



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106456773 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580017178.X

(22)申请日 2015.02.27

(30)优先权数据

61/946,124 2014.02.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.09.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/017963 2015.02.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/131031 EN 2015.09.03

(71)申请人 因赛特公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 K·瓦迪

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/497(2006.01)

A61K 31/519(2006.01)

A61P 7/00(2006.01)

A61P 7/06(2006.01)

权利要求书3页 说明书50页

(54)发明名称

用于治疗骨髓增生异常综合征的JAK1抑制剂

(57)摘要

本发明涉及JAK1选择性抑制剂,具体涉及吡咯并[2,3-d]嘧啶和吡咯并[2,3-b]吡啶的衍生物,以及这些抑制剂在治疗骨髓增生异常综合征(MDS)中的用途。

1. 一种治疗有治疗需要的患者的骨髓增生异常综合征的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的JAK1选择性抑制剂或其可药用盐。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述JAK1选择性抑制剂对JAK1的选择性强于对JAK2、JAK3和TYK2的选择性。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述JAK1选择性抑制剂选自:

3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈;

3-(1-[1,3]噁唑并[5,4-b]吡啶-2-基吡咯烷-3-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈;

4-[(4-{3-氰基-2-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈;

4-[(4-{3-氰基-2-[3-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡咯-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈;

{1-{1-[3-氟-2-(三氟甲基)异烟酰基]哌啶-4-基}-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈;

4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-[4-氟-2-(三氟甲基)苯基]哌啶-1-甲酰胺;

[3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]-1-(1-{[2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]羰基}哌啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]乙腈;

[反式-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]-3-(4-{[2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]羰基}哌嗪-1-基)环丁基]乙腈;

{反式-3-(4-{[4-[(3-羟基氮杂环丁烷-1-基)甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈;

{反式-3-(4-{[4-[(2S)-2-(羟甲基)吡咯烷-1-基]甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈;

{反式-3-(4-{[4-[(2R)-2-(羟甲基)吡咯烷-1-基]甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈;

4-(4-{3-[(二甲氨基)甲基]-5-氟苯氧基}哌啶-1-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丁腈;

5-{3-(氰甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-异丙基吡嗪-2-甲酰胺;

4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-2,5-二氟-N-[(1S)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]苯甲酰胺;

5-{3-(氰甲基)-3-[4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-异丙基吡嗪-2-甲酰胺;

{1-(顺式-4-{[6-(2-羟乙基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈;

{1-(顺式-4-{[4-[(乙氨基)甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈;

{1-(顺式-4-[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基)环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈;

{1-(顺式-4-[4-[(3R)-3-羟基吡咯烷-1-基]甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基)环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈;

{1-(顺式-4-[4-[(3S)-3-羟基吡咯烷-1-基]甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基)环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈;

{反式-3-(4-[4-[(1S)-2-羟基-1-甲基乙基]氨基]甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基)哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈;

{反式-3-(4-[4-[(2R)-2-羟丙基]氨基]甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基)哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈;

{反式-3-(4-[4-[(2S)-2-羟丙基]氨基]甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基)哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈;

{反式-3-(4-[4-(2-羟乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基)哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈;

或这些物质的可药用盐。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征为难治性血细胞减少伴单系发育异常(RCUD)。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征为难治性贫血伴环形铁粒幼红细胞(RARS)。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征为难治性血细胞减少伴多系发育异常。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征为难治性贫血伴原始细胞增多1型(RAEB-1)。

8. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征为难治性贫血伴原始细胞增多2型(RAEB-2)。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征为骨髓增生异常综合征未分类型(MDS-U)。

10. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征为与孤立性del(5q)染色体相关的骨髓增生异常综合征。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述骨髓增生异常综合征用红细胞生成刺激剂难以治疗。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述患者依赖输注红血细胞。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,所述方法还包括施用选自IMiD、抗IL-6剂、抗TNF- α 剂、低甲基化剂或生物应答调节物(BRM)的额外治疗剂。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述抗TNF- α 剂选自英夫利昔单抗和依那西普。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述低甲基化剂为DNA甲基转移酶抑制剂。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述DNA甲基转移酶抑制剂选自5-氮杂胞苷和地西他滨。

17. 根据权利要求13所述的方法,其中所述IMiD选自沙利度胺、雷利度胺、泊马度胺、

CC-11006和CC-10015。

18. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,所述方法还包括施用选自抗胸腺细胞球蛋白、重组人粒细胞集落刺激因子(G CSF)、粒细胞-单核细胞CSF (GM-CSF)、红细胞生成刺激剂(ESA)和环孢菌素的额外治疗剂。

用于治疗骨髓增生异常综合征的JAK1抑制剂

[0001] 本申请要求2014年2月28日提交的美国临时申请第61/946,124号的优先权权益,该临时申请全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及JAK1选择性抑制剂及其在治疗骨髓增生异常综合征(MDS)中的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 骨髓增生异常综合征(MDS)(以前被称为骨髓造血异常综合征或白血病前期)是一组异质的克隆性造血疾病,其特征是存在一种或多种主要髓样细胞系无效造血的现象。骨髓增生异常综合征与骨髓衰竭、外周血细胞减少以及发展成急性髓性白血病(AML)的倾向有关。此外,在约50%的MDS病例中,可检测到细胞遗传学克隆性异常。MDS在一般人群中的发病率为5/100,000,并随年龄增长而上升,在70岁以上的人群中可达到约22至45/100,000 (Greenberg, "The myelodysplastic syndromes", Hoffman, et al, eds. Hematology: Basic Principles and Practice (3rd ed.), Churchill Livingstone; 2000:1106-1129 (Greenberg, "骨髓增生异常综合征", Hoffman等人编辑,《血液学:基本原理与实践》第3版,丘吉尔利文斯顿出版社,2000年,第1106-1129页); Liesveld and Lichtman, Chapter 88. "Myelodysplastic Syndromes (Clonal Cytopenias and Oligoblastic Myelogenous Leukemia)", Prchal et al, eds. Williams Hematology. 8th ed., New York: McGraw-Hill; 2010 (Liesveld和Lichtman, "骨髓增生异常综合征(克隆性血细胞减少和寡原始细胞骨髓性白血病)", Prchal等人编辑,《威廉姆斯血液病学》第8版,第88章,纽约麦格劳-希尔集团,2010年))。尽管我们对MDS病理生理学的了解已取得科学进展,但几乎没有可用于治疗MDS的方法,仅有的治疗方法大部分只能减轻MDS症状,对于不适合进行造血干细胞移植(HSCT)的那些患者尤其如此。

[0005] MDS的护理标准包括支持性护理,该支持性护理涉及观察和临床监护、社会心理支持以及尽量提高生活质量 (Cheson, et al, Blood 2000; 96:3671-3674 (Cheson等人,《血液》,2000年,第96卷,第3671-3674页); Venugopal et al. Cancer Treat Res 2001; 108:257-265 (Venugopal等人,《癌症治疗和研究》,2001年,第108卷,第257-265页); Greenberg, Int J Ped Hem-Onc 1997; 4:231-238 (Greenberg,《国际儿科血液学与肿瘤学杂志》,1997年,第4卷,第231-238页))。此外,如果伴有症状性贫血,则需要输注红细胞;如果由于血小板减少而产生流血,则需要输注血小板。如果骨髓增生异常综合征患者需要输注红细胞,则可能出现以下并发症:产生同种抗体,这需要增大输注频率;铁超负荷,伴随肝脏、心脏和内分泌器官出现终末器官损伤,因而需要整合铁来将血清铁蛋白维持在1000μg/L以下 (Venugopal等人,2001年(见上文); Greenberg, 1997年(见上文))。如果是难治性症状性血细胞减少病例,则需要造血细胞因子的支持,诸如使用重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞单核细胞CSF(GM-CSF)来治疗伴有感染性并发症的中性粒细胞减少性MDS,使用红细胞生成刺激剂(ESA)来治疗症状性贫血 (Cheson等人,2000年(见上文); Jädersten et al, Blood 2005; 106:803-811 (Jädersten等人,《血液》,2005年,第106卷,第803-811页); Schiffer,

Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006:205-210 (Schiffer,《血液学》(美国血液学会教育计划),2006年,第205-210页)。在MDS早期(即,IPSS低危和IPSS中危-1),症状性贫血是需要进行治疗性干预的最常见原因。ESA只对一部分出现症状性贫血的患者有效,其中不依赖输注红细胞的那些患者或内源EPO水平低(<500IU)的那些患者,对ESA的响应最强(Cheson等人,2000年(见上文);Jädersten等人,2005年(见上文);Schiffer,2006年(见上文);Fenaux,et al.,Lancet Oncol 2009;10:223-232 (Fenaux等人,《柳叶刀肿瘤学》,2009年,第10卷:第223-232页))。尽管甚至在需要输注红细胞并且网织红细胞计数低时,通常仍在继续使用ESA,但患者对ESA治疗的响应最终停止,此时需要输注红细胞来支持治疗。输血需求可不同,还可受需要更高Hgb水平的伴随医学问题的影响,比如心绞痛、抗红细胞的同种抗体的发展、脾肿大以及血小板减少或血小板功能异常引发的隐源性消化道出血(Venugopal等人,2001年(见上文);Greenberg,1997年(见上文);Fenaux等人,2009年(见上文))。

[0006] 低强度疗法包括使用低强度化学疗法或生物应答调节剂(BRM)。现已证明,低甲基化剂(诸如,DNA甲基转移酶抑制剂5-氮杂胞苷和地西他滨(5-氮杂-2'-脱氧胞苷))可降低随机3期研究中白血病转化的风险,并可提高一部分患者的总生存率(Fenaux等人,2009年(见上文);Silverman,J Clin Oncol 2002;20:2429-2440 (Silverman,《临床肿瘤学杂志》,2002年,第20卷:第2429-2440页);Silverman,J Clin Oncol 2006;24:3895-3903 (Silverman,《临床肿瘤学杂志》,2006年,第24卷:第3895-3903页))。同样,经研究证实,用地西他滨治疗中危和高危的MDS患者,疾病响应率更高、好转持续时间更长、AML发展时间更长、生存益处更多。另外,研究还证实,地西他滨可显著改善患者报告的有关疲劳和生理机能的程度方面的生活质量(基于欧洲癌症研究治疗组织[EORTC QLQ C30]) (Kantarjian,et al.,Cancer 2006;106:1794-1803 (Kantarjian等人,《癌症》,2006年,第106卷,第1794-1803页);Lübbert,et al.,Br J Haematol 2001;114:349-357 (Lübbert等人,《英国血液学杂志》,2001年,第114卷,第349-357页);Lübbert,et al.,J Clin Oncol 2011;29:1987-1996 (Lübbert等人,《临床肿瘤学杂志》,2011年,第29卷:第1987-1996页))。5-氮杂胞苷和地西他滨这两种药物都被批准用于治疗MDS,它们明确地提供临床益处,因而NCCN MDS小组建议用来治疗IPSS中危-2和高危的MDS患者(美国国家综合癌症网络(NCCN),《骨髓增生异常综合征指南》2012年第1版,www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp)。

[0007] 一直以来,炎性分子都被认为是驱使MDS患者体内的造血祖细胞增殖和凋亡的调节诱因。据信,慢性免疫刺激与造血干细胞/祖细胞(HSPC)中和骨髓(BM)微环境中的衰老依赖性变化相结合,是造成疾病发病机制的关键因素。越来越多的证据表明,造血衰老和MDS病理学中都存在先天免疫信号转导激活这一现象(Chen等人,2014年)。因此,包括T细胞抑制剂(诸如,抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、环孢菌素、沙利度胺及其类似物雷利度胺)在内的免疫调节剂(Molldrem,et al.,Br J Haematol 1997;99:699-705 (Molldrem等人,《英国血液学杂志》,1997年,第99卷,第699-705页);Sloand,et al.,J Clin Oncol 2008;26:2505-2511 (Sloand等人,《临床肿瘤学杂志》,2008年,第26卷,第2505-2511页);Raza,et al.,Blood 2008;111:86-93 (Raza等人,《血液》,2008年,第111卷,第86-93页);Fenaux,et al.,Blood 2011;118:3765-3776 (Fenaux等人,《血液》,2011年,第118卷,第3765-3776页);

List, et al., N Engl J Med 2005; 352: 549-557 (List等人,《新英格兰医学杂志》, 2005年, 第352卷, 第549-557页)) 被用作低强度MDS治疗剂。高强度MDS疗法包括强化诱导化疗, 如治疗AML和HSCT所用的疗法。多种不同的强化化疗方案都有改变疾病自然病程的潜力, 故研究人员已对这些方案进行了测试, 但对比研究尚未发现益处; 所以这种疗法仍待研究, 仅仅是高危MDS患者的一种可能的选择。进行同种异体造血干细胞移植是根治MDS的唯一方法, 并最好从与患者配型相合的同胞捐赠者移植, 这种方法是高危MDS患者的首选疗法, 但由于缺乏合适的捐赠者, 并且随年龄增长并存病增多, 这些因素通常妨碍高危MDS患者接受这种疗法 (NCCN 2012年 (见上文); Larson, Best Pract Res Clin Hematol 2006; 19: 293-300 (Larson,《临床血液学最佳实践与研究》, 2006年, 第19卷, 第293-300页); Schiffer, Best Pract Res Clin Hematol 2007; 20: 49-55 (Schiffer,《临床血液学最佳实践与研究》, 2007年, 第20卷, 第49-55页))。

[0008] 因此, 需要开发用于治疗骨髓增生异常综合征的新疗法。本申请满足了该需要和其他需要。

发明内容

[0009] 本申请提供了治疗有治疗需要的患者的骨髓增生异常综合征 (MDS) 的方法, 所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的JAK1选择性抑制剂或其可药用盐。

[0010] 本申请还提供了用于治疗有治疗需要的患者的骨髓增生异常综合征的JAK1选择性抑制剂。

[0011] 本申请还提供JAK1选择性抑制剂用来制造用于治疗有治疗需要的患者的骨髓增生异常综合征的药物的用途。

具体实施方式

[0012] 本文所述的方法利用JAK1选择性抑制剂。JAK1选择性抑制剂是一种相比除JAK1外的其他JAK激酶, 优先抑制JAK1活性的化合物。JAK1在许多细胞因子和生长因子信号转导通路中发挥重要作用, 如果这些信号转导通路失调, 则可能引起或导致发病。例如, 类风湿性关节炎是一种会产生多种有害影响的疾病, 患有类风湿性关节炎的机体内的IL-6水平升高 (Fonesca, et al., Autoimmunity Reviews, 8: 538-42, 2009 (Fonesca等人,《自身免疫评论》, 第8卷, 第538-542页, 2009年))。由于IL-6至少部分经由JAK1来转导信号, 所以预计直接或间接通过抑制JAK1来拮抗IL-6具有临床意义 (Guschin, et al Embo J 14: 1421, 1995 (Guschin等人,《欧洲分子生物学学会志》, 第14卷, 第1421页, 1995年); Smolen, et al. Lancet 371: 987, 2008 (Smolen等人,《柳叶刀》, 第371卷, 第987页, 2008年))。此外, 在某些癌症中, JAK1发生突变, 导致组成型的不合需要的肿瘤细胞生长和存活 (Mullighan, Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 9414-8, 2009 (Mullighan,《美国国家科学院院刊》, 第106卷, 第9414-9418页, 2009年); Flex, J Exp Med. 205: 751-8, 2008 (Flex,《实验医学杂志》, 第205卷, 第751-758页, 2008年))。在其他自身免疫疾病和癌症中, 激活JAK1的炎性细胞因子的系统水平升高还可引发疾病和/或相关症状。因此, 患有这类疾病的患者可因JAK1受抑制而得益。JAK1的选择性抑制剂在发挥效力的同时, 可避免因抑制其他JAK激酶而产生的不必要和潜在不良的效应。

[0013] 相对于其他JAK激酶选择性抑制JAK1的抑制剂与选择性较低的抑制剂相比,可能有多种治疗优势。就针对JAK2的选择性而言,许多重要的细胞因子和生长因子(包括例如促红细胞生成素(Epo)和促血小板生成素(Tpo))经由JAK2转导信号(Parganas, et al. Cell. 93:385-95, 1998 (Parganas等人,《细胞》,第93卷,第385-395页,1998年))。Epo是产生红血细胞的关键生长因子,因此,缺乏Epo依赖型信号转导可导致红血细胞数量减少,继而引发贫血(Kaushansky, NEJM 354:2034-45, 2006 (Kaushansky,《新英格兰医学杂志》,第354卷,第2034-2045页,2006年))。Tpo是JAK2依赖型生长因子的另一例子,其在控制巨核细胞(产生血小板的细胞)增殖和成熟方面发挥重要作用(Kaushansky, NEJM 354:2034-45, 2006 (Kaushansky,《新英格兰医学杂志》,第354卷,第2034-2045页,2006年))。因此,Tpo信号转导减弱将导致巨核细胞的数量减少(巨核细胞减少症),以及循环血小板计数减少(血小板减少症)。这可能引发不希望和/或不可控的出血。还可能期望减轻对其他JAK(诸如JAK3和Tyk2)的抑制,因为有证据显示,缺乏这些激酶的功能形式的人会罹患多种疾病,诸如重症联合免疫缺陷或高免疫球蛋白E综合征(Minegishi, et al. Immunity 25:745-55, 2006 (Minegishi等人,《免疫》,第25卷,第745-755页,2006年); Macchi, et al. Nature, 377:65-8, 1995 (Macchi等人,《自然》,第377卷,第65-68页,1995年))。因此,与其他JAK的亲力和降低的JAK1抑制剂相比选择性较低的抑制剂,在降低包括免疫抑制、贫血和血小板减少症在内的副作用方面具有明显的优势。

[0014] 炎性细胞因子在最终导致血细胞减少和造血异常的MDS的发病机制中起重要的作用。据推测,抑制这些炎性细胞因子的活性将促进正常造血,并将减轻骨髓前体细胞过早凋亡的现象。炎性细胞因子通过激活JAK来介导下游效应,其中激活JAK涉及经由配体介导的受体二聚化和转磷酸化/自身磷酸化而将JAK并置。所得的JAK异型二聚体(由JAK1和JAK2构成,或由JAK1和JAK3构成)对信号进行转导,并介导这些细胞因子的细胞应答。另外,JAK同型二聚体(仅由JAK2构成)对来源于骨髓生长因子的信号进行转导,所述骨髓生长因子是诸如负责刺激红细胞生成的EPO和负责刺激血小板生成的TPO。因此,JAK1选择性抑制剂将在不抑制JAK2介导的红细胞生成和血小板生成的情况下,引起炎性细胞因子信号转导终止,从而恢复正常的造血功能,并缓解骨髓血细胞减少症。

[0015] 尽管我们对MDS病理生理学的了解已取得科学进展,但几乎没有可用于治疗MDS的方法,仅有的治疗方法大部分只能减轻MDS症状,对于不适合进行造血干细胞移植的那些患者尤其如此。多项研究表明MDS是一种克隆性疾病,还证实克隆扩展是骨髓中的造血祖细胞过度增殖引起的。还研究了骨髓中的过度增殖状态导致外周血细胞减少这一似非而是的观点,结果显示,造血细胞存在过量的髓内程序性死亡(或称细胞凋亡)。这种细胞凋亡在具有全部FAB分型的患者体内发现,但在原始细胞计数增长的患者体内,这种细胞凋亡减少。克隆群体似乎逐渐变得抗凋亡,并获得优于正常造血前体细胞的增殖优势,此优势导致原始细胞计数增长并演变为AML。还变得明显的是,过度凋亡在很大程度上是由MDS患者的骨髓中过度表达的大量促炎性细胞因子介导的。MDS的病理生物学所涉及的细胞因子包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN γ) 和IL-1 β 。已在MDS患者的外周血液和骨髓中观察到了高血浆浓度的典型促凋亡细胞因子TNF- α ,并且已在来源于MDS患者的骨髓单核细胞中观察到TNF受体和信使核糖核酸(mRNA)的表达升高。类似地,已在MDS骨髓单核细胞中发现IFN γ 和IL-1 β 的含量增大,而且IL-1 β 一直与MDS演变为AML有关。IL-1 β 由于刺激GM-CSF和IL-3

而对造血细胞具有可变的调节效应,但当IL-1 β 的浓度较高时(这在炎症状态下观察到),其通过诱导TNF α 和前列腺素E2(前列腺素E2是骨髓干细胞增殖的强效抑制剂)而引起对造血功能的抑制。此外,已在来源于MDS患者的骨髓细胞中观察到高水平的IL-6、成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子和转化生长因子 β 。另外,那些抑制正常造血增殖和成熟的细胞因子无法对发展中的异常克隆发挥这种促凋亡效应,故导致这些异常细胞出现选择性增殖。有证据表明,这些促炎性细胞因子的来源是改变的骨髓微环境,这种改变的骨髓微环境通常促使正常的造血细胞增殖和分化,也可能是免疫调节细胞浸润和造成MDS病理学结果的血管生成现象的原因(Raza,et al.,Blood 1995;86:268-276 (Raza等人,《血液》,1995年,第86卷,第268-276页);Raza,et al,Int J Hematol 1996a;63:265-278 (Raza等人,《国际血液学杂志》,1996年a辑,第63卷,第265-278页);Raza,et al.,Leuk Res 1996b;20:881-890 (Raza等人,《白血病研究》,1996年b辑,第20卷,第881-890页);Mundle,et al.Am J Hematol 1999;60:36-47 (Mundle等人,《美国血液学杂志》,1999年,第60卷,第36-47页);Claessens,et al.,Blood 2002;99:1594-1601 (Claessen等人,《血液》,2002年,第99卷,第1594-1601页))。

[0016] 细胞因子介导的促炎性状态是造成MDS病因的原因这一观点,导致开发出了通过保护分化中的造血细胞不过早凋亡,来改善MDS的血细胞减少现象的新颖抗细胞因子疗法。现已证明,抗TNF- α 剂(如沙利度胺及其类似物雷利度胺,英夫利昔和依那西普)可有效地改善MDS患者体内的血细胞减少现象(NCCN 2012(见上文),Larson 2006(见上文),Schiffer 2007(见上文))。在对14位MDS患者的研究中,依那西普使25%的患者表现出红系血液学改善,此外使12.5%的可评估患者表现出血小板计数和ANC改善。另外,将间歇应用依那西普与应用ATG联合,导致红系血液学出现更明显改善,而且需要输血的14位MDS患者中有5位变为持续超过两年不依赖红细胞(RBC)和血小板输注。在对招募的83位患者进行的探索沙利度胺对MDS的效果的研究中,51位患者完成了12周的治疗,其中16位患者表现出血液学改善,10位先前依赖输血的患者变为不依赖输血,并且大部分响应者处于IPSS低危或中危-1类别(NCCN 2012(见上文))。此外,较高危险度类别的患者(尤其是原始细胞比例高的患者)有提早中断治疗的倾向。抑制促炎性细胞因子的效应的另一种方法是抑制其细胞应答。有相当多的细胞因子受体和生长因子受体利用JAK家族的非受体TYK,来经由转录因子STAT信号转导将细胞外配体结合传导到细胞应答中。

[0017] JAK有4个成员,分别是:JAK1、JAK2、JAK3和TYK2。JAK组成型地与细胞因子受体和生长因子受体相关,并已作为配体诱导的受体二聚化的直接后果而被活化,一旦JAK出现后续并置,并且在JAK催化结构域的活化环中发现的保守酪氨酸出现转磷酸化/自身磷酸化,就发生JAK活化。一旦这些酪氨酸磷酸化,JAK就进入高活性状态,于是能够使细胞因子受体上充当多种蛋白质(包括STAT蛋白)的停靠位点的特异性酪氨酸残基磷酸化。JAK是与STAT活化相关的主要激酶家族。活化的STAT转移到细胞核内,在其中用作转录因子,驱动对于细胞活化、定位、存活与增殖很重要的多个基因的表达。

[0018] 现已证实,JAK1和JAK2的抑制剂鲁索替尼可显著缩小骨髓纤维化患者的脾脏大小,并改善其症状。无论受试者体内的JAK2中是否存在V617F突变,这些改善都很明显,而且这些改善很可能与促炎性细胞因子受抑制相关。使用鲁索替尼时观察到的主要不良事件(AE)是血小板减少症和贫血症;这两种病症很少导致双盲、安慰剂对照的3期研究出现中

断,而且都至少部分地因JAK2介导的骨髓抑制引起。因此假设,选择性抑制JAK1会对MDS患者发挥抑制促炎性细胞因子的有益效应,并引起因造血前体细胞的过早凋亡而导致的血细胞减少现象的减轻。另外,JAK2的活性受抑制后,将使造血细胞因子即EPO和TPO能够表现生理活性,从而允许正常的造血细胞进行生理增殖和分化。

[0019] 此外,MDS患者经常发生铁超负荷,最近的研究数据表明这对总生存率和无白血病生存率有影响。现已假定,改变铁调素(最近发现的调控铁平衡的关键激素)的产量可发挥控制铁超负荷的作用,并且铁调素的改变的产量可受炎性细胞因子如IL-6调控。最近的研究表明,MDS患者体内的铁调素和CRP(全身性炎症的标志物)的水平都升高。Santini,et al.,PLoS One,6(8),e23109,pages 1-8(2011)(Santini等人,《科学公共图书馆综合卷》,第6卷第8期,e23109,第1-8页,2011年)。这些数据表明,抑制JAK可降低CRP和铁调素的水平,从而可逆转MDS患者体内出现的炎症和铁超负荷现象。

[0020] 因此,本申请尤其提供了一种治疗有治疗需要的患者的骨髓增生异常综合征的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的JAK1选择性抑制剂或其可药用盐。本文使用的“骨髓增生异常综合征”,是指世界卫生组织在2008年提出的MDS分型(参见例如表1)。具体地讲,世界卫生组织(WHO)联合美国血液病理学会(SH)和欧洲血液病理学协会(EAHP)在1997年一同提出了新的造血系统肿瘤分型(Harris,et al.,J Clin Oncol1999;17:3835-3849(Harris等人,《临床肿瘤学杂志》,1999年,第17卷,第3835-3849页);Vardiman,et al.,Blood 2002;100:2292-2302(Vardiman等人,《血液》,2002年,第100卷,第2292-2302页))。对于MDS,WHO不仅利用来自法美英(FAB)分型的形态学标准,还引入了可用的遗传特征、生物学特性和临床特征来定义MDS的亚型(Bennett,et al.,Br J Haematol 1982;51:189-199(Bennett等人,《英国血液学杂志》,1982年,第51卷,第189-199页))。2008年,通过并入新的临床和科研信息而将WHO对MDS的分型(表1)进一步细化,以允许对单系发育异常进行与预后相关的精确亚分型(Vardiman,et al.,Blood 2009;114:937-951(Vardiman等人,《血液》,2009年,第114卷,第937-951页);Swerdlow,et al.,WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.4th Edition.Lyon France:IARC Press;2008:88-103(Swerdlow等人,《WHO造血组织和淋巴组织肿瘤分型》,第4版,法国里昂国际癌症研究机构出版,2008年,第88-103页;Bunning and Germing,“Myelodysplastic syndromes/neoplasms”,Chapter 5,Swerdlow,et al,eds.WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.(ed.4th edition):Lyon,France:IARC Press;2008:88-103(Bunning和Germing,“骨髓增生异常综合征/肿瘤”,Swerdlow等人编辑的《WHO造血组织和淋巴组织肿瘤分型》,第4版,第5章,法国里昂国际癌症研究机构出版,2008年,第88-103页))。

[0021] 表1:2008年WHO对骨髓增生异常综合征重新进行的分型

[0022]

亚型	血液	骨髓
难治性血细胞减少伴单系发育异常(RCUD)	单系血细胞减少或两系血细胞减少	1个细胞系中 $\geq 10\%$ 的细胞、 $< 5\%$ 的原始细胞发育异常
难治性贫血伴环形铁粒幼红细胞(RARS)	贫血，无原始细胞	$\geq 15\%$ 的红系前体细胞伴环形铁粒幼红细胞，仅红系细胞发育异常，原始细胞 $< 5\%$
难治性血细胞减少伴多系发育异常	血细胞减少，单核细胞 $< 1 \times 10^9/L$	≥ 2 个造血细胞系中 $\geq 10\%$ 的细胞发育异常， $\pm 15\%$ 的环形铁粒幼红细胞，原始细胞 $< 5\%$
难治性贫血伴原始细胞增多1型(RAEB-1)	血细胞减少，原始细胞 $\leq 2\%$ 至 4% ，单核细胞 $< 1 \times 10^9/L$	单系或多系发育异常，无奥氏小体，原始细胞为 5% 至 9%
难治性贫血伴原始细胞增多2型(RAEB-2)	血细胞减少，原始细胞 $\leq 5\%$ 至 19% ，单核细胞 $< 1 \times 10^9/L$	单系或多系发育异常，有或无奥氏小体，原始细胞为 10% 至 19%
骨髓增生异常综合征未分类型(MDS-U)	血细胞减少	单系发育异常或无发育异常，但具有典型的MDS细胞遗传特性，原始细胞 $< 5\%$
与孤立性del(5q)染色体相关的MDS	贫血，血小板正常或增多	单系红细胞孤立性del(5q)，原始细胞 $< 5\%$

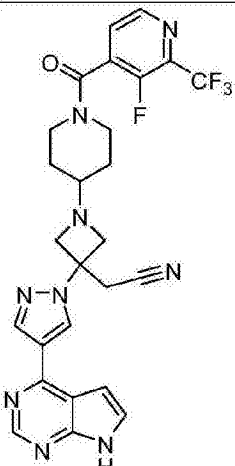
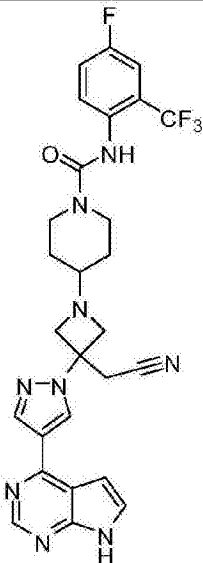
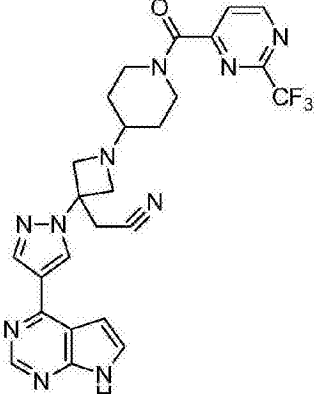
[0023] 在一些实施例中，JAK1选择性抑制剂对JAK1的选择性强于对JAK2、JAK3和TYK2的选择性。例如，本文所述的化合物或其可药用盐相较于JAK2、JAK3和TYK2中的一者或多者优先抑制JAK1。在一些实施例中，所述化合物相较于JAK2优先抑制JAK1（例如，JAK1与JAK2的 IC_{50} 之比大于1）。在一些实施例中，所述化合物或盐对JAK1的选择性大约是对JAK2的选择性的10倍。在一些实施例中，所述化合物或盐对JAK1的选择性大约是对JAK2的选择性的3倍、5倍、10倍、15倍或20倍，其中选择性通过测量ATP为1mM时的 IC_{50} 计算得到（例如，参见实例A）。

[0024] 在一些实施例中，JAK1选择性抑制剂为表2列出的化合物，或其可药用盐。

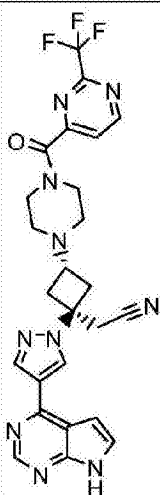
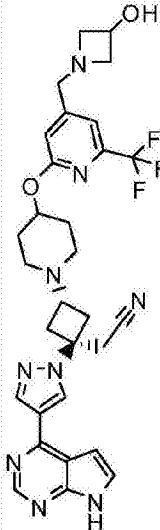
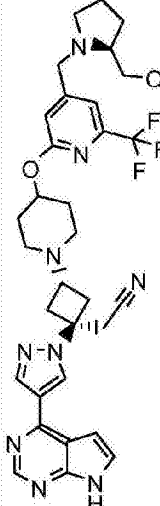
[0025] 表2

[0026]

制备例 编号	名称	结构	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
1 ^a	3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈		+	>10
2	3-(1-[1,3]噁唑并[5,4-b]吡啶-2-基吡咯烷-3-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈		+	>10
3	4-[4-{3-氰基-2-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羧基]-3-氟苄腈		+	>10
4	4-[4-{3-氰基-2-[3-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羧基]-3-氟苄腈		+	>10

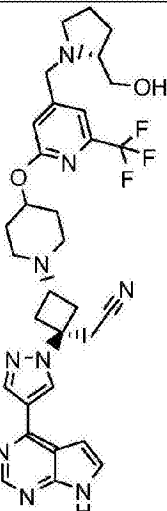
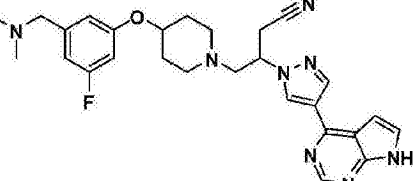
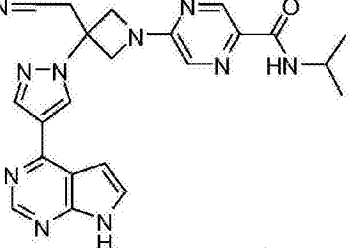
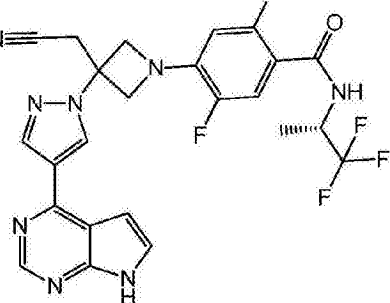
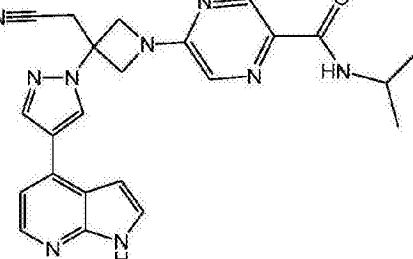
5	{1-{1-[3-氟-2-(三氟甲基)异烟酰基]哌啶-4-基}-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈		+	>10
6	4-{3-(氟甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-[4-氟-2-(三氟甲基)苯基]哌啶-1-甲酰胺		+	>10
7	[3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]-1-(1-{2-(三氟甲基)嘧啶-4-基}羰基)哌啶-4-基]氮杂环丁烷-3-基]乙腈		+	>10

[0027]

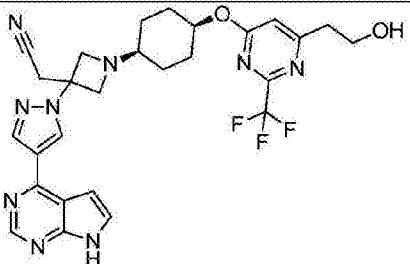
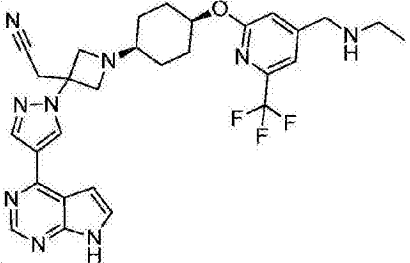
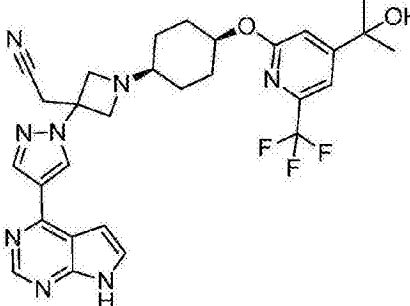
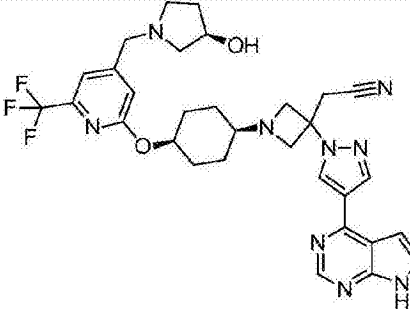
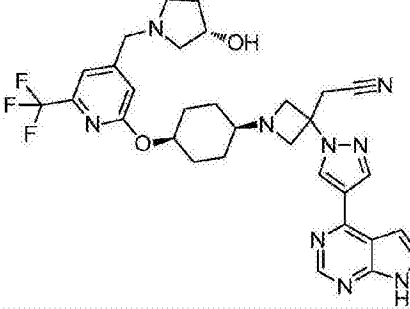
8	[反式-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]-3-(4-{[2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]羰基}哌嗪-1-基)环丁基]乙腈		+	>10
9	{反式-3-(4-{[4-[(3-羟基氮杂环丁烷-1-基)甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈		+	>10
10	{反式-3-(4-{[4-[(2S)-2-(羟甲基)吡咯烷-1-基]甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈		+	>10

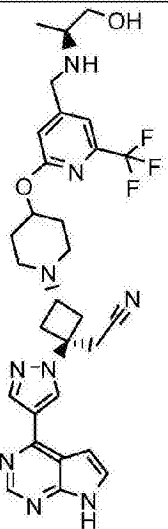
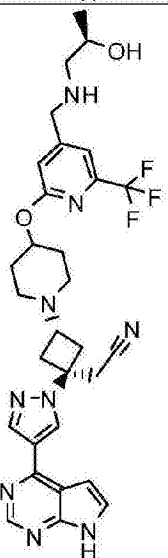
[0028]

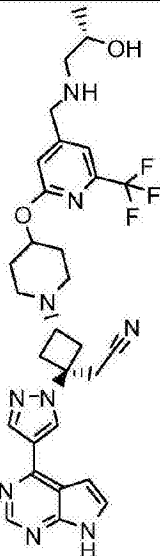
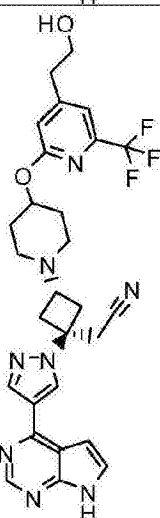
[0029]

11	{反式-3-(4-{[4-{[(2R)-2-(羟甲基)吡咯烷-1-基]甲基}-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈		+	>10
12 ^b	4-(4-{3-[(二甲氨基)甲基]-5-氟苯氧基}哌啶-1-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丁腈		+	>10
13	5-{3-(氟甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-异丙基吡嗪-2-甲酰胺		+	>10
14	4-{3-(氟甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-2,5-二氟-N-[(1S)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]苯甲酰胺		+	>10
15	5-{3-(氟甲基)-3-[4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-异丙基吡嗪-2-甲酰胺		+	>10

[0030]

16	{1-(顺式-4-{[6-(2-羟乙基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈		+	>10
17	{1-(顺式-4-{[4-[(乙氨基)甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈		+	>10
18	{1-(顺式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈		+	>10
19	{1-(顺式-4-{[4-{[(3R)-3-羟基吡咯烷-1-基]甲基}-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈		+	>10
20	{1-(顺式-4-{[4-{[(3S)-3-羟基吡咯烷-1-基]甲基}-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈		+	>10

21	{反式-3-(4-{[4-({[(1S)-2-羟基-1-甲基乙基]氨基}甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈		+	>10
[0031] 22	{反式-3-(4-{[4-({[(2R)-2-羟基丙基]氨基}甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈		+	>10

[0032]	23 {反式-3-(4-{[4-({[(2S)-2-羟丙基]氨基}甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈		+	>10
	24 {反式-3-(4-{[4-(2-羟乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈		+	>10

[0033] +是指<10nM(参见实例A的检测条件)

[0034] ^a对映异构体1的数据

[0035] ^b对映异构体2的数据

[0036] 在一些实施例中, JAK1选择性抑制剂为{1-[1-[3-氟-2-(三氟甲基)异烟酰基]哌啶-4-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈己二酸盐。

[0037] 在一些实施例中, JAK1选择性抑制剂选自(R)-3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈、(R)-3-(1-[1,3]噁唑并[5,4-b]吡啶-2-基)吡咯烷-3-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈、(R)-4-[(4-{3-氰基-2-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈、(R)-4-[(4-{3-氰基-2-[3-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡咯-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈或(R)-4-(4-{3-[(二甲氨基)甲基]-5-氟苯氧基}哌啶-1-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丁腈,或者前述任一种物质的可药用盐。

[0038] 在一些实施例中, JAK1选择性抑制剂选自(S)-3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈、(S)-3-(1-[1,3]噁唑并

[5,4-b]吡啶-2-基吡咯烷-3-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈、(S)-4-[(4-{3-氰基-2-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈、(S)-4-[(4-{3-氰基-2-[3-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡咯-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈或(S)-4-(4-{3-[(二甲氨基)甲基]-5-氟苯氧基}哌啶-1-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丁腈,或者前述任一种物质的可药用盐。

[0039] 在一些实施例中,JAK1选择性抑制剂为GLPG0634 (Galapagos公司)。

[0040] 在一些实施例中,表2的化合物按下列文献中描述的合成工序制备:2010年5月21日提交的美国专利公开第2010/0298334号,2010年8月31日提交的美国专利公开第2011/0059951号,2011年3月9日提交的美国专利公开第2011/0224190号,2011年11月18日提交的美国专利公开第2012/0149681号,2011年11月18日提交的美国专利公开第2012/0149682号,2012年6月19日提交的美国专利公开第2013/0018034号,2012年8月17日提交的美国专利公开第2013/0045963号,以及2013年5月17日提交的美国专利公开第2014/0005166号,这些专利公开各自全文以引用方式并入本文。

[0041] 在一些实施例中,JAK1抑制剂选自下列文献中的化合物:2010年5月21日提交的美国专利公开第2010/0298334号,2010年8月31日提交的美国专利公开第2011/0059951号,2011年3月9日提交的美国专利公开第2011/0224190号,2011年11月18日提交的美国专利公开第2012/0149681号,2011年11月18日提交的美国专利公开第2012/0149682号,2012年6月19日提交的美国专利公开第2013/0018034号,2012年8月17日提交的美国专利公开第2013/0045963号,以及2013年5月17日提交的美国专利公开第2014/0005166号,这些专利公开各自全文以引用方式并入本文。

[0042] 在一些实施例中,骨髓增生异常综合征为难治性血细胞减少伴单系发育异常(RCUD)。

[0043] 在一些实施例中,骨髓增生异常综合征为难治性贫血伴环形铁粒幼红细胞(RARS)。

[0044] 在一些实施例中,骨髓增生异常综合征为难治性血细胞减少伴多系发育异常。

[0045] 在一些实施例中,骨髓增生异常综合征为难治性贫血伴原始细胞增多1型(RAEB-1)。

[0046] 在一些实施例中,骨髓增生异常综合征为难治性贫血伴原始细胞增多2型(RAEB-2)。

[0047] 在一些实施例中,骨髓增生异常综合征为骨髓增生异常综合征未分类型(MDS-U)。

[0048] 在一些实施例中,骨髓增生异常综合征为与孤立性del(5q)染色体相关的骨髓增生异常综合征。

[0049] 在一些实施例中,骨髓增生异常综合征用红细胞生成刺激剂(ESA)难以治疗。在一些实施例中,用ESA难以治疗是指,施用红细胞生成素(EPO)(或等同物)至少40,000IU/周,持续8周后,Hgb未能提高至少1.5g/dL。

[0050] 在一些实施例中,患者依赖输注红血细胞(RBC)。在一些实施例中,依赖输注红血细胞是指,患者在治疗之前8周内,由于Hgb低于9g/dL,需要输注至少4单位的叠集RBC。

[0051] 在一些实施例中,与健康人群对照组相比,患者的血清铁调素水平升高。在一些实

施例中,与健康人群对照组相比,患者的血清c-反应蛋白(CRP)浓度升高。在一些实施例中,血清CRP浓度升高是指浓度等于或大于约10 μ g/mL。在一些实施例中,健康人群按Santini, et al., PLoS One, 6 (8), e23109, pages 1-8 (2011) (Santini等人,《科学公共图书馆综合卷》,第6卷第8期,e23109,第1-8页,2011年)中所述定义,该文献全文以引用方式并入本文。

[0052] 在一些实施例中,患者具有为1或2的改良格拉斯哥预后评分(modified Glasgow Prognostic Score)。改良格拉斯哥预后评分(GPS)在McMillian, Cancer Treatment Reviews, 39 (5): 534-540 (2013) (McMillian,《癌症治疗综述》,第39卷第5期,第534-540页,2013年)中描述,该文献全文以引用方式并入本文(具体地讲,评分如表1所示)。

[0053] 在一些实施例中,本发明提供了本文所述的化合物或其可药用盐(如本文任一实施例所述),所述化合物或其可药用盐在治疗本文所述的任何疾病或失调的方法中使用。在一些实施例中,本发明提供本文所述的化合物或其可药用盐(如本文任一实施例所述)的用途,其用于制备在治疗本文所述的任何疾病或失调的方法中使用的药物。

[0054] JAK1选择性抑制剂还包括本文所述化合物的可药用盐。本文使用的“可药用盐”,是指所公开化合物的衍生物,其中通过将母体化合物的现有酸或碱部分转化为其盐形式,而对该母体化合物进行改性。可药用盐的例子包括但不限于碱性残基(诸如胺类)的无机酸盐或有机酸盐、酸性残基(诸如羧酸)的碱盐或有机盐,等等。可药用盐包括例如由无毒的无机酸或有机酸形成的母体化合物的无毒盐。可药用盐可采用常规化学法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。一般来讲,此类盐可通过使这些化合物的游离酸或游离碱形式与化学计量的合适碱或酸在水中、有机溶剂中或水与有机溶剂的混合物中反应而制备;通常优选非水性介质,例如乙醚、乙酸乙酯、醇类(如甲醇、乙醇、异丙醇或丁醇)或乙腈(ACN)。合适的盐在Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418(《雷明顿药物科学》第17版,美国宾夕法尼亚州伊斯顿市麦克出版公司,1985年,第1418页)和Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977)(《药物科学杂志》,第66卷,第2页,1977年)中列出,这些文献各自全文以引用方式并入本文。在一些实施例中,本文所述的化合物包括N-氧化物形式。

[0055] 本文所述的化合物可以是不对称的(例如,有一个或多个立构中心)。除非另外指明,否则包括所有立体异构体(诸如,对映异构体和非对映异构体)。本文所述的含有被不对称取代的碳原子的化合物可被分离成旋光形式或外消旋形式。有关由无旋光性的起始物质制备旋光形式物质的方法是本领域已知的,诸如通过拆分外消旋的混合物或通过立体选择合成来制备。许多烯烃几何异构体、C=N双键等也可存在于本文所述的化合物中,本发明设想了所有此类稳定异构体。本文描述了本发明化合物的顺式和反式几何异构体,这些几何异构体可被分离为异构体混合物或单独的异构形式。

[0056] 拆分化合物的外消旋混合物可采用本领域已知的众多方法中的任一种进行。一种示例性方法包括利用手性拆分酸(其为有旋光性的成盐有机酸)进行分级重结晶。用于分级重结晶方法的合适拆分剂为(例如)有旋光性的酸,诸如D型和L型的酒石酸、二乙酰酒石酸、二苯甲酰酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸或各种有旋光性的樟脑磺酸(诸如 β -樟脑磺酸)。适用于分级重结晶方法的其他拆分剂包括立体异构纯形式的 α -甲基苄胺(例如S形式和R形式,或非对映纯形式)、2-苯甘氨酸、去甲麻黄碱、麻黄碱、N-甲基麻黄碱、环己乙胺、1,2-二氨基环己烷等。

[0057] 拆分外消旋混合物也可通过在填充了有旋光性的拆分剂(如,二硝基苯甲酰苯基甘氨酸)的柱上洗脱来进行。合适的洗脱溶剂组合物可由本领域技术人员确定。

[0058] 本文所述的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式来源于单键与相邻双键的对换连同相伴出现的质子迁移。互变异构形式包括质子转移互变异构体,其为具有相同经验式和总电荷的同分异构质子化状态。示例性的质子转移互变异构体包括酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺-亚胺对以及其中质子可占据杂环体系中的两个或更多个位置的环状形式,例如1H-和3H-咪唑、1H-、2H-和4H-1,2,4-三唑、1H-和2H-异吡啶以及1H-和2H-吡唑。互变异构形式可处于平衡状态,也可通过合适的取代被立体地锁定为一种形式。

[0059] 本发明的化合物还可包含出现在中间体或最终化合物中的原子的所有同位素。同位素包括原子序数相同但质量数不同的那些原子。例如,氢的同位素包括氘。

[0060] 本文所用的术语“化合物”,旨在包括所示结构的所有立体异构体、几何异构体、互变异构体和同位素。另外,除非另外指明,否则本文通过名称或结构鉴定为一种特定互变异构形式的化合物旨在包括其他互变异构形式。

[0061] 所有化合物及其可药用盐可与其他物质(诸如,水和溶剂)共同存在(如,水合物与溶剂合物),也可与其他物质分离。

[0062] 在一些实施例中,本文所述的化合物或其盐被基本上分离。所谓“被基本上分离”,是指化合物至少部分地或基本上从其形成环境或检测环境中分开。“部分地分开”可包括例如富含本发明所述化合物的组合物。“基本上分开”可包括含有按重量计至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少约99%的本发明所述化合物或其盐的组合物。分离化合物及其盐的方法是本领域的常规方法。

[0063] 本文使用的术语“个体”或“患者”可互换,用来指任何动物,包括哺乳动物,优选小鼠、大鼠、其他啮齿动物、兔、狗、猫、猪、牛、羊、马或灵长类动物,最优选人类。

[0064] 本文使用的短语“治疗有效量”,是指可引起生物学响应或药物响应的活性化合物或药剂的用量,所述响应由研究者、兽医、医师或其他临床医生在组织、系统、动物、个体或人体中寻求。在一些实施例中,治疗有效量为约1mg至约100mg、约1mg至约20mg、约4mg至约10mg、约5mg至约1000mg、或约10mg至约500mg。在一些实施例中,治疗有效量为每日一次4mg、6mg或10mg。

[0065] 本文所用的短语“可药用”,是指在可靠的医学判断范围内适用于与人类和动物的组织接触而不会产生过度的毒性、刺激、变态反应或者其他问题或并发症,同时与合理的益处/风险率相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0066] 本文使用的术语“治疗”,是指下列一种或多种:(1)预防疾病,例如预防可能有出现疾病、病症或失调的倾向,但还未经历或表现该疾病的病态或症状的个体患上该疾病、病症或失调;(2)抑制疾病,例如抑制正经历或表现疾病、病症或失调的病态或症状的个体的该疾病、病症或失调(即,阻止病态和/或症状进一步发展);(3)减轻疾病,例如减轻正经历或表现疾病、病症或失调的病态或症状的个体的该疾病、病症或失调(即,逆转病态和/或症状,诸如降低疾病的严重程度)。

[0067] 联合疗法

[0068] 本文所述的方法还可包括施用一种或多种额外的治疗剂。所述一种或多种额外的

治疗剂既可同时施用给患者,也可循序施用给患者。

[0069] 在一些实施例中,该方法还包括施用选自IMiD、抗IL-6剂、抗TNF- α 剂、低甲基化剂和生物应答调节剂(BRM)的额外治疗剂。

[0070] 一般来讲,BRM是由活生物体产生的用于治疗疾病的物质,该物质既可在机体内天然产生、也可在实验室中制备。BRM的例子包括IL-2、干扰素、各种类型的集落刺激因子(CSF、GM-CSF、G-CSF)、单克隆抗体(诸如阿昔单抗、依那西普、英夫利昔单抗、利妥昔单抗、曲妥单抗)和高剂量抗坏血酸盐。

[0071] 在一些实施例中,抗TNF- α 剂为英夫利昔单抗和依那西普。

[0072] 在一些实施例中,低甲基化剂为DNA甲基转移酶抑制剂。在一些实施例中,DNA甲基转移酶抑制剂选自5-氮杂胞苷和地西他滨。

[0073] 一般来讲,IMiD用作免疫调节剂。在一些实施例中,IMiD选自沙利度胺、雷利度胺、泊马度胺、CC-11006和CC-10015。

[0074] 在一些实施例中,该方法还包括施用选自抗胸腺细胞球蛋白、重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-单核细胞CSF(GM-CSF)、红细胞生成刺激剂(ESA)和环孢菌素的额外治疗剂。

[0075] 在一些实施例中,该方法还包括向患者施用额外的JAK抑制剂。在一些实施例中,额外的JAK抑制剂为托法替尼或鲁索替尼。

[0076] 一种或多种额外的治疗剂可包括化学治疗剂、抗炎剂、类固醇、免疫抑制剂以及Bcr-Abl激酶抑制剂、Flt-3激酶抑制剂、RAF激酶抑制剂和FAK激酶抑制剂(诸如在WO 2006/056399中描述的那些,该专利全文以引用方式并入本文),或可与本文所述的化合物联合使用的其他治疗剂。

[0077] 示例性的化学治疗剂包括蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米)、沙利度胺、来那度胺和DNA损伤剂(诸如美法仑、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、依托泊苷、卡莫司汀等)。

[0078] 示例性的类固醇包括皮质类固醇,诸如地塞米松或泼尼松。

[0079] 示例性的Bcr-Abl抑制剂包括美国专利第5,521,184号、WO 04/005281和美国专利序列号60/578,491中所公开属种的化合物及其可药用盐,这些专利各自全文以引用方式并入本文。

[0080] 示例性的合适Flt-3抑制剂包括WO 03/037347、WO 03/099771和WO 04/046120中公开的化合物及其可药用盐,这些专利各自全文以引用方式并入本文。

[0081] 示例性的合适RAF抑制剂包括WO 00/09495和WO 05/028444中公开的化合物及其可药用盐,这两篇专利各自全文以引用方式并入本文。

[0082] 示例性的合适FAK抑制剂包括WO 04/080980、WO 04/056786、WO 03/024967、WO 01/064655、WO 00/053595和WO 01/014402中公开的化合物及其可药用盐,这些专利各自全文以引用方式并入本文。

[0083] 在一些实施例中,可将一种或多种本发明的化合物与一种或多种其他激酶抑制剂(包括伊马替尼)联合使用,尤其适于治疗抗伊马替尼或其他激酶抑制剂的患者。

[0084] 在一些实施例中,合适的化学治疗剂可选自抗代谢剂、拓扑异构酶1抑制剂、铂类似物、紫杉烷、蒽环类化合物和EGFR抑制剂,以及这些物质的组合。

[0085] 在一些实施例中,抗代谢剂包括卡培他滨、吉西他滨和氟尿嘧啶(5-FU)。

[0086] 在一些实施例中,紫杉烷包括紫杉醇、Abraxane[®] (用于可注射混悬剂的紫杉醇蛋白质结合颗粒)和Taxotere[®] (多西他赛)。

[0087] 在一些实施例中,铂类似物包括奥沙利铂、顺铂和卡铂。

[0088] 在一些实施例中,拓扑异构酶1抑制剂包括伊立替康和拓扑替康。

[0089] 在一些实施例中,葱环类化合物包括多柔比星或多柔比星的脂质体制剂。

[0090] 在一些实施例中,化学治疗剂为FOLFIRINOX (5-FU、醛氢叶酸、伊立替康和奥沙利铂)。在一些实施例中,化学治疗剂为吉西他滨和Abraxane[®] (用于可注射混悬剂的紫杉醇蛋白质结合颗粒)。

[0091] 在一些实施例中,额外的治疗剂为美法仑、美法仑联合泼尼松 [MP]、多柔比星、地塞米松和Velcade (硼替佐米)。用于治疗多发性骨髓瘤的其他额外治疗剂包括Bcr-Abl激酶抑制剂、Flt-3激酶抑制剂、RAF激酶抑制剂和FAK激酶抑制剂。这些治疗剂可与本发明的化合物组合成单一剂型或连续剂型,也可作为单独的剂型同时施用或循序施用。

[0092] 在一些实施例中,将皮质类固醇 (诸如地塞米松) 与至少一种JAK1选择性抑制剂联合施用给患者,其中间歇地而非连续地施用地塞米松。

[0093] 在一些另外的实施例中,可在骨髓移植或干细胞移植之前、期间和/或之后,将一种或多种JAK1选择性抑制剂与其他治疗剂的组合施用给患者。

[0094] 在一些实施例中,额外治疗剂为醋酸氟轻松(Retisert[®])或利美索龙 (AL-2178, Vexol, 爱尔康公司 (Alcon))。

[0095] 在一些实施例中,额外治疗剂为环孢菌素(Restasis[®])。

[0096] 在一些实施例中,额外治疗剂为皮质类固醇。在一些实施例中,皮质类固醇为曲安西龙、地塞米松、氟轻松、可的松、泼尼松龙或氟甲龙 (flumetholone)。

[0097] 在一些实施例中,额外治疗剂选自Dehydrex[™] (Holles Labs)、Civamide (Opko)、透明质酸钠 (Vismed, Lantibio/TRB Chemedica)、环孢菌素 (ST-603, 西里昂治疗公司 (Sirion Therapeutics))、ARG101 (T) (睾酮, Argentis)、AGR1012 (P) (Argentis)、依卡倍特钠 (Senju-Ista)、吉法酯 (参天制药公司 (Santen))、15-(s)-羟基二十碳四烯酸 (15(S)-HETE)、西维美林 (cevimeline)、强力霉素 (ALTY-0501, Alacritty)、米诺环素、iDestrin[™] (NP50301, Nascent 制药公司 (Nascent Pharmaceuticals))、环孢菌素A (Nova22007, 诺瓦加利制药公司 (Novagali))、氧四环素 (耐久霉素, MOLI1901, Lantibio)、CF101 (2S, 3S, 4R, 5R)-3,4-二羟基-5-[6-[(3-碘苯基)甲基氨基]嘌呤-9-基]-N-甲基-氧杂环戊烷-2-氨基甲酰, Can-Fite 生物制药公司 (Can-Fite Biopharma))、伏环孢素 (LX212或LX214, 勒克斯生物科学公司 (Lux Biosciences))、ARG103 (Agentis)、RX-10045 (合成消退素类似物, 瑞瑟露公司 (Resolvix))、DYN15 (戴安斯治疗股份有限公司 (Dyanmis Therapeutics))、来格列酮 (DE011, 第一三共株式会社 (Daiichi Sanko))、TB4 (雷金纳克斯生物制药公司 (RegeneRx))、OPH-01 (Ophtalmis Monaco)、PCS101 (派瑞克科学公司 (Pericor Science))、REV1-31 (Evolutec)、催泪蛋白 (Senju)、瑞巴派特 (大冢制药-诺华公司 (Otsuka-Novartis))、OT-551 (Othera)、PAI-2 (美国宾夕法尼亚大学和天普大学)、匹鲁卡品、他克莫司、吡美莫司 (AMS981, 诺华公司 (Novartis))、氯替泼诺、利妥昔单抗、地夸磷索四钠 (INS365, Inspire)、KLS-0611 (Kissei Pharmaceuticals)、脱氢表雄酮、阿那白滞素、依法

利珠单抗、霉酚酸钠、依那西普(Embrel[®])、羟化氯喹、NGX267(TorreyPines Therapeutics)、托珠单抗、吉西他滨、奥沙利铂、左旋天冬酰胺酶或沙利度胺。

[0098] 在一些实施例中,额外治疗剂为抗血管生成剂、胆碱能激动剂、TRP-1受体调节剂、钙通道阻滞剂、粘蛋白促分泌素、MUC1兴奋剂、钙调磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、P2Y2受体激动剂、毒蕈碱性受体激动剂、mTOR抑制剂、另一种JAK抑制剂、Bcr-Abl激酶抑制剂、Flt-3激酶抑制剂、RAF激酶抑制剂和FAK激酶抑制剂,诸如WO 2006/056399中描述的那些激酶抑制剂,该专利全文以引用方式并入本文。在一些实施例中,额外治疗剂为四环素衍生物(例如,米诺环素或强力霉素)。在一些实施例中,额外治疗剂结合到FKBP12。

[0099] 在一些实施例中,额外治疗剂是烷化剂或DNA交联剂;抗代谢物/去甲基化剂(例如5-氟尿嘧啶、卡培他滨或阿扎胞苷);抗激素治疗剂(例如,激素受体拮抗剂、SERM或芳香化酶抑制剂);有丝分裂抑制剂(例如长春新碱或紫杉醇);拓扑异构酶(I型或II型)抑制剂(例如米托蒽醌和伊立替康);细胞凋亡诱导剂(例如ABT-737);核酸治疗剂(例如反义核酸或RNAi);核受体配体(例如激动剂和/或拮抗剂:全反式视黄酸或蓓萨罗丁);表观遗传学靶向剂,诸如组蛋白脱乙酰酶抑制剂(例如伏立诺他)、低甲基化剂(例如地西他滨);蛋白质稳定性调节剂,诸如Hsp90抑制剂、泛素和/或泛素样缀合分子或早期解离分子;或者EGFR抑制剂(埃罗替尼)。

[0100] 药物制剂和剂型

[0101] JAK1选择性抑制剂在用作药物时,可按药物组合物的形式施用。这些组合物可采用制药领域熟知的方式来制备,而且可通过多种途径施用,具体取决于需要的是局部治疗还是全身治疗,以及待治疗的部位。给药可为局部给药(包括透皮给药、表皮给药、眼部给药和黏膜给药(包括鼻内、阴道和直肠递送))、经肺给药(例如,通过吸入或吹入粉剂或气雾剂,包括利用喷雾器;气管内或鼻内给药)、口腔给药或肠胃外给药。肠胃外给药包括静脉内给药、动脉内给药、皮下给药、腹膜内给药、肌肉内给药、注射或输液;或者颅内给药,例如鞘内给药或脑室内给药。肠胃外给药可以是单次推注剂量形式,也可例如采用持续灌注泵完成。用于局部给药的药物组合物和制剂可包括透皮贴剂、软膏剂、洗剂、霜剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体制剂和散剂。常规的药物载体,水性、粉末或油性基质,增稠剂等可能是必要的或期望的。

[0102] 本发明还包括药物组合物,这些药物组合物包含本文所述的JAK1选择性抑制剂或其可药用盐作为活性成分,以及一种或多种可药用的载体(赋形剂)。在一些实施例中,该组合物适用于局部给药。在制备组合物的过程中,通常将活性成分与赋形剂混合、用赋形剂稀释活性成分,或将活性成分包封在例如胶囊、小袋、纸张或其他容器等形式的载体内。赋形剂用作稀释剂时,可为固体、半固体或液体材料,用于充当活性成分的溶媒、载体或介质。因此,所述组合物可以是下列形式:片剂、丸剂、散剂、锭剂、小药囊、扁囊剂、酏剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂(作为固体,或处于液体介质中)、含有例如最高10重量%的活性化合物的软膏剂、软明胶胶囊和硬明胶胶囊、栓剂、无菌可注射溶液剂,以及无菌包装散剂。

[0103] 在制备制剂的过程中,可研磨活性化合物,以提供适当的粒度,然后再与其他成分混合。如果活性化合物基本上不溶解,则可将其研磨成小于200目的粒度。如果活性化合物基本上可溶于水,则可通过研磨来调整其粒度(例如约40目),以使其基本上均匀地分布在制剂中。

[0104] JAK1选择性抑制剂可使用已知的研磨方法(诸如湿磨法)进行研磨,以获得适于形成片剂和其他制剂类型的粒度。JAK1选择性抑制剂的细粉碎(纳米颗粒)制剂可采用本领域已知的工艺制备,例如,参见国际申请第WO 2002/000196号。

[0105] 合适赋形剂的一些例子包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、海藻酸盐、黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆和甲基纤维素。所述制剂可额外包含:润滑剂(诸如滑石、硬脂酸镁和矿物油)、润湿剂、乳化剂和助悬剂、防腐剂(诸如羟基苯甲酸甲酯和羟基苯甲酸丙酯)、甜味剂和调味剂。所述组合可被配制在采用本领域已知的方法施用给患者后,快速、持续或延迟释放活性成分。

[0106] 在一些实施例中,所述药物组合物包含硅化微晶纤维素(SMCC),以及本文所述的至少一种化合物或其可药用盐。在一些实施例中,硅化微晶纤维素包含按重量计约98%的微晶纤维素和约2%的二氧化硅。

[0107] 在一些实施例中,所述组合物是持续释放组合物,包含本文所述的至少一种JAK1选择性抑制剂或其可药用盐,以及至少一种可药用的载体。在一些实施例中,所述组合物包含本文所述的至少一种JAK1选择性抑制剂或其可药用盐,以及选自微晶纤维素、乳糖一水合物、羟丙基甲基纤维素和聚环氧乙烷的至少一种组分。在一些实施例中,所述组合物包含本文所述的至少一种JAK1选择性抑制剂或其可药用盐,以及微晶纤维素、乳糖一水合物和羟丙基甲基纤维素。在一些实施例中,所述组合物包含本文所述的至少一种JAK1选择性抑制剂或其可药用盐,以及微晶纤维素、乳糖一水合物和聚环氧乙烷。在一些实施例中,所述组合物还包含硬脂酸镁或二氧化硅。在一些实施例中,微晶纤维素是Avicel PH102™。在一些实施例中,乳糖一水合物是Fast-flo 316™。在一些实施例中,羟丙基甲基纤维素是羟丙基甲基纤维素2208 K4M(例如,Methocel K4 M Premier™)和/或羟丙基甲基纤维素2208 K100LV(例如,Methocel K00LV™)。在一些实施例中,聚环氧乙烷是聚环氧乙烷WSR 1105(例如,Polyox WSR 1105™)。

[0108] 在一些实施例中,使用湿法制粒工艺来生产所述组合物。在一些实施例中,使用干法制粒工艺来生产所述组合物。

[0109] 所述组合物可按单位剂型配制,每剂量含有约5mg至约1,000mg(1g)活性成分,更通常含有约100mg至约500mg活性成分。在一些实施例中,每剂量含有约10mg活性成分。在一些实施例中,每剂量含有约50mg活性成分。在一些实施例中,每剂量含有约25mg活性成分。术语“单位剂型”,是指适合用作供人类受试者和其他哺乳动物使用的单一剂量的物理上分立的单位,每单位含有预定量的经计算可产生所需治疗效果的活性物质以及合适的药物赋形剂。

[0110] 在一些实施例中,所述组合物含有约2mg至约10mg、或者约5mg至约50mg的活性成分。本领域的普通技术人员将会知道,这体现为含有约2mg至约10mg、5mg至约10mg、约10mg至约15mg、约15mg至约20mg、约20mg至约25mg、约25mg至约30mg、约30mg至约35mg、约35mg至约40mg、约40mg至约45mg、或约45mg至约50mg的活性成分的化合物或组合物。

[0111] 在一些实施例中,所述组合物含有约50mg至约500mg的活性成分。本领域的普通技术人员将会知道,这体现为含有约50mg至约100mg、约100mg至约150mg、约150mg至约200mg、约200mg至约250mg、约250mg至约300mg、约350mg至约400mg、或约450mg至约500mg的活性成分的化合物或组合物。

[0112] 在一些实施例中,所述组合物含有约500mg至约1,000mg的活性成分。本领域的普通技术人员将会知道,这体现为含有约500mg至约550mg、约550mg至约600mg、约600mg至约650mg、约650mg至约700mg、约700mg至约750mg、约750mg至约800mg、约800mg至约850mg、约850mg至约900mg、约900mg至约950mg、或约950mg至约1,000mg的活性成分的化合物或组合物。

[0113] 活性化合物可在宽剂量范围内有效,并通常以药学上有效的量施用。然而,应当理解,实际施用的化合物量往往将由医师依据有关情况来判定,这些有关情况包括待治疗的病症、所选择的给药途径、所施用的实际化合物,个体患者的年龄、体重和响应,患者症状的严重程度,等等。

[0114] 为制备固体组合物(诸如片剂),将主要活性成分与药物赋形剂混合,以形成含有本文所述化合物或其可药用盐的均质混合物的固体预制剂组合物。要是提及这些预制剂组合物为均质的,则活性成分通常均匀地分散遍及组合物,因此组合物可被轻易地细分为效果相同的单位剂型,诸如片剂、丸剂和胶囊。随后将这种固体预制剂细分为上述类型的单位剂型,所述单位剂型含有例如约0.1mg至约1000mg的本发明所述活性成分。

[0115] 片剂或丸剂可被包衣或以其他方式配混,以提供具有长效优点的剂型。例如,片剂或丸剂可包含内剂量组分和外剂量组分,外剂量组分为内剂量组分上的包层的形式。这两种组分可被肠溶层分开,肠溶层用于抵抗胃内崩解,并允许内部组分完好无损地经过胃进入十二指肠,或延迟释放。可使用多种材料来制作这类肠溶层或肠溶包衣,这些材料包括多种聚合酸,以及聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素之类材料的混合物。

[0116] 可掺有所述化合物和组合物以供口服给药或注射给药的液体剂型包括:水性溶液剂、适当调味的糖浆剂、水性或油性混悬剂、含食用油(诸如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)的调味乳剂,以及酞剂和类似的药用溶媒。

[0117] 用于吸入或吹入的组合物包括可药用的水性溶剂、有机溶剂或这两类溶剂的混合物中的溶液剂和混悬剂,以及散剂。所述液体或固体组合物可含有合适的如上文所述的可药用赋形剂。在一些实施例中,所述组合物经由口服途径或鼻吸入途径给药,以实现局部或全身效应。所述组合物可利用惰性气体来雾化。雾化的溶液可从雾化装置直接吸入,或者,雾化装置可附接至面罩面帐(face masks tent)或间歇式正压呼吸机。溶液剂组合物、混悬剂组合物或散剂组合物可经口施用,也可由按适当的方式递送制剂的装置经鼻施用。

[0118] 局部制剂可含有一种或多种常规载体。在一些实施例中,软膏剂可含有水和一种或多种疏水性载体,疏水性载体选自例如液体石蜡、聚氧乙烯烷基醚、丙二醇、白凡士林等。霜剂的载体组合物可基于水与甘油以及一种或多种其他组分的组合,所述一种或多种其他组分例如甘油单硬脂酸酯、PEG-甘油单硬脂酸酯和鲸蜡硬脂醇。凝胶剂可使用异丙醇和水,与其他组分适当地组合来配制,所述其他组分为诸如甘油、羟乙基纤维素等。在一些实施例中,局部制剂含有按重量计至少约0.1%、至少约0.25%、至少约0.5%、至少约1%、至少约2%或至少约5%的本文所述化合物,或其可药用盐。所述局部制剂可适当地封装在例如100g的管中,这些管任选地附带有治疗所选适应症(例如,银屑病或其他皮肤病)的用法说明。

[0119] 施用给患者的化合物或组合物的量将因所施用的具体物质、给药目的(诸如,预防或治疗)、患者的状态、给药方式等不同而异。在治疗应用中,可将组合物按足以治愈或至少

部分地控制疾病症状及其并发症的量施用给已患病的患者。有效剂量将取决于正在治疗的病情,以及主治临床医生依据诸如疾病的严重程度、患者的年龄、体重和一般状况等因素做出的判断。

[0120] 施用给患者的组合物可为上述药物组合物的形式。这些组合物可采用常规的灭菌技术来灭菌,也可无菌过滤。水性溶液剂可被包装好以便按原样使用,也可被冻干;使用冻干制剂时,先与无菌水性载体混合,再施用。化合物制剂的pH通常为3至11,更优选为5至9,最优选为7至8。应当理解,使用某些前述赋形剂、载体或稳定剂将导致形成药用盐。

[0121] 本文所述的JAK1选择性抑制剂或其可药用盐的治疗剂量可依据例如治疗的具体用途、化合物的给药方式、患者的健康状况和病情,以及处方医师所做的判断而变化。本文所述化合物或其可药用盐在药物组合物中的比例或浓度可因许多因素不同而异,这些因素包括剂量、化学特性(例如,疏水性)和给药途径。例如,JAK1选择性抑制剂可按含有重量体积比为约0.1%至约10%的所述化合物的生理缓冲水性溶液剂提供,用于肠胃外给药。一些典型的剂量范围是每天约1 μ g/kg体重至约1g/kg体重。在一些实施例中,剂量范围是每天约0.01mg/kg体重至约100mg/kg体重。剂量有可能取决于诸如下列变量:疾病或失调的类型和进展程度、特定患者的总体健康状况、所选化合物的相对生物学功效、赋形剂的配方,以及给药途径。有效剂量可从来源于体外测试体系或动物模型测试体系的剂量响应曲线推知。

[0122] 本发明的组合物还可包含一种或多种额外的药剂,诸如化学治疗剂、类固醇、抗炎化合物或免疫抑制剂,这些额外药剂的例子在上文列出。

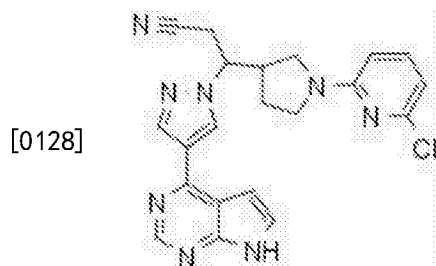
[0123] 试剂盒

[0124] 本发明还包括可用于例如治疗或预防骨髓增生异常综合征的药物试剂盒,所述试剂盒包括一个或多个容器,这些容器装有包含治疗有效量的本文所述化合物或其可药用盐的药物组合物。如果需要,此类试剂盒还可包括各种常规药物试剂盒部件中的一种或多种,诸如装有一种或多种可药用载体的容器、额外的容器等,这对于本领域的技术人员来说将是显而易见的。试剂盒中也可装有使用说明(为说明书或标签的形式,用来指示待施用组分的量)、给药指南和/或有关混合组分的指南。

[0125] 实例

[0126] 下文将借助具体的实例来更详细地描述本发明。提供以下各实例是为了进行示意性的说明,并非旨在以任何方式限制本发明。本领域的技术人员会很容易认识到,改变或修改多种非关键参数,可得到基本相同的结果。依据本文所述的至少一种测定法,已发现各实例中的化合物都是JAK抑制剂。

[0127] 实例1:3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(分离出两种不同的对映异构体)



[0129] 步骤1:3-{2-氰基-1-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,

3-d] 嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基] 乙基] 吡咯烷-1-羧酸苄酯

[0130] 将3-[2-氰乙烯基]吡咯烷-1-羧酸苄酯(4.3g, 0.017mol, 按WO 2007/070514的实例742中所述制备的E异构体和Z异构体的混合物)溶解在乙腈(270mL)中。添加1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(5.02mL, 0.0336mol), 接着添加4-(1H-吡唑-4-基)-7-[[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(5.6g, 0.017mol, 按WO 2007/070514的实例65中所述制备)。室温下搅拌混合物过夜。旋转蒸发除去溶剂, 将残余物重新溶解在乙酸乙酯中。依次用1N HCl、水、饱和碳酸氢钠与盐水洗涤该溶液, 置于硫酸钠上方干燥后, 真空浓缩。利用快速柱层析, 在硅胶上用己烷中的0-100%乙酸乙酯进行梯度洗脱, 来纯化产物, 得到非对映异构体1(首先洗脱出来)(3.5g, 36%)和非对映异构体2(稍后洗脱出来)(2.5g, 25%)。LCMS (M+H)⁺: 572.2。

[0131] 步骤2: 3-吡咯烷-3-基-3-[4-(7-[[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈

[0132] 将3-{2-氰基-1-[4-(7-[[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]乙基]吡咯烷-1-羧酸苄酯(3.5g, 6.1mmol) (来自实例1的步骤1的非对映异构体1)溶解在100mL甲醇中, 添加催化量的10%Pd-C。在50psi氢气中将混合物振荡24小时。然后过滤该混合物, 并且真空除去溶剂。产物不作进一步纯化即被使用。LCMS (M+H)⁺: 438.2。

[0133] 步骤3: 3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7-[[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈

[0134] 将3-吡咯烷-3-基-3-[4-(7-[[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(150mg, 0.27mmol)、2,6-二氯吡啶(48.7mg, 0.329mmol)在NMP(1.6mL)中的混合物与N,N-二异丙基乙胺(96μL, 0.55mmol)的混合物微波加热到135℃, 维持20分钟。利用快速柱层析, 在硅胶上用己烷中的0-80%乙酸乙酯进行梯度洗脱来进行纯化, 得到标题产物(28mg, 18%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ8.85 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.37 (dd, 1H), 6.79 (d, 1H), 6.57 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.45 (dt, 1H), 3.91 (dd, 1H), 3.57-3.46 (m, 3H), 3.39-3.29 (m, 2H), 3.24 (dd, 1H), 3.13-3.01 (m, 1H), 3.01 (dd, 1H), 1.98-1.88 (m, 1H), 1.82-1.69 (m, 1H), 0.95-0.88 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 549.1。

[0135] 利用手性HPLC(手性技术有限公司(Chiral Technologies)的Chiralcel 0J-H, 5μm, 30×250mm, 45%乙醇/己烷, 20mL/min)将该外消旋产物分离成对映异构体, 得到对映异构体1(首先洗脱出来, 保留时间40.7min)和对映异构体2(稍后洗脱出来, 保留时间51.6min), 这两个对映异构体分别在步骤4a、4b中去保护。

[0136] 步骤4a: 3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(对映异构体1)

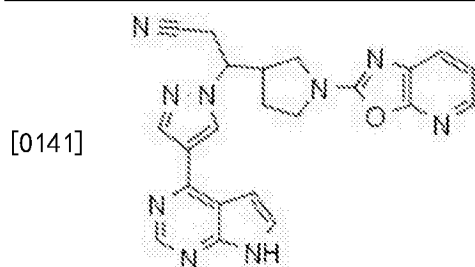
[0137] 将3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7-[[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(来自步骤3的对映异构体1)置于含有1:1TFA/DCM(2mL)的溶液中搅拌2小时, 然后浓缩。将残余物溶解在1mL MeOH中, 加入0.2mL EDA。经由制备型HPLC/MS(C18柱, 用含有0.15%NH₄OH的ACN/H₂O梯度洗脱)进行纯化, 得到产物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ9.44 (br s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 7.39 (dd,

1H), 7.38 (dd, 1H), 6.79 (dd, 1H), 6.58 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 4.46 (dt, 1H), 3.92 (dd, 1H), 3.55-3.48 (m, 1H), 3.39-3.31 (m, 2H), 3.25 (dd, 1H), 3.13-3.02 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H), 2.00-1.88 (m, 1H), 1.84-1.71 (m, 1H); LCMS (M+H)⁺: 419.1。

[0138] 步骤4b: 3-[1-(6-氯吡啶-2-基)吡咯烷-3-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(对映异构体2)

[0139] 使用来自步骤3的对映异构体2, 按步骤4a中所述操作: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 9.59 (br s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 7.40 (dd, 1H), 7.38 (dd, 1H), 6.79 (dd, 1H), 6.58 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 4.46 (dt, 1H), 3.92 (dd, 1H), 3.55-3.48 (m, 1H), 3.39-3.31 (m, 2H), 3.25 (dd, 1H), 3.14-3.02 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H), 1.99-1.90 (m, 1H), 1.83-1.72 (m, 1H); LCMS (M+H)⁺: 419.1。

[0140] 实例2: 3-(1-[1,3]噁唑并[5,4-b]吡啶-2-基吡咯烷-3-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(分离出一种对映异构体)



[0142] 步骤1: 3-(1-[1,3]噁唑并[5,4-b]吡啶-2-基吡咯烷-3-基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈

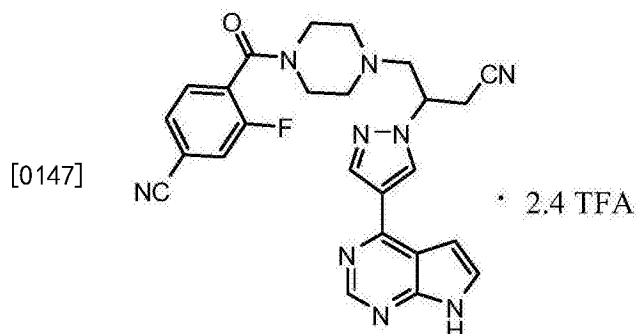
[0143] 将1,4-二氧杂环己烷(30mL)中的噁唑并[5,4-b]吡啶-2(1H)-硫酮(1.17g, 7.68mmol, 按US 2010/0298334的实例33的步骤4所述制备)和3-吡咯烷-3-基-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(2.80g, 6.40mmol, 来自实例15的步骤3)加热到70℃维持2小时。真空除去溶剂。用乙醇(40mL)复溶粗产物, 用20个小时分批加入硝酸银(3g, 15mmol)和氢氧化铵水溶液(6mL)进行处理。然后向反应混合物中添加水、1N NaOH和盐水。过滤除去不可溶物质。分离滤液的各层。用三份乙酸乙酯萃取含水部分。将萃取物置于硫酸钠上方干燥, 滗析并浓缩。利用快速柱层析, 在硅胶上用10% MeOH/DCM洗脱, 来纯化粗产物, 得到灰白色泡沫产物(2.84g, 80%)。 ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 8.83 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.92 (dd, 1H), 7.57 (dd, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.13 (dd, 1H), 6.78 (d, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.52 (dt, 1H), 4.05 (dd, 1H), 3.82 (ddd, 1H), 3.67-3.44 (m, 4H), 3.25 (dd, 1H), 3.24-3.09 (m, 1H), 2.98 (dd, 1H), 2.06-1.74 (m, 2H), 0.97-0.88 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 556.1。

[0144] 步骤2: 3-(1-[1,3]噁唑并[5,4-b]吡啶-2-基吡咯烷-3-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈

[0145] 将3-(1-[1,3]噁唑并[5,4-b]吡啶-2-基吡咯烷-3-基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙腈(5.35g, 9.63mmol, 利用步骤1的方法制备)置于DCM和TFA的2:1混合物(60mL)中搅拌6小时。旋转蒸发除去溶剂。将粗制残余物溶解在含有EDA(5.15mL, 77.0mmol)的甲醇(50mL)中, 搅拌过夜。除去溶剂后, 利用快速柱层析, 在硅胶上用0-15% MeOH/DCM(3.59g, 88%)进行梯度洗脱, 来

纯化产物。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) : δ 8.72 (s, 1H) , 8.40 (s, 1H) , 8.34 (s, 1H) , 7.89 (dd, 1H) , 7.54 (dd, 1H) , 7.36 (d, 1H) , 7.12 (dd, 1H) , 6.75 (d, 1H) , 4.56 (dt, 1H) , 4.01 (dd, 1H) , 3.80 (ddd, 1H) , 3.60 (ddd, 1H) , 3.48 (dd, 1H) , 3.26 (dd, 1H) , 3.21–3.06 (m, 1H) , 3.02 (dd, 1H) , 2.03–1.76 (m, 2H) ; LCMS (M+H) $^+$: 426.1。

[0146] 实例3: 4-[(4-{3-氰基-2-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈三氟乙酸盐(分离出单一对映异构体)



[0148] 步骤1: (R)-和(S)-4-{3-氰基-2-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0149] 将1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(5.5mL, 0.037mol)加入(E)-和(Z)-4-(3-氰基烯丙基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(11.1g, 0.0441mol, 按US2011/0059951的实例1的步骤1至2所述制备)和4-(1H-吡唑-4-基)-7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(11.6g, 0.0368mol, 按W02007/070514的实例65所述制备)溶于乙腈(70mL)的溶液中。50℃下搅拌混合物15小时。真空除去溶剂。将残余物溶解在乙酸乙酯中, 用水洗涤三次, 再用盐水洗涤一次, 置于硫酸钠上方干燥, 然后浓缩。进行快速柱层析, 接着进行制备型HPLC-MS(用含有0.15% NH_4OH 的MeCN/ H_2O 梯度洗脱), 得到白色泡沫产物(8.20g, 39%)。

[0150] 利用手性HPLC将外消旋混合物分离成单一对映异构体(Phenomenex Lux-Cellulose-2, 21.2×250mm, 5 μm , 用30%乙醇/70%己烷洗脱, 流速20mL/min)。峰1(首先洗脱出来): 4.0g, 峰2(稍后洗脱出来): 4.0g。 ^1H NMR峰1(400MHz, CDCl_3) : δ 8.84 (s, 1H) , 8.33 (s, 1H) , 8.31 (s, 1H) , 7.40 (d, 1H) , 6.79 (d, 1H) , 5.68 (s, 2H) , 4.70–4.62 (m, 1H) , 3.58–3.51 (m, 2H) , 3.44–3.35 (br m, 4H) , 3.16 (dd, 1H) , 3.10 (dd, 1H) , 2.99 (dd, 1H) , 2.89 (dd, 1H) , 2.50–2.40 (br m, 4H) , 1.44 (s, 9H) , 0.95–0.89 (m, 2H) , -0.06 (s, 9H) ; LCMS (M+H) $^+$: 567.3。 ^1H NMR峰2(400MHz, CDCl_3) : δ 8.84 (s, 1H) , 8.32 (s, 1H) , 8.31 (s, 1H) , 7.40 (d, 1H) , 6.79 (d, 1H) , 5.68 (s, 2H) , 4.70–4.62 (m, 1H) , 3.58–3.51 (m, 2H) , 3.45–3.34 (br m, 4H) , 3.16 (dd, 1H) , 3.10 (dd, 1H) , 2.99 (dd, 1H) , 2.90 (dd, 1H) , 2.50–2.40 (br m, 4H) , 1.44 (s, 9H) , 0.95–0.89 (m, 2H) , -0.06 (s, 9H) ; LCMS (M+H) $^+$: 567.3。

[0151] 步骤2: 4-哌嗪-1-基-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丁腈盐酸盐

[0152] 将4-{3-氰基-2-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-羧酸叔丁酯(4.0g, 7.0mmol; 来自步骤1的峰2)溶于1,4-二氧杂环己烷(40mL)中, 再添加4.0M HCl的二氧杂环己烷(25mL, 100mmol)溶液。室温下搅拌混合物80分钟。真空除去溶剂, 得到产物盐酸盐。LCMS (M+H) $^+$: 467.3。

[0153] 步骤3: 4-[(4-{3-氰基-2-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈三氟乙酸盐(分离出单一对映异构体)

1H), 3.57-3.50 (m, 2H), 3.45-3.37 (m, 4H), 3.06 (dd, 1H), 3.00-2.90 (m, 2H), 2.83 (dd, 1H), 2.57-2.35 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 0.96-0.86 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 566.3。

[0159] 利用手性HPLC将外消旋物分离成单一对映异构体(手性技术有限公司(Chiral Technologies)的ChiralPAK IA, 20×250mm, 5μm, 流动相为30%乙醇/70%己烷, 流速12mL/min)。峰1(首先洗脱出来的对映异构体): 1.8g; 峰2(稍后洗脱出来的对映异构体): 1.9g。

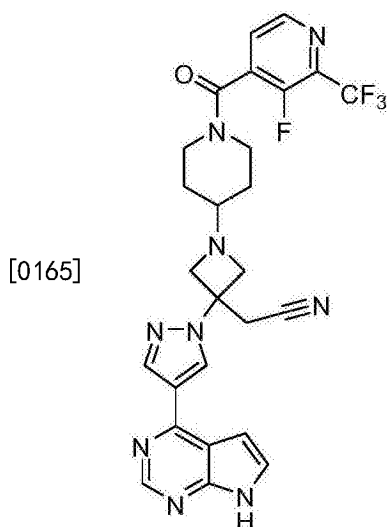
[0160] 步骤2: 4-哌嗪-1-基-3-[3-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡咯-1-基]丁腈盐酸盐

[0161] 向4-{3-氰基-2-[3-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡咯-1-基]丙基}哌嗪-1-羧酸叔丁酯(1.9g, 0.0034mol; 来自步骤1的峰2)在1,4-二氧杂环己烷(20mL)中的溶液中添加4.0M HCl的对二氧杂环己烷(12mL, 48mmol)溶液。室温下搅拌混合物80分钟。真空除去溶剂, 得到浅黄色固体产物(1.90g, 100%)。LCMS (M+H)⁺: 466.3。

[0162] 步骤3: 4-[(4-{3-氰基-2-[3-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡咯-1-基]丙基}哌嗪-1-基)羰基]-3-氟苄腈三氟乙酸盐

[0163] 室温下搅拌4-氰基-2-氟苄甲酸(44mg, 0.26mmol, 阿法埃莎公司(Alfa Aesar))、N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸酯(93mg, 0.24mmol)和三乙胺(171μL, 1.22mmol)在THF(2.4mL)中的混合物15分钟。加入4-哌嗪-1-基-3-[3-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡咯-1-基]丁腈盐酸盐(110mg, 0.20mmol; 来自步骤2)。搅拌反应混合物2小时。加入乙酸乙酯和水。分离各层, 取有机层依次用水、1N NaOH和盐水洗涤, 置于硫酸钠上方干燥, 然后浓缩。将残余物首先溶解在DCM与TFA的1:1混合物中, 1小时后浓缩, 然后在含有乙二胺(0.2mL)的甲醇(2mL)中搅拌1小时。利用制备型HPLC-MS(用含有0.1% TFA的MeCN/H₂O梯度洗脱)纯化, 得到产物3.3xTFA盐(84mg, 48%)。¹H NMR (300MHz, d₆-dmsO): δ13.22 (br s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.00 (dd, 1H), 7.97-7.93 (m, 1H), 7.80 (dd, 1H), 7.61 (t, 1H), 7.35 (s, 2H), 7.18-7.13 (m, 1H), 5.00-4.80 (m, 1H), 3.75-3.49 (br m, 2H), 3.35-2.33 (m, 10H); ¹⁹F NMR (300MHz, d₆-dmsO): δ-74.82 (s, 10F), -114.53 (s, 1F); LCMS (M+H)⁺: 483.2。

[0164] 实例5: {1-[1-[3-氟-2-(三氟甲基)异烟酰基]哌啶-4-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈



[0166] 步骤A:3-氧代氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯

[0167] 在0℃下向3-羟基氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯(10.0g,57.7mmol)、二甲基亚砜(24.0mL,338mmol)、三乙胺(40mL,300mmol)和二氯甲烷(2.0mL)的混合物中分批加入三氧化硫-吡啶复合物(40g,200mmol)。搅拌混合物3小时之后,用盐水淬灭,然后用二氯甲烷萃取。将合并的萃取物置于无水Na₂SO₄上方干燥,过滤,再减压浓缩。用硅胶柱(己烷中的0-6%乙酸乙酯(EtOAc))纯化残余物,获得3-氧代氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯(5.1g,收率为52%)。

[0168] 步骤B:3-(氰基亚甲基)氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯

[0169] 在氮气氛围下,向一只配有搅拌棒、隔膜、氮气入口、250mL加料漏斗和热电偶的经烘干的1L四颈圆底烧瓶中装入氢化钠(5.6g,0.14mol)和四氢呋喃(THF)(140mL)。将混合物冷却至3℃,然后用注射器用20分钟滴加氰甲基膦酸二乙酯(22.4mL,0.138mol)。溶液变成浅黄色浆料。然后搅拌反应混合物75分钟,同时温热至18.2℃。在经烘干的圆底烧瓶中制备3-氧代氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯(20g,0.1mol)的四氢呋喃(280mL)溶液,经由套管装入加料漏斗,然后在25分钟内滴加到反应混合物中。反应溶液变为红色。搅拌反应溶液过夜。24小时之后利用TLC(70%己烷/EtOAc)检查反应进度,发现反应完全。用200mL的20%盐水和250mL的EtOAc稀释反应溶液。将溶液分相,用250mL的EtOAc萃取水相。将合并的有机相置于MgSO₄上方干燥,过滤后减压蒸发,接着利用快速层析法(0%至20%EtOAc/己烷,150g快速柱)纯化,得到所需的产物3-(氰基亚甲基)氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯(15g,收率为66.1%)。

[0170] 步骤C:4-氯-7-([2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

[0171] 向-5℃(冰/盐浴)下的氢化钠(36.141g,903.62mmol)在N,N-二甲基乙酰胺(118mL)中的悬浮液缓慢加入4-氯吡咯并[2,3-d]嘧啶(119.37g,777.30mmol)在N,N-二甲基乙酰胺(237mL)中的深色溶液。用N,N-二甲基乙酰胺(30mL)冲洗烧瓶和加料漏斗。立即产生大量气体。混合物变成略浑浊的橙色混合物。在0℃下搅拌混合物60分钟,得到浅棕色的浑浊混合物。向该混合物中缓慢加入[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基氯(152.40g,914.11mmol),在0℃下搅拌反应物1小时。然后缓慢加入12mL的H₂O来淬灭反应。加入更多的水(120mL),接着加入甲基叔丁基醚(MTBE)(120mL)。搅拌混合物10分钟后。分离有机层。用另一份MTBE(120mL)萃取水层。合并有机萃取物,用盐水洗涤(120mL×2),减压浓缩,得到深色油状的粗产物4-氯-7-([2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。收率:85.07g(97%);LC-MS:284.1(M+H)⁺。不纯化该粗产物,直接用于下一反应。

[0172] 步骤D:4-(1H-吡唑-4-基)-7-([2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

[0173] 向1000mL圆底烧瓶中装入4-氯-7-([2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(10.00g,35.23mmol)、1-丁醇(25.0mL)、1-(1-乙氧基乙基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(15.66g,52.85mmol)、水(25.0mL)和碳酸钾(12.17g,88.08mmol)。将该溶液脱气4次,每次都氮气填充。向溶液中加入四(三苯基膦)钯(0)(4.071g,3.523mmol)。将该溶液脱气4次,每次都氮气填充。在100℃下搅拌混合物过夜。待混合物冷却到室温后,用硅藻土(celite)床过滤,然后用乙酸乙酯(42mL)冲洗硅藻土。合并滤液,分离有机层。用乙酸乙酯萃取水层。合并有机萃取物,在30至70℃的浴温下真

空浓缩,得到最终化合物4-(1H-吡唑-4-基)-7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。收率:78%。LC-MS:316.2(M+H)⁺。

[0174] 步骤E:3-(氰甲基)-3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯

[0175] 向配有顶置式搅拌器、隔膜和氮气入口的2L圆底烧瓶中装入3-(氰基亚甲基)氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯(9.17g,0.0472mol)、4-(1H-吡唑-4-基)-7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(14.9g,0.0472mol)和乙腈(300mL)。所得的溶液是非均相体系。室温下,用注射器用3分钟向溶液中分批加入1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(8.48mL,0.0567mol)。溶液慢慢变得均质并呈黄色。室温下搅拌反应溶液3小时。利用HPLC和LC/MS判断反应完成,旋转蒸发浓缩以除去乙腈(约150mL)。加入EtOAc(100mL),然后加入100mL的20%盐水。将两相分开。用150mL的EtOAc萃取水相。将合并的有机相置于MgSO₄上方干燥,过滤并浓缩,得到橙色油状物。利用快速层析法(150克二氧化硅,60%EtOAc/己烷,加有CH₂Cl₂)纯化,得到黄色油状的标题化合物3-(氰甲基)-3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯(21.1g,收率为88%)。LC-MS:[M+H]⁺=510.3。

[0176] 步骤F:3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈二盐酸盐

[0177] 向3-(氰甲基)-3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-羧酸叔丁酯(2g,3.9mmol)在10mL的THF中的溶液添加10mL的4N HCl/二氧杂环己烷溶液。室温下搅拌溶液1小时,然后真空浓缩,得到1.9g(99%)为白色粉末状固体的标题化合物,不纯化该化合物,直接用于下一反应。LC-MS:[M+H]⁺=410.3。

[0178] 步骤G:4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}哌啶-1-羧酸叔丁酯

[0179] 向{3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈二盐酸盐(2.6g,6.3mmol)、4-氧代-1-哌啶羧酸叔丁酯(1.3g,6.3mmol)在THF(30mL)中的溶液添加N,N-二异丙基乙胺(4.4mL,25mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(2.2g,10mmol)。室温下搅拌混合物过夜。加入20mL盐水后,用EtOAc萃取溶液。将萃取物置于无水Na₂SO₄上方干燥,然后浓缩。使用CombiFlash柱,用己烷中的30-80%EtOAc进行洗脱,来纯化残余物,得到所需产物4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}哌啶-1-羧酸叔丁酯。收率:3.2g(86%);LC-MS:[M+H]⁺=593.3。

[0180] 步骤H:1-哌啶-4-基-3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈三盐酸盐

[0181] 向4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}哌啶-1-羧酸叔丁酯(3.2g,5.4mmol)在10mL的THF中的溶液添加10mL的4N HCl/二氧杂环己烷溶液。室温下搅拌反应混合物2小时。减压除去溶剂,得到3.25g(100%)白色粉末状固体{1-哌啶-4-基-3-[4-(7-{{2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基}甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}

乙腈三盐酸盐,将其直接用于下一反应。LC-MS: $[M+H]^+ = 493.3$ 。 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ 9.42 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.39 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.96 (d, 2H), 4.56 (m, 2H), 4.02-3.63 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.53 (t, 2H), 3.49-3.31 (3, 3H), 2.81 (m, 2H), 2.12 (d, 2H), 1.79 (m, 2H), 0.83 (t, 2H), -0.10 (s, 9H)。

[0182] 步骤I: {1- {1- [3-氟-2- (三氟甲基) 异烟酰基] 哌啶-4-基} -3- [4- (7- { [2- (三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈

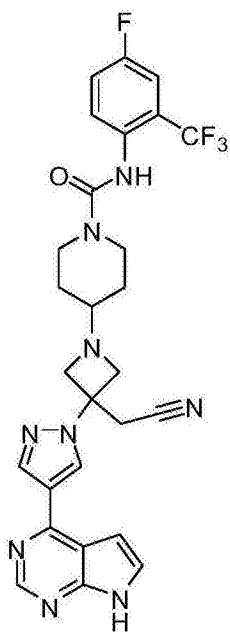
[0183] 室温下将 {1-哌啶-4-基-3- [4- (7- { [2- (三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈三盐酸盐 (1.22g, 2.03mmol)、3-氟-2- (三氟甲基) 异烟酸 (460mg, 2.2mmol)、苯并三唑-1-基氧基三 (二甲氨基) 磷六氟磷酸酯 (1.07g, 2.42mmol) 和三乙胺 (2.0mL, 14mmol) 在二甲基甲酰胺 (DMF) (20.0mL) 中的混合物搅拌过夜。LS-MS显示反应完全。将EtOAc (60mL) 与饱和NaHCO₃水溶液 (60mL) 加入反应混合物。室温下搅拌10分钟后,分离有机相,用EtOAc萃取水层三次。用盐水洗涤合并的有机相,置于无水Na₂SO₄上方干燥,过滤,再减压蒸发。利用快速层析法纯化,得到所需产物 {1- {1- [3-氟-2- (三氟甲基) 异烟酰基] 哌啶-4-基} -3- [4- (7- { [2- (三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈。LC-MS: 684.3 (M+H)⁺。

[0184] 步骤J: {1- {1- [3-氟-2- (三氟甲基) 异烟酰基] 哌啶-4-基} -3- [4- (7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈

[0185] 向 {1- {1- [3-氟-2- (三氟甲基) 异烟酰基] 哌啶-4-基} -3- [4- (7- { [2- (三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈 (56mg, 0.1mmol) 在二氯甲烷 (1.5mL) 中的溶液添加三氟乙酸 (1.5mL)。室温下搅拌混合物2小时。真空除去溶剂后,将残余物溶解在含有20%乙二胺的甲醇溶液中。室温下搅拌1小时,然后用HPLC (方法B) 纯化溶液,得到标题化合物。LC-MS: 554.3 (M+H)⁺; 1H NMR (400MHz, CDCl₃): 9.71 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.55 (d, J=4.6Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.52 (t, J=4.6Hz, 1H), 7.39 (dd, J₁=3.4Hz, J₂=1.5Hz, 1H), 6.77 (dd, J₁=3.6Hz, J₂=0.7Hz, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.63 (dd, J₁=7.8Hz, J₂=3.7Hz, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.38 (s, 2H), 3.11 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.40 (m, 1H)。

[0186] 实例6: 4- {3- (氰甲基) -3- [4- (7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-1-基} -N- [4-氟-2- (三氟甲基) 苯基] 哌啶-1-甲酰胺

[0187]



[0188] 步骤A: 4- {3- (氰甲基) -3- [4- (7- { [2- (三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-1-基} -N- [4-氟-2- (三氟甲基) 苯基] 哌啶-1-甲酰胺

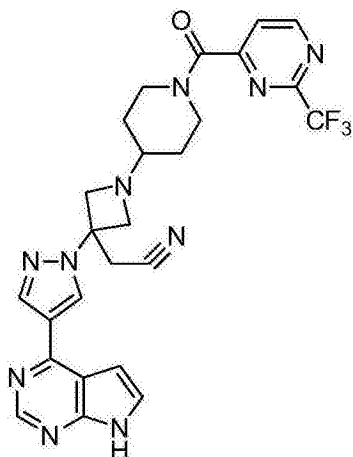
[0189] 向 {1-哌啶-4-基-3- [4- (7- { [2- (三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈三盐酸盐 (500mg, 1mmol) 在四氢呋喃 (30mL) 中的溶液添加三乙胺 (0.29g, 2.8mmol) 和 4-氟-1-异氰酸根-2- (三氟甲基) 苯基 (190mg, 0.95mmol)。室温下搅拌混合物1小时。减压除去溶剂。用CombiFlash柱, 以30-100% EtOAc/己烷进行纯化, 得到粉末状的4- {3- (氰甲基) -3- [4- (7- { [2- (三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-1-基} -N- [4-氟-2- (三氟甲基) 苯基] 哌啶-1-甲酰胺。LC-MS: 698.1 (M+H)⁺。

[0190] 步骤B: 4- {3- (氰甲基) -3- [4- (7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-1-基} -N- [4-氟-2- (三氟甲基) 苯基] 哌啶-1-甲酰胺

[0191] 将4- {3- (氰甲基) -3- [4- (7- { [2- (三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-1-基} -N- [4-氟-2- (三氟甲基) 苯基] 哌啶-1-甲酰胺 (210mg, 0.3mmol) 溶解于三氟乙酸在二氯甲烷溶液 (20mL) 中的50M溶液中。室温下搅拌1小时之后, 减压除去溶剂。将残余物溶解在甲醇 (20mL) 和乙二胺 (1.0g, 17mmol) 中。室温下搅拌1小时之后, 利用HPLC (方法B) 纯化混合物, 得到白色粉末状的4- {3- (氰甲基) -3- [4- (7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-1-基} -N- [4-氟-2- (三氟甲基) 苯基] 哌啶-1-甲酰胺。LC-MS: 568.1 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 12.10 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.55 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.01 (d, J=3.6Hz, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.67 (d, J=8Hz, 2H), 3.51 (m, 4H), 2.92 (m, 2H), 2.38 (m, 1H), 1.62 (m, 2H), 1.09 (m, 2H)。

[0192] 实例7: 3- [4- (7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] -1- (1- { [2- (三氟甲基) 嘧啶-4-基] 羰基} 哌啶-4-基) 氮杂环丁烷-3-基] 乙腈

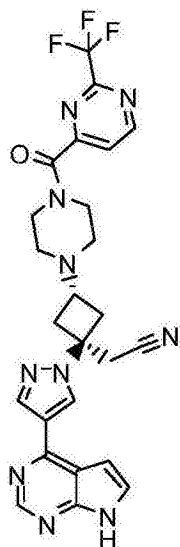
[0193]



[0194] 采用与制备实例5所用方法类似的方法来制备标题化合物。LC-MS (M+H)⁺: 537.2。

[0195] 实例8: [反式-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]-3-(4-{[2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]羰基}哌嗪-1-基)环丁基]乙腈

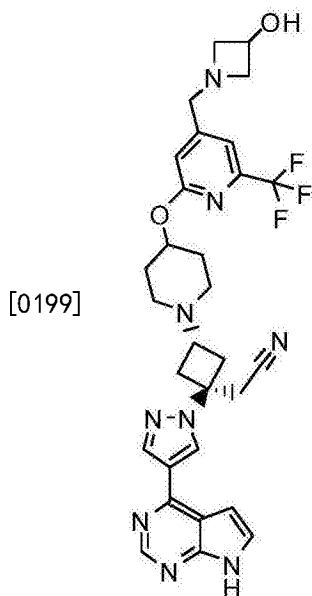
[0196]



[0197] 将2-(三氟甲基)嘧啶-4-羧酸 (0.225g, 1.17mmol, 按W02006/067445中所述方法水解购自Apollo公司的甲酯制备)、N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸酯 (0.29g, 0.76mmol, 奥德里奇公司 (Aldrich)) 和三乙胺 (0.26mL, 1.9mmol) 在四氢呋喃 (6mL) 中的混合物预搅拌15分钟, 接着加入 {反式-3-哌嗪-1-基-1-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈 (0.188g, 0.380mmol, 按US 2012/0149681的实例1b的步骤1中所述制备) 的四氢呋喃 (10mL) 溶液。搅拌反应混合物过夜。真空除去THF。将残余物在饱和碳酸氢钠与乙酸乙酯之间分配。共萃取含水部分三次。将合并的有机萃取物置于硫酸钠上方干燥, 滗析并浓缩。利用快速层析法, 用DCM中的0-10% MeOH进行梯度洗脱, 以纯化受SEM保护的中间体。采用下述方式实现去保护: 首先与三氟乙酸 (10mL) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液一同搅拌2小时, 接着真空蒸发溶剂, 然后与含有乙二胺 (0.5mL, 7mmol) 的甲醇 (6mL, 200mmol) 一同搅拌过夜。将反应混合物在水与乙酸乙酯之间分配, 再用乙酸乙酯萃取含水部分两次。将合并的萃取物置于硫酸钠上方干燥, 过滤并浓缩。利用快速层析法, 用DCM中的0-10% MeOH进行梯度洗脱, 来纯化产物。利用制备型HPLC-MS (C18柱, 用含有0.1% TFA的H₂O/MeCN梯度洗脱) 再次纯化产物。经由旋转蒸

发从含有所需物质的洗脱液中除去乙腈,然后向剩余的水溶液中添加碳酸氢钠将其中和,再用乙酸乙酯萃取数次。将合并的有机萃取物置于硫酸钠上方干燥,过滤并浓缩。利用制备型HPLC-MS(C18柱,用含有0.15%NH₄OH的H₂O/MeCN梯度洗脱)再次纯化产物。冷冻含有所需物质的洗脱液,再冻干,得到游离碱形式的产物(99mg,48%)。¹H NMR(300MHz,CD₃OD): δ 9.13(d,1H),8.71(s,1H),8.66(s,1H),8.39(s,1H),7.88(d,1H),7.50(d,1H),6.98(d,1H),3.89-3.81(m,2H),3.59-3.52(m,2H),3.34(s,2H),3.13-3.03(m,2H),2.97(tt,1H),2.59-2.42(m,6H);¹⁹F NMR(282MHz,CD₃OD): δ -72.43(s,3F);LCMS(M+H)⁺:537.0。

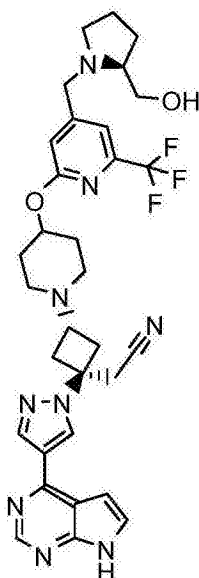
[0198] 实例9: {反式-3-(4-{[4-[(3-羟基氮杂环丁烷-1-基)甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈



[0200] 按照US 2012/0149681的实例153的方法,在置换步骤中使用N,N-二异丙基乙胺(64 μ L,0.37mmol)和氮杂环丁烷-3-醇盐酸盐(30mg,0.3mmol,Oakwood公司)。室温下搅拌过夜后,加入甲醇(0.20mL),得到均相溶液,室温下继续搅拌该均相溶液2.5小时,然后依据US2012/0149681的实例153中给出的去保护条件和纯化条件进行处理,得到游离碱形式的产物(9.7mg,44%)。¹H NMR(400MHz,dmsO) δ 12.12(br s,1H),8.81(s,1H),8.67(s,1H),8.40(s,1H),7.59(d,J=3.6Hz,1H),7.29(s,1H),7.06(d,J=3.6Hz,1H),6.93(s,1H),5.34(d,J=6.4Hz,1H),5.05-4.77(m,1H),4.19(h,J=6.1Hz,1H),3.60(s,2H),3.50(td,J=6.1,2.0Hz,2H),3.40(s,2H),3.06-2.92(m,2H),2.86-2.71(m,3H),2.68-2.53(m,2H),2.38-2.22(m,2H),2.22-2.07(br m,2H),2.05-1.95(br m,2H),1.75-1.48(m,2H);¹⁹F NMR(376MHz,dmsO) δ -67.36(s);LCMS(M+H)⁺:608.2。

[0201] 实例10: {反式-3-(4-{[4-[(2S)-2-(羟甲基)吡咯烷-1-基]甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈

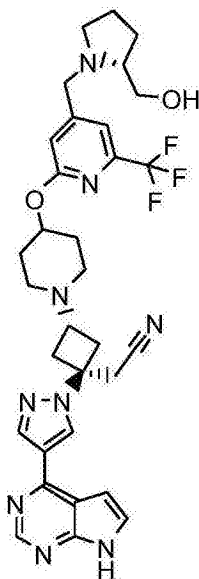
[0202]



[0203] 按照US 2012/0149681的实例158的方法,不同的是,用胺置换甲磺酸酯是使用(2S)-吡咯烷-2-基甲醇(20 μ L,0.2mmol,奥德里奇公司(Aldrich))在室温下过夜进行的(8.3mg,59%)。¹H NMR(500MHz,DMSO) δ 12.09(br s,1H),8.81(s,1H),8.69(s,1H),8.41(s,1H),7.59(d,J=3.5Hz,1H),7.39(s,1H),7.06(d,J=3.6Hz,1H),7.03(s,1H),5.00(tt,J=8.4,3.9Hz,1H),4.48(s,1H),4.12(d,J=14.8Hz,1H),3.45(d,J=15.0Hz,1H),3.41(s,2H),3.42-3.25(m,2H),3.06-2.97(m,2H),2.87-2.77(m,2H),2.69-2.62(m,2H),2.59(dddd,J=5.8,5.8,5.8,8.1Hz,1H),2.41-2.31(m,2H),2.22-2.09(m,3H),2.08-1.95(m,2H),1.83(dddd,J=8.1,8.1,8.3,12.2Hz,1H),1.75-1.46(m,5H);¹⁹F NMR(376MHz,dmsO) δ -67.24(s);LCMS(M+H)⁺:636.3。

[0204] 实例11: {反式-3-(4-{[4-{[(2R)-2-(羟甲基)吡咯烷-1-基]甲基}-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈

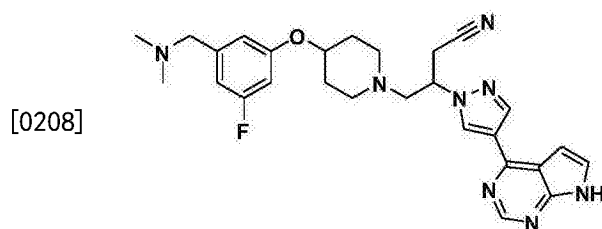
[0205]



[0206] 按照US 2012/0149681的实例158的方法,不同的是,用胺置换甲磺酸酯是使用(2R)-吡咯烷-2-基甲醇(20 μ L,0.2mmol,奥德里奇公司(Aldrich))在室温下过夜进行的

(8.3mg, 59%)。¹H NMR (400MHz, dmsO) δ 12.14 (br s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.08 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 5.04-4.94 (m, 1H), 4.52 (t, J=5.4Hz, 1H), 4.12 (d, J=14.9Hz, 1H), 3.52-3.22 (m, 5H), 3.09-2.92 (m, 2H), 2.86-2.73 (m, 2H), 2.70-2.53 (m, 3H), 2.42-2.27 (m, 2H), 2.22-2.09 (m, 3H), 2.06-1.87 (m, 2H), 1.82 (dddd, J=8.0, 8.0, 8.4, 11.9Hz, 1H), 1.77-1.37 (m, 5H); ¹⁹F NMR (376MHz, dmsO) δ -67.24 (s); LCMS (M+H)⁺: 636.3。

[0207] 实例12: 4-(4-{3-[(二甲氨基)甲基]-5-氟苯氧基}哌啶-1-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丁腈(手性)



[0209] 步骤1: 3-氟-5-羟基苯甲醛

[0210] 向3-氟-5-羟基苯腈(1.00g, 7.29mmol)在-78℃甲苯(60.0mL)中的悬浮液添加1.0M二异丁基氢化铝的甲苯溶液(18.2mL, 18.2mmol)。在-78℃下搅拌所得的混合物1小时, 让其升至室温过夜。加入甲醇与水的1:1混合物(10mL), 搅拌35分钟。将固体过滤后, 用乙酸乙酯洗涤。依次用水和盐水洗涤滤液, 置于Na₂SO₄上方干燥, 过滤并浓缩。用硅胶柱纯化(用10-50%乙酸乙酯/己烷洗脱)粗产物, 得到所需产物(0.77g, 75%)。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.49 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 7.10 (m, 2H), 6.87 (d, 1H)。

[0211] 步骤2: 3-[(二甲氨基)甲基]-5-氟苯酚

[0212] 向二甲胺盐酸盐(160mg, 1.96mmol)和3-氟-5-羟基苯甲醛(250.0mg, 1.784mmol)在二氯甲烷(9.0mL)中的混合物添加三乙胺(323 μ L, 2.32mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠树脂(1.1g, 2.7mmol)。搅拌所得混合物过夜, 然后过滤并浓缩。用硅胶柱纯化(用0-15%甲醇/DCM洗脱)粗产物, 得到所需产物(0.21g, 70%)。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 6.55 (m, 2H), 6.42 (d, 1H), 2.15 (s, 6H), 1.89 (s, 2H)。LCMS (M+H)⁺: 170.1。

[0213] 步骤3: 4-(4-{3-[(二甲氨基)甲基]-5-氟苯氧基}哌啶-1-基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丁腈

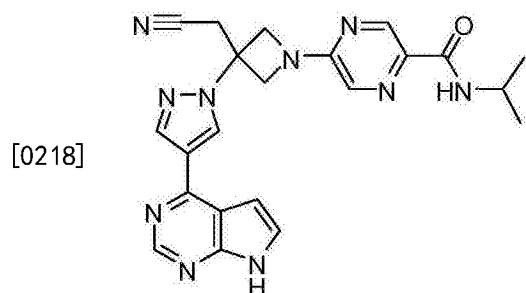
[0214] 向3-[(二甲氨基)甲基]-5-氟苯酚(158mg, 0.934mmol)在二氯甲烷(9mL)中的混合物添加三苯基膦树脂(578mg, 1.37mmol)和偶氮二羧酸二叔丁酯(229mg, 0.996mmol)。搅拌混合物20分钟, 然后加入4-(4-羟基哌啶-1-基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]丁腈(300mg, 0.6mmol)在二氯甲烷(2mL)中的溶液。室温下搅拌反应混合物过夜。加入额外的三苯基膦树脂(0.5g)、偶氮二羧酸二叔丁酯(0.23g)和DCM(8mL), 继续搅拌2小时。用DCM洗涤小瓶和树脂, 并过滤。用10% NaOH水溶液洗涤滤液。将有机层置于MgSO₄上方干燥, 过滤并浓缩。用硅胶柱纯化(用0-15%甲醇/DCM洗脱)粗产物, 得到受SEM保护的产物。LCMS (M+H)⁺: 633.5。向纯化的产物加入二氯甲烷(1.5mL)和三氟乙酸(1.5mL, 19mmol), 搅拌2小时。蒸发掉溶剂, 然后加入甲醇(3.5mL)和二乙胺(0.70mL, 10mmol)。搅拌所得混合物1小时, 然后浓缩。将浓缩物吸收在DCM中, 用水洗涤, 随后置于Na₂SO₄上方干燥, 过滤并浓缩, 得到粗产物, 利用手性制备型HPLC(Chiralcel

0J-H柱, 4.6×250mm, 5μm, 60%乙醇/己烷, 0.5ml/min) 纯化粗产物, 得到两个对映异构体。

[0215] 对映异构体1(首先洗脱出来): LCMS (M+H)⁺: 503.3。

[0216] 对映异构体2(稍后洗脱出来): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8.78 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 6.96 (d, 1H), 6.64 (t, 3H), 4.94 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.39 (m, 2H), 3.19 (d, 3H), 2.77 (m, 3H), 2.60 (m, 1H), 2.32 (m, 2H), 2.10 (s, 6H), 1.83 (m, 2H), 1.54 (m, 2H)。LCMS (M+H)⁺: 503.3。

[0217] 实例13: 5-{3-(氰甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-异丙基吡嗪-2-甲酰胺



[0219] 步骤1: 5-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}吡嗪-2-羧酸甲酯

[0220] 在氮气下将(R)-(+)-2,2'-双(二苯膦基)-1,1'-联萘(0.065g, 0.10mmol)加入{3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈二盐酸盐(0.50g, 1.0mmol)、5-氯吡嗪-2-羧酸甲酯(0.18g, 1.0mmol)(Ark制药公司(Ark Pharm, Inc.), 产品目录号: AK-23920)和碳酸铯(1.0g, 3.1mmol)在甲苯(15.0mL)中的混合物, 接着加入乙酸钡(0.023g, 0.10mmol)。120℃下搅拌反应混合物3小时。冷却到室温后, 用硅藻土(celite)垫过滤反应混合物, 然后用乙酸乙酯洗涤。减压浓缩滤液。利用快速层析法, 在硅胶柱上用二氯甲烷中的0-70%乙酸乙酯纯化残余物, 得到所需产物(0.31g, 55%)。LCMS (M+H)⁺: m/z = 546.3。

[0221] 步骤2: 5-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}吡嗪-2-羧酸

[0222] 在30℃下将5-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}吡嗪-2-羧酸甲酯(0.31g, 0.57mmol)、一水氢氧化锂(0.060g, 1.4mmol)在甲醇(6.0mL)和水(2.5mL)中的混合物搅拌过夜。用HCl水溶液将混合物的pH调节到4, 然后减压浓缩以除去MeOH。过滤所得的固体, 用水和乙醚洗涤, 然后真空干燥, 得到所需产物(0.25g, 83%)。LCMS (M+H)⁺: m/z = 532.3

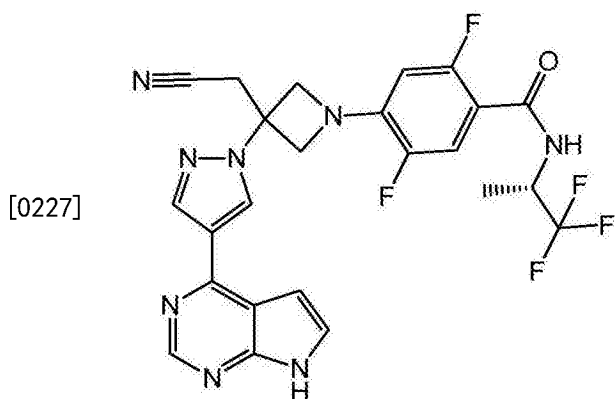
[0223] 步骤3: 5-{3-(氰甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-异丙基吡嗪-2-甲酰胺

[0224] 将三乙胺(15μL, 0.11mmol)加入5-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}吡嗪-2-羧酸(19.4mg, 0.0365mmol)、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸酯(19mg, 0.044mmol)和2-丙胺(3.2mg, 0.055mmol)在二氯甲烷(1.3mL)中的混合物。室温下搅拌反应混合物过夜。用NaHCO₃水溶液处理反应混合物, 用二氯甲烷萃取(2×2mL)。用水(1mL)洗涤合并的有机层, 再减压浓缩。不进一步纯化残余物, 直接用于下一步。LCMS (M+H)⁺: m/z =

573.3。

[0225] 向上述中间体中加入二氯甲烷(1.3mL)和三氟乙酸(0.6mL)。室温下搅拌反应混合物1.5小时,然后减压浓缩反应混合物。将残余物溶解在甲醇(1.3mL)中。向该溶液中加入乙二醇(0.086mL)。室温下搅拌反应混合物2小时,然后利用RP-HPLC (pH=10) 纯化,得到所需产物。LCMS (M+H)⁺:m/z=443.2。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 12.15 (br, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.63 (d, J=1.2Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.12 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.97 (d, J=1.2Hz, 1H), 7.60 (dd, J=3.3, 2.4Hz, 1H), 7.07 (dd, J=3.4, 1.7Hz, 1H), 4.81 (d, J=9.8Hz, 2H), 4.53 (d, J=9.6Hz, 2H), 4.13-4.02 (m, 1H), 3.78 (s, 2H), 1.14 (d, J=6.8Hz, 6H)。

[0226] 实例14:4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-2,5-二氟-N-[(1S)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]苯甲酰胺



[0228] 步骤1:4-氯-2,5-二氟-N-[(1S)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]苯甲酰胺

[0229] 在0℃下将4-氯-2,5-二氟苯甲酰氯(29.6mg,0.140mmol)(Oakwood公司,产品目录号:001628)加入(2S)-1,1,1-三氟丙-2-胺盐酸盐(20.0mg,0.134mmol)(SynQuest Lab公司,产品目录号:3130-7-S1)和二异丙基乙胺(58μL,0.33mmol)在二氯甲烷(4.0mL)中的混合物。室温下搅拌反应混合物30分钟后,用饱和NaHCO₃水溶液处理,接着用二氯甲烷萃取(3×10mL)。用盐水洗涤合并的有机层后,将其置于MgSO₄上方干燥,过滤并减压浓缩,得到所需产物。不进一步纯化该产物,直接用于下一步反应。LCMS (M+H)⁺:m/z=288.0/290.0。

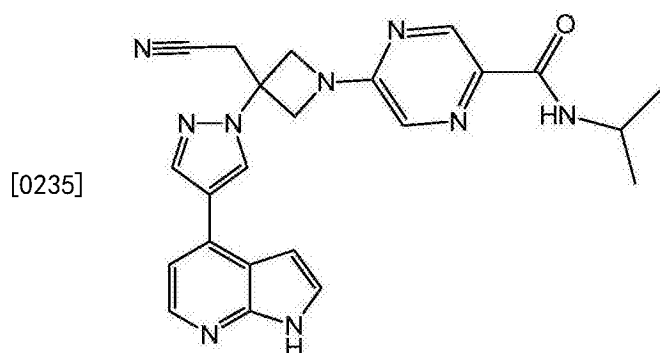
[0230] 步骤2:4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-2,5-二氟-N-[(1S)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]苯甲酰胺

[0231] 在N₂下将(R)-(+)-2,2'-双(二苯膦基)-1,1'-联萘(8.3mg,0.013mmol)加入{3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈二盐酸盐(65mg,0.13mmol)、4-氯-2,5-二氟-N-[(1S)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]苯甲酰胺(0.14mmol)和碳酸铯(0.13g,0.40mmol)在甲苯(4.0mL)中的混合物,接着加入乙酸钡(3.0mg,0.013mmol)。在130℃下搅拌反应混合物5小时。将反应混合物冷却至室温后,用水处理混合物,然后用乙酸乙酯萃取(3×10mL)。用盐水洗涤合并的有机层后,将其置于MgSO₄上方干燥,过滤并减压浓缩,得到粗产物。不进一步纯化该粗产物,直接用于下一步反应。LCMS (M+H)⁺:m/z=661.2。

[0232] 步骤3:4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-2,5-二氟-N-[(1S)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]苯甲酰胺

[0233] 在0℃下,在N₂中将三氟化硼醚合物(0.051mL,0.40mmol)加入4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-2,5-二氟-N-[(1S)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]苯甲酰胺在乙腈(1.0mL)中的溶液。室温下搅拌反应混合物3小时。(LCMS (M+H)⁺:m/z=561.3)。然后将混合物冷却至0℃,加水(0.13mL)。30分钟后,在0℃下在5分钟内缓慢加入5.0M氢氧化铵水溶液(0.2mL,1mmol)。室温下搅拌反应混合物过夜,然后利用RP-HPLC (pH=10)纯化,得到所需产物。LCMS (M+H)⁺:m/z=531.0。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 12.62 (br, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.51 (dd, J=8.8, 1.2Hz, 1H), 7.78 (br, 1H), 7.35 (dd, J=12.6, 6.5Hz, 1H), 7.23 (d, J=1.9Hz, 1H), 6.65 (dd, J=11.9, 7.3Hz, 1H), 4.76 (m, 1H), 4.70 (d, J=9.3Hz, 2H), 4.44 (d, J=9.2Hz, 2H), 3.76 (s, 2H), 1.30 (d, J=7.1Hz, 3H)。

[0234] 实例15: 5-{3-(氰甲基)-3-[4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-异丙基吡嗪-2-甲酰胺



[0236] 步骤1: 5-{3-(氰甲基)-3-[4-(1-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}吡嗪-2-羧酸甲酯

[0237] 将N,N-二异丙基乙胺(1.0mL,6.0mmol)加入{3-[4-(1-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈二盐酸盐(0.96g,2.0mmol)和5-氯吡嗪-2-羧酸甲酯(0.34g,2.0mmol)在1,4-二氧杂环己烷(15mL)中的混合物。在120℃下搅拌反应混合物过夜。用饱和NaHCO₃水溶液处理混合物,用二氯甲烷萃取(3×20mL)。用盐水洗涤合并的有机层,置于MgSO₄上方干燥,过滤,再减压浓缩。利用快速层析法,在硅胶柱上用己烷中的0-60%乙酸乙酯纯化残余物,得到所需产物(0.13g,12%)。LCMS (M+H)⁺:m/z=545.2。

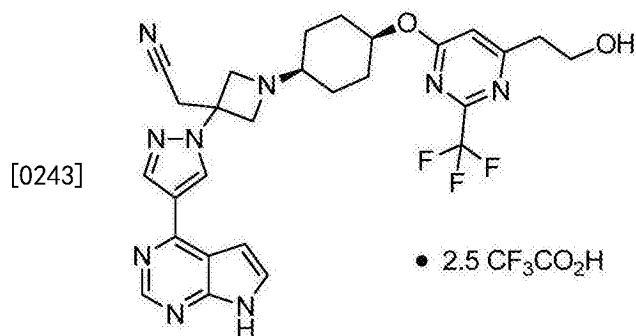
[0238] 步骤2: 5-{3-(氰甲基)-3-[4-(1-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}吡嗪-2-羧酸

[0239] 在40℃下将5-{3-(氰甲基)-3-[4-(1-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}吡嗪-2-羧酸甲酯(0.13g,0.24mmol)、一水氢氧化锂(0.025g,0.60mmol)在甲醇(4.0mL)、THF(2.0mL)和水(1.0mL)中的反应混合物搅拌3小时。用2.0NHCl水溶液将混合物的pH调节到4,然后减压浓缩以除去MeOH和THF。过滤形成的沉淀物,用水和乙醚洗涤,然后真空干燥,得到所需产物(0.100g,79%)。LCMS (M+H)⁺:m/z=531.4。

[0240] 步骤3: 5-{3-(氰甲基)-3-[4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}-N-异丙基吡嗪-2-甲酰胺

[0241] 将N,N-二异丙基乙胺 (19 μ L, 0.11mmol) 加入5-{3-(氰甲基)-3-[4-(1-{[2-(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]氮杂环丁烷-1-基}吡啶-2-羧酸 (19.4mg, 0.0365mmol)、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷六氟磷酸酯 (19mg, 0.044mmol) 和2-丙胺 (3.2mg, 0.055mmol) 在DMF (1.0mL) 中的混合物。室温下搅拌反应混合物过夜。用饱和NaHCO₃水溶液处理反应混合物, 用二氯甲烷萃取 (3 $\times$ 20mL)。用盐水洗涤合并的有机层, 置于MgSO₄上方干燥, 过滤, 再减压浓缩。用二氯甲烷 (1.3mL) 和TFA (1.3mL) 处理残余物。室温下搅拌混合物1.5小时, 然后减压浓缩。将残余物溶解在甲醇 (1.3mL) 中, 接着用乙二胺 (0.086mL, 1.3mmol) 处理。室温下搅拌所得混合物2小时, 然后利用RP-HPLC (pH=10) 纯化, 得到所需产物。LCMS (M+H)⁺: m/z=442.1。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 12.19 (br, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.66 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.32 (d, J=5.7Hz, 1H), 8.14 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.00 (d, J=1.4Hz, 1H), 7.67 (dd, J=3.2, 2.7Hz, 1H), 7.54 (d, J=5.5Hz, 1H), 7.09 (dd, J=3.5, 2.7Hz), 4.82 (d, J=10.0Hz, 2H), 4.56 (d, J=10.0Hz, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.79 (s, 2H), 1.17 (d, J=6.4Hz, 6H)。

[0242] 实例16: {1-(顺式-4-{[6-(2-羟乙基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈三(三氟乙酸盐)



[0244] 步骤1: [6-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-8-基氧基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]丙二酸二乙酯

[0245] 在0℃下向四氢呋喃 (40mL) 和NaH在矿物油 (1.1g, 28mmol) 中的混合物滴加丙二酸二乙酯 (4.2mL, 28mmol)。然后加入4-氯-6-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-8-基氧基)-2-(三氟甲基)嘧啶 (如US 2013/0045963的实例1的步骤1所述) (3.75g, 11.1mmol)。在64℃下搅拌反应混合物3小时。然后进行HPLC和LCMS分析, 结果显示反应完成度为70%。再加热6小时, 然后冷却至20℃。结果只形成了痕量的脱羧产物。用碳酸氢盐溶液稀释反应混合物, 然后用EtOAc萃取。用盐水洗涤EtOAc萃取物, 置于Na₂SO₄上方干燥, 接着真空蒸发, 得到8.5g油状物 (包含过量的丙二酸二乙酯和矿物油)。将粗产物上样到120克硅胶柱上, 用层析法纯化, 使用的溶剂A为己烷, 溶剂B为乙酸乙酯, 流速为60mL/min; 先用溶剂A洗脱3分钟, 接着在40分钟内梯度增加至40%溶剂B; 检测器的检测波长设定为254nm; 收集47mL级分; 保留时间为28分钟。蒸发合并的级分, 得到4.6g无色油状物, 收率为90%。¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.05 (s, 1H); 5.30 (m, 1H, OCH); 4.85 (s, 1H, CH); 4.25 (m, 2H, OCH₂); 3.95 (s, 4H, OCH₂); 1.6-2.1 (m, 8H); 1.28 (t, 3H, CH₃)。

[0246] 步骤2: [6-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-8-基氧基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]乙酸乙酯

[0247] 将[6-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-8-基氧基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]丙二酸二乙酯(4.60g,9.95mmol)溶解在乙醇(46mL)中。加入水(18μL,1.0mmol)和21%乙醇钠的乙醇溶液(0.37mL,1.0mmol)。在75℃下搅拌反应混合物1小时。HPLC和LCMS分析显示,脱羧反应进度为60%。再继续加热2小时(反应完全)。用碳酸氢盐水溶液稀释反应混合物,然后用EtOAc萃取。用盐水洗涤EtOAc萃取物,用Na₂SO₄干燥,接着真空蒸发,得到3.4g油状物(收率为88%)。LCMS、HPLC和NMR分析结果显示,该油状物足够纯净,可继续进行下一步反应。¹H NMR(400MHz,DMSO-D₆):δ7.20(s,1H);5.20(m,1H,OCH);4.10(q,2H,OCH₂);3.89(s,2H,CH₂);3.85(s,4H,OCH₂);1.5-2.0(m,8H);1.15(t,3H,CH₃)。HPLC分析结果显示,该油状物的UV最大吸收波长为222nm和252nm。

[0248] 步骤3:2-[6-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-8-基氧基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]乙醇

[0249] 将[6-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-8-基氧基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]乙酸乙酯(3.0g)溶解在四氢呋喃(40mL)中,置于冰浴中冷却。加入四氢硼酸钠(884mg,23.4mmol),之后分批加入甲醇(4.8mL,120mmol)。搅拌反应混合物20分钟,移除冰浴,然后在21℃下搅拌0.5小时。HPLC和LCMS分析结果显示没有酯剩余,还显示了转化为所需的M+H 349;此外还显示,出现了若干种过度还原产物(至少一种过度还原产物不具有UV吸光度)。用水猝灭反应混合物,然后蒸发。用碳酸氢盐水溶液和EtOAc稀释反应混合物,搅拌0.5小时。用盐水洗涤EtOAc层,用Na₂SO₄干燥,接着蒸发,得到3.0g油状物。将产物上样到120克硅胶柱上,用层析法纯化,使用的溶剂A为己烷,溶剂B为3% iPA/EtOAc,流速为60mL/min;先用溶剂A洗脱3分钟,接着在30分钟内梯度增加至50%溶剂B,然后用50%溶剂B洗脱15分钟;检测器的检测波长设定为254nm;收集47mL级分;保留时间为34分钟。蒸发合并的级分,得到1.5g浅黄色粘稠油状物,收率为56%。¹H NMR(300MHz,DMSO-D₆):δ7.10(s,1H);5.20(m,1H,OCH);4.71(t,1H,OH);3.85(s,4H,OCH₂);3.72(q,2H,OCH₂);2.85(t,2H,CH₂);1.5-2.0(m,8H)。

[0250] 步骤4:4-{[6-(2-羟乙基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氧基}环己酮

[0251] 将2-[6-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-8-基氧基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]乙醇溶解在丙酮(60mL,900mmol)中,加入5.0M氯化氢水溶液(20mL,98mmol),搅拌17小时。LCMS和HPLC分析结果显示,反应物几乎完全转化为M+H 305。加入碳酸氢盐水溶液,搅拌反应混合物,然后浓缩。用EtOAc萃取该混合物。用Na₂SO₄干燥EtOAc萃取物,真空蒸发,得到1.3g浅黄色粘稠油状物(不经纯化,直接用于下一反应)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):δ6.80(s,1H);5.60(m,1H,OCH);4.06(t,2H,OCH₂);3.04(t,2H,CH₂);2.61(m,2H);2.45(m,2H);2.25(m,2H)。

[0252] 步骤5:1-[4-{[6-(2-羟乙基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氧基}环己基]-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基]乙腈

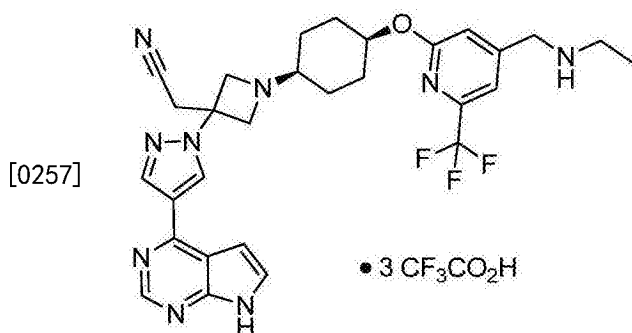
[0253] 在氮气下,将{3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈二盐酸盐(1.9g,3.9mmol)和4-{[6-(2-羟乙基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氧基}环己酮(1.3g,4.3mmol)在干燥四氢呋喃(36mL)中搅拌15分钟。然后加入三乙酰氧基硼氢化钠(1.7g,8.2mmol)。在20℃下搅拌混合物16小时。HPLC和LCMS分析结果显示,反应物完全转化为反式产物和顺式产物(M+H 698;1:1比率)。用水猝灭反应,浓缩,与20%KHC0₃一同搅拌,然后用乙酸乙酯萃取,萃取物用Na₂SO₄干燥,过滤并蒸发,得到2.8g异构产物。利用制备型LCMS分离异构产物,使用的是Waters仪器,30mm×

100mm Xbridg C18柱;流速60mL/min;先用55%CH₃CN-H₂O (0.1%NH₄OH) 洗脱0.5分钟,接着在4.5分钟内梯度增加至72%;运行24次;保留时间:反式异构体为4.6分钟,顺式异构体为5.4分钟。分离出的顺式异构体的残留反式异构体含量小于1%。得到1.00g顺式异构体,收率为37%。¹H NMR (500MHz, CDCl₃;以及COSY、HSQC和HMBC): δ8.83 (s, 1H); 8.40 (s, 1H); 8.28 (s, 1H); 7.40 (m, 1H); 6.80 (m, 1H); 6.67 (s, 1H); 5.64 (s, 2H, SEM); 5.17 (m, 1H, OCH); 4.01 (t, 2H, OCH₂); 3.74 (s, 2H, NCH); 3.59 (m, 2H, NCH); 3.55 (t, 2H, SEM); 3.38 (s, 2H, CH₂CN); 2.95 (t, 2H, CH₂); 2.30 (m, 1H, NCH); 2.15 (m, 2H); 1.84 (m, 2H); 1.50 (m, 2H); 1.30 (m, 2H); 0.90 (t, 2H, SEM); -0.92 (s, 9H, SEM)。

[0254] 步骤6: {1-(顺式-4-{{6-(2-羟乙基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基}氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈三(三氟乙酸盐)

[0255] 将{1-(4-{{6-(2-羟乙基)-2-(三氟甲基)嘧啶-4-基}氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈异构体溶解在二氯甲烷(18mL)和三氟乙酸(TFA, 18mL, 230mmol)中,搅拌1.0小时。浓缩溶液,以除去TFA。LCMS分析结果显示,反应物转化为羟甲基中间体M+H 598,其TFA酯的一部分为M+H 694,残留SEM小于5%。将残余物溶解在甲醇(36mL)中,加入15.0M氢氧化铵水溶液(9.0mL, 130mmol)。在21℃下搅拌溶液18小时。HPLC和LCMS分析结果显示,没有剩余的M+H 598峰或TFP酯。蒸发溶液。加入碳酸氢盐溶液,再用EtOAc萃取产物,由此除去三氟乙酸铵。蒸发合并的EtOAc萃取物,得到0.96g产物。将产物溶解在70mL含有1.5当量TFA(180μL)的10%H₂O/ACN中。利用制备型LCMS分离产物,使用的是Waters Fraction-Linx仪器和30mm×100mm Sunfire C18柱;流速60mL/min;先用15%ACN-H₂O (0.1%TFA)洗脱0.5分钟,接着在4.5分钟内梯度增加至33%;检测器设定为m/z 568;运行14次;保留时间为5.0分钟。HPLC分析结果显示,UV最大吸收波长为224nm、252nm、294nm和318nm。将合并的级分冻干。得到1.0g白色固体(收率为80%)。NMR分析结果显示,该白色固体为2.5TFA盐。¹H NMR (500MHz, CD₃CN;以及COSY、HSQC和HMBC): δ10.84 (s, 1H, NH); 9.00 (s, 1H); 8.90 (s, 1H); 8.56 (s, 1H); 7.66 (m, 1H); 7.10 (m, 1H); 6.86 (s, 1H); 5.39 (m, 1H, OCH); 4.86 (brs, 2H, NCH); 4.66 (m, 2H, NCH); 3.90 (t, 2H, OCH₂); 3.78 (s, 2H, CH₂CN); 3.39 (m, 1H, NCH); 2.92 (t, 2H, CH₂); 2.20 (m, 2H); 1.92 (m, 2H); 1.76 (m, 4H)。¹⁹F NMR (400MHz, DMSO-D₆): δ-69.8 (s); -74.8 (s, TFA); C₂₇H₂₉F₃N₉O₂计算得到的LCMS (M+H)⁺: m/z = 568.24

[0256] 实例17: {1-(顺式-4-{{4-[(乙氨基)甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基}氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈三(三氟乙酸盐)



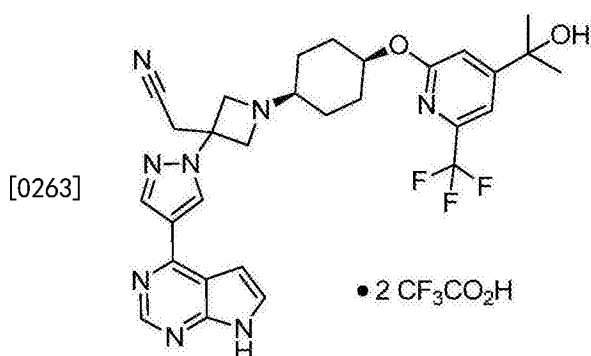
[0258] 步骤1: [2-[(顺式-4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}环己基)氧基]-6-(三氟甲基)吡啶-4-基]甲基甲磺酸酯

[0259] 将{1-(顺式-4-{[4-(羟甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈(来自US 2013/0045963的实例64, 145.0mg, 0.2124mmol)溶解在二氯甲烷(2.93mL)中, 冷却至0℃。向其中加入N,N-二异丙基乙胺(60.5μL, 0.347mmol), 接着加入甲磺酰氯(23μL, 0.30mmol)。在0℃下搅拌反应混合物1小时。然后用EtOAc处理反应混合物, 所得物用于下一反应。MS (ES): 761 (M+1)。

[0260] 步骤2: {1-(顺式-4-{[4-(乙氨基)甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈三(三氟乙酸盐)

[0261] 将[2-[(顺式-4-{3-(氰甲基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-1-基}环己基)氧基]-6-(三氟甲基)吡啶-4-基]甲基甲磺酸酯(50mg, 0.06571mmol)溶解在1,4-二氧杂环己烷(2.5mL)中, 加入2.0M乙胺的THF溶液(300μL, 0.6mmol)。在25℃下搅拌反应溶液16小时之后, LCMS分析结果显示主要是产物。利用LC纯化产物, 蒸发, 然后按US 2013/0045963的实例1所述去保护, 再利用LC纯化, 得到产物。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 9.08 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.25 (d, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.08 (d, 2H), 4.80 (d, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.50 (m, 1H), 3.16 (q, 2H), 2.24 (m, 2H), 2.01 (m, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.34 (t, 3H)。¹⁹F NMR (376MHz, CD₃OD) δ -70.52 (s), -77.49 (s)。MS (ES): 580 (M+1)。

[0262] 实例18: {1-(顺式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈双(三氟乙酸盐)



[0264] 步骤1: 2-氯-6-(三氟甲基)异烟酸

[0265] 将2-氯-6-(三氟甲基)吡啶(1.0g, 5.51mmol, Oakwood Products公司)溶解在四氢呋喃(20mL)中, 然后在25℃下加入1.0M氯化锂-氯(2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基)镁(1:1)的THF溶液(6.610mL, 6.610mmol, 奥德里奇公司(Aldrich Co.))。25℃下搅拌反应溶液1小时, 然后冷却至-78℃。

[0266] 在-78℃下搅拌反应溶液1小时, 使其升至室温, 用水猝灭, 然后在1N NaOH和乙醚之间分配。分离各相, 用另外的乙醚洗涤水相, 再用浓HCl酸化至pH约1, 然后用乙醚萃取。用

水、饱和NaCl洗涤合并的有机相,置于MgSO₄上方干燥,过滤,再蒸干,得到粗产物。NMR分析结果显示,该粗产物由对位羧酸和间位羧酸的约2:1混合物组成。将该混合物用于下一反应。^{440MHz} NMR (CDCl₃) δ8.17 (s, 1H) , 8.11 (s, 1H) 。

[0267] 步骤2: 2-氯-6-(三氟甲基) 异烟酸乙酯和2-氯-6-(三氟甲基) 烟酸乙酯

[0268] 在小管内,将2-氯-6-(三氟甲基) 烟酸 (0.98g, 4.4mmol) 和2-氯-6-(三氟甲基) 异烟酸 (1.85g, 8.2mmol) 溶解在原甲酸乙酯 (5.0mL, 30.1mmol) 中,然后120℃加热5小时,加热完毕后,TLC分析结果显示,大部分起始物质已耗尽,并形成了产物。真空蒸发反应混合物,然后利用硅胶层析法,使用10% EtOAc/己烷纯化残余物,得到两种乙酯产物。^{1H} NMR (400MHz, CDCl₃) : δ8.14 (s, 1H) , 8.08 (s, 1H) , 4.47 (q, 2H) , 1.44 (t, 3H) 。

[0269] 步骤3: 2-[2-氯-6-(三氟甲基) 吡啶-4-基] 丙-2-醇

[0270] 将2-氯-6-(三氟甲基) 异烟酸乙酯 (0.35g, 1.4mmol) 溶解在四氢呋喃 (13.8mL) 中,冷却至-78℃,然后加入3.0M甲基溴化镁的醚溶液 (1.4mL, 4.1mmol) 。在-78℃下搅拌反应溶液3小时之后,LCMS分析结果显示不存在起始物质。用饱和NH₄Cl猝灭反应,然后在水/1N HCl和EtOAc之间分配,分离各相,用另外的EtOAc洗涤水相。用水、饱和NaCl洗涤合并的有机相,置于MgSO₄上方干燥,过滤,再蒸干,得到粗产物。NMR分析结果显示,该粗产物由该醇和甲基酮中间体的约1:1混合物组成。不纯化该粗产物,直接用于下一反应。^{400MHz} NMR (CDCl₃) : δ7.70 (s, 1H) , 7.63 (s, 1H) , 1.60 (s, 6H) 。

[0271] 步骤4: 2-[2-(1,4-二氧杂螺[4.5] 癸-8-基氧基) -6-(三氟甲基) 吡啶-4-基] 丙-2-醇

[0272] 将1,4-二氧杂螺[4.5] 癸-8-醇 (0.25g, 1.58mmol) 和2-[2-氯-6-(三氟甲基) 吡啶-4-基] 丙-2-醇 (0.2g, 0.835mmol) 溶解在四氢呋喃 (2mL) 中,冷却至0℃,然后加入氢化钠 (70.0mg, 1.75mmol) 在矿物油中的60%混合物,在0℃下搅拌反应混合物30分钟,接着25℃下搅拌60小时,此时TLC分析结果指示存在某种产物。用水猝灭反应,用乙酸乙酯萃取,有机萃取物用水、饱和NaCl洗涤,置于MgSO₄上方干燥,再真空蒸发。利用LC (pH 2) 纯化残余物,得到产物。MS (ES) : 362 (M+1) 。

[0273] 步骤5: 4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基) -6-(三氟甲基) 吡啶-2-基] 氧基} 环己酮

[0274] 将2-[2-(1,4-二氧杂螺[4.5] 癸-8-基氧基) -6-(三氟甲基) 吡啶-4-基] 丙-2-醇 (0.049g, 0.14mmol) 溶解在丙酮 (3.7mL) 中。加入12.0M的氯化氢水溶液 (0.43mL, 5.2mmol) ,在25℃下搅拌16小时,此时LCMS分析结果显示反应完成度约为70%。加入额外的12.0M氯化氢水溶液 (0.43mL, 5.2mmol) ,搅拌3小时;此时LCMS分析结果显示,反应完成度约为90%,用过量NaHCO₃猝灭反应,再用EtOAc萃取,然后蒸发有机萃取物,得到产物。不纯化该产物,直接用于下一反应。MS (ES) : 318 (M+1) 。

[0275] 步骤5: {1-(顺式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基) -6-(三氟甲基) 吡啶-2-基] 氧基} 环己基) -3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈

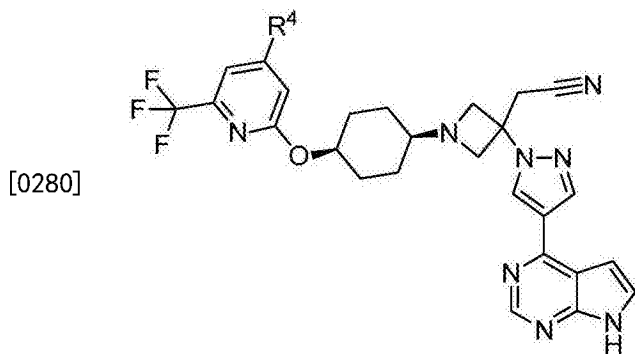
[0276] 将 {3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基} -7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-4-基) -1H-吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈二盐酸盐 (55.3mg, 0.115mmol) 和4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基) -6-(三氟甲基) 吡啶-2-基] 氧基} 环己酮溶解在干燥的1,2-二氯乙烷 (1.38mL) 中,搅拌5分钟,然后加入三乙酰氧基硼氢化钠 (86.1mg, 0.406mmol) 。在25℃下搅

拌反应混合物16小时之后,LCMS分析结果显示,主要有两种非对映产物。用水猝灭反应,加NaHCO₃中和,然后用乙酸乙酯萃取,再蒸发掉溶剂。利用LCMS (pH 10) 纯化残余物,将含有第二峰的级分合并,然后蒸发,得到{1-(顺式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈。还分离了第一峰,得到{1-(反式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈。MS (ES): 712 (M+1)。

[0277] 步骤6: {1-(顺式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈双(三氟乙酸盐)

[0278] 将{1-(顺式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈按US 2013/0045963的实例1中所述去保护,然后利用液相色谱法(pH 2)纯化,得到1-(顺式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈双(三氟乙酸盐)。采用类似的方式制备并表征{1-(反式-4-{[4-(1-羟基-1-甲基乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈双(三氟乙酸盐)。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 9.07 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.78 (d, J=3.7Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.24 (d, J=3.7Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 5.09 (d, J=12.2Hz, 2H), 4.82 (d, J=12.2Hz, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.5 (m, 1H), 2.27 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 1.74 (m, 4H), 1.50 (s, 6H)。MS (ES): 581 (M+1)。

[0279] 下面的实例19和20按照与实例17的工序类似的工序制备。

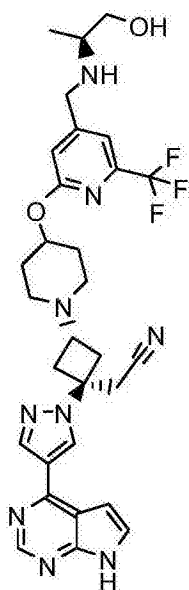


[0281]

实例编号	R4	MS (M+H)+	名称
19		622	{1-(顺式-4-{[4-{[(3R)-3-羟基吡咯烷-1-基]甲基}-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈五(三氟乙酸盐)
20		622	{1-(顺式-4-{[4-{[(3S)-3-羟基吡咯烷-1-基]甲基}-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}环己基)-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈三(三氟乙酸盐)

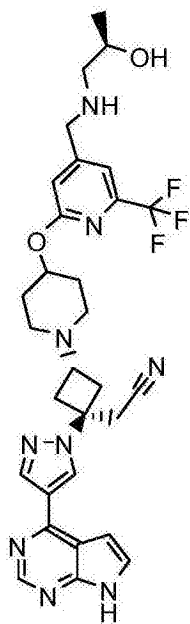
[0282] 实例21: {反式-3-(4-{[4-({[(1S)-2-羟基-1-甲基乙基]氨基]甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基]哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈

[0283]



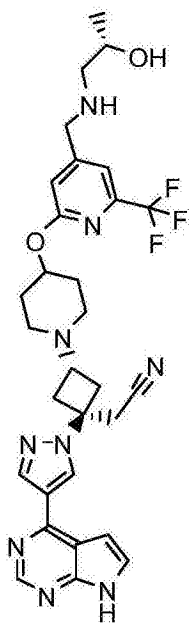
[0284] 将N,N-二异丙基乙胺(9.4μL,0.054mmol)和甲磺酸酐(7.9mg,0.045mmol)加入{反式-3-(4-{[4-(羟甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基]哌啶-1-基)-1-[4-(7-{[2-(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈(10.0mg,0.018mmol,来自US2014/0005166的实例A2的步骤F的中间体的峰1)在二氯甲烷(0.30mL)中的溶液,在形成甲磺酸盐期间搅拌30分钟。真空除去溶剂,并且将残余物重新溶解在四氢呋喃(0.30mL)和甲醇(0.10mL)的混合物中,然后加入(2S)-2-氨基丙-1-醇(20.0μL,0.27mmol,Acros公司)。在40℃下搅拌反应混合物过夜。真空除去溶剂,然后与1:1的TFA:DCM一同搅拌1小时,将粗产物去保护,然后浓缩,再与乙二胺(0.10mL)一起在甲醇(1.0mL)中搅拌,直到完全去保护(如采用LCMS所确定)。利用制备型HPLC-MS(C18柱,用含有0.15% NH₄OH的MeCN/H₂O梯度洗脱)纯化产物。冷冻洗脱液,再冻干,得到游离碱形式的产物(6.0mg,54%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ8.74(s,1H),8.67(s,1H),8.40(s,1H),7.51(d,J=3.6Hz,1H),7.37(s,1H),7.00-6.97(m,2H),5.23-5.00(m,1H),3.90(d,J=14.8Hz,1H),3.81(d,J=14.8Hz,1H),3.50(dd,J=10.9,4.9Hz,1H),3.41(dd,J=10.9,6.9Hz,1H),3.31(s,2H),3.16-3.05(m,2H),2.95(p,J=7.5Hz,1H),2.83-2.63(m,3H),2.56-2.42(m,2H),2.39-2.23(m,2H),2.19-2.04(m,2H),1.93-1.75(m,2H),1.05(d,J=6.4Hz,3H)。¹⁹F NMR(376MHz,CD₃OD) δ-70.30(s)。LCMS(M+H)⁺:610.3

[0285] 实例22: {反式-3-(4-{[4-({[(2R)-2-羟丙基]氨基]甲基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基]哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈



[0287] 按照US 2014/0005166的实例9中的工序,在置换步骤中使用(2R)-1-氨基丙-2-醇(12μL,0.15mmol,奥德里奇公司(Aldrich)),该置换步骤在50℃下进行2小时。获得游离碱形式的产物(8.7mg,46%)。¹H NMR(400MHz,d₆-DMSO) δ12.13(s,1H),8.83(s,1H),8.69(s,1H),8.42(s,1H),7.60(d,J=3.6Hz,1H),7.42(s,1H),7.08(d,J=3.6Hz,1H),7.04(s,1H),5.11-4.90(m,1H),4.49(d,J=4.4Hz,1H),3.76(s,2H),3.67(tt,J=10.3,5.6Hz,1H),3.42(s,2H),3.11-2.96(m,2H),2.81(p,J=7.5Hz,1H),2.74-2.56(m,2H),2.46-2.25(m,4H),2.24-2.09(m,2H),2.09-1.90(m,2H),1.81-1.51(m,2H),1.03(d,J=6.2Hz,3H)。¹⁹F NMR(376MHz,d₆-DMSO) δ-67.29(s)。LCMS(M+H)⁺:610.3。

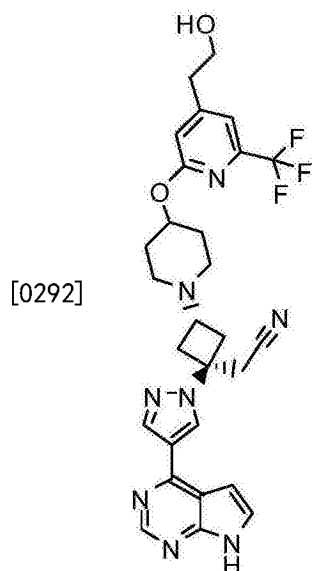
[0288] 实例23: {反式-3-(4-{[4-({(2S)-2-羟丙基} 氨基) 甲基]-6-(三氟甲基)吡啶-2-基} 氧基) 哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基] 环丁基} 乙腈



[0290] 按照US 2014/0005166的实例9中的工序,在置换步骤中使用(2S)-1-氨基丙-2-醇(12μL,0.15mmol,奥德里奇公司(Aldrich)),该置换步骤在50℃下进行2小时(7.9mg,

42%)。¹H NMR (400MHz, d₆-DMSO) δ12.13 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.08 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 5.27-4.71 (m, 1H), 4.49 (d, J=4.4Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.72-3.62 (m, 1H), 3.42 (s, 2H), 3.09-2.96 (m, 2H), 2.81 (p, J=7.4Hz, 1H), 2.72-2.55 (m, 2H), 2.43-2.25 (m, 4H), 2.25-2.08 (m, 2H), 2.08-1.96 (m, 2H), 1.78-1.57 (m, 2H), 1.03 (d, J=6.2Hz, 3H)。¹⁹F NMR (376MHz, d₆-DMSO) δ-67.29 (s)。LCMS (M+H)⁺:610.3。

[0291] 实例24: {反式-3-(4-{[4-(2-羟乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈



[0293] 将{反式-3-(4-{[4-(2-羟乙基)-6-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧基}哌啶-1-基)-1-[4-(7-{[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]环丁基}乙腈(9.0mg, 0.013mmol, 来自US 2014/0005166的实例A4的步骤3的中间体的峰2)去保护,然后在二氯甲烷(0.50mL)和三氟乙酸(0.50mL)的混合物中搅拌1小时,将其纯化。真空除去溶剂,并且将残余物置于含有乙二胺(0.1mL)的甲醇(0.1mL)中搅拌。利用制备型HPLC-MS (C18柱,用含有0.15%NH₄OH的MeCN/H₂O梯度洗脱)纯化,得到游离碱形式的产物(5.8mg, 79%)。¹H NMR (300MHz, d₆-DMSO) δ12.12 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.08 (d, J=3.6Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.99 (tt, J=8.2, 4.1Hz, 1H), 4.73 (t, J=4.9Hz, 1H), 3.66 (q, J=5.9Hz, 2H), 3.42 (s, 2H), 3.11-2.95 (m, 2H), 2.90-2.71 (m, 3H), 2.71-2.56 (m, 2H), 2.44-2.30 (m, 2H), 2.15 (t, J=9.2Hz, 2H), 2.09-1.82 (m, 2H), 1.83-1.58 (m, 2H)。¹⁹F NMR (282MHz, d₆-DMSO) δ-67.26 (s)。LCMS (M+H)⁺:567.2。

[0294] 实例A: JAK激酶体外测定

[0295] 依据Park et al., Analytical Biochemistry 1999, 269, 94-104 (Park等人,《分析生物化学》,1999年,第269卷,第94-104页)中描述的以下体外测定,来检测本文化合物对JAK靶标的抑制活性。使用杆状病毒,在昆虫细胞中表达具有N末端His标记的人类JAK1催化结构域(第837至1142位氨基酸)、人类JAK2催化结构域(第828至1132位氨基酸)和人类JAK3催化结构域(第781至1124位氨基酸),再加以纯化。测量生物素化肽的磷酸化,由此测定JAK1、JAK2或JAK3的催化活性。利用均相时间分辨荧光(HTRF)检测磷酸化肽。用40微升反应物测量化合物对每种激酶的IC₅₀,所述40微升反应物在50mM Tris (pH 7.8) 缓冲液中含有

酶、ATP和500nM肽,以及100mM NaCl、5mM DTT和0.1mg/mL (0.01%) BSA。对于1mM IC_{50} 测量,反应物中的ATP浓度为1mM。室温下反应1小时,然后用含有45mM EDTA、300nM SA-APC、6nM Eu-Py20的20 μ L测定缓冲液(美国马萨诸塞州波士顿市珀金埃尔默公司(Perkin Elmer, Boston, MA))终止反应。与铕标记抗体的结合进行40分钟,然后在Fusion读板机(美国马萨诸塞州波士顿市珀金埃尔默公司(Perkin Elmer, Boston, MA))上测量HTRF信号。有关按照实例A的测定法以1mM ATP检测各实例的化合物获得的数据,参见表2。

[0296] 实例B:细胞测定

[0297] 可将依赖细胞因子、因而依赖JAK/STAT信号转导才能生长的癌细胞系按每孔6000个细胞(96孔板格式)接种在RPMI 1640、10%FBS和1nG/mL的适当细胞因子中。可将化合物加入DMSO/培养基(最终浓度为0.2%DMSO)内的细胞中,在37°C、5%CO₂的条件下温育72小时。进行CellTiter-Glo发光法细胞活力测定(CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay)(普洛麦格公司(Promega)),然后执行TopCount定量测定(美国马萨诸塞州波士顿市珀金埃尔默公司(Perkin Elmer, Boston, MA)),来评估化合物对细胞活力的影响。使用测定读数相同的非JAK驱动细胞系,平行测定化合物的潜在脱靶效应。所有实验通常都一式两份进行。

[0298] 上述细胞系还可用于检查化合物对JAK激酶或潜在下游底物(诸如STAT蛋白、Akt、Shp2或Erk)的磷酸化的影响。这些实验可如下进行:先进行细胞因子饥饿过夜,接着进行短暂的化合物预温育(2小时或更短时间)和约1小时或更短时间的细胞因子刺激。然后从细胞中提取蛋白质,采用本领域技术人员熟悉的技术进行分析,这些技术包括免疫印迹法或ELISA,使用的是能够区分磷酸化蛋白和总蛋白的抗体。这些实验可利用正常细胞或癌细胞来研究化合物对肿瘤细胞存活生物学或对炎症疾病的中介物的活性。例如,就研究化合物对炎症疾病的中介物的活性来说,可使用细胞因子诸如IL-6、IL-12、IL-23或IFN来刺激JAK活化,从而引起一种或多种STAT蛋白磷酸化,并可能产生转录谱(采用阵列或qPCR技术评估)或者产生并/或分泌蛋白质(诸如IL-17)。可使用本领域技术人员常用的技术来测量化合物抑制这些细胞因子介导的效应的能力。

[0299] 本文的化合物还可在被设计用于评估其对突变JAK(例如,在骨髓增生性失调中发现的JAK2V617F突变)的效力和活性的细胞模型中进行测试。这些实验往往利用血液学谱系中异位表达野生型或突变型JAK激酶的细胞因子依赖性细胞(例如BaF/3)(James, C., et al. Nature 434:1144-1148 (James, C. 等人,《自然》,第434卷,第1144-1148页);Staerk, J., et al. JBC 280:41893-41899 (Staerk, J. 等人,《生物化学杂志》,第280卷,第41893-41899页))。终点包括化合物对细胞存活、增殖以及磷酸化JAK、STAT、Akt或Erk蛋白质的效应。

[0300] 可评估本文中某些化合物抑制T细胞增殖的活性。此类测定可被视为是对细胞因子(即JAK)驱动增殖的另一种测定,也可被视为是对免疫抑制或对免疫激活的抑制的简化测定。下面简述了此类实验的执行方法。使用Ficoll Hypaque分离方法,由人全血样品制备外周血单核细胞(PBMC),可通过淘洗从PBMC获得T细胞(级分2000)。可将新分离的人T细胞以 2×10^6 个细胞/毫升的密度置于培养基(RPMI 1640,补充有10%胎牛血清、100U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素)中,37°C下最长保存2天。对于IL-2刺激的细胞增殖分析,首先使用植物血凝素(PHA)以10 μ g/mL的最终浓度处理T细胞72小时。用PBS洗涤细胞一次后,将细胞以6000个细胞/孔的密度接种到96孔板内,在存在100U/mL人IL-2(以色列雷霍沃特市

(Rehovot, Israel) 的 ProSpec-Tany TechnoGene 公司) 的情况下, 用培养基中浓度不同的化合物进行处理。将板在 37℃ 下温育 72 小时, 然后使用 CellTiter-Glo 发光试剂, 按照制造商建议的方案 (美国威斯康星州麦迪逊市普洛麦格公司 (Promega; Madison, WI)) 来评估增殖指数。

[0301] 测定 C.S100A9 转基因小鼠模型

[0302] 已有证据显示, S100A9 转基因小鼠表现出 MDSC 骨髓积聚, 伴有类似于 MDS 的渐进性多系血细胞减少症和细胞发育异常的进展。此外, 借助全反式视黄酸处理或借助承载免疫受体酪氨酸基激活基序 (承载 ITAM) 的活性衔接蛋白 (DAP12) 对 CD33 信号转导的中断来迫使 MDSC 早熟, 从而挽救血液表型并缓解疾病。该体系可用于测试临床前模型中 JAK1 抑制对 MDS 样疾病的影响。J. Clin. Invest., 123 (11): 4595-4611 (2013) (《临床研究杂志》, 第 123 卷, 第 11 期, 第 4595-4611 页, 2013 年)。因此, 经管饲法给予 JAK1 选择性抑制剂。然后监测化合物减轻在 S100A9 转基因小鼠体内观测到的血细胞减少和细胞发育异常现象的能力。

[0303] 所有专利、专利申请、期刊文章和书籍都全文以引用方式并入本文。