

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年9月15日 (15.09.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/188796 A1

(51) 国际专利分类号:
A61P 37/00 (2006.01) *A61P 17/06* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61K 31/5383* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/079887

(22) 国际申请日: 2022年3月9日 (09.03.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110255275.X 2021年3月9日 (09.03.2021) CN
202110861899.6 2021年7月29日 (29.07.2021) CN

(71) 申请人: 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司(CSPC ZHONGQI PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (SHIJIAZHUANG) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国河北省石家庄市高新区中山东路896号, Hebei 050035 (CN)。石药集团欧意药业有限公司(CSPC OUYI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国河北省石家庄市石家庄经济技术开发区扬子路88号, Hebei 052165 (CN)。

(71) 申请人(对除CN外的所有指定国): 杭州英创医药科技有限公司(HANGZHOU INNOGATE PHARMA CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道文一西路1500号4号楼18层南, Zhejiang 311121 (CN)。

(72) 发明人: 杨汉煜(YANG, Hanyu); 中国河北省石家庄市高新区中山东路896号, Hebei 050035 (CN)。张汉承(ZHANG, Hancheng); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道文一西路1500号4号楼18层南, Zhejiang 311121 (CN)。刘喜宝(LIU, Xibao);

中国河北省石家庄市高新区中山东路896号, Hebei 050035 (CN)。蔡聪聪(CAI, Congcong); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道文一西路1500号4号楼18层南, Zhejiang 311121 (CN)。秦宁(QIN, Ning); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道文一西路1500号4号楼18层南, Zhejiang 311121 (CN)。淡墨(DAN, Mo); 中国河北省石家庄市高新区中山东路896号, Hebei 050035 (CN)。吕璐(LYU, Lu); 中国河北省石家庄市高新区中山东路896号, Hebei 050035 (CN)。张丹丹(ZHANG, Dandan); 中国河北省石家庄市高新区中山东路896号, Hebei 050035 (CN)。刘洁茹(LIU, Jieru); 中国河北省石家庄市高新区中山东路896号, Hebei 050035 (CN)。

(74) 代理人: 中国专利代理(香港)有限公司(CHINA PATENT AGENT (H.K.) LTD.); 中国香港特别行政区湾仔港湾道23号鹰君中心22字楼, Hong Kong (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: USE OF TRICYCLIC HETEROARYL-CONTAINING COMPOUND

(54) 发明名称: 一种含有三环杂芳基的化合物的用途

(57) Abstract: The present application provides the use of a compound (I) or an optical isomer or pharmaceutically acceptable salt thereof in preparation of a medicament for treating JAK and SYK kinase high expression or abnormal activation related diseases, including autoimmune diseases such as immune-mediated skin diseases, particularly psoriasis, atopic dermatitis, and SLE. The compound (I) or the optical isomer or pharmaceutically acceptable salt thereof in the present invention can mitigate skin lesions of mice suffering from psoriasis, atopic dermatitis, and SLE, relieves renal injury, inhibits enlargement of immune organs, reduces the level of inflammation, inhibits increase of SLE-related antibodies and cytokines in serum, has a certain safe therapeutic window, and has good prospects of clinical application.

(57) 摘要: 本申请提供化合物(I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐在制备用于治疗JAK和SYK激酶高表达或异常激活相关疾病, 包括自身免疫性疾病, 如免疫介导的皮肤病, 尤其是银屑病、特应性皮炎和SLE的药物中的用途。本发明所述化合物(I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐可改善银屑病、特应性皮炎和SLE小鼠皮肤病变, 缓解肾损伤, 抑制免疫器官增大, 降低炎症水平, 抑制血清中SLE相关抗体和细胞因子的增高, 且具有一定安全治疗窗, 具有很好的临床应用前景。

WO 2022/188796 A1

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

一种含有三环杂芳基的化合物的用途

技术领域

本发明属于医药领域，具体涉及一种含有三环杂芳基的化合物在
5 制备治疗激酶 JAK 和 SYK 高表达或异常激活相关疾病的药物中的应用。

背景技术

JAK (Janus kinase)，即 Janus 激酶，是一类非跨膜型非受体型酪氨酸激酶，含四个亚型：JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 (Tyrosine kinase
10 2)。JAK1、JAK2 和 TYK2 广泛存在于各种组织和细胞中，JAK1 参与介导 IL-6、IFN 等炎症信号通路，JAK2 可单独介导 IL-3、IL-5 和 EPO 等细胞因子信号通路，JAK3 仅存在于骨髓和淋巴系统，介导 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-21 的信号传导，TYK2 参与 IFN- α 、IL-6、IL-10 和 IL-12 信号传导。JAK 抑制剂通过特异性抑制 JAK-STAT (Signal
15 transducers and activators of transcription) 信号通路，阻滞上述细胞因子的级联放大作用，参与免疫调节等过程。

SYK (Spleen tyrosine kinase)，即脾酪氨酸激酶，是一种非受体型酪氨酸激酶，存在于细胞基质中。SYK 广泛表达于造血细胞、淋巴细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞，在 B 淋巴细胞高表达，在肿瘤和
20 自身免疫性疾病中发挥重要作用。Dectin-1/ITAM 是抗原刺激免疫细胞诱导免疫性疾病的经典路径。在正常 B 细胞中，当抗原诱导的 BCR 交联，使胞内免疫受体酪氨酸酶活化基序 (ITAM) 发生磷酸化时，胞浆中的 SYK 是 ITAM 首先招募并活化的对象，活化的 SYK 再通过 CARD9 依赖性途径激活转录因子 NF- κ B，产生一系列炎症因子。另外，该途径还可激活 Caspase-8，激活的 Caspase-8 剪切 IL-1 β 前体，促进未成熟的 IL-1 β 成熟。CARD9 非依赖途径 NLRP3 信号通路也在未成熟 IL-1 β 成熟中发挥作用。因此，SYK 也是自身免疫性疾病的一个重要靶点。

银屑病 (Psoriasis) 是一种免疫介导的慢性、复发性、炎症性皮肤病。患病率在世界各地有显著差异，美国患病率为 0.5%~3.15%，欧洲
30 为 0.75%~2.9%，中国 1984 年报告银屑病患病率为 0.123%，2008 年调查 6 个城市患病率为 0.47%，2017 年西南 4 省患病率为 0.5%，中国银屑病患者约在 600 万以上。银屑病可发生于任何年龄，无性别差异，

约 2/3 的患者在 40 岁以前发病，大部分患者冬重夏轻。

银屑病病因及发病机制尚未完全阐明，可能涉及遗传、免疫、环境等多种因素，通过以 T 淋巴细胞介导为主、多种免疫细胞共同参与的免疫反应，引起角质形成细胞过度增殖、关节滑膜细胞与软骨细胞炎症发生。银屑病的典型临床表现为鳞屑性红斑或斑块，局限或广泛分布。银屑病可以合并其他系统异常，如伴内脏及关节损害。中重度患者罹患代谢综合征和动脉粥样硬化性心血管疾病的风险增加。

根据银屑病的临床表现和病理特征，可分为以下几种类型：1、寻常型银屑病：为最常见的一型，多急性发病。典型表现为境界清楚、形状大小不一的红斑，周围有炎性红晕。稍有浸润增厚。表面覆盖多层银白色鳞屑。鳞屑易于刮脱，刮净后淡红发亮的半透明薄膜，刮破薄膜可见小出血点（Auspitz 征）。皮损好发于头部、骶部和四肢伸侧面。部分患者自觉不同程度的瘙痒。2、脓疱型银屑病：分泛发型和掌跖型。泛发性脓疱型银屑病是在红斑上出现群集性浅表的无菌性脓疱，部分可融合成脓湖。全身均可发病。以四肢屈侧和皱褶部位多见，口腔黏膜可同时受累。急性发病或突然加重时常伴有寒战、发热、关节疼痛、全身不适和白细胞计数增多等全身症状。多呈周期性发作，在缓解期往往出现寻常型银屑病皮损。掌跖脓疱病皮损局限于手足，对称发生，一般状况良好，病情顽固，反复发作。3、红皮病型银屑病：又称银屑病性剥脱性皮炎，是一种严重的银屑病。常因外用刺激性较强药物，长期大量应用糖皮质激素，减量过快或突然停药所致。表现为全身皮肤弥漫性潮红、肿胀和脱屑，伴有发热、畏寒、不适等全身症状，浅表淋巴结肿大，白细胞计数增高。4、关节病性银屑病：又称银屑病性关节炎。银屑病患者同时发生类风湿性关节炎样的关节损害，可累及全身大小关节，但以末端指（趾）节间关节病变最具特征性。受累关节红肿疼痛，关节周围皮肤也常红肿。关节症状常与皮肤症状同时加重或减轻。血液类风湿因子阴性。

目前银屑病尚无特效疗法，主要治疗手段包括局部治疗、物理治疗、系统治疗、中医中药治疗等多种疗法。其中，局部治疗包括外用药物治疗、物理疗法等。外用药物主要为：维生素 D3 类似物、糖皮质激素、蒽林、维 A 酸凝胶和霜剂、焦油类、免疫抑制剂等，以及其他外用药物如他克莫司，匹美莫司、0.03% 的喜树碱软膏、5% 的水杨酸软膏

等。系统治疗药物包括甲氨蝶呤、维 A 酸类、环孢素、他克莫司，霉酚酸酯，生物制剂如依那西普、英夫利昔单抗以及抗生素等。对于中、重度患者，单一治疗不佳时通常给予联合、交替或序贯治疗。现有治疗虽短期效果显著，但会产生诸多副作用且复发率高，远期疗效欠佳，

5 如：甲氨蝶呤治疗量与中毒量很接近；维 A 酸类药物主要副作用为致畸胎；环孢素 A 不良反应有肾毒性、高血压、恶心、呕吐、乏力、肌颤及尿路刺激症状等；他克莫司不良反应类似环孢素 A；霉酚酸酯不良反应有胃肠道症状、贫血、白细胞减少，有增加感染和诱发肿瘤的风险等。

10 特应性皮炎（Atopic dermatitis, AD），又称异位性皮炎、遗传过敏性皮炎，是一种以皮肤瘙痒、多形性皮疹为特征的变态反应性皮肤病，在不同年龄阶段有不同的临床表现，是一种慢性、复发性、炎症性皮肤病。由于患者常合并过敏性鼻炎、哮喘等其他特应性疾病，故被认为是一种系统性疾病。过去 30 年全球范围内 AD 患病率逐渐增加，

15 发达国家儿童 AD 患病率达 10%~20%，中国 AD 患病率的增加晚于西方发达国家和日本、韩国，但近 10 年来增长迅速。1998 年学龄期青少年（6~20 岁）AD 的总患病率为 0.70%，2002 年 10 城市学龄前儿童（1~7 岁）的患病率为 2.78%，2012 年上海地区 3~6 岁儿童患病率达 8.3%。2014 年我国 12 个城市 1~7 岁儿童 AD 患病率达到 12.94%，1~12 月婴

20 儿 AD 患病率达 30.48%。

AD 的发病与遗传和环境等因素关系密切。虽然确切发病机制尚不清楚，但目前认为免疫异常、皮肤屏障功能障碍、皮肤菌群紊乱等因素是发病的重要环节。AD 通常初发于婴儿期，1 岁前发病者约占全部患者的 50%，呈慢性经过，临床表现多种多样，最基本的特征是皮肤

25 干燥、慢性湿疹样皮损和明显瘙痒。部分患者可同时有其他过敏性疾病，如过敏性哮喘、过敏性鼻炎等。此外，由于长期慢性炎症反应，慢性病程患者合并发生神经系统疾病、炎症肠病、类风湿性关节炎、心血管疾病和淋巴瘤的风险明显增高。

目前 AD 的治疗包括基础治疗（避免接触过敏等），外用药物治疗（外用糖皮质激素和外用钙调神经磷酸酶抑制剂等），系统治疗（口服抗组胺药物、免疫抑制剂、糖皮质激素等），紫外线治疗和抗微生物治疗等，其中以外用药、激素和免疫抑制剂为主。通常采用阶梯治

30

疗方式针对轻中度患者进行治疗。现有的治疗方法虽能缓解症状，但仍存在一定的局限性及诸多不良反应。在迅速起效、瘙痒控制、预防复发上仍有许多未被满足的需求。

5 红斑狼疮（lupus erythematosus, LE）是一种典型的自身免疫性结缔组织病,可分为盘状红斑狼疮(DLE)、亚急性皮肤型红斑狼疮(SCLE)、系统性红斑狼疮（SLE）、深在性红斑狼疮（LEP）、新生儿红斑狼疮（NLE）、药物性红斑狼疮（DIL）等亚型。

10 盘状红斑狼疮，主要侵犯皮肤，是红斑狼疮中最轻的类型。少数可有轻度内脏损害，少数病例可转变为系统性红斑狼疮，多数患者皮损无自觉症状，但很难完全消退。亚急性皮肤型红斑狼疮，临床上较少见，是一种特殊的中间类型，皮损常反复发作，绝大多数患者均有内脏损害，但严重者很少，主要症状为关节痛、肌肉痛、反复低热，少数有肾炎、血液系统改变。深在性红斑狼疮又称狼疮性脂膜炎、深部红斑狼疮，同样是中间类型的红斑狼疮，性质不稳定，可单独存在，
15 以后既可转化为盘状红斑狼疮，也可转化为系统性红斑狼疮，或与它们同时存在。新生儿红斑狼疮，表现为皮肤环形红斑和先天性心脏传导阻滞，有自限性，一般在生后4~6个月内自行消退，心脏病变常持续存在。药物性红斑狼疮主要表现为发热、关节痛、肌肉痛、面部蝶形红斑、口腔溃疡，可有浆膜炎，停药后逐渐好转，病情较重者可给
20 予药物治疗。

系统性红斑狼疮（Systemic lupus erythematosus, SLE）是一种系统性自身免疫性疾病，是红斑狼疮各类型中最为严重的一型，以全身多系统多脏器受累、反复的复发与缓解、体内存在大量自身抗体为主要临床特点，如不及时治疗，会造成受累脏器的不可逆损害，最终导致
25 患者死亡。SLE患病率地域差异较大，目前全球SLE患病率为0~241/10万，中国大陆地区SLE患病率为30~70/10万，男女患病比为1:10~12。SLE具体发病因素尚未完全明确，是由多个因素共同参与引起的，主要与遗传、感染、内分泌及环境等多种因素有关。免疫调节机制的缺陷，如凋亡细胞和免疫复合物的清除也是SLE发生的重要因素。免疫
30 耐受丧失、抗原负荷增加、过度的T细胞辅助、B细胞抑制缺陷以及Th1细胞向Th2细胞转变导致B细胞过活化和致病性自身抗体的产生。另外，有一些药物如甲基多巴、苯妥英钠、青霉胺、奎尼丁、心

得安等可以直接引起药物性狼疮和加重红斑狼疮。绝大多数 SLE 患者发病时即有多系统损害表现，少数病人由其他类型的红斑狼疮发展而来，部分病人还同时伴有其他的结缔组织病，如硬皮病、皮炎、干燥综合征等，形成各种重叠综合征。

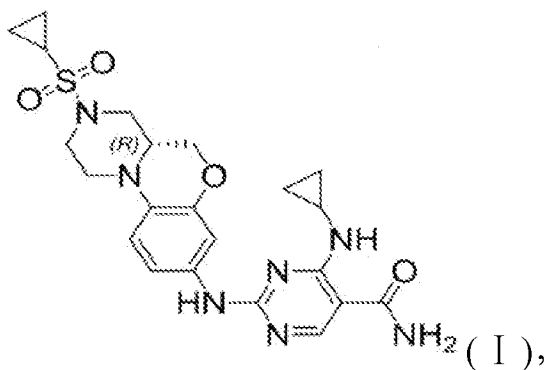
- 5 目前 SLE 药物治疗以糖皮质激素、羟氯喹为基础用药。然而，应用上述药物的治疗会产生相应的副作用，如感染、肝肾功能受损和代谢异常等，有时不得不减量或停药，而且目前仍没有良好的药物控制病情发展，仍需继续开发新的药物。SYK 和 JAK 分别处在诱发 SLE 两条不同信号通路的上游，因此 SYK-JAK 双通道抑制剂有望成为治疗
- 10 SLE 的有效途径。目前尚无被批准上市的 JAK-SYK 双靶点抑制剂。以 DLE 为开发适应症的 JAK-SYK 双靶点抑制剂产品 R333，也已因一项 II 期临床失败，于 2013 年 10 月 24 日宣布终止开发。

因此，存在对开发新的用于治疗自身免疫性疾病，尤其是免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病如银屑病、特应性皮炎或红斑狼疮等的药物的需要。

15

发明内容

具有如下结构式 (I) 的化合物 (I)：



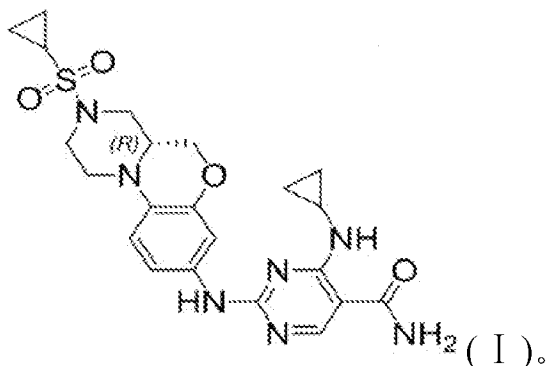
- 20 其化学名称为：(R)-4-(环丙氨基)-2-((3-(环丙磺酰基)-1,2,3,4,4a,5-六氢苯并[b]吡唑[1,2-d][1,4]噁嗪-8-基)氨基)嘧啶-5-甲酰胺，首次公开于公开号为 WO2018108084 的 PCT 国际申请中，且已知是一种高选择性的 JAK 激酶和 SYK 激酶双靶点抑制剂，可用于治疗癌症。

本發明人經過進一步研究發現，化合物 (I) 通過抑制 JAK 和 SYK 激酶對細胞的信號轉導和分裂增殖等起調控作用，在治療自身免疫性

25 疾病方面具有優越的效果，尤其是在免疫介導的皮膚病和自身免疫性

结缔组织病如银屑病、特应性皮炎或红斑狼疮等的治疗中表现出令人满意的活性和低的毒副作用。

本发明据此提供了化合物 (I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐在制备用于治疗 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病的药物中的用途：



优选地，上述用途中，所述的 JAK 激酶为 JAK1、JAK2、JAK3 或 TYK2 激酶中的一种或几种，优选为 JAK3 和/或 TYK2 激酶。

优选地，上述用途中，所述的 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病为自身免疫性疾病。

优选地，上述用途中，所述自身免疫性疾病为免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病。

优选地，上述用途中，所述免疫介导的皮肤病选自银屑病或特应性皮炎，所述银屑病优选寻常型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病或关节病性银屑病；所述自身免疫性结缔组织病为红斑狼疮，所述红斑狼疮优选盘状红斑狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、系统性红斑狼疮、深在性红斑狼疮、新生儿红斑狼疮、药物性红斑狼疮，进一步优选为系统性红斑狼疮。

进一步地，上述用途中，所述药物含有治疗有效量的化合物 (I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐，以及任选的，药学上可接受的赋形剂或载体。

本发明药物的施用方式没有特别限制，代表性的施用方式包括但不限于：口服、直肠、肠胃外（静脉内、肌肉内或皮下）和局部给药。相应地，本发明药物可制成临床上可接受的各种剂型，包括口服剂型、注射剂型、局部给药剂型或外用剂型等。

优选地，本发明药物在临床上可以单独使用，也可以与其他治疗

组分联合使用。为方便临床使用，本发明化合物（I）、其光学异构体或其药学上可接受的盐可以与其它治疗组分联合制备复方药物或组合产品。

5 本发明还提供所述药物的使用方法，即把治疗有效量的本发明化合物（I）、其光学异构体或其药学上可接受的盐施用于需要治疗的哺乳动物（如人）。

本发明提供了一种治疗 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病的方法，其特征在于，将治疗有效量的本发明化合物（I）、其光学异构体或其药学上可接受的盐施用于需要治疗的哺乳动物（如人）。

10 本发明所述的 JAK 激酶为 JAK1、JAK2、JAK3 或 TYK2 激酶中的一种或几种，优选为 JAK3 和/或 TYK2 激酶。本发明所述的 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病为自身免疫性疾病，如免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病，所述免疫介导的皮肤病选自银屑病或特应性皮炎，所述银屑病优选寻常型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病
15 型银屑病或关节病性银屑病；所述自身免疫性结缔组织病为红斑狼疮，所述红斑狼疮优选盘状红斑狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、系统性红斑狼疮、深在性红斑狼疮、新生儿红斑狼疮、药物性红斑狼疮，进一步优选为系统性红斑狼疮。

20 本发明还提供一种包含治疗有效量的化合物（I）、其光学异构体或其药学上可接受的盐的药物，其特征在于，所述药物用于治疗受试者的 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病，其为自身免疫性疾病，如免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病，所述免疫介导的皮肤病选自银屑病或特应性皮炎，所述银屑病优选寻常型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病或关节病性银屑病；所述自身免疫性结
25 缔组织病为红斑狼疮，所述红斑狼疮优选盘状红斑狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、系统性红斑狼疮、深在性红斑狼疮、新生儿红斑狼疮、药物性红斑狼疮，进一步优选为系统性红斑狼疮。

所述的 JAK 激酶为 JAK1、JAK2、JAK3 或 TYK2 激酶中的一种或几种，优选为 JAK3 和/或 TYK2 激酶。

30 本发明还提供一种复方药物或组合产品，所述复方药物或组合产品包含治疗有效量的化合物（I）、其光学异构体或其药学上可接受的盐，和其它治疗组分，其特征在于，所述复方药物或组合产品用于治

疗受试者的 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病,其为自身免疫性疾病,如免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病,所述免疫介导的皮肤病选自银屑病或特应性皮炎,所述银屑病优选寻常型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病或关节病性银屑病;所述自身免疫性结缔组织病为红斑狼疮,所述红斑狼疮优选盘状红斑狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、系统性红斑狼疮、深在性红斑狼疮、新生儿红斑狼疮、药物性红斑狼疮,进一步优选为系统性红斑狼疮。

所述的 JAK 激酶为 JAK1、JAK2、JAK3 或 TYK2 激酶中的一种或几种,优选为 JAK3 和/或 TYK2 激酶。

10 本发明所述的治疗有效量是指药学上认为的有效给药剂量,即活性化合物的量足以明显改善病情,而不至于产生严重的副作用。对于 60 kg 体重的人而言,日给药剂量通常为 0.01~2000 mg,优选 1~500 mg,更优选为 10~400 mg,进一步优选为 15~360 mg 或 15~250 mg,如: 15 mg、45 mg、60 mg、90 mg、135 mg、180 mg、240 mg、300 mg、
15 360 mg。可以每日一次单剂量施用,可以每天分多次施用,也可以间隔使用。具体剂量和给药频率应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师根据常规技能可以确定的。所述施用方式没有特别限制,代表性的施用方式包括但并不限于:口服、直肠、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)和局部给药。所述活性化合物的量以化合物(I)
20 计。

体内、体外研究显示,(1)本发明化合物(I)在体外能显著抑制 JAK1、JAK2、JAK3、TYK2 和 SYK 激酶活性,其中在 JAK3 和 TYK2 上有较强的抑制作用,IC₅₀ 分别为 1.43 nM 和 0.82 nM,在 JAK2 和 SYK 上的抑制作用略弱于 JAK3 和 TYK2,IC₅₀ 在 3 nM~8 nM 之间,针对
25 JAK1 的抑制作用最弱,IC₅₀ 为 20.04 nM。(2)本发明所述化合物(I)能够改善或显著降低 IMQ 诱导的银屑病模型小鼠的皮肤厚度、耳厚度、脾重量、脾指数,PASI 评分(红肿,鳞屑,厚度与总分)、小鼠皮肤表皮厚度、皮肤病理评分,以及皮肤组织中 IL-6 和 TNF- α 的含量。(3)本发明所述化合物(I)能够改善或显著降低 OXA 诱导的特应性皮炎
30 模型小鼠的皮肤厚度和皮肤临床评分;能够改善造模区域皮肤炎症细胞聚集,水肿及毛细血管扩张现象,显著降低病理评分和表皮厚度(4)本发明所述化合物 I 化合物(I)能够剂量依赖性改善 MRL/lpr 红斑狼

疮模型小鼠皮肤病变，缓解肾损伤，减少淋巴结和脾脏肿大以及抑制血清中 SLE 相关抗体和细胞因子的增高。其中 20 mg/kg 组小鼠给药 7 周后能够有效抑制 SLE 小鼠的淋巴结肿大，在试验终点指标评价结果显示，20 mg/kg 给药可有效抑制脾肿大和淋巴结肿大，在慢性指数 (CI) 5 的双肾总病理评分出现比较明显的下降，也可一定程度抑制血清 IL-6 以及 TNF- α 的过度表达。40 mg/kg 和 60 mg/kg 给药剂量能够在改善皮损病变（皮肤损伤评分及皮肤病理评分）、缓解肾损伤（降低小鼠尿蛋白，减少肾脏免疫复合物沉积）、抑制免疫器官增大（改善淋巴结病理评分以及抑制脾脏和淋巴结增大）等方面全面改善 SLE 小鼠的多种症状。10

以上研究结果表明，本发明所述的化合物 (I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐可改善银屑病小鼠和特应性皮炎小鼠的皮肤病变，抑制免疫器官增大；还可以剂量依赖性改善 SLE 小鼠的皮肤病变，抑制免疫器官增大，缓解肾脏功能损伤，降低炎症水平，且具有一定安全治疗窗，具有很好的临床应用前景。15

附图说明

图 1: IMQ 诱导的银屑病模型小鼠研究终点时的脾重量图。

图 2: IMQ 诱导的银屑病模型小鼠研究终点时的脾指数（脾重/体重%）图。20

图 3: IMQ 诱导的银屑病模型小鼠研究终点时的小鼠皮肤组织中 IL-6 的含量图。

图 4: IMQ 诱导的银屑病模型小鼠研究终点时的小鼠皮肤组织中 TNF- α 的含量图。

图 5: IMQ 诱导的银屑病模型小鼠研究终点时的皮肤病理评分图。25

图 6: IMQ 诱导的银屑病模型小鼠研究终点时的皮肤表皮厚度图。

图 7: OXA 诱导的特应性皮炎模型小鼠研究终点时的皮肤病理评分图。

图 8: OXA 诱导的特应性皮炎模型小鼠研究终点时的皮肤表皮厚度图。30

图 9: SLE 小鼠试验终点皮肤病理评分图。

图 10: SLE 小鼠试验终点淋巴结重量图，A: 总淋巴结重量；B:

总淋巴结重/体重%。

图 11: SLE 小鼠试验终点脾脏重量图, A: 脾脏重量; B: 脾重/体重 %。

图 12: SLE 小鼠经治疗 16 周的尿蛋白-曲线下面积图。

5 图 13: SLE 小鼠试验终点肾脏重量图, A: 总肾重; B: 肾重/体重 %。

图 14: SLE 小鼠肾脏组织 HE 染色评分图, A: 双侧肾脏 HE 评分-活动指数; B: 双侧肾脏 HE 评分-慢性指数; C: 双侧肾脏 HE 评分-肾小管间质损伤。

10 图 15: SLE 小鼠肾脏组织 IHC (IgG) 染色评分图。

图 16: SLE 小鼠血清抗 ds-DNA 抗体浓度图。

图 17: SLE 小鼠血清细胞因子水平图, A: TNF- α 浓度; B: IL-6 浓度。

15 具体实施方式

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

20

实验材料来源或配制:

1、化合物 (I): 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司自制。

2、阳性对照药、实验中所用试剂、原材料均为商业购买或自行配制。

25

3、体内实验受试物(化合物(I)和阳性对照化合物)配制方法: 称量后用含 0.4% Tween80 和 0.5% 甲基纤维素的水溶液溶解, 化合物(I)配置浓度分别为 0.3 mg、1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL 和 6 mg/mL; 阳性对照药用生理盐水配置浓度为 0.3 mg/mL 或 0.6 mg/mL, 临用时稀释至所需浓度。

30

4、溶媒(0.4% Tween80/0.5% 甲基纤维素)配制 1 L:

称取 5.0 g 甲基纤维素粉末至干净玻璃瓶中, 加入 900 mL 的无菌水, 过夜搅拌至充分溶解; 吸取 4.0 mL Tween80, 充分搅拌混匀, 定

容至终体积 1000 mL。该溶液保存于 4 摄氏度冰箱。

5、OXA 配制:

丙酮/橄榄油 (4/1) 溶媒配置: 40 mL 丙酮和 10 mL 橄榄油混合震荡 30 秒, 至混合均匀得丙酮/橄榄油 (4/1) 溶媒。

- 5 5% OXA 配制: 称取 100.00 mg OXA, 溶于 2.00 ml 的丙酮/橄榄油 (4/1) 中, 振荡 30 秒。

0.1% OXA 配制: 称取 15.69 mg OXA, 溶于 15.69 mL 的丙酮/橄榄油 (4/1) 中, 振荡 30 秒。现用现配, 每隔两天配一次。

10 实施例 1: 化合物 (I) 对激酶的活性抑制试验

1. 激酶: SYK、JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2

2. 实验方法

采用 Mobility Shift Assay 测定蛋白激酶活性。化合物 (I) 用 DMSO 溶解后, 在 100% DMSO 中配置成浓度梯度。以激酶缓冲液稀释, 在 15 384 孔板中加入 5 μ L 的 5 倍反应终浓度的化合物 (I) (10% DMSO)。加入 10 μ L 的 2.5 倍酶溶液后室温孵育 10 分钟, 再加入 10 μ L 的 2.5 倍底物溶液。28 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟, 向 384 孔板反应板中加 30 μ L 终止液终止反应 (100 mM HEPES, pH 7.5, 0.015% Brij-35, 0.2% Coating Reagent #3, 50 mM EDTA)。Caliper EZ Reader II 上复制转化率数据, 20 把转化率转化成抑制率数据: % 抑制率 = (max-转化率)/(max-min) \times 100%。其中, “min”为不加酶进行反应的对照样孔转化率; “max”为加入 DMSO 作为对照孔转化率。以化合物浓度和抑制率为横纵坐标, 绘制曲线, 使用 XLFit excel add-in version 5.4.0.8 拟合计算 IC₅₀ 值。拟合公式: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + (\text{IC}_{50}/X)^{\text{HillSlope}})$ 。

25

激酶	激酶缓冲液	底物
SYK	20 mM HEPES, pH 7.5, 0.01% Triton X-100	FAM-Peptide 22 和 2 μ M ATP
JAK1	25 mM HEPES, pH 7.5, 0.01%Brij-35, 0.01% Triton, 0.5 mM EGTA	FAM-Peptide D 和 66 μ M ATP
JAK2		FAM-Peptide 22 和 6.5 μ M ATP
JAK3		FAM-Peptide 22 和 4.3 μ M ATP
TYK2		FAM-Peptide 30 和 16 μ M ATP

3. 实验结果

化合物 (I) 对激酶的抑制活性测试结果见下表:

表 1 化合物(I)对激酶的抑制活性

激酶	JAK1	JAK2	JAK3	TYK2	SYK
IC ₅₀ , nM	20.04	3.92	1.43	0.82	7.25

5

实施例 2: 化合物(I)对 IMQ 诱导的小鼠的银屑病模型中的药效试验

1. 试验目的

10 本试验目的在于评估化合物(I)在 IMQ (5%咪喹莫特乳膏乳膏) 诱导的小鼠银屑病模型中的药效。咪喹莫特的临床不良反应之一为诱导银屑病发作, 利用咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型操作简单、易于实现, 且皮肤表型、病理特征具有组织间复杂相互作用并与临床银屑病类似的优点。

2. 试验药物

15 受试药: 化合物(I)

阳性对照药: 地塞米松 (Dex)

溶媒: 0.4% Tween80/0.5%甲基纤维素。

3. 试验动物

5-6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 70 只。

20 4. 试验分组及给药方案

根据实验开始前一天体重把动物随机分成 7 组, 详见表 2:

表 2 银屑病药效实验分组

分组	数量	造模	给药	给药途径 与频率	给药剂 量(mpk)	给药持 续时间	研究终点
1	10	正常对照	溶媒	PO bid	/	14 天	第 14 天
2	10	IMQ 诱导	溶媒	PO bid	/	14 天	第 14 天
3	10	IMQ 诱导	化合物(I)	PO bid	3	14 天	第 14 天
4	10	IMQ 诱导	化合物(I)	PO bid	10	14 天	第 14 天
5	10	IMQ 诱导	化合物(I)	PO bid	30	14 天	第 14 天
6	10	IMQ 诱导	化合物(I)	PO bid	60	14 天	第 14 天
7	10	IMQ 诱导	Dex	PO qd	3	14 天	第 14 天

备注：“PO”为口服；“bid”为每日 2 次；“qd”为每日 1 次；mpk: mg/kg。

造模:

- 5 动物于涂药前一天背部剃毛，形成约 2 cm×3 cm 大小的皮肤暴露区。IMQ 诱导小鼠，每天定时在小鼠裸露的背部以及右耳涂抹 5%咪喹莫特乳膏 62.5 mg，持续 14 天。正常对照组小鼠，每日定时在小鼠裸露的背部以及右耳涂抹凡士林。

5. 试验结果

10 5.1 化合物(I)对 IMQ 诱导的小鼠的皮肤厚度的影响

从实验第一天开始每日进行皮肤厚度测量，直至实验结束。

- 15 皮肤厚度测量方法如下：使用左手拇指和食指将鼠背部皮肤连同皮下组织捏起，方向与老鼠身体方向相同；右手握数显千分测厚规（型号 BK-3281，生产厂家：上海纽辉）在距左手捏起部位 1 cm 处（近造模部位的中心）测量皮褶厚度，厚度以 mm 为单位，实际厚度为测量厚度的一半（皮肤厚度=测量值/2）。

- 20 实验结果显示，同正常对照组相比，模型组小鼠在连续 14 天给予 5%咪喹莫特乳膏刺激之后，皮肤厚度显著升高。在研究终点时，化合物(I)（3 mpk、10 mpk、30 mpk 和 60 mpk）和地塞米松（3 mpk）治疗均显著抑制了皮肤厚度的升高（5 组均为： $P<0.001$ vs 模型组），详见表 3。

表 3 IMQ 诱导小鼠经治疗 14 天的皮肤厚度
(均值 ± 标准误差, 单位: mm)

组别	第 1 天	第 14 天
1	0.34 ± 0.00	0.26 ± 0.00 ^{***}
2	0.33 ± 0.00	0.60 ± 0.02
3	0.32 ± 0.00	0.51 ± 0.01 ^{***}
4	0.32 ± 0.00	0.53 ± 0.02 ^{***}
5	0.32 ± 0.00	0.50 ± 0.01 ^{***}
6	0.33 ± 0.01	0.43 ± 0.02 ^{***}
7	0.32 ± 0.00	0.32 ± 0.01 ^{***}

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 模型组。

5 5.2 化合物(I)对 IMQ 诱导的小鼠的耳厚度的影响

每日对耳厚度进行测量(耳廓中心位置)。

实验结果显示,同正常对照组相比,连续 14 天给予 5%咪喹莫特乳膏刺激使得小鼠右耳厚度显著升高。在研究终点时,化合物(I) 3 mpk、10 mpk、30 mpk 和 60 mpk)和地塞米松(3 mpk)治疗均显著抑制了耳厚度的增加(5 组均为: $P < 0.001$ vs 模型组),化合物(I)对耳厚度增加的抑制呈现剂量依赖性。详见表 4。

表 4 IMQ 诱导小鼠经治疗 14 天的耳厚度
(均值 ± 标准误差, 单位: mm)

组别	第 1 天			第 14 天		
	右	左	右-左	右	左	右-左
1	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.00 ^{***}	0.15 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^{***}
2	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.54 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.38 ± 0.00
3	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.01 ^{***}	0.16 ± 0.00	0.32 ± 0.01 ^{***}
4	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.44 ± 0.00 ^{***}	0.15 ± 0.00	0.28 ± 0.00
5	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.41 ± 0.01 ^{***}	0.16 ± 0.00	0.26 ± 0.01 ^{***}
6	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.01 ^{***}	0.15 ± 0.00	0.22 ± 0.01 ^{***}
7	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.01 ^{***}	0.15 ± 0.00	0.18 ± 0.00 ^{***}

15 注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs G2 (模型组)。

5.3 化合物(I)对IMQ诱导的小鼠的皮肤PASI评分的影响

从实验第一天开始每日进行皮肤拍照，直至实验结束。

临床症状采用PASI评分标准，从红斑(Erythema)，鳞屑(Scaling)，
5 皮肤厚度(Thickness)3项指标进行评价，以0~4分进行记分，将3
者积分相加得到总积分。PASI评分标准如下：0，无症状；1，轻度；2，
中度；3，重度；4，极重度。

红斑：0-无红斑可见；1-呈淡红色；2-红色；3-深红色；4-红色极
深。

鳞屑：0-皮肤表面无可见鳞屑；1-部分皮损表面上覆有鳞屑；2-大
10 多数皮损表面覆盖有鳞屑；3-皮损部位几乎全部被鳞屑覆盖；4-皮损部
位全部被鳞屑覆盖。

皮肤厚度：0-皮肤光滑无褶皱；1-皮肤边缘轻微褶皱，或皮肤粗糙；
2-皮损处全部出现轻微褶皱，或轻微隆起；3-皮损处褶皱程度进一步加
15 深，或皮损肥厚、隆起明显；4-皮损处完全褶皱，或皮损高度肥厚，明
显凸起。

干燥及瘙痒不计入总分。

实验结果显示，连续14天给予5%咪喹莫特乳膏刺激之后，模型
组小鼠的红斑，鳞屑，皮肤厚度PASI评分以及总分均显著升高。在研
究终点时，化合物(I)(3mpk)的治疗显著改善了鳞屑评分($P<0.001$
20 vs 模型组)与总分($P<0.05$ vs 模型组)；化合物(I)(10mpk和30mpk)
的治疗显著改善了鳞屑评分(10mpk组： $P<0.01$ vs 模型组；30mpk
组： $P<0.001$ vs 模型组)、皮肤厚度评分(2组均为： $P<0.001$ vs 模型
组)与总分(10mpk组： $P<0.01$ vs 模型组；30mpk组： $P<0.001$ vs 模
型组)；化合物(I)(60mpk)以及地塞米松(3mpk)的治疗显著改
25 善了红斑评分、鳞屑评分、皮肤厚度评分与总分(2组均为： $P<0.001$ vs
模型组)。详见表5。

表 5 IMQ 诱导小鼠经治疗 14 天的皮肤 PASI 评分(均值 ± 标准误差)

组别	第 1 天				第 14 天			
	红斑	鳞屑	厚度	总分	红斑	鳞屑	厚度	总分
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^{***}	0.00 ± 0.00 ^{***}	0.00 ± 0.00 ^{***}	0.00 ± 0.00 ^{***}
2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00
3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	2.30 ± 0.15 ^{***}	2.80 ± 0.13	8.10 ± 0.23 [*]
4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.90 ± 0.10	2.40 ± 0.27 ^{**}	2.40 ± 0.27 ^{***}	7.70 ± 0.60 ^{**}
5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.90 ± 0.10	1.20 ± 0.13 ^{***}	1.40 ± 0.16 ^{***}	5.50 ± 0.31 ^{***}
6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.15 ^{***}	1.20 ± 0.13 ^{***}	1.40 ± 0.16 ^{***}	4.60 ± 0.34 ^{***}
7	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.10 ± 0.10 ^{***}	1.10 ± 0.10 ^{***}	0.90 ± 0.10 ^{***}	4.10 ± 0.18 ^{***}

5.4 化合物(I)对 IMQ 诱导的小鼠的脾重量的影响

5 实验第 14 天, 进行脾重量采集。

实验结果显示, 化合物(I) (10 mpk、30 mpk 和 60 mpk) 和地塞米松(3 mpk)治疗显著抑制了脾重量的升高(化合物(I)10 mpk 组为: $P < 0.05$ vs 模型组; 其它 3 组均为: $P < 0.001$ vs 模型组); 化合物(I) (30 mpk 和 60 mpk) 和地塞米松(3 mpk)治疗显著抑制了脾指数的升高(3 组均为: $P < 0.001$ vs 模型组), 详见表 6。

表 6 IMQ 诱导小鼠经治疗 14 天的脾重量及脾指数(脾重/体重%) (均值 ± 标准误差)

组别	脾重 (mg)	脾重/体重 (mg/g)
1	73.11 ± 3.20	4.24 ± 0.19
2	216.20 ± 13.22	13.12 ± 0.77
3	231.44 ± 12.72	14.46 ± 0.71
4	182.01 ± 9.11 [*]	11.71 ± 0.56
5	146.81 ± 7.71 ^{***}	9.27 ± 0.47 ^{***}
6	125.73 ± 4.63 ^{***}	8.01 ± 0.28 ^{***}
7	93.79 ± 4.64 ^{***}	6.17 ± 0.29 ^{***}

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs G2 (模型组)

5.5 皮肤表皮厚度测定及病理评分

实验结束后，所有小鼠过量吸入二氧化碳安乐死，采集皮肤，分为四份，其中一份放置于组织固定液固定 24 小时，用于病理检测。经脱水处理后石蜡包埋，制成 4 微米的切片。皮肤切片通过苏木伊红染色，可观察角质层、表皮层、真皮层和炎症细胞浸润情况。在测量表皮层厚度时，先用莱卡 Aperio CS2 扫描仪在 200 倍率下扫描染完色的皮肤切片，然后观察组织病理改变，进行评分。

病理评分具体标准如下：表皮层中发现芒罗小脓肿（Munro microabscess）2.0 分；角化过度 0.5 分；角化不全 1.0 分；颗粒层变薄或消失 1.0 分；棘层增厚 1.0 分；皮突延长、起伏根据轻中重度分别计 0.5 分、1.0 分、1.5 分。真皮层中单一核或多核细胞浸润根据轻中重度分别计 0.5 分、1.0 分、1.5 分；乳突上顶 0.5 分；毛细血管扩张 0.5 分。

在测量表皮层厚度时，先用莱卡 Aperio CS2 扫描仪在 200 倍率下扫描染完色的皮肤切片，然后用 HALO 分析软件打开扫描后的图片。用软件中“分型”模板，将皮肤表皮定义为注释层，在注释层中将表皮分为上下两个线段，然后同“图层厚度”选项将线段中大约 200 处厚度计算出来。每个切片的表皮厚度是由表皮厚度平均值来表示。

实验结果表明，组 1 正常对照组镜下可见完整的皮肤结构，细胞形态正常，未见明显的异常改变。组 2 模型组的皮肤可见芒罗小囊肿，角化过度或不全，棘层增厚，并伴有明显的血管扩张，以及中度到重度的炎症细胞浸润。同组 1 正常对照组相比，连续 14 天给予 5%咪喹莫特乳膏刺激显著升高了皮肤组织的病理评分。化合物(I) (60 mpk) 和地塞米松 (3 mpk) 的治疗显著改善了模型小鼠的皮肤组织病理评分（化合物(I) 60 mpk 组： $P < 0.01$ vs 模型组；地塞米松组： $P < 0.001$ vs 模型组）。同组 1 正常对照组相比，组 2 模型组的皮肤表皮厚度显著增加。化合物(I) (30 mpk 和 60 mpk) 和地塞米松 (3 mpk) 的治疗显著降低了模型小鼠的表皮厚度（化合物(I) 2 组： $P < 0.05$ vs 模型组；地塞米松组： $P < 0.001$ vs 模型组）。详见表 7。

表 7 IMQ 诱导小鼠经治疗 14 天的病理评分与表皮厚度 (平均值 ± 标准误差)

组别	病理评分	表皮厚度 (μm)
1	0.00 ± 0.00	25.32 ± 0.93
2	8.25 ± 0.56	138.78 ± 9.69
3	7.75 ± 0.39	136.10 ± 5.96
4	7.45 ± 0.80	131.63 ± 7.15
5	5.55 ± 0.90	121.75 ± 8.17*
6	5.05 ± 0.88**	113.28 ± 6.95*
7	3.95 ± 0.50***	84.98 ± 7.40***

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs G2 (模型组)

5 5.6 皮肤样本炎症因子检测

实验结束后, 所有小鼠过量吸入二氧化碳 (CO₂) 安乐死, 采集皮肤, 分成四份, 其中三份于液氮中进行速冻, 并保存于 -80 摄氏度冰箱, 用于炎症因子检测。

使用 ELISA 方法对 IL-6 和 TNF- α 进行检测。

- 10 组织标本: 称取一定量的皮肤组织, 加入一定量的 PBS (pH=7.4), 用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清液。分装后一份待检测, 其余冷冻备用。

操作步骤:

- 15 1. 标准品的加样: 设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L。

2. 加样: 分别设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L, 然后再加待测样品 10 μ L (样品最终稀释度为 5 倍)。将样品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀。

- 20 3. 加酶: 每孔加入酶标试剂 100 μ L, 空白孔除外。

4. 温育: 用封板膜封板后置 37 摄氏度温育 60 分钟。

5. 配液: 将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。

6. 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。

7.显色：每孔先加入显色剂 A 50 μ L，再加入显色剂 B 50 μ L，轻轻震荡混匀，37 摄氏度避光显色 15 分钟。

8.终止：每孔加终止液 50 μ L，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

9.测定：以空白孔调零，450 nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

10.计算：用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式 $y=bx+a$ ，其中 x 为浓度， y 为 OD 值，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

实验结果表明，化合物(I)（3 mpk、10 mpk、30 mpk 和 60 mpk）和地塞米松(3 mpk)显著降低了 IL-6 在皮肤中的含量(化合物(I)3 mpk 和 60 mpk 组： $P<0.001$ vs 模型组；化合物(I)10 mpk、30 mpk 组和地塞米松组： $P<0.01$ vs 模型组)和 TNF- α 在皮肤中的含量（化合物(I)30 mpk 组： $P<0.001$ vs 模型组；化合物(I)10 mpk 组： $P<0.05$ vs 模型组；化合物(I)3 mpk、60 mpk 组和地塞米松组： $P<0.01$ vs 模型组）。详见表 8。

表 8 IMQ 诱导小鼠经治疗 14 天的皮肤炎性因子含量
(平均值 \pm 标准误差)

组别	IL-6 (浓度 pg/g)	TNF- α (浓度 pg/g)
1	544.08 \pm 44.29 ^{***}	906.85 \pm 41.88 ^{***}
2	1000.87 \pm 72.20	1937.90 \pm 129.72
3	554.74 \pm 88.14 ^{***}	1191.74 \pm 124.81 ^{**}
4	641.83 \pm 96.28 ^{**}	1432.02 \pm 152.77 [*]
5	638.09 \pm 59.63 ^{**}	1236.41 \pm 100.8 ^{***}
6	499.72 \pm 95.81 ^{***}	1188.81 \pm 159.63 ^{**}
7	607.20 \pm 76.89 ^{**}	1172.53 \pm 115.72 ^{***}

注：* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ vs G2（模型组）

20

实施例 3：化合物(I)对 OXA 诱导的小鼠特应性皮炎模型的药效试验

1. 试验目的

本试验目的在于评估化合物(I)在 OXA 诱导的 Balb/c 小鼠特应性

皮炎模型中的药效学。反复多次的 OXA 刺激小鼠的背部皮肤，可以产生长期的炎症反应。该模型更贴近临床上的皮肤炎症，是筛选和评价具有抗炎活性的化合物的常用模型。

2. 试验药物

5 受试药：化合物(I)

阳性对照药：地塞米松 (Dex)

溶媒 (0.4% Tween80/0.5% 甲基纤维素)。

3. 试验动物

8-9 周龄雌性 Balb/c 小鼠，70 只。

10 4. 试验分组及给药方案

根据给药前，各组动物的体重，随机分为 7 组，每组 10 只动物，详见表 9。

表 9 特应性皮炎药效试验分组

组别	动物数	5% OXA 致敏 (Day -7)	给药剂量 (mpk)	0.1% OXA 激发	给药起始时间	给药途径和频次	给药时长 (天)
正常对照组	10	丙酮/橄榄油 (4/1)	/	丙酮/橄榄油 (4/1)	Day1	PO bid	22
模型组	10	5% OXA	/	0.1% OXA	Day1	PO bid	22
化合物 (I) 3 mpk 组	10	5% OXA	3	0.1% OXA	Day1	PO bid	22
化合物 (I) 10 mpk 组	10	5% OXA	10	0.1% OXA	Day1	PO bid	22
化合物 (I) 30 mpk 组	10	5% OXA	30	0.1% OXA	Day1	PO bid	22
化合物 (I) 60 mpk 组	10	5% OXA	60	0.1% OXA	Day1	PO bid	22
地塞米松 3 mpk 组	10	5% OXA	3	0.1% OXA	Day1	PO qd	22

诱导特应性皮炎模型:

小鼠按体重随机分为 7 组,如上表 9 所示。第 7 天进行 OXA 诱导。诱导方式为将 5% OXA (溶于丙酮/橄榄油 (4/1) 的溶剂中) 涂抹于小鼠后背近脖颈处, 涂抹 10 μ L (1.5 cm \times 1.5 cm)。正常对照组的小鼠以 5 相同的方式涂抹丙酮/橄榄油 (4/1) 的溶剂 10 μ L。第 1 天到第 22 天, 进行免疫刺激, 将 100 μ L 0.1% OXA (溶于丙酮/橄榄油 (4/1) 的溶剂中) 均匀涂抹于小鼠后背近脖颈处。每两天涂抹一次。正常对照组的小鼠以相同的方式涂抹丙酮/橄榄油 (4/1) 的溶剂 100 μ L。免疫刺激当天, 需进行皮肤厚度测量、临床评分及拍照, 则上述工作完成之后进行 10 OXA 涂抹。

给药方案:

化合物给药剂量如表 9 所示。化合物(I) 在第 1 到第 22 天以灌胃方式给药, 每日两次 (PO, bid)。早晨给药, 在皮肤厚度测量、临床 15 评分、拍照及 OXA 免疫刺激之前完成。两次给药间隔 8 小时。

5. 试验结果

5.1 化合物(I) 对 OXA 诱导的特应性皮炎的小鼠的体重的影响
每周记录两次体重数据。

实验结果显示, OXA 刺激对小鼠体重无显著性影响。在研究终点 20 时, 化合物(I) (3 mpk、10 mpk、30 mpk 和 60 mpk) 对小鼠体重无显著性影响; 地塞米松治疗后小鼠体重显著下降。详见表 10。

表 10 OXA 诱导小鼠经治疗 22 天的体重 (均值 \pm 标准误差)

组别	体重 (g)		
	第-7 天	第 1 天	第 7 天
正常对照组	18.56 \pm 0.17	18.56 \pm 0.17	19.65 \pm 0.28
模型组	18.12 \pm 0.13	18.12 \pm 0.13	19.37 \pm 0.18
化合物(I) 3 mpk 组	18.11 \pm 0.13	18.11 \pm 0.13	18.83 \pm 0.20
化合物(I) 10 mpk 组	18.11 \pm 0.13	18.11 \pm 0.13	18.80 \pm 0.22
化合物(I) 30 mpk 组	18.10 \pm 0.12	18.10 \pm 0.12	18.79 \pm 0.11
化合物(I) 60 mpk 组	18.10 \pm 0.12	18.10 \pm 0.12	18.92 \pm 0.13
地塞米松 3 mpk 组	18.08 \pm 0.12	18.08 \pm 0.12	16.92 ^{***} \pm 0.20

注: * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs 模型组

5.2 化合物(I) 对 OXA 诱导的特应性皮炎的小鼠的皮肤厚度的影响

皮肤厚度 (1.5 cm×1.5 cm 造模区域) 于第 1 天到第 22 天使用 Mitutoyo digimatic indicator (三丰数显量表, 型号 ID-C, 美国) 进行测量, 每两天测量一次。如果皮肤厚度测量和 OXA 免疫刺激在同一天, 那么会优先对皮肤厚度进行测量。

实验结果显示, OXA 免疫刺激之后, 小鼠的背部皮肤 (1.5 cm×1.5 cm 造模区域) 厚度显著升高。从第 17 天起, 与模型组相比, 化合物(I) (30 mpk 和 60 mpk) 显著抑制了造模区域皮肤厚度的升高 (30 mpk 组第 17 天和 22 天: $P<0.05$ vs 模型组; 60 mpk 组第 17 天和 22 天: $P<0.01$ vs 模型组)。从第 7 天起, 与模型组相比, 地塞米松显著抑制了皮肤厚度的增高 (第 7 天: $P<0.01$ vs 模型组; 第 17 和 22 天: $P<0.001$ vs 模型组)。详见表 11。

表 11 OXA 诱导小鼠经治疗 1-22 天的皮肤厚度 (均值 ± 标准误差, 单位: mm)

组别	第 1 天	第 7 天	第 17 天	第 22 天
正常对照组	0.334 ^{***} ±0.007	0.356 ^{***} ±0.013	0.347 ^{***} ±0.013	0.376 ^{***} ±0.031
模型组	0.524±0.015	0.978±0.022	1.361±0.058	1.403±0.045
化合物(I) 3 mpk 组	0.511±0.016	0.944±0.026	1.361±0.043	1.368±0.028
化合物(I) 10 mpk 组	0.535±0.027	0.958±0.026	1.257±0.020	1.338±0.021
化合物(I) 30 mpk 组	0.534±0.029	0.976±0.021	1.228 [*] ±0.063	1.268 [*] ±0.072
化合物(I) 60 mpk 组	0.556±0.035	0.993±0.033	1.180 ^{**} ±0.054	1.238 ^{**} ±0.033
地塞米松 3 mpk 组	0.532±0.012	0.813 ^{**} ±0.023	0.646 ^{***} ±0.035	0.599 ^{***} ±0.025

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs 模型组。

5.3 化合物(I) 对 OXA 诱导的特应性皮炎的小鼠的皮肤临床评分
造模区域的皮肤于第 1 天到第 22 天参照表 12 皮肤评分标准进行

临床评分，每两天评价一次。如果皮肤临床评分和 OXA 免疫刺激在同一天，那么会优先进行皮肤临床评分。

表 12 皮肤评分标准

标准	分值
正常	0
发红	1
水肿	2
蜕皮	3
渗液	4

5

实验结果表明，OXA 免疫刺激之后，小鼠造模区域皮肤临床评分显著升高。从第 19 天起，与模型组相比，化合物(I) (30 mpk 和 60 mpk) 显著抑制了皮肤临床评分的升高（均为 $P < 0.05$ vs 模型组）。从第 9 天起，与模型组相比，地塞米松显著抑制了皮肤临床评分的升高（第 9 天： $P < 0.05$ vs 模型组；第 19 天和 22 天： $P < 0.001$ vs 模型组）。详见表 13。

10

表 13 OXA 诱导小鼠经治疗 1-22 天的皮肤临床评分（均值 \pm 标准误差）

组别	第 1 天	第 9 天	第 19 天	第 22 天
正常对照组	0.0 \pm 0.00	0.0 ^{***} \pm 0.00	0.0 ^{***} \pm 0.00	0.0 ^{***} \pm 0.00
模型组	0.4 \pm 0.16	3.2 \pm 0.13	3.0 \pm 0.00	3.0 \pm 0.00
化合物(I) 3 mpk 组	0.4 \pm 0.16	3.1 \pm 0.10	2.9 \pm 0.10	3.0 \pm 0.00
化合物(I) 10 mpk 组	0.4 \pm 0.16	3.0 \pm 0.00	2.7 \pm 0.15	2.7 \pm 0.15
化合物(I) 30 mpk 组	0.5 \pm 0.17	3.0 \pm 0.00	2.5 [*] \pm 0.17	2.5 [*] \pm 0.17
化合物(I) 60 mpk 组	0.6 \pm 0.16	3.0 \pm 0.00	2.5 [*] \pm 0.17	2.5 [*] \pm 0.17
地塞米松 3 mpk 组	0.4 \pm 0.16	2.7 [*] \pm 0.15	1.2 ^{***} \pm 0.13	1.1 ^{***} \pm 0.10

15 注：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ vs 模型组。

5.4 皮肤表皮厚度测定及病理评分

研究终点时采集造模区域组织进行苏木素-伊红染色用于皮肤病理评分和表皮厚度的测量。

小鼠处死后，取下背部皮肤，将其放置于 10%中性福尔马林固定 24 小时。经脱水处理后石蜡包埋，制成 4 微米的切片。皮肤切片通过苏木素-伊红染色，显微镜下观察角质层、表皮层和真皮层炎症细胞浸润和组织改变情况，进行病理评分。评分标准为：炎症细胞聚集和水肿，分为 1 分轻微，2 分中度，3 分严重；毛细血管扩张，分为 1 分轻微，2 分中度，3 分重度。

炎症细胞聚集具体评分标准如下：（1）1 分轻微：可见少量 < 10% 炎症细胞占据面积出现在真皮区域；（2）2 分中度：炎症细胞占据面积在 10%-50% 的皮肤真皮区域；（3）3 分严重：炎症细胞分布面积 \geq 50% 的皮肤真皮区域。

皮肤水肿具体评分标准如下：（1）1 分轻微：偶见几处表皮与真皮交界处细胞水肿，水肿细胞聚集长度小于 10% 的真皮与表皮交界线长度；（2）2 分中度：水肿细胞占据长度介于 10%-50% 的真皮与表皮交界线长度；（3）3 分严重：水肿细胞占据长度大于 50% 的真皮与表皮交界线长度。

毛细血管扩张具体评分标准如下：（1）1 分轻微：偶见 1-3 处毛细血管扩张；（2）2 分中度：3-6 处毛细血管扩张；（3）3 分重度：大于 6 处毛细血管扩张。

在测量表皮层厚度时，先用莱卡 Aperio CS2 扫描仪在 200 倍率下扫描染完色的皮肤切片，然后用 HALO 病理分析软件打开扫描后的图片。用软件中“分型”模板，将皮肤表皮定义为注释层，在注释层中将表皮分为上下两个线段，然后用“图层厚度”选项将线段中大约 100 处厚度计算出来。每个切片的表皮厚度是由表皮厚度平均值来表示的。

实验结果显示，模型组造模区域皮肤存在炎症细胞聚集，水肿及毛细血管扩张现象。根据实验方法中提及的病理评分标准，该组病理评分达到 6.8。与模型组相比，化合物(I)（10 mpk、30 mpk 和 60 mpk）治疗后可以显著降低该区域皮肤的病理评分（ $P < 0.01$ vs 模型组）；地塞米松治疗后显著降低了病理评分（ $P < 0.001$ vs 模型组）。OXA 刺激使得小鼠后背造模区域皮肤表皮层厚度显著增加。与模型组相比，化合物(I)（10 mpk、30 mpk 和 60 mpk）能够显著降低表皮厚度（ $P < 0.05$

vs 模型组)；地塞米松治疗后该区域表皮层厚度显著下降 ($P < 0.001$ vs 模型组)。详见表 14。

表 14 OXA 诱导小鼠经治疗 22 天的病理评分与表皮厚度
(平均值±标准误差)

组别	表皮厚度 (μm)	病理评分
正常对照组	4.34 ^{***} ±1.30	0.0 ^{***} ±0.00
模型组	86.76±3.55	6.8±0.33
化合物(I) 3 mpk 组	75.79±3.36	6.4±0.34
化合物(I) 10 mpk 组	68.84 [*] ±4.95	5.1 ^{**} ±0.43
化合物(I) 30 mpk 组	75.08 [*] ±3.57	5.0 ^{**} ±0.42
化合物(I) 60 mpk 组	72.90 [*] ±4.00	5.0 ^{**} ±0.52
地塞米松 3 mpk 组	54.53 ^{***} ±2.98	1.1 ^{***} ±0.10

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 模型组

实施例 4: 化合物(I)对 SLE 模型小鼠的药效试验

1. 试验药物

受试药: 化合物(I)

阳性对照药: 泼尼松 (国药准字 H33021207)。

2. 试验动物

4 周龄雌性 MRL/lpr 小鼠, 50 只; 4 周龄雌性 C57BL/6 小鼠, 10 只。

3. 试验分组及给药方案

根据血清抗 ds-DNA 抗体浓度将雌性 MRL/lpr 小鼠随机分成 5 组, 分别为模型组: 溶剂 (含 0.4% Tween80 和 0.5% 甲基纤维素的水溶液) 10 mL/kg BID, 阳性对照组: 泼尼松 6 mg/kg QD, 化合物(I)20、40 和 60 mg/kg BID 组, 给药体积均为 10 mL/kg。另外, 雌性 C57BL/6 小鼠作为正常对照组。化合物(I)和模型组从第 5 周龄开始每天两次灌胃给药或溶剂, 两次给药时间间隔 8 小时; 泼尼松从第 5 周龄开始每天一次灌胃给药; 共给药 17 周。

模型组有 2 只小鼠分别在给药 15 周和 16 周死亡, 试验终点时剩余 8 只; 化合物(I) 20 mg/kg BID 组有 1 只小鼠在给药 16 周后期死亡,

试验终点时剩余 9 只；其余各组未出现小鼠死亡现象。

4. 试验结果

4.1 化合物(I)对 MRL/lpr 小鼠皮肤的影响

4.1.1 皮肤损伤情况及评分

5 观察小鼠脸部、耳朵和背部皮肤损伤情况，对其进行评分，每周一次，共 17 次。

评分系统：1) 皮肤红肿、出血；2) 毛发缺失和皮肤干燥程度；3) 水肿；4) 表皮脱落/腐蚀；5) 苔藓样硬化斑等症状。每项评分分值如下：正常=0 分；轻微 = 1 分；中度 = 2；严重=3 分。皮肤损伤严重程度根据统计每项评估症状的总分决定。

结果显示，与模型组相比，从治疗 14 周开始，化合物(I)高剂量和中剂量组能够有效抑制系统性红斑狼疮小鼠的皮肤损伤程度（14 周-16 周，**P*<0.05 vs 模型组； 17 周，***P*<0.01 vs 模型组），阳性对照药泼尼松 6 mg/kg 组也有效抑制系统性红斑狼疮小鼠的皮肤损伤程度（17 周，***P*<0.01 vs 模型组），详见表 15。

表 15 小鼠经治疗 0-17 周皮肤评分

周数	皮肤评分，均值 ± 标准误差					
	正常对照组	模型组	阳性对照组	化合物(I)组	化合物(I)组	化合物(I)组
				20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
0	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
4	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
8	0.0±0.00	0.0±0.00	0.3±0.15	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
12	0.0±0.00	0.1±0.10	0.3±0.15	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
14	0.0±0.00*	0.3±0.21	0.2±0.13	0.2±0.20	0.0±0.00*	0.0±0.00*
16	0.0±0.00*	0.3±0.24	0.1±0.10	0.2±0.13	0.0±0.00*	0.0±0.00*
17	0.0±0.00**	0.4±0.24	0.1±0.10**	0.2±0.15	0.0±0.00**	0.0±0.00**

注：**P*<0.05, ***P*<0.01 vs 模型组

20 4.1.2 皮肤 HE 病理评分

试验终点将小鼠解剖时，取小鼠背部皮肤组织 HE 染色，进行病理评分。

皮肤 HE 病理评分标准

评分	0	1	2	3	4
角化过度/角化不全	无	轻微	轻度	中度	重度
毛囊角栓	无	轻微	轻度	中度	重度
表皮、真皮萎缩	无	轻微	轻度	中度	重度
真皮浅层水肿	无	轻微	轻度	中度	重度
炎症细胞浸润	无	轻微	轻度	中度	重度
毛细血管扩张充血	无	轻微	轻度	中度	重度
表皮增生	无	轻微	轻度	中度	重度

5 结果显示，各给药组均可不同程度改善皮肤病理得分，化合物(I)组高剂量组显示了统计学差异(** $P < 0.01$ vs 模型组)，阳性对照药泼尼松 6 mg/kg 组也显示了统计学差异(** $P < 0.001$ vs 模型组)，实验结果详见表 16 及图 9。

10 表 16 小鼠经治疗 17 周后皮肤 HE 病理评分

皮肤 HE 病理评分，均值 ± 标准误差						
	正常对照组	模型组	阳性对照组	化合物(I)组 20mg/kg	化合物(I)组 40mg/kg	化合物(I)组 60mg/kg
分数	1.00±0.21***	4.63±0.46	1.80±0.36***	3.56±0.44	3.60±0.37	2.60±0.37**

注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 模型组

4.2 化合物(I)对 MRL/lpr 小鼠淋巴结的影响

4.2.1 淋巴结评分

15 在试验过程中对 MRL/lpr 小鼠淋巴结进行了评分，每周一次，共 17 次。

评分标准按淋巴结直径大小 (cm)，评分分值为 0-6 分:

0分：正常；

1分：小（在一个两侧点位置直径小于1 cm）；

2分：小（在两个两侧点位置直径小于1 cm）；

3分：小（在三个两侧点位置直径小于1 cm）；

5 4分：大（在一个两侧点位置直径大于1 cm，另外两个两侧点位置直径小于1 cm）；

5分：大（在两个两侧点位置直径大于1 cm，另外一个两侧点位置直径小于1 cm）；

6分：大（在三个两侧点位置直径大于1 cm）。

10 从淋巴结评分数据来看，给药治疗7周后，化合物(I)高、中剂量均能够有效抑制系统性红斑狼疮小鼠的淋巴结肿大程度(*** $P < 0.001$ vs 模型组)，低剂量组在给药7周至11周可显著抑制SLE小鼠淋巴结肿大(7-9周，*** $P < 0.001$ vs 模型组；11周，* $P < 0.05$ vs 模型组)，而12周后至实验终点则差异不再明显。阳性对照药泼尼松6 mg/kg组也
15 有效抑制系统性红斑狼疮小鼠的淋巴结肿大程度(*** $P < 0.001$ vs 模型组)，详见表17。

表 17 小鼠经 17 周治疗淋巴结评分

淋巴结评分，均值 ± 标准误差						
周数	正常对照组	模型组	阳性对照组	化合物(I)组	化合物(I)组	化合物(I)组
				20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
0	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
6	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
7	0.0±0.00***	1.6±0.22	0.2±0.13***	0.6±0.22***	0.3±0.15***	0.1±0.10***
9	0.0±0.00***	3.0±0.26	0.3±0.15***	2.0±0.26***	0.7±0.26***	0.3±0.15***
11	0.0±0.00***	3.5±0.27	0.0±0.00***	2.8±0.29*	0.9±0.23***	0.4±0.16***
12	0.0±0.00***	3.7±0.21	0.0±0.00***	3.0±0.21	1.2±0.25***	0.5±0.22***
17	0.0±0.00***	4.1±0.23	0.0±0.00***	3.6±0.24	1.5±0.34***	1.0±0.26***

注：* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ vs 模型组

4.2.2 淋巴结重量

试验终点将小鼠解剖后进行了（颌下、腋下和腹股沟）淋巴结组织称重，从淋巴结组织称重数据来看，与模型组相比，化合物(I)高、中两个剂量均能够有效抑制系统性红斑狼疮小鼠的淋巴结肿大程度（*** $P < 0.001$ vs 模型组），详见表 18 和图 10。

5

表 18 淋巴结重量（均值 ± 标准误差）

	正常 对照组	模型组	阳性 对照组	化合物(I) 组	化合物(I) 组	化合物(I) 组
				20mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
总淋巴 结 (g)	0.0175± 0.00***	2.0416± 0.35	0.1123± 0.03***	1.6823± 0.24	0.7319± 0.12***	0.5680± 0.08***
总淋巴 结重/ 体重%	0.0823± 0.01***	5.3365± 0.65	0.3445± 0.08***	4.7396± 0.60	2.1603± 0.35***	1.7879± 0.26***

注：*** $P < 0.001$ vs 模型组

4.3 化合物(I)对 MRL/lpr 小鼠脾脏的影响

10

试验终点将小鼠解剖后进行了脾脏组织称重，与模型组相比，化合物(I)高、中、低三个剂量均能够有效抑制系统性红斑狼疮小鼠的脾脏肿大程度（*** $P < 0.001$ vs 模型组），详见表 19 和图 11。

表 19 脾脏重量及脾重/体重（均值 ± 标准误差）

	正常 对照组	模型组	阳性 对照组	化合物(I) 组	化合物(I) 组	化合物(I) 组
				20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
脾 (g)	0.0755± 0.00***	0.6799± 0.07	0.0756± 0.01***	0.4658± 0.04***	0.3184± 0.03***	0.2805± 0.03***
脾重/ 体重%	0.3556± 0.01***	1.8596± 0.14	0.2362± 0.03***	1.3336± 0.11***	0.9485± 0.09***	0.8892± 0.10***

15 注：*** $P < 0.001$ vs 模型组

4.4 化合物(I)对 MRL/lpr 小鼠肾脏的影响

4.4.1 尿蛋白-曲线下面积

在试验过程中检测小鼠尿蛋白含量，每周一次，至16周。根据不同时间下尿蛋白含量，绘制尿蛋白浓度-时间曲线图，计算各曲线下面积。

- 5 可以发现化合物(I)的3个剂量组对尿蛋白有不同程度的改善，16周的时间曲线下面积在化合物(I)的中高剂量组出现明显统计学差异(* $P < 0.05$ vs 模型组)。详见表20和图12。

表20 小鼠经治疗16周的尿蛋白-曲线下面积

尿蛋白-曲线下面积，均值 ± 标准误差，wk*mg/L						
	正常对照组	模型组	阳性对照组	化合物(I)组 20 mg/kg	化合物(I)组 40 mg/kg	化合物(I)组 60 mg/kg
面	3856.14±	6809.65±	2360.38±	5646.42±	3851.50±	4138.70±
积	296.45*	1140.71	161.30***	587.29	340.32*	1048.57*

10 注: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs 模型组

4.4.2 肾脏重量

试验终点将小鼠解剖后进行了肾脏组织称重，与模型组相比，化合物(I)高剂量组在双肾总病理评分出现极其显著下降(*** $P < 0.001$ vs 模型组)，化合物(I)中剂量组在双肾总病理评分出现显著性下降(** $P < 0.01$ vs 模型组)，详见表21和图13。

15

表21 小鼠经治疗17周后总肾重及肾脏重/体重

	正常对照组	模型组	阳性对照组	化合物(I)组	化合物(I)组	化合物(I)组
				20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
总肾重(g)	0.2682± 0.01***	0.4685± 0.02	0.3526± 0.01***	0.4146± 0.02	0.3704± 0.01**	0.3639± 0.02***
总肾重/体重%	1.2610± 0.05	1.2958± 0.07	1.1050± 0.04	1.1855± 0.05	1.0997± 0.05	1.1424± 0.07

注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 模型组

20

4.4.3 肾脏 HE 病理评分

肾脏 HE 评分标准:

Activity Index (AI, 活动指数) 评分标准

病变	病变特点		分值
增生	肾小球囊腔未见囊壁层上皮细胞增生	(0)	0
	肾小球囊腔偶见囊壁层上皮细胞轻微增生	(<5%)	1
	肾小球囊腔少量可见囊壁层上皮细胞增生	(5%~25%)	2
	肾小球囊腔部分可见囊壁层上皮细胞增生	(25%~50%)	3
	肾小球囊腔广泛可见囊壁层上皮细胞增生	(>50%)	4
细胞性新月体	肾小球囊腔未见新月体形成	(0)	0
	肾小球囊腔偶见新月体形成	(<5%)	1
	肾小球囊腔少量可见新月体形成	(5%~25%)	2
	肾小球囊腔部分可见新月体形成	(25%~50%)	3
	肾小球囊腔广泛可见新月体形成	(>50%)	4
嗜中性粒细胞浸润	肾小球未见中性粒细胞浸润	(0)	0
	肾小球偶见中性粒细胞浸润	(<5%)	1
	肾小球少量可见中性粒细胞浸润	(5%~25%)	2
	肾小球部分可见中性粒细胞浸润	(25%~50%)	3
	肾小球广泛可见中性粒细胞浸润	(>50%)	4

肾小球周围炎细胞浸润	肾小球周围未见炎细胞浸润	(0)	0
	肾小球周围偶见炎细胞浸润	(<5%)	1
	肾小球周围少量可见炎细胞浸润	(5%~25%)	2
	肾小球周围部分可见炎细胞浸润	(25%~50%)	3
	肾小球周围广泛可见炎细胞浸润	(>50%)	4
纤维素样坏死	肾小球内未出现凝固性致密性嗜酸性物质,无纤维素样坏死形成	(0)	0
	肾小球内偶现凝固性致密性嗜酸性物质, 局部偶见纤维素样坏死形成	(<5%)	1
	肾小球内少量出现凝固性致密性嗜酸性物质,纤维素样坏死少量形成	(5%~25%)	2
	肾小球内部分出现凝固性致密性嗜酸性物质,纤维素样坏死部分形成	(25%~50%)	3
	肾小球内广泛出现凝固性致密性嗜酸性物质,纤维素样坏死广泛形成	(>50%)	4
肾小球肾炎活动度(AI)为以上5项得分总和			0~20

Chronic Index (CI, 慢性指数) 评分标准

病变	病变程度	分值
肾小球硬化 (节段或全球)	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
纤维性新月体	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
间质纤维化	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
肾小管萎缩	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
慢性指数 (CI) 为以上 4 项得分总和		0 ~ 12

Tubulointerstitial lesions (TIL, 肾小管间质损害) 评分标准

病变	病变程度	分值
肾小管变性、坏死	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
肾小管萎缩	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
间质炎性细胞浸润	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
间质纤维化	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
肾小管间质损伤 (TIL) 为以上 4 项得分总和		0 ~ 12

HE 染色评分结果：与模型组相比，在活动指数 (AI) 评分上，化合物(I)中高剂量组在双肾总病理评分均有出现显著性下降 (** $P < 0.01$ vs 模型组)；在慢性指数 (CI) 评分上，化合物(I)高剂量组在双肾总病理评分出现显著性下降 (** $P < 0.01$ vs 模型组)，化合物(I)低剂量组在双肾总病理评分出现比较明显的下降 ($P < 0.05$ vs 模型组)；在肾小管间质损害 (TIL) 评分上，化合物(I)高剂量组在双肾总病理评分中出现显著性的下降 (** $P < 0.01$ vs 模型组)。详见表 22 和图 14。

表 22 小鼠经治疗 17 周后肾脏 HE 病理评分

分数	双侧肾脏病理评分, 均值 ± 标准误差					
	正常 对照组	模型组	阳性 对照组	化合物 (I)组 20 mg/kg	化合物 (I)组 40 mg/kg	化合物 (I)组 60 mg/kg
活动指数	0.00±0.00* **	8.80±2.28	1.80±0.36* **	5.20±0.73	4.00±0.42* *	3.90±0.75* *
慢性指数	0.40±0.22* **	10.10±1.31	4.90±0.62* **	7.00±0.54*	7.60±0.50	6.00±0.75* *
肾小管间 质损害	1.40±0.56* **	13.50±1.50	3.60±0.45* **	13.50±0.52	12.30±1.03	8.50±0.91* *

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 模型组

5 通过肾脏组织 IHC 染色, 对 IgG 染色阳性细胞率以及着色强弱进行了评分。

肾脏 IHC (IgG) 评分标准:

IHC 评分标准一

染色强度	评分值
阴性	0
弱	1
中	2
强	3

IHC 评分标准二

细胞阳性率	评分值
无阳性细胞	0
细胞阳性率 ≤ 10%	1
10% < 细胞阳性率 ≤ 50%	2
50% < 细胞阳性率 ≤ 80%	3
细胞阳性率 > 80%	4

最终评分结果为二者乘积，0分为阴性(-)；1-3分为低表达(+); 4-8为中表达(++)；9-12分为高表达(+++)。

结果显示，与模型组相比，化合物(I)各剂量组均不同程度的改善肾脏组织中 IgG 沉积，其中化合物(I)高剂量组在双肾总 IHC 染色病理评分中出现比较明显的下降 (* $P < 0.05$ vs 模型组)。详见表 23 和图 15。

表 23 小鼠经治疗 17 周后肾脏 IHC 病理评分

分数	肾脏 IHC 病理评分，均值 ± 标准误差					
	正常对照组	模型组	阳性对照组	化合物 (I)组 20 mg/kg	化合物 (I)组 40 mg/kg	化合物 (I)组 60 mg/kg
双侧肾脏	5.10±0.35***	9.10±0.71	7.90±0.77	8.90±0.72	7.40±0.56	6.90±0.28*

注：* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs 模型组

10

4.5 化合物(I)对 MRL/lpr 小鼠血清抗 ds-DNA 抗体浓度的影响

在试验过程中检测小鼠血清抗 ds-DNA 抗体浓度，每 4 周一次，至 16 周。

结果显示，模型组小鼠红斑狼疮症状随着试验时间进行不断加重。从抗 ds-DNA 抗体浓度来看，经过 3-4 周治疗后，和模型组相比，化合物(I)中剂量组可有效降低抗 ds-DNA 抗体浓度水平(16 周, * $P < 0.05$ vs 模型组)。阳性对照药泼尼松 6 mg/kg 也可有效降低抗 ds-DNA 抗体浓度水平。详见表 24 和图 16。

20

表 24 小鼠经治疗 0-16 周抗 Ds-DNA 抗体浓度

周数	抗 Ds-DNA 抗体浓度 (以 ug/mL 表示), 均值 ± 标准误差				
	正常对照组	模型组	阳性对照组	化合物(I)组 40 mg/kg	化合物(I)组 60 mg/kg
0	1.83±0.01	3.30±0.39	3.26±0.30	3.32±0.39	3.33±0.42
4	2.13±0.03	319.71±25.79	183.55±28.07	346.06±35.04	249.26±24.12
8	2.60±0.16	943.95±131.31	363.75±18.45	885.04±96.38	806.75±110.22
12	3.01±0.30	1475.64±182.77	619.78±25.47	1390.83±266.11	1168.19±113.75
16	4.71±0.73***	2884.10±952.05	606.66±26.65**	1198.59±86.64*	1272.27±50.19

注: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs 模型组

4.6 化合物(I)对 MRL/lpr 小鼠血清细胞因子的影响

5 试验终点, 采用 ELISA 方法, 检测小鼠血清细胞因子水平。结果显示, 与模型组相比, 化合物(I)低中高三个剂量组均降低 TNF-α 浓度水平, 并且中高剂量组与模型组相比有显著差异 (**P<0.01 vs 模型组)。化合物(I)低中高三个剂量组对 IL-6 因子也具有一定降低作用, 高剂量组对 IL-6 降低效果显著。详见表 25 和图 17。

10

表 25 试验终点血清中细胞因子浓度

细胞因子	均值 ± 标准误差, Con.(pg/mL)					
	正常对照组	模型组	阳性对照组	化合物(I)组 20 mg/kg	化合物(I)组 40 mg/kg	化合物(I)组 60 mg/kg
IL-6	5.19±2.61** *	70.78±17.46	19.91±10.43	52.38±5.29	63.17±12.60	35.99±7.36
TNF-α	3.22±0.32** *	59.65±7.99	5.50±1.13**	48.03±4.12	32.29±4.62*	30.61±4.72*

注: **P<0.01, ***P<0.001 vs 模型组

实施例 5 毒理学实验

15

遵从 NMPA 《药物非临床研究质量管理规范》和 FDA GLP 规范

(21CFR Part 58)，并符合国际人用药品注册技术要求协调会(ICH)和 NMPA 相关指导原则要求的一般毒理学研究，对化合物(I)进行了毒理学研究，为临床患者使用化合物(I)提供安全性数据支持。给药方式及实验结果如下：

实验名称	剂量和给药方式
SD 大鼠单次经口灌胃给药毒性试验	0 (溶媒)、300、800 和 2000 mg/kg
Beagle 犬单次经口灌胃给药毒性试验	0 (溶媒)、125、250 和 500 mg/kg/次，24 小时内给药 2 次，间隔至少 4 小时
SD 大鼠经口灌胃给药四周恢复四周重复给药毒性试验	SD 大鼠每天 2 次 (间隔 4 小时以上) 连续 28 天经口分别给予溶媒或 10、30 和 100 mg/kg/次
Beagle 犬经口灌胃给药四周恢复四周重复给药毒性试验	Beagle 犬每天 2 次 (间隔 4 小时以上) 连续 28 天经口分别给予溶媒或 3、10 和 30 mg/kg/次

5

实验结果：

化合物(I)对动物中枢神经系统、呼吸系统，心血管系统没有影响，预计对人的中枢神经系统、呼吸系统和心血管系统没有副作用；大鼠单次给药的 NOAEL 为 2000 mg/kg，Beagle 犬单次给药的 MTD 为 500 mg/kg/次 (1000 mg/kg/天)，大鼠 28 天重复给药的 NOAEL 为 10 mg/kg/次 (20 mg/kg/天)，Beagle 犬 28 天重复给药的 NOAEL 为 3 mg/kg/次 (6 mg/kg/天) 化合物(I)没有遗传毒性。安全窗评估见下表，大鼠起效剂量为 3 mg/kg/次 BID，按照暴露量计算，化合物(I)在 Beagle 犬中有 1 倍的安全窗，在 SD 大鼠中有 8-13 倍的安全窗；按照剂量计算，化合物(I)在 Beagle 犬和 SD 大鼠中均有 3 倍的安全窗。拟待定化合物(I)首次人体试验爬坡起始剂量为 15 mg，化合物(I)在 Beagle 犬重复给药毒理研究中的 NOAEL 剂量的人体等效剂量与人体起始剂量比有 14 倍的安全窗，在 SD 大鼠重复给药毒理研究中的 NOAEL 剂量的人体等效剂量与人体起始剂量比有 16 倍的安全窗。因此，根据化合物(I)临床前毒理研究数据，拟开展的 I 期临床试验单次给药爬坡剂量为：15 mg、45 mg、60 mg、90 mg、135 mg、180 mg、240 mg、

15

20

300 mg 和 360 mg。

表 26 化合物 (I) 安全窗推算

实验项目	动物剂量 (mg/kg/ 次 BID)	AUC (h*ng/mL)	人体等效剂量 (mg, 按 60 kg 体重计)	安全窗 (倍)	
				剂量 法	暴露量 法
大鼠起效剂量	3	4310	73	/	/
大鼠 28 天 试验 NOAEL	10	♂33900 ♀58100	242	3	♂8 ♀13
犬 28 天试验 NOAEL	3	♂3300 ♀3930	210	3	1

- 5 I 期临床试验结果显示, 单次给药爬坡剂量至 240 mg 时, 尚未出现 3 级以上安全性问题。

10 综上, 化合物 (I) 可改善银屑病和特应性皮炎小鼠的皮肤病变, 抑制免疫器官增大, 降低炎症水平; 还可剂量依赖性改善 SLE 小鼠皮肤病变, 缓解肾损伤, 抑制免疫器官增大, 以及抑制血清中 SLE 相关抗体和细胞因子的增高; 且具有一定安全治疗窗, 具有很好的临床应用前景。

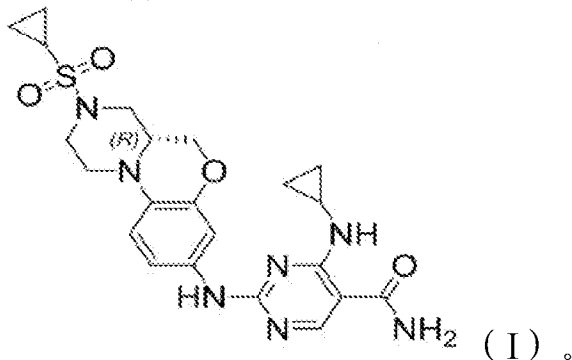
本申请使用的英文缩略词的全称及中文名如下:

缩略语	英文名	中文名
IL	Interleukin	白介素
IFN	Interferon	干扰素
EPO	Erythropoietin	促红细胞生成素
Dectin-1	Dendritic cell-associated C-type lectin-1	树突状细胞相关性 C 型植物凝集素-1
ITAM	Immunoreceptor tyrosine activation motif	免疫受体酪氨酸活化基序

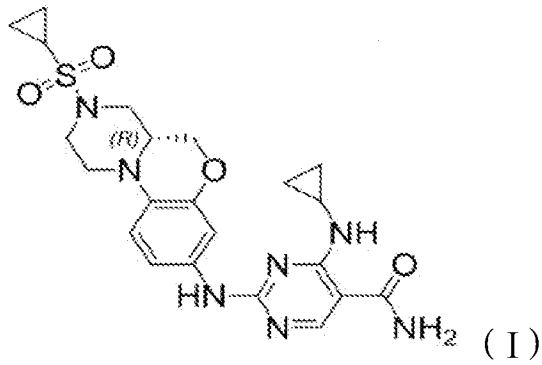
BCR	B cell receptor	B 细胞抗原受体
CARD9	Caspase recruitment domain 9	胱天蛋白酶募集域蛋白 9
NF-κB	Nuclear factor κB	核转录因子 κB
Caspase-8	CysteinyI aspartate specific protease 8	半胱氨酸蛋白酶 8
NLRP3	NLR Family, Pyrin Domain Containing Protein 3 (NLRP3)	NLRP3 炎性小体
Th	helper T cell	辅助性 T 细胞
HE	Hematoxylin-Eosin stain	苏木精-伊红染色
IMQ	Imiquimod	咪喹莫特
MC	Methylcellulose	甲基纤维素
PASI	Psoriasis area and severity index	发病面积大小和严重程度指数
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
OXA	4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one	4-乙氧基亚甲基-2-苯基恶唑啉-5-酮
Dex	Dexamethasone	地塞米松
NOAEL	No observed adverse effect level	未见不良反应剂量

权 利 要 求

1. 化合物(I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐在制备用于治疗 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病的药物中的用途, 其中
- 5 所述的 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病为自身免疫性疾病, 所述化合物(I)的结构如下式所示:

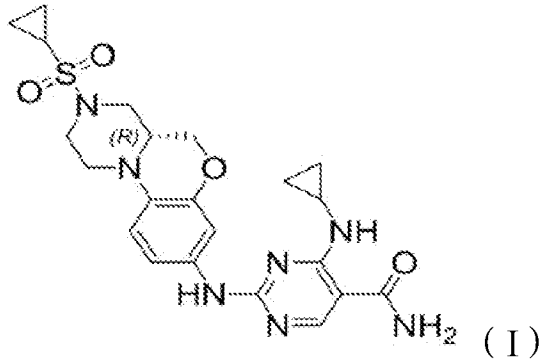


2. 如权利要求 1 所述的用途, 所述自身免疫性疾病为免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病。
- 10 3. 如权利要求 2 所述的用途, 其中所述免疫介导的皮肤病选自银屑病或特应性皮炎, 所述银屑病优选寻常型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病或关节病性银屑病; 其中所述自身免疫性结缔组织病为红斑狼疮, 所述红斑狼疮优选盘状红斑狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、系统性红斑狼疮、深在性红斑狼疮、新生儿红斑狼疮、药物性红
- 15 斑狼疮, 进一步优选为系统性红斑狼疮。
4. 如权利要求 1-3 任一所述用途, 其特征在于, 所述药物含有治疗有效量的化合物(I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐, 以及任选的, 药学上可接受的赋形剂或载体。
- 20 5. 如权利要求 4 所述用途, 其特征在于, 所述药物制成临床上可接受的各种剂型, 包括口服剂型、注射剂型、局部给药剂型或外用剂型。
6. 如权利要求 1-3 任一项所述用途, 其特征在于, 所述药物在临床上单独使用或与其他治疗组分联合使用。
7. 一种包含治疗有效量的化合物(I)、其光学异构体或其药学上可
- 25 接受的盐的药物,



其中所述药物用于治疗受试者的 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病，其为自身免疫性疾病，如免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病，所述免疫介导的皮肤病选自银屑病或特应性皮炎，所述银屑病优选寻常型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病或关节病性银屑病；所述自身免疫性结缔组织病为红斑狼疮，所述红斑狼疮优选盘状红斑狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、系统性红斑狼疮、深在性红斑狼疮、新生儿红斑狼疮、药物性红斑狼疮，进一步优选为系统性红斑狼疮。

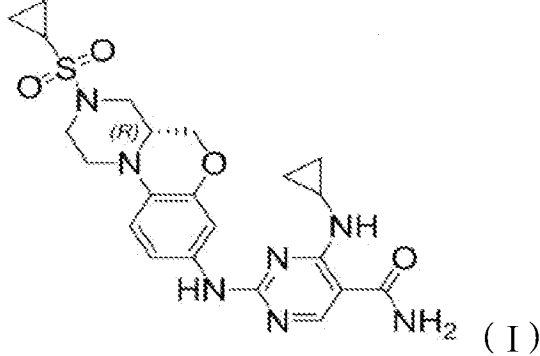
8. 一种治疗 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病的方法，包括将治疗有效量的化合物(I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐施用于需要治疗的哺乳动物(如人)：



所述的 JAK 和 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病为自身免疫性疾病，如免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病，所述免疫介导的皮肤病选自银屑病或特应性皮炎，所述银屑病优选寻常型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病或关节病性银屑病；所述自身免疫性结缔组织病为红斑狼疮，所述红斑狼疮优选盘状红斑狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、系统性红斑狼疮、深在性红斑狼疮、新生儿红斑狼疮、药物性红斑狼疮，进一步优选为系统性红斑狼疮。

9. 一种复方药物或组合产品，所述复方药物或组合产品包含治疗

有效量的化合物(I)、其光学异构体或其药学上可接受的盐,和其它治疗组分,



其特征在于,所述复方药物或组合产品用于治疗受试者的 JAK 和
 5 SYK 激酶高表达或异常激活相关疾病,其为自身免疫性疾病,如免疫介导的皮肤病和自身免疫性结缔组织病,所述免疫介导的皮肤病选自银屑病或特应性皮炎,所述银屑病优选寻常型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病或关节病性银屑病;所述自身免疫性结缔组织病为红斑狼疮,所述红斑狼疮优选盘状红斑狼疮、亚急性皮肤型红斑狼疮、
 10 系统性红斑狼疮、深在性红斑狼疮、新生儿红斑狼疮、药物性红斑狼疮,进一步优选为系统性红斑狼疮。

10. 如权利要求 4 所述用途,其特征在于,所述治疗有效量为 0.01 ~ 2000 mg,优选 1 ~ 500 mg,更优选为 10~400 mg,进一步优选为 15~360 mg 或 15~250 mg,如: 15 mg、45 mg、90 mg、135 mg、180 mg、
 15 240 mg、300 mg、360 mg。

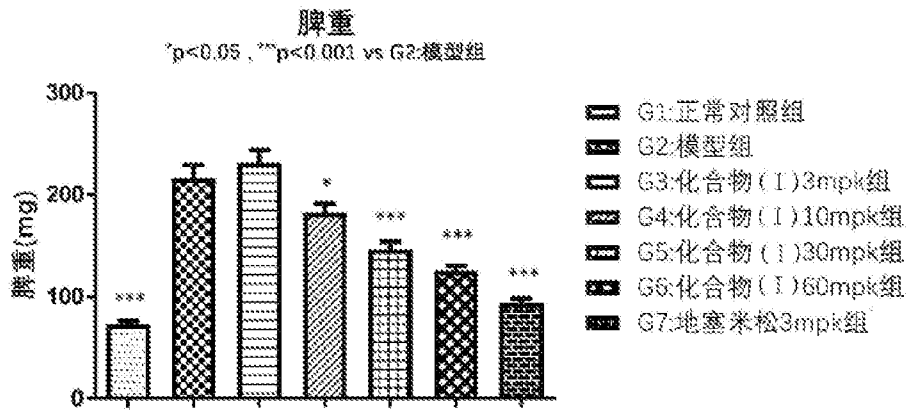


图 1

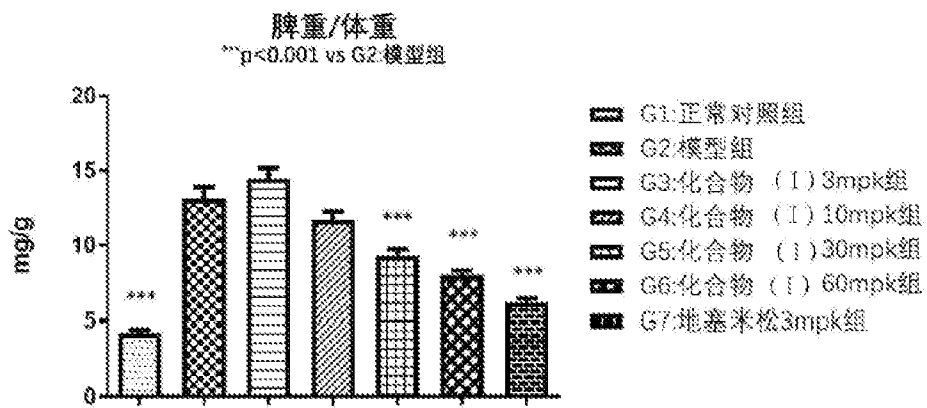


图 2

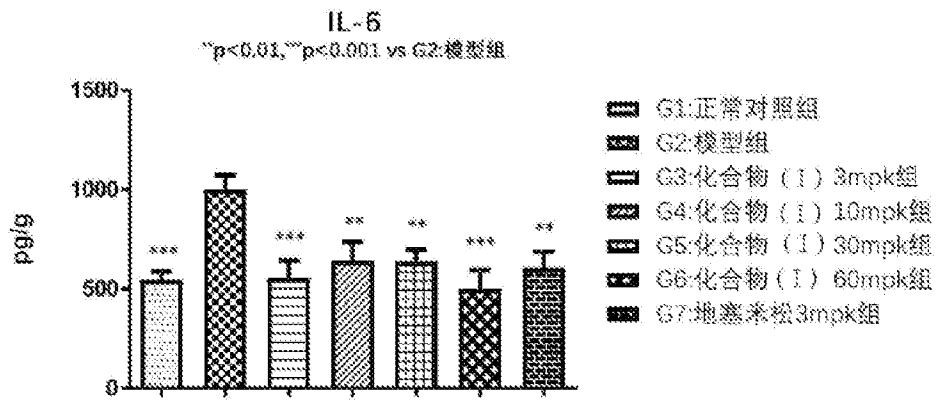


图 3

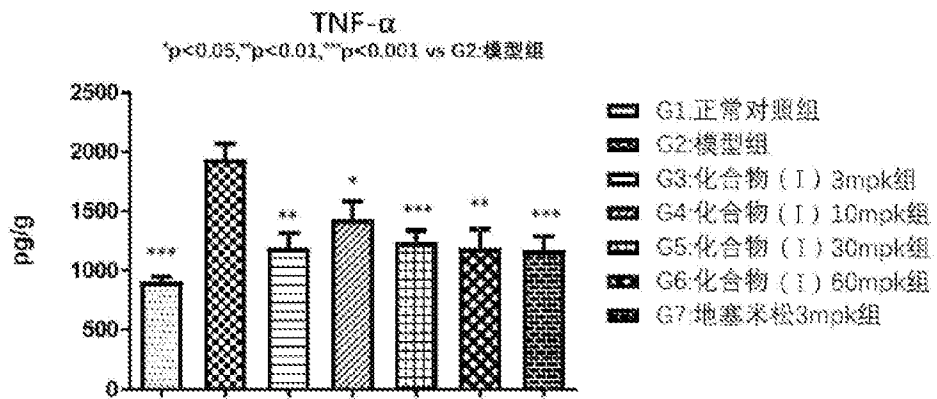


图 4

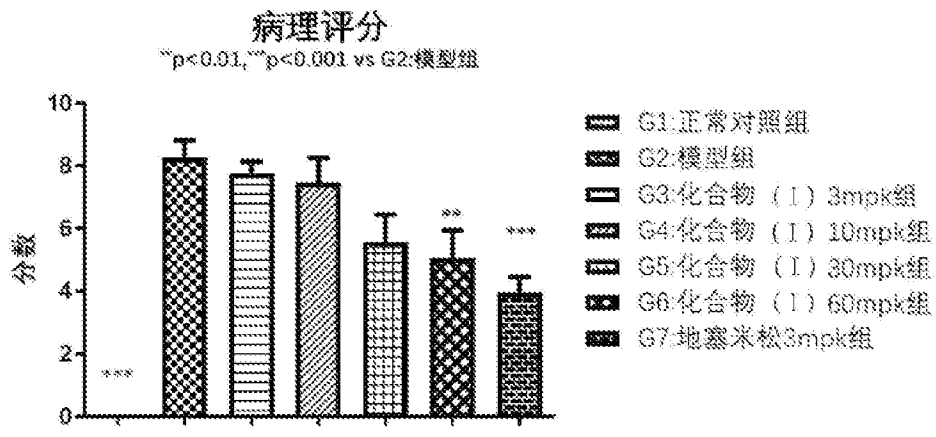


图 5

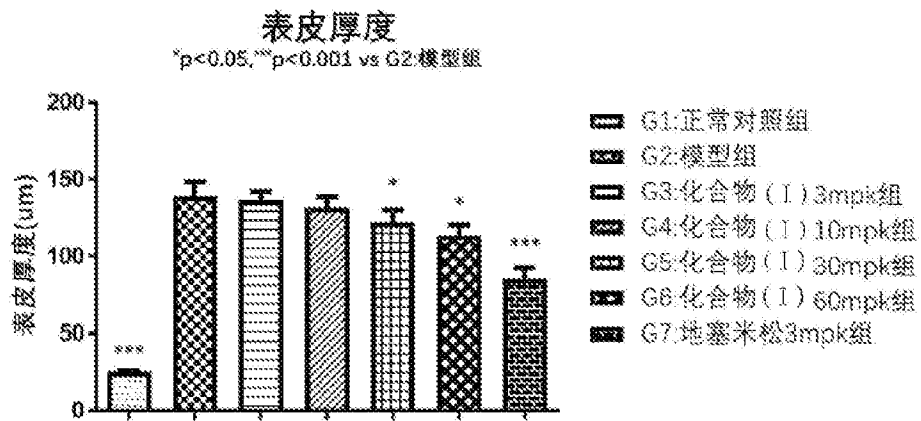


图 6

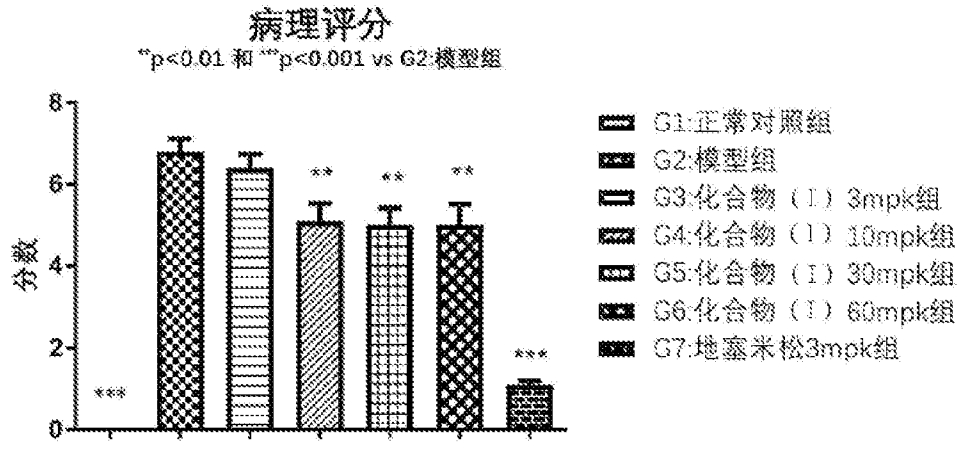


图 7

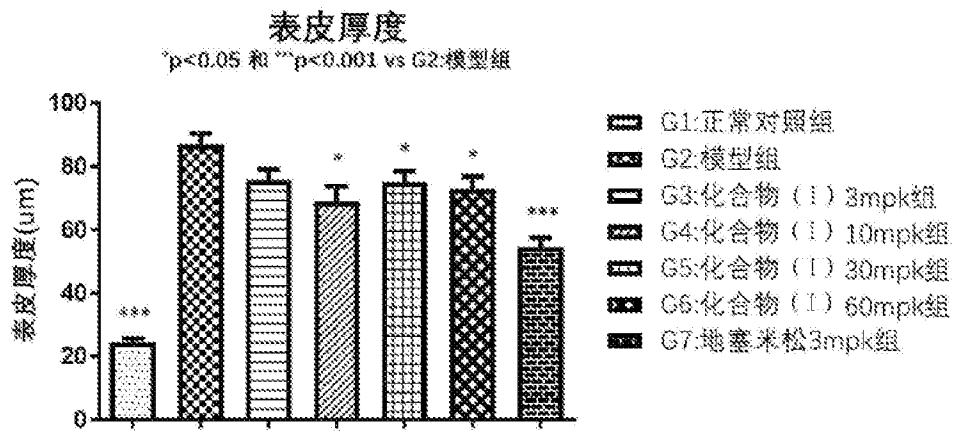


图 8

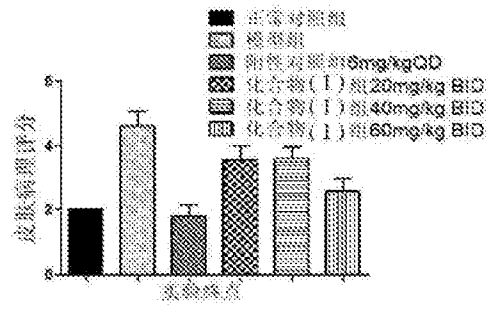


图 9

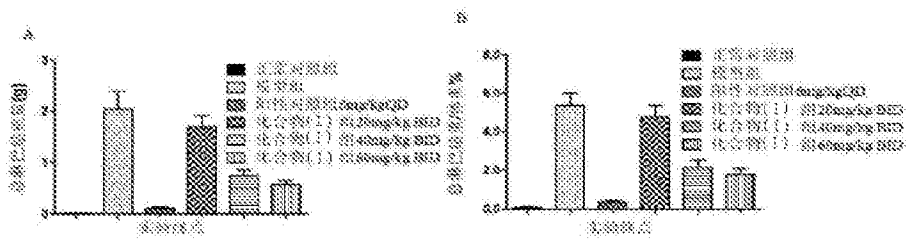


图 10

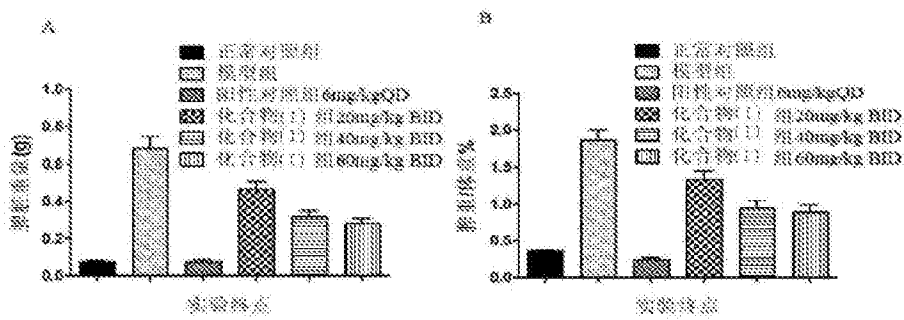


图 11

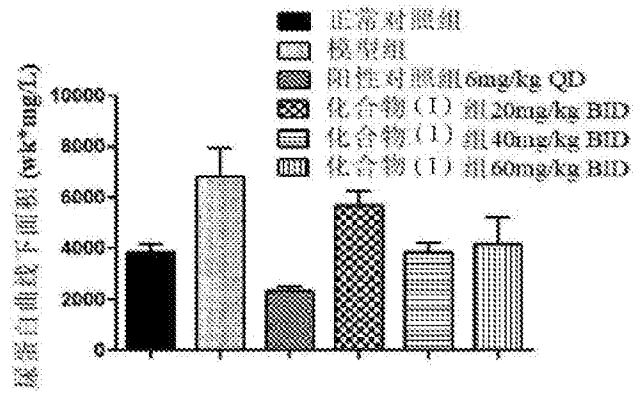


图 12

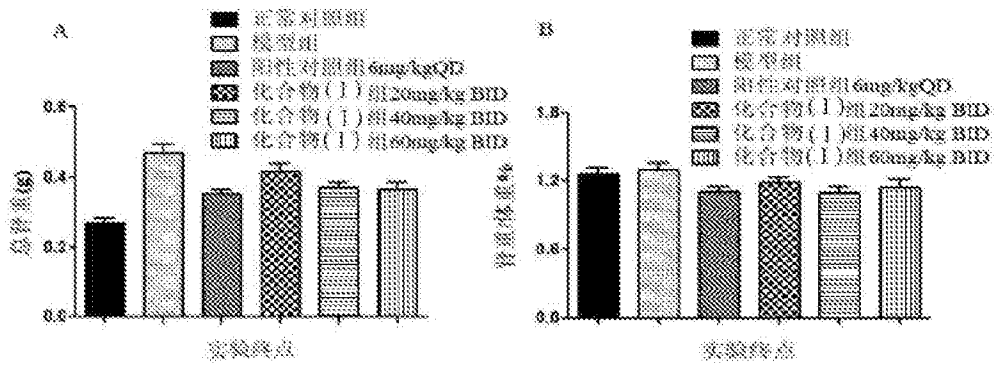


图 13

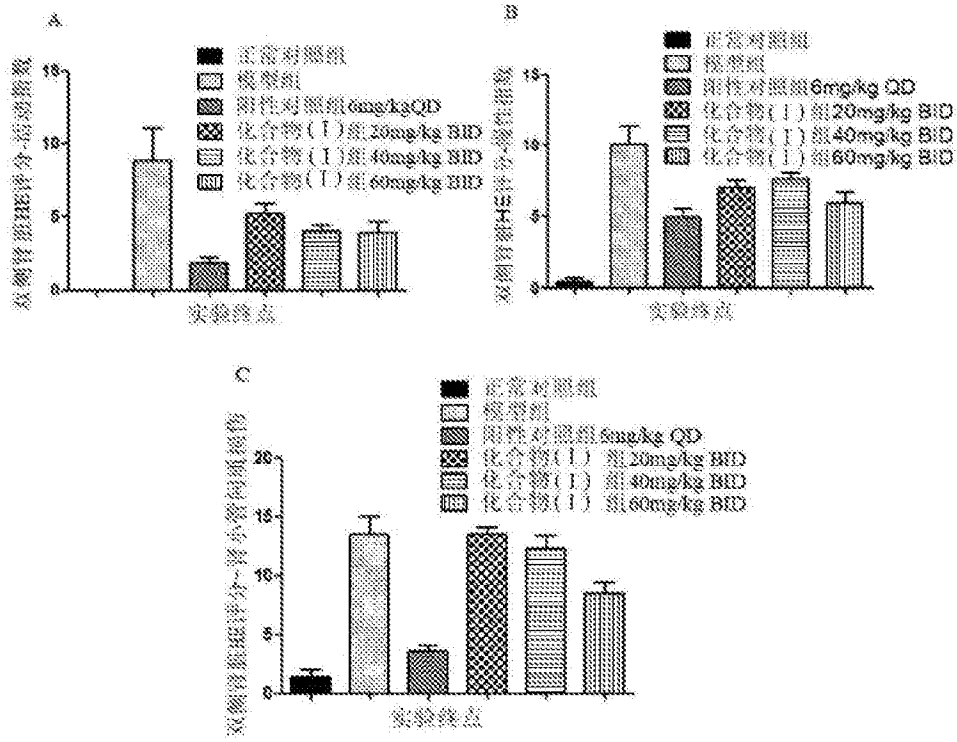


图 14

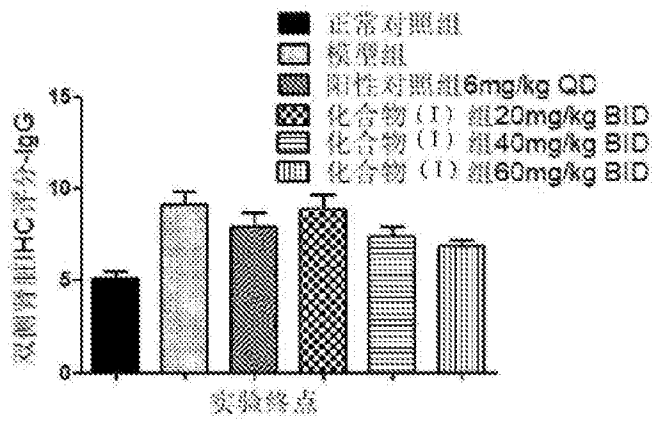


图 15

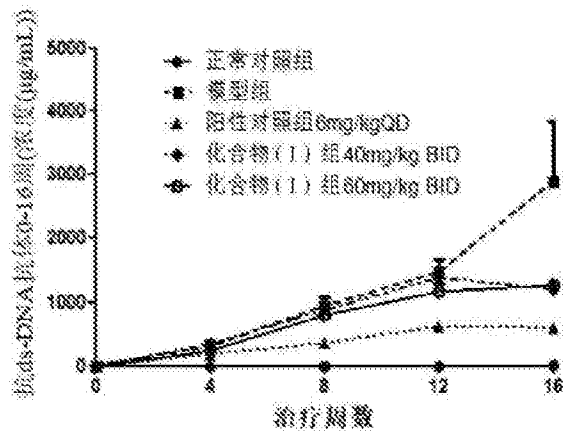


图 16

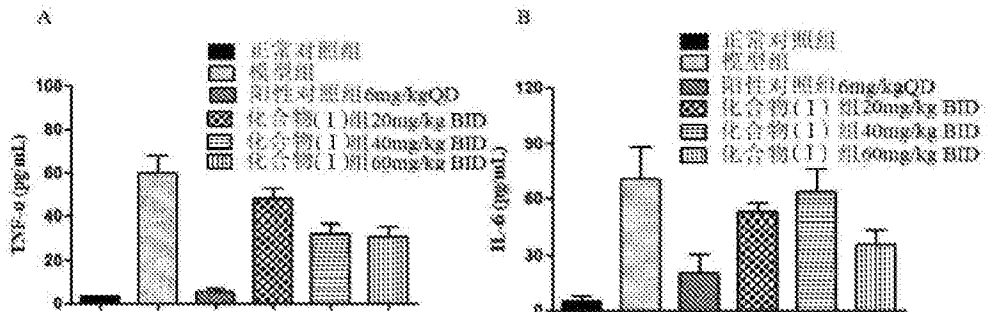


图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/079887

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61P 37/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 17/06(2006.01)i; A61K 31/5383(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, EPODOC, CNPAT, CAPLUS(STN), REG(STN), BAIDU: 免疫, 银屑病, 狼疮, 石药, JAK, SYK, ?immun?, psoriasis?, lupus, SYHX1901, 2230362-95-3, 2230362-69-1, 结构式检索, structural formula search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018108084 A1 (HANGZHOU INNOGATE PHARMA. CO. LTD.) 21 June 2018 (2018-06-21) see pp. 2, 9, 12, and 16-17	1, 4-10
A	CN 102066340 A (PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC.) 18 May 2011 (2011-05-18) see description, pp. 1 and 91, and claims 68-72	1-10
A	CN 103003281 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 27 March 2013 (2013-03-27) see abstract and claim 20	1-10
A	CN 102812029 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.) 05 December 2012 (2012-12-05) see abstract and claim 19	1-10
A	CN 102066339 A (PORTOLA PHARMACEUTICALS INC.) 18 May 2011 (2011-05-18) see claims 78-82	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 May 2022		Date of mailing of the international search report 07 June 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claim 8 relates to a method for treating a human/animal body. The present search report is formed on the basis of a corresponding pharmaceutical use of the claimed compound.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/079887

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018108084	A1	21 June 2018	EP	3553064	A1	16 October 2019
				US	2019308993	A1	10 October 2019
				CN	109153687	A	04 January 2019
				CN	113603707	A	05 November 2021
				CN	110746443	A	04 February 2020
				US	2020354376	A1	12 November 2020
				JP	2020503378	A	30 January 2020
				CN	110734454	A	31 January 2020
CN	102066340	A	18 May 2011	KR	20100126863	A	02 December 2010
				HR	P20161310	T1	02 December 2016
				MA	32280	B1	02 May 2011
				DO	P2010000310	A	15 March 2011
				JP	2015078194	A	23 April 2015
				SV	2010003706	A	23 March 2011
				HN	2010002119	A	17 June 2013
				CA	2723205	A1	03 December 2009
				MY	155639	A	13 November 2015
				EP	2321283	A1	18 May 2011
				JP	2011518158	A	23 June 2011
				EA	201001619	A1	30 June 2011
				CA	2960692	A1	03 December 2009
				WO	2009145856	A1	03 December 2009
				CN	103003281	A	27 March 2013
AR	081204	A1	04 July 2012				
MX	325698	B	26 November 2014				
US	2014155376	A1	05 June 2014				
US	2011288067	A1	24 November 2011				
WO	2011144585	A1	24 November 2011				
RU	2012152352	A	27 June 2014				
KR	20130083386	A	22 July 2013				
JP	2013529204	A	18 July 2013				
BR	112012029437	A2	07 March 2017				
EP	2571880	A1	27 March 2013				
MX	2012013378	A	24 January 2013				
CN	102812029	A	05 December 2012				
				WO	2011117160	A1	29 September 2011
				KR	20130004342	A	09 January 2013
				EP	2550274	A1	30 January 2013
				BR	112012023752	A2	24 September 2019
				TW	201136936	A	01 November 2011
				CA	2786402	A1	29 September 2011
				MX	2012010610	A	03 October 2012
				AR	080699	A1	02 May 2012
				RU	2012142550	A	27 April 2014
				JP	2013522337	A	13 June 2013
				CN	102066339	A	18 May 2011
JP	2015091806	A	14 May 2015				
KR	20160088433	A	25 July 2016				
SG	2014015085	A	27 June 2014				
CR	11793	A	07 March 2011				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/079887

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CN 104230911 A	24 December 2014
		EP 2323993 A2	25 May 2011
		KR 20100132550 A	17 December 2010
		VN 29259 A1	25 April 2012
		JP 2011518157 A	23 June 2011
		SG 165655 A1	29 November 2010
		DO P2010000309 A	15 March 2011
		KR 20170051521 A	11 May 2017
		SV 2010003705 A	23 March 2011
		CA 2728893 A1	12 November 2009
		MX 315135 B	07 November 2013
		WO 2009136995 A2	12 November 2009

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/079887

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61P 37/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 17/06(2006.01)i; A61K 31/5383(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61P A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>WPI, EPDOC, CNPAT, CAPLUS(STN), REG(STN), Baidu:免疫, 银屑病, 狼疮, 石药, JAK, SYK, ?immun?, psoriasis?, lupus, SYHX1901, 2230362-95-3, 2230362-69-1, 结构式检索</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2018108084 A1 (HANGZHOU INNOGATE PHARMA. CO. LTD.) 2018年6月21日 (2018 - 06 - 21) 参见第2、9、12、16-17页</td> <td>1, 4-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102066340 A (波托拉医药品公司) 2011年5月18日 (2011 - 05 - 18) 参见说明书第1、91页和权利要求第68-72项</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103003281 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2013年3月27日 (2013 - 03 - 27) 参见摘要和权利要求第20项</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102812029 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司等) 2012年12月5日 (2012 - 12 - 05) 参见摘要和权利要求第19项</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102066339 A (波托拉医药品公司) 2011年5月18日 (2011 - 05 - 18) 参见权利要求第78-82项</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2018108084 A1 (HANGZHOU INNOGATE PHARMA. CO. LTD.) 2018年6月21日 (2018 - 06 - 21) 参见第2、9、12、16-17页	1, 4-10	A	CN 102066340 A (波托拉医药品公司) 2011年5月18日 (2011 - 05 - 18) 参见说明书第1、91页和权利要求第68-72项	1-10	A	CN 103003281 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2013年3月27日 (2013 - 03 - 27) 参见摘要和权利要求第20项	1-10	A	CN 102812029 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司等) 2012年12月5日 (2012 - 12 - 05) 参见摘要和权利要求第19项	1-10	A	CN 102066339 A (波托拉医药品公司) 2011年5月18日 (2011 - 05 - 18) 参见权利要求第78-82项	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	WO 2018108084 A1 (HANGZHOU INNOGATE PHARMA. CO. LTD.) 2018年6月21日 (2018 - 06 - 21) 参见第2、9、12、16-17页	1, 4-10																		
A	CN 102066340 A (波托拉医药品公司) 2011年5月18日 (2011 - 05 - 18) 参见说明书第1、91页和权利要求第68-72项	1-10																		
A	CN 103003281 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2013年3月27日 (2013 - 03 - 27) 参见摘要和权利要求第20项	1-10																		
A	CN 102812029 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司等) 2012年12月5日 (2012 - 12 - 05) 参见摘要和权利要求第19项	1-10																		
A	CN 102066339 A (波托拉医药品公司) 2011年5月18日 (2011 - 05 - 18) 参见权利要求第78-82项	1-10																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年5月17日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年6月7日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>安玲玲</p> <p>电话号码 86-(10)-53962161</p>																		

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 8
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求8涉及人/动物体的治疗方法，本检索报告是基于所要求保护化合物的相应制药用途做出的。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/079887

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2018108084	A1	2018年6月21日	EP	3553064	A1	2019年10月16日
				US	2019308993	A1	2019年10月10日
				CN	109153687	A	2019年1月4日
				CN	113603707	A	2021年11月5日
				CN	110746443	A	2020年2月4日
				US	2020354376	A1	2020年11月12日
				JP	2020503378	A	2020年1月30日
				CN	110734454	A	2020年1月31日
CN	102066340	A	2011年5月18日	KR	20100126863	A	2010年12月2日
				HR	P20161310	T1	2016年12月2日
				MA	32280	B1	2011年5月2日
				DO	P2010000310	A	2011年3月15日
				JP	2015078194	A	2015年4月23日
				SV	2010003706	A	2011年3月23日
				HN	2010002119	A	2013年6月17日
				CA	2723205	A1	2009年12月3日
				MY	155639	A	2015年11月13日
				EP	2321283	A1	2011年5月18日
				JP	2011518158	A	2011年6月23日
				EA	201001619	A1	2011年6月30日
				CA	2960692	A1	2009年12月3日
				WO	2009145856	A1	2009年12月3日
CN	103003281	A	2013年3月27日	CA	2799904	A1	2011年11月24日
				AR	081204	A1	2012年7月4日
				MX	325698	B	2014年11月26日
				US	2014155376	A1	2014年6月5日
				US	2011288067	A1	2011年11月24日
				WO	2011144585	A1	2011年11月24日
				RU	2012152352	A	2014年6月27日
				KR	20130083386	A	2013年7月22日
				JP	2013529204	A	2013年7月18日
				BR	112012029437	A2	2017年3月7日
				EP	2571880	A1	2013年3月27日
				MX	2012013378	A	2013年1月24日
				CN	102812029	A	2012年12月5日
WO	2011117160	A1	2011年9月29日				
KR	20130004342	A	2013年1月9日				
EP	2550274	A1	2013年1月30日				
BR	112012023752	A2	2019年9月24日				
TW	201136936	A	2011年11月1日				
CA	2786402	A1	2011年9月29日				
MX	2012010610	A	2012年10月3日				
AR	080699	A1	2012年5月2日				
RU	2012142550	A	2014年4月27日				
JP	2013522337	A	2013年6月13日				
CN	102066339	A	2011年5月18日	MA	32442	B1	2011年7月3日
				JP	2015091806	A	2015年5月14日
				KR	20160088433	A	2016年7月25日
				SG	2014015085	A	2014年6月27日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/079887

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CR 11793 A	2011年3月7日
		CN 104230911 A	2014年12月24日
		EP 2323993 A2	2011年5月25日
		KR 20100132550 A	2010年12月17日
		VN 29259 A1	2012年4月25日
		JP 2011518157 A	2011年6月23日
		SG 165655 A1	2010年11月29日
		DO P2010000309 A	2011年3月15日
		KR 20170051521 A	2017年5月11日
		SV 2010003705 A	2011年3月23日
		CA 2728893 A1	2009年11月12日
		MX 315135 B	2013年11月7日
		WO 2009136995 A2	2009年11月12日