



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107108508 B

(45)授权公告日 2020.09.01

(21)申请号 201580072308.X

(22)申请日 2015.12.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107108508 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(30)优先权数据
1422469.5 2014.12.17 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.07.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/080022 2015.12.16

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/097001 EN 2016.06.23

(73)专利权人 皮姆科2664有限公司
地址 英国大伦敦

(72)发明人 斯蒂芬·艾伦·史密斯
利萨·帕特尔
艾恩·罗伯特·格雷格

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
C07D 213/85(2006.01)
C07C 311/20(2006.01)

(56)对比文件
WO 2010032009 A1,2010.03.25
WO 2008114022 A1,2008.09.25
WO 2010032010 A1,2010.03.25

审查员 解晓妮

权利要求书2页 说明书54页 附图1页

(54)发明名称

N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-苯基-苯磺酰胺和N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-(2-吡啶基)-苯磺酰胺化合物及其治疗用途

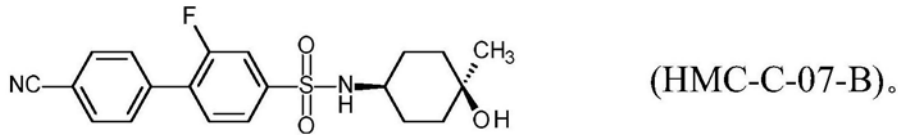
(57)摘要

本发明一般涉及治疗性化合物的领域。更具体地说,本发明涉及某些取代的N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-苯基-苯磺酰胺和N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-(2-吡啶基)苯磺酰胺化合物(在本文中统称为HMC化合物),其可用于例如治疗包括以下的病症(例如疾病):炎症和/或关节破坏和/或骨质疏松;由免疫系统的过度或/或不当和/或延长激活所介导的病症;炎性和自身免疫病症,例如类风湿性关节炎;银屑病;银屑病性关节炎;慢性阻塞性肺病(COPD);哮喘;动脉粥样硬化;炎性肠病;强直性脊柱炎;多发性硬化症;全身性红斑狼疮;舍格伦氏综合征;与骨质疏松有关的病症,如在类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病或佩吉特氏病中与过度的破骨细胞活性有关的骨质疏松;癌症,如血液恶性肿瘤,如多发性骨髓瘤、白血病或淋巴瘤,或实体

肿瘤癌症,如膀胱癌、乳腺癌(女性和/或男性)、结肠癌、肾细胞癌、肾癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、脑癌、皮肤癌、甲状腺癌、基底细胞型成釉细胞瘤或黑色素瘤;与纤维化有关的病症,如全身性硬化或硬皮病;或罕见的血管炎,如贝切特氏病。本发明还涉及包含所述化合物的药物组合物,及所述化合物和组合物在例如疗法中的用途。

CN 107108508 B

1. 下式化合物,或其药学上可接受的盐:



2. 一种组合物,其包含根据权利要求1所述的化合物及药学上可接受的载体或稀释剂。

3. 一种制备组合物的方法,所述方法包括将根据权利要求1所述的化合物与药学上可接受的载体或稀释剂混合的步骤。

4. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
类风湿性关节炎。

5. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
银屑病。

6. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
银屑病性关节炎。

7. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
慢性阻塞性肺病。

8. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
哮喘。

9. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
动脉粥样硬化。

10. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
炎性肠病。

11. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
强直性脊柱炎。

12. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
多发性硬化症。

13. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
全身性红斑狼疮。

14. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
舍格伦氏综合征。

15. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
与骨质疏松有关的病症。

16. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
在类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病或佩吉特氏病中与过度的破骨细胞活性有关的骨质疏松。

17. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
与IL-6的过度产生有关的癌症。

18. 根据权利要求17所述的化合物的用途,其中所述癌症为:
血液恶性肿瘤。

19. 根据权利要求17所述的化合物的用途,其中所述癌症为:

多发性骨髓瘤。

20. 根据权利要求17所述的化合物的用途,其中所述癌症为:
白血病。

21. 根据权利要求17所述的化合物的用途,其中所述癌症为:
淋巴瘤。

22. 根据权利要求17所述的化合物的用途,其中所述癌症为:
实体肿瘤癌症。

23. 根据权利要求17所述的化合物的用途,其中所述癌症为:
膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、脑癌、皮肤癌、甲状腺癌、
基底细胞型成釉细胞瘤或黑色素瘤。

24. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
与IL-6的过度产生有关的纤维化。

25. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
全身性硬化。

26. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
硬皮病。

27. 根据权利要求1所述的化合物在制造用于治疗以下的药剂中的用途:
贝切特氏病。

N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-苯基-苯磺酰胺和N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-(2-吡啶基)-苯磺酰胺化合物及其治疗用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请涉及2014年12月17日提交的联合王国专利申请号1422469.5,该专利内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及治疗性化合物的领域。更具体地说,本发明涉及某些取代的N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-苯基-苯磺酰胺和N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-(2-吡啶基)苯磺酰胺化合物(在本文中统称为HMC化合物),其可用于例如治疗包括以下的病症(例如疾病):炎症和/或关节破坏和/或骨质疏松;由免疫系统的过度或不当和/或延长激活所介导的病症;炎性和自身免疫病症,例如类风湿性关节炎;银屑病;银屑病性关节炎;慢性阻塞性肺病(COPD);哮喘;动脉粥样硬化;炎性肠病;强直性脊柱炎;多发性硬化症;全身性红斑狼疮;舍格伦氏综合征(Sjogren's syndrome);与骨质疏松有关的病症,如在类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病或佩吉特氏病(Paget's disease)中与过度的破骨细胞活性有关的骨质疏松;癌症,如血液恶性肿瘤,如多发性骨髓瘤、白血病或淋巴瘤、或实体肿瘤癌症,如膀胱癌、乳腺癌(女性和/或男性)、结肠癌、肾细胞癌、肾癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、脑癌、皮肤癌、甲状腺癌、基底细胞型成釉细胞瘤或黑色素瘤;与纤维化有关的病症,如全身性硬化或硬皮病;或罕见的血管炎,如贝切特氏病(Behçet's disease)。本发明还涉及包含所述化合物的药物组合物,及所述化合物和组合物在例如疗法中的用途。

[0004] 背景

[0005] 在本文中引用的许多出版物是为了更充分地描述并公开本发明以及本发明所属的技术领域。这些出版物各自以引用的方式整体并入本公开中,其程度如同指出每个个别出版物具体和分别以引用的方式并入一般。

[0006] 除非文中另外要求,否则在本说明书全文中,包括之后的权利要求,词语“包含/包括(comprise)”及变型如“包含/包括(comprises)”和“包含/包括(comprising)”应理解为意指包括所述整数或步骤或整数或步骤的组,而不是排除任何其它整数或步骤或整数或步骤的组。

[0007] 必须指出,除非文中另外清楚陈述,否则如说明书和所附权利要求书中所用,单数形式“一”、“一个”及“所述”包括复数个指示物。因此,例如,“药物载体”包括两种或更多种此类载体的混合物等。

[0008] 范围在本文中常表达为从“约”一个具体值和/或至“约”另一个具体值。当表达这样的范围时,另一实施方案包括从一个具体值和/或至另一个具体值。类似地,当通过利用先行词“约”将数值表示为近似值时,应了解所述具体值形成另一个实施方案。

[0009] 本公开包括可对理解本发明有用的信息。这并不是承认,本文所提供的任何信息是现有技术或与正要求保护的发明相关,或者被明确地或含蓄地引用的任何出版物是现有

技术。

[0010] 慢性炎症性疾病

[0011] 炎症是由于身体受伤所致的组织的免疫应答。急性炎症是在身体受伤或感染之后保护并治愈身体的正常保护反应,其表征为在受伤部位处的加热、肿胀和发红。然而,如果炎症持续较长时间,那么其将变为慢性。慢性炎症是包括以下的一系列疾病病状的标志和影响因素:类风湿性关节炎、炎性肠病、全身性红斑狼疮、多发性硬化症及银屑病。

[0012] 炎症过程是复杂的并且涉及分子和细胞信号的生物级联,其可改变生理反应。在受伤部位处,细胞释放分子信号如细胞因子和白介素,它们在受累及的区域中引起许多变化,包括血管扩张、血流增加、血管通透性提高、白细胞(leukocytes/white blood cells)侵入、以及含有蛋白质像免疫球蛋白(抗体)的体液的渗出。若干不同类型的白细胞,包括粒细胞、单核细胞及淋巴细胞,参与了炎症级联。然而,慢性炎症主要由单核细胞和长寿的巨噬细胞介导;单核细胞一旦离开血流并进入组织便成熟为巨噬细胞。巨噬细胞吞没并消化微生物、外源侵入物及衰老的细胞并且巨噬细胞释放若干不同的化学介质,包括肿瘤坏死因子- α (TNF α)、白介素(例如IL-1、IL-6、IL-12及IL-23)以及使炎症反应长存的前列腺素。在稍后阶段,其它细胞(包括淋巴细胞)侵袭受累及的组织。

[0013] 因此,在广泛多种慢性炎症病状中存在共同的病理学。另外,在包括癌症和代谢疾病如肥胖和糖尿病的其它疾病中也观察到慢性炎症的特征。

[0014] 最常见的慢性炎症病状之一是类风湿性关节炎(RA),一种影响全世界高达2%人群的病状。虽然它是一种复杂的疾病,但存在与RA进展有关的许多生理学、细胞学及生物化学因素,这是一系列其它疾病所共有的,包括具有自身免疫性(例如多发性硬化症)、炎症(例如动脉粥样硬化和癌症)、骨质疏松(例如骨质疏松症)及增殖(例如血液恶性肿瘤)组分的那些疾病。这使得对于RA的理解不仅对于更广泛疾病的研究是重要的,而且提示经由这些共同过程的修改起作用的药物试剂可具有除RA外的效用。后者通过临床实践来证实,其中RA药物已显示在多种其它病状中具有广泛效用。

[0015] 类风湿性关节炎及相关自身免疫/炎症性疾病

[0016] 类风湿性关节炎(RA)是特征为多个关节的滑膜内衬的慢性炎症联合进行性关节退化的自身免疫病症。RA一般累及腕关节和手关节并且还可累及肘、肩、臀、颈及膝,导致严重的疼痛和残疾(参见,例如Scott等人,2010)。世界卫生组织预测有2370万人患有RA,其发病率的不断提高是由于病状与不断增加的年龄之间的相关性。

[0017] RA的确切病因就所有自身免疫病症来说仍不清楚,不过可能的触发包括降低的自体耐受性、对环境因素的异常反应、感染因子及激素刺激(参见,例如Klareskog等人,2006; Firestein等人,2005)。

[0018] 在细胞水平下,RA的发展通常从T细胞浸润内衬受累关节的滑膜开始;这随后经由细胞-细胞接触及包括以下的各种细胞因子的后续释放造成单核细胞、巨噬细胞及滑膜成纤维细胞的激活:肿瘤坏死因子- α (TNF α)和促炎性白介素如IL-1、IL-6、IL-12及IL-23(参见,例如Astry等人,2011)。这些促炎性细胞因子随后帮助协调若干复杂的信号转导级联,包括NF κ B、干扰素调节因子(IRF)、Toll样受体(TLR)及Jak/STAT途径(参见,例如Malemud等人,2010),这造成了编码各种产物的基因的诱导,所述产物传播炎症反应并且还促进组织破坏。这些产物包括组织降解酶,如胶原酶、基质金属蛋白酶(MMP)、组织蛋白酶及其它促炎

性因子,如选择素、整联蛋白、白细胞三烯、前列腺素、趋化因子及其它细胞因子(参见,例如McInnes等人,2007;Smolen等人,2003)。另外,这些细胞还增加MMP的产生,从而造成胞外基质的降解及关节内软骨的丢失(参见,例如Sun,2010),即一种还涉及被称为破骨细胞的专门类别的细胞和被称为核因子 κ -B配体的受体活化剂(RANKL)的因子的过程(参见,例如Takayanagi,2009)。

[0019] RANKL为破骨细胞生成的关键因子,并且上调的RANKL产生造成破骨细胞分化增加且最终导致骨质破坏(参见,例如Long等人,2012)。RA中的炎性反应造成淋巴细胞、树突细胞及巨噬细胞的积聚,所有都在局部工作以产生细胞因子及其它促炎性介质如TNF α 和IL-6,这将进一步强化RANKL对骨质破坏的影响。另外,炎性级联导致滑膜细胞的增生(参见,例如Takayanagi,2009),这又造成滑膜的增厚和血管化直至被称为血管翳的破坏性和侵袭性组织。血管翳含有破坏骨骼的破骨细胞和参与了软骨破坏的金属蛋白酶。因而,RANKL轴对于RA的进展和病理以及骨免疫系统(免疫系统与骨骼系统之间的相互作用)来说很关键,骨免疫系统对如下所述的许多不同疾病病状的病理极为重要。

[0020] TNF α 在RA中的作用

[0021] TNF受体和配体超家族在炎症与相关局部和全身骨质疏松的因果关系起关键作用。TNF α 是有效的促炎性因子,其调节巨噬细胞功能的许多方面。它在创伤、感染或暴露于源自细菌的LPS之后快速释放并且已被证明是发炎组织中最丰富的早期介质之一。在它的各种功能中尤其是其在协调促炎性细胞因子级联的产生中的重要作用。除促炎性细胞因子之外,TNF α 还增加脂质信号转导介质如前列腺素。基于这些作用,已提出TNF α 作为炎性细胞活化和募集中重要参与者,并且提示其在包括类风湿性关节炎的许多慢性炎症性疾病的发展中的关键作用(参见,例如Liu,2005;Feldmann等人,2001;Brennan等人,1996;Brennan等人,1992)。TNF α 在RA中的重要性通过以下研究结果得到突显:阻断TNF α 的抗体可以预防RA的动物模型中的炎症,并且抗TNF α 疗法是目前用于RA的最有效治疗(参见,例如Pisetsky,2012及下文提供的更多细节)。

[0022] TNF α 自身引发信号传导级联,从而造成转录因子NF κ B和AP-1的活化(参见,例如Parameswaran等人,2010)。TNF α 和IL-1与其各自受体的结合造成下游信号转导子(称为TRAF)的募集。由TRAF募集其它激酶,并且所生成的激酶复合物激活MAP-激酶途径,最终造成AP-1的活化和I κ B激酶的磷酸化。I κ B是NF κ B的抑制剂,其通过防止NF κ B向核中易位而起作用。通过I κ B激酶使I κ B磷酸化造成I κ B的降解。I κ B一旦降解,NF κ B便迁移到核中,在核中其促进凋亡抑制基因的转录,凋亡抑制基因促进T细胞和B细胞的存活,由此延长免疫应答。炎症应答的此延长对RA的慢性性质极为重要。NF κ B活化的重要性通过以下事实来证明:抑制肽对NF κ B活性的抑制可预防RA动物模型中的关节炎(参见,例如Jimi等人,2004)。

[0023] 在类风湿性关节炎中的其它关键因子

[0024] 如上所述,除TNF α 和NF κ B之外的许多因子也用于促进RA及其它慢性炎症性疾病中的炎症。其中尤其是IL-6和干扰素调节因子(IRF)。

[0025] 白细胞介素-6(IL-6)是促炎性细胞因子,在RA的炎症期间,各种免疫系统细胞(主要是巨噬细胞和T细胞)一旦被激活,IL-6的水平便升高。其经由在急性期反应中的关键作用在疾病中具有多效性作用并且深入参与了控制从急性向慢性炎症的过渡。这是通过改变炎症空间中的白细胞浸润物的组成,将其从嗜中性白细胞移至单核细胞/巨噬细胞来完成

(参见,例如Gabay,2006)。另外,IL-6对T和B细胞发挥刺激效应,由此促进慢性炎症反应,并对破骨细胞发挥刺激效应,由此促进骨转换。这些效应牵涉于除RA外的广泛多种自身免疫/炎症疾病的病理中,包括全身性红斑狼疮、动脉粥样硬化、银屑病、银屑病性关节炎、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、舍格伦氏综合征、动脉粥样硬化及炎性肠病,以及牵涉于如多发性骨髓瘤和前列腺癌的癌症中。另外,IL-6与以下疾病有牵连:涉及骨质疏松的疾病(例如骨质疏松症)、由纤维化介导的疾病(例如全身性硬化)、糖尿病、移植排斥、各种癌症(包括例如多发性骨髓瘤、淋巴瘤、前列腺癌)、神经变性疾病(例如阿尔茨海默氏病(Alzheimer's))、精神障碍(例如抑郁症)、以及某些罕见的脉管炎(例如贝切特氏病)。关于全部综述,参见,例如Rincon,2012。

[0026] 干扰素调节因子(IRF)是由转录因子家族组成,这些转录因子在健康和疾病中细胞反应的转录调控中具有多种功能。IRF通常在N末端中含有DNA结合结构域,其中大多数成员还含有介导蛋白质-蛋白质相互作用的C末端IRF相关结构域。已在哺乳动物中鉴别了十个IRF及若干病毒编码的IRF同系物。IRF在免疫应答期间响应于内源性和微生物刺激而被激活,并且选择性和协同性地调节参与多种炎症过程的关键细胞因子和转录因子的表达。举例来说,细菌脂多糖的受体TLR-4的刺激激活信号传导级联,该级联激活了NF κ B和IRF-5,而IRF-7是被涉及STAT转录因子家族的过程激活,这些转录因子同样但独立地被IL-6激活。

[0027] IRF的激活产生许多下游效应,包括巨噬细胞命运的特化(参见,例如Krausgruber等人,2011)、T辅助细胞分化(参见,例如Zhang等人,2012)及B细胞增殖(参见,例如Minamino等人,2012)。在疾病中的这些不同作用是由来自动物敲除模型的数据突出,其显示了例如响应于炎症刺激的降低水平的IL-6和TNF α (参见,例如Takaoka等人,2005)。

[0028] 除如上所述的IRF的生物作用之外,若干IRF家族成员还在遗传上与对炎症病状的倾向有关。例如,在IRF-3和IRF-7中的多态性与对全身性红斑狼疮的敏感性有关(参见,例如Akahoshi等人,2008;Fu等人,2011)。另外,控制巨噬细胞命运的IRF-5与对RA、全身性红斑狼疮、眶坏死性肉芽肿病、舍格伦氏综合征及全身性硬化的敏感性有关(参见,例如Sharif等人,2012;Hu等人,2011)。

[0029] 类风湿性关节炎的治疗

[0030] RA的早期疗法集中在对疾病症状的控制,主要通过减轻炎症,而非延迟疾病进展实现。这些药物包括NSAID,如阿斯匹林、双氯芬酸及萘普生。炎症进一步受到糖皮质激素的控制,并且它们与NSAID的组合提供对炎症相当有效的短期控制。近年来,治疗RA的更侵袭性手段已被引入,从疾病发作开始,使用所谓的疾病改善抗风湿药物(DMARD),该药物用于减缓或甚至预防疾病进展。这包括许多旧药,包括金盐;柳氮磺胺吡啶;抗疟药如羟氯奎;D-青霉胺;免疫抑制剂如霉酚酸、咪唑硫嘌呤、环孢菌素A、他克莫司和雷帕霉素;米诺环素;来氟米特;且最重要的是氨甲蝶呤(参见,例如Smolen等人,2003)。

[0031] 氨甲蝶呤现在是用于临床试验比较的金标准疗法,并且一般与更新的疗法组合使用。其在大部分患者中是有效的,与上述所有试剂一样,具有显著的胃肠道副作用,这致使大致50%患者最终必须停止治疗(参见,例如Mount等人,2005)。这些较陈旧的DMARD的另一缺点是药物开始起作用所花费的时间长度,范围从数周(氨甲蝶呤)至数月(金盐)。虽然完全缓解仅发生在约四分之一的患者中,但对于显示无效的那些,一般可能终止治疗,而不会遭受更剧烈的疾病反弹的风险(参见,例如Smolen等人,2003)。

[0032] 近年来,RA的治疗已通过靶向特定炎性途径的生物制剂的出现而彻底改变。若干生物制剂目前被批准用于RA中,包括抗IL-6和IL-1生物制剂,如托珠单抗(**Actemra®**)和阿那白滞素(**Kineret®**)(参见,例如Scott等人,2010)。然而,第一且最重要的生物制剂是抗肿瘤坏死因子(抗TNF)疗法。

[0033] 抗TNF α 疗法是用于RA的市场主导治疗。多种抗TNF α 试剂可供使用,包括中和抗体如英夫利昔单抗(**Remicade®**; J&J and Schering Plough)和阿达木单抗(**Humira®**; Abbott);或诱饵受体如依那西普(**Enbrel®**; Amgen and Wyeth),这两者代表了用于RA以及其他疾病如克罗恩氏病(Crohn's disease)和银屑病的经验证且极其有效的治疗。许多其它炎性和自身免疫病症也作为可能的靶标进行了研究。阻断TNF α 的作用的其它手段包括聚乙二醇化抗TNF α 片段赛妥珠单抗(**Cimzia®**, UCB)。所有这些疗法最终用于防止如上所述的TNF α 的下游效应子(包括NF κ B)的激活。然而,尽管有其市场成功,抗TNF α 疗法仍具有许多副作用,包括某些恶性肿瘤如淋巴瘤和严重感染如军团菌属和李斯特菌属的提高风险以及心力衰竭、乙型肝炎再激活及脱髓鞘疾病的提高风险。

[0034] 最终且最近,JAK激酶抑制剂托法替尼(**Xeljanz®**, Pfizer)补充了RA治疗的范围。然而,托法替尼具有许多安全考量,包括严重感染的提高风险以及胃肠穿孔、肝损伤及某些癌症的提高风险,这可能限制其在人类中的运用(参见,例如O' Shea等人,2013)。

[0035] 因此,仍需要对RA及其它炎性疾病的新型和改进疗法的需要,其中尤其关注改进的安全性。

[0036] 骨免疫系统和骨病症

[0037] 骨免疫系统是关于免疫系统与骨骼系统之间结合和相关的相互作用的术语。

[0038] 在正常生理条件下,骨骼系统提供对生命器官的支持、移动、保护,以及用于钙和磷酸盐的矿物贮库。为了实现和适应这些功能,骨骼处于动态平衡中,特征为连续的破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨沉积(参见,例如Karsenty等人,2002)。此生物过程被称为骨“重建”并且以与产生关键的破骨细胞分化因子(包括如上所述的RANKL)的成骨细胞和其降解骨时通过产生成骨细胞介质促进骨形成的破骨细胞结合的方式发生。

[0039] 先天性和适应性免疫细胞经由多种细胞表面和分泌介质发挥对破骨细胞和成骨细胞的作用(参见,例如Takayanagi,2009)。在破骨细胞前体上RANKL受体(RANK)的激活引发了转录变化的级联,这造成破骨细胞的形成和骨吸收所需机构的表达,包括连接至骨、酸分泌及蛋白质水解所需的分子。对破骨细胞分化来说重要的许多转录因子是免疫应答的关键调节物,如NF κ B及激活的T细胞c1的核因子(NFATc1)并且此过程还被参与炎症的因子如TNF α 和IL-6增强。

[0040] 除其在RA的进展和发病机理中的关键作用之外,骨免疫系统还在包括骨质疏松症及其它骨病症和癌症的许多其它疾病中发挥关键作用(参见,例如Dallas等人,2011)。

[0041] 骨质疏松症是一种以骨密度降低、骨组织退化及骨折风险提高为特征的常见疾病。许多因素促成骨质疏松症的发病机理,包括饮食不良、缺乏锻炼、吸烟及过度饮酒。骨质疏松症还与炎性疾病如类风湿性关节炎、内分泌疾病如甲状腺毒症以及某些药物治疗如糖皮质激素的治疗有关而出现。实际上,骨质疏松症相关的脆性骨折代表了可发生在患有风湿性疾病如RA、全身性红斑狼疮及强直性脊柱炎的患者中最重要的并发症之一。

[0042] 骨的佩吉特氏病是一种病因未知的常见病状,其特征为增多的骨转换和杂乱的骨重建,具有破骨细胞和成骨细胞活性提高的区域。虽然佩吉特氏骨通常比正常的骨更致密,但异常结构造成骨骼的机械强度较低,从而导致骨骼变形并且对病理性骨折的易感性增加。

[0043] IL-6、TNF α 及RANKL信号传导已显示在破骨细胞过度活性及后续的骨质疏松增加中发挥重要作用(参见,例如Tanaka等人,2003;Roodman,2006)。影响这些途径的药物的使用已通过以下来验证:完成针对RANKL的单克隆抗体AMG-162 (Denosumab $\text{\textcircled{R}}$, Amgen, 用于治疗骨质疏松症/多发性骨髓瘤)的临床试验以及越来越多的证据表明抗TNF α 和抗IL-6疗法还预防关节炎疾病中的骨质疏松(参见,例如Ogata等人,2012;Billau,2010)。

[0044] 骨免疫系统和癌症

[0045] 许多类型的癌症都会影响骨骼。癌症相关的骨疾病可表现为高钙血症的出现或溶骨性和/或骨硬化性转移的发展。增加的破骨细胞性骨吸收在两种病状的发病机理中都发挥关键作用。虽然几乎任何癌症都可因骨转移而变得复杂,但最常见的来源是多发性骨髓瘤、乳腺癌及前列腺癌。与高钙血症有关的最常见的肿瘤是多发性骨髓瘤、乳腺癌及肺癌。

[0046] 如上所述,RANK/RANKL信号传导是发生在骨骼重建期间的破骨细胞形成和骨吸收必需的。虽然生理水平的RANK/RANKL信号传导刺激乳腺上皮细胞的增殖和细胞存活,但最近显示在这些组织中异常的RANK/RANKL信号传导影响乳腺肿瘤发生的发病和进展并且使用地诺单抗 (Xgeva $\text{\textcircled{R}}$, Amgen) 阻断RANKL信号传导已经证明在预防骨转移的继发性并发症如病理性骨折及在患有乳腺癌的患者的高钙血症中是有效的(参见,例如Steger等人,2011)。

[0047] 阻断RANK/RANKL信号传导的疗法还可减小促骨癌症转移到骨骼的能力。已显示在人上皮肿瘤细胞以及黑色素瘤细胞的表面上经由RANK的信号传导诱导这些肿瘤细胞中的趋化反应,而在黑色素瘤转移的鼠模型中,用中和RANKL受体RANK的骨保护素对小鼠的治疗性处理显著地降低骨骼内而非其它器官内的肿瘤负荷。

[0048] 除在癌症中对RANKL的作用之外,还有越来越多的证据表明NF κ B经由分子如TNF α 的激活在两种血液恶性肿瘤如骨髓瘤和淋巴瘤以及实体肿瘤如乳腺癌、前列腺癌及肺癌的促进和进展中发挥重要作用(参见,例如Baud等人,2009)。而且,越来越意识到炎症和骨免疫系统在癌症中及在对放射疗法和化疗剂的抗性的发展中的作用和重要性。此外,已提出炎症实际上是癌症的基本特征之一(参见,例如Mantovani,2009)。通过防止NF κ B激活改善抗癌治疗的功效因此是加强现有治疗方案的有前景的策略并且目前正处在研究中,最显著地用于多发性骨髓瘤的治疗。

[0049] 在正常细胞凋亡途径中的缺陷也与肿瘤细胞生长的发展和进展以及炎症有牵连。细胞凋亡(程序性细胞死亡)在异常细胞的除去中发挥关键作用;在信号传导级联中的缺陷(通常将造成其诱导)在肿瘤发生中发挥关键作用。放射疗法和许多化疗剂通过引起细胞损伤起作用,这通常将诱导细胞凋亡;在该途径中的缺陷因此还降低这类试剂的有效性。在造成细胞凋亡的信号传导途径中最重要效应分子被称为胱天蛋白酶,其可由许多刺激触发,包括结合至其受体的TNF α 。在编码胱天蛋白酶的基因中的突变见于许多肿瘤类型中,包括胃癌、乳腺癌、肾细胞癌及颈癌,且通常还见于T细胞成淋巴细胞性淋巴瘤和基底细胞成釉细胞瘤中(参见,例如Philchenkov等人,2004)。激活胱天蛋白酶且由此使细胞对细胞凋

亡敏感的化合物作为癌症疗法将极其有效,无论是以单一试剂形式抑或在提高现有癌症化疗和放射疗法的有效性中。

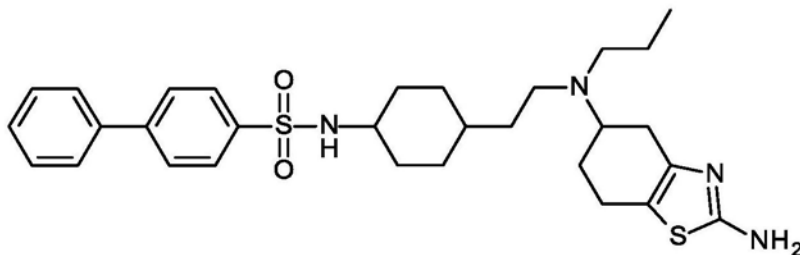
[0050] 预防炎症并破坏骨免疫系统的试剂

[0051] 本发明者已经鉴别了新化合物,其例如预防炎症和/或骨质疏松且由此可用于治疗具有炎性或自身免疫组分的疾病,包括例如类风湿性关节炎、炎性肠病、全身性红斑狼疮、动脉粥样硬化、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、葡萄膜炎、盆腔炎、子宫内膜异位症、银屑病和银屑病性关节炎;涉及骨质疏松的疾病,包括例如与类风湿性关节炎、骨质疏松症、骨的佩吉特氏病和多发性骨髓瘤有关的骨质疏松;以及与NF κ B的激活、与异常的NF κ B信号传导或与炎症或IL-6过度产生有关的癌症,包括血液恶性肿瘤,如多发性骨髓瘤、白血病、T细胞成淋巴细胞性淋巴瘤和其它淋巴瘤(例如非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's Lymphoma)),及实体肿瘤,如膀胱癌、乳腺癌(女性和/或男性)、结肠癌、肾癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌、皮肤癌、甲状腺癌和黑色素瘤;与胱天蛋白酶介导的细胞死亡的失活或损伤有关的癌症,如胃癌、乳腺癌、肾癌、颈癌及基底细胞成釉细胞瘤;与IRF-5的受调节活性有关的病状,包括眶坏死性肉芽肿病和全身性硬化;与IL-6的过度产生有关的纤维化,如全身性硬化或硬皮病;与IL-6过度产生有关的神经变性疾病,如阿尔茨海默氏病;也与IL-6过度产生有关的精神障碍,如抑郁症;与IL-6过度产生有关的血管生成疾病,如年龄相关的黄斑变性和糖尿病性视网膜病、IL-6相关的增生如卡斯尔曼病(Castleman's disease)以及与IL-6过度产生有关的某些罕见脉管炎,如贝切特氏病。

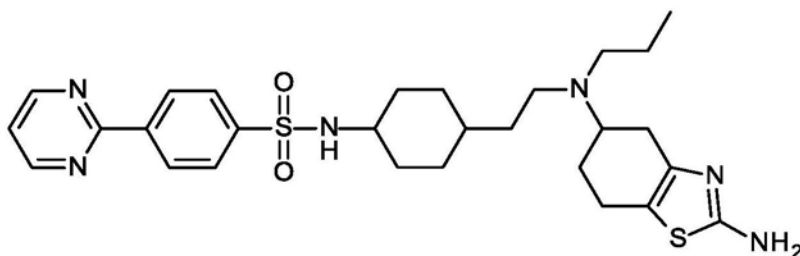
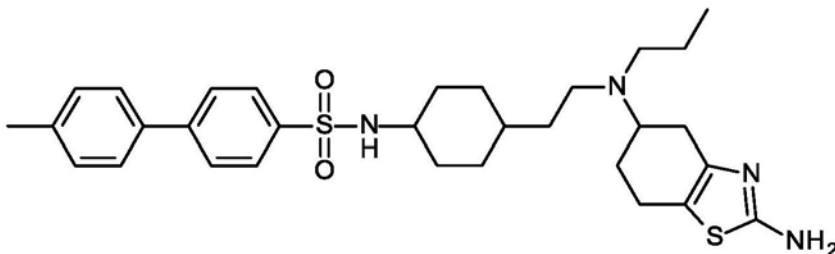
[0052] 不希望受任何特定理论约束,本发明者相信此作用可经由涉及阻断TNF α 和/或RANKL信号传导和/或IRF活性和/或IL-6产生抑制的机制实现。

[0053] 已知化合物

[0054] Wang等人,2010描述了明显为高亲和力和选择性多巴胺D₃受体完全激动剂的某些化合物。其中示出的化合物的实例包括以下(参见,例如其中第18-19页和第48-50页):



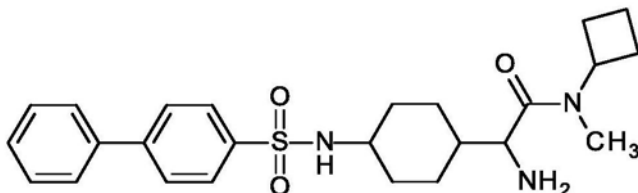
[0055]



[0056] Chen等人,2012描述了类似的化合物。

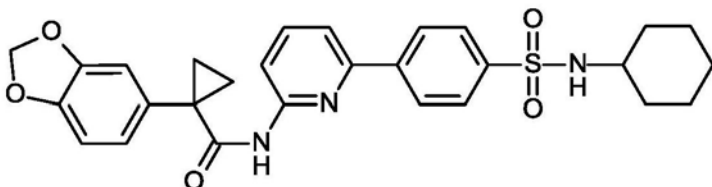
[0057] Tsutsumi等人,2005描述了明显显示了DPP-IV抑制活性且明显可用于治疗II型糖尿病和肥胖的某些化合物。下列化合物显示为其中第192页的实施例89:

[0058]

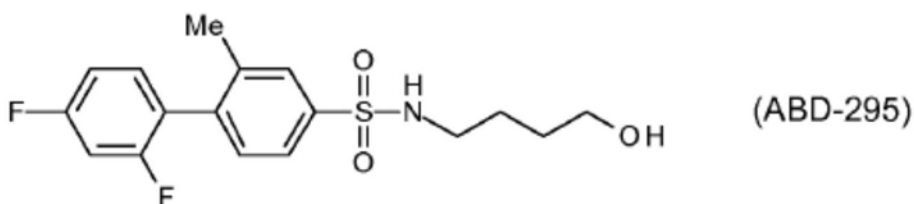
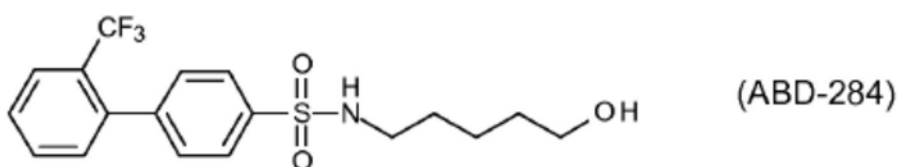
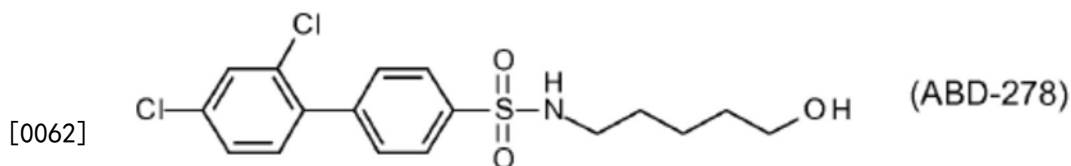
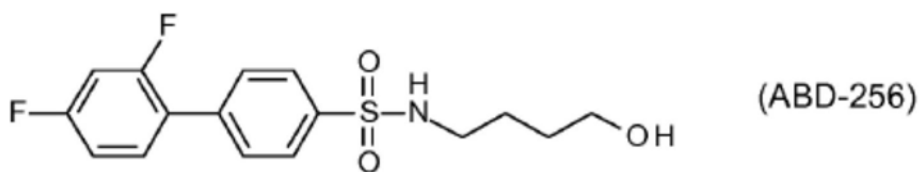
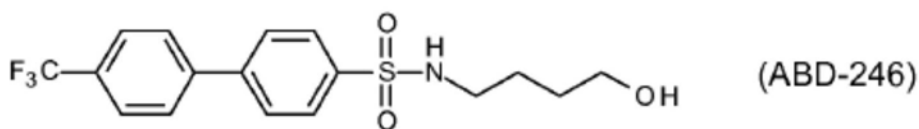


[0059] Hadida等人,2007描述了据说适用作ATP结合盒(“ABC”)转运体或其片段的调节物的某些化合物,包括囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(“CFTR”)。下列化合物显示为其中第77页的实施例208:

[0060]

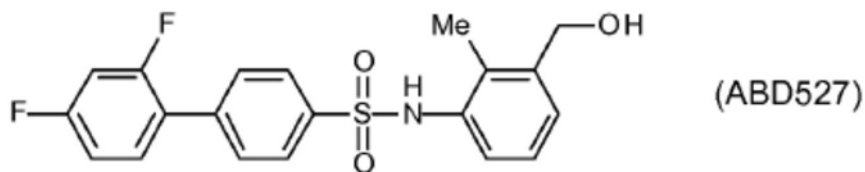
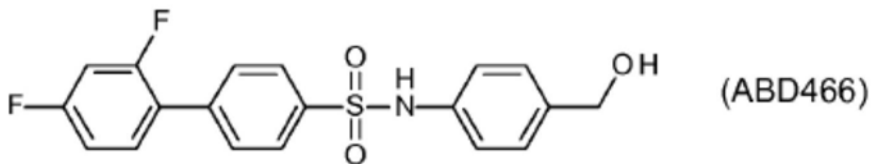
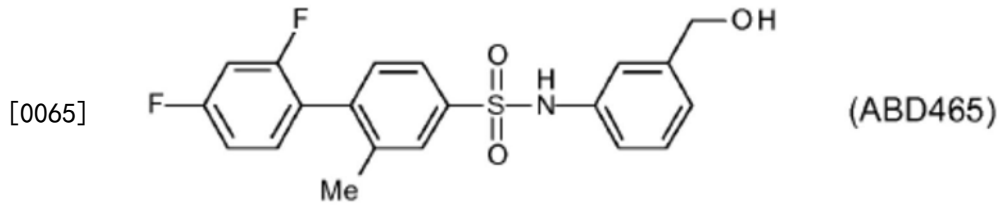
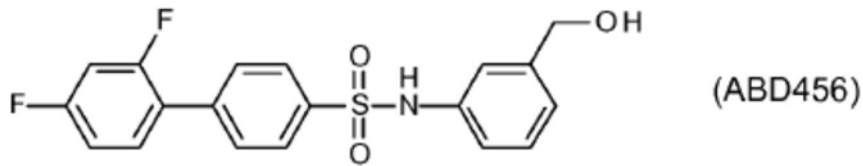
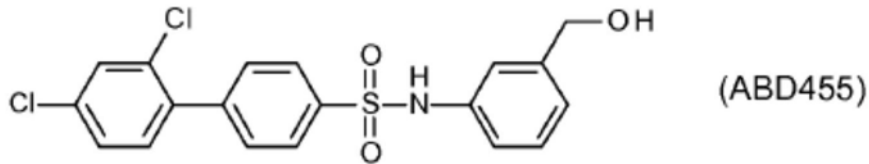


[0061] Ralston等人,2005描述了某些联苯-4-磺酰胺,其是用于:抑制破骨细胞存活、形成和/或活性;抑制由破骨细胞介导和/或由骨吸收表征的病状;治疗骨病症如骨质疏松症、类风湿性关节炎、癌症相关的骨疾病和佩吉特氏病;以及治疗与炎症或免疫系统的激活有关的病状。其中所示化合物的实例包括以下:

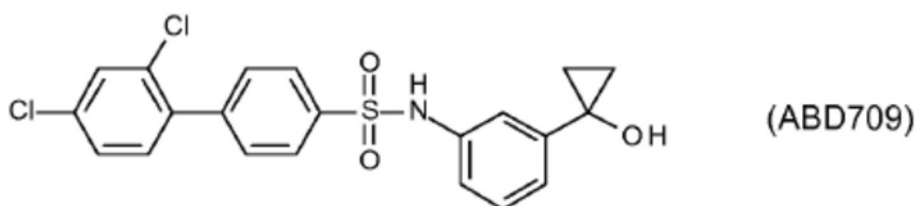
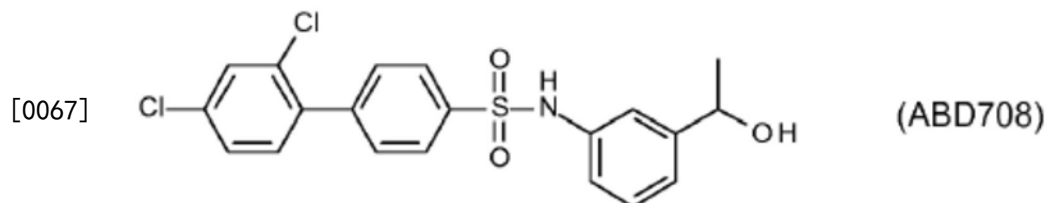
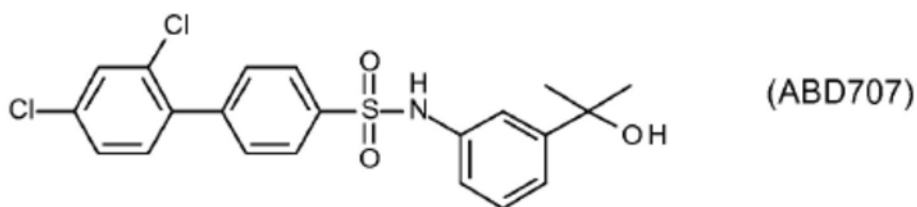


[0063] Greig等人,2006描述了类似的化合物。

[0064] Greig等人,2008描述了某些联苯-4-磺酰胺,其是用于:治疗炎症和/或关节破坏和/或骨质疏松;由免疫系统的过度/或不当和/或延长激活所介导的病症;炎性和自身免疫病症,例如类风湿性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、动脉粥样硬化、炎性肠病和强直性脊柱炎;以及与骨质疏松有关的病症,如在类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病和佩吉特氏病中与过度的破骨细胞活性有关的骨质疏松。其中所示化合物的实例包括以下:

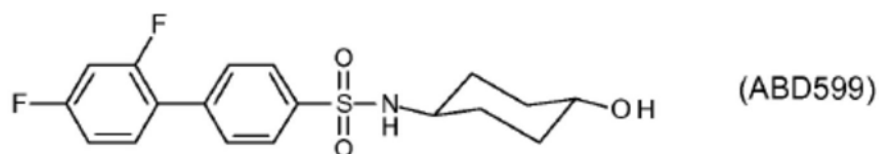


[0066] Greig等人,2010b描述了某些联苯-4-磺酰胺,其是用于:治疗炎症和/或关节破坏和/或骨质疏松;由免疫系统的过度和/或不当和/或延长激活所介导的病症;炎性和自身免疫病症,例如类风湿性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、动脉粥样硬化、炎性肠病和强直性脊柱炎;以及与骨质疏松有关的病症,如在类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病和佩吉特氏病中与过度的破骨细胞活性有关的骨质疏松;以及癌症,如血液恶性肿瘤和实体肿瘤。其中所示化合物的实例包括以下:

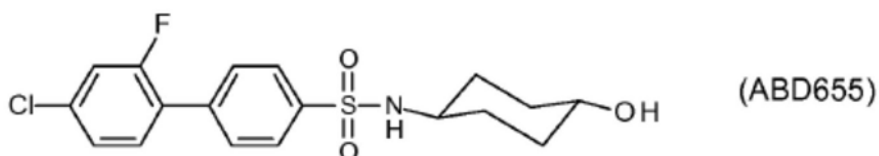


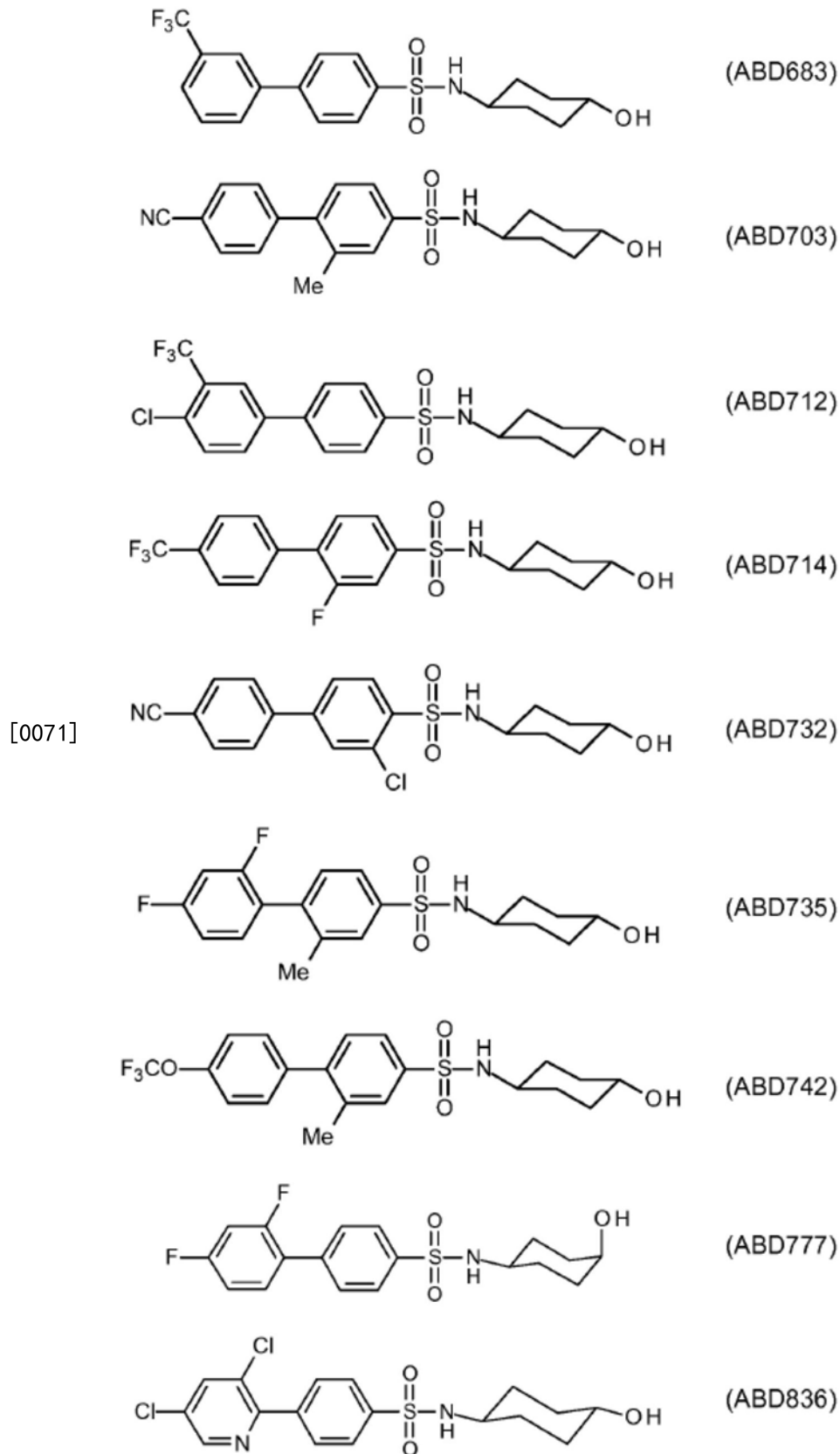
[0068] Greig等人,2013描述了类似的化合物。

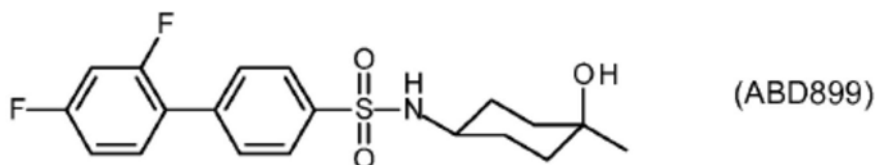
[0069] Greig等人,2010a描述了某些联苯-4-磺酰胺,其是用于:治疗炎症和/或关节破坏和/或骨质疏松;由免疫系统的过度 and/或不当和/或延长激活所介导的病症;炎性和自身免疫病症,例如类风湿性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、动脉粥样硬化、炎性肠病和强直性脊柱炎;与骨质疏松有关的病症,如在类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病和佩吉特氏病中与过度的破骨细胞活性有关的骨质疏松;以及癌症,如血液恶性肿瘤和实体肿瘤。其中所示化合物的实例包括以下:



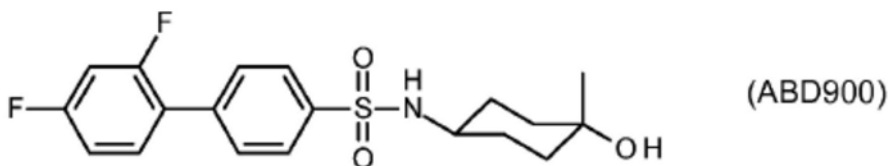
[0070]







[0072]



[0073] 具有改进性质的新化合物

[0074] 本文所述的HMC化合物被保护以免受到存在于已知化合物中的若干毒性不利因素的侵害,特别是Greig等人,2010a中所示的那些并且在疾病模型中显示出改善的功效。

[0075] 不希望受任何特定理论约束,本发明者相信取代基的特定组合及其在联芳基环结构上的位置产生了优越的性质。这些组合保护化合物以免接触见于已知化合物中的一般毒性和心血管安全性不利因素。具体地说,本文所述的HMC化合物基本上受保护以免人Ether- α -go-go相关基因(hERG)的抑制,该基因代表了主要心血管安全性不利因素。

[0076] 如果药物将要用于临床,那么其必须具有合适的安全性和功效模式。其必须显示出足够程度的安全性以允许向人给药,而没有预期的严重一般副作用。临床上可接受的药物还不应抑制hERG,hERG是离子通道,当其受到抑制时,可产生致命性心脏病,被称为长QT综合征。连同这些安全特性,所述药物必须针对生物靶标足够有效以给出所需治疗作用并且其必须具有足够的稳定性以在循环中保持足够久的时间以便到达生物靶标。

[0077] 此外,药物应与酶具有最小的相互作用可能性,所述酶使药物在体内代谢以便:允许药物的稳固递送;使药物影响其它药物代谢(所谓的药物-药物相互作用)的可能性最小;预防可归因于药物-药物相互作用的严重不良反应。后者是评价药物的关键组分并且本文所述的HMC化合物在使归因于其体外代谢模式的可能的药物-药物相互作用最小中显示出显著优势。

[0078] 药物的毒物学性质(副作用)的降低是与药效学(药物对身体的作用)和药代动力学(身体对药物的作用)性质的优化相比同等挑战和重要性的开发障碍。本文所述的HMC化合物通过改善心血管安全性并提供改善的代谢分布而对生物靶标几乎没有或没有效力的变化损失而提供作为经口治疗剂(与已知化合物相比)的巨大优势。

[0079] 本文所述的HMC化合物将用于治疗例如慢性炎性病状、骨质疏松及癌症的试剂的所需特征组合。

发明概要

[0080] 本发明的一方面涉及如本文所述的某些取代的N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-苯基-苯磺酰胺和N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-(2-吡啶基)苯磺酰胺化合物(在本文中统称为HMC化合物)。

[0081] 本发明的另一方面涉及一种组合物(例如药物组合物),其包含如本文所述的HMC化合物及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0082] 本发明的另一方面涉及一种制备组合物(例如药物组合物)的方法,所述方法包括

将如本文所述的HMC化合物与药学上可接受的载体或稀释剂混合的步骤。

[0083] 本发明的另一方面涉及如本文所述的HMC化合物,其是用于通过疗法治疗人体或动物体的方法中,例如,用于治疗如本文所述的病症(例如疾病)的方法。

[0084] 本发明的另一方面涉及如本文所述的HMC化合物的用途,其是用于制造治疗例如如本文所述的病症(例如疾病)的药剂。

[0085] 本发明的另一方面涉及一种治疗例如本文所述的病症(例如疾病)的方法,所述方法包括向需要治疗的患者施用治疗有效量的如本文所述的HMC化合物,优选呈药物组合物的形式。

[0086] 本发明的另一方面涉及一种试剂盒,其包括(a)如本文所述的HMC化合物,优选作为药物组合物提供并且在合适的容器中和/或用合适的包装;和(b)使用说明,例如关于如何施用化合物的书面说明。

[0087] 本发明的另一方面涉及一种可通过如本文所述的合成法获得的HMC化合物或包括如本文所述的合成法的方法。

[0088] 本发明的另一方面涉及一种通过如本文所述的合成法获得的HMC化合物或包括如本文所述的合成法的方法。

[0089] 本发明的另一方面涉及如本文所述的新型中间体,其适用于在本文所述的合成法中使用。

[0090] 本发明的另一方面涉及如本文所述的这种新型中间体在本文所述的合成法中的用途。

[0091] 如本领域技术人员所理解,本发明的一方面的特征和优选实施方案还涉及本发明的其它方面。

[0092] 附图简述

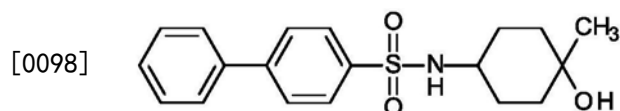
[0093] 图1是以下各组随时间(给药天数)变化的平均关节炎指数的曲线图:对照(实心圆)、参考化合物ABD899(10mg/kg/d)(空心圆)及阳性对照依那西普(三角形)。

[0094] 图2是以下各组随时间(给药天数)变化的平均关节炎指数的曲线图:对照(实心圆)、化合物HMC-C-07-B(0.3mg/kg/d)(空心圆)及化合物HMC-C-07-B(3mg/kg/d)(正方形)。

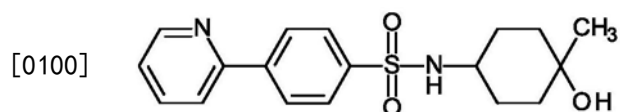
[0095] 发明详述

[0096] 化合物

[0097] 本发明的一方面涉及某些化合物,其可适宜地被描述为取代的N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-苯基-苯磺酰胺和N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-(2-吡啶基)苯磺酰胺化合物。

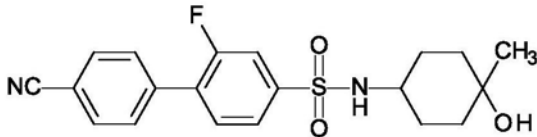
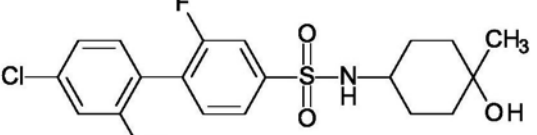
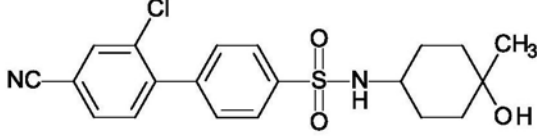
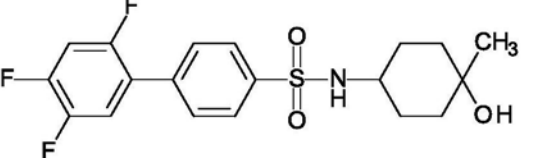
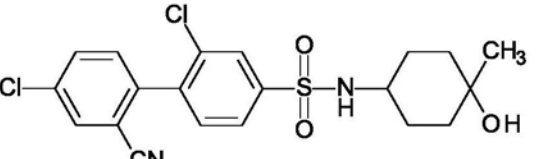
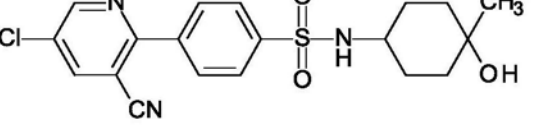


[0099] N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-苯基-苯磺酰胺

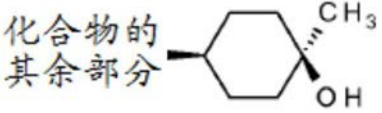
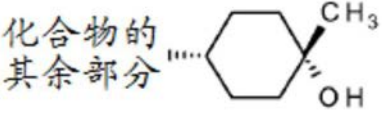
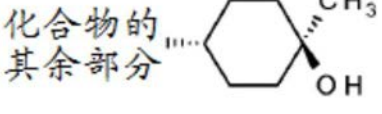
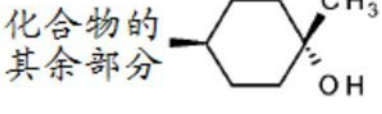


[0101] N-(4-羟基-4-甲基-环己基)-4-(2-吡啶基)苯磺酰胺

[0102] 因此,本发明的一方面是化合物,其选自下式化合物,或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂合物(为方便起见,在本文中统称为“HMC化合物”):

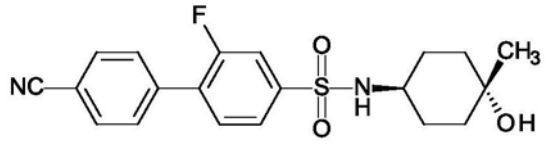
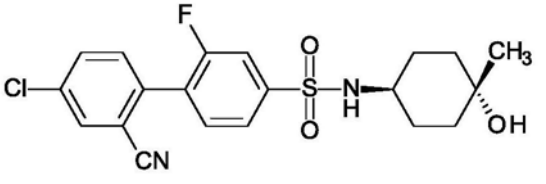
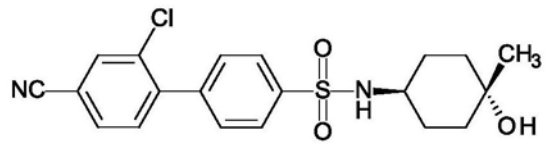
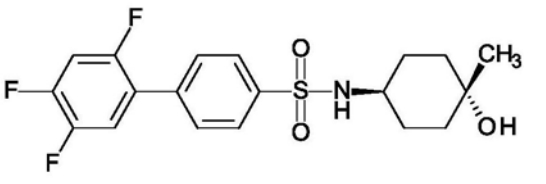
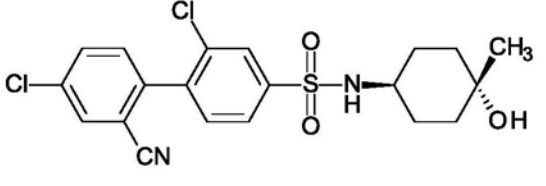
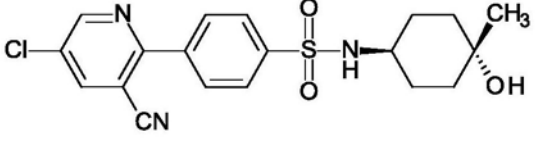
| | | |
|--------|---|----------|
| |  | HMC-C-07 |
| |  | HMC-C-08 |
| [0103] |  | HMC-C-09 |
| |  | HMC-C-10 |
| |  | HMC-C-11 |
| [0104] |  | HMC-N-05 |

[0105] 注意在环己基环的一侧上的取代基(即,在右侧上的-OH和-CH₃)可相对于分子的其余部分定位为“反式”/“顺式”或“顺式”/“反式”(即,在其所连接至的环己基环上,相对于在环己基环的对位处连接的化合物的其余部分)。

| | | |
|--------|--|---|
| [0106] |  <p>化合物的其余部分</p> <p>“顺式-OH”</p> |  <p>化合物的其余部分</p> <p>“顺式-OH”</p> |
| |  <p>化合物的其余部分</p> <p>“反式-OH”</p> |  <p>化合物的其余部分</p> <p>“反式-OH”</p> |

[0107] 除非另外指出,意图是所有这类构象由不指定具体构象的化合物所涵盖。

[0108] 在一个实施方案中,所述化合物呈“反式-OH”构象,如在例如以下化合物中:

| | |
|---|------------|
|  | HMC-C-07-A |
|  | HMC-C-08-A |
|  | HMC-C-09-A |
|  | HMC-C-10-A |
|  | HMC-C-11-A |
|  | HMC-N-05-A |

[0111] 在一个实施方案中,所述化合物呈“顺式-OH”构象,如在例如以下化合物中:

| | | |
|--------|--|------------|
| | | HMC-C-07-B |
| | | HMC-C-08-B |
| [0112] | | HMC-C-09-B |
| | | HMC-C-10-B |
| | | HMC-C-11-B |
| [0113] | | HMC-N-05-B |

[0114] 还注意到环己烷环可采取“椅式”、“船式”或“扭转”构象,并且构象之间的相互转化是可能的。除非另外指出,意图是所有这类构象(例如,“椅式”、“船式”、“扭转”、“OH是轴向的”、“OH是赤道的”等)由不指定具体构象的化合物所涵盖。

[0115] 基本上纯化的形式

[0116] 本发明的一方面涉及如本文所述的HMC化合物,其呈基本上纯化的形式和/或呈基本上不含污染物的形式。

[0117] 在一个实施方案中,基本上纯化的形式为至少50重量%、例如至少60重量%、例如至少70重量%、例如至少80重量%、例如至少90重量%、例如至少95重量%、例如至少97重量%、例如至少98重量%、例如至少99重量%。

[0118] 除非有所指定,基本上纯化的形式是指呈任何构象形式的化合物。举例说来,在一个实施方案中,基本上纯化的形式是指构象形式的混合物,即相对于其它化合物纯化的。在一个实施方案中,基本上纯化的形式是指一种构象形式。在一个实施方案中,基本上纯化的形式是指构象形式的混合物。在一个实施方案中,基本上纯化的形式是指构象形式的等摩尔混合物。

[0119] 在一个实施方案中,污染物占不超过50重量%、例如不超过40%重量%、例如不超

过30%重量%、例如不超过20%重量%、例如不超过10%重量%、例如不超过5%重量%、例如不超过3%重量%、例如不超过2%重量%、例如不超过1重量%。

[0120] 除非有所指定,污染物是指其它化合物,其并非构象形式。在一个实施方案中,污染物是指其它化合物及其它构象形式。

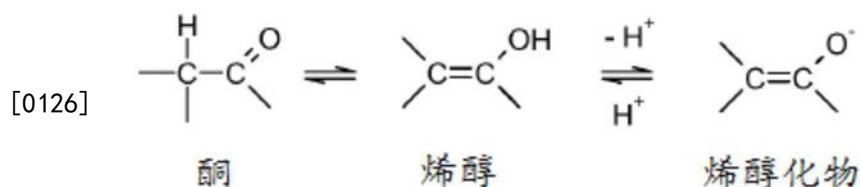
[0121] 在一个实施方案中,基本上纯化的形式是至少60%构象上纯的(即,以摩尔计60%的化合物是所需构象,且40%是不希望有的构象形式)、例如至少70%构象上纯的、例如至少80%构象上纯的、例如至少90%构象上纯的、例如至少95%构象上纯的、例如至少97%构象上纯的、例如至少98%构象上纯的、例如至少99%构象上纯的。

[0122] 异构体

[0123] 某些化合物可以特定的几何、光学、对映异构、非对映异构、差向异构、阻转异构(atropic)、立体异构、互变异构、构象或端基异构形式存在,包括但不限于顺式和反式;E型和Z型;c型和t型和r型;内型和外型;R型、S型和内消旋型;D型和L型;d型和l型;(+)和(-)型;酮式、烯醇式和烯醇化物式;顺式和反式;向斜式和背斜式; α 型和 β 型;轴向式和赤道式;船式、椅式、扭转式、包封式和半椅式;及其组合,在下文统称为“异构体”(或“异构形式”)。

[0124] 对一类结构的提及很可能包括在那类内的结构异构形式(举例来说, C_{1-7} 烷基包括正丙基和异丙基;丁基包括正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基;甲氧苯基包括邻甲氧苯基、间甲氧苯基和对甲氧苯基)。然而,对特定基团或取代型式的提及不意在包括其它结构(或构造)异构体,其区别在于原子之间的关系,而非空间中的位置。举例来说,对甲氧基- OCH_3 的提及不应视为对其结构异构体羟甲基- CH_2OH 的提及。类似地,对邻氯苯基的提及不应视为对其结构异构体间氯苯基的提及。

[0125] 上述排除不涉及互变异构形式,例如,酮式、烯醇式和烯醇化物式,如在例如以下互变异构对中:酮/烯醇(在下文中示出)、亚胺/烯胺、酰胺/亚氨基醇、脘/脘、亚硝基/脞、硫酮/烯硫醇、N-亚硝基/羟基偶氮、及硝基/酸硝基。



[0127] 注意到特别包括在术语“异构体”中的是具有一个或多个同位素取代的化合物。举例来说,H可呈任何同位素形式,包括 1H 、 2H (D)和 3H (T);C可呈任何同位素形式,包括 ^{11}C 、 ^{12}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C ;O可呈任何同位素形式,包括 ^{15}O 、 ^{16}O 和 ^{18}O ;N可呈任何同位素形式,包括 ^{14}N 和 ^{15}N ;F可呈任何同位素形式,包括 ^{18}F 和 ^{19}F 等等。

[0128] 除非另有规定,对具体化合物的提及包括所有这类异构形式,包括其混合物(例如外消旋混合物)。用于制备(例如,不对称合成)和分离(例如,分步结晶和色谱法)这类异构形式的方法是本领域中已知的或者通过改编本文中所教导的方法或以已知方式用已知方法轻易获得。

[0129] 盐

[0130] 可能适宜或者需要制备、纯化和/或处理化合物的相应盐,例如药学上可接受的盐。药学上可接受的盐的实例论述于Berge等人,1977,“Pharmaceutically Acceptable Salts,”J.Pharm.Sci.,第66卷,第1-19页中。

[0131] 例如,如果化合物是阴离子或具有可为阴离子的官能团(例如, $-\text{COOH}$ 可为 $-\text{COO}^-$),那么盐可用合适的阳离子形成。合适的无机阳离子的实例包括但不限于碱金属离子如 Na^+ 和 K^+ 、碱土阳离子如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 、及其它阳离子如 Al^{3+} 。合适的有机阳离子的实例包括但不限于铵离子(即 NH_4^+)和取代的铵离子(例如, NH_3R^+ 、 NH_2R_2^+ 、 NHR_3^+ 、 NR_4^+)。一些合适的取代的铵离子的实例是衍生自以下的那些:乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、氨丁烷、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苯甲基胺、苯基苄基胺、胆碱、甲基葡胺和缓血酸胺,以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。常见的季铵离子的实例是 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 。

[0132] 如果化合物是阳离子或具有可为阳离子的官能团(例如, $-\text{NH}_2$ 可为 $-\text{NH}_3^+$),那么盐可用合适的阴离子形成。合适的无机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下无机酸的那些:盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、亚硝酸、磷酸及亚磷酸。合适的有机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下有机酸的那些:2-乙酰氧基苯甲酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、乙二胺四乙酸、乙二磺酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸(glucelonic)、葡糖酸、谷氨酸、乙醇酸、羧基马来酸、羧基萘羧酸、羧乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、粘液酸、油酸、草酸、棕榈酸、双羧萘酸、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、磺胺酸、酒石酸、甲苯磺酸及戊酸。合适的聚合有机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下聚合酸的那些:丹宁酸、羧甲基纤维素。

[0133] 除非另有规定,对具体化合物的提及还包括其盐形式。

[0134] 溶剂合物和水合物

[0135] 可能适宜或者需要制备、纯化和/或处理化合物的相应溶剂合物。术语“溶剂合物”在本文中以常规含义用于指代溶质(例如化合物、化合物的盐)和溶剂的复合物。如果溶剂是水,那么溶剂合物可适宜地被称为水合物,例如单水合物、二水合物、三水合物等。

[0136] 除非另有规定,对具体化合物的提及还包括其溶剂合物和水合物形式。

[0137] 化学保护形式

[0138] 可能适宜或者需要制备、纯化和/或处理呈化学保护形式的化合物。术语“化学保护形式”在本文中以常规的化学意义使用并且涉及其中一个或多个反应性官能团受保护以免于在特定条件下(例如pH、温度、放射线、溶剂等等)不合需要的化学反应。实际上,公知的化学方法是可逆地用于致使官能团不起反应,否则其将在特定条件下具反应性。在化学保护形式下,一个或多个反应性官能团呈受保护或保护基形式(也称为被掩蔽或掩蔽基团或被封端或封端基团)。通过保护反应性官能团,可进行涉及其它未受保护的官能团的反应,而不会影响受保护基团;保护基可被除去,通常在后续步骤中,而基本上不会影响分子的其余部分。参见,例如Protective Groups in Organic Synthesis(T.Green和P.Wuts;第4版;John Wiley and Sons,2006)。

[0139] 广泛多种这类“保护”、“封端”或“掩蔽”方法被广泛使用并且是有机合成中公知的。举例来说,具有两个非等效反应性官能团(两者都将在特定条件下反应)的化合物可被衍生化以致使其中一个官能团“受保护”且因此在特定条件下不反应;由此被保护,该化合物可用作仅有效地具有一个反应性官能团的反应物。在所需反应(涉及其它官能团)完成之后,受保护基可被“去保护”以使其回到其初始官能团。

[0140] 举例来说,胺基可受保护,例如,作为酰胺($-\text{NRCO}-\text{R}$)或氨基甲酸酯($-\text{NRCO}-\text{OR}$),例如作为:甲基酰胺($-\text{NHCO}-\text{CH}_3$);苄氧基酰胺($-\text{NHCO}-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{NH}-\text{Cbz}$);作为叔丁氧基酰胺

(-NHCO-OC(CH₃)₃, -NH-Boc); 2-联苯-2-丙氧基酰胺(-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅, -NH-Bpoc)、作为9-芴基甲氧基酰胺(-NH-Fmoc)、作为6-硝基藜芦基氧基酰胺(-NH-Nvoc)、作为2-三甲基甲硅烷基乙氧基酰胺(-NH-Teoc)、作为2,2,2-三氯乙氧基酰胺(-NH-Troc)、作为烯丙氧基酰胺(-NH-Alloc)、作为2(-苯磺酰基)乙氧基酰胺(-NH-Psec);或在合适的情况下(例如环胺),作为硝基氧自由基(>N-O●)。

[0141] 前药

[0142] 可能适宜或者需要制备、纯化和/或处理呈前药形式的化合物。如本文所用的术语“前药”是指一种化合物,当其代谢(例如体内)时,产生所需的活性化合物。通常,前药是无活性的,或比所需活性化合物的活性低,但可提供有利的处理、施用或代谢性质。

[0143] 化学合成

[0144] 本文描述了用于HMC化合物的化学合成的方法。这些和/或其它公知方法可以已知方式修改和/或改编以促进本文所述的额外HMC化合物的合成。

[0145] 组合物

[0146] 本发明的一方面涉及一种组合物(例如药物组合物),其包含如本文所述的HMC化合物及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0147] 在一个实施方案中,所述组合物进一步包含一种或多种(例如1、2、3、4种)如本文所述的额外治疗剂。

[0148] 本发明的另一方面涉及一种制备组合物(例如药物组合物)的方法,所述方法包括混合如本文所述的HMC化合物及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0149] 本发明的另一方面涉及一种制备组合物(例如药物组合物)的方法,所述方法包括混合如本文所述的HMC化合物;一种或多种(例如,1、2、3、4种)如本文所述的额外治疗剂;以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0150] 用途

[0151] 如本文所述的HMC化合物可用于例如治疗病症(例如疾病),包括例如本文所述的病症(例如疾病)。

[0152] 在治疗方法中的用途

[0153] 本发明的另一方面涉及如本文所述的HMC化合物,其是用于通过疗法治疗人体或动物体的方法中,例如,用于治疗如本文所述的病症(例如疾病)的方法。

[0154] 本发明的另一方面涉及一种如本文所述的HMC化合物,与一种或多种(例如1、2、3、4种)如本文所述的额外治疗剂组合,其是用于通过疗法治疗人体或动物体的方法中,例如,用于治疗如本文所述的病症(例如疾病)的方法。

[0155] 在药剂制造中的用途

[0156] 本发明的另一方面涉及如本文所述的HMC化合物的用途,其是用于制造治疗例如如本文所述的病症(例如疾病)的药剂。

[0157] 在一个实施方案中,药剂包含HMC化合物。

[0158] 本发明的另一方面涉及如本文所述的HMC化合物和一种或多种(例如1、2、3、4种)如本文所述的额外治疗剂在制造用于治疗例如如本文所述的病症(例如疾病)的药剂中的用途。

[0159] 在一个实施方案中,所述药剂包含HMC化合物和一种或多种(例如1、2、3、4种)额外

的治疗剂。

[0160] 治疗方法

[0161] 本发明的另一方面涉及一种治疗例如本文所述的病症(例如疾病)的方法,所述方法包括向需要治疗的患者施用治疗有效量的如本文所述的HMC化合物、优选呈药物组合物形式。

[0162] 本发明的另一方面涉及一种治疗例如本文所述的病症(例如疾病)的方法,所述方法包括向需要治疗的患者施用治疗有效量的如本文所述的HMC化合物、优选呈药物组合物的形式,和一种或多种(例如1、2、3、4种)如本文所述的额外治疗剂、优选呈药物组合物的形式。

[0163] 所治疗的病状

[0164] 在一个实施方案中,所述治疗为炎性病状或自身免疫病状的治疗。

[0165] 在一个实施方案中,所述治疗为与炎症和/或免疫系统的激活有关的病状的治疗。

[0166] 在一个实施方案中,所述治疗为由免疫系统的过度 and/或不当 and/或延长激活所介导的病状的治疗。

[0167] 在一个实施方案中,所述治疗为炎症的治疗。

[0168] 在一个实施方案中,所述治疗为与炎症或免疫系统的激活有关的病状的治疗。

[0169] 在一个实施方案中,所述治疗为类风湿性关节炎;银屑病;银屑病性关节炎;慢性阻塞性肺病(COPD);哮喘;动脉粥样硬化;炎性肠病;或强直性脊柱炎的治疗。

[0170] 在一个实施方案中,所述治疗为类风湿性关节炎的治疗。

[0171] 在一个实施方案中,所述治疗为银屑病的治疗。

[0172] 在一个实施方案中,所述治疗为银屑病性关节炎的治疗。

[0173] 在一个实施方案中,所述治疗为慢性阻塞性肺病(COPD)的治疗。

[0174] 在一个实施方案中,所述治疗为哮喘的治疗。

[0175] 在一个实施方案中,所述治疗为动脉粥样硬化的治疗。

[0176] 在一个实施方案中,所述治疗为强直性脊柱炎的治疗。

[0177] 在一个实施方案中,所述治疗为炎性肠病的治疗。

[0178] 在一个实施方案中,所述治疗为对造成移植后器官或移植物排斥的免疫应答的预防。

[0179] 在一个实施方案中,所述治疗为其中IRF-5表达或活性异常的炎性病状的预防。

[0180] 在一个实施方案中,所述治疗为过度表达TNF α 、IL-1、IL-6、RANKL和/或NF κ B的肿瘤的治疗。

[0181] 在一个实施方案中,所述治疗为肿瘤的治疗,为此TNF α 、IL-1、RANKL、NF κ B、IRF如IRF-3、-5或-7和/或IL-6表达或活性或信号传导的抑制促进或改善细胞毒性杀肿瘤剂的作用。

[0182] 在一个实施方案中,所述治疗为血液恶性肿瘤的治疗。

[0183] 在一个实施方案中,所述治疗为多发性骨髓瘤的治疗。

[0184] 在一个实施方案中,所述治疗为白血病的治疗;例如,急性成淋巴细胞性白血病。

[0185] 在一个实施方案中,所述治疗为淋巴瘤的治疗;例如,非霍奇金氏淋巴瘤、T细胞淋巴瘤(例如T-成淋巴细胞性淋巴瘤、结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋

巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤)、及B细胞淋巴瘤(例如,霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤)(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关的淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴瘤细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、毛细胞白血病和伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's Lymphoma))。

[0186] 在一个实施方案中,所述治疗为实体肿瘤癌的治疗,例如,膀胱癌、乳腺癌(女性和/或男性)、结肠癌、肾细胞癌、肾癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、脑癌、皮肤癌、甲状腺癌、基底细胞成釉细胞瘤或黑色素瘤。

[0187] 在一个实施方案中,血液恶性肿瘤(例如,多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤等)和实体肿瘤癌(例如,膀胱癌等)与NF κ B的激活、异常的NF κ B信号传导或炎症有关。

[0188] 在一个实施方案中,血液恶性肿瘤(例如,多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤等)和实体肿瘤癌(例如,膀胱癌等)与胱天蛋白酶诱导的失活或受损或异常的胱天蛋白酶信号传导有关。

[0189] 在一个实施方案中,所述治疗为增生性病征的治疗;例如卡斯尔曼病。

[0190] 在一个实施方案中,所述治疗为选自以下的疾病或病征的治疗:具有炎性或自身免疫组分的疾病,包括哮喘、动脉粥样硬化、过敏性疾病如特应性、过敏性鼻炎、特应性皮炎、过敏症、过敏性支气管肺曲霉病及过敏性肺炎(鸽子饲养者疾病、农民肺、加湿器肺病、麦芽工人肺病);过敏,包括在哺乳动物如家畜(例如狗和猫)中的跳蚤过敏性皮炎、接触性变应原,包括蚊咬或其它昆虫刺伤过敏、毒常春藤、毒栎、毒肤杨或其它皮肤变应原;自身免疫病症,包括I型糖尿病及相关并发症、多发性硬化症、关节炎、全身性红斑狼疮、自身免疫(桥本氏(Hasimoto's))甲状腺炎、自身免疫肝病如肝炎和原发性胆汁性肝硬化、甲状腺机能亢进(格雷夫斯氏病(Graves'disease);甲状腺毒症)、胰岛素抗药性糖尿病、自身免疫肾上腺机能不全(爱迪生氏病(Addison's disease))、自身免疫卵巢炎、自身免疫睾丸炎、自身免疫溶血性贫血症、阵发性寒冷性血红蛋白尿症、贝切特氏病、自身免疫血小板减少症、自身免疫中性白细胞减少、恶性贫血、纯红细胞贫血症、自身免疫凝血病、子宫内膜异位症、重症肌无力、实验性变应性脑脊髓炎、自身免疫多发性神经炎、天疱疮及其它大疱病、风湿性心脏炎、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)、心切开后综合征、舍格伦氏综合征、多发性肌炎、皮肌炎及硬皮病;由不适当的炎症(不管是局部抑或全身)引起的疾病状况,例如肠易激或炎性综合征(Mazzucchelli等人,1996)、皮肤病如扁平苔癣、迟发性超敏反应、慢性肺炎,例如肺泡炎和肺肉芽瘤、齿龈炎症或其它牙周病、及与骨髓来源的病变有关的骨性炎症(Volejnikova等人,1997)、过敏性肺病如过敏性肺炎(Sugiyama等人,1995)、及与从嗜碱性粒细胞释放组胺有关的炎症(Dvorak等人,1996),如枯草热、从肥大细胞释放组胺(Galli等人,1989)、或肥大细胞肿瘤、I型过敏性反应(过敏症、皮肤过敏、荨麻疹、痛风、过敏性鼻炎和过敏性肠胃炎);溃疡性结肠炎或克罗恩氏病;TNF α 诱导的多囊肾病(Li等人,2008);或隐热蛋白(Cryopyrin)相关周期性综合征,包括肢痛综合征(Muckle-Wells Syndrome)。

[0191] 在一个实施方案中,所述治疗为由破骨细胞介导的病征的治疗。

[0192] 在一个实施方案中,所述治疗为由过度骨吸收表征的病征的治疗。

[0193] 在一个实施方案中,所述治疗为与骨质疏松有关的病征的治疗。

[0194] 在一个实施方案中,所述治疗为骨质疏松的治疗。

- [0195] 在一个实施方案中,所述治疗为与炎症有关的骨质疏松的治疗。
- [0196] 在一个实施方案中,所述治疗为与炎症无关的骨质疏松的治疗。
- [0197] 在一个实施方案中,所述治疗为与破骨细胞过度激活有关的骨质疏松的治疗。
- [0198] 在一个实施方案中,所述治疗为关节破坏的治疗。
- [0199] 在一个实施方案中,所述治疗为与炎症有关的关节破坏的治疗。
- [0200] 在一个实施方案中,所述治疗为与破骨细胞过度激活有关的关节破坏的治疗。
- [0201] 在一个实施方案中,所述治疗为在类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病或佩吉特氏病中与破骨细胞过度激活有关的骨质疏松的治疗。
- [0202] 在一个实施方案中,所述治疗为与类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病或骨的佩吉特氏病有关的骨质疏松的治疗。
- [0203] 在一个实施方案中,所述治疗为类风湿性关节炎、骨质疏松症、癌症相关的骨疾病或骨的佩吉特氏病的治疗。
- [0204] 在一个实施方案中,所述治疗为以下的治疗:骨的瘤形成,不管是原发性肿瘤抑或转移,包括骨肉瘤和骨瘤(参见,例如Zheng等人,1998)及癌症相关的骨疾病(例如,恶性肿瘤的高钙血症、骨转移、溶骨性骨转移、多发性骨髓瘤、乳癌)。
- [0205] 在一个实施方案中,所述治疗为由与骨吸收增加有关的以下病状引起的高钙血症的治疗,包括:维生素D中毒、原发性或三发性甲状旁腺机能亢进、固定及结节病。
- [0206] 在一个实施方案中,所述治疗为假体植入物的无菌性松动(例如,人造关节,例如膝、臀等,可由于被局部炎症驱动的破骨细胞活性而松动)的治疗(参见,例如Childs等人,2001)。
- [0207] 在一个实施方案中,所述治疗为骨硬化病、骨关节炎或异位骨形成的治疗。
- [0208] 在一个实施方案中,所述治疗为与纤维化有关的病症如全身性硬化或硬皮病的治疗。
- [0209] 在一个实施方案中,所述治疗为罕见的血管炎如贝切特氏病的治疗。
- [0210] 治疗
- [0211] 如在本文中在治疗病状的背景下所用的术语“治疗”一般是指治疗和疗法,不管是人抑或动物(例如,在兽医施用中),其中实现一些所需的治疗作用,例如,病状进展的抑制,并且包括进度的减慢、进度的停止、病状症状的减轻、病状的改善、以及病状的治愈。还包括治疗作为预防措施(即预防)。举例来说,在还没有患上病状但处于发展成病状的风险下的患者中的使用是由术语“治疗”所涵盖。
- [0212] 例如,炎症的治疗包括炎症的预防、降低炎症的发病率、降低炎症的严重性、减轻炎症的症状等。
- [0213] 如本文所用的术语“治疗有效量”是指化合物或包含化合物的材料、组合物或剂型当根据所需治疗方案施用时有效产生一些所需治疗作用的量,该量与合理的利益/风险比相称。
- [0214] 组合疗法
- [0215] 术语“治疗”包括组合治疗和疗法,其中两种或更多种治疗或疗法被组合,例如依次地或同时地。举例来说,本文所述的化合物还可在组合疗法中使用,例如,联合其它试剂,例如抗炎剂等。治疗和疗法的实例包括化疗(活性剂的施用,包括例如药物、抗体(例如,如

在免疫疗法中)、前药(例如,如在光动力疗法中、GDEPT、ADEPT等);手术;放射疗法;光动力疗法;基因疗法;及控制饮食。

[0216] 本发明的一方面涉及如本文所述的化合物,与一种或多种额外治疗剂组合。

[0217] 具体的组合将由内科医师决断,内科医师会使用其公知常识和熟练开业医师已知的给药方案选择剂量。

[0218] 试剂(即,本文所述的化合物加上一种或多种其它试剂)可同时或依次施用,并且可以分别不同的剂量方案且经由不同途径施用。例如,当依次施用时,试剂可以紧密间隔的时间间隔(例如,在5-10分钟期间内)或更长的时间间隔(例如相隔1、2、3、4小时或更久,或当需要时相隔甚至更长时间)施用,精确的给药方案与一种或多种治疗剂的性质相称。

[0219] 试剂(即,本文所述的化合物加上一种或多种其它试剂)可在单一剂型中一起配制,或替代地,个别试剂可单独配制并且以试剂盒形式任选与此试剂盒的使用说明一起提供。

[0220] 其它用途

[0221] 本文所述的HMC化合物还可作为体外测定的一部分使用,例如,以便确定候选宿主是否可能受益于所讨论的化合物的治疗。

[0222] 本文所述的HMC化合物还可用作例如测定中的标准,以便鉴别其它化合物、其它抗炎剂等等。

[0223] 试剂盒

[0224] 本发明的一方面涉及一种试剂盒,其包括(a)如本文所述的HMC化合物或包含如本文所述的HMC化合物的组合物,例如,优选在合适的容器中和/或用合适的包装提供;和(b)使用说明,例如关于如何施用化合物或组合物的书面说明。

[0225] 在一个实施方案中,所述试剂盒进一步包含一种或多种(例如1、2、3、4种)如本文所述的额外治疗剂。

[0226] 书面说明还可包括适应症的清单,用于此的活性成分为合适的治疗。

[0227] 施用途径

[0228] HMC化合物或包含HMC化合物的药物组合物可通过任何适宜的施用途径向受试者施用,不管是全身/周围地抑或局部地(即,在所需作用部位处)。

[0229] 施用途径包括经口(例如,通过摄取);经颊;舌下;经皮(包括,例如通过贴剂、药膏等);经粘膜(包括,例如通过贴剂、药膏等);鼻内(例如,通过喷鼻剂、滴剂或由喷雾器或干燥粉末递送装置);眼部(例如,通过滴眼剂);肺部(例如,通过吸入或吹入疗法,使用例如气溶胶,例如经由口腔或鼻);直肠(例如,通过栓剂或灌肠剂);阴道(例如,通过子宫托);胃肠外,例如通过注射,包括皮下、皮内、肌内、静脉内、动脉内、心内、鞘内、脊柱内、囊内、囊下、眶内、腹膜内、气管内、表皮下、关节内、蛛网膜下及胸骨内;通过贮库或贮器的植入,例如皮下或肌内。

[0230] 在一个优选实施方案中,施用途径为经口(例如,通过摄取)。

[0231] 在一个优选实施方案中,施用途径为胃肠外的(例如,通过注射)。

[0232] 受试者/患者

[0233] 受试者/患者可为脊索动物、脊椎动物、哺乳动物、胎盘哺乳动物、有袋动物(例如袋鼠、袋熊)、啮齿动物(例如豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠)、鼠科动物(例如小鼠)、兔类动物(例如

兔)、鸟类(例如鸟)、犬科(例如狗)、猫科(例如猫)、马属(例如马)、猪科(例如猪)、绵羊(ovine)(例如绵羊(sheep))、牛科(例如母牛)、灵长类动物、猿(simian)(例如猴或猿(ape))、猴(例如狨猴、狒狒)、猿(例如大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)、或人。此外,受试者/患者可为其发育形式的任一种,例如胎儿。

[0234] 在一个优选实施方案中,所述受试者/患者为人。

[0235] 制剂

[0236] 虽然HMC化合物有可能单独施用,但最好以药物制剂(例如,组合物、制剂、药剂)形式来递呈其,该药物制剂包含至少一种如本文所述的HMC化合物连同一种或多种本领域技术人员所熟知的其它药学上可接受的成分一起,包括药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂、佐剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂(例如,润湿剂)、掩蔽剂、着色剂、调味剂及甜味剂。所述制剂可进一步包含其它活性剂,例如,其它治疗剂或预防剂。

[0237] 因此,本发明进一步提供如上所定义的药物组合物及制备药物组合物的方法,所述方法包括将至少一种如本文所述的HMC化合物与一种或多种本领域技术人员所熟知的其它药学上可接受的成分(例如载体、稀释剂、赋形剂等)混合。如果被配制成离散单位(例如片剂等),那么每个单位含有预定量(剂量)的化合物。

[0238] 如本文所用的术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适用于与所讨论的受试者(例如人)接触而无过度毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的化合物、成分、材料、组合物、剂型等。每种载体、稀释剂、赋形剂等在与制剂的其它成分相容的意义上必须也是“可接受的”。

[0239] 合适的载体、稀释剂、赋形剂等可见于标准的药学教科书中,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1990;和Handbook of Pharmaceutical Excipients,第5版,2005。

[0240] 制剂可通过药剂学领域中熟知的任何方法来制备。这类方法包括将化合物与构成一种或多种辅助成分的载体缔合的步骤。一般说来,制剂通过将化合物与载体(例如,液体载体、细分散的固体载体等)均匀并亲密地缔合,然后必要时使产物成型来制备。

[0241] 可制备制剂以提供快速或缓慢释放;立即、延迟、定时或持续释放;或其组合。

[0242] 制剂可适合呈以下形式:液体、溶液(例如水性、非水性)、混悬液(例如水性、非水性)、乳剂(例如水包油、油包水)、酏剂、糖浆剂、干药糖剂、嗽口水、滴剂、片剂(包括例如包衣片剂)、颗粒剂、粉剂、糖锭、锭剂、胶囊(包括例如硬及软明胶胶囊)、扁囊剂、丸剂、安瓿、大丸剂、栓剂、子宫托、酊剂、凝胶、糊剂、膏剂、霜剂、洗剂、油类、泡沫、喷雾剂、烟雾剂或气溶胶。

[0243] 制剂可适合作为贴剂、粘合型药膏、绷带、敷料等提供,将其用一种或多种化合物及任选一种或多种其它药学上可接受的成分浸渍,包括例如渗透、浸透及吸收增强剂。制剂还适合以贮库或贮器形式提供。

[0244] 化合物可溶于、悬浮于或与一种或多种其它药学上可接受的成分混合。化合物可存在于脂质体或其它微粒中,其被设计以将化合物靶向例如血液组分或一个或多个器官。

[0245] 适用于经口施用(例如,通过摄取)的制剂包括液体、溶液(例如水性、非水性)、混悬液(例如水性、非水性)、乳剂(例如水包油、油包水)、酏剂、糖浆剂、干药糖剂、片剂、颗粒

剂、粉剂、胶囊、扁囊剂、丸剂、安瓿、大丸剂。

[0246] 适用于经颊施用的制剂包括嗽口水、糖锭、锭剂、以及贴剂、粘合型膏药、贮库及贮器。糖锭通常包含在调味基料、通常蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶中的化合物。锭剂通常包含在惰性基质如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶中的化合物。嗽口水通常包含在合适的液体载体中的化合物。

[0247] 适用于舌下施用的制剂包括片剂、糖锭、锭剂、胶囊及丸剂。

[0248] 适用于经口经粘膜施用的制剂包括液体、溶液(例如水性、非水性)、混悬液(例如水性、非水性)、乳剂(例如水包油、油包水)、嗽口水、糖锭、锭剂、以及贴剂、粘合型药膏、贮库及贮器。

[0249] 适用于非经口经粘膜施用的制剂包括液体、溶液(例如水性、非水性)、混悬液(例如水性、非水性)、乳剂(例如水包油、油包水)、栓剂、子宫托、凝胶、糊剂、膏剂、霜剂、洗剂、油剂、以及贴剂、粘合型药膏、贮库及贮器。

[0250] 适用于经皮施用的制剂包括凝胶、糊剂、膏剂、霜剂、洗剂及油剂、以及贴剂、粘合型药膏、绷带、敷料、贮库及贮器。

[0251] 片剂可通过任选地用一种或多种辅助成分的传统手段(例如压制或模制)制备。压制片可通过在合适的机器中压制呈自由流动形式如粉剂或颗粒剂的化合物来制备,任选地与一种或多种以下各物混合:粘合剂(例如聚维酮、明胶、阿拉伯胶、山梨糖醇、黄芪胶、羟丙基甲基纤维素);填充剂或稀释剂(例如乳糖、微晶纤维素、磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石、二氧化硅);崩解剂(例如淀粉羟基乙酸钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠);表面活性剂或分散剂或润湿剂(例如十二烷基硫酸钠);防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、山梨酸);调味剂、增味剂及甜味剂。膜制片可通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物的混合物来制备。片剂可任选地被包衣或刻痕并且可被配制以便提供其中化合物的缓慢或控制释放,使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放分布。片剂可任选地具有包衣,例如以影响释放,例如肠溶包衣,以提供在除胃以外的肠道部分中的释放。

[0252] 膏剂通常是由化合物及石蜡或水可混溶的软膏基质制备。

[0253] 霜剂通常是由化合物及水包油乳膏基质制备。如果需要的话,乳膏基质的水相可包括例如至少约30%w/w多元醇,即具有两个或更多个羟基的醇,如丙二醇、丁-1,3-二醇、甘露糖醇、山梨糖醇、甘油和聚乙二醇及其混合物。局部制剂可理想地包含经由皮肤或其它累及区域增强化合物的吸收或渗透的化合物。这类真皮渗透增强剂的实例包括二甲亚砷及相关类似物。

[0254] 乳液通常是由化合物及油相制备,其可任选地仅包含乳化剂(或称为利泄剂),或其可包含至少一种乳化剂与脂肪或油或与脂肪和油两者的混合物。优选地,纳入亲水性乳化剂以及用作稳定剂的亲脂性乳化剂。还优选地纳入油和脂肪两者。总之,有或者没有稳定剂的乳化剂构成了所谓的乳化蜡,并且该蜡同油和/或脂肪一起构成了所谓的乳化软膏基质,其形成霜剂制剂的油性分散相。

[0255] 合适的利泄剂和乳液稳定剂包括Tween 60、Span 80、十六十八醇、十四烷醇、单硬脂酸甘油酯及十二烷基硫酸钠。适用于制剂的油或脂肪的选择是基于实现所需的美观性质,由于化合物在可能用于药物乳液制剂中的大多数油中的溶解度极低。因此,霜剂优选应

是具有适当稠度的非油腻的、非染色的以及可清洗的产物,以避免从管道或其它容器中渗漏。可使用直链或支链单-或二元烷基酯如二异己二酸酯、硬脂酸异十六烷基酯、可可脂肪酸的丙二醇二酯、豆蔻酸异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸2-乙基己酯或称为Crodamol CAP的支链酯的掺合物,最后三个为优选的酯。它们可单独或以组合形式使用,这取决于所需特性。或者,可使用高熔点脂质,如白色软石蜡和/或液体石蜡或其它矿物油。

[0256] 适用于鼻内施用的制剂(其载体为液体)包括例如喷鼻剂、滴鼻剂、或通过喷雾剂的气溶胶施用,包括化合物的水性或油性溶液。

[0257] 适用于鼻内施用的制剂(其载体为固体)包括例如作为粒度在例如约20至约500微米范围内的粗粉末呈递的那些,施用方式为鼻吸入式,即通过鼻腔从靠近鼻孔的容器内快速吸入粉末。

[0258] 适用于肺施用(例如,通过吸入或吹入疗法)的制剂包括作为来自加压包装的气溶胶喷雾呈递的那些,借助于合适的推进剂,如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。

[0259] 适用于眼部施用的制剂包括滴眼剂,其中将化合物溶解或悬浮于合适的载体(特别是用于所述化合物的水溶剂)中。

[0260] 适用于直肠施用的制剂可作为具有合适基质的栓剂来呈递,所述基质包含例如天然或硬化油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇,例如可可脂或水杨酸盐;或作为用于通过灌肠剂的治疗的溶液或混悬液来呈递。

[0261] 适用于阴道施用的制剂可作为子宫托、棉塞、霜剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂呈递,所述制剂除化合物之外还含有如本领域中已知为合适的这类载体。

[0262] 适用于胃肠外施用(例如,通过注射)的制剂包括水性或非水性、等渗、无热原、无菌液体(例如,溶液、混悬液),其中化合物被溶解、悬浮或以其它方式提供(例如,在脂质体或其它微粒中)。这类液体可另外含有其它药学上可接受的成分,如抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、悬浮剂、增稠剂、及使得制剂与预定受体的血液(或其它相关体液)等渗的溶质。赋形剂的实例包括例如水、醇、多元醇、甘油、植物油等。适用于这类制剂中的等渗载体的实例包括氯化钠注射液(Sodium Chloride Injection)、林格氏溶液(Ringer's Solution)或乳酸林格氏注射液(Lactated Ringer's Injection)。通常,化合物在液体中的浓度为约1ng/mL至约10 μ g/mL,例如约10ng/mL至约1 μ g/mL。制剂可存在于单位剂量或多剂量密封容器中,例如安瓿和小瓶,并且可保存在冷冻干燥(冻干)条件下,仅需要添加无菌液体载体,例如注射用水,在使用之前立即添加。临时注射溶液和混悬液可由无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备。

[0263] 剂量

[0264] 本领域技术人员应理解,HMC化合物及包含HMC化合物的组合物的合适剂量在患者之间可不同。确定最佳剂量一般将涉及使针对任何风险或有害副作用的治疗利益的水平平衡。所选择的剂量水平将取决于多种因素,包括特定的HMC化合物的活性、施用途径、施用时间、HMC化合物的排泄率、治疗持续时间、以组合形式使用的其它药物、化合物和/或材料、病状的严重性、以及患者的人种、性别、年龄、体重、状况、一般健康及先前病史。HMC化合物的量和施用途径最终将由内科医师、兽医或临床医师决断,不过一般将选择剂量以达成在作

用部位处的局部浓度,由此实现预期效果,而不会造成相当大的有害或不良副作用。

[0265] 施用可在治疗过程期间以一个剂量,连续或间歇地(例如,以分次剂量,在适当的时间间隔下)实现。确定施用的最有效手段和剂量的方法为本领域技术人员所公知并且将随用于疗法的制剂、疗法的目的、被治疗的靶细胞及被治疗的受试者而变化。可用由主治的内科医师、兽医或临床医师选择的剂量水平和模式来进行单次或多次施用。

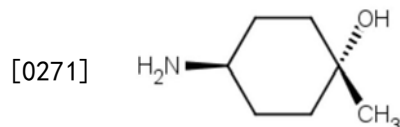
[0266] 一般说来,HMC化合物的合适剂量在每公斤受试者体重每天约50 μ g至约20mg范围内(更通常约100 μ g至约10mg)。对于肺施用(例如,通过吸入),合适的剂量在每公斤受试者体重每天约50ng至约1mg范围内。当化合物为盐、酯、酰胺、前药等时,基于母体化合物计算所施用的量,且因此有待使用的实际重量成比例地增加。

[0267] 化学合成

[0268] 本文描述了用于HMC化合物的化学合成的方法。这些和/或其它公知方法(参见,例如Greig等人,2010a;Bahmanyar等人,2010)可以已知方式被修改和/或改编以提供替代或改进的合成方法。

[0269] 合成A

[0270] (1r,4r)-4-氨基-1-甲基环己-1-醇

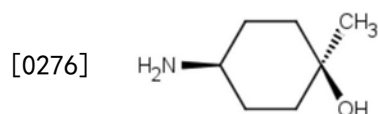


[0272] 将氢氧化钾(50%用水润湿;2.0g)在300mL高压灭菌器中添加到(1r,4r)-4-(二苄基氨基)-1-甲基环己醇(7.5g,24.2mmol)在甲醇(100mL)中的搅拌溶液中。向高压灭菌器中装入氢气(50atm;~5MPa)并且在80 $^{\circ}$ C下加热24小时。冷却混合物并滤掉催化剂。使滤液回到高压灭菌器并添加氢氧化钾(50%用水润湿;3.0g)。向高压灭菌器中装入氢气(50atm;~50MPa)并且在80 $^{\circ}$ C下加热过夜。将混合物冷却并通过硅藻土过滤并且浓缩滤液以得到呈灰白色粘性固体的标题化合物(3.2g,定量)。

[0273] ^1H NMR(400MHz;CDCl₃) δ :2.86-2.76(1H,m),1.84-1.76(2H,m),1.75-1.63(2H,m),1.55-1.43(2H,m),1.30-1.17(5H,m)。

[0274] 合成B

[0275] (1s,4s)-4-氨基-1-甲基环己-1-醇

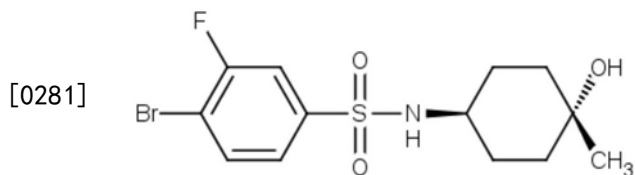


[0277] 如下将四个相同批次的(1s,4s)-4-二苄基氨基-1-甲基环己-1-醇(每个批次为15g,总共60g)单独脱苄基化:向在乙醇(450mL)中的(1s,4s)-4-二苄基氨基-1-甲基环己-1-醇(15g,193.9mmol)中添加10%氢氧化钾(15g,50%湿催化剂)。将反应混合物用氮气、接着氢气冲洗,并且在室温下,在氢气气氛下搅拌16小时。将溶液通过硅藻土过滤并且用额外的乙酸乙酯洗涤。将来自所有四个批次的滤液合并并且在减压下蒸发以得到标题化合物(23g,91.8%产率)。将化合物在无进一步纯化下用于下一步。

[0278] ^1H NMR(400MHz,CDCl₃) δ :2.6(m,1H),1.74-1.56(m,4H),1.5-1.3(m,7H),1.21(s,3H)。

[0279] 合成C

[0280] 4-溴-3-氟-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺

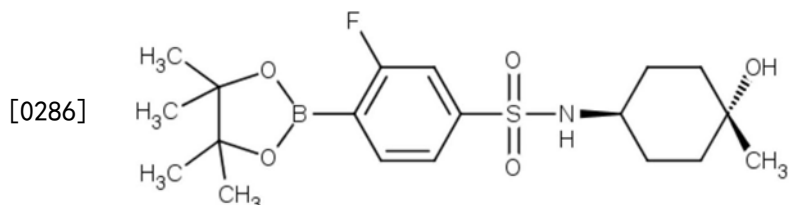


[0282] 将二异丙基乙胺 (20mL, 116.2mmol) 添加到 (1r,4r)-4-氨基-1-甲基环己醇 (3g, 23.2mmol) 在二氯甲烷 (150mL) 中的溶液中并且将反应混合物冷却至0℃。添加呈固体的4-溴-3-氟苯-1-磺酰氯 (6.98g, 25.5mmol) 并且在室温下搅拌反应混合物4小时。将反应混合物用1M盐酸中和并且将化合物萃取到二氯甲烷中。将有机层分离, 经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。将所获得的残余物用正戊烷洗涤, 过滤并干燥以得到标题化合物 (7g, 82%)。

[0283] MS (ESI) m/z 368 [M+H]。

[0284] 合成D

[0285] 3-氟-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺

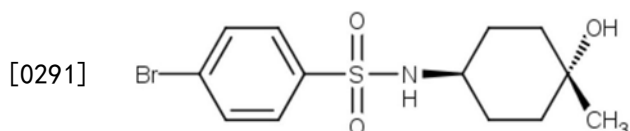


[0287] 使用氩气为甲苯 (50mL)、4-溴-3-氟-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺 (9g, 24.6mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷) (9.33g, 36.7mmol) 及乙酸钾 (7.23g, 73.7mmol) 的搅拌溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II) (1.8g, 2.5mmol) 并且再为反应混合物脱气10分钟并在110℃下搅拌4小时。将反应混合物冷却至室温并通过硅藻土过滤。将有机层分离, 经硫酸钠干燥并在减压下浓缩以得到标题化合物 (10g, 98%)。对于大规模批次, 将化合物在无进一步纯化下使用。当以较小规模进行此制备时, 将残余物溶于醚中, 过滤并且浓缩滤液以得到所需产物。

[0288] MS (ESI) m/z 412 [M-H]。

[0289] 合成E

[0290] 4-溴-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺



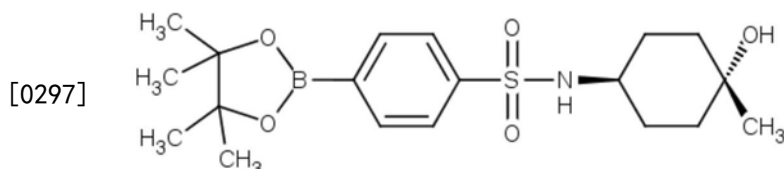
[0292] 将二异丙基乙胺 (24mL, 137.8mmol) 添加到 (1r,4r)-4-氨基-1-甲基环己醇 (3.6g, 27.86mmol) 在二氯甲烷 (150mL) 中的溶液中并且将反应混合物冷却至0℃。添加呈固体的4-溴苯-1-磺酰氯 (7.83g, 30.6mmol) 并且使反应混合物在室温下搅拌4小时。将反应混合物用1M盐酸中和并且将化合物萃取到二氯甲烷中。将有机层分离, 经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。将所获得的残余物用戊烷洗涤, 过滤并干燥以得到标题化合物 (7g, 72%)。

[0293] ^1H NMR (400MHz; CDCl_3) δ : 7.74 (2H, d), 7.65 (2H, d), 4.77-4.61 (1H, m), 3.33-3.23 (1H, m), 1.85-1.75 (2H, m), 1.63-1.51 (2H, m), 1.49-1.30 (4H, m), 1.20 (3H, s)。

[0294] LCMS: (运行时间: 3.5min): 保留时间: 1.33min (97%, MS (ESI) m/z 346 [M-H])。

[0295] 合成F

[0296] N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺

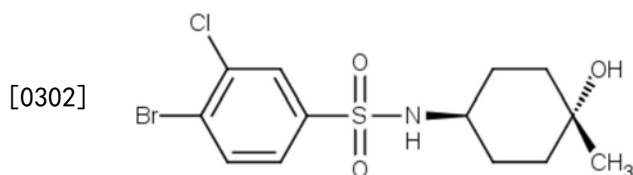


[0298] 使用氩气为4-溴-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺 (9g, 25.8mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷) (9.87g, 38.9mmol) 及乙酸钾 (7.6g, 77.5mmol) 在甲苯 (50mL) 中的溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II) (1.8g, 2.5mmol) 并且再为反应混合物脱气10分钟并在100°C下搅拌4小时。在减压下蒸发溶剂并将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩以得到标题化合物 (8g, 78%)。对于大规模批次,将化合物在无进一步纯化下使用。当以较小规模进行此制备时,将残余物溶于醚中,过滤并且浓缩滤液以得到所需产物。

[0299] MS (ESI) m/z 394 [M-H]。

[0300] 合成G

[0301] 4-溴-3-氯-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺

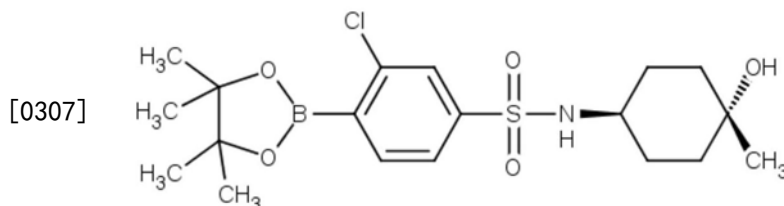


[0303] 向(1r,4r)-4-氨基-1-甲基环己醇 (1.2g, 9.29mmol) 在二氯甲烷 (50mL) 中的溶液中添加二异丙基乙胺 (2.99g, 23.13mmol) 并且将反应混合物冷却至0°C。添加4-溴-3-氯苯磺酰氯 (2.61g, 9.0mmol) 并且使反应混合物在室温下搅拌3-4小时。将反应混合物用1M盐酸中和并且将化合物萃取到二氯甲烷中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。将所获得的残余物用戊烷洗涤,过滤并干燥以提供标题化合物 (2.1g, 59%)。

[0304] MS (ESI) m/z 380 [M-H]。

[0305] 合成H

[0306] 3-氯-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺



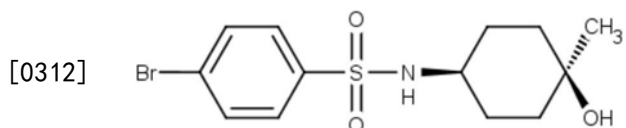
[0308] 使用氩气为4-溴-3-氯-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺 (1g,

2.61mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷) (0.729g, 2.87mmol) 及乙酸钾 (0.767g, 7.82mmol) 在甲苯 (30mL) 中的溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II) (0.19g, 0.26mmol) 并且再为反应混合物脱气10分钟并在100℃下搅拌4小时。在减压下蒸发溶剂并且将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩以提供标题化合物 (1.2g, 100%)。将化合物在无纯化下用于下一步。

[0309] MS (ESI) m/z 428 [M-H]。

[0310] 合成I

[0311] 4-溴-N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺

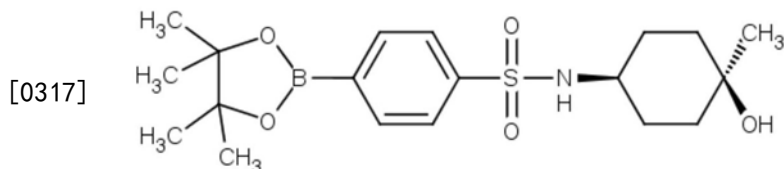


[0313] 向(1s,4s)-4-氨基-1-甲基环己-1-醇 (2g, 15.48mmol) 在二氯甲烷 (100mL) 中的溶液中添加二异丙基乙胺 (5g, 38.68mmol) 并且将反应混合物冷却至0℃。添加4-溴苯-1-磺酰氯 (4.35g, 17.02mmol) 并且使反应混合物在室温下搅拌3-4小时。将反应混合物用1M盐酸中和并且将化合物萃取到二氯甲烷中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。将所获得的残余物用戊烷洗涤,过滤并干燥以提供标题化合物 (3.6g, 67%)。

[0314] MS (ESI) m/z 346 [M-H]。

[0315] 合成J

[0316] N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺

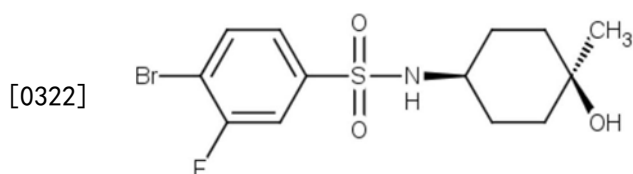


[0318] 使用氩气为4-溴-N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺 (3.5g, 10.05mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷) (2.8g, 11.03mmol) 及乙酸钾 (2.9g, 29.5mmol) 在甲苯 (45mL) 中的溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II) (0.737g, 1.01mmol) 并且再为反应混合物脱气10分钟并在100℃下搅拌4小时。在减压下蒸发溶剂并将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩以提供标题化合物 (3.6g, 91%)。将化合物在无纯化下用于下一步。

[0319] MS (ESI) m/z 394 [M-H]。

[0320] 合成K

[0321] 4-溴-3-氟-N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺

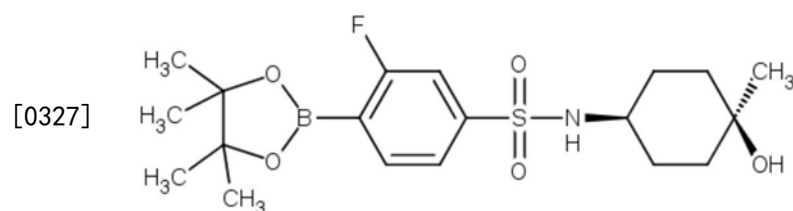


[0323] 向(1s,4s)-4-氨基-1-甲基环己-1-醇(1g,7.74mmol)在二氯甲烷(80mL)中的溶液中添加二异丙基乙胺(2.5g,19.3mmol)并且将反应混合物冷却至0℃。添加4-溴-3-氟苯磺酰氯(2.33g,8.5mmol)并且使在反应混合物在室温下搅拌3-4小时。将反应混合物用1M盐酸中和并且将化合物萃取到二氯甲烷中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。将所获得的残余物用戊烷洗涤,过滤并干燥以提供标题化合物(1.6g,56%)。

[0324] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.03-7.90 (m, 1H), 7.87-7.70 (m, 2H), 7.61-7.54 (m, 1H), 2.97-2.84 (m, 1H), 1.59-1.37 (m, 4H), 1.36-1.14 (m, 4H), 1.01 (s, 3H)。

[0325] 合成L

[0326] 3-氟-N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺

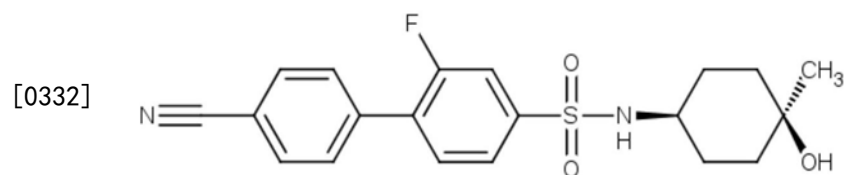


[0328] 使用氩气为4-溴-3-氟-N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺(1.6g,4.37mmol)、4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷)(1.22g,4.8mmol)及乙酸钾(1.28g,13mmol)在甲苯(40mL)中的溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(0.319g,0.44mmol)并且再为反应混合物脱气10分钟并在110℃下搅拌2小时。在减压下蒸发溶剂并且将残余物用乙酸乙酯稀释。将有机层通过从不溶解的固体中过滤来分离,经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩以得到标题化合物(产量1.5g粗品)。将化合物在无纯化下用于下一步。

[0329] 合成M

[0330] 4'-氰基-2-氟-N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)-[1,1'-联苯]-4-磺酰胺

[0331] (HMC-C-07-B)



[0333] 使用氩气为3-氟-N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺(1.5g,3.63mmol)、4-溴苄腈(1.63g,8.96mmol)及碳酸钠(0.961g,9.07mmol)在1,4-二噁烷:水(30:3mL)中的搅拌溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(0.2649g,0.36mmol)并且再为反应混合物脱气10分钟并在80℃下搅拌8小时。在减压下蒸发溶剂并且通过硅胶柱色谱法,使用230-400目硅胶,用10-60%乙酸乙酯/己烷作为洗脱剂纯化残余物。将所得的残余物用己烷、接着正戊烷洗涤,得到呈灰白色固体的标题化合物(0.23g,16%)。

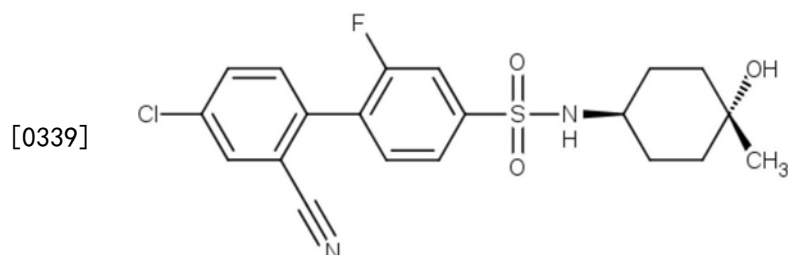
[0334] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.00 (d, J=8.37Hz, 2H), 7.90-7.79 (m, 4H), 7.79-7.71 (m, 2H), 4.01 (s, 1H), 3.05-2.90 (m, 1H), 1.62-1.48 (m, 2H), 1.48-1.32 (m, 4H), 1.27-1.13 (m, 2H), 1.02 (s, 3H)。

[0335] LCMS:流动相A:5mM甲酸铵水溶液+0.1%氨,流动相B:乙腈+5%流动相A+0.1%氨;柱:YMC Triart,C18 (50X4.6mm) 3um;流动速率:1.4mL/min。运行时间:4.5min-初始溶剂10:90B:A经前2.5min线性增至95:5B:A,保持在95:5B:A持续0.5min,经1min线性降至10:90B:A并且保持在10:90B:A持续最后0.5min。保留时间2.39min m/z 387 [M-H]。

[0336] 合成N

[0337] 4'-氯-2'-氰基-2-氟-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-[1,1'-联苯]-4-磺酰胺

[0338] (HMC-C-08-A)



[0340] 使用氩气为3-氟-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺(1.3g,3.15mmol)2-溴-5-氯苄腈(1.7g,7.85mmol)、碳酸钠(0.834g,7.87mmol)在二噁烷:水(20:2mL)中的搅拌溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(0.230g,0.31mmol)并且再为反应混合物脱气10分钟并在110℃下搅拌6小时。在减压下蒸发溶剂并将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法,使用100-200目硅胶,用10-60%乙酸乙酯/己烷作为洗脱剂纯化残余物。将所得的物质用己烷、接着正戊烷洗涤,得到标题化合物(0.16g,12%)。

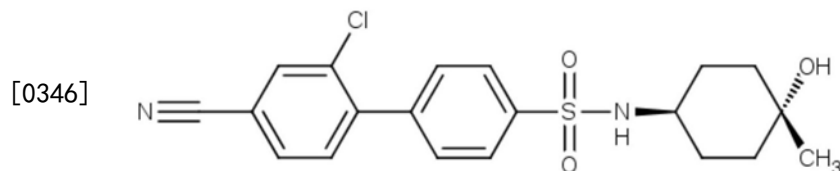
[0341] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 7.85-7.64 (m, 4H), 7.61-7.54 (m, 1H), 7.52-7.44 (m, 1H), 4.62-4.52 (m, 1H), 3.5-3.35 (m, 1H), 1.98-1.82 (m, 2H), 1.55-1.35 (m, 5H), 1.24 (s, 3H)。

[0342] LCMS:流动相A:5mM甲酸铵水溶液+0.1%氨,流动相B:乙腈+5%流动相A+0.1%氨;柱:YMC Triart,C18 (50X4.6mm) 3um;流动速率:1.4mL/min。运行时间:4.5min-初始溶剂10:90B:A经前2.5min线性增至95:5B:A,保持在95:5B:A持续0.5min,经1min线性降至10:90B:A并且保持在10:90B:A持续最后0.5min。保留时间2.35min m/z 421 [M-H]。

[0343] 合成O

[0344] 2'-氯-4'-氰基-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-[1,1'-联苯]-4-磺酰胺

[0345] (HMC-C-09-A)



[0347] 使用氩气为N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺(1.7g,4.30mmol)、3,4-二氯苄腈(1.85g,10.8mmol)及碳酸钠(1.14g,10.8mmol)在二噁烷:水(25:3mL)中的搅拌溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(0.315g,0.43mmol)并且再为反应混合物脱气10分钟并

在110℃下搅拌6小时。在减压下蒸发溶剂并将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法,使用230-400目硅胶,用10-60%乙酸乙酯/己烷作为洗脱剂纯化残余物。将所得的物质用己烷、接着正戊烷洗涤,得到标题化合物(0.58g,33%)。

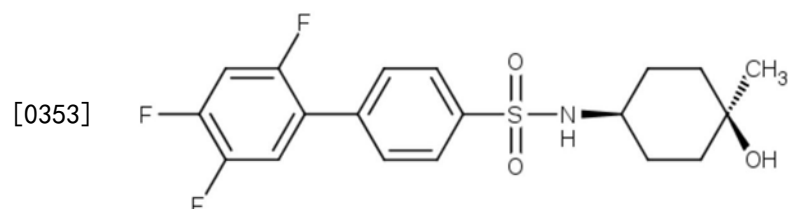
[0348] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 7.97 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H), 7.83-7.78 (m, 1H), 7.68-7.62 (m, 1H), 7.57 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 7.46 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H), 4.55-4.45 (m, 1H), 3.42-3.32 (m, 1H), 1.94-1.82 (m, 2H), 1.67-1.55 (m, 2H), 1.55-1.35 (m, 4H), 1.23 (s, 3H), 1.11 (br. s, 1H)。

[0349] LCMS: 流动相A: 5mM甲酸铵水溶液+0.1%氨, 流动相B: 乙腈+5%流动相A+0.1%氨; 柱: YMC Triart, C18 (50X4.6mm) 3um; 流动速率: 1.4mL/min。运行时间: 4.5min-初始溶剂10:90B:A经前2.5min线性增至95:5B:A, 保持在95:5B:A持续0.5min, 经1min线性降至10:90B:A并且保持在10:90B:A持续最后0.5min。保留时间2.26min m/z 403 [M-H]。

[0350] 合成P

[0351] 2',4',5'-三氟-N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)-[1,1'-联苯]-4-磺酰胺

[0352] (HMC-C-10-B)



[0354] 使用氩气为N-((1s,4s)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺(1.8g,4.55mmol)、1-溴-2,4,5-三氟苯(2.4g,11.4mmol)及碳酸钠(1.2g,11.3mmol)在二噁烷:水(30:3mL)中的搅拌溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(0.333g,0.455mmol)并且再为反应混合物脱气10分钟并在110℃下搅拌6小时。在减压下蒸发溶剂并将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法,使用230-400目硅胶,用10-60%乙酸乙酯/己烷作为洗脱剂纯化残余物。将所得的残余物用己烷、接着正戊烷洗涤,得到标题化合物(0.60g,33%)。

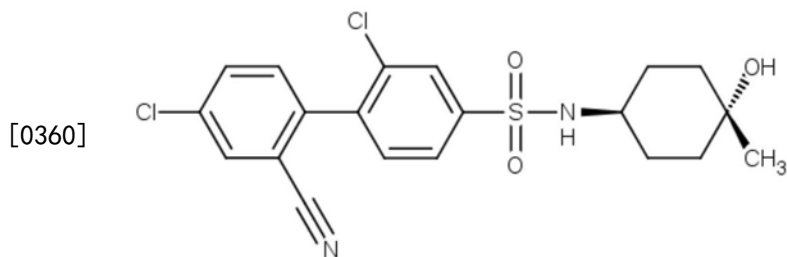
[0355] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.00-7.91 (m, 2H), 7.66-7.58 (m, 2H), 7.33-7.27 (m, 1H), 7.12-7.02 (m, 1H), 4.42 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 3.25-3.11 (m, 1H), 1.77-1.45 (m, 7H), 1.45-1.32 (m, 2H), 1.20 (s, 3H)。

[0356] LCMS: 流动相A: 5mM甲酸铵水溶液+0.1%氨, 流动相B: 乙腈+5%流动相A+0.1%氨; 柱: YMC Triart, C18 (50X4.6mm) 3um; 流动速率: 1.4mL/min。运行时间: 4.5min-初始溶剂10:90B:A经前2.5min线性增至95:5B:A, 保持在95:5B:A持续0.5min, 经1min线性降至10:90B:A并且保持在10:90B:A持续最后0.5min。保留时间2.53min m/z 398 [M-H]。

[0357] 合成Q

[0358] 2,4'-二氯-2'-氰基-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-[1,1'-联苯]-4-磺酰胺

[0359] (HMC-C-11-A)



[0361] 使用氩气为3-氯-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺(1.122g,2.61mmol)、2-溴-5-氯苄腈(1.41g,6.51mmol)及碳酸钠(0.691g,6.52mmol)在二噁烷:水(30:3mL)中的搅拌溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(0.190g,0.26mmol)并且再为反应混合物脱气10分钟并在110℃下搅拌6小时。在减压下蒸发溶剂并将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。通过超临界流体色谱法(SFC),使用二氧化硅-2-乙基吡啶柱及液体二氧化碳:甲醇的混合物(甲醇起始于10%,增至40%并且回到10%,经19分钟的运行时间)纯化残余物以提供标题化合物(0.285g,25%)。

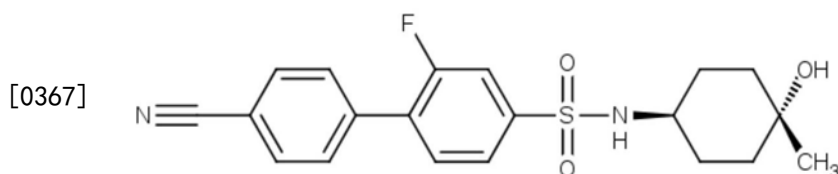
[0362] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.25 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 8.04-8.01 (m, 1H), 7.97-7.83 (m, 3H), 7.75-7.64 (m, 2H), 4.14 (s, 1H), 3.2-3.1 (m, 1H), 1.7-1.55 (m, 2H), 1.55-1.42 (m, 2H), 1.33-1.2 (m, 4H), 1.06 (s, 3H)。

[0363] LCMS: 流动相A: 5mM甲酸铵水溶液+0.1%氨, 流动相B: 乙腈+5%流动相A+0.1%氨; 柱: YMC Triart, C18 (50X4.6mm) 3 μm ; 流动速率: 1.4mL/min。运行时间: 4.5min-初始溶剂10:90B:A经前2.5min线性增至95:5B:A, 保持在95:5B:A持续0.5min, 经1min线性降至10:90B:A并且保持在10:90B:A持续最后0.5min。保留时间2.48min m/z 437 [M-H]。

[0364] 合成R

[0365] 4'-氰基-2-氟-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-[1,1'-联苯]-4-磺酰胺

[0366] (HMC-C-07-A)



[0368] 使用氩气为3-氟-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺(1.3g,3.15mmol)、4-溴苄腈(1.43g,7.86mmol)及碳酸钠(0.834g,7.87mmol)在二噁烷:水(20:2mL)中的搅拌溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(0.230g,0.314mmol)并且再为反应混合物脱气10分钟并在110℃下搅拌6小时。在减压下蒸发溶剂并将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法,使用230-400目硅胶,用10-60%乙酸乙酯/己烷作为洗脱剂纯化残余物。将所得的物质用己烷、接着正戊烷洗涤,得到标题化合物(0.28g,23%)。

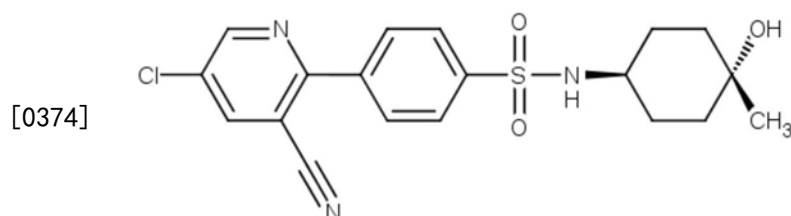
[0369] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.00 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.86-7.80 (m, 4H), 7.78-7.72 (m, 2H), 4.14 (s, 1H), 3.21-3.09 (m, 1H), 1.70-1.56 (m, 2H), 1.55-1.42 (m, 2H), 1.34-1.20 (m, 4H), 1.06 (s, 3H)。

[0370] LCMS:流动相A:5mM甲酸铵水溶液+0.1%氨,流动相B:乙腈+5%流动相A+0.1%氨;柱:YMC Triart,C18 (50X4.6mm) 3um;流动速率:1.4mL/min。运行时间:4.5min-初始溶剂10:90B:A经前2.5min线性增至95:5B:A,保持在95:5B:A持续0.5min,经1min线性降至10:90B:A并且保持在10:90B:A持续最后0.5min。保留时间2.22min m/z 387 [M-H]。

[0371] 合成S

[0372] 4-(5-氯-3-氰基吡啶-2-基)-N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)苯磺酰胺

[0373] (HMC-N-05-A)



[0375] 使用氩气为N-((1r,4r)-4-羟基-4-甲基环己基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)苯磺酰胺(1.7g,4.30mmol)、2,5-二氯烟腈(1.86g,10.75mmol)及碳酸钠(1.14g,10.8mmol)在二噁烷:水(25:3mL)中的搅拌溶液脱气10分钟。添加[1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(II)(0.315g,0.43mmol)并且再为反应混合物脱气10分钟并在110℃下搅拌6小时。在减压下蒸发溶剂并将化合物萃取到乙酸乙酯中。将有机层分离,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法,使用230-400目硅胶,用10-60%乙酸乙酯/己烷作为洗脱剂纯化残余物。将所得的物质用己烷、接着正戊烷洗涤,得到标题化合物(0.63g,36%)。

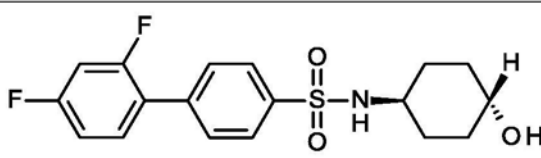
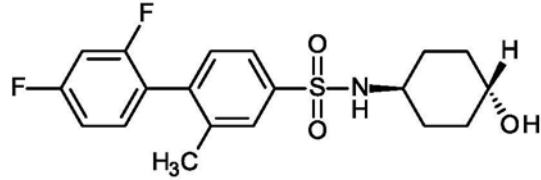
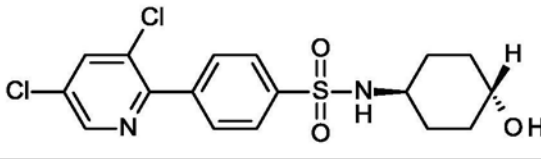
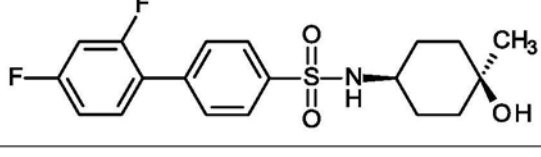
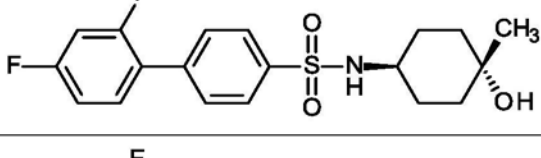
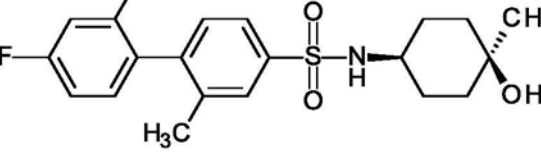
[0376] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 8.86 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.13-7.99 (m, 5H), 4.53 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 1H), 3.42-3.32 (m, 1H), 1.92-1.81 (m, 2H), 1.66-1.54 (m, 2H), 1.53-1.36 (m, 4H), 1.23 (s, 3H), 1.12 (br. s, 1H)。

[0377] LCMS:流动相A:5mM甲酸铵水溶液+0.1%氨,流动相B:乙腈+5%流动相A+0.1%氨;柱:YMC Triart,C18 (50X4.6mm) 3um;流动速率:1.4mL/min。运行时间:4.5min-初始溶剂10:90B:A经前2.5min线性增至95:5B:A,保持在95:5B:A持续0.5min,经1min线性降至10:90B:A并且保持在10:90B:A持续最后0.5min。保留时间2.20min m/z 406 [M+H]。

[0378] 额外的化合物

[0379] 还制备以下化合物用作本文所述的生物研究中的参考化合物:

[0380]

| 代码 | 结构 |
|--------|--|
| ABD599 |  |
| ABD735 |  |
| ABD836 |  |
| ABD899 |  |
| ABD900 |  |
| REF001 |  |

[0381] 生物研究

[0382] 使用基于J774巨噬细胞细胞系的存活的活力测定来评价效力。巨噬细胞与破骨细胞密切相关并且先前已用作破骨细胞存活的模型系统(参见,例如Luckman等人,1998,“Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation:evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages,”J.Bone Miner.Res.,第13卷,第1668-1678页)。模型指示在如骨质疏松症、骨关节炎及类风湿性关节炎的疾病中两者对骨保护的作用,以及对炎症的作用,这是由于像破骨细胞一样,J774巨噬细胞就存活来说依赖于持续的NFκB激活。

[0383] 抗炎作用通过评价用促炎性刺激细菌脂多糖(LPS)刺激的人Thp-1衍生的巨噬细胞产生白介素-6(IL-6)进一步表征。LPS是与细胞表面受体、Toll样受体-4一起发挥作用以激活NFκB和IRF信号传导途径来产生IL-6。在此刺激测定中IL-6的减少指示在其中IL-6产生异常的病状的治疗中具有效用的抗炎作用。

[0384] 化合物抑制被称为细胞色素P450(CYP450)的药物代谢酶家族的潜能是其作为治

疗性化合物的潜力的关键决定因素。在其中关键性CYP450酶过度表达的重组Bactosome系统中针对控制探针底物测试化合物。在此测定中CYP450活性的降低指示化合物影响其自身及人中的其它血浆药物水平的潜能并且潜在地产生不良毒性药物反应。

[0385] 另外,在人Ether-à-go-go (hERG) 离子通道测定中评价潜在毒性。hERG有助于协调心脏跳动的电活动并且其抑制可造成潜在致命的病症,称为长QT综合征。因此,在药物开发中应避免hERG的抑制。

[0386] 还进行体内研究来评估这些化合物作为药物的潜能。

[0387] 在大鼠中评价药代动力学。

[0388] 在胶原蛋白诱发的关节炎的小鼠模型中评价对疾病的作用。

[0389] 生物研究1

[0390] 刃天青巨噬细胞J774活力测定

[0391] 通过与J774巨噬细胞一起孵育且随后使用刃天青测定细胞活力来测定测试化合物的体外效力。

[0392] 刃天青为氧化还原染料,通常用作培养细胞中活力的指标(参见,例如Anoopkumar-Dukie,2005,“Resazurin assay of radiation response in cultured cells”,British Journal of Radiology,第78卷,第945-947页)。其对细胞无毒并且在培养基中是稳定的,从而允许体外细胞增殖的连续测量作为动力学或终点测定。该测定是基于活的、代谢活性细胞使用来自还原物质如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH)的电子将刃天青(其为蓝色的和非荧光的)还原为试卤灵和二氢试卤灵(其为红色的和荧光的)的能力。从氧化形式到还原形式的此转化可用比色法或荧光测定法测量。削弱细胞活力和增殖的损伤还影响细胞还原刃天青的能力,并且染料还原率与存在的活细胞的数量成正比。

[0393] 对于荧光测量,通常使用530-560nm激发和590nm发射波长。对于比色测量,通常测量在570nm(还原形式)和600nm(氧化形式)下的吸光度。进行简单计算以确定两种物质的相对量:高比率的试卤灵(还原形式)与刃天青(氧化形式)为细胞增殖和存活的指标。低比率指示静息或不存活的细胞。

[0394] 将J774细胞以 10^4 个细胞/孔铺板于96孔板的 $100\mu\text{L}$ αMEM (α 改良伊格尔培养基(α Modified Eagle Medium))中并且使其粘附过夜。次日,将测试化合物制备成在DMSO中的 100mM 溶液。将这些储备溶液在DMSO中稀释,接着在培养基(αMEM)中稀释1000x,之后直接添加到孔中以便得到所需最终化合物浓度。在 $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ 下72小时孵育之后,将刃天青(Alamar Blue, Biosource International)添加到各孔(1:10v/v, $10\mu\text{L}$)中。接着在 37°C 下孵育该板3小时,并且在590nm下,以25nm带宽测量荧光。

[0395] 每种测试化合物的平均结果表示为反映细胞活力的平均对照值的百分比(%)。接着对在所有所测试浓度下的平均值作图并且通过使用针对Windows的GraphPad Prism软件(GraphPad Software, San Diego California USA)或Grafit第5版(Erithacus Software)将数据拟合至4参数 IC_{50} 方程来计算 IC_{50} 。每个实验重复两次并且将数据显示为来自两个实验的平均 IC_{50} 。

[0396] 结果总结于下表中。

表 1
刃天青巨噬细胞 J774 活力测定

| 化合物 | IC ₅₀ (μM) ^(a) | IC ₅₀ (μM) ^(a) |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| ABD599 | 0.41 (n=2) ⁽¹⁾ | |
| ABD735 | 0.07 (n=3) ⁽¹⁾ | 0.11 (n=5) ⁽²⁾ |
| ABD836 | 1.45 (n=2) ⁽¹⁾ | |
| ABD899 | 0.27 (n=3) ⁽¹⁾ | 0.21 (n=5) ⁽²⁾ |
| ABD900 | 3.64 (n=3) ⁽¹⁾ | 2.91 (n=5) ⁽²⁾ |
| REF001 | 0.05 (n=2) ⁽¹⁾ | |
| HMC-C-07-A | | 1.66 (n=2) ⁽²⁾ |
| HMC-C-07-B | 0.09 (n=2) ⁽²⁾ | 0.096 (n=4) ⁽²⁾ |
| HMC-C-08-A | | 1.25 (n=2) ⁽²⁾ |
| HMC-C-09-A | | 0.69 (n=2) ⁽²⁾ |
| HMC-C-10-B | | 0.54 (n=2) ⁽²⁾ |
| HMC-C-11-A | | 1.46 (n=2) ⁽²⁾ |
| HMC-N-05-A | | 1.82 (n=2) ⁽²⁾ |

[0397] [0398] ^(a) 实验重复的次数显示在括号中,例如,n=2表示每个实验进行两次并且所示IC₅₀为两个结果的平均值。当实验重复的次数相比第一列在第二列中有所增加时,将进行额外的实验重复并且所示新结果为初始实验与新实验的平均值。

[0399] ⁽¹⁾ 来自刃天青巨噬细胞活力测定的结果,在30μM至1.5nM的10点浓度范围内进行,其中每个浓度n=3次重复。使用Grafit第5版(Erithacus Software)计算IC₅₀。

[0400] ⁽²⁾ 来自刃天青巨噬细胞活力测定的结果,在10μM至0.5nM的12点浓度范围内进行,其中每个浓度n=4次重复。使用针对Windows的GraphPad Prism软件第5版(GraphPad Software)计算IC₅₀。

[0401] 这些数据证明本文所述的HMC化合物在刃天青巨噬细胞J774活力测定中显示出极佳的效力,并且与参考化合物相比没有效力损失。HMC-C-07-B尤其显示极佳的活性。

[0402] 生物研究2

[0403] Thp1巨噬细胞IL-6释放测定

[0404] 通过与Thp1巨噬细胞一起孵育且随后用炎性刺激(细菌脂多糖(LPS))刺激然后测量细胞白介素-6(IL-6)释放来测定测试化合物在人细胞中的体外效力。

[0405] 该测定强烈地指示对炎症的作用。LPS为Toll样受体-4(TLR4)的配体,其为细胞表面受体的Toll样受体家族的成员。此受体在先天性免疫系统的激活中是重要的,其主要功能为:

[0406] (a) 通过细胞因子如IL-6的产生将免疫细胞募集到感染部位;

[0407] (b) 激活补体级联以鉴别细菌、活化细胞并清除死细胞和抗体复合物;

[0408] (c) 由细胞如巨噬细胞和树突细胞激活外来物质的去除;以及

[0409] (d) 激活抗原呈递,适应性免疫系统的一部分。

[0410] TLR4通过激活信号传导级联发挥其作用,该级联导致若干转录因子的激活,包括NFκB以及干扰素调节转录因子(IRF)家族的成员3、5及7(IRF-3、IRF-5及IRF-7)。这些转录

因子且尤其是NF κ B和IRF-5的激活驱使细胞因子如白介素6 (IL-6) 的合成和分泌。

[0411] IL-6的过度产生/表达与包括自身免疫、炎性及癌症的一系列病症有关。IL-6主要由巨噬细胞和T细胞合成并且深入参与控制从急性到慢性炎症的过渡。这是通过改变炎症空间中的白细胞浸润物的组成,将其从嗜中性白细胞移至单核细胞/巨噬细胞来完成(参见,例如Gabay, 2006)。另外,IL-6对T和B细胞(由此促进慢性炎症反应)以及对破骨细胞(由此促进骨转换)发挥刺激效应。这些效应牵涉于包括以下的若干疾病的病理中:骨质疏松症、类风湿性关节炎、糖尿病、动脉粥样硬化、抑郁症、阿尔茨海默氏病、全身性红斑狼疮、贝切特氏病、多发性骨髓瘤及前列腺癌。此外,患有晚期或转移性癌症的患者具有高于正常循环水平的IL-6。降低巨噬细胞中的IL-6水平因此是治疗上有益的。

[0412] 在24孔板中将Thp1细胞以 1.7×10^5 个细胞/孔的浓度铺板于含有1%青霉素-链霉素和10%热灭活的胎牛血清的150 μ L RPMI完全培养基中并且使其粘附过夜。次日,将细胞用佛波醇肉豆蔻酸(PMA)以200nM的最终浓度刺激以诱导分化并保持3天。将测试化合物制备成在DMSO中的100nM溶液,然后在培养基中稀释之前在DMSO中连续稀释。在用100ng/mL LPS刺激之前1小时,将稀释的化合物添加到培养物中。在30、10、3、1、0.3、0.1、0.03、0.01及0.001 μ M的浓度下,在9点浓度反应曲线中一式三份测试化合物。在37 $^{\circ}$ C/5%CO $_2$ 下孵育18小时之后,收集细胞培养基并且使用人IL-6 duo-set ELISA试剂盒(R&D Systems)就人IL-6水平进行测定。每种测试化合物(n=3)的平均结果表示为平均对照值的百分比(%)。接着对在所有所测试浓度下的平均值作图并且通过使用针对Windows的GraphPad Prism软件(GraphPad Software, San Diego California USA)或Grafit第5版(Erithacus Software)将数据拟合至4参数IC $_{50}$ 方程计算IL-6的抑制的IC $_{50}$ 。每个实验重复两次并且将数据显示为来自两个实验的平均IC $_{50}$ 。

[0413] 结果总结于下表中。

| 化合物 | IC $_{50}$ (μ M) ⁽¹⁾ | IC $_{50}$ (μ M) ⁽²⁾ |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| ABD599 | 0.07 ⁽¹⁾ | 0.19 ⁽²⁾ |
| ABD899 | 0.03 ⁽¹⁾ | 0.04 ⁽²⁾ |
| ABD900 | 0.09 ⁽¹⁾ | 0.11 ⁽²⁾ |
| HMC-C-07-B | | 0.018 ⁽²⁾ |
| HMC-C-08-A | | 0.16 ⁽²⁾ |
| HMC-C-09-A | | 0.17 ⁽²⁾ |
| HMC-C-10-B | | 0.55 ⁽²⁾ |
| HMC-C-11-A | | 0.26 ⁽²⁾ |
| HMC-N-05-A | | 0.30 ⁽²⁾ |

[0415] ⁽¹⁾ 将Thp1细胞以 3×10^5 个细胞/孔的浓度铺板。使用Grafit第5版(Erithacus Software)计算IC $_{50}$ 。

[0416] ⁽²⁾ 将Thp1细胞以 1.7×10^5 个细胞/孔的浓度铺板。使用针对Windows的GraphPad Prism软件第5版(GraphPad Software)计算IC $_{50}$ 。

[0417] 这些数据证明本文所述的HMC化合物在抑制从人巨噬细胞释放IL-6中显示出极佳

的效力,表明其治疗IL-6被上调的病症中的效用。HMC-C-07-B尤其显示极佳的活性。

[0418] 生物研究3

[0419] 人细胞色素P450抑制测定

[0420] 细胞色素P450 (CYP450) 酶的抑制是临床使用中药物-药物相互作用的主要原因之一,并且可使新药的开发变得复杂或中断。

[0421] 测试化合物抑制最相关的细胞色素P450酶中的五种的能力是通过在特定的探针底物存在下测定细胞色素P450酶在称为Bactosomes (Cypex Ltd, Dundee, Scotland UK DD2 1NH) 的重组细胞色素制剂中的活性来测量。Bactosomes为重组CYP450的高效和成本有效的来源,与其它来源如肝微粒体相比具有更高的酶比活性。如果化合物抑制酶活性,那么探针底物的消失速率将降低。测定以下CYP450同工型:CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及CYP3A4。在Bactosomes中CYP450抑制潜能的研究被当作容许快速预测体内可能的药物-药物相互作用的有价值的模型(参见,例如Weaver等人,2003)。

[0422] Bactosomes获自商业来源(Cypex, Scotland, UK)。将测试化合物与Bactosomes在6个浓度下孵育。孵育样品10分钟,之后终止反应并且通过LC-MS/MS多反应监测(MRM)就底物探针的存在/量来分析样品。

[0423] 将CYP450酶(最终蛋白质:对于CYP1A2是75pmol/mL;对于CYP2C19是12.5pmol/mL;且对于CYP2C9、2D6和3A4是25pmol/mL)、0.1M磷酸盐缓冲液pH 7.4、探针及测试化合物(最终浓度50、15.8、5、1.58、0.5及0.158 μ M;从10mM储备溶液稀释以得到1%的最终DMSO浓度)在37 $^{\circ}$ C下预孵育5分钟。反应通过添加20 μ L在磷酸盐缓冲液中的10mM NADPH来起始。最终孵育体积为200 μ L。以下对照抑制剂被用于每个CYP450抑制测定:CYP1A2: α -萘黄酮;CYP2C9:磺胺苯吡唑;CYP2C19:反苯环丙胺;CYP2D6:奎尼丁;CYP3A4:酮康唑。

[0424] 在37 $^{\circ}$ C下孵育每种化合物10分钟。通过添加甲醇(最终组成1:1,含水:甲醇)终止反应。振荡孵育板,在20 $^{\circ}$ C下冷凝2小时,并且在4 $^{\circ}$ C下,在3500rpm下离心15分钟以沉淀蛋白质。然后将上清液转移到小瓶中以便使用MS/MRM进行分析,其中条件示于下表中。

| 表 3 MS 条件 | |
|--------------|---|
| [0425] HPLC: | Waters Alliance 2790 |
| MS/MS: | Triple Quadrupole Quattro Ultima (Micromass, Manchester) |
| 软件: | Analyst 1.5 |

| | | |
|--------|---------------------------------|--|
| [0426] | 电离模式: | ESI+ |
| | 扫描模式: | 多反应监测(MRM) |
| | 柱: | Devosil C30 |
| | 柱温度(°C): | 40 |
| | 相 A: | 0.1%甲酸/水 |
| | 相 B: | 0.1%甲酸/甲醇 |
| | 梯度 | 97% A (0-0.3 min), 5% A (0.55-1.55 min), 97% A (1.6 min) |
| | 停止时间 | 2.5 min |
| | 注入体积(μL): | 30 |
| | 流动速率(mL/min): | 1.2 |

[0427] 通过在Microsoft Excel内的线性变换测定 IC_{50} 值。

[0428] 数据总结于下表中。

| 化合物 | IC_{50} (μM) | | | | |
|------------|------------------------------------|--------|---------|--------|--------|
| | CYP1A2 | CYP2C9 | CYP2C19 | CYP2D6 | CYP3A4 |
| ABD599 | >25 | 9.5 | >25 | 20.7 | >25 |
| ABD735 | >25 | 25 | >25 | >25 | >25 |
| ABD899 | >25 | 3.9 | 7.3 | 45.3 | 21.6 |
| HMC-C-07-A | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| HMC-C-07-B | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| HMC-C-08-A | 27 | 6.7 | 30 | 19 | 29 |
| HMC-C-09-A | 23 | 34 | >50 | >50 | 33 |
| HMC-C-10-B | >16 | 2.4 | 8.5 | >16 | 9.2 |
| HMC-C-11-A | 11 | 2.7 | 5.1 | 9.3 | 12 |
| HMC-N-05-A | 36 | 27 | >50 | >50 | >50 |

[0430] 该数据证明本文所述的HMC化合物与参考化合物相比显示出减少的药物-药物相互作用不利因素。HMC-C-07-A显示尤其良好的分布。

[0431] 生物研究4

[0432] hERG离子通道测定

[0433] 人Ether-à-go-go-相关基因(hERG)离子通道的抑制介导心脏动作电位中的复极化IKr电流,由此表明其促进协调心脏跳动的电活动。当hERG传导穿过细胞膜的电流的能力受到抑制或损害时,这可导致称为长QT综合征的潜在致命性病症。在hERG与长QT综合征之间的这种关联使得hERG抑制成为重要的抗靶标,这必须在药物开发期间被避免。

[0434] 测试化合物针对hERG离子通道的活性。使用自动化路径-钳、Q-膜片法,使用稳定转染的中国仓鼠卵巢细胞(hERG-CHO)进行测定。在37°C下将hERG-CHO细胞在F-12凯恩营养素混合物培养基(Kaighn's Nutrient Mixture medium)(Invitrogen)+10%FBS中培养1-3

天。将细胞保持在30℃下持续24至48小时，之后膜片钳处理，以便提高hERG电流振幅。随后，通过胰蛋白酶化收获细胞，并且在室温下将其保持在Q膜片细胞制备状态下的无血清培养基(Serum Free Medium) (SFM) 中长达6小时，之后洗涤并再悬浮于细胞外溶液中并且施加于膜片钳位点以便数据记录。

[0435] 膜片钳电压方案：在实现全细胞模式之后，将细胞保持在-80mV下。递送50毫秒脉冲至-40mV以测量漏电流，将其从即时的尾电流中减去。然后将细胞去极化至+20mV持续2秒，接着是一个第二脉冲至-40mV以揭示hERG尾电流。每5秒钟递送此范式一次以监测电流振幅。

[0436] 细胞外溶液：137mM NaCl, 4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM D(+)-葡萄糖, 10mM HePES缓冲液(用NaOH调节pH至7.4)。

[0437] 在实现全细胞模式之后，首先施加细胞外溶液(对照)并且使细胞在细胞外溶液中稳定2分钟。接着从低浓度至高浓度渐增地施加测试化合物。将细胞以每个测试浓度孵育5分钟。每次孵育期间，使用如上所述的电压方案反复地刺激细胞，并且连续地监测尾电流振幅。

[0438] 接受标准：

[0439] (1) 在对照中峰值尾电流>100pA。

[0440] (2) 初始耗尽<30%并且在测试化合物的第一施加之前，耗尽终止。

[0441] (3) 在任何时候，漏电流<50%对照峰值尾电流。

[0442] (4) 在整个实验期间， $r_s < 20M\Omega$ 。

[0443] 通过测量在与测试化合物一起孵育之前和之后经由一秒测试脉冲至-40mV接着是两秒脉冲至+20mV来诱导的尾电流振幅获得抑制程度(%)。将电流差相对于对照归一化并且乘以100以获得抑制百分比。

[0444] 将浓度(log)反应曲线拟合到逻辑斯谛方程(三个参数假设电流在极高测试化合物浓度下的完全阻断)以产生50%抑制浓度的估算值(IC₅₀)。由电流振幅的减小百分比×连续浓度来构建每种化合物的浓度-反应关系。

[0445] 结果总结于下表中。

| 化合物 | 在 10 μ M 下的抑制% |
|------------|--------------------|
| ABD599 | 74.9 |
| ABD899 | 85.2 |
| ABD900 | 15.1 |
| HMC-C-07-A | 47 |
| HMC-C-07-B | 40 |
| HMC-C-08-A | 29 |
| HMC-C-09-A | 57 |
| HMC-N-05-A | 35 |

[0447] 数据证明本文所述的HMC化合物具有心脏安全性质，这是经口活性药物所需的。

[0448] 生物研究5

[0449] 人原破骨细胞生成研究

[0450] 测试化合物的体外效力是通过将它们与人原单核细胞一起孵育并且评价对成熟破骨细胞形成的作用来确定。

[0451] 骨重建发生在整个生命期间,以保持骨骼的完整性。此过程是由骨髓中的细胞、成骨细胞及破骨细胞进行,它们分别负责骨的合成和吸收。需要在由破骨细胞介导的骨吸收与由成骨细胞介导的骨形成之间的平衡以维持骨的体内平衡;这两个活动之间的任何不平衡都可能造成骨骼异常。具体说来,骨病症如骨质疏松症、炎性骨质溶解及溶骨性转移性骨疾病是归因于破骨细胞激活的增加及随后的骨吸收率的提高。提高的破骨细胞活性还是类风湿性关节炎的标志(Sato等人,2006)。对于具有抑制破骨细胞的骨吸收能力的新药用于治疗这些病状有极大的关注。

[0452] 使用来源于人全血的单核细胞测试化合物减少人原破骨细胞形成(破骨细胞生成)的活性。对细胞表面标记物CD14呈阳性的单核细胞是存在于循环中的先天性免疫系统的一部分。外周血单核细胞分化以形成若干细胞类型,包括破骨细胞。人原破骨细胞是通过从人全血中分离CD14+单核细胞并且在含有巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和RANKL+10%胎牛血清的 α MEM培养基中培养大约6天而形成,其中确切的持续时间取决于细胞的个别供体。

[0453] 当在如上所述条件下培养单核细胞时,它们形成大的多核细胞(破骨细胞),其针对耐酒石酸盐酸性磷酸酶(TRAP)呈阳性染色。在培养的第5天与第6天之间进行TRAP染色,这取决于个别供体。破骨细胞经鉴定为对TRAP呈阳性染色并且含有超过3个核的细胞。减少TRAP阳性细胞数量的化合物减少破骨细胞的形成。用于治疗骨质疏松症的二膦酸盐化合物阿伦磷酸盐被用作此测定中用于减少破骨细胞生成的阳性对照。

[0454] 对破骨细胞形成的作用通过针对TRAP染色并且在显微镜下计数各孔中含有超过三个核的细胞来评价。这允许在各处理孔中细胞数目的绝对测定。

[0455] 破骨细胞生成及化合物影响的评价:

[0456] 从健康供体收集PBMC(外周血单核细胞)并且通过在一层Ficoll Paque(GE Healthcare,UK)上离心来分离。接着使用autoMACS Pro Separator(MiltenyiBiotec)从PBMC中分选单核细胞,其根据细胞表面上存在的标记物来分选细胞。将所得的CD14+单核细胞再悬浮于补充有10%FCS、25ng/mL M-CSF及100ng/ml RANKL的 α MEM中并且添加到48孔板中,接着在37°C/5%CO₂下孵育长达6天。从向孔中接种之日开始,细胞便补充有媒介物(0.1%DMSO)或测试化合物。每2天补充培养基。

[0457] 在培养期结束时,将培养基从细胞中移走并且将细胞在室温下固定,然后用磷酸盐缓冲盐水洗涤。接着添加TRAP染色溶液并且在37°C下孵育细胞直到出现红色,之后将反应通过用水冲洗来终止。将染色细胞风干,然后使用常规显微镜拍照并且由两个独立的观察者对TRAP阳性多核破骨细胞计数。

[0458] 将测试化合物的各浓度的平均结果(n=6)在两个观察者之间取平均值,然后表示为倍数变化对比平均对照值。接着使用来自Gratit的软件(Erithacus Software)将数据以图表形式作图。

[0459] 结果总结于下表中。

| 表 6 人原破骨细胞生成(*) | | |
|--------------------|-------------------|-----------------------------|
| 测试化合物 | 在 1 μ M 下的减少% | IC ₅₀ (μ M) |
| 阿仑膦酸盐 | 12 | 未计算 |
| ABD900 | 90 | 0.37 |
| HMC-C-07-B | 90 | 0.12 |

[0462] (*) 在单核细胞分化的第4天,当已观察到成熟破骨细胞时添加化合物。

[0463] 数据表明HMC-C-07-B在减少破骨细胞形成方面比测定中的阳性对照、阿仑膦酸盐或参考化合物ABD900显示出更佳的效力。

[0464] 生物研究6

[0465] 啮齿动物药代动力学研究

[0466] 使用体内药代动力学测定研究吸收和代谢稳定性。

[0467] 向三个8-12周龄的雄性Han Wistar大鼠给予测试化合物,经口或静脉内施用(剂量水平为静脉内1mg/kg体重或经口5mg/kg体重)。将测试化合物于0.5%羧甲基纤维素(CMC)/0.1%Tween-80中配制以便经由经口途径施用,或于含5%DMSO/10% solutol的盐水中配制以便经由静脉内途径施用。对于化合物HMC-C-01-A,将经口施用于含2%二甲基乙酰胺/20%羟丙基- β -环糊精的水中配制。在整个研究期间除空腹过夜之外,动物可以自由取用食物并且直到给药当天的给药后2小时。

[0468] 在以下时间点从眶后血管丛采集血液样品并且置于含有20%K₂EDTA溶液的微管中:

[0469] 经口给药:给药前;给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8及24小时。

[0470] 静脉内给药:给药前;给药后0.08、0.25、0.5、1、2、4、8及24小时。

[0471] 将血液样品离心以获得血浆,将血浆转移到单独的容器中并在-20°C下冷冻。

[0472] 对于分析,将样品在室温下解冻并且通过蛋白质沉淀来制备,其中乙腈以与血浆呈1:4比率的内标(500ng/mL格列甲嗪)加标。接着将样品涡旋5分钟并且在4°C下,在20,600 \times g下离心10分钟。收集100 μ L上清液用于分析。在加标具有10 μ L分析物的空白大鼠血浆样品之后,类似地制备标准样品。

[0473] 使用LC-MS/MS,用下表中示出的条件测定测试化合物在大鼠血浆样品中的浓度。

| 表 7 LC-MS/MS 条件 | |
|--------------------|--|
| HPLC: | Schimidzu Agilent |
| MS/MS: | API 4000 |
| 软件: | Analyst 1.5 |
| 电离模式: | Turbo spray, 阴离子模式 |
| 扫描模式: | 多反应监测(MRM) |
| [0474] 柱 | Waters, Xterra, MS-C18 (2) 5 μ m 50 x 3.0 mm ; Discovery Grace Smart RP183 μ , 150 x 2.1, 3 μ M; Waters Symmetry Shelf C18 75 x 4.6, 3.5 μ M ; Agilent Zorbax XDB, 150 x 4.6, 5 μ M |
| 柱温度(°C): | 40 |
| 相 A: | 乙腈 |
| 相 B: | 0.1%甲酸 |
| 流动速率(mL/min) : | 0.8-1.2 |

[0475] 通过Phoenix WinNonlin 6.3版(Pharsight Corp,CA),使用标准非区室方法计算测试化合物的药代动力学参数。峰值血浆浓度(C_{max})和峰值血浆浓度时间(T_{max})为观测值。通过将线性梯形法则利用直至最后一次可测量浓度(AUC_{last})且此后通过将最终消除相外推到无穷大(AUC_{inf})来确定血浆浓度时间曲线下面积(AUC)。最终消除速率常数(k_{el})通过对数血浆浓度-时间曲线的线性终末部分的回归分析来确定。消除相半衰期($t_{1/2}$)被计算为 $0.693/k_{el}$ 。试验性经口生物利用率(F)通过将经口施用之后的AUC(0-24小时)除以静脉内施用之后的调整的AUC(0-8小时)来计算(即 $F = AUC(p.o.) \times 剂量(i.v.) / AUC(i.v.) \times 剂量(p.o.)$)并且报告为百分比(%)。

[0476] 药代动力学数据总结于下表中。

表 8
药代动力学数据

| 化合物 | 生物利用率, F (%) | i.v. AUC (ng/mL/min) | p.o. AUC (ng/mL/min) | T _{1/2} (h) |
|----------------------------------|--------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| ABD735 | 83 | 1081 | 8965 ⁽⁴⁾ | 3.8 |
| ABD836 | 55 | 2142 | 5927 | 5.3 |
| ABD899 | 50 | 2133 | 10740 ⁽⁴⁾ | 10.8 |
| REF001 | 50 | 963 | 4766 ⁽⁴⁾ | 7.2 |
| HMC-C-07-B ⁽¹⁾ (2) | 100 | 24072 | 146299 ⁽⁵⁾ | 9.7 |
| HMC-C-07-B ⁽³⁾ | 86 | 11627 | 39463 | 9.0 |
| HMC-N-05-A ⁽¹⁾ | 88 | 891 | 3937 | 0.8 |

[0477] (1) 将化合物在含5%DMSO/10% solutol的盐水中给药以便经由经口和静脉内途径施用。

[0479] (2) 在以下时点收集样品: 给药前、静脉内给药后0.08、0.25、0.5、1、2、4、8、23及24小时; 以及给药前、经口给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、23及24小时。

[0480] (3) 在以下时点收集样品: 给药前、静脉内给药后0.03、0.1、0.167、0.25、0.5、1、2、4、6、8及24小时。

[0481] (4) 以5mg/kg经口给药。

[0482] (5) 以10mg/kg经口给药。

[0483] 这些数据证明本文所述的HMC化合物具有与参考化合物相当的极佳经口药代动力学性质。由此表明这些化合物很可能适用作经口药物。

[0484] 生物研究7

[0485] 小鼠胶原蛋白诱发的关节炎

[0486] 将七至八周龄的雄性DBA/1j小鼠用于所有程序。将动物以10只一组进行圈养, 并且保持在21°C ± 2°C下, 12小时明/暗循环, 食物和水无限制。完全弗氏佐剂(Complete Freund's adjuvant) (CFA) 是通过在弗氏不完全佐剂(Incomplete Freund's adjuvant) (IFA) (0.85mL石蜡油和0.15mL二缩甘露醇一油酸) 中以1:1 (v/v) 比率用4mg/mL结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis) H37Ra的悬浮液乳化4mg/mL牛II型胶原来制备。用在CFA中的200µg牛II型胶原皮下免疫所有小鼠。21天后, 用在IFA中的100µg牛II型胶原皮下免疫所有小鼠。在‘增强(boosters)’免疫处理之后, 小鼠开始出现关节炎的体征和症状。

[0487] 关于关节炎的肉眼评价, 每周三次监测每只小鼠的各爪中的以下体征并且总计以生成关节炎指数(AI) (一只动物的最大AI为16):

[0488] 0=没有可见的关节炎影响。

[0489] 1=1趾的水肿和/或红斑。

[0490] 2=2趾的水肿和/或红斑。

[0491] 3=超过2趾的水肿和/或红斑。

[0492] 4=整个爪和趾的严重关节炎。

[0493] 将动物分到具有2.5的平均关节炎指数的治疗组中,然后每天一次给予化合物持续14天,对于测试化合物通过经口管饲法或对于阳性对照依那西普以10mg/kg的剂量皮下注射。实验完成之后,处死小鼠。

[0494] 通过在各治疗组中生成关节炎指数的平均值来分析数据。然后使用下式将平均关节炎指数与对照(未治疗)动物的关节炎指数相比较以生成疾病抑制百分比。

$$[0495] \quad \text{疾病的抑制}\% = 100 - \left[\frac{\text{[平均关节炎指数: 治疗的动物]}}{\text{[平均关节炎指数: 未治疗的动物]}} \times 100 \right]$$

[0496] 数据总结于下表中。

| 表 9 关节炎的抑制 | | |
|---------------|-----------------|--------|
| 化合物 | 剂量 (mg / kg /天) | 疾病的抑制% |
| ABD735 | 10 | 44 |
| ABD899 | 10 | 77 |
| HMC-C-07-B | 3 | 56 |
| HMC-C-07-B | 0.3 | 16 |

[0498] 图1是以下各组作为时间(给药天数)的函数的平均关节炎指数的曲线图:对照(实心圆)、参考化合物ABD899(10mg/kg/d)(空心圆)及阳性对照依那西普(三角形)。

[0499] 图2是以下各组作为时间(给药天数)的函数的平均关节炎指数的曲线图:对照(实心圆)、化合物HMC-C-07-B(0.3mg/kg/d)(空心圆)及化合物HMC-C-07-B(3mg/kg/d)(正方形)。

[0500] 数据表明HMC-C-07-B能够以与临床上使用的治疗依那西普类似的程度减轻患有胶原诱发的关节炎的小鼠中疾病的体征和症状。然而,重要的是,HMC-C-07-B在比参考化合物ABD899所需更低的剂量下实现此作用。

[0501] 生物研究8

[0502] DoHH2淋巴瘤细胞系增殖

[0503] 通过与DoHH2B细胞淋巴瘤细胞一起孵育且随后使用流式细胞术测定细胞数量来测定测试化合物的体外效力。

[0504] 流式细胞术为用于细胞计数、细胞分选和生物标记物检测的基于激光的生物物理技术,通过将细胞悬浮在流体流中并且通过电子检测装置使其穿过。其允许每秒高达数千个粒子的物理和化学特征的同时多参数分析。为了量化细胞数目,将计数珠粒用作内标。计数珠粒为添加到已知体积的样品中的微珠的校准悬浮液,因此每珠粒的样品体积是已知的。这允许样品中细胞数目的绝对测定。使用被称为CellProliferation Dye (eFluor® 450)的染料测量细胞增殖。eFluor® 450为可缀合至细胞特异性标记物的有机染料。当与被缀合物结合的细胞数量成比例的方式由激光刺激时,其发荧光。因此,它的信号提供特异性细胞类型的增殖的指征。

[0505] 将DoHH2细胞在96孔板中以10⁵个细胞/孔铺板于补充有10%FCS、2mM 1-谷氨酰

胺、100U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素的100 μ L RPMI培养基中并且使其粘附过夜。次日,将测试化合物制备成在DMSO中的100mM溶液。将这些储备溶液在DMSO中稀释,接着在培养基中稀释1000x,之后直接添加到孔中以便得到所需最终化合物浓度。还将细胞增殖染料添加到细胞中。在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下孵育72小时之后,将细胞固定并且在具有确切体积的计数珠粒的流式细胞仪上运行。在eFluor 450上较低的细胞被认为已增殖。

[0506] 每种测试化合物的平均结果表示为反映细胞活力的平均对照值的百分比(%)。接着对所有所测试浓度下的平均值作图并且通过使用KaleidaGraph软件(Synergy Software,Reading,Pennsylvania USA)将数据拟合至4参数IC₅₀方程来计算IC₅₀。

[0507] 结果总结于下表中。

| 表 10 DoHH2 B 细胞淋巴瘤增殖测定 | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 化合物 | IC ₅₀ (μ M) |
| ABD899 | 0.135 |
| HMC-C-07-B | 0.186 |

[0509] 这些数据证明HMC-C-07-B在DoHH2B细胞淋巴瘤增殖测定中显示出与参考化合物ABD899相当的极佳效力。

[0510] ***

[0511] 上文描述了本发明的原理、优选实施方案及操作模式。然而,本发明将不会被视作限于所论述的具体实施方案。反而,上述实施方案应被认为是说明性而非限制性的。应理解,可由本领域技术人员在不背离本发明范围的情况下在那些实施方案中做出改变。

[0512] 参考文献

[0513] 在本文中引用许多出版物以便更充分地描述并公开本发明以及本发明所属的现有技术。这些出版物的完全引用列于下面。这些出版物各自以引用的方式整体并入本公开中,其程度如同指出每个个别出版物具体和分别以引用的方式并入一般。

[0514] Akahoshi et al.,2008,“Promoter polymorphisms in the IRF3 gene confer protection against systemic lupus erythematosus”,Lupus,Vol.17 pp.568-574.

[0515] Astry et al.,2011,“A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis”,J Interferon Cytokine Res.,Vol.31,pp.927-940.

[0516] Bahmanyar et al.,2010,“Aminotriazolopyridines and their use as kinase inhibitors”,international patent publication number WO 2010/027500 A1 published11March 2010.

[0517] Baud et al.,1999,“Signalling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain”,Genes Dev., Vol.13,pp.1297-1308.

[0518] Baud et al.,2009,“Is NF κ B a good target for cancer therapy?Hopes and pitfalls”,Nat.Rev.Drug Disc.,Vol.8,pp.33-40.

- [0519] Billiau,2010,“Etanercept improves linear growth and bone mass acquisition in MTX-resistant polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis”,Rheumatology (Oxford),Vol.49,pp.1550-1558.
- [0520] Bladh et al.,2006,“Novel sulphonamide derivatives as glucocorticoid receptor modulators for the treatment of inflammatory diseases”,international patent publication number WO 2006/046916 A1 published 04 May 2006.
- [0521] Brennan et al.,1992,“Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints”,Eur.J.Immunol.,Vol.22,pp.1907-1912.
- [0522] Brennan et al.,1996,“Cytokines in autoimmunity”,Curr.Opin.Immunol.,Vol.8,pp.872-877.
- [0523] Chen et al.,2012,“High-affinity and selective dopamine D₃ receptor full agonists”,Bioorg.&Med.Chem.Lett.,Vol.22,pp.5612-5617.
- [0524] Childs,L.M.,et al.,2001,“Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis”,Journal of Bone and Mineral Research,Vol.16,No.2,pp.338-347.
- [0525] Dallas et al.,2011,“Osteoimmunology at the nexus of arthritis, osteoporosis,cancer,and infection”,J.Clin.Invest.,Vol.121,pp.2534-2542.
- [0526] Dimitris et al.,1998,“The Pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease”,Ann Intern Med.,Vol.128,No.2,pp.127-137.
- [0527] Dvorak et al.,1996,“Comparative ultrastructural morphology of human basophils stimulated to release histamine by anti-IgE,recombinant IgE-dependent histamine-releasing factor,or monocyte chemotactic protein-1”,Journal of Allergy and Clinical Immunology,Vol.98,pp.355-370.
- [0528] Feldmann et al.,1994,“TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis”,Circ.Shock,Vol.43,pp.179-184.
- [0529] Feldmann et al.,1996,“Rheumatoid arthritis”,Cell,Vol.85,pp.307-310.
- [0530] Feldmann et al.,2001,“The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis”,Curt.Dir.Autoimmun.,Vol.3,pp.188-199.
- [0531] Firestein,2005“Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis”,J.Clin.Rheumatol.,Vol.11,pp.S39-S44.
- [0532] Fu et al.,2011,“Association of a functional IRF7 variant with systemic lupus erythematosus”,Arthritis Rheum.,Vol.63,pp.749-754.
- [0533] Gabay,2006,“Interleukin-6 and chronic inflammation”,Arthritis Research&Therapy,Vol.8 (Suppl 2),S3.
- [0534] Galli et al.,1989,“IgE,Mast Cells and the Allergic Response”,Ciba Foundation Symposium,Vol.147,pp.53-73.
- [0535] Gottlieb,2005,“Psoriasis:Emerging Therapeutic Strategies”,Nat.Rev.Drug Disc.,Vol.4,pp.19-34.

- [0536] Greig et al.,2006,“Development and characterization of biphenylsulfonamides as novel inhibitors of bone resorption”,J.Med.Chem.,Vol 49:pp 7487-7492.
- [0537] Greig et al.,2008,“Biphenyl-4-yl-sulfonic acid arylamides and their use as therapeutic agents”,international patent publication number WO 2008/114022 A1 published25 September 2008.
- [0538] Greig et al.,2010a,“Aryl-phenyl-sulfonamido-cycloalkyl compounds and their use”,international patent publication number WO 2010/032009 A1 published25 March 2010.
- [0539] Greig et al.,2010b,“Aryl-phenyl-sulfonamido-phenylene compounds and their use”,international patent publication number WO 2010/032010 A1 published25 March 2010.
- [0540] Greig et al.,2013,“Development of triarylsulfonamides as novel anti-inflammatory agents”,Bioorg.&Med.Chem.Lett.,Vol.23,pp.816-820.
- [0541] Hadida et al.,2007,“Heterocyclic modulators of ATP-binding cassette transporters”,international patent publication number WO 2007/056341 A1 published18 May 2007.
- [0542] Hu et al.,2011,“A meta-analysis of the association of IRF5 polymorphism with systemic lupus erythematosus International”,Journal of Immunogenetics,Vol.38,pp.411-417.
- [0543] Jimi et al.,2004,“Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo”,Nat.Med.,Vol.10,pp.617-624.
- [0544] Joosten et al.,1996,“Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice.A comparative study using anti-TNF alpha,anti-IL-1alpha/beta,and IL-1Ra,”Arthritis Rheum.,Vol.39,pp.797-809.
- [0545] Karsenty et al.,2002,“Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development”,Dev.Cell.,Vol.2,pp.389-406.
- [0546] Klareskog et al.,2006,“Mechanisms of disease:Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis,”Nat.Clin.Pract.Rheumatol.,Vol.2,pp.425-433.
- [0547] Korzenik et al.,2006,“Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease,”Nat.Rev.Drug Disc.,Vol.5,pp.197-209.
- [0548] Krausgruber et al.,2011,“IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses”,Nat.Immunol.,Vol.12,pp.231-238.
- [0549] Li et al.,2008,“A tumor necrosis factor-a-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease”,Nature Medicine,Vol.14,No.8, pp.863-868.
- [0550] Liu,2005,“Molecular mechanism of TNF signalling and beyond,”Cell

Res.,Vol.15,pp.24-27.

[0551] Long,2012,“Osteoimmunology:the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling”,Bone Key Rep.,Vol.1,p.59.

[0552] Malemud et al.,2010,“Myeloid-related protein activity in Rheumatoid Arthritis”,International Journal of Interferon,Cytokine and Mediator Research,Vol.2,pp.97-111.

[0553] Mantovani,2009,“Inflaming metastasis”,Nature,Vol.457,pp.36-37.

[0554] Mazzucchelli et al.,1996,“Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease”,J.Pathol.,Vol.178,No.2,pp.201-206.

[0555] McInnes et al.,2007,“Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis”,Nat.Rev.Immunol.,Vol.7,pp.429-442.

[0556] Minamino et al.,2012,“IRF-2 regulates B-cell proliferation and antibody production through distinct mechanisms”,Int Immunol.,Vol.24,pp.573-581.

[0557] Mount et al.,2005,“Rheumatoid arthritis market”,Nat.Rev.Drug Disc.,Vol.2,pp.11-12.

[0558] O’Shea et al.,2013,“Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases”,Annals of Rheumatic Disease,Vol.72,Supplement 2,pp.111-115.

[0559] Ogata et al.,2012,“Safety and Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis”,Clin Med Insights Arthritis Musculoskeletal Disord.,Vol.5,pp.27-42.

[0560] Patel et al.,2014,“N-(4-hydroxy-4-methyl-cyclohexyl)-4-phenyl-benzenesulfonamide and N-(4-hydroxy-4-methyl-cyclohexyl)-4-(2-pyridyl) benzenesulfonamide compounds and their therapeutic use”,international patent publication number WO 2014/207445 A1 published 31 December 2014.

[0561] Parameswaran et al.,2010,“Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages”,Crit.Rev.Eukaryot.Gene Expr.,Vol.20,pp.87-103.

[0562] Philchenkov et al.,2004,“Caspases and cancer:mechanisms of inactivation and new treatment modalities”,Exp.Oncol.,Vol 26,pp 82-97.

[0563] Pisetsky,2012,“Advances in the treatment of inflammatory arthritis”,Best Pract.Res.Clin.Rheumatol.,Vol.26,pp.251-261.

[0564] Ralston et al.,2005,“Aryl alkyl sulfonamides as therapeutic agents for the treatment of bone conditions”,international patent publication number WO 2005/118528 A2published 15 December 2005.

[0565] Rincon,2012“Interleukin-6:from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases”,Trends in Immunology,Vol.33,No.11,pp.571-577.

[0566] Roodman,2006,“Regulation of osteoclast differentiation”,Ann.N.Y.Acad.Sci.,Vol.1068,pp.100-109.

- [0567] Sato et al., 2006, "Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology", Curr. Opin. Rheumatol., Vol. 18, No. 4, pp. 419-426.
- [0568] Scott et al., 2010, "Rheumatoid Arthritis", Lancet, Vol. 376, pp. 1094-1108.
- [0569] Sharif et al., 2012, "IRF5 polymorphism predicts prognosis in patients with systemic sclerosis", Annals of the Rheumatic Diseases, Vol. 71, pp. 1197-1202.
- [0570] Smolen et al., 2003, "Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis", Nat. Rev. Drug Disc., Vol. 2, pp. 473-488.
- [0571] Steger et al., 2011, "Denosumab for the treatment of bone metastases in breast cancer: evidence and opinion", Ther. Adv. Med. Oncol., Vol. 3, pp. 233-243.
- [0572] Sugiyama et al., 1995, "Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis", Eur. Respir. J., Vol. 8, pp. 1084-1090.
- [0573] Sun, 2010, "Mechanical loading, cartilage degradation and arthritis", Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 1211, pp. 37-50.
- [0574] Takaoka et al., 2005, "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors", Nature, Vol. 434, pp. 243-249.
- [0575] Takayanagi, 2009, "Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone", Nature Reviews Rheumatology, Vol. 5, pp. 667-676.
- [0576] Tanaka et al., 2003, "Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function", J. Bone Miner. Metab., Vol. 21, pp. 123-133.
- [0577] Tsutsumi et al., 2005, "Dipeptidyl peptidase IV inhibitor", international patent publication number WO 2005/025554 A2 published 24 March 2005.
- [0578] van den Berg et al., 1999, "Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1", Baillieres Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., Vol. 13, pp. 577-597.
- [0579] van den Berg, 2002, "Is there a rationale for combined TNF and IL-1 blocking in arthritis?", Clin. Exp. Rheumatol., Vol. 20, pp. S21-S25.
- [0580] Volejnikova et al., 1997, "Monocyte recruitment and expression of monocyte chemoattractant protein-1 are developmentally regulated in remodeling bone in the mouse", Am. J. Pathol., Vol. 150, No. 5, pp. 1711-1721.
- [0581] Wang et al., 2010, "Selective ligands for the dopamine 3 (D₃) receptor and methods of using same", international patent publication number WO 2010/025235 A1 published 04 March 2010.
- [0582] Weaver, et al., 2003, "Cytochrome p450 inhibition using recombinant proteins and mass spectrometry/multiple reaction monitoring technology in a cassette incubation", Drug Metabolism and Disposition, Vol. 31, No. 7, pp. 955-966.
- [0583] Zhang et al., 2012 "Regulation of T helper cell differentiation by

interferon regulatory factor family members”, Immunol. Res., Vol. 54 pp. 169-176.

[0584] Zheng et al., 1998, “Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in giant cell tumors of bone osteoclastoma: Possible involvement in CD68⁺ macrophage-like cell migration”, Journal of Cellular Biochemistry, Vol. 70, No. 1, pp. 121-129.

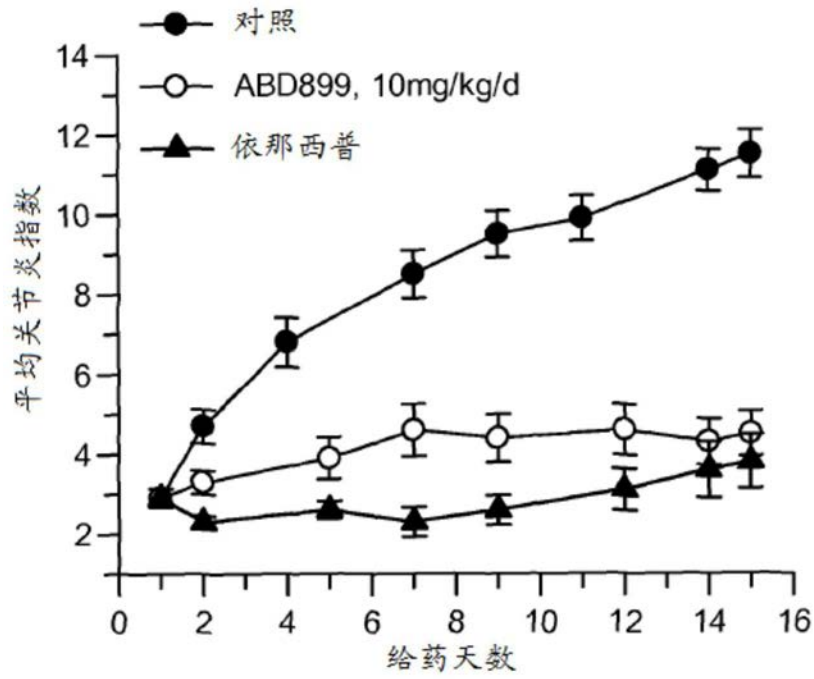


图1

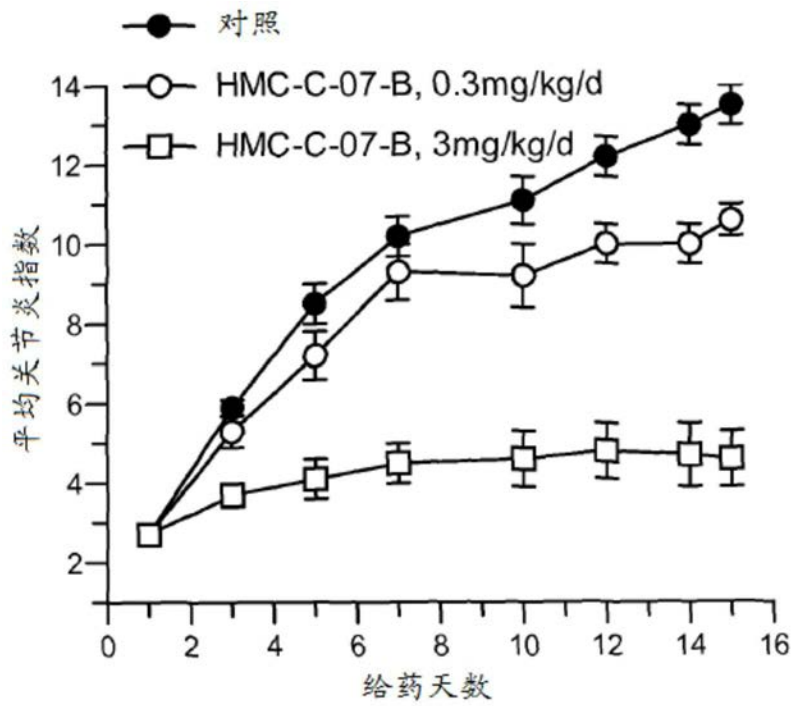


图2