



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101565420 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 200910136811. 3

A61P 25/00(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 04. 21

A61P 29/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/046, 602 2008. 04. 21 US

(56) 对比文件

WO 2008075110 A1, 2008. 06. 26, 第 77 页 :7-12 行 ;权利要求 1, 101-103 ;实施例 52-55, 58, 60, 61D, 62E, 63-66, 67D, 68E, 68F, 69E, 69F, 81C, .

(73) 专利权人 莱西肯医药有限公司

地址 美国得克萨斯州

WO 2008075109 A1, 2008. 06. 26, 实施例 57, 68, 85a, 90.

(72) 发明人 休·艾尔弗雷德·博古恩

布赖斯·奥尔登·哈里森 刘瑛

罗斯·玛博恩 布雷特·马丽内里

大卫·布伦特·罗林斯

丹尼斯·斯图尔特·赖斯

诺里斯·安德鲁·惠特洛克

尼科尔·凯瑟琳·古德温

贾森·帕特里克·希利

WO 2007125325 A1, 2007. 11. 08, 第 63 页 : 16-21 行 ;第 116 页 ;实施例 18C 和 18D ;权利要求 1, 100-102.

WO 2006091450 A1, 2006. 08. 31, 第 20 页 ;实施例 5. 1 ;第 24 页 :表格 1 ;权利要求 1.

WO 2007125321 A2, 2007. 11. 08, 第 23 页 :17-19 行 ;第 36 页 :4-18 行 ;第 85 页 :1-4 行 ;权利要求 1, 86, 90, 91, 94, 95 ;实施例 69-78.

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

WO 2005051304 A2, 2005. 06. 09, 第 28 页 :3-24 行 ;权利要求 1, 34, 43.

(51) Int. Cl.

C07D 487/04(2006. 01)

A61K 31/519(2006. 01)

A61K 31/635(2006. 01)

A61P 27/02(2006. 01)

A61P 27/06(2006. 01)

审查员 黄清昌

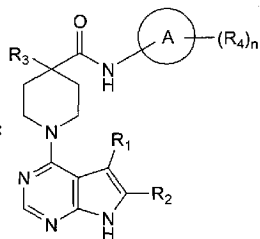
权利要求书1页 说明书52页 附图1页

(54) 发明名称

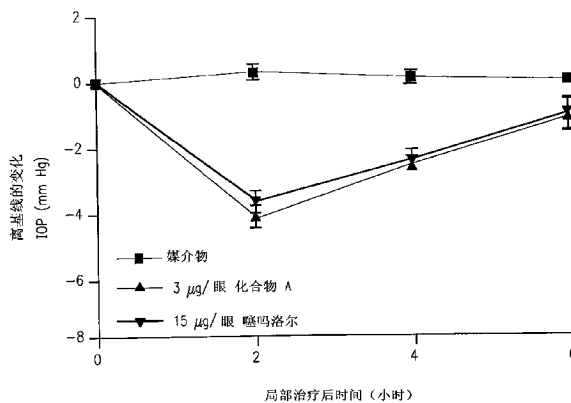
LIMK2 抑制剂、包含其的组合物及其用法

(57) 摘要

本发明公开了 LIM 激酶 2 的抑制剂, 以及包括所述抑制剂的药物组合物和它们的用法。具体的

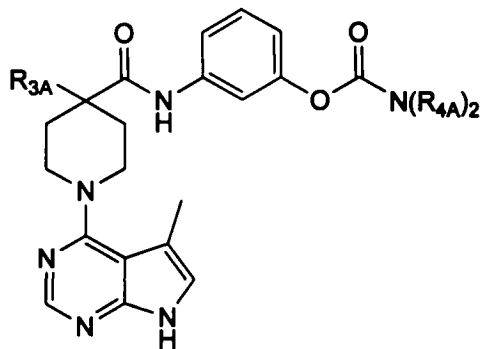


化合物由下式表示 :



CN 101565420 B

1. 下式所示的化合物：



或其可药用盐，其中：

每个 R_{3A} 为氰基或任选地被取代的烷基或杂烷基，其任选地被烷氧基、 NH_2 、羰基或杂烷基中的一个或多个取代；

每个 R_{4A} 独立地为氢或 C_{1-4} 烷基；以及

术语烷氧基是指 -O- 烷基基团，

术语“杂烷基”是指其中至少一个碳原子已被杂原子 N、O 或 S 替换的烷基部分，

术语“烷基”是指具有 1-4 个碳原子的直链、支链和 / 或环状的烃。

2. 权利要求 1 的化合物，其是 3-(4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯或其可药用盐。

3. 药物制剂，其包括适于眼科给药的液体媒介物和权利要求 1 或 2 的化合物。

4. 治疗或预防有效量的权利要求 1 或 2 的化合物在制备用于降低患者眼内压的药物中的应用。

5. 治疗或预防有效量的权利要求 1 或 2 的化合物在制备用于治疗、应对或预防影响患者视力的疾病或病症的药物中的应用。

LIMK2 抑制剂、包含其的组合物及其用法

[0001] 本申请要求 2008 年 4 月 21 日提交的美国临时专利申请 61/046,602 的优先权,所述申请被全文并入本文作为参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及激酶抑制剂、包括所述抑制剂的组合物、以及它们用于治疗各种疾病和病症的方法。

背景技术

[0003] 蛋白激酶是催化 ATP 的 γ -磷酸基转移到接受者蛋白质的一类酶。据估计人类基因组编码超过 500 种不同的蛋白激酶,其中的许多已经与包括癌和炎症在内的各种疾病和病症有关。

[0004] LIM 激酶 (LIMK) 涉及 p53 途径。参见,例如,国际申请 W002/099048。LIMK 属于具有两个 N 端 LIM 基序和一个 C 端蛋白激酶结构域的独特组合的激酶的一个小型亚家族。这些 LIM 基序和激酶结构域通过富含脯氨酸和丝氨酸的区域连接,所述富含脯氨酸和丝氨酸的区域包含若干推定的酪蛋白激酶和 map 激酶识别部位。LIM 激酶和它们的途径蛋白被认为有助于 Rho- 诱导的肌动蛋白细胞骨架的重新组织。出处同前。LIM 激酶家族的成员包括 LIM 激酶 1 (LIMK1) 和 LIM 激酶 2 (LIMK2)。二者都使丝切蛋白 (cofilin) 磷酸化并且调节 Rho 家族依赖性肌动蛋白细胞骨架重排。出处同前。

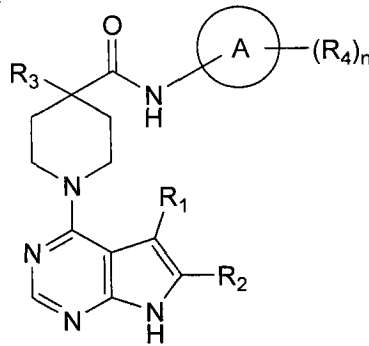
[0005] 已经提出将 LIM 激酶抑制剂用于癌的治疗。出处同前。还有提议,LIMK 抑制剂可通过促进小梁细胞中的肌动蛋白解聚以及降低眼压而用于治疗青光眼。参见国际申请 W0 04/047868。当前的青光眼治疗通过不同的机理起作用。前列腺素 F2a 类似物 (例如,拉坦前列素) 通过使流体从眼睛流出而对眼内压 (IOP) 的自主升高有效。碳酸酐酶抑制剂 (例如,乙酰唑胺)、 β -阻断剂 (例如,噻吗洛尔)、拟交感神经药 (例如,毛果芸香碱)、和 α 肾上腺素能受体激动剂 (例如,溴莫尼定) 都减少眼房水产生。

[0006] 已经报告了不同化学型的大量化合物作为激酶抑制剂。例如,已经公开了苯基取代的嘧啶化合物,据报道可以用作 LIMK 抑制剂。参见国际申请 W0 2006/084017。已经公开了基于吡咯 [2,3-d] 嘧啶的化合物作为各种不同激酶的抑制剂。参见,例如,美国专利公开 2004/0058922、国际申请 W0 2007/125325、国际申请 W0 2007/125321、国际申请 W0 2006/046024、美国专利公开 2005/0130954、和美国专利公开 2006/0189638。

发明内容

[0007] 本发明部分地涉及下式的化合物:

[0008]



[0009] 及其可药用盐,其取代基如本文中所定义的。特定的化合物是有效的 LIMK2 抑制剂。

[0010] 本发明的一个实施方案包括如下的药物制剂,其包括本文中公开的化合物。

[0011] 另一个实施方案包括使用本文中公开的化合物治疗、应对和预防受 LIMK2 影响的各种疾病和病症的方法,所述疾病和病症包括癌、炎性疾病和病症、和影响视力的疾病和病症(例如,眼睛的疾病和病症),例如青光眼、神经变性和感染。

附图说明

[0012] 图 1 表示两个化合物在以下实施例所述的眼高压试验中的作用。化合物 A 是本发明的化合物,剂量为每只眼睛 $3 \mu\text{g}$ 。另一个化合物为噻吗洛尔,剂量为每只眼睛 $15 \mu\text{g}$ 。媒介物对照的数据是使用不同媒介物进行的八次实验的平均值。化合物 A 的数据是使用不同媒介物进行的八次实验的平均值。噻吗洛尔的数据是使用商用制剂得到的两个实验的平均值。

[0013] 详细说明

[0014] 本发明部分地基于新型化合物的发现,所述化合物是 LIM 激酶 2(LIMK2) 的抑制剂。LIMK2 抑制剂可用于治疗、应对和 / 或预防眼睛的各种疾病和病症,例如青光眼。参见,例如,2008 年 8 月 8 日提交的美国专利申请 12/188,515。本发明的优选化合物在溶液中是稳定的,因此可被并入到液体剂型例如滴眼剂中。另外,特定的化合物是可溶于水的。

[0015] 定义

[0016] 除非另有说明,术语“烯基”是指具有 2-20(2-10 个或 2-6 个)个碳原子并且包括至少一个碳-碳双键的直链、支链和 / 或环状的烃。代表性的烯基基团包括乙烯基,烯丙基,1-丁烯基,2-丁烯基,异丁烯基,1-戊烯基,2-戊烯基,3-甲基-1-丁烯基,2-甲基-2-丁烯基,2,3-二甲基-2-丁烯基,1-己烯基,2-己烯基,3-己烯基,1-庚烯基,2-庚烯基,3-庚烯基,1-辛烯基,2-辛烯基,3-辛烯基,1-壬烯基,2-壬烯基,3-壬烯基,1-癸烯基,2-癸烯基和 3-癸烯基。

[0017] 除非另有说明,术语“烷氧基”是指 -O- 烷基基团。烷氧基基团的实例包括但不限于 $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, 和 $-\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ 。

[0018] 除非另有说明,术语“烷基”是指具有 1-20(例如,1-10 或 1-4)个碳原子的直链、支链和 / 或环状(“环烷基”)的烃。具有 1-4 个的烷基基团称为“低级烷基”。烷基基团的实例包括但不限于甲基,乙基,丙基,异丙基,正丁基,叔丁基,异丁基,戊基,己基,异己基,庚基,4,4-二甲基戊基,辛基,2,2,4-三甲基戊基,壬基,癸基,十一烷基和十二烷基。环烷

基基团可以是单环的或多环的,其实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基和金刚烷基。烷基部分的另外的实例具有直链、支链和 / 或环状的部分 (例如,1-乙基-4-甲基-环己基)。术语“烷基”包括饱和烃类以及烯基和炔基部分。

[0019] 除非另有说明,术语“烷基芳基”或“烷基-芳基”是指结合于芳基部分的烷基部分。

[0020] 除非另有说明,术语“烷基杂芳基”或“烷基-杂芳基”是指结合于杂芳基部分的烷基部分。

[0021] 除非另有说明,术语“烷基杂环”或“烷基-杂环”是指结合于杂环部分的烷基部分。

[0022] 除非另有说明,术语“炔基”是指具有 2-20 个 (2-20 个或 2-6 个) 碳原子并且包括至少一个碳-碳三键的直链、支链或环状的烃。代表性的炔基部分包括乙炔基,丙炔基,1-丁炔基,2-丁炔基,1-戊炔基,2-戊炔基,3-甲基-1-丁炔基,4-戊炔基,1-己炔基,2-己炔基,5-己炔基,1-庚炔基,2-庚炔基,6-庚炔基,1-辛炔基,2-辛炔基,7-辛炔基,1-壬炔基,2-壬炔基,8-壬炔基,1-癸炔基,2-癸炔基和 9-癸炔基。

[0023] 除非另有说明,术语“芳基”是指由碳原子和氢原子组成的芳香环或芳香性的或部分芳香性的环系统。芳基部分可以包括结合或耦合在一起的多个环。芳基部分的实例包括但不限于葱基、奥基、联苯基、茛基、茛满基、茛基、萘基、菲基、苯基、1,2,3,4-四氢萘基和甲苯基。

[0024] 除非另有说明,术语“芳基烷基”或“芳基-烷基”是指结合于烷基部分的芳基部分。

[0025] 除非另有说明,术语“卤素”和“卤代”包括氟、氯、溴、和碘。

[0026] 除非另有说明,术语“杂烷基”是指如下的烷基部分 (例如,直链、支链或环状的),其中所述烷基部分的至少一个碳原子已被替换为杂原子 (例如,N、O 或 S)。

[0027] 除非另有说明,术语“杂烷基芳基”或“杂烷基-芳基”是指结合于芳基部分的杂烷基部分。

[0028] 除非另有说明,术语“杂烷基杂环”或“杂烷基-杂环”是指结合于杂环部分的杂烷基部分。

[0029] 除非另有说明,术语“杂芳基”是指如下的芳基部分,其中所述芳基部分的至少一个碳原子已被替换为杂原子 (例如,N、O 或 S)。其实例包括但不限于吡啶基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并异噻唑基、苯并异噻唑基、苯并喹啉基、苯并噻唑基、苯并噻唑基、呋喃基、咪唑基、吡啶基、异噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噻唑基、2,3-二氮杂萘基、吡嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基 (pyrimidinyl)、嘧啶基 (pyrimidyl)、吡咯基、喹啉基、喹啉基、四唑基、噻唑基和三嗪基。

[0030] 除非另有说明,术语“杂芳基烷基”或“杂芳基-烷基”是指结合于烷基部分的杂芳基部分。

[0031] 除非另有说明,术语“杂环”是指由碳、氢和至少一个杂原子 (例如,N、O 或 S) 组成的芳香性的、部分芳香性的或非芳香性的单环或多环的环或环系统。杂环可以包括耦合或结合在一起的多个环 (即,两个或更多个)。杂环包括杂芳基。其实例包括但不限于苯并 [1,3] 二氧杂环戊烯基,2,3-二氢-苯并 [1,4] 二氧杂芑基,1,2-二氮杂萘基、呋喃基、

乙内酰脲基 (hydantoinyl)、吗啉基、氧杂环丁基、环氧乙烷基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷酮基 (pyrrolidinonyl)、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基和戊内酰胺基 (valerolactamyl)。

[0032] 除非另有说明,术语“杂环烷基”或“杂环-烷基”是指结合于烷基部分的杂环部分。

[0033] 除非另有说明,术语“杂环烷基”是指非芳香性的杂环。

[0034] 除非另有说明,术语“杂环烷基烷基”或“杂环烷基-烷基”是指结合于烷基部分的杂环烷基部分。

[0035] 除非另有说明,术语“LIMK2IC₅₀”是使用以下实施例所述的体外人 LIM 激酶 2 抑制试验测定的化合物的 IC₅₀。

[0036] 除非另有说明,术语“应对”包括预防已经患有具体疾病或病症的患者的所述疾病或病症的再发生,和 / 或延长已经患有所述疾病或病症的患者保持症状缓解的时间。该术语包括调节所述疾病或病症的阈值、发展和 / 或持续时间,或者改变患者对所述疾病或病症作出应答的方式。

[0037] 除非另有说明,术语“可药用盐”是指从可药用的无毒的酸或碱制备的盐,所述可药用的无毒的酸或碱包括无机的酸和碱和有机的酸和碱。适合的可药用碱加成盐包括但不限于由铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌制得的金属盐,或由赖氨酸、N, N' - 二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺 (N- 甲基葡糖胺) 和普鲁卡因制得的有机盐。适合的无毒的酸包括但不限于无机酸和有机酸,例如乙酸、海藻酸、邻氨基苯甲酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸 (ethenesulfonic acid)、甲酸、富马酸、糠酸、半乳糖醛酸、葡糖酸、葡醛酸、谷氨酸、羟基乙酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、双羟萘酸、泛酸、苯基乙酸、磷酸、丙酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、对氨基苯磺酸、硫酸、酒石酸和对甲苯磺酸。具体的无毒的酸包括盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和甲磺酸。因此,具体的盐的实例包括盐酸盐和甲磺酸盐。其它是本领域中公知的。参见,例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18thed. (Mack Publishing, Easton PA :1990) 和 Remington :The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed. (Mack Publishing, Easton PA :1995)。

[0038] 除非另有说明,“有效力的 LIMK2 抑制剂”是指 LIMK2IC₅₀ 低于约 250nM 的化合物。

[0039] 除非另有说明,术语“预防”是指在患者开始患有特定疾病或病症之前发生的作用,其抑制所述疾病或病症或降低其严重程度。换句话说,该术语包括防病 (prophylaxis)。

[0040] 除非另有说明,“预防有效量”的化合物是足以预防疾病或病况、或与所述疾病或病况相关的一种或多种症状、或预防其再发生的量。化合物的“预防有效量”是指治疗剂的量,该治疗剂单独地或与其它药物组合,提供在预防所述疾病方面的预防性益处。术语“预防有效量”可以包括改善总体防病的量或增强另一种预防性药物的预防效力的量。

[0041] 除非另有说明,术语“立体异构混合物”包括外消旋混合物以及立体异构体富集的混合物 (例如, R/S = 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35 和 70/30)。

[0042] 除非另有说明,术语“立体异构体纯”是指包括化合物的一种立体异构体并且基本上不含该化合物的其它立体异构体的组合物。例如,具有一个立构中心的化合物的立体异构体纯的组合物基本上不含该化合物的相反的立体异构体。具有两个立构中心的化合物的立

体异构纯的组合物基本上不含该化合物的其它非对映体。典型的立体异构纯化合物包括大于约 80 重量%的该化合物的一种立体异构体以及低于约 20 重量%的该化合物的其它立体异构体,大于约 90 重量%的该化合物的一种立体异构体以及低于约 10 重量%的该化合物的其它立体异构体,大于约 95 重量%的该化合物的一种立体异构体以及低于约 5 重量%的该化合物的其它立体异构体,大于约 97 重量%的该化合物的一种立体异构体以及低于约 3 重量%的该化合物的其它立体异构体,大于约 99 重量%的该化合物的一种立体异构体以及低于约 1 重量%的该化合物的其它立体异构体。

[0043] 除非另有说明,术语“取代的”在用于描述化学结构或部分时是指该结构或部分的衍生物,其中其一个或多个氢原子被化学部分或官能团代替,所述化学部分或官能团例如但不限于醇、醛、烷氧基、烷酰基氧基、烷氧基羰基、烯基、烷基(例如,甲基、乙基、丙基、叔丁基)、炔基、烷基羰基氧基(-OC(O)烷基)、酰胺(例如-C(O)NH-烷基-、-烷基NHC(O)烷基)、脒基(例如,-C(NH)NH-烷基-、-C(NR)NH₂)、胺(伯胺、仲胺和叔胺,例如烷基氨基、芳基氨基、芳基烷基氨基)、芳酰基、芳基、芳基氧基、偶氮基、氨基甲酰基(carbamoyl)(例如,-NHC(O)O-烷基-、-OC(O)NH-烷基)、氨基甲酰基(carbamy1)(例如,CONH₂、CONH-烷基、CONH-芳基、CONH-芳基烷基)、羰基、羧基、羧酸、羧酸酐、羧酰氯、氰基、酯、环氧化物、醚(例如,甲氧基、乙氧基)、胍基、卤代、卤代烷基(例如,-CCl₃、-CF₃、-C(CF₃)₃)、杂烷基、半缩醛、亚胺(伯亚胺和仲亚胺)、异氰酸酯、异硫氰酸酯、酮、腈、硝基、氧代、磷酸二酯、硫化物、磺酰胺基(例如,SO₂NH₂)、砜、磺酰基(包括烷基磺酰基、芳基磺酰基和芳基烷基磺酰基)、亚砜、硫醇(例如,巯基、硫醚)和脲(例如,-NHCONH-烷基-)。

[0044] 除非另有说明,化合物的“治疗有效量”是足以在疾病或病况的治疗或应对中提供治疗性益处、或延迟与所述疾病或状况有关的一种或多种症状或使之最小化的量。化合物的“治疗有效量”是指治疗剂的量,其单独地或与其它疗法组合,提供在治疗或应对所述疾病或病况方面的治疗性益处。术语“治疗有效量”可以包括改善疾病或病况的总体治疗、减少或避免其症状或病因、或增强另一种治疗剂的治疗效力的量。

[0045] 除非另有说明,术语“治疗”是指在患者患有特定疾病或病症的同时发生的作用,其降低所述疾病或病症的严重程度,或延迟或延缓所述疾病或病症的进展。

[0046] 除非另有说明,术语“包括”具有与单数或复数的“包括但不限于”相同的含义。类似地,术语“例如”具有与术语“例如但不限于”相同的含义。

[0047] 除非另有说明,在一系列名词前面紧接着的一个或多个形容词被认为是修饰每个名词。例如,短语“任选地被取代的烷基、芳基、或杂芳基”具有与“任选地被取代的烷基、任选地被取代的芳基、或任选地被取代的杂芳基”相同的含义。

[0048] 需要指出的是,形成更大化合物的一部分的化学部分在本文中可以用其作为单个分子的名称或通常用于记录其游离基的名称来描述。例如,术语“吡啶”和“吡啶基”在用于描述连接于其它化学部分的基团时具有相同的含义。因此,两个短语“XOH,其中X是吡啶基”和“XOH,其中X是吡啶”具有相同的含义,并且都包括化合物吡啶-2-醇、吡啶-3-醇、吡啶-4-醇。

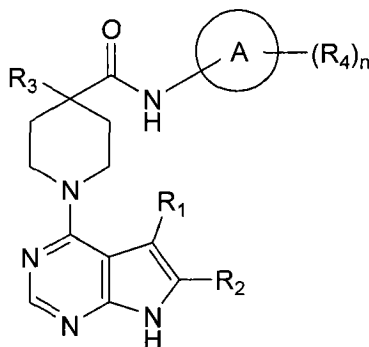
[0049] 需要指出的是,如果结构或结构的一部分的立体化学没有用例如粗体或虚线表示,则该结构或该结构部分被解释为包括其所有的立体异构体。此外,图中表示的具有不饱和和化合价的任何原子都被假定为连接于足够的氢原子,以满足其化合价。另外,用一个实线

与一个虚线平行表示的化学键包括单键和双键（例如，芳香族的），如果化合价允许。

[0050] 化合物

[0051] 本发明包括下式的化合物：

[0052]



[0053] 及其可药用盐，其中：A 为任选地被取代的芳基或杂环； R_1 为氢，卤素，氰基或任选地被取代的烷基，杂烷基，芳基或杂环； R_2 为氢，卤素，氰基，或任选地被取代的烷基，杂烷基，芳基或杂环； R_3 为 R_{3A} ， OR_{3B} ， $N(R_{3B})_2$ ， $NC(O)R_{3B}$ ， $NC(O)OR_{3B}$ ， $NC(O)N(R_{3B})_2$ ， SR_{3B} ， SOR_{3B} 或 SO_2R_{3B} ；每个 R_{3A} 为氰基， $C(O)R_{3C}$ ， CO_2R_{3C} ， $CON(R_{3C})_2$ ，或任选地被取代的烷基，烷基芳基，烷基杂环，芳基，杂烷基，杂烷基芳基，杂烷基杂环或杂环；每个 R_{3B} 独立地为氢， $C(O)R_{3C}$ ， CO_2R_{3C} ， $CON(R_{3C})_2$ ，或任选地被取代的烷基，杂烷基，芳基或杂环；每个 R_{3C} 独立地为任选地被取代的烷基，芳基或杂环；每个 R_4 独立地为氢，卤素， OR_{4B} ， $OC(O)R_{4B}$ ， $OC(O)N(R_{4B})_2$ ， $N(R_{4B})_2$ ， $NC(O)R_{4A}$ ， $NC(O)OR_{4A}$ ， $NC(O)N(R_{4A})_2$ ， SR_{4B} ， SOR_{4B} 或 SO_2R_{4B} ，或任选地被取代的烷基，杂烷基，芳基或杂环；每个 R_{4B} 独立地为氢或任选地被取代的烷基，杂烷基，芳基或杂环；和 n 为 0-3。

[0054] 在具体的实施方案中，所述化合物使得：1) 每个 R_{4A} 独立地为氢或任选地被取代的烷基或杂烷基；和 2) 在 R_1 和 R_2 都是氢和 A 为苯基时， R_4 不是卤素。

[0055] 在一个实施方案中，A 为任选地被取代的苯基。在另一个实施方案中，A 为任选地被取代的杂环。

[0056] 在一个实施方案中， R_1 为氢，卤素，氰基或任选地被取代的低级烷基。在具体的实施方案中， R_1 为氢。在另一个实施方案中， R_1 为卤素（例如，氯）。在另一个实施方案中， R_1 为任选地被取代的低级烷基（例如，甲基）。

[0057] 在一个实施方案中， R_2 为氢，卤素，氰基或任选地被取代的低级烷基。在具体的实施方案中， R_2 为氢。在另一个实施方案中， R_2 为卤素（例如，氯）。在另一个实施方案中， R_2 为任选地被取代的低级烷基（例如，甲基）。

[0058] 在一个实施方案中， R_3 为 R_{3A} ， OR_{3B} 或 $N(R_{3B})_2$ 。在具体的实施方案中， R_3 为 R_{3A} ，并且 R_{3A} 为任选地被取代的烷基，烷基杂环，杂烷基或杂环。在一个具体的实施方案中， R_{3A} 为任选地被取代的烷基。在另一个实施方案中， R_{3A} 为任选地被取代的烷基杂环。在另一个实施方案中， R_{3A} 为任选地被取代的杂烷基。在另一个实施方案中， R_{3A} 为任选地被取代的杂环。在具体的实施方案中， R_3 为 OR_{3B} 或 $N(R_{3B})_2$ ，并且 R_{3B} 为氢或任选地被取代的烷基或芳基。在一个具体的实施方案中， R_{3B} 为氢。在另一个实施方案中， R_{3B} 为任选地被取代的烷基。在另一个实施方案中， R_{3B} 为任选地被取代的芳基。

[0059] 在一个实施方案中， R_4 为卤素。在另一个实施方案中， R_4 为 $OC(O)N(R_{4A})_2$ 并且至少一个 R_{4A} 为例如低级烷基（例如，甲基）。

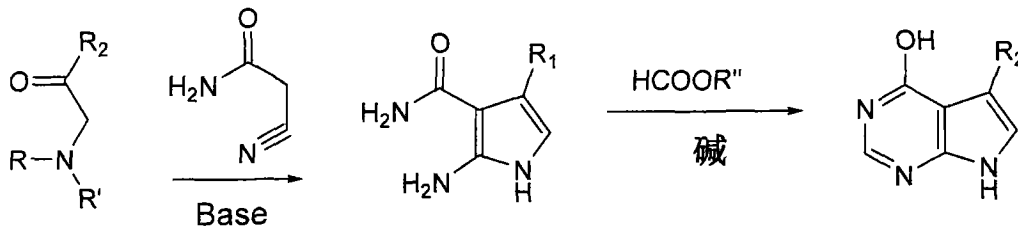
[0060] 本发明的特定的化合物是有效的 LIMK2 抑制剂。某些化合物具有低于约 100, 75, 50, 25 或 10nM 的 LIMK2IC₅₀。

[0061] 合成方法

[0062] 本发明的化合物可以通过本领域已知的方法制备。参见, 例如, 美国专利公开 2004/0058922 和 2005/0130954。

[0063] 吡咯并嘧啶类可以通过本领域中已知的多种方法来制备。参见, 例如, West, *J. Org. Chem.* 26 :4959 (1961) ;Aono 等人, EP 0733633-B1. 一个方法描述在 2007 年 10 月 22 日提交的美国专利申请 11/876, 051 中, 并且表示在以下反应路线 1 中:

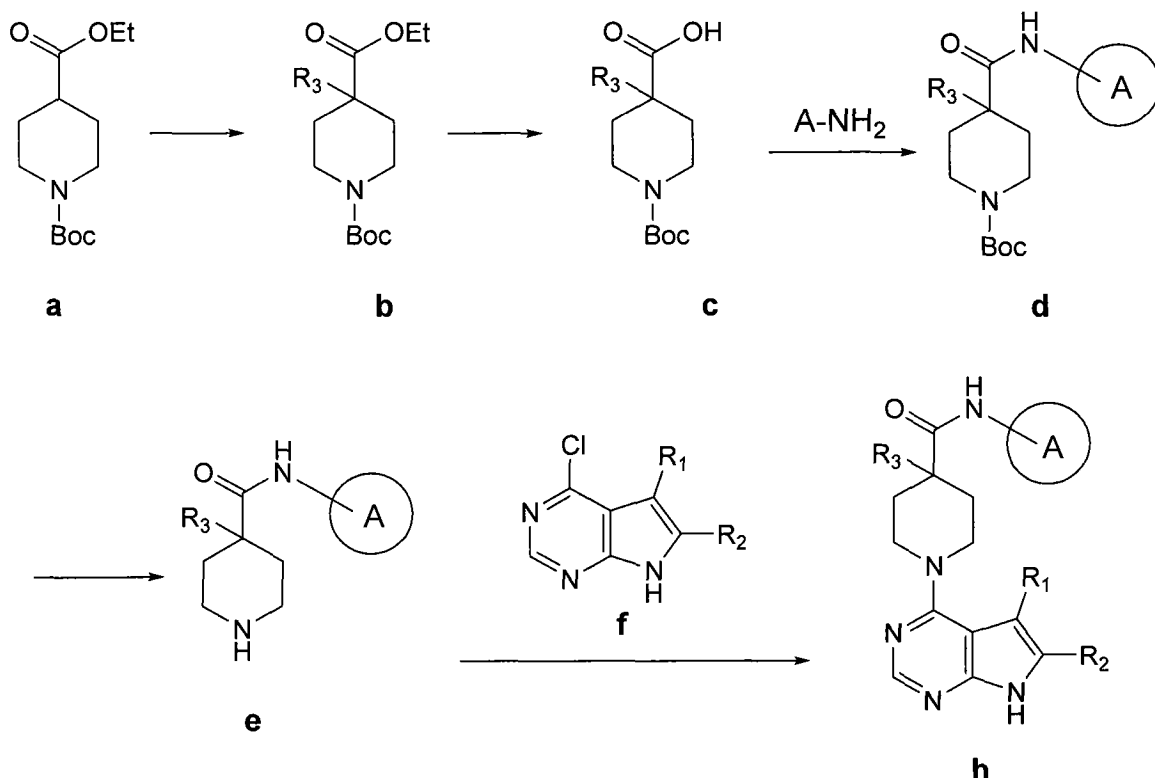
[0064]



[0065] 反应路线 1

[0066] 然后使用本领域已知的方法将得到的 4-羟基吡咯并 [2,3-d] 嘧啶化合物转化为相应的 4-氯化物 (以下反应路线 2 中的化合物 f)。参见, 例如, West, *J. Org. Chem.* 26 : 4959 (1961)。然后将所述化合物用于制备本发明的化合物, 如以下反应路线 2 中所示:

[0067]



[0068] 反应路线 2

[0069] 在反应路线 2 所示的方法中, 市售的哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (a) 用适合的碱 (例如, 二异丙基氨基锂) 和烷基化试剂 (例如, 烷基溴化物或氯化物) 烷基化, 得到化合物 b。其它的式 b 化合物为市售的。化合物 b 用碱例如 LiOH 或 NaOH 水溶液皂化,

得到羧酸 c, 用适合的试剂 (例如, HATU 与二异丙基乙基胺在乙酸异丙酯中) 使其与式 NH_2A 的胺偶联, 得到酰胺 d。用适合的酸 (例如, 含 HCl 的 MeOH 或含 TFA 的 CH_2Cl_2) 处理化合物 d 除去 Boc 基团, 得到胺 e。将胺 e 和氯化物 f 与适合的碱 (例如, 二异丙基乙基胺) 在适合的溶剂 (例如, 异丙醇、异丁醇) 中加热, 得到化合物 h。如果需要, 可以使用已知的方法将化合物转化为被本发明所涵盖的多种其它化合物。

[0070] 用法

[0071] 本发明包括抑制 LIMK2 的方法, 包括使 LIMK2 接触有效力的 LIMK2 抑制剂。优选的有效力的 LIMK2 抑制剂是本发明的化合物 (即, 本文中公开的化合物)。

[0072] 特定的实施方案包括治疗、应对或预防患者的炎性疾病或病症的方法, 其包括对此需要的患者给予治疗或预防有效量的本发明的化合物。

[0073] 另一个实施方案包括治疗、应对或预防患者的癌症的方法, 其包括对此需要的患者给予治疗或预防有效量的本发明的化合物。

[0074] 另一个实施方案包括降低患者的眼内压的方法, 其包括抑制有此需要的患者中的 LIMK2 活性或表达。在一个方法中, LIMK2 活性是通过使患者的眼睛接触有效力的 LIMK2 抑制剂来抑制的。特定的有效力的 LIMK2 抑制剂在本文中公开。在另一个方法中, LIMK2 表达是通过对患者的眼睛给予抑制 LIMK2 表达的化合物 (例如, siRNA) 来抑制的。

[0075] 另一个实施方案包括治疗、应对或预防影响患者视力的疾病或病症的方法, 包括抑制有此需要的患者中的 LIMK2 活性或表达。在一个方法中, LIMK2 活性是通过使患者的眼睛接触有效力的 LIMK2 抑制剂来抑制的。特定的有效力的 LIMK2 抑制剂在本文中公开。影响视力的疾病和病症包括青光眼、神经变性疾病和感染性疾病。

[0076] 药制剂

[0077] 本发明包括药学组合物, 所述药学组合物包括一种或多种本发明的化合物。某些药学组合物是单个的单位剂型, 适合于经口给药、粘膜给药 (例如, 鼻、舌下、阴道、颊或直肠)、非肠道给药 (例如, 皮下、静脉内、快速浓注、肌肉内或动脉内)、透皮给药、局部给药和眼科给药 (例如, 局部, 玻璃体内) 对患者给药。

[0078] 剂型的实例包括但不限于: 片剂; 囊片 (caplets); 胶囊, 例如软的弹性明胶胶囊; 扁囊剂 (cachets); 锭剂 (troches); 菱形剂 (lozenges); 分散剂; 栓剂; 膏剂; 热敷剂 (泥罨剂 (poultices)); 糊剂; 粉剂; 敷料; 霜剂; 贴膏剂 (plasters); 溶液; 贴剂; 气雾剂 (例如, 鼻喷雾剂或吸入剂); 凝胶剂; 适于口服或粘膜给药至患者的液体剂型, 包括悬浮液 (例如, 含水或非水的液体悬浮液、水包油乳剂、或油包水液体乳剂)、溶液剂、和酞剂; 适于对患者非肠道给药的液体剂型; 和可以重构以提供适于对患者非肠道给药的液体剂型的无菌固体 (例如, 结晶或无定形的固体)。

[0079] 所述制剂应该适合给药方式。例如, 口服给药需要肠溶包衣以保护本发明的化合物免于在胃肠道内降解。类似地, 制剂可以包含便于将活性成分递送到作用部位的成分。例如, 可以将化合物在脂质体制剂中给药, 以便保护它们免于降解性酶的影响, 便于转运到循环系统中, 和实现跨细胞膜递送到细胞内位置。

[0080] 剂型的组成、形状和类型随其应用的不同而不同。例如, 用于疾病的急性治疗的剂型可以包含与用于相同疾病的慢性治疗的剂型相比为更大量的一种或多种活性成分。类似地, 非肠道剂型可以包含与用于治疗相同疾病的口服剂型相比为较小量的一种或多种活

性成分。其中被本发明所涵盖的具体剂型彼此不同的这些和其它方式对于本领域技术人员来说是显而易见的。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing, Easton PA :1990)。

[0081] 口服剂型

[0082] 适于经口给药的本发明的药学组合物可以作为离散的剂型存在,例如但不限于片剂(例如,咀嚼片)、囊片、胶囊、和液体(例如,调味糖浆剂)。这种剂型包含预定量的活性成分,并且可以通过本领域技术人员公知的制剂方法来制备。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing, Easton PA :1990)。

[0083] 典型的经口给药剂型是根据常规的药学混合技术将活性成分与至少一种赋形剂合并为紧密的混合物来制备的。赋形剂可以根据期望用于给药的制备物形式的不同而采取不同的形式。

[0084] 由于容易给药,片剂和胶囊代表了最有利的口服剂型单位形式。如果需要,片剂可以用标准的含水或非水技术进行包衣。这种剂型可以通过制剂领域的常规方法来制备。通常,药学组合物和剂型是如下制备的:将活性成分与液体载体、细分散的固体载体、或其二者均匀地和紧密地混合,然后如有必要将产物成形为所需的形式。可以将崩解剂并入到固体剂型中,以促进迅速的溶出。还可以并入润滑剂,以便于剂型(例如,片剂)的生产。

[0085] 非肠道剂型

[0086] 非肠道剂型可以通过多种途径对患者给药,所述途径包括但不限于皮下、静脉内(包括快速浓注)、肌肉内和动脉内。因为它们的给药典型地绕过了患者对污染物的天然防卫机制,因此非肠道剂型特别地是无菌的或在对患者给药之前能够进行灭菌。非肠道剂型的实例包括但不限于准备用于注射的溶液、准备用于溶解或悬浮在注射用可药用媒介物中的干产物、准备用于注射的悬浮液、和乳剂。

[0087] 可以用于提供本发明的非肠道剂型的适合的媒介物是本领域技术人员公知的。其实例包括但不限于:注射用水 USP;含水的媒介物,例如但不限于氯化钠注射液、林格溶液、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液、和乳酸盐林格溶液;可与水混合的媒介物例如但不限于乙醇、聚乙二醇和聚丙二醇;和非水的媒介物,例如但不限于玉米油、棉子油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。

[0088] 透皮剂型、局部剂型和粘膜剂型

[0089] 透皮、局部和粘膜剂型包括但不限于眼用溶液、喷雾剂、气雾剂、霜剂、洗液、膏剂、凝胶剂、溶液、乳剂、悬浮剂或本领域技术人员已知的其它形式。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing, Easton PA :1990); 和 Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4th ed. (Lea&Febiger, Philadelphia : 1985)。透皮剂型包括“储库型”或“基质型”贴剂,可以将其施用于皮肤并且佩戴特定的时间,以允许渗透所需量的活性成分。

[0090] 可以用于提供透皮、局部和粘膜剂型的适合的赋形剂(例如,载体和稀释剂)和其它材料是药学领域技术人员公知的,并且随着要施用给定药学组合物或剂型的特定组织的不同而不同。

[0091] 根据要治疗的特定组织的不同而异,可以在用本发明的活性成分治疗之前、与同时、或之后使用另外的组分。例如,可以使用渗透增强剂来帮助将活性成分递送到组织。

[0092] 还可以调节药学组合物或剂型的 pH 或要被施加所述药学组合物或剂型的组织的 pH, 以改善一种或多种活性成分的递送。类似地, 可以调节溶剂载体的极性、其离子强度、或张力, 以改善递送。还可以将化合物例如硬脂酸酯加入到药学组合物或剂型中, 用于有利地改变一种或多种活性成分的亲水性或亲油性, 以便改善递送。在这个方面, 硬脂酸酯可以用作制剂的脂质媒介物、作为乳化剂或表面活性剂, 以及作为递送增强剂或渗透增强剂。可以使用活性成分的不同盐、水合物或溶剂合物来进一步调节所得组合物的性质。

[0093] 眼科用剂型

[0094] 可以使用含水溶液、含水悬浮液、和膏剂将本发明的化合物递送到眼睛 (例如, 局部递送)。如本领域技术人员知道的, 眼科用产品在其最终的容器中必须是无菌的, 以防止眼睛的微生物污染。一旦已经打开, 可以使用防腐剂来保持无菌。眼科用制剂还要求控制制剂的 pH、缓冲容量、粘度和张力。优选的制剂具有约 6.5-8.5 的 pH, 约 0.01-0.1 的缓冲容量。特别的制剂是等渗的。特别的制剂具有约 25-50cps 的粘度。

[0095] 可以提供用于有效地将活性药物成分 (API) 递送到其作用部位的安全媒介物的成分是公知的, 但是根据 API 的物理和化学特性的不同而异。

[0096] 经过适当缓冲的含水溶剂可用于递送水溶性化合物。在溶液组合物中, 聚合物成分典型地用于增加组合物的粘度。适合的聚合物的实例包括纤维素聚合物 (例如, 羟基丙基甲基纤维素、羟基乙基纤维素、乙基羟基乙基纤维素)、合成聚合物 (例如, 羧乙烯基聚合物、聚乙烯醇)、聚糖 (例如, 黄原胶、瓜尔豆胶和右旋糖酐)、及其混合物。参见, 例如, 美国专利 4, 136, 173 和 7, 244, 440。悬浮液也可以用于递送化合物。聚合物成分典型地在悬浮液组合物中用作物理稳定性助剂, 用于帮助保持不溶性成分悬浮或可容易地再分散。出处同前。

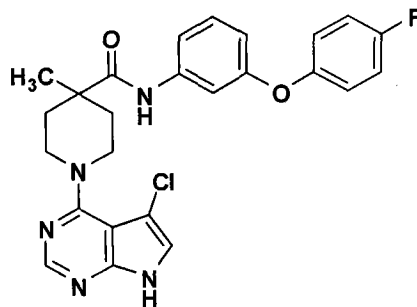
[0097] 防腐剂可用于确保制剂是无菌的。适合的防腐剂包括苯扎氯铵、苄索氯铵、氯丁醇、乙酸苯基汞、硫柳汞、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。并且抗氧化剂用来确保容易氧化的制剂的稳定性。适合的抗氧化剂包括乙二胺四乙酸、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠和硫脲。

实施例

[0098] 可以从以下实施例来理解本发明的各个方面, 但不用于限制本发明的范围。

[0099] 实施例 1: 1-(5-氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)-N-(3-(4-氟苯氧基)苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺的合成

[0100]



[0101] A. 4-(3-(4-氟苯氧基)苯基氨基甲酰基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制

备。将 1-(叔丁氧羰基)-4-甲基哌啶-4-甲酸 (243mg, 1.0mmol), 3-(4-氟苯氧基) 苯胺 (203mg, 1.0mmol), DCC (206mg, 1.0mmol), 和 HOAt (138mg, 1.01mmol) 合并于 EtOAc (50mL) 和 DMF (5mL) 中, 将反应混合物在 80°C 加热 20 小时。将大部分的 EtOAc 蒸发掉, 产生固体的沉淀, 通过过滤将其除去。滤液用 EtOAc 稀释, 用 1N HCl 水溶液、水和盐水洗涤, 干燥, 并且真空浓缩, 得到标题化合物。MS (ES+) [M+H]⁺ = 429。

[0102] B. N-(3-(4-氟苯氧基) 苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺的制备。 将得自步骤 A 的 4-(3-(4-氟苯氧基) 苯基氨基甲酰基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁基酯用含 4N HCl 的二氧杂环己烷在室温处理 16 小时。通过过滤分离产物并用乙醚洗涤, 得到标题化合物 (206mg, 两步收率 56%), 为盐酸盐。MS (ES+) [M+H]⁺ = 329。

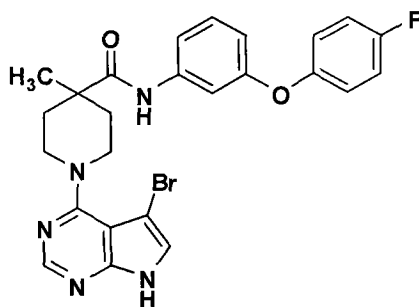
[0103] C. 4,5-二氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉的制备。 向 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉 (154mg, 1.0mmol) 的 CH₂Cl₂ (6mL) 溶液中加入 NCS (134mg, 1.0mmol)。将反应混合物回流 18 小时, 过滤, 并且真空浓缩, 得到标题化合物, 将其以粗品形式用于下一步。MS (ES+) [M+H]⁺ = 189。

[0104] D. 1-(5-氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)-N-(3-(4-氟苯氧基) 苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺的制备。 将得自步骤 B 的 N-(3-(4-氟苯氧基) 苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺 (50mg, 0.13mmol), 4,5-二氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉得自步骤 C (19mg, 0.1mmol), 和三乙胺 (0.04mL, 0.3mmol) 合并于异丙醇 (1mL) 中并在微波条件下在 130°C 加热 30 分钟。通过制备性 HPLC 分离产物, 得到标题化合物。

[0105] ¹H NMR (CD₃OD) : δ 8.22 (s, 1H), 7.30-7.35 (m, 4H), 7.03-7.14 (m, 4H), 6.73-6.76 (m, 1H), 3.96-4.02 (m, 2H), 3.44-3.51 (m, 2H), 2.35-2.38 (m, 2H), 1.74-1.81 (m, 2H), 1.38 (s, 3H); MS (ES+) [M+H]⁺ = 480。

[0106] 实施例 2: 1-(5-溴-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)-N-(3-(4-氟苯氧基) 苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺的合成

[0107]



[0108] A. 5-溴-4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉的制备。 向 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉 (1.2g, 7.8mmol) 的 CH₂Cl₂ (25mL) 溶液中加入含 N-溴乙酰胺 (1.2g, 8.7mmol) 的 CH₂Cl₂ (25mL)。将反应混合物回流 40 分钟, 然后浓缩并用冷水洗涤。粗的物质从最小量的异丙醇中重结晶并且真空干燥, 得到标题化合物 (82%), 为浅灰色固体。MS (ES+) [M+H]⁺ = 232。

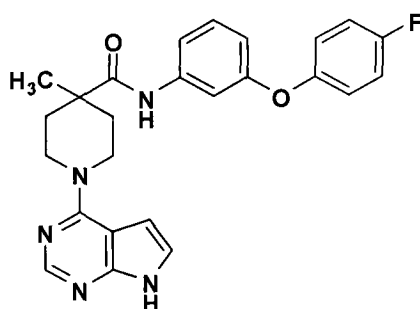
[0109] B. 1-(5-溴-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)-N-(3-(4-氟苯氧基) 苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺的制备。 向得自实施例 1 步骤 B 的 N-(3-(4-氟苯氧基) 苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺 (36mg, 0.1mmol) 的异丙醇 (1mL) 溶液中加入得自步骤 A 的 5-溴-4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉 (24mg, 0.1mmol) 和三乙胺 (0.04mL, 0.3mmol)。将

反应混合物在微波条件下在 100℃加热 10 分钟,然后真空浓缩。产物通过制备性 HPLC 分离,得到标题化合物。

[0110] ^1H NMR(CD_3OD) : δ 8.21 (s, 1H), 7.22-7.35 (m, 4H), 6.98-7.17 (m, 4H), 6.72-6.77 (m, 1H), 3.84-3.95 (m, 2H), 3.32-3.51 (m, 2H), 2.30-2.40 (m, 2H), 1.72-1.85 (m, 2H), 1.38 (s, 3H); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 525$ 。

[0111] 实施例 3 :N-(3-(4-氟苯氧基)苯基)-4-甲基-1-(7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺的合成

[0112]

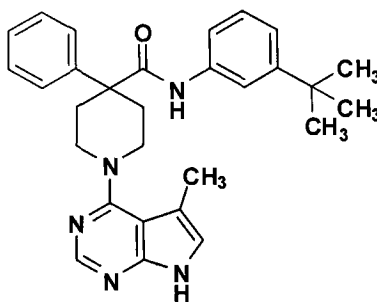


[0113] 向得自实施例 1 步骤 B 的 N-(3-(4-氟苯氧基)苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺 (20mg, 0.05mmol) 的异丙醇 (1mL) 溶液中加入 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑 (15mg, 0.1mmol) 和三乙胺 (0.04mL, 0.3mmol)。将反应混合物在微波条件下在 180℃加热 30 分钟,然后真空浓缩。产物通过制备性 HPLC 分离,得到标题化合物。

[0114] ^1H NMR(CD_3OD) : δ 8.01 (s, 1H), 7.18-7.23 (m, 3H), 6.91-7.16 (m, 5H), 6.65-6.68 (d, 1H), 6.51-6.53 (d, 1H), 4.12-4.25 (m, 2H), 3.351-3.62 (m, 2H), 2.13-2.28 (m, 2H), 1.50-1.60 (m, 2H), 1.25 (s, 3H); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 447$ 。

[0115] 实施例 4 :N-(3-叔丁基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)-4-苯基哌啶-4-甲酰胺的合成

[0116]



[0117] A. 4-苯基哌啶-4-甲酸的制备。将 1-(叔丁氧羰基)-4-苯基哌啶-4-甲酸 (1.0g, 3.3mmol) 在室温用含 4N HCl 的二氧杂环己烷 (20mL) 处理 2 小时。产物通过过滤分离,得到标题化合物 (0.74g, 93%), 为白色固体。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 206$ 。

[0118] B. 1-(5-甲基-4,7-二氢-3H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)-4-苯基哌啶-4-甲酸的制备。向得自步骤 A 的 4-苯基哌啶-4-甲酸 (0.74g, 3.1mmol) 的异丙醇 (10mL) 溶液中加入 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑 (0.52g, 3.1mmol) 和三乙胺 (1.0mL, 9.8mmol)。将反应混合物在微波条件下在 180℃加热 180 分钟,然后真空浓缩。将残余物溶解于冰水中并且通过加入 1N HCl 水溶液中和到 pH 4。通过过滤分离产物并且在 65℃真空

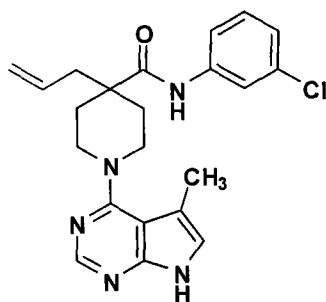
干燥 3 小时,得到标题化合物 (62%),为棕色固体。MS (ES+) $[M+H]^+ = 336$ 。

[0119] C. N-(3-叔丁基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-苯基哌啶-4-甲酰胺的制备。向得自步骤 B 的 1-(5-甲基-4,7-二氢-3H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-苯基哌啶-4-甲酸 (33mg, 0.1mmol) 的 DMF (2mL) 溶液中加入 3-叔丁基苯胺 (15mg, 0.1mmol), BOP (50mg, 0.11mmol) 和三乙胺 (0.04mL, 0.3mmol)。将反应混合物在室温搅拌 20 小时,并将酰胺产物通过制备性 HPLC 分离,得到标题化合物。

[0120] $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) : δ 8.20 (s, 1H), 7.16-7.57 (m, 9H), 7.01 (s, 1H), 3.90-3.94 (d, 2H), 3.45-3.52 (t, 2H), 2.73-2.78 (d, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.28-2.35 (t, 2H), 1.30 (s, 9H); MS (ES+) $[M+H]^+ = 468$ 。

[0121] 实施例 5: 4-烯丙基-N-(3-氯苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺的合成

[0122]



[0123] A. 4-烯丙基-4-(3-氯苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。在 N_2 的气氛下,将 4-烯丙基-1-(叔丁氧羰基)哌啶-4-甲酸 (0.158g, 0.586mmol), 吡啶 (0.189mL, 2.34mmol), 和 DMF (3 滴) 溶解于 CH_2Cl_2 (10mL) 中并在冰浴中冷却。向冷却的溶液中滴加草酰氯 (0.056mL, 0.645mmol)。将反应搅拌 40 分钟,之后加入 3-氯苯胺 (0.061mL, 0.586mmol)。将反应从冰浴中取出并在室温搅拌过夜。粗的反应用 1N HCl 水溶液和盐水洗涤,用 MgSO_4 干燥,并且真空浓缩。残余物硅胶色谱法纯化 (乙酸乙酯/己烷梯度),以 51% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[M+H]^+ = 379$ 。

[0124] B. 4-烯丙基-N-(3-氯苯基)哌啶-4-甲酰胺的制备。向得自步骤 A 的 4-烯丙基-4-(3-氯苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (0.172g, 0.453mmol) 的 MeOH (10mL) 溶液中加入含 4M HCl 的二氧杂环己烷 (0.340mL, 1.36mmol)。将反应在 50°C 加热 30 分钟,然后真空浓缩,再溶解于 MeOH 并且再浓缩两次,得到标题化合物,为盐酸盐。MS (ES+) $[M+H]^+ = 279$ 。

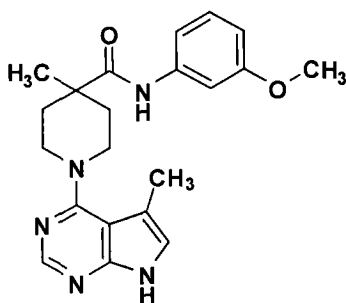
[0125] C. 4-烯丙基-N-(3-氯苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺的制备。将得自步骤 B 的 4-烯丙基-N-(3-氯苯基)哌啶-4-甲酰胺 (0.142g, 0.453mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (0.075g, 0.453mmol), N, N-二异丙基乙基胺 (0.236mL, 1.35mmol), 和异丙醇 (5mL) 合并并在压力管中在 120°C 加热过夜。将粗的反应溶解于 CH_2Cl_2 , 用 H_2O 和盐水洗涤,用 MgSO_4 干燥,并且真空浓缩。残余物通过硅胶色谱法纯化 (MeOH : CH_2Cl_2 梯度),以 61% 收率得到标题化合物。

[0126] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD) ppm 8.19 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H), 7.32 (t, $J = 8, 16\text{Hz}$, 1H), 7.14 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H), 7.00 (s, 1H), 5.78-5.88 (m, 1H), 5.11-5.16 (m, 2H), 3.91 (d, $J = 13.6\text{Hz}$, 2H), 3.24-3.30 (m, 2H), 2.50 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H),

2.45(s, 3H), 2.41(d, J = 13.6Hz, 2H), 1.80-1.86(m, 2H); MS(ES+) [M+H]⁺ = 410。

[0127] 实施例6: N-(3-甲氧基苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺的合成

[0128]



[0129] A. 4-甲基哌啶-4-甲酸的制备。将1-(叔丁氧羰基)-4-甲基哌啶-4-甲酸(0.500g, 2.06mmol)用含4M HCl的二氧杂环己烷(10mL)在室温处理2小时,得到标题化合物(0.294g, 100%),为盐酸盐。MS(ES+) [M+H]⁺ = 144.0。

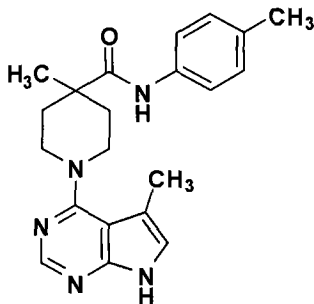
[0130] B. 4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4yl)-哌啶-4-甲酸的制备。向4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑(0.274g, 1.64mmol)的异丙醇(10mL)溶液中加入得自步骤A的4-甲基哌啶-4-甲酸盐盐酸盐(0.294g, 1.64mmol)和三乙胺(0.654mL, 4.92mmol)。将反应在微波条件下加热到180℃,保持1小时,浓缩,聚集在冰水中,并且用6N HCl水溶液中和到pH 3,以使产物沉淀。通过过滤收集产物并且真空干燥过夜,得到标题化合物(0.42g, 75%),为灰色固体。MS(ES+) [M+H]⁺ = 275.2。

[0131] C. N-(3-甲氧基苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺的制备。向得自步骤B的4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4yl)-哌啶-4-甲酸(0.020g, 0.073mmol)的DMF(1mL)溶液中加入BOP试剂(0.065g, 0.15mmol),三乙胺(0.019mL, 0.15mmol),和3-甲氧基苯胺(0.012mL, 0.11mmol)。将反应搅拌过夜,然后真空浓缩。残余物通过制备性HPLC纯化,得到标题化合物(0.091g, 33%)。

[0132] ¹H NMR(CD₃OD): δ 8.07(1H, bs), 7.00-7.17(3H, m), 6.89(1H, s), 6.58-6.61(1H, m), 3.62-3.72(5H, m), 3.22-3.34(2H, m), 2.12-2.33(5H, m), 1.62-1.71(2H, m), 1.29(3H, s); MS(ES+) [M+H]⁺ = 380.1。

[0133] 实施例7: 4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)-N-对-甲苯基哌啶-4-甲酰胺的合成

[0134]



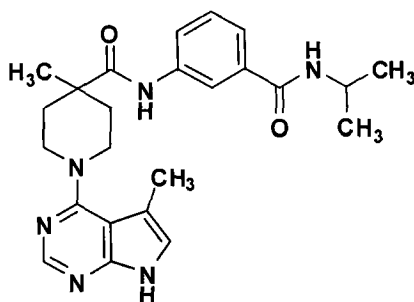
[0135] 向得自实施例6步骤B的4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4yl)-哌啶-4-甲酸(0.020g, 0.073mmol)的DMF(1mL)溶液中加入BOP试剂(0.065g, 0.15mmol),三

乙胺 (0.019mL, 0.15mmol), 和 4-甲基苯胺 (0.012mL, 0.11mmol)。将反应搅拌过夜并且真空浓缩。残余物通过制备性 HPLC 纯化, 得到标题化合物 (0.0133g, 50%)。

[0136] $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 8.07 (1H, bs), 7.31 (2H, $J = 8.4\text{Hz}$, d), 7.04 (2H, $J = 8.4\text{Hz}$, d), 6.89 (1H, s), 3.68-3.73 (2H, m), 3.21-3.44 (2H, m), 2.21-2.33 (8H, m), 1.62-1.71 (2H, m), 1.29 (3H, s); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 364.2$ 。

[0137] 实施例 8: N-(3-(异丙基氨基甲酰基)苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺的合成

[0138]

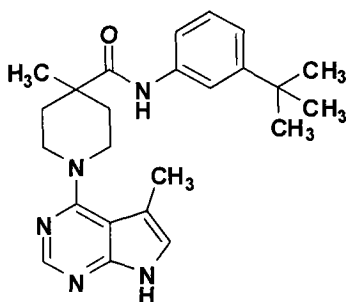


[0139] 向得自实施例 6 步骤 B 的 4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-哌啶-4-甲酸 (0.030g, 0.11mmol) 的 DMF (1mL) 溶液中加入 HATU (0.042g, 0.11mmol), 三乙胺 (0.028mL, 0.22mmol) 和 3-氨基-N-异丙基-苯甲酰胺 (0.029mg, 0.17mmol)。将反应在 50°C 搅拌 48 小时并且真空浓缩。残余物通过制备性 HPLC 纯化, 得到标题化合物 (0.023g, 48%)。

[0140] $^1\text{HNMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 8.19 (1H, s), 7.99 (1H, m), 7.7-7.72 (1H, m), 7.56-7.58 (1H, m), 7.41-7.43 (1H, $J = 8\text{Hz}$ 和 15.6Hz , dd), 7.00 (1H, $J = 0.8\text{Hz}$, d), 4.20-4.23 (1H, m), 3.79-3.85 (2H, m), 3.36-3.46 (2H, m), 2.38-2.44 (5H, m), 1.76-1.83 (2H, m), 1.42 (3H, s), 1.268 (6H, $J = 6.8\text{Hz}$, d); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 435$ 。

[0141] 实施例 9: N-(3-叔丁基苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺的合成

[0142]



[0143] A. 4-(3-叔丁基苯基氨基甲酰基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。 向 1-(叔丁氧羰基)-4-甲基哌啶-4-甲酸 (0.30g, 1.2mmol), DMF (20 滴), 和吡啶 (0.38g, 4.8mmol) 的二氯乙烷 (10mL) 溶液中加入草酰氯 (0.15g, 1.2mmol)。将混合物搅拌 40 分钟, 并且加入 3-叔丁基苯胺。将混合物搅拌 1 小时, 用二氯甲烷稀释, 分别用饱和 NaHCO_3 水溶液和 1.0N HCl 水溶液洗涤两次, 用 MgSO_4 干燥, 并且浓缩。硅胶色谱纯化 (0-2% MeOH : CH_2Cl_2), 以 61% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 375$ 。

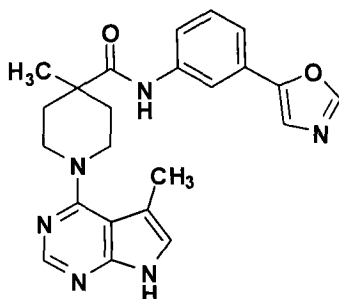
[0144] B. N-(3-叔丁基苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺的制备。得自步骤 A 的 4-(3-叔丁基苯基氨基甲酰基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (0.4g, 1.07mmol) 用 HCl (4.0N, 在二氧杂环己烷中, 1.3mL, 5.34mmol) 在甲醇 (5.0mL) 中在 50℃ 处理 30 分钟。将混合物浓缩, 以定量的收率得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[M+H]^+ = 275$ 。

[0145] C. N-(3-叔丁基苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺。将得自步骤 B 的 N-(3-叔丁基苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺 (0.33g, 1.07mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉 (0.18g, 1.07mmol), N,N-二异丙基乙基胺 (0.69g, 5.34mmol), 和异丙醇 (7mL) 合并并在压力级密封管中并在 100℃ 加热 18 小时。将混合物浓缩并且聚集在二氯甲烷中, 从中收集沉淀物 (0.18g)。将溶液色谱纯化 (SiO_2 , 0-2% MeOH : CH_2Cl_2), 并将过柱的物质 (0.15g) 与沉淀物合并并且在 60℃ 溶解于甲醇 (15mL)。加入水 (5.0mL), 并将混合物冷却。将得到的沉淀物过滤, 用水洗涤, 并且干燥, 以 50% 收率得到标题化合物。

[0146] 1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) ppm 11.51 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.22 (t, $J = 8$ Hz 和 16Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.63-3.68 (m, 2H), 3.28-3.33 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.25-2.29 (m, 2H), 1.63-1.68 (m, 2H), 1.31 (s, 3H), 1.27 (s, 9H); MS (ES+) $[M+H]^+ = 406$ 。

[0147] 实施例 10 : 4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)-N-(3-(噁唑-5-基)苯基)哌啶-4-甲酰胺的合成

[0148]



[0149] A. 4-甲基-4-(3-(噁唑-5-基)苯基氨基甲酰基)-哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。在 0℃ 向 1-(叔丁氧羰基)-4-甲基哌啶-4-甲酸 (61.3mg, 0.252mmol) 和吡啶 (79.7mg, 0.08mL, 1.01mmol) 的 1,2-二氯乙烷 (2mL) 溶液中加入 DMF (1-2 滴), 随后加入草酰氯 (31.9mg, 0.022mL, 0.252mmol)。将反应搅拌 0.5 小时, 并且加入 3-(噁唑-5-基)苯胺 (40.4mg, 0.252mmol)。将反应搅拌另外的 1.5 小时。混合物用乙酸乙酯 (10mL) 稀释, 并将有机物用 0.1N HCl (2x10mL)、盐水 (4mL) 洗涤, 用 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 并且浓缩, 得到标题化合物, 其不经进一步纯化用于下一步。MS (ES+) $[M+H]^+ = 386.2$ 。

[0150] B. 4-甲基-N-(3-(噁唑-5-基)苯基)哌啶-4-甲酰胺的制备。向得自步骤 A 的 4-甲基-4-(3-(噁唑-5-基)苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (77.7mg, 0.202mmol) 的甲醇 (3mL) 溶液中加入 HCl (4.0N, 在二氧杂环己烷中, 0.4mL, 1.6mmol)。将反应搅拌 15 小时然后浓缩到干燥, 得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[M+H]^+ = 286.2$ 。

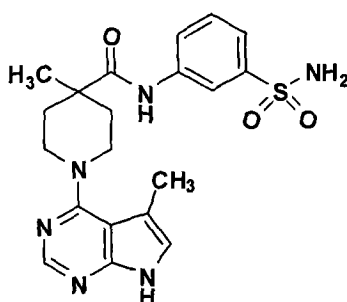
[0151] C. 4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)-N-(3-(噁唑-5-基)苯基)哌啶-4-甲酰胺的制备。向压力管加入得自步骤 B 的 4-甲基-N-(3-(噁唑-5-基)苯基)哌啶-4-甲酰胺盐酸盐 (51.9mg, 0.17mmol) 和异丙醇 (3mL) 的溶液, 并向这个溶液

中加入 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (55.0mg, 0.329mmol) 和 N,N-二异丙基乙基胺 (297.9mg, 0.40mL, 2.31mmol)。将管密封, 并将反应加热到 105℃, 保持 15 小时。采用常规手段对反应进行后处理, 并将残余物通过制备性 HPLC 纯化, 得到标题化合物, 为灰白色固体。

[0152] ^1H NMR (400MHz) ppm 8.27 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.03 (t, $J = 1.77\text{Hz}$, 1H), 7.58 (ddd, $J = 8.08, 2.02, 1.01\text{Hz}$, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.50 (dt, $J = 8.08, 1.26\text{Hz}$, 1H), 7.43 (t, $J = 7.83\text{Hz}$, 1H), 7.00 (app. d, $J = 0.76\text{Hz}$, 1H), 3.78-3.86 (m, 2H), 3.38-3.46 (m, 2H), 2.44 (d, $J = 0.76\text{Hz}$, 3H), 2.36-2.44 (m, 2H), 1.79 (ddd, $J = 13.39, 9.85, 3.54\text{Hz}$, 2H), 1.42 (s, 3H); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 417.2$ 。

[0153] 实施例 11: 4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-(3-氨基磺酰基苯基)哌啶-4-甲酰胺的合成

[0154]



[0155] A. 4-甲基-4-(3-氨基磺酰基苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。向 1-(叔丁氧羰基)-4-甲基哌啶-4-甲酸 (60mg, 0.25mmol) 的二氯乙烷 (2.0mL) 溶液中加入 DMF (2 滴) 和吡啶 (78mg, 0.99mmol), 随后加入草酰氯 (31mg, 0.25mmol)。将混合物搅拌 40 分钟, 并且加入 3-氨基-苯磺酰胺。将混合物在 50℃ 加热 3 小时, 并将混合物冷却, 用二氯甲烷稀释, 分别用饱和 NaHCO_3 水溶液和 1.0N HCl 水溶液洗涤两次, 用 MgSO_4 干燥, 并且浓缩。硅胶色谱纯化 (2-5% MeOH : CH_2Cl_2) 以 40% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 398$ 。

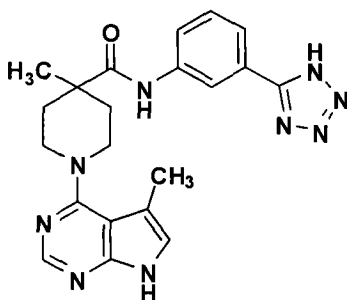
[0156] B. 4-甲基-N-(3-氨基磺酰基苯基)哌啶-4-甲酰胺的制备。得自步骤 A 的 4-甲基-4-(3-氨基磺酰基苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (39mg, 0.098mmol) 用 HCl (4.0N, 在二氧杂环己烷中, 98 μL , 0.39mmol) 在甲醇 (1.0mL) 中在 50℃ 处理 45 分钟。将混合物浓缩, 以定量的收率得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 298$ 。

[0157] C. 4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-(3-氨基磺酰基苯基)哌啶-4-甲酰胺的制备。将得自步骤 B 的 4-甲基-N-(3-氨基磺酰基苯基)哌啶-4-甲酰胺 (33mg, 0.098mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (16mg, 0.098mmol), N,N-二异丙基乙基胺 (51mg, 0.39mmol), 和异丙醇 (1.0mL) 合并于压力级密封管中并在 105℃ 加热 18 小时。将混合物浓缩, 并将残余物通过制备性 HPLC 纯化, 以 21% 收率得到标题化合物。

[0158] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ppm 11.52 (s, 1H), 9.72 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.87-7.90 (m, 1H), 7.50-7.52 (m, 2H), 7.35 (s, 2H), 7.06 (s, 1H), 4.09-4.13 (m, 1H), 3.66-3.40 (m, 2H), 3.25-3.31 (m, 2H), 3.18 (d, $J = 4\text{Hz}$, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.27-2.30 (m, 2H), 1.64-1.70 (m, 2H), 1.32 (s, 3H); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 429$ 。

[0159] 实施例 12 :N-(3-(1H-四唑-5-基)苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺的合成

[0160]



[0161] A. 4-(3-(1H-四唑-5-基)苯基氨基甲酰基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。向 1-(叔丁氧羰基)-4-甲基哌啶-4-甲酸 (100mg, 0.41mmol) 的二氯乙烷 (2.0mL) 溶液中加入 DMF (2 滴) 和吡啶 (0.13g, 1.6mmol), 随后加入草酰氯 (57mg, 0.45mmol)。将混合物搅拌 40 分钟, 并且加入 3-(1H-四唑-5-基)-苯基胺。将混合物搅拌 2 小时, 形成粉红色沉淀物。将混合物过滤, 并将滤液用 1.0N HCl 水溶液和盐水洗涤, 用 $MgSO_4$ 干燥, 并且浓缩, 以 70% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[M+H]^+ = 387$ 。

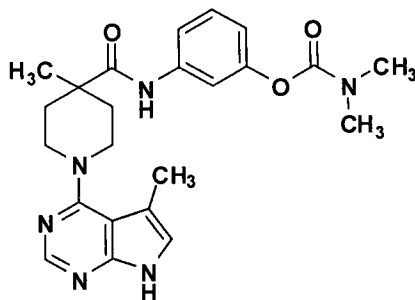
[0162] B. N-(3-(1H-四唑-5-基)苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺的制备。将得自步骤 A 的 4-(3-(1H-四唑-5-基)苯基氨基甲酰基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (0.11g, 0.29mmol) 用 HCl (4.0N, 在二氧杂环己烷中, 0.36mL, 1.45mmol) 在甲醇 (2.0mL) 中处理并在 50°C 加热 30 分钟。将混合物浓缩, 以定量的收率得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[M+H]^+ = 287$ 。

[0163] C. N-(3-(1H-四唑-5-基)苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺的制备。将得自步骤 B 的 N-(3-(1H-四唑-5-基)苯基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺 (93mg, 0.29mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (49mg, 0.29mmol), N, N-二异丙基乙基胺 (0.19g, 1.45mmol), 异丙醇 (4.0mL), 和 DMSO (0.5mL) 合并在压力级密封管中并在 105°C 加热 18 小时。将混合物浓缩, 并将残余物通过制备性 HPLC 纯化, 以 4.3% 收率得到标题化合物。

[0164] 1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) ppm 11.5 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 8Hz$, 1H), 7.69 (d, $J = 8Hz$, 1H), 7.40 (t, $J = 8$ 和 16Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 3.64-3.72 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.29-2.33 (m, 2H), 1.91 (s, 2H), 1.64-1.70 (m, 2H), 1.34 (s, 3H); MS (ES+) $[M+H]^+ = 418$ 。

[0165] 实施例 13 :3-(4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0166]



[0167] A. 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。将 1-(叔丁氧羰基)-4-甲基哌啶-4-甲酸 (67mg, 0.28mmol), EDC (64mg, 0.33mmol), HOBt (45mg, 0.33mmol) 和二氯乙烷 (2.0mL) 合并并在压力级密封管中并且搅拌 45 分钟。加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯 (50mg, 0.28mmol), 并将混合物在 85℃ 加热 18 小时。将混合物浓缩并且色谱纯化 (SiO_2 , 0-2% MeOH : CH_2Cl_2), 以 50% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 406$ 。

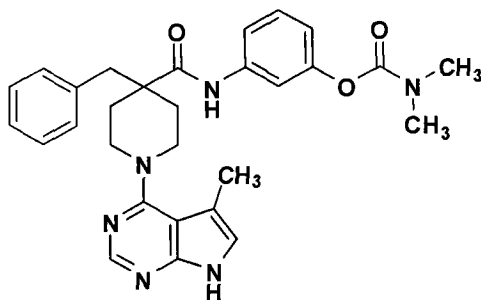
[0168] B. 3-(4-甲基哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。将得自步骤 A 的 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)-4-甲基哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (56mg, 0.138mmol) 用 HCl (4.0N, 在二氧杂环己烷中, 0.17mL, 0.69mmol) 在甲醇 (2.0mL) 中在 40℃ 处理 3 小时。将混合物浓缩, 以定量的收率得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 306$ 。

[0169] C. 3-(4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。将得自步骤 B 的 3-(4-甲基哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯 (47mg, 0.14mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (23mg, 0.138mmol), N,N-二异丙基乙基胺 (54mg, 0.41mmol), 和异丙醇 (1.0mL) 合并并在压力级密封管中并在 100℃ 加热 18 小时。将混合物浓缩, 并将残余物通过制备性 HPLC 纯化, 以 53% 收率得到标题化合物。

[0170] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) ppm 8.18 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.42-7.44 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H), 7.34 (t, $J = 8$ 和 16Hz , 1H), 7.0 (s, 1H), 6.87-6.89 (m, 1H), 3.79-3.85 (m, 2H), 3.37-3.44 (m, 2H), 3.14 (s, 1H), 3.01 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.36-2.40 (m, 2H), 1.75-1.81 (m, 2H), 1.40 (s, 3H); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 437$ 。

[0171] 实施例 14 : 3-(4-苄基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0172]



[0173] A. 4-苄基-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)-苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。在 N_2 的气氛下, 将 4-苄基-1-(叔丁氧羰基)哌啶-4-甲酸 (0.2g,

0.626mmol), 吡啶 (0.202mL, 2.5mmol), 和 DMF (3 滴) 溶解于 CH_2Cl_2 (10mL) 并在冰浴中冷却。向冷却的溶液中滴加草酰氯 (0.06mL, 0.688mmol)。然后将反应从冰浴中取出并在室温搅拌 30 分钟。将反应再次在冰浴中冷却, 并且一次性加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯 (0.112g, 0.626mmol)。反应搅拌过夜, 然后用 1N HCl 水溶液和盐水洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 并且真空浓缩。残余物硅胶色谱法纯化 (乙酸乙酯: 己烷梯度), 以 54% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 500$ 。

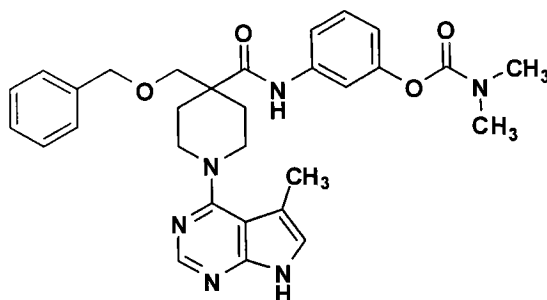
[0174] B. 3-(4-苄基哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。 向得自步骤 A 的 4-苄基-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)-苄基氨基甲酰基) 哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (0.162g, 0.336mmol) 的 MeOH (5mL) 溶液中加入含 4M HCl 的二氧杂环己烷 (0.250mL, 1.00mmol)。将反应在 50°C 加热 1 小时, 然后真空浓缩, 再溶解于 MeOH 并且再浓缩两次, 得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 382$ 。

[0175] C. 3-(4-苄基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基) 哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。 将得自步骤 B 的 3-(4-苄基哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯 (0.140g, 0.336mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉 (0.056g, 0.336mmol), N,N-二异丙基乙基胺 (0.175mL, 1.00mmol), 和异丙醇 (5mL) 合并并在压力管中并在 120°C 加热过夜。反应用 CH_2Cl_2 稀释, 用 H_2O 和盐水洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 并且真空浓缩。残余物聚集在热的乙醇/ H_2O 中。在冷却时, 产物从溶液中沉淀出来, 以 81% 收率得到标题化合物。

[0176] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) ppm 8.18 (s, 1H), 7.15-7.37 (m, 8H), 7.00 (s, 1H), 6.88-6.91 (m, 1H), 3.97 (d, $J = 13.6\text{Hz}$, 2H), 3.25 (t, $J = 12, 24\text{Hz}$, 2H), 3.14 (s, 3H), 3.02 (s, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.40 (d, $J = 14.4\text{Hz}$, 2H), 1.85-1.92 (m, 2H); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 513$ 。

[0177] 实施例 15: 3-(4-(苄氧基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基) 哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0178]



[0179] A. 4-(苄氧基甲基) 哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯的制备。 在 -78°C 将 LDA (2.64mL, 5.82mmol) 加入到哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (1g, 3.88mmol) 的 THF (35mL) 溶液中。将反应搅拌 30 分钟, 然后加入 BOMCl (0.6g, 3.88mmol)。使反应回温到室温, 然后用 NH_4Cl 水溶液猝灭。水层用 EtOAc 提取, 并将有机提取物用盐水洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 并且真空浓缩。残余物通过快速色谱法纯化 (80g SiO_2 , 0-10% 乙酸乙酯: 己烷), 得到标题化合物 (0.5g, 34%)。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 378$ 。

[0180] B. 4-(苄氧基甲基)-1-(叔丁氧羰基) 哌啶-4-甲酸的制备。 将得自步骤 A 的 4-(苄氧基甲基) 哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (0.500g, 1.3mmol) 溶解于 1N

LiOH 水溶液 (15mL) 和 THF (10mL) 中并且在 50°C 加热 24 小时。反应混合物用 1N HCl 酸化并用 Et₂O 提取。有机提取物用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并且真空浓缩, 得到标题化合物 (0.3g, 65%)。MS (ES+) [M+H]⁺ = 349。

[0181] C. 4-(苄氧基甲基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)-苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。向得自步骤 B 的 4-(苄氧基甲基)-1-(叔丁氧羰基)哌啶-4-甲酸 (0.3g, 0.85mmol) 的乙酸异丙酯 (10mL) 溶液中加入 N, N-二异丙基乙基胺 (0.165mL, 0.94mmol) 和 HATU (0.94mmol)。将反应在 85°C 加热 30 分钟, 并向混合物加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯。将反应在 85°C 加热 2 小时, 然后通过标准方法后处理。通过快速色谱法分离产物 (40g SiO₂, 0-30% 乙酸乙酯: 己烷), 得到标题化合物 (0.25g, 57%)。MS (ES+) [M+H]⁺ = 512。

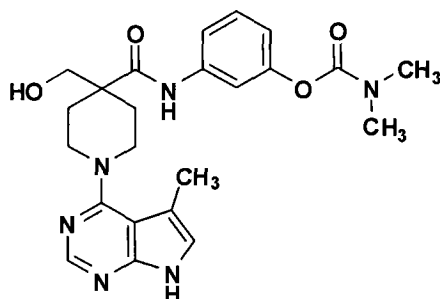
[0182] D. 3-(4-(苄氧基甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。将得自步骤 C 的 4-(苄氧基甲基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (0.25g, 0.49mmol) 溶解于异丙醇, 用 4N HCl 处理, 并且搅拌 2 小时。用 NaHCO₃ 将反应混合物调节到 pH 7-8, 然后用 Et₂O 提取。将有机提取物真空浓缩, 得到标题化合物 (0.2g, 100%)。MS (ES+) [M+H]⁺ = 412。

[0183] E. 3-(4-(苄氧基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤 D 的 3-(4-(苄氧基甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯 (0.2g, 0.49mmol) 的异丙醇 (5mL) 溶液中加入 N, N-二异丙基乙基胺 (0.167mL, 0.98mmol) 和 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (0.08g, 0.49mmol)。将反应在 85°C 加热过夜, 用 EtOAc 稀释, 用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并且真空浓缩。残余物通过快速色谱法纯化 (40g SiO₂, 0-80% 乙酸乙酯: 己烷), 得到标题化合物 (0.1g, 38%)。

[0184] ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) ppm 10.68 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.33-7.44 (m, 6H), 7.25 (t, J = 8, 16Hz, 1H), 7.11 (d, J = 8Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.86 (d, J = 8Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 3.62-3.75 (m, 4H), 3.09 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.27-2.33 (m, 2H), 1.75-1.82 (m, 2H); MS (ES+) [M+H]⁺ = 543。

[0185] 实施例 16 : 3-(4-(羟基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0186]



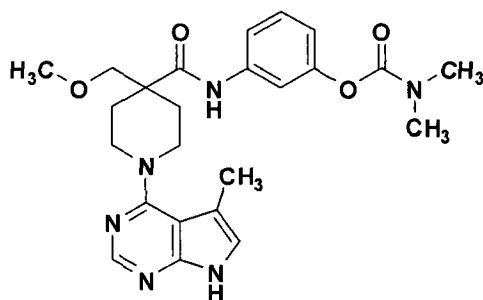
[0187] 向得自实施例 15 步骤 E 的 3-(4-(苄氧基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯 (30mg, 0.055mmol) 的 THF (2mL) 溶液中加入 Pd/C (10%)。将反应混合物在 60psi 的 H₂ 下搅拌过夜。将混合物过滤并且真空浓缩。残余物通过制备性 HPLC 纯化 (30x250mm C18 column, 10-100%

MeCN : H₂O(10mMNH₄OAc), 18 分钟, 45mL/min), 得到标题化合物 (1mg)。

[0188] ¹H NMR(400MHz, CD₃OD) ppm 8.18(s, 1H), 7.52(s, 1H), 7.40-7.42(m, 1H), 7.33(t, J = 8, 16Hz, 1H), 7.00(s, 1H), 6.87(d, J = 8Hz, 1H), 3.84-3.89(m, 2H), 3.75(s, 2H), 3.32-3.44(m, 2H), 3.14(s, 3H), 3.00(s, 3H), 2.45(s, 3H), 2.38(d, J = 12Hz, 2H), 1.72-1.81(m, 2H); MS(ES+) [M+H]⁺ = 453。

[0189] 实施例 17 : 3-(4-(甲氧基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0190]



[0191] A. 4-(甲氧基甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯的制备。在氮气下在 -78°C 向哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (1.0g, 4.07mmol) 的 THF (20mL) 溶液中滴加 LDA (1.5M, 在 THF 中, 4.0mL, 6.10mmol)。将这个溶液在 -78°C 搅拌 1 小时, 之后加入甲氧基甲基氯 (0.8mL, 10.5mmol)。使这个系统在 2 小时内缓慢升温到室温。反应用 NH₄Cl 水溶液猝灭并用乙酸乙酯提取 (3x50mL)。有机层用硅胶垫干燥, 并将溶剂真空除去。标题化合物通过硅胶色谱纯化分离 (5-10% 乙酸乙酯: 己烷), 为澄清的油状物 (830mg, 69% 收率)。MS(ES+) [M+H]⁺ = 302.4。

[0192] B. 1-(叔丁氧羰基)-4-(甲氧基甲基)-哌啶-4-甲酸的制备。向得自步骤 A 的 4-(甲氧基甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (732mg, 2.63mmol) 在 1 : 2 乙醇 / 水 (9mL) 中的溶液加入氢氧化锂一水合物 (700mg)。将混合物加热到 75°C, 保持 1 小时。将反应冷却到室温并且倾倒在 50mL 的饱和 NaHSO₄ 水溶液中。水层用乙酸乙酯提取 (3x50mL)。合并的有机层用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并且真空浓缩, 得到标题化合物, 为粘稠的黄色油状物, 其不经进一步纯化用于下一步。MS(ES+) [M+H]⁺ = 274.2。

[0193] C. 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)-4-(甲氧基甲基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。向得自步骤 B 的 1-(叔丁氧羰基)-4-(甲氧基甲基)-哌啶-4-甲酸 (718mg, 2.63mmol), 吡啶 (0.84mL, 10.52mmol), 和 DMF (催化量, 3 滴) 的 CH₂Cl₂ (13mL) 溶液中滴加草酰氯 (0.25mL, 2.89mmol, 小心: 放热反应)。在气体放出平息之后, 将反应室温搅拌 30 分钟。向这个溶液中一次性加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯 (475mg, 2.63mmol) 并且搅拌另外的 30 分钟。反应用饱和 NH₄Cl 水溶液猝灭, 并将水层用乙酸乙酯提取 (3x50mL)。合并的有机层用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤, 并且真空浓缩。硅胶色谱纯化 (50% 乙酸乙酯: 己烷), 得到标题化合物 (1.03g, 90% 收率, 两步)。MS(ES+) [M+NH₄]⁺ = 453.3

[0194] D. 3-(4-(甲氧基甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤 C 的 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)-苯基氨基甲酰基)-4-(甲氧基甲基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (1.03g, 2.37mmol) 的甲醇 (10mL) 溶液中加入 HCl (4M 的二氧杂环己烷

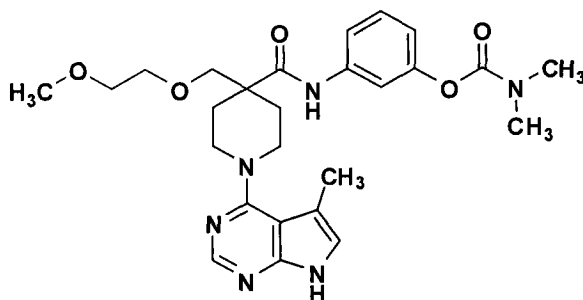
溶液, 2mL)。将反应在 50°C 加热 1 小时, 然后真空浓缩, 得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[M+H]^+ = 336.3$ 。

[0195] E. 3-(4-(甲氧基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤 D 的 3-(4-(甲氧基甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯, 和 N,N-二异丙基乙基胺 (2mL, 11.9mmol) 的异丙醇 (5mL) 溶液中加入 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (397mg, 2.37mmol)。将反应混合物在密封的高压管中加热到 110°C, 保持 17 小时, 期间混合物变为均匀的。将反应真空浓缩并且通过硅胶色谱纯化 (3-5% 甲醇: CH₂Cl₂)。产物用冷的甲醇洗涤, 得到标题化合物, 为灰白色固体 (462mg, 42% 收率)。

[0196] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) ppm 11.50 (br. s., 1H), 9.45 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.54-7.57 (m, 1H), 7.47 (d, J = 8.84Hz, 1H), 7.29 (t, J = 8.08Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.81 (dd, J = 8.08, 2.27Hz, 1H), 3.68-3.78 (m, 2H), 3.56 (s, 2H), 3.26 (s, 3H), 3.21 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.22-2.31 (m, 2H), 1.65-1.78 (m, 2H); MS (ES+) $[M+H]^+ = 467.3$ 。

[0197] 实施例 18 : 3-(4-((2-甲氧基乙氧基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0198]



[0199] A. 4-((2-甲氧基乙氧基)甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯的制备。在 -78°C 向哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (2.0g, 7.8mmol) 的 THF (70mL) 溶液在 8 分钟内滴加 LDA, 保持温度低于 -75°C。将混合物在 -78°C 搅拌 1 小时。滴加 1-氯甲氧基-2-甲氧基-乙烷 (0.97g, 7.8mmol) 同时保持温度低于 -75°C。将混合物在 -78°C 搅拌 3 小时, 然后使其回温到室温过夜。混合物用饱和 NH₄Cl 水溶液猝灭并用 EtOAc 提取 3 次。将有机物合并, 用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并且浓缩。硅胶色谱纯化 (10-20% 乙酸乙酯: 己烷), 以 67% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[M+H]^+ = 346$ 。

[0200] B. 1-(叔丁氧羰基)-4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-4-甲酸的制备。将得自步骤 A 的 4-((2-甲氧基乙氧基)甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (1.78g, 5.15mmol) 在 80°C 用在乙醇 (12mL) 和水 (24mL) 中的 LiOH (0.62g, 2.6mmol) 处理 18 小时。将混合物冷却, 用二氯甲烷稀释, 并且用饱和 NaHSO₄ 水溶液洗涤。水相用二氯甲烷反提取 (3x), 并将有机物合并, 用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并且浓缩, 以定量收率得到标题化合物。MS (ES+) $[M+H]^+ = 318$ 。

[0201] C. 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)-4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯的制备。向得自步骤 B 的 1-(叔丁氧羰基)-4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-4-甲酸 (1.6g, 5.1mmol) 的二氯乙烷溶液中加入吡啶 (1.6g, 20mmol) 和 DMF (0.05mL),

随后加入草酰氯 (0.65g, 5.1mmol)。将混合物搅拌 30 分钟, 然后加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯 (0.91g, 5.04mmol)。将混合物搅拌 18 小时, 然后用二氯甲烷稀释, 用 1N HCl 水溶液洗涤两次和用盐水洗涤一次, 用 $MgSO_4$ 干燥, 并且浓缩。硅胶色谱纯化 (0-5% MeOH : CH_2Cl_2), 以 88% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[M+H]^+ = 480$ 。

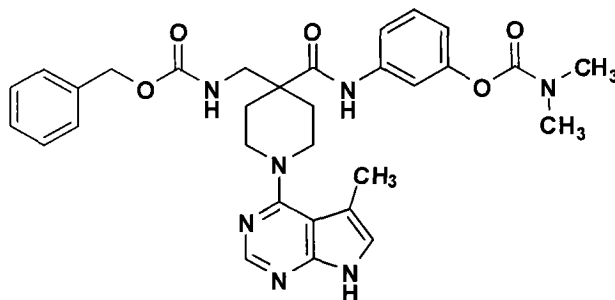
[0202] D. 3-(4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。 将得自步骤 C 的 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)-4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-1-甲酸叔丁基酯 (2.1g, 4.4mmol) 用 HCl (4.0N, 在二氧杂环己烷中, 5.5mL, 22mmol) 在甲醇 (20mL) 中在 50°C 处理 30 分钟。将混合物浓缩, 以定量的收率得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[M+H]^+ = 380$ 。

[0203] E. 3-(4-((2-甲氧基乙氧基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。 将得自步骤 D 的 3-(4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯 (1.82g, 4.38mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (0.73g, 4.4mmol), N, N-二异丙基乙基胺 (2.8g, 22mmol), 和异丙醇 (50mL) 合并并在压力级密封管中并在 115°C 加热 18 小时。将混合物浓缩并且色谱纯化 (SiO_2 , 0-5% MeOH : CH_2Cl_2), 以 61% 收率得到标题化合物。

[0204] 1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) ppm 11.48 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 8Hz$, 1H), 7.30 (t, $J = 8$ 和 $16Hz$, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.81 (d, $J = 8Hz$, 1H), 3.68-3.76 (m, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.55-3.58 (m, 2H), 3.44-3.47 (m, 2H), 3.24-3.30 (m, 2H), 3.23 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.26 (d, $J = 16Hz$, 2H), 1.69-1.76 (m, 2H); MS (ES+) $[M+H]^+ = 511$ 。

[0205] 实施例 19 : 3-(4-((苄氧基羰基氨基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0206]



[0207] A. 4-((苄氧基羰基氨基)-甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯的制备。 在 0°C 向 4-(氨基甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯 (0.300g, 1.1mmol) 和 N, N-二异丙基乙基胺 (0.229mL, 1.32mmol) 的 CH_2Cl_2 (5mL) 溶液中加入氯甲酸苄酯。将反应搅拌过夜, 然后用 CH_2Cl_2 稀释并用 H_2O 和盐水洗涤, 用 $MgSO_4$ 干燥, 并且真空浓缩。残余物硅胶色谱法纯化 (EtOAc : 己烷梯度), 以 82% 收率得到标题化合物。MS (ES+) $[M+H]^+ = 407$ 。

[0208] B. 4-((苄氧基羰基氨基)甲基)-1-(叔丁氧羰基)哌啶-4-甲酸的制备。 向得自步骤 A 的 4-((苄氧基羰基氨基)甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯的甲醇 (5mL) 溶液中加入 1N NaOH 水溶液 (0.615mL, 0.615mmol)。将反应在 50°C 加热过夜, 用 1N HCl 水溶液酸化到 pH 5, 并用 CH_2Cl_2 提取 3 次。合并的有机提取物用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干

干燥,并且真空浓缩,得到标题化合物,将其以粗品形式用于下一步。MS (ES+) [M+H]⁺ = 393。

[0209] C. 4-((苄氧基羰基氨基)甲基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苄基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯的制备。在N₂的气氛下,将得自步骤B的4-((苄氧基羰基氨基)甲基)-1-(叔丁氧羰基)哌啶-4-甲酸(0.240g,0.611mmol),吡啶(0.197mL,2.44mmol)和DMF(3滴)溶解于CH₂Cl₂(10mL)并在冰浴中冷却。向溶液中滴加草酰氯(0.064mL,0.733mmol)。然后将反应从冰浴中取出并在室温搅拌30分钟。将反应再次在冰浴中冷却,并且一次性加入3-氨基苄基二甲基氨基甲酸酯(0.110g,0.611mmol)。将反应搅拌过夜,然后用1N HCl水溶液和盐水洗涤,用MgSO₄干燥,并且真空浓缩。残余物硅胶色谱法纯化(乙酸乙酯:己烷梯度),以72%收率得到标题化合物。MS (ES+) [M+NH₄]⁺ = 573。

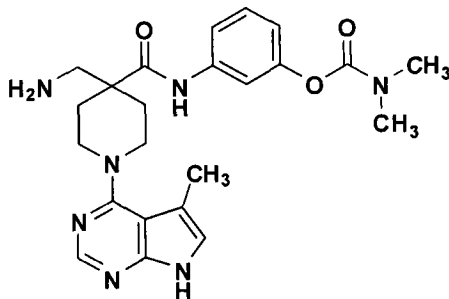
[0210] D. 3-(4-((苄氧基羰基氨基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苄基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤C的4-((苄氧基羰基氨基)甲基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苄基氨基甲酰基)-哌啶-1-甲酸叔丁基酯(0.245g,0.441mmol)的MeOH(2mL)溶液中加入含4M HCl的二氧杂环己烷(0.331mL,1.32mmol)。将反应在50℃加热1小时,然后真空浓缩,再溶解于MeOH并且再浓缩两次,得到标题化合物,为盐酸盐。MS (ES+) [M+H]⁺ = 455。

[0211] E. 3-(4-((苄氧基羰基氨基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苄基二甲基氨基甲酸酯的制备。将得自步骤D的3-(4-((苄氧基羰基氨基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苄基二甲基氨基甲酸酯(0.216g,0.441mmol),4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(0.073g,0.441mmol),N,N-二异丙基乙基胺(0.230mL,1.32mmol),和异丙醇(5mL)合并并在压力管中在120℃加热过夜。粗的反应用CH₂Cl₂稀释并用H₂O和盐水洗涤,用MgSO₄干燥,并且真空浓缩。残余物硅胶色谱法纯化(MeOH:CH₂Cl₂梯度),以54%收率得到标题化合物。

[0212] ¹H NMR(400MHz, CD₃OD) ppm 8.18(s,1H),7.49(s,1H),7.40(d, J = 8Hz,1H),7.26-7.34(m,6H),7.00(s,1H),6.89(d, J = 8Hz,1H),5.06(s,2H),3.92(d, J = 13.2Hz,2H),3.50(s,2H),3.28-3.37(m,2H),3.1(s,3H),2.99(s,3H),2.43(s,3H),2.40(d, J = 12Hz,2H),1.79(t, J = 10.6,21.2Hz,2H);MS (ES+) [M+H]⁺ = 586。

[0213] 实施例20:3-(4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苄基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0214]

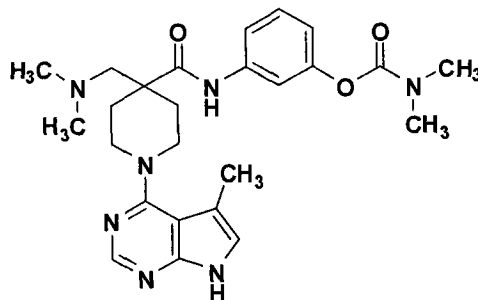


[0215] 将得自实施例19步骤E的3-(4-((苄氧基羰基氨基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苄基二甲基氨基甲酸酯(0.140g,0.239mmol),Pd/C(10% Pd/C, Pearlman),和甲醇(5mL)合并并且在1个大气压下氢化过夜。将反应过滤通过硅藻土,真空浓缩,并且通过中性相(neutral phase)制备性HPLC纯化,以52%收率得到标题化合物,为乙酸盐。

[0216] ^1H NMR(400MHz, D_2O) ppm 7.90(s, 1H), 7.30(t, $J = 8.6\text{Hz}$, 1H), 7.18-7.19(m, 2H), 6.84-6.88(m, 1H), 3.48(d, $J = 13.6\text{Hz}$, 2H), 3.20(s, 2H), 3.08(t, $J = 10.8, 21.6\text{Hz}$, 2H), 2.96(s, 3H), 2.83(s, 3H), 2.27(d, $J = 14.4\text{Hz}$, 2H), 2.11(s, 3H), 1.72(t, $J = 10, 20\text{Hz}$, 2H); MS(ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 452$ 。

[0217] 实施例 21 :3-(4-((二甲基氨基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0218]

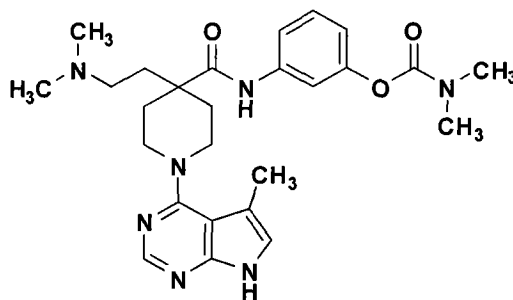


[0219] 向得自实施例 20 的 3-(4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的乙酸盐(14mg, 0.027mmol), 乙酸(6.2 μl , 0.11mmol), 和 NaBH_3CN (2.1mg, 0.034mmol) 溶液中加入甲醛(37%, 在 H_2O 中, 48 μl , 0.064mmol)。将反应搅拌过夜, 然后浓缩, 并将残余物通过制备性 HPLC 纯化(30x100mm C18 柱, 5-70% MeCN : H_2O (10mM NH_4OAc), 12 分钟, 45mL/min.) 并且冻干, 得到标题化合物(8mg, 0.014mmol, 57%), 为乙酸盐。

[0220] ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) ppm 8.18(s, 1H), 7.51(t, $J = 2.02\text{Hz}$, 1H), 7.37-7.42(m, 1H), 7.34(t, $J = 8.08\text{Hz}$, 1H), 7.00(s, 1H), 6.85-6.91(m, 1H), 3.89(d, $J = 13.64\text{Hz}$, 2H), 3.38-3.48(m, 2H), 3.14(s, 3H), 3.01(s, 3H), 2.72(s, 2H), 2.36-2.45(m, 11H), 1.79(ddd, $J = 13.71, 10.42, 3.41\text{Hz}$, 2H); MS(ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 480$ 。

[0221] 实施例 22 :3-(4-(2-(二甲基氨基)乙基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0222]



[0223] A. 4-(2-(二甲基氨基)乙基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯的制备。在 -78°C 向哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯(514mg, 2mmol) 的 THF(10mL) 溶液中滴加 LDA(1.5M, 在环己烷中, 2mL, 3mmol)。在 30 分钟之后, 加入含 2-溴-N,N-二甲基乙胺(370mg, 2.4mmol) 的 THF(3mL)。将反应在 -78°C 搅拌 30 分钟, 然后使其回温到室温, 搅拌 2 小时, 然后用饱和 NaHCO_3 水溶液猝灭, 用 EtOAc 稀释, 用饱和 NaHCO_3 水溶液和盐水(进行反提取)洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 并且真空浓缩。残余物通过快速色谱法纯化(40g SiO_2 , 0-15%

MeOH : CH₂Cl₂), 得到标题化合物 (328mg, 1.0mmol, 50%), 为黄色油状物。MS (ES+) [M+H]⁺ = 329.

[0224] B. 1-(叔丁氧羰基)-4-(2-(二甲基氨基)乙基)哌啶-4-甲酸的制备。将得自步骤 A 的 4-(2-(二甲基氨基)乙基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (328mg, 1.0mmol) 在 1 : 1EtOH : H₂O(5mL) 中用氢氧化锂一水合物 (210mg, 5mmol) 在 60℃ 处理过夜。将反应冷却到室温, 用 1N HCl 水溶液中和到 pH 6, 并且真空浓缩。残余物通过制备性 HPLC 纯化并且冻干两次, 得到标题化合物 (191mg, 64%), 为白色固体。MS (ES+) [M+H]⁺ = 301。

[0225] C. 4-(2-(二甲基氨基)乙基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯的制备。将得自步骤 B 的 1-(叔丁氧羰基)-4-(2-(二甲基氨基)乙基)哌啶-4-甲酸 (100mg, 0.33mmol), HATU(175mg, 0.46mmol), 和 N, N-二异丙基乙基胺 (0.116mL, 0.67mmol) 在乙酸异丙酯中搅拌 10 分钟。加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯 (90mg, 0.5mmol), 并将反应在 85℃ 搅拌 2 小时, 冷却到室温, 搅拌过夜, 然后用 EtOAc 稀释, 用饱和 Na₂CO₃ 水溶液和盐水 (进行反提取) 洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤, 并且真空浓缩, 得到标题化合物, 为粘稠的油状物。MS (ES+) [M+H]⁺ = 463。

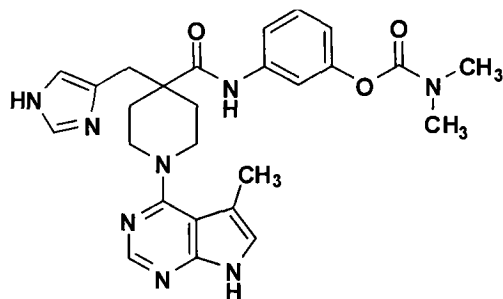
[0226] D. 3-(4-(2-(二甲基氨基)乙基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯)用 1 : 1TFA : CH₂Cl₂(1.5mL) 处理 45 分钟。将反应真空浓缩, 并将残余物通过制备性 HPLC 纯化 (30x100mm C18 柱, 0-50% MeOH : H₂O(0.1% TFA), 12 分钟, 45mL/min.) 并且冻干, 得到不纯的标题化合物 (173mg), 为 TFA 盐。MS (ES+) [M+H]⁺ = 363。

[0227] E. 3-(4-(2-(二甲基氨基)乙基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。将得自步骤 D 的不纯的 3-(4-(2-(二甲基氨基)乙基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯 (173mg) 与 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (50mg, 0.30mmol) 和 N, N-二异丙基乙基胺 (0.174mL, 5mmol) 合并并在异丁醇 (0.4mL) 中并在 110℃ 加热 7 小时。将反应冷却到室温并且真空浓缩。残余物通过制备性 HPLC 纯化 (30x100mm C18 柱, 10-70% MeCN : H₂O(10mMNH₄OAc), 12 分钟, 45mL/min) 并且冻干, 得到标题化合物 (60mg), 为二乙酸盐。

[0228] ¹H NMR(400MHz, CD₃OD) ppm 8.19(s, 1H), 7.52(t, J = 2.15Hz, 1H), 7.44(d, J = 8.08Hz, 1H), 7.35(t, J = 8.08Hz, 1H), 7.01(s, 1H), 6.91(dd, J = 7.58, 1.77Hz, 1H), 3.91(d, J = 13.64Hz, 2H), 3.37-3.30(m, 2H), 3.14(s, 3H), 3.01(s, 3H), 2.75-2.82(m, 2H), 2.58(s, 6H), 2.43-2.47(m, 5H), 2.00-2.08(m, 2H), 1.79-1.89(m, 2H); MS (ES+) [M+H]⁺ = 494。

[0229] 实施例 23 : 3-(4-((1H-咪唑-4-基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0230]



[0231] A. 4-((1-(3-(2-(4-(二甲基氨基)苯基)吡啶-2-基)乙基)-1H-咪唑-4-基)甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯的制备。在 -78°C 向哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (360mg, 1.39mmol) 的无水 THF (10mL) 溶液在 10 分钟内滴加 LDA (1.7M, 在 THF 中, 1.07mL, 1.8mmol)。将反应混合物在 -78°C 搅拌 1 小时, 并且缓慢加入含 4-(氯甲基)-1-(3-(2-(4-(二甲基氨基)苯基)吡啶-2-基)乙基)-1H-咪唑 (500mg, 13.9mmol) 的 THF (5mL)。使反应混合物在 1 小时内回温到室温, 用饱和 NH_4Cl (10mL) 水溶液猝灭, 并用 EtOAc 提取 (3x20mL)。合并的有机提取物用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并且真空浓缩。通过硅胶色谱纯化 (10-50% EtOAc : 己烷), 得到标题化合物 (403mg, 51%)。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 580.3$ 。

[0232] B. 1-(叔丁氧羰基)-4-((1-(3-(2-(4-(二甲基氨基)苯基)吡啶-2-基)乙基)甲基)哌啶-4-甲酸的制备。向得自步骤 A 的 4-((1-(3-(2-(4-(二甲基氨基)苯基)吡啶-2-基)乙基)甲基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-乙基酯 (330mg, 0.57mmol) 在 1 : 1 : 2 的 THF : MeOH : H_2O (10mL) 中的溶液加入 LiOH (136mg, 5.7mmol)。将混合物回流, 直到 LCMS 显示完全转化为产物, 然后真空浓缩, 溶解于水 (3mL) 中, 用 NaHSO_4 水溶液中和到 pH 5-6, 并用乙酸乙酯提取 (3x10mL)。合并的有机相用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 并且真空浓缩, 得到标题化合物 (273mg, 86%)。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 552.2$ 。

[0233] C. 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)-4-((1-(3-(2-(4-(二甲基氨基)苯基)吡啶-2-基)乙基)甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯的制备。向得自步骤 B 的 1-(叔丁氧羰基)-4-((1-(3-(2-(4-(二甲基氨基)苯基)吡啶-2-基)乙基)甲基)哌啶-4-甲酸 (270mg, 0.6mmol) 的乙酸异丙酯 (5mL) 溶液中加入 HATU (273mg, 0.73mmol) 和 N,N-二异丙基乙基胺 (205 μL , 1.2mmol)。将混合物搅拌 5 分钟, 并且加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯 (108mg, 0.6mmol)。将得到的混合物在 90°C 加热 2 小时。反应混合物用 EtOAc (10mL) 稀释, 用 NaHCO_3 水溶液和盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并且真空浓缩。残余物硅胶色谱法纯化 (10-70% EtOAc : 己烷), 得到标题化合物 (185mg, 43%)。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 714.2$ 。

[0234] D. 3-(4-((1H-咪唑-4-基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤 C 的 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)-苯基氨基甲酰基)-4-((1-(3-(2-(4-(二甲基氨基)苯基)吡啶-2-基)乙基)甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (180mg) 的 MeOH (5mL) 溶液中加入 HCl (1N, 在二氧杂环己烷中, 1mL)。将反应在 60°C 加热 1 小时, 然后真空浓缩。残余物溶解于 EtOAc (5mL), 用 NaHCO_3 水溶液和盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并且真空浓缩, 得到标题化合物 (84mg, 93%)。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 372.2$ 。

[0235] E. 3-(4-((1H-咪唑-4-基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。

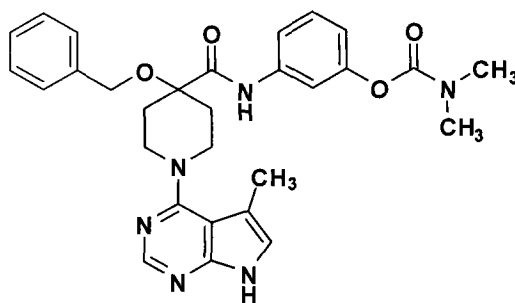
[0236] 将得自步骤 D 的 3-(4-((1H-咪唑-4-基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯 (10mg, 0.027mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 (5mg, 0.03mmol),

和 N, N-二异丙基乙基胺 (23 μ L, 0.135mmol) 合并并在异丙醇 (0.5mL) 中。得到的混合物在密封的压力管中在 100 $^{\circ}$ C 加热 24 小时。将反应混合物冷却并且真空浓缩。残余物通过制备性 HPLC 纯化 (10-95% MeOH : H₂O, 含 0.1% HCOOH), 然后用含 AcOH 的 H₂O 处理并且冻干, 得到标题化合物 (5.7mg, 42%), 为乙酸盐。

[0237] ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) ppm 8.17 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.42-7.45 (m, 1H), 7.31-7.39 (m, 2H), 6.99-7.01 (m, 1H), 6.87-6.91 (m, 1H), 6.79 (s, 1H), 3.90-3.98 (m, 2H), 3.14 (s, 3H), 3.02 (br. s., 2H), 3.01 (s, 3H), 2.44 (d, J = 1.01Hz, 3H), 2.36-2.43 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 1.83-1.93 (m, 4H); MS (ES+) [M+H]⁺ = 503.3.

[0238] 实施例 24 : 3-(4-(苄氧基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) 哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0239]



[0240] A. 4-羟基哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯的制备。向 4-羟基哌啶-4-甲酸甲酯 (如 Zheng 等人在 2005 年 4 月 14 日提交的美国专利申请 2005/0080095 中所述制备) (792mg, 4.98mmol) 和三乙胺 (1.04mL, 7.47mmol) 的二氯甲烷 (25mL) 溶液中加入二碳酸二叔丁酯 (1.26mL, 5.48mmol)。通过 TLC 分析 /ELSD 监控反应进行。在反应完成时, 真空除去挥发性物质。硅胶色谱纯化 (0-10% MeOH : CH₂Cl₂) 得到标题化合物, 为澄清的油状物 (1.25g, 99% 收率)。MS (ES+) [M+H]⁺ = 250.2.

[0241] B. 4-(苄氧基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯的制备。向得自步骤 A 的 4-羟基哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯 (535mg, 2.06mmol) 的 DMF (8.2mL) 溶液中小心地加入氢化钠 (60% 的矿物油分散物, 124mg, 3.09mmol)。将混合物在室温搅拌 30 分钟。加入苄基溴 (0.29mL, 2.47mmol), 并将反应搅拌另外的 30 分钟。在通过 TLC 分析监控反应完成后, 反应用 50mL 的 1 : 1 饱和 NH₄Cl 水溶液 : 水猝灭。水层用乙酸乙酯提取 (3x50mL)。合并的有机层用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并且真空浓缩。硅胶色谱纯化 (5-10% 乙酸乙酯 : 己烷) 得到标题化合物, 为澄清的油状物 (359mg, 54% 收率)。MS (ES+) [M+H]⁺ = 340.3.

[0242] C. 1-(叔丁氧羰基)-4-(苄氧基)-哌啶-4-甲酸的制备。向得自步骤 B 的 4-(苄氧基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯 (350mg, 1.00mmol) 在 1 : 2 甲醇 / 水 (6mL) 中的溶液加入氢氧化锂一水合物 (200mg)。将混合物加热到 60 $^{\circ}$ C, 保持 30 分钟, 然后冷却到室温并且倾倒在饱和 NaHSO₄ 水溶液 (25mL) 上。水层用乙酸乙酯提取 (3x25mL)。合并的有机层用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并且真空浓缩, 得到标题化合物, 为粘稠的油状物, 其不经进一步纯化用于下一步。

[0243] D. 4-(苄氧基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基-氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯的制备。向得自步骤 C 的 1-(叔丁氧羰基)-4-(苄氧基)-哌啶-4-甲酸 (335mg,

1.00mmol), 吡啶 (0.43mL, 5.40mmol), 和 DMF (催化量, 3 滴) 的 CH_2Cl_2 (6.8mL) 溶液中滴加草酰氯 (0.13mL, 1.49mmol, 小心: 放热反应)。在气体放出平息之后, 将反应在室温搅拌 30 分钟。向溶液中一次性加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯 (244mg, 1.35mmol), 将其搅拌另外的 30 分钟。反应用饱和 NH_4Cl 水溶液猝灭, 并将水层用乙酸乙酯提取 (3x50mL)。合并的有机层用盐水洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 过滤, 并且真空浓缩。硅胶色谱纯化 (40% 乙酸乙酯: 己烷), 得到标题化合物, 为白色固体 (406mg, 82% 收率。MS (ES+) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 515.4$ 。

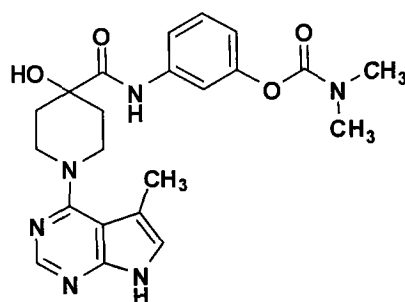
[0244] E. 3-(4-(苄氧基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基-氨基甲酸酯的制备。向得自步骤 D 的 4-(苄氧基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)-苄基-氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (400mg, 0.804mmol) 的甲醇 (4mL) 溶液中加入 HCl (4M 的二氧杂环己烷溶液, 0.8mL)。将反应在 50°C 加热 1 小时, 然后真空浓缩, 得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 398.4$ 。

[0245] F. 3-(4-(苄氧基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤 E 的 3-(4-(苄氧基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯, 和 N,N-二异丙基乙基胺 (0.7mL, 4.02mmol) 的异丙醇 (1.6mL) 溶液中加入 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啶 (135mg, 0.804mmol)。将反应混合物在密封的高压管中加热到 110°C , 保持 17 小时, 期间混合物变为均相的。将反应真空浓缩, 并将一半物质通过制备性 HPLC 纯化 (30x100mm C18 柱, 20-100% 乙腈: 水 (10mM 乙酸铵), 15 分钟, 45mL/min) 得到标题化合物 (33.4mg), 为白色固体。

[0246] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) ppm 9.71-9.74 (br. s., 1H), 8.22 (s, 1H), 7.51 (app q, $J = 1.85\text{Hz}$, 1H), 7.44-7.49 (m, 2H), 7.29-7.42 (m, 5H), 7.03 (d, $J = 1.01\text{Hz}$, 1H), 6.89 (ddd, $J = 7.83, 2.27, 1.26\text{Hz}$, 1H), 4.54 (s, 2H), 3.91-3.99 (m, 2H), 3.45-3.54 (m, 2H), 3.14 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.46 (d, $J = 1.01\text{Hz}$, 3H), 2.22-2.36 (m, 4H); MS (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 529.3$ 。

[0247] 实施例 25 : 3-(4-羟基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0248]



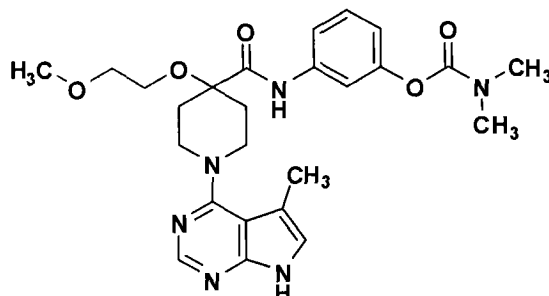
[0249] 将得自实施例 24 步骤 F 的粗的 3-(4-(苄氧基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯 (85% 纯度, 大约 80mg) 聚集在甲醇 (2mL) 中, 并且加入催化量的 Pearlman 催化剂。将这个系统在 60psi 氢化 24 小时, 其后观察到少量的产物。加入三氟乙酸 (0.1mL), 并且继续在 60psi 的 H_2 氢化 3 天, 其后反应完成大约三分之一。将反应过滤, 并将产物通过制备性 HPLC 分离 (30x100mm C18 柱, 10-100% 乙腈: 水 (10mM 乙酸铵), 15 分钟, 45mL/min) 得到标题化合物 (9.6mg), 为白色固体。

[0250] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) ppm 8.20 (s, 1H), 7.55 (t, $J = 2.02\text{Hz}$, 1H), 7.44 (ddd, $J = 8.08, 2.02, 1.01\text{Hz}$, 1H), 7.33 (t, $J = 8.08\text{Hz}$, 1H), 6.99 (app. d., $J = 1.01\text{Hz}$, 1H),

6.87 (ddd, $J = 8.08, 2.27, 0.76\text{Hz}$, 1H), 3.95–4.03 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.41 (dt, $J = 12.63, 2.27\text{Hz}$, 2H), 3.13–3.26 (m, 2H), 3.12 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 2.44 (d, $J = 0.76\text{Hz}$, 3H), 2.36 (dt, $J = 13.39, 4.29\text{Hz}$, 2H), 1.75–1.83 (m, 2H)。MS (ES+) $[M+H]^+ = 439.3$ 。

[0251] 实施例 26 : 3-(4-(2-甲氧基乙氧基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0252]



[0253] A. 4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯的制备。向 4-羟基哌啶-1,4-二甲酸 1-叔丁基酯 4-甲基酯 (360mg, 1.39mmol) 的 DMF (5.6mL) 溶液中小心地加入氢氧化钠 (60%的矿物油分散物, 84mg, 2.08mmol)。将混合物在室温搅拌 30 分钟。加入 1-氯-2-甲氧基乙烷 (0.38mL, 4.17mmol), 并将反应在 60℃ 搅拌 72 小时。反应用 25mL 水猝灭。水层用乙酸乙酯提取 (3x25mL)。合并的有机层用盐水洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 并且真空浓缩。硅胶色谱纯化 (20–35% 乙酸乙酯: 己烷), 得到标题化合物和起始原料, 将其以混合物形式用于下一步 (150mg, 1 : 2 产物: 起始原料)。

[0254] B. 1-(叔丁氧羰基)-4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-4-甲酸的制备。将得自步骤 A 的产物混合物 (150mg) 聚集在 1 : 2 的甲醇: 水 (3mL) 中。加入氢氧化锂一水合物 (150mg), 并将混合物加热到 60℃, 保持 2 小时。将反应冷却到室温并且倾倒在饱和 NaHSO_4 水溶液 (25mL) 上。水层用乙酸乙酯提取 (3x25mL)。合并的有机层用盐水洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 并且真空浓缩, 得到 1-(叔丁氧羰基)-4-羟基哌啶-4-甲酸和 1-(叔丁氧羰基)-4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-4-甲酸为 2 : 1 的混合物, 为粘稠的油状物, 其不经一步纯化用于下一步。MS (ES+) $[M+H]^+ = 304.2$ 。

[0255] C. 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)-4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯的制备。向得自步骤 B 的羧酸, 吡啶 (0.2mL, 2.48mmol), 和 DMF (催化量, 2 滴) 的 CH_2Cl_2 (3.1mL) 溶液中滴加草酰氯 (60 μL , 0.68mmol, 小心: 放热反应)。在气体放出平息之后, 将反应在室温搅拌 30 分钟。向溶液中一次性加入 3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯 (112mg, 0.62mmol), 将其搅拌另外的 30 分钟。反应用饱和 NH_4Cl 水溶液猝灭, 并将水层用乙酸乙酯提取 (3x50mL)。合并的有机层用盐水洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 过滤, 并且真空浓缩。硅胶色谱纯化 (80% 乙酸乙酯: 己烷), 得到标题化合物, 为灰白色固体 (150mg)。MS (ES+) $[M+\text{CH}_3\text{CN}]^+ = 529.3$ 。

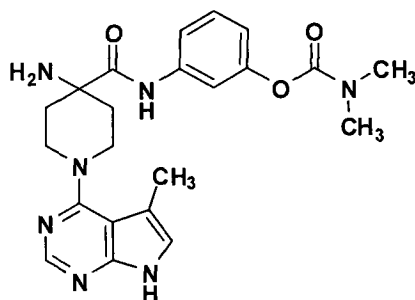
[0256] D. 3-(4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤 C 的 4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)-苯基氨基甲酰基)-4-(2-甲氧基乙氧基)-哌啶-1-甲酸叔丁酯 (150mg, 0.322mmol) 的甲醇 (2mL) 溶液中加入 HCl (4M 的二氧杂环己烷溶液, 0.3mL)。将反应在 50℃ 加热 1 小时, 然后真空浓缩, 得到标题化合物, 为盐酸盐。MS (ES+) $[M+H]^+ = 366.3$ 。

[0257] E. 3-(4-(2-甲氧基乙氧基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤D的3-(4-(2-甲氧基乙氧基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯,和N,N-二异丙基乙基胺(0.28mL, 1.6mmol)的异丙醇(1.0mL)溶液中加入4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(55mg, 0.322mmol)。将反应混合物在密封的高压管中加热到110℃,保持17小时,期间混合物变为均相的。将混合物真空浓缩并且通过制备性HPLC纯化(30x100mm C18柱,5-100%乙腈:水(10mM NH₄OAc),15分钟,45mL/min)得到标题化合物(17.4mg),为白色固体。

[0258] ¹H NMR(400MHz, CD₃OD)ppm 8.20(s, 1H), 7.51(t, J = 2.02Hz, 1H), 7.40(ddd, J = 8.08, 2.02, 1.01Hz, 1H), 7.33(t, J = 8.08Hz, 1H), 6.98-7.02(m, 1H), 6.89(ddd, J = 7.83, 2.27, 1.01Hz, 1H), 3.92-4.01(m, 2H), 3.69(br. s., 4H), 3.51(s, 3H), 3.29-3.38(m, 2H), 3.12(s, 3H), 2.99(s, 3H), 2.43(d, J = 1.01Hz, 3H), 2.31(dt, J = 13.64, 4.29Hz, 2H), 1.97-2.07(m, 2H)。MS(ES+) [M+H]⁺ = 497.3。

[0259] 实施例27:3-(4-氨基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0260]



[0261] A. 4-(叔丁氧羰基氨基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯的制备。将N-Boc-氨基-(4-N-Boc-哌啶基)甲酸(0.114g, 0.33mmol), HATU(0.151g, 0.40mmol)和N,N-二异丙基乙基胺(128mg, 1.0mmol)合并并在乙酸异丙酯(2.3mL)中并且在室温搅拌15分钟。加入3-氨基苯基二甲基氨基甲酸酯(0.072g, 0.40mmol),并将混合物在80℃加热1.5小时。将反应混合物冷却,用EtOAc稀释,用2N Na₂CO₃, 1N HCl, 和盐水洗涤,然后用MgSO₄干燥并且浓缩。通过硅胶色谱纯化(60% EtOAc/己烷),得到标题化合物(0.075g, 45%),为白色固体。MS(ES+) [M+NH₄]⁺ = 524。

[0262] B. 3-(4-氨基哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。向得自步骤A的4-(叔丁氧羰基氨基)-4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(0.141g, 0.28mmol)的MeOH(2mL)溶液中加入HCl(4N, 在二氧杂环己烷中, 0.21mL, 0.84mmol)。将混合物在室温搅拌14小时。这时加入HCl/二氧杂环己烷的另一个等分,并将混合物在室温搅拌另外的24小时。真空除去溶剂,得到标题化合物(0.084g, 98%),将其以粗品形式用于下一步。MS(ES+) [M+H]⁺ = 307。

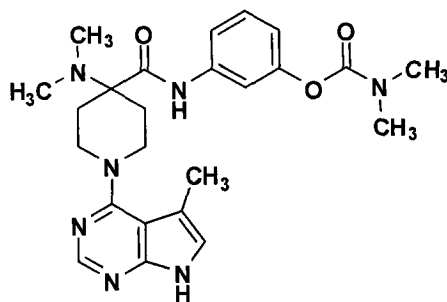
[0263] C. 3-(4-氨基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的制备。将得自步骤B的3-(4-氨基哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯(0.109g, 0.36mmol), 4-氯-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(0.060g, 0.36mmol), 和N,N-二异丙基乙基胺(0.277g, 2.14mmol)合并并在异丙醇(5mL)中并且在密封的管中在120℃加热18小时。将混合物浓缩,并将残余物通过硅胶色谱纯化(0-10%

MeOH/CH₂Cl₂), 得到标题化合物 (0.085g, 55%), 为白色固体。

[0264] ¹H NMR(400MHz, CD₃OD) ppm 8.25(s, 1H), 7.61(m, 1H), 7.47(m, 1H), 7.38(m, 1H), 7.05(d, J = 1.0Hz, 1H), 6.91(m, 1H), 4.00(m, 2H), 2.48(m, 2H), 3.18(s, 3H), 3.05(s, 3H), 2.51(s, 3H), 2.45(m, 2H), 1.72(m, 2H); MS(ES+) [M+H]⁺ = 438。

[0265] 实施例 28: 3-(4-(二甲基氨基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0266]

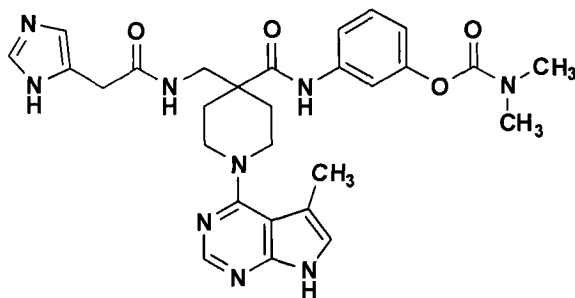


[0267] 将得自实施例 27 步骤 C 的 3-(4-氨基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯 (0.028g, 0.064mmol) 溶解于 MeOH(1mL)。加入甲醛 (37 重量%的 H₂O 溶液, 0.15mmol, 12 μl), 随后加入 AcOH(0.26mmol, 15 μl) 和 NaBH₃CN(0.008g, 0.13mmol)。将混合物在室温搅拌 2 小时之后真空浓缩。通过制备性 HPLC 纯化, 得到标题化合物 (0.017g, 57%), 为白色固体。

[0268] ¹H NMR(400MHz, CD₃OD) ppm 8.21(s, 1H), 7.56(m, 1H), 7.46(m, 1H), 7.37(m, 1H), 7.03(d, J = 1.0Hz, 1H), 6.92(m, 1H), 4.08(m, 2H), 3.47(m, 2H), 3.17(s, 3H), 3.04(s, 3H), 2.48(s, 3H), 2.40(s, 6H), 2.26(m, 2H), 2.09(m, 2H); MS(ES+) [M+H]⁺ = 466。

[0269] 实施例 29: 3-(4-((2-(1H-咪唑-5-基)乙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的合成

[0270]



[0271] 向 2-(1H-咪唑-5-基)乙酸 (0.238g, 1.47mmol) 和 HATU(0.372g, 0.978mmol) 在 CH₂Cl₂(5mL) 中的悬浮液加入 N,N-二异丙基乙基胺 (0.51mL, 2.93mmol)。将得到的溶液在室温搅拌 20 分钟。向这个溶液中加入在 CH₂Cl₂(5mL) 中的 3-(4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯的乙酸盐 (得自实施例 20, 0.500g, 0.978mmol) 和 N,N-二异丙基乙基胺 (0.17mL)。将反应在室温搅拌 6 小时, 然后用 H₂O(10mL) 和 CH₂Cl₂(20mL) 稀释。混合物用 CH₂Cl₂ 提取 (2x10mL), 并将合并的有机物用 NaHCO₃(10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并且真空浓缩。残余物通过快速色谱法纯化 (3-10% MeOH : CH₂Cl₂) 得到标题化合物 (0.393g, 72% 收率), 为

白色固体。将这个固体悬浮在水中,并且加入乙酸,直到溶液变为澄清。将这个溶液冻结并且冻干,得到标题化合物的二乙酸盐 (0.477g)。

[0272] ^1H NMR (400MHz, MeOD- d_6) δ ppm 8.17 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 0.76\text{Hz}$, 1H), 7.47 (t, $J = 2.02\text{Hz}$, 1H), 7.37 (ddd, $J = 1.01, 1.77, 8.08\text{Hz}$, 1H), 7.30 (t, $J = 8.08\text{Hz}$, 1H), 6.98 (d, $J = 1.01\text{Hz}$, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.87 (ddd, $J = 1.01, 2.27, 8.08\text{Hz}$, 1H), 3.87 (ddd, $J = 3.28, 3.28, 14.15\text{Hz}$, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.52 (s, 2H), 3.32-3.38 (m, 2H), 3.12 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.42 (d, $J = 0.76\text{Hz}$, 3H), 2.35-2.42 (m, 2H), 1.96 (s, 6H), 1.75-1.85 (m, 2H)。MS (ES+) [M+H] = 560。

[0273] 实施例 30 :另外的化合物

[0274] 使用本文中所述的方法和本领域中已知的方法,制备了表 1 中的下列另外的化合物。以下为一些化合物提供的 LIMK2IC₅₀数据是使用实施例 32 中所述的试验测定的。

[0275] 表 1

[0276]

化合物	MS (M+H) ⁺	LIMK2 IC ₅₀
N-(3-(4-氟苯氧基)苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	460	< 250nM
N-(3-溴苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	428	< 250nM
N-(3-溴苯基)-1-(5-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-甲基哌啶-4-甲酰胺	450	< 250nM
N-(3-(N-异丙基氨基磺酰基)苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	471	< 250nM
4-烯丙基-N-(3-溴苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	456	< 250nM
N-(4-甲氧基苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	380	< 250nM

4-烯丙基-N-(3-叔丁基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	432	< 250nM
4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-(3-(三氟甲基)苯基)哌啶-4-甲酰胺	418	< 250nM
4-烯丙基-N-(3-(4-氟苯氧基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	486	< 250nM

[0277]

4-烯丙基-N-(3-氟苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-s]咪啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺	394	< 250nM
4-烯丙基-N-(3-甲氧基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺	406	< 250nM
3-(4-烯丙基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺)苯基二甲基氨基甲酸酯	463	< 250nM
3-(4-异丙基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺)苯基二甲基氨基甲酸酯	465	< 250nM
4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)-N-苯基哌啶-4-甲酰胺	350	< 250nM
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)-4-丙基哌啶-4-甲酰胺)苯基二甲基氨基甲酸酯	465	< 250nM
N-(3-溴-4-氟苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺	447	< 250nM

4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-(3-(吗啉基磺酰基)苯基)哌啶-4-甲酰胺	499	< 250nM
4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-间甲苯基哌啶-4-甲酰胺	364	< 250nM
N-(3-异丁酰胺基苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	435	< 250nM
N-(3-(2-(二甲基氨基)-2-氧代乙基)苯基)-4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	435	< 250nM
3-(4-甲基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基吗啉-4-甲酰胺	479	< 250nM
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-(3-甲基脲基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	509	
3-(4-(2-(二甲基氨基)乙氧基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	524	

[0278]

3-(4-氧基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	448		
3-(4-(乙酰胺基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	494		< 250nM
3-(4-(2-氨基乙基氨基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	481		< 250nM
3-(4-(2-(叔丁氧羰基氨基)乙基氨基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	581		< 250nM
3-(4-(2-(苄氧基)乙基氨基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	572		< 250nM
3-(4-氧基-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	448		< 250nM
3-(4-(2-羟基乙基氨基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	482		< 250nM

3-(4-((1-苄基-1H-四唑-5-基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	595	< 250nm
3-(4-((1H-四唑-5-基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	505	< 250nm
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啶-4-基)-4-(甲基磺酰胺基)基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	530	< 250nm
3-(4-((N,N-二甲基氨基磺酰基氨基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	559	< 250nm
3-(4-((甲氧基羰基氨基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	510	< 250nm
3-(4-((1-甲基-1H-吡唑-4-甲酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	560	< 250nm
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啶-4-基)-4-(吗啉-4-甲酰胺基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	565	< 250nm

[0279]

3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-(脲基甲基)哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯	495	< 250nM
3-(4-((3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯	568	< 250nM
3-(4-((1-叔丁氧羰基氨基环丙烷甲酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯	635	< 250nM
3-(4-((2-氨基乙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯	509	< 250nM
3-(4-((2-(二甲基氨基)乙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯	537	< 250nM
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-((氨基磺酰基氨基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯	531	< 250nM
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-(2H-四唑-5-基)哌啶-4-甲酰胺基) 苯基二甲基氨基甲酸酯	491	< 250nM

3-(4-((1H-咪唑-2-基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	503	< 250nm
3-(4-((1-氨基环丙烷甲酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	535	< 250nm
(S)-3-(4-((2-氨基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	589	< 250nm
4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啉-4-基)-N-(3-(噁唑-5-基)苯基)哌啶-4-甲酰胺	432	< 250nm
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啉-4-基)-4-(吗啉基甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	522	< 250nm
(S)-3-(4-((2-氨基-3-羟基丙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]噻啉-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	539	< 250nm

[0280]

(S)-3-(4-((2,5-二氨基戊酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	566	< 250nm
3-(4-(叠氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	478	< 250nm
4-(氨基甲基)-N-(3-羟基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	381	< 250nm
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-(2-吗啉基乙基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	536	< 250nm
二甲基 1-((4-(3-(二甲基氨基甲酰基氧基)苯基氨基甲酰基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-4,5-二甲酸酯	620	< 250nm
3-(4-((5-甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	560	< 250nm
3-(4-((2-(2-甲氧基乙氧基)乙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	568	< 250nm

4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-间甲苯基哌啶-4-甲酰胺	379	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-氟苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	399	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-甲氧基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	395	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-氟苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	383	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-(异丙基氨基甲酰基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	450	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-(二甲基氨基甲酰基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	436	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-(2-(二甲基氨基)-2-氧代乙氧基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	466	< 250nM

[0281]

3-(4-((3-甲氧基丙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	538	< 250nm
3-(4-((2-甲氧基乙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	524	< 250nm
4-(氨基甲基)-N-(3-(2-甲氧基乙氧基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	439	< 250nm
4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-(3-(三氟甲基)苯基)哌啶-4-甲酰胺	433	< 250nm
4-(氨基甲基)-N-(3-氰基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-基)哌啶-4-甲酰胺	390	< 250nm
3-(4-((2-(2,5-二氧代咪唑烷-4-基)乙酰胺基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	592	< 250nm
4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-(2-(氨基)苯并[d]噁唑-6-基)哌啶-4-甲酰胺	435	< 500nm

4-(氨基甲基)-N-(2-(二甲基氨基)苯并[d]噁唑-6-基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	449	< 500nM
3-(4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺) 苯基二乙基氨基甲酸酯	480	< 250nM
3-(4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺) 苯基吡咯烷-1-甲酸酯	478	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-溴苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	443	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-异丙氧基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	423	< 250nM
4-(氨基甲基)-N-(3-叔丁基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺	421	< 250nM
(R)-3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-((吡咯烷-2-甲酰胺)甲基)哌啶-4-甲酰胺) 苯基二.甲基氨基甲酸酯	549	

[0282]

3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)-4-((甲基氨基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	466		
3-(4-(2-(二甲基氨基)乙基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二乙基氨基甲酸酯	522		
4-(2-(二甲基氨基)乙基)-N-(3-异丙氧基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺	465		
N-(3-叔丁基苯基)-4-(2-(二甲基氨基)乙基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺	463		
3-(1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)-4-((5-氧代吡咯烷-2-甲酰胺基)甲基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯	563		
N-(3-溴苯基)-4-(2-(二甲基氨基)乙基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺	485		
4-(2-(二甲基氨基)乙基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)-N-(3-(三氟甲基)苯基)哌啶-4-甲酰胺	475		

3-(4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺基)苯基二异丙基氨基甲酸酯	508	
4-(氨基甲基)-N-(4-(氨基甲基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺	394	
4-(氨基甲基)-N-(4-((二甲基氨基)甲基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺	422	
4-(氨基甲基)-N-(3-乙氧基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺	409	
4-(氨基甲基)-N-(3-异丁氧基苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺	437	
(R)-4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)-N-(3-(四氢呋喃-3-基氧基)苯基)哌啶-4-甲酰胺	451	
4-(氨基甲基)-N-(3-(环戊基氧基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪唑-4-基)哌啶-4-甲酰胺	449	

[0283]

465	4-((氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-N-(3-(四氢-2H-吡喃-4-基氧基)苯基)哌啶-4-甲酰胺
467	4-((氨基甲基)-N-(3-((3R,4R)-4-羟基四氢呋喃-3-基氧基)苯基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌啶-4-甲酰胺

[0284] LIMK2 的表达和纯化

[0285] 使用 BAC-to-BAC[®] 杆状病毒表达系统 (Baculovirus Expression System, Invitrogen) 表达 LIMK2。根据使用手册中提供的生产商说明书生产重组杆状病毒。简而言之,将携带 LIMK2 插入物的质粒 (pFactBac1 或 pFastBacHT) 转化到 MAX Efficiency

DH10Bac 感受态大肠埃希氏杆菌中以产生重组杆粒。DH10Bac 大肠埃希氏杆菌宿主株包含具有 mini-attTn7 目标位置和辅助细胞质粒的杆状病毒穿梭载体（杆粒），并且允许在 pFastBac 载体上的 mini-Tn7 单元和杆粒上的 mini-attTn7 目标位置之间的移位之后产生重组杆粒。移位反应在由辅助细胞质粒提供的移位蛋白的存在下进行。将细胞铺板并将白色的菌落拾起用于如使用手册中所述进行杆粒分离。

[0286] 将分离的杆粒 DNA 转染到 SF9 细胞中以产生重组杆状病毒，并且在转染后五天收集病毒。将病毒在 T75 烧瓶中以 0.2 的多重感染度 (MOI) 扩增。扩增的病毒用于以 MOI 5 感染 SF9 细胞，用于蛋白质表达。

[0287] 对于 LIMK2 构建体的小规模纯化，使用感染有重组杆状病毒的 Sf9 细胞的 50ml 培养物。通过以 500xg 离心 5 分钟收获细胞。然后将细胞再悬浮在细胞裂解缓冲液（每克细胞为 5 体积）中。典型的细胞裂解缓冲液包含以下：50mM HEPES (pH 8.0)，300mM KCl，10% 甘油，1% NP-40，15mM 咪唑，1mM 苯胺，和 Roche 完全蛋白酶抑制剂（每 50ml 细胞裂解液为 1 片）。通过使细胞悬浮液以 14,000–20,000psi 的液体压力通过 Microfluidics Microfluidizer M-110Y 一次进行细胞裂解，随后将细胞裂解液在 4°C 以 60,000xg 离心 15 分钟。

[0288] 然后将上清液直接加载到包含共价连接于次氨基三乙酸 NTA 的钴离子的色谱基质上。将色谱基质在与蛋白质加载溶液相同的缓冲液中平衡。带有离子的树脂典型地具有相当于每 ml 添装树脂为 5–10mg 组氨酸标记的蛋白质的结合能力。可被加载到柱上的提取物的量取决于提取物中的可溶组氨酸标记的蛋白质的量而定。然后将柱以逐步的方式进行洗脱，第一阶段用：50mM HEPES (pH 8.0)，300mM KCl，10% 甘油，1% NP-40，15mM 咪唑，1mM 苯胺；第二阶段用 20mM HEPES (pH 8.0)，500mM KCl，10% 甘油，和 20mM 咪唑；第三阶段用 20mM HEPES (pH 8.0)，100mM KCl，10% 甘油，和 20mM 咪唑；随后用含 250mM 的在相同缓冲液中的咪唑洗脱。然后通过 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析 LIMK2 蛋白质溶液，使用同时针对蛋白质的羧基端点和内部催化性结构域的商用抗体。为了进行储存，将蛋白质透析到 50mM Tris (pH 7.5)，150mM NaCl，0.1% BME，0.03% Brij-35，和 50% 甘油中。

[0289] 在 Wave Bioreactor (Wave Biotech) 中使用 10L 的培养物体积进行大规模的 LIMK2 纯化。将 $2-3 \times 10^6$ 个活细胞 / mL 的 10L 的细胞培养物以 MOI = 5pfu/ 细胞感染并且在感染后 48 小时收获。

[0290] 体外 LIMK2 抑制试验

[0291] 开发了用于识别 LIMK2 抑制剂的体外试验。分析读数是 ^{33}P 从 ATP 底物并入到固定化髓鞘碱性蛋白涂覆的快速板 (Perkin Elmer Biosciences) 中，将板在装备有读板器的闪烁计数器上计数 (TopCount, Packard Bioscience, Meriden, CT)。使用 384 孔的平的 MBP 快速板，总的试验体积是 50 μl 。HTS 程序利用 Biomek FX 用于稀释。

[0292] 对于每个试验，成分和条件如下：将 200ng 的酶在试验缓冲液（1X 试验缓冲液包含 30mM HEPES (pH 8.0)，5mM DTT，和 10mM MgCl_2 ），10 μM ATP，0.2 μCi [γ - ^{33}P]-ATP 和 10 μM 的潜在的抑制性化合物中温育。将反应在室温下温育 60 分钟，用 75 μl 的终止 / 洗涤缓冲液（1X 终止 / 洗涤缓冲液包含 50mM EDTA 和 20mM Tris (pH 7.4)）洗涤 3 次，然后将板在闪烁计数器上读数。在每个板上将不同浓度的星孢菌素（400nM，200nM，100nM 和 50nM；购自 BIOMOL (Plymouth Meeting, PA)）用作对照。

[0293] 地塞米松诱导的眼高压模型

[0294] 为二十八日龄小鼠 Alzet 微型渗透泵 (DURECT Corp., Cupertino, CA) 填充水溶性地塞米松 (dex) 在 PBS (Sigma, St. Louis, MO) 中的溶液, 使得它们会每天释放大约 0.1mg 的 dex。一旦为泵填充 dex, 使泵在 PBS 中在 37°C 平衡 60 小时。将经过平衡的泵经手术皮下植入到体重为 25-35 克的野生型 C57:129F2 杂交小鼠的后背上。手术切口用 5-0 编织线 (ROBOZ, Gaithersburg, MD) 缝合并研究的整个持续时间用抗生素膏剂处理。手术切口用 TissueMend II (Webster Veterinary, Houston, TX) 粘合。在手术当天和手术后 24 小时通过 IP 注射止痛剂 (丁丙诺啡)。使用 TonoLab (Colonial Medical Supply Co., Franconia, NH) 张力计测量这些小鼠的眼内压 (IOP)。将小鼠用异氟烷适度地镇静, 并在进行 IOP 测量之前用 0.5% 丙美卡因 ((Akorn, Buffalo Grove, IL) 局部麻醉。在微型泵植入之前的 1 天测量基线 IOP。在微型泵植入之后, 每周进行 IOP 测量 2-3 次, 持续 4 周。在植入之后的第 21 到 28 天使用潜在的降眼压化合物进行药理学研究。

[0295] 体内效果

[0296] 然后在如上所述的小鼠眼高压模型中试验本发明的化合物。对小鼠的眼睛局部给药的本发明的四种化合物的效果描述在以下表 2 中:

[0297] 表 2

[0298]

化合物	剂量 ^a	制剂 ^b	IOP 的变化(研究的个数) ^c		
			2 小时	4 小时	6 小时
A	30	1	-4.4	-1.6	未试验
A	3	1	-4.2(7)	-2.6(7)	-1.3(4)
A	0.3	1	-2.0(3)	-1.6(3)	-0.1
A	3	2	-4.6	-2.6	-1.4
B	30	2	-4.1	-2.5	-0.3
B	3	2	-3.4	-2.2	-0.3
C	3	3	-3.5(2)	-0.9(2)	-0.5(2)
D	3	3	-1.8	-0.8	未试验
D	0.3	3	-2.2	-0.4	未试验

[0299] ^a每只眼睛的微克数。

[0300] ^b用于制备不同制剂的眼科可接受的赋形剂。制剂 1 的 pH 是 7.2; 制剂 2 的 pH 是 7.2; 和制剂 3 的 pH 是 6.0。

[0301] ^c时间是剂量给药之后的小时数。

[0302] 在眼高压模型中将化合物 A 的效果与噻吗洛尔的效果进行比较。如图 1 所示, 每只眼睛局部给药 3 μg 化合物 A 产生基本上如同每只眼睛局部给予 15 μg 噻吗洛尔的效果。

[0303] 化合物 A = 3-(4-(氨基甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)哌

啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯。

[0304] 化合物 B = 3-(4-(2-(二甲基氨基)乙基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯。

[0305] 化合物 C = 3-(4-((1H-咪唑-4-基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯。

[0306] 化合物 D = 3-(4-((2-甲氧基乙氧基)甲基)-1-(5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]咪啉-4-基)哌啉-4-甲酰胺基)苯基二甲基氨基甲酸酯。

[0307] 上面引用的所有出版物(例如,专利和专利申请)都全文并入本文作为参考。

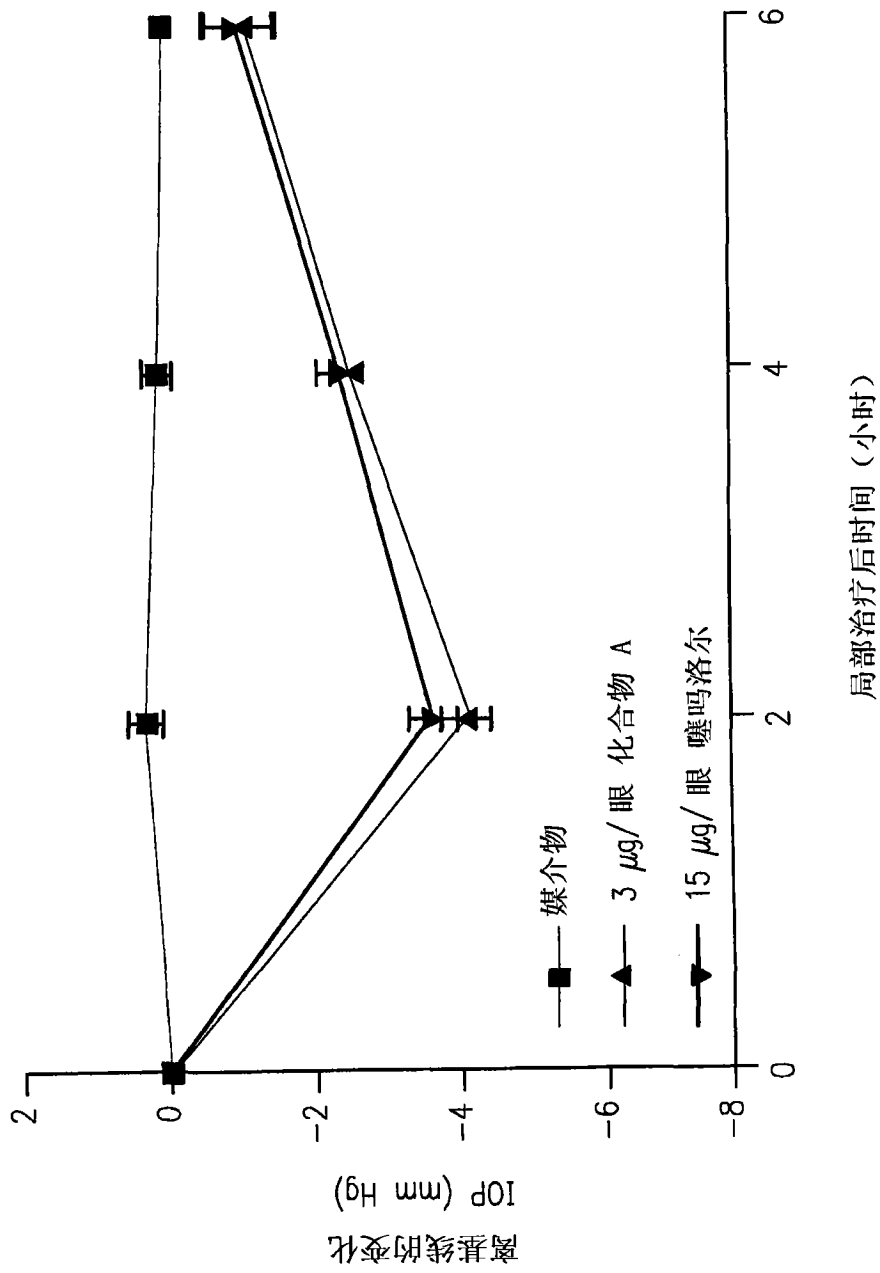


图 1