



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108602827 B

(45) 授权公告日 2021.08.20

(21) 申请号 201680077913.0

(73) 专利权人 安塞塔制药公司

(22) 申请日 2016.11.04

地址 荷兰奥斯

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 T.巴夫 E.德兹瓦特 S.费尔凯克  
N.胡根布姆 D.德蒙

申请公布号 CN 108602827 A

(43) 申请公布日 2018.09.28

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30) 优先权数据

代理人 李进 罗文峰

62/252420 2015.11.06 US

62/261228 2015.11.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.CI.

2018.07.04

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 孙静

PCT/IB2016/056661 2016.11.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/077507 EN 2017.05.11

权利要求书3页 说明书69页

(54) 发明名称

Bruton酪氨酸激酶的咪唑并吡嗪抑制剂

(57) 摘要

在一些实施方案中,本发明涉及BTK抑制剂或其药学上可接受的盐,共晶,酯,前药,溶剂合物,水合物或衍生物,或涉及包含这些化合物的药物组合物,并涉及它们在治疗中的用途。特别地,在一些实施方案中,本发明涉及咪唑并吡嗪化合物,其药物组合物以及所述化合物和药物组合物在治疗过度增殖性病症、炎性病症、免疫病症或自身免疫病症中的用途。

1. 选自以下的化合物：

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]-甲基-氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺；

4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺，

及其药学上可接受的盐。

2. 权利要求1的化合物，所述化合物用于治疗过度增殖性病症、炎性病症、免疫病症或自身免疫病症。

3. 根据权利要求1的化合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗有此需要的患者的过度增殖性病症、炎性病症、免疫病症或自身免疫病症。

4. 权利要求3的用途，其中所述过度增殖性病症、炎性病症、免疫病症或自身免疫病症选自：膀胱癌，头颈部癌，胰腺导管腺癌，胰腺癌，结肠癌，乳癌，纤维肉瘤，间皮瘤，肺癌，胸腺癌，前列腺癌，结肠直肠癌，卵巢癌，急性骨髓性白血病，胸腺癌，脑癌，鳞状细胞癌，皮肤

癌,眼癌,视网膜母细胞瘤,黑素瘤,口腔和口咽癌,胃癌,宫颈癌,肾癌,肝癌,食管癌,睾丸癌,妇产科癌症,甲状腺癌,获得性免疫缺陷综合征相关的淋巴瘤,卡波西肉瘤,病毒诱导的癌症,成胶质细胞瘤,血液肿瘤,慢性粒细胞白血病,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡中心淋巴瘤,丙型肝炎病毒感染,霍奇金淋巴瘤,多发性骨髓瘤,非霍奇金淋巴瘤,原发性中枢神经系统淋巴瘤,肿瘤血管生成,慢性炎症性疾病,类风湿性关节炎,动脉粥样硬化,炎性肠病,糖尿病,糖尿病性视网膜病,早产儿视网膜病,年龄相关性黄斑变性,血管瘤,神经胶质瘤,白塞病,风湿性多肌痛,巨细胞动脉炎,结节病,Kawasaki病,青少年特发性关节炎,化脓性汗腺炎,干燥综合征,银屑病关节炎,青少年类风湿性关节炎,强直性脊柱炎,克罗恩病和狼疮。

5. 权利要求4的用途,其中所述过度增殖性病症、炎性病症、免疫病症或自身免疫病症选自:肾细胞癌,眼内黑素瘤,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,肝细胞癌,转移性结肠癌,IV期黑素瘤,银屑病,湿疹,硬皮病,溃疡性结肠炎,特应性皮炎,贮袋炎,脊柱关节炎和葡萄膜炎。

6. 治疗有效量的权利要求1的化合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗有此需要的患者的实体肿瘤癌症,其中治疗有效量有效地抑制实体肿瘤癌细胞与选自以下的至少一种微环境之间的信号传导:巨噬细胞,单核细胞,肥大细胞,辅助T细胞,细胞毒性T细胞,调节性T细胞,天然杀伤细胞,骨髓衍生抑制细胞,调节性B细胞,嗜中性粒细胞,树突细胞和成纤维细胞。

7. 权利要求6的用途,其中所述实体肿瘤癌症选自胰腺癌,乳癌,卵巢癌,黑素瘤,肺癌,头颈部癌和结肠直肠癌。

8. 包含权利要求1的化合物和至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

9. 权利要求8的药物组合物,用于治疗有此需要的患者的过度增殖性病症、炎性病症、免疫病症或自身免疫病症。

10. 权利要求9的药物组合物,其中所述过度增殖性病症选自:膀胱癌,头颈部癌,胰腺导管腺癌(PDA),胰腺癌,结肠癌,乳癌,纤维肉瘤,间皮瘤,肺癌,胸腺瘤,前列腺癌,结肠直肠癌,卵巢癌,急性骨髓性白血病,胸腺癌,脑癌,鳞状细胞癌,皮肤癌,眼癌,视网膜母细胞瘤,黑素瘤,口腔和口咽癌,胃癌,宫颈癌,肾癌,肝癌,食管癌,睾丸癌,妇产科癌症,甲状腺癌,获得性免疫缺陷综合征相关的淋巴瘤,卡波西肉瘤,病毒诱导的癌症,成胶质细胞瘤,血液肿瘤,慢性粒细胞白血病,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡中心淋巴瘤,丙型肝炎病毒感染,霍奇金病,多发性骨髓瘤,非霍奇金淋巴瘤和原发性中枢神经系统淋巴瘤。

11. 权利要求9的药物组合物,其中所述过度增殖性病症选自:肾细胞癌,眼内黑素瘤,非小细胞肺癌,肝细胞癌,转移性结肠癌,小细胞肺癌和IV期黑素瘤。

12. 权利要求9的药物组合物,其中所述炎性病症、免疫病症或自身免疫病症选自:慢性炎症性疾病,类风湿性关节炎,动脉粥样硬化,炎性肠病,皮肤病,1型糖尿病,2型糖尿病,糖尿病性视网膜病,早产儿视网膜病,年龄相关性黄斑变性,白塞病,风湿性多肌痛,巨细胞动脉炎,结节病,Kawasaki病,青少年特发性关节炎,化脓性汗腺炎,干燥综合征,银屑病关节炎,青少年类风湿性关节炎,强直性脊柱炎,克罗恩病,狼疮,人类白细胞抗原相关疾病,自身抗体,免疫治疗,Addison病,自身免疫多内分泌综合征1型,自身免疫多内分泌综合征2型,Grave病,Hashimoto甲状腺炎,多内分泌自身免疫,医源性自身免疫,特发性甲状腺功能减退症,白癜风和狼疮性肾炎。

13. 权利要求9的药物组合物,其中所述炎性病症、免疫病症或自身免疫病症选自:银屑病,湿疹,硬皮病,溃疡性结肠炎,特应性皮炎,贮袋炎,脊柱关节炎和葡萄膜炎。

## Bruton酪氨酸激酶的咪唑并吡嗪抑制剂

### 发明领域

[0001] 在一些实施方案中,本发明涉及杂环化合物,涉及包含这些化合物的药物组合物,以及它们在治疗中的用途。在一些实施方案中,本发明涉及咪唑并吡嗪化合物在治疗过度增殖性病症、炎性病症、免疫病症或自身免疫病症中的用途。

### [0002] 发明背景

[0003] B淋巴细胞活化在适应性免疫反应的产生中是至关重要的。脱轨的B淋巴细胞活化是许多自身免疫疾病的标志,因此调节这种免疫反应具有治疗意义。最近,B细胞疗法在自身免疫疾病中的成功已经确立。使用利妥昔单抗(抗CD20疗法)治疗类风湿性关节炎(RA)患者是被接受的临床疗法。更近期的临床试验研究表明,用利妥昔单抗治疗还能改善复发缓解型多发性硬化症(RRMS)和系统性红斑狼疮(SLE)患者的疾病症状。这一成功支持了靶向B细胞免疫的自身免疫疾病的未来疗法的潜力。

[0004] Bruton酪氨酸激酶(BTK)是在B细胞和骨髓细胞中表达的Tec家族非受体蛋白激酶。BTK在由B细胞受体(BCR)和肥大细胞上的Fc $\epsilon$ R1接合活化的信号传导途径中的功能被充分证实。此外,暗示了BTK作为Toll样受体信号传导的下游靶标的功能。BTK由普列克底物蛋白同源(PH)结构域、Tec同源(TH)结构域、Src同源3(SH3)结构域、Src同源2(SH2)结构域和酪氨酸激酶或Src同源1(TK或SH1)结构域组成。BTK在成熟B细胞中的B细胞受体(BCR)和肥大细胞上的Fc $\epsilon$ R1的接合活化的信号传导途径中的功能被充分证实。人类BTK中的功能性突变导致原发性免疫缺陷疾病(X连锁的无丙种球蛋白血症(agammaglobuinaemia)),其特征在于原B细胞与前B细胞阶段之间存在阻断的B细胞发育中的缺陷。结果是几乎没有B淋巴细胞,导致所有类别的血清免疫球蛋白显著减少。这些发现支持了BTK在自身免疫疾病中自身抗体产生的调节中的关键作用。

[0005] BTK在许多B细胞淋巴瘤和白血病中表达。功能失调的B细胞具有重要作用的其它疾病是B细胞恶性肿瘤,如Hendriks等,Nat.Rev.Cancer,2014,14,219-231中所述。已报道的BTK在调节B细胞增殖和凋亡中的作用表明BTK抑制剂在治疗B细胞淋巴瘤中的潜力。因此已经开发BTK抑制剂作为许多这些恶性肿瘤的潜在疗法,如D'Cruz等人,Oncotargets and Therapy 2013,6,161-176中所述。由于报道的BTK在Fc $\epsilon$ R介导的肥大细胞活化中的调节作用,BTK抑制剂也可表现出治疗过敏反应的潜力,如Gilfillan等,Immunologic.Rev.2009,288,149-169中所述。此外,还报道BTK牵涉RANKL诱导的破骨细胞分化,如Shinohara等人,Cell 2008,132,794-806中所述,因此也可能对治疗骨再吸收病症具有重要性。功能失调的B细胞具有重要作用的其它疾病是B细胞恶性肿瘤。实际上,抗CD20疗法在临床中有效用于治疗滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病,如Lim等人,Haematologica,2010,95,135-143中所述。已报道的BTK在调节B细胞增殖和凋亡中的作用表明BTK抑制剂在治疗B细胞淋巴瘤中也有潜力。BTK的抑制似乎特别与由于慢性活性BCR信号传导的B细胞淋巴瘤有关,如Davis等人,Nature,2010,463,88-94中所述。

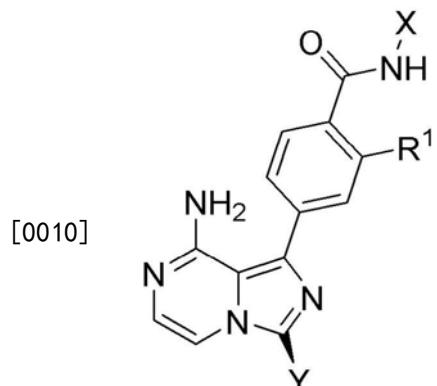
[0006] 在许多实体肿瘤中,支持性微环境(可能构成大部分肿瘤块)是使肿瘤能存活的动力。肿瘤微环境通常定义为“促进致瘤性转化(neoplastic transformation)、支持肿瘤生

长和侵袭、保护肿瘤免受宿主免疫、促进治疗抗性并提供生态位 (niches) 供显性转移 (dominant metastases) 旺盛生长的细胞、可溶性因子、信号传导分子、细胞外基质和机械暗示 (mechanical cues)”的复杂混合物,如Swartz等人,Cancer Res.,2012,72,2473中所述。尽管肿瘤表达应被T细胞识别的抗原,但由于微环境的免疫抑制,免疫系统对肿瘤的清除很少见。用例如化疗处理肿瘤细胞本身也已被证明不足以克服微环境的保护作用。因此迫切需要新的方法来更有效地治疗实体肿瘤,该方法考虑到微环境的作用。

[0007] 迄今报道的一些BTK抑制剂对Src家族激酶没有选择性。由于对Src家族激酶敲除,特别是对双重和三重敲除报道的显著的不利影响,这被认为对于对Src家族激酶没有选择性的BTK抑制剂的开发是禁止性的。Lyn缺陷型和Fyn缺陷型小鼠均表现出模拟人类狼疮肾炎表型的自身免疫。另外,Fyn缺陷型小鼠也显示明显的神经缺陷。Lyn敲除小鼠也表现出过敏样表型,表明Lyn是通过控制肥大细胞反应性和过敏相关特性的IgE介导的过敏反应的广泛的负调节物,如Odom等人,J.Exp.Med.,2004,199,1491-1502中所述。此外,老龄Lyn敲除小鼠发生严重的脾肿大(骨髓样扩张)和播散的单核细胞/巨噬细胞肿瘤,如Harder等人,Immunity,2001,15,603-615中所述。这些观察符合在Lyn缺陷型小鼠中观察到的高反应性B细胞、肥大细胞和骨髓细胞,和增加的Ig水平。雌性Src敲除小鼠由于减少的卵泡发育和排卵而不育,如Roby等人,Endocrine,2005,26,169-176中所述。双重敲除Src-/-Fyn-/-和Src-/-Yes-/-表现出严重的表型,对运动和呼吸有影响。三重敲除Src-/-Fyn-/-Yes-/-在第9.5天死亡,如Klinghoffer等人,EMBO J.,1999,18,2459-2471所示。对于双重敲除Src-/-Hck-/-,三分之二的小鼠在出生时死亡,存活小鼠发生骨硬化症、髓外造血、贫血、白细胞减少,如Lowell等人,Blood,1996,87,1780-1792所示。因此,同时抑制Src家族激酶的多种或全部激酶的抑制剂可能会导致严重的不利影响。

[0008] 发明概述

[0009] 一方面,BTK抑制剂是具有以下结构的式(I)化合物:

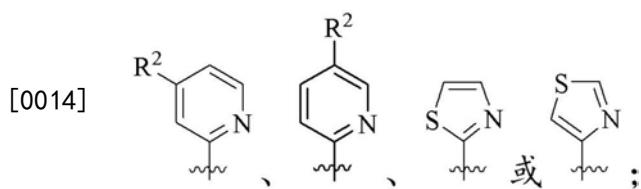


(I)

[0011] 或其药学上可接受的盐、共晶、酯、前药、溶剂合物、水合物或衍生物,其中:

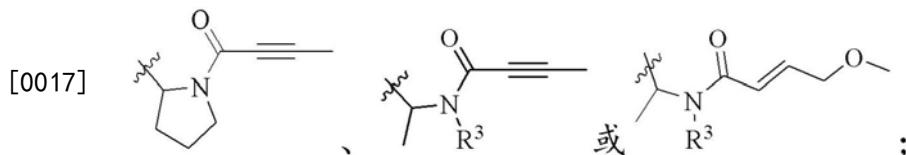
[0012] R<sup>1</sup>是氢或甲氧基,其中甲氧基任选被一个或两个氟取代;

[0013] X是:



[0015]  $R^2$ 是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基,其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代;

[0016] Y是:



[0018]  $R^3$ 是H或甲基。

[0019] 在实施方案中,本发明包括选自以下的式(I)化合物:

[0020] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-1);

[0021] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-2);

[0022] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-3);

[0023] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-4);

[0024] 4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(式E-5);

[0025] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]-甲基-氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-6);

[0026] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(式E-7);

[0027] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(式E-8);

[0028] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-9);

[0029] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(式E-10);

[0030] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-11);

[0031] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-12);

[0032] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-13);

[0033] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-14)；

[0034] 4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺(式E-15)；

[0035] 4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-16)；

[0036] 4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-17)；

[0037] (R)-4-(8-氨基-3-(1-(丁-2-炔酰基)吡咯烷-2-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-N-(噻唑-4-基)苯甲酰胺(式E-24)；及其药学上可接受的盐、共晶、酯、前药、溶剂合物、水合物或衍生物。

[0038] 发明详述

[0039] 尽管本文示出并描述了本发明的优选实施方案,但是这些实施方案仅作为示例提供,并不意图另外限制本发明的范围。所描述的本发明实施方案的各种替代方案可以用于实践本发明。

[0040] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。本文提及的所有专利和公布通过引用整体并入。

[0041] 如本文所用,术语“共同施用”,“共施用”,“与……组合而被施用”和“与……组合施用”包括向受试者施用两种或更多种药剂,使得这些药剂和/或其代谢物同时存在于受试者中。共同施用包括在分开的组合物中同时施用,在不同的时间在分开的组合物中施用,或者在其中存在两种或更多种药剂的组合物中施用。

[0042] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以实现预期应用的本文所述化合物或化合物组合的量,所述预期应用包括但不限于疾病治疗。治疗有效量可以根据预期的应用(体外或体内)或要治疗的受试者和疾病状况(例如受试者的体重、年龄和性别),疾病状况的严重程度,施用方式等改变,本领域普通技术人员可容易地确定。该术语也适用于将在靶细胞中诱导特定反应(例如,血小板粘附和/或细胞迁移的降低)的剂量。具体的剂量将根据所选择的具体化合物、所遵循的给药方案、该化合物是否与其它化合物联合施用、施用的时机、施用的组织以及其中携带化合物的物理递送系统而改变。

[0043] 这里使用的术语“治疗效果”包括如上所述的治疗益处和/或预防益处。预防效果包括延迟或消除疾病或病情的出现,延迟或消除疾病或病情症状的发作,减缓、停止或逆转疾病或病情的发展,或其任何组合。

[0044] 术语“药学上可接受的盐”是指衍生自本领域已知的各种有机和无机抗衡离子的盐。药学上可接受的酸加成盐可以用无机酸和有机酸形成。可以衍生盐的无机酸包括例如盐酸,氢溴酸,硫酸,硝酸和磷酸。可以衍生盐的有机酸包括例如乙酸,丙酸,乙醇酸,丙酮酸,草酸,马来酸,丙二酸,琥珀酸,富马酸,酒石酸,柠檬酸,苯甲酸,肉桂酸,扁桃酸,甲磺酸,乙磺酸,对甲苯磺酸和水杨酸。药学上可接受的碱加成盐可以用无机碱和有机碱形成。可以衍生盐的无机碱包括例如钠,钾,锂,铵,钙,镁,铁,锌,铜,锰和铝。可以衍生盐的有机碱包括例如伯胺,仲胺和叔胺,取代的胺,包括天然存在的取代的胺,环胺和碱性离子交换树脂。具体实例包括异丙胺,三甲胺,二乙胺,三乙胺,三丙胺和乙醇胺。在选择的实施方案

中,药学上可接受的碱加成盐选自铵盐,钾盐,钠盐,钙盐和镁盐。术语“共晶”是指由本领域已知的许多共晶形成物(cocrystal former)衍生的分子复合物。与盐不同,共晶通常不涉及共晶和药物之间的氢转移,而是涉及晶体结构中的共晶形成物与药物之间的分子间相互作用,例如氢键,芳族环堆积,或分散力。

[0045] “药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”旨在包括任何和所有溶剂,分散介质,涂层,抗细菌剂和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂。此类介质和药剂(agent)用于药物活性物质的用途在本领域中是公知的。除非任何常规介质或药剂与活性成分不相容,其在本发明的治疗组合物中的用途被预期。补充的活性成分也可以掺入所述组合物中。

[0046] “前药”旨在描述可在生理条件下或通过溶剂分解转化为本文所述的生物活性化合物的化合物。因此,术语“前药”是指药学上可接受的生物活性化合物的前体。前药在施用于受试者时可以是无活性的,但在体内例如通过水解转化为活性化合物。前药化合物通常在哺乳动物生物体中提供溶解度,组织相容性或延迟释放的优点(参见例如Bundgaard, *Design of Prodrugs*, Elsevier, Amsterdam, 1985)。术语“前药”还旨在包括任何共价结合的载体,其在施用于受试者时在体内释放活性化合物。如本文所述的活性化合物的前药可以通过修饰活性化合物中存在的官能团来制备,修饰的方式使得修饰在常规操作中或体内被裂解以产生活性母体化合物。前药包括例如其中羟基、氨基或巯基与任何基团结合的化合物,当将活性化合物的前药施用于哺乳动物受试者时,所述任何基团分别裂解形成游离羟基、游离氨基或游离巯基。前药的实例包括但不限于活性化合物中醇的乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物,羧酸的各种酯衍生物或胺官能团的乙酰胺、甲酰胺和苯甲酰胺衍生物。

[0047] 当在本文中使用范围来描述例如物理或化学性质如分子量或化学式时,意图包括其中的范围和具体实施方案的所有组合和子组合。当提及数字或数字范围时使用术语“约”意味着所提及的数字或数字范围是实验可变性内(或统计实验误差内)的近似值,因此数字或数字范围可以变化例如所述数字或数字范围的1%至15%之间。术语“包括”(以及诸如“包含”或“含有”或“具有”或“含”的相关术语)包括那些实施方案,例如由所描述的特征“组成”或基本上由所描述的特征“组成”的任何组合物、方法或过程的实施方案。

[0048] “异构体”是具有相同分子式的不同化合物。“立体异构体”是仅在原子排列在空间中的方式不同的异构体-即具有不同的立体化学构型。“对映异构体”是一对为彼此的不可重叠镜像的立体异构体。一对对映异构体的1:1混合物是“外消旋”混合物。术语“(±)”在适当时用于指定外消旋混合物。“非对映异构体”是具有至少两个不对称原子的立体异构体,但不是彼此的镜像。根据Cahn-Ingold-Prelog R-S系统确定绝对立体化学。当化合物是纯对映异构体时,每个手性碳上的立体化学可以由(R)或(S)指定。可以将绝对构型未知的拆分化合物根据其在钠D线波长处旋转平面偏振光的方向(右旋或左旋)指定为(+)或(-)。本文所述的某些化合物含有一个或多个不对称中心,因此可以产生对映异构体,非对映异构体和其它立体异构形式,就绝对立体化学而言,可以将其定义为(R)或(S)。本化学实体、药物组合物和方法意在包括所有这些可能的异构体,包括外消旋混合物,光学纯形式和中间体混合物。光学活性(R)-和(S)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂来制备,或者使用常规技术来拆分。当本文所述的化合物含有烯属双键或其它几何不对称中心时,除非另有说明,所述化合物旨在包括E和Z几何异构体。

[0049] 术语“水合物”包括但不限于半水合物、一水合物、二水合物、三水合物等。BTK抑制

剂的水合物可以通过在合适的条件下使BTK抑制剂与水接触以产生选择的水合物来制备。

[0050] 在一些实施方案中,对映异构体富集的组合物就每单位质量的治疗效用而言具有比该组合物的外消旋混合物更高的效力。对映异构体可以通过本领域技术人员已知的方法从混合物中分离,该方法包括手性高压液相色谱 (HPLC) 和手性盐的形成和结晶;或优选的对映异构体可以通过不对称合成来制备。参见例如Jacques等人,Enantiomers, Racemates and Resolutions,Wiley Interscience,New York,1981;Eliel,Stereochemistry of Carbon Compounds,McGraw-Hill, NY,1962;以及Eliel and Wilen,Stereochemistry of Organic Compounds,Wiley, New York,1994。

[0051] “互变异构体”是通过互变异构相互转化的结构不同的异构体。“互变异构”是异构化的形式,包括质子移变或质子转移互变异构,它被认为是酸碱化学的子集。“质子移变互变异构”或“质子转移互变异构”涉及质子的迁移,伴随着键序的变化,通常是单键与相邻双键的交换。当互变异构是可能的(例如在溶液中)时,可以达到互变异构体的化学平衡。互变异构的实例是酮-烯醇互变异构。酮-烯醇互变异构的具体实例是戊烷-2,4-二酮和4-羟基戊-3-烯-2-酮互变异构体的相互转化。互变异构的另一个实例是酚-酮互变异构。酚-酮互变异构的具体实例是吡啶-4-酚和吡啶-4(1H)-酮互变异构体的相互转化。

[0052] “溶剂合物”是指与一个或多个药学上可接受的溶剂分子物理缔合的化合物。

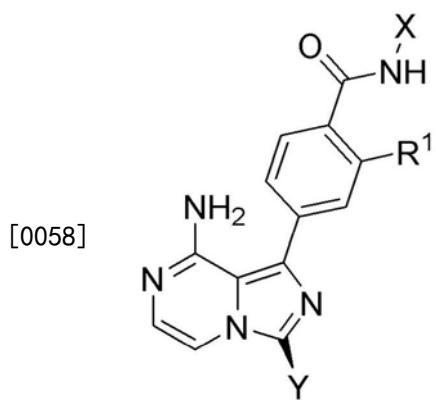
[0053] “取代的”意指所提及的基团可以连接有一个或多个单独和独立地选自例如以下的另外的基团、基或部分:酰基,烷基,烷基芳基,环烷基,芳烷基,芳基,碳水化合物,碳酸酯,杂芳基,杂环烷基,羟基,烷氧基,芳基氧基,巯基,烷硫基,芳硫基,氰基,卤素,羰基,酯,硫代羰基,异氰酸基,硫氰酸基,异硫氰酸基,硝基,氧代,全卤代烷基,全氟烷基,磷酸酯,甲硅烷基,亚磺酰基,磺酰基,磺酰胺基,次硫酸基(sulfonyl),磺酸酯,脲和氨基(包括单-和二-取代的氨基)及其被保护的衍生物。取代基本身可以被取代,例如,环烷基取代基本身可以在其一个或多个环碳上具有卤素取代基。术语“任选取代的”意指用指定的基团、基或部分的任选取代。

[0054] 本发明化合物还包括那些化合物的结晶和无定形形式,包括例如化合物的多晶型物,假多晶型物,溶剂合物,水合物,未溶剂化多晶型物(包括无水物(anhydride)),构象多晶型物和无定形形式,以及它们的混合物。“结晶形式”和“多晶型”旨在包括化合物的所有结晶和无定形形式,包括例如多晶型物,假多晶型物,溶剂合物,水合物,未溶剂化多晶型物(包括无水物(anhydride)),构象多晶型物和无定形形式,以及它们的混合物,除非提及特定的结晶或无定形形式。

[0055] BTK抑制剂

[0056] 本发明的BTK抑制剂包括与靶标共价结合(以不可逆的方式)的BTK抑制剂和与靶标非共价结合(以可逆的方式)的BTK抑制剂。在实施方案中,BTK抑制剂共价结合于BTK位置481处的半胱氨酸残基。

[0057] 一方面,BTK抑制剂是具有以下结构的式(I)化合物:

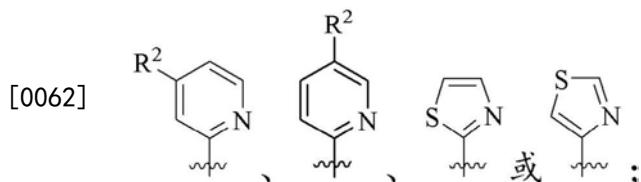


(I)

[0059] 或其药学上可接受的盐、共晶、酯、前药、溶剂合物、水合物或衍生物，其中：

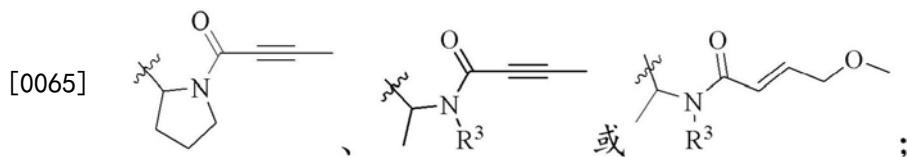
[0060] R<sup>1</sup>是氢或甲氧基，其中甲氧基任选被一个或两个氟取代；

[0061] X是：



[0063] R<sup>2</sup>是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基，其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代；

[0064] Y是：

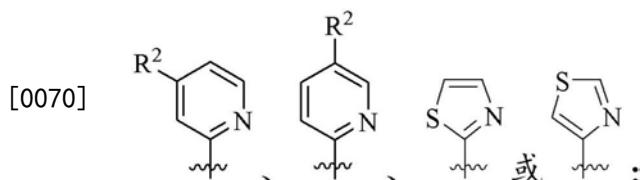


[0066] R<sup>3</sup>是H或甲基。

[0067] 在实施方案中，所述BTK抑制剂是式(I)的化合物，其中：

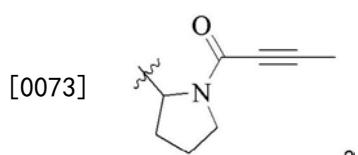
[0068] R<sup>1</sup>是氢；

[0069] X是：



[0071] R<sup>2</sup>是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基，其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代；

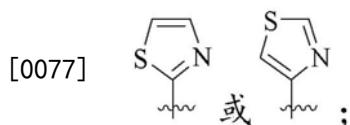
[0072] Y是：



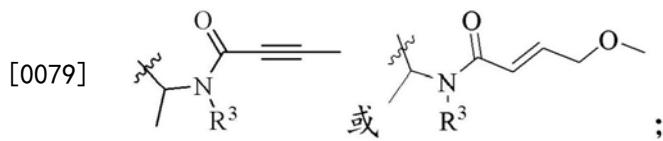
[0074] 在实施方案中，所述BTK抑制剂是式(I)的化合物，其中：

[0075]  $R^1$ 是甲氧基；

[0076] X是：



[0078] Y是：

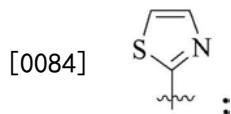


[0080]  $R^3$ 是H或甲基。

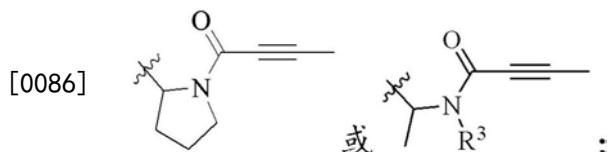
[0081] 在实施方案中，所述BTK抑制剂是式(I)的化合物，其中：

[0082]  $R^1$ 是氢；

[0083] X是：



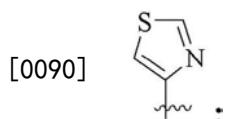
[0085] Y是：



[0087]  $R^3$ 是H或甲基。

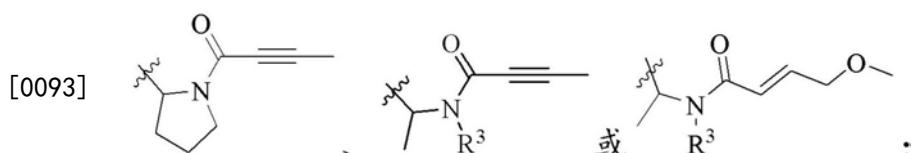
[0088] 在实施方案中，所述BTK抑制剂为式(I)的化合物，其中 $R^1$ 为氢或甲氧基，其中甲氧基任选被一个或两个氟取代；

[0089] X是：



[0091]  $R^2$ 是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基，其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代；

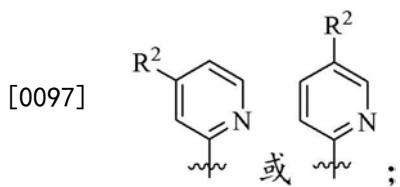
[0092] Y是：



[0094]  $R^3$ 是H或甲基。

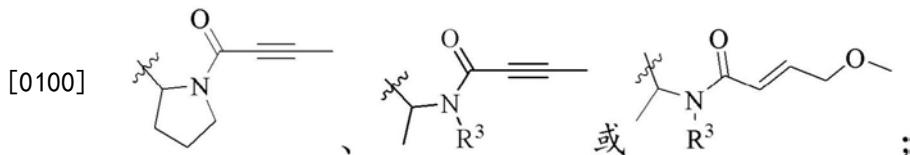
[0095] 在实施方案中，所述BTK抑制剂为式(I)的化合物，其中 $R^1$ 为氢或甲氧基，其中甲氧基任选被一个或两个氟取代；

[0096] X是：



[0098]  $R^2$ 是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基,其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代;

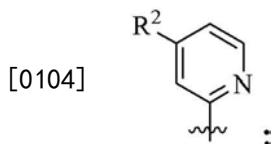
[0099] Y是:



[0101]  $R^3$ 是H或甲基。

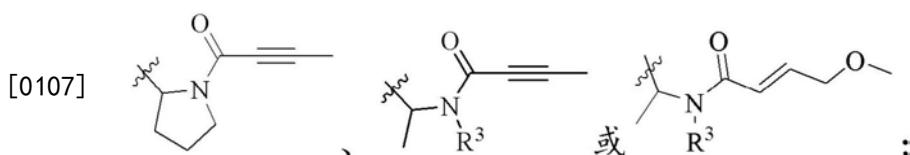
[0102] 在实施方案中,所述BTK抑制剂为式(I)的化合物,其中 $R^1$ 为氢或甲氧基,其中甲氧基任选被一个或两个氟取代;

[0103] X是:



[0105]  $R^2$ 是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基,其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代;

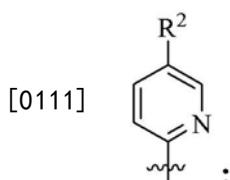
[0106] Y是:



[0108]  $R^3$ 是H或甲基。

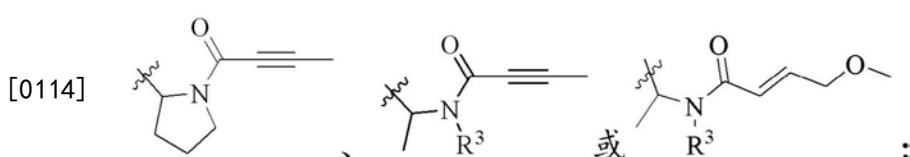
[0109] 在实施方案中,所述BTK抑制剂为式(I)的化合物,其中 $R^1$ 为氢或甲氧基,其中甲氧基任选被一个或两个氟取代;

[0110] X是:



[0112]  $R^2$ 是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基,其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代;

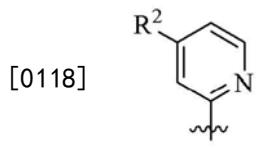
[0113] Y是:



[0115]  $R^3$ 是H或甲基。

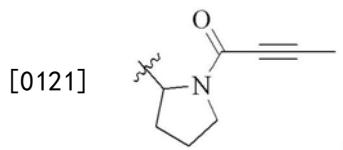
[0116] 在实施方案中,所述BTK抑制剂为式(I)的化合物,其中 $R^1$ 为氢或甲氧基,其中甲氧基任选被一个或两个氟取代;

[0117] X是:



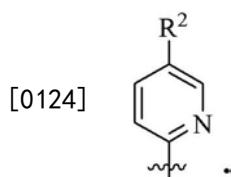
[0119]  $R^2$ 是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基,其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代;

[0120] Y是:



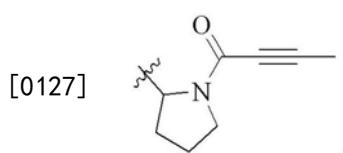
[0122] 在实施方案中,所述BTK抑制剂为式(I)的化合物,其中 $R^1$ 为氢或甲氧基,其中甲氧基任选被一个或两个氟取代;

[0123] X是:



[0125]  $R^2$ 是氢、卤素、甲基、甲氧基或乙氧基,其中甲基、甲氧基和乙氧基各自任选被一个、两个或三个氟取代;

[0126] Y是:



[0128] 在实施方案中,所述BTK抑制剂是选自以下的式(I)化合物:

[0129] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-1);

[0130] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-2);

[0131] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-3);

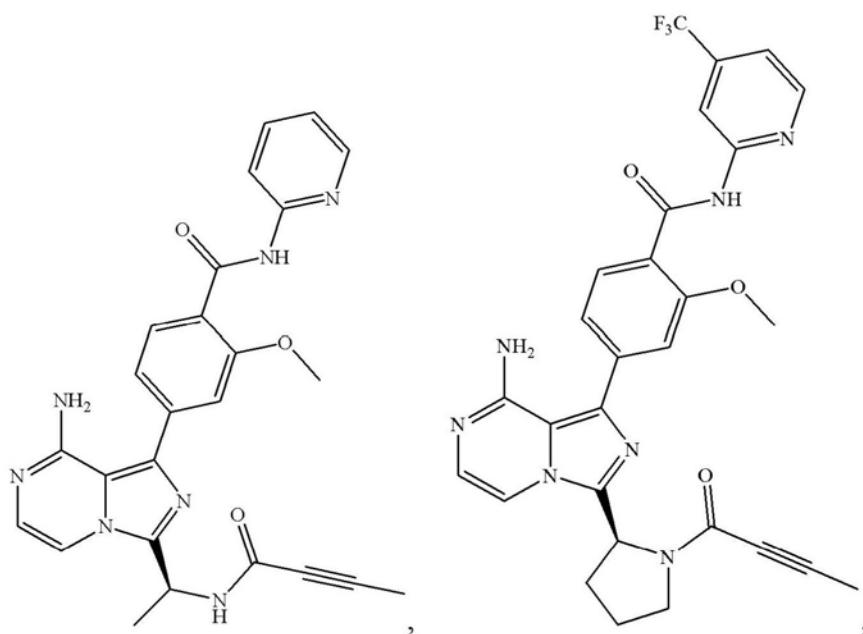
[0132] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-4);

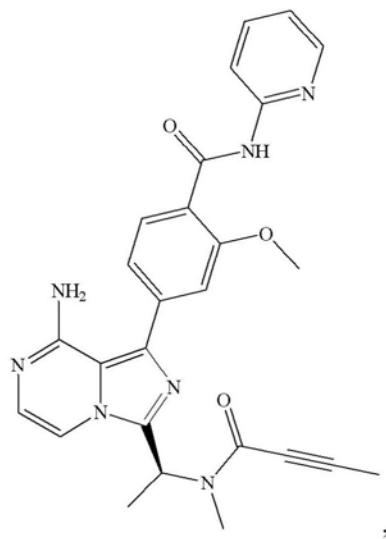
[0133] 4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(式E-5);

[0134] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[[[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]-甲基-氨基]乙基]咪唑并

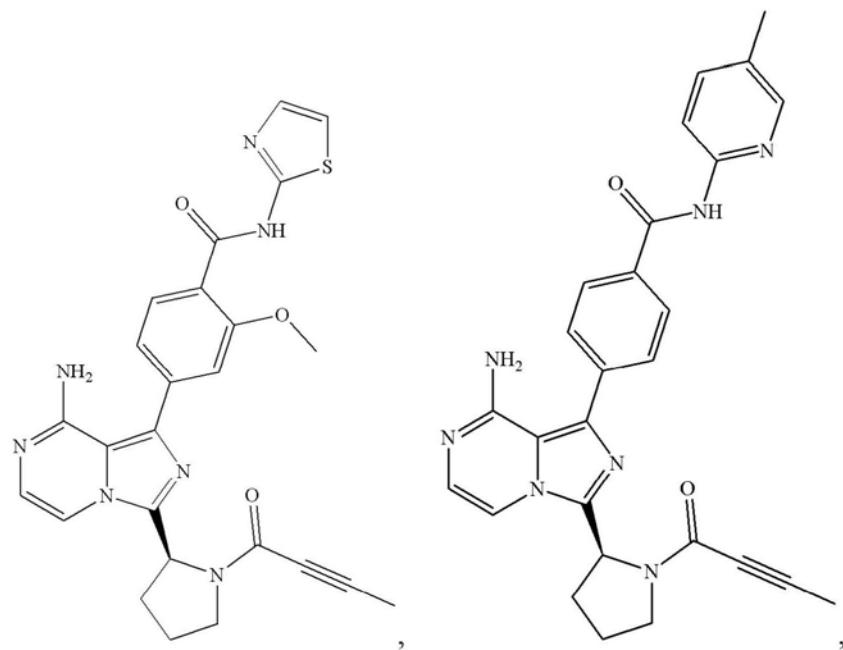
- [1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-6)；
- [0135] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(式E-7)；
- [0136] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(式E-8)；
- [0137] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-9)；
- [0138] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(式E-10)；
- [0139] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-11)；
- [0140] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-12)；
- [0141] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[[[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-13)；
- [0142] 4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[[[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-14)；
- [0143] 4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺(式E-15)；
- [0144] 4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-16)；
- [0145] 4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(式E-17)；
- [0146] (R)-4-(8-氨基-3-(1-(丁-2-炔酰基)吡咯烷-2-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-N-(噻唑-4-基)苯甲酰胺(式E-24)；
- [0147] 及其药学上可接受的盐、共晶、酯、前药、溶剂合物、水合物或衍生物。
- [0148] 在实施方案中,所述BTK抑制剂是选自以下的化合物:

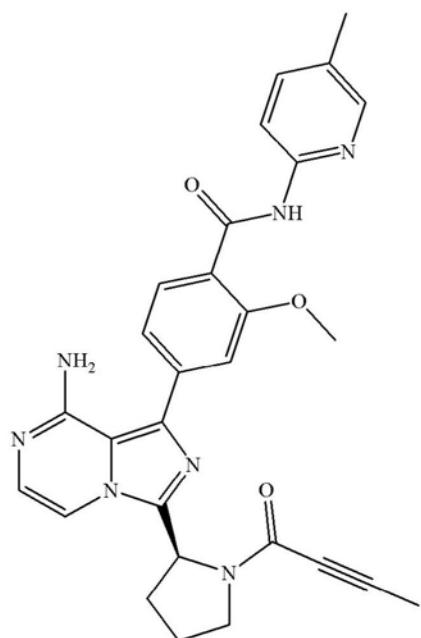
[0149]



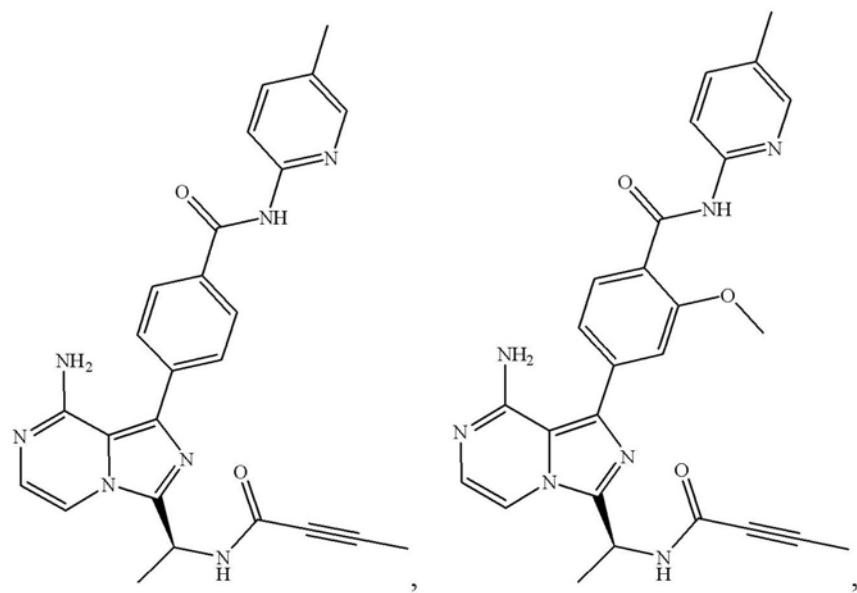


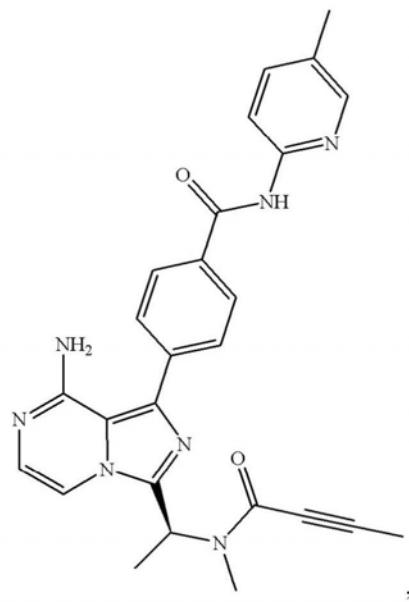
[0150]





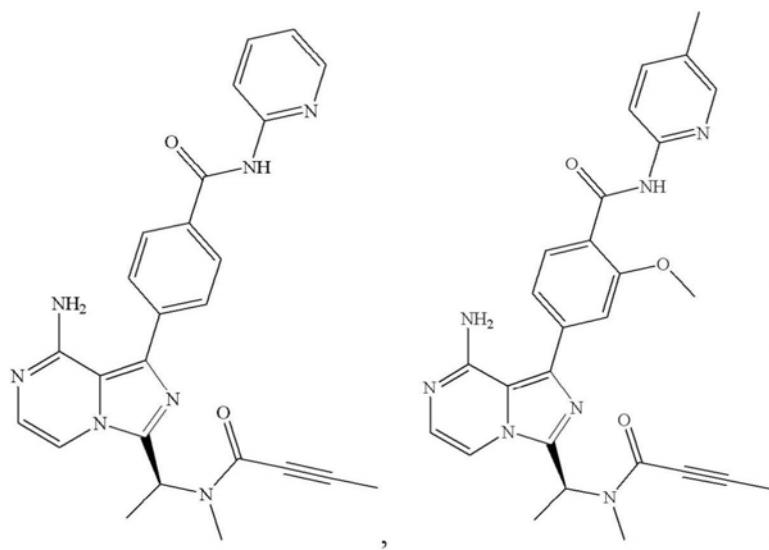
[0151]



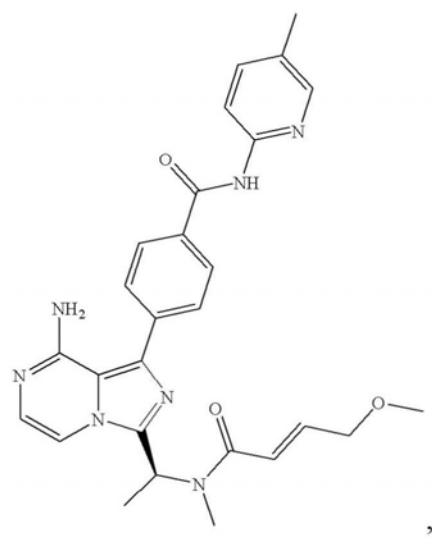


,

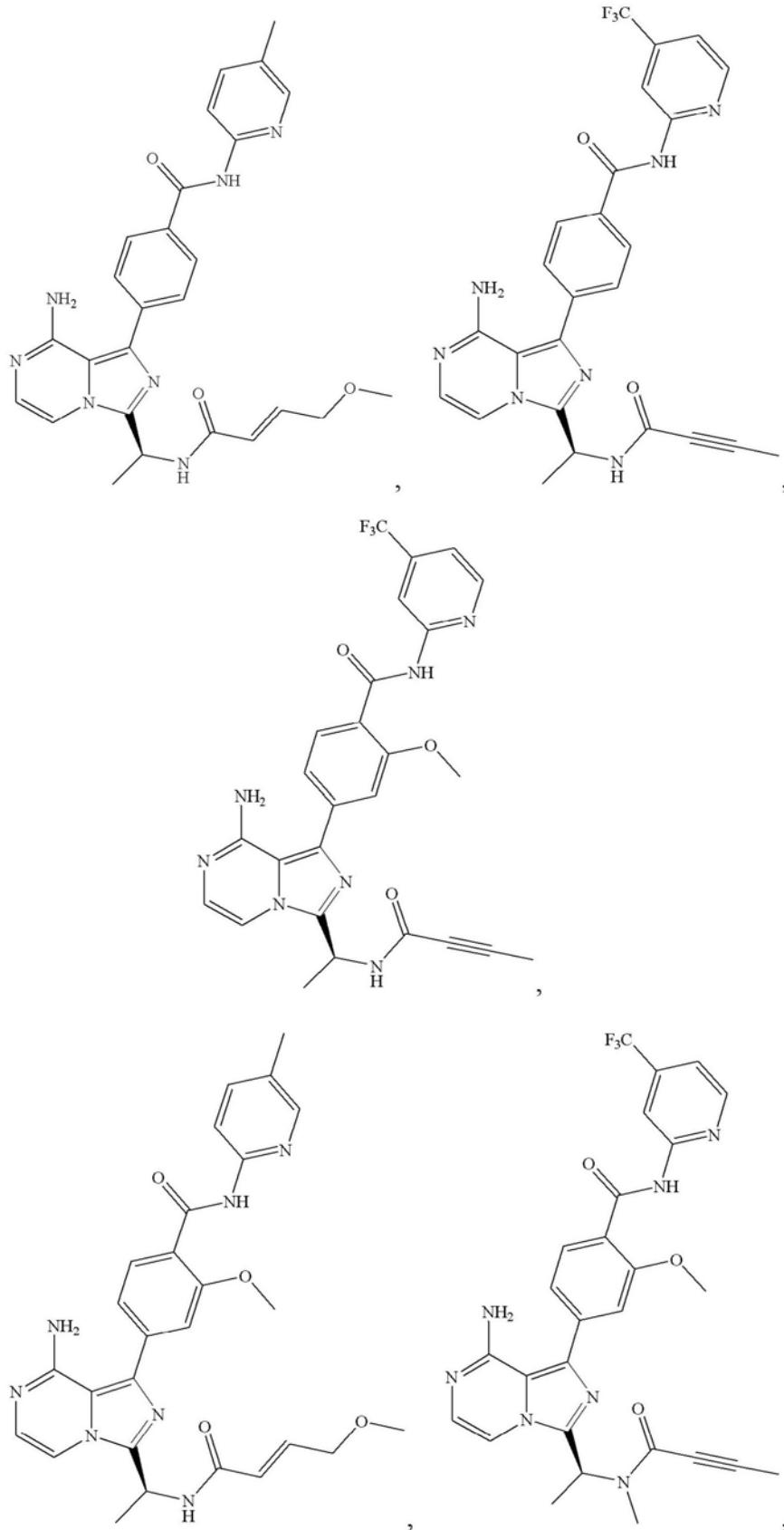
[0152]

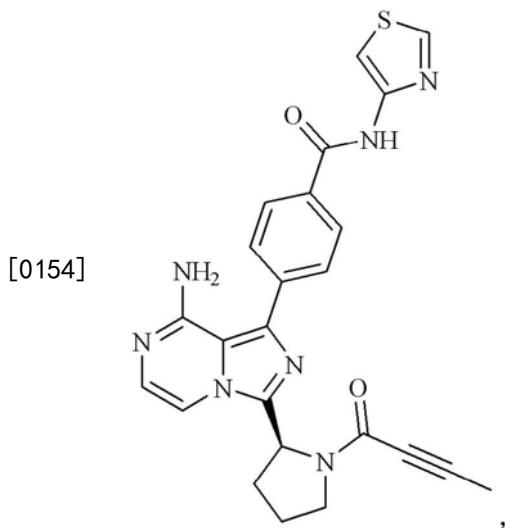


,



,





[0155] 其对映异构体和其药学上可接受的盐、共晶、酯、前药、溶剂合物、水合物或衍生物。

[0156] 药物组合物

[0157] 在选择的实施方案中,本发明提供了用于治疗实体肿瘤癌症、淋巴瘤和白血病的药物组合物。

[0158] 通常配制药物组合物以提供治疗有效量的BTK抑制剂作为活性成分或其药学上可接受的盐、共晶、酯、前药、溶剂合物、水合物或衍生物。如果需要,药物组合物含有其药学上可接受的盐和/或配位络合物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂,载体,包括惰性固体稀释剂和填充剂,稀释剂,包括无菌水溶液和各种有机溶剂,渗透促进剂,增溶剂和佐剂。

[0159] 药物组合物作为BTK抑制剂施用。如果需要,可以将其它药剂混入制备物中或可将两种组分配制成单独的制备物,以分开或同时组合使用。

[0160] 在选择的实施方案中,本发明药物组合物中提供的每种BTK抑制剂的浓度独立地小于例如100%,90%,80%,70%,60%,50%,40%,30%,20%,19%,18%,17%,16%,15%,14%,13%,12%,11%,10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,1%,0.5%,0.4%,0.3%,0.2%,0.1%,0.09%,0.08%,0.07%,0.06%,0.05%,0.04%,0.03%,0.02%,0.01%,0.009%,0.008%,0.007%,0.006%,0.005%,0.004%,0.003%,0.002%,0.001%,0.0009%,0.0008%,0.0007%,0.0006%,0.0005%,0.0004%,0.0003%,0.0002%或0.0001%w/w,w/v或v/v,相对于药物组合物的总质量或体积计。

[0161] 在选择的实施方案中,本发明药物组合物中提供的每种BTK抑制剂的浓度独立地大于90%,80%,70%,60%,50%,40%,30%,20%,19.75%,19.50%,19.25%,19%,18.75%,18.50%,18.25%,18%,17.75%,17.50%,17.25%,17%,16.75%,16.50%,16.25%,16%,15.75%,15.50%,15.25%,15%,14.75%,14.50%,14.25%,14%,13.75%,13.50%,13.25%,13%,12.75%,12.50%,12.25%,12%,11.75%,11.50%,11.25%,11%,10.75%,10.50%,10.25%,10%,9.75%,9.50%,9.25%,9%,8.75%,8.50%,8.25%,8%,7.75%,7.50%,7.25%,7%,6.75%,6.50%,6.25%,6%,5.75%,5.50%,5.25%,5%,4.75%,4.50%,4.25%,4%,3.75%,3.50%,3.25%,3%,2.75%,2.50%,2.25%,2%,1.75%,1.50%,1.25%,1%,0.5%,0.4%,0.3%,0.2%,0.1%,0.09%,0.08%,0.07%,0.06%,0.05%,0.04%,0.03%,0.02%,0.01%,0.009%,0.008%,0.007%,0.006%,

0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% 或 0.0001% w/w, w/v 或 v/v, 相对于药物组合物的总质量或体积计。

[0162] 在选择的实施方案中, 本发明的每种BTK抑制剂的浓度独立地在以下范围内: 约 0.0001% 至约 50%, 约 0.001% 至约 40%, 约 0.01% 至约 30%, 约 0.02% 至约 29%, 约 0.03% 至约 28%, 约 0.04% 至约 27%, 约 0.05% 至约 26%, 约 0.06% 至约 25%, 约 0.07% 至约 24%, 约 0.08% 至约 23%, 约 0.09% 至约 22%, 约 0.1% 至约 21%, 约 0.2% 至约 20%, 约 0.3% 至约 19%, 约 0.4% 至约 18%, 约 0.5% 至约 17%, 约 0.6% 至约 16%, 约 0.7% 至约 15%, 约 0.8% 至约 14%, 约 0.9% 至约 12% 或约 1% 至约 10% w/w, w/v 或 v/v, 相对于药物组合物的总质量或体积计。

[0163] 在选择的实施方案中, 本发明的每种BTK抑制剂的浓度独立地在以下范围内: 约 0.001% 至约 10%, 约 0.01% 至约 5%, 约 0.02% 至约 4.5%, 约 0.03% 至约 4%, 约 0.04% 至约 3.5%, 约 0.05% 至约 3%, 约 0.06% 至约 2.5%, 约 0.07% 至约 2%, 约 0.08% 至约 1.5%, 约 0.09% 至约 1%, 约 0.1% 至约 0.9% w/w, w/v 或 v/v, 相对于药物组合物的总质量或体积计。

[0164] 在选择的实施方案中, 本发明的每种BTK抑制剂的量独立地等于或小于 3.0g, 2.5g, 2.0g, 1.5g, 1.0g, 0.95g, 0.9g, 0.85g, 0.8g, 0.75g, 0.7g, 0.65g, 0.6g, 0.55g, 0.5g, 0.45g, 0.4g, 0.35g, 0.3g, 0.25g, 0.2g, 0.15g, 0.1g, 0.09g, 0.08g, 0.07g, 0.06g, 0.05g, 0.04g, 0.03g, 0.02g, 0.01g, 0.009g, 0.008g, 0.007g, 0.006g, 0.005g, 0.004g, 0.003g, 0.002g, 0.001g, 0.0009g, 0.0008g, 0.0007g, 0.0006g, 0.0005g, 0.0004g, 0.0003g, 0.0002g 或 0.0001g。

[0165] 在选择的实施方案中, 本发明的每种BTK抑制剂的量独立地大于 0.0001g, 0.0002g, 0.0003g, 0.0004g, 0.0005g, 0.0006g, 0.0007g, 0.0008g, 0.0009g, 0.001g, 0.0015g, 0.002g, 0.0025g, 0.003g, 0.0035g, 0.004g, 0.0045g, 0.005g, 0.0055g, 0.006g, 0.0065g, 0.007g, 0.0075g, 0.008g, 0.0085g, 0.009g, 0.0095g, 0.01g, 0.015g, 0.02g, 0.025g, 0.03g, 0.035g, 0.04g, 0.045g, 0.05g, 0.055g, 0.06g, 0.065g, 0.07g, 0.075g, 0.08g, 0.085g, 0.09g, 0.095g, 0.1g, 0.15g, 0.2g, 0.25g, 0.3g, 0.35g, 0.4g, 0.45g, 0.5g, 0.55g, 0.6g, 0.65g, 0.7g, 0.75g, 0.8g, 0.85g, 0.9g, 0.95g, 1g, 1.5g, 2g, 2.5 或 3g。

[0166] 根据本发明的每种BTK抑制剂在很宽的剂量范围内有效。例如, 在成年人的治疗中, 剂量的范围独立是 0.01-1000mg, 0.5-100mg, 1-50mg/天, 5-40mg/天是可以使用的剂量的实例。确切的剂量将取决于施用途径, 化合物施用的形式, 待治疗的受试者的性别和年龄, 待治疗的受试者的体重以及主治医师的偏好和经验。

[0167] 以下描述的是非限制性的药物组合物及其制备方法。

[0168] 口服施用的药物组合物

[0169] 在选择的实施方案中, 本发明提供了含有本文公开的BTK抑制剂和适用于口服施用的药物赋形剂的供口服施用的药物组合物。

[0170] 在选择的实施方案中, 本发明提供了用于口服施用的固体药物组合物, 其包含: (i) 本文公开的有效量的BTK抑制剂和 (ii) 适用于口服施用的药物赋形剂。

[0171] 在选择的实施方案中, 药物组合物可以是适合口服的液体药物组合物。适用于口

服施用的本发明的药物组合物可以提供为离散剂型,例如胶囊,扁囊剂或片剂,或液体或气溶胶喷雾剂,其各自含有预定量的活性成分,作为粉末或处于以下之中:颗粒,水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,水包油乳液或油包水液体乳液。这种剂型可以通过任何制药方法制备,但是所有方法都包括使活性成分与构成一种或多种必需成分的载体联合的步骤。通常,通过将活性成分与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀且紧密地混合,然后如果需要,将产品成形为所需的外观来制备组合物。例如,片剂可以通过任选地与一种或多种辅助成分压制或模制来制备。

[0172] 压制的片剂可以通过在合适的机器中压制自由流动形式的活性成分例如粉末或颗粒,任选地与赋形剂混合来制备,赋形剂例如但不限于粘合剂,润滑剂,惰性稀释剂和/或表面活性剂或分散剂。模制片剂可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物的混合物来制备。

[0173] 本发明还包括无水药物组合物和剂型,因为水可促进一些化合物的降解。例如,在药物领域中可以加入水(例如5%)作为模拟长期储存的手段,以便确定诸如保质期或制剂随时间推移的稳定性的特征。本发明的无水药物组合物和剂型可以使用无水或低含水量成分和低水分或低湿度条件来制备。如果预期在制造,包装和/或储存过程中与水分和/或湿气有实质性接触,则可以将含有乳糖的本发明的药物组合物和剂型制成无水的。可以制备和储存无水药物组合物,使其保持其无水性质。因此,可以使用已知防止暴露于水的材料包装无水组合物,使得它们可以包含在合适的制剂药盒中。合适的包装的实例包括但不限于密封箔,塑料或类似物,单位剂量容器,泡罩包装和条形包装(strip pack)。

[0174] 根据常规的药物复合技术,作为活性成分的每种BTK抑制剂可以与药物载体紧密混合而组合。根据施用所需的制备物形式,载体可以采取多种形式。在制备用于口服剂型的组合物时,任何常用的药物介质都可以用作载体,例如水,二醇,油,醇,调味剂,防腐剂,着色剂等,用于口服液体制备物(如悬浮液,溶液和酏剂)或气雾剂;或者载体如淀粉,糖,微晶纤维素,稀释剂,成粒剂,润滑剂,粘合剂和崩解剂可以在口服固体制备物的情况下使用,在一些实施方案中,不使用乳糖。例如,合适的载体包括具有固体口服制备物的粉末,胶囊和片剂。如果需要,片剂可以通过标准的水性或非水性技术进行涂层。

[0175] 适用于药物组合物和剂型的粘合剂包括但不限于玉米淀粉,马铃薯淀粉或其它淀粉,明胶,天然和合成胶,例如阿拉伯胶,藻酸钠,海藻酸,其它藻酸盐,粉状黄着胶,瓜耳胶,纤维素及其衍生物(例如乙基纤维素,乙酸纤维素,羧甲基纤维素钙,羧甲基纤维素钠),聚乙烯吡咯烷酮,甲基纤维素,预胶化淀粉,羟丙基甲基纤维素,微晶纤维素及其混合物。

[0176] 用于本文公开的药物组合物和剂型的合适填充剂的实例包括但不限于滑石,碳酸钙(例如颗粒或粉末),微晶纤维素,粉状纤维素,葡萄糖结合剂,高岭土,甘露糖醇,硅酸,山梨糖醇,淀粉,预胶化淀粉及其混合物。

[0177] 崩解剂可用于本发明的组合物中以提供当暴露于水性环境时崩解的片剂。过多的崩解剂可能会产生在瓶中崩解的片剂。太少可能不足以发生崩解,从而改变活性成分从剂型释放的速率和程度。因此,可以使用足够量的崩解剂来形成本文公开的化合物的剂型,所述崩解剂既不太少也不太多以致不利地改变活性成分的释放。所使用的崩解剂的量可以根据制剂的类型和施用方式而变化,并且可以容易地由本领域的普通技术人员辨别。在药物组合物中可以使用约0.5至约15重量%的崩解剂或约1至约5重量%的崩解剂。可用于形成

本发明的药物组合物和剂型的崩解剂包括但不限于琼脂,海藻酸,碳酸钙,微晶纤维素,交联羧甲基纤维素钠,交聚维酮,波拉克林钾,淀粉羟乙酸钠,马铃薯或木薯淀粉,其它淀粉,预胶化淀粉,其它淀粉,粘土,其它藻酸,其它纤维素,胶或其混合物。

[0178] 可用于形成本发明的药物组合物和剂型的润滑剂包括但不限于硬脂酸钙,硬脂酸镁,矿物油,轻质矿物油,甘油,山梨糖醇,甘露糖醇,聚乙二醇,其它二醇,硬脂酸,月桂基硫酸钠,滑石,氢化植物油(例如花生油,棉籽油,葵花油,芝麻油,橄榄油,玉米油和大豆油),硬脂酸锌,油酸乙酯,ethyl laurate,琼脂或它们的混合物。另外的润滑剂包括例如硅酸盐(syloid)硅胶,合成二氧化硅的凝结气溶胶或其混合物。可任选加入润滑剂,其用量小于药物组合物的约1重量%。

[0179] 当需要水性悬浮液和/或酏剂用于口服施用时,其中的必需活性成分可以与以下组合:各种甜味剂或调味剂,着色物质或染料以及如果需要的话乳化剂和/或悬浮剂连同稀释剂如水,乙醇,丙二醇,甘油及其各种组合。

[0180] 片剂可以不涂层或通过已知技术涂层以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,并由此提供较长时期的持续作用。例如,可以使用延时材料,例如甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯。口服使用的制剂也可以提供为硬明胶胶囊,其中活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙,磷酸钙或高岭土混合,或者提供为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油介质,例如花生油,液体石蜡或橄榄油混合。

[0181] 可用于形成本发明的药物组合物和剂型的表面活性剂包括但不限于亲水性表面活性剂,亲脂性表面活性剂及其混合物。也就是说,可以使用亲水性表面活性剂的混合物,可以使用亲脂性表面活性剂的混合物,或者可以使用至少一种亲水性表面活性剂和至少一种亲脂性表面活性剂的混合物。

[0182] 合适的亲水性表面活性剂通常可以具有至少10的HLB值,而合适的亲脂性表面活性剂通常可以具有约10或小于约10的HLB值。用于表征非离子两亲化合物的相对亲水性和疏水性的经验参数是亲水-亲脂平衡(“HLB”值)。具有较低HLB值的表面活性剂更亲脂或疏水,并且在油中具有更大的溶解度,而具有较高HLB值的表面活性剂更亲水,并且在水性溶液中具有更大的溶解度。通常认为亲水性表面活性剂是HLB值大于约10的那些化合物,以及HLB值通常不适用的阴离子、阳离子或两性离子化合物。类似地,亲脂性(即疏水性)表面活性剂是具有等于或小于约10的HLB值的化合物。然而,表面活性剂的HLB值仅仅是通常用于使得能够配制工业、药物和化妆品乳液的粗略指导。

[0183] 亲水性表面活性剂可以是离子型或非离子型。合适的离子表面活性剂包括但不限于烷基铵盐;夫西地酸盐;氨基酸、寡肽和多肽的脂肪酸衍生物;氨基酸、寡肽和多肽的甘油酯衍生物;卵磷脂和氢化卵磷脂;溶血卵磷脂和氢化溶血卵磷脂;磷脂及其衍生物;溶血磷脂及其衍生物;肉碱脂肪酸酯盐;烷基硫酸酯的盐;脂肪酸盐;多库酯钠;acylactylates;甘油单酯和甘油二酯的单和双乙酰化酒石酸酯;琥珀酰化的甘油单酯和甘油二酯;甘油单酯和甘油二酯的柠檬酸酯;和它们的混合物。

[0184] 在上述组中,离子表面活性剂包括,例如:卵磷脂,溶血卵磷脂,磷脂,溶血磷脂及其衍生物;肉碱脂肪酸酯盐;烷基硫酸酯的盐;脂肪酸盐;多库酯钠;acylactylates;甘油单酯和甘油二酯的单和双乙酰化酒石酸酯;琥珀酰化的甘油单酯和甘油二酯;甘油单酯和甘油二酯的柠檬酸酯;和它们的混合物。

[0185] 离子表面活性剂可以是离子化形式的卵磷脂,溶血卵磷脂,磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰甘油,磷脂酸,磷脂酰丝氨酸,溶血磷脂酰胆碱,溶血磷脂酰乙醇胺,溶血磷脂酰甘油,溶血磷脂酸,溶血磷脂酰丝氨酸,PEG-磷脂酰乙醇胺,PVP-磷脂酰乙醇胺,脂肪酸的乳酸酯,硬脂酰-2-乳酸酯,硬脂酰乳酸酯,琥珀酰化甘油单酯,甘油单酯/甘油二酯的单/双乙酰化酒石酸酯,甘油单酯/甘油二酯的柠檬酸酯,胆酰肌氨酸,己酸酯,辛酸酯,癸酸酯,月桂酸酯,肉豆蔻酸酯,棕榈酸酯,油酸酯,蓖麻醇酸酯,亚油酸酯,亚麻酸酯,硬脂酸酯,十二烷基硫酸盐,teracecyl sulfate,多库酯,月桂酰肉碱,棕榈酰肉碱,肉豆蔻酰肉碱及其盐和混合物。

[0186] 亲水性非离子表面活性剂可以包括但不限于烷基葡萄糖苷;烷基麦芽糖苷;烷基硫酸葡萄糖苷;月桂基聚乙二醇甘油酯;聚氧化烯烷基醚如聚乙二醇烷基醚;聚氧化烯烷基酚如聚乙二醇烷基酚;聚氧化烯烷基酚脂肪酸酯,例如聚乙二醇脂肪酸单酯和聚乙二醇脂肪酸二酯;聚乙二醇甘油脂肪酸酯;聚甘油脂肪酸酯;聚氧化烯山梨糖醇酐脂肪酸酯,例如聚乙二醇山梨糖醇酐脂肪酸酯;多元醇与以下至少一种成员的亲水性酯交换产物:甘油酯,植物油,氢化植物油,脂肪酸和甾醇;聚氧乙烯甾醇,其衍生物和类似物;聚氧乙烯化维生素及其衍生物;聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物;及其混合物;聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯,和多元醇与以下至少一种成员的亲水性酯交换产物:甘油三酯、植物油和氢化植物油。多元醇可以是甘油,乙二醇,聚乙二醇,山梨糖醇,丙二醇,季戊四醇或糖。

[0187] 其它亲水性非离子表面活性剂包括但不限于PEG-10月桂酸酯,PEG-12月桂酸酯,PEG-20月桂酸酯,PEG-32月桂酸酯,PEG-32二月桂酸酯,PEG-12油酸酯,PEG-15油酸酯,PEG-20油酸酯,PEG-20二油酸酯,PEG-32油酸酯,PEG-200油酸酯,PEG-400油酸酯,PEG-15硬脂酸酯,PEG-32二硬脂酸酯,PEG-40硬脂酸酯,PEG-100硬脂酸酯,PEG-20二月桂酸酯,PEG-25甘油基三油酸酯,PEG-32二油酸酯,PEG-20甘油基月桂酸酯,PEG-30甘油基月桂酸酯,PEG-20甘油基硬脂酸酯,PEG-20甘油基油酸酯,PEG-30甘油基油酸酯,PEG-30甘油基月桂酸酯,PEG-40甘油基月桂酸酯,PEG-40棕榈仁油,PEG-50氢化蓖麻油,PEG-40蓖麻油,PEG-35蓖麻油,PEG-60蓖麻油,PEG-40氢化蓖麻油,PEG-60氢化蓖麻油,PEG-60玉米油,PEG-6癸酸酯/辛酸酯甘油酯,PEG-8癸酸酯/辛酸酯甘油酯,聚甘油-10月桂酸酯,PEG-30胆固醇,PEG-25植物甾醇,PEG-30大豆甾醇,PEG-20三油酸酯,PEG-40山梨糖醇酐油酸酯,PEG-80山梨糖醇酐月桂酸酯,聚山梨醇酯20,聚山梨醇酯80,POE-9月桂醚,POE-23月桂醚,POE-10油醇醚,POE-20油醇醚,POE-20硬脂醚,生育酚PEG-100琥珀酸酯,PEG-24胆固醇,聚甘油-10油酸酯,吐温40,吐温60,蔗糖单硬脂酸酯,蔗糖单月桂酸酯,蔗糖单棕榈酸酯,PEG 10-100壬酚系列,PEG 15-100辛酚系列和泊洛沙姆。

[0188] 仅举例来说,合适的亲脂性表面活性剂包括:脂肪醇;甘油脂肪酸酯;乙酰化甘油脂肪酸酯;低级醇脂肪酸酯;丙二醇脂肪酸酯;脱水山梨糖醇脂肪酸酯;聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯;甾醇和甾醇衍生物;聚氧乙烯化甾醇和甾醇衍生物;聚乙二醇烷基醚;糖酯;糖醚;甘油单酯和甘油二酯的乳酸衍生物;多元醇与以下至少一种成员的疏水性酯交换产物:甘油酯,植物油,氢化植物油,脂肪酸和甾醇;油溶性维生素/维生素衍生物;和它们的混合物。在该组内,优选的亲脂性表面活性剂包括甘油脂肪酸酯,丙二醇脂肪酸酯及其混合物,或者是多元醇与以下至少一种成员的疏水性酯交换产物:植物油,氢化植物油和甘油三酯。

[0189] 在实施方案中,组合物可以包含增溶剂以确保本发明化合物的良好增溶和/或溶解并使本发明化合物的沉淀最小化。这对于非口服使用的组合物-例如注射用组合物可能特别重要。还可以加入增溶剂以增加亲水性药物和/或其它组分的溶解度,如表面活性剂,或者将组合物维持为稳定或均匀的溶液或分散体。

[0190] 合适的增溶剂的实例包括但不限于以下:醇和多元醇,例如乙醇,异丙醇,丁醇,苯甲醇,乙二醇,丙二醇,丁二醇及其异构体,甘油,季戊四醇,山梨糖醇,甘露糖醇,二乙二醇单乙基醚(transcutol),二甲基异山梨醇,聚乙二醇,聚丙二醇,聚乙烯醇,羟丙基甲基纤维素和其它纤维素衍生物,环糊精和环糊精衍生物;平均分子量为约200至约6000的聚乙二醇的醚,例如四氢糠醇PEG醚(四甘醇)或甲氧基PEG;酰胺和其它含氮化合物如2-吡咯烷酮,2-哌啶酮,ε-己内酰胺,N-烷基吡咯烷酮,N-羟烷基吡咯烷酮,N-烷基哌啶酮,N-烷基己内酰胺,二甲基乙酰胺和聚乙烯吡咯烷酮;酯,如丙酸乙酯,柠檬酸三丁酯,柠檬酸乙酰基三乙酯,柠檬酸乙酰基三丁酯,柠檬酸三乙酯,油酸乙酯,辛酸乙酯,丁酸乙酯,甘油三乙酸酯,丙二醇单乙酸酯,丙二醇二乙酸酯,ε-己内酯及其异构体,δ-戊内酯及其异构体,β-丁内酯及其异构体;和本领域已知的其它增溶剂,例如二甲基乙酰胺,二甲基异山梨醇,N-甲基吡咯烷酮,单辛酸甘油酯,二甘醇单乙醚和水。

[0191] 也可以使用增溶剂的混合物。实例包括但不限于甘油三乙酸酯,柠檬酸三乙酯,油酸乙酯,辛酸乙酯,二甲基乙酰胺,N-甲基吡咯烷酮,N-羟乙基吡咯烷酮,聚乙烯吡咯烷酮,羟丙基甲基纤维素,羟丙基环糊精,乙醇,聚乙二醇200-100,四甘醇,二乙二醇单乙基醚,丙二醇,和二甲基异山梨醇。特别优选的增溶剂包括山梨糖醇,甘油,甘油三乙酸酯,乙醇,PEG-400,四甘醇和丙二醇。

[0192] 可以包含的增溶剂的量没有特别限制。给定的增溶剂的量可以限于生物可接受的量,其可以由本领域技术人员容易地确定。在一些情况下,可能有利的是包括远远超过生物可接受量的量的增溶剂,例如使药物浓度最大化,在将组合物提供给患者之前使用常规技术例如蒸馏或蒸发除去过量增溶剂。因此,如果存在的话,基于药物和其它赋形剂的总重量,增溶剂重量比可以是10重量%,25重量%,50重量%,100重量%或至多约200重量%。如果需要,也可以使用非常少量的增溶剂,例如5%,2%,1%或甚至更少。通常,增溶剂可以以约1重量%至约100重量%,更通常约5重量%至约25重量%的量存在。

[0193] 该组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的添加剂和赋形剂。这些添加剂和赋形剂包括但不限于防粘剂,消泡剂,缓冲剂,聚合物,抗氧化剂,防腐剂,螯合剂,粘度调节剂,张力调节剂,调味剂,着色剂,增味剂,遮光剂,悬浮剂,粘合剂,填充剂,增塑剂,润滑剂,以及它们的混合物。

[0194] 另外,可将酸或碱掺入组合物中以利于加工,增强稳定性或出于其它原因。药学上可接受的碱的实例包括氨基酸,氨基酸酯,氢氧化铵,氢氧化钾,氢氧化钠,碳酸氢钠,氢氧化铝,碳酸钙,氢氧化镁,硅酸镁铝,合成硅酸铝,合成水合碳酸钙(hydrocalcite),氢氧化镁铝,二异丙基乙胺,乙醇胺,乙二胺,三乙醇胺,三乙胺,三异丙醇胺,三甲胺,三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)等。还合适的是为药学上可接受的酸的盐的碱,所述药学上可接受的酸例如乙酸,丙烯酸,己二酸,海藻酸,烷磺酸,氨基酸,抗坏血酸,苯甲酸,硼酸,丁酸,碳酸,柠檬酸,脂肪酸,甲酸,富马酸,葡糖酸,氢醌磺酸,异抗坏血酸,乳酸,马来酸,草酸,对溴苯磺酸,丙酸,对甲苯磺酸,水杨酸,硬脂酸,琥珀酸,鞣酸,酒石酸,巯基乙酸,甲苯磺酸,尿酸等。还

可以使用多元酸的盐,例如磷酸钠,磷酸氢二钠和磷酸二氢钠。当碱是盐时,阳离子可以是任何方便的和药学上可接受的阳离子,例如铵,碱金属和碱土金属。实例可以包括但不限于钠,钾,锂,镁,钙和铵。

[0195] 合适的酸是药学上可接受的有机或无机酸。合适的无机酸的实例包括盐酸,氢溴酸,氢碘酸,硫酸,硝酸,硼酸,磷酸等。合适的有机酸的实例包括乙酸,丙烯酸,己二酸,海藻酸,烷磺酸,氨基酸,抗坏血酸,苯甲酸,硼酸,丁酸,碳酸,柠檬酸,脂肪酸,甲酸,富马酸,葡萄糖酸,氢醌磺酸,异抗坏血酸,乳酸,马来酸,甲磺酸,草酸,对溴苯磺酸,丙酸,对甲苯磺酸,水杨酸,硬脂酸,琥珀酸,鞣酸,酒石酸,巯基乙酸,甲苯磺酸和尿酸。

[0196] 注射用药物组合物

[0197] 在选择的实施方案中,本发明提供了含有BTK抑制剂和适合注射的药物赋形剂的注射用药物组合物。组合物中药剂的组分和量如本文所述。

[0198] 本发明组合物可掺入以便通过注射施用的形式包括水性或油悬浮液或乳液,具有芝麻油,玉米油,棉籽油或花生油,以及酏剂,甘露糖醇,右旋糖或无菌水溶液和类似的药物媒介。

[0199] 盐水中的水溶液也常规地用于注射。也可以使用乙醇,甘油,丙二醇和液体聚乙二醇(及其合适的混合物),环糊精衍生物和植物油。例如,通过使用诸如卵磷脂的涂层以在分散体的情况下维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂,可维持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯,氯丁醇,苯酚,山梨酸和硫柳汞来预防微生物的作用。

[0200] 无菌注射溶液通过将BTK抑制剂以所需量与上文列举的各种其它成分(如需要)一起掺入适当溶剂中,接着过滤灭菌来制备。通常,分散体通过将各种灭菌的活性成分掺入含有基本分散介质和上述列举的那些中的所需其它成分的无菌媒介中制备。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉末,某些理想的制备方法是喷雾干燥,真空干燥和冷冻干燥(冻干)技术,产生活性成分加任何额外的所需成分的粉末(来自其先前无菌过滤的溶液)。本领域技术人员已知的其它冻干或喷雾干燥制剂也可用于本发明。这种制剂包括美国专利No. 5,908,826, 6,267,958, 7,682,609, 7,592,004, 和8,298,530, 以及U.S. 专利申请公布No. 2010/0158925中公开的那些,其教导通过引用明确地结合于此。

[0201] 剂量和给药方案

[0202] 施用的BTK抑制剂的量将取决于所治疗的哺乳动物,疾病或病情的严重程度,施用速率,化合物的处置和处方医师的判断。然而,有效剂量在以下范围内:约0.001至约100mg每kg体重每天,例如约1至约35mg/kg/天,以单剂量或分剂量给药。对于70kg的人,这将约为0.05至7g/天,如约0.05至约2.5g/天。在一些情况下,低于上述范围的下限的剂量水平可能是超过足够量的,而在其它情况下,可以使用更大的剂量而不引起任何有害的副作用-例如通过将这样的较大剂量分成几个小剂量用于施用全天。

[0203] 在选择的实施方案中,BTK抑制剂以单剂量施用。典型地,这样的施用将通过注射进行,例如通过静脉内注射,以便快速引入药剂。但是,可以适当使用其它途径。单剂量的BTK抑制剂也可用于治疗急性病情。

[0204] 在选择的实施方案中,BTK抑制剂以多剂量施用。给药可以是每天约一次,两次,三次,四次,五次,六次或多于六次。给药可以是约每月一次,每两周一次,每周一次或每隔一

天一次。在其它实施方案中，BTK抑制剂约每天一次至约每天6次施用。在另一个实施方案中，BTK抑制剂的施用持续少于约7天。在又一个实施方案中，施用持续超过约6、10、14、28天，两个月，六个月或一年。在某些情况下，连续给药被实现并保持必要长的时间。

[0205] 本发明的药剂的施用可以持续必要长的时间。在选择的实施方案中，将BTK抑制剂施用超过1、2、3、4、5、6、7、14或28天。在一些实施方案中，所述BTK抑制剂被施用少于28、14、7、6、5、4、3、2或1天。在选择的实施方案中，所述BTK抑制剂持续地长期施用-例如用于治疗慢性效应。

[0206] BTK抑制剂的组合的有效量可以通过具有相似的用途的药剂的任何可接受的施用方式以单剂量或多剂量施用，所述施用方式包括直肠，口腔，鼻内和透皮途径，通过动脉内注射，静脉内，腹膜内，肠胃外，肌内，皮下，口服，局部或作为吸入剂施用。

#### [0207] 治疗方法

[0208] 在一些实施方案中，本发明涉及治疗哺乳动物的过度增殖性病症，炎性病症，免疫病症或自身免疫病症的方法，其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的BTK抑制剂或所述BTK抑制剂的药学上可接受的盐，共晶，酯，前药，溶剂合物，水合物或衍生物。

[0209] 在一些实施方案中，本发明涉及用BTK抑制剂治疗选自以下的哺乳动物的过度增殖性病症的方法：膀胱癌，头颈部癌，胰腺导管腺癌(PDA)，胰腺癌，结肠癌，乳腺癌，乳癌，纤维肉瘤，间皮瘤，肾细胞癌，肺癌，胸腺瘤(thyoma)，前列腺癌，结肠直肠癌，卵巢癌，急性骨髓性白血病，胸腺癌，脑癌，鳞状细胞癌，皮肤癌，眼癌，视网膜母细胞瘤，黑素瘤，眼内黑素瘤，口腔和口咽癌，胃的癌，胃癌，宫颈癌，头、颈、肾癌，肾脏癌，肝癌，卵巢癌，前列腺癌，结肠直肠癌，食管癌，睾丸癌，妇产科癌症，甲状腺癌，获得性免疫缺陷综合征(AIDS)相关的癌症(例如淋巴瘤和卡波西肉瘤)，病毒诱导的癌症，成胶质细胞瘤，食管肿瘤，血液肿瘤，原发性中枢神经系统淋巴瘤，非小细胞肺癌(NSCLC)，慢性粒细胞白血病，弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)，食道肿瘤，滤泡中心淋巴瘤，头颈部肿瘤，丙型肝炎病毒感染，肝细胞癌，霍奇金病，转移性结肠癌，多发性骨髓瘤，非霍奇金淋巴瘤，卵巢肿瘤，胰腺肿瘤，肾细胞癌，小细胞肺癌或IV期黑素瘤。在选择的实施方案中，本发明涉及用BTK抑制剂治疗例如以下的病症的方法：过度增殖性病症，包括但不限于癌症，如急性骨髓性白血病，胸腺，脑，肺，鳞状细胞，皮肤，眼，视网膜母细胞瘤，眼内黑色素瘤，口腔和口咽，膀胱，胃的，胃，胰腺，膀胱，乳，宫颈，头，颈，肾，肾脏，肝，卵巢，前列腺，结直肠，食管，睾丸，妇产科，甲状腺，CNS，PNS，AIDS-相关(例如淋巴瘤和卡波西肉瘤)或病毒诱导的癌症。在一些实施方案中，所述药物组合物用于治疗非癌过度增殖性病症，例如皮肤良性增生(例如银屑病)，再狭窄或前列腺(例如，良性前列腺肥大(BPH))。

[0210] 在一些实施方案中，本发明涉及用BTK抑制剂治疗哺乳动物的炎性，免疫或自身免疫病症的方法。在选择的实施方案中，本发明还涉及用BTK抑制剂治疗疾病的方法，其中所述疾病选自肿瘤血管生成，慢性炎症性疾病，类风湿性关节炎，动脉粥样硬化，炎性肠病，皮肤病如银屑病，湿疹和硬皮病，1型糖尿病，2型糖尿病，糖尿病性视网膜病，早产儿视网膜病，年龄相关性黄斑变性，血管瘤，神经胶质瘤和黑素瘤，溃疡性结肠炎，特应性皮炎，贮袋炎，脊柱关节炎，葡萄膜炎，白塞病，风湿性多肌痛，巨细胞动脉炎，结节病，Kawasaki病，青少年特发性关节炎，化脓性汗腺炎，干燥综合征，银屑病关节炎，青少年类风湿性关节炎，强直性脊柱炎，克罗恩病，狼疮，狼疮肾炎，人类白细胞抗原(HLA)相关疾病，自身抗体，免疫治

疗,Addison病,自身免疫多内分泌综合征1型 (APS-1),自身免疫多内分泌综合征2型 (APS-2),Grave病,Hashimoto甲状腺炎,多内分泌自身免疫,医源性自身免疫,特发性甲状旁腺功能减退症,白癜风和狼疮性肾炎。

[0211] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗炎性,免疫或自身免疫病症的方法,该病症为慢性B细胞病症,其中BCR信号传导导致自身免疫抗体的不适当产生或促炎细胞因子的释放和免疫细胞包括炎性T细胞的活化。在这种类型的疾病中,通过抑制BTK来减少BCR信号传导可能导致治疗益处。在一些实施方案中,本发明提供了治疗选自以下的炎性,免疫或自身免疫病症的方法:类风湿性关节炎 (RA),青少年RA,青少年特发性关节炎,骨关节炎,银屑病关节炎,寻常性银屑病,天疱疮,大疱性类天疱疮,骨关节炎,感染性关节炎,进行性慢性关节炎,风湿性多肌痛,变形性关节炎,创伤性关节炎,痛风性关节炎,Reiter综合征, polychondritis,急性滑膜炎,强直性脊柱炎,脊椎炎,干燥综合征 (SS),系统性红斑狼疮 (SLE),盘状红斑狼疮 (盘状LE),LE肿胀,狼疮肾炎 (LN),抗磷脂沉积,皮肌炎,多肌炎,自身免疫血液病,血小板减少症,特发性血小板减少性紫癜,血栓性血小板减少性紫癜,自身免疫(冷)凝集素疾病,自身免疫溶血性贫血,冷球蛋白血症,再生障碍性贫血,嗜中性白细胞减少症,自身免疫血管炎,白塞病,抗嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA) 相关性血管炎,硬皮病,系统性硬化症,重症肌无力,多发性硬化症 (MS),慢性局灶性脑炎,Guillain-Barre综合征,慢性疲劳综合征,全身劳力不耐症,视神经脊髓炎,自身免疫性葡萄膜炎,结膜炎,角膜结膜炎,Grave病,甲状腺相关性眼病,慢性甲状腺炎,具有显微镜下多血管炎的肉芽肿病,Wegener肉芽肿病,自身免疫胃炎,自身免疫炎症性肠病,溃疡性结肠炎,克罗恩病,移植植物抗宿主病,特发性口炎性腹泻,自身免疫肝炎,活动性肝炎(急性和慢性),特发性肺纤维化,支气管炎,肺间质纤维化,慢性炎性肺病,结节病,特发性膜性肾病,IgA肾病,肾小球硬化症,肾小球性肾炎(伴有或不伴有肾病综合征),胰腺炎和1型或2型糖尿病。

[0212] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗炎性,免疫或自身免疫病症的方法,其中所述炎性,免疫或自身免疫病症是慢性自身免疫和炎性病症,其中骨髓细胞和肥大细胞中的BTK信号传导导致不适当的促炎细胞因子的释放和免疫细胞的活化,免疫细胞包括炎性T细胞,自体反应性B细胞,活化的组织巨噬细胞,活化的肥大细胞,浸润性单核细胞和粒细胞炎性浸润,以及组织驻留树突细胞群的活化。在这种性质的疾病中,减少通过骨髓细胞上的表面或内吞受体的BTK信号传导可能导致治疗益处。在一些实施方案中,本发明提供了治疗选自以下的炎性,免疫或自身免疫病症的方法:糖尿病性视网膜病,巨细胞动脉炎,Kawasaki病,炎性肠病,过敏性肠病,特发性口炎性腹泻,肠病,疱疹后神经痛,风湿性多肌痛,原发性胆汁性肝硬化,重症肌无力,炎性疼痛,恶病质,牙周病,中耳炎,肺尘症,单核细胞增多症,肺气肿,肺纤维化,硅肺病,慢性炎性肺病,慢性阻塞性肺病,肺功能不全,肺部间质纤维化,whipple,皮肤良性增生(例如银屑病),由感染引起的肌痛,继发于感染的恶病质,全身劳力不耐症,动脉粥样硬化,肉芽肿病,具有显微镜下多血管炎的肉芽肿病,化脓性汗腺炎,年龄相关性黄斑变性和淀粉样变性。

[0213] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗炎性,免疫或自身免疫病症的方法,其中所述炎性,免疫或自身免疫病症是皮肤病,其中BTK介导的信号参与炎性细胞的募集,活化和/或增殖,和皮肤中的炎症介体和抗微生物肽的产生。在一些实施方案中,本发明提供治疗皮肤病的方法,其中所述皮肤病由以下产生:全身性疾病的皮肤表现,其中敏化,淋巴细胞募

集,局部或淋巴结抗原呈递细胞的淋巴细胞偏移,皮肤驻留或皮肤归巢淋巴细胞的活化,先天性免疫感应,角质形成细胞抗微生物反应,驻留或浸润骨髓树突状细胞的活化,浆细胞样树突细胞,巨噬细胞,肥大细胞,嗜中性粒细胞和/或Langerhans细胞导致皮肤损伤的发展。在一些实施方案中,本发明提供治疗选自以下的皮肤病的方法:寻常性银屑病,滴状银屑病,红皮病型银屑病,银屑病指甲,环状脓疱性银屑病,脓疱性银屑病,反向银屑病,银屑病性关节炎,皮肤角化病,副银屑病,结节性红斑,掌跖汗腺炎,特应性皮炎,特应性湿疹,脂溢性湿疹,脂溢性皮炎,出汗障碍,红斑痤疮,皮肤红斑狼疮,急性皮肤红斑狼疮,亚急性皮肤红斑狼疮,盘状红斑狼疮,红斑狼疮肿胀,狼疮性肾炎(LN),红斑狼疮性脂膜炎,多形红斑,疣,疣状红斑狼疮,白癜风,斑秃,purigo nodularis,扁平苔藓,purigo pigmentosum,寻常性天疱疮,大疱性类天疱疮,红斑性天疱疮,结节性天疱疮,红皮病性结节病,肉芽肿性皮炎,硬皮病,系统性硬化症,系统性硬化症的皮肤表现,弥漫性皮肤肥大细胞增生病,红皮病性肥大细胞增多症,环状肉芽肿,结节性软骨皮炎,接触性皮炎,药疹,线状IgA大疱性皮肤病,嗜酸性粒细胞性皮炎,毛发角化病,淋巴瘤样丘疹病,急性苔藓痘疮样糠疹(PLEVA),慢性苔藓样糠疹(PLC),发热性溃疡坏死性穆-哈二氏病(FUMHD),慢性荨麻疹,类风湿性中性粒细胞性皮炎,冷球蛋白性紫癜和高球蛋白血性紫癜。

[0214] 在一些实施方案中,本发明提供治疗过度增殖性病症的方法,其中过度增殖性病症是骨中的慢性自身免疫和炎性病症,其中破骨细胞,肥大细胞和骨髓细胞中的BTK信号传导参与骨溶解,破骨细胞过程,骨重塑过程的不平衡或骨密度的损失。这种性质的疾病,通常也具有自身免疫成分,包括骨关节炎,由于转移引起的骨损失,溶骨性病变,骨质疏松症,强直性脊柱炎,脊椎关节炎,弥漫性特发性骨骼增生症,痛风性关节炎以及与多发性骨髓瘤相关的骨病症。在一些实施方案中,本发明提供治疗过度增殖性病症的方法,其中所述过度增殖性病症选自骨关节炎,由于转移引起的骨损失,溶骨性病变,骨质疏松症,强直性脊柱炎,脊椎关节炎,弥漫性特发性骨骼增生症,痛风性关节炎以及与多发性骨髓瘤相关的骨病症。

[0215] 在一些实施方案中,本发明提供治疗过敏性和特应性疾病的方法,其中活化的B细胞产生IgE抗体,肥大细胞在Fc $\epsilon$ R接合后脱粒,导致释放促炎因子和急性活化局部组织反应以及慢性改变内皮细胞,神经受体和其它支配器官功能的近端结构。这些病情包括特应性皮炎,接触性皮炎,湿疹,特应性湿疹,寻常性天疱疮,大疱性天疱疮,结节性痒疹,Stevens-Johnson综合征,哮喘,气道超敏反应,支气管痉挛,支气管炎,反应性哮喘,慢性阻塞性肺病,1型超敏反应,2型超敏反应,过敏性鼻炎,过敏性结膜炎以及气道上的其它炎性或阻塞性疾病。可以治疗或预防的过敏症之中包括对以下的过敏等:食物,食物添加剂,昆虫毒素,尘螨,花粉,动物物质,金属和某些药物。

[0216] 在实施方案中,本发明提供了抑制人受试者器官或细胞移植之前或之后的免疫反应的方法,其包括向所述人受试者施用治疗有效量的BTK抑制剂或BTK抑制剂的药学上可接受的盐,共晶,酯,前药,溶剂合物,水合物或衍生物。在实施方案中,本发明提供了抑制人受试者器官或细胞移植之前或期间的免疫反应的方法,其中所述人受试者是移植供体,包括向所述人受试者施用治疗有效量的BTK抑制剂或BTK抑制剂的药学上可接受的盐,共晶,酯,前药,溶剂合物,水合物或衍生物。在实施方案中,本发明提供了抑制人受试者器官或细胞移植之前或之后的免疫反应的方法,其中所述人受试者是移植受体,包括向所述人受试者

施用治疗有效量的BTK抑制剂或BTK抑制剂的药学上可接受的盐,共晶,酯,前药,溶剂合物,水合物或衍生物。在实施方案中,本发明提供了在移植之前用BTK抑制剂治疗具有高水平抗异型HLA抗体的患者的方法,以降低抗异型HLA负荷,作为移植调理治疗的一部分。在一些实施方案中,本发明提供了在移植期间或之后用BTK治疗患者以减少抗异型抗体的重新产生的方法。在实施方案中,本发明提供了在人受试者器官或细胞移植之前,期间或之后抑制同种异体移植排斥的方法,包括向所述人受试者施用治疗有效量的BTK抑制剂或BTK抑制剂的药学上可接受的盐,共晶,酯,前药,溶剂合物,水合物或衍生物。在实施方案中,本发明提供了使用BTK抑制剂的对接受实体器官移植的患者的移植前调理方案的方法。在实施方案中,本发明提供了在人受试者移植的早期手术后阶段期间在器官移植之前,期间或之后用BTK抑制剂抑制体液性急性排斥的方法,包括向所述人受试者施用治疗有效量的BTK抑制剂或BTK抑制剂的药学上可接受的盐,共晶,酯,前药,溶剂合物,水合物或衍生物。在实施方案中,本发明提供了通过在器官移植之前,期间或之后抑制BTK来抑制骨髓细胞向组织同种异体移植物中的浸润的方法。在实施方案中,本发明提供了降低与移植后器官中的缺血/再灌注相关的生理变化并因此减少导致白细胞迁移的促炎信号的方法。在实施方案中,本发明提供了在器官移植的植入后阶段期间抑制向T淋巴细胞的有效B细胞抗原呈递的方法,并且因此减少同种异体移植物特异性细胞毒性和辅助T细胞群,包括CD8 T细胞,Th1 T细胞,Th2 T细胞和Th17 T细胞,以及其它促炎T细胞群体的发育。在实施方案中,本发明提供了通过用BTK抑制剂治疗来在移植后防止B细胞重新活化的方法,所述BTK抑制剂的剂量防止通过移植器官描述的隔室中的BCR的信号传导。在实施方案中,本发明提供了通过用BTK抑制剂治疗来在移植后防止B细胞重新活化的方法,所述BTK抑制剂的剂量防止通过来自移植器官的引流淋巴结描述的隔室中的BCR的信号传导。在实施方案中,本发明提供了在器官移植后用BTK抑制剂治疗急性或慢性移植物排斥的方法,所述BTK抑制剂的剂量防止通过移植器官内炎性组织描述的隔室中的BCR的信号传导。在任何前述实施方案中,器官或细胞移植选自心脏移植,肾移植,肾脏移植,肺移植,肝移植,ABO-不相容移植和干细胞移植。在一些实施方案中,本发明提供了治疗人受试者的方法,其中所述人受试者是移植受体,所述方法包括施用BTK抑制剂的步骤。

[0217] 在实施方案中,本发明提供了治疗移植物抗宿主病(GVHD)的方法,包括施用BTK抑制剂的步骤,其中所述GVHD选自与干细胞移植相关的GVHD,与骨髓移植相关的GVHD,胸腺GVHD,皮肤GVHD,胃肠GVHD,肝GVHD,急性GVHD和慢性GVHD。

[0218] 在一个实施方案中,所述药物抑制神经退行性疾病,所述神经退行性疾病涉及微神经胶质细胞活化,巨噬细胞募集和活化,包括骨髓细胞的炎性细胞的浸润,其需要BTK信号传导以传递活化信号,识别活化内皮细胞上的整联蛋白,渗出,或原位发育成产生细胞因子和/或趋化因子的细胞。式(I)对BTK的抑制作用将抑制疾病活动或疾病进展,这是通过抑制神经退行性疾病进行的,所述神经退行性疾病涉及蛋白质毒性聚集,如 $\beta$ 淀粉样蛋白沉积物的积聚(淀粉样蛋白斑块),神经原纤维缠结,tau聚集和过度磷酸化,胞质内包涵体,胞质内成对螺旋丝,多聚葡萄糖包涵体,Papp-Lantos体,含泛素的包涵体,以及蛋白质降解控制不足和/或不能处理错折叠蛋白导致神经退行的病症。这些疾病包括散发性和家族性阿尔茨海默病,轻度认知缺损,脑淀粉样血管病,路易体痴呆,阿尔茨海默病的路易体变体,唐氏综合征,亨廷顿病,纹状体黑质变性,多系统萎缩(MSA-P,MSA-C,Shy-Drager综合征),散发

性或遗传性肌萎缩侧索硬化(ALS或Lou Gehrig病),原发性侧索硬化,青少年原发性侧索硬化,神经退行性tau蛋白病,散发性或遗传性突触核病,神经元核内包涵体疾病,帕金森病,连锁于17号染色体伴帕金森病的额颞叶痴呆(FTDP-17)。

[0219] 在实施方案中,本发明涉及用BTK抑制剂治疗哺乳动物神经退行性病症的方法,其中抑制神经胶质细胞,骨髓细胞,Schwann细胞,少突细胞和驻留于CNS中的其它骨髓衍生的细胞类型中的炎性过程通过其与BTK的共价相互作用和抑制通过BTK途径的信号传导来实现。施用式(I)将预防或减少神经退行,这是通过抑制由于以下原因的对错误折叠和/或积累的细胞内蛋白质的免疫识别和炎性反应进行的:三核苷酸重复病症(聚谷氨酰胺疾病),亨廷顿病,脊髓小脑性共济失调1,2,3型(Machado-Joseph疾病),6,7和17;脊髓和延髓肌萎缩,齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩,神经元蜡样脂褐质,额颞叶痴呆(Pick氏病,原发性进行性失语和语义性痴呆),皮质基底节变性和进行性核上性麻痹。

[0220] 在另一个实施方案中,式(I)的施用可以用于抑制哺乳动物的BTK,从而改善炎症介导的神经元死亡和其它神经炎症效应,它们是由于散发性或遗传性朊病毒疾病,朊病毒病症例如Creutzfeldt-Jakob病,苦鲁病,Gerstmann-**Sträussler**-Scheinker综合征,以及导致橄榄体脑桥小脑萎缩,散发性致命性失眠,致命性家族性失眠的病症。在家族性朊病毒病症的情况下,在哺乳动物中施用式(I)还可以用于预防和/或延迟疾病临床表现的发生,以及在临床迹象发作之后减少疾病症状并减缓疾病进展。

[0221] 在实施方案中,本发明涉及用BTK抑制剂治疗哺乳动物中由CNS缺血引起的神经炎性病症的方法。式(I)的治疗可以在症状发作和/或鉴定最近的CNS缺血事件的成像后不久使用,以通过减少缺氧组织中驻留细胞中的BTK介导的信号来防止微神经胶质细胞活化,炎性细胞浸润,血管渗透和随后的再灌注损伤。通过在缺血事件后数小时或数天内施用共价BTK抑制剂,治疗将减少和/或预防与缺血性脑损伤相关的神经炎性和神经退行性病症,包括血管性痴呆,轻度认知缺损,脑血管意外,中风,短暂性缺血发作(小中风),局灶性脑缺血,多局灶性脑缺血,血栓性中风,栓塞性中风以及在受限或局限血流区域周围的梗塞或半影的形成。

[0222] 在实施方案中,本发明涉及用BTK抑制剂治疗中枢和/或外周神经系统中的自身免疫介导的神经退行性病症的方法。通过抑制BTK介导的自身抗体产生,式(I)可以减少组织中驻留的骨髓衍生细胞的活化,并抑制循环骨髓细胞的转胞吞作用,渗出和浸润,由此减少炎症。此外,用式(I)治疗可减少在内皮-微神经胶质细胞界面和间质间隙处的炎性过程的活化,在此,自身免疫神经病中观察到了淋巴聚集物,所述减少是通过以下方式进行的:1)改变微神经胶质细胞和内皮细胞之间的串话(cross-talk),2)抑制活化B淋巴细胞及其同源抗原呈递至循环或浸润T细胞,和3)减少细胞因子和/或趋化因子的产生。通过与式(I)的共价相互作用抑制BTK的这些作用被认为减少自身免疫T细胞向灰质和白质中的浸润,这是通过抑制B细胞活化,细胞因子活化,和APC功能,以及通过改变专业APC(包括浸润的单核细胞,活化的微神经胶质细胞和少突细胞)的发育和成熟状态进行的。因此,使用例如式(I)的共价BTK抑制剂治疗自身免疫介导的神经退行性病症的方法可通过抑制先天性免疫过程以及减少抗体产生和自身免疫T细胞的活化而削弱疾病进展。本发明可以减缓动物模型中的实验性自身免疫脑病以及人类神经病的进展或诱导其好转,人类神经病包括视神经脊髓炎(Devic's综合征),Guillain-Barre综合征,多发性硬化症,临床孤立综合征,复发-缓解型

多发性硬化症,恶性多发性硬化症,原发性进行性多发性硬化症,视神经脊髓炎谱疾病,Balo同心圆硬化症,Marburg多发性硬化症,弥漫性髓鞘硬化症,慢性局灶性脑炎,Rasmussen脑炎,僵人综合征,重症肌无力,与抗MAG IgM单克隆丙种球蛋白病相关的多发性神经病。

[0223] 在另一个实施方案中,本发明涉及用BTK抑制剂治疗哺乳动物感染或感染后神经炎症引起的多发性神经病的方法,所述多发性神经病包括Bannworth综合征(莱姆病),慢性脑脊髓炎(莱姆病);疱疹后神经痛;HTLV-1相关的脊髓病;进行性多灶性脑白质病;慢性疲劳综合征(CFS),全身劳力不耐症(SEID),肌痛性脑脊髓炎(ME),病毒后疲劳综合征(PVFS),慢性疲劳免疫功能失常综合征(CFIDS);Meniere病(眩晕-内耳内淋巴液调节),Guillain-Barre综合征,肌萎缩侧索硬化,进行性延髓麻痹,婴儿进行性延髓麻痹(或青少年进行性延髓麻痹),Bell麻痹,前庭神经炎,急性播散性脑脊髓炎,复发性或多相性播散性脑脊髓炎和慢性脑脊髓炎。

[0224] 在一些实施方案中,本发明涉及用BTK抑制剂治疗可遗传的神经退行性病症的方法,其中基因突变导致外周或中枢神经,脊神经,背根神经节或特别是保护这些结构的髓鞘的退行;和/或导致继发于神经元,Schwann细胞,神经胶质细胞或星形胶质细胞缺陷的炎症反应。疾病选自Charcot-Marie-Tooth疾病,Dejerine-Sottas疾病,肥大性间质性神经病,Rett综合征,溶酶体贮积病和/或脂质贮积症(Gaucher病,Tay-Sachs病,Neimann-Pick病A,B和C型;Farber病,GM1神经节苷脂沉积病,GM2神经节苷脂沉积病,I型粘多糖病(包括Hurler,Hurler-Scheie和Scheie综合征),神经元蜡样脂褐质(Santavuori-Haltia病,Jansky-Bielschowsky病,Batten病,Kufs病,和其它儿童/青少年神经元蜡样脂褐质),脑白质营养不良(包括肾上腺脑白质营养不良,异染性脑白质营养不良,Canavan病,Alexander病,Pelizaeus-Merzbacher病);和线粒体异常功能,例如Friedreich共济失调,慢性进行性外眼肌麻痹,Alper病,脊髓性肌萎缩(遗传性SMN1或SMN2突变),婴儿型脊髓性肌萎缩(Werdnig-Hoffman病),青少年脊髓性肌萎缩(Wohlfart-Kugelberg-Welander病),先天性多发性关节旋转症和其中炎症可能导致运动神经(特别是长神经)丧失的疾病,如遗传性痉挛性截瘫。

[0225] 在一些实施方案中,本发明涉及用包含BTK抑制剂的组合物治疗人的实体肿瘤癌症的方法,其中所述剂量有效抑制实体肿瘤细胞与选自以下的至少一种微环境之间的信号传导:巨噬细胞,单核细胞,肥大细胞,辅助T细胞,细胞毒性T细胞,调节性T细胞,天然杀伤细胞,骨髓衍生抑制细胞,调节性B细胞,嗜中性粒细胞,树突细胞和成纤维细胞。在选择的实施方案中,本发明涉及使用BTK抑制剂治疗胰腺癌,乳癌,卵巢癌,黑素瘤,肺癌,头颈部癌和结肠直肠癌的方法,其中所述剂量有效抑制实体肿瘤细胞与选自以下的至少一种微环境之间的信号传导:巨噬细胞,单核细胞,肥大细胞,辅助T细胞,细胞毒性T细胞,调节性T细胞,天然杀伤细胞,骨髓衍生抑制细胞,调节性B细胞,嗜中性粒细胞,树突细胞和成纤维细胞。

[0226] 在一些实施方案中,过度增殖性病症是实体肿瘤癌症,选自膀胱癌,鳞状细胞癌,头颈部癌,胰腺导管腺癌(PDA),胰腺癌,结肠癌,乳腺癌,乳癌,纤维肉瘤,间皮瘤,肾细胞癌,肺癌,胸腺瘤,前列腺癌,结肠直肠癌,卵巢癌,急性骨髓性白血病,胸腺癌,脑癌,鳞状细胞癌,皮肤癌,眼癌,视网膜母细胞瘤,黑素瘤,眼内黑素瘤,口腔癌症,口咽癌,胃的癌,胃

癌,宫颈癌,肾癌,肾脏癌,肝癌,卵巢癌,前列腺癌,结肠直肠癌,食管癌,睾丸癌,妇产科癌症,甲状腺癌,获得性免疫缺陷综合征(AIDS)相关的癌症(例如淋巴瘤和卡波西肉瘤),病毒诱导的癌症如宫颈癌(人乳头瘤病毒),B细胞淋巴组织增生性疾病,鼻咽癌(Epstein-Barr病毒),卡波西肉瘤和原发性渗出性淋巴瘤(卡波西肉瘤疱疹病毒),肝细胞癌(乙型和丙型肝炎病毒)和T细胞白血病(人类T细胞白血病病毒-1),成胶质细胞瘤,食管肿瘤,头颈部肿瘤,转移性结肠癌,头颈部鳞状细胞癌,卵巢肿瘤,胰腺肿瘤,肾细胞癌,血液肿瘤,小细胞肺癌,非小细胞肺癌,IV期黑素瘤和神经胶质瘤。

[0227] 在一些实施方案中,过度增殖性病症是B细胞血液恶性肿瘤,选自慢性淋巴细胞白血病(CLL),小淋巴细胞白血病(SLL),非霍奇金淋巴瘤(NHL),弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡性淋巴瘤(FL),套细胞淋巴瘤(MCL),霍奇金淋巴瘤,B细胞急性成淋巴细胞白血病(B-ALL),Burkitt淋巴瘤,Waldenström巨球蛋白血症(WM),Burkitt淋巴瘤,多发性骨髓瘤,骨髓增生异常综合征或骨髓纤维化。在实施方案中,本发明涉及治疗哺乳动物癌症的方法,其中所述癌症是慢性粒细胞白血病,急性骨髓性白血病,DLBCL(包括活化的B细胞(ABC)和生发中心B细胞(GCB)亚型),滤泡中心淋巴瘤,霍奇金病,多发性骨髓瘤,惰性非霍奇金淋巴瘤和成熟B细胞ALL。

[0228] 在一些实施方案中,过度增殖性病症是CLL的亚型。已经表征了许多CLL的亚型。CLL通常按在白血病细胞中的免疫球蛋白重链可变区(IgV<sub>H</sub>)突变状态归类。R.N.Damle等人,Blood 1999,94,1840-47;T.J.Hamblin等人,Blood 1999,94,1848-54。具有IgV<sub>H</sub>突变的患者通常比没有IgV<sub>H</sub>突变的患者存活时间更长。ZAP70表达(阳性或阴性)也用于表征CLL。L.Z.Rassenti等人,N Engl J Med. 2004,351,893-901。CpG3上ZAP-70的甲基化也用于表征CLL,例如通过焦磷酸测序。R.Claus等人,J.Clin.Oncol.2012,30,2483-91;J.A.Woyach等人,Blood 2014,123,1810-17。CLL也按Binet或Rai标准下疾病的阶段进行分类。J.L.Binet等人,Cancer 1977,40,855-64;K.R.Rai,T.Han,Hematol.Oncol.Clin.North Am.1990,4,447-56。其它常见的突变,如11q缺失,13q缺失和17p缺失可以使用熟知的技术如荧光原位杂交(FISH)来评估。在实施方案中,本发明涉及治疗人的CLL的方法,其中所述CLL选自IgV<sub>H</sub>突变阴性CLL,ZAP-70阳性CLL,在CpG3 ZAP-70甲基化的CLL(ZAP-70 methylated at CpG3 CLL),CD38阳性CLL,以17p13.1(17p)缺失为特征的慢性淋巴细胞性白血病和以11q22.3(11q)缺失为特征的CLL。

[0229] 在一些实施方案中,过度增殖性病症是CLL,其中CLL经历了Richter转化。评估Richter转化(也被称为Richter综合征)的方法描述于P.Jain and S.O'Brien,Oncology,2012,26,1146-52。Richter转化是在5-10%的患者中观察到的CLL的亚型。它涉及由CLL的侵袭性淋巴瘤的发展并且预后总体较差。

[0230] 在一些实施方案中,过度增殖性病症是患者中的CLL或SLL,其中患者对淋巴细胞增多症敏感。在实施方案中,本发明涉及治疗患者中的CLL或SLL的方法,其中所述患者表现出由选自病毒感染,细菌感染,原生动物感染或脾切除术后状态的病症引起的淋巴细胞增多症。在实施方案中,任何前述实施方案中的病毒感染选自传染性单核细胞增多症,肝炎和细胞巨化病毒。在实施方案中,任何前述实施方案中的细菌感染选自百日咳,结核病和普鲁氏菌病。

[0231] 在一些实施方案中,过度增殖性病症选自骨髓增殖性病症(MPD),骨髓增殖性肿

瘤,真性红细胞增多症(PV),特发性血小板增多症(ET),原发性骨髓纤维化(PMF),骨髓增生异常综合征,慢性髓细胞性白血病(BCR-ABL1-阳性),慢性中性粒细胞性白血病,慢性嗜酸性粒细胞白血病或肥大细胞增多症。

[0232] 在一些实施方案中,炎性,免疫或自身免疫病症选自肿瘤血管生成,慢性炎性疾病,类风湿性关节炎,动脉粥样硬化,炎性肠病,皮肤病如银屑病,湿疹和硬皮病,糖尿病,糖尿病性视网膜病,早产儿视网膜病,年龄相关性黄斑变性,血管瘤,神经胶质瘤和黑素瘤,溃疡性结肠炎,特应性皮炎,贮袋炎,脊柱关节炎,葡萄膜炎,白塞病,风湿性多肌痛,巨细胞动脉炎,结节病,Kawasaki病,青少年特发性关节炎,化脓性汗腺炎,干燥综合征,银屑病关节炎,青少年类风湿性关节炎,强直性脊柱炎,克罗恩病,狼疮和狼疮肾炎。

[0233] 在一些实施方案中,炎性,免疫或自身免疫病症是与哺乳动物中的血管发生或血管生成相关的疾病,其可表现为肿瘤血管生成,慢性炎性疾病如类风湿性关节炎,炎性肠病,动脉粥样硬化,皮肤病如银屑病,湿疹和硬皮病,糖尿病,糖尿病性视网膜病,早产儿视网膜病,年龄相关性黄斑变性,血管瘤,神经胶质瘤,黑素瘤,卡波西肉瘤和卵巢癌,乳癌,肺癌,胰腺癌,前列腺癌,结肠癌和表皮样癌。

[0234] 在一些实施方案中,炎性,免疫或自身免疫病症是治疗,预防和/或控制哮喘。如本文所用,“哮喘”涵盖气道收缩,而不管其原因,包括反应性气道疾病。哮喘的常见触发因素包括但不限于暴露于环境刺激物(例如过敏原),冷空气,暖空气,香水,湿空气,运动或尽力,以及情绪压力。本文还提供了治疗,预防和/或控制与哮喘相关的一种或多种症状的方法。症状的例子包括但不限于严重咳嗽,气道收缩和粘液产生。

[0235] 本文所述化合物和化合物组合在治疗,预防和/或控制本文所述的其它指定疾病或病症中的功效也可以使用本领域已知的各种模型来测试。治疗,预防和/或控制哮喘的功效可以使用卵诱导的哮喘模型评估,其描述于例如Lee等人,J. Allergy Clin. Immunol. 2006,118,403-9。治疗,预防和/或控制关节炎(例如类风湿性或银屑病关节炎)的功效可以使用自身免疫动物模型评估,其描述于例如Williams等人,Chem. Biol. 2010,17,123-34,WO 2009/088986,WO 2009/088880和WO 2011/008302。治疗,预防和/或控制银屑病的功效可以使用具有表皮,脉管系统或免疫细胞中的靶向突变的转基因或敲除小鼠模型,由自发突变产生的小鼠模型,和具有人皮肤或免疫细胞的异种移植的免疫缺陷型小鼠模型来评估,所有这些都描述于例如Boehncke等人,Clinics in Dermatology,2007,25,596-605。治疗,预防和/或控制纤维化或纤维化病情的功效可以使用以下模型进行评估:肾纤维化的单侧输尿管阻塞模型,其描述于例如Chevalier等人,Kidney International 2009,75,1145-1152;博来霉素诱导的肺纤维化模型,描述于例如Moore等人,Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 2008,294,L152-L160;多种肝/胆纤维化模型,描述于例如Chuang等人,Clin. Liver Dis. 2008,12,333-347和Omenetti等人,Laboratory Investigation,2007,87,499-514(胆管结扎模型);或许多骨髓纤维化小鼠模型中的任何一种,例如描述于Varicchio等人,Expert Rev. Hematol. 2009,2,315-334。治疗,预防和/或控制硬皮病的功效可以使用通过重复局部注射博来霉素诱导的小鼠模型来评估,描述于例如Yamamoto等人,J. Invest. Dermatol. 1999,112,456-462。治疗,预防和/或控制皮肌炎的功效可以使用通过用兔肌球蛋白免疫诱导的肌炎小鼠模型评估,描述于例如Phyanagi等人,Arthritis & Rheumatism,2009,60(10),3118-3127。治疗,预防和/或控制狼

疮的功效可以使用各种动物模型评估,描述于例如Ghoreishi等人,Lupus,2009,19,1029-1035;Ohl等人,J.Biomed.&Biotechnol.,Article ID 432595 (2011);Xia等人,Rheumatology,2011,50,2187-2196;Pau等人,PLoS ONE,2012,7 (5),e36761;Mustafa等人,Toxicology,2011,90,156-168;Ichikawa等人,Arthritis&Rheumatism,2012,62 (2),493-503;Rankin等人,J.Immunology,2012,188,1656-1667。治疗,预防和/或控制干燥综合征的功效可以使用各种小鼠模型评估,描述于例如Chiorini等人,J.Autoimmunity,2009,33,190-196。

[0236] 可以使用本领域已知的各种模型来测试本文所述化合物和化合物组合在治疗,预防和/或控制指定疾病或病症中的功效。例如,用于确定胰腺癌治疗功效的模型描述于Herreros-Villanueva等人,World J.Gastroenterol.2012,18,1286-1294。用于确定乳癌治疗功效的模型描述于例如Fantozzi,Breast Cancer Res.2006,8,212。用于确定卵巢癌治疗功效的模型描述于例如Mullany等人,Endocrinology 2012,153,1585-92;和Fong等人,J.Ovarian Res.2009,2,12。用于确定黑素瘤治疗功效的模型描述于例如Damsky等人,Pigment Cell&Melanoma Res.2010,23,853-859。用于确定肺癌治疗功效的模型描述于例如Meuwissen等人,Genes&Development,2005,19,643-664。用于确定肺癌治疗功效的模型描述于例如Kim,Clin.Exp.Otorhinolaryngol.2009,2,55-60;和Sano,Head Neck Oncol.2009,1,32。用于确定结肠直肠癌治疗功效的模型,包括CT26模型,描述于Castle等人,BMC Genomics,2013,15,190;Endo等人,Cancer Gene Therapy,2002,9,142-148;Roth等人,Adv.Immunol.1994,57,281-351;Fearon等人,Cancer Res.1988,48,2975-2980。

[0237] 也可以使用用于确定血液恶性肿瘤(包括B细胞癌)治疗功效的模型。例如,可以使用PiBCL1鼠模型和BALB/c(单倍型H-2d)小鼠评估弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中的功效。I11idge等人,Cancer Biother.&Radiopharm.2000,15,571-80。可以使用具有C3H/HeN(单倍型2-Hk)小鼠的38C13鼠模型或者38C13 Her2/neu模型评估非霍奇金淋巴瘤(NHL)中的功效。Timmerman等人,Blood 2001,97,1370-77;Penichet等人,Cancer Immunol.Immunother.2000,49,649-662。可以使用BALB/c(单倍型H-2d)小鼠用BCL1模型评估CLL中的功效。Dutt等人,Blood,2011,117,3230-29。

## 实施例

[0238] 现在参照以下实施例描述本文包含的实施方案。提供这些实施例仅仅是为了说明的目的,并且本文所包含的公开内容决不应被解释为限于这些实施例,而是应该被解释为包含由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。实施例中描述的试剂可商购获得或可根据文献中描述的程序制备。

[0239] 使用以下缩写:

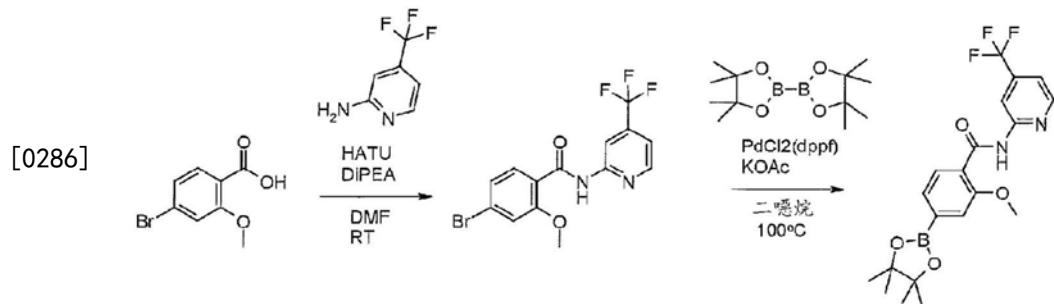
- |        |                   |                                       |
|--------|-------------------|---------------------------------------|
| [0240] | HATU              | 0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲阳离子六氟磷酸盐 |
| [0241] | POCl <sub>3</sub> | 磷(V)氯氧化物                              |
| [0242] | DMF               | N,N-二甲基甲酰胺                            |
| [0243] | NBS               | N-溴琥珀酰亚胺                              |
| [0244] | DCM               | 二氯甲烷                                  |

[0245]	EtOAc	乙酸乙酯
[0246]	KOAc	乙酸钾
[0247]	IPA	2-丙醇
[0248]	ACN	乙腈
[0249]	MW	微波
[0250]	AcOH	乙酸
[0251]	DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
[0252]	THF	四氢呋喃
[0253]	EtOH	乙醇
[0254]	EDCI	1- (3-二甲基氨基丙基) -3-乙基碳二亚胺
[0255]	DMAP	二甲基氨基吡啶
[0256]	HPLC	高压液相色谱
[0257]	LiHMDS	六甲基二硅基胺基锂
[0258]	MeOH	甲醇
[0259]	n-BuLi	正丁基锂
[0260]	NMR	核磁共振
[0261]	LC-MS	液相色谱-质谱
[0262]	SCX-2	强阳离子交换-2
[0263]	KOtBu	叔丁醇钾
[0264]	T3P	丙基膦酸酐
[0265]	RT	室温
[0266]	Rt	保留时间
[0267]	NMP	1-甲基-2-吡咯烷酮
[0268]	TFA	三氟乙酸
[0269]	DMSO	二甲基亚砜
[0270]	DIAD	偶氮二羧酸二异丙酯
[0271]	THP	四氢吡喃
[0272]	TBDMS	叔丁基二甲基甲硅烷基
[0273]	TEA	三乙胺
[0274]	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	三(二亚苄基丙酮)二钯(0)
[0275]	PdCl <sub>2</sub> (dppf).DCM	[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)与二氯甲烷的复合物
[0276]	TLC	薄层色谱
[0277]	PE	相交换
[0278]	CDCl <sub>3</sub>	氯仿-d
[0279]	HBr	溴化氢
[0280]	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	碳酸钾
[0281]	m/z	质荷比
[0282]		实施例1-BTK抑制剂的合成

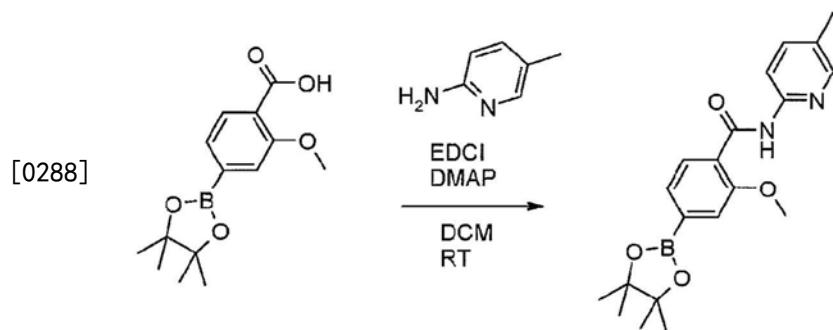
[0283] 包括在本发明中的BTK抑制剂可以通过有机化学领域公知的方法制备。参见例如 March, Advanced Organic Chemistry, 4th Edition, John Wiley&Sons, 2001。在合成过程中,可能必须和/或希望保护任何有关分子上的敏感或反应基团。这通过常规保护基团实现,例如 Greene and Wutts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Edition, John Wiley&Sons, 1999中所述的那些。使用本领域公知的方法任选地在方便的后续阶段除去保护基团。

[0284] 如果需要,反应的产物任选地使用常规技术分离和纯化,但不限于过滤,蒸馏,结晶,色谱法等。这些材料任选地使用常规手段表征,包括物理常数和光谱数据的测量。

[0285] 包含在本发明中的BTK抑制剂可以通过以下途径合成。硼酸频哪醇酯可以如下制备:

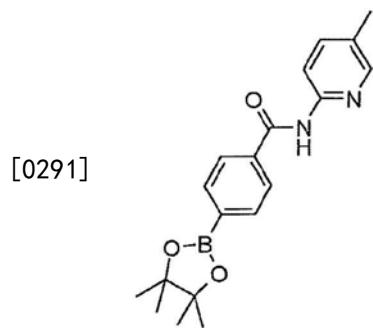


[0287] 方案1



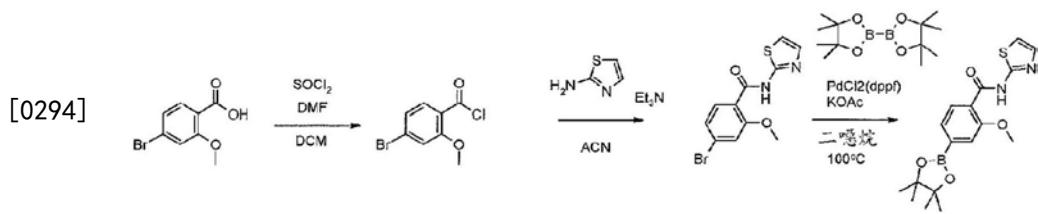
[0289] 方案2

[0290] 下列化合物可以按照与方案1和方案2中所示的制备类似的方式制备:



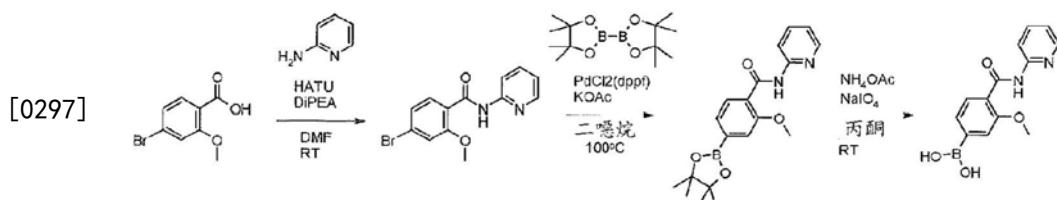
[0292] 方案3

[0293] 额外的硼酸频哪醇酯可如下制备:



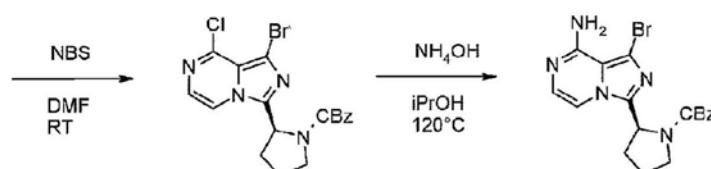
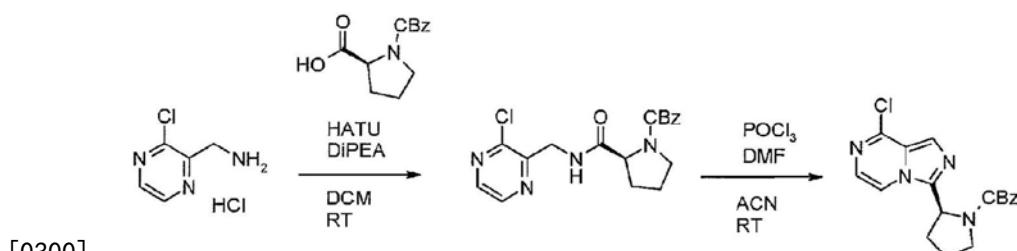
[0295] 方案4

[0296] 硼酸可以如下制备：



[0298] 方案5

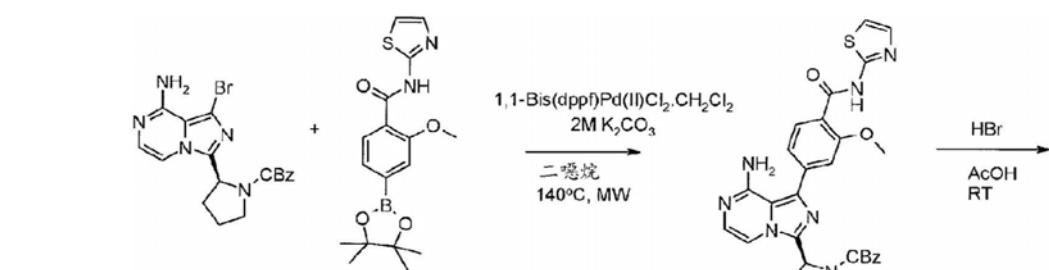
[0299] 吡咯烷衍生物可以如下制备(其中CBz是指羧基苄基)：



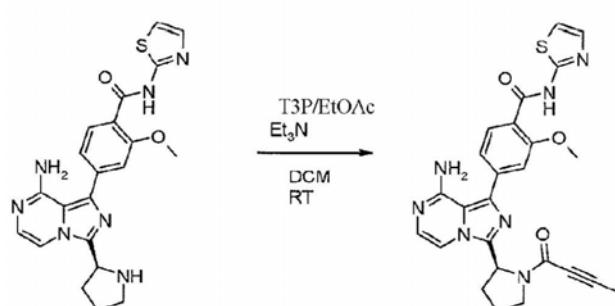
[0301] 方案6

[0302] 以类似的方式制备CBz保护的丙氨酸和N-甲基丙氨酸衍生物。

[0303] 吡咯烷衍生物也可以如下制备：



[0304]



[0305] 方案7

[0306] 在上述合成中,硼酸和硼酸频哪醇酯在Suzuki偶联步骤中同样好地起作用。

[0307] 本发明在其范围内还包括根据本发明的BTK抑制剂的例如由于构型或几何异构产生的所有立体异构形式。这种立体异构形式包括对映异构体,非对映异构体,顺式和反式异构体等。在本文所述化合物的单独立体异构体的情况下,本发明也包括前述立体异构体,其基本上不含,即联合小于5%,优选小于2%,特别是小于1%其它立体异构体。任何比例的立体异构体的混合物,例如包含基本相等量的两种对映异构体的外消旋混合物也包括在本发明的范围内。

[0308] 对于手性化合物,用于不对称合成由此获得纯立体异构体的方法是本领域公知的,例如,手性诱导合成,从手性中间体开始的合成,对映选择性酶促转化,在手性介质上使用色谱法分离立体异构体。这些方法描述在Collins等人,eds.,*Chirality in Industry*, John Wiley&Sons, 1992。同样地,合成几何异构体的方法也是本领域公知的。

[0309] 可以呈游离碱形式的本发明化合物可以以药学上可接受的盐的形式从反应混合物中分离出来。药学上可接受的盐还可以通过用有机或无机酸处理本文公开的BTK抑制剂的游离碱来获得,所述有机或无机酸例如氯化氢,溴化氢,碘化氢,硫酸,磷酸,乙酸,丙酸,乙醇酸,马来酸,丙二酸,甲磺酸,富马酸,琥珀酸,酒石酸,柠檬酸,苯甲酸和抗坏血酸。

[0310] 本文公开的本发明化合物也可以以无定形形式存在或以多晶形式(也称为多晶型形式)存在。所有的物理形式都包含在本发明的范围内。溶剂合物的制备通常是已知的。因此,例如,Caira等人,J.Pharm.Sci.,2004,93,601-611描述了在乙酸乙酯中以及从水中制备抗真菌剂氟康唑的溶剂合物。溶剂合物,水合物等的类似的制备方法被van Tonder等人, AAPS PharmSciTech.,2004,5(1),article 12;和Bingham等人,Chem.Commun.2001,,603-604描述。典型的非限制性方法涉及在高于环境温度下将本发明化合物溶解在所需量的所需溶剂(有机溶剂或水或其混合物)中,并以足以形成晶体的速率冷却溶液,然后通过标准方法分离晶体。分析技术例如IR光谱法显示作为溶剂合物(或水合物)的晶体中存在溶剂(或水)。

[0311] 本发明还包括同位素标记的本发明的化合物,其与本文所述的那些相同,除了事实上一个或多个原子被原子质量或质量数不同于通常在自然界发现的原子质量或质量数的原子替换。可掺入本发明化合物的同位素的实例包括氢,碳,氮,氧,磷,氟和氯的同位素,分别如<sup>2</sup>H,<sup>3</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>14</sup>C,<sup>15</sup>N,<sup>17</sup>O,<sup>18</sup>O,<sup>18</sup>F,<sup>32</sup>P,<sup>35</sup>S和<sup>36</sup>Cl。

[0312] 本文公开的化合物的放射性同位素标记形式(例如用<sup>3</sup>H和<sup>14</sup>C标记的那些)可用于化合物和/或底物组织分布测定中。氟(<sup>3</sup>H)和碳-14(<sup>14</sup>C)同位素因其易于制备和可检测性而特别优选。此外,用更重的同位素例如氘(<sup>2</sup>H)取代可以提供由更大的代谢稳定性导致的某些治疗优势(例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求),因此在某些情况下可能是优选的。本文公开的化合物的同位素标记形式通常可以通过按照方案和/或下述实施例中公开的那些程序类似的程序制备,用适当的同位素标记的试剂代替非同位素标记的试剂。

[0313] 实施例2-分析方法

[0314] 以下液相色谱(LC)和质谱(MS)方法可用于表征包含在本发明中的化合物。

[0315] 方法A

[0316] LC-MS光谱仪(Agilent)

- [0317] 检测器:DAD (210, 254和280nm)
- [0318] 质量检测器:API-ES (10-2000amu, pos./neg.离子模式)
- [0319] 洗脱液(流动相):A:在MilliQ-水中的0.1%甲酸,B:乙腈
- [0320] 柱:Waters Xterra C18 MS, 50×4.6mm ID, 2.5μm
- [0321] 流速:0.5mL/min
- [0322] 梯度洗脱程序:
- | 时间(min)    | A (%) | B (%) |
|------------|-------|-------|
| 0.0        | 90    | 10    |
| [0323] 7.0 | 10    | 90    |
| 7.1        | 0     | 100   |
| 10.0       | 90    | 10    |
- [0324] 方法B
- [0325] LC-MS光谱仪(Waters);检测器:DAD (214nm)
- [0326] 质量检测器:API-ES (100-1000amu, pos./neg.离子模式)
- [0327] 洗脱液(流动相):A:在水中的0.1%三氟乙酸(TFA);B:乙腈
- [0328] LC-MS流动方法:梯度
- [0329] 柱:Acquity HSS-T3 (2.1×100mm×1.8μm)
- [0330] 流速:0.3mL/min
- [0331] 梯度洗脱程序:
- | 时间(min)     | A (%) | B (%) |
|-------------|-------|-------|
| 0.0         | 90.0  | 10.0  |
| 1.0         | 90.0  | 10.0  |
| [0332] 2.0  | 85.0  | 15.0  |
| 4.5         | 45.0  | 55.0  |
| 6.0         | 10.0  | 90.0  |
| 8.0         | 10.0  | 90.0  |
| 9.0         | 90.0  | 10.0  |
| [0333] 10.0 | 90.0  | 10.0  |
- [0334] 方法C
- [0335] HPLC:Gilson分析型HPLC系统
- [0336] 柱:Phenomenex Luna C18 (2) (100×2.00mm, 5μm)
- [0337] 检测器:UV/Vis (210/240nm)
- [0338] 流速:1mL/min
- [0339] 洗脱液(流动相):A:乙腈,B:乙腈/MilliQ-水=1/9 (v/v),C:在MilliQ-水中的0,1%TFA
- [0340] 梯度洗脱程序:

时间(min)	A(%)	B(%)	C(%)
---------	------	------	------

0.00	0	97	3
------	---	----	---

[0341] 

11.90	97	0	3
-------	----	---	---

14.40	97	0	3
-------	----	---	---

15.40	0	97	3
-------	---	----	---

[0342] 方法D

[0343] HPLC:Waters分析型HPLC系统;柱:SunFire-C18 (4.6×50mm,5μm)

[0344] 检测器:UV/Vis (210/240nm)

[0345] 流速:1mL/min

[0346] 洗脱液(流动相):A:水中的5mM乙酸铵,B:乙腈

[0347] 梯度洗脱程序:

时间(min)	A(%)	B(%)
---------	------	------

0.0	90	10
-----	----	----

1.5	90	10
-----	----	----

[0348] 

6.0	10	90
-----	----	----

8.0	10	90
-----	----	----

8.5	90	10
-----	----	----

10.0	90	10
------	----	----

[0349] 方法E

[0350] HPLC:Waters分析型HPLC系统;柱:X-Bridge Shield-RP-18 (4.6×250mm,5μm)

[0351] 检测器:可编程二极管阵列

[0352] 流速:1mL/min

[0353] 洗脱液:A:水中2mM乙酸铵,B:乙腈

[0354] 梯度洗脱程序:

时间(min)	A(%)	B(%)
---------	------	------

0.0	70	30
-----	----	----

1.0	70	30
-----	----	----

[0355] 

3.5	20	80
-----	----	----

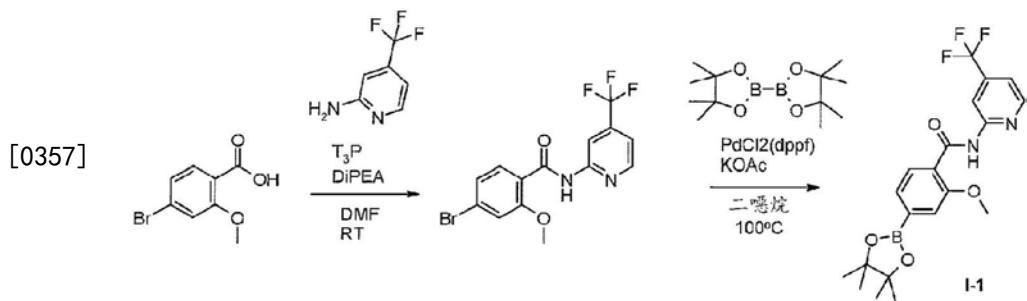
5.5	5	95
-----	---	----

7.0	5	95
-----	---	----

8.5	70	30
-----	----	----

10.0	70	30
------	----	----

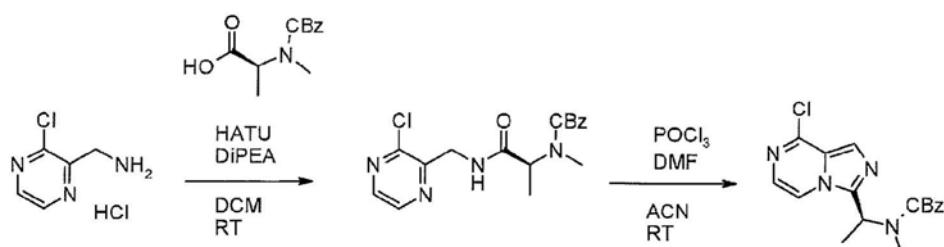
[0356] 实施例3-制备2-甲氧基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(I-1)



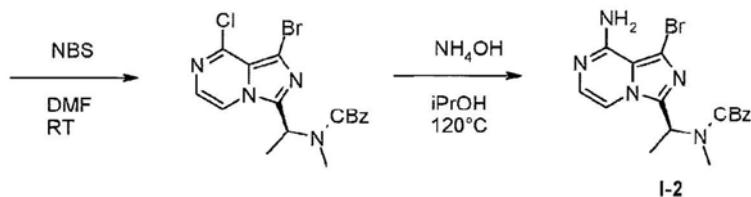
[0358] 4-溴-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺的制备。将4-(三氟甲基)吡啶-2-胺(13.0g,80.1mmol)和4-溴-2-甲氧基-苯甲酸(18.5g,80.1mmole)在DMF(150mL)中的溶液冷却至0℃,加入N,N-二异丙基乙基胺(44.2mL,240.3mmol),然后滴加丙基膦酸酐溶液(50%,在二氯甲烷中,76.4g,120.1mmol),并将反应混合物在80℃加热16小时。将反应混合物冷却并用水(300mL)稀释。滤出所得固体并用水(300mL)洗涤。将该固体溶于10%甲醇/二氯甲烷(200mL),并用水洗涤。将有机部分用硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到4-溴-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(17.0g,56.8%),为浅褐色固体。

[0359] 2-甲氧基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺的制备。将4-溴-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(17.0g,45.3mmol),双联频哪醇基二硼(bis(pinacolata)diboron)(13.7g,54.3mmol)和乙酸钾(8.8g,90.6mmol)吸收于二噁烷(170mL)中并将反应混合物在氮气下脱气10分钟。然后添加PdCl<sub>2</sub>(dpPf)<sub>2</sub>·DCM(1.7g,2.2mmol)并将反应混合物在100℃加热16小时。将反应混合物冷却,将水(300mL)加入到该混合物中并用乙酸乙酯(200mL)萃取。将有机部分用硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到残余物,其通过使用硅胶(100-200目)和0-10%乙酸乙酯/己烷的柱色谱法进一步纯化,得到2-甲氧基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(14.4g,77.0%),为灰白色固体。HPLC(方法E)R<sub>t</sub>:5.99min;<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>,300K):10.9(1H,s),8.64(1H,d,J=4.8Hz),8.56(1H,s),7.83(d,1H,J=7.6Hz),7.54(d,1H,J=4.8Hz),7.41-7.37(m,2H),3.98(s,3H)和1.32(s,12H)。

[0360] 实施例4-制备N-[(1S)-1-(8-氨基-1-溴-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(I-2)



[0361]



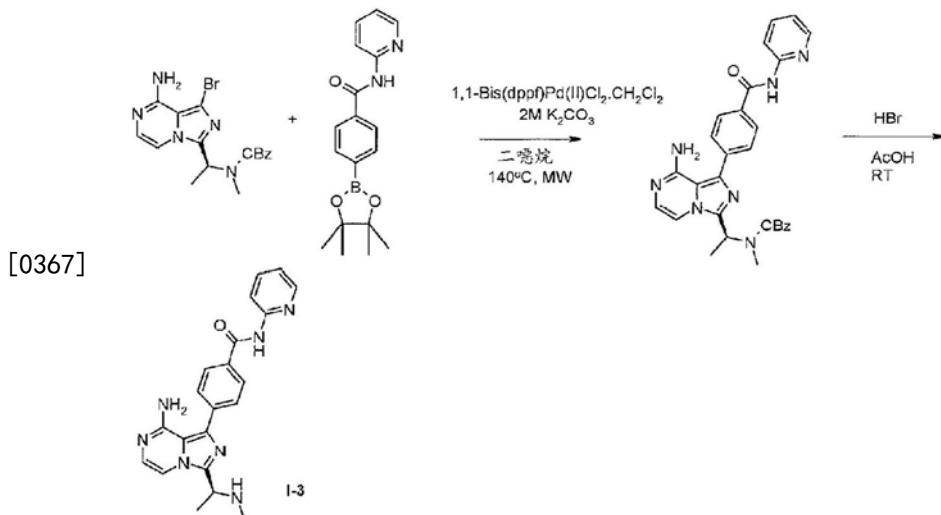
[0362] 制备N-[(1S)-2-[(3-氯吡嗪-2-基)甲基氨基]-1-甲基-2-氧化-乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯。在10分钟内将N,N-二异丙基乙基胺(19.35mL,111.09mmol)滴加到(2S)-2-[(苄氧基羰基(甲基)氨基]丙酸(6.59g,27.77mmol),(3-氯吡嗪-2-基)甲胺盐酸盐(5.00g,27.77mmol)和HATU(15.84g,41.66mmol)在二氯甲烷(250mL)中的混合物,并将所得混合物在20℃搅拌3小时。将混合物用饱和碳酸氢钠水溶液(200mL)洗涤一次,并用饱和氯化铵水溶液(200mL)洗涤一次。有机层用硫酸钠干燥,过滤并蒸发至干。通过硅胶快速柱色谱法(0-100%乙酸乙酯/庚烷)纯化残余物,得到N-[(1S)-2-[(3-氯吡嗪-2-基)甲基氨基]-1-甲基-2-氧化-乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(9.2g,91.3%),为无色油状物。数据:LC-MS(方法A)R<sub>t</sub>:5.32min;m/z 363.2(M+H)<sup>+</sup>。

[0363] 制备N-[(1S)-1-(8-氯咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯。在室温下,经5分钟将POCl<sub>3</sub>(14.22mL,152.15mmol)逐滴添加至N-[(1S)-2-[(3-氯吡嗪-2-基)甲基氨基]-1-甲基-2-氧化-乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(9.2g,25.36mmol)和DMF(0.2mL,2.54mmol)的乙腈(200mL)溶液中,并将混合物在70℃下搅拌2小时。将反应混合物冷却至室温并倒入冰(250mL)中。用碳酸钠使混合物的pH值为~8,用乙酸乙酯(250mL)萃取两次。将合并的有机萃取物用盐水(200mL)洗涤一次,用硫酸钠干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(100%乙酸乙酯)纯化残余物,得到N-[(1S)-1-(8-氯咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(8.0g,91.5%),为橙色油状物。数据:LC-MS(方法A)R<sub>t</sub>:6.18min;m/z 345.1(M+H)<sup>+</sup>。

[0364] 制备N-[(1S)-1-(1-溴-8-氯-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯。将NBS(4.54g,25.52mmol)加入到N-[(1S)-1-(8-氯咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(8.0g,23.2mmol)的NMP(50mL)溶液中,并将混合物在室温下搅拌2小时。将乙酸乙酯(250mL)和碳酸氢钠饱和水溶液(250mL)加入反应混合物中并分离各层。有机萃取物用水(200mL)洗涤一次,用饱和盐水(200mL)洗涤一次,用硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过快速柱色谱法(0至100%乙酸乙酯/庚烷)纯化残余物,得到N-[(1S)-1-(1-溴-8-氯-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(6.5g,66.1%),为白色固体。数据:LC-MS(方法A)R<sub>t</sub>:7.05min;m/z 423.0+425.0(1:1)(M+H)<sup>+</sup>。

[0365] 制备N-[(1S)-1-(8-氨基-1-溴-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯。在两个微波小瓶(1×0.9g;1×1.3g)中,将N-[(1S)-1-(1-溴-8-氯-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(2.2g,5.19mmol)悬浮于IPA(2×12mL)中,加入氢氧化铵(28%,水中)(2×8mL,410.84mmol)并将混合物在120℃下微波加热2小时。合并反应混合物并浓缩至小体积。滤出固体,用水(50mL)洗涤并与乙腈(25mL)共蒸发一次,得到标题化合物(1.8g,85.8%收率),为黄色固体。数据:LC-MS(方法A)R<sub>t</sub>:4.27min;m/z 404.1+406.1(1:1)(M+H)<sup>+</sup>。

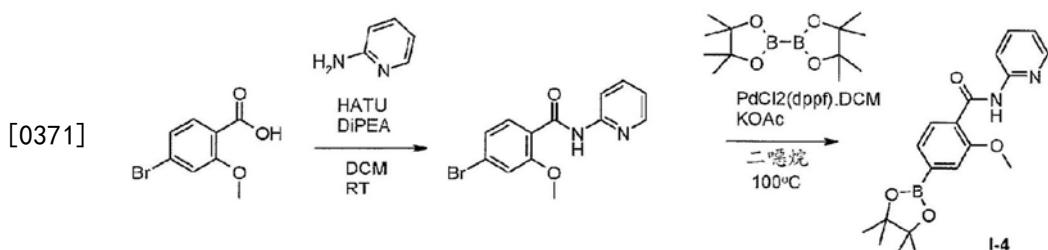
[0366] 实施例5-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(甲基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(I-3)



[0368] 制备N-[(1S)-1-[8-氨基-1-[4-(2-吡啶基氨基甲酰基)苯基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基]乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯。将中间体I-2(300mg, 0.74mmol)添加至N-(2-吡啶基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯甲酰胺(313mg, 0.96mmol) / 1,4-二噁烷(15mL), 加入2M碳酸钾水溶液(3mL)并将混合物用N<sub>2</sub>气吹扫5分钟。加入Bis(dppf)Pd(II)Cl<sub>2</sub>(30.3mg, 0.04mmol), 再次吹扫混合物并将反应混合物在微波中在140℃下搅拌30分钟。将反应混合物倒入水(50mL)中并用乙酸乙酯(100mL)萃取两次。将合并的有机萃取物用饱和盐水(100mL)洗涤一次, 经硫酸钠干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(0至8%甲醇/二氯甲烷)纯化残余物, 得到N-[(1S)-1-[8-氨基-1-[4-(2-吡啶基氨基甲酰基)苯基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基]乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(205mg, 53.0%), 为黄色油状物。数据:LC-MS(方法A)R<sub>t</sub>:4.69min; m/z 522.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0369] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(甲基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺。将氢溴酸/乙酸(33wt%; 4mL, 70.2mmol)和N-[(1S)-1-[8-氨基-1-[4-(2-吡啶基氨基甲酰基)苯基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基]乙基]-N-甲基-氨基甲酸苄基酯(200mg, 0.38mmol)的混合物在室温下搅拌4小时。将反应混合物倒入水(50mL)中并用二氯甲烷(30mL)萃取两次。用固体碳酸钠使水相呈碱性(pH~10), 用二氯甲烷(30mL)萃取一次, 并用乙酸乙酯(50mL)萃取两次。将合并的有机萃取物用饱和盐水(100mL)洗涤一次, 经硫酸钠干燥并浓缩, 得到4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(甲基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(115mg, 77.4%), 为灰白色固体。数据:LC-MS(方法A)R<sub>t</sub>:1.09min; m/z 388.2 (M+H)<sup>+</sup>。

[0370] 实施例6-制备2-甲氧基-N-(2-吡啶基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯甲酰胺(I-4)

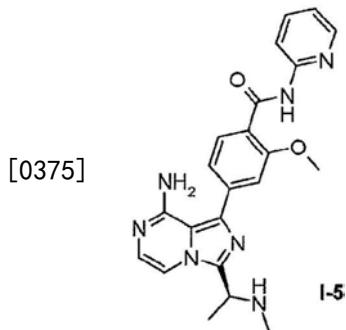


[0372] 制备4-溴-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺。向4-溴-2-甲氧基-苯甲酸(15.3g,

66.2mmol) 的二氯甲烷 (250mL) 溶液中加入吡啶-2-胺 (6.9g, 72.8mmol) 和 DIPEA (34.6mL, 198.7mmol)。加入HATU (32.7g, 86.1mmol) 并将混合物在室温下搅拌过夜。加入水 (200mL) 并将反应混合物搅拌1小时。将有机层减压浓缩。加入DCM (50mL) 并使溶液结晶过周末。滤出固体, 用乙醚 (10mL) 洗涤两次, 减压干燥, 得到4-溴-2-甲氧基-N-(2-吡啶基) 苯甲酰胺 (14.4g, 66.8%) , 为浅褐色晶体。数据: LC-MS (方法A)  $R_t$ : 6.05min; m/z 307.0+309.0 (1:1) ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

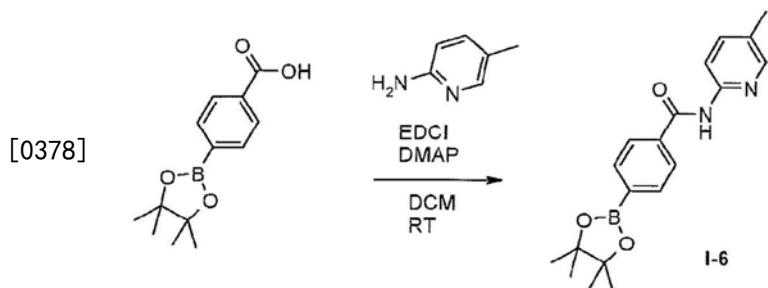
[0373] 制备2-甲氧基-N-(2-吡啶基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基) 苯甲酰胺。向4-溴-2-甲氧基-N-(2-吡啶基) 苯甲酰胺 (14.4g, 46.9mmol) 的1,4-二噁烷 (175mL) 溶液中加入双联频哪醇基二硼 (bis (pinacolata) diboron) (14.3g, 56.3mmol) 和乙酸钾 (9.2g, 93.8mmol)。加入PdCl<sub>2</sub> (dppf) . DCM (1.9g, 2.3mmol) , 并将混合物在100℃搅拌5小时。将反应混合物用水 (150mL) 稀释并用乙酸乙酯 (150mL) 萃取两次。将合并的有机层用硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。通过快速柱色谱法 (0至50% 乙酸乙酯/庚烷) 纯化残余物。含有产物的级分在减压下浓缩。将残余物悬浮于庚烷 (150mL) 中并搅拌30分钟。滤出固体并用庚烷 (15mL) 洗涤两次, 得到2-甲氧基-N-(2-吡啶基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基) 苯甲酰胺 (10.4g, 62.6%) , 为白色固体。数据: LC-MS (方法A)  $R_t$ : 6.86min; m/z 355.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup> . <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K) :  $\delta$  = 10.51 (1H, s) , 8.36 (1H, m) , 8.26 (1H, d,  $J$  = 8.4Hz) , 7.89 (1H, d,  $J$  = 7.6Hz) , 7.85 (1H, m) , 7.41 (1H, dd,  $J$ 1 = 7.6Hz,  $J$ 2 = 0.9Hz) , 7.38 (1H, s) , 7.17 (1H, m) , 4.01 (3H, s) , 1.33 (12H, s) 。

[0374] 实施例7-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(甲基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基) 苯甲酰胺 (I-5)



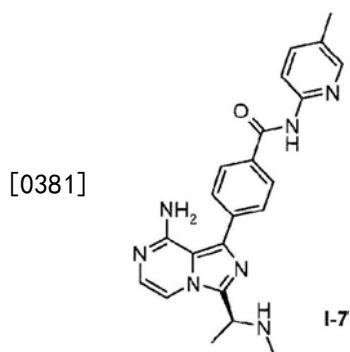
[0376] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(甲基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基) 苯甲酰胺。使用中间体I-2和I-4以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物, 得到标题化合物 (320mg, 100% , 两步) , 为浅黄色固体。数据: LC-MS (方法A)  $R_t$ : 2.38min; m/z 418.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0377] 实施例8-制备N-(5-甲基-2-吡啶基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基) 苯甲酰胺 (I-6)



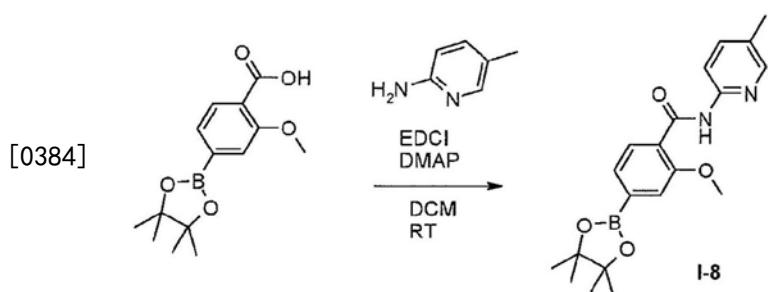
[0379] 制备N- (5-甲基-2-吡啶基) -4- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基) 苯甲酰胺。将4- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基) 苯甲酸(3.0g, 12.09mmol), 5-甲基吡啶-2-胺(1.43g, 13.3mmol), EDCI(2.55g, 13.3mmol) 和DMAP(177.3mg, 1.45mmol) 溶于DCM(50mL) 中。将反应混合物在21℃搅拌过夜。向反应混合物中加入50mL 3% 柠檬酸水溶液并将反应混合物搅拌15分钟。将有机层依次用50mL 1% 柠檬酸水溶液和盐水(50mL) 洗涤, 倾倒在PE-过滤器上并真空浓缩, 得到标题化合物, 为灰白色固体(3.52g, 86.0%)。数据: LC-MS  $R_t$ : 6.397min;  $m/z$  339.3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>;  $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ , 300K):  $\delta$  = 8.86 (1H, s), 8.32 (1H, d,  $J$  = 8.5Hz), 8.12 (1H, m), 7.93 (4H, s), 7.60 (1H, dd,  $J$ 1 = 2.3Hz,  $J$ 2 = 8.5Hz), 2.33 (3H, s), 1.37 (12H, s)。

[0380] 实施例9-制备4- [8-氨基-3- [(1S)-1- (甲基氨基) 乙基] 咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基] -N- (5-甲基-2-吡啶基) 苯甲酰胺(I-7)



[0382] 制备4- [8-氨基-3- [(1S)-1- (甲基氨基) 乙基] 咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基] -N- (5-甲基-2-吡啶基) 苯甲酰胺。使用中间体I-2和I-6以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物, 得到标题化合物(275mg, 92%, 两步), 为浅黄色固体。数据: LC-MS (方法A)  $R_t$ : 1.60min;  $m/z$  402.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

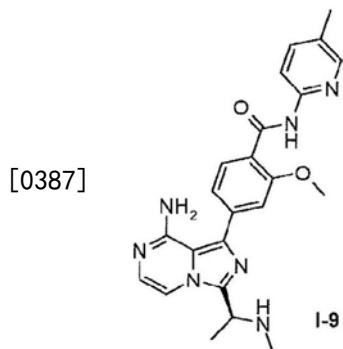
[0383] 实施例10-制备2-甲氧基-N- (5-甲基-2-吡啶基) -4- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基) 苯甲酰胺(I-8)



[0385] 制备2-甲氧基-N- (5-甲基-2-吡啶基) -4- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基) 苯甲酰胺。使用2-甲氧基-4- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-

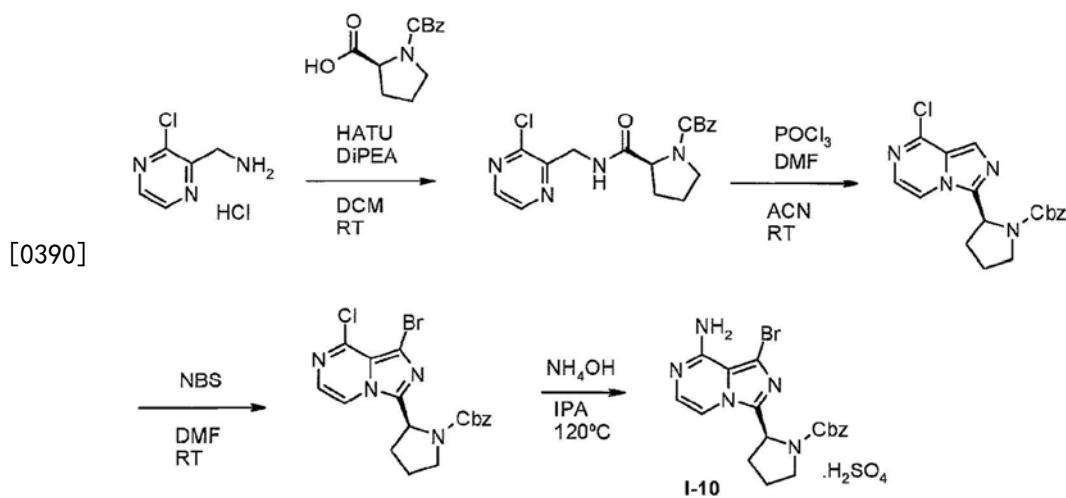
基)苯甲酸以与对中间体I-6所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(4.21g, 75.2%),为灰白色固体。数据:LC-MS  $R_t$ :7.178min;  $m/z$  369.3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>;  $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ , 300K):  $\delta$ =10.34 (1H, s), 8.33 (1H, d,  $J$ =8.6Hz), 8.25 (1H, d,  $J$ =7.7Hz), 8.14 (1H, m), 7.55 (2H, d,  $J$ =7.8Hz), 7.44 (1H, s), 4.12 (3H, s), 2.31 (3H, s), 1.37 (12H, s)。

[0386] 实施例11-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(甲基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(I-9)



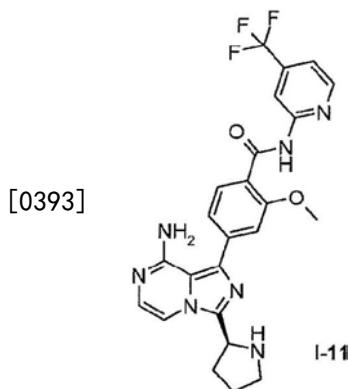
[0388] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(甲基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-2和I-8以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(209mg, 66%, 两步),为浅黄色固体。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ :2.86min;  $m/z$  432.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0389] 实施例12-制备(2S)-2-(8-氨基-1-溴-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)吡咯烷-1-羧酸苄基酯硫酸盐(I-10)



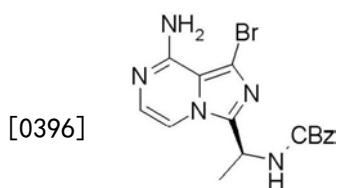
[0391] 制备(2S)-2-(8-氨基-1-溴-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)吡咯烷-1-羧酸苄基酯硫酸盐。该化合物按照国际专利申请公布No.WO 2013/010868 A1中描述的类似方式制备,其公开内容通过引用并入本文,得到标题化合物,为米色固体。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ :3.736min;  $m/z$  414.1+416.1 (1:1) ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0392] 实施例13-制备4-[8-氨基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(I-11)



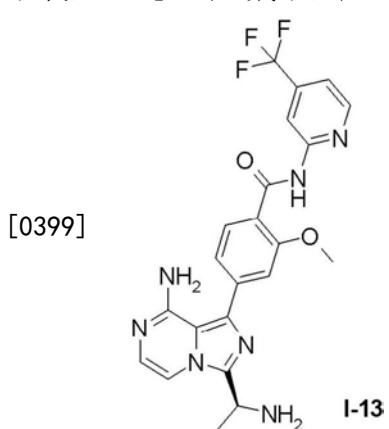
[0394] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-2-吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺。使用中间体I-1和I-10以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(165mg,47%,两步),为浅黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :3.86min;  $m/z$  498.3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0395] 实施例14-制备N-[(1S)-1-(8-氨基-1-溴-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]氨基甲酸苄基酯(I-12)



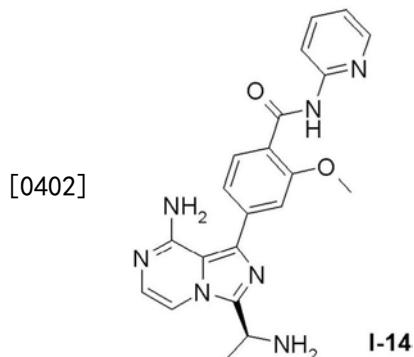
[0397] 制备N-[(1S)-1-(8-氨基-1-溴-咪唑并[1,5-a]吡嗪-3-基)乙基]氨基甲酸苄基酯。使用(2S)-2-(苄基氧基羰基氨基)丙酸以与对中间体I-2所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(1.8g,42%,四步),为白色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :3.59min;  $m/z$  390.0+392.0(1:1) ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0398] 实施例15-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(I.13)



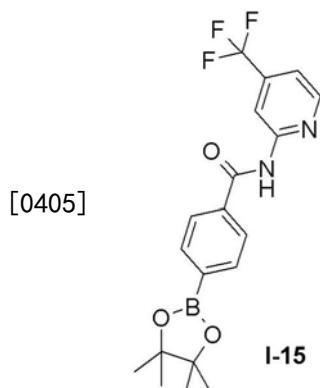
[0400] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺。使用中间体I-1和I-12以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(79mg,65%,两步)。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :3.771min;  $m/z$  472.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0401] 实施例16-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(I-14)



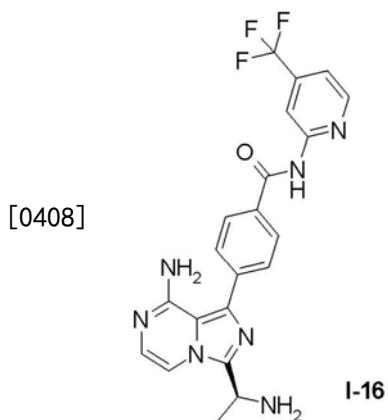
[0403] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-4和I-12以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(164mg,66%,两步),为黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :2.04min;  $m/z$  404.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0404] 实施例17-制备4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(I-15)



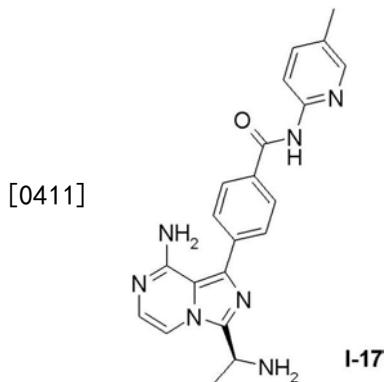
[0406] 制备4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺。使用4-(三氟甲基)吡啶-2-胺以与对中间体I-6所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(694mg,43.9%),为白色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :7.74min;  $m/z$  393.3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0407] 实施例18-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(I-16)



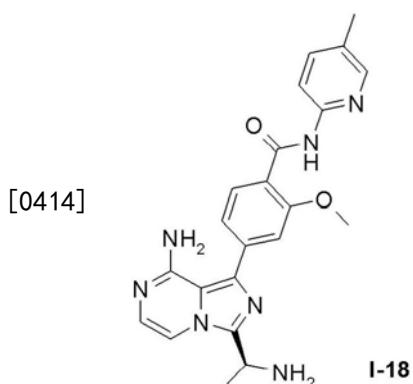
[0409] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺。使用中间体I-12和I-15以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(135mg,59.6%,两步),为黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ : 3.40min;  $m/z$  442.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0410] 实施例19-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(I-17)



[0412] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-12和I-6以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(217mg,70%,两步),为浅黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ : 1.28min;  $m/z$  388.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

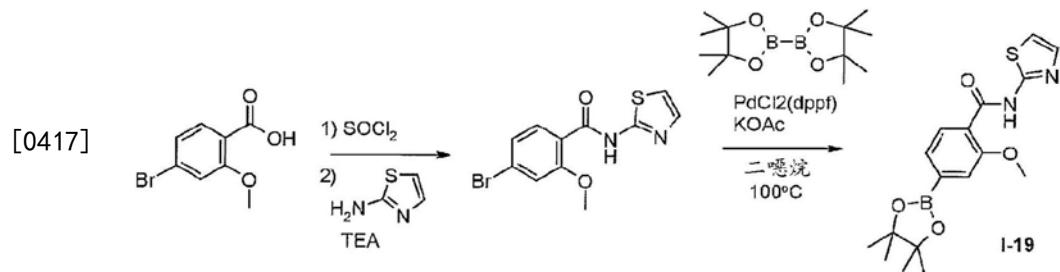
[0413] 实施例20-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(I-18)



[0415] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-氨基乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-

(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-12和I-8以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(219mg,77%,两步),为黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :2.68min;  $m/z$  418.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0416] 实施例21-制备2-甲氧基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺(I-19)

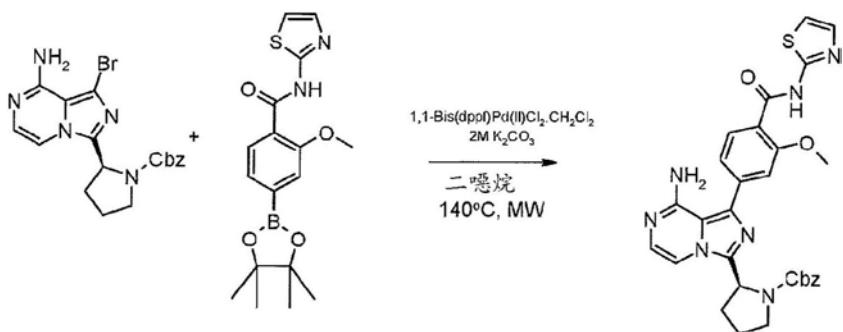


[0418] 制备4-溴-2-甲氧基-苯甲酰氯。将4-溴-2-甲氧基-苯甲酸(8.38g,36.27mmol)溶于DCM(75mL)中。加入亚硫酰氯(5.29mL,72.54mmol)和催化量的DMF。将反应混合物回流搅拌3小时。将反应混合物真空浓缩并在油泵上干燥,得到定量收率的黄色固体(9.5g)。

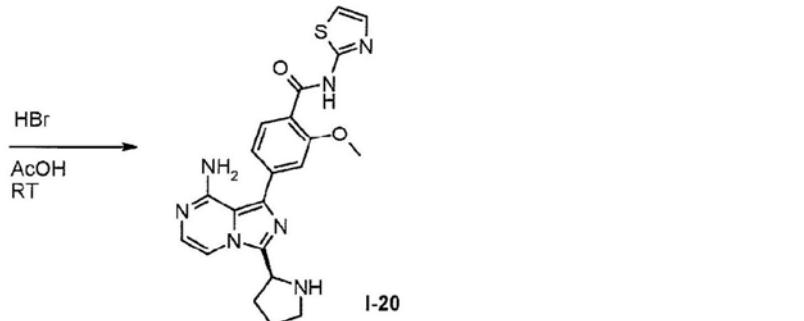
[0419] 制备4-溴-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺。将4-溴-2-甲氧基-苯甲酰氯(4.00g,16.03mmol)加入到噻唑-2-胺(3.21g,32.07mmol)和三乙胺(3.34mL,24.1mmol)的乙腈(100mL)溶液中。混合物在21℃搅拌过夜。将反应混合物用水(100mL)稀释并用EtOAc(2×100mL)洗涤两次。将有机层用盐水(150mL)洗涤,用硫酸钠干燥并真空浓缩。粗产物使用快速色谱法纯化,用0-100%EtOAc/庚烷洗脱,得到标题化合物,为白色固体(1.01g,20.1%)。数据:LC-MS  $R_t$ :6.065min;  $m/z$  313.0+315.0 ( $M, M+2$ )<sup>+</sup>。

[0420] 制备2-甲氧基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺。将4-溴-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺(1.01g,3.23mmol)溶于无水1,4-二噁烷(32mL)中。添加双联频哪醇基二硼(Bis (pinacolato) diboron)(983mg,3.87mmol)和乙酸钾(633mg,6.45mmol)。用氮气吹扫混合物10分钟。加入PdCl<sub>2</sub>(dppf)<sub>2</sub>(132mg,0.16mmol),再次用氮气吹扫混合物5分钟。在氮气氛下,将反应混合物在100℃下搅拌过夜。将反应混合物用水(40mL)稀释并用EtOAc(50mL)萃取。将有机层用盐水(40mL)洗涤,经硫酸钠干燥并真空浓缩,得到褐色/黑色油(1.76g粗品>100%),其作为粗品在下一步中使用。LC-MS  $R_t$ :6.928min;  $m/z$  361.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0421] 实施例22-制备4-[8-氨基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺(I-20)

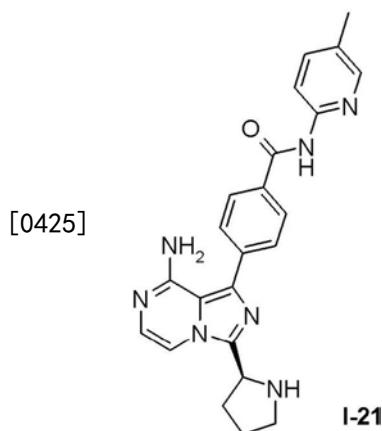


[0422]



[0423] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺。使用中间体I-10和I-19以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(89mg,42%,两步),为黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :2.851min; m/z 436.3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

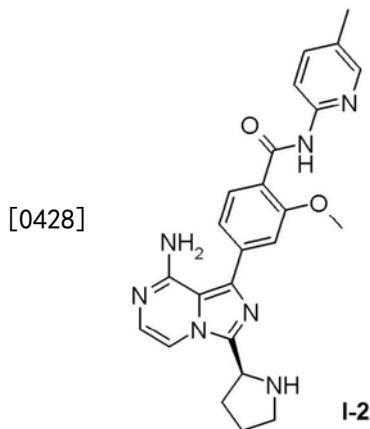
[0424] 实施例23-制备4-[8-氨基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(I-21)



[0425]

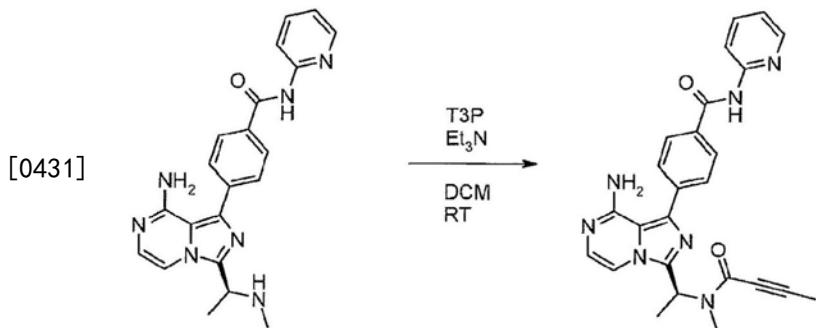
[0426] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-10和I-6以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(176mg,87%,两步),为黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :1.728min; m/z 414.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0427] 实施例24-制备4-[8-氨基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(I-22)



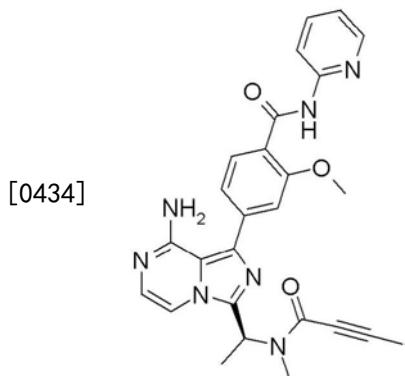
[0429] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-10和I-8以与对中间体I-3所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(187mg,87%,两步),为黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ : 2.975min;  $m/z$  444.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0430] 实施例25-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(E-1)



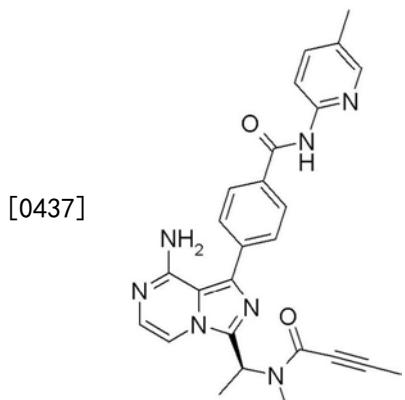
[0432] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺。将丙基膦酸酐溶液(50%,在DMF中)(0.08mL,0.15mmol)加入到三乙胺(0.05mL,0.39mmol),丁-2-炔酸(13.67mg,0.16mmol)和中间体I-3(60mg,0.15mmol)的二氯甲烷(10mL)溶液中,并将混合物在室温下搅拌2小时。将反应混合物直接加载在SiO<sub>2</sub>柱上并通过快速柱色谱(0至8%甲醇/二氯甲烷)纯化,将最纯的级分合并并浓缩。将残余物作为悬浮液由乙腈/水(1:1)冻干,得到标题化合物(56.9mg,81.0%),为浅黄色固体。数据:LC-MS  $R_t$ : 3.77min;  $m/z$  454.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ : 4.95min, 100%纯度; <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>,300K):  $\delta$ =10.88(1H,s), 8.43(1H,ddd,  $J$ 1=4.8Hz,  $J$ 2=1.9Hz,  $J$ 3=0.9Hz), 8.25(1H,dt,  $J$ 1=8.3Hz,  $J$ 2=0.9Hz), 8.19(2H,dd,  $J$ 1=8.5Hz,  $J$ 2=1.5Hz), 7.88(1H,m), 7.79(2H,dd,  $J$ 1=8.5Hz,  $J$ 2=2.2Hz), 7.40(0.3H,d,  $J$ =5.1Hz), 7.32(0.7H,d,  $J$ =5.1Hz), 7.25(0.3H,d,  $J$ =4.9), 7.20(1.7H,m), 6.28(2H,br.s), 6.16(1H,m), 2.88(2.1H,s), 2.60(0.9H,s), 2.16(0.9H,s), 2.05(2.1H,s), 1.74(0.9H,d,  $J$ =6.9Hz), 1.65(2.1H,d,  $J$ =6.9Hz)。

[0433] 实施例26-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(E-2)



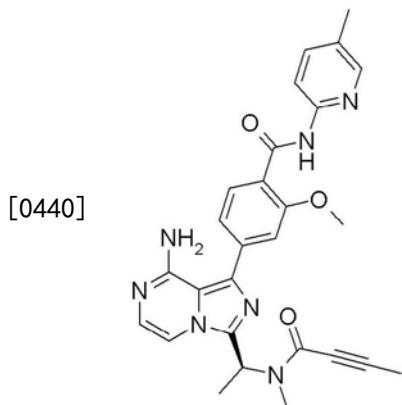
[0435] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(4-甲氧基-2-吡啶基)甲基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-5和丁-2-炔酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(67mg,57%),为浅黄色固体。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ : 4.19min; m/z 484.1 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC (方法C)  $R_t$ : 5.93min, 99.0% 纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K):  $\delta$ =10.50 (1H, s), 8.38 (1H, m), 8.30 (1H, d,  $J$ =8.2Hz), 8.05 (1H, d,  $J$ =8.0Hz), 7.87 (1H, m), 7.43 (2H, m), 7.39 (0.3H, d,  $J$ =5.0Hz), 7.30 (0.7H, d,  $J$ =5.1Hz), 7.24 (0.3H, d,  $J$ =4.9Hz), 7.18 (1.7H, m), 6.35 (2H, m), 6.14 (1H, m), 4.08 (3H, s), 2.87 (2H, s), 2.60 (1H, s), 2.14 (1H, s), 2.03 (2H, s), 1.73 (1H, d, 6.8Hz), 1.64 (2H, d,  $J$ =6.8Hz)。

[0436] 实施例27-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(4-甲基-2-吡啶基)甲基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(E-3)



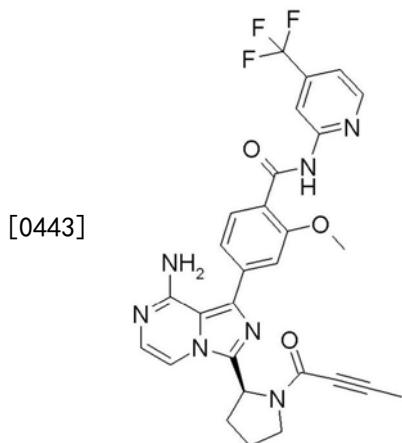
[0438] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(4-甲基-2-吡啶基)甲基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-7和丁-2-炔酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(67mg,57%),为浅黄色固体。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ : 3.89min; m/z 468.3 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC (方法C)  $R_t$ : 5.25min, 99.9% 纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K):  $\delta$ =10.79 (1H, s), 8.26 (1H, m), 8.19 (2H, dd,  $J$ 1=8.6Hz,  $J$ 2=1.6Hz), 8.14 (1H, d,  $J$ =8.5Hz), 7.78 (2H, dd,  $J$ 1=8.6Hz,  $J$ 2=2.3Hz), 7.70 (1H, dd,  $J$ 1=8.6Hz,  $J$ 2=2.0Hz), 7.40 (0.3H, d,  $J$ =5.0Hz), 7.31 (0.7H, d,  $J$ =5.0Hz), 7.25 (0.3H, d,  $J$ =4.9Hz), 7.19 (0.7H, d,  $J$ =4.9Hz), 6.28 (2H, m), 6.16 (1H, m), 2.88 (2H, s), 2.61 (1H, s), 2.31 (3H, s), 2.16 (1H, s), 2.05 (2H, s), 1.74 (1H, d,  $J$ =6.8Hz), 1.65 (2H, d,  $J$ =6.8Hz)。

[0439] 实施例28-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(4-甲基-2-吡啶基)甲基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(E-4)



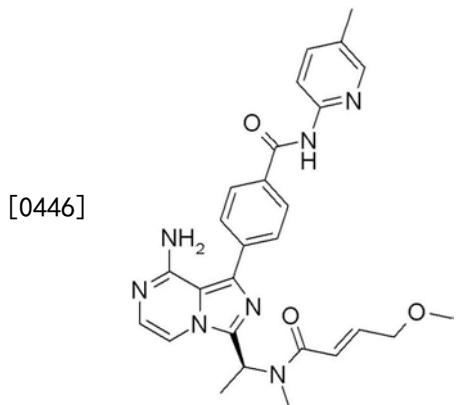
[0441] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(4-甲氧基-2-吡啶基)甲基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-9和丁-2-炔酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(68mg,59%),为白色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :4.39min; m/z 498.2 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ :5.90min, 100%纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K):  $\delta$ =10.42 (1H, s), 8.20 (2H, m), 8.05 (1H, d,  $J$ =8.0Hz), 7.69 (1H, dd,  $J$ 1=8.6Hz,  $J$ 2=2.3Hz), 7.17-7.45 (4H, m), 6.35 (2H, m), 6.14 (1H, m), 4.07 (3H, s), 2.86 (2H, s), 2.60 (1H, s), 2.29 (3H, s), 2.04 (2H, s), 1.97 (1H, s), 1.73 (1H, d,  $J$ =6.8Hz), 1.64 (2H, d,  $J$ =6.8Hz)。

[0442] 实施例29-制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(E-5)



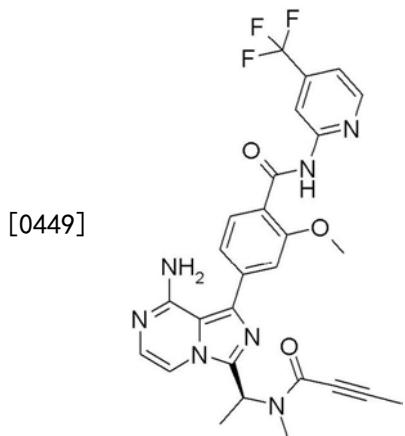
[0444] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺。使用中间体I-11和丁-2-炔酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(54mg,89%),为浅黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :5.05min; m/z 564.4 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ :6.82min, 99.1%纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K):  $\delta$ =10.86 (1H, s), 8.66 (1H, d,  $J$ =5.1Hz), 8.62 (1H, s), 8.01 (1H, dd,  $J$ 1=8.1Hz,  $J$ 2=1.9Hz), 7.82 (0.4H, d,  $J$ =5.1Hz), 7.80 (0.6H, d,  $J$ =5.1Hz), 7.56 (1H, d,  $J$ =5.1Hz), 7.40 (2H, m), 7.18 (0.4H, d,  $J$ =4.9Hz), 7.14 (0.6H, d,  $J$ =4.9Hz), 6.26 (2H, m), 5.74 (0.4H, dd,  $J$ 1=7.6Hz,  $J$ 2=4.1Hz), 5.48 (0.6H, dd,  $J$ 1=7.6Hz,  $J$ 2=4.1Hz), 4.06 (3H, s), 3.83 (1.3H, m), 3.61 (0.7H, m), 2.48-1.65 (7H, m)。

[0445] 实施例30-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[[[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]-甲基-氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(E-6)



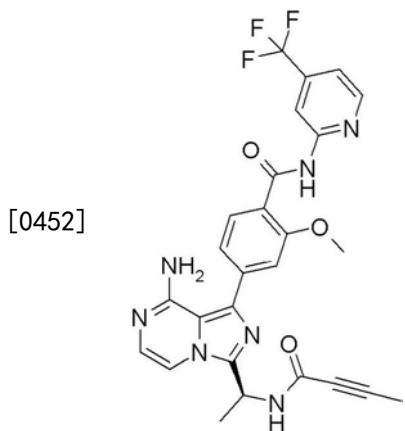
[0447] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]-甲基-氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-7和(E)-4-甲氧基丁-2-烯酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物。产率26.8mg (42%)。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ : 3.85min; m/z 500.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC (方法C)  $R_t$ : 5.35min, 97.3% 纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K):  $\delta$  = 10.79 (1H, s), 8.26 (1H, d,  $J$ =2.4Hz), 8.19 (2H, d,  $J$ =8.5Hz), 8.14 (1H, d,  $J$ =8.7Hz), 7.79 (2H, d,  $J$ =8.6Hz), 7.70 (1H, dd,  $J$ 1=8.7Hz,  $J$ 2=2.3Hz), 7.38 (1H, d,  $J$ =5.0Hz), 7.16 (1H, d,  $J$ =4.9Hz), 6.85 (1H, dt,  $J$ 1=15.0Hz,  $J$ 2=4.2Hz), 6.55 (1H, d,  $J$ =15.2Hz), 6.33 (1H, q,  $J$ 1,  $J$ 2=7.1Hz), 6.24 (2H, s), 4.10 (1H, dd,  $J$ 1=2.1Hz,  $J$ 2=2.7Hz), 3.31 (3H, s), 2.79 (3H, s), 2.31 (3H, s) 1.64 (3H, d,  $J$ =6.8Hz)。

[0448] 实施例31-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(E-7)



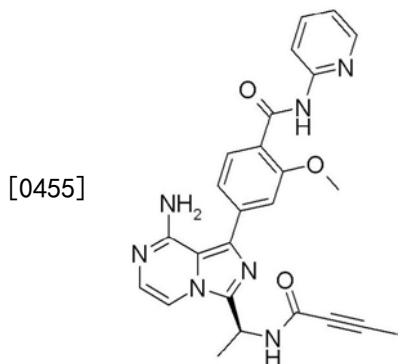
[0450] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[丁-2-炔酰基(甲基)氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺。使用中间体I-1和丁-2-炔酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物。产率35.5mg (62%)。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ : 5.20min; m/z 552.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC (方法C)  $R_t$ : 7.11min, 99.4% 纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K):  $\delta$  = 10.87 (1H, s), 8.66 (1H, d,  $J$ =5.2Hz), 8.61 (1H, s), 8.02 (1H, d,  $J$ =8.0Hz), 7.57 (1H, d,  $J$ =5.1Hz), 7.42 (2H, m), 7.40 (0.3H, s), 7.28 (0.7H, s), 7.24 (0.3H, s), 7.19 (0.7H, s), 6.35 (2H, br. s), 6.15 (1H, m), 4.06 (3H, s), 2.87 (2H, s), 2.61 (1H, s), 2.15 (1H, s), 2.04 (2H, s), 1.73 (1H, d,  $J$ =6.8Hz), 1.64 (2H, d,  $J$ =6.8Hz)。

[0451] 实施例32-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺(E-8)



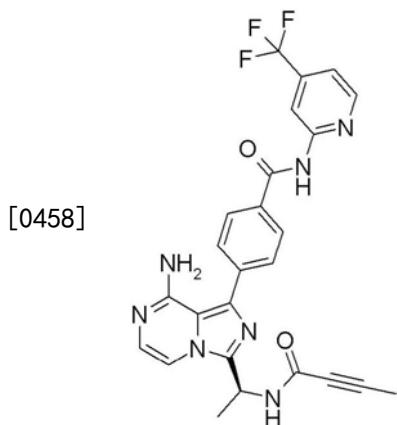
[0453] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺。使用中间体I-13和丁-2-炔酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,产率为31.1mg (54%)。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ : 4.78min; m/z 538.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC (方法C)  $R_t$ : 6.40min, 99.8% 纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ , 300K) :  $\delta$  = 10.87 (1H, s), 9.22 (1H, d,  $J$ =8.0Hz), 8.67 (1H, d,  $J$ =5.2Hz), 8.61 (1H, s), 8.02 (1H, d,  $J$ =8.0Hz), 7.56 (2H, m), 7.42 (2H, m), 7.16 (1H, d,  $J$ =4.9Hz), 6.28 (2H, br. s), 5.48 (1H, m), 4.06 (3H, s), 1.98 (3H, s), 1.59 (3H, d,  $J$ =6.9Hz)。

[0454] 实施例33-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺 (E-9)



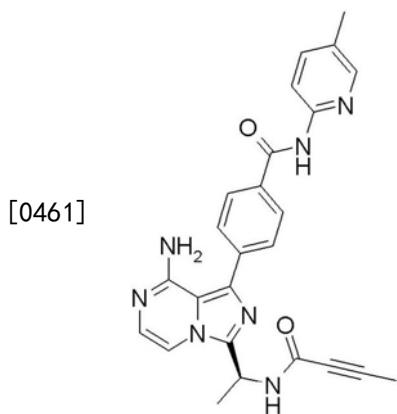
[0456] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-14以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物 (55.5mg, 47.4%) ,为黄色固体。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ : 3.68min; m/z 470.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC (方法C)  $R_t$ : 4.76min, 97.3% 纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ , 300K) :  $\delta$  = 10.51 (1H, s), 9.22 (1H, d,  $J$ =8.0Hz), 8.39 (1H, m), 8.32 (1H, d,  $J$ =8.3Hz), 8.07 (1H, d,  $J$ =8.0Hz), 7.89 (1H, m), 7.56 (1H, d,  $J$ =5.1Hz), 7.43 (1H, m), 7.40 (1H, m), 7.20 (1H, m), 7.17 (1H, d,  $J$ =4.9Hz), 6.29 (2H, s), 5.50 (1H, m), 4.08 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.60 (3H, d,  $J$ =6.9Hz)。

[0457] 实施例34-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺 (E-10)



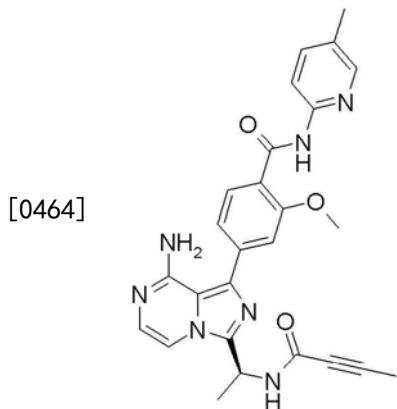
[0459] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-[4-(三氟甲基)-2-吡啶基]苯甲酰胺。使用中间体I-16以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(45.3mg,83.9%),为浅黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :4.52min;  $m/z$  508.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ :5.80min,100%纯度;<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO- $d_6$ ,300K): $\delta$ =11.36(1H,s),9.18(1H,d, $J$ =8.2Hz),8.70(1H,d, $J$ =5.1Hz),8.58(1H,m),8.19(2H,d, $J$ =8.5Hz),7.77(2H,d, $J$ =8.5Hz),7.56(1H,m),7.53(1H,d, $J$ =5.1Hz),7.15(1H,d, $J$ =5.0),6.21(2H,s),5.48(1H,m),1.95(3H,s),1.59(3H,d, $J$ =6.9Hz)。

[0460] 实施例35-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(E-11)



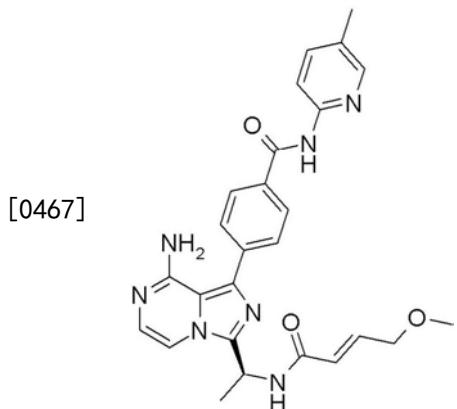
[0462] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-17以与对实施例E-11所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(25.7mg,21.8%),为浅黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :3.41min;  $m/z$  454.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ :443min,99.5%纯度;<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO- $d_6$ ,300K): $\delta$ =10.78(1H,s),9.20(1H,d, $J$ =8.2Hz),8.26(1H,m),8.18(2H,d, $J$ =8.6Hz),8.14(1H,d, $J$ =8.5Hz),7.76(2H,d, $J$ =8.5Hz),7.70(1H,dd, $J$ 1=8.3Hz, $J$ 2=2.4Hz),7.54(1H,d, $J$ =5.1Hz),7.16(1H,d, $J$ =5.0Hz),6.21(2H,s),5.50(1H,m),2.31(3H,s),1.95(3H,s),1.60(3H,d, $J$ =7.0Hz)。

[0463] 实施例36-制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-(丁-2-炔酰基氨基)乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(E-12)



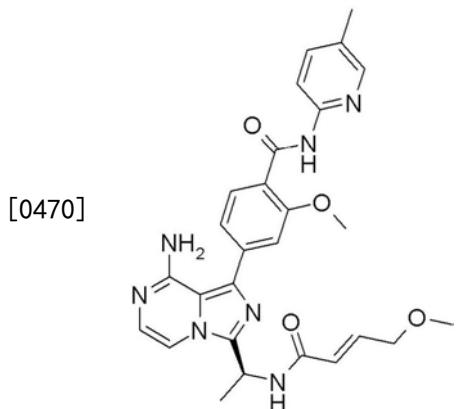
[0465] 制备4-[(1S)-1-[(4-((2R,3S)-3-((E)-4-((2R)-2-methoxybutyl)but-2-enyl)butyl)amino)butyl]amino]butyl 2-methyl-4-pyridylmethylcarbamate。使用中间体I-18以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(55.4mg,44.9%),为黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :3.89min;  $m/z$  484.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ :5.12min,96.2%纯度;<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO- $d_6$ ,300K): $\delta$ =10.43(1H,s),9.21(1H,d, $J$ =8.0Hz),8.22(2H,m),8.07(1H,d, $J$ =8.0Hz),7.71(1H,dd, $J$ 1=8.5Hz, $J$ 2=2.2Hz),7.56(1H,d, $J$ =5.0Hz),7.41(2H,m),7.16(1H,d, $J$ =4.9Hz),6.29(2H,s),5.49(1H,m),4.08(3H,s),2.30(3H,s),1.96(3H,s),1.60(3H,d, $J$ =7.0Hz)。

[0466] 实施例37-制备4-[(1S)-1-[(4-((2R,3S)-3-((E)-4-((2R)-2-methoxybutyl)but-2-enyl)butyl)amino)butyl]amino]butyl 2-methyl-4-pyridylmethylcarbamate(E-13)



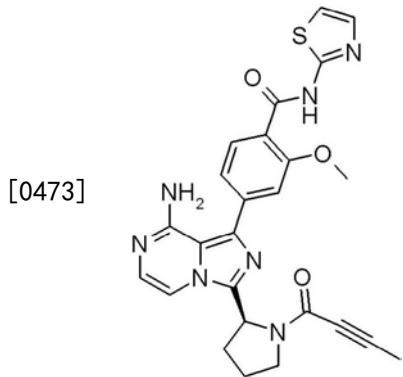
[0468] 制备4-[(1S)-1-[(4-((2R,3S)-3-((E)-4-((2R)-2-methoxybutyl)but-2-enyl)butyl)amino)butyl]amino]butyl 2-methyl-4-pyridylmethylcarbamate。使用中间体I-17和(E)-4-甲氧基丁-2-烯酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(24.0mg,57.6%),为浅黄色固体。数据:LC-MS(方法A)  $R_t$ :3.41min;  $m/z$  486.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ :4.47min,98.2%纯度;<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO- $d_6$ ,300K): $\delta$ =10.76(1H,s),8.69(1H,d, $J$ =8.2Hz),8.24(1H,m),8.16(2H,d, $J$ =8.6Hz),8.12(1H,d, $J$ =8.5Hz),7.75(2H,d, $J$ =8.6Hz),7.68(1H,dd, $J$ 1=8.5Hz, $J$ 2=1.8Hz),7.56(1H,d, $J$ =5.1Hz),7.13(1H,d, $J$ =4.9),6.69(1H,m),6.18(2H,s),6.10(1H,m),5.56(1H,m),4.02(2H,m),3.27(3H,s),2.30(3H,s),1.62(3H,d, $J$ =6.8Hz)。

[0469] 实施例38-制备4-[(1S)-1-[(4-((2R,3S)-3-((E)-4-((2R)-2-methoxybutyl)but-2-enyl)butyl)amino)butyl]amino]butyl 2-methyl-4-pyridylmethylcarbamate(E-14)



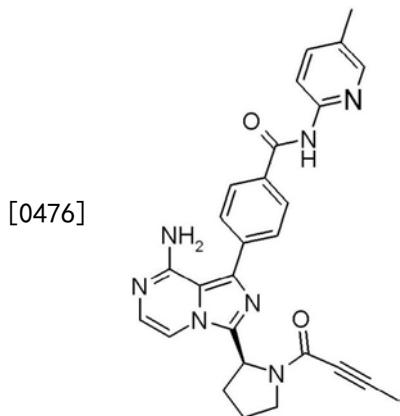
[0471] 制备4-[8-氨基-3-[(1S)-1-[(E)-4-甲氧基丁-2-烯酰基]氨基]乙基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。使用中间体I-18和(E)-4-甲氧基丁-2-烯酸以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(30.5mg, 36.4%) ,为浅黄色固体。数据:LC-MS (方法A)  $R_t$ : 3.89min; m/z 516.2 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC (方法C)  $R_t$ : 4.55min, 98.8% 纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K) :  $\delta$ =10.41 (1H, s) , 8.71 (1H, d,  $J$ =8.7Hz) , 8.20 (2H, m) , 8.05 (1H, d,  $J$ =8.0Hz) , 7.69 (1H, m) , 7.58 (2H, d,  $J$ =5.0Hz) , 7.39 (2H, m) , 7.13 (1H, d,  $J$ =5.0Hz) , 6.69 (1H, m) , 6.26 (2H, s) , 6.10 (1H, m) , 5.56 (1H, m) , 4.06 (3H, s) , 4.02 (2H, m) , 3.27 (3H, s) , 2.29 (3H, s) , 1.62 (3H, d,  $J$ =6.9Hz) 。

[0472] 实施例39-制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺(E-15)



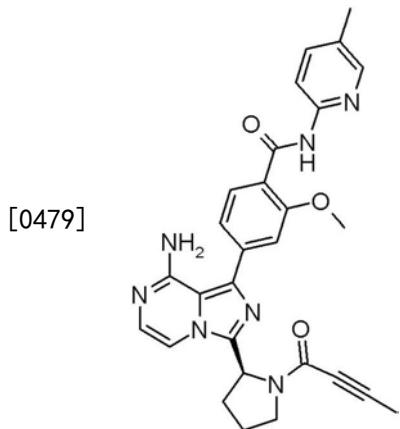
[0474] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-噻唑-2-基-苯甲酰胺。以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(12.6mg, 21.8%) ,为黄色固体。数据:LC-MS  $R_t$ : 4.095min; m/z 502.3 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC (方法C)  $R_t$ : 5.42min, 99.5% 纯度; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 300K) :  $\delta$ =11.82 (1H, s) , 7.88 (2H, m) , 7.82 (1H, d,  $J$ =5.1Hz) , 7.56 (1H, d,  $J$ =3.6Hz) , 7.40 (1H, dt,  $J$ 1=1.3Hz,  $J$ 2=3.7Hz) , 7.36 (1H, dd,  $J$ 1=1.3Hz,  $J$ 2=7.9Hz) , 7.32 (1H, d,  $J$ =3.6Hz) , 7.17 (1H, dd,  $J$ 1=5.0Hz,  $J$ 2=16.1Hz) , 6.26 (2H, br d,  $J$ =27.0Hz) , 5.47-5.77 (1H, m) , 4.03 (3H, d,  $J$ =2.3Hz) , 3.84 (1H, t,  $J$ =6.7Hz) , 3.62 (1H, m) , 2.69 (1H, m) , 2.34 (2H, m) , 2.15 (1H, m) , 2.03 (2H, s) , 1.66 (1H, s) 。

[0475] 实施例40-制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(E-16)



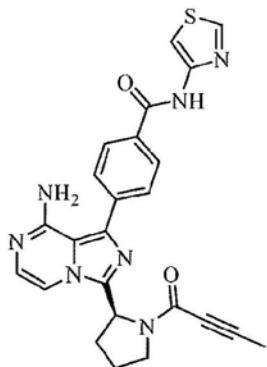
[0477] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(30.3mg,33.9%),为黄色固体。数据:LC-MS  $R_t$ :3.84min;  $m/z$  480.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ :4.92min,99.9%纯度;<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>,300K): $\delta$ =10.79(1H,s),8.26(8.26,1H),8.17(2H,dd,J1=1.6Hz,J2=6.8Hz),8.14(1H,d,J=8.4Hz),7.82-7.91(1H,dd,J1=5.1Hz,J2=22.8Hz),7.68-7.78(3H,m),7.16(1H,dd,J1=5.0Hz,J2=14.9Hz),6.35(2H,br s),5.47-5.77(1H,m),3.84(2H,t,J=6.8Hz),3.61(1H,m),2.41(1H,m),2.31(3H,s),2.16(1H,m),2.03(2H,s),2.00(1H,m),1.65(1H,s)。

[0478] 实施例41-制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺(E-17)

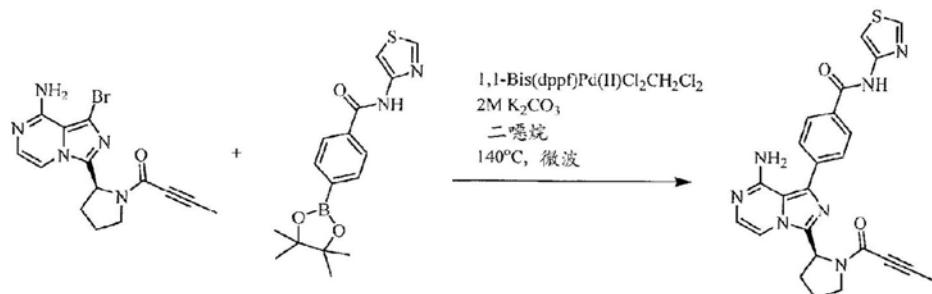


[0480] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-2-甲氧基-N-(5-甲基-2-吡啶基)苯甲酰胺。以与对实施例E-1所述类似的方式制备该化合物,得到标题化合物(48.3mg,56.0%),为浅黄色固体。数据:LC-MS  $R_t$ :4.26min;  $m/z$  510.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; HPLC(方法C)  $R_t$ :5.57min,100%纯度;<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>,300K): $\delta$ =10.42(1H,s),8.22(2H,q,J=2.3Hz),8.05(1H,dd,J1=2.0Hz,J2=8.1Hz),7.84(1H,dd,J1=5.2Hz,J2=25.2Hz),7.70(1H,dd,J1=2.3Hz,J2=8.3Hz),7.40(2H,m),7.17(1H,dd,J1=4.9Hz,J2=16.1Hz),6.26(2H,br d,J=27.7Hz),5.46-5.78(1H,m),4.08(3H,d,J=2.4Hz),3.84(2H,t,J=6.4Hz),3.62(1H,m),2.38(2H,m),2.30(3H,s),2.15(1H,m),2.03(2H,s),1.66(1H,s)。

[0481] 实施例42-制备(R)-4-(8-氨基-3-(1-(丁-2-炔酰基)吡咯烷-2-基)咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基)-N-(噻唑-4-基)苯甲酰胺(E-24)



[0482]



[0483] 制备4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-噻唑-4-基-苯甲酰胺。将中间体I-23 (200mg, 0.50mmol, 1.0eq), 中间体I-25 (277mg, 0.70mmol, 1.2eq), 2M碳酸钾水溶液 (0.16mL, 1.10mmol, 2.0eq) 在1,4-二噁烷 (5mL) 中的溶液脱气5分钟。加入PdC12 (dppf) 2 (18mg, 0.03mmol, 0.05eq), 然后将反应混合物再次脱气5分钟, 并在100℃下搅拌16小时。完成后, 反应混合物用水稀释并用乙酸乙酯萃取。有机层用无水硫酸钠干燥并浓缩。通过HPLCprep纯化将残余物纯化, 得到标题化合物 (15mg, 6%), 为白色固体。数据: LC-MS (方法G) Rt: 3.96min; m/z 475.5 (M+H) +. HPLC (方法H) Rt: 8.43min, 95%纯度; 1H NMR (400MHz, DMSO-d6, 300K) : δ = 11.49 (1H, s), 9.05 (1H, d, J = 2.24Hz), 8.16 (2H, dd, J = 2.60Hz, J = 8.38Hz), 7.89-7.84 (1H, m), 7.81 (1H, d, J = 7.28Hz), 7.74-7.71 (2H, m), 7.13 (1H, dd, J = 4.92Hz, J = 15.76Hz), 6.14 (2H, bs), 5.72-5.46 (1H, m), 3.83-3.80 (1H, t), 3.60-3.58 (1H, m), 2.49-2.36 (1H, m), 2.28-2.10 (2H, m), 2.05-1.92 (3H, m), 1.62 (1H, s)。

## [0484] 实施例43-测量BTK,EGFR和其它酶活性

[0485] 使用如下概述的IMAP(基于固定化金属离子亲和力的荧光偏振)测定来测量BTK酶活性。

[0486] 在KR缓冲液(10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%吐温-20, 0.05%NaN<sub>3</sub>, 1mM DTT, 2mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.2)中将BTK酶(His-BTK (Millipore catalog# 14-552))稀释至0.4U/mL。

[0487] 在100%DMSO中制备测试化合物的连续稀释液(log10)，从2mM到63.2nM。然后将在DMSO中的稀释液在KR缓冲液中稀释50倍。测定中的最终化合物浓度范围为10μM至0.316nM。

[0488] 测定如下进行:在KR缓冲液中的5 $\mu$ L/孔测试化合物(测定中的最终DMSO浓度为1%)与5 $\mu$ L/孔的0.4U/mL BTK酶(测定中的最终浓度是0.1U/mL)混合。测试化合物和BTK酶

在室温下预温育60分钟,然后加入5 $\mu$ L/孔的在KR-缓冲液中的200nM二氢荧光素标记的底物肽(B1k/Lyntide底物,例如#R7188/#R7233,Molecular Devices)。测定中的最终肽底物浓

度是50nM。通过加入5 $\mu$ L/孔的在KR-缓冲液中的20 $\mu$ M ATP (最终ATP浓度为5 $\mu$ M ATP, 在BTK IMAP测定中的K<sub>m</sub> ATP) 开始激酶测定。在室温下温育2小时后, 通过加入40 $\mu$ L/孔IMAP渐进结合溶液(Progressive Binding Solution) (根据供应商(Molecular Devices) 规程使用75%1×缓冲液A和25%1×缓冲液B与1:600的渐进结合溶液) 停止酶反应。在室温下在黑暗中温育60分钟后, 读取FP信号。使用平行和垂直滤波器测量535nm处的荧光, 以确定由于磷酸化底物与珠粒的结合而引起的旋转差异。数值计算为有和无ATP的对照的读数差异( $\Delta$  mPi) 的百分比。通过使用Activity Base的实验结果的曲线拟合来确定IC<sub>50</sub>值。结果报告在表1中。

[0489] 使用如下所概述的IMAP(基于固定化金属离子亲和力的荧光偏振) 测定来测量EGFR酶活性。

[0490] 在KR缓冲液(10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%吐温-20, 0.1%NaN<sub>3</sub>, 1mM DTT, 2mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.5) 中将EGFR酶(Invitrogen catalog# PR7295B) 稀释至2.5 $\mu$ g/mL。

[0491] 在100%DMSO中制备测试化合物的连续稀释液(log10), 从1mM到31.6nM。然后将在DMSO中的稀释液在KR缓冲液中稀释25倍, 其中5 $\mu$ L用于测定, 使得测定中的最终化合物浓度范围为10 $\mu$ M至0.316nM。

[0492] 测定如下进行: 在KR缓冲液中的5 $\mu$ L/孔测试化合物(测定中的最终DMSO浓度为1%) 与5 $\mu$ l/孔的2.5 $\mu$ g/mL EGFR酶(测定中的最终浓度是625ng/mL) 混合。测试化合物和EGFR酶在室温下预温育60分钟, 然后加入5 $\mu$ L/孔的在KR-缓冲液中的200nM荧光素标记的底物肽(PDGFR-tide底物肽RP7084, Molecular Devices)。测定中的最终肽底物浓度是50nM。通过加入5 $\mu$ L/孔的在KR-缓冲液中的8 $\mu$ M ATP(最终ATP浓度为2 $\mu$ M, 在EGFR IMAP测定中的K<sub>m</sub> ATP) 开始激酶测定。在室温下在黑暗中温育60min后, 通过加入40 $\mu$ L/孔IMAP渐进结合溶液(根据供应商(Molecular Devices) 规程使用20%1×缓冲液A和80%1×缓冲液B与600×稀释珠粒) 停止酶反应。在室温下在黑暗中温育60分钟后, 读取FP信号。使用平行和垂直滤波器测量535nm处的荧光, 以确定由于磷酸化底物与珠粒的结合而引起的旋转差异。数值计算为有和无ATP的对照的读数差异( $\Delta$  mPi) 的百分比。通过使用GraphPad Prism6的实验结果的曲线拟合来确定IC<sub>50</sub>值。结果报告在表1中。

[0493] 使用如下所概述的IMAP(基于固定化金属离子亲和力的荧光偏振) 测定来测量ITK酶活性。

[0494] 在KR缓冲液(10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%吐温-20, 0.1%NaN<sub>3</sub>, 1mM DTT, 2mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.5) 中将ITK酶(Millipore#14-660M) 稀释至0.2U/mL。

[0495] 在100%DMSO中制备测试化合物的连续稀释液(log10), 从2mM到63.2nM。然后将在DMSO中的稀释液在KR缓冲液中稀释50倍。测定中的最终化合物浓度范围为10 $\mu$ M至0.316nM。

[0496] 测定如下进行: 在KR缓冲液中的5 $\mu$ L/孔测试化合物(测定中的最终DMSO浓度为1%) 与5 $\mu$ l/孔的0.2U/mL ITK酶(测定中的最终浓度是0.05U/mL(8.4nM)) 混合。测试化合物和ITK酶在室温下预温育60分钟, 然后加入5 $\mu$ L/孔的在KR-缓冲液中的200nM二氢荧光素标记的底物肽(B1k/Lyntide底物#R8124, Molecular Devices)。测定中的最终肽底物浓度是50nM。通过加入5 $\mu$ L/孔的在KR-缓冲液中的20 $\mu$ M ATP(最终ATP浓度为5 $\mu$ M ATP, 在ITK IMAP测定中的K<sub>m</sub> ATP) 开始激酶测定。在室温下温育2小时后, 通过加入40 $\mu$ L/孔IMAP渐进结合溶液(根据供应商(Molecular Devices) 规程使用60%1×缓冲液A和40%1×缓冲液B与800×

稀释的珠粒(渐进结合系统(Progressive Binding System), Molecular Devices #R8124)停止酶反应。在室温下在黑暗中温育60分钟后,读取FP信号。使用平行和垂直滤波器测量535nm处的荧光,以确定由于磷酸化底物与珠粒的结合而引起的旋转差异。数值计算为有和无ATP的对照的读数差异( $\Delta mPi$ )的百分比。通过使用Activity Base的实验结果的曲线拟合来确定IC<sub>50</sub>值。

[0497] 使用如下所概述的IMAP(基于固定化金属离子亲和力的荧光偏振)测定来测量TEC酶活性。

[0498] 在KR缓冲液(10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% 吐温-20, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 1mM DTT, 2mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.5)中将TEC酶(Millipore#14-801M)稀释至2U/mL。

[0499] 在100%DMSO中制备测试化合物的连续稀释液(log10),从2mM到63.2nM。然后将在

DMSO中的稀释液在KR缓冲液中稀释50倍。测定中的最终化合物浓度范围为10μM至0.316nM。

[0500] 测定如下进行:在KR缓冲液中的5μL/孔测试化合物(测定中的最终DMSO浓度为1%)与5μL/孔的2U/mL TEC酶(测定中的最终浓度是0.5U/mL (6.3nM))混合。测试化合物和TEC酶在室温下预温育60分钟,然后加入5μL/孔的在KR-缓冲液中的200nM二氢荧光素标记的底物肽(B1k/Lyntide底物#R7188, Molecular Devices)。测定中的最终肽底物浓度是50nM。通过加入5μL/孔的在KR-缓冲液中的20μM ATP(最终ATP浓度为5μM ATP, 在TEC IMAP测定中的K<sub>m</sub> ATP)开始激酶测定。在室温下温育2小时后,通过加入40μL/孔IMAP渐进结合溶液(根据供应商(Molecular Devices)规程使用60%1×缓冲液A和40%1×缓冲液B与800×稀释的珠粒(渐进结合系统(Progressive Binding System), Molecular Devices #R8124)停止酶反应。在室温下在黑暗中温育60分钟后,读取FP信号。使用平行和垂直滤波器测量535nm处的荧光,以确定由于磷酸化底物与珠粒的结合而引起的旋转差异。数值计算为有和无ATP的对照的读数差异( $\Delta mPi$ )的百分比。通过使用Activity Base的实验结果的曲线拟合来确定IC<sub>50</sub>值。

[0501] 使用如下所概述的IMAP(基于固定化金属离子亲和力的荧光偏振)测定来测量TXK酶活性。

[0502] 在KR缓冲液(10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% 吐温-20, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 1mM DTT, 2mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.5)中将TXK酶(Millipore#14-761)稀释至2.5U/mL。

[0503] 在100%DMSO中制备测试化合物的连续稀释液(log10),从2mM到63.2nM。然后将在

DMSO中的稀释液在KR缓冲液中稀释50倍。测定中的最终化合物浓度范围为10μM至0.316nM。

[0504] 测定如下进行:在KR缓冲液中的5μL/孔测试化合物(测定中的最终DMSO浓度为1%)与5μL/孔的2.5U/mL TXK酶(测定中的最终浓度是0.625U/mL (4.4nM))混合。测试化合物和TXK酶在室温下预温育60分钟,然后加入5μL/孔的在KR-缓冲液中的200nM二氢荧光素标记的底物肽(B1k/Lyntide底物#R7188, Molecular Devices)。测定中的最终肽底物浓度是50nM。通过加入5μL/孔的在KR-缓冲液中的4μM ATP(最终ATP浓度为1μM ATP, 在TXK IMAP测定中的K<sub>m</sub> ATP)开始激酶测定。在室温下温育2小时后,通过加入40μL/孔IMAP渐进结合溶液(根据供应商(Molecular Devices)规程使用60%1×缓冲液A和40%1×缓冲液B与800×稀释的珠粒(渐进结合系统(Progressive Binding System), Molecular Devices)停止酶反应。在室温下在黑暗中温育60分钟后,读取FP信号。使用平行和垂直滤波器测量535nm处的荧光,以确定由于磷酸化底物与珠粒的结合而引起的旋转差异。数值计算为有和无ATP

的对照的读数差异 ( $\Delta mPi$ ) 的百分比。通过使用Activity Base的实验结果的曲线拟合来确定  $IC_{50}$  值。

[0505] 使用如下所概述的IMAP(基于固定化金属离子亲和力的荧光偏振)测定来测量BMX酶活性。

[0506] 在KR缓冲液(10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% 吐温-20, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 1mM DTT, 2mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.5)中将BMX酶(Millipore#14-499M)稀释至0.5U/mL。

[0507] 在100%DMSO中制备测试化合物的连续稀释液(log10),从2mM到63.2nM。然后将在DMSO中的稀释液在KR缓冲液中稀释50倍。测定中的最终化合物浓度范围为10μM至0.316nM。

[0508] 测定如下进行:在KR缓冲液中的5μL/孔测试化合物(测定中的最终DMSO浓度为1%)与5μL/孔的0.5U/mL BMX酶(测定中的最终浓度是0.125U/mL (4.5nM))混合。测试化合物和BMX酶在室温下预温育60分钟,然后加入5μL/孔的在KR-缓冲液中的200nM二氢荧光素标记的底物肽(B1k/Lyntide底物#R7188,Molecular Devices)。测定中的最终肽底物浓度是50nM。通过加入5μL/孔的在KR-缓冲液中的20μM ATP(最终ATP浓度为5μM ATP,在BMX IMAP测定中的K<sub>m</sub> ATP)开始激酶测定。在室温下温育2小时后,通过加入40μL/孔IMAP渐进结合溶液(根据供应商(Molecular Devices)规程使用60%1×缓冲液A和40%1×缓冲液B与800×稀释的珠粒(渐进结合系统(Progressive Binding System),Molecular Devices #R8124)停止酶反应。在室温下在黑暗中温育60分钟后,读取FP信号。使用平行和垂直滤波器测量535nm处的荧光,以确定由于磷酸化底物肽与珠粒的结合而引起的旋转差异。数值计算为有和无ATP的对照的读数差异 ( $\Delta mPi$ ) 的百分比。通过使用Activity Base的实验结果的曲线拟合来确定  $IC_{50}$  值。

[0509] 实施例44-人外周血单核细胞(PBMC) CD69测定

[0510] 将全血收集在肝素涂布的Vacutainer管(BD Biosciences, San Jose, CA)中并用于使用Ficoll-Hypaque(Pharmacia, Uppsala, Sweden)分离PBMC。将分离的PBMC在90%FCS/10%DMSO中冷藏直至以后使用。

[0511] 将来自低温储存的细胞在37°C水浴中解冻,用RPMI/1%FCS稀释,洗涤2次,然后以 $1 \times 10^5$ 细胞/孔在RPMI/10%FCS中接种。

[0512] 在100%DMSO中制备测试化合物的连续稀释液(log10),从10mM到316nM,然后在RPMI/1%FCS中稀释100倍。对于每个孔,然后将10μL转移到含有90μL的PBMC细胞的深孔板中。测定中的最终化合物浓度范围为10μM至0.316nM,最终的DMSO浓度为0.1%。然后在存在或不存在测试化合物的情况下将PBMC在37°C温育2小时,之后用山羊F(ab')2抗-IgM(Southern Biotech, #2022-14,最终测定浓度5μg/mL)刺激18小时。

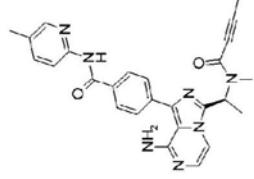
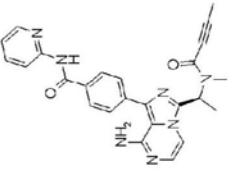
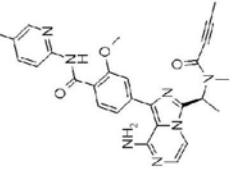
[0513] 在用抗IgM刺激后,将PBMC与抗-CD69-FITC,抗-CD19-BV421(分别为BD Biosciences #555530和#562440)和7AAD(Life Technologies #A1310)在冰上温育30分钟。进行流式细胞术,从CD19+门控生命B细胞(CD19+ gated life B cells)中CD69-FITC通道获得荧光值。通过使用GraphPad Prism的实验结果的曲线拟合来确定  $EC_{50}$  值。

表 1. BTK 抑制剂的活性数据

[0515]

[0516]

[0517]

化合物	IMAP (IC <sub>50</sub> )						PBMC 测定 (CD69) EC <sub>50</sub> (nM)		
	BTK (nM)	EGFR WT (nM)	TEC (nM)	Txk (nM)	ITK (nM)	ErbB 2 <sup>D</sup> (nM)	ErbB 4 <sup>D</sup> (nM)	Bmx (nM)	Jak3 <sup>D</sup> (nM)
	1.8	354	3.1	3.9	254			4.5	1.7
	2.1	123	5.0	3.7	>	1000		7.5	1.9
	5.1	>	4.6	5.1	>	1000		6.8	5.1

[0518]

化合物	BTK (nM)	EGF R WT (nM)	TEC (nM)	T <sub>50k</sub> (nM)	ITK (nM)	ErbB 2 <sup>1)</sup> (nM)	ErbB 4 <sup>1)</sup> (nM)	Blk <sup>1)</sup> (nM)	Bmx (nM)	Jak3 <sup>1)</sup> (nM)	PBMC 测定 (CD69) EC <sub>50</sub> (nM)
	11	> 1000	3.8	14	> 1000				15		3.5
	2.4		360	1.9	1.5	478			2.9		4.2
	1.8		327	2.6	1.8		119			1.9	0.70

[0519]

[0520]

1) 由在 Life Technologies (Bleiswijk, Netherlands) 进行的 Z-LYTE 测定得到的值