



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108137584 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680060910.6

(22)申请日 2016.10.14

(30)优先权数据

1518456.7 2015.10.19 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/074662 2016.10.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/067848 EN 2017.04.27

(71)申请人 加拉帕戈斯股份有限公司

地址 比利时梅赫伦

(72)发明人 R·C·X·布莱斯 R·J·J·热内

A·M·容古 J·G·P·O·多扬

F·G·拉贝古雷

J·M·勒弗朗索瓦 O·马莫利蒂

B·A·施密特 S·E·范德普拉斯

C·J·M·梅内特

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 沈晓书 黄革生

(51)Int.Cl.

C07D 471/04(2006.01)

A61K 31/437(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书90页

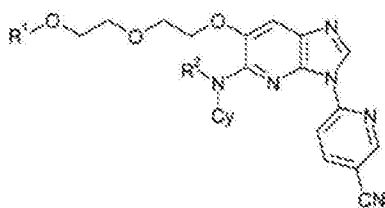
序列表2页

(54)发明名称

作为IRAK抑制剂的6-[5-氨基-6-(2-乙氧基乙氧基)-咪唑并[4,5-B]吡啶-3-基]-烟腈衍生物及其用途

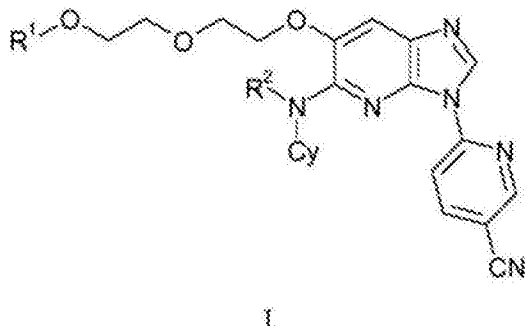
(57)摘要

本发明公开了式(I)化合物:其中R¹、R²和Cy如本文所定义。本发明涉及抑制IRAK家族激酶的化合物、它们的制备方法、包含该化合物的药物组合物以及使用该化合物的治疗方法,通过施用本发明化合物用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病。



(I)

1. 式I化合物,



其中

Cy是

-单环C₃₋₇环烷基,其任选被一个或多个独立地选择的R³取代,或
-4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,任选被一个或多个独立地选择的R³取代;

R¹是

-H,

--SO₃H,

--P(=O)(OH)₂,

-C₁₋₄烷基,

--C(=O)- (包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子的4至7元单环杂环烷基),或

--C(=O)C₁₋₆烷基,该C₁₋₆烷基任选被一个或多个独立地选择的R⁴基团取代;

R²是H或C₁₋₄烷基;

每个R³独立地选自:

-OH,

-=O,

-卤素,和

-C₁₋₄烷基;

每个R⁴独立地选自:

--NR^{5a}R^{5b},

--C(=O)OH,

-4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,任选被一个或多个独立地选择的C₁₋₄烷基取代,和

--NHC(=O)-C₁₋₄烷基-NH₂;并且

R^{5a}和R^{5b}独立地为H或C₁₋₄烷基;

或其药学上可接受的盐或溶剂化物或溶剂化物的盐。

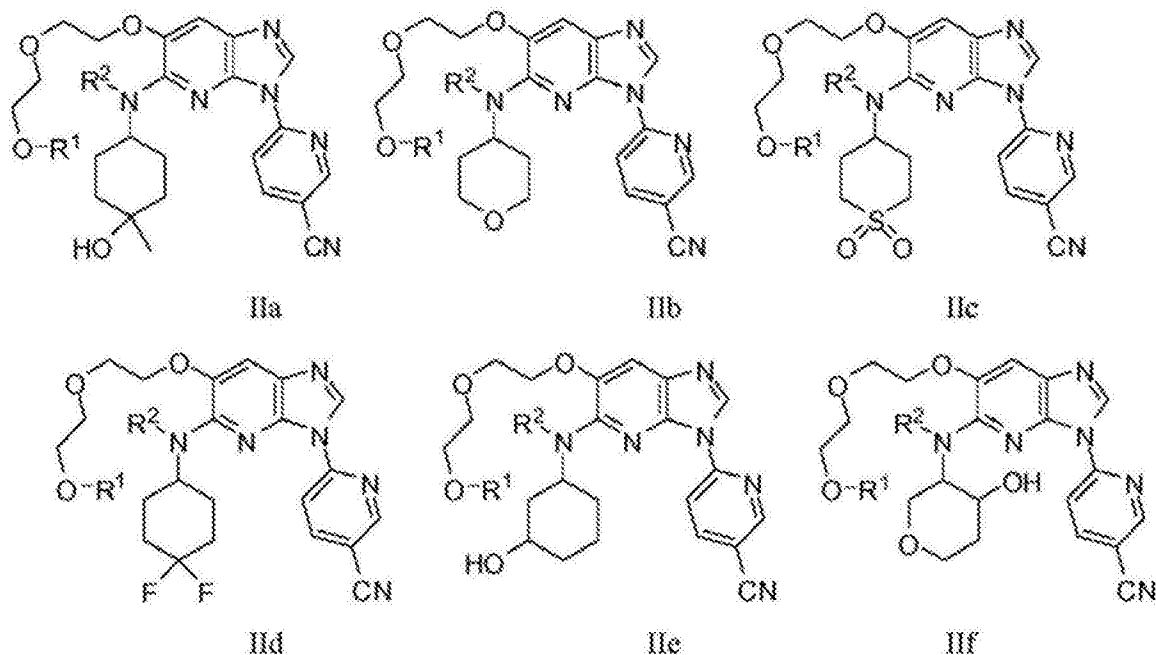
2. 如权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐,其中Cy是被一个或两个独立地选择的R³取代的单环C₃₋₇环烷基。

3. 如权利要求1或2的化合物或其药学上可接受的盐,其中Cy是四氢吡喃基或四氢噻喃基,其各自任选被一个或两个独立地选择的R³取代。

4. 如权利要求1至3中任一项的化合物或其药学上可接受的盐,其中R³选自OH、=O、F和-

CH₃。

5. 如权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐, 其中该化合物是式IIa、IIb、IIc、IIId、IIe或IIIf:



6. 如权利要求1至5中任一项的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R¹是H、-CH₃、-SO₃H或-P(=O)(OH)₂。

7. 如权利要求1至5中任一项的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R¹是-C(=O)C₁₋₆烷基, 该C₁₋₆烷基被一个或两个独立地选择的R⁴取代。

8. 如权利要求1至5中任一项的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R¹是-C(=O)C₁₋₆烷基, 该C₁₋₆烷基被一个或两个独立地选择的-C(=O)OH、-NH₂、-NHCH₃或-N(CH₃)₂取代。

9. 如权利要求1至8中任一项的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R²是H或-CH₃。

10. 如权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐, 其中该化合物选自:

6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈, 和

(S)-2-氨基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯。

11. 药物组合物, 其包含药学上可接受的载体和药用有效量的如权利要求1至10中任一项的化合物或其药学上可接受的盐。

12. 如权利要求11的药物组合物, 其包含其它治疗剂。

13. 如权利要求12的药物组合物, 其中该其它治疗剂是用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的活性剂。

14. 如权利要求1至10中任一项的化合物或其药学上可接受的盐或如权利要求11至13中任一项的药物组合物, 其用于药物中。

15. 如权利要求1至10中任一项的化合物或其药学上可接受的盐或如权利要求11至13中任一项的药物组合物, 其用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病。

作为IRAK抑制剂的6-[5-氨基-6-(2-乙氧基乙氧基)-咪唑并 [4,5-B]吡啶-3-基]-烟腈衍生物及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及可用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的化合物。特别地,本发明化合物可以抑制白介素-1受体相关激酶(IRAK),其是参与炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的激酶家族,并且更特别是IRAK-4。本发明还提供了制备本发明化合物的方法、包含本发明化合物的药物组合物、通过施用本发明化合物用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的疾病的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 激酶参与细胞生理学的许多基本过程,例如蛋白质磷酸化。特别地,蛋白质和脂质激酶参与细胞的活化、生长、分化和存活。蛋白质激酶可以分为优选磷酸化酪氨酸残基的那些和优选磷酸化丝氨酸和/或苏氨酸残基的那些。

[0004] 多年来,激酶已经发展成为抗炎药研发的极重要的靶标(Cohen 2009)。特别地,IRAK激酶并且更特别地IRAK-4已经被鉴定为在炎症和自身免疫疾病中起作用(Ringwood& Li 2008;Wang等人2009)。

[0005] IRAK在许多细胞类型中表达并且介导来自多种细胞受体包括白介素-1(IL-1)和tol1样受体(TLR)的信号。在IRAK家族中,已经鉴定出4个成员,即IRAK 1-4(Wang等人2009),并且IRAK-4(该家族的最新成员)代表有吸引力的治疗靶标(Li等人2002)。事实上,相信IRAK-4为在IL-1受体和TLR(除TLR3以外)的早期下游活化的关键蛋白质激酶,其通过IRAK-1和IRAK-2的快速活化起始信号传导,引起先天免疫响应。并且,其它白介素例如IL-18和IL-33依赖于IRAK-4用于信号传导。因此,这些细胞因子参与致病过程的疾病(例如,纤维变性(Li等人2014;McHedlidze等人2013;Rankin等人2010)和特应性皮炎(Salimi等人2013))是通过IRAK-4抑制剂治疗的潜在靶标疾病。

[0006] 在表达无活性IRAK-4突变体而非野生型的小鼠中,观察到由几种TLR激动剂触发对脓毒性休克的完全耐受以及对IL-1的受损响应。此外,表达无活性IRAK-4突变体而非野生型的小鼠在几种自身免疫疾病模型例如类风湿性关节炎(Koziczak-Holbro等人2009)和多发性硬化(Staschke等人2009)中部分地受到保护。令人感兴趣的是,类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮患者的血清已显示以IRAK-4依赖性方式活化浆细胞样树突细胞(Chiang等人2011)。最后,已在患有导致IRAK-4无活性的遗传缺陷的儿童中观察到反复化脓性细菌感染。由于在带有去活化IRAK-4突变的成人中未观察到这些化脓性感染,所以IRAK-4信号传导系统对于成人先天免疫性的某些方面似乎是冗余的。

[0007] 先天免疫系统的信号传导组分的失调还越来越被认为是癌症起始和进展中的重要因素(Rhyasen&Starczynowski 2015)。事实上,有证据证明IL-1在肿瘤细胞生长、血管生成、侵袭、耐药性和转移中起直接作用(Carmi等人2013;Vidal-Vanaclocha等人2000)。另外,TLR参与众多促肿瘤响应,这取决于肿瘤细胞背景而定。作为IL-1受体和TLR信号传导的必需介质,IRAK家族激酶代表有前景的癌症药物靶标。另外,已显示几种癌症类型依赖于MYD88的活化形式,其是TLR和IL-1R下游的转接分子,其活化IRAK-4。已在例如弥漫性大B细

胞淋巴瘤 (DLBCL) (Ngo等人2011) 和Waldenstrom巨球蛋白血症 (Treon等人2012) 中鉴别出活化MYD88突变。另外的报道支持IRAK-4在肿瘤学领域,特别是T细胞急性淋巴母细胞白血病 (T-ALL) 中的作用 (Li等人2015)。已显示IRAK-4的药理学抑制增强T-ALL对化学治疗剂的敏感性。

[0008] 已显示IL-33在纤维变性和变态反应性疾病,特别是哮喘和特应性皮炎的发展中起作用 (Nabe 2014)。由于该细胞因子通过IRAK-4依赖性途径进行信号传导 (Kroeger等人2009),所以这些疾病还可以代表IRAK-4抑制剂的靶标。

[0009] 最后,已显示几种自身炎性疾病依赖于IL-1活性,并且因此,IL-1阻断生物制剂显示对这些患者的一些益处。痛风、幼年型特发性关节炎、穆-韦病、家族性地中海热、贝赫切特病、成人发作斯蒂尔病是该自身炎性疾病的实例 (Dinarello等人2012)。

[0010] 用小分子抑制细胞因子信号传导可有助于减轻免疫-炎症疾病的疾病结果 (Sundberg等人2014)。特别地,细胞因子可以在生物体防御病原体和感染中起作用。然而,当研发免疫-炎症疾病的新疗法时,一方面至关重要的是选择可在不损害适当和/或先天免疫响应的情况下被抑制的途径中所涉及的靶标,因为同时抑制多个细胞因子反应途径可能过度削弱免疫系统。然而,难以实现药物对激酶的选择性 (Bain等人2003; Fabian等人2005),但其是高度希望的以便避免脱靶相关的副作用,特别是在长期治疗的背景下 (Broekman等人2011; Dy&Adjei 2013; Force&Kolaja 2011)。

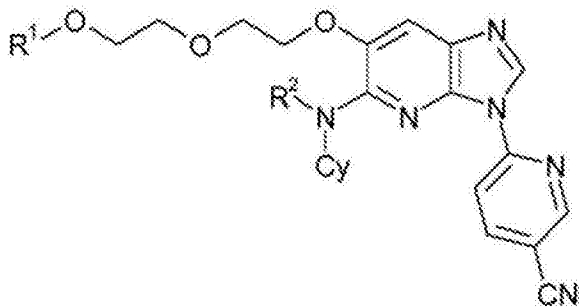
[0011] 特别地,最近显示伴随使用IL-1阻断剂 (阿那白滞素 (Anakinra)) 和TNF α 阻断剂 (依那西普 (Etanercept)) 导致嗜中性白血球减少和感染的风险增加。(Genovese等人, 2003, EMEA public statement EMEA/31631/02, 2003年2月5日)。此发现强调选择性在研发新药物时是关键要素,并且因此,希望研发能够选择性地调节信号传导途径而不影响其它途径的化合物,特别是能够选择性地调节IL-1响应而不影响TNF α 信号传导途径的化合物。

[0012] 目前的疗法并不令人满意,并且因此需要鉴别可用于预防和/或治疗炎症性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病并且具有降低的脱靶相关性副作用的其它化合物。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明是基于新化合物的鉴别,及其在预防和/或治疗炎症性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病中的用途。特别地,本发明化合物可以是IRAK抑制剂,并且更特别地是IRAK-4抑制剂。本发明还提供了制备这些化合物的方法,包含这些化合物的药物组合物,以及通过施用本发明化合物预防和/或治疗炎症性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的方法。

[0015] 因此,在本发明的第一方面中,提供了具有式 (I) 的本发明化合物:



[0016]

- [0017] 其中
- [0018] Cy是
- [0019] -单环C₃₋₇环烷基,其任选被一个或多个独立地选择的R³取代,或
- [0020] -4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子并且任选被一个或多个独立地选择的R³取代;
- [0021] R¹是
- [0022] -H,
- [0023] --SO₃H,
- [0024] --P(=O)(OH)₂,
- [0025] -C₁₋₄烷基,
- [0026] --C(=O)-(包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子的4至7元单环杂环烷基),或
- [0027] --C(=O)C₁₋₆烷基,该C₁₋₆烷基任选被一个或多个独立地选择的R⁴基团取代;
- [0028] R²是H或C₁₋₄烷基;
- [0029] 每个R³独立地选自:
- [0030] -OH,
- [0031] --=O,
- [0032] -卤素,和
- [0033] -C₁₋₄烷基;
- [0034] 每个R⁴独立地选自:
- [0035] --NR^{5a}R^{5b},
- [0036] --C(=O)OH,
- [0037] -4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子并且任选被一个或多个独立地选择的C₁₋₄烷基取代,和
- [0038] --NHC(=O)-C₁₋₄烷基-NH₂;并且
- [0039] R^{5a}和R^{5b}独立地是H或C₁₋₄烷基。
- [0040] 在一个方面中,提供了本发明化合物用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病。在特别的方面中,本发明化合物可以抑制IRAK激酶家族成员,并且更特别的是IRAK-4。在另一个特别的方面中,与密切相关的类似物相比,本发明化合物可以显示出针对IRAK家族激酶并且更特别的是IRAK-4的改善的选择性,因此降低了脱靶相关的毒性。在进一步的方面中,本发明化合物可以表现出良好的代谢稳定性,其可以产生改善的口服生物利用度。
- [0041] 在进一步的方面中,本发明化合物可以显示出针对IRAK-4的选择性,其可以产生改善的安全性并且是脱靶相关的副作用更低。在特别的方面中,本发明化合物可以是IL-1的选择性抑制剂。
- [0042] 在进一步的方面中,本发明提供了药物组合物,其包含本发明化合物和药用载体、赋形剂或稀释剂。在特别的方面中,药物组合物可以另外包含适合与本发明化合物组合使用的其它治疗活性成分。在更特别的方面中,该其它治疗活性成分是用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的活性剂。

[0043] 另外,可用于本文公开的药物组合物 and 治疗方法中的本发明化合物在制备和使用是药理学上可接受的。

[0044] 在本发明的进一步的方面中,本发明提供了治疗患有选自本文列出的那些病症并且特别是炎症性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的病症的哺乳动物、特别是人的方法,该方法包括施用有效量的如本文所述的本发明药物组合物或化合物。

[0045] 本发明还提供了包含本发明化合物和适合的药用载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物,其用于医药中。在特别的方面中,药物组合物用于预防和/或治疗炎症性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病。

[0046] 在其它方面中,本发明提供了合成本发明化合物的方法,并且代表性的合成方案和途径稍后公开于本文中。

[0047] 通过考虑随后的详细描述,本领域技术人员将明确其它目的和优点。

[0048] 应了解,本发明化合物可以经代谢以产生生物活性代谢物。

[0049] 发明详述

[0050] 定义

[0051] 以下术语旨在具有下文所阐述关于其的含义并且可用于理解本发明的描述和预期范围。

[0052] 当描述本发明(其可以包括化合物、含有该化合物的药物组合物和使用该化合物和组合物的方法)时,除非另有指示,否则以下术语(若存在)具有以下含义。还应理解,当在本文中描述时,任何下文所定义的部分可以被多种取代基取代,并且各定义旨在将该取代部分包括于其下述范围内。除非另有说明,否则术语‘取代的’如下文所描述来定义。应进一步理解,在本文中使用时认为术语‘基团(group)’及‘基团(radical)’可互换。

[0053] 本文可以使用的冠词‘一(a和an)’是指一个或多于一个(即至少一个)的该冠词的语法对象。例如,‘类似物’意指一种类似物或多于一种类似物。

[0054] ‘烷基’意指具有指定数目的碳原子的直链或支链脂族烃。特别的烷基具有1至6个碳原子或1至4个碳原子。支链意指一个或多个烷基(例如甲基、乙基或丙基)连接至直链烷基链。特别的烷基是甲基($-\text{CH}_3$)、乙基($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、正丙基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、异丙基($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、正丁基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、叔丁基($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)、仲丁基($-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、正戊基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、正己基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)和1,2-二甲基丁基($-\text{CHCH}_3-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)。特别的烷基具有1至4个碳原子。

[0055] ‘烷氧基’是指基团O-烷基,其中烷基具有指定数目的碳原子。特别的是,该术语是指基团O- C_{1-6} 烷基。特别的烷氧基是甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基、正己氧基和1,2-二甲基丁氧基。特别的烷氧基是低级烷氧基,即具有1至6个碳原子。进一步特别的烷氧基具有1至4个碳原子。

[0056] ‘链烯基’是指具有指定数目碳原子的单价烯属(不饱和)烃基团。特别的链烯基具有2至8个碳原子,并且更特别的是具有2至6个碳原子,其可以是直链或支链的并且具有至少1个并且特别是1至2个烯属不饱和位点。特别的链烯基包括乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、正丙烯基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、异丙烯基($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$)等。

[0057] ‘氨基’是指基团 $-\text{NH}_2$ 。

[0058] ‘芳基’是指通过从母体芳族环系的单一碳原子除去一个氢原子衍生的单价芳族

烃基团。特别是,芳基是指具有指定数目的环原子的芳族环结构(单环或多环)。特别的是,该术语包括包含6至10个环成员的基团。当芳基是单环环系时,则其优选含有6个碳原子。特别是,芳基包括苯基和萘基。

[0059] ‘环烷基’是指具有指定数目的环原子的非芳族烃基环结构(单环、稠合多环、桥连多环或螺环)。环烷基可以具有3至12个碳原子,特别是3至10个,并且更特别是3至7个碳原子。例如,环烷基包括单一环结构,例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。

[0060] ‘氰基’是指基团-CN。

[0061] ‘卤代’或‘卤素’是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)和碘(I)。特别的卤素是氟或氯。

[0062] ‘杂’在用于描述化合物或存于化合物上的基团时意指该化合物或基团中的一个或多个碳原子已经被氮、氧或硫杂原子代替。杂可以应用于上文所述烃基中的任何一个,例如具有1至4个并且特别是1个、2个或3个杂原子、更通常一个或两个杂原子例如单一杂原子的烷基例如杂烷基,环烷基例如杂环烷基,芳基例如杂芳基等。

[0063] ‘杂环烷基’意指包含一个或多个独立地选自O、N和S的杂原子和指定数目的环原子的非芳族完全饱和环结构(单环、稠合多环、螺环或桥连多环)。杂环烷基环结构可以具有4至12个环成员,特别是4至10个环成员并且更特别是4至7个环成员。每个环可以含有至多4个通常选自氮、硫和氧的杂原子。通常,杂环烷基环将含有至多4个杂原子、更通常至多3个杂原子、更通常至多2个、例如单一杂原子。杂环的实例包括但不限于氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、吡咯烷基(例如,1-吡咯烷基、2-吡咯烷基和3-吡咯烷基)、四氢呋喃基(例如,1-四氢呋喃基、2-四氢呋喃基和3-四氢呋喃基)、四氢噻吩基(例如,1-四氢噻吩基、2-四氢噻吩基和3-四氢噻吩基)、哌啶基(例如,1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基和4-哌啶基)、四氢吡喃基(例如,4-四氢吡喃基)、四氢噻喃基(例如,4-四氢噻喃基)、吗啉基、硫代吗啉基、二噁烷基或哌嗪基。

[0064] 以下说明性实例中显示了单环的特别实例:



[0065]

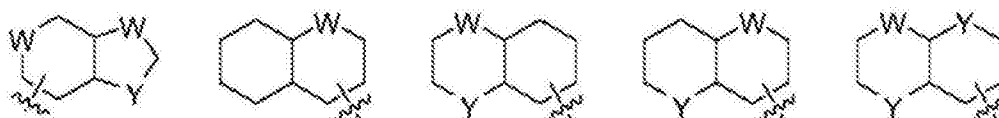


[0066] 其中每个W和Y独立地选自-CH₂-、-NH-、-O-和-S-。

[0067] 以下说明性实例中显示了稠合二环的特别实例:



[0068]



[0069] 其中每个W和Y独立地选自-CH₂-、-NH-、-O-和-S-。

[0070] 以下说明性实例中显示了桥连二环的特别实例：

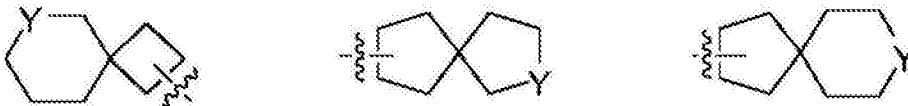
[0071]



[0072] 其中每个W和Y独立地选自-CH₂-、-NH-、-O-和-S-。

[0073] 以下说明性实例中显示了螺环的特别实例：

[0074]



[0075] 其中每个Y选自-CH₂-、-NH-、-O-和-S-。

[0076] ‘羟基’是指基团-OH。

[0077] ‘氧代’是指基团=O。

[0078] ‘取代的’是指其中一个或多个氢原子各自独立地被相同或不同的取代基代替的基团。

[0079] ‘磺基’或‘磺酸’是指基团例如-SO₃H。

[0080] 如本文所用术语‘被一个或多个取代’是指一至四个取代基。在一个实施方案中，其是指一至三个取代基。在进一步的实施方案中，其是指一个或两个取代基。在进一步的实施方案中，其是指一个取代基。

[0081] 有机合成领域普通技术人员应认识到，化学上可行的稳定杂环（不论其是芳族的还是非芳族的）中的杂原子的最大数目是由环的大小、不饱和度和杂原子的价决定的。通常，杂环可以具有一至四个杂原子，只要杂芳族环在化学上可行并且稳定即可。

[0082] ‘药学上可接受的’意指已获得联邦或州政府管理机构或除美国外的国家的相应机构批准或可获得批准或已列于美国药典 (US Pharmacopeia) 或其它公认药典中用于动物（并且更特别是用于人）中。

[0083] ‘药学上可接受的盐’是指药学上可接受的并且具有母体化合物的期望药理活性的本发明化合物的盐。特别是，此类无毒性盐可以是无机或有机酸加成盐和碱加成盐。特别是，此类盐包括：(1) 酸加成盐，与无机酸形成，所述的无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等；或与有机酸形成，所述的有机酸例如乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、苯乙醇酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙-二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基二环[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡庚糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等；或(2) 当存在于母体化合物中的酸性质子被金属离子（例如，碱金属离子、碱土金属离子或铝离子）代替时或与有机碱（例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、N-甲基葡萄糖胺等）配位时形成的盐。盐进一步包括例如钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、铵盐、四烷基铵盐等；并且当化合物含有碱性官能团时，包括无毒性有机或无机酸的盐，例如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等。术语“药学上可接受的阳离子”是指酸性官能团的可接受的阳离子抗衡离子。此类阳离子例如钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵阳离子等。

[0084] ‘药学上可接受的媒介物’是指与本发明化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。

[0085] ‘前药’是指具有可裂解基团并且可通过溶剂分解或在生理学条件下变为在体内具有药学活性的本发明化合物的化合物,包括本发明化合物的衍生物。此类实例包括但不限于胆碱酯衍生物等、N-烷基吗啉酯等。

[0086] ‘溶剂化物’是指通常通过溶剂分解反应与溶剂缔合(associated)的化合物形式。该物理缔合包括氢键合。常用溶剂包括水、乙醇、乙酸等。本发明化合物可以制备为例如结晶形式并且可以进行溶剂化或水合。适合的溶剂化物包括药学上可接受的溶剂化物,例如水合物,并且进一步包括化学计量的溶剂化物和化学计量的溶剂化物。在某些情形中,例如,在一种或多种溶剂分子掺入结晶固体的晶格中时,溶剂化物能够被分离。“溶剂化物”包括溶液相和可分离溶剂化物。代表性的溶剂化物包括水合物、乙醇化物和甲醇化物。

[0087] ‘个体’包括人。术语‘人’、‘患者’和‘个体’在本文中可互换使用。

[0088] ‘有效量’意指本发明化合物在施用个体以治疗疾病时足以实现该疾病治疗的量。‘有效量’可以取决于该化合物、疾病及其严重程度以及待治疗个体的年龄、体重等而不同。

[0089] ‘预防(preventing或prevention)’是指降低患上或发生疾病或障碍的风险(即在疾病发作前使得在可能暴露于致病剂或易感染该疾病的个体中不发生该疾病的至少一种临床症状)。

[0090] 术语‘预防(prophylaxis)’是指‘预防(prevention)’,并且是指目的为预防而非治疗或治愈疾病的措施或程序。预防措施的非限制性实例可以包括施用疫苗;向由于例如缺少运动而具有血栓形成风险的住院患者施用低分子量肝素;以及在逗留疟疾是地方病或感染疟疾的风险较高的地理区域时提前施用抗疟疾剂例如氯喹(chloroquine)。

[0091] 在一个实施方案中,任何疾病或障碍的‘治疗(treating或treatment)’是指改善该疾病或障碍(即阻止该疾病或减缓其至少一种临床症状的表现、程度或严重性)。在另一个实施方案中,‘治疗’是指改善个体不能感受到的至少一个身体参数。在另一个实施方案中,‘治疗’是指在物理方面调节疾病或障碍(例如稳定可感受到的症状)或在生理学方面调节疾病或障碍(例如稳定物理参数)或二者兼有。在进一步的实施方案中,‘治疗’是指减缓疾病的进程。

[0092] 如本文所用术语‘变态反应性疾病’是指特征在于免疫系统的高敏障碍的病症的组,包括变态反应性气道疾病(例如哮喘、鼻炎)、特应性皮炎、鼻窦炎、湿疹和荨麻疹以及食物变态反应或对昆虫毒液的变态反应。

[0093] 如本文所用术语‘哮喘’是指特征在于与无论何种原因(内源性、外源性或二者;变态反应或非变态反应)的气道收缩相关的肺气流变化的任何肺障碍。术语哮喘可以与一个或多个用以指示原因的形容词一起使用。

[0094] 如本文所用术语‘炎性疾病’是指包括以下的病症的组:类风湿性关节炎、骨关节炎、幼年型特发性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、变态反应性气道疾病(例如,哮喘、鼻炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎性肠病(IBD,例如,克罗恩病、溃疡性结肠炎)、肠易激惹综合征、内毒素引发的疾病状态(例如,心脏搭桥手术后并发症或促成例如慢性心脏衰竭的慢性内毒素状态)、成人发作斯蒂尔病、穆-韦综合征、家族性寒冷性自身炎症综合征(FCAS)、贝赫切特病、家族性地中海热(familial Mediterranean fever)、痛风、新

生儿发作多系统炎性疾病 (NOMID)、施尼茨勒综合征以和涉及软骨的相关疾病,例如关节的相关疾病。特别的是,该术语是指类风湿性关节炎、幼年型特发性关节炎、银屑病、骨关节炎、变态反应性气道疾病 (例如,哮喘)、慢性阻塞性肺病 (COPD) 和炎性肠病。更特别的是,该术语是指类风湿性关节炎、幼年型特发性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺病 (COPD) 和炎性肠病。

[0095] 如本文所用术语 ‘自身免疫疾病’ 是指包括以下的疾病的组:阻塞性气道疾病,包括病症例如COPD、哮喘 (例如,内源性哮喘、外源性哮喘、粉尘性哮喘、小儿哮喘),特别是慢性或顽固性哮喘 (例如,迟发性哮喘和气道高反应性),支气管炎包括支气管性哮喘,系统性红斑狼疮 (SLE)、皮肤红斑狼疮、狼疮性肾炎、皮炎、舍格伦综合征、多发性硬化、银屑病、干眼病、I型糖尿病及其相关性并发症、特应性湿疹 (特应性皮炎)、甲状腺炎 (桥本甲状腺炎和自身免疫甲状腺炎)、接触性皮炎以及其它湿疹性皮炎、炎性肠病 (例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)、动脉粥样硬化和肌萎缩性侧索硬化。特别的是,该术语是指COPD、哮喘、系统性红斑狼疮、I型糖尿病和炎性肠病。

[0096] 如本文所用术语 ‘纤维变性’ 是指系统性硬化症、特发性肺纤维变性以及其它形式的肺纤维变性和间质性肺疾病、酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、肾纤维变性和由炎性肠病引起的结肠纤维变性。

[0097] 如本文所用术语 ‘增殖性疾病’ 是指病症例如癌症 (例如,子宫平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性障碍 (例如,真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和骨髓纤维变性)、白血病 (例如,急性骨髓样白血病、急性和慢性淋巴母细胞性白血病)、多发性骨髓瘤、银屑病、再狭窄症、硬皮病或纤维变性。特别的是,该术语是指癌症、白血病、多发性骨髓瘤和银屑病。

[0098] 如本文所用术语 ‘癌症’ 是指皮肤或身体器官例如但不限于乳房、前列腺、肺、肾、胰脏、胃或肠中细胞的恶性或良性生长。癌症易于浸润至毗邻组织中并且扩散 (转移) 至远程器官,例如骨、肝脏、肺或脑。如本文所用术语癌症包括转移性肿瘤细胞类型 (例如但不限于黑色素瘤、淋巴瘤、白血病、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和肥大细胞瘤) 和组织癌类型 (例如但不限于结肠直肠癌、前列腺癌、小细胞肺癌及非小细胞肺癌、乳腺癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、胃癌、胶质母细胞瘤、原发性肝癌、卵巢癌、前列腺癌和子宫平滑肌肉瘤)。特别的是,术语 “癌症” 是指急性淋巴母细胞白血病、急性骨髓样白血病、肾上腺皮质癌、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌 (骨肉瘤和恶性纤维性组织细胞瘤)、脑干神经胶质瘤、脑瘤、脑和脊髓瘤、乳癌、支气管瘤、伯基特淋巴瘤、宫颈癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、胚胎瘤、子宫内膜癌、室管膜母细胞瘤、室管膜瘤、食道癌、尤因肉瘤家族的肿瘤、眼癌、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃 (gastric, stomach) 癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道基质瘤 (GIST)、胃肠道基质细胞瘤、生殖细胞瘤、神经胶质瘤、毛细细胞白血病、头颈癌、肝细胞 (肝) 癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤 (内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌、兰格汉斯细胞组织细胞增多症、喉头癌、白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性骨髓样白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、毛细细胞白血病、肝癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、髓母细胞瘤、髓质上皮瘤、黑色素瘤、间皮瘤、口腔癌、慢性骨髓性白血病、

骨髓样白血病、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、骨恶性纤维性组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低度恶性潜在肿瘤、胰脏癌、乳头状瘤、副甲状腺癌、阴茎癌、咽癌、中间分化的松果体实质瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体肿瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞(肾)癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、尤因肉瘤家族的肿瘤、卡波西肉瘤、塞扎里综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和维尔姆斯肿瘤。

[0099] 如本文所用术语‘白血病’是指血液和血液形成器官的肿瘤病。该疾病可造成骨髓和免疫系统功能障碍,此致使宿主极易受感染和出血的影响。特别的是,该术语白血病是指急性骨髓样白血病(AML)和急性淋巴母细胞性白血病(ALL)以及慢性淋巴母细胞性白血病(CLL)。

[0100] ‘本发明化合物’及等效表达意欲包括如本文所述的式(e)化合物,若上下文允许,则该表达包括药学上可接受的盐和溶剂化物,例如水合物,及药学上可接受的盐的溶剂化物。类似地,对中间体的提及,不管是否要求保护该中间体本身,若上下文允许,则意欲包括它们的盐和溶剂化物。

[0101] 当在本文中提及范围时,例如但不限于C₁₋₈烷基,所引用范围应视为所述范围每个成员的代表。

[0102] 本发明化合物的其它衍生物的酸和酸衍生物形式具有活性,但其酸敏感形式通常在哺乳动物生物体内提供溶解性、组织相容性或延迟释放的优点(Bundgaard 1985)。前药包括本领域技术人员已知的酸衍生物,例如通过使母体酸与适合醇反应制备的酯,或通过使母体酸化合物与取代或未取代的胺反应制备的酰胺,或酸酐或混合酸酐。衍生自连接于本发明化合物上的酸性基团的简单脂族或芳族酯、酰胺和酸酐是特别有用的前药。在一些情形下,期望制备双酯型前药,例如(酰基氧基)烷基酯或((烷氧基羰基)氧基)烷基酯。特别的是,此类前药是本发明化合物的C₁₋₈烷基、C₂₋₈链烯基、C₆₋₁₀任选取代的芳基和(C₆₋₁₀芳基)-(C₁₋₄烷基)酯。

[0103] 如本文所用术语‘同位素变体’是指在构成化合物的一个或多个原子处以非天然比例含有同位素的该化合物。例如,化合物的‘同位素变体’可以含有一个或多个非放射性同位素,例如氘(²H或D)、碳-13(¹³C)、氮-15(¹⁵N)等。应理解,在进行该同位素取代的化合物中,以下原子(若存在)可不同以使例如任何氢可以是²H/D,任何碳可以是¹³C,或任何氮可以是¹⁵N,并且该原子的存在和替换可以由本领域技术人员确定。同样,在例如所得化合物可用于药物和/或底物组织分布研究的情形下,本发明可以包括制备具有放射性同位素的同位素变体。放射性同位素氚(即³H)和碳-14(即¹⁴C)因易于掺入并且容易检测而特别可用于此目的。另外,可以制备被正电子发射同位素(例如¹¹C、¹⁸F、¹⁵O和¹³N)取代的化合物并且该化合物可在正电子发射断层扫描(PET)研究中用来检查底物受体占据情况。

[0104] 还应理解,具有相同分子式但其原子的键合的性质或顺序不同或其原子空间排列不同的化合物称为‘异构体’。原子空间排列不同的异构体称为‘立体异构体’。

[0105] 彼此非镜像的立体异构体称为‘非对映异构体’,并且那些彼此为不可重迭镜像的

称为‘对映异构体’。当化合物具有不对称中心,例如其与4个不同基团键合时,可能存在一对对映异构体。对映异构体的特征在于其不对称中心的绝对构型并且可通过Cahn和Prelog的R-和S-排序规则或通过分子旋转偏振光平面的方式来描述并且称为右旋或左旋(即,分别称为(+)或(-)-异构体)。手性化合物可以以单个对映异构体或其混合物的形式存在。含有等比例的对映异构体的混合物称为‘外消旋混合物’。

[0106] ‘互变异构体’是指具有特定化合物结构的可相互转换形式并且在氢原子和电子置换方面有所不同的化合物。因此,两种结构可以通过 π 电子个原子(通常为H)运动达到平衡。例如,烯醇和酮是互变异构体,因为它们可以通过用酸或碱处理快速地相互转化。互变异构现象的另外的实例是苯基硝基甲烷的酸式和硝基形式,其同样是通过用酸或碱处理形成。

[0107] 互变异构形式可能与达到目标化合物的最佳化学反应性和生物活性相关。

[0108] 本发明化合物可以具有一个或多个不对称中心;因此,此类化合物可以以单个(R)-或(S)-立体异构体或以其混合物制备。

[0109] 除非另有指示,否则当本说明书和权利要求中对特定化合物的描述或命名意欲包括单个对映异构体及其混合物,外消旋体。确定立体化学的方法和分离立体异构体的方法是本领域众所周知的。

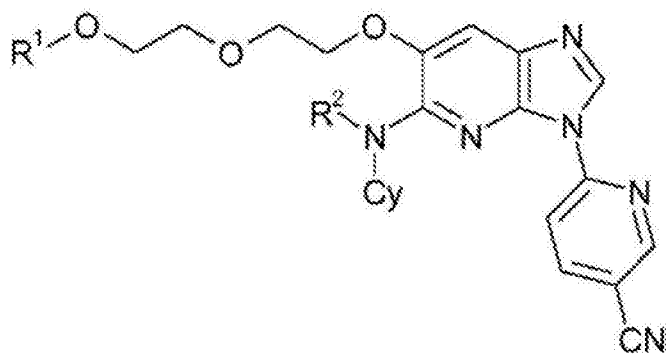
[0110] 应了解,本发明化合物可以被代谢以产生生物活性代谢物。

[0111] 本发明

[0112] 本发明是基于新化合物的鉴别,其在预防和/或治疗炎症性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病中的用途。特别是,该化合物可以抑制IRAK并且更特别是IRAK-4。

[0113] 本发明还提供了制备这些化合物的方法、包含这些化合物的药物组合物,以及通过施用本发明化合物预防和/或治疗炎症性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的方法。

[0114] 因此,在本发明的第一方面中,提供了具有式(I)的本发明化合物:



[0115]

I

[0116] 其中

[0117] Cy是

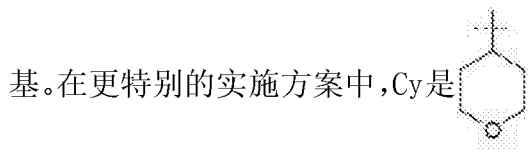
[0118] -单环C₃₋₇环烷基,其任选被一个、两个或三个独立地选择的R³取代,或

[0119] -4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,任选被一个、两个或三个独立地选择的R³取代;

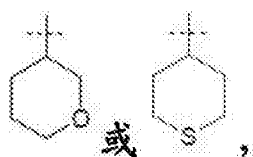
[0120] R¹是

[0121] -H,

- [0122] --SO₃H,
- [0123] --P(=O)(OH)₂,
- [0124] -C₁₋₄烷基,
- [0125] --C(=O)-(包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子的4至7元单环杂环烷基),或
- [0126] --C(=O)C₁₋₆烷基,该C₁₋₆烷基任选被一个或多个独立地选择的R⁴取代;
- [0127] R²是H或C₁₋₄烷基;
- [0128] 每个R³独立地选自:
- [0129] -OH,
- [0130] =O,
- [0131] -卤素,和
- [0132] -C₁₋₄烷基;
- [0133] 每个R⁴独立地选自:
- [0134] --NR^{5a}R^{5b},
- [0135] --C(=O)OH,
- [0136] -4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,任选被一个或多个独立地选择的C₁₋₄烷基取代,和
- [0137] --NHC(=O)-C₁₋₄烷基-NH₂;并且
- [0138] R^{5a}和R^{5b}独立地是H或C₁₋₄烷基。
- [0139] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中Cy是单环C₃₋₇环烷基。在特别的实施方案中,Cy是环己基。
- [0140] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中Cy是被一个、两个或三个独立地选择的R³取代的单环C₃₋₇环烷基。在特别的实施方案中,Cy是被一个、两个或三个独立地选择的R³取代的环己基。在另外的特别的实施方案中,Cy是被一个或两个R³取代的单环C₃₋₇环烷基。在更特别的实施方案中,Cy是被一个或两个独立地选择的R³取代的环己基。
- [0141] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中Cy是包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子的4至7元单环杂环烷基。在特别的实施方案中,Cy是四氢吡喃基或四氢噻喃基。



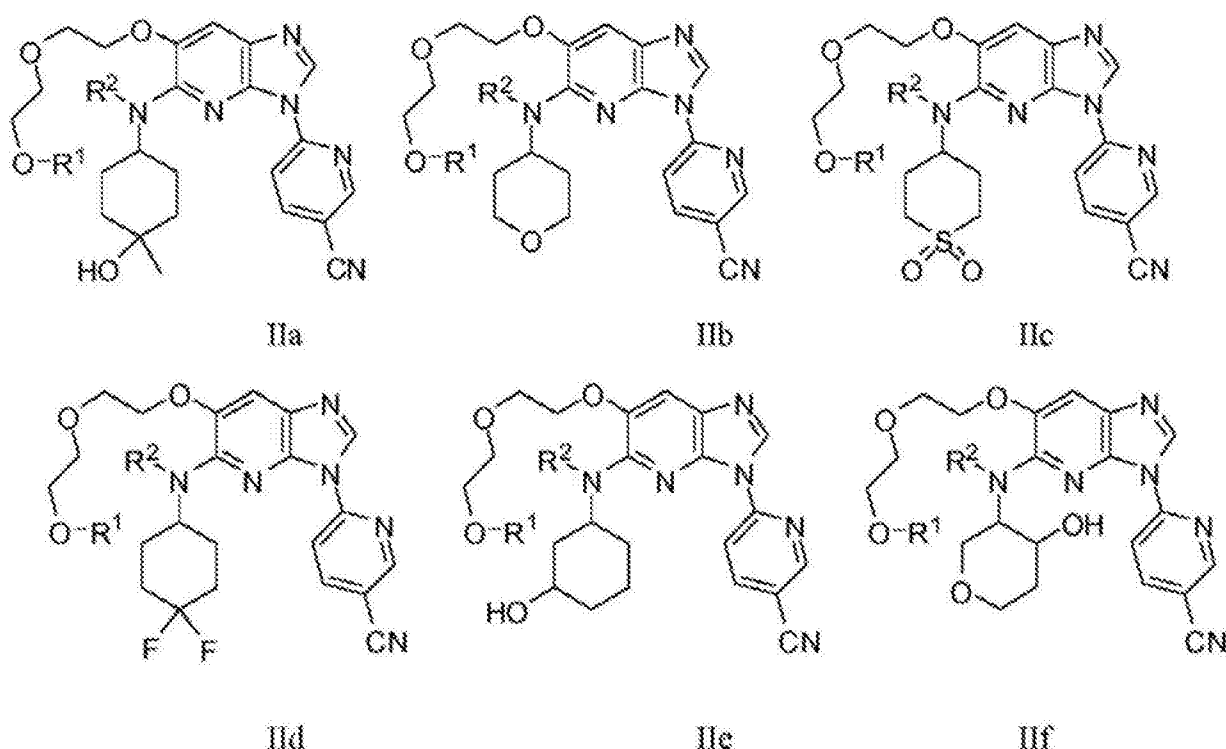
- [0142] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中Cy是单环4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,其被一个、两个或三个独立地选择的R³取代。在另外的实施方案中,Cy是四氢吡喃基或四氢噻喃基,其各自被一个、两个或三个独立地选择的R³取代。在特别的实施方案中,Cy是4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,其被一个或两个R³取代。在另外的特别的实施方案中,Cy是四氢吡喃基或四氢噻喃基,其各自被一个或两个独立地选择的R³取代。在更特别的实施方案中,Cy是



[0143] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中每个 R^3 选自OH、=O、卤素和 C_{1-4} 烷基。在特别的实施方案中,每个 R^3 选自OH、=O、F和 $-CH_3$ 。在更特别的实施方案中,每个 R^3 选自OH和 $-CH_3$ 。在另外的更特别的实施方案中,每个 R^3 是F。在另外的更特别的实施方案中,每个 R^3 是=O。

[0144] 在一个实施方案中,本发明化合物是式IIa、IIb、IIc、IIId、IIe或IIf:

[0145]



[0146] 其中 R^1 和 R^2 如上文所述。

[0147] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-IIIf中的任何一个,其中 R^1 是H、 $-SO_3H$ 或 $-P(=O)(OH)_2$ 。

[0148] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-IIIf中的任何一个,其中 R^1 是 C_{1-4} 烷基。在特别的实施方案中, R^1 是 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 或 $-CH(CH_3)_2$ 。在更特别的实施方案中, R^1 是 $-CH_3$ 。

[0149] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-IIIf中的任何一个,其中 R^1 是 $-C(=O)-$ (包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子的4至7元单环杂环烷基)。在特别的实施方案中, R^1 是 $-C(=O)-$ 吡咯烷基。

[0150] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-IIIf中的任何一个,其中 R^1 是 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基。在特别的实施方案中, R^1 是 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基,该 C_{1-6} 烷基选自 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 或 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 。

[0151] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-IIIf中的任何一个,其中 R^1 是 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基,该 C_{1-6} 烷基被一个或多个独立地选择的 R^4 取代。在特别的实施方案中, R^1 是 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基,该 C_{1-6} 烷基选自 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 或 $-CH_2CH(CH_3)_2$,其各自被一个或多个独立

地选择的 R^4 取代。在另外的特别的实施方案中, R^1 是 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基,该 C_{1-6} 烷基被一个或两个独立地选择的 R^4 取代。在更特别的实施方案中, R^1 是 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基,该 C_{1-6} 烷基选自 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 或 $-CH_2(CH(CH_3)_2)$,其各自被一个或两个独立地选择的 R^4 取代。

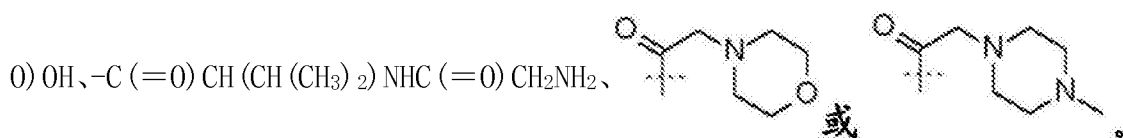
[0152] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-II f中的任何一个,并且 R^4 是 $-NR^{5a}R^{5b}$,其中 R^{5a} 和 R^{5b} 各自独立地是H或 C_{1-4} 烷基。在特别的实施方案中, R^{5a} 和 R^{5b} 各自独立地是H、 $-CH_3$ 或 $-CH_2CH_3$ 。在更特别的实施方案中, R^{5a} 是H,并且 R^{5b} 是H、 $-CH_3$ 或 $-CH_2CH_3$ 。在最特别的实施方案中, R^4 是 $-NH_2$ 、 $-NHCH_3$ 或 $-N(CH_3)_2$ 。

[0153] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-II f中的任何一个,其中 R^4 是 $-C(=O)OH$ 。

[0154] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-II f中的任何一个,其中 R^4 是4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,任选被一个或多个独立地选择的 C_{1-4} 烷基取代。在特别的实施方案中, R^4 是吗啉基、哌啶基或哌嗪基,其各自任选被一个或多个独立地选择的 C_{1-4} 烷基取代。在另外的特别的实施方案中, R^4 是4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,任选被一个 C_{1-4} 烷基取代。在更特别的实施方案中, R^4 是4至7元单环杂环烷基,其包含一个或两个独立地选自N、S和O的杂原子,任选被一个 $-CH_3$ 取代。在另外的更特别的实施方案中, R^4 是吗啉基、哌啶基或哌嗪基,其各自任选被一个或多个 $-CH_3$ 取代。在最特别的实施方案中, R^4 是吗啉基、哌啶基或哌嗪基,其各自任选被一个 $-CH_3$ 取代。

[0155] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-II f中的任何一个,其中 R^4 是 $-NHC(=O)-C_{1-4}$ 烷基- NH_2 。在特别的实施方案中, R^4 是 $-NHC(=O)-CH_2-NH_2$ 。

[0156] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-II f中的任何一个,其中 R^1 是 $-C(=O)CH_2NH_2$ 、 $-C(=O)CH_2NHCH_3$ 、 $-C(=O)CH_2N(CH_3)_2$ 、 $-C(=O)CH_2CH_2N(CH_3)_2$ 、 $-C(=O)CH(NH_2)CH(CH_3)_2$ 、 $-C(=O)CH_2CH_2C(=O)OH$ 、 $-C(=O)CH(NH_2)CH_2C(=O)OH$ 、 $-C(=O)CH(NH_2)CH_2CH_2C(=O)OH$ 、 $-C(=O)CH(CH(CH_3)_2)NHC(=O)CH_2NH_2$ 、



[0157] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-II f中的任何一个,其中 R^2 是H。

[0158] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I-II f中的任何一个,其中 R^2 是 C_{1-4} 烷基。在特别的实施方案中, R^2 是 $-CH_3$ 。

[0159] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中该化合物选自:

[0160] 6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈(nicotinonitrile),

[0161] 6-{5-(1,1-二氧化-四氢-2H-噻喃-4-基氨基)-6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-烟腈,

[0162] 6-{6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基]-甲基-氨基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-烟腈,

[0163] 6-{6-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-5-[甲基-(四氢-吡喃-4-基)-氨基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-烟腈,

[0164] 6-[6-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈,

- [0165] 6-{5-(3-羟基-环己基氨基)-6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-烟腈,
- [0166] 6-{5-(4,4-二氟-环己基氨基)-6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-烟腈,
- [0167] 硫酸单-(2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基)酯,
- [0168] (S)-2-氨基-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基]-乙基酯,
- [0169] (S)-2-氨基-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基]-乙基酯草酸盐,
- [0170] 6-[6-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-5-[[(顺式-3,4)-4-羟基四氢吡喃-3-基]氨基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈,
- [0171] 6-[6-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-5-[[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基环己基]氨基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈,
- [0172] 6-[5-[[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基)-甲基-氨基]-6-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈,
- [0173] 6-[5-[[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基环己基)氨基]-6-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈,
- [0174] 2-(二甲基氨基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯,
- [0175] 2-氨基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯,
- [0176] 2-(甲基氨基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯,
- [0177] (2S)-吡咯烷-2-甲酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯,
- [0178] (2S)-2-[(2-氨基乙酰基)氨基]-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯,
- [0179] 2-吗啉代乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯,
- [0180] 2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯,
- [0181] 3-(二甲基氨基)丙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯,
- [0182] 2-(二甲基氨基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸盐,
- [0183] 2-氨基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸盐,
- [0184] 2-(甲基氨基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并

[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸盐,

[0185] (2S)-吡咯烷-2-甲酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸盐,

[0186] (3S)-3-氨基-4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-氧代-丁酸盐酸盐,

[0187] (4S)-4-氨基-5-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-5-氧代-戊酸盐酸盐,

[0188] (2S)-2-[(2-氨基乙酰基)氨基]-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸盐,

[0189] 2-吗啉代乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸盐,

[0190] 2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸盐,

[0191] 3-(二甲基氨基)丙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸盐,和

[0192] 4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-氧代-丁酸。

[0193] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中该化合物是6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈。

[0194] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中该化合物不是6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈。

[0195] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中该化合物是(S)-2-氨基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯。

[0196] 在一个实施方案中,本发明化合物是式I,其中该化合物不是(S)-2-氨基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯。

[0197] 在一实施方案中,本发明化合物不是同位素变体。

[0198] 在一方面中,根据本文描述的任一实施方案的本发明化合物作为游离碱存在。

[0199] 在一方面中,根据本文描述的任一实施方案的本发明化合物是药学上可接受的盐。

[0200] 在一方面中,根据本文描述的任一实施方案的本发明化合物是该化合物的溶剂化物。

[0201] 在一方面中,根据本文描述的任一实施方案的本发明化合物是化合物的药学上可接受的盐的溶剂化物。

[0202] 尽管上文已单独大致列出了每个实施方案的指定基团,但本发明化合物包括其中上述式以及本文存在的其它式中的几个或每个实施方案选自针对每个变量分别指定的特定成员或基团中的一个或多个。因此,本发明意欲包括在其范围内的此类实施方案的所有组合。

[0203] 尽管上文已单独大致列出了每个实施方案的指定基团,但本发明化合物可以是一个或多个变量(例如R基团)选自任何上文列出的式的一个或多个实施方案的化合物。因此,本发明旨在包括在其范围内的任何公开的实施方案的变量的所有组合。

[0204] 或者,本发明还包括自基团或实施方案排除指定变量中的一个或多个或其组合。

[0205] 在某些方面中,本发明提供了上述式的化合物的前药和衍生物。前药是本发明化合物的衍生物,其具有代谢可裂解的基团并且通过溶剂分解或在生理条件下变为在体内具有药物活性的本发明化合物。该实例包括但不限于胆碱酯衍生物等、N-烷基吗啉酯等。

[0206] 本发明化合物的其它衍生物的酸和酸衍生物形式具有活性,但酸敏感形式通常在哺乳动物生物体内提供溶解性、组织相容性或延迟释放的优点(Bundgaard 1985)。前药包括本领域技术人员众所周知的酸衍生物,例如通过使母体酸与适合醇反应制备的酯,或通过使母体酸化合物与取代或未取代的胺反应制备的酰胺,或酸酐或混合酸酐。衍生自连接于本发明化合物上的酸性基团的简单脂族或芳族酯、酰胺和酸酐是优选的前药。在一些情形下,期望制备双酯型前药,例如(酰基氧基)烷基酯或((烷氧基羰基)氧基)烷基酯。特别有用的是本发明化合物的C₁至C₈烷基、C₂-C₈链烯基、芳基、C₇-C₁₂取代的芳基和C₇-C₁₂芳基烷基酯。

[0207] 药物组合物

[0208] 在用作药物时,本发明化合物通常以药物组合物形式施用。该组合物可以以制药领域众所周知的方式制备并且包含至少一种本发明式I的活性化合物。通常,本发明化合物是以药用有效量施用。本发明化合物的实际施用量通常可以由医师根据相关情况来确定,所述的情况包括待治疗的病症、所选施用途径、实际施用的本发明化合物、个体患者的年龄、重量和响应、患者症状的严重程度等。

[0209] 本发明的药物组合物可以通过多种途径包括口服、直肠、经皮、皮下、关节内、静脉内、肌内和鼻内来施用。取决于预期递送途径,将本发明化合物优选配制为可注射或口服组合物或配制为均用于经皮施用的膏剂、洗剂或贴剂。

[0210] 用于口服施用的组合物可以采取散装液体溶液或悬浮液或散装粉末形式。然而,更通常地,该组合物是以单位剂型存在以有利于精确给药。术语‘单位剂型’是指适于作为单一剂量用于人个体和其它哺乳动物的物理离散单位,每个单位含有经计算可产生期望治疗效果的预定量的活性材料以及适合的药用赋形剂、媒介物或载体。典型的单位剂型包括液体组合物的预填充、预测量安瓿或注射器或在固体组合物的情形下包括丸剂、片剂、胶囊剂等。在此类组合物中,本发明的式I化合物通常是次要组分(约0.1重量%至约50重量%或优选约1重量%至约40重量%),并且剩余部分是有助于形成期望剂型的多种媒介物或载体以及加工助剂。

[0211] 适于口服施用的液体形式可以包括具有缓冲剂、助悬剂和分散剂、着色剂、矫味剂等的水性或非水性媒介物。固体形式可以包括例如任何以下成分或具有类似性质的本发明化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂,例如海藻酸、**Primojel**[®]或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或矫味剂,例如薄荷或橙味矫味剂。

[0212] 可注射组合物通常是基于可注射无菌盐水或磷酸盐缓冲盐水或本领域已知的其它可注射载体。如前文所述,此类组合物中的本发明的式I的活性化合物通常是次要组分,

通常为约0.05重量%至10重量%，并且剩余部分是可注射载体等。

[0213] 通常将经皮组合物配制为含有活性成分的局部软膏剂或乳膏剂，该活性成分的量通常在以下范围内：约0.01重量%至约20重量%、优选约0.1重量%至约20重量%、优选约0.1重量%至约10重量%并且更优选约0.5重量%至约15重量%。当配制为软膏剂时，活性成分通常将与石蜡或水可混溶软膏基质组合。可选择的是，可使用例如水包油乳膏剂基质将活性成分配制成乳膏剂。此类经皮制剂是本领域所众所周知的并且通常包括其它成分以增强活性成分或制剂的真皮渗透的稳定性。所有此类已知的经皮制剂和成分均包括在本发明范围内。

[0214] 本发明化合物还可以通过经皮装置施用。因此，经皮施用可以使用储库或孔膜型贴剂或固体基质类贴剂来实现。

[0215] 可口服施用、可注射或局部施用的组合物的上述组分仅具代表性。其它材料以及加工技术等描述于Remington's Pharmaceutical Sciences (第17版, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania) 的第8部分中，该文献并入本文作为参考。

[0216] 本发明化合物还可以以缓释形式或自缓释药物递送系统施用。代表性的缓释材料的描述可参见Remington's Pharmaceutical Sciences。

[0217] 以下制剂实例说明了可以根据本发明制备的代表性药物组合物。然而，本发明并不限于以下药物组合物。

[0218] 制剂1-片剂

[0219] 可以将本发明的式I化合物与干燥明胶粘合剂以约1:2的重量比混合成干燥粉末。可以添加少量硬脂酸镁作为润滑剂。该混合物可以在压片机中形成240-270mg片剂(80-90mg本发明式I的活性化合物/片剂)。

[0220] 制剂2-胶囊剂

[0221] 可以将本发明式I化合物与淀粉稀释剂以约1:1的重量比混合成干燥粉末。该混合物可以填充成250mg胶囊(125mg本发明式I的活性化合物/胶囊)。

[0222] 制剂3-液体

[0223] 可以将本发明式I化合物(125mg)与蔗糖(1.75g)和黄原胶(4mg)混合并且将所得的混合物混合，使其通过10号网目美国筛，然后与先前制备的微晶纤维素和羧甲基纤维素钠(11:89, 50mg)的水溶液混合。可以用水稀释苯甲酸钠(10mg)、矫味剂和着色剂并且在搅拌下添加。然后，在搅拌下添加足够水。然后，可以进一步添加足够水以制备5mL的总体积。

[0224] 制剂4-片剂

[0225] 可以将本发明式I化合物与干燥明胶粘合剂以约1:2的重量比混合成干燥粉末。可以添加少量硬脂酸镁作为润滑剂。该混合物可以在压片机中形成450-900mg片剂(150-300mg本发明式I的活性化合物)。

[0226] 制剂5-注射剂

[0227] 可以将本发明式I化合物在缓冲无菌盐水可注射水性介质中溶解或悬浮至约5mg/mL的浓度。

[0228] 制剂6-局部制剂

[0229] 可以在约75℃将硬脂醇(250g)和白凡士林(250g)熔融，然后可以添加溶解于水(约370g)中的本发明式I化合物(50g)、对羟基苯甲酸甲酯(0.25g)、对羟基苯甲酸丙酯

(0.15g)、月桂基硫酸钠(10g)和丙二醇(120g)的混合物并且可以搅拌所得混合物直至其凝结为止。

[0230] 治疗方法

[0231] 在一个实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于医药中。在特别的实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病。

[0232] 在另外的实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于制备用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的药物。

[0233] 在其它治疗方法方面中,本发明提供了预防和/或治疗患有炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的哺乳动物的方法,该方法包括施用有效量的本文所述的用于治疗或预防所述病症的本发明化合物或者一种或多种药物组合物。

[0234] 在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明化合物和另外的治疗剂的药物组合物。在特别的实施方案中,其它治疗剂是用于预防和/或治疗炎性疾病、自身免疫疾病和/或增殖性疾病的活性剂。

[0235] 在一个实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于预防和/或治疗炎性疾病。在特别的实施方案中,炎性疾病选自类风湿性关节炎、骨关节炎、幼年型特发性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、变态反应性气道疾病(例如,哮喘、鼻炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎性肠病(例如,克罗恩病、溃疡性结肠炎)、内毒素引发的疾病状态(例如,心脏搭桥手术后并发症或促成例如慢性心脏衰竭的慢性内毒素状态)和涉及软骨的相关疾病例如关节的相关疾病。更特别的是,炎性疾病是银屑病或幼年型特发性关节炎。

[0236] 在另外的实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于制备用于预防和/或治疗炎性疾病的药物。在特别的实施方案中,炎性疾病选自类风湿性关节炎、骨关节炎、幼年型特发性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、变态反应性气道疾病(例如,哮喘、鼻炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎性肠病(例如,克罗恩病、溃疡性结肠炎)、内毒素引发的疾病状态(例如,心脏搭桥手术后并发症或促成例如慢性心脏衰竭的慢性内毒素状态)和涉及软骨的相关疾病例如关节的相关疾病。更特别的是,炎性疾病是银屑病或幼年型特发性关节炎。

[0237] 在其它治疗方法方面中,本发明提供了预防和/或治疗患有炎性疾病的哺乳动物的方法,该方法包括施用有效量的本文所述用于治疗或预防该病症的本发明化合物或者一种或多种药物组合物。在特别的实施方案中,炎性疾病选自类风湿性关节炎、骨关节炎、幼年型特发性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、变态反应性气道疾病(例如,哮喘、鼻炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎性肠病(例如,克罗恩病、溃疡性结肠炎)、内毒素引发的疾病状态(例如,心脏搭桥手术后并发症或促成例如慢性心脏衰竭的慢性内毒素状态)和涉及软骨的相关疾病例如关节的相关疾病。更特别的是,炎性疾病是银屑病或幼年型特发性关节炎。

[0238] 在一个实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于预防和/或治疗自身免疫疾病。在特别的实施方案中,自身免疫疾病选自阻塞性气道疾病(包括病症例如COPD、哮喘(例如,内源性哮喘、外源性哮喘、粉尘性哮喘、小儿哮

喘)、特别是慢性或顽固性哮喘(例如,迟发性哮喘和气道高反应性)、支气管炎包括支气管性哮喘、系统性红斑狼疮(SLE)、皮肤红斑狼疮、狼疮肾炎、皮炎、舍格伦综合征、多发性硬化、银屑病、干眼病、I型糖尿病及其相关性并发症、特应性湿疹(特应性皮炎)、甲状腺炎(桥本甲状腺炎和自身免疫甲状腺炎)、接触性皮炎和其它湿疹性皮炎、炎性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)、动脉粥样硬化和肌萎缩性侧索硬化。更特别的是,该自身免疫疾病是系统性红斑狼疮。

[0239] 在另外的实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于制备用于预防和/或治疗自身免疫疾病的药物。在特别的实施方案中,自身免疫疾病选自阻塞性气道疾病包括病症例如COPD、哮喘(例如,内源性哮喘、外源性哮喘、粉尘性哮喘、小儿哮喘)、特别是慢性或顽固性哮喘(例如,迟发性哮喘和气道高反应性)、支气管炎包括支气管性哮喘、系统性红斑狼疮(SLE)、皮肤红斑狼疮、狼疮肾炎、皮炎、舍格伦综合征、多发性硬化、银屑病、干眼病、I型糖尿病及其相关性并发症、特应性湿疹(特应性皮炎)、甲状腺炎(桥本甲状腺炎和自身免疫甲状腺炎)、接触性皮炎和其它湿疹性皮炎、炎性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)、动脉粥样硬化和肌萎缩性侧索硬化。更特别的是,自身免疫疾病是系统性红斑狼疮。

[0240] 在其它治疗方法方面中,本发明提供了预防和/或治疗患有自身免疫疾病的哺乳动物的方法,该方法包括施用有效量的本文所述用于治疗或预防该病症的本发明化合物或者一种或多种药物组合物。在特别的实施方案中,自身免疫疾病选自阻塞性气道疾病包括病症例如COPD、哮喘(例如,内源性哮喘、外源性哮喘、粉尘性哮喘、小儿哮喘)、特别是慢性或顽固性哮喘(例如,迟发性哮喘和气道高反应性)、支气管炎包括支气管性哮喘、系统性红斑狼疮(SLE)、皮肤红斑狼疮、狼疮肾炎、皮炎、舍格伦综合征、多发性硬化、银屑病、干眼病、I型糖尿病及其相关性并发症、特应性湿疹(特应性皮炎)、甲状腺炎(桥本甲状腺炎和自身免疫甲状腺炎)、接触性皮炎和其它湿疹性皮炎、炎性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)、动脉粥样硬化和肌萎缩性侧索硬化。更特别的是,自身免疫疾病是系统性红斑狼疮。

[0241] 在一个实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于预防和/或治疗增殖性疾病。在特别的实施方案中,增殖性疾病选自癌症(例如,子宫平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性障碍(例如,真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和骨髓纤维变性)、白血病(例如,急性骨髓样白血病、急性和慢性淋巴母细胞性白血病)、多发性骨髓瘤、银屑病、再狭窄症、硬皮病或纤维变性。

[0242] 在另外的实施方案中,本发明提供了本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物,其用于制备用于预防和/或治疗增殖性疾病的药物。在特别的实施方案中,增殖性疾病选自癌症(例如,子宫平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性障碍(例如,真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和骨髓纤维变性)、白血病(例如,急性骨髓样白血病、急性和慢性淋巴母细胞性白血病)、多发性骨髓瘤、银屑病、再狭窄症、硬皮病或纤维变性。

[0243] 在其它治疗方法方面中,本发明提供了预防和/或治疗患有增殖性疾病的哺乳动物的方法,该方法包括施用治疗有效量的本文所述用于治疗或预防该病症的本发明化合物或者一种或多种药物组合物。在特别的实施方案中,增殖性疾病选自癌症(例如,子宫平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性障碍(例如,真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和骨髓纤维变性)、白血病(例如,急性骨髓样白血病、急性和慢性淋巴母细胞性白血病)、多发性

骨髓瘤、银屑病、再狭窄症、硬皮病或纤维变性。

[0244] 注射剂量水平范围为约0.1mg/kg/h至至少10mg/kg/h,其均是施用约1小时至约120小时,并且特别是24小时至96小时。还可施用约0.1mg/kg至约10mg/kg或更高剂量的预填充推注以实现适当稳态水平。对于40kg至80kg的人患者而言,预期最大总剂量不超过约1g/天。

[0245] 为了预防和/或治疗长期病症(例如退化性病症),治疗方案通常延长至数月或数年,因此口服给药对于患者具有便利性和耐受性是优选的。对于口服给药,一至四(1-4)次常规剂量/天、特别是一至三(1-3)次常规剂量/天、通常一至二(1-2)次常规剂量/天并且最通常一(1)次常规剂量/天是代表性方案。可选择的是,对于长效药物,对于口服给药,每隔一周一次、每周一次和每天一次是代表性方案。特别的是,剂量方案可以是每1至14天一次,更特别的是每1至10天一次,甚至更特别的是每1至7天一次并且最特别的是每1至3天一次。

[0246] 使用这些给药形式,每个剂量提供了约1mg至约1000mg本发明化合物,特别剂量各自提供约10mg至约500mg并且特别是约30mg至约250mg。

[0247] 通常选择经皮剂量以提供类似于或低于使用注射剂量实现的血液水平。

[0248] 当用于预防病症发作时,通常可以根据建议和/或在医师监督下,以上述剂量水平给具有发生该病症的风险的患者施用本发明化合物。具有发生特定病症的风险的患者通常包括具有该病症的家族病史者或已经通过基因试验或筛选确定特别易于发生该病症者。

[0249] 本发明化合物可以作为单一活性剂施用或其可以与其它治疗剂组合施用,所述其它治疗剂包括显示相同或类似治疗活性的本发明的其它化合物和已经确定安全有效地进行该组合施用的本发明的其它化合物。在特别的实施方案中,两种(或更多种)活性剂的共施用使得可显著降低待使用的每种活性剂的剂量,从而减少所观察到的副作用。

[0250] 在一个实施方案中,施用本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物作为药物。在特别的实施方案中,所述药物组合物另外包含其它活性成分。

[0251] 在一个实施方案中,将本发明化合物与另外的治疗剂共施用用于治疗 and/或预防涉及炎症的疾病,特别的活性剂包括但不限于免疫调节剂例如,硫唑嘌呤(azathioprine)、皮质类固醇(例如,泼尼松龙(prednisolone)或地塞米松(dexamethasone))、环磷酰胺(cyclophosphamide)、环孢素A(cyclosporin A)、他克莫司(tacrolimus)、吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil)、莫罗单抗-CD3(muromonab-CD3)(OKT3,例如**Orthocolone®**)、ATG、阿司匹林(aspirin)、乙酰氨基酚、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)和吡罗西康(piroxicam)。

[0252] 在一个实施方案中,将本发明化合物与另外的治疗剂共施用用于治疗 and/或预防关节炎(例如,类风湿性关节炎);特别的活性剂包括但不限于镇痛药、非类固醇抗炎药(NSAID)、类固醇、合成DMARD(例如但不限于甲氨蝶呤(methotrexate)、来氟米特(leflunomide)、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、金诺芬(auranofin)、金硫丁二钠(sodium aurothiomalate)、青霉胺(penicillamine)、氯喹、羟基氯喹、硫唑嘌呤、托法替尼(tofacitinib)、巴西替尼(baricitinib)、福他替尼(fostamatinib)和环孢素)和生物DMARD(例如但不限于英夫利昔单抗(infliximab)、依那西普、阿达木单抗(adalimumab)、利妥昔单抗(rituximab)和阿巴他塞(abatacept))。

[0253] 在一个实施方案中,将本发明化合物与另外的治疗剂共施用用于治疗 and/或预防

增生性障碍；特别的活性剂包括但不限于：尼特达尼(nintedanib)、吡非尼酮(pirfenidone)、甲氨蝶呤、甲酰四氢叶酸(leukovorin)、亚德里亚霉素(adriamycin)、泼尼松(prednisone)、博来霉素(bleomycin)、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、长春瑞滨(vinorelbine)、多柔比星(doxorubicin)、他莫昔芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、阿那曲唑(anastrozole)、戈舍瑞林(goserelin)、抗HER2单克隆抗体(例如, HerceptinTM)、卡培他滨(capecitabine)、盐酸雷洛昔芬(raloxifene hydrochloride)、EGFR抑制剂(例如 **Iressa**®、TarcevaTM、ErbixTM)、VEGF抑制剂(例如, AvastinTM)、蛋白酶体抑制剂(例如, VelcadeTM)、**Glivec**®和hsp90抑制剂(例如, 17-AAG)。另外, 可以将本发明式I化合物与其它疗法包括但不限于放射疗法或外科手术组合施用。在特别的实施方案中, 增生性障碍选自纤维变性、癌症、骨髓增生性障碍或白血病。

[0254] 在一个实施方案中, 将本发明化合物与另外的治疗剂共施用用于治疗和/或预防自身免疫疾病, 特别的活性剂包括但不限于：糖皮质激素、细胞生长抑制剂(例如嘌呤类似物)、烷化剂(例如, 氮芥(环磷酰胺)、亚硝基脲、铂配位复合物)、抗代谢药(例如, 甲氨蝶呤、巯唑嘌呤和巯基嘌呤)、细胞毒性抗生素(例如, 放线菌素D(dactinomycin)、蒽环类(anthracyclines)、丝裂霉素C(mitomycin C)、博来霉素和光辉霉素(mithramycin))、抗体(例如, 抗CD20、抗CD25或抗CD3(OTK3)单克隆抗体、**Atgam**®和**Thymoglobuline**®)、环孢素、他克莫司、雷帕霉素(rapamycin)(西罗莫司(sirosimus))、干扰素(例如, IFN- β)、TNF结合蛋白(例如, 英夫利昔单抗、依那昔普或阿达木单抗)、麦考酚酯、芬戈莫德(fingolimod)和多球菌壳素(myriocin)。

[0255] 在一个实施方案中, 将本发明化合物与另外的治疗剂一起共施用用于治疗和/或预防哮喘和/或鼻炎和/或COPD, 特别的活性剂包括但不限于： β 2-肾上腺素受体激动剂(例如, 沙丁胺醇(salbutamol)、左旋沙丁胺醇(levsalbuterol)、特布他林(terbutaline)和比托特罗(bitolterol))、肾上腺素(吸入的或片剂)、抗胆碱剂(例如, 异丙托溴铵(ipratropium bromide))和糖皮质激素(口服或吸入的)。长效 β 2-激动剂(例如, 沙美特罗(salmeterol)、福莫特罗(formoterol)、班布特罗(bambuterol)和缓释口服沙丁胺醇)、吸入的类固醇和长效支气管扩张剂的组合(例如, 氟替卡松(fluticasone)/沙美特罗、布地奈德(budesonide)/福莫特罗)、白三烯拮抗剂和合成抑制剂(例如, 孟鲁司特(montelukast)、扎鲁司特(zafirlukast)和齐留通(zileuton))、介质释放的抑制剂(例如, 色甘酸盐和酮替芬(ketotifen))、IgE响应的生物调节剂(例如, 奥马佐单抗(omalizumab))、抗组胺药(例如, 西替利嗪(cetirizine)、桂利嗪(cinnarizine)、非索非那定(fexofenadine))和血管收缩剂(例如, 羟甲唑啉(oxymetazoline)、赛洛唑啉(xylometazoline)、萘甲唑啉(naphazoline)和曲马唑啉(tramazoline))。

[0256] 另外, 可以将本发明化合物与紧急疗法组合施用用于哮喘和/或COPD, 此类疗法包括氧或氮氧混合气(heliox)施用、雾化沙丁胺醇或特布他林(任选与抗胆碱剂(例如, 异丙托铵(ipratropium))组合)、全身性类固醇(口服或静脉内, 例如, 泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼松龙、地塞米松或氢化可的松)、静脉内沙丁胺醇、非特异性 β -激动剂(注射或吸入, 例如, 肾

上腺素、异他林(isoetarine)、异丙肾上腺素、奥西那林(metaproterenol)、抗胆碱剂(IV或雾化,例如,格隆溴铵(glycopyrrolate)、阿托品(atropine)、异丙托铵)、甲基黄嘌呤(茶碱、胺茶碱、苄胺茶碱)、具有支气管扩张效应的吸入麻醉剂(例如,异氟烷、氟烷(halothane)、恩氟烷(enflurane))、氯胺酮(ketamine)和静脉内硫酸镁。

[0257] 在一个实施方案中,将本发明化合物与另外的治疗剂共施用用于治疗和/或预防炎症肠病(IBD),特别的活性剂包括但不限于:改善疾病的合成糖皮质激素(例如,泼尼松、布地奈德)、免疫调节剂(例如,甲氨蝶呤、来氟米特、柳氮磺吡啶、美沙拉嗪(mesalazine)、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤和环孢素)和改善疾病的生物制剂、免疫调节剂(英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗(certolizumab)、依曲珠单抗(etrolizumab)、维多珠单抗(vedolizumab)、优特克单抗(ustekinumab)、利妥昔单抗和阿巴他赛)。

[0258] 在一个实施方案中,将本发明化合物与另外的治疗剂一起共施用用于治疗和/或预防SLE,特别的活性剂包括但不限于:人单克隆抗体(贝利木单抗(belimumab) (**Benlysta**[®]))、疾病改善抗风湿药(DMARD),例如抗疟疾药(例如,**Plaquenil**[®]、羟基氯喹)、免疫抑制剂(例如,甲氨蝶呤和硫唑嘌呤)、环磷酰胺和霉酚酸、免疫抑制药和镇痛药,例如非类固醇抗炎药物、阿片剂(opiate)(例如,右丙氧芬(dextropropoxyphene)和复方可待因及扑热息痛(co-codamol))、类阿片(例如,氢可酮(hydrocodone)、羟可酮(oxycodone)、MS **Contin**[®]或美沙酮(methadone)) 和 **Duragesic**[®] 芬太尼透皮贴剂(**Duragesic**[®] fentanyl transdermal patch)。

[0259] 在一个实施方案中,将本发明化合物与另一治疗剂一起共施用用于治疗和/或预防银屑病,特别的活性剂包括但不限于:局部治疗剂,例如含有煤焦油、二羟基蒽酚(dithranol)(地蒽酚(anthralin))、皮质类固醇(例如去羟米松(desoximetasone)(Topicort[™]))、乙酸氟轻松(fluocinonide)、维生素D3类似物(例如,卡泊三醇(calcipotriol))、阿甘油(argan oil)和类视色素(阿维a酯(etretinate)、维生素A酸(acitretin)、他扎罗汀(tazarotene))的浴溶液、湿润剂、药用乳膏剂和软膏剂,全身性治疗剂,例如甲氨蝶呤、环孢素、类视色素、硫鸟嘌呤、羟基脲、柳氮磺吡啶、吗替麦考酚酯、硫唑嘌呤、他克莫司、富马酸酯或生物制剂,例如Amevive[™]、Enbrel[™]、Humira[™]、Remicade[™]、Raptiva[™]和优特克单抗(IL-12和IL-23阻断剂)。另外,可以将本发明化合物与其它疗法组合施用,所述疗法包括但不限于光疗法或光化学疗法(例如,补骨脂素和紫外线A光疗法(PUVA))。

[0260] 在一个实施方案中,将本发明化合物与另外的治疗剂共施用用于治疗和/或预防变态反应,特别的活性剂包括但不限于:抗组胺药(例如西替利嗪、苯海拉明(diphenhydramine)、非索非那定、左西替利嗪(levocetirizine))、糖皮质激素(例如泼尼松、倍他米松(betamethasone)、倍氯米松(beclomethasone)、地塞米松)、肾上腺素、茶碱或抗白三烯(例如孟鲁斯特(montelukast)或扎鲁斯特(zafirlukast))、抗胆碱剂和减充血剂。

[0261] 本领域技术人员应清楚,给患者递送两种或更多种治疗剂的任何方式可以包括共施用作为同一治疗方案的一部分。尽管可以单一制剂(即作为单一药物组合物)同时施用两种或更多种活性剂,但此并非必需。该活性剂可以以不同制剂在不同时间施用。

[0262] 化学合成程序**[0263] 概述**

[0264] 本发明化合物可以使用以下一般方法和程序自容易获得的起始材料制备。应了解, 尽管给出典型或优选的制备条件(即反应温度、时间、反应物的摩尔比、溶剂、压力等), 但除非另有说明, 否则还可使用其它制备条件。最佳反应条件可以随所用的特别的反应物或溶剂而变化, 但该条件可以由本领域技术人员通过常规优化程序来确定。

[0265] 另外, 如本领域技术人员所了解, 可能需要常用保护基来防止某些官能团发生不期望的反应。用于特别官能团的适合保护基以及用于保护和脱保护的适合条件的选择是本领域众所周知的。例如, T.W.Greene和P.G.M.Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Blackwell; 第4修订版(2006)和其中所引用的参考文献(Wuts&Greene 2006)中描述了众多保护基及其引入和去除。

[0266] 提供以下方法的细节以制备如上文所定义的本发明化合物和比较实施例。本发明化合物可以由有机合成领域技术人员自己知或市售起始材料和反应物来制备。

[0267] 除非另有说明, 否则所有试剂均是商品级并且未经进一步纯化按照接受时的状态使用。使用市售无水溶剂在惰性气氛下进行反应。除非另有说明, 否则在所有其它情形下均使用试剂级溶剂。在硅胶标准品(30 μ m至70 μ m)上进行柱色谱。使用经预涂覆的硅胶60F-254板(厚度为0.25mm)进行薄层色谱。¹H NMR光谱在400MHz Bruker Avance光谱仪或300MHz Bruker Avance DPX光谱仪上记录。¹H NMR光谱的化学位移(δ)是相对于作为内标的四甲基硅烷(δ 0.00)或适当残留溶剂峰以百万份数(ppm)来报告。多重性是以单峰(s)、双峰(d)、三重峰(t)、四重峰(q)、五重峰(quin)、多重峰(m)和宽峰(br)给出。电喷雾MS光谱在Waters platform LC/MS光谱仪上或利用具有Waters Acquity PDA检测器和SQD质谱仪的Waters Acquity UPLC获得。所用柱: UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 5mm VanGuard预柱和Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 30mm柱或Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 50mm柱。所有方法均使用MeCN/H₂O梯度。MeCN和H₂O含有0.1%甲酸或0.05%NH₃。制备型LCMS: 所用柱, Waters XBridge Prep C18 5 μ m ODB 30 $\times$ 100mm(制备型柱)和Waters XBridge C18 5 μ m, 4.6mm $\times$ 100mm(分析柱)。所有方法均使用MeCN/H₂O梯度。MeCN和H₂O含有0.1%甲酸或0.1%二乙胺。

[0268] 表I. 试验部分中所使用的缩写的列表。

[0269]

AcOH	乙酸
APMA	乙酸 4-氨基苯基汞
aq.	水性
atm	大气压

[0270]

BINAP	(+/-)-2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘
Boc	叔丁氧基-羰基
br	宽峰信号
BSA	牛血清白蛋白
Calc	计算值
Cpd	化合物
d	双峰
δ	化学位移
DCM	二氯甲烷
dd	双双峰
DIPEA	二异丙基乙基胺
DMAP	二甲基氨基吡啶
DMF	二甲基甲酰胺
DMSO	二甲亚砜
dt	双三重峰
DTT	二硫苏糖醇
EDCI	N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐
EDTA	乙二胺四乙酸
eq.	当量
ES-	电喷雾负性
ES+	电喷雾正性
Et₂O	乙醚
EtOAc	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
g	克
h	小时
HPLC	高效液相色谱
Hz	赫兹

[0271]

Int	中间体
iPrOH	异丙醇
LiOMe	甲醇锂
LiOtBu	叔丁醇锂
m	多重峰
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
mg	毫克
MgOAc	乙酸镁
MHz	兆赫兹
min	分钟
mL	毫升
mmol	毫摩尔
mol	摩尔
MOPS	3-(N-吗啉代)丙磺酸
MS	质谱
MW	分子量
N	当量浓度
NaBH(OAc) ₃	三乙酰氧基硼氢化钠
NaOtBu	叔丁醇钠
NBS	N-溴琥珀酰亚胺
NMR	核磁共振
Obsvd	观察值
PBS	磷酸盐缓冲盐水
PBST	具有 Tween 20 的磷酸盐缓冲盐水
Pd(OAc) ₂	二乙酸钯
Pd/C	钯炭
ppm	百万分率

[0272]

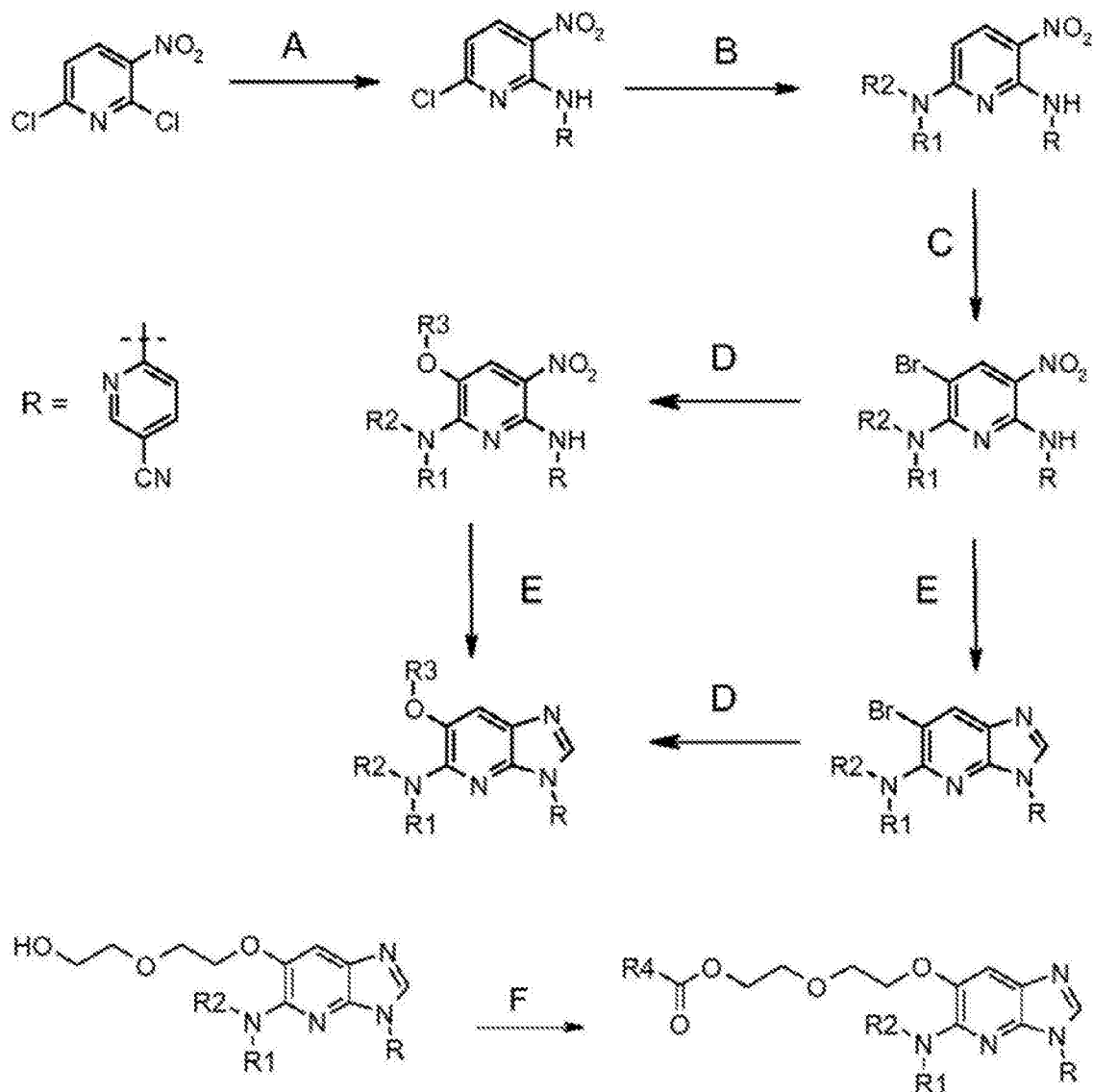
q	四重峰
qd	四双峰
quin	五重峰
r.t.	室温
s	单峰
sat.	饱和
SEM	平均值标准误差
t	三重峰
td	三双峰
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃
UPLC	超高效液相色谱

[0273] 本发明化合物的合成制备

[0274] 实施例1.一般合成方法

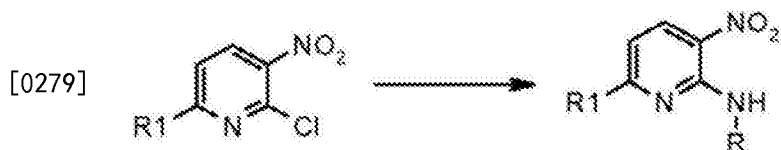
[0275] 1.1.合成方法概述

[0276]



[0277] 1.2.一般方法

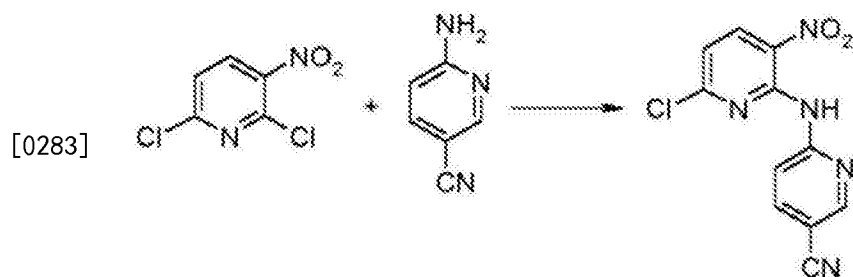
[0278] 1.2.1.一般方法A



[0280] 向NaH (2当量, 60%于矿物油中) 于在0℃冷却的干燥THF中的溶液中添加相应的6-氨基-烟腈 (1.1至1.2当量)。30分钟后, 在0℃, 添加2-氯-3-硝基吡啶 (1当量) 并且在室温搅拌反应物并且通过UPLC-MS监测。如果反应未完成, 则在0℃再次冷却反应物, 并且添加更多NaH, 然后添加更多胺。将反应混合物倾倒入冰水中并且搅拌2小时。过滤出沉淀物, 用H₂O洗涤, 并且在真空下风干, 得到期望的化合物。

[0281] 一般方法A的说明性合成:

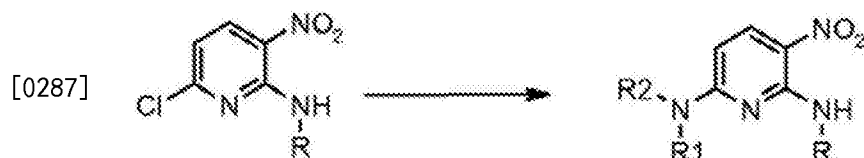
[0282] 6-(6-氯-3-硝基-吡啶-2-基氨基)-烟腈 (中间体1)



[0284] 向NaH(2.07g, 51.81mmol, 2当量, 60%于矿物油中)于在0℃冷却的干燥THF(50mL)中的溶液中添加6-氨基-烟腈(3.4g, 28.5mmol, 1.1当量)。30分钟后, 在0℃, 添加2,6-二氯-3-硝基-吡啶(5g, 25.91mmol, 1当量)并且将反应物在室温搅拌16小时。使反应物冷却至0℃, 添加NaH(0.5g, 13mmol, 0.5当量)并且将反应物在0℃搅拌1小时, 然后在室温搅拌2小时。将反应混合物倾倒入冰水中并且搅拌2小时。过滤出沉淀物, 用H₂O洗涤, 并且在真空下风干。将所获得固体溶于MeCN(75mL)中, 在室温搅拌1小时30分钟并且在0℃搅拌1小时。然后将其过滤并且用MeOH洗涤, 得到期望的化合物。

[0285] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ10.81(1H, br s), 8.73(1H, dd), 8.61(1H, d), 8.31(1H, dd), 8.01(1H, dd), 7.36(1H, d)。

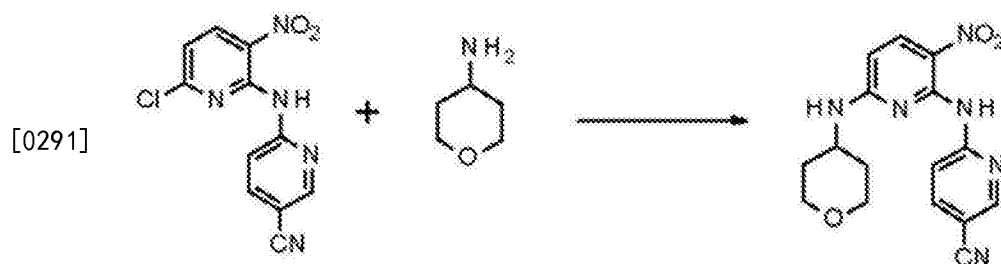
[0286] 1.2.2.一般方法B



[0288] 向于DMSO中的6-氯-3-硝基-吡啶-2-基氨基衍生物(1当量)中添加相应的胺(1.1当量)和DIPEA(2当量), 然后在110-130℃微波处理反应混合物, 直至完成反应为止。用H₂O稀释混合物, 过滤出沉淀物并且在真空下风干, 得到期望的化合物。

[0289] 一般方法B的说明性合成:

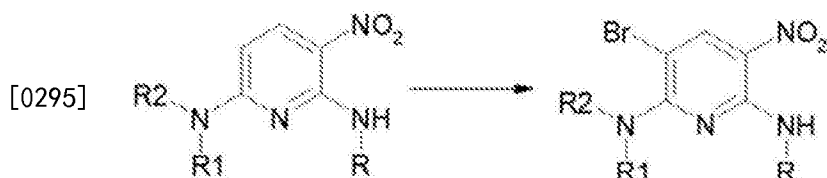
[0290] 6-[3-硝基-6-(四氢-吡喃-4-基氨基)-吡啶-2-基氨基]-烟腈(中间体8)



[0292] 向于DMSO(20mL)中的6-(6-氯-3-硝基-吡啶-2-基氨基)-烟腈(中间体1, 4g, 14.51mmol, 1当量)中添加四氢-吡喃-4-基胺(1.65mL, 15.96mmol, 1.1当量)和DIPEA(5.05mL, 29.02mmol, 2当量), 然后将反应混合物在130℃微波处理20分钟。用H₂O和Et₂O稀释混合物, 过滤出沉淀物并且在真空下风干, 得到期望的化合物。

[0293] ¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ11.38(1H, s), 8.78(1H, d), 8.47-8.63(2H, m), 8.39(1H, dd), 8.17(1H, d), 6.27(1H, d), 3.98-4.12(1H, m), 3.91(2H, d), 3.52(2H, t), 1.94(2H, d), 1.33-1.67(2H, m)。

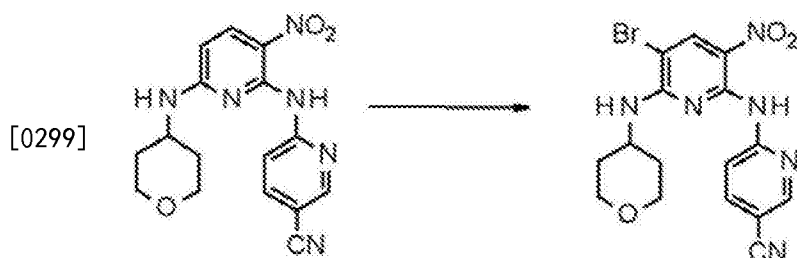
[0294] 1.2.3.一般方法C



[0296] 将NBS (1.1至2当量)添加至3-硝基-吡啶-2,6-二氨基衍生物 (1当量) 于干燥MeCN中的溶液中,在室温搅拌反应物并且通过UPLC-MS监测。若未达到完全完成,则添加额外NBS直至没有剩余起始材料为止。过滤出所形成的沉淀物,用Et₂O洗涤并且在真空下风干,得到期望的化合物。

[0297] 一般方法C的说明性合成:

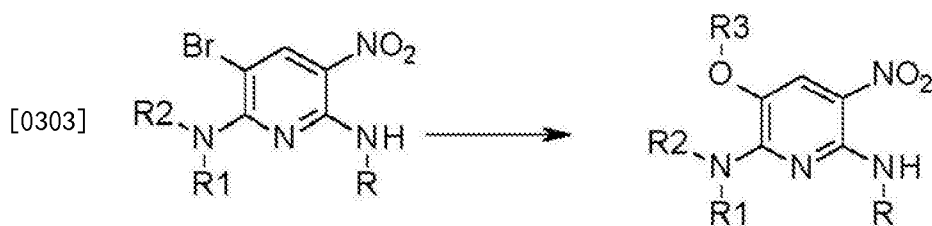
[0298] 6-[5-溴-3-硝基-6-(四氢-吡喃-4-基氨基)-吡啶-2-基氨基]-烟腈 (中间体11)



[0300] 将NBS (2.04g, 11.46mmol, 1.3当量)添加至6-[3-硝基-6-(四氢-吡喃-4-基氨基)-吡啶-2-基氨基]-烟腈 (中间体8, 3g, 8.81mmol, 1当量) 于干燥MeCN (150mL) 中的溶液中并且将反应物在室温搅拌4小时。添加NBS (0.31g, 1.76mmol, 0.2当量) 并且将反应物在室温搅拌另外的16小时。过滤出所形成的沉淀物,用Et₂O洗涤并且在真空下风干,得到期望的化合物。

[0301] ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 11.10 (1H, br s), 8.80 (1H, m), 8.34-8.50 (3H, m), 7.72 (1H, d), 4.05-4.25 (1H, m), 3.93 (2H, m), 3.38-3.55 (2H, m), 1.70-1.87 (4H, m)。

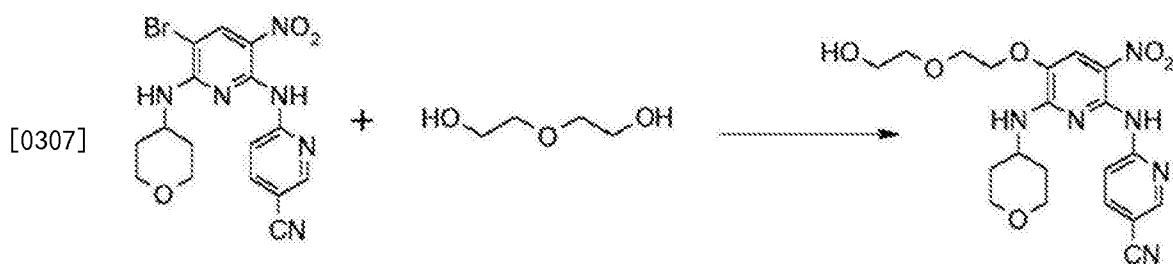
[0302] 1.2.4.一般方法D



[0304] 向相应醇 (5当量) 于干燥1,4-二噁烷中或于用作溶剂的相应醇中的溶液中分批添加LiOtBu (3当量)。然后添加2-氨基-3-溴吡啶衍生物 (1当量), 然后添加CuI (0.6当量)。于微波辐射下将反应物加热至80-120℃, 或处于110-150℃, 直至完成反应为止。将混合物倾倒入冰水中或添加1N HCl水溶液。过滤出沉淀物并且在真空下风干。然后通过硅胶上进行快速色谱纯化残留物, 得到期望的化合物。

[0305] 一般方法D的说明性合成:

[0306] 6-[5-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-3-硝基-6-(四氢-吡喃-4-基氨基)-吡啶-2-基氨基]-烟腈 (中间体19)

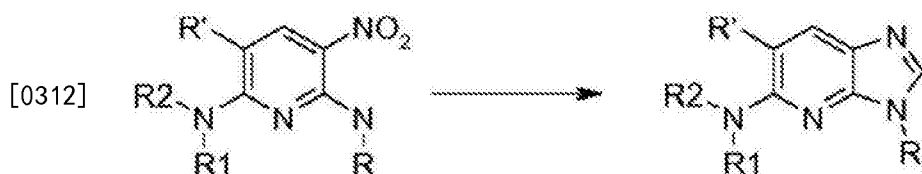


[0308] 将LiOtBu (2.87g, 35.8mmol, 3当量) 分批添加至2-(2-羟基-乙氧基)-乙醇 (5.7mL, 59.7mmol, 5当量) 于干燥1,4-二噁烷 (50mL) 中的溶液中。添加6-[5-溴-3-硝基-6-(四氢-吡喃-4-基氨基)-吡啶-2-基氨基]-烟腈 (中间体11, 5.0g, 11.9mmol, 1当量), 然后添加CuI (1.36g, 7.2mmol, 0.6当量)。然后将反应物加热至120℃达4小时。使混合物冷却至0℃, 添加1N HCl水溶液 (50mL) 并且将所得混合物在室温搅拌20分钟。过滤沉淀物并且在真空下干燥。然后通过硅胶上进行快速色谱 (用在DCM中的0至5% MeOH洗脱) 纯化残留物, 得到期望的化合物。

[0309] MW (计算值): 444.45; MW (观察值): 445.18ES+。

[0310] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 11.42 (1H, s), 8.75-8.79 (1H, m), 8.47-8.50 (1H, m), 8.38 (1H, dd), 7.87 (1H, d), 7.69 (1H, s), 4.58-4.72 (1H, m), 4.21-4.26 (2H, m), 4.11-4.21 (1H, m), 3.94 (2H, dd), 3.82 (2H, dd), 3.44-3.57 (6H, m), 1.81-1.90 (2H, m), 1.74 (2H, qd)。

[0311] 1.2.5.一般方法E



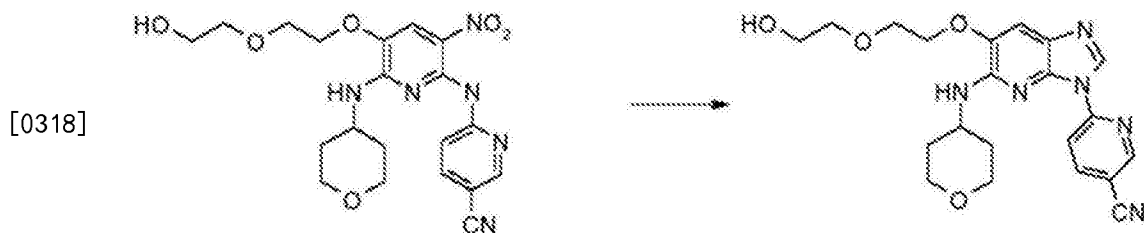
[0313] 向2,6-二氨基-5-硝基-吡啶衍生物 (1当量) 于干燥MeOH中的溶液中添加原甲酸三甲酯 (约0.1mL对于0.1mmol 2,6-二氨基-5-硝基-吡啶衍生物) 和甲酸 (约0.1mL对于0.1mmol 2,6-二氨基-5-硝基-吡啶衍生物)。然后添加NH₄Cl (4当量) 和Zn (4至5当量) 并且将混合物加热至70℃, 直至完成反应为止。然后使反应混合物冷却至室温。

[0314] 若在冷却后观察到沉淀, 则过滤固体并且用DCM/CHCl₃和2%甲酸水溶液使其进行水性后处理, 得到期望的化合物。

[0315] 若在冷却后未发生沉淀, 则蒸发溶剂, 然后通过硅胶上进行快速色谱纯化残留物, 得到期望的化合物。

[0316] 一般方法E的说明性合成:

[0317] 6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈 (化合物1)



[0319] 向6-[5-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-3-硝基-6-(四氢-吡喃-4-基氨基)-吡啶-

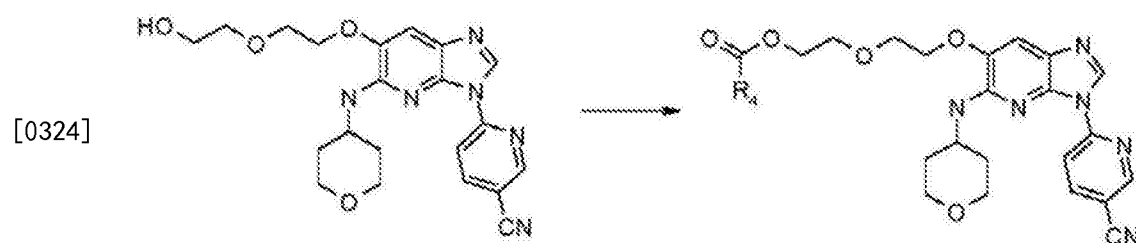
2-基氨基]-烟腈(中间体19, 2.3g, 5.2mmol, 1当量)于干燥MeOH (60mL) 中的溶液中添加原甲酸三甲酯(10mL) 和甲酸(10mL)。然后添加NH₄Cl (1.1g, 20.7mmol, 4当量) 和Zn (1.4g, 20.7mmol, 4当量) 并且将混合物加热至回流达2小时。添加MeOH (30mL) 并且将反应混合物加热至回流达1小时。

[0320] 使混合物冷却至室温, 过滤所形成的沉淀物并且在真空下干燥。添加MeOH (100mL) 和甲酸(2mL) 并且将所得混合物在回流下搅拌1小时。使混合物冷却至室温, 将其倾倒入冰水中并且过滤所形成的沉淀物并且在真空下干燥。将固体悬浮于DCM和CHCl₃的混合物中, 通过硅藻土过滤并且用2%甲酸水溶液洗涤滤液。将有机相经Na₂SO₄干燥, 过滤并且浓缩至干燥, 得到期望的化合物。

[0321] MW (计算值): 424.46; MW (观察值): 425.40ES+

[0322] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ9.00 (1H, dd), 8.89-8.95 (1H, m), 8.75 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.59 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.61-4.69 (1H, m), 4.22 (2H, dd), 4.05-4.17 (1H, m), 3.90-3.98 (2H, m), 3.83 (2H, dd), 3.50-3.60 (6H, m), 1.99 (2H, m), 1.55-1.70 (2H, m)。

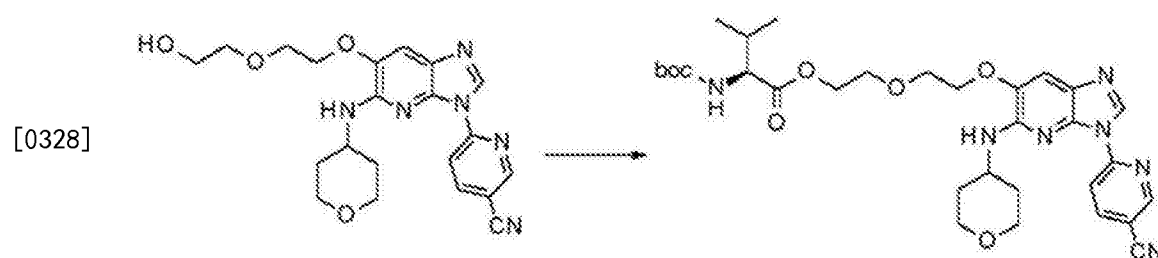
[0323] 1.2.6. 一般方法F



[0325] 在室温在DCM中搅拌化合物1、相应的羧酸(1.5当量)、DMAP (1.5当量) 和EDCI (2.25当量) 的混合物, 直至完成反应为止。用H₂O猝灭反应物, 用DCM萃取, 然后将有机层经MgSO₄干燥并且蒸发至干燥。通过在硅胶上进行快速色谱纯化残留物, 得到期望的化合物。

[0326] 一般方法F的说明性合成:

[0327] (S)-2-叔丁氧基羰基氨基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯(中间体30)



[0329] 将化合物1 (42mg, 0.1mmol, 1当量)、boc-(S)-缬氨酸 (33mg, 0.15mmol, 1.5当量)、DMAP (19mg, 0.15mmol, 1.5当量) 和EDCI (45mg, 0.225mmol, 2.25当量) 的混合物在室温在DCM (5mL) 中搅拌3小时。用H₂O猝灭反应物, 用DCM萃取, 然后将有机层经MgSO₄干燥并且蒸发至干燥。通过在硅胶上进行快速色谱(用在庚烷中的0至100%EtOAc洗脱) 纯化残留物, 得到期望的化合物。

[0330] 1.2.7. 一般方法G: 成盐方法

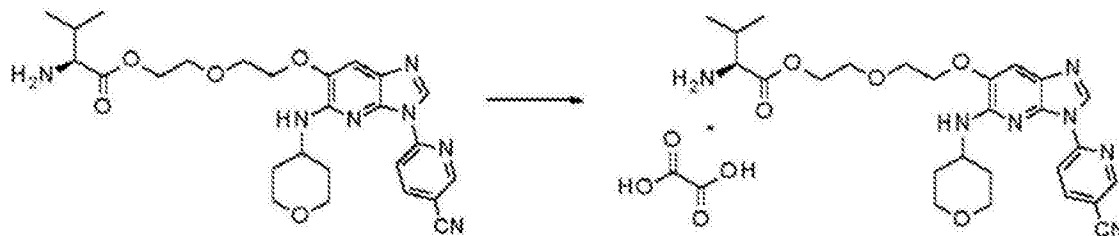
[0331] 将起始材料溶解于热EtOAc或EtOAc和MeOH (5/1) 的热混合物中。将草酸(0.2M于EtOAc中, 1当量) 添加至热溶液中。形成沉淀物, 过滤该沉淀物, 用Et₂O冲洗并且干燥, 得到

期望的化合物,为起始材料的草酸盐。

[0332] 一般方法G的说明性合成:

[0333] (S)-2-氨基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯草酸盐(化合物10)

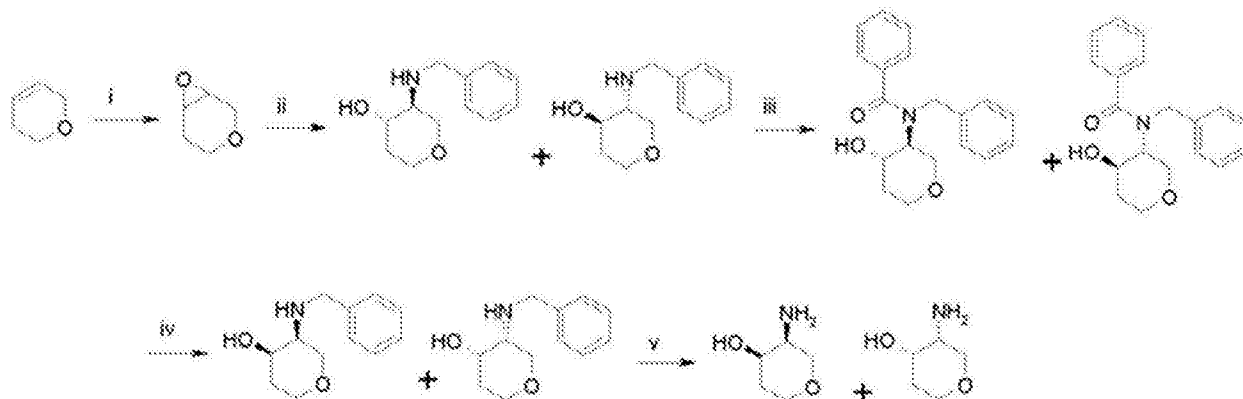
[0334]



[0335] 将化合物9(100mg,0.19mmol,1当量)溶于热EtOAc(10mL)中并且将草酸(0.2M于EtOAc中,0.96mL,0.19mmol,1当量)添加至该热溶液中。过滤所形成的沉淀物,用Et₂O冲洗并且干燥,得到期望的化合物。

[0336] 1.2.8.(3,4顺式)-3-氨基-四氢-吡喃-4-醇(中间体28)的合成

[0337]



[0338] 步骤i):3,7-二氧杂-二环[4.1.0]庚烷

[0339] 向间氯过苯甲酸(23.51g,136.2mmol,2当量)于DCM(15mL)中的溶液中添加3,6-二氢-2H-吡喃(5.73g,68.1mmol,1当量)于DCM(10mL)中的溶液。将反应混合物在室温搅拌6小时,此后添加间氯过苯甲酸(11.76g,68.1mmol,1当量)。将反应混合物在室温搅拌16小时并且将其过滤出。用Na₂SO₃、NaHCO₃和水的饱和溶液洗涤滤液。然后将有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并且在真空中浓缩,得到期望的化合物,其未经进一步纯化即用于下一步骤中。

[0340] 步骤ii):(3,4反式)-3-苄基氨基-四氢-吡喃-4-醇

[0341] 将3,7-二氧杂-二环[4.1.0]庚烷(2.7mmol,1当量)和苄基胺(300μL,2.7mmol,1当量)于EtOH(10mL)中的混合物在回流温度加热18小时。然后蒸发EtOH并且通过在硅胶上进行柱色谱(用DCM:MeOH:NH₄OH10:1:0.1洗脱)纯化粗品,得到期望的化合物。

[0342] 步骤iii):N-苄基-N-((3,4反式)-4-羟基-四氢-吡喃-3-基)-苯甲酰胺

[0343] 将苯甲酰氯(78μL,0.68mmol,1当量)逐滴添加至来自先前步骤的(3,4anti)-3-苄基氨基-四氢-吡喃-4-醇(140mg,0.68mmol,1当量)和TEA(280μL,2.03mmol,3当量)于DCM(2mL)中的冰冷却溶液中。将反应混合物在室温搅拌1小时。然后用2N HCl水溶液将混合物洗涤两次。用DCM萃取水层,然后将合并的有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并且在真空中浓缩,得

到期望的化合物。

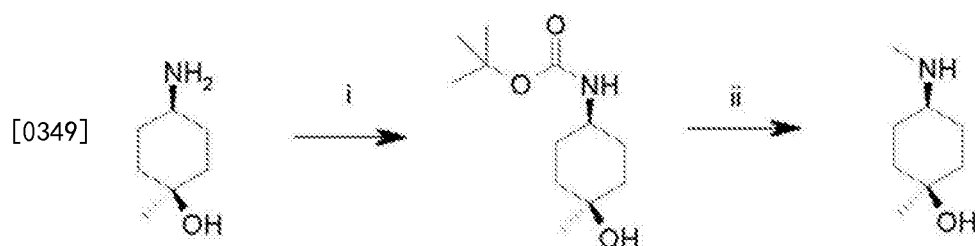
[0344] 步骤iv): (3,4顺式)-3-苄基氨基-四氢-吡喃-4-醇

[0345] 在0℃,将N-苄基-N-((3,4反式)-4-羟基-四氢-吡喃-3-基)-苯甲酰胺(220mg, 0.71mmol, 1当量)于DCM(2.5mL)中的溶液逐滴添加至亚硫酸氯(195μL, 2.68mmol, 3.8当量)中。将反应混合物在室温搅拌4小时,然后在真空中浓缩。向残留物中添加6N HCl水溶液(2mL),并且将所得混合物在回流温度加热18小时。冷却后,过滤出沉淀物,用水洗涤,并且用EtOAc萃取滤液。向水层中添加Et₂O并且添加2N NaOH水溶液以使该混合物为碱性。分离各相并且用DCM和EtOAc萃取水相。然后将合并的有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并且在真空中浓缩,得到期望的化合物。

[0346] 步骤v): (3,4顺式)-3-氨基-四氢-吡喃-4-醇

[0347] 将(3,4顺式)-3-苄基氨基-四氢-吡喃-4-醇(100mg, 0.48mmol, 1当量)于MeOH(3mL)中的溶液在室温和1atm的H₂下在10%Pd/C(40mg)上氢化1.5小时。通过硅藻土过滤来去除催化剂,用MeOH洗涤并且蒸发滤液,得到期望的化合物。

[0348] 1.2.9. (顺式-1,4)-1-甲基-4-甲基氨基-环己醇(中间体29)的合成



[0350] 步骤i): (顺式-1,4)-(4-羟基-4-甲基-环己基)-氨基甲酸叔丁基酯

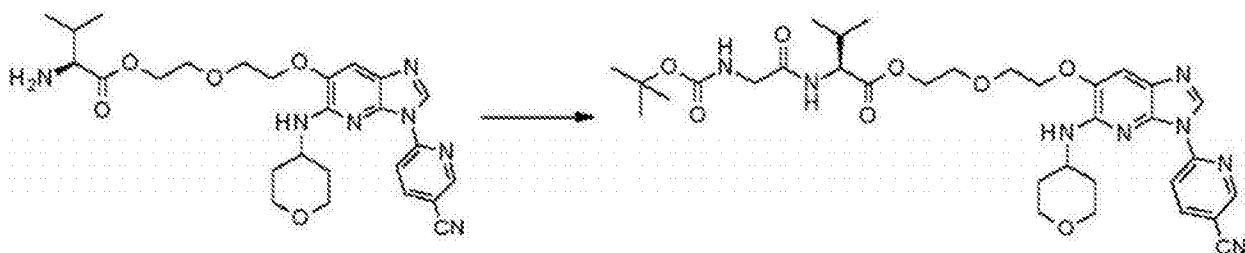
[0351] 向顺式-4-氨基-1-甲基环己醇(1.0g, 7.74mmol, 1当量)于MeCN(15mL)中的悬浮液中添加二碳酸二叔丁基酯(1.85g, 8.47mmol, 1.1当量)并且将混合物在室温搅拌16小时。过滤沉淀物,用己烷洗涤并且干燥,得到期望的化合物。

[0352] 步骤ii): (顺式-1,4)-1-甲基-4-甲基氨基-环己醇

[0353] 在室温向LiAlH₄于THF中的2.0M溶液(7mL, 14.0mmol, 4.9当量)中分批添加(顺式-1,4)-(4-羟基-4-甲基-环己基)-氨基甲酸叔丁基酯(660mg, 2.9mmol, 1当量)。将反应混合物在室温搅拌1小时并且在回流下搅拌45分钟。使反应混合物冷却至室温,然后添加水和THF。过滤出沉淀并且用THF洗涤。将滤液浓缩至干燥,得到期望的化合物。

[0354] 1.2.10. 中间体34: (2S)-2-[[2-(叔丁氧基羰基氨基)乙酰基]氨基]-3-甲基-丁酸 2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基]乙基酯

[0355]



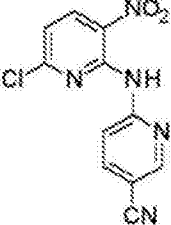
[0356] 在DCM(4mL)中混合化合物9(170mg, 0.40mmol, 1当量)、2-(叔丁氧基羰基氨基)乙

酸 (Boc-Gly-OH, 105mg, 0.60mmol, 1.5当量)、EDCI (173mg, 0.90mmol, 2.25当量) 和DMAP (73mg, 0.6mmol, 1.5当量) 并且在室温搅拌过夜。用盐水猝灭反应物, 用DCM萃取并且蒸发合并的有机相, 得到期望的化合物。

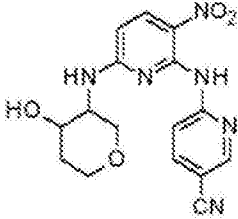
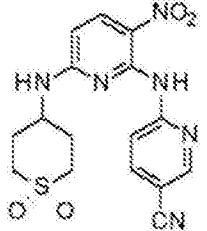
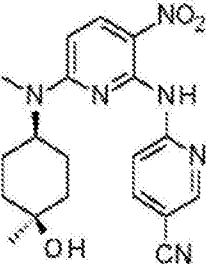
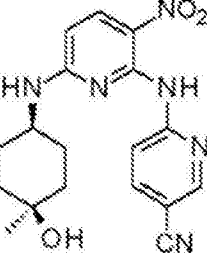
[0357] 表II. 本发明化合物所使用的中间体。

[0358] SM=起始材料, Mtd=方法, MS Mes'd=测量的质量

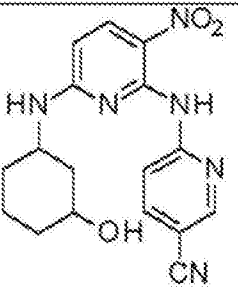
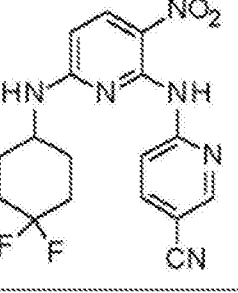
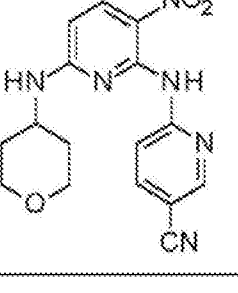
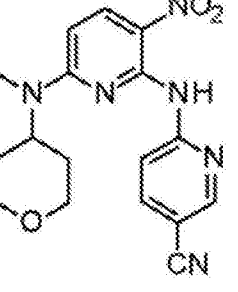
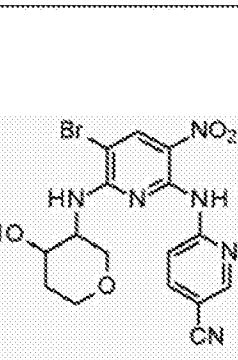
[0359]

中间体 编号	结构	名称	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
1		6-[(6-氯-3-硝基-2-吡啶基)氨基]吡啶-3-甲腈	2,6-二氯-3-硝基吡啶	A	275.7	276.3

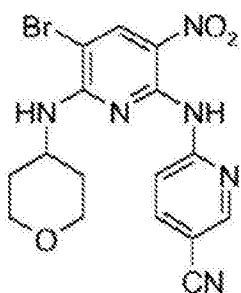
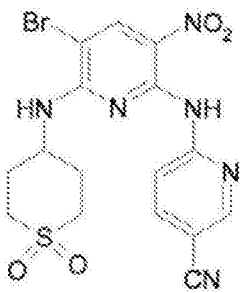
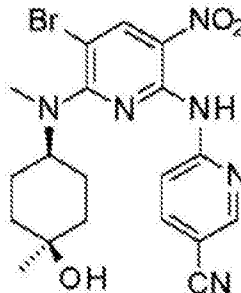
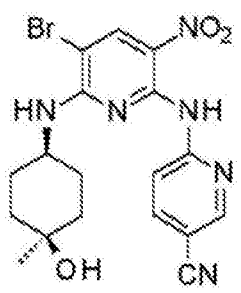
[0360]

2		6-[[6-[(顺式-3,4)-4-羟基四氢吡喃-3-基]氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 1 + 中间体 28	B	356.3	357.4
3		6-[[6-[(1,1-二氧代硫杂环己烷-4-基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 1	B	388.4	389.2
4		6-[[6-[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基]-甲基-氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 1 + 中间体 29	B	382.4	-
5		6-[[6-[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 1	B	368.4	-

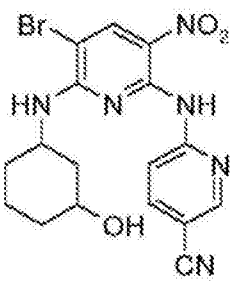
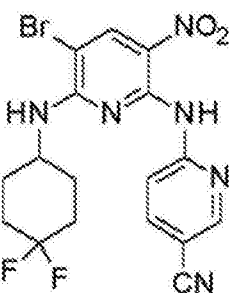
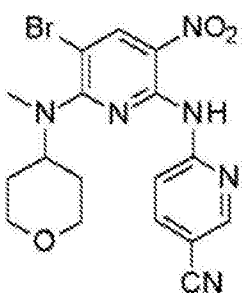
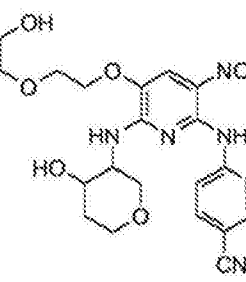
[0361]

6		6-[[6-[(3-羟基环己基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 1	B	354.4	355.4
7		6-[[6-[(4,4-二氟环己基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 1	B	374.4	375.4
8		6-[[3-硝基-6-(四氢吡喃-4-基氨基)-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 1	B	340.3	341.4
9		6-[[6-[甲基(四氢吡喃-4-基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 1	B	354.4	-
10		6-[[5-溴-6-[(顺式-3,4)-4-羟基四氢吡喃-3-基]氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 2	C	435.2	435.4 437.3

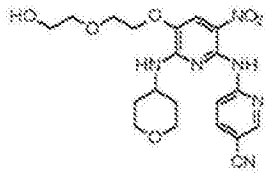
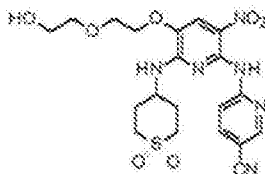
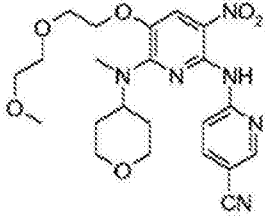
[0362]

11		6-[[5-溴-3-硝基-6-(四氢吡喃-4-基氨基)-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 8	C	419.2	419.5 421.4
12		6-[[5-溴-6-[(1,1-二氧代硫杂环己烷-4-基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 3	C	467.3	467.2 469.3
13		6-[[5-溴-6-[(4-羟基-4-甲基-环己基)-甲基-氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 4	C	461.3	-
14		6-[[5-溴-6-[(顺式1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 5	C	447.3	-

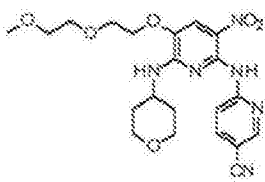
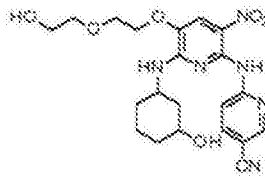
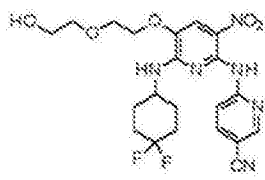
[0363]

15		6-[[5-溴-6-[(3-羟基环己基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 6	C	433.3	433.4 435.4
16		6-[[5-溴-6-[(4,4-二氟环己基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 7	C	453.3	453.3 455.3
17		6-[[5-溴-6-[甲基(四氢吡喃-4-基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 9	C	433.3	433.4 435.4
18		6-[[5-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-6-[(顺式-3,4)-4-羟基四氢吡喃-3-基]氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 10	D	460.5	-

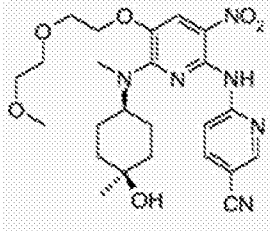
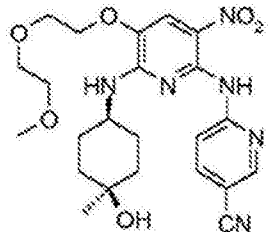
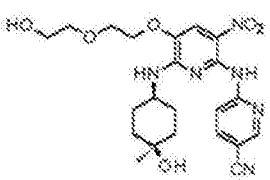
[0364]

19		6-[[5-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-3-硝基-6-(四氢吡喃-4-基氨基)-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 11	D	444.5	445.2
20		6-[[6-[(1,1-二氧代硫杂环己烷-4-基)氨基]-5-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 12	D	492.5	493.6
21		6-[[5-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]-6-[甲基(四氢吡喃-4-基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 17	D	472.5	473.6

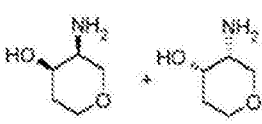
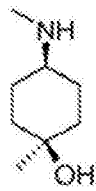
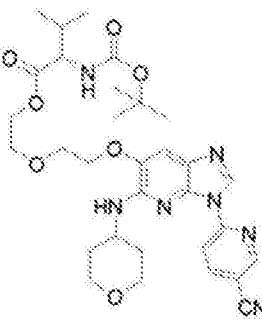
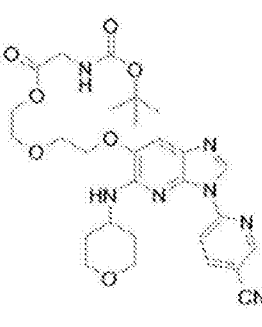
[0365]

22		6-[[5-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]-3-硝基-6-(四氢吡喃-4-基氨基)-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 11	D	458.5	459.5
23		6-[[6-[(3-羟基环己基)氨基]-5-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 15	D	458.5	459.5
24		6-[[6-[(4,4-二氟环己基)氨基]-5-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 16	D	478.5	479.5

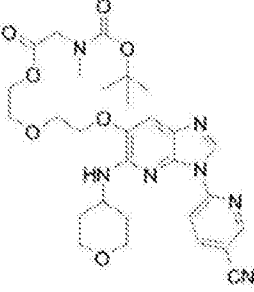
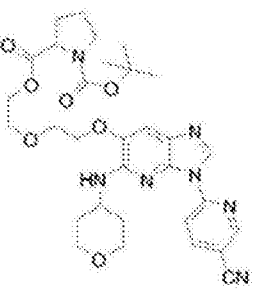
[0366]

25		6-[[6-[(顺式1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基)-甲基-氨基]-5-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 13	D	500.6	-
26		6-[[6-[(顺式1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基)氨基]-5-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 14	D	486.5	-
27		6-[[5-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-6-[(顺式1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基)氨基]-3-硝基-2-吡啶基]氨基]吡啶-3-甲腈	中间体 14	D	472.5	-

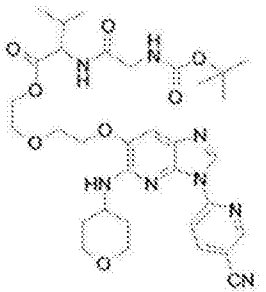
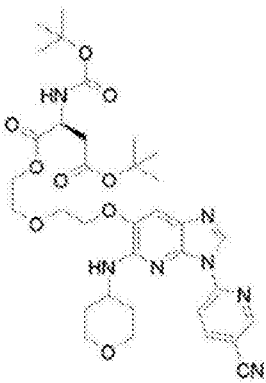
[0367]

28		(3,4-顺式)-3-氨基-四氢-吡喃-4-醇	3,6-二氢-2H-吡喃	实施例 1.2.8	117.2	-
29		(顺式-1,4)-1-甲基-4-甲基氨基-环己醇	顺式-4-氨基-1-甲基环己醇	实施例 1.2.9	143.2	-
30		(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基-丁酸 2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 1	F	623.7	624.9
31		2-(叔丁氧基羰基氨基)乙酸 2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 1	F	581.6	582.7

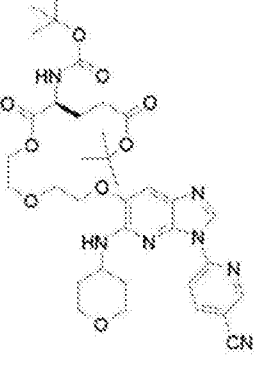
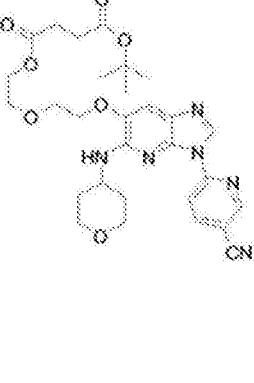
[0368]

32		2-[叔丁氧基 羰基(甲基)氨 基 乙 酸 2-[2-[3-(5- 氯 基 -2- 吡 啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基 乙 基酯	化合物 1	F	595.7	596.7
33		(2S)- 吡咯烷 -1,2- 二甲酸 O1-叔丁基酯 O2-[2-[2-[3-(5- 氯基 -2- 吡 啶基)-5-(四氢 吡喃-4-基氨基 基) 咪 唑 并 [4,5-b] 吡 啶 -6-基]氧基乙 氧基 乙基]酯	化合物 1	F	621.6	622.8

[0369]

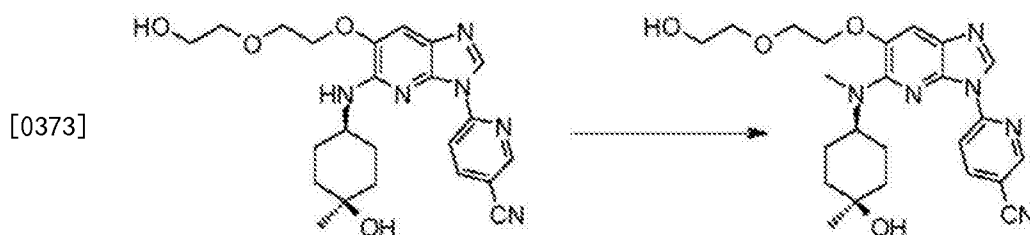
34		(2S)-2-([2-(叔丁氧基羰基氨基)乙酰基]氨基)-3-甲基-丁酸 2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 9	实施 例 1.2.10	680.8	681.8
35		(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁二酸 O4-叔丁基酯 O1-[2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基]酯	化合物 1	F	695.8	696.9

[0370]

36		(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)戊二酸 O5-叔丁基酯 O1-[2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基]酯	化合物 1	F	709.8	710.8
37		丁二酸 O4-叔丁基酯 O1-[2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基]酯	化合物 1	F	580.6	581.7

[0371] 实施例2. 本发明化合物的制备。

[0372] 2.1. 化合物3: 6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基]-甲基-氨基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-烟腈

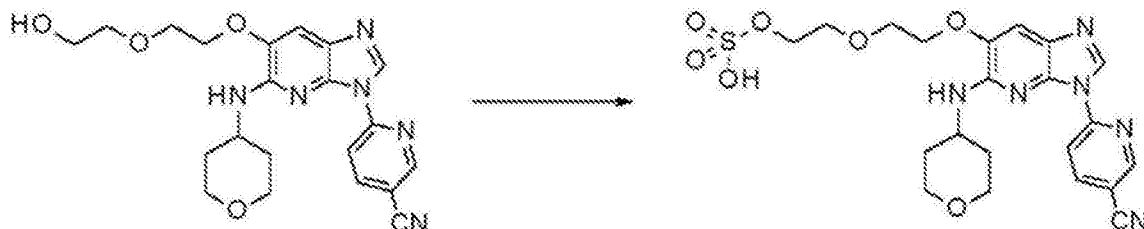


[0374] 将甲醛 (3.1 μ L, 0.11 mmol, 1 当量) 添加至化合物12 (50 mg, 0.11 mmol, 1 当量) 于 TFA/DCM 的混合物 (2 mL, 1/1) 中的溶液中。在室温搅拌 30 分钟后, 添加 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (47 mg,

0.22mmol, 2当量) 并且将反应物在室温搅拌1小时。然后将反应混合物蒸发至干燥并且通过制备型HPLC-MS纯化粗产物, 得到期望的化合物。

[0375] 2.2. 化合物8: 硫酸单-(2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基)酯

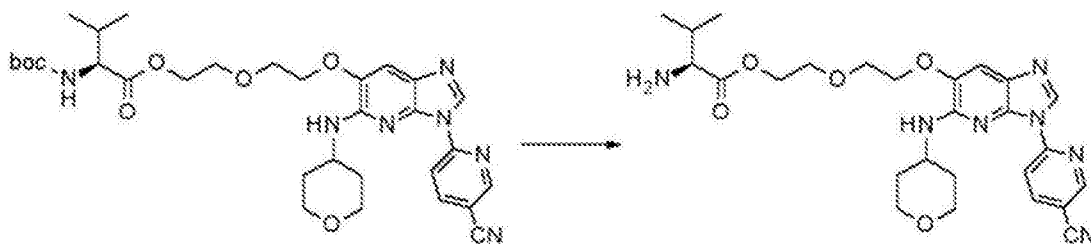
[0376]



[0377] 将化合物1 (84mg, 0.2mmol, 1当量) 添加至吡啶-SO₃复合物 (127mg, 0.8mmol, 4当量) 于吡啶 (5mL) 中的溶液中并且将反应物加热至回流达16小时。然后将混合物蒸发至干燥并且通过在硅胶上进行快速色谱 (自100% EtOAc至100% (DCM/MeOH/AcOH/H₂O: 90/10/1/1) 然后至100% (DCM/MeOH/AcOH/H₂O: 85/15/2/2) 洗脱) 纯化, 得到期望的化合物。

[0378] 2.3. 化合物9: (S)-2-氨基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯

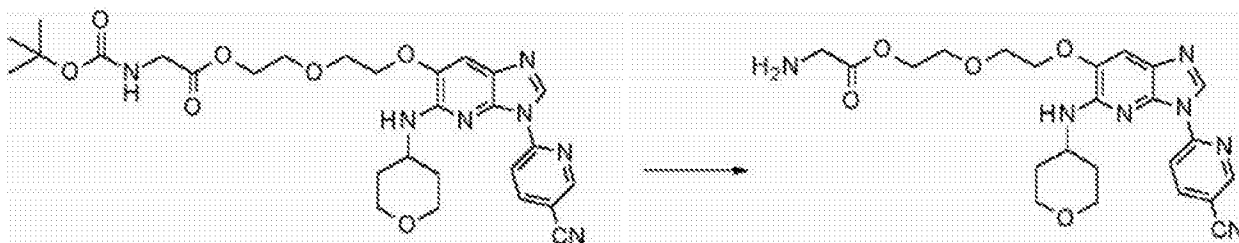
[0379]



[0380] 将TFA (0.5mL) 添加至中间体30 (20mg, 0.032mmol, 1当量) 于DCM (10mL) 中的溶液中, 并且将混合物在室温搅拌1小时。用NaHCO₃的饱和水溶液猝灭反应物并且用EtOAc萃取。将有机层经MgSO₄干燥并且蒸发至干燥。使残留物自DCM/Et₂O于庚烷中的溶剂系统重结晶, 得到期望的化合物。

[0381] 2.4. 化合物16: 2-氨基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯

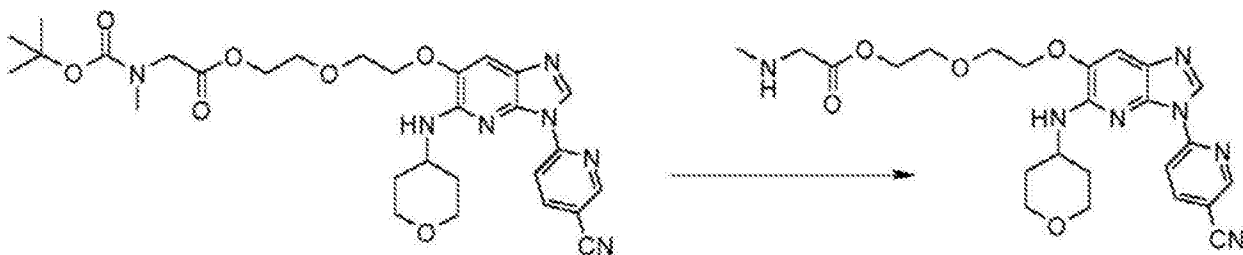
[0382]



[0383] 将中间体31 (195mg, 0.34mmol, 1当量) 置于TFA/DCM混合物 (1/5mL) 中并且将反应物在室温搅拌2小时。然后用甲苯稀释反应混合物并且蒸发至干燥。将残留物溶于DCM中, 用NaHCO₃饱和水溶液洗涤并且将有机相蒸发至干燥。将残留物溶于最小量DCM中, 添加大体积的Et₂O并且使所形成的固体在烧瓶底部沉降。小心去除溶剂, 使固体留于烧瓶中, 添加戊烷并且过滤固体, 得到期望的化合物。

[0384] 2.5. 化合物17: 2-(甲基氨基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯

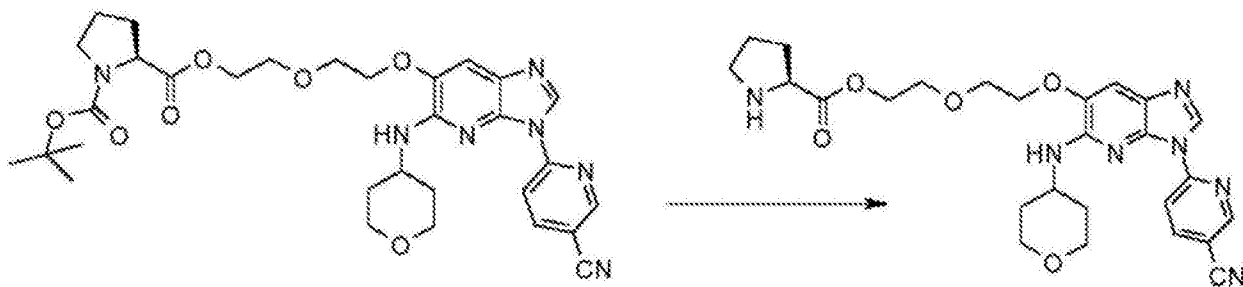
[0385]



[0386] 将中间体32 (205mg, 0.34mmol, 1当量) 置于TFA/DCM混合物 (1/5mL) 中, 并且将反应物在室温搅拌2小时。然后用甲苯稀释反应混合物并且蒸发至干燥。将残留物溶于DCM中, 用饱和NaHCO₃水溶液洗涤并且将有机相蒸发至干燥。将残留物溶于最少量DCM中, 添加大体积的Et₂O并且使所形成的固体在烧瓶底部沉降。小心去除溶剂, 使固体留于烧瓶中, 添加戊烷并且过滤固体, 得到期望的化合物。

[0387] 2.6. 化合物18: (2S)-吡咯烷-2-甲酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯

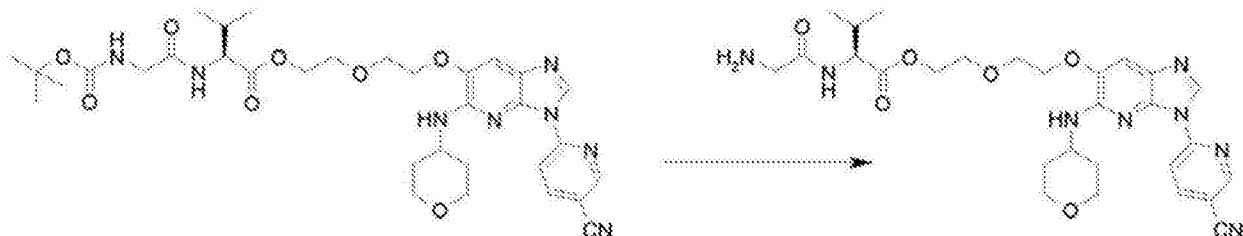
[0388]



[0389] 将中间体33 (211mg, 0.34mmol, 1当量) 置于TFA/DCM混合物 (1/5mL) 中并且将反应物在室温搅拌2小时。然后用甲苯稀释反应混合物并且蒸发至干燥。将残留物溶于DCM中, 用饱和NaHCO₃水溶液洗涤并且将有机相蒸发至干燥。将残留物溶于最少量DCM中, 添加大体积的Et₂O并且使所形成的固体在烧瓶底部沉降。小心去除溶剂, 使固体留于烧瓶中, 添加戊烷并且过滤固体, 得到期望的化合物。

[0390] 2.7. 化合物19: (2S)-2-[(2-氨基乙酰基)氨基]-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯

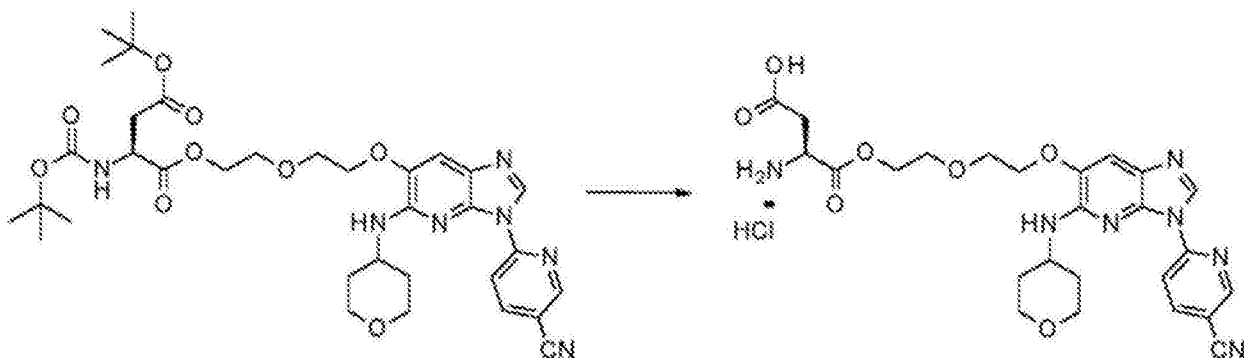
[0391]



[0392] 将中间体34 (212mg, 0.31mmol, 1当量) 置于TFA/DCM混合物 (1/5mL) 中并且将反应物在室温搅拌2小时。然后添加甲苯并且将溶剂蒸发至干燥。将残留物溶于DCM中并且在添加饱和NaHCO₃水溶液后, 固体沉淀。过滤该固体并且干燥, 得到期望的化合物。

[0393] 2.8. 化合物27: (3S)-3-氨基-4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-氧代-丁酸盐盐酸盐

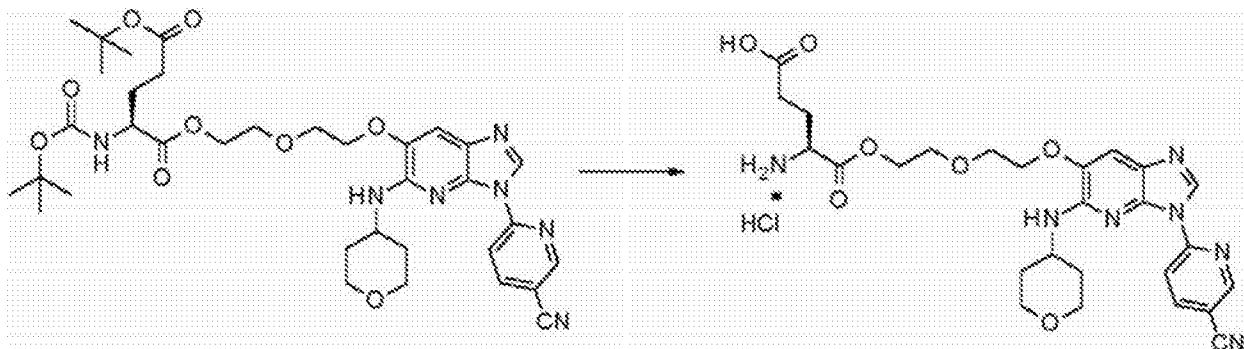
[0394]



[0395] 将HCl于1,4-二噁烷中的溶液(4M,0.4mL,1.6mmol,5当量)添加至于1,4-二噁烷(4mL)中的中间体35(222mg,0.32mmol,1当量)中。将混合物在室温搅拌3小时,然后蒸发至干燥。将残留物溶于HCl于1,4-二噁烷中的溶液(4M,6mL)中,将反应物在室温搅拌2小时并且添加更多HCl于1,4-二噁烷中的溶液(4M,2mL)。在室温搅拌1小时后,将溶剂蒸发至干燥,得到期望的化合物。

[0396] 2.9. 化合物28: (4S)-4-氨基-5-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-5-氧代-戊酸盐盐酸盐

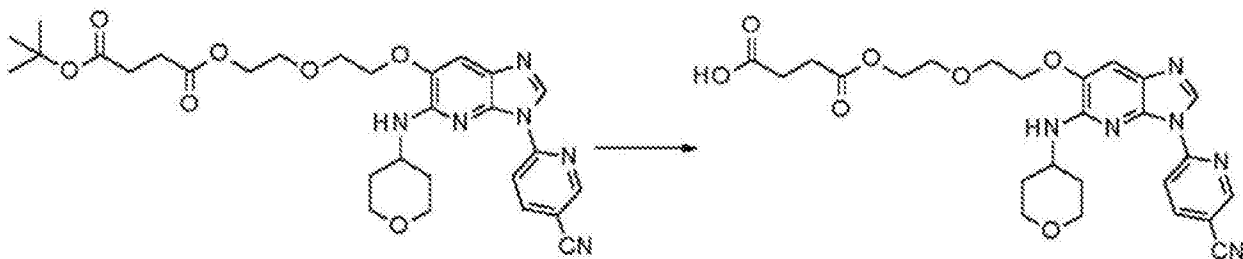
[0397]



[0398] 将HCl于1,4-二噁烷中的溶液(4M,0.41mL,1.63mmol,5当量)添加至于1,4-二噁烷(4mL)中的中间体36(232mg,0.33mmol,1当量)中。将混合物在室温搅拌3小时,然后蒸发至干燥。将残留物溶于HCl于1,4-二噁烷中的溶液(4M,6mL)中并且将反应物在室温搅拌2小时。将溶剂蒸发至干燥,得到期望的化合物。

[0399] 2.10. 化合物33: 4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-氧代-丁酸

[0400]



[0401] 将中间体37 (90mg, 0.16mmol, 1当量) 置于TFA/DCM混合物 (1/5mL) 中并且将反应物在室温搅拌2小时。然后添加甲苯并且将溶剂蒸发至干燥。通过在硅胶上进行快速色谱 (于DCM中的0至6% MeOH洗脱) 纯化残留物, 并且使所获得产物自MeOH沉淀, 在过滤后得到期望的化合物。

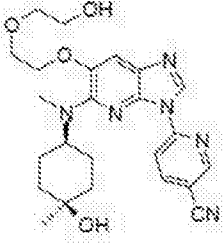
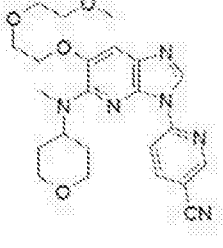
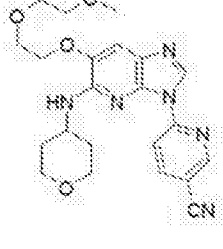
[0402] 表III. 说明性本发明化合物.

[0403] SM=起始材料, Mtd=方法, MS Mes'd=测量的质量

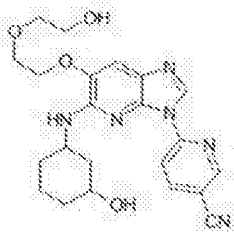
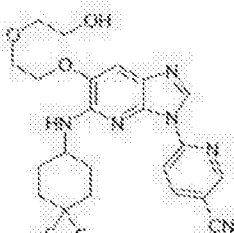
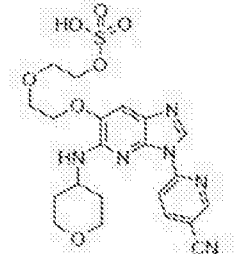
[0404]

化合物 编号	结构	名称	SM	方法	MW	MS Mes'd
1		6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈	中间体 19	E	424.5	ES+ 425.4
2		6-[5-(1,1-二氧代-四氢-2H-噻喃-4-基氨基)-6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈	中间体 20	E	472.5	ES+ 473.6 ES- 471.5

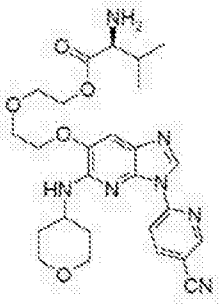
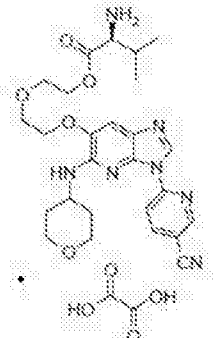
[0405]

3		6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基)-甲基-氨基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈	化合物 12	实施例 2.1	466.5	ES+ 467.6
4		6-[6-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-5-[甲基-(四氢-吡喃-4-基)-氨基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈	中间体 21	E	452.5	453.6
5		6-[6-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-烟腈	中间体 22	E	438.5	ES+ 439.5 ES- 437.5

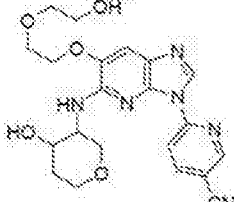
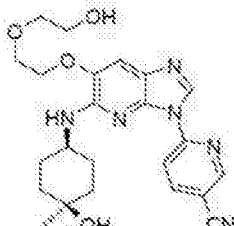
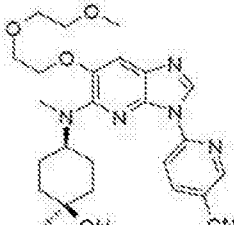
[0406]

6		6-{5-(3-羟基-环己基氨基)-6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-烟腈	中间体 23	E	438.5	ES+ 439.49
7		6-{5-(4,4-二氟-环己基氨基)-6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-烟腈	中间体 24	E	458.5	ES+ 459.5 ES- 457.4
8		硫酸单-(2-{2-[3-(5-氟基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基)酯	化合物 1	实施 例 2.2	504.5	ES+ 505.4 ES- 503.4

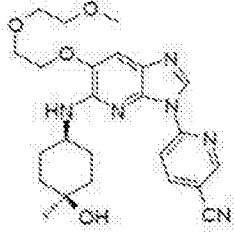
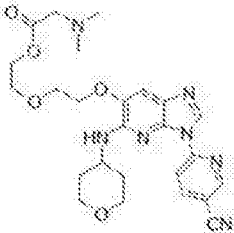
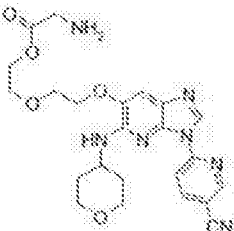
[0407]

9		(S)-2-氨基-3-甲基-丁酸 2-((2-((3-(5-氯基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基)-乙氧基)-乙基酯	中间体 30	实施 例 2.3	523.6	ES+ 524.6 ES- 522.6
10		(S)-2-氨基-3-甲基-丁酸 2-((2-((3-(5-氯基-吡啶-2-基)-5-(四氢-吡喃-4-基氨基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基)-乙氧基)-乙基酯 草酸盐	化合物 9	G	613.6	524.4

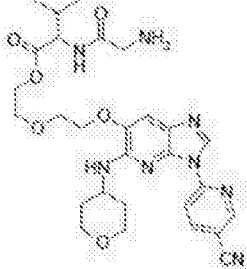
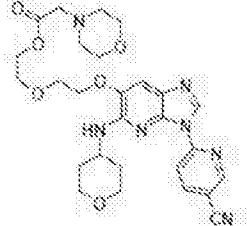
[0408]

11		6-[6-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-5-[[(顺式-3,4)-4-羟基四氢吡喃-3-基]氨基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲基腈	中间体 18	E	440.5	441.3
12		6-[6-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-5-[[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基环己基]氨基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲基腈	中间体 27	E	452.5	453.0
13		6-[5-[[(顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基-环己基)-甲基-氨基]-6-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲基腈	中间体 25	E	480.6	481.4

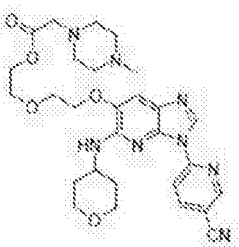
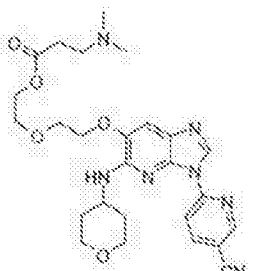
[0409]

14		6-[5-(((顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基环己基)氨基)-6-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲基脞	中间体 26	E	466.5	467.3
15		2-(二甲基氨基)乙酸 2-[2-[3-(5-氟基)-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 1	F	509.6	510.4
16		2-氨基乙酸 2-[2-[3-(5-氟基)-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	中间体 31	实施例 2.4	481.5	482.4

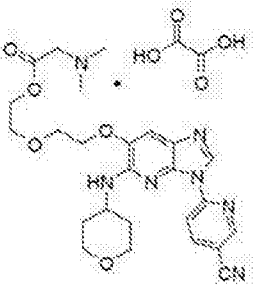
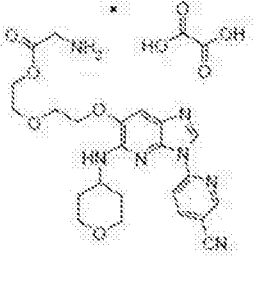
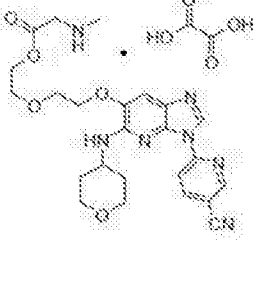
[0411]

19		(2S)-2-[(2-氨基乙酰基)氨基]-3-甲基-丁酸 2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	中间体 34	实施 例 2.7	580.6	603.4 (M+ Na)
20		2-吗啉代乙酸 2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 I	F	551.6	552.4

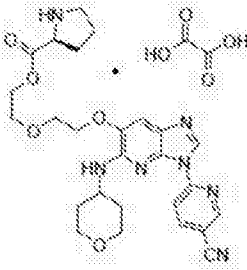
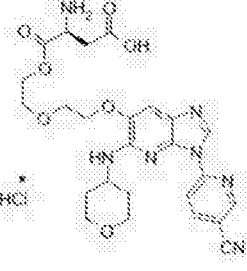
[0412]

21		2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙酸 2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 1	F	564.6	565.3
22		3-(二甲基氨基)丙酸 2-[2-[3-(5-氟基-2-吡啶基)-5-(四氢吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 1	F	523.6	524.3

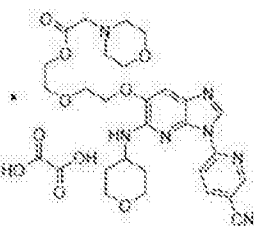
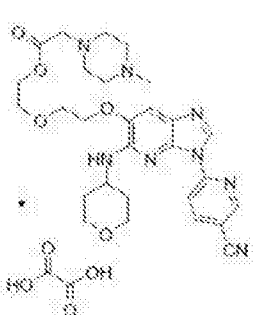
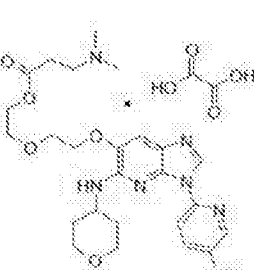
[0413]

23		2-(二甲基氨基)乙酸 2-[2-[3-(5-氰基 -2-吡啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙基 酯草酸盐	化合物 15	G	599.6	ES+ 510.3
24		2-氨基乙酸 2-[2-[3-(5-氰基 -2-吡啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙基 酯草酸盐	化合物 16	G	571.6	ES+ 482.3
25		2-(甲基氨基) 乙 酸 2-[2-[3-(5-氰基 -2-吡啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙基 酯草酸盐	化合物 17	G	585.6	ES+ 496.3

[0414]

26		(2S)-吡咯烷-2-甲 酸 2-[2-[3-(5-氟基 -2- 吡 啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙基 酯草酸盐	化合物 18	G	611.6	ES+ 522.3
27		(3S)-3- 氨 基 -4-[2-[2-[3-(5- 氟基-2-吡啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙氧 基]-4-氧代-丁 酸盐盐酸盐	中间体 35	实施 例 2.8	576.0	ES+ 540.5

[0416]

30		2-吗啉代乙酸 2-[2-[3-(5-氟基 -2- 吡 啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙基 酯草酸盐	化合物 20	G	641.6	ES+ 510.3
31		2-(4-甲基哌嗪 -1-基)乙酸 2-[2-[3-(5-氟基 -2- 吡 啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙基 酯草酸盐	化合物 21	G	654.6	ES+ 565.6
32		3-(二甲基氨 基)丙酸 2-[2-[3-(5-氟基 -2- 吡 啶 基)-5-(四氢吡 喃-4-基氨基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙基 酯草酸盐	化合物 22	G	613.6	ES+ 524.4

[0419]

化合物 编号	NMR 数据
1	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.89-8.95 (1H, m), 8.75 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.59 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.61-4.69 (1H, m), 4.22 (2H, dd), 4.05-4.17 (1H, m), 3.90-3.98 (2H, m), 3.83 (2H, dd), 3.50-3.60 (6H, m), 1.98-2.01 (2H, m), 1.55-1.70 (2H, m)
2	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.87-9.06 (2H, m), 8.63 (1H), 7.65 (1H, br s), 6.38 (1H, d), 4.64 (1H, br s), 4.17-4.30 (3H, m), 3.80-3.88 (2H, m), 3.50-3.60 (4H, m), 3.40-3.48 (2H, m), 3.09-3.19 (3H, m), 2.15-2.35 (4H, m)
3	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.98-9.03 (1H, m), 8.94 (1H), 8.87 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.66 (1H, s), 4.58-4.70 (1H, m), 4.13-4.22 (2H, m), 4.08 (1H, s), 3.85-3.96 (1H, m), 3.80 (2H, dd), 3.46-3.58 (4H, m), 2.93 (3H, s), 1.91-2.07 (2H, m), 1.62 (2H, d), 1.50 (2H, d), 1.35-1.45 (2H, m), 1.13 (3H, s)
4	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 9.02-9.11 (1H, m), 8.93 (1H, s), 8.75 (1H, d), 8.13 (1H, dd), 7.51 (1H, s), 4.16-4.29 (3H, m), 4.09 (2H, dd), 3.85-3.97 (2H, m), 3.67-3.74 (2H, m), 3.55-3.63 (2H, m), 3.41-3.55 (2H, m), 3.40 (3H, s), 3.00 (3H, s), 2.01 (2H, qd), 1.76 (2H, dd)
5	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.92 (1H, dd), 8.76 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.00 (1H), 4.21 (2H, dd), 4.06-4.17 (1H, m), 3.90-3.97 (2H, m), 3.80-3.84 (2H, m), 3.61-3.66 (2H, m), 3.54 (2H, td), 3.47-3.51 (2H, m), 3.27 (3H, s), 1.99 (2H, dd), 1.54-1.67 (2H, m)
6	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.99 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.74 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.55 (1H, s), 6.19 (1H, d), 4.72 (1H, d), 4.61-4.68 (1H, m), 4.15-4.23 (2H, m), 3.89-4.02 (1H, m), 3.77-3.87 (2H, m), 3.67 (1H, td), 3.50-3.57 (4H, m), 2.17 (1H, d), 1.87-1.96 (1H, m), 1.71-1.86 (2H, m), 1.14-1.45 (4H, m)
7	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.86-9.07 (2H, m), 8.76 (1H, br s), 8.63 (1H, d), 7.58 (1H, br s), 6.13 (1H, d), 4.51-4.76 (1H, m), 4.13-4.26 (2H, m), 3.72-3.94 (2H, m), 3.47-3.63 (5H, m), 2.09 (8H, m)
8	¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD) δ 9.03 (1H, d), 8.88-8.95 (1H, br s), 8.84 (1H, d), 8.41 (1H, dd), 7.46 (1H, br s), 4.14-4.36 (5H, m), 3.95-4.12 (4H, m), 3.86 (2H, dd), 3.60-3.76 (2H, m), 2.12 (2H, d), 1.64-1.85 (2H, m)

[0420]

化合物 编号	NMR 数据
9	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.02 (1H, d), 8.83 (1H, s), 8.76 (1H, br s), 8.13 (1H, d), 7.42 (1H, br s), 5.31 (1H, d), 4.36 (2H, br s), 4.24 (2H, br s), 4.18 (1H, br s), 4.08 (2H, d), 3.91 (2H, br s), 3.81 (2H, d), 3.62 (2H, t), 3.36 (1H, d), 2.16 (2H, d), 2.05 (1H, d), 1.26 (2H, br s), 0.98 (3H, d), 0.91 (3H, d)
10	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.00 (1H, d), 4.40-4.46 (1H, m), 4.21-4.31 (3H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.91-3.99 (2H, m), 3.85-3.90 (2H, m), 3.83 (1H, s), 3.75-3.80 (2H, m), 3.51-3.60 (2H, m), 2.04-2.15 (1H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m), 0.89-0.98 (6H, m)
11	¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, d), 8.84 (1H, d), 8.76 (1H, s), 8.59 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 5.80 (1H, d), 5.25 (1H, br s), 4.65 (1H, br s), 4.20-4.27 (2H, m), 4.16 (1H, t), 4.02-4.10 (1H, m), 3.79-3.84 (2H, m), 3.66-3.75 (2H, m), 3.56-3.62 (2H, m), 3.54 (4H, s), 1.82-1.94 (1H, m), 1.65-1.76 (1H, m)
12	¹ H NMR (600 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.86-8.99 (2H, m), 8.69 (1H, s), 8.49-8.58 (1H, m), 7.50 (1H, s), 5.82 (1H, d), 4.58-4.71 (1H, m), 4.17 (2H, d), 4.11 (1H, s), 3.81 (2H, d), 3.68-3.77 (1H, m), 3.53 (4H, s), 1.71-1.86 (4H, m), 1.62 (2H, d), 1.44-1.53 (2H, m), 1.17 (3H, s)
13	¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.87 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.65 (1H, s), 4.11-4.21 (2H, m), 4.08 (1H, s), 3.89 (1H, t), 3.72-3.82 (2H, m), 3.55-3.62 (2H, m), 3.44-3.50 (2H, m), 3.25 (3H, s), 2.93 (3H, s), 1.99 (2H, qd), 1.62 (2H, d), 1.50 (2H, d), 1.40 (2H, td), 1.12 (3H, s)
14	¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.92-8.99 (2H, m), 8.73 (1H, s), 8.59 (1H, dd), 7.54 (1H, s), 5.79 (1H, d), 4.18 (2H, t), 4.08 (1H, br s), 3.80 (2H, t), 3.72-3.82 (1H, m), 3.60-3.68 (2H, m), 3.45-3.52 (2H, m), 3.26 (3H, s), 1.72-1.83 (4H, m), 1.57-1.68 (2H, m), 1.43-1.56 (2H, m), 1.17 (3H, s)
15	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.03 (1H, dd), 8.83 (1H, s), 8.76 (1H, dd), 8.14 (1H, dd), 7.40 (1H, s), 5.42 (1H, d), 4.37-4.39 (2H, m), 4.07-4.26 (5H, m), 3.93-3.95 (2H, m), 3.82-3.84 (2H, m), 3.61-3.67 (2H, m), 3.24 (2H, s), 2.37 (6H, s), 2.14-2.24 (2H, m), 1.66-1.76 (2H, m)
16	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.05 (1H, d), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, d), 8.16 (1H, dd), 7.44 (1H, s), 5.34 (1H, d), 4.38-4.40 (2H, m), 4.08-4.28 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.83-3.85 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.52 (2H, s), 2.37 (6H, s), 2.15-2.22 (2H, m), 1.65-1.75 (2H, m)
17	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.05 (1H, dd), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, dd), 8.16 (1H, dd), 7.43 (1H, s), 5.36 (1H, d), 4.38-4.41 (2H, m), 4.08-4.28 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.83-3.85 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.45 (2H, s), 2.48 (3H, s), 2.15-2.22 (2H, m), 1.68-1.76 (2H, m)
18	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.05 (1H, d), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, d), 8.16 (1H, dd), 7.43 (1H, s), 5.38 (1H, d), 4.37-4.40 (2H, m), 4.08-4.27 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.82-3.86 (3H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.08-3.14 (1H, m), 2.91-2.97 (1H, m), 2.12-2.21 (3H, m), 1.86-1.95 (1H, m), 1.60-1.82 (4H, m)

[0421]

化合物 编号	NMR 数据
19	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.77 (1H, d), 8.64 (1H, dd), 8.30 (1H, br s), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 5.14 (2H, br s), 4.09-4.35 (6H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.85-3.87 (2H, m), 3.74-3.76 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.35 (2H, br s), 1.96-2.10 (3H, m), 1.58-1.68 (2H, m), 0.85-0.88 (6H, m)
20	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.03 (1H, d), 8.83 (1H, s), 8.77 (1H, d), 8.14 (1H, dd), 7.42 (1H, s), 5.34 (1H, d), 4.36-4.39 (2H, m), 4.07-4.26 (5H, m), 3.93-3.95 (2H, m), 3.81-3.84 (2H, m), 3.74-3.77 (4H, m), 3.61-3.67 (2H, m), 3.28 (2H, s), 2.59-2.61 (4H, m), 2.16-2.20 (2H, m), 1.65-1.75 (2H, m)
22	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.04 (1H, dd), 8.84 (1H, s), 8.77 (1H, dd), 8.14 (1H, dd), 7.42 (1H, s), 5.35 (1H, d), 4.33-4.36 (2H, m), 4.07-4.27 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.81-3.83 (2H, m), 3.61-3.68 (4H, m), 2.54-2.68 (4H, m), 2.27 (6H, s), 2.16-2.20 (2H, m), 1.66-1.76 (2H, m)
23	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.92 (1H, dd), 8.77 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.02 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.06-4.18 (1H, m), 3.91-3.95 (2H, m), 3.84-3.86 (2H, m), 3.73-3.76 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, br s), 3.51-3.57 (2H, m), 2.5 (6H, s), 1.96-2.01 (2H, m), 1.57-1.67 (2H, m)
24	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.32-4.35 (2H, m), 4.24-4.26 (2H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.92-3.97 (2H, m), 3.86-3.89 (2H, m), 3.84 (2H, s), 3.77-3.79 (2H, m), 3.53-3.59 (2H, m), 1.98-2.02 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
25	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.33-4.35 (2H, m), 4.23-4.26 (2H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.92-3.98 (4H, m), 3.86-3.89 (2H, m), 3.76-3.79 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 2.58 (3H, s), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
26	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.29-4.42 (3H, m), 4.23-4.26 (2H, m), 4.10-4.18 (1H, m), 3.92-3.97 (2H, m), 3.87-3.89 (2H, m), 3.77-3.80 (2H, m), 3.53-3.59 (2H, m), 3.12-3.25 (4H, m), 2.19-2.27 (1H, m), 1.92-2.03 (3H, m), 1.81-1.89 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
28	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.04 (1H, dd), 8.92-8.94 (H, m), 8.78 (1H, s), 8.66 (1H, dd), 8.54 (3H, br s), 7.59 (1H, s), 4.38-4.43 (1H, m), 4.24-4.34 (3H, m), 4.08-4.17 (2H, m), 3.87-3.97 (4H, m), 3.77-3.80 (2H, m), 3.51-3.56 (2H, m), 2.37-2.54 (2H, m), 1.97-2.06 (4H, m), 1.59-1.69 (2H, m)
30	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.01 (1H, dd), 8.93 (1H, d), 8.77 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.08-4.18 (1H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.72-3.76 (2H, m), 3.52-3.60 (6H, m), 3.32 (2H, s), 2.53-2.57 (4H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
31	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, d), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.08-4.26 (5H, m), 3.92-3.98 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.72-3.76 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.36 (2H, s), 2.60-3.15 (11H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)

[0422]

化合物编号	NMR 数据
32	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.01 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.84-3.89 (2H, m), 3.73-3.78 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.24-3.28 (2H, t), 2.82-2.86 (2H, t), 2.73 (6H, s), 1.96-2.04 (2H, m), 1.57-1.67 (2H, m)
33	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 12.19 (1H, br s), 9.02 (1H, dd), 8.94 (1H, dd), 8.77 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.08-4.25 (5H, m), 3.91-3.97 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.70-3.75 (2H, m), 3.51-3.59 (2H, m), 2.45-2.55 (4H, m), 1.96-2.03 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)

[0423] 生物实施例

[0424] 实施例3. 体外分析

[0425] 3.1. 人IRAK-4的IC₅₀测定

[0426] 在放射性滤板分析中测定IRAK-4的IC₅₀值。该分析的原理在于在使用[γ-³³P]ATP和ATP由酶IRAK-4磷酸化后测量掺入RIP140底物中的³³P。通过将样品上样至滤板上(使用收获器, PerkinElmer)和6个后续洗涤步骤去除未掺入的³³P。在将MicroScint™-20 (PerkinElmer, 6013621)添加至滤板后通过闪烁计数器(Topcount, PerkinElmer)测量RIP140中所掺入的³³P。

[0427] 将5μL试验化合物的水稀释系列(自20μM或6.6μM最高浓度开始)(来自100%DMSO储备溶液, 1/5稀释)添加至各孔中(在反应分析中最终DMSO浓度为1%)。IRAK-4 (Carna Biosciences, 09-145)和RIP140 (SEQ ID1, 参考表VII)分别以10ng/mL和4μM的最终浓度使用。在25 mM Tris pH 7.5, 0.025% Triton X-100, 5mM MnCl₂和2mM DTT中将酶和底物稀释至11μL的总体积。通过添加在与酶和底物相同的缓冲液中稀释的9μL 1μM ATP (Sigma, A6419-5G)+0.25μCi [γ-³³P]ATP (PerkinElmer, NEG602K001MC)开始反应。将混合物在30℃温育45分钟。通过添加25μL 150mM磷酸(VWR, 1.00573.1000)终止反应。将样品转移至滤板并且使用闪烁计数器测量所掺入的放射性。

[0428] 使用10μM星孢素(staurosporine) (1%DMSO)作为阳性对照(100%抑制); 媒介物(水+1%DMSO)作为阴性对照(0%抑制)。

[0429] 表V. 本发明化合物的体外人IRAK-4IC₅₀

[0430]

化合物编号	hIRAK-4IC ₅₀ (nM)
1	6.35
2	25.4
3	21.7
4	523
5	13.8
6	4.85
7	14.3
8	51.4

9	13.5
11	14.3
12	0.95
13	39.1
14	3.45

[0431] 3.2. 激酶选择性分析 (宽面板)

[0432] 在REACTION BIOLOGY (Reaction Biology Corp., 1Great Valley Parkway, Suite 2Malvern, PA 19355, USA) 处在放射测定激酶分析中测定人激酶的抑制。

[0433] 为测量化合物的 IC_{50} , 以10个剂量 (自10 μ M (最高浓度) 开始, 利用3倍系列稀释) 试验该化合物。通过拟合剩余酶活性% (相对于DMSO对照) 的剂量-响应曲线推导出 IC_{50} 值。

[0434] 3.3. 激酶选择性分析 (集中面板)

[0435] 此分析的目的是测定本发明化合物对在抑制时可引起不希望的副作用的所选择范围的人激酶的活性和选择性 (Dy&Adjei 2013; Force&Kolaja 2011)。

[0436] 3.3.1. 分析方案

[0437] 在放射性滤板分析中测定脱靶激酶的 IC_{50} 值。该分析的原理在于测量在使用 $[\gamma -^{33}P]$ ATP和ATP由激酶磷酸化时掺入肽底物中的 ^{33}P 。通过将样品上样至滤板上 (使用收获器, PerkinElmer) 和6个后续洗涤步骤去除未掺入的 ^{33}P 。在将MicroScintTM-20 (PerkinElmer, 6013621) 添加至滤板后通过闪烁计数器 (Topcount, PerkinElmer) 测量肽底物中掺入的 ^{33}P 。

[0438] 将5 μ L试验化合物的水稀释系列 (自20 μ M或6.6 μ M最高浓度开始) (来自100% DMSO储备溶液, 1/5稀释) 添加至各孔中 (在反应分析中最终DMSO浓度为1%)。酶和肽底物是以最佳浓度使用的 (参见表VI)。将酶和底物在分析缓冲液中稀释至11 μ L的总体积。通过添加在与酶和底物相同的缓冲液中稀释的9 μ L ATP+ $[\gamma -^{33}P]$ ATP开始反应。在30 $^{\circ}$ C温育该混合物。通过添加25 μ L 150mM磷酸终止反应。将样品转移至滤板并且使用闪烁计数器测量所掺入的放射性。

[0439] 温育时间、分析缓冲液组成以及ATP、酶和底物的浓度报告于表VI中, 例如激酶脱靶分析。

[0440] 使用10 μ M星孢素 (1% DMSO) 作为阳性对照 (100%抑制); 媒介物 (水+1% DMSO) 作为阴性对照 (0%抑制)。

[0441] 表VI. 人激酶脱靶抑制分析的条件

[0442]

激酶， [激酶]	底物， [底物]	ATP	分析缓冲液	温育时间
ABL (Life Technologies, P3049), 40 ng/mL	PolyGT (Sigma- Aldrich, P0275), 5 µg/mL	0.5 µM ATP + 0.25 µCi/25 µL [γ- ³³ P]ATP	50 mM Tris pH 7.7 0.03% Triton X-100 1 mM DTT 25 mM MgCl ₂	60 分钟
Aurora B (Carna BioSciences, 05-102), 10 ng/mL	组蛋白H3 肽 (SEQ ID2), 0.5 µM	1.3 µM ATP + 0.25 µCi/25 µL [γ- ³³ P]ATP	25 mM Tris pH 7.7 0.01% Triton X-100 5 mM MgCl ₂ 5 mM DTT	90 分钟
CDK2 (Carna Biosciences, 04-103), 30 ng/mL	组蛋白H1-衍生的 肽 (SEQ ID3), 0.36 µM	0.1 µM ATP + 0.25 µCi/25 µL [γ- ³³ P]ATP	8 mM MOPS pH 7.0 0.01% Brij-35 1 mM DTT 5 mM MnCl ₂	60 分钟
CDK9 (Millipore, 14-685), 230 ng/mL	PDKtide (SEQ ID4), 0.5 µM	0.25 µM ATP + 0.125 µCi/25 µL [γ- ³³ P]ATP	20 mM MOPS pH 7.0 0.01% Triton X-100 5 mM MnCl ₂	60 分钟
c-KIT (Millipore, 14-559), 0.01 mU/µL	PolyGT (Sigma- Aldrich, P0275), 0.1 mg/mL	3 µM ATP + 0.25 µCi/25 µL [γ- ³³ P]ATP	16 mM Tris pH 7.0 500 µM EDTA 0.01% Triton X-100 10 mM MnCl ₂ 1 mM DTT 10 mM MgOAc	90 分钟
GSK3b (Carna Biosciences, 04-141), 20 ng/mL	磷酸化糖原 合成酶肽 2 (Millipore, 12-241), 1.25 µM	1.5 µM ATP + 0.25 µCi/25 µL [γ- ³³ P]ATP	50 mM Tris pH8.0 0.01% Brij-35 1 mM DTT 5 mM MgOAc	90 分钟
c-SRC (Carna Biosciences, 08-173), 8 ng/mL	PolyGT (Sigma- Aldrich, P0275), 2 µg/mL	0.25 µM ATP + 0.125 µCi/25 µL [γ- ³³ P]ATP	25 mM MOPS pH 7.0 10 mM MnCl ₂ 2.5 mM DTT 0.01% Brij35	60 分钟

[0443] 表VII. 人激酶脱靶抑制分析中所使用的肽底物

[0444]

底物	SEQ ID No.	序列	提供者
RIP140 肽	1	CYGVASSHLKTLLKKSKVKDQ	Almac Group Ltd. 20 Seagoe Industrial Estate Craigavon BT63 5QD UK
组蛋白 H3 肽	2	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLC	AnaSpec Inc. 34801 Campus Drive Fremont, CA 94555 USA
组蛋白 H1-衍生的肽	3	GGGPATPKKAKKL	AnaSpec Inc. 34801 Campus Drive Fremont, CA 94555 USA
PDKtide	4	KTFCGTPEYLAPEVRREPRILSEEEQE MFRDFDYIADWC	Thermo Fisher Scientific Inc. 81 Wyman St. Waltham, MA 02451 USA

[0445] 表VIII. 说明性本发明化合物的体外人激酶脱靶IC₅₀

[0446]

化合物 编号	ABL IC ₅₀ (nM)	Aurora B IC ₅₀ (nM)	CDK2 IC ₅₀ (nM)	CDK9 IC ₅₀ (nM)	GSK3b IC ₅₀ (nM)	c-SRC IC ₅₀ (nM)
1	-	-	>6670	>1330	>6670	>1330
2	-	-	>1330	712	>1330	>1330
5	2690	-	>4000	2290	>4000	>2940
6	656	-	2670	1030	>4000	754
9	633	-	>4000	639	3250	286
11	-	-	>1330	834	>1330	>1330
12	138	>1880	944	1150	>1330	477
14	-	-	1380	1390	2240	319

[0447] 3.3.2. 结论

[0448] 表VIII的数据与表V的那些相关,显示本发明化合物在激酶脱靶中对在IRAK-4中的抑制效能更低。该数据证实本发明化合物针对IRAK-4的选择性,由此限制与激酶脱靶抑制相关的副作用的风险。

[0449] 3.4. 细胞分析: 在PBMC中CL097活化的TNF α 释放抑制

[0450] 在细胞分析中使用初级分离的人外周血单核细胞(PBMC)试验本发明化合物以测量在使用特定TLR7/8激动剂CL097进行TLR活化后炎症细胞因子TNF α 的分泌。通过人TNF α 酶联免疫吸附分析(ELISA)方案对细胞培养上清液中TNF α 蛋白质的释放进行定量。

[0451] 3.4.1. 自人暗黄覆盖层分离人初级PBMC

[0452] 将暗黄覆盖层(由Croatian Institute for Transfusion Medicine提供)在4℃保持过夜并且在第二天进行处理以分离PBMC。使用Ficoll-Paque™ PLUS (GE HealthCare, 17-1440-02)通过密度梯度离心分离PBMC。利用无菌PBS (1×) 1:4稀释等体积的暗黄覆盖层并且在适当50mL **Falcon**®管中使35mL在15mL Ficoll-Paque PLUS顶部小心分层。在室温将该管以1500rpm离心35分钟,并且无加速或间断。在离心后,去除上部血清层并且小心分离单核细胞环并且将其转移至新鲜**Falcon**®管。在PBS中将分离的细胞悬浮液稀释至至多50mL,随后实施在室温以1300rpm离心10分钟的步骤。在PBS中实施2个额外洗涤步骤和细胞汇集后,通过将细胞沉淀物再悬浮于50mL AKL裂解缓冲液(150mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 1mM Na₂EDTA, pH 7.4)中,随后轻轻混合来溶解剩余红细胞。然后在室温将50mL悬浮液以1300rpm离心10分钟,随后去除上清液,并且将细胞沉淀物再悬浮于培养基(RPMI 1640 (Gibco, 21875)+在56℃热灭活30分钟的10%胎牛血清(FBS, Biowest, S1810)+Pen/Strep (Gibco, 15240))中。

[0453] 3.4.2. 在PBMC分析中的化合物处理和触发

[0454] 使用血液学分析仪(Sysmex XS-500i)对细胞进行计数,并且将其以 4.0×10^5 个细胞/孔的密度平铺于96孔培养板中的160μL培养基中。随后,在37℃和5%CO₂下通过添加20μL $10 \times$ 浓缩的化合物溶液将PBMC与试验化合物一起预温育1小时。在不同浓度下试验该化合物,并且通过自10mM储备溶液在DMSO中3倍系列稀释、随后在补充有1%FBS和1%Pen/Strep的 $2 \times$ M199培养基(Gibco, 21157-029)中进行1:50稀释步骤来制备。该分析中的最终试验浓度始于20μM,并且随后进行3倍系列稀释,并且最终DMSO浓度同样为0.2%。在化合物预温育步骤后,通过将20μL 10μg/mL CL097溶液(InvivoGen, tlr1-c97-5)添加至各孔中来触发PBMC,其中最终分析体积为200μL/孔并且最终CL097触发剂浓度为1μg/mL。利用相等DMSO浓度(无CL097触发剂)调节阴性对照。然后在37℃和5%CO₂下在潮湿温育箱中将分析板温育4小时。然后通过将细胞培养基转移至384深孔板中收获细胞上清液并且立即将其转移至ELISA板中用于对人TNF α 进行定量。

[0455] 3.4.3. 通过ELISA对TNF α 进行定量

[0456] 以抗体捕获活性分析(ELISA)定量细胞上清液中的分泌的TNF α 的含量。将白色Greiner Lumitrac™ 384孔板用每孔40μL在PBS中稀释的1μg/mL抗人TNF α 抗体溶液(MAb1; BD Biosciences, 551220)在4℃温育过夜进行包被。在利用100μL PBS洗涤各孔后,利用100μL阻断缓冲液(PBS+1%牛血清白蛋白+5%蔗糖)阻断剩余结合位点并且在室温温育4小时。在阻断步骤后,用具有Tween 20的PBS(PBST)将孔洗涤一次,随后添加样品和标准品。在稀释缓冲液中1/3稀释含有TNF α 的样品并且添加40μL在4℃温育过夜。在添加35μL以1/2000格式稀释并且最终浓度为250ng/mL的二级生物素化抗TNF α 检测抗体(MAb11; BD Biosciences, 554511)后,将各孔洗涤3次(用PBST洗涤两次并且用PBS洗涤一次)。在室温温育2小时和适当洗涤步骤($2 \times$ PBST, $1 \times$ PBS)后,利用35μL 1/4000稀释的辣根过氧化物酶结合的链霉亲和素溶液(Life Technologies, SNN2004)温育各孔,随后在室温在黑暗中进行

45分钟的温育步骤。然后将各孔洗涤3次(2×PBST,1×PBS),随后利用50μL化学发光ELISA底物溶液(Roche,11582950001)温育5分钟。在PerkinElmer EnVision 2104多标记读板器中测量转化的底物发光信号。

[0457] 3.4.4.数据分析

[0458] 所有对照均在ELISA的人TNFα标准曲线的线性范围内测量。所有数据均针对分析质量参数来检查有效性(信号/背景>2并且Z' >0.3)。

[0459] 使用未刺激的样品(无触发剂/媒介物(0.2%DMSO))作为阳性对照(100%抑制)。使用刺激的样品(触发剂/媒介物(0.2%DMSO))作为阴性对照(0%抑制)。使用阳性和阴性对照根据以下公式来计算Z' 和抑制百分数(PIN)值:

[0460]

$$PIN = \frac{RCLU \text{ 触发剂 / 媒介物} - RCLU \text{ 试验化合物}}{RCLU \text{ 触发剂 / 媒介物} - RCLU \text{ 无触发剂 / 媒介物}} \times 100 ;$$

其中RCLU=相对化学发光光单位。

[0461] 对在浓度-响应模式中试验的化合物的PIN值进行绘图并且使用GraphPad Prism®软件应用非线性回归(S形)曲线拟合得到IC₅₀值。

[0462] 3.5.细胞分析:癌细胞分析

[0463] 3.5.1.细胞系

[0464] 在37℃和5%CO₂下,在补充有10%胎牛血清(Invitrogen,S7524)或20%人血清(Invitrogen,34005100)的IMDM(Gibco®,21980-032)中培养来自OCI-Ly3、OCI-Ly10、OCI-Ly7和OCI-Ly19细胞系(来自DSMZ,Germany或ATTC,US)的人淋巴瘤细胞。

[0465] 3.5.2.细胞生长分析

[0466] 将淋巴瘤细胞(2至7×10³)平铺于96孔板中,并且利用不同剂量的试验化合物(来自30μM(1/3稀释,8个点))进行处理。将处理的细胞在37℃和5%CO₂下温育7天。使用星孢素(10μM)作为阳性对照。

[0467] 通过利用~~alamarBlue~~®(Invitrogen,DAL 1025)根据制造商的说明温育细胞来测定细胞生长。使用PerkinElmer En~~Vision~~®读板器测量荧光。使用DMSO媒介物值作为0%抑制和星孢素值作为100%抑制计算生长抑制百分数。

[0468] 3.6.在SW1353细胞中的IL-1和TNFα响应细胞分析

[0469] 此分析的目的在于在体外人细胞分析设置中评估本发明化合物对活化的TLR/IRAK-4途径的选择性。SW1353细胞来自软骨细胞细胞系并且对白介素1(IL-1)和TNFα细胞因子触发剂均有响应。两种细胞因子触发剂均诱导这些细胞表达白介素6(IL-6)和MMP13。在此分析中使用IL-6和MMP13释放作为读出并且代表试验化合物对TLR/IRAK-4途径的抑制水平的量度。IL-1触发剂通过IRAK-4依赖性途径进行信号传导,而TNFα不需要IRAK-4进行信号传导。因此,选择性地抑制IRAK-4的化合物仅影响SW1353细胞的IL-1驱动MMP13或IL-6的表达并且并不影响TNFα驱动的这些蛋白质的表达。

[0470] 3.6.1.SW1353细胞的收获和接种

[0471] 在补充有10%FBS和1%青霉素/链霉素(Penicillin/Streptomycin)的DMEM中培

养SW1353细胞。在37℃和5%CO₂下的潮湿气氛中温育细胞并且一周次培养两次。在次培养期间,使用胰蛋白酶-EDTA分离细胞,随后进行利用细胞培养基中和的步骤。在离心后(1,000rpm,在5分钟期间),将沉淀物再悬浮于细胞培养基中并且使用自动细胞计数器(Invitrogen Countess™)对细胞进行计数。

[0472] 使用第16代的细胞并且将其以15,000个细胞/孔的密度平铺于96孔培养板中的120μL细胞培养基中。使细胞在过夜温育期间附着。

[0473] 3.6.2.SW1353分析中的化合物处理和触发

[0474] 在37℃和5%CO₂下通过添加15μL 10×浓缩的化合物溶液将SW1353细胞与试验化合物一起预温育2小时。在不同浓度下试验该化合物,并且通过自10mM储备溶液在DMSO中3倍系列稀释,随后在细胞培养基中进行1/50稀释步骤来制备。该分析中的最终试验浓度始于20μM,并且随后进行3倍系列稀释,并且最终DMSO浓度同样为0.2%。在化合物预温育步骤后,通过将15μL 10×浓缩的IL-1β(Peprotech,200-01B)或TNFα触发剂(Peprotech,300-01A)添加至各孔中来触发SW1353细胞,其中最终分析体积为150μL/孔并且最终触发剂浓度分别为1ng/mL和10ng/mL。利用相同DMSO浓度(无触发剂)调节阴性对照。然后在37℃和5%CO₂下在潮湿的温育箱中温育分析板。24小时和48小时后通过将细胞培养基转移至V型底聚丙烯96孔板中来收获细胞上清液并且在-80℃储存直至ELISA读出为止。

[0475] 3.6.3.通过ELISA对IL-6进行定量

[0476] 在酶联免疫吸附分析(ELISA)中对细胞上清液中分泌的IL-6的水平进行定量。利用每孔40μL在4℃在PBS中稀释的1μg/mL抗人IL-6小鼠抗体(R&D Systems,MAB206)溶液将白色Lumitrac™ 384孔板包被过夜。在用100μL PBST将孔洗涤两次并且用PBS洗涤一次后,利用100μL阻断缓冲液(于PBS中的1%BSA和5%蔗糖)阻断剩余结合位点并且在室温温育4小时。在阻断步骤后,用PBST将孔洗涤一次,随后添加样品或作为标准品的重组人IL-6(R&D Systems,206-IL-050)。在稀释缓冲液中1/20稀释样品并且添加40μL以在4℃温育过夜。在以50ng/mL的最终浓度添加35μL二级生物素化抗IL-6检测抗体(人IL-6生物素化山羊多克隆抗体(R&D Systems,BAF206))后,将孔洗涤3次(用PBST洗涤两次并且用PBS洗涤一次)。在室温温育2小时和适当洗涤步骤(用PBST两次并且用PBS一次)后,利用35μL 1/2,000稀释的链霉亲和素-HRP溶液(Invitrogen,SNN2004)温育各孔,随后在室温在黑暗中温育45分钟。然后将各孔洗涤3次(用PBST两次并且用PBS一次),随后利用50μL化学发光ELISA底物溶液(Roche,11 582 950 001)温育5分钟。利用Luminoskan™ Ascent光度计测量转化的底物的发光。

[0477] 3.6.4.通过ELISA对MMP13进行定量

[0478] 在抗体捕获活性分析中对细胞上清液中分泌的MMP13的水平进行定量。为了该目的,在4℃利用35μL 1.5μg/mL抗人MMP13抗体溶液将黑色Nunc® MaxiSorp™ 384孔板包被过夜。在利用PBST将孔洗涤两次后,在4℃利用100μL于PBS中的5%脱脂奶粉将剩余结合位点阻断24小时。在阻断步骤后,利用PBST将各孔洗涤两次,随后添加样品和标准品。在稀释缓冲液中1/5稀释样品并且在室温添加35μL达4小时。然后用PBST将各孔洗涤两次。随后,通过添加35μL 1.5mM APMA溶液(Sigma-Aldrich,A9563)完全活化MMP13蛋白质并且在37℃温育1小时。然后用PBST将各孔洗涤两次并且添加35μL MMP13底物(OMNIMMP®荧光底物

(BIOMOL,P-126))。在37℃温育1小时后,利用PerkinElmer EnVision®(激发波长:320nm,发射波长:405nm)测量转化的底物的荧光。

[0479] 3.6.5.数据分析和计算

[0480] 所有对照均在ELISA的人IL-6和MMP13标准曲线的线性范围内测量。所有生成的数据均针对分析质量参数来验证(信号/背景>2并且Z'>0.3)。

[0481] 使用未刺激的样品(无触发剂/媒介物(0.2%DMSO))作为阳性对照(100%抑制)。使用刺激的样品(触发剂/媒介物(0.2%DMSO))作为阴性对照(0%抑制)。使用阳性和阴性对照来计算Z'和抑制百分数(PIN)值。

[0482] 抑制百分数(PIN) = ((RU触发剂/媒介物-RU试验化合物)/(RU触发剂/媒介物-RU无触发剂/媒介物)*100);其中RU分别意指IL-6和MMP13ELISA的相对化学发光光单位或相对荧光单位。对在浓度-响应中试验的试验化合物的PIN值进行绘图并且使用GraphPad Prism®软件应用非线性回归(S形)曲线拟合得到IC₅₀值。

[0483] 表IX.说明性本发明化合物的SW1353细胞选择性分析结果

[0484]

化合物编号	IL-1 β 触发剂		TNF α 触发剂	
	IL-6 IC ₅₀ (nM) [在 20 μ M 的 PIN]	MMP13 IC ₅₀ (nM) [在 20 μ M 的 PIN]	IL-6 IC ₅₀ (nM) [在 20 μ M 的 PIN]	MMP13 IC ₅₀ (nM) [在 20 μ M 的 PIN]
1	54 [89%]	36 [81%]	>20000 [54%]	>20000 [26%]
12	40 [80%]	29 [75%]	>20000 [22%]	>20000 [36%]

[0485] 3.6.6.结论

[0486] 表IX的数据显示本发明化合物可有效抑制SW1352细胞中由IL-1 β 触发的IL-6和MMP13表达,而此类化合物对TNF α 触发的事件的效应在效能和最大振幅方面有所受限。这些数据证实本发明化合物对IRAK-4驱动途径的选择性,并且对TNF α 信号传导的影响非常有限,此又可以限制治疗相关的副作用例如嗜中性白血球减少和感染的出现。

[0487] 实施例4.ADME分析

[0488] 4.1.动力学溶解性

[0489] 自化合物的3.3mM DMSO储备溶液开始,于DMSO中通过进行1/2稀释制备化合物的系列稀释:3.3mM、1.6mM、0.83mM、0.41mM和0.21mM。将此稀释系列转移至透明V型底96孔板(Greiner,651201),并且在0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)或0.1M柠檬酸盐缓冲液(pH 3.0)中进一步1/33.5稀释。最终化合物浓度为99.5 μ M、49.7 μ M、24.9 μ M、12.4 μ M和6.22 μ M。最终DMSO浓度不超过3%。作为沉淀的阳性对照,将茈(30mM)添加至每个96孔板的角落孔中。密封分析板并且在37℃在以230rpm振荡的同时温育1小时。然后在白光显微镜下扫描各板,在每个

浓度下产生沉淀物的单个图像(50×放大率)。通过影像分析软件分析每个孔,并且报告化合物显现完全溶解的最高浓度。

[0490] 4.2. 微粒体稳定性

[0491] 于DMSO中三倍稀释化合物于DMSO中的10mM储备溶液。然后在96深孔板(Nunc, 278752)中在105mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中将此预稀释的化合物溶液稀释至2μM并且在37℃预温热。

[0492] 在105mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中以1:700倍数稀释700U/mL的葡萄糖-6-磷酸盐-脱氢酶(G6PDH, Roche, 10127671001)工作储备溶液。在105mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中以1:8倍数稀释含有0.528M MgCl₂·6H₂O (Sigma, M2670)、0.528M D-葡萄糖-6-磷酸盐(Sigma, G7879)和0.208M NADP⁺ (Sigma, N0505)的辅因子混合物。

[0493] 制备含有目标物种(例如,人、小鼠、大鼠、狗)的1mg/mL肝微粒体(Tebu-bio)、1.2U/mL G6PDH和辅因子混合物(6.6mM MgCl₂、6.6mM葡萄糖-6-磷酸盐、2.6mM NADP⁺)的工作溶液。在室温将此混合物预温育15分钟,但决不超过20分钟。

[0494] 在预温育后,以相等量一起添加化合物稀释液和含有微粒体的混合物并且以300rpm温育30分钟。对于第0分钟的时间点而言,向化合物稀释液中添加2体积MeCN,之后添加微粒体混合物。温育期间的最终浓度为:1μM试验化合物或对照化合物、0.2% DMSO、0.5mg/mL微粒体、0.6U/mL G6PDH、3.3mM MgCl₂、3.3mM葡萄糖-6-磷酸盐和1.3mM NaDP⁺。

[0495] 在37℃温育30分钟后,使用2体积MeCN终止反应。

[0496] 混合样品,离心并且收获上清液以在LC-MS/MS上进行分析。仪器响应(即峰高)参考零时间点样品(视为100%)以便确定剩余化合物的百分数。在分析设计中包括普萘洛尔(Propranolol)和维拉帕米(verapamil)作为参照物。

[0497] 关于微粒体稳定性的数据表示为30分钟温育后剩余化合物总量的百分数。

[0498] 4.3. S9亚细胞级分中的代谢稳定性

[0499] 此分析的目的在于通过测定化合物在S9亚细胞级分中的体外代谢稳定性来评价通过醛氧化酶的化合物代谢。

[0500] 首先在DMSO中稀释化合物于DMSO中的10mM储备溶液(40倍),得到250μM浓度。用水进一步稀释此化合物溶液(5倍),得到50μM化合物工作溶液(获得1μM的化合物最终浓度)。以5mM在水中制备肼屈嗪(hydralazine)(醛氧化酶的选择性抑制剂)(获得100μM的最终浓度)。通过在37℃将10μL肝S9悬浮液(人、大鼠、小鼠、猴, BD Gentest™, 20mg/mL)添加至86μL 50mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中来制备温育混合物(2mg蛋白质/mL的最终浓度)。添加2μL 5mM肼屈嗪用于在添加选择性抑制剂的情况下温育,或添加2μL水用于在无抑制剂下温育。在5分钟预温热后,通过将2μL 50μM试验化合物添加至温育混合物中来起始反应。在温育0分钟、3分钟、6分钟、12分钟、18分钟和30分钟后,用300μL具有1%乙酸混合物含有10ng/mL华法林(warfarin)(作为分析内标)的MeCN:MeOH(2:1)终止反应(100μL)。混合样品,离心并且通过LC-MS/MS分析上清液。包括酞嗪作为阳性对照。

[0501] 仪器响应(化合物和内标的峰面积比)参考零时间点样品(视为100%)以便确定剩余化合物的百分数。使用剩余化合物%的绘图使用GraphPad **Prism**®软件来确定S9温育物中的半衰期和内在清除率。使用以下式计算体外内在清除率(μL/min/mg):

[0502] $CL_{int}(\mu L/min/mg) = 0.693/t_{1/2}(min) * (mL温育物/mg蛋白质) * 1000$

[0503] 若通过S9的清除率受胍屈嗪抑制,则可以将试验化合物分类为醛氧化酶的底物。试验化合物的物种特异性清除率还可以指示通过醛氧化酶的代谢。

[0504] 4.4.肝细胞中的代谢稳定性

[0505] 首先在DMSO中将试验化合物于DMSO中的10mM储备溶液稀释至3mM,然后在修饰的Krebs-Henseleit缓冲液(Sigma,K3753)中稀释至5 μ M。在37℃在轻轻振荡下将此化合物稀释液添加至经汇集冷冻保存的肝细胞(BioreclamationIVT)的悬浮液中。最终反应条件为:1 μ M试验化合物、0.03%DMSO、50万个活力肝细胞/mL和75 μ L温育体积。分别使用睾酮(1 μ M)和7-羟基香豆素(1 μ M)作为I期和II期代谢反应对照。

[0506] 在温育0分钟、10分钟、20分钟、45分钟、90分钟、120分钟和180分钟后,利用225 μ L含有10ng/mL华法林钠(作为分析内标)的MeCN:MeOH(2:1)终止反应。混合样品,离心并且通过LC-MS/MS分析上清液。

[0507] 仪器响应(试验化合物和内标峰面积的比)参考零时间点样品(视为100%)以便确定剩余化合物的百分数。

[0508] 使用剩余化合物的百分数的绘图使用GraphPad **Prism**[®]软件来确定肝细胞温育物中的半衰期和内在清除率。

[0509] 4.5.CYP抑制

[0510] 使用cDNA表达的人细胞色素P450同工酶和代谢为荧光代谢物的非荧光底物评价试验化合物对人细胞色素P450同工酶(CYP1A2、2C9、2C19、2D6和3A4)的抑制潜能。

[0511] 试验3.3 μ M和10 μ M下的化合物,其中最终DMSO浓度为0.3%。将化合物与酶一起温育15分钟,之后添加辅因子-底物混合物。对于CYP3A4(BD Biosciences,456202)、CYP2C9(BD Biosciences,456258)、CYP2C19(BD Biosciences,456259)和CYP1A2(BD Biosciences,456203)分析而言,在辅因子混合物中的最终反应浓度为:0.4U/mL葡萄糖-6-磷酸盐-脱氢酶(G6PDH,Roche,10165875001)、3.3mM MgCl₂(Sigma,M2670)、3.3mM D-葡萄糖-6-磷酸盐(Sigma,G7879)和1.3mM NADP⁺(Sigma,N0505)。对于CYP2D6(BD Biosciences,456217)而言,该分析中的最终反应浓度为0.4U/mL G6PDH、0.41mM MgCl₂、0.41mM D-葡萄糖-6-磷酸盐和8.2 μ M NADP⁺。酶和底物的浓度报告于表X中。在一定温育时段后,通过添加终止溶液终止反应。对于利用DBF作为底物的试验,使用2N NaOH终止溶液,而对于所有其它底物而言,终止溶液为80%MeCN/20%0.5M Tris碱。

[0512] 在PerkinElmer En**Vision**[®]读取器上在适当激发和发射波长下立即(对于CEC、AMMC、BFC而言)或在20分钟后(对于使用DBF作为底物的CYP2C9和CYP3A4而言)读取荧光(参考表X)。

[0513] 然后通过将数据标准化为空白样品来计算试验化合物对CYP抑制的百分数:100%抑制是在添加酶/底物混合物之前终止空白样品,并且0%抑制是在发生酶反应(50分钟)后终止空白样品。

[0514] 表X.用于所研究的每个CYP450同工酶的抑制分析条件

[0515]

	CYP3A4	CYP3A4	CYP2C19	CYP2C9	CYP1A2	CYP2D6
底物 (μM)						
DBF	1	-	-	0.5	-	-
CEC	-	-	35	-	4	-
AMMC	-	-	-	-	-	0.5
BFC	-	120	-	-	-	-
磷酸盐缓冲 液 (pH 7.4) (mM)	200	90	25	25	25	25
酶(pmol/孔)	1	1.5	6	2	1.5	3
温育时间 (分钟)	50	50	50	50	50	50
阳性对照	酮康唑	酮康唑	氟伏沙明	磺胺苯吡唑	氟伏沙明	奎尼丁
激发波长 (nm)	485	400	400	485	400	380
发射波长 (nm)	530	530	460	530	460	460

[0516] AMMC:氨基乙基-7-甲氧基-4-甲基香豆素,CEC:3-氰基-7-乙氧基香豆素,BFC:7-苄基氧基-4-三氟甲基香豆素,DBF:二苄基荧光素

[0517] 4.6.MDCKII-MDR1渗透性

[0518] MDCKII-MDR1细胞是过表达人多药物抗性(MDR1)基因、编码P-糖蛋白(P-gp)的Madin-Darby犬肾上皮细胞。细胞自荷兰癌症研究所(Netherlands Cancer Institute)获得并且在24孔**Millicell**[®]细胞培养插板(Millipore,PSRP010R5)中进行3至4天培养后使用。如下所述进行双向MDCKII-MDR1渗透性分析。

[0519] 将 3×10^5 个细胞/mL(1.2×10^5 个细胞/孔)接种于由DMEM(Sigma,D5796)+1% Glutamax-100(Sigma,G8541)+1%抗生素/抗霉菌剂(Sigma,A5955)+10%FBS(Sigma,F7524;在56℃去活化30分钟)组成的平板培养基中。将细胞在CO₂温育箱中保持3至4天。在接种后24小时并且在试验当天更换培养基。

[0520] 在Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(D-PBS,pH 7.4;Sigma,D8662)中制备试验化合物和参考化合物(胺普那韦(amprenavir)(Moravek Biochemicals,M-1613)、双氯芬酸(Sigma,D6889)),并且以10 μM (在胺普那韦的情形下为0.5 μM)的最终浓度添加至Millicell细胞培养板装配的顶室(400 μL)或底侧室(800 μL)中,并且最终DMSO浓度为1%。将接受溶液(D-PBS

+1%DMSO)添加至Millicell细胞培养板的相对室中。

[0521] 将100μM荧光黄 (Lucifer yellow) (Sigma, L0259) 添加至所有供体缓冲溶液中, 以便通过监测荧光黄渗透性来评价细胞单层的完整性。荧光黄是用于细胞旁运输途径的荧光标记物, 并且其用作内部对照以验证分析期间每个细胞单层的紧密结合完整性。

[0522] 在37℃在定轨振荡器上以150rpm振荡的同时温育1小时后, 自顶室和基底室二者中取出75μL等份样品并且将其添加至96孔板中含有分析内标 (10ng/mL 华法林) 的225μL MeCN: 水溶液 (2:1) 中。还在试验开始时自供体溶液分成等份样品, 以获得初始浓度。

[0523] 通过高效液相色谱/质谱 (LC-MS/MS) 测量样品中化合物的浓度。

[0524] 在含有来自所有接受孔 (底侧或顶侧) 的150μL液体的96孔板中利用Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL (激发波长: 485nm, 测量波长: 530nm) 测量荧光黄。

[0525] 实施例5. 全血分析

[0526] 5.1. 离体人TNFα释放抑制 (全血分析)

[0527] 该分析的目的是在离体人全血设置中评估本发明化合物对活化的TLR/IRAK-4途径的活性。Toll样受体 (TLR) 是识别众多微生物分子的型式识别受体 (称为病原体相关的分子型式 (PAMP))。人TLR7和TLR8识别咪唑并喹啉化合物 (例如, CL097) 和单链RNA作为其天然配体。TLR的活化使得TLR激动剂处理的细胞产生多种细胞因子 (例如, TNFα、IL-8、IL-6)。在此分析中使用细胞因子释放作为读出并且其代表试验化合物对TLR/IRAK-4途径的抑制水平的量度。应注意在完整生物体的情况下, 存在这些细胞因子的不依赖于TLR/IRAK-4途径的其它来源, 例如, 巨噬细胞 (在活化Fcγ受体时 (Yan等人2012)) 或T细胞 (在活化T细胞受体时 (Brehm等人2005))。

[0528] 5.1.1. 试验设计

[0529] 通过静脉穿刺将健康志愿者的血液收集至肝素锂管中, 然后轻轻颠倒若干次以防止凝固并且在37℃在摇摆混合器式振荡器上温育至少15分钟。然后, 将200μL血液分配至2mL微管中, 并且将其在37℃与0.3%DMSO或不同浓度下的试验化合物 (10μM至0.01μM, 在无谷氨酰胺的RPMI1640 (Life Technologies, 31870) 中进行3倍稀释) 一起一式两份预温育15分钟。在此预温育后, 在37℃利用CL097 (2μg/mL (来自1mg/mL水溶液); InvivoGen, tlr1-c97) 或媒介物 (蒸馏水) 将血液触发3小时30分钟。在4℃以5000×g将微管离心10分钟, 并且将约80μL血浆收集至聚苯乙烯96孔板中。可以新鲜地或在触发后不久在-80℃冷冻地分析血浆。最后, 通过使用人TNF-α DuoSet ELISA试剂盒 (R&D Systems, DY210) 根据制造商的说明将血浆稀释40倍来进行TNFα的定量。在PerkinElmer EnVision 2102多标记读板器上在450nm测定光学密度 (OD)。

[0530] 5.1.2. 数据分析

[0531] 通过对y轴上的平均吸收相对于x轴上的浓度进行绘图来创建标准曲线, 并且通过该图形上的点绘制最佳拟合曲线。进行线性回归分析来确定等式 ($y = ax + b$) 和R平方值。对于每个血液样品重复, 考虑稀释倍数使用下式来计算TNFα浓度:

[0532] $\text{TNF}\alpha\text{浓度}_{\text{样品1}} = 40 * (\text{OD}_{\text{样品1}} - b) / a$

[0533] 然后针对每个重复使用下式将数据表示为抑制百分数 (PIN):

[0534]

$$\text{PIN 样品 1} = \frac{\text{利用 CL097 的平均 TNF}\alpha - \text{TNF}\alpha \text{ 样品 1}}{\text{利用 CL097 的平均 TNF}\alpha - \text{利用媒介物的平均 TNF}\alpha} \times 100$$

[0535] 其中‘利用CL097的平均TNF α ’是利用CL097触发的重复样品的平均TNF α 浓度；‘TNF α 样品1’是样品1的TNF α 浓度；并且‘利用媒介物的平均TNF α ’是用媒介物处理的重复样品的平均TNF α 浓度。

[0536] 使用平均PIN $\pm$ SEM生成曲线拟合。使用GraphPad **Prism**[®]软件得到图形和IC₅₀计算。

[0537] 5.2. 离体大鼠TNF α 释放抑制(全血分析)

[0538] 该分析的目的是在离体大鼠全血设置中评价本发明化合物对活化的TLR/IRAK-4途径的活性。Toll样受体(TLR)是识别众多微生物分子的型式识别受体(称为病原体相关的分子型式(PAMP))。尽管人TLR7和TLR8均识别咪唑并喹啉化合物(例如,CL097)和单链RNA作为其天然配体,但啮齿动物TLR8需要其它因素(例如寡脱氧核苷酸(例如,poly(dT)))进行活化。

[0539] 5.2.1. 试验设计

[0540] 自Janvier Labs (France) 获得Sprague Dawley大鼠(雄性,7至8周龄,200g至250g体重)。

[0541] 通过放血将自至少2只大鼠获得的血液收集至肝素锂管中,然后在37°C在摇摆混合器式振荡器上预温育至少15分钟。将来自所有大鼠的血液混合至50mL聚丙烯管中以得到独特血液批次。然后,将200 μ L血液分配至2mL微管中并且将其在37°C与0.3%DMSO或不同浓度下的试验化合物(10 μ M至0.01 μ M,在无谷氨酰胺的RPMI 1640 (Life Technologies, 31870) 中进行3倍稀释)一起一式两份温育15分钟。在此预温育后,在37°C利用CL097 (10 μ g/mL (来自1mg/mL水溶液); InvivoGen, tlr1-c97) 和poly(dT) (1 μ M (来自100 μ M水溶液); InvivoGen, tlr1-pt17) 或媒介物(蒸馏水)将血液触发3小时30分钟。在4°C将微管以5000 $\times$ g离心10分钟并且将约80 μ L血浆收集至聚苯乙烯96孔板中。可以新鲜地或在触发后不久在-80°C下冷冻地分析血浆。最后,使用大鼠TNF- α Quantikine ELISA试剂盒(R&D Systems, SRTA00)根据制造商的说明对血浆(1:3稀释)进行TNF α 的定量。在PerkinElmer EnVision 2102多标记读板器上在450nm测定光学密度(OD)。

[0542] 5.2.2. 数据分析

[0543] 通过对y轴上的平均吸收性相对于x轴上的浓度进行绘图来创建标准曲线并且通过该图形上的点绘制最佳拟合曲线。进行线性回归分析以确定等式($y=ax+b$)和R平方值。对于每个血液样品重复,考虑稀释倍数使用下式计算TNF α 浓度:

$$\text{TNF}\alpha \text{ 浓度}_{\text{样品1}} = 40 * (\text{OD}_{\text{样品1}} - b) / a$$

[0545] 然后针对每个重复使用下式将数据表示为抑制百分数(PIN):

[0546]

$$\text{PIN 样品 1} = \frac{\text{利用 CL097 的平均 TNF}\alpha - \text{TNF}\alpha \text{ 样品 1}}{\text{利用 CL097 的平均 TNF}\alpha - \text{利用媒介物的平均 TNF}\alpha} \times 100$$

[0547] 其中‘利用CL097的平均TNF α ’是利用CL097+poly(dT)触发的重复样品的平均TNF α

浓度；‘TNF α 样品1’是样品1的TNF α 浓度；并且‘利用媒介物的平均TNF α ’是用媒介物处理的重复样品的平均TNF α 浓度。

[0548] 使用平均PIN $\pm$ SEM生成曲线拟合。使用GraphPad **Prism**[®]软件得到图形和IC₅₀计算。

[0549] 实施例6.体内分析

[0550] 6.1.通过局部应用咪喹莫特(imiquimod) (TLR7/8激动剂) 诱导的银屑病样表皮增生鼠类模型。

[0551] 6.1.1.材料

[0552] **Aldara**[®]5%咪喹莫特乳膏剂获自MEDA。

[0553] 抗小鼠IL-12/IL-23p40FG纯化抗体(C17.8)获自Affymetrix eBioscience(目录号16-7123-85)。

[0554] 6.1.2.动物

[0555] Balb/cJ小鼠(雌性,18-20g体重)获自Janvier Labs(France)。在12小时明/暗循环(07:00-19:00)下保持小鼠。将温度维持在22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,随意提供食物和水。

[0556] 6.1.3.研究设计

[0557] 研究的设计是根据Van der Fits L.等人(van der Fits等人2009)改编而成。

[0558] 在第一天,在利用异氟烷浅麻醉下在小鼠的两只耳朵周围剃毛。

[0559] 将30mg市售咪喹莫特乳膏剂(Aldara 5%乳膏剂)应用于每只耳朵的内部和外部表面上达连续4天,转换成1.5mg活性化合物的日剂量。对照动物接受相同量的凡士林(vaseline)。

[0560] 对于第1天至第5天,以每日两次口服在0.5%甲基纤维素中的试验化合物(10mg/kg或30mg/kg)对小鼠给药,之后应用咪喹莫特(在第5天,在安乐死前2小时对小鼠仅给药一次)。

[0561] 在阳性参考组中,在第1天和第1天前的3天,动物接受两次抗小鼠IL-12/IL-23p40抗体(10mg/kg)的腹膜内注射。

[0562] 6.1.4.疾病的评价

[0563] 每日利用厚度规(Mitutoyo, Absolute Digimatic, 547-321)测量两只耳朵的厚度。在试验开始和处死时评价体重。在第5天,在最后一次给药后2小时,将小鼠处死。切割耳廓,除去软骨。对耳廓进行称重,然后将其浸没于含有1mL **RNAlater**[®]溶液的小瓶中以评价基因表达或浸没于福尔马林(formalin)中用于组织学。

[0564] 每组有14只小鼠。结果表示为平均值 $\pm$ SEM,并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于咪喹莫特-媒介物组进行统计分析。

[0565] 6.1.5.组织学

[0566] 在处死后,收集耳朵并且于3.7%甲醛中进行固定,之后包埋于石蜡中。切割2 μ m厚的切片,并且用苏木精和曙红染色。通过影像分析(SisNcom软件)测量耳朵表皮厚度,并且以20倍放大率捕获6个影像/耳朵。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于咪喹莫特-媒介物组进行统计分析。

[0567] 6.1.6.基因表达分析

[0568] 将耳朵自 **RNAlater**[®] 溶液取出并且将其在Preceellys装置中利用1.4mm陶瓷珠破裂后置于 **Trizol**[®] 中。然后使用 **NucleoSpin**[®] RNA试剂盒纯化总RNA。制备cDNA并且使用SYBR Green技术在ViiA7实时PCR系统 (Applied Biosystems) 中利用来自Qiagen的基因特异性引物进行定量PCR。相对于亲环素A(cyclophilin A) 管家基因表达水平计算每个基因(IL17A, IL1B, IL22, LCN2, S100A8和S100A9) 的表达水平。数据表示为相对量的平均值 $\pm$ SEM ($RQ = 2^{-\Delta C_T}$, 其中 $\Delta C_T = C_T \text{ 样品} - C_T \text{ 亲环素A}$)。所用统计试验为相对于咪喹莫特-媒介物组的ANOVA变异数分析以及Dunnett事后试验。

[0569] 6.2. 皮内注射IL-23诱导的银屑病样表皮增生的鼠类模型

[0570] 6.2.1. 材料

[0571] 由e-Bioscience提供的无载体小鼠重组IL-23 (14-8231, CF)。

[0572] 6.2.2. 动物

[0573] 自CERJ (France) 获得Balb/c小鼠 (雌性, 18-20g体重)。在12小时明/暗循环 (07:00-19:00) 下保持小鼠。将温度维持在22℃, 随意提供食物和水。

[0574] 6.2.3. 研究设计

[0575] 研究的设计是根据Rizzo HL. 等人 (Rizzo等人2011) 改编而成。

[0576] 在第1天 (D1), 在小鼠的两只耳朵周围剃毛。

[0577] 对于连续4天 (D1至D4), 在通过吸入异氟烷诱导的麻醉下, 小鼠在右耳廓接受每日皮内剂量的小鼠重组IL-23 (1 μ g/20 μ L, 于PBS/0.1%BSA中) 并且在左耳廓接受20 μ L PBS/0.1%BSA。

[0578] 自D1至D5, 在IL-23注射前的1小时, 利用试验化合物 (10mg/kg、30mg/kg或100mg/kg, 口服每天一次, 于甲基纤维素0.5%中) 或媒介物对小鼠给药。

[0579] 6.2.4. 疾病的评价

[0580] 每日利用自动卡尺测量两只耳朵的厚度。在开始和处死时评价体重。在第5天, 在最后一次给药后2小时, 将小鼠处死。切割耳廓, 除去软骨。对耳廓进行称重, 然后将其置于含有1mL **RNAlater**[®] 溶液的小瓶或甲醛中。

[0581] 在D4, 在给药前 (T0) 和给药后1小时、3小时、6小时, 还自眼窝后鼻窦收集血液样品用于PK描述。

[0582] 每组有8只小鼠。结果表示为平均值 $\pm$ SEM, 并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于IL-23媒介物组进行统计分析。

[0583] 6.2.5. 组织学

[0584] 在处死后, 收集耳朵并且于3.7%甲醛中进行固定, 之后包埋于石蜡中。制作2 μ m厚的切片, 并且用苏木精和曙红染色。通过影像分析 (Sis' Ncom软件) 测量耳朵表皮厚度, 并且以20倍放大率捕获6个影像/耳朵。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于IL-23媒介物组进行统计分析。

[0585] 6.2.6. 基因表达分析

[0586] 自 **RNAlater**[®] 溶液去除一半耳朵并且将其在Preceellys装置中利用1.4mm陶瓷珠破裂之后置于 **Trizol**[®] 中。然后使用 **NucleoSpin**[®] RNA试剂盒纯化总RNA。制备cDNA并

且使用SYBR Green技术在ViiA7实时PCR系统(Applied Biosystems)中利用来自Qiagen的基因特异性引物进行定量PCR。相对于亲环素A管家基因表达水平计算每个基因(IL17A, IL1B, IL22, LCN2, S100A8和S100A9)的表达水平。数据表示为相对量的平均值 $\pm$ SEM ($RQ=2^{-\Delta C_T}$, 其中 $\Delta C_T=C_T$ 样品- C_T 亲环素A)。所用统计试验为相对于IL-23媒介物组的ANOVA变异数分析和Dunnett事后试验。

[0587] 6.3.PK/PD模型:由CL097 (特定TLR7/8激动剂) 诱导的TNF α 释放

[0588] 此分析的目的是确定在施用本发明化合物后对体内IRAK-4依赖性事件的抑制与此化合物的循环浓度水平之间的关系。

[0589] 6.3.1.材料

[0590] CL097 (目录号tlrl-c97) 和poly (dT) (目录号tlrl-pt17) 获自InvivoGen。

[0591] **AlphaLISA**[®]小鼠TNF α 试剂盒获自Perkin-Elmer (目录号AL505C)。

[0592] 6.3.2.动物

[0593] DBA/1J小鼠(雄性,18-20g体重)获自Janvier Labs (France)。在12小时明/暗循环(07:00-19:00)下保持小鼠。将温度维持在 $22\pm 2^\circ\text{C}$,随意提供食物和水。

[0594] 6.3.3.研究设计

[0595] 小鼠接受口服剂量的试验化合物。使用未接受任何给药的一组原样(intact)动物作为 $t=0$ 时间点。

[0596] 在给药后30分钟、1小时、3小时、8小时或24小时将通过心脏内取样(在异氟烷麻醉下)获得的两个血液样品收集至肝素锂管中。一个样品用于药物动力学(PK)分析并且另一个用于药效学(PD)标志物定量。

[0597] 6.3.4.血浆中化合物水平的定量

[0598] 以5000rpm将全血样品离心10分钟并且在分析前将所得血浆样品储存于 -20°C 。通过LC-MS/MS方法测定每个试验化合物的血浆浓度。

[0599] 6.3.5.药物动力学参数的确定

[0600] 使用**WinNonlin**[®] (**Pharsight**[®], 美国) 计算药物动力学参数。

[0601] 6.3.6.PD标志物的定量

[0602] 在 37°C 用CL097和poly (dT) 将每个血液样品刺激2小时。然后,收集血浆并且通过AlphaLISA根据制造商的说明来分析TNF α 。

[0603] 每组有6只小鼠。结果表示为TNF α 浓度(pg/mL) 或表示为相对于 $t=0$ 时间点的抑制百分数(PIN)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于相应时间点的媒介物组进行统计分析。

[0604] 6.4.通过局部应用MC903诱导的特应性皮炎的鼠类预防模型

[0605] 6.4.1.材料

[0606] 甲基纤维素0.5%获自VWR (目录号AX021233)。MC903 (卡泊三醇) 获自Tocris Bioscience (目录号2700/50)。**ProSense**[®]680获自PerkinElmer (目录号NEV10003)。

RNAlater[®]获自Ambion (目录号AM7021)。**Imalgene**[®]1000 (Merial) 和**Rompun**[®]2% (Bayer) 获自Centravet (目录号IMA004-6827812和ROM001-6835444)。

[0607] 6.4.2.动物

[0608] BALB/cN小鼠(雌性,18-20g体重)或CD1/Swiss小鼠(雌性,24-26g体重)获自Janvier Labs (France)。在12小时明/暗循环(07:00-19:00)下保持小鼠。将温度维持在 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$,随意提供食物和水。

[0609] 6.4.3. 研究设计

[0610] 研究的设计是根据Li M.等人(Li等人2006)改编而成。

[0611] 在第一天(D1),用Imalgene和Rompun (7.5%/2.5%;0.1mL/10g)的腹膜内注射将小鼠麻醉并且在两只耳朵周围剃毛。

[0612] 自D1起,将20 μL EtOH或2nmol MC903(于20 μL EtOH中)局部应用于小鼠的两只耳朵上达连续五天。

[0613] 自D1至D8,利用试验化合物(15mg/kg或30mg/kg,口服每日两次,于甲基纤维素0.5%中)或地塞米松(5mg/kg,口服每日一次,于甲基纤维素0.5%中)或媒介物对小鼠进行给药。

[0614] 6.4.4. 血浆中化合物水平的定量

[0615] 通过LC-MS/MS方法测定每个试验化合物的血浆浓度,其中以正性或负性电喷雾模式操作质谱仪。

[0616] 6.4.5. 药物动力学参数的确定

[0617] 使用**Phoenix[®] WinNonlin[®] (Pharsight[®])**,美国)计算药物动力学参数。

[0618] 6.4.6. 疾病的评价

[0619] 在研究开始时、每隔一天和在处死时使用厚度规(Mitutoyo, Absolute Digimatic, 547-321)测量两只耳朵的厚度(在通过异氟烷吸入诱导麻醉后)。

[0620] 在研究开始时、每隔一天和在处死时评价体重。

[0621] 在D4,所有组的小鼠均接受**ProSense[®]**680探针(0.8nmol/10g,腹膜内)。在D5,用Imalgene和Rompun (7.5%/2.5%;0.1mL/10g)的腹膜内注射将小鼠麻醉。使用体内分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系统,激发波长:630nm,发射波长:700nm,获取时间:5秒)测量粒细胞浸润。

[0622] 在D8,在最后一次给药后2小时,将小鼠处死并且在包被EDTA的管上收集全血并且冷冻血浆用于进一步的测量(包括循环化合物)。还在包被肝素的管中收集血液的样品。

[0623] 收集耳朵的耳廓并且称重。将一只耳朵纵向切成2半。一半在甲醛缓冲液4%中进行固定用于组织学;另一半浸没于**RNAlater[®]**中以评价基因表达。

[0624] 每组有8只小鼠。结果表示为平均值 $\pm$ SEM并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于MC903媒介物组(对于耳朵厚度和重量)、相对于EtOH媒介物组(对于体重)进行统计分析。

[0625] 6.4.7. 组织学

[0626] 在处死后,收集一半耳朵并且于3.7%甲醛中进行固定,之后包埋于石蜡中。通过免疫组织化学利用特定细胞标记抗体(CD3用于T细胞并且EPX用于嗜酸性粒细胞)对4 μm 厚的切片进行免疫染色。通过影像分析(CalPix软件,TRIBVN Healthcare)测量每只小鼠整个切片的免疫染色的细胞区域。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于MC903媒介物组进行统计分析。

[0627] 6.4.8. 基因表达分析

[0628] 将耳朵自 **RNAlater**[®] 溶液取出并且将其在 Bertin Instruments **Precellys**[®] 均质器中利用 1.4mm 陶瓷珠破裂后置于 **Trizol**[®] 中。然后使用苯酚/氯仿方案提取总 RNA 并且利用 QIAcube 使用 **RNeasy**[®] 96 **QIAcube**[®] HT 试剂盒 (Qiagen, 目录号 74171) 纯化。制备 cDNA 并且使用 SYBR Green 技术在 ViiA 7 实时 PCR 系统 (Applied Biosystems) 中利用来自 Qiagen 的基因特异性引物进行定量 PCR。相对于 HPRT、GAPDH 和 β -肌动蛋白管家基因表达水平来计算每个基因 (IL4、IL5、IL13、TSLP、IL33、ST2、IL25、IL31、IFN γ 、IL6、IL10、LCN2、S100A8 和 S100A9) 的表达水平。数据表示为相对量的平均值 $\pm$ SEM ($RQ = 2^{-\Delta C_T}$, 其中 $\Delta C_T = C_T$ 样品 - 平均 (C_T HPRT、 C_T GAPDH、 C_T β -肌动蛋白))。所用统计试验为相对于 EtOH/MC903 媒介物组的 ANOVA 变异数分析以及 Dunnett 事后试验。

[0629] 6.5. 通过局部应用 MC903 诱导的特应性皮炎的鼠类治疗模型

[0630] 6.5.1. 材料

[0631] 甲基纤维素 0.5% 获自 VWR (目录号 AX021233)。MC903 (卡泊三醇) 获自 Tocris Bioscience (目录号 2700/50)。**ProSense**[®] 680 获自 PerkinElmer (目录号 NEV10003)。**RNAlater**[®] 获自 Ambion (目录号 AM7021)。**Imalgene**[®] 1000 (Meril) 和 **Rompun**[®] 2% (Bayer) 获自 Centravet (目录号 IMA004-6827812 和 ROM001-6835444)。

[0632] 6.5.2. 动物

[0633] BALB/cN 小鼠 (雌性, 18-20g 体重) 或 CD1/Swiss 小鼠 (雌性, 24-26g 体重) 获自 Janvier Labs (France)。在 12 小时明/暗循环 (07:00-19:00) 下保持小鼠。将温度维持在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 随意提供食物和水。

[0634] 6.5.3. 研究设计

[0635] 研究的设计根据 Li M. 等人 (Li 等人 2006) 改编而成。

[0636] 在第一天 (D1), 利用 Imalgene 和 Rompun (7.5%/2.5%; 0.1mL/10g) 的腹膜内注射将小鼠麻醉并且在两只耳朵周围剃毛。

[0637] 自 D1 起, 将 20 μL EtOH 或 2nmol MC903 (于 20 μL EtOH 中) 局部应用于小鼠的两只耳朵上直至 D9、D11 或 D15 (除了在周末期间)。

[0638] 自 D5, 利用试验化合物 (15 或 30mg/kg, 口服每日二次, 于甲基纤维素 0.5% 中) 或地塞米松 (5mg/kg, 口服每日一次, 于甲基纤维素 0.5% 中) 或媒介物对小鼠进行给药, 直至 D10、D12 或 D16。

[0639] 6.5.4. 血浆中化合物水平的定量

[0640] 通过 LC-MS/MS 方法确定每个试验化合物的血浆浓度, 其中以正性或负性电喷雾模式操作质谱仪。

[0641] 6.5.5. 药物动力学参数的确定

[0642] 使用 **Phoenix**[®] **WinNonlin**[®] (**Pharsight**[®], 美国) 计算药物动力学参数。

[0643] 6.5.6. 疾病的评价

[0644] 在应用 MC903 前、在研究开始时、一周三次和在处死时使用厚度规 (Mitutoyo, Absolute Digimatic, 547-321) 测量两只耳朵的厚度 (在通过异氟烷吸入诱导麻醉后)。

[0645] 在研究开始时、一周三次和在处死时评价体重。

[0646] 在D8、D10或D11,所有组的小鼠均接受**ProSense**[®]680探针(0.8nmol/10g,腹膜内)。第二天(D9、D11或D12),用Imalgene和Rompun(7.5%/2.5%;0.1mL/10g)的腹膜内注射将小鼠麻醉。然后使用体内分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系统,激发波长:630nm,发射波长:700nm,获取时间:5秒)测量粒细胞浸润。

[0647] 在D10、D12或D16,在最后一次给药后的2小时,将小鼠处死;在包被EDTA的管上收集全血并且冷冻血浆用于进一步的测量(包括循环化合物)。

[0648] 收集耳朵的耳廓。将一只耳朵纵向切成2半。一半在甲醛缓冲液4%中进行固定用于组织学;另一半浸没于**RNAlater**[®]中以评价基因表达。

[0649] 每组有8只小鼠。结果表示为平均值±SEM,并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于MC903媒介物组(对于耳朵厚度和重量)、相对于EtOH媒介物组(对于体重)进行统计分析。

[0650] 6.5.7.组织学

[0651] 在处死后,收集一半耳朵并且于3.7%甲醛中进行固定,之后包埋于石蜡中。通过免疫组织化学利用抗CD3抗体对4μm厚的切片进行免疫染色。通过影像分析(CalPix软件,TRIBVN Healthcare)测量每只小鼠整个切片的免疫染色的细胞区域。数据表示为平均值±SEM,并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于MC903媒介物组进行统计分析。

[0652] 6.5.8.基因表达分析

[0653] 将耳朵自**RNAlater**[®]溶液取出并且将其在Bertin Instruments **Precellys**[®]均质器中利用1.4mm陶瓷珠破裂后置于**Trizol**[®]中。然后使用苯酚/氯仿方案提取总RNA并且利用QIAcube使用**RNeasy**[®]96**QIAcube**[®]HT试剂盒(Qiagen,目录号74171)进行纯化。制备cDNA并且使用SYBR Green技术在ViiA7实时PCR系统(Applied Biosystems)中利用来自Qiagen的基因特异性引物进行定量PCR。相对于HPRT、GAPDH和β-肌动蛋白管家基因表达水平计算每个目标基因(GOI=IL4、IL5、IL13、TSLP、IL33、ST2、IL25、IL31、IFN γ、IL6、IL10、LCN2、S100A8和S100A9)的表达水平。

[0654] 所有qPCR数据均表示为标准化的相对量的平均值±SEM($NRQ = 2^{-(\Delta Cq GOI) / Geomean(2^{-(\Delta Cq HPRT)}, 2^{-(\Delta Cq GAPDH)}, 2^{-(\Delta Cq \beta\text{-肌动蛋白)})}$),其中 $\Delta Cq = Cq\text{平均值} - Cq\text{样品}$ 。所用统计试验为相对于EtOH/MC903媒介物组的ANOVA变异数分析和Dunnett事后试验。

[0655] 6.6.通过表皮应用咪喹莫特诱导的系统性红斑狼疮的鼠类模型

[0656] 6.6.1.材料

[0657] **Aldara**[®]5%咪喹莫特乳膏剂获自MEDA。

[0658] 小鼠抗双链DNA抗体ELISA试剂盒获自Alpha Diagnostic International(目录号5120)。小鼠尿白蛋白ELISA试剂盒获自Abcam(目录号ab108792)。尿肌酐分析试剂盒获自Abnova(目录号KA4344)。

[0659] 6.6.2.动物

[0660] BALB/cJ小鼠(雌性,18-20g体重)获自Janvier Labs(France)。在12小时明/暗循环(07:00-19:00)下保持小鼠。将温度维持在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,随意提供食物和水。

[0661] 6.6.3.研究设计

[0662] 研究的设计根据Yokogawa M.等人(Yokogawa等人2014)改编而成。

[0663] 在第1天(D1),在小鼠的右耳周围剃毛。

[0664] 小鼠每周3次在右耳廓接受1.25mg咪喹莫特的表皮应用达连续12周(D1至D86)。对照组接受相同量的凡士林。

[0665] 自D1至D86,利用试验化合物(30mg/kg,口服每日一次,于甲基纤维素0.5%中)或媒介物(10mL/kg)对小鼠进行给药。

[0666] 6.6.4.疾病的评价

[0667] 每周一次利用自动量规(Mitutoyo, Absolute Digimatic, 547-321)测量耳朵的厚度。

[0668] 在开始时和每周一次评价体重直至处死。在尸检时,还测量脾脏重量。在最后一次给药后的2小时将小鼠处死。

[0669] 在不同时间点(例如,在D28天、D56天和D84天),将小鼠个别地置于代谢笼中以进行尿分析并且评价蛋白尿(白蛋白对肌酐比)。

[0670] 在不同时间点(例如,在D28、D56和D86)收集血清以评价抗双链DNA IgG水平。

[0671] 在D13,在即将给药之前(T0)和给药后1小时、3小时、6小时还自眼窝后鼻窦收集血液样品用于PK描述。

[0672] 每组有8至19只小鼠。结果表示为平均值 $\pm$ SEM,并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于咪喹莫特媒介物组进行统计分析。

[0673] 6.6.5.血浆中化合物水平的定量

[0674] 通过LC-MS/MS方法测定每个试验化合物的血浆浓度,其中以正性或负性电喷雾模式操作质谱仪。

[0675] 6.6.6.药物动力学参数的确定

[0676] 使用**Phoenix[®] WinNonlin[®] (Pharsight[®], 美国)**计算药物动力学参数。

[0677] 6.6.7.组织学

[0678] 在处死后,收集左肾并且将其纵向切成2个部分。一部分在3.7%甲醛中进行固定,之后包埋于石蜡中。制备4 μm 厚的切片并且用过碘酸-希夫(Periodic acid-Schiff, PAS)进行染色或利用CD3(T细胞)、CD20(B细胞)和F4/80(巨噬细胞)进行免疫染色。

[0679] 6.6.7.1.组织病理学

[0680] 在每个肾小球中,在0至2的量表上对4个不同的读出(包括系膜增生、毛细血管内增生、系膜基质扩展和节段性硬化症)进行分级,然后将其相加。对每个肾,对约50个肾小球进行评分,然后求平均,得到一个肾小球损伤分值(Yokogawa等人2014)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM并且使用Kruskal-Wallis试验随后Dunn事后试验相对于咪喹莫特媒介物组进行统计分析。

[0681] 6.6.7.2.细胞定量

[0682] 对于每个细胞类型,使用影像分析(CalPix软件, TRIBVN Healthcare)对整个组织切片以20倍的放大率进行免疫组织化学分析。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,并且使用单因素

ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于咪唑莫特媒介物组进行统计分析。

[0683] 6.6.8. 基因表达分析

[0684] 在处死时,将左肾的第二部分置于含有1.4mm陶瓷珠的管中并且利用Bertin Instruments **Precellys**[®]均质器在1%DTT RLT裂解缓冲液(Qiagen,目录号79216)中将其破裂。然后利用QIAcube使用**RNeasy**[®]96**QIAcube**[®]HT试剂盒(Qiagen,目录号74171)纯化总RNA。制备cDNA并且使用SYBR Green技术在ViiA7实时PCR系统(Applied Biosystems)中利用来自Qiagen的基因特异性引物进行定量PCR。相对于亲环素、GAPDH和β-肌动蛋白管家基因表达水平计算每个目标基因(GOI=CD3、CD68、CD20、OAS1、Mx1、IFIT1、CXCL11和Usp18)的表达水平。

[0685] 在处死时,将三分之一脾脏置于含有1.4mm陶瓷珠的管中并且利用Bertin Instruments **Precellys**[®]均质器在**Trizol**[®]中将其破裂。使用苯酚/氯仿方法提取总RNA,然后利用QIAcube使用**RNeasy**[®]96**QIAcube**[®]HT试剂盒(Qiagen,目录号74171)纯化。制备cDNA并且使用SYBR Green技术在ViiA7实时PCR系统(Applied Biosystems)中利用来自Qiagen的基因特异性引物进行定量PCR。相对于亲环素、GAPDH和β-肌动蛋白管家基因表达水平,计算每个目标基因(GOI=CD20、IRF7、OAS1、Mx1、IFIT1、CXCL11、Usp18、BCL6、CXCL13、CXCR5、MAF、ICOSL、PDCD1、SH2D1a)的表达水平。

[0686] 所有qPCR数据均表示为标准化的相对量的平均值±SEM($NRQ = 2^{-(\Delta Cq_{GOI})} / \text{Geomean}(2^{-(\Delta Cq_{\text{亲环素}})}, 2^{-(\Delta Cq_{\text{GAPDH}})}, 2^{-(\Delta Cq_{\beta\text{-肌动蛋白}})})$),其中 $\Delta Cq = Cq_{\text{平均值}} - Cq_{\text{样品}}$ 。所用统计试验为相对于咪唑莫特媒介物组的ANOVA变异数分析和Dunnett事后测试。

[0687] 6.7. 通过IL-23的过表达诱导的银屑病性关节炎的鼠类模型

[0688] 6.7.1. 材料

[0689] 小鼠IL-23增强的附加型表达载体(EEV)获自System Biosciences(目录号EEV651A-1)。Ringer溶液片剂获自Sigma-Aldrich(目录号96724-100TAB)。小鼠IL-23Quantikine ELISA试剂盒是获自R&D Systems(目录号M2300)。**ProSense**[®]680和**OsteoSense**[®]750EX获自PerkinElmer(目录号NEV10003和NEV10053EX)。**RNAlater**[®]获自Ambion(目录号AM7021)。**Imalgene**[®]1000(Merial)和**Rompun**[®]2%(Bayer)获自Centravet(目录号IMA004-6827812和ROM001-6835444)。

[0690] 6.7.2. 动物

[0691] B10.RIII小鼠(雄性,8周龄)获自Charles River(France)。在12小时明/暗循环(07:00-19:00)下保持小鼠。将温度维持在22±2℃,随意提供食物和水。

[0692] 6.7.3. 研究设计

[0693] 研究的设计根据Sherlock JP.等人(Sherlock等人2012)改编而成。

[0694] 在第一天(D1),小鼠经历Ringer或于Ringer中的IL-23EEV流体动力注射至尾部静脉中(3μg/2.1mL,静脉内注射达4-6秒的时段)。

[0695] 自D5起,每周两次,对小鼠的临床症状进行评分直至试验结束。

[0696] 在D5,在颌下静脉中通过穿刺收集血液以评价血清IL-23的浓度。

[0697] 在D9,所有组的小鼠均接受**ProSense**[®]680探针(0.8nmol/10g,腹膜内)。在D10,利用Imalgene和Rompun(7.5%/2.5%;0.1mL/10g)的腹膜内注射将小鼠麻醉。然后使用体内分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系统,激发波长:630nm,发射波长:700nm,获取时间:5秒)测量粒细胞浸润。

[0698] 在D11,根据**ProSense**[®]680分子成像和评分进行随机化。

[0699] 自D12起,利用试验化合物(30mg/kg,口服每日二次,于甲基纤维素0.5%中)或媒介物对小鼠进行给药。

[0700] 在D19,在最后一次给药后的T0、T1h、T3h和T6h对血液进行取样。分离血浆并且保持在20℃直至生物分析为止。

[0701] 在D36,在最后一次施用化合物后的2小时将所有组的小鼠处死。收集以下各项:

[0702] -立即将左后肢的足跟围绕附着点(enthesis)(无皮肤)于Precellys管中速冻。将脚趾收集于含有**RNAlater**[®]的管中。立即在甲醛缓冲液4%中固定右后肢用于组织学评估。在固定后的48小时进行X射线测量。

[0703] -将一只耳朵收集于含有**RNAlater**[®]的管中用于转录分析。

[0704] -在血清血管中收集全血并且通过轻轻颠倒8至10次进行混合。在凝固后,将血液样品以1800×g离心10分钟。在离心后,在-80℃储存血清。

[0705] -将结肠的一部分(1cm末端结肠)在Precellys管中立即速冻用于转录分析。在甲醛缓冲液4%中立即固定另一部分(1cm末端结肠)以进行进一步组织学分析。

[0706] 6.7.4.疾病的评价

[0707] 在研究开始时、然后每周两次和在处死时评价体重。

[0708] 每周两次,对炎症的临床体征进行评分:正常爪为0;若一个趾肿胀,则为1;若两个或更多个趾肿胀,则为2;若整个爪肿胀,则为3。将所有肢的分值相加以产生总体分值。

[0709] 在D23,所有组的小鼠均接受**ProSense**[®]680探针(0.8nmol/10g,腹膜内)。在D24,利用Imalgene和Rompun(7.5%/2.5%;0.1mL/10g)的腹膜内注射将小鼠麻醉。然后使用体内分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系统,激发波长:630nm,发射波长:700nm,获取时间:5秒)测量粒细胞浸润。

[0710] 在D32,所有组的小鼠均接受**ProSense**[®]680探针(0.8nmol/10g,腹膜内)和**OsteoSense**[®]750EX探针(0.8nmol/10g,腹膜内)。在D33,利用Imalgene和Rompun(7.5%/2.5%;0.1mL/10g)的腹膜内注射将小鼠麻醉。使用体内分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系统;对于**ProSense**[®]680探针,激发波长:630nm,发射波长:700nm,获取时间:5秒;对于**OsteoSense**[®]750EX探针,激发波长:720nm,发射波长:790nm,获取时间:5秒)测量粒细胞浸润和骨重塑。

[0711] 每组有10只小鼠。结果表示为平均值±SEM并且使用单因素ANOVA随后使用Dunnett事后试验相对于患病媒介物组(针对评分和影像分析)、相对于假媒介物组(针对体重)来进行统计分析。

[0712] 最后附注

[0713] 本领域技术人员应了解,前面的描述本质上是示例性和解释性的,并且意欲说明本发明及其优选的实施方案。通过常规试验,本领域技术人员将意识到在不背离本发明的精神下可以作出明显修饰和变通。在所附权利要求的范围内的所有此类修饰均意欲包括在本文内。因此,本发明并非意欲通过以上描述来定义,而是通过以下权利要求及其等价形式来定义。

[0714] 本说明书中引用的所有出版物(包括(但不限于)专利和专利申请)均并入本文作为参考,如同每个个别出版物特别并且个别指示如完全阐述并入本文作为参考一般。

[0715] 应了解,因素例如多种化合物的差示细胞渗透能力可以促成体外生物化学和细胞分析中的化合物活性间的差异。

[0716] 如本申请中所给出和阐述的本发明化合物的至少某些化学名称可以通过使用市售化学品命名软件程序自动生成,但未经独立验证。进行此功能的代表性程序包括由OpenEye Scientific Software, Inc.出售的Lexichem命名工具和由MDL Information Systems, Inc出售的Autonom Software工具。在所指示的化学名称和所绘的结构不同的情况下,以所绘的结构为准。

[0717] 参考文献

[0718] Bain J et al.2003.The specificities of protein kinase inhibitors:an update.Biochem.J.371,199-204.

[0719] Brehm MA,Daniels KA,Welsh RM.2005.Rapid Production of TNF- α following TCR Engagement of Naive CD8 T Cells.J.Immunol.175,5043-5049.

[0720] Broekman F,Giovannetti E,Peters GJ.2011.Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted?World J.Clin.Oncol.2,80-93.

[0721] Bundgaard H.1985.Design of prodrugs,Elsevier.

[0722] Carmi Y et al.2013.The Role of IL-1 β in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response.J.Immunol.190,3500-3509.

[0723] Chiang EY,Yu X,Grogan JL.2011.Immune Complex-Mediated Cell Activation from Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis Patients Elaborate Different Requirements for IRAK1/4 Kinase Activity across Human Cell Types.J.Immunol.186,1279-1288.

[0724] Cohen P.2009.Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs.Curr.Opin.Cell Biol.21,317-324.

[0725] Dinarello CA,Simon A,van der Meer JWM.2012.Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases.Nat.Rev.Drug Discov.11,633-652.

[0726] Dy GK,Adjei AA.2013.Understanding,recognizing,and managing toxicities of targeted anticancer therapies.CA.Cancer.J.Clin.63,249-279.

[0727] Fabian MA et al.2005.A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors.Nat.Biotechnol.23,329-336.

[0728] van der Fits L et al.2009.Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis..J.Immunol.182,

5836-5845.

[0729] Force T, Kolaja KL. 2011. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 111-126.

[0730] Koziczak-Holbro M et al. 2009. The critical role of kinase activity of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 in animal models of joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 60, 1661-1671.

[0731] Kroeger KM, Sullivan BM, Locksley RM. 2009. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38 α -dependent pathway. *J. Leukoc. Biol.* 86, 769-778.

[0732] Li D et al. 2014. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 1422-1432.e11.

[0733] Li M et al. 2006. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11736-11741.

[0734] Li S et al. 2002. IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5567-5572.

[0735] Li Z et al. 2015. Inhibition of IRAK1/4 sensitizes T cell acute lymphoblastic leukemia to chemotherapies. *J. Clin. Invest.* 125, 1081-1097.

[0736] McHedlidze T et al. 2013. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*, 39, 357-371.

[0737] Nabe T. 2014. Interleukin(IL)-33: New Therapeutic Target for Atopic Diseases. *J. Pharmacol. Sci.* 126, 85-91.

[0738] Ngo VN et al. 2011. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470, 115-119.

[0739] Rankin AL et al. 2010. IL-33 Induces IL-13-Dependent Cutaneous Fibrosis. *J. Immunol.* 184, 1526-1535.

[0740] Rhyasen GW, Starczynowski DT. 2015. IRAK signalling in cancer. *Br. J. Cancer* 112, 232-237.

[0741] Ringwood L, Li L. 2008. The involvement of the interleukin-1 Receptor-Associated Kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine* 42, 1-7.

[0742] Rizzo HL et al. 2011. IL-23-Mediated Psoriasis-Like Epidermal Hyperplasia Is Dependent on IL-17A. *J. Immunol.* 186, 1495-1502.

[0743] Salimi M et al. 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* 210, 2939-2950.

[0744] Sherlock JP et al. 2012. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t+CD3+CD4-CD8-entheseal resident T cells. *Nat. Med.* 18, 1069-1076.

- [0745] Staschke KA et al.2009.IRAK4 Kinase Activity Is Required for Th17 Differentiation and Th17-Mediated Disease.J.Immunol.183,568-577.
- [0746] Sundberg TB et al.2014.Small-molecule control of cytokine function: new opportunities for treating immune disorders.Curr.Opin.Chem.Biol.23,23-30.
- [0747] Treon SP et al.2012.MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia.N.Engl.J.Med.367,826-833.
- [0748] VidaI-Vanaclocha F et al.2000.IL-18 regulates IL-1 β -dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1.Proc.Natl.Acad.Sci.97,734-739.
- [0749] Wang Z et al.2009.IRAK-4 Inhibitors for Inflammation.Curr.Top.Med.Chem.9,724-737.
- [0750] Wuts PGM, Greene TW.2006.Greene's Protective Groups in Organic Synthesis 4th ed., Wiley-Interscience.
- [0751] Yah C et al.2012.C5a-regulated CCAAT/Enhancer-binding Proteins β and δ Are Essential in Fc γ Receptor-mediated Inflammatory Cytokine and Chemokine Production in Macrophages.J.Biol.Chem.287,3217-3230.
- [0752] Yokogawa M et al.2014.Epicutaneous Application of Toll-like Receptor 7 Agonists Leads to Systemic Autoimmunity in Wild-Type Mice:A New Model of Systemic Lupus Erythematosus.Arthritis Rheumatol.66,694-706.

[0001]

序列表

<110> 加拉帕戈斯股份有限公司

<120> 作为IRAK抑制剂的6-[5-氨基-6-(2-乙氧基乙氧基)-咪唑并[4,5-B]吡啶-3-基]-烟腈衍生物及其用途

<130> GAL-226-80-PCT

<160> 4

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RIP146肽

<400> 1

Cys	Tyr	Gly	Val	Ala	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Lys	Lys	Ser
1			5					10					15		

Lys	Val	Lys	Asp	Gln
			20	

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 组蛋白H3肽

<400> 2

Ala	Arg	Thr	Lys	Gln	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro
1			5					10					15		

Arg	Lys	Gln	Leu	Cys
			20	

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 组蛋白H1-衍生的肽

<400> 3

Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Thr	Pro	Lys	Lys	Ala	Lys	Lys	Leu
1			5					10				

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDKtide

<400> 4

Lys	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Arg	Arg
1			5						10					15	

Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln Glu Met Phe Arg Asp Phe
20 25 30

[0002]

Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys
35