



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105073750 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201480011832. 1

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22) 申请日 2014. 03. 03

代理人 安佩东 黄革生

(30) 优先权数据

61/772, 938 2013. 03. 05 US

(51) Int. Cl.

C07D 473/16(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07D 473/34(2006. 01)

2015. 09. 01

A61K 31/52(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 11/06(2006. 01)

PCT/EP2014/054017 2014. 03. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/135473 EN 2014. 09. 12

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·德 文森特 菲达尔格

R·多米尼克

F·J·罗裴茨-塔比阿 S-S·苏

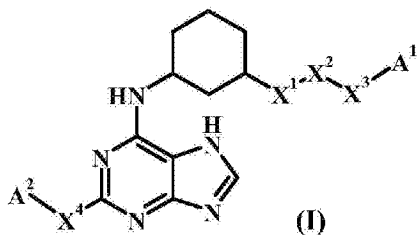
权利要求书2页 说明书31页

(54) 发明名称

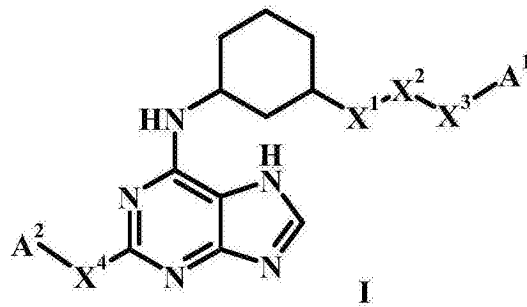
布鲁顿氏酪氨酸激酶抑制剂

(57) 摘要

本申请公开了可抑制 BTK 的通式 (I) 的化合物, 其中所有变量如本文所定义。本文所公开的化合物可用于调节 BTK 的活性并且可用于治疗与过度 BTK 活性有关的疾病。该化合物还可用于治疗与异常 B- 细胞增殖有关的炎性和自身免疫性疾病例如类风湿性关节炎。本发明还公开了含有式 (I) 化合物和至少一种载体、稀释剂或赋形剂的组合物。



1. 式 I 的化合物或其可药用的盐,



其中:

A¹是 H 或 A¹' ;

A¹' 是任选地被一个或多个 A¹'' 取代的低级烷基或苯基 ;

各 A¹'' 独立地是卤素或低级烷基 ;

A²是 H 或 A²' ;

A²' 是任选地被低级烷基取代的杂芳基 ;

X¹是 -NH、C(=O) 或不存在 ;

X²是 -NH、C(=O) 或不存在 ;

X³是低级亚烷基或不存在 ; 并且

X⁴是 -NH 或不存在。

2. 权利要求 1 所述的化合物, 其中 X¹是 -NH。

3. 权利要求 1 或 2 所述的化合物, 其中 X²是 -C(=O)。

4. 权利要求 1-3 中的任一项所述的化合物, 其中 X³不存在。

5. 权利要求 1-4 中的任一项所述的化合物, 其中 A¹是任选地被一个或多个 A¹'' 取代的苯基。

6. 权利要求 1-5 中的任一项所述的化合物, 其中 X⁴不存在。

7. 权利要求 1-6 中的任一项所述的化合物, 其中 A²是 H。

8. 权利要求 1 所述的化合物, 其中 X¹是 -C(=O)。

9. 权利要求 8 所述的化合物, 其中 X²是 -NH。

10. 权利要求 8 或 9 所述的化合物, 其中 X³是亚甲基。

11. 权利要求 8-10 中的任一项所述的化合物, 其中 A¹是任选地被一个或多个 A¹'' 取代的苯基。

12. 权利要求 8-11 中的任一项所述的化合物, 其中 A²是 H。

13. 权利要求 8-12 中的任一项所述的化合物, 其中 X⁴不存在。

14. 权利要求 1 所述的化合物, 其中 X⁴是 -NH, A²是吡啶基并且 A²' 是甲基。

15. 权利要求 1-14 中的任一项所述的化合物, 其选自以下化合物:

4-叔丁基-N-[3-(7H-嘌呤-6-基氨基)环己基]苯甲酰胺;

N-[(3-氯苯基)甲基]-3-(9H-嘌呤-6-基氨基)环己烷-1-甲酰胺;

6-N-环己基-2-N-(1-甲基吡啶-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺;

6-N-(3-甲基环己基)-2-N-(1-甲基吡啶-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺; 和

4-叔丁基-N-[3-[[2-[(1-甲基吡啶-4-基)氨基]-9H-嘌呤-6-基]氨基]环己基]

苯甲酰胺。

16. 权利要求 1-14 中的任一项所述的化合物,其选自以下化合物:

4-叔丁基-N-[3-(9H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-苯甲酰胺;

3-(9H-嘌呤-6-基氨基)-环己烷甲酸 3-氯-苄基酰胺,

N*6*-环己基-N*2*-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺;

N*6*-(3-甲基-环己基)-N*2*-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺;和

4-叔丁基-N-{3-[2-(1-甲基-1H-吡唑-4-基氨基)-9H-嘌呤-6-基氨基]-环己基}-苯甲酰胺。

17. 一种治疗炎性和/或自身免疫性病症的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的权利要求 1-16 中任一项所述的化合物。

18. 一种治疗炎性病症的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的权利要求 1-16 中任一项所述的化合物。

19. 一种治疗类风湿性关节炎的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的权利要求 1-16 中任一项所述的化合物。

20. 一种治疗哮喘的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的权利要求 1-16 中任一项所述的化合物。

21. 一种药物组合物,其包含权利要求 1-16 中任一项所述的化合物以及至少一种可药用的载体、赋形剂或稀释剂。

22. 权利要求 1-16 中任一项所述的化合物在治疗炎性和/或自身免疫性病症中的用途。

23. 权利要求 1-16 中任一项所述的化合物在制备用于治疗炎性和/或自身免疫性病症的药物中的用途。

24. 用于治疗炎性和/或自身免疫性病症的权利要求 1-16 中任一项所述的化合物。

25. 如上所述的本发明。

布鲁顿氏酪氨酸激酶抑制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及抑制 BTK 并可用于治疗由异常的 B- 细胞活化造成的自身免疫和炎性疾病的新化合物的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 蛋白激酶构成了人类酶中最大的一族并且通过向蛋白加成磷酸根基团来调节许多不同的信号过程 (T. Hunter, Cell 1987 50:823-829)。具体而言,酪氨酸激酶磷酸化蛋白中酪氨酸残基的苯酚部分。酪氨酸激酶族包括控制细胞生长、迁移和分化的成员。已经表明在许多人类疾病中都涉及异常的激酶活性,所述疾病包括癌症、自身免疫性和炎性疾病。由于蛋白激酶是细胞信号传导的关键调节剂,它们因此提供了用小分子激酶抑制剂调节细胞功能的靶点,成为良好的药物设计靶点。除治疗激酶介导的疾病过程外,也可用激酶活性的有效的选择性抑制剂来研究细胞信号传导过程和鉴定治疗感兴趣的其它细胞靶点。

[0004] 有良好的证据表明 B- 细胞在自身免疫和 / 或炎性疾病的发病机理中起关键作用。消耗 B 细胞的以蛋白为基础的疗法如利妥昔单抗 (Rituxan) 可有效对抗自身抗体驱动的炎性疾病如类风湿性关节炎 (Rastetter 等, Annu Rev Med 2004 55:477)。因此,在 B- 细胞活化中起一定作用的蛋白激酶抑制剂将可用于治疗 B- 细胞介导的疾病病理学如自身抗体产生。

[0005] 通过 B- 细胞受体 (BCR) 的信号传导控制着包括增殖和分化成成熟的抗体生产细胞在内的一系列 B- 细胞应答。BCR 是 B- 细胞活性的关键调节点,异常的信号传导可造成失调的 B- 细胞增殖和形成导致多种自身免疫和 / 或炎性疾病的致病性自身抗体。布鲁顿氏 (Bruton's) 酪氨酸激酶 (BTK) 是一种非 -BCR 关联性激酶,其位于膜近侧区并且直接位于 BCR 的下游。已经表明 BTK 的缺乏阻断了 BCR 信号传导,因此,抑制 BTK 将是一种阻断 B- 细胞介导的疾病进程的有用的治疗途径。

[0006] BTK 是酪氨酸激酶 Tec 族的一员,已经表明其是早期 B- 细胞发育和成熟的 B- 细胞活化和存活的关键调节剂 (Khan 等, Immunity 1995 3:283 ;Ellmeier 等, J. Exp. Med. 2000 192:1611)。人体内的 BTK 突变导致了 X- 连锁无丙种球蛋白血症 (XLA) (Rosen 等, New Eng. J. Med. 1995 333:431 和 Lindvall 等, Immunol. Rev. 2005 203:200 中的综述)。这些患者免疫功能低下,表现出 B- 细胞成熟受损、免疫球蛋白和外周 B- 细胞水平下降、不依赖 T- 细胞的免疫应答减少以及 BCR 刺激后的钙动员减弱。

[0007] BTK- 缺乏小鼠模型也提供了 BTK 在自身免疫和炎性疾病中的作用的证据。在全身性红斑狼疮 (SLE) 的临床前鼠科动物模型中, BTK- 缺乏小鼠表现出显著的疾病进程改善。此外, BTK- 缺乏小鼠耐受胶原诱导的关节炎 (Jansson 和 Holmdahl Clin. Exp. Immunol. 1993 94:459)。已经证明一种选择性 BTK 抑制剂在小鼠关节炎模型中表现出剂量依赖性的功效 (Z. Pan 等, Chem. Med Chem. 2007 2:58-61)。

[0008] BTK 也通过参与疾病进程的除 B- 细胞外的其它细胞进行表达。例如, BTK 由肥大细胞表达,并且得自 BTK- 缺乏的骨髓的肥大细胞表现出受损的抗原诱导的脱粒作用 (Iwaki 等, J. Biol. Chem. 2005 280:40261)。这表明 BTK 可用于治疗病理性肥大细胞应答如过敏和

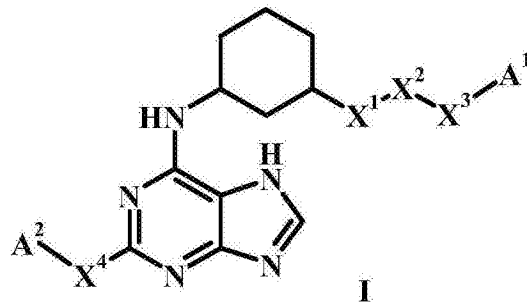
哮喘。得自无 BTK 活性的 XLA 患者的单核细胞在刺激后也表现出 TNF α 产生减少 (Horwood 等, J Exp Med 197:1603, 2003)。因此,可用小分子 BTK 抑制剂来调控 TNF α 介导的炎症。还报道了 BTK 在细胞凋亡中起一定作用 (Islam 和 Smith Immunol.Rev.2000 178:49),因此, BTK 抑制剂将可用于治疗某些 B- 细胞淋巴瘤和白血病 (Feldhahn 等, J. Exp. Med. 2005 201:1837)。

[0009] 发明概述

[0010] 本申请提供了如本文下面所述的式 I 的 BTK 抑制剂化合物、其使用方法：

[0011] 本申请提供了式 I 化合物或其可药用的盐，

[0012]



[0013] 其中：

[0014] A^1 是 H 或 $A^{1'}$ ；

[0015] $A^{1'}$ 是任选地被一个或多个 $A^{1''}$ 取代的低级烷基或苯基；

[0016] 各 $A^{1''}$ 独立地是卤素或低级烷基；

[0017] A^2 是 H 或 $A^{2'}$ ；

[0018] $A^{2'}$ 是任选地被低级烷基取代的杂芳基；

[0019] X^1 是 -NH、C(=O) 或不存在；

[0020] X^2 是 -NH、C(=O) 或不存在；

[0021] X^3 是低级亚烷基或不存在；并且

[0022] X^4 是 -NH 或不存在。

[0023] 本申请提供了治疗炎症和 / 或自身免疫性病症的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的化合物。

[0024] 本申请提供了一种包含式 I 化合物和至少一种可药用的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。

[0025] 发明的详细描述

[0026] 定义

[0027] 本文所用的措辞“一个”或“一种”是指一个或多个该类实体；例如,一种化合物是指一种或多种化合物或至少一种化合物。因此,术语“一个”、“一个或多个”和“至少一个”在本文可互换使用。

[0028] 措辞“如本文上面所定义”是指如发明概述或范围最宽的权利要求中提供的各基团范围最宽的定义。在下面提供的所有其它实施方案中,可存在于各实施方案中和没有明确定义的取代基保留发明概述中提供的范围最宽的定义。

[0029] 无论是在连接语还是在权利要求的主体中,本说明书中所用的术语“包含”被解释

为具有开放式含义。即,该术语被解释为与“至少具有”或“至少包括”的措辞同义。当用于一种方法中时,术语“包含”意指该方法至少包括所列举的步骤,但是也可以包括其它步骤。当用于化合物或组合物背景中时,术语“包含”意指该化合物或组合物至少包括所列举的特征或组分,但是也可以包括其它特征或组分。

[0030] 除非另外特别说明,否则本文所用的词语“或”的用法是“和 / 或”的“包含”的含义,而不是“二选一 / 或者”的“排他的”含义。

[0031] 本文用术语“独立地”表示一种变量在任何一种情况中均适用,不考虑同一化合物中存在还是不存在具有相同或不同定义的变量。因此,在其中 R” 出现两次并被定义为“独立地是碳或氮”的化合物中,两个 R” 可以都是碳,两个 R” 可以都是氮,或者一个 R” 可以是碳而另一个可以是氮。

[0032] 当任何变量在描绘或描述本发明所用或所要保护的化合物的任何部分或结构式中出现一次以上时,其每次出现时的定义与其在每次另外出现时的定义是独立的。只有当所述化合物是稳定的化合物时,取代基和 / 或变量的组合才是允许的。

[0033] 位于一个键的末端的符号“*”或穿过一个键的符号“———”各自是指官能团或其它化学部分与其是其中一部分的分子的其余部分的连接点。因此,例如:



[0035] 画入环系内的键(与连接在不同顶点上的键相反)表示该键可连接到任何适宜的环原子上。

[0036] 本文所用的术语“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况可以发生但不一定发生,并且该描述包括其中该事件或情况发生的情况和其不发生的情况。例如,“任选地被取代的”意指该任选地被取代的部分可结合氢原子或取代基。

[0037] 措辞“任选的键”意指该键可存在或不存在,并且该描述包括单键、双键或三键。如果一种取代基被定义为“键”或“不存在”,则与该取代基相连的原子直接相连。

[0038] 本文所用的术语“约”意指大概、在……附近、大致或左右。当术语“约”与数字范围联用时,其通过使边界在所给出的数值上向上和向下延伸对该范围进行修饰。一般而言,本文所用的术语“约”将所述数值上下改变 20%。

[0039] 某些式 I 的化合物可能表现出互变异构现象。互变异构化合物可以以两种或多种可互相转化的种类的形式存在。两个原子之间共价键合的氢原子的迁移产生质子互变异构体。互变异构体通常处于平衡状态,并且当试图分离各互变异构体时,通常产生一种混合物,该混合物的化学和物理性质与化合物的混合物一致。平衡的位置取决于分子内的化学特征。例如,在许多脂族醛和酮如乙醛中,酮形式占优,而在苯酚中,烯醇形式占优。常见的质子互变异构体包括酮 / 烯醇 ($-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}- \rightleftharpoons -\text{C}(\text{-OH})=\text{CH}-$)、酰胺 / 亚氨酸 ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}- \rightleftharpoons -\text{C}(\text{-OH})=\text{N}-$) 和脒 ($-\text{C}(=\text{NR})-\text{NH}- \rightleftharpoons -\text{C}(\text{-NHR})=\text{N}-$) 互变异构体。后两种互变异构体在杂芳基和杂环中特别常见,本发明包括所述化合物所有的互变异构形式。

[0040] 除非特别定义,否则本文所用的技术和科学术语具有本发明所属领域技术人员通常所理解的含义。本文参考本领域技术人员已知的各种方法和材料。陈述药理学一般原理的标准参考著作包括 Goodman 和 Gilman 的 *The Pharmacological Basis of Therapeutics*,

第 10 版, McGraw Hill Companies Inc., 纽约 (2001)。可以用本领域技术人员已知的任何适宜材料和 / 或方法来实施本发明。然而, 对优选的材料和方法进行了描述。除非另外指明, 否则在下面说明书和实施例中涉及的材料、试剂等可得自商业来源。

[0041] 本文所述的定义可串接形成化学相关的组合, 如“杂烷基芳基”、“卤代烷基杂芳基”、“芳基烷基杂环基”、“烷基羰基”、“烷氧基烷基”等。当用术语“烷基”在另一个术语后作为后缀时, 如在“苯基烷基”或“羟基烷基”中, 其意指被一至两个选自其它特别命名的基团的取代基取代的如上面所定义的烷基。因此, 例如, “苯基烷基”是指具有一至两个苯基取代基的烷基, 并且因此包括苄基、苯基乙基和联苯基。“烷基氨基烷基”是具有一至两个烷基氨基取代基的烷基。“羟基烷基”包括 2- 羟基乙基、2- 羟基丙基、1-(羟基甲基)-2- 甲基丙基、2- 羟基丁基、2, 3- 二羟基丁基、2-(羟基甲基)、3- 羟基丙基等。因此, 如本文所用的那样, 用术语“羟基烷基”来定义下面所定义的杂烷基的一个子集。术语-(芳) 烷基是指未被取代的烷基或芳烷基。术语(杂) 芳基是指芳基或杂芳基。

[0042] 本文所用的术语“螺环烷基”意指螺环的环烷基, 例如, 螺环 [3. 3] 庚烷。本文所用的术语螺杂环烷基意指螺环的杂环烷基, 例如, 2, 6- 二氮杂螺环 [3. 3] 庚烷。

[0043] 本文所用的术语“酰基”表示式 $-C(=O)R$ 的基团, 其中 R 是氢或如本文所定义的低级烷基。本文所用的术语“烷基羰基”表示其中 R 是如本文所定义的烷基的式 $C(=O)R$ 的基团。术语 C_6 酰基是指包含 6 个碳原子的基团 $-C(=O)R$ 。本文所用的术语“芳基羰基”意指其中 R 是芳基的式 $C(=O)R$ 的基团; 本文所用的术语“苯甲酰基”是其中 R 是苯基的“芳基羰基”。

[0044] 本文所用的术语“酯”表示其中 R 是如本文所定义的低级烷基的式 $-C(=O)OR$ 的基团。

[0045] 本文所用的术语“烷基”表示包含 1 至 10 个碳原子的直链或支链的饱和单价烃残基。术语“低级烷基”表示包含 1 至 6 个碳原子的直链或支链烃残基。本文所用的“ C_{1-10} 烷基”是指由 1 至 10 个碳组成的烷基。烷基的实例非限制性地包括低级烷基, 包括甲基、乙基、丙基、异 - 丙基、正 - 丁基、异 - 丁基、叔 - 丁基或戊基、异戊基、新戊基、己基、庚基和辛基。

[0046] 当术语“烷基”在另一个术语后用作后缀时, 如在“苯基烷基”或“羟基烷基”中, 其意指被一至两个选自其它特定命名的基团的取代基取代的如上面所定义的烷基。因此, 例如, “苯基烷基”表示基团 $R'R''-$, 其中 R' 是苯基, R'' 是如本文所定义的亚烷基, 应当清楚的是, 该苯基烷基部分的连接点将位于亚烷基上。芳基烷基的实例非限制性地包括苄基、苯基乙基、3- 苯基丙基。术语“芳基烷基”或“芳烷基”具有类似解释, 只是 R' 是芳基。术语“(杂) 芳基烷基”或“(杂) 芳烷基”具有类似解释, 只是 R' 任选地是芳基或杂芳基。

[0047] 术语“卤代烷基”或“卤代 - 低级烷基”或“低级卤代烷基”是指其中一个或多个碳原子被一个或多个卤素原子取代的包含 1 至 6 个碳原子的直链或支链烃残基。

[0048] 除非另外表明, 否则本文所用的术语“亚烷基”表示 1 至 10 个碳原子的二价饱和直链烃基 (例如, $(CH_2)_n$) 或 2 至 10 个碳原子的二价饱和支链烃基 (例如, $-CHMe-$ 或 $-CH_2CH(i-Pr)CH_2-$)。除亚甲基的情况外, 亚烷基的开放价键不连接在相同原子上。亚烷基的实例非限制性地包括亚甲基、亚乙基、亚丙基、2- 甲基 - 亚丙基、1, 1- 二甲基 - 亚乙基、亚丁基、2- 乙基亚丁基。

[0049] 本文所用术语“烷氧基”意指 -O- 烷基,其中烷基如上面所定义,如甲氧基、乙氧基、正-丙氧基、异-丙氧基、正-丁氧基、异-丁氧基、叔-丁氧基、戊氧基、己氧基,包括其异构体。本文所定义的“低级烷氧基”表示具有如前面所定义的“低级烷基”的烷氧基。本文所用的“C₁₋₁₀烷氧基”是指其中烷基是 C₁₋₁₀的 -O- 烷基。

[0050] 术语“PCy₃”是指被三个环状部分三取代的磷。

[0051] 术语“卤代烷氧基”或“卤代-低级烷氧基”或“低级卤代烷氧基”是指其中一个或多个碳原子被一个或多个卤素原子取代的低级烷氧基。

[0052] 本文所用的术语“羟基烷基”表示其中不同碳原子上的一至三个氢原子被羟基代替的如本文所定义的烷基。

[0053] 本文所用的术语“烷基磺酰基”和“芳基磺酰基”是指式 -S(=O)₂R 的基团,其中 R 分别是烷基或芳基且烷基和芳基如本文所定义。本文所用的术语“杂烷基磺酰基”表示式 -S(=O)₂R 的基团,其中 R 是如本文所定义的“杂烷基”。

[0054] 本文所用的术语“烷基磺酰基氨基”和“芳基磺酰基氨基”是指式 -NR'S(=O)₂R 的基团,其中 R 分别是烷基或芳基,R' 是氢或 C₁₋₃烷基,且烷基和芳基如本文所定义。

[0055] 本文所用的术语“环烷基”是指包含 3 至 8 个碳原子的饱和碳环,即环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或环辛基。本文所用的“C₃₋₇环烷基”是指在碳环中由 3 至 7 个碳组成的环烷基。

[0056] 本文所用的术语“羧基-烷基”是指其中一个氢原子被羧基取代的烷基部分,应当清楚的是,该杂烷基是通过碳原子连接的。术语“羧基”是指 -CO₂H 部分。

[0057] 本文所用的术语“杂芳基”或“杂芳族的”意指具有至少一个芳族或部分不饱和环的 5 至 12 个环原子的单环或二环基团,每个环包含四至八个原子,混有一个或多个 N、O 或 S 杂原子,其余的环原子是碳,应当清楚的是,该杂芳基的连接点将位于芳族或部分不饱和环上。如本领域技术人员众所周知的那样,杂芳基环比其全碳副本的芳族特性低。因此,对于本发明的目的而言,杂芳基仅需要具有一定程度的芳族特性。杂芳基部分的实例包括具有 5 至 6 个环原子和 1 至 3 个杂原子的单环芳族杂环,非限制性地包括吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噁唑基、4,5-二氢-噁唑基、5,6-二氢-4H-[1,3]噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、三唑啉、噁二唑和噁二唑啉(oxadiazoline),其可任选地被一个或多个,优选一个或两个选自羟基、氰基、烷基、烷氧基、硫代、低级卤代烷氧基、烷硫基、卤素、低级卤代烷基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、卤素、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氨基烷基、烷基氨基烷基和二烷基氨基烷基、硝基、烷氧基羰基和氨基甲酰基、烷基氨基甲酰基、二烷基氨基甲酰基、芳基氨基甲酰基、烷基羰基氨基和芳基羰基氨基的取代基取代。二环部分的实例非限制性地包括喹啉基、异喹啉基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、萘啶基、5,6,7,8-四氢-[1,6]萘啶基和苯并异噻唑。二环部分可任选地在任何一个环上被取代,但是,其连接点位于包含杂原子的环上。

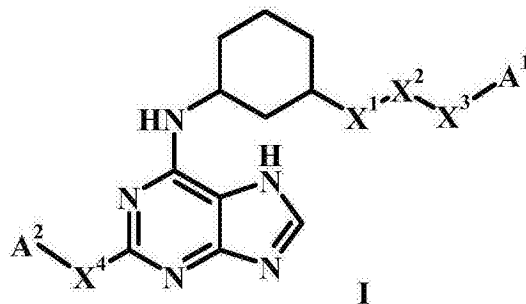
[0058] 除非特别说明,本文所用的术语“杂环基”、“杂环烷基”或“杂环”表示由一个或多个环,优选一至两个环组成的单价饱和环状基团(包括螺环环系)以及其离子形式,每个环包含三至八个原子,混有一个或多个环杂原子(选自 N、O 或 S(O)₀₋₂),并且可任选地被一个或多个,优选一个或两个选自羟基、氧代、氰基、低级烷基、低级烷氧基、低级卤代烷氧基、烷

硫基、卤素、低级卤代烷基、羟基烷基、硝基、烷氧基羰基、氨基、烷基氨基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、烷基氨基磺酰基、芳基氨基磺酰基、烷基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、烷基氨基羰基、芳基氨基羰基、烷基羰基氨基、芳基羰基氨基的取代基独立地取代。杂环基团的实例非限制性地包括吗啉基、哌嗪基、哌啶基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、六氢氮杂萘基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、咪唑烷基、噻唑烷基、异咪唑烷基、四氢吡喃基、硫代吗啉基、奎宁环基和咪唑啉基，以及其离子形式。实例还可以是双环，如，例如，3, 8-二氮杂-双环[3. 2. 1]辛烷、2, 5-二氮杂-双环[2. 2. 2]辛烷或八氢-吡嗪并[2, 1-c][1, 4]咪唑。

[0059] BTK 抑制剂

[0060] 本申请提供了式 I 化合物或其可药用的盐，

[0061]



[0062] 其中：

[0063] A¹是 H 或 A¹'；

[0064] A¹' 是任选地被一个或多个 A¹'' 取代的低级烷基或苯基；

[0065] 各 A¹'' 独立地是卤素或低级烷基；

[0066] A²是 H 或 A²'；

[0067] A²' 是任选地被低级烷基取代的杂芳基；

[0068] X¹是 -NH、C(=O) 或不存在；

[0069] X²是 -NH、C(=O) 或不存在；

[0070] X³是低级亚烷基或不存在；并且

[0071] X⁴是 -NH 或不存在。

[0072] 本申请提供了式 I 化合物，其中 X¹是 -NH。

[0073] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 X²是 -C(=O)。

[0074] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 X³不存在。

[0075] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 A¹是任选地被一个或多个 A¹'' 取代的苯基。

[0076] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 X⁴不存在。

[0077] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 A²是 H。

[0078] 本申请提供了式 I 化合物，其中 X¹是 -C(=O)。

[0079] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 X²是 -NH。

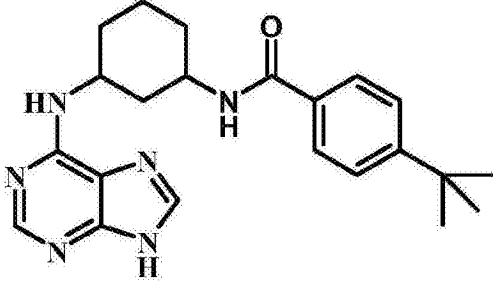
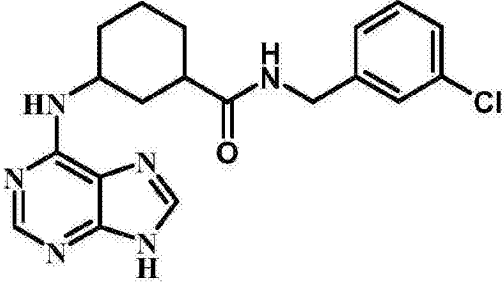
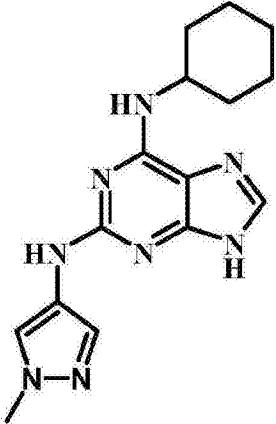
[0080] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 X³是亚甲基。

[0081] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 A¹是任选地被一个或多个 A¹'' 取代的苯基。

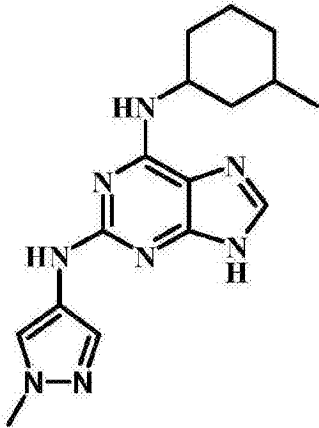
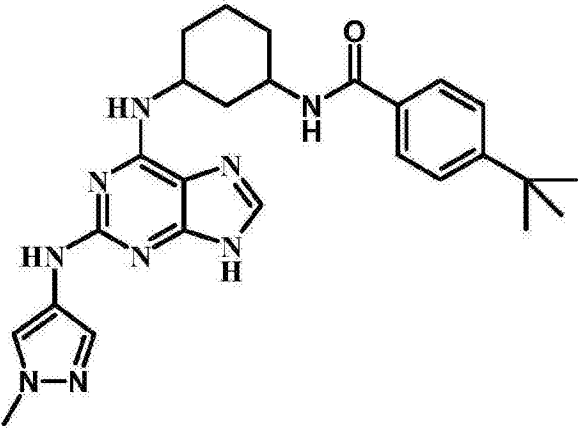
[0082] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 A²是 H。

[0083] 本申请提供了以上的式 I 化合物，其中 X⁴不存在。

- [0084] 本申请提供了式 I 化合物,其中 X⁴是 -NH, A²是吡唑基并且 A^{2'} 是甲基。
- [0085] 本申请提供了选自下列的式 I 化合物:
- [0086] 4-叔丁基-N-[3-(7H-嘌呤-6-基氨基)环己基]苯甲酰胺;
- [0087] N-[(3-氯苯基)甲基]-3-(9H-嘌呤-6-基氨基)环己烷-1-甲酰胺;
- [0088] 6-N-环己基-2-N-(1-甲基吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺;
- [0089] 6-N-(3-甲基环己基)-2-N-(1-甲基吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺;和
- [0090] 4-叔丁基-N-[3-[[2-[(1-甲基吡唑-4-基)氨基]-9H-嘌呤-6-基]氨基]环己基]苯甲酰胺。
- [0091] 本申请提供了一种治疗炎性和/或自身免疫性病症的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的化合物。
- [0092] 本申请提供了一种治疗类风湿性关节炎的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的化合物。
- [0093] 本申请提供了一种治疗哮喘的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的化合物。
- [0094] 本申请提供了一种包含式 I 化合物的药物组合物。
- [0095] 本申请提供了一种包含式 I 化合物和至少一种可药用的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。
- [0096] 本申请提供了式 I 化合物在制备治疗炎症的药物中的用途。
- [0097] 本申请提供了式 I 化合物在制备治疗自身免疫性病症的药物中的用途。
- [0098] 本申请提供了式 I 化合物在制备治疗类风湿性关节炎的药物中的用途。
- [0099] 本申请提供了式 I 化合物在制备治疗哮喘的药物中的用途。
- [0100] 本申请提供了如上所述的化合物用于治疗炎性和/或自身免疫性病症的用途。
- [0101] 本申请提供了如上所述的化合物用于治疗类风湿性关节炎的用途。
- [0102] 本申请提供了如上所述的化合物用于治疗哮喘的用途。
- [0103] 本申请提供了如本文所述的化合物、方法或组合物。
- [0104] 化合物和制备
- [0105] 在下表中提供了本发明所包括的在本发明范围内的典型化合物的实例。提供下面的这些实施例和制备例以使得本领域技术人员可更清楚地理解和实施本发明。它们仅仅是本发明的说明和代表,不应被看成是对本发明范围的限制。
- [0106] 一般而言,本申请中所用的命名法是基于 AUTONOMETM v. 4.0, 一种用于产生 IUPAC 系统命名法的 Beilstein Institute 计算机系统。如果在所示结构和对该结构给出的名称之间有矛盾,则所示结构所占权重更高。此外,如果没有用例如粗体或虚线表明一种结构或结构的一部分的立体化学,则该结构或结构部分被解释为包括其所有立体异构体。
- [0107] 表 I 描述了通式 I 化合物的一些实例:
- [0108] 表 I
- [0109]

化合物	命名	结构
I-1	4-叔丁基-N-[3-(9H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-苯甲酰胺	
I-2	3-(9H-嘌呤-6-基氨基)-环己烷甲酸 3-氯-苄基酰胺	
I-3	N ⁶ -环己基-N ² -(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺	

[0110]

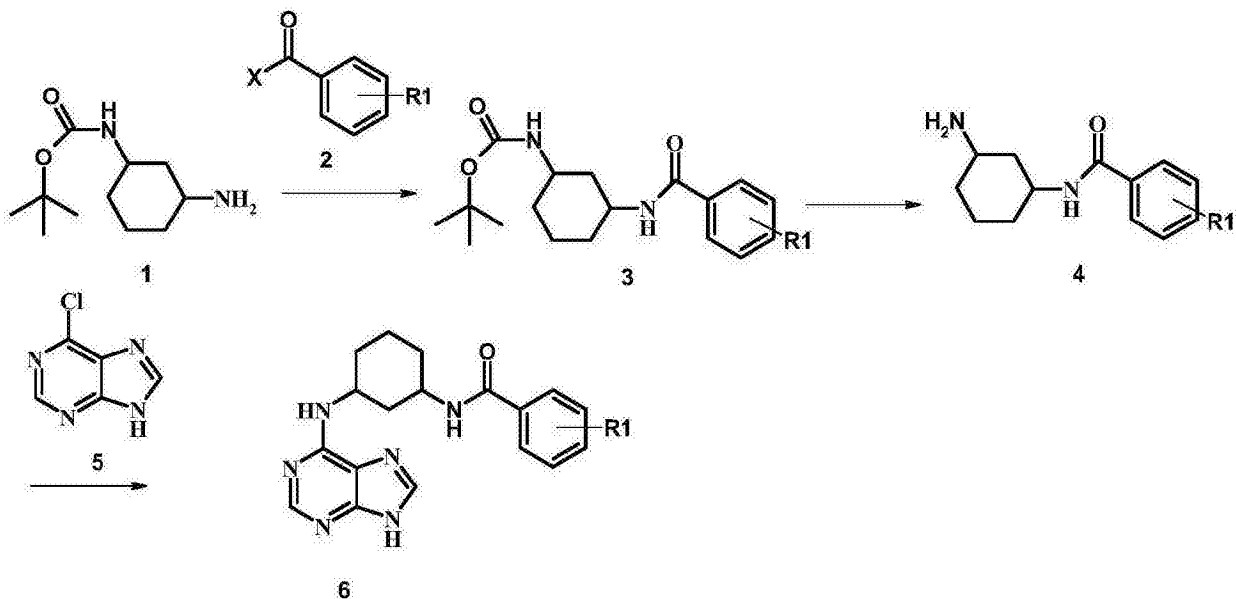
I-4	N [*] 6 [*] -(3-甲基-环己基)-N [*] 2 [*] -(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺	
I-5	4-叔丁基-N-{3-[2-(1-甲基-1H-吡唑-4-基氨基)-9H-嘌呤-6-基氨基]-环己基}-苯甲酰胺	

[0111] 一般合成流程

[0112] 本发明的化合物可通过任何常规方法制备。在实施例中提供了用于合成这些化合物的适宜方法。通常,本发明化合物可按照以下流程制备。

[0113] 流程 1

[0114]

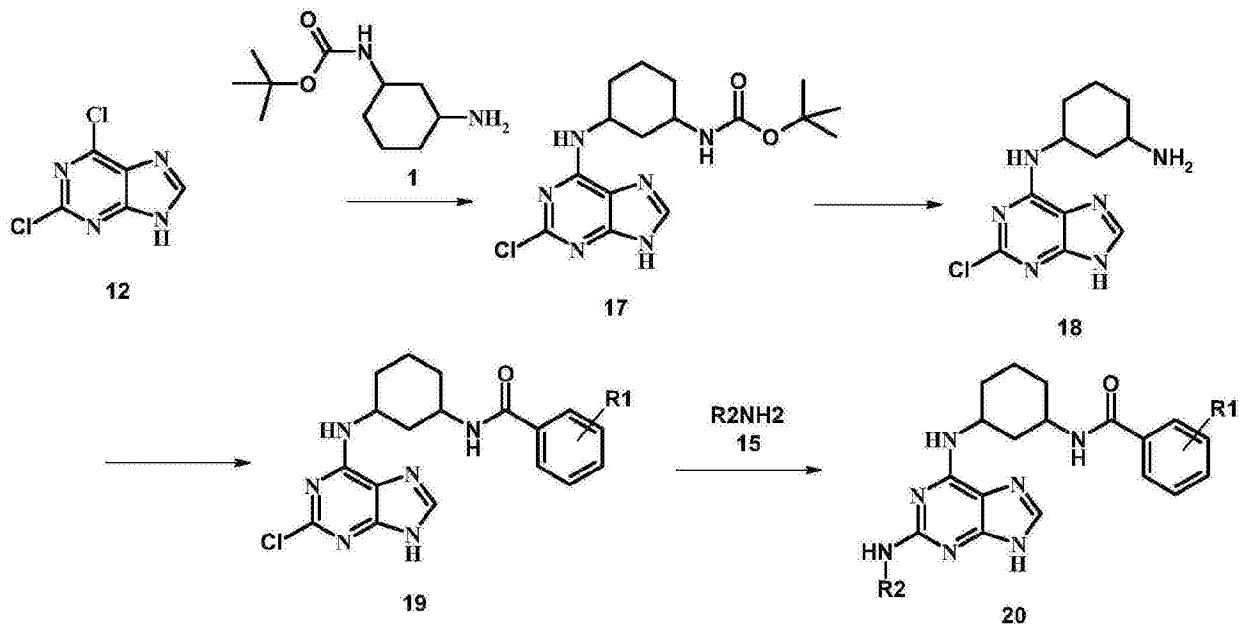


[0115] 其中的R₁如以上通式I中所述的式6化合物可按照流程1来制备。用(3-氨基-环己基)-氨基甲酸叔丁酯(化合物1)作为原料,与2进行酰化反应生成式3化合物中的酰胺

应可在微波照射下在约 150°C 的温度下进行,反应时间为 30 分钟至 2 小时。在该反应过程中,化合物 12 的 6 位上的较活泼的氯被区域选择性地置换。2 位上的较不活泼的氯需要更为苛刻的条件并且需要使用过量的 TMSCl 和 1-甲基-1H-吡唑-4-胺在微波中在 160°C 加热 1 小时(相关的方法参见:Organic Process Research&Development 2006, 10, 799)以得到式 16 的本发明化合物。

[0122] 流程 4

[0123]



[0124] 本发明的式 20 的化合物可按照流程 4 所示进行制备。在上文中已经描述了制备式 20 化合物的类似步骤。

[0125] 药物组合物和施用

[0126] 本发明的化合物可以被配制到多种口服施用剂型和载体中。口服施用可以为片剂、包衣片、糖锭剂、硬和软明胶胶囊、溶液、乳剂、糖浆或混悬液的形式。当通过其它施用途进行施用时,本发明的化合物是有效的,所述其它施用途包括连续(静脉内滴注)局部胃肠外、肌内、静脉内、皮下、经皮(其可包括渗透增强剂)、颊、鼻、吸入和栓剂施用。优选的施用方式通常为使用方便的日给药方案的口服施用,可根据痛苦程度以及患者对活性成分的反应来调整该日给药方案。

[0127] 可以将本发明的一种或多种化合物以及其可药用的盐与一种或多种常规的赋形剂、载体或稀释剂制成药物组合物和单位剂量的形式。该药物组合物和单位剂型可以包含常规比例的常规组分,包含或不包含另外的活性化合物或成分,并且该单位剂型可包含与所用的预期日剂量范围相称的任何适宜有效量的活性成分。该药物组合物可以以固体例如片剂或填充胶囊、半固体、粉剂、缓释制剂、或液体如溶液、混悬液、乳剂、酞剂、或用于口服使用的填充胶囊的形式进行应用;或者可以以用于直肠或阴道施用的栓剂形式进行应用;或者可以以用于胃肠外应用的无菌可注射溶液的形式进行应用。典型的制剂将包含约 5% 至约 95% 的一种或多种活性化合物(w/w)。术语“制剂”或“剂型”意指包括活性化合物的固体和液体制剂,且本领域技术人员将意识到,根据靶器官或组织和所需剂量以及药动学参数,活性成分可存在于不同的制剂中。

[0128] 本文所用的术语“赋形剂”是指用于制备药物组合物的化合物，其通常是安全、无毒的并且在生物学或其它方面不会不可取，并且包括可兽用以及可人类药用的赋形剂。本发明的化合物可单独施用，但是，通常与一种或多种根据所需施用途和标准药理学实践选择的适宜的药用赋形剂、稀释剂或载体混合到一起进行施用。

[0129] “可药用的”意指可用于制备通常是安全、无毒、并且在生物学或其它方面不会不可取的药物组合物，并且包括对于兽用以及人类药用而言可接受的物质。

[0130] 活性成分的“可药用盐”形式可以首先赋予活性成分非盐形式时不存在的所需的药理学性质，并且就活性成分在体内的治疗活性而言，甚至对活性成分的药效学产生积极影响。措辞化合物的“可药用的盐”意指药理学可接受的且具有所需母体化合物的药理学活性的盐。该类盐包括：(1) 与无机酸或有机酸形成的酸加成盐，所述无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等；所述有机酸如乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、枸橼酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷-二磺酸、2-羟基乙烷磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基双环[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡庚糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等；或(2) 当母体化合物中存在的酸性质子被金属离子，例如碱金属离子、碱土金属离子或铝离子代替时形成的盐；或者母体化合物中存在的酸性质子与有机碱如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨基三丁醇、N-甲基葡糖胺等配位形成的盐。

[0131] 固体形式的制剂包括粉剂、片剂、丸剂、胶囊、扁囊剂、栓剂和可分散颗粒。固体载体可以是一种或多种也可作为稀释剂、矫味剂、稳定剂、润滑剂、助悬剂、粘合剂、防腐剂、片剂崩解剂或封装材料的物质。在粉剂中，载体通常是分割的很细的固体，其是一种与分割的很细的活性组分的混合物。在片剂中，通常将活性组分与具有所需结合能力的载体以适宜比例混合并将其压成所需形状和大小。适宜的载体非限制性地包括碳酸镁、硬脂酸镁、滑石粉、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。除活性组分外，固体形式的制剂还可包含着色剂、矫味剂、稳定剂、缓冲剂、人工和天然甜味剂、分散剂、增稠剂、增溶剂等。

[0132] 液体制剂也适用于口服施用，包括乳液、糖浆、酏剂、水溶液、水性混悬液。这些制剂包括用于在临用前转化成液体形式的制剂的固体形式的制剂。乳液可以在溶液、例如丙二醇水溶液中制备，或者可以包含乳化剂如卵磷脂、脱水山梨醇单油酸酯或阿拉伯胶。水溶液可以通过将活性组分溶解于水中并加入适宜的着色剂、矫味剂、稳定剂和增稠剂来进行制备。水性混悬液可以通过将分割的很细的组分分散在含有粘性物质的水中来进行制备，所述粘性物质如天然或合成的树胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和其它众所周知的助悬剂。

[0133] 本发明化合物可以配制成用于胃肠外给药（例如通过注射，如推注或连续输注）的制剂，并可以以单位剂量形式存在于安瓿、预填充的注射器、小容量输注容器或加有防腐剂的多剂量容器中。所述组合物可以采取诸如混悬液、溶液、或位于油性或水性基质中的乳剂，例如位于含水聚乙二醇中的溶液的形式。油性或非水性载体、稀释剂、溶剂或基质的实例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油（例如橄榄油）和可注射的有机酯（例如油酸乙酯），并且其可以包含制剂物质，如防腐剂、润湿剂、乳化剂或助悬剂、稳定剂和/或分散剂。或者，活

性成分可以为通过无菌分离无菌固体或者通过冷冻干燥溶液得到的粉末形式,其用于在使用前用适当的溶媒例如无菌无热原的水配制。

[0134] 本发明化合物可以配制成用于表皮局部给药的制剂,如软膏、霜剂或洗剂,或透皮贴剂。例如,可以用含水或油性基质并加入合适的增稠剂和/或胶凝剂来配制软膏和霜剂。洗剂可以用含水或油性基质来配制,并且通常还含有一种或多种乳化剂、稳定剂、分散剂、助悬剂、增稠剂或着色剂。适于口腔局部给药的制剂包括:在矫味的基质中含有活性剂的锭剂,所述基质通常为蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶;在惰性基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶中含有活性成分的软锭剂;以及在合适的液体载体中含有活性成分的漱口剂。

[0135] 本发明化合物可以配制成栓剂给药。先将低熔点蜡(例如脂肪酸甘油酯的混合物或可可脂)熔化,然后例如通过搅拌将活性成分分散均匀。然后将熔化的均匀混合物倒入适当大小的模具中,使其冷却并固化。

[0136] 本发明化合物可以配制成用于阴道给药的制剂。适宜制剂是除了活性成分外还含有本领域已知载体的子宫托、卫生栓、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂。

[0137] 本发明化合物可以配制成鼻内给药制剂。通过常规方式例如用滴管、吸管或喷雾,将溶液或混悬液直接应用于鼻腔。该制剂可以以单剂量或多剂量形式提供。在滴管或吸管的多剂量的情况中,通过给予患者适当的、预定体积的溶液或混悬液来完成给药。在喷雾的情况下,通过例如计量喷雾泵的方式来完成给药。

[0138] 本发明化合物可以配制成气雾剂给药的形式,特别是用于呼吸道,并且包括鼻内给药的形式。该化合物通常具有很小的粒度,例如五(5)微米或更小。可以用现有技术中已知的方式例如微粉化来获得该类粒度。活性成分在具有适当的抛射剂(如含氯氟烃(CFC),例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷或二氯四氟乙烷,或二氧化碳或其它合适的气体)的加压包装中被提供。气雾剂也可方便地含有表面活性剂如卵磷脂。药物的剂量可通过计量阀控制。或者,活性成分可以是干燥粉末的形式,例如化合物在适当的粉末基质(如乳糖、淀粉、淀粉衍生物如羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷(PVP))中的粉末混合物。粉末载体可在鼻腔内形成凝胶。粉末组合物可以为单位剂量形式,如明胶的胶囊或药筒或铝塑包装,可以用吸入器由所述包装施用该粉末。

[0139] 当需要时,可以用适于活性成分的持续或受控释放给药的肠溶包衣制备制剂。例如,本发明的化合物可以被配制到经皮或皮下药物传递装置中。当化合物的缓释是必要的且患者对治疗方案的依从性至关重要时,这些传递系统是有利的。在透皮传递系统中的化合物通常附着在皮肤粘附性固体载体上。还可以将感兴趣的化合物与渗透促进剂(例如,氮酮(1-十二烷基氮杂-环庚-2-酮))组合。通过手术或注射将缓释传递系统植入皮下层中。皮下埋植剂将化合物包埋在脂溶性膜(例如硅橡胶)或生物可降解聚合物(例如聚乳酸)中。

[0140] 在 Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, E. W. Martin 编辑, Mack Publishing Company, 第 19 版, Easton, Pennsylvania 中描述了适宜制剂以及药用载体、稀释剂和赋形剂。熟练的制剂学家可在说明书教导下对该制剂进行修改从而在不会使本发明组合物不稳定或损害其治疗活性的情况下提供大量用于特定给药途径的制剂。

[0141] 例如,可通过本领域技术人员公知的微小修饰(成盐、酯化等)来对本发明化合物进行修饰以使得它们在水或其它溶媒中的溶解性更好。本领域技术人员还公知的是,可改

变特定化合物的给药途径和剂量方案以控制本发明化合物的药动学,从而将其在患者体内的有益作用最大化。

[0142] 本文所用的术语“治疗有效量”意指减轻个体疾病症状所需的数量。将根据各特定病例的个体需求来对剂量进行调整。该剂量可根据许多因素在很宽的范围内进行变化,所述因素如所治疗疾病的严重程度、患者的年龄和总体健康情况、所治疗的患者使用的其它药物、给药途径和形式以及所涉及的医师的偏好和经验。对于口服给药而言,在单一疗法和/或联合治疗中,约0.01至约1000mg/kg体重/天的日剂量将是适宜的。优选的日剂量为每天约0.1至约500mg/kg体重,更优选0.1至约100mg/kg体重,并且最优选1.0至约10mg/kg体重。因此,对于对70kg体重的人进行的给药而言,剂量范围将为每天约7mg至0.7g。该日剂量可以以单剂量或分割剂量的形式进行给药,每天通常给药1至5个剂量。通常用低于化合物最佳剂量的较小剂量开始治疗。其后,以小的增量增加剂量,直至达到各患者的最佳效果。治疗本文所述疾病领域的普通技术人员将能在不进行过度实验的情况下依赖个人知识、经验和本申请公开的内容,确定对于给定疾病和患者而言本发明化合物的治疗有效量。

[0143] 该药物制剂优选为单位剂型。在该类形式中,制剂被细分成包含适宜量活性组分的单位剂量。该单位剂型可以是进行了包装的制剂,该包装包含离散数量的制剂,例如进行了包装的片剂、胶囊,和位于小瓶或安瓿中的粉剂。该单位剂型也可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身,或者它可以是包装形式的适当数量的任何上述形式。

[0144] 适应症和治疗方法

[0145] 通式 I 的化合物抑制布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK)。BTK 被上游激酶活化导致了磷酸酯酶 $-C\gamma$ 的活化,该磷酸酯酶 $-C\gamma$ 的活化接下来又刺激了促炎介质的释放。式 I 的化合物可用于治疗关节炎和其它抗炎和自身免疫性疾病。因此,式 I 的化合物可用于治疗关节炎。式 I 的化合物可用于抑制细胞中的 BTK 和用于调控 B- 细胞发育。本发明进一步包含含有式 I 化合物和可药用载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。

[0146] 本文所述的化合物是激酶抑制剂,特别是 BTK 抑制剂。这些抑制剂可用于治疗哺乳动物中一种或多种对激酶抑制有响应的疾病,包括对 BTK 抑制和/或 B- 细胞增殖的抑制有响应的疾病。不希望受任何特定理论的束缚,据信本发明化合物与 BTK 的相互作用导致了 BTK 活性的抑制,并因此导致了这些化合物的药物用途。因此,本发明包括对患有对 BTK 活性的抑制和/或抑制 B- 细胞增殖有响应的疾病的哺乳动物、例如人进行治疗的方法,该方法包括给患有该类疾病的哺乳动物施用有效量的至少一种本文所提供的化学实体。可实验确定有效浓度,例如可以通过测定化合物的血液浓度来进行确定,或者可以通过计算生物利用度从理论上确定有效浓度。除 BTK 外,可受影响的其它激酶非限制性地包括其它酪氨酸激酶和丝氨酸/苏氨酸激酶。

[0147] 激酶在控制基础细胞过程如增殖、分化和死亡(细胞凋亡)的信号传导途径中起着重要作用。已经表明在许多疾病中都涉及异常的激酶活性,所述疾病包括多种癌症、自身免疫和/或炎性疾病、以及急性炎症反应。激酶在关键细胞信号传导途径中的多层面作用为鉴定靶向于激酶和信号传导途径的新药提供了重要机遇。

[0148] 一个实施方案包括对患有自身免疫和/或炎性疾病、或对 BTK 活性和/或 B- 细胞增殖的抑制有响应的急性炎症反应的患者进行治疗的方法。

[0149] 可用本发明化合物和组合物影响的自身免疫和 / 或炎性疾病非限制性地包括：银屑病、过敏、克罗恩氏病、肠易激综合征、斯耶格伦氏病、组织移植排斥和移植器官的超急性排斥、哮喘、全身性红斑狼疮（和相关的肾小球肾炎）、皮炎、多发性硬化、硬皮症、血管炎（ANCA- 相关的和其它血管炎）、自身免疫性溶血和血小板减少状态、古德帕斯彻氏综合症（和相关的肾小球肾炎和肺出血）、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、慢性特发性血小板减少性紫癜（ITP）、阿狄森氏病、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、糖尿病、败血性休克和重症肌无力。

[0150] 本文包括治疗方法，其中将至少一种本文所提供的化学实体与抗炎剂联合施用。抗炎剂非限制性地包括 NSAID、非-特异性和 COX-2 特异性环氧合酶抑制剂、金化合物、皮质类固醇、甲氨蝶呤、肿瘤坏死因子受体（TNF）拮抗剂、免疫抑制剂和甲氨蝶呤。

[0151] NSAID 的实例非限制性地包括布洛芬、氟比洛芬、萘普生和萘普生钠、双氯芬酸、双氯芬酸钠和米索前列醇的组合、舒林酸、奥沙普秦、二氟尼柳、吡罗昔康、吲哚美辛、依托度酸、非诺洛芬钙、酮洛芬、萘普酮钠、柳氮磺胺吡啶、甲苯酰吡啶乙酸钠和羟氯喹。NSAID 的实例还包括 COX-2 特异性抑制剂如塞来昔布、伐地考昔、罗美昔布和 / 或依托考昔。

[0152] 在一些实施方案中，抗炎剂是水杨酸盐 / 酯。水杨酸盐 / 酯非限制性地包括乙酰水杨酸或阿司匹林、水杨酸钠、和胆碱和水杨酸镁。

[0153] 抗炎剂还可以是皮质类固醇。例如，皮质类固醇可以是可的松、地塞米松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙、泼尼松龙磷酸钠或泼尼松。

[0154] 在另一些实施方案中，抗炎剂是金化合物如硫代苹果酸金钠或金诺芬。

[0155] 本发明还包括其中抗炎剂是代谢抑制剂如二氢叶酸还原酶抑制剂如甲氨蝶呤或二氢乳清酸脱氢酶抑制剂如来氟米特的实施方案。

[0156] 本发明的其它实施方案涉及组合产品，其中至少一种抗炎化合物是抗 -C5 单克隆抗体（如依库单抗或培克珠单抗）、TNF 拮抗剂如依那西普、或英利昔单抗（其是一种抗 -TNF α 单克隆抗体）。

[0157] 本发明的另一些实施方案涉及另一些组合产品，其中至少一种活性剂是免疫抑制化合物如选自甲氨蝶呤、来氟米特、环孢菌素、他克莫司、硫唑嘌呤和麦考酚酸莫酯的免疫抑制化合物。

[0158] 已经表明表达 BTK 的 B- 细胞和 B- 细胞前体参与 B- 细胞恶性肿瘤的病理学，所述 B- 细胞恶性肿瘤非限制性地包括 B- 细胞淋巴瘤、淋巴瘤（包括何杰金氏和非何杰金氏淋巴瘤）、毛细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、慢性和急性髓细胞白血病和慢性和急性淋巴细胞性白血病。

[0159] 已经表明 BTK 是 B- 系淋巴细胞中 Fas/APO-1 (CD-95) 死亡诱导信号传导复合物 (DISC) 的抑制剂。白血病 / 淋巴瘤细胞的命运可能在于由 DISC 活化的半胱天冬酶的对抗促凋亡作用和涉及 BTK 和 / 或其底物的上游抗细胞凋亡调控机理之间的平衡 (Vassilev 等, J. Biol. Chem. 1998, 274, 1646-1656)。

[0160] 还已经发现, BTK 抑制剂可用作化学敏化剂, 因此, 可用于与其它化疗药, 特别是诱导细胞凋亡的药物联用。可用于与化学敏化性 BTK 抑制剂联用的其它化疗药的实例包括拓扑异构酶 I 抑制剂（喜树碱或拓扑替康）、拓扑异构酶 II 抑制剂（例如道诺霉素和依托泊苷）、烷化剂（例如环磷酰胺、美法仑和 BCNU）、针对微管蛋白的活性剂（例如紫杉醇和长春

花碱)和生物学活性剂(例如抗体如抗 CD20 抗体、IDEC 8、免疫毒素和细胞因子)。

[0161] 已经表明 BTK 活性与一些表达由染色体 9 和 22 的部分的易位产生的 bcr-abl 融合基因的白血病有关。在慢性髓细胞性白血病中通常会观察到这种异常。BTK 被 bcr-abl 激酶结构性磷酸化,该激酶启动在 bcr-abl 细胞中防止细胞凋亡的下游存活信号。(N. Feldhahn 等, J. Exp. Med. 2005201(11):1837-1852)。

[0162] 治疗方法

[0163] 本申请提供了一种治疗炎性和 / 或自身免疫性病症的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的化合物。

[0164] 本申请提供了一种治疗炎性病症的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的化合物。

[0165] 本申请提供了一种治疗类风湿性关节炎的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的化合物。

[0166] 本申请提供了一种治疗哮喘的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I。

[0167] 本申请提供了一种治疗炎性和 / 或自身免疫性病症的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的 BTK 抑制剂化合物。

[0168] 本申请提供了一种治疗关节炎的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的 BTK 抑制剂化合物。

[0169] 本申请提供了一种治疗哮喘的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的 BTK 抑制剂化合物。

[0170] 本申请提供了一种抑制 B- 细胞增殖的方法,其包括给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的 BTK 抑制剂化合物。

[0171] 本申请提供了一种抑制 BTK 活性的方法,其包括施用任何一种式 I 的 BTK 抑制剂化合物,其中所述 BTK 抑制剂化合物在 BTK 活性体外生物化学试验中表现出 50 微摩尔或更低的 IC_{50} 。

[0172] 在上面方法的一个变型中,该 BTK 抑制剂化合物在 BTK 活性体外生物化学试验中表现出 100 纳摩尔或更低的 IC_{50} 。

[0173] 在上面方法的另一个变型中,该化合物在 BTK 活性体外生物化学试验中表现出 10 纳摩尔或更低的 IC_{50} 。

[0174] 本申请提供了一种治疗炎性病症的方法,其包括给需要其的患者共同施用与式 I 的 BTK 抑制剂化合物联合的治疗有效量的抗炎化合物。

[0175] 本申请提供了一种治疗关节炎的方法,其包括给需要其的患者共同施用与式 I 的 BTK 抑制剂化合物联合的治疗有效量的抗炎化合物。

[0176] 本申请提供了一种通过给需要其的患者施用治疗有效量的式 I 的 BTK 抑制剂化合物来治疗淋巴瘤或 BCR-ABL1⁺ 白血病细胞的方法。

[0177] 本发明提供了如上所述的化合物用作治疗活性物质的用途。

[0178] 本发明提供了如上所述的化合物在治疗炎性和 / 或自身免疫性病症中的用途。

[0179] 本发明提供了如上所述的化合物用于制备治疗炎性和 / 或自身免疫性病症的药物的用途。

- [0180] 本发明提供了用于治疗炎性和 / 或自身免疫性病症的如上所述的化合物。
 [0181] 本发明提供了用于治疗类风湿性关节炎的如上所述的化合物。
 [0182] 本发明提供了用于治疗哮喘的如上所述的化合物。
 [0183] 本发明提供了如上所述的本发明。

实施例

- [0184] 缩写
- [0185] AcOH 乙酸
- [0186] BOC 叔丁氧基羰基
- [0187] Bu 丁基
- [0188] BuOH 丁醇
- [0189] CDI 羰基二咪唑
- [0190] Cs₂CO₃ 碳酸铯
- [0191] DCM 二氯甲烷
- [0192] DHP 二氢吡喃
- [0193] DMA 二甲基乙酰胺
- [0194] DIPEA 二异丙基乙基胺
- [0195] DMF N,N- 二甲基甲酰胺
- [0196] DMSO 二甲基亚砷
- [0197] EtOAc 乙酸乙酯
- [0198] EtOH 乙醇
- [0199] H 小时
- [0200] 0-(7- 氮杂苯并三唑 -1- 基)-N, N, N', N' - 四甲基脲
- [0201] HATU 六氟磷酸盐
- [0202] HCl 氯化氢
- [0203] LC-MS 液相色谱 - 质谱
- [0204] HPLC 高压液相色谱
- [0205] K₂CO₃ 碳酸钾
- [0206] MeOH 甲醇
- [0207] Min 分钟
- [0208] MW 微波
- [0209] NMP 1- 甲基 -2- 吡咯烷酮
- [0210] Pd/C 钯碳
- [0211] PdCl₂(dppf) [1, 1' - 双 (二苯基膦) 二茂铁] 二氯化钯 (II)
- [0212] Pd₂(dba)₃ 三 (二亚苄基丙酮) 二钯 (0)
- [0213] Pd(OAc)₂ 乙酸钯
- [0214] Pd(PPh₃)₄ 四 (三苯基膦) 钯
- [0215] PTSA 对甲苯磺酸
- [0216] RT (或 rt) 室温

[0217]	tBuOK	叔丁醇钾
[0218]	TFA	三氟乙酸
[0219]	THF	四氢呋喃
[0220]	THP	四氢吡喃
[0221]	TLC	薄层色谱
[0222]	TMSCl	三甲基氯硅烷
[0223]	Xphos	2-二环己基膦-2',4',6'-三异丙基联苯

[0224] 常用缩写包括：乙酰基 (Ac)、偶氮二异丁腈 (AIBN)、大气压 (Atm)、9-硼杂双环 [3.3.1] 壬烷 (9-BBN 或 BBN)、2,2'-二(二苯基膦基)-1,1'-联萘 (BINAP)、叔丁氧羰基 (Boc)、二叔丁基焦碳酸酯或 boc 酐 (BOC₂O)、苄基 (Bn)、丁基 (Bu)、化学文摘登记号 (CASRN)、苄氧羰基 (CBZ 或 Z)、羰基二咪唑 (CDI)、1,4-二氮杂双环 [2.2.2] 辛烷 (DABCO)、二乙基氨基三氟化硫 (DAST)、二亚苄基丙酮 (dba)、1,5-二氮杂双环 [4.3.0] 壬-5-烯 (DBN)、1,8-二氮杂双环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (DBU)、N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)、1,2-二氯乙烷 (DCE)、二氯甲烷 (DCM)、2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌 (DDQ)、偶氮二甲酸二乙酯 (DEAD)、偶氮二甲酸二异丙酯 (DIAD)、二-异丁基氢化铝 (DIBAL 或 DIBAL-H)、二-异丙基乙基胺 (DIPEA)、N,N-二甲基乙酰胺 (DMA)、4-N,N-二甲基氨基吡啶 (DMAP)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基亚砜 (DMSO)、1,1'-二-(二苯基膦基)乙烷 (dppe)、1,1'-二-(二苯基膦基)二茂铁 (dppf)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI)、2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉 (EEDQ)、乙基 (Et)、乙酸乙酯 (EtOAc)、乙醇 (EtOH)、2-乙氧基-2H-喹啉-1-甲酸乙酯 (EEDQ)、乙醚 (Et₂O)、乙基异丙基醚 (EtOiPr)、0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (HATU)、乙酸 (HOAc)、1-N-羟基苯并三唑 (HOBt)、高压液相色谱 (HPLC)、异-丙醇 (IPA)、异丙基氯化镁 (iPrMgCl)、六甲基二硅氮烷 (HMDS)、液相色谱质谱 (LCMS)、六甲基二硅氮烷锂 (LiHMDS)、间-氯过氧苯甲酸 (m-CPBA)、甲醇 (MeOH)、熔点 (mp)、MeSO₂- (甲磺酰基或 Ms)、甲基 (Me)、乙腈 (MeCN)、间-氯过氧苯甲酸 (MCPBA)、质谱 (ms)、甲基叔-丁基醚 (MTBE)、甲基四氢呋喃 (MeTHF)、N-溴琥珀酰亚胺 (NBS)、正-丁基锂 (nBuLi)、N-羧基酐 (NCA)、N-氯琥珀酰亚胺 (NCS)、N-甲基吗啉 (NMM)、N-甲基吡咯烷酮 (NMP)、氯铬酸吡啶 (PCC)、二氯-((二-二苯基膦基)二茂铁基)钯 (II) (Pd(dppf)Cl₂)、乙酸钯 (II) (Pd(OAc)₂)、三(二亚苄基丙酮)二钯 (0) (Pd₂(dba)₃)、重铬酸吡啶 (PDC)、苄基 (Ph)、丙基 (Pr)、异-丙基 (i-Pr)、磅 / 平方英寸 (psi)、吡啶 (pyr)、1,2,3,4,5-五苯基-1'-(二-叔丁基膦基)二茂铁 (Q-Phos)、室温 (环境温度、rt 或 RT)、仲-丁基锂 (sBuLi)、叔-丁基二甲基甲硅烷基或 t-BuMe₂Si (TBDMS)、四-正丁基氟化铵 (TBAF)、三乙胺 (TEA 或 Et₃N)、2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基 (TEMPO)、三甲基甲硅烷基乙氧基甲基 (SEM)、三氟甲磺酸酯或 CF₃SO₂- (Tf)、三氟乙酸 (TFA)、1,1'-二-2,2,6,6-四甲基庚烷-2,6-二酮 (TMHD)、0-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐 (TBTU)、薄层色谱 (TLC)、四氢呋喃 (THF)、三甲基甲硅烷基或 Me₃Si (TMS)、对-甲苯磺酸单水合物 (TsOH 或 pTsOH)、4-Me-C₆H₄SO₂- 或甲苯磺酰基 (Ts)、N-尿烷-N-羧基酐 (UNCA)。当与烷基部分一起使用时,包括前缀正 (n)、异 (i-)、仲 (sec-)、叔 (t-) 和新在的常规命名法具有其常规含义。(J. Rigaudy 和 D. P. Klesney, Nomenclature in Organic Chemistry, IUPAC 1979 Pergamon Press, 牛津大学)。

[0225] 一般条件

[0226] 本发明的化合物可以用可商业获得的起始材料开始,用本领域技术人员已知的一般合成技术和操作来进行制备。下面的概述是适于制备该类化合物的反应流程。在具体实施例中可以找到进一步的例证。

[0227] 制备实施例

[0228] 试剂购买自 Aldrich、Sigma、Maybridge、Oakwood、Arkpharminc 或其它供应商,并且不经进一步纯化直接使用。利用微波照射加热的反应利用 Personal Chemistry Emrys Optimizer System 或 CEM Discovery System 进行。微克级至数克级规模化合物的纯化通过本领域技术人员已知的方法进行,例如硅胶快速色谱;在某些情况下还可利用一次性的预装填克级硅胶柱 (RediSep)TM 进行制备型快速柱纯化,用 CombiFlash 系统洗脱。BiotageTM 和 ISCOTM 也是可用于本发明以纯化中间体的快速柱仪器。

[0229] 为了鉴定化合物的身份和纯度,利用以下系统记录 LC/MS(液相色谱/质谱)波谱。对于质谱的测定,该系统由 Micromass Platform II 分光计:正离子模式的 ES 电离(质量范围:150-1200amu)组成。同步的色谱分离利用以下 HPLC 系统实现:ES Industries Chromegabond WR C-18 3u **120Å** (3.2x 30mm) 短柱;流动相 A:水 (0.02% TFA) 和流动相 B:乙腈 (0.02% TFA);梯度 10% B 至 90% B,3 分钟;平衡时间 1 分钟;流速 2mL/分钟。

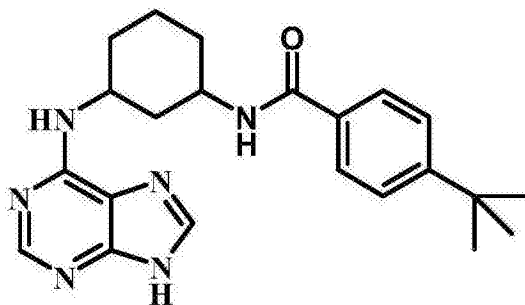
[0230] 许多式 1 化合物还通过反相 HPLC 利用本领域技术人员已知的方法纯化。在某些情况下,制备型 HPLC 纯化利用 PE Sciex 150 EX Mass Spec 进行,其控制连接到 Shimadzu 制备型 HPLC 系统和 Leap 自动注射器上的 Gilson 215 收集器。利用 LC/MS 检测(正离子检测)将化合物从洗脱流中收集:利用在 10 分钟内溶剂 (A) 0.05% TFA/H₂O 和溶剂 (B) 0.035% TFA/乙腈的适当的线性梯度模式将化合物从 C-18 柱 (2.0X 10cm,以 20mL/min 洗脱)洗脱。为了注射到 HPLC 系统上,将粗样品溶于甲醇、乙腈和 DMSO 的混合物。化合物的表征通过 ¹H-NMR 利用 Bruker 400MHz NMR 波谱仪进行。

[0231] 本发明的化合物可以按照已知的技术合成。提供以下实施例和参考以助于对本发明的理解。然而,实施例并不是想要限制本发明,本发明的实际范围如所附的权利要求所述。实施例中最终产物的名称利用 Isis AutoNom 2000 产生。

[0232] 实施例 1:

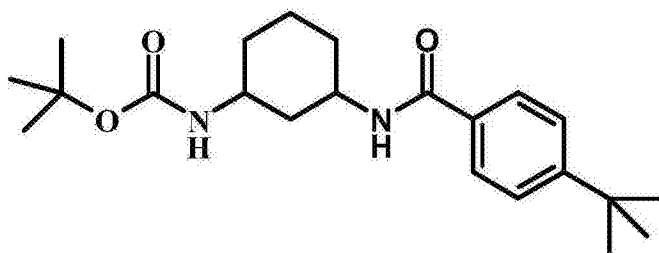
[0233] 4-叔丁基-N-[3-(7H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-苯甲酰胺

[0234]



[0235] 步骤 1) [3-(4-叔丁基-苯甲酰基氨基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯

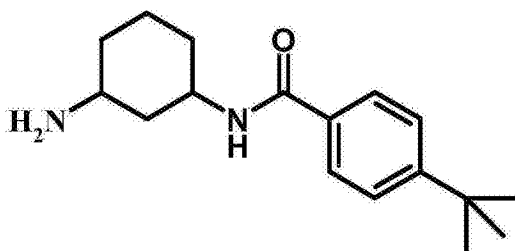
[0236]



[0237] 向搅拌着的 (3-氨基-环己基)-氨基甲酸叔丁酯 (0.250g, 1.16mmol) 的 DMF (10.0mL) 溶液中在室温下加入二异丙基乙基胺 (1.5mL, 7mmol)。在相同的温度下搅拌 15 分钟后, 向反应混合物中加入 HATU (0.529g, 1.39mmol), 然后加入 4-叔丁基-苯甲酸 (0.208g, 1.16mmol)。将反应混合物室温搅拌 16 小时。用水 (10mL) 稀释后, 将混合物用乙酸乙酯 (2×50mL) 萃取。将合并的有机相用水、盐水洗涤并用无水硫酸钠干燥。减压除去溶剂。将粗品物质通过柱色谱纯化 (硅胶, 10% 乙酸乙酯 - 己烷) 得到白色固体状 [3-(4-叔丁基-苯甲酰基氨基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯 (0.250g, 48%)。LC/MS:m/z $C_{22}H_{34}N_2O_3$ ($[M+H]^+$) 计算值: 375; 实测值: 375.4。

[0238] 步骤 2) N-(3-氨基-环己基)-4-叔丁基-苯甲酰胺

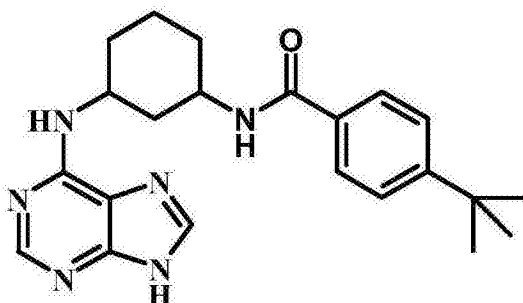
[0239]



[0240] 向搅拌着的 [3-(4-叔丁基-苯甲酰基氨基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯 (0.250g, 0.66mmol) 的二氯甲烷 (8.0mL) 溶液中在 0°C 下加入 TFA (0.25mL 3.3mmol)。在 0°C 下搅拌 15 分钟后, 将反应混合物室温搅拌 4 小时。减压除去溶剂。将粗产物用饱和 $NaHCO_3$ 水溶液中和并用二氯甲烷 (3×30mL) 萃取。将合并的有机层用无水硫酸钠干燥。减压除去溶剂得到浅黄色固体状 N-(3-氨基-环己基)-4-叔丁基-苯甲酰胺 (0.170g, 94%)。LC/MS:m/z $C_{17}H_{26}N_2O_3$ ($[M+H]^+$) 计算值: 275; 实测值: 275.4。

[0241] 步骤 3) 4-叔丁基-N-[3-(7H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-苯甲酰胺

[0242]



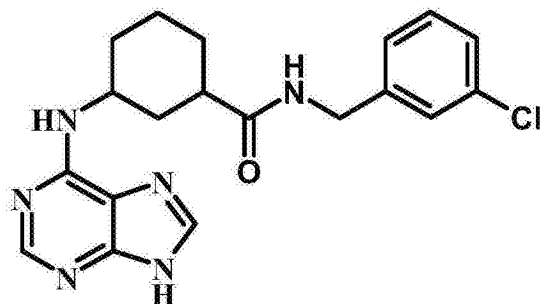
[0243] 向 6-氯-9H-嘌呤 (0.100g, 0.64mmol) 的 NMP (2.0mL) 溶液中在室温下加入 N-(3-氨基-环己基)-4-叔丁基-苯甲酰胺 (0.211g, 0.77mmol) 和二异丙基乙基胺 (0.26mL, 1.60mmol)。将反应混合物用微波在 150°C 下照射 30 分钟。将反应混合物用水

(10mL) 稀释并用乙酸乙酯 (2x 20mL) 萃取。将合并的有机相用无水硫酸钠干燥并减压除去溶剂。将粗产物通过柱色谱纯化 (硅胶, 10% MeOH- 二氯甲烷) 得到白色固体状 4-叔丁基-N-[3-(7H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-苯甲酰胺 (0.037g, 15%)。LC/MS:m/z $C_{22}H_{28}N_6O$ ($[M+H]^+$) 计算值: 393; 实测值: 393.4。

[0244] 实施例 2:

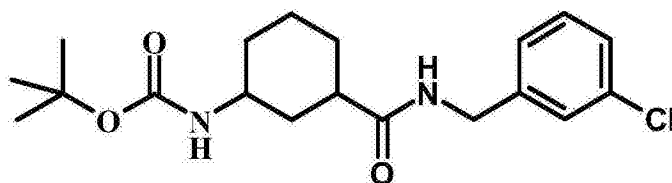
[0245] 3-(9H-嘌呤-6-基氨基)-环己烷甲酸 3-氯-苄基酰胺

[0246]



[0247] 步骤 1) [3-(3-氯-苄基氨基甲酰基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯

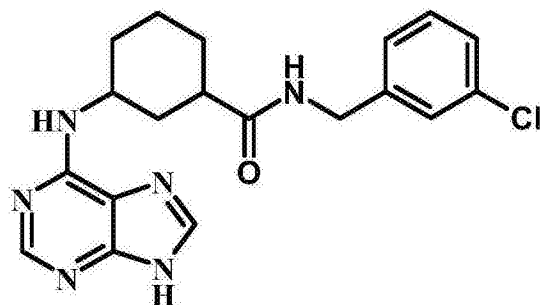
[0248]



[0249] 在 250mL 的圆底烧瓶中将 3-(叔丁氧基羰基氨基)环己烷甲酸 (2g, 8.22mmol)、(3-氯苄基)甲胺 (1.28g, 9.04mmol) 和 HATU (3.44g, 9.04mmol) 与 DMF (20mL) 混合。加入 DIPEA (1.44mL, 8.22mmol)。将反应混合物室温搅拌 16 小时。将反应混合物用 EtOAc 稀释并用水洗涤。将合并的有机相用无水硫酸钠干燥。减压除去溶剂。将粗产物用 DCM 研磨得到所需化合物, 将其过滤并晾干。得到白色固体状 [3-(3-氯-苄基氨基甲酰基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯 (2.8g, 93%)。

[0250] 步骤 2) 3-(9H-嘌呤-6-基氨基)-环己烷甲酸 3-氯-苄基酰胺

[0251]



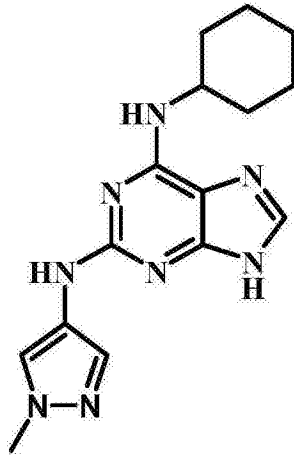
[0252] 在 20mL 的闪烁管中, 将 [3-(3-氯-苄基氨基甲酰基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯 (1.0g, 2.73mmol) 用 DCM (5mL) 和 TFA (5mL) 溶解。将反应混合物室温搅拌 1 小时。减压除去溶剂。将粗产物溶于 DMF (2mL)。加入 6-氯-9H-嘌呤 (0.463g, 3.0mmol) 和 DIPEA (2.4mL, 13.6mmol)。将反应混合物于 100°C 加热 16 小时。将反应混合物冷却, 用

EtOAc 稀释并用水洗涤。将合并的有机相用无水硫酸钠干燥并减压除去溶剂。将得到的粗产物用 MeOH 研磨得到棕色固体状 3-(9H-嘌呤-6-基氨基)-环己烷甲酸 3-氯-苄基酰胺 (0.12g, 11%)。LC/MS:m/z $C_{19}H_{21}ClN_6O$ ($[M+H]^+$) 计算值:385;实测值:385.0。

[0253] 实施例 3:

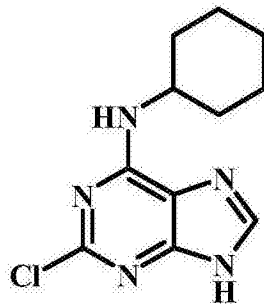
[0254] N*6*-环己基-N*2*-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺

[0255]



[0256] 步骤 1) (2-氯-9H-嘌呤-6-基)-环己基-胺

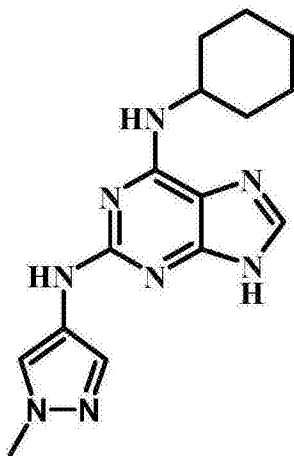
[0257]



[0258] 向 2,6-二氯-9H-嘌呤 (500mg, 2.6mmol) 和环己基胺 (289mg, 2.91mmol) 的 DMF (5mL) 溶液中加入 DIPEA (0.49mL, 2.91mmol) 并在氮气氛下加热至 100°C 加热 16 小时。将反应混合物冷却至室温并加入水。滤出沉淀的固体,干燥得到黄色固体状 (2-氯-9H-嘌呤-6-基)-环己基-胺 (600mg, 90.1%)。LC/MS:m/z $C_{11}H_{14}ClN_5$ ($[M+H]^+$) 计算值:252;实测值:252。

[0259] 步骤 2) N*6*-环己基-N*2*-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺

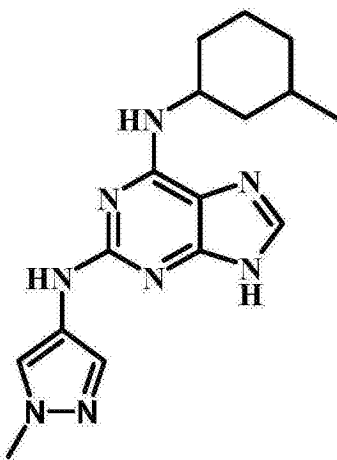
[0260]



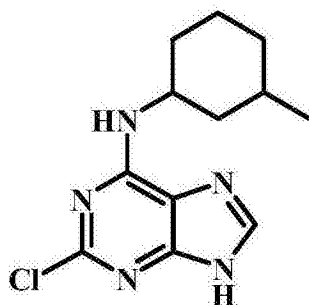
[0261] 向(2-氯-9H-嘌呤-6-基)-环己基-胺(300mg, 1.19mmol)的n-BuOH(2.0mL)溶液中加入1-甲基-1H-吡唑-4-基胺(810mg, 8.34mmol)和TMS-Cl(0.567mL, 4.65mmol)。将反应混合物在微波中于160℃照射1小时。减压除去溶剂。将粗品物质通过制备型HPLC纯化[柱=Gemini NX C18(100x30.0mm)5 μ , 5mM NH₄OAc/乙腈]得到灰白色固体状N*6*-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(60mg, 16%)。LC/MS:m/z C₁₅H₂₀N₈([M+H]⁺) 计算值:313;实测值:313.2。

[0262] 实施例4:

[0263] N*6*-(3-甲基-环己基)-N*2*-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺
[0264]



[0265] 步骤1) (2-氯-9H-嘌呤-6-基)-(3-甲基-环己基)-胺
[0266]

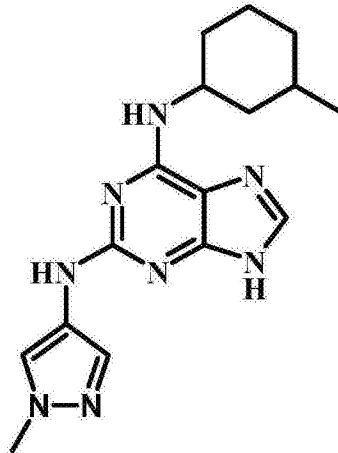


[0267] 向2,6-二氯-9H-嘌呤(500mg, 2.6mmol)和3-甲基-环己基胺(329mg, 2.91mmol)

的 DMF (5mL) 溶液中加入 DIPEA (0.49mL, 2.91mmol) 并在氮气氛下加热至 100 °C 加热 16 小时。将反应混合物冷却至室温并加入水。滤出沉淀的固体, 干燥得到黄色固体状 (2-氯-9H-嘌呤-6-基)-(3-甲基-环己基)-胺 (600mg, 86%)。LC/MS:m/z $C_{12}H_{16}ClN_5$ ($[M+H]^+$) 计算值: 266; 实测值: 266.3。

[0268] 步骤 2) N⁶-(3-甲基-环己基)-N²-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺

[0269]

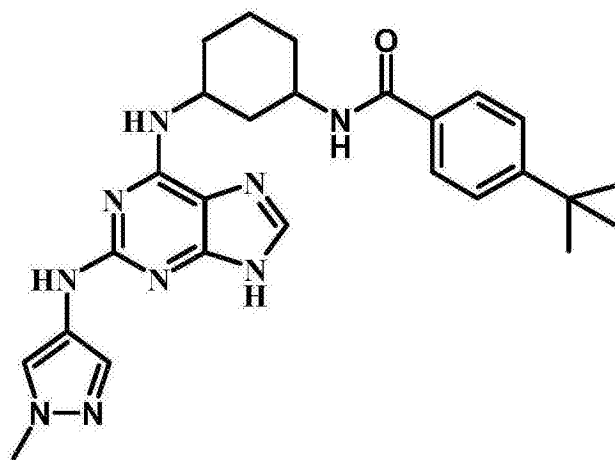


[0270] 向 (2-氯-9H-嘌呤-6-基)-(3-甲基-环己基)-胺 (200mg, 0.755mmol) 的 n-BuOH (2.0mL) 溶液中加入 1-甲基-1H-吡唑-4-基胺 (513mg, 5.3mmol) 和 TMS-Cl (0.36mL, 2.94mmol)。将反应混合物在微波中于 160°C 加热 1 小时。减压除去溶剂。将粗品物质通过制备型 HPLC 纯化 [柱 = Gemini NX C18 (100x30.0mm) 5 μ , 5mM NH₄OAc/乙腈] 得到灰白色固体状 N⁶-(3-甲基-环己基)-N²-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-9H-嘌呤-2,6-二胺 (65mg, 27%)。LC/MS:m/z $C_{16}H_{22}N_8$ ($[M+H]^+$) 计算值: 327; 实测值: 327.2。

[0271] 实施例 5:

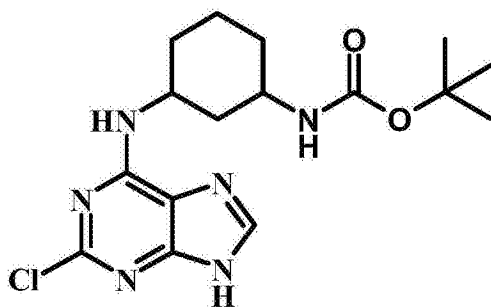
[0272] 4-叔丁基-N-{3-[2-(1-甲基-1H-吡唑-4-基氨基)-9H-嘌呤-6-基氨基]-环己基}-苯甲酰胺

[0273]



[0274] 步骤 1) [3-(2-氯-9H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯

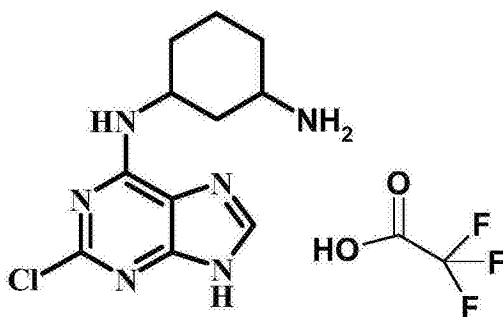
[0275]



[0276] 向 2,6-二氯-9H-嘌呤 (1.5g, 7.93mmol) 和 (3-氨基-环己基)-氨基甲酸叔丁酯 (1.88g, 8.73mmol) 的 DMF (15mL) 溶液中加入 DIPEA (1.49mL, 8.73mmol) 并加热至 110°C 加热 16 小时。将反应混合物冷却至室温并加入水。滤出沉淀的固体,干燥得到棕色固体状 [3-(2-氯-9H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯 (1.8g, 粗品)。LC/MS:m/z $C_{16}H_{23}ClN_6O_2$ ($[M+H]^+$) 计算值:367;实测值:367.2。

[0277] 步骤 2) N-(2-氯-9H-嘌呤-6-基)-环己烷-1,3-二胺 TFA 盐

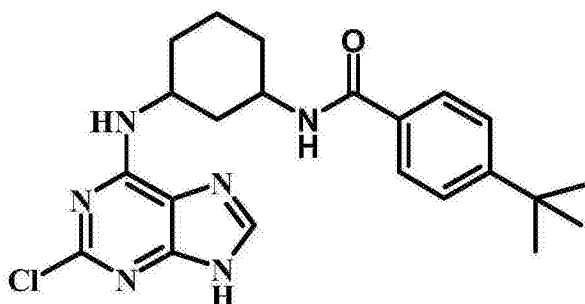
[0278]



[0279] 向搅拌着的 [3-(2-氯-9H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-氨基甲酸叔丁酯粗品 (900mg, 2.45mmol) 的 DCM (5mL) 溶液中于 0°C 滴加 33% TFA 的 DCM 溶液 (10mL) 并于室温搅拌 2 小时。减压除去溶剂。将粗品物质用乙醚洗涤 (2x 5mL) 得到黑色粘性固体状的 N-(2-氯-9H-嘌呤-6-基)-环己烷-1,3-二胺 TFA 盐 (1.95g, 粗品)。LC/MS:m/z $C_{11}H_{15}ClN_6$ ($[M+H]^+$) 计算值:267;实测值:267.2。

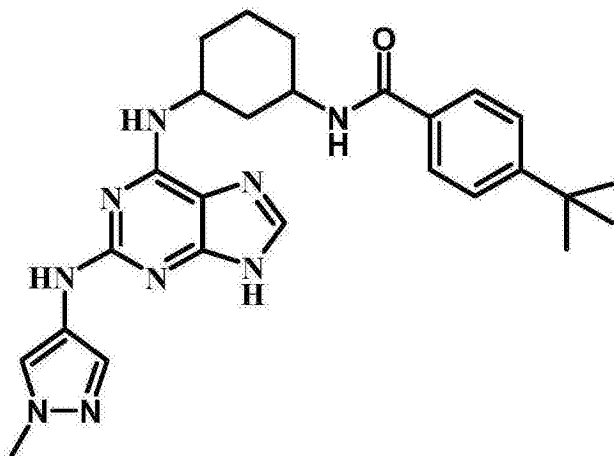
[0280] 步骤 3) 4-叔丁基-N-[3-(2-氯-9H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-苯甲酰胺

[0281]



[0282] 向 N-(2-氯-9H-嘌呤-6-基)-环己烷-1,3-二胺 TFA 盐 (1.9g, 5.0mmol) 的 DMF (20mL) 溶液中加入 DIPEA (2.65mL, 15.0mmol)。将反应混合物室温搅拌 15 分钟然后加入 HATU (2.28g, 6.0mmol) 和 4-叔丁基-苯甲酸 (0.89g, 5.0mmol)。将反应混合物室温搅拌 16 小时。将反应混合物用水稀释 (40mL) 并用 EtOAc (2x60mL) 萃取。将合并的有机层用无水硫酸钠干燥并减压除去溶剂。将粗品物质用己烷 (40mL) 洗涤并干燥得到棕色固体

状 4-叔丁基-N-[3-(2-氯-9H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-苯甲酰胺 (800mg, 3 步的收率 47%)。LC/MS:m/z $C_{22}H_{27}ClN_6O$ ($[M+H]^+$) 计算值:427;实测值:427.2。步骤 4)4-叔丁基-N-[2-(1-甲基-1H-吡唑-4-基氨基)-9H-嘌呤-6-基氨基]-环己基]-苯甲酰胺 [0283]



[0284] 向 4-叔丁基-N-[3-(2-氯-9H-嘌呤-6-基氨基)-环己基]-苯甲酰胺 (200mg, 0.46mmol) 的 n-BuOH (2.0mL) 溶液中加入 1-甲基-1H-吡唑-4-基胺 (319mg, 3.28mmol) 和 TMS-Cl (0.23mL, 21.83mmol)。将反应混合物在微波中于 160 °C 照射 1 小时。减压除去溶剂。将粗品物质通过制备型 HPLC 纯化 [柱 = Gemini NX 110A C18 (100x30.0mm) 5 μ , 5mM NH_4OAc /乙腈] 得到灰白色固体状 4-叔丁基-N-[3-[2-(1-甲基-1H-吡唑-4-基氨基)-9H-嘌呤-6-基氨基]-环己基]-苯甲酰胺 (52mg, 22%)。LC/MS:m/z $C_{26}H_{33}N_9O$ ($[M+H]^+$) 计算值:488;实测值:488.2。

[0285] 生物学实施例

[0286] 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 抑制试验

[0287] 该试验是通过过滤捕获放射性的 ^{33}P 磷酸化产物。BTK、生物素化的 SH_2 肽底物 (Src 同源性) 和 ATP 的相互作用导致肽底物的磷酸化。生物素化的产物是结合的链霉抗生素蛋白琼脂糖小珠。所有被结合的放射性标记的产物都是用闪烁计数器来进行探测的。

[0288] 试验板是 96-孔聚丙烯 (Greiner) 和 96-孔 1.2 μm 亲水性 PVDF 滤板 (Millipore)。这里所报告的浓度是最终的试验浓度:10-100 μM 化合物的 DMSO 溶液 (Burdick 和 Jackson)、5-10nM BTK 酶 (His-标记的, 全长型)、30 μM 肽底物 (生物素-Aca-AAAEEIYGEI-NH₂)、100 μM ATP (Sigma)、8mM 咪唑 (Sigma, pH 7.2)、8mM 甘油-2-磷酸酯 (Sigma)、200 μM EGTA (Roche Diagnostics)、1mM $MnCl_2$ (Sigma)、20mM $MgCl_2$ (Sigma)、0.1mg/ml BSA (Sigma)、2mM DTT (Sigma)、1 μCi ^{33}P ATP (Amersham)、20% 链霉抗生素蛋白琼脂糖小珠 (Amersham)、50mM EDTA (Gibco)、2M NaCl (Gibco)、2M NaCl w/1% 磷酸 (Gibco)、microscint-20 (Perkin Elmer)。

[0289] IC_{50} 测定是利用由标准 96-孔板试验模板产生的数据, 由每个化合物的 10 个数据点来计算的。在每个板上对一个对照化合物和七个未知的抑制剂进行试验, 每个板运行两次。一般而言, 化合物从 100 μM 开始以半对数进行稀释, 在 3nM 结束。对照化合物是十字孢碱。在不存在肽底物的情况下计算背景。在存在肽底物的情况下测定总活性。用下面的方案来测定 BTK 抑制作用。

- [0290] 1) 样品制备：以半对数增量,用试验缓冲液(咪唑,甘油-2-磷酸酯,EGTA,MnCl₂,MgCl₂,BSA)对试验化合物进行稀释。
- [0291] 2) 小珠制备
- [0292] a.) 通过在 500g 下离心来对小珠进行清洗
- [0293] b.) 用 PBS 和 EDTA 复溶小珠,从而产生 20% 的小珠浆液
- [0294] 3) 将不含底物的反应混合物(试验缓冲液,DTT,ATP,³³P ATP)和含底物的反应混合物(试验缓冲液,DTT,ATP,³³P ATP,肽底物)在 30℃ 预培养 15 分钟。
- [0295] 4) 为了开始试验,将 10 μL 位于酶缓冲液(咪唑,甘油-2-磷酸酯,BSA)中的 BTK 和 10 μL 试验化合物在室温下预培养 10 分钟。
- [0296] 5) 向 BTK 和化合物中加入 30 μL 不含或含底物的反应混合物。
- [0297] 6) 将共计 50 μL 试验混合物在 30℃ 下培养 30 分钟。
- [0298] 7) 将 40 μL 试验样品转移到 150 μL 位于滤板中的小珠浆液中以终止反应。
- [0299] 8) 在 30 分钟后,用下面的步骤洗涤滤板
- [0300] a. 3x 250 μL NaCl
- [0301] b. 3x 250 μL 包含 1% 磷酸的 NaCl
- [0302] c. 1x 250 μL H₂O
- [0303] 9) 将该板在 65℃ 下干燥 1 小时或者在室温下干燥一夜
- [0304] 10) 加入 50 μL microscint-20 并在闪烁计数器上对 ³³P cpm 进行计数。
- [0305] 由以 cpm 为单位的原始数据计算百分比活性
- [0306] 百分比活性 = (样品 - bkg) / (总活性 - bkg) x 100
- [0307] 用单点剂量响应 S 形模型,由百分比活性计算 IC₅₀
- [0308] $y = A + ((B - A) / (1 + ((x / C)^D)))$
- [0309] x = 化合物浓度, y = % 活性, A = min, B = max, C = IC₅₀, D = 1 (希尔斜率)
- [0310] 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 抑制 TR-FRET (时间分辨 FRET) 试验
- [0311] 该 BTK 竞争试验利用 FRET (荧光共振能量转移) 技术测定化合物对于布鲁顿氏酪氨酸激酶的灭活状态的效力 (IC₅₀)。将 BTK - Eu 复合物在冰上孵育 1 小时,然后以起始浓度 50nM BTK-Bioease™:10nM Eu-链霉亲和素 (Perkin-Elmer 目录号 AD0062) 使用。试验缓冲液由 20mM HEPES (pH 7.15)、0.1mM DTT、10mM MgCl₂、0.5mg/ml BSA 和 3% 激酶稳定剂 (Fremont Biosolutions, 目录号 STB-K02) 组成。1 小时后,将以上反应混合物在试验缓冲液中稀释 10 倍以制得 5nM BTK:1nM Eu-链霉亲和素复合物 (供体荧光团)。然后将 18 μl 0.11nM BTK-Eu 和 0.11nM Kinase Tracer 178 (Invitrogen, 目录号 PV5593) 的混合物分散入 384-孔平底板 (Greiner, 784076) 中,用单独的 BTK-Eu 作为阴性对照。将试验中的待测化合物以 10x 浓度制备并在 DMSO 中以半对数增量进行系列稀释,以产生 10 个数据点的曲线。为了开始 FRET 反应,将以 10x 原液制备的化合物的 DMSO 溶液加入到板中并将板在 14℃ 下孵育 18-24 小时。
- [0312] 孵育后,将该板在 BMG Pherastar 荧光板读数器 (或者等同仪器) 上读数并用于测定来自供体荧光团 (620nm 发射) 和 FRET (665nm 发射) 的发射能。将阴性对照孔的值平均得到平均最低值。将阳性的“无抑制剂”对照孔平均得到平均最大值。将最大 FRET 的百分数利用以下等式计算:

[0313] $\% \text{最大 FRET} = 100 \times [(\text{FSR}_{\text{化合物}} - \text{FSR}_{\text{平均最小值}}) / (\text{FSR}_{\text{平均最大值}} - \text{FSR}_{\text{平均最小值}})]$ 其中 $\text{FSR} = \text{FRET 信号比}$ 。 $\% \text{最大 FRET}$ 曲线在 Activity Base (Excel) 中绘制并确定 $\text{IC}_{50}(\%)$ 、希尔斜率、 z' 和 $\% \text{CV}$ 。利用 Microsoft Excel 从一式两份的曲线（从两次独立的稀释得到的单一抑制曲线）推导出平均 IC_{50} 和标准偏差。

[0314] 在下面的表 II 中列出了本试验中代表性化合物的数据。

[0315] 表 II

[0316]

化合物	FRET IC50 (μmol)
1	9.57272
2	100
3	2.82172
4	40.6264
5	0.05694
6	0.04532
7	0.109

[0317] 通过 CD69 表达测量的全血中 B 细胞活化的抑制作用

[0318] 一种用于测试 BTK 抑制剂抑制人血中 B 细胞受体介导的 B 细胞活化的能力的操作如下：

[0319] 人全血 (HWB) 得自健康志愿者, 有如下限制条件: 24 小时内不服药, 不吸烟。通过静脉穿刺将血液收集到用肝素钠抗凝的 Vacutainer 管中。用 PBS (20x) 将试验化合物稀释至所需的起始药物浓度的十倍, 然后用 10% DMSO 的 PBS 溶液进行三倍系列稀释, 以产生九个点的剂量 - 响应曲线。将 5.5 μl 各化合物的稀释液一式两份地加入到 2ml 的 96-孔 V 底板 (Analytical Sales and Services, #59623-23) 中; 将 5.5 μl 10% DMSO 的 PBS 溶液加入到对照和无刺激物孔中。向各孔中加入 HWB (100 μl), 在混合后, 将这些板在 37°C, 5% CO_2 , 100% 湿度下培养 30 分钟。在混合的情况下, 向各孔中加入 Goat F(ab')₂ 抗 - 人 IgM (Southern Biotech, #2022-14) (10 μl 500 $\mu\text{g/ml}$ 溶液, 终浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$) (无刺激物孔除外) 并将这些板再培养 20 小时。

[0320] 在 20 小时培养结束时, 将这些样品与荧光 - 探针 - 标记的抗体 (15 μl PE 小鼠抗 - 人 CD20, BD Pharmingen, #555623 和 / 或 20 μl APC 小鼠抗 - 人 CD69, BD Pharmingen #555533) 一起在 37°C, 5% CO_2 , 100% 湿度下培养 30 分钟。为了补偿调整和初始电压设置, 包括进行了诱导的对照、未染色的和单染色的。然后, 将样品用 1ml 1X Pharmingen 溶解缓冲液 (BD Pharmingen #555899) 进行溶解并将这些板在 1800rpm 下离心 5 分钟。通过抽吸除去上清液, 将剩余的沉积物再次用另一份 1ml 1X Pharmingen 溶解缓冲液溶解, 如前那样使这些板离心。将上清液吸出并将剩余的沉积物在 FACs 缓冲液 (PBS+1%

FBS) 中进行洗涤。在最后一次离心后,除去上清液并将沉积物重新混悬于 180 μ l FACS 缓冲液中。将样品转移到适于在 BD LSR II 流式细胞仪上的 HTS 96 孔系统上运行的 96 孔板中。

[0321] 用适于所用荧光素的激发和发射波长,获取数据并用 Cell Quest Software 获得阳性细胞值百分比。最初用 FACS 分析软件 (Flow Jo) 对结果进行分析。试验化合物的 IC₅₀ 被定义为用抗 -IgM 刺激后 CD69⁺ 阳性 (也是 CD20⁺ 阳性的) 细胞百分比降低 50% 的浓度 (减去未进行刺激的背景的 8 个孔的均值后的 8 个对照孔的均值)。用 Xlfit 软件第 3 版,方程 201 来计算 IC₅₀ 值。

[0322] B-细胞活化的抑制作用 - 拉莫斯细胞中的 B 细胞 FLIPR 试验

[0323] 通过测定试验化合物对抗 -IgM 刺激的 B 细胞响应的影响来证明本发明化合物对 B-细胞活化的抑制作用。

[0324] B 细胞 FLIPR 试验是一种测定潜在的抑制剂对抗 -IgM 抗体刺激引起的细胞内钙增加的影响的以细胞为基础的功能性方法。将拉莫斯细胞 (人 Burkitt's 淋巴瘤细胞系, ATCC-No. CRL-1596) 在生长培养基 (如下所述) 中培养。在试验前一天,将拉莫斯细胞重新混悬于新鲜的生长培养基 (同上) 中并将其浓度设定为在组织培养烧瓶中为 0.5×10^6 /mL。在试验当天,对细胞进行计数并将其浓度设定为在组织培养烧瓶中,在补加有 1μ M FLUO-3AM (TefLabs 目录号 :0116, 在无水 DMSO 和 10% 普朗尼克酸中制备的) 的生长培养基中为 1×10^6 /mL, 将其在 37°C (4% CO₂) 下培养 1 小时。为了除去细胞外染料,通过离心 (5min, 1000rpm) 收集细胞,将其以 1×10^6 个细胞 /mL 重新混悬于 FLIPR 缓冲液 (如下所述) 中,然后以每孔 1×10^5 个细胞的数量将其分散到 96-孔聚-D-赖氨酸涂布的黑色 / 透明板 (BD 目录号 :356692) 中。以 100 μ M 至 0.03 μ M 范围内的各种浓度 (7 个浓度, 细节如下) 加入试验化合物,并使其与细胞一起在室温下培养 30 分钟。通过加入 10 μ g/mL 抗 -IgM (Southern Biotech, 目录号 :2020-01) 来刺激拉莫斯细胞 Ca²⁺ 信号传导并在 FLIPR (Molecular Devices, 用具有氩激光器的 CCD 照相机在 480nm 激发下捕捉 96 孔板的图像) 上进行测量。

[0325] 培养基 / 缓冲液 :

[0326] 生长培养基 : 含有 L-谷氨酰胺 (Invitrogen, 目录号 :61870-010)、10% 胎牛血清 (FBS, Summit Biotechnology 目录号 :FP-100-05) ; 1mM 丙酮酸钠 (Invitrogen Cat. No. 11360-070) 的 RPMI 1640 培养基。

[0327] FLIPR 缓冲液 : HBSS (Invitrogen, 目录号 :141175-079)、2mM CaCl₂ (Sigma 目录号 :C-4901)、HEPES (Invitrogen, 目录号 :15630-080)、2.5mM 丙磺舒 (Sigma, 目录号 :P-8761)、0.1% BSA (Sigma, 目录号 :A-7906)、11mM 葡萄糖 (Sigma, Cat-No. G-7528)

[0328] 化合物稀释细节描述 :

[0329] 为了得到 100 μ M 的最高最终试验浓度,将 24 μ L 10mM 化合物储备液 (在 DMSO 中制得) 直接加入到 576 μ L FLIPR 缓冲液中。将试验化合物用 FLIPR 缓冲液稀释 (用 Biomek 2000 自动移液器), 得到下面的稀释系列 : 基质、 1.00×10^{-4} M、 1.00×10^{-5} 、 3.16×10^{-6} 、 1.00×10^{-6} 、 3.16×10^{-7} 、 1.00×10^{-7} 、 3.16×10^{-8} 。

[0330] 试验和分析 :

[0331] 用 max-min 统计数值 (从由添加刺激性抗体造成的峰减去静息基线), 用

Molecular Devices FLIPR 控制和统计输出软件来报告钙的分子内增加。用非线性曲线拟合 (GraphPad Prism 软件) 来测定 IC_{50} 。

[0332] 小鼠胶原 - 诱导的关节炎 (mCIA)

[0333] 在第 0 天,在尾巴根部或后背的一些点上,用 II 型胶原在完全弗氏佐剂 (CFA) 中的乳剂对小鼠进行注射 (i. d.)。在胶原免疫后,动物在约 21-35 天时出现关节炎。在第 21 天,通过全身施用位于不完全弗氏佐剂 (IFA ;i. d.) 中的胶原来使关节炎的发生同步 (激发)。在第 20 天之后,每天检查动物是否出现轻度关节炎 (得分为 1 或 2 ;见下面的评分说明),这是激发的信号。在激发后,对小鼠进行评分并用候选治疗剂以规定的时间 (通常是 2-3 周) 和给药频率每天一次 (QD) 或每天两次 (BID) 进行给药。

[0334] 大鼠胶原诱导的关节炎 (rCIA)

[0335] 第 0 天,在后背的一些位置上,用牛 II 型胶原在不完全弗氏佐剂 (CFA) 中的乳剂对大鼠进行皮内 (i. d.) 注射。在大约第 7 天,在尾巴根部或背部的另一些部位进行胶原乳剂的加强注射 (i. d.)。通常在最初的胶原注射后第 12-14 天观察到关节炎。从第 14 天往后,如下所述 (关节炎的评估) 那样对动物的关节炎发展进行评估。从第二次激发时开始,以预防的方式用候选的治疗剂对动物进行给药,以规定的时间 (通常是 2-3 周) 和给药频率每天一次 (QD) 或每天两次 (BID) 进行给药。

[0336] 关节炎评估:

[0337] 在两种模型中,都用涉及按照下述标准对 4 只爪子进行评估的评分系统来对爪子和肢体关节的炎症发展进行定量:

[0338] 评分: 1 = 爪子或一个指 (趾) 头肿胀和 / 或发红

[0339] 2 = 两个或多个关节肿胀

[0340] 3 = 整个爪子肿胀,有两个以上关节涉及

[0341] 4 = 整个爪子和指 (趾) 头的严重关节炎

[0342] 在第 0 天进行基础测量评估,并在第一个迹象或肿胀时再次开始进行评估,每周评估最多三次,直至实验结束。通过将各爪子的四种分值相加得到各小鼠的关节炎指数,给出每只动物最高为 16 的得分。

[0343] 大鼠体内哮喘模型

[0344] 用 100 μ g 位于 0.2ml 明矾 (alum) 中的 OA (卵清蛋白) 每周一次地对雄性 Brown-Norway 大鼠 i. p. 给药进行敏化,给药三周 (第 0、7 和 14 天)。在第 21 天 (最后一次敏化后一周),用基质或化合物制剂对大鼠进行给药 (q. d.),在 OA 气雾剂激发 (1% OA, 45 分钟) 前 0.5 小时皮下给药,在激发后 4 或 24 小时结束。在处死时,由所有的动物收集血清和血浆,分别用于血清学和 PK。插入气管插管并用 PBS 对肺灌洗 3 次。对该 BAL 液进行总白细胞计数和白细胞分类计数。用库尔特计数器测定细胞等分试样 (20-100 μ l) 中的总白细胞数。对于白细胞分类计数而言,将 50-200 μ l 样品在 Cytospin 中进行离心,将载玻片用 Diff-Quik 进行染色。用标准的形态学标准在光学显微镜下对单核细胞、嗜酸细胞、中心粒细胞和淋巴细胞的比例进行计数并以百分比的形式表达。与对照水平相比,在 OA 敏化和激发大鼠的 BAL 中,BTK 的代表性抑制剂表现出总白细胞计数降低。

[0345] 为了清楚和明了,已经用举例说明和实施例对前述本发明的一些细节进行了描述。对于本领域技术人员显而易见的是,可以在所附权利要求书的范围内进行变化和修饰。

因此,应当清楚的是,上面的说明是用于进行说明,并不是用于进行限制。因此,本发明的范围不是参考上面的说明书来决定的,而是应当参考所附的权利要求书来决定,同时,也要求保护与该类权利要求等同的所有范围。

[0346] 本申请中所列举的所有专利、专利申请和公开物都在与各个专利、专利申请或公开物被单独指明的程度相同的程度上被全部引入作为参考用于所有目的。