



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112313233 A

(43) 申请公布日 2021.02.02

(21) 申请号 201980040198.7

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2019.06.14

代理人 初明明 彭昶

(30) 优先权数据

62/685737 2018.06.15 US

62/846290 2019.05.10 US

(51) Int.Cl.

C07D 471/14 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/055005 2019.06.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/239387 EN 2019.12.19

(71) 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时·比尔斯·特恩豪特斯路30号

(72) 发明人 P·J·克劳祖克 P·费尔南德斯

M·S·蒂谢诺

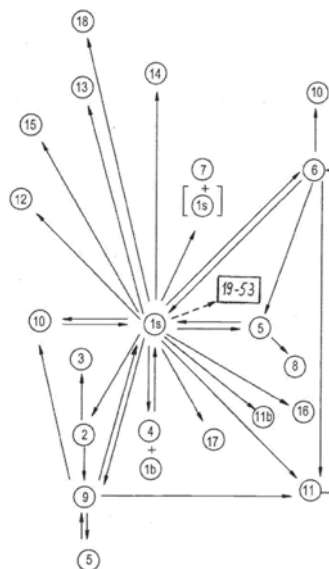
权利要求书2页 说明书62页 附图20页

(54) 发明名称

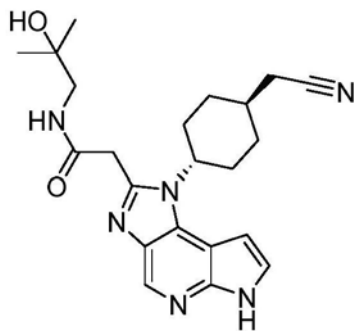
JAK家族激酶的小分子抑制剂

(57) 摘要

本发明提供了2-((1r,4r)-4-(咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-1(6H)-基)环己基)乙腈化合物、包含该化合物的药物组合物、制备该化合物的方法以及使用该化合物的方法,包括用于治疗由JAK介导的疾病状态、障碍和病症的方法。



1. 一种下式的化合物



其中所述化合物为形式1s、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、11b、12、15、16、17、18、19、20、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52和53中的至少一种形式。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式11、11b、15、16、17和18中的至少一种形式。

3. 根据权利要求2所述的化合物,其中所述化合物为形式11。

4. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式11和11b中的至少一种形式。

5. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式1s、6、10、5、8和11中的至少一种形式。

6. 根据权利要求5所述的化合物,其中所述化合物为形式1s、6、10和11中的至少一种形式。

7. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式19。

8. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式1s和16中的至少一种形式。

9. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式1s和11b中的至少一种形式。

10. 根据权利要求5所述的化合物,其中所述化合物为形式1s和11中的至少一种形式。

11. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式1s和17中的至少一种形式。

12. 根据权利要求9所述的化合物,其中所述化合物为形式11b。

13. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式12。

14. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式16。

15. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式20。

16. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式1s和12中的至少一种形式。

17. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式1s和15中的至少一种形式。

18. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式1s、15和19中的至少一种形式。

19. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式1s和18中的至少一种形式。

20. 根据权利要求17所述的化合物,其中所述化合物为形式15。

21. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式17。

22. 根据权利要求19所述的化合物,其中所述化合物为形式18。

23. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式21。

24. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式22。

25. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式23。
26. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式24。
27. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式25。
28. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式26。
29. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式27。
30. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式28。
31. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式29。
32. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式30。
33. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式31。
34. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式32。
35. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式33。
36. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式34。
37. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式35。
38. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式36。
39. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式37。
40. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式38。
41. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式39。
42. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式40。
43. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式41。
44. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式42。
45. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式43。
46. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式44。
47. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式45。
48. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式46。
49. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式47。
50. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式48。
51. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式49。
52. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式50。
53. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式51。
54. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式52。
55. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为形式53。

## JAK家族激酶的小分子抑制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及某些咪唑并吡咯并吡啶化合物,包含所述化合物的药物组合物,制备所述化合物的方法,以及将所述化合物用作JAK抑制剂和用于治疗由JAK介导的疾病状态、障碍和病症的方法。

### 背景技术

[0002] 内部因素、外部因素或这两种因素的组合可触发或与身体中的异常免疫应答的发展相关联。因此,病理状态得以发展,其中通常存在于身体内的组成(例如物质和组织)经受此类免疫应答。这些状态一般被称为免疫系统疾病。因为身体的免疫系统被涉及并且该损伤影响身体组织,所以此类疾病也称为自身免疫疾病。因为此类系统和组织是同一个身体的一部分,因此术语“自身免疫疾病”和“免疫系统疾病”在本文中可互换使用,不考虑是什么触发了异常免疫系统反应。此外,潜在的免疫问题的识别或机制并不总是清楚的。参见,例如,D.J.Marks等人,Crohn's disease:An immune deficiency state,Clinical Reviews in Allergy and Immunology 38(1),20-30(2010);J.D.Lalande等人,Mycobacteria in Crohn's disease:How innate immune deficiency may result in chronic inflammation,Expert Reviews of Clinical Immunology 6(4),633-41(2010);J.K.Yamamoto-Furusho等人,Crohn's disease:Innate immunodeficiency,World Journal of gastroenterology,12(42),6751-55(2006)。如本文所用,术语“自身免疫疾病”不排除其原因包括外部因素或试剂(诸如环境或细菌因素)和内部因素(诸如遗传易感性)的病症。因此,诸如克罗恩病(CD)的病症在本文中被称为自身免疫疾病,而不论病症是由身体本身触发还是由外部因素触发。参见例如,J.L.Casanova等人,Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of Macrophages,J.Exp.Med.206(9),1839-43(2009)。

[0003] 在由自身免疫性疾病引起的各种不利影响中,通常观察到以下情况中的至少一种:组织损伤,并且有时为组织破坏,以及可影响器官生长和器官功能的器官改变。自身免疫性疾病的示例影响大多数主要器官、内分泌和外分泌腺体、血液和肌肉、以及多种系统,诸如消化系统、血管系统、结缔系统和神经系统。通常采用免疫抑制治疗来治疗自身免疫性疾病。

[0004] 已知有多种理论可解释自身免疫性疾病是如何产生的,一些理论关注内源因素,而其他因素则还包括外源因素。在分子水平上,认为Janus激酶/信号转导子和转录激活因子(JAK/STAT)信号传导通路在将信息从细胞外化学信号传递到细胞核中起到重要作用,从而导致参与细胞活性诸如免疫性的基因的调节。细胞因子是在细胞信号传导中起重要作用的细胞外分子的示例。白细胞诸如中性粒细胞由细胞因子和趋化因子募集,从而最终导致慢性炎症性疾病的组织损伤。

[0005] Janus激酶(JAK)蛋白质家族由4个酪氨酸激酶,JAK1、JAK2、JAK3和Tyk2组成,其是I型和II型细胞因子受体的细胞内信号传导的中心。术语JAK是指JAK1、JAK2、JAK3或Tyk2、

或它们的任何组合。每种JAK与受体亚基缔合,所述受体亚基二聚化(或多聚化)以形成功能受体。根据J.D.Clark等人,Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases, J. Med. Chem. 57 (12), 5023-38 (2014), “当细胞因子结合到其受体时发生激活步骤,从而诱导受体亚基的多聚化(二聚化或更高级的络合物。这使与每个亚基缔合的JAK彼此邻近,从而触发一系列磷酸化事件,最终导致信号转导子和转录激活因子(STAT)蛋白质的磷酸化和活化。然后,磷酸化的STAT二聚体易位至细胞核,在所述细胞核中其与调节其表达的靶基因结合。”一旦处于细胞核中,STAT就经由与DNA上的特异性识别位点结合来调节炎症过程中多种介质的基因转录。参见,例如, J. Med. Chem. 57 (12), 5023-38 (2014), 如上所引用的。大量证据展示出JAK/STAT途径在炎症、自身免疫疾病和癌症中的重要性。参见,例如, M. Coskun等人, Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, Pharmacological Research 76, 1-8 (2013); 和 J. J. O’Shea等人, JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer, The New England Journal of Medicine 368, 161-70 (2013)。

[0006] 炎症肠病,包括克罗恩病和溃疡性结肠炎(UC)的特征在于复发性肠道炎症、上皮屏障的破坏和微生物生态失调。胃肠道中的过度炎症反应由几种促炎细胞因子介导,其包括TNF $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-21和IL-23,所述促炎性细胞因子对先天性和适应性免疫系统的细胞,包括T淋巴细胞和B淋巴细胞、上皮细胞、巨噬细胞和树突细胞(DC)发挥作用。参见,例如, Pharmacological Research 76, 1-8 (2013), 上文所引用的; S. Danese等人, JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: A hub for Multiple inflammatory cytokines, American Journal of Physiology, gastrointestinal and Liver Physiology 310, G155-62 (2016); 和 M. F. Neurath, Cytokines in inflammatory bowel disease, Nature Reviews Immunology 14, 329-42 (2014)。

[0007] 期望预防和/或控制此类过度炎症反应。按照如上文概述的此类反应机制,设想JAK抑制(参见图1中呈锯齿状箭头形式的例示,其示出pan-JAK抑制剂攻击JAK/STAT信号传导通路和炎症)以预防或控制过度的炎症反应。抑制多个此类JAK蛋白的JAK抑制剂在本文中被称为pan-JAK抑制剂。已经在托法替尼的情况下观察到此类预防或控制的治疗有益效果的示例,托法替尼是在美国被批准用于治疗类风湿性关节炎并且目前被批准用于溃疡性结肠炎的临床开发的口服生物可利用的pan-JAK抑制剂。在2期临床试验中,据报道对194名患有中度至重度溃疡性结肠炎的患者临床功效进行了评估。参见,例如, W. J. Sandborn等人, Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis, The New England Journal of Medicine 367, 616-24 (2012)。该试验的公布信息指示,相比于安慰剂中观察到的42%,每天两次(BID)接受0.5mg、3mg、10mg和15mg剂量的患者分别实现32%、48%、61%和78%的临床反应率。据进一步报道,相比于安慰剂中观察到的10%,临床缓解的次要重点(Mayo评分 $\leq 2$ )为13%、33%、48%和41%。参见,例如, The New England Journal of Medicine 367, 616-24 (2012), 如上文所引用的。在3期UC临床试验中,据报道相比于接受安慰剂治疗的122名患者中的10名,476名患者中88名在利用托法替尼治疗8周(10mg BID)之后达到临床缓解。参见W. J. Sandborn等人, Efficacy and safety of oral

tofacitinib as induction therapy in patients with Moderate-to-severe ulcerative colitis: results from 2 phase 3 randomised controlled trials, *J. Crohns Colitis* 10, S15-S (2016)。有关克罗恩病的报道指出托法替尼也曾进行针对CD治疗的研发;然而,据报道,由于在中度至重度CD的4周/2期临床试验中不能达到临床功效而中断。参见W.J.Sandborn等人, A phase 2 study of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in patients with Crohn's disease, *Clinical gastroenterology and hepatology: The official clinical practice journal of the American gastroenterological Association* 12, 1485-93e2 (2014)。根据查阅的公开文献,目前尚不清楚CD中的托法替尼失败是否与临床研究设计、UC和CD之间的机制差异或剂量限制性全身不良事件有关。参见, *Pharmacological Research* 76, 1-8 (2013), 上文所引用的; *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American gastroenterological Association* 12, 1485-93e2 (2014), 上文所引用的; 以及C.J.Menet等人, Triazolopyridines as selective JAK1 inhibitors: from hit identification to LPG0634, *J. Med. Chem.* 57, 9323-42 (2014)。按照这种JAK抑制剂的特征, 希望找到用于预防和/或控制过度的炎症反应的附加的JAK抑制剂。

[0008] 已经报道了关于利用托法替尼的2期和3期炎性肠病 (IBD) 临床试验两者的全身不良事件。参见 *The New England Journal of Medicine* 367, 616-24 (2012), 上文所引用的; *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American gastroenterological Association* 12, 1485-93e2 (2014), 上文所引用的; 以及J.Panes等人, Efficacy and safety of oral tofacitinib for induction therapy in patients with Moderate-to-severe Crohn's disease: results of a Phase 2b randomised placebo-controlled trial, *J. Crohns Colitis* 10, S18-S19 (2016)。这些不良事件包括减少的绝对中性粒细胞计数 (ANC)、升高的总胆固醇 (低密度和高密度脂质)、肠穿孔和感染。此类不良事件与在类风湿性关节炎 (RA) 患者中在托法替尼治疗之后观察到的那些不一致 (参见, 例如, J.M.Kremer等人, The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo, *Arthritis and Rheumatism* 60, 1895-905 (2009)), 其中一些可能由EPO、TPO和集落刺激因子 (csf-2和GM-CSF (粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子)) 的JAK2依赖性抑制和/或IL-6的JAK1依赖性抑制导致。参见, *Arthritis and Rheumatism* 60, 1895-905 (2009), 上文所引用的; 和O.H.Nielsen等人, Will novel oral formulations change the Management of inflammatory bowel disease? Expert Opinion on Investigational Drugs 25, 709-18 (2016)。

[0009] 参考图1, 口服药物原则上可遵循胃肠道从口腔到食道 (1), 到胃 (2) 穿过十二指肠 (3) 到空肠 (4), 然后到回肠 (5), 并且然后到结肠 (6)。此类不同部分的相对吸收面积对于空肠 (4) 而言为大约60%, 对于回肠 (5) 而言为大约26%, 对于结肠 (6) 而言为大约13%。通过这些不同胃肠区域吸收可导致全身分布发生, 这继而可导致不可取的副作用。胃肠道具有非常大的表面积。参见, 例如, H.F.Helander等人, Surface area of the digestive tract-revisited, *Scandinavian Journal of gastroenterology* 49 (6), 681-89 (2014); 以

及K.J.Filipski等人,Intestinal Targeting of Drugs:Rational Design Approaches and Challenges Current Topics in Medicinal Chemistry 13,776-802(2013)。此类广泛的吸收表面积有利于物质的全身分布,所述物质可穿过肠道各个部分的壁并进入血流,并且继而有可能导致全身分布的物质的不希望的作用。出于简化的说明性目的,全身分布由图1中的虚线箭头表示为透过结肠壁,但是此类分布不限于结肠壁,因为其还可通过如图1所示的胃肠道其他部分的壁发生,诸如小肠的那些壁。还应当理解,图1中的虚线箭头表示胃肠道之外的全身分布,因为已知这种全身分布参照胃肠道生理学而发生,并且此类虚线箭头仅以示意性说明方式指代此类全身分布。对于肠组织、穿过肠组织的运输、以及代谢的说明,参见,例如,Current Topics in Medicinal Chemistry 13,777-80(2013),如上文所引用的。

[0010] 药物候选者流失的一个主要原因是安全性和耐受性。参见,例如,I.Kola等人,Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?Nature Reviews Drug Discovery 3,711-5(2004);M.J.Waring等人,An analysis of the attrition of drug candidates from fourMajor pharmaceutical companies.Nature Reviews Drug Discovery 14,475-86(2015);M.Hay等人,Clinical development success rates for investigational drugs,Nature Biotechnology 32,40-51(2014);和M.E.Bunnage,Getting pharmaceutical R&D back on target,Nature Chemical Biology 7,335-9(2011)。增加到预期靶组织的化合物的局部组织浓度,同时限制对其他组织的暴露,可减少不希望的作用。参见,例如,V.P.Torchilin,Drug targeting.European Journal of Pharmaceutical Sciences:Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences11,增刊2,S81-91(2000)。这种概念已被广泛接受用于某些疾病和组织,诸如眼部(参见,例如,R.gaudana等人,Ocular drug delivery,The AAPS Journal 12,348-60(2010)),皮肤(参见,例如,R.Folster-Holst等人,Topical hydrocortisone 17-butyrate 21-propionate in the treatment of inflammatory skin diseases: pharmacological data,clinical efficacy,safety and calculation of the therapeutic index,Die Pharmazie71,115-21(2016)),以及肺部(参见,例如,J.S.Patil等人,Pulmonary drug delivery strategies:A concise,systematic review,Lung India:official organ of Indian Chest Society 29,44-9(2012))。与这些组织靶向方案类似,增加肠药物浓度同时限制其他组织中不期望的药物含量可增加安全性边际量。参见,例如,I.R.Wilding等人,Targeting of drugs and vaccines to the gut, Pharmacology&Therapeutics 62,97-124(1994);D.Charmot,Non-systemic drugs:a critical review,Current Pharmaceutical Design 18,1434-45(2012);以及Current Topics in Medicinal Chemistry 13,第780页(2013),如上文所引用的。用实现有限的全身暴露的化合物对胃肠组织中的靶进行组织选择性调节可潜在地改善用于治疗胃肠道疾病(包括溃疡性结肠炎和克罗恩病)的此类化合物的治疗指数。参见,例如,O.Wolk等人,New targeting strategies in drug therapy of inflammatory bowel disease: mechanistic approaches and opportunities,Expert Opin.Drug Deliv.10(9),1275-86(2013)。术语“全身效应”在本文中用于指全身暴露以及任何此类全身暴露的效应,即使它们不总是相同。

[0011] 因为一些已知的JAK抑制剂具有与其全身效应相关的不利影响,所以希望找到新的JAK抑制剂作为用于预防和/或控制过度炎症反应的活性物质,并且消除或减少其全身效应。此外,期望找到对胃肠组织具有局部效应的JAK抑制剂,以用于以减少的全身效应治疗病症,诸如但不限于IBD。由于各种JAK蛋白质所起的作用,还希望找到pan-JAK抑制剂。

[0012] 原则上可根据多种策略来进行肠组织靶向。参见,例如,Current Topics in Medicinal Chemistry 13,第780至95页(2013)(如上文所引用的),其涉及包括下列的方法:物理化学特性方法、转运-介导的方法、前药方法、以及制剂和技术方法。然而,应当认识到,“存在组织靶向程序特有的多个挑战和缺陷”,具体地讲肠靶向化合物,如在上文所引用的Current Topics in Medicinal Chemistry 13,第795页(2013)中所述的。

[0013] IBD病症可扩展到胃肠道的多个部分。尽管为了简化的说明的目的,在图1仅示出降结肠中的结肠疾病位点(10),炎性肠病可影响胃肠道的任何部分,如同克罗恩病的情况一样,或者在直肠和结肠中,如溃疡性结肠炎的情况那样。参见,例如,NIDDK(国家糖尿病、消化和肾脏疾病研究所、国家卫生研究所、美国卫生与公众服务部,<<http://spotidoc.com/doc/71780/crohns-disease---national-digestive-diseases-information>>,2016年11月29日访问)。IBD疾病位点可以为,例如,回肠(位于回肠)、回肠结肠(影响回肠和结肠的部分)和结肠(位于结肠中,如在图1中的降结肠中示例性地示出)。因此,在某些疾病场景中,可期望沿整个或大部分肠道进行药物递送。在其他疾病场景中,可期望增加胃肠道的任何给定部分处的局部浓度。在其他场景中,在肠道中的不同位点处的这两种递送形式的组合可能是期望的。

[0014] 此类场景中的一种将集中于递送活性物质,该活性物质由于通过胃肠道时的有限吸收而具有有限的全身效应,如图1中的实线箭头所例示的,同时可用于在胃肠(GI)道的广泛部分中起作用,这是在本文中被称为“局部GI效应”的特征。由于减小的全身效应,可评价此类物质的更宽的剂量范围。还可期望此类活性物质具有低渗透性,使得仅少量穿过肠壁进入血流中,以在其到达非靶向区域时限制不可取的不利副作用。

[0015] 此外,还设想用JAK抑制剂作为其他疾病的治疗候选者。它们被设想用于治疗眼部病症,包括干眼症(B.Colligris等人,Recent developments on dry eye disease treatment compounds,Saudi J.Ophthalmol.28(1),19-30(2014)),骨髓增生性肿瘤、骨髓增生性疾病(E.J.Baxter等人,Acquired Mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human Myeloproliferative disorders,Lancet 365,1054-1061(2005);C.James等人,A unique clonal JAK2 Mutation Leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera,Nature 434,1144-1148(2005);R.Kralovics等人,Again-of-function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative disorders,N.Engl.J.Med.352,1779-1790(2005);R.L.Levine等人,Activating Mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera,essential thrombocythemia,and Myeloid Metaplasia with Myelofibrosis,Cancer Cell 7,387-397(2005);G.Wernig等人,Efficacy of TG101348,a selective JAK2 inhibitor,in treatment of a Murine Model of JAK2V617F-induced polycythemia vera,Cancer Cell 13,311-320(2008)),骨髓增生性综合征、急性骨髓性白血病、全身炎症反应综合征、全身发病型幼年类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎(H.W.Li等人,Effect of MiR-19a and MiR-21 on the JAK/STAT signaling



pathway in the peripheral blood Mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis, *Exp. Ther. Med.* 11 (6), 2531-2536 (2016)), III型超敏反应、IV型超敏反应、主动脉炎症、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、幼年型脊髓性肌萎缩、糖尿病视网膜病变、糖尿病肾脏疾病, 包括糖尿病肾病 (F.C. Brosius等人, JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease, *Diabetologia* 59 (8), 1624-7, (2016); C.C. Berthier等人, Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway Members in human diabetic nephropathy, *Diabetes* 58 (2), 469-77, (2009); E.N. Gurzov等人, The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes, *FEBS J.* 283 (16), 3002-15 (2016)), 微血管病、炎症 (M. Kopf等人, Averting inflammation by targeting the cytokine environment, *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 703-718 (2010); J.J. O'Shea等人, A new Modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway, *Nature Rev. Drug Discov.* 3, 555-564 (2004)), 慢性炎症、炎性肠病, 包括溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (R.H. Duerr等人, A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene, *Science* 314, 1461-1463 (2006); M. Coskun等人, Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Pharmacol. Res.* 76, 1-8 (2013); M.J. Waldner等人, Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development, *Semin. Immunol.* 26 (1), 75-9 (2014); S. Danese等人, JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: a hub for Multiple inflammatory cytokines, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310 (3), G155-62 (2016); W. Strober等人, Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology* 140, 1756-1767 (2011)), 过敏性疾病、白癜风、特应性皮炎 (R. Bissonnette等人, Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial, *Br. J. Dermatol.* 175 (5), 902-911 (2016); W. Amano等人, JAK inhibitor JTE-052 regulates contact hypersensitivity by downmodulating T cell activation and differentiation, *J. Dermatol. Sci.* 84, 258-265 (2016); T. Fukuyama等人, Topically Administered Janus-Kinase Inhibitors Tofacitinib and Oclacitinib Display Impressive Antipruritic and Anti-Inflammatory Responses in a Model of Allergic Dermatitis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354 (3), 394-405 (2015)), 斑秃 (A.K. Alves de Medeiros等人, JAK3 as an Emerging Target for Topical Treatment of Inflammatory Skin Diseases, *PLoS One* 11 (10) (2016); L. Xing等人, Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition, *Nat. Med.* 20 (9), 1043-9 (2014)), 炎性硬皮病、与器官移植相关的急性或慢性免疫疾病 (P.S. Changelian等人, Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor, *Science* 302, 875-878 (2003); F. Behbod等人, Concomitant inhibition of Janus kinase 3 and calcineurin-dependent signaling pathways synergistically prolongs the survival of rat heart allografts, *J. Immunol.* 166, 3724-3732 (2001); S. Busque等人, Calcineurin-inhibitor-free immunosuppression based on the JAK inhibitor CP-

690,550:a pilot study in de novo kidney allograft recipients,Am.J.Transplant, 9,1936-1945 (2009)), 银屑病关节炎、溃疡性结肠病、自身免疫性大疱性疾病、自身免疫性溶血性贫血、类风湿性关节炎 (J.M.Kremer等人,A randomized,double-blind placebo-controlled trial of 3doseLevels of CP-690,550versus placebo in the treatment of active rheumatoid arthritis,Arthritis Rheum.54(年会会议摘要),L40 (2006); W.Williams等人,A randomized placebo-controlled study of INCB018424,a selective Janus kinase1&2 (JAK1&2) inhibitor in rheumatoid arthritis (RA), Arthritis Rheum.58,S431 (2008);N.Nishimoto等人,Study of active controlledMonotherapy used for rheumatoid arthritis,an IL-6inhibitor (SAMURAI):evidence of clinical and radiographic benefit from an×ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab,Ann.Rheum.Dis.66 (9),1162-7 (2007)), 类风湿性关节炎相关的间质性肺病、系统性红斑狼疮 (A.goropevšek 等人,The Role of STAT Signaling Pathways in the Pathogenesis of SystemicLupus Erythematosus,Clin.Rev.Allergy Immunol.(在线预公布)<<http://www.docguide.com/role-stat-signaling-pathways-pathogenesis-systemic-lupus-erythematosus?tsid=5>>2016年5月23日;M.Kawasaki等人,Possible role of the JAK/STAT pathways in the regulation of T cell-interferon relatedgenes in systemicLupus erythematosus, Lupus.20 (12),1231-9 (2011);Y.Furumoto等人,Tofacitinib amelioratesMurineLupus and its associated vascular dysfunction,Arthritis Rheumatol.,(在线预公布)<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27429362>>2016年7月18日)), 系统性红斑狼疮相关肺病、皮炎/多发性肌炎相关肺病、哮喘 (K.Vale,Targeting the JAK/STAT pathway in the treatment of'Th2-high'severe asthma,FutureMed.Chem.8 (4),405-19 (2016)), 强直性脊柱炎 (AS) (C.Thompson等人,Anti cytokine therapy in chronic inflammatory arthritis,Cytokine 86,92-9 (2016)), AS相关肺病、自身免疫性肝炎、1型自身免疫性肝炎 (经典自身免疫性肝炎或狼疮性肝炎)、2型自身免疫性肝炎 (抗LKM抗体肝炎)、自身免疫介导的低血糖、银屑病 (C.L.Leonardi等人,Efficacy and safety of ustekinumab,a human interleukin-12/23Monoclonal antibody,in patients with psoriasis:76-week results from a randomised,double-blind,placebo-controlled trial (PHOENIX 1), Lancet 371,1665-1674 (2008);G.Chan等人,Dose-dependent reduction in psoriasis severity as evidence of immunosuppressive activity of an oral Jak3 inhibitor in humans,Am.J.Transplant.6,S87 (2006);K.A.Papp等人,Efficacy and safety of tofacitinib,an oral Janus kinase inhibitor,in the treatment ofpsoriasis:a phase 2b randomized placebo-controlled dose-ranging study,Br.J.Dermatol.167,668-677 (2012);M.Cargill等人,ALarge-scalegenetic association study confirms IL12B andLeads to the identification of IL23R as psoriasis-riskgenes, Am.J.Hum.Genet.80,273-290 (2007)), 1型银屑病、2型银屑病、斑块状银屑病、中度至重度慢性斑块状银屑病、自身免疫性中性粒细胞减少症、精子自身免疫、多发性硬化症 (所有亚型,B.M.Segal等人,Repeated subcutaneous injections of IL12/23p40 neutralising antibody,ustekinumab,in patients with relapsing-remittingMultiple sclerosis:a

phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study, *Lancet Neurol.* 7, 796-804 (2008); Z. Yan 等人, Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases, *Clin. Immunol.* (在线预公布) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713030>>, 2016年10月3日访问; E.N. Benveniste 等人, Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in Multiple sclerosis and the animal Model of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Interferon Cytokine Res.* 34 (8), 577-88 (2014); Y. Liu 等人, Therapeutic efficacy of suppressing the Jak/STAT pathway in Multiple Models of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* 192 (1), 59-72 (2014)), 急性风湿热、舍格伦综合征、舍格伦综合征/疾病相关肺疾病 (T. Fujimura 等人, Significance of Interleukin-6/STAT Pathway for the gene Expression of REG Ia, a New Autoantigen in Sjögren's Syndrome Patients, in Salivary Duct Epithelial Cells, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* (在线预公布) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339601>> 2016年6月24日), 自身免疫性血小板减少症、神经炎症, 包括帕金森病 (Z. Yan 等人, 2016年10月3日, 上文所引用的)。据报道, 除了炎症性疾病之外, JAK抑制剂还在癌症治疗中具有治疗应用 (S. J. Thomas 等人, The role of JAK/STAT signaling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumors, *British J. Cancer* 113, 365-71 (2015); A. Kontzias 等人, Jakinibs: A new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease, *Current Opinion in Pharmacology*, 12 (4), 464-70 (2012年8月); M. Pesu 等人, Therapeutic targeting of JANUS kinases, *Immunological Reviews*, 223, 132-42 (2008年6月); P. Norman, Selective JAK inhibitors in development for rheumatoid arthritis, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 23 (8), 1067-77 (2014年8月))。此外, JAK抑制剂还可用于预防结肠直肠癌, 因为结肠中的炎症减少可导致此类器官中的癌症预防。

## 发明内容

[0016] 本发明涉及以下化合物:

[0017] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺;

[0018] 2-((1r,4r)-4-(2-(1H-咪唑-4-基)咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-1(6H)-基)环己基)乙腈;

[0019] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(环丙基甲基)乙酰胺;

[0020] N-(2-氰乙基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺;

[0021] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)乙酰胺;

[0022] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)乙酰胺;

[0023] N-(2-氰基-2-甲基丙基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺;

[0024] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-((1-羟基环丁基)甲基)乙酰胺;

[0025] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(1-甲基-1H-吡啶-4-基)乙酰胺;

[0026] N-(4-(氰甲基)二环[2.2.1]庚-1-基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺;

[0027] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(1H-吡啶-3-基)乙酰胺;

[0028] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-((1-羟基环丙基)甲基)乙酰胺;以及

[0029] 此类化合物的药学上可接受的盐、以及它们的组合。

[0030] 术语“本发明的化合物”旨在涵盖至少一种化合物,所述化合物选自上述化合物组,无论其呈不含溶剂形式还是呈水合形式和/或溶剂化形式中的任一种,如本文所示的。

[0031] 本发明的实施方案涉及化合物,包含所述化合物的药物组合物,制备和纯化其的方法,将其用作JAK抑制剂的方法和将其用于治疗由JAK介导的疾病状态、障碍和病症的方法。

[0032] 本发明的实施方案表现出具有局部GI效应以及较低或可忽略不计的全身效应的pan-JAK抑制效应。此外,具有此类特征的本发明的实施方案可口服。

[0033] 本发明的附加实施方案是使用本发明的化合物或本发明的活性剂治疗患有或诊断有由JAK介导的疾病、障碍或医学病症的受治疗者的方法。

[0034] 由以下具体实施方式和通过实施本发明,本发明的附加实施方案、特征和优点将显而易见。

## 附图说明

[0035] 图1

[0036] 人胃肠道的一部分的示意图,其以不按比例拉伸渲染的形式示出。十二指肠(3)、空肠(4)和回肠(5)(全部均示意性地示出)在胃(2)和食道(1)之后形成小肠。大肠包括结肠(6),其继而包括盲肠(7)和阑尾(未示出)、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠(环同样未示出)和直肠(11)。横结肠是包含在右(8)结肠弯曲和左(9)结肠弯曲之间的部分,从盲肠(7)延伸到右结肠弯曲(8)的升结肠,从左结肠弯曲(9)延伸到直肠(11)的降结肠。为了方便起见,参考结肠示出了各种分布图案,但它们也可指胃肠道的其他部分。出于简化的说明性目的,全身分布由图1中的虚线箭头表示为透过结肠壁,但是此类分布不限于结肠壁,因为其还可通过如图1所示的胃肠道其他部分的壁发生,诸如小肠的那些壁。出于简化的示例性目的,具有一些组织渗透的分布由图1中的实线箭头表示为穿透结肠组织,但此类穿透并不限于结肠组织,因为其也可在图1所示胃肠道的其他部分,诸如小肠的组织中发生。根据本发明的JAK抑制剂的实施方案的效果示例性地示为破坏JAK/STAT信号传导通路,否则其将导致与炎性肠病(“IBD”)相关的炎症,诸如克罗恩病或溃疡性结肠炎。以举例的方式但不作为

限制,疾病位点示例性地示为降结肠中的结肠疾病位点(10)。

[0037] 图2

[0038] 示出了化合物实施例1的实施方案的制备/互相转化的示意图。实施方案19至36、38和39得自实施方案1s,并且实施方案37和40至53得自实施方案19,如在该图中由虚线箭头和相同图中所示框中的图例“19-53”进行符号表示。

[0039] 图3

[0040] 化合物实施例1的以下实施方案的高通量X-射线粉末衍射 (HT-XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:1s,2(通过在室温下在1,4-二氧六环中平衡获得),3b(通过在环己酮中热循环获得),1b+4(通过甲醇/水(50/50,体积/体积)中以 $\mu\text{L}$ 规模进行冷却结晶获得),5(通过在氯仿中热循环获得),6(通过在乙腈中以 $\text{mL}$ 规模进行冷却结晶获得),7(由1s+7获得,继而通过在庚烷中进行溶剂平衡获得),7(通过1s+7的去溶剂化获得,继而在庚烷中进行溶剂平衡获得),8(通过循环差示扫描量热法由实施方案5的去溶剂化获得),以及9(通过循环差示扫描量热法由实施方案2的去溶剂化获得)。

[0041] 图4

[0042] 化合物实施例1的以下实施方案的高通量X-射线粉末衍射 (HT-XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:1s(原料),1a(在暴露于加速老化条件(AAC)(40°C和70%相对湿度)之后获得,实施方案1s的多种样品形式),1b(通过在甲苯中在室温下进行溶剂平衡获得),1c(通过在乙酸乙酯/1,4-二氧六环(50/50,体积/体积)中以 $\mu\text{L}$ 规模进行冷却结晶获得),1d(通过在乙腈/氯仿(50/50,体积/体积)中以 $\mu\text{L}$ 规模进行冷却结晶获得),1e(通过在乙酸乙酯/1,4-二氧六环(50/50,体积/体积)中以 $\mu\text{L}$ 规模进行冷却结晶获得),1f(通过在对二甲苯中在室温下进行溶剂平衡获得),1g(通过在苯甲醚中在50°C下进行溶剂平衡获得),1h(通过在对二甲苯中以 $\mu\text{L}$ 规模进行冷却结晶获得)。

[0043] 图5

[0044] 化合物实施例1的以下实施方案的高通量X-射线粉末衍射 (HT-XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:1s,3b(通过在环己酮中热循环获得),3c(通过在1,4-二氧六环中以 $\mu\text{L}$ 规模进行冷却结晶获得),3d(通过在四氢呋喃中以 $\mu\text{L}$ 规模进行冷却结晶获得)和3e(通过在异丁醇中热循环获得)。

[0045] 图6

[0046] 实施方案1s的其初始形式(“1s”)、在暴露于40°C和70%相对湿度四天后(“1s 70RH”)以及在暴露于25°C和100%相对湿度四天后(实施方案10或“10”)的HR-XRPD衍射图。

[0047] 图7A

[0048] 实施方案11的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案。

[0049] 图7B

[0050] 实施方案12的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案。

[0051] 图7C

[0052] 实施方案13的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案。

[0053] 图7D

[0054] 实施方案14的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案。

[0055] 图7E

[0056] 实施方案11b的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案。

[0057] 图8

[0058] 化合物实施例1的以下实施方案的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:实施方案17、实施方案18、实施方案15和实施方案16。

[0059] 图9

[0060] 实施方案19的调制DSC (“mDSC”) 曲线,示出了在115.3°C处的玻璃化转变点 ( $T_g$ )。(纵轴标签中的“Rev”是指“可逆”)。

[0061] 图10A

[0062] 实施方案18的TGA (热重量分析),示出了在30°C和170°C之间的6.5%重量/重量的损耗。

[0063] 图10B

[0064] 实施方案18的DSC (差示扫描量热法),示出了在45°C和90°C之间的52.8J/g的吸热、140.6°C下的31.0J/g的吸热、168.8°C下的24.3J/g的放热以及200.0°C下的31.3J/g的吸热。

[0065] 图11

[0066] 化合物实施例1的以下实施方案的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:实施方案20和实施方案21。

[0067] 图12A

[0068] 实施方案17的TGA,示出了在30°C和100°C之间的4.2%重量/重量的损耗。

[0069] 图12B

[0070] 实施方案17的DSC,示出了在45°C和100°C之间的90.3J/g的吸热、143.8°C下的35.5J/g的吸热、168.3°C下的1.6J/g的吸热、178°C下的3.8J/g的放热以及200.0°C下的9.2J/g的吸热。

[0071] 图13

[0072] 化合物实施例1的以下实施方案的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:实施方案31、实施方案30、实施方案17、实施方案29、实施方案16、实施方案26、实施方案25、实施方案18、实施方案24、实施方案23、实施方案27和实施方案22。

[0073] 图14

[0074] 化合物实施例1的以下实施方案的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:实施方案32、实施方案33、实施方案23、实施方案34、实施方案35、实施方案36、实施方案25、实施方案38、实施方案17、实施方案39和实施方案28。

[0075] 图15

[0076] 化合物实施例1的以下实施方案的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:实施方案46、实施方案45、实施方案44、实施方案43、实施方案42、实施方案41、实施方案40和实施方案37。

[0077] 图16

[0078] 化合物实施例1的以下实施方案的X-射线粉末衍射 (XRPD) 图案的叠加,从底部至顶部:实施方案53、实施方案52、实施方案51、实施方案50、实施方案49、实施方案48和实施方案47。

- [0079] 图17A
- [0080] 实施方案11的TGA,示出了在155°C和185°C之间的4.7%重量/重量的损耗。
- [0081] 图17B
- [0082] 实施方案11的DSC,示出了由于溶剂损耗而在167.8°C下的57.8J/g的第一吸热以及由于样品熔融而在194.5°C下的90.8J/g的第二吸热。
- [0083] 图18
- [0084] 实施方案11的重量法蒸气吸附 (GVS) 等温曲线图,示出了0%至90%RH之间的0.66%的质量变化。纵轴上的质量变化是参考起始样品的质量而言的。
- [0085] 图19A
- [0086] 实施方案6的TGA,示出了在高于260°C的温度下的重量损耗,重量损耗被解释为与样品劣化相关。
- [0087] 图19B
- [0088] 实施方案6的DSC,示出了由于样品熔融而在194.4°C下的95.8J/g的吸热。
- [0089] 图20A
- [0090] 实施方案8的TGA,示出了在40°C和240°C之间的1.4%重量/重量的损耗,这对应于0.07mol的1,4-二氧六环的损耗。
- [0091] 图20B
- [0092] 实施方案8的DSC,示出了由于样品熔融而在199.7°C下的58.6J/g的吸热。
- [0093] 图21A
- [0094] 实施方案2的TGA,示出了在75°C和110°C之间的7.4%重量/重量的损耗、在110°C和130°C之间的11.9%重量/重量的损耗、在130°C和165°C之间的2.0%重量/重量的损耗以及在165°C和210°C之间的2.5%重量/重量的损耗。
- [0095] 图21B
- [0096] 实施方案2的DSC,示出了92.8°C下的86.2J/g的吸热、111.5°C下的11.1J/g的吸热、149.0°C下的45.5J/g的吸热、165.2°C下的20.6J/g的放热、177.1°C下的3.7J/g的吸热、200.2°C下的43.0J/g的吸热以及220.6°C下的29.3J/g的吸热。
- [0097] 图22A
- [0098] 实施方案9的TGA。
- [0099] 图22B
- [0100] 实施方案9的DSC,示出了221.8°C下的104.4J/g的吸热。
- [0101] 图23A
- [0102] 实施方案16的TGA,示出了在30°C和105°C之间的5.2%重量/重量的损耗。
- [0103] 图23B
- [0104] 实施方案16的DSC,示出了在35°C和90°C之间的48.4J/g的吸热、147.0°C下的41.8J/g的吸热、166.6°C下的1.0J/g的吸热、180.7°C下的4.4J/g的放热以及201.1°C下的7.7J/g的吸热。
- [0105] 图24
- [0106] 实施方案11的X-射线粉末衍射 (XRPD) (标记为“11”)和实施方案11在可变温度 (VT)-XRPD实验之后的X-射线粉末衍射 (XRPD) (标记为“VT后11”)以及实施方案6的X-射线

粉末衍射 (XRPD)。

### 具体实施方式

[0107] 如本文所用,术语“包括”、“含有”和“包含”是以其开放的、非限制性的意思使用。

[0108] 本文给出的任何式旨在表示具有该结构式所示的结构化合物以及某些变型或形式。某些结构可作为互变异构体存在。另外,还设想本发明的此类化合物的无定形形式、水合物、溶剂化物、多晶型物和假多晶型物、以及它们的混合物作为本发明的一部分。本发明的实施方案呈无溶剂形式或如本文所示的水合形式和/或溶剂化形式中的任一种。

[0109] 本文中对化合物的提及代表着对以下任何一者的提及:(a) 这种化合物的实际述及的形式,和 (b) 这种化合物在提到化合物时所考虑的该化合物所处介质中的任何形式。例如,本文中对诸如R-COOH的化合物的提及涵盖对例如以下任何一者的提及:R-COOH(s)、R-COOH(sol)和R-COO<sup>-</sup>(sol)。在此示例中,R-COOH(s)是指固体化合物,其例如可以为片剂或某些其他固体药物组合物或制剂的形式;R-COOH(sol)是指化合物在溶剂中的未离解形式;而R-COO<sup>-</sup>(sol)是指化合物在溶剂中的离解形式,诸如化合物在含水环境中的离解形式,无论此类离解形式是衍生自R-COOH、其盐还是衍生自在所考虑介质中经解离后产生R-COO<sup>-</sup>的任何其他实体。在另一个示例中,诸如“使实体暴露于式R-COOH的化合物”的表述是指使该实体暴露于化合物R-COOH在发生该暴露的介质中所存在的一种或多种形式。在又一个示例中,诸如“使实体与式R-COOH的化合物反应”之类的表述是指使(a) 这种实体(为这种实体在发生该反应的介质中所存在的一种或多种化学相关形式)与(b) 化合物R-COOH在发生该反应的介质中所存在的一种或多种化学相关形式反应。就这一点而言,如果该实体例如处于含水环境中,则应理解化合物R-COOH是在该相同介质中,因此该实体正被暴露于诸如R-COOH(aq)和/或R-COO<sup>-</sup>(aq)之类的物质,其中下标“(aq)”根据其在化学和生物化学中的常规含义代表“含水”。在这些命名示例中选择了羧酸官能团;然而,此选择并非意图进行限定,而仅为举例说明。应当理解,可用其他官能团提供类似的示例,这些官能团包括但不限于羟基、碱性氮成员(如在胺中的那些)和任何其他在含有该化合物的介质中按照已知方式进行相互作用或转化的基团。此类相互作用和转化包括但不限于解离、缔合、互变异构、溶剂分解包括水解、溶剂化包括水合、质子化和去质子化。就这一点本文不提供进一步的示例,因为在给定介质中的这些相互作用和转化为本领域任何普通技术人员所知。

[0110] 本文给定的任何式还旨在表示化合物的未标记形式以及同位素标记形式。同位素标记的化合物具有本文给出式所描绘的结构,不同的是一个或多个原子被呈富集形式的具有选定的原子量或质量数的原子所代替。可以以超过天然丰度的形式掺入本发明的化合物中的同位素的示例分别包括:氢、碳、氮和氧的同位素,诸如<sup>2</sup>H、<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>O和<sup>17</sup>O。此类同位素标记的化合物可用于代谢研究(优选利用<sup>14</sup>C),反应动力学研究(利用例如氘(即,<sup>2</sup>H或<sup>3</sup>H);或氚(即,<sup>3</sup>H)),检测或成像技术[诸如正电子发射断层显像(PET)或单光子发射计算机断层显像(SPECT)],包括药物或底物组织分布测定,或在患者的放射性治疗中。具体地,<sup>18</sup>F或<sup>11</sup>C标记的化合物对于PET或SPECT研究可能是尤其优选的。此外,用较重的同位素如氘(即<sup>2</sup>H)进行置换可以提供由更大的代谢稳定性所带来的某些治疗优势,例如局部体内半衰期延长或需要的剂量减少。同位素标记的本发明的化合物通常可以通过用容易获得的同位素标记的试剂替代非同位素标记的试剂以执行下文描述的“方案”中或“实施例和



制备”中所公开的程序来制备。

[0111] “互变异构体”是指为特定化合物结构的可互换形式,并且氢原子和电子的位置发生变化的化合物。因此,在不同位置具有H成员的两种结构可处于平衡状态,同时满足化合价规则。例如,烯醇与酮是互变异构体,因为它们迅速地通过用酸或碱处理而互相转化。

[0112] 当提及本文给出的任何式时,对于指定的变量,从可能的种类的列表中选择具体的部分并非意图限定所述变量在其他地方出现时要选择相同的种类。换句话讲,除非另外指明,否则当变量不止一次出现时,从指定列表中选择该种类与对式别处的同一变量选择该种类无关。

[0113] 就取代基术语的第一示例而言,如果取代基 $S^1_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 和 $S_2$ 中的一者,并且取代基 $S^2_{\text{实施例}}$ 为 $S_3$ 和 $S_4$ 中的一者,则这些指派是指根据以下选择所产生的本发明的实施方案: $S^1_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 并且 $S^2_{\text{实施例}}$ 为 $S_3$ ;  $S^1_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 并且 $S^2_{\text{实施例}}$ 为 $S_4$ ;  $S^1_{\text{实施例}}$ 为 $S_2$ 并且 $S^2_{\text{实施例}}$ 为 $S_3$ ;  $S^1_{\text{实施例}}$ 为 $S_2$ 并且 $S^2_{\text{实施例}}$ 为 $S_4$ ; 以及此类选择中每一者的等同指派。因此为简明起见,本文使用较短的术语“ $S^1_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 和 $S_2$ 中的一者,且 $S^2_{\text{实施例}}$ 为 $S_3$ 和 $S_4$ 中的一者”,但并非限制性的。上述以通用术语陈述的关于取代基术语的第一示例,是旨在举例说明本文描述的不同取代基指派。

[0114] 此外,当对任何成员或取代基给出不止一种指派时,本发明的实施方案包括可从所列举的指派独立选取而作出的多种分组,及其等同物。就取代基术语的第二示例而言,如果其在本文中描述取代基 $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 、 $S_2$ 和 $S_3$ 中的一者,则该列举是指以下本发明的实施方案: $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ ;  $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_2$ ;  $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_3$ ;  $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 和 $S_2$ 中的一者;  $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 和 $S_3$ 中的一者;  $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_2$ 和 $S_3$ 中的一者;  $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 、 $S_2$ 和 $S_3$ 中的一者; 以及 $S_{\text{实施例}}$ 为这些选择中每一者的任何等同指派。因此为简明起见,本文使用较短的术语“ $S_{\text{实施例}}$ 为 $S_1$ 、 $S_2$ 和 $S_3$ 中的一者”,但并非限制性的。上述以通称方式陈述的关于取代基术语的第二个示例,是旨在举例说明本文描述的多个取代基指派。

[0115] 以下JAK抑制剂是本发明的示例性实施方案:

[0116] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺;

[0117] 2-((1r,4r)-4-(2-(1H-咪唑-4-基)咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-1(6H)-基)环己基)乙腈;

[0118] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(环丙基甲基)乙酰胺;

[0119] N-(2-氰乙基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺;

[0120] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)乙酰胺;

[0121] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)乙酰胺;

[0122] N-(2-氰基-2-甲基丙基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺;

[0123] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-((1-羟基环丁基)甲基)乙酰胺;

[0124] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(1-甲基-1H-吡啶-4-基)乙酰胺;

[0125] N-(4-(氰甲基)二环[2.2.1]庚-1-基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺;

[0126] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(1H-吡啶-3-基)乙酰胺;以及

[0127] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-((1-羟基环丙基)甲基)乙酰胺。

[0128] 本发明的附加实施方案是上文给出的化合物的药学上可接受的盐。

[0129] 本发明的附加实施方案是药物组合物,其各自包含有效量的上文给出的化合物或其药学上可接受的盐中的至少一种。

[0130] “药学上可接受的盐”是化合物的盐,该盐是无毒的、生物学上可耐受的或换句话说讲在生物学上适于施用于受治疗者。一般参见以下文献:S.M.Berge等人,“Pharmaceutical Salts”,*J.Pharm.Sci.* 66,1-19(1977),和*Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection, and Use*, Stahl和Wermuth编辑,Wiley-VCH and VHCA, Zurich, 2002。本发明的化合物可具有足够酸性的基团、足够碱性的基团或同时具有这两种类型的官能团,从而相应地可与多种无机碱或有机碱以及无机酸和有机酸反应以形成可药用盐。药学上可接受的盐的示例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯代苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 $\gamma$ -羟丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐和扁桃酸盐。

[0131] 如果本发明的化合物含有至少一种碱性氮,则所需的药学上可接受的盐可通过本领域可用的任何合适方法制备,例如,用下述酸处理游离碱:无机酸,如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、硝酸、硼酸和磷酸;或者有机酸,如乙酸、苯乙酸、丙酸、硬脂酸、乳酸、抗坏血酸、马来酸、羟基马来酸、羟乙磺酸、琥珀酸、戊酸、延胡索酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、油酸、棕榈酸、月桂酸、吡喃糖苷酸(如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 $\alpha$ -羟基酸(如扁桃酸、柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(如天冬氨酸或谷氨酸)、芳族酸(如苯甲酸、2-乙酰氧基苯甲酸、萘甲酸或肉桂酸)、磺酸(如月桂基磺酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、乙磺酸)、诸如本文作为例子给出的那些酸的任何相容混合物,以及根据本技术领域的普通技能水平视为等同物或可接受替代物的任何其他酸及其混合物。

[0132] 并非根据本发明的化合物的药学上可接受的盐的所有实施方案均可等同地施用于其开发,因为足够弱碱性(例如, $pK_a$ 为约4)的化合物可不形成足够稳定的盐以供开发目的。参见,例如,G.A.Stephenson等人,*J.Pharm.Sciences* 100(5),1607-17(2011)“Physical stability of salts of weak bases in the solid state”。设想本发明的一些实施方案涵盖根据本发明的化合物与合适的共晶体形成物的共结晶形式。用于药物用途

的共晶体的设计和特性及其制备和表征方法已在例如以下文献中给出:N.Shan等人,Drug Discovery Today,13 (9/10),440-46 (2008) “The role of cocrystals in Pharmaceutical science”;N.Qiao等人,Intl.J.Pharmaceutics,419,1-11 (2011) “Pharmaceutical cocrystals:An overview”;R.Thakuria等人,Intl.J.Pharmaceutics,453,101-25 (2013) “Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs”。

[0133] 本发明的化合物,包括其药学上可接受的盐,无论是单独的还是组合的(统称为“活性剂”)可用作本发明方法中的JAK抑制剂。用于调节JAK活性的此类方法包括将JAK暴露于有效量的至少一种本发明的化合物。

[0134] 在一些实施方案中,JAK抑制剂用于诊断有或患有通过JAK活性介导的疾病、障碍或医学病症(诸如本文所述的那些)的受治疗者。症状或疾病状态旨在包括在“疾病、障碍或医学病症”的范围内。

[0135] 因此,本发明涉及使用本文所述的活性剂治疗诊断有或患有通过JAK介导的疾病、障碍或医学病症的受治疗者的方法。如本文所用,术语“治疗(treat或treating)”意在指将本发明的活性剂或组合物施用给受治疗者,目的是通过调节JAK实现治疗或预防有益效果。治疗包括通过对JAK活性的调节来介导,实现对疾病、障碍或病症或者疾病、障碍或病症的一种或多种症状逆转、改善、减轻、抑制其进展,减少其严重程度,减少,或者加以预防。术语“受治疗者”指需要此类治疗的哺乳类患者,例如人。术语“抑制剂”是指减少、预防、灭活、脱敏或下调JAK表达或活性的化合物。

[0136] 本发明的实施方案提供了用于预防和/或控制过度炎性反应的JAK抑制剂。根据本发明的JAK抑制剂的实施方案是pan-JAK抑制剂。

[0137] 除非另外指明,否则术语“JAK抑制剂物理-化学特性”是指如下所示的相应命名的特性:

[0138] 如对化合物实施例1至12的描述中所给出的,在摩尔质量的情况下;

[0139] 如根据各自的定义所测定的,在H键供体、受体和可旋转键的数目的情况下;以及

[0140] 如参考表1a,第2列所测量的,在血浆浓度的情况下,以及参考表7,第3列和第4列所测量的,在P-gp抑制剂存在下的A-B渗透性系数和B-A渗透性系数的情况下。

[0141] 本发明的实施方案提供抑制JAK的方法,该方法包括将JAK受体暴露于JAK抑制剂,该JAK抑制剂的特征在于具有以下JAK抑制剂物理-化学特性:血浆浓度在约0.1ng/mL至约60ng/mL的范围内,cLog P在约0.1至约2.8的范围内,在P-gp抑制剂存在下的A-B渗透性系数在约0.1至约2.5的范围内,B-A渗透性系数在约0.5至约20的范围内,tPSA在约85至约120的范围内。

[0142] 在根据本发明的抑制JAK的方法的其他实施方案中,血浆浓度在约10ng/mL至约20ng/mL的范围内。

[0143] 在根据本发明的抑制JAK的方法的其他实施方案中,cLogP在约0.8至约1.4的范围内。

[0144] 在根据本发明的抑制JAK的方法的其他实施方案中,在P-gp抑制剂存在下的A-B渗透性系数在约0.6至约1.5的范围内。

[0145] 在根据本发明的抑制JAK的方法的其他实施方案中,B-A渗透性系数在约0.5至约5的范围内。

[0146] 在根据本发明的抑制JAK的方法的其他实施方案中,tPSA在约100至约120的范围内。

[0147] 除了上文针对根据本发明的抑制JAK的方法所述的血浆浓度、clogP值、渗透性系数和tPSA值之外,本发明的另外实施方案还提供抑制JAK的方法,该方法包括将JAK受体暴露于JAK抑制剂,该JAK抑制剂的特征还在于具有以下JAK抑制剂物理-化学特性:摩尔质量在约300gMo1<sup>-1</sup>至约500gMo1<sup>-1</sup>的范围内,氢键供体数在约2个至约3个的范围内,氢键受体数在约4个至约5个的范围内,并且可旋转键数在约3个至约6个的范围内。

[0148] 在根据本发明的抑制JAK的方法的其他实施方案中,摩尔质量在约340gMo1<sup>-1</sup>至约430gMo1<sup>-1</sup>的范围内。

[0149] 在根据本发明的抑制JAK的方法的其他实施方案中,可旋转键数在约5个至约6个的范围内。

[0150] 本发明的实施方案提供用于治疗受治疗者胃肠道炎症的方法,该方法包括向受治疗者施用药学上有效量的JAK抑制剂,该JAK抑制剂的特征在于具有以下JAK抑制剂物理-化学特性:血浆浓度在约0.1ng/mL至约60ng/mL的范围内,cLog P在约0.1至约2.8的范围内,在P-gp抑制剂存在下的A-B渗透性系数在约0.1至约2.5的范围内,B-A渗透性系数在约0.5至约20的范围内,tPSA在约85至约120的范围内。

[0151] 在根据本发明的治疗胃肠道炎症的方法的其他实施方案中,血浆浓度在约10ng/mL至约20ng/mL的范围内。

[0152] 在根据本发明的治疗胃肠道炎症的方法的其他实施方案中,cLogP在约0.8至约1.4的范围内。

[0153] 在根据本发明的治疗胃肠道炎症的方法的其他实施方案中,在P-gp抑制剂存在下的A-B渗透性系数在约0.6至约1.5的范围内。

[0154] 在根据本发明的治疗胃肠道炎症的方法的其他实施方案中,B-A渗透性系数在约0.5至约5的范围内。

[0155] 在根据本发明的治疗胃肠道炎症的方法的其他实施方案中,tPSA在约100至约120的范围内。

[0156] 除了上文针对根据本发明的治疗炎症的方法所述的血浆浓度、cLogP值、渗透性系数和tPSA值之外,本发明的另外实施方案还提供用于治疗受治疗者胃肠道炎症的方法,其中JAK抑制剂物理-化学特性的特征还在于具有以下JAK抑制剂物理-化学特性:摩尔质量在约300gMo1<sup>-1</sup>至约500gMo1<sup>-1</sup>的范围内,氢键供体数在约2个至约3个的范围内,氢键受体数在约4个至约5个的范围内,并且可旋转键数在约3个至约6个的范围内。

[0157] 在根据本发明的治疗胃肠道炎症的方法的其他实施方案中,摩尔质量在约350gMo1<sup>-1</sup>至约430gMo1<sup>-1</sup>的范围内。

[0158] 在根据本发明的治疗胃肠道炎症的方法的其他实施方案中,可旋转键数在约5个至约6个的范围内。

[0159] 根据本发明的JAK抑制剂的实施方案具有以下JAK物理-化学特性:血浆浓度在约0.1ng/mL至约60ng/mL的范围内,cLogP在0.1至约2.8的范围内,在P-gp抑制剂存在下的A-B渗透性系数在约0.1至约2.5的范围内,B-A渗透性系数在约0.5至约20的范围内,并且tPSA在约85至约120的范围内。

[0160] 根据本发明的JAK抑制剂的另外实施方案具有在约10ng/mL至约20ng/mL范围内的血浆浓度。

[0161] 根据本发明的JAK抑制剂的另外实施方案具有在约0.8至约1.4范围内的cLogP值。

[0162] 根据本发明的JAK抑制剂的另外实施方案具有在约0.6至约1.5范围内的在P-gp抑制剂存在下的A-B渗透性系数。

[0163] 根据本发明的JAK抑制剂的另外实施方案具有在约0.5至约5范围内的B-A渗透性系数。

[0164] 根据本发明的JAK抑制剂的另外实施方案具有在约100至约120范围内的tPSA值。

[0165] 除了上文针对根据本发明的JAK抑制剂所述的血浆浓度、cLogP值、渗透性系数和tPSA值之外,根据本发明的JAK抑制剂的其他实施方案还具有以下JAK抑制剂物理-化学特性:摩尔质量在约300gMo1<sup>-1</sup>至约500gMo1<sup>-1</sup>的范围内,氢键供体数在约2个至约3个的范围内,氢键受体数在约4个至约5个的范围内,并且可旋转键数在约3个至约6个的范围内。

[0166] 根据本发明的JAK抑制剂的另外实施方案具有在约350gMo1<sup>-1</sup>至约430gMo1<sup>-1</sup>范围内的摩尔质量。

[0167] 根据本发明的JAK抑制剂的另外实施方案具有在约5个至约6个范围内的可旋转键数。

[0168] 在根据本发明的治疗方法中,将有效量的根据本发明的至少一种活性剂施用给患有或被诊断为具有此类疾病、障碍或医学病症的受治疗者。“有效量”意指足以总体上在需要对指定疾病、障碍或医学病症进行此类治疗的患者中产生期望的治疗或预防有益效果的量或剂量。本发明的活性剂的有效量或剂量可通过诸如建模、剂量递增研究或临床试验的方法探知,并且通过考虑各种因素来探知,例如施用或药物递送的方式或途径,试剂的药代动力学,疾病、障碍或病症的严重程度和病程,受治疗者之前进行或现在进行的疗法,受治疗者的健康状况和对药物的响应,以及主治医师的判断。对于70kg的人,合适剂量的示例性范围是以单剂量单位或多剂量单位计,约1mg/天至1000mg/天。

[0169] 本发明的实施方案为作为用于预防和/或控制过度炎性反应的活性物质的新型JAK抑制剂,并且其全身效应被消除或降低。本发明的另外实施方案是对胃肠组织具有局部效应的JAK抑制剂,其用于治疗诸如但不限于IBD的病症,但不引起全身效应或可接受地降低此类全身效应。

[0170] 本发明的实施方案是低渗透性JAK抑制剂。本发明的另外实施方案是具有水性溶解度的JAK抑制剂。

[0171] 一旦患者的疾病、障碍或病症发生改善,就可将剂量调整为预防性或维持性的治疗。例如,施用的剂量或频次或者这两方面可根据症状而降低到能维持期望的治疗或预防作用的水平。当然,如果症状已减轻到适当的水平,可停止治疗。然而,患者可能因病征的任何复发而需要长期的间歇性治疗。

[0172] 此外,还设想本发明化合物单独地,与本发明的一种或多种其他化合物组合,或与附加活性成分组合用于治疗下文所述的病症。附加活性成分可单独与本发明的至少一种化合物共同施用,与本发明的活性剂共同施用,或者与此类试剂一起包括在根据本发明的药物组合物中。在一个示例性的实施方案中,附加活性成分是已知或被发现有效治疗由JAK活性介导的病症、障碍或疾病的那些活性成分,诸如另一种JAK抑制剂或者对另一个与该特定

病症、障碍或疾病相关的靶有活性的化合物。该组合可有助于提高功效(例如,通过在该组合中包括强化根据本发明活性剂的效能或有效性的化合物),减少一种或多种副作用,或者减少根据本发明的活性剂的所需剂量。

[0173] 当提及抑制靶时,“有效量”意指足以影响JAK蛋白质家族中的至少一者的活性的量。测量靶的活性可通过分析方法来进行。

[0174] 设想本发明的活性剂单独使用或与一种或多种附加活性成分组合使用以配制本发明的药物组合物。本发明的药物组合物包含有效量的至少一种根据本发明的活性剂。

[0175] 药物组合物中常用的药学上可接受的赋形剂是无毒的、生物学上可耐受的并且换句话说讲在生物学上适于施用于受治疗者的物质,诸如惰性物质,其被添加到药物组合物中或换句话说讲用作媒介物、载体或稀释剂以促进试剂的施用并与其相容。此类赋形剂的示例包括碳酸钙、磷酸钙、多种糖和多类淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0176] 含有一个或多个剂量单位的活性剂的药物组合物的递送形式可使用本领域技术人员已知的或可利用的药学上可接受的赋形剂和配混技术进行制备。该组合物在本发明方法中可通过合适的递送途径施用,例如通过口服途径、肠胃外途径、直肠途径、局部途径或眼部途径施用,或者通过吸入施用。

[0177] 制剂可为片剂、胶囊、囊剂、糖衣丸剂、散剂、颗粒剂、锭剂、重构用散剂、液体制剂或栓剂的形式。所述组合物可配制用于多种给药途径中的任一种,诸如静脉输注、皮下注射、局部给药或口服。优选地,所述组合物可被配制用于口服。

[0178] 对于口服给药,本发明的活性剂可以片剂、胶囊剂、或小珠的形式提供,或者作为溶液、乳液或混悬剂提供。为了制备口服组合物,可配制活性剂以例如对于70kg人而言,产生以单剂量单位或多剂量单位计约1mg/天至1000mg/天的剂量作为示例性范围。

[0179] 口服片剂可包括与相容的药学上可接受的赋形剂诸如稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂混合在一起的一种或多种活性成分。合适的惰性填充剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙、乳糖、淀粉、糖、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、山梨醇等。液态口服赋形剂包括乙醇、甘油、水等。淀粉、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、羟乙基淀粉钠、微晶纤维素和藻酸是崩解剂。粘结剂可包括淀粉和明胶。润滑剂(当存在时)可为硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。如果需要,片剂可用材料诸如甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯进行包衣,以延迟在胃肠道中的吸收,或者可用肠溶衣进行包衣。可使用的附加涂层包括被设计成根据时间、pH或细菌含量释放化合物或活性剂的涂层。

[0180] 用于口服的胶囊剂包括硬明胶胶囊和软明胶胶囊或(羟丙基)甲基纤维素胶囊。为制备硬明胶胶囊剂,可将一种或多种活性成分与固体、半固体或液体稀释剂混合。软明胶胶囊剂可以通过将活性成分与下述物质混合而制备:油诸如花生油或橄榄油、液体石蜡、短链脂肪酸的单甘油酯和二甘油酯的混合物、聚乙二醇400或丙二醇。口服施用的液体可为悬浮液、溶液、乳液或糖浆的形式,或者可冻干或作为干燥制品呈现,供临用前用水或其他合适的媒介物进行重构。此类液体组合物可任选地包含:药学上可接受的赋形剂,例如悬浮剂(例如,山梨醇、甲基纤维素、海藻酸钠、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶等);非水性媒介物,例如油类(例如杏仁油或分级椰子油)、丙二醇、乙醇或水;防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸);润湿剂,例如卵磷脂;以及(如果需要)矫味剂或染色剂。

[0181] 本发明的活性剂还可以通过非口服途径施用。例如,组合物可配制成栓剂、灌肠剂或泡沫供直肠给药。对于胃肠外使用,包括静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下途径,本发明的活性剂可提供在缓冲至适当的pH和等渗度的无菌水溶液剂或混悬剂中,或者提供在胃肠外可接受的油中。合适的含水媒介物包括林格氏溶液和等渗氯化钠。此类形式可以单位剂型(如安瓿或一次性注射装置)呈现,以可从中抽取适当剂量的多剂量形式(如小瓶)呈现,或者以可用来制备可注射制剂的固体形式或预浓缩物呈现。示例性的输注剂量范围为约1至1000 $\mu$ g/kg/分钟的与可药用载体混合的活性剂,时间为几分钟到几天。

[0182] 对于局部施用而言,可将活性剂与药用载体以药物对媒介物约0.01%至约20%,优选地0.1%至10%的浓度混合。另一种施用本发明活性剂的方式可利用贴剂制剂来实现透皮递送。

[0183] 另选地,在本发明方法中活性剂可经由鼻内或口服途径通过吸入来施用,例如以还含有合适的载体的喷雾制剂形式施用。

[0184] 在另一个实施方案中,本发明涉及治疗患有或诊断有由JAK介导的疾病、障碍或医学病症的受治疗者的方法,该方法包括向需要此类治疗的受治疗者施用有效量的活性剂。

[0185] 在本发明方法的某些实施方案中,疾病、障碍或医学病症是炎性肠病,诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎。

[0186] 本发明的其他实施方案提供用于调节JAK活性的方法,包括在此类激酶存在于受治疗者体内时进行调节,该方法包括将JAK暴露于有效量的至少一种选自本发明化合物的化合物。

[0187] 本发明的化合物可用作JAK抑制剂,其可口服给药并特异性分配到肠组织,同时维持低全身暴露。这与大多数已知的JAK抑制剂形成对比,所述JAK抑制剂口服给药并分布到多个组织,这是由于其具有广泛的全身暴露。

[0188] 表1a和表1b示出体内实验的结果。这些结果包括如方案1、2或3中所述施用于小鼠的十五种化合物的血浆浓度和结肠组织浓度。通过按照方案1使用跖背静脉采血的静脉穿刺获得化合物(B)、(C)和实施例6和11的血浆浓度和结肠浓度结果。通过按照方案2使用眶后采血获得化合物(A)与实施例1和3至5的血浆浓度和结肠浓度结果,并且按照方案2使用跖背静脉的静脉穿刺获得实施例2、7至10和12的血浆浓度和结肠浓度结果。方案1和2的结果示于表1a中。通过按照方案3获得实施例1、3和4的血浆浓度和结肠浓度结果。方案3的结果示于表1b中。这些方案根据标题体内研究在下文进行描述。

[0189] 表1a:口服给药后的体内实验的结果-测试化合物的平均浓度

测试化合物	口服给药后的血浆浓度 (ng/mL)						口服给药后的结肠浓度 (ng/g)	
	时间=0.5h		时间=2h		时间=4h		时间=4h	
	平均值*	标准偏差	平均值*	标准偏差	平均值*	标准偏差	平均值*	标准偏差
A	347.0	78.5	69.1	40.8	84.5	25.5	895.0	260.6
B	352.7	85.7	66.3	26.2	11.3	3.7	6076.7	3125.8
C	547.0	71.4	130.2	63.7	16.7	5.9	7776.7	3500.2
实施例1	13.4	1.5	6.1	3.7	3.3	1.2	8591.7	10245.7
实施例2	24.5	3.6	4.2	1.8	1.3	0.1	7600.0	983.6
实施例3	41.4	15.1	3.9	0.7	1.5**	***	2147.2	1821.6
实施例4	12.9	1.6	7.5	2.8	3.3	1.5	4448.3	989.3
实施例5	31.9	5.1	8.8	1.7	6.0	1.2	5328.3	986.0
实施例6	18.8	20.6	3.0	0.9	1.7 <sup>#</sup>	<sup>##</sup>	11706.7	11305.2
实施例7	47.0	3.8	9.6	4.4	5.0	1.2	12008.3	9461.1
实施例8	43.1	8.7	5.4	0.6	2.6	0.6	7396.7	3037.3
实施例9	15.1	1.8	6.2	4.5	3.9	0.9	7683.3	230.9
实施例10	26.6	4.0	3.2	1.0	3.1	0.7	3005.0	1347.2
实施例11	1.6**	***	^	^^	^	^^	4785.0	1059.9
实施例12	15.6	8.7	4.2	1.4	2.3	1.0	5885.0	3154.1

[0190]

[0191] \*除非另有说明,否则由得自三只小鼠的值计算平均值。

[0192] \*\*用得自两只小鼠的值计算平均值,因为得自第三只小鼠的值低于定量下限。

[0193] \*\*\*没有计算标准偏差,因为平均值仅由两个值计算。

[0194] <sup>#</sup>平均值作为得自一只小鼠给出,因为得自第二只和第三只小鼠的值低于定量下限。[0195] <sup>##</sup>按照该表中的注释<sup>#</sup>,不计算标准偏差。

[0196] ^不计算平均值,因为所有三只小鼠的值低于定量下限。

[0197] ^^按照该表中的注释^,不计算标准偏差。

[0198] 表1b:结肠内给药后的体内实验的结果-测试化合物的平均浓度



测试化合物	结肠内给药后的血浆浓度 (ng/mL)						结肠内给药后的结肠浓度 (ng/g)	
	时间=0.5h		时间=2h		时间=4h		时间=4h	
	平均值*	标准偏差	平均值*	标准偏差	平均值*	标准偏差	平均值*	标准偏差
[0199] 实施例 1	2.5 <sup>#</sup>	###	^	^^	^	^^	681.0	437.0
实施例 3	1.5 <sup>#</sup>	###	^	^^	^	^^	227.8	254.1
实施例 4	3.8 <sup>**</sup>	***	2.5 <sup>#</sup>	###	^	^^	26.1 <sup>#</sup>	###

[0200] \*除非另有说明,否则由得自三只小鼠的值计算平均值。

[0201] \*\*用得自两只小鼠的值计算平均值,因为得自第三只小鼠的值低于定量下限。

[0202] \*\*\*没有计算标准偏差,因为平均值仅由两个值计算。

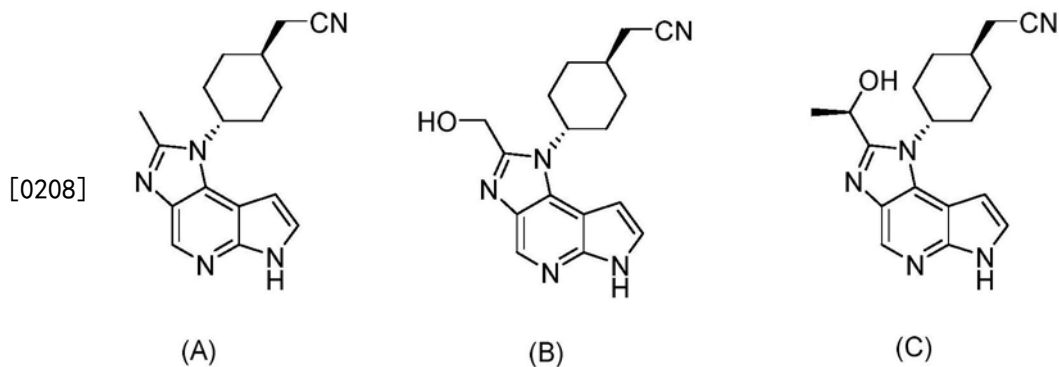
[0203] <sup>#</sup>平均值作为得自一只小鼠给出,因为得自第二只和第三只小鼠的值低于定量下限。

[0204] <sup>##</sup>按照该表中的注释<sup>#</sup>,不计算标准偏差。

[0205] <sup>^</sup>不计算平均值,因为所有三只小鼠的值低于定量下限。

[0206] <sup>^^</sup>按照该表中的注释<sup>^</sup>,不计算标准偏差。

[0207] 化合物 (A) 至 (C) 是对于其作为Janus激酶抑制剂的用途已经在W02013/007765或W02011/086053中公开的以下参考化合物:



[0209] 表1a和表1b中的化合物实施例1至12是相应实施例中给出的本发明的实施方案。

[0210] 如表1a中所示,发现化合物实施例1至12的结肠浓度远高于相应的血浆浓度,其中[结肠(4h)]:[血浆(0.5h)]浓度比在约52至约3,000的范围内。相比之下,化合物(A)至(C)的此类比率在约3至约17的范围内。表1b还提供了实施例1、3和4在结肠内给药之后具有低全身暴露的支持性数据。当比较结果涉及4h血浆浓度值时,本发明实施方案的相对于参考化合物的特性之间对比更加突出。在这一方面,化合物实施例1至12的[结肠(4h)]:[血浆(4h)]浓度比在约888至约6886的范围内。相比之下,化合物(A)至(C)的此类比率在约11至约538的范围内。这些结肠与血浆的浓度比率指示化合物实施例1至12在口服给药的任何时间下均具有低全身效应,然而化合物(A)至(C)具有相对高的全身效应。这是化合物实施例1至12的局部GI效应的非预期发现。

[0211] 如表4中所示,测量化合物实施例1至12的酶促活性以确定每个单独酶的活性。对

于测试的所有化合物,测量出酶活性的抑制,从而展示出这些化合物是pan-JAK抑制剂。该表给出的化合物(A)至(C)的数据还展示出这些化合物对所有JAK蛋白的酶活性的抑制。

[0212] 如表5所示,化合物实施例1至12的细胞活性使用刺激物IL-2、IFN- $\alpha$ 和GM-CSF在外周血单核细胞(PBMC)中评估并且分别测量STAT5、STAT4和STAT5的磷酸化抑制。对于测试的所有化合物,测量出在三种刺激物的情况下,STAT磷酸化的抑制。

[0213] 如表6所示,化合物实施例1至12的溶解度在模拟胃液(“SGF”)和模拟肠液(“SIF”)中测量。测试的所有化合物示出在SGF中高于400 $\mu$ M的可测量溶解度,以及在SIF中在81 $\mu$ M至高于400 $\mu$ M的范围内的可测量的溶解度。如同一表中所示,这些溶解度数据与化合物(A)至(C)的溶解度相当。

[0214] 如表7中所示,化合物(A)至(C)和实施例1至12的渗透性在具有或不具有依克立达(P-gp抑制剂)的情况下,使用MDCK-MDR1细胞系来测量。所有化合物在具有和不具有P-gp抑制剂(依克立达)的情况下均展示出针对顶端到基底侧输送测量的低渗透性。化合物(A)至(C)和实施例1至12的渗透系数值较低,并且对于顶端到基底侧输送而言在不具有依克立达(对于所有此类化合物)和具有依克立达(对于化合物(B)至(C)和化合物实施例1至12)的情况下相当(此表中第2列和第3列),但是化合物(A)至(C)的基底侧到顶端渗透系数大于化合物实施例1至12中大多数的那些基底侧到顶端渗透系数,如同一表中的第4列中所示。参考表7中的第3列和第4列,化合物实施例1至12中的大多数具有在依克立达存在下测量的低顶端到基底侧渗透性系数(第3列),并且还具低基底侧到顶端渗透系数(第4列)。这两个特征将此类化合物表征为低渗透性化合物。不能对化合物(A)至(C)进行相同的表征,所述化合物的基底侧到顶端渗透性系数(第4列)大于化合物实施例1至12中大多数的那些基底侧到顶端渗透性系数。在同一表中给出的化合物(A)至(C)和实施例1至12的流出比示出所有这些化合物均为P-gp物质。

[0215] 已知的参考教导内容或建议均不指示,相比于参考化合物(A)至(C)的那些,本发明实施方案的全身效应的明显缺乏可基于化合物(A)至(C)的结构比较或其他特征(诸如参考表4、6和7中所讨论的那些)来推断和/或预测。即使参考化合物(A)至(C)的某些基团呈现出与本发明实施方案的相似基团的结构类似性,也是如此。

[0216] 此外,参考教导内容或建议均不指示,相比于参考化合物(A)至(C)的那些,本发明化合物的低渗透性特征可基于结构比较来推断和/或预测。

[0217] 提供如下具体实施例来进一步说明本发明和各种实施方案。

[0218] 在获得下文实施例中描述的化合物和相应的分析数据时,除非另外指明,否则遵循以下实验和分析方案。

[0219] 除非另外指明,否则在室温(rt)下磁力搅拌反应混合物。当“干燥”溶液时,通常将它们放在干燥剂如Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>或MgSO<sub>4</sub>上进行干燥。在将混合物、溶液和提取物“浓缩”的情况下,它们通常是在旋转蒸发仪上进行减压浓缩。

[0220] 薄层色谱是用Merck硅胶60F<sub>254</sub> 2.5cm $\times$ 7.5cm、250 $\mu$ m或5.0cm $\times$ 10.0cm、250 $\mu$ m预涂硅胶板进行。

[0221] 除非另外指明,否则正相快速柱层析(FCC)是在硅胶(SiO<sub>2</sub>)上用2M NH<sub>3</sub>的MeOH/DCM的溶液洗脱来进行。

[0222] 除非另外指明,否则质谱(MS)是在Agilent 1100系列MSD上使用电喷雾电离

(ESI),以正离子模式获得。计算的质量(calcd.)对应于精确质量。

[0223] 核磁共振(NMR)谱是在Bruker DRX型光谱仪上获得。以下<sup>1</sup>H NMR数据的格式是:在四甲基硅烷参照物的低场的化学位移(单位为ppm)(多重度,耦合常数J(单位为Hz),积分)。

[0224] 用ChemDraw(CambridgeSoft,Cambridge,MA)或ACD/Name第9版(Advanced Chemistry Development,Toronto,Ontario,Canada)产生化学名。以举例的方式,名称(1r,4r)是指使用Chemdraw Ultra Pro 14.0的命名功能产生的环己基环周围反式取向。

[0225] 为了提供更简明的描述,本文给出的一些数量表述没有用术语“约”修饰。应当理解,无论是否明确使用术语“约”,本文所给出的每个量意在指实际的给定值,并且其还意在指根据本领域一般技术将可合理推理得到的这些给定值的近似值,包括这些给定值的由实验和/或测量条件所引起的等价值和近似值。

[0226] 当收率以百分数的形式给出时,这种收率是指被给出该收率的实体的质量与同一实体在特定化学计量条件下可获得的最大量之比。除非另外指明,否则以百分比形式给出的试剂浓度是指质量比。

[0227] 诸如TGA、DSC、GVS的实验通常示出基于被分析的单个样品呈现的数据的轻微波动以及存在的溶剂的水合和/或量的轻微变化。

[0228] 单个实施方案的TGA图根据X轴上的温度(°C)和Y轴上的重量损耗(%)示出。

[0229] 单个实施方案的DSC图根据X轴上的温度(°C)和Y轴上的热流(W/g)示出。DSC加热速率为10°C/分钟。吸热事件和放热事件的积分提供以J/g为单位的吸收能量(对于吸热事件)或释放能量(对于放热事件)。示出的横跨迹线的虚线表示被积分的区域。

[0230] 在存在术语“Exo Up”的附图中,吸热事件由下降的曲线反映,并且放热事件由上升的曲线反映。

[0231] 一些衍射图已经在由间距分开以便于可视化的衍射图的叠加布置中呈现。衍射图中的每一个衍射图都参考为此类衍射图中的每一个衍射图与纵轴的交点的零相对强度,或者参考此类衍射图中的每一个衍射图的最低相对强度读数。

[0232] 显示任何单个实施方案的多个XPRD图案的附图反映了针对此类实施方案的样品获得的不同图案,虽然这些样品是用相同方法在不同溶剂中制备的。

[0233] 本文所用的缩写和首字母缩略词包括如下所示的以下内容:定义的缩写和首字母缩略词

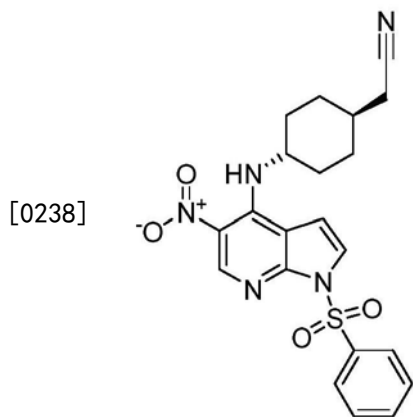
[0234]

首字母缩略词	术语
AAC	加速老化条件 (40℃和 70% RH)
ACN	乙腈
aq	含水
br	宽
cLogP	经计算的 logP
DCM	二氯甲烷
DIPEA、DIEA 或 Hunig 碱	二异丙基乙胺
DMA	二甲基乙酰胺
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
DMPU	1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1 <i>H</i> )-嘧啶酮
DMSO	二甲基亚砷
DSC	差示扫描量热法
EtOAc 或 EA	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
ESI	电喷雾离子化
FCC	正相硅胶快速柱色谱
g	克
GVS	重量法蒸气吸附
h	小时
HPLC	高压液相色谱法
HR-XRPD	高分辨率 X-射线粉末衍射
HT-XRPD	高通量 X-射线粉末衍射

首字母缩略词	术语
IPA	异丙醇
i.c.	结肠内
Hz	赫兹
LCMS	液相色谱和质谱
M	摩尔
mDSC	调制差示扫描量热法
m/z	质量与电荷的比率
MeOH	甲醇
mg	毫克
min	分钟
mL	毫升
$\mu$ L	微升
mmol	毫摩尔
MTBE	甲基叔丁基醚
[0235] MS	质谱
NMR	核磁共振
p.o.	口服或经嘴
ppm	百万分之一
PTFE	聚四氟乙烯
PyBOP	苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷磷六氟磷酸盐
PyBrOP	三吡咯烷基溴化磷六氟磷酸盐
RH	相对湿度
R <sub>t</sub>	保留时间
Rt 或 RT	室温
TFA	三氟乙酸
TGA	热重量分析
THF	四氢呋喃
TLC	薄层色谱法
tPSA	拓扑极性表面积
XRPD	X-射线粉末衍射

[0236] 中间体1合成和表征:

[0237] 2-((1r,4r)-4-((5-硝基-1-(苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)环己基)乙腈



[0239] 步骤A:N-[(1r,4r)-4-(羟甲基)环己基]氨基甲酸叔丁酯。向用氮气惰性气氛吹扫并维持氮气惰性气氛的20-L 4-颈圆底烧瓶中放置(1r,4r)-4-[[叔丁氧基]羰基]氨基]环己烷-1-羧酸(1066g,4.38mol,1.00当量)和THF(10L)。然后在-10℃在1小时内滴加BH<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>S(10M,660mL)。将所得溶液在15℃下搅拌3小时。将该反应平行进行三次,并且合并反应混合物。然后通过添加甲醇(2L)淬灭该反应。真空浓缩所得混合物。这产生N-[(1r,4r)-4-(羟甲基)环己基]氨基甲酸叔丁酯(3000g,99.6%),其为白色固体。MS(ESI):C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>的质量计算值为229.32;m/z实测值,215.2[M-tBu+MeCN+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR:(300MHz,CDCl<sub>3</sub>):δ4.40(s,1H),3.45(d,J=6.3Hz,2H),3.38(s,1H),2.05-2.02(m,2H),1.84-1.81(m,2H),1.44(s,11H),1.17-1.01(m,4H)。

[0240] 步骤B:N-[(1r,4r)-4-[(甲磺酰基氧基)甲基]环己基]氨基甲酸叔丁酯。向用氮气惰性气氛吹扫并维持氮气惰性气氛的20-L 4-颈圆底烧瓶中放置N-[(1r,4r)-4-(羟甲基)环己基]氨基甲酸叔丁酯(1000g,4.36mol,1.00当量)、二氯甲烷(10L)、吡啶(1380g,17.5mol,4.00当量)。之后在-15℃下,滴加MsCl(1000g,8.73mol,2.00当量)。将所得的溶液在25℃下搅拌过夜。将该反应平行进行3次,并且合并反应混合物。然后该反应通过添加2L水淬灭。用乙酸乙酯(1×9L)萃取水层。将有机层分离并且用1M HCl(3×10L)、NaHCO<sub>3</sub>(饱和水溶液)(2×10L)、水(1×10L)和盐水(1×10L)洗涤。混合物用无水硫酸钠干燥、过滤并真空浓缩。这产生N-[(1r,4r)-4-[(甲磺酰基氧基)甲基]环己基]氨基甲酸叔丁酯(3300g,82%),其为白色固体。LC-MS:MS(ESI):C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>S的质量计算值为307.15;m/z实测值,292.1[M-tBu+MeCN+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR:(300MHz,CDCl<sub>3</sub>):δ4.03(d,J=6.6Hz,2H),3.38(s,1H),3.00(s,3H),2.07-2.05(m,2H),1.87-1.84(m,2H),1.72-1.69(m,1H),1.44(s,9H),1.19-1.04(m,4H)。

[0241] 步骤C:N-[(1r,4r)-4-(氰甲基)环己基]氨基甲酸叔丁酯。向10L 4-颈圆底烧瓶中,放置N-[(1r,4r)-4-[(甲磺酰基氧基)甲基]环己基]氨基甲酸叔丁酯(1100g,3.58mol,1.00当量)、DMSO(5500mL)和NaCN(406g,8.29mol,2.30当量)。将所得的混合物在90℃下搅拌5小时。将该反应平行3次,并且合并反应混合物。然后通过添加15L水/冰来淬灭反应。通过过滤收集固体。用水(3×10L)洗涤固体。这产生N-[(1r,4r)-4-(氰甲基)环己基]氨基甲酸叔丁酯(2480g,97%),其为白色固体。MS(ESI):C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的质量计算值为238.17;m/z实测值,224[M-tBu+MeCN+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR:(300MHz,CDCl<sub>3</sub>):δ4.39(s,1H),3.38(s,1H),2.26(d,J=6.9Hz,2H),2.08-2.04(m,2H),1.92-1.88(m,2H),1.67-1.61(m,1H),1.44(s,9H),1.26-1.06(m,4H)。

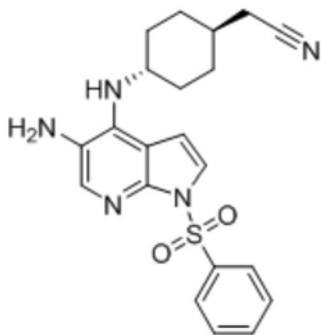
[0242] 步骤D: 2-[(1r,4r)-4-氨基环己基]乙腈盐酸盐。向10-L圆底烧瓶中放置N-[(1r,4r)-4-(氰甲基)环己基]氨基甲酸叔丁酯(620g, 2.60mol, 1.00当量)和1,4-二氧六环(2L)。之后在10℃下,边搅拌边逐滴加入HCl的1,4-二氧六环溶液(5L, 4M)。将所得的溶液在25℃下搅拌过夜。将该反应进行4次,并且合并反应混合物。通过过滤收集固体。固体用1,4-二氧六环(3×3L)、乙酸乙酯(3×3L)、和己烷洗涤(3×3L)洗涤。这产生2-[(1r,4r)-4-氨基环己基]乙腈盐酸盐(1753g, 96%),其为白色固体。MS (ESI): C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>的质量计算值为138.12; m/z实测值为139.25, [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR: (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ8.14 (s, 3H), 2.96-2.84 (m, 1H), 2.46 (d, J=6.3Hz, 2H), 1.98 (d, J=11.1Hz, 2H), 1.79 (d, J=12.0Hz, 2H), 1.64-1.49 (m, 1H), 1.42-1.29 (m, 2H), 1.18-1.04 (m, 2H)。

[0243] 步骤E: 2-((1r,4r)-4-((5-硝基-1-(苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)环己基)乙腈。向包含2-[(1r,4r)-4-氨基环己基]乙腈盐酸盐(29.10g, 166.6mmol)的1000mL圆底烧瓶中加入DMA(400mL)。所得的悬浮液用4-氯-5-硝基-1-(苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶(51.53g, 152.6mmol)处理,之后用DIPEA(63.0mL, 366mmol)处理。反应混合物置于N<sub>2</sub>下并且在80℃下加热4小时。将该粗反应混合物冷却至室温并缓慢倒入包含1.6L水的剧烈搅拌的2L烧瓶中。将所得悬浮液在室温下搅拌15分钟,然后过滤并在真空烘箱中在70℃下加热干燥16小时,以提供标题化合物(63.37g, 95%),其为黄色固体。MS (ESI): C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S的质量计算值为439.1; m/z实测值为440.1 [M+H]<sup>+</sup>。 <sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ9.10 (s, 1H), 8.99 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.23-8.15 (m, 2H), 7.66-7.59 (m, 2H), 7.56-7.49 (m, 2H), 6.67 (d, J=4.2Hz, 1H), 3.95-3.79 (m, 1H), 2.38 (d, J=6.2Hz, 2H), 2.32-2.21 (m, 2H), 2.08-1.98 (m, 2H), 1.88-1.76 (m, 1H), 1.60-1.32 (m, 4H)。

[0244] 中间体2合成和表征:

[0245] 2-((1r,4r)-4-((5-氨基-1-(苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)环己基)乙腈

[0246]

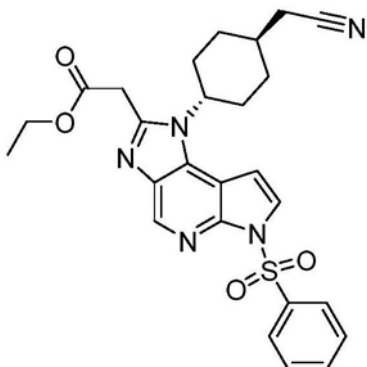


[0247] 将2-((1r,4r)-4-((5-硝基-1-(苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)环己基)乙腈(中间体1, 58.60g, 133.3mmol)溶于THF/MeOH(1:1, 4800mL)中。使混合物以10mL/min与100%氢气(大气压, 80℃)一起通过连续流动的氢化反应器(10%Pd/C), 诸如Thales Nano H-Cube<sup>®</sup>, 然后使溶液浓缩以提供为紫色固体的产物。将固体用EtOAc(400mL)研磨, 然后再次用MeOH(200mL)研磨, 并且然后过滤并真空干燥, 以提供标题化合物(50.2g, 91.9%收率)。MS (ESI): C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S的质量计算值为409.2; m/z实测值为410.2 [M+H]<sup>+</sup>。 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ8.10-8.03 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.51-7.43 (m, 1H), 7.43-7.34 (m, 3H), 6.44 (d, J=4.2Hz, 1H), 4.61 (d, J=8.5Hz, 1H), 3.65-3.51 (m, 1H), 2.74 (s, 2H), 2.26 (d, J=

6.4Hz, 2H), 2.19-2.05 (m, 2H), 1.97-1.86 (m, 2H), 1.76-1.59 (m, 1H), 1.33-1.12 (m, 4H).

[0248] 中间体3合成和表征:

[0249] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸乙酯

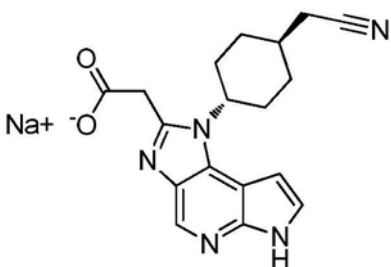


[0250]

[0251] 向包含搅拌棒和2-((1r,4r)-4-((5-氨基-1-(苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)环己基)乙腈(中间体2, 58.31g, 142.4mmol)的1L圆底烧瓶中3-乙氧基-3-亚氨基丙酸乙酯(60.51g, 309.3mmol), 之后添加EtOH(600mL, 在3Å分子筛上干燥48小时)。将回流冷凝器附接到反应烧瓶, 用N<sub>2</sub>吹扫反应, 并且在90℃下加热9小时。将反应混合物冷却至室温并使其静置30小时, 其中产物作为棕色针状物结晶。用刮刀将固体破碎, 并且将反应混合物转移到2L烧瓶中。在剧烈搅拌的情况下, 经由分液漏斗缓慢添加水(1.4L)。在完成水的添加之后, 将悬浮液搅拌30分钟。通过过滤分离棕色针, 并且然后通过使空气通过过滤器来干燥1小时。将产物转移至500mL烧瓶中并用EtOAc(200mL)处理。添加少量晶种, 所述晶种引发白色固体沉淀的形成。将悬浮液在室温下搅拌30分钟, 过滤, 用EtOAc(25mL)冲洗, 并且真空干燥以提供为白色固体的产物(48.65g, 68%收率)。MS(ESI): C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S的质量计算值为505.2; m/z实测值为506.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.85(s, 1H), 8.28-8.19(m, 2H), 7.84(d, J=4.0Hz, 1H), 7.61-7.53(m, 1H), 7.52-7.43(m, 2H), 6.84(d, J=4.1Hz, 1H), 4.32(s, 1H), 4.20(q, J=7.1Hz, 2H), 4.09(s, 2H), 2.44(d, J=6.2Hz, 2H), 2.40-2.27(m, 2H), 2.16(d, J=13.3Hz, 2H), 2.12-1.96(m, 3H), 1.54-1.38(m, 2H), 1.27(t, J=7.1Hz, 3H)。

[0252] 中间体4合成和表征:

[0253] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸钠



[0254]

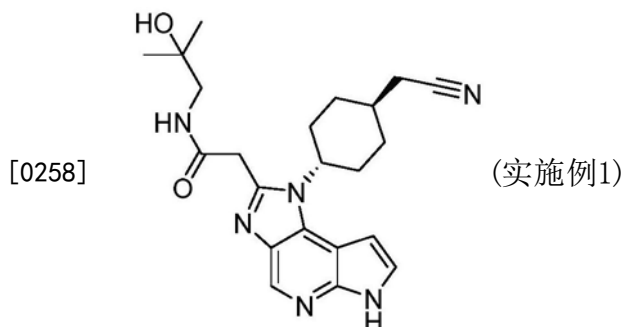
[0255] 向2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸乙酯(中间体3, 9.50g, 18.8mmol)的MeOH(30mL)和THF(30mL)溶液中添加氢氧化钠水溶液(56.4mL, 56.4mmol, 1M), 并且在室温下搅拌14小时。在室温下减压移除溶剂, 以提供为棕色固体的标题化合物(7g), 将其用于下一步骤而无需进



一步纯化。MS (ESI) :  $C_{18}H_{18} N_5NaO_2$  的质量计算值为359.1;  $m/z$  实测值为337.9  $[M+H-Na]^+$ 。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  8.52-8.47 (m, 1H), 7.85-7.81 (m, 2H), 7.46-7.41 (m, 4H), 6.85-6.81 (m, 1H), 4.60-4.46 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 2.59-2.49 (m, 4H), 2.19-2.05 (m, 6H), 1.56-1.43 (m, 2H) (标题化合物与苯磺酸的1:1混合物)。

[0256] 实施例1合成和表征:

[0257] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺



[0259] 步骤A: 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺。为了确保干燥的原料,在反应之前,将2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸乙酯(中间体3)在真空下于50℃下加热18小时。在1L烧瓶中,将2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸乙酯(中间体3, 52.585g, 104.01mmol)悬浮于DMA (50mL)中。加入1-氨基-2-甲基丙-2-醇(50mL),并且将反应加热至110℃并持续45分钟,然后加热至125℃并持续5小时。将该反应冷却至室温并用EtOAc (800mL)稀释。有机层用水/盐水溶液萃取三次,其中该溶液由1L水加上50mL盐水组成。将水层用EtOAc (2×600mL)反萃取。将合并的有机层在无水 $MgSO_4$ 上干燥,浓缩至干燥,并且然后在真空下干燥3天,以提供标题化合物(65.9g, 98%收率),其为黄色泡沫。将产物用于下一步骤而无需进一步纯化。MS (ESI) :  $C_{28}H_{32}N_6O_4S$  的质量计算值为548.22;  $m/z$  实测值为549.2  $[M+H]^+$ 。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  8.76 (s, 1H), 8.26-8.19 (m, 2H), 7.84 (d,  $J=4.1$ Hz, 1H), 7.60-7.53 (m, 1H), 7.50-7.44 (m, 2H), 6.84 (d,  $J=4.2$ Hz, 1H), 4.76-4.61 (m, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.45 (s, 1H), 3.27 (d,  $J=5.9$ Hz, 2H), 2.41 (d,  $J=6.5$ Hz, 2H), 2.38-2.25 (m, 2H), 2.23-2.12 (m, 2H), 2.09-1.94 (m, 4H), 1.48 (qd,  $J=13.6, 4.0$ Hz, 2H), 1.21 (s, 6H)。

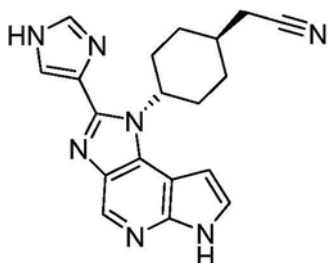
[0260] 步骤B: 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺。向包含搅拌棒的1L烧瓶中,添加2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺(65.90g, 102.1mmol)。添加1,4-二氧六环(300mL),之后添加KOH水溶液(3M, 150mL)。将反应在80℃下加热2小时。将反应冷却至室温,并且在旋转蒸发器上将溶剂体积减少至约200mL。残余物用水/盐水(100mL/100mL)的溶液处理,然后用10%MeOH的 $CH_2Cl_2$ 溶液(2×1L)萃取。将有机层合并,经无水 $MgSO_4$ 干燥,并浓缩至干燥以提供黄色固体。将固体悬浮于 $CH_2Cl_2$ (200mL)中,剧烈搅拌30分钟,并且然后通过过滤收集。固体用 $CH_2Cl_2$ (100mL)冲洗,通过使空气通过过滤器来干燥,并且然后在真空下于室

温下进一步干燥16小时,以提供标题化合物(41.59g,89%收率),其为白色固体。MS (ESI):  $C_{22}H_{28}N_6O_2$ 的质量计算值为408.23;  $m/z$ 实测值为409.2  $[M+H]^+$ 。 $^1H$  NMR (600MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.85 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.21-8.10 (m, 1H), 7.49-7.43 (m, 1H), 6.74-6.65 (m, 1H), 4.53-4.42 (m, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.08 (d,  $J=6.0$ Hz, 2H), 2.58 (d,  $J=6.1$ Hz, 2H), 2.41-2.28 (m, 2H), 2.09-1.92 (m, 5H), 1.42-1.31 (m, 2H), 1.09 (s, 6H)。本文以实施例的形式提供了本发明实施方案中的每一个实施方案的合成和活性化合物表征。由于本发明的一些实施方案的晶体结构,可进行多晶型物筛选以进一步表征任何此类化合物的特定形式。对于化合物实施例1而言,根据标题多晶型物筛选由实施例以非限制性方式对其进行说明。本文报告的涉及化合物实施例1的测试用实施方案1s给出的形式的此类化合物进行,如下文多晶型物筛选实施例中所述。

[0261] 实施例2合成和表征:

[0262] 2-((1r,4r)-4-(2-(1H-咪唑-4-基)咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-1(6H)-基)环己基)乙腈

[0263]



(实施例2)

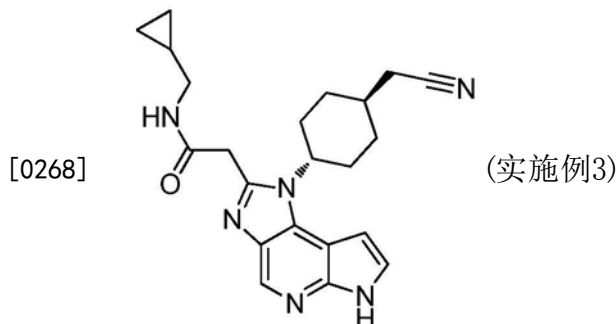
[0264] 步骤A: 2-((1r,4r)-4-(2-(1H-咪唑-4-基)-6-(苯磺酰基)咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-1(6H)-基)环己基)乙腈。向包含磁力搅拌棒的1L圆底烧瓶中,添加2-((1r,4r)-4-(5-硝基-1-(苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)氨基)环己基)乙腈(中间体1,23.3g,53.0mmol),之后添加DMSO(200mL)和甲醇(200mL)。添加固体形式的1H-咪唑-4-甲醛(8.56g,89.1mmol),之后添加水(100mL)溶液形式的硫酸氢钠(32.7g,188mmol)。反应容器配备有回流冷凝器,并且在加热块中加热至90℃并持续15小时。然后将反应混合物冷却至室温并在搅拌下加入含有水(2000mL)的烧瓶中,这导致形成白色沉淀。将混合物搅拌30分钟,并且通过过滤收集固体。该固体通过使空气通过过滤器来干燥6小时,并且然后在60℃的加热真空烘箱中进一步干燥3天,以提供标题化合物(22.7g,88%收率),其为黄色固体。MS (ESI):  $C_{25}H_{23}N_7O_2S$ 的质量计算值为485.16;  $m/z$ 实测值为486.1  $[M+H]^+$ 。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.74 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.20-8.11 (m, 2H), 8.04-7.96 (m, 2H), 7.76-7.68 (m, 1H), 7.68-7.60 (m, 2H), 7.19 (d,  $J=4.2$ Hz, 1H), 5.56 (s, 1H), 2.58 (d,  $J=6.3$ Hz, 2H), 2.38-2.24 (m, 2H), 2.07 (s, 1H), 1.98 (d,  $J=10.8$ Hz, 5H), 1.35 (q,  $J=12.3$ Hz, 2H)。

[0265] 步骤B: 2-((1r,4r)-4-(2-(1H-咪唑-4-基)咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-1(6H)-基)环己基)乙腈。标题化合物使用类似于实施例1,步骤B中所述的那些的条件,使用2-((1r,4r)-4-(2-(1H-咪唑-4-基)-6-(苯磺酰基)咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-1(6H)-基)环己基)乙腈(222mg,0.46mmol)代替2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺来制备,并且残余物通过快速柱层析(0-15% 2N  $NH_3$ -MeOH/EA)移除以提供标题化合物(97mg,69%收率)。MS (ESI):  $C_{19}H_{19}N_7$ 的质量计算值为345.17;  $m/z$ 实测值为346.0  $[M+H]^+$ 。 $^1H$

NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$ 12.61 (s, 1H) , 11.86 (s, 1H) , 8.55 (s, 1H) , 7.92 (d, J=1.3Hz, 1H) , 7.83 (s, 1H) , 7.48 (t, J=3.0Hz, 1H) , 6.76 (dd, J=3.5, 1.8Hz, 1H) , 5.85 (s, 1H) , 2.60 (d, J=6.0Hz, 2H) , 2.57-2.41 (m, 2H) , 2.14-1.88 (m, 5H) , 1.45-1.27 (m, 2H) 。

[0266] 实施例3合成和表征:

[0267] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(环丙基甲基)乙酰胺



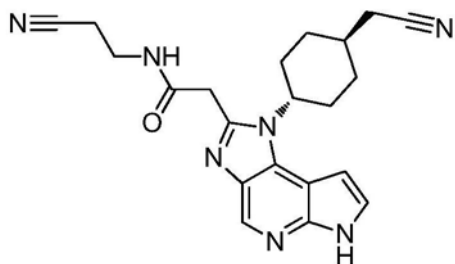
[0269] 步骤A: 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(环丙基甲基)乙酰胺。将2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸乙酯(中间体3, 555mg, 1.06mmol)和环丙基甲胺(1.87mL, 21.1mmol)的混合物在微波反应器中在125°C下加热1小时。残余物用水处理,然后用乙酸乙酯萃取。将有机层合并,在硫酸钠上干燥,通过二氧化硅塞,并且使用旋转蒸发器浓缩至干燥以提供标题化合物(642mg)。MS (ESI): C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S的质量计算值为530.21; m/z实测值为531.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.64 (s, 1H) , 8.19-8.11 (m, 2H) , 7.95 (d, J=4.1Hz, 1H) , 7.66-7.57 (m, 1H) , 7.57-7.48 (m, 2H) , 7.11 (d, J=4.1Hz, 1H) , 4.53 (s, 1H) , 4.08 (s, 2H) , 3.07 (d, J=7.1Hz, 2H) , 2.53 (d, J=5.9Hz, 2H) , 2.45-2.30 (m, 2H) , 2.14-2.03 (m, 5H) , 1.55-1.42 (m, 2H) , 1.02-0.94 (m, 1H) , 0.54-0.47 (m, 2H) , 0.24-0.18 (m, 2H) 。

[0270] 步骤B: 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(环丙基甲基)乙酰胺。向2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(环丙基甲基)乙酰胺(560mg, 1.05mmol)在1,4-二氧六环(4.22mL)中的混合物中添加3N KOH(2.81mL)。将混合物在80°C下加热1小时,然后利用碱性HPLC纯化:Xbridge Prep OBD C<sub>18</sub> 50mm x100mm, 5 $\mu$ m柱(洗脱液: 0-100%NH<sub>4</sub>OH水溶液/ACN(10Min))以提供标题化合物(187mg, 46%收率)。MS (ESI): C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O的质量计算值为390.22; m/z实测值为391.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.57 (s, 1H) , 7.50 (d, J=3.5Hz, 1H) , 6.86 (d, J=3.5Hz, 1H) , 4.57 (s, 1H) , 4.11 (s, 2H) , 3.13 (d, J=7.0Hz, 2H) , 2.67-2.52 (m, 4H) , 2.20-2.03 (m, 5H) , 1.58-1.44 (m, 2H) , 1.12-0.97 (m, 1H) , 0.60-0.48 (m, 2H) , 0.31-0.22 (m, 2H) 。

[0271] 实施例4合成和表征:

[0272] N-(2-氰乙基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺

[0273]



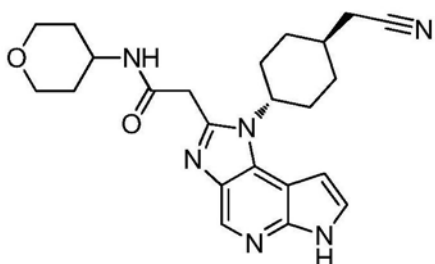
(实施例4)

[0274] 向2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)乙酸钠(中间体4,400mg,1.11mmol)和3-氨基丙腈(320mg,2.24mmol)的DMF(5mL)溶液中添加PyBOP(870mg,1.67mmol)和DIPEA(0.60mL,3.5mmol)。将反应混合物在室温下搅拌40小时。在真空移除DMF后,残余物使用50-100%乙酸乙酯的庚烷溶液通过快速柱层析纯化。将收集的级分真空浓缩至小体积,过滤出沉淀出来的白色固体,用10%MeOH的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液洗涤,并干燥以提供标题化合物(75mg,17%收率)。将滤液浓缩至干燥,并通过使用Varian Pursuit XR<sub>s</sub>5Diphenyl 100mm×30mm柱(洗脱液:10-90%CH<sub>3</sub>CN的水溶液,0.1%TFA)的反相-HPLC纯化以提供透明油。将该材料溶于10%MeOH的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液中,通过SILICYCLE SPE-R66030B-03P Carbonate的三个500mg柱(SiliaBond酸清除剂固相萃取柱)以除去TFA,用10%MeOH的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液洗脱,以提供标题化合物的附加级分(88mg,20%收率)。将两个级分合并以提供最终产物(163mg,37%收率),其为白色固体。MS(ESI):C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O的质量计算值为389.20;m/z实测值为390.3[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CD<sub>3</sub>OD):δ8.53(s,1H),7.48(d,J=3.0Hz,1H),6.84(d,J=3.5Hz,1H),4.51(br s,1H),4.12(s,2H),3.50(t,J=6.6Hz,2H),2.71(t,J=6.6Hz,2H),2.45-2.63(m,4H),2.03-2.19(m,5H),1.44-1.57(m,2H)。

[0275] 实施例5合成和表征:

[0276] 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)-*N*-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)乙酰胺

[0277]



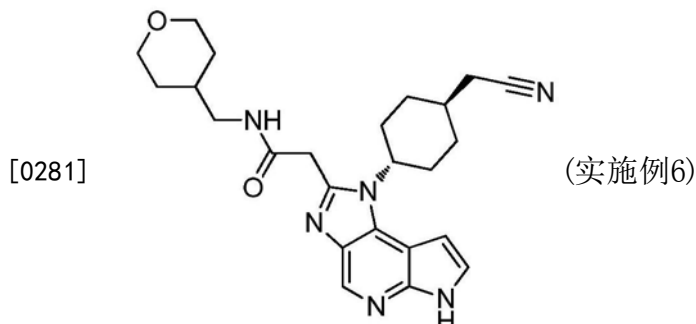
(实施例5)

[0278] 将2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)乙酸乙酯(中间体3,309mg,0.61mmol)和4-氨基四氢吡喃(195mg,1.93mmol)在1,4-二氧六环(0.5mL)中的混合物在微波反应器中在180℃下加热1小时。然后,反应混合物用1,4-二氧六环(1.5mL)稀释,用3*N* KOH水溶液(2mL)处理,并在80℃下加热1.5小时。然后,残余物用水(10mL)处理并用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3×50mL)萃取。合并有机层,在MgSO<sub>4</sub>上干燥并且真空浓缩。粗料使用快速柱层析(5-10%MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)纯化以提供标题化合物(146mg,57%收率)。MS(ESI):C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>的质量计算值为420.23;m/z实测值为421.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(600MHz,DMSO-*d*<sub>6</sub>):δ11.84(s,1H),8.49(s,1H),8.36(d,J=7.5Hz,1H),7.46(t,J=3.0Hz,1H),6.73-6.67(m,1H),4.54-4.41(m,1H),3.98(s,2H),3.86-3.81(m,2H),3.81-

3.74 (m, 1H), 3.40-3.34 (m, 2H), 2.60 (d, J=6.0Hz, 2H), 2.41-2.29 (m, 2H), 2.10-2.01 (m, 1H), 2.00-1.93 (m, 4H), 1.77-1.70 (m, 2H), 1.49-1.33 (m, 4H)。

[0279] 实施例6合成和表征:

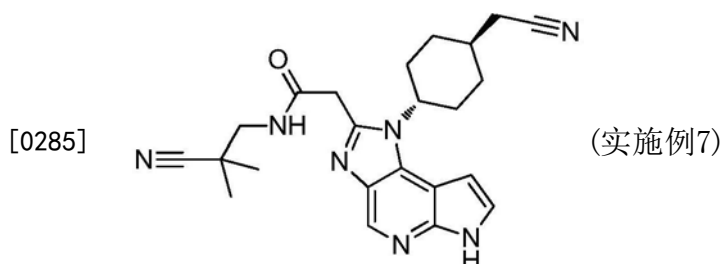
[0280] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)乙酰胺



[0282] 向微波小瓶中添加2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸乙酯(中间体3,300mg,0.593mmol)和4-氨基甲基四氢吡喃(683mg,5.93mmol)。在125℃下将所得溶液搅拌1小时。接着添加二氧六环(2.37mL)和KOH(3M的水溶液,1.58mL,4.75mmol),并且将反应在微波中在80℃下搅拌1小时。反应经使用Waters Xbridge Prep OBD C<sub>18</sub> 150mm×30mm,5μm柱(洗脱液:0-100%水(0.05%NH<sub>4</sub>OH)/ACN(10Min)的碱性HPLC纯化,以提供标题化合物(97mg,38%收率)。MS(ESI):C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>的质量计算值为434.24;m/z实测值为435.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CD<sub>3</sub>OD):δ8.43(s,1H),7.38(d,J=3.5Hz,1H),6.74(d,J=3.5Hz,1H),4.43(s,1H),4.03-3.96(m,2H),3.89-3.79(m,2H),3.34-3.25(m,2H),3.04(d,J=6.8Hz,2H),2.54-2.38(m,4H),2.08-1.96(m,5H),1.74-1.63(m,1H),1.59-1.54(m,2H),1.46-1.33(m,2H),1.25-1.14(m,2H)。

[0283] 实施例7合成和表征:

[0284] N-(2-氰基-2-甲基丙基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺

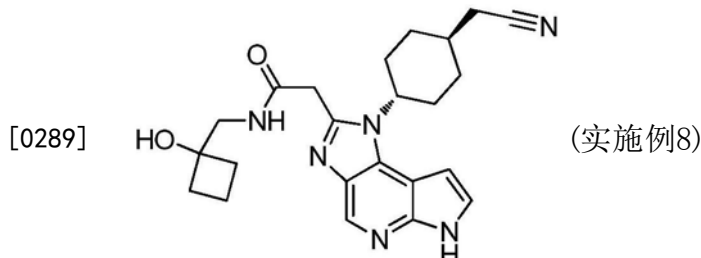


[0286] 将2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸钠(中间体4,300mg,0.835mmol)、3-氨基-2,2-二甲丙腈(82.0mg,0.835mmol)、DIPEA(216mg,1.67mmol)和DMF(5mL)的溶液在0℃下搅拌1小时。然后添加PyBrOP(467mg,1.00mmol),并且反应混合物在室温下搅拌过夜。混合物用10mL水淬灭并且通过使用制备型HPLC进行纯化和使用Waters Xbridge Prep OBD C<sub>18</sub> 150mm×30mm 5μm柱(洗脱液:28%水(0.05%氢氧化铵,体积/体积)-ACN)的制备型HPLC纯化,以提供标题化合物(58mg,16%收率),其为白色固体。MS(ESI):C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O的质量计算值为417.23;m/z实测值

为418.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ11.86 (br s, 1H), 8.71-8.66 (m, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.48-7.45 (m, 1H), 6.73-6.69 (m, 1H), 4.53-4.42 (m, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.33-3.31 (m, 1H), 2.57 (d, J=5.6Hz, 2H), 2.41-2.27 (m, 2H), 2.05-1.93 (m, 5H), 1.45-1.26 (m, 9H)。

[0287] 实施例8合成和表征:

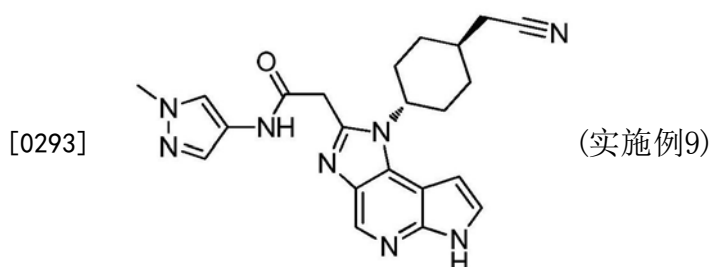
[0288] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-((1-羟基环丁基)甲基)乙酰胺



[0290] 将2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸钠(中间体4, 300mg, 0.835mmol)、1-(氨基甲基)环丁醇(84.4mg, 0.835mmol)、DIPEA(216mg, 1.67mmol)和DMF(5mL)的溶液在0℃下搅拌1小时。接着,添加PyBrOP(467mg, 1.00mmol),并且在室温下搅拌过夜,然后用10mL水淬灭。反应通过使用Kromasil 150mm×25mm, 10μm柱(洗脱液:水(0.05%氢氧化铵, 体积/体积)-ACN, 9%至39%, 体积/体积)的制备型碱性HPLC纯化,以提供标题化合物(90mg, 26%收率),其为白色固体。MS (ESI): C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>的质量计算值为420.23; m/z实测值为421.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ11.58 (br s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.94-7.85 (m, 1H), 7.46-7.40 (m, 1H), 6.75-6.70 (m, 1H), 4.89 (br s, 1H), 4.57-4.47 (m, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.27 (d, J=6.0Hz, 2H), 2.55 (d, J=6.0Hz, 2H), 2.45-2.31 (m, 2H), 2.10-1.88 (m, 9H), 1.71-1.60 (m, 1H), 1.54-1.35 (m, 3H)。

[0291] 实施例9合成和表征:

[0292] 2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)乙酰胺

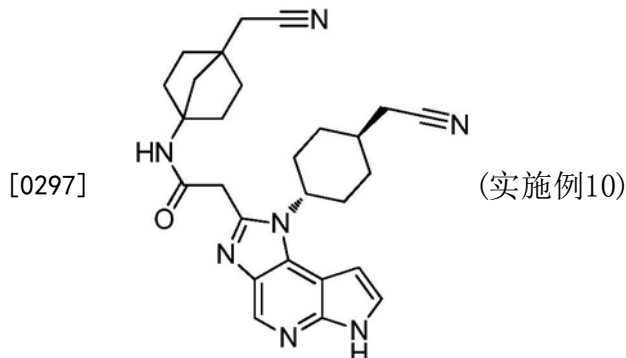


[0294] 向2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸钠(中间体4, 100mg, 0.278mmol)和1-甲基-1H-吡唑-4-胺(54.0mg, 0.557mmol)的DMF(0.8mL)溶液中添加PyBrOP(217mg, 0.417mmol)和DIPEA(0.144mL, 0.835mmol),并且将混合物在室温下搅拌过夜。减压移除DMF,并且残余物通过快速柱层析(50-100%EtOAc/庚烷,然后10%MeOH/DCM),并且随后通过使用Varian Pursuit XR<sub>s</sub>5Diphenyl 100mm×30mm柱(洗脱液:10-90%CH<sub>3</sub>CN的水溶液,0.1%TFA)的反相HPLC进行纯化,以提供TFA盐形式的产物。将该材料溶于10%MeOH的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液中,并且通过

SILICYCLE SPE-R66030B-03P Carbonate的500mg柱 (SiliaBond酸清除剂固相萃取柱) 以移除TFA, 从而提供标题化合物 (34mg, 29% 收率), 其为白色固体。MS (ESI):  $C_{22}H_{24}N_8O$  的质量计算值为416.21;  $m/z$  实测值为417.3  $[M+H]^+$ 。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 12.77 (br s, 1H), 11.24 (br s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (br s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.29-7.20 (m, 1H), 6.74 (br s, 1H), 4.85-4.65 (m, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.80-2.55 (m, 1H), 2.45 (d,  $J$  = 6.6Hz, 2H), 2.32-1.98 (m, 6H), 1.62-1.44 (m, 2H)。

[0295] 实施例10合成和表征:

[0296] N-(4-(氰甲基)二环[2.2.1]庚-1-基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺



[0298] 步骤A: 环戊烷-1,3-二羧酸二甲酯。在冰水浴中将环戊烷-1,3-二羧酸 (70.0g, 443mmol) 和无水甲醇 (300mL) 的溶液冷却至0°C。滴加浓硫酸 (14mL), 将温度保持在<15°C。加入后, 将反应加热至90°C并搅拌过夜。将反应冷却至室温并浓缩至干。将残余物用MTBE (500mL) 和 $H_2O$  (100mL) 处理。分离水层并用MTBE (2×100mL) 萃取。将合并的有机萃取物用饱和碳酸氢钠 (2×100mL)、盐水 (100mL) 洗涤, 在无无水 $MgSO_4$ 上干燥、过滤并浓缩至干, 以提供标题化合物 (72.5g, 88%), 其为淡黄色油状物。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  3.65 (s, 6H), 2.84-2.72 (m, 2H), 2.26-2.17 (m, 1H), 2.11-2.02 (m, 1H), 1.96-1.88 (m, 4H)。

[0299] 步骤B: 二环[2.2.1]庚烷-1,4-二羧酸二甲酯。在 $N_2$ 下于-78°C (干冰/丙酮) 下, 向二异丙基胺 (152mL, 1090mmol) 和无水THF (1000mL) 的溶液中缓慢添加正丁基锂 (2.5M的己烷溶液, 419.0mL, 1048mmol)。接着, 在冷却至-78°C之前, 将反应在0°C下搅拌0.5小时。经由加料漏斗添加DMPU (404mL, 3350mmol)。然后经由加料漏斗缓慢加入二甲基环戊烷-1,3-二羧酸酯 (78.0g, 419mmol) 和无水THF (300mL) 的溶液。将反应升温至0°C并搅拌30分钟, 然后冷却至-78°C, 并且用1-溴-2-氯乙烷 (59.0mL, 712mmol) 和无水THF (200mL) 的溶液处理。使反应物缓慢升温至室温并且在室温下搅拌12小时。反应用饱和氯化铵水溶液 (400mL) 淬灭。反应用乙酸乙酯 (500mL) 稀释, 分离有机层, 并且用乙酸乙酯 (2×500mL) 进一步萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水 (2×300mL) 洗涤, 在无无水 $MgSO_4$ 上干燥、过滤并且浓缩至干。将残余物通过硅胶垫过滤并用乙酸乙酯 (2000mL) 洗涤。将滤液浓缩至干并将残余物通过快速柱层析 (石油醚/乙酸乙酯, 30:1至20:1, 梯度洗脱) 纯化以提供标题化合物 (48.5g, 54%), 其为白色固体。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  3.69 (s, 6H), 2.08-1.99 (m, 4H), 1.91 (s, 2H), 1.73-1.63 (m, 4H)。

[0300] 步骤C: 4-(甲氧基羰基) 二环[2.2.1]庚烷-1-羧酸。在0°C下将向二甲基二环[2.2.1]庚烷-1,4-二羧酸 (27.3g, 129mmol) 和THF (700mL) 的溶液中缓慢添加氢氧化钠

(5.145g, 128.6mmol) 的甲醇 (80mL) 溶液, 并且将反应混合物在室温下搅拌过夜。将反应浓缩至干燥, 并且残余物用 MTBE (15mL) 研磨。沉淀通过过滤收集, 用 MTBE (5mL) 洗涤, 并且溶于 100mL 的 H<sub>2</sub>O 中。用 2M HCl 将溶液酸化至 pH=4。沉淀通过过滤收集并真空干燥, 以提供标题化合物 (13.0g, 51.0%), 其为白色固体。滤液用乙酸乙酯 (3×75mL) 萃取, 合并的有机萃取物用盐水 (50mL) 洗涤, 在无水 MgSO<sub>4</sub> 上干燥, 过滤并浓缩至干, 以提供第二级分的标题化合物 (8.0g, 31%), 其为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.21 (br s, 1H), 3.59 (s, 3H), 1.94-1.86 (m, 4H), 1.74 (s, 2H), 1.61-1.54 (m, 4H)。

[0301] 步骤D: 4-(((苄氧基)羰基)氨基)二环[2.2.1]庚烷-1-羧酸甲酯。向 4-(甲氧基羰基)二环[2.2.1]庚烷-1-羧酸 (13.0g, 65.6mmol)、DIPEA (22.8mL, 131mmol) 和无水甲苯 (200mL) 的溶液中添加二苯基磷酰基叠氮化物 (17.1mL, 78.6mmol), 并将反应混合物在 110℃ 下搅拌 2 小时。将反应冷却至 50℃, 添加苄醇 (13.6mL, 131mmol), 并且将反应混合物在 110℃ 下搅拌过夜。将反应浓缩至干燥, 溶于 MTBE (250mL) 中并用 H<sub>2</sub>O (150mL) 洗涤。分离有机层并用 MTBE (2×100mL) 萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水 (100mL) 洗涤, 在无水 MgSO<sub>4</sub> 上干燥, 过滤并且浓缩至干。残余物通过快速柱层析 (石油醚/乙酸乙酯, 10:1 至 5:1, 梯度洗脱) 纯化, 以提供不纯的产物 (28.5g), 其为淡黄色油状物。产物通过使用 Phenomenex SynergiMax-RP 250×50mm×10μm 柱 (洗脱液: 38% 至 68% (体积/体积) CH<sub>3</sub>CN 和 H<sub>2</sub>O, 具有 0.1% TFA) 的制备型酸性 HPLC 来进一步纯化。合并纯级分, 并且在真空下移除挥发物。残余物用 H<sub>2</sub>O (80mL) 稀释, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液将溶液的 pH 调节至 pH=8, 所得的溶液用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×100mL) 萃取。合并的有机层用盐水 (75mL) 洗涤, 在无水 MgSO<sub>4</sub> 上干燥, 过滤并浓缩至干, 以提供标题化合物 (17.3g, 85%), 其为无色油状物。MS (ESI): C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的质量计算值为 303.2; m/z 实测值为 303.9 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.56 (br s, 1H), 7.37-7.30 (m, 5H), 4.97 (s, 2H), 3.58 (s, 3H), 1.90-1.80 (m, 6H), 1.65-1.59 (m, 4H)。

[0302] 步骤E: 4-((叔丁氧基羰基)氨基)二环[2.2.1]庚烷-1-羧酸甲酯。向具有氢气球 (13psi) 的 500mL 圆底烧瓶中添加 4-(((苄氧基)羰基)氨基)二环[2.2.1]庚烷-1-羧酸甲酯 (17g, 56mmol)、二碳酸二叔丁基酯 (18.35g, 84.06mmol)、MeOH (200mL) 和湿 Pd/C (4g, 10 重量%, 50% H<sub>2</sub>O) 的混合物, 并且在室温下搅拌 72 小时。滤出催化剂, 并将滤液浓缩至干燥。残余物通过快速柱层析 (石油醚/乙酸乙酯, 20:1 至 1:1, 梯度洗脱) 纯化以提供标题化合物 (12.0g, 79.5%), 其为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.04 (br s, 1H), 3.57 (s, 3H), 1.93-1.78 (m, 4H), 1.77 (s, 2H), 1.63-1.53 (m, 4H), 1.35 (s, 9H)。

[0303] 步骤F: 4-((叔丁氧基羰基)氨基)二环[2.2.1]庚烷-1-羧酸。在室温下向 4-((叔丁氧基羰基)氨基)二环[2.2.1]庚烷-1-羧酸甲酯 (5.0g, 19mmol)、THF (40mL) 和 MeOH (20mL) 的溶液中加入氢氧化钠水溶液 (1.0M, 46.4mL, 46.4mmol), 并且将反应混合物在室温下搅拌 24 小时。将反应浓缩至干, 并且残余物用 H<sub>2</sub>O (20mL) 稀释, 用 2M HCl 酸化至 pH=4-5 以提供沉淀。将沉淀溶于 150mL 乙酸乙酯中, 用盐水 (45mL) 洗涤, 在无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上干燥, 过滤并浓缩至干, 以提供标题化合物 (4.74g, 100% 收率), 其为白色固体, 将其直接用于下一步骤中。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.06 (br s, 1H), 7.00 (br s, 1H), 1.87-1.73 (m, 6H), 1.58-1.50 (m, 4H), 1.35 (s, 9H)。

[0304] 步骤G: (4-(羟甲基)二环[2.2.1]庚-1-基)氨基甲酸叔丁基酯。在氮气气氛下, 在 0℃ 下, 向 4-((叔丁氧基羰基)氨基)二环[2.2.1]庚烷-1-羧酸 (4.74g, 18.6mmol) 和无水 THF



(50mL)的溶液中缓慢添加硼烷-四氢吡喃络合物(1.0M,37.1mL,37.1mmol)的溶液。在添加完成后,将反应在室温下搅拌过夜。水(30mL)缓慢加入所述混合物中并将其搅拌附加的30分钟。将反应浓缩至干燥,并且残余物用乙酸乙酯(50mL)稀释,用H<sub>2</sub>O(15mL)和盐水(10mL)洗涤,在无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩至干。残余物通过快速柱色谱(石油醚/乙酸乙酯,2:1)纯化,以提供标题化合物(4.0g,89%收率),其为白色固体。TLC(石油醚/乙酸乙酯,2:1),R<sub>f</sub>=0.5。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):6.88(br s,1H),4.38(t,J=5.4Hz,1H),3.36(d,J=5.4Hz,2H),1.73(br s,2H),1.64-1.49(m,4H),1.42(s,2H),1.39-1.33(m,9H),1.25-1.16(m,2H)。

[0305] 步骤H: (4-((叔丁氧羰基)氨基)二环[2.2.1]庚-1-基)甲基甲磺酸酯。向(4-(羟甲基)二环[2.2.1]庚-1-基)氨基甲酸叔丁酯(2.0g,8.3mmol)和无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(30mL)的溶液中添加吡啶(2.7mL,33mmol)。将反应冷却至0℃,并且加入甲磺酰氯(2.0mL,25.0mmol),并且将混合物在室温下搅拌3小时。反应用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mL)和水(30mL)稀释。将有机层分离,用盐水(15mL)洗涤,在无水MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩至干。残余物通过快速柱色谱(石油醚/乙酸乙酯,5:1至1:1,梯度洗脱)纯化,以提供标题化合物(2.58g,97%),其为白色固体。TLC(石油醚/乙酸乙酯,1:1),R<sub>f</sub>=0.85。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>)4.73(br s,1H),4.21(s,2H),2.98(s,3H),1.93-1.90(m,2H),1.78-1.62(m,6H),1.53-1.34(m,11H)。

[0306] 步骤I: (4-(氰甲基)二环[2.2.1]庚-1-基)氨基甲酸叔丁酯。向(4-((叔丁氧羰基)氨基)二环[2.2.1]庚-1-基)甲基甲磺酸酯(2.58g,8.07mmol)和DMSO(25mL)的溶液中添加氰化钠(1.20g,24.5mmol)。将反应加热至100℃并搅拌24小时。将反应用50mL的水稀释并用乙酸乙酯(3×40mL)萃取。将合并的有机萃取物用盐水(20mL)洗涤,在无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩至干。残余物通过快速柱色谱(石油醚/乙酸乙酯,5:1)纯化,以提供标题化合物(1.8g,89%收率),其为白色固体。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):δ7.00(br s,1H),2.67(s,2H),1.82(br s,2H),1.69-1.52(m,6H),1.47-1.40(m,2H),1.37(s,9H)。

[0307] 步骤J: 2-(4-氨基二环[2.2.1]庚-1-基)乙腈盐酸盐。在0℃下,向(4-(氰甲基)二环[2.2.1]庚-1-基)氨基甲酸叔丁酯(850mg,3.40mmol)和乙酸乙酯(2mL)的悬浮液中添加HCl的乙酸乙酯(4.0M,10mL,40mmol)溶液。在室温下搅拌2小时后,在减压下将混合物浓缩至干。将残余物用MTBE(5mL)研磨,并且悬浮液经由过滤分离。滤饼用MTBE(1mL)洗涤,并且减压干燥,以提供标题化合物(450mg,71%),其为白色固体。MS(ESI):C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>的质量计算值为150.12M/z,实测值为151.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ8.59(br.s.,3H),2.78(s,2H),1.90-1.77(m,2H),1.74-1.62(m,4H),1.60(s,2H),1.56-1.46(m,2H)。

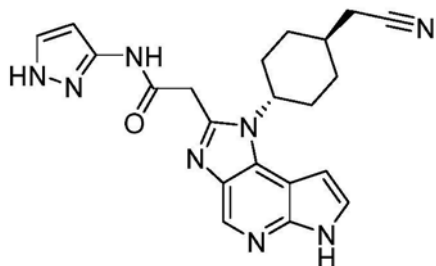
[0308] 步骤K: N-(4-(氰甲基)二环[2.2.1]庚-1-基)-2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酰胺。在0℃下向2-(1-((1r,4r)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)乙酸钠(中间体4,300mg,0.835mmol)、2-(4-氨基二环[2.2.1]庚-1-基)乙腈盐酸盐(138mg,0.918mmol)和DIPEA(0.291mL,1.67mmol)的无水DMF(6mL)溶液中添加PyBrOP(428mg,0.918mmol)。将反应在室温下搅拌12小时。混合物用10mL水淬灭,并用EtOAc(3×20mL)萃取。将合并的有机相用盐水洗涤,在无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩至干。残余物通过制备型HPLC(使用Xtimate C<sub>18</sub> 150×25mm×5μm柱(洗脱液:23%至33%(体积/体积)CH<sub>3</sub>CN和H<sub>2</sub>O,具有10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)并通过制备型TLC(二氯甲烷:甲醇=15:1)纯化,以提供标题化合物(36.6mg,9%收率),其为

白色固体。MS (ESI) :  $C_{27}H_{31}N_7O$  的质量计算值为469.3;  $m/z$  实测值为470.2  $[M+H]^+$ 。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CD_3OD$ ) :  $\delta$ 8.53 (s, 1H), 7.48 (d,  $J=4.0$ Hz, 1H), 6.84 (d,  $J=4.0$ Hz, 1H), 4.47 (br s, 1H), 4.07-4.02 (m, 2H), 2.63 (s, 2H), 2.61-2.50 (m, 4H), 2.18-1.98 (m, 7H), 1.94-1.84 (m, 2H), 1.82 (s, 2H), 1.79-1.68 (m, 2H), 1.62-1.43 (m, 4H)。

[0309] 实施例11合成和表征:

[0310] 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)-*N*-(1*H*-吡啶-3-基)乙酰胺

[0311]



(实施例11)

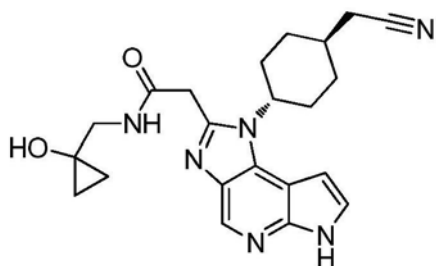
[0312] 步骤A: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)-*N*-(1*H*-吡啶-3-基)乙酰胺。以类似于实施例1, 步骤A中所述的方式, 使用1*H*-吡啶-3-胺 (465mg, 5.48mmol) 代替1-氨基-2-甲基丙-2-醇来制备标题化合物 (383mg, 70%)。MS (ESI) :  $C_{27}H_{26}N_8O_3S$  的质量计算值为542.2;  $m/z$  实测值为543.2  $[M+H]^+$ 。 $^1H$  NMR (500MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ 12.36 (s, 1H), 11.36 (s, 1H), 10.81 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.14-8.10 (m, 2H), 7.96 (d,  $J=4.1$ Hz, 1H), 7.72-7.68 (m, 1H), 7.63-7.60 (m, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.13 (d,  $J=4.2$ Hz, 1H), 6.44-6.41 (m, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 2.56 (d,  $J=6.2$ Hz, 2H), 2.23-2.13 (m, 2H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.41-1.32 (m, 2H)。

[0313] 步骤B: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)-*N*-(1*H*-吡啶-3-基)乙酰胺。标题化合物以类似于实施例1, 步骤B的方式, 使用2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)-*N*-(1*H*-吡啶-3-基)乙酰胺 (270mg, 0.500mmol) 代替2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)-*N*-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺来制备, 并且通过使用Xbridge Prep OBD  $C_{18}$  150mm $\times$ 30mm, 5 $\mu$ m, 洗脱液5% ACN/ $NH_4OH$  (含水) (10分钟) 的碱性HPLC来纯化, 以提供标题化合物 (15mg, 7%)。MS (ESI) :  $C_{21}H_{22}N_8O$  的质量计算值为402.5;  $m/z$  实测值为403.2  $[M+H]^+$ 。 $^1H$  NMR (500MHz,  $DMSO-d_6$ ) :  $\delta$ 12.35 (s, 1H), 11.85 (s, 1H), 10.84 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.58 (d,  $J=2.3$ Hz, 1H), 7.46 (d,  $J=3.4$ Hz, 1H), 6.72 (d,  $J=3.5$ Hz, 1H), 6.47-6.39 (m, 1H), 4.64-4.46 (m, 1H), 4.21 (s, 2H), 2.57 (d,  $J=6.1$ Hz, 2H), 2.45-2.26 (m, 2H), 2.08-1.88 (m, 5H), 1.39 (q,  $J=11.7$ Hz, 2H)。

[0314] 实施例12合成和表征:

[0315] 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)-*N*-((1-羟基环丙基)甲基)乙酰胺

[0316]



(实施例12)

[0317] 将2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(氰甲基)环己基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-*d*]吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)乙酸钠(中间体4,300mg,0.835mmol)、1-(氨基甲基)环丙醇(72.7mg,0.835mmol)、DIPEA(216mg,1.67mmol)和DMF(5mL)的溶液在0℃下搅拌1小时。然后,添加PyBrOP(467mg,1.00mmol)并在室温下搅拌过夜。混合物用10mL水淬灭,并且通过使用Kromasil 150mm×25mm,10μm柱(洗脱液:水(0.05%氢氧化铵,体积/体积)-ACN,5%至35%,体积/体积)的制备型碱性HPLC纯化,以提供标题化合物(84mg,25%收率),其为白色固体。MS(ESI):C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>的质量计算值为406.21;m/z实测值为407.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-*d*<sub>6</sub>):δ11.53(br s,1H),8.50(s,1H),8.03-7.93(m,1H),7.44-7.40(m,1H),6.74-6.71(m,1H),5.04(s,1H),4.58-4.49(m,1H),4.02(s,2H),3.29(d,J=6.0Hz,2H),2.55(d,J=6.0Hz,2H),2.45-2.31(m,2H),2.10-1.97(m,5H),1.50-1.37(m,2H),0.62-0.55(m,2H),0.55-0.48(m,2H)。

#### [0318] 多晶型物筛选实施例

[0319] 作为游离碱的根据本发明的化合物的一些实施方案呈现出具有复杂固态行为的多种结晶构型,其中一些由于不同量的掺入溶剂,继而可在它们中间呈现出区别特征。根据本发明的化合物的一些实施方案呈假多晶型物的形式,其为由于晶格本身中不同量的溶剂而呈现出晶格组成差异的相同化合物的实施方案。此外,在根据本发明的化合物的一些结晶实施方案中,还可存在通道溶剂化,其中溶剂掺入存在于晶格中的通道或空隙内。例如,对于化合物实施例1,发现了各种结晶构型,包括表2中给出的那些。由于这些特征,通常观察到非化学计量的溶剂化物,如表2所示。此外,根据本发明的一些实施方案的晶体结构中存在此类通道或空隙使得水和/或溶剂分子能够以不同程度的粘结强度保持在晶体结构内。因此,在根据本发明的一些实施方案中,具体环境条件的改变可容易地导致水分子和/或溶剂分子的一些损失或增益。应当理解表2中所列实施方案中的每一个实施方案的“溶剂化”(表2中第三列)是公式溶剂化,并且作为化学计量数的实际测定(表2中第四列)在对其进行实验测定时,可根据实际环境条件与公式溶剂化略有所不同。例如,如果一个实施方案中约一半的水分子可与晶格中活性化合物氢键键合的形式存在,同时约另一半水分子可处于在晶格中的通道或空隙中,则环境条件的变化可改变空隙或通道中此类松散包含的水分子的量,并因此导致根据例如单晶衍射分配的公式溶剂化与例如通过热重量分析偶联质谱进行测定的化学计量之间的轻微差异。制得此类实施方案中的每一个实施方案后,通过诸如单晶衍射和结合质谱的热重量分析的技术来测定根据本发明的化合物的特征,诸如公式溶剂化和化学计量。

#### [0320] 表2:化合物实施例1的结晶形式的一些实施方案

实施方案	结晶溶剂	溶剂化	化学计量
1s	-	一水合物	0.8 H <sub>2</sub> O
1a	水	一水合物	1.3 H <sub>2</sub> O
1b	甲苯	甲苯溶剂化物	0.4 甲苯
1c	乙酸乙酯/1,4-二氧六环	一水合物	1.1 H <sub>2</sub> O
1d	乙腈/氯仿	1.7 水合物	1.7 H <sub>2</sub> O
1e	乙酸乙酯/1,4-二氧六环	一水合物	1 H <sub>2</sub> O
1f	对二甲苯	对二甲苯溶剂化物	0.3 对二甲苯
1f	异丙基苯	异丙基苯溶剂化物	0.3 异丙基苯
1g	苯甲醚	苯甲醚溶剂化物	0.3 苯甲醚
1h	对二甲苯	对二甲苯溶剂化物	0.2 对二甲苯
2	1,4-二氧六环	1,4-二氧六环溶剂化物	1.2 1,4-二氧六环
3b	环己酮	环己酮溶剂化物	0.3 环己酮
3c	1,4-二氧六环	1,4-二氧六环溶剂化物	0.5 1,4-二氧六环
3d	THF	THF 溶剂化物	0.4 THF
3e	异丁醇	异丁醇溶剂化物	0.7 异丁醇
[0321] 1b+4	水/甲醇	混合的水合物/甲醇溶剂化物	-
5	氯仿	氯仿溶剂化物	0.5 氯仿
6	乙腈	无水	0.2 乙腈
1s+7	庚烷	庚烷溶剂化物	0.1 庚烷
7	-	非溶剂化	-
8	-	非溶剂化	-
9	-	非溶剂化	-
10		二水合物	1.8 H <sub>2</sub> O
11	乙醇	乙醇溶剂化物	0.5 乙醇
11b	甲醇	甲醇溶剂化物	0.5 甲醇
12	-	无水	-
13	甲醇/水	亚稳态形式	
14		亚稳态水合物	
15	甲苯	甲苯溶剂化物	0.55 甲苯
16	乙酸乙酯	乙酸乙酯溶剂化物	0.09 乙酸乙酯
17	乙酸异丙酯	乙酸异丙酯溶剂化物	0.13 乙酸异丙酯
18	2-丁酮	2-丁酮溶剂化物	0.2 2-丁酮

[0322] 如实施例1中所述获得的化合物通过如下方法进一步结晶：制备DCM中的浆液（1:3,例如30ml DCM中的10g化合物），将其在40℃下搅拌4小时，并且在25℃下进一步搅拌14小时，然后在25℃下缓慢添加庚烷（1:2,例如，将20ml庚烷加入化合物/DCM浆液/溶液中），缓慢加入到化合物/DCM浆液/溶液中，在40℃下搅拌4小时，冷却至25℃，并且在25℃下搅拌另外14小时。随后的过滤导致成灰白色固体形式的化合物实施例1，其被鉴定为一水合物，1s实施方案。

[0323] 如下制备化合物实施例1的无定形式（实施方案19）。将实施方案1s（1g）溶解于叔丁醇（40体积）中并在50℃下搅拌。将预干燥的分子筛添加到溶液中并搅拌10分钟。将溶液过滤并等分到HPLC小瓶（1ml）中，然后将小瓶在干冰-丙酮浴中冷冻。然后将样品置于冷冻干燥机上48小时。通过XRPD,该材料为无定形的，并且通过<sup>1</sup>H-NMR,其与本发明的结构相

符,其中化合物实施例1的每个分子中存在0.4mol叔丁醇。将该材料加热至150℃并在150℃下保持10分钟。通过XRPD和<sup>1</sup>H-NMR分析最终样品,并且确定其为无定形的并且化合物实施例1的每个分子保留0.03mol叔丁醇。

[0324] 表2和图2中的实施方案1至18是结晶的,并且图2中的实施方案19是无定形的。实施方案1s和1a至1h是同构的。实施方案1s以中心对称的三斜晶系空间群P-1形式结晶。术语“实施方案1”统称为同构实施方案1s和1a至1h。此类1s和1a至1h实施方案中的任一个有时被称为实施方案1的同构成员或仅被称为实施方案1的成员。实施方案3b、3c、3d和3e是同构的,并且以单斜体系,空间群C2/c形式结晶。术语“实施方案3”统称为同构的实施方案3b、3c、3d和3e。此类3b、3c、3d和3e实施方案中的任一个有时被称为实施方案3的同构成员或仅被称为实施方案3的成员。同构实施方案是使得其具有类似的晶体结构特性(相同的对称性和相似的晶胞参数和晶体堆积),同时具有不同的化学组成(即,掺入晶格中的不同溶剂和/或水分子)的那些。同构实施方案中的晶胞参数可由于不同的组成(掺入晶体结构中的溶剂或水)而略有不同。表2中提及的实施方案如图2中示意性地示出并且如以下内容更详细描述进行制备和/或互相转化。

[0325] 用于这些制备中的结晶方案包括纯溶剂中的溶剂平衡、蒸发结晶、热过滤冷却结晶、反溶剂碰撞结晶、热循环结晶、低温温育、热/冷熟化、高温温育、使用无定形材料的高温熟化(实施方案19)以及使用无定形材料的热循环(实施方案19)。通过HT-XRPD或XRPD对固体进行分析。当适用时,将母液完全蒸发,并且也通过HT-XRPD或XRPD对剩余固体进行分析。作为一水合物的原料实施方案1s为主要固体形式。

[0326] 在25℃和50℃下的溶剂平衡

[0327] 通过将化合物实施方案1s悬浮于二十种纯溶剂中并在室温下搅拌两周和在50℃下搅拌一周来进行长期浆液实验。在平衡时间结束后,将残余固体与母液分离。固体在环境条件下干燥,并且在真空(5mBar)下干燥,然后通过HT-XRPD分析。随后,将固体暴露于加速老化条件(40℃/70%相对湿度)两天,并且再次通过HT-XRPD分析。

[0328] 从大部分结晶溶剂中,获得作为实施方案1s的原料。从多种结晶溶剂中,发现HT-XRPD图案类似于初始实施方案1s的那些。在大多数这些衍射图案中,鉴定出峰位移和/或附加峰。这些图案中的每一个图案对应于标记为1a至1h中的一者的实施方案,并且基于此类实施方案的HT-XRPD衍射图案中的相似性,它们作为实施方案1的同构成员的实施方案被呈现。在暴露于40℃和75%相对湿度两天之后,实施方案1的全部同构成员均转化成实施方案1a。

[0329] 当其暴露于25℃下100%RH时,实施方案1s转化成水合实施方案10。然而,实施方案10在环境条件下在物理上不稳定。虽然实施方案1s以三斜晶系,空间群P-1形式结晶,但发现实施方案10以单斜晶体系,空间群C 2/c形式结晶。实施方案10在环境条件下具有有限的物理稳定性,并且其转化成另一个实施方案,诸如1s或1a。这种行为可归因于所有水合/溶剂化分子的不均匀强结合。在这种情况下,实施方案10将具有较不强键合的第二水分子,其将在环境条件下损失。更精确地,通过将此类实施方案的20mg样品暴露于40℃和70%相对湿度并持续四天,并且将相同实施方案的另一20mg样品暴露于25℃和100%相对湿度也持续四天,在气候室中研究实施方案1s的物理稳定性。四天后,通过HR-XRPD分析各种固体样品,测定晶胞参数,并对衍射图建立索引。衍射图如图6所示。从底部至顶部,图6中的第一

衍射图对应于作为原料的实施方案1s,并且第二衍射图对应于在暴露于40°C和70%相对湿度4天后的相同形式,在同一图中标记为“1s 70RH”。该分析显示初始实施例1s已回收,但具有少量的结晶形式,所述第二结晶形式可能是具有较高含水量的另一水合实施方案。由于其存在的量很小,因此不可能对此类形式建立索引。第三衍射图对应于暴露于25°C和100%相对湿度4天后的实施方案1s,其在一图中标记为“10”。这些条件导致实施方案1s转化为实施方案10,其具有少量初始实施方案1s杂质和溶剂化物,如表2中所表征的。在脱水后,实施方案1s和10两者重结晶成无水形式,其中熔点为148°C。

[0330] 实施方案10还通过将实施方案1s或实施方案19在水中浆液转化来制备,其中温度循环为25°C至5°C。通过将50mg材料悬浮于1mL水中来制备浆液。25°C至5°C的温度循环为:将混合物在25°C下加热1小时,并且然后在2小时周期内将温度降至5°C。然后将混合物在5°C的温度下保持1小时。然后在2小时周期内将温度升至25°C。将该温度循环方案重复总共约24小时。通过真空过滤分离固体,并且然后在过滤器上干燥10分钟。实施方案10在环境条件和真空下的干燥期间转化成实施方案1s。

[0331] 室温下的溶剂平衡由作为结晶溶剂的甲苯产生实施方案1b,并且由对二甲苯作为结晶溶剂产生实施方案1f。

[0332] 鉴定了三个附加固体实施方案并且命名为实施方案2、3和7。由在室温下在1,4-二氧六环中进行溶剂平衡实验鉴定出实施方案2(其TGA和DSC分别示于图21A和图21B中),然而在50°C下由庚烷的单一溶剂平衡实验中以与实施方案1s的混合物形式发现实施方案7。鉴定出若干相似但不相同的衍射图,将所述衍射图分组为实施方案3b、3c、3d和3e,其为实施方案3的等构成员。发现实施方案3的等构成员与实施方案1的成员混合。在一些情况下,包含实施方案3的成员的混合物转化为实施方案1a或者实施方案1a和3e的混合物。实施方案7看起来是物理稳定的,但实施方案2在暴露于AAC两天后转化为实施方案3e。

#### [0333] 蒸发结晶

[0334] 将从室温下进行的溶剂平衡实验保留的母液用于缓慢蒸发结晶实验。过滤母液以除去任何颗粒物质并使其在环境条件下缓慢蒸发。通过HT-XRPD分析获得的固体,并且在暴露于AAC两天后再次分析。

[0335] 由于化合物实施例1在一些溶剂中的较差溶解度,当使用此类溶剂时,不回收固体。在固体沉淀的实验中,回收实施方案1或3的无定形残余物或同构成员。在稳定性研究期间,实施方案1的不同成员转化为实施方案1a,然而实施方案3的样品似乎在物理上是稳定的。在一些情况下,无定形固体在稳定性研究后保持无定形的,变得潮解或示出一些结晶度的迹象。

#### [0336] 冷却结晶

[0337] 将在50°C下进行的溶剂平衡实验的母液在50°C下过滤以除去任何颗粒物质。使用0.2 $\mu$ m PTFE过滤器过滤50°C下的悬浮液,并且将溶液置于5°C并老化72小时。当固体在老化期间中沉淀时,将这些固体与液体分离,在环境条件下和真空下干燥,并且通过HT-XRPD分析。使剩余的母液缓慢蒸发,并通过HT-XRPD分析剩余的固体。将不发生沉淀的样品置于真空下,并且通过HT-XRPD分析干燥的固体。然后将所有固体暴露于AAC(40°C/70%RH下2天)并通过HT-XRPD重新分析。

[0338] 固体在一些溶液中冷却时不沉淀,在这种情况下,将溶液在环境条件下蒸发。由于

化合物实施例1在一些溶剂中的低溶解度,从一些溶液中不获得固体。

[0339] 从四种溶剂(2-丙醇、2-丁酮、乙腈和甲醇)中发生沉淀。在800 $\mu$ L乙腈中,25mg/mL的浓度下以mL规模进行单一冷却结晶实验的蒸发之后,鉴定出实施方案6。实施方案6在2天AAC后似乎是稳定的固体形式,并且其呈现为非溶剂化实施方案。

[0340] 以 $\mu$ L规模进行冷却/蒸发结晶

[0341]  $\mu$ L规模的冷却/蒸发结晶实验在96孔板中进行,其使用12种纯溶剂和12种溶剂混合物并应用四种温度分布。在每个孔中,固体定量投放大约4mg的实施方案1s。随后,添加结晶溶剂(80 $\mu$ L)和溶剂混合物以达到50mg/mL的浓度,其中将每个孔单独密封,以随后经历四种温度分布中的一种。在完成温度分布后,使溶剂在低环境压力下蒸发(24小时),并且在暴露于AAC 2天(40 $^{\circ}$ C/70%RH)之前和之后通过HT-XRPD分析剩余固体。

[0342] 从大多数溶剂体系和温度分布中发现实施方案1和3的成员。然而,观察到固体形式相对于温度分布的某种趋势。实施方案1b主要从短温度分布(3小时老化)识别。然而,具有长老化时间的相同溶剂体系导致实施方案1f、实施方案3的成员或实施方案1和3的成员的混合物的识别。实施方案3c由1,4-二氧六环作为结晶溶剂,以及50 $^{\circ}$ C作为初始温度,保持60分钟,之后以1 $^{\circ}$ C/小时的速率冷却至20 $^{\circ}$ C的最终温度,保持48小时的温度分布来获得;实施方案3d由四氢呋喃作为结晶溶剂和与实施方案3c相同的温度分布来获得。

[0343] 当应用短老化条件时,在甲醇/水(50/50,体积/体积)、THF和DCM/IPA(50/50,体积/体积)中进行的实验中鉴定出实施方案4。实施方案4通过如下方法获得:用水和甲醇的混合物(50/50),以及50 $^{\circ}$ C作为初始温度,保持60分钟,之后以20 $^{\circ}$ C/小时的速率冷却至5 $^{\circ}$ C的最终温度,保持3小时的温度分布处理实施方案1s,这连同实施方案1b一起产生实施方案4。实施方案4连同实施方案1b还通过如下方法获得:用水和甲醇的混合物(50/50),以及50 $^{\circ}$ C作为初始温度,保持60分钟,之后以20 $^{\circ}$ C/小时的速率冷却至20 $^{\circ}$ C的最终温度,保持3小时的温度分布处理1s。实施方案4在环境条件下看起来不是物理稳定的。冷却结晶实验以乙酸乙酯/1,4-二氧六环(50/50,体积/体积)作为结晶溶剂,以及50 $^{\circ}$ C作为初始温度,保持60分钟,之后以1 $^{\circ}$ C/小时的速率冷却至5 $^{\circ}$ C的最终温度,保持48小时的温度分布,产生实施方案1c;以乙腈/氯仿(50/50,体积/体积)作为结晶溶剂,以及50 $^{\circ}$ C作为初始温度,保持60分钟,之后以1 $^{\circ}$ C/小时的速率冷却至5 $^{\circ}$ C的最终温度,保持48小时的温度分布,产生实施方案1d;以及以乙酸乙酯/1,4-二氧六环(50/50,体积/体积)作为结晶溶剂,以及50 $^{\circ}$ C作为初始温度,保持60分钟,之后以1 $^{\circ}$ C/小时的速率冷却至20 $^{\circ}$ C的最终温度,保持48小时的温度分布,产生实施方案1e。

[0344] 实施方案5在氯仿作为结晶溶剂,以及50 $^{\circ}$ C作为初始温度,保持60分钟,之后以1 $^{\circ}$ C/小时的速率冷却至20 $^{\circ}$ C的最终温度,保持48小时的温度分布来进行的实验中鉴定出来。

[0345] 如先前在其他结晶方法中观察到的,在稳定性研究期间观察到类似的转化。在大多数情况下,所有固体形式均转化为实施方案1a或包含实施方案1a的混合物。

[0346] 从固体混合物蒸发结晶

[0347] 在使用溶剂/反溶剂混合物的蒸发结晶中,制备化合物的澄清溶液,其中首先蒸发溶剂(高蒸气压),从而导致化合物在一定程度上以晶体形式沉淀。然后,这些晶体在蒸发反溶剂(较低的蒸气压)时充当种子。

[0348] 化合物实施例1不完全溶于溶剂体系中的每一个溶剂体系中。出于该原因,所用实

验均包括蒸发之前的过滤。

[0349] HT-XRPD分析的结果展示出化合物实施例1在蒸发溶剂混合物时主要以实施方案1s形式结晶。对于以下溶剂/反溶剂体系观察到这种情况：四氢呋喃/水、乙腈/水、氯仿/乙醇、甲醇/乙酸乙酯、2-丁酮/异丙醇和庚烷/丙酮。从两种体系，丙酮/异丙基苯和1,4-二氧六环/甲酸乙酯中，鉴定出同构实施方案3b和3e，其在AAC之后分别转化成实施方案1a和3d，以及实施方案1s和3e的不同混合物。

#### [0350] 反溶剂重结晶

[0351] 化合物实施例1的饱和溶液在纯溶剂中制备。反溶剂添加在正向和反向添加中进行。在正向添加中，将反溶剂以三份等分试样添加到化合物溶液中。通过将一定体积的化合物溶液加入大量过量的反溶剂(20mL)中来进行反向添加。

[0352] 沉淀后，将固体与液体分离，在环境条件下干燥，并在真空(5毫巴)下干燥，然后通过HT-XRPD分析。将在添加反溶剂时不发生沉淀的实验在5℃下储存48小时以诱导沉淀。随后分离沉淀的固体并通过HT-XRPD分析。当未获得固体时，将溶液在温和条件下蒸发，并且通过HT-XRPD分析残余固体。将所有固体暴露于AAC(40℃/70%RH下2天)并通过HT-XRPD进行重新分析。

[0353] 在所有情况下，正向反溶剂结晶均示出沉淀。所有固体均可被归类为实施方案1的同构成员(1s、1b、1j、1f)或实施方案3的同构成员(3b、3d、3f)。在暴露于AAC后，除了转化为实施方案1a和3e的混合物的固体样品之外，所有固体样品均转化为实施方案1a。

[0354] 在作为溶剂的DMSO中进行的反向反溶剂结晶实验根据所用的反溶剂给出不同的固体形式。在二氯甲烷或对二甲苯的情况下，鉴定出实施方案1的同构成员(1s和1b)，然而在MTBE的情况下得到无定形残余物。用庚烷和水作为反溶剂，在反溶剂添加时不沉淀的两种溶液的蒸发导致油状物。在AAC之后观察到转化成实施方案1a，并且无定形残余物变得潮解。

#### [0355] 热过滤实验

[0356] 利用热过滤的冷却结晶实验由在50℃下制得的化合物实施例1在不同溶剂混合物中的过饱和溶液进行。热过滤溶液经历48小时的冷却分布。将其中固体在温度分布之后已经沉淀的小瓶进行离心，并且将固体与液体分离并通过HT-XRPD分析(在真空下干燥后)。如果没有固体沉淀，则在真空下蒸发溶液，并且通过HT-XRPD分析固体。将所有固体暴露于AAC(40℃/70%RH下2天)并通过HT-XRPD重新分析。在一半的热过滤实验中，不发生沉淀，并且在溶剂蒸发时，由于化合物实施例1在那些溶剂体系中的较差溶解度，不回收足够的固体。在三个实验中，回收无定形残余物，其在AAC后结晶成实施方案1(1s或1a)和实施方案3(3e)的成员的混合物，或变得潮解。实施方案5从丙酮/氯仿(50/50，体积/体积)中的实验鉴定。该实施方案看起来在物理上不稳定，因为在AAC后观察到实施方案1a的转化。

#### [0357] 热循环实验

[0358] 在室温下，在10种溶剂中制备约6mg实施方案1s的悬浮液。使悬浮液在5℃和50℃之间循环。在热循环完成后，固体通过离心分离并在环境条件和真空(5毫巴)下干燥，然后通过HT-XRPD分析。随后，将所有固体暴露于AAC两天，并再次通过HT-XRPD分析。热循环实验通常促进更稳定的多晶型形式的形成。除了在环己酮中进行的实验之外，所有小瓶均在热分布后包含固体。将环己酮溶液在适度真空下缓慢蒸发。实施方案1、实施方案3的成员或其



混合物主要鉴定为呈湿固体形式。在干燥这些固体后,观察到转化为实施方案1s。实施方案3b和3e得自在300 $\mu$ L环己酮中在51mg/mL浓度下的热循环(3b)和在400 $\mu$ L异丁醇中在37.3mg/mL浓度下的热循环(3e)。实施方案5得自在800 $\mu$ L氯仿中在18.6mg/mL浓度下的热循环。

[0359] 图3、图4和图5示出了表2中所列并且在上述筛选中也被提及的实施方案中的一些实施方案的HT-XRPD图案的叠加。

[0360] 从大部分结晶实验中回收实施方案1s。其是取决于环境条件,具有可变数量的掺入的水分子和/或其他溶剂的通道水合物。观察到转化成实施方案1a。这种形式包含略多的水(1.3个水分子)。在暴露于40 $^{\circ}$ C和75%相对湿度两天之后,实施方案1的全部同构成员均转化成实施方案1a。对于实施方案1的成员,XRPD图案中的一些衍射峰的偏移可归因于掺入晶格中的不同溶剂或水分子。图4示出了实施方案1的成员的HT-XRPD图案的叠加。衍射图1s对应于呈实施方案1s形式的,作为原料的化合物实施例1。衍射图1a对应于实施方案1a,其在若干实施方案1s的样品暴露于AAC之后获得。衍射图1b对应于实施方案1b,其从甲苯中室温下进行的溶剂平衡实验获得。衍射图1c对应于实施方案1c,其从在乙酸乙酯/1,4-二氧六环(50/50,体积/体积)中以 $\mu$ L规模进行的冷却结晶实验中获得。衍射图1d对应于实施方案1d,其从在乙腈/氯仿(50/50,体积/体积)中以 $\mu$ L规模进行的冷却结晶实验中获得。衍射图1e对应于实施方案1e,其从在乙酸乙酯/1,4-二氧六环(50/50,体积/体积)中以 $\mu$ L规模进行的冷却结晶实验中获得。衍射图1f对应于实施方案1f,其从在对二甲苯中室温下进行的溶剂平衡实验中获得。衍射图1g对应于实施方案1g,其从在苯甲醚中在50 $^{\circ}$ C下进行的溶剂平衡实验中获得。衍射图1h对应于实施方案1h,其从在对二甲苯中以 $\mu$ L规模进行的冷却结晶实验中获得。

[0361] 实施方案3的成员的衍射图如图5所示。不同HT-XRPD图案中观察到的偏移最可能归因于掺入晶格中的不同溶剂分子。实施方案3通过在70%RH下将实施方案2加热至40 $^{\circ}$ C并持续4天来获得。实施方案3b至3e是包含非化学计量的溶剂的溶剂化形式,所述非化学计量的量根据掺入晶体结构中的溶剂而有所不同(0.3-0.7个分子)。包含实施方案3的成员的混合物在暴露于AAC时是不稳定的,并且其在一些情况下转化为实施方案1a或者实施方案1a和3e的混合物。对实施方案1a转化归因于在暴露于高相对湿度时由水分子交换溶剂分子,并且重结晶成水合实施方案1a。

[0362] 实施方案9通过如下方式获得:将实施方案2加热至约200 $^{\circ}$ C的温度,之后冷却至25 $^{\circ}$ C,并且还进行循环DSC 25 $^{\circ}$ C-200 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C-300 $^{\circ}$ C。实施方案9也通过附加的程序获得。此类程序中的一种是两步程序:在室温下用1,4-二氧六环(10体积)处理实施方案1s(1.5g)。加入实施方案2的种子(5mg)并将样品在室温下搅拌24小时。将所得的悬浮液过滤并将样品风干1.5小时。通过XRPD确定该样品为实施方案2。在该两步程序的第二步中,将实施方案2以10 $^{\circ}$ C/分钟加热至210 $^{\circ}$ C并在210 $^{\circ}$ C下保持30分钟。然后使样品冷却至室温。通过XRPD分析确定所得的固体为实施方案9。此类程序中的另一种也是用于获得实施方案9的两步程序。在该程序中,用1,4-二氧六环(10体积)处理实施方案1s(1.5g)。加入实施方案2的种子(5mg)并将样品在室温下搅拌24小时。将所得的悬浮液过滤并将样品风干1.5小时。通过XRPD确定该样品为实施方案2。在该程序的第二步中,将实施方案2以10 $^{\circ}$ C/分钟加热至150 $^{\circ}$ C,然后以2 $^{\circ}$ C/分钟进一步加热至170 $^{\circ}$ C。然后使样品冷却至室温。通过XRPD分析确定所得的固体为实

施方案9。实施方案9的TGA和DSC分别示于图22A和图22B中。

[0363] 实施方案1s通过使实施方案9在50℃下在以下溶剂中浆化6天来获得：2-丁酮、丙酮/水(90/10,体积/体积)和乙腈/水(90/10,体积/体积)。当在室温下进行相同的实验时,也获得实施方案1s。

[0364] 实施方案8通过将实施方案5加热至约175℃的温度来获得。实施方案8也通过附加的程序获得。此类程序中的一种是两步程序：用1,4-二氧六环(10体积)处理实施方例1s(1.5g)并在室温下搅拌72小时。过滤所得的悬浮液,并且将获得的固体在室温下于真空烘箱中干燥16小时。通过XRPD确定从该第一步获得的固体为实施方案3c。在第二步中,将实施方案3c(100mg)以10℃/分钟加热至150℃,然后以2℃/分钟的较慢速率加热至180℃。然后使样品冷却回室温。通过XRPD确定所得的固体为实施方案8。此类程序中的另一种也是用于获得实施方案8的两步程序。在该程序中,用1,4-二氧六环(3体积)处理实施方案19(300mg)并在60℃下摇动24小时。过滤所得的悬浮液,并且通过XRPD确定从该第一步获得的固体为实施方案3c。在第二步中,将实施方案3c(300mg)以10℃/分钟加热至180℃。然后使样品冷却回室温。通过XRPD确定所得的固体为实施方案8。实施方案8的TGA和DSC分别示于图20A和图20B中。

[0365] 除了如上所述的实施方案6的制备之外,该实施方案通过加热实施方案11(80mg至100mg,其制备方式将在下文描述),通过热重量分析以10℃/分钟从环境温度加热至185℃,并且保持等温3分钟来获得。然后使样品冷却至室温。实施方案6也通过使实施方案11经受浆液实验而从实施方案11获得。浆液实验按如下方式运行：将溶剂添加到实施方案11(50mg)中,并且将混合物在指定温度下搅拌0.5小时。加入形式9的晶种(5mg),并且将混合物在指定温度下搅拌过夜。通过离心分离固体并通过XRPD使用乙酸异丙酯(0.5mL)在30℃和50℃两者下分析。实施方案6的生成通过XRPD确认。实施方案6的TGA和DSC分别示于图19A和图19B中。

[0366] 本发明的附加实施方案如下所述获得。

[0367] 通过使实施方案5经受浆液实验将其转化成实施方案9。使用各种溶剂在所鉴定的温度下如下进行浆液实验：将溶剂添加到实施方案5(50mg)中,并且将混合物在指定温度下搅拌0.5小时。加入形式9的晶种(5mg),并且将混合物在指定温度下搅拌过夜。通过离心分离固体并通过XRPD分析。使用以下溶剂进行50℃下的浆液实验运行：TBME(0.75mL)以及乙酸异丙酯：庚烷的33:67混合物(0.5mL)。使用以下溶剂进行75℃下的浆液实验运行：乙酸异丙酯(0.5mL)和甲基乙基酮(0.5mL)。

[0368] 实施方案11按如下方式获得：将实施方案1s(45g)在乙醇(无水,水含量<0.1%,300mL)中的悬浮液在50℃下搅拌16.5小时。然后以0.25℃/分钟将悬浮液冷却至5℃。随后,在5℃下将悬浮液搅拌3小时。然后滤出固体并用冷(5℃)乙醇(无水,水含量<0.1%,90mL)洗涤,并且在40℃下真空干燥17小时,获得大约39g的实施方案11。实施方案11的TGA和DSC分别示于图17A和图17B中。

[0369] 实施方案11还按如下方式获得：将无水乙醇(170mL)添加到实施方案1s(19g)中并加热至溶剂的约沸点。少量固体(5%)不溶解并且通过热过滤去除。确定滤出的固体为实施方案1s。因此将固体添加回滤液中,并且将该混合物加热直至所有固体溶解。经由分液漏斗向该热溶液中逐滴加入庚烷(535mL)。在庚烷的该逐滴加入期间,剧烈搅拌该热溶液。在庚

烷加入完成后,将含有热溶液/庚烷混合物的烧瓶浸入冰水浴中并剧烈搅拌一小时。然后通过过滤收集固体,并且通过使空气通过白色固体滤饼来干燥15分钟。通过在高真空下在70℃下加热16小时,并且然后在80℃下加热18小时,将其进一步干燥,获得16.3g的实施方案11。实施方案11的衍射图示于图7中。

[0370] 在实施方案11的吸湿性研究中,发现它仅是轻微吸湿性的,其中在如图18所示的GVS分析中,0%至90%RH之间的质量变化为0.66%。GVS分析后的XRPD分析示出材料是物理稳定的。执行变温(VT)-XRPD以评估实施方案11在加热时的稳定性。如XRPD分析所示,材料在经受高达约175℃的温度时保持不变,然而在经受高于180℃的温度时,样品转化成实施方案6。在图24中示出了实施方案11在VT-XRPD实验之前和之后的衍射图以及实施方案6的衍射图。实施方案11还在40℃/75%RH下经受静态储存分析长达48天。在2天、5天和48天后,通过XRPD和Karl Fisher (KF) 分析样品。实施方案11如XRPD分析所示保持不变,其中48天后总水摄取量为1.2%。材料在静态储存48天后的<sup>1</sup>H-NMR示出材料保留0.36摩尔当量的乙醇。<sup>1</sup>H-NMR表明,在环境条件下储存该研究期间的实施方案11含有0.46摩尔当量的乙醇。

[0371] 实施方案11b按如下方式从实施方案1s获得:将10mL干燥甲醇添加到3.3g实施方案1s中。使该混合物经受以下温度循环:将混合物在40℃下加热1小时,并且然后在2小时周期内将温度升至60℃。然后将混合物在60℃下加热1小时。然后在2小时周期内将温度降至40℃。将该温度循环方案重复总共约20小时。此时,在2小时周期内将混合物冷却至5℃。在5℃下通过真空过滤分离固体,并且然后在环境温度下真空干燥约66小时。另选地,实施方案11b使用以下程序从实施方案1s获得:将1mL干燥甲醇添加到330mg实施方案1s中。使该混合物经受以下温度循环:将混合物在40℃下加热1小时,并且然后在2小时周期内将温度升至60℃。然后将混合物在60℃下加热1小时。然后在2小时周期内将温度降至40℃。将该温度循环方案重复总共约18小时。此时,通过离心分离固体,并且然后在环境温度下真空干燥约33小时。使用分子筛(3Å, 在真空下于100℃下活化至少24小时)干燥上述实验的甲醇。实施方案11b的衍射图示于图7E中。

[0372] 实施方案12得自实施方案1s,其在25℃下暴露于低于10%RH的湿度条件以提供实施方案12。实施方案12的衍射图示于图7B中。

[0373] 实施方案13按如下方式获得:向25℃±5℃下的250mL四颈烧瓶中添加实施方案1s的样品。然后向烧瓶中加入MeOH(4.0V, 40mL)和纯化水(10mL, 1.0V),并且搅拌直至所有固体溶解。向混合物中鼓入N<sub>2</sub>1小时,并且然后将混合物冷却至0℃至5℃。在N<sub>2</sub>下于0℃下,将纯化水(40mL)加入到100mL四颈烧瓶中,然后加入NaBH<sub>4</sub>(1.0g),制备0.225mL体积的NaBH<sub>4</sub>/水(0.006当量, 2.5%重量/重量)的冷溶液(0℃至5℃);将混合物在0℃下搅拌,直至所有NaBH<sub>4</sub>溶解。将此类NaBH<sub>4</sub>溶液加入到冷却(0℃至5℃)的250mL烧瓶中并在0℃至5℃下搅拌。反应混合物的颜色变为黄色。在0℃至5℃下,在1小时内逐滴加入纯化水(40mL, 4.0V, 使用前用N<sub>2</sub>脱气)。将反应在N<sub>2</sub>下于0℃至5℃下搅拌4小时。在0℃至5℃下,在1小时内逐滴加入附加的纯化水(30mL, 3.0V, 脱气),并且在N<sub>2</sub>下于0℃至5℃下将反应混合物搅拌附加的16小时。然后过滤反应,并且在手套箱环境中在N<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>含量为200ppm)下,用纯化水(20mL, 2V, 使用前用N<sub>2</sub>脱气)洗涤所得的固体。将固体在35℃±5℃下用润湿的氮气真空干燥,以提供呈灰白色固体的实施方案13。实施方案13的衍射图示于图7C中。

[0374] 实施方案14按如下方式制备:将2-(1-((1r, 4r)-4-(氰甲基)环己基)-6-(苯磺酰

基)-1,6-二氢咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-N-(2-羟基-2-甲基丙基)乙酰胺(48.15kg,在实施例2的步骤B中制备)、EtOH(技术等级,481L)和KOH(6.613kg)在10℃至20℃下搅拌9小时。然后用乙酸(6.74L)淬灭反应,将温度保持在10℃至20℃。加入乙腈(240L),并且将溶剂减压蒸发至约240L的体积。将乙腈的该加入和蒸发再重复两次。将所得的混合物加热至60℃至70℃并保持5小时,之后将其冷却至10℃至15℃并搅拌2小时。然后将该混合物中的固体过滤掉并用乙腈(48L)洗涤两次。然后将固体添加到水(240L)中,并将反应混合物在45℃至50℃下加热3小时至5小时,然后在15℃至20℃下冷却4小时。滤出剩余的固体并用水(96L,两次)洗涤滤饼。将该滤饼在45℃下干燥以提供实施方案14(26.28kg)。实施方案14的衍射图示于图7D中。

[0375] 本发明的附加实施方案如下所述获得。

#### [0376] 溶解度评估

[0377] 用渐增体积的溶剂处理实施方案1s(15mg),直至材料完全溶解或直至已加入最多100mL溶剂。按如下增量加入溶剂:5mL、10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、70mL和100mL。在每次加入溶剂之后,在轻轻搅拌下将体系在50℃下保持5分钟,并且目视评估固体的存在。该过程持续进行,直至总共加入100mL溶剂。如果无固体残留,则不加入附加的溶剂。在评估完成之后,将溶液在50℃下保持1小时,并且然后在搅拌下以0.1℃/分钟从50℃冷却至5℃。如果存在固体,则使用96孔板在真空下过滤混合物并通过XRPD进行分析。如果获得澄清溶液,则使溶液在室温下蒸发。根据得到所注明的实施方案的该程序在5℃和50℃的温度下使用以下溶剂(其中在紧接在溶剂之后的括号中注明了添加的总量),其中在每个温度之后的括号内给出溶解程度:5℃(悬浮液)下和50℃(悬浮液)下的水(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(溶液)下的甲醇(10mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(溶液)下的乙醇(30mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(溶液)下的2-丙醇(30mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(溶液)下的1-丙醇(30mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(溶液)下的丙酮(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(混浊)下的乙酸乙酯(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(溶液)下的乙腈(100mL),得到实施方案6,其衍射图示于图3中;5℃(部分溶解)下和50℃(混浊)下的甲苯(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(混浊)下的乙酸异丙酯(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(悬浮液)下的甲基叔丁基醚(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(溶液)下的2-丁酮(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(部分溶解)下和50℃(溶液)下的THF(70mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(溶液,样品被冷冻并在室温下蒸发)下和50℃(溶液)下的DMSO(5mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(溶液,在室温下蒸发)下和50℃(溶液)下的N-甲基吡咯烷酮(5mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(悬浮液)下的乙醚(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(悬浮液)下的甲基异丁基酮(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(悬浮液)下的DCM(100mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;5℃(悬浮液)下和50℃(悬浮液)下的庚烷(100mL),得到实施方案18,其衍射图示于图8中;5℃(部分溶解,样品被冷冻并

在室温下蒸发)下和50°C(悬浮液)下的1-4-二氧六环(100mL),得到干燥形式的实施方案3c,其衍射图示于图5中;5°C(悬浮液)下和50°C(悬浮液)下的硝基甲烷(100mL),得到不良结晶的实施方案(衍射图未示出);5°C(溶液)下和50°C(溶液)下的1-甲氧基-2-丙醇(20mL),得到干燥形式的实施方案20,其衍射图示于图11中;5°C(悬浮液)下和50°C(悬浮液)下的2-甲基-THF(100mL),得到实施方案18,其衍射图示于图8中,并且其TGA和DSC分别示于图10A和图10B中;5°C(悬浮液)下和50°C(混浊)下的四氢化萘(100mL),得到实施方案4和实施方案1b的混合物,其衍射图示于图3中;5°C(悬浮液)下和50°C(溶液)下的3-甲基-1-丁醇(100mL),得到实施方案17,其衍射图示于图8中,并且其TGA和DSC分别示于图12A和图12B中;5°C(悬浮液)下和50°C(混浊)下的苯甲醚(100mL),得到实施方案4和实施方案1b的混合物,其衍射图示于图3中;5°C(溶液)下和50°C(溶液)下的叔丁醇/水(1:1,10mL),得到干燥形式的实施方案19,其调制DSC示于图9中;5°C(悬浮液)下和50°C(混浊)下的1,2-二甲氧基乙烷(100mL),得到实施方案4和实施方案1b的混合物,其衍射图示于图3中;5°C(悬浮液)下和50°C(混浊)下的异丙基苯(100mL),得到实施方案4和实施方案1b的混合物,其衍射图示于图3中;5°C(悬浮液)下和50°C(悬浮液)下的二异丙基醚(100mL),得到实施方案18,其衍射图示于图8中;5°C(悬浮液)下和50°C(溶液)下的吗啉(5mL),得到干燥形式的实施方案21,其衍射图示于图11中;5°C(悬浮液)下和50°C(溶液)下的乙醇:水(95:5,10mL),得到不良结晶的实施方案(衍射图未示出);5°C(溶液)下和50°C(溶液)下的乙醇:水(9:1,5mL),得到干燥形式的实施方案1s,其衍射图示于图5中;以及5°C(悬浮液)下和50°C(溶液)下的乙腈:水(95:5,30mL),得到不良结晶的实施方案(衍射图未示出)。

#### [0378] 在5°C下温育

[0379] 通过用每种溶剂处理实施方案1s(30mg)来进行在5°C下温育的若干实验,并且将混合物在5°C下浆化48小时。取出等分试样并立即通过XRPD进行分析。将每个等分试样干燥16小时,并且通过XRPD重新分析。然后将风干的样品置于真空烘箱(室温)中24小时,之后通过XRPD进一步分析。根据得到所注明的实施方案的该程序使用以下溶剂(其中在紧接在溶剂之后的括号中注明了添加的总溶剂量,然后是溶解程度):水(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;甲醇(5mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;乙醇(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;2-丙醇(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;1-丙醇(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;丙酮(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;乙酸乙酯(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;乙腈(30mL,悬浮液),得到不良结晶的实施方案(衍射图未示出);甲苯(30mL,悬浮液),得到实施方案15,其衍射图示于图8中;乙酸异丙酯(30mL,悬浮液),得到实施方案17,其衍射图示于图8中;甲基叔丁基醚(30mL,悬浮液),得到实施方案18,其衍射图示于图8中;2-丁酮(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;THF(30mL,悬浮液),得到实施方案17,其衍射图示于图8中;乙醚(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;甲基异丁基酮(30mL,悬浮液),得到实施方案17,其衍射图示于图8中;DCM(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;庚烷(30mL,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;1,4-二氧六环(30mL,悬浮液),得到实施方案3c,其来自该实验的衍射图示于图5中;硝基甲烷(30mL,悬浮液),得到不良结晶形式的实施方案1s,其衍射图未示出;丙二醇(30mL,悬浮液),得到不良结晶的实施方案(衍射图未示出);2-甲基-四

氢呋喃 (30mL, 悬浮液), 得到实施方案18, 其衍射图示于图8中; 四氢化萘 (30mL, 悬浮液), 得到不良结晶的实施方案1s, 其衍射图未示出; 3-甲基-1-丁醇 (30mL, 悬浮液), 得到实施方案18, 其衍射图示于图8中; 苯甲醚 (30mL, 悬浮液), 得到实施方案1s, 其中其衍射图类似于实施方案1s的衍射图 (如图5所示), 不同的是它显示一些附加的峰; 1,2-二甲氧基乙烷 (30mL, 悬浮液), 得到实施方案1s, 其中其衍射图类似于实施方案1s的衍射图 (如图5所示), 不同的是它显示一些附加的峰; 异丙基苯 (30mL, 悬浮液), 得到实施方案1s, 其中其衍射图类似于实施方案1s的衍射图 (如图5所示), 不同的是它显示一些附加的峰; 二异丙基醚 (30mL, 悬浮液), 得到实施方案17, 其衍射图示于图8中; 乙醇:水 (95:5, 30mL, 悬浮液), 得到实施方案1s, 其衍射图示于图5中; 乙腈:水 (95:5, 30mL, 悬浮液), 得到不良结晶的实施方案 (衍射图未示出); 以及聚乙二醇 (30mL, 悬浮液), 得到不良结晶的实施方案 (衍射图未示出)。

#### [0380] 热/冷熟化

[0381] 将实施方案1s (30mg) 在每种溶剂中的悬浮液置于平台振荡温育箱中并经受从环境温度至大约50°C的一系列热冷却循环24小时。这通过每4小时打开和关闭加热来实现。自始至终保持摇动。从每个样品取出等分试样并使其风干2小时。通过XRPD分析风干的固体, 然后使用真空烘箱 (室温, 24小时) 真空干燥并通过XRPD重新分析。将该实验中获得的所有样品真空干燥, 并且在真空干燥后, 通过在高温下进行XRPD温育来分析每个样品。根据得到所注明的实施方案的该程序使用以下溶剂 (其中在紧接在溶剂之后的括号中注明了添加的总溶剂量): 水 (20mL), 得到实施方案1s, 其衍射图示于图5中; 甲醇 (5mL), 得到实施方案22, 其衍射图示于图13中; 乙醇 (5mL), 得到实施方案1s, 其衍射图示于图5中; 2-丙醇 (10mL), 得到实施方案27, 其该实验的衍射图示于图13中; 1-丙醇 (10mL), 得到实施方案23, 其衍射图示于图13中; 丙酮 (20mL), 得到实施方案1s, 其衍射图示于图5中; 乙酸乙酯 (20mL), 得到不良结晶形式的实施方案1s, 其衍射图未示出; 乙腈 (20mL), 得到不良结晶的实施方案24, 其衍射图示于图13中; 甲苯 (20mL), 得到不良结晶的实施方案1s, 其衍射图未示出; 乙酸异丙酯 (20mL), 得到实施方案18, 其衍射图示于图13中; 甲基叔丁基醚 (20mL), 得到不良结晶的实施方案1s, 其衍射图未示出; 2-丁酮 (20mL), 得到实施方案26, 其衍射图示于图13中; THF (20mL), 得到实施方案18, 其衍射图示于图13中; 乙醚 (20mL), 得到不良结晶的实施方案1s, 其衍射图未示出; 甲基异丁基酮 (20mL), 得到实施方案25, 其衍射图示于图13中; DCM (20mL), 得到不良结晶形式的实施方案1s, 其衍射图未示出; 庚烷 (20mL), 得到实施方案1s, 其衍射图示于图5中; 1,4-二氧六环 (20mL), 得到实施方案27, 其该实验的衍射图示于图13中; 硝基甲烷 (20mL), 得到不良结晶的实施方案1s, 其衍射图未示出; 丙二醇 (5mL), 得到不良结晶的实施方案 (衍射图未示出); 2-甲基-四氢呋喃 (20mL), 得到实施方案18, 其衍射图示于图13中; 四氢化萘 (20mL), 得到实施方案1s, 其衍射图示于图5中; 3-甲基-丁醇 (20mL), 得到实施方案18, 其衍射图示于图13中; 苯甲醚 (20mL), 得到实施方案16, 其衍射图示于图13中, 并且其TGA和DSC分别示于图23A和图23B中; 1,2-二甲氧基乙烷 (20mL), 得到实施方案29, 其衍射图示于图13中; 异丙基苯 (20mL), 得到实施方案1s, 其衍射图示于图5中; 二异丙基醚 (20mL), 得到实施方案17, 其衍射图示于图13中; 乙醇:水 (95:5, 20mL), 得到实施方案30, 其衍射图示于图13中; 乙腈:水 (95:5, 20mL), 得到不良结晶形式的实施方案1s, 其衍射图未示出; 以及聚乙二醇 (5mL), 得到实施方案31, 其衍射图示于图13中。

#### [0382] 实施方案1s在60°C下温育

[0383] 用溶剂处理实施方案1s (30mg) 并在60°C下摇动24小时。取出等分试样并使其风干16小时。然后通过XRPD分析干燥的样品。根据得到所注明的实施方案的该程序使用以下溶剂(其中在紧接在溶剂之后的括号中注明了添加的总溶剂量):水(10mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;乙醇(10mL),得到实施方案32,其衍射图示于图14中;2-丙醇(10mL),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;1-丙醇(10mL),得到实施方案23,其衍射图示于图14中;丙酮(10mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;乙酸乙酯(10mL),得到实施方案34,其衍射图示于图14中;乙腈(10mL),得到实施方案35,其衍射图示于图14中;甲苯(10mL),得到实施方案36,其衍射图示于图14中;乙酸异丙酯(10mL),得到实施方案25,其该实验的衍射图示于图14中;甲基叔丁基醚(10mL),得到实施方案35,其衍射图示于图14中;2-丁酮(10mL),得到实施方案38,其衍射图示于图14中;THF(10mL),得到实施方案33,其该实验的衍射图示于图14中;乙醚(10mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;甲基异丁基酮(10mL),得到实施方案25,其该实验的衍射图示于图14中;DCM(10mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;庚烷(10mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;1-4-二氧六环(10mL),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;硝基甲烷(10mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;丙二醇(10mL),得到实施方案28,其该实验的衍射图示于图14中;2-甲基-四氢咪喃(10mL),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;四氢化萘(10mL),得到实施方案1s和实施方案19的混合物(混合物的衍射图未示出),实施方案1s的衍射图示于图5中,实施方案19的调制DSC曲线示于图9中;3-甲基-1-丁醇(10mL),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;苯甲醚(10mL),得到实施方案36,其衍射图示于图14中;1,2-二甲氧基乙烷(10mL),得到实施方案34,其衍射图示于图14中;异丙基苯(10mL),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;二异丙基醚(10mL),得到实施方案17,其衍射图示于图8中;乙醇:水(95:5,10mL),得到实施方案28,其衍射图示于图14中;以及聚乙二醇(5mL),得到实施方案39,其该实验的衍射图示于图14中

#### [0384] 高温熟化

[0385] 用如下所示量的溶剂处理多个实施方案19 (25mg) 样品中的每个样品,继而产生多个样品,每个样品在60°C下搅拌24小时。分离来自每个样品的固体,风干16小时并通过XRPD进行分析。根据得到所注明的实施方案的该程序使用以下溶剂(其中在紧接在溶剂之后的括号中注明了添加的总溶剂量,然后是溶解程度):水(125 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;甲醇(125 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图类似于图5所示实施方案1s的衍射图,不同的是它显示一些附加的峰;乙醇(125 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;2-丙醇(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案37,其衍射图示于图15中;1-丙醇(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案40,其衍射图示于图15中;丙酮(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;乙酸乙酯(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;乙腈(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;甲苯(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;乙酸异丙酯(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案37,其衍射图示于图15中;甲基叔丁基醚(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;2-丁酮(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;THF(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案37,其衍射图示于图15中;乙醚(150 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;甲基异丁基酮(150 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;DCM(75 $\mu$ L,悬浮液),



得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;庚烷(150 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案41,其衍射图示于图15中;1,4-二氧六环(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案3c,其衍射图示于图5中;硝基甲烷(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案42,其衍射图示于图15中;丙二醇(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案43,其衍射图示于图15中;2-甲基-四氢呋喃(150 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;四氢化萘(150 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;3-甲基-1-丁醇(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;苯甲醚(150 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;1,2-二甲氧基乙烷(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;异丙基苯(150 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案44,其衍射图示于图15中;二异丙基醚(150 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;乙醇:水(95:5,75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案45,其衍射图示于图15中;乙腈:水(95:5,75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案1s,当与图5所示的衍射图比较时,其衍射图示出单元膨胀;以及聚乙二醇(75 $\mu$ L,悬浮液),得到实施方案46,其衍射图示于图15中。

#### [0386] 热循环

[0387] 用如下所示量的溶剂处理多个实施方案19(25mg)样品中的每个样品,继而产生多个样品,通过热循环(40 $^{\circ}$ C至60 $^{\circ}$ C,4小时循环)使每个样品熟化24小时。分离固体,风干16小时并通过XRPD进行分析。根据得到所注明的实施方案的该程序使用以下溶剂(其中在紧接在溶剂之后的括号中注明了添加的总溶剂量,然后是在24小时时观察到的外观):水(125 $\mu$ L,绿色色调固体),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;甲醇(75 $\mu$ L,透明固体),得到实施方案11,其衍射图示出与图7中的衍射图相比以大角度偏移的峰;乙醇(100 $\mu$ L,绿色色调固体),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;2-丙醇(75 $\mu$ L,黄色色调固体),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;1-丙醇(75 $\mu$ L,白色悬浮液),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;丙酮(75 $\mu$ L,绿色色调固体),得到实施方案47,其衍射图示于图16中;乙酸乙酯(75 $\mu$ L,白色悬浮液),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;乙腈(75 $\mu$ L,白色悬浮液),得到不良结晶的实施方案6,其衍射图示于图3中;甲苯(75 $\mu$ L,透明固体),得到实施方案36,其衍射图示于图14中;乙酸异丙酯(75 $\mu$ L,白色固体),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;甲基叔丁基醚(75 $\mu$ L,白色悬浮液),得到实施方案6,其衍射图示于图3中;2-丁酮(75 $\mu$ L,灰白色固体),得到实施方案33,其衍射图示于图14中;THF(75 $\mu$ L,灰白色固体),得到实施方案48,其衍射图示于图16中;乙醚(150 $\mu$ L,灰白色固体),得到实施方案49,其衍射图示于图16中;甲基异丁基酮(150 $\mu$ L,灰白色固体),得到实施方案25,其衍射图非常类似于图13所示的实施方案25的衍射图;DCM(125 $\mu$ L,白色悬浮液),得到实施方案1s,其衍射图示于图5中;庚烷(150 $\mu$ L,白色固体),得到实施方案19,其改进的DSC曲线示于图9中;1,4-二氧六环(75 $\mu$ L,白色固体),得到实施方案3c,其衍射图示于图5中;硝基甲烷(75 $\mu$ L,白色悬浮液),得到实施方案50,其衍射图示于图16中;丙二醇(75 $\mu$ L,霜膏悬浮液),得到实施方案10,其衍射图非常类似于实施方案10的衍射图(如图16所示),不同的是它示出无定形光晕;2-甲基-四氢呋喃(150 $\mu$ L,白色固体),得到实施方案48,其衍射图示于图16中;四氢化萘(150 $\mu$ L,白色固体),得到不良结晶的实施方案,其衍射图未示出;3-甲基-1-丁醇(75 $\mu$ L,白色悬浮液),得到实施方案25,其衍射图示于图13中;苯甲醚(150 $\mu$ L,白色悬浮液),得到实施方案51,其衍射图示于图16中;1,2-二甲氧基乙烷(75 $\mu$ L,白色悬浮液),得到实施方案52,其衍射图示于图16中;异丙基苯(150 $\mu$ L,白色固体),得到不良结晶的实施方案,其衍射图未示出;二异丙醚(150 $\mu$



L, 白色固体), 得到实施方案6, 其衍射图示于图3中; 乙醇: 水 (95:5, 75 $\mu$ L, 透明固体), 得到实施方案11, 其衍射图示于图7中; 乙腈: 水 (95:5, 75 $\mu$ L, 透明固体), 得到实施方案53, 其衍射图示于图16中; 以及丙二醇 (75 $\mu$ L, 淡粉色悬浮液), 得到实施方案31, 其衍射图非常类似于实施方案31的衍射图 (如图13所示), 不同的是它示出无定形光晕。

[0388] 化合物实施例1的实施方案11、11b、12、13、14、15、16、17、18、19、20、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52和53中的任一个实施方案以及它们的任何组合是根据本发明的化合物的实施方案。根据本发明的化合物的其他实施方案包括作为非吸湿性溶剂化物的化合物实施例1, 诸如化合物实施例1的实施方案11。根据本发明的化合物的其他实施方案包括无定形形式的化合物实施例1, 诸如化合物实施例1的实施方案19。化合物实施例1的实施方案11、16、17和18中的任一个实施方案以及它们的任何组合是根据本发明的化合物的实施方案。本发明的另外实施方案包括呈药学上可接受的共晶体形式的根据本发明的化合物。本发明的附加实施方案包括呈药学上可接受的盐形式的根据本发明的化合物。

[0389] 实施例1至12为JAK抑制剂, 并且在酶测定和细胞测定法中进行测试。酶测定的结果示于表4中, 其名称为酶抑制测定的结果。实施例1至12还在三个细胞测定中进行测试: IL-2pSTAT5 (JAK1/JAK3)、IFN $\alpha$ pSTAT4 (JAK1/TYK2) 和GM-CSF pSTAT5 (JAK2/JAK2), 其中表5中示出的结果名称为基于细胞的测定数据。下面是如何进行酶测定的说明, 其包括测定中使用的材料 (根据标题材料), 如何设置测定 (根据标题测定方案), 以及用于分析数据的方法 (根据标题高通量质谱 (HTMS) 方法)。

#### [0390] 酶抑制测定

##### [0391] 材料

[0392] 基底 (NH<sub>2</sub>-KGGEEEEYFELVKK-CO<sub>2</sub>)、内标肽 (NH<sub>2</sub>-SWGAIETDKEYYTVKD-CO<sub>2</sub>) 和产品肽 (仅用于标准曲线) (NH<sub>2</sub>-KGGEEEEY-Pi-FELVKK-CO<sub>2</sub>) 购自 (Fremont, CA, USA)。将JAK1-JH1JH2 (具有His-GST标记和C-末端tev (ENLYFQ-G) 裂解位点的574-1154)、JAK3-JH1JH2 (具有GST标记和C-末端tev (ENLYFQ-G) 裂解位点的512-1124)、和Tyk2-JH1JH2 (具有C-末端tev (ENLYFQ-G) 裂解位点的8H\_tev\_580-1182-C936A-C1142A) 内部纯化。JAK2-JH1JH2 (具有GST标记和C-末端tev (ENLYFQ-G) 裂解位点的532-1132) 购自Invitrogen。LC/MS级水和乙腈 (ACN) 购自HoneyWell, Burdick&Jackson (Muskegon, MI, USA)。二甲基亚砜99.8% (DMSO) 和三氟乙酸99.5% (TFA) 购自EMD Chemical (Gibbstown, NJ, USA)。三磷酸腺苷 (ATP)、4-吗啉丙磺酸 (MOPS)、氯化镁 (MgCl<sub>2</sub>)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、二硫苏糖醇 (DTT)、甲酸>95% (FA) 和Tween-20购自Sigma (StLouis, MO, USA)。384孔聚丙烯板, 目录号781280, 购自Greiner (Monroe, NC), RapidFire™柱A C4柱 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)。

[0393] HTMS实验在RapidFire 300仪器 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 上以正电离模式进行, 所述仪器与具有电喷雾离子源 (RF-MS) (Concord, ON, Canada) 的ABSiex QTrap 4000系统偶联。RapidFire系统利用3个Agilent 1200系列等度泵Agilent Technologies (Santa Clara, CA) 和得自Ismatec (Wertheim, Germany) 的一个型号ISM832C的蠕动泵来运行。整个系统使用RapidFire软件进行操作, 该软件与质谱仪的Analyst软件连接。

##### [0394] 测定方案

[0395] 通过在DMSO中连续稀释1:3或1:4来制备每种化合物的11点投配系列,其中点12为DMSO对照。从连续稀释板,使用Labcyte Echo (Sunnyvale,CA) 或Biosero ATS (San Diego, CA) 将样品转移至384孔测定板 (#781280, Greiner, Monroe, NC)。一式两份测试化合物。柱12用于阳性对照,并且柱24包含阴性对照且不添加酶。将来自内部收集的具有对JAK同种型的抑制活性的化合物用作参考化合物。20 $\mu$ L反应中的DMSO最终浓度 $\leq$ 0.25%。蛋白质中的每一种蛋白质的测定条件汇总于表3中。通过向10 $\mu$ L在反应缓冲液中制备的基质溶液(50mMOPs pH 7.5, 10mMMgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 2mM DTT, 0.002% Tween-20)中添加10 $\mu$ L酶和ATP混合物来引发酶反应。在反应开始之前,将Tyk2酶与2mM ATP预温育30分钟。在将酶加入到反应混合物中之后,立即以1000rpm将板离心1分钟,并且在25 $^{\circ}$ C下对于JAK3而言温育45分钟,并且对于JAK1、JAK2和Tyk2而言温育90分钟。通过使用Multidrop Combi试剂分配器(Thermo Scientific, Waltham, MA)添加包含0.15 $\mu$ M内标肽的20 $\mu$ L 0.5% TFA来淬灭反应。柱24中的若干孔通常用于产品标准曲线。淬灭后,将测定板以3000rpm离心3分钟,并使用PlateLoc (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 用可刺穿的铝箔(目录号06644-001, Agilent)密封。然后将平板转移到RapidFire以用于MS分析。通过与未抑制的酶反应相比,样品孔中的磷酸化产物含量的降低来评估化合物抑制。上述测定的测定条件示于表3中并且在这些测定中测试的实施例1至12的结果示于表4中。

[0396] 表3: JAK家族酶测定的测定条件\*

酶	[酶], nM	[ATP], $\mu$ M	[基质], $\mu$ m	[IS], nM
JAK1- JH1JH2	8.0	12.5	200	100
[0397] JAK2- JH1JH2	7.0 或 3.6	30	40	100
JAK3- JH1JH2	2.0	150	40	100
Tyk2- JH1JH2	25 或 14.7	50	200	100

[0398] \*反应缓冲液: 50mMOPs, pH 7.5 10mMMgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 2mM DTT, 0.002% Tween-20; “IS”代表内标肽; “基质”代表肽。

[0399] 高通量质谱 (HTMS) 法

[0400] RapidFire上的样品分析使用由水/TFA/FA (100:0.01:0.1, 体积/体积/体积) 组成的流动相A1, 由ACN/水/TFA/FA (80:20:0.01:0.1, 体积/体积/体积) 组成的流动相B1来进行。使用了以下运行参数: 状态1 (抽吸), 250ms; 状态2 (加载/洗涤), 3000ms; 状态3 (洗脱), 4000ms; 状态4 (重新平衡), 1000ms, 流量为1.25mL/min。将样品从384-孔测定板直接抽吸并递送到RF-MS微型固相C4萃取柱 (A型) 上。洗涤出不期望的组分, 诸如盐、辅因子、洗涤剂和大蛋白质, 并且将保留的分析物 (基质、产物和IS) 直接共洗脱到ABSiex Qtrap 4000系统上。肽 (基质)、磷酸肽 (产物) 和内标肽 (IS) 的量化通过MRM, 分别使用562 $\rightarrow$ 136.0, 589.2 $\rightarrow$ 215.7和953.2 $\rightarrow$ 158.8 (或974.2 $\rightarrow$ 158.8) 转变来进行。

[0401] 表4: 酶抑制测定的结果

测试化合物	JAK1_JH1JH2 IC <sub>50</sub> (nM)	JAK2_I_JH1JH2 IC <sub>50</sub> (nM)	JAK3_I_JH1JH2 IC <sub>50</sub> (nM)	Tyk2_I_JH1JH2 IC <sub>50</sub> (nM)
A	<0.2	<0.2	12.4	0.9
B	<0.2	<0.2	13.4	<0.2
C	<0.2	0.6	49.7	0.2
[0402] 实施例 1	0.4	8.6	92.2	7.4
实施例 2	0.2	1.0	33.9	1.5
实施例 3	0.2	6.2	82.8	11.6
实施例 4	0.1	6.6	96.2	2.2
实施例 5	0.3	2.1	23.1	4.1

测试化合物	JAK1_JH1JH2 IC <sub>50</sub> (nM)	JAK2_I_JH1JH2 IC <sub>50</sub> (nM)	JAK3_I_JH1JH2 IC <sub>50</sub> (nM)	Tyk2_I_JH1JH2 IC <sub>50</sub> (nM)
实施例 6	0.1	1.4	28.2	1.1
实施例 7	0.2	5.6	98.4	4.8
[0403] 实施例 8	0.4	7.0	75.6	6.6
实施例 9	0.2	6.6	79.9	4.7
实施例 10	1.0	6.5	87.5	9.0
实施例 11	0.4	1.6	30.3	1.5
实施例 12	0.9	9.4	101.3	8.7

#### [0404] 细胞测定

##### [0405] IL-2pSTAT5 (JAK1/JAK3) 细胞测定

[0406] AlphaLISA测定(基于来自PerkinElmer的Alpha Technology)通过如下方法进行:首先以HBSS (Hank平衡盐溶液)中30,000个细胞/4 $\mu$ L/孔在384-孔板中接种新鲜解冻的PBMC (Biological Specialty Corporation),所述HBSS包含0.1% IgG (免疫球蛋白G)-无蛋白酶-无BSA (牛血清白蛋白) (Jackson ImmunoResearch目录号001-000-161)。然后,在37 $^{\circ}$ C下用2 $\mu$ L/孔的在DMSO中以半对数滴定浓度稀释的化合物处理细胞并持续三十分钟,其中最高测试浓度为10 $\mu$ M,并且最终DMSO浓度为0.5%。接着,在37 $^{\circ}$ C下,用2 $\mu$ L/孔的IL-2 (R&D Systems目录号202-IL-050),以5ng/mL刺激细胞三十分钟。通过添加2 $\mu$ L/孔的裂解缓冲液 (PerkinElmer目录号ALSU-PST5-A10K)终止细胞反应,之后在室温下温育五分钟。向细胞中添加5 $\mu$ L/孔受体混合物 (PerkinElmer目录号ALSU-PST5-A10K)并在室温下在暗处温育一小时。然后,向细胞中添加5 $\mu$ L/孔供体混合物 (PerkinElmer目录号ALSU-PST5-A10K)并在室温下在暗处温育过夜。最后,在PerkinElmer EnVision上读板以用于检测时间分辨的荧光信号。在化合物测试浓度下测定IL-2-依赖性pSTAT5抑制的百分比;并且对于每种化合物,生成剂量曲线并计算IC<sub>50</sub>。化合物IC<sub>50</sub>通过化合物浓度相对于 $\alpha$ 信号的半对数稀释滴定曲线的非线性回归, sigmoidal剂量响应分析来计算。首字母缩略词“ $\alpha$ ”代表放大的发光邻近均匀测定; $\alpha$ 信号是发光/荧光信号。

##### [0407] IFN $\alpha$ pSTAT4 (JAK1/TYK2) 细胞检测

[0408] AlphaLISA测定(基于来自PerkinElmer的Alpha Technology)通过如下方法进行:首先以DMEM (Dulbecco改性的伊格尔培养基)中100,000个细胞/6 $\mu$ L/孔在384-孔板中接种新鲜解冻的PBMC (Biological Specialty Corporation),所述DMEM包含10% FBS (胎牛血清)和1,000 I.U./mL青霉素和1,000 $\mu$ g/mL链霉素。然后,在37 $^{\circ}$ C下用2 $\mu$ L/孔的在DMSO中以半

对数滴定浓度稀释的化合物处理细胞并持续三十分钟,其中最高测试浓度为10 $\mu$ M,并且最终DMSO浓度为0.5%。接着,在37 $^{\circ}$ C下,用2 $\mu$ L/孔的IFN $\alpha$  (PBL Assay Science目录号11101-2),以4ng/mL刺激细胞三十分钟。通过添加2 $\mu$ L/孔的裂解缓冲液(PerkinElmer目录号ALSU-PST4-A10K)终止细胞反应,之后在室温下温育五分钟。向细胞中添加4 $\mu$ L/孔的受体混合物(PerkinElmer目录号ALSU-PST4-A10K)并在室温下在暗处温育一小时。然后,向细胞中添加4 $\mu$ L/孔的供体混合物(PerkinElmer目录号ALSU-PST4-A10K)并在室温下在暗处温育过夜。最后,在PerkinElmer EnVision上读板以用于检测时间分辨的荧光信号。在化合物测试浓度下测定IFN $\alpha$ -依赖pSTAT4抑制的百分比;并且对于每种化合物,生成剂量曲线并计算IC<sub>50</sub>。化合物IC<sub>50</sub>通过化合物浓度相对于 $\alpha$ 信号的半对数稀释滴定曲线的非线性回归,sigmoidal剂量响应分析来计算。术语“ $\alpha$ ”在紧接前述细胞测定说明中定义。

[0409] GM-CSFpSTAT5 (JAK2/JAK2) 细胞检测

[0410] AlphaLISA测定(基于来自PerkinElmer的Alpha Technology)通过如下方法进行:首先以HBSS中30,000个细胞/4 $\mu$ L/孔在384-孔板中接种新鲜解冻的PBMC (Biological Specialty Corporation),所述HBSS包含0.1% IgG-无蛋白酶-无BSA (Jackson ImmunoResearch目录号001-000-161)。然后,在37 $^{\circ}$ C下用2 $\mu$ L/孔的在DMSO中以半对数滴定浓度稀释的化合物处理细胞并持续三十分钟,其中最高测试浓度为10 $\mu$ M,并且最终DMSO浓度为0.5%。接着,在37 $^{\circ}$ C下,用2 $\mu$ L/孔的GM-CSF (R&D Systems目录号215-GM-050),以11pg/mL刺激细胞十五分钟。通过添加2 $\mu$ L/孔的裂解缓冲液(PerkinElmer目录号ALSU-PST5-A10K)终止细胞反应,之后在室温下温育五分钟。向细胞中添加5 $\mu$ L/孔受体混合物(PerkinElmer目录号ALSU-PST5-A10K)并在室温下在暗处温育一小时。然后,向细胞中添加5 $\mu$ L/孔供体混合物(PerkinElmer目录号ALSU-PST5-A10K)并在室温下在暗处温育过夜。最后,在PerkinElmer EnVision上读板以用于检测时间分辨的荧光信号。在化合物测试浓度下测定GM-CSF-依赖性pSTAT5抑制的百分比;并且对于每种化合物,生成剂量曲线并计算IC<sub>50</sub>。化合物IC<sub>50</sub>通过化合物浓度相对于 $\alpha$ 信号的半对数稀释滴定曲线的非线性回归,sigmoidal剂量响应分析来计算。术语“ $\alpha$ ”在IL-2pSTAT5 (JAK1/JAK3) 细胞测定说明中定义。

[0411] 表5:基于细胞的测定数据

测试化合物	IL-2 pSTAT5 (JAK1/JAK3) IC <sub>50</sub> (nM)	IFN $\alpha$ pSTAT4 (JAK1/TYK2) IC <sub>50</sub> (nM)	GM-CSF pSTAT5 (JAK2/JAK2) IC <sub>50</sub> (nM)
实施例 1	21.6	59.5	83.9
实施例 2	9.0	20.8	61.0
实施例 3	6.4	10.1	21.9
实施例 4	35.5	64.7	119.4
[0412] 实施例 5	6.4	38.1	28.9
实施例 6	6.7	39.4	25.1
实施例 7	9.7	38.5	67.3
实施例 8	20.6	42.8	33.8
实施例 9	11.2	35.9	26.9
实施例 10	16.8	40.4	44.6
实施例 11	49.1	96.5	201.5
实施例 12	13.9	81.4	75.4

[0413] 在溶解度和渗透性测定中测试实施例1至12。溶解度测定的结果示于表6中,其名称为溶解度测定数据,并且渗透性测定的结果示于表7中,其名称为MDCK-MDR1渗透性数据。这些溶解度和渗透性测定分别在下文在标题溶解度测定和渗透性测定下描述。

#### [0414] 溶解度测定

[0415] 溶解度测量在以下溶解度介质中进行:模拟胃液(34.2mM氯化钠和100mM盐酸)或模拟肠液(空腹状态[pH 6.5]:3mM牛磺胆酸钠,0.75mM卵磷脂,28.4mM磷酸二氢钠,8.7mM氢氧化钠和105.9mM氯化钠)。将测试化合物以10mM的浓度溶于DMSO中。将测试化合物分配(20  $\mu$ L)到Nunc 1-mL-96-深孔-PP板中,并且经由从TurboVap 96吹下氮气并持续6小时来蒸发DMSO,或直至产生干燥残余物。然后,将400 $\mu$ L的溶解度培养基加入包含干燥固体的孔中。将预裂孔盖牢固地置于孔板上,并将样品在环境温度下剧烈搅拌2-5天。在温育时间段之后,样品通过AcroPrep 1-mL-96-过滤器板过滤到新的2-mL-96-深孔-PP板中,并且通过UV-HPLC,使用范围为0.004mM-0.55mM的3-点校准对上清液进行定量。由以下公式计算每种化合物的溶解度:

$$[0416] \quad \text{溶解度} = \frac{\text{样品峰面积}}{\text{得自3个标准样的平均响应因子}}$$

[0417] 溶解度值在4 $\mu$ M-400 $\mu$ m的范围内。将超出该范围的值记录为<4 $\mu$ m或>400 $\mu$ m。记录溶解度,只要研究下的化合物足够稳定以完成相应的溶解度测定。

#### [0418] 表6:溶解度测定数据

测试化合物	SGF 溶解度 ( $\mu\text{M}$ )	SIF 溶解度 ( $\mu\text{M}$ )
A	>400	>400
B	>400	75
C	>400	>400
实施例 1	>400	387
实施例 2	>400	>400
实施例 3	>400	>400
[0419] 实施例 4	>400	>400
实施例 5	>400	198
实施例 6	>400	>400
实施例 7	>400	81
实施例 8	>400	>400
实施例 9	>400	>400
实施例 10	>400	359
实施例 11	>400	>400
实施例 12	>400	>400

#### [0420] 渗透性测定

[0421] 根据Cyprotex方案,使用得自NIH(Rockville,MD,USA)的MDCK-MDR1细胞系进行渗透性测量。将传代数介于6-30之间的细胞以 $3.4 \times 10^5$ 个细胞/ $\text{cm}^2$ 的细胞密度接种到Multiscreen plate™(Millipore)上并培养三天,然后进行渗透性研究。该测定中的细胞形成填充培养皿的表面积的单细胞层的内聚片材,其也称为铺满单层,并且在第四天将测试化合物加入膜的顶侧并且在60分钟的时间段内监测化合物的跨单层转运。

[0422] 在引入经常用于这些测定中的“A”和“B”术语的简单且基本的方式中,实体的顶端(“A”)侧或隔室为此类实体暴露于内腔或外部环境的侧面,然而基底外侧(“B”)侧或隔室是此类实体暴露于典型的内部环境的侧面或隔室,其包括相对侧。例如,当此类实体示例性地为肠上皮细胞时,此类肠细胞的顶端侧将为细胞暴露于肠腔的侧面,而基底侧将为暴露于血液的侧面。

[0423] 将测试化合物以10mM的浓度溶于DMSO中。定量投配溶液通过用pH7.4的测定缓冲液(Hanks平衡盐溶液)以 $5\mu\text{M}$ 的最终浓度稀释测试化合物来制备。为了评估顶端至基底侧(“A-B”)的渗透性,从顶端隔室中移除缓冲液并用具有或不具有渗透性糖蛋白(“Pgp”、“P-gp”、“Pgp”或“P-gp”)抑制剂依克立达( $2\mu\text{m}$ )的测试化合物定量投配溶液替代。为了评估基底侧至顶端(“B-A”)的渗透性,从伴随板移除缓冲液并用测试化合物定量投配溶液替换。温育在 $37^\circ\text{C}$ 下在5% $\text{CO}_2$ 的气氛与95%相对湿度中一式两份地进行。每种测定均包括参考标记普萘洛尔(高渗透性)和哌唑嗪(PgP基质)。温育60分钟后,稀释顶端样品和基底侧样品,并且通过LC/MS/MS,使用在 $0.0039\mu\text{M}$ 至 $3\mu\text{M}$ 范围内的8点校准,在适当稀释样品的情况下(受体稀释因子=1;供体和 $C_0$ 稀释因子=10)对测试化合物进行量化。每种化合物的渗透性系数( $P_{\text{app}}$ )由以下公式计算: $P_{\text{app}} = (dQ/dt) / (C_0 \times S)$ ,其中 $dQ/dt$ 为药物穿过细胞的渗透速率, $C_0$ 为时间为零时的供体隔室浓度,S为细胞单层的面积。

[0424] 测量所有温育条件的回收百分比。这些测量未显示出不可接受的化合物/板结合

或细胞单层中的化合物聚积。

[0425] 表7中的第二列和第三列示出在不具有P-gp抑制剂(第二列)和具有P-gp抑制剂(第三列,标记为 $P_{app(A-B)}^e$ ) (其为依克立达)的情况下,顶侧到基底侧化合物转运的 $P_{app(A-B)}$ 值。 $P_{app(A-B)}$ 给出了在该测定中穿透细胞的渗透程度的指示,其被设想用于模拟跨表达Pgp的细胞(诸如表达Pgp胃肠道细胞)的跨细胞转运。测定在列3中给出的 $P_{app(A-B)}^e$ 值(在P-gp抑制剂存在下的 $P_{app(A-B)}$ )以确认P-gp在化合物流出中的作用。表7中的第四列示出了基底侧至顶侧化合物转运的 $P_{app(B-A)}$ 值。通过使用来自同一表中的第四列和第二列的相应渗透性系数值,在表7的第五列中以 $P_{app(B-A)}/P_{app(A-B)}$ 给出测试化合物的流出比。化合物(A)至(C)以及化合物实施例1至12的流出比(第五列,表7)始终大于2,这指示所有此类化合物均发生化合物流出。

[0426] 第2列中的 $P_{app(A-B)}$ 值一般较低,并且与参考化合物(A)至(C)以及化合物实施例1至12相当。这些较低的值指示所有此类化合物的低渗透性,这是由于P-gp效应,因为所有此类化合物均为P-gp基质,如由第5列中给出的值全部均大于2所指示的。为了表征为具有低渗透性,在第三列和第四列中分别给出的 $P_{app(A-B)}^e$ 和 $P_{app(B-A)}$ 的值应当较低。然而,这些数据示出化合物(A)-(C)的 $P_{app(B-A)}$ 大于化合物实施例1至12的对应值。

[0427] 通过由荧光分析检查荧光黄的渗透来监测每个单层的完整性。这种检查显示细胞在该测定中保持令人满意的铺满的单层。

[0428] 表7:MDCK-MDR1渗透性数据

测试化合物**	MDCK-MDR1 $P_{app(A-B)}$ ( $10^{-6}cm/sec$ ), 在 5 ( $\mu M$ )下	MDCK- MDR1 $P_{app(A-B)}^e$ ( $10^{-6}cm/sec$ ), 在 5 ( $\mu M$ )下	MDCK-MDR1 $P_{app(B-A)}$ ( $10^{-6}cm/sec$ ), 在 5 ( $\mu M$ )下	$P_{app(B-A)}/P_{app(A-B)}$
A	1.3	22	55.3	43
B	0.4	1.7	23.5	59
C	0.5	2.5	23.1	46
实施例 1	<0.5, 0.4	<0.5, 1.1	0.9, 1.1	>1.9, 3.3
实施例 2*	1.1	1.6	4.8	4.4
实施例 3	<0.4, <0.5	2.3, 1.6	17, 16	>41, >33
实施例 4	0.1	0.5	1.3	8.7
实施例 5	<0.4, <0.5	0.7, 0.5	1.8, 2.1	>4.8, >4.5
实施例 6	<0.3, <0.3	0.9, 1.1	2.5, 2.6	>8.4, >8.7
实施例 7	<0.4	1.2	3.6	>9
实施例 8	0.1	0.5	1.7	11.5
实施例 9	<0.4	0.6	1.8	>4.2
实施例 10	<0.4	1.1	7.1	>16.9

[0429]

测试化合物**	MDCK-MDR1 $P_{app(A-B)}$ ( $10^{-6}cm/sec$ ), 在 5 ( $\mu M$ )下	MDCK- MDR1 $P_{app(A-B)}^e$ ( $10^{-6}cm/sec$ ), 在 5 ( $\mu M$ )下	MDCK-MDR1 $P_{app(B-A)}$ ( $10^{-6}cm/sec$ ), 在 5 ( $\mu M$ )下	$P_{app(B-A)}/P_{app(A-B)}$
实施例 11	<0.4	0.8	1.1	>2.9
实施例 12	<0.5	0.6	1.1	>2.2

[0430]

[0431] \*对于A至B、A至B(具有依克立达)和B至A条件,起始浓度测量为 $>7\mu\text{m}$ 。

[0432] \*\*除非另外指明,否则化合物(A)至(C)和实施例1至12均在 $5\mu$ 的浓度下测试。对于细胞中以两个数据点示出的数据,将化合物测试两次。

[0433] 体内研究

[0434] 口服给药-方案1

[0435] 以 $25\text{mg}/\text{kg}$ 口服给药的剂量,以20%羟丙基- $\beta$ -环糊精(HP $\beta$ CD)中的溶液形式以 $5\text{mL}/\text{kg}$ 的剂量体积对三只非空腹雌性C57BL/6小鼠经口施用测试化合物。在给药后0.5小时、2小时和4小时经由眶后采血或跖背静脉的静脉穿刺来收集血液样品。将血液样品收集到包含抗凝剂(肝素钠)的试管中,并置于湿冰上。通过离心分离血浆级分并且除非在样品收集之后不久进行分析,否则就将其冷冻在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至多4小时并且在4小时之后冷冻在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。在给药后4小时收集结肠样品。从盲肠开始,解剖 $4\text{cm}$ 至 $6\text{cm}$ 的结肠样品,在纵轴上切开,并且通过用 $2\text{mL}$ 盐水冲洗除去固体内容物。通过将结肠置于 $5\text{mL}$ 盐水中并摇动5秒来进一步洗涤结肠。然后将结肠样品拍干,称重,并以1份组织(g)对4份HPLC级水( $\text{mL}$ )进行均化。使用合格的液相色谱-三重四极质谱(LC-MS/MS)法测定化合物在血浆和结肠匀浆物中的浓度。该方案用于评价以下测试化合物:化合物(B)和(C)以及实施例6和11。

[0436] 口服给药方案2

[0437] 以 $25\text{mg}/\text{kg}$ 口服给药的剂量,以20%HP $\beta$ CD中的溶液形式以 $5\text{mL}/\text{kg}$ 的剂量体积对三只非空腹雌性C57BL/6小鼠经口施用测试化合物。在给药后0.5小时、2小时和4小时经由眶后采血或跖背静脉来收集血液样品。将血液样品收集到包含抗凝剂(肝素钠)的试管中,并置于湿冰上。通过离心分离血浆级分并且除非在样品收集之后不久进行分析,否则就将其冷冻在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至多4小时并且在4小时之后冷冻在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。在给药后4小时收集结肠样品。从盲肠下方 $2\text{cm}$ ,解剖 $4\text{cm}$ 的结肠样品,在纵轴上切开,并且通过用 $2\text{mL}$ 盐水冲洗除去固体内容物。通过将结肠置于 $5\text{mL}$ 盐水中并摇动5秒来进一步洗涤结肠。然后将结肠样品拍干,称重,并以1份组织(g)对4份HPLC级水( $\text{mL}$ )进行均化。使用合格的液相色谱-三重四极质谱(LC-MS/MS)法测定化合物在血浆和结肠匀浆物中的浓度。该方案用于评价以下测试化合物:化合物(A)以及实施例1至5、7至10和12。

[0438] 结肠内给药-方案3

[0439] 结肠内(IC)给药组:在通过吸入用异氟烷麻醉后,使用注射器和针以 $5\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量,以20%HP $\beta$ CD中溶液形式,以 $1\text{mL}/\text{kg}$ 的剂量体积,通过腹壁中的小切口向三只非空腹雌性C57BL/6小鼠在结肠内施用化合物。在给药后0.5小时、2小时和4小时经由眶后采血来收集血液样品。将血液样品收集到包含抗凝剂(肝素钠)的试管中,并置于湿冰上。通过离心分离血浆级分并且除非在样品收集之后不久进行分析,否则就将其冷冻在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至多4小时并且在4小时之后冷冻在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。在给药后4小时收集结肠样品。从盲肠下方 $2\text{cm}$ ,解剖 $4\text{cm}$ 的结肠样品,在纵轴上切开,并且通过用 $2\text{mL}$ 盐水冲洗除去固体内容物。通过将结肠置于 $5\text{mL}$ 盐水中并摇动5秒来进一步洗涤结肠。然后将结肠样品拍干,称重,并以1份组织(g)对4份HPLC级水( $\text{mL}$ )进行均化。使用合格的液相色谱-三重四极质谱(LC-MS/MS)法测定化合物在血浆和结肠匀浆物中的浓度。该方案用于评价以下测试化合物的结肠内给药:实施例1、3和4。

[0440] 化合物实施例1至12的特征还在于表8中给出的物理-化学特性。 $c\text{LogP}$ 和 $t\text{PSA}$ 值通过使用ChemBioDraw Ultra 14.0来计算,其中P为正辛醇-水分配系数。总极性表面积



(tPSA) 计算为所有极性原子(主要是氧和氮,还包括其所连接的氢)的表面总和。

[0441] 表8:化合物实施例1至12的一些物理-化学特性

[0442]

测试化合物	cLog P	tPSA	#氢键供体	#氢键受体	#可旋转键
实施例 1	0.94	113.11	3	5	6
实施例 2	2.31	88.17	2	4	3
实施例 3	1.58	92.88	2	4	6
实施例 4	0.54	116.67	2	5	6
实施例 5	0.24	102.11	2	5	5

[0443]

测试化合物	cLog P	tPSA	#氢键供体	#氢键受体	#可旋转键
实施例 6	0.86	102.11	2	5	6
实施例 7	1.25	116.67	2	5	6
实施例 8	1.13	113.11	3	5	6
实施例 9	1.14	108.48	2	5	5
实施例 10	1.35	116.67	2	5	6
实施例 11	1.50	117.27	3	5	5
实施例 12	0.57	113.11	3	5	6

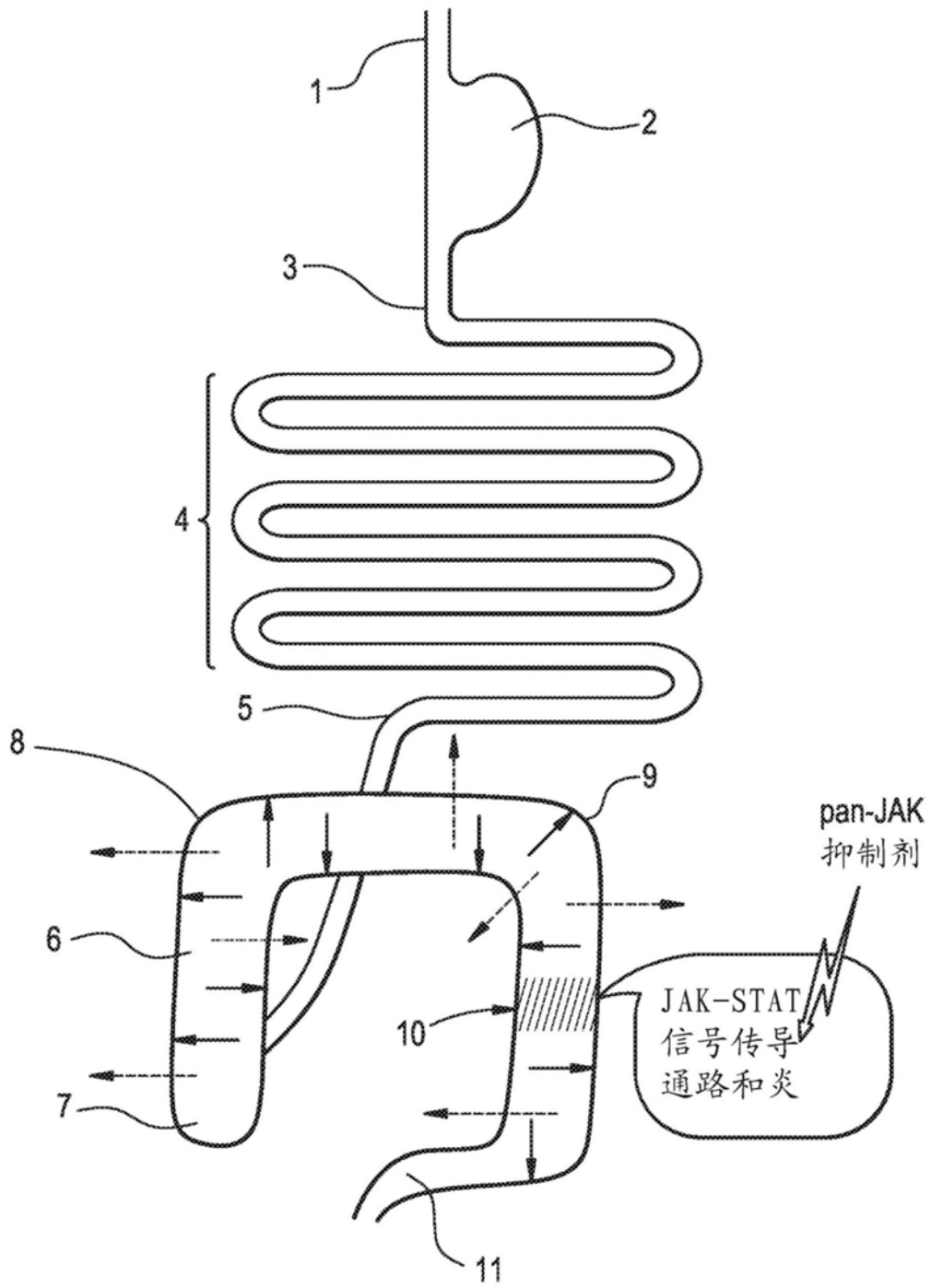


图1

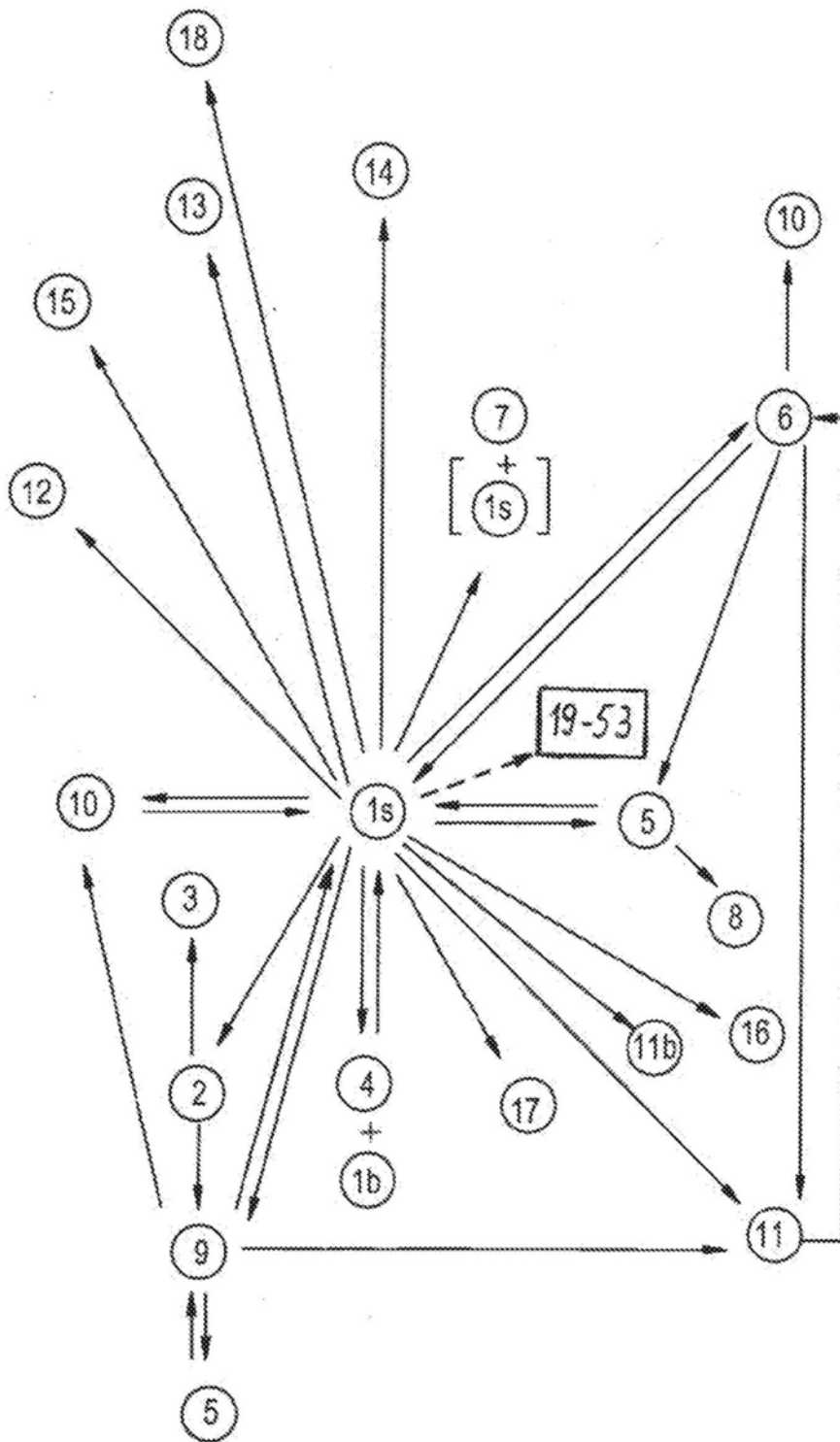


图2

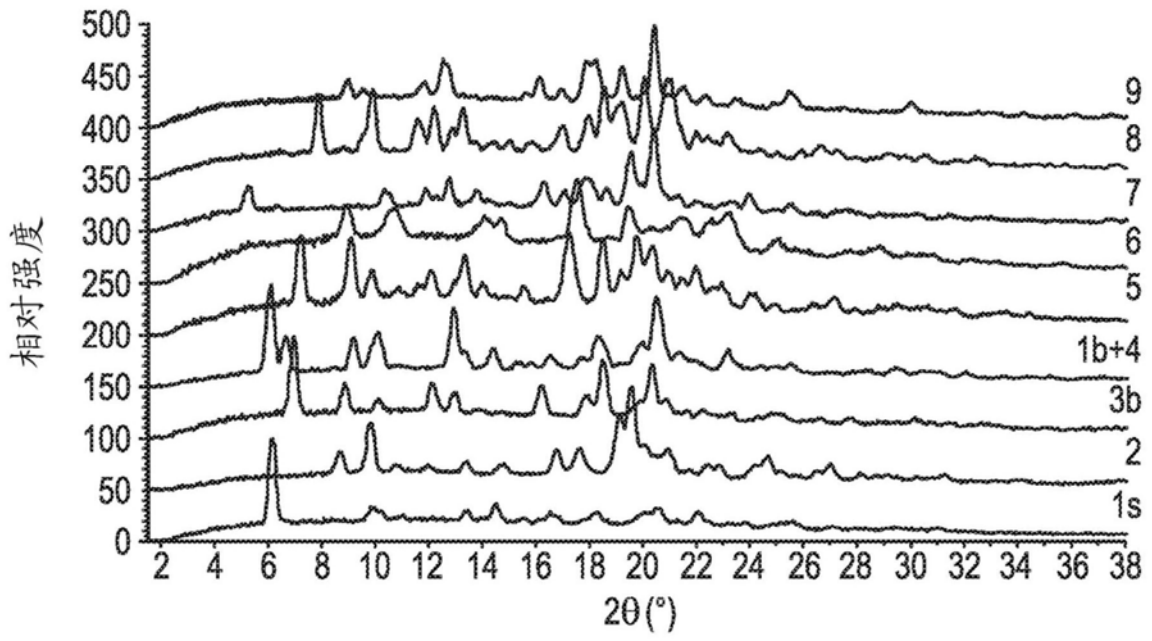


图3

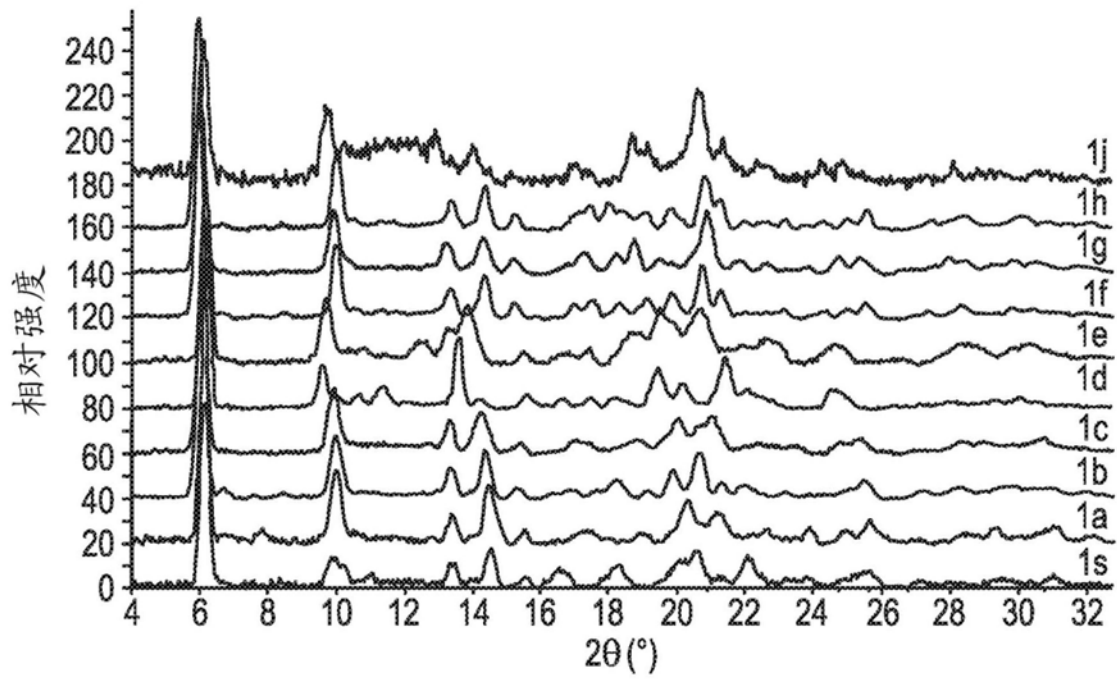


图4

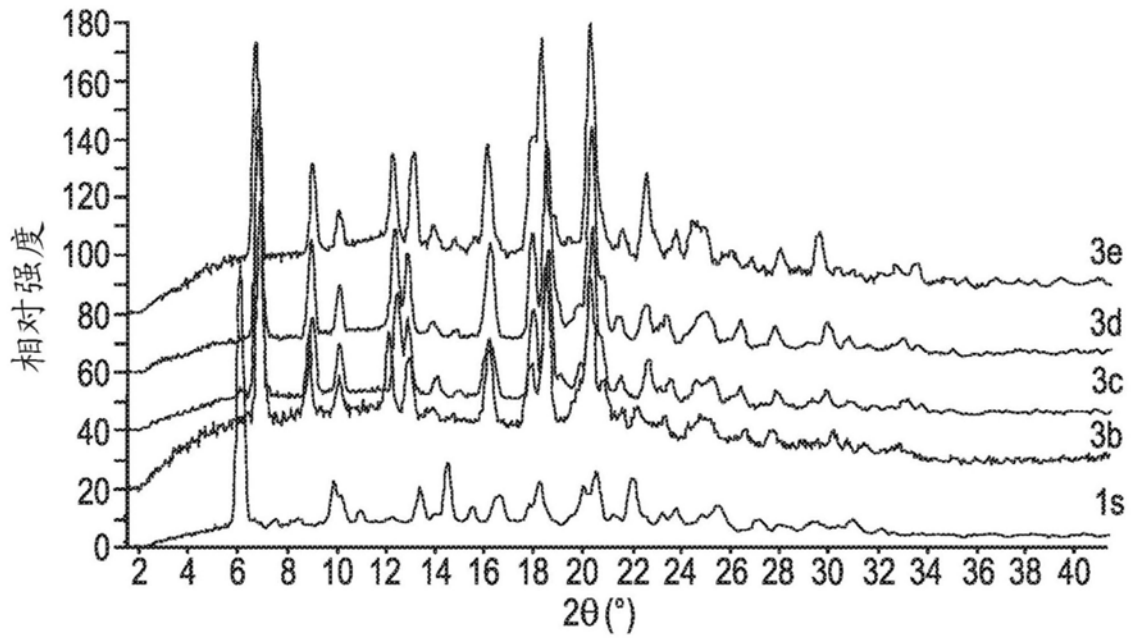


图5

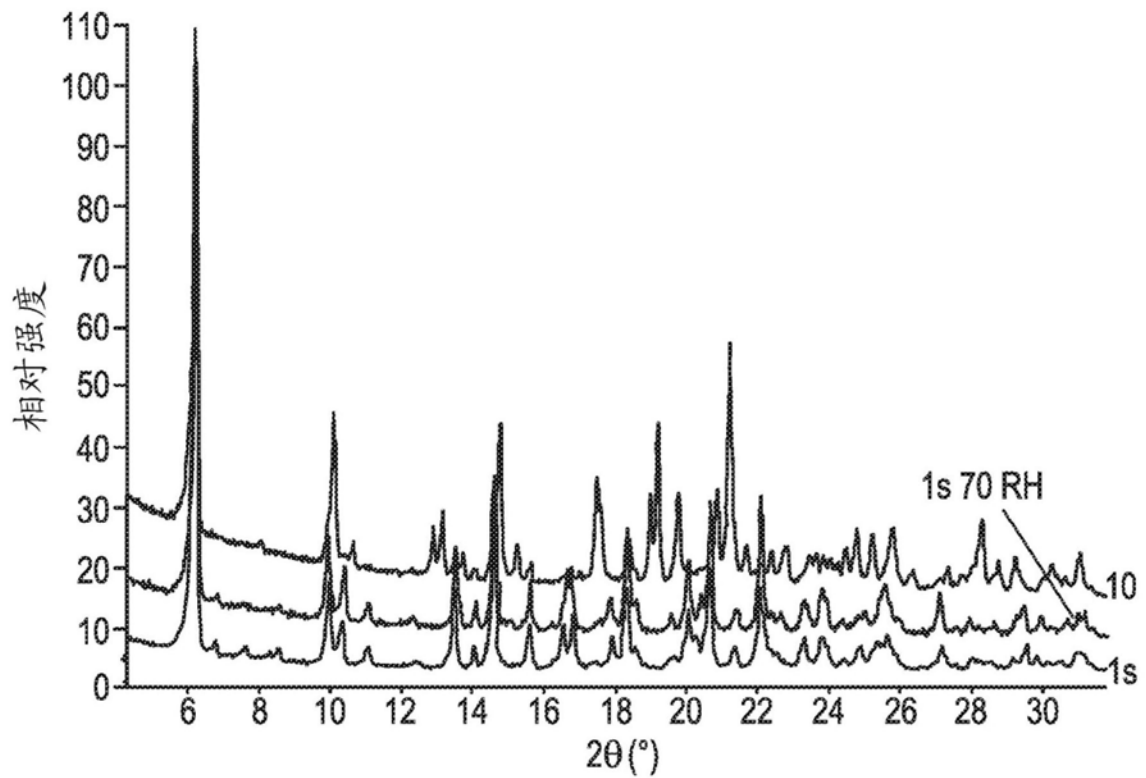


图6

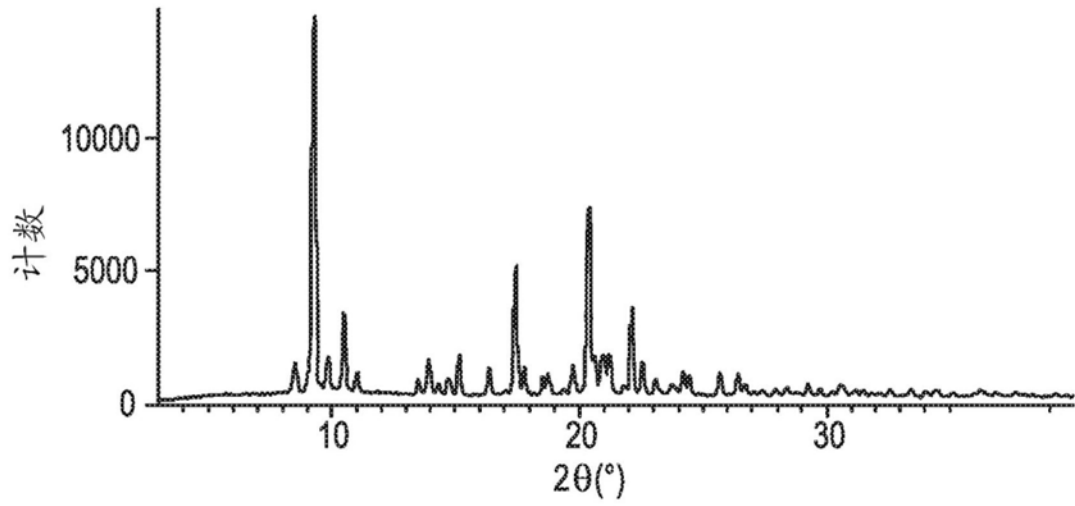


图7A

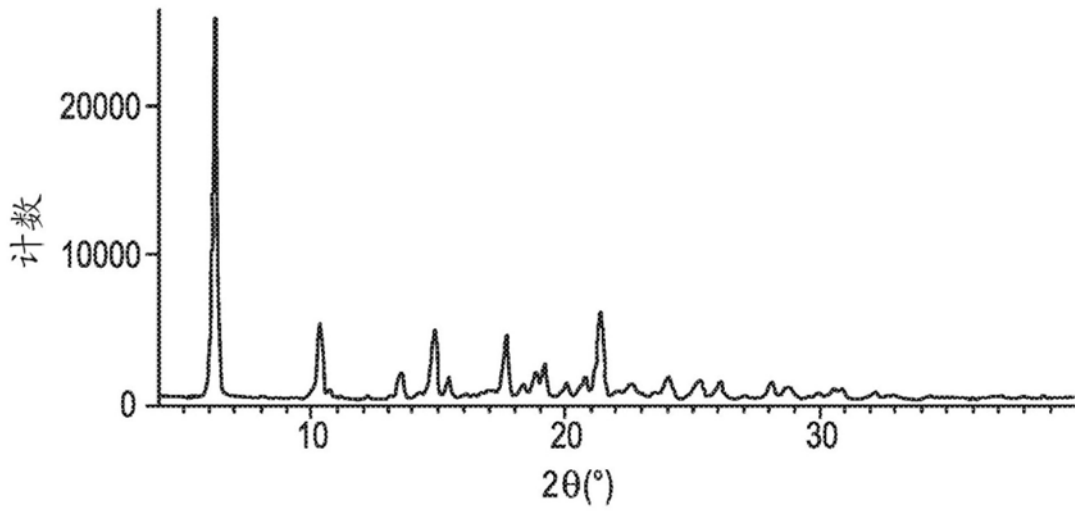


图7B

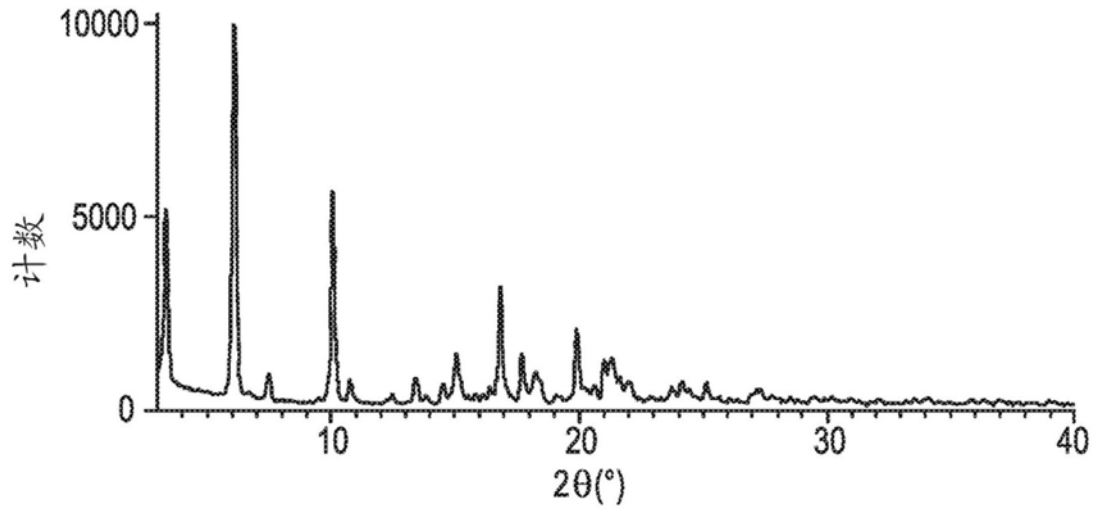


图7C

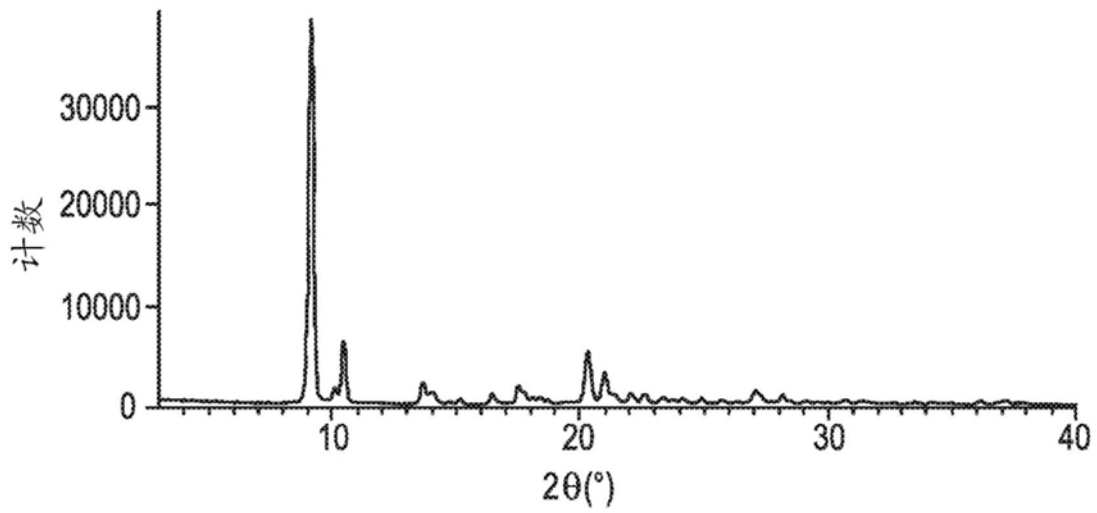


图7D

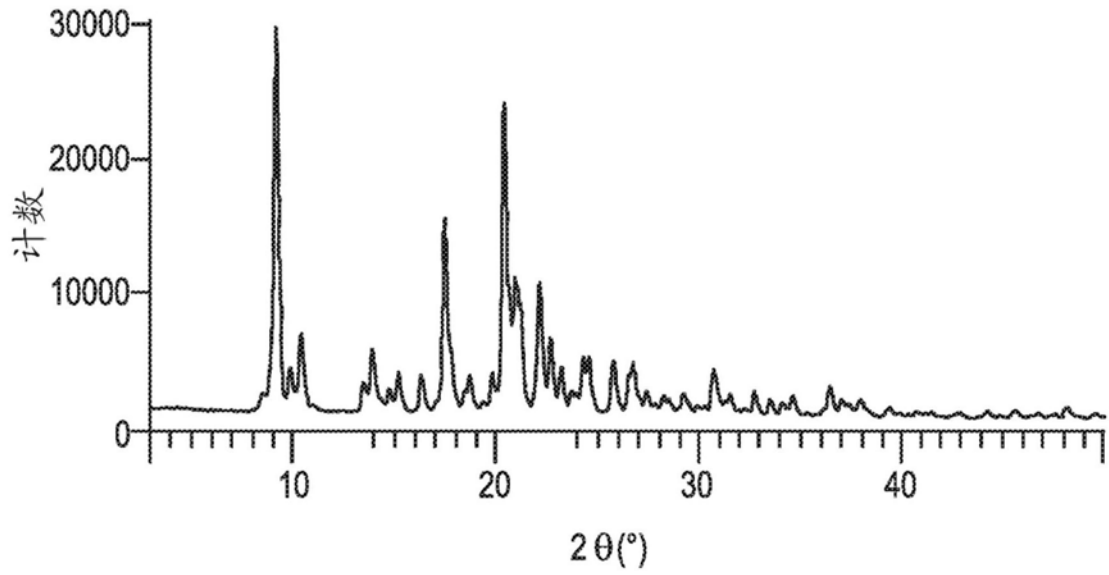


图7E

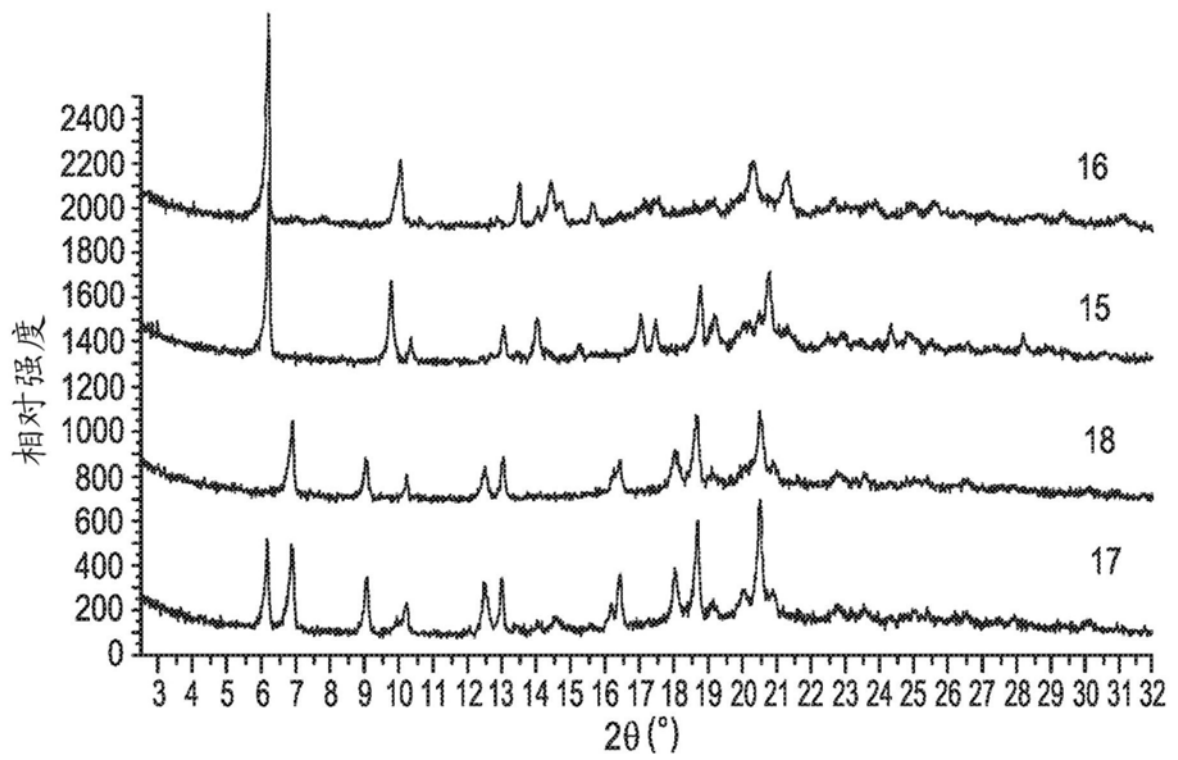


图8



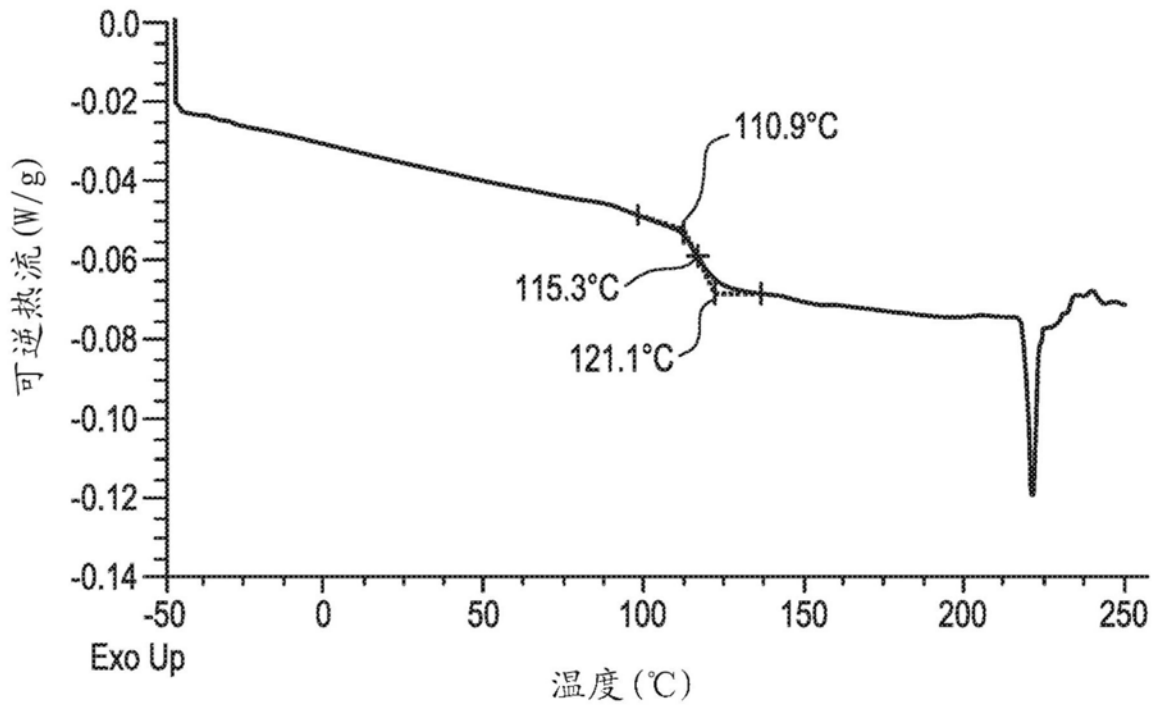


图9

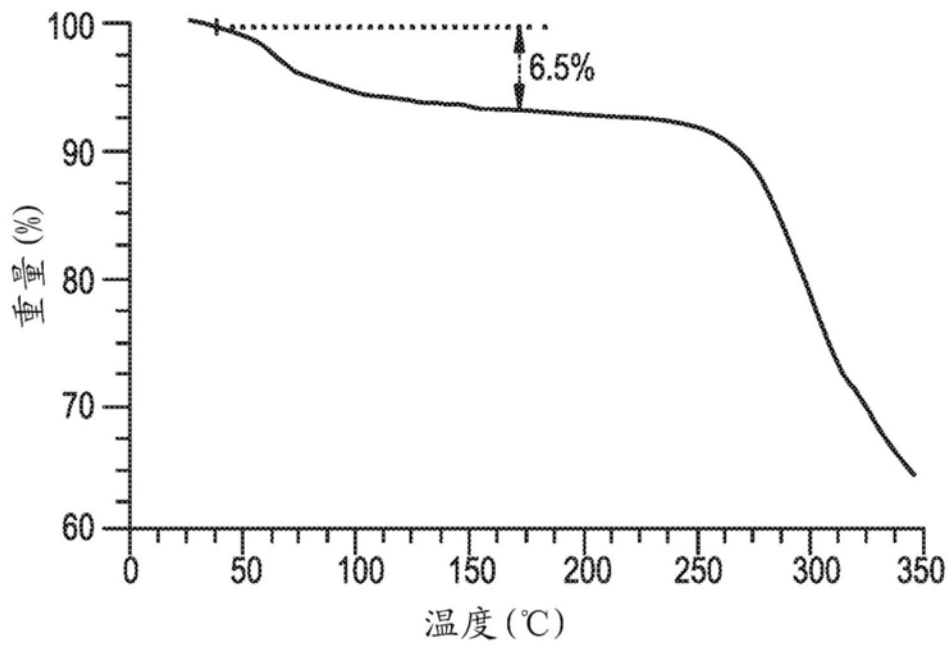


图10A

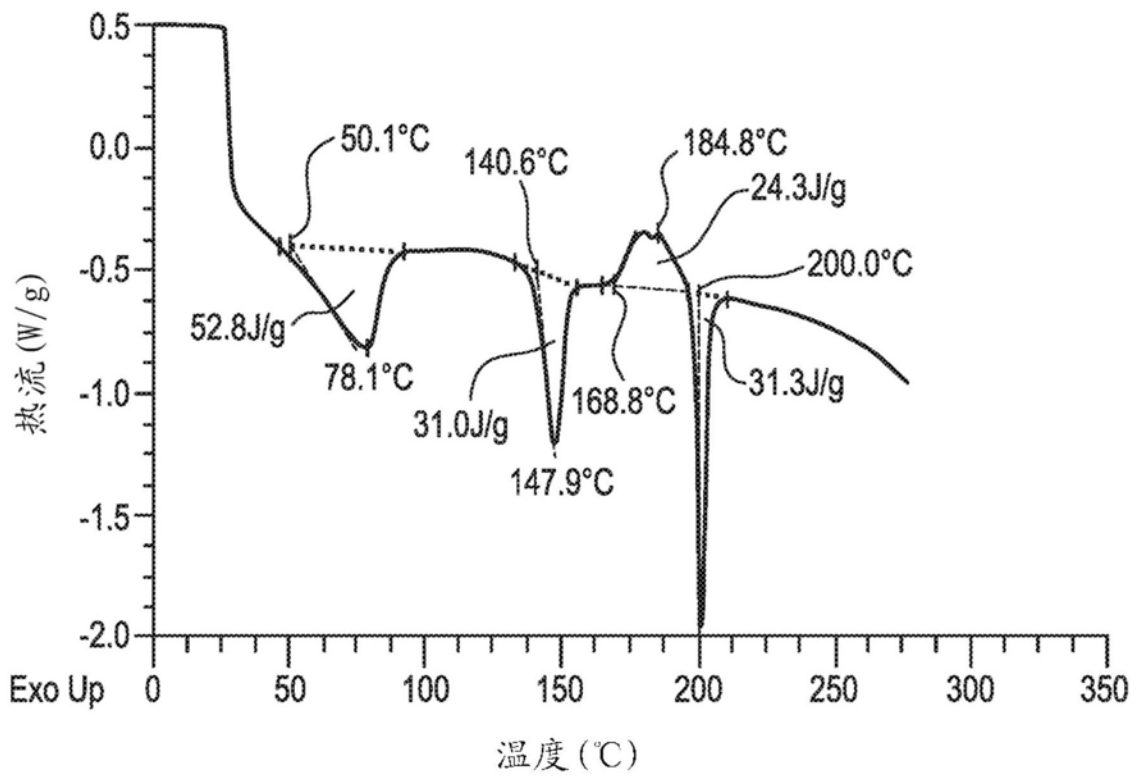


图10B

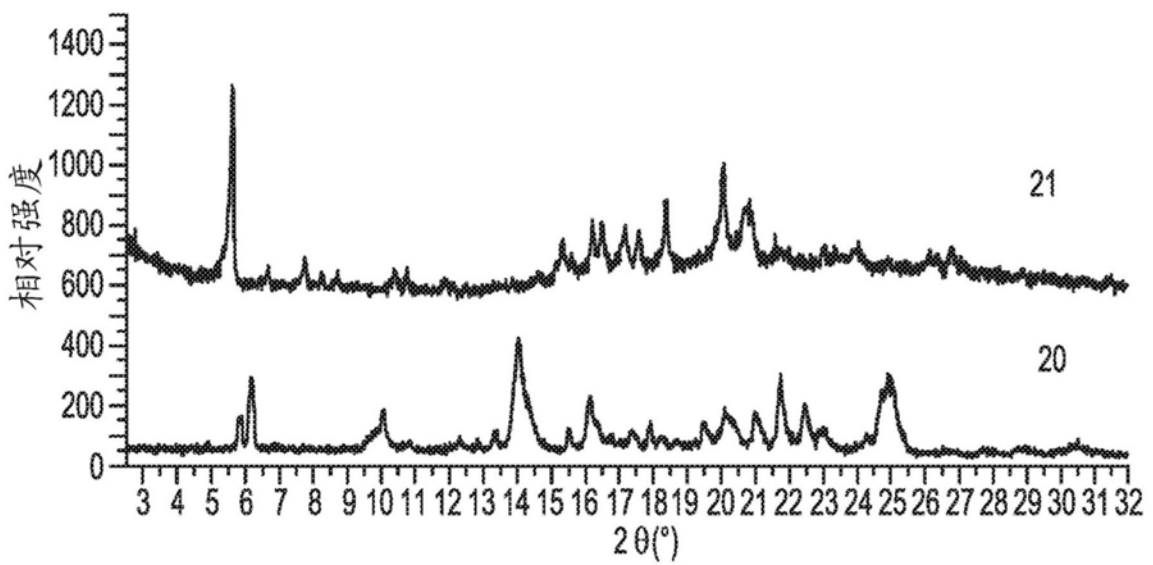


图11

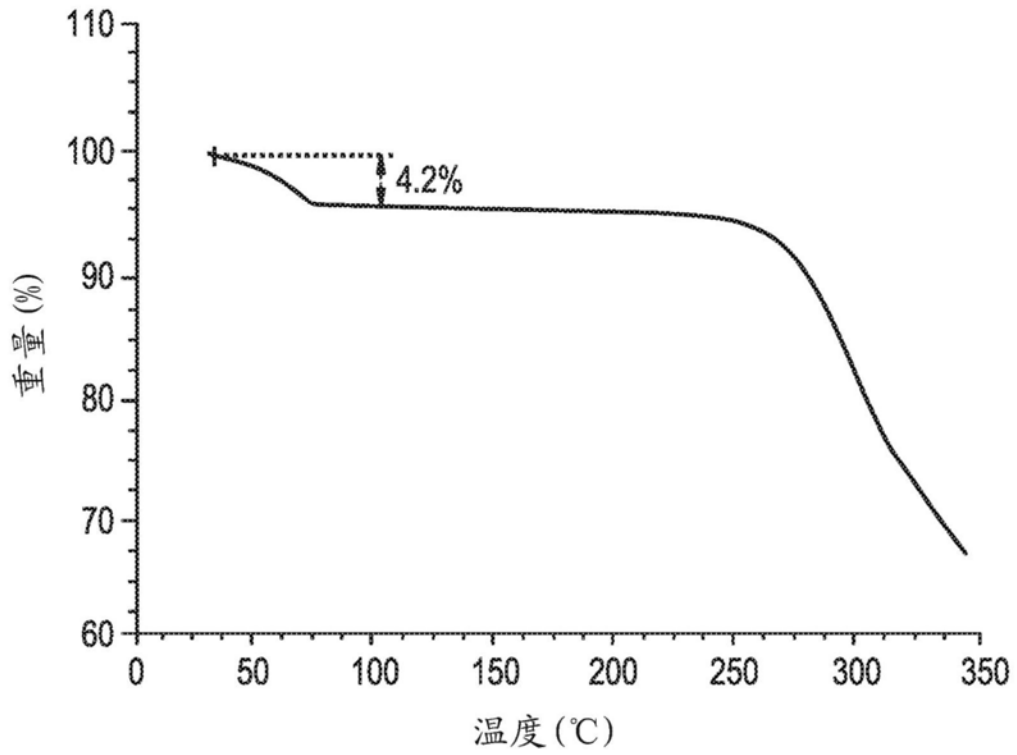


图12A

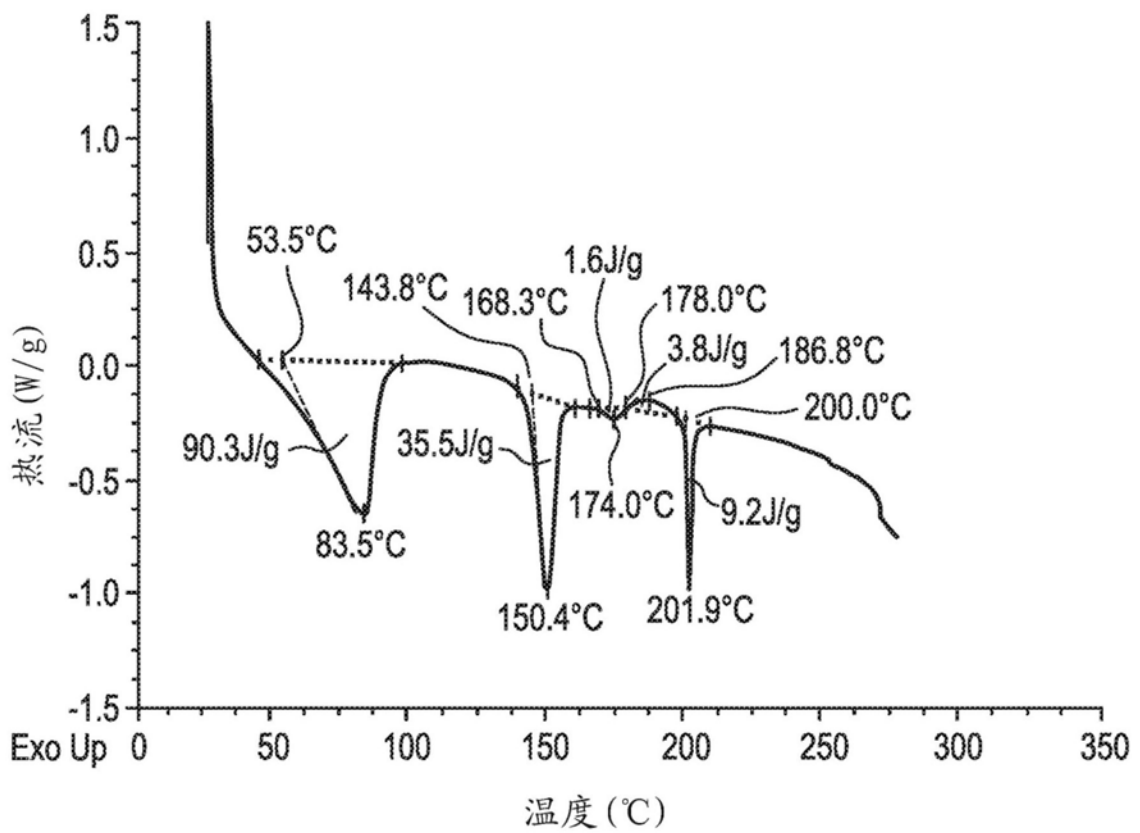


图12B

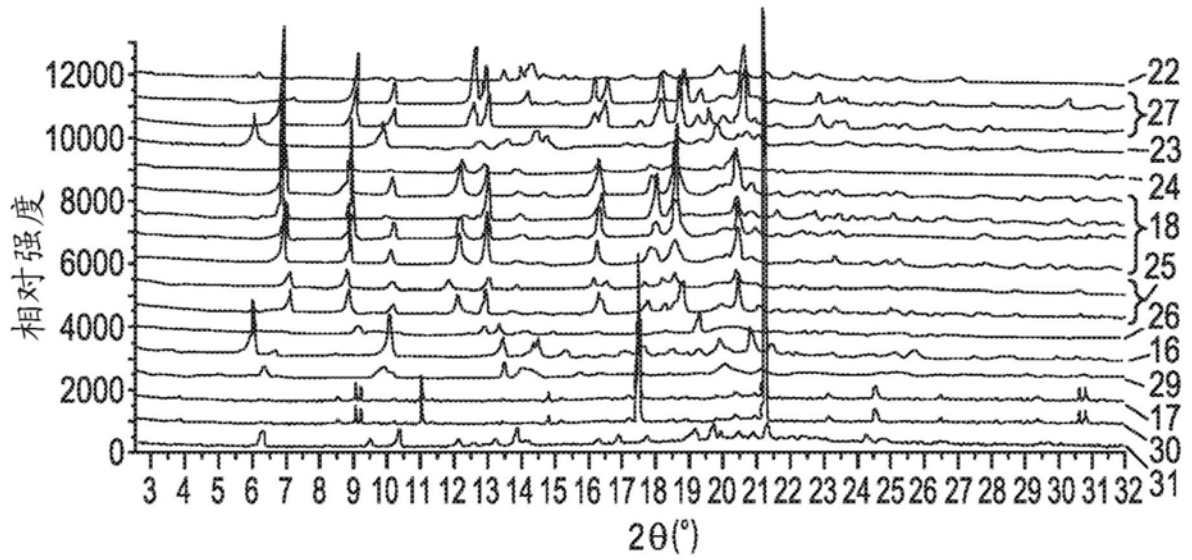


图13

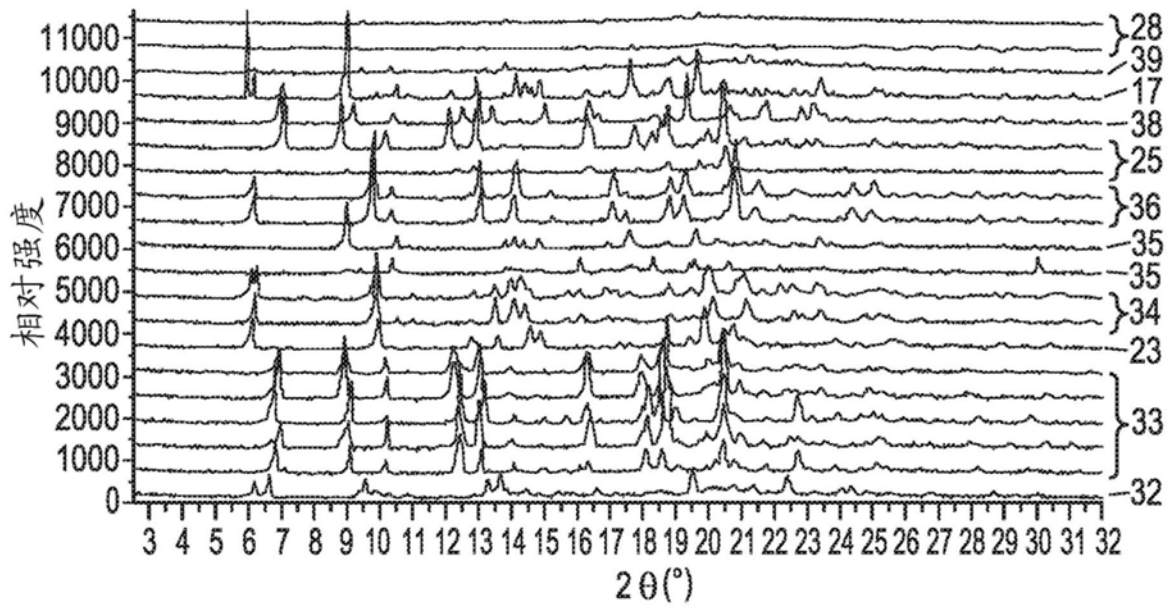


图14

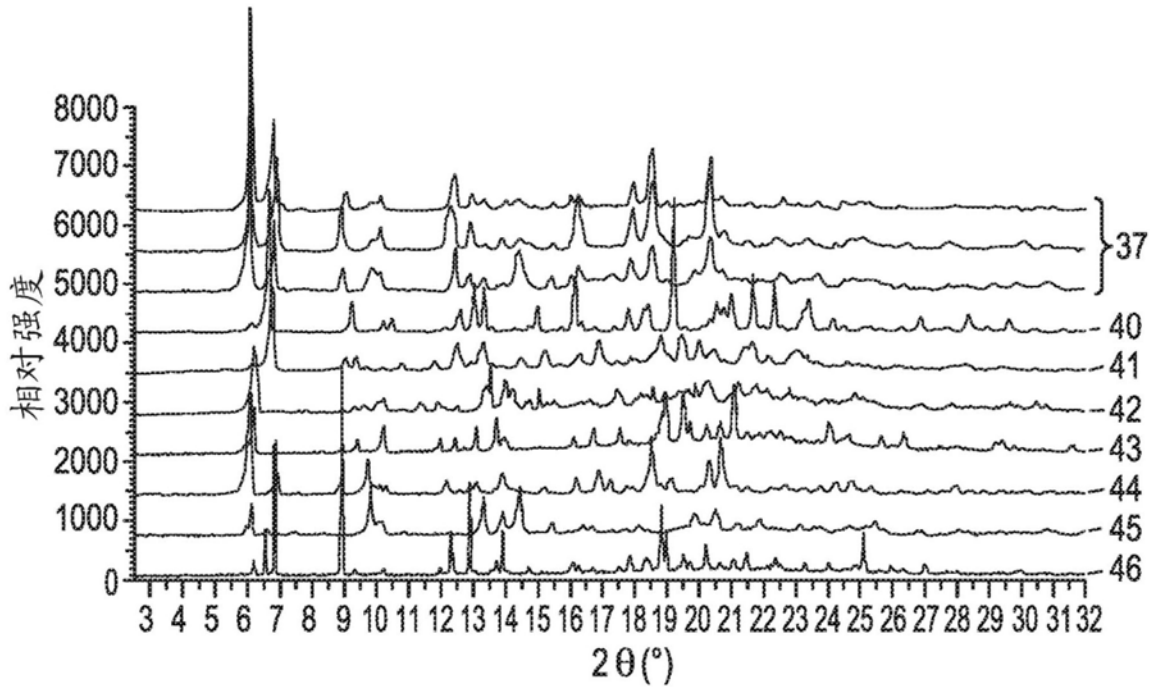


图15

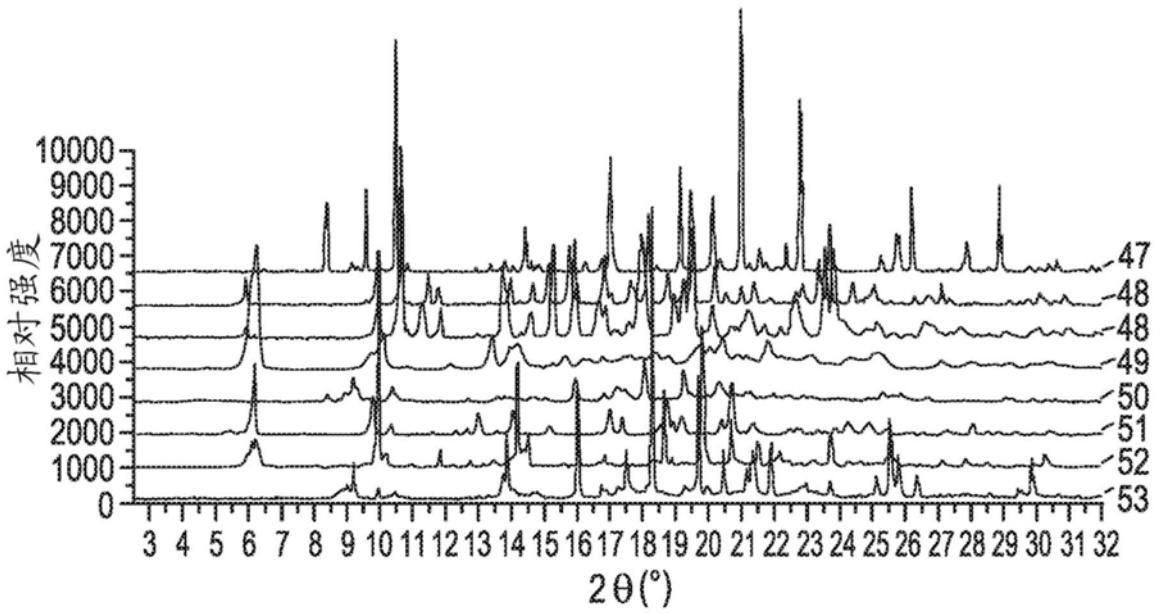


图16

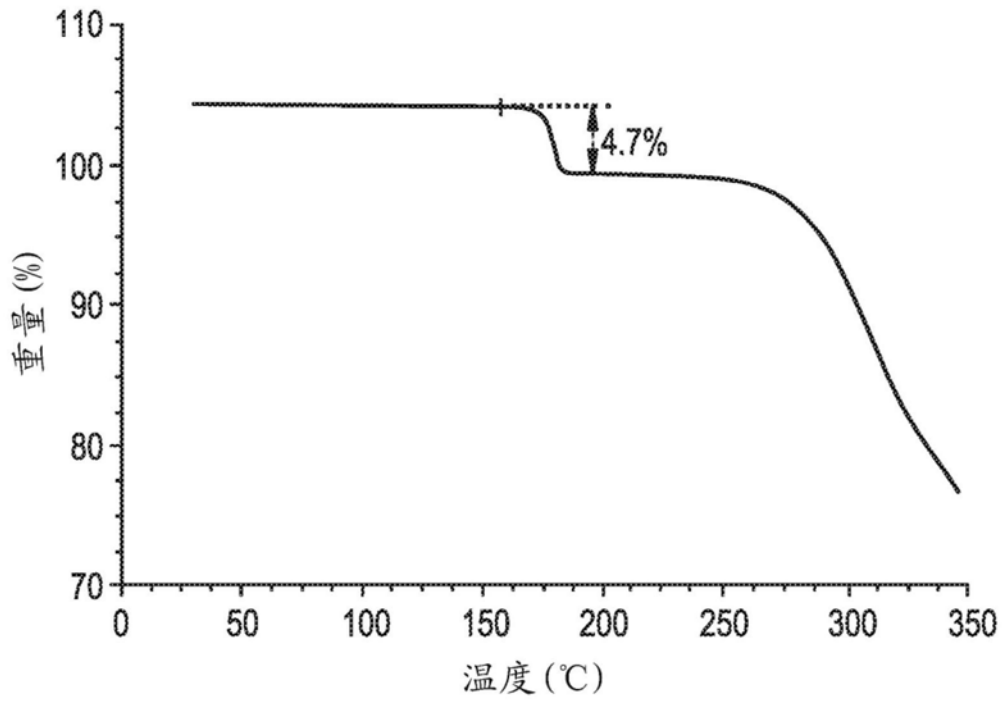


图17A

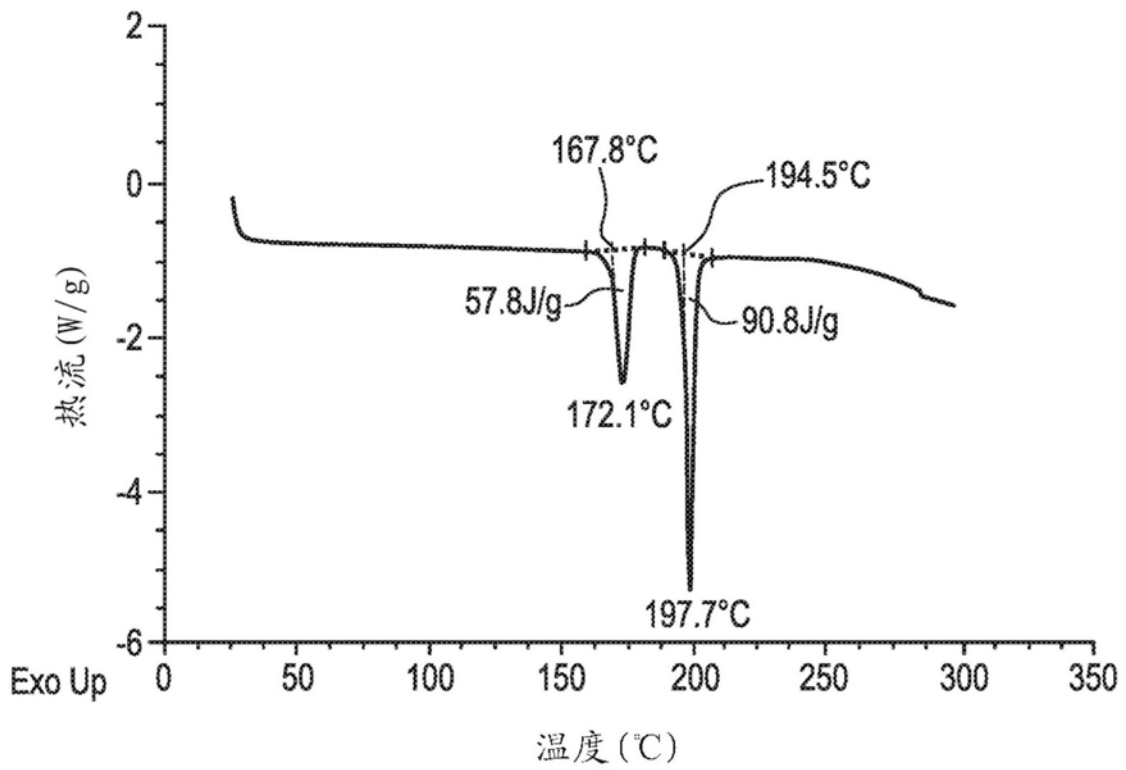


图17B

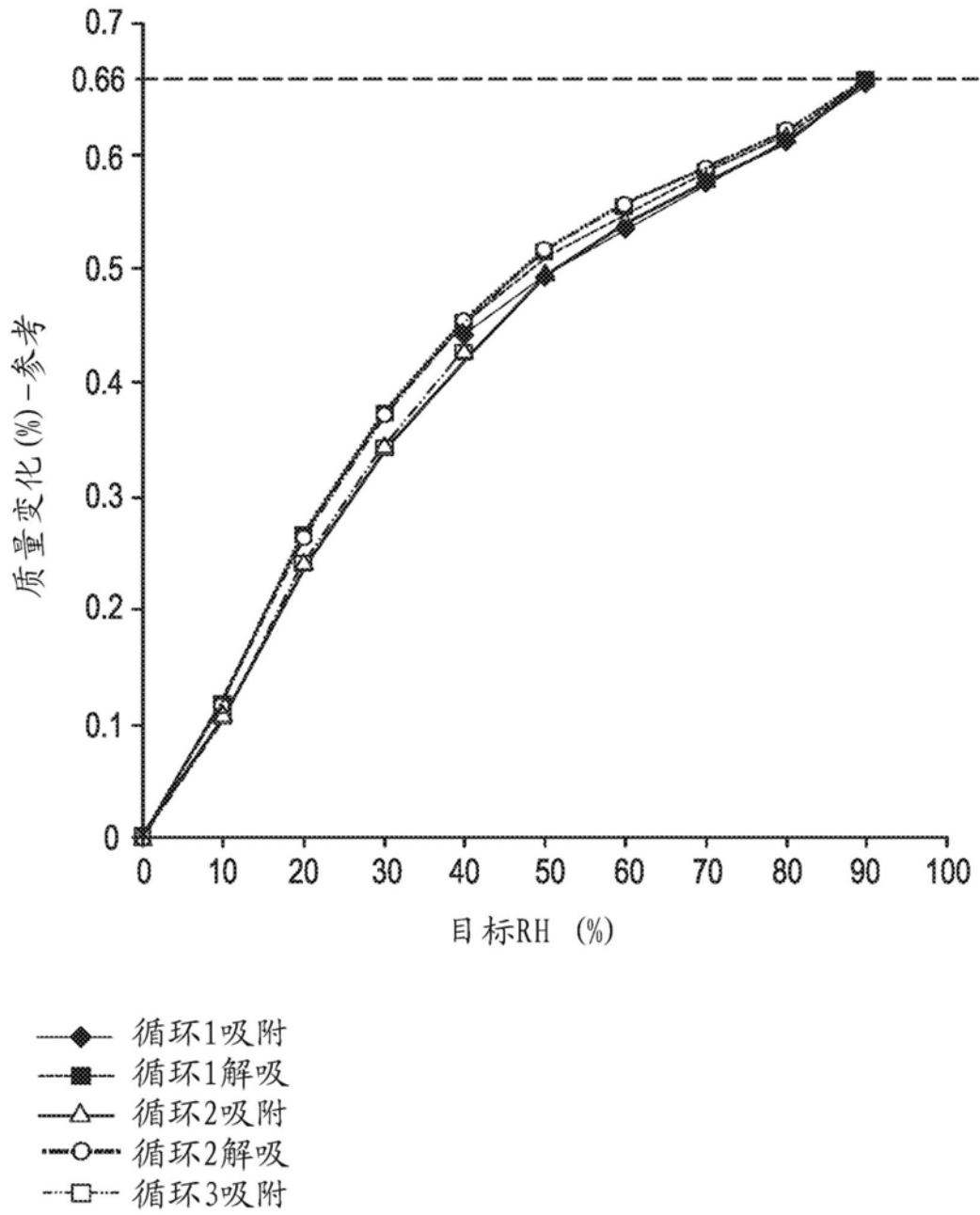


图18

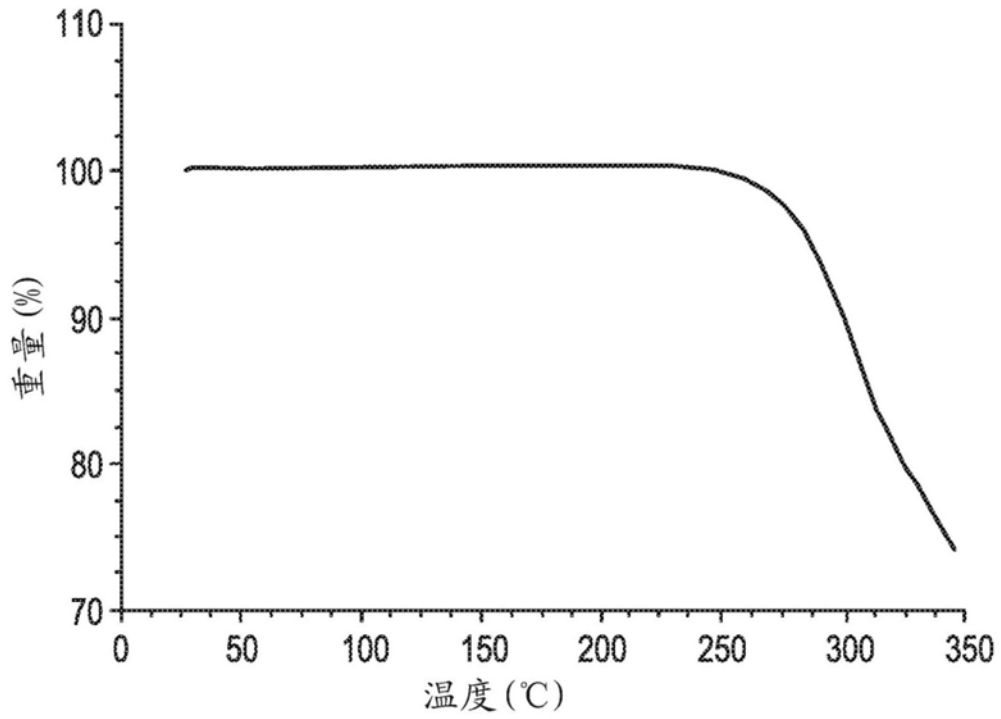


图19A

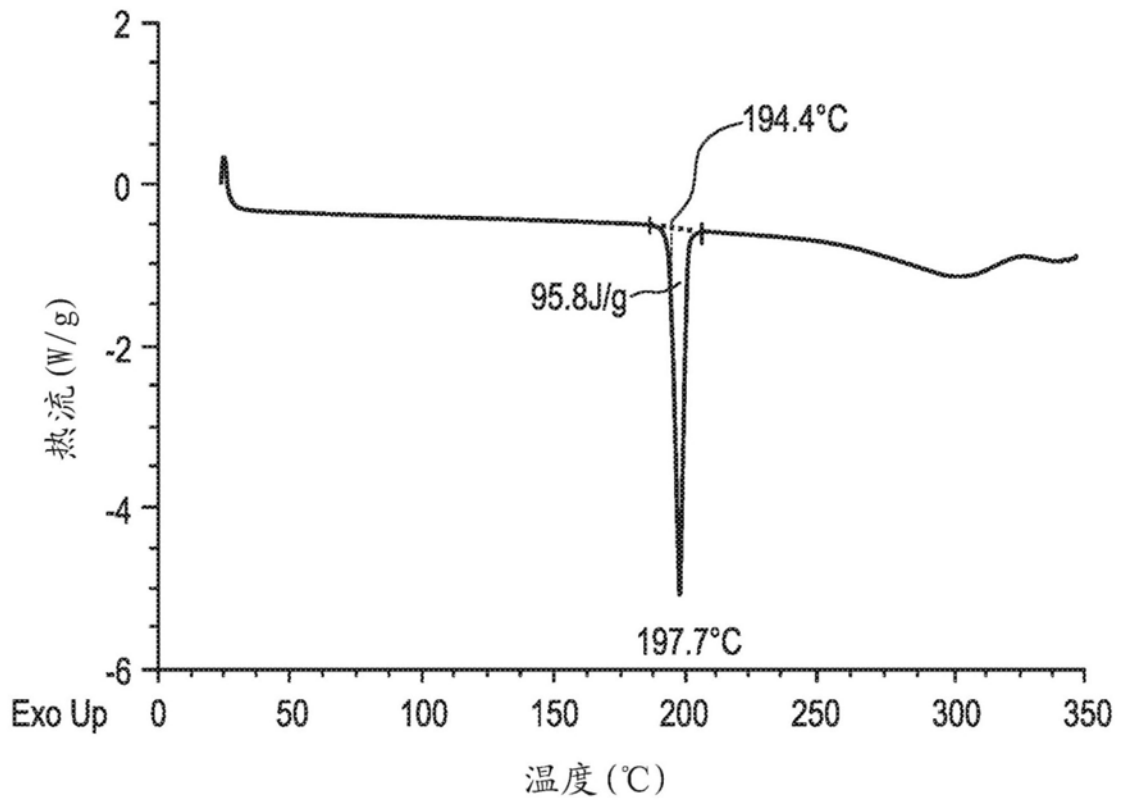


图19B



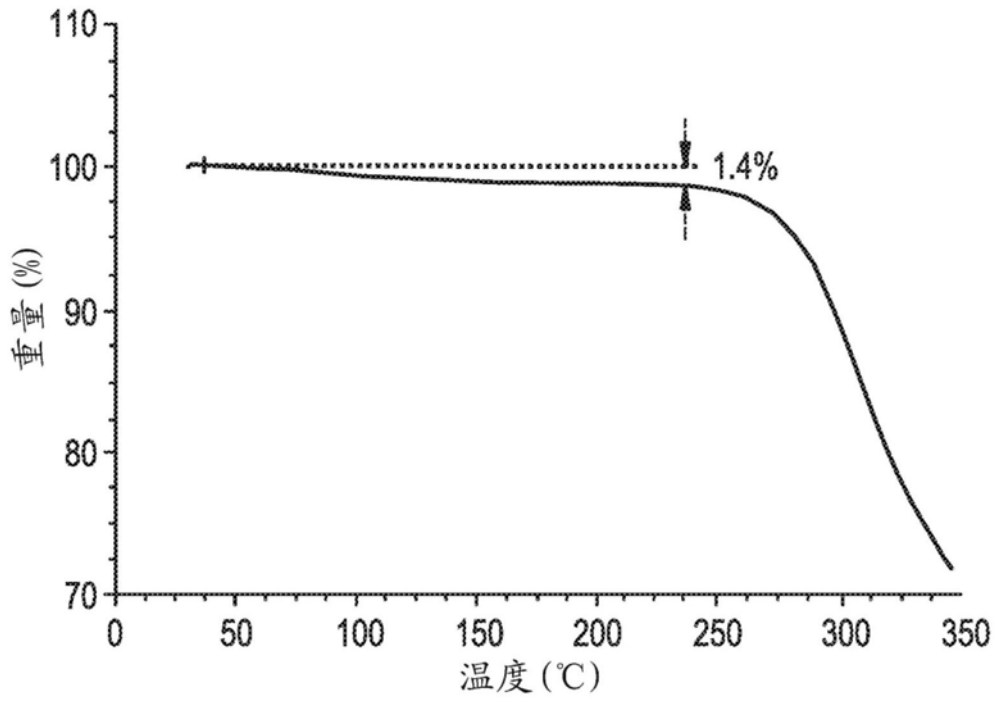


图20A

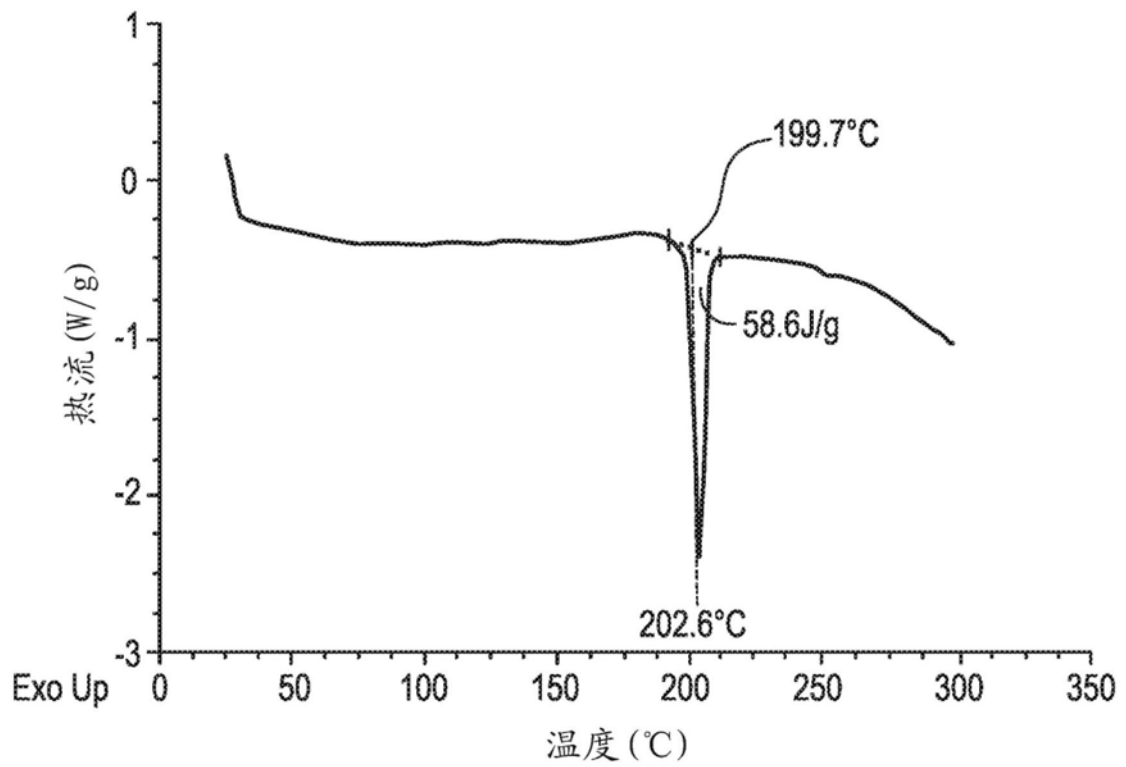


图20B

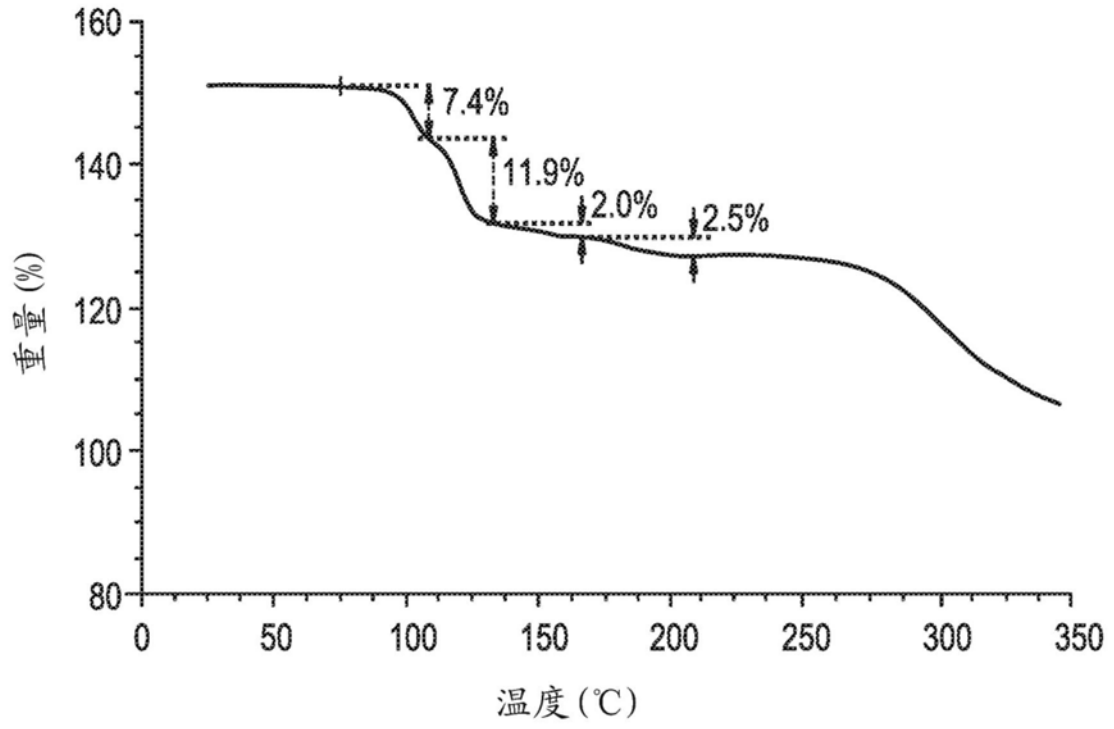


图21A

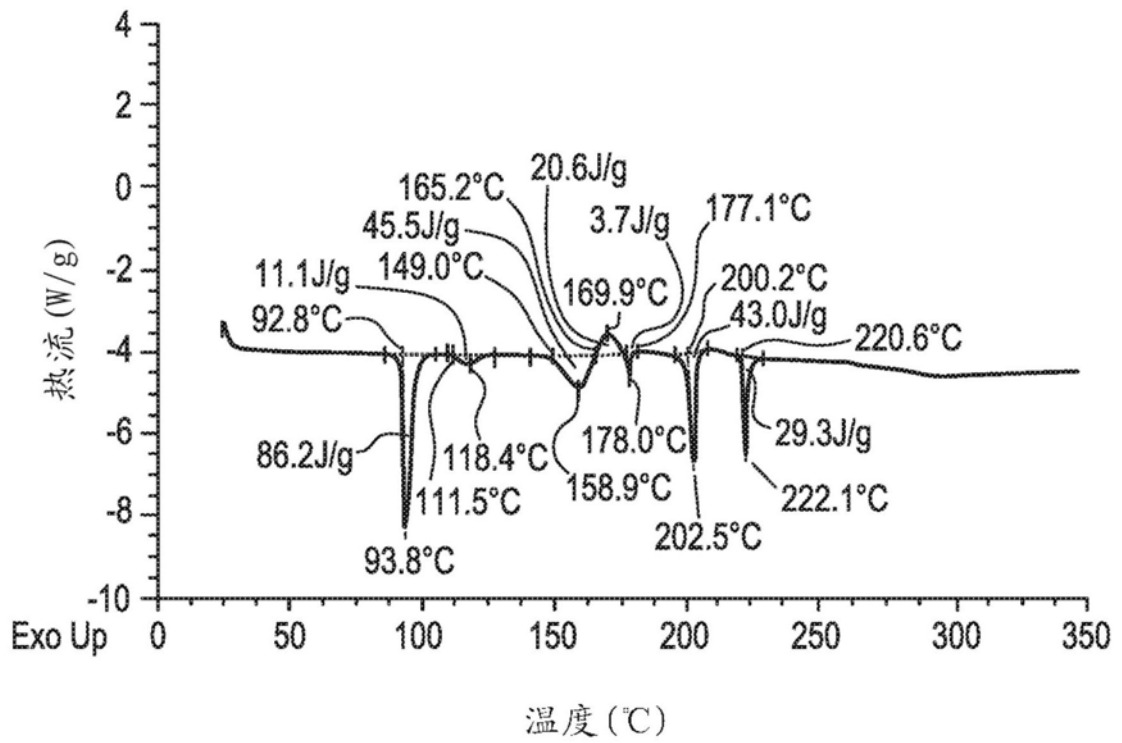


图21B

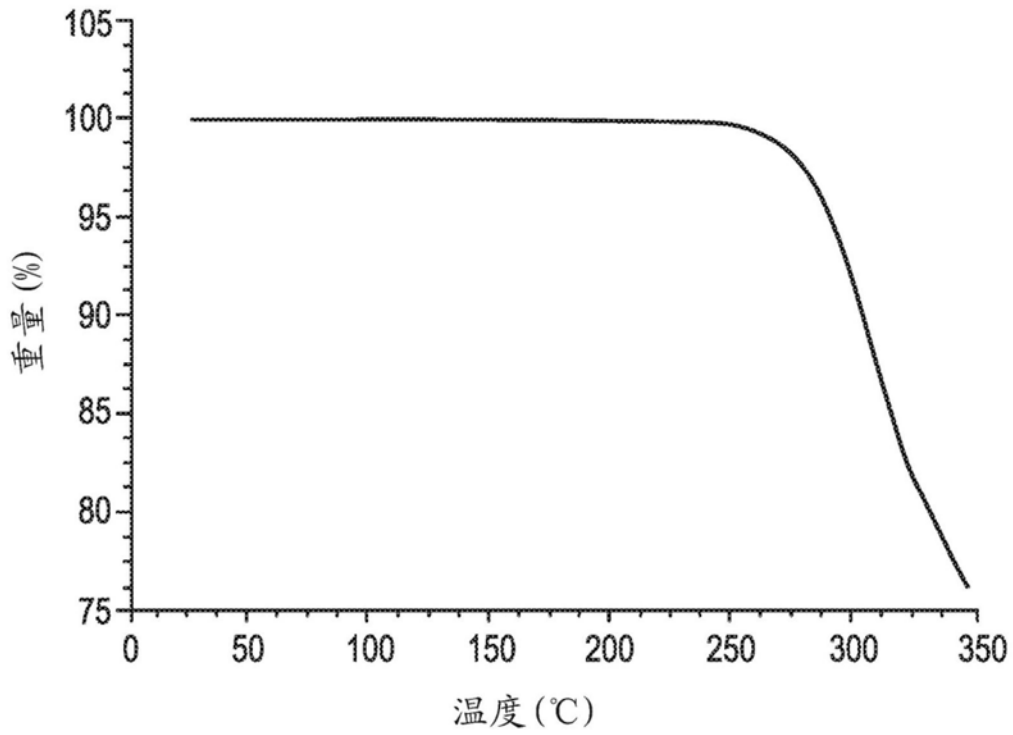


图22A

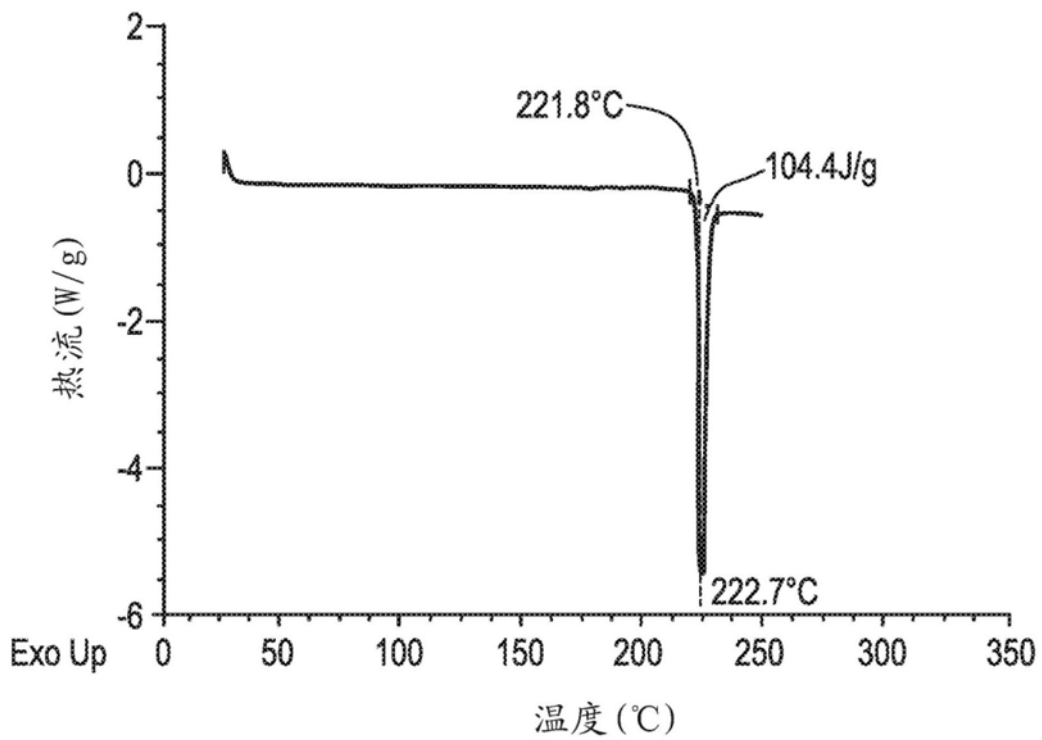


图22B

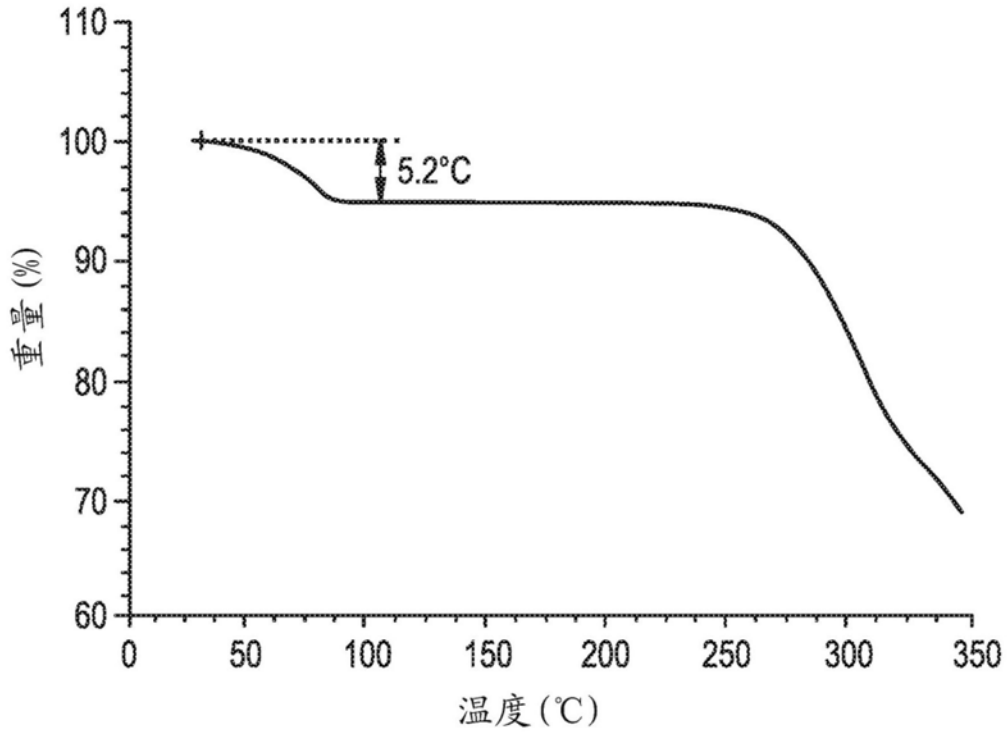


图23A

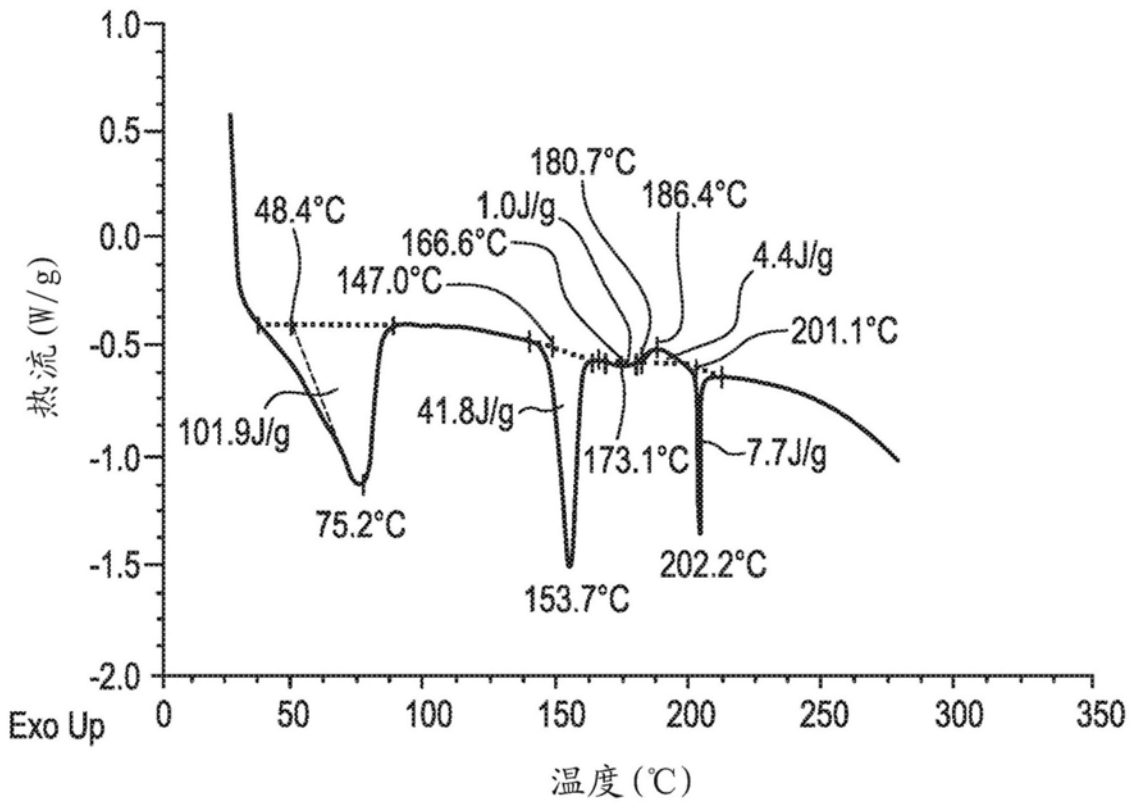


图23B

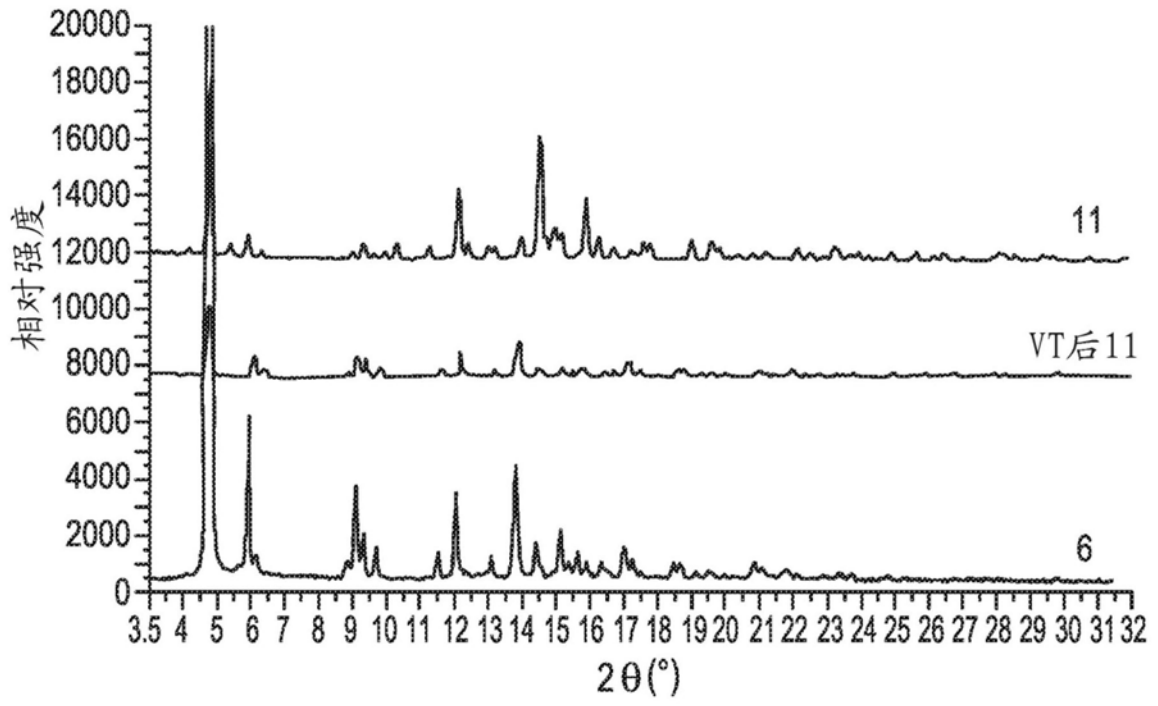


图24