



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110522731 B

(45) 授权公告日 2022.08.02

(21) 申请号 201910753454.9

(22) 申请日 2015.02.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110522731 A

(43) 申请公布日 2019.12.03

(30) 优先权数据
61/940282 2014.02.14 US
61/941064 2014.02.18 US

(62) 分案原申请数据
201580008529.0 2015.02.13

(73) 专利权人 瑞斯比维特有限公司
地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 A.I.朗肖 E.A.F.福代斯
S.T.奥尼恩斯 J.金-昂德伍德
J.D.维纳布尔

(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 李进 彭昶

(51) Int.Cl.
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102395575 A, 2012.03.28
WO 2013/050757 A1, 2013.04.11

审查员 耿爱新

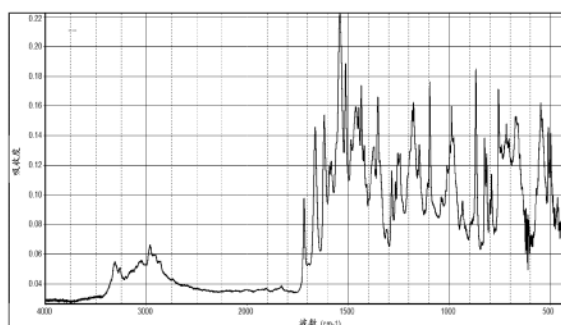
权利要求书1页 说明书44页 附图11页

(54) 发明名称

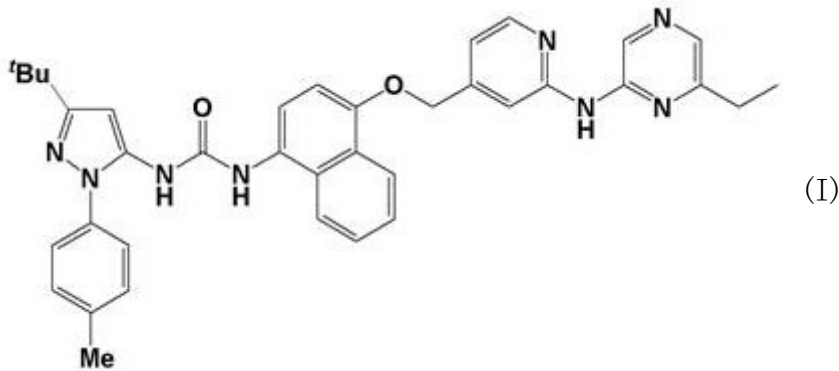
作为抗炎化合物的芳族杂环化合物

(57) 摘要

本发明涉及作为抗炎化合物的芳族杂环化合物。提供了如说明书中所定义的式(I)化合物,该化合物为p38 MAP激酶抑制剂,用作药物以尤其治疗炎症性疾病。



1. 一种干粉药物制剂, 包含式 (I) 化合物,



或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1的干粉药物制剂, 其中所述化合物为其马来酸盐的形式。

3. 根据权利要求2的干粉药物制剂, 其中所述化合物为其2型结晶多晶型物的形式, 特征在于粉末XRD图中具有于4.2, 8.4, 8.7, 11.0, 11.5, 12.6, 14.4, 14.9, 16.0, 17.0, 17.4, 18.8, 19.5, 20.2, 21.7, 22.4, 23.8, 25.8及26.3 (± 0.2) 度 $2-\theta$ 的峰位。

4. 根据权利要求1的干粉药物制剂, 其中所述化合物为其游离碱形式。

5. 根据权利要求1至4中任一项的干粉药物制剂, 其中所述化合物是具有1-10 μm 的质量平均直径的精细分散形式。

6. 根据权利要求1至4中任一项的干粉药物制剂, 其中所述化合物是微粉化的。

7. 根据权利要求1至4中任一项的干粉药物制剂, 包括选自乳糖、葡萄糖和甘露醇的稀释剂。

8. 根据权利要求7的干粉药物制剂, 其中所述稀释剂是乳糖。

9. 根据权利要求7的干粉药物制剂, 其中所述稀释剂是 α -乳糖单水合物。

10. 根据权利要求1至4中任一项的干粉药物制剂, 包括硬脂酸镁或硬脂酸钙。

11. 根据权利要求1至10中任一项的干粉药物制剂在制备药物中的用途, 所述药物用于局部给药至肺部。

12. 根据权利要求1至10中任一项的干粉药物制剂在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗呼吸病症。

13. 根据权利要求12所述的用途, 其中所述呼吸病症是COPD或哮喘。

14. 根据权利要求1至10中任一项的干粉药物制剂在制备药物中的用途, 所述药物用于在具有一种或多种慢性病的患者中治疗炎症疾病的加重或治疗病毒感染。

15. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述炎症疾病的加重是病毒病情的加重。

16. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述慢性病是COPD或哮喘。

17. 根据权利要求1至10中任一项的干粉药物制剂与抗病毒剂的组合产品。

18. 根据权利要求17所述的组合产品, 其中所述抗病毒剂是扎那米韦、奥塞米韦、帕拉米韦或拉尼米韦。

19. 根据权利要求17所述的组合产品, 其中所述抗病毒剂是磷酸奥塞米韦。

20. 一种干粉吸入器装置, 包括根据权利要求1至10中任一项的干粉药物制剂。

作为抗炎化合物的芳族杂环化合物

[0001] 本申请是申请日为2015年2月13日,申请号为201580008529.0,发明名称为“作为抗炎化合物的芳族杂环化合物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种化合物,其为p38有丝分裂原活化蛋白质激酶家族例如其 α 和 γ 激酶亚型及酪氨酸激酶的Src家族的抑制剂(本文中称为p38 MAP激酶抑制剂),还涉及其治疗的用途,包括用于药物组合,尤其是治疗炎性疾病,特别是肺部的炎性疾病,如哮喘及COPD,以及胃肠道的炎性疾病,如溃疡性结肠炎、易激性肠病(IBD)及克罗恩氏病及眼睛的炎性疾病,如葡萄膜炎。

背景技术

[0003] 四种p38 MAPK同工型(分别为 α , β , γ 及 δ),业经证实各自于人类展现不同的组织表达形式。该p38 MAPK α 及 β 同工型经发现于身体内无所不在,存在于许多不同类型的细胞中。该 α 同工型的显著特征在于其在炎症中的作用。虽然使用在小鼠中的化学遗传学方法的研究显示,该p38 MAPK β 同工型未于炎症中起作用(O'Keefe, S.J. et al., J. Biol. Chem., 2007, 282(48), 34663-71),但它可能经由调节COX2的表达而参与疼痛机制(Fitzsimmons, B.L. et al., Neuroreport, 2010, 21(4), 313-7)。这些同工型被很多先前描述的小分子量化合物抑制。早期的抑制剂种类毒性大,这是由于这些同工型的广泛组织分布造成的,导致了该化合物的多种脱靶效应。再者,由于在临床研究中不可接受的安全性,相当数量抑制剂的开发业已中止(Pettus, L.H.及Wurz, R.P., Curr. Top. Med. Chem., 2008, 8(16), 1452-67)。由于这些不利的影随化学类型而变化,且该化合物具有独特的激酶选择性模式,观察到的毒性可以是结构相关的,而不是以p38的机制为基础的。最近,已经开发对于p38 α/β MAPK具有较大功效及特异性的化合物;然而,当治疗慢性炎性疾病,包括类风湿性关节炎(SCI0-469, Genovese et al., J. Rheumatol., 2011, 38, 846-54; Pamapimod, Cohen et al., Arthritis Rheum., 2009, 60, 335-344; BMS-582949, Schieven et al., Arthritis Rheum., 2010, 62, Suppl. 10:1513)及COPD(Losmapimod, Watz et al., Lancet Resp. Med., 2014, 2, 63-72),所达到的功效水平一直令人失望。再者,值得注意的是,发现p38 MAPK抑制剂于一周的治疗后提供给IBD患者的益处没有持续经历四周的治疗期(BIRB-796, Schreiber, S. et al., Clin. Gastro. Hepatology, 2006, 4, 325-334)。

[0004] 从这些研究中得到的重要结论是,使用靶标特异性的激酶抑制剂可能不足以在复杂的炎性疾病中达到并维持治疗效益,这种情况下,多个免疫炎性通路的异常调节及生物适应可规避单一靶标机制的封锁,从而导致反应损失。可以这样说,对于复杂的炎性疾病如COPD,类风湿性关节炎及IBD,靶向对于调节与病理相关的不同的免疫炎性机制关键的一组激酶的抑制剂将有更大的潜力以达到功效及持续治疗的反应。

[0005] p38 MAPK- α 在调节炎性途径中的作用已被广泛研究,并良好建立。关于p38 MAPK

γ 及 δ 同工型了解较少, 不同于 α 及 β 同工酶, γ 及 δ 同工型在特定的组织及细胞中表达。该 p38 MAPK- δ 同工型在胰腺、睾丸、肺部、小肠和肾脏中表达更多。其也富含于巨噬细胞并可在嗜中性粒细胞、CD4+T 细胞及内皮细胞中检测到 (Shmueli, O. et al., *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326 (10-11), 1067-1072; Smith, S. J. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149, 393-404; Hale, K. K., *J. Immunol.*, 1999, 162 (7), 4246-52; Wang, X. S. et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272 (38), 23668-23674)。对于 p38 MAPK γ 的分布所知甚少, 尽管它在脑部、骨骼肌及心脏, 以及于淋巴细胞及巨噬细胞中表达更多 (Shmueli, O. et al., *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326 (10-11), 1067-1072; Hale, K. K., *J. Immunol.*, 1999, 162 (7), 4246-52; Court, N. W. et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002, 34 (4), 413-26; Mertens, S. et al., *FEBS Lett.*, 1996, 383 (3), 273-6)。证据显示, p38 MAPK- γ 及 p38 MAPK- δ 激酶在免疫重要且促炎性细胞类型中表达, 这引起了对于它们相对于 p38 MAPK- α 的功能的兴趣。目前没有 p38 MAPK γ 及 p38 MAPK δ 的选择性小分子抑制剂用于药理上评估这些激酶的作用, 尽管以前公开的一个化合物, BIRB 796, 已知具有泛同工型抑制活性。于较高的化合物浓度时观察到 p38 MAPK γ 及 δ 同工型的抑制, 所述浓度高于抑制 p38 MAPK α 及 p38 β 所需的浓度 (Kuma, Y., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 19472-19479)。此外, BIRB796 还通过上游激酶 MKK6 或 MKK4 损害 p38 MAPK 或 JNK 的磷酸化。Kuma 讨论了以下可能性, 抑制剂结合至 MAPK 蛋白质所造成的构象改变可以影响其磷酸化位置及上游活化剂的停靠位置两者的结构, 从而损害 p38 MAPK 或 JNK 的磷酸化。

[0006] p38 MAP 激酶被认为在许多信号通路中起到举足轻重的作用, 所述信号通路参与引起及维持人类疾病中 (例如, 严重哮喘中及 COPD 中) 的慢性、持续性炎症 (Chung, F., *Chest*, 2011, 139 (6), 1470-1479)。现有大量的文献证明 p38 MAP 激酶由一系列促炎性细胞因子来活化, 且其活化造成额外促炎性细胞因子的募集及释放。例如, Smith 说明 p38 MAP 激酶抑制剂对于人类 PBMC 的 TNF α 释放的抑制功效。然而, 由吸烟者及戒烟者分离出来的肺部组织巨噬细胞生成某些细胞因子 (IL-8 及 GM-CSF) 对于 p38 α / β MAPK 抑制剂相对不敏感, 且 Smith 建议, 表达于这些细胞的大量 p38 MAPK- δ 可以解释该化合物削弱的功效 (Smith et al., *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149, 393-404)。Risco 等, (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, 109, 11200-11205) 使用 p38 MAPK- γ 及 p38 MAPK- δ 基因敲除小鼠来研究这些 p38 同工型在调节巨噬细胞的细胞因子生成的通路中的作用。这些研究证明, 在小鼠中, 两种激酶都是包括促炎性细胞因子生成的先天免疫炎性反应所必须。更近的, Criado, G. 等, (*Arthritis Rheum.*, 2014, 66 (5), 1208-17) 证明了, 在炎性关节炎小鼠模型中, 与正常对照小鼠相比, p38 γ / δ - / - 小鼠的疾病严重性降低与较少细胞因子生成及免疫激活有关联, 表示 p38 MAPK γ 及 p38 MAPK δ 为炎性关节炎病理学的重要调节剂。这些结果显示, 除了 p38 MAPK α , p38 MAPK γ 及 p38 MAPK δ 为复杂疾病的潜在治疗标靶, 所述复杂疾病涉及先天及适应性免疫反应, 如 COPD。

[0007] 使用 p38 MAP 激酶抑制剂治疗慢性阻塞性肺病 (COPD) 也已被研究。靶向 p38 MAPK α / β 的小分子抑制剂已被证明可有效降低得自 COPD 患者 (其通常为皮质类固醇不敏感) 的细胞及组织中 (Smith, S.J., *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149, 393-404) 以及多种体内动物模型中 (Underwood, D.C. et al., *Am. J. Physiol.*, 2000, 279, L895-902; Nath, P. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, 544, 160-167) 的多种炎性参数。Irusen 及其同

事也提及由于细胞核中降低的糖皮质激素受体 (GR) 的结合亲和力, p38 MAPK α/β 可能与皮质类固醇不敏感性有关 (Irusen, E. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, 109, 649-657)。一系列 p38 MAP 激酶抑制剂的临床经验, 包括 AMG548、BIRB 796、VX702、SCI0469 及 SCI0323 已被描述 (Lee, M.R. and Dominguez, C., *Current Med. Chem.*, 2005, 12, 2979-2994)。

[0008] COPD 病况中, 潜在的炎症据报实质上对于吸入式皮质类固醇的抗炎性功效具有抗性。因此, 治疗 COPD 的较佳策略是开发出干预作用, 其同时具有固有的抗炎性功效及提高 COPD 患者肺部组织对于吸入的皮质类固醇的敏感性的能力。最近, Mercado 的公开 (Mercado, N., et al., *Mol. Pharmacol.*, 2011, 80 (6), 1128-1135) 证实, 沉默 p38 MAPK- γ 具有恢复对于皮质类固醇敏感性的潜力。P38 MAPK α (Mercado, N. et al., *PLoS ONE*, 2012, 7 (7), e41582, 1-9) 及 JNK (Papi et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, 132, 1075-1085) 已被报导具有调节皮质类固醇不敏感性的作用, 且 Armstrong 等 (JPET, 2011, 338, 732-740) 已表明混合的 p38 同工型抑制剂 BIRB-796 及皮质类固醇地塞米松对于 COPD 肺泡巨噬细胞具有协同的抗炎作用。因此, 使用较少 p38 α -特异性的 MAP 激酶抑制剂以治疗 COPD 及严重哮喘时, 可能对患者有益。

[0009] 许多被诊断罹患哮喘或罹患 COPD 的患者继续经受不受控制的症状及可能由于住院治疗而导致的其医疗状况的恶化。尽管使用最先进的目前可用的治疗方案, 包括吸入性皮质类固醇及长效 β -激动剂的组合产品, 这种情况仍发生。在过去十年中累积的数据显示, 未能有效管理肺部疾病的潜在炎症组分是病情加重的最可能的原因。鉴于皮质类固醇作为抗炎性剂的确定功效及, 特别是, 吸入式皮质类固醇在治疗哮喘中的确定功效, 这些发现引起了深入的研究。所得到的研究证实, 某些环境刺激引起患者肺部的对皮质类固醇不敏感的炎性改变。例如起因于病毒介导的上呼吸道感染 (URTI) 的反应, 其对于增加哮喘及 COPD 相关发病率特别重要。

[0010] 流行病学研究揭露上呼吸道的病毒感染与已诊断罹患慢性呼吸道疾病的患者的大比例的病情加重之间有很强的关联性。一些在这方面最引人注目的数据来源于罹患哮喘的儿童纵向研究 (Papadopoulos, N.G. et al., *Paediatr. Respir. Rev.*, 2004, 5 (3), 255-260)。多种额外的研究所支持的结论是病毒感染可促进病情加重且提高疾病的严重性。例如已报道鼻病毒实验性临床感染造成哮喘患者对组胺的支气管过度反应, 该哮喘患者对于皮质类固醇治疗无反应 (Grunberg, K., et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, 164 (10), 1816-1822)。更多的证据来源于罹患囊性纤维化的患者病情加重与 HRV 感染之间所观察到的关联性 (Wat, D. et al., *J. Cyst. Fibros.*, 2008, 7, 320-328)。与该主体数据一致的另外发现是呼吸道病毒感染, 包括鼻病毒, 代表独立的风险因子, 其与小儿肺移植接受者的 12 月存活率为负相关 (Liu, M. et al., *Transpl. Infect. Dis.*, 2009, 11 (4), 304-312)。

[0011] TLR3 为核内体病原模式识别受体, 其可感应病毒感染期间生成的病毒 dsRNA。人类支气管上皮细胞 (BEAS2B) 中, 该 TLR3 途径响应鼻病毒感染 (RV1B 及 RV39) 而被激活 (Wang et al., *J. Immunol.*, 2009, 183, 6989-6997)。证实有实验性哮喘的过敏性小鼠中, 吸入性 dsRNA 及鼻病毒感染引起嗜中性粒细胞加重 (Mahmutovic-Persson et al., *Allergy*, 2014, 69 (3), 348-358)。在过敏性哮喘模型中, 感染鼻病毒 TLR3 敲除小鼠证实了与 TLR3 阳

性对照相比降低的肺部嗜中性粒细胞及巨噬细胞的浸润和显著较低的呼吸道炎症 (Wang, Q. et al., PLoS Pathog., 7 (5), e1002070)。综合以上观察结果,显示TLR3-途径的激活在呼吸道炎症的发展及呼吸道疾病响应鼻病毒介导的呼吸道感染而加重之中可能起重要作用。

[0012] 在人类鼻病毒感染的细胞中,TLR3的活化已显示涉及c-Src激酶的受体募集及激活,其介导多种下游细胞效应。已有少数的研究将细胞Src (Src1或p60-Src) 或Src家族激酶的激活与感染病毒后的特定反应联系起来。这些包括以下报告,通过c-Src依赖机制,腺病毒引起由PI3激酶介导的Akt的激活。Syk激酶活性据报导在HRV感染中由作为上游激酶的c-Src控制 (Lau et al., J. Immunol., 2008, 180, 870-880)。还有提议称,鼻病毒-39所诱导的上皮细胞中IL-8的生成依赖于Src激酶的激活 (Bentley, J.K. et al., J. Virol., 2007, 81, 1186-1194)。最后,已提出,Src激酶的激活涉及诱导在上皮细胞及粘膜下腺体中由鼻病毒-14生成粘蛋白 (Inoue, D. et al., Respir. Physiol. Neurobiol., 2006, 154 (3), 484-499)。

[0013] 之前已公开了抑制p59-HCK的化合物可有效对抗流感病毒复制 (Charron, C.E. et al., WO 2011/070369)。某些p38 MAPK 抑制剂也被描述为呼吸道合胞病毒的复制抑制剂 (Cass, L. et al., WO 2011/158039)。

[0014] 由于以上总结的原因,旨在治疗慢性呼吸道疾病并合并c-Src及p59-HCK激酶的抑制及p38 MAPK的抑制的化合物,预计将特别有效。

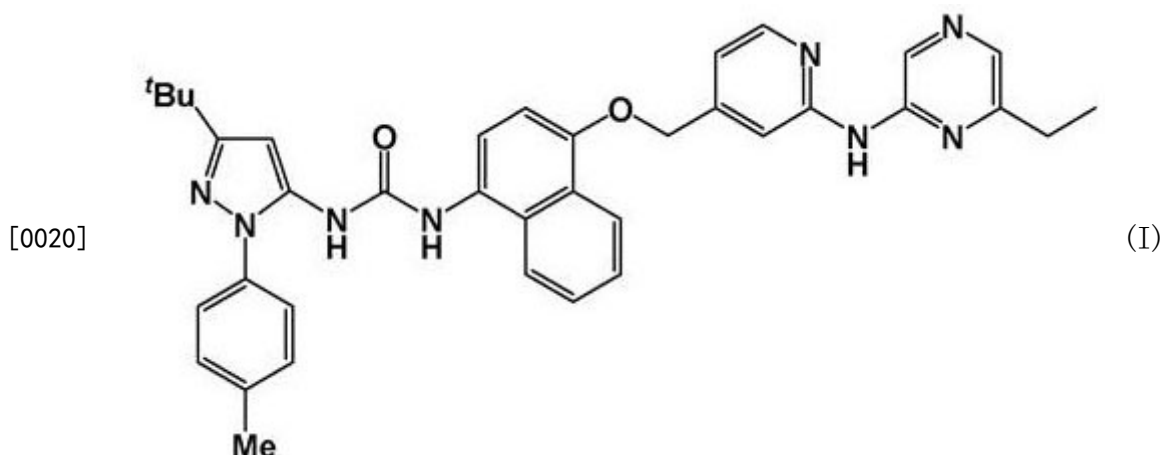
[0015] 除了在控制促炎途径活性的细胞信号传导事件中具有重要作用,现今激酶也被认定可调节一系列细胞功能的活性。其中,近来已讨论过DNA完整性的维持 (Shilo, Y. Nat. Rev. Cancer, 2003, 3, 155-168) 和细胞分裂的复杂过程的协调。最近的发现的例子是,在出版物中描述了一系列的作用于所谓的“Olaharsky激酶”的抑制剂对于体外微核形成频率的影响 (Olaharsky, A.J. et al., PLoS Comput. Biol., 2009, 5 (7), e1000446)。微核形成牵涉于或有关于有丝分裂过程的破坏,且因此为不需要的潜在毒性的表现。发现糖原合酶激酶3 α (GSK3 α) 的抑制是提高激酶抑制剂促进微核形成的可能性的特别显著的因素。近来,用RNAi来抑制激酶GSK3 β 也被报导可促进微核形成 (Tighe, A. et al., BMC Cell Biology, 2007, 8:34)。

[0016] 有可能通过优化剂量和/或通过改变给药途径而减弱与Olaharsky激酶如GSK3 α 的药物相互作用所产生的不利影响。然而,更有利的是确认治疗上有用的分子,该分子证实针对这些靶外酶具有很低或不可检测到的活性,且因而对于有丝分裂过程仅引起很小破坏或无破坏,如在有丝分裂分析中所测定的。

[0017] 考虑本文中所引述的文献,显而易见的是仍然需要确定及开发新的p38 MAP激酶抑制剂,其较目前可用的治疗具有改善的治疗潜力。想要的化合物为那些通过至少发挥出与先前药物相等有利的功效而表现出优异的治疗指数,但在一个或多个方面,在相关的治疗剂量时毒性较低的化合物。因此,本发明的目的是提供如此的新颖化合物,该化合物可抑制p38 MAP激酶的酶活性,例如具有某些亚类型特异性 (特别为 α 及 γ),以及抑制Src家族内的酪氨酸激酶 (如p59-HCK,且特别为c-Src) 的酶活性,因而具有良好抗炎特性且适于治疗使用。本发明化合物对于Olaharsky激酶,如GSK3 α 具有弱抑制活性或不具抑制活性,且对于SYK激酶具有弱抑制活性或不具抑制活性,这有助于其预期的良好的安全性。

[0018] 发明概述

[0019] 根据本发明,提供了式(I)化合物:



[0021] 或其药学上可接受的盐。

[0022] 式(I)化合物与其药学上可接受的盐于本文中有时称为“本发明化合物”或类似者。

[0023] 附图简述

[0024] 图1显示2型的式(I)化合物马来酸盐样品的IR光谱(微ATR)

[0025] 图2显示2型的式(I)化合物马来酸盐样品的粉末XRD图,

[0026] 图3显示1型的式(I)化合物马来酸盐样品的粉末XRD图

[0027] 图4显示2型的式(I)化合物马来酸盐样品的DSC曲线

[0028] 图5显示2型的式(I)化合物马来酸盐样品的TGA曲线

[0029] 图6显示2型的式(I)化合物马来酸盐样品的DVS重迭

[0030] 图7显示2型的式(I)化合物马来酸盐样品的DVS动力学图

[0031] 图8显示对各种含有本发明化合物(游离碱及马来酸盐形式)的组合物进行化学稳定性测试的结果

[0032] 图9显示测试化合物对于BEAS2B细胞中鼻病毒诱导的IL-8释放的功效。

[0033] 本发明的详细说明

[0034] 式(I)化合物可以药学上可接受的盐的形式制备或使用,包括式(I)化合物能够形成的治疗活性的无毒性酸加成盐。这些药学上可接受的酸加成盐可通过用适当的酸于适当溶剂或溶剂混合物中处理该游离碱形式而方便地得到。适当酸包括,例如,无机酸如氢卤酸,如盐酸或氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等;或有机酸,例如,醋酸、丙酸、羟基醋酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、环拉酸、水杨酸、对氨基水杨酸、双羟萘酸等。优选,式(I)化合物以其马来酸盐形式使用。相反,该盐形式可通过用适当碱处理而转化为游离碱形式。

[0035] 本文中所提供的本发明延伸至式(I)化合物的所有立体异构体。本文中所使用的术语“立体异构体”指具有相同分子式及键合原子顺序(结构),而不同之处仅在于其原子在空间的三维取向的异构分子。

[0036] 如本文中所使用,式(I)化合物的定义意欲包括该化合物的所有互变异构体,及该化合物的溶剂合物(包括该化合物的盐的溶剂合物),除非文中另有明确说明。溶剂合物的

实例包括水合物。

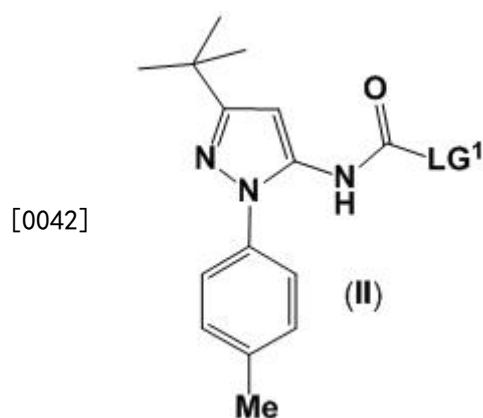
[0037] 本文中提供的本发明延伸至该式 (I) 化合物的前药, 也就是, 在体内分解和/或代谢而提供活性式 (I) 化合物的化合物。

[0038] 本发明另一方面提供式 (I) 化合物的一种或多种代谢产物, 特别是保留式 (I) 化合物的一种或多种治疗活性的代谢产物。代谢产物, 如本文中所使用, 是在体内由式 (I) 化合物代谢而产生的化合物, 例如但不限于氧化代谢产物和/或例如由 O-去烷基化而产生的代谢产物。

[0039] 所公开的化合物包括其中所指定的原子为天然存在或非天然存在的同位素的化合物。在一个实施方案中, 该同位素为稳定的同位素。因此所公开的化合物包括例如含氘化合物等。

[0040] 所公开的内容也延伸至本文中定义的该化合物的所有多晶形式。

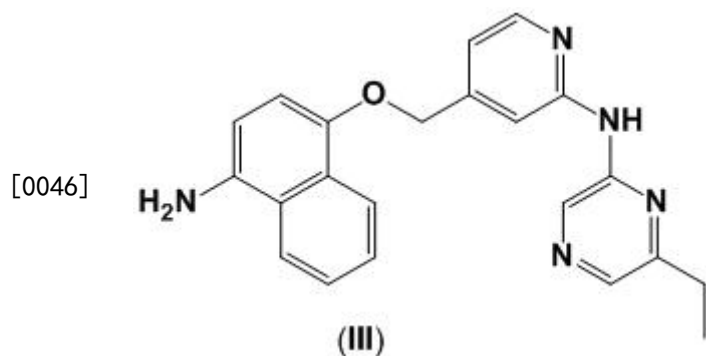
[0041] 制备式 (I) 化合物或其经保护的衍生物的第一个方法包括将式 (II) 化合物



[0043] 或其经保护的衍生物

[0044] 其中 LG¹ 代表离去基团;

[0045] 与式 (III) 化合物



[0047] 或其经保护的衍生物进行反应;

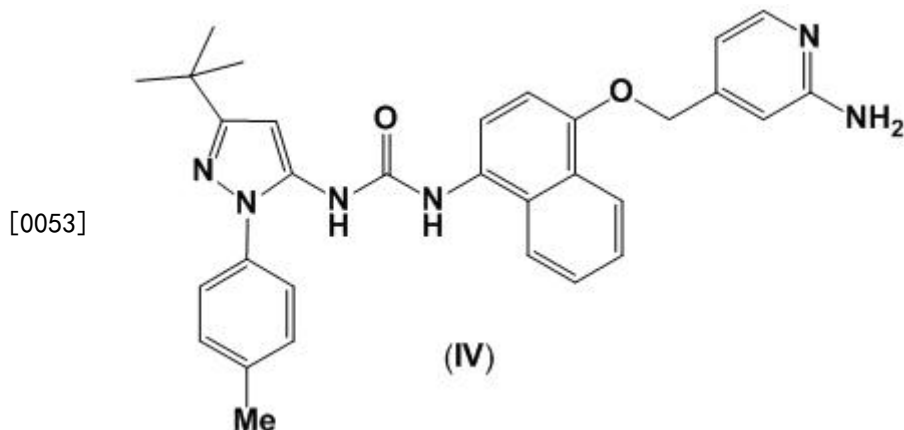
[0048] 且任选将产物去保护而得到式 (I) 化合物。

[0049] 在式 (II) 化合物中, 离去基团 LG 的实例包括卤素 (尤其是 Cl, Br) 及芳基氧基-, 尤其是苯氧基-。

[0050] 适当的保护基及其去除方式如下文所述。

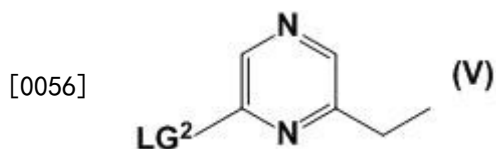
[0051] 式 (II) 及 (III) 化合物的反应的适当条件包括将 (II) 及 (III) 的混合物于适当溶剂如 THF、DCM 或醋酸异丙酯中用三乙胺或 Hunig 氏碱处理并将反应温热至如 40°C 的温度。

[0052] 制备式(I)化合物的第二个方法包括将式(IV)化合物



[0054] 或其经保护的衍生物,

[0055] 与式(V)化合物



[0057] 其中LG²代表离去基团,如卤素且尤其是Cl,

[0058] 或其经保护的衍生物进行反应,

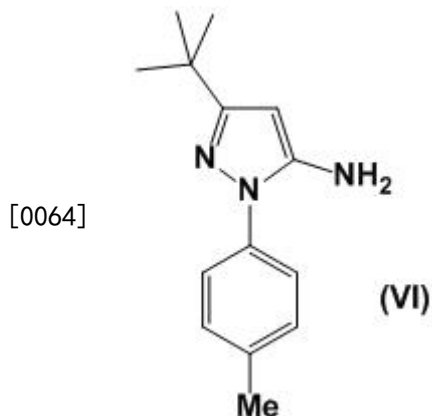
[0059] 且任选将产物去保护而得到式(I)化合物。

[0060] 适当的保护基及其去除方式如下文所述。

[0061] 式(IV)及(V)化合物的反应的适当条件包括那些通常用于Buchwald反应的条件,即将溶剂如1,4-二噁烷中的(IV)及(V)的溶液用钯源及配体如Pd₂(dba)₃及BINAP和碱(如叔丁醇钠或碳酸铯)于升高温度下处理。

[0062] 备选的配体包括二苯基膦二茂铁及三苯基膦;备选的钯源包括醋酸钯(II)及四(三苯基膦)钯(0);备选的碱包括双(三甲基甲硅烷基)氨基锂及磷酸钾;备选的溶剂包括THF及甲苯。关于更广泛的条件,参见Surry, D.S., Buchwald, S.L.(2008), "Biaryl Phosphane Ligands in Palladium-Catalyzed Amination", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 6338-6361,及其中的参考文献。

[0063] 式(II)化合物可通过将式(VI)化合物



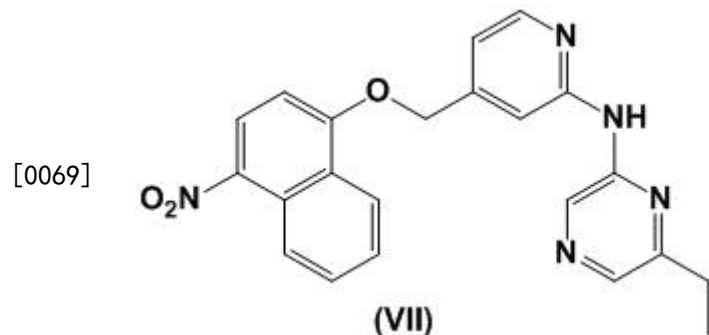
[0065] 与式LG¹C(=O)LG³化合物进行反应而制备,其中LG³代表离去基团,如卤素且尤其是

C1。

[0066] 式(VI)化合物与式 $LG^1C(=O)LG^3$ 化合物(其中, LG^1 为PhO且 LG^3 为Cl)的反应的适当条件包括将式(VI)化合物于溶剂如醋酸异丙酯中的溶液及无机碱如碳酸钠的水溶液的混合物用氯甲酸苯酯处理。

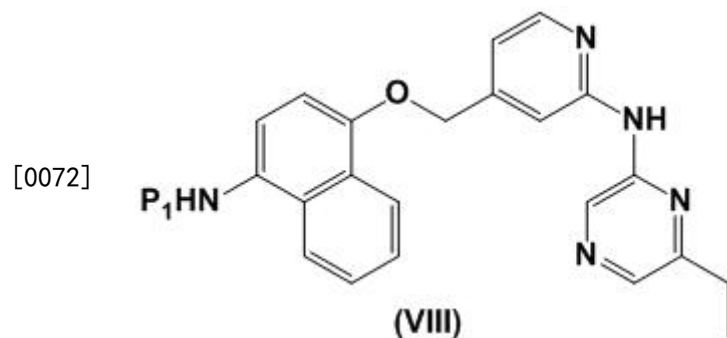
[0067] 式(VI)化合物为已知的,或可通过本领域技术人员已知的方法制备。

[0068] 制备式(III)化合物的第一个方法包括将式(VII)化合物还原,



[0070] 还原式(VII)化合物的适当条件包括在披铂碳催化剂上用氢气处理。此反应可在升高压力下于溶剂(如用醋酸酸化的THF)中进行。替代地,其可于溶剂如DCM/MeOH中用H-cube氢化器于流动条件下进行。

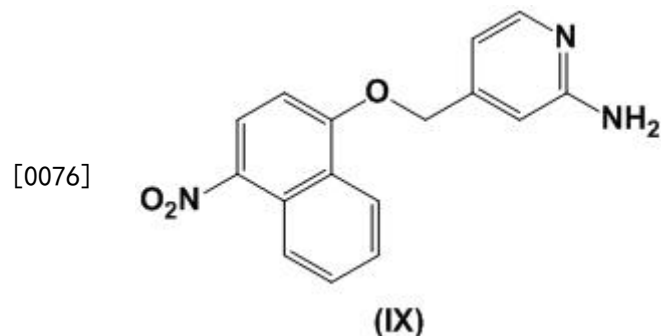
[0071] 制备式(III)化合物的第二个方法包括将式(VIII)化合物去保护,



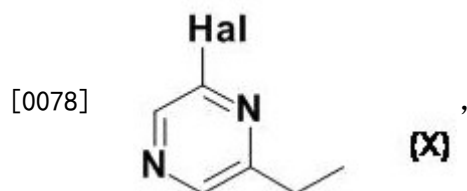
[0073] 其中 P^1 代表胺保护基团。

[0074] 适当的保护基及其去除方式如下文所述。最适合的保护基为Boc,其可通过用酸如TFA或HCl处理而去除。

[0075] 制备式(VII)化合物的第一个方法包括将式(IX)化合物



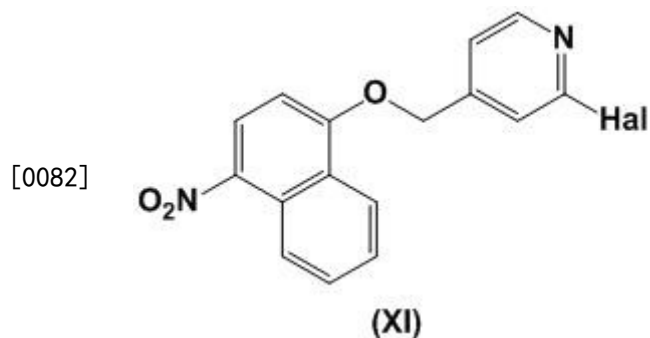
[0077] 与式(X)化合物进行反应



[0079] 其中Hal代表卤素,尤其是Cl。

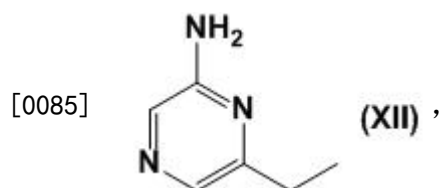
[0080] 式 (IX) 与 (X) 化合物的反应的适当条件包括上述式 (IV) 与 (V) 化合物的反应所用的条件。

[0081] 制备式 (VII) 化合物的第二个方法包括将式 (XI) 化合物



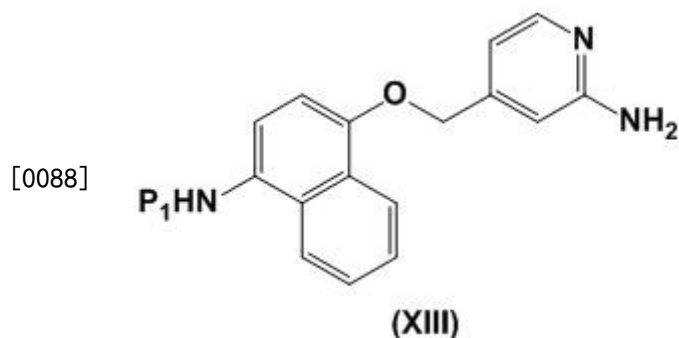
[0083] 其中Hal代表卤素,尤其是Cl,

[0084] 与式 (XII) 化合物进行反应

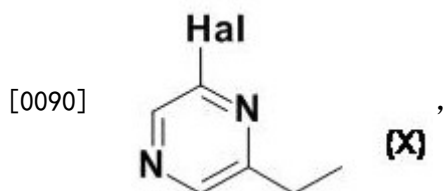


[0086] 式 (XI) 与 (XII) 化合物的反应的适当条件包括将 (XI) 及 (XII) 在溶剂如1,4-二噁烷中的溶液用钯源及配体如Pd₂(dba)₃及BINAP和碱(如叔丁醇钠或碳酸铯)于升高温度下处理。

[0087] 制备式 (VIII) 化合物的第一个方法包括将式 (XIII) 化合物



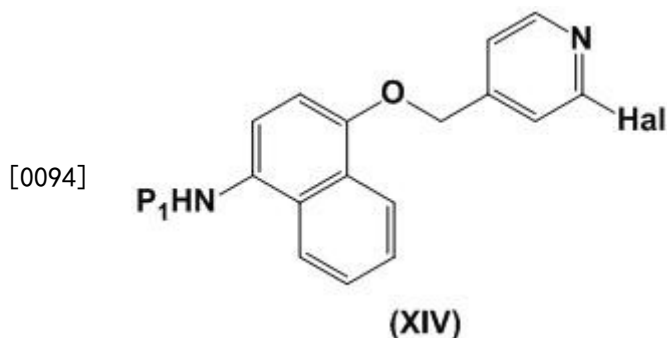
[0089] 与式 (X) 化合物进行反应



[0091] 其中Hal代表卤素,尤其是Cl。

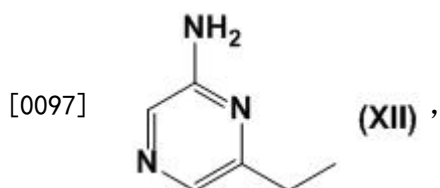
[0092] 式(XIII)与(X)化合物反应的适当条件与上述式(IX)与(X)化合物的反应所用条件相同。

[0093] 制备式(VIII)化合物的第二个方法包括将式(XIV)化合物



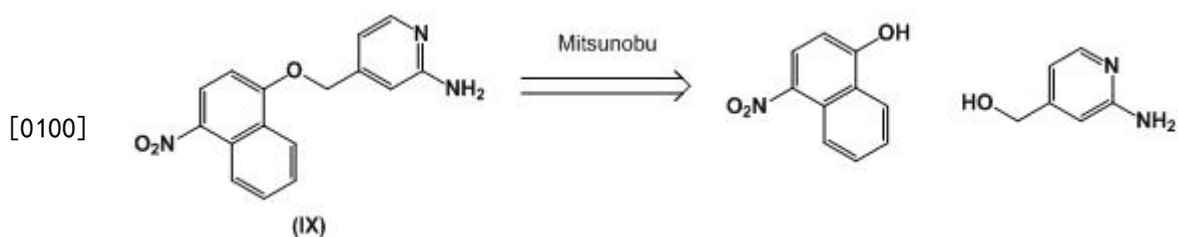
[0095] 其中Hal代表卤素,尤其是Cl,

[0096] 与式(XII)化合物进行反应



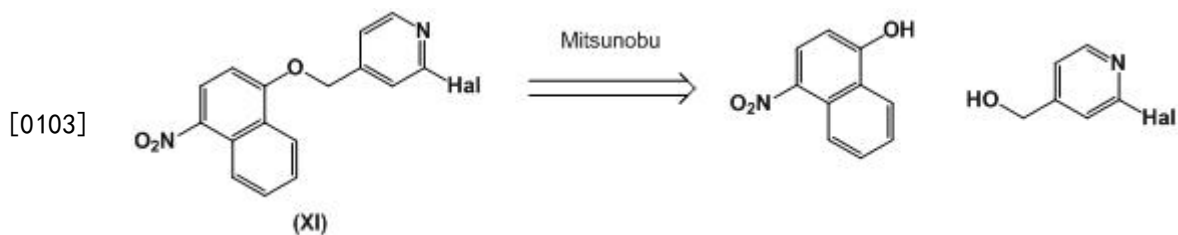
[0098] 式(XIV)与(XII)化合物的反应的适当条件与上述式(XI)与(XII)化合物的反应所用条件相同。

[0099] 式(IX)化合物可如下列流程所示来制备:



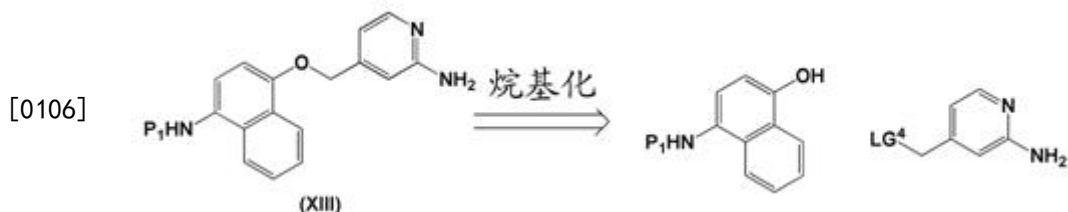
[0101] 此方法的试剂为已知化合物。Mitsunobu条件包括将苯酚及醇的混合物于溶剂如THF中用三苯基膦及偶氮二甲酸二异丙酯处理。更大范围的条件,参见Swamy, K. C.; Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. (2009). "Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications" Chemical Reviews 109(6):2551-2651,及其中的参考文献。

[0102] 式(XI)化合物可如下列流程所示而制备:



[0104] 此方法的试剂为已知化合物。Mitsunobu条件包括上述那些条件。

[0105] 式 (XIII) 化合物可如下列流程所示而制备：



[0107] 其中LG⁴为离去基团，如卤素，尤其是Cl。

[0108] 此方法的试剂为已知化合物。烷基化条件包括将苯酚及烷基卤化物的混合物用碱如碳酸铯或碳酸钾于溶剂如乙腈或DMF中任选于升高温度下处理。

[0109] 式 (XIV) 化合物可如下列流程所示而制备：



[0111] 其中LG⁵为离去基团，如上文关于LG⁴提及的那些。

[0112] 此方法的试剂为已知化合物。烷基化的条件包括上述那些条件。

[0113] 式 (IV)、(V)、(VI)、(X) 及 (XII) 化合物为已知的，或可通过本领域技术人员已知的方法制备。关于式 (IV) 化合物，参见例如W02010/067131，特别是称为“中间体A”的化合物结构。关于式 (VI) 化合物，参见例如W000/043384，特别为式LXVII化合物。

[0114] 外观稳定的本发明化合物的游离碱形式的结晶非溶剂合物形式可通过由在乙腈中的溶液（优选为热的，如回流温度）再结晶而得到。如果生成其它形式，此形式可通过在乙腈中浆化而得到。

[0115] 如上所述，马来酸盐为特别重要的本发明化合物的形式。该马来酸盐可通过将本发明化合物的游离碱形式用马来酸于适当溶剂中处理而制备。

[0116] 优选的方法中，该马来酸盐通过将本发明化合物的2-丁酮溶液用马来酸的2-丁酮溶液处理而制备。使得发生结晶，可通过加晶种帮助结晶。呈其2型结晶多晶型物的马来酸盐依此方式制备。该2型结晶多晶型物也可通过将本发明化合物的马来酸盐于2-丁酮中的热溶液冷却（如由50℃冷却至室温）而得到。使得发生结晶，可通过加晶种帮助结晶。

[0117] 本发明化合物的马来酸盐的2型结晶多晶型物的特征在于粉末XRD图具有于4.2，8.4，8.7，11.0，11.5，12.6，14.4，14.9，16.0，17.0，17.4，18.8，19.5，20.2，21.7，22.4，23.8，25.8及26.3(±0.2)度2-θ的峰位（参见图2）。8.4及8.7(±0.2)度2-θ的峰（双峰）为2

型结晶多晶型物的特别具有特征性的峰,因为这些位置的峰不存在于1型结晶多晶型物的XRD图。

[0118] 2型结晶多晶型物具有高熔点(大约199°C),具有似平板的形态。

[0119] 本发明化合物的马来酸盐的另一结晶形式由THF中再结晶出来后确认,其较2型具有较少有利性质。其具有似针状形态及较低熔点,大约148°C。此结晶形式称为1型。

[0120] 该本发明化合物的马来酸盐的1型结晶多晶型物的特征在于粉末XRD图中具有于3.8,6.3,7.8,9.3,9.9,10.7,11.2,12.7,15.4,16.5,17.9,19.2及19.6(± 0.2)度的峰位(参见图3)。6.3,7.8及9.9(± 0.2)度 $2-\theta$ 的峰为1型结晶多晶型物的特别具有特征性的峰,因为这些位置的峰不存在于2型结晶多晶型物的XRD图中。

[0121] 因此该2型多晶型物的特征在于具有XRD衍射图,其含有10,11,12,13,14,15,16,17,18或更优选为19个选自以下的峰位:4.2,8.4,8.7,11.0,11.5,12.6,14.4,14.9,16.0,17.0,17.4,18.8,19.5,20.2,21.7,22.4,23.8,25.8及26.3(± 0.2)度 $2-\theta$,优选包括于8.4及8.7(± 0.2)度 $2-\theta$ 的峰,但不含有于6.3,7.8及9.9(± 0.2)度 $2-\theta$ 的峰。

[0122] 关于图2及3,应了解XRD图中的强度变化可能由于影响强度的过程而出现,如样品的处理历史。

[0123] 结晶的但较马来酸盐不重要的本发明化合物的盐包括氢溴酸盐、磷酸盐、酒石酸盐、富马酸盐及甲磺酸盐。

[0124] 一种或多种上述反应期间,可能需要保护基来保护化学敏感基团,以确保该方法有效。因此,如果想要或必须,中间体化合物(包括前文强调的式(II)至(V)化合物,以及式(VI)至(XIV)化合物)可使用常规保护基来保护。保护基及其去除方式描述于“Protective Groups in Organic Synthesis”, by Theodora W. Greene and Peter G.M. Wuts, published by John Wiley & Sons Inc; 4th Rev Ed., 2006, ISBN-10:0471697540。因此例证性的胺保护基团包括Boc,其可通过TFA而去除,且例证性的醇保护基为THP,其可通过HCl而去除。

[0125] 式(III)化合物(连同其氨基基团经保护的衍生物,如式(VIII)化合物)及式(VII)化合物为新颖的。这些新颖化合物,连同其盐类(包括药学上可接受的盐)作为本发明的各个方面而要求保护。

[0126] 式(I)化合物为p38 MAP激酶抑制剂(尤其是 α 亚型的抑制剂),且于一方面,本发明化合物提供来用作药物,如治疗炎性疾病,例如COPD和/或哮喘。

[0127] 式(I)化合物预期为体内有效。

[0128] 通常,至今开发的现有技术的化合物意欲用于口服给药。此策略包括优化药物的药代动力学特征,以便达到足够的作用时间。此方法中,足够高的药物浓度被建立并维持于剂量之间,以提供持续的临床益处。这种方法不可避免的结果是,所有的身体组织,且尤其是肝脏及消化道,有可能会暴露于超治疗活性浓度的药物,无论它们是否受到所治疗疾病的不利影响。

[0129] 备选的策略是设计治疗模式,其中,该药物被直接给药至炎性器官,即,利用局部给药。虽然此法不适于治疗所有慢性炎性疾病,其业已用于肺部病症,如哮喘及COPD;皮肤疾病,例如,对抗特应性皮炎及牛皮癣;鼻疾病,以过敏性鼻炎为代表;及胃肠道疾病,如溃疡性结肠炎、IBD及克罗恩氏病;及眼睛的炎性疾病,如葡萄膜炎。

[0130] 局部治疗中,可达到功效的其中一种方法为通过使用具有持续作用时间并被保持在相关器官中的药物,从而将全身毒性的风险降到最小。或者,于某些情况中,可以开发产生活性药物的“储存库”的制剂,其可维持想要的效果。第一种方法由抗胆碱能药物噻托溴铵(Spiriva)例证。此化合物局部给药至肺部作为COPD的治疗方法,并且对于其靶受体具有异常高的亲和力而导致非常慢的分离速率,且因此显示持续的作用时间。

[0131] 一方面,所公开的式(I)化合物特别适用于局部递送,如局部递送至肺部,特别是用来治疗呼吸道疾病,例如慢性呼吸道疾病,如COPD和/或哮喘。

[0132] 一个实施方案中,式(I)化合物适用于使患者对皮质类固醇治疗敏感,而该患者已经对于这样的治疗方案而言变得难治。

[0133] 式(I)化合物可有抗病毒的特性,例如能防止小核糖核酸病毒,特别是鼻病毒、流感或呼吸道合胞病毒感染细胞(如呼吸道上皮细胞)。

[0134] 因此该化合物被认为是抗病毒剂,特别是适用于防止、治疗或改善小核糖核酸病毒的感染,如鼻病毒感染,流感或呼吸道合胞病毒感染。

[0135] 一个实施方案中,式(I)化合物可降低由病毒感染诱导的炎症,如鼻病毒感染且特别是导致细胞因子如IL-8释放(尤其是体内)的病毒感染。此活性可例如使用鼻病毒诱导的IL-8分析于体外测试,描述于本文中的实施例。

[0136] 一个实施方案中,式(I)化合物可降低由鼻病毒诱导的ICAM1表达,尤其是体内。ICAM1为所谓的大沟鼻病毒血清型用于感染细胞的受体机制。此活性可例如通过本文实施例中描述的方法来测定。

[0137] 预期上述性能使得式(I)化合物特别适于用来在具有一种或多种慢性病况,如充血性心脏衰竭、COPD、哮喘、糖尿病、癌症的患者和/或免疫抑制患者中例如器官移植后,治疗(包括预防)炎性疾病的加重,特别是病毒病情加重,或治疗病毒感染。该用途可与抗病毒剂,如扎那米韦、奥塞米韦(例如磷酸奥塞米韦)、帕拉米韦或拉尼米韦组合。

[0138] 通常,式(I)化合物可用于治疗一种或多种具有炎性组分的病况,其适当地可通过局部疗法而治疗。

[0139] 特别是,式(I)化合物可用于治疗一种或多种呼吸道病症,包括COPD(包括慢性支气管炎和肺气肿)、哮喘、小儿哮喘、囊性纤维化、结节病、特发性肺纤维化、过敏性鼻炎、鼻窦炎及鼻窦炎的,尤其是哮喘,或COPD(包括慢性支气管炎和肺气肿)。

[0140] 因此,式(I)化合物可用于治疗患有囊性纤维化的受试者的肺部炎性(及其症状)。

[0141] 该式(I)化合物可用于治疗眼睛疾病或病症包括干燥性角结膜炎(干眼症)、过敏性结膜炎、结膜炎、糖尿病性视网膜病变、黄斑水肿(包括湿性黄斑水肿及干性黄斑水肿)、术后白内障炎症或特别为葡萄膜炎(包括后、前及全葡萄膜炎)。

[0142] 该式(I)化合物可用于治疗皮肤疾病或病症,包括过敏性皮炎、接触性皮炎、特应性皮炎或牛皮癣。

[0143] 该式(I)化合物可用于治疗胃肠道疾病或病症,包括溃疡性结肠炎、IBD或克罗恩氏病。

[0144] 该式(I)化合物可用于治疗关节疾病或病症,包括类风湿性关节炎或骨关节炎且特别为继发于此病况的炎性关节。

[0145] 该式(I)化合物可用于治疗癌症,包括胃癌,及用于抑制肿瘤的生长及转移,包括

肺癌(如非小细胞肺癌)、胃癌、结肠直肠癌及恶性黑色素瘤。

[0146] 也预期式(I)化合物可用于治疗某些其它病况,包括牙周炎、牙龈炎及咽炎。

[0147] 式(I)化合物也可以当患者的病情对于皮质类固醇的治疗而言已经变得难治时使患者的病情对于皮质类固醇的治疗再敏感。

[0148] 再者,本发明提供药物组合物,其包含根据本公开内容的化合物,任选连同一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体。

[0149] 稀释剂及载体可包括适用于经胃肠外、口服、局部、粘膜及直肠给药的那些。

[0150] 本发明也提供制备该药物组合物(例如供胃肠外、口服、局部、粘膜或直肠给药的药物组合物)的方法,该方法包含将成份混合。

[0151] 如上所述,该组合物可制备如供胃肠外、皮下、肌内、静脉内、关节内或关节周围给药,特别为液态溶液或悬浮液形式;供口服给药,特别为片剂或胶囊形式或液态溶液或悬浮液形式;供局部如肺部或鼻内给药,特别为粉末、水溶液或悬浮液、鼻滴剂或水性或非水性气溶胶形式;供经皮给药,如贴剂、乳膏、软膏;供粘膜给药,如给药至口腔、舌下或阴道粘膜;及供直肠给药,如以栓剂、乳膏、软膏或泡沫的形式给药。

[0152] 该组合物可方便地以单位或多剂量形式给药且可通过任何制药领域熟知的方法制备,例如描述于Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985)的方法。供胃肠外给药的制剂可含有作为赋形剂的无菌水或盐水,亚烷基二醇如丙二醇,聚亚烷基二醇如聚乙二醇,植物来源的油,氢化萘等。经鼻给药的制剂可以是固体且可含有赋形剂,例如乳糖或葡聚糖,或可为水性或油性溶液或悬浮液以用作为鼻滴剂或计量喷雾剂形式。供口腔给药时,通常赋形剂包括糖、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶化淀粉等。

[0153] 适用于口服给药的组合物可包括一种或多种生理上相容的载体和/或赋形剂且可为固体或液体形式。可用以下来制备片剂及胶囊:粘合剂,例如,糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄耆胶或聚乙烯吡咯烷酮;填充剂,如乳糖、蔗糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨糖醇或甘氨酸;润滑剂,如硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇或二氧化硅;及表面活性剂,如月桂基硫酸钠。液态组合物可含有常规添加剂如悬浮剂,例如山梨糖醇糖浆、甲基纤维素、糖浆、明胶、羧甲基-纤维素或食用脂;乳化剂如卵磷脂或阿拉伯胶;植物油如杏仁油、椰子油、鳕鱼肝油或花生油;防腐剂如丁基化的羟基苯甲醚(BHA)及丁基化的羟基甲苯(BHT)。液态组合物可被封装在例如明胶中以提供单位剂量形式。

[0154] 固体口服剂量形式包括片剂、两部分的硬壳胶囊及软弹性明胶(SEG)胶囊。

[0155] 干壳制剂通常包括约40%至60%w/w浓度的明胶,约20%至30%浓度的增塑剂(如甘油、山梨糖醇或丙二醇)及约30%至40%浓度的水。其它物质如防腐剂、染料、遮光剂和调味剂也可存在。液态填充物质包括诸如矿物油、植物油、三酸甘油酯、二醇、多元醇及表面活性剂的介质或介质组合中的固体药物或液体药物,所述固体药物已溶解、增溶或分散(利用悬浮剂如蜂蜡、氢化蓖麻油或聚乙二醇4000)。

[0156] 适当的,式(I)化合物局部给药至肺部、眼睛或肠道。因此,我们根据本发明提供药物组合物,其包含本发明化合物,任选连同一种或多种局部可接受的稀释剂或载体。

[0157] 局部给药至肺部可通过使用气溶胶制剂来实现。气溶胶制剂通常包括悬浮或溶解于适当气溶胶推进剂的活性成份,所述推进剂如氯氟烃(CFC)或氢氟烃(HFC)。适当CFC推进

剂包括三氯单氟甲烷(推进剂11)、二氯四氟甲烷(推进剂114)及二氯二氟甲烷(推进剂12)。适当HFC推进剂包括四氟乙烷(HFC-134a)及七氟丙烷(HFC-227)。以总吸入组合物的重量计,该推进剂通常占40%-99.5%,如40%-90%。该制剂可包括赋形剂,包括共溶剂(如乙醇)及表面活性剂(如卵磷脂、去水山梨醇三油酸酯等)。其它可能的赋形剂包括聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、甘油等。气溶胶制剂封装于罐中且通过计量阀(如由Bespak, Valois或3M提供或替代地由Aptar, Coster或Vari提供)而递送适当剂量。

[0158] 局部给药至肺部也可通过使用非加压制剂如水溶液或悬浮液而实现。这些可通过喷雾器给药,如可手持且便携或家庭用或医院用(即非便携)的喷雾器。该制剂可包括赋形剂如水、缓冲剂、张力调节剂、pH调节剂、表面活性剂及共溶剂。悬浮液体及气溶胶制剂(无论是加压还是不加压)通常含有细微分散形式的本发明化合物,例如, D_{50} 为0.5-10 μm 如大约1-5 μm 。粒径分布可使用 D_{10} 、 D_{50} 及 D_{90} 值来表示。该粒径分布的 D_{50} 中值定义为以微米表示的将分布分为两半的粒径。源自激光衍射的测量更准确地描述为体积分布,且因此,使用此方法所得到的 D_{50} 值更具有意义地称为 Dv_{50} 值(体积分布的中值)。如本文中使用的, Dv 值指使用激光衍射测量的粒径分布。类似的,有关激光衍射所使用的 D_{10} 及 D_{90} 值分别用来指 Dv_{10} 及 Dv_{90} 值,且指10%分布在 D_{10} 值以下的粒径和90%分布在 D_{90} 值以下的粒径。

[0159] 局部给药至肺部也可通过使用干粉制剂来实现。干粉制剂将含有呈精细分散形式的本公开的化合物,通常具有1-10 μm 的质量平均直径(MMAD)或0.5-10 μm ,如约1-5 μm 的 D_{50} 。呈精细分散形式的本发明化合物粉末可通过微粉化方法或类似的尺寸降低方法来制备。微粉化可通过使用喷射研磨机来进行,如Hosokawa Alpine制备的喷射研磨机。所产生的粒径分布可使用激光衍射来测量(如用Malvern Mastersizer 2000S仪器)。该制剂通常含有局部可接受的稀释剂,如乳糖、葡萄糖或甘露醇(优选为乳糖),该稀释剂通常具有相对较大粒径,如50 μm 或更大的质量平均直径(MMAD),如100 μm 或更大;或40-150 μm 的 D_{50} 。如本文中所使用,术语“乳糖”指含有乳糖的组分,包括 α -乳糖单水合物、 β -乳糖单水合物、无水 α -乳糖、无水 β -乳糖及无定形乳糖。乳糖组分可通过微粉化、过筛、碾磨、压制、凝结或喷雾干燥加工。也涵盖市售可得的各种乳糖形式,例如Lactohale[®](吸入级乳糖;DFE Pharma),InhaLac[®]70(干粉吸入器使用的过筛乳糖;Meggler),Pharmatose[®](DFE Pharma)及Respitose[®](过筛吸入等级的乳糖;DFE Pharma)产品。一个实施方案中,该乳糖组分选自: α -乳糖单水合物、无水 α -乳糖及无定形乳糖。优选,该乳糖为 α -乳糖单水合物。

[0160] 干粉制剂也可含有其它赋形剂。因此,一个实施方案中,根据本公开内容的干粉制剂包括硬脂酸镁或硬脂酸钙。该制剂可具有优异的化学和/或物理稳定性,尤其是当该制剂也含有乳糖时。

[0161] 干粉制剂通常使用干粉吸入器(DPI)装置来递送。干粉递送系统的实例包括SPINHALER[®]、DISKHALER[®]、TURBOHALER[®]、DISKUS[®]、SKYEHALER[®]、ACCUHALER[®]及CLICKHALER[®]。干粉递送系统的其它实例包括ECLIPSE、NEXT、ROTAHALER、HANDIHALER、AEROLISER、CYCLOHALER、BREEZHALER/NEOHALER、MONODOSE、FLOWCAPS、TWINCAPS、X-CAPS、TURBOSPIN、ELPENHALER、MIATHALER、TWISTHALER、NOVOLIZER、PRESSAIR、ELLIPTA、ORIEL干粉吸入器、MICRODOSE、PULVINAL、EASYHALER、ULTRAHALER、TAIFUN、PULMOJET、OMNIHALER、GYROHALER、TAPER、CONIX、XCELOVAIR及PROHALER。

[0162] 一个实施方案中,本发明化合物以微粉化干粉制剂来提供,例如包含适当级别的

乳糖。

[0163] 因此,本发明另一方面提供药物组合物,其包含颗粒形式的本发明化合物以及颗粒乳糖,该组合物任选包含硬脂酸镁。

[0164] 一个实施方案中,本发明化合物以微粉化干粉制剂提供,包含适当级别的乳糖及硬脂酸镁,该制剂填充至例如DISKUS的装置中。适当地,该装置为多剂量装置,例如,该制剂填充至泡中用于多单位剂量装置,如DISKUS。

[0165] 另一实施方案中,本发明化合物提供为微粉化的干粉制剂,例如包含适当级别的乳糖,填充至硬壳胶囊中以便用于单一剂量装置,如AEROLISER。

[0166] 另一实施方案中,本发明化合物提供为微粉化的干粉制剂,包含适当级别的乳糖及硬脂酸镁,填充至硬壳胶囊中以便用于单一剂量装置,如AEROLISER。

[0167] 另一实施方案中,本发明化合物提供为细粉末以供用于吸入性剂量形式中,其中,该粉末为 D_{50} 为0.5-10 μm (如约1-5 μm)的细颗粒,其通过非喷射研磨微粉化的尺寸减小过程生成,该过程如喷雾干燥,喷雾冷冻,微流化,高压均质化,超临界流体结晶化,超声结晶化或这些方法的组合,或其它适当的本领域已知的用来制造空气动力学粒径为0.5-10 μm 的细颗粒的颗粒形成法。所产生的粒径分布可用激光衍射(如用Malvern Mastersizer 2000S仪器)来测量。该颗粒可单独包括该化合物或还包括适当的可有助于加工的其它赋形剂。所产生的细颗粒可形成最终制剂以递送至人体或可任选进一步与其它适当的赋形剂调制以利于用可接受的剂量形式来递送。

[0168] 本发明化合物也可经直肠给药,例如以栓剂或灌肠剂形式,其包括水性或油性溶液以及悬浮液及乳状液及泡沫。该组合物根据本领域技术人员熟知的标准程序来制备。例如,栓剂可通过将活性成份与常规栓剂基质,如可可脂或其它甘油酯混合而制备。在这种情况下,该药物与适当的无刺激性的赋形剂混合,该赋形剂在常温时为固体但在直肠温度时则为液体,且因此在直肠中融化而释放药物。该物质为可可脂及聚乙二醇。

[0169] 通常,当组合物意欲以滴眼液或眼药膏形式局部给药至眼睛时,本发明化合物的总量为约0.0001至小于4.0% (w/w)。

[0170] 优选,对于眼睛局部给药,该根据本发明给药的组合物可调制成为溶液、悬浮液、乳状液及其它剂量形式。通常优选为水溶液,这是基于调制容易,以及患者能通过将一至两滴该溶液滴注至受影响的眼睛而容易地给予该组合物。然而,该组合物也可为悬浮液、粘稠或半粘稠凝胶,或其它类型的固体或半固体组合物。悬浮液可优选用于略溶于水的化合物。

[0171] 给药至眼睛的替代方法为将本发明化合物的溶液或悬浮液进行玻璃体内注射。此外,本发明化合物也可通过眼部植入物或插入物而引入。

[0172] 根据本发明给药的组合物也可包括各种其它成份,包括但不限于,张度剂、缓冲剂、表面活性剂、稳定聚合物、防腐剂、共溶剂及粘度构建剂。本发明适当的药物组合物包括本发明化合物,其与张度剂及缓冲剂一起调制。本发明药物组合物可进一步任选包括表面活性剂和/或缓和剂和/或稳定聚合物。

[0173] 可使用各种张度剂来调整组合物的张力,优选调整成为用于眼科组合物的天然泪液的张力。例如,氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、单糖如右旋糖、果糖、半乳糖,和/或简单的多元醇如糖醇甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、乳糖醇、异麦芽糖醇、麦芽糖醇及氢化淀粉水解产物可添加至组合物中以接近生理张力。张度剂的量将根据所添加的特定试剂而变化。然

而,通常该组合物将具有足以使最终组合物具有眼用可接受的渗透压的量(通常为约150-450 mOsm,优选为250-350mOsm且最优选为约290mOsm)的张度剂。通常,本发明张度剂的存在范围为2至4%w/w。本发明优选的张度剂包括单糖或糖醇,如D-甘露醇。

[0174] 适当的缓冲系统(如磷酸钠、醋酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或硼酸)可添加至组合物中以防止pH在储存条件下偏移。特定的浓度将根据所使用的试剂而变化。然而,优选选择缓冲剂以便使目标pH维持在pH5至8的范围,且更优选为使目标pH维持在pH5至7的范围。

[0175] 可任选使用表面活性剂以递送较高浓度的本发明化合物。表面活性剂用于增溶化合物并稳定胶体分散液,如胶束溶液、微乳液、乳液及悬浮液。可任选使用的表面活性剂的实例包括聚山梨酸酯、泊洛沙姆、聚乙二醇40硬脂酸酯、聚乙二醇蓖麻油、泰洛沙泊、Triton及脱水山梨糖醇单月桂酸酯。用于本发明的优选表面活性剂具有的亲水/亲油/平衡“HLB”范围为由12.4至13.2且可接受作为眼用,如TritonX114及泰洛沙泊。

[0176] 可添加至本发明化合物的眼科组合物中的额外试剂为缓和剂,其用作稳定聚合物。该稳定聚合物应为优先供眼局部使用的离子/荷电的实例,更具体地,为其表面带有负电的可表现出(-)10-50mV的 ζ -电势以具有物理稳定性并能在水中形成分散液(即水可溶)的聚合物。本发明优选的稳定聚合物是聚电解质,或超过一种聚电解质,来自交联聚丙烯酸酯类,如卡波姆及皮姆琳(R),特别是卡波姆974p(聚丙烯酸),以0.1-0.5%w/w使用。

[0177] 其它化合物也可添加至本发明化合物的眼科组合物中以提高载体的粘度。粘度增强剂的实例包括但不限于:多糖类,如透明质酸及其盐类、硫酸软骨素及其盐类、葡聚糖、纤维素类的各种聚合物;乙烯基聚合物;及丙烯酸聚合物。

[0178] 局部眼科产品通常以多剂量形式包装。因此需要防腐剂来防止使用期间的微生物污染。适当的防腐剂包括:苯扎氯铵、氯丁醇、苄基十二烷基二甲基铵溴化物、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯乙醇、依地酸二钠、山梨酸、聚季铵盐-1或本领域技术人员已知的其它试剂。该防腐剂通常以0.001至1.0%w/v的浓度使用。本发明的单位剂量组合物无菌,但通常未防腐。因此,该组合物通常不含有防腐剂。

[0179] 医师或其它技术人员将能决定本发明化合物的适当剂量,从而决定应包括于任何特定的药物制剂中的本发明化合物的量(无论是单位剂量形式或其它)。

[0180] 式(I)化合物具有治疗活性。因此,另一方面,本发明提供如本文中所述的用于治疗一种或多种上述病况的化合物。

[0181] 另一方面,本发明提供如本文中所述的化合物用于制备治疗一种或多种上述病况的药物的用途。

[0182] 另一方面,本发明提供治疗一种或多种上述病况的方法,包括将有效量的本发明化合物或包含该化合物的药物组合物给药至受试者。

[0183] 术语“治疗”意欲包括预防以及治疗性处理。治疗病况或病症也包括治疗其加重的情况。

[0184] 本发明化合物也可与一种或多种其它活性成份一起给药,所述其它活性成份如适于治疗上述病况的活性成份。

[0185] 例如,治疗呼吸道病症的可能的组合包括与以下物质的组合:类固醇(如布地奈德(budesonide)、二丙酸倍氯米松(beclomethasone dipropionate)、丙酸氟替卡松(fluticasone propionate)、糠酸莫米松(mometasone furoate)、糠酸氟替卡松

(fluticasone furoate)、环索奈德(ciclesonide)、 β 激动剂(如特布他林(terbutaline)、沙丁胺醇(salbutamol)、沙美特罗(salmeterol)、福莫特罗(formoterol)、维兰特罗(vilanterol)、欧达特罗(olodaterol)、茚达特罗(indacaterol)、瑞普特罗(reproterol)、非诺特罗(fenoterol))、黄嘌呤(如茶碱)、抗胆碱能药物或毒蕈碱拮抗剂(如异丙托溴铵(ipratropium)、噻托溴铵(tiotropium)、阿地溴铵(aclidinium)、茛地溴铵(umeclidinium)或甘罗溴铵(glycopyrronium)(例如呈溴盐形式))、PI3激酶抑制剂及抗病毒剂(如扎那米韦(zanamivir)、奥司他韦(oseltamivir)(例如呈磷酸盐形式)、帕拉米韦(peramivir)及拉尼米韦(laninamivir))。

[0186] 一个实施方案中,提供本发明化合物用作药物与一种或多种其它活性成份合并给药,所述其它活性成份如选自皮质类固醇、 β 激动剂、黄嘌呤、毒蕈碱拮抗剂及PI3激酶抑制剂。适当地,该 β 激动剂为 β_2 激动剂。

[0187] 一个实施方案中,所公开的化合物通过吸入给药且皮质类固醇经口给药或通过吸入给药,可组合或分开给药。

[0188] 一个实施方案中,所公开的化合物通过吸入给药且 β_2 激动剂经口给药或通过吸入给药,可组合或分开给药。

[0189] 一个实施方案中,所公开的化合物通过吸入给药且毒蕈碱拮抗剂经口给药或通过吸入给药,可组合或分开给药。

[0190] 一个实施方案中,所公开的化合物通过吸入给药,其与均口服或吸入给药的皮质类固醇、 β_2 激动剂及毒蕈碱拮抗剂中的一种或多种组合或分开给药。

[0191] 再者,治疗胃肠道病症时(如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎),可能的组合包括与例如一种或多种选自下列的药物的组合:

[0192] - 5-氨基水杨酸,或其前药(如柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、奥色拉嗪(olsalazine)或巴柳氮(bisalazide));

[0193] - 皮质类固醇(如泼尼松龙(prednisolone)、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)或布地奈德(budesonide));

[0194] - 免疫抑制剂(如环孢菌素、他克莫司(tacrolimus)、甲氨蝶呤(methotrexate)、硫唑嘌呤(azathioprine)或6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine));

[0195] - 抗-TNF α 抗体(如英夫利昔单抗(infliximab)、阿达木单抗(adalimumab)、赛妥珠单抗(certolizumab pegol)或戈利木单抗(golimumab));

[0196] - 抗-IL12/IL23抗体(如优特克单抗(ustekinumab))或小分子IL12/IL23抑制剂(如阿吡莫德(apilimod));

[0197] - 抗- $\alpha_4\beta_7$ 抗体(如维多珠单抗(vedolizumab));

[0198] - MAdCAM-1阻断剂(如PF-00547659);

[0199] - 对抗细胞粘附分子 α_4 -整合素的抗体(如那他珠单抗(natalizumab));

[0200] - 对抗IL2受体 α 亚单位的抗体(如达克珠单抗(daclizumab)或巴利昔单抗(basiliximab));

[0201] - JAK3抑制剂(如托法替尼(tofacitinib)或R348);

[0202] - Syk抑制剂及其前药(如扶坦替尼(fostamatinib)及R-406);

[0203] - 磷酸二酯酶-4抑制剂(如替托司特(tetomilast));

- [0204] - HMPL-004;
- [0205] - 益生菌;
- [0206] - 德莎拉秦 (Dersalazine);
- [0207] - 塞马莫德 (semapimod) /CPSI-2364; 及
- [0208] - 蛋白质激酶C抑制剂 (如AEB-071)。
- [0209] 治疗眼睛病症 (如干燥性角结膜炎或葡萄膜炎) 时, 可能的组合包括与例如一种或多种选自下列的药物的组合:
- [0210] - 皮质类固醇 (如地塞米松 (dexamethasone)、泼尼松龙、曲安奈德 (triamcinolone acetonide)、二氟泼尼酯 (difluprednate) 或醋酸氟轻松 (fluocinolone acetonide));
- [0211] - 免疫抑制剂 (如环孢菌素、伏环孢素 (voclosporin)、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、吗替麦考酚酯或他克莫司);
- [0212] - 抗-TNF α 抗体 (如英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗、ESBA-105或戈利木单抗);
- [0213] - 抗-IL-17A抗体 (如苏金单抗 (secukinumab));
- [0214] - mTOR抑制剂 (如西罗莫司 (sirolimus));
- [0215] - VGX-1027;
- [0216] - JAK3抑制剂 (如妥扶替尼 (tofacitinib) 或R348); 及
- [0217] - 蛋白质激酶C抑制剂 (如AEB-071)。
- [0218] 因此, 本发明另一方面提供式 (I) 化合物, 其与一种或多种其它活性成份, 例如一种或多种上述活性成份组合。
- [0219] 类似的, 本发明另一方面提供组合产品, 其包含:
- [0220] (A) 本发明化合物; 及
- [0221] (B) 一种或多种其它治疗剂,
- [0222] 其中, 组分 (A) 及 (B) 各与药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体混合调制。
- [0223] 本发明的这一方面中, 该组合产品可为单一 (组合) 药物制剂或部件的套装。
- [0224] 因此, 本发明此方面涵盖药物制剂, 所述药物制剂包括与药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体混合的本发明化合物及其它治疗剂 (该制剂于下文中称为“组合制剂”)。
- [0225] 也涵盖包含以下组分的部件的套装:
- [0226] (i) 药物制剂, 其包括与药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体混合的本发明化合物; 及
- [0227] (ii) 药物制剂, 其包括与药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体混合的一种或多种其它治疗剂,
- [0228] 其中组分 (i) 及 (ii) 各自提供为适合于与另一组分结合给药的形式。
- [0229] 因此, 部件的套装的组分 (i) 为混合药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体的上述组分 (A)。类似的, 组分 (ii) 为混合药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体的上述组分 (B)。
- [0230] 该一种或多种其它治疗剂 (即上述组分 (B)) 可例如为任何上述与治疗呼吸道、胃肠道及眼睛病症有关联的药物。
- [0231] 如果组分 (B) 为多于一种的其它治疗剂, 这些其它治疗剂可互相调制在一起或与

组分(A)调制,或它们可分别调制。

[0232] 一个实施方案中,组分(B)为一种其它治疗剂。另一实施方案中,组分(B)为两种其它治疗剂。

[0233] 本发明此方面的组合产品(组合制剂或部件的套装)可用于治疗或预防炎性疾病,如上述炎性疾病,例如:

[0234] - 呼吸病症,包括COPD(包括慢性支气管炎和肺气肿)、哮喘、小儿哮喘、囊性纤维化、结节病、特发性肺纤维化、过敏性鼻炎、鼻炎及鼻窦炎,尤其是哮喘或COPD(包括慢性支气管炎和肺气肿);

[0235] - 眼睛疾病或病症,包括过敏性结膜炎、结膜炎、干燥性角结膜炎(干眼症)、青光眼、糖尿病性视网膜病变、黄斑水肿(包括糖尿病性黄斑水肿)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、干性和/或湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)、术后白内障炎症或特别为葡萄膜炎(包括后、前及全葡萄膜炎)、角膜移植及角膜缘细胞移植排斥反应;

[0236] - 皮肤疾病或病症,包括过敏性皮炎、接触性皮炎、特应性皮炎或牛皮癣;及

[0237] - 胃肠道疾病或病症,包括麸质敏感性肠病(乳糜泻疾病)、嗜酸性食道炎、肠移植抗宿主疾病或特别为溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

[0238] 本文中所述的本发明诸多方面(如上述化合物、组合、方法及用途)可具有的优点是,治疗本文中所述的病况时,与现有技术已知的用于治疗那些病况的类似的化合物、组合、方法(治疗)或用途等相比,可以使医生和/或患者更方便,更加有效,毒性更低,更长效,具有更好的选择性,具有更宽范围的活性,更高效能,产生的副作用更少,具有更好的药代动力学和/或药效学特征,具有更适合的固态性质,具有更好的稳定性,或可具有其它有用的药理学性质。

[0239] 相对于现有技术的化合物,在至少一些实施方案中,该式(I)化合物预期将有一种或多种下列特性:

[0240] - 其具有特别适用于局部(topical)/局部(local)给药的特性(如局部(topical)/局部(local)给药后,产生式(I)化合物的高的靶组织浓度,但低的血浆或全身浓度,和/或式(I)化合物由血浆或全身循环的快速清除);

[0241] - 在静脉给药之后,具有降低的血管外暴露的风险(如由于式(I)化合物的低体积分布);

[0242] - 其对于选择的激酶和/或一系列的激酶,如p38 MAPK α 、p38 MAPK γ 、Src及p59-HCK具有优异效能;

[0243] - 其具有低的或不具有对抗Olaharsky激酶,特别为GSK3 α 的抑制活性;

[0244] - 其具有低的或不具有对抗Syk激酶的抑制活性;

[0245] - 其具有降低的 β -连环链蛋白诱导和/或细胞有丝分裂抑制;

[0246] - 其对于细胞色素P450超家族的成员不具有或具有较低的时间依赖性抑制;和/或

[0247] - 其产生问题较少(如毒性较小)的代谢产物,例如在给药至患者后。

[0248] 实验部分

[0249] 本文中所使用的缩写定义如下(表1)。任何未定义的缩写旨在传达其通常接受的含义。

[0250] 表1:缩写

AcOH	冰醋酸
Ac ₂ O	醋酸酐
Aq	含水的
[0251] b	宽
BEH	亚乙基桥杂合型
BINAP	1,1'-联萘基-2,2'-二胺
Boc	叔丁氧基羰基

CSH	荷电表面杂合型
d	双峰
Δ	化学位移
DCM	二氯甲烷
DIAD	偶氮二甲酸二异丙酯
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
(ES ⁺)	电喷雾离子化, 正模式
(ES ⁻)	电喷雾离子化, 负模式
Et	乙基
EtOAc	醋酸乙酯
EtOH	乙醇
h	小时
HATU	1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐
Hunig's base	N,N-二异丙基乙基胺
IPA	异丙醇
ⁱ PrOAc	醋酸异丙酯
m	多重峰
[0252] (M+H) ⁺	质子化的分子离子
(M-H) ⁻	去质子化的分子离子
Me	甲基
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
MHz	兆赫
min	分钟
m/z	质荷比
NMR	核磁共振(光谱)
Pd ₂ (dba) ₃	三(二亚苄基丙酮)二钯(0)
Ph	苯基
q	四重峰
RT	室温
HPLC	高效液相色谱
s	单峰
Sat	饱和
SCX	固体支持的阳离子交换(树脂)
t	三重峰
^t Bu	叔丁基
THF	四氢呋喃

TFA	三氟醋酸
UV	紫外线
AKT	v-akt小鼠胸腺瘤病毒致癌基因同源物1
ATP	腺苷-5'-三磷酸
BALF	支气管肺泡灌洗液
BSA	牛血清白蛋白
COPD	慢性阻塞性肺病
CXCL1	趋化因子(C-X-C基序)配体1
COX2	细胞色素C氧化酶亚单位II
DSC	差示扫描量热
DSS	葡聚糖硫酸钠
DTT	二硫苏糖醇
d-U937 cells	PMA分化的U-937细胞
DVS	动态蒸气吸附
dsRNA	双链RNA
ELISA	酶联免疫吸附试验
FACS	荧光激活细胞分选
FBS	胎牛血清
FRET	荧光共振能量转移
[0253] GM-CSF	CSF2: 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
GSK3 α	糖原合酶激酶3 α
GSK3 β	糖原合酶激酶3 β
HBSS	Hank氏平衡盐溶液
HCK	造血细胞激酶
HRV	人类鼻病毒
IBD	炎性肠道疾病
IC50	50%抑制浓度
ICAM-1	细胞间粘附分子1
IFN	干扰素
IL-2	白细胞介素2
IL-8	白细胞介素8
JNK	c-Jun N-末端激酶
KC	角质细胞化学引诱物
LPMC	固有层单核细胞
LPS	脂多糖
MAPK	有丝分裂原活化蛋白质激酶
MAPKAP-K2	有丝分裂原活化蛋白质激酶-活化蛋白质激酶-2
MKK4	有丝分裂原活化蛋白质激酶激酶4
MKK6	有丝分裂原活化蛋白质激酶激酶6

	MOI	多重感染
	MTT	3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物
	OD	光密度
	PBMC	外周血单核细胞
	PBS	Dulbecco氏磷酸盐缓冲盐水
	PHA	植物凝集素
	PI3	磷酸肌醇3激酶
	PMA	佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯
	REC50	相对50%有效浓度
	RNA	核糖核酸
	RNAi	RNA干扰
[0254]	RSV	呼吸道合胞病毒
	SDS	十二烷基硫酸钠
	SMS	表面测量系统
	SRC	v-src肉瘤(Schmidt-Ruppin A-2)病毒致癌基因同源物(禽类)
	Syk	脾酪氨酸激酶
	TCID50	50%组织培养感染剂量
	TGA	热重分析
	TLR3	Toll样受体3
	TNBS	2,4,6-三硝基苯磺酸
	TNF α	肿瘤坏死因子 α
	URTI	上呼吸道感染
	XPD	粉末X射线衍射
	XRD	X-射线衍射

[0255] 化学实施例

[0256] 一般程序

[0257] 所有的起始原料及溶剂从商业来源获得或根据所引述文献制备。除非另有说明，所有反应均要搅拌。有机溶液按常规经无水硫酸镁干燥。氢化反应于Thales H-cube流动反应器上在所述条件下进行。

[0258] 柱色谱法于预填充的二氧化硅(230-400目, 40-63 μ m)柱筒上以所注明的量进行。SCX购自Supelco且于使用前用1M盐酸处理。除非另有说明，首先将要被纯化的反应混合物用MeOH稀释且用数滴AcOH使其呈酸性。将此溶液直接加载至SCX上并用MeOH清洗。然后通过用0.7M的NH₃/MeOH清洗，将想要的物质洗脱。

[0259] 制备型反相高效液相色谱

[0260] 如下进行：使用于215及254nm的UV检测，用Waters X-Select Prep-C18, 5 μ m, 19x50 mm 柱，用含有0.1%v/v甲酸的H₂O-MeCN梯度洗脱10分钟；或用Waters X-Bridge Prep-C18, 5 μ m, 19x50 mm柱，用含有0.1%碳酸氢铵的H₂O-MeCN梯度洗脱10分钟。

[0261] 分析方法

[0262] 反相高效液相色谱

[0263] 方法1: Waters XSelect CSH C18 2.5 μ m (4.6 x 30 mm), 40 $^{\circ}$ C; 流速2.5-4.5 mL min⁻¹, 用含有0.1%v/v甲酸的H₂O-MeCN梯度于4分钟期间洗脱，使用254nm的UV检测。梯度信

息:0-3.00min,由95% H₂O-5% MeCN渐变至5% H₂O-95% MeCN;3.00-3.01min,保持5% H₂O-95% MeCN,流速提高至4.5mL min⁻¹;3.01-3.50min,保持5% H₂O-95% MeCN;3.50-3.60min,恢复到95% H₂O-5% MeCN,流速降低至3.50mL min⁻¹;3.60-3.90min,保持95% H₂O-5% MeCN;3.90-4.00min,保持95% H₂O-5% MeCN,流速降低至2.5mL min⁻¹。

[0264] 方法2:Waters XBridge BEH C18,2.5 μm(4.6 x 30 mm),40 °C;流速 2.5-4.5 mL min⁻¹,用含有10 mM 碳酸氢铵的H₂O-MeCN 梯度于4分钟期间洗脱,使用254 nm的UV检测。梯度信息:0-3.00 min,由95% H₂O-5% MeCN渐变至5% H₂O-95% MeCN;3.00-3.01 min,保持5% H₂O-95% MeCN,流速提高至4.5 mL min⁻¹;3.01-3.50 min,保持5% H₂O-95% MeCN;3.50-3.60 min,恢复到95% H₂O-5% MeCN,流速降低至3.50 mL min⁻¹;3.60-3.90 min,保持95% H₂O-5% MeCN;3.90-4.00 min,保持95% H₂O-5% MeCN,流速降低至2.5 mL min⁻¹。

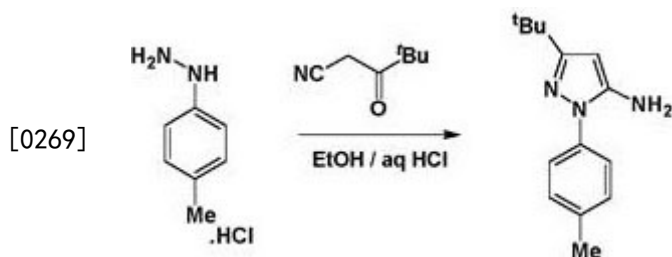
[0265] ¹H NMR光谱

[0266] ¹H NMR光谱于Bruker Avance III光谱仪上,于400 MHz,用残留的未氧化的溶剂作为参考从而得到,且除非另有说明,于DMSO-d₆中运行。

实施例

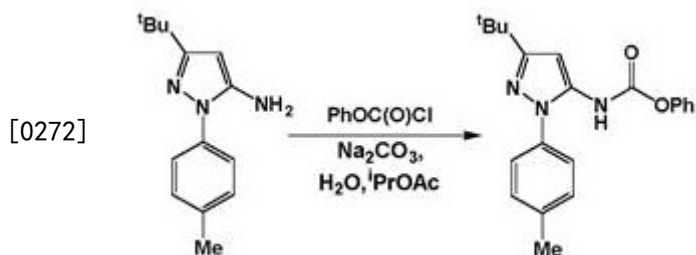
[0267] 实施例1A:1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲

[0268] 中间体A:3-叔丁基-1-对甲苯基-1H-吡唑-5-胺



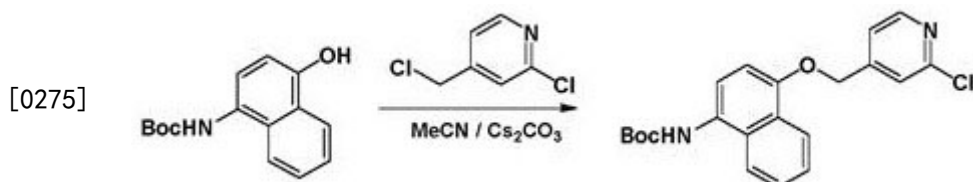
[0270] 向含有对甲苯基肼盐酸盐(100 g,630 mmol)于EtOH(1251 mL)中的经搅拌的溶液中加入4,4-二甲基-3-氧代戊腈(88 g,699 mmol)及HCl(62.5 mL,750 mmol)。将产生的混合物于回流中搅拌过夜。将反应混合物冷却至室温并于真空浓缩至约原体积的1/3。然后,将反应混合物于冰浴中冷却并用6M的NaOH水溶液调节到约pH8-9。将反应混合物用乙醚(500 mL)萃取并将有机相用水(2 x 300 mL)清洗,之后经硫酸镁干燥并于真空浓缩而得到橙色固体。将固体悬浮于异己烷中并于回流中搅拌2.5 h,之后冷却并于仍然热时过滤而得到呈淡褐色固体的小标题的产物3-叔丁基-1-对甲苯基-1H-吡唑-5-胺(76.5 g,52%);R^t 1.31 min(方法1);m/z 230(M+H)⁺(ES⁺);¹H NMR δ:1.20(9H,s),2.32(3H,s),5.10(2H,br s),5.35(1H,s),7.24(2H,d),7.42(2H,m)。

[0271] 中间体B:(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)氨基甲酸苯酯



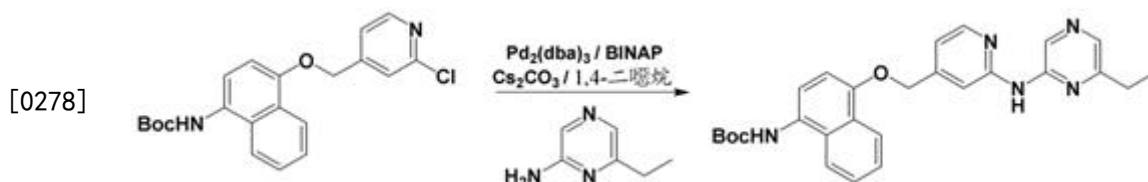
[0273] 将含有3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-胺(中间体A) (20g, 87.0mmol) 于醋酸异丙酯(240mL) 中的溶液添加至含有碳酸钠(11.3g, 106mmol) 于水(80mL) 中的经搅拌的溶液中。10分钟后, 将氯甲酸苯酯(12.1mL, 96mmol) 加入并将产生的混合物于环境温度搅拌过夜。将反应混合物用水(160mL) 稀释, 将各层分离并将有机层用水(2 x 80 mL), 盐水(80 mL) 清洗, 干燥(MgSO₄) 并于真空浓缩。将产生的黄色固体悬浮于10%乙醚/异己烷(320 mL) 中并搅拌直到得到均匀悬浮液。将固体通过过滤法收集并用异己烷清洗而得到呈白色粉末的小标题的化合物(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基) 氨基甲酸苯酯(27.3 g, 88%); R^t 2.65 min(方法1); m/z 350 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ: 1.29 (9H, s), 2.37 (3H, s), 6.35 (1H, s), 7.10-7.23 (3H, 重迭 m), 7.33-7.46 (6H, 重迭 m), 9.99 (1H, s)。

[0274] 中间体C: (4-((2-氯吡啶-4-基) 甲氧基) 萘-1-基) 氨基甲酸叔丁酯



[0276] 向含有2-氯-4-(氯甲基) 吡啶(30 g, 185 mmol) 及(4-羟基萘-1-基) 氨基甲酸叔丁酯(40.0 g, 154 mmol) 于乙腈(200 mL) 中的混合物中加入碳酸铯(75 g, 231 mmol) 并将产生的混合物加热至55 °C。16小时后, 将反应混合物用30% MeOH/DCM(600 mL) 及水(400 mL) 稀释。将各层分离并将水层用额外量的30% MeOH/DCM(2 x 600 mL) 萃取, 并将有机层于真空浓缩而得到粗产物。将粗产物用MeOH(200 mL) 研磨, 声处理约5分钟并浆化1天。将产生的固体通过过滤法收集并用MeOH(2 x 10 mL) 清洗而得到呈黄色固体的小标题的化合物(4-((2-氯吡啶-4-基) 甲氧基) 萘-1-基) 氨基甲酸叔丁酯(43 g, 70%); R^t 2.60 min(方法1); m/z 383 (M-H)⁻ (ES⁻); ¹H NMR δ: 1.47 (9H, s), 5.41 (2H, s), 6.98 (1H, d), 7.36 (1H, d), 7.55-7.61 (3H, 重迭 m), 7.65 (1H, m), 7.94 (1H, m), 8.29 (1H, m), 8.45 (1H, m), 9.00 (1H, bs)。

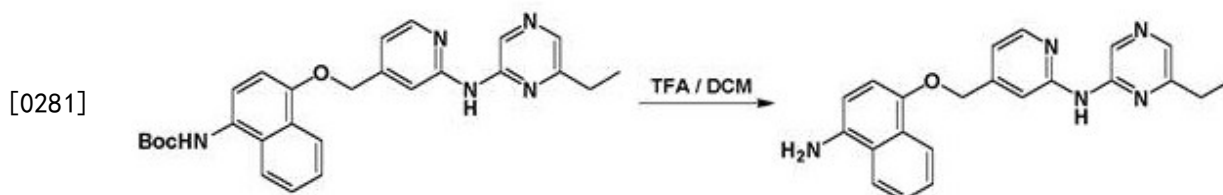
[0277] 中间体D (经保护): (4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基) 氨基) 吡啶-4-基) 甲氧基) 萘-1-基) 氨基甲酸叔丁酯



[0279] 将含有(4-((2-氯吡啶-4-基) 甲氧基) 萘-1-基) 氨基甲酸叔丁酯(中间体C) (1050 mg, 2.73 mmol), 6-乙基吡嗪-2-胺(437 mg, 3.55 mmol), 及碳酸铯(1333 mg, 4.09 mmol) 于1,4-二噁烷(15 mL) 中的混合物用氮脱气5分钟。将含有Pd₂(dba)₃ (125 mg, 0.136 mmol) 及BINAP(170 mg, 0.273 mmol) 于1,4-二噁烷(5 mL) 中的溶液加入, 并将反应混合物于90 °C

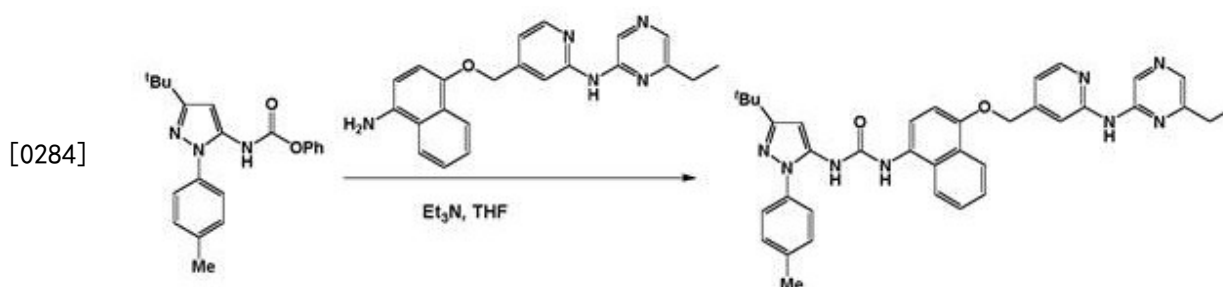
搅拌6小时。将反应混合物冷却并于室温搅拌16小时,然后用10% MeOH/DCM(25 mL)稀释并经由硅藻土塞过滤,用额外的10% MeOH/DCM(15 mL)清洗。将溶剂于真空去除并将粗产物与MeOH(15 mL)合并且浆化3小时。将产生的橙色固体通过过滤法分离,然后与MeOH/EtOH(5 mL)溶液合并且搅拌72小时。再次将产生的橙色固体通过过滤法分离,然后将丙酮(20 mL)加入并将混合物浆化2小时。将残留的固体过滤出来,并将滤出液蒸发而得到小标题的化合物(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯(360 mg,27%); R^t 2.6 min(方法2); m/z 472(M+H) $^+$ (ES $^+$); 1H NMR δ :1.18(3H,t),1.47(9H,s),2.63(2H,q),5.36(2H,s),6.99(1H,d),7.06(1H,d),7.36(1H,d),7.53-7.63(2H,m),7.90-8.06(3H,重迭 m),8.29(1H,d),8.36(1H,m),8.91(1H,s),8.96(1H,s),10.06(1H,s)。

[0280] 中间体D:N-(4-(((4-氨基萘-1-基)氧基)甲基)吡啶-2-基)-6-乙基吡嗪-2-胺



[0282] 将TFA(1.485 mL,19.09 mmol)添加至含有(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯(中间体D(经保护))(360 mg,0.763 mmol)于DCM(15 mL)中的溶液中,并将反应混合物于室温搅拌4小时,然后于真空浓缩。将残留物与饱和碳酸氢钠溶液合并且于室温搅拌16小时。将固体过滤出来,用乙腈清洗,并于真空干燥而得到呈米黄色固体的小标题的化合物 N-(4-(((4-氨基萘-1-基)氧基)甲基)吡啶-2-基)-6-乙基吡嗪-2-胺(200 mg,69%); R^t 2.14 min(方法2); m/z 372(M+H) $^+$ (ES $^+$); 1H NMR δ :1.20(3H,t),2.64(2H,q),5.18-5.24(4H,重迭 m),6.59(1H,d),6.82(1H,d),7.03(1H,d),7.41-7.51(2H,重迭 m),7.98-8.01(2H,m),8.04(1H,m),8.22-8.29(2H,重迭 m),8.91(1H,s),10.04(1H,s)。

[0283] 1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲



[0285] 于40 °C,将三乙胺(0.013 mL,0.093 mmol)添加至含有(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)氨基甲酸苯酯(中间体B)(0.042 g,0.121 mmol)及N-(4-(((4-氨基萘-1-基)氧基)甲基)吡啶-2-基)-6-乙基吡嗪-2-胺(中间体D)(0.093 g,0.250 mmol)于THF(1.5 mL)中的溶液中。将反应混合物于40 °C 搅拌40分钟,然后冷却至室温并搅拌3天,然后于真空浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法(12 g 柱,0至5% MeOH/DCM)纯化而得到灰白色-褐色的固体。将产物通过制备型HPLC(Gilson,酸性(0.1%甲酸),酸性,Waters X-Select Prep-C18,5 μ m,19 x 50 mm 柱,45-75% MeCN/水)再纯化而得到呈灰白色固体的标题化合

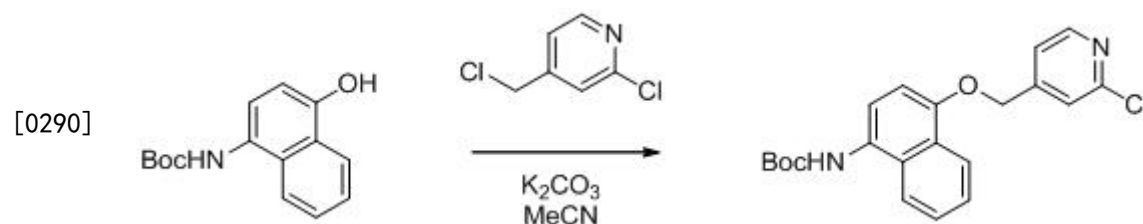
物1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡啶-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡啶-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(0.029 g,49%); R^t 2.26 min(方法1); m/z 627 (M+H)⁺ (ES⁺), 625 (M-H)⁻ (ES⁻);¹H NMR δ :1.18 (3H,t),1.28 (9H,s),2.40 (3H,s),2.63 (2H,q),5.36 (2H,s),6.36 (1H,s),7.02 (1H,d),7.07 (1H,dd),7.37 (2H,m),7.45 (2H,m),7.56-7.67 (3H,重迭m),7.94 (1H,m),7.99 (1H,s),8.02 (1H,s),8.30 (1H,d),8.39 (1H,m),8.60 (1H,s),8.81 (1H,s),8.92 (1H,s),10.08 (1H,s)。

[0286] 实施例1B:1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡啶-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡啶-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(不同批次)

[0287] 于22 °C,将1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡啶-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡啶-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(10.0 g)于乙腈(770 mL)中搅拌。将非均相混合物以3 °C/分钟的速率加热至回流温度并维持回流2.5小时。将混合物加晶种1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡啶-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡啶-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(100 mg)。将混合物于18小时期间线性冷却至20 °C然后再次加热至回流温度并回流2小时然后于18小时期间线性冷却至22 °C。将固体产物过滤出来,用乙腈(77 mL)清洗并于45 °C真空干燥18小时而得到1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡啶-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡啶-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(8.73 g)。

[0288] 实施例2A:1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡啶-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡啶-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(2型)

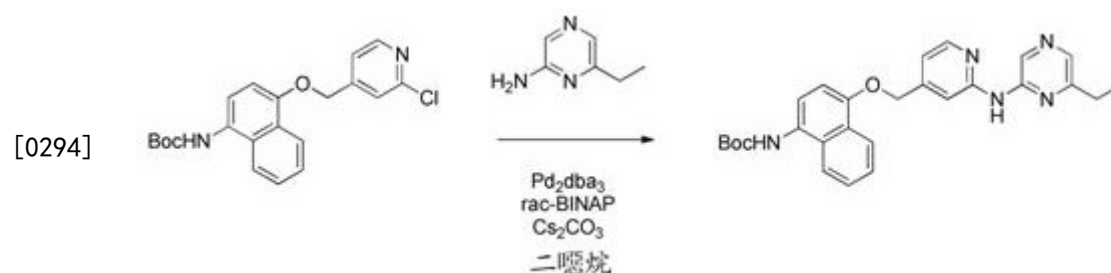
[0289] 中间体C:(4-((2-氯吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯



[0291] 将乙腈(420 mL)添加至 2-氯-4-(氯甲基)吡啶(1.05 eq,59.5 g)中,并将混合物于20 °C搅拌。将(4-羟基萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯(90.8 g)添加至混合物中然后将碳酸钾(72.6 g)加入。将非均相混合物以1.0 K/分钟的速率加热至55 °C。

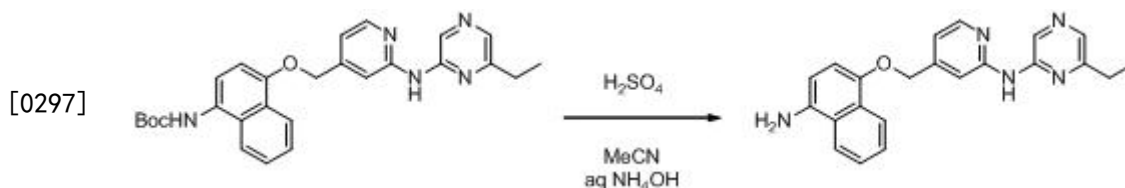
[0292] 将混合物于55 °C搅拌16小时然后将反应混合物冷却至22 °C。将水(1260 mL)于30分钟内加入并将混合物于22 °C搅拌30分钟。将沉淀过滤出来并用200 mL水清洗2次。将产物于50 °C真空干燥20小时而得到(4-((2-氯吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯(100.0 g,90.6%)。

[0293] 中间体D(经保护):(4-((2-((6-乙基吡啶-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯



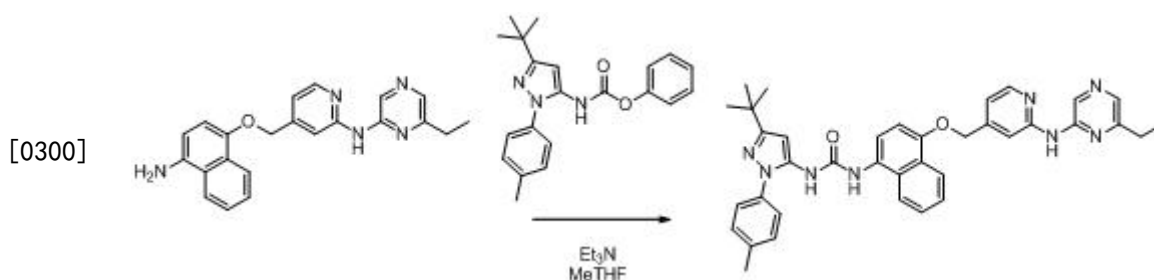
[0295] 将二噁烷(125 mL)添加至(4-((2-氯吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯(中间体C) (9.6 g)中并将混合物于20 °C搅拌。于20 °C,将碳酸铯(2 eq,16.3 g)及2-氨基-6-乙基吡嗪(1.5 eq,4.8 g)添加至该搅拌的混合物中。将氩气吹扫通过反应混合物。将三(二亚苄基丙酮)二钯(0) (0.05 eq,1.14 g)及外消旋BINAP(0.10 eq,1.56 g)添加至反应混合物中。于20 °C,将混合物再搅拌15分钟。将混合物以1.5 K/分钟的速率加热至90 °C,然后于90 °C搅拌12小时。将混合物冷却至20 °C并再继续搅拌6小时。将非均相混合物经由寅氏盐过滤,并将滤出物用二噁烷(两次 5 mL)清洗。将滤液于20 毫巴真空及50 °C浓缩。将残留物溶解于乙醇(150 mL)。发生了自发结晶。将非均相混合物于22 °C搅拌3小时。将沉淀过滤并用乙醇(10 mL)清洗。将产物于50 °C真空干燥20小时而得到(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯(9.05 g,76.8%)。

[0296] 中间体D:N-(4-(((4-氨基萘-1-基)氧基)甲基)吡啶-2-基)-6-乙基吡嗪-2-胺



[0298] 将乙腈(200 mL)添加至(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)氨基甲酸叔丁酯(中间体D(经保护)) (10.5 g)中并将非均相混合物于20 °C搅拌。将硫酸(4.5 eq,5.5 mL)于20 °C经2小时加入。于20 °C,将非均相混合物再搅拌2小时。于15分钟期间将氨水(10 eq,17 mL)添加至该反应混合物中并将温度通过冷却而维持于20 °C。于20 °C,将水(33.4 mL)于5分钟期间添加至该非均相混合物中。于20 °C搅拌30分钟后,将混合物冷却至5 °C并于5 °C再搅拌2小时。将沉淀过滤出来并用水(33.4 mL)及2-丙醇(18 mL)清洗。将产物于50 °C真空干燥24小时而得到N-(4-(((4-氨基萘-1-基)氧基)甲基)吡啶-2-基)-6-乙基吡嗪-2-胺(6.2 g,75%)。

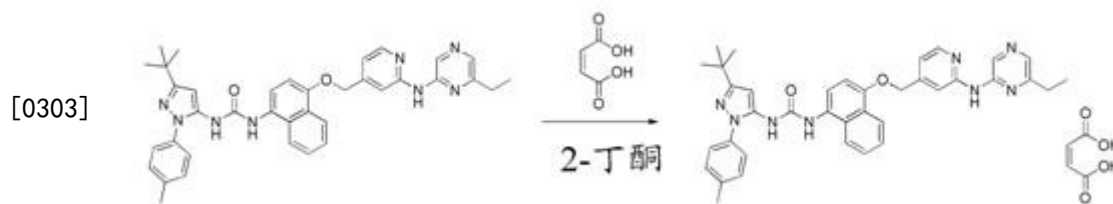
[0299] 1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲



[0301] 将2-甲基四氢呋喃(1809 mL)添加至N-(4-(((4-氨基萘-1-基)氧基)甲基)吡啶-2-基)-6-乙基吡嗪-2-胺(中间体D) (41.3 g)中并将混合物于20 °C搅拌。将(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)氨基甲酸苯酯(1.2 eq,51.3 g)添加至混合物中。将三乙胺(0.25 eq,3.9 mL)加入并于20 °C将混合物再搅拌10分钟。将非均相反应混合物于30分钟期间加热至48 °C并维持于48 °C达3.5小时。于48 °C下10分钟后,该混合物变得均匀并加入晶种1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(60 mg)。将反应混合物冷却至20 °C并再搅拌16小时。将形成的沉淀过滤出来并用2-甲基四氢呋喃(两次139 mL)清洗。将产物于45 °C真空干燥18

小时而得到1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(54.1 g,77.5%)。

[0302] 1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(2型)



[0304] 于20 °C,将2-丁酮(4442 mL)添加至1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(111.04 g)中并搅拌。将非均相混合物加热至65 °C并成为均相溶液。将SilicaMetS Thiol(金属清除剂)(5.55 g)加入并将该混合物于65 °C搅拌30分钟。将Norit A Supra(活性炭)(5.55 g)加入并将该混合物于65 °C再搅拌20分钟。将混合物用寅氏盐趁热过滤。将滤出物用温2-丁酮(1555 mL)(60 °C)清洗。将2-丁酮(2887 mL)添加至滤液中并达到60 °C,同时搅拌。

[0305] 将马来酸(1.0 eq,20.56 g)溶解于2-丁酮(555 mL)中。于65 °C,将马来酸溶液于80分钟期间添加至1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲溶液中。在10%的马来酸溶液加入后,将混合物添加晶种1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(2型)。将混合物于60 °C持续搅拌1小时,然后于6小时期间以2.3的指数非线性冷却至5 °C。将沉淀过滤出来并用2-丁酮(278 mL)清洗两次。将产物于45 °C真空干燥20小时而得到1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(2型)(113.8 g,86.5%)。

[0306] 实施例2B:1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(2型)(不同批次)

[0307] 将2-丁酮(750 mL)添加至1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲(7.50 g)中并将混合物搅拌。将混合物于20分钟期间加热至60 °C。将含有马来酸(1.39 g)于2-丁酮(12 mL)中的溶液于5分钟期间添加至该混合物中。约加入一半马来酸溶液后发生自发结晶。将混合物于60 °C搅拌30分钟然后于6小时期间以指数坡度(指数= 2.3)冷却至 5 °C,然后于5 °C搅拌30分钟,然后于30分钟期间加热至65 °C,然后于65 °C搅拌30分钟,然后于6小时期间以指数坡度(指数= 2.3)冷却至 5 °C,然后于5 °C搅拌30分钟,然后于30分钟期间加热至65 °C,然后于65 °C搅拌30分钟,然后于6小时期间以指数坡度(指数= 2.3)冷却至 5 °C。将产物过滤出来并用2-丁酮(50 mL)清洗两次,随即于45 °C真空干燥而得到1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(2型)(7.0 g)。

[0308] 实施例2C:1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(1型)

[0309] 于50 °C,将1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(15 mg)溶解于THF(100 vol.)中并将温度于50 °C和室温之间循环24小时(每一温度4小时)。然后将溶液保存在冰箱中24小时,之后将固体物质(1型)分离。

[0310] 实施例2D:1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(1型)(不同批次)

[0311] 于50 °C,将1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲溶解于THF(40 vol.)中并将1 eq马来酸加入。将样品置于室温和50°C之间(每一温度4小时)熟化2天。将固体物质(1型)分离。

[0312] 实施例3:微粉化批次

[0313] 实施例3A:微粉化形式的1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲

[0314] 微粉化的1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲是通过将来自实施例1B的物质于Hosokawa Alpine Spiral Jet Mill 50 AS(5 cm)微粉化设备(压力1.0 巴)(手动进料)中进行微粉化而制备的。通过激光衍射使用Malvern Mastersizer 2000S(分散于水/吐温80,0.1%w/v)测定的粒径体积参数提供于下表:

[0315]	Dv10(微米)	Dv50(微米)	Dv90(微米)
	0.15	1.54	10.76

[0316] 实施例3B:微粉化形式的1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐2型

[0317] 微粉化的1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲马来酸盐(2型)是通过将来自实施例2B的物质于Hosokawa Alpine Spiral Jet Mill 50 AS(5 cm)微粉化设备(压力1.0 巴)(手动进料)中进行微粉化而制备的。通过激光衍射使用Malvern Mastersizer 2000S(分散于水/吐温80,0.1%w/v)测定的输入和输出物质的粒径体积参数提供于下表:

	Dv10(微米)	Dv50(微米)	Dv90(微米)
[0318] 输入物质 (实施例2B)	3	9	128
输出物质 (实施例3B)	1.21	2.18	4.00

[0319] 实施例4:适用于吸入的,含有1-(3-(叔丁基)-1-(对甲苯基)-1H-吡唑-5-基)-3-(4-((2-((6-乙基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)甲氧基)萘-1-基)脲游离碱及马来酸盐(2型)的含乳糖的组合物

[0320] 通过掺混如下成份而制备组合物:

实施例	活性成份 (实施例3B) (马来酸盐(2型), 微粉化)	乳糖单水合物 *	硬脂酸镁**
[0321] 4a	75mg	75mg	-
4b	75mg	-	75mg
4c	75mg	35mg	35mg

实施例	活性成份 (实施例3A) (游离碱形式, 微粉化)**	乳糖单水合物*	硬脂酸镁**
4d	10 μ g	25mg	-
4e	10 μ g	25mg	1%
[0322] 4f	100 μ g	25mg	-

实施例	活性成份 (实施例3B) (马来酸盐(2型), 微粉化)	乳糖单水合物*	硬脂酸镁**
4g	10 μ g	25mg	-
4h	10 μ g	25mg	1%
4i	100 μ g	25mg	-

[0323] *Lactohale LH200 **来源:Peter Greven (级别:Ligamed MF-2V;植物等级)

[0324] 实施例5:表征及稳定性测试

[0325] 活性成份的物理表征

[0326] 红外光谱 (IR) -微型衰减全反射 (微ATR)

[0327] 使用适当的微ATR配件来分析样品。

[0328] 扫描次数:32

[0329] 分辨率:1cm⁻¹

[0330] 波长范围:4000至400cm⁻¹

[0331] 仪器:Thermo Nexus 670 FTIR光谱仪

[0332] 检测器:具有KBr窗的DTGS

[0333] 分光镜:Ge/KBr

[0334] 微ATR配件:具有Si晶体的Harrick Split Pea

[0335] 实施例2A物质的样品的红外光谱示于图1,反映出实施例1的马来酸盐的分子结构的振动模式。

[0336] 粉末XRD

[0337] 2型物质的粉末X-射线衍射 (XPD) 分析用PANanalytical (Philips) X' PertPRO MPD 衍射仪进行。该仪器配备有Cu LFF X-射线管。

[0338] 化合物铺在零背景样品支架上。

[0339] 仪器参数:

[0340] 发生器电压:45kV

[0341] 发生器电流强度:40mA

[0342] 几何:Bragg-Brentano

[0343] 台(stage):旋转器台 (spinner stage)

[0344] 测量条件:

- [0345] 扫描模式：连续
 [0346] 扫描范围：3至50°2 θ
 [0347] 步长：0.02°/步
 [0348] 计算时间：30秒/步
 [0349] 旋转器旋转时间：1秒
 [0350] 辐射型：CuK α

	入射光束路径:		衍射光束路径:
	程序发散狭缝:	15 mm	长抗散射屏蔽: +
[0351]	Soller狭缝:	0.04 rad	Soller狭缝: 0.04 rad
	光束掩膜:	15mm	Ni过滤器: +
	抗散射狭缝:	1°	检测器: X'Celerator
	光束刀(beam knife):	+	

[0352] 1型物质的粉末X-射线衍射(XPD)分析在Bruker AXS C2 GADDS衍射仪上进行。化合物被轻微地压在载玻片上。

- [0353] 仪器参数:
 [0354] 发生器电压: 40kV
 [0355] 发生器电流强度: 40mA
 [0356] 几何: 反射(=Bragg-Brentano)
 [0357] 台: 自动化XYZ台
 [0358] 测量条件:
 [0359] 扫描模式: 连续
 [0360] 扫描范围: 3至30°2 θ
 [0361] 步长: 0.05°/步
 [0362] 计算时间: 120秒
 [0363] 辐射型: CuK α
 [0364] 检测器: HiStar 2-维
 [0365] 单Göbel多层镜偶联0.3 mm的针孔准直器

[0366] 实施例2A物质样品的粉末XRD图示于图2,显示无卤素存在的衍射峰,表明化合物作为结晶产物存在。该XRD图为结晶多晶型物2型的特征。

[0367] 实施例2D物质样品的粉末XRD图示于图3,显示无卤素存在的衍射峰,表明化合物作为结晶产物存在。该XRD图为结晶多晶型物1型的特征。

[0368] 差示扫描量热(DSC)

[0369] 将约3mg测试化合物转移至标准铝TA-仪器样品皿中。将样品皿用适当盖子密封并用装备有RCS冷却单元的TA-Instruments Q1000 MTDSC来记录DSC曲线。

- [0370] 使用下列参数:
 [0371] 起始温度: 25°C
 [0372] 加热速率: 10°C/分钟
 [0373] 最终温度: 300°C

[0374] 氮流：50mL/分钟

[0375] 实施例2A物质样品的DSC曲线示于图4，显示产物于约198.6 °C熔化并分解(2型)。

[0376] 热重分析(TGA)

[0377] 将测试化合物转移至铝样品皿中。用TA Instruments Q500热重仪记录热重曲线。使用下列参数：

[0378] 起始温度：室温

[0379] 加热速率：20°C/min

[0380] 分辨率：4

[0381] 最终条件：300°C或<80[(w/w)%]

[0382] 实施例2A物质样品的TGA图示于图5。由室温至高达175°C的温度范围内没有重量损失的记录。高于175°C的重量损失是由于产物的蒸发和分解。

[0383] 动态蒸气吸附(DVS)

[0384] 将大约20mg的测试化合物转移进行SMS动态蒸气吸附并记录于25°C时相对于大气湿度的重量变化。

[0385] 使用下列参数：

[0386] 干燥：在干燥氮气下60min

[0387] 平衡：60min/步骤。

[0388] RH(%) 测量点：

[0389] 第一组：

[0390] 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5

[0391] 第二组：

[0392] 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 0

[0393] DVS测试用实施例2A物质的样品进行(参见图6和7)。在最初的干燥步骤期间，记录的重量损失为0.3%。该产物没有显示吸湿。

[0394] DVS之后的产物通过XRD及IR进行研究且试验前后保持在相同的固体状态形式(数据未显示)。没有观察到盐的解离迹象。

[0395] 扫描电子显微镜(SEM)

[0396] 对于SEM实验，在Phenom Pro扫描电子显微镜上收集数据。使用导电双面胶带将少量样品安装到铝桩(stub)上。用溅射涂布机涂布金薄层(20mA, 120sec)。

[0397] 将本发明化合物的马来酸盐的1型和2型物质的样品通过SEM检测。1型产物具有针样形态。2型产物具有平板样形态。2型的平板样形态较1型的针样形态更适合制备吸入产品。

[0398] 活性成份的物理表征结果概述

[0399] 根据XRD，测试物质为结晶，并且在约198.6°C熔化并分解。于室温和175°C之间通过TGA未观察到重量损失。该物质显示不吸湿。没有该盐的固态转化或解离的证据。这些特性证实式(I)化合物马来酸盐适合作为候选药物。

[0400] 微粉化形式的活性成份的物理表征

[0401] 将实施例3B物质的样品通过IR、粉末XRD、DSC、TGA及DVS，依照上述对实施例2A物质所述的相似方法进行研究。IR及粉末XRD结果基本相同(数据未显示)。根据XRD，测试物质

为结晶,并且根据DSC在约194.6℃熔化并分解。该物质显示不吸湿(数据未显示)。没有该盐的固态转化或解离的证据(数据未显示)。这些特性证实了微粉化形式的式(I)化合物马来酸盐适合作为候选药物。

[0402] 物理稳定性测试-乳糖共混物的稳定性

[0403] 将实施例4a、4b及4c的组合物于40℃/75%RH,50℃/80%RH及50℃/环境RH的条件下储存3、6及13周。于时间零点及三个时间点获得XRD图及IR光谱(测试参数与上述活性成份表征所述的相同)。在时间零点和任何时间点之间都没有观察到XRD图或IR光谱的相关差异(数据未显示)。未观察到该盐的固态形式变化或解离。

[0404] 化学稳定性测试-活性成份及共混物的稳定性

[0405] 用于降解测定的UPLC方法

[0406] 将样品用溶剂混合物(DMSO/水 80:20)(7mL)于10mL小瓶中萃取。

[0407] 使用下列参数进行UPLC色谱法:

[0408] 柱:Supelco Ascentis Express C18,150 mm 长 x 3.0 mm i.d.,2.7 μm 粒径

[0409] 柱温度:30 °C

[0410] 自动进样器温度:5°C

[0411] 流速:0.40 mL /min

[0412] 流动相:

[0413] 溶剂A:10mM醋酸铵(0.771 g/L)+ 0.1% v/v 三氟醋酸/水

[0414] 溶剂B:乙腈/异丙醇70:30(v/v)

[0415] 梯度:

溶剂	时间(分)					
	0	20	25	30	31	36
[0416] %A	90	35	0	0	90	90
%B	10	65	100	100	10	10

[0417] 分析运行时间:36 min

[0418] 数据收集时间:30 min

[0419] 注入体积:5μL

[0420] 波长:于200和400nm之间扫描

[0421] 用来计算含量均匀度的波长:334.0nm

[0422] 实施例4d、4e、4f、4g、4h及4i的组合物于50℃/75%RH,60℃/30%RH,60℃/50%RH,70℃/10%RH,70℃/75%RH及80℃/50%RH条件下储存14和30天。

[0423] 在时间零点及时间点7,14及30天通过UPLC测量降解,结果示于图8,图片A至F。

[0424] 含有活性成份马来酸盐2型的组合物的总降解百分比总是比含有活性成份游离碱的等价的组合物低,说明马来酸盐2型在这些制剂中更稳定。这些制剂中,含有活性成份马来酸盐2型的组合物在较高浓度的总降解百分比低于含有活性成份马来酸盐2型的组合物在较低浓度的总降解百分比。

[0425] 实施例1B及实施例2B物质的类似研究中(即未微粉化和未共混的物质),样品于50℃/75%RH,60℃/50%RH,70℃/10%RH,70℃/75%RH及80℃/50%RH的条件下储存至多30天,得到类似的定性结果,即,马来酸盐的总降解百分比总是低于游离碱(数据未显示)。

[0426] 由这些结果看来,本发明化合物的马来酸盐(单独及与乳糖组合)比游离碱形式更加化学稳定。

[0427] 实施例6:生物测试

[0428] 生物测试的实验方法

[0429] 酶抑制分析

[0430] 本文所公开化合物的酶抑制活性通过FRET使用标记有供体及受体荧光团的合成肽来测定(Z-LYTE,Life Technologies,Paisley,UK)。

[0431] p38 MAPK α 酶抑制

[0432] 本发明化合物对抗p38 MAPK α 同工型的抑制活性(MAPK14:Life Technologies)通过测定p38 MAPK α 下游分子MAPKAP-K2的靶标肽的活化/磷酸化水平而间接地评估。该酶(40 ng/mL,2.5 μ L)与测试化合物(2.5 μ L,以下任一浓度:40 μ g/mL,12 μ g/mL,4 μ g/mL,1.2 μ g/mL,0.4 μ g/mL,0.12 μ g/mL,0.04 μ g/mL,0.012 μ g/mL,0.004 μ g/mL或0.0012 μ g/mL)于室温培养2小时。然后将FRET肽(8 μ M,2.5 μ L)及p38 α 非活性靶标MAPKAP-K2(Life Technologies,2000 ng/mL),及适当的ATP溶液(2.5 μ L,40 μ M)添加至酶/化合物混合物中并于室温培养1小时。在荧光微量读板器(EnVision,Perkin Elmer,Waltham,MA,USA)中检测之前的1小时添加显影剂(蛋白酶,5 μ L)。

[0433] p38 MAPK γ 酶抑制

[0434] 本发明化合物对抗p38MAPK γ (MAPK12:Life Technologies)的抑制活性通过测量靶标肽的活化/磷酸化水平而评估。将酶(800 ng/mL,2.5 μ L)与测试化合物(2.5 μ L,以下任一浓度:40 μ g/mL,12 μ g/mL,4 μ g/mL,1.2 μ g/mL,0.4 μ g/mL,0.12 μ g/mL,0.04 μ g/mL,0.012 μ g/mL,0.004 μ g/mL或0.0012 μ g/mL)于室温培养2小时。然后将FRET肽(8 μ M,2.5 μ L),及适当ATP溶液(2.5 μ L,400 μ M)添加至酶/化合物混合物中并于室温培养1小时。在荧光微量读板器(EnVision,Perkin Elmer)中检测前的1小时添加显影剂(蛋白酶,5 μ L)。

[0435] Hck,c-Src及Syk酶抑制

[0436] 本发明化合物对抗Hck、c-Src及Syk酶(Life Technologies)的抑制活性以前文所描述的类似方式进行评估。将相关的酶(分别为1000 ng/mL,1400 ng/mL或2000 ng/mL,2.5 μ L)与测试化合物(40 μ g/mL,12 μ g/mL,4 μ g/mL,1.2 μ g/mL,0.4 μ g/mL,0.12 μ g/mL,0.04 μ g/mL,0.012 μ g/mL,0.004 μ g/mL或0.0012 μ g/mL,各2.5 μ L)于室温培养2小时。然后将FRET肽(8 μ M,2.5 μ L),及适当的ATP溶液(2.5 μ L,对于c-Src为800 μ M的ATP,对于HCK及Syk为60 μ M的ATP)添加至酶/化合物混合物中并于室温培养1小时。在荧光微量读板器(EnVision,Perkin Elmer)中检测前1小时添加显影剂(蛋白酶,5 μ L)。

[0437] GSK 3 α 酶抑制

[0438] 本发明化合物对抗GSK 3 α 酶同工型(Life Technologies)的抑制活性以前文所述的类似方式来评估。将GSK3 α 蛋白质(500 ng/mL,2.5 μ L)与测试化合物(2.5 μ L,以下任一浓度:40 μ g/mL,12 μ g/mL,4 μ g/mL,1.2 μ g/mL,0.4 μ g/mL,0.12 μ g/mL,0.04 μ g/mL,0.012 μ g/mL,0.004 μ g/mL或0.0012 μ g/mL)于室温培养2小时。然后将FRET肽(8 μ M,2.5 μ L)(其为GSK3 α 的磷酸化靶标)及ATP(40 μ M,2.5 μ L)添加至酶/化合物混合物中并将产生的混合物于室温培养1小时。在荧光微量读板器(EnVision,Perkin Elmer)中检测前1小时添加显影剂(蛋白酶,5 μ L)。

[0439] 所有情况中,该位点特异性的蛋白酶仅裂解未磷酸化的肽并消除FRET信号。各反应的磷酸化水平使用香豆素发射(供体)与荧光素发射(受体)的比率来计算,其中低比率表示高的磷酸化水平而高比率表示低的磷酸化水平。相对于未抑制的对照来计算各反应的抑制百分比,然后由浓度-反应曲线来计算50%抑制浓度(IC₅₀值)。

[0440] 细胞分析(使用于实施例中)

[0441] 使用下列细胞分析以评估本发明化合物且结果列于下文。

[0442] d-U937细胞中LPS诱导的TNF α /IL-8释放

[0443] 将U937细胞,人类单核细胞系,通过与PMA(100-200ng/mL)培养48至72小时而分化成巨噬细胞型细胞。将细胞与最终浓度的测试化合物预培养2小时,然后用LPS(0.1 μ g/mL;来自E. Coli:0111:B4,Sigma)刺激4小时。收集上层清液,通过三明治ELISA(Duo-set,R&D systems)以测定TNF α 及IL-8浓度。以在各浓度的测试化合物下由10 μ g/mL的BIRB796获得的结果与载体对照相比所得的百分比计算TNF α 产生的抑制。相对50%有效浓度(REC₅₀)由得到的浓度-反应曲线来确定。通过与载体对照相比较计算各浓度的测试化合物下的IL-8产生的抑制。50%抑制浓度(IC₅₀)由得到的浓度-反应曲线来确定。

[0444] BEAS2B细胞中Poly I:C诱导的ICAM-1表达

[0445] Poly I:C作为简单的RNA病毒模拟物用于这些研究中。Poly I:C-Oligofectamine混合物(2% Oligofectamine \pm 1 μ g/mL Poly I:C,25 μ L;分别来自Life Technologies和Invivogen Ltd., San Diego,CA)转染至BEAS2B细胞(人类支气管上皮细胞,ATCC)中。将细胞与最终浓度的测试化合物预培养2小时并通过基于细胞的ELISA来测定细胞表面上的ICAM-1表达水平。于poly I:C转染后18小时的时间点,将细胞用4%甲醛/PBS(100 μ L)固定,然后通过添加含有0.1%叠氮化钠及1%过氧化氢的清洗缓冲液(100 μ L,0.05%吐温/PBS:PBS-吐温)猝灭内源性过氧化物酶。用清洗缓冲液(3 x 200 μ L)清洗细胞。用5%奶/PBS-吐温(100 μ L)阻断孔1小时后,将细胞与抗人类ICAM-1抗体(50 μ L;Cell Signaling Technology,Danvers,MA)/1% BSA PBS于4 $^{\circ}$ C培养过夜。

[0446] 将细胞用PBS-吐温(3 x 200 μ L)清洗并与第二抗体(100 μ L;HRP-共轭抗兔IgG,Dako Ltd., Glostrup,Denmark)培养。然后将细胞与底物(50 μ L)培养2-20min,接着添加终止溶液(50 μ L,1N H₂SO₄)。通过使用分光光度计读取相对于参考波长655nm的450nm的吸光度以检测ICAM-1信号。然后,将细胞用PBS-吐温(3 x 200 μ L)清洗,在用结晶紫染色(50 μ L的2%的PBS溶液)并用1%的SDS的PBS溶液(100 μ L)洗脱后通过读取于595nm的吸光度而确定各孔的总细胞数目。所测得的OD₄₅₀₋₆₅₅读数通过除以各孔的OD₅₉₅读数而针对细胞数进行校正。于各浓度的测试化合物下,通过与载体对照相比较而计算ICAM-1表达的抑制。50%抑制浓度(IC₅₀)由所得到的浓度-反应曲线来确定。

[0447] 细胞有丝分裂分析

[0448] 将来自健康个体的外周血液单核细胞(PBMC)使用密度梯度(Histopaque[®]-1077,Sigma-Aldrich,Poole,UK)由全血(Quintiles,London,UK)中分离。随即将PBMC(每一样品中三百万个细胞)用2% PHA(Sigma-Aldrich,Poole,UK)处理48小时,接着暴露于各种浓度的测试化合物20小时。在收集前2小时,将PBMC用地美可辛(0.1 μ g/mL;Life Technologies,Paisley,UK,)处理以捕获分裂中期的细胞。为了观察有丝分裂的细胞,将PBMC透化并通过加入Intraprep(50 μ L;Beckman Coulter,France)而固定,并用抗磷酸化

组蛋白3 (0.26 ng/L; #9701; Cell Signalling) 及碘化丙啶 (1 mg/mL; Sigma-Aldrich) 如前所述来染色 (Muehlbauer P.A. et al., Mutation Res., 2003, 537, 117-130)。使用 ATTUNE 流式细胞仪 (Life Technologies) 观察荧光, 选通淋巴细胞。计算各处理相对于载体 (0.5% DMSO) 处理的有丝分裂抑制百分比。

[0449] 测试化合物对于细胞存活力的影响: MTT 分析

[0450] 在两个方案中将经分化的 U937 细胞与各测试化合物 (最终浓度 10 $\mu\text{g/mL}$, 于 200 μL 下述介质中) 预培养: 第 1 个方案 - 于 5% FCS RPMI1640 介质中预培养 4 小时, 第 2 个方案 - 于 10% FCS RPMI1640 介质中预培养 24 小时。将上层清液用新的介质 (200 μL) 替换并将 MTT 储备溶液 (10 μL , 5 mg/mL) 添加至各孔中。培养 1 小时后, 将介质去除, 将 DMSO (200 μL) 添加至各孔中并将板轻轻地摇动 1 小时后于 550 nm 读取吸光度。计算各孔中相对于载体 (0.5% DMSO) 处理的细胞存活力的损失百分比。结果, 药物处理相对于载体的细胞存活力的明显增加表示为负百分比。

[0451] 来自 COPD 患者的经 LPS-处理的痰液巨噬细胞中的细胞因子生成

[0452] COPD 患者使用超声雾化器 (Devilbiss, Carthage, MO) 潮式呼吸 5 分钟, 吸入 3% (w/v) 高渗盐水的雾化溶液。此步骤最多重复 3 次直到得到足够的痰液。用旋涡混合器将该痰液样品于 0.02% v/v 二硫苏糖醇 (DTT) 溶液中均质化并剧烈混合。将样品再悬浮于 PBS (40 mL) 中, 接着以 1500 rpm 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 分钟而得到痰液细胞团。将该细胞团用 PBS (40 mL) 清洗。然后将痰液细胞再悬浮于 4 mL 巨噬细胞无血清介质 (巨噬细胞-SFM, Life technologies, 含有 20 U/mL 青霉素, 0.02 mg/mL 链霉素及 5 $\mu\text{g/mL}$ 两性霉素 B) 中并接种至高结合 (high bound) 96 孔板上, 接着于 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 下培养 1 小时以允许巨噬细胞附着至板的底部。将板上的细胞用新鲜巨噬细胞-SFM (200 μL /孔) 清洗以去除嗜中性粒细胞及其它被污染的细胞。将板上的粘附细胞 (主要为痰液巨噬细胞) 用于进一步的分析。痰液的诱导在 Guys 医院 (Guys Hospital) 的 Quintiles 药物研究单位 (Quintiles Drug Research Unit) 进行, 伦理委员会的批准及签署的知情同意书由 Quintiles 获得。

[0453] 适当时, 将 1 μL 含有所说明浓度的测试化合物或参考制品的溶液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 或 0.001 $\mu\text{g/mL}$) 或替代地作为载体对照的 1 μL DMSO 添加至各个孔 (200 μL , 介质中) 并将细胞培养 2 小时。将细胞用 LPS 溶液 (50 μL , 最终浓度: 1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 下培养 18 小时。然后收集上层清液并保持于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。使用适当的 luminex 试剂盒测量所选择的分析物。将上层清液解冻后, 将磁性抗体小球扩增 (multiplexed) 并于 96-孔板中与标准背景溶液或适当体积的样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 振摇培养过夜。每一孔以 200 μL 由试剂盒所提供的清洗缓冲液用磁性洗板器清洗两次后, 将小球于室温与试剂盒所提供的生物素结合抗体溶液振摇培养 1 小时。将链霉亲和素溶液于室温振摇添加 30 分钟。各孔用 200 μL 清洗缓冲液清洗后, 将小球再悬浮于鞘液 (150 μL) 中并立刻分析。用 Xcel Fit 软件以 4 或 5-参数方程式使用各标准曲线来计算上层清液的各分析物的浓度。通过与载体对照相比较计算各浓度下各细胞因子生成的抑制。

[0454] 鼻病毒诱导的 IL-8 释放

[0455] 人类鼻病毒 RV16 得自 American Type Culture Collection (Manassas, VA)。通过用 HRV 感染 MRC5 细胞直到 80% 细胞产生病变从而生成病毒储备液。

[0456] 将 BEAS2B 细胞用 HRV 以 1.2 的 MOI 感染, 并于 33 $^{\circ}\text{C}$ 轻微振荡下培养 1 小时以促进吸

收。然后将细胞用PBS清洗,将新鲜介质加入并将细胞再培养72小时。收集上层清液以供使用Duoset ELISA开发试剂盒(R&D系统,Minneapolis,MN)分析IL-8浓度。HRV感染前2小时加入化合物,感染后1小时洗出未感染的HRV。

[0457] 细胞分析(在实施例中未采用)

[0458] 下列细胞分析可用来评估本发明的化合物:

[0459] 鼻病毒诱导的IL-8释放(上述方法的变化)及ICAM-1表达

[0460] 人类鼻病毒RV16得自American Type Culture Collection (Manassas,VA)。通过用HRV感染HeLa细胞直到80%细胞产生病变从而生成病毒储备液。

[0461] BEAS2B细胞用HRV以5的MOI感染,并于33 °C轻微振荡培养1至2小时以促进吸收。然后将细胞用PBS清洗,将新鲜介质加入并将细胞再培养72小时。收集上层清液以供使用Duoset ELISA开发试剂盒(R&D系统,Minneapolis,MN)分析IL-8浓度。

[0462] 细胞表面ICAM-1表达的水平通过基于细胞的ELISA来测定。感染后72小时,将细胞用4%甲醛/PBS固定。通过添加0.1%叠氮化钠及1%过氧化氢猝灭内源性过氧化物酶之后,将孔用清洗缓冲液(0.05%吐温/PBS:PBS-吐温)清洗。用5%奶/PBS-吐温阻断孔1小时后,将细胞与抗人类ICAM-1抗体/5% BSA PBS-吐温(1:500)培养过夜。将孔用PBS-吐温清洗并与第二抗体(HRP-共轭抗兔IgG,Dako Ltd.)培养。通过添加底物并使用分光光度计以参考波长655nm读取450nm的读数以检测ICAM-1信号。然后用PBS-吐温清洗孔,在结晶紫染色和用1% SDS溶液洗脱后通过读取595 nm的吸光度测定每孔的总细胞数。测得的OD₄₅₀₋₆₅₅读数通过除以各孔的OD₅₉₅读数从而针对细胞数进行校正。HRV感染前2小时加入化合物,感染后1至2小时洗出未感染的HRV。

[0463] PBMC细胞中LPS诱导的TNF α / IL-8释放

[0464] 将来自健康个体的外周血液单核细胞(PBMC)用密度梯度(Lymphoprep,Axis-Shield Healthcare)从全血中分离。在标准组织培养条件下(37°C, 5%CO₂),将PBMC接种于96孔板中并用所需浓度的化合物处理2小时,然后添加1 ng/mL LPS (Escherichia Coli 0111:B4,来自Sigma Aldrich) 24小时。收集上层清液用于通过三明治ELISA(Duo-set, R&D系统)测定TNF α 浓度,并在荧光微读板器(Varioskan® Flash,ThermoFisher Scientific)上读数。IL-8及TNF α 生成的50%抑制(IC₅₀)浓度由剂量反应曲线计算得到。

[0465] CD3/CD28刺激的PBMC细胞中IL-2及IFN γ 的释放

[0466] 将来自健康个体的PBMC使用密度梯度(Lymphoprep,Axis-Shield Healthcare)由全血中分离。将细胞添加至用CD3/CD28单克隆抗体(分别为0.3 μ g/mL eBioscience及3 μ g/mL BD Pharmingen)混合物预涂布的96孔板中。然后将所需浓度的化合物添加至孔中并将板置于标准组织培养条件下3天。收集上层清液并通过三明治ELISA(Duo-set,R&D系统)测定IL-2及IFN γ 的释放。IC₅₀由剂量反应曲线来确定。

[0467] HT29细胞中IL-1 β 诱导的IL-8的释放

[0468] 将HT29 细胞,人类结肠腺癌细胞系,接种于96孔板中(24小时)并用所需浓度的化合物预处理2小时,之后添加5 ng/mL IL-1 β (Abcam) 24小时。收集上层清液,通过三明治ELISA(Duo-set,R&D系统)定量测定IL-8。IC₅₀由剂量反应曲线来确定。

[0469] T细胞增殖

[0470] 将来自健康个体的PBMC使用密度梯度(Lymphoprep,Axis-Shield Healthcare)由

全血中分离。首先将淋巴细胞部分通过负磁性细胞分选而富集CD4⁺ T细胞,按制造商的说明(Miltenyi Biotec 130-091-155)进行。然后使用微珠用CD45RA⁺细胞的正磁性选择将自然的CD4⁺ T细胞分离,按制造商的说明(130-045-901)进行。将细胞以每孔 2×10^5 个细胞在100 μ L RPMI/10%FBS中接种至96孔平板上(Corning Costar)。将25 μ L测试化合物在标准介质中稀释至适当浓度(8x 最终浓度)且添加至板的重复的孔中以达到0.03 ng/mL - 250 ng/mL剂量反应范围。加入DMSO作为阴性对照。将板预培养2小时,之后用1 μ g/mL抗-CD3(OKT3;eBioscience)来刺激。72小时后,将各孔的介质替换为150 μ L含有10 μ M BrdU(Roche)的新鲜介质。16小时后,将上层清液去除,将板干燥并通过添加100 μ L固定/变性溶液至各孔20分钟而将细胞固定,根据制造商的说明(Roche)进行。将板用PBS清洗一次,然后添加抗-BrdU检测抗体,并于室温培养90分钟。然后将板用供应的清洗缓冲液轻轻地清洗三次,通过添加100 μ L底物溶液显影。通过添加50 μ L的1 M H₂SO₄停止该反应,并于450 nm在读板器(Varioskan[®] Flash,ThermoFisher Scientific)上读取吸光度。IC₅₀由剂量反应曲线来确定。

[0471] 人类活检分析

[0472] 肠粘膜活检得自IBD患者的结肠的炎症区。将活检材料切成小片(2-3 mm)并于无血清介质中在5% CO₂/95% O₂气氛中于37 °C置于器官培养室中的钢网格上。将DMSO对照或所需浓度的测试化合物添加至组织并于器官培养室中培养24小时。收集上层清液以通过R&D ELISA来测定IL-6,IL-8,IL-1 β 及TNF α 水平。相对于对DMSO对照(100%)测得的细胞因子释放来计算测试化合物的细胞因子释放抑制百分比。

[0473] 来自IBD患者的CD3/CD28刺激的LPMC细胞中的IL-2及IFN γ 的释放

[0474] 如下将鼓膜中层单核细胞(LPMC)由手术样品的炎症IBD粘膜或由手术样品的正常粘膜分离并纯化:

[0475] 用解剖刀将粘膜由手术样品的较深层去除,并切割成3-4 mm大小的片段。通过在磁力搅拌器搅拌下用1 mM EDTA (Sigma-Aldrich,Poole,UK)/HBSS(Sigma-Aldrich)清洗组织片段三次而去除上皮,于每次清洗后弃去上层清液。然后于37 °C,将样品用1A型胶原酶(1 mg/mL;Sigma-Aldrich)搅拌处理1小时。然后将得到的细胞悬浮液用100 μ m细胞过滤器过滤,清洗两次,再悬浮于含有10%胎牛血清,100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素的RPMI-1640介质(Sigma-Aldrich)中,并用于细胞培养。

[0476] 在DMSO对照或适当浓度的化合物存在时,将新鲜分离的LPMC (2x10⁵细胞/孔)用1 μ g/mL α -CD3/ α -CD28刺激48小时。48小时后,将上层清液去除并通过R&D ELISA来分析TNF α 及IFN γ 的存在。相对于对DMSO对照(100%)测得的细胞因子释放来计算测试化合物的细胞因子释放抑制百分比。

[0477] 由IBD患者分离的肌成纤维细胞的细胞因子释放的抑制

[0478] 将来自炎症IBD粘膜的肌成纤维细胞如下分离:

[0479] 将粘膜解剖并丢弃,且于37 °C,将1 mm-大小的粘膜样品于潮湿的CO₂培养箱中在补充有20% FBS,1%非必须氨基酸(Invitrogen,Paisley,UK),100 U/mL青霉素,100 μ g/mL链霉素,50 μ g/mL庆大霉素,及1 μ g/mL两性霉素(Sigma-Aldrich)的Dulbecco's改良的Eagle's介质(DMEM,Sigma-Aldrich)中培养。将所建立的肌成纤维细胞群体接种至25cm²培养瓶中并于补充有20%FBS及抗生素的DMEM中培养到至少第4代以提供足够的量供刺激实验

使用。

[0480] 然后,将肌成纤维细胞的亚汇合的单层以每孔 3×10^5 细胞接种至12-孔板中并于 37°C ,5% CO_2 下在无血清介质中经受饥饿24小时,然后在DMSO对照或适当浓度的化合物存在下培养24小时。24小时后,将上层清液移出并通过R&D ELISA分析IL-8及IL-6的存在。相对于对DMSO对照(100%)所测定的细胞因子释放来计算测试化合物的细胞因子释放的抑制百分比。

[0481] 人类嗜中性粒细胞脱粒

[0482] 嗜中性粒细胞如下由人类外周血液中分离:

[0483] 通过静脉穿刺收集血液并通过添加1:1 EDTA:无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS,无 Ca^+ / Mg^+)抗凝。加入葡聚糖(3% w/v) (1份葡聚糖溶液至4份血液)并将血液于室温放置约20分钟。小心地将上层清液以密度梯度(Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare)分层并离心(15 min, 2000 rpm, 无制动)。将上层清液吸除并将细胞团块再悬浮于无菌盐水(0.2%)中不超过60秒(以裂解污染的红血球)。然后加入10倍体积的PBS并将细胞离心(5 min, 1200 rpm)。将细胞再悬浮于HBSS+ (Hank's平衡盐溶液(不含酚红),含有细胞松弛素B(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及1 mM CaCl_2)以达到 5×10^6 细胞/mL。

[0484] 在V-底96孔板的每孔中加入 5×10^4 细胞并与适当浓度的测试化合物(0.3-1000 ng/mL)或载体(DMSO, 0.5% 最终浓度)培养(30 min, 37°C)。通过加入fMLP(最终浓度1 μM)刺激脱粒,进一步培养后(30 min, 37°C)将细胞通过离心(5 min, 1500 rpm)移出并将上层清液转移至平底96孔板。加入等体积的四甲基联苯胺(TMB)并于10分钟后,通过添加等体积的硫酸(0.5 M)而终止反应并读取于450 nm的吸光度(减去655 nm的背景)。50%抑制浓度(IC_{50})由所得到的浓度-反应曲线来测定。

[0485] 细胞的细胞毒性试验

[0486] 将 5×10^4 TK6细胞(成淋巴细胞T细胞系)在195 μL 介质(补充有10%胎牛血清的RPMI)中添加至96孔板的适当数目的孔中。将5 μL 的DMSO 对照(最终浓度0.5% v/v)或测试化合物(最终浓度为5或1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)添加至孔中并于 37°C ,5% CO_2 下培养。24小时后,将板以1300 rpm离心3分钟并将上层清液弃去。然后将细胞再悬浮于7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶(PI)/PBS中。15分钟后,将细胞通过流式细胞仪(BD accuri)来分析。%存活力以基于DMSO对照归一化的测试孔中PI阴性的细胞的百分比计。

[0487] 体内检查:药效学及抗炎活性(用于实施例中)

[0488] 下列体内检查用于评估本发明化合物且结果如下。

[0489] 小鼠中LPS诱导的嗜中性粒细胞聚集

[0490] 于指定时间(2-8小时内),将未禁食的Balb/c小鼠经由气管内途径给予载体或测试物质,之后通过施用LPS挑战刺激炎性反应。于 $T = 0$ 时,将小鼠置于暴露室,暴露于LPS(7.0 mL, 0.5 mg/mL的PBS溶液, 30 min)。再8小时后,将动物麻醉,对其气管插管,通过经由气管导管灌注再由其肺部抽取1.0 mL的PBS以提取BALF。用Neubaur血球计来测量BALF样品中总的及分化的白细胞计数。BALF样品的细胞离心涂片通过于室温以200 rpm离心5分钟制备,并用DiffQuik染色系统(Dade Behring)染色。将细胞用油浸式显微镜计数。BAL中嗜中性粒细胞数的数据以平均值 \pm S.E.M. (平均值的标准误差)表示。相对于载体处理计算各处理的嗜中性粒细胞聚集的抑制百分比。

[0491] 香烟烟雾模型

[0492] 将A/J小鼠(雄性,5周大)暴露于香烟烟雾(4%香烟烟雾,用空气稀释)30分钟每天,共11天,使用供小动物用的Tobacco Smoke Inhalation Experiment System(烟草烟雾吸入实验系统)(Model SIS-CS;Sibata Scientific Technology,Tokyo,Japan)进行。最后的香烟烟雾暴露后,将测试物质每天一次经鼻内(35 μ L的于10% DMSO/PBS中的溶液)给予3天。最后一次给药后12小时,将每只动物麻醉,气管插管并收集支气管肺泡灌洗液(BALF)。使用抗小鼠MOMA2抗体(巨噬细胞)或抗小鼠7/4抗体(嗜中性粒细胞),通过FACS分析(EPICS[®] ALTRA II,Beckman Coulter,Inc., Fullerton,CA,USA)来测定肺泡巨噬细胞及嗜中性粒细胞的数目。将BALF离心并收集上层清液。使用Quantikine[®]小鼠KC ELISA试剂盒(R&D系统,Inc., Minneapolis,MN,USA)来定量测定BALF中角化细胞化学引诱物(keratinocyte chemoattractant)(KC;CXCL1)的水平。

[0493] 体内检查:药效学及抗炎活性(未用于实施例中)

[0494] 下列体内检查可用来评估本发明的化合物:

[0495] 小鼠中DSS诱导的结肠炎

[0496] 在通过用DSS处理刺激炎症反应前一天(-1天),将未禁食的10-12周大的雄性BDF1小鼠通过每天两次的经口管饲给予载体、参照物(5-ASA)或测试化合物。在研究的0天,将DSS(5% w/v)于饮用水中给予,接着BID给予载体(5 mL/kg),参照物(100 mg/kg)或测试化合物(5 mg/kg)7天。该含有DSS的饮用水每3天补充一次。研究期间,将动物每天称重并观察粪便且根据粪便稠度来记录得分。在+6天处死时,将大肠取出并记录长度及重量。取结肠部分进行MPO分析以测定嗜中性粒细胞浸润或进行组织病理学评分来确定疾病严重性。

[0497] 小鼠中TNBS诱导的结肠炎

[0498] 在通过用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)(15 mg/mL,于50%乙醇/50%盐水中)处理刺激性反应前一天(-1天),将未禁食的10-12周大的雄性BDF1小鼠通过每天两次的经口管饲给予载体(5mL/kg)、参照物(布地缩松2.5 mg/kg)或测试化合物(1、5或50 mg/kg)。在研究的0天,将TNBS(200 μ L)经塑料导管经结肠内给予,接着BID给予载体,参照物或测试化合物2或4天。研究期间,将动物每天称重并观察粪便且根据粪便稠度来记录得分。在第2天(或第4天)处死时,将大肠取出并记录长度及重量。取结肠部分进行MPO分析以测定嗜中性粒细胞浸润或进行组织病理学研究,包括评分来确定疾病严重性。

[0499] 小鼠的继承性转移

[0500] 于研究的第0天,将雌性Ba1b/C小鼠杀死并取得脾脏以供CD45RB^{high}细胞分离(使用SCID IBD细胞分离方案)。然后将大约 4×10^5 细胞/mL的CD45RB^{high}细胞IP注入(100 μ L/小鼠)雌性SCID动物。于研究的第14天,将小鼠称重并根据体重随机分成治疗组。于第21天,将化合物于花生油载体中以下面所列剂量水平及5 mL/kg的剂量体积经口管饲BID给药。继续处理直到研究的第42天,该时间点,将动物于上午给药后4小时进行尸检。记录结肠长度及重量,用作研究的第二终点,测量结肠水肿。然后将结肠分成六个截面,将其中四个用于组织病理学评分(初步终点),将两个均质化供细胞因子分析。所示数据为天然(naïve)动物和载体动物之间诱导窗口的抑制%,其中,较高的抑制暗示更接近非疾病的天然的表现型。

[0501] 体外及体内检查结果

[0502] 本发明化合物(游离碱形式)的体外检查结果见以下表2、表3、表4及表5以及图9。

与结构上相关的参考化合物N-(4-(4-(3-(3-叔丁基-1-对甲苯基-1H-吡唑-5-基)脲基)萘-1-基氧基)吡啶-2-基)-2-甲氧基乙酰胺(WO2010/112936的实施例1)对比,该参考化合物先前已经被描述为具有抗病毒功效的有效的抗炎剂,还与熟知的抗炎剂丙酸氟替卡松对比。

[0503] 表2:测试化合物的p38 MAPK α 及 γ ,HCK,c-Src,Syk及GSK3 α 酶特性

酶抑制的IC₅₀值(nM)

测试化合物	p38	p38	HCK	c-Src	Syk	GSK3 α
	MAPK α	MAPK γ				
[0504] 参考化合物	10	87	7	11	42	18
本发明化合物	26	152	55	199	>15955	>15105

[0505] 表 3:测试化合物的LPS诱导的TNF α 及IL-8释放及PolyIC诱导的ICAM-表达的抑制

测试化合物	LPS诱导的释放(nM)		PolyIC /
	IL-8	TNF α	ICAM1(nM)
[0506] 测试化合物	IC ₅₀ (dU937)	REC ₅₀ (dU937)	IC ₅₀ (BEAS2B)
参考化合物	1.2	0.7	3.8
本发明化合物	11.4	5.5	61.1

[0507] 表4:测试化合物对细胞存活力的影响

测试化合物	MTT分析 ¹		有丝分裂分析 ²
	d-U937细胞指定时间点的细胞存活力		有丝分裂抑制(%)
[0508] 测试化合物	4h	24h	5 μ g/mL
参考化合物	-	+	93 \pm 5
本发明化合物	-	-	18 \pm 7

[0509] 1. 细胞存活力检查:-ve及+ve分别指在指定的时间点在10 μ g/mL下,该值低于和高于无显著影响的阈值,所述阈值定义为30%的抑制。

[0510] 2. 平均 \pm SEM

[0511] 表5:测试化合物对于来自COPD患者的LPS处理的痰液巨噬细胞的细胞因子产生的影响

0.1 $\mu\text{g/mL}$ 下的抑制百分比	
测试化合物	IL-6
丙酸氟替卡松	29 \pm 21
本发明化合物	48 \pm 9

[0513] 体外及体内检查结果概述

[0514] 本发明化合物在体外及体内分析中证明了符合良好抗炎活性的特性。其对于Syk及GSK3 α 激酶具有很弱的活性(表2和3)。

[0515] 本发明化合物在测量其对于细胞存活力的影响的分析系统中显示出显著较低的活性,表明其很可能比参考化合物具有更优良的治疗指数(表4)。

[0516] 本发明化合物在使用的分析系统中与丙酸氟替卡松相比显示出更优良的抗炎活性(表5)。

[0517] 本发明化合物显示HRV诱导的IL-8的剂量依赖性抑制(图9)。

[0518] 综上所述,这些结果显示本发明化合物具有与以上公开的参考化合物类似的抗炎性质且有利地伴有更好的治疗指数。

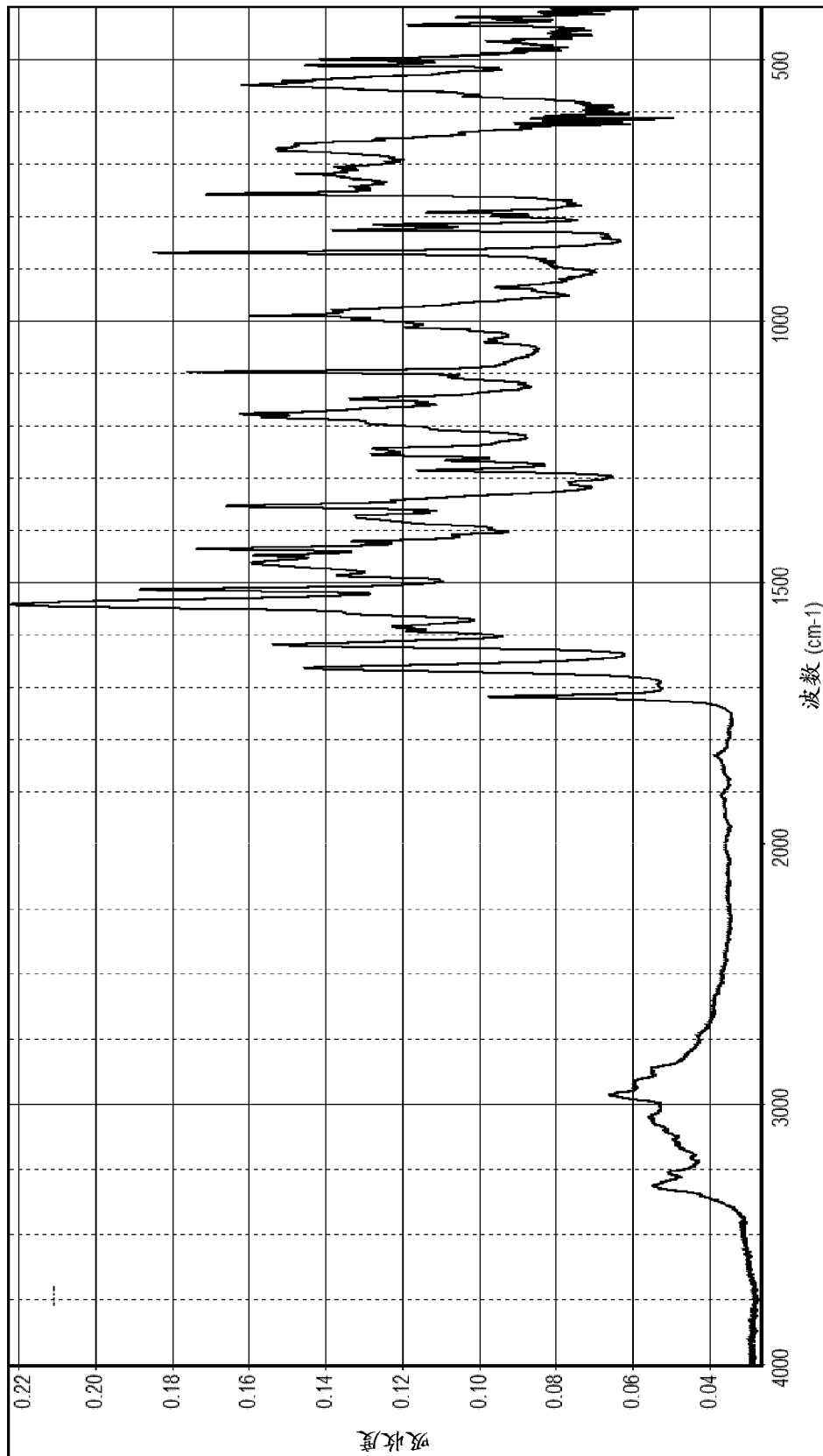


图1

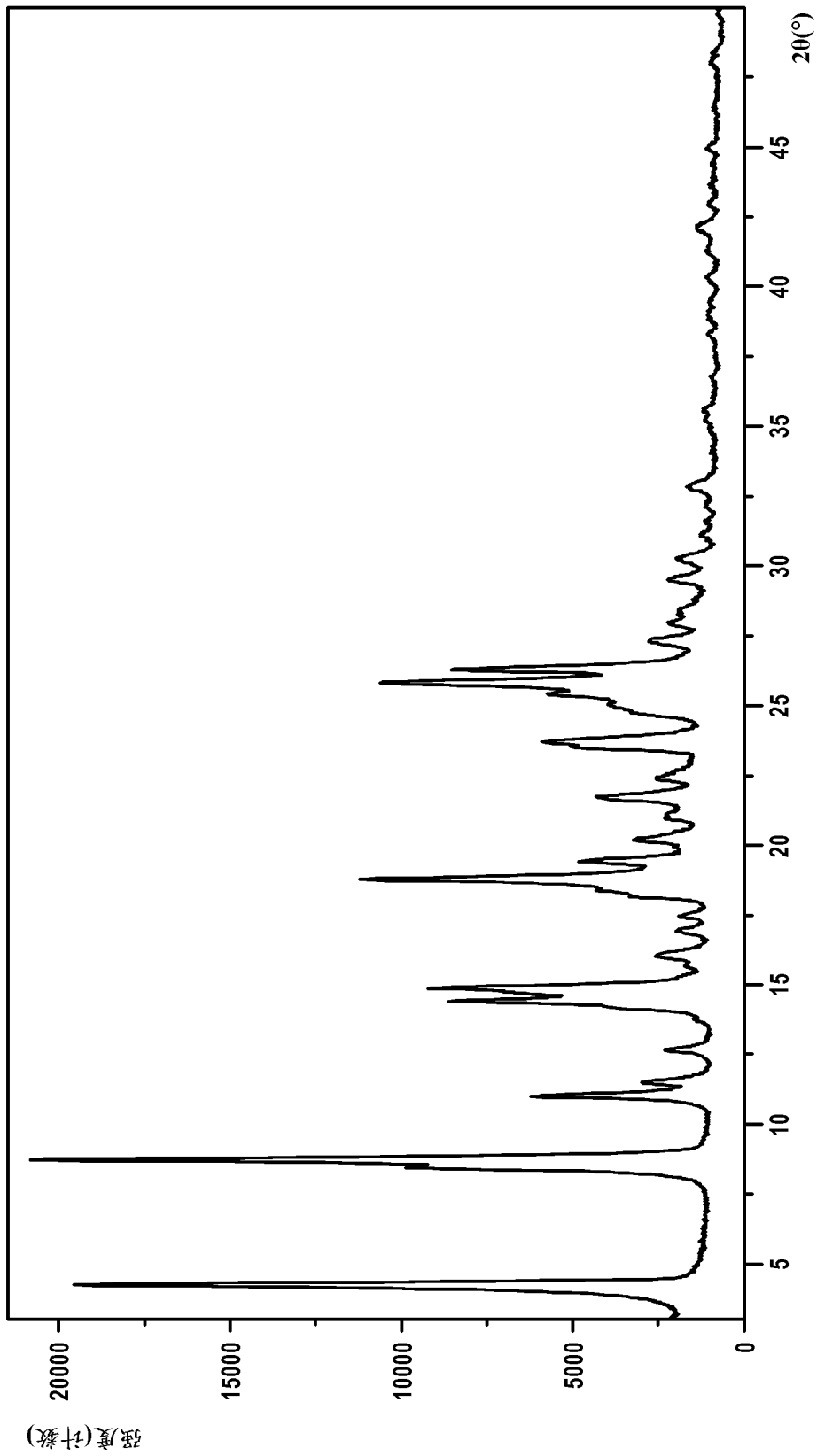


图 2

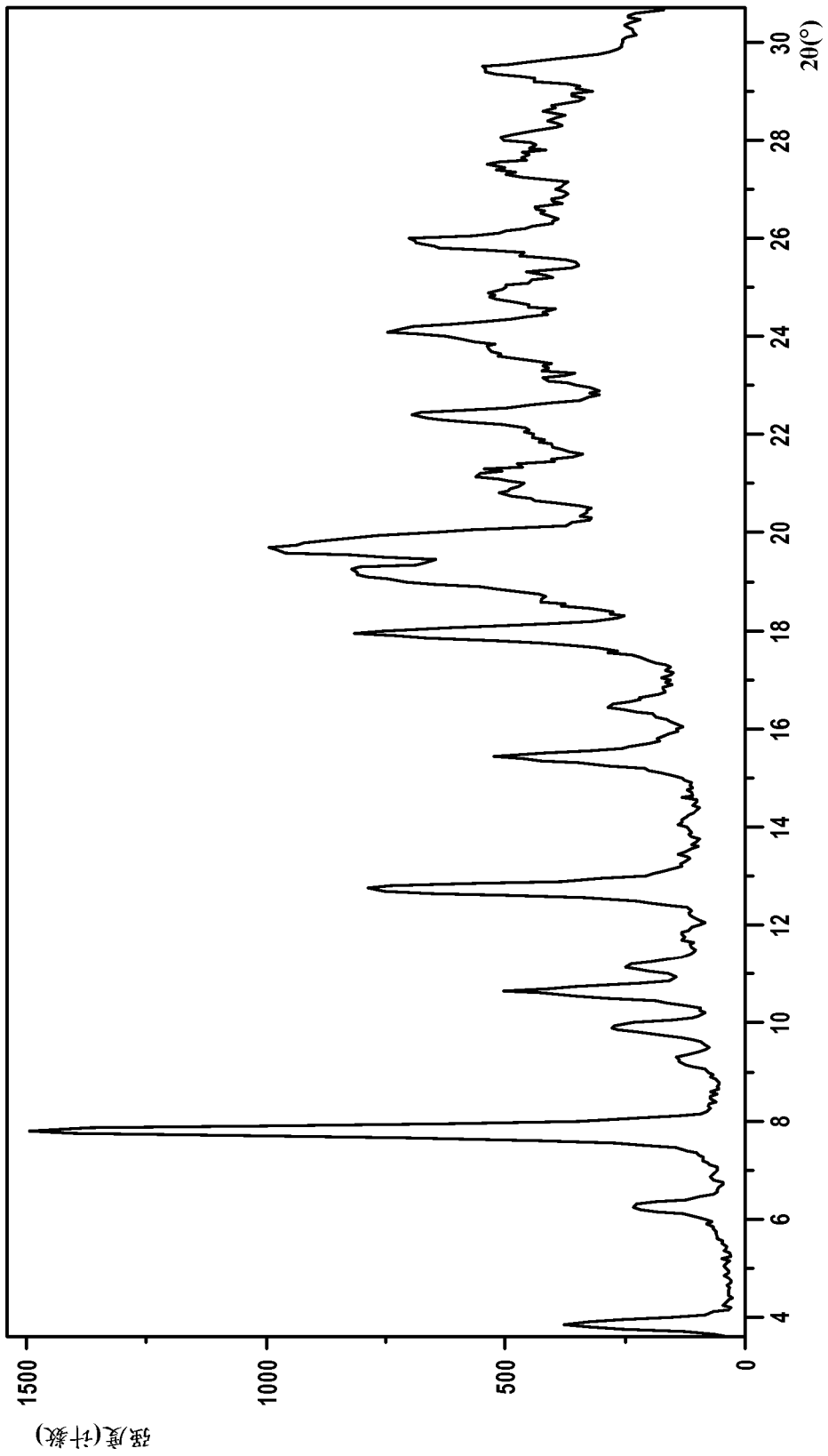


图 3

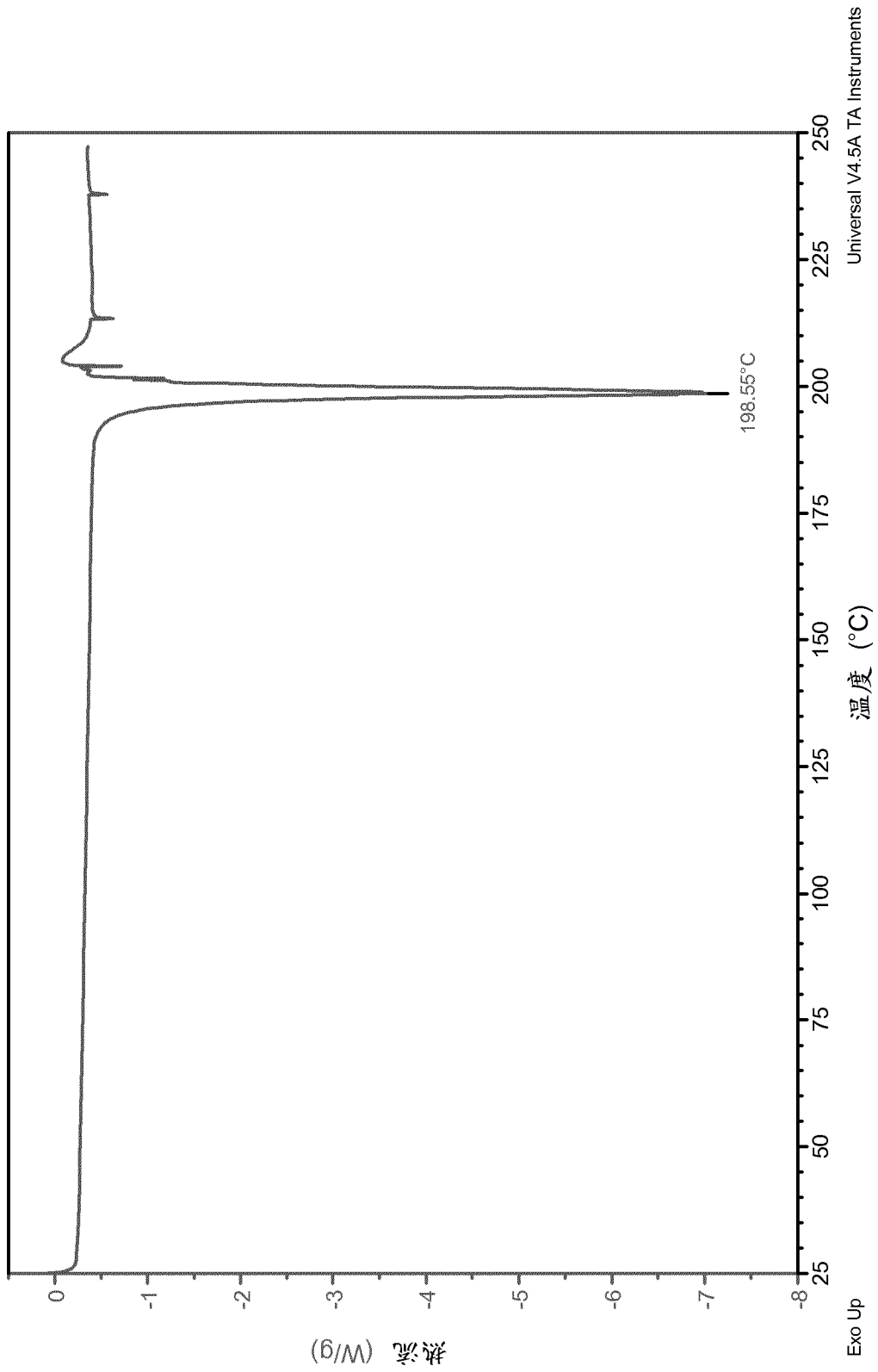


图 4

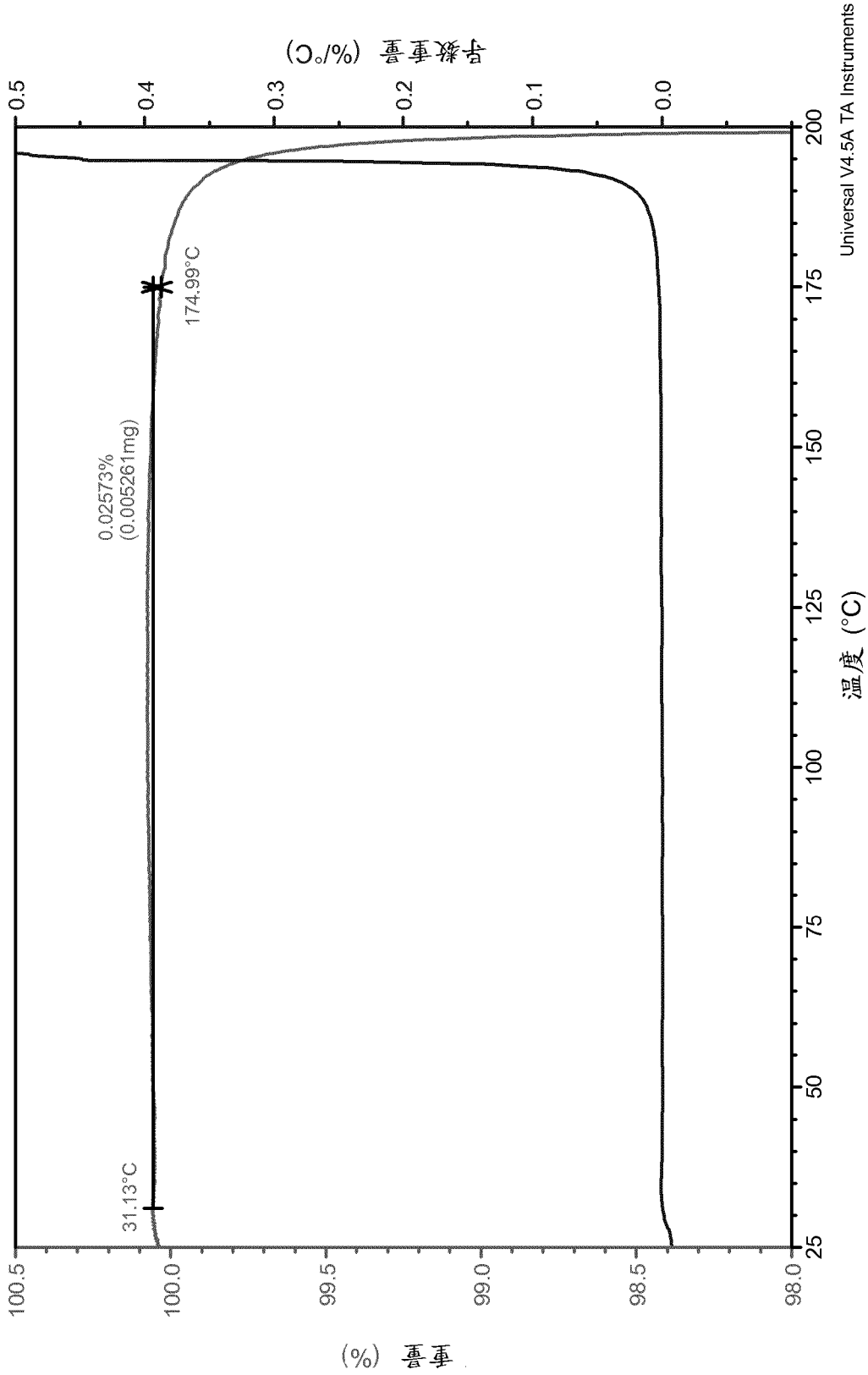


图 5

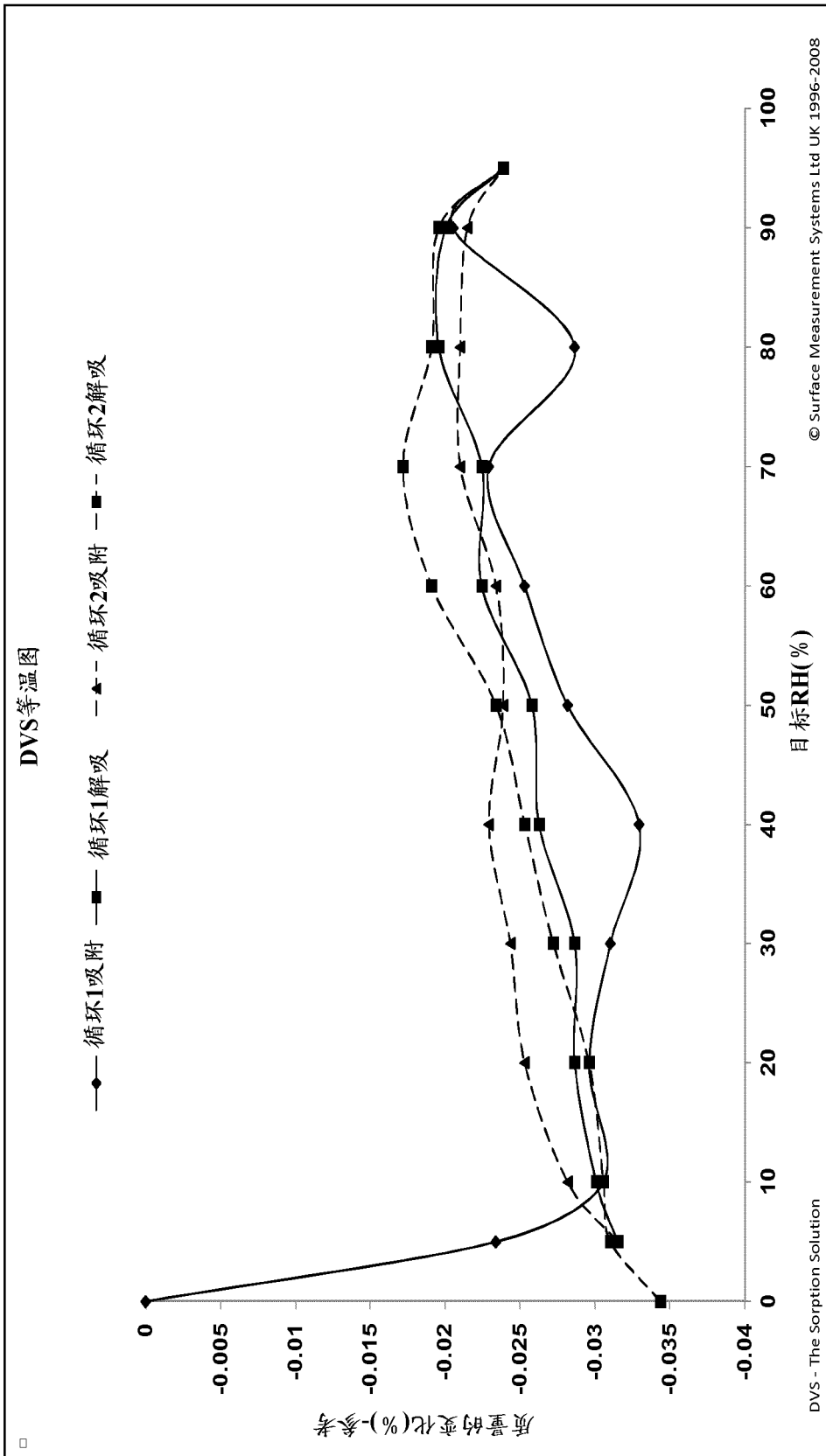


图 6

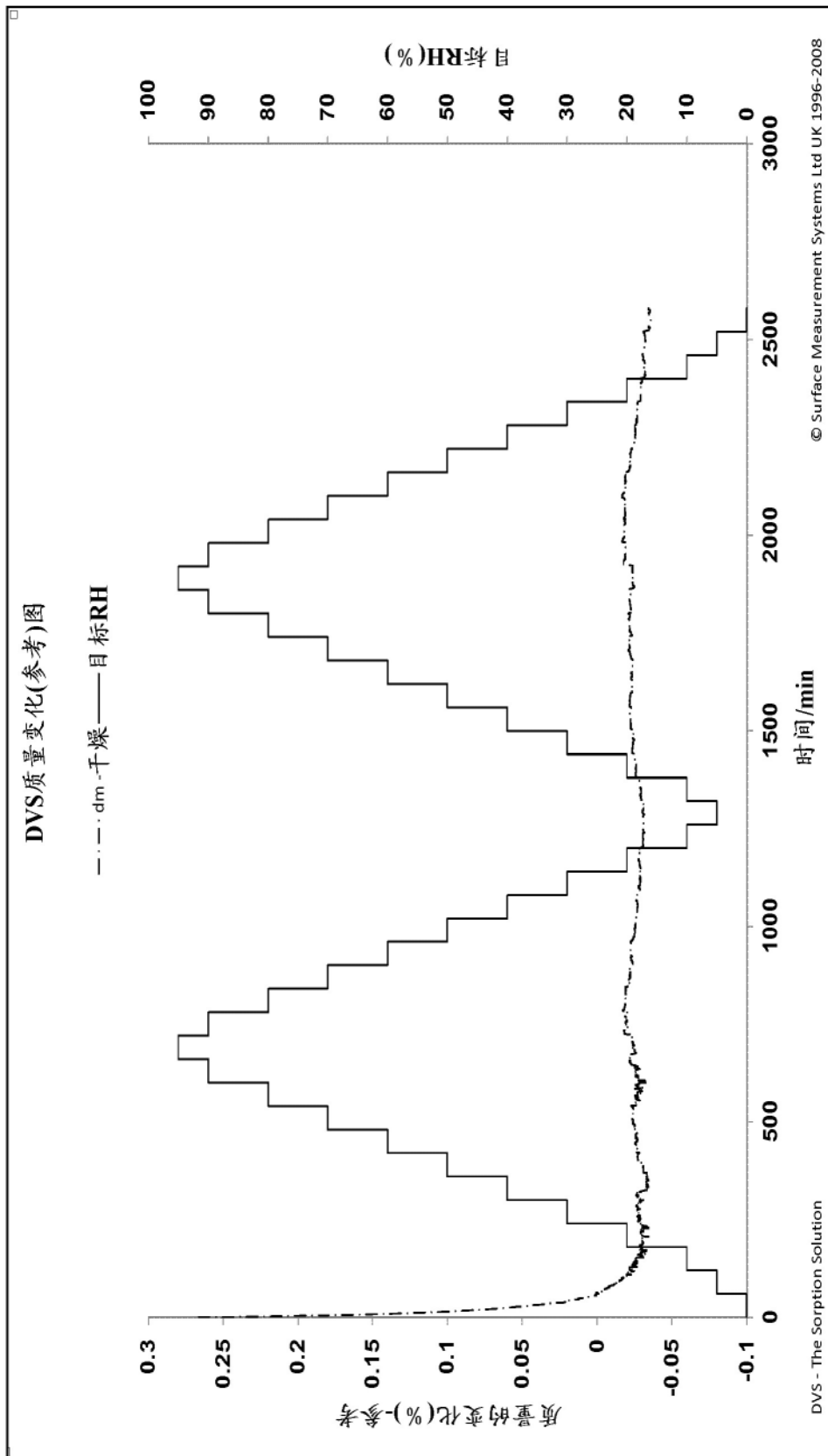
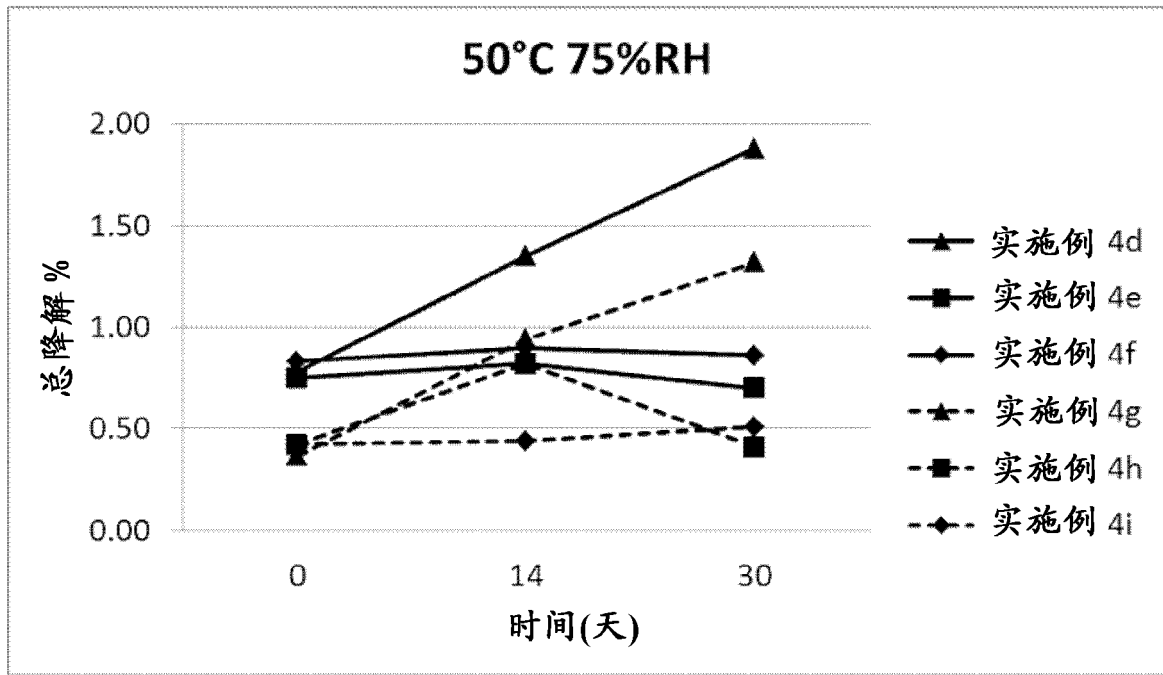


图 7

A



B

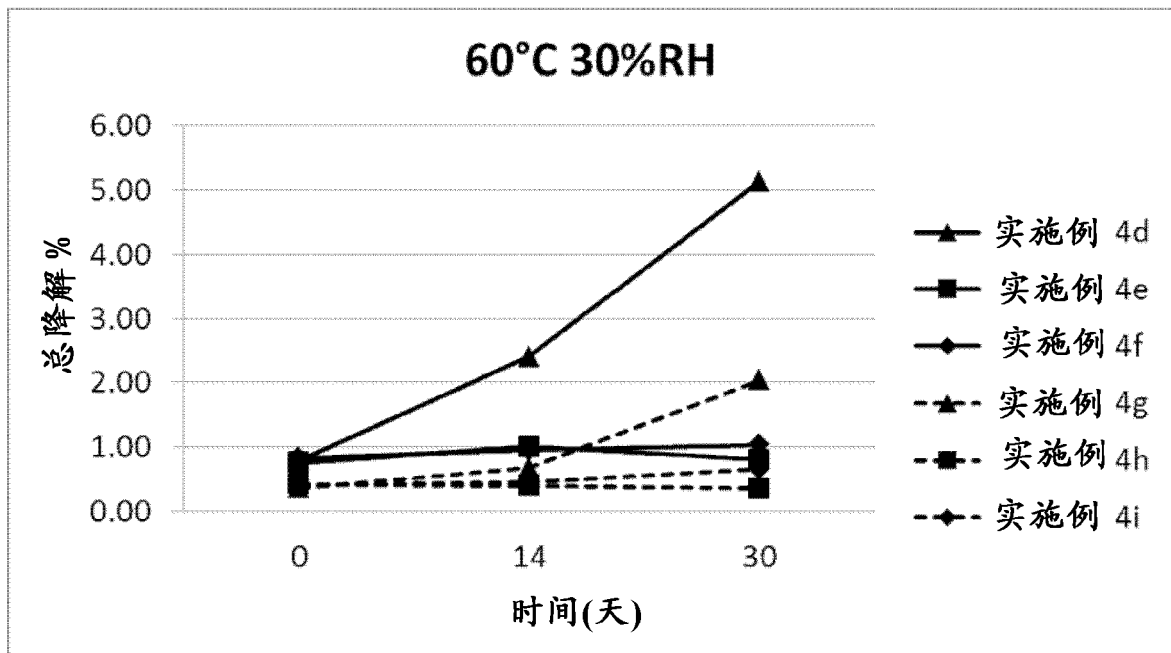


图 8

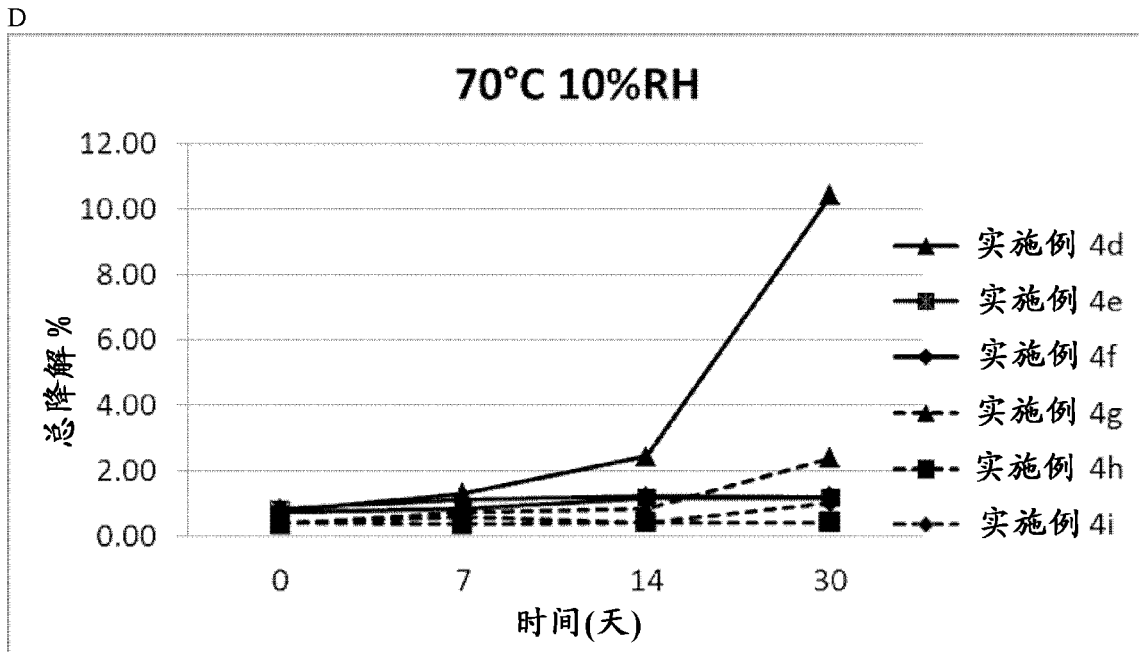
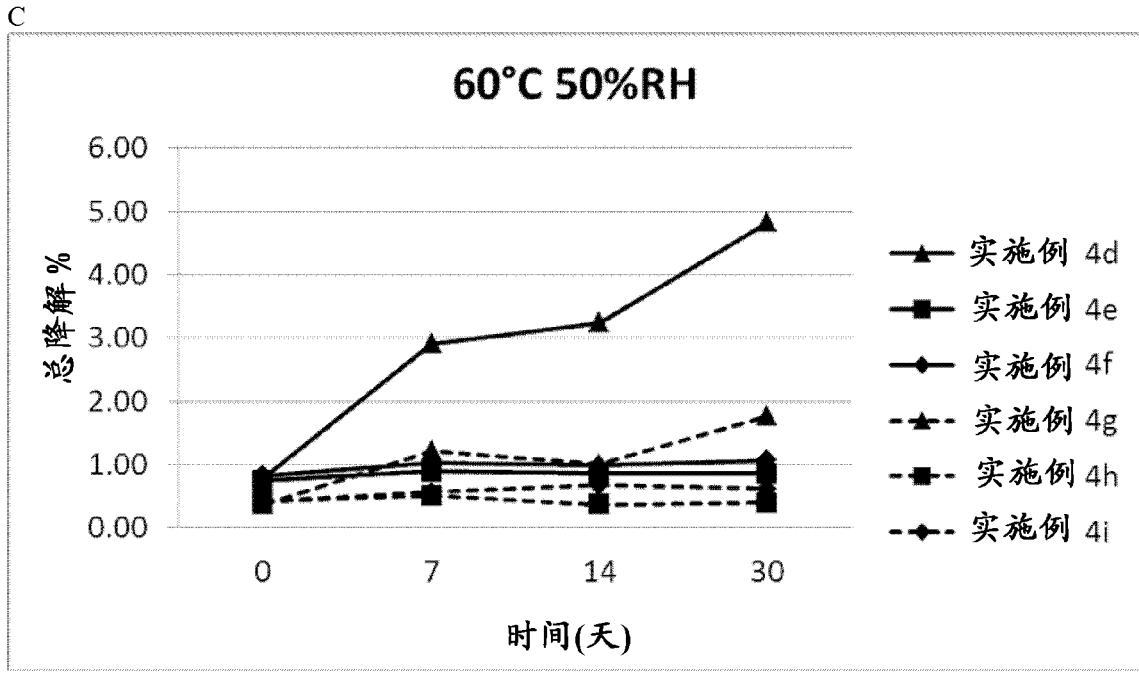


图 8续

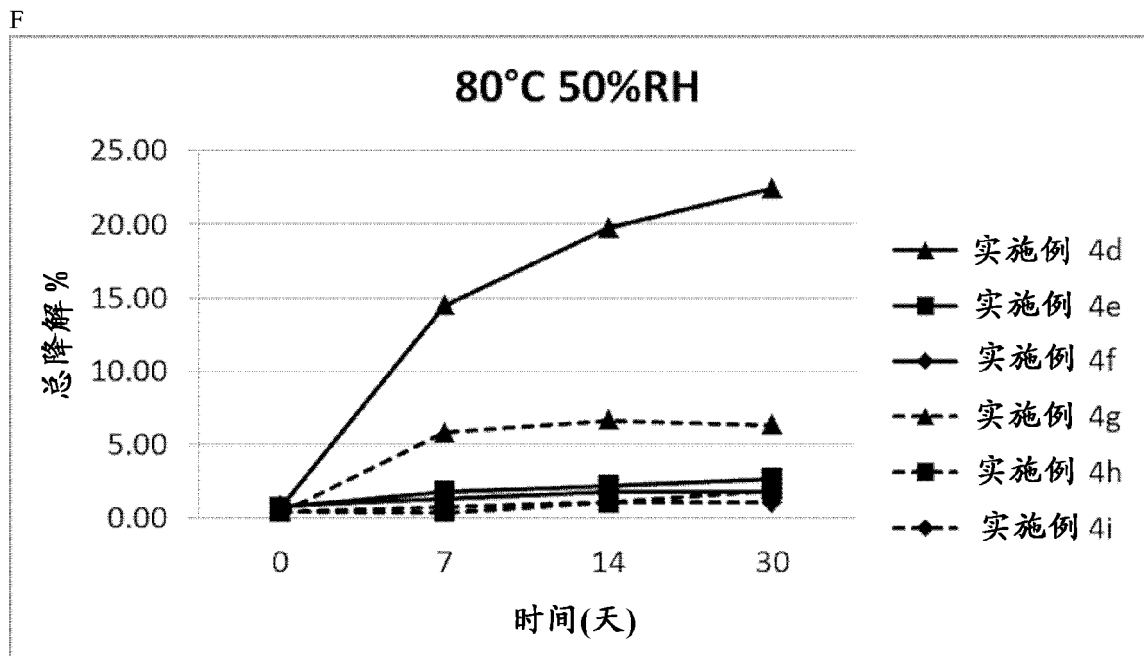
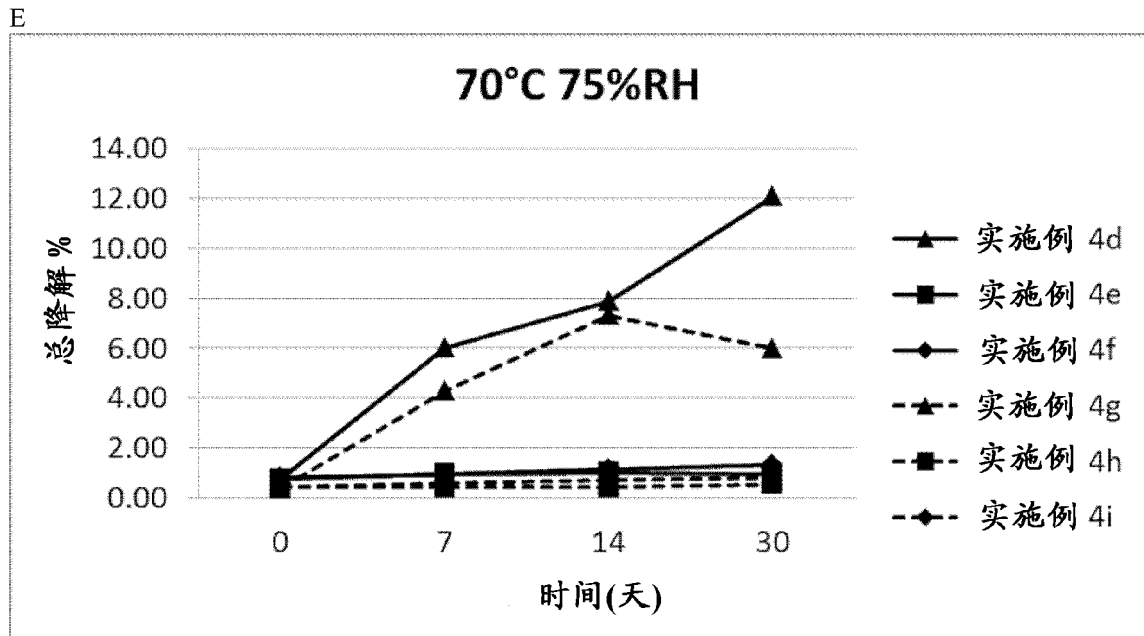


图 8续

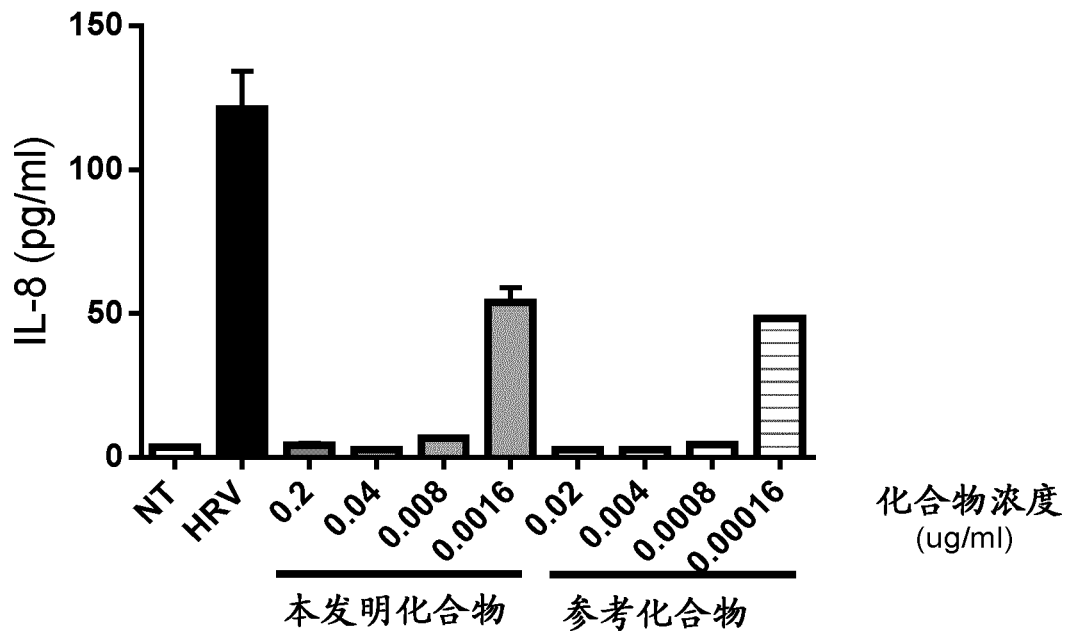


图 9