

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03815958.9

C07D471/04

A61K 31/506

A61K 31/437

A61P 25/00

A61P 35/00

A61P 9/00

A61P 37/00

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1665810A

[22] 申请日 2003.5.30 [21] 申请号 03815958.9

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 30 [33] US [31] 60/384,538

[86] 国际申请 PCT/US2003/016900 2003.5.30

[87] 国际公布 WO2003/101989 英 2003.12.11

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.5

[71] 申请人 沃泰克斯药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 B·E·莱德福

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 程 泳

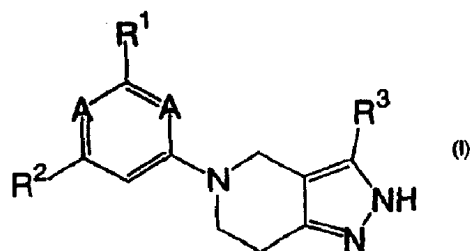
//(C07D471/04,231:00,221:00)

权利要求书 5 页 说明书 30 页

[54] 发明名称 JAK 和 CDK2 蛋白激酶的抑制剂

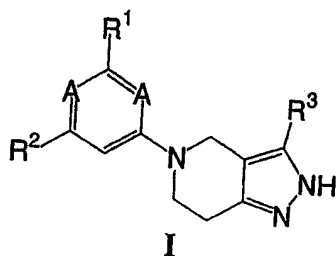
[57] 摘要

本发明提供通式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。这些化合物是蛋白激酶的抑制剂,特别是 JAK 和 CDK2 哺乳动物蛋白激酶的抑制剂。本发明还提供包含本发明化合物的药学上可接受的组合物以及利用那些化合物和组合物治疗多种蛋白激酶介导的疾病的方法。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 通式 I 的化合物或其药学上可接受的盐:



其中每个 A 独立地是氮或 CH，条件是至少一个 A 是氮；

R^1 和 R^2 各自独立地选自卤素、CN、 NO_2 、 R^4 、 OR^4 、 SR^4 、 $\text{N}(R^4)_2$ 、 $\text{NH}(R^4)$ 、 $\text{NHCH}_2(R^4)_2$ 、 $\text{NHC}(O)R^4$ 、 NHCO_2R^4 、 NHSO_2R^4 、 $\text{NHC}(O)\text{N}(R^4)_2$ 、或 $\text{NHSO}_2\text{N}(R^4)_2$ ，条件是： R^1 和 R^2 中至少一个选自 $\text{NH}(R^4)$ 、 $\text{NHCH}_2(R^4)_2$ 、 $\text{NHC}(O)R^4$ 、 NHCO_2R^4 、 NHSO_2R^4 、 $\text{NHC}(O)\text{N}(R^4)_2$ 、或 $\text{NHSO}_2\text{N}(R^4)_2$ ；

R^3 是任选取代的环，选自

- (a) 饱和或不饱和的 3-8 元单环或 8-10 元双环；
- (b) 具有 1-3 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元杂环；或
- (c) 具有 1-4 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元单环或 8-10 元双环的杂芳环；

每个 R^4 选自 R 或 Ar；

每个 R 独立选自氢或任选取代的 C_{1-6} 脂族基团，其中：与同一氮原子结合的两个 R 任选与氮共同形成具有 0-2 个除了与其结合的氮之外的独立选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元饱和、部分不饱和、或完全不饱和的环；且

每个 Ar 是任选取代的环，选自：

- (a) 饱和的、部分不饱和的 3-8 元单环或 8-10 元双环、或芳环；
- (b) 具有 1-3 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元杂环；或
- (c) 具有 1-4 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元单环或 8-10

元双环的杂芳环。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中:

R^1 和 R^2 各自独立地选自卤素、 R^4 、 OR^4 、 SR^4 、 $N(R^4)_2$ 、 NHR^4 、 $NHCH_2(R^4)_2$ 、或 $NHC(O)R^4$, 条件是 R^1 和 R^2 中至少一个选自 NHR^4 、 $NHCH_2(R^4)_2$ 、或 $NHC(O)R^4$ 。

3. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中:

R^3 是任选取代的环, 选自

(a) 3-6 元饱和的单环或芳环;

(b) 具有 1-2 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元杂环; 或

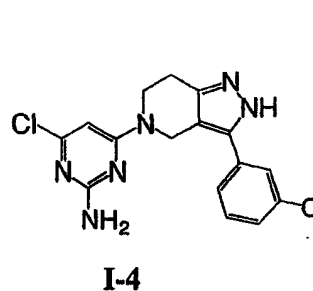
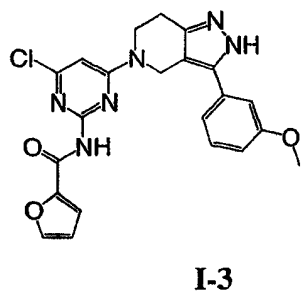
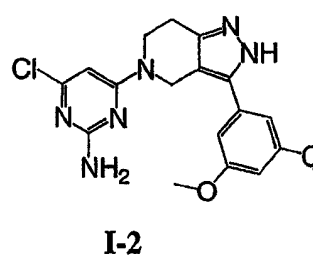
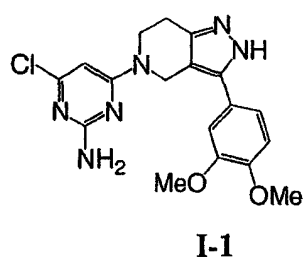
(c) 具有 1-3 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元单环或 9-10 元双环的杂芳环。

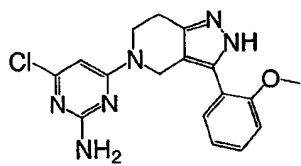
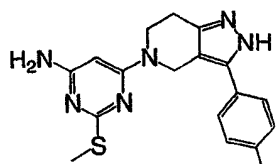
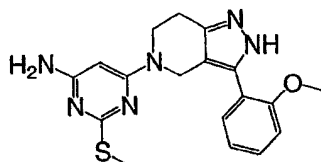
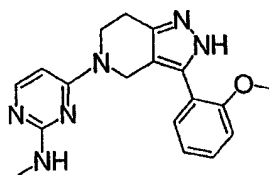
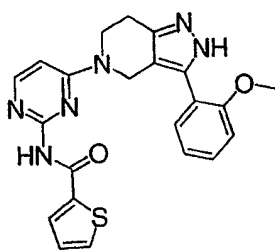
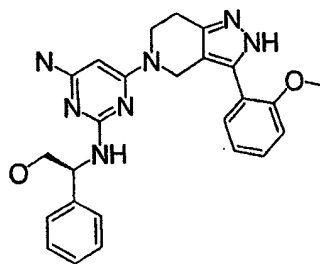
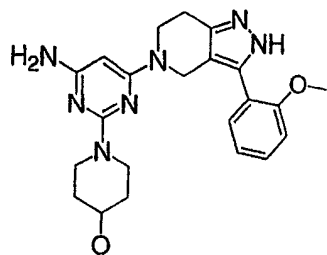
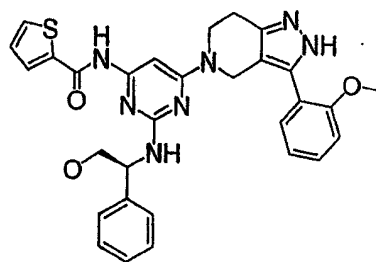
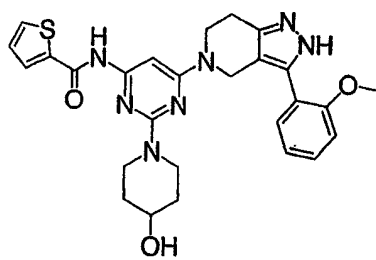
4. 根据权利要求 3 所述的化合物, 其中 R^3 是用 1-3 个独立选自 R^0 、卤素、 $N(R^0)_2$ 、 OR^0 、或 SR^0 的基团任选取代的。

5. 根据权利要求 3 所述的化合物, 其中:

R^3 是选自环丙基、环戊基、环己基、苯基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、异噻唑基、三唑基、苯并噻吩基、或苯并[1,3]间二氧杂环戊烯基的任选取代的环。

6. 一种化合物, 选自:



**I-5****I-6****I-7****I-8****I-9****I-10****I-11****I-12****I-13**

7. 一种包含权利要求 1 的化合物以及药学上可接受的载体、助剂、或赋形剂的组合物。

8. 根据权利要求 7 所述的组合物, 其还包含选自化疗或抗增殖剂、阿尔茨海默氏病的治疗、帕金森氏病的治疗、用于治疗多发性硬化(MS)的药剂、哮喘的治疗、抗炎剂、免疫调节或免疫抑制剂、神经营养因子、用于治疗心血管病的药剂、用于治疗肝病的药剂、用于治疗血液疾病的药剂、或用于治疗免疫缺损疾病的药剂的附加治疗剂。

9. 一种抑制生物样品或患者中 JAK 或 CDK2 激酶活性的方法, 包括使所述生物样品接触如下物质或给予所述患者如下物质的步骤:

- a) 权利要求 7 的组合物; 或
- b) 权利要求 1 的化合物。

10. 一种用于治疗或减轻选自变应性疾病、自身免疫性病、增殖性疾病、病毒病、以及与器官移植有关的病症的病、病症、或疾病严重程度的方法, 包括给予患者治疗有效量的权利要求 1 的化合物或权利要求 7 的组合物。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述病、病症、或疾病选自变应性或 I 型过敏反应、哮喘、移植排斥、移植物抗宿主病、类风湿性关节炎、肌萎缩性侧索硬化、多发性硬化、家族性肌萎缩性侧索硬化 (FALS)、白血病、或淋巴瘤。

12. 根据权利要求 10 所述的方法, 包括给予所述患者附加治疗剂的附加步骤, 所述附加治疗剂选自: 化疗或抗增殖剂、阿尔茨海默氏病的治疗、帕金森氏病的治疗、用于治疗多发性硬化 (MS) 的药剂、哮喘的治疗、用于治疗精神分裂症的药剂、抗炎剂、免疫调节或免疫抑制剂、神经营养因子、用于治疗心血管病的药剂、用于治疗肝病的药剂、用于治疗血液疾病的药剂、或用于治疗免疫缺损疾病的药剂, 其中:

所述附加治疗剂适于所治疗的病; 且

所述附加治疗剂与所述组合物以单一剂量形式共同给药或作为多剂量形式的一部分与所述组合物分开给药。

13. 一种用于涂覆可植入装置的组合物, 包含权利要求 1 的化合物以及适于涂覆所述可植入装置的载体。

14. 一种用权利要求 13 的组合物涂覆的可植入装置。

JAK 和 CDK2 蛋白激酶的抑制剂

本申请要求 35 U.S.C. § 119(e) 下的、2002 年 5 月 30 日提交的, 名称为“JAK 和 CDK2 蛋白激酶的抑制剂”的美国临时申请号 60/384,538 的优先权, 其全部内容均引入此处作为参考。

发明技术领域

本发明涉及用作蛋白激酶抑制剂的化合物。本发明还提供包含本发明化合物的药学上可接受的组合物以及使用该组合物治疗多种疾病的方法。

发明背景

近年来, 通过更好地了解与疾病有关的酶和其它生物分子的结构, 已经大大帮助了新治疗剂的研究。已成为广泛研究目标的其中一类重要的酶是蛋白激酶。

蛋白激酶由一大家族结构上相关的酶组成, 它们负责细胞内各种信号转导过程的控制。(见, Hardie, G. 和 Hanks, S. *The Protein Kinase Facts Book, I 和 II*, Academic Press, San Diego, CA: 1995)。由于蛋白激酶结构和催化功能的保守性, 它们被认为是从共同的先祖基因进化的。几乎所有激酶都包含一个相似的 250-300 氨基酸催化结构域。通过激酶使其磷酸化的底物不同可将它们分成几个家族(例如, 蛋白-酪氨酸、蛋白-丝氨酸/苏氨酸, 脂类等)。已经鉴定出了通常与这些激酶家族中的每一个相对应的序列基元(见, 例如, Hanks, S. K., Hunter, T., *FASEB J.* 1995, 9, 576-596; Knighton 等人, *Science* 1991, 253, 407-414; Hiles 等人, *Cell* 1992, 70, 419-429; Kunz 等人, *Cell* 1993, 73, 585-596; Garcia-Bustos 等人, *EMBO J.* 1994, 13, 2352-2361)。

通常，蛋白激酶通过影响从核苷三磷酸向参与信号传导途径的蛋白受体的磷酸基转移而介导胞内信号。这些磷酸化事件可起调制或调节目标蛋白生物功能的分子开关的作用。这种刺激物的例子包括环境和化学应激信号(例如，渗透冲击、热激、紫外线辐射、细菌内毒素、和 H_2O_2)、细胞因子(例如，白介素-1 (IL-1) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α))、和生长因子(例如，粒细胞巨嗜细胞-集落刺激因子 (GM-CSF) 和成纤维细胞生长因子 (FGF))。胞外刺激物可影响与细胞生长、迁移、分化、激素分泌、转录因子激活、肌肉收缩，葡萄糖代谢，蛋白合成控制，以及细胞周期调节有关的一种或多种细胞反应。

很多疾病都与通过上述蛋白激酶-介导的事件所引发的异常细胞反应有关。这些疾病包括，但不限于，自身免疫病、炎性病、骨病、代谢病、神经和神经变性病、癌症、心血管病、变态反应和哮喘、阿尔茨海默氏病、和与激素有关的病。因此，药用化学方面的巨大努力已经找到了可有效作为治疗剂的蛋白激酶。

Janus 激酶 (JAK) 属于酪氨酸激酶家族，由 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 组成。JAK 在细胞因子信号传导中起着重要的作用。激酶 JAK 家族的下游底物包括转录蛋白的信号转导剂和激活剂 (STAT)。JAK/STAT 信号传导涉及很多异常免疫反应，如变态反应、哮喘、自身免疫病如移植排斥、类风湿性关节炎、肌萎缩性侧索硬化和多发性硬化以及实体和血液恶性肿瘤如白血病和淋巴瘤的介导。JAK/STAT 途径的药物干预已被评论过 [Frank *Mol. Med.* 5: 432-456 (1999) 和 Seidel 等人, *Oncogene* 19: 2645-2656 (2000)]。

JAK1、JAK2、和 TYK2 为遍在性表达，而 JAK3 则主要在造血细胞中表达。JAK3 只与共同的细胞因子受体 γ 链 (γ_c) 结合并被 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、和 IL-15 激活。事实上，由 IL-4 和 IL-9 诱导的鼠肥大细胞的增殖和存活已经显示出依赖于 JAK3-和 γ_c -信号传导 [Suzuki 等人, *Blood* 96: 2172-2180 (2000)]。

敏化肥大细胞的高亲和性免疫球蛋白 (Ig) E 受体的交联导致促炎介质，包括许多血管活性细胞因子的释放从而导致急性变态反应，

或介导 (I 型) 过敏反应 [Gordon 等人, *Nature* 346: 274-276 (1990) 和 Galli, N. *Engl. J. Med.* 328: 257-265 (1993)]。JAK3 在 IgE 受体-介导的肥大细胞反应中的重要作用已经在体外和体内建立 [Malaviya 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 807-813 (1999)]。此外, 还报道了通过抑制 JAK3 而预防由肥大细胞-激活介导的 I 型过敏反应, 包括过敏症 [Malaviya 等人, *J. Biol. Chem.* 274: 27028-27038 (1999)]。用 JAK3 抑制剂针对肥大细胞可调节肥大细胞体外脱粒并预防体内 IgE 受体/抗原-介导的过敏反应。

近来的研究描述了用于免疫抑制和同种异体移植接受的 JAK3 的成功寻靶。研究证实了给予 JAK3 抑制剂后, 水牛心脏同种异体移植在 Wistar Furth 受体中的剂量-依赖性存活, 表明在移植物抗宿主疾病中调节有害免疫反应的可能性 [Kirken, *Transpl. Proc.* 33: 3268-3270 (2001)]。

IL-4-介导的 STAT-磷酸化被暗示涉及类风湿性关节炎 (RA) 的早期和晚期阶段。RA 滑膜和滑膜液中的促炎细胞因子的上调是疾病的特征。已经证实了 IL-4 介导的 IL-4/STAT 途径的激活是通过 Janus 激酶 (JAK 1 & 3) 介导的, 而 IL-4 相关的 JAK 激酶在 RA 滑膜中表达 [Muller-Ladner 等人, *J. Immunol.* 164: 3894-3901 (2000)]。

家族性肌萎缩性侧索硬化 (FALS) 是一种可影响约 10% ALS 患者的致命性神经变性疾病。FALS 小鼠的存活率在用 JAK3 特异性抑制剂处理后增加。这表明 JAK3 在 FALS 中起作用 [Trieu 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 22-25 (2000)]。

转录蛋白的信号转导剂和激活剂 (STAT) 是尤其是由 JAK 家族激酶激活的。近来的研究结果暗示了通过用特异性抑制剂针对 JAK 家族激酶而干预 JAK/STAT 信号传导途径来治疗白血病的可能性 [Sudbeck 等人, *Clin. Cancer Res.* 5: 1569-1582 (1999)]。JAK3 特异性化合物已显示出可抑制 JAK3-表达细胞系 DAUDI、RAMOS、LC1-19、NALM-6、MOLT-3 和 HL-60 的克隆发生性生长。

在动物模型中, TEL/JAK2 融合蛋白已经诱导了髓增殖疾病, 且在

造血细胞系中, TEL/JAK2 的引入导致了 STAT1、STAT3、STAT5 的激活, 以及细胞因子-依赖性生长 [Schwallier 等人, *EMBO J.* 17: 5321-5333 (1998)]。

JAK3 和 TYK2 的抑制消除了 STAT3 的酪氨酸磷酸化, 并抑制了蕈样肉芽肿, 一种皮肤 T-细胞淋巴瘤形式的细胞生长。这些结果暗示了组成型激活的 JAK/STAT 途径中的 JAK 家族激酶存在于蕈样肉芽肿中 [Nielsen 等人, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 6764-6769 (1997)]。同样, STAT3、STAT5、JAK1 和 JAK2 被证实了在最初特征为 LCK 过量表达的小鼠 T-细胞淋巴瘤中被组成型激活, 从而进一步暗示了异常细胞生长中的 JAK/STAT 途径 [Yu 等人, *J. Immunol.* 159: 5206-5210 (1997)]。此外, IL-6 介导的 STAT3 激活可被 JAK 抑制剂阻断, 导致骨髓瘤细胞对编程性细胞死亡敏感 [Catlett-Falcone 等人, *Immunity* 10: 105-115 (1999)]。

细胞周期蛋白-依赖性激酶 (CDK) 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 它由 β -折叠丰富的氨基末端叶和大多为 α -螺旋的较大羧基末端叶组成。CDK 显示出与所有蛋白激酶共有的 11 个亚结构域, 分子量为 33-44kD。这个家族的激酶, 其包括 CDK1、CDK2、CDK4、和 CDK6, 需要在与 CDK2 Thr160 相对应的残基处磷酸化, 从而成为完全活性的 [Meijer, L., *Drug Resistance Updates*, 3, 83-88 (2000)]。

每个 CDK 复合体都是从调节性细胞周期蛋白亚单位 (例如, 细胞周期蛋白 A、B1、B2、D1、D2、D3、和 E) 和催化激酶亚单位 (例如, CDK1、CDK2、CDK4、CDK5、和 CDK6) 形成的。每个不同的激酶/细胞周期蛋白对可发挥调节被称作 G1、S、G2、和 M 阶段的细胞周期不同和特定阶段的作用 [Nigg, E., *Nature Reviews*, 2, 21-32 (2001); Flatt, P., Pietsenpol, J., *Drug Metabolism Reviews*, 32, 283-305 (2000)]。

CDK 涉及细胞增殖疾病, 特别是癌症。细胞增殖是细胞分裂周期的直接或间接反调节的结果, 且 CDK 在该周期各个阶段的调节方面起着重要的作用。例如, 细胞周期蛋白 D1 的过量表达通常与若干种人类癌症, 包括乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌和神经胶质瘤有关 [Flatt, P.,

Pietenpol, J., *Drug Metabolism Reviews*, 32, 283-305 (2000)]。CDK2/细胞周期蛋白 E 复合体在从细胞周期的早期 G₁ 到 S 阶段的发展中起着重要的作用,且细胞周期蛋白 E 的过量表达与各种实体瘤有关。因此,细胞周期蛋白 D1、E、或它们相关的 CDK 的抑制剂可用作癌症治疗的目标[Kaubisch, A. , Schwartz, G., *The Cancer Journal*, 6, 192-212 (2000)]。

CDK,特别是 CDK2 还在编程性细胞死亡和 T-细胞发育中发挥作用。CDK2 已经被鉴定为胸腺细胞编程性细胞死亡的重要调节剂[Williams, O. 等人, *European Journal of Immunology*, 709-713 (2000)]。CDK2 激酶活性的刺激与胸腺细胞中编程性细胞死亡的发展有关,响应特定的刺激物。CDK2 激酶活性的抑制可阻断这种导致胸腺细胞保护的编程性细胞死亡。

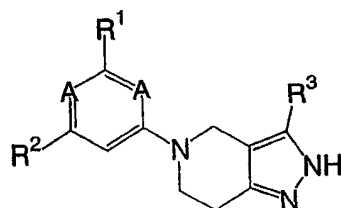
除了调节细胞周期和编程性细胞死亡之外,CDK 还直接涉及转录过程。很多病毒的复制过程都需要 CDK。CDK 抑制剂抑制病毒复制的例子包括人巨细胞病毒、疱疹病毒、和水痘-带状疱疹病毒[Meijer, L., *Drug Resistance Updates*, 3, 83-88 (2000)]。

CDK 的抑制还可用于治疗神经变性疾病如阿尔茨海默氏病。与阿尔茨海默氏病有关的成对螺旋丝 (PHF) 的出现是由 CDK5/p25 所致的 Tau 蛋白的高度磷酸化引起的[Meijer, L., *Drug Resistance Updates*, 3, 83-88 (2000)]。

因此,非常需要研制出可用于治疗各种与 JAK 和 CKD2 激活有关的病或病症的 JAK 和 CKD2 蛋白激酶抑制剂,特别是对于这些疾病的绝大多数而言,目前采用了不太适宜的治疗。

发明概述

现在已经发现了本发明的化合物,及其药学上可接受的组合物可有效作为蛋白激酶的抑制剂。在某些实施方案中,这些化合物可有效作为 JAK 和 CDK-2 蛋白激酶的抑制剂。这些化合物或其药学上可接受的衍生物具有通式 I:



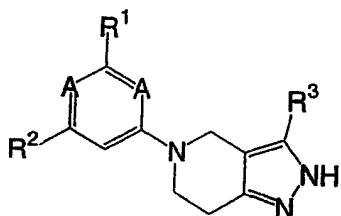
I

其中 A、R¹、R²、和 R³ 如下面所定义的。这些化合物及其药学上可接受的组合物用于治疗或减轻多种疾病，包括，但不限于，变应性疾病，如哮喘和特应性皮炎，自身免疫性病如 SLE 狼疮和牛皮癣，增殖性疾病如癌症，以及与器官移植有关的病症的严重程度。

发明详述

1. 本发明化合物的一般性描述：

本发明涉及通式 I 的化合物，或其药学上可接受的盐：



I

其中：

每个 A 独立地是氮或 CH，条件是至少一个 A 是氮；

R¹ 和 R² 各自独立地选自卤素、CN、NO₂、R⁴、OR⁴、SR⁴、N(R⁴)₂、NH(R⁴)、NHCH₂(R⁴)₂、NHC(O)R⁴、NHCO₂R⁴、NHSO₂R⁴、NHC(O)N(R⁴)₂、或 NHSO₂N(R⁴)₂，条件是：R¹ 和 R² 中至少一个选自 NH(R⁴)、NHCH₂(R⁴)₂、NHC(O)R⁴、NHCO₂R⁴、NHSO₂R⁴、NHC(O)N(R⁴)₂、或 NHSO₂N(R⁴)₂；

R³ 是任选取代的环，选自

(a) 饱和或不饱和的 3-8 元单环或 8-10 元双环;

(b) 具有 1-3 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元杂环;

或

(c) 具有 1-4 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元单环或 8-10 元双环的杂芳环;

每个 R' 选自 R 或 Ar;

每个 R 独立选自氢或任选取代的 C₁₋₆ 脂族基团, 其中: 与同一氮原子结合的两个 R 任选与氮共同形成具有 0-2 个除了与其结合的氮之外的独立选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元饱和、部分不饱和、或完全不饱和的环; 且

每个 Ar 是任选取代的环, 选自:

(a) 饱和、部分不饱和的 3-8 元单环或 8-10 元双环、或芳环;

(b) 具有 1-3 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元杂环;

或

(c) 具有 1-4 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元单环或 8-10 元双环的杂芳环。

2. 化合物和定义:

本发明的化合物包括上面一般性描述的那些, 且它们由此处公开的类、子类、和种进一步举例说明。除非另有说明, 否则应用此处所用的下列定义。就本发明的目的而言, 化学元素是根据元素周期表, CAS 版, Handbook of Chemistry and Physics, 第 75 版鉴定的。此外, 有机化学的一般原则在 "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, 和 "March's Advanced Organic Chemistry", 第五版, Smith, M. B. 和 March 编, J., John Wiley & Sons, New York: 2001 中描述, 它们的全部内容均引入此处作为参考。

正如这里所述的, 本发明的化合物可任选被一个或多个取代基取代, 这些取代基是上面一般性举例说明的, 或由本发明具体的类、子

类、和种举例说明的。应当了解短语“任选取代的”可与短语“取代或未取代的”互换使用。通常，术语“取代的”，无论前面是否加了“任选”，都是指用指定的取代基取代已知结构中的氢基。除非另有说明，任选取代的基团可在基团的每个可取代位置具有取代基，且当可用不止一个选自指定基团的取代基取代任何已知结构中的不止一个位置时，每个位置上的取代基可以相同或不同。本发明预期的取代基组合优选可形成稳定或化学可用化合物的那些。此处所用术语“稳定的”是指当经历用于它们的产生、检测，且优选用于它们的回收、纯化的条件，和用于此处所公开的一种或多种目的时，基本上不会改变的化合物。在某些实施方案中，稳定的化合物或化学可用的化合物是在没有水分或其它化学反应性条件存在的条件下，当在 40℃或更低的温度下保持至少一周时，基本上不会改变的化合物。

此处所用术语“脂族的”或“脂族基团”是指直链（即，无支链的）或支链、取代或未取代的烃链，它是完全饱和的或包含一个或多个不饱和单位，或是指单环烃或双环烃，它是完全饱和的或包含一个或多个不饱和单位，但其不是芳香的（此处也称作“碳环”“环脂族的”或“环烷基”），它具有与分子剩余部分相连的单一点。除非另有说明，脂族基团包含 1-20 个脂族碳原子。在某些实施方案中，脂族基团包含 1-10 个脂族碳原子。在其它实施方案中，脂族基团包含 1-8 个脂族碳原子。在其它实施方案中，脂族基团包含 1-6 个脂族碳原子，在其它实施方案中，脂族基团包含 1-4 个脂族碳原子。在某些实施方案中，“环脂族的”（或“碳环”或“环烷基”）是指单环的 C_3-C_8 烃或双环的 C_8-C_{12} 烃，它是完全饱和的或包含一个或多个不饱和单位，但它不是芳香的，具有与分子剩余部分相连的单一点，其中所述双环系统中的任一独立的环具有 3-7 节。适宜的脂族基团包括，但不限于，线型或支链的、取代或未取代的烷基、烯基、炔基及其杂化物，如（环烷基）烷基、（环烯基）烷基或（环烷基）烯基。

此处所用的术语“杂脂族的”是指其中一个或两个碳原子被一个或多个氧、硫、氮、磷、或硅独立取代的脂族基团。杂脂族基团可以

是取代或未取代的、支链或无支链的、环状或无环的，且包括“杂环”、“杂环基”、“杂环脂族的”或“杂环的”基团。

此处所用的术语“杂环”、“杂环基”、“杂环脂族的”或“杂环的”是指非-芳香的单环、双环、或三环系统，其中一个或多个环节是独立选择的杂原子。在某些实施方案中，“杂环”、“杂环基”、“杂环脂族的”或“杂环的”基团具有 3-14 个环节，其中一个或多个环节是独立选自氧、硫、氮、或磷的杂原子，且系统中的每个环包含 3-7 个环节。

术语“杂原子”是指一个或多个氧、硫、氮、磷、或硅（包括，氮、硫、磷、或硅的任何氧化形式；任何碱性氮的季铵化形式或；杂环的可取代氮，例如 N(3, 4-二氢-2H-吡咯基)、NH(吡咯烷基)或 NR⁺(如 N-取代的吡咯烷基)）。

此处所用的术语“不饱和的”是指该部分具有一个或多个不饱和单位。

此处所用的术语“烷氧基”、或“硫烷基”是指与通过氧（“烷氧基”）或硫（“硫烷基”）原子与主碳链相连的先前定义的烷基。

术语“卤烷基”、“卤烯基”和“卤烷氧基”是指根据具体情况用一个或多个卤原子取代的烷基、烯基或烷氧基。术语“卤素”是指 F、Cl、Br 或 I。

此处单独使用或用作较大部分，如“芳烷基”、“芳烷氧基”、或“芳氧基烷基”中一部分的术语“芳基”是指具有总共 5-14 个环节的单环、双环、和三环系统，其中系统中的至少一个环是芳香的且系统中的每个环都包含 3-7 个环节。术语“芳基”可与术语“芳环”互换使用。术语“芳基”还指此处下面定义的杂芳环系统。

单独使用或用作较大部分，如“杂芳烷基”或“杂芳基烷氧基”中一部分的术语“杂芳基”是指具有总共 5-14 个环节的单环、双环、和三环系统，其中系统中的至少一个环是芳香的，系统中的至少一个环包含一个或多个杂原子，且其中系统中的每个环都包含 3-7 个环节。术语“杂芳基”可与术语“杂芳环”或术语“杂芳香的”互换使用。

芳基(包括芳烷基、芳烷氧基、芳氧基烷基等)或杂芳基(包括杂芳烷基和杂芳基烷氧基等)可包含一个或多个取代基。芳基或杂芳基的不饱和碳原子上的适宜取代基选自卤素、 $-R^o$ 、 $-OR^o$ 、 $-SR^o$ 、1,2-亚甲二氧基、1,2-亚乙二氧基、用 R^o 任选取代的苯基(Ph)、用 R^o 任选取代的 $-O(Ph)$ 、用 R^o 任选取代的 $-(CH_2)_{1-2}(Ph)$ 、用 R^o 任选取代的 $-CH=CH(Ph)$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R^o)_2$ 、 $-NR^oC(O)R^o$ 、 $-NR^oC(S)R^o$ 、 $-NR^oC(O)N(R^o)_2$ 、 $-NR^oC(S)N(R^o)_2$ 、 $-NR^oCO_2R^o$ 、 $-NR^oNR^oC(O)R^o$ 、 $-NR^oNR^oC(O)N(R^o)_2$ 、 $-NR^oNR^oCO_2R^o$ 、 $-C(O)C(O)R^o$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^o$ 、 $-CO_2R^o$ 、 $-C(O)R^o$ 、 $-C(S)R^o$ 、 $-C(O)N(R^o)_2$ 、 $-C(S)N(R^o)_2$ 、 $-OC(O)N(R^o)_2$ 、 $-OC(O)R^o$ 、 $-C(O)N(OR^o)R^o$ 、 $-C(NOR^o)R^o$ 、 $-S(O_2)R^o$ 、 $-S(O_3)R^o$ 、 $-SO_2N(R^o)_2$ 、 $-S(O)R^o$ 、 $-NR^oSO_2N(R^o)_2$ 、 $-NR^oSO_2R^o$ 、 $-N(OR^o)R^o$ 、 $-C(=NH)-N(R^o)_2$ 或 $-(CH_2)_{0-2}NHC(O)R^o$ ，其中每个独立存在的 R^o 选自氢、任选取代的 C_{1-6} 脂族的、未取代的 5-6 元杂芳基或杂环、苯基、 $-(O)Ph$ 或 $-CH_2(Ph)$ 、或者虽然在上面定义，同一取代基或不同取代基上两个独立存在的 R^o 与和每个 R^o 基团结合的原子共同形成 5-8 元的杂环基、芳基或杂芳环，或形成具有 0-3 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元环烷基环。 R^o 的脂族基团上的任选取代基选自 NH_2 、 $NH(C_{1-4} \text{脂族的})$ 、 $N(C_{1-4} \text{脂族的})_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族的、 OH 、 $O(C_{1-4} \text{脂族的})$ 、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $CO_2(C_{1-4} \text{脂族的})$ 、 $O(\text{卤代 } C_{1-4} \text{脂族的})$ 、或卤代 C_{1-4} 脂族的，其中 R^o 每个前述的 C_{1-4} 脂族基团都是未取代的。

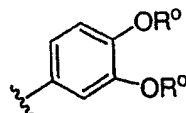
脂族或杂脂族基团，或非芳香的杂环可包含一个或多个取代基。脂族或杂脂族基团、或非芳香杂环的饱和碳上的适宜取代基选自上面芳基或杂芳基的不饱和碳所列的那些，且此外还包括下列： $=O$ 、 $=S$ 、 $=NNHR^*$ 、 $=NN(R^*)_2$ 、 $=NNHC(O)R^*$ 、 $=NNHCO_2(\text{烷基})$ 、 $=NNHSO_2(\text{烷基})$ 、或 $=NR^*$ ，其中每个 R^* 独立选自氢或任选取代的 C_{1-6} 脂族的。 R^* 的脂族基团上的任选取代基选自 NH_2 、 $NH(C_{1-4} \text{脂族的})$ 、 $N(C_{1-4} \text{脂族的})_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族的、 OH 、 $O(C_{1-4} \text{脂族的})$ 、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $CO_2(C_{1-4} \text{脂族的})$ 、 $O(\text{卤代 } C_{1-4} \text{脂族的})$ 、或卤代 C_{1-4} 脂族的，其中 R^* 每个前述的 C_{1-4} 脂族基团都是未取代的。

非芳香杂环的氮上的任选取代基选自 $-R^+$ 、 $-N(R^+)_2$ 、 $-C(O)R^+$ 、

$-\text{CO}_2\text{R}^+$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^+$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^+$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^+$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^+)_2$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^+)_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{N}(\text{R}^+)_2$ 、或 $-\text{NR}^+\text{SO}_2\text{R}^+$ ；其中 R^+ 是氢、任选取代的 C_{1-6} 脂族的、任选取代的苯基、任选取代的 $-\text{O}(\text{Ph})$ 、任选取代的 $-\text{CH}_2(\text{Ph})$ 、任选取代的 $-(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{Ph})$ 、任选取代的 $-\text{CH}=\text{CH}(\text{Ph})$ 、或具有 1-4 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的未取代的 5-6 元杂芳基或杂环，或者，尽管如上面所定义的，同一取代基或不同取代基上两个独立存在的 R^+ 与和每个 R^+ 基团结合的原子共同形成 5-8 元的杂环基、芳基、或杂芳环，或形成具有 0-3 个独立选自氮、氧、或硫的杂原子的 3-8 元环烷基环。脂族基团或 R^+ 苯环上的任选取代基选自 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4} \text{脂族的})$ 、 $\text{N}(\text{C}_{1-4} \text{脂族的})_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族的、 OH 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{脂族的})$ 、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4} \text{脂族的})$ 、 $\text{O}(\text{卤代 } \text{C}_{1-4} \text{脂族的})$ 或卤代 $(\text{C}_{1-4} \text{脂族的})$ ，其中 R^+ 每个先前的 C_{1-4} 脂族基团都是未取代的。

术语“亚烷基链”是指可以是完全饱和的或具有一个或多个不饱和和单元且具有两个与分子剩余部分相连的点的直链或支链碳链。

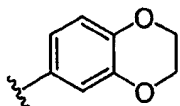
如上所述，在某些实施方案中，两个独立存在的 R^0 （或 R^+ ，或此处相似定义的任何其它变量）可与和每个变量相连的原子共同形成 5-8 元的杂环基、芳基或杂芳环，或形成具有 0-3 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元环烷基环。两个独立存在的 R^0 （或 R^+ ，或此处相似定义的任何其它变量）与和每个变量结合的原子共同形成的环的例子包括，但不限于下列：a) 两个独立存在的 R^0 （或 R^+ ，或此处相似定义的任何其它变量）与同一原子结合，并与该原子共同形成环，例如， $\text{N}(\text{R}^0)_2$ ，其中所存在的两个 R^0 与氮原子共同形成吡啶-1-基、哌嗪-1-基、或吗啉-4-基；和 b) 两个独立存在的 R^0 （或 R^+ ，或此处相似定义的任何其它变量）与不同的原子结合，并与那些原子共同形成环，例如，其中苯基被所存在的两个 OR^0 取代，



所存在的这

两个 R^0 与和它们结合的氧原子共同形成一个稠合的 6-元含氧

环:



。应当认识到, 当两个独立存在的 R^0 (或 R^+ , 或此

处相似定义的任何其它变量) 与和每个变量结合的原子共同连接时, 可形成各种其它环, 且上面详细描述的例子不认为是限制。

除非另有说明, 此处描述的结构还可包括该结构的所有同分异构体 (例如, 对映异构体、非对映异构体、和几何异构体 (或构象异构体)) 形式; 例如, 每个不对称中心的 R 和 S 构型, (Z) 和 (E) 的双键异构体, 及 (Z) 和 (E) 的构象异构体。因此, 本发明化合物的单一立体异构体以及对映异构体、非对映异构体、和几何异构体 (或构象异构体) 混合物也落在本发明的范围之内。除非另有说明, 本发明化合物的所有互变异构形式都落在本发明的范围之内。此外, 除非另有说明, 此处所描述的结构还包括区别仅在于存在一个或多个同位素富集原子的化合物。例如, 具有只是用氘或氚取代氢的本发明结构, 或具有只是用 ^{13}C -或 ^{14}C -富集的碳取代碳的本发明结构的化合物也落在本发明的范围之内。例如, 这种化合物可用作生物学测定法中的分析工具或探针。

3. 举例性化合物的描述:

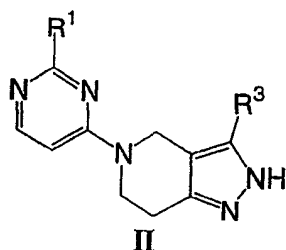
通式 I 优选的 R^1 和 R^2 基团选自卤素、 R^4 、 OR^4 、 SR^4 、 $\text{N}(\text{R}^4)_2$ 、 NHR^4 、 $\text{NHCH}_2(\text{R}^4)_2$ 或 $\text{NHC}(\text{O})\text{R}^4$, 条件是 R^1 和 R^2 中至少一个选自 NHR^4 、 $\text{NHCH}_2(\text{R}^4)_2$ 或 $\text{NHC}(\text{O})\text{R}^4$ 。通式 I 更优选的 R^1 和 R^2 基团选自氯、氟、氢、甲基、乙基、丙基、叔丁基、环丙基、异丙基、OH、OMe、OEt、SH、SMe、SEt、 NH_2 、 $\text{NHC}(\text{O})$ 噻吩基、 $\text{NHC}(\text{O})$ 呋喃基、 $\text{NHCH}_2(\text{苯基})\text{CH}_2\text{OH}$ 、吗啉基、硫代吗啉基或 4-羟基哌啶基。

通式 I 的优选 R^3 基团是任选取代的环, 选自:

- (a) 饱和的 3-6 元单环或芳环;
- (b) 具有 1-2 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元杂环; 或
- (c) 具有 1-3 个独立选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元单环或 9-10 元双环的杂芳环。

通式 I 更优选的 R^3 基团是任选取代的基团, 选自环丙基、环戊基、环己基、苯基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、异噻唑基、三唑基、苯并噻吩基或苯并[1,3]间二氧杂环戊烯基。 R^3 上的优选取代基, 当存在时, 选自 R^0 、卤素、 $N(R^0)_2$ 、 OR^0 、或 SR^0 。

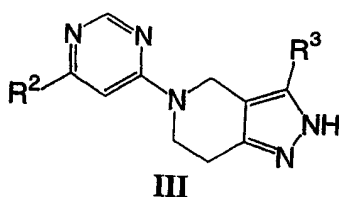
按照其中一个实施方案, 本发明涉及通式 II 的化合物或其药学上可接受的衍生物,



其中 R^1 和 R^3 如上面所定义的。

通式 II 优选的 R^1 和 R^3 基团在上面通式 I 的化合物中描述。

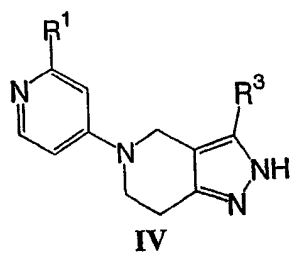
按另一实施方案, 本发明涉及通式 III 化合物或其药学上可接受的衍生物,



其中 R^2 和 R^3 如上面所定义的。

通式 III 优选的 R^2 和 R^3 基团在上面通式 I 的化合物中描述。

按另一实施方案, 本发明涉及通式 IV 化合物或其药学上可接受的衍生物,

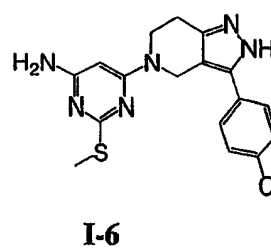
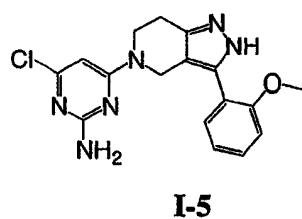
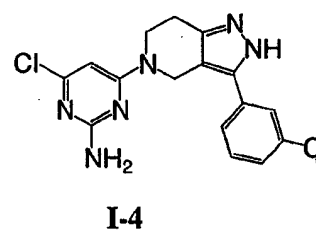
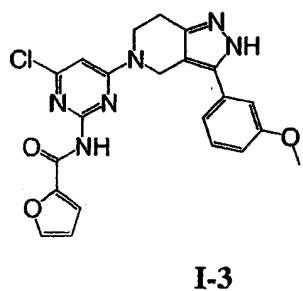
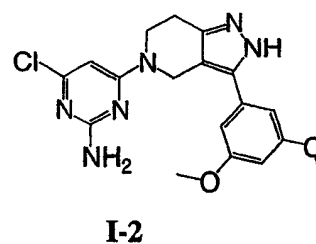
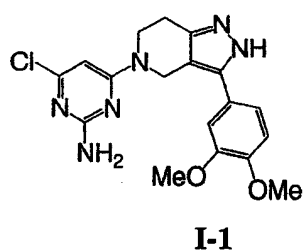


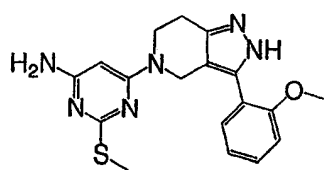
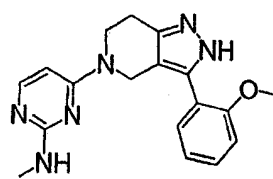
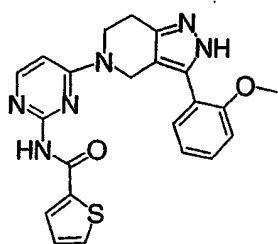
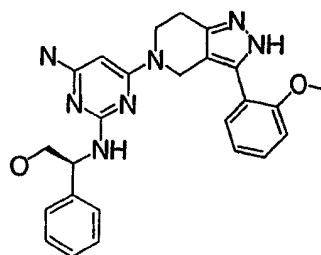
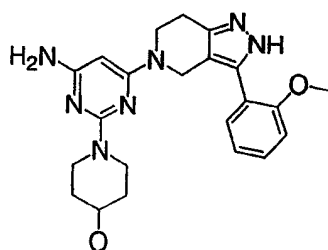
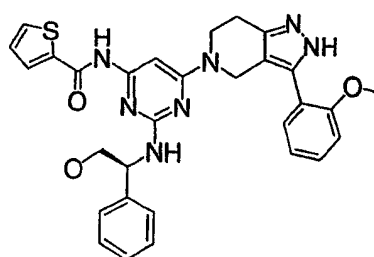
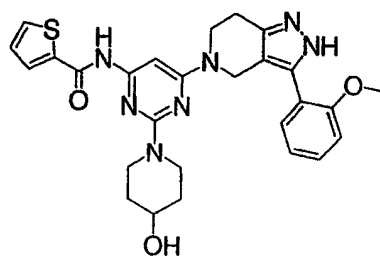
其中 R^1 和 R^3 如上面所定义的。

通式 IV 优选的 R^1 和 R^3 基团在上面通式 I 的化合物中描述。

通式 I 化合物的代表性例子在下面的表 1 中给出。

表 1. 通式 I 化合物的例子

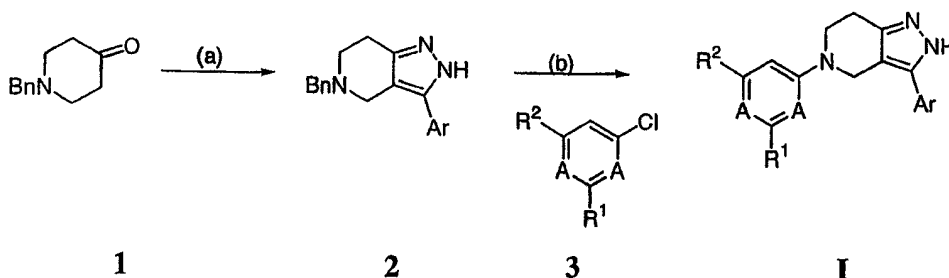


**I-7****I-8****I-9****I-10****I-11****I-12****I-13**

4. 一般性合成方法学

本发明的化合物大多可通过本领域那些技术人员已知的类似化合物的方法制备，如下面一般流程所举例说明的，以及下面的制备实施例。

流程 I



试剂和条件：(a) i LDA、ArC(O)Cl ii NH₂NH₂；(b) i Pd/C、H₂ ii 3

上面的流程 I 表示用于制备通式 I 化合物的一般方法。在有芳基酰氯存在的条件下，用 LDA 处理 4-氧代-哌啶-1-羧酸苯甲酯，并用肼处理所得中间体以提供化合物 2。经由氢化作用除去化合物 2 的苯甲基保护基团，并用芳基氯化物 3 处理所得的胺以提供通式 I 的化合物。使用本领域技术人员已知的和下面实施例举例说明的方法，化合物 2 和 3 是用于形成各种通式 I 化合物的有用中间体。

虽然上面和此处描述了某些举例性实施方案，但应当了解本发明的化合物可按照上面一般性描述的方法，使用适宜的起始材料，利用本领域普通技术人员通常可获得的方法制备。

5. 用途，制剂和给药

药学上可接受的组合物

正如上面所讨论的，本发明提供蛋白激酶抑制剂化合物，且因此本发明的化合物可用于治疗病、疾病、和病症，包括但不限于，变应性疾病如哮喘和特应性皮炎、自身免疫病如 SLE 狼疮和牛皮癣，增殖

性疾病如癌症、病毒病以及与器官移植有关的病症，包括给予需要的受治疗者有效量的化合物，或包含化合物的药学上可接受的组合物。在优选实施方案中，所述病、病症、或疾病选自癌症、阿尔茨海默氏病、再狭窄、血管生成、肾小球肾炎、巨细胞病毒、HIV、疱疹、牛皮癣、动脉粥样硬化、脱发、自身免疫病如类风湿性关节炎、变应性或I型过敏反应、哮喘，自身免疫病如移植排斥、移植物抗宿主病、类风湿性关节炎、肌萎缩性侧索硬化、和多发性硬化、神经变性疾病如家族性肌萎缩性侧索硬化(FALS)、以及实体和血液恶性肿瘤如白血病和淋巴瘤。因此，本发明另一方面提供药学上可接受的组合物，其中这些组合物包含此处所述的任一化合物，且任选包含药学上可接受的载体、助剂、或赋形剂。在某些实施方案中，这些组合物任选进一步包含一种或多种附加治疗剂。

还应当认识到本发明的某些化合物可以游离形式存在用于处理，或适当的，以其药学上可接受的衍生物形式存在。按照本发明，药学上可接受的衍生物包括，但不限于，药学上可接受的盐、酯、所述酯的盐、或任何其它加合物或衍生物，它们在给予需要的患者后，能够直接或间接提供此处所述的化合物，或其代谢物或残渣。

此处所用术语“药学上可接受的盐”是指落在合理的医疗鉴定范围内、适用于和人类及低等动物的组织接触而没有毒性、刺激性、变应性反应等，且与合理的收益/风险比相称的那些盐。“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的任何无毒的盐或酯的盐，给予受体后，它们能够直接或间接提供本发明的化合物或其抑制活性的代谢物或残渣。此处所用的术语“其抑制活性的代谢物或残渣”是指其代谢物或残渣也是 JAK 或 CDK-2 激酶的抑制剂。

药学上可接受的盐是本领域熟知的。例如，S.M. Berge 等人在 *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19 中详细描述了药学上可接受的盐，其引入此处作为参考。本发明化合物的药学上可接受的盐包括从适宜的无机和有机酸和碱衍生的那些。药学上可接受的、无毒的酸加成盐的例子是与无机酸，如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯

酸或与有机酸如醋酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸形成的氨基盐，或通过使用本领域所用的其它方法，如离子交换形成的氨基盐。其它药学上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天门冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、酸式硫酸盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、延胡索酸盐、葡萄糖庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酯酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对-甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。来源于适宜碱的盐包括碱金属、碱土金属、铵和 $N^+(C_{1-4} \text{烷基})_4$ 盐。本发明还预期了此处所公开化合物的任一碱性含氮基团的季铵化。水-或油-溶性或可分散的产品可通过这种季铵化获得。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。其它药学上可接受的盐包括，适宜的，使用抗衡离子如卤化物、氢氧化物、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸基和芳基磺酸基形成的无毒的铵、季铵、和胺阳离子。

如上所述，本发明药学上可接受的组合物还可包含药学上可接受的载体、助剂、或赋形剂，如此处所用的，它们包括任何及所有溶剂、稀释剂、或其它液体赋形剂、分散或混悬助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘结剂、润滑剂等，适于所需的特定剂量形式。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 公开了在配制药学上可接受的组合物时所用的各种载体以及用于制备它们的已知技术。除了与本发明化合物不相容的任何常规载体介质外，如产生任何不良的生物作用或以有害的方式与药学上可接受组合物的任何其它组分相互作用，预期它的使用落在本发明的范围之内。可作

为药学上可接受载体的材料的一些例子包括,但不限于,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白,如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、或山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质,如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物,羊毛脂、糖如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;粉状黄芪胶;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂如椰子油和栓剂蜡;油如花生油、棉籽油;红花子油;芝麻油;橄榄油;玉米油和豆油;二醇;如丙二醇或聚乙二醇;酯如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原的水;等渗生理盐水;林格氏溶液;乙醇、和磷酸盐缓冲溶液以及其它无毒相容的润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、释放剂、涂层剂、甜味剂、调味剂和加香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中,这要根据配制者的判断。

化合物和药学上可接受的组合物的使用

另一方面,提供一种治疗或减轻病、疾病、或病症,包括变应性疾病如哮喘和特应性皮炎、自身免疫病如 SLE 狼疮和牛皮癣、增殖性疾病如癌症、病毒引起的病、以及与器官移植有关的病症严重程度的方法,包括给予需要的受治疗者有效量的化合物或包含化合物的药学上可接受的组合物。在优选实施方案中,所述并、病症、或疾病选自癌症、阿尔茨海默氏病、再狭窄、血管生成、肾小球肾炎、巨细胞病毒、HIV、疱疹、牛皮癣、动脉粥样硬化、脱发、自身免疫病如类风湿性关节炎、变应性或 I 型过敏反应、哮喘,自身免疫病如移植排斥、移植物抗宿主病、类风湿性关节炎、肌萎缩性侧索硬化、和多发性硬化、神经变性疾病如家族性肌萎缩性侧索硬化(FALS)、以及实体和血液恶性肿瘤如白血病和淋巴瘤。在本发明某些实施方案中,化合物或药学上可接受的组合物的“有效量”是指可有效治疗或减轻病、疾病、或病症,包括变应性疾病如哮喘和特应性皮炎、自身免疫病如 SLE 狼

疮和牛皮癣、增殖性疾病如癌症、病毒引起的疾病、以及与器官移植有关的病症严重程度的用量。本发明方法的化合物和组合物可用有效治疗或减轻病、疾病、或病症，包括变应性疾病如哮喘和特应性皮炎、自身免疫病如 SLE 狼疮和牛皮癣、增殖性疾病如癌症、病毒引起的疾病、以及与器官移植有关的病症严重程度的任何用量和任何给药途径给药。所需的准确用量将根据被治疗者不同而变化，这取决于被治疗者的人种、年龄、和一般状况，感染的严重程度，特定的药剂，其给药方式等。优选将本发明的化合物配制成便于给药且剂量均匀的剂量单位形式。此处所用的表达方式“剂量单位形式”是指适于所治疗患者的药剂的实际分离单位。然而，应当理解，本发明化合物及组合物的总的每日使用情况将在合理的医疗鉴定范围内由主治医生决定。任何特定的患者或生物的具体有效剂量水平取决于各种因素，包括所治疗的疾病和疾病的严重程度；所用的具体化合物的活性；所用的具体组合物；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；给药时间；给药途径；和所用具体化合物的排泄速率；治疗的持续时间；与所用具体化合物联合或同时使用的药物；以及医疗领域熟知的因素。此处所用的术语“患者”是指动物，优选哺乳动物，且最优选人。

可将本发明药学上可接受的组合物口服、直肠、非肠道、脑池内、阴道内、腹膜内、局部（如粉剂、软膏剂、或滴剂）、口腔、按口腔或鼻喷雾等给予患者，这取决于所治疗感染的严重程度。在某些实施方案中，本发明的化合物可以每天约 0.01mg/kg 被治疗者体重-约 50mg/kg 被治疗者体重，优选约 1mg/kg 被治疗者体重-约 25mg/kg 被治疗者体重的剂量水平口服或非肠道给药，每天一次或多次，从而获得所需的治疗效果。

用于口服给药的液体剂量形式包括，但不限于，药学上可接受的乳状液、微乳、溶液、混悬液、糖浆剂和酏剂。除活性化合物外，所述液体剂量形式还可包含本领域通常使用的惰性稀释剂如，例如，水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油（特别

是棉籽、花生、玉米、胚、橄榄、蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯、及其混合物。除惰性稀释剂外,所述口服组合物还可包括助剂,如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调料、和加香剂。

可注射的制剂,例如,无菌的可注射含水或油状混悬液可按照本领域已知的,使用适宜分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。所述无菌可注射的制剂还可以是溶于无毒的非肠道可接受的稀释剂或溶剂,例如,1,3-丁二醇中无菌可注射溶液、混悬液或乳状液。所用的可接受的赋形剂和溶剂是水、林格氏溶液、U.S.P.和等渗的氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发油通常可被用作溶剂或悬浮基质。就此目的而言,任何温和的不挥发油都可使用,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外,脂肪酸如油酸可用于制备可注射的制剂。

可注射的制剂可通过,例如,留存细菌的滤器,或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂而灭菌,所述无菌固定组合物形式的灭菌剂可在使用前,将其溶于或分散于无菌水或其它无菌的可注射基质中。

为了延长本发明化合物的作用,常需要减缓化合物从皮下或肌肉内注射吸收。这可通过使用具有较差水溶性的结晶或无晶形物质的液体混悬液而实现。然后化合物的吸收速率就取决于其溶解速率,依次,可取决于晶体的大小和结晶形式。可选择性地,非肠道给药的化合物形式的延迟吸收是通过将化合物溶解或混悬于油赋形剂中而实现的。可注射的储存形式是通过在生物降解聚合物,如聚交酯-聚乙醇酸交酯中形成化合物的微囊基质而制成的。根据化合物与聚合物的比例以及所用特定聚合物的性质,可控制化合物的释放速率。其它生物降解聚合物的例子包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储存的可注射制剂还可通过将化合物埋入与肌体组织相容的脂质体或微乳中而制备。

用于直肠或阴道给药的组合物优选栓剂,它们可通过将本发明的化合物与适宜的无刺激性赋形剂或载体,如椰子油、聚乙二醇或栓剂蜡混合而制备,它们在室温下为固体,但在体温下为液体,因此可在直肠或阴道腔中溶化并释放活性化合物。

用于口服给药的固体剂量形式包括胶囊剂、片剂、丸剂、粉剂、和颗粒剂。在这种固体剂量形式中，将活性化合物与至少一种惰性、药学上可接受的赋形剂或载体如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或a)填充剂或填料如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇、和硅酸，b)粘结剂如，例如，羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶，c)湿润剂如甘油，d)崩解剂如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐、和碳酸钠，e)溶解延迟剂如石蜡，f)吸收促进剂如季铵化合物，g)湿润剂如，例如，鲸蜡醇和一硬脂酸甘油酯，h)吸收剂如高岭土和膨润土，和i)润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、及其混合物混合。对于胶囊剂、片剂和丸剂而言，所述剂量形式还可包含缓冲剂。

相似类型的固体组合物还可被用作软和硬-填充明胶胶囊中的填充剂，其中使用赋形剂如乳糖或乳糖以及高分子量的聚乙二醇等。片剂、糖衣丸、胶囊剂、丸剂、和颗粒剂的固体剂量形式可用涂层及壳体，如肠溶衣和药物配制领域熟知的其它涂层制备。它们可任选包含不透明剂且还可以是仅仅，或优选，在肠道某一特定部分，任选地，以延迟方式释放活性成分的组合物。可用的包埋组分的例子包括聚合物物质和蜡。相似类型的固体组合物还可被用作软和硬-填充明胶胶囊中的填充剂，其中使用赋形剂如乳糖或乳糖以及高分子量的聚乙二醇等。

所述活性化合物还可以是具有上述一种或多种赋形剂的微囊形式。片剂、糖衣丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂的固体剂量形式可用涂层如肠溶衣、控释涂层和药物配制领域熟知的其它涂层制备。在这种固体剂量形式中，所述活性化合物可与至少一种惰性稀释剂如蔗糖、乳糖或淀粉混合。这种剂量形式还可包含，按照标准实践，除惰性稀释剂外的其它物质，例如片剂润滑剂和其它压片用助剂，如硬脂酸镁和微晶纤维素。就胶囊剂、片剂和丸剂而言，所述剂量形式还可包含缓冲剂。它们还可任选包含不透明剂且还可以是仅仅，或优选在肠道的特定部分，任选地，以延迟方式释放活性成分的组合物。可用的包埋组分的例子包括聚合物物质和蜡。

用于局部或透皮给予本发明化合物的剂量形式包括软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。所述活性成分在无菌条件下与药学上可接受的载体混合，且可能需要任何所需的防腐剂或缓冲剂。眼用制剂，滴耳剂、和滴眼剂也被预期包括在本发明的范围之内。此外，本发明预期了透皮贴剂的使用，它具有将化合物控制释放到肌体的附加优点。这种剂量形式可通过将化合物溶解或分散于适宜的介质中而制备。吸收增强剂还可用于增加化合物穿过皮肤的通量。速率可通过提供速率控制薄膜或通过将化合物分散在聚合物基质或凝胶中而控制。

如上一般性所述，本发明的化合物可用作蛋白激酶抑制剂。在其中一个实施方案中，本发明的化合物和组合物是一种或多种JAK或CDK-2的抑制剂，且因此，不希望受到任何特殊理论的限制，所述化合物和组合物特别用于治疗或减轻病、病症、或疾病的严重程度，其中JAK或CDK-2的一个或多个激活涉及所述病、病症、或疾病。当JAK或CDK-2的激活涉及特定的病、病症或疾病时，所述病、病症、或疾病还可被称作“JAK或CDK-2-介导的病”或疾病综合症。因此，另一方面，本发明提供一种用于治疗或减轻病、病症或疾病严重程度的方法，其中JAK-3的一个或多个激活涉及所述疾病状况。

在本发明中用作JAK或CDK-2抑制剂的化合物的活性可体外、体内、或在细胞系中测定。体外测定法包括测定激活JAK或CDK-2的磷酸化活性或ATP酶活性抑制的测定法。选择性的体外测定法可量化抑制剂与JAK或CDK-2结合的能力。抑制剂结合可通过在结合前放射性标记所述抑制剂，分离抑制剂/JAK或抑制剂/CDK-2复合体，并测定放射性标记结合的量而测量。可选择性地，抑制剂结合可通过进行竞争实验而测定，其中将新的抑制剂与和已知放射性配体结合的JAK或CDK-2培养。

此处所用术语“可测量地抑制”是指包含所述组合物和JAK或CDK-2激酶的样品与在没有所述组合物的条件下包含JAK或CDK-2激酶的等价样品之间JAK或CDK-2活性的可测量的改变。

此处所用术语“CDK-2-介导的病”或“CDK-2-介导的病症”是指已知 CDK-2 在其中发挥作用的任何病或其它有害病症。术语“CDK-2-介导的病”或“CDK-2-介导的病症”还指可通过用 CDK-2 抑制剂治疗而减轻的那些病或病症。这种病症包括，但不限于，癌症、阿尔茨海默氏病、再狭窄、血管生成、肾小球肾炎、巨细胞病毒、HIV、疱疹、牛皮癣、动脉粥样硬化、脱发和自身免疫病如类风湿性关节炎。见 Fischer, P. M. and Lane, D. P. *Current Medicinal Chemistry*, 2000, 7, 1213-1245; Mani, S., Wang, C., Wu, K., Francis, R. and Pestell, R. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 2000, 9, 1849; Fry, D. W. and Garrett, M. D. *Current Opinion in Oncologic, Endocrine & Metabolic Investigational Drugs* 2000, 2, 40-59。

此处所用术语“JAK-介导的病”是指已知 JAK 家族激酶，特别是 JAK-3 在其中发挥作用的任何病或其它有害病症。这种病症包括，但不限于，免疫反应如变应性或 I 型过敏反应、哮喘、自身免疫性病如移植排斥、移植物抗宿主疾病、类风湿性关节炎、肌萎缩性侧索硬化、和多发性硬化、神经变性疾病，如家族性肌萎缩性侧索硬化 (FALS)、以及实体和血液恶性肿瘤如白血病和淋巴瘤。

还应当了解本发明的化合物和药学上可接受的组合物可用于联合疗法中，即，所述化合物和药学上可接受的组合物可与一种或多种其它所需的治疗或医疗过程同时、在其之前、或之后给予。用于联合方案中的疗法（治疗或过程）的特定组合要考虑所需治疗和/或过程以及所希望获得的治疗效果的相容性。还应当认识到所用的疗法可相对于同一疾病获得所希望的效果（例如，本发明的化合物可与用于治疗同一疾病的其它药剂同时给药），或它们可获得不同的效果（例如，任何副作用的控制）。此处所用的、通常给药用于治疗或预防特定疾病、或病症的其它治疗剂被称作“适于所治疗的疾病、或病症”。

例如，化疗剂或其它抗增殖剂可与本发明的化合物联合治疗增殖性病和癌症。已知化疗剂的例子包括，但不限于，例如，可与本发明抗癌剂联合使用的其它疗法或抗癌剂包括手术、放疗（在一些实施例

中, γ -射线、中子束放疗、电子束放疗、质子治疗、近程治疗、和系统放射性同位素, 仅仅是举几个例子)、内分泌疗法、生物反应改性剂(干扰素、白介素和肿瘤坏死因子(TNF), 仅仅是举几个例子)、高温和冷疗法、减弱任何副作用的药剂(例如, 止吐剂)、和其它批准的化疗药物, 包括但不限于, 烷基化药物(氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、美法仑、异环磷酰胺)、抗代谢物(甲氧蝶呤)、嘌呤拮抗剂和嘧啶拮抗剂(6-巯基嘌呤、5-氟尿嘧啶、Cytarabine、吉西他滨)、纺锤体抑制剂(长春花碱、长春新碱、长春碱、紫杉醇)、鬼臼毒素(依托泊苷、伊立替康、拓扑替康)、抗生素(阿霉素、博来霉素、丝裂霉素)、亚硝基脲(卡莫司汀、罗氮芥)、无机离子(顺铂、碳铂)、酶(天门冬酰胺酶)、和激素(他莫昔芬、利普安、氟他胺、和甲地孕酮)、GleevecTM、亚德里亚霉素、地塞米松、和环磷酰胺。更新的癌症疗法的更全面讨论见<http://www.nci.nih.gov/>, FDA批准的肿瘤药物的列表见<http://www.fda.gov/cder/cancer/druglistframe.htm>, 和The Merck Manual, Seventeenth Ed. 1999, 其全部内容引入此处作为参考。

本发明抑制剂的其它例子还可与下列治疗联合, 它们包括但不限于: 阿尔茨海默氏病的治疗如Aricept®和Exelon®; 帕金森氏病的治疗如L-DOPA/卡比多巴、恩他卡朋、罗毗尼洛、派拉米苏、溴隐亭、硫丙麦角林、trihexphenidyl、和金刚烷胺; 治疗多发性硬化(MS)的药剂如 β -干扰素(例如, Avonex®和Rebif®)、Copaxone®、和米托蒽醌; 哮喘的治疗如沙丁胺醇和Singulair®; 用于治疗精神分裂症的药剂如奥氮平、维斯通、喹迪平、和氟哌啶醇; 抗炎剂如皮质类固醇、TNF阻断剂、IL-1 RA、硫唑嘌呤、环磷酰胺、和柳氮磺胺吡啶; 免疫调节和免疫抑制剂如环孢菌素、他克莫司、瑞帕霉素、霉酚酸酯、干扰素、皮质类固醇、环磷酰胺、硫唑嘌呤、和柳氮磺胺吡啶; 神经营养因子如乙酰胆碱酯酶抑制剂、MAO抑制剂、干扰素、抗惊厥剂、离子通道阻断剂、利鲁唑、和抗帕金森氏病的药剂; 用于治疗心血管病的药剂如 β -阻断剂、ACE抑制剂、利尿剂、硝酸盐、钙通道阻断剂、和斯汀汀; 用于治疗肝病的药剂如皮质类固醇、考来烯胺、干扰素和抗

病毒剂；用于治疗血液疾病的药剂如皮质类固醇、抗白血病的药剂、和生长因子；以及用于治疗免疫缺损病的药剂如 γ -球蛋白。

存在于本发明组合物中的其它治疗剂的用量不会超过在仅包含该治疗剂作为活性剂的组合物中通常给药的用量。优选，目前公开的组合物中的其它治疗剂的用量为通常存在于仅包含该药剂作为治疗活性剂的组合物中用量的约50%-100%。

本发明的化合物或其药学上可接受的组合物还可掺入到用于涂覆可植入的医疗装置，如假体、人造瓣膜、血管移植物、移植片固定模和导管的组合物中。因此，本发明另一方面包括用于涂覆可注入装置的组合物，其包含上面一般性描述以及此处的类和子类中描述的本发明化合物，和适于涂覆所述可植入装置的载体。另一方面，本发明包括用组合物涂覆的可注入装置，该组合物包含上面一般性描述以及此处的类和子类中描述的本发明化合物，以及适于涂覆所述可植入装置的载体。

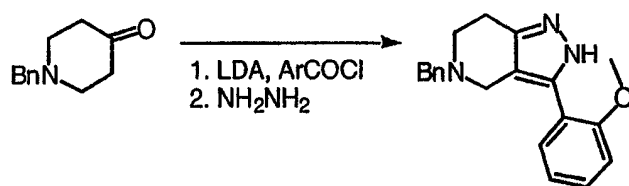
血管移植片固定模，例如，已经用于克服再狭窄（损伤后血管壁的再狭窄）。然而，使用移植片固定模或其它可植入装置的患者会有凝块形成或血小板活化的危险。这些有害的作用可通过用包含激酶抑制剂的药学上可接受的组合物预先涂覆所述装置而防止或缓和。适宜的涂层和涂覆的可植入装置的一般性制备在美国专利 6,099,562、5,886,026、和 5,304,121 中描述。涂层通常是生物适合的聚合材料如水凝胶聚合物、聚甲基二硅氧烷、聚己内酯、聚乙二醇、聚乳酸、乙烯醋酸乙烯酯、及其混合物。所述涂层还可任选被氟硅氧烷、多糖、聚乙二醇、磷脂或其组合的适合包衣进一步覆盖，从而赋予组合物控制特性。

本发明另一方面涉及抑制生物样品或患者中的JAK或CDK-2活性，该方法包括给予患者，或使所述生物样品与通式I的化合物或包含所述化合物的组合物接触。此处所用的术语“生物样品”包括，但不限于，细胞培养物或其提取物；从哺乳动物或其提取物获得的活组织检查材料；以及血液、唾液、尿液、粪便、泪液、或其它体液或其提取物。

生物样品中JAK或CDK-2 激酶活性的抑制可用于本领域技术人员已知的各种目的。这种目的的例子包括，但不限于，输血、器官移植、生物样品贮藏、和生物测定。

合成实施例

实施例 1



5-苯甲基-3-(2-甲氧基-苯基)-4,5,6,7-四氢-2H-吡唑并[4,3-c]吡啶

经由注射器将 2.7mL 2.0M 二异丙酰胺锂溶液加入到 1.0g 苯甲基哌啶酮 (5.3mmol、1.0 个当量) 溶于 20mL THF 的冰冷溶液中。0℃ 搅拌所得溶液 20 分钟。然后向溶液中加入 1.0mL 的间-茴香酰氯 (7.0mmol、1.3 个当量)，引起立即沉淀。用 10mL 甲醇结束反应，浓缩成油，其不能溶于 20mL 乙醇中，并用 5mL 一水合肼处理，搅拌 12 小时。浓缩反应混合物，并通过硅胶层析纯化产物 (梯度，EtOAc-EtOH)，得到 470mg 产物 (1.50mmol、28% 产率)。

实施例 2

6-[3-(2-甲氧基-苯基)-2,4,6,7-四氢-吡唑并[4,3-c]吡啶-5-基]-2-甲基硫烷基-嘧啶-4-基胺 (I-7)

步骤 A: 向 180mg 5-苯甲基-3-(2-甲氧基-苯基)-4,5,6,7-四氢-2H-吡唑并[4,3-c]吡啶 (0.56mmol、1 个当量) 溶于 10mL 乙醇中的溶液加入到 100mg 10%Pd/C 中。搅拌所述溶液 48 小时，得到 100mg 所需的胺

(0.44mmol、78 %产率)，其无需进一步纯化即可使用。步骤 B: 将 50mg 粗胺(0.22mmol、1 个当量)、46mg 6-氯-2-甲基硫烷基嘧啶-4-基胺(0.26mmol、1.2 个当量)、50mg K_2CO_3 和 5mL 二甲基甲酰胺装入到 25mL 圆底烧瓶中。115℃搅拌反应混合物 12 小时，并用 10mL 水结束。用 2x20mL 醋酸乙酯萃取所得浆液。合并有机层并浓缩成油，其可通过硅胶层析纯化(CH_2Cl_2 -EtOAc-EtOH)，得到 23mg 白色固体的化合物 I-7(0.062mmol、24%产率)。 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 7.33 (1 H, d, $J = 7$ Hz)、7.26 (1H, t, $J = 8$ Hz)、6.99 (1 H, t, $J = 7$ Hz)、6.95 (1 H, d, $J = 8$ Hz)、5.34 (1 H, s)、4.83 (2 H, br s)、4.63 (2 H, br s)、3.90 (2 H, m)、3.86 (3 H, s)、2.37 (3 H, s) ppm。FIA MS: 369.2 (M+H) HPLC: $R_t = 2.731$ 分。纯度>95%。

实施例 3

6-[3-(4-氯-苯基)-2,4,6,7-四氢-吡唑并[4,3-c]吡啶-5-基]-2-甲基硫烷基-嘧啶-4-基胺(I-6):

化合物 I-6 是按照流程 I 的一般方法，以和实施例 2 基本相似的方式制备的。 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.66 (2 H, br s)、7.52 (2 H, br s)、6.28 (1H, s)、4.66 (2 H, br s)、3.87 (2 H, br s)、2.74 (2 H, br s)、2.33 (3 H, s) ppm。FIA MS: 373.2 (M+H) HPLC: $R_t = 2.954$ 分。纯度>95%。

实施例 4

4-氯-6-[3-(2-甲氧基-苯基)-2,4,6,7-四氢-吡唑并[4,3-c]吡啶-5-基]-嘧啶-2-基胺(I-5):

化合物 I-5 是按照流程 I 的一般方法，以和实施例 2 基本相似的方式制备的。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33 (1 H, t, $J = 7$ Hz)、7.30 (1 H, d, $J = 8$ Hz)、7.05 (1 H, t, $J = 7$ Hz)、6.99 (1 H, d, $J = 8$ Hz)、6.00 (1 H, s)、4.83 (2 H, br s)、4.72 (2H, br s)、3.90 (3H, s)、3.89 (2 H, br s) ppm。LC/MS: 357.49 (M+H)，HPLC: R_t

= 2.630 分。纯度>95%。

实施例 5

4-氯-6-[3-(3-甲氧基-苯基)-2,4,6,7-四氢-吡唑并[4,3-c]吡啶-5-基]-嘧啶-2-基胺 (I-4):

化合物 I-4 是按照流程 I 的一般方法, 以和实施例 2 基本相似的方式制备的。¹H NMR (500 MHz, TFA-D) δ 6.88 (1 H, t, $j = 8\text{Hz}$)、6.58 (3 H, m)、5.95 (1H, s)、4.58 (1H, br s)、4.26 (1 H, br s)、3.77 (1 H, br s)、3.45 (1 H, br s)、3.3 (3 H, s)、2.52 (2 H, m) ppm. LC/MS: 357.3 (M+H), HPLC: $R_t = 2.692$ 分。纯度>95%。

实施例 6

咪喃-2-羧酸 {4-氯-6-[3-(3-甲氧基-苯基)-2,4,6,7-四氢-吡唑并[4,3-c]吡啶-5-基]-嘧啶-2-基}-酰胺 (I-3):

化合物 I-3 是按照流程 I 的一般方法, 以和实施例 2 基本相似的方式制备的。¹H NMR (500 MHz, TFA-D) δ 7.04 (1 H, s)、6.95 (1 H, m)、6.89 (H, m)、6.58 (3 H, m)、6.41 (1H, d, $j=11\text{Hz}$)、6.04 (1 H, m)、4.66 (1 H, s)、4.37 (1 H, s)、3.85 (1 H, m)、3.56 (1 H, m)、3.30 (3 H, s)、2.62 (1 H, m)、2.55 (1 H, m) ppm. FIA MS : 451.3 (M+H), HPLC: $R_t = 3.127$ 分, >95%纯度。

实施例 7

JAK 抑制测定法:

JAK 的化合物抑制是通过 G. R. Brown 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, vol.10, pp575-579 所述的方法以下列方式测定的。向先前在 4℃ 下用聚(Glu、Ala、Tyr) 6:3:1 涂覆、然后用磷酸盐缓冲的生理盐水 0.05% 和吐温(PBST)洗涤的 Maxisorb 平板中加入 2 μM ATP、5mM MgCl_2 、和化合物溶于 DMSO 的溶液。反应是用 JAK 酶开始的并在 30℃ 下培养该平板 60 分钟。然后用 PBST 洗涤平板, 加入 100 μl HRP-

接合的 4G10 抗体，并在 30℃ 下培养该平板 90 分钟。再次用 PBST 洗涤该平板，加入 100 μ L TMB 溶液，并在 30℃ 下再次培养该平板 30 分钟。加入硫酸 (1M、100 μ L) 终止反应，在 450nm 阅读该平板从而获得光密度以进行分析确定 IC₅₀ 值。本发明的化合物显示出可抑制 JAK3。

实施例 8

CDK2 抑制测定法

使用标准偶联酶测定法筛选化合物抑制 CDK-2/细胞周期蛋白 A 的能力 (Fox 等人, (1998) Protein Sci 7, 2249)。反应是在 100mM HEPES pH 7.5、10 mM MgCl₂、25mM NaCl、1mM DTT 和 1.5% DMSO 中进行的。测定法中的终底物浓度为 100 μ M ATP (Sigma chemicals) 和 100 μ M 肽。测定是在 30℃ 和 25nM CDK-2/细胞周期蛋白 A 进行的。偶联酶系统组分的终浓度为 2.5mM 磷酸烯醇丙酮酸、350 μ M NADH、30 μ g/ml 丙酮酸激酶和 10 μ g/ml 乳酸脱氢酶。

制备包含除了 CDK-2/细胞周期蛋白 A、DTT 和目标试验化合物外的上面所列所有试剂的测定母缓冲溶液。将 56 μ l 试验反应物放在 384 孔平板中，接着加入 1 μ l 含试验化合物的 2mM DMSO 母液 (化合物终浓度 30 μ M)。在 30℃ 下将平板预培养 10 分钟并通过加入 10 μ l 酶 (终浓度 25nM) 而开始反应。30℃ 下，使用 BioRad Ultramark 平板阅读器 (Hercules, CA) 实时获得反应速率共 5 分钟。相对于含 DMSO 但没有化合物的标准孔滴定显示 >50% 抑制的化合物，并使用类似方案测定 IC₅₀。本发明的化合物显示可抑制 CDK2。