



(10) 授权公告号 CN 115190878 B

(45) 授权公告日 2024.10.29

(21) 申请号 202180017759.9

(22) 申请日 2021.03.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115190878 A

(43) 申请公布日 2022.10.14

(30) 优先权数据
62/983,931 2020.03.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.08.30

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/070207 2021.03.01

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/178991 EN 2021.09.10

(73) 专利权人 施万生物制药研发IP有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 G·T·法斯

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

专利代理师 蒋林清

(51) Int.Cl.
C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 110461839 A, 2019.11.15

审查员 闫娟娟

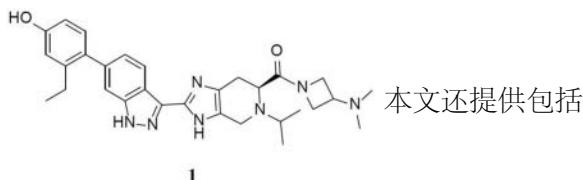
权利要求书2页 说明书50页 附图2页

(54) 发明名称

JAK抑制剂化合物的结晶水合物

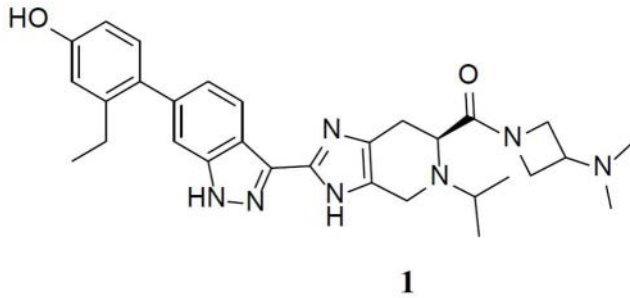
(57) 摘要

本文提供一种式1化合物的结晶水合物，



此类结晶水合物的药物组合物、使用此类结晶水合物治疗呼吸道疾病的方法和适用于制备此类结晶水合物的方法。

1. 一种式1化合物的结晶水合物,



其中所述结晶水合物的特征在于包括在 5.68 ± 0.20 、 8.49 ± 0.20 、 10.43 ± 0.20 、 10.94 ± 0.20 、 11.55 ± 0.20 、 12.20 ± 0.20 、 13.08 ± 0.20 、和 17.06 ± 0.20 的 2θ 值处的衍射峰的粉末X射线衍射图案,以及其中所述结晶水合物为单水合物。

2. 根据权利要求1所述的结晶水合物,其中所述粉末X射线衍射图案的特征进一步在于具有在 26.29 ± 0.20 的 2θ 值处的另外的衍射峰。

3. 根据权利要求1所述的结晶水合物,其中所述结晶水合物的特征在于其中峰位置大体上与图1中所展示的图案的峰位置一致的粉末X射线衍射图案。

4. 根据权利要求1所述的结晶水合物,其中所述结晶水合物的特征在于在 $10^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的加热速率下记录的差示扫描量热法迹线,其在 $212.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 的温度下展示吸热流最大值。

5. 根据权利要求1所述的结晶水合物,其中所述结晶水合物的特征在于差示扫描量热法迹线大体上与图2中所展示的差示扫描量热法迹线一致。

6. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1至5中任一权利要求所述的结晶水合物和药学上可接受的载剂。

7. 一种制备根据权利要求1至5中任一权利要求所述的结晶水合物的方法,所述方法包括:

(a) 在 $55^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 的温度下将(S) - (3 - (二甲氨基)氮杂环丁-1-基) (2 - (6 - (2-乙基-4-羟苯基) - 1H-咪唑-3-基) - 5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮溶解于醇溶剂中以得到溶液;

(b) 使步骤(a)中获得的所述溶液冷却到 $10^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 以产生悬浮液;

(c) 在惰性气体条件下从步骤(b)的所述悬浮液分离固体;

(d) 在 $60^\circ\text{C} \pm 15^\circ\text{C}$ 下干燥步骤(c)中获得的所述固体;

(e) 使步骤(d)中获得的所述固体经受环境湿度和温度条件以得到所述结晶水合物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述醇溶剂为甲醇或乙醇。

9. 一种根据权利要求1至5中任一权利要求所述的结晶水合物的用途,其用于制造用于治疗哺乳动物的呼吸道疾病的药剂。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述呼吸道疾病选自以下组成的群组:哮喘、慢性阻塞性肺病、囊肿性纤维化、肺炎、自发性肺纤维化、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、支气管炎、气肿、类肉瘤病、嗜酸粒细胞性疾病、蠕虫感染、肺动脉高血压、淋巴管平滑肌瘤、支气管扩张症、过敏性支气管肺曲菌病、嗜酸粒细胞性肉芽肿伴多血管炎、嗜酸性粒细胞增多综合征、吕弗勒综合征、和肺移植抗宿主病。

11. 根据权利要求9所述的用途,其中所述呼吸道疾病为哮喘。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述哮喘为中度到重度哮喘。

13. 根据权利要求9所述的用途,其中所述药剂通过吸入投予。

14. 根据权利要求10所述的用途,其中所述肺炎是浸润性肺病、药物诱导的肺炎、真菌诱导的肺炎、过敏性肺炎、自发性急性嗜酸粒细胞性肺炎、自发性慢性嗜酸粒细胞性肺炎、阻塞性细支气管炎伴机化性肺炎或免疫检查点抑制剂诱导的肺炎。

15. 根据权利要求1至5中任一权利要求所述的结晶水合物的用途,其用于制造用于预防或延迟哺乳动物的肺移植排斥反应的药剂。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述肺移植排斥反应选自由以下组成的群组:原发性移植物功能障碍、机化性肺炎、急性排斥反应、淋巴细胞性细支气管炎和慢性肺同种异体移植物功能障碍。

17. 根据权利要求15所述的用途,其中所述肺移植排斥反应为急性肺移植排斥反应。

18. 根据权利要求15所述的用途,其中所述肺移植排斥反应为慢性肺同种异体移植物功能障碍。

19. 根据权利要求15所述的用途,其中所述肺移植排斥反应选自由以下组成的群组:阻塞性细支气管炎、局限性慢性肺同种异体移植物功能障碍和嗜中性同种异体移植物功能障碍。

20. 根据权利要求15所述的用途,其中所述药剂通过吸入投予。

JAK抑制剂化合物的结晶水合物

技术领域

[0001] 本文中提供一种适用于治疗呼吸道疾病和其它疾病的JAK抑制剂化合物的结晶水合物形式。本文中还提供包括此类结晶形式的药物组合物、使用所述结晶形式治疗例如呼吸道疾病的方法和适用于制备此类结晶形式的方法。

背景技术

[0002] 细胞因子为细胞间信号传导分子,其包含趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。细胞因子对于正常细胞生长和免疫调节为至关重要的且也驱动免疫介导的疾病并有助于恶性细胞生长。许多细胞因子水平升高与大量疾病或病况有关,尤其以炎症为特征的那些疾病的病变。取决于经由转录因子的信号转导子和转录活化因子(STAT)家族信号传导的杰纳斯(Janus)酪氨酸激酶(JAK)家族,许多与疾病有关的细胞因子经由信号传导通路起作用。

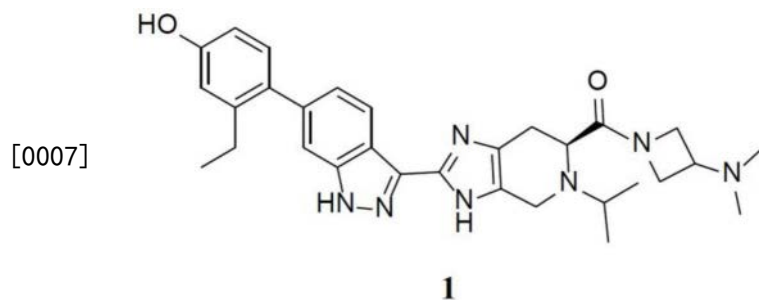
[0003] JAK家族包括四个成员JAK1、JAK2、JAK3和酪氨酸激酶2(TYK2)。细胞因子与JAK依赖性细胞因子受体的结合诱导受体二聚,此使得JAK激酶上的酪氨酸残基磷酸化,从而影响JAK活化。磷酸化JAK转而结合各种STAT蛋白质且使各种STAT蛋白质磷酸化,所述STAT蛋白质在细胞核中二聚、内化且直接调节基因转录,在其它作用中,产生与发炎性疾病相关的下游作用。JAK通常与细胞因子受体成对缔合作为均二聚体或异二聚体。特定细胞因子与特定JAK对相关。JAK家族的四个成员中的每一个都与发炎相关的细胞因子中的至少一个的信号传导有关。

[0004] 哮喘为气道的慢性疾病,其无预防或治愈方法。所述疾病的特征在于气道的发炎、纤维化、高反应性和重构,其皆促成气流限制。全世界估计有3亿人罹患哮喘,且据估计,截至2025年,患有哮喘的人数将增长超过1亿。尽管大多数患者可通过使用可与白三烯调节剂(leukotriene modifier)和/或长效 β 促效剂组合的吸入式皮质类固醇来达成对哮喘症状的控制,但仍有患有重度哮喘的患者亚群的疾病不受常规疗法控制。与经由JAK-STAT通路进行信号传导的哮喘发炎有关的细胞因子包含IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-23、IL-31、IL-27、胸腺基质淋巴生成素(TSLP)、干扰素- γ (IFN γ)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。除哮喘以外,气道发炎也为其它呼吸道疾病所特有的。慢性阻塞性肺病(COPD)、囊肿性纤维化(CF)、肺炎、间质肺病(包含自发性肺纤维化)、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、支气管炎、气肿和阻塞性细支气管炎也为呼吸道疾病,其中病理生理学被认为与JAK信号传导细胞因子有关。

[0005] JAK信号传导细胞因子也在T细胞活化中起主要作用,T细胞为对许多免疫过程重要的免疫细胞亚型。病理性T细胞活化在多种呼吸道疾病的病因中至关重要。自体反应性T细胞在阻塞性细支气管炎伴机化性肺炎(也称为COS)中起作用。与COS类似,肺移植排斥反应的病因与所移植供体肺的接受者的T细胞的异常T细胞活化有关。肺移植排斥反应可早期以原发性移植物功能障碍(PGD)、机化性肺炎(OP)、急性排斥反应(AR)或淋巴细胞性细支气管炎(LB)形式出现,或其可在肺移植后数年以慢性肺同种异体移植物功能障碍(CLAD)形式

出现。CLAD先前称为阻塞性细支气管炎 (BO),但现在被视为可具有不同病理学表达的综合征,包含BO、限制性CLAD (rCLAD或RAS) 和嗜中性同种异体移植物功能障碍。慢性肺同种异体移植物功能障碍 (CLAD) 为肺移植接受者的长期管理中的主要挑战,这是因为其导致所移植肺逐渐失去功能(戈捷 (Gauthier) 等人,《当前移植报告 (Curr. Transplant. Rep.) 》,2016,3 (3),185-191)。CLAD对治疗的反应不佳,且因此,仍需要能够预防或治疗这种病况的有效化合物。例如IFN γ 和IL-5的若干JAK依赖性细胞因子在CLAD和肺移植排斥反应中上调(贝拉斯特吉 (Berastegui) 等人,《临床移植 (Clin. Transplant.) 》2017,31,e12898)。此外,在JAK依赖性IFN信号传导下游的CXCR3趋化因子(例如CXCL9和CXCL10)的高肺水平与肺移植患者的恶化结果有关(林西娅 (Shino) 等人,《公共科学图书馆·综合 (PLOS One) 》,2017,12(7),e0180281)。已展示全身性JAK抑制在肾移植排斥反应中有效(比森蒂 (Vicenti) 等人,《美国移植杂志 (American Journal of Transplantation) 》,2012,12,2446-56)。因此,JAK抑制剂有可能有效预防或延迟肺移植排斥反应和CLAD。如描述为肺移植排斥反应的基础的类似T细胞活化事件也被视为造血干细胞移植后可能发生的肺移植物抗宿主病 (GVHD) 的主要驱动因子。与CLAD类似,肺GVHD为一种慢性进行性病况,其结果极其不佳且目前尚无经批准的治疗。对95位接受全身性JAK抑制剂卢佐替尼 (ruxolitinib) 作为补救治疗的患有类固醇难治性急性或慢性GVHD的患者的回溯性多中心调查研究表明,大多数患者(包含患有肺GVHD的那些患者)对卢佐替尼完全或部分反应(蔡瑟 (Zeiser) 等人,《白血病 (Leukemia) 》,2015,29,10,2062-68)。

[0006] 2019年9月3日提交的共同转让的美国申请序列号16/559,077公开适用作JAK抑制剂的一些二甲基氨基氮杂环丁酰胺化合物。确切来说,化合物(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(化合物1):

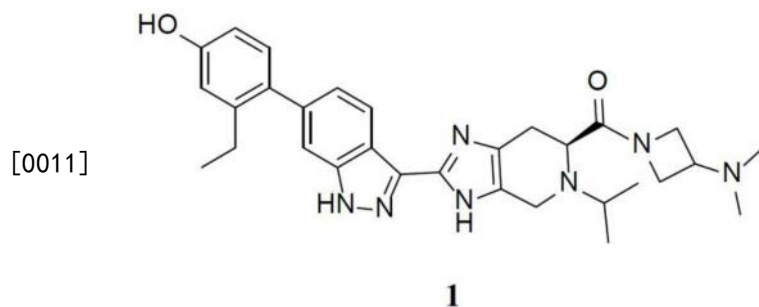


[0008] 在所述申请中特别公开为一种适用于治疗、预防和/或延迟发炎呼吸道疾病的强效非全身性泛JAK抑制剂,所述发炎呼吸道疾病包含哮喘和肺移植排斥反应。

[0009] 为有效地将此化合物用作治疗剂,将需要具有结晶固态盐形式。举例来说,将高度需要具有在适当高温下热稳定的物理形式,从而有助于材料的加工和存储。结晶固体一般优于非晶形式,以提升制品的纯度和稳定性。然而,有机化合物的结晶形式的形成为高度不可预测的。尚不存在可靠方法来预测有机化合物的何种形式(如果存在)将结晶。此外,尚不存在方法来预测何种结晶形式(如果存在)将具有用作药剂所需要的物理特性。因此,需要化合物1的结晶形式。

发明内容

[0010] 本文提供一种式1化合物的结晶水合物：



[0012] 本文还提供药物组合物,其包括本公开的结晶水合物和药学上可接受的载剂。

[0013] 本文提供一种制备本公开的结晶水合物的方法,以及治疗、预防、延迟和/或缓解适合于用JAK抑制剂进行治疗的疾病,确切来说呼吸道疾病和肺移植排斥反应的方法。

[0014] 本文还提供结晶水合物形式的用途,其用于医学疗法中且用于制造用于治疗、预防、延迟和/或缓解适合于用JAK抑制剂进行治疗的疾病,确切来说呼吸道疾病和肺移植排斥反应的调配物或药剂。

附图说明

[0015] 通过参考随附图式来说明本发明的各个方面。

[0016] 图1展示化合物1的结晶水合物的粉末x射线衍射(PXRD)图案。

[0017] 图2展示化合物1的结晶水合物的差示扫描量热法(DSC)热谱图。

[0018] 图3展示化合物1的结晶水合物的热重分析(TGA)曲线图。

[0019] 图4展示在约25°C的温度下观测到的化合物1的结晶水合物的动态湿气吸附(DMS)等温线。

具体实施方式

[0020] 定义

[0021] 除非另外指示,否则当描述本公开(包含其各个方面和实施例)时,以下术语具有以下含义。

[0022] 术语“约”意指指定值的 $\pm 5\%$ 。

[0023] 术语“水合物”意指由水分子和本公开化合物的分子形成的复合物或聚集物,通常呈结晶形式,其中水分子与化合物分子的比可为1:1、小于1:1或大于1:1。

[0024] 当参考例如X射线衍射图案、DSC迹线或TGA迹线时,术语“大体上”包含不必与本文中所描绘的那些图案或迹线相同,但当由所属领域的一般技术人员考虑时处于实验误差或偏差的限值内的图案或迹线。

[0025] 术语“治疗有效量”意指当向需要治疗的患者投予时足以实现治疗的量。

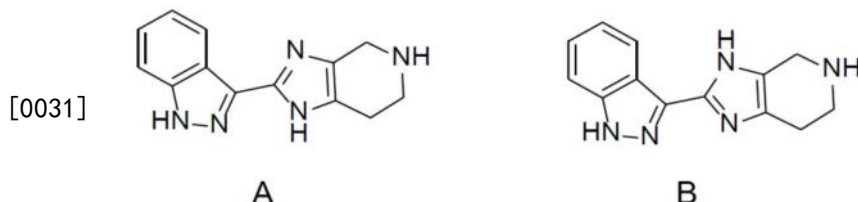
[0026] 术语“治疗(treating/treatment)”意指缓解或抑制患者(尤其人类)的正经治疗的医学病况、疾病或病症(例如,呼吸道疾病);或减轻医学病况、疾病或病症的症状。

[0027] 必须注意,如本说明书和所附权利要求书中所使用,除非另外明确规定内容,否则单数形式“一(a/an)”、“一个”和“所述”可包含多个参考物。

[0028] 命名公约

[0029] 化合物1根据如实施于化学绘图 (ChemDraw) 软件 (马萨诸塞州剑桥市的珀金埃尔默公司 (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA)) 中的IUPAC公约命名为 (S) - (3- (二甲氨基) 氮杂环丁-1-基) (2- (6- (2-乙基-4-羟苯基) -1H-吡唑-3-基) -5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基) 甲酮。

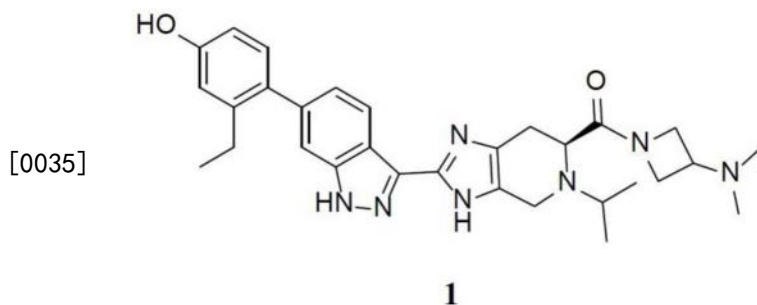
[0030] 此外,在化合物1的结构中的四氢咪唑并吡啶部分的咪唑并部分以下文针对实例1的化合物的片段所说明的互变异构形式存在



[0032] 根据IUPAC公约,这些图示产生咪唑部分的原子的不同编号: (S) - (3- (二甲氨基) 氮杂环丁-1-基) (2- (6- (2-乙基-4-羟苯基) -1H-吡唑-3-基) -5-异丙基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基) 甲酮 (结构A) 与 (S) - (3- (二甲氨基) 氮杂环丁-1-基) (2- (6- (2-乙基-4-羟苯基) -1H-吡唑-3-基) -5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基) 甲酮 (结构B)。将理解,虽然结构以特定形式来展示或命名,但本发明也包含其互变异构体。

[0033] 化合物1的结晶形式

[0034] 本文提供一种式1化合物的结晶水合物 (形式I):



[0036] 在一个实施例中,结晶水合物的特征在于包括 2θ 值为 5.68 ± 0.20 、 10.43 ± 0.20 、 10.94 ± 0.20 和 13.08 ± 0.20 的衍射峰的粉末X射线衍射 (PXRD) 图案。结晶水合物的特征可进一步在于具有 2θ 值为 8.49 ± 0.20 的一个另外的衍射峰的PXRD图案。结晶水合物的特征可进一步在于具有 2θ 值选自 11.55 ± 0.20 、 12.20 ± 0.20 、 17.06 ± 0.20 和 26.29 ± 0.20 的两个或更多个另外的衍射峰的PXRD图案。结晶水合物的特征可进一步在于具有 2θ 值为 11.55 ± 0.20 、 12.20 ± 0.20 、 17.06 ± 0.20 和 26.29 ± 0.20 的另外的衍射峰的PXRD图案。

[0037] 结晶水合物的特征可在于具有 2θ 值选自 5.68 ± 0.20 、 8.49 ± 0.20 、 10.43 ± 0.20 、 10.94 ± 0.20 、 11.55 ± 0.20 、 12.20 ± 0.20 、 13.08 ± 0.20 、 15.94 ± 0.20 、 16.24 ± 0.20 、 17.06 ± 0.20 、 17.60 ± 0.20 、 18.41 ± 0.20 、 18.82 ± 0.20 、 18.96 ± 0.20 、 21.90 ± 0.20 、 22.08 ± 0.20 、 22.27 ± 0.20 、 24.55 ± 0.20 和 26.29 ± 0.20 的2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个衍射峰的PXRD图案。

[0038] 如粉末X射线衍射的领域中所熟知,与相对峰高度相比,PXRD光谱的峰位置对实验细节 (例如样品制备和仪器几何结构的细节) 相对更不敏感。因此,在一个实施例中,结晶水合物的特征在于其中峰位置大体上与图1中所展示的那些峰位置一致的粉末x射线衍射图

案。

[0039] 在另一实施例中,结晶水合物的特征在于在暴露于高温时的其行为。如图2中所显示,在10°C/分钟的加热速率下记录的差示扫描量热法(DSC)迹线展现出起始于约55.1°C且在约139.4°C下达到峰值的脱水吸热,和鉴定为起始于约198.6°C且在约212.4°C下达到峰值的熔融转变的吸热流峰。在一个实施例中,结晶水合物形式(形式I)的特征在于在10°C/分钟的加热速率下记录的差示扫描量热法迹线在 $212.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 的温度下展示吸热流最大值。在另一实施例中,吸热流最大值是在 $212.4 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度下。在另一实施例中,吸热流最大值是在 $212.4 \pm 1^\circ\text{C}$ 的温度下。

[0040] 在一个实施例中,结晶水合物为单水合物。

[0041] 图3的热重分析(TGA)迹线展示,达100.0°C时,重量损失为约3.4%。化合物在约27°C的起始温度下脱水。可在约248.2°C的起始温度下看出与分解相关的重量损失。

[0042] 已证实本发明的结晶水合物具有可逆的吸附/解吸附特征曲线。固体为中度吸湿的。如图4中所展示,当在室温下暴露于0%与90%之间的相对湿度范围时,结晶水合物展现出约5.3%的总吸湿量。

[0043] 形式I的特征在于如通过单晶X射线结晶学所测定具有以下尺寸的单位晶胞: $a=20.8736(5) \text{ \AA}$; $b=9.15021(19) \text{ \AA}$; $c=15.7412(3) \text{ \AA}$; $a=90^\circ$; $b=98.4786(18)^\circ$; 且 $g=90^\circ$ 。在100(2)K的温度下分析的形式I的单晶的特征在于具有以下尺寸的单斜晶系: $a=20.8736(5) \text{ \AA}$; $b=9.15021(19) \text{ \AA}$; $c=15.7412(3) \text{ \AA}$; $a=90^\circ$; $b=98.4786(18)^\circ$; $g=90^\circ$; 晶胞体积(V)为 $2973.67(11) \text{ \AA}^3$,和空间群C2。

[0044] 形式I在如实例10中所展示的温度和相对湿度的加速条件下展现出良好的稳定性。

[0045] 合成程序

[0046] 可由易于获得的起始材料使用以下实例中所描述的程序或使用本申请的现有技术章节中所列的共同转让的美国申请中所描述的程序来制备化合物1。

[0047] 形式I可通过以下来制备:

[0048] (a) 在 $55^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 的温度下将(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮溶解于醇溶剂中以得到溶液;

[0049] (b) 使步骤(a)中获得的溶液冷却到 $10^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 以产生悬浮液;

[0050] (c) 在惰性气体条件下从步骤(b)的悬浮液中分离固体;

[0051] (d) 在 $60^\circ\text{C} \pm 15^\circ\text{C}$ 下干燥步骤(c)中获得的固体;

[0052] (e) 使步骤(d)中获得的固体经受环境湿度和温度条件以得到结晶水合物。

[0053] 在一些实施例中,醇溶剂为甲醇。在一些实施例中,醇溶剂为乙醇。

[0054] 在一些实施例中,添加形式I的晶种以在步骤(b)中初始形成悬浮液。

[0055] 药物组合物

[0056] 本公开的结晶水合物固体形式可以药物组合物或调配物的形式使用。此类药物组合物可有利地通过吸入投予给患者。另外,可通过任何可接受的投予途径投予药物组合物,所述投予途径包含但不限于口服、局部(包含经皮)、经直肠、经鼻和非经肠投予模式。

[0057] 因此,在一个实施例中,本文中提供一种药物组合物,其包括药学上可接受的载剂或赋形剂和化合物1的结晶水合物(形式I)。任选地,必要时此类药物组合物可含有其它治疗剂和/或调配剂。当讨论组合物和其用途时,化合物1的结晶水合物(形式I)在本文中也可称为“活性剂”。

[0058] 本公开的药物组合物通常含有治疗有效量的化合物1的结晶水合物(形式I)。然而,本领域技术人员将认识到,药物组合物可含有超过治疗有效量(即主体组合物(bulk composition))或小于治疗有效量(即经设计以用于多次投予以达成治疗有效量的个别单位剂量)。

[0059] 通常,此类药物组合物将含有约0.01重量%到约95重量%的活性剂;包含例如约0.05重量%到约30重量%;和约0.1重量%到约10重量%的活性剂。

[0060] 任何常规载剂或赋形剂可用于本公开的药物组合物中。特定载剂或赋形剂或载剂或赋形剂的组合的选择将取决于正用于治疗特定患者或特定类型的医学病况或疾病病状的授予模式。在这方面,针对特定授予模式制备合适的药物组合物很好地在制药领域技术人员的范围内。另外,本公开的药物组合物中所使用的载剂或赋形剂为可商购的。通过进一步说明,常规调配技术描述于《雷明顿:药学的科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,第20版,利平科特·威廉姆斯(Lippincott Williams)和怀特(White),马里兰州巴尔的摩(Baltimore,Maryland)(2000);和H.C.安塞尔(Ansel)等人,《药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)》,第7版,利平科特·威廉姆斯和怀特,马里兰州巴尔的摩(1999)中。

[0061] 可充当药学上可接受的载剂的材料代表性实例包含但不限于以下:糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素,例如微晶纤维素和其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉末状黄蓍;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,例如丙二醇;多元醇,例如丙三醇、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;褐藻酸;无热原质水;等张生理食盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及用于药物组合物中的其它无毒相容物质。

[0062] 通常通过将活性剂与药学上可接受的载剂和一或多种任选的成分充分且紧密地混合或掺合来制备药物组合物。随后可使用常规工序和设备使所得均匀掺合的混合物成形为片剂、胶囊、丸剂和其类似物或装载到其中。

[0063] 在一个实施例中,药物组合物适用于吸入授予。用于吸入授予的药物组合物通常呈气雾剂或粉末的形式。此类组合物一般使用吸入剂递送装置授予,所述吸入剂递送装置例如干粉吸入器(DPI)、定量吸入器(MDI)、喷雾器吸入器或类似递送装置。

[0064] 在一特定实施例中,药物组合物通过吸入使用干粉吸入器授予。此类干粉吸入器通常以在吸气期间分散于患者的气流中的自由流动粉末形式授予药物组合物。为获得自由流动粉末组合物,治疗剂通常将与合适的赋形剂一起调配,所述赋形剂例如乳糖、淀粉、甘露醇、右旋糖、聚乳酸(PLA)、聚乳酸交酯-共聚-乙交酯(PLGA)或其组合。通常,使治疗剂微粉化且与合适的载剂组合以形成适用于吸入的组合物。

[0065] 用于干粉吸入器中的代表性药物组合物包括乳糖和呈微粉化形式的化合物1的结

晶水合物。此类干粉组合物可例如通过将干燥研磨乳糖与治疗剂组合,且接着干掺合组分来制得。接着通常将组合物装载到干粉施配器中或装载到与干粉递送装置一起使用的吸入套筒或胶囊中。

[0066] 适用于通过吸入投予治疗剂的干粉吸入剂递送装置描述于所属领域中且此类装置的实例为可商购的。举例来说,代表性干粉吸入剂递送装置或产品包含艾欧泽(Aeolizer)(诺华(Novartis));艾尔迈斯(Airmax)(IVAX);克里克海尔(ClickHaler)(信达生物(Innovata Biomed));迪斯克海尔(Diskhaler)(葛兰素史克(GlaxoSmithKline));迪斯科斯(Diskus)/阿库海尔(Accuhaler)(葛兰素史克);伊利帕(Ellipta)(葛兰素史克);易耶海尔(Easyhaler)(奥利昂集团(Orion Pharma));伊克里普(Eclipse)(安内特(Aventis));氟劳坎普(FlowCaps)(好利安(Hovione));汉德海尔(Handihaler)(勃林格殷格翰(Boehringer Ingelheim));普维那(Pulvinal)(凯西(Chiesi));诺它海尔(Rotahaler)(葛兰素史克);斯盖海尔(SkyeHaler)/舍提海尔(Certihaler)(斯凯制药(SkyePharma));推斯特海尔(Twisthaler)(先灵葆雅(Schering-Plough));土布海尔(Turbuhaler)(阿斯利康(AstraZeneca));尤特海尔(Ultrahaler)(安内特);和其类似物。

[0067] 在另一特定实施例中,药物组合物通过吸入使用定量吸入器来投予。此类定量吸入器通常使用压缩推进剂气体排出测量的量的治疗剂。因此,使用定量吸入器投予的药物组合物通常包括治疗剂于液化推进剂中的悬浮液。可采用任何合适的液化推进剂,包含氢氟烷烃(HFA),例如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134a)和1,1,1,2,3,3,3-七氟-正丙烷(HFA 227);和氯氟碳化物,例如 CCl_3F 。在一特定实施例中,推进剂为氢氟烷烃。在一些实施例中,氢氟烷烃调配物含有共溶剂,例如乙醇或戊烷;和/或表面活性剂,例如脱水山梨醇三油酸酯、油酸、卵磷脂和丙三醇。

[0068] 用于定量吸入器中的代表性药物组合物包括约0.01重量%到约5重量%的化合物1的结晶水合物(形式I);约0重量%到约20重量%的乙醇;和约0重量%到约5重量%的表面活性剂;其中剩余部分为HFA推进剂。此类组合物通常通过向含有治疗剂、乙醇(如果存在)和表面活性剂(如果存在)的合适的容器中添加冷却或加压的氢氟烷烃来制备。为制备悬浮液,将治疗剂微粉化,且接着与推进剂组合。接着将组合物装载到气雾剂罐中,其通常形成定量吸入器装置的一部分。

[0069] 适用于通过吸入投予治疗剂的定量吸入器装置描述于所属领域中且此类装置的实例为可商购的。举例来说,代表性定量吸入器装置或产品包含艾欧拜德(AeroBid)吸入器系统(森林制药(Forest Pharmaceuticals));爱喘乐(Atrovent)吸入气雾剂(勃林格殷格翰);福罗稳(Flovent)(葛兰素史克);迈斯艾尔(Maxair)吸入器(3M);舒喘灵(Proventil)吸入器(谢林(Schering));施立稳(Serevent)吸入气雾剂(葛兰素史克);和其类似物。

[0070] 在另一特定实施例中,药物组合物通过吸入使用喷雾器吸入器来投予。此类喷雾器装置通常产生促使药物组合物以载送到患者的呼吸道的雾滴形式喷雾的高速度空气流。因此,当调配用于喷雾器吸入器中时,治疗剂可经微粉化或纳米研磨且与合适的载剂组合形成悬浮液。

[0071] 用于喷雾器吸入器中的代表性药物组合物包括悬浮液,其包括约0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到约20 mg/mL 的本公开的结晶水合物和与雾化调配物相容的赋形剂。在一个实施例中,溶液具有约3到约8的pH。

[0072] 适用于通过吸入授予治疗剂的喷雾器装置描述于所属领域中且此类装置的实例为可商购的。举例来说,代表性喷雾器装置或产品包含能倍乐软雾剂(Respimat Softmist)吸入器(勃林格殷格翰);AERx肺部递送系统(阿迪姆公司(Aradigm Corp.));PARI LC Plus可再用喷雾器(德国百瑞有限公司(Pari GmbH));和其类似物。

[0073] 在又另一实施例中,本公开的药物组合物可替代地以打算用于口服授予的剂型制备。适用于口服授予的药物组合物可呈胶囊、片剂、丸剂、口含锭、扁囊剂、糖衣药丸、粉末、粒剂的形式;或呈于水性或非水性液体中的悬浮液形式;和其类似物;各自含有预定量的化合物1的结晶水合物(形式I)作为活性成分。

[0074] 当打算以固体剂型用于口服授予时,本公开的药物组合物将通常包括活性剂和一种或多种药学上可接受的载剂,例如柠檬酸钠或磷酸二钙。任选地或可替代地,此类固体剂型也可包括:填充剂或增量剂、粘合剂、保湿剂、溶液阻滞剂、吸收加速剂、润湿剂、吸附剂、润滑剂、着色剂和缓冲剂。脱模剂(release agent)、润湿剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于本公开的药物组合物中。

[0075] 形式I也可调配为用于眼部注射的无菌水性悬浮液。可包含于这种水性调配物中的适用赋形剂包含聚山梨醇酯80、羧甲基纤维素、氯化钾、氯化钙、氯化镁、乙酸钠、柠檬酸钠、组氨酸、 α - α -二水合海藻糖、蔗糖、聚山梨醇酯20、羟丙基- β -环糊精和磷酸钠。苯甲醇可充当防腐剂,且可包含氯化钠以调整张力。另外,可将盐酸和/或氢氧化钠添加到溶液中以用于pH调节。用于眼部注射的水性调配物可制备为无防腐剂形式。

[0076] 替代性调配物还可包含控制释放调配物、经皮贴片和非经肠调配物。制备此类替代性调配物的常规赋形剂和方法描述于例如前述由雷明顿(Remington)所著的参考文献中。

[0077] 以下非限制性实例说明了本公开的代表性药物组合物。

[0078] 干粉组合物

[0079] 将化合物1的微粉化结晶水合物(形式I)(1g)与研磨乳糖(25g)掺合。接着将此掺合混合物以每剂量足以提供约0.1mg到约4mg之间的式1化合物的量装载到可剥离泡罩包装的个别泡罩中。使用干粉吸入器授予泡罩的内含物。

[0080] 干粉组合物

[0081] 将化合物1的微粉化结晶水合物(形式I)(1g)与研磨乳糖(20g)掺合以形成化合物与研磨乳糖的重量比为1:20的主体组合物。将掺合组合物包装到每剂量能够递送约0.1mg到约4mg之间的式1化合物的干粉吸入装置中。

[0082] 定量吸入器组合物

[0083] 将化合物1的微粉化结晶水合物形式I(10g)分散于通过将卵磷脂(0.2g)溶解于除矿物质水(200mL)中所制备的溶液中。将所得悬浮液喷雾干燥且接着微粉化以形成包括平均直径小于约1.5 μ m的粒子的微粉化组合物。接着将微粉化组合物装载到定量吸入器套筒中,所述定量吸入器套筒以当通过定量吸入器授予时每剂量足以提供约0.1mg到约4mg的化合物1的量含有加压1,1,1,2-四氟乙烷。

[0084] 喷雾器组合物

[0085] 将本公开的结晶水合物形式I(25mg)悬浮于含有1.5-2.5当量盐酸的溶液中,随后添加氢氧化钠以将pH调节到3.5到5.5,且添加3重量%的甘油。使用每剂量提供约0.1mg到

约4mg的化合物1的喷雾器装置来授予悬浮液。

[0086] 用于眼部注射的水性调配物

[0087] 每毫升无菌水性悬浮液包含5mg到50mg的化合物1的结晶水合物(形式I)、氯化钠(用于张力)、0.99% (w/v) 苯甲醇(作为防腐剂)、0.75% 羧甲基纤维素钠和0.04% 聚山梨醇酯。可包含氢氧化钠或盐酸以将pH调节到5到7.5。

[0088] 用于眼部注射的水性调配物

[0089] 无菌无防腐剂水性悬浮液包含于10mM磷酸钠、40mM氯化钠、0.03% 聚山梨醇酯20和5% 蔗糖中的5mg/mL到50mg/mL的化合物1的结晶水合物(形式I)。

[0090] 效用

[0091] 化合物1已经设计以用于治疗呼吸道发炎和呼吸道纤维变性疾病。确切来说,化合物已经设计以使得能够将强效抗细胞因子药剂直接递送到肺部中的呼吸道疾病的作用位点,同时限制全身性暴露。

[0092] 化合物1已展示为以下JAK酶家族的强效抑制剂: JAK1、JAK2、JAK3和TYK2。另外,已证实化合物1强效抑制促发炎和促纤维化细胞因子。已认识到, JAK抑制剂的广泛抗发炎性作用可抑制正常免疫细胞功能,从而潜在地导致感染的风险增加。本发明化合物已经优化以限制从肺部到血浆中的吸收,因此最小化免疫抑制的风险。

[0093] 如下文的实验章节中所描述,化合物1的吸收和分布已在临床前分析中进行剖析。化合物1在小鼠中进行测试,且在给药后5小时展示在肺组织中的浓度较高且在血浆中的吸收率较低。已展示化合物1抑制促发炎细胞因子IL-13在小鼠肺组织中的影响。具体来说,已证实化合物抑制肺组织中IL-13诱导的STAT6磷酸化,此提供局部肺JAK靶标活体内参与的证据。已在授予测试化合物之后4小时授予促发炎细胞因子IL-13时观测到此作用,从而提供在肺中的显著滞留的另一证据。

[0094] 已证实化合物1在细胞水平和肺组织中的显著滞留方面皆展现强效抑制活性。本发明人的广泛研究已证实,虽然有可能鉴定在细胞水平方面有效的化合物或展示在肺中的显著滞留的化合物,但发现同时展现两种所要特征的化合物更加困难。

[0095] 已在哮喘的临床前模型中稳固地显示JAK抑制剂的抗发炎活性(马拉维亚(Malaviya)等人,《国际免疫药理学(Int. Immunopharmacol)》,2010,10,829-836;松永(Matsunaga)等人,《生物化学和生物物理研究通讯(Biochem. and Biophys. Res. Commun.)》,2011,404,261-267;库德拉茨(Kudlacz)等人,《欧洲药典(Eur. J. Pharmacol)》,2008,582,154-161)。与经由JAK-STAT通路信号传导的哮喘发炎有关的细胞因子包含IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-23、IL-31、IL-27、胸腺基质淋巴生成素(TSLP)、干扰素- γ (IFN γ) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。因此,预期化合物1和其结晶水合物形式I适用于治疗发炎性呼吸道病症,尤其哮喘。哮喘已分类为Th2低亚型和Th2高亚型(辛普森(Simpson)等人,《呼吸学(Respirology)》,2006,11,54-61)。IL4、IL13、IL5和TSLP与Th2高哮喘有关,而IL23/IL12、IL6、IL27和IFN γ 与Th2低哮喘有关。基于其泛JAK抑制性特征曲线,化合物1强效抑制Th2高哮喘和Th2低哮喘的介体。因此,预期化合物1的形式I将适用于治疗Th2高哮喘和Th2低哮喘。

[0096] 肺部发炎和纤维化的特征在于除哮喘以外的其它呼吸道疾病,例如慢性阻塞性肺病(COPD)、囊肿性纤维化(CF)、肺炎、间质性肺病(包含自发性肺纤维化)、急性肺损伤、急性

呼吸窘迫综合征、支气管炎、气肿、阻塞性细支气管炎和类肉瘤病。因此,还预期化合物1和其结晶水合物形式I适用于治疗慢性阻塞性肺病、囊肿性纤维化、肺炎、间质性肺病(包含自发性肺纤维化)、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、支气管炎、气肿、阻塞性细支气管炎和类肉瘤病。

[0097] 当与其对应氟类似物(化合物C-1)相比时,化合物1已展示具有类似的JAK活性。然而,化合物1具有产生显著较少的硫酸化代谢的优点,如分析章节中所证实。此为显著的,因为硫酸化代谢发生于肺部中,此可能导致快速降低活性母化合物的暴露。

[0098] 已证实化合物1抑制与发炎相关的细胞因子。因此,如下详述,形式I有可能适用于治疗某些特定呼吸道疾病。

[0099] 嗜酸性气道发炎为统称为嗜酸性肺病的疾病的特有特征(科廷(Cottin)等人,《临床胸部医学(Clin.Chest.Med.)》,2016,37(3),535-56)。嗜酸粒细胞性疾病已与IL-4、IL-13和IL-5信号传导相关。嗜酸性肺病包含感染(尤其蠕虫感染)、药物诱导的肺炎(例如由例如抗生素、苯妥英(phenytoin)或L-色氨酸的治疗药物诱导)、真菌诱导的肺炎(例如过敏性支气管肺曲菌病)、过敏性肺炎和嗜酸粒细胞性肉芽肿伴多血管炎(先前称为彻奇-斯全司综合征(Churg-Strauss syndrome))。未知病因的嗜酸粒细胞性肺病包含自发性急性嗜酸粒细胞性肺炎、自发性慢性嗜酸粒细胞性肺炎、嗜酸性粒细胞增多综合征和吕弗勒综合征(Löffler syndrome)。

[0100] IL-6基因中的多形现象与IL-6水平升高和产生肺动脉高血压(PAH)的风险增加有关(方(Fang)等人,《美国高血压学会杂志(J.Am.Soc.Hypertens.)》,2017,11(3),171-177)。确证IL-6于PAH中的作用,对IL-6受体链gp130的抑制缓解了PAH大鼠模型中的疾病(黄(Huang)等人,《加拿大心脏病学杂志(Can.J.Cardiol.)》,2016,32(11),1356.e1-1356.e10)。

[0101] 例如IFN γ 、IL-12和IL-6的细胞因子与一定范围的非过敏性肺病,例如类肉瘤病和淋巴管平滑肌瘤有关(E1-哈希姆(Hashemite)等人,《美国呼吸细胞与分子生物学杂志(Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.)》,2005,33,227-230,和E1-哈希姆等人,《癌症研究(Cancer Res.)》,2004,64,3436-3443)。也已展示本公开化合物抑制IL-6和IFN γ 信号传导。

[0102] 支气管扩张症和浸润性肺病为与慢性嗜中性发炎有关的疾病。

[0103] 病理性T细胞活化在多种呼吸道疾病的病因中至关重要。自体反应性T细胞在阻塞性细支气管炎伴机化性肺炎(也称为COS)中起作用。与COS类似,肺移植排斥反应的病因与所移植供体肺的接受者T细胞的异常T细胞活化有关。肺移植排斥反应可早期以原发性移植物功能障碍(PGD)、机化性肺炎(OP)、急性排斥反应(AR)或淋巴细胞性细支气管炎(LB)形式出现,或其可在肺移植后数年以慢性肺同种异体移植物功能障碍(CLAD)形式出现。CLAD先前称为阻塞性细支气管炎(BO),但现在被视为可具有不同病理学表达的综合征,包含BO、限制性CLAD(rCLAD或RAS)和嗜中性同种异体移植物功能障碍。慢性肺同种异体移植物功能障碍(CLAD)为肺移植接受者的长期管理中的主要挑战,这是因为其导致所移植肺逐渐失去功能(戈捷等人,《当前移植报告》,2016,3(3),185-191)。CLAD对治疗的反应不佳,且因此,仍需要能够预防或治疗此病况的有效化合物。例如IFN γ 和IL-5的若干JAK依赖性细胞因子在CLAD和肺移植排斥反应中上调(贝拉斯特吉等人,《临床移植》2017,31,e12898)。此外,在

JAK依赖性IFN信号传导下游的CXCR3趋化因子(例如CXCL9和CXCL10)的高肺水平与肺移植患者的恶化结果有关(林西娅等人,《公共科学图书馆·综合》,2017,12(7),e0180281)。已展示全身性JAK抑制在肾移植排斥反应中有效(比森蒂等人,《美国移植杂志》,2012,12,2446-56)。因此,JAK抑制剂有可能有效预防或延迟肺移植排斥反应和CLAD。如描述为肺移植排斥反应的基础的类似T细胞活化事件也被视为造血干细胞移植后可能发生的肺移植抗宿主病(GVHD)的主要驱动因子。与CLAD类似,肺GVHD为一种慢性进行性病况,其结果极其不佳且目前尚无经批准的治疗。对95位接受全身性JAK抑制剂卢佐替尼作为补救治疗的患有类固醇难治性急性或慢性GVHD的患者的回溯性多中心调查研究表明,大多数患者(包含患有肺GVHD的那些患者)对卢佐替尼完全或部分反应(蔡瑟等人,《白血病》,2015,29,10,2062-68)。由于全身性JAK抑制与严重不良事件和较小治疗指数相关,因而仍需要吸入的肺部定向的非全身性JAK抑制剂来预防和/或延迟肺移植排斥反应或肺GVHD。化合物1具有满足此需求所需要的特性。近年来,免疫检查点抑制剂诱导的肺炎(另一种T细胞介导性肺病)随着免疫检查点抑制剂的使用增加而出现。在用这些T细胞刺激剂治疗的癌症患者中,可能产生致死性肺炎。

[0104] 经混合淋巴细胞反应分析为模拟移植排斥反应的活体外分析。展示化合物1有效地抑制IFN γ 分泌。

[0105] 因此,在一个实施例中,本公开提供一种治疗哺乳动物(例如,人类)的呼吸道疾病的方法,所述方法包括向哺乳动物(或人类)授予治疗有效量的化合物1的结晶水合物(形式I)或包括化合物1的结晶水合物(形式I)的药物组合物。

[0106] 在一个实施例中,呼吸道疾病选自自由以下组成的群组:哮喘、慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、肺炎、自发性肺纤维化、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、支气管炎、气肿、类肉瘤病、嗜酸粒细胞性疾病、肺部感染、蠕虫感染、肺动脉高血压、淋巴管平滑肌瘤、支气管扩张症、浸润性肺病、药物诱导的肺炎、真菌诱导的肺炎、过敏性支气管肺曲菌病、过敏性肺炎、嗜酸粒细胞性肉芽肿伴多血管炎、自发性急性嗜酸粒细胞性肺炎、自发性慢性嗜酸粒细胞性肺炎、嗜酸性粒细胞增多综合征、吕弗勒综合征、阻塞性细支气管炎伴机化性肺炎、肺移植抗宿主病和免疫检查点抑制剂诱导的肺炎。在一些实施例中,呼吸道疾病为哮喘。在一些实施例中,哮喘为中度到重度哮喘。在一些实施例中,哮喘为轻度到中度哮喘。在一些实施例中,药物组合物通过吸入授予。在一些实施例中,哮喘为Th2高哮喘。在一些实施例中,哮喘为Th2低哮喘。

[0107] 在一个实施例中,本公开提供一种预防或延迟哺乳动物(例如,人类)的肺移植排斥反应的方法,所述方法包括向哺乳动物(或人类)授予治疗有效量的化合物1的结晶水合物(形式I)或包括化合物1的结晶水合物(形式I)的药物组合物。在一些实施例中,肺移植排斥反应选自自由以下组成的群组:原发性移植物功能障碍、机化性肺炎、急性排斥反应、淋巴细胞性细支气管炎和慢性肺同种异体移植物功能障碍。在一些实施例中,肺移植排斥反应为急性肺移植排斥反应。在一些实施例中,肺移植排斥反应为慢性肺同种异体移植物功能障碍。在一些实施例中,肺移植排斥反应选自自由以下组成的群组:阻塞性细支气管炎、局限性慢性肺同种异体移植物功能障碍和嗜中性同种异体移植物功能障碍。在一些实施例中,药物组合物通过吸入授予。

[0108] 本文中还提供形式I的用途,其用于医学疗法中和用于制造用于治疗、预防、延迟

或缓解适合于用JAK抑制剂进行治疗的疾病,确切来说呼吸道疾病和肺移植排斥反应的调配物或药剂。

[0109] 本公开进一步提供一种治疗哺乳动物的哮喘的方法,所述方法包括向哺乳动物投予治疗有效量的化合物1的结晶水合物(形式I)或包括药学上可接受的载剂和化合物1的结晶水合物(形式I)的药物组合物。

[0110] 当用于治疗哮喘时,化合物1的结晶水合物(形式I)将通常以单次每日剂量或每日多次剂量形式投予,但可使用其它投予形式。每剂量投予的活性剂的量或每日投予的总量将通常由医师鉴于相关情形来决定,包含待治疗的病况、所选投予途径、所投予的实际化合物和其相对活性、个别患者的年龄、体重和反应、患者的症状的严重程度和其类似物。

[0111] 本公开进一步提供一种治疗哺乳动物的呼吸道疾病(包括但不限于本文中所描述的疾病)的方法,所述方法包括向哺乳动物投予治疗有效量的化合物1的结晶水合物(形式I),或包括药学上可接受的载剂和化合物1的结晶水合物(形式I)的药物组合物。

[0112] 当用于治疗呼吸道疾病(包括但不限于本文中所描述的疾病)时,化合物1的结晶水合物(形式I)将通常以单次每日剂量或以每日多次剂量投予,但可使用其它投予形式。每剂量投予的活性剂的量或每日投予的总量将通常由医师鉴于相关情形来决定,包含待治疗的病况、所选投予途径、所投予的实际化合物和其相对活性、个别患者的年龄、体重和反应、患者的症状的严重程度和其类似物。

[0113] 人类冠状病毒为常见呼吸道病原体且通常诱导轻度上呼吸道疾病。两种高病原性病毒严重急性呼吸道综合征相关冠状病毒(SARS-CoV-1)和中东呼吸道综合征相关冠状病毒(MERS-CoV)分别引起导致超过10%和35%死亡率的严重呼吸道综合征(阿西里(Assiri)等人,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》,2013,369,407-1)。新近出现的2019冠状病毒疾病(COVID-19)和后续大流行已造成全球医疗紧急情况。与SARS-CoV-1和MERS-CoV类似,患者亚群(约16%)可出现表达为导致入ICU(约5%)、呼吸衰竭(约6.1%)和死亡的急性肺损伤(ALI)的严重呼吸道疾病(王(Wang)等人,《JAMA》,2020,323,11,1061-1069;关(Guan)等人,《新英格兰医学杂志》,2020,382,1708-1720;黄(Huang)等人,《柳叶刀(The Lancet)》,2020.395(10223),497-506;陈(Chen)等人,《柳叶刀》,2020,395(10223),507-13)。患有COVID-19的患者亚群似乎患有导致急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的高炎性“细胞因子风暴(cytokine storm)”。这种细胞因子风暴也可溢出进入全身循环中且产生败血症并最终产生多器官功能障碍综合征。COVID-19中出现的失调细胞因子信号传导的特征在于干扰素(IFN)、白介素(IL)和趋化因子的表达增加从而导致ALI和相关死亡。这种高发炎性反应可潜在地通过肺选择性泛杰纳斯激酶(JAK)抑制剂进行调节和治疗。针对IL-6(妥珠单抗(tocilizumab)和赛瑞单抗(sarilumab))的单株抗体似乎在治疗患有由COVID-19所致的ALI的患者中有效(徐(Xu)X,韩(Han)M,李(Li)T,孙(Sun)W,王(Wang)D,付(Fu)B等人《妥珠单抗对重症COVID-19患者的有效治疗(Effective Treatment of Severe COVID-19 Patients with Tocilizumab)》,2020,《PNAS》,<https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117>)。尽管COVID-19的活体内模型尚待公布,但经2003SARS-CoV-1和2012MERS-CoV的小鼠适应株感染以及经人类SARS-CoV-1感染的表达人类SARS-CoV-1受体hACE2的转殖基因小鼠显示JAK依赖性细胞因子(例如IFN γ 、IL-6和IL-12)和下游趋化因子(例如趋化因子(C-C模体)配位体10(CCL10)、CCL2和CCL7)的升高(麦克雷(McCray)等人,

《病毒学杂志(J Virol.)》,2007,81(2),813-21;格雷特贝克(Gretebeck)等人,《病毒学的当前观点(Curr Opin Virol.)》2015,13,123-9.;戴(Day)等人,《病毒学(Virology)》.2009,395(2),210-22)。也已展示JAK抑制剂在脂多糖或更昔洛韦(ganciclovir)诱导的ALI的小鼠模型中为有益的(塞维尔尼尼(Severgnini)等人,《美国呼吸与重症医学杂志(Am J Respir Crit Care Med.)》,2005,171(8),858-67;金(Jin)等人,《美国生理学杂志-肺细胞和分子生理学(Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.)》,2018,314(5),L882-92)。最终,基于临床试验的结果,巴瑞替尼(baricitinib)(JAK抑制剂)已与瑞德西韦(remdesivir)一起接受紧急情况使用授权(emergency use authorization;EUA),以用于治疗需要补充氧、有创机械通气或体外膜式氧合的患者的COVID-19(<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-drug-combination-treatment-covid-19#:~:text=Today%2C%20the%20U.S.%20Food%20and,or%20older%20requiring%20supplemental%20oxygen%20>)。在患有COVID-19的住院患者的临床试验中,与接受安慰剂与瑞德西韦的患者相比,展示巴瑞替尼联合瑞德西韦在开始治疗之后的29天内缩短恢复时间。

[0114] 因此,作为肺选择性吸入泛JAK抑制剂的化合物1可特别适合于衰减与COVID-19相关的细胞因子风暴。通过向肺递送且避免全身性免疫抑制,也可避免导致死亡率恶化的另外的感染。此在需要通气支持的那些患者中尤其如此。由于患有COVID-19的个体的主要死亡原因似乎为合并症和重复感染,因而吸入药物治疗可为一种避免将使患者易置于这些风险下的全身性免疫抑制。

[0115] 因此,本公开提供一种治疗经冠状病毒(例如SARS-CoV-1、SARS-CoV-2和MERS-CoV)感染的哺乳动物(或患者)或其症状的方法,所述方法包括向哺乳动物(或患者)授予本公开的化合物1的结晶水合物(形式I),或包括药学上可接受的载剂和本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)的药物组合物。本公开还提供一种治疗由冠状病毒感染(例如SARS-CoV-1、SARS-CoV-2和MERS-CoV)造成的哺乳动物(或患者)的ALI和/或ARDS的方法,所述方法包括向哺乳动物(或患者)授予本公开的化合物1的结晶水合物(形式I),或包括药学上可接受的载剂和本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)的药物组合物。

[0116] JAK抑制剂的作用机制已与治疗鼻发炎性疾病有关(《鼻内托法替尼对小鼠慢性鼻窦炎伴鼻息肉的治疗作用(Therapeutic Effects of Intranasal Tofacitinib on Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps in Mice)》,朱(Joo)等人,《喉论(The Laryngoscope)》,2020,<https://doi.org/10.1002/lary.29129>)。此外,通过阻断IL-4和IL-13信号传导通路起作用的度匹鲁单抗(Dupilumab)已批准用于治疗具有鼻息肉的慢性鼻窦炎。

[0117] 因此,本文还提供一种治疗哺乳动物(例如,人类)的鼻发炎性疾病的方法,所述方法包括向哺乳动物(或人类)授予本公开的化合物1的结晶水合物(形式I),或包括药学上可接受的载剂和本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)的药物组合物。在一些实施例中,鼻发炎性疾病选自自由以下组成的群组:具有或不具有鼻息肉的慢性鼻窦炎、具有鼻息肉的鼻窦炎,和鼻炎(非过敏性、过敏性、常年性和血管舒缩性鼻炎)。

[0118] 作为JAK抑制剂,本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)也可适用于多种其它疾病。本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可适用于多种胃肠发炎性适应症,包含但不限

于发炎性肠病、溃疡性结肠炎(直肠乙状结肠炎、全结肠炎、溃疡性直肠炎和左侧结肠炎)、克罗恩氏病(Crohn's disease)、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、白塞氏病(Behcet's disease)、脂泻病、免疫检查点抑制剂诱导的结肠炎、回肠炎、嗜酸粒细胞性食道炎、移植物抗宿主病相关结肠炎和感染性结肠炎。溃疡性结肠炎(雷蒙德(Reimund)等人,《临床免疫学杂志(J.Clin.Immunology)》,1996,16,144-150)、克罗恩氏病(沃伊沃特(Woywodt)等人,《欧洲胃肠病学和肝病学杂志(Eur.J.Gastroenterology Hepatology)》,1999,11,267-276)、胶原性结肠炎(库马瓦(Kumawat)等人,《分子免疫学(Mol.Immunology)》,2013,55,355-364)、淋巴细胞性结肠炎(库马瓦等人,2013)、嗜酸性食道炎(Weinbrand-戈奇贝格(Goichberg)等人,《免疫学研究(Immunol.Res.)》,2013,56,249-260)、移植物抗宿主病相关结肠炎(科格希尔(Coghill)等人,《血液学(Blood)》,2001,117,3268-3276)、感染性结肠炎(斯托马赫(Stallmach)等人,《国际结直肠病杂志(Int.J.Colorectal Dis.)》,2004,19,308-315)、白塞氏病(周(Zhou)等人,《自身免疫评论(Autoimmun.Rev.)》,2012,11,699-704)、脂泻病(德日东(de Nitto)等人,《世界胃肠病学杂志(World J.Gastroenterol.)》,2009,15,4609-4614)、免疫检查点抑制剂诱导的结肠炎(例如,CTLA-4抑制剂诱导的结肠炎;矢野(Yano)等人,《转化医学杂志(J.Translation.Med.)》,2014,12,191),PD-1或PD-L1抑制剂诱导的结肠炎)和回肠炎(山本(Yamamoto)等人,《消化和肝脏疾病(Dig.Liver Dis.)》,2008,40,253-259)的特征在于某些促发炎细胞因子水平的升高。因为许多促发炎细胞因子经由JAK活化信号传导,因此本申请中所描述的化合物可能能够缓解发炎且提供症状减轻。确切来说,本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可适用于诱导且维持溃疡性结肠炎的缓解,且适用于治疗移植物抗宿主病中的克罗恩氏病、免疫检查点抑制剂诱导的结肠炎和肠胃不良作用。因此,在一个实施例中,本公开提供一种治疗哺乳动物(例如,人类)的胃肠道发炎疾病的方法,所述方法包括向哺乳动物投予本公开的化合物1的结晶水合物(形式I),或包括药学上可接受的载剂和化合物1的结晶水合物(形式I)的药物组合物。

[0119] 异位性皮肤炎和其它发炎皮肤病与依赖于JAK-STAT通路的促发炎细胞因子的升高有关。因此,本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可在多种皮肤发炎或瘙痒病况中为有益的,包括但不限于异位性皮肤炎、斑秃、白斑病、牛皮癣、皮炎、皮肤T细胞淋巴瘤(内奇波鲁克(Netchiporouk)等人,《细胞周期(Cell Cycle)》2014;13,3331-3335)和亚型(塞扎莱综合征(Sezary syndrome)、蕈样霉菌病、佩吉特样网状细胞增多症、肉芽肿性松弛皮肤、淋巴瘤样丘疹病、慢性苔藓样糠疹、急性痘疮样苔癣样糠疹、CD30+皮肤T细胞淋巴瘤、继发性皮肤CD30+大细胞淋巴瘤、非蕈样霉菌病CD30-皮肤大T细胞淋巴瘤、多形性T细胞淋巴瘤、伦纳特淋巴瘤(Lennert lymphoma)、皮下T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤)、结节性痒疹、扁平苔藓、原发性局部皮肤淀粉样变性、大疱性类天疱疮、移植物抗宿主病的皮肤表达、类天疱疮、盘状狼疮、环状肉芽肿、慢性单纯性苔癣、外阴/阴囊/肛周瘙痒病、硬化性苔癣、带状疱疹后神经痛、扁平苔藓和脱发性毛囊炎。确切来说,异位性皮肤炎(包(Bao)等人,《JAK-STAT》,2013,2,e24137)、斑秃(邢(Xing)等人,《自然医学(Nat.Med.)》2014,20,1043-1049)、白斑病(克雷格洛(Craiglow)等人,《美国医学会杂志(JAMA Dermatol.)》2015,151,1110-1112)、结节性痒疹(松科利(Sonkoly)等人,《变态反应与临床免疫学杂志(J.Allergy Clin.Immunol.)》2006,117,411-417)、扁平苔癣(韦尔茨-库比亚克(Welz-Kubiak)等人,《免疫学研究杂志(J Immunol Res.)》2015,ID:854747)、原

发性局部皮肤淀粉样变性(田中(Tanaka)等人,《英国皮肤病杂志(Br J Dermatol.)》2009, 161,1217-1224)、大疱性类天疱疮(费利西亚尼(Feliciani)等人,《国际免疫病理学和药理学杂志(Int J Immunopathol Pharmacol.)》1999,12,55-61)和移植物抗宿主疾病的皮肤表达(兴山(Okuyama)等人,《研究性皮肤病学杂志(J Invest Dermatol.)》2014,134,992-1000)的特征在于经由JAK活化信号传导的某些细胞因子的升高。因此,本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可能能够缓解由这些细胞因子驱动的相关皮肤发炎或瘙痒病。确切来说,本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可预期适用于治疗异位性皮肤炎和其它发炎性皮肤病。因此,在一个实施例中,本公开提供一种治疗哺乳动物(例,如人类)的发炎性皮肤病的方法,所述方法包括向哺乳动物的皮肤施加包括本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)和医药载剂的药物组合物。在一个实施例中,发炎性皮肤病为异位性皮肤炎。

[0120] 已展示许多眼部疾病与依赖于JAK-STAT通路的促发炎细胞因子的升高相关。因此,化合物1的结晶水合物(形式I)可适用于治疗多种眼部疾病,包括但不限于葡萄膜炎、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、年龄相关的黄斑变性和异位性角膜结膜炎。确切来说,葡萄膜炎(河春(Horai)和卡斯皮(Caspi),《干扰素和细胞因子研究杂志(J. Interferon Cytokine Res.)》,2011,31,733-744)、糖尿病性视网膜病变(阿布考尔(Abcouwer),《临床细胞免疫学杂志(J. Clin. Cell. Immunol.)》,2013,增刊1,1-12)、糖尿病性黄斑水肿(孙(Sohn)等人,《美国眼科学杂志(American Journal of Ophthalmology)》,2011,152,686-694)、干眼病(史蒂文森(Stevenson)等人,《眼科学文献(Arch. Ophthalmol.)》,2012,130,90-100)和年龄相关的黄斑变性(尼克尔拜因(Knickelbein)等人,《国际临床眼科(Int. Ophthalmol. Clin.)》,2015,55(3),63-78)的特征在于经由JAK-STAT通路信号传导的某些促发炎细胞因子的升高。视网膜静脉栓塞(RVO)为非常盛行的视觉致残性疾病。视网膜血流堵塞可导致视网膜血管结构损伤、出血和组织局部缺血。尽管RVO的原因是多因素的,但血管以及发炎性介体皆展示出重要性(德巴克塔(Deobhakta)等人,《国际炎症杂志(International Journal of Inflammation)》,2013,文章ID 438412)。经由JAK-STAT通路信号传导的细胞因子(例如IL-6和IL-13)以及其产生部分地通过JAK-STAT通路信号传导驱动的其它细胞因子(例如MCP-1)已在患有RVO的患者的眼部组织中检测到较高水平(修科(Shchuko)等人,《印度眼科杂志(Indian Journal of Ophthalmology)》,2015,63(12),905-911)。因此,本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可能能够缓解相关眼部发炎且逆转疾病进展或提供此疾病的症状减轻。虽然患有RVO的许多患者通过光凝治疗,但此为本质上破坏性疗法。还使用抗VEGF剂,但其仅在一部分患者中有效。也已展示降低眼部发炎程度的类固醇药物(曲安奈德(Triamcinolone acetonide)和地塞米松(dexamethasone)植入物)为患有某些形式的RVO的患者提供有益结果,但其也已展示导致白内障和增加的眼内压/青光眼。

[0121] 因此,本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可能能够缓解相关眼部发炎且逆转疾病进展或提供症状减轻。在一个实施例中,因此,本公开提供一种治疗哺乳动物的眼部疾病的方法,所述方法包括向哺乳动物的眼部授予包括本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)和医药载剂的药物组合物。在一个实施例中,眼部疾病为葡萄膜炎、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、年龄相关的黄斑变性、视网膜静脉栓塞或异位性角膜结膜炎。在一个实施例中,所述方法包括通过玻璃体内注射来授予本公开的化合物1的结晶水合物

(形式I)。化合物1的结晶水合物(形式I)也可与适用于眼部疾病的一或多种化合物组合使用。

[0122] 化合物1的结晶水合物(形式I)也可适用于治疗其它疾病,例如其它发炎性疾病、自体免疫疾病或癌症。本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可适用于治疗以下中的一或多种:关节炎、类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、移植排斥反应、干眼症、牛皮癣性关节炎、糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病、运动神经元疾病、骨髓发育不良综合征、疼痛、肌肉减少症、恶病质、败血性休克、全身性红斑性狼疮症、白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、僵直性脊椎炎、骨髓纤维化、B细胞淋巴瘤、肝细胞癌、霍奇金氏病(Hodgkins disease)、乳癌、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、非小细胞肺癌、卵巢透明细胞癌、卵巢肿瘤、胰脏肿瘤、真性红细胞增多症、休格连氏综合征(Sjogren's syndrome)、软组织肉瘤、肉瘤、脾肿大、T细胞淋巴瘤和重型地中海贫血。

[0123] 组合疗法

[0124] 本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)可与通过相同机制或通过不同机制起作用以治疗疾病的一或多种药剂组合使用。不同药剂可在单独组合物或相同组合物中依序或同时投予。适用于组合疗法的药剂类别包括但不限于 β 2肾上腺素受体促效剂、毒蕈碱受体拮抗剂、糖皮质激素促效剂、G蛋白偶合受体-44拮抗剂、白三烯D4拮抗剂、毒蕈碱M3受体拮抗剂、组织胺H1受体拮抗剂、免疫球蛋白E拮抗剂、PDE 4抑制剂、IL-4拮抗剂、毒蕈碱M1受体拮抗剂、组织胺受体拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-5拮抗剂、5-脂肪加氧酶抑制剂、 β 肾上腺素受体促效剂、CCR3趋化因子拮抗剂、CFTR刺激剂、免疫球蛋白调节剂、白介素33配位体抑制剂、PDE 3抑制剂、磷酸肌醇-3激酶 δ 抑制剂、凝血素A2拮抗剂、弹性蛋白酶抑制剂、Kit酪氨酸激酶抑制剂、白三烯E4拮抗剂、白三烯拮抗剂、PGD2拮抗剂、TNF α 配位体抑制剂、TNF结合剂、互补级联抑制剂、趋化因子配位体抑制剂、谷胱甘肽还原酶抑制剂、组织胺H4受体拮抗剂、IL-6拮抗剂、IL2基因刺激剂、免疫球蛋白 γ Fc受体IIB调节剂、干扰素 γ 配位体、白介素13配位体抑制剂、白介素17配位体抑制剂、L-选择蛋白拮抗剂、白血球弹性酶抑制剂、白三烯C4拮抗剂、白三烯C4合成酶抑制剂、膜铜胺氧化酶抑制剂、金属蛋白酶-12抑制剂、金属蛋白酶-9抑制剂、螨过敏原调节剂、毒蕈碱受体调节剂、烟碱乙酰胆碱受体促效剂、核因子 κ B抑制剂、p-选择蛋白拮抗剂、PDE 5抑制剂、PDGF受体拮抗剂、磷酸肌醇-3激酶 γ 抑制剂、TLR-7促效剂、TNF拮抗剂、Ab1酪氨酸激酶抑制剂、乙酰胆碱受体拮抗剂、酸性哺乳动物壳质酶抑制剂、ACTH受体促效剂、肌动蛋白聚合调节剂、腺苷A1受体拮抗剂、腺苷酸环化酶刺激剂、肾上腺素受体拮抗剂、促肾上腺皮质激素配位体、醇脱氢酶5抑制剂、 α 1抗胰蛋白酶刺激剂、 α 1蛋白酶抑制剂、雄激素受体调节剂、血管收缩素转化酶2刺激剂、ANP促效剂、Bcr蛋白质抑制剂、 β 1肾上腺素受体拮抗剂、 β 2肾上腺素受体拮抗剂、 β 2肾上腺素受体调节剂、 β 淀粉样蛋白调节剂、BMP10基因抑制剂、BMP15基因抑制剂、钙通道抑制剂、组织蛋白酶G抑制剂、CCL26基因抑制剂、CCR3趋化因子调节剂、CCR4趋化因子拮抗剂、细胞粘附分子抑制剂、伴侣蛋白刺激剂、壳质酶抑制剂、胶原蛋白I拮抗剂、互补C3抑制剂、CSF-1拮抗剂、CXCR2趋化因子拮抗剂、细胞因子受体共享 β 链调节剂、细胞毒性T淋巴细胞蛋白质-4刺激剂、脱氧核糖核酸酶I刺激剂、脱氧核糖核酸酶刺激剂、二肽基肽酶I抑制剂、DNA回旋酶抑制剂、DP前列腺素类受体调节剂、E-选择蛋白拮抗剂、EGFR家族酪氨酸激酶受体抑制剂、弹性蛋白调节剂、内皮素

ET-A拮抗剂、内皮素ET-B拮抗剂、环氧化物水解酶抑制剂、FGF3受体拮抗剂、Fyn酪氨酸激酶抑制剂、GATA 3转录因子抑制剂、葡糖神经酰胺酶调节剂、谷氨酸受体调节剂、GM-CSF配位体抑制剂、鸟苷酸环化酶刺激剂、H+K+ATP酶抑制剂、血红蛋白调节剂、肝素促效剂、组织蛋白去乙酰酶抑制剂、组织蛋白去乙酰酶-2刺激剂、HMG CoA还原酶抑制剂、I- κ B激酶 β 抑制剂、ICAM1基因抑制剂、IL-17拮抗剂、IL-17受体调节剂、IL-23拮抗剂、IL-4受体调节剂、免疫球蛋白G调节剂、免疫球蛋白G1促效剂、免疫球蛋白G1调节剂、免疫球蛋白 ϵ Fc受体IA拮抗剂、免疫球蛋白 γ Fc受体IIB拮抗剂、免疫球蛋白 κ 调节剂、胰岛素敏化剂、干扰素 β 配位体、白介素1样受体拮抗剂、白介素18配位体抑制剂、白介素受体17A拮抗剂、白介素-1 β 配位体抑制剂、白介素-5配位体抑制剂、白介素-6配位体抑制剂、KCNA电位闸控钾通道-3抑制剂、Kit配位体抑制剂、层粘连蛋白-5促效剂、白三烯CysLT1受体拮抗剂、白三烯CysLT2受体拮抗剂、LOXL2基因抑制剂、Lyn酪氨酸激酶抑制剂、MARCKS蛋白质抑制剂、MDR相关蛋白4抑制剂、金属蛋白酶-2调节剂、金属蛋白酶-9调节剂、盐皮质激素受体拮抗剂、毒蕈碱M2受体拮抗剂、毒蕈碱M4受体拮抗剂、毒蕈碱M5受体拮抗剂、利钠(Natriuretic)肽受体A促效剂、从然杀手细胞受体调节剂、烟碱ACh受体 α 7亚单元刺激剂、NK细胞受体调节剂、核因子 κ B调节剂、类鸦片生长因子受体促效剂、P-糖蛋白抑制剂、P2X3嘌呤受体拮抗剂、p38 MAP激酶抑制剂、肽酶1调节剂、磷脂酶A2抑制剂、磷脂酶C抑制剂、纤维蛋白溶酶原活化抑制剂1抑制剂、血小板活化因子受体拮抗剂、PPAR γ 促效剂、前列环素促效剂、蛋白酪氨酸激酶抑制剂、SH2域肌醇磷酸酶1刺激剂、信号转导抑制剂、钠通道抑制剂、STAT-3调节剂、干细胞抗原-1抑制剂、超氧化歧化酶调节剂、T细胞表面糖蛋白CD28抑制剂、T细胞表面糖蛋白CD8抑制剂、TGF β 促效剂、TGF β 拮抗剂、凝血素合成酶抑制剂、胸腺基质淋巴蛋白配位体抑制剂、胸腺素促效剂、胸腺素 β 4配位体、TLR-8促效剂、TLR-9促效剂、TLR9基因刺激剂、拓朴异构酶IV抑制剂、肌钙蛋白I快速骨骼肌刺激剂、肌钙蛋白T快速骨骼肌刺激剂、I型IL-1受体拮抗剂、II型TNF受体调节剂、离子通道调节剂、子宫球蛋白刺激剂和VIP促效剂。

[0125] 可与本发明化合物1的结晶水合物(形式I)组合使用的特定药剂包含但不限于醋酸洛斯普特(rosiptor acetate)、芜地溴铵(umeclidinium bromide)、塞库单抗(secukinumab)、醋酸米特法林(metenkefalin acetate)、醋酸特瑞迪卡泰德(tridecactide acetate)、丙酸氟替卡松(fluticasone propionate)、 α -环糊精稳定化萝卜硫素、特泽派单抗(tezepelumab)、糠酸莫美他松(mometasone furoate)、BI-1467335、度匹鲁单抗、阿地铵(aclidinium)、福莫特罗(formoterol)、AZD-1419、HI-1640V、利维潘(rivipansel)、CMP-001、甘露醇、ANB-020、奥马珠单抗(omalizumab)、曲加力单抗(tregalizumab)、米替杂可(Mitizax)、苯拉组单抗(benralizumab)、戈利木单抗(golimimumab)、罗氟司特(roflumilast)、伊马替尼(imatinib)、REGN-3500、马赛替尼(masitinib)、阿普司特(apremilast)、RPL-554、阿克姆(Actimmune)、阿达木单抗(adalimumab)、卢帕他定(rupatadine)、帕罗格列(parogrelil)、MK-1029、二丙酸倍氯米松(beclometasone dipropionate)、反丁烯二酸福莫特罗(formoterol fumarate)、莫格利珠单抗(mogamulizumab)、塞曲司特(seratrodast)、UCB-4144、纳米利塞(nemiralisib)、CK-2127107、非维兰特(fevipirant)、达尼立辛(danirixin)、波生坦(bosentan)、阿巴西普(abatacept)、EC-18、德卫利昔(duvelisib)、多西帕斯德(dociparstat)、环丙沙星(ciprofloxacin)、沙丁胺醇(salbutamol)HFA、厄多司坦(erdosteine)、PrEP-001、奈多罗

米(nedocromil)、CDX-0158、沙丁胺醇、恩博沙(enobosarm)、R-TPR-022、朗齐鲁单抗(lenzilumab)、糠酸氟替卡松(fluticasone furoate)、三氟甲磺酸威兰特罗(vilanterol trifenatate)、丙酸氟替卡松、沙美特罗(salmeterol)、PT-007、PRS-060、瑞美斯特赛-L(remestemcel-L)、瓜胺酸、RPC-4046、氧化氮、DS-102、吉瑞利单抗(gerilimzumab)、阿塔尔(Actair)、糠酸氟替卡松、茚地氯铵(umeclidinium)、威兰特罗(vilanterol)、AG-NPP709、加蒙克斯(Gamunex)、英利昔单抗(infliximab)、安培(Ampion)、阿库马莫德(acumapimod)、卡那吉努单抗(canakinumab)、INS-1007、CYP-001、思鲁库单抗(sirukumab)、丙酸氟替卡松、美泊利单抗(mepolizumab)、匹伐他汀(pitavastatin)、索利霉素(solithromycin)、依那西普(etanercept)、艾伐卡托(ivacaftor)、阿那白滞素(anakinra)、MPC-300-IV、格隆溴铵(glycopyrronium bromide)、阿地溴铵(aclidinium bromide)、FP-025、里森基单抗(risankizumab)、格隆铵(glycopyrronium)、反丁烯二酸福莫特罗、阿迪泼赛尔(Adipocell)、YPL-001、噻托溴铵(tiotropium bromide)、格隆溴铵、顺丁烯二酸茚达特罗(indacaterol maleate)、安德西单抗(andedaliximab)、奥达特罗(olodaterol)、埃索美拉唑(esomeprazole)、尘螨疫苗、艾蒿花粉过敏原疫苗、万莫龙(vamorolone)、吉法匹生(gefapixant)、瑞芬那新(revefenacin)、吉非替尼(gefitinib)、瑞津(ReJoin)、泰鲁斯特(tipelukast)、贝多拉君(bedoradrine)、SCM-CGH、SHP-652、RNS-60、布罗达单抗(brodalumab)、BIO-11006、茚地氯铵、三氟甲磺酸威兰特罗、异丙托溴铵(ipratropium bromide)、塔罗金单抗(tralokinumab)、PUR-1800、VX-561、VX-371、奥洛他定(olopatadine)、妥布特罗(tulobuterol)、反丁烯二酸福莫特罗、曲安奈德、瑞利珠单抗(reslizumab)、羟萘甲酸沙美特罗(salmeterol xinafoate)、丙酸氟替卡松、二丙酸倍氯米松、反丁烯二酸福莫特罗、噻托溴铵、利盖利珠单抗(ligelizumab)、RUTI、柏替利木单抗(bertilimumab)、奥马珠单抗、格隆溴铵、SENS-111、二丙酸倍氯米松、CHF-5992、LT-4001、茚达特罗(indacaterol)、格隆溴铵、糠酸莫美他松、非索非那定(fexofenadine)、格隆溴铵、阿奇霉素(azithromycin)、AZD-7594、福莫特罗、CHF-6001、巴芬特罗(batefenterol)、OATD-01、奥达特罗、CJM-112、罗格列酮(rosiglitazone)、沙美特罗、塞提普兰特(setipiprant)、吸入干扰素 β 、AZD-8871、普卡那肽(plecanatide)、氟替卡松、沙美特罗、二十碳五烯酸单甘油酸酯、雷布瑞奇单抗(lebrikizumab)、RG-6149、QBKPN、莫美他松(Mometasone)、茚达特罗、AZD-9898、丙酮酸钠(sodium pyruvate)、齐留通(zileuton)、CG-201、咪达那新(imidafenacin)、CNT0-6785、CLBS-03、莫美他松、RGN-137、丙卡特罗(procaterol)、福莫特罗、CCI-15106、POL-6014、茚达特罗、倍氯米松(beclomethasone)、MV-130、GC-1112、阿勒格瓦茨得宝(Allergovac depot)、MEDI-3506、QBW-251、ZPL-389、乌地那非(udenafil)、GSK-3772847、左旋西替利嗪(levocetirizine)、AXP-1275、ADC-3680、替马兰特(timapiprant)、阿贝特罗(abediterol)、AZD-7594、异丙托溴铵、硫酸沙丁胺醇、塔得克尼 α (tadekinig alfa)、ACT-774312、链道酶 α 、伊洛前列素(iloprost)、巴芬特罗、糠酸氟替卡松、阿利卡弗森(alicaforsen)、环索奈德(ciclesonide)、金刚砂胺(emeramide)、阿福莫特罗(arformoterol)、SB-010、奥扎格雷(Ozagrel)、BTT-1023、德克单抗(Dectrekumab)、左旋沙丁胺醇(levulbuterol)、普鲁司特(pranlukast)、玻尿酸、GSK-2292767、福莫特罗、NOV-14、芦西纳坦(Lucinactant)、沙丁胺醇、普赖苏稜(prednisolone)、依巴司汀(ebastine)、地塞米松西匹西雷(dexamethasone cipeclate)、

GSK-2586881、BI-443651、GSK-2256294、VR-179、VR-096、hdm-ASIT+、布地奈德(budesonide)、GSK-2245035、VTX-1463、依美斯汀(Emedastine)、右旋普拉克索(dexpramipexole)、左旋沙丁胺醇、N-6022、地塞米松磷酸钠、PIN-201104、OPK-0018、TEV-48107、司特(suplatast)、BI-1060469、吉米鲁司特(Gemilukast)、干扰素 γ 、达拉扎肽(dalazatide)、比拉斯汀(bilastine)、丙酸氟替卡松、羟萘甲酸沙美特罗、RP-3128、苯环喹溴铵(bencycloquidium bromide)、瑞利珠单抗、PBF-680、CRTH2拮抗剂、普鲁司特、羟萘甲酸沙美特罗、丙酸氟替卡松、单水合噻托溴铵、马鲁司特(masilukast)、RG-7990、多索茶碱(Doxofylline)、阿贝特罗、格隆溴铵、TEV-46017、ASM-024、丙酸氟替卡松、格隆溴铵、羟萘甲酸沙美特罗、沙丁胺醇、TA-270、氟尼缩松(Flunisolide)、色甘酸钠(sodium chromoglycate)、Epsi-gam、ZPL-521、沙丁胺醇、阿肽地尔(aviptadil)、TRN-157、扎鲁司特(Zafirlukast)、斯替姆普赛尔(Stempeucel)、哌罗来斯钠(pemirolast sodium)、纳多洛尔(nadolol)、丙酸氟替卡松+羟萘甲酸沙美特罗、RV-1729、硫酸沙丁胺醇、二氧化碳+全氟辛基溴、APL-1、德克单抗+VAK-694、赖氨酸乙酰基水杨酸盐、齐留通、TR-4、人类同种异体脂肪衍生间叶细胞母细胞疗法、MEDI-9314、PL-3994、HMP-301、TD-5471、NKTT-120、哌罗来斯(pemirolast)、二丙酸倍氯米松、川丁特罗(trantinterol)、单钠 α 流明诺(monosodium alpha luminol)、IMD-1041、AM-211、TBS-5、ARRY-502、塞曲司特、重组米迪斯美(midismase)、ASM-8、地夫可特(deflazacort)、班布特罗(bambuterol)、RBx-10017609、异丙托铵(ipratropium)+非诺特罗(fenoterol)、氟替卡松+福莫特罗、依匹斯汀(epinastine)、WIN-901X、VALERGEN-DS、OligoG-COPD-5/20、妥布特罗、奥克斯都保(oxis Turbuhaler)、DSP-3025、ASM-024、咪唑司汀(mizolastine)、布地奈德+沙美特罗、LH-011、AXP-E、组织胺人类免疫球蛋白、YHD-001、茶碱(theophylline)、胺溴素(ambroxol)+厄多司坦、雷马曲班(ramatroban)、孟鲁司特(montelukast)、普鲁司特、AG-1321001、妥布特罗、异丙托铵+沙丁胺醇、曲尼司特(tranilast)、甲基普赖苏穰舒必坦(methylprednisolone suleptanate)、考福辛达罗帕特(colforsin daropate)、瑞吡司特(repirinast)和多索茶碱。

[0126] 本文中还提供一种药物组合物,其包括本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)和一或多种其它治疗剂。治疗剂可选自上文所指定的药剂类别和上文所描述的特定药剂列表。在一些实施例中,药物组合物适用于递送到肺。在一些实施例中,药物组合物适用于吸入或雾化投予。在一些实施例中,药物组合物为干粉或液体悬浮剂。

[0127] 此外,在一方法实施例中,本公开提供一种治疗哺乳动物的疾病或病症的方法,其包括向哺乳动物投予本公开的化合物1的结晶水合物(形式I)和一或多种其它治疗剂。

[0128] 当用于组合疗法中时,药剂可以单一药物组合物形式调配,或药剂可提供于单独组合物中,所述组合物同时或在不同时间通过相同或通过不同投予途径投予。此类组合物可单独地包装或可作为试剂盒包装在一起。试剂盒中的两种或更多种治疗剂可通过相同投予途径或通过不同投予途径投予。

[0129] 实例

[0130] 提供以下合成和生物实例以说明本发明,且不得以任何方式解释为限制本发明的范围。除非另外指示,否则在以下实例中,以下缩写具有以下含义。未在下文定义的缩写具有其一般可接受的含义。

[0131]	ACN=	乙腈
[0132]	calcd=	计算值
[0133]	DCM=	二氯甲烷
[0134]	DIPEA=	N,N-二异丙基乙胺
[0135]	DMF=	N,N-二甲基甲酰胺
[0136]	EtOAc=	乙酸乙酯
[0137]	h=	小时
[0138]	HATU=	N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)脒六氟磷酸盐
[0139]	IPA=	异丙醇
[0140]	IPAc=	乙酸异丙酯
[0141]	KOAc=	乙酸钾
[0142]	MeOH=	甲醇
[0143]	min=	分钟
[0144]	PdCl ₂ (dppf)=	二氯(1,1'-双(二苯膦基)-二茂铁)二钯(II)
[0145]	Pd(PPh ₃) ₄ =	四(三苯膦)钯(0)
[0146]	RT=	室温
[0147]	TEA=	三乙胺
[0148]	TFA=	三氟乙酸
[0149]	THF=	四氢呋喃

[0150] 双(频哪醇合)二硼=4,4,5,5,4',4',5',5'-八甲基-[2,2']联[[1,3,2]二氧硼杂环戊烷]

[0151] 试剂和溶剂购自商业供应商(奥尔德里奇(Aldrich)、福禄卡(Fluka)、西格玛(Sigma)等),且不经进一步纯化即使用。通过薄层色谱(TLC)、分析型高效液相色谱(anal.HPLC)和质谱分析来监测反应混合物的进程。如在每个反应中特定描述来处理反应混合物;通常通过萃取和其它纯化方法(例如温度依赖性和溶剂依赖性结晶和沉淀)来纯化反应混合物。另外,通过柱色谱或通过制备型HPLC,通常使用C18或BDS柱填料和常规洗脱剂以常规方式纯化反应混合物。下文描述典型的制备型HPLC条件。

[0152] 通过质谱和¹H-NMR光谱以常规方式进行反应产物的表征。对于NMR分析,将样品溶解于氘化溶剂(例如CD₃OD、CDCl₃或d₆-DMSO)中,且在标准观测条件下用Varian Gemini 2000仪器(400MHz)获得¹H-NMR光谱。通过电喷雾电离法(ESMS)用耦合到自动纯化系统的应用生物系统(Applied Biosystems)(加利福尼亚州福斯特城(Foster City,CA))型号API 150EX仪器或沃特士(Waters)(马萨诸塞州米尔福德(Milford,MA))3100仪器来执行化合物的质谱鉴定。

[0153] 制备型HPLC条件

[0154]	柱:	C18, 5 μ m. 21.2 \times 150mm或C18, 5 μ m 21 \times 250或C14, 5 μ m 21 \times 150mm
[0155]	柱温度:	室温
[0156]	流动速率:	20.0mL/min
[0157]	流动相:	A=水+0.05%TFA
[0158]		B=ACN+0.05%TFA,

[0159] 注射体积: (100 μ L-1500 μ L)

[0160] 检测器波长: 214nm

[0161] 将粗化合物以约50mg/mL溶解于1:1水:乙酸中。使用2.1 \times 50mm C18柱进行4分钟分析规模测试运行,随后使用100 μ L注射液用基于分析规模测试运行的B滞留%的梯度进行15或20分钟制备型规模运行。确切梯度为样品依赖性的。用21 \times 250mm C18柱和/或21 \times 150mm C14柱检查具有紧密运行杂质的样品以进行最优选分离。通过质谱分析来鉴定含有所要产物的级分。

[0162] 分析型HPLC条件

[0163] 方法A

[0164] 柱: Agilent Zorbax Bonus-RP C18,150 \times 4.60mm,3.5微米

[0165] 柱温度: 40 $^{\circ}$ C

[0166] 流动速率: 1.5mL/min

[0167] 注射体积: 5 μ L

[0168] 样品制备: 溶解于1:1ACN:1M HCl中

[0169] 流动相: A=水:TFA(99.95:0.05)

[0170] B=ACN:TFA(99.95:0.05)

[0171] 检测器波长: 254nm和214nm

[0172] 梯度: 总共26min(时间(min)/%B):0/5、18/90、22/90、22.5/90、26/5

[0173] 方法B

[0174] 柱: Agilent Poroshell 120Bonus-RP,4.6 \times 150mm,2.7 μ m

[0175] 柱温度: 30 $^{\circ}$ C

[0176] 流动速率: 1.5mL/min

[0177] 注射体积: 10 μ L

[0178] 流动相: A=ACN:水:TFA(2:98:0.1)

[0179] B=ACN:水:TFA(90:10:0.1)

[0180] 样品制备: 溶解于流动相B中

[0181] 检测器波长: 254nm和214nm

[0182] 梯度: 总共60min(时间(min)/%B):0/0、50/100、55/100、55.1/0、60/0

[0183] 方法C

[0184] 柱: Agilent Poroshell 120Bonus-RP,4.6 \times 150mm,2.7 μ m

[0185] 柱温度: 30 $^{\circ}$ C

[0186] 流动速率: 1.5mL/min

[0187] 注射体积: 10 μ L

[0188] 流动相: A=ACN:水:TFA(2:98:0.1)

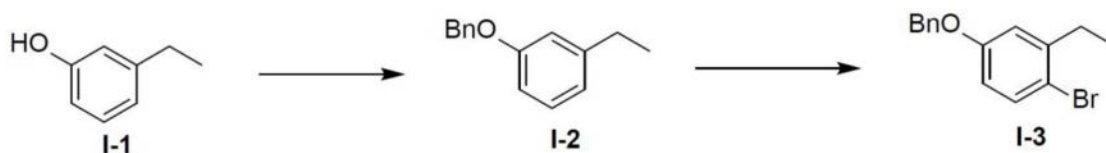
[0189] B=ACN:水:TFA(90:10:0.1)

[0190] 样品制备: 溶解于流动相B(0.15mL)中,接着用流动相A(0.85mL)稀释

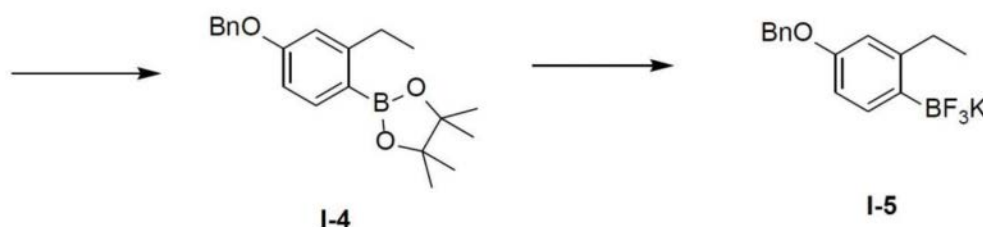
[0191] 检测器波长: 245nm

[0192] 梯度: 总共46min(时间(分钟)/%B):0/0、25/50、35/100、40/100、40.1/0、46/0

[0193] 制备1: (4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)三氟- λ^4 -硼烷, 钾盐 I-5



[0194]



[0195] (a) 1-(苯甲氧基)-3-乙苯 (I-2)

[0196] 在室温下向3-乙酚 (I-1) (25.0g, 204.0mmol) 于ACN(250mL, 10体积) 中的搅拌溶液中添加碳酸钾(42.0g, 306mmol)。将所得反应块状物在室温下搅拌15分钟, 随后以逐滴方式添加苯甲基溴(24.0mL, 204mmol)。将所得反应混合物在室温下搅拌6小时。在反应完成(TLC监测)后, 将所得反应块状物倒入水(1.0L)中, 随后用EtOAc (2×2L) 萃取化合物。将合并的有机物用冷水、盐水溶液洗涤, 且经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下蒸发。接着通过硅胶柱色谱(100-200M) 通过使用洗脱剂2% EtOAc/己烷来纯化粗产物, 以得到呈淡黄色油性化合物的所要产物 (I-2) (35.0g, 81%)。¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 7.46-7.44 (m, 2H), 7.39 (t, J=7.6Hz, 2H), 7.34-7.31 (m, 1H), 7.21 (t, J=7.6Hz), 6.86-6.80 (m, 3H), 5.07 (s, 2H), 2.64 (q, J=7.6Hz, 2H), 1.24 (t, J=7.6Hz, 3H)。

[0197] (b) 4-(苯甲氧基)-1-溴-2-乙苯 (I-3)

[0198] 历经15分钟的时段, 向1-(苯甲氧基)-3-乙苯 (I-2) (35.0g, 164mmol) 于ACN (525mL, 15体积) 中的冰冷搅拌溶液中逐份添加N-溴丁二酰亚胺(32.0g, 181mmol)。将所得反应混合物在室温下搅拌下一个1小时。在反应完成(TLC监测)之后, 将所得反应块状物倒入冰冷水(1.50L)中, 随后用EtOAc (2×1L) 萃取化合物。将合并的有机物用水洗涤, 且经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下蒸发以获得粗产物。将正己烷(250mL) 添加到粗材料, 从而产生浆液, 随后经由烧结漏斗过滤。在减压下蒸发母液以获得呈淡黄色油性化合物的所要产物 I-3 (42.0g, 87%)。¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 7.52-7.29 (m, 7H), 6.88 (s, 1H), 6.68 (d, J=6.0Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 2.69 (q, J=7.6Hz, 2H), 1.20 (t, J=7.5Hz, 3H)。

[0199] (c) 2-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷 (I-4)

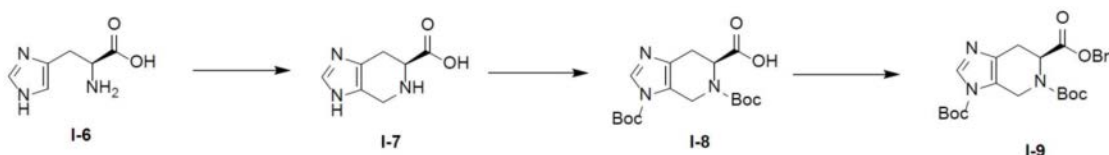
[0200] 通过吹扫N₂(g) 持续15min使4-(苯甲氧基)-1-溴-2-乙苯 (I-3) (42.0g, 144mmol)、双(频哪醇合)二硼(44.0g, 173mmol) 和乙酸钾(28g, 288mmol) 于二噁烷(440mL) 中的搅拌溶液脱气, 随后添加PdCl₂(dppf) DCM复合物(11.0g, 15mmol)。将所得反应混合物加热到80°C 持续下一个16h。在反应完成(TLC监测)之后, 使反应块状物经由硅藻土床过滤, 且在减压下蒸发母液以获得粗产物。通过硅胶柱色谱(100-200M) 通过使用洗脱剂1% EtOAc/己烷来纯化粗残余物, 以得到呈淡黄色油性化合物的所要产物 (I-4) (32.0g, 66%)。¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 7.74 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.45-7.36 (m, 5H), 6.84-6.78 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 2.91

(q, J=7.6Hz), 1.33(s, 12H), 1.19(t, J=7.6Hz, 3H)。

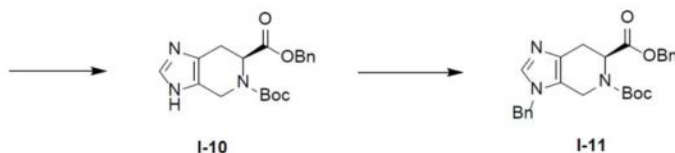
[0201] (d) (4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)三氟- λ^4 -硼烷, 钾盐 (I-5)

[0202] 向化合物2-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷 (I-4) (20g, 59.0mmol) 于丙酮: 甲醇 (200mL, 1:1 比率, 10 体积) 中的搅拌溶液中添加 3M 氟化氢钾溶液 (23.0g, 295mmol, 溶解于 98.0mL 的水中)。将所得反应混合物在室温下搅拌 16 小时。在反应完成 (TLC 监测) 之后, 将所得反应块状物在减压下蒸发。将由此获得的固体溶解于水 (100mL) 中, 且在室温下搅拌 30min。将所得反应块状物经由烧结漏斗过滤, 用正己烷洗涤, 并在减压下干燥以得到呈白色固体状的所要产物 (I-5) (14.0g, 74%)。¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 7.43 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.37 (t, J=7.5Hz, 2H), 7.30 (t, J=7.1Hz, 1H), 7.22 (d, J=8.0Hz), 6.58 (s, 1H), 6.53 (d, J=7.9Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 2.65 (q, J=7.5Hz, 2H), 1.07 (t, J=7.4Hz, 3H)。

[0203] 制备 2: (S)-3-苯甲基-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸 6-苯甲酯 5-(叔丁酯) (I-11)



[0204]



[0205] (a) (S)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸, 盐酸盐 (I-7)

[0206] 向 L-组氨酸 (I-6) (5.0kg, 32.14mol) 于水 (40L, 8 体积) 中的冰冷搅拌悬浮液中添加浓盐酸 (3.93L, 33.75mol), 随后以逐滴方式添加甲醛 (5.50L, 67.5mol, 37% 水溶液)。将所得溶液在相同温度下搅拌 30 分钟且接着在 80°C 下加热 8 小时。通过 LCMS 监测反应进程。在减压下去除水以获得粗产物且将所得粗物质在甲苯 (20L) 中搅拌 2 小时。在减压下去除有机物以去除过量水且将化合物共沸干燥。接着将所得材料放入乙醚 (20L) 中且搅拌 2 小时。接着将固体材料过滤且空气干燥以获得呈灰白色固体状的所要产物 (I-7) (6.50Kg, 85%)。¹H NMR (400MHz, D₂O) δ 8.69 (s, 1H), 4.56 (d, J=15.4Hz, 1H), 4.42 (d, J=15.5Hz, 1H), 4.20 (dd, J=5.5, 5.2Hz, 1H), 3.42 (dd, J=5.0, 17.0Hz, 1H), 3.11 (dd, J=10.2, 16.8Hz, 1H)。

[0207] (b) (S)-3,5-双(叔丁氧基羰基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸 (I-8)

[0208] 向 (S)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸二盐酸盐 (I-7) (6.10Kg, 25.40mol) 于 1,4-二噁烷 (48L, 8 体积) 和水 (48L, 8 体积) 中的冰冷搅拌溶液中逐滴添加三乙胺 (12.36L, 89mol), 随后历经 30min 的时段添加二碳酸二叔丁酯 (18.07L, 78.74mol, 溶解于 5L 的 1,4-二噁烷中)。将所得反应混合物在室温下搅拌下一个 16 小时。在反应完成 (TLC 与 LCMS 监测) 之后, 将浅黄色反应混合物用水 (10L) 稀释, 且连续用乙醚 (2×10L) 和 EtOAc (2×7.50L) 洗涤。丢弃有机相。将水层冷却, 且用 6N HCl 溶液使其达到 pH 约 3; 用 EtOAc (3×10L) 萃取水相。将合并的有机物用盐水溶液洗涤, 经硫酸钠干燥, 且在减压下浓缩。使油性残余物从 30% EtOAc: 己烷结晶以得到呈灰白色固体状的所要产物 (I-8) (5.1Kg, 55%)。(m/z):

$C_{17}H_{25}N_3O_6$ 的[M+H]⁺计算值368.18,实验值368.21。

[0209] (c) (S) -6,7-二氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-3,5,6(4H)三甲酸6-苯甲酯3,5-二叔丁酯(I-9)

[0210] 向(S) -3,5-双(叔丁氧基羰基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸(I-8) (5.1Kg, 13.88mol) 于DCM(51L, 10体积) 中的冰冷溶液中依序添加饱和碳酸氢钠水溶液(41.0L, 8体积)、四丁基碘化铵(5.13Kg, 13.88mol) 和苯甲基溴(2.47L, 20.82mol)。将所得反应混合物在室温下搅拌下一个16小时。在反应完成(TLC与LCMS监测)之后,分离二相溶液。用DCM(3×10L) 萃取水层。将合并的有机物用盐水溶液洗涤,经硫酸钠干燥,过滤且在减压下浓缩以获得粗产物,通过硅胶柱色谱(100-200M) 通过使用洗脱剂40%EtOAc/己烷纯化所述粗产物以得到呈粘稠油状物的所要产物(I-9) (4.50Kg, 72%)。(m/z): $C_{24}H_{31}N_3O_6$ 的[M+H]⁺计算值458.22,实验值458.60。

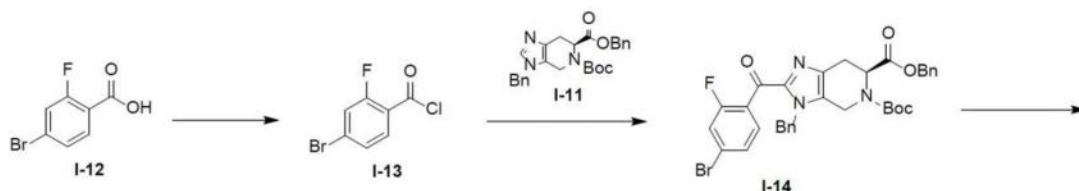
[0211] (d) (S) -3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯)(I-10)

[0212] 向(S) -6,7-二氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-3,5,6(4H) -三甲酸6-苯甲酯3,5-二叔丁酯(I-9) (4.50Kg, 9.84mol) 于IPA(45L, 10体积) 中的冰冷溶液中逐滴添加氢氧化铵(36L, 8体积)。将所得反应混合物进一步在室温下搅拌下一个16小时。在反应完成(TLC与LCMS监测)之后,将所得混合物用水(25L) 稀释,随后用EtOAc(3×20L) 萃取。将合并的有机物用盐水溶液洗涤,经硫酸钠干燥,过滤且在减压下浓缩以得到粗产物,通过硅胶柱色谱(100-200M) 通过使用洗脱剂2%MeOH/DCM纯化所述粗产物以获得呈浓稠粘性油状物的所要产物(I-10) (2.70Kg, 77%)。(m/z): $C_{19}H_{23}N_3O_4$ 的[M+H]⁺计算值358.17,实验值358.33。

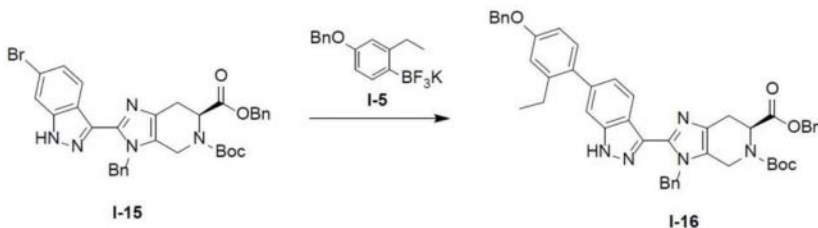
[0213] (e) (S) -3-苯甲基-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯)(I-11)

[0214] 向(S) -3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯)(I-10) (2.70kg, 7.55mol) 于DCM(32.4L, 12体积) 中的冰冷溶液中添加1N氢氧化钠水溶液(24.3L, 9体积), 随后依序添加四丁基碘化铵(2.80Kg, 7.55mol) 和苯甲基溴(0.99L, 8.31mol)。将所得反应混合物在室温下搅拌下一个2小时。在反应完成(TLC与LCMS监测)之后,分离二相溶液。用DCM(3×10L) 萃取水层。将合并的有机物用盐水溶液洗涤,经硫酸钠干燥,过滤且在减压下浓缩以得到粗产物,通过硅胶柱色谱(100-200M) 通过使用洗脱剂40%EtOAc/己烷纯化所述粗产物以获得呈粘性油状物的所要产物(I-11) (1.70Kg, 63%)。(m/z): $C_{26}H_{29}N_3O_4$ 的[M+H]⁺计算值448.22,实验值448.20。

[0215] 制备3: (S) -3-苯甲基-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-1H-吡啶-3-基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯)(I-16)



[0216]



[0217] (a) 4-溴-2-氟苯甲酰氯 (I-13)

[0218] 向4-溴-2-氟苯甲酸 (I-12) (1.25Kg, 5.71mol) 于DCM (12.5L, 15体积) 中的冰冷搅拌溶液中以逐滴方式添加乙二酰氯 (0.98L, 11.42mol)。将所得反应混合物在相同温度下搅拌10min。接着将DMF (150mL) 以逐滴方式添加到反应混合物。将所得反应块状物升温到室温且搅拌2小时。在反应完成 (通过TLC监测) 之后, 在氮气气氛下在减压下去除过量乙二酰氯以获得粗产物 (I-13) (1.08Kg, 80%), 所述粗产物不经进一步纯化即用于下一步骤中。

[0219] (b) (S)-3-苯甲基-2-(4-溴-2-氟苯甲酰基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯) (I-14)

[0220] 在室温下向 (S)-3-苯甲基-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯) (I-11) (1.70Kg, 3.80mol) 于ACN (13.6L, 8体积) 中的搅拌溶液中添加三乙胺 (2.11L, 15.2mol), 随后添加4-溴-2-氟苯甲酰氯 (I-13) (1.08Kg, 4.56mol) 于3.4L ACN 中, 2体积)。在添加完成之后, 所得反应混合物颜色从淡黄色变为棕色。将所得反应混合物在相同温度下搅拌30min, 且通过TLC监测反应进程。将所得反应混合物用冰冷水 (10L) 淬灭, 随后用EtOAc (3×5L) 萃取, 且将合并的有机物用盐水溶液洗涤。使有机物经硫酸钠干燥, 过滤且在减压下浓缩以得到粗产物, 通过硅胶柱色谱 (100-200M) 通过使用洗脱剂20% EtOAc/己烷纯化所述粗产物以获得所要产物 (I-14) (1.74Kg, 71%)。 (m/z): C₃₃H₃₁BrFN₃O₅的 [M+H]⁺计算值648.14, 实验值648.20。

[0221] (c) (S)-3-苯甲基-2-(6-溴-1H-吡唑-3-基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯) (I-15)

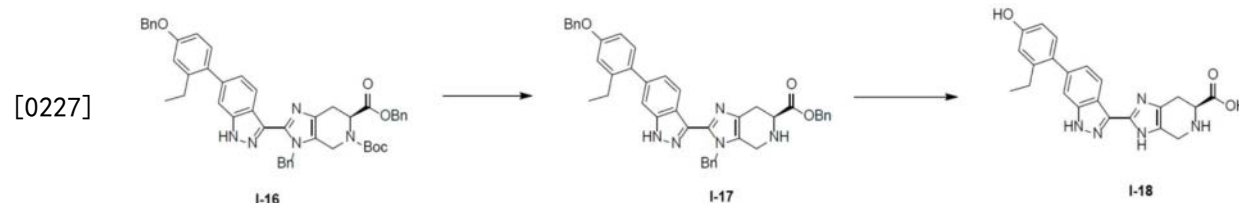
[0222] 在室温下向 (S)-3-苯甲基-2-(4-溴-2-氟苯甲酰基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯) (I-14) (1.74Kg, 2.68mol) 于THF (26.0L, 15体积) 中的搅拌溶液中添加水合肼 (0.705L, 13.4mol)。将所得反应混合物在60℃下加热3小时。在反应完成 (TLC监测) 之后, 将所得反应块状物倒入冰冷水 (10L) 中, 随后用EtOAc (3×10L) 萃取化合物。将合并的有机物用盐水洗涤, 且经硫酸钠干燥, 过滤, 并在减压下蒸发以得到粗产物, 通过硅胶柱色谱 (100-200M) 通过使用洗脱剂20% EtOAc/己烷纯化所述粗产物以获得呈灰白色固体状的所要产物 (I-15) (1.12Kg, 65%)。 (m/z): C₃₃H₃₂BrN₅O₄的 [M+H]⁺计算值642.16, 实验值642.21。

[0223] (d) (S)-3-苯甲基-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-1H-吡唑-3-基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯) (I-16)

[0224] 将双(频哪醇合)二硼(250g, 984mmol)与丙-2-醇(1882mL, 2.46E+04mmol)一起装入先前使用氟化学物质蚀刻的5L 3颈单壁烧瓶中,且搅拌混合物直到完全溶解为止。溶解为吸热的(-4°C)。在先前使用氟化学物质蚀刻的4L锥形瓶中,将氟化钾氢氟酸盐(538g, 6891mmol)溶解于水(2.306L, 1.28E+05mmol)中以形成3M溶液。溶解为吸热的(-12°C)。接着过滤溶液以从氟化钾氢氟酸盐去除少量不溶的材料。一旦两种溶液完全溶解,那么历经15分钟将锥形瓶的内含物逐份装入到单壁烧瓶中。观测到适度放热(+10°C)。在添加期间,溶液变为浓稠和半不透明的灰色浆液,且延长搅拌以保持内含物良好混合。将混合物搅拌1.5h,且接着经由粗糙的玻璃烧结漏斗(4L, 先前经蚀刻)过滤。需要30-45分钟来完成过滤。丢弃透明的二相滤液。将白色固体在滤纸上干燥10分钟(观测到滤饼开裂)。将固体转移回到经清洁的5L 3颈单壁烧瓶中且用水(1.33L, 7.38E+04mmol)重新浆化。将浆液搅拌2h,此后其形成透明的均质水凝胶。将溶液再搅拌1h,随即使用4L粗糙的玻璃漏斗(先前经蚀刻)滤除固体/凝胶。使固体在滤纸上干燥30分钟。将固体转移回到经清洁的5L 3颈单壁烧瓶且用丙酮(1.084L, 1.48E+04mmol)重新浆化。将白色/灰色浆液搅拌1h且接着在4L粗糙的玻璃漏斗(先前经蚀刻)上过滤。需要20分钟来完成过滤,且接着在漏斗上干燥另外1h。在此时间期间,偶尔搅动固体以确保均匀干燥。淡白色粉末在干燥之后保留于滤纸上。将固体在55°C下在真空下随着缓慢氮气渗出干燥20h,以得到疏松白色固体(收集到200.3g)。

[0225] 向(S)-3-苯甲基-2-(6-溴-1H-吡唑-3-基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯)(I-15)(10.0g, 16.0mmol)于2-甲基四氢呋喃(100mL, 10体积)中的搅拌溶液中添加(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)三氟- λ^4 -硼烷,钾盐(I-5)(8.0g, 20mmol)和上文获得的疏松白色固体(0.20g)。使所得反应混合物经氮气脱气30分钟。向此溶液中添加所制备的碳酸铯水溶液(20.0g, 62.0mmol于60mL水中, 6体积)。将所得反应混合物进一步脱气15分钟,随后添加双(二叔丁基(4-二甲氨基苯基)膦)二氯钯(II)(0.66g, 0.93mmol),且将反应混合物在真空下抽空并通过氮气吹扫。将所得反应混合物在110°C下加热20小时。在反应完成(TLC与LCMS监测)之后,将所得反应混合物冷却到室温,且经由硅藻土床过滤,接着进一步用EtOAc(3×0.5L)洗涤。将合并的有机物用1N氢氧化钠溶液(3×0.5L)洗涤。接着将合并的有机物用盐水洗涤,且经硫酸钠干燥,过滤,且在减压下蒸发以得到粗产物,通过硅胶柱色谱(100-200M)通过使用洗脱剂20%EtOAc/己烷纯化所述粗产物以获得呈淡黄色固体状的所要产物(I-16)(作为N-苯甲基区位异构体的混合物)(8.0g, 66%)。(m/z): C₄₈H₄₇N₅O₅的[M+H]⁺计算值774.36, 实验值774.59。

[0226] 制备4: (S)-2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸, 盐酸盐(I-18)



[0228] (a) (S)-3-苯甲基-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸苯甲酯, 盐酸盐(I-17)

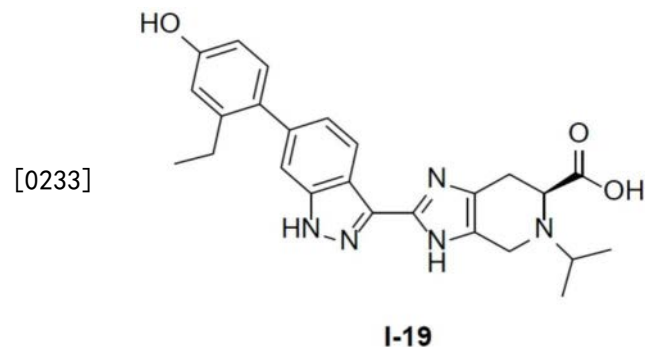
[0229] 将(S)-3-苯甲基-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-1H-吡唑-3-基)-3,4,6,7-

四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯) (I-16) (1.0g, 1.292mmol) 溶解于二噁烷(8mL) 和水(1.5mL) 中, 随后添加含氯化氢溶液4M的二噁烷(7mL, 28.0mmol), 且将反应混合物在室温下搅拌3小时(通过LCMS监测反应进程)。接着冷冻且冻干反应混合物, 且将粗产物(I-17) 直接用于下一反应中(假设定量产率)。(m/z): $C_{43}H_{39}N_5O_3$ 的[M+H]⁺计算值674.31, 实验值674.3。

[0230] (b) (S)-2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸, 盐酸盐(I-18)

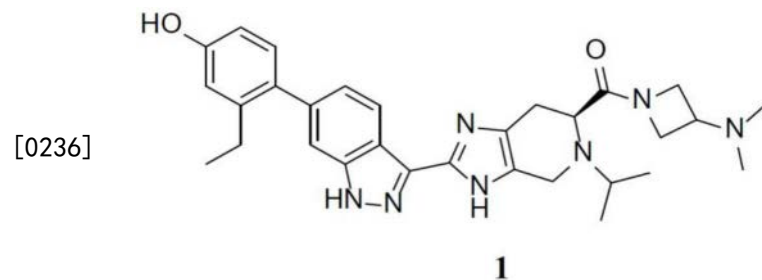
[0231] 在50°C下将(S)-3-苯甲基-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸苯甲酯, 盐酸盐(I-17) (0.918g, 1.292mmol) 溶解于2-丙醇(15mL)、含氯化氢溶液5M的水(0.258mL, 1.292mmol) 和水(0.25mL) 中, 随后添加钯(10重量%于碳上)、50%水(0.138g, 0.065mmol)。接着用氮气吹扫反应烧瓶, 连接氢气气囊, 且将反应混合物在50°C下搅拌4天, 其中视需要补充氢气气囊(通过LCMS监测反应进程)。接着通过过滤去除所有固体, 且浓缩所得溶液。将残余物溶解于1:1ACN/水中, 冷冻且冻干。所得粉末(I-18) 不经进一步纯化即使用(假设定量产率)。(m/z): $C_{22}H_{21}N_5O_3$ 的[M+H]⁺计算值404.17, 实验值404.2。

[0232] 制备5: (S)-2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸(I-19)



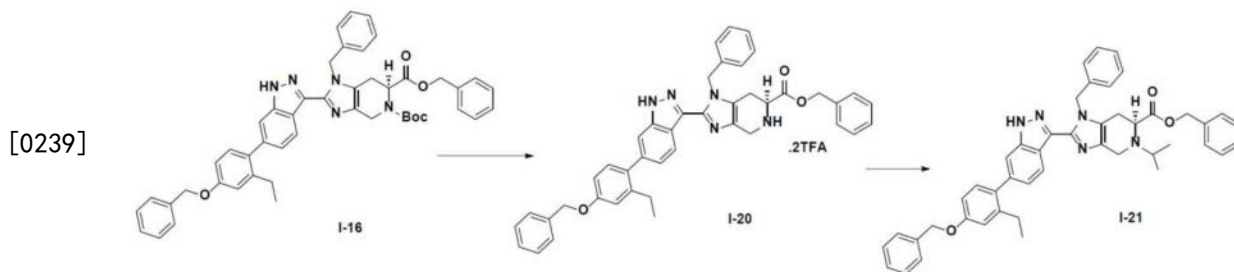
[0234] 将(S)-2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸, HCl (I-18) (0.25g, 0.568mmol) 悬浮于DMF (2.5mL) 和丙酮(2.5mL) 中, 随后添加乙酸(0.098mL, 1.705mmol) 和氰基硼氢化钠(0.179g, 2.84mmol), 且将反应混合物在室温下搅拌24小时(通过LCMS监测反应进程)。浓缩反应混合物, 接着通过逆相色谱(5-70% ACN/水梯度, 50g C18aq柱) 纯化粗产物以得到标题化合物的TFA盐(149mg, 47%产率)。(m/z): $C_{25}H_{27}N_5O_3$ 的[M+H]⁺计算值446.21, 实验值446.3。

[0235] 实例1: (S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮



[0237] 将(S)-2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸, TFA (I-19) (50mg, 0.089mmol)、3-(二甲氨基)氮杂环丁二氢氯化物 (23.20mg, 0.134mmol) 和DIPEA (0.078mL, 0.447mmol) 溶解于DMF (1.5mL) 中, 接着添加HATU (51.0mg, 0.134mmol), 且将反应混合物在室温下搅拌3小时 (通过LCMS监测反应进程)。添加胼 (0.014mL, 0.447mmol) 以分解非所要副产物, 且将溶液在室温下搅拌10分钟。接着浓缩反应混合物, 且通过制备型HPLC (5-70%ACN/水梯度, C18柱) 纯化粗产物以得到标题化合物的TFA盐 (25mg, 37%产率)。(m/z): $C_{30}H_{37}N_7O_2$ 的[M+H]⁺计算值528.30, 实验值528.3。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ13.09 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.27 (d, J=8.31, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.04 (m, 2H), 6.71 (d, J=2.54, 1H), 6.64 (dd, J=2.53, 8.26, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.82 (m, 2H), 3.64 (m, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.74 (m, 2H), 2.47 (q, J=7.56, 2H), 2.07 (d, J=3.69, 6H), 1.07 (m, 6H), 1.00 (t, J=7.50, 3H)。

[0238] 制备6: (S)-1-苯甲基-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸苯甲酯 (I-21)



[0240] 步骤1

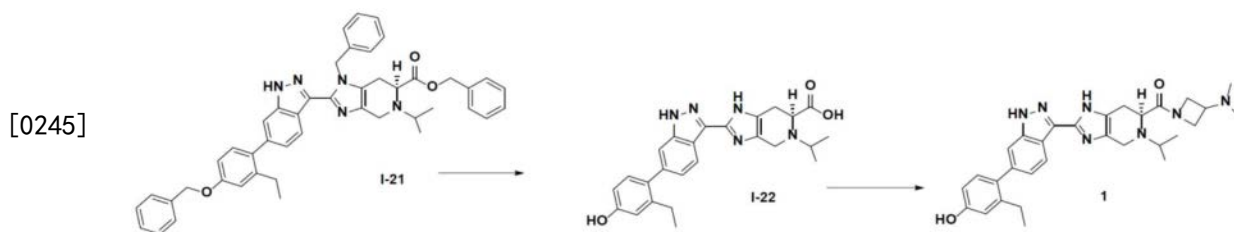
[0241] 在3颈干燥圆底烧瓶中添加I-16 (550g, 0.71摩尔)。将化合物在室温 (24-25°C) 下溶解于DCM (4125mL) 中, 以得到透明淡黄色溶液。历经下一个30分钟使溶液冷却到0°C (冰盐混合物) (外部温度为-5°C)。接着经由滴液漏斗历经45min缓慢添加TFA (1375mL)。将反应物在相同温度 (0°C) 下搅拌10min。将反应块状物升温到30°C, 且在相同温度下搅拌1.5h。通过TLC以及通过LCMS监测反应进程。在反应完成之后, 在40°C下在减压下蒸发反应混合物以得到呈淡棕色浓稠粘性块状物的粗材料。通过每次添加2.5L庚烷且蒸发到干燥将庚烷汽提进行两次。接着在高真空下干燥化合物。获得呈浓稠粘性液体状的所要产物I-20 (641g, 100%产率, LCMS=94.35%纯)。

[0242] 步骤2

[0243] 在3颈干燥圆底烧瓶中, 在室温 (25°C) 下在惰性气氛下一次性装入分子筛4A° (641g, w/w), 随后添加8体积丙酮 (5.13L)。观测到白色悬浮液。历经10分钟将步骤1中获得的材料 (641g, 0.71mol, 溶解于7.690L (12体积) 的丙酮中) 缓慢添加到烧瓶中, 以避免在烧瓶内部形成胶状块状物。针对反应块状物观测到淡黄色。在25°C下逐滴添加CH₃COOH (15.4mL, 0.266mol), 且将所得反应块状物在相同温度下搅拌30min。观测到暗黄色悬浮液。在25°C下历经30min的时段逐份添加三乙酰氧基硼氢化钠 (297g, 1.4mol)。温度从25°C上升到31°C, 且反应块状物颜色也从暗黄色变为淡黄色。将所得反应混合物在30°C下搅拌下一个30min。通过LCMS和TLC监测反应进程。在反应完成之后, 将反应混合物冷却到10°C且再搅拌20min。接着经由硅藻土床过滤反应块状物以去除分子筛和三乙酰氧基硼氢化钠。将用于过滤的硅藻土床用2-Me-THF 10体积 (6.41L) 洗涤, 且单独获取2-Me-THF。将上文获得的丙

酮母液在减压下蒸发到干燥以得到浓稠粘性液体。将所获得的粘性液体溶解于用于硅藻土床洗涤的2-Me-THF (6.41L) 中。向有机层 (2-Me-THF) 添加10% NaHCO₃水溶液 (约5.5L) 以使pH达到约7.02。此时,观测到轻微气体逸出,其在5分钟内停止。分离二相层和有机层。进一步用水 (2.0L, 两次) 洗涤有机层。有机层经Na₂SO₄干燥,过滤且在减压下在45°C下蒸发,以得到呈轻微浅黄色多泡固体状的(S)-1-苯甲基-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸苯甲酯(I-21) (500g), 95.73%纯(通过HPLC)。执行了11个相同规模的批次,且将所获得的材料组合。制备化合物于庚烷(5体积)中的浆液,且将所述浆液在室温下搅拌2小时。将化合物过滤且用庚烷(2体积)洗涤。在不施加任何外部温度的情况下将湿滤饼在真空盘式干燥器中干燥24小时以得到5.40kg的化合物I-21。

[0244] 制备7: (S)-3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(1)



[0246] 步骤1:

[0247] 在25°C下在搅拌下向3颈圆底烧瓶中装入(S)-1-苯甲基-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸苯甲酯(1,350g,1886mmol)和四氢呋喃(2025mL)以得到均质透明黄色/橙色溶液。在搅拌下向溶液中添加丙-2-醇(11,475mL)和6M氯化氢(水溶液)(1257mL)以在25°C下得到均质溶液。使用氮气鼓泡以使从由搅拌的黄色浆液脱气30min。将10wt% Pd/C、50wt% H₂O (202.5g, 95mmol) 添加到反应器中。断开氮气,随即将反应溶液用H₂鼓泡吹扫,且升温到65°C内部温度。HPLC显示反应在210min之后完成。使反应混合物经由10克硅藻土垫过滤以去除大量催化剂。收集到透明的黄色溶液。向滤液中装入10% (w/w) SiliaMetS 硫醇(101.25g, 953mmol) (白色固体),且在50°C下历经1小时搅拌混合物以清除Pd的剩余部分。在1小时之后,经由0.2微米滤纸滤出SiliametS 硫醇以得到淡黄色均质溶液。接着将滤液浓缩到3×(体积)且保持处于50°C。向50°C浓缩溶液中添加3当量的12M HCl(471ml, 5657mmol)。在50°C下历经5min搅拌之后,添加2.025克晶种,且保持处于50°C下超过1小时。浆液显著增稠。历经120min缓慢添加15×(体积)的乙腈(20250mL)。接着将批料保持处于50°C超过2小时,接着历经3小时冷却到20°C,且在搅拌下保持过夜。接着过滤浆液,且将滤饼用ACN冲洗五次,且在高真空下在50°C下干燥过夜。

[0248] 一旦卸载,那么获得呈(S)-2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸, 2HCl (850g, 1640mmol, 87%产率)形式的浅橙色固体的滤饼。

[0249] 对1.115kg的化合物I-21进行类似流程以得到另外700g的化合物I-22。合并所获得的两个批次。

[0250] 步骤2:

[0251] 在20℃下向20L夹套反应器中装入N,N-二甲基氮杂环丁-3-胺, 2HCl (432g, 2497mmol) 和N,N-二甲基乙酰胺 (3750ml, 4.00E+04mmol)。在20℃下历经约5min添加DIPEA (2699ml, 1.55E+04mmol)。将混合物在20℃下搅拌15min以得到混浊溶液, 在以200rpm的搅拌下将所述混浊溶液冷却到10-15℃。将(S)-2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸, 2.2HCl (1250g, 2378mmol) 添加到批料, 同时使温度维持低于20℃。在添加期间观测到放热反应(观测到约7℃的放热)。获得浆液, 将其在15-25℃下搅动约15min。在15min之后, 仍观测到稀浆液。在17℃的内部温度下, 历经约5分钟添加HATU (994g, 2615mmol), 同时在20±5℃下以350rpm混合。在添加期间, 温度上升到22℃。在添加HATU之后获得稀浆液。将批料保持处于20-25℃, 且在搅拌下以215rpm搅动直到反应达到完成, 即2h。向已完成反应物中装入用1体积水(1.25L)稀释的1M HCl水溶液(4993ml, 4993mmol)的预混合冷却(5℃)溶液, 同时使批料温度维持低于30℃。

[0252] 将5体积乙酸异丙酯(6, 250mL)装入批料中且将混合物搅动约15min。停止搅动。将酸性水层分离且转移到反应器中。丢弃有机层。水层的pH经测定为4-5.0。将5体积乙酸异丙酯(6, 250mL)添加到批料且在20℃下进行搅动持续约15min。使混合物在20℃下静置。将酸性水层分离且转移到反应器中。丢弃有机层。将5体积乙酸异丙酯(6, 250mL)添加到批料, 将其在20℃下搅动约15min, 接着使其在20℃下静置。将酸性水层分离且转移到反应器中。丢弃有机层。在20℃下将酸性水层存储过夜。将30体积水(37.5kg)装入反应器中。添加碳酸氢钠(1238g, 1.47E+04mmol), 且搅动混合物直到实现完全溶解。停止搅动, 且将溶液保持处于20℃过夜。在搅拌下, 将10体积2-甲基四氢呋喃(12, 500mL)添加到水溶液中。观测到放热事件。将内部温度调整到20±5℃。历经约10min将酸性水层添加到反应器。观测到1℃的轻度放热。将混合物在20℃下搅动约15min, 接着使其在20℃下静置。将底部水层去除且添加到反应器。将有机层去除, 且通过装入5体积2-甲基四氢呋喃(6, 250mL)进行萃取并在20℃下混合约15min。将合并的有机层在50℃浴温下用旋转蒸发器浓缩到3体积(3.75L)。添加10体积2-甲基四氢呋喃(12, 500mL), 且在50℃浴温下用旋转蒸发器将混合物浓缩到3体积(3.75L)。将乙腈(2.00E+04mL)添加到25L夹套反应器中, 且在以215rpm的混合的情况下将其内部温度调整到0-5℃。在0-5℃下历经约1小时将浓缩批料(约3.75L)添加到经冷却乙腈中。使混合物在0℃下老化过夜, 同时以215rpm的混合。将其过滤, 且在0℃下用4体积预冷却乙腈(5, 000mL)洗涤滤饼。在N₂气压力下历经2小时在滤纸上干燥滤饼。将湿滤饼在50℃下在高真空下(伴随轻微N₂吹扫)进一步干燥过夜, 以得到呈非晶形固体的(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(1150g, 2179mmol, 92%产率)。遵循相同方法制备第二批材料, 以得到1036g的呈非晶形固体(通过PXRD确认)的(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮, 且将两个批次合并。

[0253] 实例2: (S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮的结晶水合物(形式I)

[0254] 在30℃下将(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(95g, 180mmol)溶于1M HCl(水溶液)(950mL)和乙酸异丙酯(950mL)中。将批料保持处于30℃超过30min, 接

着分离各层。此重复三次,始终保留底部水层且丢弃乙酸异丙酯层。在水层的第四次乙酸异丙酯萃取之后,添加2-甲基四氢呋喃(950ml,9419mmol),随后添加足够的10%碳酸氢钠以使pH=7.5。将混合物搅拌超过30min且分离各层。用2-甲基四氢呋喃(250mL)萃取水层。合并2-甲基四氢呋喃层。进行从2-甲基四氢呋喃到乙腈的溶剂交换以从溶液沉淀出产物。在过滤和干燥之后,获得89克的粗物质(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮的滤饼。将此固体(89克)溶于445mL的甲醇中。在搅拌到完全溶解之后,经由0.2 μ m滤纸过滤批料。接着将滤液加热到55 $^{\circ}$ C的内部温度,且在搅拌下保持处于此温度超过60min。一些沉淀物开始形成以得到略微混浊的溶液。接着将温度以0.2 $^{\circ}$ C/min线性冷却到15 $^{\circ}$ C的最终内部温度,接着保持处于15 $^{\circ}$ C超过8小时。此时,批料显著增稠,且在氮气层下使用高真空过滤浆液。将湿滤饼卸载且历经18小时在高真空(28mm Hg)下在温度设定为65 $^{\circ}$ C的真空烘箱中干燥。接着卸载干燥滤饼,且使其平衡到环境湿度和温度以得到(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮水合物形式I(75g,140mmol,78%产率)的最终白色到灰白色结晶滤饼。

[0255] 实例3: (S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(化合物1)的结晶水合物,形式I

[0256] 向20L夹套反应器中添加制备7中获得的(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(化合物1,2186g,4143mmol),随后添加甲醇(10930mL)。将所获得的浆液搅拌且加热到55 $^{\circ}$ C以得到透明的均质溶液。将溶液保持处于55 $^{\circ}$ C超过30min且接种(用先前实例中获得的2.186g材料)。将溶液在55 $^{\circ}$ C下再保持一小时。发生结晶和稠化。接着历经450分钟将混合物冷却到10 $^{\circ}$ C。使批料内部地保持处于10 $^{\circ}$ C超过12小时,然后过滤。在5 $^{\circ}$ C下用预冷却甲醇(2186mL)洗涤湿滤饼。将滤饼在真空下在氮气吹扫下在过滤干燥器上干燥,且将加热夹套设定为55 $^{\circ}$ C。使滤饼在这些干燥条件下保持超过19小时。接着将滤饼卸载且在干燥盘中铺展开,且历经30小时使其平衡到环境RH条件,以得到呈灰白色到浅黄色固体状的(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮的结晶水合物,形式I(1411.6g,2587mmol,62.4%产率)。

[0257] 实例4: (S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(化合物1)的结晶水合物,形式I

[0258] 将甲醇(1.250mL)添加到以与实例2中所展示类似的方式获得的250g的粗物质(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(化合物1)中,且将所获得的浆液加热到55 $^{\circ}$ C持续约30分钟以得到均质溶液。经由0.2 μ m滤纸过滤溶液。将滤液在55 $^{\circ}$ C下搅拌约3小时以引发结晶。将所得稀浆液的温度调整到5 $^{\circ}$ C持续约250分钟。将稠化浆液在5 $^{\circ}$ C下搅拌过夜。接着使用压力过滤器分离固体。将滤饼在5 $^{\circ}$ C下用预冷却的甲醇(250mL)洗涤,且接

着在高真空下在55℃下干燥过夜以得到180g的结晶材料。向所获得的180g结晶材料中添加甲醇(900mL)。将搅拌浆液的温度调整到55℃持续约30分钟。将浆液在55℃下搅拌约3小时。接着将浆液的温度调整到5-15℃持续约200分钟。将浆液在5-15℃下再搅拌约2小时。在惰性条件下使用压力过滤器分离固体。将滤饼用在5-15℃下预冷却的甲醇(300mL)洗涤,且接着在真空烘箱中在55-65℃下在高真空下干燥约12小时。将干燥滤饼在环境温度、压力和相对湿度下保持约12小时,以得到165.7g的呈灰白色到淡黄色固体状的结晶单水合物(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(形式I),纯度为97.7%(基于HPLC数据)。

[0259] 实例5: (S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(化合物1)的结晶水合物,形式I

[0260] 通过遵循与制备7步骤2中所展示类似的制备来获得(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮。在50℃下历经5小时将所获得的固体(0.100g,0.183mmol)溶解于乙醇(0.5ml,0.183mmol)中,此时形成浆液。将浆液在彼温度下在惰性条件下过滤,且在真空下在60℃下在烘箱中干燥超过12小时,随后在环境室温和压力下平衡超过12小时以得到形式I(0.06g)。

[0261] 实例6-10:结晶形式的特性

[0262] 通过粉末X射线衍射(PXRD)、差示扫描量热法(DSC)、热重分析(TGA)、动态湿气吸附(DMS)和单晶X射线衍射来分析(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酮(化合物1)的结晶水合物,形式I的样品。

[0263] 实例6粉末X射线衍射

[0264] 用配备有Lynxeye 1D检测器的Bruker D8-Advance X射线衍射仪使用具有45kV的输出电压和40mA的电流的Cu-K α 辐射($\lambda=1.54051 \text{ \AA}$)来获得图1的粉末X射线衍射图案。以布伦塔诺(Bragg-Brentano)几何模式操作仪器,其中设定入射、发散度和散射狭缝以最大化样品处的强度。对于测量,将少量粉末(5-25mg)平缓地按压于样品固持器上以形成光滑表面且使其经受X射线暴露。以2 θ -2 θ 模式从2°到35°的2 θ 以0.02°的步长大小和2秒/步长的扫描速率扫描样品持续总共1小时扫描时间。通过布鲁克衍射套件(Bruker DiffracSuite)测量软件控制数据获取,且通过杰德(Jade)软件(版本7.7)进行分析。化合物1的结晶水合物,形式I的所观测PXRD 2 θ 峰位置和d间距展示于表1中。

[0265] 表1:结晶水合物形式I的PXRD数据

	2θ	d(Å)	面积	A%
	5.68	15.56	40.1	100.0
	8.49	10.40	10.6	26.4
	10.43	8.47	18.2	45.5
[0266]	10.94	8.08	13.2	32.9
	11.55	7.65	8.1	20.3
	12.20	7.25	6.9	17.3
	13.08	6.76	13.7	34.3
	15.94	5.56	15.1	37.6
	16.24	5.45	3.3	8.2
	17.06	5.19	6.2	15.6
	17.60	5.04	745.5	4.8
	18.41	4.82	2.3	5.6
	18.82	4.71	2.3	5.8
[0267]	18.96	4.68	4.3	10.6
	21.90	4.06	2.5	6.1
	22.08	4.02	4.4	11.1
	22.27	3.99	5	12.6
	24.55	3.62	4.3	10.9
	26.29	3.39	3.4	8.4

[0268] 实例7:热分析

[0269] 使用TA Instruments Model Discovery DSC执行差示扫描量热法(DSC)。用TRIOS软件收集数据,且使用TA Instruments Universal Analysis软件进行分析。将结晶形式的样品准确称取到覆盖有TZero气密针孔封盖的铝盘中。将样品最初冷却到-20℃,其后使用10℃/min的线性加热斜升将样品从-20℃加热到250℃。形式I的代表性DSC热谱图展示于图2中。

[0270] 使用配备有高分辨率能力的TA Instruments Model Discovery TGA模块执行热重分析(TGA)测量。使用TA Instruments TRIOS软件收集数据,且使用TA Instruments Universal Analysis软件进行分析。将所称样品置于铂盘上,且以10℃/分钟的加热速率从环境温度到260℃进行扫描。在使用期间,用氮气流吹扫其余部分和锅炉室。形式I的代表性TGA迹线展示于图3中。在27℃与100℃之间观测到约3.4%的重量损失,且所述重量损失对应于单水合物形式的脱水。

[0271] 实例8:动态湿气吸附评定

[0272] 使用VTI大气压微量天平SGA-100系统(VTI公司(VTI Corp.),海厄利亚()),FL33016)执行动态湿气吸附(DMS)测量。使用所称样品,且湿度在分析开始时为最低可能值(接近0%RH)。DMS分析由以下组成:进行初始干燥步骤(约0%RH)持续16小时,随后在5%RH/步长的扫描速率下在5%RH到90%RH的湿度范围内进行两次吸附和解吸附循环。在25℃下以等温方式执行DMS运行。形式I的代表性DMS迹线展示于图4中。

[0273] 实例9:单晶X射线衍射

[0274] 将具有尺寸0.28×0.11×0.02mm的化合物1的结晶水合物(形式I)的晶体安放于玻璃纤维上。

[0275] 在配备有Oxford Cryosystems Cobra冷却装置的Rigaku Atlas CCD衍射仪上收集数据。使用Cu K α 辐射收集数据,且使用Bruker AXS SHELXTL软件解析且优化晶体结构。连接到碳的氢原子以几何方式放置且用安放各向同性置换参数使其优化。连接到杂原子的氢原子位于差异傅里叶图(difference Fourier map)中,且用各向同性置换参数使其从由优化。单位晶胞参数以及晶体系统和空间群细节提供于表2中。数据确认形式I为单水合物。

[0276] 表2:来自单晶X射线衍射分析的数据

数据收集的温度	100(2) K
用于数据收集的波长	1.54178 Å
晶体系统	单斜
空间群	C2
[0277] 单位晶胞尺寸	a = 20.8736(5) Å
	b = 9.15021(19) Å
	c = 15.7412(3) Å
	a = 90°
	b = 98.4786(18)°
单位晶胞体积	2973.67(11) Å ³
最终 R 指数[F ² >2 σ (F ²)]	R ₁ = 0.0368, wR ₂ = 0.0975

[0278] 实例10:稳定性研究

[0279] 对于如表3和表4中所展示的化合物1水平和杂质概况,通过HPLC分析在25°C和60%相对湿度(RH)的加速条件下以及在40°C和75%相对湿度(RH)的加速条件下存储的形式I的样品。

[0280] RRT = 相对滞留时间(相对于化合物1)

[0281] LOQ = 定量极限(0.05% a/a),仅报导处于或高于LOQ的峰

[0282] 表3:在40°C/75%RH下的化合物1和杂质百分比

RRT	T=0	T=1 个月 40°C/75% RH	T=3 个月 40°C/75% RH
	% a/a	% a/a	% a/a
0.77	0.17	0.18	0.18
0.84	0.05	0.06	0.05
0.95			0.05
0.97	0.06	0.07	0.07
[0283] 化合物 1	97.5%	97.5%	97.5%
1.10		0.09	
1.11	0.07	0.12	0.10
1.13			0.05
1.18			0.06
1.25	0.11	0.11	0.14
1.28	0.36	0.35	0.36

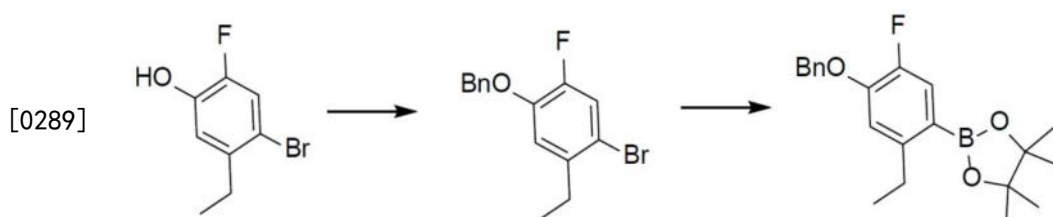
	T=0	T=1 个月 40°C/75% RH	T=3 个月 40°C/75% RH
[0284]	1.30	0.21	0.22
	1.35	0.06	0.11
	1.77		0.05
	1.84	0.32	0.31
	1.85	0.13	0.20
	2.11	0.06	0.05
	2.27	0.07	0.07

[0285] 表4:在25°C/60%RH下的化合物1和杂质百分比

RRT	T=0	T=3 个月 25°C/60% RH
	% a/a	% a/a
0.77	0.17	0.18
0.84	0.05	0.05
0.95		0.05
0.97	0.06	0.06
化合物 1	97.5%	97.6%
[0286]	1.11	0.07
	1.25	0.11
	1.28	0.36
	1.30	0.21
	1.35	0.06
	1.84	0.32
	1.85	0.13
	2.11	0.06
	2.27	0.07

[0287] 形式I在这些条件下呈现良好的稳定性。

[0288] 制备8:2-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷



[0290] (a) 1-(苯甲氧基)-4-溴-5-乙基-2-氟苯

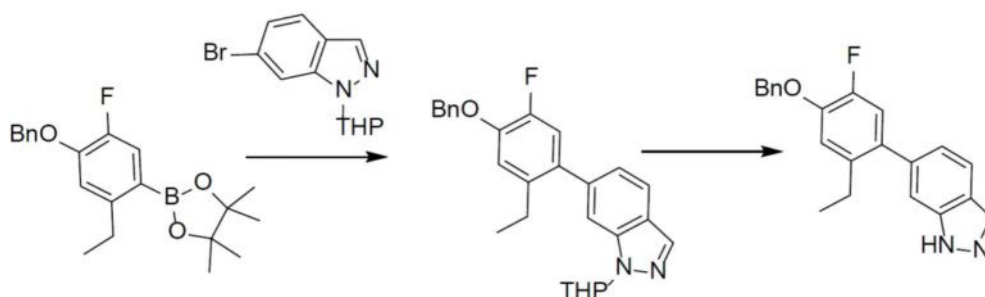
[0291] 向4-溴-5-乙基-2-氟苯酚 (20g, 91.03mmol) 于ACN(250mL) 中的溶液中添加 K_2CO_3 (31.55g, 228.3mmol), 随后逐滴添加苯甲基溴 (13.10mL, 109.58mmol)。将所得反应混合物在80°C下搅拌2小时。将水层用EtOAc萃取(三次), 合并且用盐水洗涤。将有机层经 Na_2SO_4 干燥, 且在减压下蒸发以得到呈浅黄色油性液体状的标题中间物 (25g, 89%产率)。 1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 7.48-7.30 (m, 5H), 7.27 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 2.66 (q, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.16 (t, $J=7.5$ Hz, 3H)。

[0292] (b) 2-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊

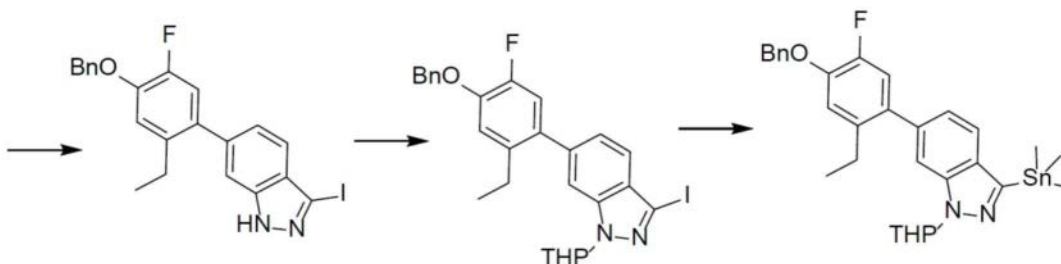
烷

[0293] 向先前步骤的产物(12.5g, 40.45mmol)于二噁烷(100mL)中的溶液中添加双(频哪醇合)二硼(15.40g, 60.67mmol)和KOAc(11.9g, 121.35mmol)。将反应混合物用氮气吹扫15min, 随后添加与二氯甲烷错合的[1, 1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)(1.65g, 2.023mmol)。将所得反应混合物搅拌且在110°C下加热3h, 经由硅藻土过滤, 且用EtOAc洗涤残余物。将滤液用过量EtOAc(200mL)稀释, 且用水(100mL), 随后盐水(100mL)洗涤, 经硫酸钠干燥, 且在真空中浓缩以得到粗产物, 将所述粗产物通过(100-200)硅胶柱色谱纯化, 用3-5%EtOAc:己烷洗脱, 以得到呈灰白色固体状的所要产物(9.50g, 66%产率)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 7.54-7.27(m, 6H), 6.81(d, J=7.9Hz, 1H), 5.16(s, 2H), 2.84(q, J=7.5Hz, 2H), 1.32(s, 12H), 1.14(t, J=7.5Hz, 3H)。

[0294] 制备9-6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-3-(三甲基锡烷基)-1H-吡唑



[0295]



[0296] (a) 6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑

[0297] 向6-溴-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑(50g, 178.57mmol)和2-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧化硼杂环戊烷(76.3g, 214.29mmol)于DMF:H₂O(480:120mL)中的溶液中添加K₃PO₄(94.64g, 446.86mmol)。使反应混合物经氮气脱气15min, 接着添加Pd(PPh₃)₂Cl₂催化剂(6.26g, 8.93mmol), 且使混合物再次经氮气脱气5min, 搅拌且在100-110°C下加热5h。经由硅藻土过滤反应混合物, 且用EtOAc洗涤残余物。将滤液用EtOAc稀释, 用冷水和盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 且在真空中浓缩以提供粗产物, 通过急骤柱色谱纯化所述粗产物以得到呈白色固体状的标题中间物(65g, 86%产率)。(m/z): C₂₇H₂₇FN₂O₂的[M+H]⁺计算值431.21, 实验值431.46。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 8.06-7.98(m, 2H), 7.70(d, J=8.2Hz, 1H), 7.51-7.32(m, 5H), 7.08(dd, J=809.6, 8.3Hz, 1H), 7.03(d, J=11.9Hz, 1H), 6.95(d, J=8.5Hz, 1H), 5.76-5.64(m, 1H), 5.20(s, 2H), 4.04(d, J=10.1Hz, 1H), 3.72(t, J=9.7Hz, 1H), 2.52(q, J=7.5Hz, 2H), 2.22-2.02(m, 3H), 1.80-1.71(m, 3H), 1.06(t, J=7.5Hz, 3H)。

[0298] (b) 6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1H-吡唑

[0299] 向先前步骤的产物(65g, 151.16mmol)于甲醇(700mL)中的溶液中添加浓HCl(120mL),且将所得溶液在60-65℃下加热3h,冷却到RT,并在真空中浓缩。将残余物溶解于EtOAc中,且用饱和NaHCO₃水溶液和水洗涤。使有机层经无水Na₂SO₄干燥,且在真空中浓缩以得到呈白色固体状的标题中间物(52g, 99%(粗物质))。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ8.13(s, 1H), 7.77(d, J=8.3Hz, 1H), 7.59-7.30(m, 6H), 7.10(d, J=8.3Hz, 1H), 7.01(d, J=11.8Hz, 1H), 6.96(d, J=8.4Hz, 1H), 5.21(s, 2H), 2.53(q, J=7.5Hz, 2H), 1.05(t, J=7.5Hz, 3H)。

[0300] (c) 6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-3-碘-1H-吡啶

[0301] 向6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1H-吡啶(56g, 161.18mmol)于DMF(400mL)中的溶液中添加KOH(36.2g, 647.39mmol),且将混合物搅拌5min。在0℃下缓慢添加碘(82.2g, 323.69mmol)于DMF(100mL)中的溶液,且在RT下搅拌30min,用水(3×150mL)稀释,并用EtOAc(3×200mL)萃取。将有机层用饱和偏亚硫酸氢钠水溶液(3×200mL)和水(400mL)洗涤,经无水Na₂SO₄干燥,且在减压下浓缩以得到粗产物,通过急骤柱色谱纯化所述粗产物以得到呈淡棕色半固体状的标题中间物(64g, 84%产率)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ10.49(s, 1H), 7.57-7.32(m, 7H), 7.16(d, J=8.3Hz, 1H), 7.04-6.91(m, 2H), 5.20(s, 2H), 2.51(q, J=7.4Hz, 2H), 1.04(t, J=7.5Hz, 3H)。

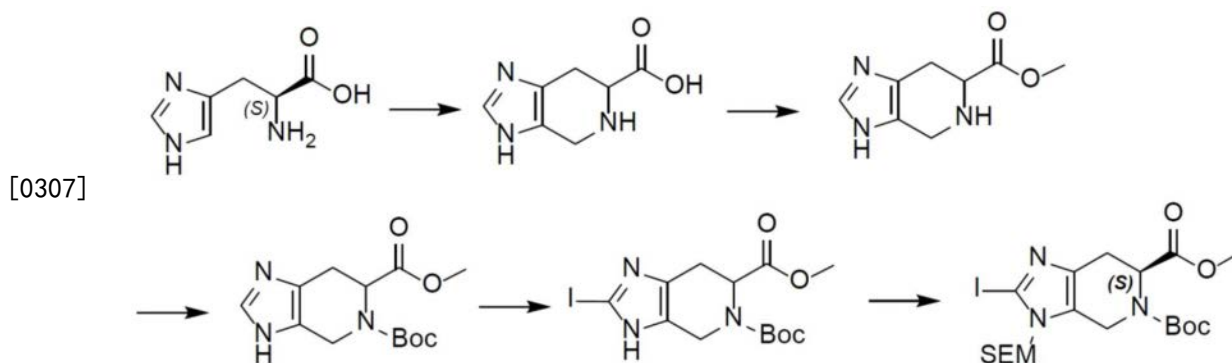
[0302] (d) 6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-3-碘-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡啶

[0303] 向先前步骤的产物(60g, 127.12mmol)于DCM(700mL)中的冰冷溶液中添加对甲苯磺酸(4.84g, 25.423mmol),随后逐滴添加3,4-二氢-2H-吡喃(17.43mL, 190.68mmol)。将反应混合物在RT下搅拌过夜,用DCM稀释,且用饱和NaHCO₃水溶液和盐水洗涤。使有机层经无水Na₂SO₄干燥,且在减压下浓缩以得到粗产物,通过急骤色谱(硅胶)纯化所述粗产物以得到呈灰白色固体状的标题中间物(64g, 91%产率)。(m/z): C₂₇H₂₆FIN₂O₂的[M+H]⁺计算值557.10, 实验值557.30。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ7.56-7.31(m, 7H), 7.14(d, J=8.3Hz, 1H), 7.01(d, J=11.8Hz, 1H), 6.95(d, J=8.5Hz, 1H), 5.68(d, J=9.3Hz, 1H), 5.20(s, 2H), 4.08-3.99(m, 1H), 3.77-3.64(m, 1H), 2.50(q, J=7.2Hz, 2H), 2.23-1.97(m, 3H), 1.81-1.68(m, 3H), 1.06(t, J=7.4Hz, 3H)。

[0304] (e) 6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-3-(三甲基锡烷基)-1H-吡啶

[0305] 向6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-3-碘-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡啶(20g, 35.97mmol)于甲苯(150mL)中的溶液中添加六甲基二锡(9.2mL, 43.17mmol)。使反应混合物经氮气脱气20min,随后添加四(三苯基膦)钨(0)(2.0g, 1.80mmol),且接着在100℃下搅拌2h,冷却到RT,经硅藻土过滤,且用EtOAc洗涤残余物。将滤液浓缩,且通过柱色谱(经由中性氧化铝)纯化,用2-5%EtOAc:己烷洗脱,以得到标题化合物(17.50g, 82%产率)。(m/z): C₃₀H₃₅FN₂O₂Sn的[M+H]⁺计算值595.17、593.17, 实验值595.49、593.55。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ7.68(d, J=8.0Hz, 1H), 7.57-7.29(m, 6H), 7.13-7.00(m, 2H), 6.96(d, J=8.4Hz, 1H), 5.81-5.68(m, 1H), 5.21(s, 2H), 4.13-4.00(m, 1H), 3.81-3.66(m, 1H), 2.54(q, J=7.3Hz, 2H), 2.23-2.00(m, 2H), 1.87-1.59(m, 4H), 1.08(t, J=7.5Hz, 3H), 0.47(s, 9H)。

[0306] 制备10: (S)-2-碘-3-((2-三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸5-(叔丁酯)6-甲酯



[0307] (a) (S)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸

[0308] 在0℃下向L-组氨酸(50g, 322.24mmol)于水(420mL)中的搅拌悬浮液中逐滴添加浓HCl(29mL),随后在0℃下一次性添加甲醛(55mL, 676.72mmol)。将所得反应混合物搅拌30min,且接着在75℃下加热6h并浓缩。将所得粗物质与乙醚一起搅拌2h,过滤且用IPA:THF(100:300mL)洗涤以得到呈灰白色固体状的标题中间物的HCl盐(75g, 99%产率(粗物质))。(m/z): $C_7H_9N_3O_2$ 的[M+H]⁺计算值168.07,实验值168.17。

[0309] (b) (S)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸甲酯

[0310] 在0℃下,向先前步骤的产物(75.0g, 312.5mmol)于甲醇(1500mL)中的搅拌溶液中逐滴添加SOCl₂(45.6mL, 625mmol),且在RT下搅拌16h,接着加热直到回流(70℃)持续1h。通过蒸馏去除溶剂,且将粗产物用甲醇,随后乙醚湿磨,以得到呈灰白色固体状的标题中间物的粗HCl盐(80g粗物质)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ9.05(s, 1H), 4.71(dd, J=9.4, 5.2Hz, 1H), 4.36(d, J=15.5Hz, 1H), 4.30(d, J=15.6Hz, 1H), 3.82(s, 3H), 3.44-3.21(m, 2H)。

[0311] (c) (S)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸5-(叔丁酯)6-甲酯

[0312] 在0℃下,向先前步骤的产物(80.0g, 314.96mmol)于甲醇(1000mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA(282mL, 1574mmol),随后添加二碳酸二叔丁酯(172mL, 787.48mmol)。将反应混合物在RT下搅拌16h,且接着添加液体NH₃(150mL, 25%于水中),且在室温下将反应混合物再次搅拌16h,通过蒸馏去除甲醇并在DCM(3×200mL)中萃取残余物。使合并的有机萃取物经无水Na₂SO₄干燥,浓缩且通过急骤色谱(100-200目硅胶)纯化,用5%MeOH:DCM洗脱,以得到标题中间物(41g, 46%产率)。(m/z): $C_{13}H_{19}N_3O_4$ 的[M+H]⁺计算值282.14,实验值282.21。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ11.85(s, 1H), 7.50(s, 1H), 5.18(dd, J=49.3, 5.1Hz, 1H), 4.51(t, J=14.2Hz, 1H), 4.09(dd, J=43.9, 16.1Hz, 1H), 3.59(s, 3H), 3.08(d, J=15.5Hz, 1H), 2.94(d, J=15.1Hz, 1H), 1.45(s, 9H)。

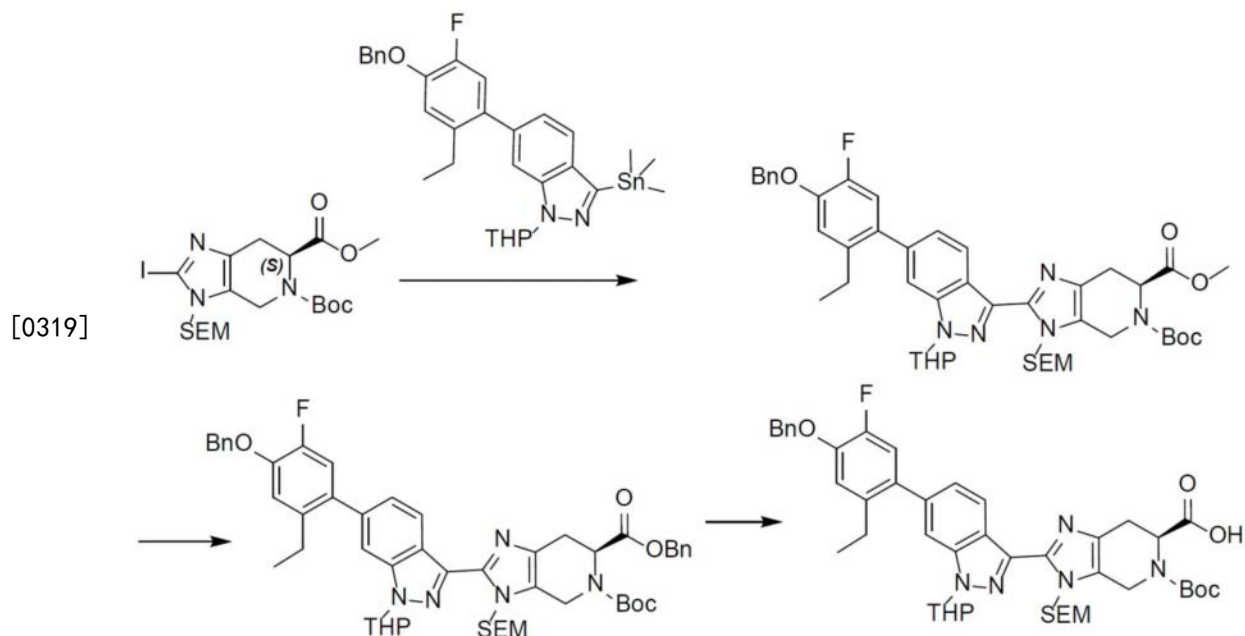
[0313] (d) (S)-2-碘-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸5-(叔丁酯)6-甲酯

[0314] 在0℃下,向先前步骤的产物(41.0g, 145.9mmol)于THF(500mL)中的溶液中添加N-碘丁二酰亚胺(66.0g, 291.8mmol),且将所得溶液在RT下搅拌4h,用水稀释且用乙酸乙酯萃取。用10%硫代硫酸钠溶液(3×200mL)洗涤有机部分。使合并的有机层经无水硫酸钠干燥,且浓缩以得到标题化合物60g(粗物质),所述标题化合物未经进一步纯化即用于下一步骤中。(m/z): $C_{13}H_{18}IN_3O_4$ 的[M+H]⁺计算值408.03,实验值408.31。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ12.48(s, 1H), 5.34-4.97(m, 1H), 4.67-4.35(m, 1H), 4.12-3.95(m, 1H), 3.60(s, 3H), 3.14-2.82(m, 2H), 1.44(s, 9H)。

[0316] (e) (S)-2-碘-3-((2-三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸5-(叔丁酯)6-甲酯

[0317] 在0℃下,向(S)-2-碘-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸5-(叔丁酯)6-甲酯(40g,0.098mol)于DMF(150mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA(35.1mL,0.19mol)。将反应混合物搅拌10min,接着在0℃下逐滴添加2-(三甲基硅烷基)-乙氧基甲基氯(19.1mL,0.10mol)。将所得反应混合物在RT下搅拌3h。在4小时之后,添加冷冻水且用EtOAc(2×200mL)萃取反应混合物。使有机层经无水硫酸钠干燥,浓缩,且通过急骤柱色谱纯化,用20-35%EtOAc:己烷洗脱,以得到呈浅黄色粘性液体状的标题产物(27g)。(m/z): $C_{19}H_{32}IN_3O_5Si$ 的[M+H]⁺计算值538.12,实验值538.42。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 5.33-5.04(m,3H),4.79-4.56(m,1H),4.54-4.14(m,1H),3.60(s,3H),3.47(t,J=7.8Hz,2H),3.31-3.16(m,1H),2.97(t,J=18.9Hz,1H),1.44(s,9H),0.92-0.74(m,2H),-0.03(s,9H)。

[0318] 制备11:(6S)-5-(叔丁氧基羰基)-2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-3-基)-3-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸



[0320] (a) (6S)-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-3-基)-3-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸5-(叔丁酯)6-甲酯

[0321] 向(S)-2-碘-3-((2-三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸5-(叔丁酯)6-甲酯(17.0g,31.65mmol)于甲苯(500mL)中的搅拌溶液中添加6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-3-(三甲基锡烷基)-1H-吡唑(20g,34.82mmol)。将反应混合物用氩气吹扫15min,添加Pd(PPh₃)₄(3.6g,3.16mmol)和碘化铜(1.20g,6.33mmol),且将反应混合物在120℃下搅拌16h。使反应混合物经由硅藻土过滤,在减压下浓缩滤液,且通过硅胶柱色谱(Redisep 80g柱,用DCM洗脱10min,且接着用15-20%EtOAc/己烷洗脱)纯化,以获得呈黄色固体状的标题中间物(15.10g,58%产率)。(m/z): $C_{46}H_{58}FN_5O_7Si$ 的[M+H]⁺计算值840.41,实验值840.54。¹H NMR

(400MHz, 氯仿-d) δ 8.43 (s, 1H), 7.54-7.33 (m, 6H), 7.20 (s, 1H), 7.05 (d, J=11.4Hz, 1H), 6.95 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.09-5.69 (m, 3H), 5.59-5.36 (m, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.97-4.80 (m, 1H), 4.12-3.90 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.57-3.47 (m, 2H), 3.40 (d, 1H), 3.21-3.05 (m, 1H), 2.74-2.34 (m, 4H), 2.25-2.07 (m, 2H), 1.94-1.65 (m, 4H), 1.54 (s, 9H), 1.12-0.99 (m, 3H), 0.91-0.75 (m, 2H), -0.12 (s, 9H)。

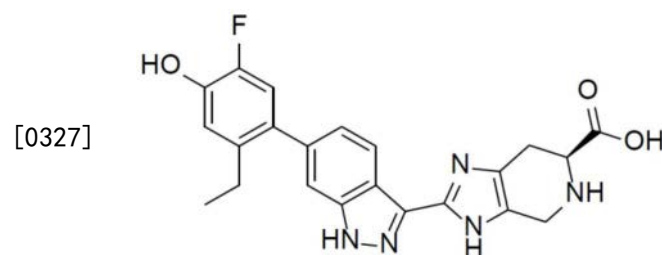
[0322] (b) (6S)-2-(6-(4-(苯甲氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡啶-3-基)-3-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5,6-二甲酸6-苯甲酯5-(叔丁酯)

[0323] 向圆底烧瓶中添加含先前步骤的产物(15.0g, 17.85mmol)的甲苯(400mL)、苯甲醇(46.3mL)和Ti(OEt)₄(7.15mL, 35.70mmol), 且使反应混合物剧烈回流(140°C)持续48h, 用水稀释且用DCM萃取。过滤悬浮液, 将滤液经Na₂SO₄干燥, 在减压下浓缩且通过硅胶柱色谱(Redisepp 80g柱, 0-5%EtOAc/己烷)纯化20min, 以去除过量苯甲醇, 接着用10-15%EtOAc/己烷洗脱, 以得到标题中间物。¹H NMR与结构一致。(m/z): C₅₂H₆₂FN₅O₇Si的[M+H]⁺计算值916.44, 实验值916.86。

[0324] (c) (6S)-5-(叔丁氧基羰基)-2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡啶-3-基)-3-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸

[0325] 向先前步骤的产物(21.0g, 22.92mmol)于1:1IPA:THF(400mL)中的搅拌溶液中添加Pd(OH)₂(5.0g)。将反应混合物在氢气气囊下在RT下搅拌16h, 经由硅藻土过滤, 在减压下浓缩, 且通过硅胶柱色谱(Redisepp 80g柱, 用25-40%EtOAc/己烷洗脱)纯化, 以得到呈灰白色固体状的标题化合物(6.1g, 8.29mmol)。(m/z): C₃₈H₅₀FN₅O₇Si的[M+H]⁺计算值736.35, 实验值736.5。¹H NMR与结构一致。(m/z): C₃₈H₅₀FN₅O₇Si的[M+H]⁺计算值736.35, 实验值736.5。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 12.94 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.34 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.20 (d, J=8.7Hz, 1H), 7.03 (d, J=11.8Hz, 1H), 6.93 (d, J=9.1Hz, 1H), 6.11-5.77 (m, 3H), 5.33-5.06 (m, 1H), 4.87-4.56 (m, 1H), 4.52-4.14 (m, 1H), 3.97-3.69 (m, 2H), 3.53-3.40 (m, 2H), 3.23-3.11 (m, 1H), 3.11-2.93 (m, 1H), 2.47-2.44 (m, 2H), 2.13-1.96 (m, 2H), 1.68 (d, J=70.9Hz, 4H), 1.48 (s, 9H), 1.02 (t, J=7.5Hz, 3H), 0.86-0.68 (m, 2H), -0.17 (s, 9H)。

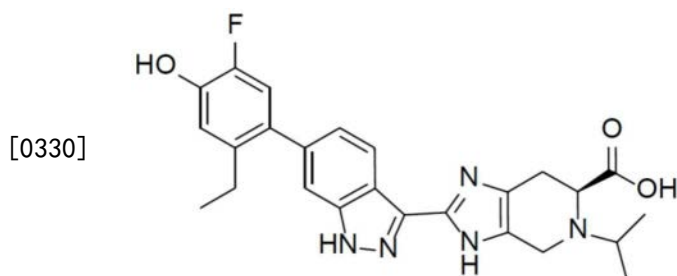
[0326] 制备12: (S)-2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟苯基)-1H-吡啶-3-基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸



[0328] 在0°C下, 向(6S)-5-(叔丁氧基羰基)-2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟苯基)-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡啶-3-基)-3-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)-甲基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸(5.7g, 7.75mmol)于5:1二噁烷:水(60mL)中的搅拌溶液中逐滴添加浓HCl(20mL)。将反应混合物升温, 且在90°C下搅拌16h, 并在真空下蒸馏以得到粗

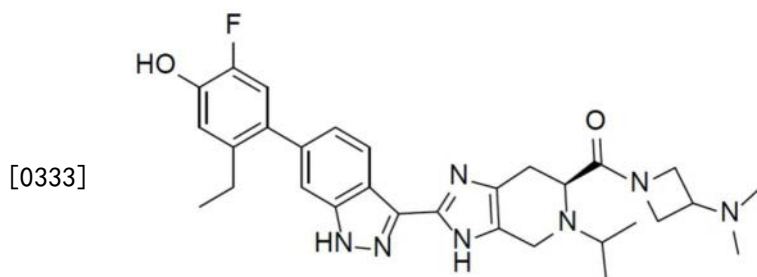
残余物,依序用经冷冻的乙醚和乙腈湿磨所述粗残余物以得到呈淡棕色固体状的标题化合物的HCl盐(3.6g,95%产率)。(m/z): $C_{22}H_{20}FN_5O_3$ 的[M+H]⁺计算值422.16,实验值422.24。¹H NMR(400MHz,D₂O/DMSO-d₆) δ 8.22(d,J=8.4Hz,1H),7.49(s,1H),7.19(d,J=8.1Hz,1H),6.99(d,J=11.9Hz,1H),6.91(d,J=9.0Hz,1H),4.56-4.51(m,1H),4.36(d,J=15.5Hz,1H),4.30(d,J=15.5Hz,1H),3.35-3.25(m,1H),3.15-3.05(m,1H),2.4-2.55(m,2H),0.97(t,J=7.5Hz,3H)。

[0329] 制备13:(S)-2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸



[0331] 向(S)-2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸,HCl(400mg,0.874mmol)、丙酮(0.192mL,2.62mmol)和乙酸(0.150mL,2.62mmol)于DMF(7mL)中的溶液中添加氰基硼氢化钠(274mg,4.37mmol),且将反应混合物在RT下搅拌过夜。添加硼氢化钠(33mg,0.874mmol),将溶液浓缩,且通过制备型HPLC纯化以得到标题化合物的TFA盐(115mg,23%产率)。(m/z): $C_{25}H_{26}FN_5O_3$ 的[M+H]⁺计算值464.20,实验值464.5。

[0332] 实例11:(S)-(3-(二甲氨基)氮杂环丁-1-基)(2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基)甲酰胺C-1



C-1

[0334] 向(S)-2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟苯基)-1H-吡唑-3-基)-5-异丙基-4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-甲酸,TFA(179mg,0.310mmol)、N,N-二甲基氮杂环丁-3-胺,2HCl(107mg,0.465mmol)和DIPEA(0.162mL,0.930mmol)于DMF(4mL)中的溶液中添加HATU(177mg,0.465mmol),且将反应混合物在RT下搅拌过夜。添加胍(5当量),将反应混合物浓缩,且通过制备型HPLC纯化以得到标题化合物的TFA盐(63mg,26%产率)。(m/z): $C_{30}H_{36}FN_7O_2$ 的[M+H]⁺计算值546.29,实验值546.7。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 9.90(s,1H),8.29(dd,1H),7.34(s,1H),7.07(d,1H),7.01(d,1H),6.89(d,1H),4.35-4.18(m,1H),4.11-3.94(m,1H),3.94-3.73(m,3H),3.70-3.57(m,2H),3.06-2.94(m,2H),2.87-2.66(m,2H),2.48-2.40(m,2H),2.13-2.00(m,6H),1.07(t,3H),1.03-0.93(m,6H)。

[0335] 生物学分析

[0336] 化合物1已在以下生物学分析中表征。

[0337] 分析1:生物化学JAK激酶分析

[0338] 将一组四种LanthaScreen JAK生物化学分析(JAK1、JAK2、JAK3和Tyk2)载于常用激酶反应缓冲液(50mM HEPES,pH 7.5,0.01%Brij-35,10mM MgCl₂和1mM EGTA)中。从生命科技(Life Technologies)获得重组GST标记的JAK酶和GFP标记的STAT1肽底物。

[0339] 在环境温度下在白色384孔微孔板(康宁(Corning))中,使连续稀释的化合物与四种JAK酶中的每一种和底物一起预培育1h。随后以具有1%DMSO的10 μ L总体积添加ATP以引发激酶反应。JAK1、JAK2、JAK3和Tyk2的最终酶浓度分别为4.2nM、0.1nM、1nM和0.25nM;所使用的对应K_m ATP浓度为25 μ M、3 μ M、1.6 μ M和10 μ M;而对于所有四种分析,底物浓度为200nM。在添加EDTA(10mM最终浓度)和Tb抗pSTAT1(pTyr701)抗体(生命科技,2nM最终浓度)于TR-FRET稀释缓冲液(生命科技)中的10 μ L制剂之前,使激酶反应在环境温度下进行1小时。在EnVision读取器(珀金埃尔默(Perkin Elmer))上读取之前,使板在环境温度下培育1h。记录且利用发射比信号(520nm/495nm),以基于DMSO和背景对照来计算抑制百分比值。

[0340] 对于剂量反应分析,相对于化合物浓度绘制抑制百分比数据,且用普瑞司母(Prism)软件(格雷夫帕德软件(GraphPad Software))由4参数稳固拟合模型测定IC₅₀值。结果表述为pIC₅₀(IC₅₀的负对数),且随后使用程普鲁索夫方程(Cheng-Prusoff equation)转换为pK_i(解离常量K_i的负对数)。

[0341] 在四种JAK分析中具有较低K_i值或较高pK_i值的测试化合物展示对JAK活性的较大抑制。

[0342] 分析2:抑制Ta11-1 T细胞中IL-2刺激的pSTAT5

[0343] 使用AlphaLisa在Ta11-1人类T细胞系(DSMZ)中测量测试化合物抑制白介素-2(IL-2)刺激的STAT5磷酸化的性能。因为IL-2经由JAK1/3信号传导,所以此分析提供JAK1/3细胞性能的测量。

[0344] 经由AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT5(Tyr694/699)试剂盒(珀金埃尔默)测量磷酸化STAT5。在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂含湿气培育箱中,在补充有15%热灭活胎牛血清(FBS,生命科技)、2mM Glutamax(生命科技)、25mM HEPES(生命科技)和1 \times 青霉素/链霉素(Pen/Strep)(生命科技)的RPMI(生命科技)中培养来自Ta11-1细胞系的人类T细胞。将化合物连续稀释于DMSO中,且以声学方式分配到空孔中。分配分析培养基(补充有10%FBS(ATCC)的不含酚红的DMEM(生命科技))(4微升/孔),且将板以900rpm振荡10min。将细胞以45,000个细胞/孔接种于分析培养基中(4微升/孔),且在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下培育1小时,随后添加含IL-2(研发系统(R&D Systems);最终浓度为300ng/mL)的预温热分析培养基(4 μ L)持续30分钟。在细胞因子刺激之后,将细胞用含有1 \times PhosStop和Complete片剂(罗氏(Roche))的6 μ L的3 \times AlphaLisa裂解缓冲液(珀金埃尔默)裂解。将裂解物在室温(RT)下以900rpm振荡10分钟。经由pSTAT5 AlphaLisa试剂盒(珀金埃尔默)测量磷酸化STAT5。将新制备的受体珠粒混合物在绿色过滤后的<100勒克斯(lux)光下分配到裂解物(5 μ L)上。将板以900rpm振荡2min,简单快速离心,且在暗处在RT下培育2小时。在绿色过滤后的<100勒克斯光下分配供体珠粒(5 μ L)。将板以900rpm振荡2分钟,简单快速离心,且在暗处在RT下培育过夜。在绿色过滤后的<100勒克斯光下,使用EnVision板读取器(珀金埃尔默)在689nm激发和570nm发射下测量发

光。

[0345] 为测定测试化合物响应于IL-2的抑制性能,在人类T细胞系中测量结合于pSTAT5的珠粒的平均发射强度。由相较于化合物浓度的信号强度的抑制曲线的分析来测定IC₅₀值。数据表述为pIC₅₀(负十进制对数IC₅₀)值(平均值±标准差)。

[0346] 活体外分析结果

[0347] 表5

化合物	JAK1 pK _i	JAK2 pK _i	JAK3 pK _i	Tyk2 pK _i	Tall-1 pIC ₅₀
1	10.2	10.5	10.2	9.1	8.6
C-1	10.4	10.8	10.1	9.5	8.8

[0349] 分析3:肺组织中经IL-13诱导的pSTAT6诱导的鼠类(小鼠)模型

[0350] IL-13为哮喘的病理生理学潜在的重要细胞因子(库德拉茨等人《欧洲药典》,2008,582,154-161)。IL-13结合于细胞表面受体,从而使杰纳斯激酶(JAK)家族的成员活化,这接着使STAT6磷酸化且随后进一步活化转录通路。在所描述模型中,将IL-13的剂量局部递送到小鼠肺部中以诱导STAT6磷酸化(pSTAT6),此接着测量为终点。

[0351] 在分析中使用来自哈伦(Harlan)的成年Balb/c小鼠。在研究当天,用异氟醚将动物轻度麻醉,且经由口腔抽吸投予媒剂或测试化合物(1mg/mL,50μl总体积,经由若干次呼吸)。在给药后,将动物侧卧放置,且在返回其饲养笼之前监测从麻醉的完全恢复。四小时后,再次简单麻醉动物,且在监测从麻醉恢复且返回其饲养笼之前经由口腔抽吸用媒剂或IL-13(0.03μg总递送剂量,50μL总体积)刺激。在媒剂或IL-13投予之后一个小时,收集全血和肺,以用于使用Perkin Elmer AlphaLISA® SureFire® UltraTMHV p-STAT6(Tyr641)分析试剂盒进行肺匀浆中的pSTAT6检测,且用于进行肺和血浆中的总药物浓度分析。将血液样品在4°C下以大约12,000rpm离心(埃彭多夫(Eppendorf)离心机,5804R)持续4分钟以收集血浆。将肺在杜氏磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline;DPBS)中冲洗,填塞干燥,急骤冷冻,称取且以1:3的稀释度在含0.1%甲酸的HPLC水中均质化。通过LC-MS分析,针对在测试基质中构建为标准曲线的分析型标准物来测定测试化合物的血浆和肺水平。将肺与血浆比率测定为在5小时以ng/g为单位的肺浓度与以ng/mL为单位的血浆浓度的比率。

[0352] 通过与经媒剂处理、IL-13刺激的对照动物相比,在5小时时存在于经处理动物的肺中的pSTAT6的水平降低来证明模型中的活性。在任何给定实验中,经媒剂处理、经IL-13刺激的对照动物与经媒剂处理、经媒剂刺激的对照动物之间的差异分别指示0%和100%抑制作用。如下文所记录,化合物1在IL-13刺激之后5小时时展现对STAT6磷酸化的抑制。

[0353] 表6:所观测的pSTAT6抑制和血浆/肺暴露

化合物	在5小时时的肺浓度(ng/g)	在5小时时的血浆浓度(ng/mL)	在5小时时的肺与血浆比率	在5小时时的pSTAT6抑制
1	10155±1979	24.0±16.2	423	75

[0355] 小鼠肺中的显著化合物浓度的观测结果确认,IL-13诱导的pSTAT6诱导的所观测抑制为测试化合物活性的结果。在5小时时的肺与血浆比率展示,化合物1展现在小鼠中的

肺中的暴露显著多于在血浆中的暴露。

[0356] 分析4:抑制人类外周血液单核细胞中的TSLP诱发的TARC释放

[0357] 胸腺基质淋巴生成素 (TSLP) 以及胸腺和活化调节的趋化因子 (TARC) 在哮喘气道中过度表达, 且与疾病严重程度相关。在肺中, 可通过响应于过敏原和病毒性感染的支气管上皮细胞释放TSLP。经由IL-7R α /TSLPR异二聚体的TSLP信号发现于广泛范围的组织和细胞类型中, 包含上皮细胞、内皮细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞和肥大细胞。TSLP与其受体的结合可诱导构形变化, 此活化JAK1和JAK2以磷酸化多种转录因子, 包含STAT3和STAT5。在免疫细胞中, 此触发胞内事件的级联, 引起细胞增殖、抗细胞凋亡、树突状细胞迁移以及Th2细胞因子和趋化因子的产生。在外周血液单核细胞 (PBMC) 中, TSLP通过活化骨髓树突状细胞以吸引且刺激T细胞 (由化学引诱剂TARC介导的方法) 而具有促发炎作用。

[0358] 在此分析中, 显示TSLP刺激诱导从PBMC释放TARC, 且此反应在用化合物处理时以剂量依赖性方式衰减。测量用于抑制TARC释放的测试化合物的性能。

[0359] 将来自3到5种供体的PBMC等分试样 (先前从全血分离且在 -80°C 下以等分试样冷冻) 在 37°C 下解冻, 且逐滴添加到含40mL预温热无菌过滤的完整RPMI培养基的50mL Falcon管中。将细胞球粒化且以 2.24×10^6 个细胞/毫升再悬浮于完整培养基中。将细胞以85 μL (190,000个细胞) /孔接种于经组织培养物处理的96孔平底微孔板中。使细胞在 37°C 与5% CO_2 下静置1小时。

[0360] 在DMSO中以10mM储备溶液形式接收化合物。执行3.7倍连续稀释, 以在DMSO中产生9种浓度的 $300 \times$ 最终分析测试浓度的测试化合物。在完整培养基中执行150倍中间物稀释以产生具有0.2% DMSO的 $2 \times$ 最终分析测试浓度的化合物。在1小时静置时段之后, 针对33.33 μM 到0.95 μM 的最终分析浓度范围, 将95 μL 的 $2 \times$ 化合物添加到PBMC的每个孔。将95 μL 含0.2% DMSO的完整培养基添加到未经处理的对照孔。将细胞在刺激之前在 37°C 与5% CO_2 下用化合物预处理1小时。

[0361] 将重组人类TSLP蛋白质以10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在具有0.1% BSA的无菌DPBS中复原, 且在 -20°C 下以等分试样形式存储。紧接在使用之前, 将等分试样解冻, 且在完整培养基中以 $20 \times$ 最终分析浓度制备。将10 μL 的 $20 \times$ TSLP添加到PBMC的每个孔, 最终分析浓度为对于10ng/mL。将10 μL 的完整培养基添加到未经刺激的对照孔。将细胞在 37°C 与5% CO_2 下在化合物的存在下刺激48小时。

[0362] 在刺激之后, 采集细胞培养物上清液, 且根据制造商的说明书使用人类CCL17/TARC Quantikine ELISA试剂盒 (研发系统#DDN00) 通过酶联免疫吸附分析 (ELISA) 来检测TARC水平。

[0363] 对于剂量反应分析, 相对于每个供体的反应百分比值绘制对数[测试化合物 (M)], 且利用格雷夫帕德普瑞司母 (GraphPad Prism) 软件, 使用具有可变斜率的4参数S形剂量-反应算法, 使用非线性回归分析来测定 IC_{50} 值。数据表述为由个别供体的 pIC_{50} 值计算且四舍五入到一个小数字的平均 pIC_{50} (负十进制对数 IC_{50}) 值。原始化合物和其消氟改性类似物的抑制性能值概述于表7中。

[0364] 表7: 用于抑制人类外周血液单核细胞中TSLP诱发的TARC释放的测试化合物的性能 (pIC_{50}) 值

[0365]	化合物	$\text{pIC}_{50} \pm$ 标准差
--------	-----	---------------------------

1	7.2±0.1
C-1	7.0±0.1

[0366] 分析5:肺S9代谢

[0367] 在人类肺S9片段(1 μ M化合物;1mg/mL S9蛋白质)中评估化合物1和C-1的活体外代谢稳定性。对于母化合物,通过高分辨率LC-MS/MS分析时间0、15、30和60分钟的样品。来自人类的肺S9片段(批次1410245)购自XenoTech LLC(堪萨斯州莱内科萨市(Lenexa,KS))。NADPH(西格玛奥尔德里奇(Sigma Aldrich),N1630)和3-磷酸腺苷5-磷酸硫酸(PAPS)(西格玛奥尔德里奇,A1651)购自西格玛奥尔德里奇(密苏里州圣路易斯市(St.Louis,MO))。乙腈和水获自VWR(宾夕法尼亚州拉德纳(Radnor,PA))且为HPLC等级或更优选的等级。雷诺昔酚(Raloxifene)和甲酸购自西格玛奥尔德里奇(密苏里州圣路易斯市)。在96孔聚丙烯板中,在37 $^{\circ}$ C的水浴中执行肺S9培育。肺S9溶液由缓冲到pH 7.4的100mM磷酸钾(马塞诸塞州沃本市的BD生物科学(BD Biosciences,Woburn,MA))组成,其补充有1mM NADPH(密苏里州圣路易斯的西格玛-奥尔德里奇(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO))、3mM氯化镁(西格玛奥尔德里奇(Sigma Aldrich),M1028)和100 μ M PAPS(密苏里州圣路易斯的西格玛-奥尔德里奇)辅因子,最终培育蛋白质浓度为1mg/mL。将雷诺昔酚(n=1)和化合物(n=1)的10mM DMSO储备液稀释于缓冲液中且外加到培育物中以得到1 μ M底物浓度(0.001% DMSO v/v)。培育体积由400 μ L组成,且时间点为0、15、30和60分钟时通过去除70 μ L等分试样取得,且稀释到140 μ L乙腈(0%甲酸)中。将所有样品在5 $^{\circ}$ C下以2250g离心10分钟。从离心样品获取上清液(50 μ L)且将其稀释到含有内部标准物的100 μ L HPLC水中。将样品在Dionex Ultimate 3000自动采样器上运行且结合Atlantis T3柱3 μ M-2.1 \times 50mm(沃特士公司(Waters Inc.),186003717)在全扫描模式中使用Thermo Q-Exactive High Resolution质谱仪(马塞诸塞州沃尔瑟姆市的赛默(Thermo,Waltham,MA))进行分析。流动相A由水+0.2%甲酸组成,且流动相B由乙腈+0.2%甲酸组成。使用Gubbs GMSU软件(乔治亚州阿尔法利塔市的古布斯公司(Gubbs Inc.,Alpharetta,GA))实现峰积分。对于每种样品,通过将分析物峰面积除以内部标准物峰面积来计算峰面积比。对于每种培育物,将每个t₀中的分析物的峰面积比设定为100%,且将来自60分钟样品的峰面积比转换为相对于对应的t₀的剩余百分比。通过观测母离子通道中基于历史内部数据、对应于每种母化合物的O-硫酸盐代谢物的早期洗脱峰来定性地进行硫酸盐代谢物形成的测定。分析的结果概述于表8中(n=2次重复)。

[0368] 表8:人类肺S9片段中的代谢稳定性

化合物	清除率(μ L/min/mg)	在60min时剩余的化合物(%)	硫酸盐出现
1	3.5	81	是
C-1	49.0	6	是

[0370] 当与其对应氟类似物(化合物C-1)相比时,化合物1产生显著更少的硫酸化代谢。

[0371] 分析6:小鼠中的血浆和肺的药物动力学

[0372] 按以下方式来测定测试化合物的血浆和肺浓度和其比率。在分析中使用来自查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)的BALB/c小鼠。以0.2mg/mL的浓度在含20%丙二醇的pH 4柠檬酸盐缓冲液中单独地调配化合物1,且通过口腔抽吸将50 μ L的给药溶液引入小鼠气管中。在给药后的不同时间点(通常0.167、2、6、24小时),经由心脏穿刺移出血液样品,且从小鼠切除完整肺。将血液样品在4 $^{\circ}$ C下以大约12,000rpm离心(埃彭多夫离心机,

5804R) 持续4分钟以收集血浆。将肺填塞干燥,称取,且在无菌水中以1:3的稀释度均质化。通过LC-MS分析,针对在测试基质中构建为标准曲线的分析型标准物来测定测试化合物的血浆和肺浓度。肺与血浆比率经测定为以 $\mu\text{g hr/g}$ 为单位的肺AUC与以 $\mu\text{g hr/mL}$ 为单位的血浆AUC的比率,其中将AUC常规地定义为在测试化合物浓度相对于时间的曲线下面积。

[0373] 表9:在单次口腔抽吸投予化合物1之后的血浆和肺组织暴露

化合物	血浆 AUC ₍₀₋₂₄₎ ($\mu\text{g hr/mL}$)	肺组织 AUC ₍₀₋₂₄₎ ($\mu\text{g hr/g}$)	肺组织:血浆 AUC 比率
1	0.943	54.5	57.8

[0375] 分析7:在人类3D气道培养物中对IFN γ 和IL-27诱导的趋化因子CXCL9和CXCL10的抑制

[0376] 从马泰克 (Mattek) (AIR-100) 获得EpiAirway组织培养物。培养物来源于哮喘供体。在细胞培养插入物中,使人类衍生的气管/支气管上皮细胞在多孔膜载体上生长和分化,从而使得气液界面具有细胞下方的温热培养基和上述气态测试气氛。在维持培养基(马泰克,AIR-100-MM)时,在37°C,5%CO₂含湿气培育箱中培养组织。测试四种供体。在第0天,在液体界面中以10 μM 、1 μM 和/或0.1 μM 用测试化合物处理组织培养物。将化合物1稀释于二甲亚砜(DMSO,西格玛)中,达0.1%的最终浓度。0.1%DMSO用作媒介剂对照。将化合物1与培养物一起在37°C,5%CO₂下培育1小时,随后以100ng/ml的最终浓度添加含有IFN γ (研发系统)或IL-27(研发系统)的预温热培养基。将组织培养物维持8天。将培养基每2天用含有化合物1和IFN γ 或IL-27的新鲜培养基置换。在第8天,收集组织培养物和上清液以进行分析。使用流式荧光检测术(luminex)分析(EMD密理博(EMD Millipore))来分析CXCL10(IP-10)和CXCL9(MIG)的上清液样品。数据表述为抑制% \pm 标准差(\pm STDV)。与经媒介剂处理的细胞相比,通过针对IFN γ 或IL-27诱导的CXCL10或CXCL9分泌的化合物抑制性能来测定抑制百分比。数据为来自4种供体的平均值。当与媒介剂对照相比时,化合物1能够将IFN γ 诱导的CXCL10分泌抑制100% \pm 1.0(在10 μM 下)、76% \pm 13(在1 μM 下)和18% \pm 22(在0.1 μM 下)。当与媒介剂相比时,化合物1能够将IFN γ 诱导的CXCL9分泌抑制100% \pm 0.1(在10 μM 下)、93% \pm 6.9(在1 μM 下)和16% \pm 41(在0.1 μM 下)。当与媒介剂对照相比时,化合物1能够将IL-27诱导的CXCL10分泌抑制100% \pm 0.0(在10 μM 下)、98% \pm 1.0(在1 μM 下)和25% \pm 26(在0.1 μM 下)。当与媒介剂对照相比时,化合物1能够将IL-27诱导的CXCL9分泌抑制100% \pm 0.0(在10 μM 下)、97% \pm 2.0(在1 μM 下)和52% \pm 18(在0.1 μM 下)。

[0377] 分析8:细胞JAK性能分析:抑制IFN γ 诱导的pSTAT1

[0378] 使用流式细胞术在来源于人类全血(斯坦福血液中心(Stanford Blood Center))的CD14阳性(CD14+)单核细胞中测量化合物1抑制经干扰素 γ (IFN γ) 刺激的STAT1磷酸化的性能。因为IFN γ 经由JAK信号传导,所以此分析提供JAK细胞性能的测量。

[0379] 使用异硫氰酸荧光素(FITC)结合的抗CD14抗体(克隆RM052,贝克曼库尔特(Beckman Coulter))来鉴定单核细胞,且使用Alexa Fluor 647结合的抗pSTAT1抗体(pY701,克隆4a,BD生物科学(BD Biosciences))来检测STAT1磷酸化。

[0380] 使用菲科尔(Ficoll)梯度从健康供体的人类全血分离人类外周血液单核细胞(PBMC)。在37°C,5%CO₂含湿气培育箱中,在补充有10%胎牛血清(FBS,生命科技)、2mM Glutamax(生命科技)、25mM HEPES(生命科技)和1 \times 青霉素/链霉素(生命科技)的RPMI(生

命科技)中培养细胞。将细胞以250,000个细胞/孔接种于培养基(200 μ L)中,培养2h,且再悬浮于含有各种浓度的测试化合物的分析培养基(50 μ L)(补充有0.1%牛血清白蛋白(Sigma)、2mM Glutamax、25mM HEPES和1 \times 青霉素/链霉素的RPMI)中。将化合物连续稀释于DMSO中,且接着在培养基中再稀释1000倍,以使最终DMSO浓度达0.1%。将测试化合物稀释液与细胞一起在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下培育1h,随后在培养基(50 μ L)中以0.6ng/mL的最终浓度添加预温热的IFN γ (研发系统)持续30min。在细胞因子刺激之后,将细胞在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下用预温热的固定溶液(100 μ L)(BD生物科学)固定10min,用FACS缓冲液(1mL)(1%BSA于PBS中)洗涤两次,再悬浮于1:10抗CD14FITC:FACS缓冲液(100 μ L)中,且在4 $^{\circ}$ C下培育15min。将细胞洗涤一次,且接着在4 $^{\circ}$ C下再悬浮于冰冷Perm缓冲液III(BD生物科学)(100 μ L)中持续30min。将细胞用FACS缓冲液洗涤两次,且接着在RT下在暗处再悬浮于1:10抗pSTAT1 Alexa Fluor 647:FACS缓冲液(100 μ L)中持续30min,在FACS缓冲液中洗涤两次,且使用MACSQuant流式细胞仪(BD生物科学)分析。

[0381] 为测定测试化合物的抑制性能,在CD14+单核细胞中测量pSTAT1的中位荧光强度(MFI)。根据MFI相对于化合物浓度的抑制曲线的分析来测定IC₅₀值。数据表述为pIC₅₀(负十进位对数IC₅₀)值。化合物1在此分析中展现7.5的pIC₅₀值。

[0382] 分析9:细胞JAK性能分析:抑制GM-CSF诱导的pSTAT5

[0383] 使用流式细胞术在来源于人类全血(斯坦福血液中心)的CD14阳性(CD14+)单核细胞中测量化合物1抑制经粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)刺激的STAT5磷酸化的性能。因为GM-CSF经由JAK信号传导,所以此分析提供JAK细胞性能的测量。

[0384] 使用异硫氰酸荧光素(FITC)结合的抗CD14抗体(克隆RM052,贝克曼库尔特)来鉴定单核细胞,且使用Alexa Fluor 647结合的抗pSTAT5抗体(pY694,BD生物科学)来检测STAT5磷酸化。

[0385] 使用菲科尔梯度从健康供体的人类全血分离人类外周血液单核细胞(PBMC)。在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂含湿气培育箱中,在补充有10%胎牛血清(FBS,生命科技)、2mM Glutamax(生命科技)、25mM HEPES(生命科技)和1 \times 青霉素/链霉素(生命科技)的RPMI(生命科技)中培养细胞。将细胞以250,000个细胞/孔接种于培养基(200 μ L)中,培养2h,且再悬浮于含有各种浓度的测试化合物的分析培养基(50 μ L)(补充有0.1%牛血清白蛋白(西格玛)、2mM Glutamax、25mM HEPES和1 \times 青霉素/链霉素的RPMI)中。将化合物连续稀释于DMSO中,且接着在培养基中再稀释1000倍,以使最终DMSO浓度达0.1%。将测试化合物稀释液与细胞一起在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下培育1h,随后以0.3ng/mL的最终浓度添加含预温热的GM-CSF(研发系统)的培养基(50 μ L)持续15min。在细胞因子刺激之后,将细胞在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下用预温热的固定溶液(100 μ L)(BD生物科学)固定10min,用FACS缓冲液(1mL)(1%BSA于PBS中)洗涤两次,再悬浮于1:10抗CD14FITC:FACS缓冲液(100 μ L)中,且在4 $^{\circ}$ C下培育15min。将细胞洗涤一次,且接着在4 $^{\circ}$ C下再悬浮于冰冷Perm缓冲液III(BD生物科学)(100 μ L)中持续30min。将细胞用FACS缓冲液洗涤两次,且接着在RT下在暗处再悬浮于1:10抗pSTAT1 Alexa Fluor 647:FACS缓冲液(100 μ L)中持续30min,在FACS缓冲液中洗涤两次,且使用MACSQuant流式细胞仪(BD生物科学)分析。

[0386] 为测定测试化合物的抑制性能,在CD14+单核细胞中测量pSTAT5的中位荧光强度(MFI)。根据MFI相对于化合物浓度的抑制曲线的分析来测定IC₅₀值。数据表述为pIC₅₀(负十

进位对数 IC_{50})值。化合物1在此分析中展现6.9的 pIC_{50} 值。

[0387] 分析10:细胞JAK性能分析:抑制IL-12诱导的pSTAT4

[0388] 使用流式细胞术在来源于人类全血(斯坦福血液中心)的CD3阳性(CD3+)T细胞中测量化合物1抑制经白介素-12(IL-12)刺激的STAT4磷酸化的性能。因为IL-12经由JAK信号传导,所以此分析提供JAK细胞性能的测量。

[0389] 使用藻红素(PE)结合的抗CD3抗体(克隆UCHT1, BD生物科学)来鉴定CD3+T细胞,且使用Alexa Fluor 647结合的抗pSTAT4抗体(克隆38/p-Stat4, BD生物科学)来检测STAT4磷酸化。

[0390] 使用菲科尔梯度从健康供体的人类全血分离人类外周血液单核细胞(PBMC)。在37°C, 5%CO₂含湿气培育箱中,在补充有10%胎牛血清(FBS, 生命科技)、2mM Glutamax(生命科技)、25mM HEPES(生命科技)、1×青霉素/链霉素(生命科技)、板结合纯化的抗CD3抗体(5 μg/ml, 克隆UCHT1, BD生物科学)和可溶的抗CD28抗体(1μg/ml, 克隆CD28.2, BD生物科学)的RPMI(生命科技)中将细胞培养3天。将细胞采集,用培养基洗涤,且接着再悬浮于含有白介素-2(IL-2, 10ng/ml, 研发系统)的培养基中。将细胞在37°C, 5%CO₂含湿气培育箱中培养3天。将细胞采集,用RPMI洗涤,且以250,000个细胞/孔接种于培养基(200μL)中,培养2h,且再悬浮于含有各种浓度的测试化合物的分析培养基(50μL)(补充有0.1%牛血清白蛋白(西格玛)、2mM Glutamax、25mM HEPES和1×青霉素/链霉素的RPMI)中。将化合物连续稀释于DMSO中,且接着在培养基中再稀释1000倍,以使最终DMSO浓度达0.1%。将测试化合物稀释液与细胞一起在37°C, 5%CO₂下培育1h,随后在培养基(50μL)中以10ng/mL的最终浓度添加预温热的IL-12(研发系统)持续30min。在细胞因子刺激之后,将细胞在37°C, 5%CO₂下用预温热的固定溶液(100μL)(BD生物科学)固定10min,用FACS缓冲液(1mL)(1%BSA于PBS中)洗涤两次,且在4°C下再悬浮于冰冷Perm缓冲液III(1000μL)(BD生物科学)中持续30min。将细胞用FACS缓冲液洗涤两次,且接着在室温下在暗处再悬浮于含有抗CD3 PE(1:50倍稀释)和抗pSTAT4 Alexa Fluor 647(1:10倍稀释)的FACS缓冲液(100μL)中持续45min。在培育之后,在使用MACSQuant流式细胞仪(米尔滕尼(Miltenyi))分析之前将细胞在FACS缓冲液中洗涤两次。为测定测试化合物的抑制性能,在CD3+T细胞中测量pSTAT4的中位荧光强度(MFI)。根据MFI相对于化合物浓度的抑制曲线的分析来测定 IC_{50} 值。数据表述为 pIC_{50} (负十进位对数 IC_{50})值。化合物1在此分析中展现6.0的 pIC_{50} 值。

[0391] 分析11:在混合淋巴细胞反应分析中对IFN γ 分泌的抑制

[0392] 经混合淋巴细胞反应分析为模拟移植排斥反应的活体外分析。将来自一种供体的T细胞与来自另一供体的同种异体树突状细胞一起培养。此反应诱导细胞免疫反应,例如IFN γ 分泌。

[0393] 使用菲科尔梯度和磁性分离(CD14微珠, 米尔滕尼)从供体A的人类全血(斯坦福血液中心)分离CD14+单核细胞。通过在37°C, 5%CO₂含湿气培育箱中,在补充有10%胎牛血清(FBS, 生命科技)、2mM Glutamax(生命科技)、1×青霉素/链霉素(生命科技)、白介素-4(IL-4, 50ng/ml, 研发系统)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF, 50ng/ml, 研发系统)的RPMI(生命科技)中将细胞培养6天而使单核细胞分化为树突状细胞。将树突状细胞采集,用培养基洗涤,且接着通过在37°C, 5%CO₂含湿气培育箱中,在含有来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)(LPS, 100ng/ml, 西格玛)的脂多糖的培养基中将细胞培养24小时进行

活化。将细胞采集,用培养基洗涤,以400,000个细胞/毫升再悬浮于培养基中,且以10,000个细胞/孔/25微升涂覆。使用菲科尔梯度和磁力分离(CD4+T细胞分离试剂盒,米尔滕尼)从供体B的人类全血(斯坦福血液中心)新分离CD4+T细胞。将T细胞以4,000,000个细胞/毫升再悬浮于补充有10%胎牛血清(FBS,生命科技)、2mM Glutamax(生命科技)、25mM HEPES(生命科技)和1×青霉素/链霉素(生命科技)的RPMI(生命科技)中。将CD4+T细胞与树突状细胞以100,000细胞/孔/25微升混合。将细胞用测试化合物(50 μ l,在20 μ M、2 μ M和/或0.2 μ M下)处理到10 μ M、1 μ M和/或0.1 μ M的最终浓度。将化合物1稀释于二甲亚砜(DMSO,西格玛)中,达0.1%的最终浓度。0.1%DMSO用作媒介剂对照。将细胞在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂含湿气培育箱中维持5天。在第5天,收集上清液,且针对干扰素 γ (INF γ)使用酶联免疫吸附分析(ELISA)进行测量。与经媒介剂处理的细胞相比,通过针对IFN γ 分泌的化合物抑制性能来测定抑制百分比。数据为来自4种供体的平均值。与媒介剂对照相比,化合物1能够将IFN γ 分泌抑制99% \pm 0.4(在10 μ M下)、76% \pm 10(在1 μ M下)和43% \pm 12(在0.1 μ M下)。

[0394] 分析12:在来源于哮喘供体的人类3D气道培养物中对自发性骨膜蛋白和IL-6分泌的抑制

[0395] 从马泰克(AIR-100)获得EpiAirway组织培养物。细胞来源于自发地分泌骨膜蛋白和白介素-6(IL-6)的哮喘供体,所述骨膜蛋白为与Th2介导的哮喘相关的基质细胞蛋白(嗜酸性),所述白介素-6为在Th2和非Th2相关的哮喘中起作用的炎性细胞因子。在细胞培养插入物中,使人类衍生的气管/支气管上皮细胞在多孔膜载体上生长和分化,从而使得气液界面具有细胞下方的温热培养基和上述气态测试气氛。在维持培养基(马泰克,AIR-100-MM)时,在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂含湿气培育箱中培养组织。测试四种供体。在第0天,在液体界面中以10 μ M、1 μ M和/或0.1 μ M用测试化合物处理组织培养物。将化合物1稀释于二甲亚砜(DMSO,西格玛)中,达0.1%的最终浓度。0.1%DMSO用作媒介剂对照。将组织培养物维持8天。将培养基每2天用含有化合物1的新鲜培养基置换。在第8天,收集上清液以进行分析。针对骨膜蛋白和白介素-6(IL-6),使用流式荧光检测术分析(EMD密理博)分析上清液样品。数据表述为抑制% \pm 标准差(\pm STDV)。与经媒介剂处理的细胞相比,通过针对骨膜蛋白和IL-6的自发性分泌的化合物抑制性能来测定抑制百分比。数据为来自3种或4种供体的平均值。当与媒介剂对照相比时,化合物1能够将自发性骨膜蛋白分泌抑制62% \pm 25(在10 μ M下)和40% \pm 28(在1 μ M下)。当与媒介剂相比时,化合物1能够将自发性IL-6分泌抑制91% \pm 9.0(在10 μ M下)、70% \pm 33(在1 μ M下)和10% \pm 40(在0.1 μ M下)。

[0396] 晶体结构

[0397] 以2.28 \AA 的分辨率使化合物C-1结合于人类JAK1来获得共晶体结构。观测到配位在ATP结合位点中结合。基于供体与受体原子之间的3.5 \AA 或更小的距离来鉴定七种特异性氢键相互作用。尤其应注意,在化合物C-1的环外酰胺的羰基与JAK1的Arg879的侧链之间鉴定出氢键相互作用。在早期模型化研究中,由于其它紧密相关的激酶(例如,TRKA、VEGFR、ABL1)在等效位置处并不拥有精氨酸残基,因此已提出此相互作用作为提供对JAK1优于其它酪氨酸激酶的选择性的方法。与不拥有环外酰胺的系列相比,晶体结构中氢键相互作用的观测结果和经改进的激酶组选择性验证了此设计假设。

[0398] 虽然本公开已参考其特定方面或实施例进行描述,但所属领域的一般技术人员将理解,在不脱离本公开的真实精神和范围的情况下,可作出各种变化或可取代等效物。另

外,在由适用专利法和规章准许的程度上,本文中所引用的所有公开案、专利和专利申请以全文引用的方式并入本文中,其引用程度如同将每个文献单独地以引用的方式并入本文中一般。

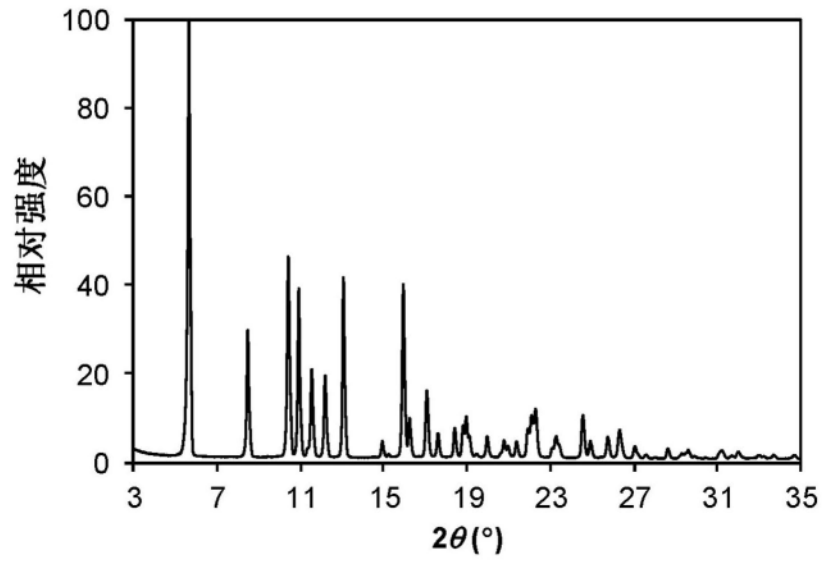


图1

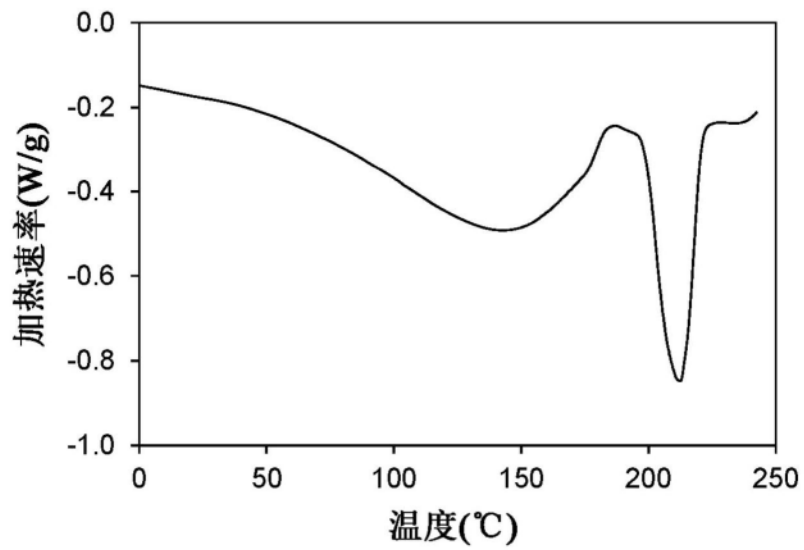


图2

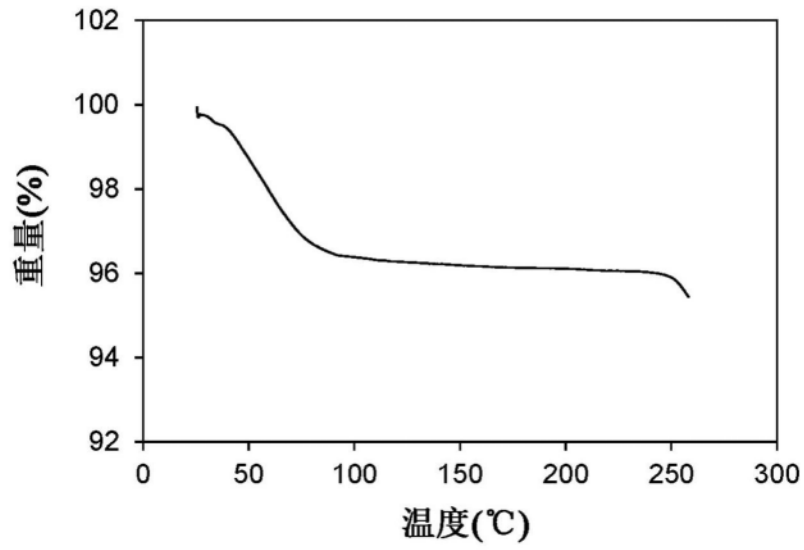


图3

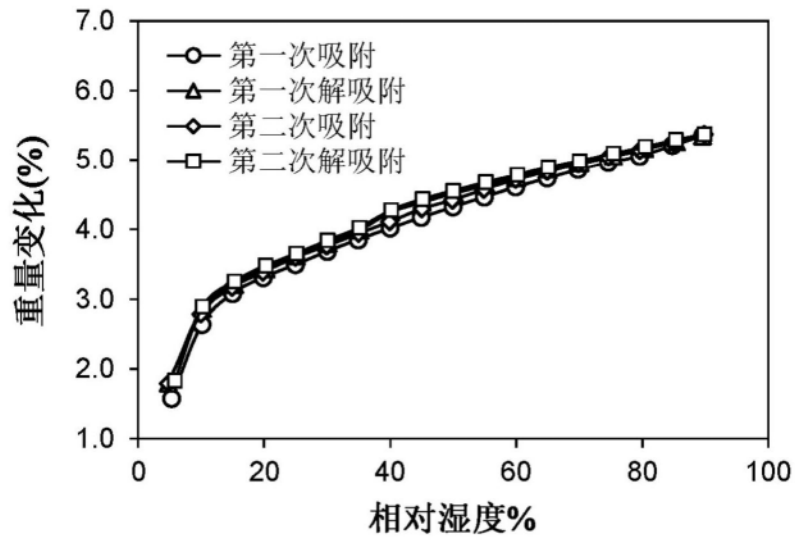


图4