



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103874699 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201280049382. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 09. 20

C07D 471/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07D 487/04 (2006. 01)

11182020. 5 2011. 09. 20 EP

A61K 31/519 (2006. 01)

A61P 37/06 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/068504 2012. 09. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/041605 EN 2013. 03. 28

(71) 申请人 赛尔佐姆有限公司

地址 英国米德尔塞克斯

(72) 发明人 N. 拉姆斯登 C. 达戈斯廷

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 刘国军

权利要求书6页 说明书43页

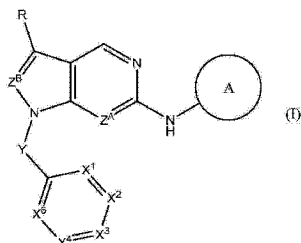
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

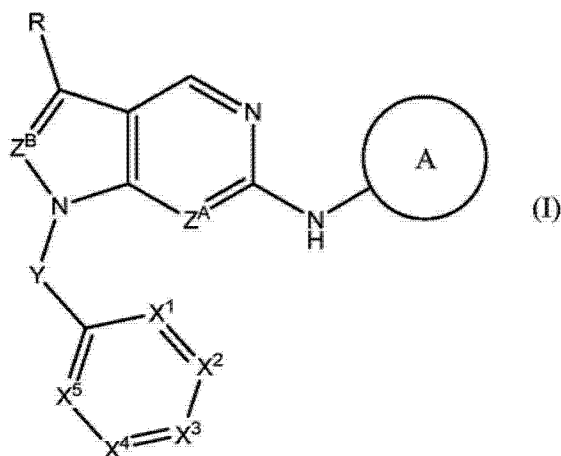
吡唑并 [4, 3-c] 吡啶衍生物作为激酶抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及式 (I) 化合物, 其中 X^1 至 X^5 、Y、 Z^A 、 Z^B 、R 和 A 具有如在说明书和权利要求书所引用的含义。所述化合物可用作激酶抑制剂用于治疗或预防免疫性、炎性、自身免疫性或变应性疾病以及免疫介导的疾病。本发明还涉及包含所述化合物的药物组合物以及作为药物的用途。



1. 式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐



其中

R 是 H 或 F；

Z^A 和 Z^B 独立地选自 CH、和 N；

环 A 是苯基、萘基、芳香 5 至 6 元杂环基、或芳香 9 至 11 元杂双环基，其中环 A 任选被一个或多个 R^1 取代；

每个 R^1 独立地为卤素、CN、 $C(O)OR^2$ 、 OR^2 、 $C(O)R^2$ 、 $C(O)N(R^2R^{2a})$ 、 $S(O)_2N(R^2R^{2a})$ 、 $S(O)N(R^2R^{2a})$ 、 $S(O)_2R^2$ 、 $S(O)R^2$ 、 $N(R^2)S(O)_2N(R^{2a}R^{2b})$ 、 $N(R^2)S(O)N(R^{2a}R^{2b})$ 、 SR^2 、 $N(R^2R^{2a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^2$ 、 $N(R^2)C(O)R^2$ 、 $N(R^2)S(O)_2R^2$ 、 $N(R^2)S(O)R^2$ 、 $N(R^2)C(O)N(R^{2a}R^{2b})$ 、 $N(R^2)C(O)OR^{2a}$ 、 $OC(O)N(R^2R^{2a})$ 、 T^1 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、或 C_{2-6} 炔基，其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^3 取代；

R^2 、 R^{2a} 、 R^{2b} 独立地选自 H、 T^1 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基，其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^3 取代；

R^3 是卤素、CN、 $C(O)OR^4$ 、 OR^4 、 $C(O)R^4$ 、 $C(O)N(R^4R^{4a})$ 、 $S(O)_2N(R^4R^{4a})$ 、 $S(O)N(R^4R^{4a})$ 、 $S(O)_2R^4$ 、 $S(O)R^4$ 、 $N(R^4)S(O)_2N(R^{4a}R^{4b})$ 、 $N(R^4)S(O)N(R^{4a}R^{4b})$ 、 SR^4 、 $N(R^4R^{4a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^4$ 、 $N(R^4)C(O)R^4$ 、 $N(R^4)S(O)_2R^{4a}$ 、 $N(R^4)S(O)R^{4a}$ 、 $N(R^4)C(O)N(R^{4a}R^{4b})$ 、 $N(R^4)C(O)OR^{4a}$ 、 $OC(O)N(R^4R^{4a})$ 、或 T^1 ；

R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 独立地选自 H、 T^1 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基，其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代；

T^1 是 C_{3-7} 环烷基、饱和的 4 至 7 元杂环基、或饱和的 7 至 11 元杂双环基，其中 T^1 任选被一个或多个相同或不同的 R^{10} 取代；

Y 是 $(C(R^{5a}))_n$ ；

n 是 0、1、2、3 或 4；

R^5 、 R^{5a} 独立地选自 H、和未取代的 C_{1-6} 烷基；或连接形成氧代 (=O)；

任选地， R^5 、 R^{5a} 连接形成未取代的 C_{3-7} 环烷基；

X^1 是 $C(R^6)$ 或 N、 X^2 是 $C(R^{6a})$ 或 N、 X^3 是 $C(R^{6b})$ 或 N、 X^4 是 $C(R^{6c})$ 或 N、 X^5 是 $C(R^{6d})$ 或 N，条件是最多两个 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 是 N；

R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 独立地选自 R^{6e} 、H、卤素、CN、 $C(O)OR^7$ 、 OR^7 、 $C(O)R^7$ 、 $C(O)N(R^7R^{7a})$ 、 $S(O)_2N(R^7R^{7a})$ 、 $S(O)N(R^7R^{7a})$ 、 $S(O)_2R^7$ 、 $S(O)R^7$ 、 $N(R^7)S(O)_2N(R^{7a}R^{7b})$ 、 $N(R^7)S(O)N(R^{7a}R^{7b})$ 、 SR^7 、 $N(R^7R^{7a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^7$ 、 $N(R^7)C(O)R^7$ 、 $N(R^7)S(O)_2R^{7a}$ 、 $N(R^7)S(O)R^{7a}$ 、 $N(R^7)C(O)N(R^{7a}R^{7b})$ 、 $N(R^7)$

$C(O)OR^{7a}$ 、 $OC(O)N(R^7R^{7a})$ 、 T^2 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{11} 取代; 条件是一个 R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 是 R^{6e} ;

R^{6e} 是 $N(R^7)C(O)C(R^{11a})=C(R^{11b}R^{11c})$ 、 $N(R^7)S(O)_2C(R^{11a})=C(R^{11b}R^{11c})$ 、或 $N(R^7)C(O)C \equiv C(R^{11a})$;

任选地一对 R^6/R^{6a} 或 R^{6a}/R^{6b} 连接形成环 T^3 ;

R^7 、 R^{7a} 、 R^{7b} 独立地选自 H 、 T^2 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^8 取代;

R^8 是卤素、 CN 、 $C(O)OR^9$ 、 OR^9 、 $C(O)R^9$ 、 $C(O)N(R^9R^{9a})$ 、 $S(O)_2N(R^9R^{9a})$ 、 $S(O)N(R^9R^{9a})$ 、 $S(O)_2R^9$ 、 $S(O)R^9$ 、 $N(R^9)S(O)_2N(R^{9a}R^{9b})$ 、 $N(R^9)S(O)N(R^{9a}R^{9b})$ 、 SR^9 、 $N(R^9R^{9a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^9$ 、 $N(R^9)C(O)R^{9a}$ 、 $N(R^9)S(O)_2R^{9a}$ 、 $N(R^9)S(O)R^{9a}$ 、 $N(R^9)C(O)N(R^{9a}R^{9b})$ 、 $N(R^9)C(O)OR^{9a}$ 、 $OC(O)N(R^9R^{9a})$ 、或 T^2 ;

R^9 、 R^{9a} 、 R^{9b} 独立地选自 H 、 T^2 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{12} 取代;

R^{10} 是卤素、 CN 、 $C(O)OR^{13}$ 、 OR^{13} 、氧代 ($=O$)、其中该环至少部分饱和、 $C(O)R^{13}$ 、 $C(O)N(R^{13}R^{13a})$ 、 $S(O)_2N(R^{13}R^{13a})$ 、 $S(O)N(R^{13}R^{13a})$ 、 $S(O)_2R^{13}$ 、 $S(O)R^{13}$ 、 $N(R^{13})S(O)_2N(R^{13a}R^{13b})$ 、 $N(R^{13})S(O)N(R^{13a}R^{13b})$ 、 SR^{13} 、 $N(R^{13}R^{13a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^{13}$ 、 $N(R^{13})C(O)R^{13a}$ 、 $N(R^{13})S(O)_2R^{13a}$ 、 $N(R^{13})S(O)R^{13a}$ 、 $N(R^{13})C(O)N(R^{13a}R^{13b})$ 、 $N(R^{13})C(O)OR^{13a}$ 、 $OC(O)N(R^{13}R^{13a})$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、或 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{14} 取代;

R^{13} 、 R^{13a} 、 R^{13b} 独立地选自 H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{14} 取代;

R^{11} 、 R^{12} 独立地选自卤素、 CN 、 $C(O)OR^{15}$ 、 OR^{15} 、 $C(O)R^{15}$ 、 $C(O)N(R^{15}R^{15a})$ 、 $S(O)_2N(R^{15}R^{15a})$ 、 $S(O)N(R^{15}R^{15a})$ 、 $S(O)_2R^{15}$ 、 $S(O)R^{15}$ 、 $N(R^{15})S(O)_2N(R^{15a}R^{15b})$ 、 $N(R^{15})S(O)N(R^{15a}R^{15b})$ 、 SR^{15} 、 $N(R^{15}R^{15a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^{15}$ 、 $N(R^{15})C(O)R^{15a}$ 、 $N(R^{15})S(O)_2R^{15a}$ 、 $N(R^{15})S(O)R^{15a}$ 、 $N(R^{15})C(O)N(R^{15a}R^{15b})$ 、 $N(R^{15})C(O)OR^{15a}$ 、 $OC(O)N(R^{15}R^{15a})$ 、和 T^2 ;

R^{11a} 、 R^{11b} 、 R^{11c} 独立地选自 H 、卤素、 CN 、 OR^{15} 、 $C(O)N(R^{15}R^{15a})$ 、和 C_{1-6} 烷基, 其中 C_{1-6} 烷基任选被一个或多个相同或不同的 R^{14} 取代;

R^{15} 、 R^{15a} 、 R^{15b} 独立地选自 H 、 T^2 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代;

R^{14} 是卤素、 CN 、 $C(O)OR^{16}$ 、 OR^{16} 、 $C(O)R^{16}$ 、 $C(O)N(R^{16}R^{16a})$ 、 $S(O)_2N(R^{16}R^{16a})$ 、 $S(O)N(R^{16}R^{16a})$ 、 $S(O)_2R^{16}$ 、 $S(O)R^{16}$ 、 $N(R^{16})S(O)_2N(R^{16a}R^{16b})$ 、 $N(R^{16})S(O)N(R^{16a}R^{16b})$ 、 SR^{16} 、 $N(R^{16}R^{16a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^{16}$ 、 $N(R^{16})C(O)R^{16a}$ 、 $N(R^{16})S(O)_2R^{16a}$ 、 $N(R^{16})S(O)R^{16a}$ 、 $N(R^{16})C(O)N(R^{16a}R^{16b})$ 、 $N(R^{16})C(O)OR^{16a}$ 、或 $OC(O)N(R^{16}R^{16a})$;

R^{16} 、 R^{16a} 、 R^{16b} 独立地选自 H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代;

T^2 是苯基、萘基、茚基、茚满基、 C_{3-7} 环烷基、4 至 7 元杂环基、或 7 至 11 元杂双环基, 其中 T^2 任选被一个或多个相同或不同的 R^{17} 取代;

T^3 是苯基、 C_{3-7} 环烷基、或 4 至 7 元杂环基, 其中 T^3 任选被一个或多个相同或不同的 R^{18} 取代;

R^{17} 、 R^{18} 独立地选自卤素、 CN 、 $C(O)OR^{19}$ 、 OR^{19} 、氧代 ($=O$)、其中该环至少部分饱和、 $C(O)R^{19}$ 、 $C(O)N(R^{19}R^{19a})$ 、 $S(O)_2N(R^{19}R^{19a})$ 、 $S(O)N(R^{19}R^{19a})$ 、 $S(O)_2R^{19}$ 、 $S(O)R^{19}$ 、 $N(R^{19})S(O)_2N(R^{19a}R^{19b})$ 、

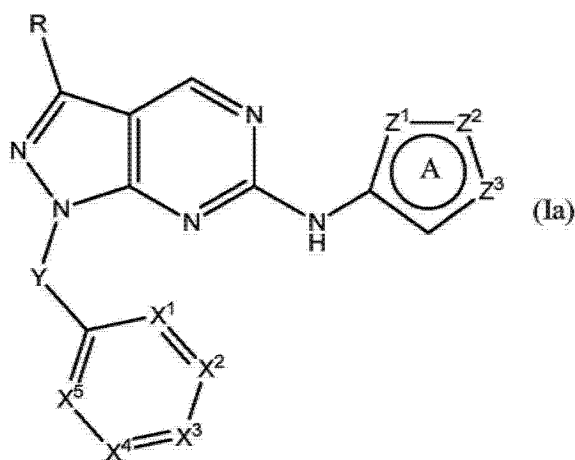
$N(R^{19})S(O)N(R^{19a}R^{19b})$ 、 SR^{19} 、 $N(R^{19}R^{19a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^{19}$ 、 $N(R^{19})C(O)R^{19a}$ 、 $N(R^{19})S(O)_2R^{19a}$ 、 $N(R^{19})S(O)R^{19a}$ 、 $N(R^{19})C(O)N(R^{19a}R^{19b})$ 、 $N(R^{19})C(O)OR^{19a}$ 、 $OC(O)N(R^{19}R^{19a})$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基,其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{20} 取代;

R^{19} 、 R^{19a} 、 R^{19b} 独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基,其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{20} 取代;

R^{20} 是卤素、CN、 $C(O)OR^{21}$ 、 OR^{21} 、 $C(O)R^{21}$ 、 $C(O)N(R^{21}R^{21a})$ 、 $S(O)_2N(R^{21}R^{21a})$ 、 $S(O)N(R^{21}R^{21a})$ 、 $S(O)_2R^{21}$ 、 $S(O)R^{21}$ 、 $N(R^{21})S(O)_2N(R^{21a}R^{21b})$ 、 $N(R^{21})S(O)N(R^{21a}R^{21b})$ 、 SR^{21} 、 $N(R^{21}R^{21a})$ 、 NO_2 、 $OC(O)R^{21}$ 、 $N(R^{21})C(O)R^{21a}$ 、 $N(R^{21})S(O)_2R^{21a}$ 、 $N(R^{21})S(O)R^{21a}$ 、 $N(R^{21})C(O)N(R^{21a}R^{21b})$ 、 $N(R^{21})C(O)OR^{21a}$ 、或 $OC(O)N(R^{21}R^{21a})$;

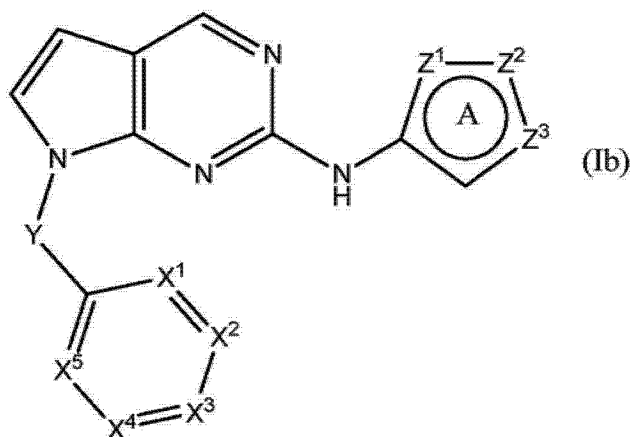
R^{21} 、 R^{21a} 、 R^{21b} 独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基,其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代。

2. 权利要求 1 的化合物,其中在式 (I) 中,环 A、 Z^A 、 Z^B 被定义以得到式 (Ia)



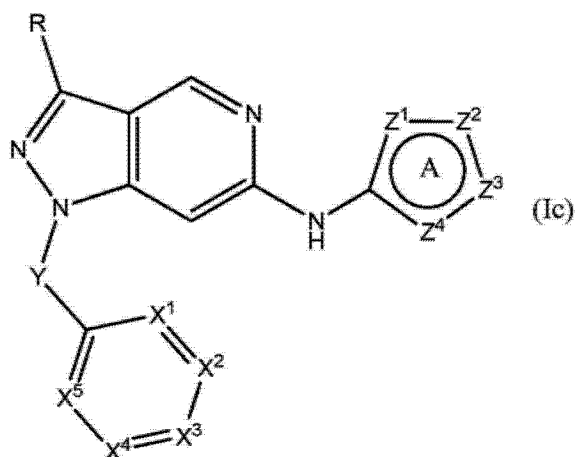
其中环 A 是芳香 5 元杂环,其中 Z^1 、 Z^2 和 Z^3 独立地选自 $C(R^1)$ 、N、 $N(R^1)$ 、O 和 S,条件是至少一个 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 是 N;且其中 R、Y、 X^1 至 X^5 和 R^1 如权利要求 1 所定义。

3. 权利要求 1 的化合物,其中在式 (I) 中,环 A、 Z^A 、 Z^B 、R 被定义以得到式 (Ib)



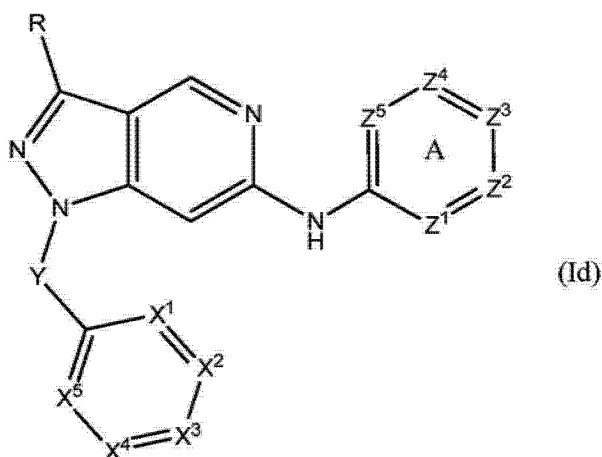
其中环 A 是 5 元芳香杂环,其中 Z^1 、 Z^2 和 Z^3 独立地选自 $C(R^1)$ 、N、 $N(R^1)$ 、O 和 S,条件是至少一个 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 是 N;且其中 Y、 X^1 至 X^5 和 R^1 如权利要求 1 所定义。

4. 权利要求 1 的化合物,其中在式 (I) 中,环 A、 Z^A 、 Z^B 被定义以得到式 (Ic)



其中环 A 是芳香的 5 元杂环, 其中 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 和 Z^4 独立地选自 C(R^1)、N、N(R^1)、O 和 S, 条件是至少一个 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 是 N 或 N(R^1); 且其中 R、Y、 X^1 至 X^5 和 R^1 如权利要求 1 所定义。

5. 权利要求 1 的化合物, 其中在式 (I) 中, A、 Z^A 、 Z^B 被定义以得到式 (Id)



其中在环 A 中, Z^1 是 C(R^1) 或 N、 Z^2 是 C(R^1) 或 N、 Z^3 是 C(R^1) 或 N、 Z^4 是 C(R^1) 或 N、 Z^5 是 C(R^1) 或 N, 条件是最多两个 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 是 N;

任选地两个相邻的 R^1 与包括 Z^1 至 Z^5 的环连接共同形成芳香双环 T^0 ;

T^0 是芳香的 9 至 11 元杂双环基、萘基、茛基、或茛满基, 其中 T^0 任选被一个或多个相同或不同的 R^{1a} 取代;

R^{1a} 是卤素、CN、C(O)OR²、OR²、氧代 (=O), 其中所述环至少部分饱和、C(O)R²、C(O)N(R²R^{2a})、S(O)₂N(R²R^{2a})、S(O)N(R²R^{2a})、S(O)₂R²、S(O)R²、N(R²)S(O)₂N(R^{2a}R^{2b})、N(R²)S(O)N(R^{2a}R^{2b})、SR²、N(R²R^{2a})、NO₂、OC(O)R²、N(R²)C(O)R^{2a}、N(R²)S(O)₂R^{2a}、N(R²)S(O)R^{2a}、N(R²)C(O)N(R^{2a}R^{2b})、N(R²)C(O)OR^{2a}、OC(O)N(R²R^{2a})、T¹、或 C₁₋₆ 烷基, 其中 C₁₋₆ 烷基任选被一个或多个相同或不同的 R^3 取代; 和

其中 R、 R^1 、 R^2 、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^3 、Y、 X^1 至 X^5 和 R^1 如权利要求 1 所定义。

6. 权利要求 1 至 5 任一项的化合物, 其中 R 是 H。

7. 权利要求 1 至 6 任一项的化合物, 其中 Y 是 CH₂。

8. 权利要求 1 至 7 任一项的化合物, 其中没有或有一个 R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 是 N。

9. 权利要求 1 至 8 任一项的化合物, 其中 R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 独立地选自 R^{6e} 、H、卤素、和

C₁₋₆ 烷基, 其中 C₁₋₆ 烷基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代, 条件是一个 R⁶、R^{6a}、R^{6b}、R^{6c}、R^{6d} 是 R^{6e}。

10. 权利要求 1 至 9 任一项的化合物, 其中 R⁷、R^{11a}、R^{11b}、R^{11c} 独立地选自 H、和 C₁₋₄ 烷基, 其中 C₁₋₄ 烷基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代。

11. 权利要求 1 至 10 任一项的化合物, 其中 R^{6a} 是 R^{6e}。

12. 权利要求 1 至 11 任一项的化合物, 其中 R^{6e} 是 NHC(O)CH=CH₂、NHC(O)C(CH₃)=CH₂、NHC(O)CH=C(CH₃)₂、NHS(O)₂CH=CH₂、或 NHC(O)C≡CH。

13. 权利要求 1 至 12 任一项的化合物, 其中环 A 是吡唑、~~噁~~唑、~~噁~~唑、三唑、苯基或吡啶基环。

14. 权利要求 1 至 13 任一项的化合物, 其中 0、1 或 2 个相同或不同的 R¹ 不是 H。

15. 权利要求 1 至 14 任一项的化合物, 其中 R¹ 是 C₁₋₄ 烷基, 其任选被 1 或 2 个相同或不同的 R³ 取代。

16. 权利要求 1 至 15 任一项的化合物, 其中 R³ 是卤素、CN、OR⁴、C(O)N(R^{4a})、或 C(O)T¹。

17. 权利要求 1 至 16 任一项的化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物选自

N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺;

N-(2-氟-5-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺;

N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丙炔酰胺;

N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)乙烯磺酰胺;

N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)甲基丙烯酰胺;

3-甲基-N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丁-2-烯酰胺;

N-(3-((2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)甲基)苯基)乙烯磺酰胺;

N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺;

N-(3-((2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)甲基)苯基)丙烯酰胺;和

N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺。

18. 药物组合物, 其包含权利要求 1 至 17 任一项的化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体, 任选地组合一种或多种其它药物组合物。

19. 用作药物的权利要求 1 至 17 任一项的化合物或其药学上可接受的盐。

20. 权利要求 1 至 17 任一项的化合物或其药学上可接受的盐, 其用于治疗或预防与

JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病或病症的方法中。

21. 权利要求 1 至 17 任一项的化合物或其药学上可接受的盐,其用在治疗或预防免疫性、炎性、自身免疫性或变应性病症或疾病或移植排斥或移植物抗宿主病的方法中。

22. 权利要求 1 至 17 任一项的化合物或其药学上可接受的盐,其用在治疗或预防增生性疾病的方法中。

23. 权利要求 1 至 17 任一项的化合物或其药学上可接受的盐用于制备治疗或预防与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病和病症的药物中的用途。

24. 一种用于在需要其的哺乳动物患者中治疗、控制、延迟或预防一种或多种选自与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病或病症的病状的方法,其中该方法包括对所述患者给予治疗有效量的权利要求 1 至 17 任一项的化合物或其药学上可接受的盐。

吡唑并 [4, 3-c] 吡啶衍生物作为激酶抑制剂

[0001] 本发明涉及新类型的激酶抑制剂,包括其药学上可接受的盐,其可用于调节蛋白激酶活性以调节细胞活性如信号转导、增殖和细胞因子分泌。更具体地,本发明提供抑制激酶活性(特别是 JAK3、BTK、BLK、ITK 和 TEC 活性)以及如上文提到的涉及细胞活性的信号转导通路的化合物。此外,本发明涉及包含所述化合物的药物组合物,例如用于治疗或预防免疫性、炎性、自身免疫性或变应性病症或疾病或移植排斥或移植物抗宿主病。

[0002] 激酶催化蛋白质、脂质、糖、核苷和其它细胞代谢物的磷酸化并在真核细胞生理学的所有方面起关键作用。特别地,蛋白激酶和脂质激酶参与信号传导事件,该事件控制对细胞外调节物或刺激物(如生长因子、细胞因子或趋化因子)响应的细胞的激活、生长、分化和存活。通常,蛋白激酶分为两类,优先磷酸化酪氨酸残基的那些和优先磷酸化丝氨酸和/或苏氨酸残基的那些。酪氨酸激酶包括跨膜生长因子受体如表皮生长因子受体(EGFR)和胞质非受体激酶如 TEC 激酶和 Janus 激酶(JAK)。

[0003] 激酶的 TEC 家族包括五个成员(TEC、BTK、ITK、RLK 和 BMX),其主要由造血细胞表达并在经免疫受体(例如高亲和性 IgE 受体(Fc ϵ RI)、T 细胞抗原受体(TCR)和 B 细胞受体(BCR)的信号传导中起关键作用。TEC 家族的成员共享相同的蛋白域结构。它们具有氨基末端 Pleckstrin Homology(PH)域、含一个或两个富含脯氨酸的区域的 TEC 同源域、SRC 同源 3(SH3)和 2(SH2)蛋白质相互作用域和羧基末端激酶域。TEC 家族激酶的激活需要以下几个步骤:经它们的 Pleckstrin Homology 域募集至质膜,被 SRC 家族激酶磷酸化和与蛋白质相互作用,这将它们带入免疫受体信号传导复合物的附近(Schwartzberg 等,2005, Nature Reviews Immunology5, 284-295)。

[0004] TEC 家族激酶对 B 细胞发育和激活至关重要。具有突变的 BTK 的患者显示 B 细胞发育障碍,导致几乎完全缺乏 B 细胞和浆细胞、免疫球蛋白水平降低和体液免疫响应受损。

[0005] 另外,TEC 激酶在肥大细胞的激活中通过高亲和性 IgE 受体(Fc ϵ RI)起作用。ITK 和 BTK 在肥大细胞中表达,并且通过 Fc ϵ RI 交联激活。当用变应原经气道激发时,ITK 缺乏小鼠中的急性和晚期炎性过敏反应均显著降低。重要地,气道肥大细胞脱粒化受损,尽管变应原特异性 IgE 和 IgG1 的野生型水平(Forssell 等,2005, Am. J. Respir. Cell Mol. Bio. 32, 511-520)。

[0006] T 细胞表达三种 TEC 激酶(ITK、RLK 和 TEC),其在 T 细胞受体(TCR)的下游激活,并且参与 TCR 信号传导。其中编码 Itk 蛋白质的基因缺失的遗传操作小鼠的研究得出关于 Itk 的生理和病生功能的重要信息。Itk 缺乏(Itk $^{-/-}$)小鼠在 T 辅助细胞 2(T_H2)响应中具有特殊缺陷,并且在过敏性哮喘模型中具有病理学降低。相反,ITK 表达在特应性皮炎(T_H2-细胞介导的疾病)患者的 T 细胞中升高。因此,已经建议 ITK 作为 T_H2-细胞介导的疾病的治疗靶点(Schwartzberg 等,2005, Nature Reviews Immunology5, 284-295)。

[0007] 已经成为目前药物开发焦点的另一组激酶是非受体酪氨酸激酶的 Janus 激酶(JAK)家族。在哺乳动物中,该家族具有四个成员,JAK1、JAK2、JAK3 和酪氨酸激酶 2(TYK2)。每个蛋白质都具有激酶域和催化惰性假性激酶域。JAK 蛋白质通过其氨基末端 FERM(带

4.1 蛋白 (Band-4.1)、埃兹蛋白 (ezrin)、根蛋白 (radixin)、膜突蛋白 (moesin)) 域结合到细胞因子受体上。细胞因子与其受体结合后, 激活 JAKs 并使受体磷酸化, 从而产生用于信号传导分子 (尤其是信号传感器的成员和转录激活子 (Stat) 家族) 的停靠位点 (docking sites) (Yamaoka 等, 2004. The Janus kinases (Jaks). Genome Biology 5(12) :253)。

[0008] 在哺乳动物中, JAK1、JAK2 和 TYK2 普遍表达。相反, JAK3 的表达主要在造血细胞中并且受细胞发育与激活的高度调节 (Musso 等, 1995. 181(4) :1425-31)。

[0009] JAK- 缺陷细胞系和基因靶向小鼠的研究已经揭示了 JAKs 在细胞因子信号传导中的基本的, 不重复的功能。JAK1 敲除小鼠显示围产期致死表型, 可能与阻止其哺乳的神经作用有关 (Rodig 等, 1998. Cell 93(3) :373-83)。由于红细胞生成障碍, JAK2 基因的删除导致在胚胎第 12.5 天时产生胚胎致死性 (Neubauer 等, 1998. Cell 93(3) :397-409)。有趣的是, JAK3 缺陷首次在患有常染色体隐性重度联合免疫缺陷 (SCID) 的人中被识别 (Macchi 等, 1995. Nature 377(6544) :65-68)。JAK3 敲除小鼠也显示 SCID 但未显示非免疫性缺陷, 表明 JAK3 抑制剂作为免疫抑制剂将在体内具有有限效应并因此成为用于免疫抑制的有前景的药物 (Papageorgiou 和 Wikman 2004, Trends in Pharmacological Sciences 25(11) :558-62)。

[0010] 在急性成巨核细胞白血病 (AMKL) 患者中已经观察到 JAK3 的激活突变 (Walters 等, 2006. Cancer Cell 10(1) :65-75)。JAK3 的这些突变形式可将 Ba/F3 细胞转变为因子独立性生长并在小鼠模型中诱导巨核母细胞白血病的特征。

[0011] 与 JAK3 抑制有关的疾病和病症进一步描述于例如 W001/42246 和 W02008/060301 中。

[0012] 文献中已报道一些 JAK3 抑制剂可用于医学领域 (O' Shea 等, 2004. Nat. Rev. Drug Discov. 3(7) :555-64)。据报道, 有效的 JAK3 抑制剂 (CP-690, 550) 在器官移植的动物模型 (Changelian 等, 2003, Science 302(5646) :875-888) 和临床试验 (参考: Pesu 等, 2008. Immunol. Rev. 223, 132-142) 中显示效力。CP-690, 550 抑制剂对 JAK3 激酶没有选择性且几乎等效抑制 JAK2 激酶 (Jiang 等, 2008, J. Med. Chem. 51(24) :8012-8018)。预期与 JAK2 相比能更有效地抑制 JAK3 的选择性 JAK3 抑制剂可能具有有利的治疗性质, 因为 JAK2 的抑制可引起贫血 (Ghoreschi 等, 2009. Nature Immunol. 4, 356-360)。

[0013] 显示 JAK3 和 JAK2 激酶抑制活性的嘧啶衍生物描述于 W0-A2008/009458 中。治疗其中 JAK 通路调节或 JAK 激酶 (特别是 JAK3) 抑制的疾病 (conditions) 的嘧啶化合物描述于 W0-A2008/118822 和 W0-A2008/118823 中。

[0014] 氟取代的嘧啶化合物作为 JAK3 抑制剂描述于 W0-A2010/118986 中。杂环基吡唑并嘧啶类似物作为 JAK 抑制剂描述于 W0-A2011/048082 中。

[0015] 吡咯并嘧啶化合物描述于 W02009/098236A1、W02010/100431A1 和 W02010/129053A2 中。

[0016] 吡唑并吡啶及其制备已知于 W02006/063820A1、W02011/019780A1 和 R. V. Fucini 等, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 18(2008), 5648-5652 中。

[0017] Jak 抑制剂还描述于国际专利申请 PCT/EP2012/056887、PCT/EP2012/064510 和 PCT/EP2012/064512 以及 W02012/022681A2 中。

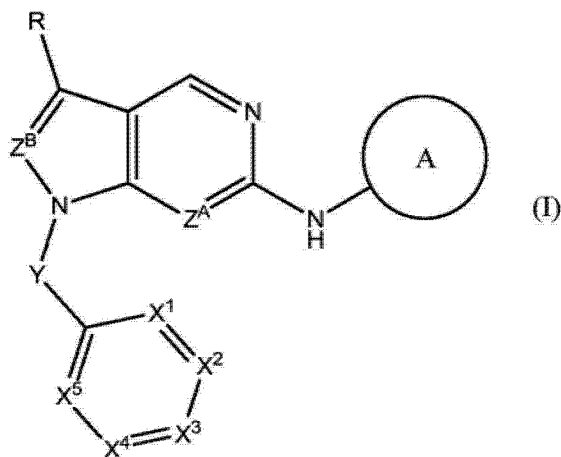
[0018] 尽管 JAK 抑制剂是本领域已知的, 但仍然需要提供另外的 JAK 抑制剂, 其具有至少

部分更有效的药物相关性质,如活性、选择性尤其是对 JAK2 激酶的选择性以及 ADME 性质。

[0019] 因此,本发明的目的是提供新类型的化合物,其可以有效地治疗或预防与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的病症。

[0020] 因此,本发明提供式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐

[0021]



[0022] 其中

[0023] R 是 H 或 F ;

[0024] Z^A 和 Z^B 独立地选自 CH ;和 N ;

[0025] 环 A 是苯基、萘基、芳香 5 至 6 元杂环基 ;或芳香 9 至 11 元杂双环基,其中环 A 任选被一个或多个 R^1 取代 ;

[0026] 每个 R^1 独立地为卤素 ;CN ;C(O)OR² ;OR² ;C(O)R² ;C(O)N(R²R^{2a}) ;S(O)₂N(R²R^{2a}) ;S(O)N(R²R^{2a}) ;S(O)₂R² ;S(O)R² ;N(R²)S(O)₂N(R^{2a}R^{2b}) ;N(R²)S(O)N(R^{2a}R^{2b}) ;SR² ;N(R²R^{2a}) ;NO₂ ;OC(O)R² ;N(R²)C(O)R^{2a} ;N(R²)S(O)₂R^{2a} ;N(R²)S(O)R^{2a} ;N(R²)C(O)N(R^{2a}R^{2b}) ;N(R²)C(O)OR^{2a} ;OC(O)N(R²R^{2a}) ;T¹ ;C₁₋₆ 烷基 ;C₂₋₆ 烯基 ;或 C₂₋₆ 炔基,其中 C₁₋₆ 烷基 ;C₂₋₆ 烯基 ;和 C₂₋₆ 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^3 取代 ;

[0027] R^2 、 R^{2a} 、 R^{2b} 独立地选自 H ;T¹ ;C₁₋₆ 烷基 ;C₂₋₆ 烯基 ;和 C₂₋₆ 炔基,其中 C₁₋₆ 烷基 ;C₂₋₆ 烯基 ;和 C₂₋₆ 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^3 取代 ;

[0028] R^3 是 卤 素 ;CN ;C(O)OR⁴ ;OR⁴ ;C(O)R⁴ ;C(O)N(R⁴R^{4a}) ;S(O)₂N(R⁴R^{4a}) ;S(O)N(R⁴R^{4a}) ;S(O)₂R⁴ ;S(O)R⁴ ;N(R⁴)S(O)₂N(R^{4a}R^{4b}) ;N(R⁴)S(O)N(R^{4a}R^{4b}) ;SR⁴ ;N(R⁴R^{4a}) ;NO₂ ;OC(O)R⁴ ;N(R⁴)C(O)R^{4a} ;N(R⁴)S(O)₂R^{4a} ;N(R⁴)S(O)R^{4a} ;N(R⁴)C(O)N(R^{4a}R^{4b}) ;N(R⁴)C(O)OR^{4a} ;OC(O)N(R⁴R^{4a}) ;或 T¹ ;

[0029] R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 独立地选自 H ;T¹ ;C₁₋₆ 烷基 ;C₂₋₆ 烯基 ;和 C₂₋₆ 炔基,其中 C₁₋₆ 烷基 ;C₂₋₆ 烯基 ;和 C₂₋₆ 炔基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代 ;

[0030] T¹ 是 C₃₋₇ 环烷基 ;饱和 4 至 7 元杂环基 ;或饱和 7 至 11 元杂双环基,其中 T¹ 任选被一个或多个相同或不同的 R^{10} 取代 ;

[0031] Y 是 (C(R⁵R^{5a}))_n ;

[0032] n 是 0、1、2、3 或 4 ;

[0033] R^5 、 R^{5a} 独立地选自 H ;和未取代的 C₁₋₆ 烷基 ;或连接形成氧代 (=O) ;

[0034] 任选地, R^5 、 R^{5a} 连接形成未取代的 C₃₋₇ 环烷基 ;

[0035] X^1 是 $C(R^6)$ 或 N ; X^2 是 $C(R^{6a})$ 或 N ; X^3 是 $C(R^{6b})$ 或 N ; X^4 是 $C(R^{6c})$ 或 N ; X^5 是 $C(R^{6d})$ 或 N , 条件是最多两个 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 是 N ;

[0036] R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 独立地选自 R^{6e} ; H ; 卤素; CN ; $C(O)OR^7$; OR^7 ; $C(O)R^7$; $C(O)N(R^7R^{7a})$; $S(O)_2N(R^7R^{7a})$; $S(O)N(R^7R^{7a})$; $S(O)_2R^7$; $S(O)R^7$; $N(R^7)S(O)_2N(R^{7a}R^{7b})$; $N(R^7)S(O)N(R^{7a}R^{7b})$; SR^7 ; $N(R^7R^{7a})$; NO_2 ; $OC(O)R^7$; $N(R^7)C(O)R^{7a}$; $N(R^7)S(O)_2R^{7a}$; $N(R^7)S(O)R^{7a}$; $N(R^7)C(O)N(R^{7a}R^{7b})$; $N(R^7)C(O)OR^{7a}$; $OC(O)N(R^7R^{7a})$; T^2 ; C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{11} 取代, 条件是一个 R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 是 R^{6e} ;

[0037] R^{6e} 是 $N(R^7)C(O)C(R^{11a})=C(R^{11b}R^{11c})$; $N(R^7)S(O)_2C(R^{11a})=C(R^{11b}R^{11c})$; 或 $N(R^7)C(O)C \equiv C(R^{11a})$;

[0038] 任选一对 R^6/R^{6a} 、 R^{6a}/R^{6b} 连接形成环 T^3 ;

[0039] R^7 、 R^{7a} 、 R^{7b} 独立地选自 H ; T^2 ; C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^8 取代;

[0040] R^8 是 卤素; CN ; $C(O)OR^9$; OR^9 ; $C(O)R^9$; $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$; $N(R^9)S(O)_2N(R^{9a}R^{9b})$; $N(R^9)S(O)N(R^{9a}R^{9b})$; SR^9 ; $N(R^9R^{9a})$; NO_2 ; $OC(O)R^9$; $N(R^9)C(O)R^{9a}$; $N(R^9)S(O)_2R^{9a}$; $N(R^9)S(O)R^{9a}$; $N(R^9)C(O)N(R^{9a}R^{9b})$; $N(R^9)C(O)OR^{9a}$; $OC(O)N(R^9R^{9a})$; 或 T^2 ;

[0041] R^9 、 R^{9a} 、 R^{9b} 独立地选自 H ; T^2 ; C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{12} 取代;

[0042] R^{10} 是 卤素; CN ; $C(O)OR^{13}$; OR^{13} ; 氧代 (=O), 其中该环至少部分饱和; $C(O)R^{13}$; $C(O)N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)_2N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)_2R^{13}$; $S(O)R^{13}$; $N(R^{13})S(O)_2N(R^{13a}R^{13b})$; $N(R^{13})S(O)N(R^{13a}R^{13b})$; SR^{13} ; $N(R^{13}R^{13a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{13}$; $N(R^{13})C(O)R^{13a}$; $N(R^{13})S(O)_2R^{13a}$; $N(R^{13})S(O)R^{13a}$; $N(R^{13})C(O)N(R^{13a}R^{13b})$; $N(R^{13})C(O)OR^{13a}$; $OC(O)N(R^{13}R^{13a})$; C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 或 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{14} 取代;

[0043] R^{13} 、 R^{13a} 、 R^{13b} 独立地选自 H ; C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{14} 取代;

[0044] R^{11} 、 R^{12} 独立地选自 卤素; CN ; $C(O)OR^{15}$; OR^{15} ; $C(O)R^{15}$; $C(O)N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)_2N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)_2R^{15}$; $S(O)R^{15}$; $N(R^{15})S(O)_2N(R^{15a}R^{15b})$; $N(R^{15})S(O)N(R^{15a}R^{15b})$; SR^{15} ; $N(R^{15}R^{15a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{15}$; $N(R^{15})C(O)R^{15a}$; $N(R^{15})S(O)_2R^{15a}$; $N(R^{15})S(O)R^{15a}$; $N(R^{15})C(O)N(R^{15a}R^{15b})$; $N(R^{15})C(O)OR^{15a}$; $OC(O)N(R^{15}R^{15a})$; 和 T^2 ;

[0045] R^{11a} 、 R^{11b} 、 R^{11c} 独立地选自 H ; 卤素; CN ; OR^{15} ; $C(O)N(R^{15}R^{15a})$; 和 C_{1-6} 烷基, 其中 C_{1-6} 烷基任选被一个或多个相同或不同的 R^{14} 取代;

[0046] R^{15} 、 R^{15a} 、 R^{15b} 独立地选自 H ; T^2 ; C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代;

[0047] R^{14} 是 卤素; CN ; $C(O)OR^{16}$; OR^{16} ; $C(O)R^{16}$; $C(O)N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)_2N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)_2R^{16}$; $S(O)R^{16}$; $N(R^{16})S(O)_2N(R^{16a}R^{16b})$; $N(R^{16})S(O)N(R^{16a}R^{16b})$; SR^{16} ; $N(R^{16}R^{16a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{16}$; $N(R^{16})C(O)R^{16a}$; $N(R^{16})S(O)_2R^{16a}$; $N(R^{16})S(O)R^{16a}$; $N(R^{16})C(O)N(R^{16a}R^{16b})$; $N(R^{16})C(O)OR^{16a}$; 或 $OC(O)N(R^{16}R^{16a})$;

[0048] R^{16} 、 R^{16a} 、 R^{16b} 独立地选自 H ; C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基; C_{2-6} 烯基; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代;

[0049] T^2 是苯基 ; 萘基 ; 茚基 ; 茚满基 ; C_{3-7} 环烷基 ; 4 至 7 元杂环基 ; 或 7 至 11 元杂双环基, 其中 T^2 任选被一个或多个相同或不同的 R^{17} 取代 ;

[0050] T^3 是苯基 ; C_{3-7} 环烷基 ; 或 4 至 7 元杂环基, 其中 T^3 任选被一个或多个相同或不同的 R^{18} 取代 ;

[0051] R^{17} 、 R^{18} 独立地选自卤素 ; CN ; $C(O)OR^{19}$; OR^{19} ; 氧代 (=O), 其中该环至少部分饱和 ; $C(O)R^{19}$; $C(O)N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)_2N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)_2R^{19}$; $S(O)R^{19}$; $N(R^{19})S(O)_2N(R^{19a}R^{19b})$; $N(R^{19})S(O)N(R^{19a}R^{19b})$; SR^{19} ; $N(R^{19}R^{19a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{19}$; $N(R^{19})C(O)R^{19a}$; $N(R^{19})S(O)_2R^{19a}$; $N(R^{19})S(O)R^{19a}$; $N(R^{19})C(O)N(R^{19a}R^{19b})$; $N(R^{19})C(O)OR^{19a}$; $OC(O)N(R^{19}R^{19a})$; C_{1-6} 烷基 ; C_{2-6} 烯基 ; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基 ; C_{2-6} 烯基 ; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{20} 取代 ;

[0052] R^{19} 、 R^{19a} 、 R^{19b} 独立地选自 H ; C_{1-6} 烷基 ; C_{2-6} 烯基 ; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基 ; C_{2-6} 烯基 ; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的 R^{20} 取代 ;

[0053] R^{20} 是 卤 素 ; CN ; $C(O)OR^{21}$; OR^{21} ; $C(O)R^{21}$; $C(O)N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)_2N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)_2R^{21}$; $S(O)R^{21}$; $N(R^{21})S(O)_2N(R^{21a}R^{21b})$; $N(R^{21})S(O)N(R^{21a}R^{21b})$; SR^{21} ; $N(R^{21}R^{21a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{21}$; $N(R^{21})C(O)R^{21a}$; $N(R^{21})S(O)_2R^{21a}$; $N(R^{21})S(O)R^{21a}$; $N(R^{21})C(O)N(R^{21a}R^{21b})$; $N(R^{21})C(O)OR^{21a}$; 或 $OC(O)N(R^{21}R^{21a})$;

[0054] R^{21} 、 R^{21a} 、 R^{21b} 独立地选自 H ; C_{1-6} 烷基 ; C_{2-6} 烯基 ; 和 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基 ; C_{2-6} 烯基 ; 和 C_{2-6} 炔基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代。

[0055] 令人惊讶地, 不受限于理论, 发现本发明化合物可以作为激酶抑制剂与它们的蛋白质靶点形成共价键, 因此与非共价抑制剂相比可能具有有利的性质, 因为它们可以不可逆地结合至它们的靶蛋白质, 并永远地将其失活。在不可逆地抑制靶点后, 重新合成蛋白质对恢复其功能可能是必要的。因此, 延长的药物作用时间可能将药物的药效学与药代动力学暴露分开 (Singh 等, 2011. Nat. Rev. Drug Discov. 10(4) : 307-317 ; Singh 等, 2010. Curr. Opin. Chem. Biol. 14(4) : 475-480)。

[0056] 如果变项或取代基可选自不同变项的组并且这样的变项或取代基出现超过一次时各个变项可以相同或不同。

[0057] 在本发明的含义中, 使用术语如下 :

[0058] 术语“任选取代的”是指未取代的或取代的。通常 - 但不限于 -, “一个或多个取代基”是指一个、两个或三个, 优选一个或两个且更优选一个取代基。通常这些取代基可以相同或不同。

[0059] “烷基”是指直链或支链的烃链。烷基碳的每个氢可被本文进一步说明的取代基取代。

[0060] “ C_{1-4} 烷基”是指具有 1-4 个碳原子的烷基链, 例如当存在于分子末端时 : 甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基, 或当分子的两个部分由烷基连接时, 例如 $-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH(C_2H_5)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 。 C_{1-4} 烷基碳的每个氢可被本文进一步说明的取代基取代。

[0061] “ C_{1-6} 烷基”是指具有 1-6 个碳原子的烷基链, 例如当存在于分子末端时 : C_{1-4} 烷基、甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基 ; 叔丁基、正戊基、正己基, 或当分子的两个部分由烷基连接时, 例如 $-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH(C_2H_5)-$ 、 $-C(C$

$\text{H}_3)_2-$ 。C₁₋₆ 烷基碳的每个氢可被本文进一步说明的取代基取代。

[0062] “C₃₋₇ 环烷基”或“C₃₋₇ 环烷基环”是指具有 3-7 个碳原子的环烷基链,例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环己烯基、环庚基。优选地,环烷基指的是环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基。环烷基碳的每个氢可被本文进一步说明的取代基取代。术语“C₃₋₅ 环烷基”或“C₃₋₅ 环烷基环”由此定义。

[0063] “卤素”是指氟、氯、溴或碘。通常优选卤素是氟或氯。

[0064] “4 至 7 元杂环基”或“4 至 7 元杂环”指的是含有 4、5、6 或 7 个环原子的环,其可含有最高达最大数量的双键(完全饱和、部分饱和或不饱和的芳香或非芳香环),其中至少一个环原子最高达 4 个环原子被选自硫(包括 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$)、氧和氮(包括 $=\text{N}(\text{O})-$)的杂原子替换,且其中该环通过碳或氮原子与分子剩余部分相连。4 至 7 元杂环的实例是氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、呋喃、噻吩、吡咯、吡咯啉、咪唑、咪唑啉、吡唑、吡唑啉、噁唑、噁唑啉、异噁唑、异噁唑啉、噻唑、噻唑啉、异噻唑、异噻唑啉、噻二唑、噻二唑啉、四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷、咪唑烷、吡唑烷、噁唑烷、异噁唑烷、噻唑烷、异噻唑烷、噻二唑烷、环丁砜、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、咪唑烷、吡啶、哒嗪、吡嗪、嘧啶、哌嗪、哌啶、吗啉、四唑、三唑、三唑烷、四唑烷、二氮杂环庚烷(diazepane)、氮杂环庚三烯(azepine)或高哌嗪(homopiperazine)。术语“5 至 6 元杂环基”或“5 至 6 元杂环”由此定义。

[0065] “饱和的 4 至 7 元杂环基”或“饱和的 4 至 7 元杂环”是指完全饱和的“4 至 7 元杂环基”或“4 至 7 元杂环”。

[0066] “芳香 5 至 6 元杂环基”或“芳香 5 至 6 元杂环”是指源自环戊二烯基或苯的杂环,其中至少一个碳原子被选自硫(包括 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$)、氧和氮(包括 $=\text{N}(\text{O})-$)的杂原子替换。这类杂环的实例是呋喃、噻吩、吡咯、咪唑、吡唑、噁唑、异噁唑、噻唑、异噻唑、噻二唑、三唑、四唑、吡啶、嘧啶、哒嗪、吡嗪、三嗪。

[0067] “5 元芳香杂环基”或“5 元芳香杂环”是指衍生自环戊二烯基的杂环,其中至少一个碳原子被选自硫(包括 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$)、氧和氮(包括 $=\text{N}(\text{O})-$)的杂原子替换。这类杂环的实例是呋喃、噻吩、吡咯、咪唑、吡唑、噁唑、异噁唑、噻唑、异噻唑、噻二唑、三唑、四唑。

[0068] “7 至 11 元杂双环基”或“7 至 11 元杂双环”是指具有 7 至 11 个环原子的双环杂环体系,其中至少一个环原子被两个环共有且可含有最高达最大数量的双键(完全饱和、部分饱和或不饱和的芳香或非芳香环),其中至少一个环原子最高达 6 个环原子被选自硫(包括 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$)、氧和氮(包括 $=\text{N}(\text{O})-$)的杂原子替换,且其中该环通过碳或氮原子与分子剩余部分相连。7 至 11 元杂双环的实例是吲哚、二氢吲哚、苯并呋喃、苯并噻吩、苯并噁唑、苯并异噁唑、苯并噻唑、苯并异噻唑、苯并咪唑、苯并咪唑啉、喹啉、喹唑啉、二氢喹唑啉、喹啉、二氢喹啉、四氢喹啉、十氢喹啉、异喹啉、十氢异喹啉、四氢异喹啉、二氢异喹啉、苯并氮杂环庚三烯(benzazepine)、嘌呤或蝶啶。术语 7 至 11 元杂双环还包括两环的螺结构如 6-氧杂-2-氮杂螺[3,4]辛烷、2-氧杂-6-氮杂螺[3,3]庚-6-基或 2,6-二氮杂螺[3,3]庚-6-基或桥杂环如 8-氮杂-双环[3.2.1]辛烷或 2,5-二氮杂双环[2.2.2]辛-2-基或 3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷。

[0069] “饱和的 7 至 11 元杂双环基”或“饱和的 7 至 11 元杂双环”是指完全饱和的“7 至 11 元杂双环基”或“7 至 11 元杂双环”。

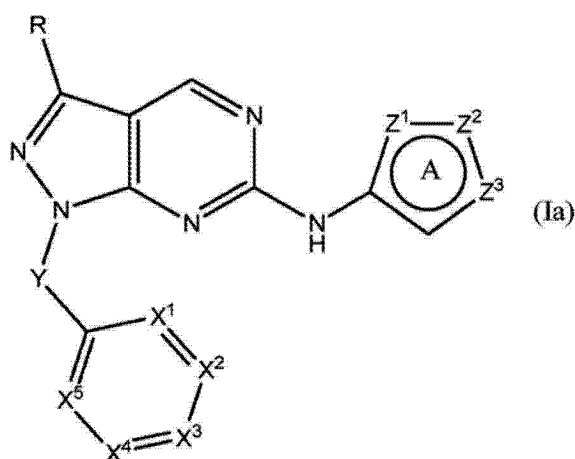
[0070] “芳香 9 至 11 元杂双环基”或“芳香 9 至 11 元杂双环”是指两个环的杂环系统,其中至少一个环是芳香的,且其中所述杂环系统含有 9 至 11 个环原子,其中两个环原子被两个环共享并且可能含有最大数量的双键(完全或部分芳香的),其中至少一个环原子至高达 6 个环原子被选自硫(包括 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$)、氧和氮(包括 $=N(O)-$)的杂原子替换,且其中该环通过碳或氮原子与分子剩余部分相连。芳香 9 至 11 元杂双环的实例为吡啶、二氢吡啶、苯并呋喃、苯并噻吩、苯并咪唑、苯并异咪唑、苯并噻唑、苯并异噻唑、苯并咪唑、苯并咪唑啉、喹啉、喹唑啉、二氢喹唑啉、二氢喹啉、四氢喹啉、异喹啉、四氢异喹啉、二氢异喹啉、苯并氮杂环庚三烯、嘌呤或蝶啶。

[0071] 优选的式(I)化合物是其中包含的一个或多个具有下文给出含义基团的那些化合物,优选的取代基定义的所有组合是本发明的主题。关于所有优选的式(I)化合物,本发明还包括所有互变异构体和立体异构体及其所有比例的混合物,及其药学上可接受的盐。

[0072] 在本发明的优选实施方案中,下文提到的取代基独立地具有以下含义。因此,这些取代基中一个或多个可具有下文给出的优选或更优选含义。

[0073] 优选地,在式(I)中,环 A、 Z^A 、 Z^B 定义被定义以得到式(Ia)

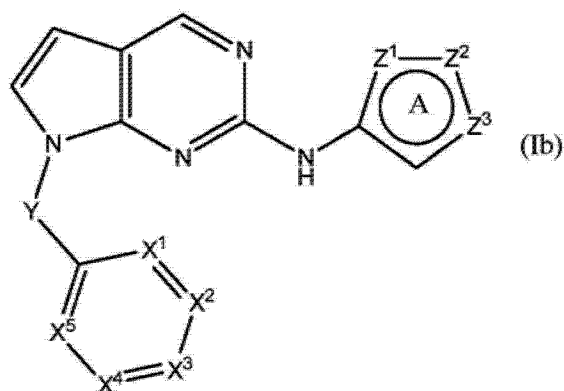
[0074]



[0075] 其中环 A 是芳香 5 元杂环,其中 Z^1 、 Z^2 和 Z^3 独立地选自 $C(R^1)$ 、 N 、 $N(R^1)$ 、 O 和 S ,条件是至少一个 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 为 N ;且其中 R 、 Y 、 X^1 至 X^5 和 R^1 如上定义。

[0076] 优选地,在式(I)中,环 A、 Z^A 、 Z^B 、 R 被定义以得到式(Ib)

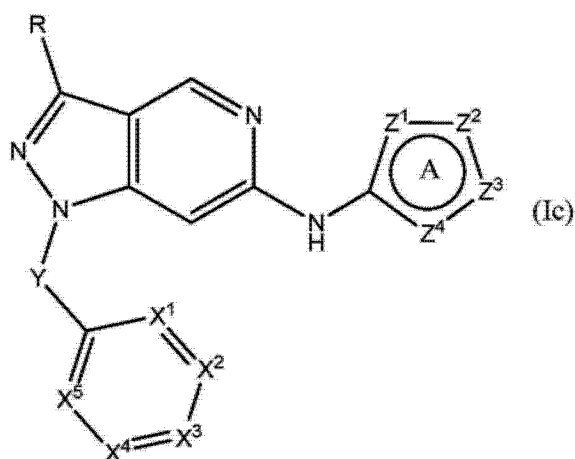
[0077]



[0078] 其中环 A 是 5 元芳香杂环, 其中 Z^1 、 Z^2 和 Z^3 独立地选自 $C(R^1)$ 、N、 $N(R^1)$ 、O 和 S, 条件是至少一个 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 为 N; 且其中 Y、 X^1 至 X^5 和 R^1 如上定义。

[0079] 优选地, 在式 (I) 中, 环 A、 Z^1 、 Z^2 和 Z^3 被定义以得到式 (Ic)

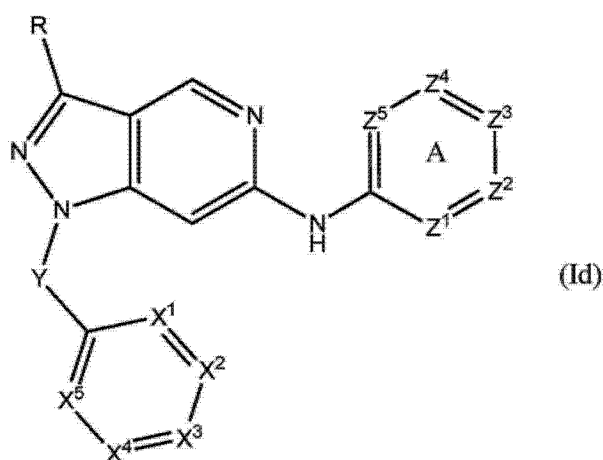
[0080]



[0081] 其中环 A 是芳香 5 元杂环, 其中 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 和 Z^4 独立地选自 $C(R^1)$ 、N、 $N(R^1)$ 、O 和 S, 条件是至少一个 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 为 N 或 $N(R^1)$; 且其中 R、Y、 X^1 至 X^5 和 R^1 如上定义。

[0082] 优选地, 在式 (I) 中, A、 Z^1 、 Z^2 和 Z^3 被定义以得到式 (Id)

[0083]



[0084] 其中在环 A 中 Z^1 为 $C(R^1)$ 或 N; Z^2 为 $C(R^1)$ 或 N; Z^3 为 $C(R^1)$ 或 N; Z^4 为 $C(R^1)$ 或 N; Z^5 为 $C(R^1)$ 或 N, 条件是最多两个 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 为 N;

[0085] 任选两个相邻的 R^1 与包括 Z^1 至 Z^5 的环连接共同形成芳香双环 T^0 ;

[0086] T^0 是芳香 9 至 11 元杂双环基; 萘基; 茛基; 或茛满基, 其中 T^0 任选被一个或多个相同或不同的 R^{1a} 取代;

[0087] R^{1a} 是卤素; CN ; $C(O)OR^2$; OR^2 ; 氧代 (=O), 其中所述环至少部分饱和; $C(O)R^2$; $C(O)N(R^2R^{2a})$; $S(O)_2N(R^2R^{2a})$; $S(O)N(R^2R^{2a})$; $S(O)_2R^2$; $S(O)R^2$; $N(R^2)S(O)_2N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)S(O)N(R^{2a}R^{2b})$; SR^2 ; $N(R^2R^{2a})$; NO_2 ; $OC(O)R^2$; $N(R^2)C(O)R^{2a}$; $N(R^2)S(O)_2R^{2a}$; $N(R^2)S(O)R^{2a}$; $N(R^2)C(O)N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)C(O)OR^{2a}$; $OC(O)N(R^2R^{2a})$; T^1 ; 或 C_{1-6} 烷基, 其中 C_{1-6} 烷基任选被一个或多个相同或不同的 R^3 取代; 和

[0088] 其中 R 、 R^1 、 R^2 、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^3 、 Y 、 X^1 至 X^5 和 R^1 如上定义。

[0089] 优选地, R 是 H 。

[0090] 优选地, Y 是 CH_2 。

[0091] 优选地, 没有或一个 (更优选没有) R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 是 N 。

[0092] 优选地, R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 独立地选自 R^{6e} ; H ; 卤素; 和 C_{1-6} 烷基, 其中 C_{1-6} 烷基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代, 条件是一个 R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 是 R^{6e} 。更优选地, 一个 R^6 、 R^{6a} 、 R^{6b} 、 R^{6c} 、 R^{6d} 是 R^{6e} 且其它最多两个 (更优选一个, 甚至更优选没有) 不是 H 。

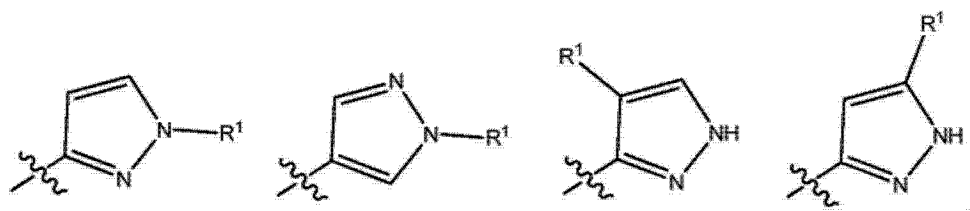
[0093] 优选地, R^7 、 R^{11a} 、 R^{11b} 、 R^{11c} 独立地选自 H ; 和 C_{1-4} 烷基, 其中 C_{1-4} 烷基任选被一个或多个相同或不同的卤素取代。

[0094] 优选地, R^{6a} 是 R^{6e} 。

[0095] 优选地, R^{6e} 是 $NHC(O)CH=CH_2$; $NHC(O)C(CH_3)=CH_2$; $NHC(O)CH=C(CH_3)_2$; $NHS(O)_2CH=CH_2$; 或 $NHC(O)C \equiv CH$ 。

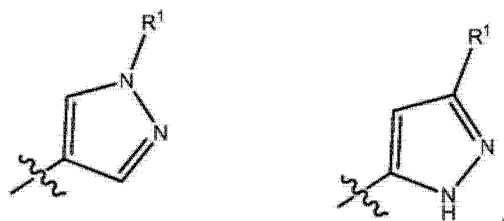
[0096] 优选地, 环 A 是吡唑、咪唑、异咪唑、三唑、苯基或吡啶环。更优选地, 环 A 是吡唑环; 甚至更优选的环选自:

[0097]



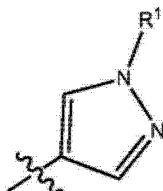
[0098] 甚至更优选为

[0099]



[0100] 甚至更优选为

[0101]



[0102] 优选地, 0、1 或 2 个 (更优选 0 或 1 个, 甚至更优选 1 个) 相同或不同的 R^1 不是 H。

[0103] 优选地, R^1 是 C_{1-4} 烷基, 其任选被 1 或 2 个相同或不同的 R^3 取代。优选地, R^1 是未取代的 C_{1-4} 烷基。

[0104] 优选地, R^3 是卤素; CN ; OR^4 ; $C(O)N(R^4R^{4a})$; 或 $C(O)T^1$ 。

[0105] 其中某些或所有上文提到的基团具有优选含义的式 (I) 化合物也是本发明的目的。

[0106] 进一步优选的本发明化合物选自

[0107] N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺;

[0108] N-(2-氟-5-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺;

[0109] N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丙炔酰胺;

[0110] N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)乙烯磺酰胺;

[0111] N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)甲基丙烯酰胺;

[0112] 3-甲基-N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丁-2-烯酰胺;

[0113] N-(3-((2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)甲基)苯基)乙烯磺酰胺;

[0114] N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺;

[0115] N-(3-((2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)甲基)苯基)丙烯酰胺; 和

[0116] N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺。

[0117] 当通式 (I) 化合物可存在互变异构 (例如酮-烯醇互变异构) 时, 独立的形式, 例如酮和烯醇形式, 被单独构成或以任何比例作为混合物一起被构成。所述互变异构适用于立体异构体, 例如对映异构体, 顺/反异构体, 构象异构体等。

[0118] 同位素标记的式 (I) 化合物 (“同位素衍生物”) 也在本发明的范围内。用于同位素标记的方法是本领域已知的。优选的同位素是元素 H、C、N、O 和 S 的同位素。

[0119] 如果需要, 异构体可通过本领域熟知的方法分离, 例如通过液相色谱法分离。所述方法适用于通过使用例如手性固定相的对映异构体。此外, 对映异构体可通过将其转变为

非对映异构体而分离,即与对映异构体纯(enantiomerically pure)的辅助化合物耦合,随后分离得到的非对映异构体并裂解辅助基团。或者,式(I)化合物的任何对映异构体可使用光学纯(optically pure)的初始物料由立体选择性合成而得到。

[0120] 式(I)化合物可以晶体或无定形体存在。此外,式(I)化合物的一些晶体可以多晶型体存在,其包括在本发明的范围内。式(I)化合物的多晶型形式可使用许多常规分析技术表征并区分,所述技术包括但不限于X-射线粉末衍射(XRPD)图、红外(IR)光谱、拉曼光谱、差示扫描量热法(DSC)、热重分析(TGA)和固态核磁共振(ssNMR)。

[0121] 如果式(I)化合物含有一个或多个酸性或碱性基团,则本发明也包括其相应药学或毒理学上可接受的盐,特别是其药学上可利用的盐。因此,含有酸性基团的式(I)化合物可根据本发明,用作例如碱金属盐、碱土金属盐或铵盐。该类盐更精确的实例包括钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或铵盐或有机胺盐,例如乙胺、乙醇胺、三乙醇胺或氨基酸盐。含有一个或多个碱性基团(即可质子化的基团)的式(I)化合物可以其与无机或有机酸的加成盐形式存在或根据本发明使用。合适酸的实例包括盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、乙二酸、乙酸、酒石酸、乳酸、水杨酸、苯甲酸、甲酸、丙酸、新戊酸、二乙基乙酸、丙二酸、丁二酸、庚二酸、富马酸、马来酸、苹果酸、氨基磺酸、苯基丙酸、葡糖酸、抗坏血酸、异烟酸、柠檬酸、己二酸以及本领域技术人员已知的其它酸。如果式(I)化合物在分子中同时含有酸性和碱性基团,则本发明除提到的盐形式之外也包括内盐或内铵盐(两性离子)。式(I)的各种盐可通过本领域技术人员已知的常规方法得到,例如通过将这些化合物在溶剂或分散剂中与有机或无机酸或碱接触,或通过与其它盐进行阴离子交换或阳离子交换。本发明也包括如下的式(I)化合物的所有盐,其由于低生理相容性,不直接适用于医药应用,但其可用于例如作为化学反应中间体或药学上可接受的盐的制备。

[0122] 在整个本发明中,术语“药学上可接受的”是指相应的化合物、载体或分子适用于人类给药。优选地,该术语是指由管理机构如 EMEA(欧洲)和/或 FDA(美国)和/或任何其它国家管理机构批准用于动物,优选人类。

[0123] 本发明还包括本发明化合物的所有溶剂合物。

[0124] 根据本发明,“JAK”包含 JAK 家族的所有成员(例如 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2)。

[0125] 根据本发明,表达式“JAK1”或“JAK1 激酶”是指“Janus 激酶 1”。

[0126] 根据本发明,表达式“JAK2”或“JAK2 激酶”是指“Janus 激酶 2”。

[0127] 根据本发明,表达式“JAK3”或“JAK3 激酶”是指“Janus 激酶 3”。编码 JAK3 的基因位于人染色体 19p13.1 中且其主要存在于造血干细胞中。JAK3 是与白介素 2(IL-2)受体的 γ 链相关连的胞浆蛋白酪氨酸激酶。该链也用作几种嗜淋巴细胞因子(包括白细胞介素 IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-21)受体组分的作用(Schindler 等,2007. J. Biol. Chem. 282(28):20059-63)。JAK3 在免疫细胞对细胞因子的响应中,尤其在肥大细胞、淋巴细胞和巨噬细胞中起重要作用。JAK3 的抑制在预防移植排斥中显示有效作用(Changelian 等,2003, Science302(5646):875-888)。

[0128] 此外,根据本发明,表达式“JAK3”或“JAK3 激酶”包括 JAK3 的突变形式,优选见于急性成巨核细胞白血病(AMKL)患者中的 JAK3 突变。更优选地,这些突变是单氨基酸突变。在急性成巨核细胞白血病(AMKL)患者中观察到激活 JAK3 突变(Walters 等,2006. Cancer Cell110(1):65-75)。因此,在一个优选实施方案中,表达式“JAK”也包括具有 V722I 或 P132T

突变的 JAK3 蛋白。

[0129] 根据本发明, 表达式“TYK2”或“TYK2 激酶”是指“蛋白酪氨酸激酶 2”。

[0130] 根据本发明, 表达“BTK”是指“Bruton's 酪氨酸激酶”。

[0131] 根据本发明, 表达“BLK”是指“B- 淋巴细胞特异性激酶”。

[0132] 根据本发明, 表达“ITK”是指“白介素 -2 (IL-2)- 可诱导的 T 细胞激酶”。

[0133] 根据本发明, 表达“TEC”是指“TEC 激酶”。

[0134] 如实施例所述, 测试了本发明化合物的效力、选择性、有效性和作用方式。在 JAK 家族中, 所有测试的化合物与 JAK3 的结合强于与 JAK1、JAK2 和 TYK2 的结合 (见表 6)。

[0135] 本发明化合物有效地结合至 BTK、BLK、ITK 和 TEC (见表 8) 并抑制激酶功能 (见表 10)。在细胞的清除研究中, 证明了预期为共价抑制剂的本发明化合物显示了长效药理作用至高达四小时, 而两种参考抑制剂显示了较短的活性 (见表 12)。另外, 质谱分析证明了实施例 1 共价结合至 JAK3 的丝氨酸残基 909 (Cys909) (见表 15)。

[0136] 因此, 本发明化合物被认为可用于预防或治疗与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病和病症, 例如免疫性、炎性、自身免疫性或变应性病症、移植排斥、移植物抗宿主病或增生性疾病如癌症。

[0137] 在一个优选实施方案中, 本发明化合物是选择性 JAK3 抑制剂。

[0138] 本发明提供药物组合物, 其包含式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分以及药学上可接受的载体, 任选地与一种或多种其它药物组合物组合。

[0139] “药物组合物”是指一种或多种活性成分和一种或多种构成载体的惰性成分, 以及由以下直接或间接得到的产品, 该产品由任何两种或更多种成分的组合、复合或聚集得到, 或由一种或多种成分的分离得到, 或由一种或多种成分的其它类型的反应或相互作用得到。因此, 本发明的药物组合物包括通过将本发明化合物和药学上可接受的载体混合而得到的任意组合物。

[0140] 术语“载体”指的是给药治疗药物的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这种药物载体可以是无菌液体, 如水或油, 包括石油、动物、植物或合成来源的那些, 包括但不限于花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物口服给药时水是优选载体。当药物组合物静脉给药时盐水和葡萄糖水溶液是优选载体。对于注射溶液优选使用盐水溶液和葡萄糖水溶液以及甘油溶液作为液体载体。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米 (rice)、面粉、白垩 (chalk)、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、干燥的脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要, 该组合物也可以含有少量润湿剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。这些组合物可采取溶液剂、悬浮剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、缓释制剂等形式。该组合物可用传统的粘合剂和载体如甘油三酯制成栓剂。口服制剂可包括标准载体如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的实例描述于 E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。这种组合物将含有治疗有效量的治疗剂, 优选地以纯化的形式, 与合适量的载体一起从而提供适当给药患者的形式。制剂应适合给药方式。

[0141] 本发明的药物组合物可包含一种或多种其它化合物作为活性成分, 如不是组合物中的首要化合物的一种或多种式 (I) 化合物或其它 JAK 抑制剂。其它生物活性化合物可以是类固醇、白三烯拮抗剂、环孢霉素或雷帕霉素。

[0142] 本发明化合物或其药学上可接受的盐及其它药学活性剂可以一起或单独给药,当单独给药时,可以任何顺序单独或相继给药。当在同一制剂中组合时,应理解为两种化合物必须是稳定的且彼此和与制剂的其它组分相容。当单独配制时,它们可以任何方便的制剂提供,方便地以对于本领域的这种化合物所已知的方式提供。

[0143] 本发明进一步包括使式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或包含式 (I) 化合物的药物组合物与其它药物或药学活性剂组合给药和 / 或本发明的药物组合物进一步包含这种药物或药学活性剂。

[0144] 在上下文中,术语“药物或药物活性剂”包括将引起组织、系统、动物或人的生物或医学反应的药物或药剂,其是例如研究者或临床医生所追求的。

[0145] “组合的 (Combined)”或“相组合 (in combination)”或“组合 (combination)”应理解为功能性共同给药 (functional coadministration),其中一些或所有化合物可以不同的制剂、不同的给药方式 (例如皮下、静脉或口服) 和不同的给药次数单独给药。该类组合的单个化合物可以单独的药物组合物相继给药以及以结合的药物组合物同时给药。

[0146] 例如,在类风湿性关节炎治疗中,可考虑与其它化学治疗剂或抗体剂组合。可用于与本发明化合物及其盐组合用于类风湿性关节炎治疗的药学活性剂的合适实例包括:免疫抑制剂,如呱氨托美丁、咪唑立宾和利美索龙;抗 TNF α 剂,如依那西普、英夫利昔、阿达木单抗、阿那白滞素 (Anakinra)、阿贝西普 (Abatacept)、利妥希玛 (Rituximab);酪氨酸激酶抑制剂,如来氟米特;激肽释放酶拮抗剂,如 subreum;白细胞介素 11 激动剂,如奥普瑞白介素 (oprelvekin); β 1 干扰素激动剂;透明质酸激动剂,如 NRD-101 (安万特 (Aventis)); 白细胞介素 1 受体拮抗剂,如阿那白滞素;CD8 拮抗剂,如盐酸氨普立糖; β 淀粉样前体蛋白拮抗剂,如 reumacon;基质金属蛋白酶抑制剂,如西马司他及其它缓解疾病的抗风湿药 (DMARD),如甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、环孢霉素 A、羟氯喹、金诺芬、金硫葡萄糖、硫代苹果酸金钠和青霉胺。

[0147] 特别地,本文定义的治疗剂可以用作单独治疗,或除本发明化合物之外还可包括常规手术或放射疗法或化学疗法。因此,本发明化合物也可与现有的治疗剂结合用于治疗增生性疾病如癌症。组合使用的合适药剂包括:

[0148] (i) 抗增殖 / 抗肿瘤药物及其结合,用于肿瘤内科如烷基化试剂 (例如顺铂、卡铂、环磷酰胺、氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安和亚硝基脲);抗代谢物 (例如叶酸拮抗剂如氟嘧啶例如 5- 氟尿嘧啶和替加氟、雷替曲塞、甲氨蝶呤、胞嘧啶阿拉伯糖苷、羟基脲) 和吉西他滨);抗肿瘤抗生素 (例如蒽环类药物如阿霉素、博来霉素、多柔比星、柔红霉素、表阿霉素、去甲氧柔红霉素、丝裂霉素、放线菌素和光辉霉素);抗有丝分裂剂 (例如长春花生物碱如长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨以及紫杉烷类物质 (taxoids) 如紫杉醇和泰索帝);和拓扑异构酶抑制剂 (例如鬼臼毒素类如依托泊苷和替尼泊苷、安吡啶、拓扑替康和喜树碱);

[0149] (ii) 细胞抑制剂如抗雌激素作用药 (例如他莫昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬和 iodoxyfene)、雌激素受体下调剂 (例如氟维司群)、抗雄激素 (例如比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特和醋酸环丙孕酮)、LHRH 拮抗剂或 LHRH 激动剂 (例如戈舍瑞林、亮丙瑞林布舍瑞林)、孕激素 (例如醋酸甲地孕酮)、芳香酶抑制剂 (例如阿那曲唑、来曲唑、vorazole 和依西美坦) 和 5 α - 还原酶抑制剂如非那雄胺;

[0150] (iii) 抗侵袭剂 (anti-invasion agents) (例如 c-Src 激酶家族抑制剂如 4-(6-氯-2,3-亚甲基二氧基苯胺基)-7-[2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙氧基]-5-四氢吡喃-4-基氧基-喹唑啉 (AZD0530) 和 N-(2-氯-6-甲基苯基)-2-{6-[4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-基]-2-甲基嘧啶-4-基氨基} 噻唑-5-甲酰胺 (达沙替尼, BMS-354825) 以及金属蛋白酶抑制剂如马立马司他和尿激酶纤溶酶原激活剂受体功能抑制剂);

[0151] (iv) 生长因子功能抑制剂: 例如这种抑制剂包括生长因子抗体和生长因子受体抗体 (例如抗 erbB2 抗体曲妥单抗 [HerceptinTM] 和抗 erbB1 抗体西妥昔单抗 [C225]); 这种抑制剂也包括例如酪氨酸激酶抑制剂, 例如表皮生长因子家族抑制剂 (例如 EGFR 家族酪氨酸激酶抑制剂如 N-(3-氯-4-氟苯基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉代丙氧基) 喹唑啉-4-胺 (吉非替尼 (gefitinib), ZD1839)、 Λ /(3-乙炔基苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基) 喹唑啉-4-胺 (厄洛替尼 (erlotinib), OSI-774) 和 6-丙烯酰胺基- Λ /(3-氯-4-氟苯基)-7-(3-吗啉代丙氧基)-喹唑啉-4-胺 (CI1033) 和 erbB2 酪氨酸激酶抑制剂如拉帕替尼 (lapatinib)、肝细胞生长因子家族抑制剂、血小板衍生生长因子家族抑制剂如伊马替尼、丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂 (例如 Ras/Raf 信号传导抑制剂如法尼基转移酶抑制剂, 例如索拉非尼 (BAY43-9006)) 以及通过 MEK 和 / 或 Akt 激酶的细胞信号传导 de 抑制剂;

[0152] (v) 抗血管生成剂如抑制血管内皮生长因子作用的那些, 例如抗血管内皮细胞生长因子抗体贝伐单抗 (AvastinTM) 和 VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂如 4-(4-溴-2-氟苯胺基)-6-甲氧基-7-(1-甲基哌啶-4-基甲氧基) 喹唑啉 (ZD6474; W001/32651 的实施例 2)、4-(4-氟-2-甲基吡啶-5-基氧基)-6-甲氧基-7-(3-吡咯烷-1-基丙氧基) 喹唑啉 (AZD2171; W000/47212 的实施例 240)、vatalanib (PTK787; W098/35985) 和 SU11248 (舒尼替尼; W001/60814)), 或以其它机制作用的化合物 (例如利诺胺、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 功能抑制剂和血管抑素);

[0153] (vi) 血管损伤剂如考布他汀 A4 和在国际专利申请 W099/02166 中公开的化合物;

[0154] (vii) 反义治疗, 例如针对上文列出的靶标的那些, 如 ISIS2503, 一种抗 ras 反义剂;

[0155] (viii) 基因治疗方法, 包括替代异常基因如异常 p53 或异常 BRCA1 或 BRCA2 的方法; GDEPT (基因导向酶前体药物疗法) 方法, 如那些使用胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或细菌硝基还原酶的方法和增加患者对化疗或放射治疗耐受能力的方法, 如多药耐受基因治疗法; 和 (ix) 免疫治疗方法, 包括体外和体内方法以提高患者肿瘤细胞的免疫原性, 如用细胞因子如白细胞介素 2、白细胞介素 4 或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子转染、减少 T 细胞无反应性的方法、使用转染的免疫细胞如细胞因子转染的树突细胞的方法、使用细胞因子转染的肿瘤细胞系的方法和使用抗独特型抗体的方法。

[0156] 其它结合治疗描述于 WO-A2009/008992 和 WO-A2007/107318 中, 其通过引用并入本文中。

[0157] 因此, 这种结合的单一化合物可以单独的药物组合物相继给药以及以结合的药物组合物同时给药。

[0158] 本发明的药物组合物包括适用于口服、直肠、局部、肠胃外 (包括皮下、肌肉内和静脉内)、眼部 (眼的)、肺部 (鼻或口腔吸入) 或鼻腔给药的组合物, 但在任何给定情况下最适当的途径取决于治疗病状的性质和严重性以及活性成分的性质。它们可便利地以单位

剂量形式提供并通过药学领域熟知的任何方法制备。

[0159] 在实际应用中,式(I)化合物可在紧密掺混物(intimate admixture)中作为活性成分与根据传统药学配合技术的药用载体结合。载体可以根据给药所需的制剂形式而采用广泛的形式,例如口服或肠胃外(包括静脉内)。在制备用于口服剂量形式的组合物时,可以采用任何通常的药用媒介,如水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等,在口服液体制剂情况下如悬浮剂、酏剂(elixir)和溶液剂;或载体如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等,在口服固体制剂情况下如粉末剂、硬胶囊和软胶囊和片剂,且固体口服制剂比液体制剂优选。

[0160] 由于给药简便,片剂和胶囊代表最有利的口服剂量单位形式,在该情况下显而易见地采用固体药用载体。如果需要,片剂可通过标准含水或无水技术包衣。这种组合物和制剂应含有至少0.1%的活性化合物。这些组合物中活性化合物的百分比当然可以变化并可便利地为单位(unit)的约2重量%至约60重量%。在这种治疗有用的组合物中活性化合物的量是使得到有效剂量的量。活性化合物也可鼻腔内给药,例如,作为液滴或喷雾。

[0161] 片剂、丸剂、胶囊剂等也可含有粘合剂如黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂如磷酸氢钙;崩解剂如玉米淀粉、马铃薯淀粉、褐藻酸;润滑剂如硬脂酸镁;以及甜味剂如蔗糖、乳糖或糖精。当剂量单位形式是胶囊时,除上述类型的材料之外其可以含有液体载体如脂肪油。

[0162] 各种其它材料可作为涂层存在或存在以改变剂量单位的物理形式。例如,片剂可涂上虫胶、糖或两者。糖浆或酏剂除活性组分之外可含有作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的 对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、染料和香料如樱桃香精或桔子香精。

[0163] 式(I)化合物也可肠胃外给药。这些活性化合物的溶液剂或悬浮剂可在水中与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合而制备。分散剂也可在甘油、液体聚乙二醇及其在油中的混合物中制备。在储存和使用的一般条件下,这些制剂含有防腐剂以预防微生物生长。

[0164] 适用于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散剂和用于即时制备无菌注射溶液剂或分散剂的无菌粉末。在所有情况下,该形式必须无菌且必须是达到易于注射程度的液体。所述形式必须在生产和储存条件下稳定且必须保护以预防微生物如细菌和真菌的污染行为。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如乙二醇、丙二醇和液态聚乙二醇)、其合适的混合物以及植物油。

[0165] 任何合适的给药途径都可用于提供哺乳动物,尤其是人类以有效剂量的本发明化合物。例如,可使用口服、直肠、局部、肠胃外、眼部、肺部、鼻腔给药等。剂量形式包括片剂、锭剂、分散剂、悬浮剂、溶液剂、胶囊剂、乳膏剂、软膏剂、气溶胶等。优选式(I)化合物口服给药。

[0166] 使用的活性组分的有效剂量可以根据使用的特定化合物、给药模式、治疗病状和治疗病状的严重程度而改变。此类剂量可以由本领域技术人员容易确定。

[0167] 本发明化合物的治疗有效量通常取决于许多因素,包括例如动物的年龄和重量、需要治疗的精确病状及其严重性、制剂的性质以及给药途径。然而,式(I)化合物用于治疗炎症疾病(例如类风湿性关节炎(RA))的有效量通常在每天0.1至100mg/kg受者(哺乳动物)体重范围内且更通常在每天1至10mg/kg受者体重范围内。因此,对于70kg的成年哺乳动物,每天的实际用量通常为70至700mg且该用量可以每天单剂量给药或更通常为每

天多次（如两次、三次、四次、五次或六次）分剂量给药从而使总日剂量相同。其药学上可接受的盐、前药或代谢物的有效量可按式（I）化合物本身有效量的比例确定。预期相似剂量也适合于治疗上文指出的其它病状。

[0168] 如本文使用的，术语“有效量”是指将引起组织、系统、动物或人的生物或医学反应的药物或药物制剂的量，所反应是例如研究者或临床医生所追求的。

[0169] 此外，术语“治疗有效量”是指与未接受该用量的相应受试者相比，能使对疾病、病症或副作用的治疗、治愈、预防或改善有所提高，或使疾病或病症的进展速率（rate of advancement）降低的任何用量。该术语也包括在其用量范围内能有效地增强正常的生理功能。

[0170] 本发明的另一方面是本发明化合物或其药学上可接受的盐作为药物。

[0171] 本发明的另一方面是本发明化合物或其药学上可接受的盐用在治疗和预防与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病或病症的方法中。

[0172] 在本发明的上下文中，与 JAK3、BTK、BLK、ITK 和 TEC 相关的疾病或病症定义为其中涉及 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 的疾病或病症。

[0173] 在一个优选实施方案中，其中与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病或病症是免疫性、炎性、自身免疫性或变应性病症或疾病或移植排斥或移植物抗宿主病。

[0174] 因此，本发明的另一方面是本发明化合物或其药学上可接受的盐用在治疗或预防免疫性、炎性、自身免疫性或变应性病症或疾病或移植排斥或移植物抗宿主病的方法中。

[0175] 组织和器官的炎症在广泛的病症和疾病中发生并在由于激活细胞因子受体家族而产生的某些变种中发生。与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 激活相关的示例性炎症病症以非限制性的方式包括辐射照射引起的皮肤炎症、哮喘、变应性炎症和慢性炎症。

[0176] 根据本发明，自身免疫性疾病是至少部分由机体对自身组分（例如蛋白质、脂质或 DNA）的免疫反应引起的疾病。器官特异性自身免疫性病症的实例是影响胰腺的胰岛素依赖型糖尿病（I 型）、影响甲状腺的桥本氏甲状腺炎和格雷夫斯病、影响胃的恶性贫血、影响肾上腺的库欣病和阿狄森病、影响肝脏的慢性活动性肝炎；多囊性卵巢综合症（PCOS）、腹腔疾病、银屑病、炎性肠病（IBD）和强直性脊柱炎。非器官特异性自身免疫性病症的实例是类风湿性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮和重症肌无力。

[0177] I 型糖尿病由自身反应性 T 细胞对分泌胰岛素的胰岛 β 细胞的选择性进攻而继发。在这种疾病中以 JAK3 为靶标是基于这样的观察：已知通过 JAK 途径传导信号的多种细胞因子参与 β 细胞的 T 细胞介导的自身免疫性损伤。事实上，JAK3 抑制剂，JANEX-1 在 I 型糖尿病的 NOD 小鼠模型中显示预防自发的自身免疫性糖尿病的发展。

[0178] 在一个优选实施方案中，自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎（RA）、炎性肠病（IBD；克罗恩病和溃疡性结肠炎）、银屑病、系统性红斑狼疮（SLE）和多发性硬化（MS）。

[0179] 类风湿性关节炎（RA）是影响大约 1% 世界人口的慢性进行性衰弱性炎症性疾病。RA 是主要影响手足小关节的对称多发性关节炎。除滑膜（synovium）、关节内衬中的炎症之外，称作血管翳（pannus）的组织攻击正面会侵略并破坏局部关节结构（Firestein2003, Nature423 :356-361）。

[0180] 炎性肠病（IBD）的特征在于慢性复发性肠道炎症。IBD 进一步分为克罗恩病和溃疡性结肠炎。克罗恩病最经常涉及末端回肠和结肠，是透壁的和间断的。相反，在溃疡性

结肠炎中,炎症是连续的且局限于直肠和结肠黏膜层。大约 10% 的情况局限于直肠和结肠,克罗恩病或溃疡性结肠炎无法明确分类且被指定为是“未确定型结肠炎 (indeterminate colitis)”。两种疾病均包括皮肤、眼睛或关节的肠外炎症。中性粒细胞诱导的伤害可通过使用中性粒细胞迁移抑制剂而预防 (Asakura 等,2007, World J Gastroenterol.13(15) : 2145-9)。

[0181] 银屑病是影响大约 2% 人口的慢性炎症性皮肤病。其特征在于通常出现于头皮、肘部和膝盖的红色鳞状皮肤斑并可能与严重的关节炎相关。这种损伤是由角质化细胞异常增殖和炎症细胞渗透进入真皮和表皮而引起的 (Schön 等,2005, New Engl. J. Med. 352 : 1899-1912)。

[0182] 系统性红斑狼疮 (SLE) 是由 T 细胞介导的 B 细胞激活产生的慢性炎症性疾病,其导致肾小球肾炎和肾功能衰竭。人类 SLE 的早期特征在于长期自身反应性 CD4+ 记忆细胞的扩增 (D' Cruz 等,2007, Lancet369(9561) :587-596)。

[0183] 多发性硬化 (MS) 是炎症和脱髓鞘性神经系统疾病 (demyelating neurological disease)。其被认为是 CD4+ 型 T 辅助细胞介导的自身免疫性病症,但近期研究指出其它免疫细胞的作用 (Hemmer 等,2002, Nat. Rev. Neuroscience3, 291-301)。

[0184] 在优选的实施方案中,所述过敏性疾病选自哮喘、慢性阻塞性肺病 (COPD)、成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、支气管炎、结膜炎、皮炎和过敏性鼻炎。

[0185] 肥大细胞表达 JAK3 并且 JAK3 是 IgE 介导的肥大细胞响应 (包括炎症介质的释放) 的主要调节剂。JAK3 被证明是治疗肥大细胞介导的过敏性反应的有效靶标。与肥大细胞激活相关的变应性病症包括 I 型速发型超敏反应如过敏性鼻炎 (花粉症)、过敏性荨麻疹 (荨麻疹)、血管性水肿、过敏性哮喘和过敏性反应例如过敏性休克。这些病症可通过抑制 JAK3 活性而治疗或预防,例如通过给药本发明的 JAK3 抑制剂。

[0186] 移植排斥 (同种异体移植排斥) 包括但不限于例如肾脏、心脏、肝脏、肺、骨髓、皮肤和角膜移植后的急性和慢性同种异体移植排斥。已知 T 细胞在同种异体移植排斥的特异性免疫应答中起到主要作用。可以治疗超急性、急性和慢性器官移植排斥。超急性排斥发生在移植后的几分钟内。急性排斥通常发生在移植后的 6 至 12 个月内。当用免疫抑制剂治疗时,超急性和急性排斥通常是可逆的。慢性排斥的特征在于器官功能逐渐丧失,其由于可发生在移植后的任何时间因而对于移植受体是持续关注的。

[0187] 移植物抗宿主病 (GVHD) 是同种骨髓移植 (BMT) 中的主要并发症。GVHD 由识别并对组织相容性复合体系统中的受体差异反应的供体 T 细胞引发,导致显著的发病率和死亡率。JAK3 在 GVHD 的诱导中起重要作用且使用 JAK3 抑制剂 (JANEX-1) 治疗已证实可减轻 GVHD 的严重性 (参见 Cetkovic-Cvrlje 和 Ucken,2004)。

[0188] 哮喘是在成人和儿童中均具有许多临床表型的复杂综合征。其主要特征包括各种程度的通气障碍、支气管高反应性和气道炎症 (Busse and Lemanske, 2001, N. Engl. J. Med. 344:350-362)。

[0189] 慢性阻塞性肺病 (COPD) 特征在于炎症、不能完全可逆的通气限制以及逐渐丧失肺功能。在 COPD 中,慢性吸入刺激物导致异常炎症应答、气道重塑和肺中的通气限制。吸入的刺激物通常为烟草烟雾,但是职业灰尘和环境污染也不断涉及 (Shapiro2005, N. Engl. J. med. 352, 2016-2019)。

[0190] 在一个优选实施方案中,炎性疾病是眼病。

[0191] 干眼症 (DES, 也称为干燥性角膜结膜炎) 是眼科医生治疗的最常见问题之一。有时 DES 被称为泪液功能不全综合征 (Jackson, 2009. *Canadian Journal Ophthalmology* 44(4), 385-394)。DES 影响最高达 10% 的年龄在 20 至 45 岁之间的人口,且百分比随年龄增长。尽管可利用许多种类的人工泪液产品,但这些产品仅提供症状的暂时缓解。因此,需要治疗干眼的制剂、组合物和治疗方法。

[0192] 如本文使用的,“干眼症”意图包括干眼症研讨会 (DEWS) 最近的官方报告中总结的病状,其定义干眼为“眼泪和眼球表面的多因素疾病,其导致不适症状、视觉障碍和具有眼球表面潜在伤害的泪膜不稳定性。该病伴随有泪膜的渗透压增加和眼球表面的炎症。” (Lemp, 2007. “The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop”, *The Ocular Surface*, 5(2), 75-92)。干眼有时也称为干燥性角膜结膜炎。在一些实施方案中,干眼症的治疗包括改善干眼症的特定症状,如眼部不适、视觉障碍、泪膜不稳定、眼泪高渗透压和眼球表面的炎症。

[0193] 葡萄膜炎是眼内炎症的最常见形式且仍然是失明的重要原因。目前用于葡萄膜炎的治疗使用全身药物,其具有严重副作用且为完全免疫抑制的。临床上,非感染性葡萄膜炎的慢性渐进性或复发形式使用局部和 / 或全身性类固醇治疗。此外,使用大环内酯类如环孢霉素和雷帕霉素,且在有些情况下使用细胞毒性剂如环磷酰胺和苯丁酸氮芥,以及抗代谢药物如硫唑嘌呤、甲氨蝶呤和来氟米特 (Srivastava 等, 2010. *Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. Clinica Chimica Acta*, doi:10.1016/j.cca.2010.04.017)。

[0194] 其它眼部疾病、结合治疗和给药途径描述于例如 WO-A2010/039939 中,其在此通过引用并入本文中。

[0195] 在另一个优选实施方案中,与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病或病症是增生性疾病,尤其是癌症。

[0196] 与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 尤其相关的疾病和病症是增殖性病症或疾病,尤其是癌症。

[0197] 因此,本发明的另一个方面是本发明化合物或其药学上可接受的盐用在治疗或防治增生性疾病 (尤其是癌症) 的方法中。

[0198] 癌症包含一组特征在于异常细胞的失控生长和扩散的疾病。癌症的所有类型通常包括在细胞生长、分裂和存活控制中的一些异常,导致细胞恶性生长。促进所述细胞恶性生长的关键因素是不依赖于生长信号、对抗生长信号不敏感、逃避细胞凋亡、无限复制潜力、持续的血管生成、组织入侵和转移、以及基因组不稳定 (Hanahan 和 Weinberg, 2000. *The Hallmarks of Cancer. Cell* 100, 57-70)。

[0199] 通常,癌症分类为血液癌症 (hematological cancer) (例如白血病和淋巴瘤和实体癌症如肉瘤和癌 (例如脑癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌))。

[0200] 本发明的激酶抑制剂也可用于治疗某些恶性肿瘤,包括皮肤癌和血液恶性肿瘤如淋巴瘤和白血病。

[0201] 尤其是其中 JAK-STAT 信号转导通路被激活（例如由于 JAK3 的激活）的癌症，被认为响应 JAK3 抑制剂的治疗。包含 JAK3 突变的癌症的实例是急性成巨核细胞白血病（AMKL）（Walters 等，2006. *Cancer Cell* 10(1) :65-75）和乳腺癌（Jeong 等，2008. *Clin. Cancer Res.* 14, 3716-3721）。

[0202] 本发明的另一方面是本发明化合物或其药学上可接受的盐用于制备治疗或预防与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病和病症的药物的用途。

[0203] 本发明的另一方面是本发明化合物或其药学上可接受的盐用于制备治疗或预防免疫性、炎性、自身免疫性或变应性病症或疾病或移植排斥或移植物抗宿主病的药物的用途。

[0204] 本发明的另一方面是本发明化合物或其药学上可接受的盐用于制备治疗或预防增生性疾病（尤其是癌症）的药物的用途。

[0205] 在本发明这些用途的上下文中，与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病和病症如上文所定义。

[0206] 本发明的另一方面是一种用于在需要其的哺乳动物患者中治疗、控制、延迟或预防一种或多种选自与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病或病症的病状的方法，其中该方法包括对所述患者给药治疗有效量的本发明化合物或其药学上可接受的盐。

[0207] 本发明的另一方面是一种用于在需要其的哺乳动物患者中治疗、控制、延迟或预防一种或多种选自免疫性、炎性、自身免疫性或变应性病症或疾病或移植排斥或移植物抗宿主病的病状的方法，其中该方法包括对所述患者给药治疗有效量的本发明化合物或其药学上可接受的盐。

[0208] 本发明的另一方面是一种用于在需要其的哺乳动物患者中治疗、控制、延迟或预防增生性疾病（尤其是癌症）的方法，其中该方法包括对所述患者给药治疗有效量的本发明化合物或其药学上可接受的盐。

[0209] 在本发明这些方法的上下文中，与 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC 相关的疾病和病症如上文所定义。

[0210] 在本发明的这些方法的上下文中，本发明化合物优选共价结合至 JAK3、BTK、BLK、ITK 或 TEC，优选共价结合至半胱氨酸残基。

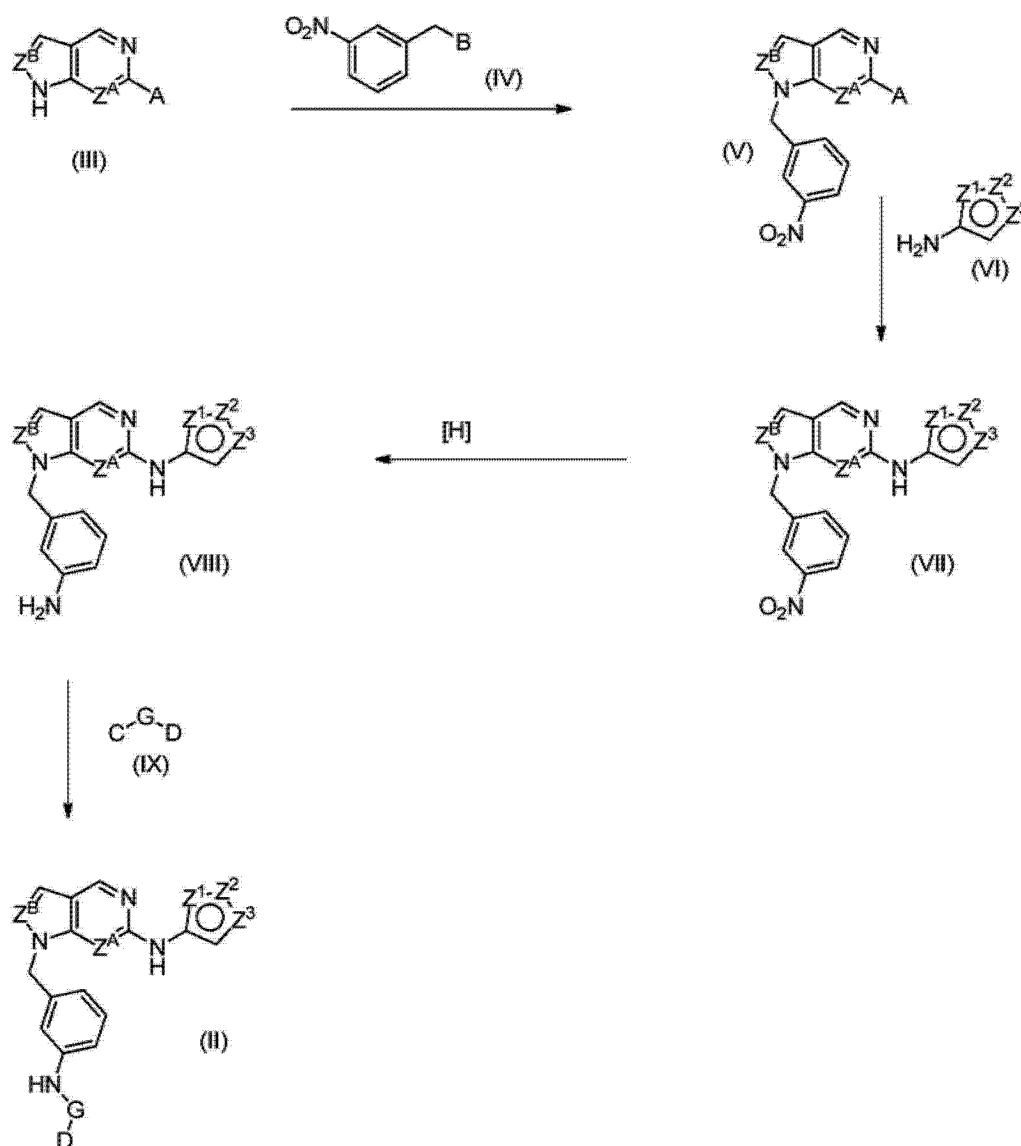
[0211] 如本文使用的，术语“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”指的是其中可存在疾病进展的减缓、阻断、阻止或停止，但不是必须显示所有症状完全消失的所有方法。

[0212] 以上讨论的关于本发明药物组合物的所有实施方案也适用于上文提到的本发明的第一或第二医疗用途或方法。

[0213] 本发明化合物的制备如文献所述，例如 W02011/048082A1。制备本发明化合物的一个示例性路线如下所述。很明显，本领域技术人员可以组合或调整该路线，尤其组合活化基或保护基的引入。

[0214] 一个制备本发明化合物的示例性通用路线如方案 1 所述。化合物 (IV) 用于例示目的。本领域技术人员将意识到，化合物 (IV) 可以被相似试剂替换以合成更多本文所述的化合物。

[0215]



[0216] 方案 1

[0217] 式 (II) 化合物可以由可市售获得的或可以由本领域熟练技术人员制得的化合物 (III)、(IV)、(VI) 和 (IX) 形成。这些反应任选应用大范围的溶剂, 包括质子溶剂, 例如醇; 极性非质子溶剂, 例如二甲基亚砜、DMF、乙腈、二烷、THF; 非极性溶剂, 例如甲苯、DCM; 或碱性溶剂, 例如吡啶。反应可以任选通过加入碱来促进, 所述碱包括但不限于胺碱, 例如三乙胺和 DIPEA; 或金属碳酸盐。反应可以任选通过酸促进, 所述酸包括无机酸, 例如氯化氢; 有机酸和 Lewis 酸。A、B 和 C 为合适的离去基团, 例如卤素。G 为 SO_2 或 $C(=O)$ 。D 为任选取代的烯基或炔基。

[0218] 本领域技术人员将理解, 反应的顺序将取决于反应条件和试剂性质; 各个化合物可能存在一种以上的路线; 改变方案 1 中详细说明的路线的反应顺序是可能的。

[0219] 在一个实施方案中, 式 (III) 化合物与式 (IV) 化合物在碱 (例如碳酸钾) 的存在下; 在极性非质子溶剂 (例如乙腈) 中反应得到式 (V) 化合物。然后式 (V) 化合物与式 (VI) 化合物在酸 (例如氯化氢) 的存在下; 在质子溶剂 (例如异丙醇) 中; 在高于 $20^\circ C$ 的温度 (例如 $90^\circ C$) 反应得到式 (VII) 化合物。然后式 (VII) 化合物与还原剂 (例如氢气); 在催化剂 (例如 Pd/C) 的存在下; 在质子溶剂 (例如甲醇) 中反应得到式 (VIII) 化合物。

然后式 (VIII) 化合物与式 (IX) 化合物在碱 (例如 DIPEA) 的存在下 ; 在非质子溶剂 (例如 DCM) 中反应得到式 (II) 化合物。

附图说明

[0220] 图 1 : 人 JAK3 的氨基酸序列 (IP1IPI00002773.4)。具有半胱氨酸残基 909 的肽 LVMEYLPSGCLR (位置 900-911) 以下划线示出。

实施例

[0221] 分析方法

[0222] NMR 波谱在 Bruker dpx400 上获得。LCMS 在 Agilent1100 上使用 Gemini C18, 3x30mm, 3 微米进行。柱流速为 1.2mL/min, 所用溶剂为水和乙腈 (0.1% 甲酸 : 高 pH, 0.1% 氨水 : 低 pH), 进样量为 3 μ L。波长为 254 和 210nm。

[0223] 方法 A

[0224] 柱 : Phenomenex Gemini-C18, 3x30mm, 3 微米。流速 : 1.2mL/min

[0225] 表 1

[0226]

时间(min)	水 (%)	ACN (%)
0	95	5
3	5	95
4.5	5	95
4.6	95	5
5	停止	

[0227] 方法 B

[0228] 柱 : Phenomenex Gemini-C18, 4.6x150mm, 5 微米。流速 : 1.0mL/min

[0229] 表 2

[0230]

时间(min)	水 (%)	ACN (%)
0.00	95.0	5.0
11.00	5.0	95.0
13.00	5.0	95.0
13.01	95.0	5.0
14.00	停止	

[0231] 方法 C

[0232] 柱 : Phenomenex Gemini-NX C18, 4.6x150mm, 5 微米。流速 : 1mL/min。梯度 :

[0233] 表 3

[0234]

时间(min)	水	乙腈
0	95	5
11	5	95
13	5	95
13.01	95	5
16.00	95	5
16.01	停止	

[0235] 表 4 :缩写

[0236]

ACN	乙腈
Ar	芳基
aq	含水
Boc	叔-丁氧基羰基
BuLi	丁基锂
DCM	二氯甲烷
DEAD	偶氮二甲酸二乙酯

[0237]

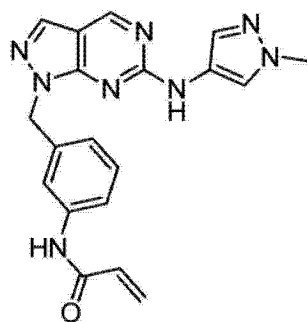
DIAD	偶氮二甲酸二异丙酯
DIPEA	二异丙基乙基胺
DME	1,2-二甲氧基乙烷
DMF	N,N'-二甲基甲酰胺
DMF-DMA	N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛
DMSO	N,N'-二甲基亚砷
DP	药物沉降(Drug pulldown)
DTT	二硫苏糖醇
EDC	1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺
EDTA	乙二胺四乙酸
EtOAc	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
eq	当量
g	克
h	小时
HATU	O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐
HCl	盐酸
HOBt	1-羟基苯并三唑
IC ₅₀	50%抑制浓度
IPA	异丙醇
iPr	异丙基
L	升
LC-MS	液相色谱质谱
M	摩尔浓度
MeOH	甲醇
Mesyl	甲磺酰基
mg	毫克
min	分钟
mL	毫升
mm	毫米
mmol	毫摩尔
mol%	摩尔百分比
μL	微升
nm	纳米
Pd ₂ (dba) ₃	三(二亚苺基丙酮)二钯(0)
PBS	磷酸盐缓冲盐水
Prep. HPLC	制备型高效液相色谱
PyBroP	三吡咯烷基溴化磷六氟磷酸盐
rt	室温
RT	保留时间
sat.	饱和的
THF	四氢呋喃
tert	叔
Xantphos	4,5-双(二苺基膦基)-9,9-二甲基氧杂蒽

[0238] 实验

[0239] 实施例 1 :N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]噻

啉-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺

[0240]



[0241] 将 6-氯-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶 (10g, 52mmol)、碳酸钾 (2eq) 和 1-(溴甲基)-3-硝基苯 (1.2eq) 在乙腈 (150mL) 中的悬浮液在室温搅拌 20h。在真空中除去溶剂, 将残余物溶于乙酸乙酯, 并用水洗涤。干燥有机相 (Na_2SO_4), 在真空中减少并用柱色谱纯化, 得到 6-氯-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶。

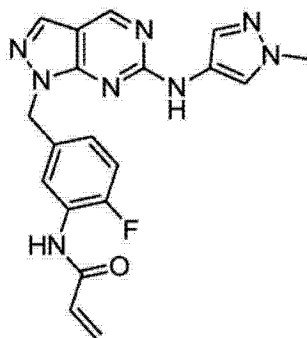
[0242] 向 6-氯-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶 (2.2g, 7.6mmol) 在异丙醇 (62mL) 中的溶液中加入 1-甲基-1H-吡唑-4-胺 (2.5eq) 和浓 HCl 溶液 (0.2mL), 并将反应在 90°C 加热 18h。冷却至室温后, 过滤固体, 用冷异丙醇洗涤, 然后风干, 得到 N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-胺。

[0243] 向 N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-胺 (0.6g, 1.7mmol) 在 MeOH (25mL) 中的溶液中加入浓 HCl 溶液 (0.6mL), 然后加入钯/碳 (60mg), 并将反应在氢气球下搅拌 2h。将所得混合物经硅藻土过滤, 并将滤液在真空中进行浓缩, 得到 1-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-胺。

[0244] 向 1-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-胺 (50mg, 0.16mmol) 在 DCM (1mL) 和 DMF (1mL) 中的溶液中加入 DIPEA (2eq), 然后加入丙烯酰氯 (1.2eq), 并将反应在室温搅拌 16h。将混合物用 DCM 稀释, 并用 1M HCl 水溶液洗涤。将有机相用饱和 NaHCO_3 水溶液然后用水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 在真空中减少, 并通过制备型 HPLC 纯化, 得到标题化合物。LC-MS 方法 C, (ES+) 375, RT=7.08min。

[0245] 实施例 2 : N-(2-氟-5-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺

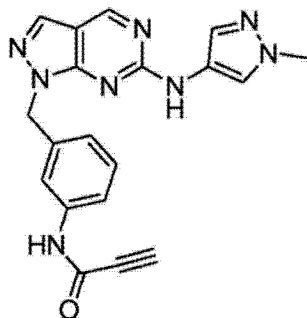
[0246]



[0247] 标题化合物根据实施例 1 的操作, 使用 4-(溴甲基)-1-氟-2-硝基苯制备。LC-MS 方法 C, (ES+) 393, RT=7.19min。

[0248] 实施例 3 :N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丙炔酰胺

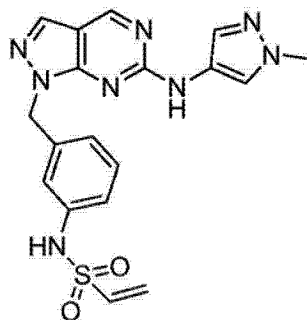
[0249]



[0250] 向 1-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-胺(在实施例 1 中制备)(50mg, 0.16mmol) 在 DMF (1.5mL) 中的溶液中加入丙炔酸(0.9eq)、DIPEA(3eq) 和 PyBroP(1.3eq), 然后将反应在室温搅拌 3h。将反应用 DCM 稀释, 并用 1M HCl 水溶液洗涤。将有机相用饱和 NaHCO₃ 水溶液然后用水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 在真空中减少, 并通过制备型 HPLC 纯化, 得到标题化合物。LC-MS 方法 C, (ES+) 373, RT=6.99min。

[0251] 实施例 4 :N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)乙烯磺酰胺

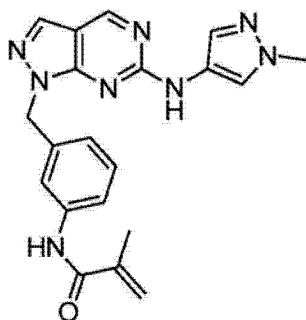
[0252]



[0253] 向 2-氯乙磺酰氯(1.1eq) 在 DCM(2mL) 中的溶液中加入二异丙基乙基胺(2.5eq), 并将混合物搅拌 30min。加入 1-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-胺(在实施例 1 中制备)(100mg, 0.32mmol) 和饱和 NaHCO₃ 水溶液(2mL), 并将反应在室温搅拌 3h。分离各相, 并将产物萃取至 DCM 中, 干燥 (Na₂SO₄), 在真空中减少, 并通过制备型 HPLC 纯化, 得到标题化合物。LC-MS 方法 C, (ES+) 411, RT=7.17min。

[0254] 实施例 5 :N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)甲基丙烯酰胺

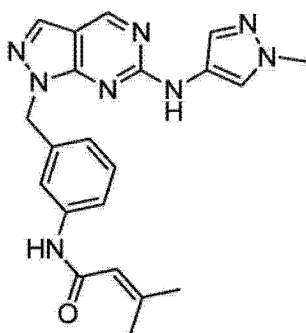
[0255]



[0256] 标题化合物根据实施例 1 的操作,使用甲基丙烯酰氯制备。LC-MS 方法 C, (ES+) 389, RT=7.44min。

[0257] 实施例 6 :3-甲基-N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)丁-2-烯酰胺

[0258]

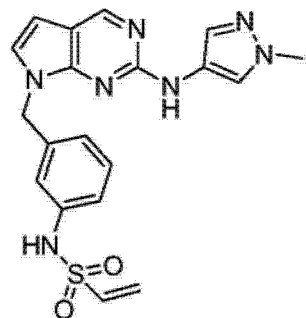


[0259] 标题化合物根据实施例 1 的操作,使用 3-甲基丁-2-烯酰氯制备。

[0260] LC-MS 方法 C, (ES+) 403, RT=7.72min。

[0261] 实施例 7 :N-(3-((2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)甲基)苯基)乙烯磺酰胺

[0262]



[0263] 将 2-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (1g, 6.5mmol)、碳酸钾 (2eq) 和 1-(溴甲基)-3-硝基苯 (1.2eq) 在乙腈 (150mL) 中的悬浮液在室温搅拌 20h。然后在真空中减少溶剂,并将残余物用乙酸乙酯稀释,并用水洗涤。干燥有机相 (Na₂SO₄) 并在真空中减少,得到 2-氯-7-(3-硝基苄基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。

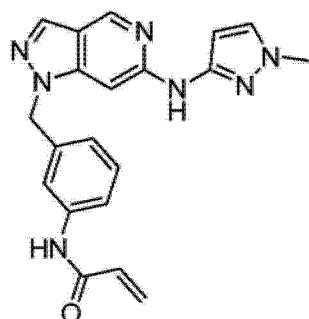
[0264] 向 2-氯-7-(3-硝基苄基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (100mg, 0.4mmol) 在异丙醇 (2mL) 中的溶液中加入 1-甲基-1H-吡唑-4-胺 (2.5eq) 和浓 HCl 溶液 (0.05mL),并将混合物在微波中在 140℃ 反应 1h。然后将混合物过滤,用冷异丙醇洗涤,然后风干,得到 N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-7-(3-硝基苄基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-胺。

[0265] 向 N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-7-(3-硝基苄基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-胺 (80mg, 0.2mmol) 在 MeOH(5mL) 中的溶液中加入 SnCl_2 , 并将反应在 60℃ 加热 4h。冷却至室温后, 将混合物萃取至乙酸乙酯中, 用水和饱和食盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4) 并在真空中减少, 得到 7-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-胺。

[0266] 向 7-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-胺 (50mg, 0.16mmol) 在 DCM(1mL) 和 DMF(1mL) 中的溶液中加入 DIPEA (2eq) 然后加入丙烯酰氯 (1.2eq), 并将反应在室温搅拌 16h。然后将混合物用 DCM 稀释, 并用 1M HCl 水溶液洗涤。然后将有机相用饱和 NaHCO_3 水溶液和水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 在真空中减少并用柱色谱纯化, 得到标题化合物。LC-MS 方法 C, (ES+) 410, RT=5.76min。

[0267] 实施例 8 : N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺

[0268]



[0269] 将 6-氯-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶 (1g, 6.5mmol)、碳酸钾 (2eq) 和 1-(溴甲基)-3-硝基苯 (1.2eq) 在乙腈 (30mL) 中的悬浮液在室温搅拌 20h。在真空中除去溶剂, 将残余物溶于乙酸乙酯, 并用水洗涤。干燥有机相 (Na_2SO_4), 在真空中减少, 并用柱色谱纯化, 得到 6-氯-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶。

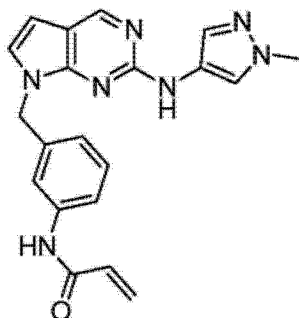
[0270] 向脱气的 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.1eq) 和 XANTPHOS (0.2eq) 在二噁烷 (5mL) 中的溶液中加入碳酸铯 (2eq)、1-甲基-1H-吡唑-3-胺 (1.2eq) 和 6-氯-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶 (100mg, 0.34mmol), 并将反应在 110℃ 加热 18h。冷却至室温后, 将反应应用乙酸乙酯稀释, 并用水洗涤。干燥有机相 (Na_2SO_4), 在真空中减少, 并用柱色谱纯化, 得到 N-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-6-胺。

[0271] 向 N-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-6-胺 (50mg, 0.14mmol) 在 MeOH(5mL) 中的溶液中加入浓 HCl 溶液 (0.1mL), 然后加入钯/碳 (10mg), 并将反应在氢气球下搅拌 2h。所得混合物经硅藻土过滤, 并将滤液在真空中进行浓缩, 得到 1-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-6-胺。

[0272] 向 1-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-3-基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-6-胺 (40mg, 0.13mmol) 在 DCM(1mL) 和 DMF(1mL) 中的溶液中加入 DIPEA (2eq), 然后加入丙烯酰氯 (1.2eq), 并将反应在室温搅拌 16h。将混合物用 DCM 稀释, 并用 1M HCl 水溶液洗涤。将有机相用饱和 NaHCO_3 水溶液然后用水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 在真空中减少, 并通过制备型 HPLC 纯化, 得到标题化合物。LC-MS 方法 C, (ES+) 374, RT=5.38min。

[0273] 实施例 9 :N-(3-((2-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)甲基)苯基)丙烯酰胺

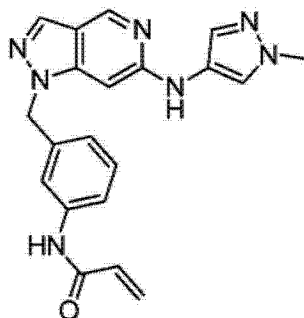
[0274]



[0275] 向 7-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-胺 (在实施例 7 中制备) (20mg, 0.06mmol) 在 DCM(1mL) 和 DMF(1mL) 中的溶液中加入 DIPEA(2eq), 然后加入丙烯酰氯 (1.2eq), 并将反应在室温搅拌 16h。将混合物用 DCM 稀释, 并用 1M HCl 水溶液洗涤。将有机相用饱和 NaHCO₃ 水溶液然后用水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 在真空中减少, 并通过制备型 HPLC 纯化, 得到标题化合物。LC-MS 方法 C, (ES+) 374, RT=5.75min。

[0276] 实施例 10 :N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-1-基)甲基)苯基)丙烯酰胺

[0277]



[0278] 将 6-氯-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶 (1g, 6.5mmol)、碳酸钾 (2eq) 和 1-(溴甲基)-3-硝基苯 (1.2eq) 在乙腈 (30mL) 中的悬浮液在室温搅拌 20h。在真空中除去溶剂, 将残余物溶于乙酸乙酯, 并用水洗涤。干燥有机相 (Na₂SO₄), 在真空中减少并用柱色谱纯化, 得到 6-氯-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶。

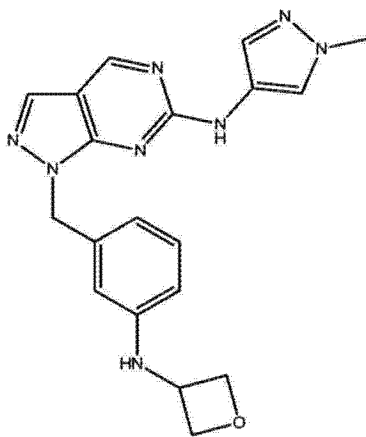
[0279] 向脱气的 Pd₂(dba)₃ (0.1eq) 和 XANTPHOS (0.2eq) 在二噁烷 (5mL) 中的溶液中加入碳酸铯 (2eq)、1-甲基-1H-吡唑-4-胺 (1.2eq) 和 6-氯-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶 (100mg, 0.34mmol), 并将反应在 110℃ 加热 18h。冷却至室温后, 将反应用乙酸乙酯稀释, 并用水洗涤。干燥有机相 (Na₂SO₄), 在真空中减少并用柱色谱纯化, 得到 N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-6-胺。

[0280] 向 N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-(3-硝基苄基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-6-胺 (50mg, 0.14mmol) 在 MeOH(5mL) 中的溶液中加入浓 HCl 溶液 (0.1mL), 然后加入钯/碳 (10mg), 并将反应在氢气球下搅拌 2h。所得混合物经硅藻土过滤, 并将滤液在真空中进行浓缩, 得到 1-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-6-胺。

[0281] 向 1-(3-氨基苄基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-吡唑并[4,3-c]吡啶-6-胺 (25mg, 0.08mmol) 在 DCM(1mL) 和 DMF(1mL) 中的溶液中加入 DIPEA (2eq), 然后加入丙烯酰氯 (1.2eq), 并将反应在室温搅拌 16h。将混合物用 DCM 稀释, 并用 1M HCl 水溶液洗涤。将有机相用饱和 NaHCO_3 水溶液然后用水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 在真空中减少, 并通过制备型 HPLC 纯化, 得到标题化合物。LC-MS 方法 C, (ES+) 374, RT=5.38min。

[0282] 参考实施例 1 : N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1-(3-(氧杂环丁烷-3-基氨基)苄基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-胺

[0283]

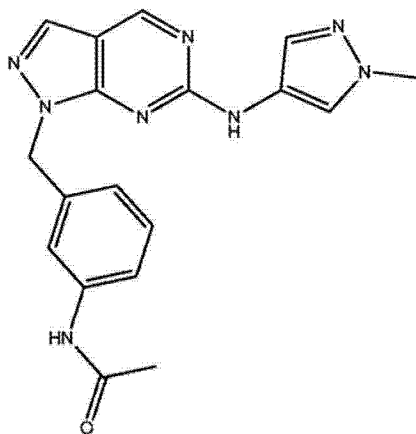


[0284] 该化合物通过类似于上述操作的操作合成。此外, 还参考了 W02012/022681A2, 第 121 页的实施例 114。

[0285] 参考实施例 2 :

[0286] N-(3-((6-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)氨基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)苯基)乙酰胺

[0287]



[0288] 该化合物通过类似于上述操作的操作合成。

[0289] 参考实施例 3 : JAK3 抑制剂 CP690, 550 (Changelian 等, 2003, Science 302 (5646) : 875-888)。

[0290] 生物学检测

[0291] 本发明化合物在能够免疫检测激酶的 Kinobeads™ 检测中对 Janus 激酶 (JAK 家族) 的作用的测定

[0292] 检测原理

[0293] 如上述实施例所描述的本发明化合物通过 Kinobeads™ 检测测试, 如对 ZAP-70 (WO-A2007/137867) 所描述的。简言之, 将测试化合物 (以各种浓度) 和经氨基吡啶并嘧啶配体 24 固定的亲和基质加入到细胞溶胞产物等份中并使之与溶胞产物样品中的蛋白质结合。培养时间后将俘获蛋白的珠 (bead) 从溶胞产物中分离。然后洗脱结合的蛋白并使用特异性抗体以斑点印迹法在 Odyssey 红外探测系统中检测并量化 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 的存在。得到对于单个激酶的剂量反应曲线并计算 IC₅₀ 值。用于 ZAP-70 (WO-A2007/137867) 和激酶选择性分析的 Kinobeads™ 检测 (WO-A2006/134056) 已经在前描述。

[0294] 方案

[0295] 亲和基质的洗涤

[0296] 将亲和基质用 15mL 含有 0.2%NP40 (IGEPAL® CA-630, Sigma, #I3021) 的 1xDP 缓冲液洗涤两次, 然后再悬浮于含有 0.2%NP40 (3% 珠浆) 的 1xDP 缓冲液中。

[0297] 5xDP 缓冲液: 250mM Tris-HCl pH7.4、25% 甘油、7.5mM MgCl₂、750mM NaCl、5mM Na₃VO₄; 通过 0.22 μm 滤膜过滤 5xDP 缓冲液并在 -80℃ 下等份储存。将 5xDP 缓冲液用 H₂O 稀释成含有 1mM DTT 和 25mM NaF 的 1xDP 缓冲液。

[0298] 测试化合物的制备

[0299] 测试化合物的母液用 DMSO 制备。在 96 孔板中制备 30 μL 稀释的 5mM 测试化合物的 DMSO 溶液。以该溶液开始制备 1:3 系列稀释液 (9 步)。对于对比试验 (没有测试化合物) 使用含有 2%DMSO 的缓冲液。

[0300] 细胞培养和细胞溶胞产物的制备

[0301] 在 1L Spinner 烧瓶 (Integra Biosciences, #182101) 中在补充有 10% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 RPMI1640 培养基 (Invitrogen, #21875-034) 中在悬浮液中以 0.15x10⁶ 至 1.2x10⁶ 细胞/mL 的密度培养 Molt4 细胞 (ATCC 目录号 CRL-1582) 和 Ramos 细胞 (ATCC 目录号 CRL-1596)。通过离心收集细胞, 用 1x PBS 缓冲液 (Invitrogen, #14190-094) 洗涤一次并将细胞颗粒在液氮中冷冻, 随后在 -80℃ 下储存。将细胞在 Potter S 匀化器中在包含以下组分的溶胞缓冲液中匀化: 50mM Tris-HCl、0.8%NP40、5% 甘油、150mM NaCl、1.5mM MgCl₂、25mM NaF、1mM 钒酸钠、1mM DTT, pH7.5。每 25mL 缓冲液加入一个完整的不含 EDTA 的片 (蛋白酶抑制剂混合物, Roche Diagnostics, 1873580)。将该材料使用机械化 POTTER S 上下振荡 10 次, 转移至 50mL falcon 管, 在冰上培养 30 分钟并在 4℃ 下以 20,000g 离心 (spun down) 10 分钟 (Sorvall SLA600 中 10,000rpm, 预冷冻)。将上清液转移至超速离心机 (UZ) - 聚碳酸酯管 (Beckmann, 355654) 并在 4℃ 下以 100,000g 离心 1 小时 (Ti50.2 中 33,500rpm, 预冷冻)。将上清液再次转移至新的 50mL falcon 管中, 通过 Bradford 检测 (BioRad) 测定蛋白质浓度并制备每等份含有 50mg 蛋白质的样品。该样品立刻用于实验或在液氮中冷冻并在 -80℃ 下储存。

[0302] 细胞溶胞产物的稀释

[0303] 将细胞溶胞产物 (每板大约 50mg 蛋白) 在室温下在水浴中解冻, 然后在冰上储存。向解冻的细胞溶胞产物中加入含有蛋白酶抑制剂 (25mL 缓冲液 1 片; 不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合物; Roche Diagnostics 1873580) 的 1xDP0.8%NP40 缓冲液以达到 10mg/mL 总

蛋白质的最终蛋白质浓度。将稀释的细胞溶胞产物在冰上储存。混合的 Molt4/Ramos 溶胞产物通过将一体积 Molt4 溶胞产物和两体积 Ramos 溶胞产物（比例 1:2）混合而制备。

[0304] 使用测试化合物和亲和基质培养溶胞产物

[0305] 向 96 孔过滤板 (Multiscreen HTS, BV Filter Plates, Millipore#MSBVN1250) 的每个孔中加入: 100 μ L 亲和基质 (3% 珠浆)、3 μ L 化合物溶液和 50 μ L 稀释的溶胞产物。将板密封并在冷却室的板振动器 (Heidolph tiramax1000) 上以 750rpm 培养 3 小时。随后将所述板用 230 μ L 洗涤缓冲液 (1xDP0, 4%NP40) 洗涤 3 次。将该过滤板放置于收集板 (Greiner bio-one, PP-microplate 96 孔 V- 型, 65120) 顶部, 然后用 20 μ L 样品缓冲液 (100mM Tris、pH7.4, 4%SDS、0.00025% 溴苯酚蓝、20% 甘油、50mM DTT) 洗脱珠。将洗脱液在 -80℃ 下快速冷冻并在 -20℃ 下储存。

[0306] 洗脱的激酶的检测和量化

[0307] 洗脱液中的激酶通过在硝基纤维素膜上点样 (spotting) 并使用针对感兴趣的激酶的第一抗体和荧光标记的第二抗体 (抗兔 IRDye™ 抗体 800 (Licor, #926-32211) 检测并量化。LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) 的 Odyssey 红外成像系统根据生产者提供的说明书 (Schutz-Geschwendener 等, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. 2004 年 5 月由 LI-COR Biosciences 出版, www.licor.com) 操作。

[0308] 洗脱液点样后将硝基纤维素膜 (BioTrace NT ;PALL, #BTNT30R) 首先通过使用 Odyssey 封闭缓冲液 (LICOR, 927-40000) 在室温下培养 1 小时而封闭。然后将封闭的膜在表 4 中示出的温度下用以 Odyssey 封闭缓冲液 (LICOR#927-40000) 稀释的第一抗体培养 16 小时。随后将该膜用含有 0.2% 吐温 20 的 PBS 缓冲液在室温下洗涤两次, 持续 10 分钟。然后将该膜在室温下用以 Odyssey 封闭缓冲液 (LICOR#927-40000) 稀释的检测抗体 (抗兔 IRDye™ 抗体 800, Licor, #926-32211) 培养 60 分钟。随后每次用含有 0.2% 吐温 20 的 1xPBS 缓冲液在室温下洗涤该膜两次, 持续 10 分钟。然后将该膜用 PBS 缓冲液冲洗一次以移除残余的吐温 20。将该膜在 4℃ 下保持于 PBS 缓冲液中, 然后用 Odyssey 仪器扫描。记录荧光信号并根据生产者的说明书进行分析。

[0309] 表 5: 抗体的来源和稀释

[0310]

目标激酶	第一抗体(稀释)	第一次培养温度	第二抗体(稀释)
JAK1	细胞信号传导#3332 (1: 100)	4°C	Licor 抗兔 800 (1: 15000)
JAK2	细胞信号传导#3230 (1: 100)	室温	Licor 抗兔 800 (1: 15000)
JAK3	细胞信号传导#3775 (1: 100)	4°C	Licor 抗兔 800 (1: 5000)
TYK2	细胞信号传导 #06-638 (1: 1000)	室温	Licor 抗兔 800 (1: 5000)

[0311] 结果

[0312] 表 6 提供本发明所选化合物在 JAK Kinobeads™ 检测中的数据。

[0313] 表 6 :在 Kinobeads™ 检测中使用抗体检测测定的抑制值 (IC₅₀, 以 nM 计)。

[0314]

实施例	JAK1	JAK2	JAK3	Tyk2
1	>10000	>10000	5	>10000
2	>10000	>10000	16	>10000
3	>10000	>10000	10	6958
4	>10000	>10000	10	6132
5	>10000	>10000	57	>10000
6	>10000	>10000	1309	>10000
7	7694	>10000	12	901
8	>10000	>10000	5	>10000
9	9420	>10000	3	8083
10	5368	>10000	1	5080
参考实施例 2	>10000	>10000	206	>10000

[0315] 化合物在使用定量质谱检测激酶的 Kinobeads™ 检测中的激酶选择性

[0316] 将之前实施例中所述的本发明所选化合物在 Kinobeads™ 检测中测试 (WO-A2006/134056 ;Bantscheff 等 , 2007. Nature Biotechnol. 25, 1035-1044)。

[0317] 将化合物用细胞裂解物等份 (Jurkat 和 Ramos 细胞裂解物的 1:1 混合物) 在 4℃ 培养 45 分钟, 并允许结合至裂解物样品中的蛋白质。然后加入 Kinobeads™ 亲和性基质以捕捉蛋白质, 所述蛋白质不与之前加入的化合物相互作用。在该两小时的 4℃ 培养步骤后, 将株从裂解物中分离, 并将株结合的蛋白质在 SDS 样品缓冲液中洗脱, 然后通过 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。将凝胶用胶体 Coomassie 染色, 将各凝胶道的染色区域切下, 用胰蛋白酶进行凝胶内蛋白质分解消化。将来自不同的凝胶区域的肽用等重同位素标记试剂 (TMT 试剂, Thermofisher) 标记, 如表 7 所示。所述 TMT 试剂为一套多种类的、胺特异性的、稳定的同位素试剂, 其可在高达六种不同的生物样品中标记肽, 能够同时鉴定和定量肽。将组合的样品使用反相色谱在 pH11 分级, 然后将级分用在线联用至串联质谱仪的纳升级液相色谱系统 (nano-flow liquid chromatography system) (LC-MS/MS) 实验分析, 然后在 MS/MS 谱中进行报道分子的离子定量 (Ross 等, 2004. Mol. Cell. Proteomics 3(12):1154-1169; Dayon 等, 2008. Anal. Chem. 80(8):2921-2931; Thompson 等, 2003. Anal. Chem. 75(8):1895-1904)。可以在 WO2006/134056 和先前出版物 (Bantscheff 等, 2007. Nat. Biotechnol. 25, 1035-1044; Bantscheff 等, 2011. Nat. Biotechnol. 29(3):255-265) 中找到进一步实验方案。

[0318] 表 7 :用 TMT 等重同位素标记试剂标记肽

[0319]

样品	化合物浓度 (nM)	TMT6 试剂
1	3000	126
2	750	127
3	187	128
3	47	129
5	12	130
6	0	131

[0320] 如表 8 所示,在 kinobeads 检测中使用先前所述的质谱检测激酶来确定本发明所选化合物的激酶选择性 (Bantscheff 等, 2007. Nat Biotechnol. 25(9):1035-1044; WO-A2006/134056)。

[0321] 表 8 :在 Kinobeads™ 检测中使用定量质谱确定的抑制值 (IC₅₀, 以 nM 计)。

[0322]

实施例	BTK	TEC	BLK	ITK
1	12	12	20	86
2	72	34	406	818
3	12	n. d.	12	12

[0323] (n. d. = 未测出)

[0324] 本发明化合物在激酶检测中对 BLK、BTK、ITK 和 JAK3 的作用的测定

[0325] 放射测量的蛋白激酶检测 (³³PanQinase® 活性检测; ProQinase GmbH, Freiburg, Germany) 用于测量蛋白激酶 BLK、BTK、ITK 和 JAK3 的激酶活性。所有激酶检测在来自 PerkinElmer (Boston, MA, USA) 的 96 孔 FlashPlates™ 上进行, 反应量为 50 μl。在四个步骤中吸取反应混合物 (cocktail), 按照以下顺序:

[0326] 20 μl 检测缓冲液 (标准缓冲液)

[0327] 5 μl 的 ATP 溶液 (在 H₂O 中)

[0328] 5 μl 测试化合物 (在 10%DMSO 中)

[0329] 10 μl 底物 / 10 μl 酶溶液 (预混合)

[0330] 所有酶的检测含有 70mM HEPES-NaOH, pH7.5、3mM MgCl₂、3mM MnCl₂、3 μM 正钒酸钠、1.2mM DTT、ATP/[γ-³³P]-ATP (可变量, 对应于各个激酶的表现 ATP-K_m)、蛋白激酶和底物 (表 9)。

[0331] 将反应混合物在 30℃ 培养 60 分钟。用 50 μl 的 2%(v/v) H₃PO₄ 终止反应, 吸干该

板并用 200 μ l 的 0.9% (w/v) NaCl 洗涤两次。用微板闪烁计数器 (Microbeta, Wallac) 测定 33 Pi。所有检测在 BeckmanCoulter/SAGIAN™ Core System 上进行。

[0332] 表 9 :酶和底物

[0333]

激酶	激酶浓度 ng/50 μ l	ATP 浓度 μ M	底物	底物浓度 μ g/50 μ l
BTK	20	3.0	聚(Glu, Tyr)4:1	0.125
ITK	50	1.0	聚(Glu, Tyr)4:1	0.125
JAK3	100	0.3	聚(Ala, GLU, Lys, Tyr)6:2:5:1	0.125

[0334] 表 10 提供了本发明所选化合物在激酶检测中的数据。

[0335] 表 10 :Prokinase 酶检测数据 (IC₅₀ 值, 以 nM 计)

[0336]

实施例	BLK	BTK	ITK	JAK3
1	nd	20	230	3
2	2000	323	n. d.	n. d.
3	n. d.	1	3	4
4	n. d.	20	80	7
参考实施例 2	n. d.	2000	无活性	290

[0337] (n. d. = 未测出)

[0338] 细胞检测

[0339] pSTAT5 检测

[0340] 检测原理

[0341] STAT5 磷酸化代表 JAK3 激活的下游信号级联的临近事件之一。因此, STAT5 磷酸化是评估 JAK3 抑制的机理作用的适当读出 (readout)。白细胞介素 -2 (IL-2) 激活人类 YT 细胞 (NK 样细胞系) 导致酪氨酸残基 694 (Tyr694) 处的 STAT5 磷酸化, 其可通过特异性抗体的免疫检测和适当检测方法 (在该情况下 AlphaScreen 检测技术) 进行定量测量。

[0342] 检测方案

[0343] 细胞培养和细胞接种

[0344] 人类 YT 细胞生长在含有 2mM L- 谷氨酰胺 (Invitrogen, 25030-024) 和 10% 热灭活 FBS (Invitrogen, 10106-169) 的 RPMI 培养基 (Lonza, BE12-167) 中并保持在潮湿的培养箱 (37°C, 5%CO₂) 中。通过离心获取细胞, 用 HBSS (Invitrogen, 14180-046) 洗涤一次, 以 1.5x10⁶ 个细胞 /ml 重新悬浮于 HBSS 中并将 0.9x10⁴ 个细胞以每孔 6 μ l 接种于 96 孔白色板 (PerkinElmer, 6005569) 中。

[0345] 用测试化合物和 IL-2 刺激处理

[0346] 将测试化合物溶于 DMSO 并制备 1:3 系列稀释液 (9 步)。为得到剂量响应曲线,

将 4%DMSO/HBSS 中的 3 μ l 四倍浓缩化合物加入到 96 孔板的每个细胞样品中,产生 1%DMSO 的最终 DMSO 浓度。将细胞在潮湿的培养箱 (37°C, 5%CO₂) 中培养一小时。向每个孔中加入 3 μ l 四倍浓缩的 IL-2 溶液 (重组人 IL-2, Peprotech200-02; 120nM 的 HBSS 溶液) 并在室温下培养 30 分钟。通过加入 3 μ l 5x 裂解缓冲液 (SureFire 裂解缓冲液; Perkin Elmer, TGRS5S10K) 将细胞裂解并在室温下轻轻摇动培养 10 分钟。

[0347] 信号检测

[0348] 对于通过 AlphaScreen® 技术的信号检测, 根据生产者 (Perkin Elmer, TGRS5S10K) 提供的说明书使用 SureFire 磷酸 -STAT5 (Tyr694/Tyr699) 试剂盒。按照生产者的推荐加入受体珠 (再活化缓冲液 / 活化缓冲液 / 受体珠以 40:10:1 的比率) 并在室温下轻轻摇动培养 1.5 小时。然后按照推荐 (稀释缓冲液 / 供体珠以 20:1 的比率) 加入供体珠并在室温下轻轻摇动培养 1.5 小时。在含有 AlphaScreen 设计的 Envision 仪器 (Perkin Elmer) 上读取平板。在生物检测中使用非线性回归对具有可变斜率的 S 形剂量 - 响应数据进行分析。

[0349] 表 11 提供了本发明所选化合物在 pSTAT5 细胞检测中的数据。

[0350] 表 11 :pSTAT5 细胞检测数据 (IC₅₀ 值, 以 nM 计)

[0351]

实施例	pSTAT5
1	31
2	378
3	33
4	74
5	2005
7	79

[0352] 清除化合物的细胞检测

[0353] 检测原理

[0354] 该时程实验能够测定是否测试化合物的药理学作用随时间持续, 甚至当化合物从细胞样品中除去后。

[0355] 检测方案

[0356] 细胞培养和细胞接种

[0357] 将人 YT 细胞如上述进行生长。通过离心收获细胞并将其悬浮在 RPMI/0.5% 热失活的 FBS 中。将 3x10⁵ 个细胞以 60 μ l / 孔接种在圆底 96 孔板 (BD-Falcon, 353077) 中。

[0358] 用测试化合物处理和 IL-2 刺激

[0359] 将测试化合物溶于 DMSO 并制备 1:3 稀释系列 (9 个步骤)。为了生成剂量响应曲线, 将 30 μ l 在 4%DMSO/RPMI/0.5%FBS 中四倍浓缩的化合物加入 96 孔板的各孔细胞样品中, 得到最终 DMSO 浓度为 1%DMSO。将细胞在增湿的培养箱 (37°C, 5%CO₂) 中培养一小时。

培养后,将细胞通过离心清洗两次,并替换培养基(RPMI/0.5%FBS),除了0时间板。将清洗的细胞在增湿的培养箱(37℃,5%CO₂)中培养30分钟、1、2和4小时,然后用IL-2刺激。向各孔中加入30 μl四倍浓缩的IL-2溶液(重组的人IL-2, Peprotech200-02;120nM的RPMI溶液),并在室温培养30分钟。通过加入30 μl的5x裂解缓冲液(MSD裂解缓冲液)裂解细胞,并在4℃伴随轻轻振荡培养10分钟。

[0360] 信号检测

[0361] 在裂解物中使用MSD **MULTI-SPOT®** 964-spot phosphor-STAT5a,b全细胞裂解物试剂盒(MesoScale Discovery, K150IGD-3),根据生产商的说明方案检测化合物对STAT5磷酸化的作用。在BioAssay中使用具有可变斜率的S形曲线剂量-响应的非线性回归分析数据,并确定IC₅₀值。

[0362] 结果

[0363] 对于参考实施例3(JAK3抑制剂CP690,550),在清洗细胞之后30分钟观察到活性的显著下降,并且在之后1小时观察到抑制活性完全丧失。参考实施例2的活性在清洗之后30分钟完全丧失。不同的是,在清洗之后长达4小时,实施例1和3仍保持了活性,仅少许活性降低。

[0364] 表12提供了本发明所选化合物和参考化合物在细胞清除研究中的数据。

[0365] 表12:在IL-2刺激的YT细胞中在清除化合物后pSTAT5抑制(pIC₅₀值)的时程。

实施例	0分钟 (未清洗)	30分钟	1小时	2小时	4小时
参考实施例3	7.6, 7.8	5.1	无活性	无活性	无活性
参考实施例1	5.8, 5.7	无活性	无活性	无活性	无活性
实施例1	8.3, 7.6	6.7	7.2, 6.5	7.2	7.0
实施例3	7.5, 6.4	6.2	6.9, 6.2	7.1	6.9

[0367] 质谱鉴定实施例1化合物修饰的JAK3肽

[0368] 检测原理

[0369] 化合物处理后,质谱分析免疫沉淀的JAK3用于确定是否实施例1化合物共价结合至JAK3。将Jurkat细胞裂解物用10 μM实施例1化合物预培养45分钟。对照样品不用化合物培养(DMSO对照)。然后,用抗-JAK3抗体(Abcam ab45141)将JAK3免疫沉淀。另外,用抗-IgG(模拟免疫沉淀)进行对照实验。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离沉淀的蛋白质。用胶体Coomassie染色凝胶,将各凝胶道的染色区域切下,并用胰蛋白酶进行凝胶内蛋白质分解消化。将源自三个样品的肽用iTRAQ试剂标记(如表13所述),并将合并的样品用在线联用至串联质谱仪的纳升级液相色谱系统(LC-MS/MS)实验分析,然后在MS/MS谱中进行iTRAQ报道分子的离子定量(Ross等,2004. Mol. Cell. Proteomics3(12):1154-1169)。将包含JAK3的凝胶区域用HCDiq(高质量精度的MS/MS谱)在Orbitrap Velos质谱仪上分析270分钟。对于Mascot检索,使用了标准参数和实施例1化合物对半胱氨酸的可变修饰。其它实验方案可见于W02006/134056和之前的出版物(Bantscheff等,2007. Nature Biotechnology25, 1035-1044)。

[0370] 表13:用iTRAQ等重同位素标记试剂标记肽

[0371]

样品	化合物	抗体	iTRAQ 试剂
1	10 μ M 实施例 1	抗-JAK3, Abcam ab45141	115
2	0.25 % DMSO	抗-JAK3, Abcam ab45141	116
3	0.25 % DMSO	兔 IgG, Sigma I5006	117

[0372] 方案

[0373] 1. 细胞裂解物的制备

[0374] 将 Jurkat 细胞 (ATCC 目录号 TIB-152 Jurkat, 克隆 E6-1) 以悬浮液形式在一升 Spinner 瓶 (Integra Biosciences, #182101) 中的补充有 10% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 RPMI1640 培养基 (Invitrogen, #21875-034) 中生长, 其密度为 0.15×10^6 至 1.2×10^6 个细胞/ml。通过离心收获细胞, 用 1x PBS 缓冲液 (Invitrogen, #14190-094) 洗涤一次, 并将细胞沉淀物在液氮中冰冻, 然后保存在 -80°C 。将 Jurkat 细胞在 Potter S 匀浆器中在以下裂解缓冲液中匀浆: 50mM Tris-HCl, 0.8% NP40, 5% 甘油, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl_2 , 25mM NaF, 1mM 钒酸钠, 1mM DTT, pH7.5。完成后, 每 25ml 缓冲液加入无 EDTA 的片剂 (蛋白酶抑制剂混合物, Roche Diagnostics, 1873580)。使用机械化的 POTTER S 将所述原料进行 10 次杜恩斯匀浆操作 (dounced), 转移至 50ml falcon 管, 在冰上培养 30 分钟, 并在 20,000g 在 4°C 旋转沉淀 10min (10,000rpm, 在 Sorvall SLA600 中, 预冷却)。将上清液转移至超离心 (UZ) - 聚碳酸酯管 (Beckmann, 355654) 中, 并在 100,000g 在 4°C 旋转 1 小时 (33,500rpm, 在 Ti50.2 中, 预冷却)。再次将上清液转移至新的 50ml falcon 管, 通过 Bradford 检测 (BioRad) 确定蛋白质浓度, 并且制备含有 50mg 蛋白质 / 等份的样品。立即将样品用于实验, 或在液氮中冰冻并保存在 -80°C 。

[0375] 2. 蛋白质的免疫沉淀

[0376] 抗体的偶联

[0377] 经伯胺将抗体共价偶联至活化的珠状琼脂糖上。所述 AminoLink® Plus Coupling Reaction (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL61105, USA) 包括醛 (在支持相上) 和胺 (在抗体上) 之间自发形成的希夫碱 (Schiff base) 键, 它们随后通过用温和还原剂 (氰基硼氢化钠) 反应而得以稳定。将 200 μ l 的 AminoLink® 树脂 (Thermo Scientific Inc., 20501) 在批中以合适的浓度与抗-JAK3 抗体 (80 μ l Abcam ab45141, Lot GR5571-5) 偶联。对于模拟免疫沉淀, 将合适量的兔 IgG (80 μ g Sigma I5006) 偶联至 100 μ l 的 AminoLink® 树脂 (Thermo Scientific Inc., 20501)。

[0378] 将 AminoLink® 树脂用 10 株体积的 PBS 洗涤三次, 然后在 1.5ml 硅化微量离心管中将抗体溶液加入树脂中。在 0.01M NaOH (由 1M NaOH 配制, Merck, 109137) 中新鲜配制 1M NaCNBH_3 (Thermo Scientific Inc., 44892), 并且每 1ml 反应体积加入 25 μ l。将混合物在 4°C 旋转 (NeoLab Rotator, 2-1175) 培养过夜。保留少量上清液以通过 Bradford 检测确定偶联效率, 弃去其余上清液。将珠用 10 株体积 1M Tris pH7.4 (Sigma-Aldrich, S5150) 洗涤两次。将 1M Tris pH7.4 以 1:1 的比例加入珠中, 每 1ml 反应体积加入 25 μ l 新鲜配制的 NaCNBH_3 , 并在室温培养旋转 30 分钟。弃去上清液, 并将珠用 10 株体积的 1M NaCl (由

5M NaCl 配制, Sigma-Aldrich, S5150) 洗涤两次。使用前, 将株用含有 0.2%NP40 的裂解缓冲液 (不含 DTT) 洗涤两次。

[0379] 用化合物培养细胞裂解物并免疫沉淀

[0380] 将细胞裂解物解冻, 用不含 DTT 和 NP40 的裂解缓冲液稀释 1 倍, 再用含有 0.4%NP40 (无 DTT) 的裂解缓冲液稀释至 5mg/ml 蛋白质浓度。将裂解物转移至超离心管 (Beckmann, 355654) 中, 并在 100,000x g 在 4℃离心 20 分钟 (33,500rpm, 在 Ti50.2 中, 预冷却)。将上清液转移至新的 falcon 管中。

[0381] 同时, 通过用 DMSO 稀释 30mM 储备溶液配制 4mM 化合物溶液。将 5 μl 的 4mM 化合物溶液和 2ml 超离心的裂解物 (10mg 蛋白质 / 样品) 在 15ml Greiner 管中在翻滚式振荡器 (end-over-end shaker) (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) 上在 4℃培养 45 分钟。这对应于最终浓度为 10 μM 的实施例 1 化合物。对于对照实验, 使用 0.25%DMSO。

[0382] 培养步骤后, 将亲和性基质 (具有固定的抗体的 AminoLink®树脂; 100 μl 株 / 免疫沉淀样品) 与裂解物样品在翻滚式振荡器上在 4℃培养 1 小时。通过在 2000rpm 离心 2 分钟收集株, 保留少量未结合的部分, 并将剩余上清液弃去。将株转移至含有 600 μl 裂解缓冲液 (无 DTT) 的 Mobicol 柱 (MoBiTech, 10055), 并用 10ml 含有 0.2%NP40 洗涤剂的裂解缓冲液、然后用 5ml 不含洗涤剂的裂解缓冲液洗涤。为了洗脱结合的蛋白质, 将 80 μl 12x SDS 样品缓冲液加至柱中。将柱在 95℃培养 10 分钟, 并通过离心将洗脱物转移至硅化的微量离心管中。然后用 50mM DTT 将蛋白质还原, 再用 108mM 碘乙酰胺烷基化。然后将蛋白质通过 SDS-聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 分离。

[0383] 3. 质谱鉴定蛋白质

[0384] 3.1 质谱分析前的蛋白质消化

[0385] 将凝胶分离的蛋白质在凝胶内消化, 基本按照之前所述的操作 (Shevchenko 等, 1996, Anal. Chem. 68:850-858)。简言之, 使用干净的解剖刀将凝胶分离的蛋白质从凝胶上切下, 使用 100 μl 15mM 三乙胺碳酸氢盐缓冲剂 (TEAB; Sigma T7408) 和 40% 乙醇水溶液脱色两次, 并用绝对乙醇脱水。然后将蛋白质在凝胶内使用猪的胰蛋白酶 (Promega) 以 10ng/μl 在 5mM TEAB 中的蛋白酶浓度消化。在 37℃消化 4 小时, 然后使用 5 μl 的 5% 甲酸停止反应。

[0386] 3.2 质谱分析前的样品制备

[0387] 将凝胶填料用 20 μl 的 1% 甲酸萃取两次, 然后用增加浓度的乙腈萃取三次。然后将萃取物与酸化的消化上清液混合, 并在真空离心干燥。

[0388] 3.3 iTRAQ 标记肽萃取物

[0389] 将用 200 μM 实施例 1 和溶剂对照 (0.5%DMSO) 处理的样品的肽萃取物用不同种类的等重同位素标记试剂 (iTRAQ Reagents Multiplex Kit, part number 4352135, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 处理。iTRAQ 试剂为一套多种类的、胺特异性的、稳定的同位素试剂, 其可在高达四种不同的生物样品中标记肽的氨基, 能够同时鉴定和定量肽。根据生产商提供的说明书使用 iTRAQ。将样品重新悬浮在 10 μl 的 50mM TEAB 溶液, pH8.5 中, 并加入 10 μl 乙醇。将 iTRAQ 试剂溶于 120 μl 乙醇, 并将 10 μl 试剂溶液加入样品中。该标记反应在水平振荡器上在室温进行一小时, 并通过加入 5 μl 的 100mM TEAB 和 100mM 甘氨酸的水溶液终止。然后将两个标记的样品混合、在真空离心干燥, 并重新悬浮在 10 μl 的

0.1% 甲酸的水溶液中。

[0390] 3.4 质谱数据获得

[0391] 将肽样品进样至直接偶联至 Thermo OrbitrapVelos 质谱仪的 1D+, Eksigent Nano LC 系统中。在 LC 系统上使用水溶液和有机溶剂的梯度分离肽（如下）。溶剂 A 为 0.1% 甲酸, 溶剂 B 为 70% 乙腈和 0.1% 甲酸。

[0392] 表 14 :LC 系统的肽洗脱

[0393]

时间 (min)	%A	%B
0	95	5
230	40	60
240	10	90
250	10	90
251	95	5
260	95	5

[0394] 3.5 蛋白质鉴定和定量

[0395] 将在 LC-MS/MS 实验中产生的肽质量和裂解数据用于查询蛋白质数据库, 所述数据库由 International Protein Index (IPI) 蛋白质序列数据库的内部注释版本 (in-house curated version) 和该数据库的教程版本 (decoy version) 组合而成 (Elias and Gygi, 2007. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. Nature Methods 4, 207-214)。通过使用软件工具 Mascot 关联测得的肽质量和裂解数据与在数据库中输入而计算的数据来鉴定蛋白质 (Perkins 等, 1999. Probability-based protein identification by searching sequence database using mass spectrometry data. Electrophoresis 20, 3551-3567)。Mascot 搜索参数为: 限差: 20ppm 肽质量。碎片质量限差: 20mmu。酶: 胰蛋白酶。固定修饰: iTRAQ(K)。可变修饰: iTRAQ(N-末端)&乙酰化(N-末端)&氧化(M)&脲甲基化(C)&实施例 1 化合物结合(C)。最大漏切: 3。调节蛋白质验收阈值以达到低于 1% 的错误发现率, 如教程数据库建议的命中率 (Elias and Gygi, 2007. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. Nature Methods 4, 207-214)。使用 iTRAQ 报道分子离子信号的峰面积进行相对蛋白质定量, 基本如之前的出版物所述 (Bantscheff 等, 2007. Nature Biotechnology 25, 1035-1044)。

[0396] 结果

[0397] 图 1 显示了人 JAK3 的序列。肽 LVMEYLPSGCLR(JAK3 的 900-911 位) 是唯一被实施例 1 化合物共价修饰的肽。该肽在半胱氨酸 909 上被修饰 (见表 15 至 17)。

[0398] 表 15 :肽 LVMEYLPSGCLR(JAK3 序列中的氨基酸残基 900-911) 的鉴定。固定修饰:

4TRAQ(K)。可变修饰:4TRAQ(N-末端),乙酰化(蛋白质N-末端),脲甲基化(C),实施例1化合物结合(C),氧化(M)。被胰蛋白酶裂解:切割K或R的C末端侧,除非下一残基为P。

[0399]

JAK3 中的位置	观察的质量	预期的质量	计算的质量	ppm	肽序列
900-911	799.4131	1596.8117	1596.8126	0	R.LVMEYLPSGCLR.D 4TRAQ(N-末端); 脲甲基化(C); 氧化(M)(离子得分 29)
900-911	633.6586	1897.9539	1897.9565	0	R.LVMEYLPSGCLR.D 4TRAQ(N-末端); 实施例1化合物 结合(C)(离子得分 33)
900-911	638.9905	1913.9495	1913.9514	0	R.LVMEYLPSGCLR.D 4TRAQ(N-末端); 实施例1化合物 结合(C); 氧化(M)(离子得分 35)

[0400] 表 16:iTRAQ-LVM(ox)EYLPSGC(脲甲基)LR MS/MS 谱的前 40 个最高离子强度的峰

[0401]

m/z	离子强度	相对强度	离子
115.107	381.8	4.48	iTRAQ
116.111	6769.6	79.51	iTRAQ
117.114	662.9	7.79	iTRAQ
145.109	3083.4	36.22	
175.119	580.7	6.82	y1
230.197	885.3	10.4	
258.194	1633.7	19.19	b1
326.961	424.6	4.99	
329.267	669.8	7.87	
340.999	766.1	9	
357.261	412.4	4.84	
402.145	397.1	4.66	
429.088	8513.7	100	锁质量
440.299	390.4	4.59	

444.331	564.9	6.64	
447.097	956.6	11.24	
569.338	464.6	5.46	
633.34	583.9	6.86	
672.315	1102.2	12.95	
673.32	553.5	6.5	
689.34	1439.5	16.91	y6
690.341	1046.5	12.29	
802.423	361.6	4.25	
803.441	345.9	4.06	
879.49	331.4	3.89	
965.49	535	6.28	
966.489	780.7	9.17	y8
1077.54	329	3.86	
1094.535	401.4	4.71	y9
1095.531	555.8	6.53	
1096.533	392.6	4.61	
1177.547	395.8	4.65	
1178.572	1767.3	20.76	y10
1234.62	352.4	4.14	
1276.628	424.4	4.98	y11
1277.64	1666.4	19.57	
1278.624	563.2	6.62	
1389.747	559.1	6.57	

1390.721	1760.9	20.68	[M+H-iTRAQ]
1391.733	473.2	5.56	

[0402]

[0403] 表 17 :iTRAQ-LVM(ox)EYLPSC(实施例 1)LR MS/MS 谱的前 40 个最高离子强度的峰

[0404]

m/z	离子强度	相对强度	离子
115.107	3035.7	58.12	iTRAQ
116.111	936.9	17.94	iTRAQ
136.076	5223.1	100	
145.107	1095.1	20.97	
175.119	888.5	17.01	
230.195	480.1	9.19	
252.65	372.4	7.13	
258.191	1328.4	25.43	b1
285.174	492.4	9.43	
321.158	378.3	7.24	
340.987	334.7	6.41	
357.259	1715.5	32.85	
409.155	1177.8	22.55	
429.088	5148.8	98.58	锁质量
433.155	800	15.32	
440.297	838.7	16.06	
447.099	629.7	12.06	
503.743	639	12.23	

504. 294	2309. 4	44. 21	b3
505. 298	523	10. 01	
569. 34	1300. 4	24. 9	
570. 341	504. 3	9. 66	
605. 345	742. 1	14. 21	
622. 232	529. 6	10. 14	
633. 338	3013. 1	57. 69	
634. 341	1088. 4	20. 84	
691. 288	412. 3	7. 89	
732. 405	306. 7	5. 87	
796. 41	433. 6	8. 3	
805. 358	304. 8	5. 83	
822. 4	762. 3	14. 59	y4
909. 426	2328. 5	44. 58	y5
910. 429	1009. 9	19. 33	
911. 428	311. 6	5. 97	
989. 455	656. 6	12. 57	
990. 454	546. 8	10. 47	
1006. 479	4902. 3	93. 86	y6
1007. 481	3551. 7	68	
1008. 481	642. 4	12. 3	
1119. 566	408. 2	7. 81	y7

[0405]

[0001]

序列表

<110> 赛尔佐姆有限公司

<120> 吡唑并[4,3-c]吡啶衍生物作为激酶抑制剂

<130> CEL67811EP

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1124

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Pro Pro Ser Glu Glu Thr Pro Leu Ile Pro Gln Arg Ser Cys
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ser Thr Glu Ala Gly Ala Leu His Val Leu Leu Pro Ala
20 25 30

Arg Gly Pro Gly Pro Pro Gln Arg Leu Ser Phe Ser Phe Gly Asp His
35 40 45

Leu Ala Glu Asp Leu Cys Val Gln Ala Ala Lys Ala Ser Gly Ile Leu
50 55 60

Pro Val Tyr His Ser Leu Phe Ala Leu Ala Thr Glu Asp Leu Ser Cys
65 70 75 80

Trp Phe Pro Pro Ser His Ile Phe Ser Val Glu Asp Ala Ser Thr Gln
85 90 95

Val Leu Leu Tyr Arg Ile Arg Phe Tyr Phe Pro Asn Trp Phe Gly Leu
100 105 110

Glu Lys Cys His Arg Phe Gly Leu Arg Lys Asp Leu Ala Ser Ala Ile
115 120 125

Leu Asp Leu Pro Val Leu Glu His Leu Phe Ala Gln His Arg Ser Asp
130 135 140

Leu Val Ser Gly Arg Leu Pro Val Gly Leu Ser Leu Lys Glu Gln Gly
145 150 155 160

Glu Cys Leu Ser Leu Ala Val Leu Asp Leu Ala Arg Met Ala Arg Glu
165 170 175

Gln Ala Gln Arg Pro Gly Glu Leu Leu Lys Thr Val Ser Tyr Lys Ala
180 185 190

Cys Leu Pro Pro Ser Leu Arg Asp Leu Ile Gln Gly Leu Ser Phe Val
195 200 205

Thr Arg Arg Arg Ile Arg Arg Thr Val Arg Arg Ala Leu Arg Arg Val
210 215 220

[0002]

Ala Ala Cys Gln Ala Asp Arg His Ser Leu Met Ala Lys Tyr Ile Met
 225 230 235 240
 Asp Leu Glu Arg Leu Asp Pro Ala Gly Ala Ala Glu Thr Phe His Val
 245 250 255
 Gly Leu Pro Gly Ala Leu Gly Gly His Asp Gly Leu Gly Leu Leu Arg
 260 265 270
 Val Ala Gly Asp Gly Gly Ile Ala Trp Thr Gln Gly Glu Gln Glu Val
 275 280 285
 Leu Gln Pro Phe Cys Asp Phe Pro Glu Ile Val Asp Ile Ser Ile Lys
 290 295 300
 Gln Ala Pro Arg Val Gly Pro Ala Gly Glu His Arg Leu Val Thr Val
 305 310 315 320
 Thr Arg Thr Asp Asn Gln Ile Leu Glu Ala Glu Phe Pro Gly Leu Pro
 325 330 335
 Glu Ala Leu Ser Phe Val Ala Leu Val Asp Gly Tyr Phe Arg Leu Thr
 340 345 350
 Thr Asp Ser Gln His Phe Phe Cys Lys Glu Val Ala Pro Pro Arg Leu
 355 360 365
 Leu Glu Glu Val Ala Glu Gln Cys His Gly Pro Ile Thr Leu Asp Phe
 370 375 380
 Ala Ile Asn Lys Leu Lys Thr Gly Gly Ser Arg Pro Gly Ser Tyr Val
 385 390 395 400
 Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Phe Asp Ser Phe Leu Leu Thr Val Cys
 405 410 415
 Val Gln Asn Pro Leu Gly Pro Asp Tyr Lys Gly Cys Leu Ile Arg Arg
 420 425 430
 Ser Pro Thr Gly Thr Phe Leu Leu Val Gly Leu Ser Arg Pro His Ser
 435 440 445
 Ser Leu Arg Glu Leu Leu Ala Thr Cys Trp Asp Gly Gly Leu His Val
 450 455 460
 Asp Gly Val Ala Val Thr Leu Thr Ser Cys Cys Ile Pro Arg Pro Lys
 465 470 475 480
 Glu Lys Ser Asn Leu Ile Val Val Gln Arg Gly His Ser Pro Pro Thr
 485 490 495
 Ser Ser Leu Val Gln Pro Gln Ser Gln Tyr Gln Leu Ser Gln Met Thr
 500 505 510
 Phe His Lys Ile Pro Ala Asp Ser Leu Glu Trp His Glu Asn Leu Gly
 515 520 525

[0003]

```

His Gly Ser Phe Thr Lys Ile Tyr Arg Gly Cys Arg His Glu Val Val
530                    535                    540

Asp Gly Glu Ala Arg Lys Thr Glu Val Leu Leu Lys Val Met Asp Ala
545                    550                    555                    560

Lys His Lys Asn Cys Met Glu Ser Phe Leu Glu Ala Ala Ser Leu Met
565                    570                    575

Ser Gln Val Ser Tyr Arg His Leu Val Leu Leu His Gly Val Cys Met
580                    585                    590

Ala Gly Asp Ser Thr Met Val Gln Glu Phe Val His Leu Gly Ala Ile
595                    600                    605

Asp Met Tyr Leu Arg Lys Arg Gly His Leu Val Pro Ala Ser Trp Lys
610                    615                    620

Leu Gln Val Val Lys Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Asn Tyr Leu Glu Asp
625                    630                    635                    640

Lys Gly Leu Pro His Gly Asn Val Ser Ala Arg Lys Val Leu Leu Ala
645                    650                    655

Arg Glu Gly Ala Asp Gly Ser Pro Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro
660                    665                    670

Gly Val Ser Pro Ala Val Leu Ser Leu Glu Met Leu Thr Asp Arg Ile
675                    680                    685

Pro Trp Val Ala Pro Glu Cys Leu Arg Glu Ala Gln Thr Leu Ser Leu
690                    695                    700

Glu Ala Asp Lys Trp Gly Phe Gly Ala Thr Val Trp Glu Val Phe Ser
705                    710                    715                    720

Gly Val Thr Met Pro Ile Ser Ala Leu Asp Pro Ala Lys Lys Leu Gln
725                    730                    735

Phe Tyr Glu Asp Arg Gln Gln Leu Pro Ala Pro Lys Trp Thr Glu Leu
740                    745                    750

Ala Leu Leu Ile Gln Gln Cys Met Ala Tyr Glu Pro Val Gln Arg Pro
755                    760                    765

Ser Phe Arg Ala Val Ile Arg Asp Leu Asn Ser Leu Ile Ser Ser Asp
770                    775                    780

Tyr Glu Leu Leu Ser Asp Pro Thr Pro Gly Ala Leu Ala Pro Arg Asp
785                    790                    795                    800

Gly Leu Trp Asn Gly Ala Gln Leu Tyr Ala Cys Gln Asp Pro Thr Ile
805                    810                    815

Phe Glu Glu Arg His Leu Lys Tyr Ile Ser Gln Leu Gly Lys Gly Asn
820                    825                    830

```

[0004]

Phe Gly Ser Val Glu Leu Cys Arg Tyr Asp Pro Leu Gly Asp Asn Thr
 835 840 845
 Gly Ala Leu Val Ala Val Lys Gln Leu Gln His Ser Gly Pro Asp Gln
 850 855 860
 Gln Arg Asp Phe Gln Arg Glu Ile Gln Ile Leu Lys Ala Leu His Ser
 865 870 875 880
 Asp Phe Ile Val Lys Tyr Arg Gly Val Ser Tyr Gly Pro Gly Arg Gln
 885 890 895
 Ser Leu Arg Leu Val Met Glu Tyr Leu Pro Ser Gly Cys Leu Arg Asp
 900 905 910
 Phe Leu Gln Arg His Arg Ala Arg Leu Asp Ala Ser Arg Leu Leu Leu
 915 920 925
 Tyr Ser Ser Gln Ile Cys Lys Gly Met Glu Tyr Leu Gly Ser Arg Arg
 930 935 940
 Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Glu Ser Glu
 945 950 955 960
 Ala His Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Pro Leu
 965 970 975
 Asp Lys Asp Tyr Tyr Val Val Arg Glu Pro Gly Gln Ser Pro Ile Phe
 980 985 990
 Trp Tyr Ala Pro Glu Ser Leu Ser Asp Asn Ile Phe Ser Arg Gln Ser
 995 1000 1005
 Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr
 1010 1015 1020
 Cys Asp Lys Ser Cys Ser Pro Ser Ala Glu Phe Leu Arg Met Met
 1025 1030 1035
 Gly Cys Glu Arg Asp Val Pro Ala Leu Cys Arg Leu Leu Glu Leu
 1040 1045 1050
 Leu Glu Glu Gly Gln Arg Leu Pro Ala Pro Pro Ala Cys Pro Ala
 1055 1060 1065
 Glu Val His Glu Leu Met Lys Leu Cys Trp Ala Pro Ser Pro Gln
 1070 1075 1080
 Asp Arg Pro Ser Phe Ser Ala Leu Gly Pro Gln Leu Asp Met Leu
 1085 1090 1095
 Trp Ser Gly Ser Arg Gly Cys Glu Thr His Ala Phe Thr Ala His
 1100 1105 1110
 Pro Glu Gly Lys His His Ser Leu Ser Phe Ser

[0005]

1115

1120

1 MAPPSEETPL IPQRSCSLLS TEAGALHVLL PARGPGPPQR LSFSFGDHLA
51 EDLCVQAAKA SGILPVIHSL FALATEDLSC WFPPSHIFSV EDASTQVLLY
101 RIRFYFPNWF GLEKCHREGL RKDLASAILD LPVLEHLFAQ HRSDLVSGRL
151 PVGLSLKEQG ECLSLAVLDL ARMAREQAQR PGELLKTVSY KACLPPSLRD
201 LIQGLSFVTR RRIRRTVRRR LRRVAACQAD RHSLMAKYIM DLERLDPAGA
251 AETFHVGLPG ALGGHDGLGL LRVAGDGGIA WTQGEQEVLO PFCDFPEIVD
301 ISIKQAPRVG PAGEHRLVTV TRTDNQILEA EFPGLPEALS FVALVDGYFR
351 LTTDSQHFFC KEVAPPRLE EVAEQCHGPI TLDFAINKLK TGGSRPGSYV
401 LRRSPQDFDS FLLTVCVQNP LGPDYKGCLI RRSPTGTFLV VGLSRPHSSL
451 RELLATCWDG GLHVDGVAVT LTSCCIPRPK EKSNIIVVQR GHSPPTSSLV
501 QPQSQYQLSQ MTFHKIPADS LEWHENLGHG SFTKIYRGCR HEVVDGEARK
551 TEVLLKVMDA KHKNCMESFL EAASLMSQVS YRHLVLLHGV CMAGDSTMVQ
601 EFVHLGAIDM YLRKRGLHVP ASWKLQVVKQ LAYALNYLED KGLPHGNVSA
651 RKVLLAREGA DGSPPFIKLS DPGVSPAVLS LEMLTDRIPW VAPECLREAQ
701 TLSLEADKWG FGATVWEVFS GVTMPISALD PAKKLQFYED RQQLPAPKWT
751 ELALLIQQCM AYEPVQRPSF RAVIRDLNSL ISSDYELLSD PTPGALAPRD
801 GLWNGAQLYA CQDPTIFEER HLKYISQLGK GNFGSVELCR YDPLGDNTGA
851 LVAVKQLQHS GPDQQRDFQR EIQILKALHS DFIVKYRGVS YGPGRQSLRL
901 VMEYLPSGCL RDFLQRHRAR LDASRLLLYS SQICKGMEYL GSRRCVHRDL
951 AARNILVESE AHVKIADFGI AKLLPLDKDY YVVREPGQSP IFWYAPESLS
1001 DNIFSRQSDV WSFGVVLYEL FTYCDKSCSP SAEFLRMMGC ERDVPALCRL
1051 LELLEEGQRL PAPPACPAEV HELMKLCWAP SPQDRPSFSA LGPQLDMLWS
1101 GSRGCETHAF TAHPEGKHHS LSFS

图 1