



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112955451 A

(43) 申请公布日 2021.06.11

(21) 申请号 201980070126.7

(22) 申请日 2019.10.18

(30) 优先权数据

62/751,967 2018.10.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/056947 2019.10.18

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/092019 EN 2020.05.07

(71) 申请人 施万生物制药研发IP有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 P·R·法特里 姜岚

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 蒋林清

(51) Int.Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

权利要求书2页 说明书33页

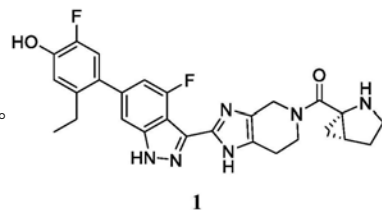
(54) 发明名称

作为JAK抑制剂的2-氮杂双环己烷化合物

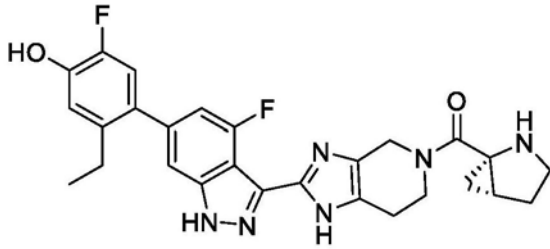
(57) 摘要

本发明提供式1的化合物或其药学上可接受盐,其可用作JAK抑制剂。本发明还提供包括所述化合物的药物组合物、使用所述化合物治疗可由JAK抑制剂治疗的疾病的方法以及用于制备所述

化合物的工艺。

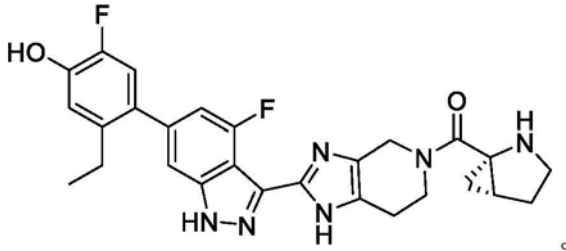


1. 一种下式的化合物，



或其药学上可接受的盐。

2. 一种下式的化合物，



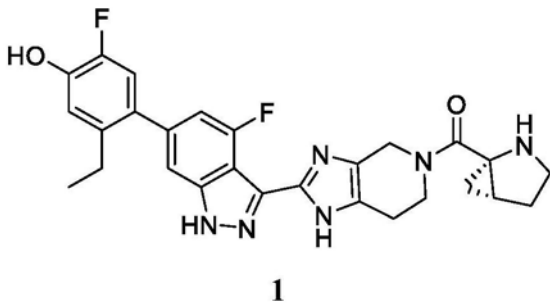
3. 一种药物组合物，包括根据权利要求1或2所述的化合物和药学上可接受的载体。

4. 根据权利要求3所述的药物组合物，其中所述组合物适合施用于眼部。

5. 根据权利要求4所述的药物组合物，其中所述组合物适于玻璃体内注射。

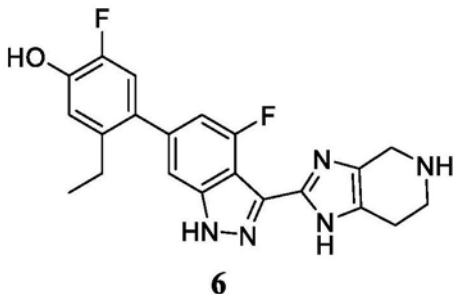
6. 根据权利要求5所述的药物组合物，其中所述组合物是悬浮液。

7. 一种制备式1的化合物或其药学上可接受的盐的工艺，

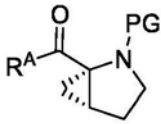


所述工艺包括：

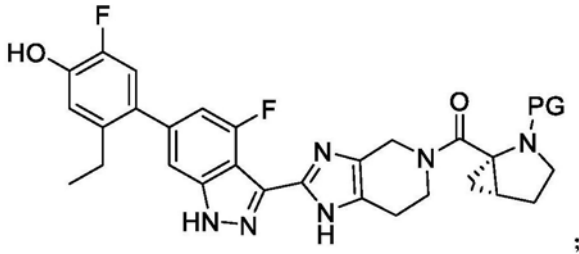
(a) 使式6的化合物：



与式7-PG的化合物反应：

**7-PG**

其中R^A是羟基或离去基团,并且PG是氨基保护基团,以得到化合物1-PG:

**1-PG**

(b) 将化合物1-PG去保护;和

(c) 任选地制备药学上可接受的盐

以提供式1的化合物或其药学上可接受的盐。

8. 根据权利要求7所述的工艺,其中R^A是羟基。

9. 根据权利要求8所述的工艺,其中6和7-PG之间的所述反应在HATU存在的情况下进行。

10. 根据权利要求7所述的工艺,其中PG是Boc。

11. 根据权利要求1或2所述的化合物,用于治疗哺乳动物的眼病。

12. 根据权利要求11所述的化合物,其中所述眼病选自葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼症、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞和特应性角膜结膜炎组成的群组。

13. 根据权利要求12所述的化合物,其中所述眼病是糖尿病性黄斑水肿或葡萄膜炎。

14. 一种根据权利要求1或2所述的化合物的用途,用于制造用于治疗哺乳动物眼病的医药。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述眼病选自葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼症、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞和特应性角膜结膜炎组成的群组。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述眼病是糖尿病性黄斑水肿或葡萄膜炎。

17. 一种治疗哺乳动物眼病的方法,所述方法包括对所述哺乳动物的眼睛施用包括根据权利要求1或2所述的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述眼病选自葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼症、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞和特应性角膜结膜炎组成的群组。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述眼病是糖尿病性黄斑水肿或葡萄膜炎。

作为JAK抑制剂的2-氮杂双环己烷化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于治疗炎性疾病,特别是眼病的JAK激酶抑制剂化合物。本发明还涉及包括这种化合物的药物组合物、使用这种化合物治疗眼病的方法以及用于制备所述化合物的工艺。

背景技术

[0002] 细胞因子是细胞间的信令分子,其包含趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。细胞因子对正常细胞生长和免疫调节至关重要,但也驱动免疫介导的疾病,并且促进恶性细胞的生长。许多细胞因子水平的升高与许多疾病或病症,特别是以炎症为特征的那些疾病的病理有关。许多与疾病有关的细胞因子通过依赖于酪氨酸激酶Janus家族(JAK)的信令通路发挥作用,酪氨酸激酶Janus家族通过转录因子的信号转导子和转录激活子(STAT)家族发出信号。

[0003] JAK家族包含四个成员:JAK1、JAK2、JAK3和酪氨酸激酶2(TYK2)。细胞因子与JAK依赖性细胞因子受体的结合诱导受体二聚化,这会导致JAK激酶上的酪氨酸残基磷酸化,从而影响JAK激活。磷酸化的JAK反过来结合并磷酸化各种STAT蛋白,这些蛋白在细胞核中二聚化、内化并且直接调节基因转录,从而导致与炎性疾病相关联的下游效应等。JAK通常以同型二聚体或异型二聚体的形式与细胞因子受体成对相关。特定的细胞因子与特定的JAK配对相关联。JAK家族的四个成员中的每一个都与和炎症相关联的细胞因子中至少一个的信令有关。

[0004] 炎症在包含葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼症、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞和特应性角膜结膜炎在内的多种眼病中发挥突出的作用。葡萄膜炎囊括多种眼内炎性病症,并且通常为自身免疫性疾病,在无已知感染诱因的情况下出现。据估计,这种病症影响美国约200万患者。在一些患者中,与葡萄膜炎相关联的慢性炎症会导致组织破坏,并且其是美国第五大致盲原因。葡萄膜炎患者眼中升高的通过JAK-STAT通路发信号的细胞因子包含IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-23和IFN- γ 。(宝来(Horai)和卡斯皮(Caspi),干扰素细胞因子研究杂志(J Interferon Cytokine Res), 2011, 31, 733-744;黄(Ooi)等人,临床医学和研究(Clinical Medicine and Research), 2006, 4, 294-309)。葡萄膜炎的现有疗法通常不佳,并且许多患者控制不佳。类固醇虽然通常有效,但与白内障和升高眼内压/青光眼相关联。

[0005] 糖尿病视网膜病变(DR)是由视网膜中的血管损伤引起的。它是糖尿病患者中最常见的视力丧失原因。血管生成以及炎性通路在疾病中起重要作用。通常,DR将发展为糖尿病性黄斑水肿(DME),这是糖尿病患者视力丧失的最常见原因。据估计,所述病症仅在美国就影响约150万患者,其中约20%的患者患有影响双眼的疾病。通过JAK-STAT通路发信号的细胞因子(诸如IL-6)以及其他细胞因子(诸如IP-10和MCP-1(也称CCL2),其产生部分由JAK-STAT通路信令驱动)被认为在与DR/DME相关联的炎症中发挥作用(艾博卡维(Abcouwer),临床细胞免疫学杂志(J Clin Cell Immunol), 2013, 增刊1, 1-12;佐恩(Sohn)等人,美国眼科

学杂志(American Journal of Ophthalmology),2011,152,686-694;欧文(Owen)和哈特尼特(Hartnett),最新糖尿病报告(Curr Diab Rep),2013,13,476-480;张(Cheung)等人,分子视觉(Molecular Vision),2012,18,830-837;董(Dong)等人,分子视觉,2013,19,1734-1746;范特苏(Funatsu)等人,眼科学(Ophthalmology),2009,116,73-79)。DME的现有疗法不佳:玻璃体内抗VEGF治疗仅在小部分患者中有效,并且类固醇与白内障和升高的眼内压相关联。

[0006] 干眼症(DED)是多因素障碍,其在美国影响约500万患者。眼表炎症被认为在这种疾病的发展和传播中起重要作用。在DED患者的眼流体中注意到细胞因子诸如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6和IFN- γ 水平升高。(史蒂文森(Stevenson)等人,眼科学文献(Arch Ophthalmol),2012,130,90-100),并且所述水平通常与疾病严重程度相关。年龄相关性黄斑变性和特应性角膜结膜炎也被认为与JAK依赖性细胞因子相关联。

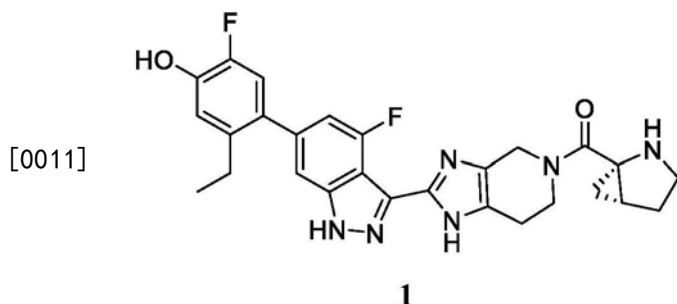
[0007] 视网膜静脉阻塞(RVO)是一种高度流行的视觉障碍性疾病。视网膜血流阻塞可导致视网膜血管系统损伤、出血和组织缺血。尽管RVO的原因是多因素的,但血管以及炎症中介物均已被证明是重要的(德奥巴克塔(Deobhakta)等人,国际炎症杂志(International Journal of Inflammation),2013,文章ID 438412)。已在RVO患者的眼组织中检测到通过JAK-STAT通路发信号的细胞因子(诸如IL-6和IL-13)以及其他细胞因子(诸如MCP-1(其产生部分由JAK-STAT通路信令驱动))水平升高(什楚科(Shchuko)等人,印度眼科学杂志(Indian Journal of Ophthalmology),2015,63(12),905-911)。虽然许多RVO病患者通过光凝固术进行治疗,但这是一种固有的破坏性疗法。也使用抗VEGF药剂,但它们仅在一小部分患者中有效。降低眼部炎症水平的类固醇药物(曲安奈德和地塞米松植入剂)也已显示出为某些RVO形式的患者提供有益结果,但也已显示出它们会导致白内障和升高的眼内压/青光眼。

[0008] 仍然需要一种强效泛JAK抑制剂来治疗眼病。

发明内容

[0009] 在一个方面,本发明提供一种用于治疗眼部炎性疾病的JAK抑制剂化合物。

[0010] 特别地,在一个方面,本发明提供一种下式的化合物:



[0012] 以下称为化合物1,或其药学上可接受的盐。

[0013] 本发明还提供一种包括化合物1或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0014] 在一个方面,本发明提供一种治疗哺乳动物眼病的方法,所述方法包括对哺乳动物施用本发明的化合物1或药物组合物。在一个方面,眼病选自由葡萄膜炎、糖尿病视网膜

病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼症、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞和特应性角膜结膜炎组成的群组。特别地,眼病是糖尿病性黄斑水肿或葡萄膜炎。

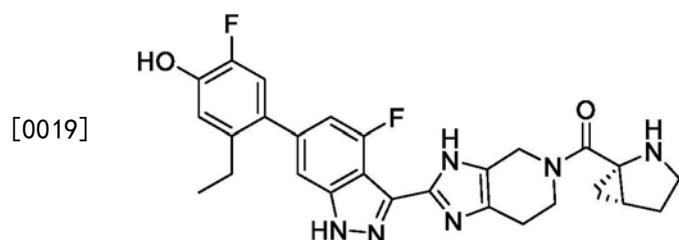
[0015] 在单独和不同的方面,本发明还提供本文所述的可用于制备化合物1的合成工艺。

[0016] 本发明还提供如本文所述的用于医学疗法的化合物1或其药学上可接受的盐,以及本发明的化合物在制造用于治疗眼病的制剂或医药中的用途。

具体实施方式

[0017] 化学结构在本文中是根据在ChemDraw软件(马萨诸塞州剑桥珀金埃尔默(PerkinElmer, Inc.))中实现的IUPAC惯例命名的。

[0018] 此外,本发明化合物结构中四氢咪唑并吡啶部分的咪唑部分以互变异构形式存在。所述化合物可以等效地表示为



[0020] 根据IUPAC惯例,这些表示会导致四氢咪唑并吡啶部分的原子编号不同。因此这种结构被指定为((1S,5R)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-1-基)(2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟基苯基)-4-氟-1H-咪唑-3-基)-3,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-基)甲酮。其还可被指定为:((1S,5R)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-1-基)(2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟基苯基)-4-氟-1H-咪唑-3-基)-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-基)甲酮。应当理解,尽管结构以特定形式来显示或命名,但本发明还包含其互变异构体。

[0021] 本发明的化合物含有几个碱性基团,并且因此,所述化合物可以作为游离碱或以各种盐形式,诸如单质子化盐形式、双质子化盐形式或其混合物存在。除非另有说明,否则所有这些形式都包含在本发明的范围内。

[0022] 本发明还包含式1的同位素标记的化合物,即其中一个原子被具有相同原子序数但原子质量不同于自然界中占优势的原子质量的原子取代或富集的式1的化合物。可掺入式1的化合物中的同位素的实例包含但不限于²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹³N、¹⁵N、¹⁵O、¹⁷O、¹⁸O和¹⁸F。特别值得关注的是富含氟或碳14的式1的化合物,这些化合物可用于例如组织分布研究。特别值得关注的还有富含氘(尤其是在代谢位点)的式1的化合物,这些化合物预计具有更高的代谢稳定性。此外,特别值得关注的是富含正电子发射同位素(诸如¹¹C、¹⁸F、¹⁵O和¹³N)的式1的化合物,这些化合物可用于例如正电子发射断层扫描(PET)研究。

[0023] 定义

[0024] 当描述包含其各个方面和实施例在内的本发明时,下面

[0025] 术语“治疗有效量”意指当对需要治疗的患者施用时足以实现治疗的量。

[0026] 术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指预防、改善或抑制患者(特别是人)中所治疗的医学病症、疾病或障碍(例如,呼吸疾病);或减轻医学病症、疾病或障碍的症状。

[0027] 术语“药学上可接受的盐”意指可接受用于对患者或哺乳动物诸如人施用的盐(例

如,对于给定剂量方案具有可接受的哺乳动物安全性的盐)。代表性的药学上可接受的盐包含乙酸、抗坏血酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、乙二磺酸、富马酸、龙胆酸、葡糖酸、葡糖醛酸、谷氨酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、羟甲基磺酸、乳酸、乳糖酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、黏酸、萘磺酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2,6-二磺酸、烟碱酸、硝酸、乳清酸、双羟萘酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸和昔美酸等的盐。

[0028] 术语“其盐”意指当酸的氢被阳离子诸如金属阳离子或有机阳离子等取代时形成的化合物。例如,阳离子可以是式1的化合物的质子化形式,即其中一个或多个氨基已被酸质子化的形式。通常,所述盐是药学上可接受的盐,但对于不打算对患者施用的中间体化合物的盐而言,这不是必需的。

[0029] 术语“氨基保护基团”意指适于防止在氨基氮上发生不期望的反应的反应的保护基团。代表性的氨基保护基团包含但不限于乙酰基;酰基,例如烷酰基,诸如乙酰基和三氟乙酰基;烷氧羰基,诸如叔丁氧羰基(Boc);芳基甲氧羰基,诸如苄氧羰基(Cbz)和9-苄基甲氧羰基(Fmoc);芳基甲基,诸如苄基(Bn)、三苯甲基(Tr)和1,1-二-(4'-甲氧基苯基)甲基;甲硅烷基,诸如三甲基甲硅烷基(TMS)、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基(SEM);等等。

[0030] 许多保护基团以及它们的引入和去除在T.W.格林(Greene)和P.G.M.伍兹(Wuts),有机合成中的保护基团(Protecting Groups in Organic Synthesis),第三版,威利(Wiley),纽约(New York)中有所描述。

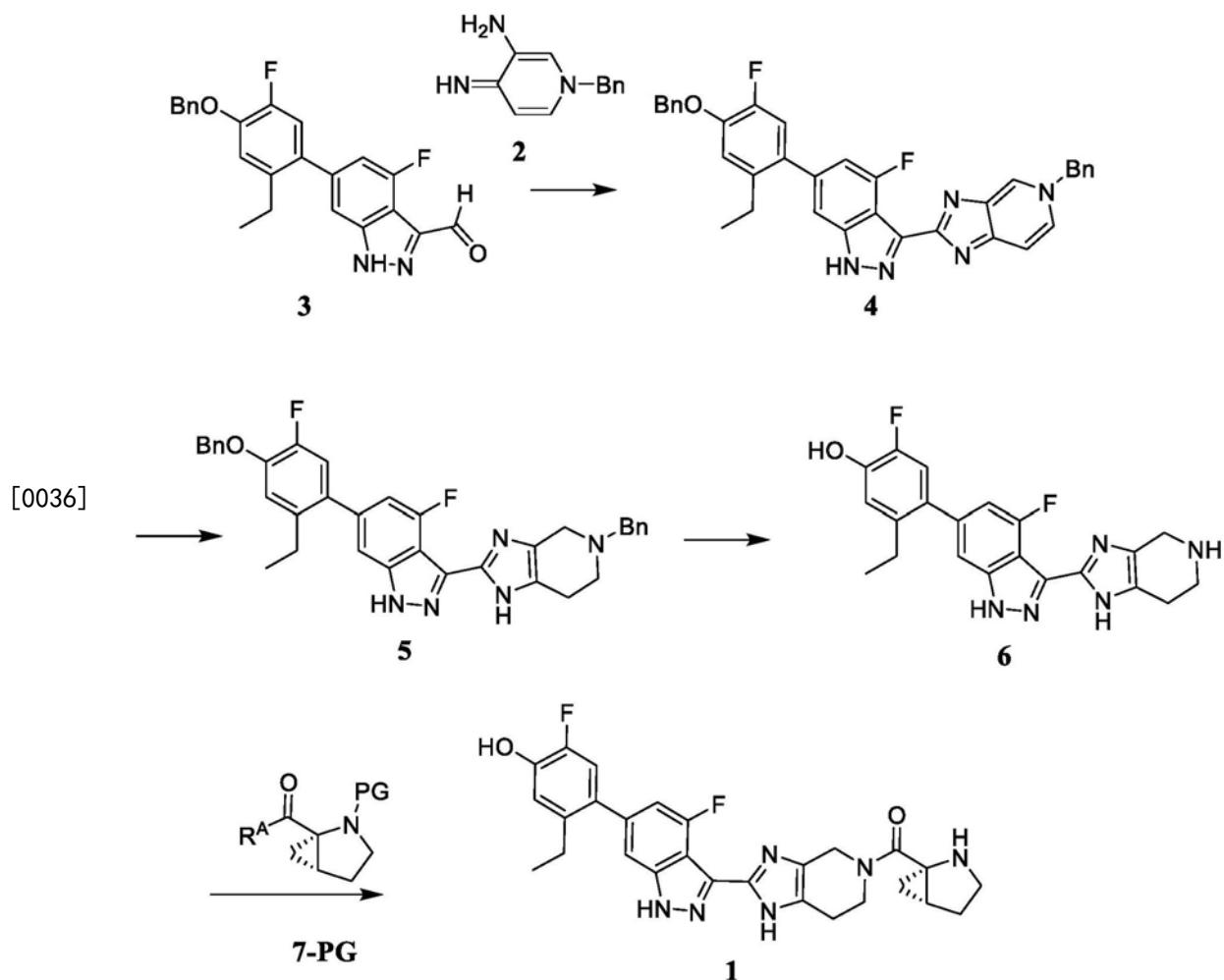
[0031] 一般合成程序

[0032] 化合物1及其中间体可根据以下一般方法和程序,使用市售或常规制备的起始材料和试剂制备。此外,具有酸性或碱性原子或官能团的化合物可以使用或可以盐的形式生产,除非另有说明(在一些情况下,在特定反应中使用盐将需要在进行反应之前使用常规程序将所述盐转化为非盐形式,例如,游离碱)。

[0033] 虽然本发明的特定实施例可以在以下程序中显示或描述,但是本领域技术人员将认识到,本发明的其他实施例或方面也可以使用这些程序或通过使用本领域技术人员已知的其他方法、试剂和起始材料来制备。特别地,应理解,化合物1可通过多种工艺路线制备,其中将反应物以不同顺序组合以在生产最终产品的途中提供不同的中间体。

[0034] 在所附实例中详细描述化合物1的制备。方案1总结关键步骤。 R^A 可以是羟基,在这种情况下,化合物7-PG与中间体6在典型的酰胺键形成条件下,在激活试剂诸如HATU、HOBT等存在的情况下偶联。另选地, R^A 可以是离去基团,诸如Cl。

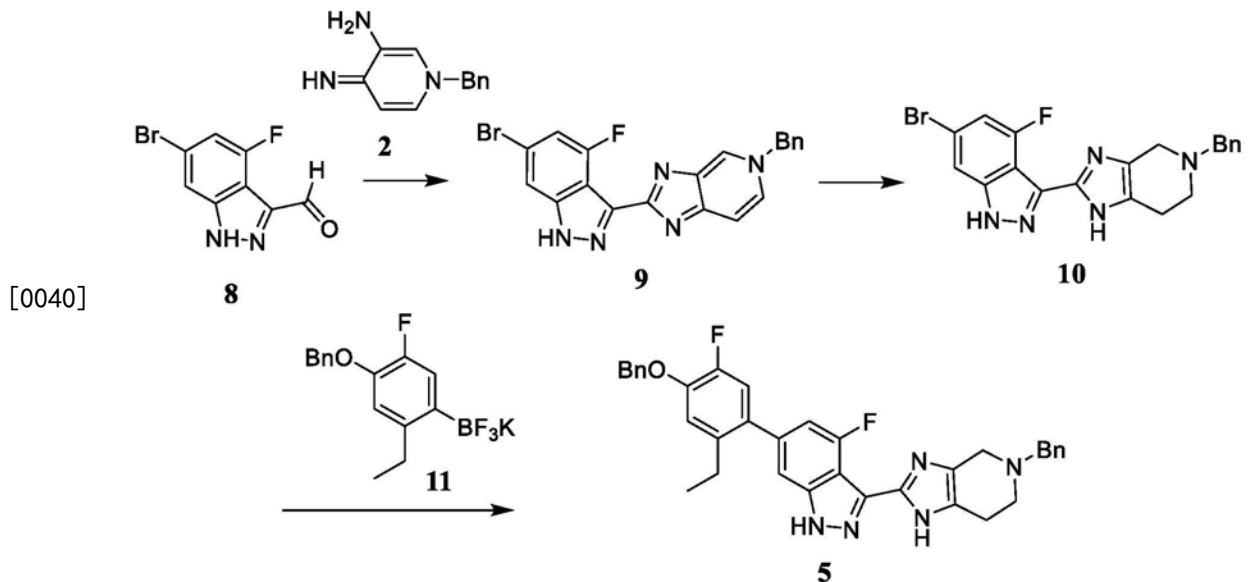
[0035] 方案1



[0037] 将化合物6与7-PG偶联后，除去保护基团“PG”得到化合物1。保护基团可选自如上定义的氨基保护基团。例如，PG可以是Boc保护基团，在这种情况下，去保护可以在强酸诸如TFA或HCl存在的情况下进行。

[0038] 中间体3可按照实验部分所述制备。方案2中说明制备重点保护的中间体5的替代方法。

[0039] 方案2



[0041] 溴吲唑醛8可以与苄基保护的亚胺化合物2反应以提供中间体9。所述反应通常在亚硫酸氢钠存在的情况下,在约130°C至约140°C的温度下进行约1至约6小时,或直至反应基本完成。使用还原剂诸如硼氢化钠还原化合物9以提供化合物10,在典型的铃木-宫浦(Suzuki-Miyaura)偶联条件下将其与受保护的苯基三氟硼酸盐11组合以提供中间体5。所述反应通常在钯催化剂存在的情况下在高温下进行。在方案2中显示为三氟硼酸钾盐的铃木配偶体11可以通过使相应的硼酸盐(下面制备1中的中间体1-5)与二氟化氢钾反应以提供中间体11来制备。另选地,硼酸盐中间体可以用来代替三氟硼酸盐11。

[0042] 因此,在方法方面,本发明提供制备式1的化合物或其药学上可接受的盐的工艺,所述工艺包括使式6的化合物与式7-PG的化合物反应,随后除去保护基团PG,和任选地制备化合物1的药学上可接受的盐以提供式1的化合物或其药学上可接受的盐。

[0043] 药物组合物

[0044] 化合物1及其药学上可接受的盐通常以药物组合物或制剂的形式使用。此类药物组合物可以有利地通过任何可接受的施用途径对患者施用,施用途径包含但不限于口服、吸入、光学注射、局部(包含透皮)、直肠、鼻和胃肠外施用模式。

[0045] 因此,在其组合物的一个方面,本发明涉及包括药学上可接受的载体或赋形剂和化合物1的药物组合物,其中如上文所定义,“化合物1”意指化合物1或其药学上可接受的盐。任选地,如果需要,则此类药物组合物可以含有其他治疗和/或配制剂。当讨论其组合物和用途时,化合物1在本文中也可称为“活性剂”。

[0046] 在一些方面,本公开提供一种包括化合物1或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些方面,所述药物组合物适于施用于眼部。在一些方面,所述组合物适于注射到眼中。在一些方面,所述组合物适于玻璃体内注射。在一些方面,所述组合物是悬浮液。在一些方面,组合物是结晶悬浮液。

[0047] 本发明的药物组合物通常含有治疗有效量的化合物1。然而,本领域技术人员将认识到,药物组合物可含有多于治疗有效量,即块体组合物,或小于治疗有效量,即设计用于多次施用以获得治疗有效量的单个单位剂量。

[0048] 典型地,此类药物组合物将含有约0.01重量%至约95重量%的活性剂;包含例如

约0.05重量%至约30重量%；和约0.1重量%至约10重量%的活性剂。

[0049] 在本发明的药物组合物中可以使用任何常规的载体或赋形剂。特定载体或赋形剂或载体或赋形剂组合的选择将取决于用于治疗特定患者的施用模式或医学病症或疾病状态的类型。就此来说，用于特定施用模式的合适药物组合物的制备完全在制药领域技术人员范围内。此外，本发明药物组合物中使用的载体或赋形剂是市售的。为了进一步说明，常规配制技术在雷明顿 (Remington): 药学的科学与实践 (The Science and Practice of pharmaceutical), 第20版, 利平科特威廉姆斯和怀特 (Lippincott Williams&White), 马里兰州巴尔的摩市 (Baltimore, Maryland) (2000); 和H.C. 安塞尔 (Ansel) 等人, 药物剂型和药物递送系统 (Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems), 第7版, 利平科特威廉姆斯和怀特, 马里兰州巴尔的摩市 (1999) 中描述。

[0050] 可用作药学上可接受的载体的材料的代表性实例包含但不限于以下: 糖, 诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖; 淀粉, 诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉; 纤维素, 诸如微晶纤维素, 及其衍生物, 诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙纤维素; 粉状黄耆胶; 麦芽; 明胶; 滑石; 赋形剂, 诸如可可脂和栓剂蜡; 油类, 诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; 二醇, 诸如丙二醇; 多元醇, 诸如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇; 酯, 诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯; 琼脂; 缓冲剂, 诸如氢氧化镁和氢氧化铝; 海藻酸; 无热原水; 等渗盐水; 林格氏溶液; 乙醇; 磷酸盐缓冲溶液; 和其他用于药物组合物的无毒相容物质。

[0051] 药物组合物通常通过将活性剂与药学上可接受的载体和一种或多种任选的成分充分和密切地混合或共混来制备。然后可使用常规程序和设备将所得的均匀共混的混合物成型或装入片剂、胶囊、丸剂等中。

[0052] 本发明的药物组合物优选包装在单位剂型中。术语“单位剂型”是指适于对患者给药的物理上离散的单元, 即, 每个单元含有预定量的活性剂, 其被计算以单独或与一个或多个另外的单元组合产生所需治疗效果。例如, 此类单位剂型可以是胶囊、片剂、丸剂等, 或适于眼部或肠胃外施用的单位包装。

[0053] 在一个实施例中, 本发明的药物组合物适于口服施用。适合口服施用的药物组合物可以是胶囊、片剂、丸剂、锭剂、扁囊剂、糖衣丸、粉末、颗粒剂形式; 或者作为在水液或非水液中的溶液或悬浮液; 或作为水包油或油包水液体乳剂; 或作为酞剂或糖浆; 等等; 其各自含有预定量的化合物1作为活性成分。

[0054] 当打算以固体剂型 (即, 作为胶囊、片剂、丸剂等) 口服施用, 本发明的药物组合物通常将包括活性剂和一种或多种药学上可接受的载体。任选地, 此类固体剂型可以包括: 填充剂或增量剂, 诸如淀粉、微晶纤维素、乳糖、磷酸二钙、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸; 粘合剂, 诸如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶; 湿润剂, 诸如甘油; 崩解剂, 诸如交联羧甲基纤维素钠、琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和/或碳酸钠; 溶液阻滞剂, 诸如石蜡; 吸收促进剂, 诸如季铵化合物; 润湿剂, 诸如鲸蜡醇和/或单硬脂酸甘油酯; 吸收剂, 诸如高岭土和/或膨润土; 润滑剂, 诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠和/或其混合物; 着色剂; 和缓冲剂。

[0055] 脱模剂、润湿剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和加香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于本发明的药物组合物中。药学上可接受的抗氧化剂的实例包含: 水溶性抗氧化剂, 诸如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等; 油溶性抗氧化剂, 诸如抗坏

血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；和金属螯合剂，诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸、山梨醇、酒石酸、磷酸等。片剂、胶囊、丸剂等的包衣剂包含用于肠溶包衣的那些，诸如醋酸邻苯二甲酸纤维素、聚乙烯基醋酸邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯共聚物、醋酸偏苯三酸纤维素、羧甲基乙基纤维素、醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素等。

[0056] 本发明的药物组合物还可以通过使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素；或其他聚合物基质、脂质体和/或微球来配制以提供活性剂的缓慢或受控释放。此外，本发明的药物组合物可以任选地含有遮光剂，并且可以被配制成使得它们仅或优选地在胃肠道的特定部分中以任选地延迟的方式释放活性成分。可使用的包埋组合物的实例包含聚物质和蜡。如果合适，则活性剂也可以与上述赋形剂中的一种或多种一起成为微囊形式。

[0057] 口服施用的合适液体剂型包含例如药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。液体剂型通常包括活性剂和惰性稀释剂，诸如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂，诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油（特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、油酸、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和山梨糖醇酐的脂肪酸酯，以及其混合物。另选地，某些液体制剂可以例如通过喷雾干燥转化为粉末，其通过常规程序用于制备固体剂型。

[0058] 除了活性成分之外，悬浮液还可以含有悬浮剂，诸如例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶，以及它们的混合物。

[0059] 化合物1也可以肠胃外施用（例如，通过静脉内、皮下、肌内或腹膜内注射）。对于肠胃外施用，活性剂通常与适合肠胃外施用的媒介物混合，所述媒介物包含例如无菌水溶液、盐水、低分子量醇，诸如丙二醇、聚乙二醇、植物油、明胶、脂肪酸酯诸如油酸乙酯等。肠胃外制剂还可含有一种或多种抗氧化剂、增溶剂、稳定剂、防腐剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂或分散剂。可通过使用无菌注射介质、灭菌剂、过滤、辐射或加热使这些制剂无菌。

[0060] 化合物1也可被配制成眼部注射用无菌水性悬浮液或溶液。可以包含在这种水性制剂中的有用的赋形剂包含聚山梨酯80、纤维素聚合物诸如羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、氯化钾、氯化钙、氯化钠、氯化镁、乙酸钠、柠檬酸钠、组氨酸、 α - α -海藻糖二水合物、蔗糖、聚山梨酯20、羟丙基- β -环糊精、苯扎氯铵、安伯来特IRP-69、聚氧乙烯二醇醚（月桂基、硬脂基和油基）、乙二胺四乙酸钠盐、牛磺胆酸钠、皂苷和聚氧乙烯蓖麻油、聚卡波非-半胱氨酸、黄原胶、结冷胶、透明质酸、脂质体和磷酸钠。渗透增强剂、表面活性剂、胆汁酸、环糊精（诸如2-羟丙基- β -环糊精）和螯合剂可包含在所述制剂中。具有与活性剂形成复合物能力的具有亲水性外表面和亲脂性内表面的圆柱形寡核苷酸也可以包含在所述制剂中。苯甲醇可用作防腐剂，并且还可包含氯化钠来调节紧张性。此外，可向溶液中加入盐酸和/或氢氧化钠，以调节pH。眼部注射用水性制剂可以制备成不含防腐剂。

[0061] 眼部制剂可允许活性成分向眼部持续释放。眼部制剂可以配制成乳剂（水包油或油包水）、悬浮液或软膏。悬浮制剂可以含有结晶形式（例如形式1或形式2）或无定形状态的化合物1或其药学上可接受的盐。

[0062] 化合物1也可被配制成适于滴眼剂给药或作为玻璃体内植入剂。植入剂可允许递送恒定治疗水平的药物。储库植入剂通常由颗粒化药芯制成，药芯周围包裹有非反应性物

质,诸如硅、乙烯醋酸乙烯酯(EVA)或聚乙烯醇(PVA);这些植入剂是不可生物降解的,并且可以递送连续量的药物达数月至一年。也可以使用基质植入剂。它们通常用于在1天至6个月的时间内递送负荷剂量,然后逐渐减少药物剂量。它们最常见由降解为水和二氧化碳的共聚物聚乳酸(PLA)和/或聚乳酸-乙醇酸(PLGA)制成。也可使用离子电渗疗法。这是一种其中施加小电流来增强离子化药物对组织的渗透的无创技术。

[0063] 基于细胞的递送系统的包封细胞技术(ECT)也可用于将治疗剂递送至眼部。通常,转基因细胞被包装在半透膜的中空管中,这会防止免疫细胞进入,并允许营养物质和治疗分子在膜上自由扩散。将聚合物区段的两端密封,并且在锚定端上放置钛环,所述钛环被植入睫状体平坦部并锚定于巩膜。

[0064] 化合物1可以配制成允许递送至眼后部的任何形式。递送模式的实例在文献(库诺(Kuno)等人,聚合物(Polymers),2011,3,193-221,德尔艾莫(del Amo)等人,今日药物发现(Drug Discovery Today),2008,13,135-143,肖特(Short),毒理学病理学(Toxicologic Pathology),2008,36,49-62)中已知。此类递送模式包含但不限于脉络膜上腔递送(其允许通过脉络膜上腔递送至脉络膜和视网膜)、眼球筋膜下递送、眼周递送、隐形眼镜、泪点塞和巩膜塞。化合物1也可通过眼周、巩膜上、球后、球周或结膜下注射递送。

[0065] 化合物1可以以乳剂、聚合微球或纳米球、脂质体、微米颗粒或纳米颗粒、微球、胶束或树枝状大分子的形式递送。可使用可生物降解和生物相容的聚合物,诸如聚丙烯酸酯和PLGA。化合物1可被包封。

[0066] 此外,化合物1可以配制成软膏或乳膏用于皮肤局部施用。软膏制剂是基质为通常透明的油性或油脂材料的半固体制剂。适用于软膏制剂的油性材料包含凡士林油(凡士林)、蜂蜡、可可脂、乳木果油和鲸蜡醇。如果需要,则软膏可以任选地另外包含润肤剂和渗透增强剂。

[0067] 乳膏制剂可以制备成包括油相和水相(通常包含纯化水)的乳剂。乳膏制剂的组分可能包含:油基质,诸如凡士林油、矿物油、植物油和动物油,以及甘油三酯;乳膏基质,诸如羊毛脂醇、硬脂酸和鲸蜡硬脂醇;凝胶基质,诸如聚乙烯醇;溶剂,诸如丙二醇和聚乙二醇;乳化剂,诸如聚山梨醇酯,硬脂酸酯,诸如硬脂酸甘油酯、辛基羟基硬脂酸酯、硬脂酸聚氧乙烯酯、PEG硬脂醚、棕榈酸异丙酯,和脱水山梨醇单硬脂酸酯;稳定剂,诸如多糖和亚硫酸钠;润肤剂(即保湿剂),诸如中链甘油三酯、肉豆蔻酸异丙酯和二甲基硅油;硬化剂,诸如鲸蜡醇和硬脂醇;抗微生物剂,诸如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯氧乙醇、山梨酸、重氮烷基脲和丁基化羟基茴香醚;渗透促进剂,诸如N-甲基吡咯烷酮、丙二醇、聚乙二醇单月桂酸酯等;和螯合剂,诸如依地酸二钠。

[0068] 另选地,将本发明的药物组合物配制成通过吸入施用。适用于通过吸入施用的药物组合物通常为气雾剂或粉末形式。这类组合物通常使用众所周知的递送装置(诸如定量吸入器、干粉吸入器、喷雾器或类似的递送装置)施用。

[0069] 当使用加压容器通过吸入施用时,本发明的药物组合物通常将包括活性成分和合适的推进剂,诸如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体。此外,所述药物组合物可以是包括化合物1和适用于粉末吸入器的粉末的胶囊或药筒(例如由明胶制成)的形式。合适的粉末基质包含,例如,乳糖或淀粉。

[0070] 以下非限制性实例说明本发明的代表性药物组合物。

[0071] 片剂口服固体剂型

[0072] 将化合物1或其药学上可接受的盐与微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和交联羧甲基纤维素钠以4:5:1:1的比率干混,并压制成片剂,以提供例如每片5mg、20mg或40mg活性剂的单位剂量。

[0073] 胶囊口服固体剂型

[0074] 通过湿法制粒将化合物1或其药学上可接受的盐与微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和交联羧甲基纤维素钠以4:5:1:1的比率组合,并装入明胶或羟丙基甲基纤维素胶囊中,以提供例如每胶囊5mg、20mg或40mg活性剂的单位剂量。

[0075] 液体制剂

[0076] 通过将本发明的化合物加入到水和抗坏血酸的混合物中形成包括化合物1(0.1%)、水(98.9%)和抗坏血酸(1.0%)的液体制剂。

[0077] 肠溶包衣口服剂型

[0078] 将化合物1溶解在含有聚乙烯吡咯烷酮的水溶液中,并以1:5w/w活性剂:珠粒的比率喷涂到微晶纤维素或糖珠粒上,然后施加约5%重量增益的包括丙烯酸共聚物的肠溶包衣。将肠溶包衣珠粒装入明胶或羟丙基甲基纤维素胶囊中,以提供例如每胶囊30mg活性剂的单位剂量。

[0079] 肠溶包衣口服剂型

[0080] 将包括Eudragit-L®和Eudragit-S®或醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素的组合的肠溶包衣施加到上述片剂口服剂型或胶囊口服剂型。

[0081] 眼部注射用水性制剂

[0082] 每mL无菌水性悬浮液包含5mg至50mg化合物1、用于调节紧张性的氯化钠、0.99% (w/v) 苯甲醇防腐剂、0.75%羧甲基纤维素钠和0.04%聚山梨酯。可包含氢氧化钠或盐酸,以将pH调整至5至7.5。

[0083] 眼部注射用水性制剂

[0084] 无菌不含防腐剂的水性悬浮液包含在10mM磷酸钠、40mM氯化钠、0.03%聚山梨酯20和5%蔗糖中的5mg/mL至50mg/mL的化合物1。

[0085] 用于局部施用的软膏制剂

[0086] 将化合物1与凡士林油、C₈-C₁₀甘油三酯、辛基羟基硬脂酸酯和N-甲基吡咯烷酮按一定比率混合,以提供含有0.05重量%至5重量%活性剂的组合物。

[0087] 用于局部施用的软膏制剂

[0088] 将化合物1与白凡士林油、丙二醇、单甘油酯和二甘油酯、石蜡、丁基化羟基甲苯和依地酸钙二钠按一定比率混合,以提供含有0.05重量%至5重量%活性剂的组合物。

[0089] 用于局部施用的软膏制剂

[0090] 将化合物1与矿物油、石蜡、碳酸亚丙酯、白凡士林油和白蜡混合,以提供含有0.05重量%至5重量%活性剂的组合物。

[0091] 用于局部施用的乳膏制剂

[0092] 将矿物油与化合物1、丙二醇、棕榈酸异丙酯、聚山梨酯60、鲸蜡醇、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯40硬脂酸酯、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯混合,以形成油相,通过剪切共混将油相与纯化水混合以提供含有0.05重量%至5重量%的活性剂

的组合物。

[0093] 用于局部施用的乳膏制剂

[0094] 包括化合物1、苯甲醇、鲸蜡醇、无水柠檬酸、单甘油酯和二甘油酯、油醇、丙二醇、鲸蜡硬脂基硫酸钠、氢氧化钠、硬脂醇、甘油三酯和水的乳膏制剂含有0.05重量%至5重量%的活性剂。

[0095] 用于局部施用的乳膏制剂

[0096] 包括化合物1、鲸蜡硬脂醇、肉豆蔻酸异丙酯、丙二醇、聚西托醇1000、二甲基硅油360、柠檬酸、柠檬酸钠和纯化水以及作为防腐剂的咪脲、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯的乳膏制剂含有0.05重量%至5重量%的活性剂。

[0097] 干粉组合物

[0098] 将微粉化化合物1 (1g) 与磨碎的乳糖 (25g) 共混。然后将此共混的混合物以足以提供每剂量约0.1mg至约4mg的化合物1的量装入可剥离泡罩包装的单个泡罩中。使用干粉吸入器施用泡罩的内容物。

[0099] 定量吸入器组合物

[0100] 将微粉化化合物1 (10g) 分散在通过将卵磷脂 (0.2g) 溶解在软化水 (200mL) 中制备的溶液中。将所得悬浮液喷雾干燥, 然后微粉化以形成包括平均直径小于约1.5 μ m的颗粒的微粉化组合物。然后将微粉化组合物以足以在通过定量吸入器施用提供每剂量约0.1mg至约4mg的化合物1的量装入含有加压的1,1,1,2-四氟乙烷的计量吸入器药筒中。

[0101] 雾化器组合物

[0102] 将化合物1 (25mg) 溶解在含1.5-2.5当量盐酸的溶液中, 然后加入氢氧化钠以将pH调节至3.5至5.5, 并加入3重量%的甘油。将溶液充分搅拌, 直至所有组分溶解。使用每剂量提供约0.1mg至约4mg的化合物1的雾化器装置施用溶液。

[0103] 效用

[0104] 化合物1已被证明是JAK酶家族 (JAK1、JAK2、JAK3和TYK2) 的强效抑制剂。

[0105] 眼病

[0106] 许多眼病已被证明与依赖JAK-STAT通路的促炎细胞因子的升高相关联。由于化合物1对所有四种JAK酶均表现出强效抑制作用, 因此其被预期可强效抑制通过JAK发信号的多种细胞因子 (诸如IL-6、IL-2和IFN- γ) 的信令和致病效应, 以及防止其产生由JAK-STAT通路信令驱动的其他细胞因子 (诸如MCP-1和IP-10) 增加。

[0107] 如测定部分所示, 化合物1在细胞测定 (包含记录细胞因子升高下游效应抑制的测定) 中表现出活性。

[0108] 此外, 玻璃体内给药化合物1已展示出对大鼠视网膜/脉络膜组织中IL-6诱导的pSTAT3的显著抑制作用。

[0109] 预期在无显著全身水平的情况下, 眼部JAK抑制将导致眼部出现强效局部抗炎活性, 且无全身驱动的副作用。因此, 预期化合物1在许多眼病中是有益的, 所述眼病包含但不限于葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼症、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞和特应性角膜结膜炎。

[0110] 特别地, 葡萄膜炎 (宝来和卡斯皮, 干扰素细胞因子研究杂志, 2011, 31, 733-744)、糖尿病视网膜病变 (艾博卡维, 临床细胞免疫学杂志, 2013, 增刊1, 1-12)、糖尿病性黄斑水

肿(佐恩等人,美国眼科学杂志,2011,152,686-694)、干眼症(史蒂文森等人,眼科学文献,2012,130,90-100)、视网膜静脉阻塞(什楚科等人,印度眼科学杂志,2015,63(12),905-911)和年龄相关性黄斑变性(尼克本(Knickelbein)等人,国际眼科临床学(Int Ophthalmol Clin),2015,55(3),63-78)的特征为通过JAK-STAT通路发出信号的某些促炎细胞因子的升高。因此,化合物1被预期能够减轻相关联的眼部炎症并逆转疾病进展或提供这些疾病的症状缓解。

[0111] 因此,在一个方面,本发明提供一种治疗哺乳动物眼病的方法,所述方法包括对哺乳动物的眼部施用包括化合物1或其药学上可接受的盐和药物载体的药物组合物。在一个方面,眼病是葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、干眼症、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞或特应性角膜结膜炎。在一个方面,所述方法包括通过玻璃体内注射施用化合物1。

[0112] 炎性皮肤病

[0113] 炎性皮肤病,诸如特应性皮炎,与依赖于JAK-STAT通路的促炎细胞因子,特别是IL-4、IL-5、IL-10、IL-13和IFN γ 的升高相关联。因此,预期化合物1在许多皮肤炎性或瘙痒性病症中是有益的,所述病症包含但不限于特应性皮炎、斑秃、白癜风、皮肤T细胞淋巴瘤、结节性痒疹、扁平苔藓、原发性局部皮肤淀粉样变性、大疱性类天疱疮、移植物抗宿主病的皮肤表现、类天疱疮、盘状狼疮、环状肉芽肿、慢性单纯性苔藓、外阴/阴囊/肛周瘙痒、硬化性苔藓、带状疱疹后神经痛瘙痒、扁平毛发苔藓和秃发性毛囊炎。特别地,斑秃(星(Xing)等人,自然医学(Nat Med.),2014年9月;20(9):1043-9)、白癜风(克雷格(Craiglow)等人,美国皮肤病学会杂志(JAMA Dermatol.),2015年10月;151(10):1110-2)、皮肤T细胞淋巴瘤(内蒂颇洛克(Netchiporouk)等人,细胞周期(Cell Cycle),2014;13(21):3331-5)、结节性痒疹(雄科伊(Sonkoly)等人,过敏与临床免疫学杂志(J Allergy Clin Immunol.),2006年2月;117(2):411-7)、扁平苔藓(韦尔茨-库比亚克(Welz-Kubiak)等人,免疫学研究杂志(J Immunol Res.),2015;2015:854747)、原发性局部皮肤淀粉样变性(田中(Tanaka)等人,英国皮肤病学杂志(Br J Dermatol.),2009年12月;161(6):1217-24)、大疱性类天疱疮(费利恰尼(Feliciani)等人,国际免疫病理学和药理学杂志(Int J Immunopathol Pharmacol.),1999年5月-8月;12(2):55-61)和移植物抗宿主病的皮肤表现(欧卡雅玛(Okiyama)等人,皮肤病学研究杂志(J Invest Dermatol.),2014年4月;134(4):992-1000)的特征是通过JAK激活发信号的某些细胞因子的升高。因此,预期化合物1能够减轻由这些细胞因子驱动的相关联皮肤炎症或瘙痒。

[0114] 因此,在一个方面,本发明提供一种治疗哺乳动物(例如,人)炎性皮肤病的方法,所述方法包括对哺乳动物的皮肤施涂包括化合物1或其药学上可接受的盐和药物载体的药物组合物。在一个方面,炎性皮肤病是特应性皮炎。

[0115] 化合物1也可与革兰氏阳性抗生素诸如莫匹罗星和夫西地酸联合使用,以治疗炎性皮肤病。因此,在一个方面,本发明提供一种治疗哺乳动物炎性皮肤病的方法,所述方法包括对哺乳动物的皮肤施涂化合物1和革兰氏阳性抗生素。在另一方面,本发明提供一种包括化合物1或其药学上可接受的盐、革兰氏阳性抗生素和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0116] 呼吸疾病

[0117] 通过JAK-STAT通路发出信号的细胞因子,特别是IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-23、IL-31、IL-27、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、干扰素- γ (IFN γ)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),也与哮喘炎症和其他炎性呼吸疾病有关。如上所述,化合物1已被证明是JAK1酶、JAK2酶、JAK3酶和TYK2酶的强效抑制剂,并且还在细胞测定中被证明对促炎细胞因子具有强效抑制作用。

[0118] JAK抑制剂的抗炎活性已在哮喘临床前模型中得到充分证明(麦乐薇娅(Malaviya)等人,国际免疫药理学杂志(Int Immunopharmacol),2010,10,829,-836;松永(Matsunaga)等人,生物化学和生物物理学研究通讯(Biochem and Biophys Res Commun),2011,404,261-267;库得劳訾(Kudlacz)等人,欧洲药理学杂志(Eur J Pharmacol),2008,582,154-161。)。因此,预期化合物1可用于治疗炎性呼吸障碍,特别是哮喘。肺炎症和纤维化是哮喘以外的其他呼吸疾病,诸如慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化(CF)、肺炎、间质性肺病(包含特发性肺纤维化)、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、支气管炎、肺气肿和闭塞性细支气管炎的特征。因此,预期化合物1还可用于治疗慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、肺炎、间质性肺病(包含特发性肺纤维化)、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、支气管炎、肺气肿、闭塞性细支气管炎和结节病。

[0119] 因此,在一个方面,本发明提供一种治疗哺乳动物(例如,人)呼吸疾病的方法,所述方法包括对哺乳动物施用化合物1或其药学上可接受的盐。

[0120] 在一个方面,呼吸疾病是哮喘、慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、肺炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化(CF)、肺炎、间质性肺病(包含特发性肺纤维化)、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、支气管炎、肺气肿、闭塞性细支气管炎或结节病。在另一方面,呼吸疾病是哮喘或慢性阻塞性肺病。

[0121] 在进一步的方面,呼吸疾病是肺感染、蠕虫感染、肺动脉高压、结节病、淋巴管肌瘤病、支气管扩张或浸润性肺病。在又一方面,呼吸疾病是药物诱导的肺炎、真菌诱导的肺炎、变应性支气管肺曲霉病、过敏性肺炎、伴有多血管炎的嗜酸性肉芽肿病、特发性急性嗜酸性肺炎、特发性慢性嗜酸性肺炎、高嗜酸细胞综合征、勒夫勒综合征、闭塞性细支气管炎机化性肺炎或免疫检查点抑制剂诱导的肺炎。

[0122] 本发明还提供一种治疗哺乳动物哮喘的方法,所述方法包括对哺乳动物施用包括化合物1或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0123] 化合物1或其药学上可接受的盐也预期可用于治疗嗜酸性肺病。嗜酸性气道炎症,其是统称为嗜酸性肺病的疾病的特征(克汀(Cottin)等人,胸腔医学(Clin.Chest.Med.),2016,37(3),535-56)。嗜酸性疾病与IL-4、IL-13和IL-5信令相关联。嗜酸性肺病包含感染(特别是蠕虫感染)、药物诱导的肺炎(例如由治疗药物诸如抗生素、苯妥英或左旋色氨酸诱导)、真菌诱导的肺炎(例如,变应性支气管肺曲霉病)、过敏性肺炎和伴有多血管炎的嗜酸性肉芽肿病(以前称为丘尔-斯特劳斯(Churg-Strauss)综合征)。病因不明的嗜酸性肺病包含特发性急性嗜酸性肺炎、特发性慢性嗜酸性肺炎、高嗜酸细胞综合征和勒夫勒综合征。

[0124] 化合物1或其药学上可接受的盐也可用于治疗PAH。IL-6基因多态性与IL-6水平升高和发生肺动脉高压(PAH)的风险增加相关联(方(Fang)等人,美国高血压学会杂志(J Am Soc Hypertens.),2017,11(3),171-177)。证实IL-6在PAH中的作用,IL-6受体链gp130的抑制改善了PAH大鼠模型中的疾病(黄(Huang)等人,加拿大心脏病学杂志(Can J Cardiol.),

2016,32(11),1356.e1-1356.e10)。

[0125] 化合物1或其药学上可接受的盐也可用于治疗非变应性肺病,诸如结节病和淋巴管肌瘤病。细胞因子诸如IFN γ 、IL-12和IL-6与一系列非变应性肺病,诸如结节病和淋巴管肌瘤病相关联(E1-哈希姆(Hashemite)等人,美国呼吸细胞和分子生物学杂志(Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.),2005,33,227-230,和E1-哈希姆等人,癌症研究(Cancer Res.),2004,64,3436-3443)。

[0126] 化合物1或其药学上可接受的盐也可用于治疗支气管扩张和浸润性肺病,所述疾病是与慢性中性粒细胞炎症相关联的疾病。某些细胞因子与中性粒细胞炎症相关联(例如,IL-6、IFN γ)。

[0127] 病理性T细胞激活在多种呼吸疾病的病因中至关重要。自身反应性T细胞在闭塞性细支气管炎机化性肺炎(也称为COS)中起作用。与COS相似,肺移植排斥的病因与移植供体肺对受体T细胞的异常细胞激活有关。肺移植排斥可早期表现为原发性移植物失功(PGD)、机化性肺炎(OP)、急性排斥(AR)或淋巴细胞性毛细支气管炎(LB),或他们在肺移植数年后表现为慢性肺同种异体移植物失功(CLAD)。CLAD以前被称为闭塞性细支气管炎(BO),但现在被认为是一种可能具有不同病理表现的综合征,包含BO、限制性CLAD(rCLAD或RAS)和同种异体中性粒细胞失功。慢性肺同种异体移植物失功(CLAD)是长期管理肺移植受体的一个主要挑战,因为它会导致移植肺逐渐丧失功能(戈捷(Gauthier)等人,最新移植物报告(Curr Transplant Rep.),2016,3(3),185-191)。CLAD对治疗的反应不佳,并且因此仍然需要能够预防或治疗此种病症的有效化合物。几种JAK依赖性细胞因子诸如IFN γ 和IL-5在CLAD和肺移植排斥中上调(贝拉斯特吉(Berastegui)等人,临床移植(Clin Transplant.),2017,31,e12898)。此外,CXCR3趋化因子(诸如位于JAK依赖性IFN信号下游的CXCL9和CXCL10)的高水平与肺移植患者的更差预后有关(林西娅(Shino)等人,科学公共图书馆综合(PLOS One),2017,12(7),e0180281)。JAK抑制已被证明在肾移植排斥中是有效的(维森缇(Vicenti)等人,美国移植杂志(American Journal of Transplantation),2012,12,2446-56)。因此,化合物1有可能有效治疗或预防肺移植排斥和CLAD。被描述为肺移植排斥基础的类似T细胞激活事件也被认为是造血干细胞移植后可能发生的肺移植物抗宿主病(GVHD)的主要驱动因素。与CLAD相似,肺GVHD是一种慢性进行性病,预后极差,并且目前尚无批准的治疗。对95个接受全身JAK抑制剂鲁索替尼作为挽救疗法的类固醇难治性急性或慢性GVHD患者的回顾性多中心调查研究证实,大多数患者(包含肺GVHD患者)对鲁索替尼完全或部分反应(蔡瑟(Zeiser)等人,白血病(Leukemia),2015,29,10,2062-68)。最近,免疫检查点抑制剂诱导的肺炎(另一种T细胞介导的肺疾)随着免疫检查点抑制剂使用的增加而出现。在接受这些T细胞刺激剂治疗的癌症患者中,可发生致死性肺炎。化合物1或其药学上可接受的盐有可能为这些服务不足的严重呼吸疾病提供新的治疗。

[0128] 胃肠道疾病

[0129] 作为JAK抑制剂,化合物1或其药学上可接受的盐也可用于多种其他疾病。化合物1或其药学上可接受的盐可用于多种胃肠道炎症适应症,包含但不限于炎性肠病、溃疡性结肠炎(直肠乙状结肠炎、全结肠炎、溃疡性直肠炎和左侧结肠炎)、克罗恩病、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、白塞病、乳糜泻、免疫检查点抑制剂诱导的结肠炎、回肠炎、嗜酸性食管炎、移植物抗宿主病相关结肠炎和感染性结肠炎。溃疡性结肠炎(雷蒙德(Reimund)等人,临

床免疫学杂志(J Clin Immunology),1996,16,144-150)、克罗恩病(冈易德特(Woywodt)等人,欧洲胃肠病学与肝病杂志(Eur J Gastroenterology Hepatology),1999,11,267-276)、胶原性结肠炎(库玛沃特(Kumawat)等人,分子免疫学(Mol Immunology),2013,55,355-364)、淋巴细胞性结肠炎(库玛沃特等人,2013)、嗜酸性食管炎(温布兰德-乔克伯格(Weinbrand-Goichberg)等人,免疫学研究(Immunol Res),2013,56,249-260)、移植物抗宿主病相关结肠炎(考海尔(Coghill)等人,血液(Blood),2001,117,3268-3276)、感染性结肠炎(斯达尔默克(Stallmach)等人,国际结直肠疾病杂志(Int J Colorectal Dis),2004,19,308-315)、白塞病(周(Zhou)等人,自身免疫综述(Autoimmun Rev),2012,11,699-704)、乳糜泻(德尼托(de Nitto)等人,世界胃肠病学杂志(World J Gastroenterol),2009,15,4609-4614)、免疫检查点抑制剂诱导的结肠炎(例如,CTLA-4抑制剂诱导的结肠炎;(亚诺(Yano)等人,转化医学杂志(J Translation Med),2014,12,191)、PD-1或PD-L1抑制剂诱导的结肠炎)和回肠炎(山本(Yamamoto)等人,消化和肝病(Dig Liver Dis),2008,40,253-259)的特征是某些促炎细胞因子水平升高。由于许多促炎细胞因子通过JAK激活而发信号,因此化合物1或其药学上可接受的盐可能减轻炎症并且提供症状缓解。特别地,化合物1或其药学上可接受的盐可用于诱导和维持溃疡性结肠炎的缓解,并且用于治疗克罗恩病、免疫检查点抑制剂诱导的结肠炎以及移植物抗宿主病中的胃肠道副作用。因此,在一个方面,本发明提供一种治疗哺乳动物(例如,人)胃肠道炎性疾病的方法,所述方法包括对哺乳动物施用化合物1或其药学上可接受的盐,或包括药学上可接受的载体和化合物1或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0130] 其他疾病

[0131] 化合物1或其药学上可接受的盐也可用于治疗其他疾病,诸如其他炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症。

[0132] 化合物1或其药学上可接受的盐可用于治疗关节炎、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、移植排斥、干眼症、银屑病关节炎、糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病、运动神经元疾病、骨髓增生异常综合征、疼痛、少肌症、恶病质、脓毒性休克、全身性红斑狼疮、白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、强直性脊柱炎、骨髓纤维化、B细胞淋巴瘤、肝细胞癌、霍奇金病、乳腺癌、多发性骨髓瘤、黑素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢透明细胞癌、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、真性红细胞增多症、Sjogrens综合征、软组织肉瘤、肉瘤、脾肿大、T细胞淋巴瘤和重型地中海贫血中的一种或多种。

[0133] 联合疗法

[0134] 化合物1或其药学上可接受的盐可与通过相同机制或通过不同机制作用的一种或多种药剂联合使用以治疗疾病。不同的药剂可以按顺序或同时以单独的组合物或以相同的组合物施用。用于联合疗法的有用种类的药剂包含但不限于抗血管生成剂、类固醇、抗炎剂、血浆激肽释放酶抑制剂、胎盘生长因子配体抑制剂、VEGF-A配体抑制剂、血管生成素配体-2抑制剂、蛋白酪氨酸磷酸酶 β 抑制剂、Tek酪氨酸激酶受体刺激剂、神经钙调蛋白抑制剂、VEGF配体抑制剂、mTOR复合物1抑制剂、mTOR抑制剂、IL-17拮抗剂、钙调蛋白调节剂、FGF受体拮抗剂、PDGF受体拮抗剂、VEGF受体拮抗剂、TNF α 配体抑制剂、TNF结合剂、蛋白聚糖4刺激剂、VEGF-C配体抑制剂、VEGF-D配体抑制剂、CD126拮抗剂、补体级联抑制剂、糖皮质激素

激动剂、补体C5因子抑制剂、大麻素受体拮抗剂、鞘氨醇-1-磷酸受体-1调节剂、鞘氨醇-1-磷酸受体-3调节剂、鞘氨醇-1-磷酸受体-4调节剂、鞘氨醇-1-磷酸受体-5调节剂、乙醛脱氢酶抑制剂、Flt3酪氨酸激酶抑制剂、Kit酪氨酸激酶抑制剂、蛋白激酶C抑制剂、促肾上腺皮质激素配体、基质细胞衍生因子1配体抑制剂、免疫球蛋白G1激动剂；白细胞介素-1 β 配体抑制剂、粘蛋白刺激剂；核因子 κ B调节剂、细胞毒性T淋巴细胞蛋白-4刺激剂、T细胞表面糖蛋白CD28抑制剂、脂蛋白脂酶刺激剂；PPAR α 激动剂、腺苷A3受体激动剂、血管紧张素II受体拮抗剂、VEGF受体拮抗剂、干扰素 β 配体、SMAD-2调节剂；TGF β 1配体抑制剂、生长抑素受体激动剂、IL-2受体 α 亚单位抑制剂、VEGF-B配体抑制剂、胸腺素 β 4配体、血管紧张素II AT-1受体拮抗剂、CCR2趋化因子拮抗剂、膜铜胺氧化酶抑制剂、CD11a拮抗剂、ICAM-1抑制剂、胰岛素样生长因子1拮抗剂、激肽释放酶抑制剂、岩藻糖基转移酶6刺激剂、GDP岩藻糖合成酶调节剂、GHR基因抑制剂、IGF1基因抑制剂、VEGF-1受体拮抗剂、白蛋白激动剂、IL-2拮抗剂、CSF-1拮抗剂；PDGF受体拮抗剂、VEGF-2受体拮抗剂、mTOR抑制剂、PPAR α 激动剂、Rho GTP酶抑制剂、Rho相关蛋白激酶抑制剂、补体C3抑制剂、EGR-1转录因子抑制剂、核红系2相关因子调节剂、核因子 κ B抑制剂、整合素 α -V/ β -3拮抗剂、促红细胞生成素受体激动剂、胰高血糖素样肽1激动剂、TNFRSF1A基因刺激剂、血管生成素配体-2抑制剂、 α -2抗纤维蛋白溶酶抑制剂、胶原拮抗剂、纤连蛋白抑制剂、层粘连蛋白拮抗剂、血纤维蛋白溶酶刺激剂、神经生长因子配体、FGF1受体拮抗剂、FGF3受体拮抗剂、itk酪氨酸激酶抑制剂、Lck酪氨酸激酶抑制剂、Ltk酪氨酸激酶受体抑制剂、PDGF受体 α 拮抗剂、PDGF受体 β 拮抗剂、蛋白酪氨酸激酶抑制剂、VEGF-3受体拮抗剂、膜铜胺氧化酶抑制剂、生长抑素2受体激动剂、生长抑素4受体激动剂、生长抑素5受体激动剂、蛋白激酶C α 抑制剂、蛋白激酶C β 抑制剂、蛋白激酶C δ 抑制剂、蛋白激酶C ϵ 抑制剂、蛋白激酶C η 抑制剂、蛋白激酶C θ 抑制剂、锚蛋白调节剂、粘蛋白刺激剂、P2Y2嘌呤受体激动剂、缝隙连接 α -1蛋白抑制剂、CCR3趋化因子拮抗剂；嗜酸细胞活化趋化因子配体抑制剂、阿米洛利敏感钠通道抑制剂、PDGF受体拮抗剂、蛋白酪氨酸激酶抑制剂、视网膜色素上皮蛋白抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、PDGF受体拮抗剂、PDGF受体 β 拮抗剂、PDGF-B配体抑制剂、生长激素受体拮抗剂、细胞粘附分子抑制剂、整合素调节剂、CXCR4趋化因子拮抗剂、含蛋白卷曲结构域抑制剂、Hsp 90调节剂、Rho相关蛋白激酶抑制剂、VEGF基因抑制剂、内皮糖蛋白抑制剂、CCR3趋化因子拮抗剂、maxi K钾通道调节剂、maxi K钾通道刺激剂、PGF2 α 激动剂、前列腺素受体激动剂、电压门控性氯通道2调节剂、补体C5a受体拮抗剂、肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂、白介素18配体抑制剂、TRP阳离子通道M8刺激剂、CNTF受体激动剂、TRPV1基因抑制剂、脱氧核糖核酸酶I刺激剂、IRS1基因抑制剂、Rho相关蛋白激酶抑制剂、聚ADP核糖聚合酶1抑制剂、聚ADP核糖聚合酶2抑制剂、聚ADP核糖聚合酶3抑制剂、香草酸VR1激动剂、NFAT5基因刺激剂、粘蛋白刺激剂、Syk酪氨酸激酶抑制剂、 α 2肾上腺素受体激动剂、环氧合酶抑制剂、淀粉样蛋白沉积抑制剂、糖原合成激酶-3抑制剂、PARP刺激剂、 τ 沉积抑制剂、DDIT4基因抑制剂、血红蛋白合成调节剂、白介素-1 β 配体抑制剂、TNF拮抗剂、KCNQ电压门控钾通道刺激剂、NMDA受体拮抗剂、环氧合酶1抑制剂、环氧合酶抑制剂、5-HT1a受体激动剂、钙通道抑制剂、FGF-2配体调节剂、磷酸肌醇3-激酶抑制剂、CD44拮抗剂、透明质酸酶调节剂、透明质酸激动剂、IL-1拮抗剂、I型IL-1受体拮抗剂、补体因子P抑制剂、微管蛋白拮抗剂、 β 淀粉样蛋白拮抗剂、IL2基因刺激剂、I- κ B激酶 β 抑制剂、核因子 κ B调节剂、纤溶酶原激活物抑制剂1抑制剂、FGF-2配体、蛋白酶调节剂和促肾上腺皮质激素调节剂。

[0135] 可与化合物1结合使用的具体药剂包含但不限于拉那芦人单抗、阿柏西普、RG-7716、AKB-9778、环孢素、贝伐单抗、依维莫司、苏金单抗、氟轻松、RP-101、角鲨胺乳酸盐、重组人润滑素、OPT-302、夏瑞鲁单抗、地塞米松、依库丽单抗、芬戈莫德、阿达木单抗、雷莎单抗、米喹妥林、促肾上腺皮质激素、培戈-奥拉替塞、康纳单抗、核黄素、阿巴西普、非诺贝特、匹利诺生、OpRegen、坎地沙坦、戈利木单抗、哌加他尼、干扰素- β 、地司特泰、醋酸奥曲肽、阿奈可他、巴西利昔单抗、脉络膜上腔曲安奈德、RGN-259、二氟泼尼酯、HL-036、培戈-阿伐普他钠、厄贝沙坦、丙帕锗、曲安奈德、阿奇霉素、BI-1467335、立他司特、依碳氯替泼诺、替普妥单抗、KVD-001、TZ-101、阿特西多森、Nov-03、贝伐单抗、AVA-101、RU-101、凡可斯伯灵、伏罗尼布、西罗莫司、胆碱非诺贝特、VX-210、APL-2、CPC-551、依拉普肽、SF-0166、西滨泰德、依拉普肽、利拉鲁肽、EYS-606、尼伐单抗、阿柏西普、奥克纤溶酶、菲格替尼、塞内格林、阿迪坡塞、溴利珠单抗、兰尼单抗、阿柏西普、帕德利波芬光动力疗法、帕唑帕尼、ASP-8232、维多瑞肽、索曲安林、培化阿比西巴、地夸磷索四钠、HCB-1019、康柏西普、柏替木单抗、SHP-659、THR-317、ALK-001、PAN-90806、干扰素 α -2b、氟轻松、苹果酸舒尼替尼、依舒司他、hI-con1、TB-403、二甲胺四环素、MA09-hRPE细胞、派勒兰尼钠、培维索孟、路米内特、布利沙福、H-1129、卡罗图西单抗、AXP-1275、兰尼单抗、异丙基乌诺前列酮、特斯多鲁单抗、肠溶包衣酚酸钠、塔德基宁 α 、曲安奈德、环孢霉素、ST-266、AVX-012、NT-501-ECT、替维西兰、维替泊芬、链道酶 α 、阿加尼生、利舒地尔、瑞卡帕布磷酸盐、珠卡赛辛、四硫钼酸盐、双氯芬酸、LHA-510、AGN-195263、他克莫司、瑞巴匹特、R-348、酒石酸溴莫尼定、维作米厅、T-89、LME-636、BI-1026706、利美索龙、妥布霉素、TOP-1630、他拉泊芬、溴芬酸钠、曲安奈德、达奈肽、依碳氯替泼诺、XED-60、EG-Mirotin、APD-209、腺病毒、PF-04523655、羟基尿素、那瓦朋特、雷替那明、CNTO-2476、兰尼单抗、氟吡汀、B27PD、S-646240、GLY-230、胍苯吡嗪、奈帕芬胺、DexNP、海藻糖、透明质酸、地塞米松-Ca持续释放储存物、那鲁佐坦、透明质酸酶、透明质酸钠、伊苏那金、生长激素抑制素、CLG-561、OC-10X、UCA-002、重组人表皮生长因子、哌罗来斯、VM-100、MB-11316、单钠 α 流明诺、兰尼单抗IMD-1041、LMG-324、HE-10、透明质酸钠、BDM-E、间质前体细胞、戒酒硫、CTC-96、PG-101、贝复舒、糜蛋白酶。

[0136] 本文还提供包括化合物1或其药学上可接受的盐以及一种或多种其他治疗剂的药物组合物。治疗剂可选自上文指定的药剂类别和上文描述的特定药剂列表。在一些实施例中，药物组合物适于眼部递送。在一些实施例中，药物组合物是液体或悬浮液组合物。

[0137] 此外，在方法方面，本发明提供一种治疗哺乳动物的疾病或障碍的方法，所述方法包括对哺乳动物施用化合物1或其药学上可接受的盐以及一种或多种其他治疗剂。

[0138] 当用于联合疗法时，所述药剂可配制成单一药物组合物，或者所述药剂可提供在同时或在不同时间通过相同或不同施用途径施用的单独组合物中。这类组合物可以单独包装，或者可以一起包装作为试剂盒。试剂盒中的两种或更多种治疗剂可以通过相同的施用途径或通过不同的施用途径施用。

[0139] 实例

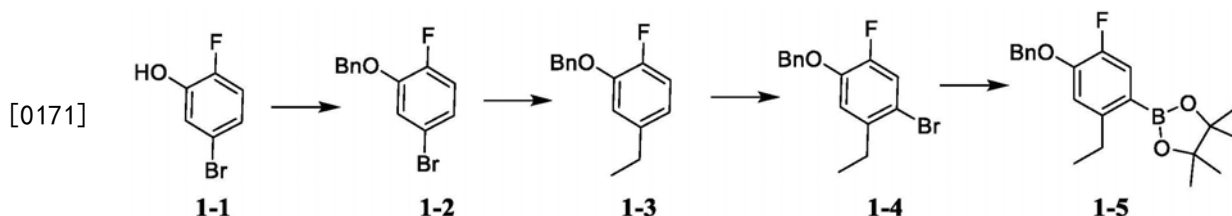
[0140] 提供以下合成和生物实例以说明本发明，并且不以任何方式解释为限制本发明的范围。在以下实例中，除非另有说明，否则以下缩写具有以下含义。下文未定义的缩写具有其普遍接受的含义。

[0141] ACN=乙腈

- [0142] Boc=叔丁氧羰基
- [0143] DCC=二环己基碳二亚胺
- [0144] DIPEA=N,N-二异丙基乙胺
- [0145] DMAc=二甲基乙酰胺
- [0146] DMF=N,N-二甲基甲酰胺
- [0147] DMSO=二甲基亚砷
- [0148] EtOAc=乙酸乙酯
- [0149] HATU=N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)六氟磷酸脒
- [0150] LDA=二异丙基酰胺锂
- [0151] min=分钟
- [0152] MTBE=甲基叔丁基醚
- [0153] NBS=N-溴代琥珀酰亚胺
- [0154] NMP=N-甲基-2-吡咯烷酮
- [0155] RT=室温
- [0156] THF=四氢呋喃
- [0157] 双(频哪醇合)二硼=4,4,5,5,4',4',5',5'-八甲基-[2,2']二[[1,3,2]二氧杂环戊硼烷基]
- [0158] Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂=二氯(1,1'-双(二苯基膦基)-二茂铁)-二钯(II)与二氯甲烷的络合物。
- [0159] 试剂和溶剂购自商业供应商(奥德里奇(Aldrich)、弗卢卡(Fluka)、西格玛(Sigma)等),并且无需进一步纯化即可使用。通过薄层色谱法(TLC)、分析型高效液相色谱法(ana1.HPLC)和质谱法监测反应混合物的进展。按照每个反应中的具体描述处理反应混合物;通常,它们通过提取和其他纯化方法诸如依赖于温度和溶剂的结晶和沉淀来纯化。此外,通常通过柱色谱或制备型HPLC(通常使用C18或BDS柱填料和常规洗脱液)纯化反应混合物。典型的制备型HPLC条件如下所述。
- [0160] 反应产物的表征通常通过质量和¹H-NMR光谱法进行。对于NMR分析,将样本溶解在氘代溶剂(诸如CD₃OD、CDCl₃或d₆-DMSO)中,并且使用瓦里安双子2000仪器(400MHz)在标准观察条件下采集¹H-NMR光谱。化合物的质谱确定通过使用与自动纯化系统耦合的应用生物系统(加利福尼亚州福斯特城(Foster City,CA))型号API 150EX仪器或沃特世(Waters)(马萨诸塞州米尔福德(Milford,MA))3100仪器的电喷雾电离法(ESMS)进行。
- [0161] 制备型HPLC条件
- [0162] 柱: C18,5μm,21.2x 150mm或C18,5μm 21x 250或C14,5μm 21x150 mm
- [0163] 柱温度: 室温
- [0164] 流速: 20.0mL/min
- [0165] 流动相: A=水+0.05%TFA
- [0166] B=ACN+0.05%TFA,
- [0167] 注射体积: (100-1500μL)
- [0168] 检测器波长: 214nm。
- [0169] 将粗化合物溶解在约50mg/mL的1:1水:乙酸中。使用2.1x 50mm C18柱进行4分钟

的分析规模测试运行,随后使用100 μ L注射液进行15或20分钟的制备规模运行,梯度基于分析规模测试运行的%B保留率。精确梯度取决于样本。使用21x 250mm C18柱和/或21x 150mm C14柱检查杂质含量接近的样本,以获得最佳分离。通过质谱分析确定含有所需产物的级分。

[0170] 制备1:2-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷(1-5)



[0172] (a) 2-(苄氧基)-4-溴-1-氟苯(1-2)

[0173] 两个反应并行进行,并结合起来进行后处理。将5-溴-2-氟苯酚(1-1)(850g, 4.5mol)、苄基溴(837g, 4.9mol)和碳酸钾(923g, 6.7mol)在ACN(5L)中的混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌12h。将反应产物合并并且浓缩,用水(8L)稀释,并用EtOAc(3x 3L)萃取。分离有机层,用盐水(3L)洗涤,用硫酸钠干燥并浓缩。通过硅胶垫纯化(用3:1石油醚:EtOAc洗脱)粗产物,得到白色固体形式的标题中间体(1.83kg, 73%产率)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.46(m, 5H), 7.15(dd, $J=7.6, 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.98-7.15(m, 1H), 5.12(s, 2H)。

[0174] (b) 2-(苄氧基)-4-乙基-1-氟苯(1-3)

[0175] 六个反应并行进行,并结合起来进行后处理。向上一步骤的产物(200g, 711mmol)在THF(100mL)中的溶液中加入碳酸钾(197g, 1.4mol)。用氮气吹扫反应混合物3次,然后加入Pd(dppf) $\text{Cl}_2\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (11.6g, 14.2mmol)。将反应混合物冷却至0 $^{\circ}$ C,滴加二乙基锌(1M, 1.07L),并且将反应混合物在70 $^{\circ}$ C下搅拌1h。将反应产物合并,冷却至20 $^{\circ}$ C,并缓慢倒入水(7L)中。向混合物中加入水性4M HCl至pH 6。分离有机层,并且用EtOAc(3x 2L)萃取水相。用盐水(5L)洗涤合并的有机层,用硫酸钠干燥,浓缩,并且通过硅胶垫纯化(用50:1石油醚:EtOAc洗脱),得到浅黄色油状物形式的标题中间体(900g, 92%产率)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.29-7.43(m, 5H), 6.94-6.97(m, 1H), 6.82(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 6.70(m, 1H), 5.09(s, 2H), 2.52-2.58(m, 2H), 1.17(t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H)。

[0176] (c) 1-(苄氧基)-4-溴-5-乙基-2-氟苯(1-4)

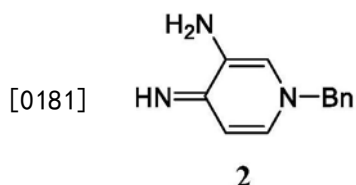
[0177] 四个反应并行进行,并进行结合。在20 $^{\circ}$ C下向2-(苄氧基)-4-乙基-1-氟苯(1-3)(293g, 1.3mol)在ACN(1L)中的溶液中分份加入NBS(249g, 1.4mol)。将反应混合物在20 $^{\circ}$ C下搅拌2h。将反应混合物合并并且浓缩。用水(5L)稀释残留物,并且用EtOAc(2x 5L)萃取。用盐水(4L)洗涤有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化(用石油醚:EtOAc 100:1-10:1洗脱)粗产物,得到浅黄色油状物形式的标题中间体(1.4kg, 89%产率)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.29-7.38(m, 5H), 7.2(d, $J=10.4\text{Hz}$, 1H), 6.8(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 5.06(s, 2H), 2.6(q, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.1(t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H)。

[0178] (d) 2-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷(1-5)

[0179] 七个反应并行进行,并结合起来进行后处理。在20 $^{\circ}$ C下在氮气下向上一步骤的产

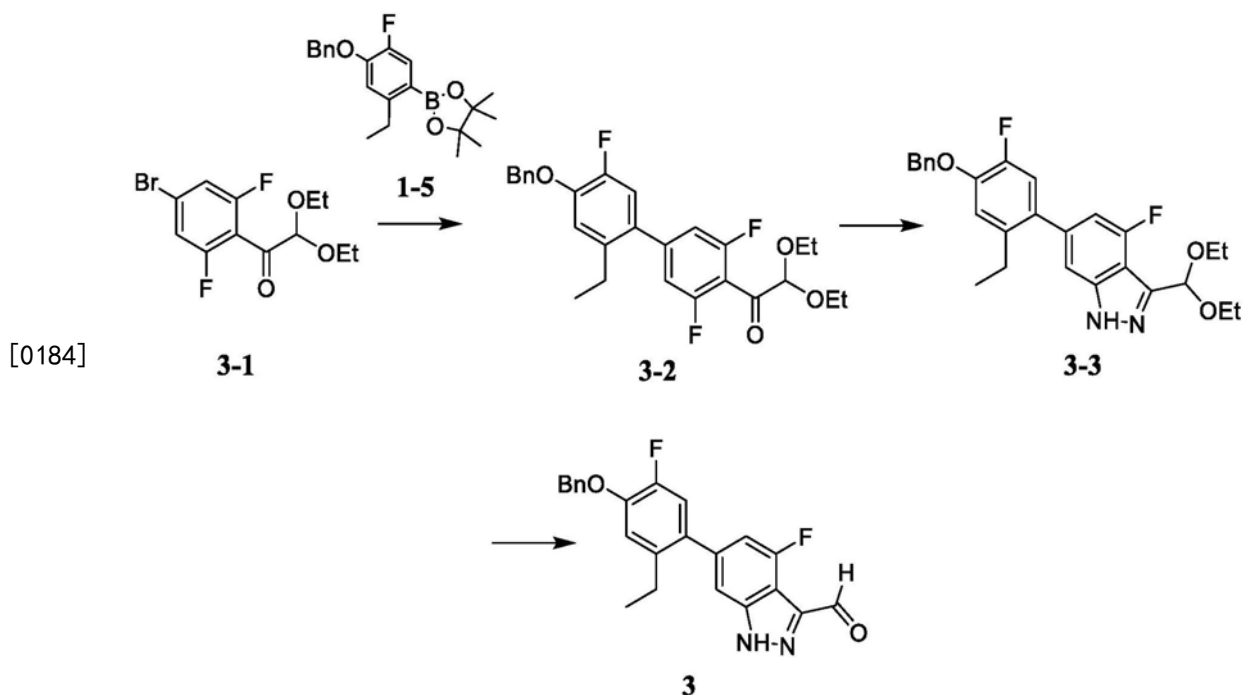
物(200g, 647mmol) 在二噁烷(2L) 中的溶液中加入乙酸钾(190g, 1.9mol)、双(频哪醇合)二硼(181g, 712mmol) 和Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂(10.6g, 12.9mmol)。将混合物在120℃下搅拌2h。将反应混合物合并, 浓缩, 用水(5L) 稀释, 并用EtOAc(3x 4L) 萃取。用无水硫酸钠干燥合并的有机相, 过滤并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化(用石油醚:EtOAc1:0-5:1洗脱) 粗产物, 得到白色固体形式的标题化合物(1.35kg, 84%产率)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ7.33-7.51(m, 6H), 6.82(d, J=7.6Hz, 1H), 5.17(s, 2H), 2.85(q, J=7.6Hz, 2H), 1.33(s, 12H), 1.15(t, J=7.6Hz, 3H)。

[0180] 制备2:1-苄基-4-亚氨基-1,4-二氢吡啶-3-胺(2)



[0182] 在0℃下向吡啶-3,4-二胺(400g, 3.67mol) 在ACN(3L) 中的溶液中分份加入苄基溴(596g, 3.49mol), 并且将反应混合物搅拌30min, 然后在20℃下搅拌12h, 并过滤。用ACN(500mL) 洗涤滤饼并干燥, 得到白色粉末形式的标题化合物的HBr盐(600g, 2.14mol, 58%产率)。¹H NMR(400MHz, MeOD) δ7.83(d, J=5.6Hz, 1H), 7.64(s, 1H), 7.32-7.40(m, 5H), 6.76(d, J=6.8Hz, 1H), 5.28(s, 2H)。

[0183] 制备3:6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4-氟-1H-吡唑-3-甲醛(3)



[0185] (a) 1-(4-溴-2,6-二氟苯基)-2,2-二乙氧基乙-1-酮(3-1)

[0186] 九个反应并行进行, 并合并进行处理。将1-溴-3,5-二氟苯(100g, 518mmol) 在THF(700mL) 中的溶液脱气并用氮气吹扫三次。然后在-70℃下加入2M LDA(311mL), 并且将反应混合物在氮气下在-70℃下搅拌0.5h。在-70℃下在氮气下逐滴添加2,2-二乙氧基乙酸乙酯(96g, 544mmol) 在THF(200mL) 中的溶液, 并且将反应混合物搅拌1h。将反应物合并, 并且分批倒入冰饱和氯化铵(10L) 中, 并用EtOAc(3x 3L) 萃取。分离有机层, 用盐水(5L) 洗涤, 用硫

酸钠干燥,浓缩,并用硅胶色谱法纯化(用石油醚:EtOAc1:0-100:1洗脱),得到呈黄色油状物的标题化合物(1.26kg,84%产率)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.12(d,J=7.2Hz,2H),5.15(s,1H),3.61-3.7(m,4H),1.2(t,J=7.2Hz,6H)。

[0187] (b) 1-(4'-(苄氧基)-2'-乙基-3,5,5'-三氟-[1,1'-联苯]-4-基)-2,2-二乙氧基乙-1-酮(3-2)

[0188] 五个反应并行进行,并合并进行处理。在20℃下向1-(4-溴-2,6-二氟苯基)-2,2-二乙氧基乙-1-酮(3-1)(189g,586mmol)在乙醇(150mL)和甲苯(1.5L)中的混合物中加入水(150mL)、碳酸钠(84.8g,800mmol)和2-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧化杂环戊硼烷(1-5)(190g,533mmol)。将悬浮液在真空下脱气,并且用氮气吹扫数次。加入Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂(13g,16mmol),并且用氮气吹扫反应混合物数次,并在120℃下搅拌2h。将反应物合并,冷却至20℃,倒入水(5L)中,并用EtOAc(3x 4L)萃取。用盐水(5L)洗涤合并的有机层,用硫酸钠干燥,过滤,浓缩,并通过硅胶色谱纯化(用石油醚:EtOAc 100:1-5:1洗脱),得到呈黄色油状物的标题中间体(880g,70%产率)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.36-7.48(m,5H),6.94-6.96(m,2H),6.86-6.92(m,2H),5.29(s,1H),5.19(s,2H),3.67-3.77(m,4H),2.52(q,J=7.6Hz,2H),1.25(t,J=6.8Hz,6H),1.07(t,J=7.2Hz,3H)。

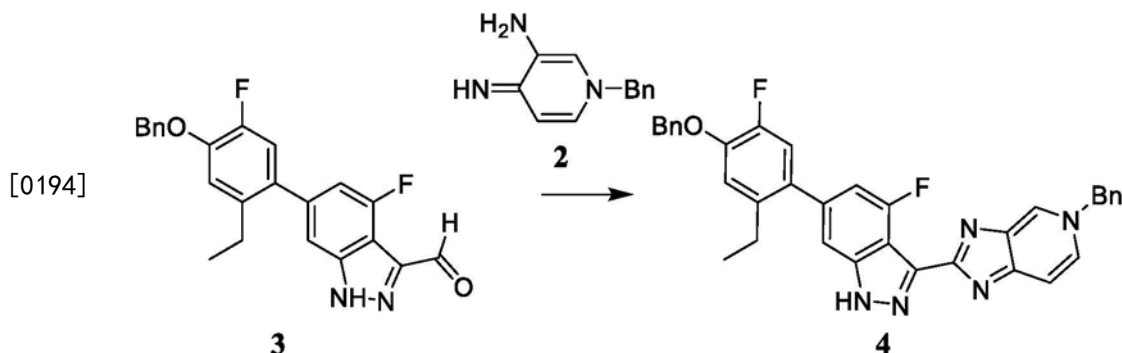
[0189] (c) 6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-3-(二乙氧基甲基)-4-氟-1H-吡啶(3-3)

[0190] 四个反应并行进行,并合并进行处理。在20℃下向上一步骤的产物(220g,466mmol)在THF(2L)中的溶液中加入一水合肼(47.6g,931mmol)。将反应混合物在100℃下搅拌12h。将四个反应物合并,并冷却至20℃并浓缩。将残留物溶解在EtOAc(5L)中,并用0.1M HCl(2x 1.5L)洗涤。用盐水(1.5L)洗涤合并的有机层,用硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到呈黄色胶状物的标题中间体(900g,粗制物),其直接用于下一步骤。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.36-7.48(m,5H),6.94-6.96(m,2H),6.86-6.92(m,2H),5.29(s,1H),5.19(s,2H),3.67-3.77(m,4H),2.52(q,J=7.6Hz,2H),1.25(t,J=6.8Hz,6H),1.07(t,J=7.2Hz,3H)。

[0191] (d) 6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4-氟-1H-吡啶-3-甲醛(3)

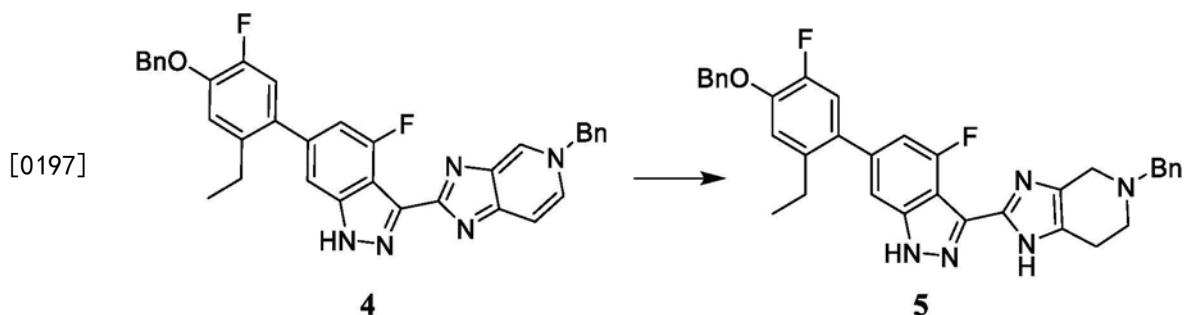
[0192] 三个反应并行进行,并结合起来进行后处理。在20℃下向上一步骤的产物(300g,643mmol)在丙酮(1.5L)中的溶液中滴加4M HCl(16mL),并且将反应混合物在20℃下搅拌0.17h。合并反应产物,浓缩,用MTBE(1L)稀释,并过滤。用MTBE(2x 300mL)洗涤滤饼,并在减压下干燥,得到黄色固体形式的标题中间体(705g,粗),其直接用于下一步。(m/z):针对C₂₃H₁₈F₂N₂O₂计算得到的[M+H]⁺393.13,实验值393.1。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ14.51(s,1H),10.17(d,J=3.6Hz,1H),7.50(d,J=7.2Hz,2H),7.40-7.42(m,4H),7.24(d,J=8.4Hz,1H),7.15(d,J=12.4Hz,1H),7.06(d,J=8.4Hz,1H),5.25(s,2H),2.52-2.53(m,2H),1.03(t,J=7.6Hz,3H)。

[0193] 制备4:5-苄基-2-(6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4-氟-1H-吡啶-3-基)-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶(4)



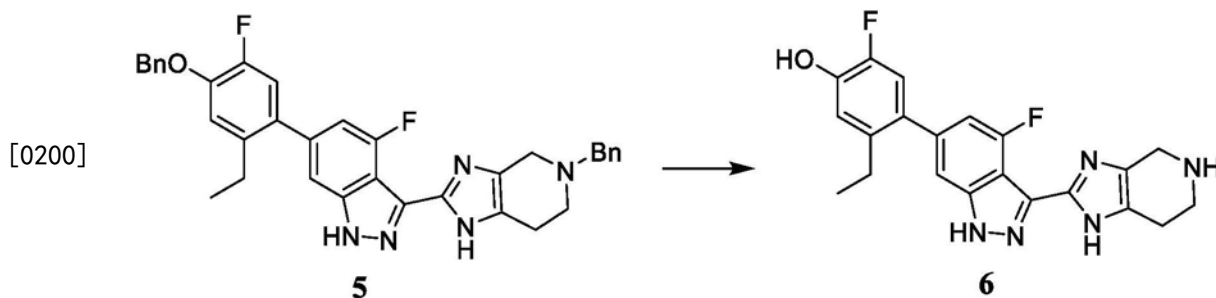
[0195] 四个反应并行进行,并结合起来进行后处理。在20℃下向6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4-氟-1H-咪唑-3-甲醛(3),制备3的产物(172g,440mmol)在DMF(1.1L)中的溶液中加入亚硫酸氢钠(68.6g,659mmol)和1-苄基-4-氨基-1,4-二氢吡啶-3-胺(2)(136g,484mmol),并且在150℃下将反应混合物搅拌2h。将四个反应产物合并,并且将反应混合物在减压下浓缩。将残留物倒入水(10L)中并过滤。在减压下干燥滤饼,得到黄色固体形式的标题中间体(990g,粗),其不经纯化直接使用。(m/z):针对 $C_{35}H_{27}F_2N_5O$ 计算得到的 $[M+H]^+$ 572.2,实验值572.3。

[0196] 制备5:5-苄基-2-(6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4-氟-1H-咪唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶(5)



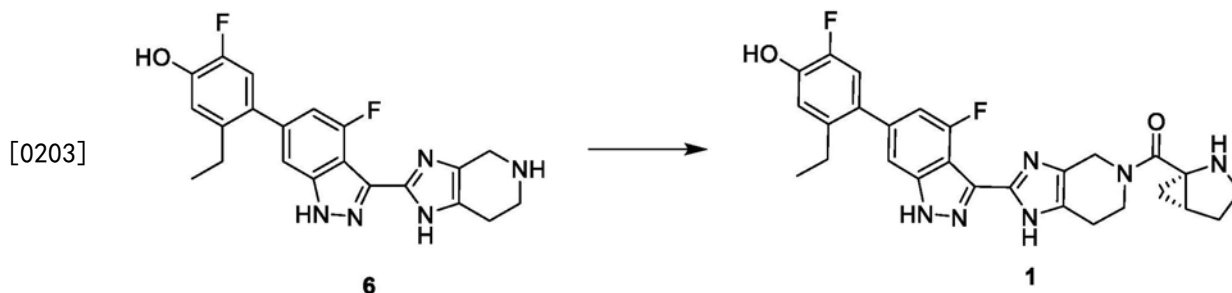
[0198] 三个反应并行进行,并结合起来进行后处理。在20℃下向5-苄基-2-(6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4-氟-1H-咪唑-3-基)-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶(4),制备4的产物(330g,577mmol)在甲醇(1.5L)和THF(1L)中的混合物中分份加入硼氢化钠(267g,6.9mol),并且将反应混合物在20℃下搅拌24h。将三个反应产物合并,并且将反应混合物加入水(10L)中,搅拌10min,并过滤。用EtOAc(2x 5L)萃取滤液,并且将合并的有机相用无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。用EtOAc(2L)稀释粗产物,搅拌30min,并过滤。用MTBE(3x 200mL)洗涤滤饼,得到浅黄色固体形式的标题中间体(275g,28%产率)。(m/z):针对 $C_{35}H_{31}F_2N_5O$ 计算得到的 $[M+H]^+$ 576.25,实验值576.3。 1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 7.50-7.52(m,2H),7.35-7.43(m,7H),7.23-7.25(m,3H),7.15(d,J=12.0Hz,1H),6.81(d,J=12.0Hz,1H),5.25(s,2H),3.72(s,2H),3.43(br.s,2H),2.78(br.s,2H),2.66(br.s,2H),2.55(q,2H),1.04(t,J=7.6Hz,3H)。

[0199] 制备6:5-乙基-2-氟-4-(4-氟-3-(4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基)-1H-咪唑-6-基)苯酚(6)



[0201] 五个反应并行进行,并结合起来进行后处理。向5-苄基-2-(6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4-氟-1H-咪唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶(5),制备5的产物(55g,95.5mmol)在THF(500mL)和甲醇(500mL)中的混合物中加入碳负载钯(15g,9.6mmol)和水性12M HCl(10mL)。将悬浮液在真空下脱气,用氢气吹扫数次,并在氢气(50psi)下在50℃下搅拌12h。将反应产物合并,并且过滤反应混合物。真空浓缩滤液,得到灰白色固体形式的标题中间体的HCl盐(150g,粗)。(m/z):针对 $C_{21}H_{19}F_2N_5O$ 计算得到的[M+H]⁺396.16,实验值396.2。¹H NMR(400MHz,MeOD) δ7.43(s,1H),7.07(d,J=11.6Hz,1H),6.97(d,J=11.6Hz,1H),6.91(d,J=8.8Hz,1H),4.57(s,2H),3.74(s,2H),3.24(s,2H),2.55(q,J=7.6Hz,2H),1.08(t,J=7.6Hz,3H)。

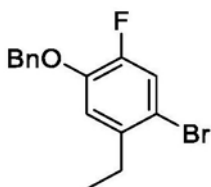
[0202] 实例1:(1S,5R)-2-氮杂双环[3.1.0]己-1-基(2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟基苯基)-4-氟-1H-咪唑-3-基)-6,7-二氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5(4H)-基)甲酮(1)



[0204] 向5-乙基-2-氟-4-(4-氟-3-(4,5,6,7-四氢-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基)-1H-咪唑-6-基)苯酚(21.4mg,0.054mmol)(6)和(1s,5r)-2-(叔丁氧基羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-1-羧酸(24.6mg,0.108mmol)在DMF(0.5ml)中的混合物中加入HATU(45.3mg,0.119mmol)和DIPEA(0.076ml,0.433mmol),并且将所得溶液在室温下搅拌16小时。向反应混合物中加入MeOH(2.00ml)和水(0.500ml),然后加入氢氧化锂(7.78mg,0.325mmol),并且将溶液在65℃下搅拌1小时。然后浓缩溶液,并且向残留物中加入TFA(0.500ml)。将所得溶液在室温下搅拌30分钟,然后浓缩。然后通过制备型HPLC(5-65%乙腈,水梯度为0.1%TFA,Zorbax Bonus-RP柱)纯化粗产物,得到标题化合物的TFA盐(19.4mg,57%产率)。(m/z):针对 $C_{27}H_{26}F_2N_6O_2$ 计算得到的[M+H]⁺505.18,实验值505.2。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ13.62(s,1H),12.44(s,1H),9.92(s,1H),7.21(s,1H),7.03(d,J=11.9Hz,1H),6.90(d,J=9.1Hz,1H),6.82(d,J=11.3Hz,1H),4.59(m,2H),3.96(m,1H),3.79(m,1H),3.27(m,1H),2.89(m,1H),2.72(m,2H),2.47(q,J=7.5Hz,2H),2.06(m,2H),1.92(m,1H),1.30(m,2H),1.00(t,J=7.5,3H)。

[0205] 制备7:1-(苄氧基)-4-溴-5-乙基-2-氟苯

[0206]



[0207] (a) 5-乙基-2-氟苯酚

[0208] 将化合物5-溴-2-氟苯酚 (80g, 419mmol) 在干燥四氢呋喃 (800mL) 中的混合物脱气并用氮气吹扫三次, 并加入 $\text{Pd}(t\text{-Bu}_3\text{P})_2$ (4.28g, 8.38mmol)。在 25°C 下向混合物中滴加二乙基锌 (114g, 921mmol), 并且将反应混合物在氮气下在 50°C 下搅拌 12h, 并缓慢倒入冰水 (1L) 中。加入 EtOAc (350mL), 并且将反应混合物搅拌 20min 并过滤。用 EtOAc (3x 500mL) 洗涤滤饼。用盐水 (600mL) 洗涤合并的有机层, 用硫酸钠干燥, 浓缩, 并通过硅胶色谱法纯化, 得到黄色油状物形式的标题中间体 (85g, 粗)。

[0209] (b) 2-(苄氧基)-4-乙基-1-氟苯

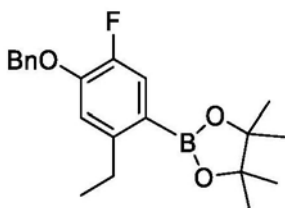
[0210] 向上一步骤的产物 (85g, 606mmol) 在 ACN (850mL) 中的溶液中加入苄基溴 (124g, 728mmol) 和 K_2CO_3 (126g, 909mmol)。将反应混合物在 25°C 下搅拌 12h, 倒入水 (1L) 中, 并用 EtOAc (4x 500mL) 萃取。用盐水 (600mL) 洗涤合并的有机层, 用硫酸钠干燥, 浓缩, 并通过硅胶色谱法纯化, 得到黄色油状物形式的标题中间体 (100g)。

[0211] (c) 1-(苄氧基)-4-溴-5-乙基-2-氟苯

[0212] 向上一步骤的产物 (100g, 434mmol) 在 ACN (1.0L) 中的溶液中逐份加入 N-溴代琥珀酰亚胺 (85g, 477mmol)。将反应混合物在 25°C 下搅拌 5h, 倒入水 (1.3L) 中, 并用 EtOAc (3x 500mL) 萃取。用盐水 (800mL) 洗涤合并的有机层, 用硫酸钠干燥, 浓缩, 并通过硅胶色谱法纯化, 得到黄色油状物形式的标题化合物 (83g)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm) 7.27-7.43 (m, 6H), 6.86 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 5.10 (s, 2H), 2.64 (q, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.15 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 1H)。

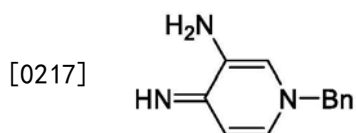
[0213] 制备 8:2-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷

[0214]



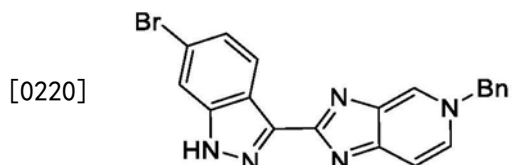
[0215] 将制备 7 的化合物 (83g, 268mmol)、双(频哪醇合)二硼 (102g, 402mmol) 和 KOAc (79.0g, 805mmol) 在二噁烷 (830mL) 中的混合物脱气, 并用氮气吹扫 3 次, 并加入 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (3.93g, 5.37mmol)。将反应混合物在氮气下在 120°C 下搅拌 4h。将混合物冷却至 25°C , 倒入水 (1L) 中, 并用 EtOAc (3x 500mL) 萃取。用盐水 (800mL) 洗涤合并的有机层, 用硫酸钠干燥, 并通过硅胶色谱法纯化。将产物用甲醇 (200mL) 洗涤, 过滤, 并且干燥滤饼, 得到白色固体形式的标题化合物 (65g)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm) 7.26-7.42 (m, 5H), 6.74 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 5.08 (s, 2H), 2.76 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.25 (s, 12H), 1.06 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H)。

[0216] 制备 9:1-苄基-4-亚氨基-1,4-二氢吡啶-3-胺



[0218] 向吡啶-3,4-二胺(200g,1.8mol)在ACN(17.0L)中的溶液中加入苄基溴(306g,1.79mol),并且将反应混合物在15℃下搅拌12h,过滤,在真空下干燥滤饼,得到白色固体形式的标题化合物(250g)。¹H NMR(d₆-DMSO,400MHz)δ(ppm)8.02(dd,J=7.2,1.6Hz,1H),7.66(s,1H),7.34-7.41(m,5H),6.79(d,J=6.8Hz,1H),5.62(s,2H),5.36(s,2H)。

[0219] 制备10:5-苄基-2-(6-溴-1H-吡啶-3-基)-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶



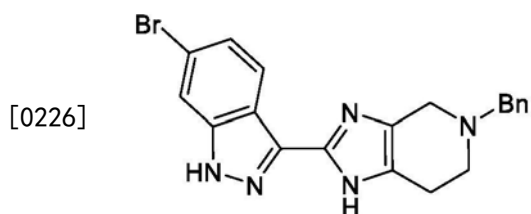
[0221] (a) 6-溴-1H-吡啶-3-基-甲醛

[0222] 在10℃下,将NaNO₂(704g,10.2mol)在水(1L)中的溶液滴加到6-溴-1H-吡啶(400g,2.0mol)在丙酮(7L)中的溶液中。将反应混合物在10℃下搅拌30min,在剧烈搅拌下缓慢加入水性3M HCl(437mL),使内部温度保持在10℃至25℃之间。将溶液在20℃下搅拌3h,并在保持温度低于35℃的同时浓缩。通过过滤收集固体。用1:2石油醚:MTBE(800mL)洗涤滤饼。通过过滤收集固体,并真空干燥,得到黑褐色固体形式的标题中间体(450g)。¹H NMR(CH₃OD,400MHz)δ(ppm)7.77(d,J=8.8Hz,1H),7.69(s,1H),7.22(dd,J=8.4,2.4Hz,1H),5.70(s,1H)。

[0223] (b) 5-苄基-2-(6-溴-1H-吡啶-3-基)-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶

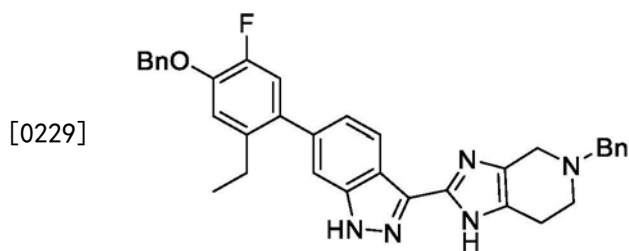
[0224] 向6-溴-1H-吡啶-3-基-甲醛(150.0g,666mmol)和1-苄基-4-亚氨基-1,4-二氢吡啶-3-胺(127.5g,639.9mmol)在DMF(750mL)中的搅拌溶液中加入NaHSO₃(83.2g,799.9mmol),并且将反应混合物在140℃下搅拌6h并倒入水(3.5L)中。过滤沉淀物,并用水(1L)洗涤,得到黑褐色固体形式的标题化合物(180g)。¹H NMR(d₆-DMSO,400MHz)δ(ppm)8.69(s,1H)8.71(d,J=7.2Hz,1H)8.37(d,J=8.4Hz,1H)8.07(d,J=6.4Hz,1H)7.97(s,1H)7.38-7.43(m,3H)7.50-7.54(m,4H)5.87(s,2H)。

[0225] 制备11:5-苄基-2-(6-溴-1H-吡啶-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶



[0227] 向5-苄基-2-(6-溴-1H-吡啶-3-基)-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶(23.0g,56.9mmol)在MeOH(200mL)和THF(1L)中的溶液中逐份加入NaBH₄(12.9g,341.3mmol),并且将反应混合物在50℃下搅拌2h。加入乙酸(10当量),将溶液浓缩至干,并用硅胶色谱法(30g硅胶,含有0.1%TEA的0-10%MeOH/DCM)纯化,得到标题化合物(6.0g)。¹H NMR(d₆-DMSO,400MHz)δ(ppm)8.24(d,J=8.0Hz,1H),7.77(s,1H),7.28-7.37(m,7H),3.74(s,2H),3.48(br.s,2H),2.80(s,2H),2.66(s,2H)。

[0228] 制备12:5-苄基-2-(6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶



[0230] (a) 5-苄基-2-(6-溴-1-(叔丁氧羰基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-羧酸叔丁酯

[0231] 两个反应并行进行。将5-苄基-2-(6-溴-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶 (80g, 196mmol)、二碳酸二叔丁酯 (128g, 587.8mmol, 135mL) 和TEA (79.3g, 784mmol, 109mL) 在DCM (1L) 中的悬浮液在20℃下搅拌12h。将两种反应悬浮液合并, 浓缩至干, 并通过硅胶色谱法 (石油醚:EtOAc 10:1-0:1) 纯化, 得到标题中间体 (170.0g)。

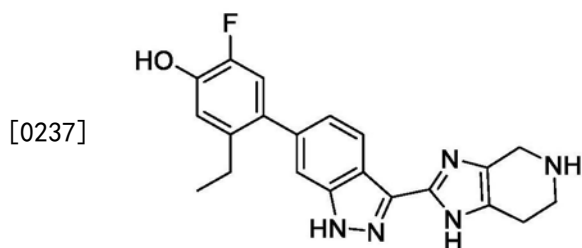
[0232] (b) 5-苄基-2-(6-溴-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶

[0233] 两个反应并行进行。将上一步骤的产物 (85g, 140mmol) 和4M HCl在MeOH (400mL) 和DCM (400mL) 中的溶液在25℃下搅拌12h。将反应混合物合并并且浓缩至干, 在搅拌下加入DCM (250mL), 并且将反应混合物搅拌30min并过滤。用DCM (2x 20mL) 洗涤滤饼并干燥, 得到灰白色固体形式的标题化合物 (85g)。

[0234] (c) 5-苄基-2-(6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶

[0235] 八十五个反应并行进行。将上一步骤的产物 (1.0g, 2.5mmol)、2-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (873mg, 2.5mmol) 和Pd(PPh₃)₄ (227mg, 196.μmol) 溶解在水 (4mL) 和二噁烷 (10mL) 的混合物中。用氮气将反应瓶鼓泡2min, 并且在氮气下快速加入Na₂CO₃ (779mg, 7.4mmol)。将反应混合物在130℃下加热1.5h。将85种反应混合物合并并且在减压下浓缩。将残留物溶解在DCM (500mL) 中, 并且通过硅胶色谱法 (150g硅胶, 用DCM:THF (6:1至3:1) 洗脱) 纯化, 得到灰白色固体形式的标题化合物 (50g)。

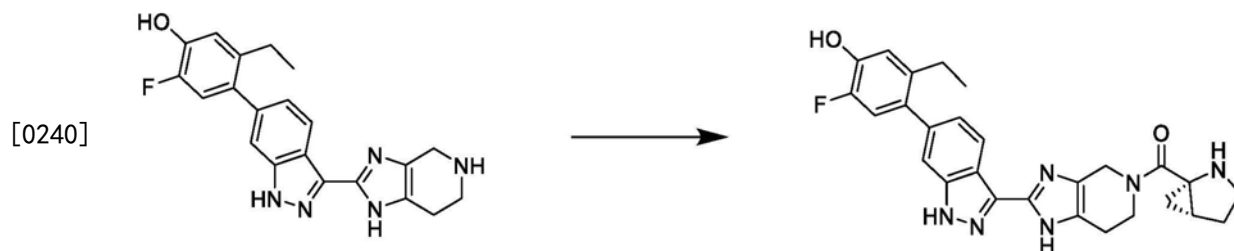
[0236] 制备13:5-乙基-2-氟-4-(3-(4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基)-1H-吡唑-6-基) 苯酚



[0238] 将5-苄基-2-(6-(4-(苄氧基)-2-乙基-5-氟苯基)-1H-吡唑-3-基)-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶 (44.5g, 79.8mmol)、Pd(OH)₂/C (25g, 2.7mmol, 50%纯度) 和TFA (44.5g, 390mmol, 28.9mL) 在MeOH (500mL) 中的混合物在氢气 (50Psi) 下搅拌4h并过滤。向滤液中加入Pd(OH)₂/C (25g, 2.7mmol, 50%纯度), 并且将所得悬浮液在25℃下在氢气 (50Psi) 下搅拌12h。将悬浮液与之前反应得到的悬浮液在5.5g规模下合并并过滤。用20:1MeOH:TFA

(2x 200mL) 洗涤滤饼。浓缩合并的滤液, 并且在搅拌下向残留物中加入在 MeOH (200mL) 中的 4M HCl。将所得悬浮液浓缩, 用 MeOH (80mL) 制成浆状, 并搅拌 30min。沉淀出一种白色固体。过滤固体, 用 MeOH (2x 10mL) 洗涤滤饼, 并真空干燥, 得到灰白色固体形式的标题化合物的 HCl 盐 (24.8g)。(m/z): 针对 $C_{21}H_{20}FN_5O$ 计算得到的 $[M+H]^+$ 378.17, 实验值 378.1。 1H NMR (d_6 -DMSO, 400MHz) δ (ppm) 8.23 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.35 (d, $J=11.2$ Hz, 1H), 6.90-6.97 (m, 2H), 4.57 (s, 2H), 3.72 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.22 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.51 (q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.04 (t, $J=7.6$ Hz, 3H)。

[0239] 实例2: ((1S,5R)-2-氮杂双环[3.1.0]己-1-基)(2-(6-(2-乙基-5-氟-4-羟基苯基)-1H-吡唑-3-基)-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-C]吡啶-5-基)甲酮C-1



[0241] 将5-乙基-2-氟-4-(3-(4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基)-1H-吡唑-6-基)苯酚(4.0g, 10.60mmol)、(1s,5r)-2-(叔丁氧基羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-1-羧酸(3.61g, 15.90mmol)和DIPEA(7.40ml, 42.4mmol)溶解在DMF(60ml)中, 然后加入HATU(8.06g, 21.20mmol), 并且将反应混合物在室温下搅拌24小时。然后加入脒(0.665ml, 21.20mmol)以裂解不需要的副产物, 然后将反应混合物浓缩至约20mL。然后将此溶液滴入200mL水中以沉淀出产物, 然后通过过滤收集产物并在真空下干燥。将所得固体溶解在二噁烷(40ml)和水(8ml)中, 然后加入盐酸(在二噁烷(40ml, 160mmol)中为4M)并且将反应混合物在室温下搅拌2小时。然后将溶液冷冻并冻干, 并且将所得固体通过制备型HPLC(5-70%乙腈/水梯度, C18柱)纯化, 得到标题化合物的TFA盐(2.69g, 42%产率)。(m/z): 针对 $C_{27}H_{27}FN_6O_2$ 计算得到的 $[M+H]^+$ 487.55, 实验值 487.7。 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 13.15 (s, 1H), 12.42 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 8.29 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.07 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J=11.9$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=9.1$ Hz, 1H), 4.51 (m, 2H), 3.92 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 2.65 (m, 3H), 2.47 (q, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.89 (m, 1H), 1.72 (m, 2H), 0.98 (t, $J=7.5$ Hz, 3H), 0.89 (m, 2H)。

[0242] 生物测定

[0243] 化合物1已通过以下生物测定中的一种或多种进行了表征。

[0244] 测定1: 生化JAK激酶测定

[0245] 在普通激酶反应缓冲液(50mM HEPES, pH 7.5, 0.01%Brij-35, 10mM $MgCl_2$ 和1mM EGTA)中进行了一组四项LanthaScreen JAK生化测定(JAK1、2、3和Tyk2)。从生命技术获得了重组GST标记的JAK酶和GFP标记的STAT1肽底物。

[0246] 将连续稀释的化合物与四种JAK酶中的每一种和底物在白色384孔微孔板(康宁(Corning))中在环境温度下预培养1h。随后加入ATP以在含1%DMSO的10 μ L总体积中引发激酶反应。JAK1、2、3和Tyk2的最终酶浓度分别为4.2nM、0.1nM、1nM和0.25nM; 使用的相应 K_m ATP浓度为25 μ M、3 μ M、1.6 μ M和10 μ M; 而所有四项测定的底物浓度均为200nM。在加入EDTA(最

终浓度为10mM)和Tb抗pSTAT1 (pTyr701) 抗体(生命技术,最终浓度为2nM)在TR-FRET稀释缓冲液(生命技术)中的10 μ L制剂之前,使激酶反应在环境温度下进行1小时。在易美逊(EnVision)阅读器(珀金埃尔默(Perkin Elmer))上读取前,让平板在环境温度下孵育1h。记录发射比信号(520nm/495nm),并且基于DMSO和背景对照来计算抑制百分比值。

[0247] 对于剂量-反应分析,绘制了抑制百分比数据/化合物浓度,并且使用Prism软件(GraphPad Software)从4参数稳健拟合模型中确定IC₅₀值。结果表示为pIC₅₀(IC₅₀的负对数),并且随后使用Cheng-Prusoff方程转换为pK_i(解离常数的负对数,Ki)。

[0248] 化合物1表现出以下酶效力。

[0249] 表1

	JAK 1 pK_i	JAK 2 pK_i	JAK 3 pK_i	Tyk2 pK_i
[0250]	9.9	10.2	9.6	8.6

[0251] 测定2:抑制Tall-1 T细胞中IL-2刺激的pSTAT5

[0252] 使用AlphaLisa在Tall-1人T细胞系(DSMZ)中测量了测试化合物抑制白介素-2(IL-2)刺激的STAT5磷酸化的效力。由于IL-2通过JAK1/3发出信号,因此该测定提供JAK1/3细胞效力的度量。

[0253] 通过AlphaLISA SureFire超pSTAT5(Tyr 694/699)试剂盒(珀金埃尔默)测量磷酸化STAT5。将来自Tall-1细胞系的人T细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂加湿孵育器中在RPMI(生命技术)中培养,RPMI中补充有15%热灭活胎牛血清(FBS,生命技术)、2mM Glutamx(生命技术)、25mM HEPES(生命技术)和1X Pen/Strep(生命技术)。在DMSO中连续稀释化合物,并以声学方式分配到空孔中。分配测定培养基(不含酚红的DMEM(生命技术),补充有10%FBS(ATCC))(4 μ L/孔),并且在900rpm下摇晃平板10min。在测定培养基(4 μ L/孔)中以45,000个细胞/孔接种细胞,并在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下培养1小时,然后在预热的测定培养基(4 μ L)中历时30分钟,加入IL-2(R&D Systems;最终浓度300ng/mL)。细胞因子刺激后,用6 μ l含1x PhosStop和Complete片剂(罗氏(Roche))的3x AlphaLisa裂解缓冲液(珀金埃尔默)裂解细胞。在900rpm下在室温(RT)下摇晃裂解物10分钟。通过pSTAT5 AlphaLisa试剂盒(珀金埃尔默)来测量磷酸化STAT5。在绿色过滤<100lux光下,将新制备的受体珠混合物分配到裂解物(5 μ L)上。在900rpm下摇晃平板2min,短暂向下旋转,并且在室温下在黑暗中孵育2hr。在绿色过滤<100lux光下分配供体珠(5 μ L)。在900rpm下摇晃平板2分钟,短暂向下旋转,并且在室温下在黑暗中孵育过夜。使用易美逊平板阅读器(珀金埃尔默)在绿色过滤<100lux光下测量在689nm下激发和在570nm下发射的发光。

[0254] 为了确定测试化合物响应于IL-2的抑制效力,在人T细胞系中测量了与pSTAT5结合的珠的平均发射强度。通过分析信号强度/化合物浓度的抑制曲线确定IC₅₀值。数据表示为pIC₅₀(负十进制对数IC₅₀)值(平均值 \pm 标准差)。在此测定中,化合物1表现出pIC₅₀值为7.8。

[0255] 测定3:细胞JAK效力测定:抑制BEAS-2B细胞中IL-13刺激的pSTAT6

[0256] 通过测量在BEAS-2B人肺上皮细胞(ATCC)中白介素-13(IL-13,R&D Systems)诱导的STAT6磷酸化,进行了AlphaScreen JAK1细胞效力测定。抗STAT6抗体(细胞信令技术(Cell Signaling Technologies))与AlphaScreen受体珠(珀金埃尔默)共轭,而抗pSTAT6

(pTyr641) 抗体 (细胞信令技术) 使用EZ-Link磺基-NHS-生物素 (赛默科技 (Thermo Scientific)) 进行生物素化。

[0257] BEAS-2B细胞在5%CO₂加湿孵育箱中在37℃下在50%DMEM/50%F-12培养基 (生命技术) 中生长, 培养基中补充有10%FBS (海克隆 (Hyclone))、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素 (生命技术) 和2mM GlutaMAX (生命技术)。在测定的第1天, 将细胞以7,500个细胞/孔的密度接种在含25μL培养基的涂有白色聚-D-赖氨酸的384孔平板 (康宁) 中, 并且让其在孵育器中粘附过夜。在测定的第2天, 取出培养基并更换为12μL含有测试化合物剂量反应的测定缓冲液 (汉克平衡盐溶液/HBSS, 25mM HEPES和1mg/mL牛血清白蛋白/BSA)。在DMSO中连续稀释所述化合物, 然后在培养基中再稀释1000倍, 使最终DMSO浓度达到0.1%。将细胞与测试化合物在37℃下孵育1h, 然后加入12μL预热的IL-13 (测定缓冲液中为80ng/mL) 进行刺激。在37℃下孵育30min后, 移除测定缓冲液 (含有化合物和IL-13), 并且加入10μL细胞裂解缓冲液 (25mM HEPES, 0.1%SDS, 1%NP-40, 5mM MgCl₂, 1.3mM EDTA, 1mM EGTA, 并且补充有来自罗氏诊断 (Roche Diagnostics) 的Complete Ultra迷你蛋白酶抑制剂和PhosSTOP)。加入检测试剂前, 在环境温度下摇晃平板30min。首先加入生物素抗pSTAT6和抗STAT6共轭受体珠粒的混合物, 并且在环境温度下孵育2h, 然后加入链霉亲和素共轭供体珠 (珀金埃尔默)。孵育至少2h后, 在易美逊平板阅读器上读取测定平板。记录AlphaScreen发光信号, 并且用于基于DMSO和背景对照来计算抑制百分比值。

[0258] 对于剂量-反应分析, 绘制了抑制百分比数据/化合物浓度, 并且使用Prism软件从4参数稳健拟合模型中确定IC₅₀值。结果也可表示为IC₅₀值的负对数pIC₅₀。在此测定中, 化合物1表现出pIC₅₀值为8。

[0259] 测定4: 细胞JAK效力测定: 抑制人PBMC中IL-2/抗CD3刺激的IFN γ

[0260] 在从人全血 (斯坦福血液中心 (Stanford Blood Center)) 中分离的人外周血单核细胞 (PBMC) 中测量了测试化合物对于抑制白介素-2 (IL-2) /抗CD3刺激的干扰素 γ (IFN γ) 的效力。由于IL-2通过JAK发出信号, 因此该测定提供JAK细胞效力的度量。

[0261] (1) 使用Ficoll梯度从健康供体的人全血中分离人外周血单核细胞 (PBMC)。将细胞在37℃、5%CO₂加湿孵育器中在RPMI (生命技术) 中培养, RPMI中补充有10%热灭活胎牛血清 (FBS, 生命技术)、2mM Glutamax (生命技术)、25mM HEPES (生命技术) 和1X Pen/Strep (生命技术)。在培养基 (50μL) 中以200,000个细胞/孔接种细胞, 并且培养1h。在DMSO中连续稀释所述化合物, 然后在培养基中再稀释500倍 (至2x最终测定浓度)。向细胞中加入测试化合物稀释液 (100μL/孔), 在37℃、5%CO₂下孵育1h, 然后在预热的测定培养基 (50μL) 中历时24h加入IL-2 (R&D Systems; 最终浓度100ng/mL) 和抗CD3 (BD生物科学 (BD Biosciences); 最终浓度1μg/mL)。

[0262] (2) 细胞因子刺激后, 将细胞以500g离心分离5min, 并且取出上清液, 并在-80℃下冷冻。为了确定测试化合物响应于IL-2/抗CD3的抑制效力, 通过ELISA (R&D Systems) 测量上清液IFN γ浓度。通过分析IFN γ浓度/化合物浓度的抑制曲线确定IC₅₀值。数据表示为pIC₅₀ (负十进制对数IC₅₀) 值。在此测定中, 化合物1表现出pIC₅₀值为6.7。

[0263] 测定5: 细胞JAK效力测定: 抑制CD4+T细胞中IL-2刺激的pSTAT5

[0264] 使用流式细胞术在从人全血 (斯坦福血液中心) 中分离的人外周血单核细胞 (PBMC) 中的CD4阳性 (CD4+) T细胞中测量了测试化合物对于抑制白介素-2 (IL-2) /抗CD3刺

激的STAT5磷酸化的效力。由于IL-2通过JAK发出信号,因此该测定提供JAK细胞效力的度量。

[0265] 使用藻红胆素(PE)共轭的抗CD4抗体(克隆RPA-T4, BD生物科学)确定CD4+T细胞,同时使用Alexa Fluor 647共轭的抗pSTAT5抗体(pY694, 克隆47, BD生物科学)检测STAT5磷酸化。

[0266] (1) 遵循测定4段落(1)的方案,但使用IL-2/抗CD3刺激细胞因子进行30min,而非24h。

[0267] (2) 细胞因子刺激后,用预热的固定液(200 μ L; BD生物科学)在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下将细胞固定10min,用DPBS缓冲液(1mL, 生命技术)洗涤两次,并且在4 $^{\circ}$ C下在冰冷的Perm缓冲液III(1000 μ L, BD生物科学)中重新悬浮30min。在DPBS中用2%FBS(FACS缓冲液)洗涤细胞两次,然后在室温下在黑暗中在含有抗CD4 PE(1:50稀释)和抗CD3抗CD3 Alexa Fluor 647(1:5稀释)的FACS缓冲液(100 μ L)中重新悬浮60min。孵育后,在使用LSRII流式细胞仪(BD生物科学)分析之前,在FACS缓冲液中洗涤细胞两次。为了确定测试化合物响应于IL-2/抗CD3的抑制效力,在CD4+T细胞中测量pSTAT5的中位荧光强度(MFI)。通过分析MFI/化合物浓度的抑制曲线确定IC₅₀值。数据表示为pIC₅₀(负十进制对数IC₅₀)值。在此测定中,化合物1表现出pIC₅₀值为7.7。

[0268] 测定6:细胞JAK效力测定:抑制人PBMC中IL-6刺激的CCL2(MCP-1)

[0269] 在从人全血(斯坦福血液中心)中分离的人外周血单核细胞(PBMC)中测量了测试化合物对于抑制白介素-6(IL-6)刺激的CCL2(MCP-1)的效力。由于IL-6通过JAK发出信号,因此该测定提供JAK细胞效力的远程度量。

[0270] (1) 在与测试化合物孵育之前,遵循测定4段落(1)的方案。在本测定中,将测试化合物加入孔中并孵育后,在预热的测定培养基(50 μ L)中加入IL-6(R&D Systems;最终浓度10ng/ml)。

[0271] (2) 细胞因子刺激48h后,将细胞以500g离心分离5min,并且取出上清液,并在-80 $^{\circ}$ C下冷冻。为了确定测试化合物响应于IL-6的抑制效力,通过ELISA(R&D Systems)测量上清液CCL2(MCP-1)浓度。通过分析CCL2/MCP-1浓度/化合物浓度的抑制曲线确定IC₅₀值。数据表示为pIC₅₀(负十进制对数IC₅₀)值。在此测定中,化合物1表现出pIC₅₀值为6.5。

[0272] 测定7:药效学测定:抑制大鼠中IL6诱导的pSTAT3

[0273] 在大鼠视网膜/脉络膜匀浆中测量单次玻璃体内施用测试化合物抑制IL-6诱导的pSTAT3的能力。

[0274] 通过将化合物1溶解在1%HPMC E5+15%HP β CD(pH7)中制备溶液制剂,使目标浓度达到10mg/mL。对雌性路易斯大鼠玻璃体内(IVT)给药(每只眼5 μ L)载体、载体加大鼠IL-6(派普泰克(Peprotech);0.5 μ g),或IL-6加化合物(0.5 μ g IL-6和45 μ g化合物1)的组合。IVT注射后一小时解剖眼组织。将视网膜/脉络膜组织匀浆,并且使用AlphaLisa(珀金埃尔默)测量pSTAT3水平。与载体和IL-6组相比,计算IL-6诱导的pSTAT3的抑制百分比。

[0275] 45 μ g剂量的化合物1在视网膜/脉络膜匀浆中抑制IL-6诱导的pSTAT3达84%。

[0276] 测定8:小鼠的肺和血浆药代动力学

[0277] 以下列方式确定化合物1的血浆和肺浓度及其比率。在所述测定中使用来自查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)的BALB/c小鼠。将化合物1在柠檬酸盐缓冲液

(pH4)中的20%丙二醇中以0.324mg/mL的浓度配制成溶液。将50 μ L的溶液制剂通过口腔吸入小鼠的气管中。在给药后的不同时间点(0.167hr、2hr、6hr),通过心脏穿刺取出血液样本,并且从小鼠中切除完整的肺。将血样在4 $^{\circ}$ C下以约12,000rpm离心分离(艾本德离心机,5804R)4分钟,以采集血浆。将肺垫干,称重,并在0.6mL无菌水中匀浆。通过LC-MS分析对照分析标准确定化合物1的血浆和肺浓度,分析标准被构建为测试基质中的标准曲线。发现持续肺部暴露,肺AUC(0-6hr)为43.5 μ g hr/g。肺对血浆比率被确定为以 μ g hr/g为单位的肺AUC对以 μ g hr/mL单位的血浆AUC之比(其中AUC通常定义为测试化合物浓度/时间的曲线下面积)。肺对血浆的AUC比率为59.6,表明高肺暴露量/血浆。

[0278] 测定9:激酶组筛选和基尼系数

[0279] 针对其他激酶对化合物1和C-1进行了筛选,以评估其选择性廓线。

[0280] 激酶标记的T7噬菌体菌株在源自BL21菌株的大肠杆菌宿主中以24孔块并行生长。大肠杆菌生长至对数期,并且用来自冷冻贮备的T7噬菌体感染(感染的多重性=0.4),并且在32 $^{\circ}$ C下在摇晃时孵育直至裂解(90-150分钟)。将裂解物离心分离(6,000x g)并过滤(0.2 μ m),以去除细胞碎片。剩余的激酶在HEK-293细胞中产生,并且随后用DNA标记用于qPCR检测。

[0281] 用生物素化的小分子配体在室温下处理链霉亲和素包衣的磁珠30分钟,以生成用于激酶测定的亲和树脂。用过量生物素封闭配接的珠,并用封闭缓冲液(SeaBlock(皮尔斯(Pierce))、1%BSA、0.05%吐温20、1mM DTT)洗涤,以去除未结合的配体并减少非特异性噬菌体结合。结合反应是通过在1x结合缓冲液(20%SeaBlock,0.17x PBS,0.05%吐温20,6mM DTT)中结合激酶、配接的亲和珠和测试化合物来进行。将测试化合物在100%DMSO中制备为40x贮备溶液,并直接稀释至测定中。所有反应均在最终体积为0.04ml的聚丙烯384孔板中进行。在室温下在摇晃时孵育测定板1小时,并且用洗涤缓冲液(1x PBS,0.05%吐温20)洗涤亲和珠。然后将珠重新悬浮在洗脱缓冲液(1x PBS,0.05%吐温20,0.5 μ M非生物素化亲和配体)中,并在室温下在摇晃时孵育30分钟。通过qPCR测量洗脱液中的激酶浓度。

[0282] 在1 μ M下筛选化合物,并且表2和3中的主要筛选结合相互作用结果报告为“抑制%”(=100-((测试化合物信号-阳性对照信号)/(阴性对照信号)-(阳性对照信号))X100),其中阴性对照为DMSO,并且阳性对照为对照化合物。

[0283] 表2

化合物/激酶	ALK	AURKA	CDK2	CDK7	CDK9	CSF1R	EPHB6	GSK3B
1	79	26	1	82	13	98	85	32
C-1	87	54	50	98.8	89	100	96.5	52

[0285] 表3

化合物/激酶	KIT	PAK4	PKAC-ALPHA	PLK4	SLK	SRC	SYK	VEGFR2	CSNK1D
1	83	41	22	39	100	65	44	47	25
C-1	98.5	89	55	40	99.9	98.9	82	59	66

[0287] 发现化合物1对EPHB6、KIT、PAK4、SRC、CDK7和CDK9的结合抑制作用显著低于化合物C-1。化合物1对其他几种激酶的结合抑制作用也较低。

[0288] 化合物1和C-1均针对35种不同的激酶进行了筛选。确定两种化合物的基尼系数。化合物1的基尼系数为0.60,并且化合物C-1的基尼系数为0.46。基尼系数用于表示化合物

对一组激酶的选择性(格拉奇克(Graczyk), 医学化学杂志(J. Med. Chem.), 2007, 50, 5773-5779)。较高的数字对应于更具选择性的化合物。

[0289] 化合物1和化合物C-1之间唯一的结构差异是核上存在氟基团。这种结构差异已被证明对化合物的激酶组选择性有重要影响。

[0290] 测定10: 细胞存活率测定

[0291] 在正常生长条件下, 在BEAS-2B人肺上皮细胞(ATCC)中进行了CellTiter-Glo发光细胞存活率/细胞毒性测定。

[0292] 细胞在5% CO₂加湿孵育器中在37°C下在50% DMEM/50% F-12培养基(生命技术)中生长, 培养基中补充有10% FBS(海克隆)、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素(生命技术)和2mM GlutaMAX(生命技术)。在测定的第1天, 将细胞以500个细胞/孔的密度接种在含25μL培养基的白色384孔组织培养平板(康宁)中, 并且让其在孵育器中粘附过夜。在测定的第2天, 加入5μL含有测试化合物剂量反应的培养基, 并在37°C下孵育48h。随后加入30μL CellTiter-Glo检测溶液(普洛麦格(Promega)), 在轨道摇动器上混合5min, 并且在易美逊阅读器上读取前再孵育10min。记录发光信号并且计算DMSO对照百分比值。

[0293] 对于剂量反应分析, 绘制DMSO对照数据百分比/化合物浓度以通过连接每个数据点的线得出剂量-反应曲线。每条曲线超过15%抑制阈值时的浓度定义为CC₁₅。

[0294] 预期在本测定中表现出较高CC₁₅值的测试化合物产生细胞毒性的可能性较小。

[0295] 化合物1表现出pCC₁₅<5(相当于CC₁₅>10μM), 而化合物C-1表现出pCC₁₅为5.8(相当于CC₁₅为1.58μM)。因此, 根据本测定, 化合物1比化合物C-1产生细胞毒性的可能性小得多。

[0296] 化合物1和化合物C-1之间唯一的结构差异是核上存在氟基团。这种结构差异已被证明对化合物的细胞毒性有重要影响。

[0297] 测定10: 细胞JAK效力测定: 抑制原代人视网膜微血管内皮细胞中IL-6反式信令刺激的p-STAT3

[0298] 在原代人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)中测量了测试化合物抑制IL-6反式信令(IL6+sIL6Rα)诱导的STAT3磷酸化的细胞效力。IL-6反式信令由IL-6受体β(gp130)介导, 所述受体在细胞内与JAK酶偶联。在gp130参与和二聚化后, JAK被激活并直接磷酸化STAT3。因此, 此测定提供JAK细胞效力的度量。将HRMEC(细胞系统(Cells Systems), 华盛顿州柯克兰(Kirkland WA))在无菌、经组织培养处理、涂有Attachment Factor™(细胞系统, 华盛顿州柯克兰)的平底96孔测定板中以每孔1x10⁴个细胞的密度平板培养。将HRMEC培养物在补充有10%胎牛血清、Culture Boost™生长因子和BacOff®抗生素(细胞系统, 华盛顿州柯克兰)的培养基中, 在37°C、95%湿度、5%CO₂条件下培养了3天。将测试化合物在DMSO中连续稀释, 然后在完全培养基中以1.11x最终测定浓度制备。将细胞与90μL 1.11x测试化合物在37°C下孵育1小时, 然后在预热的测定培养基中历时30分钟加入10μL 10x IL-6/sIL6Rα(派普泰克; 最终浓度500pM IL-6, 5nM sIL6Rα)。刺激后, 取出上清液, 并且将细胞材料收集在含有磷酸酶抑制剂(PhosSTOP™, 罗氏)的50μL裂解缓冲液(AlphaLISA® SureFire® Ultra™测定试剂盒, 珀金埃尔默)中, 并在-80°C下存储直至分析。为了确定测试化合物的抑制效力, 根据制造商的说明, 使用AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-STAT3(Tyr705)测定试剂盒(珀金埃尔默)来测量p-STAT3的水平。根据%p-STAT3α信号/测试化合物浓度的抑制曲线确定IC₅₀值(使用GraphPad Prism 7.0进行的曲线拟合)。数据表示为pIC₅₀(负log₁₀(测试化

合物浓度))。在三个独立实验中,化合物1表现出 pIC_{50} 为 6.3 ± 0.1 。

[0299] 虽然已经参考本发明的特定方面或其实施例描述了本发明,但是本领域普通技术人员将理解,在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下,可以进行各种改变或可以替换等同物。此外,在适用的专利法规和条例允许的范围内,在如同每一文件单独通过引用并入本文的程度上,本文引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用整体并入本文。