



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103180316 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 26

(21) 申请号 201180050485. X

C07D 413/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 08. 26

A61K 31/427 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/423 (2006. 01)

61/377, 842 2010. 08. 27 US

A61P 29/00 (2006. 01)

A61P 19/10 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61P 3/10 (2006. 01)

2013. 04. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/049424 2011. 08. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02012/027710 EN 2012. 03. 01

(71) 申请人 钙医学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·P·惠滕 Y·裴 J·曹 Z·王

E·罗杰斯 B·戴克 J·格里

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 高瑜 杨淑媛

(51) Int. Cl.

C07D 417/14 (2006. 01)

C07D 417/04 (2006. 01)

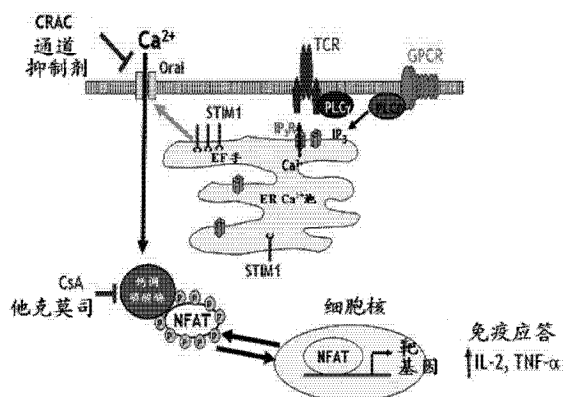
权利要求书12页 说明书129页 附图2页

(54) 发明名称

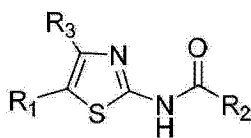
调节细胞内钙的化合物

(57) 摘要

本发明描述了调节钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性的化合物和包含此类化合物的药物组合物。本发明还描述了单独使用以及与其他化合物联合使用此类 SOC 通道调节剂以治疗将会从 SOC 通道活性的抑制中获益的疾病或病状的方法。

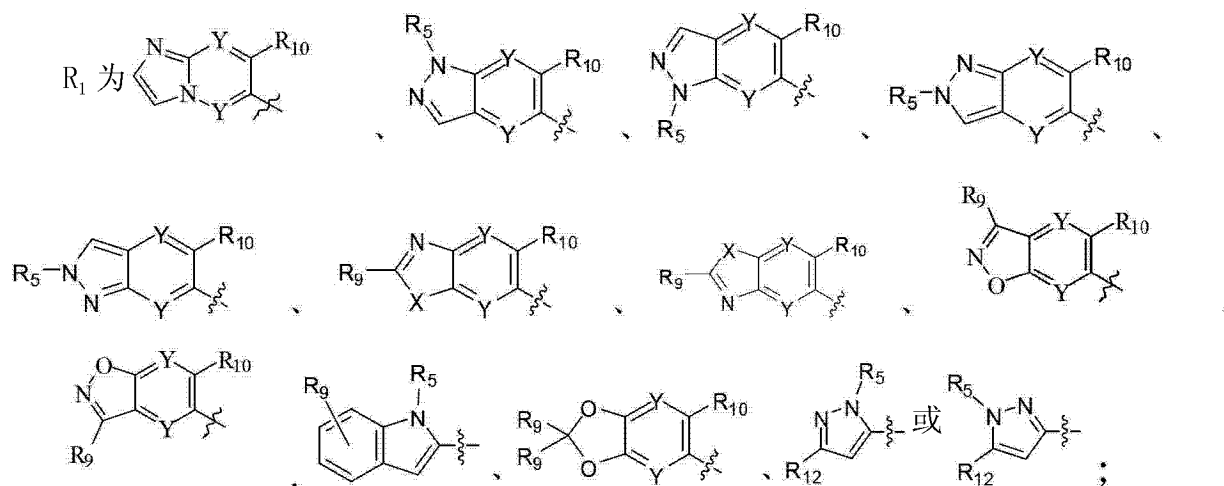


1. 一种具有式 (I) 结构的化合物, 或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药:



式 (I);

其中:



X 为 S、O 或 NR₅;

Y 独立地选自 CR₁₀ 或 N;

R₂ 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基; 其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R₃ 取代;

R₃ 独立地选自 H、F、D、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的 C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、任选地取代的 C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基;

R₅ 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、苯基和苄基;

R₉ 和 R₁₀ 各自独立地选自 H、D、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、卤素、C₁-C₆ 烷基羰基或 CF₃;

R₁₂ 选自 CN、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 R₂ 为芳基。

3. 权利要求 2 的化合物, 其中芳基为苯基。

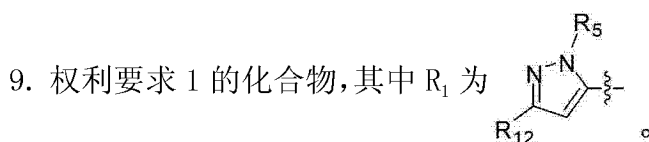
4. 权利要求 3 的化合物, 其中苯基经至少一个独立地选自 F、Cl、Br 和 I 的 R₃ 取代。

5. 权利要求 3 的化合物, 其中苯基经至少两个取代基取代。

6. 权利要求 1 的化合物, 其中 R₂ 为杂芳基。

7. 权利要求 6 的化合物, 其中杂芳基为吡啶基。

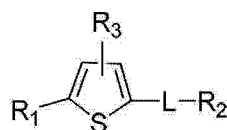
8. 权利要求 7 的化合物, 其中吡啶基经至少一个独立地选自 F 和 Cl 的 R₃ 取代。



10. 权利要求 9 的化合物, 其中 R_5 为 C_1-C_6 烷基。

11. 权利要求 10 的化合物, 其中 R_{12} 为 CF_3 。

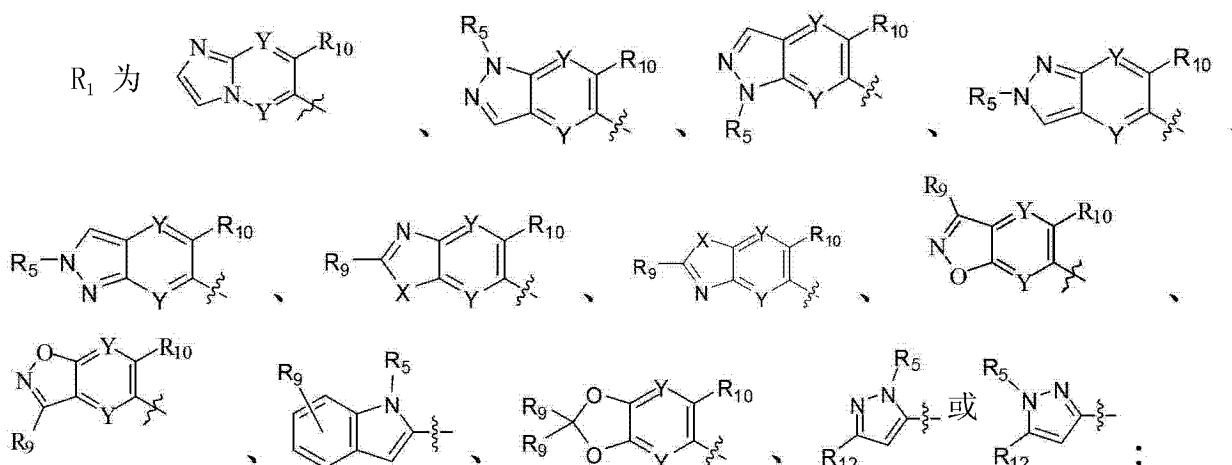
12. 一种具有式 (II) 结构的化合物, 或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药:



式 (II);

其中:

L 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)NH-$;



X 为 S 、 O 或 NR_5 ;

Y 独立地选自 CR_{10} 或 N ;

R_2 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基; 其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R_3 取代;

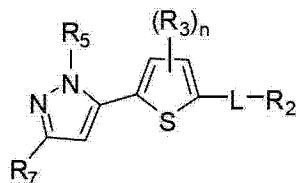
R_3 独立地选自 H 、 F 、 D 、 Cl 、 Br 、 I 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OR_5$ 、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_3-C_8 环烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、任选地取代的 C_2-C_8 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O -芳基、任选地取代的杂芳基;

R_5 选自 H 、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_3-C_8 环烷基、苯基和苄基;

R_{12} 为 CF_3 、任选地取代的芳基、任选地取代的 O -芳基或任选地取代的杂芳基;

R_9 和 R_{10} 各自独立地选自 H 、 D 、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、卤素、 C_1-C_6 烷基羰基或 CF_3 。

13. 一种具有式 (III) 结构的化合物, 或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药:



式 (III);

其中:

L 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)NH-$;

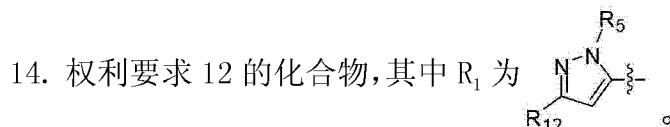
R_2 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基；其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R_8 取代；

R_8 独立地选自 F、D、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的 C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、任选地取代的 C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基；

R_3 独立地选自 F、D、Cl、Br、-CN、-NO₂、-OH、-NH₂、-CF₃ 和 -OCF₃；

R_5 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、苯基和苄基；

R_7 选自 CF₃、CN、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基；且 n 为选自 1 或 2 的整数。



15. 权利要求 14 的化合物, 其中 R_5 为 C₁-C₆ 烷基。

16. 权利要求 15 的化合物, 其中 R_{12} 为 CF₃。

17. 权利要求 12 的化合物, 其中 R_2 为芳基。

18. 权利要求 17 的化合物, 其中芳基为苯基。

19. 权利要求 18 的化合物, 其中所述苯基经至少一个独立地选自 F、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、C₁-C₆ 烷基、C₃-C₈ 环烷基、C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基的 R_3 取代。

20. 权利要求 19 的化合物, 其中 R_3 为氟。

21. 权利要求 18 的化合物, 其中苯基经至少两个取代基取代。

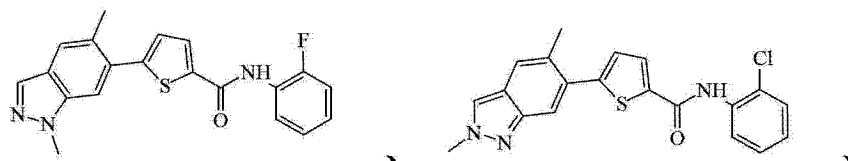
22. 权利要求 18 的化合物, 其中苯基经至少三个取代基取代。

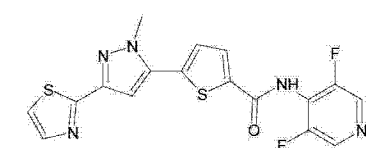
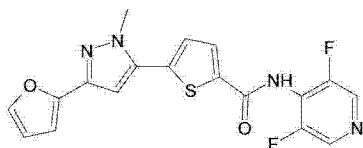
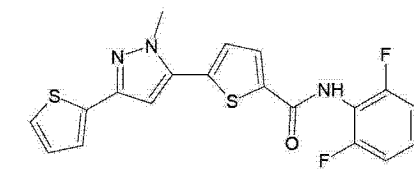
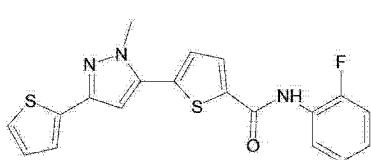
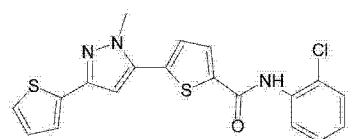
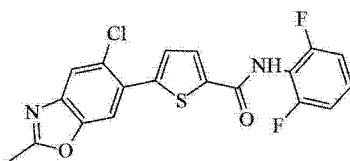
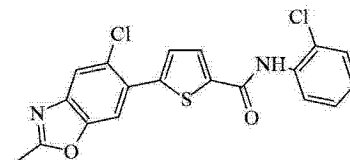
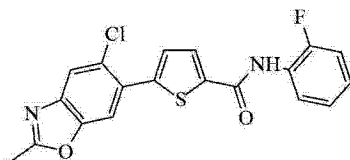
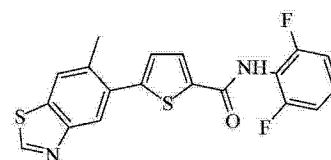
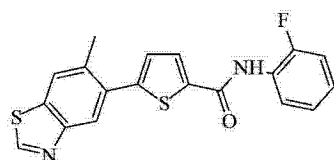
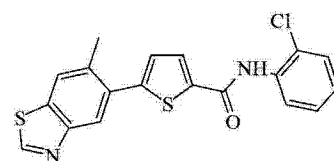
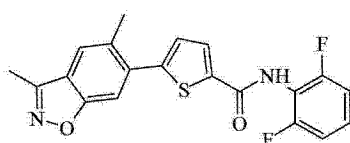
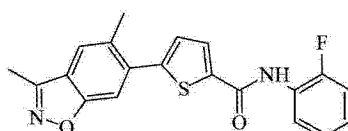
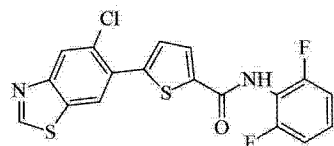
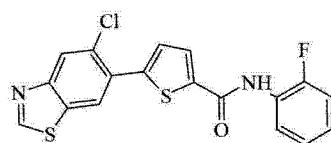
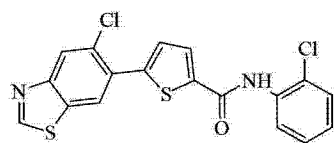
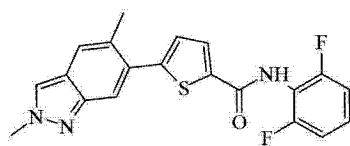
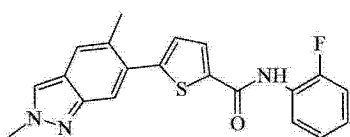
23. 权利要求 12 的化合物, 其中 R_2 为杂芳基。

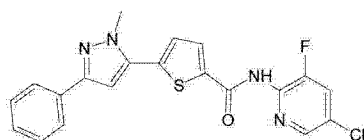
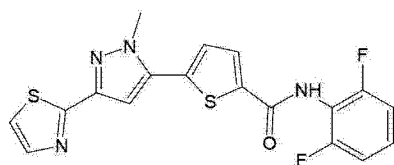
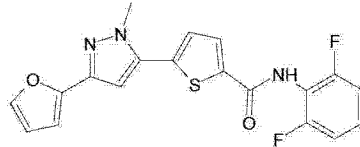
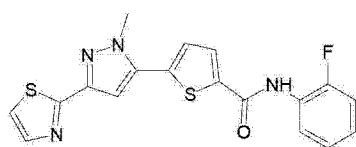
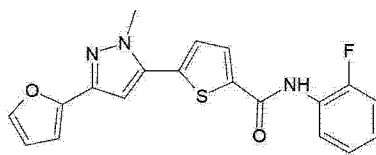
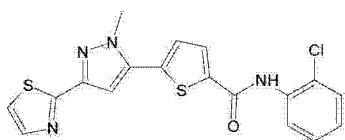
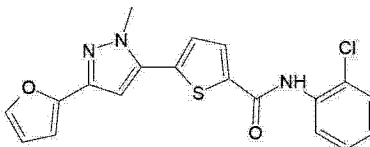
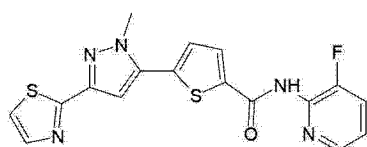
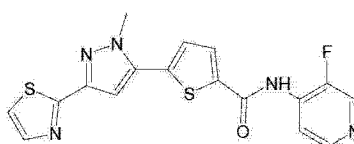
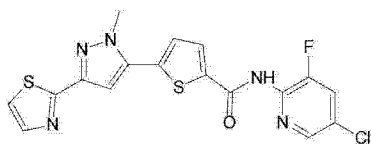
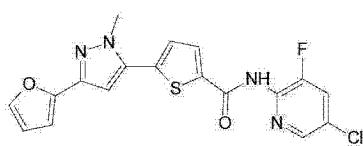
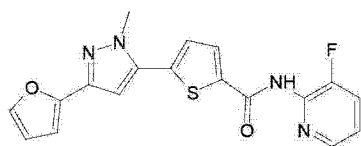
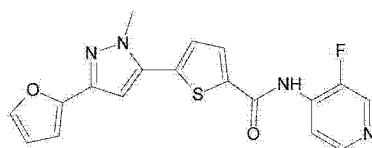
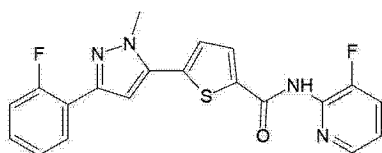
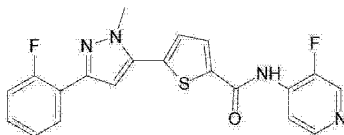
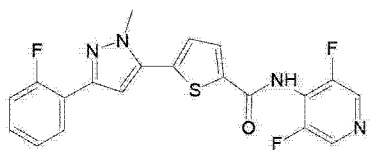
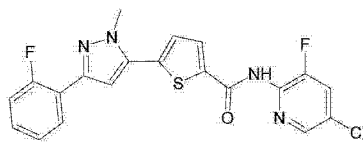
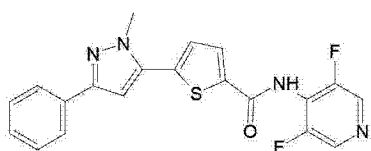
24. 权利要求 23 的化合物, 其中杂芳基为吡啶基。

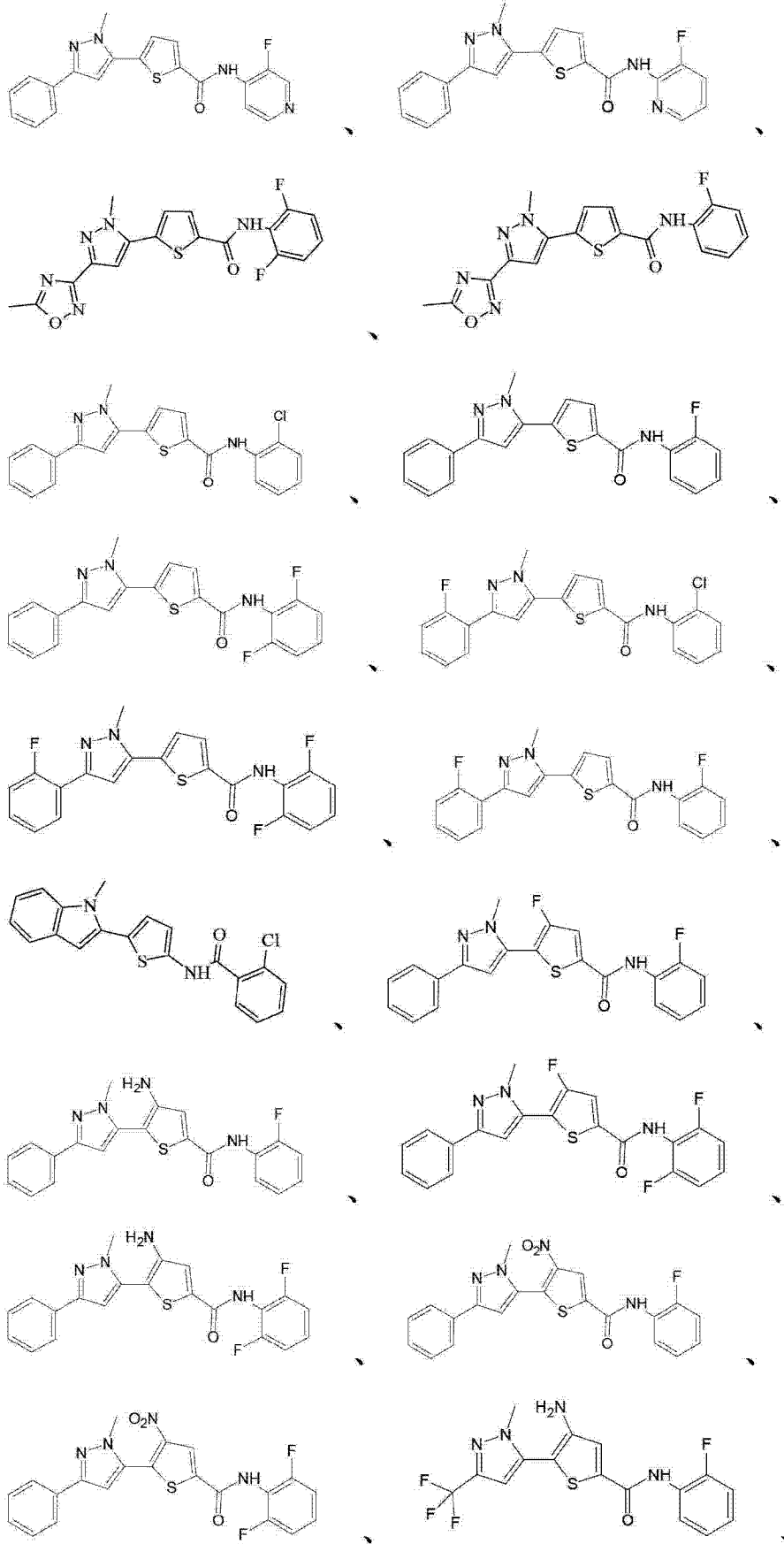
25. 权利要求 24 的化合物, 其中吡啶基经至少一个独立地选自 F 和 Cl 的 R_3 取代。

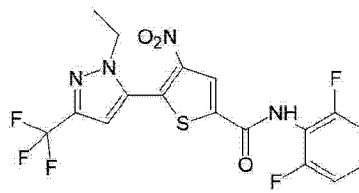
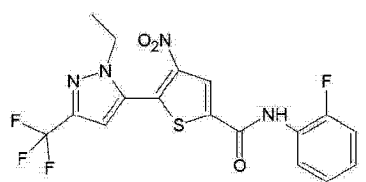
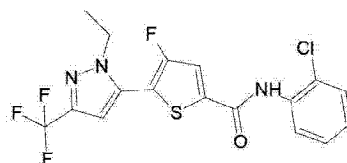
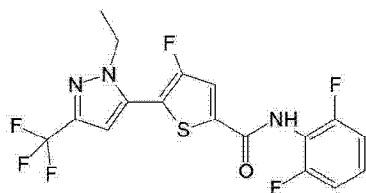
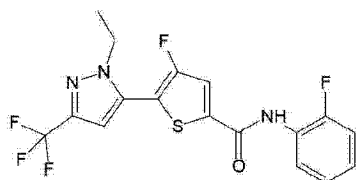
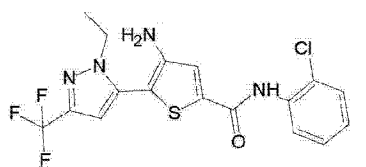
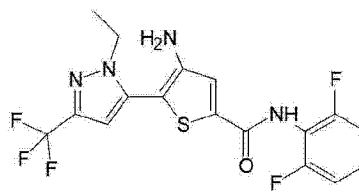
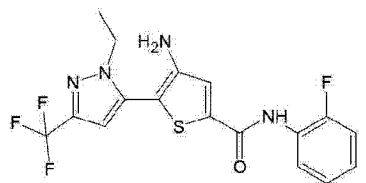
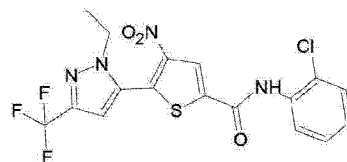
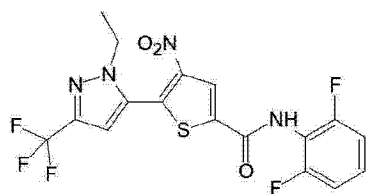
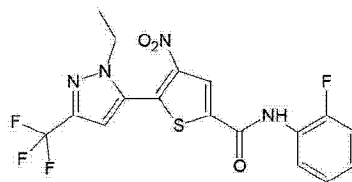
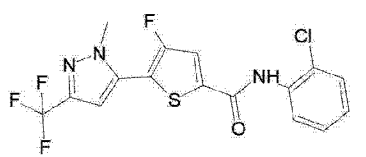
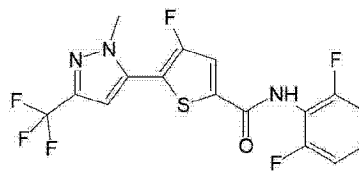
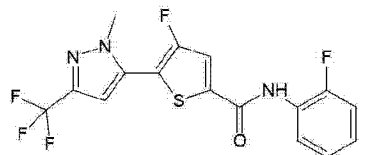
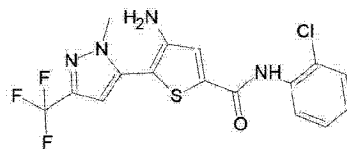
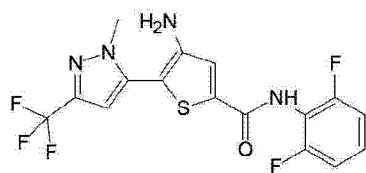
26. 一种化合物, 选自:

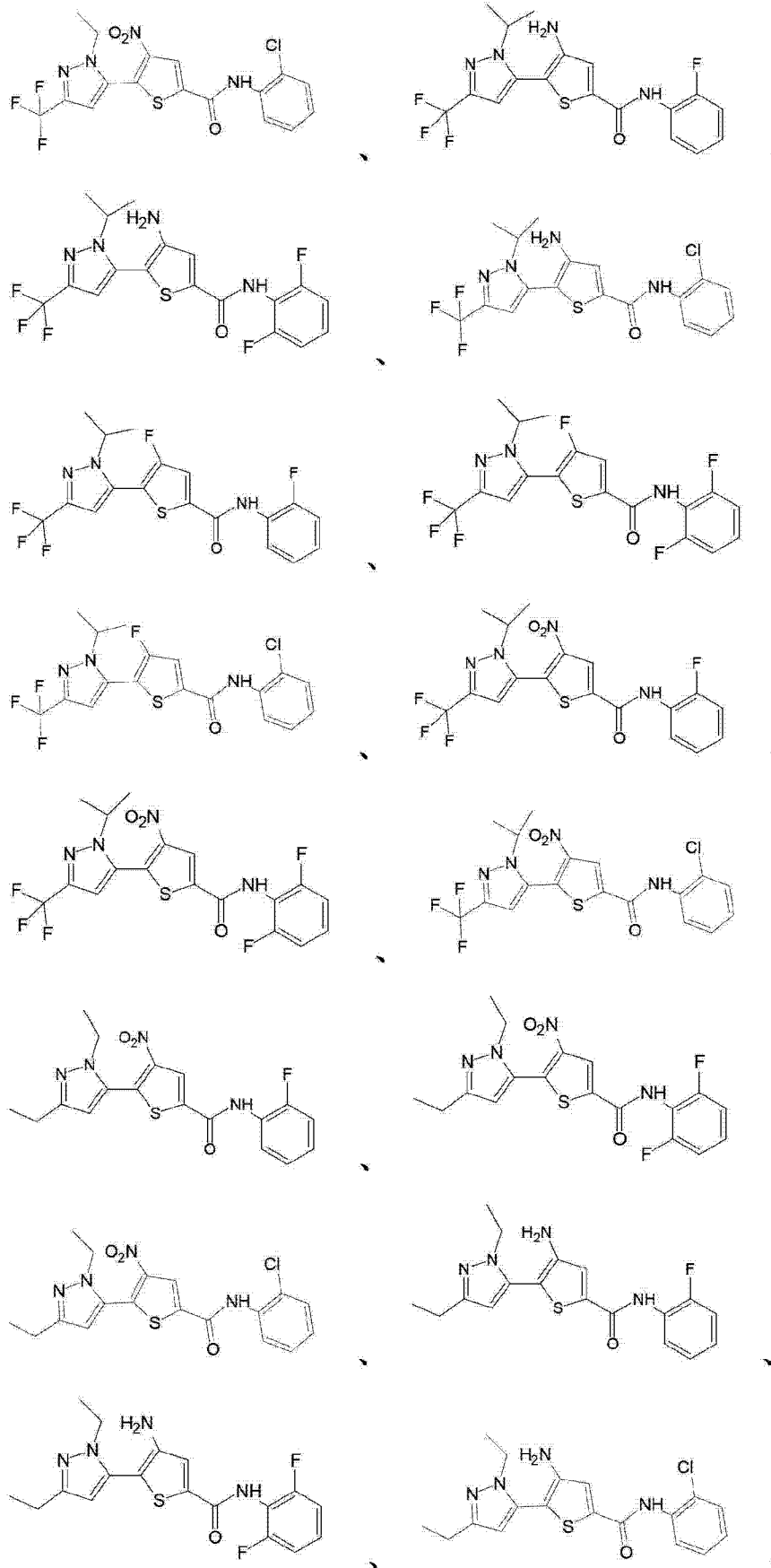


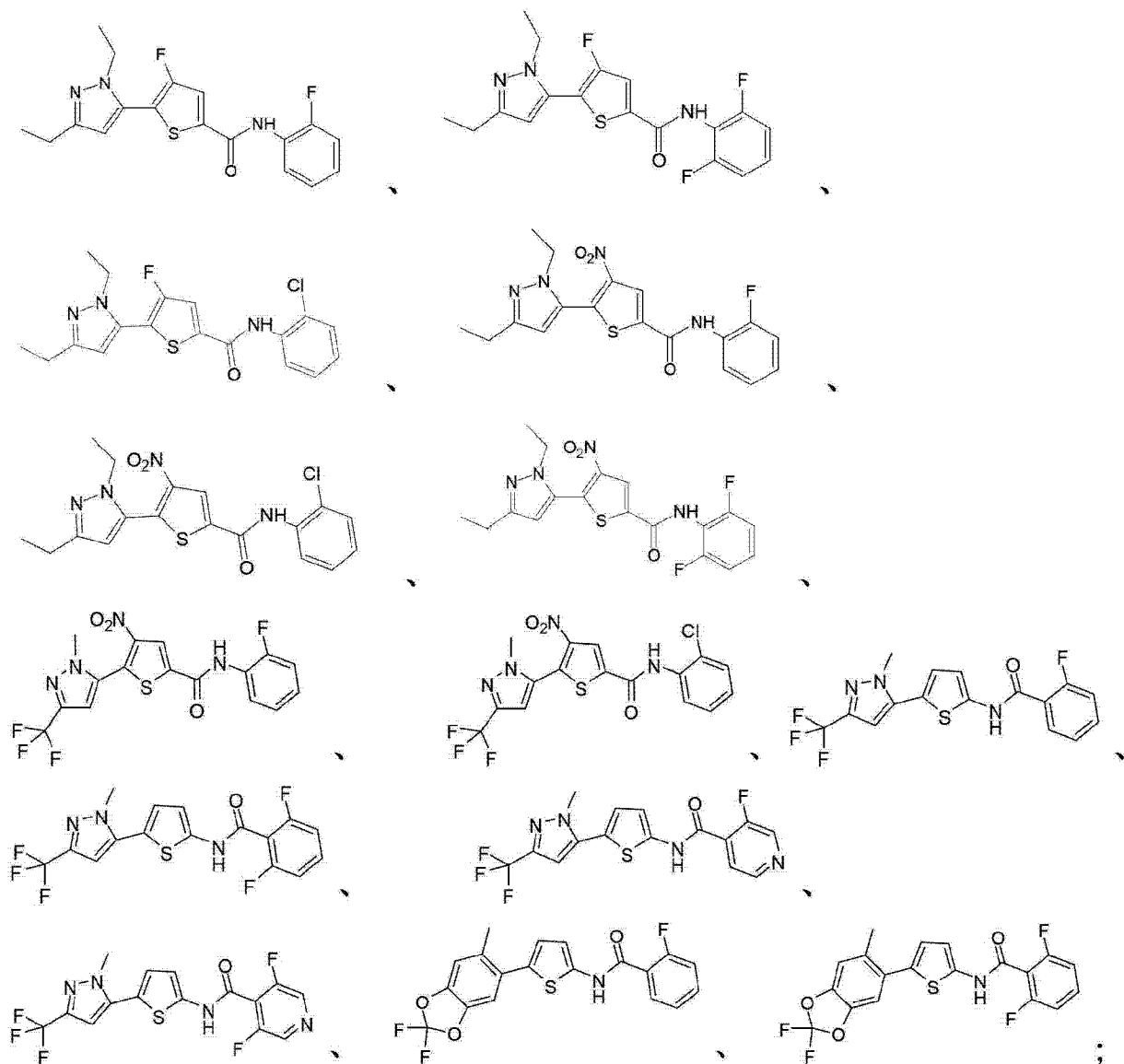






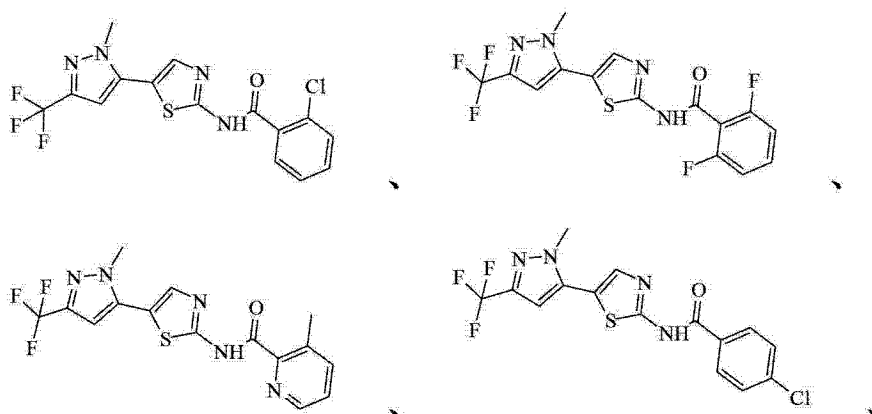


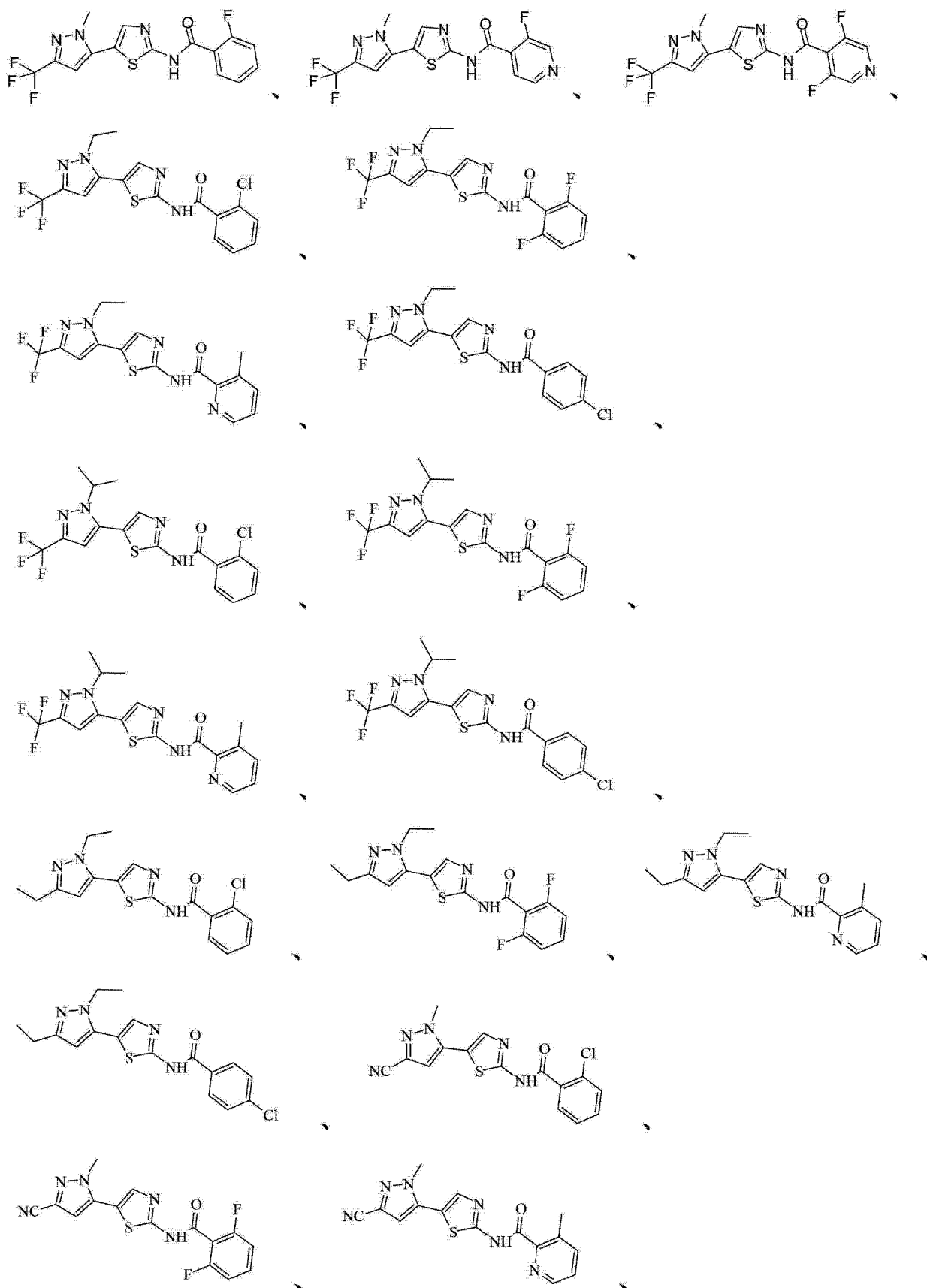


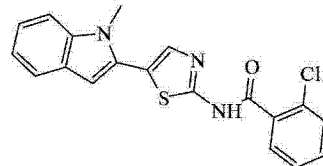
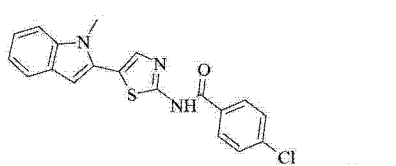
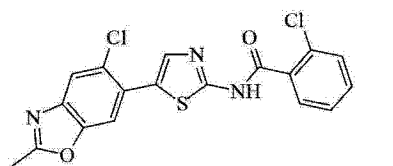
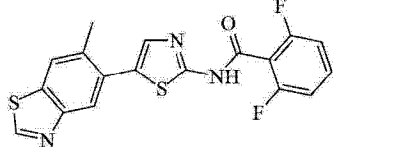
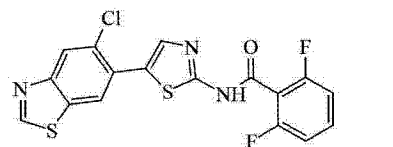
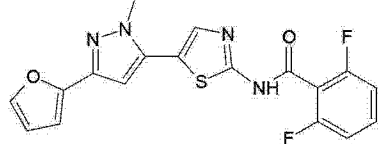
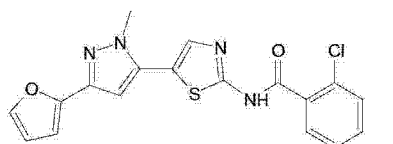
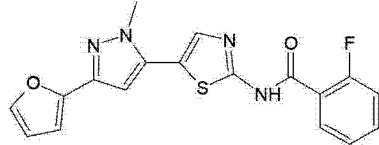
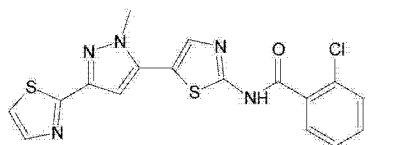
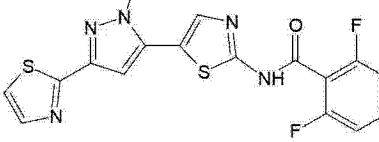
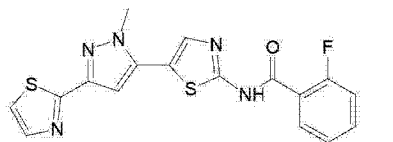
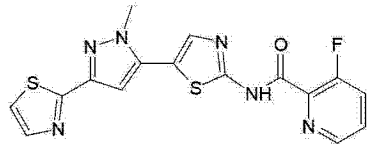
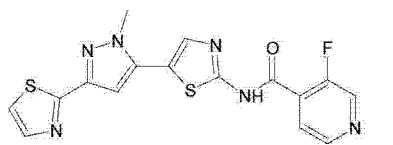
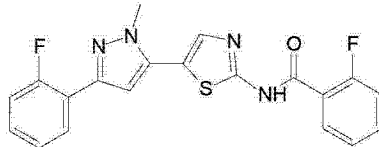
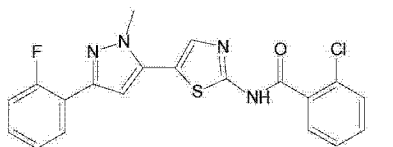
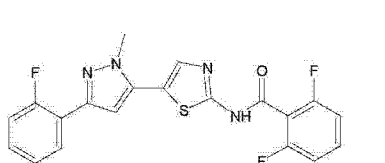
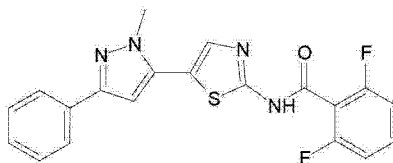
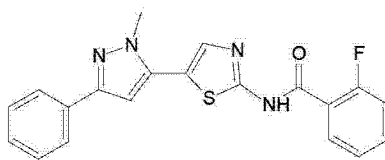
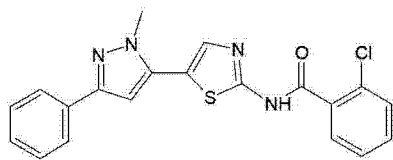


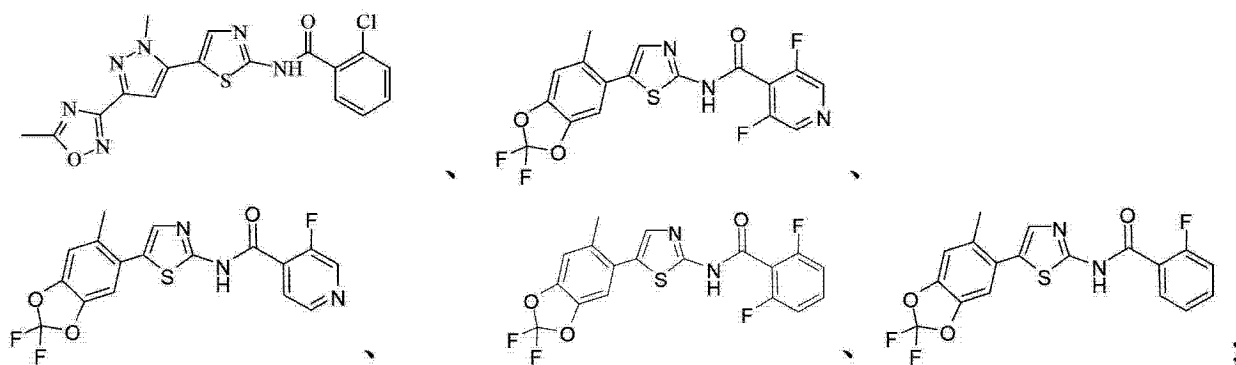
或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药。

27. 一种化合物,选自:









或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药。

28. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂或粘合剂和权利要求 1-27 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的前药或药学上可接受的溶剂合物。

29. 一种治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对所述哺乳动物施用根据权利要求 1-27 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药或者权利要求 28 的组合物。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述哺乳动物的疾病、病症或病状选自涉及以下方面的疾病/病症:炎症、肾小球肾炎、葡萄膜炎、肝脏疾病或病症、肾脏疾病或病症、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎、炎性肠病、血管炎、皮炎、骨关节炎、炎性肌病、变应性鼻炎、阴道炎、间质性膀胱炎、硬皮病、骨质疏松症、湿疹、器官移植排斥、同种异体移植或异种移植、移植物排斥、移植物抗宿主病、红斑狼疮、I 型糖尿病、肺纤维化、皮炎、甲状腺炎、重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血、囊性纤维化、慢性复发性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、变应性结膜炎、肝炎和特应性皮炎、哮喘、银屑病、多发性硬化症、舍格伦综合征和自身免疫疾病或病症。

31. 一种调节钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性的方法,包括使所述钙池操纵的钙 (SOC) 通道复合物或其部分与根据权利要求 1-27 所述的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药或者权利要求 28 的组合物接触。

32. 权利要求 1-27 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的前药或药学上可接受的溶剂合物在制备药物中的用途,该药物用于调节个体中的钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性或治疗个体中将会从所述钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性的调节中获益的疾病或病状。

33. 权利要求 32 的用途,其中权利要求 1-27 中任一项的化合物抑制钙池操纵的钙内流 (SOCE)。

34. 权利要求 32 或权利要求 33 的用途,其中所述钙池操纵的钙通道活性是钙释放激活的钙通道活性。

调节细胞内钙的化合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于 2010 年 8 月 27 日提交的美国临时申请第 61/377,842 号的权益,该临时申请通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文描述了化合物、包含所述化合物的药物组合物和药物以及使用所述化合物调节钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性的方法。

背景技术

[0004] 钙在细胞功能和存活中起重要作用。例如,钙是信号向细胞中转导和信号在细胞内转导的关键要素。细胞对生长因子、神经递质、激素和多种其他信号分子的响应通过钙依赖的过程来启动。

[0005] 几乎所有的细胞类型都以某种方式依赖细胞质 Ca^{2+} 信号的产生来调节细胞功能或引发特定响应。细胞溶质 Ca^{2+} 信号控制一系列细胞功能,所述细胞功能涵盖从短期响应(例如收缩和分泌)到细胞生长和增殖的长期调节。这些信号通常参与从细胞内钙池例如内质网 (ER) 释放 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 穿过质膜流入的某些组合。在一个实例中,细胞激活始于激动剂与表面膜受体的结合,所述表面膜受体通过 G- 蛋白机制与磷脂酶 C (PLC) 偶联。PLC 激活导致肌醇 1, 4, 5- 三磷酸 (IP_3) 的产生, IP_3 进而激活 IP_3 受体,从而引起 Ca^{2+} 从 ER 释放。ER 中 Ca^{2+} 的下降然后发出信号,以激活质膜的钙池操纵的钙 (SOC) 通道。

[0006] 钙池操纵的钙 (SOC) 流入是控制多种多样的功能的细胞生理学过程,所述功能例如但不限于:细胞内 Ca^{2+} 池的重填 (Putney 等人, Cell, 75, 199-201, 1993); 酶活性的激活 (Fagan 等人, J. Biol. Chem. 275:26530-26537, 2000); 基因转录 (Lewis, Annu. Rev. Immunol. 19:497-521, 2001); 细胞增殖 (Nunez 等人, J. Physiol. 571. 1, 57-73, 2006); 和细胞因子的释放 (Winslow 等人, Curr. Opin. Immunol. 15:299-307, 2003)。在一些不可兴奋细胞例如血液细胞、免疫细胞、造血细胞、T 淋巴细胞和肥大细胞中,通过钙释放激活的钙 (CRAC) 通道(一种类型的 SOC 通道)发生 SOC 流入。

[0007] 钙流入机制曾被称为钙池操纵的钙内流 (SOCE)。间质相互作用分子 (STIM) 蛋白是 SOC 通道功能的基本组分,充当传感器,用于探测钙从细胞内钙池的消耗并用于激活 SOC 通道。

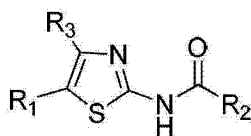
发明内容

[0008] 本文描述了式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物、包含所述化合物的组合物及使用其调节细胞内钙的方法。在一个方面,式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物通过抑制钙池操纵的钙通道活性调节细胞内钙。在一个方面,式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物通过阻止活化的钙池操纵的钙通道复合物的活性调节细胞内钙。在一个方面,式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物抑制钙池操纵通道的活化。在一个方面,式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化

合物抑制钙释放激活的钙通道的活化。在一个方面,式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物调节SOC通道复合物的至少一种蛋白质的活性,调节该蛋白质的相互作用,或调节该蛋白质的水平或分布,或与该蛋白质结合,或与该蛋白质相互作用。在一个方面,式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物调节CRAC通道复合物的至少一种蛋白质的活性,调节该蛋白质的相互作用,或调节该蛋白质的水平或分布,或与该蛋白质结合,或与该蛋白质相互作用。

[0009] 一方面,是具有以下结构的式(I)化合物,或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药:

[0010]



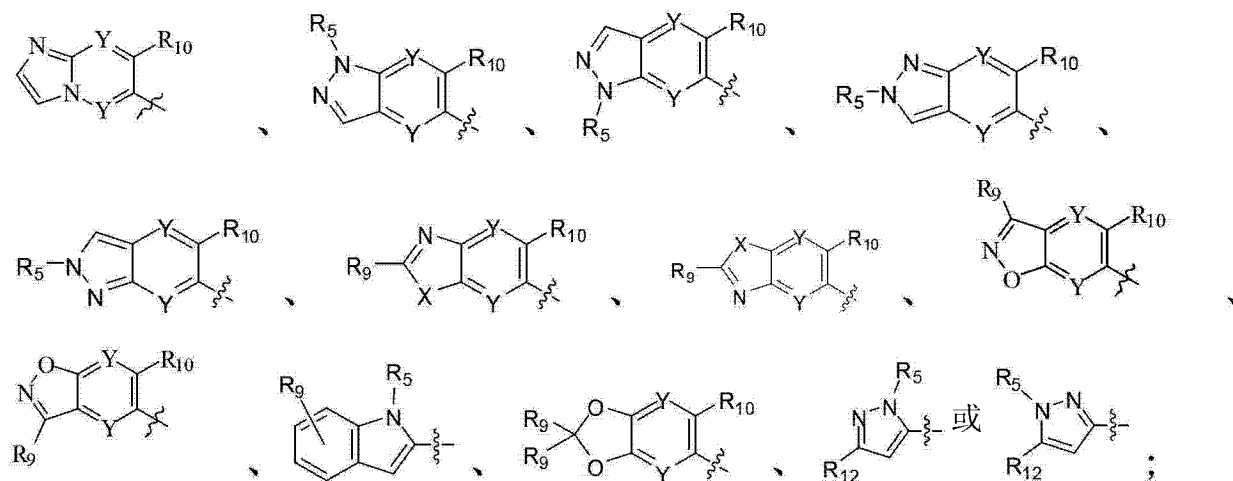
[0011] 式(I)

[0012] 其中:

[0013] R

1

为



[0014] X为S、O或NR₅;

[0015] Y独立地选自CR₁₀或N;

[0016] R₂为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基;其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个R₃取代;

[0017] R₃独立地选自H、F、D、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、任选地取代的C₁-C₆烷基、任选地取代的C₃-C₈环烷基、任选地取代的C₁-C₆杂烷基、C₁-C₆卤代烷基、任选地取代的C₂-C₈杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的O-芳基和任选地取代的杂芳基;

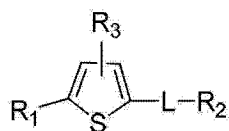
[0018] R₅选自H、C₁-C₆烷基、C₁-C₆卤代烷基、C₃-C₈环烷基、苯基和苄基;

[0019] R₉和R₁₀各自独立地选自H、D、任选地取代的C₁-C₆烷基、卤素、C₁-C₆烷基羰基或CF₃;

[0020] R₁₂选自CN、-OR₅、任选地取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆卤代烷基和任选地取代的C₃-C₈环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的O-芳基和任选地取代的杂芳基。

[0021] 另一方面,是具有式(II)结构的化合物,或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药:

[0022]



[0023] 式 (II) ;

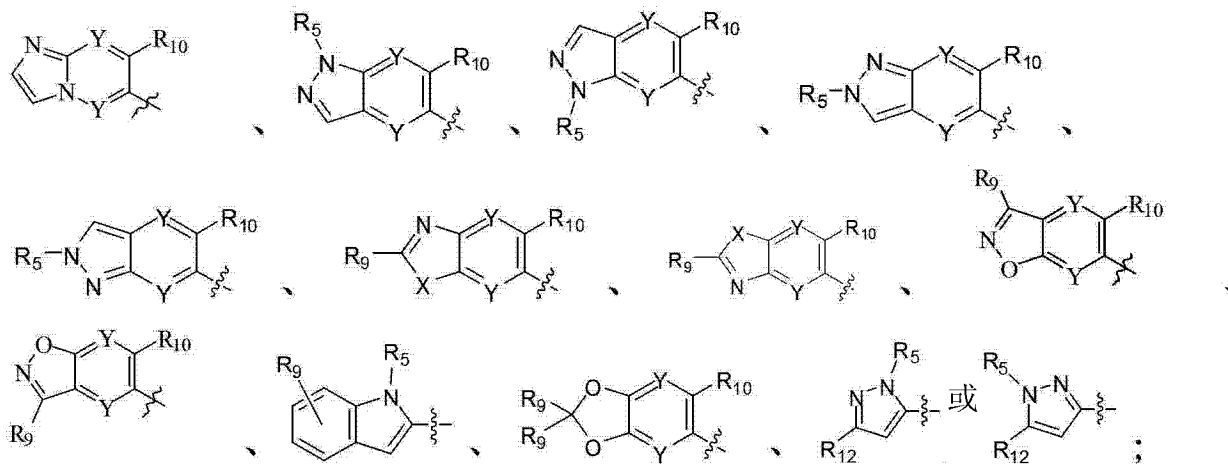
[0024] 其中 :

[0025] L 为 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$;

[0026] R

1

为



[0027] X 为 S、O 或 NR_5 ;

[0028] Y 独立地选自 CR_{10} 或 N ;

[0029] R_2 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基 ; 其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R_3 取代 ;

[0030] R_3 独立地选自 H、F、D、Cl、Br、I、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OR}_5$ 、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_3-C_8 环烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、任选地取代的 C_2-C_8 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基 ;

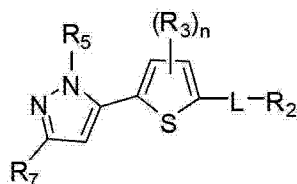
[0031] R_5 选自 H、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_3-C_8 环烷基、苯基和苄基 ;

[0032] R_{12} 为 CF_3 、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基或任选地取代的杂芳基 ;

[0033] R_9 和 R_{10} 各自独立地选自 H、D、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、卤素、 C_1-C_6 烷基羰基或 CF_3 。

[0034] 另一方面,是具有以下结构的式 (III) 化合物,或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药 :

[0035]



[0036] 式 (III)

[0037] 其中 :

[0038] L 为 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$;

[0039] R_2 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基 ; 其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂

芳基任选地经至少一个 R_8 取代；

[0040] R_8 独立地选自 F、D、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的 C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、任选地取代的 C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基；

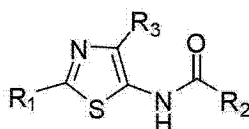
[0041] R_3 独立地选自 F、D、Cl、Br、-CN、-NO₂、-OH、-NH₂、-CF₃ 和 -OCF₃；

[0042] R_5 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、苯基和苄基；

[0043] R_7 选自 CF₃、CN、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基；且 n 为选自 1 或 2 的整数。

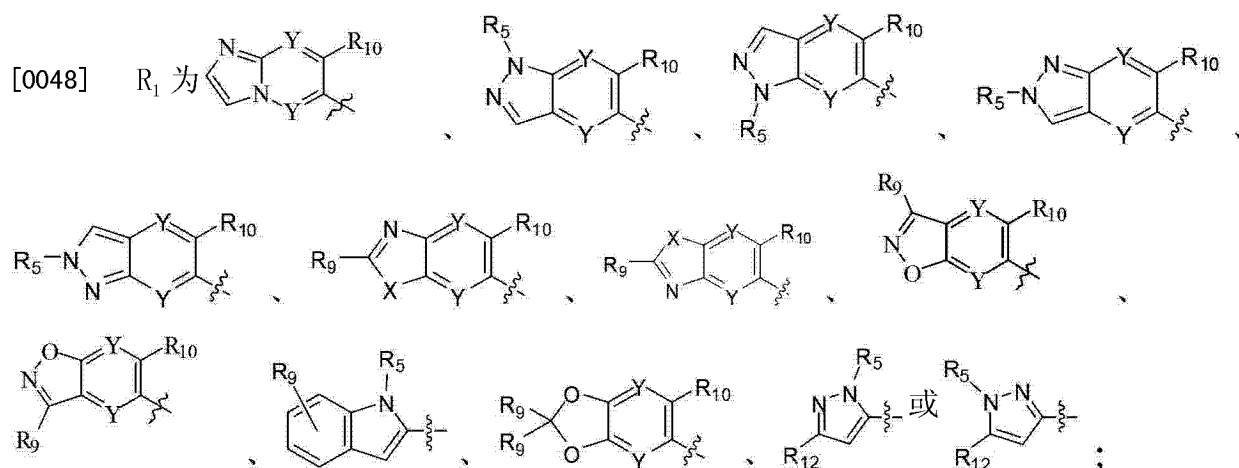
[0044] 另一方面，是具有以下结构的式 (IV) 化合物，或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药：

[0045]



[0046] 式 (IV)

[0047] 其中：



[0049] X 为 S、O 或 NR₅；

[0050] Y 独立地选自 CR₁₀ 或 N；

[0051] R_2 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基；其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R_3 取代；

[0052] R_3 独立地选自 H、F、D、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的 C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、任选地取代的 C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基；

[0053] R_5 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、苯基和苄基

[0054] R_9 和 R_{10} 各自独立地选自 H、D、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、卤素、C₁-C₆ 烷基羰基或 CF₃；

[0055] R_{12} 选自 CN、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基。

[0056] 在一个实施方案中，是式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物，其中 R_2 为芳基。

在另一实施方案中,芳基是苯基。在又一实施方案中,苯基经至少一个选自 D、F、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、C₁-C₆ 烷基、C₃-C₈ 环烷基、C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基的取代基取代。在一个实施方案中,取代基为氟。在一个实施方案中,苯基经至少两个取代基取代。在另一实施方案中,苯基经至少三个取代基取代。

[0057] 在另一实施方案中,是式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物,其中 R₂ 为杂芳基。在另一实施方案中,杂芳基为吡啶基。在又一实施方案中,吡啶基基团经至少一个选自 D、F、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、C₁-C₆ 烷基、C₃-C₈ 环烷基、C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基的取代基取代。在一个实施方案中,取代基为氟。在一个实施方案中,吡啶基经至少两个取代基取代。在另一实施方案中,吡啶基经至少三个取代基取代。

[0058] 在另一实施方案中,是式 (I)、(II) 或 (IV) 的化合物,其中 R₁ 为杂芳基。在另一实施方案中,杂芳基选自吡唑、呋喃、苯并噻唑或苯并噁唑。

[0059] 另一方面,是一种药物组合物,其包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂或粘合剂,和具有式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 结构的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的前药或药学上可接受的溶剂合物。

[0060] 另一方面,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用具有式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 结构的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,或者包含该成分与药学上可接受的稀释剂、赋形剂或粘合剂的药物组合物。

[0061] 另一方面,是调节钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性的方法,包括使 SOC 通道复合物或其部分接触式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,或者包含该成分与药学上可接受的稀释剂、赋形剂或粘合剂的药物组合物。

[0062] 另一方面,是在哺乳动物中调节钙释放激活的钙通道 (CRAC) 活性的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物,其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物调节哺乳动物中的 CRAC 活性。

[0063] 另一方面,是在哺乳动物中抑制活化 T 细胞核因子 (NFAT) 的钙池操纵的钙内流 (SOCE) 活化的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物,其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物抑制哺乳动物中 NFAT 的 SOCE 活化。

[0064] 又一方面,是在哺乳动物中通过抑制 NFAT 的 SOCE 活化来减少细胞因子释放的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物,其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物减少哺乳动物中的细胞因子释放。

[0065] 在进一步的方面,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II) 或 (III) 的化合物。

[0066] 一方面,是治疗哺乳动物的自身免疫疾病、异种免疫疾病或病状或炎性疾病的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐或前药。

[0067] 在一个实施方案中,自身免疫疾病是炎性肠病、类风湿性关节炎、重症肌无力、多

发性硬化症、舍格伦综合征、I 型糖尿病、红斑狼疮、银屑病、骨关节炎、硬皮病和自身免疫性溶血性贫血。

[0068] 在另一实施方案中,异种免疫疾病或病状是移植物抗宿主病、移植物排斥、特应性皮炎、变应性结膜炎、器官移植排斥、同种异体移植或异种移植和变应性鼻炎。

[0069] 在进一步的实施方案中,炎性疾病是葡萄膜炎、血管炎、阴道炎、哮喘、炎性肌肉疾病、皮炎、间质性膀胱炎、结肠炎、克罗恩病、皮炎、肝炎和慢性复发性肝炎。

[0070] 另一方面,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、N-氧化物或前药。

[0071] 在一个实施方案中,哺乳动物的疾病、病症或病状选自肾小球肾炎、肝脏疾病或病症、肾脏疾病或病症、慢性阻塞性肺病、骨质疏松症、湿疹、肺纤维化、甲状腺炎、囊性纤维化和原发性胆汁性肝硬化。

[0072] 本文提供的化合物用于调节细胞内钙。在一个方面,本文提供的化合物调节 SOC 通道活性。在一个方面,本文提供的化合物调节 CRAC 通道活性。在另一方面,本文提供的化合物调节 STIM 蛋白活性。在另一方面,本文提供的化合物调节 Orai 蛋白活性。在另一方面,本文提供的化合物调节 STIM 蛋白与 Orai 蛋白的功能性相互作用。在另一方面,本文提供的化合物减少功能性 SOC 通道的数目。在另一方面,本文提供的化合物减少功能性 CRAC 通道的数目。在一个方面,本文所述化合物是 SOC 通道阻滞剂。在一个方面,本文所述的化合物是 CRAC 通道阻滞剂或 CRAC 通道调节剂。

[0073] 在一个方面,式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物是 CRAC 通道活性的选择性抑制剂。

[0074] 从以下的详述中将会明了本文所述的化合物、组合物、方法和用途的其他目标、特点和优点。然而,应该理解,该详述及特定实施例尽管指出了特定实施方案,但仅以示例的方式提供,因为从本详述将会明白在本公开内容的精神和范围内的各种改变和修改。

附图说明

[0075] 图 1 概述了 I_{CRAC} 通道途径。

[0076] 图 2 示出了在稳定地过表达 Orai1 和 STIM1 的细胞中,在紧接中断 (break-in) 之后,在激活 I_{CRAC} 之前,以及在胞内钙池耗竭完全激活 I_{CRAC} 之后 5 分钟时,响应于电压刺激的典型 I_{CRAC} 踪迹。

[0077] 发明详述

[0078] 细胞钙稳态是涉及控制细胞内钙水平和钙移动的调控系统总和的结果。细胞钙稳态至少部分地通过以下方式实现:通过钙结合;通过钙穿过质膜进出细胞的移动;以及在细胞内通过钙穿过细胞内细胞器的膜移动,所述细胞器包括,例如内质网、肌浆网、线粒体和包括内体和溶酶体在内的胞吞细胞器。

[0079] 钙穿过细胞膜的移动通过特化的蛋白质进行。例如,来自细胞外隙的钙可通过各种钙通道和钠/钙交换体进入细胞,并通过钙泵和钠/钙交换体从细胞主动排出。钙还可通过肌醇三磷酸或兰尼碱 (ryanodine) 受体从内部钙池释放,并可被这些细胞器借助钙泵吸收。

[0080] 钙可通过几种普通类型的通道中的任何一种进入细胞,所述通道包括但不限于电压操纵的钙(VOC)通道、钙池操纵的钙通道(SOC)和以反向模式运行的钠/钙交换体。VOC通道由膜去极化激活,并且在可兴奋细胞例如神经细胞和肌肉细胞中发现,而在大多数情况下在不可兴奋细胞中没有发现。在某些条件下, Ca^{2+} 可经由以反向模式运行的 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换体进入细胞。

[0081] 胞吞作用提供了另一过程,通过该过程细胞可经由内体从细胞外基质中吸收钙。另外,某些细胞例如外分泌细胞可经由胞吐作用释放钙。

[0082] 细胞溶质钙浓度被严格调节为静息水平,在哺乳动物细胞中通常估计为大约 $0.1\ \mu\text{M}$,而细胞外钙浓度通常为约 2mM 。这种严格调节便于信号借助于穿过质膜和胞内细胞器膜的瞬时钙流而转导到细胞内和在细胞内转导。在细胞中有多种细胞内钙转运和缓冲系统,它们起调整细胞内钙信号和维持低静息细胞质钙浓度的作用。在静息细胞内,参与维持基础钙水平的主要元件是在内质网和质膜两者中的钙泵和渗漏途径。静息的细胞溶质钙水平的扰动可影响钙依赖性信号的传送,并且在大量细胞过程中导致缺陷。例如,细胞增殖涉及长期的钙信号传导顺序。其他涉及钙信号传导的细胞过程包括但不限于分泌、转录因子信号传导和受精。

[0083] 激活磷脂酶C(PLC)的细胞表面受体产生来自细胞内和细胞外来源的细胞溶质 Ca^{2+} 信号。由于从内质网(ER)释放 Ca^{2+} 而导致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (细胞内钙浓度)的初始瞬时升高,这一过程由PLC产物肌醇-1,4,5-三磷酸(IP_3)引发, IP_3 打开ER中的 IP_3 受体(Strebb等人,Nature,306,67-69,1983)。然后接着发生通过质膜中特化的钙池操纵的钙(SOC)通道(在免疫细胞的情况下,所述SOC通道为钙释放激活的钙(CRAC)通道)穿过质膜的持续 Ca^{2+} 内流的后续阶段。钙池操纵的 Ca^{2+} 内流(SOCE)是其中 Ca^{2+} 池本身的排空激活质膜中的 Ca^{2+} 通道以帮助重填钙池的过程(Putney,Cell Calcium,7,1-12,1986;Parekh等人,Physiol. Rev. 757-810;2005)。SOCE不只是简单地为了重填钙池而提供 Ca^{2+} ,而是其本身可产生持续的 Ca^{2+} 信号,所述信号控制诸如基因表达、细胞代谢和胞吐作用等基本功能(Parekh和Putney,Physiol. Rev. 85,757-810(2005))。

[0084] 在淋巴细胞和肥大细胞中,抗原或Fc受体的激活分别引起 Ca^{2+} 从细胞内钙池释放,进而导致通过质膜中的CRAC通道的 Ca^{2+} 流入。随后细胞内 Ca^{2+} 的升高激活钙调磷酸酶,这是一种调节转录因子NFAT的磷酸酶。在静息细胞中,NFAT被磷酸化,并位于细胞质中,但当被钙调磷酸酶去磷酸化时,NFAT转移到细胞核,并根据刺激条件和细胞类型而激活不同的遗传程序。响应于感染及在移植排斥期间,NFAT与在“效应”T细胞的细胞核中的转录因子AP-1(Fos-Jun)合作,由此反式激活细胞因子基因、调节T细胞增殖的基因和其他协调主动免疫应答的基因(Rao等人,Annu Rev Immunol.,1997;15:707-47)。与此相反,在识别自身抗原的T细胞中,在没有AP-1的情况下NFAT被激活,并激活被称为“无反应性(anergy)”的转录程序,该转录程序抑制自身免疫应答(Macian等人,Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. Cell. 2002年6月14日;109(6):719-31)。在被称为调节性T细胞的T细胞亚类(其抑制由自身反应性效应T细胞介导的自身免疫)中,NFAT与转录因子FOXP3合作以激活负责抑制功能的基因(Wu等人,Cell,2006年7月28日;126(2):375-87;Rudensky AY, GavinM, ZhengY. Cell. 2006年7月28日;126(2):253-256)。

[0085] 内质网(ER)执行多种过程。ER具有作为 Ca^{2+} 槽和激动剂敏感性 Ca^{2+} 池的作用,

并且蛋白质折叠 / 加工在其腔内发生。在后一种情况下,众多的 Ca^{2+} - 依赖性伴侣蛋白质确保新合成的蛋白质正确折叠并被运送到合适的目的地。ER 还参与囊泡运输、应激信号的释放、胆固醇代谢的调节和细胞凋亡。这些过程中的许多都需要腔内的 Ca^{2+} , 并且蛋白质错误折叠、ER 应激反应和细胞凋亡都可由长时间消耗 ER 中的 Ca^{2+} 而诱导。因为它含有有限量的 Ca^{2+} , 显然在刺激期间释放 Ca^{2+} 后, ERCa^{2+} 含量应该下降。然而, 为了保持 ER 的功能完整性, 至关重要是 Ca^{2+} 含量不能降得太低或至少维持在低水平上。因此给 ER 补充 Ca^{2+} 对于所有真核细胞而言都是重要的过程。因为 ERCa^{2+} 含量的降低激活质膜中的钙池操纵的 Ca^{2+} 通道, 所以认为该 Ca^{2+} 内流途径的主要功能是维持对合适的蛋白质合成和折叠必不可少的 ERCa^{2+} 水平。然而, 钙池操纵的 Ca^{2+} 通道具有其他重要作用。

[0086] 电生理学研究提供了对钙池操纵的钙内流的认识, 所述电生理学研究确定了排空钙池的过程激活肥大细胞中的 Ca^{2+} 电流, 其被称为 Ca^{2+} 释放激活的 Ca^{2+} 电流或 I_{CRAC} 。 I_{CRAC} 为非电压激活的、内向整流, 并且明显对于 Ca^{2+} 是选择性的。在几种主要为造血来源的细胞类型中发现了 I_{CRAC} 。 I_{CRAC} 不是唯一的钙池操纵的电流, 而且现在很明显, 钙池操纵的流入包括在不同细胞类型中具有不同性质的 Ca^{2+} - 通透性通道家族。 I_{CRAC} 是所阐述的第一种钙池操纵的 Ca^{2+} 电流, 并且仍然是用于研究钙池操纵的流入的流行模型。

[0087] 可通过排空 ERCa^{2+} 池的任何程序来激活钙池操纵的钙通道; 钙池是怎样排空的似乎无关紧要, 净效应是钙池操纵的 Ca^{2+} 内流的激活。在生理学上, 由 IP_3 水平的升高或其他 Ca^{2+} - 释放信号诱导钙池排空, 接着是从钙池释放 Ca^{2+} 。但还有若干其他用于排空钙池的方法。这些方法包括以下这些:

[0088] 1) 提高细胞溶质中的 IP_3 (在受体刺激后或用 IP_3 本身或相关同类物例如不可代谢的类似物 $\text{Ins}(2, 4, 5)\text{P}_3$ 透析细胞溶质);

[0089] 2) 应用 Ca^{2+} 离子载体 (例如, 离子霉素) 来对 ER 膜进行通透化;

[0090] 3) 用高浓度的 Ca^{2+} 螯合剂 (例如, EGTA 或 BAPTA) 透析细胞质, 所述螯合剂螯合从钙池渗漏的 Ca^{2+} 并因此防止钙池重填;

[0091] 4) 与例如 **毒** 胡萝卜素 (thapsigargin)、环匹阿尼酸 (cyclopiazonic acid) 和二叔丁基对苯二酚等肌浆网 / 内质网 Ca^{2+} -ATP 酶 (SERCA) 抑制剂接触;

[0092] 5) 用例如硫柳汞等药剂使 IP_3 受体对静息水平的 InsP_3 敏感; 和

[0093] 6) 将可透过膜的金属 Ca^{2+} 螯合剂例如 N, N, N', N' - 四 (2- 吡啶基甲基) 乙二胺 (TPEN) 直接填充到钙池中。

[0094] 通过质量作用, TPEN 降低游离的腔内 Ca^{2+} 浓度而不改变总钙池 Ca^{2+} , 从而产生钙池耗竭依赖性信号。

[0095] 这些排空钙池的方法存在潜在的问题。钙池操纵的 Ca^{2+} 内流的关键特征是, 激活通道的是钙池中 Ca^{2+} 含量的降低, 而不是随后细胞质 Ca^{2+} 浓度的升高。然而, 离子霉素和 SERCA 泵阻滞剂通常由于钙池耗竭而引起细胞质 Ca^{2+} 浓度升高, 而这种 Ca^{2+} 升高能够打开可透过 Ca^{2+} 的、 Ca^{2+} 激活的阳离子通道。避免这类问题的一种方法是在用高浓度的 Ca^{2+} 螯合剂如 EGTA 或 BAPTA 强烈缓冲细胞质 Ca^{2+} 的条件下使用药剂。

[0096] 钙池操纵的钙内流

[0097] 由于从细胞内钙池 (例如内质网) 释放钙而引起的其中钙浓度的降低提供了钙从细胞外基质流入细胞内的信号。这种钙流入 (其产生细胞溶质钙浓度的持续“平台期”

升高)通常不依靠电压门控的质膜通道,并且不涉及钙对钙通道的激活。这种钙流入机制被称为容量性钙内流(CCE)、钙释放激活的、钙池操纵的或耗竭操纵的钙内流。可将钙池操纵的钙内流记录为具有独特性质的离子电流。该电流被称为 I_{SOC} (钙池操纵的电流)或 I_{CRAC} (钙释放激活的电流)。

[0098] 钙池操纵的或钙释放激活的电流的电生理学分析揭示了这些电流的独特的生物物理性质(参见,例如 Parekh 和 Penner(1997) *Physiol. Rev.* 77:901-930)。例如,该电流可被细胞内钙池的耗竭(例如通过非生理激活剂,例如 ~~毒~~胡萝卜素、CPA、离子霉素和 BAPTA,和生理激活剂,例如 IP_3) 激活,并且可在生理溶液或条件下相对于单价离子对二价阳离子例如钙是选择性的,可受到细胞溶质钙水平的变化的影响,并且可在低细胞外浓度的二价阳离子的存在下显示出改变的选择性和传导性。该电流还可被 2-APB 阻断或增强(取决于浓度),被 SKF96365 和 Gd^{3+} 阻断,并且通常可被描述为非严格电压门控的。

[0099] 在肥大细胞和 Jurkat 白血病 T 细胞中进行的膜片钳研究已经确定了 CRAC 内流机制为具有独特生物物理特性的离子通道,该特性包括与极低传导性配对的对 Ca^{2+} 的高选择性。此外,显示 CRAC 通道满足钙池操纵的严格标准,其仅由 ER 中 Ca^{2+} 的降低激活,而不由细胞溶质 Ca^{2+} 或 PLC 产生的其他信息激活(Prakriya 等人,在 *Molecular and Cellular Insights into Ion Channel Biology*(Robert Maue 编)121-140(Elsevier Science, Amsterdam, 2004)中)。

[0100] 细胞内钙池对钙池操纵的钙内流的调节

[0101] 钙池操纵的钙内流由细胞内钙池中的钙水平来调节。细胞内钙池的特征可以是对药剂的敏感性,所述药剂可以是生理学药剂或药理学药剂,它们激活钙从钙池的释放或抑制钙向钙池中的吸收。业已研究了不同细胞的细胞内钙池的特征,并且已将钙池表征为对多种药剂敏感,所述药剂包括但不限于 IP_3 和影响 IP_3 受体的化合物、~~毒~~胡萝卜素、离子霉素和/或环ADP-核糖(cADPR)(参见,例如 Berridge(1993) *Nature* 361:315-325; Churchill 和 Louis(1999) *Am. J. Physiol.* 276:C426-C434; Dargie 等人(1990) *Cell Regul.* 1:279-290; Gerasimenko 等人(1996) *Cell* 84:473-480; Gromoda 等人(1995) *FEBS Lett.* 360:303-306; Guse 等人(1999) *Nature* 398:70-73)。

[0102] 通过通常被称为钙泵的肌浆网-内质网钙 ATP 酶(SERCA)来实现内质网和肌浆网(SR;横纹肌中的内质网的特化形式)贮存细胞器内的钙累积。在信号转导期间(即当内质网通道被激活以提供钙从内质网向细胞质内的释放时),通过 SERCA 泵用已从细胞外基质进入细胞的细胞质钙对内质网钙进行补充(Yu 和 Hinkle(2000) *J. Biol. Chem.* 275:23648-23653; Hofer 等人(1998) *EMBO J.* 17:1986-1995)。

[0103] 与 IP_3 和兰尼碱受体有关的钙释放通道提供钙从内质网和肌浆网向细胞质内的控制释放,从而导致细胞质钙浓度瞬时提高。 IP_3 受体介导的钙释放由 IP_3 引发, IP_3 是通过经由磷脂酶 C 的作用裂解质膜磷酸肌醇而形成的,而磷脂酶 C 是通过激动剂与质膜 G 蛋白偶联受体或酪氨酸激酶的结合而激活的。兰尼碱受体介导的钙释放由细胞质钙的增加引发,被称为钙诱导的钙释放(CICR)。兰尼碱受体(对兰尼碱和咖啡因具有亲和力)的活性也可由环ADP-核糖调节。

[0104] 因此,钙池中和细胞质中的钙水平起伏不定。例如,当用组胺(PLC-连接的组

胺受体的激动剂) 处理 HeLa 细胞时, ER 游离钙浓度可从约 60–400 μM 的范围降低到约 1–50 μM (Miyawaki 等人 (1997) Nature 388:882–887)。随着细胞内钙池的游离钙浓度降低, 钙池操纵的钙内流得到激活。因此, 钙池钙的耗竭以及伴随的细胞溶质钙浓度的升高可调节向细胞内的钙池操纵的钙内流。

[0105] 细胞质钙缓冲作用

[0106] 激动剂对细胞中信号传导过程的激活可涉及例如通过打开 IP_3 受体通道大大增加内质网的钙通透性, 以及通过钙池操纵的钙内流大大增加质膜的钙通透性。钙通透性的这些增加与细胞溶质钙浓度的增加有关, 而细胞溶质钙浓度的增加可分为两个组分: 在 IP_3 受体激活期间钙从内质网释放的“尖峰”期, 和由于钙从细胞外基质进入细胞质中而引起的钙水平持续升高的平台期。一旦受到刺激, 约 100nM 的静息细胞内游离钙浓度可整体上升到大于 1 μM , 且在细胞微域内更高。细胞用内源钙缓冲器调节这些钙信号, 包括诸如线粒体、内质网和高尔基体等细胞器的生理缓冲作用。线粒体通过内膜中的单向输送体吸收钙是由大的、负的线粒体膜电位驱动的, 累积的钙通过钠依赖的和非钠依赖的交换体缓慢释放, 在某些情况下, 通过通透性转换孔 (PTP) 缓慢释放。因此, 线粒体可通过在细胞激活期间吸收钙而起到钙缓冲器的作用, 并且稍后可缓慢释放钙。钙向内质网内的吸收由肌浆网和内质网钙 ATP 酶 (SERCA) 调节。钙向高尔基体内的吸收由 P- 型钙转运 ATP 酶 (PMR1/ATP2C1) 介导。另外, 有证据表明有显著量的在 IP_3 受体激活后释放的钙通过质膜钙 ATP 酶的作用而排出细胞。例如, 质膜钙 ATP 酶在人 T 细胞和 Jurkat 细胞中提供占优势的钙清除机制, 尽管在人 T 细胞中钠 / 钙交换也有助于钙清除。在贮钙细胞器内, 钙离子可与诸如集钙蛋白、钙网蛋白和钙联蛋白等特化钙缓冲蛋白质结合。另外, 在细胞溶质中存在调节钙尖峰并有助于钙离子再分配的钙缓冲蛋白质。因此, 参与任何这些和其他机制 (通过其可降低细胞溶质钙水平) 的蛋白质和其他分子, 是涉及、参与和 / 或提供细胞质钙缓冲作用的蛋白质。因此, 细胞质钙缓冲作用在通过 SOC 通道持续钙流入或 Ca^{2+} 释放爆发期间帮助调节细胞质 Ca^{2+} 水平。细胞质 Ca^{2+} 水平的大幅增加或钙池重填使 SOCE 失活。

[0107] 下游钙内流介导的事件

[0108] 除细胞内钙池变化外, 钙池操纵的钙内流还影响许多事件, 这些事件是钙池操纵的变化的结果, 或是除钙池操纵的变化之外还发生的事件。例如, Ca^{2+} 流入导致包括丝氨酸磷酸酶钙调磷酸酶在内的大量钙调蛋白 - 依赖性酶的激活。细胞内钙增加对钙调磷酸酶的激活引起诸如肥大细胞脱粒等急性分泌过程。活化的肥大细胞释放预先形成的含有组胺、肝素、 $\text{TNF}\alpha$ 和诸如 β -氨基己糖苷酶等酶的颗粒。某些细胞事件, 例如 B 和 T 细胞增殖, 需要持续的钙调磷酸酶信号, 这需要细胞内钙的持续增加。若干转录因子由钙调磷酸酶调节, 包括 NFAT (活化 T 细胞核因子)、MEF2 和 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 。NFAT 转录因子在包括免疫细胞在内的许多细胞类型中起重要作用。在免疫细胞中, NFAT 介导包括细胞因子、趋化因子和细胞表面受体在内的大量分子的转录。在诸如 IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-8、IL-13 以及肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF}\alpha$)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和 γ -干扰素 (γ -IFN) 等细胞因子的启动子内已经发现了针对 NFAT 的转录元件。

[0109] NFAT 蛋白的活性由其磷酸化水平来调节, 磷酸化水平进而由钙调磷酸酶和 NFAT 激酶二者来调节。细胞内钙水平增加对钙调磷酸酶的激活导致 NFAT 的去磷酸化作用以及向细胞核中的进入。NFAT 的再磷酸化遮盖了 NFAT 的核定位序列并防止其进入细胞核内。

因为其定位和活性强烈依赖于钙调磷酸酶介导的去磷酸化作用,所以 NFAT 是细胞内游离钙水平的灵敏的指示物。

[0110] 疾病、病症或病状

[0111] 临床研究证明,对于支持 T 细胞对抗原的应答的基因的激活而言,CRAC 通道是必需的。淋巴细胞激活和适应性免疫应答需要持续的钙内流。钙向淋巴细胞的内流主要通过 CRAC 通道发生。增加的钙导致 NFAT 激活和免疫应答所需的细胞因子的表达。抑制钙池操纵的钙内流是一种有效的防止 T 细胞激活的方法。

[0112] 用本文所述化合物(例如式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物)抑制 CRAC 通道活性提供了一种用于提供免疫抑制疗法的手段,在重症联合免疫缺陷(SCID)患者中发现的钙池操纵的钙内流的消除证明了这一点。来自患有 T 细胞免疫缺陷或具有 T 细胞激活主要缺陷的 SCID 的患者的 T 细胞、成纤维细胞和(在某些情况下)B 细胞,显示钙池操纵的钙内流的强烈缺陷(Feske 等人(2001)Nature Immunol. 2:316-324;Paratiseti 等人(1994)J. Biol. Chem. 269:32327-32335;和 LeDeist 等人(1995)Blood 85:1053-1062)。SCID 患者缺乏适应性免疫应答,但在主要器官中没有任何损害或毒性。SCID 患者表型表明,抑制 CRAC 通道是有效的免疫抑制策略。

[0113] 涉及炎症的疾病/病症和与免疫系统有关的疾病/病症

[0114] 可用本文提供的化合物、组合物和方法治疗或预防的疾病或病症包括涉及炎症的疾病和病症和/或与免疫系统有关的疾病和病症。这些疾病包括但不限于哮喘、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎、炎性肠病、肾小球肾炎、神经炎性疾病(例如多发性硬化症)和免疫系统的病症。

[0115] 炎性介质对嗜中性粒细胞(PMN)的激活在一定程度上是通过增加细胞溶质钙浓度而达到的。据认为钙池操纵的钙流入尤其在 PMN 激活中起重要作用。已经显示创伤增加 PMN 钙池操纵的钙流入(Hauser 等人(2000)J. Trauma Injury Infection and Critical Care 48 (4):592-598),并且由于钙池操纵的钙流入增强而延长的细胞溶质钙浓度升高可改变与趋化因子偶联的刺激物应答,并导致损伤后的 PMN 功能障碍。因此,通过钙池操纵的钙通道对 PMN 细胞溶质钙浓度的调节可用于调节 PMN 介导的炎症,并且在损伤、中风或脓毒症后不损害心血管功能(Hauser 等人(2001)J. Leukocyte Biology 69(1):63-68)。

[0116] 钙在淋巴细胞激活中起关键作用。例如通过抗原刺激激活淋巴细胞导致细胞内游离钙浓度的快速增加和包括活化 T 细胞核因子(NFAT)、NF- κ B、JNK1、MEF2 和 CREB 在内的转录因子的激活。NFAT 是 IL-2(和其他细胞因子)基因的关键转录调节物(参见,例如 Lewis(2001)Annu. Rev. Immunol 19:497-521)。保持 NFAT 处于转录活性状态需要细胞内钙水平持续升高,而细胞内钙水平持续升高依赖于钙池操纵的钙内流。淋巴细胞中的钙池操纵的钙内流的降低或阻止会阻止依赖于钙的淋巴细胞激活。因此,淋巴细胞中的细胞内钙,尤其是钙池操纵的钙内流的调节(例如钙池操纵的钙内流的降低、消除)可以是一种治疗免疫疾病和免疫相关疾病的方法,所述疾病包括例如:慢性免疫疾病/病症,急性免疫疾病/病症,自身免疫和免疫缺陷疾病/病症,涉及炎症、器官移植移植排斥和移植抗宿主病和改变的(例如过度活跃的)免疫应答的疾病/病症。例如,自身免疫疾病/病症的治疗可包括降低、阻止或消除淋巴细胞中的钙池操纵的钙内流。

[0117] 免疫病的实例包括：银屑病、类风湿性关节炎、血管炎、炎性肠病、皮炎、骨关节炎、哮喘、炎性肌病、变应性鼻炎、阴道炎、间质性膀胱炎、硬皮病、骨质疏松症、湿疹、同种异体移植或异种移植（器官、骨髓、干细胞和其他细胞和组织）移植物排斥、移植物抗宿主病、红斑狼疮、炎性疾病、I 型糖尿病、肺纤维化、皮炎、舍格伦综合征、甲状腺炎（例如桥本甲状腺炎和自身免疫性甲状腺炎）、重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血、多发性硬化症、囊性纤维化、慢性复发性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、变应性结膜炎和特应性皮炎。

[0118] 癌症和其他增生性疾病

[0119] 本文提供的式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物、其组合物和方法可与恶性肿瘤的治疗联合使用，所述恶性肿瘤包括但不限于淋巴网状内皮细胞起源的恶性肿瘤、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、头颈癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌和直肠癌。钙池操纵的钙内流可在癌细胞的细胞增殖中起重要作用 (Weiss 等人 (2001) International Journal of Cancer 92(6):877-882)。

[0120] SOCE 的抑制足以防止肿瘤细胞增殖。吡啶衍生物 BTP-2 (一种直接 I_{CRAC} 阻滞剂) 在 Jurkat 细胞 (Zitt 等人, J. Biol. Chem., 279, 12427-12437, 2004) 和结肠癌细胞中抑制 SOCE 和增殖。已经提示，持续的 SOCE 需要线粒体 Ca^{2+} 吸收 (Nunez 等人, J. Physiol. 571. 1, 57-73, 2006)，并提示阻止线粒体 Ca^{2+} 吸收导致 SOCE 抑制 (Hoth 等人, P. N. A. S., 97, 10607-10612, 2000; Hoth 等人, J. Cell. Biol. 137, 633-647, 1997; Glitsch 等人, EMBO J., 21, 6744-6754, 2002)。刺激 Jurkat 细胞可诱导持续的 SOCE 和使 NFAT 去磷酸化的 Ca^{2+} - 依赖的磷酸酶 (钙调磷酸酶) 的激活，从而促进白介素 -2 表达和增殖。式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物抑制 SOCE 并可用于治疗癌症或其他增生性疾病或病状。

[0121] 肝脏疾病和病症

[0122] 可用本文提供的式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物、其组合物和方法治疗或预防的疾病或病症包括肝或肝脏疾病和病症。这些疾病和病症包括但不限于例如由于移植、肝炎和肝硬化引起的肝脏损伤。

[0123] 钙池操纵的钙内流牵涉到慢性肝脏疾病 (Tao 等人 (1999) J. Biol. Chem., 274(34):23761-23769) 以及冷藏-温复氧后的移植损伤 (Elimadi 等人 (2001) Am J. Physiology, 281(3Part1):G809-G815)。

[0124] 肾脏疾病和病症

[0125] 可用本文提供的方法治疗或预防的疾病或病症包括肾脏或肾疾病和病症。肾小球系膜细胞增生通常是这些疾病和病症的主要特征。这些疾病和病症可能是由免疫学或其他损伤机制引起的，包括 IgAN、膜增生性肾小球肾炎或狼疮肾炎。肾小球系膜细胞复制控制的失调似乎也在进行性肾衰竭的发病机理中起重要作用。

[0126] 正常成人肾脏中的系膜细胞极少更新，更新率小于 1%。肾小球 / 肾脏疾病的突出特征是由于系膜细胞的增殖率升高或细胞消亡减少而引起的肾小球系膜增生。当在没有细胞消亡的情况下诱导系膜细胞增殖时（例如由于促有丝分裂刺激），可发生系膜增生性肾小球肾炎。有资料指出，系膜细胞生长调节剂，尤其是生长因子，可通过调节钙池操纵的钙通道而起作用 (Ma 等人 (2001) J. Am. Soc. Of Nephrology, 12: (1) 47-53)。钙池操纵的钙内流的调节剂可通过抑制系膜细胞增殖帮助治疗肾小球疾病。

[0127] 钙池操纵的钙通道

[0128] 临床研究证明,对于支持T细胞对抗原的应答的基因的激活而言,CRAC通道(一种类型的SOC通道)是必需的(Partiseti 等人, *JBiol. Chem.*, 269, 32327-32335, 1994; Feske 等人, *Curr. Biol.* 15, 1235-1241, 2005)。SOCE 可直接促进细胞溶质 Ca^{2+} 水平 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 升高,如在 T 淋巴细胞中,在该细胞中 CRAC 通道产生驱动支持抗原激活 T 细胞的基因表达所需的持续 Ca^{2+} 信号。淋巴细胞激活和适应性免疫应答需要持续钙内流。钙向淋巴细胞的内流主要通过 CRAC 通道发生。增加的钙水平导致 NFAT 激活和免疫应答所需的细胞因子的表达。

[0129] T 细胞中的 CRAC 通道具有独特的生物物理学指纹、可定量的钙池依赖性和基本功能。研究表明,CRAC 通道由两种组分蛋白质组成,这两种蛋白质相互作用形成 CRAC 通道。由两个功能组分 STIM1 和 Orai1 组装成 CRAC 通道。STIM1(间质相互作用分子 1) 被鉴定为哺乳动物 ERCa^{2+} 传感器(Liou, J. 等人 *Curr. Biol.* 15, 1235 - 1241 (2005); Roos, J. 等人, *J. Cell Biol.* 169, 435 - 445 (2005); WO 2004/1078995; US2007/0031814)。Orai1/CRACM1 被鉴定为哺乳动物 CRAC 通道的组分(Feske, S. 等人 *Nature* 441, 179 - 185 (2006); Vig, M. 等人 *Science* 312, 1220 - 1223 (2006); Zhang, S. L. 等人 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 9357 - 9362 (2006))。

[0130] STIM1 是 ERCa^{2+} 池内的 Ca^{2+} 传感器,其响应于钙池耗竭而移动到靠近质膜的 ER 内陷点中。Orai1 为质膜中的形成孔的 CRAC 通道亚单位。两种膜蛋白质 STIM1 和 Orai1 各自经证明为激活 CRAC 通道所必需的。

[0131] 在人胚肾 293 细胞 (HEK293 细胞) 中 STIM1 和 Orai1 二者的表达重建了功能性 CRAC 通道。单独的 Orai1 表达强烈降低 HEK293 细胞中的钙池操纵的 Ca^{2+} 内流和大鼠嗜碱细胞性白血病细胞中的 Ca^{2+} 释放激活的 Ca^{2+} 电流 (I_{CRAC})。然而,与感测钙池的 STIM1 蛋白一起表达的 Orai1 导致 SOCE 大量增加,从而使 Ca^{2+} 内流速率提高至多 103 倍。这种 Ca^{2+} 内流完全是钙池依赖性的,因为同时的共表达没有引起可测量的非钙池依赖性 Ca^{2+} 内流。钙池操纵的通道阻滞剂 2-氨基乙氧基二苯基硼酸盐可完全阻止所述内流。STIM 蛋白介导 Ca^{2+} 池感测及没有内在通道性质的内质网-质膜偶联。Orai1 贡献于负责 Ca^{2+} 内流的质膜通道组分。Orai1 过表达对 CRAC 通道功能的抑制反映了 STIM1 和 Orai1 之间所需要的化学计量学(Soboloff 等人, *J. Biol. Chem.* Vol. 281, no. 30, 20661-20665, 2006)。

[0132] 间质相互作用分子 (STIM) 蛋白

[0133] 在果蝇 S2 细胞内使用 **毒**胡萝卜素激活的 Ca^{2+} 内流作为钙池操纵的通道的标记而进行的 RNAi 筛选中,一种基因大大降低了 Ca^{2+} 内流,且该基因编码蛋白质间质相互作用分子 (Stim) (Roos, J. 等人 *J. Cell Biol.* 169, 435-445, 2005)。在哺乳动物细胞中有两种 Stim 的同系物, STIM1 和 STIM2,它们似乎都广泛分布 (Williams 等人, *BiochemJ.* 2001Aug 1; 357 (Pt3): 673-85)。STIM1 是钙池操纵的 Ca^{2+} 内流的 ERCa^{2+} 传感器。STIM1 是具有多个预测的蛋白质相互作用或信号结构域的 77 kDa 的 I 型膜蛋白,主要位于 ER 中,但也程度有限地位于质膜中。

[0134] 由 RNAi 引起的 STIM1 减少大大降低了 Jurkat T 细胞中的 I_{CRAC} 和 HEK293 上皮细胞和 SH-SY5Y 成神经瘤细胞中的钙池操纵的 Ca^{2+} 内流。然而,紧密相关的 STIM2 的减少没有影响。这些结果指示了 STIM(果蝇)和 STIM1(哺乳动物)在钙池操纵的通道的激活机制中的重要作用。STIM1 不可能是钙池操纵的通道本身。它没有通道样序列,而且该蛋白质

的过表达仅适度地增强 Ca^{2+} 内流。STIM1 既位于质膜上也位于像 ER 的细胞内膜上 (Manji 等人, *Biochim Biophys Acta*. 2000 年 8 月 31 日; 1481(1):147-55. 2000)。蛋白质序列提示其跨膜一次, 其 NH_2 末端定向于 ER 腔或细胞外隙。 NH_2 末端含有 EF- 手结构域, 并在 ER 中起到 Ca^{2+} 传感器的作用。该蛋白质也含有蛋白质-蛋白质相互作用结构域, 其在细胞质中尤其为卷曲螺旋结构域而在 ER (或细胞外隙) 中为不育基序 (SAM), 这二者都靠近预测的跨膜结构域。STIM1 可寡聚体化, 因此 ER 和质膜中的蛋白质可相互作用而将二者桥联在一起 (Roos, J. 等人 *J. Cell Biol.* 169, 435 - 445 (2005))。

[0135] 全内反射荧光 (TIRF) 和共聚焦显微术揭示, 当 Ca^{2+} 池充满时 STIM1 分布于整个 ER 中, 但在钙池耗竭时 STIM1 再分配到靠近质膜的分离内陷点中。尽管 STIM1 向连接 ER 区的再分配很慢 (Liou, J. 等人 *Curr. Biol.* 15, 1235-1241 (2005); Zhang, S. L. 等人 *Nature* 437, 902-905 (2005)), 但其比 CRAC 通道的打开早几秒钟 (Wu 等人, *J. Cell Biol.* 174, 803-813 (2006)), 因此作为 CRAC 通道激活的基本步骤足够快。

[0136] 已经提示钙池耗竭导致 STIM1 插入到质膜内, 在质膜处其可通过 CRAC 通道控制钙池操纵的钙内流 (Zhang, S. L. 等人 *Nature* 437, 902-905 (2005); Spassova, M. A. 等人 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 4040-4045 (2006))。

[0137] STIM1 作为 SOCE 的 Ca^{2+} 传感器的关键证据是, EF 手结构基序的预测的 Ca^{2+} 结合残基的突变 (预期降低其对 Ca^{2+} 的亲合力并因此模拟钙池耗竭的状态) 使 STIM1 自发再分配到内陷点中, 并且即使在钙池充满时也引发通过 SOC 的组成型 Ca^{2+} 流入 (Spassova, M. A. 等人 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 4040-4045 (2006); Liou, J. 等人 *Curr. Biol.* 15, 1235-1241 (2005))。

[0138] Orai 蛋白

[0139] Orai1 (也被称为 CRACM1) 为广泛表达的、33kDa 的质膜蛋白质, 其具有 4 个跨膜结构域并缺乏与其他离子通道的显著序列同源性 (Vig, M. 等人 *Science* 312, 1220-1223 (2006); Zhang, S. L. 等人 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 9357-9362 (2006))。

[0140] 对来自人类重症联合免疫缺陷 (SCID) 综合征患者的 T 细胞 (其中 T 细胞受体啮合或钙池耗竭不能激活 Ca^{2+} 内流) 的研究已表明是由于 Orai1 中的单点突变 (Feske, S. 等人 *Nature* 441, 179-185 (2006))。

[0141] 存在其他哺乳动物 Orai 同系物, 例如 Orai2 和 Orai3, 然而, 其功能尚未清楚地确定。当在 HEK 细胞中与 STIM1 过表达时, Orai2 和 Orai3 可表现出 SOC 通道活性 (Mercer, J. C. 等人 *J. Biol. Chem.* 281, 24979-24990 (2006))。

[0142] Orai1 诱变研究获得了 Orai1 促成 CRAC 通道孔的证据。在 Glu106 或 Glu190 处的突变显示了 CRAC 通道对 Ca^{2+} 离子的选择性, 所述突变减弱了 Ca^{2+} 结合的能力, 从而阻止单价阳离子的通透 (类似于对电压门控性 Ca^{2+} 通道所述的机制) (Yeromin, A. V. 等人 *Nature* 443, 226-229 (2006); Vig, M. 等人 *Curr. Biol.* 16, 2073 - 2079 (2006); Prakriya, M. 等人 *Nature* 443, 230-233 (2006))。

[0143] 中和在 I-II 环中的一对天冬氨酸 (Asp110 和 Asp112) 上的电荷降低了因 Gd^{3+} 引起的阻滞和因细胞外 Ca^{2+} 引起的外向电流的阻滞, 这表明这些带负电荷的位点可促进多价阳离子靠近孔口的累积。

[0144] 通过 Orai1 过表达所观察到的电流与 ICRAC 极为相似, 而且 Orai1 可形成多聚体 (Yeromin, A. V. 等人 Nature 443, 226-229 (2006); Vig, M. 等人 Curr. Biol. 16, 2073-2079 (2006); Prakriya, M. 等人 Nature 443, 230-233 (2006)) 这一事实使得天然 CRAC 通道很可能为单独的 Orai1 的多聚体或它与紧密相关的亚单位 Orai2 和 / 或 Orai3 组合的多聚体。

[0145] 功能性的钙池操纵的钙通道

[0146] 通过一种类型的 SOC 通道 (CRAC 通道) 已经很大程度上表征了 SOC 通道。从 ER 腔失去 Ca^{2+} 引发 CRAC 通道活性, 该过程与通过 STIM1 和 Orai1 的作用打开质膜中的 CRAC 通道相偶联。由 STIM1 感测 Ca^{2+} 的耗竭, 使其在邻近质膜的连接 ER 中积聚。在为了定位打开的 CRAC 通道而进行的基于 TIRF 的 Ca^{2+} 成像研究中, 观察到 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高与 STIM1 内陷点共定位, 这直接表明 CRAC 通道仅在这些位点的极接近处打开 (Luik 等人, J. Cell Biol. 174, 815-825 (2006))。

[0147] 在共表达 STIM1 和 Orai1 的细胞中, 钙池耗竭致使 Orai1 本身从分散分布移向在质膜中直接在 STIM1 对面聚积, 从而使得 STIM1 能够激活所述通道 (Luik 等人, J. Cell Biol. 174, 815-825 (2006); Xu, P. 等人 Biochem. Biophys. Res. Commun. 350, 969-976 (2006))。因此, ER 中的 STIM1 和质膜中的 Orai1 的并列簇群形成 CRAC 通道。在 ER 和质膜 (Orai1/STIM1 来自其中) 之间的接合间隙 (约 10-25nm) 可以小到足以允许 STIM1 和 Orai1 之间的蛋白质-蛋白质相互作用。这可得到以下事实的支持: 过表达的 STIM1 和 Orai1 可以免疫共沉淀 (Yeromin, A. V. 等人 Nature 443, 226-229 (2006); Vig, M. 等人 Curr. Biol. 16, 2073-2079 (2006))。

[0148] 因此, STIM1 和 Orai1 直接相互作用或者作为多蛋白质复合物的成员相互作用。当在一项研究中 STIM1 细胞溶质部分的表达本身足以激活 CRAC 通道时, 观察到支持这一点的证据 (Huang, G. N. 等人 Nature Cell Biol. 7, 1003 - 1010 (2006)), 而且删除 ERM/ 卷曲螺旋和其他 C- 末端结构域的效果提示了在 STIM1 聚簇和 SOC 通道激活中的作用 (Baba, Y. 等人 Proc. Natl Acad. Sci. USA 103, 16704-16709 (2006))。在体外除去 Ca^{2+} 时, 分离的 EF-SAM 区在 STIM1 的腔侧形成二聚体和高阶多聚体, 这表明 STIM1 寡聚化可能是钙池操纵的钙激活的早期步骤 (Stathopulos 等人, J. Biol. Chem. 281, 35855-35862 (2006))。

[0149] 在一些实施方案中, 本文所述的式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物调节细胞内钙, 例如, 抑制或降低 SOCE 和 / 或 I_{CRAC} 。在其他实施方案中, 式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物的调节起因于多种作用, 例如但不限于: 与蛋白质的结合, 与蛋白质的相互作用, 或对参与调节细胞内钙的蛋白质 (例如 STIM 蛋白和 / 或 Orai 蛋白) 的相互作用、活性、水平或任何其他物理、结构或其他性质的调节。

[0150] 例如, 用于评估测试剂与参与调节细胞内钙的蛋白质之间的结合或相互作用的方法包括 NMR、质谱分析法、荧光光谱法、闪烁邻近分析、表面等离子体共振分析和其他方法。用于评估对参与调节细胞内钙的蛋白质的相互作用、活性、水平或任何其他物理、结构或其他性质的调节的方法实例包括但不限于: 用于评估对蛋白质相互作用的影响的 FRET 测定; 用于评估对蛋白质相互作用和对蛋白质的物理和结构性质的影响的 NMR、X- 射线结晶法和圆二色谱法; 和适于评估蛋白质特定活性的活性测定。

[0151] 监测或评估对细胞内钙的影响

[0152] 在一些实施方案中,在用本文所述的任何筛选/鉴定方法监测或评估式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物对细胞内钙的影响时,对细胞内(包括细胞溶质和细胞内细胞器或区室)钙和/或离子向细胞、细胞器、钙池或其部分(例如膜)内、在其中或离开它们的移动进行直接或间接评估或测量。本文描述了用于评价钙水平和离子移动或流入的多种方法。所用的具体方法和采用的条件取决于是否监测或评估细胞内钙的特定方面。例如,在本文所述的一些实施方案中,试剂和条件是已知的,并且用于特异性评价钙池操纵的钙内流、静息细胞溶质钙水平、钙缓冲作用和钙水平以及被细胞内细胞器和钙池的吸收或从其中的释放。在其他实施方案中,使用例如细胞、细胞内细胞器或钙池区室、膜(包括例如脱离的膜片或脂双层)或无细胞测定系统(例如在膜泡外)来监测或评估式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物对细胞内钙的影响。通常,在测试剂的存在下监测或评估细胞内钙的某些方面,并与对照例如在没有测试剂时的细胞内钙进行比较。

[0153] 调节细胞内钙的方法

[0154] 在一些实施方案中,细胞内钙的调节是对细胞内钙的任何改变或调整,包括但不限于:细胞质和/或细胞内钙储存细胞器(例如内质网)中的钙浓度或水平的改变;钙向细胞或细胞内钙池或细胞器内移动、从其中移出或在其内移动的改变;钙在细胞内的定位的改变;和钙流入细胞、流出细胞和在细胞内流动的动力学或其他性质的改变。在一些实施方案中,细胞内钙调节涉及改变或调节(例如降低或抑制):钙池操纵的钙内流,细胞溶质钙缓冲作用,细胞内钙池或细胞器中的钙水平或钙向细胞内钙池或细胞器内的移入、从其中的移出或在其中的移动,和/或基础或静息细胞溶质钙水平。在一些实施方案中,细胞内钙的调节涉及改变或调节:受体介导的离子(例如钙)移动,第二种信使操纵的离子(例如钙)移动,钙向细胞内的流入或向细胞外的流出,和/或离子(例如钙)向细胞内区室(包括,例如内体和溶酶体)内的吸收或从其中的释放。

[0155] 在一个方面,本文所述的化合物在免疫系统细胞(例如淋巴细胞、白细胞、T细胞、B细胞)、成纤维细胞(或源自成纤维细胞的细胞)或表皮细胞、真皮细胞或皮肤细胞(例如角化细胞)中调节细胞内钙,例如但不限于调节(例如降低或抑制)SOC通道活性,例如抑制CRAC通道活性(例如抑制ICRAC、抑制SOCE)。在一些实施方案中,调节参与调节细胞内钙的一种或多种蛋白质(例如STIM蛋白和/或Orai蛋白)的步骤涉及,例如,降低蛋白质的水平、表达、活性、功能和/或分子相互作用。例如,如果细胞表现出钙水平增加或缺乏对细胞内钙调节(例如钙池操纵的钙内流)方面的调节,那么在其他实施方案中,调节涉及降低蛋白质(例如STIM蛋白和/或Orai蛋白)的水平、表达、活性或功能或分子相互作用。

[0156] 化合物

[0157] 本文所述的化合物调节细胞内钙,并可以用于治疗其中细胞内钙的调节具有有益效果的疾病或病状。在一个实施方案中,本文所述的化合物抑制钙池操纵的钙内流。在一个实施方案中,式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物干扰SOCE单元的组装。在另一个实施方案中,式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物改变形成钙池操纵的钙通道复合物的蛋白质的功能性相互作用。在一个实施方案中,式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物改变STIM1与Orai1的功能性相互作用。在其他实施方案中,式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物是SOC通道孔阻滞剂。在其他实施方案中,式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物是CRAC通道孔阻滞剂。

[0158] 在一个方面,本文所述的化合物抑制与活化的 SOC 通道直接相关的电生理电流 (I_{SOC})。在另一个方面,本文所述的化合物抑制与活化的 CRAC 通道直接相关的电生理电流 (I_{CRAC})。

[0159] 可以受益于细胞内钙调节的疾病或病症包括但不限于免疫系统相关疾病(例如自身免疫疾病)、涉及炎症的疾病或病症(例如哮喘、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎、炎性肠病、肾小球肾炎,神经炎性疾病、多发性硬化症和免疫系统病症)、癌症或其他增生性疾病、肾病和肝病。在一个方面,本文所述的化合物可以用作免疫抑制剂,用以防止移植的移植物排斥,同种异体移植或异种移植排斥(器官、骨髓、干细胞、其他细胞和组织)、移植物抗宿主病。移植的移植物排斥可以由组织或器官移植引起。移植物抗宿主病可以由骨髓或干细胞移植引起。

[0160] 对于钙池操纵的钙通道复合物中的蛋白质的至少一部分,本文所述的化合物调节其活性,调节其相互作用,或与其结合,或与其相互作用。在一个实施方案中,对于钙释放激活的钙通道复合物中的蛋白质的至少一部分,本文所述的化合物调节其活性,调节其相互作用,或与其结合,或与其相互作用。在一个方面,本文所述的化合物降低功能性钙池操纵的钙通道复合物的水平。在一个方面,本文所述的化合物降低活化的钙池操纵的钙通道复合物的水平。在一个方面,钙池操纵的钙通道复合物是钙释放激活的钙通道复合物。

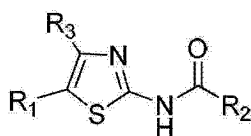
[0161] 当对患有疾病或病症的个体施用用于治疗疾病或病症的本文所述的化合物时,该化合物有效地降低、改善或消除该疾病或病症的症状或表现。还可以对易患疾病或病症、但尚未表现出该疾病或病症的症状的个体施用本文所述的化合物,以预防或延迟所述症状的发展。该药剂单独地或与其他药剂联用可以具有此类效果,或可以起到提高另一种药剂的治疗效果的作用。

[0162] 本文所述的化合物、其药学上可接受的盐、药学上可接受的前药或药学上可接受的溶剂合物调节细胞内钙,并且可以用于治疗其中细胞内钙的调节提供益处的患者。

[0163] 在一个方面,本文所述的化合物是 CRAC 通道活性的选择性抑制剂。

[0164] 在一个方面,是具有以下结构的式 (I) 化合物,或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药:

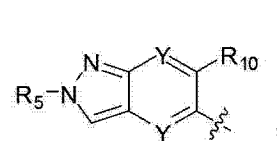
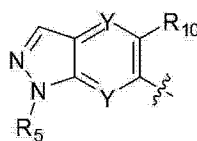
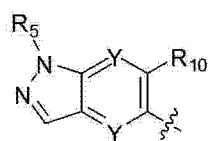
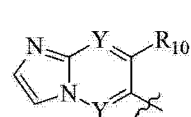
[0165]



[0166] 式 (I)

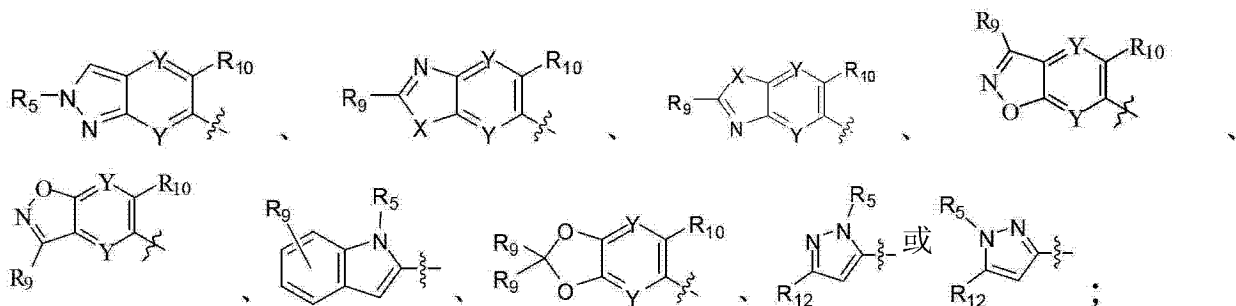
[0167] 其中:

[0168] R



1

为



[0169] X 为 S、O 或 NR_5 ;

[0170] Y 独立地选自 CR₁₀ 或 N:

[0171] R_2 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基；其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R_3 取代；

[0172] R_3 独立地选自 H、F、D、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、C₁-C₆ 烷基、C₃-C₈ 环烷基、C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 0- 芳基和任选地取代的杂芳基；

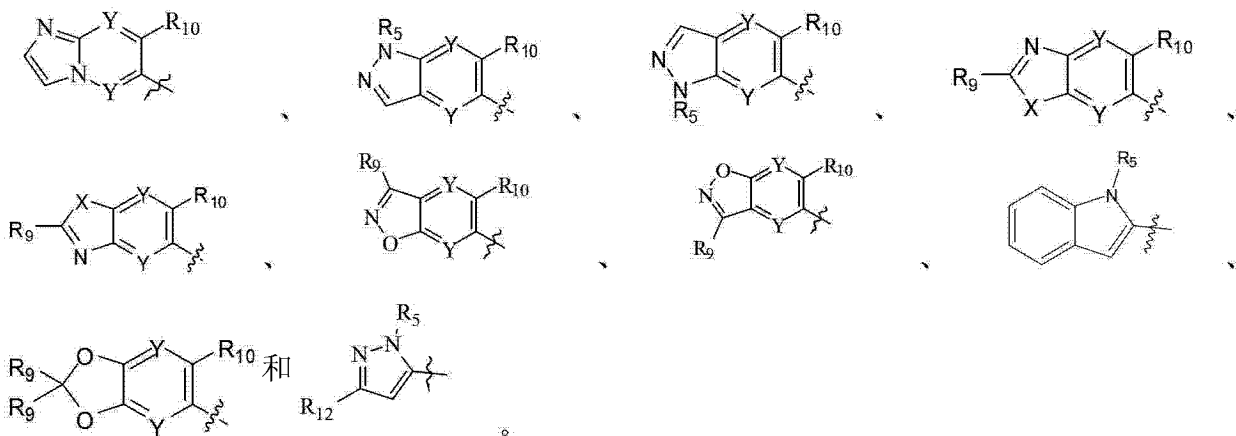
[0173] R₅ 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、苯基和苄基；

[0174] R_9 和 R_{10} 各自独立地选自 H、D、 C_1 - C_6 烷基、卤素、 C_1 - C_6 烷基羰基或 CF_3 ;

[0175] R_{12} 选自 CN、 $-OR_5$ 、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_3-C_8 环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基。

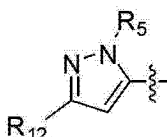
[0176] 在某些实施方案中,是式(I)的化合物,其中 R_1 为

[0177]



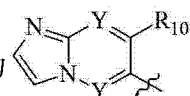
[0178] 在进一步的实施方案中,是式 (I) 的化合物,其中 R_2 是任选地经至少一个独立地选自 F、Cl、Br 和 I 的 R_3 取代的芳基。在另一实施方案中, R_2 是任选地经至少一个独立地选自 F 或 Cl 的 R_3 取代的芳基。在另一实施方案中, R_2 是任选地经至少一个 F 取代的芳基。在另一实施方案中, R_2 是任选地经至少一个 Cl 取代的芳基。在另一实施方案中, R_2 是任选地经至少一个独立地选自 F 或 Cl 的 R_3 取代的苯基。在另一实施方案中, R_2 是任选地经至少一个 F 取代的苯基。在另一实施方案中, R_2 是任选地经至少一个 Cl 取代的苯基。在另一实施方案中, R_3 选自 -CN、-NO₂、-OH、-OCF₃ 和 -OR₅, 其中 R_5 为 C₁-C₆ 烷基。在另一实施方案中, R_3 为 -OH。在进一步的实施方案中, R_3 为 -CN。在另一实施方案中,是式 (I) 的化合物,其中 R_{12} 为 C₁-C₆ 卤代烷基。在另一实施方案中, R_{12} 为 C₁-C₆ 烷基。在进一步的实施方案中, C₁-C₆ 烷基为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在另一实施方

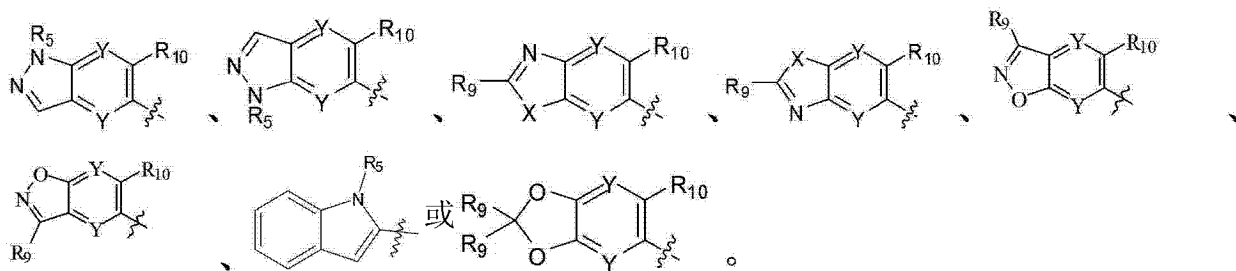
案中, R_5 为 H 或 C_1-C_6 烷基。在另一实施方案中, R_5 为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在进一步的实施方案中, R_5 为 H。在又一进一步的实施方案中, R_5 为甲基。在另一实施方案中, 是式 (I) 的化合物, 其中 R_2 为杂芳基, 该杂芳基选自: 噻吩基、噻蒎基、呋喃基、吡喃基、噻二唑基、苯并噻二唑基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、吩噻噻基 (phenoxathiinyl)、吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噻唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吲哚基、异吲哚基、3H-吲哚基、吲哚基、吲唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、噁唑基、噻唑基、蝶啶基、4aH-咔唑基、咔唑基、咔啉基、菲啶基、吡啶基、萘嵌间二氮苯基、菲咯啉基、吩嗪基、吩吡嗪基、吩噻嗪基、呋咱基和吩噻嗪基。在进一步的实施方案中, R_2 为吡啶基。在另一实施方案中, R_2 为呋喃基。在进一步的实施方案中, R_2 为吡喃基。在一个实施方案中, 是式 (I) 的化合物, 其中 R_2 为经至少一个选自 F、Cl、Br 和 I 的 R_3 取代的杂芳基。在另一实施方案中, R_2 为经选自 H、F、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、 C_1-C_6 烷基和 C_3-C_8 环烷基的至少两个 R_3 或至少三个 R_3 取代的杂芳基。

[0179] 本文还描述了其中 R_1 为  的式 (I) 的化合物, 其中 R_{12} 选自 CF₃、

CN、-OR₅、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基和 C_3-C_8 环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基、任选地取代的杂芳基; 且 R_5 为 C_1-C_6 烷基。在一个实施方案中, R_5 为 CH₃。在另一实施方案中, R_{12} 为 -CN。在另一实施方案中, R_{12} 为 CF₃。在另一实施方案中, R_{12} 为 OH。在又一实施方案中, R_{12} 为 C_1-C_6 烷基。在进一步的实施方案中, R_{12} 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基和叔丁基。在一个实施方案中, R_{12} 为甲基。在另一实施方案中, R_{12} 为乙基。在另一实施方案中, R_{12} 为任选地取代的芳基。在进一步的实施方案中, R_{12} 为任选地取代的苯基。在又一实施方案中, R_{12} 为任选地取代的杂芳基。在进一步的实施方案中, R_{12} 选自任选地取代的呋喃基、噻吩基、噻唑基、噁唑基、噻二唑基、吡唑基和吡啶基。在另一实施方案中, R_{12} 为任选地取代的呋喃基。在另一实施方案中, R_{12} 为任选地取代的噻吩基。在另一实施方案中, R_{12} 为任选地取代的噻唑基。在另一个实施方案中, R_{12} 为任选地取代的噁唑基。在另一实施方案中, R_{12} 为任选地取代的噻二唑基。在另一实施方案中, R_{12} 为任选地取代的吡唑基。在另一实施方案中, R_{12} 为任选地取代的吡啶基。

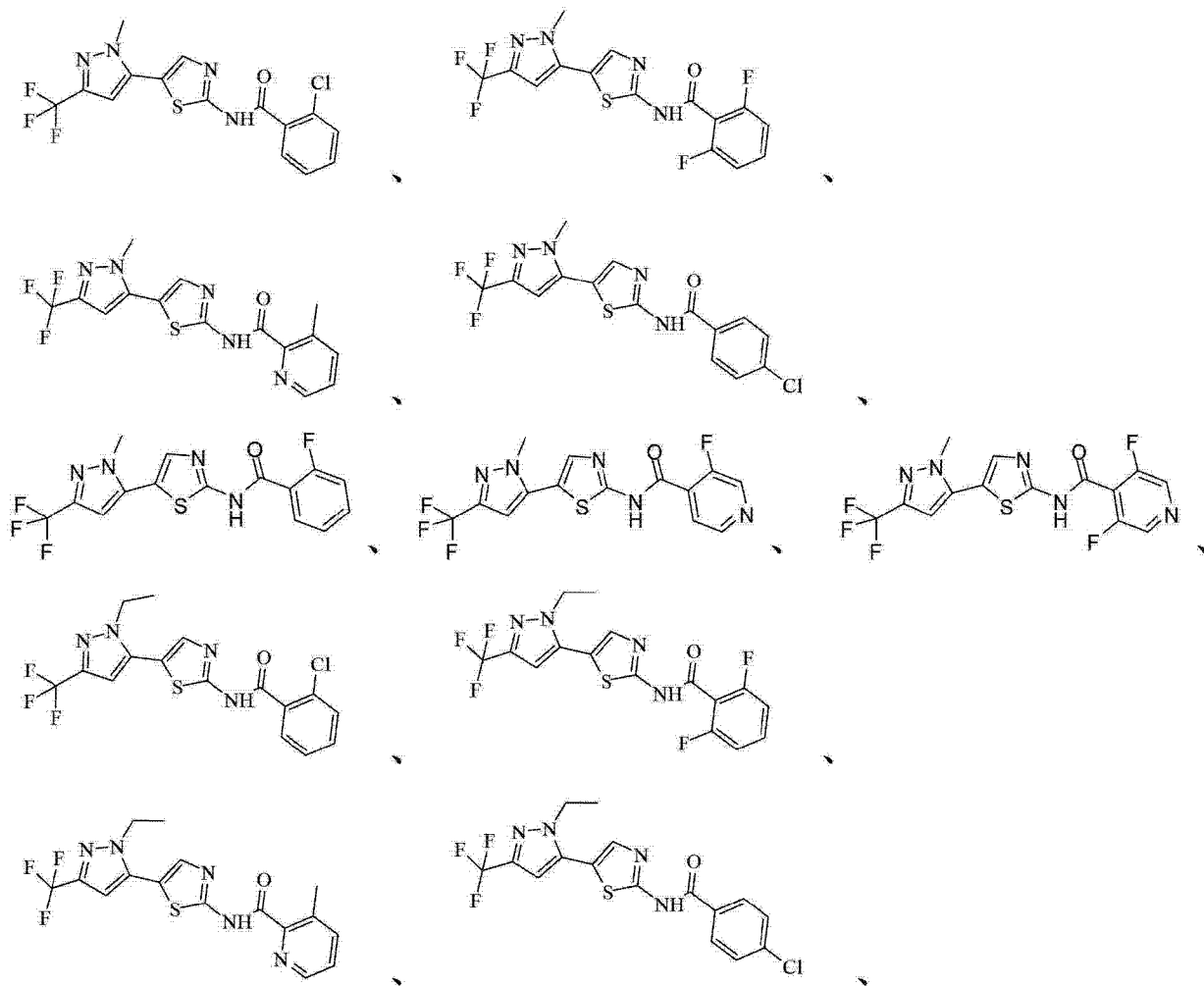
[0180] 在另一个实施方案中, 是式 (I) 的化合物, 其中 R_{12} 选自 CF₃、CN、-OR₅、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_3-C_8 环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基。在另一实施方案中, 是式 (I) 的化合物, 其中 R_{12} 选自 CF₃、 C_1-C_6 烷基和 C_3-C_8 环烷基。在某些实施方案中, R_{12} 为 CF₃。在其他实施方案中, R_{12} 为环丙基。在其他实施方案中, R_5 为 C_1-C_6 烷基。在某些实施方案中, R_5 为 CH₃。在某些实施方案中, R_5 为 C₂H₅。在某些实施方案中, R_5 为异丙基。

[0181] 在某些实施方案中, 是式 (I) 的化合物, 其中 R_1 为 

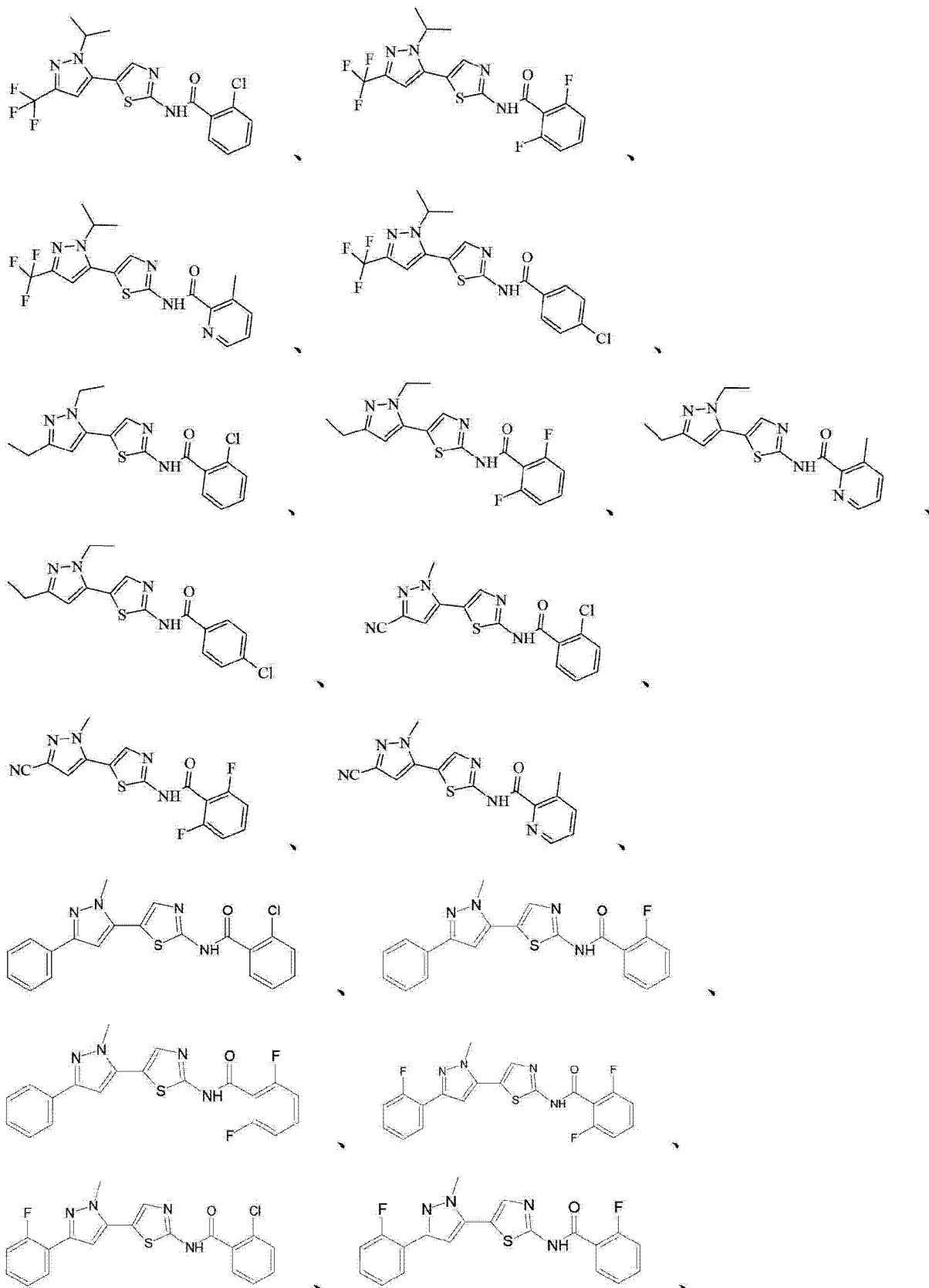


[0182] 在另一个方面,是选自以下的化合物:

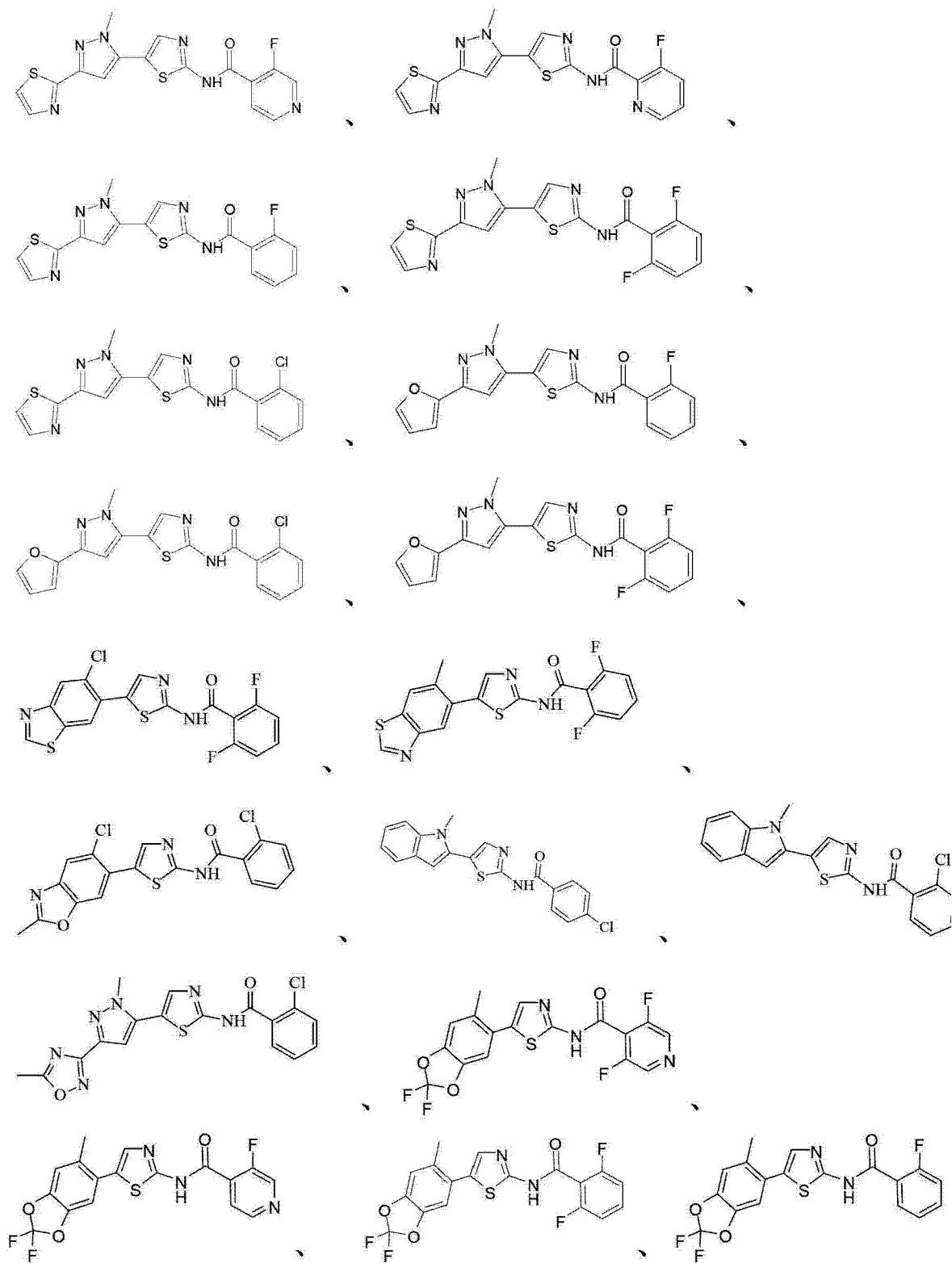
[0183]



[0184]



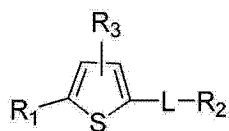
[0185]



；或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药。

[0186] 在另一方面，本文描述了具有式 (II) 结构的化合物，或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药：

[0187]



[0188] 式 (II) ;

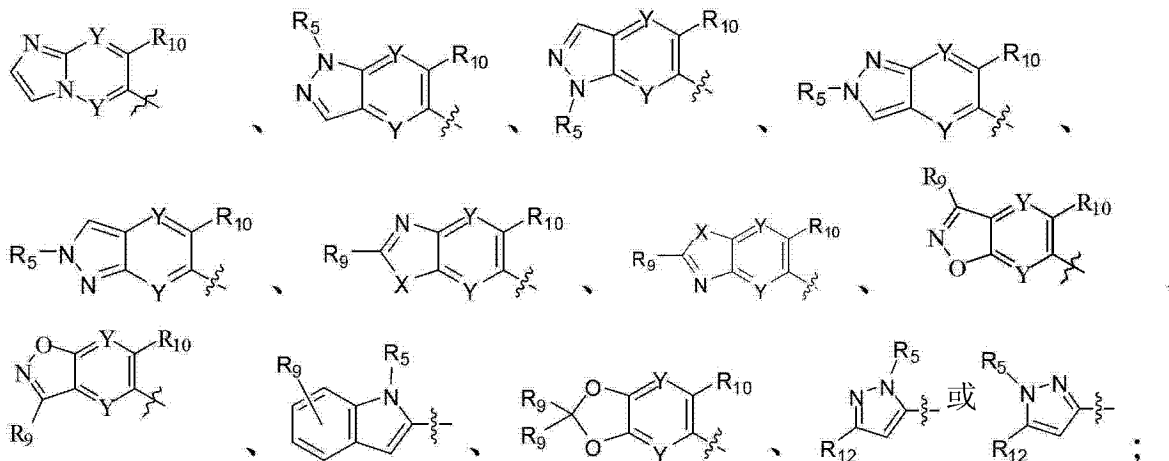
[0189] 其中 :

[0190] L 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)NH-$;

[0191] R

1

为



[0192] X 为 S 、 O 或 NR_5 ;

[0193] Y 独立地选自 CR_{10} 或 N ;

[0194] R_2 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基 ; 其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R_3 取代 ;

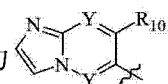
[0195] R_3 独立地选自 H 、 F 、 D 、 Cl 、 Br 、 I 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OR_5$ 、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_3-C_8 环烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、任选地取代的 C_2-C_8 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O -芳基、任选地取代的杂芳基 ;

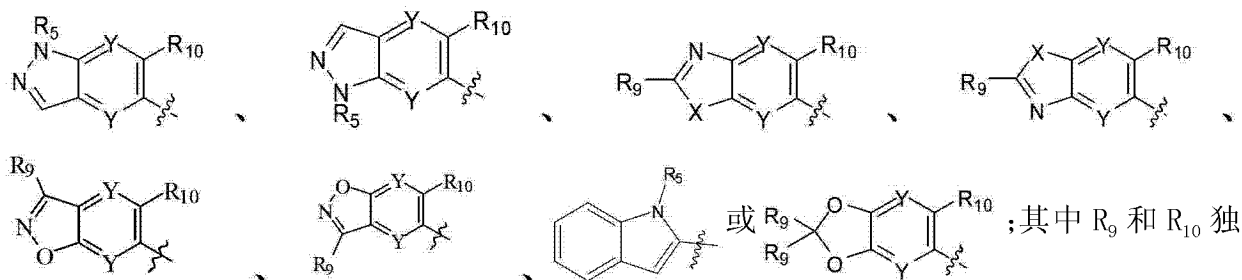
[0196] R_5 选自 H 、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_3-C_8 环烷基、苯基和苄基 ;

[0197] R_{12} 为 CF_3 、任选地取代的芳基、任选地取代的 O -芳基或任选地取代的杂芳基 ;

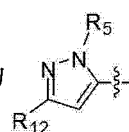
[0198] R_9 和 R_{10} 各自独立地选自 H 、 D 、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、卤素、 C_1-C_6 烷基羰基或 CF_3 。

[0199] 对于任意和所有实施方案,取代基选自所列出的备选物的子集。例如,在一些实施方案中, R_2 为杂芳基。在其他实施方案中,杂芳基选自噻吩基、噻蒾基、呋喃基、吡喃基、噻二唑基、苯并噻二唑基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、吩噻噻基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噻唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡啶基、异吡啶基、3H-吡啶基、吡啶基、吡唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹啉基、喹啉基、噻唑基、噻唑基、蝶啶基、4aH-吡唑基、吡唑基、吡啶基、菲啶基、吡啶基、萘啶基、菲啶基、吩噻基、吩噻基、吩噻基、呋喃基和吩噻基。在一个实施方案中, R_2 为吡唑基。在一些实施方案中, R_2 经至少两个取代基或至少三个取代基取代。在又一实施方案中, R_2 经至少一个选自 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OR_5$ 、 C_1-C_6 烷基和 C_3-C_8 环烷基的 R_3 取代。

[0200] 在式 (II) 化合物的一些实施方案中, R_1 为 



立地为 H、 C_1-C_6 烷基、卤素、 C_1-C_6 烷基羰基或 CF_3 , 且 R_5 选自 H、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_3-C_8 环烷基、苯基和苄基。

[0201] 在某些实施方案中, 是式 (II) 的化合物, R_1 为  其中 R_5 为 H、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_3-C_8 环烷基、苯基和苄基。

在另一实施方案中, R_5 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在又一实施方案中, R_5 为甲基。在进一步的实施方案中, R_{12} 为 CF_3 、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基、任选地取代的杂芳基。在一个实施方案中, R_{12} 为 CF_3 。在另一实施方案中, 是式 (II) 的化合物, 其中 R_{12} 为任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基、任选地取代的杂芳基。在一个实施方案中, R_{12} 为任选地取代的苯基。在另一实施方案中, 苯基经至少一个卤素取代。在另一实施方案中, 苯基经至少两个卤素取代。在另一实施方案中, R_{12} 选自任选地取代的噻吩基、噻蒎基、呋喃基、吡喃基、噻二唑基、噁二唑基、苯并噻二唑基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、吩噻噻基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡啶基、异吡啶基、3H-吡啶基、吡啶基、吡唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹啉基、喹唑啉基、噻唑基、噁唑基、噁唑基、蝶啶基、4aH-吡唑基、吡唑基、吡啶基、菲啶基、吡啶基、萘啶基、二氮苯基、菲咯啉基、吩嗪基、吩吡嗪基、吩噻嗪基、呋喃基和吩噻嗪基。在进一步的实施方案中, R_{12} 为任选地取代的噻吩基、呋喃基、噁二唑基或噻唑基。

[0202] 在另一实施方案中, R_3 选自 F、Cl、Br 和 I。在又一实施方案中, R_3 为 F。在另一实施方案中, R_3 为 Br。在进一步的实施方案中, R_3 为 Cl。在又一实施方案中, R_3 为 NO_2 。在另一实施方案中, R_3 为 C_2-C_8 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基或任选地取代的杂芳基。在一个实施方案中, R_3 为任选地取代的杂芳基, 该杂芳基选自噻吩基、噻蒎基、呋喃基、吡喃基、噻二唑基、噁二唑基、苯并噻二唑基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、吩噻噻基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡啶基、异吡啶基、3H-吡啶基、吡啶基、吡唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹啉基、喹唑啉基、噻唑基、噁唑基、噁唑基、蝶啶基、4aH-吡唑基、吡唑基、吡啶基、菲啶基、吡啶基、萘啶基、二氮苯基、菲咯啉基、吩嗪基、吩吡嗪基、吩噻嗪基、呋喃基和吩噻嗪基。在进一步的实施方案中, R_3 为噁二唑基。

[0203] 在某些实施方案中, 是式 (II) 的化合物, 其中 R_2 为芳基。在其他实施方案中, R_2 为苯基。在某些实施方案中, 苯基经至少一个 R_3 取代, R_3 独立地选自: F、Cl、Br、

I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、C₁-C₆ 烷基、C₃-C₈ 环烷基、C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基。在某些实施方案中,苯基经至少一个独立地选自 F 和 Cl 的 R₃ 取代。在一些实施方案中,苯基经至少两个取代基或至少三个取代基取代。在某些实施方案中,R₃ 为氟。在其他实施方案中,R₃ 为氯。在另一实施方案中,R₃ 为 OR₅,其中 R₅ 为甲基或乙基。

[0204] 在某些实施方案中,是式 (II) 的化合物,其中 R₂ 为杂芳基。在一些实施方案中,R₂ 为吡啶基。在某些实施方案中,吡啶基经至少一个 R₃ 取代,R₃ 独立地选自 :F、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、C₁-C₆ 烷基、C₃-C₈ 环烷基、C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基。在某些实施方案中,吡啶基经至少一个独立地选自 F 和 Cl 的 R₃ 取代。在一些实施方案中,吡啶基经至少两个取代基或至少三个取代基取代。在某些实施方案中,R₃ 为氟。在其他实施方案中,R₃ 为氯。在另一实施方案中,R₃ 为 OR₅,其中 R₅ 为甲基或乙基。

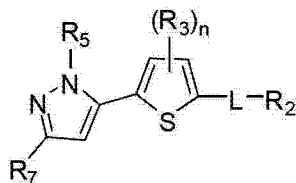
[0205] 在另一实施方案中,是式 (II) 的化合物,其中 R₃ 选自 CF₃、C₁-C₆ 烷基和 C₃-C₈ 环烷基。在某些实施方案中,R₃ 为 CF₃。在某些实施方案中,R₃ 为环丙基。在其他实施方案中,R₃ 为 C₁-C₆ 烷基。在某些实施方案中,R₃ 为 CH₃。在某些实施方案中,R₃ 为 C₂H₅。在某些实施方案中,R₃ 为异丙基。

[0206] 在另一实施方案中,是式 (II) 的化合物,其中 L 为 -C(=O)NH-。

[0207] 在另一实施方案中,是式 (II) 的化合物,其中 L 为 -NH-C(=O)-。

[0208] 在另一方面,是具有式 (III) 结构的化合物,或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药:

[0209]



[0210] 式 (III) ;

[0211] 其中 :

[0212] L 为 -NH-C(=O)- 或 -C(=O)NH- ;

[0213] R₂ 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基 ;其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R₈ 取代 ;

[0214] R₈ 独立地选自 F、D、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的 C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、任选地取代的 C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基 ;

[0215] R₃ 独立地选自 F、D、Cl、Br、-CN、-NO₂、-OH、-NH₂、-CF₃ 和 -OCF₃ ;

[0216] R₅ 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、苯基和苄基 ;

[0217] R₇ 选自 CF₃、CN、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基 ;且 n 为选自 1 或 2 的整数。

[0218] 在一个实施方案中,R₅ 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、苯基和苄基。在另一实施方案中,R₅ 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在又

一实施方案中, R_5 为甲基。在一个实施方案中, R_7 选自 CF_3 、 CN 、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基和 C_3-C_8 环烷基。在另一实施方案中, R_7 为 CF_3 。在另一实施方案中, R_7 为 C_1-C_6 烷基。在另一实施方案中, C_1-C_6 烷基选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在又一实施方案中, R_5 为甲基。在另一实施方案中, R_7 为乙基。

[0219] 在另一实施方案中, 是式 (III) 的化合物, 其中 R_3 独立地选自 F 、 D 、 Cl 、 Br 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CF_3$ 和 $-OCF_3$ 。在某些实施方案中, R_3 为 CF_3 。在某些实施方案中, R_3 为 F 、 Cl 或 Br 。在又一进一步的实施方案中, R_3 为 F 。在另一个实施方案中, R_3 为 Br 。在又一个实施方案中, R_3 为 Cl 。在另一实施方案中, R_3 为 NO_2 。在又一实施方案中, R_3 为 NH_2 。

[0220] 在某些实施方案中, 是式 (III) 的化合物, 其中 R_2 为芳基。在其他实施方案中, R_2 为苯基。在某些实施方案中, 苯基经至少一个 R_8 取代, R_8 选自: F 、 Cl 、 Br 、 I 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OR_5$ 、 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_2-C_8 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O -芳基和任选地取代的杂芳基。在一些实施方案中, 苯基经至少两个取代基或至少三个取代基取代。在某些实施方案中, R_8 为氟。在另一实施方案中, R_8 为氯。

[0221] 在某些实施方案中, 是式 (III) 的化合物, 其中 R_2 为杂芳基。在一些实施方案中, 杂芳基选自噻吩基、噻蒎基、呋喃基、吡喃基、噻二唑基、苯并噻二唑基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、吩噻噻基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噻唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡啶基、异吡啶基、3H-吡啶基、吡啶基、吡唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹啉基、喹唑啉基、噻唑基、噻唑基、蝶啶基、4aH-吡唑基、吡唑基、吡啶基、菲啶基、吡啶基、萘嵌间二氮苯基、菲咯啉基、吩嗪基、吩吡嗪基、吩噻嗪基、呋喃基和吩噻嗪基。在另一实施方案中, R_2 为吡啶基。在一个实施方案中, R_2 为吡唑基。在一些实施方案中, R_2 经至少两个取代基或至少三个取代基取代。在又一实施方案中, R_2 被至少一个选自 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OR_5$ 、 C_1-C_6 烷基和 C_3-C_8 环烷基的 R_8 取代。

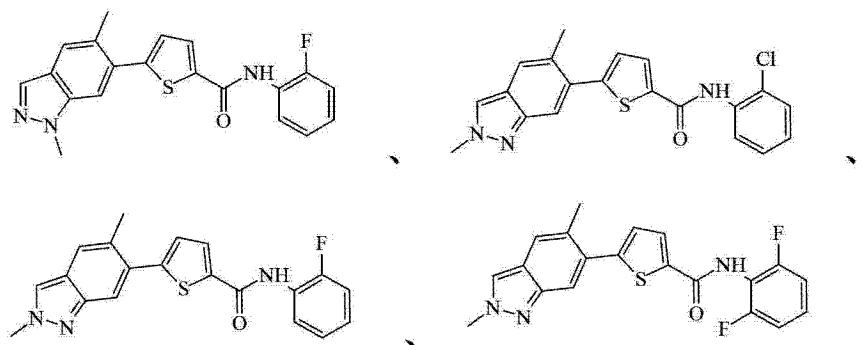
[0222] 在另一实施方案中, 是式 (III) 的化合物, 其中 R_8 选自 F 、 Cl 、 Br 、 CF_3 、 C_1-C_6 烷基和 C_3-C_8 环烷基。在某些实施方案中, R_8 为 CF_3 。在某些实施方案中, R_8 为环丙基。在其他实施方案中, R_8 为 C_1-C_6 烷基。在某些实施方案中, R_8 为 CH_3 。在某些实施方案中, R_8 为 C_2H_5 。在某些实施方案中, R_8 为异丙基。在另一实施方案中, R_8 为 F 。在进一步的实施方案中, R_8 为 Cl 。

[0223] 在另一实施方案中, 是式 (III) 的化合物, 其中 L 为 $-C(=O)NH-$ 。

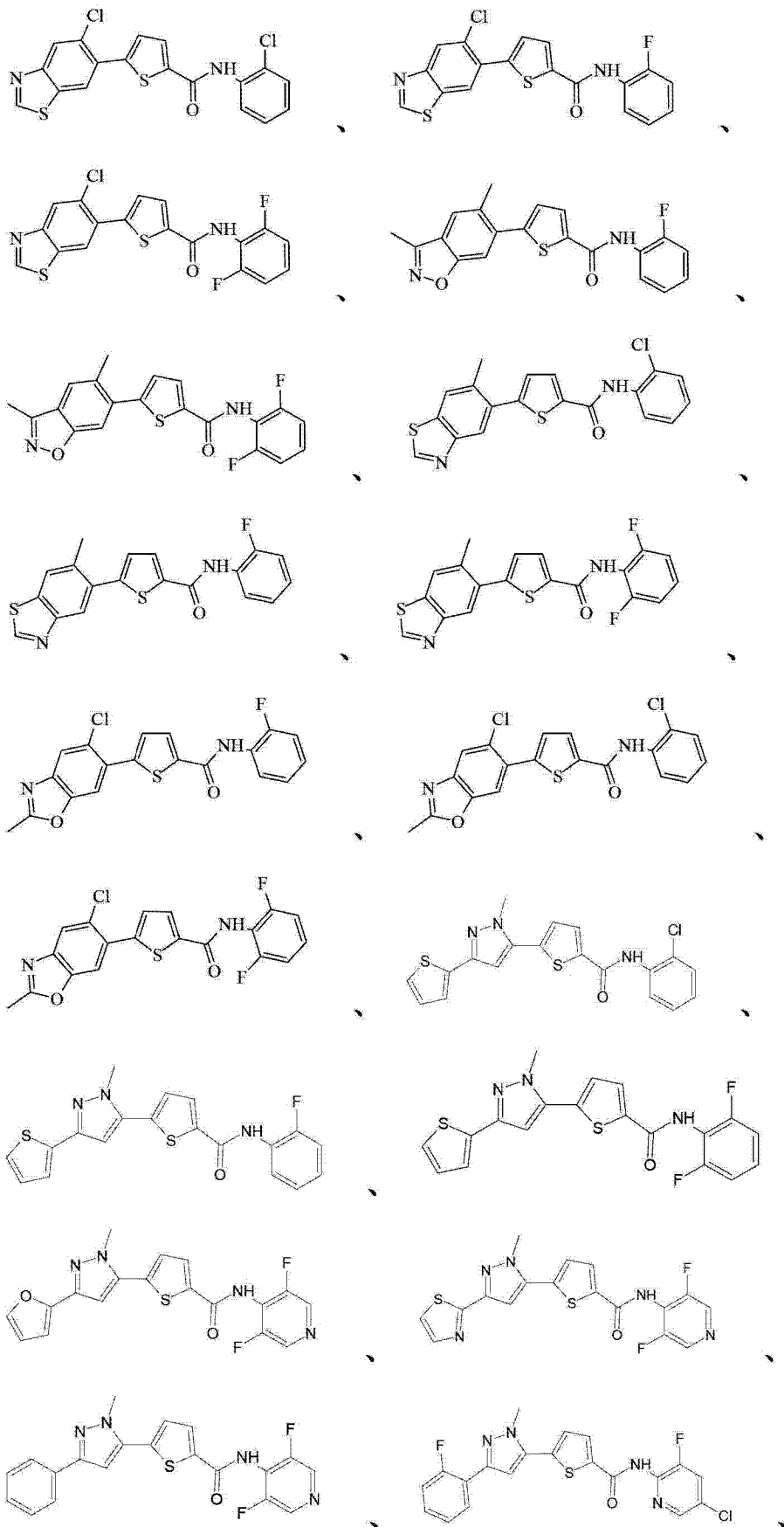
[0224] 在另一实施方案中, 是式 (III) 的化合物, 其中 L 为 $-NH-C(=O)-$ 。

[0225] 在又一方面, 是选自以下的化合物:

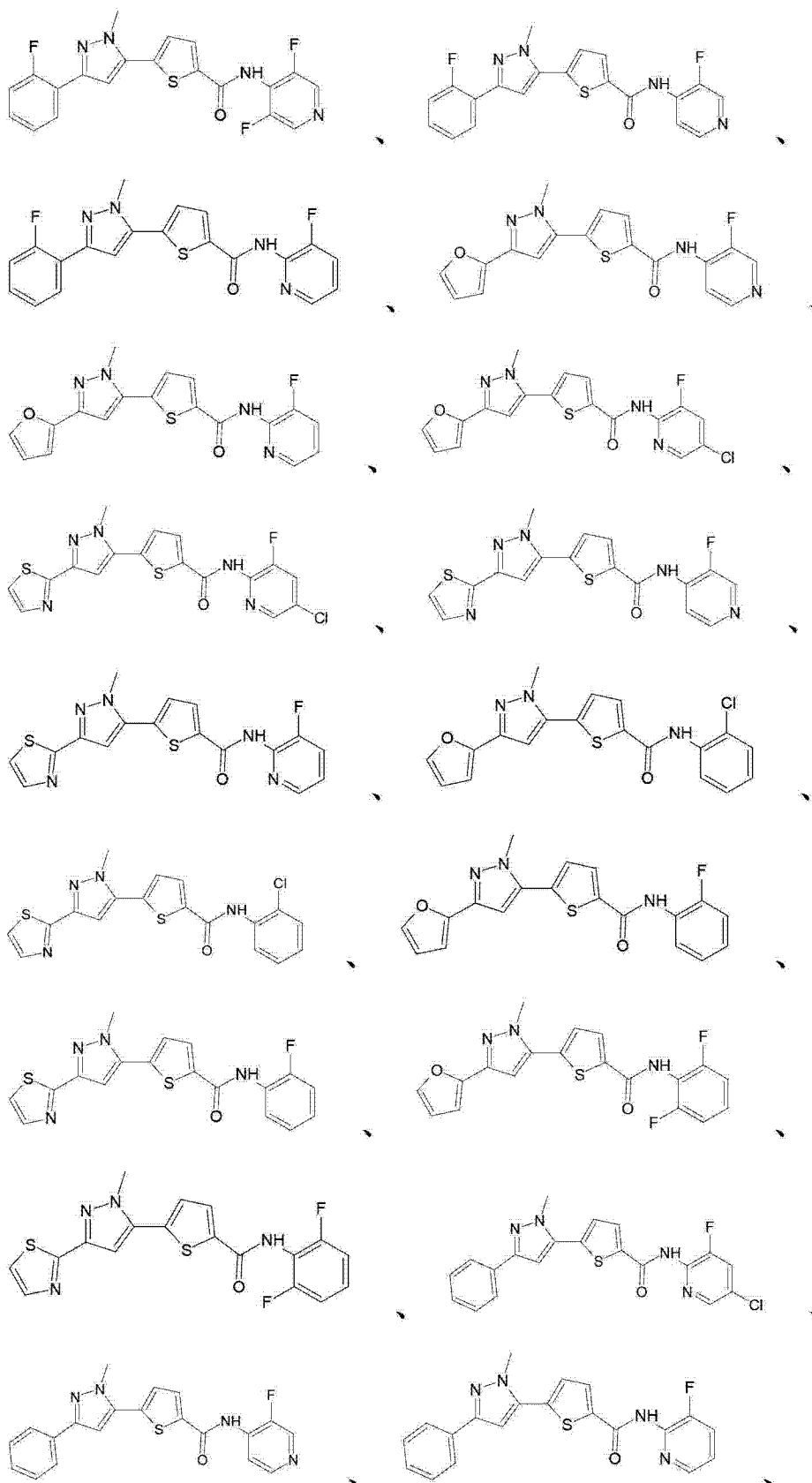
[0226]



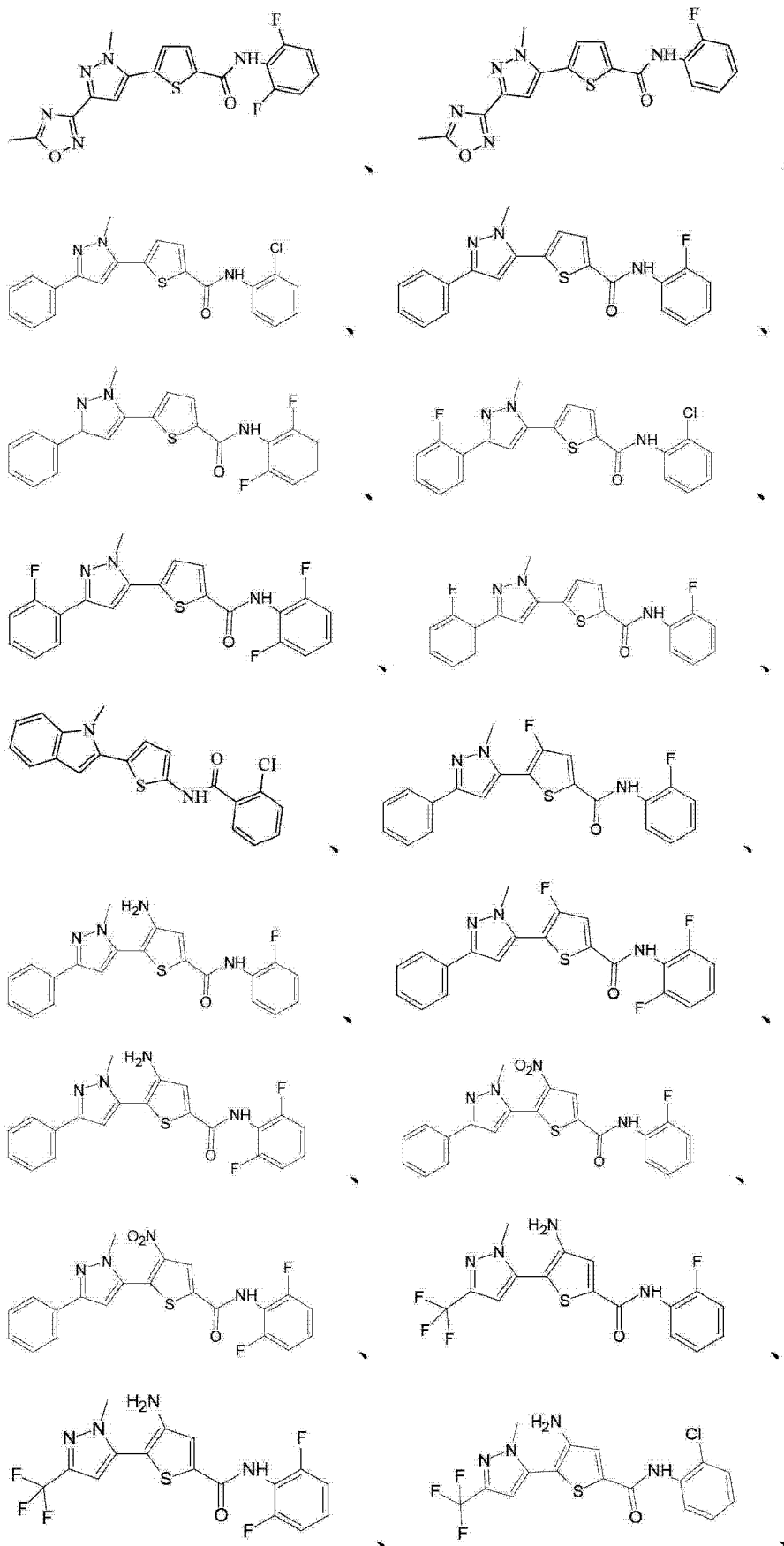
[0227]



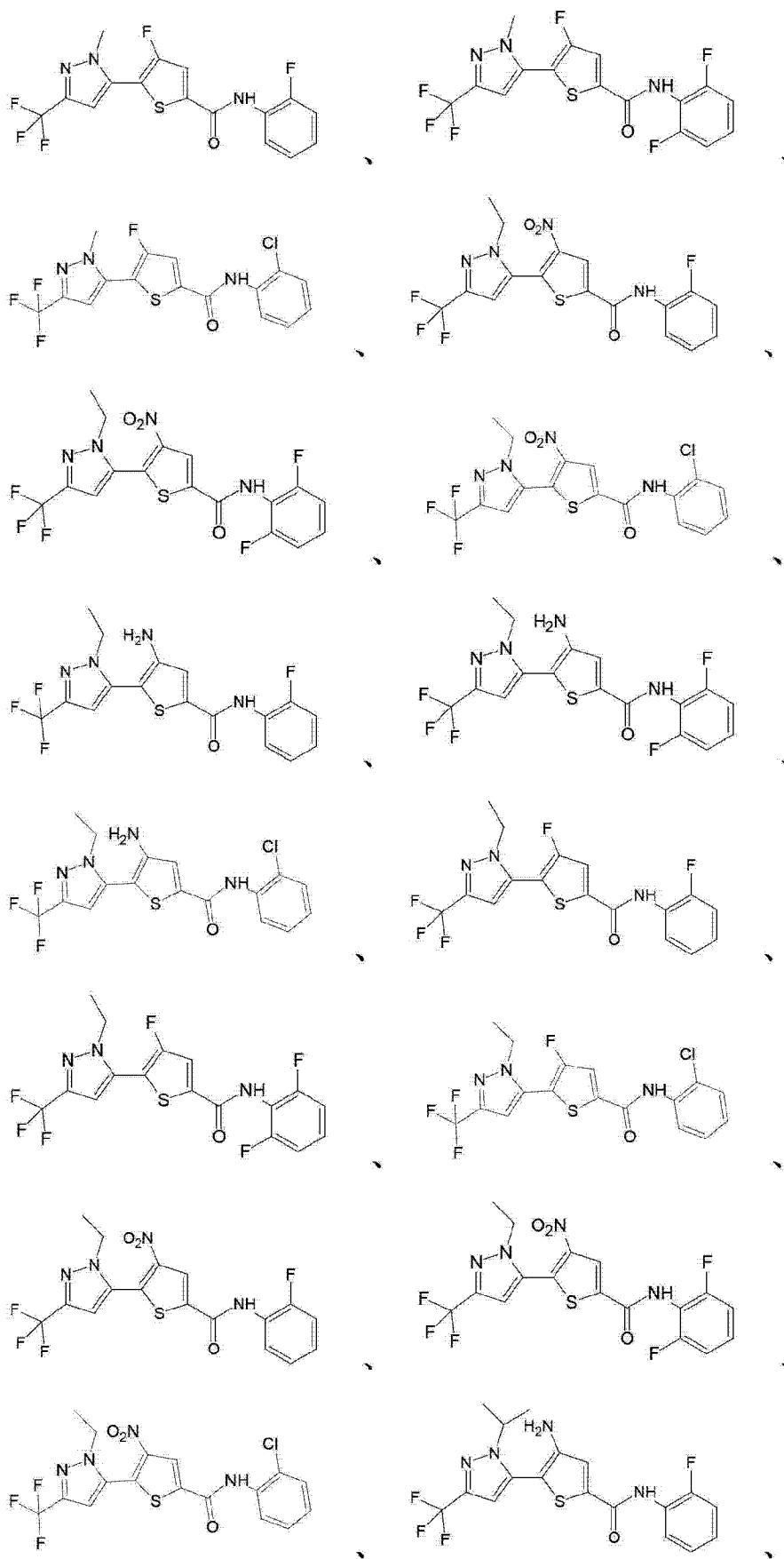
[0228]



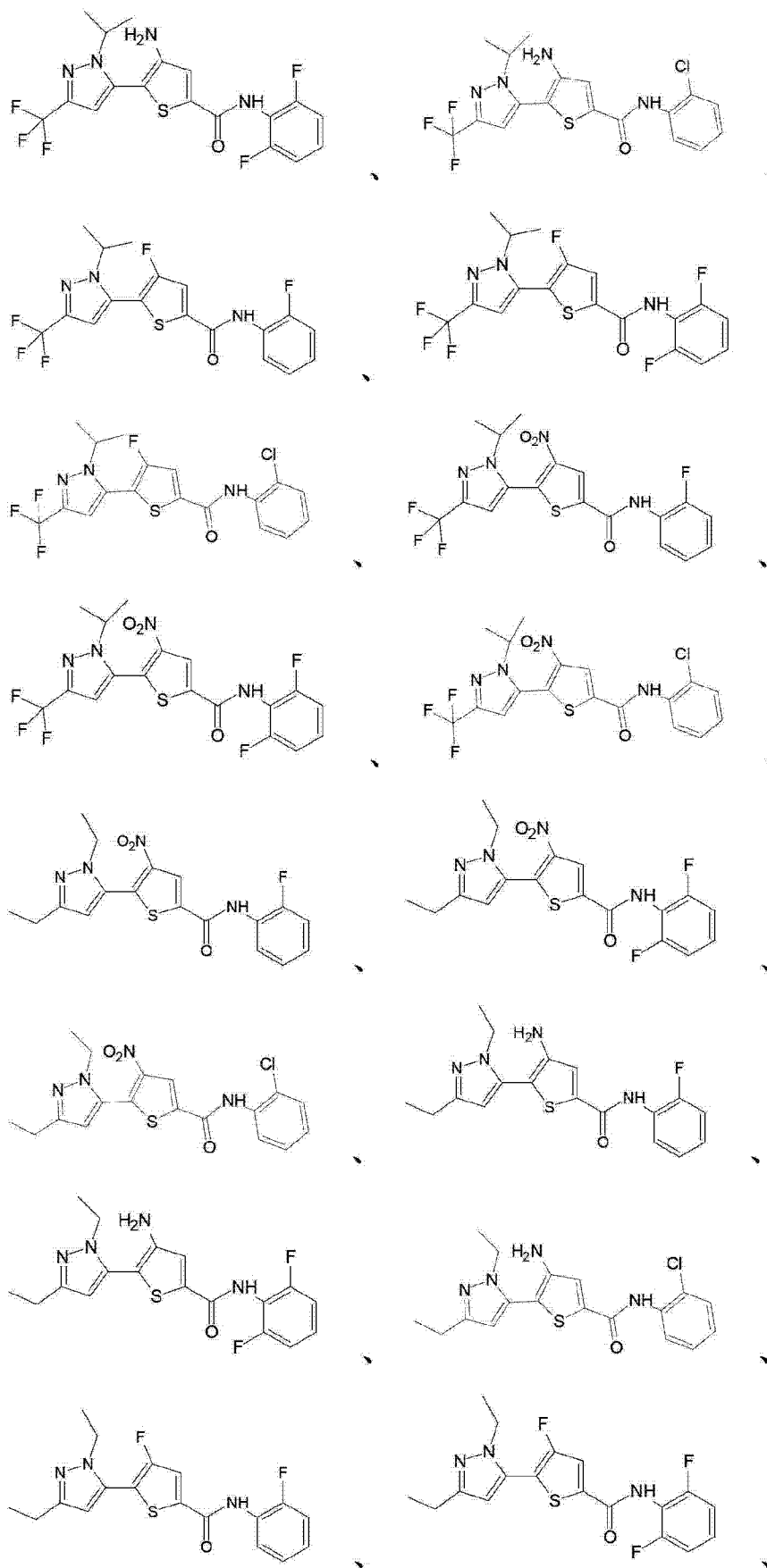
[0229]



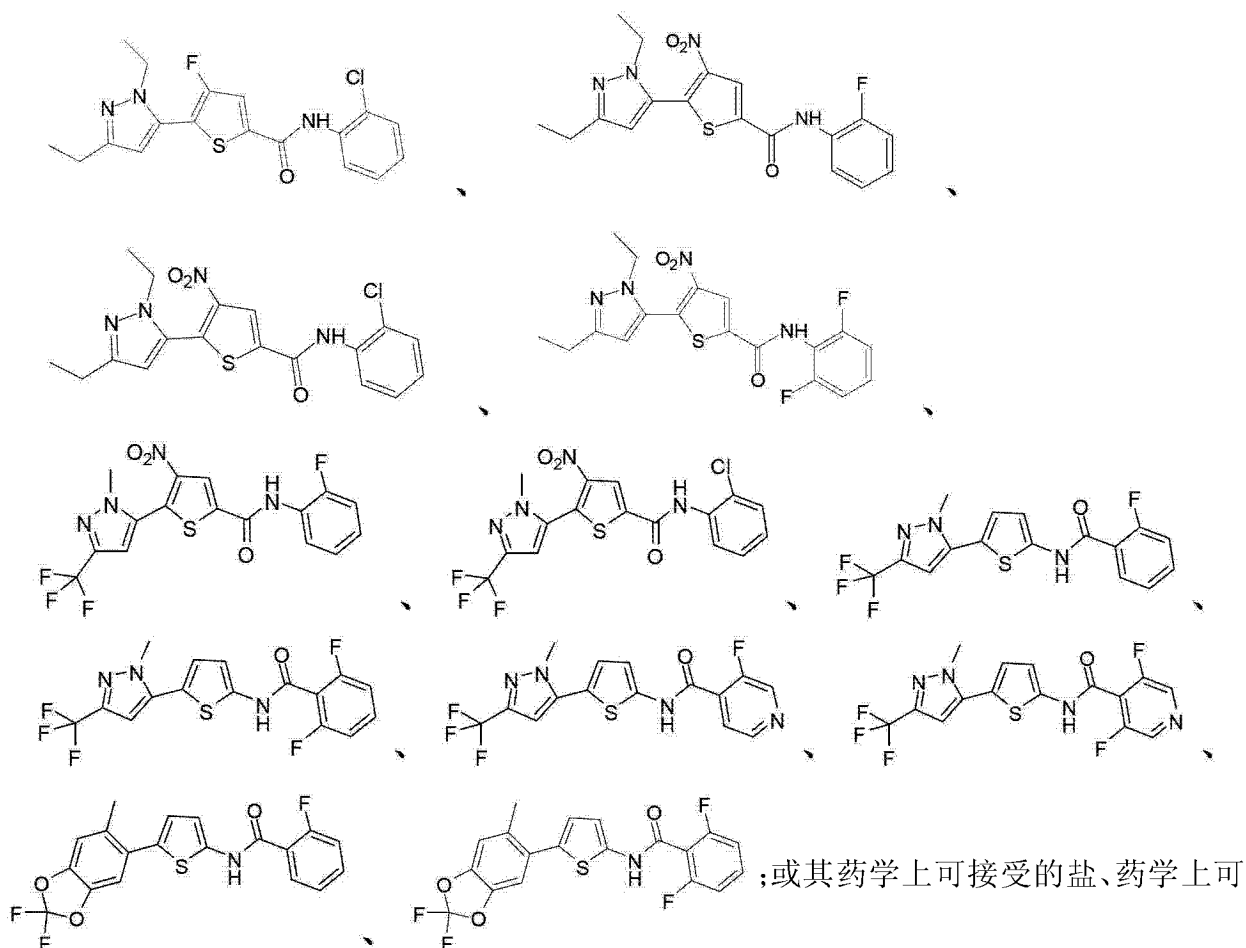
[0230]



[0231]



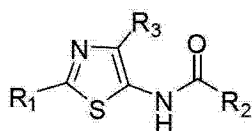
[0232]



接受的溶剂合物或药学上可接受的前药。

[0233] 在一个方面,是具有以下结构的式(IV)的化合物,或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药:

[0234]



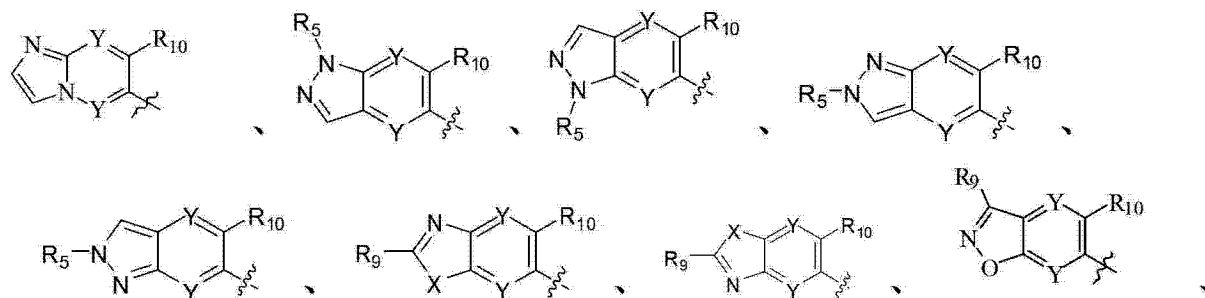
[0235] 式(IV)

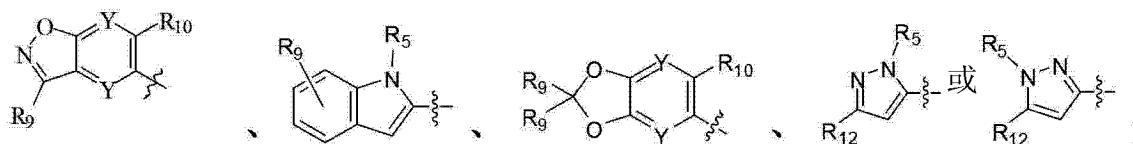
[0236] 其中:

[0237] R

1

为





[0238] X 为 S、O 或 NR₅；

[0239] Y 独立地选自 CR₁₀ 或 N；

[0240] R₂ 为芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基；其中芳基、杂芳基、稠合芳基或稠合杂芳基任选地经至少一个 R₃ 取代；

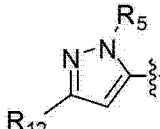
[0241] R₃ 独立地选自 H、F、D、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的 C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、任选地取代的 C₂-C₈ 杂环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基、任选地取代的杂芳基；

[0242] R₅ 选自 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、苯基和苄基；

[0243] R₉ 和 R₁₀ 各自独立地选自 H、D、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、卤素、C₁-C₆ 烷基羰基或 CF₃；

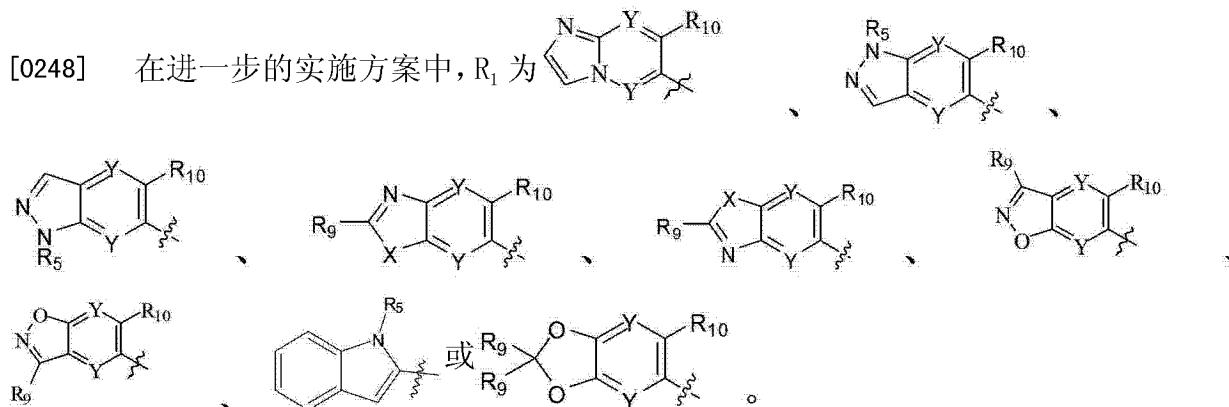
[0244] R₁₂ 选自 CN、-OR₅、任选地取代的 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、任选地取代的 C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基。

[0245] 在进一步的实施方案中，R₂ 为任选地经至少一个选自 F、Cl、Br 和 I 的 R₃ 取代的芳基。在另一实施方案中，R₃ 选自 -CN、-NO₂、-OH、-OCF₃ 和 -OR₅，其中 R₅ 为 C₁-C₆ 烷基。在另一实施方案中，R₃ 为 -OH。在进一步的实施方案中，R₃ 为 -CN。在另一实施方案中，是式 (IV) 的化合物，其中 R₁₂ 选自 H、F、Cl、Br 和 I。在另一实施方案中，R₁₂ 为 C₁-C₆ 烷基。在进一步的实施方案中，C₁-C₆ 烷基为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在另一实施方案中，R₅ 为 H 或 C₁-C₆ 烷基。在另一实施方案中，R₅ 为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在进一步的实施方案中，R₅ 为 H。在又一进一步的实施方案中，R₅ 为甲基。在另一实施方案中，是式 (IV) 的化合物，其中 R₂ 为杂芳基，该杂芳基选自：噻吩基、噻蒎基、呋喃基、吡喃基、噻二唑基、苯并噻二唑基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、吩噻基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噻唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、异吡嗪基、3H-吡嗪基、吡嗪基、吡唑基、嘌呤基、4H-嘌呤基、异嘌呤基、嘌呤基、喹啉基、喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹啉基、喹啉基、噻唑基、噻唑基、蝶啶基、4aH-吡唑基、吡唑基、吡啶基、菲啶基、吡啶基、萘嵌间二氮苯、菲咯啉基、吩嗪基、吩吡嗪基、吩噻嗪基、呋喃基和吩噻嗪基。在进一步的实施方案中，R₂ 为吡啶基。在另一实施方案中，R₂ 为呋喃基。在进一步的实施方案中，R₂ 为吡喃基。在一个实施方案中，是式 (IV) 的化合物，其中 R₂ 为经至少一个选自 F、Cl、Br 和 I 的 R₃ 取代的杂芳基。在另一实施方案中，R₂ 为经选自 H、F、Cl、Br、I、-CN、-NO₂、-OH、-CF₃、-OCF₃、-OR₅、C₁-C₆ 烷基和 C₃-C₈ 环烷基的至少两个 R₃ 或至少三个 R₃ 取代的杂芳基。

[0246] 本文还描述了式 (IV) 的化合物，其中 R₁ 为 ；R₁₂ 选自 CN、-OR₅、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₃-C₈ 环烷基、任选地取代的芳基、任选地取代的 O-芳基和任选地取代的杂芳基；且 R₅ 为 C₁-C₆ 烷基。在一个实施方案中，R₁₂ 为 -CN。在另一实施方案中，R₁₂ 为 OH。

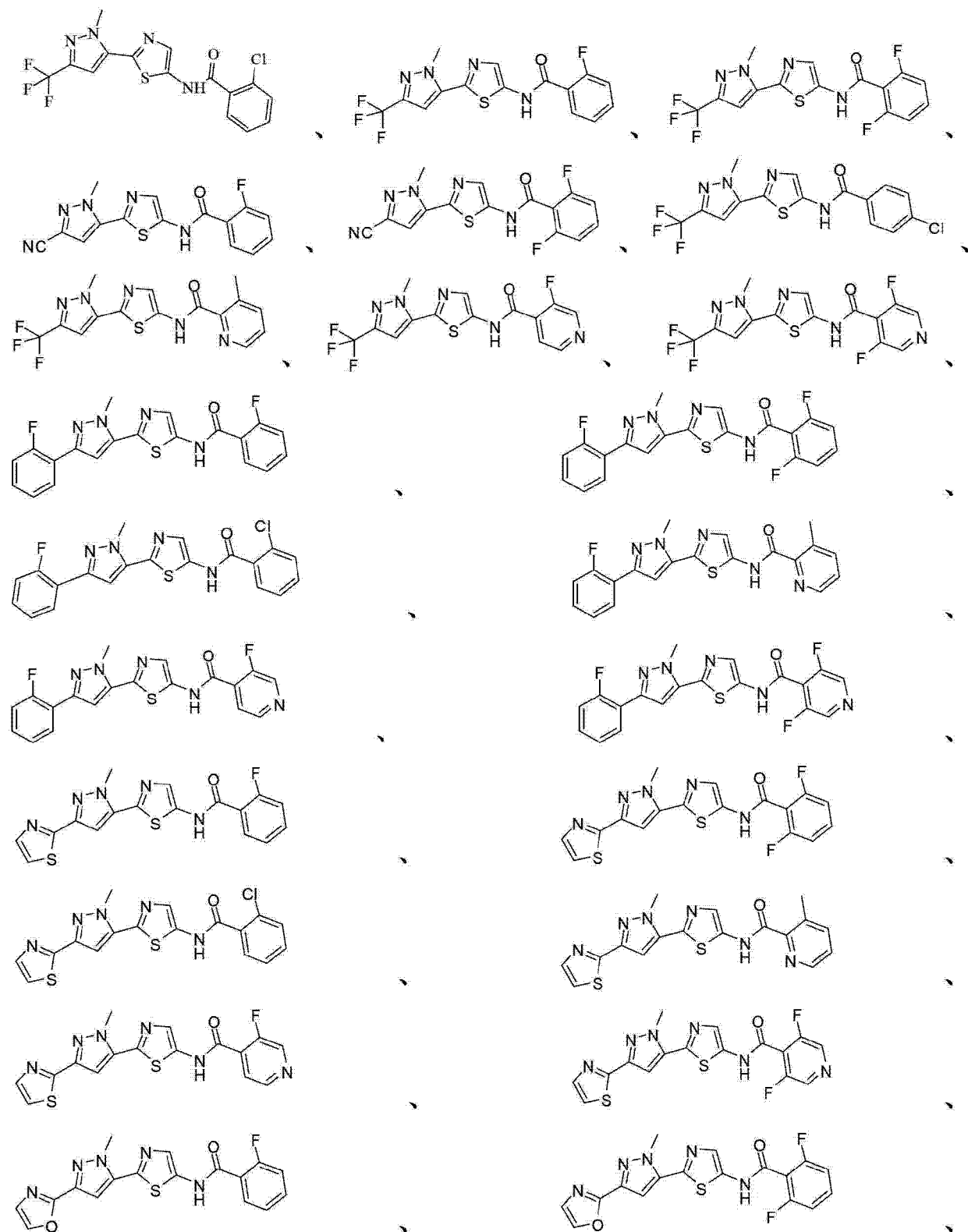
在又一实施方案中, R_{12} 为 C_1-C_6 烷基。在进一步的实施方案中, R_{12} 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基和叔丁基。在一个实施方案中, R_{12} 为甲基。在另一实施方案中, R_{12} 为乙基。

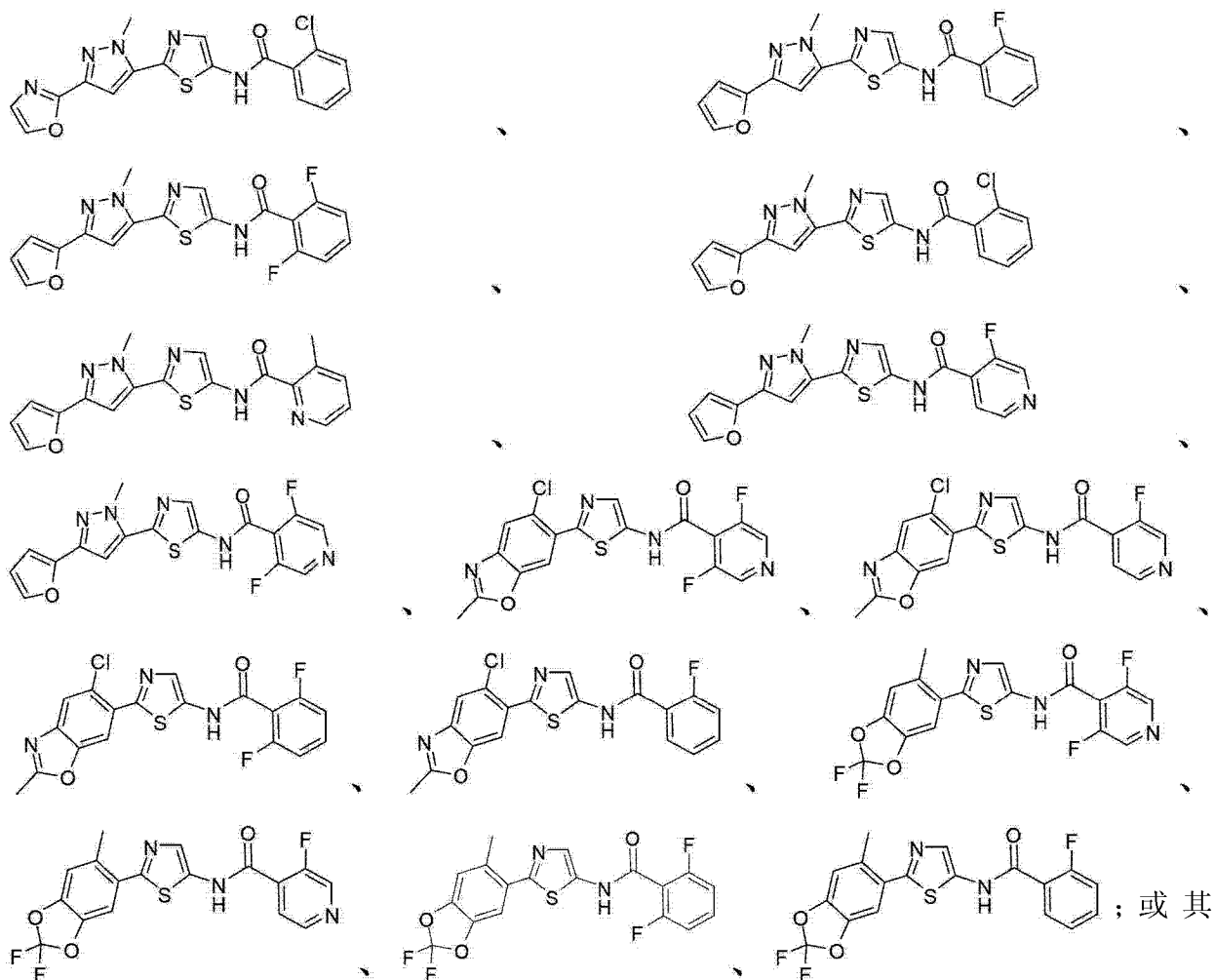
[0247] 在另一实施方案中, 是式 (IV) 的化合物, 其中 R_{12} 选自 CF_3 、 C_1-C_6 烷基和 C_3-C_8 环烷基。在某些实施方案中, R_{12} 为 CF_3 。在其他实施方案中, R_{12} 为环丙基。在其他实施方案中, R_5 为 C_1-C_6 烷基。在某些实施方案中, R_5 为 CH_3 。在某些实施方案中, R_5 为 C_2H_5 。在某些实施方案中, R_5 为异丙基。



[0249] 在另一方面, 是选自以下的化合物:

[0250]





药上可接受的盐、药上可接受的溶剂合物或药上可接受的前药。

[0251] 另一方面,是一种药物组合物,其包含药上可接受的稀释剂、赋形剂或粘合剂以及具有式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 结构的化合物或其药上可接受的盐、药上可接受的前药或药上可接受的溶剂合物。

[0252] 另一方面,是式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药上可接受的盐、药上可接受的溶剂合物或药上可接受的前药在制备药物中的用途,该药物用于调节个体中的钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性或治疗个体中将会从钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性的调节中获益的疾病、病症或病状。在一个实施方案中,式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物抑制钙池操纵的钙内流 (SOCE)。在另一实施方案中,钙池操纵的钙通道活性是钙释放激活的钙通道活性。

[0253] 另一方面,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用具有式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 结构的化合物或其药上可接受的盐、药上可接受的溶剂合物或药上可接受的前药,或者包含该成分与药上可接受的稀释剂、赋形剂或粘合剂的药物组合物。

[0254] 在某些实施方案中,哺乳动物中的疾病、病症或病状选自涉及以下方面的疾病/病症:炎症、肾小球肾炎、葡萄膜炎、肝脏疾病或病症、肾脏疾病或病症、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎、炎性肠病、血管炎、皮炎、骨关节炎、炎性肌病、变应性鼻炎、阴道炎、间质性膀胱炎、硬皮病、骨质疏松症、湿疹、器官移植排斥、同种异体移植或异种移植、移植物排斥、

移植物抗宿主病、红斑狼疮、I 型糖尿病、肺纤维化、皮肤炎、甲状腺炎、重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血、囊性纤维化、慢性复发性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、变应性结膜炎、肝炎和特应性皮炎、哮喘、银屑病、多发性硬化症、舍格伦综合征和自身免疫疾病或病症。

[0255] 另一方面,是调节钙池操纵的钙 (SOC) 通道活性的方法,包括使 SOC 通道复合物或其部分接触式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,或者包含该成分与药学上可接受的稀释剂、赋形剂或粘合剂的药物组合物。

[0256] 本文还提供了在哺乳动物中调节钙释放激活的钙通道 (CRAC) 活性的方法,包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药。

[0257] 在一个实施方案中,是在哺乳动物中调节钙释放激活的钙通道 (CRAC) 活性的方法,包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中对于选自间质相互作用分子 (STIM) 蛋白质家族的钙释放激活的 (CRAC) 通道复合物的至少一种组分,式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物调节其活性,调节其相互作用,或调节其水平,或与其结合,或与其相互作用。

[0258] 在另一实施方案中,是在哺乳动物中调节钙释放激活的钙通道 (CRAC) 活性的方法,包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物调节 STIM1 或 STIM2 的活性,调节其相互作用,或调节其水平,或与其结合,或与其相互作用。

[0259] 在又一实施方案中,是在哺乳动物中调节钙释放激活的钙通道 (CRAC) 活性的方法,包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物调节钙释放激活的钙 (CRAC) 通道活性抑制了钙池操纵的钙内流 (SOCE)。

[0260] 在进一步的实施方案中,是在哺乳动物中调节钙释放激活的钙通道 (CRAC) 活性的方法,包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物调节钙释放激活的钙 (CRAC) 通道活性抑制了与激活的 CRAC 通道直接相关的电生理电流 (I_{CRAC})。

[0261] 在又一进一步的实施方案中,是在哺乳动物中调节钙释放激活的钙通道 (CRAC) 活性的方法,包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物以低于 $10\ \mu\text{M}$ 的 IC_{50} 抑制 SOCE。

[0262] 在另一实施方案中,是在哺乳动物中调节钙释放激活的钙通道 (CRAC) 活性的方法,包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物在低于 $10\ \mu\text{M}$ 的浓度下抑制与激活的 CRAC 通道直接相关的电生理电流 (I_{CRAC})。

[0263] 一方面,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药。

[0264] 在一个实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获

益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物调节哺乳动物 STIM1 蛋白或哺乳动物 STIM2 蛋白的活性,调节其相互作用,或与其结合,或与其相互作用。

[0265] 在又一实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中所述疾病、病症或病状是类风湿性关节炎。

[0266] 在进一步的实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中所述疾病、病症或病状是银屑病。

[0267] 在一个实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中所述疾病、病症或病状是炎性肠病。

[0268] 在另一实施方案中,所述炎性肠病是溃疡性结肠炎。

[0269] 在进一步的实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中所述疾病、病症或病状是器官移植排斥。

[0270] 在进一步的实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中所述疾病、病症或病状是多发性硬化症。

[0271] 在又一进一步的实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,进一步包括对哺乳动物施用第二治疗剂。

[0272] 在另一个实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中第二治疗剂选自免疫抑制剂、糖皮质激素、非甾体抗炎药、Cox-2 特异性抑制剂、来氟米特、金硫葡萄糖、硫代苹果酸金盐、硫代硫酸金钠、柳氮磺吡啶、羟氯喹、米诺环素、抗 TNF α 剂、阿巴西普、阿那白滞素、干扰素 β 、干扰素 γ 、白介素 -2 、变态反应疫苗、抗组胺药、抗白三烯、 β -激动剂、茶碱和抗胆碱能药。

[0273] 在又一实施方案中,是治疗哺乳动物中将会从钙池操纵的钙通道活性的抑制中获益的疾病、病症或病状的方法,包括对哺乳动物施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药,其中第二治疗

剂选自他克莫司、环孢菌素、雷帕霉素、甲氨蝶呤、环磷酰胺、硫唑嘌呤、巯嘌呤、麦考酚酯或 FTY720、泼尼松、醋酸可的松、泼尼松龙、甲泼尼龙、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、倍氯米松、醋酸氟氢可的松、醋酸去氧皮质酮、醛固酮、阿司匹林、水杨酸、龙胆酸、水杨酸胆碱镁、水杨酸胆碱、水杨酸胆碱镁、水杨酸胆碱、水杨酸镁、水杨酸钠、二氟尼柳、卡洛芬、非诺洛芬、非诺洛芬钙、氟比洛芬、布洛芬、酮洛芬、萘丁美酮 (nabutone)、酮咯酸 (ketolorac)、酮咯酸氨基丁三醇、萘普生、奥沙普秦、双氯芬酸、依托度酸、吲哚美辛、舒林酸、托美丁、甲氯灭酸盐、甲氯灭酸钠、甲灭酸、吡罗昔康、美洛昔康、塞来考昔、罗非考昔、伐地考昔、帕瑞考昔、艾托考昔、芦米考昔、CS-502、JTE-522、L-745, 337 和 NS398、来氟米特、金硫葡萄糖、硫代苹果酸金盐、硫代硫酸金钠、柳氮磺吡啶、羟氯喹、米诺环素、英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、阿巴西普、阿那白滞素、干扰素- β 、干扰素- γ 、白介素-2、变态反应疫苗、抗组胺药、抗白三烯、 β -激动剂、茶碱和抗胆碱能药。

[0274] 本文还描述了在哺乳动物中抑制活化 T 细胞核因子 (NFAT) 的钙池操纵的钙内流 (SOCE) 激活的方法, 包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药。

[0275] 在一个实施方案中, 是在哺乳动物中抑制活化 T 细胞核因子 (NFAT) 的钙池操纵的钙内流 (SOCE) 激活的方法, 包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药, 其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物调节哺乳动物 STIM1 蛋白或哺乳动物 STIM2 蛋白的相互作用, 或调节其水平, 或与其结合, 或与其相互作用。

[0276] 另一方面, 是在哺乳动物中通过抑制 NFAT 的钙池操纵的钙内流激活而降低细胞因子表达的方法, 包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药。

[0277] 在另一实施方案中, 是在哺乳动物中通过抑制 NFAT 的钙池操纵钙内流激活而降低细胞因子表达的方法, 包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药, 其中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物调节哺乳动物 STIM1 蛋白或哺乳动物 STIM2 蛋白的相互作用, 或调节其水平, 或与其结合, 或与其相互作用。

[0278] 在又一实施方案中, 是在哺乳动物中通过抑制 NFAT 的钙池操纵钙内流激活而降低细胞因子表达的方法, 包括施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂合物或药学上可接受的前药, 其中该细胞因子选自 IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1RA、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、制癌蛋白 M、促红细胞生成素、白血病抑制因子 (LIF)、干扰素、 γ -干扰素 (γ -IFN)、B7. 1 (CD80)、B7. 2 (B70、CD86)、TNF- α 、TNF- β 、LT- β 、CD40 配体、Fas 配体、CD27 配体、CD30 配体、4-1BBL、Trail 和移动抑制因子 (MIF)。

[0279] 化合物的其他形式

[0280] 在某些情况下, 本文所述的化合物可以作为非对映异构体、对映异构体或其他立体异构形式存在。本文提供的化合物包括所有非对映异构体、对映异构体形式和差向异构形式以及其合适的混合物。可通过色谱法或通过形成非对映异构体并由再结晶或色谱

法或其任何组合分离,来进行立体异构体的分离。(Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, “Enantiomers, Racemates and Resolutions”, John Wiley And Sons, Inc., 1981, 其公开内容通过引用并入本文)。还可通过立体选择性合成来获得立体异构体。

[0281] 在某些情形下,化合物可作为互变异构体存在。所有互变异构体都包括在本文所述的通式内。

[0282] 本文所述的方法和组合物包括使用无定形形式以及晶形(也被称为多晶型物)。本文所述的化合物可呈药学上可接受的盐形式。同样,具有相同活性类型的这些化合物的活性代谢物也包括在本发明的范围内。另外,本文所述的化合物可以以非溶剂合物形式以及以与药学上可接受的溶剂(例如水、乙醇等)的溶剂合物的形式存在。也认为本文提供的化合物的溶剂合物形式已在本文中公开。

[0283] 在一些实施方案中,本文所述的化合物可被制备为前药。“前药”指在体内转化为母体药物的药剂。前药通常是有用的,因为在某些情形下,它们可能比母体药物更易于给药。例如,它们通过口服给药可能是生物可利用的,而母体药物不行。前药还可能在药物组合物中具有比母体药物改善的溶解性。前药的实例(不限于此)可为本文所述的化合物,其作为酯类(“前药”)施用以促进跨细胞膜递送,在细胞膜处水溶性不利于流动性,但一旦到了水溶性有益的细胞内,其可被代谢水解为活性实体羧酸。前药的另外的实例可为与酸基团键合的短肽(多氨基酸),肽将被代谢从而展现活性部分。在某些实施方案中,一旦在体内施用,前药就化学转化为所述化合物的生物学、药学或治疗活性形式。在某些实施方案中,前药通过一步或多步或过程酶代谢为所述化合物的生物学、药学或治疗活性形式。

[0284] 为了产生前药,修饰药学活性化合物以便在体内施用后再产生活性化合物。可将前药设计为改变药物的代谢稳定性或转运特性,以遮盖副作用或毒性,改进药物味道,或改变药物的其他特性或性质。在一些实施方案中,凭借对体内药效学过程和药物代谢的了解,一旦确定了药学活性化合物,就可以设计化合物的前药。(参见,例如 Nogrady(1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, 第 388-392 页; Silverman(1992); *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, Inc., San Diego, 第 352-401 页; Saulnier 等人, (1994), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, p. 1985; Rooseboom 等人, *Pharmacological Reviews*, 56:53-102, 2004; Miller 等人, *J. Med. Chem.* Vol. 46, no. 24, 5097-5116, 2003; Aesop Cho, “Recent Advances in Oral Prodrug Discovery”, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol. 41, 395-407, 2006)。

[0285] 本文所述化合物的前药形式包括在权利要求的范围内,其中所述前药在体内代谢以产生本文所述的具有式(I)、(II)、(III)或(IV)结构的化合物。在某些情况下,本文所述的某些化合物可为另一衍生物或活性化合物的前药。

[0286] 前药通常是有用的,因为在某些情形下,它们可能比母体药物更易于给药。例如,它们通过口服给药可能是生物可利用的,而母体药物不行。前药还可在药物组合物中具有比母体药物改善的溶解性。可将前药设计为可逆药物衍生物,用作增强药物向位点特异性组织转运的调节剂。在一些实施方案中,前药的设计增加了有效的水溶性。参见,例如 Fedorak 等人, *Am. J. Physiol.*, 269:G210-218(1995); McLoed 等人, *Gastroenterol.*, 106:405-413(1994); Hochhaus 等人, *Biomed. Chrom.*, 6:283-286(1992);

J. Larsen 和 H. Bundgaard, *Int. J. Pharmaceutics*, 37, 87 (1987) ; J. Larsen 等 人 , *Int. J. Pharmaceutics*, 47, 103 (1988) ; Sinkula 等 人 , *J. Pharm. Sci.*, 64:181-210 (1975) ; T. Higuchi 和 V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, A. C. S. Symposium Series 的第 14 卷 ; 和 Edward B. Roche, *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 所有公开内容都并入本文)。

[0287] 本文所述化合物的芳环部分上的位点可易于进行各种代谢反应, 因此, 在芳环结构上引入合适的取代基, 例如仅作为举例, 引入卤素, 可减少、最小化或消除该代谢途径。

[0288] 可用同位素 (例如用放射性同位素) 或通过其他手段标记本文所述的化合物, 包括但不限于使用发色团或荧光部分、生物发光标记、光激活的或化学发光标记。

[0289] 本文所述的化合物包括同位素标记的化合物, 它们与各种通式中所述的化合物及本文提出的结构相同, 不同之处在于, 有一个或多个原子被原子质量或质量数与通常在自然界发现的原子质量或质量数不同的原子所代替。可引入本发明化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、氟和氯的同位素, 例如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 。某些同位素标记的本文所述化合物, 例如已引入诸如 ^3H 和 ^{14}C 等放射性同位素的化合物, 可用于药物和 / 或底物组织分布测定。另外, 用同位素例如氘即 ^2H 置换可提供某些由于较高的代谢稳定性而导致的优点, 例如体内半衰期延长或剂量需求降低。

[0290] 在另外的或进一步的实施方案中, 本文所述的化合物在施用于需要的生物体后即代谢, 产生代谢物, 所述代谢物然后用于产生所需的效果, 包括所需的治疗效果。

[0291] 本文所述的化合物可形成和 / 或用作药学上可接受的盐。药学上可接受的盐的类型包括但不限于: (1) 酸加成盐, 其通过化合物的游离碱形式与药学上可接受的无机酸或有机酸反应而形成, 所述无机酸例如: 盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、偏磷酸等; 所述有机酸例如: 乙酸、丙酸、己酸、环戊基丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、三氟乙酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰) 苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1, 2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲基二环-[2. 2. 2] 辛-2-烯-1-羧酸、葡庚糖酸、4, 4'-亚甲基双-(3-羟基-2-烯-1-羧酸)、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、十二烷基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸、丁酸、苯乙酸、苯丁酸、丙戊酸等; (2) 当存在于母体化合物中的酸性质子被金属离子置换时形成的盐, 所述金属离子例如碱金属离子 (例如锂、钠、钾)、碱土金属离子 (例如镁或钙) 或铝离子。在某些情况下, 本文所述的化合物可与有机碱配位, 所述有机碱例如但不限于乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨基丁三醇、N-甲基葡萄糖胺、二环己胺、三(羟基甲基) 甲胺。在其他情况下, 本文所述的化合物可与氨基酸 (例如但不限于精氨酸、赖氨酸等) 形成盐。用于与包括酸性质子的化合物形成盐的可接受的无机碱包括但不限于氢氧化铝、氢氧化钙、氢氧化钾、碳酸钠、氢氧化钠等。

[0292] 应该理解, 所谓药学上可接受的盐包括其溶剂加成形式或晶体形式, 尤其是溶剂合物或多晶型物。溶剂合物含有化学计量量的或非化学计量量的溶剂, 并且可在与药学上可接受的溶剂例如水、乙醇等结晶过程中形成。当溶剂为水时形成水合物, 或者当溶剂为醇时形成醇化物。在本文所述的过程中可方便地制备或形成本文所述化合物的溶剂合物。另外, 本文提供的化合物可以以非溶剂合物以及溶剂合物的形式存在。通常, 就本文提供的化合物和方法的目的而言, 认为溶剂合物形式等同于非溶剂合物形式。

[0293] 在一些实施方案中,本文所述的化合物,例如式(I)、(II)、(III)和(IV)化合物,呈各种形式,包括但不限于无定形、磨碎的形式和纳米颗粒形式。另外,本文所述的化合物包括晶形,也被称为多晶型物。多晶型物包括化合物的相同元素组成的不同晶体堆积排列。多晶型物通常具有不同的X-射线衍射图样、熔点、密度、硬度、晶体形状、光学性质、稳定性和溶解性。诸如再结晶溶剂、结晶速率和储存温度的各种因素可导致单一晶形占优。

[0294] 可用多种技术完成药学上可接受的盐、多晶型物和/或溶剂合物的筛选和表征,所述技术包括但不限于热分析、X-射线衍射、光谱分析、蒸汽吸附和显微镜检查。热分析方法针对热化学降解或热物理过程,包括但不限于多晶型转化,并且这类方法用于分析多晶型之间的关系,测定重量减轻,以发现玻璃化温度,或用于赋形剂相容性研究。此类方法包括但不限于差示扫描量热法(DSC)、调制式差示扫描量热法(MDSC)、热重分析法(TGA)和热重分析和红外线分析法(TG/IR)。X-射线衍射方法包括但不限于单晶和粉末衍射仪及同步加速器源。所用的各种分光技术包括但不限于拉曼、FTIR、UV-VIS和NMR(液态和固态)。各种显微镜检查技术包括但不限于偏振光显微镜检查、具有能量色散X射线分析(EDX)的扫描电子显微镜检查(SEM)、具有EDX的环境扫描电子显微镜检查(处于气态或水蒸汽气氛中)、IR显微镜检查和拉曼显微镜检查。

[0295] 在整个本说明书中,可选择基团及其取代基以提供稳定的部分和化合物。

[0296] 化合物的合成

[0297] 在一些实施方案中,用化学文献中所述的手段,用本文所述的方法,或通过其组合,实现本文所述化合物的合成。另外,本文提供的溶剂、温度和其他反应条件可以变化。

[0298] 在其他实施方案中,用于合成本文所述化合物的原料和试剂可以合成产生或从例如但不限于Sigma-Aldrich、FischerScientific(Fischer Chemicals)和AcrosOrganics的商业来源获得。

[0299] 在另外的实施方案中,用本文所述以及本领域公认的技术和材料合成本文所述的化合物和具有不同取代基的其他相关化合物,所述技术及材料例如在以下文献中描述:Fieser和Fieser的Reagents for Organic Synthesis,第1-17卷(John Wiley and Sons,1991);Rodd的Chemistry of Carbon Compounds,第1-5卷和增补卷(Elsevier Science Publishers,1989);Organic Reactions,第1-40卷(John Wiley and Sons,1991);Larock的Comprehensive Organic Transformations(VCH Publishers Inc.,1989);March,ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY,第4版(Wiley 1992);Carey和Sundberg,ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY,第4版,第A和B卷(Plenum2000,2001);和Green和Wuts,PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS,第3版(Wiley 1999)(所有文献的公开内容都通过引用并入本文中)。制备本文所公开化合物的通用方法可由反应衍生,所述反应可利用适合的试剂和条件进行改进,以便引入在本文提供的通式中发现的各个部分。作为指导,可使用以下合成方法。

[0300] 通过亲电体与亲核体的反应形成共价连接

[0301] 可用各种亲电体和/或亲核体来修饰本文所述的化合物,以形成新官能团或取代基。标题为“共价连接及其前体实例”的表1列出了所选择的共价连接及产生该共价连接的前体官能团的非限制性实例。表1可用作提供共价连接的多种可用的亲电体和亲核体组合的指导。前体官能团显示为亲电基团和亲核基团。

[0302] 表1:共价连接及其前体实例

[0303]

共价连接产物	亲电体	亲核体
甲酰胺	活化酯	胺 / 苯胺
甲酰胺	酰基叠氮	胺 / 苯胺
甲酰胺	酰卤	胺 / 苯胺
酯	酰卤	醇 / 酚
酯	酰基腈	醇 / 酚
甲酰胺	酰基腈	胺 / 苯胺
亚胺	醛	胺 / 苯胺
烷基胺	烷基卤	胺 / 苯胺
酯	烷基卤	羧酸
硫醚	烷基卤	硫醇
醚	烷基卤	醇 / 酚
硫醚	烷基磺酸酯	硫醇
酯	酐	醇 / 酚
甲酰胺	酐	胺 / 苯胺
苯硫酚	芳基卤	硫醇
芳基胺	芳基卤	胺
硫醚	氮杂环丙烷	硫醇
甲酰胺	羧酸	胺 / 苯胺
酯	羧酸	醇
肼	酰肼	羧酸
N- 酰基脲或酐	碳二亚胺	羧酸
酯	重氮烷	羧酸

硫醚	环氧化物	硫醇
硫醚	卤代乙酰胺	硫醇
脲	异氰酸酯	胺 / 苯胺
氨基甲酸酯	异氰酸酯	醇 / 酚
硫脲	异硫氰酸酯	胺 / 苯胺
硫醚	马来酰亚胺	硫醇
烷基胺	磺酸酯	胺 / 苯胺
硫醚	磺酸酯	硫醇
磺酰胺	磺酰卤	胺 / 苯胺
磺酸酯	磺酰卤	酚 / 醇

[0304]

[0305] 保护基的应用

[0306] 在所述反应中,当在最终产物中需要反应性官能团时,为了避免其不必要地参与反应,可能必需保护所述反应性官能团,例如羟基、氨基、亚氨基、巯基或羧基。保护基用于封闭某些或所有活性部分,并防止这些基团参与化学反应,直到除掉保护基。优选的是每一个保护基可通过不同手段去除。在完全不同的反应条件下断裂的保护基满足差别去除的要求。

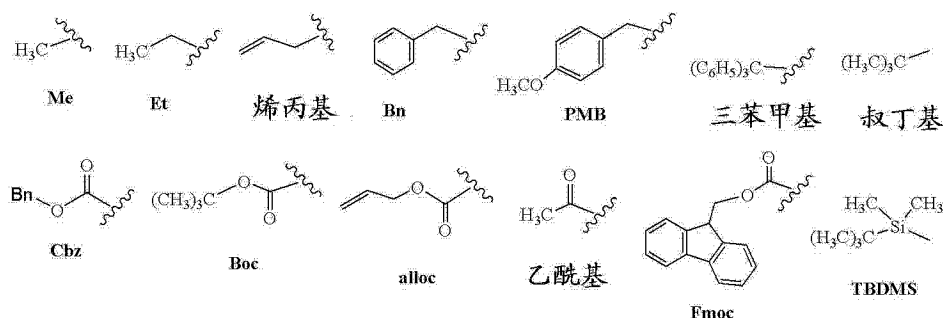
[0307] 可通过酸、碱、还原条件(例如氢解作用)和/或氧化条件除去保护基。诸如三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、缩醛和叔丁基二甲基甲硅烷基等基团对酸敏感,且可用于在用 Cbz 基团(其可通过氢解作用除去)和 Fmoc 基团(其对碱敏感)保护的氨基的存在下保护羧基和羟基反应性部分。羧酸和羟基反应性部分可在用对酸敏感的基团(例如氨基甲酸叔丁酯)或氨基甲酸酯(其对酸和碱二者都稳定但可水解除去)封闭的胺的存在下,用对碱敏感的基团(例如但不限于甲基、乙基和乙酰基)封闭。

[0308] 羧酸和羟基反应性部分还可用水解除去的保护基例如苄基封闭,同时能够与酸氢键结合的氨基可用对碱敏感的基团例如 Fmoc 封闭。羧酸反应性部分可通过转化为本文所举例的简单酯化合物而得到保护,包括转化为烷基酯,或者它们可用可氧化除去的保护基例如 2,4-二甲氧基苄基封闭,同时共存的氨基可用对氟化物敏感的氨基甲酸甲硅烷酯封闭。

[0309] 然后在酸保护基和碱保护基的存在下烯丙基封闭基团是有用的,因为烯丙基封闭基团稳定并可随后由金属或 π -酸催化剂除去。例如,可在对酸敏感的氨基甲酸叔丁酯或对碱敏感的乙酸胺保护基的存在下用 Pd^0 催化的反应对烯丙基封闭的羧酸进行脱保护。保护基的再一形式为化合物或中间体可连接在其上的树脂。只要残基连接到树脂上,官能团就受到封闭并不能反应。一旦从树脂释放,官能团就可用于反应。

[0310] 通常,封闭基/保护基可选自:

[0311]



[0312] 在以下文献中阐述了其他保护基并详述了适用于保护基的产生及其去除的技术:Greene 和 Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第3版, John Wiley & Sons, New York, NY, 1999; 和 Kocienski, *Protective Groups*, Thieme Verlag, New York, NY, 1994,就此公开内容而言其通过引用并入本文中)。

[0313] 某些术语

[0314] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与要求保护的主体所属的通常理解的相同的含义。在对本文术语有多种定义的情况下,以本章节的定义为准。本文所引用的所有专利、专利申请、出版物和发布的核苷酸和氨基酸序列(例如可在 GenBank 或其他数据库获得的序列)都通过引用而并入。在提及 URL 或其他此等标识符或地址时,应该理解此等标识符可能变化,且互联网上的具体信息可能变化不定,但通过搜索互联网可发现等同的信息。随附的参考文献证实了此类信息的可获得性和公共传播。

[0315] 应该理解,前述一般描述和以下详细描述仅为示例性和解释性的,并非限制任何请求保护的主体。在本说明书中,除非另外明确指出,否则单数的使用包括复数。应该注意,除非上下文明确指出不是这样,否则如在本说明书和所附权利要求中所用的,单数形式“一个”、“一种”、“该”包括复数指示物。在本申请书中,除非另外指出,否则“或”的使用意即“和/或”。此外,术语“包括”以及其他形式例如“包含”、“被包括”是非限制性的。

[0316] 本文所用的章节标题仅用于组织目的,不能理解为限制所述主题。

[0317] 标准化学术语的定义可在参考文献中找到,所述参考文献包括但不限于 Carey 和 Sundberg “*ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY* 第4版”A 卷(2000)和 B 卷(2001),Plenum Press, New York。除非另外指出,否则使用质谱分析、NMR、HPLC、蛋白质化学、生物化学、重组 DNA 技术和药理学等常规方法。

[0318] 除非提供明确定义,否则与本文所述的分析化学、合成有机化学和医学及药物化学关联使用的命名及其实验室程序和技术是本领域公认的。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送及患者的治疗。标准技术可用于重组 DNA、寡核苷酸合成和组织培养和转化(例如电穿孔、脂质转染)。例如,可用厂商规格的试剂盒或如本领域通常所完成的或如本文所述的那样进行反应和纯化技术。前述技术和程序通常可用常规方法进行,并且如在整个本说明书中引用和讨论的一般及更具体的参考文献中所述的那样进行。

[0319] 应该理解,本文所述的方法和组合物不限于本文所述的特定方法、方案、细胞系、构建体和试剂,且本身可变化。还应该理解,本文所用的术语仅用于阐述特定实施方案的目的,并非意欲限制本文所述的方法、化合物、组合物的范围。

[0320] 本文所用的 C_1-C_x 包括 C_1-C_2 、 C_1-C_3 ... C_1-C_x 。 C_1-C_x 指构成其所指的部分的碳原子的数目（不包括任选的取代基）。

[0321] “烷基”指脂肪族烃基。烷基可包括或可不包括不饱和单元。烷基部分可以是“饱和和烷基”，意即其不含有任何不饱和（即碳-碳双键或碳-碳叁键）单元。烷基也可以是“不饱和烷基”部分，意即其含有至少一个不饱和单元。烷基部分不管是饱和的还是不饱和的，都可以是支链、直链或环状。

[0322] “烷基”可具有 1-6 个碳原子（本文中，数值范围例如“1-6”无论什么时候出现，都是指所给定的范围中的各个整数；例如“1-6 个碳原子”意味着烷基可由 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子等等，至多并包括 6 个碳原子组成，但本定义也包括未指明数值范围的术语“烷基”的存在）。本文所述化合物的烷基可指定为“ C_1-C_6 烷基”或类似的指定。仅作为举例，“ C_1-C_6 烷基”表示在烷基链中有 1-6 个碳原子，即所述烷基链选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、己基、丙烯-3-基（烯丙基）、环丙基甲基、环丁基甲基、环戊基甲基、环己基甲基。烷基可被取代或未被取代。视结构而定，烷基可以是单价的或二价的（即亚烷基）。

[0323] “烷氧基”指“-O- 烷基”，其中烷基如本文所定义。

[0324] 术语“烯基”指其中烷基的前两个原子形成双键而该双键不是芳香基的部分的一类烷基。也就是说，烯基以原子 $-C(R)=CR_2$ 开始，其中 R 指烯基的其余部分，它们可相同或不同。烯基的非限制性实例包括 $-CH=CH_2$ 、 $-C(CH_3)=CH_2$ 、 $-CH=CHCH_3$ 、 $-CH=C(CH_3)_2$ 和 $-C(CH_3)=CHCH_3$ 。烯基部分可以是支链、直链或环状的（在这种情况下，其也被称为“环烯基”）。烯基可具有 2-6 个碳。烯基可被取代或未被取代。视结构而定，烯基可以是单价的或二价的（即亚烯基）。

[0325] 术语“炔基”指其中烷基的前两个原子形成叁键的一类烷基。也就是说，炔基以原子 $-C \equiv C-R$ 开始，其中 R 指炔基的其余部分。炔基的非限制性实例包括 $-C \equiv CH$ 、 $-C \equiv CCH_3$ 、 $-C \equiv CCH_2CH_3$ 和 $-C \equiv CCH_2CH_2CH_3$ 。炔基部分的“R”部分可以是支链、直链或环状的。炔基可具有 2-6 个碳。炔基可被取代或未被取代。视结构而定，炔基可以是单价的或二价的（即亚炔基）。

[0326] “氨基”指 $-NH_2$ 基团。

[0327] 术语“烷基胺”或“烷基氨基”指 $-N(\text{烷基})_xH_y$ 基团，其中烷基如本文所定义，且 x 和 y 选自 $x=1, y=1$ 和 $x=2, y=0$ 。当 $x=2$ 时，烷基与它所连接的氮一起可任选地形成环状环系统。“二烷基氨基”指 $-N(\text{烷基})_2$ 基团，其中烷基如本文所定义。

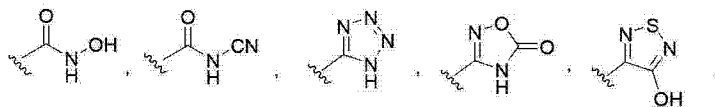
[0328] 术语“芳香族”指具有含有 $4n+2$ 个 π 电子的离域 π -电子体系的平面环，其中 n 为整数。芳香环可由 5、6、7、8、9 或多于 9 个原子形成。芳香族可任选被取代。术语“芳香族”包括芳基（例如苯基、萘基）和杂芳基（例如吡啶基、喹啉基）二者。

[0329] 本文所用的术语“芳基”指其中形成环的每一个原子都为碳原子的芳香环。芳基环可由 5、6、7、8、9 或多于 9 个碳原子形成。芳基可任选地被取代。芳基的实例包括但不限于苯基和萘基。视结构而定，芳基可以是单价的或二价的（即亚芳基）。

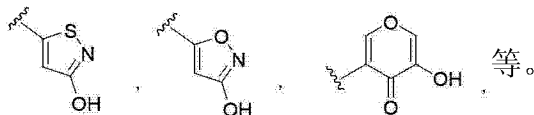
[0330] “羧基”指 $-CO_2H$ 。在一些实施方案中，羧基部分可被“羧酸生物电子等排体”替换，后者是指表现出与羧酸部分相似的物理和/或化学性质的官能团或部分。羧酸生物电子等排体具有与羧酸基团相似的生物学性质。含羧酸部分的化合物可具有用羧酸生物电子等排

体交换的羧酸部分,并且当与含有羧酸的化合物比较时其具有相似的物理和 / 或生物学性质。例如,在一个实施方案中,羧酸生物电子等排体将在与羧酸基团大约相同的生理 pH 时电离。羧酸的生物电子等排体的实例包括但不限于:

[0331]

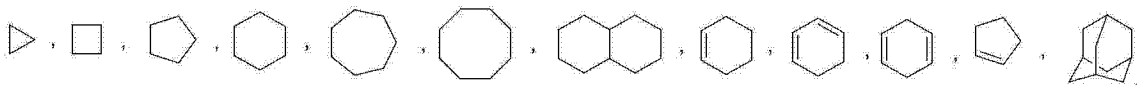


[0332]

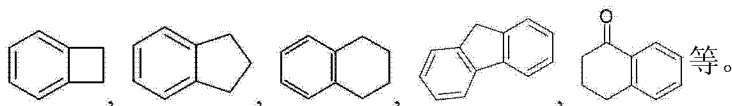


[0333] 术语“环烷基”指单环或多环非芳香族基团,其中形成环的每一个原子(即骨架原子)均为碳原子。环烷基可以是饱和的或部分不饱和的。环烷基可与芳环稠合(在该情况下,环烷基通过非芳香环碳原子键合)。环烷基包括具有 3-10 个环原子的基团。环烷基的说明性实例包括但不限于以下部分:

[0334]

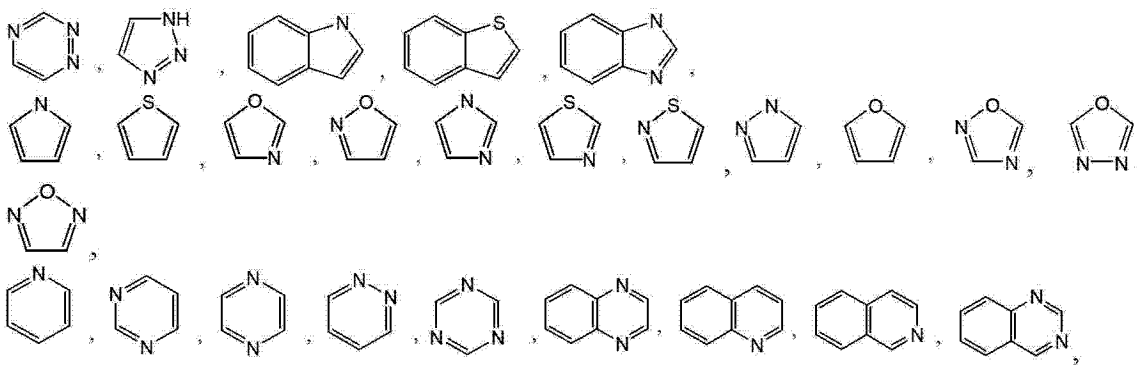


[0335]

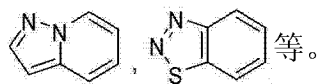


[0336] 术语“杂芳基”或“杂芳香族基团”指包括一个或多个选自氮、氧和硫的环杂原子的芳基。含 N 的“杂芳香族”或“杂芳基”部分指其中环的至少一个骨架原子为氮原子的芳族基团。多环状杂芳基可以是稠合的或非稠合的。杂芳基的说明性实例包括以下部分：

[0337]

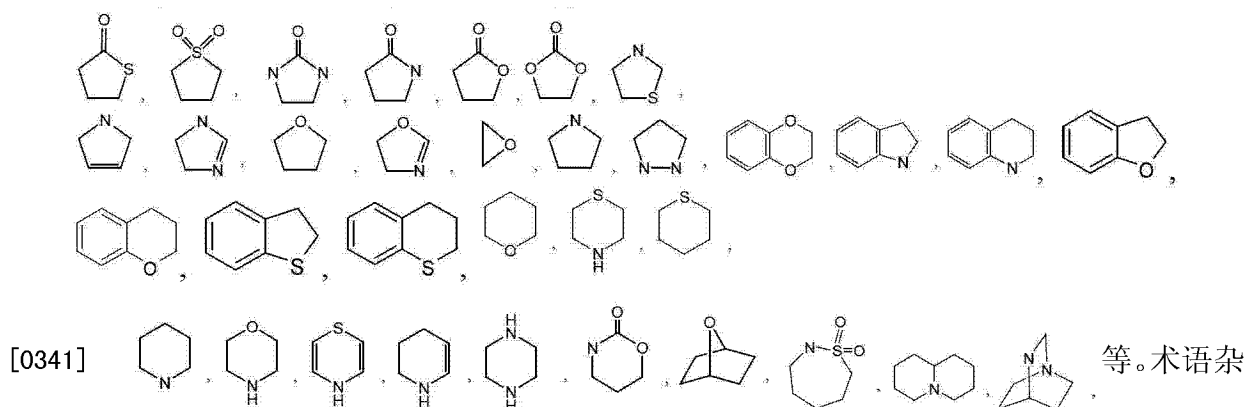


[0338]



[0339] “杂环烷基”或“杂脂环族基团”指其中至少一个骨架环原子为选自氮、氧和硫的杂原子的环烷基。所述基团可与芳基或杂芳基稠合。杂环烷基（也被称为非芳香族杂环）的说明性实例包括：

[0340]



脂环族基团也包括碳水化合物的所有环形式,其包括但不限于单糖、二糖和寡糖。除非另外指出,否则杂环烷基在环中具有 2-10 个碳。应该理解,当提及杂环烷基中的碳原子数时,杂环烷基中的碳原子数与构成杂环烷基(即杂环烷基环的骨架原子)的原子(包括杂原子)总数不同。

[0342] 术语“卤代”或者“卤素”意指氟、氯、溴和碘。

[0343] 术语“卤代烷基”指被一个或多个卤素取代的烷基。所述卤素可以相同或者它们可以不同。卤代烷基的非限制性实例包括 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}(\text{CH}_3)_3$ 等。

[0344] 术语“氟烷基”和“氟烷氧基”分别包括被一个或多个氟原子取代的烷基和烷氧基。氟烷基的非限制性实例包括 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}(\text{CH}_3)_3$ 等。氟烷氧基的非限制性实例包括 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}(\text{CH}_3)_2$ 等。

[0345] 术语“杂烷基”指其中一个或多个骨架链原子选自不是碳的原子(例如氧、氮、硫、磷、硅或其组合)的烷基。一个或多个杂原子可位于杂烷基的任何内部位置。实例包括但不限于 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_5-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 。另外,至多可有两个杂原子是连续的,作为举例,例如 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。除了杂原子数目外,“杂烷基”可具有 1-6 个碳原子。

[0346] 术语“键”或“单键”指两个原子之间的化学键,或当认为由键连接的原子为较大子结构的部分时指两个部分之间的化学键。

[0347] 术语“部分”指分子的特定区段或官能团。通常认为化学部分是嵌入分子内或附加在分子上的化学实体。

[0348] 如本文所用的取代基“R”在本身出现且没有指定数字时,是指选自烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)和杂环烷基的取代基。

[0349] 术语“任选地取代的”或“经取代”意指所提及的基团可经一个或多个另外的基团取代,该另外的基团单独和独立地选自:烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环烷基、 $-\text{OH}$ 、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、烷基亚砷、芳基亚砷、烷基砷、芳基砷、 $-\text{CN}$ 、炔烃、 C_1-C_6 烷基炔烃、卤素、酰基、酰氧基、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2^-$ 烷基、硝基、卤代烷基、氟烷基和氨基,包括单取代的氨基和二取代的氨基(例如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{N}(\text{R})_2$),及其被保护的衍生物。举例而言,任选的取代

基可为 L^sR^s , 其中每一个 L^s 独立地选自: 键、 $-O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、 $-S(=O)_2NH-$ 、 $-NHS(=O)_2-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ 烷基})-$ 或 $-(C_2-C_6 \text{ 烯基})-$; 而每一个 R^s 独立地选自: H 、 $(C_1-C_6 \text{ 烷基})$ 、 $(C_3-C_8 \text{ 环烷基})$ 、芳基、杂芳基、杂环烷基和 C_1-C_6 杂烷基。在以上所述的例如 Greene 和 Wuts 的来源中可发现可形成以上取代基的保护性衍生物的保护基。

[0350] 本文所述的方法和制剂包括使用具有式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 结构的化合物的晶形 (也被称为多晶型物) 或药学上可接受的盐以及具有相同活性类型的这些化合物的活性代谢物。在某些情形下, 化合物可作为互变异构体存在。所有的互变异构体都包括在本文提供的化合物的范围内。另外, 本文所述的化合物可以以非溶剂合物以及和药学上可接受的溶剂 (例如水、乙醇等) 的溶剂合物的形式存在。也认为本文提供的化合物的溶剂合物形式已在本文中公开。

[0351] 术语“药盒”和“制品”作为同义词使用。

[0352] 术语“个体”或“患者”包括哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物的实例包括但不限于任何哺乳动物纲成员: 人、非人灵长类动物 (例如黑猩猩和其他猿和猴类); 农场动物, 例如牛、马、绵羊、山羊、猪; 家养动物, 例如兔、狗和猫; 实验室动物, 包括啮齿动物, 例如大鼠、小鼠和豚鼠等。非哺乳动物的实例包括但不限于鸟、鱼等。在一个本文提供的方法和组合物的实施方案中, 哺乳动物为人。

[0353] 如本文所用的术语“治疗”包括减轻、减退或改善疾病或病症的症状, 预防另外的症状, 改善或预防症状的内在病因, 抑制疾病或病症, 例如阻止疾病或病症的发展, 减轻疾病或病症, 引起疾病或病症好转, 减轻由疾病或病症引起的病状, 或预防性和 / 或治疗性地终止疾病或病症的症状。

[0354] 如本文所用的术语“靶蛋白”指能够被本文所述的化合物例如式 (I)、(II) 或 (III) 化合物结合或与之相互作用的蛋白质或蛋白质部分。在某些实施方案中, 靶蛋白为 STIM 蛋白。在某些实施方案中, 靶蛋白为 Orai 蛋白。

[0355] 如本文所用的“STIM 蛋白”包括但不限于诸如人和啮齿动物 (例如小鼠) STIM-1 等哺乳动物 STIM-1、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) D-STIM、秀丽线虫 (*C. elegans*) C-STIM、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) STIM 和诸如人和啮齿动物 (例如小鼠) STIM-2 等哺乳动物 STIM-2。(参见 US2007/0031814 的第 [0211] 到 [0270] 段以及 US2007/0031814 的表 3, 通过引用并入本文)。如本文所述, 此类蛋白质已被鉴定为涉及、参与和 / 或提供以下作用: 钙池操纵的钙内流或其调节, 细胞质钙缓冲作用和 / 或对细胞内钙池 (例如内质网) 中的钙水平的调节, 或对钙移入或移出细胞内钙池 (例如内质网) 或在其内的移动的调节。

[0356] 如本文所用的“Orai 蛋白”包括 Orai1(WO 07/081804 中所述的 SEQ ID NO:1)、Orai2(WO 07/081804 中所述的 SEQ ID NO:2) 或 Orai3(WO 07/081804 中所述的 SEQ ID NO:3)。Orai1 核酸序列对应于 GenBank 登录号 NM_032790, Orai2 核酸序列对应于 GenBank 登录号 BC069270, Orai3 核酸序列对应于 GenBank 登录号 NM_152288。如本文所用的 Orai 指任何一个 Orai 基因, 例如 Orai1、Orai2、Orai3 (参见 WO 07/081804 的表 I)。如本文所述, 这类蛋白质已被鉴定为涉及、参与和 / 或提供以下作用: 钙池操纵的钙内流或其调节, 细胞质钙缓冲作用和 / 或对细胞内钙池 (例如内质网) 钙水平的调节, 或对钙移入或移出

细胞内钙池（例如内质网）或在其内移动的调节。

[0357] 术语“片段”或“衍生物”当指蛋白质（例如 STIM、Orai）时，意指在至少一种测定中保留与天然蛋白质基本相同的生物学功能或活性的蛋白质或多肽。例如，所提及的蛋白质的片段或衍生物保留至少约 50% 的天然蛋白质的活性、至少 75%、至少约 95% 的天然蛋白质的活性，如例如通过钙流入测定所确定的。

[0358] 如本文所用的，通过施用特定化合物或药物组合物改善特定疾病、病症或病状的症状，是指因施用所述化合物或组合物而产生的或与其有关的任何严重程度减轻、发作延迟、进展减慢或持续时间缩短，而不管是永久性的还是临时性的，是持续性的还是暂时性的。

[0359] 如本文所用的术语“调节”意指直接或间接地与靶蛋白相互作用以便改变靶蛋白的活性，仅作为举例，包括抑制靶标的活性或限制或降低靶标的活性。

[0360] 如本文所用的术语“调节剂”指改变靶标活性的化合物。例如，与在没有调节剂时的活性大小相比，调节剂可引起靶标某些活性的大小的增加或降低。在某些实施方案中，调节剂为抑制剂，其降低靶标的一种或多种活性的大小。在某些实施方案中，抑制剂完全阻止靶标的一种或多种活性。

[0361] 如本文所用的关于细胞内钙的“调节”指细胞内钙的任何改变或调整，包括但不限于改变细胞质和 / 或细胞内钙储存细胞器（例如内质网）的钙浓度，以及改变钙流进、流出细胞及在细胞内流动的动力学。在这方面，调节指降低。

[0362] 如本文所用的术语“靶活性”指能够由调节剂调节的生物学活性。某些示例性靶活性包括但不限于结合亲和力、信号转导、酶活性、肿瘤生长、炎症或炎症相关过程和与疾病或病状相关的一种或多种症状的改善。

[0363] 如本文所用的术语 SOC 通道活性或 CRAC 通道活性的“抑制”或“抑制剂”指钙池操纵的钙通道活性或钙释放激活的钙通道活性的抑制。

[0364] 如本文所用的关于制剂、组合物或组分的术语“可接受的”，意指对所治疗的个体的一般健康没有持久的有害作用。

[0365] 如本文所用的“药学上可接受的”指不破坏化合物的生物学活性或性质且相对无毒的物质，例如载体或稀释剂，即可对个体施用所述物质而不引起不想要的生物学作用，或不以有害方式与含有其的组合物中的任何组分相互作用。

[0366] 如本文所用的术语“药物组合”意指因混合或联合一种以上活性成分而产生的产物，包括活性成分的固定组合和非固定组合。术语“固定组合”意指一种活性成分（例如式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物）和共同药剂以单一实体或剂量形式同时施用于患者。术语“非固定组合”意指将一种活性成分（例如式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物）和共同药剂作为分开实体同时、并行或没有特别的间隔时间限制地序贯施用于患者，其中所述施用在患者体内提供两种化合物的有效水平。后者也应用于鸡尾酒疗法，例如施用三种或更多种活性成分。

[0367] 术语“药物组合物”指本文所述式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物与其他化学组分例如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和 / 或赋形剂的混合物。药物组合物方便将化合物施用于生物体。本领域存在施用化合物的多种技术，包括但不限于：静脉内、经口、气雾剂、肠胃外、经眼、经肺及局部给药。

[0368] 如本文所用的术语“有效量”或“治疗有效量”指所施用的药物或化合物足以在某种程度上减轻所治疗的疾病或病症的一种或多种症状的量。结果可为指征、症状或病因的降低和 / 或减轻,或任何其他期望的生物系统的改变。例如,用于治疗应用的“有效量”是提供疾病症状的临床显著减轻所需的包含本文所述式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物的组合物的量。在任何个体病例中合适的“有效”量可用诸如剂量增加研究等技术来确定。

[0369] 如本文所用的术语“增强”意指增加或延长所需效果的效力或持续时间。因此,关于增强治疗剂的效力,术语“增强”指增加或延长其他治疗剂对系统的效果的效力或持续时间的能力。如本文所用的“增强有效量”指足以提高另一治疗剂在所需系统中的效果的量。

[0370] 如本文所用的术语“共施用”等意指包括对单个患者施用所选择的治疗剂,并且旨在包括通过相同或不同给药途径或在相同或不同时间施用药物的治疗方案。

[0371] 如本文所用的术语“载体”指促进化合物引入细胞或组织的相对无毒的化学化合物或药剂。

[0372] 术语“稀释剂”指用于在递送前稀释目的化合物的化学化合物。稀释剂也可用于稳定化合物,因为它们可提供更稳定的环境。溶解于经缓冲的溶液(其还可提供 pH 控制或维持)中的盐用作本领域的稀释剂,其包括但不限于磷酸盐缓冲的盐水溶液。

[0373] 本文所公开的化合物的“代谢物”为当所述化合物代谢时形成的该化合物的衍生物。术语“活性代谢物”指当所述化合物代谢时形成的化合物的生物学活性衍生物。如本文所用的术语“代谢”是指生物体改变特定物质的过程总和(包括但不限于水解反应和酶催化的反应)。因此,酶可导致化合物的特定结构改变。例如,细胞色素 P450 催化多种氧化性和还原性反应,同时尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶催化活化的葡萄糖醛酸分子转移到芳香醇、脂肪醇、羧酸、胺和游离巯基。可从 The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 9 版, McGraw-Hill (1996) 获得关于代谢的进一步信息。可通过对宿主施用化合物并分析来自该宿主的组织样品,或通过将化合物与肝细胞在体外孵育并分析所得到的化合物,来鉴定本文所公开的化合物的代谢物。

[0374] “生物利用度”指本文所公开的化合物(例如式 (I)、(II) 或 (III) 化合物)被递送到所研究的动物或人的总循环中的重量百分比。当静脉内施用时,药物的总暴露($AUC(0-\infty)$)通常被定义为 100% 可生物利用的 (F%)。“口服生物利用度”指当经口施用药物组合物时,与静脉内注射相比,本文所公开的化合物被吸收到总循环中的程度。

[0375] “血液血浆浓度”指本文所公开的式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物在个体血液血浆组分中的浓度。应该理解,由于代谢的可变性和 / 或可能与其他治疗剂相互作用,本文所述化合物的血浆浓度在不同个体之间可能显著变化。根据本文所公开的一个实施方案,本文所公开的化合物的血液血浆浓度在不同个体之间可能变化。同样地,诸如最大血浆浓度 (C_{max}) 或达到最大血浆浓度的时间 (T_{max}) 或血浆浓度时间曲线下总面积 ($AUC(0-\infty)$) 等数值在不同个体间可能变化。由于这种可变性,构成化合物的“治疗有效量”所需的量在不同个体之间可能变化。

[0376] 如本文所用的“钙稳态”指在细胞内维持细胞内钙水平和移动的总体平衡,包括钙信号传导。

[0377] 如本文所用的“细胞内钙”指位于细胞中而没有指明特定细胞定位的钙。与此相反,关于“细胞溶质”或“细胞质”的钙指位于细胞的细胞质中的钙。

[0378] 如本文所用的,对细胞内钙的影响为细胞内钙的任何方面的任何改变,包括但不限于以下方面的改变:细胞内钙水平和定位;和钙移进、移出细胞或细胞内钙池或细胞器或在其中的移动。例如,对细胞内钙的影响可为以下性质的改变:例如钙流入或在细胞或其部分中发生的移动的动力学、敏感性、速率、幅度和电生理学特性。对细胞内钙的影响可为改变任何细胞内钙调节过程,包括钙池操纵的钙内流、胞质钙缓冲作用和钙在细胞内钙池中的水平或钙移进、移出细胞内钙池或在其中的移动。可以以多种方法评估任何这些方面,包括但不限于评估:钙或其他离子(特别是阳离子)水平、钙或其他离子(特别是阳离子)的移动、钙或其他离子(特别是阳离子)水平的波动、钙或其他离子(特别是阳离子)流入的动力学和/或钙或其他离子(特别是阳离子)通过膜的转运。改变可以是统计学显著的任何这样的变化。因此,例如,如果认为测试细胞和对照细胞中的细胞内钙不同,那么这种差异可能是统计显著性差异。

[0379] 如本文所用的“涉及”在关于蛋白质与细胞内钙或细胞内钙调节方面之间的关系时,意指当蛋白质在细胞中的表达或活性被降低、改变或消除时,存在伴随的或相关的细胞内钙或细胞内钙调节的一个或多个方面的降低、改变或消除。表达或活性的这种改变或降低可由于改变编码所述蛋白质的基因的表达或通过改变所述蛋白质水平而发生。因此涉及细胞内钙方面(例如钙池操纵的钙内流)的蛋白质可以是提供或参与细胞内钙或细胞内钙调节方面的蛋白质。例如,提供钙池操纵的钙内流的蛋白质可以是 STIM 蛋白和/或 Orai 蛋白。

[0380] 如本文所用的作为钙通道组分的蛋白质是参与形成该通道的多蛋白质复合物的蛋白质。

[0381] 如本文所用的关于细胞溶质钙水平的“基础或“静息”指钙在细胞的细胞质中的浓度,所述细胞例如为未受刺激的细胞,其未遭受导致钙移入、移出细胞或在细胞内移动的条件。基础或静息细胞溶质钙水平可以是细胞的细胞质中游离钙(即未与细胞内钙结合物质结合的钙)的浓度,所述细胞例如是未受刺激的细胞,其未遭受导致钙移入或移出细胞的条件。

[0382] 如本文所用的关于离子(包括阳离子例如钙)的“移动”指离子向细胞内、向细胞外或在细胞内的移动或变换位置,例如流入。因此,离子的移动可为,例如:离子从细胞外基质向细胞内移动,从细胞内向细胞外基质移动,从细胞内细胞器或储存位点向细胞溶质移动,从细胞溶质向细胞内细胞器或储存位点移动,从一个细胞内细胞器或储存位点向另一个细胞内细胞器或储存位点移动,从细胞外基质向细胞内细胞器或储存位点移动,从细胞内细胞器或储存位点向细胞外基质移动,和在细胞的细胞质内从一个位点向另一个位点移动。

[0383] 如本文所用的向细胞内的“阳离子内流”或“钙内流”指阳离子例如钙进入细胞内位点例如细胞的细胞质,或进入细胞内细胞器腔或储存位点。因此,阳离子内流可为,例如:阳离子从细胞外基质或从细胞内细胞器或储存位点向细胞的细胞质移动,或阳离子从细胞质或细胞外基质向细胞内细胞器或储存位点移动。钙从细胞内细胞器或储存位点向细胞质内的移动也被称为从细胞器或储存位点的“钙释放”。

[0384] 如本文所用的“调节细胞内钙的蛋白质”指参与调节、控制和/或改变细胞内钙的任何细胞蛋白质。例如,这样的蛋白质可以以多种方式参与改变或调节细胞内钙,包括但不

限于：通过维持静息或基础细胞质钙水平，或通过参与细胞对信号的响应，所述信号通过包括细胞内钙相对于静息或基础状态的偏差的机制在细胞中传送。在“调节细胞内钙的蛋白质”的上下文中，“细胞的”蛋白质是与细胞有关的蛋白质，例如细胞质蛋白质、质膜相关蛋白质或细胞内膜蛋白质。调节细胞内钙的蛋白质包括但不限于离子转运蛋白质、钙结合蛋白质和调节离子转运蛋白质的调节性蛋白质。

[0385] 如本文所用的“改善”指疾病或病状的好转或与疾病或病状有关的症状的至少部分缓解。

[0386] 如本文所用的“细胞应答”指因离子移入或移出细胞或在细胞内移动而产生的任何细胞应答。细胞应答可与依赖（至少部分）离子例如钙的任何细胞活性有关。此类活性可包括例如细胞激活、基因表达、胞吞作用、胞吐作用、细胞运输和凋亡性细胞死亡。

[0387] 如本文所用的“免疫细胞”包括免疫系统的细胞和在免疫应答中行使功能或有活性的细胞，例如但不限于：T-细胞、B-细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性细胞、肥大细胞、浆细胞、白细胞、抗原递呈细胞和自然杀伤细胞。

[0388] 如本文所用的“细胞因子”指由细胞分泌的小的可溶性蛋白质，其可改变分泌细胞或另一细胞的行为或性质。细胞因子与细胞因子受体结合并引发细胞内的行为或性能，例如细胞增殖、死亡或分化。示例性细胞因子包括但不限于：白介素（例如 IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-1RA）、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、制癌蛋白 M、促红细胞生成素、白血病抑制因子（LIF）、干扰素、B7.1（也被称为 CD80）、B7.2（也被称为 B70、CD86）、TNF 家族成员（TNF- α 、TNF- β 、LT- β 、CD40 配体、Fas 配体、CD27 配体、CD30 配体、4-1BBL、Trail）和 MIF。

[0389] “钙池操纵的钙内流”或“SOCE”指这样一种机制，通过该机制，钙离子从细胞内钙池的释放与离子穿过质膜的流入相配合。

[0390] “SOC 通道活性的选择性抑制剂”意指对 SOC 通道具有选择性而基本上不影响其他类型的离子通道活性的抑制剂。

[0391] “CRAC 通道活性的选择性抑制剂”意指对 CRAC 通道具有选择性而基本上不影响其他类型的离子通道和 / 或其他 SOC 通道的活性的抑制剂。

[0392] 监测或评估对细胞内钙的影响

[0393] 在用本文所述或本领域公认的任何筛选 / 鉴定方法监测或评估式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物对细胞内钙的影响时，对细胞内（包括细胞溶质和细胞内细胞器或区室）钙和 / 或离子向细胞、细胞器、钙池或其部分（例如膜）内、在其中或离开它们的移动进行直接或间接评估或测量。用于评价钙水平和离子移动或流入的多种方法在本文中描述和 / 或是本领域公认的。所用的具体方法和采用的条件可取决于是否监测或评估细胞内钙的特定方面。例如，如本文所述在一些实施方案中，试剂和条件是用于特异性评价钙池操纵的钙内流、静息细胞溶质钙水平、钙缓冲作用和钙水平以及被细胞内细胞器和钙池的吸收或从其中的释放。使用例如细胞、细胞内细胞器或钙池区室、膜（包括例如脱离的膜片或脂双层）或无细胞测定系统（例如在膜泡外）来监测或评估式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物对细胞内钙的影响。通常，在测试剂的存在下监测或评估细胞内钙的某些方面，并与对照例如在没有测试剂时的细胞内钙进行比较。

[0394] 调节细胞内钙的方法

[0395] 细胞内钙的调节可以是对细胞内钙的任何改变或调整,包括但不限于:改变细胞质和/或细胞内钙储存细胞器(例如内质网)中的钙浓度或水平;改变钙向细胞或细胞内钙池或细胞器内移动、从其中移出和在其内移动;改变钙在细胞内的定位;和改变钙流入细胞、流出细胞和在细胞内流动的动力学或其他性质。在特定实施方案中,细胞内钙调节可以涉及以下方面的改变或调整(例如降低或抑制):钙池操纵的钙内流,细胞溶质钙缓冲作用,细胞内钙池或细胞器中的钙水平或钙移入、移出细胞内钙池或细胞器或在其中的移动,和/或基础或静息细胞溶质钙水平。在一些实施方案中,细胞内钙的调节可以涉及以下方面的改变或调整:受体介导的离子(例如钙)移动,第二信使操纵的离子(例如钙)移动,钙流入或流出细胞,和/或离子(例如钙)向细胞内区室(包括例如核内体和溶酶体)内的吸收或从其中释放。

[0396] 一方面,本文所描述的化合物在免疫系统细胞(例如淋巴细胞、白细胞、T细胞、B细胞)、成纤维细胞(或源自成纤维细胞的细胞)或表皮细胞、真皮细胞或皮肤细胞(例如角化细胞)中调节细胞内钙,例如但不限于调节(例如降低或抑制)SOC通道活性,例如抑制CRAC通道活性(例如抑制 I_{CRAC} 、抑制SOCE)。调节参与调节细胞内钙的一种或多种蛋白质(例如STIM蛋白和/或Orai蛋白)的步骤可涉及例如降低蛋白质的水平、表达、活性、功能和/或分子相互作用。例如,如果细胞显示出钙水平增加或缺乏对细胞内钙调节方面(例如钙池操纵的钙内流)的调节,那么调节可涉及降低蛋白质(例如STIM蛋白和/或Orai蛋白)的水平、表达、活性或功能或分子相互作用。

[0397] 药物组合物和给药方法的实例

[0398] 可用一种或多种生理学上可接受的载体以常规方式配制药物组合物,所述载体包括赋形剂和促进将活性化合物加工为可药用的制剂的助剂。合适的制剂取决于所选择的给药途径。可在例如以下文献中找到本文所述药物组合物的合适的赋形剂的其他详细信息:Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995);Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania 1975;Lieberman,H.A.和Lachman,L.编,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;和Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版(Lippincott Williams & Wilkins 1999),所述公开内容通过引用并入本文。

[0399] 如本文所用的药物组合物指本文所述的式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物与诸如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂等其他化学组分的混合物。药物组合物便于将所述化合物施用于生物体。在实施本文提供的治疗或应用方法时,以药物组合物将治疗有效量的本文所述化合物施用于患有待治疗的疾病、病症或病状的哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。治疗有效量可根据疾病严重程度、个体的年龄和相对健康、所用化合物的功效和其他因素而广泛变化。式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物可单独使用,或与一种或多种作为混合物组分的治疗剂联合使用(如在联合治疗中)。

[0400] 可通过多种给药途径将本文所述药物制剂施用于个体,包括但不限于:经口、肠胃外(例如静脉内、皮下、肌肉内)、经鼻、含服、局部、直肠或透皮给药途径。此外,可将本文所述的包含本文所述式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物的药物组合物配制为任何合适的剂

型,包括但不限于:水性口服分散液、液剂、凝胶剂、糖浆剂、酏剂、浆液剂、混悬剂、气雾剂、控释制剂、速熔制剂、泡腾剂、冻干制剂、片剂、散剂、丸剂、糖衣丸、胶囊剂、延时释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂、多颗粒制剂和混合即释和控释制剂。

[0401] 可以以局部而不是全身方式施用化合物和/或组合物,例如经由将化合物直接注射到器官或组织,其通常在储存制剂或持续释放制剂中。此类长效制剂可通过植入(例如皮下或肌肉内)或通过肌肉内注射而施用。此外,可以在靶向给药系统中施用药物,例如在用器官特异性抗体包衣的脂质体中。脂质体将被靶向至器官并被器官选择性吸收。另外,可以以快速释放制剂形式、以延长释放制剂形式或以中等程度释放制剂形式提供药物。

[0402] 可用常规方式制备包含本文所述化合物的药物组合物,例如,仅举例来说,借助常规混合、溶解、制粒、包糖衣、磨细、乳化、包封、包埋或压片工艺。

[0403] 药物组合物将包含至少一种以游离酸或游离碱形式或以药学上可接受的盐形式存在的本文所述式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物作为活性成分。另外,本文所述的方法和药物组合物包括使用晶形(也被称为多晶型物)、以及具有同样活性类型的这些化合物的活性代谢物。在某些情形下,化合物可以作为互变异构体存在。所有互变异构体都包括在本文提供的化合物的范围内。另外,本文所述的化合物可以以非溶剂合物以及和药学上可接受的溶剂(例如水、乙醇等)的溶剂合物的形式存在。也认为本文提供的化合物的溶剂合物形式已在本文中公开。

[0404] 在某些实施方案中,本文提供的组合物还可包含一种或多种防腐剂以抑制微生物活性。合适的防腐剂包括季铵化合物,例如苯扎氯铵、西曲溴铵和西吡氯铵。

[0405] 用于口服使用的药物制剂可如下获得:将一种或多种固态赋形剂与一种或多种本文所述化合物(例如式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物)混合,任选地碾磨得到的混合物,并在需要时加入合适的助剂后处理颗粒混合物,以获得片剂、丸剂或胶囊剂。合适的赋形剂包括,例如:填充剂,例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧基甲基纤维素钠;或其他赋形剂,例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP或聚维酮)或磷酸钙。若需要可加入崩解剂,例如交联的交联羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐例如藻酸钠。

[0406] 为糖衣丸核提供合适的包衣。为此目的,可使用浓缩糖溶液,其可任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可将染料或颜料加入到片剂或糖衣丸包衣中用于区分或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0407] 可口服使用的药物制剂包括由明胶制备的推入配合式(push-fit)胶囊,以及由明胶和增塑剂(例如甘油或山梨醇)制备的密封软胶囊。推入配合式胶囊剂可含有与以下物质混合的活性成分:填充剂,例如乳糖;粘合剂,例如淀粉;和/或润滑剂,例如滑石或硬脂酸镁;和任选的稳定剂。在软胶囊剂中,活性化合物可溶解于或悬浮于合适的液体例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。另外,可加入稳定剂。

[0408] 在一些实施方案中,本文所公开的固体剂型可呈以下形式:片剂(包括混悬片)、速熔片剂、咀嚼崩解片、速崩片、泡腾片或囊片)、丸剂、散剂(包括无菌包装的散剂、可分配散剂(dispensable powder)或泡腾散剂)、胶囊剂(包括软胶囊或硬胶囊,例如由源自动

物的明胶或源自植物的 HPMC 制备的胶囊,或“撒布胶囊 (sprinkle capsule)”、固态分散剂、固态溶液剂、可生物蚀解的剂型、控释制剂、脉冲释放剂型、多颗粒剂型、丹剂、颗粒剂或气雾剂。在其他实施方案中,药物制剂呈散剂形式。在又一个实施方案中,药物制剂呈片剂形式,包括但不限于速溶片剂。另外,本文所述化合物的药物制剂可作为单个胶囊或在多胶囊剂型中施用。在某些实施方案中,药物制剂以 2 个或 3 个或 4 个胶囊或药片施用。

[0409] 在某些实施方案中,通过将本文所述式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物颗粒与一种或多种药物赋形剂混合以形成散装掺合物来制备固体剂型(例如片剂、泡腾片和胶囊剂)。当称这些散装掺合物为均匀时,意指本文所述式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物颗粒均匀地分散在整个组合物中,因而所述组合物可再分为相等的有效单位剂型,例如片剂、丸剂和胶囊剂。个体单位剂量也可包括薄膜衣,其在口服后或与稀释剂接触后崩解。这些制剂可通过常规制药技术制备。

[0410] 本文所述的药物固体剂型可包含本文所述式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物和一种或多种药学上可接受的添加剂,例如可配伍载体、粘合剂、填充剂、悬浮剂、矫味剂、甜味剂、崩解剂、分散剂、表面活性剂、润滑剂、着色剂、稀释剂、增溶剂、湿润剂、增塑剂、稳定剂、渗透促进剂、湿润剂、消泡剂、抗氧化剂、防腐剂或其一种或多种组合。在其他方面,用标准包衣程序,例如 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 20 版(2000)中所述的程序,在本文所述化合物的制剂周围提供薄膜包衣。在一个实施方案中,本文所述化合物的有些或所有颗粒都被包衣。在另一个实施方案中,本文所述化合物的有些或所有颗粒都被微胶囊化。在再一实施方案中,本文所述化合物的颗粒不微胶囊化且不包衣。

[0411] 用于本文所述固体剂型的合适的载体包括但不限于:阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糊精、甘油、硅酸镁、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、氯化钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉、羟丙基甲基纤维素、乙酸硬脂酸羟丙基甲基纤维素、蔗糖、微晶纤维素、乳糖、甘露醇等。

[0412] 用于本文所述固体剂型的合适的填充剂包括但不限于:乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预胶化淀粉、羟丙基甲基纤维素 (HPMC)、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、乙酸硬脂酸羟丙基甲基纤维素 (HPMCAS)、蔗糖、木糖醇、乳糖醇、甘露醇、山梨醇、氯化钠、聚乙二醇等。

[0413] 为了从固体剂型基质尽可能有效地释放式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物,通常在制剂中使用崩解剂,尤其是当用粘合剂压制剂型时。当所述剂型吸收潮气时崩解剂通过膨胀或毛细管作用有助于剂型基质破裂。用于本文所述固体剂型的合适的崩解剂包括但不限于:天然淀粉,例如玉米淀粉或马铃薯淀粉;预胶化淀粉,例如 National 1551 或 Amijel[®] 或羟乙酸淀粉钠,例如 Promogel[®] 或 Explotab[®];纤维素,例如木材产品;

甲基晶体纤维素,例如 Avicel[®]、Avicel[®] PH101、Avicel[®] PH102、Avicel[®] PH105、Elcema[®] P100、Emcocel[®]、Vivacel[®]、Ming Tia[®] 和 Solka-Floc[®];甲基纤维素;交联羧甲基纤维素或交联纤维素,例如交联羧基甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol[®])、交联羧基甲基纤维素或交联的交联羧甲基纤维素;交联淀粉,例如羟乙酸淀粉钠;交联聚合物,例如交聚维酮、交联聚乙烯吡咯烷酮;藻酸盐,例如藻酸或藻酸的盐例如藻酸钠;粘土,例如

Veegum[®] HV (硅酸镁铝); 树胶, 例如琼脂、瓜尔胶、刺槐豆胶、刺梧桐树胶、果胶或黄蓍胶; 羟乙酸淀粉钠、膨润土、天然海绵、表面活性剂; 树脂, 例如阳离子-交换树脂; 柑桔渣、十二烷基硫酸钠、与淀粉组合的十二烷基硫酸钠等等。

[0414] 粘合剂赋予固体口服剂型制剂粘性: 对于填充了粉末的胶囊制剂, 它们帮助形成可填入软壳和硬壳胶囊的塞段; 对于片剂制剂, 它们确保药片在压制后保持完整, 并帮助确保在压制或填入步骤前混合物均匀。适合在本文所述固体剂型中作为粘合剂的物质包括但不限于: 羧甲基纤维素、甲基纤维素 (例如 **Methocel[®]**)、羟丙基甲基纤维素 (例如羟丙基纤维素 USP Pharmacat-603、乙酸酯硬脂酸羟丙基甲基纤维素 (Aquate HS-LF 和 HS)、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素 (例如 **Klucel[®]**)、乙基纤维素 (例如 **Ethocel[®]**) 和微晶纤维素 (例如 **Avicel[®]**)、微晶右旋糖、直链淀粉、硅酸镁铝、多聚糖酸、膨润土、明胶、聚乙烯吡咯烷酮 / 乙酸乙烯酯共聚物、交聚维酮、聚维酮、淀粉、预胶化淀粉、黄蓍胶、糊精、糖例如蔗糖 (例如 **Dipac[®]**)、葡萄糖、右旋糖、糖蜜、甘露醇、山梨醇、木糖醇 (例如 **Xylitab[®]**)、乳糖、天然或合成树胶 (例如阿拉伯胶、黄蓍胶、印度胶、依莎贝果壳 (isapol husks))、淀粉、聚乙烯吡咯烷酮 (例如 **Povidone[®] CL**、**Kollidon[®] CL**、**Polyplasdone[®] XL-10** 和 **Povidone[®] K-12**)、落叶松阿拉伯半乳聚糖、**Veegum[®]**、聚乙二醇、蜡、藻酸钠等。

[0415] 一般而言, 将含量为 20-70% 的粘合剂用于填充粉末的明胶胶囊制剂中。片剂制剂中粘合剂的使用量根据是否直接压片、湿法制粒、碾压或使用其他赋形剂 (例如本身可作为适度粘合剂的填充剂) 而变化。在一些实施方案中, 配方师决定制剂的粘合剂水平, 但片剂制剂中粘合剂用量通常至多 70%。

[0416] 用于本文所述固体剂型的合适的润滑剂或助流剂包括但不限于: 硬脂酸、氢氧化钙、滑石、玉米淀粉、硬脂酰富马酸钠、碱金属和碱土金属盐 (例如铝、钙、镁、锌盐)、硬脂酸、硬脂酸钠、硬脂酸镁、硬脂酸锌、蜡、**Stearowet[®]**、硼酸、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、聚乙二醇或甲氧基聚乙二醇 (例如 Carbowax[™]、PEG4000、PEG5000、PEG 6000)、丙二醇、油酸钠、二十二烷酸甘油酯、硬脂酸棕榈酸甘油酯、苯甲酸甘油酯、十二烷基硫酸镁或十二烷基硫酸钠等。

[0417] 用于本文所述固体剂型的合适的稀释剂包括但不限于: 糖 (包括乳糖、蔗糖和右旋糖)、多糖 (包括葡萄糖结合剂和麦芽糊精)、多元醇 (包括甘露醇、木糖醇和山梨醇)、环糊精等。

[0418] 用于本文所述固体剂型的合适的湿润剂包括, 例如: 油酸、单硬脂酸甘油酯、单油酸脱水山梨糖醇酯、单月桂酸脱水山梨糖醇酯、油酸三乙醇胺、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯、季铵化合物 (例如 **Polyquat 10[®]**)、油酸钠、十二烷基硫酸钠、硬脂酸镁、多库酯钠、三醋精、维生素 ETPGS 等。

[0419] 用于本文所述固体剂型的合适的表面活性剂包括, 例如: 十二烷基硫酸钠、单油酸脱水山梨糖醇酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆 (polaxomer)、胆

盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物例如 **Pluronic[®]** (BASF) 等。

[0420] 用于本文所述固体剂型的合适的悬浮剂包括但不限于：聚乙烯吡咯烷酮（例如聚乙烯吡咯烷酮 K12、聚乙烯吡咯烷酮 K17、聚乙烯吡咯烷酮 K25 或聚乙烯吡咯烷酮 K30）、聚乙二醇（例如聚乙二醇可具有约 300–约 6000 或约 3350–约 4000 或约 5400–约 7000 的分子量）、乙烯基吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物 (S630)、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚山梨醇酯-80、羟乙基纤维素、藻酸钠、树胶（例如黄蓍胶和阿拉伯树胶、瓜尔胶）、黄原胶（包括黄原胶树胶）、糖、纤维索材料（例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素）、聚山梨醇酯-80、藻酸钠、聚乙氧基脱水山梨糖醇单月桂酸酯、聚乙氧基脱水山梨糖醇单月桂酸酯、聚维酮等。

[0421] 用于本文所述固体剂型的合适的抗氧化剂包括例如丁羟甲苯 (BHT)、抗坏血酸钠和生育酚。

[0422] 在本文所述固体剂型中使用的添加剂之间有相当多的重叠。因此，以上所列的添加剂应该理解为仅是示例性，而不是限制可包括在本文所述药物组合物固体剂型中的添加剂的类型。

[0423] 在其他实施方案中，药物制剂的一层或多层可被塑化。作为说明，增塑剂通常为高沸点固体或液体。可加入占包衣组合物的约 0.01%–约 50% 重量 (w/w) 的合适的增塑剂。增塑剂包括但不限于：邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸酯、聚乙二醇、甘油、乙酰化甘油酯、三醋精、聚丙二醇、聚乙二醇、柠檬酸三乙酯、癸二酸二丁酯、硬脂酸、油脂剂、硬脂酸酯和蓖麻油。

[0424] 压制片为通过压制上述散装掺合制剂而制备的固体剂型。在各种实施方案中，设计为在口中溶解的压制片将包含一种或多种矫味剂。在其他实施方案中，压制片将包括围绕最终压制片的薄膜。在某些实施方案中，薄膜包衣可提供从制剂延迟释放本文所述式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物。在其他实施方案中，薄膜衣有助于患者的顺应性（例如 **Opadry[®]** 包衣或糖包衣）。包含 **Opadry[®]** 的薄膜包衣通常占片剂重量的约 1%–约 3%。在其他实施方案中，压制片包括一种或多种赋形剂。

[0425] 例如，可通过将上述化合物制剂的散装掺合物放置到胶囊内来制备胶囊。在某些实施方案中，将制剂（非水性混悬液和溶液）置于软明胶胶囊中。在其他实施方案中，将制剂置于标准明胶胶囊剂或非明胶胶囊（例如包含 HPMC 的胶囊）中。在其他实施方案中，将制剂置于撒布胶囊中，其中可整个吞进胶囊，或可在食用前将胶囊打开并将其中的内容物撒布在食物上。在某些实施方案中，可将治疗剂量分到多个（例如两个、三个或四个）胶囊中。在某些实施方案中，制剂的全部剂量以胶囊形式递送。

[0426] 在各种实施方案中，可将本文所述式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物颗粒和一种或多种赋形剂干混并压为团块，例如药片，所述团块的硬度足以提供在口服后小于约 30 分钟、小于约 35 分钟、小于约 40 分钟、小于约 45 分钟、小于约 50 分钟、小于约 55 分钟或小于约 60 分钟内基本上崩解，从而将制剂释放到胃肠液中的药物组合物。

[0427] 在另一方面，剂型可包括微胶囊化的制剂。在某些实施方案中，微胶囊化材料中存在一种或多种其他相容性物质。示例性材料包括但不限于 pH 调节剂、蚀解促进剂 (erosion facilitator)、消泡剂、抗氧化剂、矫味剂和载体物质，例如粘合剂、悬浮剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、湿润剂和稀释剂。

[0428] 用于本文所述的微胶囊化的物质包括与本文所述化合物相容的物质,所述物质足以将所述化合物与其他非相容性赋形剂分开。与本文所述化合物相容的物质为在体内延迟释放式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物的物质。

[0429] 用于延迟释放包含本文所述化合物的制剂的示例性微胶囊化物质包括但不限于:羟基丙基纤维素醚(HPC),例如 **Klucel[®]** 或 Nisso HPC;低取代羟基丙基纤维素醚(L-HPC);羟丙基甲基纤维素醚(HPMC),例如 Seppifilm-LC、**Pharmacoat[®]**、Metolose SR、**Methocel[®]-E**、Opadry YS、PrimaFlo、Benecel MP824 和 Benecel MP843;甲基纤维素聚合物,例如 **Methocel[®]-A**;乙酸酯硬脂酸羟丙基甲基纤维素 Acoat (HF-LS、HF-LG、HF-MS) 和 **Metolose[®]**;乙基纤维素(EC)及其混合物,例如 E461、**Ethocel[®]**、**Aqualon[®]-EC**、**Surelease[®]**;聚乙烯醇(PVA),例如 Opadry AMB;羟乙基纤维素,例如 **Natrosol[®]**;羧甲基纤维素及羧基纤维素的盐(CMC),例如 **Aqualon[®]-CMC**;聚乙烯醇和聚乙二醇共聚物,例如 **Kollicoat IR[®]**;甘油单酯(Myverol)、甘油三酯(KLX);聚乙二醇;改性的食用淀粉;丙烯酸类聚合物及丙烯酸类聚合物与纤维素醚的混合物,例如 **Eudragit[®] EP0**、**Eudragit[®] L30D-55**、**Eudragit[®] FS 30D**、**Eudragit[®] L100-55**、**Eudragit[®] L100**、**Eudragit[®] S100**、**Eudragit[®] RD100**、**Eudragit[®] E100**、**Eudragit[®] L12.5**、**Eudragit[®] S12.5**、**Eudragit[®] NE30D** 和 **Eudragit[®] NE40D**;邻苯二甲酸酯乙酸纤维素;seppifilm,例如 HPMC 和硬脂酸的混合物;环糊精;及这些物质的混合物。

[0430] 在另外其他实施方案中,向微胶囊化材料中引入增塑剂,例如:聚乙二醇,例如 PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG3350 和 PEG800;硬脂酸;丙二醇;油酸和三醋精。在其他实施方案中,可用于延迟释放药物组合物的微胶囊化材料来自美国药典或美国国家处方集(NF)。在另外其他实施方案中,微胶囊化材料为 Klucel。在另外其他实施方案中,微胶囊化材料为甲基纤维素。

[0431] 本文所述的微胶囊化的化合物可通过以下方法来配制,所述方法包括:例如喷雾干燥处理、旋转盘(spinning disk)-溶剂处理、热融化处理、喷雾冷却方法、流化床、静电沉积、离心挤出、旋转悬浮分离、在液-气或固-气界面聚合、压力挤出或喷雾溶剂提取浴。除这些外,还可使用若干化学技术,例如:复凝聚、溶剂蒸发、聚合物-聚合物不相容、液体介质中的界面聚合、原位聚合、液中干燥和在液体介质中去溶剂化。此外,还可使用其他方法,例如碾压、挤出/滚圆、凝聚或纳米颗粒包衣。

[0432] 在另外其他实施方案中,还可根据本发明制备泡腾散剂。泡腾盐已用于将药物分散在水中以供口服。泡腾盐为在干混合物中含有药物的小颗粒或粗粉,其通常由碳酸氢钠、柠檬酸和/或酒石酸组成。当将这类盐加入到水中时,酸和碱反应释放二氧化碳气体,从而引起“泡腾”。泡腾盐的实例包括例如以下成分:碳酸氢钠,或碳酸氢钠和碳酸钠的混合物,柠檬酸和/或酒石酸。导致释放二氧化碳的任何酸-碱组合都可用于代替碳酸氢钠和柠檬酸和酒石酸的组合,只要所述成分适于药用并产生约 6.0 或更高的 pH 即可。

[0433] 在其他实施方案中,包含本文所述化合物的本文所述制剂为固态分散剂。产生所述固态分散剂的方法包括但不限于例如美国专利号 4,343,789、5,340,591、5,456,923、5,700,485、5,723,269 和美国专利公开号 2004/0013734。在另外其它实施方案中,本文所述的制剂为固溶体。固溶体将物质连同活性剂和其他赋形剂结合起来,以便加热该混合物导致药物溶解,然后将得到的组合物冷却以提供固体混合物,该固体混合物可进一步配制或直接加到胶囊中或压制成片。产生此类固溶体的方法包括但不限于例如美国专利号 4,151,273、5,281,420 和 6,083,518。

[0434] 可进一步配制包括包含本文所述化合物的本文所述制剂在内的药物固体口服剂型,以提供式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物的控制释放。控制释放是指按照所需释放曲线经长时间从包含本文所述化合物的剂型释放所述化合物。控制释放曲线包括例如:持续释放、延长释放、脉冲释放和延迟释放曲线。与即时释放组合物相反,控制释放组合物允许按照预定曲线经长时间将药物递送给个体。这样的释放速率可在长时间提供治疗有效的药剂水平,并由此提供更长时间的药理反应,同时与常规快速释放剂型相比使副作用最小化。这种较长的反应时间提供了用相应的短效即时释放制剂不能达到的很多固有益处。

[0435] 在某些实施方案中,可将本文所述的固体剂型配制为肠溶衣延迟释放口服剂型,即使用肠溶衣来影响在胃肠道小肠中的释放的本文所述药物组合物的口服剂型。肠溶衣剂型可为压制片或模制片或挤压片/模制片(包衣或未包衣),其含有本身被包衣或未包衣的活性成分和/或其他组合物组分的颗粒、粉末、丹丸、珠粒或颗粒。肠溶衣口服剂型也可以是胶囊(包衣或未包衣),其含有本身被包衣或未包衣的固体载体或组合物的团粒、珠粒或颗粒。

[0436] 如本文所用的术语“延迟释放”是指递送以使可在某些通常可预测的肠道部位完成释放,所述部位比如果没有延迟释放改变所完成的释放部位更远。在某些实施方案中,用于延迟释放的方法为包衣。任何包衣应该施加到足够的厚度,以使整个包衣不溶解在 pH 低于约 5 的胃肠道液体中,但在 pH 约 5 及以上时溶解。包衣可由以下物质制备:

[0437] 丙烯酸类聚合物。丙烯酸类聚合物的性能(主要是其在生物学流体中的溶解度)可基于取代程度和类型而变化。合适的丙烯酸类聚合物的实例包括甲基丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸铵共聚物。Eudragit 系列 E、L、S、RL、RS 和 NE (RohmPharma) 可溶解于有机溶剂、水性分散液或干粉中使用。Eudragit 系列 RL、NE 和 RS 在胃肠道中不溶但可渗透,并且主要用于靶向结肠。Eudragit 系列 E 溶解于胃中。Eudragit 系列 L、L-30D 和 S 不溶于胃中而溶于肠中;

[0438] 纤维素衍生物。合适的纤维素衍生物的实例为:乙基纤维素;纤维素与邻苯二甲酸酐的偏乙酸酯的反应混合物。其性能可基于取代程度和类型而变化。邻苯二甲酸乙酸纤维素(CAP)在 pH>6 时溶解。Aquateric(FMC)为水基体系,为颗粒<1 μm 的喷雾干燥的 CAP 假胶乳(pseudolatex)。Aquateric 中的其他组分可包括普郎尼克类(Pluronic)、吐温和乙酰单甘油酯。其他合适的纤维素衍生物包括:乙酸偏苯三酸纤维素(Eastman);甲基纤维素(Pharmacoat, Methocel);邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素(HPMCP);琥珀酸羟丙基甲基纤维素(HPMCS);和乙酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素(例如 AQOAT(Shin Etsu))。其性能可基于取代程度和类型而变化。例如,HPMCP(例如 HP-50、HP-55、HP-55S、HP-55F 等级)是合适的。其性能可基于取代程度和类型而变化。例如,合适的乙酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素的级别包

括但不限于:AS-LG(LF),其在pH5时溶解;AS-MG(MF),其在pH5.5时溶解;和AS-HG(HF),其在较高pH时溶解。这些聚合物作为颗粒或用于水性分散液的细粉提供;

[0439] 聚乙酸邻苯二甲酸乙烯酯(PVAP)。PVAP在pH>5时溶解,并且对水蒸汽和胃液有相当低的渗透性。

[0440] 在某些实施方案中,包衣可含有并且通常确实含有增塑剂和可能的其他包衣赋形剂,例如着色剂、滑石和/或硬脂酸镁。合适的增塑剂包括柠檬酸三乙酯(Citroflex 2)、三醋精(三乙酸甘油酯)、乙酰柠檬酸三乙酯(Citroflex A2)、Carbowax 400(聚乙二醇400)、邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰化单甘油酯、甘油、脂肪酸酯、丙二醇和邻苯二甲酸二丁酯。具体而言,阴离子羧酸丙烯酸类聚合物通常含有10-25重量%的增塑剂,尤其是邻苯二甲酸二丁酯、聚乙二醇、柠檬酸三乙酯和三醋精。可采用常规包衣技术例如喷雾或锅包衣(pan coating)来施加包衣。包衣厚度应该足以确保口服剂型保持完整,直到达到肠道中期望的局部递送部位。

[0441] 除了增塑剂外还可将着色剂、防粘剂、表面活性剂、消泡剂、润滑剂(例如烧焦蜡或PEG)加入到包衣中,以溶解或分散包衣材料,并且改进包衣性能和包衣产品。

[0442] 在其他实施方案中,用脉冲剂型递送包含本文所述式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物的本文所述制剂。脉冲剂型能够在控制的滞后时间后于预定时间点或在特定部位提供一次或多次即时释放脉冲。脉冲剂型可用多种脉冲制剂施用,所述制剂包括但不限于以下文献中所述的制剂:美国专利号5,011,692、5,017,381、5,229,135、5,840,329、4,871,549、5,260,068、5,260,069、5,508,040、5,567,441和5,837,284。

[0443] 很多其他控制释放系统类型适用于本文所述的制剂。所述递送系统的实例包括例如:基于聚合物的系统,例如聚乳酸和聚乙醇酸、聚酞和聚己酸内酯;多孔基质,基于非聚合物的脂类系统,包括固醇类,例如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪,例如甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡包衣,可生物蚀解的剂型,使用常规粘合剂的压制片,等等。参见例如Lieberman等人,Pharmaceutical Dosage Forms,第2版,第1卷,第209-214页(1990);Singh等人,Encyclopedia of Pharmaceutical Technology,第2版,第751-753页(2002);美国专利号4,327,725、4,624,848、4,968,509、5,461,140、5,456,923、5,516,527、5,622,721、5,686,105、5,700,410、5,977,175、6,465,014和6,932,983。

[0444] 在某些实施方案中,提供包含本文所述化合物(例如式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物)的颗粒和至少一种分散剂或悬浮剂的药物制剂以供口服施用于个体。所述制剂可为用于混悬液的粉末和/或颗粒,当其与水混合时,获得基本上均匀的混悬液。

[0445] 用于口服给药的液体制剂剂型可为水性混悬剂,其选自包括但不限于以下的剂型:药学上可接受的水性口服分散剂、乳剂、溶液剂、酞剂、凝胶剂和糖浆剂。参见例如Singh等人,Encyclopedia of Pharmaceutical Technology,第2版,第754-757页(2002)。

[0446] 本文所述的水性混悬剂和分散剂可保持如The USP Pharmacists' Pharmacopeia(2005版,第905章)中所定义均匀状态至少4小时。均一性应该通过与关于测定整个组合物均一性相一致的采样法来测定。在一个实施方案中,可通过持续不到1分钟的物理搅动来将水性混悬剂重新悬浮为均匀的混悬剂。在另一个实施方案中,可通过持续不到45秒的物理搅动来将水性混悬剂重新悬浮为均匀的混悬剂。在又一

个实施方案中,可通过持续不到 30 秒的物理搅动来将水性混悬剂重新悬浮为均匀的混悬剂。在又一个实施方案中,保持均匀的水性分散剂不需搅动。

[0447] 本文所述的药物组合物可包含甜味剂,例如但不限于:阿拉伯胶糖浆、安塞蜜 K(acesulfame K)、阿力甜(alitame)、茴芹、苹果、阿斯巴甜、香蕉、巴伐利亚奶油、浆果、红醋栗、奶油糖果、柠檬酸钙、樟脑、焦糖、樱桃、樱桃精、巧克力、肉桂、泡泡糖、柑桔、柑桔潘趣酒、柑桔精、棉花糖、可可粉、可乐、冷樱桃、冷柑桔、甜蜜素(cyclamate)、甜精(cylamate)、右旋糖、桉树、丁香酚、果糖、果汁潘趣酒、姜、甘草酸酯、甘草(欧亚甘草)糖浆、葡萄、柚子、蜂蜜、益寿糖(isomalt)、柠檬、酸橙、柠檬精、甘草酸单铵盐(MagnaSweet[®])、麦芽醇、甘露醇、枫、药属葵、薄荷醇、薄荷精、混合浆果、二氢查尔酮(neohesperidine)DC、纽甜(neotame)、橙子、梨、桃、薄荷、薄荷膏、Prosweet[®]粉、覆盆子、根汁汽水、朗姆酒、糖精、黄樟油精、山梨醇、留兰香、留兰香精、草莓、草莓精、甜叶菊、三氯蔗糖、蔗糖、糖精钠、糖精、阿斯巴甜、安塞蜜钾、甘露醇、踝蛋白(talin)、三氯蔗糖、山梨醇、瑞士奶油、塔格糖、柑橘、祝马丁(thaumatin)、百果糖(tutti frutti)、香草、胡桃、西瓜、野樱桃、鹿蹄草、木糖醇,或这些矫味剂成分的任何组合,例如茴芹-薄荷醇、樱桃-茴芹、肉桂-橙子、樱桃-肉桂、巧克力-薄荷、蜂蜜-柠檬、柠檬-酸橙、柠檬-薄荷、薄荷醇-桉树、橙-精油、香草-薄荷,及其混合物。

[0448] 在某些实施方案中,本文所述的药物制剂可为自乳化的药物递送系统(SEDSS)。乳剂是一个不混溶相通常以小滴形式存在于另一个相中的分散剂。通常通过剧烈机械分散来制备乳剂。SEDSS 与乳剂或微乳剂不同,当将其加入到过量水中而无任何外部机械分散或搅动时,其自发形成乳剂。SEDSS 的优点是仅需要轻缓的混合来将小滴分散在整个溶液中。另外,可在给药前立即加入水或水相,这可确保不稳定的或疏水的活性成分的稳定性。因此,SEDSS 提供有效的递送系统用于口服和肠胃外递送疏水性活性成分。SEDSS 可提供疏水性活性成分生物利用度的改进。产生自乳化剂型的方法包括但不限于例如美国专利号 5,858,401、6,667,048 和 6,960,563。

[0449] 在本文所述的水性分散剂或混悬剂中使用的上述添加剂之间有重叠,因为给定的添加剂通常由本领域的不同从业者进行不同地分类,或者通常针对其若干不同功能中的任一种进行使用。因此,应理解上述添加剂仅为示例性的,而不限制可包括在本文所述制剂中的添加剂的类型。

[0450] 经鼻制剂的潜在赋形剂包括例如美国专利号 4,476,116、5,116,817 和 6,391,452。盐水中的制剂溶液采用苯甲醇或其他合适的防腐剂、氟碳化合物和/或其他增溶剂或分散剂。参见,例如 Ansel, H. C. 等人, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 第 6 版 (1995)。优选地用合适的药学上可接受的无毒成分制备这些组合物和制剂。合适的载体的选择高度依赖于所需鼻剂型(例如溶液剂、混悬剂、软膏剂或凝胶剂)的确切性质。鼻剂型除活性成分外还通常含有大量水。也可存在少量其他成分,例如 pH 调节剂、乳化剂或分散剂、防腐剂、表面活性剂、胶凝剂或缓冲剂和其他稳定剂和增溶剂。优选地,鼻剂型应该与鼻分泌物等渗。

[0451] 为了通过吸入给药,本文所述的化合物可呈气雾剂、薄雾或粉剂的形式。本文所述的药物组合物方便地使用合适的抛射剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二

氧化碳或其他合适的气体从加压包或喷雾器中以气雾喷雾形式递送。在加压气雾剂的情况下,可通过提供阀门来递送计量量来确定剂量单位。例如,仅举例而言,可配制在吸入器或吹入器中使用的明胶的胶囊和药筒,其含有本文所述化合物和合适的粉末基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0452] 可用多种制剂来施用包含本文所述化合物的含服制剂,包括但不限于美国专利号 4, 229, 447、4, 596, 795、4, 755, 386 和 5, 739, 136。另外,本文所述的含服剂型可进一步包含可生物蚀解(可水解)的聚合物载体,所述聚合物载体也可起将所述剂型粘附到颊黏膜上的作用。将含服剂型制备为经预定时间逐渐蚀解,其中基本上始终提供所述化合物的递送。含服给药避免了口服给药存在的缺点,例如吸收缓慢、胃肠道中存在的流体对活性剂的降解和/或在肝脏中的首过失活。关于可生物蚀解(可水解)的聚合物载体,实际上可使用任何这样的载体,只要不危及所需的药物释放曲线,并且该载体与本文所述的化合物及可存在于含服剂量单位中的任何其他组分相容。通常,聚合物载体包含可粘附到颊黏膜的湿表面的亲水性(水溶性和水膨胀性)聚合物。可用于本文的聚合物载体的实例包括丙烯酸聚合物和共聚物,例如称为“卡波姆”(Carbopol[®],其可从 B. F. Goodrich 获得,是一种这样的聚合物)的共聚物。还可将其他组分引入本文所述的含服剂型中,包括但不限于崩解剂、稀释剂、粘合剂、润滑剂、矫味剂、着色剂、防腐剂等。对于含服或舌下给药,组合物可采用以常规方式配制的片剂、锭剂或凝胶剂形式。

[0453] 本文所述的透皮制剂可用多种装置施用,包括但不限于以下美国专利所述的装置:美国专利号 3, 598, 122、3, 598, 123、3, 710, 795、3, 731, 683、3, 742, 951、3, 814, 097、3, 921, 636、3, 972, 995、3, 993, 072、3, 993, 073、3, 996, 934、4, 031, 894、4, 060, 084、4, 069, 307、4, 077, 407、4, 201, 211、4, 230, 105、4, 292, 299、4, 292, 303、5, 336, 168、5, 665, 378、5, 837, 280、5, 869, 090、6, 923, 983、6, 929, 801 和 6, 946, 144。

[0454] 本文所述的透皮剂型可掺有某些本领域常规的药学上可接受的赋形剂。在一个实施方案中,本文所述的透皮制剂包含至少 3 种组分:(1) 式 (I)、(II) 或 (III) 化合物的制剂;(2) 渗透促进剂;和 (3) 水性助剂。另外,透皮制剂可包含另外的组分,例如但不限于胶凝剂、乳膏剂和软膏剂基质等。在某些实施方案中,透皮制剂可进一步包含织造或非织造的衬底材料,以增强吸收并防止透皮制剂从皮肤上脱落。在其他实施方案中,本文所述的透皮制剂可保持饱和或过饱和状态,以促进向皮肤内的扩散。

[0455] 适于透皮施用本文所述化合物的制剂可采用透皮递送装置和透皮递送贴剂,并且可以是亲脂性乳剂或缓冲的水性溶液,其溶解和/或分散在聚合物或粘合剂中。可构建这样的贴剂用于连续、脉冲或按需递送药剂。此外,可借助离子电渗贴剂等实现本文所述化合物的透皮递送。另外,透皮贴剂可提供本文所述的化合物的控制递送。可通过用控制速率膜或通过将化合物截留于聚合物基质或凝胶中来减慢吸收速率。相反地,吸收促进剂可用于提高吸收。吸收促进剂或载体可包括可吸收的药学上可接受的溶剂以帮助通过皮肤。例如,透皮装置可为绷带形式,其包含背衬部件、含有任选与载体在一起的化合物的储器、任选的控制速率的屏障(以便长时间以受控制的及预定的速率将化合物递送到宿主皮肤)以及将该装置固定于皮肤的手段。

[0456] 适于肌肉内、皮下或静脉内注射的制剂可包括生理学上可接受的无菌水性或非水性溶液剂、分散剂、混悬剂或乳剂和用于重建成无菌可注射溶液剂或分散剂的无菌粉末。合

适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或载体的实例包括：水、乙醇、多元醇（丙二醇、聚乙二醇、甘油、克列莫佛（cremophor）等）、其合适的混合物、植物油（例如橄榄油）和可注射的有机酯（例如油酸乙酯）。例如，可通过使用包衣如卵磷脂，通过在分散剂的情况下维持所需粒径，以及通过使用表面活性剂，来保持适当的流动性。适于皮下注射的制剂还可含有添加剂，例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂（例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等）来确保防止微生物生长。还可能期望包含等渗剂，例如糖、氯化钠等。可通过使用吸收延迟剂（例如单硬脂酸铝和明胶）造成可注射药物形式的延长吸收。

[0457] 为了静脉内注射，可将本文所述的化合物配制在水性溶液中，优选地在生理学上相容的缓冲液，例如 Hank 溶液、Ringer 溶液或生理盐水缓冲液中。为了透黏膜给药，可在制剂中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域公认的。对于其他肠胃外注射，合适的制剂可包括水性或非水性溶液剂，优选地含有生理学上相容的缓冲液或赋形剂。此类赋形剂通常是本领域公认的。

[0458] 肠胃外注射可涉及推注或连续输注。注射用制剂可呈现为单位剂型，例如安瓿或多剂量容器，其中含有添加的防腐剂。本文所述的药物组合物可呈作为在油性或水性载体中的无菌混悬剂、溶液剂或乳剂而适于肠胃外注射的形式，且可含有调配剂，例如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。肠胃外施用的药物制剂包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。另外，活性化合物的混悬剂可制备为合适的油性注射混悬剂。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油（例如芝麻油）或合成脂肪酸酯（例如油酸乙酯或甘油三酯）或脂质体。水性注射混悬剂可含有提高混悬剂的粘度的物质，例如羧基甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地，混悬剂还可含有合适的稳定剂或提高化合物的溶解度以允许制备高度浓缩的溶液的试剂。或者，活性成分可呈粉末形式，以便在使用前用合适的载体（例如无菌无热原水）配制。

[0459] 在某些实施方案中，可采用用于药物化合物的递送系统，例如脂质体和乳剂。在某些实施方案中，本文提供的组合物还包含黏膜粘着聚合物，该黏膜粘着聚合物选自例如羧甲基纤维素、卡波姆（carbomer）（丙烯酸聚合物）、聚（甲基丙烯酸甲酯）、聚丙烯酰胺、聚卡波非（polycarbophil）、丙烯酸 / 丙烯酸丁酯共聚物、藻酸钠和葡聚糖。

[0460] 在某些实施方案中，可局部施用本文所述的化合物，并将其配制为多种可局部施用的组合物，例如溶液剂、混悬剂、洗剂、凝胶剂、糊剂、药棒、香膏剂、乳膏剂或软膏剂。这类药物化合物可含有增溶剂、稳定剂、张力提高剂、缓冲剂和防腐剂。

[0461] 也可将本文所述的化合物配制在直肠组合物中，例如灌肠剂、直肠凝胶、直肠泡沫剂、直肠气雾剂、栓剂、胶凝栓剂或保留灌肠剂，它们含有常规栓剂基质，例如可可脂或其他甘油酯，以及合成聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮、PEG 等。在组合物的栓剂形式中，首先融化低熔点蜡，例如但不限于脂肪酸甘油酯的混合物，任选地与可可脂组合。

[0462] 通常，以有效改善或预防疾病或病症的症状的的发展的量（即治疗有效量）施用药剂，例如式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物。因此，治疗有效量可以是能至少部分防止或逆转疾病或病症的量。获得有效量所需的剂量可根据药剂、制剂、疾病或病症和施用药剂的个体而变化。

[0463] 有效量的确定还可能涉及体外测定，其中将不同的药物剂量施用于培养中的细胞，并测定有效改善某些或所有症状的药剂浓度，以便计算体内所需的浓度。有效量也可基

于体内动物研究。

[0464] 可在出现疾病或病症的症状之前、同时及随后施用药剂。在某些实施方案中,将药剂施用于具有疾病或病症家族史的个体,或具有可能指示易患疾病或病症的表型的个体,或具有使个体易患疾病或病症的基因型的个体。

[0465] 所用的具体递送系统可取决于多种因素,包括例如预定目标和给药途径,例如局部或全身。递送目标可以是引起或促成疾病或病症的特定细胞,包括,例如:具有改变的细胞内钙或钙失调或稳态失衡的细胞,和细胞内钙没有改变但可能具有某些改变、缺乏或缺陷的细胞,这些改变、缺乏或缺陷可至少部分通过改变细胞的细胞内钙而补偿、抵消、逆转或减缓或消除。特定细胞包括,例如:免疫细胞(例如淋巴细胞、T细胞、B细胞、白细胞)、成纤维细胞(或源自成纤维细胞的细胞)、表皮细胞、真皮细胞或皮肤细胞(例如角化细胞)、血液细胞、肾脏或肾细胞(例如系膜细胞)、肌细胞(例如平滑肌细胞,例如气道(气管或支气管)平滑肌细胞)和外分泌或分泌(例如唾液腺,包括腮腺腺泡和下颌下腺)细胞。例如,靶细胞可以是:引起哮喘病或疾病的肺或气道中的常驻细胞或浸润细胞;引起神经、神经退化或脱髓鞘疾病或病症的神经系统中的常驻细胞或浸润细胞;参与肾脏移植排斥的常驻细胞或浸润细胞;当激活时导致移植抗宿主病的移植细胞;参与肾脏移植排斥的常驻细胞或浸润细胞;其活化引起炎症例如关节炎的常驻细胞或浸润细胞;涉及神经病和肾小球肾炎的肾脏或肾系统中的常驻细胞或浸润细胞(例如系膜细胞);和参与自身免疫病(例如舍格伦综合征)的外分泌腺(例如唾液腺和泪腺)中的常驻细胞或浸润细胞。通过本领域公认的方法施用药剂可针对一种或多种细胞类型或细胞类型的子集。例如,药剂可与细胞表面受体或毒素的抗体、配体偶联,或者可被包含在将会选择性内化到细胞中的颗粒(例如脂质体,或其中病毒受体特异性结合某些细胞类型的病毒,或缺乏病毒核酸的病毒颗粒)中,或者可被局部施用。

[0466] 给药方法和治疗方案的实例

[0467] 本文所述的化合物可用于制备药物,该药物用于调节细胞内钙,或用于治疗将会至少部分从细胞内钙的调节中获益的疾病或病状。另外,用于对需要治疗的个体治疗本文所述的任何疾病或病状的方法涉及向所述个体施用治疗有效量的药物组合物,该药物组合物含有至少一种本文所述的化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的前药或药学上可接受的溶剂合物。

[0468] 可施用含有本文所述的化合物的组合物用于预防性和/或治疗性处理。在治疗性应用中,将组合物以足以治愈或至少部分阻止疾病或病状的症状的量施用于已经患有该疾病或病状的患者。对于该应用有效的量将取决于疾病或病状的严重程度和进程、先前的治疗、患者的健康状况、体重和对药物的反应以及经治医生的判断。

[0469] 在预防性应用中,将含有本文所述化合物的组合物施用于对特定疾病、病症或病状易感或处于其风险之中的患者。所述量定义为“预防性有效量或剂量”。在这种应用中,精确的量也视患者的健康状况、体重等而定。当在患者中使用时,对于该应用的有效量将视病状或病症的严重程度和进程、先前治疗、患者的健康状况、体重和对药物的反应及治疗医生的判断而定。

[0470] 在其中所述患者的病状没有改善的情况下,根据医生的裁量,可长期施用化合物,

也就是说,可以施用延长的时期(包括患者生命的整个期间),以改善或以其他方式控制或限制患者疾病或病状的症状。

[0471] 在其中所述患者的状态的确得到改善的情况下,根据医生的裁量,可以连续施用化合物;或者,所施用的药物的剂量可以暂时减少或暂时中止一段时间(即“休药期”)。休药期的长度可在2天到1年不等,仅作为举例,包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。在休药期期间的剂量降低可以是约10%到约100%,仅作为举例,包括约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约100%。

[0472] 一旦患者的病状发生改善,若需要,则施用维持剂量。随后,给药剂量或给药频率或二者可随症状的变化降低到改善的疾病、病症或病状得以保持的水平。然而,一旦任何症状复发,患者可能需要长期的间歇治疗。

[0473] 对应于这种量的给定药剂的量将随以下因素而变化:例如具体的化合物、疾病或病状及其严重程度、需要治疗的个体或宿主的特性(例如体重),但也可以根据病例的具体情况以本领域公认的方式确定,所述具体情况包括例如所施用的具体药剂、给药途径、所治疗的病状和所治疗的个体或宿主。然而,一般而言,对于成年人治疗所采用的剂量通常为每天约0.02-约5000mg,在某些实施方案中,每天约1-约1500mg。所需剂量可方便地以单剂量提供,或作为同时(或经较短时间)施用或以适当间隔(例如每天2次、3次、4次或更多次亚剂量)施用的分开剂量提供。

[0474] 本文所述的药物组合物可以呈适于单次施用精确剂量的单位剂型。在单位剂型中,制剂被分为含有合适量的一种或多种化合物的单位剂量。单位剂量可呈含有分散量的制剂的包装形式。非限制性实例是包装片剂或胶囊剂 and 在小瓶或安瓿中的粉剂。水性混悬组合物可包装在不能重复盖紧的单剂量容器中。或者,可使用能重复盖紧的多剂量容器,在这种情况下组合物中通常包含防腐剂。仅举例而言,用于肠胃外注射的制剂可以以加入防腐剂的单位剂型(包括但不限于安瓿)或多剂量容器提供。

[0475] 本文所述的适于本文所述化合物的每日剂量为约0.01mg/kg-约20mg/kg。在一个实施方案中,日剂量为约0.1mg/kg-约10mg/kg。在较大型哺乳动物(包括但不限于人)中指定的日剂量介于约0.5mg至约1000mg之间,其方便地以单剂量或以分开剂量(包括但不限于至多每天4次)施用或以延长释放形式施用。用于口服的合适的单位剂型包含约1-约500mg的活性成分。在一个实施方案中,单位剂量为约1mg、约5mg、约10mg、约20mg、约50mg、约100mg、约200mg、约250mg、约400mg或约500mg。前述范围仅为建议性的,因为关于个体治疗方案的变量数很多,明显偏离这些推荐值也是常见的。这些剂量可随多种变量而变化,所述变量不限于所用化合物的活性、待治疗的疾病或病状、给药方式、个别个体的要求、所治疗的疾病或病状的严重程度和医生的判断。

[0476] 可通过标准药学过程在细胞培养物或实验动物中确定此类治疗方案的毒性和治疗效力,包括但不限于测定LD₅₀(群体的50%致死的剂量)和ED₅₀(群体的50%治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比率为治疗指数,可表示为LD₅₀和ED₅₀之间的比率。优选表现出高治疗指数的化合物。从细胞培养试验和动物研究中获得的数据可用于推断用

于人的剂量范围。优选地,此类化合物的剂量在包括具有最小~~毒~~性的ED₅₀的循环浓度的范围内。剂量可根据所用剂型及所采用的给药途径在该范围内变化。

[0477] 联合治疗

[0478] 式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物及其组合物还可与针对其对于待治疗病状的治疗价值而选择的其他治疗剂联合使用。一般而言,在采用联合治疗的实施方案中,本文所述的组合物和其他药剂不必在同一药物组合物中施用,并且可能因为不同的物理和化学特性而不得不通过不同途径施用。给药方式的确定和如果可能的话在同一药物组合物中给药的可取性完全在临床医生的知识范围内。初次给药可按本领域公认的方案进行,然后基于所观察的效果,可由临床医生修改剂量、给药方式和给药时间。

[0479] 在某些情况下,将至少一种本文所述的化合物与另一种治疗剂联合给药可能是合适的。仅举例而言,如果患者在接受一种本发明化合物(例如式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物)后经历的一种副作用为恶心,那么与初始治疗剂联合施用抗恶心药物可能是合适的。或者,仅举例而言,通过施用辅助剂可能提高本文所述化合物之一的治疗效果(即辅助剂本身可能具有很小的治疗益处,但与另一治疗剂联合时,对患者的总治疗益处得到增加)。或者,仅举例而言,通过联合施用本文所述化合物之一与也具有治疗益处的另一种治疗剂(也包括治疗方案)可提高患者经历的益处。在任何情况下,不管所治疗的疾病、病症或病状怎样,患者经历的总益处可能只是两种治疗剂的加成,或者患者可经历协同益处。

[0480] 所用化合物的具体选择将取决于主治医生的诊断及其对患者病状的判断和合适的治疗方案。可并行地(例如同时、基本上同时或在同一治疗方案中)或序贯地施用化合物,这取决于疾病、病症或病状的性质、患者的状况和所用化合物的实际选择。治疗方案期间的给药次序和每种治疗剂的给药重复次数的确定完全在临床医生的知识范围内,由其在评估所治疗的疾病和患者的状况后确定。

[0481] 当药物在联合治疗中使用时,治疗有效剂量可变化。通过实验确定药物和在联合治疗方案中使用的其他药剂的治疗有效剂量的方法在文献中阐述。例如,文献中广泛阐述了应用较低剂量的节律给药(metronomic dosing)(即提供更频繁的较低剂量)以使~~毒~~副作用最小化。联合治疗进一步包括在不同时间开始和终止的周期性治疗,以帮助患者的临床处理。

[0482] 对于本文所述的联合治疗,共同施用的化合物的剂量当然根据使用的联合药物的类型、使用的具体药物、所治疗的疾病或病状等等而变化。另外,当与一种或多种生物学活性剂共同施用,本文提供的化合物可与该生物学活性剂同时或序贯施用。若序贯施用,则主治医生应决定联合施用蛋白质与生物学活性剂的合适的次序。

[0483] 在任何情况下,多种治疗剂(其中之一为本文所述的式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物)可以以任何次序或甚至同时施用。如果是同时施用,则多种治疗剂可在单个同一形式中或在多种形式中提供(仅举例而言,作为单个药丸或作为两个分开的药丸)。治疗剂之一可以以多个剂量施用,或者两种都可作为多个剂量施用。如果不是同时施用,则多个剂量之间的时间可从零周以上到小于四周不等。另外,所述组合方法、组合物和制剂不限于仅使用两种药物;也想到使用多种治疗组合。

[0484] 应该理解,用以治疗、预防或改善寻求缓解的病状的剂量方案可按照多种因素进

行改进。这些因素包括个体罹患的病症或病状以及个体的年龄、体重、性别、饮食及医疗状况。因此,实际采用的剂量方案可广泛地变化,因此可能偏离本文所述的剂量方案。

[0485] 组成本文所公开的联合治疗的药剂可以是联合剂型,或呈计划基本上同时施用的分开的剂型。也可序贯施用组成联合治疗的药剂,可通过要求两步给药方案施用任一种治疗化合物。两步给药方案可能要求序贯施用活性剂或空间上分离地施用分开的活性剂。多个给药步骤之间的时间可为几分钟到几小时,取决于每一种药剂的性质,例如药剂的效力、溶解性、生物利用度、血浆半衰期和动力学曲线。靶分子浓度的昼夜节奏变化也可决定最佳给药间隔。

[0486] 另外,本文所述的化合物还可与可能为患者提供相加的或协同的益处的程序联合使用。仅举例而言,预期患者在本文所述的方法中获得治疗性和/或预防性益处,其中本文所公开的化合物的药物组合物和/或与其他治疗剂的组合可与遗传测试相联合,以确定个体是否是已知与某些疾病或病状有关的突变基因的携带者。

[0487] 本文所述的化合物和联合治疗可在所述疾病或病状出现之前、期间或之后施用,施用含有化合物的组合物的时机可能变化。因此,例如,化合物可作为预防药物使用,并且可连续施用于具有发展病状或疾病倾向的个体,以便防止所述疾病或病状的发生。化合物和组合物可在症状开始发作期间或发作后尽可能快地施用于个体。可在症状发作后前 48 小时内,优选地在症状发作后前 48 小时内,更优选地在症状发作后前 6 小时内,最优选地在症状发作后前 3 小时内,开始施用化合物。初次给药可经由任何实用途径,例如静脉内注射、推注、经约 5 分钟至约 5 小时的输注、丸剂、胶囊、透皮贴剂、含服递送等或其组合。优选地在检测到或怀疑有疾病或病状发作后尽可能快地施用化合物,施用时间长度为治疗疾病所需的时间长度,例如 1 天至约 3 个月。对于每一个体治疗长度可能变化,并且可用已知标准来确定长度。例如,化合物或含有化合物的制剂可施用至少 2 周,优选约 1 个月至约 5 年。

[0488] SOCE 抑制剂

[0489] 在一个方面,式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物与其他 SOCE 抑制剂联合施用或使用。在一个方面,SOCE 抑制剂为非选择性抑制剂。

[0490] 已阐述了多种 SOCE 抑制剂。SOCE 的抑制剂包括:

[0491] a) 阳离子,其包括镧系元素阳离子,例如 Gd^{3+} 、 La^{3+} ;

[0492] b) P-450 抑制剂,其包括益康唑、咪康唑、克霉唑、酮康唑;

[0493] c) 环氧合酶抑制剂,其包括尼氟灭酸、氟芬那酸、替尼达普;

[0494] d) 脂氧合酶抑制剂,其包括去甲二氢化愈创木酸、二十碳四炔酸;

[0495] e) 为通道阻滞剂的化合物,其包括 SK&F96365、SC38249、LU52396、L-651, 582、粉防己碱、2-APB;

[0496] f) 不通过对 SOC 通道本身的作用来抑制 SOCE 的化合物,其包括 U73122 (磷脂酶 C 抑制剂)、渥曼青霉素 (磷脂酰肌醇激酶抑制剂)。

[0497] 这些 SOCE 抑制剂中的某些具有非特异性作用和/或促进 SOCE 抑制的多种作用模式,包括封阻 SOC 通道的孔 (通道阻滞剂)、抑制似乎支持 SOCE 的线粒体 ATP 合成 (Gamberucci 等人, J Biol. Chem., 269, 23597-23602, 1994; Marriott 等人, Am. J. Physiol., 269, C766-C774, 1995)、干扰细胞质 pH (Muallem 等人, Am. J. Physiol., 257, G917-G924, 1989) 以及抑制 SOC 通道的激活。

[0498] 免疫抑制剂

[0499] 在一个实施方案中,本文所述的化合物在免疫抑制疗法中作为单一药剂施用,以降低、抑制或防止免疫系统活性。免疫抑制疗法在临床上用于:防止移植的器官和组织(例如骨髓、心脏、肾脏、肝脏)排斥;治疗自身免疫疾病或最可能是自身免疫起源的疾病(例如类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、克罗恩病和溃疡性结肠炎);和治疗某些其他非自身免疫炎性疾病(例如长期变应性哮喘控制)。

[0500] 在某些实施方案中,本文所述的化合物与选自以下的其他免疫抑制剂一起施用:钙调磷酸酶抑制剂(例如但不限于环孢菌素、他克莫司);mTOR抑制剂(例如但不限于西罗莫司、依维莫司);抗增生药物(例如但不限于硫唑嘌呤、霉酚酸);皮质类固醇(例如但不限于泼尼松、醋酸可的松、泼尼松龙、甲泼尼龙、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、倍氯米松、醋酸氟氢可的松、醋酸去氧皮质酮、醛固酮、氢化可的松);抗体(例如但不限于单克隆抗IL-2R α 受体抗体(巴利昔单抗、达克珠单抗)、多克隆抗T-细胞抗体(抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、抗淋巴细胞球蛋白(ALG)))。

[0501] 其他免疫抑制剂包括但不限于:糖皮质激素(阿氯米松、醛固酮、安西奈德、倍氯米松、倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、脱氧皮质酮、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、地塞米松、二氟拉松、二氟可龙、二氟泼尼酯、氟氯缩松、氟氢可的松、氟氢缩松、氟美松、氟尼缩松、氟轻松安奈德(fluocinolone acetonide)、醋酸氟轻松、氟可丁、氟可龙、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、氟替卡松、福莫可他、哈西缩松、卤米松、氢化可的松/皮质醇、醋丙氢可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲羟松、甲泼尼松、甲泼尼龙、醋丙甲泼尼龙、糠酸莫米松、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松、泼尼松龙、泼尼立定、利美索龙、替可的松、曲安西龙、乌倍他索)、环磷酰胺、亚硝基脲、顺铂、卡铂、奥沙利铂、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、嘧啶类似物、蛋白质合成抑制剂、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、更生霉素、蒽环类(anthracycline)、丝裂霉素C、博来霉素、光辉霉素(mithramycin)、Atgam^(R)、Thymoglobuline^(R)、OKT3^(R)、巴利昔单抗、达克珠单抗、环孢菌素、他克莫司、西罗莫司、干扰素(IFN- β 、IFN- γ)、阿片类、TNF结合蛋白(英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、戈利木单抗)、霉酚酸、霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil)、FTY720以及US7,060,697中列出的那些。

[0502] 治疗自身免疫疾病、炎性疾病的药物

[0503] 当个体罹患自身免疫疾病、病症或病状或炎性疾病、病症或病状或处于罹患所述疾病、病症或病状的风险之中时,本文所述的化合物与一种或多种以下治疗剂以任意组合施用:免疫抑制剂(例如他克莫司、环孢菌素、雷帕霉素、甲氨蝶呤、环磷酰胺、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、麦考酚酯或FTY720)、糖皮质激素(例如泼尼松、醋酸可的松、泼尼松龙、甲泼尼龙、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、倍氯米松、醋酸氟氢可的松、醋酸去氧皮质酮、醛固酮)、非甾体抗炎药(例如水杨酸盐、芳基烷酸、2-芳基丙酸、N-芳基安茴酸、昔康类、考昔类或磺苯胺类)、Cox-2特异性抑制剂(例如伐地考昔、艾托考昔、芦米考昔、塞来考昔或罗非考昔)、来氟米特、金硫葡萄糖、硫代苹果酸金盐、硫代硫酸金钠、柳氮磺吡啶、羟氯喹、米诺环素、TNF- α 结合蛋白(例如英夫利昔单抗、依那西普或阿达木单抗)、阿巴西普、阿那白滞素、干扰素- β 、干扰素- γ 、白介素-2、抗白三烯、茶碱或抗胆碱能药。

[0504] 在一个实施方案中,本文所述的化合物与 NFAT- 钙调磷酸酶途径抑制剂联合施用。在一个实施方案中,NFAT- 钙调磷酸酶途径抑制剂包括但不限于环孢菌素 A(CsA) 和他克莫司(FK506)。

[0505] 在一个实施方案中,本文所述的化合物或包含式(I)、(II)、(III) 或(IV) 化合物的组合物和药物与包括但不限于非甾体抗炎药(NSAID) 和皮质类固醇(糖皮质激素) 的抗炎药联合施用于患者。

[0506] NSAID 包括但不限于:阿司匹林、水杨酸、龙胆酸、水杨酸胆碱镁、水杨酸胆碱、水杨酸胆碱镁、水杨酸胆碱、水杨酸镁、水杨酸钠、二氟尼柳、卡洛芬、非诺洛芬、非诺洛芬钙、氟比洛芬、布洛芬、酮洛芬、萘丁美酮、酮咯酸、酮咯酸氨基丁三醇、萘普生、奥沙普秦、双氯芬酸、依托度酸、吲哚美辛、舒林酸、托美丁、甲氯灭酸盐、甲氯灭酸钠、甲灭酸、吡罗昔康、美洛昔康、COX-2 特异性抑制剂(例如但不限于塞来考昔、罗非考昔、伐地考昔、帕瑞考昔、艾托考昔、芦米考昔、CS-502、JTE-522、L-745, 337 和 NS398)。

[0507] 本文涵盖与 NSAID 的组合,所述 NSAID 为选择性 COX-2 抑制剂。此类化合物包括但不限于以下文献中公开的化合物:美国专利号 5,474,995;美国专利号 5,861,419;美国专利号 6,001,843;美国专利号 6,020,343;美国专利号 5,409,944;美国专利号 5,436,265;美国专利号 5,536,752;美国专利号 5,550,142;美国专利号 5,604,260;美国专利号 5,698,584;美国专利号 5,710,140;W094/15932;美国专利号 5,344,991;美国专利号 5,134,142;美国专利号 5,380,738;美国专利号 5,393,790;美国专利号 5,466,823;美国专利号 5,633,272;美国专利号 5,932,598 和 6,313,138;它们都通过引用并入本文。

[0508] 已描述为选择性 COX-2 抑制剂并因此可用于本文所述的方法或药物组合物中的化合物包括但不限于:塞来考昔、罗非考昔、芦米考昔、艾托考昔、伐地考昔和帕瑞考昔或它们的药学上可接受的盐。

[0509] 皮质类固醇类包括但不限于:倍他米松、泼尼松、阿氯米松、醛固酮、安西奈德、倍氯米松、倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、脱氧皮质酮、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、地塞米松、二氟拉松、二氟可龙、二氟泼尼酯、氟氯缩松、氟氢可的松、氟氢缩松、氟美松、氟尼缩松、氟轻松安奈德、醋酸氟轻松、氟可丁、氟可龙、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、氟替卡松、福莫可他、哈西缩松、卤米松、氢化可的松/皮质醇、醋丙氢可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲羟松、甲泼尼松、甲泼尼龙、醋丙甲泼尼龙、糠酸莫米松、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松/泼尼松龙、利美索龙、替可的松、曲安西龙和乌倍他索。

[0510] 用作抗炎药物的其他药剂包括通过引用并入本文的美国专利公开 2005/0227929 中公开的那些药剂。

[0511] 某些可商购的抗炎性药物包括但不限于:Arthrotec[®](双氯芬酸和米索前列醇)、Asacol[®](5-氨基水杨酸)、Salofalk[®](5-氨基水杨酸)、Auralgan[®](安替比林和苯佐卡因)、Azulfidine[®](柳氮磺吡啶)、Daypro[®](奥沙普秦)、Lodine[®](依托度酸)、Ponstan[®](甲灭酸)、Solumedrol[®](甲泼尼龙)、Bayer[®](阿司匹林)、Bufferin[®](阿司匹林)、Indocin[®](吲哚美辛)、Vioxx[®](罗非考昔)、Celebrex[®]

(塞来考昔)、**Bextra**[®] (伐地考昔)、**Arcoxia**[®] (艾托考昔)、**Prexige**[®] (芦米考昔)、**Advil**[®]、**Motrin**[®] (布洛芬)、**Voltaren**[®] (双氯芬酸)、**Orudis**[®] (酮洛芬)、**Mobic**[®] (美洛昔康)、**Relafen**[®] (萘丁美酮)、**Aleve**[®]、**Naprosyn**[®] (萘普生)、**Feldene**[®] (吡罗昔康)。

[0512] 在一个实施方案中,本文所述的化合物与白三烯受体拮抗剂联合施用,所述白三烯受体拮抗剂包括但不限于 BAYu9773 (参见 EP00791576 ;1997 年 8 月 27 日公布)、DUO-LT (Tsuji 等人, Org. Biomol. Chem., 1, 3139-3141, 2003)、扎鲁司特 (**Accolate**[®])、孟鲁司特 (**Singulair**[®])、普仑司特 (prankulast) (**Onon**[®]) 及其衍生物或类似物。

[0513] 药盒 / 制品

[0514] 本文还阐述了用于本文所述的治疗性应用的药盒和制品。这样的药盒可包括载体、包装或区室化以接纳一个或多个例如小瓶、管等容器的容器,每一个容器包括一个用于本文所述方法的单独元件。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器和试管。容器可由多种材料例如玻璃或塑料制成。

[0515] 本文提供的制品含有包装材料。用于包装药物产品的包装材料包括例如美国专利号 5, 323, 907、5, 052, 558 和 5, 033, 252 中所述的材料。药物包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶、管、吸入器、泵、袋、小瓶、容器、注射器、瓶和适用于所选制剂和预期给药方式及治疗的任何包装材料。想到本文提供的化合物和组合物的一系列制剂,也想到对将会从 CRAC 通道活性的抑制中获益的任何疾病、病症或病状的多种治疗。

[0516] 例如,容器可包括一种或多种本文所述的化合物,该化合物任选地处于组合物中或与如本文所公开的另一药剂联合。容器任选地具有无菌进入孔(例如,容器可为静脉溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的瓶塞的小瓶)。这样的药盒任选地包含化合物及标识说明或标签或关于其在本文所述方法中的应用的说明书。

[0517] 药盒通常可包括一个或多个另外的容器,每一个容器含有一种或多种从商业及使用者观点来看期望用于本文所述化合物的不同的物质(例如试剂,任选地为浓缩形式,和/或装置)。此类物质的非限制性实例包括但不限于缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器;载体、包装、容器、小瓶和/或管标签,其中列出了内容物和/或使用说明,和具有使用说明的包装插页。通常也包括一套说明书。

[0518] 标签可在容器上或附属于容器。当构成标签的文字、数字或其他符号附在、铸在或刻在容器本身时,标签可在容器上;当标签例如作为包装插页存在于也容纳容器的支座或载架内时,标签可附属于容器。标签可用来标示用于特定治疗应用的内容物。标签也可标出例如在本文所述方法中使用该内容物的指导。

[0519] 在某些实施方案中,药物组合物可以在包装(pack)或分配器装置(dispenser device)中提供,所述包装或分配器装置可含有一个或多个含本文提供的化合物的单位剂型。包装例如可含有金属或塑料箔,例如泡罩包装。包装或分配器装置可伴随有给药说明书。包装或分配器装置也可伴随有附属在容器中的告知书,该告知书为管理药品制造、使用或销售的政府机构所规定的形式,其反映管理机构对于人或兽医给药的药物形式的批准。这样的告知书例如可以是美国食品药品监督管理局对于处方药批准的标签或批准的产品插

页。也可制备在相容的药物载体中配制的含有本文提供的化合物的组合物,将其置于合适的容器中,并标注出用于治疗所指出的病状。

[0520] 测定

[0521] 有几种技术可用于评估钙池操纵的钙内流和细胞中的钙信号传导。此类技术包括但不限于:膜片钳电生理学(测量穿过细胞膜例如质膜的钙离子或其他离子);电容测量(允许在单细胞水平上追踪胞吐作用);使用荧光染料的钙成像允许跟踪钙在细胞质内移动的模式;荧光共振能量转移(FRET)使得能够评估蛋白质-蛋白质相互作用;且分子生物学方法允许操纵目标蛋白质的表达水平。

[0522] 可使用多种测定方法来检测式(I)、(II)或(III)化合物对细胞内钙的调节。此类测定包括基于细胞的体外测定以及体内动物模型。可使用检测、监测或测量对细胞内钙(包括钙内流介导的事件)的影响的任何测定。此类测定包括但不限于如下测定:其监测、测量和/或检测细胞内钙水平,钙水平的调节,和钙向细胞和细胞内细胞器内的移动、向其外的移动或在其内的移动。测定还可包括监测、测量和/或检测钙内流介导的事件和参与钙内流介导的事件的分子,所述分子例如但不限于:信号转导分子、转录因子、分泌的分子和受钙稳态变化影响的其他分子。测定包括但不限于本文所述的测定和通过引用并入本文的美国专利公布号 2007/0031814 和 W007/081804 所述的测定。

[0523] 细胞和细胞模型

[0524] 对于式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物调节细胞内钙的体外测试而言,多种细胞类型可用于此类测定。在特定实施方案中,细胞为其中发生钙池操纵的钙内流的细胞,或可操纵以使细胞中发生钙池操纵的钙内流的细胞。在特定实施方案中,细胞含有一种或多种参与调节细胞内钙(特别是,涉及、参与和/或提供:钙池操纵的钙内流;钙移入、移出细胞内细胞器或钙池或在其内的移动;调节细胞内细胞器或钙池(例如内质网)中的钙水平;和/或钙缓冲作用)的蛋白质,例如本文提供的那些蛋白质。在特定实施方案中,所述蛋白质包括 STIM 蛋白(包括 STIM1、STIM2、DSTIM 和 CSTIM 蛋白)和/或 Orai 蛋白(Orai1、Orai2、Orai3)。细胞可内源性表达所述蛋白质或重组表达所述蛋白质。

[0525] 用于所述方法的细胞可以来自任何物种。在一个实施方案中,细胞可为真核细胞。在一个实施方案中,细胞可为酵母、昆虫(例如果蝇或按蚊)或哺乳动物细胞。哺乳动物细胞包括但不限于啮齿动物(例如小鼠、大鼠和仓鼠)、灵长类动物、猴、狗、牛、兔和人细胞。多种细胞类型可用于所述方法中,包括,例如:神经元细胞、神经系统细胞、脑细胞、免疫系统细胞(例如 T 淋巴细胞和 B 细胞)、原代细胞、血液和造血细胞、基质细胞、髓系细胞、淋巴细胞和多种肿瘤和癌细胞。特定细胞包括果蝇 Schneider2 或 S2 细胞、人胚肾(HEK293)细胞、大鼠嗜碱细胞性白血病(RBL-2H3)细胞、Jurkat 细胞、上皮细胞、横纹肌肉瘤细胞、杆状细胞、视网膜母细胞瘤细胞、神经上皮瘤细胞、成神经瘤细胞、骨肉瘤细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞、红白血病细胞和成淋巴细胞。其他细胞系包括 HEK293 和 293T、CHO(包括 CHO-K1)、LTK-、N2A、H6 和 HGB。很多这样的细胞和细胞系可通过细胞保藏机构例如美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, Va.)获得。原代细胞可通过从组织来源分离而获得。

[0526] 可使用来自已经细胞系的细胞,例如成神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞、嗜铬细胞瘤 PC12 细胞、成神经细胞瘤 SK-N-BE(2)C 或 SK-N-SH 细胞、人 SK-N-MC 神经上皮瘤细胞、SMS-KCNR 细胞、人 LAN-5 成神经细胞瘤细胞、人 GI-CA-N 成神经细胞瘤细胞、人 GOTO 成神经

细胞瘤细胞、小鼠 Neuro 2a (N2A) 成神经细胞瘤细胞和 / 或人 IMR32 成神经细胞瘤细胞、慢性髓样白血病细胞 (例如人 K562 细胞)、早幼粒细胞性白血病细胞 (例如 HL60 细胞) 和组织细胞性淋巴瘤细胞 (例如 U937 细胞)、伯基特淋巴瘤细胞 (例如 CA46 细胞)、B- 细胞 (例如 NALM6)、急性淋巴细胞白血病细胞 (例如 MOLT4 细胞)、T 细胞 (例如 Jurkat 细胞) 和早期 T-ALL (例如 DU528) 细胞。

[0527] 在一个实施方案中,在体外测定中用于测试本文所述化合物调节细胞内钙的细胞的选择涉及数种考虑,包括,例如:在所述方法中使用的特定蛋白质,和在所述方法中监测或评估的细胞内钙调节的特定方面或活性。

[0528] 在一个实施方案中,通过监测或评估对钙池操纵的钙内流的影响来检测本文所述的化合物对细胞内钙的调节。通常在此类方法中使用的细胞自然地或通过细胞操作显示出钙池操纵的钙内流。内源性显示钙池操纵的钙内流的细胞包括某些可兴奋细胞和大部分不可兴奋细胞,并且可用本文所述的和 / 或本领域公认的方法进行鉴定。

[0529] 在一个实施方案中,可能期望使用含有信号传导和信使系统的组分的细胞,所述组分可实现钙从细胞内钙池的释放。例如,含有受体介导的磷脂酶 C (PLC) 激活系统的组分的细胞可用于钙池耗竭的生理激活 (经由 IP_3 的产生),以便于监测钙池操纵的钙内流。受体介导的 PLC 激活通过截然不同的偶联机制发生:由 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 引起的 PLC- β 激活,和由酪氨酸激酶受体和非受体酪氨酸激酶引起的 PLC- γ 激活。因此,当激动剂激活已知参与受体介导的 PLC- 激活系统的一种或多种受体时,可监测或评估含有该系统的细胞的钙池操纵的钙内流。(参见,例如 Bouron (2000) FEBS Lett 470:269-272; Millar 等人 (1995) J. Exp. Biol. 198:1843-1850; Yagodin 等人 (1998) Cell Calcium 23:219-228; Yagodin 等人 (1999) Cell Calcium 25:429-438; 和 Patterson 等人 (2002) Cell 111:1-20)。

[0530] 在用本文所述的化合物处理后的细胞内钙可在多种条件下进行评估。可选择条件以评估测试剂对细胞内钙特定方面的影响。例如,试剂和条件用于具体评价钙池操纵的钙内流、静息细胞溶质钙水平、钙缓冲作用和细胞内细胞器的钙水平及钙吸收或从细胞内细胞器的钙释放。可用任何本文所述的或本领域公认的方法评估静息细胞溶质钙水平、细胞内细胞器钙水平和阳离子移动。此类评估细胞内钙调节的方法包括但不限于:基于钙敏感性指示剂 (例如 fluo-3、mag-fura2 和靶向 ER 的水母发光蛋白) 的测量、基于标记的钙 (例如 $^{45}Ca^{2+}$) 的测量和电生理学测量。可评估的离子流的特定方面包括但不限于:离子流量的降低 (包括消除);改变的离子电流的生物物理学性质;和改变的离子流对钙流入过程 (例如钙池操纵的钙内流) 的激活剂或抑制剂的敏感性。也可获得用于具体评价受体介导的钙移动和第二信使操纵的钙移动的试剂和条件。

[0531] 钙池操纵的钙内流的评估

[0532] 在一个方面,在允许发生钙池操纵的钙内流的条件下将本文所述的化合物加至细胞,以便评估式 (I)-(III) 化合物对钙池操纵的钙内流的影响。这类条件在本文中描述并且是本领域所公认的。

[0533] 例如,在一种方法中,可以在本文所述的化合物的存在下,处理细胞以降低细胞内钙池的钙水平,然后分析响应于此的离子 (例如钙) 流入的迹象。用于降低细胞内钙池的钙水平和用于分析细胞的离子 (例如钙) 流入迹象的技术是本领域所公认的并且在本文中描述。

[0534] 在其他方法中,可在本文所述的化合物的存在下,使用针对穿过脱离细胞的质膜片或外面向外的膜囊泡的电流进行的电生理学分析来检测或监测钙池操纵的通道电流(例如 I_{SOC} 、 I_{CRAC})。

[0535] 钙内流介导的事件的评估

[0536] 参与钙调节的途径的多种分子是已知的。对参与钙内流介导的事件的分子的评估可用于监测细胞内钙,并可用于例如本文所述的筛选测定中以监测本文提供的化合物的效果。测定的实例包括但不限于检测或确定参与钙内流介导的事件的分子的存在情况、水平、水平的变化、产生、修饰(例如磷酸化和去磷酸化)、移动、降解及活性的测定(参见,例如, Trevillyan 等人 (2001) J. Biol. Chem. 276:48118-26)。本文所述的测定可使用已用本文提供的化合物处理或接触的细胞,或表达改变量的测试分子(例如参与钙调节的蛋白质,包括 STIM 蛋白、Orai 蛋白)的细胞,或对照细胞。测定也可在已用生理学或非生理学激活剂刺激的细胞或在未受刺激的细胞中进行。以下是对参与钙内流介导的事件的分子的代表性测定,并且仅意味着是示例性的。在本文所述的任何筛选和/或调节方法中也可采用针对这些分子的其他测定和针对参与钙内流介导的事件的其他分子的测定。

[0537] β -氨基己糖苷酶释放

[0538] 在肥大细胞中, Ca^{2+} 流入导致脱粒和释放炎性介质,例如肝素、组胺和酶,例如 β -氨基己糖苷酶。因此检测和/或测量此类分子的释放可用于监测细胞内钙。例如,可收集来自肥大细胞的培养基。然后可加入 β -氨基己糖苷酶的适当的底物(例如对硝基苯基-乙酰基-葡萄糖胺),并评估所得到的混合物的吸光度以测定样品中 β -氨基己糖苷酶活性的相对量(Funaba 等人 (2003) Cell Biol. International 27:879-85)。

[0539] 钙/钙调蛋白依赖性 CaN 磷酸酶活性

[0540] 磷酸酶钙调磷酸酶(CaN)使多种蛋白质去磷酸化,从而影响它们的活性和定位。可通过在存在或不存在式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物的情况下温育纯化的 CaN 和 CaN 底物,例如对应于 cAMP-依赖性激酶 RII 亚单位序列的放射性标记的肽,来评估 CaN 活性(参见 Trevillyan 等人 (2001) J. Biol. Chem. 276:48118-26)。可测定释放的放射性标记肽的水平和/或游离无机磷酸盐的量以评估 CaN 去磷酸化活性。

[0541] NFAT 转录活性

[0542] NFAT(活化 T 细胞核因子)转录因子响应于细胞内钙水平调节多种基因。例如, NFAT 蛋白调节参与免疫应答的细胞因子基因的转录。来自 NFAT 调节的基因的启动子和/或来自这些基因的调节区和元件可用于监测 NFAT 调节的表达,并由此监测细胞内钙。可用可操作地连接到报告基因(例如萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白质(GFP)或本领域已知的任何其他报告基因)上的 NFAT 调节的启动子或 NFAT 调节的元件来构建报告基因融合体(参见例如,美国公开申请号 2002-0034728)。报告蛋白的量或活性为 NFAT 活性的量度。

[0543] NFAT 磷酸化

[0544] NFAT 激活主要通过其磷酸化来调节,磷酸化进而调节其亚细胞定位。在未受刺激的细胞中, NFAT 是高度磷酸化的细胞溶质蛋白质。由多种机制诱导的细胞内 Ca^{2+} 的升高提高了 Ca^{2+} -钙调蛋白依赖性磷酸酶(钙调磷酸酶)的活性。活化的钙调磷酸酶使 NFAT 分子调控区内的多个丝氨酸残基去磷酸化。NFAT 响应于 Ca^{2+} 水平的降低或 CaN 抑制而被再磷

酸化。

[0545] 例如,可通过在细胞中表达可检测地标记的 NFAT 蛋白(例如 His6 标记的 -NFAT)来监测 NFAT 的磷酸化状态。可用 Ni^{2+} 色谱法从细胞纯化标记的 NFAT,并进行凝胶电泳和染色或蛋白质印迹。根据其较慢的迁移可区别 NFAT 的更高度磷酸化的形式。磷酸化的 NFAT 的状态可用作 NFAT 活化的量度(参见 Trevillyan 等人(2001)J. Biol. Chem276:48118-26)。

[0546] NFAT 核定位

[0547] 由 NFAT 的磷酸化状态来调节 NFAT 在细胞质和细胞核之间的定位。NFAT 的磷酸化通过遮盖核定位序列来防止核定位。例如,可通过在细胞中表达荧光标记的 NFAT(例如 GFP-NFAT)来监测 NFAT 核定位。可用共聚焦显微镜检查来监测标记的 NFAT 的核定位(参见 Trevillyan 等人(2001)J. Biol. Chem276:48118-26)。

[0548] 细胞因子分泌

[0549] 可用蛋白质检测测定来监测细胞因子分泌(例如 IL-2 分泌)。例如,可从免疫细胞收集上清液。可利用使用 IL-2 抗体的 ELISA 测定或其他合适的形式来检测和/或测定与对照细胞相比分泌的 IL-2 的量。在类似的测定中也可检测其他细胞因子例如 $\text{TNF-}\alpha$ 的分泌。

[0550] 细胞因子表达

[0551] 可直接或间接地在细胞中评估细胞因子(例如但不限于 IL-2)的表达。例如,在间接方法中,可将 IL-2 启动子可操作地连接到报告基因,例如萤光素酶或 β -半乳糖苷酶,并将报告构建体引入到细胞中。可监测报告基因的表达并与对照细胞中的基因表达进行比较(参见 Trevillyan 等人(2001)J. Biol. Chem276:48118-26)。或者,可评估内源或重组 IL-2mRNA 或蛋白质的表达。

[0552] T 细胞增殖

[0553] 细胞因子,例如 IL-2,对于 T-细胞响应于促分裂原或同种抗原刺激的增殖是必不可少的,因此细胞因子表达或分泌的变化改变了 T-细胞增殖。例如,可用伴刀豆球蛋白 A 或同种异体反应性淋巴细胞诱导 T 细胞,并且例如通过让细胞经受 ^3H -胸苷脉冲并测量 ^3H -胸苷掺入来测定 T 细胞增殖(参见 Trevillyan 等人(2001)J. Biol. Chem276:48118-26)。

[0554] 在一些实施方案中,通过评估以下任何标准来测定本文提供的化合物对 SOCE 的调节(例如抑制或降低):

[0555] a. 存在对增加的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的直接抑制,如通过钙指示剂所测量的;

[0556] b. 存在对 I_{SOC} 或 I_{CRAC} 的直接抑制,如通过膜片钳所测量的;

[0557] c. 存在对诸如钙调磷酸酶活性、NFAT 亚细胞定位、NFAT 磷酸化和/或细胞因子(例如 IL-2)产生等下游信号功能的抑制;或

[0558] d. 在激活诱导的细胞增殖、分化和/或细胞凋亡信号途径中存在改变。

[0559] 动物模型

[0560] 可在方法实施方案中使用的动物模型进一步包括动物,例如但不限于非人动物,所述动物至少在其某些细胞中具有依赖于细胞内钙或由细胞内钙调节的细胞过程的改变或缺陷或异常功能。依赖于细胞内钙或由细胞内钙调节的细胞过程包括例如细胞激活、基因表达、细胞运输和细胞凋亡。涉及至少部分可由细胞内钙调节所补偿的缺陷的疾病/病症包括但不限于:自身免疫疾病,包括:类风湿性关节炎、炎性肠病、舍格伦综合征(与淋巴

细胞入侵唾液腺上皮细胞有关的细胞因子可降低腮腺细胞中的钙动员；同样，包括转录因子激活、细胞因子基因表达和细胞增殖在内的 T- 细胞激活依赖于由钙池操纵的钙流入提供的细胞内钙水平的持续升高）、哮喘（钙池操纵的钙内流可在介导支气管收缩和支气管平滑肌细胞增殖中起重要作用）、肾小球肾炎和肾小球炎症（细胞内钙变化，例如通过钙池操纵的钙内流，对肾小球炎症共培养模型中的单核细胞粘附发送信号）。

[0561] 动物模型的类型包括但不限于非人动物，例如非人无脊椎动物和脊椎动物和非人哺乳动物，啮齿动物（例如小鼠、大鼠和仓鼠）、牛、鸡、猪、山羊、狗、绵羊、昆虫、果蝇、线虫（nematode）、蠕虫、秀丽线虫、猴、大猩猩和其他灵长类动物。

[0562] 动物模型包括转基因和非转基因动物。可用于特定方法实施方案中的此类动物模型的一个实例是作为哮喘特征的气道高反应性（AHR）的啮齿动物模型。该模型可以如下产生：例如，通过用卵白蛋白免疫而致敏，接着与气雾化的卵白蛋白接触，并用胆碱能刺激（例如经由施用乙酰甲胆碱或乙酰胆碱）来攻击（参见例如 Xu 等人（2002）*J. Appl. Physiol.* 93:1833-1840；Humbles 等人（2002）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:1479-1484）。可评估气道高反应性（可以使用例如用压力型体积描记法记录呼吸压力曲线的方法并通过测量肺参数如肺传导率和肺顺应性对其进行评估），并比较已用及未用本文提供的化合物治疗的动物。可用于特定方法实施方案的动物模型的另一实例为肾小球系膜增生性肾小球肾炎的啮齿动物模型，其可通过例如施用抗 Thy1.1 抗体而产生（参见，例如 Jefferson 和 Johnson（1999）*J. Nephrol.* 12:297-307）。可评估任何数量的指示肾小球肾炎或肾功能不全的参数（例如肾小球系膜细胞增殖、血压、尿蛋白质排泄、肌酐清除率、肾小球硬化指数和其他参数），并比较已用及未用测试药剂治疗的动物。非肥胖型糖尿病（NOD）小鼠（近交小鼠品系，其自然发展共有 1 型糖尿病的很多免疫遗传特征的自身免疫型糖尿病）是可在特定方法实施方案中使用的动物模型的另一实例。这些小鼠也表现出很多自身免疫外分泌病（例如舍格伦综合征）的特征，包括降低外分泌组织分泌功能（参见，例如 Humphreys-Beher 和 Peck（1999）*Arch. Oral Biol.* 44 Suppl 1:S21-25 和 Brayer 等人（2000）*J. Rheumatol.* 27:1896-1904）。可评估与舍格伦综合征有关的特征（例如外分泌腺（例如唾液腺和泪腺）中的淋巴细胞浸润，下颌下腺中树状细胞和巨噬细胞的存在，通过测量基础和刺激的泪液分泌而获得的泪腺的完整性，唾液流速和淀粉酶活性），并可比较已用及未用本文所述的化合物治疗的动物。自身免疫疾病的动物（例如啮齿动物）模型也可用于特定方法实施方案中。此类动物包括自美国国立卫生院（NIH）自身免疫大鼠模型库和发育中心（Bethesda, Md.；可访问 www.ors.od.nih.gov/dirs/vrp/ratcenter）获得的大鼠模型。类风湿性关节炎（RA）和相关慢性 / 炎性自身免疫疾病的一个大鼠模型是胶原蛋白诱导的关节炎（CIA）模型（参见，例如 Griffiths 和 Remmers（2001）*Immunol. Rev.* 184:172-183）。可评估自身免疫疾病的特有表型（例如，改变的对自身抗原的免疫反应性水平，表达自身抗原的靶器官的慢性炎症，和器官损伤中侵入的单个核细胞和组织成纤维细胞的激活和参与），并比较已用及未用本文提供的化合物治疗的动物。神经性疼痛或炎性疼痛的动物（例如啮齿动物）模型也可用于特定方法实施方案中。例如，一种神经性疼痛大鼠模型涉及在结扎腰椎神经后发展为触觉异常痛敏（对另外无害刺激物的夸张的反应）（参见，例如 Chaplan 等人（1994）*J. Neurosci. Methods* 53:55-63 和 Luo 等人（2001）*J. Neurosci.* 21:1868-1875）。可评估神经性疼痛的一个特有特征，触觉异常痛敏（例如通

过评价响应于施用压力的缩爪阈值), 并比较已用及未用本文所述的化合物治疗的动物。

实施例

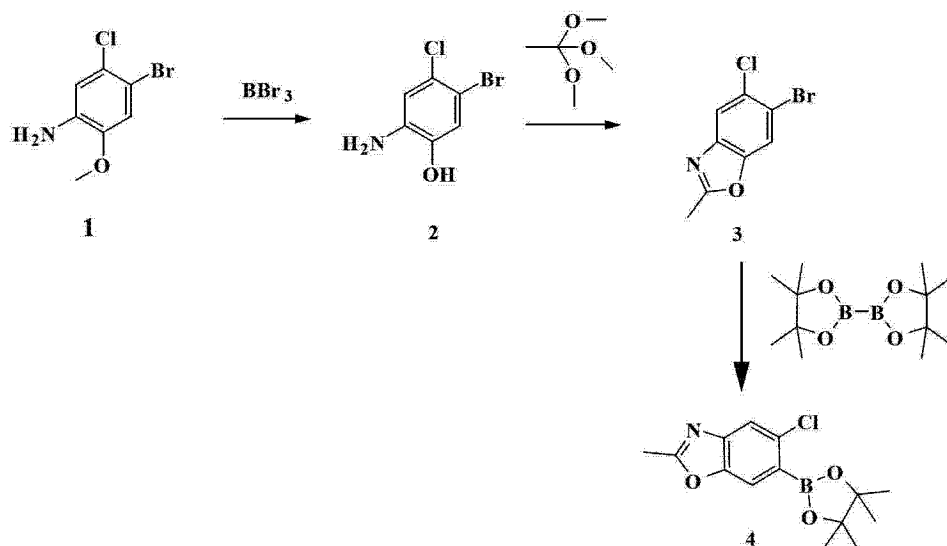
[0563] 这些实施例仅以说明性目的提供, 并非限制本文提供的权利要求的范围。用于合成本文所述化合物的原料和试剂可以合成获得或者可从例如但不限于 Sigma-Aldrich、AcrosOrganics、Fluka 和 FischerScientific 的商业来源获得。

[0564] 合成实施例

[0565] 这些实施例仅以说明性目的提供, 并非不限制本文提供的权利要求的范围。用于合成本文所述化合物的原料和试剂可以合成获得或者可从例如但不限于 Sigma-Aldrich、Acros Organics、Fluka 和 Fischer Scientific 的商业来源获得。

[0566] 2-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷(4)的制备:

[0567]



[0568] 2-氨基-5-溴-4-氯苯酚(2)的制备: 向4-溴-3-氯-6-甲氧基苯胺(1)(944mg, 4mmol)在10mlDCM中的悬液中加入含1MBBr₃的DCM(8ml, 8mmol)。将反应混合物在室温(r. t.)下搅拌2h, 反应混合物变为棕色溶液, 而后回到棕色悬液。用碳酸氢钠水溶液猝灭后, 用EA萃取混合物。用盐水洗涤有机相, 经硫酸钠干燥, 浓缩至干, 得到棕色固体2865mg。产率: 97.2%, 纯度 >95%。

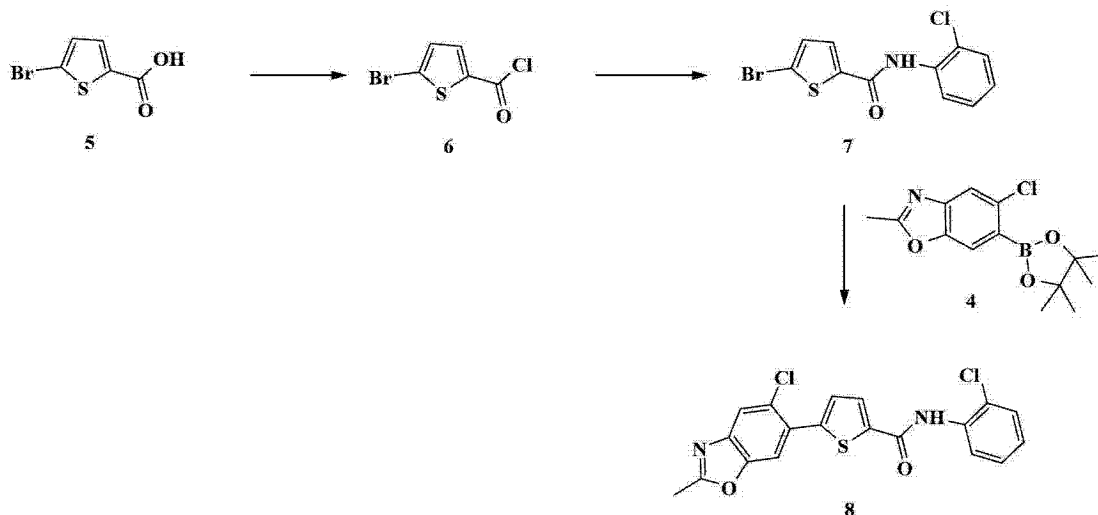
[0569] 6-溴-5-氯-2-甲基苯并噁唑(3)的制备: 将2-氨基-5-溴-4-氯苯酚(2)(865mg, 3.89mmol)、三氟甲磺酸铯(III)盐(24mg, 1%mol)和原乙酸三甲酯(610 μl, 1.2当量)在3mlEtOH中的混合物在90°C下加热1小时。冷却至室温后, 析出灰白色针状物, 将其过滤, 用MeOH、水进行洗涤并干燥, 得到呈灰白色结晶固体的标题化合物791mg。产率80.2%; 纯度 >95%。

[0570] 2-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷(4)的制备: 将6-溴-5-氯-2-甲基苯并噁唑(3, 493mg, 2mmol)、双(频哪醇)二硼(1.01g, 2mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯(II)二氯甲烷络合物(1:1)(163mg)和乙酸钾(588mg)在8ml二氧杂环己烷中的混合物在Ar下于90°C加热20小时。

EA/ 盐水处理 (work-up) 之后,用硫酸钠干燥有机相,浓缩,并进行硅胶快速柱纯化,得到 925mg 白色固体,将其溶解在 20ml THF/MeOH/H₂O(5:4:1) 中,并在室温下同 30ml 1M HCl 搅拌 30 分钟。用 EA/ 盐水处理,而后进行快速柱纯化,得到 205mg 呈白色固体的 2-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (4)。

[0571] 实施例 1:[5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (8) 的制备:

[0572]

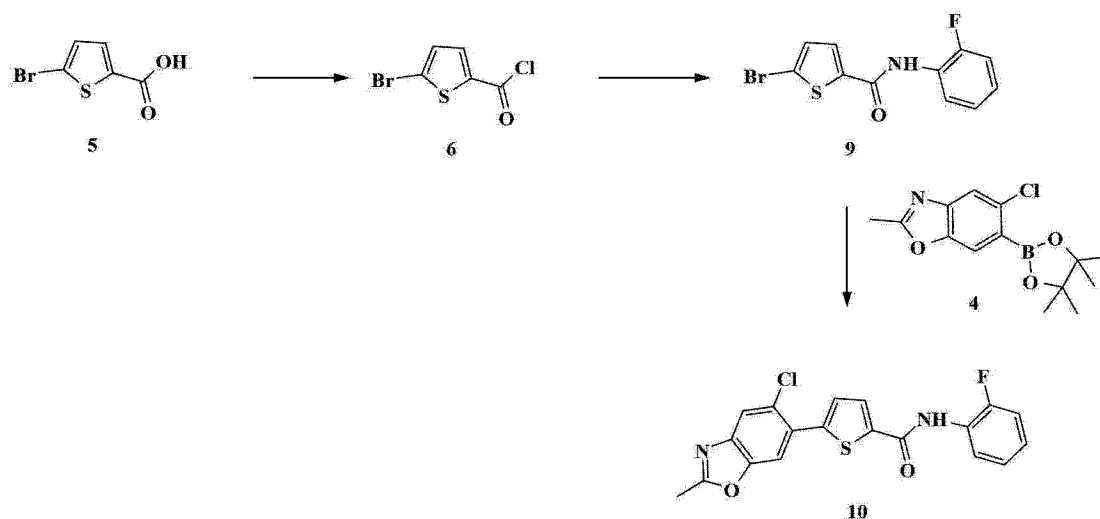


[0573] (5-溴(2-噻吩基))-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (7) 的制备:将 5-溴-噻吩-2-甲酸 (5) (207mg, 1mmol)、草酰氯 (420 μ l) 和催化量的 DMF 在 5ml DCM 中的混合物在室温下搅拌 2 小时,而后蒸发至干。将产生的固体残留物溶解在 5ml DCM 中,并向其中加入 2-氯苯胺 (209 μ l, 2 当量) 和 DIEA (522 μ l)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,之后用 EA/HCl 水溶液/盐水处理。将有机相浓缩,然后在快速硅胶柱上纯化,得到 291mg 呈浅黄色固体的 (5-溴(2-噻吩基))-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (7)。(产率:92%,纯度>90%)。

[0574] [5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (8) 的制备:将 (5-溴(2-噻吩基))-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (7) (25mg, 0.08mmol)、2-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (4) (23mg, 0.08mmol)、四(三苯基膦)-钯 (0) (Pd(Ph₃P)₄, 12mg) 和碳酸钠 (32mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在微波反应器中在 Ar 下于 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩,然后经历硅胶快速柱色谱。将分离的粗产物在制备型 HPLC 上再纯化,得到 10.7mg 呈白色固体的 [5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (8) (产率:33.1%;纯度>95%)。LC-MS:针对 C₁₉H₁₂C₁₂N₂O₂S 计算:404 (M+1)。

[0575] 实施例 2:[5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (10) 的制备:

[0576]

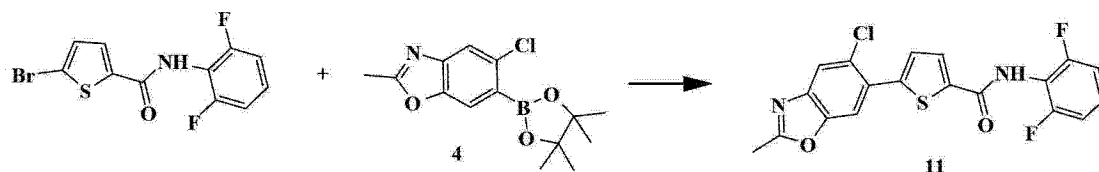


[0577] (5-溴(2-噻吩基))-N-(2-氟苯基)甲酰胺(9)的制备:将5-溴-噻吩-2-甲酸(5)(207mg, 1mmol)、草酰氯(420 μ l)和催化量的DMF在5mlDCM中的混合物在室温下搅拌2小时,之后蒸发至干。将产生的固体残留物溶解在5mlDCM中,并向其中加入2-氟苯胺(193 μ l, 2当量)和DIEA(522 μ l)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,之后用EA/HCl水溶液/盐水处理。将有机相浓缩,然后在快速硅胶柱上纯化,得到267mg呈灰白色固体的(5-溴(2-噻吩基))-N-(2-氟苯基)甲酰胺(9)(产率:89%,纯度>95%)。

[0578] [5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氟苯基)甲酰胺(10)的制备:将(5-溴(2-噻吩基))-N-(2-氟苯基)甲酰胺(9)(24mg, 0.08mmol)、2-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷(4)(23mg, 0.08mmol)、四(三苯基膦)-钯(0)($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg)和碳酸钠(32mg)在0.5mlDME、0.5mlEtOH和0.25ml水中的混合物在微波反应器中在Ar下于110°C加热30分钟。反应混合物用EA/盐水处理。将有机相浓缩,然后经历硅胶快速柱色谱。将分离的粗产物在制备型HPLC上再纯化,得到12.1mg呈白色固体的[5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氟苯基)甲酰胺(10)(产率:39%;纯度>95%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{S}$ 计算:387(M+1)。

[0579] 实施例3:[5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺(11)的制备:

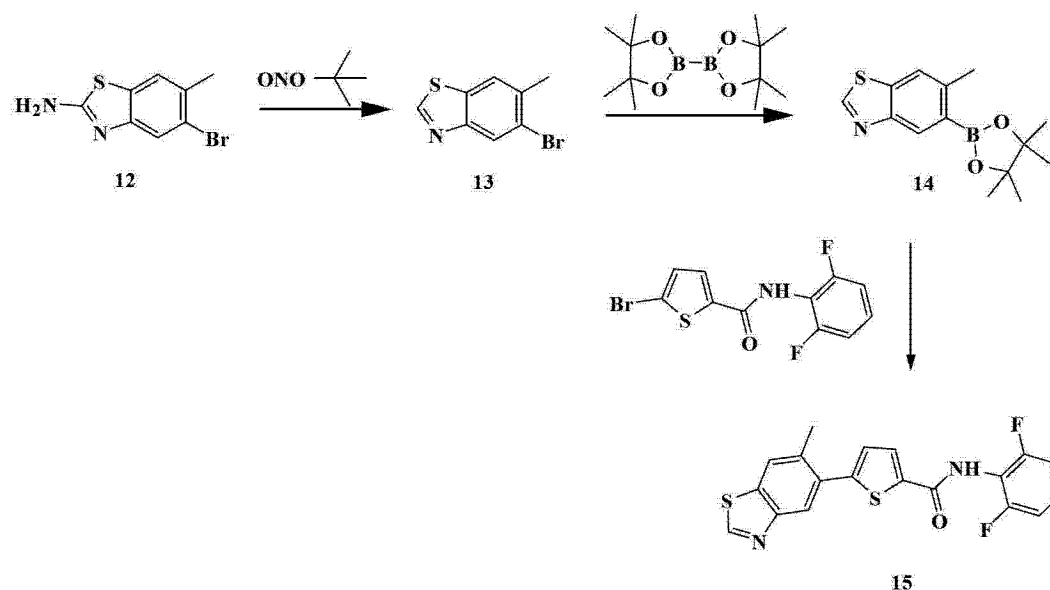
[0580]



[0581] 将(5-溴(2-噻吩基))-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺(25mg, 0.08mmol)、2-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷(4)(29mg, 0.1mmol)、四(三苯基膦)-钯(0)($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg)和碳酸钠(32mg)在0.5mlDME、0.5mlEtOH和0.25ml水中的混合物在微波反应器中在Ar下于110°C加热30分钟。反应混合物用EA/盐水处理。将有机相浓缩,然后经历硅胶快速柱色谱,得到22.4mg呈黄色固体的[5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺(11)(产率:55.3%;纯度>95%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 计算:405(M+1)。

[0582] 实施例 4 :N-(2,6-二氟苯基)[5-(6-甲基苯并噻唑-5-基)(2-噻吩基)]甲酰胺(15)的制备:

[0583]

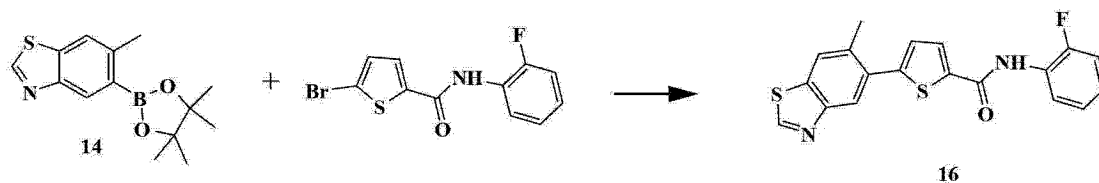


[0584] 5-溴-6-甲基苯并噻唑(13)的制备:将2-氨基-5-溴-6-甲基噻唑(12)(460mg, 1.89mmol)和亚硝酸叔丁酯(336 μ l, 1.5当量)在10mlDMF中的溶液在50°C下加热4小时。冷却至室温后,用EA稀释反应混合物,用1N NaOH、盐水洗涤。有机相用硫酸钠干燥,浓缩,并经历硅胶快速柱色谱(0-30%B, A:己烷;B:含50%EA的己烷),得到呈橙色固体的5-溴-6-甲基苯并噻唑(13)(197mg,产率:45.7%,纯度>95%)。

[0585] 6-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑(14)的制备:将5-溴-6-甲基噻唑(13, 114mg, 0.5mmol)、双(频哪醇)二硼(152mg, 0.6mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯(II)二氯甲烷络合物(1:1)(49mg)和醋酸钾(98mg, 1mmol)在3ml二氧杂环己烷中的混合物在Ar下于90°C加热16小时。用EA/盐水处理后,有机相用硫酸钠干燥,浓缩,并进行硅胶快速柱纯化,得到100.8mg呈白色固体的6-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑(14)(产率:73.3%;纯度>90%)。

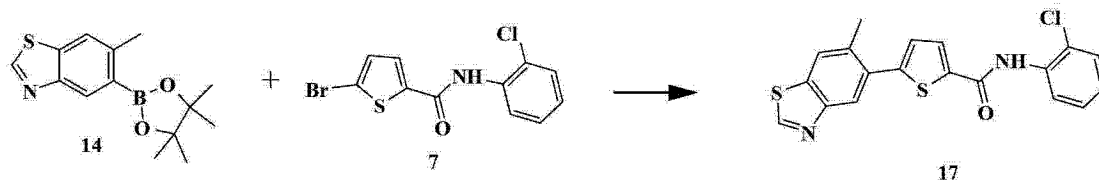
[0586] N-(2,6-二氟苯基)[5-(6-甲基苯并噻唑-5-基)(2-噻吩基)]甲酰胺(15)的制备:将(5-溴(2-噻吩基))-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺(22mg, 0.07mmol)、6-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑(14)(19mg, 0.07mmol)、四(三苯基膦)-钯(0)(Pd(Ph₃P)₄, 8mg)和碳酸钠(22mg)在0.5mlDME、0.5mlEtOH和0.25ml水中的混合物在微波反应器中在Ar下于110°C加热30分钟。反应混合物用EA/盐水处理。将有机相浓缩,然后经历制备型HPLC色谱,得到22.8mg呈白色固体的N-(2,6-二氟苯基)[5-(6-甲基苯并噻唑-5-基)(2-噻吩基)]甲酰胺(15)(产率:84.3%;纯度>95%)。LC-MS:针对C₁₉H₁₂F₂N₂O₂计算:387(M+1)。

[0587]



[0588] 实施例 5 :N-(2-氟苯基)[5-(6-甲基苯并噻唑-5-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (16) 的制备:将 (5-溴(2-噻吩基)-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (9, 21mg, 0.07mmol)、6-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑 (14) (19mg, 0.07mmol)、四(三苯基膦)-钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 8mg) 和碳酸钠 (22mg) 在 0.5mlDME、0.5mlEtOH 和 0.25ml 水中的混合物在微波反应器中在 Ar 下于 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩,然后经历制备型 HPLC 色谱,得到 23.4mg 呈黄色固体的 N-(2-氟苯基)[5-(6-甲基苯并噻唑-5-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (16) (产率:90.7%; 纯度 >95%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{OS}_2$ 计算:369(M+1)。

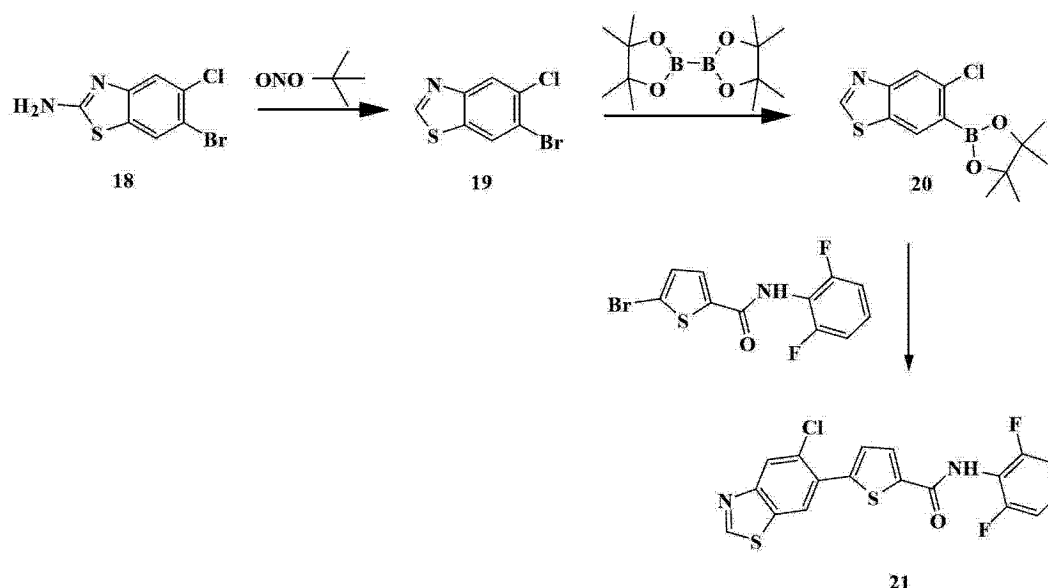
[0589]



[0590] 实施例 6 :N-(2-氯苯基)[5-(6-甲基苯并噻唑-5-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (17) 的制备:将 (5-溴(2-噻吩基)-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (7, 21mg, 0.07mmol)、6-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑 (14) (19mg, 0.07mmol)、四(三苯基膦)-钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 8mg) 和碳酸钠 (22mg) 在 0.5mlDME、0.5mlEtOH 和 0.25ml 水中的混合物于微波反应器中在 Ar 下于 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩,然后经历制备型 HPLC 色谱,得到 22.6mg 呈黄色固体的 N-(2-氯苯基)[5-(6-甲基苯并噻唑-5-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (17) (产率:83.9%; 纯度 >95%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}_2$ 计算:385(M+1)。

[0591] 实施例 7 :N-(2,6-二氟苯基)[5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (21) 的制备:

[0592]

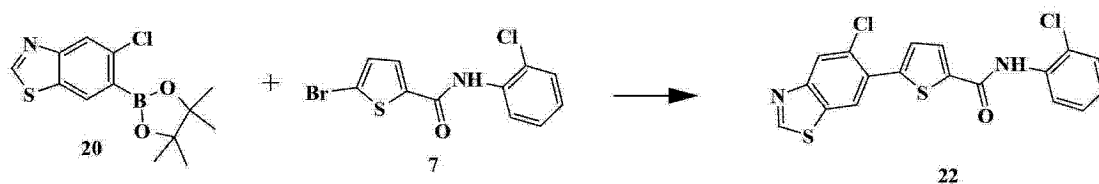


[0593] 6-溴-5-氯苯并噻唑 (19) 的制备：将 2-氨基-6-溴-5-氯噻唑 (18) (210mg, 0.8mmol) 和亚硝酸叔丁酯 (285 μ l, 3 当量) 在 5ml DMF 中的溶液在 50° C 下加热 4 小时。冷却至室温后, 将反应混合物用 EA 稀释, 用 1N NaOH、饱和 NaCO₃ 而后用盐水进行洗涤。有机相用硫酸钠干燥, 浓缩, 并经历硅胶快速柱色谱 (0-30%B, A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到呈浅黄色固体的 6-溴-5-氯苯并噻唑 (19) (113mg, 产率: 56.8%, 纯度 >95%)。

[0594] 5-氯-6-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑 (20) 的制备：将 6-溴-5-氯苯并噻唑 (19, 113mg, 0.455mmol)、双(频哪醇)二硼 (138mg, 1.2 当量)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯 (II) 二氯甲烷络合物 (1:1) (37mg) 和醋酸钾 (89mg, 2 当量) 在 5ml 二氧杂环己烷中的混合物在 Ar 下于 90° C 加热 16 小时。EA/ 盐水处理后, 有机相用硫酸钠干燥, 浓缩, 并经历硅胶快速柱纯化 (0-40%B, A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 88.4mg 呈灰白色固体的 5-氯-6-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑 (20) (产率: 66.1%; 纯度 >90%)。

[0595] N-(2,6-二氟苯基)[5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (21) 的制备：将 (5-溴(2-噻吩基)-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺 (19mg, 0.06mmol)、5-氯-6-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑 (20) (17mg, 0.06mmol)、四(三苯基膦)-钯 (0) (Pd(Ph₃P)₄, 7mg) 和碳酸钠 (19mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110° C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 然后经历硅胶快速色谱 (0-80%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 17.8mg 呈白色固体的 N-(2,6-二氟苯基)[5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (21) (产率: 72.9%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 C₁₈H₉F₂ClN₂OS₂ 计算: 407 (M+1)。

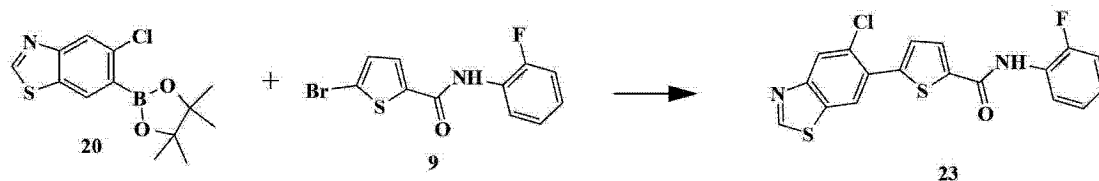
[0596]



[0597] 实施例 8: N-(2-氯苯基)[5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (22) 的制备：将 (5-溴(2-噻吩基)-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (7, 19mg, 0.06mmol)、

5-氯-6-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑(20)(17mg, 0.06mmol)、四(三苯基膦)-钯(0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 7mg) 和碳酸钠(19mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 然后经历硅胶快速色谱 (0-60%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 16.4mg 呈灰白色固体的 N-(2-氯苯基)[5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(2-噻吩基)] 甲酰胺 (22) (产率 67.4%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 计算: 406 (M+1)。

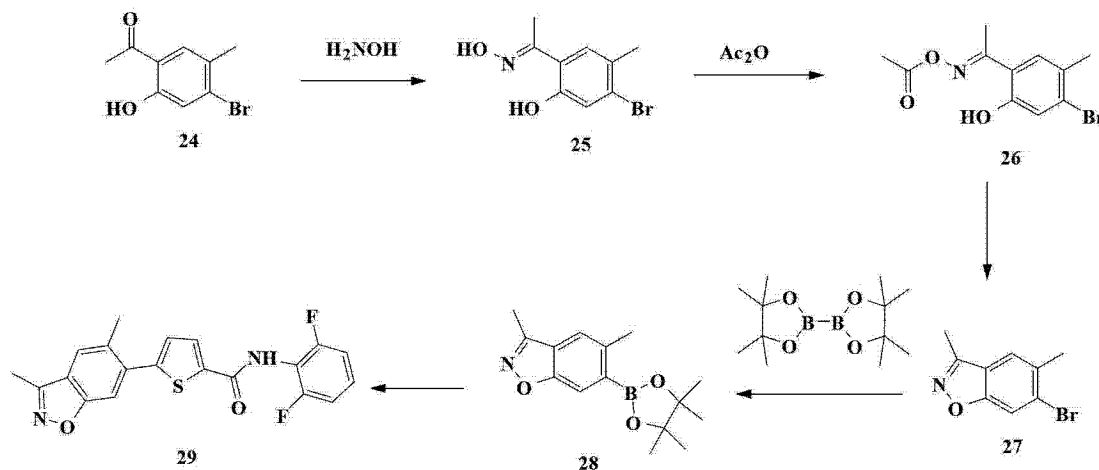
[0598]



[0599] 实施例 9: [5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氟苯基) 甲酰胺 (23) 的制备: 将 (5-溴-2-(2-噻吩基)-N-(2-氟苯基) 甲酰胺 (9, 18mg, 0.06mmol)、5-氯-6-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基))苯并噻唑 (20) (17mg, 0.06mmol)、四(三苯基膦)-钯(0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 7mg) 和碳酸钠(19mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 然后经历硅胶快速色谱 (0-60%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 16.7mg 呈白色固体的 [5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氟苯基) 甲酰胺 (23) (产率: 71.6%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{FClN}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 计算: 389 (M+1)。

[0600] 实施例 10: N-(2,6-二氟苯基)[5-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)(2-噻吩基)] 甲酰胺 (29) 的制备:

[0601]



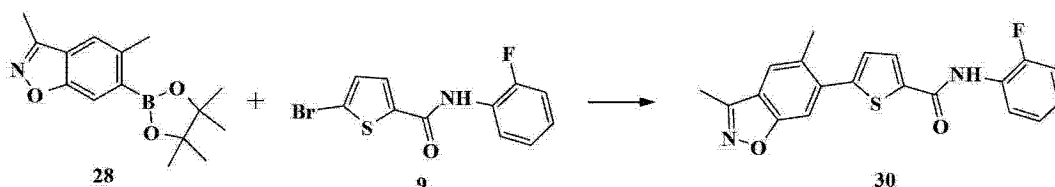
[0602] 6-溴-3,5-二甲基苯并[d]异噁唑 (27) 的制备: 将盐酸羟胺 (400mg, 58mmol) 在 1ml 水中的溶液加入到 NaOAc 在 1ml 水中的溶液中。向得到的溶液中加入 1-乙酰基-4-溴-2-羟基-5-甲基苯 (24) (1.14g, 5mmol), 随后加入 15ml EtOH。将反应混合物在 80°C 下搅拌 1 小时。浓缩至其体积的一半之后, 将反应混合物倒入 60ml 冰水中。将形成的沉淀过滤, 用水洗涤并干燥, 得到 1.19g 呈白色固体的 5-溴-2-((羟基亚氨基)乙基)-4-甲基苯酚 (25) (产率: 97.5%; 纯度 >95%)。将上述中间体 25 (1.19g, 4.875mmol) 溶解在 10ml Ac_2O 中, 在室温下搅拌 2 小时, 反应混合物变为白色悬液。过滤并用水洗涤后得到

1.0g 2-(4-溴-2-羟基-5-甲基苯基)-1-氮丙-1-烯基醋酸酯 (26)。将 EA 加入滤液中,用水洗涤。有机相用硫酸钠干燥并浓缩至干,得到另外 370mg 灰白色固体 26。(总共 1.37g,产率:98%,纯度>95%)。将纯净的 2-(4-溴-2-羟基-5-甲基苯基)-1-氮丙-1-烯基醋酸酯 (26) (0.5g, 1.748mmol) 在 175°C 下加热 2 小时,之后在 100°C 下加热 1 小时。冷却至室温后,将深棕色固体溶解在 DCM 中,并经历硅胶快速色谱 (0-40%B, A:己烷;B:含 50%EA 的己烷),得到黄色晶体 6-溴-3,5-二甲基苯并[d]异噁唑 (27) (92mg, 产率:23.3%;纯度>95%)。

[0603] 2-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (28) 的制备:将 6-溴-3,5-二甲基苯并[d]异噁唑 (27, 45mg, 0.2mmol)、双(频哪醇)二硼 (60mg, 1.2 当量)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯(II)二氯甲烷络合物 (1:1) (20mg) 和醋酸钾 (40mg, 2 当量) 在 2ml 二氧杂环己烷中的混合物在 Ar 下 90°C 加热过夜。EA/盐水处理后,有机相用硫酸钠干燥,浓缩,并经硅胶快速柱纯化 (0-40%B, A:己烷;B:含 50%EA 的己烷),得到 40mg 呈灰白色固体的 2-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (28) (产率:73.6%;纯度>95%)。

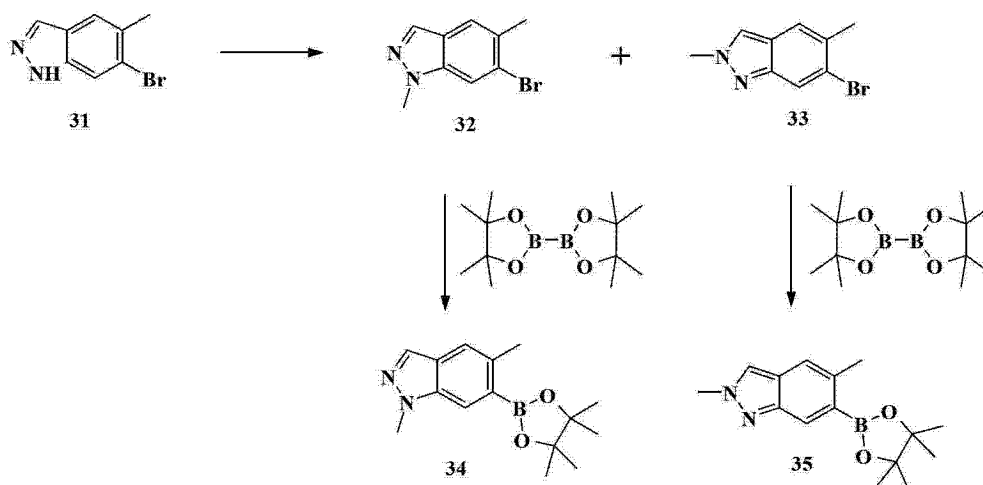
[0604] N-(2,6-二氟苯基)[5-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (29) 的制备:将 (5-溴(2-噻吩基)-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺 (23mg, 0.073mmol)、2-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (28) (20mg, 0.073mmol)、四(三苯基膦)-钯(0) (Pd(Ph₃P)₄, 8mg) 和碳酸钠 (29mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/盐水处理。将有机相浓缩,然后经历硅胶快速色谱 (0-80%B; A:己烷;B:含 50%EA 的己烷),得到 24.9mg 呈白色固体的 N-(2,6-二氟苯基)[5-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (29) (产率:88.7%;纯度>95%)。LC-MS:针对 C₂₀H₁₄F₂N₂O₂S 计算:385(M+1)。

[0605]



[0606] 实施例 11:[5-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (30) 的制备:将 (5-溴(2-噻吩基)-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (22mg, 0.073mmol)、2-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (28) (20mg, 0.073mmol)、四(三苯基膦)-钯(0) (Pd(Ph₃P)₄, 8mg) 和碳酸钠 (29mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/盐水处理。将有机相浓缩,然后经历硅胶快速色谱 (0-80%B; A:己烷;B:含 50%EA 的己烷),得到 22.4mg 呈浅黄色固体的 [5-(3,5-二甲基苯并[d]异噁唑-6-基)(2-噻吩基)]-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (30) (产率:83.7%;纯度>95%)。LC-MS:针对 C₂₀H₁₅FN₂O₂S 计算:367(M+1)。

[0607]

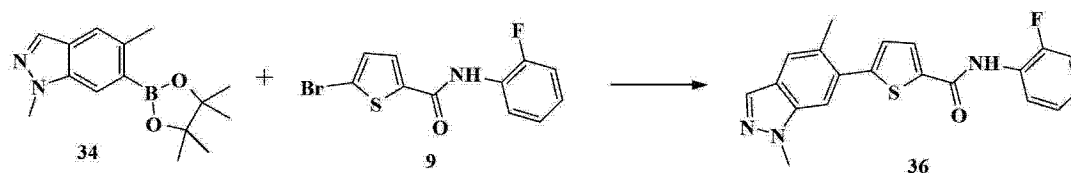


[0608] 6-溴-1,5-二甲基-1H-吡唑 (32) 和 6-溴-2,5-二甲基-2H-吡唑 (33) 的制备：向 6-溴-5-甲基-1H-吡唑 (31, 211mg, 1mmol) 在 5ml 干 THF 中的溶液中小心地加入氢氧化钠 (200mg, 60%)。在室温下搅拌该悬液 2 小时，而后加入碘甲烷 ($93 \mu\text{l}$, 1.5 当量)。在室温下搅拌 3h 后，反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相用硫酸钠干燥，浓缩，然后经历硅胶柱色谱 (0-50%-100%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷)，得到 101.4mg 呈白色固体的 6-溴-1,5-二甲基-1H-吡唑 (32) (产率: 45.0%; 纯度 >95%) 和 99.9mg 呈白色固体的 6-溴-2,5-二甲基-2H-吡唑 (33) (产率: 44.4%; 纯度 >95%)。

[0609] 2-(1,5-二甲基(1H-吡唑-6-基))-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (34) 的制备：将 6-溴-1,5-二甲基-1H-吡唑 (32, 98mg, 0.44mmol)、双(频哪醇)二硼 (132mg, 1.2 当量)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯 (II) 二氯甲烷络合物 (1:1) (40mg) 和醋酸钾 (80mg, 2 当量) 在 4ml 二氧杂环己烷中的混合物在 Ar 下于 90°C 加热过夜。EA/ 盐水处理后，有机相用硫酸钠干燥，浓缩，并经历硅胶快速柱纯化 (0-70%B, A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷)，得到 100mg 呈白色固体的 2-(1,5-二甲基(1H-吡唑-6-基))-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (34) (产率: 83.5%; 纯度 >90%)。

[0610] 2-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基))-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (35) 的制备：将 6-溴-2,5-二甲基-2H-吡唑 (33, 95mg, 0.42mmol)、双(频哪醇)二硼 (130mg, 1.2 当量)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯 (II) 二氯甲烷络合物 (1:1) (40mg) 和醋酸钾 (80mg, 2 当量) 在 4ml 二氧杂环己烷中的混合物在 Ar 下于 90°C 加热过夜。EA/ 盐水处理后，有机相用硫酸钠干燥，浓缩，并经历硅胶快速柱纯化 (0-80%B, A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷)，得到 112mg 呈灰白色固体的 2-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基))-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (35) (产率: 97.9%; 纯度 90%)。

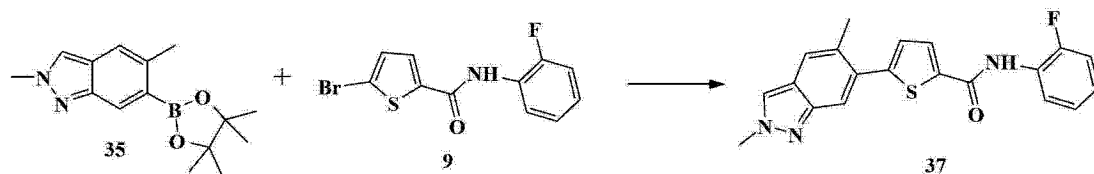
[0611]



[0612] 实施例 12: [5-(1,5-二甲基(1H-吡唑-6-基))(2-噻吩基)]-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (36) 的制备：将 5-溴(2-噻吩基)-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (24mg, 0.08mmol)、2-(1,5-二甲基(1H-吡唑-6-基))-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (34) (20mg, 0.08mmol)、

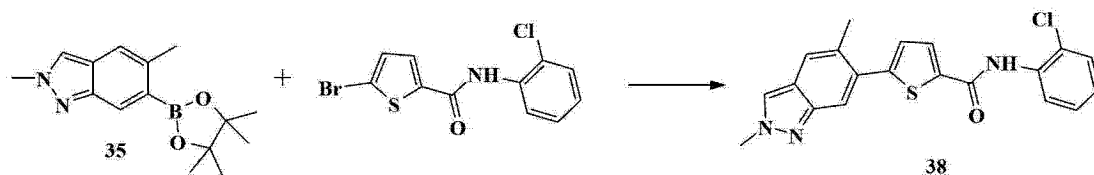
四(三苯基膦)-钯(0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg) 和碳酸钠 (32mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 然后经历硅胶快速色谱 (0-70%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 28.5mg 呈白色固体的 [5-(1,5-二甲基(2H-吡唑-6-基)(2-噻吩基))-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (36) (产率: 97.5%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{OS}$ 计算: 366(M+1)。

[0613]



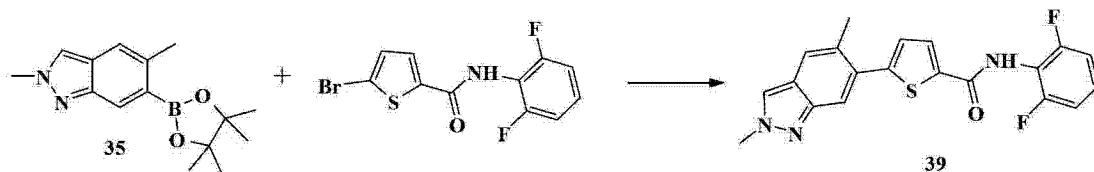
[0614] 实施例 13: [5-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基)(2-噻吩基))-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (37) 的制备: 将 (5-溴(2-噻吩基))-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (24mg, 0.08mmol)、2-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基))-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (35) (22mg, 0.08mmol)、四(三苯基膦)-钯(0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg) 和碳酸钠 (32mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 然后经历硅胶快速色谱 (0-80%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 22.4mg 呈灰白色固体的 [5-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基)(2-噻吩基))-N-(2-氟苯基)甲酰胺 (37) (产率: 76.7%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{OS}$ 计算: 366(M+1)。

[0615]



[0616] 实施例 14: [5-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基)(2-噻吩基))-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (38) 的制备: 将 (5-溴(2-噻吩基))-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (25mg, 0.08mmol)、2-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基))-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (35) (22mg, 0.08mmol)、四(三苯基膦)-钯(0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg) 和碳酸钠 (32mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 然后经历硅胶快速色谱 (0-80%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 21mg 呈黄色固体的 [5-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基)(2-噻吩基))-N-(2-氯苯基)甲酰胺 (38) (产率: 68.7%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{OS}$ 计算: 382(M+1)。

[0617]

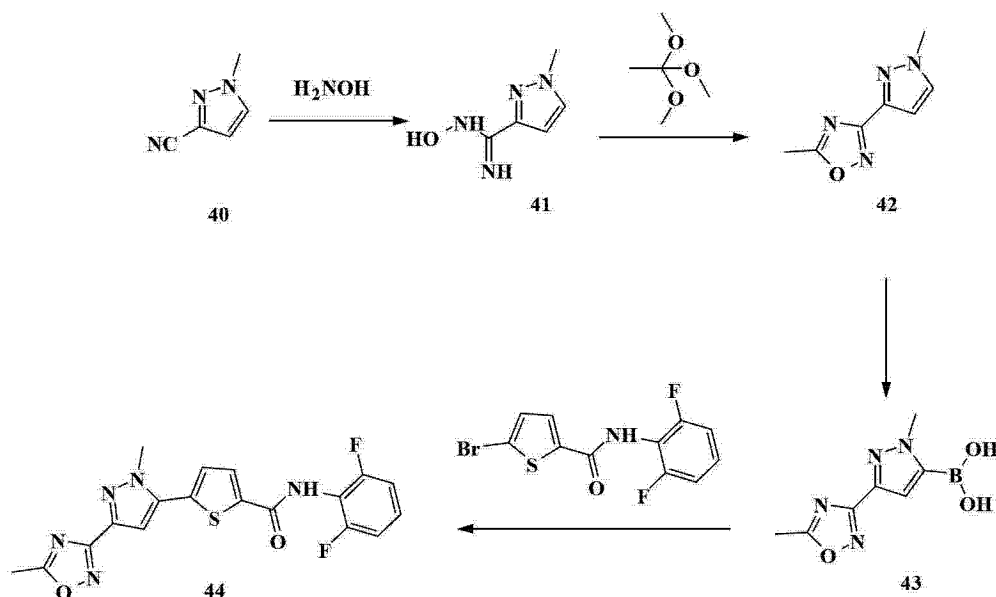


[0618] 实施例 15: [5-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基)(2-噻吩基))-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺 (39) 的制备: 将 (5-溴(2-噻吩基))-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺 (26mg, 0.08mmol)、2-(2,5-二甲基(2H-吡唑-6-基))-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (35)

(22mg, 0.08mmol)、四(三苯基膦)-钯(0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg) 和碳酸钠 (32mg) 在 0.5ml DME、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 然后经历硅胶快速色谱 (0-100%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 21.4mg 呈黄色固体的 [5-(2, 5-二甲基 (2H-吡唑-6-基) (2-噻吩基))-N-(2, 6-二氟苯基) 甲酰胺 (39) (产率: 69.8%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{OS}$ 计算: 384(M+1)。

[0619] 实施例 16 : N-(2, 6-二氟苯基) {5-[1-甲基-3-(5-甲基 (1, 2, 4-噁二唑-3-基)) 吡唑-5-基] (2-噻吩基)} 甲酰胺 (44) 的制备:

[0620]

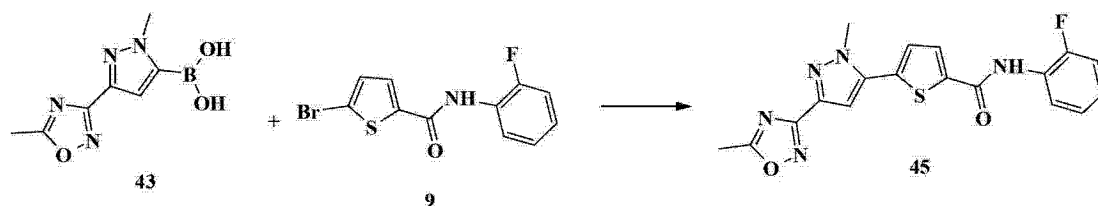


[0621] 5-甲基-3-(1-甲基吡唑-3-基)-1,2,4-噁二唑 (42) 的制备: 向盐酸羟胺 (351mg, 5.05mmol) 在 4ml EtOH 中的悬液中加入 1.86ml 含 21%wt 乙醇钠的乙醇。将得到的混合物在室温下搅拌 10 分钟, 之后加入 3-氰基-1-甲基吡唑 (40) (535mg, 5mmol)。将得到的悬液在 90°C 下加热过夜。冷却后, 将反应混合物用 EA 稀释, 之后用盐水洗涤。将有机相浓缩至干, 得到 506mg 粗中间体 41。将上述粗中间体 41、三氟甲磺酸铯 (III) 盐 (22mg, 1%mol) 和原乙酸三甲酯 (550 μl , 1.2 当量) 在 5ml EtOH 中的混合物在 85°C 下加热 2 小时。冷却至室温后, 形成细针状物。过滤并用 MeOH 洗涤后, 回收 166mg 呈淡黄色针状物的中间体 41。将滤液浓缩, 使用 0-100%B (A: 己烷; B: EA) 进行硅胶柱纯化, 得到 230mg 呈白色固体的 5-甲基-3-(1-甲基吡唑-3-基)-1,2,4-噁二唑 (42)。

[0622] [1-甲基-3-(5-甲基-1,2,4-噁二唑-3-基)] 吡唑-5-基-硼酸 (43) 的制备: 将正丁基锂 (1.12ml, 2.5M, 在己烷中) 在己烷中的溶液在 -70°C 下滴加到 5-甲基-3-(1-甲基吡唑-3-基)-1,2,4-噁二唑 (42) (230mg, 1.4mmol) 在 7ml 干 THF 中的冷溶液中。将反应混合物在相同温度下搅拌 3h, 之后加入硼酸三甲酯 (468 μl , 3 当量)。使混合物慢慢升至室温, 并在室温下搅拌过夜。用 15ml 1N HCl 将反应猝灭。在室温下搅拌 2 小时后, 加入 EA, 而后用盐水洗涤。有机相用 1N NaOH 进行萃取。水相用 HCl 酸化至 pH=2, 之后用 EA 进行萃取。EA 相用盐水洗涤, 用硫酸钠干燥并浓缩至干, 得到 374mg 呈黄色固体的 [1-甲基-3-(5-甲基-1,2,4-噁二唑-3-基)] 吡唑-5-基-硼酸 (43)。

[0623] N-(2,6-二氟苯基){5-[1-甲基-3-(5-甲基(1,2,4-噁二唑-3-基))吡唑-5-基](2-噻吩基)}甲酰胺(44)的制备:将(5-溴(2-噻吩基)-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺(32mg, 0.1mmol)、[1-甲基-3-(5-甲基-1,2,4-噁二唑-3-基)]吡唑-5-基-硼酸(43)(31mg, 0.15mmol)、四(三苯基膦)-钯(0)($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 18mg)和碳酸钠(33mg)在0.5mlDME、0.5mlEtOH和0.25ml水中的混合物在Ar下于微波反应器中110°C加热30分钟。反应混合物用EA/盐水处理。将有机相浓缩,然后经历硅胶快速色谱(0-100%B;A:己烷;B:含50%EA的己烷),得到14.6mg呈灰白色固体的N-(2,6-二氟苯基){5-[1-甲基-3-(5-甲基(1,2,4-噁二唑-3-基))吡唑-5-基](2-噻吩基)}甲酰胺(44)(产率:36.4%;纯度>95%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ 计算:402(M+1)。

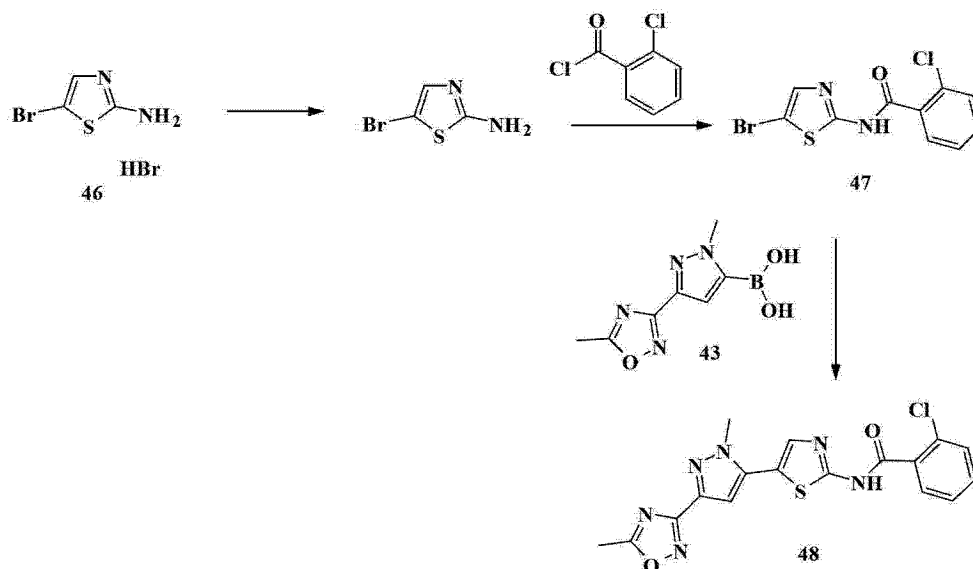
[0624]



[0625] 实施例 17:N-(2-氟苯基){5-[1-甲基-3-(5-甲基(1,2,4-噁二唑-3-基))吡唑-5-基](2-噻吩基)}甲酰胺(45)的制备:将(5-溴(2-噻吩基)-N-(2-氟苯基)甲酰胺(15mg, 0.05mmol)、[1-甲基-3-(5-甲基-1,2,4-噁二唑-3-基)]吡唑-5-基-硼酸(43)(21mg, 0.1mmol)、四(三苯基膦)-钯(0)($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg)和碳酸钠(22mg)在0.5mlDME、0.5mlEtOH和0.25ml水中的混合物在Ar下于微波反应器中110°C加热30分钟。反应混合物用EA/盐水处理。将有机相浓缩,然后经历制备型HPLC纯化,得到42mg产物,将其在笔状硅胶柱上使用含50%EA的己烷进行再纯化,得到2.8mg呈白色固体的N-(2-氟苯基){5-[1-甲基-3-(5-甲基(1,2,4-噁二唑-3-基))吡唑-5-基](2-噻吩基)}甲酰胺(45)(产率:7.3%;纯度>95%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}$ 计算:384(M+1)。

[0626] 实施例 18:(2-氯苯基)-N-{5-[1-甲基-3-(5-甲基(1,2,4-噁二唑-3-基))吡唑-5-基](1,3-噻唑-2-基)}甲酰胺(48)的制备:

[0627]

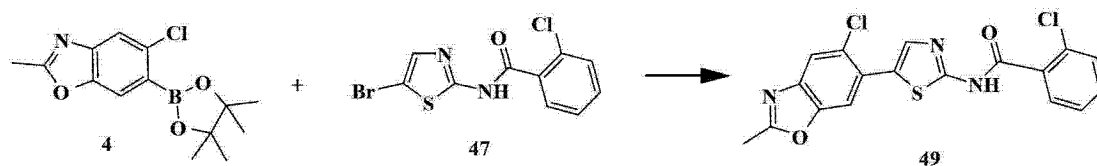


[0628] N-(5-溴(1,3-噻唑-2-基))(2-氯苯基)甲酰胺(47)的制备:将2-氨基-5-溴

噻唑氢溴酸盐 (46, 2.6g, 10mmol) 在 100mlEA 中的混合物与 NaCO_3 水溶液一起摇动。有机相用硫酸钠干燥并浓缩, 得到游离的氨基溴噻唑, 将其溶解在 25mlDCM 中。向得到的溶液中加入 2-氯苯甲酰氯 (1.52ml, 12mmol)、DIEA (5.2ml, 3 当量) 和 DMAP (10mg)。在室温下搅拌过夜之后, 用 DCM/ NaCO_3 水溶液处理反应混合物, 将 DCM 相浓缩至干。将固体残留物溶解在 20mlTHF/MeOH/ H_2O (5:4:1) 中。加入 10ml1N NaOH, 并将混合物在室温下搅拌 4 小时, 之后用 DCM/ NaCO_3 水溶液处理。将 DCM 相浓缩并经过硅胶柱, 得到 1.165g 呈黄色固体的 N-(5-溴 (1,3-噻唑-2-基)) (2-氯苯基) 甲酰胺 (47) (产率: 36.9%; 纯度 >95%)。

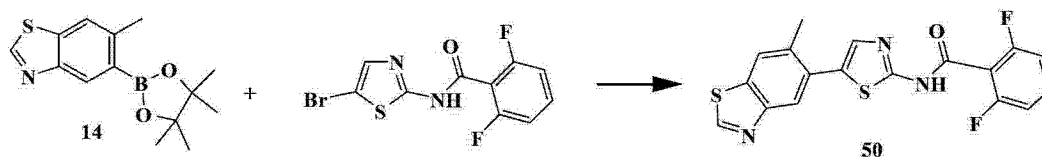
[0629] (2-氯苯基)-N-{5-[1-甲基-3-(5-甲基 (1,2,4-噁二唑-3-基)) 吡唑-5-基] (1,3-噻唑-2-基)} 甲酰胺 (48) 的制备: 将 N-(5-溴 (1,3-噻唑-2-基)) (2-氯苯基) 甲酰胺 (47, 32mg, 0.1mmol)、[1-甲基-3-(5-甲基-1,2,4-噁二唑-3-基)] 吡唑-5-基-硼酸 (43) (31mg, 0.15mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯 (II) 二氯甲烷络合物 (1:1) (12mg) 和磷酸钾 (32mg) 在 1mlDMF 和 0.2ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 150°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理, 将有机相浓缩, 而后经历制备型 HPLC 纯化, 得到 5.8mg 呈浅棕色固体的 (2-氯苯基)-N-{5-[1-甲基-3-(5-甲基 (1,2,4-噁二唑-3-基)) 吡唑-5-基] (1,3-噻唑-2-基)} 甲酰胺 (48) (产率: 14.5%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{S}$ 计算: 401(M+1)。

[0630]



[0631] 实施例 19: N-[5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基) (1,3-噻唑-2-基)] (2-氯苯基) 甲酰胺 (49) 的制备: 将 N-(5-溴 (1,3-噻唑-2-基)) (2-氯苯基) 甲酰胺 (47, 25mg, 0.08mmol)、2-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (4) (29mg, 0.1mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯 (II) 二氯甲烷络合物 (1:1) (12mg) 和磷酸钾 (21mg) 在 1mlDMF 和 0.2ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 150°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理, 将有机相浓缩, 而后经历制备型 HPLC 纯化, 得到 3.1mg 呈淡棕色固体的 N-[5-(5-氯-2-甲基苯并噁唑-6-基) (1,3-噻唑-2-基)] (2-氯苯基) 甲酰胺 (49) (产率: 9.6%; 纯度 >90%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 计算: 405(M+1)。

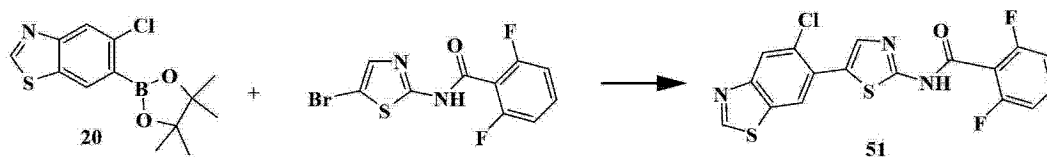
[0632]



[0633] 实施例 20: (2,6-二氟苯基)-N-[5-(6-甲基苯并噁唑-5-基) (1,3-噻唑-2-基)] 甲酰胺 (50) 的制备: 将 N-(5-溴 (1,3-噻唑-2-基)) (2,6-二氟苯基) 甲酰胺 (31mg, 0.1mmol)、6-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基 (1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)) 苯并噁唑 (14) (27mg, 0.1mmol)、四(三苯基膦)-钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg) 和碳酸钠 (32mg) 在 0.5mlDMF、0.5mlEtOH 和 0.2ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。

反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 然后经历制备型 HPLC 纯化, 得到 4.6mg 呈淡棕色固体的 (2,6-二氟苯基)-N-[5-(6-甲基苯并噻唑-5-基)(1,3-噻唑-2-基)] 甲酰胺 (50) (产率: 11.9%; 纯度 >90%)。LC-MS: 针对 $C_{18}H_{11}F_2N_3OS_2$ 计算: 388(M+1)。

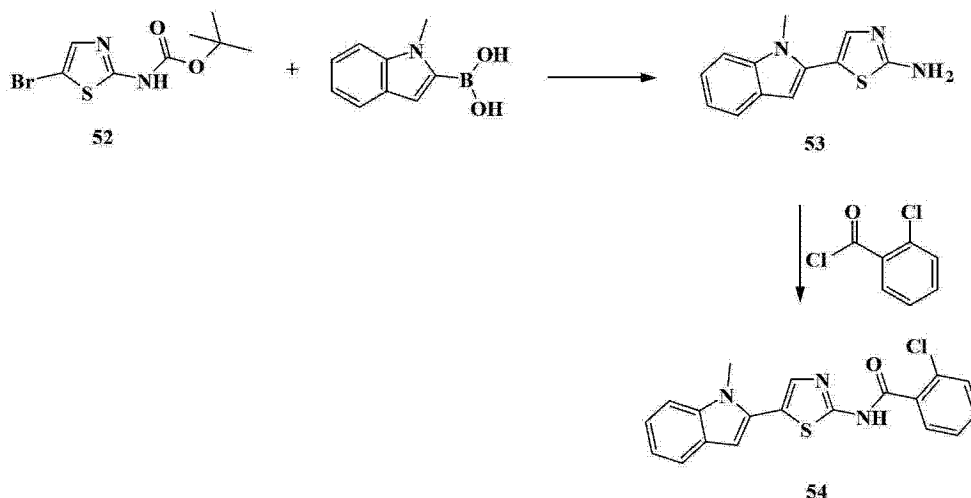
[0634]



[0635] 实施例 21: (2,6-二氟苯基)-N-[5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(1,3-噻唑-2-基)] 甲酰胺 (51) 的制备: 将 N-(5-溴(1,3-噻唑-2-基))(2,6-二氟苯基) 甲酰胺 (38mg, 0.12mmol)、5-氯-6-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)) 苯并噻唑 (20) (34mg, 0.12mmol)、四(三苯基膦)-钯 (0) ($Pd(PPh_3)_4$, 14mg) 和碳酸钠 (38mg) 在 1.0ml DMF、0.5ml EtOH 和 0.25ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 $110^\circ C$ 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 而后经历制备型 HPLC 纯化, 得到 7.1mg 呈淡棕色固体的 (2,6-二氟苯基)-N-[5-(5-氯苯并噻唑-6-基)(1,3-噻唑-2-基)] 甲酰胺 (51) (产率: 14.5%; 纯度 >95%)。LC-MS: 针对 $C_{17}H_8ClF_2N_3OS_2$ 计算: 408(M+1)。

[0636] 实施例 22: (2-氯苯基)-N-[5-(1-甲基吡咯-2-基)(1,3-噻唑-2-基)] 甲酰胺 (54) 的制备:

[0637]

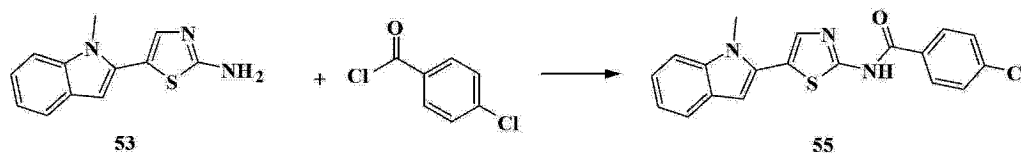


[0638] 5-(1-甲基吡咯-2-基)-1,3-噻唑-2-基胺 (53) 的制备: 将 (叔丁氧基)-N-(5-溴(1,3-噻唑-2-基)) 甲酰胺 (52, 140mg, 0.5mmol)、1-甲基吡咯-2-基硼酸 (88mg, 0.5mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁] 氯化钯 (II) 二氯甲烷络合物 (1:1) (40mg) 和磷酸钾 (106mg) 在 2ml DMF 和 0.5ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 $150^\circ C$ 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩, 而后经历硅胶快速柱纯化 (0-100%B, A: 己烷; B: EA), 得到 21mg 呈棕色固体的 5-(1-甲基吡咯-2-基)-1,3-噻唑-2-基胺 (53) (产率: 18.3%; 纯度 >90%)。

[0639] (2-氯苯基)-N-[5-(1-甲基吡咯-2-基)(1,3-噻唑-2-基)] 甲酰胺 (54) 的制备: 向 5-(1-甲基吡咯-2-基)-1,3-噻唑-2-基胺 (53, 10mg, 0.043mmol) 在 1ml DCM 中的混合物中加入 2-氯苯甲酰氯 ($11 \mu l$, 2 当量)、DIEA ($37 \mu l$, 3 当量) 和 DMAP (2mg)。在室

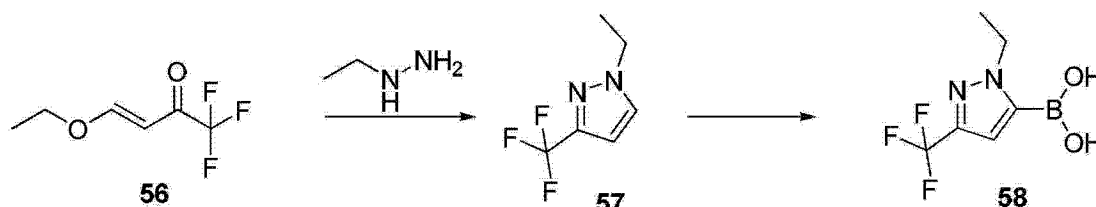
温下搅拌过夜后,反应混合物用 DCM/NaCO₃ 水溶液处理,将 DCM 相浓缩至干。将固体残留物溶解在 2ml THF/MeOH/H₂O (5:4:1) 中。加入 0.1ml 1N NaOH,并在室温下将混合物搅拌 1 小时,之后用 DCM/NaCO₃ 水溶液处理。将 DCM 相浓缩,并经历硅胶快速柱,得到 15.3mg 呈黄色固体的 (2-氯苯基)-N-[5-(1-甲基咪唑-2-基)(1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (54) (产率:97%;纯度>95%)。LC-MS:针对 C₁₈H₁₄ClN₃O₂S 计算:368 (M+1)。

[0640]



[0641] 实施例 23:(4-氯苯基)-N-[5-(1-甲基咪唑-2-基)(1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (55) 的制备:以相似的方式,从 5-(1-甲基咪唑-2-基)-1,3-噻唑-2-基胺 (53, 10mg, 0.043mmol) 开始,通过与 4-氯苯甲酰氯反应来合成 (4-氯苯基)-N-[5-(1-甲基咪唑-2-基)(1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (55) (15mg, 产率 94.8%;纯度>90%)。LC-MS:针对 C₁₈H₁₄ClN₃O₂S 计算:368 (M+1)。

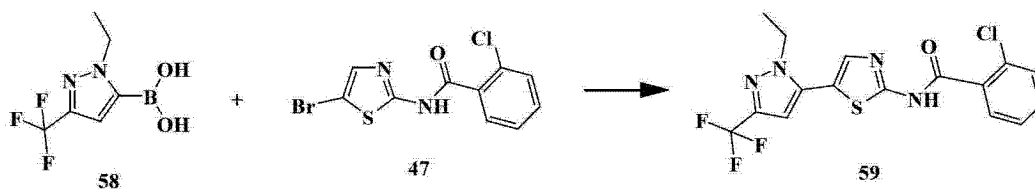
[0642]



[0643] (1-乙基-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-5-基)硼酸 (58) 的制备:在室温下向化合物 56 (100g, 0.595mol) 和甲醇 (400mL) 的混合物中加入乙基肼 (113g, 1.2mol)。将混合物回流 4 小时。将该混合物倒入水 (1L) 中,并用 DCM (600mL) 萃取。有机层用水 (3×400mL)、盐水洗涤,用 Na₂SO₄ 干燥,浓缩。蒸馏残留物,得到淡黄色液体化合物 57 (35g, 35.8%)。

[0644] 在 -78° C 下向化合物 57 (35g, 0.21mol) 在干 THF (400mL) 中的溶液中加入 n-BuLi (256mL, 0.64mol, 2.5M)。将混合物在 78° C 下搅拌 20 分钟后加入硼酸三异丙酯 (79g, 0.42mol)。将反应化合物在室温下搅拌过夜。用 1M HCl 将混合物调节至 pH=5。用 EtOAc (500mL) 和水 (500mL) 分离混合物。用 EtOAc (3×500mL) 萃取水层。合并有机相并用盐水洗涤,浓缩为呈黄色油状物的 58 (25g, 57%)。

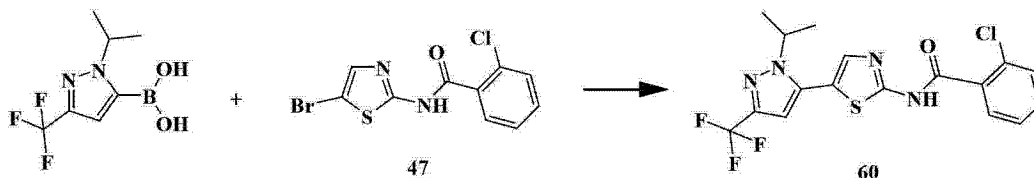
[0645]



[0646] 实施例 24:(2-氯苯基)-N-[5-[1-乙基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (59) 的制备:将 N-(5-溴(1,3-噻唑-2-基))(2-氯苯基)甲酰胺 (47, 62mg, 0.2mmol)、(1-乙基-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-5-基)硼酸 (58) (62mg, 0.3mmol)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]氯化钯 (II) 二氯甲烷络合物 (1:1) (24mg) 和磷酸钾 (63mg) 在 2ml DMA 和 0.5ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 150° C

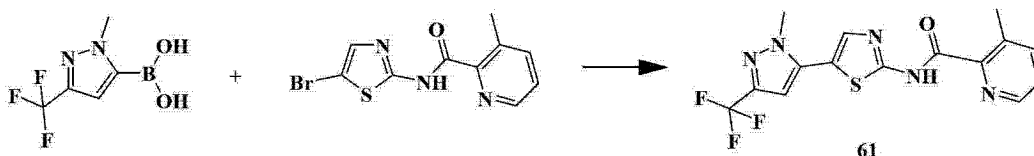
加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理。将有机相浓缩,而后经历制备型 HPLC 纯化,得到 11.5mg 呈深棕色固体的 (2- 氯苯基)-N-{5-[1- 乙基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3- 噻唑-2-基)} 甲酰胺 (59) (产率:14%;纯度>90%)。LC-MS:针对 $C_{16}H_{12}ClF_3N_4OS$ 计算:401(M+1)。

[0647]



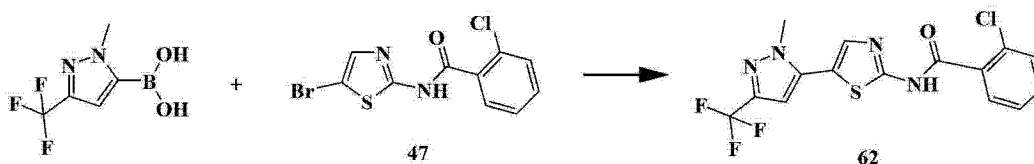
[0648] 实施例 25:(2- 氯苯基)-N-{5-[1-(甲基乙基)-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3- 噻唑-2-基)} 甲酰胺 (60) 的制备:以相似的方式,通过与 (1-(甲基乙基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑-5-基) 硼酸 (66mg, 0.3mmol) 偶联由 N-(5- 溴 (1,3- 噻唑-2-基)) (2- 氯苯基) 甲酰胺 (47, 62mg, 0.2mmol) 制备 (2- 氯苯基)-N-{5-[1-(甲基乙基)-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3- 噻唑-2-基)} 甲酰胺 (60) (8.1mg, 深棕色固体,产率 9.8%;纯度>95%)。LC-MS:针对 $C_{17}H_{14}ClF_3N_4OS$ 计算:415(M+1)。

[0649]



[0650] 实施例 26:(3- 甲基 (2- 吡啶基))-N-{5-[1- 甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3- 噻唑-2-基)} 甲酰胺 (61) 的制备:以相似的方式,通过与 (1- 甲基-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑-5-基) 硼酸 (34mg, 2 当量) 偶联由 N-(5- 溴 (1,3- 噻唑-2-基)) (3- 甲基 (2- 吡啶基)) 甲酰胺 (25.9mg, 0.087mmol) 制备 (3- 甲基 (2- 吡啶基))-N-{5-[1- 甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3- 噻唑-2-基)} 甲酰胺 (61) (2.3mg, 黄色固体,产率 7.2%;纯度>95%)。LC-MS:针对 $C_{15}H_{12}F_3N_5OS$ 计算:368(M+1)。

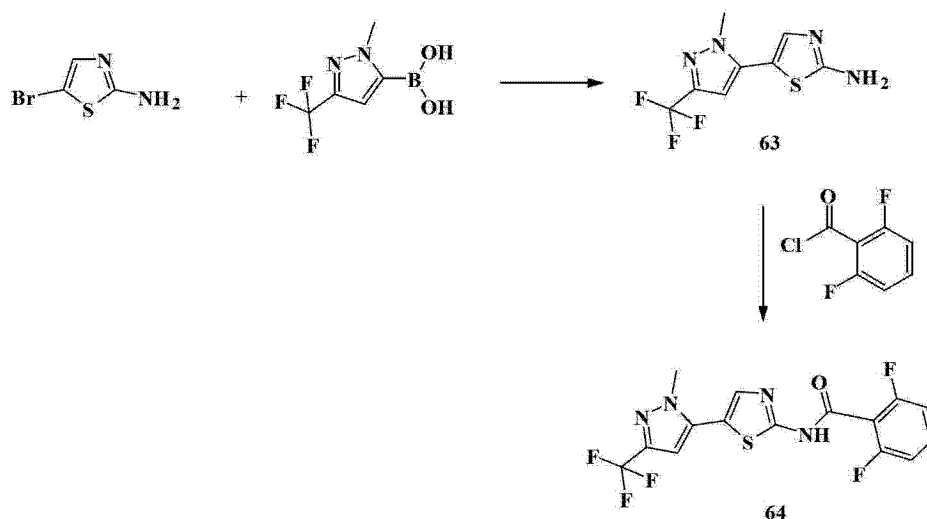
[0651]



[0652] 实施例 27:(2- 氯苯基)-N-{5-[1- 甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3- 噻唑-2-基)} 甲酰胺 (62) 的制备:以相似的方式,通过与 (1- 甲基-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑-5-基) 硼酸 (145mg, 0.75mmol) 偶联由 N-(5- 溴 (1,3- 噻唑-2-基)) (2- 氯苯基) 甲酰胺 (47, 158mg, 0.5mmol) 制备 (2- 氯苯基)-N-{5-[1- 甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3- 噻唑-2-基)} 甲酰胺 (62) (10.4mg, 白色固体,产率 5.4%;纯度>95%)。LC-MS:针对 $C_{15}H_{10}ClF_3N_4OS$ 计算:387(M+1)。

[0653] 实施例 28:(2,6- 二氟苯基)-N-{5-[1- 甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](1,3- 噻唑-2-基)} 甲酰胺 (64) 的制备:

[0654]

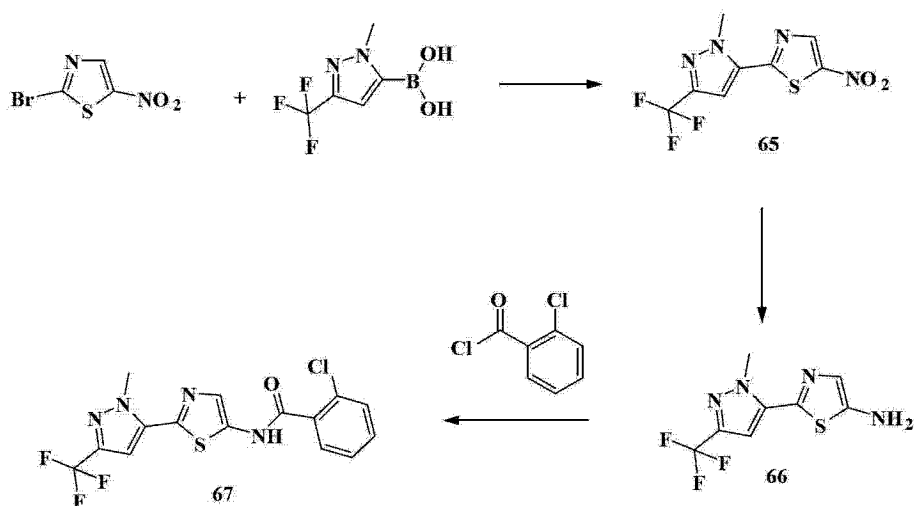


[0655] 5-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-1,3-噻唑-2-基胺 (63) 的制备：将 (1-甲基-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-5-基) 硼酸 (290mg, 1.5mmol)、2-氨基-5-溴噻唑 (1mmol)、双(二叔丁基(4-二甲基氨基苯基)膦)二氯钯(II) (A-Phos) (53mg) 和 K_3PO_4 (212mg, 1mmol) 在 2ml CAN、2ml 二氧杂环己烷、0.5ml H_2O 中的悬液用氩气鼓泡，之后在 $70^\circ C$ 下加热 1 小时。冷却至室温后，将反应混合物在 EA 中吸收，用 $NaHCO_3$ 水溶液和盐水洗涤，用 Na_2SO_4 干燥，浓缩至干。制备型 HPLC 纯化得到 4.6mg 呈淡黄色固体的 5-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-1,3-噻唑-2-基胺 (63) (产率 1.9%；纯度 >95%)。

[0656] (2,6-二氟苯基)-N-{5-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-(1,3-噻唑-2-基)} 甲酰胺 (64) 的制备：向 5-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-1,3-噻唑-2-基胺 (63, 4.6mg, 0.019mmol) 在 0.5ml DCM 中的混合物中加入 2,6-二氟苯甲酰氯 (5 μ l, 2 当量)、DIEA (17 μ l, 3 当量) 和 DMAP (2mg)。在室温下搅拌过夜后，将反应混合物用 DCM/ $NaCO_3$ 水溶液处理，将 DCM 相浓缩至干。将固体残留物溶解在 1ml THF/MeOH/ H_2O (5:4:1) 中。加入 0.1ml 1N NaOH，并将混合物在室温下搅拌 1 小时，之后用 DCM/ $NaCO_3$ 水溶液处理。将 DCM 相浓缩并经历硅胶快速柱，得到 5.6mg 呈白色固体的 (2,6-二氟苯基)-N-{5-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-(1,3-噻唑-2-基)} 甲酰胺 (64) (产率：75.9%；纯度 >95%)。LC-MS：针对 $C_{15}H_9F_5N_4OS$ 计算：389 (M+1)。

[0657] 实施例 29：(2-氯苯基)-N-{2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-(1,3-噻唑-5-基)} 甲酰胺 (67) 的制备：

[0658]



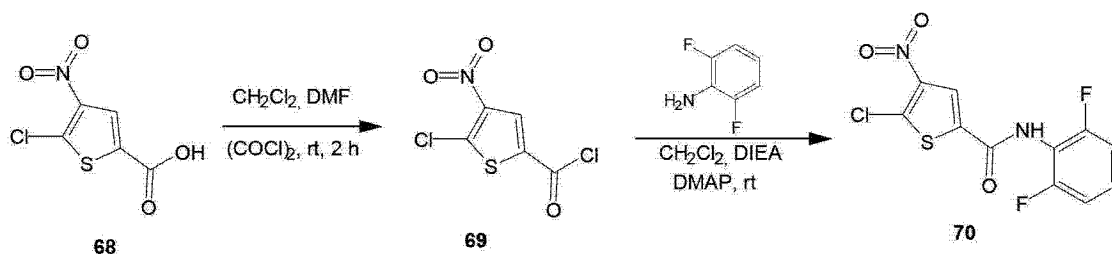
[0659] 2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-5-硝基-1,3-噻唑 (65) 的制备: 将 2-溴-5-硝基噻唑 (209mg, 1mmol)、(1-甲基-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-5-基)硼酸 (194mg, 1mmol)、四(三苯基膦)-钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 57mg) 和碳酸钠 (212mg) 在 3ml DMF、0.5ml EtOH 和 0.5ml 水中的混合物在 Ar 下于微波反应器中 110°C 加热 30 分钟。反应混合物用 EA/ 盐水处理, 将有机相浓缩, 而后经历硅胶快速色谱 (0-30%B; A: 己烷; B: 含 50%EA 的己烷), 得到 37.5mg 呈淡黄色固体的 2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-5-硝基-1,3-噻唑 (65) (产率: 13.5%; 纯度 >90%)。

[0660] 5-氨基-2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-1,3-噻唑 (66) 的制备: 将 2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-5-硝基-1,3-噻唑 (65, 350mg, 0.13mmol) 和 Pd/C 在 4ml MeOH 中的混合物在 H_2 气球下于室温搅拌 4 小时, 之后经硅藻土过滤。将滤液浓缩至干, 得到 8.1mg 呈棕色稠油状物的 5-氨基-2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-1,3-噻唑 (66), 将其直接用于下一步反应。

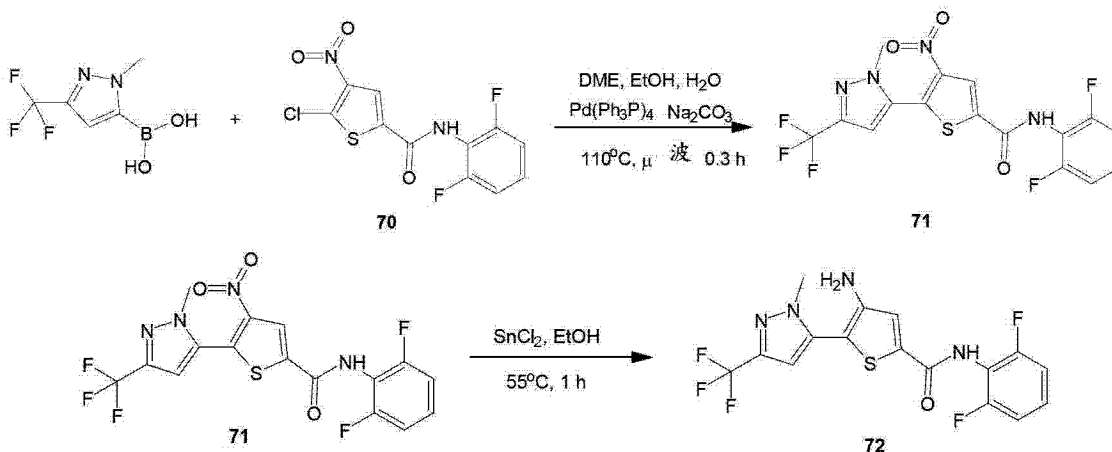
[0661] (2-氯苯基)-N-{2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-1,3-噻唑-5-基}甲酰胺 (67) 的制备: 向 5-氨基-2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-1,3-噻唑 (66, 8.1mg, 0.03mmol) 在 1ml DCM 中的混合物中加入 2-氯苯甲酰氯 ($3.8\mu\text{l}$, 2 当量)、DIEA ($52\mu\text{l}$, 3 当量) 和 DMAP (2mg)。在室温下搅拌 2 小时后, 将反应混合物用 DCM/ NaCO_3 水溶液处理, 将 DCM 相浓缩至干。将固体残留物溶解在 1ml THF/MeOH/ H_2O (5:4:1) 中。加入 0.06ml 1N NaOH, 并将混合物在室温下搅拌 1 小时, 之后用 DCM// NaCO_3 水溶液处理。将 DCM 相浓缩并经历制备型 HPLC 纯化, 得到 3.7mg 呈黄色固体的 (2-氯苯基)-N-{2-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-1,3-噻唑-5-基}甲酰胺 (67) (产率: 31.9%; 纯度 >90%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{OS}$ 计算: 387 (M+1)。

[0662] 实施例 30-34: {4-氨基-5-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基]-2-噻吩基}-N-(2,6-二氟苯基)甲酰胺 (72) 的制备:

[0663]



[0664]



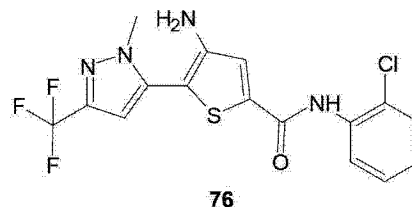
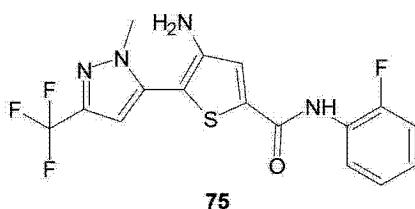
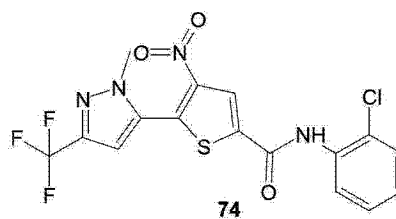
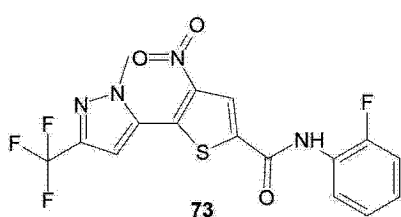
[0665] 向 68 (414mg, 2mmol) 在 CH_2Cl_2 (10ml) 中的溶液中加入 1 滴 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。将草酰氯 (508mg, 0.34mL, 4mmol) 慢慢加入上述溶液中。将反应混合物在室温下搅拌过夜。真空去除有机溶剂并干燥。将残余的 69 溶解在 CH_2Cl_2 (10ml) 中并加入 2,6-二氟苯胺 (516mg, 4mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 1g, 1.4mL, 8mmol)。将混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO_3 (20mL) 猝灭反应,并用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 进行萃取。将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。通过快速柱纯化残留物,得到呈黄色固体的化合物 70 (105mg, 16%)。

[0666] 将 (1-甲基-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-5-基)硼酸 (29mg, 0.15mmol) 和 70 (40mg, 0.12mmol) 溶解在 1mL 二甲氧基乙烷和 1mLEtOH 中。加入 0.5mL $2\text{MNa}_2\text{CO}_3$,用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟,之后加入四(三苯基膦)-钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg, 0.01mmol)。将反应液在微波引发剂作用下于 110°C 加热 30 分钟。用 EtOAc 萃取处理反应混合物,并通过快速柱纯化,得到黄色固体 71。

[0667] 向 71 在 EtOH (10ml) 中的溶液中加入 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (226mg, 1mmol),并将反应混合物在 55°C 下加热 4 小时。真空去除溶剂,并用水和 EtOAc 处理残留物。分离有机相,并用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 萃取水相。通过 HPLC 纯化最终产物,得到呈黄色固体的化合物 72 (9.5mg, 20%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_5\text{N}_4\text{OS}$ 计算:403(M+1)。

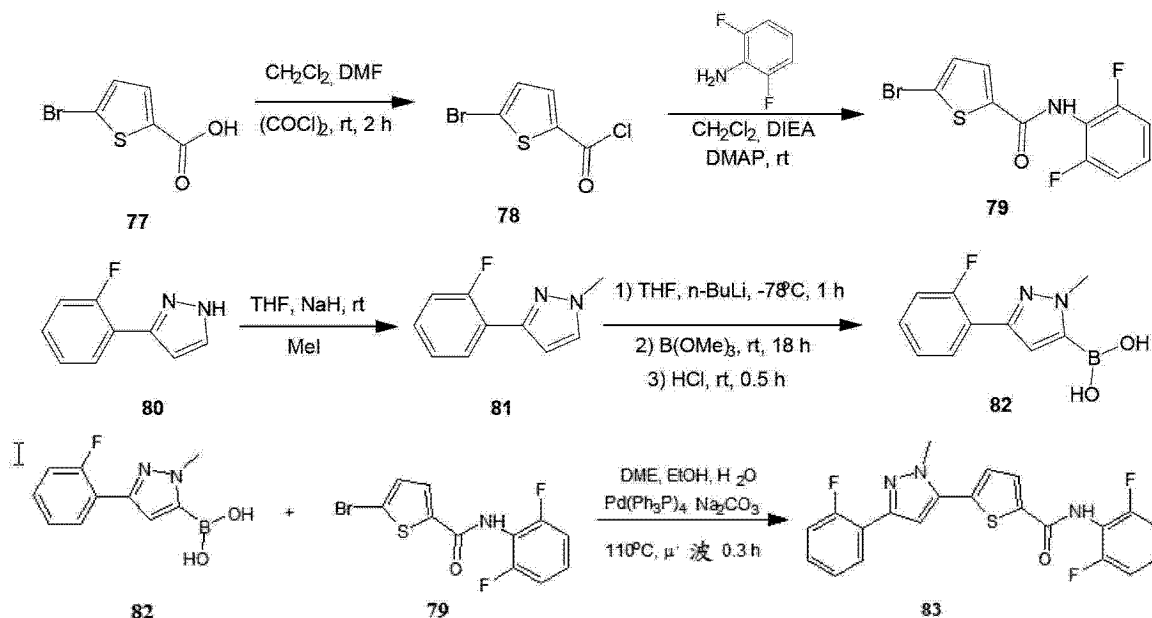
[0668] 使用与 72 相似的过程制备化合物 73-76。对于化合物 75,LC-MS:针对 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_4\text{N}_4\text{OS}$ 计算:385(M+1)。对于化合物 76,LC-MS:针对 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{OS}$ 计算:401(M+1)。

[0669]



[0670] 实施例 35-41 :N-(2,6-二氟苯基){5-[3-(2-氟苯基)-1-甲基吡唑-5-基](2-噻吩基)}甲酰胺(83)的制备:

[0671]



[0672] 向 77 (207mg, 1mmol) 在 CH_2Cl_2 (10mL) 中的溶液中加入 1 滴 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。将草酰氯 (254mg, 0.17mL, 2mmol) 慢慢加入上述溶液中。将反应混合物在室温下搅拌过夜。真空去除有机溶剂并干燥。将残留物溶解在 CH_2Cl_2 (10mL) 中并加入 2,6-二氟苯胺 (258mg, 2mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 0.5g, 0.7mL, 4mmol)。将混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO_3 (20mL) 猝灭反应,并用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 进行萃取。将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。通过快速柱纯化残留物,得到呈黄色固体的化合物 79 (105mg, 16%)。

[0673] 向 80 (1g, 6.0mmol) 在 THF (50mL) 中的溶液中加入 NaH (0.57g, 24mmol)。将混合物搅拌 1 小时,并一次性加入 MeI (1.75g, 12mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 18 小时。用 MeOH 猝灭反应,并真空去除溶剂。用水和 EtOAc 处理残留物。分离有机层并用 EtOAc 萃取水相。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩,得到粗产物。将粗产物在 ISCO 柱上纯化。合并含有纯产物的级分并将其蒸发。得到黄色油状物 81 (0.97g, 92%)。

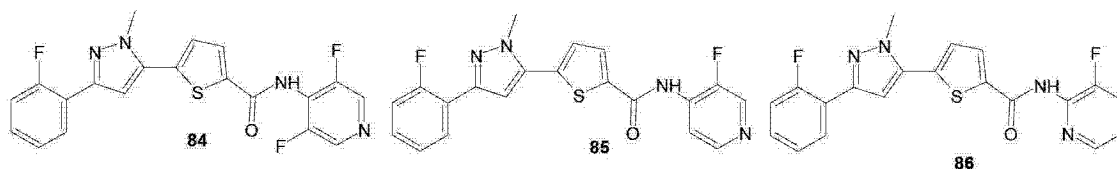
[0674] 将 81 (971mg, 5.51mmol) 在 THF (20mL) 中的溶液在 -78°C 下冷却,而后加入

2. 5Mn-BuLi (3. 3mL, 8. 26mmol)。将混合物在 -78°C 下搅拌 4 小时, 并加入硼酸三甲酯 (1mL, 8. 96mmol)。使反应混合物升温至室温并搅拌过夜。用 1M HCl 猝灭反应并搅拌 0. 5 小时。用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 萃取混合物。用 1M NaOH 洗涤有机相。将水相用浓 HCl 酸化并用 EtOAc 萃取。合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩, 得到呈黄色固体的硼酸 82 (994mg, 82%)。

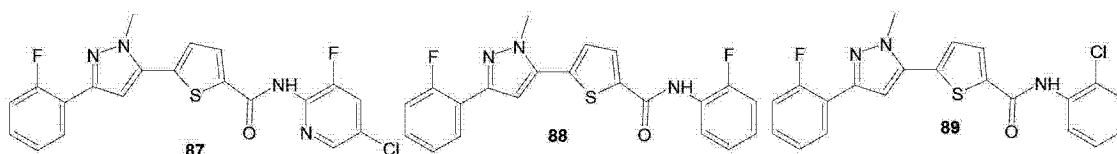
[0675] 将硼酸 82 (22mg, 0. 1mmol) 和 79 (32mg, 0. 1mmol) 溶解在 1mL 二甲氧基乙烷和 1mL EtOH 中。加入 0. 5mL $2\text{MNa}_2\text{CO}_3$, 并用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟, 之后加入四 (三苯基膦) - 钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg, 0. 01mmol)。将反应液在微波引发剂作用下于 110°C 加热 30 分钟。用 EtOAc 萃取处理反应混合物, 且通过 HPLC 纯化产物, 得到白色固体 83 (26mg, 63%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}$ 计算: 414 (M+1)。

[0676] 用与 83 相似的过程制备化合物 84-89。对于化合物 84, LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{OS}$ 计算: 415 (M+1)。对于化合物 85, LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_4\text{OS}$ 计算: 397 (M+1)。对于化合物 86, LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_4\text{OS}$ 计算: 397 (M+1)。对于化合物 87, LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClF}_2\text{N}_4\text{OS}$ 计算: 431 (M+1)。对于化合物 88, LC-MS: 针对 $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{OS}$ 计算: 396 (M+1)。对于化合物 89, LC-MS: 针对 $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClFN}_3\text{OS}$ 计算: 412 (M+1)。

[0677]

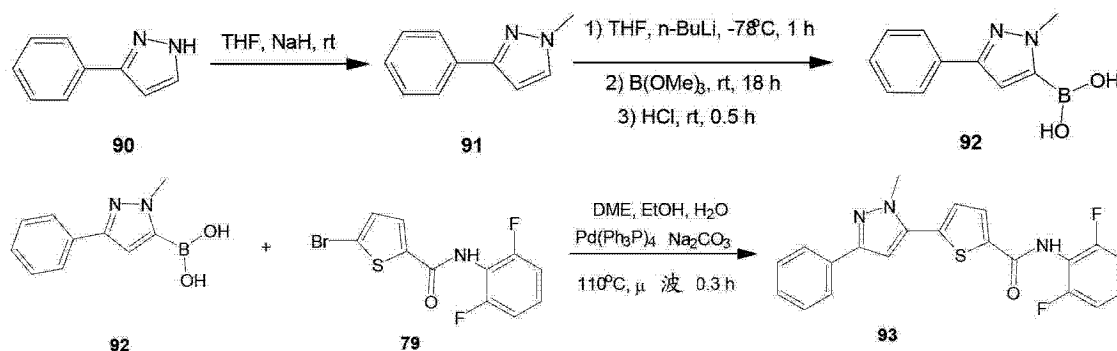


[0678]



[0679] 实施例 42-48: N-(2, 6-二氟苯基) [5-(1-甲基-3-苯基吡唑-5-基)] (2-噻吩基) 甲酰胺 (93) 的制备:

[0680]



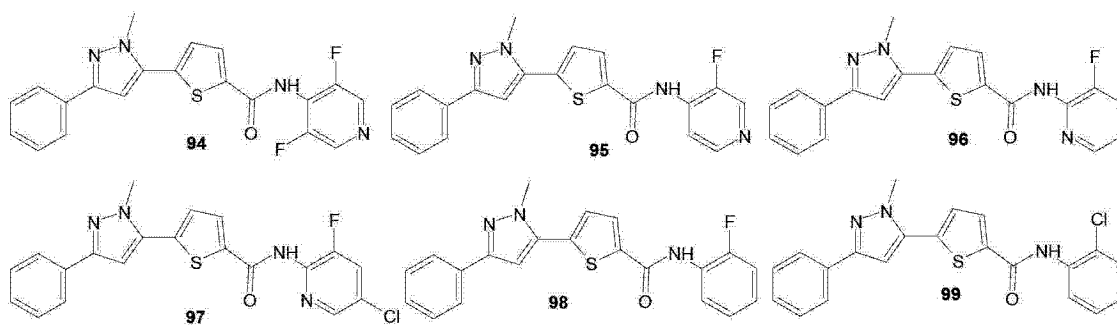
[0681] 向 90 (1g, 6. 9mmol) 在 THF (50mL) 中的溶液中加入 NaH (0. 66g, 27. 6mmol)。将混合物搅拌 1 小时, 并一次性添加 MeI (1. 97g, 13. 8mmol)。在室温下搅拌反应混合物 18 小时。用 MeOH 猝灭反应, 并真空去除溶剂。用水和 EtOAc 处理残留物。分离有机层并用 EtOAc 萃取水相。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩, 得到粗产物。将粗产物在 ISCO 柱上纯化。合并含有纯产物的级分并将其蒸发。得到黄色油状物 91 (0. 53g, 48%)。

[0682] 将 91 (185mg, 1.17mmol) 在 THF (5mL) 中的溶液在 -78°C 下冷却, 之后加入 2.5Mn-BuLi (0.7mL, 1.75mmol)。将混合物在 -78°C 下搅拌 4 小时, 并加入硼酸三甲酯 (2mL, 1.75mmol)。使反应混合物升温至室温并搅拌过夜。用 1M HCl 猝灭反应并搅拌 0.5 小时。用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 萃取混合物。用 1M NaOH 洗涤有机相。将水相用浓 HCl 酸化并用 EtOAc 萃取。合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩, 得到呈黄色固体的硼酸 92 (121.5mg, 51%)。

[0683] 将硼酸 92 (23mg, 0.11mmol) 和 79 (32mg, 0.1mmol) 溶解在 1mL 二甲氧基乙烷和 1mL EtOH 中。加入 0.5mL $2\text{MNa}_2\text{CO}_3$, 并用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟, 之后加入四(三苯基膦)-钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg, 0.01mmol)。将反应在微波引发剂作用下于 110°C 加热 30 分钟。用 EtOAc 萃取处理反应混合物, 且通过 HPLC 纯化产物, 得到白色固体 93 (21mg, 53%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{OS}$ 计算: 396 (M+1)。

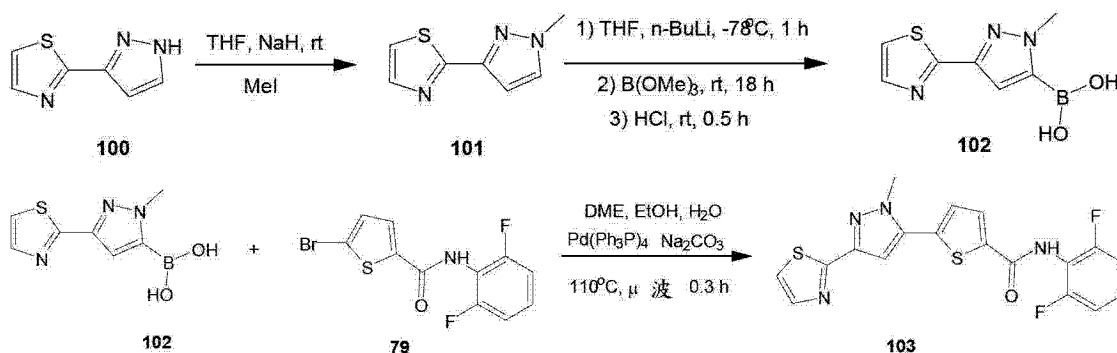
[0684] 使用与 93 相似的过程制备化合物 94-99。对于化合物 94, LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_4\text{OS}$ 计算: 397 (M+1)。对于化合物 95, LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{OS}$ 计算: 379 (M+1)。对于化合物 96, LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{OS}$ 计算: 379 (M+1)。对于化合物 97, LC-MS: 针对 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{ClFN}_4\text{OS}$ 计算: 413 (M+1)。对于化合物 98, LC-MS: 针对 $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{OS}$ 计算: 378 (M+1)。对于化合物 99, LC-MS: 针对 $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{OS}$ 计算: 394 (M+1)。

[0685]



[0686] 实施例 49-55: (2,6-二氟苯基)[5-(1-甲基-3-(1,3-噻唑-2-基)吡唑-5-基)]甲酰胺 (103) 的制备:

[0687]



[0688] 向 100 (1.5g, 10mmol) 在 THF (50mL) 中的溶液中加入 NaH (2.4g, 100mmol)。将混合物搅拌 1 小时, 并一次性添加 MeI (2.8g, 20mmol)。在室温下搅拌反应混合物 18 小时。用 MeOH 猝灭反应, 并真空去除溶剂。用水和 EtOAc 处理残留物。分离有机层并用 EtOAc 萃取水相。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩, 得到粗产物。在 ISCO 柱上纯化粗产物。合并含有纯产物的级分并将其蒸发。得到黄色油状物 101 (1.5g, 91%)。

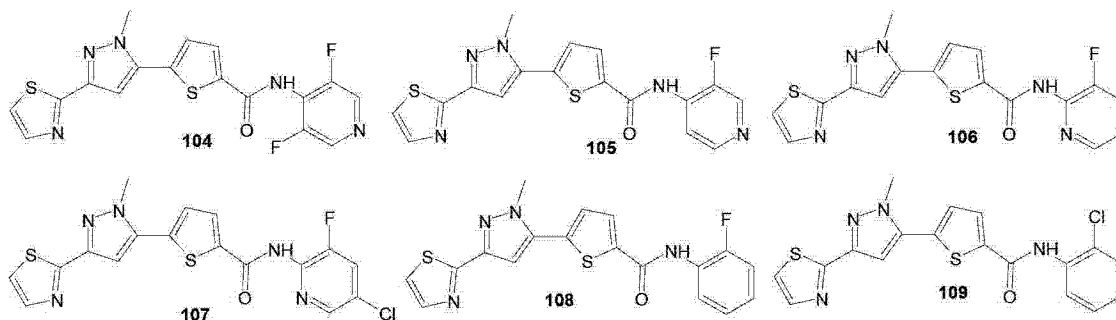
[0689] 将 101 (395mg, 2.4mmol) 在 THF (20mL) 中的溶液在 -78°C 下冷却, 之后加入

2. 5Mn-BuLi (1. 4mL, 3. 6mmol)。将混合物在 -78°C 下搅拌 4 小时, 并加入硼酸三甲酯 (0. 4mL, 3. 6mmol)。使反应混合物升温至室温并搅拌过夜。用 1M HCl 猝灭反应并搅拌 0. 5 小时。用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 萃取混合物。用 1M NaOH 洗涤有机相。将水相用浓 HCl 酸化并用 EtOAc 萃取。合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩, 得到呈黄色固体的硼酸 102 (317mg, 63%)。

[0690] 将硼酸 102 (23mg, 0. 11mmol) 和 79 (32mg, 0. 1mmol) 溶解在 1mL 二甲氧基乙烷和 1mL EtOH 中。加入 0. 5mL $2\text{MNa}_2\text{CO}_3$, 并用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟, 之后加入四 (三苯基膦)-钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg, 0. 01mmol)。将反应在微波引发剂作用下于 110°C 加热 30 分钟。用 EtOAc 萃取处理反应混合物, 且通过 HPLC 纯化产物, 得到黄色固体 103 (19mg, 46%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_4\text{OS}$ 计算: 403 (M+1)。

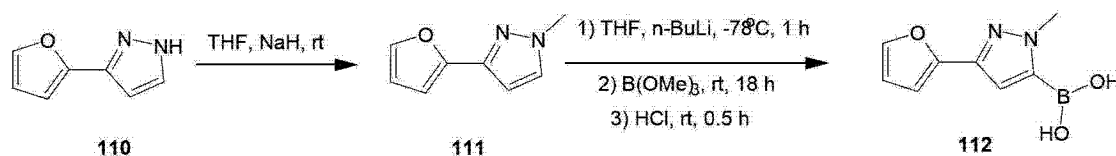
[0691] 使用与 103 相似的过程制备化合物 104-109。对于化合物 104, LC-MS: 针对 $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_5\text{OS}_2$ 计算: 404 (M+1)。对于化合物 105, LC-MS: 针对 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{OS}_2$ 计算: 386 (M+1)。对于化合物 106, LC-MS: 针对 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{OS}_2$ 计算: 386 (M+1)。对于化合物 107, LC-MS: 针对 $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{ClFN}_5\text{OS}_2$ 计算: 420 (M+1)。对于化合物 108, LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{OS}_2$ 计算: 385 (M+1)。对于化合物 109, LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{OS}_2$ 计算: 401 (M+1)。

[0692]

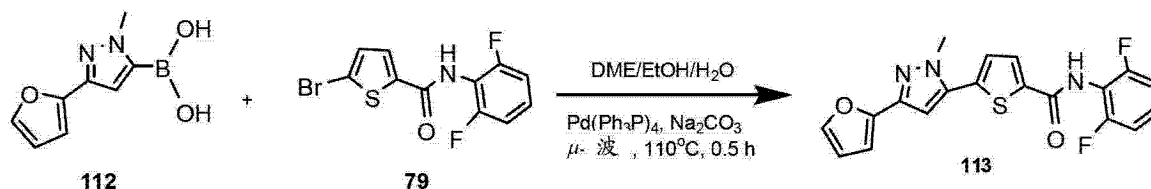


[0693] 实施例 56-62: N-(2, 6-二氟苯基) [5-(3-(2-呋喃基)-1-甲基吡唑-5-基)] (2-噻吩基)] 甲酰胺 (113) 的制备:

[0694]



[0695]



[0696] 向 110 (1. 4g, 10. 4mmol) 在 THF (50mL) 中的溶液中加入 NaH (2. 4g, 100mmol)。将混合物搅拌 1 小时, 并一次性加入 MeI (2. 8g, 20mmol)。在室温下搅拌反应混合物 18 小时。用 MeOH 猝灭反应, 并真空去除溶剂。用水和 EtOAc 处理残留物。分离有机层并用 EtOAc 萃取水相。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩, 得到粗产物。将粗产物在 ISCO 柱上纯化。合并含有纯产物的级分并将其蒸发。得到黄色油状物 111 (1. 45g, 94%)。

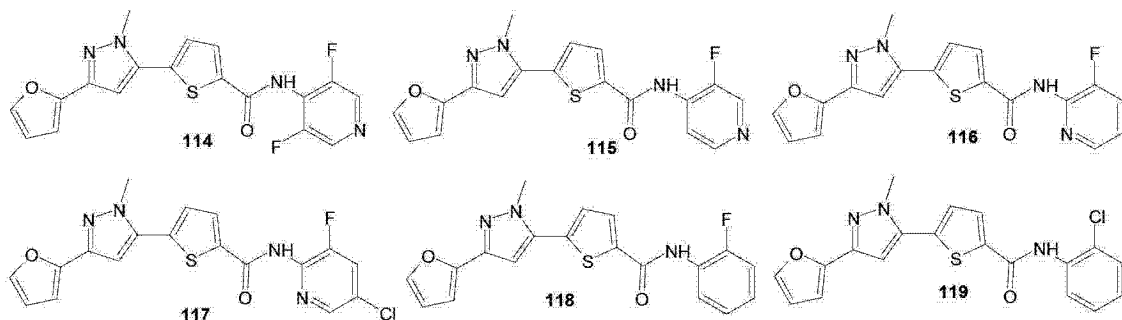
[0697] 将 111 (670mg, 4. 5mmol) 在 THF (20mL) 中的溶液在 -78°C 下冷却, 之后加

入 2.5Mn-BuLi (3.6mL, 9mmol)。将混合物在 -78°C 下搅拌 4 小时, 并加入硼酸三甲酯 (1mL, 9mmol)。使反应混合物升温至室温并搅拌过夜。用 1M HCl 猝灭反应并搅拌 0.5 小时。用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 萃取混合物。用 1M NaOH 洗涤有机相。将水相用浓 HCl 酸化并用 EtOAc 萃取。合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩, 得到呈黄色固体的硼酸 112 (343mg, 40%)。

[0698] 将硼酸 112 (22mg, 0.11mmol) 和 79 (32mg, 0.1mmol) 溶解在 1mL 二甲氧基乙烷和 1mL EtOH 中。加入 0.5mL $2\text{MNa}_2\text{CO}_3$, 并用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟, 之后加入四(三苯基膦)-钯 (0) ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, 12mg, 0.01mmol)。将反应在微波引发剂作用下于 110°C 加热 30 分钟。用 EtOAc 萃取处理反应混合物, 且通过 HPLC 纯化产物, 得到黄色固体 113 (21mg, 53%)。LC-MS: 针对 $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 计算: 386 (M+1)。

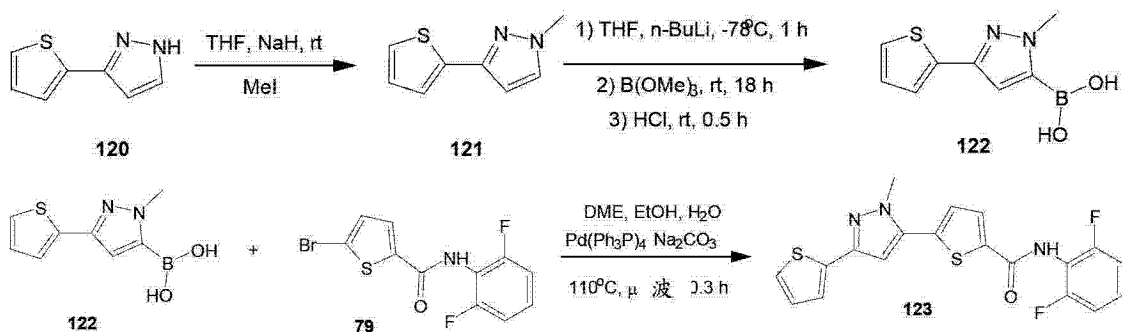
[0699] 使用与 113 相似的过程制备化合物 114-119。对于化合物 114, LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ 计算: 387 (M+1)。对于化合物 115, LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{O}_2\text{S}$ 计算: 369 (M+1)。对于化合物 116, LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{O}_2\text{S}$ 计算: 369 (M+1)。对于化合物 117, LC-MS: 针对 $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{ClFN}_4\text{O}_2\text{S}$ 计算: 403 (M+1)。对于化合物 118, LC-MS: 针对 $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ 计算: 368 (M+1)。对于化合物 119, LC-MS: 针对 $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ 计算: 384 (M+1)。

[0700]



[0701] 实施例 63-65: N-(2,6-二氟苯基)[5-(1-甲基-3-(2-噻吩基)吡唑-5-基)(2-噻吩基)]甲酰胺 (123) 的制备:

[0702]



[0703] 向 120 (1.5g, 10mmol) 在 THF (50mL) 中的溶液中加入 NaH (2.4g, 100mmol)。将混合物搅拌 1 小时, 并一次性加入 MeI (2.8g, 20mmol)。在室温下搅拌反应混合物 18 小时。用 MeOH 猝灭反应, 并真空去除溶剂。用水和 EtOAc 处理残留物。分离有机层并用 EtOAc 萃取水相。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩, 得到粗产物。将粗产物在 ISCO 柱上纯化。合并含有纯产物的级分并将其蒸发。得到黄色油状物 121 (1.5g, 91%)。

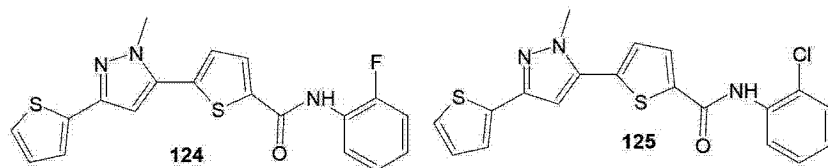
[0704] 将 121 (395mg, 2.4mmol) 在 THF (20mL) 中的溶液在 -78°C 下冷却, 之后加入 2.5Mn-BuLi (1.4mL, 3.6mmol)。将混合物在 -78°C 下搅拌 4 小时, 并加入硼酸三甲酯

(0.4mL, 3.6mmol)。使反应混合物升温至室温并搅拌过夜。用 1M HCl 猝灭反应并搅拌 0.5 小时。用 EtOAc (20mL × 2) 萃取混合物。用 1M NaOH 洗涤有机相。将水相用浓 HCl 酸化并用 EtOAc 萃取。合并的有机相用 Na₂SO₄ 干燥、过滤、浓缩, 得到呈黄色固体的硼酸 122 (317mg, 63%)。

[0705] 将硼酸 122 (22mg, 0.11mmol) 和 79 (32mg, 0.1mmol) 溶解在 1mL 二甲氧基乙烷和 1mL EtOH 中。加入 0.5mL 2M Na₂CO₃, 并用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟, 之后加入四(三苯基膦)-钯(0) (Pd(Ph₃P)₄, 12mg, 0.01mmol)。将反应在微波引发剂作用下于 110° C 加热 30 分钟。用 EtOAc 萃取处理反应混合物, 且通过 HPLC 纯化产物, 得到白色固体 123 (5.3mg, 13%)。LC-MS: 针对 C₁₉H₁₃F₂N₃OS₂ 计算: 402 (M+1)。

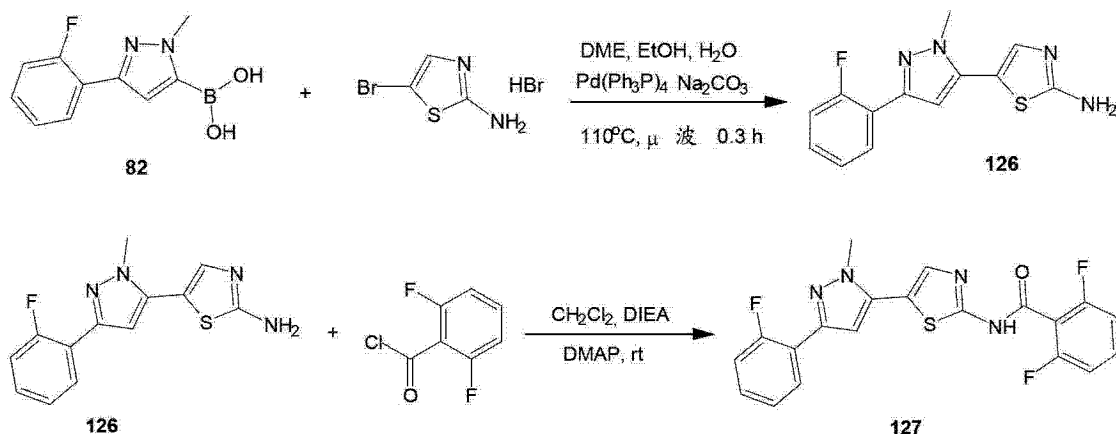
[0706] 使用与 123 相似的过程制备化合物 124-125。对于化合物 124, LC-MS: 针对 C₁₉H₁₄FN₃OS₂ 计算: 384 (M+1)。对于化合物 125, LC-MS: 针对 C₁₉H₁₄ClN₃OS₂ 计算: 400 (M+1)。

[0707]



[0708] 实施例 66-68: (2,6-二氟苯基-N-[5-[2-(氟苯基)-1-甲基吡唑-5-基](1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (127) 的制备:

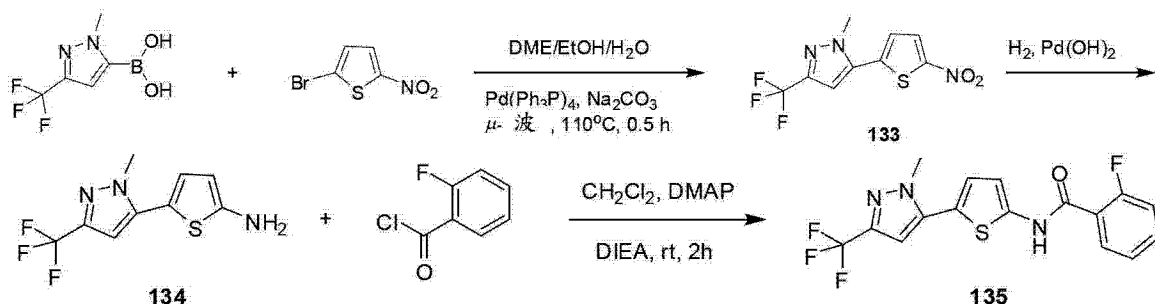
[0709]



[0710] 将硼酸 82 (242mg, 1.1mmol) 和 2-氨基-5-溴噻唑氢溴酸盐 (260mg, 1 mmol) 溶解在 5mL 二甲氧基乙烷和 5mL EtOH 中。加入 2mL 2M Na₂CO₃, 并用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟, 之后加入四(三苯基膦)-钯(0) (Pd(Ph₃P)₄, 115mg, 0.1mmol)。将反应在微波引发剂作用下于 110° C 加热 30 分钟。反应混合物用 EtOAc 萃取进行处理, 且通过快速柱纯化产物, 得到白色固体 126 (80mg, 29%)。

[0711] 向 126 (25mg, 0.07mmol) 在 CH₂Cl₂ (5mL) 中的溶液中加入 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 52mg, 72 μL, 0.4mmol)、4-二甲基氨基吡啶 (DMAP, 0.6mg, 0.05mmol)。将 2,6-二氟苯甲酰氯 (18mg, 0.1mmol) 滴加到上述溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO₃ (20mL) 猝灭反应, 并用 EtOAc 进行萃取。通过 HPLC 纯化产物, 得到白色固体 127 (5.4mg, 19%)。LC-MS: 针对 C₂₀H₁₃F₃N₄OS 计算: 415 (M+1)。

[0712] 使用与 127 相似的过程制备化合物 128-129。对于化合物 128, LC-MS: 针对 C₂₀H₁₄F₂N₄OS 计算: 397 (M+1)。对于化合物 129, LC-MS: 针对 C₂₀H₁₄ClFN₄OS 计算: 413 (M+1)。



[0722] 将 1- 甲基 -3- 三氟甲基吡唑 -5- 硼酸 (97mg, 0.5mmol) 和 2- 溴 -5- 硝基噻吩 (104mg, 0.5mmol) 溶解在 2mL 二甲氧基乙烷和 2mLEtOH 中。加入 1mL2MNa₂CO₃, 并用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟, 之后加入四 (三苯基膦) - 钯 (0) (Pd(Ph₃P)₄, 60mg, 0.05mmol)。将反应在微波引发剂作用下于 110 ° C 加热 30 分钟。反应混合物用 EtOAc 萃取进行处理, 且通过快速柱纯化产物, 得到黄色固体 133。在标准条件下氢化之后, 向 134 (37mg, 0.15mmol) 在 CH₂Cl₂ (10mL) 中的溶液中加入 2- 氟苯甲酰氯、N, N- 二异丙基乙胺 (DIEA, 0.5g, 0.7mL, 4mmol) 和催化量的 DMAP。将混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO₃ (20mL) 猝灭反应, 并用 EtOAc (20mL × 2) 进行萃取。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄) 并真空浓缩。将残留物溶解在 THF (2mL) 和 MeOH (2mL) 中。加入 1MNaOH (2mL) 并在室温下搅拌 0.5h。将反应混合物浓缩, 并用 EtOAc- 盐水处理。通过快速柱纯化粗产物, 得到呈黄色固体的化合物 135 (2.7mg, 5%)。LC-MS : 针对 C₁₆H₁₁F₄N₃OS 计算 : 370 (M+1)。

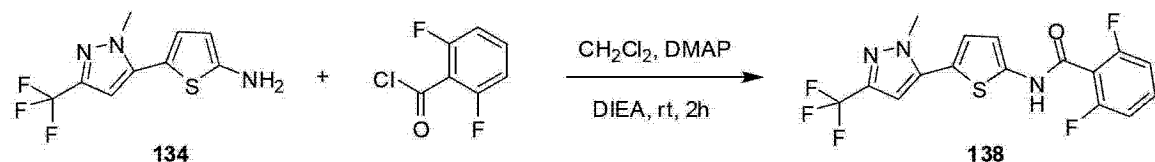
[0723] 使用与 135 相似的过程,通过用中间体 63 替换中间体 134 来制备化合物 136 和 137。对于化合物 136, LC-MS :针对 $C_{15}H_{10}F_4N_4OS$ 计算 :371 (M+1)。对于化合物 137, LC-MS : 针对 $C_{15}H_{10}ClF_3N_4OS$ 计算 :387 (M+1)。

[0724]



[0725] 实施例 74 : (2,6-二氟苯基)-N-{5-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](2-噻吩基)} 甲酰胺 (138) 的制备 :

[0726]

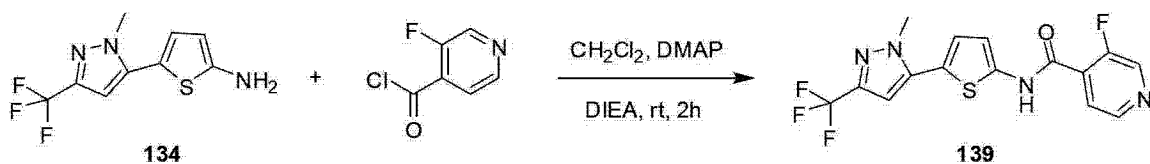


[0727] 向 134 (37mg, 0.15mmol) 在 CH_2Cl_2 (10ml) 中的溶液中加入 2,6-二氟苯甲酰氯、N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 0.5g, 0.7mL, 4mmol) 和催化量的 DMAP。将混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO_3 (20mL) 猝灭反应,并用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 进行萃取。将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。将残留物溶解在 THF (2mL) 和 MeOH (2mL) 中。加入 1MNaOH (2mL) 并在室温下搅拌 0.5h。将反应混合物浓缩,并用 EtOAc- 盐水处理。通过 HPLC 纯化粗产物,得到呈绿色固体的化合物 138 (1.7mg, 3%)。LC-MS :针对 $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_5\text{N}_3\text{OS}$ 计算 :388 (M+1)。

[0728] 实施例 75-76 : (3- 氟 (4- 吡啶基)) -N- {5- [1- 甲基 -3- (三氟甲基) 吡唑 -5- 基]

(2-噻吩基)}甲酰胺(139)的制备:

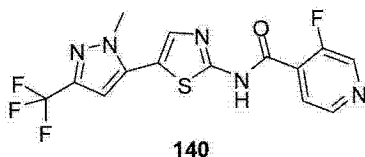
[0729]



[0730] 向 134 (25mg, 0.1mmol) 在 CH_2Cl_2 (10ml) 中的溶液中加入 3-氟吡啶-4-碳酰氯、N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 0.5g, 0.7mL, 4mmol) 和催化量的 DMAP。将混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO_3 (20mL) 猝灭反应,并用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 进行萃取。将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。通过 HPLC 纯化粗产物,得到呈棕色固体的化合物 139 (6.7mg, 18%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_4\text{N}_4\text{OS}$ 计算:371 (M+1)。

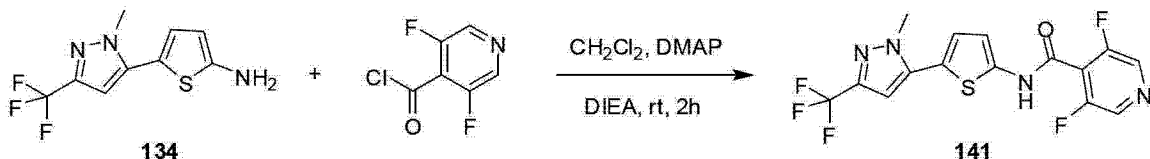
[0731] 使用与 139 相似的过程,通过用中间体 63 替换中间体 134 来制备化合物 140。对于化合物 140, LC-MS:针对 $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_4\text{N}_5\text{OS}$ 计算:372 (M+1)。

[0732]



[0733] 实施例 77-78:(3,5-二氟(4-吡啶基))-N-[5-[1-甲基-3-(三氟甲基)吡唑-5-基](2-噻吩基)}甲酰胺(141)的制备:

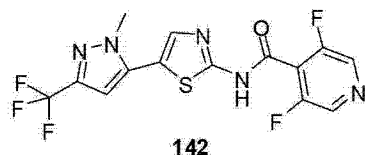
[0734]



[0735] 向 134 (25mg, 0.1mmol) 在 CH_2Cl_2 (10ml) 中的溶液中加入 3,5-二氟吡啶-4-碳酰氯、N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 0.5g, 0.7mL, 4mmol) 和催化量的 DMAP。将混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO_3 (20mL) 猝灭反应,并用 EtOAc (20mL $\times$ 2) 进行萃取。将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。通过快速柱纯化粗产物,得到呈棕色固体的化合物 138 (7mg, 18%)。LC-MS:针对 $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{F}_5\text{N}_4\text{OS}$ 计算:389 (M+1)。

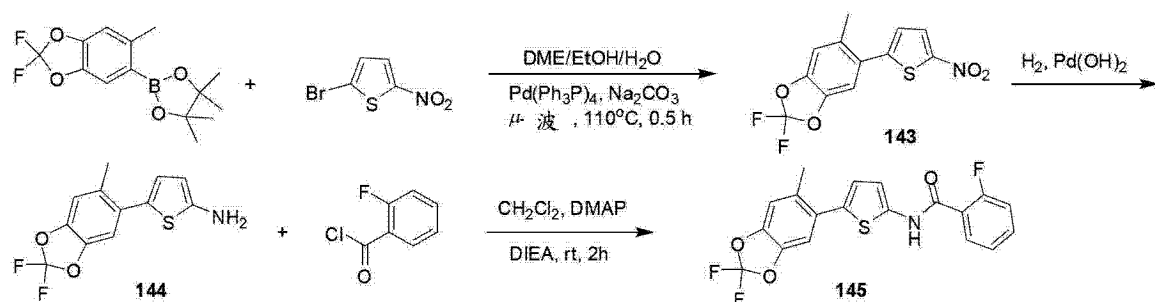
[0736] 使用与 141 相似的过程,通过用中间体 63 替换中间体 134 来制备化合物 142。对于化合物 142, LC-MS:针对 $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{F}_5\text{N}_5\text{OS}$ 计算:390 (M+1)。

[0737]



[0738] 实施例 79:N-[5-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d]1,3-二氧环戊烷-5-基)(2-噻吩基)](2-氟苯基)甲酰胺(145)的制备:

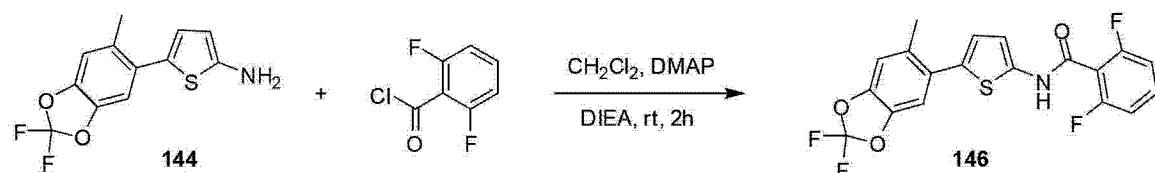
[0739]



[0740] 将 2-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (298mg, 1mmol) 和 2-溴-5-硝基噻吩 (208mg, 1mmol) 溶解在 4mL 二甲氧基乙烷和 4mLEtOH 中。加入 2mL 2MNa₂CO₃, 并用 Ar 使混合物鼓泡 1 分钟, 之后加入四(三苯基膦)-钯 (0) (Pd(Ph₃P)₄, 116mg, 0.1mmol)。将反应在微波引发剂作用下于 110°C 加热 30 分钟。用 EtOAc 萃取处理反应混合物, 且通过快速柱纯化产物, 得到黄色固体 143。在标准条件下氢化之后, 向 144 (135mg, 0.5mmol) 在 CH₂Cl₂ (10mL) 中的溶液中加入 2-氟苯甲酰氯、N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 0.5g, 0.7mL, 4mmol) 和催化量的 DMAP。将混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO₃ (20mL) 猝灭反应, 并用 EtOAc (20mL×2) 进行萃取。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄) 并真空浓缩。将残留物溶解在 THF (2mL) 和 MeOH (2mL) 中。加入 1MNaOH (2mL) 并在室温下搅拌 0.5h。将反应混合物浓缩, 并用 EtOAc- 盐水处理。通过快速柱纯化粗产物, 得到呈棕色固体的化合物 145 (92.7mg, 47%)。LC-MS : 针对 C₁₉H₁₂F₃NO₃S 计算 : 392 (M+1)。

[0741] 实施例 80 : N-[5-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-(2-噻吩基)]-(2,6-二氟苯基)甲酰胺 (146) 的制备 :

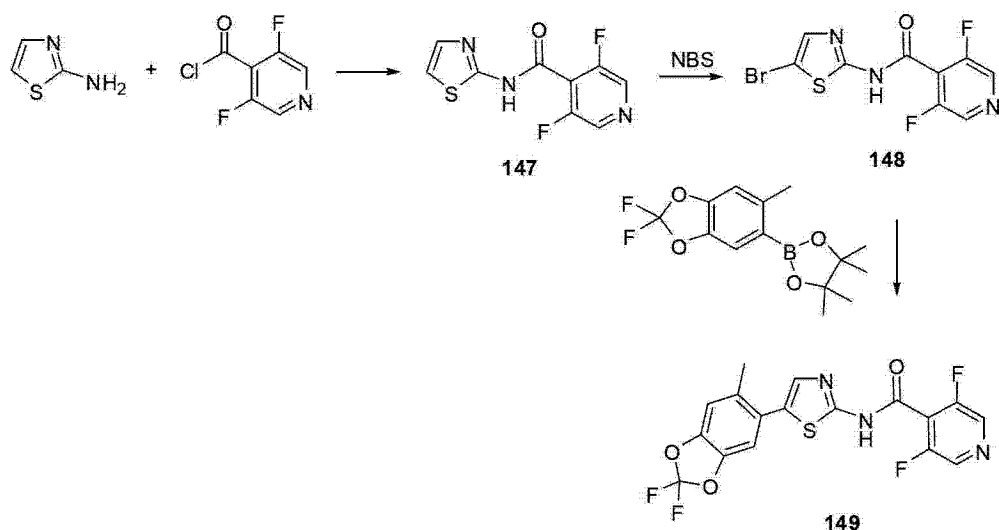
[0742]



[0743] 向 144 (135mg, 0.5mmol) 在 CH₂Cl₂ (10mL) 中的溶液中加入 2,6-二氟苯甲酰氯、N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 0.5g, 0.7mL, 4mmol) 和催化量的 DMAP。将混合物在室温下搅拌 2 小时。用饱和 NaHCO₃ (20mL) 猝灭反应, 并用 EtOAc (20mL×2) 进行萃取。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄) 并真空浓缩。将残留物溶解在 THF (2mL) 和 MeOH (2mL) 中。加入 1MNaOH (2mL) 并在室温下搅拌 0.5h。将反应混合物浓缩并用 EtOAc- 盐水处理。通过 HPLC 纯化粗产物, 得到呈白色固体的化合物 146 (50.5mg, 25%)。LC-MS : 针对 C₁₉H₁₁F₄NO₃S 计算 : 410 (M+1)。

[0744] 实施例 81-82 : (3,5-二氟(4-吡啶基))-N-[5-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-(1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (149) 的制备 :

[0745]



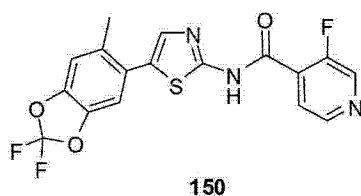
[0746] 向 2-氨基噻唑 (200mg, 2mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (1.0mL) 在 10mL DCM 中的混合物中加入酰基氯 (354mg, 2mmol)。将生成的混合物在室温下搅拌 4 小时,之后用 DCM/NaHCO₃ 水溶液 / 盐水处理。将有机相干燥 (Na₂SO₄) 并浓缩,得到呈棕色固体的中间体 147 (444mg, 产率 :92%, 纯度 >90%), 该中间体无需进行进一步纯化即可使用。

[0747] 向 147 (444mg, 1.84mmol) 在 10mL 乙腈中的悬液中加入 NBS (393mg, 2.2mmol, 1.2 当量)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,而后用乙酸乙酯 / NaHCO₃ 水溶液 / 盐水处理。将有机相干燥 (Na₂SO₄)、浓缩,并经硅胶纯化,得到呈淡黄色固体的化合物 148 (128mg, 产率 :21.7%, 纯度 >95%), 并从柱上回收中间体 147 (51.6mg)。

[0748] 向 (3,5-二氟(4-吡啶基))-N-(5-溴(1,3-噻唑-2-基))甲酰胺 (148) (32mg, 0.1mmol)、2-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (45mg, 0.15mmol)、双(二叔丁基(4-二甲基氨基苯基)膦)二氯钯(II) (11mg, 10%mol) 和 K₃PO₄ (32mg) 在 1mL CAN、1mL 二氧杂环己烷、0.5mL H₂O 中的混合物中鼓入氩气。将反应混合物在 85°C 下加热 4 小时。冷却至室温后,将反应混合物在乙酸乙酯中吸收,用 NaHCO₃ 水溶液和盐水洗涤。将有机相干燥 (Na₂SO₄)、浓缩,而后经历制备型 HPLC 色谱,得到 (3,5-二氟(4-吡啶基))-N-[5-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d]1,3-二氧杂环戊烷-5-基)(1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (149) (16.8mg, 产率 :40.8%, 纯度 >95%)。LC-MS :针对 C₁₇H₉F₄N₃O₃S 计算 :412(M+1)。

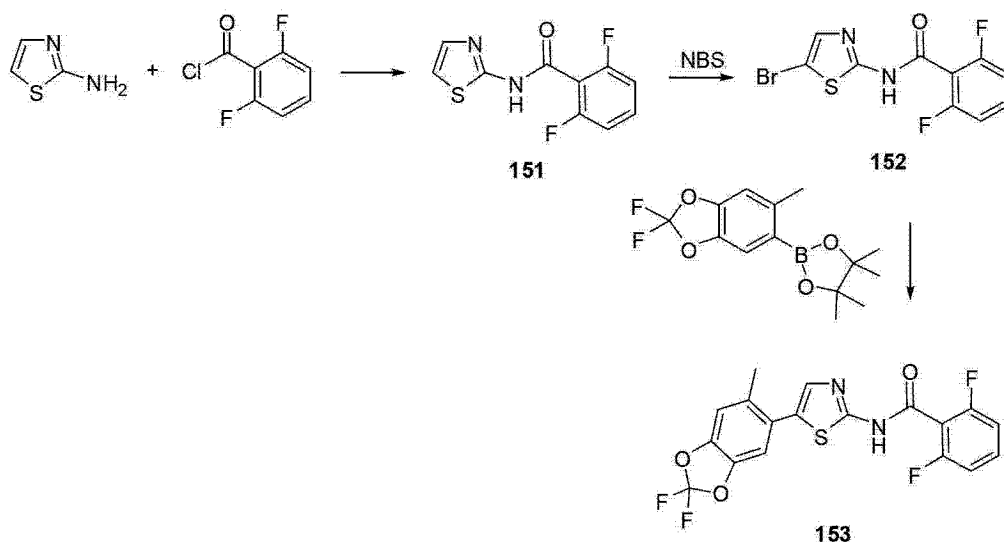
[0749] 使用与 149 相似的过程制备化合物 150。对于化合物 150, LC-MS :针对 C₁₇H₁₀F₃N₃O₃S 计算 :394(M+1)。

[0750]



[0751] 实施例 83-84 : (2,6-二氟苯基)-N-[5-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d]1,3-二氧杂环戊烷-5-基)(1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (153) 的制备 :

[0752]



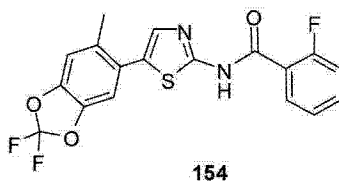
[0753] 在 0 ° C 下向 2-氨基噻唑 (200mg, 4mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (2.1mL) 在 15mL DCM 中的混合物中加入 2,6-苯甲酰氯 (600 μ l, 4.8mmol) 在 5mL DCM 中的溶液。将生成的混合物在 0 ° C 下搅拌 10 分钟,而后在室温下搅拌 1.5 小时,之后用 DCM/NaHCO₃ 水溶液 / 盐水处理。将有机相干燥 (Na₂SO₄) 并浓缩,得到呈黄色固体的中间体 151 (1.18g, 纯度 >85%), 将该中间体溴化而无需进一步纯化。

[0754] 向粗品 151 (1.18g) 在 20mL 乙腈中的悬液中加入 NBS (1.07g, 6mmol, 1.5 当量)。将反应液在室温下搅拌过夜,而后用乙酸乙酯 / NaHCO₃ 水溶液 / 盐水处理。将有机相干燥 (Na₂SO₄)、浓缩并经硅胶纯化,得到呈淡黄色固体的化合物 152 (350mg, 产率 :27.4%, 纯度 >90%), 并从柱中回收中间体 151 (194mg)。

[0755] 向 (2,6-二氟苯基)-N-(5-溴(1,3-噻唑-2-基))甲酰胺 (152) (64mg, 0.2mmol)、2-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (489mg, 0.3mmol)、双(二叔丁基(4-二甲基氨基苯基)膦)二氯钯(II) (21mg, 10%mol) 和 K₃PO₄ (64mg) 在 1mL CAN、1mL 二氧杂环己烷、0.5mL H₂O 中的混合物中鼓入氩气。将反应混合物在 85 ° C 下加热 7h。冷却至室温后,将反应混合物在乙酸乙酯中吸收,用 NaHCO₃ 水溶液和盐水洗涤。将有机相干燥 (Na₂SO₄)、浓缩,而后经历制备型 HPLC 色谱,得到呈白色固体的 (2,6-二氟苯基)-N-[5-(2,2-二氟-6-甲基苯并[d]1,3-二氧杂环戊烷-5-基)(1,3-噻唑-2-基)]甲酰胺 (153) (7.4mg, 产率 :9%, 纯度 >95%)。LC-MS : 针对 C₁₈H₁₀F₄N₂O₃S 计算 :411 (M+1)。

[0756] 使用与 153 相似的过程制备化合物 154。对于化合物 154, LC-MS : 针对 C₁₈H₁₁F₃N₂O₃S 计算 :393 (M+1)。

[0757]



[0758] 体外实施例

[0759] 实施例 85 : 调节细胞内钙水平的药剂的体外筛选 :

[0760] 使用基于荧光的测定来筛选本文所述的化合物,如调节细胞内钙的式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物。

[0761] A. Orai1/STIM1 稳定细胞中钙池操纵的钙内流的基于荧光的测定。

[0762] 细胞:

[0763] 通过将人类 Orai1 表达质粒 (pcDNA3.1-Orai1-cmyc) 转染到稳定过表达人类 STIM1 的 HEK-293 细胞 (Roos 等人, 2005 JCB169 (3):435-445) 中而产生稳定表达重组人类 STIM1 和 Orai1 的细胞。选择稳定表达 STIM1 和 Orai1 两种蛋白质的细胞集落,而后通过有限稀释进行亚克隆。将细胞在 37° C/6%CO₂ 下培养于含有 10%FBS 和适当的选择标记的完全培养基中。

[0764] 测定:

[0765] 在进行测定前一天,将 Orai1/STIM1 稳定细胞以 90-95% 的汇合度接种到 384 孔板中的 50 μL 完全培养基中。细胞在 37° C/6%CO₂ 下生长过夜。在测定当天,向细胞加入含有 1.5 μM fluo-4-AM (Invitrogen) 的完全培养基,而后将这些细胞在室温下培养 1 小时。在无 Ca²⁺ 的 HBSS (Hank 缓冲盐溶液) 中洗涤细胞一次,并向各孔加入 35 μL 无 Ca²⁺ HBSS。将测试化合物加入各孔中的 10 μL 无 Ca²⁺ HBSS 溶液中,以 4.5X 所需终浓度制备之,并在室温下温育 30 分钟。而后用 FLIPR³⁸⁴ (Molecular Devices) 读板仪测量初始基线荧光信号。通过添加 5 μL 含 10XCaCl₂ (10mM) 的 HBSS 来启动钙内流,用 FLIPR³⁸⁴ 读板仪测量细胞荧光的变化。在每个孔中,通过计算在钙加入后测得的峰荧光信号与初始基线荧光信号 (称为峰值-基底) 之间的差异来确定由于钙流入细胞中而导致的荧光信号幅度。IC₅₀ 值通常计算为抑制 50% 的峰值-基底信号的浓度。

[0766] B. RBL-2H3 细胞中钙池操纵的钙内流的基于荧光的测定。

[0767] 细胞:

[0768] RBL-2H3 细胞获自 ATCC,并在 37° C/6%CO₂ 下保持在含有 10%FBS 的完全培养基中。

[0769] 测定:

[0770] 在进行测定前一天,将 RBL-2H3 细胞接种到 384 孔板中的 50 μL 完全培养基中。细胞在 37° C/6%CO₂ 下生长过夜,并到第二天生长至 50-60% 的汇合度。在测定当天,加入含有 1.5 μM Fluo-4-AM 染料 (Invitrogen) 的完全培养基,并在室温下温育 1 小时。在不含 Ca²⁺ 的 HBSS 缓冲液中洗涤细胞两次,并向每孔加入 35 μL 不含 Ca²⁺ 的 HBSS 缓冲液。向孔中加入在不含 Ca²⁺ 的 HBSS 溶液中以 4.5X 所需浓度制备的 10 μL 测试化合物,并在室温下温育 5 分钟。向孔中加入在不含 Ca²⁺ 的 HBSS 溶液中以 5.5X 所需浓度 (5.5 μM) 制备的 10 μL 毒胡萝卜素,并温育另外 25 分钟。然后用 FLIPR³⁸⁴ (Molecular Devices) 读板仪测量初始基线荧光信号。加入 5 μL 12X 含钙的 HBSS (12mM),并用 FLIPR³⁸⁴ 读板仪测量细胞荧光的变化。在每个孔中,通过计算在加入钙 7 秒钟之后所测量的荧光信号与零时间 (t=0) 的初始基线荧光信号之间的差异来确定由于钙进入细胞所导致的作为时间的函数的荧光信号变化。该参数被称为上升斜率 (Upslope)。IC₅₀ 值计算为抑制 50% 的上升斜率时的浓度。

[0771] C. Jurkat 细胞中钙池操纵的钙内流的基于荧光的测定。

[0772] 细胞:

[0773] JurkatE6-1 细胞获自 ATCC,并在 37° C/6%CO₂ 下保持在含有 10%FBS 的完全培养基中。

[0774] 测定：

[0775] 在进行测定前一天,将 Jurkat E6-1 细胞以二百万个细胞 /mL 的密度接种到 T-175 烧瓶中的完全培养基中。使细胞在 37° C/6%CO₂ 下生长过夜。次日,加入含有 1.5 μ M Fluo-4-AM 染料 (Invitrogen) 的完全培养基,并在室温下培养 1 小时。收获细胞,用不含 Ca²⁺ 的 HBSS 缓冲液洗涤两次,并接种在 384 孔板中的 35 μ L 不含 Ca²⁺ 的 HBSS 缓冲液中。向孔中加入在不含 Ca²⁺ 的 HBSS 溶液中以 4.5X 所需终浓度制备的 10 μ L 测试化合物,并在室温下温育 5 分钟。向每孔中加入在不含 Ca²⁺ 的 HBSS 溶液中以 5.5X 所需浓度 (5.5 μ M) 制备的 10 μ L 毒胡萝卜素,并温育另外 25 分钟。用 FLIPR³⁸⁴ (Molecular Devices) 读板仪测量初始基线荧光信号。加入 5 μ L 12X 含钙的 HBSS (12mM),并用 FLIPR³⁸⁴ 读板仪测量细胞荧光的变化。在每个孔中,通过计算在加入钙 7 秒钟之后所测量的荧光信号与零时间 (t=0) 的初始基线荧光信号之间的差异来确定由于钙流入细胞所导致的作为时间的函数的荧光信号变化。该参数被称为上升斜率 (Upslope)。IC₅₀ 值计算为抑制 50% 的上升斜率时的浓度。

[0776] 表 A. 基于荧光的体外测定数据

[0777]

实施 例	FLIPR_CRAC:9 点 CRC:O1S1_JR251:IC50:峰值相对于基 础(uM)	FLIPR_CRAC:9 点 CRC - Fluo4_TG-D:RBL-2H3:IC50:上升斜率 0-7sec (M)
1	A	A
2	A	A
3	A	A
4	A	A
5	A	A
6	A	A
7	A	A
8	B	A
9	A	A
10	A	A

[0778]

实施 例	FLIPR_CRAC:9 点 CRC:O1S1_JR251:IC50:峰值相对于基 础(nM)	FLIPR_CRAC:9 点 CRC - Fluo4_TG-D:RBL-2H3:IC50:上升斜率 0-7sec (M)
11	A	A
12	B	A
13	A	A
14	B	A
15	B	NT
16	B	NT
17	B	A
18	C	NT
19	A	A
20	B	A
21	--	NT
22	C	A
23	--	NT
24	B	A
25	C	B
26	< 50%效力	A
27	A	A
28	A	A
29	C	C
30	C	NT
31	NT	NT
32	NT	NT
33	C	A
34	C	A
35	A	A
36	A	A
37	A	A
38	A	A
39	A	B
40	NT	NT
41	A	A
42	A	A
43	B	B
44	A	B
45	B	B
46	A	A
47	A	B
48	A	B
49	A	A
50	B	A
51	A	A
52	B	B
53	A	A
54	A	A
55	A	A
56	A	A
57	A	A
58	A	A
59	A	B

[0779]

实施 例	FLIPR_CRAC:9 点 CRC:O1S1_JR251:IC50:峰值相对于基 础(uM)	FLIPR_CRAC:9 点 CRC - Fluo4_TG-D:RBL-2H3:IC50:上升斜率 0-7sec (M)
60	A	A
61	A	A
62	A	B
63	C	NT
64	--	NT
65	C	NT
66	--	NT
67	B	NT
68	--	NT
69	B	A
70	--	NT
71	A	A
72	A	A
73	B	B
74	A	A
75	< 50%效力	C
76	A	A
77	B	A
78	C	B
79	C	B
80	C	A
81	C	A
82	A	A
83	C	A
84	A	A

[0780] A : $IC_{50} < 0.6 \mu M$; B : $IC_{50} = 0.6 - 1.2 \mu M$; C : $IC_{50} > 1.2 \mu M$; NT = 未测定。

[0781] 实施例 86 : 体外 I_{CRAC} 膜片钳试验 :

[0782] 目的

[0783] 本试验的目的是检测具有式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 结构的化合物在体外对克隆的 CRAC 通道 (在 HEK293 细胞中稳定表达的 Orai1 和 STIM1 基因) 的影响, 所述通道负责 I_{CRAC} (钙释放激活的钙通道电流)。

[0784] 测试物 and 对照物

[0785] 制剂 : 在二甲亚砜 (DMSO) 中制备测试物储备溶液, 并冷冻储存。每天通过将储备溶液稀释到适当的外部记录缓冲液中, 新鲜制备测试物浓度。如有必要, 则在环境室温下超声处理 (2510 型, Branson Ultrasonics, Danbury, CT) 测试物制剂, 以促进溶解。在某些情况下, 测试溶液包含至多 0.1% 的 DMSO, 并且 0.1% DMSO 的存在不影响通道电流。

[0786] 测试物浓度和数量

[0787] 通常评价每个测试物的三 (3) 个浓度 (0.1、1 和 $10 \mu M$) 的影响。将测试物称重, 并在 DMSO 中制备为 30mM 或 10mM 储备溶液。在外部记录缓冲液中稀释 DMSO 储备液, 以制备 $10 \mu M$ 测试溶液 (最终 DMSO 为 0.03% 或 0.1%)。将 $10 \mu M$ 测试溶液在外部记录缓冲液中稀释, 以制备 $1 \mu M$ 和 $0.1 \mu M$ 测试溶液。测试溶液包含至多 0.1% 的 DMSO (在最高浓度时), 将其在测试溶液中稀释至较低浓度。

[0788] 阳性对照物

[0789] 分批制备阳性对照物的储备溶液,等分以供单独使用,冷冻储存,并在六个月之内使用。每天通过将储备溶液稀释到外部记录缓冲液中,新鲜制备阳性对照浓度。在测试阳性对照物中的最终 DMSO 浓度至多是溶液的 0.1%。

[0790] 阴性对照物

[0791] 阴性对照物是在外部记录缓冲液中的 0.1%DMSO。

[0792] 克隆的离子通道测试系统

[0793] 按照 CalciMedica 标准方案,将细胞保持在组织培养箱中。将储备液保持在低温存储器中。将用于电生理学的细胞接种在塑料组织培养皿中。

[0794] HEK293 细胞

[0795] 用适当的离子通道 cDNA (Orai1/STIM1) 稳定地转染 HEK293 细胞。将细胞在补充有 10% 胎牛血清 (Gibco 10082)、100U/mL 青霉素 G 钠、1mM 丙酮酸钠 (Gibco 11360)、100 μ g/mL 硫酸链霉素 (Gibco 10378)、0.5mg/ml 遗传霉素 (Gibco 10131-035) 和 50 μ g/ml 吉欧霉素 (zeocin) (Invitrogen 45-0430) 的 DMEM (Gibco 11960) 中培养。细胞应保持在 $\leq 80\%$ 汇合度下。测试前一天,用不含钙 / 镁的 D-PBS 将培养皿中的细胞洗涤一次,用胰蛋白酶 / EDTA 处理,重新悬浮在培养基中,并计数。然后将细胞在含有 1% 胎牛血清的培养基中稀释,并在 24 孔组织培养皿中,将细胞以低密度 (5-10K) 接种到聚 D- 赖氨酸包被的盖玻片上,并置于组织培养箱 (设置为 37° C, 湿度 95% 的空气、6%CO₂ 气氛) 中。

[0796] 测试方法

[0797] 记录室 (Recording Chamber) 和测试物的灌注

[0798] 将含有细胞的盖玻片转移到记录室 (Warner Instruments) 中,同时连续灌注外部记录缓冲液。在记录 I_{CRAC} 期间,通过重力供给浴灌注 (gravity-fed bath perfusion), 将所有处理从一次性注射器贮器经由一次性聚乙烯管递送入特氟隆 (Teflon) 歧管中。流速设定在 1.2-1.5ml/min 之间,从而确保溶液在约 1 分钟内完全交换。所有实验都在环境温度下进行。

[0799] 测试物处理组

[0800] 对于其中施用测试物 10 分钟的实验,处理范例总结在表 2 中。对照记录缓冲液灌注五 (5) 分钟,同时发展 I_{CRAC} , 并建立稳定基线; 每个细胞用作其自己的对照。将每种测试物施加于幼稚细胞 ($n \geq 2$, 其中 $n = \text{细胞数目} / \text{浓度}$; 1 浓度 / 细胞), 持续十 (10) 分钟时间 (表 2)。洗去测试物十 (10) 分钟,以探究该效应的可逆性。将不含钙的外部记录盐水灌注两 (2) 分钟,以测定在不存在 I_{CRAC} 时的背景电流。再次施用含有钙的对照盐水三 (3) 分钟。

[0801] 对于其中在记录 I_{CRAC} 之前施用测试物 30 分钟的实验,处理范例总结在表 3 中。在每个实验开始之前,细胞与化合物在室温下温育 30 分钟,并且使化合物在整个 I_{CRAC} 记录期间保持存在。对照细胞仅接触载体。在中断和建立全细胞膜片钳配置之后,将记录缓冲液 ± 化合物灌注十 (10) 分钟。在该 10 分钟时期结束时,测量 I_{CRAC} 的幅度。通过将用化合物预处理的细胞中的 I_{CRAC} 信号与用载体预处理的细胞中的信号进行比较,来确定化合物的效果。

[0802] 表 2. 用于 10 分钟施用研究的测试物方案

[0803]

编号 (Epoch)	溶液	接触时间
1	基线对照 / 稳定	5 分钟
2	测试物	10 分钟
3	洗液	10 分钟
4	0 钙	2 分钟
5	对照	3 分钟

[0804]

[0805] 表 3. 用于 40 分钟施用研究的测试物表

[0806]

编号	溶液	接触时间
	测试物	30 分钟
1	测试物	10 分钟
2	洗液	10 分钟
3	0 钙	2 分钟
4	对照	3 分钟

[0807] 对照处理组

[0808] 作为阴性对照,将 0.1%DMSO 应用于幼稚细胞 ($n \geq 2$, 其中 n = 细胞数目)。这用于监测 I_{CRAC} 的降低幅度。作为阳性对照,将 $1 \mu M$ 的 4-(4- 溴苯基)-2-(3- 氟苯甲酰胺基) 噻吩-3- 甲酸常规地施加于幼稚细胞 ($n \geq 2$, 其中 n = 细胞数目)。

[0809] 全细胞膜片钳程序

[0810] 使用标准的全细胞膜片钳程序。胞外和胞内溶液的组成示于表 4 和表 5 中。在倒置显微镜 (Olympus IX71) 上使细胞显像,并使用 Multiclamp700B 放大器和 PClamp 软件 (Axon Instruments) 对其进行电压钳操作。简要地说,将充满细胞内溶液 (附录 1) 的硼硅酸盐膜片移液管定位在细胞膜上。一旦形成 $G \Omega$ 密封,就施加抽吸直至膜片破裂并且建立全细胞配置为止。用 Clampex 中的“膜测试”来评价该配置的质量,以测定细胞电容 (C_m)、输入电阻 (R_m)、存取电阻 (R_a) 和在 $-50mV$ 时的保持电流 (I_h)。数据储存在 CalciMedica 计算机网络上 (每夜进行备份),用于离线分析。

[0811] 表 4. 细胞外溶液组成 (浓度, mM)

[0812]

NaCl	120
TEA-Cl	10
HEPES	10
CaCl ₂	10 (和 0)
MgCl ₂	2 (和 12)
葡萄糖	10

[0813]

[0814] 用 NaOH 将 pH 调节至 7.2, 并用蔗糖将最终渗透度 (osmolarity) 调节至 325。每天制备溶液。除非另有说明, 溶液制备所使用的化学品购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), 并且是 ACS 试剂级纯度或更高等级。

[0815] 表 5. 细胞内溶液组成 (浓度, mM)

[0816]

Cs-谷氨酸盐	120
HEPES	10
BAPTA	20
MgCl ₂	3

[0817] 用 CsOH 将 pH 调节至 7.2。分批制备溶液, 等分, 并冷冻直到使用为止。每天使用新鲜的等分试样, 并整天在冰上储存。除非另有说明, 在溶液制备中使用的化学品购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), 并且是 ACS 试剂级。

[0818] I_{CRAC} 测试程序

[0819] 使用在胞内溶液中的 20mM BAPTA, 通过细胞内钙池的被动消耗而激活来自 Orail/STIM1 通道复合物的 I_{CRAC}。使用 Clampex 软件引发刺激电压方案 (在表 6 中示出) (每六 (6) 秒钟施加一次), 获得电压钳数据。在 10kHz 将电流数字化, 并在 2kHz 过滤。采用全细胞电容补偿。代表性的 I_{CRAC} 踪迹在图 2 中示出。

[0820] 表 6. 电压钳方案

[0821]

电压	描述
V _h +30 mV	最小化扫描之间的钙内流
10 毫秒内 V _{step} 达到 0 mV	评估“零”电流
10 毫秒内 V _{step} 达到 -100 mV	测量高驱动力时的 I _{CRAC}
50 毫秒内 V _{ramp} 达到 +100 mV	监测 I _{CRAC} 的向内整流谱
10 毫秒内 V _{step} 达到 +50 mV	估算泄漏电流

[0822]

[0823] 数据分析

[0824] 使用 Clampfit 软件进行数据分析。测量 -100mV 时的 I_{CRAC} , 将 5 分钟之后测量的电流用作基线对照。对于 10 分钟施用研究, 将施用测试物 10 分钟之后测量的电流相对于基线电流进行标准化, 并表示为 % 对照。对于 40 分钟施用研究, 将在 10 分钟 I_{CRAC} 记录时间结束时所测量的电流用作比较值。在“0 钙”缓冲液中测量的电流用于减去背景泄漏电流。将每个测试物浓度 ($n \geq 2$) 的数据点拟合至 S 形函数 (SigmaPlot), 以确定 IC_{50} 值和 Hill 斜率。

[0825] 体内实施例

[0826] 实施例 87: 肥大细胞脱粒的体外测定

[0827] 细胞:

[0828] RBL-2H3 细胞获自 ATCC, 并在 37°C / $6\%\text{CO}_2$ 下保持在含有 10%FBS 的完全培养基中。

[0829] 测定:

[0830] a) 用 $1\mu\text{M}$ ~~毒~~胡萝卜素 / 20nMTPA 进行刺激

[0831] 在进行测定前一天, 将 RBL-2H3 细胞接种在 96 孔板中。使细胞在 37°C / $6\%\text{CO}_2$ 下生长过夜。次日, 用含有 $1.8\text{mM}\text{CaCl}_2$ 和 1.75% 胎牛血清 (FBS) 的 HBSS 缓冲液洗涤细胞两次。加入在含有 $1.8\text{mM}\text{CaCl}_2$ + 1.75%FBS 的 HBSS 缓冲液中制备的 $70\mu\text{L}$ 测试化合物, 并在 37°C / $6\%\text{CO}_2$ 下温育 10 分钟。通过加入 $7\mu\text{L}$ 的 11X ~~毒~~胡萝卜素 / TPA ($11\mu\text{M}$ ~~毒~~胡萝卜素 / 220nMTPA) 来刺激细胞, 并在 37°C / $6\%\text{CO}_2$ 下温育 120 分钟。收集培养基, 并通过加入 $70\mu\text{L}$ 在含有 $1.8\text{mM}\text{CaCl}_2$ 的 HBSS 中的 0.05% TritonX-100 来制备细胞裂解物。测定培养基和细胞裂解物两者中的 β -氨基己糖苷酶的水平。通过以下步骤进行 β -氨基己糖苷酶测定: 将 $40\mu\text{L}$ 含有 1mM 对硝基苯基-乙酰基-葡萄糖酰胺底物 ($\text{pH}4.5$) 的 0.05M 柠檬酸钠加入到 $10\mu\text{L}$ 样品 (条件培养基或细胞裂解物) 中, 在 37°C 下温育 60 分钟, 然后加入 $100\mu\text{L}$ 0.05M 碳酸钠 / 0.05M 碳酸氢钠 ($\text{pH}10.5$), 充分混合, 读取 405nm 处的吸光度。释放的 β -氨基己糖苷酶的百分比计算如下: $A_{405}(\text{培养基}) / [A_{405}(\text{培养基}) + A_{405}(\text{裂解物})]$ 。 IC_{50} 值计算为在载体处理的细胞中释放的 β -氨基己糖苷酶有 50% 得到抑制时的浓度。

[0832] b) 用 IgE-DNP 进行刺激

[0833] 在进行测定前一天, 将 RBL-2H3 细胞接种在 96 孔板中的 $200\mu\text{L}$ 完全培养基中, 保持 1 小时。加入 $20\mu\text{L}$ 的 11XDNP-IgE, 并使细胞在 37°C / $6\%\text{CO}_2$ 下生长过夜。次日, 用含有 $1.8\text{mM}\text{CaCl}_2$ 和 1.75% 胎牛血清 (FBS) 的 HBSS 缓冲液洗涤细胞两次。加入在含有 $1.8\text{mM}\text{CaCl}_2$ 和 1.75%FBS 的 HBSS 缓冲液中制备的 $70\mu\text{L}$ 测试化合物, 并在 37°C / $6\%\text{CO}_2$ 下温育 10 分钟。通过加入 $7\mu\text{L}$ 的 11XDNP-BSA 来刺激细胞, 并在 37°C / $6\%\text{CO}_2$ 下温育 30 分钟。收集培养基, 并通过加入 $70\mu\text{L}$ 在含有 $1.8\text{mM}\text{CaCl}_2$ 的 HBSS 中的 0.05% TritonX-100 来制备细胞裂解物。测定培养基和细胞裂解物两者中的 β -氨基己糖苷酶的水平。通过以下步骤进行 β -氨基己糖苷酶测定: 将 $40\mu\text{L}$ 含有 1mM 对硝基苯基-乙酰基-葡萄糖酰胺底物的 0.05M 柠檬酸钠 ($\text{pH}4.5$) 加入到 $10\mu\text{L}$ 样品 (条件培养基或细胞裂解物) 中, 在 37°C 下温育 60 分钟, 然后加入 $100\mu\text{L}$ 0.05M 碳酸钠 / 0.05M 碳酸氢钠 ($\text{pH}10.5$), 充分混合, 并读取 405nm 处的吸光度。释放的 β -氨基己糖苷酶的百分比计算如下: $A_{405}(\text{培养基}) / [A_{405}(\text{培养基}) + A_{405}(\text{裂解物})]$ 。 IC_{50} 值计算为在载体处理的细胞中释放的 β -氨基己糖苷酶有 50% 得到抑制时的浓度。

[0834] 实施例 88 :从 T 细胞释放细胞因子的体外测定 :

[0835] 细胞 :

[0836] JurkatE6-1 细胞从 ATCC 获得,并在 37° C/6%CO₂ 下保持在含有 10%FBS 的完全培养基中。

[0837] 测定 :

[0838] 在进行测定前一天,在 96 孔板中,以 1.5×10^5 个细胞 / 孔的密度将 Jurkat T 细胞接种在 90 μ L 含有 1.8mM CaCl₂ 和 1.75% 胎牛血清 (FBS) 的 HBSS 缓冲液中,保持 3 小时。加入 10 μ L 在 HBSS 中制备的 10X 测试化合物,并在 37° C/6%CO₂ 下温育 10 分钟。通过加入 10 μ L 的 11X PHA/TPA (27.5 μ g/mL PHA/880nM TPA) 来刺激细胞,并在 37° C/6%CO₂ 下温育 20 小时。次日,收集上清液,并按照生产商的方案通过 ELISA 来测定 IL-2 水平。IC₅₀ 值计算为在载体处理的细胞中 50% 的分泌的 IL-2 得到抑制时的浓度。

[0839] 表 B. 从 T 细胞释放细胞因子的体外测定数据

实施例	IL-2:PHA/TPA:Jurkat:IC50: (M)
1	A
2	A
3	A
4	A
5	A
6	A
7	A
8	NT
9	A
10	A
11	A
12	NT
13	A
14	NT
15	NT
16	NT
17	NT
18	NT
19	B
20	A
21	NT
22	NT
23	NT
24	A
25	NT
26	NT
27	A
28	A
29	NT
30	NT
31	NT
32	NT
33	NT

[0840]

[0841]

实施例	IL-2:PHA/TPA:Jurkat:IC50: (M)
34	NT
35	A
36	A
37	A
38	B
39	A
40	NT
41	C
42	A
43	NT
44	B
45	NT
46	A
47	C
48	C
49	NT
50	NT
51	A
52	NT
53	A
54	A
55	A
56	A
57	A
58	A
59	C
60	A
61	A
62	B
63	NT
64	NT
65	NT
66	NT
67	NT
68	NT
69	NT
70	NT
71	NT
72	A
73	NT
74	A
75	NT
76	NT
77	NT
78	NT
79	NT
80	NT
81	NT
82	A
83	A

[0842]

实施例	IL-2:PHA/TPA:Jurkat:IC50: (M)
84	A

[0843] A:IC50<0.05 μ M; B:IC50=0.05-0.1 μ M; C=IC50>0.1 μ M; NT= 未测定。

[0844] 实施例 89:在小鼠足垫 DTH 中式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物、CSA 或雷帕霉素的剂量-响应效应:

[0845] 目的:确定当在致敏以及诱导阶段给药时测试化合物对 mBSA 诱导的足垫 DTH 应答的剂量-响应效应。

[0846] 动物:雄性 SwissWebster 小鼠,在开始研究时大约 20-25 克。

[0847] 材料:甲基化 BSA(Sigma) 弗氏完全佐剂 (Difco) 加补充结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) H37RA (Difco)。

[0848] 总体研究设计:用异氟烷麻醉小鼠,在尾底皮内注射抗原 0.1ml (D0、D07)。通过在水溶液中制备 4mg/ml 溶液来准备抗原。等体积的抗原和加入 4mg/ml MTB 的弗氏完全佐剂 (在向油中加入 MTB 后超声处理 5 分钟) 通过手动混合进行乳化,直到该物质的珠粒在放入水中时仍保持其形状。在第 0 天开始用测试化合物处理,每天一次 (24 小时间隔),并继续到第 10 天进行攻击时。

[0849] 在第 10 天向动物的右后足垫内注射 20 μ l 的 10mg/ml mBSA。向 5 只未致敏的雄性动物的足垫内注射 mBSA。24 小时后 (第 11 天) 在内踝和外踝处横切左右后爪,称重,并测量由注射抗原引起的重量差异。

[0850] 统计学分析。用 Student t 检验或具有 Dunnett 后检验的 ANOVA 分析每组爪重量 (平均值 $\pm$ SE) 的差异。统计学显著性设定于 $p \leq 0.05$ 。

[0851] 表 7. 处理组雄性动物

[0852]

组别	数目	每天一次口服 10 ml/kg 处理
1	5	正常对照(未致敏)仅向右足垫注射 mBSA
2	8	DTH+载体(70% PEG400/30%水)
3	8	DTH+测试化合物 (50 mg/kg, 口服, 每天一次)

[0853]

组别	数目	每天一次口服 10 ml/kg 处理
4	8	DTH+测试化合物 (100 mg/kg, 口服, 每天一次)
5	8	DTH+测试化合物 (200 mg/kg, 口服, 每天一次)
6	8	DTH+测试化合物 (300 mg/kg, 口服, 每天一次)
7	8	DTH+CSA (100 mg/kg, 每天一次, 腹膜内)
8	8	DTH+雷帕霉素(5 mg/kg, 每天一次, 腹膜内)

[0854] 预期式 (I)-(IV) 的化合物在该模型中是有效的。

[0855] 实施例 90:式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物在大鼠中的药代动力学数据:

[0856] 经口施用的在 25%PEG400/20% 乙醇 /55% H_2O 载体中的式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物在大鼠中的生物利用度和血浆药代动力学性质。两个包括体重大约 250–300 克的雄性 Sprague-Dawley 大鼠的处理组（每组 3 只大鼠）如下给药：1) 静脉注射给药组，施用 2mg/kg；和 2) 口服给药组，施用 10mg/kg。每组至多收集 10 个时间点。典型的时间点为：给药前、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时、12 小时和 24 小时。在每一时间点经由颈静脉插管收集至多 300 μ L 全血。将全血收集到含抗凝血剂的微量离心管中，在微型离心机中以 5000rpm 离心 5 分钟，然后将血浆转移到干净的微量离心管。对血浆样品进行生物学分析。

[0857] 实施例 91：式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物在胶原蛋白诱导的关节炎 (CIA) 大鼠模型中的效应：

[0858] 目的：确定通过每天一次口服给药施用的测试化合物在抑制大鼠炎症、软骨破坏和进行性 II 型胶原蛋白关节炎的骨吸收方面的效力。

[0859] 动物：在研究开始时重 125–150g 的雌性 Lewis 大鼠 (Charles River#7246950)。用胶原蛋白注射 40 只大鼠，在第 10 和 11 天得到完全应答者。4 只未免疫的动物作为正常对照。

[0860] 材料：测试化合物、II 型胶原蛋白、弗氏不完全佐剂、乙酸。测试化合物以 10mg/ml 的浓度在 50%PEG400/50% 水中制备。通过在 0.01N 乙酸中制备 4mg/ml 溶液来制备胶原蛋白。通过手动混合乳化等体积的胶原蛋白和弗氏不完全佐剂，直到置于水中时该物质的珠粒仍保持其形状。

[0861] 总体研究设计：动物（关节炎：10 只大鼠 / 组，正常对照：4 只大鼠 / 组）。

[0862] 用异氟烷麻醉关节组中的动物，并注射胶原蛋白 (D0)；每只动物接受 300 μ L 的混合物，分布在背部 3 个皮下部位。在第 6 天 (D6) 再次麻醉动物，如前所述进行第二次胶原蛋白注射。

[0863] 在第 0 天用 5ml/kg 剂量体积的口服溶液开始以 24 小时间隔（每天一次）口服施用式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 的化合物。在关节炎的第 0、3、6 天和 9–17 天对大鼠称重，并在第 9 天开始每天对脚踝进行测径器测量。在关节炎的第 17 天测量最终体重。在第 17 天，麻醉所有动物以进行终点采血，然后无痛致死。随后移取后爪和膝，称取后爪重量，然后（连同膝一起）置于福尔马林中进行针对显微镜检查的处理。还移取肝脏、脾脏和胸腺和肾脏，剪掉无关的组织并称重。为了组织病理学检查而将肾脏保留在福尔马林中。

[0864] 采样在 1 天中进行，并且涉及第 2–5 组，保存来自所有组的样品。这导致所有动物被相似地处理，并且对临床参数和最终肝脏重量来说至关重要。

[0865] 实施例 92：式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物对 DNBS 诱导的大鼠结肠炎的效果：

[0866] 程序：在使用前让重量为 200 ± 20 g 的雄性 Wistar 大鼠禁食 24 小时。通过用 12cm 长的导管结肠内灌注 DNBS (2, 4-二硝基苯磺酸, 20mg, 在 0.5ml 乙醇中, 30%)，接着通过导管轻轻注射空气 (2ml) 以确保溶液留在结肠中，来诱导远端结肠炎。将动物分为 5 只一组。在 DNBS 灌注前 24 小时和 1 小时通过合适的给药途径每日一次或每日 2 次施用测试物和载体，然后连续施用 6 天。一个正常对照组单用 0.9%NaCl 处理，而不进行 DNBS 攻击。在每日 2 次给药的最后给药后 12 小时及在每日 1 次给药的最后给药后 24 小时处死动物，移取结肠并称重。在实验期间，每日监测体重、粪便潜血和大便稠度。此外，当在移取结肠前打开腹

腔时,记录结肠和其他器官之间的粘连,也记录移取后是否存在结肠溃疡,以及每一结肠的称重(按照已确立的评分标准记录肉眼可见损伤的评分)。按照以下公式计算结肠与体重的比率:结肠(g)/体重 $\times 100$ 。用载体对照+DNBS组相对于载体对照组的比率的“净”增加作为与单个治疗组进行比较的基础,并表示为“Dec. (%)”(降低百分比)。相对于载体处理对照组,结肠与体重比率降低30%或更多($\geq 30\%$)被认为是显著的。

[0867] 柳氮磺吡啶用作标准测试剂。(Hogaboam CM等人,An orally active non-selective endothelin receptor antagonist,bosentan,markedly reduces injury in a rat model of colitis.Eur J Pharmacol.309:261-269,1996;YueG等人,the 21-aminosteroid tirilazid mesylate ameliorates inflammatory bowel disease in rats.J Pharmacol Exp Ther.276:265-270,1996。)

[0868] 预期式(I)-(IV)的化合物在该模型中减少结肠炎。

[0869] 实施例93:式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物对大鼠中的皮肤移植物排斥的影响:

[0870] 程序:无特定病原体的Lewis and Brown Norway大鼠(10周龄)购自Charles River,并圈养在清洁常规条件下。处理所述动物,并使其适应环境两周时间。皮肤供体:10周龄的雌性Brown Norway大鼠。皮肤接受者:10周龄的雌性Lewis大鼠。

[0871] 将供体Brown Norwa大鼠杀死,充当5至8次皮肤移植的供体。杀死Brown Norway大鼠之后,立即刮下大鼠的腹部皮肤,获取直径大小为20mm的皮肤移植物。除去结缔组织之后,将这些移植物移植到Lewis大鼠上。通过以下步骤进行该程序:在异氟烷麻醉下,刮下Lewis大鼠的上背部皮肤,通过冲切取下一块直径为15mm的皮肤,并将其置换为源于Brown Norway大鼠的皮肤移植物。

[0872] 在该研究期间,每个移植物用Safil6/0紫(B Braun,Aesculap)以4-6针来固定,并覆盖石蜡纱布敷料BP(Paraffin Gauze Dressing BP)(3 $\times$ 3cm, Smith&Nephew)(一块纱布和外科胶带)。这种处理使得因非排斥原因造成的移植物脱落的机会降到最小。

[0873] 在所有情况下,用绷带保护移植物;这些绷带在六天之后去除,以能够每日检查移植物。

[0874] 通过评价炎症的第一指征(发红)和坏死(移植物变硬和变黑)来监测排斥。

[0875] 实施例94:式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物在活动性类风湿性关节炎患者中的安全性及疗效的II期临床试验:

[0876] 本II期临床试验的目的是研究在活动性类风湿性关节炎患者中单次及重复静脉内输注式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物的安全性、耐受性、PK、PD和疗效。

[0877] 患者:合格的个体应为18至75岁的男性及女性。

[0878] 标准:

[0879] 入选标准:

[0880] • 所有个体必须使用可接受的避孕,以确保在研究过程中以及对于男性在给药后至少12周和对于女性在给药后32周无妊娠发生;

[0881] • 除重量范围为55-95kg外,体重指数应在18.5-35kg/m²范围内(含);

[0882] • 个体必须能够签署知情同意书,并可遵从研究要求和时间表;

[0883] • 个体必须根据1987年修订的美国风湿病学会(ACR)标准诊断为RA;

- [0884] • 个体必须在筛选时和给药前具有大于 4.2 的 DAS28 疾病活动性评分；
- [0885] • 个体必须在筛选时和给药前具有 $>0.5\text{mg/dl}$ 的 CRP 血清水平或 28mm/小时 的 ESR 水平；
- [0886] • 个体在过去没有接受任何生物学治疗,包括用于治疗类风湿性关节炎的生物制品；
- [0887] • 个体在筛选时必须具有包括以下的肝功能检验结果:丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 在正常值上限 (ULN) 的 1.5 倍内,碱性磷酸酶 (ALP) 在 ULN 的 3 倍内。患者必须在筛选时也具有在 ULN 以内的总胆红素；
- [0888] • 个体必须在筛选前接受至少 3 个月的甲氨蝶呤,并且必须接受稳定剂量的甲氨蝶呤 (至多 25mg/周) 至少 8 周,并愿意在整个研究期间保持该剂量；
- [0889] • 如果除了甲氨蝶呤外还施用柳氮磺吡啶,个体必须在筛选前接受稳定剂量至少 4 周,并愿意在整个研究期间保持该剂量；
- [0890] • 如果除了甲氨蝶呤外还施用羟氯喹或氯喹,个体必须在筛选前接受稳定剂量至少 3 个月,并愿意在整个研究期间保持该剂量；
- [0891] • 施用其他口服抗风湿药治疗 (可包括非甾体抗炎药 (NSAID)、COX-2 抑制剂、口服糖皮质激素例如泼尼松龙 (约 10mg/天)) 的个体必须在筛选前接受稳定给药方案至少 4 周,并愿意在整个研究期间保持该方案。接受肌肉内糖皮质激素例如甲泼尼龙 (约 120mg/月) 的个体必须在筛选前接受稳定给药方案至少 3 个月,并愿意在整个研究期间保持该方案；
- [0892] • 个体必须在此前接受稳定剂量的叶酸盐补充剂 (5mg/周) 至少 4 周。
- [0893] 排除标准:
- [0894] • 经筛选医学评价、实验室检查 (例如血液学参数在正常限度之外) 或 ECG (12 导联或 Holter) 确定的任何临床相关异常；
- [0895] • 个体在筛选时具有乙型肝炎表面抗原或丙型肝炎抗体阳性结果；
- [0896] • 个体在过去 6 个月内不止一次有肝功能检验升高史 (ALT、AST 和 $\text{ALP} > 3 \times$ 正常上限 (ULN); 总胆红素 $> 1.5 \times \text{ULN}$)；
- [0897] • 先前接触过结核分枝杆菌或过去受其感染过；
- [0898] • 个体具有急性感染；
- [0899] • 个体具有重复感染、慢性感染或机会感染史,在研究者和 / 或 GSK 医学监测者看来,这会让个体在参加该试验时处于不能接受的风险中；
- [0900] • 个体具有恶性肿瘤史,不包括手术治愈的基底细胞癌或子宫颈癌已治愈的女性 (>2 年前)；
- [0901] • 个体具有人免疫缺陷病 ~~毒~~ (HIV) 或其他免疫缺陷病史；
- [0902] • 个体的计算肌酐清除率小于 50ml/min ；
- [0903] • 个体具有明显的心脏、肺、代谢、肾、肝或胃肠道病状,在研究者和 / 或 GSK 医学监测者看来,这会让个体在参加该试验时处于不能接受的风险中；
- [0904] • 个体在筛选的 1 个月内已经施用环孢菌素、来氟米特、环磷酰胺或硫唑嘌呤。过去施用过环孢菌素、来氟米特、环磷酰胺或硫唑嘌呤的个体必须已经从所有药物相关不良事件中恢复；

[0905] •个体在筛选前的1个月内已经施用金盐或D-青霉胺,过去施用过金盐或D-青霉胺的个体必须已经从所有药物相关不良事件中恢复;

[0906] •个体在筛选的1个月内已接受关节内糖皮质激素;

[0907] •近期出血性病症、贫血症、消化性溃疡病、吐血或胃肠道出血史;

[0908] •个体具有血液系统疾病或获得性血小板病症史,包括药物诱导的血小板减少症、急性先天性血小板减少症或维勒布兰德氏病;

[0909] •个体在过去12个月内具有已知的颅内出血风险(包括中枢神经系统(CNS)手术),在6个月内具有动脉血管畸形、动脉瘤、明显的闭合性头部创伤,或研究者和/或医学监测者认为有关的任何其他事件;

[0910] •个体的Hb<10g/10分升(dL)且血小板计数<150×10⁹/升(L);

[0911] •在给药前56天期间献血超过500ml;

[0912] •男性个体不愿避免与怀孕或哺乳的女性性交;或男性个体不愿在除其女性伴侣使用另一种避孕方式外还使用含杀精子剂的避孕套,所述另一种避孕方式例如是宫内避孕器(IUD)、含杀精子剂的子宫帽、口服避孕药、注射孕酮、皮下植入左炔诺孕酮或输卵管结扎,若女性在给药后至少12周可能怀孕;

[0913] •能够生育的女性个体不愿使用适当的避孕,如研究限制章节所定义的。若需要,将要确认女性不能生育(即绝经后或手术绝育,例如输卵管结扎或子宫切除术或双侧卵巢切除术)。绝经后状态将通过筛选时的血清卵泡刺激激素(FSH)和雌二醇浓度来确认。手术绝育被定义为女性已进行了有记录的子宫切除术、输卵管结扎或双侧卵巢切除术;

[0914] •个体在筛选前的12个月内具有药物滥用史;

[0915] •经常饮酒超过平均每周摄入大于21个单位或平均每日摄入大于3个单位(男性)或平均每周摄入大于14个单位或平均每日摄入大于2个单位(女性)的历史。经常在24小时期间饮用超过12个单位乙醇的个体也将排除在外。1个单位等于半品脱(220ml)啤酒/贮藏啤酒或1个量度(25ml)的烈酒或1杯(125ml)葡萄酒;

[0916] •筛选时妊娠检验阳性或泌乳;

[0917] •在之前3个月或5个半衰期(选择更长的那一个)参加任何试验药物的试验。

[0918] 研究设计:这是一项随机的、双盲的、安慰剂对照的适应性的剂量调查研究,以研究在活动性类风湿性关节炎患者中单次及重复静脉内输注式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物的安全性、耐受性、PK、PD和疗效。本研究分为2部分:A部分为适应性的剂量调查期,提供单次静脉内输注的安全性、耐受性、PK、PD。B部分为重复给药期,提供在静脉内重复输注所选择剂量水平后的安全性、耐受性、PK、PD和疗效。

[0919] 主要结果指标:

[0920] •在单次渐增施用式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物后1个月和3次重复施用式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物后3个月的安全性和耐受性。式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物在1个月时的临床疗效(DAS28评分)。

[0921] 次要结果指标:

[0922] •在单次和重复静脉内给药后的加权平均值DAS28;

[0923] •在单次和重复静脉内施用后式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物的血浆PK参数,包括游离的和结合的式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物(血清)浓度、AUC_(0-∞)、C_{max}、清除

率、分布容量和积累速率；

[0924] • 在单次和重复静脉内给药后的 DAS28 和 EULAR 响应标准；

[0925] • 在单次和重复静脉内给药后的 ACR20/ACR50/ACR70 响应；

[0926] • 用 28- 关节计数评估的肿胀关节数目；

[0927] • 用 28- 关节计数评估的触痛 / 疼痛关节数目；

[0928] • 个体的疼痛评价；

[0929] • 医生对关节炎状况的总体评价；

[0930] • 患者对关节炎状况的总体评价；

[0931] • 功能性残疾指数（健康评价调查问卷）；

[0932] • C- 反应蛋白（CRP）；

[0933] • ESR；

[0934] • 总体疲劳指数；

[0935] • HAQ 失能指数；

[0936] • 在单次和重复静脉内给药后的药效学生物标记；

[0937] • 血浆暴露模型的临床终点变化的特征性 AUC_{50} 和 EC_{50} ，如根据 S 形 E_{max} 和间接响应 PK/PD 模型所评估的；

[0938] • 免疫原性（人抗式（I）、（II）、（III）或（IV）化合物的抗体）。

[0939] 实施例 95：式（I）、（II）、（III）或（IV）化合物在严重顽固性斑块型银屑病患者中的安全性和疗效的 II 期临床试验；

[0940] 本 II 期临床试验的目的是研究式（I）、（II）、（III）或（IV）化合物在严重顽固性斑块型银屑病患者中的安全性、疗效和耐受性。

[0941] 患者：合格的个体应为 18 至 75 岁的男性及女性。

[0942] 标准：

[0943] 入选标准：

[0944] • 患者罹患严重顽固性斑块型银屑病，并至少一种全身疗法（对于本研究而言，认为补骨脂素及紫外线 A 为全身疗法）无效；

[0945] • 患者具有至少 10% 的 BSA 的银屑病累及；

[0946] • 患者具有 4 或更高的 PSGA 评分；

[0947] • 患者若为女性，则为手术绝育或绝经后 2 年，或者若为能生育的女性，则目前使用医学上可接受的避孕法并同意在研究期间（并在参与研究后 30 天）继续使用该方法。可接受的避孕方法包括：禁欲、与屏障法协同的甾体避孕药（口服、透皮、植入或注射）或宫内避孕器（IUD）；

[0948] • 患者若为男性，则为手术绝育，或者若能够生育后代，则目前使用被认可的节育方法并同意在研究期间（并在施用最后一剂式（I）、（II）、（III）或（IV）化合物后 60 天，因为可能对精子发生有影响）继续使用该方法；

[0949] • 患者必须愿意并能够遵守研究程序和限制，并愿意如本方案所规定的回到诊所进行随访评估。

[0950] 排除标准：

[0951] • 患者已经接受以下治疗：在计划研究治疗的第一天前的 4 周内接受全身性银屑

病治疗（特别是，类视黄醇、甲氨蝶呤、环孢菌素 A、依那西普、依法珠单抗、其他生物药剂或其他免疫调节剂）；或在 2 周内接受基于紫外线的治疗；或在 6 周内接受阿来西普治疗；

[0952] • 患者在计划研究治疗的第一天前的 1 周（7 天）内已经接受有效的 CYP3A4 抑制剂（包括环孢菌素、克霉唑、氟康唑、伊曲康唑、酮康唑、伏立康唑、红霉素、克拉霉素和醋竹桃霉素）、人免疫缺陷病~~毒~~（HIV）蛋白酶抑制剂或奈法唑酮的治疗；

[0953] • 患者目前正在接受华法林（warfarin）；

[0954] • 患者对式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物或式 (I)、(II)、或 (III) 化合物的任何组分具有超敏性；

[0955] • 患者在筛选访视（第 1 次访视）时经检测具有一个或多个以下血清化学值：

[0956] • 胆红素水平大于正常上限 (ULN) 的 2 倍；

[0957] • ALT 或 AST 水平大于 ULN 的 2 倍；

[0958] • 血清肌酸酐水平或高于 2mg/dL；

[0959] • 患者目前需要用蛋白酶抑制剂治疗 HIV；

[0960] • 患者正在就胃溃疡的临床诊断用药，或在前 3 周经历黑粪症或吐血 (hematoemesis)；

[0961] • 患者为怀孕或泌乳的女性；

[0962] • 患者在计划研究治疗的第一天前的 4 周内已经接受试验药物治疗。

[0963] 研究设计：这是关于式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物在严重顽固性斑块型银屑病患者中的安全性、疗效和耐受性的探索性、开放标签、非随机的剂量渐增研究。

[0964] 实施例 96：式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物用于预防肾移植后急性排斥的安全性和疗效的 II 期临床试验

[0965] 肾移植后的标准免疫抑制治疗为他克莫司、霉酚酸吗啉乙酯和泼尼松龙联合治疗。使用该方案，在移植后前 6 个月内急性排斥的发生率可降到约 20%。目前存在的主要挑战仍是通过防止慢性同种异体移植物肾病 (CAN) 来改进长期结果。因为急性排斥是 CAN 的有效预测指标，所以进一步降低急性排斥的发生率可改进长期移植物存活。本 II 期临床试验的目的是研究式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物用于预防肾移植后急性排斥的有效性和安全性。

[0966] 患者：合格的个体应为 18 岁及以上的男性及女性。

[0967] 标准：

[0968] 入选标准：

[0969] • 肾移植受者；

[0970] • 签署注明日期并有目击证人的 IRB 知情同意书。

[0971] 排除标准：

[0972] • 妊娠；

[0973] • HLA 相同的活体供者；

[0974] • 作为初始肾病的溶血性尿~~毒~~症综合征；

[0975] • 在先前移植物中复发的局灶性节段性肾小球硬化症；

[0976] • 先前移植失败超过 2 次和 / 或 PRA>85%；

- [0977] • 目前未用胰岛素治疗的糖尿病；
- [0978] • 总白细胞计数 $<3,000/\text{mm}^3$ 或血小板计数 $<75,000/\text{mm}^3$ ；
- [0979] • 乙型肝炎、丙型肝炎或 HIV 活动性感染；
- [0980] • 结核病史。
- [0981] 研究设计：这是关于预防性使用式 (I)、(II) 或 (III) 化合物的疗效和安全性的随机、双盲、安慰剂对照的介入研究。一组在移植时静脉内接受单剂量的式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物，另一组接受安慰剂输注。
- [0982] 主要结果
- [0983] • 确定在移植后前 6 个月内经活检证实的急性排斥的发生率和严重程度。
- [0984] 次要结果
- [0985] • 在 6 个月时由内源性肌酐清除率估测的肾功能；
- [0986] • 在 6 个月时慢性同种异体移植物肾病的发生率；
- [0987] • 在 6 个月时感染和恶性肿瘤的累积发生率；
- [0988] • 移植后前 6 个月期间的医疗费用；
- [0989] • 患者及移植物存活。
- [0990] 实施例 97：式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物在活动性溃疡性结肠炎 (UC) 患者中的安全性和耐受性的 II 期临床试验
- [0991] 本 II 期临床试验的目的是研究式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物方案在活动性溃疡性结肠炎患者中的安全性、耐受性。
- [0992] 患者：合格的个体应为 18 岁及以上的男性及女性。
- [0993] 标准：
- [0994] 入选标准：
- [0995] • 用 5-ASA 治疗并且也用 6-MP 和 / 或皮质类固醇治疗的活动性 UC，或先前已用 AZA、6-MP 或皮质类固醇治疗并且不耐受它们的 UC 患者；
- [0996] • 在施用研究药物 ≤ 14 天时进行的 Mayo 评分为 6-10 分，且在内窥镜检查时为中度到重度疾病 (Mayo 评分至少为 2)；
- [0997] • 如果在施用研究药物之前按照以下方案用药并且如果在研究期间预计没有变化，那么施用以下药物的个体可以入选本研究：
- [0998] ◦ 每天泼尼松龙 $\leq 20\text{mg}$ (或等同量) (在施用研究药物之前剂量必须稳定至少 2 周)；
- [0999] ◦ 5-ASA (在施用研究药物之前剂量必须稳定至少 4 周)；
- [1000] ◦ AZA 或 6-MP (在施用研究药物之前剂量必须稳定至少 3 个月)；
- [1001] ◦ 直肠类固醇或 5-ASA (在施用研究药物之前剂量必须稳定至少 4 周)；
- [1002] • 使用直肠药物的个体经乙状结肠镜检查必须具有 $\geq 20\text{cm}$ 的可见病变；
- [1003] • 筛选实验室值必须满足某些标准：
- [1004] ◦ 女性必须绝经 (>12 个月没有月经) 或手术绝育 (例如通过子宫切除术和 / 或双侧卵巢切除术) 或必须在施用研究药物前有效避孕 (例如口服避孕药、宫内避孕器 (IUD)、避孕套和杀精子剂双重屏障方法) 至少 4 周并同意在其参与研究期间继续避孕；和
- [1005] ◦ 性活跃的男性个体必须在研究期间使用屏障避孕法。

[1006] 排除标准：

- [1007] • 在施用研究药物前 8 周内的抗 TNF 治疗；
- [1008] • 在施用研究药物前 ≤ 4 周的任何更多的实验性治疗；
- [1009] • 在研究治疗前 ≤ 8 周用任何单克隆抗体或基于免疫球蛋白的融合蛋白进行的先前治疗；
- [1010] • 存在库欣综合征；
- [1011] • 很可能需要切除结肠的中 ~~毒~~ 性巨结肠或爆发性疾病；
- [1012] • 结肠镜检查或乙状结肠镜检查禁忌症；
- [1013] • 原发性或继发性免疫缺陷；
- [1014] • 除 UC 外的自身免疫疾病，不包括舍格伦综合征或甲状腺机能减退；
- [1015] • 恶性肿瘤史，不包括已充分治疗的和治愈的基底细胞癌或鳞状细胞皮肤癌或原位宫颈癌；
- [1016] • 严重精神疾病（具有稳定抑郁症并接受适当治疗的个体将被允许参与本研究）；
- [1017] • 由以下证明的急性或慢性感染证据：
- [1018] • 病原体和 / 或艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) ~~毒~~ 素大便培养阳性；
- [1019] • 筛查胸部 X 射线摄影术的发现，例如肺浸润物或腺病；
- [1020] • 目前的结核感染治疗，活动性 TB 的临床或放射性证据，或者对于北美个体而言没有预先预防的阳性 PPD；
- [1021] • 在施用研究药物前 ≤ 3 个月有带状疱疹；
- [1022] • 在研究治疗前 4 周内需要静脉注射抗生素或在加入时需要口服抗生素的活动性感染疾病；
- [1023] • HIV 或 AIDS；
- [1024] • 表明活动性或慢性感染的 HBV 或 HCV 阳性检验；
- [1025] • 需要用药的临床上显著的心脏病、不稳定型心绞痛、6 个月内心肌梗死或充血性心力衰竭；
- [1026] • 需要积极治疗的心律失常，临床上无意义的或小的传导异常除外；
- [1027] • 需要用药 / 治疗的脑血管病史；
- [1028] • 抗凝治疗或已知的出血障碍；
- [1029] • 需要积极治疗的癫痫病；
- [1030] • 已知的药物或酒精滥用；
- [1031] • 怀孕或哺乳；
- [1032] • 主要研究者认为将给个体带来研究药物风险或将难以解释治疗疗效或安全性的任何潜在的医学状况；或
- [1033] • 不能或不愿回来进行随访及不能或不愿遵守研究方案。
- [1034] 主要结果指标：
- [1035] • 在第 57 天时与筛选时相比的 Mayo 评分变化。
- [1036] 次要结果指标：
- [1037] • 缓解率

[1038] 研究设计 :这是式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物在经历爆发的活动性 UC 个体中的 II 期双盲、安慰剂对照、随机多剂量研究。所有个体都具有活动性疾病,同时使用含 5-ASA 的药物,并施用稳定剂量的皮质类固醇和 / 或硫唑嘌呤或 6-巯基嘌呤,或先前已施用这些药物但不能耐受它们。爆发被定义为在接受研究药物施用的 2 周内 Mayo 评分为 6-10 分,且经内镜检查可见中度到重度疾病活动性 (Mayo 内窥镜子评分至少为 2)。允许同时施用的药物 (含有皮质类固醇、硫唑嘌呤 (AZA)、6-巯基嘌呤 (6-MP) 和 5-氨基水杨酸盐 (5-ASA) 的化合物) 的剂量应该在研究期间保持不变。个体在第 1、15、29 和 43 天随机静脉内接受安慰剂或式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物。所有个体都最长到第 85 天以定期间隔时间到诊所进行安全性、疗效、药代动力学和 / 或药效学评价。所有个体都在最后一次施用研究药物后的 70 天进行联系。通过生命体征测量、临床实验室检验、身体检查、免疫原性评价、胸部 x-光检查、心电图和治疗中突发的不良事件的发生率和严重程度来确定安全性评价。通过在第 57 天时与筛选时相比的 Mayo 评分变化来确定活动性的主要临床评价。次要终点包括根据第 57 天时的 Mayo 评分确定缓解率、黏膜愈合评估和 IBDQ 评分与基线相比的变化。

[1039] 实施例 98 :式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物在多发性硬化症患者中的安全性和疗效的 II 期临床试验 :

[1040] 本 II 期临床试验的目的是研究式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物在复发缓解型多发性硬化症患者中的安全性、疗效和耐受性。

[1041] 患者 :合格的个体应为 18 至 65 岁的男性及女性。

[1042] 标准 :

[1043] 入选标准 :

[1044] • 确诊为复发缓解型多发性硬化症 ;

[1045] • 具有至少一个以下病史 :a. 在先前 2 年内 MS 最少复发 2 次但在筛选前 1 个月内未复发 ;b. 在先前 6 个月内 MS 复发但在筛选前 1 个月内未复发。

[1046] 排除标准 :

[1047] • 具有 CNS 疾病 (例如 CNS 淋巴瘤、系统性红斑狼疮) ;

[1048] • 具有显著的 MS 延髓累及或其他神经缺陷 ;

[1049] • 具有褥疮溃疡 ;

[1050] • 在筛选的 3 个月内曾接受免疫调节治疗。

[1051] 主要结果指标 :

[1052] • 到第 23 周在颅部 MRI 上新 Gd 增强的 T1-加权病变的累积数。

[1053] 次要结果指标 :

[1054] • 到第 23 周 MS 复发的总次数 ;在第 23 周展开残疾状态量表 (EDSS) 评分与基线相比的变化。

[1055] 研究设计 :这是在复发缓解型多发性硬化症患者中多次皮下注射式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物的 II 期双盲、安慰剂对照的、随机剂量范围研究。患者将在第 0、1、2、3、7、11、15 和 19 或 100 周接受式 (I)、(II)、(III) 或 (IV) 化合物或安慰剂的皮下注射。

[1056] 药物组合物

[1057] 肠胃外组合物

[1058] 为了制备适于注射给药的肠胃外药物组合物,将100mg式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物溶解于DMSO中,然后与10mL的0.9%无菌盐水混合。将该混合物引入到适于注射给药的剂量单位形式中。

[1059] 在另一个实施方案中,混合以下成分以形成可注射制剂:

	成分	量
[1060]	式(I)、(II)、(III)或(IV)的化合物	1.2 g
	乙酸钠缓冲溶液(0.4 M)	2.0 mL
	HCl (1 N)或 NaOH (1 M)	适量到合适的 pH
	水(无菌蒸馏水)	适量到 20 mL

[1061] 将以上除水外的所有成分混合,必要时搅拌,必要时稍微加热。然后加入足量水。

[1062] 口服组合物

[1063] 为了制备用于口服给药的药物组合物,将100mg的式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物与750mg的淀粉混合。将该混合物引入适于口服给药的口服剂量单元例如硬明胶胶囊中。

[1064] 在另一个实施方案中,紧密混合以下成分并压成单一刻痕片。

	成分	每片的量, mg
[1065]	式(I)、(II)或(III)的化合物	200
	玉米淀粉	50
	交联羧甲纤维素钠	25
	乳糖	120
	硬脂酸镁	5

[1066] 在又一个实施方案中,紧密混合以下成分并装入硬壳明胶胶囊中。

	成分	每片的量, mg
[1067]	式(I)、(II)或(III)的化合物	200
	乳糖, 喷雾干燥	148
	硬脂酸镁	2

[1068] 在又一实施方案中,混合以下成分以形成口服给药的溶液剂/混悬剂:

	成分	量
[1069]	式(I)、(II)或(III)的化合物	1 g
	无水碳酸钠	0.1 g
	乙醇(200 proof), USP	10 mL
	纯化水, USP	90 mL
	阿斯巴甜	0.003g

[1070] 舌下(硬锭剂)组合物

[1071] 为了制备用于含服给药的药物组合物,例如硬锭剂,将 100mg 式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物与 420mg 粉状糖与 1.6mL 淡玉米糖浆、2.4mL 蒸馏水和 0.42mL 薄荷提取物的混合物混合。轻轻地混合该混合物,倒入模子中以形成适于含服给药的锭剂。

[1072] 吸入组合物

[1073] 为了制备用于吸入给药的药物组合物,将 20mg 式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物与 50mg 无水柠檬酸和 100mL 的 0.9% 氯化钠溶液混合。将该混合物引入适于吸入给药的吸入递送单元例如喷雾器中。

[1074] 直肠凝胶组合物

[1075] 为了制备直肠递送的药物组合物,将 100mg 式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物与 2.5g 甲基纤维素(1500mPa)、100mg 羟基苯甲酸甲酯、5g 甘油和 100mL 纯水混合。然后将得到的凝胶混合物引入适于直肠给药的直肠递送单元例如注射器中。

[1076] 栓剂制剂

[1077] 通过将式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物与 Witepsol™H-15(饱和植物脂肪酸的甘油三酯;Riches-Nelson, Inc., NewYork)混合制备总重量为 2.5g 的栓剂,其具有以下组成:

	成分	每个栓剂的量, mg
[1078]	式(I)、(II)或(III)的化合物	500
	Witepsol® H-15	余量

[1079] 局部凝胶组合物

[1080] 为制备局部凝胶药物组合物,将 100mg 式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物与 1.75g 羟丙基纤维素、10mL 丙二醇、10mL 肉豆蔻酸异丙酯和 100mL 纯化的乙醇(USP)混合。然后将得到的凝胶混合物引入适于局部给药的容器例如管中。

[1081] 眼用溶液组合物

[1082] 为了制备眼用溶液药物组合物,将 100mg 式(I)、(II)、(III)或(IV)化合物与溶于 100mL 纯水中的 0.9g 的 NaCl 混合,并用 0.2 微米过滤器过滤。然后将得到的等渗溶液引入适于眼睛给药的眼用递送单元例如滴眼剂容器中。

[1083] 本文所述的实施例和实施方案仅为说明性目的,且在一些实施方案中,多种修改或改变包括在本公开内容的范围内和附加权利要求的范围内。

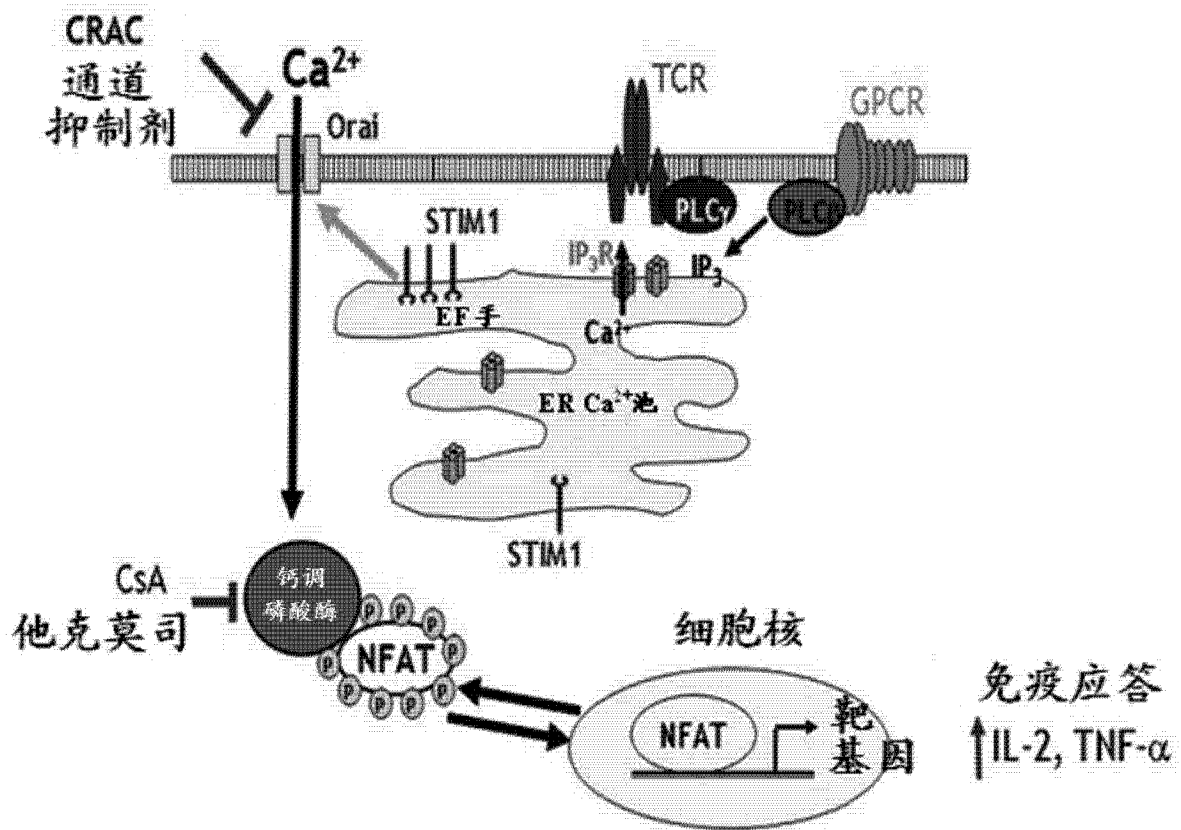
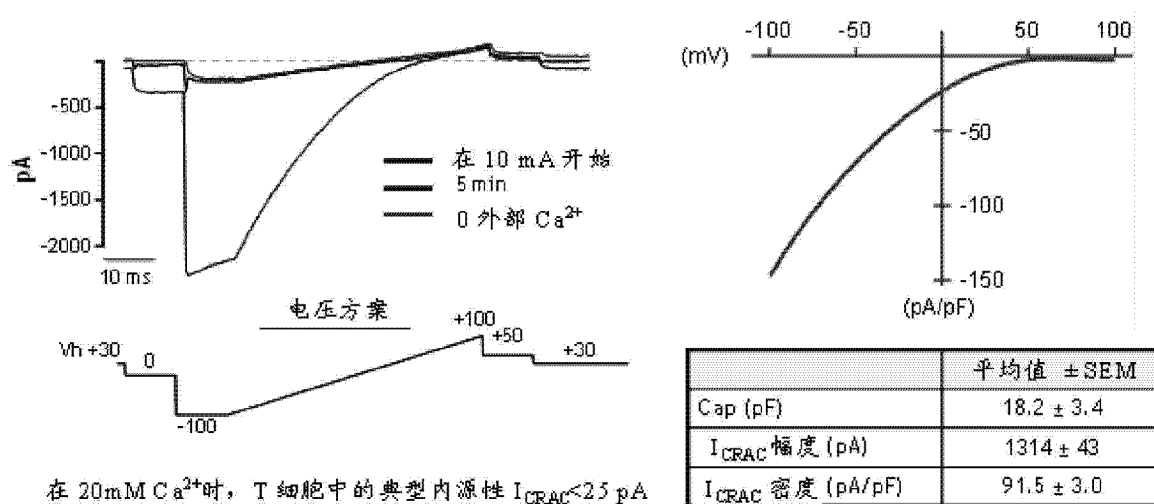


图 1



在紧接中断之后,在激活 I_{CRAC} 之前,以及在胞内钙池耗竭完全激活 I_{CRAC} 之后 5 分钟时,响应于电压刺激的典型 I_{CRAC} 踪迹。

图 2