



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112638915 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 201980058750.5

(22) 申请日 2019.09.04

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112638915 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(30) 优先权数据  
62/728913 2018.09.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.03.09

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/049448 2019.09.04

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/055636 EN 2020.03.19

(73) 专利权人 伊莱利利公司  
地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 陈招根 J·A·埃里克森 赵改英

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001  
专利代理师 王颖煜 彭昶

(51) Int.Cl.  
C07D 487/04 (2006.01)  
A61P 17/06 (2006.01)  
A61P 37/00 (2006.01)  
A61K 31/519 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2019023468 A1, 2019.01.31  
WO 2017087590 A1, 2017.05.26  
WO 2004076458 A1, 2004.09.10  
审查员 吕世华

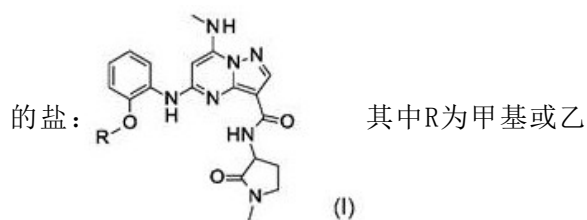
权利要求书2页 说明书19页

## (54) 发明名称

用于治疗银屑病和系统性红斑狼疮的吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺衍生物

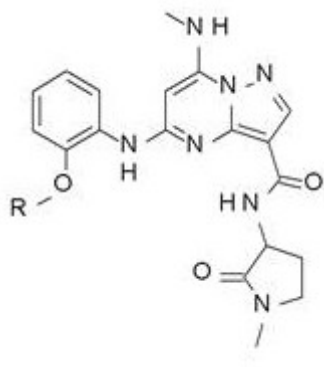
## (57) 摘要

本发明提供了式I化合物或其药学上可接受



其可用于治疗银屑病或系统性红斑狼疮。

1. 下式的化合物或其药学上可接受的盐：

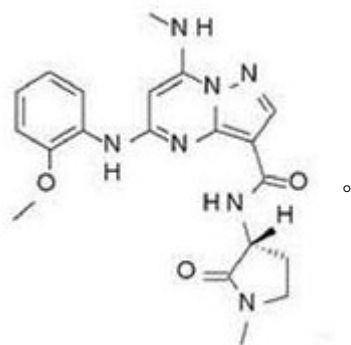


其中R为甲基或乙基。

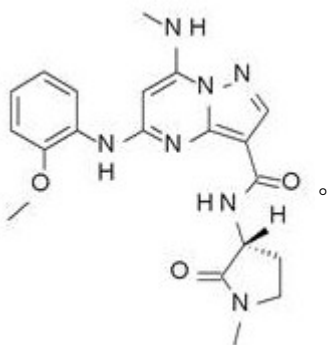
2. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中R为甲基。

3. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中R为乙基。

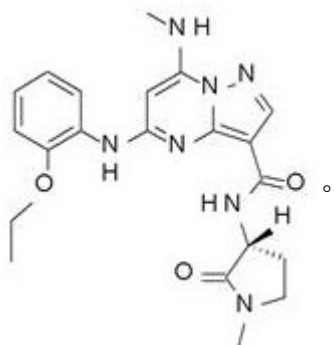
4. 根据权利要求1或权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中所述化合物为：



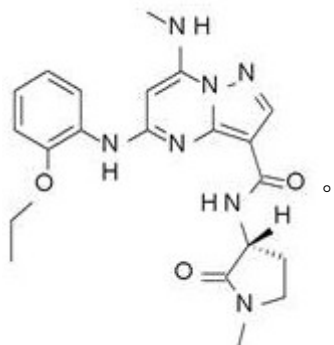
5. 根据权利要求4所述的化合物，其中所述化合物为：



6. 根据权利要求1或权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中所述化合物为：



7. 根据权利要求6所述的化合物,其中所述化合物为:



8. 根据权利要求1至7中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐用于制备用于治疗银屑病的药物的用途。

9. 根据权利要求1至7中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐用于制备用于治疗系统性红斑狼疮的药物的用途。

10. 药物组合物,包含根据权利要求1至7中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

11. 一种制备药物组合物的方法,包括将根据权利要求1至7中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐与一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合。

## 用于治疗银屑病和系统性红斑狼疮的吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺衍生物

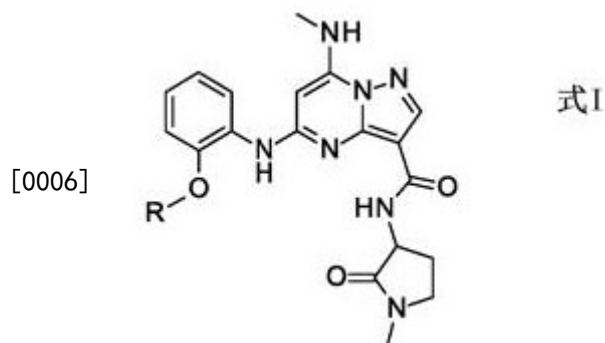
[0001] 本发明涉及与TYK2的假激酶结构域(JH2)结合并抑制某些细胞因子信号转导(特别是IL-23和IFN $\alpha$ 信号转导)的某些新颖的化合物、包含所述化合物的药物组合物、使用所述化合物治疗某些自身免疫性疾病(如银屑病)的方法以及用于所述化合物的合成的中间体和/或方法。

[0002] 本发明属于银屑病和/或其他自身免疫性疾病的治疗领域,所述银屑病和/或其他自身免疫性疾病被认为是由某些促炎细胞因子的TYK2信号转导介导的(参见例如,J.S.Tokarski等人,*J. Biol. Chem.*,第290(17)卷,第11061-11074页(2015))。银屑病是一种慢性皮肤病,其估计会影响普通人群的约2%。银屑病的治疗选项包括,例如,局部治疗(如皮质类固醇)、光疗(如紫外线B(UVB))以及系统治疗(如甲氨蝶呤(methotrexate)和阿普斯特(apremilast))。不幸的是,这样的药剂并不总是提供有效的治疗,并且可能伴有各种不利的副作用。因此,在如银屑病和系统性红斑狼疮的自身免疫性疾病的治疗中存在未满足的需求,并且期望新的治疗选项。

[0003] WO 2017/087590公开了某些咪唑并吡嗪化合物,其通过作用于TYK2以引起信号转导抑制来通过调节IL-12、IL-23和/或IFN $\alpha$ 用于治疗自身免疫性病况,如银屑病或系统性红斑狼疮。第7,557,110号美国专利公开了某些吡唑并[1,5-a]嘧啶衍生物作为激酶抑制剂用于治疗激酶介导的病况,如炎症疾病和自身免疫性疾病。R. Moslin等人,*Med. Chem. Commun.*,第8卷,第700-712页(2017)公开了某些咪唑并[1,2-b]吡嗪TYK2假激酶配体作为TYK2信号转导的有效和选择性抑制剂。

[0004] 需要作用于TYK2 JH2结构域并抑制IL-23和IFN $\alpha$ 信号转导的另外的化合物。本发明提供了与TYK2 JH2结构域结合的某些新颖的化合物。另外,本发明提供了抑制IL-23和IFN $\alpha$ 信号转导的某些新颖的化合物。因此,本发明提供了用于治疗自身免疫性疾病(如银屑病和系统性红斑狼疮)的某些新颖的化合物。

[0005] 因此,本发明提供了式I化合物或其药学上可接受的盐:



[0007] 其中R为甲基或乙基。

[0008] 本发明还提供了在需要这样的治疗的患者中治疗银屑病的方法,包括向所述患者施用有效量的式I化合物或其药学上可接受的盐。本发明进一步提供了在需要这样的治疗的患者中治疗系统性红斑狼疮的方法,包括向所述患者施用有效量的式I化合物或其药学

上可接受的盐。本发明进一步提供了在需要这样的治疗的患者中治疗选自炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、银屑病性关节炎、类风湿性关节炎、斑秃、特应性皮炎、中轴型脊柱关节炎和多发性硬化症的疾病的方法,包括向所述患者施用有效量的式I化合物或其药学上可接受的盐。

[0009] 此外,本发明提供式I化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗,特别是用于治疗银屑病。另外,本发明提供式I化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗系统性红斑狼疮。本发明还提供式I化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗选自炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、银屑病性关节炎、类风湿性关节炎、斑秃、特应性皮炎、中轴型脊柱关节炎和多发性硬化症的疾病。

[0010] 本发明还提供式I化合物或其药学上可接受的盐用于制备用于治疗银屑病的药物的用途。此外,本发明提供式I化合物或其药学上可接受的盐用于制备用于治疗系统性红斑狼疮的药物的用途。本发明还提供式I化合物或其药学上可接受的盐用于制备用于治疗选自炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、银屑病性关节炎、类风湿性关节炎、斑秃、特应性皮炎、中轴型脊柱关节炎和多发性硬化症的疾病的药物的用途。

[0011] 本发明进一步提供了药物组合物,包含式I化合物或其药学上可接受的盐以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。本发明进一步提供了制备药物组合物的方法,包括将式I化合物或其药学上可接受的盐与一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合。本发明还包括用于合成式I化合物的新颖的中间体和方案。

[0012] 如本文所用,术语“治疗”包括抑制、减缓、停止或逆转现有症状或病症的进展或严重程度。

[0013] 如本文所用,术语“患者”是指哺乳动物,特别是人。

[0014] 如本文所用,术语“有效量”是指本发明化合物或其药学上可接受的盐的量或剂量,其在向患者单或多剂量施用后,在被诊断或治疗的患者中提供期望的作用。

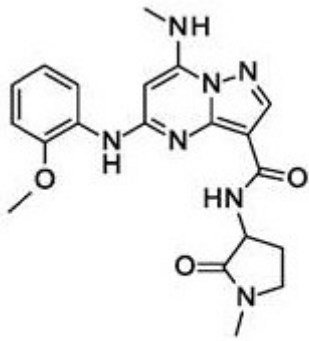
[0015] 本领域技术人员可以通过使用已知技术并通过观察在类似情况下获得的结果来确定有效量。在确定患者的有效量时,主治医生会考虑许多因素,包括但不限于:患者的物种;它的尺寸、年龄和总体健康状况;所涉及的具体疾病或病症;疾病或病症的程度或涉及程度或严重程度;个体患者的响应;施用的特定化合物;施用方式;所施用制剂的生物利用度特征;选择的给药方案;合并用药的使用;和其他相关情况。本发明的化合物被制备成单位剂型,以提供每天的剂量,所述剂量在约0.005 mg/kg至约8 mg/kg体重的范围内。

[0016] 本发明的化合物被配制成药物组合物,所述药物组合物通过使所述化合物生物可利用的任何途径施用。最优选地,这样的组合物用于口服施用。这样的药物组合物及其制备方法是本领域公知的(参见,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy, L.V. Allen 编辑,第22版,Pharmaceutical Press,2012)。

[0017] 式I化合物或其药学上可接受的盐在本发明的治疗方法中特别有用,所有构型、对映异构体及其混合物(包括外消旋物)均考虑在本发明的范围内,尽管某些构型是优选的。下列段落描述了这样的构型。应当理解,这些优选既适用于本发明的治疗方法,也适用于本发明的化合物。

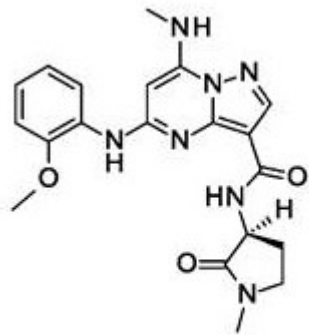
[0018] 本发明的化合物包括:

[0019]

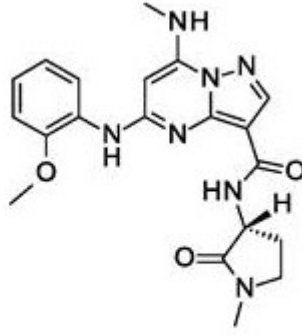


式1a

[0020]

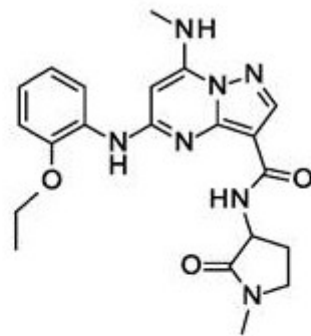


式1a(i),

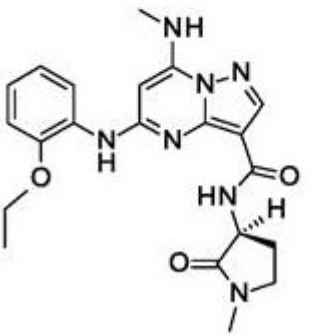


式1a(ii)

[0021]

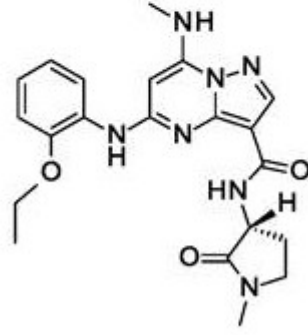


式1b



式1b(i),

和



式1b(ii)

[0022] 以及其药学上可接受的盐。

[0023] 优选式Ia(ii)和式Ib(ii)化合物,其中特别优选式Ia(ii)化合物及其药学上可接受的盐。

[0024] 以下制备中描述的某些中间体可包含一个或多个氮保护基。应当理解,保护基可以如本领域技术人员所理解的根据特定的反应条件和要进行的特定转变而变化。保护和脱保护条件是本领域技术人员公知的,并且描述在文献(参见例如,“*Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis*”,第四版,Peter G.M. Wuts 和 Theodora W. Greene著, John Wiley and Sons, Inc. 2007)中。

[0025] 单独的异构体、对映异构体和非对映异构体可以由本领域普通技术人员在本发明化合物的合成中的任何方便点,通过如选择性结晶技术或手性色谱(参见,例如,J. Jacques等人,“*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*”, John Wiley and Sons, Inc., 1981,以及E.L. Eliel 和 S.H. Wilen,“*Stereochemistry of Organic Compounds*”, Wiley-Interscience, 1994)的方法进行分离或拆分。

[0026] 本发明化合物的药学上可接受的盐可以例如通过在合适的溶剂(如乙醚)中,在本领域中公知的标准条件下,使本发明化合物的适当游离碱与适当的药学上可接受的酸的反应而形成。另外,这样的盐的形成可以在氮保护基脱保护同时发生。参见,例如,Gould, P.L., “Salt selection for basic drugs,” *International Journal of Pharmaceutics*, 33:201-217 (1986); Bastin, R.J.等人 “Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities,” *Organic Process Research and Development*, 4:427-435 (2000); 以及Berge, S.M.等人, “Pharmaceutical Salts,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66:1-19, (1977)。

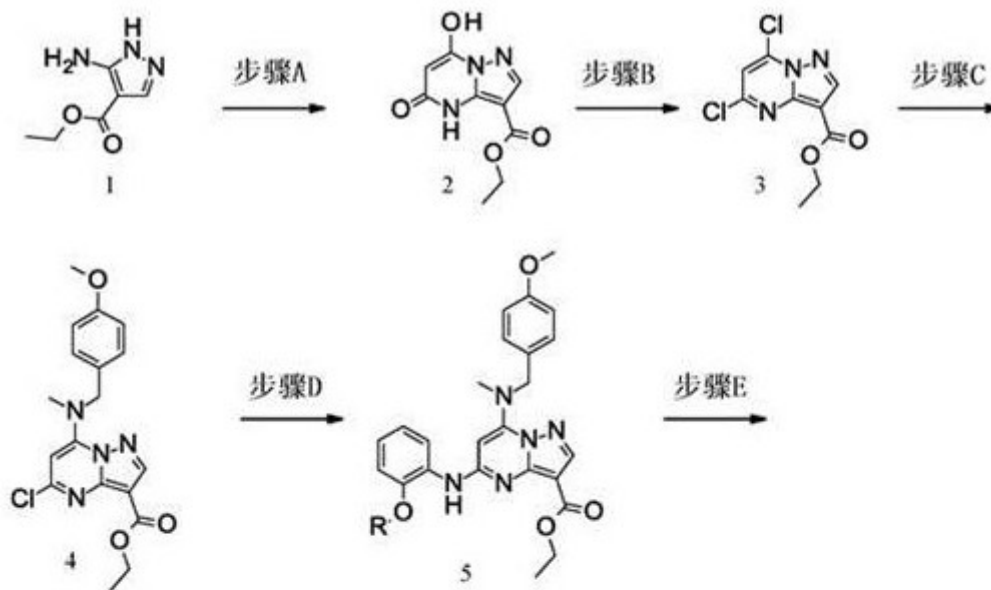
[0027] 某些缩写定义如下:“BOP”是指(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐;“BrettPhos”是指二环己基[3,6-二甲氧基-2’,4’,6’-三(1-甲基乙基)[1,1’-联苯]-2-基]磷;“t-BuOH”是指叔丁醇(t-butanol 和 t-butyl alcohol);“BSA”是指牛血清白蛋白;“CDI”是指1,1’-羰基二咪唑;“DCC”是指1,3-二环己基碳二亚胺;“DCM”是指二氯甲烷;“DEM”是指丙二酸二乙酯;“DIC”是指1,3-二异丙基碳二亚胺;“DIEA”是指N,N-二异丙基乙胺;“DMAP”是指二甲基氨基吡啶;“DMEM”是指杜氏改良eagle培养基(Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium);“DMF”是指N,N-二甲基甲酰胺;“DMSO”是指二甲基亚砷;“DPPA”是指二苯基磷酰基叠氮化物;“EDCI”是指1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;“EtOAc”是指乙酸乙酯;“EtOH”是指乙醇(ethanol 和 ethyl alcohol);“FBS”是指胎牛血清;“HATU”是指1-[双(二甲基氨基)甲叉基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐;“HBTU”是指(1H-苯并三唑-1-基氧基)(二甲基氨基)-N,N-二甲基甲脒基六氟磷酸盐((1H-benzotriazol-1-yloxy)(dimethylamino)-N,N-dimethylmethaniminium hexafluorophosphate);“HEPES”是指4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸;“HOAt”是指1-羟基-7-偶氮苯并三唑;“HOBt”是指1-羟基苯并三唑水合物;“IFN $\alpha$ ”是指干扰素 $\alpha$ ;“IL-12”是指白介素12;“IL-23”是指白介素23;“IPA”是指异丙醇(isopropanol 和 isopropyl alcohol);“JAK”是指Janus激酶;“LiHMDS”是指六甲基二硅基氨基锂;“MeI”是指碘甲烷;“MeNH $_2$ ”是指甲胺;“MeOH”是指甲醇(methanol 和 methyl alcohol);“MTBE”是指甲基叔丁基醚;“NaOEt”是指乙醇钠;“Ni NTA”是指镍-次氨基三乙酸;“PBS”是指磷酸盐缓冲盐水;“Pd(OAc) $_2$ ”是指乙酸钯(II);“PyBOP”是指(苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷)基磷六氟磷酸盐;“PyBrOP”是

指溴(三吡咯烷基)磷六氟磷酸盐;“RPM”是指每分钟转数;“RPMI”是指罗斯威尔帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute);“SPA”是指闪烁迫近分析法;“T3P”是指2,4,6-三丙基-1,3,5,2,4,6-三氧三磷酸-2,4,6-三氧化物(2,4,6-tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphorinane-2,4,6-trioxide);“TEA”是指三乙胺;“TFA”是指三氟乙酸;“THF”是指四氢呋喃;“TYK2”是指酪氨酸激酶2;“UVB”是指紫外线B;“STAT”是指信号转导子和转录蛋白的激活子;以及“YSI”是指硅酸钇。

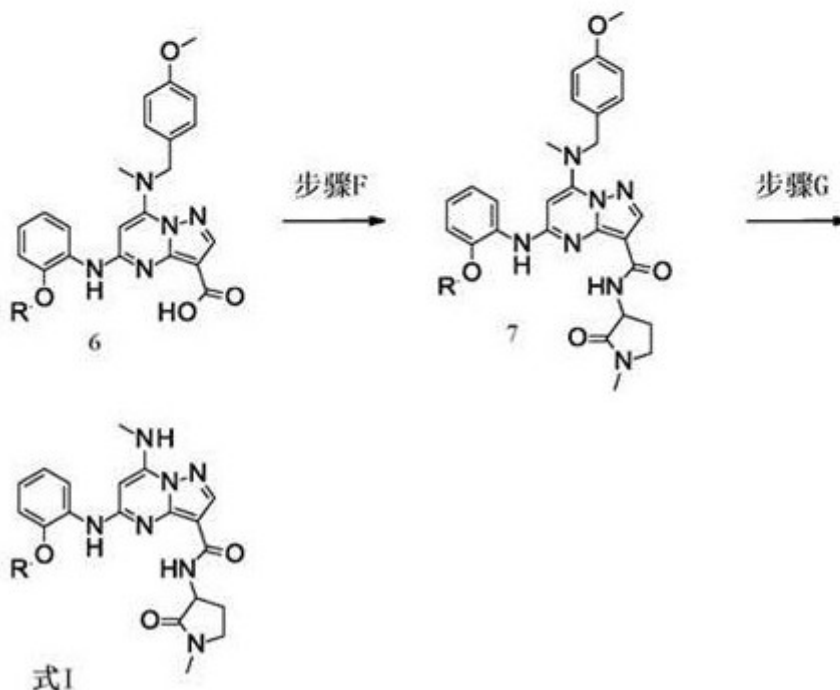
[0028] 本发明的化合物或其盐可以通过本领域普通技术人员已知的多种方法制备,其中一些在以下方案、制备和实施例中说明。以下方案中每个步骤的产物可以通过本领域公知的常规方法进行回收,包括萃取、蒸发、沉淀、色谱、过滤、研磨和结晶。在以下方案中,除非另有说明,否则所有取代基均如先前所定义。试剂和起始原料对于本领域普通技术人员来说是容易获得的。在不限制本发明范围的情况下,提供以下方案、制备和实施例以进一步说明本发明。

[0029] 方案1





[0030]



[0031] 方案1, 步骤A描述了在溶剂(如EtOH)中在约80°C使用合适的碱(如NaOEt或叔丁醇钾), 将DEM添加到化合物(1)中并随后环化成化合物(2)。

[0032] 在步骤B中, 可以在约50-100°C在合适的溶剂(如乙腈)中使用合适的氯源(如POCl<sub>3</sub>)和合适的有机碱(如吡啶)将化合物(2)的7-羟基和5-氧代基团氯化以得到化合物(3)。

[0033] 在步骤C中, 可以在本领域公知的条件下, 在环境温度在合适的溶剂(如1,4-二噁烷)中使用亲核试剂(如1-(4-甲氧基苯基)-N-甲基-甲胺)和合适的有机碱(如DIEA)进行化合物(3)的7-氯基团上的选择性亲核芳香取代以得到化合物(4)。

[0034] 在步骤D中, 可以在本领域熟知的条件下, 使用合适的催化剂和配体组合(如Pd(OAc)<sub>2</sub>和BrettPhos)以及合适的碱(如碳酸钾)在溶剂(如1,4-二噁烷)中用微波在约120°C加热, 在化合物(4)上用胺(如2-甲氧基苯胺或2-乙氧基苯胺)进行Buchwald偶联, 以形成

化合物(5)。

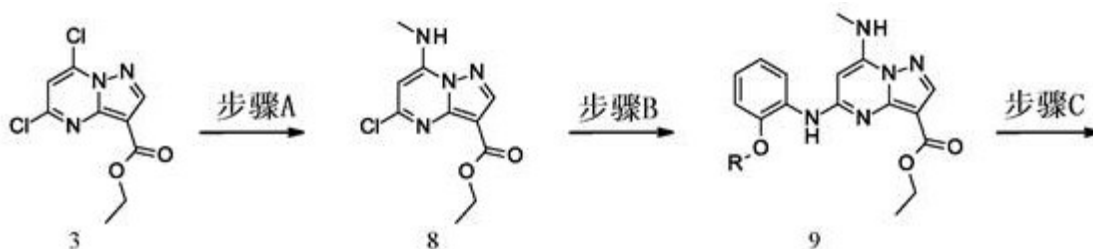
[0035] 如步骤E中所示,可以在约90°C在溶剂(如1,4-二噁烷和EtOH)中用NaOH水溶液处理化合物(5),以通过酯的碱性水解得到化合物(6)。

[0036] 在步骤F中,可以使用合适的有机碱(如DIEA)和合适的偶联剂(如BOP)在合适的溶剂(如DMF)中在化合物(6)和胺(如3-氨基-1-甲基-吡咯烷-2-酮)之间进行酰胺偶联以得到化合物(7)。本领域技术人员将认识到,有几种适当的方法用于得自羧酸和胺的反应的酰胺形成。例如,在偶联剂的存在下,在有或没有有机碱(如DIEA或TEA)的情况下,胺化合物与适当的羧酸的反应可提供步骤F的化合物。偶联剂包括碳二亚胺(如DCC、DIC、EDCI)或羰基二咪唑(如CDI)。酰胺偶联添加剂(如HOBt和HOAt)也可以用于促进反应。另外,可以使用非亲核性阴离子的脲鎓或磷盐(如HBTU、HATU、PyBOP和PyBrOP)代替更传统的偶联剂。可以使用添加剂(如DMAP)来促进反应。

[0037] 在步骤G中,在标准条件下在合适的溶剂(如DCM)中使用合适的酸(如TFA)将化合物(7)脱保护,得到式I化合物。

[0038] 方案2提供式I的外消旋化合物的另外的合成。

[0039] 方案2



[0040]



[0041] 在方案2,步骤A中,可以在本领域公知的条件下,在环境温度在合适的溶剂(如THF)中使用适当的亲核试剂(如MeNH<sub>2</sub>)进行化合物(3)的7-氯基团上的选择性亲核芳香取代,以得到化合物(8)。

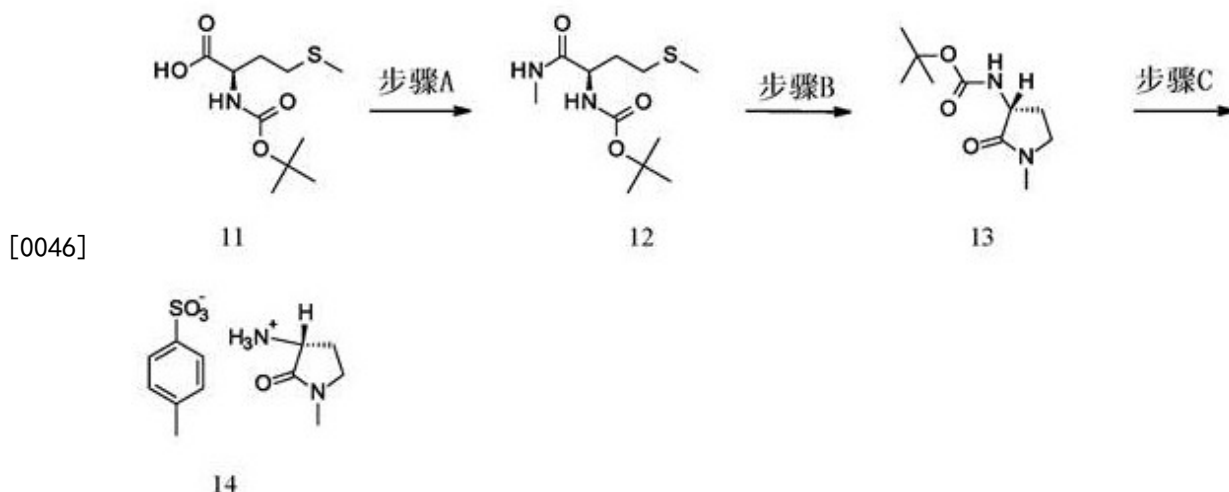
[0042] 在步骤B中,可以在标准微波条件下在合适的溶剂体系(如1,4-二噁烷、2-甲基-2-丁醇和乙酸)中,使用合适的催化剂和配体体系(如氯化烯丙基钯(II)二聚体和(R)-(+)-2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘)与合适的碱(如碳酸钾),加热至105°C,用胺(如2-甲氧基苯胺或2-乙氧基苯胺)在化合物(8)上进行Buchwald偶联,以形成化合物(9)。

[0043] 如步骤C中所示,可以在约90°C在合适的溶剂(如EtOH)中用合适的碱(如氢氧化锂水溶液)处理化合物(9),以通过酯的碱性水解得到化合物(10)。

[0044] 步骤D描述了在本领域公知的条件(如在方案1步骤F中一般描述的)下在溶剂(如

THF)中使用合适的有机碱(如DIEA)和合适的偶联剂(如EDCI)以及合适的添加剂(如HOBt)在化合物(10)和胺(如3-氨基-1-甲基-吡咯烷-2-酮)之间通过酰胺偶联形成式I。

[0045] 方案3

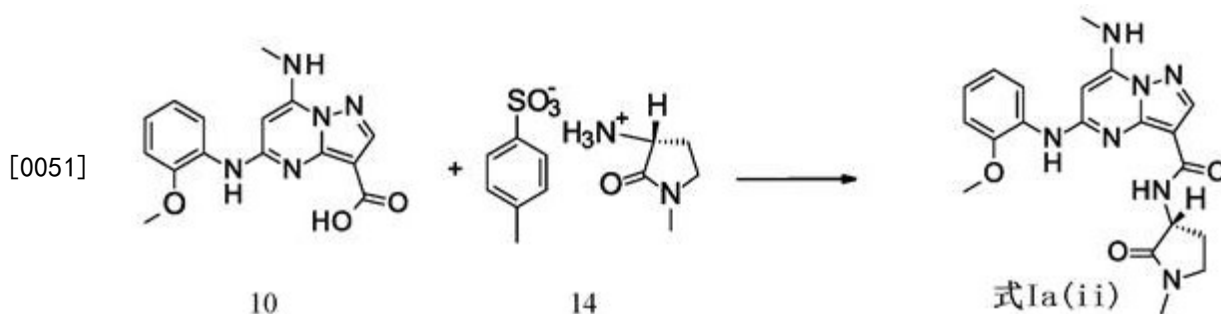


[0047] 在方案3,步骤A中,化合物(12)的形成显示为在本领域公知的条件(如在方案1步骤F中一般描述的)下在溶剂(如DMF)中在0-22℃使用合适的有机碱(如DIEA)和合适的偶联剂(如HATU)在化合物(11)和MeNH<sub>2</sub>之间的酰胺偶联。

[0048] 在步骤B中,可采用将MeI添加至化合物(12)以形成二甲基硫碘盐,然后在适当的溶剂(如THF)中在0-22℃用适当的碱(如LiHMDS)处理,以得到环化化合物(13)。

[0049] 在步骤C中,在标准条件下在合适的溶剂(如乙腈)中在约55℃使用合适的酸(如4-甲基苯磺酸)将化合物(13)脱保护,然后添加溶剂(如MTBE)以沉淀化合物(14)。

[0050] 方案4

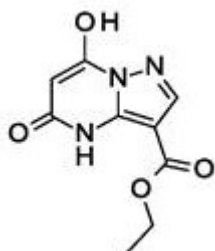


[0052] 在方案4中,式Ia(ii)的形成描述为在本领域公知的条件(如在方案1步骤F中一般描述的)下在溶剂(如EtOAc)中在约80℃使用合适的有机碱(如吡啶)和合适的偶联剂(如T3P)在化合物(10)和化合物(14)之间的酰胺偶联。

[0053] 制备1

[0054] 7-羟基-5-氧代-4H-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯

[0055]



[0056] 方案1,步骤A:将5-氨基-1H-吡唑-4-甲酸乙酯(12.5 g,80.6 mmol)和DEM(18.5 mL,121 mmol)溶于EtOH(90 mL)中。向该混合物中添加NaOEt(在EtOH中21 m%,45.1 mL,121 mmol),并将所述反应在90°C搅拌24小时。此时间之后,将反应冷却至环境温度。然后将混合物用5 N HCl水溶液酸化,并将得到的沉淀过滤,得到标题化合物,为白色固体(11.7 g,65.1%)。ES/MS  $m/z$  224 (M+H)。

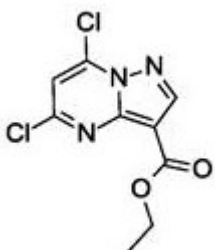
[0057] 另外的制备1

[0058] 方案1,步骤A:在25°C在氮气下向5-氨基-1H-吡唑-4-甲酸乙酯(400 g,2.58 mol)和DEM(584 mL,3.87 mol)在EtOH(6.00 L)中的溶液中添加叔丁醇钾(578 g,5.16 mol)。将所述溶液在80°C搅拌12小时,然后将反应冷却至22°C。用0.1 N HCl(2 L)稀释反应混合物,并用5 N HCl将pH调节至3。将混合物过滤并将滤饼用水(800 mL)洗涤。将固体在真空下干燥至恒重,得到标题化合物,为灰白色固体(460 g,81%)。ES/MS  $m/z$  224 (M+H)。

[0059] 制备2

[0060] 5,7-二氯吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯

[0061]



[0062] 方案1,步骤B:将7-羟基-5-氧代-4H-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯(11.7 g,52.4 mmol)悬浮在乙腈(50 mL)中,并用氮气吹扫5分钟。在50°C向该混合物中添加POCl<sub>3</sub>(14.8 mL,157 mmol),随后添加吡啶(4.28 mL,52.4 mmol),然后将反应在100°C搅拌5小时。此时间之后,将反应冷却至环境温度,并倒入冰/水混合物中。将该混合物用饱和碳酸氢钠水溶液中和,并将得到的沉淀过滤,得到标题化合物,为白色固体(13 g,95.3%)。ES/MS  $m/z$  (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 260/262 [M+H]<sup>+</sup>。

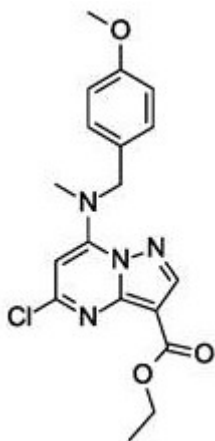
[0063] 另外的制备2

[0064] 方案1,步骤B:向7-羟基-5-氧代-4H-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯(400 g,1.79 mol)在乙腈(2 L)中的悬浮液中,在50°C在氮气下滴加POCl<sub>3</sub>(416 mL,4.48 mol)和吡啶(217 mL,2.69 mol)。将反应在80°C搅拌12小时。蒸发反应混合物,并将残余物倒入水(2 L)中。将反应混合物过滤并将固体用水(800 mL)洗涤。将固体在真空下干燥至恒重,得到标题化合物,为橙色固体(360 g,66%)。ES/MS  $m/z$  (<sup>35</sup>Cl/<sup>37</sup>Cl) 260/262 [M+H]<sup>+</sup>。

[0065] 制备3

[0066] 5-氯-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯

[0067]

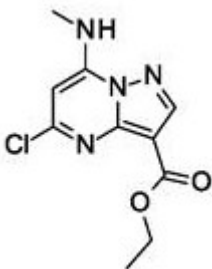


[0068] 方案1,步骤C:将5,7-二氯吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯(5 g,19.2 mmol)溶于1,4-二噁烷(40 mL)中。向该混合物中添加1-(4-甲氧基苯基)-N-甲基-甲胺(3.5 g,20 mmol),随后添加DIEA(6.7 mL,38.4 mmol),并将反应在环境温度搅拌2小时。此时间之后,将反应用水(100 mL)淬灭,并用EtOAc(3×100 mL)萃取。然后将合并的有机相经硫酸镁干燥、过滤并蒸发。残余物经由硅胶色谱(0-70% 在己烷中的EtOAc)纯化,得到标题化合物,为粘稠的澄清油,其经静置固化成白色固体(3.55 g,49.3%)。ES/MS  $m/z$  ( $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ ) 375/377  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0069] 制备3a

[0070] 5-氯-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯

[0071]



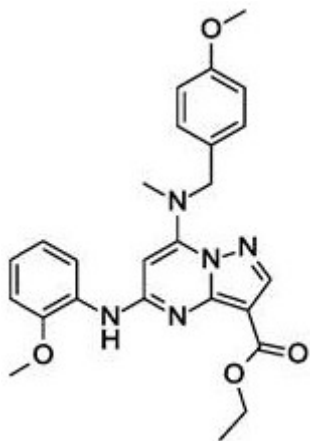
[0072] 方案2,步骤A:将5,7-二氯吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯(50.0 g,192 mmol)添加到THF(250 mL)中,并将溶液冷却至10°C。然后添加 $\text{MeNH}_2$ (33% w/w在乙醇中)(79 mL,634 mmol)的溶液,保持温度低于20°C。将反应混合物搅拌并温热至22°C,并搅拌4小时。然后添加水(300 mL),并将混合物再搅拌1小时。

[0073] 过滤收集所得固体,并用THF/水混合物(2:3)(100 mL)和水(400 mL)洗涤。然后将固体在真空(10 mbar/50°C)下干燥至恒重,得到标题化合物,为浅棕色固体(49.5 g,90%)。ES/MS  $m/z$  ( $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ ) 255/257  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0074] 制备4

[0075] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯

[0076]



[0077] 方案1,步骤D:在四个微波小瓶中的每一个中,将5-氯-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯(2.5 g,6.7 mmol)和2-甲氧基苯胺(0.9 g,7.3 mmol)溶于1,4-二噁烷(17 mL)中。向该混合物中添加碳酸钾(1.4 g,10 mmol),然后添加BrettPhos(0.37 g,0.67 mmol)和Pd(OAc)<sub>2</sub>(0.15 g,0.67 mmol)。将反应微波加热至120℃保持2小时。此时间之后,将反应冷却至环境温度。合并反应混合物,通过硅藻土过滤并蒸发。所得残余物经由硅胶色谱(30-50% 在己烷中的EtOAc)纯化,得到标题化合物,为灰白色泡沫状物(10.8 g,88.0%)。ES/MS *m/z* 462 (M+H)。

[0078] 以与制备4的方法基本相似的方式制备以下化合物。

[0079] 表1

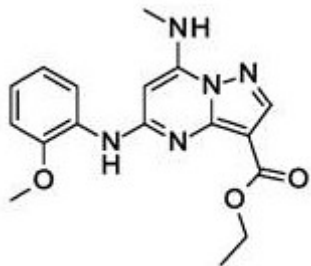
[0080]

制备号	化学名称	结构	物理数据
5	5-(2-乙氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯		ES/MS <i>m/z</i> 476 (M+H)

[0081] 制备4a

[0082] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯

[0083]



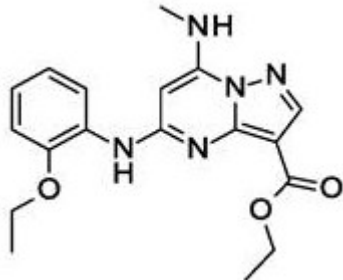
[0084] 方案2,步骤B:向带有机械搅拌器、冷凝器和氮气入口的1 L 3颈圆底烧瓶中添加

5-氯-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯(53.0 g, 197.7 mmol)、2-甲氧基苯胺(25.1 g, 203.9 mmol)和碳酸钾(60.0 g, 434.1 mmol), 随后添加1,4-二噁烷(250 mL)和无水2-甲基-2-丁醇(250 mL)。将混合物搅拌并用氮气吹扫30分钟。然后, 添加乙酸(23.0 mL, 401.4 mmol)、氯化烯丙基钡(II)二聚体(0.4 g, 1.07 mmol)和(R)-(+)-2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-联萘(1.37 g, 2.13 mmol), 并继续氮气吹扫15分钟。然后将反应混合物在105°C加热20小时。此时间之后, 停止加热, 并以细流添加水(400 mL)。在搅拌的同时将所得混合物冷却至环境温度, 然后进一步冷却至15°C保持2小时。过滤收集所得固体, 并用水/叔戊醇(9:1)混合物(3×100 mL)和水(150 mL)洗涤。将固体在真空(10 mbar/35°C)下干燥至恒重, 得到标题化合物, 为米色固体(66.5 g, 95.6%)。ES/MS  $m/z$  342 (M+H)。

[0085] 以与制备4a的方法基本相似的方式制备以下化合物。

[0086] 表2

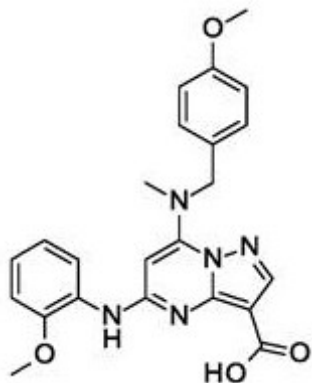
[0087]

制备号	化学名称	结构	物理数据
5a	5-(2-乙氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯		ES/MS $m/z$ 356 (M+H)

[0088] 制备6

[0089] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸

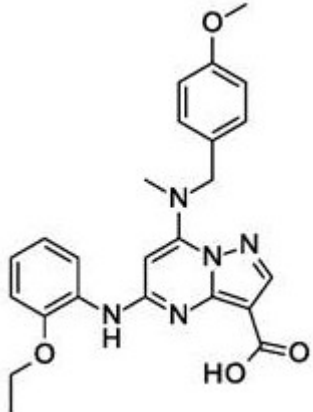
[0090]



[0091] 方案1, 步骤E: 将5-(2-甲氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯(10.8 g, 23.4 mmol)溶于1,4-二噁烷(117 mL)和EtOH(4.7 mL)中。向该混合物中添加2.5 N NaOH水溶液(37 mL, 93.6 mmol), 并将反应在90°C搅拌20小时。此时间之后, 将反应冷却至环境温度并蒸发以除去挥发性有机物。然后将剩余的水溶液用1 N HCl水溶液调节至大约pH 5, 并将固体沉淀物用氯仿/IPA(3:1)(3×300 mL)萃取。合并的有机层经无水硫酸钠干燥、过滤并蒸发, 得到标题化合物, 为灰白色固体(9.54 g, 89.9%)。ES/MS  $m/z$  434 (M+H)。

[0092] 以与制备6的方法基本相似的方式制备以下化合物。

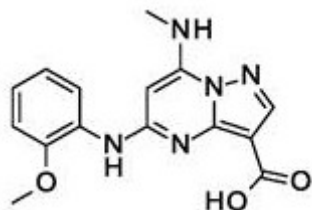
## [0093] 表3

[0094] 制备号	化学名称	结构	物理数据
7	5-(2-乙氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸		ES/MS $m/z$ 448 (M+H)

## [0095] 制备6a

[0096] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸

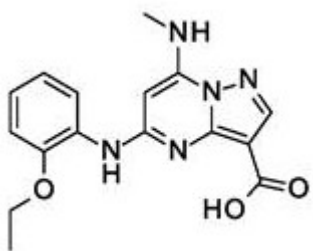
[0097]



[0098] 方案2,步骤C:将5-(2-甲氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸乙酯(5.98 g,17.3 mmol)、EtOH(48 mL)、水(30 mL)和氢氧化锂(1.2 g,50.0 mmol)的混合物回流4小时。此时间之后,将反应混合物冷却至70℃,并通过添加HCl(10% w/w)中和以调节至pH 2。然后,将反应混合物冷却至2℃并搅拌2小时。通过过滤收集所得固体,并用水(30 mL)洗涤。将固体在真空下干燥至恒重,得到标题化合物,为奶油色固体(5.55 g,100%)。ES/MS  $m/z$  314 (M+H)。

[0099] 将与制备6a的方法基本相似的方式制备以下化合物。

## [0100] 表4

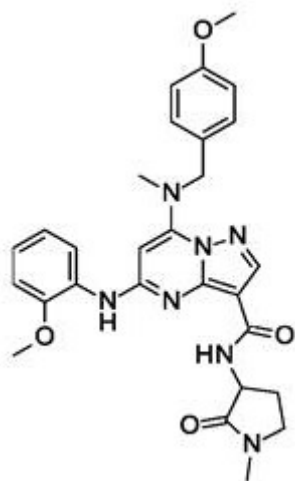
[0101] 制备号	化学名称	结构	物理数据
7a	5-(2-乙氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸		ES/MS $m/z$ 328 (M+H)

## [0102] 制备8

[0103] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]-N-[rac-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺



[0104]



[0105] 方案1,步骤F:向5-(2-甲氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸(0.30 g,0.69 mmol)和外消旋的3-氨基-1-甲基-吡咯烷-2-酮(0.095 g,0.83 mmol)在DMF(3.5 mL)中的混合物中添加BOP(0.41 g,0.93 mmol)和DIEA(0.48 mL,2.77 mmol)。将反应混合物在环境温度在氮气下搅拌60小时。此时间之后,将反应用饱和氯化铵水溶液(30 mL)淬灭,并用EtOAc(50 mL)萃取。有机层用水和饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥、过滤并蒸发。将该残余物经由硅胶色谱(2-4% 在DCM中的MeOH)纯化,得到标题化合物(0.30 g,83.2%)。ES/MS  $m/z$  530 (M+H)。

[0106] 以与制备8的方法基本相似的方式制备以下化合物。

[0107] 表5

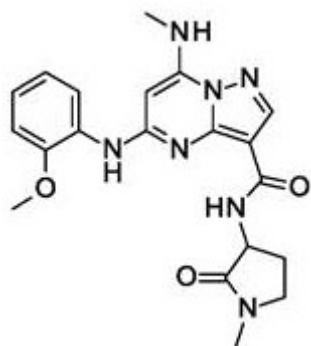
[0108]

制备号	化学名称	结构	物理数据
9	5-(2-乙氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]-N-[rac-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺		ES/MS $m/z$ 544 (M+H)

[0109] 制备10

[0110] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)-N-[rac-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺

[0111]



[0112] 方案1,步骤G:将5-(2-甲氧基苯胺基)-7-[(4-甲氧基苯基)甲基-甲基-氨基]-N-[rac-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(0.3 g,0.58 mmol)在DCM(11.5 mL)和TFA(11.5 mL)中的溶液在环境温度搅拌4小时。此时间之后,将反应蒸发以除去挥发性有机物。将残余物用DCM(20 mL)和7 M在甲醇中的氨(4 mL)处理。将所得混合物搅拌10分钟并蒸发。然后将残余物经由硅胶色谱(2-8%在DCM中的MeOH)纯化,得到标题化合物(0.18 g,74.2%)。ES/MS  $m/z$  410 (M+H)。

[0113] 以与制备10的方法基本相似的方式制备以下化合物。

[0114] 表6

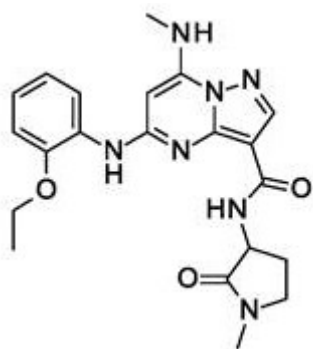
[0115]

制备号	化学名称	结构	物理数据
11	5-(2-乙氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)-N-[rac-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺		ES/MS $m/z$ 424 (M+H)

[0116] 另外的制备11

[0117] 5-(2-乙氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)-N-[rac-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺

[0118]

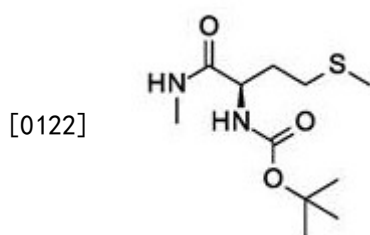


[0119] 方案2,步骤D:将5-(2-乙氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(4.5 g,8.9 mmol)、外消旋3-氨基-1-甲基-吡咯烷-2-酮(1.2 g,11.0 mmol)和HOBt(1.8

g, 13.0 mmol) 悬浮在 THF (89 mL) 中。在 0°C 向该混合物中添加 EDCI (2.6 g, 13.0 mmol) 和 DIEA (6.2 mL, 36.0 mmol)。使反应温热至环境温度, 并在氮气下搅拌 18 小时。此时间之后, 将反应蒸发以除去挥发性有机物。所得残余物用水 (300 mL) 处理, 并用氯仿/IPA 的混合物 (3:1) (3×300 mL) 萃取。合并的有机层经无水硫酸钠干燥、过滤并蒸发。然后将残余物经由硅胶色谱 (3-10% 在 DCM 中的 MeOH) 纯化, 得到标题化合物 (3.5 g, 92.0%)。ES/MS  $m/z$  424 (M+H)。

[0120] 制备 12

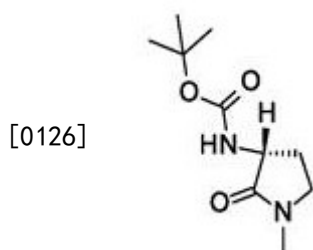
[0121] N-[(1R)-1-(甲基氨基甲酰基)-3-甲基硫基-丙基]氨基甲酸叔丁酯



[0123] 方案 3, 步骤 A: 将 (叔丁氧羰基)-D-蛋氨酸 (400 g, 1.6 mol)、盐酸甲胺 (162.47 g, 2.4 mol) 和 DIEA (700 mL, 4.01 mol) 在 DMF (4 L) 中的溶液冷却至 0°C, 并添加 HATU (732.1 g, 1.92 mol)。将反应温热至环境温度。搅拌 2 小时后, 蒸发溶剂。然后添加水 (10 L), 并用 DCM (2 x 3 L) 萃取水溶液。有机层合并, 用饱和碳酸氢钠水溶液 (3L) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 并蒸发。所得残余物通过硅胶色谱纯化, 用己烷中的 EtOAc 洗脱, 得到标题化合物, 为白色固体 (368 g, 87%)。ES/MS  $m/z$  263 (M+H)。

[0124] 制备 13

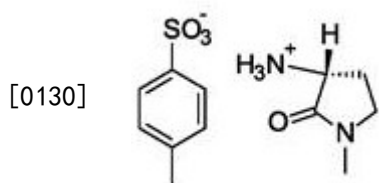
[0125] N-[(3R)-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]氨基甲酸叔丁酯



[0127] 方案 3, 步骤 B: 将 N-[(1R)-1-(甲基氨基甲酰基)-3-甲基硫基-丙基]氨基甲酸叔丁酯 (368 g, 1.40 mol) 和 MeI (3.68 L, 59.11 mol) 的混合物在环境温度搅拌 18 小时。然后, 将混合物蒸发。将部分所得的粗制二甲基碘盐 (210 g, 0.52 mol) 溶于 THF (4.7 L) 中, 在氮气氛围下冷却至 0°C, 并滴加 LiHMDS (1.00 M 在 THF 中的溶液, 1.16 L, 1.16 mol)。然后将反应混合物温热至环境温度。4 小时后, 添加水 (2.4 L), 并将溶剂蒸发至一半体积。将混合物用 DCM (2×3 L) 萃取。合并有机物并蒸发。残余物通过硅胶色谱纯化, 用在 DCM 中的 MeOH 洗脱, 得到标题化合物, 为白色固体 (50 g)。ES/MS  $m/z$  215 (M+H)。手性 HPLC:  $R_t$  (保留时间) = 9.13 分钟; LC 柱: ChiralPac IA OD 4.6 x 250 mm 5  $\mu$ m; 等度: 0.1% 二乙胺/己烷/乙醇 (85/15); 柱温: 25°C; 流速: 1.0 mL/min。旋光度:  $[\alpha]_D^{20} = +53^\circ$  (C=0.5, MeOH)。

[0128] 制备 14

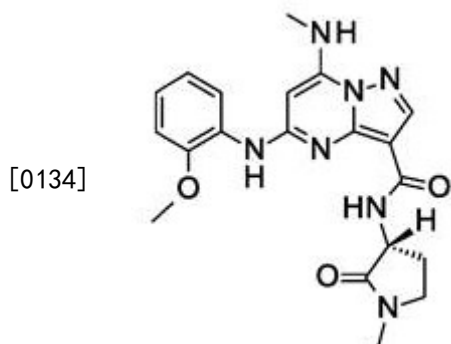
[0129] (3R)-3-氨基-1-甲基-吡咯烷-2-酮; 对甲苯磺酸盐



[0131] 方案3,步骤C:将N-[(3R)-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]氨基甲酸叔丁酯(46 g, 214.69 mmol)和4-甲基苯磺酸(74.5 g, 433 mmol)在乙腈(500 mL)中的混合物加热至55℃,并搅拌4小时。然后,添加MTBE(1 L),并将混合物冷却至22℃。通过过滤收集所得固体,用另外的MTBE洗涤,并在真空下干燥至恒重,得到标题化合物,为白色固体(60 g, 95%)。ES/MS  $m/z$  115 (M+H)。旋光度: $[\alpha]_D^{20} = +31.3^\circ$  (C=0.5, MeOH)。

[0132] 实施例1

[0133] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)-N-[(3R)-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺



[0135] 方案4:将5-(2-甲氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酸(50 g, 159.6 mmol)和(3R)-3-氨基-1-甲基-吡咯烷酮-2-酮;对甲苯磺酸盐(60 g, 222 mmol)在吡啶(150 mL)中的混合物在环境温度搅拌15分钟。然后添加T3P(1.67 M在EtOAc中的溶液, 185 mL, 309 mmol),并将混合物在80℃加热3小时。将反应混合物冷却至60℃,并添加水(600 mL)。将反应冷却至环境温度,并通过过滤收集所得固体,并用水(100 mL)洗涤。

[0136] 将所得湿固体溶于DMSO(300 mL)中,并加热至60℃。添加活性炭(2 g)并在60℃搅拌30分钟。然后将混合物经硅藻土过滤。从滤液上方滴加水(300 mL),保持温度在60℃。将混合物冷却至环境温度,且所得固体通过过滤收集,并用水(100 mL)洗涤。将固体在真空下干燥至恒重,得到标题化合物,为白色固体(52 g, 78%)。ES/MS  $m/z$  410 (M+H)。手性SFC:Rt(保留时间)=1.63分钟;SFC柱:Chiralpak AD(4.6 x 100 mm) 5 μm;等度:IPA(0.2% IPAm);柱温:40℃;流速:5.0 mL/min。旋光度: $[\alpha]_D^{20} = -4.19^\circ$  (C=0.3, MeOH)。

[0137] 另外的实施例1

[0138] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)-N-[(3R)-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺

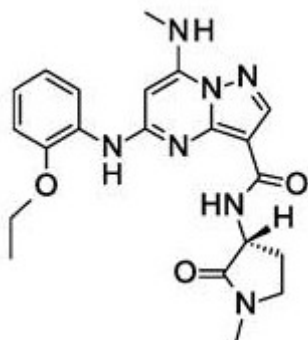
[0139] 5-(2-甲氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)-N-[rac-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺的外消旋混合物经手性色谱纯化,得到第一洗脱对映异构体,为标题化合物。ES/MS  $m/z$  410 (M+H)。纯化条件:CHIRALPAK® AD-H;流动相:10% 在MeOH中的ACN;流速:30 mL/min;UVW:225 nm;保留时间:2.53分钟。

[0140] (S对映异构体保留时间:3.78分钟)。

[0141] 实施例2

[0142] 5-(2-乙氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)-N-[(3R)-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺

[0143]



[0144] 5-(2-乙氧基苯胺基)-7-(甲基氨基)-N-[rac-1-甲基-2-氧代-吡咯烷-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺的外消旋混合物经手性色谱纯化,得到第一洗脱对映异构体,为标题化合物。ES/MS  $m/z$  424 (M+H)。纯化条件:CHIRALPAK® AD-H;流动相:40% 在CO<sub>2</sub>中的EtOH;流速:70 g/min;UVW:260 nm;保留时间:2.56分钟。

[0145] (S对映异构体保留时间:4.28分钟)。

[0146] 通过闪烁逼近分析法与TYK2 JH2结合

[0147] 将具有N端His<sup>6</sup>标签的人JAK(胞质酪氨酸激酶的Janus家族)家族酪氨酸激酶2(TYK2)的假激酶结构域(JH2)在杆状病毒中表达,并通过Ni-NTA亲和力和尺寸排阻色谱纯化。钇(YSi)His-Tag闪烁逼近分析法(SPA)珠(cat#PRNQ0096)购自PerkinElmer Life Sciences。<sup>3</sup>H-N-[(1R)-1-[3-[8-甲基-5-(甲基氨基)-8H-咪唑并[4,5-d]噻唑并[5,4-b]吡啶-2-基]苯基]乙基]-2-(甲基磺酰基)苯甲酰胺由Quotient Bio合成,比活度为63 Ci/mmol,浓度为6.78 μM(储存在乙醇中)(cat#TRQ41678)(另参见例如,J.S.Tokarski等人,*J. Biol. Chem.*, 第290(17)卷,第11061-11074页(2015)以及R. Moslin等人,*Med. Chem. Commun.*, 第8卷,第700-712页(2017))。

[0148] 在100% DMSO(200 nL)中制备实施例1的3倍、10点连续稀释液,并使用液体声学处理(acoustic liquid handling)将其转移到96孔白色透明底部非结合表面测定板(Costar 3604)中。用于确定抑制百分比的对照孔中包含DMSO(200 nL)或冷的未标记的抑制剂(200 nL,10 mM,200 μM最终浓度)。将在测定缓冲液(50 mM HEPES,pH 7.5,0.005% Tween-20)中的带有His标签的TYK2 JH2(20 μL,7.1 nM)和<sup>3</sup>H-N-[(1R)-1-[3-[8-甲基-5-(甲基氨基)-8H-咪唑并[4,5-d]噻唑并[5,4-b]吡啶-2-基]苯基]乙基]-2-(甲基磺酰基)苯甲酰胺(50 nM)添加至稀释的抑制剂中。在室温孵育2小时后,将在含有0.2% BSA的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的YSi铜His-Tag SPA珠(100 μL,0.5 mg/mL)添加到每个孔中。在室温15分钟后,使用Trilux Microbeta对放射性进行计数。计算每种抑制剂浓度下放射性配体结合的抑制百分比,并使用Genedata Screener®拟合至四参数非线性对数方程,得出实施例1化合物的IC<sub>50</sub>为0.045 μM(±0.016 μM,n = 3),且实施例2化合物的IC<sub>50</sub>为0.040 μM(±0.012 μM,n = 4),表示为带有平均值的标准误差(SEM)的GeoMetric平均值。该结果表明,实施例1和实施例2的化合物在体外与TYK2 JH2结构域结合。

[0149] TF1细胞中通过pSTAT1的IFN $\alpha$ 信号转导的抑制

[0150] 使TF1细胞(ATCC,CL-2003)在补充有10%透析FBS、0.1 mg/ml氨苄青霉素和2 ng/mL粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的RPMI 1640(GIBCO)中生长。将TF1细胞(每孔100 K)接种在96孔聚-D-赖氨酸包被的板中,所述板处于无血清DMEM中,并在5% CO<sub>2</sub>下于37°C孵育过夜。将实施例1在DMSO中连续稀释,添加到细胞中,并在37°C孵育1小时。然后在37°C用10 ng/ml IFN $\alpha$ 2刺激细胞20分钟。除去培养基后,在含有Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Thermo Scientific #78441)的缓冲液中在室温裂解细胞30分钟。按照供应商推荐的方案,使用AlphaLISA SureFire Ultra p-Stat1(Tyr701)测定试剂盒(Perkin Elmer #ALSU-PST1-A50K)将p-Stat1(Tyr701)的数量定量为在615 nm处的发光。计算每种抑制剂浓度的抑制百分比,并使用Genedata Screener<sup>®</sup>拟合至四参数非线性对数方程,得出实施例1化合物的IC<sub>50</sub>为0.008  $\mu$ M( $\pm$ 0.001  $\mu$ M,n = 5),且实施例2化合物的IC<sub>50</sub>为0.010  $\mu$ M( $\pm$ 0.001  $\mu$ M,n = 4),表示为带有平均值的标准误差(SEM)的GeoMetric平均值。该结果表明,实施例1和实施例2的化合物是TF1细胞中通过pSTAT1的IFN $\alpha$ 信号转导的抑制剂。

[0151] IL23 pSTAT3 AlphaLISA测定

[0152] 表达内源性IL23受体的IL2依赖的Kit225细胞用与萤火虫荧光素酶(SABiosciences CLS-6028L)连接的Lenti STAT3 Reporter稳定转导。使用AlphaLISA技术(TGR Biosciences ALSU-TST3-A50K),在IL2存在下被IL23诱导后,通过定量由STAT3磷酸化引起的基因表达,将这些细胞用于监测TYK2活性。使细胞在补充有10% FBS(Invitrogen 10082)、1X Pen/Strep(Gibco 15140-122)、200 ng/ml嘌呤霉素(Sigma P9620)和新鲜的10 ng/ml重组人IL2(R&D Systems 202-IL-50)的RPMI 1640(Gibco 22400)中生长。

[0153] 为了测定准备,将细胞以300,000个细胞/孔分配到在DMEM(Sigma D5796)中的Biocoat黑色聚-d-赖氨酸包被的透明底部384孔板(Becton Dickinson Bio-Coat 35-4640)中,并在37°C孵育过夜。将溶解在DMSO中的化合物连续稀释1:3,以产生10点浓度响应曲线(最终DMSO = 0.1%)。将细胞与实施例1在37°C预孵育1小时,然后用IL23(最终25 ng/ml)刺激30分钟。在2000 rpm离心10分钟后,将细胞沉淀物用1:1裂解缓冲液(TGR Biosciences)与Halt蛋白酶和磷酸酶(Halt Protease & Phosphatase)抑制剂混合物(Thermo Scientific 1861281)的混合物裂解30分钟。按照供应商推荐的方案进行AlphaLISA反应,并使用Envision读板仪(Perkin Elmer)测量萤火虫素酶的水平。使用四参数非线性对数方程(GeneData Screener 13.0.5)计算相对IC<sub>50</sub>,得出实施例1化合物的IC<sub>50</sub>为0.009  $\mu$ M( $\pm$ 0.001  $\mu$ M,n = 4),且实施例2化合物的IC<sub>50</sub>为0.010  $\mu$ M( $\pm$ 0.002  $\mu$ M,n = 3),表示为带有平均值的标准误差(SEM)的GeoMetric平均值。该结果表明,在基于细胞的测定中,实施例1和实施例2的化合物是IL-23信号转导的抑制剂。