, 1H), 4.56(br d, J=13.6Hz, 1H), 4.46(br d, J=12.7Hz, 1H), 4.09(d, J=9.0Hz, 2H), 4.03-3.95(m, 5H), 3.48(br t, J=12.0Hz, 1H), 3.19-3.11(m, 1H), 2.91(dt, J=4.2, 11.5Hz, 1H), 2.54(s, 3H), 2.19-1.90(m, 3H), 1.60(s, 3H), 0.79(d, J=6.6Hz, 3H)。

[0558] 实例44

[0559] 为了确定式(I)和(Ia)的化合物在HEK293-Blue-hTLR-7/8/9细胞测定中的活性,进行以下检测。

[0560] HEK293-Blue-hTLR-7细胞测定:

[0561] 稳定的HEK293-Blue-hTLR-7细胞系购自InvivoGen(Cat.#:hkb-htlr7, San Diego, California, USA)。这些细胞最初设计用于通过监测NF-κB活化来研究人TLR7刺激。将SEAP(分泌的胚胎碱性磷酸酶)报告基因置于与五个NF-κB和AP-1结合位点融合的IFN-β最小启动子的控制下。通过用TLR7配体刺激HEK-Blue hTLR7细胞使NF-κB和AP-1活化以诱导SEAP。因此,在配体(诸如R848(Resiquimod))的刺激下孵育20小时,报告基因表达被TLR7拮抗剂降低。使用QUANTI-Blue™试剂盒(Cat.#:rep-qbl, Invivogen, San Diego, Ca, USA)在640nm波长下测定细胞培养上清液SEAP报告基因的活性,在碱性磷酸酶存在的条件下该检测培养基变成紫色或蓝色。

[0562] 在含有4.5g/L葡萄糖、50U/mL青霉素、50mg/mL链霉素、100mg/mL Normocin、2mM L-谷氨酰胺、10%(v/v)热灭活的胎牛血清的Dulbecco's Modified Eagle培养基(DMEM)的96孔板中以170μL的体积将HEK293-Blue-hTLR7细胞以250,000~450,000个细胞/mL的密度孵育,在上述DMEM中,在最终DMSO存在的条件下以1%的最终稀释度添加20μL供试化合物和10μL的20uM R848,在37℃的CO₂培养箱中进行20小时的培养。然后将每个孔中的20μL上清液与180μL Quanti-blue底物溶液在37℃下孵育2小时,并使用分光光度计在620~655nm下读取吸光度。TLR7活化导致下游NF-κB活化的信号传导途径已被广泛接受,因此对类似的报告基因检测方法进行了修改以评估TLR7拮抗剂。

[0563] HEK293-Blue-hTLR-8细胞测定:

[0564] 稳定的HEK293-Blue-hTLR-8细胞系购自InvivoGen (Cat. #: hkb-htlr8, San Diego, California, USA)。这些细胞最初设计用于通过监测NF- κ B活化来研究人TLR8刺激。将SEAP (分泌的胚胎碱性磷酸酶) 报告基因置于与五个NF- κ B和AP-1结合位点融合的IFN- β 最小启动子的控制下。通过用TLR8配体刺激HEK-Blue hTLR8细胞使NF- κ B和AP-1活化以诱导SEAP。因此, 在配体 (诸如R848) 的刺激下孵育20小时, 报告基因表达被TLR8拮抗剂降低。使用QUANTI-Blue™试剂盒 (Cat. #: rep-qbl, Invivogen, San Diego, Ca, USA) 在640nm波长下测定细胞培养上清液SEAP报告基因的活性, 在碱性磷酸酶存在的条件下该检测培养基变成紫色或蓝色。

[0565] 在含有4.5g/L葡萄糖、50U/mL青霉素、50mg/mL链霉素、100mg/mL Normocin、2mM L-谷氨酰胺、10% (v/v) 热灭活的胎牛血清的Dulbecco's Modified Eagle培养基 (DMEM) 的96孔板中以170 μ L的体积将HEK293-Blue-hTLR8细胞以250,000 ~ 450,000个细胞/mL的密度孵育, 在上述DMEM中, 在最终DMSO存在的条件下以1%的最终稀释度添加20 μ L供试化合物和10 μ L的60 μ M R848, 在37°C的CO₂培养箱中进行20小时的培养。然后将每个孔中的20 μ L上清液与180 μ L Quanti-blue底物溶液在37°C下孵育2小时, 并使用分光光度计在620 ~ 655nm下读取吸光度。TLR8活化导致下游NF- κ B活化的信号传导途径已被广泛接受, 因此对类似的报告基因检测方法进行了修改以评估TLR8拮抗剂。

[0566] HEK293-Blue-hTLR-9细胞测定:

[0567] 稳定的HEK293-Blue-hTLR-9细胞系购自InvivoGen (Cat. #: hkb-htlr9, San Diego, California, USA)。这些细胞最初设计用于通过监测NF- κ B活化来研究人TLR9刺激。将SEAP (分泌的胚胎碱性磷酸酶) 报告基因置于与五个NF- κ B和AP-1结合位点融合的IFN- β 最小启动子的控制下。通过用TLR9配体刺激HEK-Blue hTLR9细胞使NF- κ B和AP-1活化以诱导SEAP。因此, 在配体 (诸如ODN2006 (Cat. #: tlr1-2006-1, Invivogen, San Diego, California, USA)) 的刺激下孵育20小时, 报告基因表达被TLR9拮抗剂降低。使用QUANTI-Blue™试剂盒 (Cat. #: rep-qbl, Invivogen, San Diego, California, USA) 在640nm波长下测定细胞培养上清液SEAP报告基因的活性, 在碱性磷酸酶存在的条件下该检测培养基变成紫色或蓝色。

[0568] HEK293-Blue-hTLR9细胞以250,000 ~ 450,000细胞/mL的密度以170 μ L的体积, 在96孔板中在含有4.5g/L葡萄糖、50U/mL青霉素、50mg/mL链霉素、100mg/mL Normocin、2mM L-谷氨酰胺、10% (v/v) 热灭活的胎牛血清的Dulbecco's Modified Eagle培养基 (DMEM) 中孵育, 其中在1%的最终DMSO存在下于连续稀释液中添加20 μ L测试化合物和10 μ L的20 μ M ODN2006的以上DMEM溶液, 在37°C的CO₂培养箱中孵育20小时。然后将每个孔中的20 μ L上清液与180 μ L Quanti-blue底物溶液在37°C下孵育2小时, 并使用分光光度计在620 ~ 655nm处读取吸光度。TLR9活化导致下游NF- κ B活化的信号传导途径已被广泛接受, 因此对类似的报告基因检测方法进行了修改以评估TLR9拮抗剂。

[0569] 式(I) 或式(Ia) 化合物具有人TLR7和/或TLR8抑制活性 (IC₅₀ 值) < 0.5 μ M。此外, 某些化合物还具有人TLR9抑制活性 < 0.5 μ M。表2显示了本发明化合物的活性数据。

[0570] 表2. 本发明化合物在HEK293-Blue-hTLR-7/8/9细胞测定中的活性

[0571]	实例编号	HEK/hTLR7 IC ₅₀ (μM)	HEK/hTLR8 IC ₅₀ (μM)	HEK/hTLR9 IC ₅₀ (μM)
	1	0.053	0.012	0.275
	2	0.027	0.021	0.142
	3	0.020	0.050	0.124
	4	0.031	0.059	0.379
	5	0.008	0.064	0.364
	6	0.007	0.037	0.208
	7	0.011	0.029	0.052
	8	0.052	0.008	0.195
	9	0.039	0.031	0.120
	10	0.039	0.013	0.212
	11	0.037	0.042	0.104
	13	0.026	0.044	0.168
	14	0.012	0.013	0.225
	15	0.024	0.047	0.130
	16	0.023	0.032	0.143
	17	0.022	0.039	0.073
[0572]	20	0.050	0.006	0.220
	21	0.016	0.003	0.372
	22	0.049	0.006	0.315
	23	0.011	0.007	0.368
	24	0.082	0.005	0.076
	25	0.009	0.007	0.098
	26	0.012	0.014	0.109
	27	0.009	0.007	0.184
	28	0.007	0.002	0.126
	29	0.005	0.008	0.238
	31	0.005	0.009	0.219
	32	0.008	0.015	0.186
	33	0.011	0.003	0.079
	34	0.082	0.011	0.165
	35	0.006	0.009	0.158
	36	0.018	0.021	0.170
	37	0.009	0.013	0.332
	38	0.013	0.011	0.192

[0573]	39	0.012	0.010	0.211
	40	0.009	0.007	0.173
	41	0.006	0.010	0.231
	43	0.016	0.006	0.203

[0574] 实例45

[0575] hERG通道抑制测定:

[0576] hERG通道抑制测定是一种高度灵敏的测量,可鉴定表现出与体内心脏毒性相关的hERG抑制作用的化合物。将hERG K^+ 通道克隆到人体内,并在CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞系中稳定表达。CHO_{hERG} 细胞用于膜片钳 (电压钳,全细胞) 实验。电压模式刺激细胞以活化hERG通道并传导 I_{KhERG} 电流 (hERG通道的快速延迟向外整流钾电流)。细胞稳定几分钟后,以0.1Hz (6bpm) 的刺激频率记录 I_{KhERG} 的振幅和动力学。此后,将测试化合物以增加的浓度添加到制剂。对于每种浓度,都试图达到稳态效果,通常在3-10分钟内达到此效果,此时施加下一个最高浓度。记录每种药物浓度下 I_{KhERG} 的振幅和动力学,并将其与对照值进行比较 (以100%计)。(参考文献:Redfern WS,Carlsson L,Davis AS,Lynch WG,MacKenzie I,Palethorpe S,Siegl PK,Strang I,Sullivan AT,Wallis R,Camm AJ,Hammond TG.2003; Relationships between preclinical cardiac electrophysiology,clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development.Cardiovasc.Res.58:32-45,Sanguinetti MC,Tristani-Firouzi M.2006; hERG potassium channels and cardiac arrhythmia.Nature 440:463-469,Webster R, Leishman D,Walker D.2002;Towards a drug concentration effect relationship for QT prolongation and torsades de pointes.Curr.Opin.Drug Discov.Devel.5:116-26)。

[0577] hERG的结果在表3中给出。安全比 ($hERG\ IC_{20}/EC_{50}$) >30表示通过抑制TLR7/8/9通路与潜在的hERG相关心脏毒性来区分药理学的充分安全窗。根据 $hERG\ IC_{20}/TLR7/8/9IC_{50}$ 的计算 (以下作为评估hERG责任的早期选择性指标),显然参比化合物ER-887258、ER-888285、ER-888286、R1和R2与本发明的化合物相比,具有更窄的安全窗。

[0578] 表3.hERG和安全比结果

[0579]

实例编号	hERG IC ₂₀ (μM)	hERG IC ₅₀ (μM)	hERG IC ₂₀ /TLR7 IC ₅₀	hERG IC ₂₀ /TLR8 IC ₅₀	hERG IC ₂₀ /TLR9 IC ₅₀
1	4.0	>10.0	75.5	333.3	14.5
2	>10.0	>20.0	>370.4	>476.2	>70.4
6	4.4	>10.0	628.6	118.9	21.2
7	5.1	>20.0	463.6	175.9	98.1
11	7.5	>20.0	202.7	178.6	72.1
12	7.0	>20.0	205.9	233.3	15.5
25	>10.0	>20.0	>1111.1	>1428.6	>102.0
26	>10.0	>20.0	>833.3	>714.3	>91.7
28	6.4	>20	914.3	3200.0	50.8
29	4.4	>10	880.0	550.0	18.5
30	4.9	>10.0	544.4	350.0	11.6
32	4.4	>10.0	550.0	293.3	23.7
33	4.1	>10.0	372.7	1366.7	51.9
35	4.4	>10.0	733.3	488.9	27.8
36	>10.0	>20.0	>555.6	>476.2	>58.8
37	>10.0	>20.0	>1111.1	>769.2	>30.1
38	5.2	>20.0	400.0	472.7	27.1
40	5.9	>20.0	655.6	842.9	34.1
43	>10.0	>20.0	>625.0	>1666.7	>49.3

[0580] 实例46

[0581] 基于人PBMC细胞的测定

[0582] 与HEK报告细胞系不同,人外周血单核细胞(PBMC)代表血液中的主要人免疫细胞,其主要由淋巴细胞、单核细胞和树突状细胞组成。这些细胞表达TLR7、TLR8或TLR9,并因此是对相应配体刺激的自然应答者。这些TLR一经活化,PBMC在体外和体内都会分泌相似的细胞因子和趋化因子,因此,TLR7/TLR8/TLR9拮抗剂在人PBMC中的体外效能可很容易地转化为其在体内的药效学应答。

[0583] 通过密度梯度(Ficoll-Paque™ PLUS,GE Healthcare life Sciences)从新鲜抽取的肝素化锂(锂肝素加采血管(Lithium Heparin Plus blood Collection tube),BD Vacutainer®)健康供体全血中分离人外周血单核细胞(PBMC)。简而言之,在带有多孔屏障的50mL锥形管(Leucosep管,Greiner bio-one)中,用25mL PBS(不含Ca²⁺、Mg²⁺)稀释50mL血液,其中15.5mL Ficoll-Paque在旋转后置于下层。在制动器处于关闭位置的情况下,将试管在800×g(1946rpm)离心20分钟,然后从血沉棕黄层中收集PBMC。然后将细胞在PBS中洗涤两次,并通过在室温下将其悬浮于2mL(红细胞裂解缓冲液,Alfa Aesar)中5至10分钟来裂解红细胞。在PBS中进行最终洗涤后,将PBMC以2×10⁶细胞/mL的最终浓度重悬浮于补充有10%胎牛血清(Sigma)的含GlutaMAX™(Gibco)的RPMI-1640培养基中,并以150μL/孔(3×10⁵细胞/孔)在组织培养物处理的圆底96孔板(Corning Incorporated)中接种。

[0584] 将在100% DMSO中溶解并连续稀释的拮抗剂化合物(本发明的化合物)添加到细胞中(重复两次),以得到最终浓度为1%的DMSO(v/v)。将PBMC用拮抗剂化合物在37℃,5% CO₂下孵育30分钟,然后按如下方式(指示最终浓度)在每孔48μL完全培养基中添加各种TLR激动剂:对于TLR9为1μM的CpG ODN 2216(InvivoGen),对于TLR8为1μg/mL的ORN 06/LyoVec(InvivoGen),以及对于TLR7和TLR8为1μg/mL的R848(InvivoGen)。将PBMC在37℃下用5% CO₂孵育过夜。收集细胞培养上清液,并根据制造商推荐的方案(eBioscience, ThermoFisher Scientific)通过Luminex测定(ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay, Invitrogen)或ELISA程序评估各种人类细胞因子的水平。另用细胞活力测定(CellTiter Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega)检查细胞的活力。

[0585] 表4.hPBMC结果

实例编号	hPBMC/TLR9 IC ₅₀ (nM)
2	470
6	617
7	420
14	340
21	848
25	320
26	330
27	380
28	520
29	710
30	780
31	410
32	320
33	146
35	870
40	540
43	470

[0588] 实例47

[0589] 人微粒体稳定性测定

[0590] 人微粒体稳定性测定用于早期评估人肝微粒体中供试化合物的代谢稳定性。

[0591] 将人肝微粒体(Cat.NO.:452117, Corning, USA; Cat.NO.:H2610, Xenotech, USA)在37℃于100mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中与测试化合物预孵育10分钟。通过添加NADPH再生系统来引发反应。最终的孵育混合物在100mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中含1μM供试化合物、0.5mg/mL肝微粒体蛋白、1mM MgCl₂、1mM NADP、1单位/mL异柠檬酸脱氢酶和6mM异柠檬酸。在37℃下孵育0、3、6、9、15和30分钟后,将300μL冷乙腈(包括内标)添加到100μL孵育混合物

中以终止反应。沉淀和离心后,通过LC-MS/MS测定样品中残留的化合物量。还制备并分析了零和30分钟无NADPH再生系统的对照。通过上述测定进行检测,本发明的化合物显示出良好的人肝微粒体稳定性,结果示如下表5所示。

[0592] 表5. 人肝微粒体对本发明化合物的稳定性

[0593]	实例编号	人微粒体的清除 (mL/min/kg)
	N8	16.3
	N79	18.2
	2	8.2
	3	9.3
[0594]	5	9.1
	6	9.3
	7	6.2
	12	9.7
	13	7.2
	14	6.7
	19	6.2
	20	9.0
	21	7.8
	27	9.1
	28	6.2
	29	6.8
	32	8.8
	33	6.2
	34	9.8
	35	6.2
	37	6.2
	38	7.8
	39	6.7
	40	8.1
	41	7.2
	43	6.5

[0595] 实例48

[0596] 3T3体外光毒性测定

[0597] 光毒性被定义为在皮肤第一次暴露于某些化学物质并随后暴露于光之后引起的毒性反应,或者是类似的在系统性施用化学物质后通过皮肤照射引起的毒性反应。本研究

中使用的测定旨在通过使用Balb/c 3T3小鼠成纤维细胞的简单体外细胞毒性测定来检测化学物质的光毒性潜力。该测试的原理是比较在暴露或不暴露于无毒剂量的UVA-光下进行测试时化学物质的细胞毒性。细胞毒性表示为细胞生长速率的剂量依赖性降低,该降低取决于处理后一天对活性染料中性红的吸收。

[0598] 1. 方法

[0599] 制备储备溶液和测试物品的剂量

[0600] 即将开始暴露于细胞之前,称重少量物质并在DMSO中新鲜配制。将该原液或适当的DMSO稀释液加入细胞悬液中,以获得所需的最终浓度。所有溶液通常在Eppendorf瓶盖中制备,使用后丢弃。

[0601] 参比物质

[0602] 氯丙嗪(HCL)(Sigma,批次/批号:120M1328V),测试浓度:300 μ g/mL,溶剂:PBS/3% DMSO

[0603] UV吸收光谱的测量

[0604] 用Lambda-2光谱光度计(Perkin Elmer)在240nm和400nm之间记录吸收光谱本身或用UV-A或UV-B预照射的吸收光谱。

[0605] UV辐射源:对于UV-A:带有滤波器H1的Sol 500

[0606] 主要光谱:315-690nm

[0607] 辐照度:大约1.67mW/cm²

[0608] 辐射剂量:大约5J/cm²

[0609] 对于UV-B:Philips TL 20W/12

[0610] 主要光谱:290-320nm

[0611] 辐照度:大约0.083mW/cm²

[0612] 辐射剂量:大约0.05J/cm²

[0613] 光毒性的测定

[0614] 对于该研究,改进的Borenfreund和Puerner的中性红吸收(NRU)分析(Borenfreund,E,Puerner JA.Toxicity determined in vitro by morphological alterations and Neutral Red absorption.Toxicology Lett.1985;24:119-124.)根据INVITTOX方案第78号(ERGATT/FRAME data bank of in vitro techniques in toxicology.INVITTOX PROTOCOL No 78.3T3 NRU Phototoxicity Assay.March 1994)进行了调整,以检查测试物品的可能的光毒性潜力。该测定基于中性红染料向培养的鼠成纤维细胞的溶酶体中的主动吸收。因为已知溶酶体膜是许多光毒性化合物的作用部位,所以该测定法可以提供潜在的光毒性损伤的量度。

[0615] 制备细胞培养物

[0616] 在37°C在6% CO₂的潮湿气氛中将鼠成纤维细胞克隆A 31(ATCC编号CCL 163,第108代)在含有sDMEM(杜贝克氏基本必需培养基,其中补充有10%小牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100单位/ml的青霉素和100 μ g/ml的链霉素)的175cm²组织培养级烧瓶中培养。在细胞接近汇合之前,通过胰蛋白酶消化将它们从烧瓶中移出。在用于测定之前,在体积为100 μ l的sDMEM中将细胞以1 $\times$ 10⁴个细胞/孔的浓度转移到96孔微量滴定板中,并使其附着24h。

[0617] 暴露于测试物品

[0618] 为了与鼠成纤维细胞一起孵育,将测试物品稀释在PBS/3% DMSO中(详细浓度见结果)。

[0619] 将培养基(杜贝克氏改良伊格尔培养基(DMEM),GlutaMAX(Gibco Ref 21885-025),10%胎牛血清(FBS)(Gibco Ref 10270-106),100IU/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Gibco Ref 15140-122))从孔中移出,并且将鼠成纤维细胞用PBS洗涤。然后加入100μL含测试物品的PBS/3% DMSO,并将靶细胞在37℃用6% CO₂孵育1h。

[0620] UV暴露

[0621] 对于每个测试物品,按照表6制备微量滴定板。将“UVA板”暴露于约5J/cm²的UVA光下,将“深色板”置于黑暗中,作为细胞毒性对照。含有盐酸氯丙嗪的板作为阳性对照。UV通量使用UV计量器(Dr.Gröbel RM21)测量。

[0622] UV照射后,将测试物品从孔中取出(用PBS的一个洗涤步骤),并替换为sDMEM。然后将靶细胞在37℃在6% CO₂中孵育过夜。

[0623] 表6. 96孔微量滴定板设置

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[0624]	A	S1	S2	U01	U02	U03	U04	U05	U06	U07	U08	S2	S1
	B	S1	S2									S2	S1
	C	S1	S2									S2	S1
	D	S1	S2									S2	S1
	E	S1	S2									S2	S1
	F	S1	S2									S2	S1
[0625]	G	S1	S2									S2	S1
	H	S1	S2									S2	S1

[0626] 96孔微量滴定板的制备如下:

[0627] 每块板含有带有细胞和溶剂但没有测试物品的孔,这些测试物品未与中性红溶液(0%标准品-S1)一起孵育,或用中性红(100%标准品-S2)染色以计算标准细胞活力曲线。标有U01-U08的孔包含不同的测试物品浓度。

[0628] 中性红吸收

[0629] 将要使中性红(NR)染色溶液的新鲜制备如下:

[0630] ●将0.4%的储备水溶液避光并在使用前过滤以除去NR晶体。

[0631] ●然后在sDMEM中制备1:40稀释的储备溶液,并添加到细胞中。

[0632] 孵育后,待测孔中装有100μL含有中性红的sDMEM。将靶细胞与NR在37℃在6% CO₂中孵育3h。

[0633] 中性红吸收测量

[0634] 从靶细胞中去除未掺入的中性红,并用至少100μL PBS洗涤孔。然后加入150μL中性红脱附溶液(1%冰醋酸,50%乙醇水溶液)以定量萃取所掺入的染料。在微量滴定板振荡器上剧烈振荡至少10分钟后,直到从细胞中提取出中性红并形成均匀溶液为止,使用SPECTRAmax PLUS微量滴定板读数器(Molecular Devices)测量所得有色溶液在540nm的吸

收。

[0635] 细胞活力的计算

[0636] 用SOFTmax Pro软件包(Molecular Devices)计算细胞活力。首先根据以下公式使用程序的线性曲线拟合选项,计算两点标准曲线(0%和100%活力):

[0637] $Y = A + (B \times X)$

[0638] (A=线的y截距;B=线的斜率;

[0639] 0%细胞活力=含溶剂但无测试物品和中性红的细胞;

[0640] 100%细胞活力=含溶剂和中性红但无测试物品的细胞)

[0641] 通过这种方式,计算与浓度增加的测试化学品一起孵育的细胞的活力。氯丙嗪(HCl)作为实验的阳性对照。

[0642] IC_{50} 值的计算

[0643] 所有计算均使用SOFTmax Pro分析软件包进行(分子器件-有关详细信息,请参见:
http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/SoftMax_Pro_User_Guide.pdf)

[0644] 光毒性区分因子的计算

[0645] 为了评估光毒性潜力,比较在有和没有UV暴露下确定的 IC_{50} 值。

[0646] 因子 = $IC_{50}(-UV) / IC_{50}(+UV)$

[0647] 为区分光毒性和非光毒性测试化学品,应用了>5的截断因子(Liebsch M, Spielmann H, Balls M, Brand M, Döring B, Dupuis J, Holzhüter HG, Klecak G, L. Eplattenier H, Lovell W, Maurer T, Moldenhauer F, Moore L, Pape W, Pfannenbecker U, Potthast JM, De Silva O, Steiling W, Willshaw A. First results of the EC/COLIPA Validation Project. In Vitro Phototoxicity Testing. 在: In Vitro Skin Toxicology: Irritation, Phototoxicity, Sensitization; 第10卷. Alternative Methods in Toxicology, -编辑. Rougier A, Maibach HI, Goldberg AM; Mary Ann Liebert Publ.: New York, USA 1994, 页. 243-251)。

[0648] 即使在最高测试浓度下对鼠成纤维细胞也没有细胞毒性的测试物品,但在UV暴露后显示出细胞活力的强烈剂量依赖性下降,也被认为具有光毒性(Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJW, Pechovitch G, Silva De O, Holzhütter, HG, Clothier R, Desolle P, Gerberick F, Liebsch M, Lowell WW, Maurer T, Pfannenbecker U, Potthast JM, Csato M, Sladowski D, Steiling W, Brantom P. The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: Results of phase II (blind trial). 部分1: The 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology in Vitro 1998, 12: 305-327)。

[0649] 测试结果如下所示,本发明的化合物显示出非常好的光毒性。

[0650] 表7. 本发明化合物的3T3测试结果

实例编号	光毒性因子	IC_{50} (UV-A) ($\mu\text{g/mL}$)
28	1	>120
40	1	>120

[0652] 实例49

[0653] 胚胎干细胞测试

[0654] 体外小鼠胚胎干细胞测试(mEST)测定是罗氏实施的常规测定。最初的EST是由

Horst Spielmann和他的团队于1997年基于源自小鼠129株的囊胚衍生的永久胚胎小鼠ESC (mESC) D3细胞系作为用于胚胎毒性筛选的体外模型而开发的,并通过了欧洲替代方法验证中心 (ECVAM) 的验证。

[0655] 我们进一步优化和修改了该方法,允许将测定应用于药物化合物。

[0656] 生物学终点和终点度量:

[0657] 代表分化细胞的3T3成纤维细胞的细胞毒性(生长抑制)和物质处理10天后未分化胚胎干细胞(D3)的细胞毒性充当两个测定终点。这是通过以下方式来确定的:使用存在于活细胞的完整线粒体中的脱氢酶,以将黄色可溶性底物3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)转化为深蓝色的不溶性甲臃产物,该甲臃产物被隔离在细胞内并在溶解细胞膜后使用吸光度读数器(570nm)定量检测。

[0658] 第三个终点是在治疗10天后抑制ES细胞分化为心肌,即心肌细胞。通过显微镜来评估该细胞的跳动。

[0659] 材料和试剂

[0660] mESC细胞:ES-D3[D3](ATCC®CRL-1934TM)

[0661] 小鼠成纤维细胞:BALB/3T3克隆A31(ATCC®CCL-163TM)

[0662] Balb/c 3T3细胞克隆A31:美国菌种保藏中心(ATCC)目录号CCL-163

[0663] ES-D3(D3):美国菌种保藏中心(ATCC)目录号CRL-1934

[0664] m-LIF:Sigma,目录号L5158-5UG

[0665] NEAA(100x):Gibco,目录号11140-035

[0666] 台盼蓝0.04%:Gibco,目录号T10282

[0667] MTT:Tocris Bioscience,目录号5224/500

[0668] 5-氟尿嘧啶:Sigma,目录号F-6627-5G

[0669] 青霉素/链霉素:Gibco,目录号15140-122

[0670] PBS(-CaCl₂/ -MgCl₂):Gibco,目录号14190-094

[0671] FCS:Hyclone,目录号SH30070.03

[0672] 具有葡萄糖、谷氨酰胺、NaHCO₃的DMEM:Gibco,目录号41966-029

[0673] 方法

[0674] 准备工作

[0675] 介质和终点测定溶液

[0676] 培养基:

	3T3	D3
	10% FCS	20% FCS
	4 mM 谷氨酰胺	2 mM 谷氨酰胺
	50 U/ml 青霉素	50 U/ml 青霉素
[0677]	50 µg/ml 链霉素	50 µg/ml 链霉素
		1% NAA
		0.1 mM β-ME
		1000 U/ml m-LIF (仅单独加入到传代培养物)
[0678]	<u>测定介质:</u>	
	3T3	D3
	10% FCS	20% FCS
	4 mM 谷氨酰胺	2 mM 谷氨酰胺
[0679]	50 U/ml 青霉素	50 U/ml 青霉素
	50 µg/ml 链霉素	50 µg/ml 链霉素
		1% NAA
		0.1 mM β-ME
[0680]	<u>用于冷冻细胞的介质:</u>	
	3T3	D3
	20% FCS	40% FCS
	4 mM 谷氨酰胺	2 mM 谷氨酰胺
	50 U/ml 青霉素	50 U/ml 青霉素
[0681]	50 µg/ml 链霉素	50 µg/ml 链霉素
		1% NAA
		0.1 mM β-ME
	7% DMSO	7% DMSO
[0682]	<u>β-巯基乙醇 (β-ME) (10mM)</u>	
[0683]	将17.5µLβ-ME加入到25mL的PBS	
[0684]	在4℃储存最长1周	
[0685]	<u>FCS</u>	
[0686]	通过水浴 (37℃) 一次解冻FCS, 并制成100mL、50mL和25mL的等分部分。	
[0687]	避免多次解冻	
[0688]	在-20℃储存	
[0689]	<u>MTT-溶液</u>	
[0690]	5mg MTT/ml PBS	
[0691]	使用来自Millipore的无菌过滤器并制成8mL和4mL的等分部分	
[0692]	在-20℃储存	

- [0693] MTT-解吸溶液
- [0694] 20% SDS溶于1:1的水/DMF中,用乙酸将pH值调节至4.5
- [0695] 测试化合物
- [0696] 储备溶液:200mM
- [0697] 溶剂:100% DMSO
- [0698] 分化测定
- [0699] 第0天
- [0700] 1) 针对D3细胞用胰蛋白酶0.05% EDTA进行细胞传代。
- [0701] 2) 组装细胞悬浮液:在50mL Falcon管中用18ml介质(针对每次测试)将细胞稀释至 2.5×10^4 /mL。
- [0702] 3) 准备培养皿(PD):将5-10mL无菌Dulbecco PBS(Gibco)加入到每个培养皿底部,分布于整个培养皿。
- [0703] 4) Eppendorf管中的测试化合物的稀释系列:将5 μ L的化合物(1:400稀释)和5 μ L对照溶液(DMSO)加入2mL细胞悬浮液,涡流。
- [0704] 5) 在培养皿中制备悬滴:涡流管,用自动吸移管吸取悬浮液并将20 μ L液滴多次分配到培养皿的盖子上,以同心圆液滴的方式总共加入2ml(约100滴);快速而平稳地转动盖子并装上PD;在37°C/5% CO₂孵育3天。
- [0705] 第3天
- [0706] 1) 14mL PP管中的化合物的稀释系列
- [0707] 6个管用于浓缩;填充有5mL测定介质
- [0708] 1个管用于DMSO(溶剂对照),填充有5mL测定介质
- [0709] 2) Eppendorf管中的化合物的稀释系列
- [0710] 加入12.5 μ L的化合物(1:400稀释)和12.5 μ L对照溶液,涡流
- [0711] 3) 将胚状体转移到细菌培养皿中
- [0712] 小心地转动PD盖子,检查液滴是否被真菌污染
- [0713] 用5mL制备好的溶液冲洗液滴数次
- [0714] 转移到细菌培养皿中
- [0715] 在37°C/5% CO₂孵育3天
- [0716] 第5天
- [0717] 1) 50mL管中的化合物的稀释系列
- [0718] 6个管用于浓缩;填充有25mL测定介质
- [0719] 1个管用于DMSO(溶剂对照),填充有25mL介质
- [0720] 2) 1.5mL管中的化合物的稀释系列
- [0721] 加入62.5 μ L的化合物(1:400稀释)和对照溶液(DMSO),涡流
- [0722] 3) 准备96孔板
- [0723] 每种化合物2个板,参见化合物板布局
- [0724] 在所有96孔中加入220 μ L介质/化合物/溶剂混合物
- [0725] 从低浓度开始
- [0726] 4) 吸移胚状体

- [0727] 目视控制培养皿中的胚状体
- [0728] 使用25 μ L吸头,在每个孔中吸取一个胚状体
- [0729] 目视检查板以确保每个孔中存在至少一个胚状体
- [0730] 在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂孵育3天
- [0731] 第10天
- [0732] 针对跳动的心肌细胞用显微镜观察每个孔
- [0733] 测定介质和DMSO对照物应显示至少80%的跳动心肌细胞(参见验收标准)
- [0734] 细胞毒性测定
- [0735] 为所有物质制备浓度为0.2mol/L的储备溶液。将测试物质在DMSO溶液中稀释。
- [0736] 第0天
- [0737] 1) 为D3和3T3细胞系制备细胞悬浮液
- [0738] 2) 3T3细胞为 2.5×10^4 个细胞/mL, D3细胞为 1.5×10^4 个细胞/mL
- [0739] 3) 将200 μ L介质吸移到96孔多孔板的外孔(空白)中
- [0740] 4) 将50 μ L细胞悬浮液加入到96孔多孔板的剩余内孔(样品)中
- [0741] 5) 在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂孵育2h以使细胞贴壁
- [0742] 6) 吸移测试物质或DMSO对照物,在5mL管中形成2mL介质和6.67 μ L测试物质的浓度
- [0743] 7) 将150 μ L/孔的溶液加入到样品孔中(总共200 μ L/孔)
- [0744] 8) 在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂孵育3天
- [0745] 第3天、第5天和第7天
- [0746] 1) 通过将5 μ L的测试物质(或DMSO对照物)(1:400)加入到mL管中来稀释2mL的介质(3T3或D3细胞培养基)
- [0747] 2) 在不损坏底部细胞层的情况下,用真空泵去除介质
- [0748] 3) 将200 μ L的经稀释测试物质(和DMSO对照物)加入到适当的样品孔中
- [0749] 孵育:
- [0750] 第3天:在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 2天
- [0751] 第5天:在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 2天
- [0752] 第7天:在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 3天
- [0753] 第10天
- [0754] 在光学显微镜下初步目视观察细胞变化、物质沉淀或其他任何影响
- [0755] MTT-测量:
- [0756] 1) 通过将4mL MTT加入到40mL DMEM中并温热至37 $^{\circ}$ C来形成最终MTT溶液
- [0757] 2) 通过小心丢弃介质而从96孔板中去除介质
- [0758] 3) 使用多壁吸移器将200 μ L的MTT溶液加入到每个孔中
- [0759] 4) 将板在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂孵育3h
- [0760] 5) 将MTT解吸溶液温热至37 $^{\circ}$ C
- [0761] 6) 小心去除MTT溶液
- [0762] 7) 将130 μ L的MTT解吸溶液加入到每个孔中,并将板在培养箱中在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,然后将板放在板振荡器上至少2-3小时
- [0763] 8) 在570nm处测量板读取器上的吸收率

[0764] 验收标准

[0765] 分化终点:需要总测定中有至少80%的跳动心肌细胞才认可为有效测

[0766] 定

[0767] 细胞毒性终点:

[0768] DMSO对照物和POS对照物的可接受范围以及对D3的OD值(约

[0769] 1.8-2.2)和3T3的OD值(0.8-1.0)的确定应在它们的适当范围内

[0770] 数据分析

[0771] 分化终点:

[0772] 确定跳动心肌细胞的总数(每孔至少一个跳动心肌细胞=一个正计数,每孔无跳动心肌细胞=负计数),归一化为阳性DMSO对照物

[0773] 细胞毒性终点:

[0774] 确定空白的OD 570的平均值(值表示染料对塑料材料的粘附力和介质的残留量)。从样品值减去该值并继续使用经校正的值进行计算。

[0775] 确定经处理的样品孔的OD 570的平均值。确定溶剂对照孔的OD 570平均值被设定为100%。存活率以归一化为DMSO溶剂对照物的%来计算。

[0776] 预测模型

[0777] 将酶标仪生成的光密度(OD570)的数据文件复制到EXCEL电子表格中。自动计算平均OD值、标准偏差和存活率。可以从电子表格中的浓度-响应曲线以图形方式计算来自测定的以下终点:

[0778] IC50 D3-50%的D3细胞已死亡时的测试物质的浓度

[0779] IC50 3T3-50%的3T3细胞已死亡时的测试物质的浓度。

[0780] ID50 D3-D3细胞到收缩性心肌细胞的分化减少50%时的测试物质的浓度。

[0781] 将来自细胞毒性测定的D3和3T3细胞的IC50值以及D3分化测定的ID50输入到从Scholz等人1999a使用的经修改预测模型开发的统计评估中:

$$[0782] \quad D12_3 = \frac{\lg IC50 D3 + \lg IC50 3T3}{2} - \lg ID50$$

[0783] D12_3<0.5表示“负”

[0784] D12_3>0.6表示“正”

[0785] 0.5与0.6之间的预测评分被标记为边界结果。

[0786] 不确定的结果也是可能的,例如,在溶解度将测试的剂量范围限制到无法针对一条或多条剂量响应曲线确定IC50或ID50值的程度的情况下(Withlow等人2007)

[0787] 表8. 针对本发明的化合物的mEST结果

[0788]	实例编号	预测评分D12_3
	28	0.44
	40	0.36

[0789] 实例50

[0790] 雄性Wister-Han大鼠的单剂量药代动力学(PK)研究

[0791] 通过对雄性Wister-Han大鼠(供应商:Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co.,Ltd)的单剂量PK研究,评估了选定化合物的药代动力学特性。简而言之,

两组动物以2mg/kg静脉内施用(IV,推注)或以10mg/kg口服施用(PO,通过管饲法)单剂量的相应的化合物。在给药后5min(仅对于IV)、15min、30min、1h、2h、4h、7h和24h时,经由颈静脉收集血样(大约150 μ L)。将血样置于含有EDTA-K2抗凝剂的管中,并且在4℃下以3000rpm的转速离心15min以从样品中分离血浆。离心后,将所得血浆转移至干净的管,以用于用LC/MS/MS来进行生物分析。使用非区室分析来计算药代动力学参数。基于IV给药后的血浆浓度-时间曲线来获得分布体积(V_{ss})、半衰期($T_{1/2}$)和清除率(CL)。从PO剂量后的实验观察来直接记录峰值浓度(C_{max})。使用线性梯形法则来计算血浆浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-last}),直至最后可检测浓度。基于IV和PO给药后的剂量归一化 AUC_{0-last} 来计算生物利用度(F)。

[0792] 药物的 V_{ss} 代表药物在身体组织而不是血浆中分布的程度。 V_{ss} 与分布到组织中的药物量成正比。 V_{ss} 越高表明组织分布的量越大。

[0793] 在表9中给出了在IV和PO施用后PK参数的结果。

[0794] 表9. 针对本发明的化合物的PK参数

[0795]	实例 编号	PO C_{max} (ng/mL)	PO AUC_{0-last} (h*ng/mL)	IV AUC_{0-last} (h*ng/mL)	CL (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)	$T_{1/2}$ (h)	F (%)
	7	465	7514	1516	16	16.8	14.7	100
[0796]	26	620	9260	2197	10.3	12.5	15.7	84.3
	28	122	1800	974	30.2	16.7	8.84	37
	40	216	2837	1062	32.8	13.2	7.26	53.4