



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106458966 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201480078848.4

(22)申请日 2014.04.24

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.11.14

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/IB2014/060991 2014.04.24

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/162461 EN 2015.10.29

(71)申请人 诺华股份有限公司  
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 B·R·贝莱尼 I·布鲁斯  
A·J·卡尚 G·霍林沃思  
J·尼夫 M·斯潘蒂夫  
S·J·沃森

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

代理人 隋晓平 黄革生

(51)Int.Cl.  
C07D 401/04(2006.01)  
C07D 403/04(2006.01)  
C07D 403/14(2006.01)  
C07D 409/04(2006.01)  
C07D 417/04(2006.01)  
A61K 31/497(2006.01)  
A61P 17/00(2006.01)  
A61P 35/00(2006.01)  
A61P 37/00(2006.01)

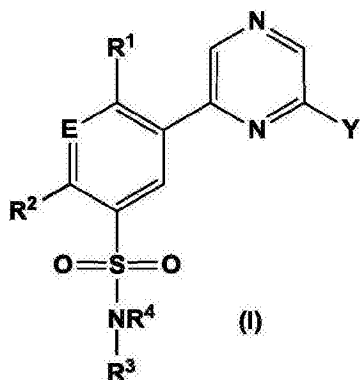
权利要求书5页 说明书55页

(54)发明名称

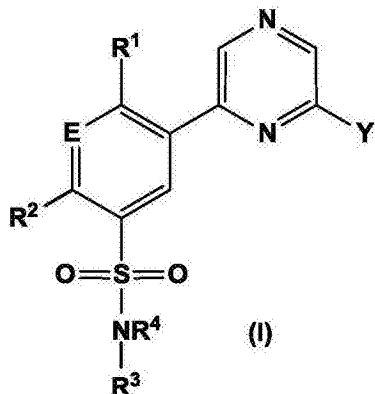
作为磷脂酰肌醇3-激酶抑制剂的吡嗪衍生物

(57)摘要

本发明提供了式(I)化合物,该化合物能够抑制PI 3-激酶γ同工型的活性,可以用于治疗通过PI 3-激酶γ同工型的激活而介导的疾病。



1. 式 (I) 化合物或其可药用的盐,



其中:

E选自N和CR<sup>E</sup>;

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>E</sup>独立选自H、卤素、C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基和C<sub>3-6</sub>环烷基;

R<sup>3</sup>选自

(i) C<sub>1-4</sub>烷基, 其是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>烷基、氧代、-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>和C<sub>3-6</sub>环烷基, 其中C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

(ii) C<sub>1-4</sub>烷氧基, 其是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、氧代、-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>和C<sub>3-6</sub>环烷基, 其中C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

(iii) -C<sub>3-6</sub>环烷基或-O-C<sub>3-6</sub>环烷基, 其中C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

(iv) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基螺环, 其通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>环烷基或C<sub>3-6</sub>杂环基稠合, 其中所述C<sub>3-6</sub>环烷基或C<sub>3-6</sub>杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

(v) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基, 其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子, 其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

(vi) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基, 其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子, 其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基为通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基稠合的螺环, 其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

R<sup>3a</sup>和R<sup>3b</sup>独立选自H、C<sub>1-4</sub>烷基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

$R^4$ 选自H和 $C_{1-4}$ 烷基;或者

$R^3$ 和 $R^4$ 与它们所连接的氮原子一起形成 $C_{3-6}$ 杂环基,该 $C_{3-6}$ 杂环基为任选的通过一个单一的碳原子与第二个 $C_{3-6}$ 杂环基或 $C_{3-6}$ 环烷基稠合的螺环,该 $C_{3-6}$ 杂环基和 $C_{3-6}$ 环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: $C_{1-4}$ 烷基、羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、卤素、 $C_{1-4}$ 烷氧基和 $C_{1-4}$ 卤代烷基;

Y为5-6元杂芳基,该杂芳基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{1-4}$ 卤代烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{1-4}$ 卤代烷氧基、卤素、-( $C_{0-3}$ 烷基)- $NR^{3a}R^{3b}$ 、-( $C_{0-3}$ 烷基)- $C_{3-6}$ 环烷基和-( $C_{0-3}$ 烷基)- $C_{3-6}$ 杂环基。

2. 权利要求1的化合物或盐,其中 $R^3$ 选自:

(i)  $C_{1-4}$ 烷基,其被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 烷基、卤素、氧代和- $NR^{3a}R^{3b}$ ;

(ii)  $C_{1-4}$ 烷氧基,其被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、卤素和 $C_{1-4}$ 烷基;

(iii) -( $C_{0-3}$ 烷基)- $C_{3-6}$ 环烷基,其中 $C_{3-6}$ 环烷基被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基和卤素;

(iv) -( $C_{0-3}$ 烷基)- $C_{3-6}$ 环烷基螺环,其通过一个单一的碳原子与第二个 $C_{3-6}$ 环烷基稠合,其中第二个 $C_{3-6}$ 环烷基被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基和卤素;

(v) -( $C_{0-3}$ 烷基)- $C_{3-6}$ 杂环基,其中 $C_{3-6}$ 杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子,其中所述 $C_{3-6}$ 杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 烷基和 $C_{1-4}$ 羟基烷基;

(vi) -( $C_{0-3}$ 烷基)- $C_{3-6}$ 杂环基,其中 $C_{3-6}$ 杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子,其中所述 $C_{3-6}$ 杂环基为通过一个单一的碳原子与第二个 $C_{3-6}$ 杂环基或 $C_{3-6}$ 环烷基稠合的螺环,其中 $C_{3-6}$ 杂环基或 $C_{3-6}$ 环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: $C_{1-4}$ 烷基、羟基和 $C_{1-4}$ 羟基烷基;

$R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 独立选自H和 $C_{1-4}$ 烷基;

$R^4$ 选自H和 $C_{1-4}$ 烷基;或者

$R^3$ 和 $R^4$ 与它们所连接的氮原子一起形成 $C_{3-6}$ 杂环基,该 $C_{3-6}$ 杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基和 $C_{1-4}$ 烷基。

3. 权利要求1或2的化合物或盐,其中

Y选自:

- 噻唑基,
- 吡唑基,
- 吡啶基,
- 三唑基,
- 咪唑基,
- 噁二唑基,
- 嘧啶基,
- 异噁唑基,
- 噁唑基,和
- 噻吩基;

它们每一个均是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代： $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{1-4}$ 卤代烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{1-4}$ 卤代烷氧基、卤素、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基烷基、 $-NR^{3a}R^{3b}$ 、 $-(C_{0-3}烷基)-C_{3-6}$ 环烷基和 $-(C_{0-3}烷基)-C_{3-6}$ 杂环基。

4. 权利要求1-3中任一项的化合物或盐，

其中Y选自：

- 噻唑-5-基，
- 吡唑-4-基，
- 吡唑-5-基，
- 吡唑-1-基，
- 吡啶-4-基，
- 吡啶-3-基，
- 1,2,4-三唑-1-基，
- 1,2,3-三唑-4-基，
- 咪唑-1-基，
- 1,2,4-噁二唑-5-基，
- 1,3,4-噁二唑-2-基，
- 噻吩-3-基，
- 异噁唑-5-基，
- 嘧啶-5-基，

它们每一个均是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代： $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{1-4}$ 卤代烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{1-4}$ 卤代烷氧基和 $-(C_{0-3}烷基)-C_{3-6}$ 环烷基。

5. 权利要求1-4中任一项的化合物或盐，

其中Y选自：

- 噻唑-5-基，
- 吡唑-4-基，
- 吡唑-5-基，
- 吡唑-1-基，
- 吡啶-4-基，
- 吡啶-3-基，
- 1,2,4-三唑-1-基，
- 1,2,3-三唑-4-基，
- 咪唑-1-基，
- 1,2,4-噁二唑-5-基，
- 异噁唑-5-基，
- 嘧啶-5-基，
- 噻吩-3-基，

它们每一个均是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代：甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、 $CF_3$ 、羟基乙基、甲氧基乙基和甲氧基。

6. 权利要求1—5中任一项的化合物或盐,其中  
R<sup>3</sup>选自丙基、丁基和戊基,其被1—3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>烷基、卤素、-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>和氧代。
7. 权利要求1—6中任一项的化合物或盐,其中  
R<sup>1</sup>选自C<sub>1-4</sub>烷基和H;并且  
R<sup>2</sup>选自H、C<sub>1-4</sub>烷基和卤素。
8. 权利要求1的化合物,该化合物选自:  
N-(3-羟基-丙基)-4-甲基-3-[6-(2-甲基-噻唑-5-基)-吡嗪-2-基]-苯磺酰胺;  
3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(2-羟基-2-甲基-丙基)-4-甲基-苯磺酰胺;  
3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-苯磺酰胺;  
3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-4-甲基-N-(3-甲基-氧杂环丁烷-3-基甲基)-苯磺酰胺;  
N-((1r,4r)-4-羟基环己基)-4-甲基-3-(6-(2-甲基噻唑-5-基)吡嗪-2-基)苯磺酰胺;  
3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(6-羟基-螺[3.3]庚-2-基)-4-甲基-苯磺酰胺;  
3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-环丁基甲基)-4-甲基-苯磺酰胺;  
3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-2,2-二甲基-丙基)-4-甲基-苯磺酰胺;  
N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-3-{6-[1-(2-吗啉-4-基-乙基)-1H-吡唑-4-基]-吡嗪-2-基}-苯磺酰胺;  
N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-3-{6-[3-甲基-1-(2-吗啉-4-基-乙基)-1H-吡唑-4-基]-吡嗪-2-基}-苯磺酰胺;  
N-(4-羟基-环己基)-4-甲基-3-(6-吡啶-3-基-吡嗪-2-基)-苯磺酰胺;  
N-(4-羟基-环己基)-4-甲基-3-[6-(5-吗啉-4-基甲基-噻吩-3-基)-吡嗪-2-基]-苯磺酰胺;和  
3-[6-(2,5-二甲基-2H-吡唑-3-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-环丁基甲基)-4-甲基-苯磺酰胺;  
或其可药用的盐。
9. 药用组合物,该药用组合物包含治疗有效量的权利要求1—8中任一项的化合物或盐和一或多种可药用的载体。
10. 药物组合产品,该药用组合产品包含治疗有效量的权利要求1—8中任一项的化合物或盐和第二种活性成分。
11. 权利要求1—8中任一项的化合物或盐,用于治疗通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型的激活而介导的病症或疾病。
12. 权利要求1—8中任一项的化合物或盐,用于治疗呼吸道疾病、过敏、类风湿性关节炎、骨关节炎、风湿性疾病、银屑病、溃疡性结肠炎、克隆病、感染性休克、增殖性疾病例如癌

症、动脉粥样硬化、移植后的同种异体移植物排斥反应、糖尿病、中风、肥胖和再狭窄。

13. 权利要求1—8中任一项的化合物或盐在生产用于治疗通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型的激活而介导的病症或疾病的药物中的用途。

14. 治疗通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型的激活而介导的病症或疾病的方法,该方法包括给予需要该治疗的个体治疗有效量的权利要求1—8中任一项的化合物或盐。

15. 治疗呼吸道疾病、过敏、类风湿性关节炎、骨关节炎、风湿性疾病、银屑病、溃疡性结肠炎、克隆病、感染性休克、增殖性疾病例如癌症、动脉粥样硬化、移植后的同种异体移植物排斥反应、糖尿病、中风、肥胖和再狭窄的方法,该方法包括给予需要该治疗的个体治疗有效量的权利要求1—8中任一项的化合物或盐。

## 作为磷脂酰肌醇3-激酶抑制剂的吡嗪衍生物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及新的作为PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型选择性抑制剂的吡嗪衍生物、它们的制备方法、含有它们的药用组合物和药物及其在通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型的激活介导的疾病和病症中的用途,特别是哮喘。

### 背景技术

[0002] 磷脂酰肌醇3-激酶(PI 3-激酶),是一个能够催化肌醇环的3'-OH的磷酸化的酶家族,在广泛的细胞调节过程中具有核心作用,包括细胞代谢、生存、运动和细胞激活(Vanhaesebroeck,B.等,Annu.Rev.Biochem.2001,70,535)。这些脂质激酶根据它们的结构和体外底物特异性分为I、II&III三个主要类别(Wymann,M.等;Biochem.Biophys.Acta,1998,1436,127)。最为广泛熟知的I类家族可以进一步细分为IA和IB亚类。IA类PI 3-激酶由85kDa控制/衔接蛋白以及三个110kDa催化亚基(p110 $\alpha$ 、p110 $\beta$ 和p110 $\delta$ )组成,它们在酪氨酸激酶系统中被激活,而IB类由单一p110 $\gamma$ 同工型(PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型)组成,其通过G蛋白-偶合受体被激活。II类PI 3-激酶的三个成员(C2 $\alpha$ 、C2 $\beta$ 和C2 $\gamma$ )和III类PI 3-激酶的单一个成员(Vps34)了解的较少。此外,还有四个PI 4-激酶和数个PI 3-激酶相关的蛋白激酶(称为PIKK's或IV类),包括DNA-PK、mTOR、ATM和ATR,所有的这些均具有相似的催化域(Abraham R.T.等;DNA repair 2004,3(8-9),883)。

[0003] PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型在例如白细胞激活、白细胞趋化性和肥大细胞脱颗粒过程中的关键作用已经披露,因而对于该靶点在自身免疫性和炎症疾病中的治疗作用产生了浓厚的兴趣(Ghigo等,Bioessays,2010,32,p185-196;Reif等,J.Immunol.,2004,173,第2236-2240页;Laffargue等,Immunity,2002,16,第441-451页;Rommel等,Nature Rev.Immunology,2007,7,第191页;Cushing等,J.Med.Chem.,2012,55,第8559页;Bergamini等,Nature Chem.Biol.,2012,8,第576页)。特别的是,很多出版物提出了PI3激酶 $\gamma$ 同工型抑制剂对于哮喘治疗的潜在功效(例如Thomas等,Immunology,2008,126,第413页;Jiang等,J.Pharm.Exp.Ther.,2012,342,第305页;Takeda等,Int.Arch.Allergy Immunol.2010,152(suppl 1),第90-95页)。也有报告指出PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型在多种其它适应症中具有潜在的治疗价值,例如癌症(Beagle和Fruman,Cancer Cell,2011,19,第693页;Schmid等,Cancer Cell,2011,19,第715页;Xie等,Biochem.Pharm.,2013,85,第1454页;Subramaniam等,Cancer Cell,2012,21,第459页),糖尿病(Kobayashi等,Proc.Nat.Acad.Sci,2011,108,第5753;Azzi等,Diabetes,2012,61,第1509页),心血管疾病(Fougerat等,Clin.Sci.,2009,116,第791页;Fougerat等,Circulation,2008,117,第1310页;Chang等,Proc.Nat.Acad.Sci.,2007,104,第8077页;Fougerat等,Br.J.Pharm.,2012,166,第1643页),肥胖(Becattini等,Proc.Nat.Acad.Sci.,2011,108,第E854页),阿尔茨海默病(Passos等,Brain,Behaviour and Immunity,2010,24,第493页)和胰腺炎(Lupia等,Am.J.Path,2004,165,第2003页)。PI 3-激酶同工型作为药物靶点的近期综述参考Blajacka等,Current Drug Targets,2011,12,第1056-1081页。

[0004] WO 2009/115517 (Novartis) 公开了作为PI 3-激酶抑制剂的氨基吡嗪和吡啶衍生物。

[0005] WO 2009/013348 (Novartis) 公开了作为PI 3-激酶抑制剂的氨基嘧啶衍生物。

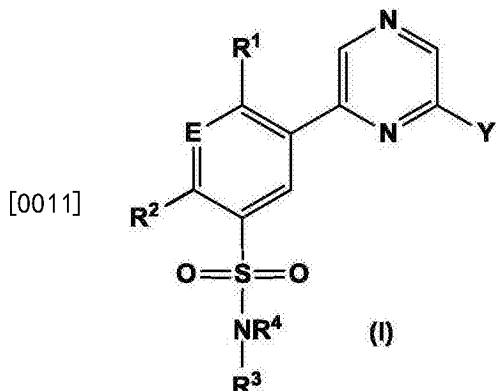
[0006] WO 2003/093297 (Exelixis) 公开了蛋白激酶调节剂和此类调节剂的使用方法。

[0007] Leahy等, J. Med. Chem., 2012, 55 (11), 第5467—5482页公开了PI 3-激酶  $\gamma$  同工型抑制剂。

[0008] 因此, 需要PI 3-激酶  $\gamma$  同工型的有效的选择性抑制剂。

[0009] 实施方案的描述

[0010] 在本发明的实施方案1中, 提供了式(I) 化合物或其可药用的盐:



[0012] 其中:

[0013] E选自N和CR<sup>E</sup>;

[0014] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>E</sup>独立选自H、卤素、C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基和C<sub>3-6</sub>环烷基;

[0015] R<sup>3</sup>选自

[0016] (i) C<sub>1-4</sub>烷基, 其是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>烷基、氧代、-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>和C<sub>3-6</sub>环烷基, 其中C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

[0017] (ii) C<sub>1-4</sub>烷氧基, 其是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、氧代、-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>和C<sub>3-6</sub>环烷基, 其中C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

[0018] (iii) -C<sub>3-6</sub>环烷基或-O-C<sub>3-6</sub>环烷基, 其中C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0019] (iv) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基螺环, 其通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>环烷基或C<sub>3-6</sub>杂环基稠合, 其中C<sub>3-6</sub>环烷基或C<sub>3-6</sub>杂环基是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0020] (v) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基, 其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少



一个选自O和N的杂原子,其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0021] (vi) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基,其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子,其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基为通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基稠合的螺环,其中C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0022] R<sup>3a</sup>和R<sup>3b</sup>独立选自H、C<sub>1-4</sub>烷基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

[0023] R<sup>4</sup>选自H和C<sub>1-4</sub>烷基;或者

[0024] R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>与它们所连接的氮原子一起形成C<sub>3-6</sub>杂环基,该C<sub>3-6</sub>杂环基为任选的通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基稠合的螺环,该C<sub>3-6</sub>杂环基和C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

[0025] Y为5—6元杂芳基,该杂芳基是未取代的或者被1—3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基、卤素、-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>、-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基。

[0026] 定义

[0027] 本文中使用的“卤代”或“卤素”可以是氟、氯、溴或碘。

[0028] 本文中使用的“C<sub>1-4</sub>烷基”表示具有1—4个碳原子的直链或支链烷基。如果指定不同数目的碳原子,例如C<sub>6</sub>或C<sub>3</sub>,则该定义可以进行相应修改。因此,例如“C<sub>1-4</sub>烷基”表示甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲-丁基和叔-丁基。

[0029] 本文中使用的“C<sub>1-4</sub>烷氧基”是指-O-C<sub>1-4</sub>烷基基团,其中C<sub>1-4</sub>烷基如本文所定义。此类基团的示例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基或己氧基等。对于烷基而言,除非规定了具体的结构,术语丙氧基、丁氧基等包括具有适当数目碳原子的所有直链和支链形式,例如丙氧基包括正-丙氧基和异丙氧基。

[0030] 本文中使用的“C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基”是指-O-C<sub>1-4</sub>烷基基团,其中C<sub>1-4</sub>烷基如本文所定义,其可以被一或多个卤素基团取代,例如-O-CF<sub>3</sub>。

[0031] 本文中使用的“C<sub>1-4</sub>卤代烷基”表示具有1—4个碳原子的直链或支链烷基,其中至少一个氢被卤素取代。如果指定不同数目的碳原子,例如C<sub>6</sub>或C<sub>3</sub>,则该定义可以进行相应修改。因此,例如“C<sub>1-4</sub>卤代烷基”表示其中至少一个氢被卤素取代的甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲-丁基和叔-丁基,例如其中卤素为氟时:CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>-、(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-、CH<sub>3</sub>-CF<sub>2</sub>-、CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>-、CF<sub>3</sub>-、CF<sub>2</sub>H-、CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>CHCF<sub>3</sub>或CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>-。

[0032] 本文中使用的“C<sub>3-6</sub>环烷基”是指3—8个碳原子的饱和的单环烃环。此类基团的示例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。如果指定不同数目的碳原子,则该定义可以进行相应修改。

[0033] 术语“羟基”是指-OH。

[0034] 本文中使用的“C<sub>1-4</sub>羟基烷基”表示其中至少一个氢被羟基取代的具有1—4个碳原子的直链或支链烷基。如果指定不同数目的碳原子,例如C<sub>6</sub>或C<sub>3</sub>,则该定义可以进行相应修

改。因此,例如“C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>羟基烷基”表示其中至少一个氢被羟基取代的甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲-丁基和叔-丁基。

[0035] “C<sub>3-6</sub>杂环基环”是指3-6元饱和的或部分不饱和的脂肪族环系,其含有1-3个选自氧和氮的杂原子。此类环系的适当的示例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、吡咯啉基或噁唑啉基。

[0036] “5-6元杂芳基”是指5-6元芳族环系,其含有1-3个选自氧、氮或硫的杂原子。在此情况下,5-元杂芳基环的示例包括呋喃基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、噁二唑基、噻二唑基、三唑基、异噻唑基、异噁唑基、噻吩基或吡唑基。6-元杂芳基环的示例包括吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基或三嗪基。

[0037] “氧代”是指=O。

[0038] 除非本文中另有规定或者上下文中有明显的矛盾,在本发明上下文中(特别是权利要求的上下文中),术语“一个”、“一种”、“该”等类似的术语应当涵盖单数和复数两种形式。

[0039] 本文中使用的术语“治疗”是指对症治疗和预防性治疗,特别是对症治疗。

[0040] 本文描述了本发明的各种实施方案。应当理解,在每个实施方案中指明的特征可以与其它指明的特征组合以提供其它的实施方案。

[0041] 在本发明的实施方案2中,提供了式(I)化合物或其可药用的盐,其中:

[0042] E选自N和CR<sup>E</sup>;

[0043] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>E</sup>独立选自H、卤素、C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基和C<sub>3-6</sub>环烷基;

[0044] R<sup>3</sup>选自

[0045] (i) C<sub>1-4</sub>烷基,其可以被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>烷基、氧代、-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>和C<sub>3-6</sub>环烷基,其中C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

[0046] (ii) C<sub>1-4</sub>烷氧基,其可以被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、氧代、-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>和C<sub>3-6</sub>环烷基,其中C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

[0047] (iii) -C<sub>3-6</sub>环烷基或-O-C<sub>3-6</sub>环烷基,其中C<sub>3-6</sub>环烷基被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0048] (iv) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基螺环,其通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>环烷基或C<sub>3-6</sub>杂环基稠合,其中第二个C<sub>3-6</sub>环烷基或C<sub>3-6</sub>杂环基被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0049] (v) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基,其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子,其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基被1-3个独立选自下列的取代基取代: C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0050] (vi) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基,其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至

少一个选自O和N的杂原子,其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基与第二个C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基通过一个单一的碳原子稠合,其中所述第二个C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基被1-3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0051] R<sup>3a</sup>和R<sup>3b</sup>独立选自H、C<sub>1-4</sub>烷基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

[0052] R<sup>4</sup>选自H和C<sub>1-4</sub>烷基;或者

[0053] R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>与它们所连接的氮原子一起形成C<sub>3-6</sub>杂环基,该C<sub>3-6</sub>杂环基为任意的通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基稠合的螺环,该C<sub>3-6</sub>杂环基和C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基;

[0054] Y为5-6元杂芳基,该杂芳基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基、卤素、-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>、-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基。

[0055] 在本发明的实施方案3中,提供了实施方案1或2的化合物或盐,其中E为CR<sup>E</sup>,R<sup>E</sup>为H。

[0056] 在本发明的实施方案4中,提供了实施方案1-3中任一项的化合物或盐,其中R<sup>1</sup>选自C<sub>1-4</sub>烷基和H。

[0057] 在本发明的实施方案5中,提供了实施方案4的化合物或盐,其中R<sup>1</sup>选自甲基和H,特别是甲基。

[0058] 在本发明的实施方案6中,提供了实施方案1-5中任一项的化合物或盐,其中R<sup>2</sup>选自H、C<sub>1-4</sub>烷基和卤素。

[0059] 在本发明的实施方案7中,提供了实施方案6的化合物或盐,其中R<sup>2</sup>选自H、氟、氯和甲基,特别是H和氟,更特别是H。

[0060] 在本发明的实施方案8中,提供了实施方案1-7中任一项的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>选自:

[0061] (i) C<sub>1-4</sub>烷基,其被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>烷基、卤素、氧代和-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>;

[0062] (ii) C<sub>1-4</sub>烷氧基,其被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、卤素和C<sub>1-4</sub>烷基;

[0063] (iii) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基,其中C<sub>3-6</sub>环烷基被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基和卤素;

[0064] (iv) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基螺环,其通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>环烷基稠合,其中第二个C<sub>3-6</sub>环烷基被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基和卤素;

[0065] (v) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基,其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子,其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>烷基和C<sub>1-4</sub>羟基烷基;

[0066] (vi) -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基,其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子,其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基为通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基稠合的螺环,其中C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、羟基和C<sub>1-4</sub>羟基烷基;

[0067] R<sup>3a</sup>和R<sup>3b</sup>独立选自H和C<sub>1-4</sub>烷基;

[0068]  $R^4$ 选自H和 $C_{1-4}$ 烷基;或者

[0069]  $R^3$ 和 $R^4$ 与它们所连接的氮原子一起形成 $C_{3-6}$ 杂环基,该 $C_{3-6}$ 杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基和 $C_{1-4}$ 烷基。

[0070] 在本发明的实施方案9中,提供了实施方案1-7中任一项的化合物或盐,其中 $R^3$ 为 $C_{1-4}$ 烷基,其是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、卤素、 $C_{1-4}$ 卤代烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{1-4}$ 烷基、氧代、 $-NR^{3a}R^{3b}$ 和 $C_{3-6}$ 环烷基,其中 $C_{3-6}$ 环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、卤素、 $C_{1-4}$ 烷氧基和 $C_{1-4}$ 卤代烷基。

[0071] 在本发明的实施方案10中,提供了实施方案9的化合物或盐,其中 $R^3$ 选自丙基、丁基和戊基,其被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 烷基、卤素、 $-NR^{3a}R^{3b}$ 和氧代。

[0072] 在本发明的实施方案11中,提供了实施方案9的化合物或盐,其中 $R^3$ 选自:

[0073] 3-羟基丙基-;

[0074] 3-羟基-2,2-二甲基丙基-;

[0075] 3-羟基-3-甲基丁基-;

[0076] 2-羟基-2-甲基丙基-;

[0077] 4,4,4-三氟-3-羟基丁基-;

[0078] 2,2-二氟乙基-;

[0079] 3,3-二甲基-2-氧代-丁基;和

[0080] 3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基丙基-。

[0081] 在本发明的实施方案12中,提供了实施方案11的化合物或盐,其中 $R^3$ 选自:

[0082] 3-羟基丙基-;

[0083] 3-羟基-2,2-二甲基丙基-;

[0084] 2-羟基-2-甲基丙基;和

[0085] 3-羟基-3-甲基丁基-。

[0086] 在本发明的实施方案13中,提供了实施方案1-7中任一项的化合物或盐,其中 $R^3$ 为 $C_{1-4}$ 烷氧基,其是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、卤素、 $C_{1-4}$ 卤代烷基、 $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、氧代、 $-NR^{3a}R^{3b}$ 和 $C_{3-6}$ 环烷基,其中 $C_{3-6}$ 环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、卤素、 $C_{1-4}$ 烷氧基和 $C_{1-4}$ 卤代烷基。

[0087] 在本发明的实施方案14中,提供了实施方案13中任一项的化合物或盐,其中 $R^3$ 选自丙氧基、丁氧基和戊氧基,其被1-3个选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 烷基和卤素。

[0088] 在本发明的实施方案15中,提供了实施方案14的化合物或盐,其中 $R^3$ 为2-羟基-2-甲基丙氧基-。

[0089] 在本发明的实施方案16中,提供了实施方案1-7中任一项的化合物或盐,其中 $R^3$ 为 $-C_{3-6}$ 环烷基或 $-O-C_{3-6}$ 环烷基,其中 $C_{3-6}$ 环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基、卤素、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{1-4}$ 卤代烷基和 $-(C_{0-3}$ 烷基) $-NR^{3a}R^{3b}$ 。

[0090] 在本发明的实施方案17中,提供了实施方案16的化合物或盐,其中 $R^3$ 选自 $-(C_{0-3}$ 烷基)-环己基、 $-(C_{0-3}$ 烷基)-环丁基和 $-(C_{0-3}$ 烷基)-环丙基,其中环己基、环丁基和环丙基被1或2个独立选自羟基、 $C_{1-4}$ 羟基烷基和卤素的取代基取代。

- [0091] 在本发明的实施方案18中,提供了实施方案17的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>选自:
- [0092] 4-羟基环己基-;
- [0093] 3-羟基环丁基-甲基-;
- [0094] 1-羟基环丁基-甲基-;
- [0095] 1-(羟基甲基)环丙基;和
- [0096] 1-羟基环丙基-甲基-。
- [0097] 在本发明的实施方案19中,提供了实施方案17的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>选自:
- [0098] 4-羟基环己基-,和
- [0099] 3-羟基环丁基-甲基-。
- [0100] 在本发明的实施方案20中,提供了实施方案1-7中任一项的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>为-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基螺环,其通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>环烷基或C<sub>3-6</sub>杂环基稠合,其中C<sub>3-6</sub>环烷基或C<sub>3-6</sub>杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>。
- [0101] 在本发明的实施方案21中,提供了实施方案20的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>选自螺[3.3]庚-2-基、螺[3.4]辛-6-基、螺[4.4]壬-2-基和螺[3.4]十一烷-3-基,其被1-3个选自羟基和卤素的取代基取代。
- [0102] 在本发明的实施方案22中,提供了实施方案21的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>为6-羟基螺[3.3]庚-2-基。
- [0103] 在本发明的实施方案23中,提供了实施方案1-7中任一项的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>为:
- [0104] -(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基,其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子,其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>烷基和C<sub>1-4</sub>羟基烷基;
- [0105] 或者-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基或-(O-C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基,其中C<sub>3-6</sub>杂环基含有至少一个选自O和N的杂原子,其中所述C<sub>3-6</sub>杂环基为通过一个单一的碳原子与第二个C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基稠合的螺环,其中C<sub>3-6</sub>杂环基或C<sub>3-6</sub>环烷基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>卤代烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>。
- [0106] 在本发明的实施方案24中,提供了实施方案23的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>选自-(C<sub>0-3</sub>烷基)-四氢呋喃基、-(C<sub>0-3</sub>烷基)-氧杂环丁基、-(C<sub>0-3</sub>烷基)-吡咯烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-四氢吡喃基,它们每一个是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:羟基、C<sub>1-4</sub>烷基和C<sub>1-4</sub>羟基烷基。
- [0107] 在本发明的实施方案25中,提供了实施方案24的化合物或盐,其中R<sup>3</sup>选自
- [0108] -(1-乙基吡咯烷-2-基)甲基,
- [0109] -(四氢-2H-吡喃-4-基),
- [0110] -(3-羟基氧杂环丁烷-3-基)甲基,
- [0111] -(3-甲基氧杂环丁烷-3-基)甲基,
- [0112] -(4-羟基-四氢吡喃)甲基,

[0113] - (3-羟基甲基-氧杂环丁烷-3-基) 甲基, 和

[0114] - (四氢呋喃-3-基) 甲基。

[0115] 在本发明的实施方案26中, 提供了实施方案1-25中任一项的化合物或盐, 其中R<sup>4</sup>为H或甲基。

[0116] 在本发明的实施方案27中, 提供了实施方案1-7中任一项的化合物或盐, 其中R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>与它们所连接的氮原子一起形成C<sub>3-6</sub>杂环基, 该杂环基是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: C<sub>1-4</sub>烷基、羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、卤素、C<sub>1-4</sub>烷氧基和C<sub>1-4</sub>卤代烷基。

[0117] 在本发明的实施方案28中, 提供了实施方案27的化合物或盐, 其中R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>与它们所连接的氮原子一起形成哌嗪基、哌啶基或氮杂环丁基, 其是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: 羟基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基和C<sub>1-4</sub>烷基。

[0118] 在本发明的实施方案29中, 提供了实施方案28的化合物或盐, 其中R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>与它们所连接的氮原子一起形成:

[0119] -3-(三氟甲基)哌嗪-1-基,

[0120] -3,3-二氟哌啶-1-基, 或

[0121] -1-(羟基甲基)氮杂环丁烷-3-基。

[0122] 在本发明的实施方案30中, 提供了实施方案1-29中任一项的化合物或盐, 其中Y选自:

[0123] -噻唑基,

[0124] -吡唑基,

[0125] -吡啶基,

[0126] -三唑基,

[0127] -咪唑基,

[0128] -噁二唑基,

[0129] -嘧啶基,

[0130] -异噁唑基,

[0131] -噁唑基, 和

[0132] -噻吩基;

[0133] 它们每一个是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基、卤素、-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>、-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基。

[0134] 在本发明的实施方案31中, 提供了实施方案30的化合物或盐, 其中Y选自:

[0135] -噻唑-5-基,

[0136] -吡唑-4-基,

[0137] -吡唑-5-基,

[0138] -吡唑-1-基,

[0139] -吡啶-4-基,

[0140] -吡啶-3-基,

[0141] -1,2,4-三唑-1-基,

[0142] -1,2,3-三唑-4-基,

- [0143] -咪唑-1-基,
- [0144] -1,2,4-噁二唑-5-基,
- [0145] -1,3,4-噁二唑-2-基,
- [0146] -噁唑-5-基,
- [0147] -异噁唑-5-基,
- [0148] -嘧啶-5-基,
- [0149] -噻吩-3-基,
- [0150] 它们每一个是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>羟基烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基。
- [0151] 在本发明的实施方案32中,提供了实施方案31的化合物或盐,其中Y选自:
- [0152] -噻唑-5-基,
- [0153] -吡唑-4-基,
- [0154] -吡唑-5-基,
- [0155] -吡唑-1-基,
- [0156] -吡啶-4-基,
- [0157] -吡啶-3-基,
- [0158] -1,2,4-三唑-1-基,
- [0159] -1,2,3-三唑-4-基,
- [0160] -咪唑-1-基,
- [0161] -1,2,4-噁二唑-5-基,
- [0162] -噁唑-5-基,
- [0163] -异噁唑-5-基,
- [0164] -嘧啶-5-基,
- [0165] -噻吩-3-基,
- [0166] 它们每一个是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代: 甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、CF<sub>3</sub>、CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、羟基乙基、甲氧基乙基和甲氧基。
- [0167] 在本发明的实施方案33中,提供了实施方案30的化合物或盐,其中Y选自:
- [0168] -5-吗啉-4-基甲基-噻吩-3-基,
- [0169] -3-环丙基-[1,2,4]三唑-1-基,
- [0170] -2-环丙基-噻唑-5-基,
- [0171] -2,5-二甲基-2H-[1,2,3]三唑-4-基,
- [0172] -2-甲基噻唑-5-基,
- [0173] -1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基,
- [0174] -1,2,4-三唑-1-基,
- [0175] -3-异丙基-1,2,4-噁二唑-5-基,
- [0176] -3-甲基-[1,2,4]噁二唑-5-基,
- [0177] -1-甲基-1H-吡唑-4-基,
- [0178] -1H-吡唑-1-基,

- [0179] -3-乙基-1,2,4-噁二唑-5-基,  
[0180] -2-甲基-2H-1,2,3-三唑-4-基,  
[0181] -(2,2,2-三氟-乙基)-1H-吡唑-4-基,  
[0182] -1H-吡唑-4-基,  
[0183] -3-甲基异噁唑-5-基,  
[0184] -2-甲基吡啶-4-基)吡嗪-2-基,  
[0185] -1H-1,2,4-三唑-1-基,  
[0186] -3-丙基-1,2,4-噁二唑-5-基,  
[0187] -2-甲基-噁唑-5-基,  
[0188] -噻啶-5-基,  
[0189] -3-甲基-1H-1,2,4-三唑-1-基,  
[0190] -5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基,  
[0191] -1-甲基-1H-吡唑-5-基,  
[0192] -吡啶-3-基,  
[0193] -吡啶-4-基,  
[0194] -2-甲基-吡啶-4-基,  
[0195] -3-甲基-1,2,4-噁二唑-5-基,  
[0196] -2-甲基噻唑-4-基,  
[0197] -4-甲基-1H-咪唑-1-基,  
[0198] -1-乙基-1H-吡唑-4-基,  
[0199] -3,5-二甲基-1H-吡唑-1-基,  
[0200] -3-环丙基-1,2,4-噁二唑-5-基,  
[0201] -3-甲基异噁唑-5-基,  
[0202] -1-异丙基-1H-吡唑-4-基,  
[0203] -1H-1,2,4-三唑-1-基,  
[0204] -1-丙基-1H-吡唑-4-基,  
[0205] -4-甲氧基吡啶-3-基,  
[0206] -吡唑-3-基,  
[0207] -3-甲基异噁唑-5-基,和  
[0208] -1-(2-甲氧基乙基)-1H-吡唑-4-基。  
[0209] 在本发明的实施方案34中,提供了实施方案1-29中任一项的化合物或盐,其中Y选自:  
[0210] -噻唑基,  
[0211] -噁二唑基,  
[0212] -异噁唑基(isoxalolyl),  
[0213] -吡唑基,  
[0214] -吡啶基,和  
[0215] -三唑基,  
[0216] 它们每一个是未取代的或者被1-3个独立选自下列的取代基取代:C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-4</sub>



卤代烷基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>1-4</sub>卤代烷氧基、-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>环烷基和-(C<sub>0-3</sub>烷基)-C<sub>3-6</sub>杂环基。

[0217] 在本发明的实施方案35中,提供了实施方案34的化合物或盐,其中Y选自:

[0218] -噻唑-5-基,

[0219] -异噻唑-5-基,

[0220] -噁二唑-5-基,

[0221] -吡唑-4-基,

[0222] -吡唑-5-基,

[0223] -吡唑-1-基,

[0224] -吡啶-4-基,

[0225] -吡啶-3-基,

[0226] -1,2,4-三唑-1-基,

[0227] -1,2,3-三唑-4-基,

[0228] 它们每一个是未取代的或者被1或2个独立选自下列的取代基取代:甲基、乙基、丙基和异丙基。

[0229] 在本发明的实施方案36中,提供了选自下列的实施方案1的化合物或盐:

[0230] N-(3-羟基-丙基)-4-甲基-3-[6-(2-甲基-噻唑-5-基)-吡嗪-2-基]-苯磺酰胺;

[0231] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(2-羟基-2-甲基-丙基)-4-甲基-苯磺酰胺;

[0232] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-苯磺酰胺;

[0233] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-4-甲基-N-(3-甲基-氧杂环丁烷-3-基甲基)-苯磺酰胺;

[0234] 反式-N-(4-羟基环己基)-4-甲基-3-(6-(2-甲基噻唑-5-基)吡嗪-2-基)苯磺酰胺;

[0235] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(6-羟基-螺[3.3]庚-2-基)-4-甲基-苯磺酰胺;

[0236] 顺式3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-环丁基甲基)-4-甲基-苯磺酰胺;

[0237] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-2,2-二甲基-丙基)-4-甲基-苯磺酰胺;

[0238] N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-3-(6-[1-(2-吗啉-4-基-乙基)-1H-吡唑-4-基]-吡嗪-2-基)-苯磺酰胺;

[0239] N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-3-(6-[3-甲基-1-(2-吗啉-4-基-乙基)-1H-吡唑-4-基]-吡嗪-2-基)-苯磺酰胺;

[0240] 反式-N-(4-羟基-环己基)-4-甲基-3-(6-吡啶-3-基-吡嗪-2-基)-苯磺酰胺;

[0241] 反式-N-(4-羟基-环己基)-4-甲基-3-[6-(5-吗啉-4-基甲基-噁吩-3-基)-吡嗪-2-基]-苯磺酰胺;

[0242] 顺式-3-[6-(2,5-二甲基-2H-吡唑-3-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-环丁基甲基)-4-甲基-苯磺酰胺;

[0243] 或其可药用的盐。

[0244] 在本发明的实施方案37中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或盐,或其可药用的盐,用于药物。

[0245] 在本发明的实施方案38中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或盐,在治疗通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型(p110- $\gamma$ )的激活而介导的病症或疾病中的用途。

[0246] 在本发明的实施方案39中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或盐,用于治疗炎性、阻塞性或过敏性疾病。

[0247] 在本发明的实施方案40中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或盐,用于治疗呼吸道疾病、过敏、类风湿性关节炎、骨关节炎、风湿性疾病、银屑病、溃疡性结肠炎、克隆病、感染性休克、增殖性疾病例如癌症、动脉粥样硬化、移植后的同种异体移植物排斥反应、糖尿病、中风、肥胖和再狭窄。

[0248] 在本发明的实施方案41中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或盐,用于治疗呼吸道疾病,特别是哮喘、COPD、COAD、COLD、慢性支气管炎、呼吸困难或肺气肿,更特别是哮喘。

[0249] 在本发明的实施方案42中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐在生产药物中的用途,所述药物用于治疗通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型(p110- $\gamma$ )的激活而介导的病症或疾病。

[0250] 在本发明的实施方案43中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐在生产药物中的用途,所述药物用于治疗呼吸道疾病、过敏、类风湿性关节炎、骨关节炎、风湿性疾病、银屑病、溃疡性结肠炎、克隆病、感染性休克、增殖性疾病例如癌症、动脉粥样硬化、移植后的同种异体移植物排斥反应、糖尿病、中风、肥胖和再狭窄。

[0251] 在本发明的实施方案44中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐在生产药物中的用途,所述药物用于治疗呼吸道疾病,特别是哮喘、COPD、COAD、COLD、慢性支气管炎、呼吸困难或肺气肿,更特别是哮喘。

[0252] 在本发明的实施方案45中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐在治疗通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型(p110- $\gamma$ )的激活而介导的病症或疾病中的用途。

[0253] 在本发明的实施方案46中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐的用途,用于治疗呼吸道疾病、过敏、类风湿性关节炎、骨关节炎、风湿性疾病、银屑病、溃疡性结肠炎、克隆病、感染性休克、增殖性疾病例如癌症、动脉粥样硬化、移植后的同种异体移植物排斥反应、糖尿病、中风、肥胖和再狭窄。

[0254] 在本发明的实施方案47中,提供了实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐的用途,用于治疗呼吸道疾病,特别是哮喘、COPD、COAD、COLD、慢性支气管炎、呼吸困难或肺气肿,更特别是哮喘。

[0255] 在本发明的实施方案48中,提供了治疗通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型(p110- $\gamma$ )的激活而介导的病症或疾病的方法,该方法包括给予需要此类治疗的个体治疗有效量的实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐。

[0256] 在本发明的实施方案49中,提供了治疗下列疾病的方法:呼吸道疾病、过敏、类风湿性关节炎、骨关节炎、风湿性疾病、银屑病、溃疡性结肠炎、克隆病、感染性休克、增殖性疾病例如癌症、动脉粥样硬化、移植后的同种异体移植物排斥反应、糖尿病、中风、肥胖和再狭

窄,该方法包括给予需要此类治疗的个体治疗有效量的实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐。

[0257] 在本发明的实施方案50中,提供了治疗下列疾病的方法:呼吸道疾病,特别是哮喘、COPD、COAD、COLD、慢性支气管炎、呼吸困难或肺气肿,更特别是哮喘,该方法包括给予需要此类治疗的个体治疗有效量的实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐。

[0258] 在本发明的实施方案51中,提供了药用组合物,其包含:

[0259] 治疗有效量的实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐和一或多种可药用的载体。

[0260] 在本发明的实施方案52中,提供了药物组合产品,其包含:

[0261] 治疗有效量的实施方案1-36中任一项的化合物或其可药用的盐和第二种活性成分。

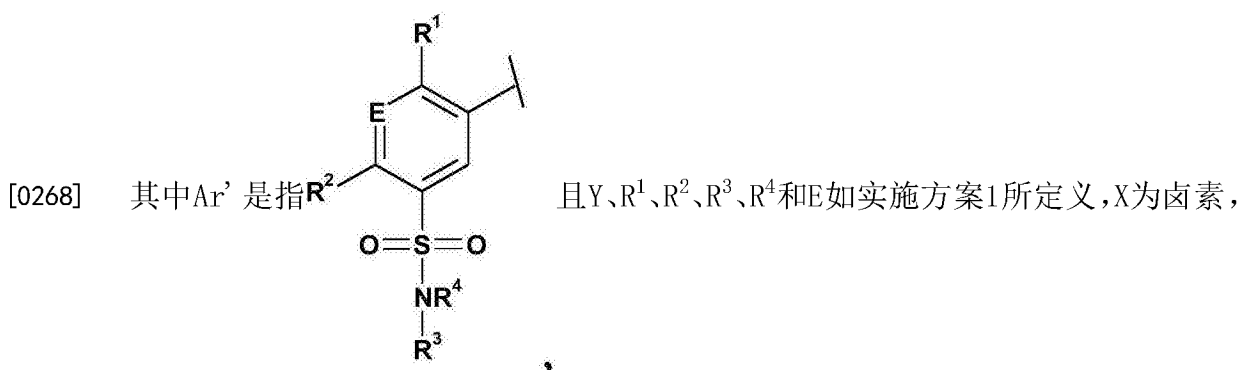
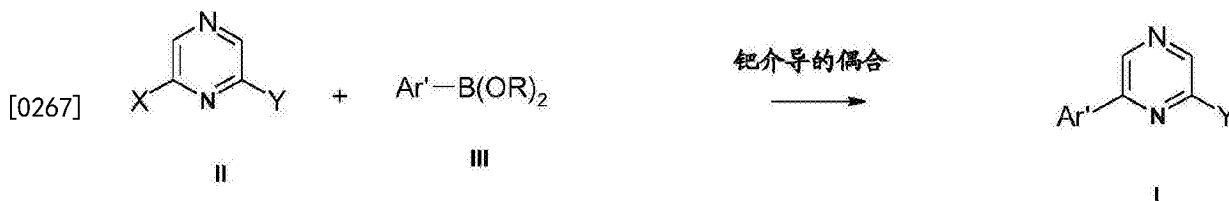
[0262] 在本发明的实施方案53中,提供了实施方案52的药物组合产品,其中第二个活性成分选自抗炎药物、抗支气管炎药物或抗组胺药物。

[0263] 在另一个实施方案中,本发明的各个化合物是列示于下面实施例部分中的那些化合物。

[0264] 术语“本发明化合物”是指实施方案1-36中任一项所定义的化合物。

[0265] 实施方案1-36中任一项所定义的化合物可以通过下面的通用合成路线合成,其具体的示例在实施例部分中有更详细的描述。

[0266] 流程1

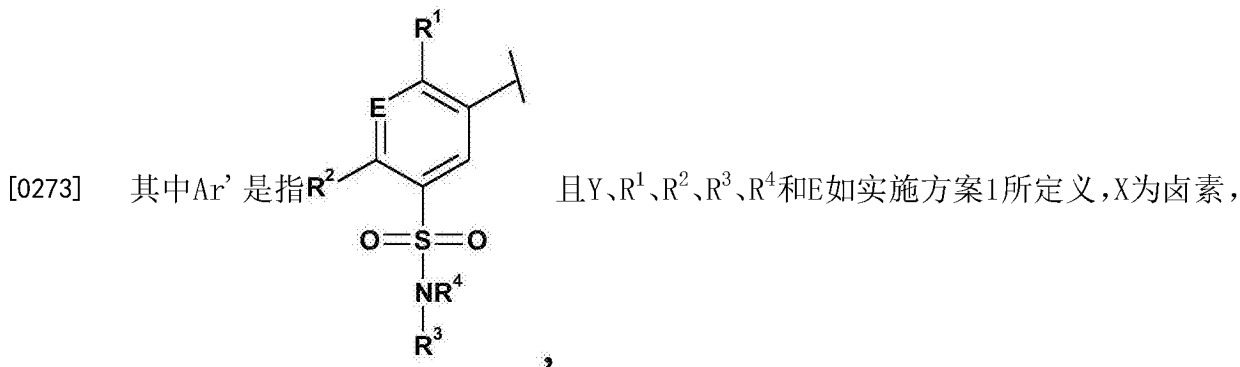
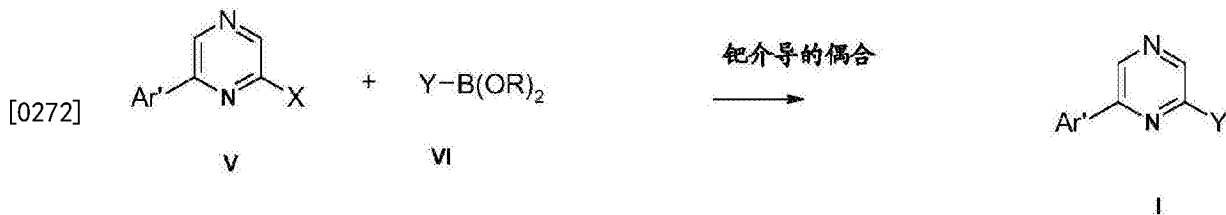


例如I、Br或Cl。

[0269] A1和A2之间的反应采用适当的钯催化剂(例如Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>)、在适当的溶剂(例如DME或MeCN)中进行。反应通常包括碱,例如碳酸钠或i-Pr<sub>2</sub>Net,可以在高温下进行,例如回流下。

[0270] 作为上面流程的替代选择,A1可以与适当的硼化合物在催化剂存在下反应以便于形成A1的硼酸/硼酸酐衍生物,然后与Ar'-Br(IV)反应,在两步工艺中形成式I化合物。

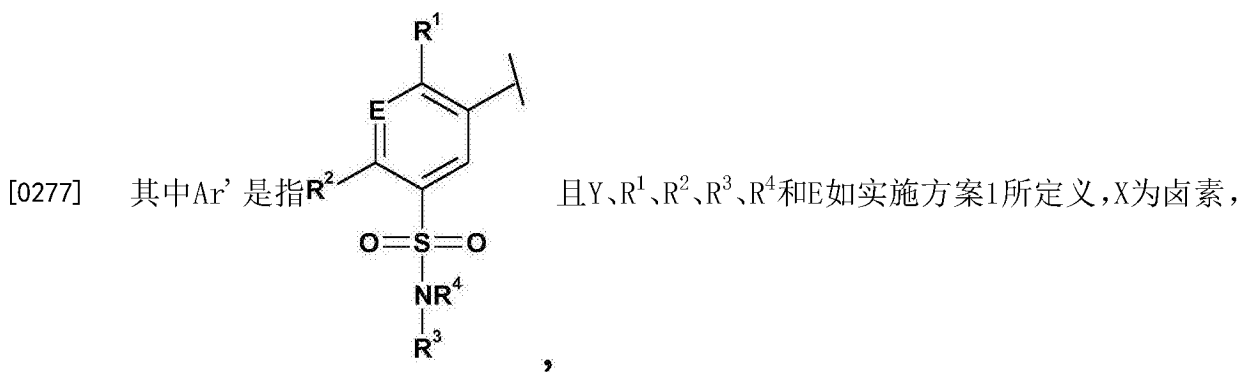
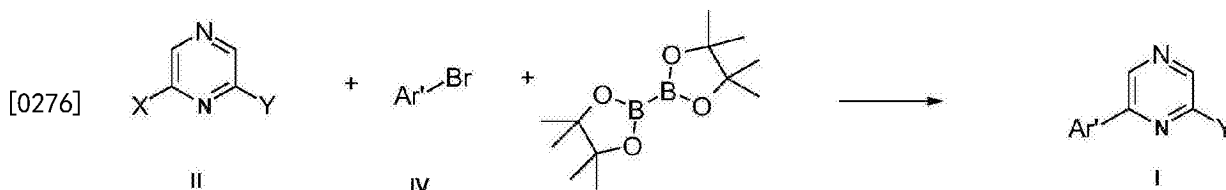
[0271] 流程2



例如I、Br或Cl。

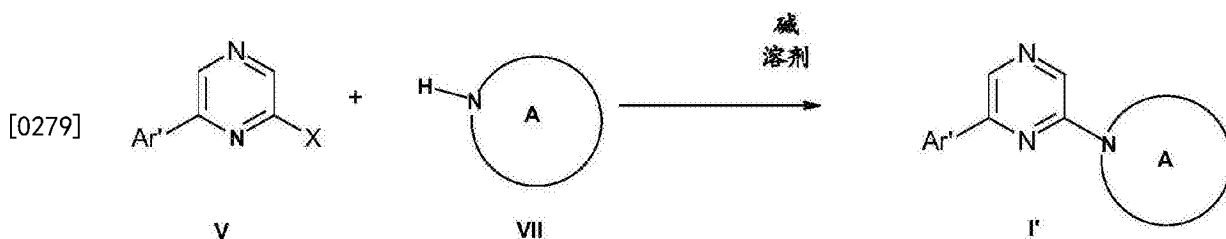
[0274] 化合物V和VI之间的反应采用适当的钯催化剂(例如Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>)、在适当的溶剂(例如DME或MeCN)中进行。反应通常包括碱,例如碳酸钠或KOAc,可以在高温下进行,例如回流下。

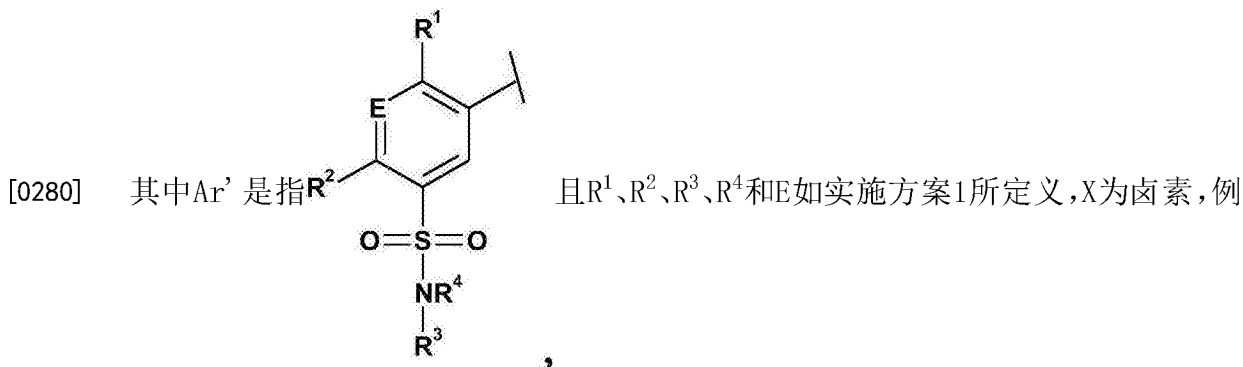
[0275] 流程3



例如I、Br或Cl。这是一个两步反应,一锅法硼酰化反应(boronylation)以及随后的Suzuki反应,这两个反应均采用典型的条件,例如Pd催化剂。

[0278] 流程4

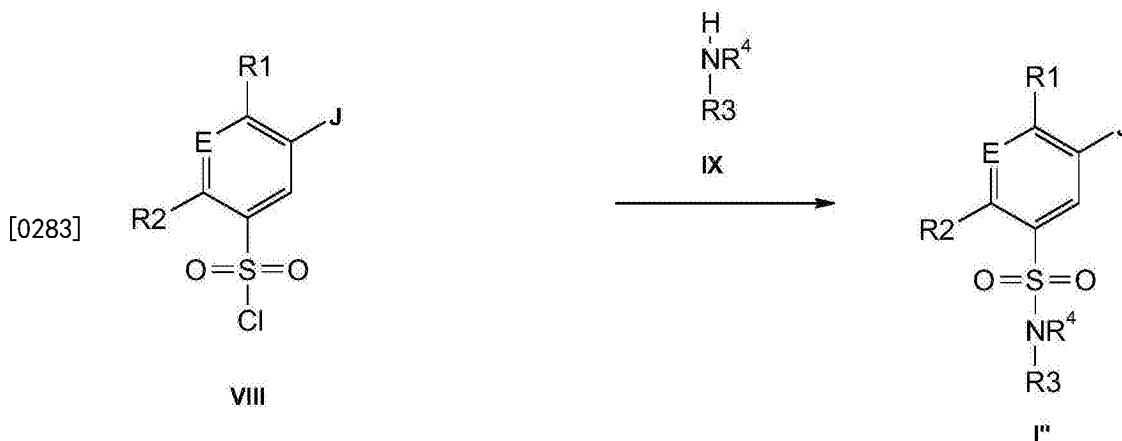




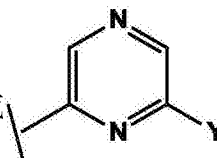
如I、Br或Cl,A本文所定义的5-6元杂芳基。

[0281] 该反应在适当的碱(例如胺或碱金属氢化物或碳酸盐,例如NaH或CsCO<sub>3</sub>)存在下、在适当的溶剂(例如二甲基乙酰胺(DMA))中进行,该反应通常在至多150℃的高温下进行,任选在CuI和N,N-二甲基甘氨酸存在下进行。

[0282] 流程5



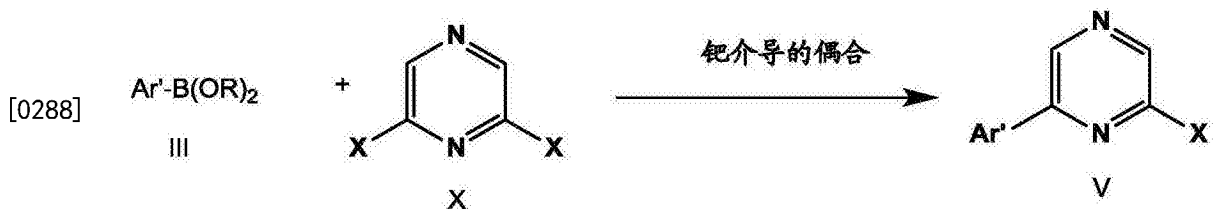
[0284] 其中Y、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>和E如实施方案1所定义,且J为溴或



[0285] 在适当的碱(例如吡啶、三乙胺或二异丙基乙基胺)存在下,在适当的溶剂(例如DCM、THF、吡啶或二甲基乙酰胺)中,于适当的温度下(例如0℃至室温),可以通过使得VIII与胺IX反应制备式I'化合物。

[0286] 式II化合物可以获自商业,或者可以根据已知的方法制备。式III可以获自商业,或者可以采用本领域技术人员熟知的标准条件制备自式IV化合物(参见实验‘硼酸酯’)。在典型的Suzuki反应条件下,式V化合物可以通过使得式III化合物与式VIII化合物反应制备(参见流程6),或者可以在典型的Suzuki反应条件下通过使得式III化合物与式IX化合物反应并随后进行卤化反应制备(参见流程7)

[0287] 流程6

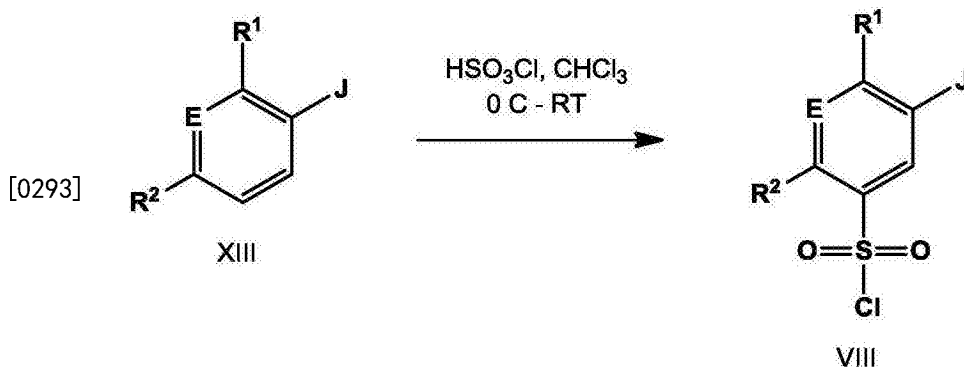


[0289] 流程7



[0291] 式VI化合物可以获自商业,或者可以根据已知的方法制备。式VIII可以获自商业,或者可以根据下面的流程8制备。

[0292] 流程8



[0294] 本发明还包括本发明方法的任何变通方法,其中在其任何阶段获得的中间体产物可以用作原料并进行其余的步骤,或者其中原料在反应条件下在位进行,或者其中反应成分以其盐的形式或光学纯的物质的形式使用。

[0295] 本发明化合物和中间体也可以根据本领域技术人员公知的方法彼此转化。

[0296] 在本文的范围内,除非上下文中另有说明,只有那些并非本发明化合物的特定需要的终产物的组成部分的易于除去的基团才能被称为“保护基团”。此类保护基团对官能团的保护、保护基团本身以及它们的裂解反应描述于例如下列标准参考著作,例如 J.F.W.McOmie,“有机化学中的保护基团(Protective Groups in Organic Chemistry)”, Plenum Press,London and New York 1973;T.W.Greene和P.G.M.Wuts,“有机合成中的保护基团(Protective Groups in Organic Synthesis)”,第3版,Wiley,New York1999;“肽(The Peptides)”;第3卷(编辑:E.Gross and J.Meienhofer),Academic Press,London and New York 1981;“Methoden der organischen Chemie”(有机化学方法),Houben Weyl,第4版,第15/I卷,Georg Thieme Verlag,Stuttgart 1974;H.-D.Jakubke和 H.Jeschkeit,“**Aminosäuren**,Peptide,Proteine”(氨基酸、肽、蛋白质),Verlag Chemie,Weinheim,Deerfield Beach,and Basel 1982;Jochen Lehmann,“Chemie der Kohlenhydrate:Monosaccharide und Derivate”(糖化学:单糖及其衍生物),Georg Thieme Verlag,Stuttgart 1974。保护基团的特征在于它们是易于除去的(即不会出现不需要的副反应),例如通过溶剂分解、还原、光解或在生理学条件下(例如通过酶的裂解反

应)除去。

[0297] 具有至少一个盐形成基团的本发明化合物的盐可以根据本领域技术人员已知的方法制备。例如,具有酸性基团的本发明化合物的盐可以通过例如采用下列物质处理化合物而形成:金属化合物,例如适当的有机羧酸的碱金属盐,如2-乙基己酸的钠盐;有机碱金属或碱土金属化合物,例如其相应的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐,如氢氧化钠或钾、碳酸钠或钾或者碳酸氢钠或钾;相应的钙化合物或者氨或适当的有机胺,优选采用化学计量的或稍微过量的盐形成试剂。本发明化合物的酸加成盐可以根据常规方法获得,例如通过采用酸或适当的阴离子交换试剂处理化合物。含有酸性和碱性盐形成基团(例如游离羧基和游离氨基基团)的本发明化合物的内盐可以通过如下方法形成:例如,采用例如弱碱将盐(例如酸加成盐)中和至等电点,或者采用离子交换剂处理。

[0298] 盐可以根据本领域技术人员已知的方法转化为游离化合物。金属和铵盐可以例如通过采用适当的酸处理而转化,酸加成盐可以例如通过采用适当的碱性试剂处理而转化。

[0299] 根据本发明获得的异构体混合物可以根据本领域技术人员已知的方法分离为单一异构体;非对映异构体可以通过例如如下方法分离:在多相溶剂混合物之间的分配方法、重结晶方法和/或色谱分离方法(例如硅胶色谱),或者通过例如在反相柱上的中压液相色谱方法;外消旋体可以通过例如下列方法分离:采用光学纯的盐形成试剂形成盐并分离由此获得的非对映异构体混合物,例如通过分步结晶的方法,或通过采用光学活性柱填料的色谱方法。

[0300] 中间体和终产物可以根据标准方法处理和/或纯化,例如采用色谱方法、分配方法、(重)结晶方法等。

[0301] 下面所述通常也适用于本文上下文中所述的所有方法。所有上述工艺步骤可以在本领域技术人员公知的反应条件下进行,包括那些下面具体描述的条件:在无或通常有溶剂或稀释剂存在下,包括例如对使用并且溶解它们的试剂是惰性的溶剂或稀释剂;在有或无催化剂、缩合剂或中和剂存在下,例如离子交换剂,如阳离子交换剂,如 $H^+$ 形式的交换剂,这取决于反应和/或待还原的反应物的性质;低温、常温或高温,例如温度范围约 $-100^{\circ}C$ 至约 $190^{\circ}C$ ,包括例如约 $-80^{\circ}C$ 至约 $150^{\circ}C$ ,例如 $-80^{\circ}C$ 至 $-60^{\circ}C$ 、于室温下、 $-20$ 至 $40^{\circ}C$ 或于回流温度下;在大气压下或密闭容器中,处于适当的压力下;和/或在惰性环境中,例如在氩气或氮气环境中。

[0302] 在反应的所有阶段,形成的异构体混合物均可以分离为单一异构体,例如非对映异构体或对映异构体,或者分离为任何需要的异构体混合物,例如外消旋物或非对映异构体的混合物,例如类似于下面“其它工艺步骤”中描述的方法。

[0303] 除非工艺方法的描述中另有说明,可以自那些适合于任何特定反应的溶剂中选择的溶剂包括那些特别指明的溶剂,或者例如水;酯类,例如低级烷基-低级烷酸酯,如乙酸乙酯;醚类,例如脂肪族醚类,如乙醚;或环醚类,例如四氢呋喃或二氧六环;液体芳族烃类,例如苯或甲苯;醇类,例如甲醇、乙醇或1-或2-丙醇;腈类,例如乙腈;卤代烃类,例如二氯甲烷或氯仿;酰胺类,例如二甲基甲酰胺或二甲基乙酰胺;碱类,例如杂环氮碱类,例如吡啶或N-甲基吡咯烷-2-酮;羧酸酐类,例如低级烷酸酐类,如乙酸酐;环状、直链或支链烃类,例如环己烷、己烷或异戊烷、甲基环己烷;或这些溶剂的混合物,例如水溶液。此类溶剂混合物也可以用于处理步骤中,例如色谱或分配步骤。

[0304] 本发明化合物(包括其盐)还可以以水合物的形式获得,或者它们的结晶可以例如包含用于结晶的溶剂。可以存在不同的结晶形式。

[0305] 本发明还涉及那些其中在任何工艺阶段作为中间体获得的化合物用作原料并进行其余的工艺步骤的工艺形式,或者其中原料在反应条件下形成,或者以衍生物的形式使用,例如以被保护的形式或盐的形式使用,或者根据本发明的方法获得的化合物可以在工艺条件下产生并进一步在位处理。

[0306] 用于合成本发明化合物的所有的原料、构建模块、试剂、酸、碱、脱水剂、溶剂和催化剂均可以获自商业,或者可以通过本领域技术人员已知的有机合成方法制备(Houben-Weyl第4版,1952,“有机合成方法”(Methods of Organic Synthesis),Thieme,第21卷)。

[0307] 术语“光学异构体”或“立体异构体”是指对于指定的本发明化合物而言任何可能存在的各种立体异构构型,包括几何异构体。应当理解,取代基可以连接在碳原子的手性中心上。术语“手性”是指与其镜像分子对具有不可重叠性的分子,而术语“非手性”是指与其镜像分子对具有可重叠性的分子。因此,本发明包括化合物的对映异构体、非对映异构体或外消旋物。“对映异构体”是彼此镜像为不可重叠的一对立体异构体。一对对映异构体的1:1混合物为“外消旋”混合物。在适当情况下,该术语用于指外消旋混合物。“非对映异构体”是具有至少两个不对称原子的立体异构体,但它们彼此不互为镜像。绝对立体化学根据Cahn-Ingold-Prelog R-S系统指定。当化合物是纯对映异构体时,在每个手性碳处的立体化学可以指定为R或S。其绝对构型未知的拆分的化合物可以根据它们在钠D线的波长处旋转平面偏振光的方向(右旋或左旋)而指定为(+)或(-)。本文描述的某些化合物包含一个或多个不对称中心或轴,因此可能产生对映异构体、非对映异构体和其它立体异构形式,其可以根据绝对立体化学而定义为(R)-或(S)-。

[0308] 根据选择的原料和工艺,本发明化合物可以以任何一种可能的异构体或其混合物的形式存在,例如纯的光学异构体或异构体混合物,例如外消旋体和对映异构体的混合物,这取决于不对称碳原子的数目。本发明应当包括所有这些可能的异构体,包括外消旋混合物、非对映异构体混合物和光学纯形式。光学活性的(R)-和(S)-异构体可以采用手性合成子或手性试剂来制备,或者采用常规技术拆分。如果化合物含有双键,则取代基可以是E或Z构型。如果化合物含有二取代的环烷基,该环烷基取代基可以具有顺式或反式构型。也应当包括所有互变异构形式。

[0309] 任何获得的异构体混合物可以根据构成组分的物理化学性质的差异而分离为纯的或基本上纯的几何或光学异构体、非对映异构体、外消旋物,例如通过色谱法和/或分步结晶的方法分离。

[0310] 任何获得的终产物或中间体的外消旋物可以通过已知的方法被拆分为光学对映体,例如,通过分离其非对映异构体盐(采用光学活性的酸或碱获得),释放出光学活性的酸性或碱性化合物。具体地讲,可以采用碱性部分将本发明化合物拆分为其光学对映体,例如,通过将光学活性的酸形成的盐分步结晶,所述酸例如酒石酸、二苯甲酰基酒石酸,二乙酰基酒石酸、二-0,0'-对甲苯酰基酒石酸、扁桃酸、苹果酸或樟脑-10-磺酸。外消旋产物也可以通过手性色谱方法拆分,例如采用手性吸附剂的高效液相色谱(HPLC)。

[0311] 另外,本发明化合物(包括其盐)也可以以其水合物的形式获得,或者包含其它用于其结晶的溶剂。本发明化合物在本性上或者通过设计可以与可药用的溶剂(包括水)形成



溶剂化物；因此，本发明应当包含溶剂化物和溶剂化物两种形式。术语“溶剂化物”是指本发明化合物(包括其可药用的盐)与一或多个溶剂分子形成的分子复合物。此类溶剂分子为那些药学领域常用的溶剂分子，已知它们对于接受者而言是无害的，例如水、乙醇等。术语“水合物”是指其中溶剂分子为水的复合物。

[0312] 本发明化合物(包括其盐、水合物和溶剂化物)自身或者通过设计可以形成多晶型物。

[0313] 本文中使用的术语“盐”是指本发明化合物的酸加成盐或碱加成盐。所述“盐”特别包括“可药用的盐”。术语“可药用的盐”是指能够保持本发明化合物的生物学有效性和特性的盐，它们通常不是在生物学或其它方面不符合要求的盐。在许多情况下，由于存在氨基和/或羧基或类似的基团，所以本发明化合物能够形成酸和/或碱盐。

[0314] 可药用的酸加成盐可以采用无机酸和有机酸形成，例如乙酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、溴化物/氢溴酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、樟脑磺酸盐、氯化物/盐酸盐、chlortheophyllonate、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、马尿酸盐、氢碘酸盐/碘化物、羟乙磺酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、萘甲酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、硬脂酸盐(octadecanoate)、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、水杨酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和三氟乙酸盐。

[0315] 可以形成盐的无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。

[0316] 可以形成盐的有机酸包括例如乙酸、丙酸、乙醇酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、延胡索酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、磺基水杨酸等。可药用的碱加成盐可以采用无机碱和有机碱形成。

[0317] 可以形成盐的无机碱包括例如铵盐和元素周期表中第I-XII族的金属。在某些实施方案中，所述盐衍生自钠、钾、铵、钙、镁、铁、银、锌、铜等，特别适宜的盐包括铵、钾、钠、钙和镁盐。

[0318] 可以形成盐的有机碱包括例如伯、仲和叔胺、取代的胺(包括天然存在的取代胺)、环胺、碱性离子交换树脂等。某些有机胺包括异丙胺、苜星青霉素、胆酸盐(cholate)、二乙醇胺、二乙胺、赖氨酸、甲葡胺、哌嗪和氨丁三醇。

[0319] 本发明的可药用的盐可以通过常规化学方法自碱性或酸性部分合成。通常，此类盐可以通过使得这些化合物的游离酸形式与化学计量的适当的碱(Na、Ca、Mg或K的氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等)反应来制备，或通过使得这些化合物的游离碱形式与化学计量的适当的酸反应进行制备。此类反应通常在水或有机溶剂中或在这两者的混合物中进行。一般而言，如果可行的话，可以采用非水性介质，如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。其它适合的盐的名单可以参考例如“Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学)”，第20版，Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985)；和“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use(药用盐手册：性质、选择和使用)”，Stahland Wermuth(Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)。

[0320] 本文给出的任何结构式还应当表示这些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中给出的结构式所描绘的结构，但是其中的一或多个原

子被具有选定原子量或质量数的原子所代替。可以掺入到本发明化合物中的同位素的示例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯,例如分别为 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{125}\text{I}$ 。本发明包括各种同位素标记的本发明化合物,例如那些其中存在放射性同位素(例如 $^3\text{H}$ 和 $^{14}\text{C}$ )的化合物或那些其中存在非放射性同位素(例如 $^2\text{H}$ 和 $^{13}\text{C}$ )的化合物。此类同位素标记的化合物可以用于代谢研究(采用 $^{14}\text{C}$ )、反应动力学研究(采用例如 $^2\text{H}$ 或 $^3\text{H}$ )、检测或成像技术,例如正电子成像术(PET)或单光子发射计算机断层成像术(SPECT),包括用于药物或底物组织分布实验或者用于患者的放射性治疗。特别是, $^{18}\text{F}$ 标记的本发明化合物是PET或SPECT研究所特别需要的。通常,可以根据本领域技术人员已知的常规技术,或根据随附实施例和制备方法中所述类似工艺,采用适当的同位素标记试剂代替以前使用的非标记试剂,制备同位素标记的本发明化合物。

[0321] 另外,由于其具有较好的代谢稳定性,采用较重同位素(特别是氘(即 $^2\text{H}$ 或D))的取代可以提供一定的治疗上的益处,例如增加体内半衰期或降低剂量需要或者改善治疗指数。应当理解,在本文中氘可以被视为是本发明化合物的取代基。此类较重同位素(特别是氘)的浓度可以通过同位素富集因子定义。本文中使用的术语“同位素富集因子”是指指定同位素的同位素丰度与天然丰度之间的比例。如果本发明化合物中的取代基用氘表示,则该化合物中每个指定氘原子的同位素富集因子为至少3500(每个指定氘原子52.5%的氘掺入)、至少4000(60%的氘掺入)、至少4500(67.5%的氘掺入)、至少5000(75%的氘掺入)、至少5500(82.5%的氘掺入)、至少6000(90%的氘掺入)、至少6333.3(95%的氘掺入)、至少6466.7(97%的氘掺入)、至少6600(99%的氘掺入)或至少6633.3(99.5%的氘掺入)。

[0322] 本发明的可药用的溶剂化物包括那些其中结晶溶剂为同位素取代的溶剂化物,例如 $\text{D}_2\text{O}$ 、 $\text{d}_6$ -丙酮、 $\text{d}_6$ -DMSO。

[0323] 包含能够作为氢键供体和/或受体的基团的本发明化合物能够与适当的共结晶形成剂形成共结晶。这些共结晶可以根据已知的共结晶形成方法自本发明化合物制备。此类方法包括研磨、加热、共升华、共融,或者在结晶条件下使得本发明化合物在溶液中与共结晶形成剂接触,然后分离由此形成的共结晶。适当的共结晶形成剂包括描述于WO 2004/078163中的那些。因此,本发明还提供了包含本发明化合物的共结晶。

[0324] 如本文中所提供的体外和体内试验所示,本发明化合物能够选择性抑制PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型。

[0325] 因此,本发明化合物可以用于治疗通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型的激活而介导的疾病,特别是炎性或过敏性疾病。

[0326] 本发明化合物适用于治疗炎性或阻塞性呼吸道疾病,导致例如减少组织损伤、呼吸道炎症、支气管高敏、重构或疾病进展。适合于本发明的炎性或阻塞性呼吸道疾病包括各种类型或起源的哮喘,包括内源性(非过敏性)哮喘和外源性(过敏性)哮喘、轻度哮喘、中度哮喘、重度哮喘、支气管哮喘、运动诱发的哮喘、职业性哮喘和细菌感染后诱发的哮喘。哮喘的治疗还应当理解为包括对例如小于4或5岁的个体的治疗,其表现出喘鸣症状且被诊断或可诊断为“喘鸣婴儿”,重病医疗保险已确立的患者类别,目前通常鉴定为初期或早期哮喘。(为方便起见,该特定的哮喘病症被称为“喘鸣婴儿综合征”)。

[0327] 哮喘治疗的预防性功效将可以通过降低症状发作的频率或严重程度进行评价,例如降低急性哮喘或支气管收缩发作的频率或严重程度,改善肺功能或改善呼吸道高敏性。

其可以进一步通过对其它对症疗法的需求的减少进行评价,即用于或预期用于限制或中止发作发生时的症状,例如抗炎药(例如皮质类固醇)或支气管扩张药。哮喘预防的有益作用对具有“晨降(morning dipping)”倾向的个体尤为明显。“晨降”是一种公认的哮喘综合征,常见于相当大比例的哮喘,特征在于哮喘发作在例如约4—6am的几个小时之间,即通常基本上远离前期任何施予的对症哮喘疗法的时间。

[0328] 本发明适用的其它炎性或阻塞性呼吸道疾病和病症包括急性肺损伤(ALI)、成人/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性阻塞性肺部、呼吸道或肺病(COPD、COAD或COLD),包括慢性支气管炎或与之相关的呼吸困难、肺气肿、以及其它药物治疗导致的呼吸道高敏性的恶化,特别是其它吸入药物疗法导致的。本发明还适用于任何类型或起因的支气管炎的治疗,包括例如急性、花生性、卡他性、croupus、慢性或结核性支气管炎。本发明适用的其它炎性或阻塞性呼吸道疾病包括任何类型或成因的尘肺病(肺部的炎性疾病,通常为职业性的疾病,无论是慢性还是急性的,经常伴有呼吸道阻塞,由反复吸入粉尘引起),包括例如矽肺、碳肺、石棉肺、石末肺、鸵鸟毛尘肺、铁尘肺、矽肺、烟草尘肺和棉尘肺。

[0329] 考虑到它们的抗炎活性,特别是与嗜酸性粒细胞激活的抑制有关的活性,本发明的化合物也可以用于治疗嗜酸性粒细胞相关的疾病,例如嗜酸粒细胞增多症,特别是与呼吸道疾病有关的嗜酸粒细胞增多症(例如涉及肺组织的病态嗜酸性粒细胞浸润),包括嗜酸粒细胞增多症(因为它影响呼吸道和/或肺),以及例如**LÖFFLER**的综合征导致的或伴发的与嗜酸性粒细胞相关的呼吸道疾病、嗜酸细胞性肺炎、寄生虫(特别是多细胞动物)感染(包括热带嗜酸性粒细胞增多症)、支气管肺曲霉病、结节性多动脉炎(包括Churg-Strauss综合征)、嗜酸细胞肉芽肿以及药物反应引发的影响呼吸道的嗜酸性粒细胞相关性疾病。

[0330] 本发明化合物也可以用于治疗皮肤的炎性或过敏性疾病,例如银屑病、接触性皮炎、特应性皮炎、斑秃、多形红斑、疱疹样皮炎、硬皮病、白癜风、变应性血管炎、荨麻疹、大疱性类天疱疮、红斑狼疮、天疱疮、获得性大疱性表皮松解和其它皮肤炎性或过敏性疾病。

[0331] 本发明化合物也可以用于治疗其它疾病或病症,特别是具有炎性成分的疾病或病症,例如,治疗眼睛的疾病和病症,如结膜炎、干燥性角膜结膜炎和春季结膜炎;影响鼻部的疾病,包括过敏性鼻炎;其中与自身免疫反应有关的或具有自身免疫成分或病因的炎性疾病,包括自身免疫性血液疾病(例如溶血性贫血、再生障碍性贫血、纯红细胞贫血和特发性血小板减少)、系统性红斑狼疮、多软骨炎、硬皮病、韦格纳肉芽肿、皮炎、慢性活动性肝炎、重症肌无力、Steven-Johnson综合征、特发性口炎性腹泻、自身免疫性炎性肠病(例如溃疡性结肠炎和克罗恩病)、内分泌性眼病、格雷夫斯氏病、结节病、肺炎、慢性过敏性肺炎、多发性硬化症、原发性胆汁性肝硬化、葡萄膜炎(前部和后部)、干燥性角膜结膜炎和春季角膜结膜炎、间质性肺纤维化、银屑病关节炎和肾小球肾炎(伴有和不伴有肾病综合征、例如包括特发性肾病综合征或微小病变性肾病)。

[0332] 可以采用本发明化合物治疗的其它疾病或病症包括:血栓形成、高血压、心脏局部缺血和胰腺炎(Nature review, 2006年11月,第5卷);贫血,包括溶血性贫血、再生障碍性贫血和纯红细胞贫血(WO 2006/040318);脓毒性休克、类风湿性关节炎、骨关节炎、增生性疾病如癌症、动脉粥样硬化、移植后的同种异体移植物排斥反应、中风、肥胖、再狭窄、糖尿病例如I型糖尿病(幼年型糖尿病)和II型糖尿病、腹泻疾病、局部缺血/再灌注损伤、视网膜病

如糖尿病性视网膜病或高压氧诱导的视网膜病以及特征在于眼内压升高或眼房水分泌的疾病,例如青光眼。

[0333] 本发明的成分可以用于心脏衰竭的治疗或预防,例如(急性和慢性)充血性心脏衰竭、左心功能不全,包括心肌收缩障碍、肥厚性心肌病、糖尿病性心肌病和其它类型的有害的心脏功能障碍和重塑。

[0334] 可以采用本发明化合物治疗的其它疾病或病症包括:脓毒性休克、类风湿性关节炎、骨关节炎、增生性疾病如癌症、动脉粥样硬化、移植后同种异体移植排斥、中风、肥胖、再狭窄、糖尿病例如I型糖尿病(幼年型糖尿病)和II型糖尿病、腹泻疾病、局部缺血/再灌注损伤、视网膜病,例如糖尿病性视网膜病或高压氧-诱发的视网膜病以及特征在于眼内压升高或眼房水分泌的疾病,如青光眼。

[0335] 本发明化合物还可以用于治疗内脏疾病、炎性肠病、炎性肠紊乱、膀胱炎,例如用于治疗间质性膀胱炎和尿失禁,包括膀胱逼尿肌反射亢进和膀胱超敏反应。

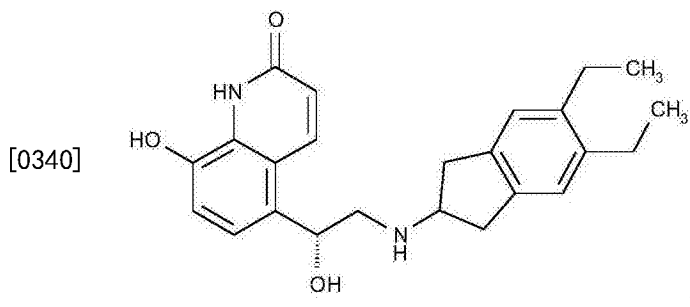
[0336] 本发明成分在抑制炎性疾病(例如炎性呼吸道疾病)中的有效性可以在呼吸道炎症或其它炎性疾病的动物模型(例如小鼠或大鼠)中证明,例如描述于Szarka等, *J. Immunol. Methods* (1997) 202:49-57; Renzi等, *Am. Rev. Respir. Dis.* (1993) 148:932-939; Tsuyuki等, *J. Clin. Invest.* (1995) 96:2924-2931; 和Cernadas等(1999) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20:1-8。

[0337] 本发明化合物也可以用作联合治疗药物与其它药物组合使用,例如抗炎药、支气管扩张药或抗组胺药,特别是用于治疗阻塞性或炎性呼吸道疾病,例如那些上文中所述疾病,例如作为此类药物的治疗活性的增效剂,或者作为减少此类药物的必需剂量或潜在副作用的手段。本发明的成分可以与其它药物在固定的药用组合中混合,或者其可以与其它药物分别给药,在其它药物给药之前、同时或之后给药。因此,本发明包括上文中所述本发明的成分与抗炎药、支气管扩张药或抗组胺药的组合,所述本发明的成分和所述药物可以存在于相同和不同的药用组合中。

[0338] PI 3-激酶抑制剂与抗炎药的有益的组合是那些与下列药物的组合:趋化因子受体的拮抗剂,例如CCR-1、CCR-2、CCR-3、CCR-4、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CCR-8、CCR-9和CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5,特别是CCR-5拮抗剂,例如Schering-Plough拮抗剂SC-351125、SCH-55700和SCH-D; Takeda拮抗剂,例如N-[[4-[[[6,7-二氢-2-(4-甲基-苯基)-5H-苯并-环庚烯-8-基]羰基]氨基]苯基]-甲基]四氢-N,N-二甲基-2H-吡喃-4-氯化铵(TAK-770); 描述于下列中的CCR-5拮抗剂:USP6,166,037(特别是权利要求18和19)、WO 00/66558(特别是权利要求8)、WO 00/66559(特别是权利要求9)、WO 04/018425和WO 04/026873。

[0339] 适当的抗炎药物包括甾体类,特别是糖皮质激素类,例如布地奈德、倍氯米松二丙酸酯、丙酸氟替卡松、环索奈德或糠酸莫米松,或者描述于下列文献的甾体类:WO 02/88167、WO 02/12266、WO 02/100879、WO 02/00679(特别是实施例3、11、14、17、19、26、34、37、39、51、60、67、72、73、90、99和101)、WO 03/35668、WO 03/48181、WO 03/62259、WO 03/64445、WO 03/72592、WO 04/39827和WO 04/66920; 非甾体糖皮质激素受体激动剂,例如描述于下列文献的那些:DE 10261874、WO 00/00531、WO 02/10143、WO 03/82280、WO 03/82787、WO 03/86294、WO 03/104195、WO 03/101932、WO 04/05229、WO 04/18429、WO 04/

19935和WO 04/26248;LTD4拮抗剂,例如孟鲁司特和扎鲁司特;PDE4抑制剂,例如西洛司特(Ariflo<sup>®</sup> GlaxoSmithKline)、罗氟司特(Byk Gulden)、V-11294A(Napp)、BAY19-8004(Bayer)、SCH-351591(Schering-Plough)、阿罗茶碱(Almirall Prodesfarma)、PD189659/PD168787(Parke-Davis)、AWD-12-281(Asta Medica)、CDC-801(Celgene)、SelCID(TM) CC-10004(Celgene)、VM554/UM565(Vernalis)、T-440(Tanabe)、KW-4490(Kyowa Hakko Kogyo)和在下列文献中公开的那些:WO 92/19594、WO 93/19749、WO 93/19750、WO 93/19751、WO 98/18796、WO 99/16766、WO 01/13953、WO 03/104204、WO 03/104205、WO 03/39544、WO 04/000814、WO 04/000839、WO 04/005258、WO 04/018450、WO 04/018451、WO 04/018457、WO 04/018465、WO 04/018431、WO 04/018449、WO 04/018450、WO 04/018451、WO 04/018457、WO 04/018465、WO 04/019944、WO 04/019945、WO 04/045607和WO 04/037805;腺苷A2B受体拮抗剂,例如描述于WO 02/42298的那些; $\beta$ -2肾上腺受体激动剂,例如沙丁胺醇(舒喘灵)、奥西那林、特布他林、沙美特罗、非诺特罗、丙卡特罗,尤其是福莫特罗、卡莫特罗及其可药用的盐,以及WO 0075114的式(I)化合物(游离形式或盐形式或溶剂化物形式),这些文件引入本文作为参考,优选其实施例的化合物,特别是下式化合物:



[0341] 相应于茛达特罗及其可药用的盐,以及WO 04/16601的式(I)化合物(游离形式或盐形式或溶剂化物形式),还包括下列化合物:EP 1440966、JP 05025045、WO 93/18007、WO 99/64035、USP 2002/0055651、WO 01/42193、WO 01/83462、WO 02/66422、WO 02/70490、WO 02/76933、WO 03/24439、WO 03/42160、WO 03/42164、WO 03/72539、WO 03/91204、WO 03/99764、WO 04/16578、WO 04/22547、WO 04/32921、WO 04/33412、WO 04/37768、WO 04/37773、WO 04/37807、WO 04/39762、WO 04/39766、WO 04/45618、WO 04/46083、WO 04/80964、WO 04/108765和WO 04/108676。

[0342] 适当的支气管扩张药包括抗胆碱能或抗毒蕈碱药物,特别是异丙托溴铵、氧托溴铵、噻托溴铵和CHF 4226(Chiesi)以及格隆溴铵,还有那些描述于下列的药物:EP 424021、USP 3,714,357、USP 5,171,744、WO 01/04118、WO 02/00652、WO 02/51841、WO 02/53564、WO 03/00840、WO 03/33495、WO 03/53966、WO 03/87094、WO 04/018422和WO 04/05285。

[0343] 适当的双重抗炎和支气管扩张药包括双重 $\beta$ -2肾上腺素受体激动剂/毒蕈碱拮抗剂,例如在美国专利2004/0167167、WO 04/74246和WO 04/74812中公开的那些。

[0344] 适当的抗组胺药物包括西替利嗪盐酸盐、对乙酰氨基酚、富马酸氯马斯汀、异丙嗪、氯雷他定、地氯雷他定、苯海拉明和非索芬那定盐酸盐、阿伐斯汀、阿司咪唑、氮卓斯汀、依巴斯汀、依匹斯汀、咪唑斯汀和特非那定以及在JP 2004107299、WO 03/099807和WO 04/026841中公开的那些。

[0345] PI3激酶抑制剂,例如本发明的那些化合物,可以与血管紧张素受体阻滞剂例如缬

沙坦(一种血管紧张素受体阻滞剂)组合,这样较缬沙坦单独给药可以取得更好的治疗效果。组合给药方案也可以令人惊奇地降低心脏、肾脏和脑等终末器官损伤的进展速度。该组合能够增强降压药的疗效(无论是恶性、原发性、肾血管性、糖尿病性、单纯收缩期或其它继发类型的高血压)并且降低脉压差。该组合还可以有效地治疗室上性和室性心律失常、心房纤维性颤动,心房扑动或有害的血管重塑。还可以进一步表明,该组合对心肌梗塞及其后遗症的治疗和预防是有益的,可以用于治疗动脉粥样硬化、心绞痛(无论是稳定型或不稳定型的)、肾功能不全(糖尿病性和非糖尿病性)、外周血管疾病、认知功能障碍和中风。此外,采用该组合疗法对血管内皮功能的改善在其中正常内皮功能被破坏的疾病中提供了益处,如心脏衰竭、心绞痛和糖尿病。此外,该组合可用于治疗或预防原发性和继发性肺动脉高血压、肾衰竭疾病,如糖尿病性肾病、肾小球肾炎、硬皮病、肾小球硬化、原发性肾脏疾病的蛋白尿以及肾血管性高血压、糖尿病性视网膜病,还包括对其它血管疾病的处理,如偏头痛、外周血管疾病、雷诺氏病、腔增生、认知功能障碍(如阿尔茨海默病)、青光眼和中风。

[0346] 本发明的化合物还可以用于治疗由淋巴细胞相互作用介导的疾病或病症,例如在移植中的疾病,如细胞、组织或器官的同种-或异种移植物的急性或慢性排斥反应或者移植物功能恢复延迟、移植物抗宿主病;自身免疫性疾病例如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、桥本甲状腺炎、多发性硬化、重症肌无力、I型或II型糖尿病及其相关疾病、血管炎、恶性贫血、斯耶格伦综合征、葡萄膜炎、格雷夫斯眼病、斑秃等等;任选的与伴有异常反应的炎性疾病,例如炎性肠疾病、节段性回肠炎或溃疡性结肠炎、内源性哮喘、炎性肺损伤、炎性肝损伤、炎性肾小球损伤、动脉粥样硬化、骨关节炎和其它湿疹性皮炎、脂溢性皮炎;免疫介导的疾病的皮肤临床表现,炎性眼病、心肌炎或肝炎、肠道缺血、外伤性休克;癌症,例如乳腺癌、T细胞淋巴瘤或T细胞白血病;感染性疾病,例如中毒性休克(如超级抗原诱导的)、脓毒性休克、成人呼吸窘迫综合症;或病毒感染,例如艾滋病、病毒性肝炎、慢性细菌感染或老年性痴呆。细胞、组织或实体器官移植的示例包括例如胰岛、干细胞、骨髓、角膜组织、神经元组织、心脏、肺、心肺组合、肾、肝、肠、胰腺、气管或食管。

[0347] 本发明化合物可以与例如作为辅助剂的其它药物组合给药,所述其它药物例如免疫抑制或免疫调节剂或其它抗炎药物,例如用于同种-或异种移植物的急性或慢性排斥或者炎性或自身免疫性疾病。例如,式I化合物可以与下列药物组合使用:钙调磷酸酶抑制剂,例如环孢菌素A或FK 506;mTOR抑制剂,例如雷帕霉素、40-0-2-羟基乙基)-雷帕霉素、CCI779、ABT578、AP23573、biolimus-7或biolimus-9;具有免疫抑制特性的子囊霉素,例如ABT-281或ASM981;糖皮质激素;环磷酰胺;咪唑硫嘌呤(azathioprene);甲氨蝶呤;来氟米特;咪唑立宾;麦考酚酸或盐;霉酚酸酯;15-脱氧精肌菌素(deoxyspergualine)或其免疫抑制同系物、类似物或衍生物;PKC抑制剂,例如描述于WO 02/38561或WO 03/82859中的那些,例如实施例56或70的化合物;JAK3激酶抑制剂,例如N-苄基-3,4-二羟基-亚苄基-氰基乙酰胺-氰基-(3,4-二羟基)-N-苄基肉桂酰胺(Tyrphostin AG 490)、灵菌红素(prodigiosin) 25-C(PNU156804)、[4-(4'-羟基苯基)-氨基-6,7-二甲氧基喹唑啉](WHI-P131)、[4-(3'-溴-4'-羟基苯基)-氨基-6,7-二甲氧基喹唑啉](WHI-P154)、[4-(3',5'-二溴-4'-羟基苯基)-氨基-6,7-二甲氧基喹唑啉]WHI-P97、KRX-211、3-[(3R,4R)-4-甲基-3-[甲基-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-氨基]-哌啶-1-基]-3-氧代-丙腈,游离形式或可药用的盐形式,例如单-柠檬酸盐(也称为CP-690,550),或公开于WO 04/052359或WO 05/066156的化合物;

S1P受体激动剂或调节剂,例如任选磷酸化的FTY720或其类似物,例如任选磷酸化的2-氨基-2-[4-(3-苄基氧基苯硫基)-2-氯代苯基]乙基-1,3-丙二醇或1-{4-[1-(4-环己基-3-三氟甲基-苄基氧基亚氨基)-乙基]-2-乙基-苄基}-氮杂环丁烷-3-甲酸或其可药用的盐;免疫抑制单克隆抗体,例如下列白细胞受体的单克隆抗体:例如MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD40、CD45、CD52、CD58、CD80、CD86或它们的配体;其它免疫调节化合物,例如具有至少一部分CTLA4胞外域的重组体结合分子或其突变体,例如与非CTLA4蛋白序列结合的CTLA4的至少细胞外部分或其突变体,所述蛋白序列例如CTLA4Ig(例如指定的ATCC 68629)或其突变体,例如LEA29Y;粘附分子抑制剂,例如LFA-1拮抗剂、ICAM-1或-3拮抗剂、VCAM-4拮抗剂或VLA-4拮抗剂。

[0348] 本发明化合物也可以用于治疗内脏疾病、炎性肠病、炎性肠紊乱、膀胱炎,例如间质性膀胱炎和尿失禁,包括膀胱逼尿肌反射亢进和膀胱超敏反应。

[0349] 根据W02006/040318,本发明化合物还可以用于治疗贫血。

[0350] 本发明化合物可以通过适当的途径给药,例如口服途径,例如以片剂或胶囊的形式给药;肠胃外途径,例如以静脉内给药;通过吸入途径,例如治疗炎性或阻塞性呼吸道疾病;通过滴鼻途径,例如治疗过敏性鼻炎;局部应用于皮肤,例如治疗过敏性皮炎;或通过直肠途径,例如治疗炎性肠病。

[0351] 因此,另一方面,提供了在治疗中使用的本发明化合物。在另一个实施方案中,所述治疗选自通过PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型的激活而介导的疾病或病症。在另一个实施方案中,所述治疗选自可以通过抑制PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型而治疗的疾病。在另一个实施方案中,所述治疗选自可以通过选择性抑制PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型超过PI 3-激酶 $\delta$ 同工型而治疗的疾病。

[0352] 术语本发明化合物的“治疗有效量”是指能够激发个体的生物学或医学响应的本发明化合物的量,例如,降低或抑制酶或蛋白的活性,或者改善症状、缓解不适、阻碍或延缓疾病进展或者预防疾病等。在一个非限定性实施方案中,术语“治疗有效量”是指当给予个体时能够在下列方面发挥作用的本发明化合物的量:(i)至少部分缓解、抑制、防止和/或减轻(ii)由PI 3-激酶特别是其 $\gamma$ 同工型介导的,或(iii)与PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型活性相关的,或(iv)特征在于PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型活性(正常或异常)的不适或病症或疾病;或(2)减少或抑制PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型的活性。在另一个非限定性实施方案中,术语“治疗有效量”是指当给予细胞或组织或非细胞生物学材料或介质时能够有效地至少部分降低或抑制PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型活性的本发明化合物的量。

[0353] 本文中使用的术语“个体”是指动物。所述动物通常是指哺乳动物。个体也是指例如灵长类(例如人类,男性或女性)、牛、绵羊、山羊、马、犬、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼类、鸟类等。在某些实施方案中,个体为灵长类。在另一些实施方案中,个体为人类。

[0354] 本文中使用的术语“抑制”是指减轻或抑制指定的不适、症状或病症或疾病,或者能够显著降低生物学活性或过程的基线活性。

[0355] 在一个实施方案中,本文中使用的术语任何疾病或病症的“治疗”是指改善疾病或病症(即阻止或终止或缓解疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一个实施方案中,“治疗”是指减轻或改善至少一种机体参数,包括那些患者不能察觉的参数。在另一个实施方案中,“治疗”是指在身体方面(例如可察觉症状的稳定)、生理学方面(例如机体参数的稳定)或以上两方面调节疾病或病症。在另一个实施方案中,“治疗”是指预防或延迟疾病或病症

的发作或发展或进程。

[0356] 本文中使用的患者“需要”的治疗是指通过此类治疗该患者能够获得生物学、医学或生命质量方面的益处。

[0357] 除非本文中另有说明或者上下文中有明显的矛盾,本文中所描述的所有方法可以以任何适当的顺序进行。本文所提供的任何和所有实例或示例性语言(如“例如”)的使用仅旨在更好地阐明本发明,并非对其它要求保护的本发明的范围加以限定。

[0358] 本发明化合物可以用作药物,因此通常可以配制为药用组合物的形式。

[0359] 因此,另一方面,本发明提供了包含本发明化合物和可药用载体的药用组合物。

[0360] 本文中使用的术语“可药用的载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣材料、表面活性剂、抗氧剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物稳定剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、染料等及其组合,它们是本领域技术人员公知的(参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药用科学),第18版,Mack Printing Company,1990,第1289—1329页)。除了与活性成分不相容的任何常规载体外,其他均可以用于治疗或药用组合物中。

[0361] 此类药用组合物可以配制为用于特定给药途径的制剂,例如口服给药、胃肠外给药和直肠给药等。另外,本发明的药用组合物可以制成固体形式(包括但不限于胶囊、片剂、丸剂、颗粒剂、散剂或栓剂)或液体形式(包括但不限于溶液剂、混悬液剂或乳剂)。所述药用组合物可以采用常规制药工艺制备(例如灭菌)和/或可以含有常规惰性稀释剂、润滑剂或缓冲剂以及辅助剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂和缓冲剂等。

[0362] 通常,所述药用组合物为片剂或明胶胶囊,它含有活性成分以及:

[0363] a) 稀释剂,例如乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素和/或甘氨酸;

[0364] b) 润滑剂,例如二氧化硅、滑石粉、硬脂酸及其镁盐或钙盐和/或聚乙二醇;对于片剂而言,还可以含有:

[0365] c) 粘合剂,例如硅酸铝镁、淀粉糊、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮;如果需要,还可以含有:

[0366] d) 崩解剂,例如淀粉、琼脂、海藻酸或其钠盐或泡腾混合物;和/或

[0367] e) 吸收剂、着色剂、矫味剂和甜味剂。

[0368] 片剂可以根据本领域已知的方法进行薄膜包衣或肠溶包衣。

[0369] 用于口服给药的适当的组合物包括为下列形式的有效量的本发明化合物:片剂、锭剂、水性或油性混悬液、可分散粉剂或颗粒剂、乳剂、硬或软胶囊或糖浆或酞剂。用于口服的组合物可以根据本领域中已知的用于生产药用组合物的任何方法制备,此类组合物可以含有一或多种选自甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂的成分,从而可以提供美观和适口的药物制剂。片剂可以含有活性成分以及与之混合的适合于生产片剂的无毒的可药用赋形剂。这些赋形剂为:例如,惰性稀释剂,例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;颗粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉或藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂是未包衣的,或者根据已知技术包衣从而使其在胃肠道中延缓崩解和吸收,从而在较长的期间提供持久的作用。例如,可以采用延时材料,例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。用于口服的制剂可以为硬明胶胶囊剂,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合;或者可以为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油性



介质混合,例如花生油、液体石蜡或橄榄油。

[0370] 某些注射用组合物为等张水溶液或混悬液,栓剂最好制备自脂肪乳或混悬液。所述组合物可以是无菌的和/或含有辅助剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶液促进剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂。另外,它们也可以含有其它具有治疗价值的物质。所述组合物可以分别根据常规混合、制粒或包衣方法制备,含有约0.1—75%或含有约1—50%的活性成分。

[0371] 透皮应用的适当的组合物包含有效量的本发明化合物以及适当的载体。适合于透皮传递的载体包括可吸收的、药理学上可接受的溶剂从而有助于通过宿主的皮肤。例如,透皮装置为绷带形式,它包括被模、含有化合物以及任选的载体的储库、任选的能够以受控和预定的速度在持续较长的时间内将化合物传递通过宿主皮肤的控速屏障以及将该装置固定在皮肤上的工具。

[0372] 局部应用(例如皮肤和眼睛应用)的适当的组合物包括水溶液、混悬液、软膏、霜剂、凝胶剂或通过例如气雾剂传递的喷雾制剂等。此类局部传递系统特别适合于皮肤应用,例如用于治疗皮肤癌,例如在防晒霜、洗剂、喷雾剂等中的预防性应用。因此,它们特别适合于局部使用,包括本领域中众所周知的化妆品、制剂。此类制剂可以含有增溶剂、稳定剂、张力增加剂、缓冲剂和防腐剂。

[0373] 本文中所述的局部应用还应当包括吸入剂或鼻腔内施用。它们可以便利地以下列形式传递:干粉吸入器中的干粉(单独应用,作为混合物,例如与乳糖的干混合物,或者混合成分颗粒,例如与磷脂的混合颗粒);或者压力容器、泵、喷雾器或雾化器中的气溶胶喷雾剂,它可以使用或者不使用适当的抛射剂。

[0374] 当可吸入形式的活性成分为气雾剂组合物时,吸入装置可以是喷雾瓶,配备与计量的组合物的剂量(例如10—100 $\mu$ l,例如25—50 $\mu$ l)相适应的阀,即被称为定量吸入器的装置。适当的此类气雾瓶和在压力下向其中装载气雾剂组合物的工艺是吸入疗法领域中技术人员众所周知的。例如,气雾剂组合物可以通过涂层罐(coated can)给药,如EP-A-0642992所述。当可吸入形式的活性成分为可喷雾的水、有机或水/有机分散液时,吸入装置可以是已知的雾化器,例如空气喷射雾化器或超声雾化器,其可以包含例如1—50ml(通常为1—10ml)的分散液;或便携式雾化器,有时也称为软雾吸入器或软雾化吸入器,例如电子控制装置,例如AERx(Aradigm,US)或Aerodose(Aerogen);或机械装置,例如RESPIMAT(Boehringer Ingelheim)雾化器,其可以使用较常规雾化器小得多的雾化体积,例如10—100 $\mu$ l。当可吸入形式的活性成分为微粉化微粒形式时,吸入装置可以是例如干粉吸入装置,其适合于自包含(A)和/或(B)的剂量单位的胶囊或水泡眼传递干粉;或者可以是多剂量干粉吸入(MDPI)装置,其适合于传递例如3—25mg的干粉,其每次驱动包含(A)和/或(B)的剂量单位。干粉组合物优选含有稀释剂或载体(例如乳糖)和有助于保护化合物免于由于水分导致的化合物性能变差(例如硬脂酸镁)。适当的此类干粉吸入装置包括公开于下列文献的装置:US 3991761(包括AEROLIZER™装置)、WO 05/113042、WO 97/20589(包括CERTIHALER™装置)、WO 97/30743(包括TWISTHALER™装置)和WO 05/37353(包括GYROHALER™装置)。

[0375] 因此,本发明还包括(A)可吸入形式的本发明的成分或其可药用的盐或溶剂化物;(B)可吸入药物,其包含可吸入形式的本发明化合物以及可吸入形式的可药用的载体;(C)

药用产品,其包含可吸入形式的此类化合物以及与之组合的吸入装置;和(D)包含可吸入形式的此类化合物的吸入装置。

[0376] 在实施本发明中使用的本发明化合物的剂量当然可以根据例如待治疗的具体疾病、期望的疗效和给药的模式而改变。一般而言,通过吸入给药的适当的日剂量为0.0001—30mg/kg,通常为每个患者0.01—10mg,口服给药的适当的日剂量为0.01—100mg/kg。

[0377] 本发明还提供了包含作为活性成分的本发明化合物的无水药用组合物和剂型,因为水可能会促进某些化合物的降解。

[0378] 本发明的无水药用组合物和剂型可以在低水分或低湿度条件下采用无水材料或低水分材料制备。无水药用组合物可以以保持其无水特性的方式制备和储存。因此,无水组合物可以采用已知的能够防止暴露于水的材料包装,它们可以包含在适当的规定的套盒中。适当的包装的示例包括但不限于密封的铝箔、塑料、单位剂量容器(如安瓿)、泡罩包装和条带包装(strip packs)。

[0379] 本发明还提供了药用组合物和剂型,其含有能够降低作为活性成分的本发明化合物的降解速度的一或多种成分。在本文中称为“稳定剂”的此类成分包括但不限于抗氧剂(例如抗坏血酸)、pH缓冲剂或盐缓冲剂等。

[0380] 本发明化合物可以与一或多种其它治疗药物同时给药或者在其给药之前或之后给药。本发明化合物与其它药物可以通过相同或不同的给药途径分别给药,或者在同一药用组合物中一起给药。

[0381] 另一方面,本发明提供了组合产品,它包含本发明化合物和至少一种其它治疗药物,例如在治疗中可以同时、分别或按顺序使用。在一个实施方案中,所述治疗为对通过PI 3-激酶特别是 $\gamma$ 同工型的激活而介导的疾病或病症的治疗。作为组合产品提供的产品包括在同一药用组合物中包含本发明化合物和其它治疗药物的组合物,或者本发明化合物和其它治疗药物为单独分开形式,例如套盒形式。

[0382] 在一个实施方案中,本发明提供了药用组合产品,其包含本发明化合物和另一种治疗药物。任选所述药用组合物可以含有上述可药用的赋形剂。

[0383] 在一个实施方案中,本发明提供了套盒,它包含两种或多种不同的药用组合物,其中至少一种含有本发明化合物。在一个实施方案中,所述套盒包括分别盛放所述组合物的工具,例如容器、分开的瓶子或分开的铝箔袋。此类套盒的一个示例为泡罩包装,通常用于包装片剂、胶囊等。

[0384] 所述套盒可以用于给予不同的剂型,例如口服和胃肠外剂型,用于以不同的剂量间隔给予不同的组合物,或者用于彼此独立的不同组合物的间隔给药(titrating the separate compositions against one another)。为了顺应性的需要,本发明的套盒通常包含给药说明书。

[0385] 本发明的药用组合物或组合产品可以是单位剂量,对于约50—70kg的个体而言,其单位剂量为约1—1000mg的活性成分,或约1—500mg或约1—250mg或约1—150mg或约0.5—100mg或约1—50mg的活性成分。本发明化合物、药用组合物或其组合产品的治疗有效量取决于个体的种属、体重、年龄和个体状况、待治疗的病症或疾病或其严重程度。普通医师、临床医师或兽医师可以容易地确定预防、治疗或抑制病症或疾病进展所必需的每个活性成分的有效量。

[0386] 上述剂量特性可以采用合适的哺乳动物通过体外和体内试验进行证明,所述动物例如小鼠、大鼠、犬、猴或离体器官、组织及其制品。本发明化合物在体外可以以溶液的形式应用,例如水溶液;在体内可以以例如混悬液或水溶液的形式在肠内、胃肠外、静脉内应用。体外剂量的范围在约 $10^{-3}$ 摩尔浓度至 $10^{-9}$ 摩尔浓度之间。体内治疗有效量取决于给药途径,在约0.1—500mg/kg或约1—100mg/kg的范围内。

[0387] PI 3-激酶拮抗剂(例如本发明化合物)还可以用作组合治疗药物,用于与第二种活性成分组合使用,所述活性成分例如有机硝酸盐和NO-供体,例如硝普钠、硝酸甘油、单硝酸异山梨醇酯、二硝酸异山梨醇酯、吗多明或SIN-1以及可吸入NO;能够抑制环磷酸鸟苷(cGMP)和/或环磷酸腺苷(cAMP)降解的化合物,例如磷酸二酯酶(PDE)1、2、3、4和/或5的抑制剂,尤其是PDE 5抑制剂,例如西地那非、伐地那非和他达拉非;鸟苷酸环化酶的NO-非依赖性、血红素-依赖性兴奋剂,例如特别是在WO 00/06568、WO 00/06569、WO 02/42301和WO 03/095451描述的化合物;鸟苷酸环化酶的NO-和血红素-非依赖性活化剂,例如特别是在WO 01/19355、WO 01/19776、WO 01/19778、WO 01/19780、WO 02/070462和WO 02/070510中描述的化合物;能够抑制人嗜中性弹性蛋白酶的化合物,例如西维来司或DX-890(ReItran);能够抑制信号转导级联的化合物,例如酪氨酸激酶和/或丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂,特别是伊马替尼、吉非替尼、厄洛替尼、索拉非尼和舒尼替尼;能够影响心脏能量代谢的化合物,例如并优选选自乙莫克舍、二氯乙酸酯、雷诺嗪或曲美他嗪;抗血栓形成剂,例如并优选选自血小板聚集抑制剂、抗凝血剂或纤溶酶物质;用于降低血压的活性物质,例如并优选选自钙拮抗剂、血管紧张素II拮抗剂、ACE抑制剂、内皮素拮抗剂、肾素抑制剂、醛固酮合酶抑制剂、 $\alpha$ -受体阻滞剂、 $\beta$ -受体阻滞剂、盐皮质激素受体拮抗剂、Rho-激酶活性物质和利尿剂;和/或能够改善脂质代谢的活性物质,例如并优选选自甲状腺受体激动剂、胆固醇合成抑制剂,例如并优选HMG-CoA还原酶抑制剂或角鲨烯合成抑制剂、ACAT抑制剂、CETP抑制剂、MTP抑制剂、PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 和/或PPAR- $\delta$ 激动剂、胆固醇吸收抑制剂、脂肪酶抑制剂、聚合胆汁酸吸附剂、胆汁酸再吸收抑制剂和脂蛋白(a)拮抗剂,尤其是在PAH或例如上文中所述的疾病和病症的治疗中,例如作为此类药物的治疗活性的增效剂,或者作为降低此类药物的需要剂量或潜在副作用的手段。

[0388] 在一个具体的实施方案中,提供了药用组合产品,其包含本发明化合物和第二种药物,其中第二个药物为PDE 5抑制剂或中性内肽酶抑制剂。

[0389] 本发明化合物可以与第二种药物在固定的药用组合中混合,或者其可以与其它药物分别给药,或者在其它药物给药之前、同时或之后给药。

[0390] 具体地讲,本发明另一方面包括PI 3-激酶抑制剂(例如本发明化合物)与下列药物的组合:渗透剂(高渗盐水、葡聚糖、甘露醇、木糖醇)、EnaC阻滞剂、抗炎药、支气管扩张药、抗组胺药、镇咳药、抗生素和/或DNase药物,其中TPH1拮抗剂和其它药物可以在相同或不同的药物组合中。

[0391] 适当的抗生素包括大环内脂类抗生素,例如妥布霉素(TOBI™)。

[0392] 适当的Dnase药物包括链道酶 $\alpha$ (dornase alfa)(Pulmozyme™)、高纯化的重组人脱氧核糖核酸酶I(rhDNase)溶液,其能够选择性裂解DNA。链道酶 $\alpha$ 可以用于治疗囊性纤维化。

[0393] 因此,本发明另一方面包括PI 3-激酶抑制剂(例如本发明化合物)与第二种药物的组合,所述第二种药物为IP受体激动剂,特别是WO 2012/007539公开的化合物。

[0394] 因此,本发明另一方面包括PI 3-激酶抑制剂(例如本发明化合物)与第二种药物的组合,所述第二种药物为多-激酶抑制剂,例如甲磺酸伊马替尼(Gleevec)。伊马替尼的功能是多种酪氨酸激酶的特异性抑制剂。其可以占据TK活性位点,导致活性的降低。机体中的TK酶包括胰岛素受体。伊马替尼对Abelson原癌基因、c-kit和PDGF-R(血小板源生长因子受体)的TK域具有特异性。

[0395] 在一个具体的实施方案中,提供了包含本发明化合物和第二种活性成分的药用组合产品,所述第二种活性成分选自磷酸二酯酶V抑制剂、中性内肽酶1抑制剂、ALK-5抑制剂、rho-激酶抑制剂、TPH1抑制剂、多-激酶抑制剂、内皮素拮抗剂、利尿剂、醛固酮受体阻断剂和内皮素受体阻断剂。

[0396] 在另一个实施方案中,提供了包含本发明化合物和第二种活性成分的药用组合产品,所述第二种活性成分选自磷酸二酯酶V抑制剂、中性内肽酶1抑制剂、ALK-5抑制剂、rho-激酶抑制剂、TPH1抑制剂、多-激酶抑制剂。

[0397] 已经发现,其中R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>均为H的实施方案1-13中任一项的化合物是本发明化合物的代谢物。

[0398] 实验

[0399] 通过下列实施例化合物阐述了本发明化合物。

[0400] 综上所述,应当理解,尽管本发明的具体实施方案在本文中为了说明的目的已经进行了描述,但是可以在不背离本发明的精神和范围内进行各种修改。因此,除了随附的权利要求之外本发明不受其他任何限制。

[0401] 通用条件:

[0402] 质谱在LCMS系统上进行,采用电喷雾离子化。它们是Agilent 1100HPLC/Micromass Platform质谱仪组合或者Waters Acquity UPLC与SQD质谱仪。[M+H]<sup>+</sup>是指单-同位素分子量。NMR谱在Bruker AVANCE 400MHz或500MHz NMR光谱仪上进行,采用ICON-NMR。光谱于298K测定,采用溶剂峰作为参比。

[0403] 本领域技术人员应当理解,当其中R<sup>1</sup>=甲基的实施方案1-36中任一项的化合物在氘化的DMSO中运行<sup>1</sup>H NMR时,由于DMSO溶剂峰位于 $\delta$ 2.5ppm附近,所述甲基质子的信号通常被遮蔽。

[0404] 下列实施例旨在阐述本发明,不应当视为是对其的限定。给出的温度均为摄氏度。如果没有另外说明,所有的蒸发均在减压下进行,优选在约15mm Hg至30mm Hg之间(=20-133mbar)。终产物、中间体和原料的结构通过标准分析方法确证,例如微量分析和光谱特征分析,例如MS、IR、NMR。使用的缩写为本领域中的常规缩写。如果没有定义,术语具有其公认的意义。

[0405] 缩写:

[0406] AcOH                      乙酸

[0407] aq.                            水

[0408] br                                宽峰

[0409] BuOH                            丁醇

[0410] conc.                            浓的

[0411] d                                双峰

[0412]	DCM	二氯甲烷
[0413]	DCC	N,N'-二环己基碳二亚胺
[0414]	DCE	1,2-二氯乙烷
[0415]	DEAD	偶氮二甲酸二乙酯
[0416]	DIPEA	二异丙基乙基胺
[0417]	DMA	二甲基乙酰胺
[0418]	DME	1,2-二甲氧基乙烷
[0419]	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
[0420]	DMSO	二甲基亚砷
[0421]	Et <sub>2</sub> O	乙醚
[0422]	EtOAc	乙酸乙酯
[0423]	EtOH	乙醇
[0424]	h	小时
[0425]	HATU	O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脒鎓六氟磷酸盐
[0426]	HOBT.H <sub>2</sub> O	1-羟基苯并三唑水合物
[0427]	HPLC	高效液相色谱
[0428]	KOAc	乙酸钾
[0429]	KOtBu	叔丁醇钾
[0430]	LCMS	液相色谱和质谱
[0431]	MeOH	甲醇
[0432]	MeCN	乙腈
[0433]	MS	质谱
[0434]	m	多重峰
[0435]	min	分钟
[0436]	ml	毫升
[0437]	m/z	质荷比
[0438]	NBS	N-溴代琥珀酰亚胺
[0439]	NMR	核磁共振
[0440]	PdCl <sub>2</sub> (dppf).CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 加合物	[1,1-二(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)二氯甲烷加合物
[0441]	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	二(三苯膦)二氯化钯(II)
[0442]	ppm	百万分之
[0443]	PS	聚合物负载的
[0444]	Rt	保留时间
[0445]	RT	室温
[0446]	s	单峰
[0447]	sat.	饱和的
[0448]	SCX-2	强阳离子交换(例如 <b>Isolute®</b> SCX-2柱,Biotage)
[0449]	t	三重峰
[0450]	TBME	甲基-叔-丁基醚

[0451]	TEA	三乙胺
[0452]	TFA	三氟乙酸
[0453]	THF	四氢呋喃
[0454]	TLC	薄层色谱

[0455] 参考下列实施例,优选的实施方案的化合物可以采用本文中所述方法或者本领域中公知的其它方法合成。

[0456] 如果适当的话,优选实施方案的各种原料、中间体和化合物可以采用常规技术分离和纯化,例如沉淀、过滤、结晶、蒸发、蒸馏和色谱技术。除非另有规定,所有的原料均可以获自商业供应商,无需进一步纯化即可使用。盐可以通过已知的成盐方法制备自化合物。

[0457] 应当理解,优选实施方案的有机化合物可能具有互变异构现象。当本说明书中的化学结构仅代表可能的互变异构形式之一时,应当理解,优选的实施方案应当涵盖所描绘的结构的所有互变异构形式。

[0458] 当使用微波加热时,其可以采用Biotage Initiator Sixty微波器在专用反应瓶中以指定的温度和时间进行。

[0459] 如果没有另外说明,分析LCMS条件如下:

[0460] 方法A

[0461] 柱:Cynergi 2.5uMMax-RP100A (20×4.0) mm.

[0462] 流动相:A:水+0.1%甲酸B:乙腈

[0463] 梯度洗脱:0.0—0.5min 20%B,2.5—4.5mins 95%B,5.0min 20%B

[0464] 方法2minLC\_v003

[0465] 柱:Waters BEH C18 50×2.1mm,1.7μm

[0466] 柱温:50℃

[0467] 洗脱液:A:H<sub>2</sub>O,B:乙腈,两者均含有0.1%TFA

[0468] 流速:0.8ml/min

[0469] 梯度洗脱:0.20min 5%B;5%—95%B 1.30min,0.25min 95%B

[0470] 方法2minLowpH

[0471] 柱:Waters Acquity CSH 1.7μm,2.1×50mm

[0472] 温度:50℃

[0473] 流动相:A:水+0.1%甲酸,B:乙腈+0.1%甲酸

[0474] 流速:1.0mL/min

[0475] 梯度洗脱:0.0min 5%B,0.2—1.3min 5—98%B,1.3—1.55min 98%B,1.55—1.6min 98—5%B

[0476] 方法2minLowpHv01

[0477] 柱:Waters Acquity CSH 1.7μm,2.1×50mm

[0478] 温度:50℃

[0479] 流动相:A:水+0.1%甲酸,B:乙腈+0.1%甲酸

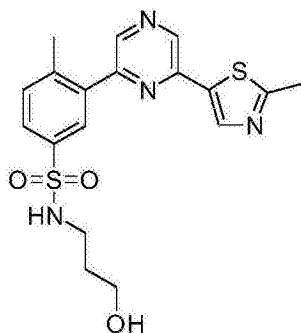
[0480] 流速:1.0mL/min

[0481] 梯度洗脱:0.0min 5%B,0.2—1.55min 5—98%B,1.55—1.75min 98%B,1.75—1.8min 98—5%B

- [0482] 方法2minLowpHv02  
 [0483] 柱:Acquity CSH C18 50×2.1mm  
 [0484] 温度:50℃  
 [0485] 洗脱液:A:水,B:乙腈,两者均含有+0.1%TFA  
 [0486] 流速:1.0mL/min  
 [0487] 梯度洗脱:0.0min 5%B,0.2—1.55min 5—98%B,1.55—1.75min 98%B,1.75—1.8min 98—5%B  
 [0488] 方法10minLowpH  
 [0489] 柱:Waters Acquity CSH 1.7μm,2.1×100mm  
 [0490] 温度:50℃  
 [0491] 流动相:A:水+0.1%甲酸,B:乙腈+0.1%甲酸  
 [0492] 流速:0.7mL/min  
 [0493] 梯度洗脱:0.0min 2%B,0.5—8.0min 2—98%B,8.0—9.0min 98%B,9.0—9.1min 98—2%B  
 [0494] 方法10minHighpH  
 [0495] 柱:Waters Acquity CSH 1.7μm,2.1×100mm  
 [0496] 温度:50℃  
 [0497] 流动相:A:水+0.1%氨,B:乙腈+0.1%氨  
 [0498] 流速:0.7mL/min  
 [0499] 梯度洗脱:0.0min 2%B,0.5—8.0min 2—98%B,8.0—9.0min 98%B,9.0—9.1min 98—2%B  
 [0500] 除非另有说明,分析的反相制备性HPLC条件如下:  
 [0501] 方法10—35%梯度洗脱lowpH  
 [0502] 柱:Waters Sunfire C18,150×30mm,5mic  
 [0503] 流动相:A=0.1%的TFA水溶液,B=0.1%的TFA的MeCN溶液  
 [0504] 梯度洗脱:0.0—0.5min 10%B 30mL/min,0.5—1.0min 10%B 30—50mL/min,1.0—7.25min 10—35%B,7.25—7.3min 35—98%B,7.3—8.3min 98%B,8.3—8.5min 98—100%B 50mL/min

[0505] 实施例1

[0506] N-(3-羟基-丙基)-4-甲基-3-[6-(2-甲基-噻唑-5-基)-吡嗪-2-基]-苯磺酰胺.



[0508] 向2—5ml微波瓶中加入2-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)噻唑(116mg,0.517mmol)、2-溴-6-氯代吡嗪(100mg,0.517mmol)、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.775ml,

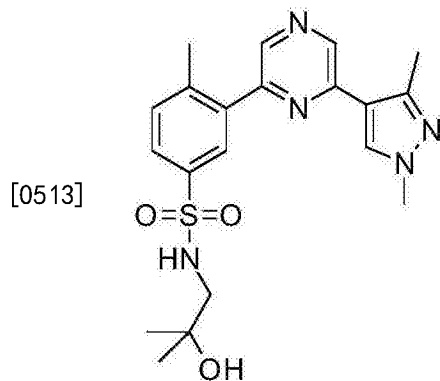
1.551mmol, 2M) 和PdCl<sub>2</sub> (dppf) .CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物 (21mg, 0.026mmol) 的DME (3ml) 溶液, 获得橙色混悬液。将反应物在biotage initiator微波器中于120℃加热60mins。向反应物中加入N-(3-羟基丙基)-4-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 苯磺酰胺 (中间体B1) (184mg, 0.517mmol) 和PdCl<sub>2</sub> (dppf) .CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物 (21mg, 0.026mmol) 。将反应物在微波器中于120℃加热60mins。将反应物萃取到乙酸乙酯中, 用水、盐水洗涤, 经硫酸镁干燥, 过滤, 减压除去溶剂。将粗品产物上样于硅胶上, 通过采用Teledyne ISCO combiflash Rf的快速柱色谱纯化, 采用TBME:MeOH (0-20%) 在12g硅胶短柱上洗脱。合并需要的组分, 减压除去溶剂得到棕色油状物, 将其于40℃减压干燥2小时。产物分离为棕色固体。

[0509] LCMS:Rt 0.86mins;MS m/z 405.2 [M+H]<sup>+</sup>;方法LowpH\_v002.

[0510] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) δ (ppm) 9.30 (1H, s), 8.78 (1H, s), 8.57 (1H, s), 7.91 (1H, d), 7.82-7.79 (1H, dd), 7.63-7.61 (1H, d), 7.57-7.54 (1H, m), 4.42-4.40 (1H, m), 3.40-3.35 (2H, m), 2.85-2.80 (2H, m), 2.72 (3H, s), 2.49 (3H, s), 1.57-1.51 (2H, m)。

[0511] 实施例2

[0512] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(2-羟基-2-甲基-丙基)-4-甲基-苯磺酰胺



[0514] 向0.5-2ml微波瓶中加入N-(2-羟基-2-甲基丙基)-4-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基) 苯磺酰胺 (中间体B2) (150mg, 0.406mmol)、2-氯代-6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基) 吡嗪 (中间体C1) (85mg, 0.406mmol)、PdCl<sub>2</sub> (dppf) .CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物 (16.59mg, 0.020mmol)、2M aq.Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.609ml, 1.219mmol) 的DME (1.3ml) 溶液。将反应物在biotage initiator微波反应器 (固定的维持时间, 每次搅拌30s, 高吸收) 中于120℃加热45mins。将反应物与水 (10ml) 合并, 萃取到EtOAc (10ml) 中。然后将有机萃取物用盐水 (15ml) 洗涤, 然后经硫酸镁干燥, 真空浓缩。反应物通过采用Teledyne ISCO combiflash Rf的快速柱色谱纯化, 采用己烷/EtOAc (0-100%) 在12g硅胶短柱上洗脱15mins。合并需要的组分, 真空浓缩, 然后在真空干燥箱中于40℃干燥3小时, 获得产物。

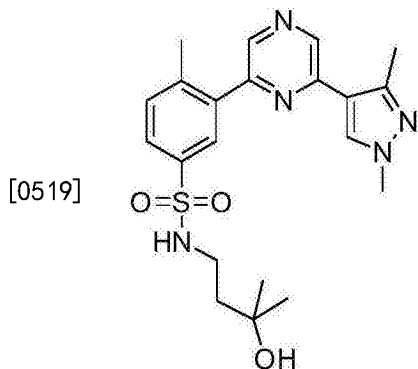
[0515] LCMS:Rt 0.94mins;MS m/z 416.4 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpHv01

[0516] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d6-DMSO) δ (ppm) 8.90 (1H, s), 8.63 (1H, s), 8.41 (1H, s), 7.94 (1H, d), 7.79 (1H, dd), 7.59 (1H, d), 7.51 (1H, br), 4.42 (1H, br), 3.84 (3H, s), 2.63 (2H, br), 2.49 (3H, s), 2.46 (3H, s), 1.05 (6H, s)。

[0517] 实施例3

[0518] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-苯磺酰胺





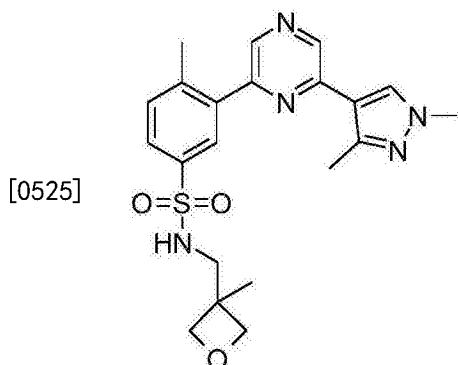
[0520] 目标化合物在类似于实施例2的条件下制备自N-(3-羟基-3-甲基丁基)-4-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯磺酰胺(中间体B3)和2-氯代-6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪(中间体C1)。

[0521] LCMS:Rt 0.96mins;MS m/z 430.4 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpHv01

[0522] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d6-DMSO) δ 8.91 (1H, s), 8.63 (1H, s), 8.41 (1H, s), 7.92 (1H, d), 7.80 (1H, dd), 7.62 (1H, d), 7.47 (1H, t), 4.28 (1H, s), 3.84 (3H, s), 2.85 (2H, m), 2.47 (3H, s), 1.51 (2H, m), 1.02 (6H, s), 一个甲基被DMSO溶剂峰掩蔽。

[0523] 实施例4

[0524] 反式3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-4-甲基-N-(3-甲基-氧杂环丁烷-3-基甲基)-苯磺酰胺



[0526] 目标化合物在类似于实施例2条件下制备自4-甲基-N-(3-甲基-氧杂环丁烷-3-基甲基)-3-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷-2-基)-苯磺酰胺(中间体B4)和2-氯代-6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪(中间体C1)。

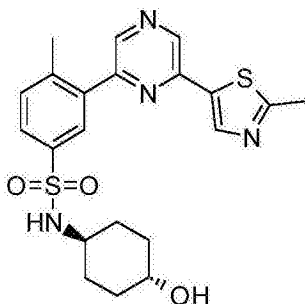
[0527] LCMS:Rt 0.96mins;MS m/z 428.2 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpHv01

[0528] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.79 (1H, s), 8.55 (1H, s), 8.04 (1H, s), 7.95 (1H, s), 7.88 (1H, dd), 7.53 (1H, d), 4.73 (1H, br t), 4.39 (4H, m), 3.95 (3H, s), 3.21 (2H, d), 2.61 (3H, s), 2.55 (3H, s), 1.29 (3H, s)。

[0529] 实施例5

[0530] 反式N-(4-羟基环己基)-4-甲基-3-(6-(2-甲基噁唑-5-基)吡嗪-2-基)苯磺酰胺

[0531]



[0532] 向反式3-(6-氯代吡嗪-2-基)-N-(4-羟基环己基)-4-甲基苯磺酰胺(中间体D2)(150mg,0.393mmol)的溶液中加入2-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)噻唑(97mg,0.432mmol)、二(三苯膦)氯化钯(II)(13.79mg,0.020mmol)和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (aq.2.0M)(589 $\mu\text{L}$ ,1.178mmol)。将反应物于微波反应器中于150 $^\circ\text{C}$ 加热30分钟。向反应物中加入饱和的碳酸钠水溶液(50ml),将产物萃取到EtOAc(2 $\times$ 50ml)中。有机相用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,真空浓缩。粗品产物通过ISCO combiflash色谱纯化,在12g硅胶柱上采用改良的0-10%梯度洗脱(DCM-2M  $\text{NH}_3$ 的MeOH溶液),采用DCM上样。将获得的澄清油状物在TBME(5ml)超声处理,用软膏刀刮直到细微的白色沉淀物形成,然后将混合物静置。通过过滤收集获得的固体,用少量的TBME洗涤,干燥。

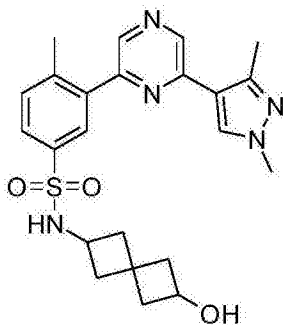
[0533] LCMS:Rt 0.89mins;MS m/z 445.3 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpH

[0534]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,DMSO- $d_6$ ) $\delta$ 9.29(1H,s),8.77(1H,s),7.56(1H,s),7.95(1H,s),7.83(1H,d),7.66(1H,br s),7.60(1H,d),4.55(1H,d),3.36-3.26(1H,m),3.01-2.90(1H,m),2.72(3H,s),2.49(3H,s),1.77-1.60(4H,m),1.27-1.03(4H,m)。

[0535] 实施例6

[0536] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(6-羟基-螺[3.3]庚-2-基)-4-甲基-苯磺酰胺

[0537]



[0538] 将搅拌的3-溴-N-(6-羟基螺[3.3]庚-2-基)-4-甲基苯磺酰胺(中间体A6)(200mg,0.555mmol)、K<sub>2</sub>OAc(82mg,0.833mmol)、PdCl<sub>2</sub>(dppf) $\cdot$ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(22.67mg,0.028mmol)和双联频哪醇基二硼(155mg,0.611mmol)的DME(2776 $\mu\text{L}$ )溶液在氮气环境下于90 $^\circ\text{C}$ 加热18h。加入2-氯代-6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)吡嗪(中间体C1)(116mg,0.555mmol)、2M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 水溶液(833 $\mu\text{L}$ ,1.665mmol)和PdCl<sub>2</sub>(dppf) $\cdot$ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(22.67mg,0.028mmol),将反应物在微波反应器中于120 $^\circ\text{C}$ 加热45mins。向反应物中加入水(80ml),将产物萃取到EtOAc(2 $\times$ 70ml)。有机相用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,聚合物负载的三甲基硫醇清除Pd。将该混合物偶尔涡旋1小时。过滤移出固体,用EtOAc洗涤,真空浓缩。粗品产物通过ISCO combiflash色谱纯化,在12g硅胶柱上采用0-10%(2M  $\text{NH}_3$ 的MeOH溶液)的DCM溶液梯度洗脱,采用DCM

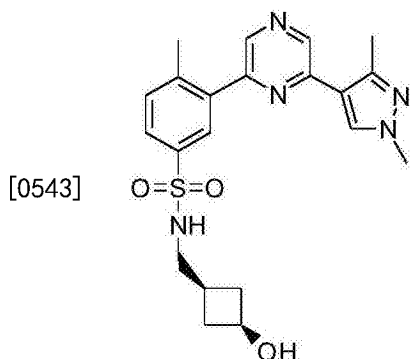
上样。获得固体产物。

[0539] LCMS:Rt 0.93mins;MS m/z 455.5 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpHv01

[0540] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d6-DMSO) δ 8.91 (1H, s), 8.62 (1H, s), 8.42 (1H, s), 7.88 (2H, m), 7.77 (1H, d), 7.58 (1H, d), 4.83 (1H, d), 3.84 (4H, m), 3.52 (1H, m), 2.47 (3H, s), 2.21 (1H, m), 2.02 (2H, m), 1.90 (1H, m), 1.71 (4H, m), 一个甲基被DMSO溶剂峰掩蔽。

[0541] 实施例7

[0542] 顺式3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-环丁基甲基)-4-甲基-苯磺酰胺



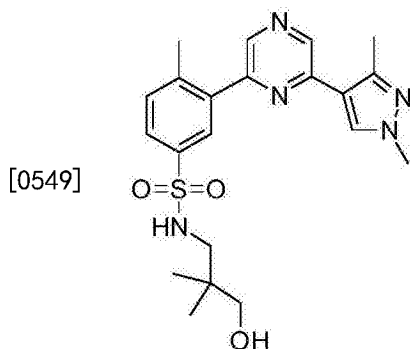
[0544] 目标化合物在类似于实施例6的条件下制备自顺式3-溴-N-(3-羟基-环丁基甲基)-4-甲基-苯磺酰胺(中间体A7)和2-氯代-6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪(中间体C1)。

[0545] LCMS:Rt 1.01mins m/z 430.3 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpHv01

[0546] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d6-DMSO) δ 8.91 (1H, s), 8.63 (1H, s), 8.42 (1H, s), 7.91 (1H, d), 7.78 (1H, dd), 7.59 (2H, m), 4.90 (1H, d), 3.84 (3H, s), (3.84 (1H, m (presumed to be under 3H peak))), 2.76 (2H, t), 2.47 (3H, s), 2.17 (2H, m), 1.75 (1H, m), 1.41 (2H, m), 一个甲基被DMSO溶剂峰掩蔽。

[0547] 实施例8

[0548] 3-[6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-2,2-二甲基-丙基)-4-甲基-苯磺酰胺



[0550] 目标化合物在类似于实施例6的条件下制备自3-溴-N-(3-羟基-2,2-二甲基-丙基)-4-甲基-苯磺酰胺(中间体A8)和2-氯代-6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基)-吡嗪(中间体C1)。

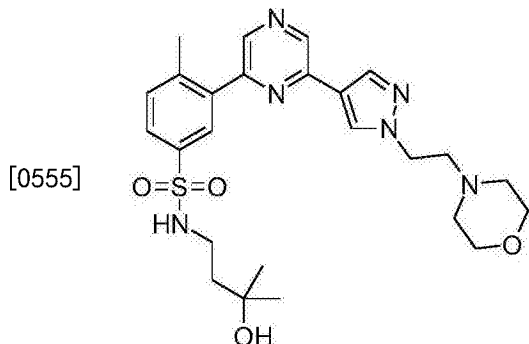
[0551] LCMS:Rt 0.99mins m/z 430.4 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpHv01

[0552] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d6-DMSO) δ 8.91 (1H, s), 8.63 (1H, s), 8.42 (1H, s), 7.93 (1H, d),

7.80 (1H, dd), 7.60 (1H, d), 7.41 (1H, t), 4.45 (1H, t), 3.84 (3H, s), 3.10 (2H, d), 2.59 (2H, d), 2.47 (3H, s), 0.77 (6H, s)。

[0553] 实施例9

[0554] N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-3-[6-[1-(2-吗啉-4-基-乙基)-1H-吡唑-4-基]-吡嗪-2-基]-苯磺酰胺



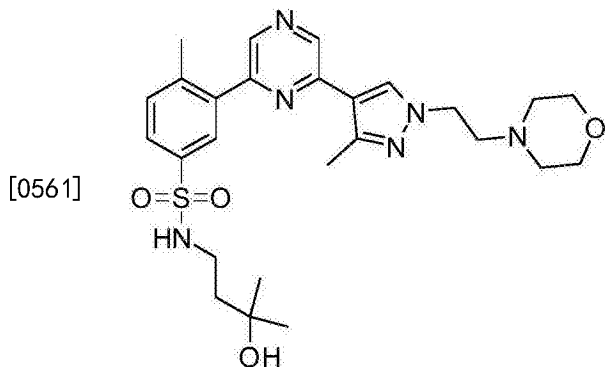
[0556] 目标化合物在类似于实施例5的条件下制备自3-(6-氯代-吡嗪-2-基)-N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-苯磺酰胺(中间体D1)和4-{2-[4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷-2-基)-吡唑-1-基]-乙基}-吗啉。

[0557] LCMS:Rt 0.63mins;MS m/z 515.4 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLC\_v003.

[0558] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ8.79 (1H, s), 8.55 (1H, s), 8.18 (1H, br s), 8.10 (1H, s), 8.05 (1H, d), 7.38 (1H, dd), 7.50 (1H, d), 5.62 (1H, br t), 4.35 (2H, br s), 3.71 (4H, br s), 3.19 (2H, m), 2.89 (2H, br s), 2.55 (3H, s), 2.53 (4H, br s), 1.65 (2H, m), 1.19 (6H, s), OH被交换。

[0559] 实施例10

[0560] N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-3-[6-[3-甲基-1-(2-吗啉-4-基-乙基)-1H-吡唑-4-基]-吡嗪-2-基]-苯磺酰胺



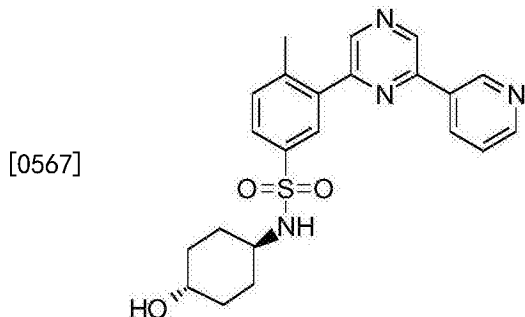
[0562] 向4-(2-(4-(6-溴吡嗪-2-基)-5-甲基-1H-吡唑-1-基)乙基)吗啉(中间体C2)(50mg, 0.142mmol)的甲苯/EtOH(2:1; 1.5ml)溶液中加入N-(3-羟基-3-甲基丁基)-4-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯磺酰胺(中间体B3)(54.4mg, 0.142mmol), 随后加入Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(5mg, 7.10μmol)和2M碳酸钠水溶液(0.213ml, 0.426mmol)。将反应物在微波反应器中于100℃加热30分钟。反应物用乙酸乙酯稀释, 用水洗涤, 将有机层减压浓缩。残留物经ISCO combiflash硅胶快速色谱纯化(12g), 采用DCM/MeOH(0-10%)梯度洗脱, 获得产物。

[0563] LCMS:Rt 0.70mins;MS m/z 529.3 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpHv01

[0564]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  8.91 (1H, s) , 8.62 (1H, s) , 8.47 (1H, s) , 7.93 (1H, d) , 7.79 (1H, dd) , 7.62 (1H, d) , 7.46 (1H, br s) , 4.28 (1H, br s) , 4.21 (2H, t) , 3.56 (4H, t) , 2.85 (2H, br t) , 2.73 (2H, t) , 2.50 (3H, s partially obscured by DMSO) , 2.48 (3H, s) , 2.42 (4H, t) , 1.50 (2H, t) , 1.01 (6H, s) 。

[0565] 实施例11

[0566] 反式N-(4-羟基-环己基)-4-甲基-3-(6-吡啶-3-基-吡嗪-2-基)-苯磺酰胺



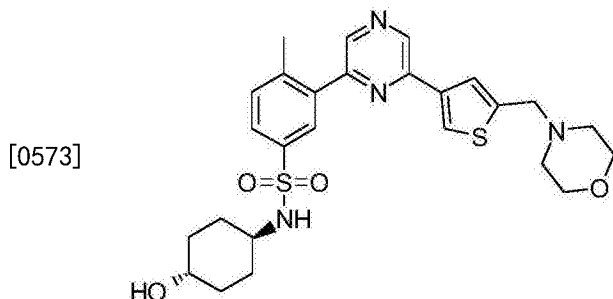
[0568] 将反式N-(4-羟基环己基)-4-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯磺酰胺(中间体B5) (204mg, 0.517mmol)、3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)吡啶(106mg, 0.517mmol)、2M aq. NaHCO<sub>3</sub> (1.3ml, 2.58mmol) 和PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(21.11mg, 0.026mmol)在1,2-二甲氧基乙烷(2.53mL)中的红色溶液在氮气环境下在微波反应器中于120℃加热0.75h。将3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)吡啶(106mg, 0.517mmol)和PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(21.11mg, 0.026mmol)加至该黑色悬浮液中, 然后加热至120℃0.75hrs。加入水(50mL), 随后采用EtOAc萃取二次(50mL×2), 用盐水(20mL)洗涤, 经硫酸镁干燥。减压浓缩获得的有机相。粗品产物通过ISCO combiflash色谱纯化, 在12g硅胶柱上采用改良的0-10% (DCM-NH<sub>3</sub>的MeOH溶液)梯度洗脱, 采用DCM上样, 获得目标化合物。

[0569] LCMS: Rt 0.76mins; MS m/z 425.5 [M+H]<sup>+</sup>; Method2minLC\_v003

[0570]  $^1\text{H}$  (400MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)  $\delta$  9.40 (2H, m) , 8.95 (1H, s) , 8.74 (1H, dd) , 8.57 (1H, m) 。8.03 (1H, d) , 7.85 (1H, dd) , 7.67 (1H, d) , 7.62 (2H, m) , 4.48 (1H, d) , 3.30 (1H, m) , 2.96 (1H, m) , 2.55 (3H, s) , 1.69 (4H, m) , 1.14 (4H, m) 。

[0571] 实施例12

[0572] 反式N-(4-羟基-环己基)-4-甲基-3-[6-(5-吗啉-4-基甲基-噻吩-3-基)-吡嗪-2-基]-苯磺酰胺



[0574] 向反式3-(6-氯代吡嗪-2-基)-N-(4-羟基环己基)-4-甲基苯磺酰胺(中间体D2) (80mg, 0.209mmol)的DME (1047 $\mu$ L)溶液中加入4-((4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)噻吩-2-基)甲基)吗啉(97mg, 0.314mmol)、二(三苯膦)氯化钯(II) (7.35mg,

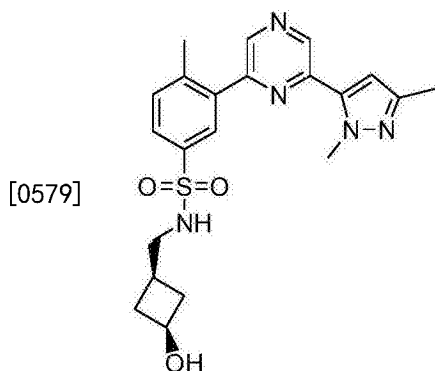
10.47 $\mu$ mol) 和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (aq. 2.0M) (66.6mg, 0.628mmol)。将反应物在微波反应器中于120℃加热30mins。向反应物中加入水(50ml), 将产物萃取到EtOAc(60ml)。有机相用盐水洗涤, 经硫酸镁干燥, 聚合物负载的三甲基硫醇清除Pd。将该混合物偶合涡旋1小时。过滤移出固体, 用EtOAc洗涤, 减压浓缩。粗品产物通过ISCO combiflash色谱纯化, 在12g硅胶柱上采用改良的0-10% (DCM-2M NH<sub>3</sub>的MeOH溶液) 梯度洗脱, 采用DCM上样, 获得白色固体。

[0575] LCMS: Rt 0.64mins; MS m/z 529.3 [M+H]<sup>+</sup>; Method 2minLowpH

[0576] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.91 (1H, s), 8.75 (1H, s), 8.32 (1H, s), 7.98 (1H, s), 7.84 (1H, d), 7.69 (1H, s), 7.60 (1H, d), 4.52 (1H, s), 3.72 (2H, br s), 2.59 (4H, br s), 3.41 (1H, br s), 2.98 (1H, br s), 2.42 (4H, br s), 1.84-1.55 (4H, m), 1.30-1.10 (4H, m)。

[0577] 实施例13

[0578] 顺式3-[6-(2,5-二甲基-2H-吡唑-3-基)-吡嗪-2-基]-N-(3-羟基-环丁基甲基)-4-甲基-苯磺酰胺



[0580] 向0.5-2ml微波瓶中加入顺式3-溴-N-(3-羟基环丁基甲基)-4-甲基苯磺酰胺(中间体A7) 150mg, 0.449mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂环戊硼烷) (125mg, 0.494mmol)、乙酸钾(66.1mg, 0.673mmol) 和PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(18.33mg, 0.022mmol)的DME(1.3ml)溶液, 将反应物在biotage initiator微波反应器(固定的维持时间, 每次搅拌30s)中于120℃加热1小时。然后向反应混合物中加入2-氯代-6-(1,3-二甲基-1H-吡唑-5-基)吡嗪(中间体C3) (94mg, 0.449mmol)、PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(18.33mg, 0.022mmol) 和2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液(0.673ml, 1.346mmol)。将反应物在biotage initiator微波反应器(固定的维持时间, 每次搅拌30s)中于120℃加热1小时。向反应物中加入水(10ml), 萃取到EtOAc(10ml)。有机萃取物用盐水洗涤(10ml), 然后经硫酸镁干燥, 真空浓缩。

[0581] 反应物通过ISCO combiflash Rf快速柱色谱纯化, 在12g硅胶短柱上采用己烷/EtOAc(0-100%)洗脱15mins, 获得目标化合物。

[0582] LCMS: Rt 0.95mins; MS m/z 429.3 [M+H]<sup>+</sup>; 方法2minLowpHv01

[0583] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)  $\delta$  9.10 (1H, s), 8.84 (1H, s), 7.94 (1H, d), 7.81 (1H, dd), 7.61 (2H, m), 6.86 (1H, s), 4.90 (1H, d), 4.09 (3H, s), 3.84 (1H, m), 2.76 (2H, t), 2.23 (3H, s), 2.17 (2H, m), 1.74 (1H, m), 1.40 (2H, m), 一个甲基被DMSO溶剂峰掩蔽。

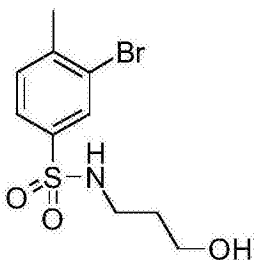
[0584] 中间体的制备:

[0585] 溴化物(A)

[0586] 中间体A1

[0587] 3-溴-N-(3-羟基丙基)-4-甲基苯磺酰胺

[0588]



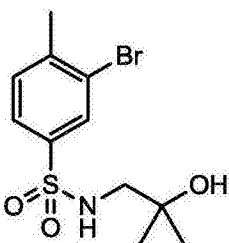
[0589] 在氮气环境下,向搅拌的3-溴-4-甲基苯-1-磺酰氯 (2g,7.42mmol) 的THF (37mL) 溶液中加入3-氨基-1-丙醇 (0.568ml,7.42mmol)、DIPEA (1.56ml,8.9mmol),将获得的混合物于室温下搅拌24小时。减压除去溶剂,将粗品产物加至0.1M HCl (100ml) 中。混合物采用EtOAc (150ml) 萃取,有机萃取物用sat.Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60ml)、盐水洗涤,经硫酸镁干燥并减压浓缩,获得目标化合物。

[0590] LCMS:Rt 0.89mins;MS m/z 310.1 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLC\_v003

[0591] 中间体A2

[0592] 3-溴-N-(2-羟基-2-甲基丙基)-4-甲基苯磺酰胺

[0593]



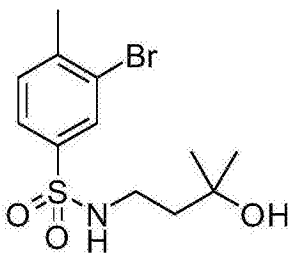
[0594] 在氮气环境下,向搅拌的3-溴-4-甲基苯-1-磺酰氯 (3.02g,11.22mmol) 的吡啶 (56ml) 溶液中加入1-氨基-2-甲基丙-2-醇 (1.0g,11.22mmol),将混合物于室温下搅拌72小时。减压除去溶剂,将获得的粗品产物加至0.1M HCl (100ml) 中。混合物用EtOAc (150ml) 萃取,有机萃取物用sat.Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100ml)、盐水洗涤,经硫酸镁干燥并减压浓缩,获得目标化合物。

[0595] LCMS:Rt 1.01mins;MS m/z 324.1 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLC\_v003

[0596] 中间体A3

[0597] 3-溴-N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-苯磺酰胺

[0598]



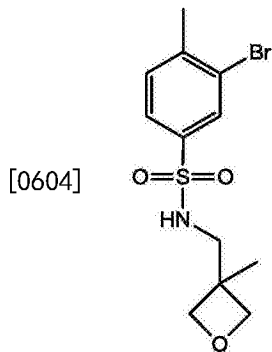
[0599] 根据中间体A2的类似方法,目标化合物制备自3-溴-4-甲基苯-1-磺酰氯和4-氨基-2-甲基丁-2-醇。

[0600] LCMS:Rt 1.04mins;MS m/z没有电离 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLC\_v003

[0601] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.93 (1H, s), 7.70 (1H, d), 7.58 (1H, d), 7.52 (1H, br), 4.28 (1H, br), 2.80 (2H, m), 2.43 (3H, s), 1.49 (2H, m), 1.15 (6H, s)。

[0602] 中间体A4

[0603] 3-溴-4-甲基-N-(3-甲基-氧杂环丁烷-3-基甲基)-苯磺酰胺

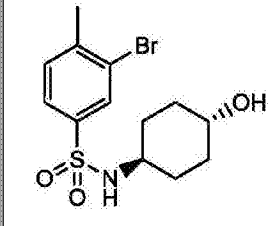
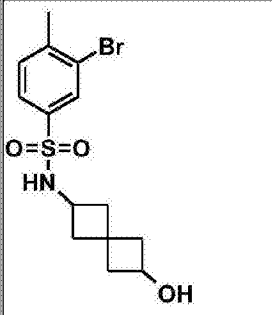
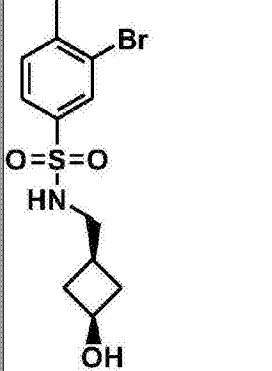


[0605] 向(3-甲基氧杂环丁烷-3-基)甲胺(2.026g, 20.03mmol)的DMA(50ml)溶液中加入乙基二异丙基胺(4.37ml, 25.04mmol)。将混合物于室温下搅拌30min,然后加入3-溴-4-甲基苯-1-磺酰氯(4.5g, 16.70mmol)。将混合物于室温下搅拌1hr。真空除去溶剂,将残留物溶于EtOAc,采用饱和的aq. NaHCO<sub>3</sub>洗涤,随后用0.1M HCl洗涤,再用盐水洗涤。有机萃取物经硫酸镁干燥,除去溶剂,获得为浅黄色粉末的产物(5.19g, 93%)。

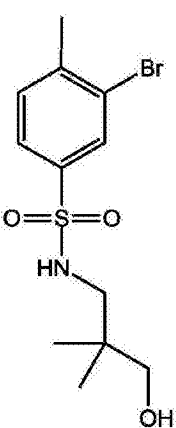
[0606] LCMS: Rt 1.10mins; MS m/z 336.1 [M+H]<sup>+</sup>; 方法2minLowpHv01

[0607] 下面表中的中间体化合物根据中间体A1的类似方法制备自适当的起始化合物:

[0608] 表1

中间体	结构	名称	[M+H] <sup>+</sup> /NMR
A5		反式3-溴-N-(4-羟基-环己基)-4-甲基苯磺酰胺	LCMS: Rt 1.01mins; MS m/z 348.1 [M+H] <sup>+</sup> ; 方法2minLC_v003
A6		3-溴-N-(6-羟基-螺[3.3]庚-2-基)-4-甲基苯磺酰胺	LCMS: Rt 1.01 mins; MS m/z 360.3 [M+H] <sup>+</sup> ; 方法2minLowpHv01
A7		顺式3-溴-N-(3-羟基-环丁基甲基)-4-甲基-苯磺酰胺	LCMS: Rt 0.91 mins; MS m/z 336.1 [M+H] <sup>+</sup> ; 方法2minLC_v003

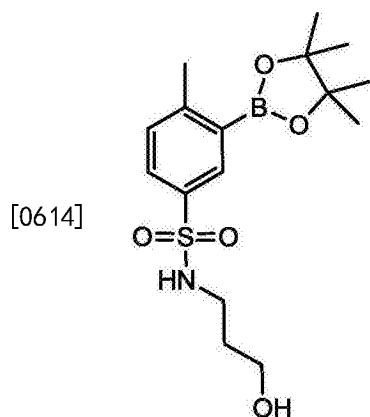


[0610]		3-溴-N-(3-羟基-2,2-二甲基丙基)-4-甲基苯磺酰胺	LCMS: Rt 0.98 mins; MS m/z 336.1 [M+H] <sup>+</sup> ; 方法 2minLC_v003
A8			

[0611] 硼酸酯 (B)

[0612] 中间体B1

[0613] N-(3-羟基丙基)-4-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯磺酰胺



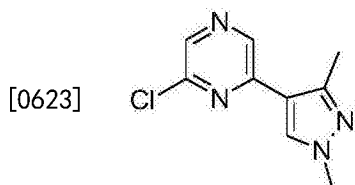
[0615] 在氮气环境下,将3-溴-N-(3-羟基丙基)-4-甲基苯磺酰胺(中间体A1)(2.25g, 7.30mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.075g, 10.95mmol)、PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(0.298g, 0.365mmol)和双(频哪醇合)二硼(2.039g, 8.03mmol)在DME(36.5mL)中的混合物于90℃搅拌5小时。将获得的混合物加至水(100mL)中,采用EtOAc萃取(2×100mL)。合并的有机萃取物用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,减压浓缩。通过硅胶色谱纯化,采用0—100%的EtOAc的异-己烷溶液梯度洗脱,获得目标化合物。

[0616] LCMS:Rt 1.03mins;MS m/z 356.5 [M+H]<sup>+</sup>;2minLC\_v003

[0617] 下面表中的中间体化合物根据中间体B1的类似方法制备自适当的起始化合物:

[0618] 表2





[0624] 将碳酸钠(33ml的2M溶液,67mmol)加至2-溴-6-氯代吡嗪(4.8g,25mmol)、1,3-二甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(5.0g,22.3mmol)和PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(0.79g,67mmol)的DME(80ml)混合物中。将混合物在氮气中脱气数次,然后于70°C加热搅拌3h。

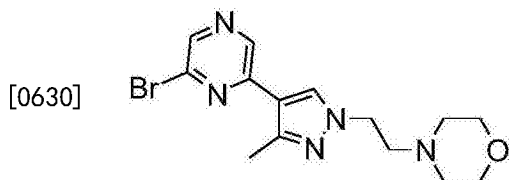
[0625] 真空除去溶剂,残留物用盐水稀释,用EtOAc萃取数次。分离合并的有机萃取物,干燥(MgSO<sub>4</sub>),真空浓缩溶剂,产物沉淀(2.21g,46%)。过滤收集固体,用乙醚-己烷洗涤。

[0626] LC-MS:Rt 0.90mins;MS m/z 209.4 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpH\_v01

[0627] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDC13) δ8.64(1H,s),8.43(1H,s),7.92(1H,s),3.92(3H,s),2.57(3H,s)。

[0628] 中间体C2

[0629] 4-{2-[4-(6-溴-吡嗪-2-基)-3-甲基-吡唑-1-基]-乙基}-吗啉



[0631] 步骤1:4-(2-(3-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-基)乙基)吗啉

[0632] 向3-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑(300mg,1.442mmol)的MeCN(10ml)溶液中加入碳酸铯(1.4g,4.33mmol),随后加入4-(2-氯代乙基)吗啉(402mg,2.163mmol),将反应物于回流下加热5小时,随后于室温下搅拌18h。将反应物减压过滤以除去碳酸铯。减压浓缩滤液。产物混合物经ISCO combiflash(GPE-15)硅胶快速色谱纯化(24g),采用DCM/甲醇梯度洗脱(0-15%),获得目标化合物及其区域异构体。

[0633] LCMS:RT 0.70mins;MS m/z 323.6 [M+H]<sup>+</sup>;Method 2min LowpHv01

[0634] 步骤2:4-{2-[4-(6-溴-吡嗪-2-基)-3-甲基-吡唑-1-基]-乙基}-吗啉

[0635] 向4-(2-(3-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-基)乙基)吗啉和区域异构体(步骤1)(302mg,0.799mmol)的甲苯/EtOH(2:1;9ml)溶液中加入2,6-二溴吡嗪(190mg,0.799mmol),随后加入Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(28.0mg,0.040mmol),然后加入2M碳酸钠水溶液(1.2ml,2.396mmol)。将反应物在微波反应器中于80°C加热1小时。将反应物的有机层分离并减压浓缩为黄色油状物。产物经ISCO combiflash(GPE-15)硅胶快速色谱纯化(24g),采用DCM/MeOH梯度洗脱(0-10%),获得为黄色油状物的两种产物,将其通过反相制备性HPLC分离(方法:10-35%梯度LowpH)。获得目标化合物,这是第二个被洗脱的化合物。立体化学通过NOE鉴定;第一个化合物显示甲基和亚甲基之间的彻底的空间相互作用(a through space interaction),而目标化合物没有。

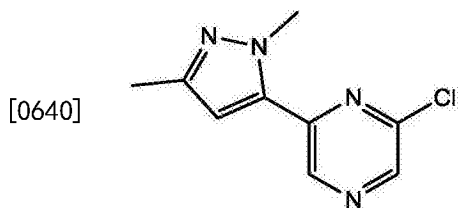
[0636] LCMS:RT 0.61mins;MS m/z 354.1 [M+H]<sup>+</sup>;Method2minLowpH.

[0637] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,d6-DMSO) δ8.88(1H,s),8.58(1H,s),8.45(1H,s),4.20(2H,t),

3.54 (4H,m) , 3.32 (3H,s) , 2.72 (2H,t) , 2.45 (4H,m) 。

[0638] 中间体C3

[0639] 2-氯代-6-(2,5-二甲基-2H-吡唑-3-基)-吡嗪



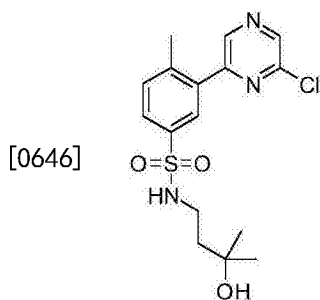
[0641] 目标化合物在类似于中间体C1的条件下制备自2-溴-6-氯代吡嗪 (4.8g, 25mmol) 和1,3-二甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑。

[0642] LCMS:0.90mins;MS m/z 211.3 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLowpH

[0643] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) , δ9.05 (1H, s) , 8.73 (1H, s) , 6.84 (1H, s) , 4.05 (3H, s) , 2.20 (3H, s)

[0644] 中间体D1

[0645] 3-(6-氯代-吡嗪-2-基)-N-(3-羟基-3-甲基-丁基)-4-甲基-苯磺酰胺



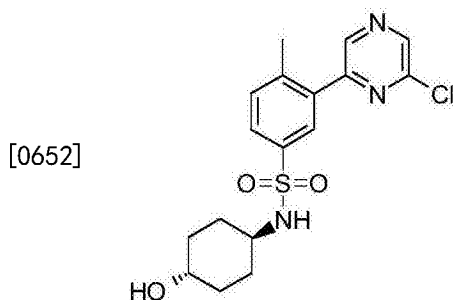
[0647] 将搅拌的N-(3-羟基-3-甲基丁基)-4-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯磺酰胺(中间体B3) (1.98g, 5.17mmol) 和2-溴-6-氯代吡嗪 (1.0g, 5.17mmol) 的DME (10ml) 溶液和2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.8ml, 15.5mmol) 在氮气中脱气数次, 然后加入PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(0.211g, 0.26mmol)。将混合物再次脱气, 然后于80℃加热。3h后, 除去溶剂, 将残留物在EtOAc和水之间分配。除去有机萃取物, 经硫酸镁干燥, 除去溶剂获得棕色残留物。硅胶色谱纯化, 采用EtOAc洗脱, 获得为无色胶状物的产物(1.401g, 73%)。

[0648] LCMS:RT 0.95mins,;MS m/z 370.4 [2M+H]<sup>+</sup>;方法2minLC\_v003.olp

[0649] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d6-DMSO) δ8.96 (1H, s) , 8.86 (1H, s) , 7.90 (1H, s) , 7.82 (1H, s) , 7.63 (1H, d) , 7.99 (1H, br t) , 4.28 (1H, s) , 2.83 (2H, m) , 2.45 (3H, s) , 1.50 (2H, m) , 1.00 (6H, s) 。

[0650] 中间体D2

[0651] 反式3-(6-氯代-吡嗪-2-基)-N-(4-羟基-环己基)-4-甲基-苯磺酰胺



[0653] 目标化合物根据中间体D1的类似方法制备自N-(3-羟基-3-甲基丁基)-4-甲基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯磺酰胺(中间体B5)和2-溴-6-氯代吡嗪。

[0654] LCMS:Rt 1.13mins;MS m/z 396.3 [M+H]<sup>+</sup>;方法2minLC\_v003.olp

[0655] 药物用途和试验

[0656] 本发明化合物及其可药用的盐可以用作药物。具体地讲,本发明化合物为合适的PI 3-激酶 $\gamma$ 同工型选择性抑制剂,可以在下面的试验中测试。

[0657] 用于PI 3-激酶 $\alpha$  (A)、PI 3-激酶 $\beta$  (B)、Vps34 (C)、PI 4-激酶 $\beta$  (D)的激酶Glo荧光激酶试验(Kglo)

[0658] 荧光ATP检测试剂激酶Glo获自Catalys,Wallisellen,Switzerland的Promega(目录号V6714,批号236161)。L- $\alpha$ -磷脂酰肌醇(PI,肝脏,牛)获自Avanti Polar Lipid(目录号840042C, Lot#LPI-274),磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸酯(PIP(4,5)2)也获自Avanti Polar Lipid(目录号840046X)。L- $\alpha$ -磷脂酰丝氨酸(PS)获自Avanti Polar Lipid(目录号840032C),正-辛基葡萄糖苷获自Avanti Polar Lipid(目录号10634425001)。荧光为充分确定的示值读数以测定ATP浓度,因此可以用于指示多种激酶的活性,无论其底物为何。激酶Glo荧光激酶试验(Promega, Madison/WI, USA)为均匀的(homogeneous) HTS方法,通过定量测定激酶反应后溶液中剩余的ATP的量而测定激酶活性。

[0659] 将50nL化合物稀释液分配到黑色384-孔低容量Non Binding Styrene (NBS)板(Costar目录号NBS#3676)上。将以甲醇中的10mg/ml溶液提供的L- $\alpha$ -磷脂酰肌醇(PI)转移至玻璃管中,在氮气流下干燥。然后将其通过涡旋再悬浮于3%辛基葡萄糖苷(1-0-正-辛基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷)中,于4 $^{\circ}$ C储存。加入5 $\mu$ L的PI/辛基葡萄糖苷混合物,该混合物中含有PI 3-激酶 $\alpha$ 和PI 3-激酶 $\beta$ 亚型或Vps34或PI 4-激酶 $\beta$ 。激酶反应于室温下通过加入5 $\mu$ L的ATP-混合物启动,该混合物含有终体积为10 $\mu$ L的10mM TRIS-HCl pH 7.5、3mM MgCl<sub>2</sub>、50mM NaCl、0.05% CHAPS、1mM DTT和1 $\mu$ M ATP。反应采用10 $\mu$ L的激酶Glo终止,10mins后采用Synergy2读数仪读板,采用的积分时间为每孔0.1秒。将2.5 $\mu$ M的NVP-BGT226(1-(3-(三氟甲基)-4-(哌嗪-1-基)苯基)-8-(6-甲氧基吡啶-3-基)-3-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮)加至试验板中使得激酶反应100%抑制,通过溶剂载体(90%的DMSO水溶液)获得0%抑制。采用(1-(3-(三氟甲基)-4-(哌嗪-1-基)苯基)-8-(6-甲氧基吡啶-3-基)-3-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮)作为参比化合物,其包含在所有试验板中,16个稀释点的形式,一式二份。

[0660] 通过将S形剂量-响应曲线拟合为试验读数对所述抑制剂浓度的图而推导出8个浓度(10、3.0、1.0、0.3、0.1、0.030、0.010和0.003 $\mu$ M)的每个化合物(n=2)的抑制百分率的

IC<sub>50</sub>值。所有的拟合均采用XLfit4 (ID Business Solutions, Guildford, UK) 程序进行。

[0661] PI 3-激酶  $\gamma$  (E)、PI 3-激酶  $\delta$  (F) 的TR-FRET Adapta试验

[0662] TR-FRET Adapta™ Universal激酶试验试剂盒购买自Invitrogen Corporation (Carlsbad/CA, USA) (目录号PV5099)。该试剂盒包含下列试剂: Adapta Eu-anti-ADP抗体 (在HEPES缓冲的生理盐水中的铈标记的抗-ADP抗体, 目录号PV5097), Alexa **Fluor**®647-标记的ADP示踪物 (在HEPES缓冲的生理盐水中的Alexa **Fluor**®647-标记的ADP示踪物, 目录号PV5098), TR-FRET稀释缓冲液pH 7.5 (目录号PV3574)。

[0663] PIK3CD底物磷脂酰肌醇 (PI) 获自Invitrogen (在50mM HEPES pH7.5中的由2mM磷脂酰肌醇 (PI) 组成的囊泡; 目录号PV5371)。PIK3CG底物磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸酯 (PIP (4,5) 2) 获自Invitrogen (PIP2: 由1mM PIP2:19mM PS组成的PS大单层囊泡, 在50mM HEPES pH7.5、3mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EGTA中; 目录号PV5100)。

[0664] 时间分辨荧光能量共振转移 (TR-FRET) 为两种相邻染料之间能量转移的技术, 一种染料 (供体) 的受激电子通过共振转移至相邻染料 (受体) 的电子, 然后以光子释放。该能量转移可以通过受体的荧光发射的增加和供体的荧光发射的降低而测定。用于蛋白激酶的TR-FRET试验采用长寿命的镧系元素铽或铈螯合物作为供体种类, 通过灯管激发源激发后引入的延迟, 其能够克服化合物自体荧光的干扰或者沉淀的化合物的光散射。结果通常表示为受体和供体荧光团的强度的比率。该值的比率性质可以校正各个孔之间试验体积的差异, 也可以校正着色化合物导致的淬灭效应 (quenching effects)。Adapta™试验可以分为两个阶段: 激酶反应阶段和ADP检测阶段。在激酶反应阶段, 将所有激酶反应成分加至孔中, 将反应物温育一段时间, 每种激酶温育时间不同。反应后, 将Eu-标记的抗-ADP抗体的检测溶液、Alexa **Fluor**®647-标记的ADP示踪物和EDTA (用于终止激酶反应) 加至试验孔中。通过激酶反应形成的ADP可以取代所述抗体的Alexa **Fluor**®647-标记的ADP示踪物, 导致TR-FRET信号的降低。在抑制剂的存在下, 通过激酶反应形成的ADP的量降低, 获得的完整的抗体-示踪物相互作用能够保持较高的TR-FRET信号。在Adapta™试验中, 供体 (铈-抗-ADP抗体) 于340nm激发, 将其能量转移至受体 (Alexa **Fluor**®647-标记的ADP示踪物)。源自Alexa **Fluor**®647的发射可以采用集中于665nm的滤波器监测, 因为其位于供体的发射峰之间, 于615/620nm测定。

[0665] 将50nL化合物稀释液分配到白色384-孔低容量聚苯乙烯板上。然后将5 $\mu$ L的PI 3-激酶  $\gamma$  或PI 3-激酶  $\delta$  和脂质底物 (PI或PIP2:PS) 以及随后加入的5 $\mu$ L的ATP (最终的试验体积10 $\mu$ L) 于室温下温育。Adapta™ TR-FRET试验的标准反应缓冲液含有10mM Tris-HCl pH 7.5、3mM MgCl<sub>2</sub>、50mM NaCl、1mM DTT、0.05% CHAPS ((3-[ (3-胆酰胺基丙基) 二甲基氨基]-1-丙烷磺酸酯)。反应采用5 $\mu$ L的含有Eu-标记的抗-ADP抗体和Alexa **Fluor**®647-标记的ADP示踪物的EDTA在TR-FRET稀释缓冲液中的混合物终止。15-60mins后在Synergy2读数仪中读板, 积分时间为0.4秒, 延迟0.05秒。通过标准反应缓冲液置换PI 3-激酶进行激酶反应100%抑制作为对照。采用该化合物的溶剂载体 (90%的DMSO水溶液) 作为0%抑制的对照。标准化合物1-(3-(三氟甲基)-4-(哌嗪-1-基) 苯基)-8-(6-甲氧基吡啶-3-基)-3-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮 (NVP-BGT226) 用作参比化合物, 以16个稀释点的形式包含在所有试验板中, 一式二份。

[0666] 采用Excel拟合软件或Graphpad Prism分析数据。通过将S形剂量-响应曲线拟合为试验读数对所述抑制剂浓度的图而推导出IC<sub>50</sub>值。所有的拟合均采用XLfit4 (ID Business Solutions, Guildford, UK) 程序进行。通过将S形剂量-响应曲线拟合为试验读数对所述抑制剂浓度的图而推导出8个浓度 (通常为10、3.0、1.0、0.3、0.1、0.030、0.010和0.003 $\mu$ M) 的每个化合物的抑制百分率的IC<sub>50</sub>值的测定。所有的拟合均采用XLfit4 (ID Business Solutions, Guildford, UK) 程序进行。

[0667] mTOR(G) 的Lanthascreen™激酶结合试验

[0668] 结合试验基于Alexa **Fluor**®647-标记的、ATP-竞争性激酶抑制剂与目标激酶的结合和置换进行。基于ATP-竞争性激酶抑制剂, Invitrogen的“激酶示踪物”已经研发出来以处理各种目标激酶, 使得它们适合于检测能够与ATP位点结合或者与改变ATP位点结构的变构位点结合的任何化合物。

[0669] 在Lanthascreen™激酶结合试验中, 供体 (Eu<sup>3+</sup>-抗-GST (谷胱甘肽S-转移酶) 抗体) 于340nm激发, 将其能量转移至受体 (Alexa **Fluor**®647-标记的ATP-竞争性激酶抑制剂=Tracer-314)。源自Tracer-314 (Alexa **Fluor**®647抑制剂) 的发射可以采用集中于665nm的滤波器监测, 因为其位于供体的发射峰之间, 其可以于615/620nm测定。Tracer-314和Eu<sup>3+</sup>-抗-GST抗体两者与所述激酶的结合, 导致自Eu<sup>3+</sup>-供体荧光团向Tracer-314的 **Alexa-Fluor**®647-受体荧光团的高度的FRET。抑制剂与激酶的结合竞争了与示踪物的结合, 导致FRET损失。

[0670] 将50nL的化合物稀释液分配到白色384-孔低容量聚苯乙烯板上。然后加入5 $\mu$ L的GST-mTOR和铈-抗-GST抗体, 随后加入5 $\mu$ L的示踪物-314 (最终的试验体积10 $\mu$ L), 将其于室温下温育。用于Lanthascreen™激酶结合试验的标准反应缓冲液含有50mM HEPES pH 7.5、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EGTA、0.01%Pluronic F-127。60mins后在Synergy2读数仪中读板, 积分时间为0.2微秒, 延迟0.1微秒。

[0671] 为了计算发射比, 受体 (Alexa **Fluor**®647-标记的Tracer-314) 于665nm处发射的信号除以供体 (Eu<sup>3+</sup>-抗-GST抗体) 于620nm处发射的信号。

[0672] 0%抑制的对照由化合物的溶剂载体 (90%的DMSO水溶液) 给出。相对100%抑制的对照通过加入10 $\mu$ M的含有GST-mTOR和铈-抗-GST抗体的混合物进行。绝对0%抑制的另一个对照由Eu<sup>3+</sup>-抗-GST抗体 (不含GST-mTOR) 给出。对脂质激酶作用的标准化合物 (standard compounds for the lipid kinase panel profiling) 可以用作参比, 其以8个稀释点的形式包含在所有试验板中。

[0673] PI 3-激酶 $\alpha$  (H)、 $\beta$  (I) 和 $\delta$  (J) 的细胞试验

[0674] AlphaScreen (扩增发光邻近均匀性试验, ALPHA, Perkin Elmer) 为非放射性珠类邻近试验技术, 在均匀的微量板模式中研究生物分子相互作用。商品名SureFire表示适合于通过采用匹配的抗体对在细胞溶解产物中定量测定内源性细胞蛋白的磷酸化作用的AlphaScreen试验, 所述抗体对由抗-磷酸-激酶和抗-激酶抗体组成。该试验能够表征细胞中激酶信号以及测定激酶抑制剂的作用。

[0675] 于37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>/90%湿度, 在潮湿的CO<sub>2</sub>保温箱中, 将大鼠-1细胞系稳定过度表达的激活的PI 3-激酶I类同工型大鼠-1pBABEpuro Myr-HA-hp110 $\delta$ 克隆5 (大鼠-1\_PI3K $\delta$ ) 和

大鼠-1pBABEpuro Myr-HA-hp110 $\alpha$ 克隆6 (大鼠-1\_PI3K $\alpha$ ) 以及大鼠-1pBABEpuro Myr-HA-hp110 $\beta$  (大鼠-1\_PI3K $\beta$ ) 接种于完全生长培养基 (DMEM高葡萄糖, 10% (v/v) 胎牛血清, 1% (v/v) MEM NEAA, 10mM HEPES, 2mM L-谷氨酰胺, 嘌呤霉素 (大鼠-1\_PI3K $\delta$ 和大鼠-1\_PI3K $\alpha$ 采用 10 $\mu$ g/mL, 大鼠-1\_PI3K $\beta$ 采用4 $\mu$ g/mL), 1% (v/v) Pen/Strep) 直到90%的汇合, 将其每周分裂二次。

[0676] 采用下列材料用于大鼠-1细胞溶解产物中p-AKT (S473) 的检测: 达尔伯克式改良伊格尔培养基 (DMEM) 高葡萄糖 (Gibco Invitrogen, Basel, Switzerland, 目录号41965), 合格的热灭活胎牛血清 (HI FBS; Gibco Invitrogen, Basel, Switzerland, 批号16140), MEM非基础氨基酸 (NEAA; Gibco Invitrogen, Basel, Switzerland, 目录号11140), HEPES (Gibco Invitrogen, Basel, Switzerland, 目录号15630), 青霉素/链霉素 (Pen/Strep, 100 $\times$ ; Gibco Invitrogen, Basel, Switzerland, 目录号15140-122), L-谷氨酰胺 (Gibco Invitrogen, Basel, Switzerland, 目录号25030), 嘌呤霉素 (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland, 目录号P9620), DMSO (MERCK, Dietikon, Switzerland, 目录号8.02912.2500), H<sub>2</sub>O, MilliQ-H<sub>2</sub>O除非另有说明 (MILLIPORE QGARD00R1, Millipore, Zug, Switzerland), 牛血清白蛋白 (BSA; Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland, 目录号A8412), SureFire p-Akt 1/2 (Ser473) 试验试剂盒 (PerkinElmer, Schwerzenbach, Switzerland, 目录号TGRAS50K)。

[0677] p-Akt (S473) SureFire试验能够在细胞溶解产物中测定内源性细胞Akt 1/2于Ser473的磷酸化作用。采用大鼠-1细胞稳定表达的人PI3K $\delta$ 、PI3K $\alpha$ 或PI3K $\beta$ p110催化亚基同工型的myr-HA-标记版本, 该试验研发作为384-孔模式中的两板方案。

[0678] 为了测试化合物, 将细胞以在20 $\mu$ l完全生长介质中的4000 (Rat-1\_PI3K $\delta$ )、7500 (Rat-1\_PI3K $\alpha$ ) 或6200 (Rat-1\_PI3K $\beta$ ) 个细胞的密度接种到细胞培养基处理的384-孔的板上, 于37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>/90%湿度生长24h。在化合物转移前不久, 移除完全培养基, 加入30 $\mu$ l试验缓冲液 (DMEM高葡萄糖, 1 $\times$ MEM NEAA, 10mM HEPES, 2mM L-谷氨酰胺, 0.1% (w/v) BSA), 将10 $\mu$ l化合物预稀释液转移至细胞中。采用化合物处理1h后, 细胞通过加入20 $\mu$ l补充有0.24% (w/v) BSA的细胞溶解缓冲液裂解。p-AKT (Ser473) 的测定采用SureFire p-Akt 1/2 (Ser473) 分析试剂盒根据生产商说明书采用5 $\mu$ l细胞溶解产物进行, 总测定体积为12 $\mu$ l。

[0679] 通过将S形剂量-响应曲线拟合为试验读数对所述抑制剂浓度的图而推导出8个浓度 (通常为10、3.0、1.0、0.3、0.1、0.030、0.010和0.003 $\mu$ M) 的每个化合物 (n=2) 的抑制百分率的IC<sub>50</sub>值。所有的拟合均采用XLfit4 (ID Business Solutions, Guildford, UK) 程序进行。

[0680] PI 3-激酶  $\gamma$  (K) 的细胞U937AKT试验

[0681] 将U937单核细胞系保持在RPMI 1640的基础培养基中, 该培养基补充有10%热灭活的FCS、100U/ml青霉素、100 $\mu$ g/ml链霉素和2mM L-谷氨酰胺 (Invitrogen)。每3或4天, 通过将细胞在新鲜的介质中以0.125 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/ml的密度接种以保持U937悬浮液培养物。将细胞于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>温育。在试验之前的3或4天, 将细胞以0.25 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/ml的密度在T162培养烧瓶中接种, 总体积为40ml。

[0682] 在开始下面所述的细胞处理之前, 将MSD (Meso Scale Discovery) 试验板通过加入150 $\mu$ l/孔封闭缓冲液封闭, 该封闭液于室温下振摇最少1小时温育并供给。试验的所有步骤必须快速进行, 根据说明准确的定时温育期和观察温度控制。

[0683] 将试验之前3或4天以0.25 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml接种的细胞抽出, 转移至50ml离心管, 计数并



于室温下以300g离心8分钟。

[0684] 将上清液抽出,将细胞团块再悬浮,在HBSS (Hank平衡盐溶液)中通过于室温下以300g离心8分钟洗涤一次。将细胞团块再次悬浮于HBSS中使得浓度为 $4 \times 10^6$ /ml,向平底96孔组织培养板的每个孔中加入100 $\mu$ L细胞悬浮液。将试验板于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>中温育1.5小时使得背景AKT磷酸化作用降低,然后进行化合物刺激步骤。

[0685] 在100%DMSO中制备5mM化合物的储备浓度;采用该浓度在HBSS中制备1:125的稀释液,获得最高化合物浓度为40 $\mu$ M,0.8%的DMSO溶液。

[0686] 在新鲜的平底96孔板中通过在HBSS 0.8%DMSO中10-倍系列稀释的40 $\mu$ M制备化合物滴定液(titrations);每次稀释后置换吸管端。在此阶段的化合物浓度是试验板中所需要的终浓度的4倍。通过自化合物稀释板直接转移50 $\mu$ l/孔,将细胞采用化合物或HBSS的0.8%DMSO溶液刺激。然后将含有化合物处理的细胞的试验板于37 $^{\circ}$ C温育30分钟。标准板的排列用于所有试验。

[0687] 除阳性对照孔(“最大MIP1 $\alpha$ ”)之外,将化合物处理的细胞采用50 $\mu$ L/孔的40ng/ml MIP1 $\alpha$  (R&D Systems目录号270-LD,冷冻干燥的储备液采用PBS 0.1%BSA重构为50 $\mu$ g/ml)刺激。阴性对照孔(“最小HBSS”)采用50 $\mu$ l/孔的HBSS在MIP1 $\alpha$ 不存在下刺激。将化合物终浓度稀释4倍,获得最高浓度为10 $\mu$ M;加入后,MIP1 $\alpha$ 的终浓度为10ng/ml。将细胞与MIP1 $\alpha$ 一起于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>中温育3分钟。刺激期3分钟后,试验板一直保持在冰冷的状态。将试验板于4 $^{\circ}$ C以300g离心2分钟,通过轻轻倾倒移出上清液,然后用纸巾吸干板。然后将细胞通过缓慢加入150 $\mu$ L/孔的冰冷的HBSS洗涤,于4 $^{\circ}$ C以300g离心5分钟。将上清液抽出,将板如上所述吸干。将板置于冰上,细胞立即采用35 $\mu$ L/孔冰冷的裂解缓冲液处理,所述缓冲液根据试剂盒说明书制备(每个实验板,向5ml的Tris裂解缓冲液加入100 $\mu$ l的50 $\times$ 蛋白酶抑制剂溶液和50 $\mu$ l的每种100 $\times$ 磷酸酶抑制剂溶液I和II)。将板在冰上温育20分钟,然后于4 $^{\circ}$ C以841g离心5分钟。

[0688] 自MSD板上抽出封闭缓冲液,将板采用300 $\mu$ l/孔的Tris洗涤缓冲液洗涤四次。然后将25 $\mu$ L的细胞溶解产物自试验板转移至洗涤的MSD板上,将其密封并于室温下振摇温育1小时。将板采用300 $\mu$ l/孔的Tris洗涤缓冲液洗涤四次,然后加入25 $\mu$ L/孔的硫-标记的抗-总AKT/pAKT检测抗体(在1ml封闭缓冲液和2ml洗涤缓冲液中稀释的60 $\mu$ l的50 $\times$ 抗体储备液),室温下振摇温育1小时。将板采用300 $\mu$ l/孔的Tris洗涤缓冲液洗涤四次,加入150 $\mu$ l/孔的读板缓冲液,小心地避免引起泡沫。立即采用MSD SECTOR Imager 6000读板。

[0689] 将结果输入Excel中,磷酸化的AKT百分率采用下列方程计算:%磷蛋白 = ((2\*磷基信号)/(磷基信号+总信号))\*100。化合物介导的AKT磷酸化作用的抑制可以采用Prizm V Graphpad软件分析。

[0690] 全血嗜中性粒细胞形态变化试验(L)

[0691] 采用流式细胞术方法测定人全血中IL-8(白介素-8)诱导的嗜中性粒细胞形态变化。

[0692] 试剂、材料和设备

[0693] 无菌蒸馏水,Baxter#UKF117

[0694] 10 $\times$ CellFIX溶液,BECTON DICKINSON Biosciences#340181

[0695] IL-8,R&D Systems#208-IL

- [0696] DMSO,Hybri-Max,Sigma-Aldrich#D2650
- [0697] Dulbecco磷酸盐缓冲的生理盐水1× [+] $\text{CaCl}_2$ , $\text{MgCl}_2$ ,gibco,life technolgies#14040
- [0698] 白蛋白溶液,Bovine Serum(30%),Sigma Aldrich#A9576-50ml
- [0699] 氯化铵 $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,Sigma Aldrich#A0171
- [0700] 碳酸氢钾 $\text{KHCO}_3$ ,Sigma Aldrich#P9144
- [0701] K2EDTA Vacutainers,Becton Dickinson**Vacutainer**<sup>®</sup>#367525
- [0702] 96-孔聚丙烯深孔板,VWR#PORV219009
- [0703] 96孔板,V-底带盖,Costar#3894
- [0704] 96孔聚丙烯板,圆底,Greiner#650261(对于HIGH THROUGHPUT SAMPLER FACS)
- [0705] 120 $\mu\text{l}$ 预灭菌的Biohit Filter Tips,Biohit#790101F
- [0706] 350 $\mu\text{l}$ 预灭菌的Biohit Tips,Biohit#790350
- [0707] 1200 $\mu\text{l}$ 预灭菌的Biohit Tips,Biohit#791202
- [0708] Biohit e120Electronic 8-channel Pipette(8-通道电子移液管)
- [0709] Biohit e120Electronic 8-channel Pipette(8-通道电子移液管)
- [0710] Eppendorf Research Plus 100-1000 $\mu\text{l}$ 移液管
- [0711] Eppendorf Research Plus 20-200 $\mu\text{l}$ 移液管
- [0712] Becton Dickinson Biosciences FACS Canto II Flow Cytometer with HIGH THROUGHPUT SAMPLER
- [0713] 在0.1%牛血清白蛋白/PBS中制备至多2 $\mu\text{M}$ 储备液的IL-8,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 储存。在当天,将IL-8在PBS(磷酸盐缓冲的生理盐水)中稀释10分钟然后使用。IL-8使用的最终浓度为2nM,对于供体剂量响应曲线,浓度范围为0.003-200nM。
- [0714] 每天新鲜制备试验固定剂溶液,将10×浓度的CellFIX<sup>TM</sup>溶液以1:10在无菌蒸馏水中稀释,然后以1:4在PBS中稀释。试验固定剂溶液在使用前保存在冰上。
- [0715] 通过将20.75g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 和2.5g  $\text{KHCO}_3$ 溶于250ml无菌 $\text{H}_2\text{O}$ 中预先制备10×溶解缓冲液。将该10×溶解缓冲液在无菌条件下过滤,于4 $^{\circ}\text{C}$ 储存至多2周。在当天,采用无菌蒸馏水制备1×溶解溶液,使用前保存在冰上。
- [0716] 将试验化合物在100%DMSO中制备为10mM储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。当用于试验时,将10mM储备化合物融化,于室温下避光储存。在当天新鲜制备化合物稀释液。早上的第一件事是在100%DMSO中制备第一系列稀释液。只有当收集血液并到达实验室时,进行下一系列在PBS中的稀释(1:10PBS,10%DMSO)。这限制了稀释的混合物暴露于塑料制品的时间,保证了暴露时间在试验之间是恒定的。将化合物以10×最终需要的浓度加至深96孔板中(血液中最终[DMSO]=1%)。
- [0717] 表3显示了在人全血嗜中性粒细胞形态变化试验中化合物系列稀释液
- [0718] 表3

[0719]

100% DMSO 系列稀释液, 1:4	10% DMSO 1:10 PBS	1% DMSO 测定板	Example <sup>1,2</sup>
10000 $\mu$ M	1000 $\mu$ M	100 $\mu$ M	B2; CPD + IL-8
2500	250	25	B3; CPD + IL-8
625	62,5	6,25	B4; CPD + IL-8
156.25	15,62	1,56	B5; CPD + IL-8
39.0625	3,9	0,39	B6; CPD + IL-8
9.765625	0,97	0,097	B7; CPD + IL-8
2.441406	0,24	0,024	B8; CPD + IL-8
0.610352	0,06	0,006	B9; CPD + IL-8
100% DMSO	10% DMSO	1% DMSO	B10; IL-8
100% DMSO	10% DMSO	1% DMSO	B11; PBS

[0720] 在进行试验的当天,制备试验固定剂缓冲液和1 $\times$ 溶解溶液,在冰上储存。如前所述在100%DMSO中制备化合物稀释液。在K2 EDTA Vacutainers中收集人全血。一旦血液送达实验室,如前述和表1中的描述进行化合物在PBS中的稀释。

[0721] 将10 $\mu$ l的10 $\times$ 化合物终浓度加入深96-孔板的适当的孔中,但是其中加入10 $\mu$ l的10%DMSO代替化合物的对照除外,如表1中系列稀释液所示。深孔试验板的外圈孔加满1200 $\mu$ l的无菌蒸馏水以防止边缘效应(A1-H1、A1-A12、A12-H12行)。

[0722] 测定每个待检测血液供体的IL-8剂量响应,监测供体对IL-8的响应。在试验的该步骤,制备IL-8剂量响应样品,将10 $\mu$ l的PBS加至指定的孔中。此外,每天还要评价没有DMSO的试验窗。对于试验制备中该步骤的此类样品而言,加入10 $\mu$ l的PBS代替10%DMSO。

[0723] 将80 $\mu$ l的全血加至化合物/10%DMSO/PBS中,加入时轻轻地混合一次。在96孔板上加盖,将样品于37 $^{\circ}$ C、水浴中温育15分钟。

[0724] 化合物预温育后,将10 $\times$ 最终的IL-8加至适当的孔中(10 $\mu$ l的20nM IL-8工作储备液,血液中IL-8的终浓度=2nM),将10 $\mu$ l的PBS加至未刺激的对照中。将10 $\times$ 最终剂量响应范围的IL-8也加至指定的孔中(试验板上最终的浓度范围为200nM-0.0005nM,PBS中1:5的系列稀释液)。将IL-8和PBS加至横跨所有试验板的适当的孔中,顺序与化合物加入的血液的顺序相同。加入所有试验板后,将样品快速混合一次以保证IL-8均匀分布。将样品于37 $^{\circ}$ C、水浴中温育5分钟。温育后,将样品板转移至冰上,同时快速向所有孔中加入250 $\mu$ l冷冻的试验固定剂缓冲液。

[0725] 将样品在冰上温育7分钟(不要混合)。固定后,迅速地向每个孔中加入1.2ml的1 $\times$ 溶解溶液。加入后将样品混合一次,在冰上温育30分钟完成均匀的红细胞溶解。溶解后,将200 $\mu$ l样品转移至冰上的96孔微量板。采用HTS以高通量模式在Becton Dickinson FACS Canto II上获得样品。根据不同的侧向散射(SSC)和前向散射(FSC)特征鉴定粒细胞。采用藻红蛋白通道区分嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞,因为后者具有较高的自体荧光。

[0726] 嗜中性粒细胞群的平均FSC值可以用于测定细胞形态的变化(较大的FSC值表示形态变化的成度较高)。数据表示为IL-8剂量响应曲线基底和试验窗对照基底之上相应的形态变化%,也可以表示为化合物处理样品相应的形态变化的抑制%。

[0727] 基底上的形态变化%

[0728] 自激动剂FSC读数减去未刺激对照FSC读数,结果除以未刺激FSC值,再乘以100,获得基底上形态变化%。

[0729] 抑制%

[0730] 抑制% =  $(X-Y) / X * 100$  (图2. 样品值)

[0731]  $X = \text{IL-8FSC响应减去未刺激对照(基底)FSC}$ 。

[0732]  $(120,984-86,163 = 34821 = X)$

[0733]  $Y = \text{化合物处理样品中IL-8FSC响应减去未刺激对照(基底)FSC}$ 。

[0734]  $(89,841-86,163 = 3678 = Y)$

[0735]  $(34821-3678) / 34821 * 100 = 89\%$ 的形态变化抑制率

[0736] 对应于X-轴上的化合物浓度在Y-轴上绘制%抑制率值,获得IC<sub>50</sub>值。

[0737] 实施例1-13的生化试验数据如下表所示:

[0738] 表4:生化试验数据

	试验 A	试验 B	试验 C	试验 D	试验 E	试验 F	试验 G
[0739] 实施例	PI3K $\alpha$	PI3K $\beta$	VPS34	PI4K $\beta$	PI3K $\gamma$	PI3K $\delta$	mTOR
	IC50( $\mu\text{M}$ )	IC50( $\mu\text{M}$ )	IC50( $\mu\text{M}$ )	IC50( $\mu\text{M}$ )	IC50( $\mu\text{M}$ )	IC50( $\mu\text{M}$ )	IC50( $\mu\text{M}$ )
	1	2	3	4	5	6	7
	0.19	6.16	3.07	> 9.1	0.022	0.20	5.25
	0.05	0.71	3.45	> 9.775	0.019	0.06	1.18
	0.08	1.45	5.30	> 9.55	0.048	0.07	3.85
	0.06	0.68	4.30	> 10	0.014	0.07	0.89
	0.15	1.12	1.81	> 9.1	0.015	0.09	4.77
	0.04	0.45	9.40	> 10	0.013	0.09	0.77
[0740]	0.09	0.63	4.40	> 10	0.011	0.10	6.00
	0.06	0.68	4.40	> 9.55	0.020	0.07	1.95
	0.26	> 9.10	> 9.1	> 9.1	0.160	0.01	> 9.1
	0.07	8.50	> 10	> 10	0.027	0.02	9.80
	0.40	3.93	3.08	> 9.1	0.088	0.12	6.24
	0.16	> 9.10	8.60	> 9.1	0.006	0.01	> 9.1
	0.10	1.90	2.45	> 9.55	0.038	0.04	3.00

[0741] 实施例1-13的细胞试验数据和全血形态变化功能试验数据如下表所示:

[0742] 表5:细胞试验数据和全血形态变化数据

[0743]

	试验 H	试验 I	试验 J	试验 K	试验 L
实施例	PI3K $\alpha$	PI3K $\beta$	PI3K $\delta$	PI3K $\gamma$	WBSC
	IC50( $\mu$ M)	IC50( $\mu$ M)	IC50( $\mu$ M)	IC50( $\mu$ M)	IC50( $\mu$ M)
1				0.329	1.331
2	0.45	0.784	0.3665	0.066	0.266
3	1.02	3.18	1.37	0.080	1.075
4	0.293	0.833	0.285	0.054	0.548
5	0.838	9.42	0.54	0.038	0.179
6	0.709	1.05	0.515	0.022	0.374
7				0.061	0.212
8				0.096	0.625
9	2.48	6.98	1.68	0.599	0.598
10	3.09	3.83	0.771	0.121	0.663
11	1.7	> 10	1.05	0.213	0.752
12	1.14	1.11	0.306	0.122	0.830
13				0.122	0.847