

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680052429.9

[51] Int. Cl.

A01N 55/00 (2006.01)

A61K 31/695 (2006.01)

A61K 31/65 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 5 月 20 日

[11] 公开号 CN 101437403A

[22] 申请日 2006.12.20

[21] 申请号 200680052429.9

[30] 优先权

[32] 2005.12.20 [33] US [31] 60/752,935

[86] 国际申请 PCT/US2006/048716 2006.12.20

[87] 国际公布 WO2007/075849 英 2007.7.5

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.6

[71] 申请人 ICAGEN 公司

地址 美国北卡罗来纳

[72] 发明人 N·A·卡斯特尔 G·C·里戈登

D·S·克拉弗特

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 王 健

权利要求书 6 页 说明书 37 页

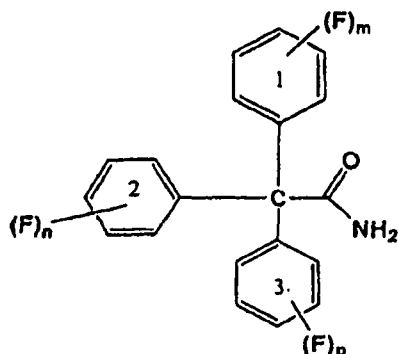
[54] 发明名称

使用三芳基甲烷化合物的治疗方法

[57] 摘要

本发明公开了钾流通的新型抑制剂用于治疗炎性过程诸如多发性硬化、胰岛素依赖性(I型)糖尿病、类风湿性关节炎、周围神经炎和肺性高血压症的应用。该化合物还可用于治疗 and 预防中风。这些抑制剂对 IK1 通道具有高特异性并且相对于非氟取代的同系物具有更高的稳定性。

1. 治疗或预防炎性过程的方法,所述方法包括对罹患所述炎性过程的对象施用治疗有效量的具有式 I 结构的化合物:



(I)

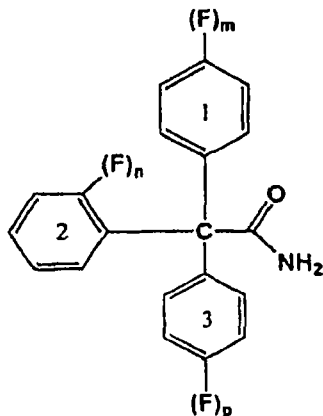
其中:

m、n 和 p 独立地选自 0 和 1, 并且 m、n 和 p 中至少之一是 1;

当 m、n 和 p 都是 1 时, 环 1 和环 2 的氟取代基所处的位置独立地选自乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位和乙酰胺取代基的对位, 并且环 3 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位; 和

当 p 是 0 且 m 是 1 且 n 是 1 时, 环 1 的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位, 环 2 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述化合物具有式 II 的结构:

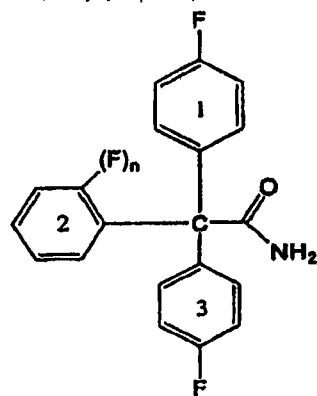


(II)

其中

m、n 和 p 独立地选自 0 和 1，并且 m、n 和 p 中至少之一是 1。

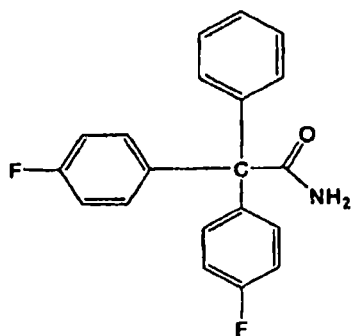
3. 权利要求 2 的方法，其中所述化合物具有式 III 的结构：



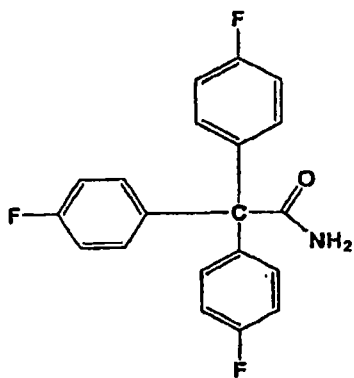
(III)

其中 n 是选自 0 和 1 的整数。

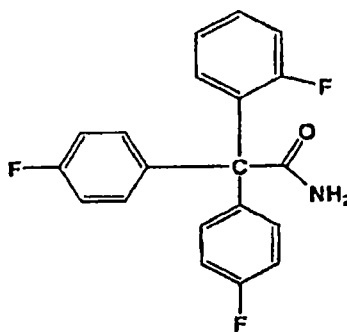
4. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物具有选自以下的结构：



；



；和



。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述炎性过程是选自以下的疾病: 多发性硬化, 胰岛素依赖性 (I 型) 糖尿病, 类风湿性关节炎, 周围神经炎和肺性高血压症。

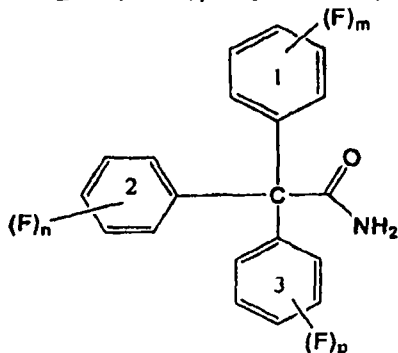
6. 权利要求 5 的方法, 其中所述炎性过程是多发性硬化。

7. 权利要求 5 的方法, 其中所述炎性过程是肺性高血压症。

8. 权利要求 1 的方法, 其中所述炎性过程由钾通道介导。

9. 权利要求 8 的方法, 其中所述钾通道是 IK1。

10. 治疗或预防多发性硬化的方法, 所述方法包括对罹患多发性硬化的对象施用治疗有效量的具有式 I 结构的化合物:



(I)

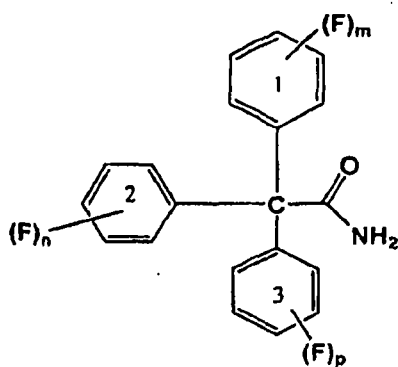
其中:

m、n 和 p 独立地选自 0 和 1, 并且 m、n 和 p 中至少之一是 1;

当 m、n 和 p 都是 1 时, 环 1 和环 2 的氟取代基所处的位置独立地选自乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位和乙酰胺取代基的对位, 并且环 3 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位; 和

当 p 是 0 且 m 是 1 且 n 是 1 时, 环 1 的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位, 环 2 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。

11. 治疗或预防肺性高血压症的方法，所述方法包括对罹患肺性高血压症的对象施用治疗有效量的具有式 I 结构的化合物：



(I)

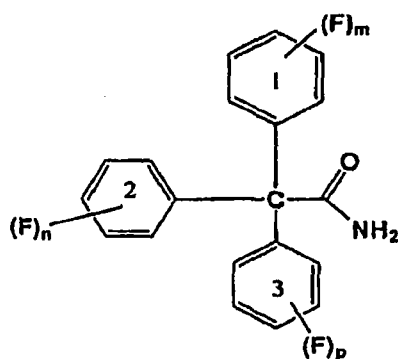
其中：

m、n 和 p 独立地选自 0 和 1，并且 m、n 和 p 中至少之一是 1；

当 m、n 和 p 都是 1 时，环 1 和环 2 的氟取代基所处的位置独立地选自乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位和乙酰胺取代基的对位，并且环 3 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位；和

当 p 是 0 且 m 是 1 且 n 是 1 时，环 1 的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位，环 2 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。

12. 治疗或预防中风的方法，所述方法包括对罹患中风和处在罹患中风危险下的对象施用治疗有效量的式 I 结构的化合物：



(I)

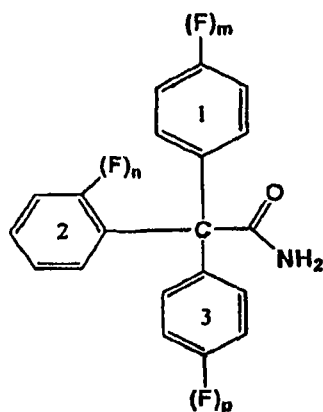
其中:

m、n 和 p 独立地选自 0 和 1, 并且 m、n 和 p 中至少之一是 1;

当 m、n 和 p 都是 1 时, 环 1 和环 2 的氟取代基所处的位置独立地选自乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位和乙酰胺取代基的对位, 并且环 3 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位; 和

当 p 是 0 且 m 是 1 且 n 是 1 时, 环 1 的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位, 环 2 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。

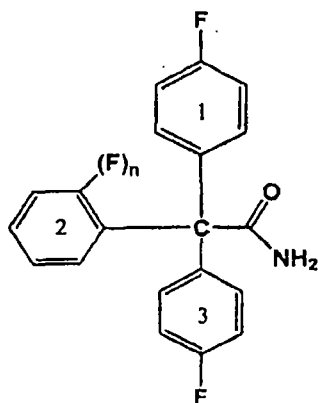
13. 权利要求 12 的方法, 其中所述化合物具有式 II 的结构:



(II)

其中 m、n 和 p 独立地选自 0 和 1, 并且 m、n 和 p 中至少之一是 1。

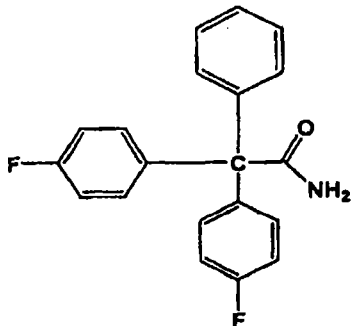
14. 权利要求 13 的方法, 其中所述化合物具有式 III 的结构:



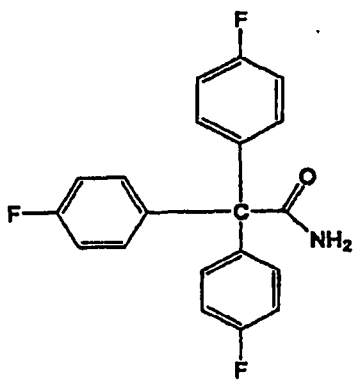
(III)

其中 n 是选自 0 和 1 的整数。

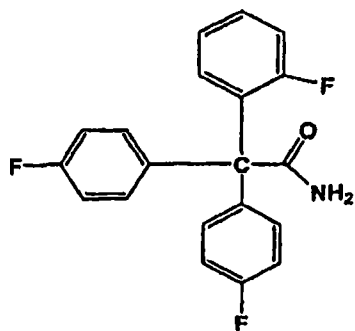
15. 权利要求 12 的方法，其中所述化合物具有选自以下的结构：



;



; 和



。

使用三芳基甲烷化合物的治疗方法

相关申请的交叉参考

本申请要求 2005 年 12 月 20 日提交的美国临时申请 60/752,935 的优先权, 该公开以全文并入本文用于所有目的。

发明背景

本发明的一个方面涉及治疗或预防炎性过程的方法, 所述炎性过程特别地包括多发性硬化和肺性高血压症。

多发性硬化 (MS) 是中枢神经系统的慢性炎性疾病。罹患 MS 的个体存在神经功能缺失, 包括视力丧失, 动作恶化, 感觉损伤, 失禁和其它与中枢神经系统缺陷有关的事件; 然而, MS 不损伤认知功能。MS 疾病进程具有变化剧烈的过程, 患者经历急性症状, 然后经历症状缓解期, 然后是后期进展形成慢性和变性病况。MS 的确切病因是未知的, 然而, 一些人假设 MS 可能是自身免疫、遗传、环境因素和/或病毒感染的综合所导致。有证据显示了 MS 的早期可能由自身免疫反应引起, 而慢性的后期可能是由于髓鞘和轴突下退化导致。Steinman, *Nature Immunology*, 2: 762-764 (2001)。与这一学说一致的是, 在鼠科动物模型中进行的近期研究显示了激活的 CD4⁺ T 细胞通过攻击中枢神经系统而对 MS 发病机理有贡献。因此, 抑制自身反应性 T 细胞代表了潜在的治疗方法。Beeton, C. 等, *PNAS*, 98: 13942-13947 (2001); Wulff 等, *J. Clin. Invest.*, 111: 1703-1713 (2003)。

T 细胞通过 Ca²⁺ 离子经由 Ca²⁺ 释放激活的 Ca²⁺ (CRAC) 通道的内流被激活。为了平衡正离子的内流, 两种 K⁺ 通道, Kv1.3 和 IK1 工作以将 K⁺ 推出细胞。这些 K⁺ 通道通过两种不同的机制工作。Kv1.3 是电压门控

通道，其响应膜去极化而开放并工作以保持静止膜电位。Beeton 等，PNAS, 98: 13942-13947 (2001)。IK1 响应细胞内 Ca^{2+} 的增加并工作以使膜电位超极化。两种通道一起在 T 细胞的激活、粘着和移动中发挥重要作用。在 T 细胞中，IK1 和 Kv1.3 通道的 mRNA 和蛋白质表达响应抗原和促有丝分裂刺激物而上调。

这些钾通道因为其受限制的表达而是药物候选物的良好靶标。它们主要在血液和上皮细胞内表达。这些通道的特异性表达分布暗示了特异性 K^+ 通道抑制剂也许具有较少的副作用。

用实验方法证明的，几种已知抑制剂相对于 K^+ 通道选择性地阻断 Kv1.3 和 IK1 通道。得自 *Stichodactyla helianthus* (ShK) 的肽毒素抑制 Kv1.3 和 IK1 通道二者。体外试验表明 Shk-Dap²²、玛格毒素和 correolide 特异性抑制 Kv1.3 通道，而克霉唑和 TRAM-4 (克霉唑的合成类似物) 特异性抑制 IK1。Ghanshani 等，J. Biol. Chem. 275: 37137-37149 (2000)。Beeton 等人使用体外试验表明选择性 Kv1.3 阻断剂抑制被长期激活的 T 细胞的增殖，而选择性 IK1 阻断剂抑制被急性激活的 T 细胞的增殖。Beeton 等，PNAS, 98: 13942-13947 (2001)。

实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 小鼠摹拟 MS 的许多病理学特征，并且作为标准动物模型被广泛地研究。T 细胞缺失的实验动物表现出不能发展成 EAE 的能力，暗示了 T 细胞是人类 MS 发展所必需的。Beeton 等在过继转移 EAE 动物模型中识别了更全面的钾通道阻断剂，ShK，提供了防止致命性 EAE 过继转移和改善疾病进程的最有效的治疗。Kv1.3 特异性阻断剂 Shk-Dap²²，提供了其次的最好保护，而 IK1 特异性阻断剂 TRAM-34 提供了有效性最小的治疗。值得注意的是，Shk-Dap²² 和 TRAM-34 的组合比单独的 Shk-Dap²² 提供更大保护。这一结果可能通过在被长期激活的 T 细胞中 Kv1.3 通道比 IK1 通道的比例高得以解释。实际上，得自 MS 患者的髓磷脂反应性 T 细胞还包含高的 Kv1.3 对 IK1

的比例，暗示了这些细胞在疾病进程期间经历多个回合的抗原刺激。

与上述的过继转移鼠科动物模型相反，已经发现 TRAM-34 降低用髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白的肽片段免疫的小鼠中的 EAE 的发展。Madsen 等, Eur. J. Immunol. 35: 10 (2005); Reich 等, Eur. J. Immunol, 35: 1 (2005)。有趣的是，该研究表明 TRAM-34 对 T 细胞克隆扩增没有影响，但是其强烈地降低细胞因子表达水平。这些体内试验暗示了 Kv1.3 和 IK1 通道不具有多余的特征。因此，开发和试验新型的 K⁺通道阻断剂可能为了解分子机制以及治疗疾病提供了另外的信息。

某些目前已知的 IK1 抑制剂具有若干问题。克霉唑和其它相关抗真菌剂，包括咪康唑、益康唑、布康唑、奥昔康唑和硫康唑，已经表现出抑制 IK1 并防止 K⁺缺失，它们由于潜在的和观察到的肝脏毒性而不是理想的临床药物。它们还在与 IK1 的相互作用中具有较低的体内半衰期，较低的生物利用度，和较低功效。一些抑制剂与非 IK1 钙激活的钾通道具有非特异性相互作用。因此，仍然需要 IK1 通道抑制剂。本发明描述了一组选择性 IK1 通道抑制剂，其满足了这些和其它需要。

本发明可特别地用于治疗或预防肺性高血压症。因此，本发明提供了治疗或预防肺性高血压症的方法。该方法包括对罹患肺性高血压症的对象施用治疗有效量的具有式 (I) 结构的化合物。该方法可特别地用于那些还罹患镰状细胞病的对象。

本文所用的肺性高血压症 (或 PH) 是指在肺血管即肺动脉内的压力异常升高。随着时间的过去，增加的压力损伤肺大动脉和肺小动脉。最小血管的血管壁变厚，并且不再能够进行通常在血液和肺之间进行的氧和二氧化碳的转运。因此，血液中的氧含量可能降低。较低的氧含量可导致肺动脉狭窄 (收缩)。这些变化进一步增加了肺循环内的增高的压力。

在肺性高血压症下，心脏右侧必须更努力地工作以推动血液通过肺动脉进入肺。随着时间的过去，右心室变厚和增大，导致被称作肺心病的病况。

在有些人中，骨髓产生更多的红血球以补偿血液中较低的氧含量，导致被称作红细胞增多症的病况。额外的红血球导致血液变得更稠和更粘，进一步增加心脏负担。这些变化还使肺原性心脏病患者处在增加的肺栓塞的风险下，因为更浓稠的血液可能发生聚集并形成血块，主要发生在腿部静脉中。这些凝块可发生移位并移动到肺。

存在两种类型的肺性高血压症：原发性和继发性。两种类型的肺性高血压症在本文中都被涵盖在该术语内。继发性肺动脉高压较原发性肺动脉高压更常见。在原发性肺动脉高压中，病因未知，但是可能以肺动脉内的肌肉层的痉挛(收缩)为起点。女性患原发性肺动脉高压是男性的两倍，并且在被诊断时一半人群至少为 35 岁。继发性肺动脉高压是指由于其它影响肺结构或功能的疾病而发生的病况。

继发性肺动脉高压可由任何的阻止血液流动通过肺的疾病或引起持续的血中低氧的疾病引起。最常见的病因之一是慢性阻塞性肺病。当肺因疾病受损时，肺需要更努力地泵送血液通过它们。随着时间的过去，慢性阻塞性肺病破坏肺内的小肺泡及其小血管(毛细血管)。在慢性阻塞性肺病中，肺性高血压症的一个最重要的病因是肺动脉狭窄，其是血液氧含量较低的结果。

导致肺性高血压症的另一种疾病是肺纤维化，其导致在肺内形成大规模的瘢痕组织。瘢痕组织破坏肺循环，并使血液流动更困难。可以导致肺性高血压症的其它肺疾病包括囊性纤维化和某些职业肺病，诸如石棉肺和硅肺病。

较不常见的是，肺性高血压症由于手术或创伤引起的肺组织的大规模缺失所导致，或者由心衰，硬皮病，呼吸能力降低的肥胖症(匹克威克综合征)，牵涉呼吸肌的神经病学疾病，慢性肝病，HIV感染，和膳食药物导致。肺性高血压症的突发病因是引发严重问题的肺栓塞，其是其中血块进入并固定在肺动脉内的一种病况。

一些肺性高血压症患者患有结缔组织疾病，特别是硬皮病。当患者兼患两种病况时，在肺性高血压症症状出现之前通常发展为雷诺氏现象。

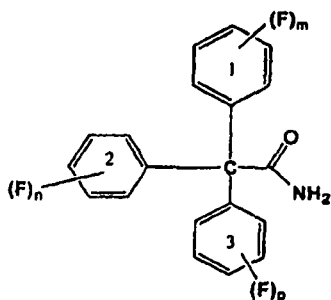
通过阻断 Kv1.3 和/或 IK1 通道而降低 T 细胞激活是针对炎性过程的治疗和/或预防方法。能抑制 Kv1.3 和/或 IK1 通道的化合物作为降低炎症的手段因此是令人期待的。虽然具有可论证的功效，迄今为止所研究的咪唑基的 Kv 1.3 和/或 IK1 通道抑制剂受到包括被文献广泛记载的潜在的肝脏毒性的若干缺点的限制。这一毒性由于抑制剂的低功效、与钙激活的钾通道而不是与 Kv1.3 和/或 IK1 通道的非特异性相互作用以及低的生物利用度而被加剧，这些中的每一个都促使抑制剂的更高剂量和更频繁的给药。

发明概述

如美国专利 6,288,122 中讨论的，三苯基乙酰胺基 K^+ 通道阻断剂是有前途的用于治疗镰状细胞病(SCD)的候选药物，该文献作为参考并入本文。另外，研究显示，三苯基乙酰胺基抑制剂是用于治疗炎性病况诸如 MS 或 PH 的潜在的候选药物。体外研究表明，三苯基乙酰胺基抑制剂，即表 1 中的化合物 3，具有长的半衰期，抑制 K^+ 通道的选择性高于抑制 IK1 通道的选择性。

因此，在第一方面，本发明提供了治疗或预防炎性过程的方法，

所述方法包括对罹患所述炎性过程的对象施用治疗有效量的具有式 I 结构的化合物:



式 I

其中 m 、 n 和 p 独立地选自 0 和 1, 并且 m 、 n 和 p 中至少之一是 1。

在示例性的实施方案中, 当 m 、 n 和 p 都是 1 时, 环 1 和环 2 的氟取代基所处的位置独立地选自乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位和乙酰胺取代基的对位, 并且环 3 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。在另外的示例性的实施方案中。当 p 是 0 且 m 是 1 且 n 是 1 时, 环 1 的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位, 并且环 2 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。

通过改变受疾病影响的细胞的细胞离子流通来控制炎性过程(例如多发性硬化)是强有力的治疗方法。另外, 对疾病过程和正常生理学二者中的细胞离子流通的作用的基本了解有希望提供新的治疗方式、方案和试剂。改变细胞离子流通的化合物, 特别是那些抑制钾流通的化合物, 作为用于阐明成为这些离子流通的基础机制的药物和探针是非常合乎需要的。同样地, 在基础研究和治疗应用中使用这些化合物的方法是研究人员和临床医师所采用的重要工具。因此, 这些化合物和方法也是本发明的目的。

因此, 在另一个方面, 本发明提供了抑制细胞的钾流通的方法。该方法包括使细胞接触一定量的有效抑制钾流通的式(I)的化合物。

用于治疗炎性过程诸如多发性硬化的重要的治疗路径是预防或延迟自身反应性 T 细胞生长。该生长停滞可同时伴有操纵 T 细胞的细胞离子流通。因此，在另一个方面，本发明提供了用于预防或延迟自身反应性 T 细胞生长的方法。该方法包括使 T 细胞接触一定量的有效预防或延迟自身反应性 T 细胞生长的式 (I) 的化合物。

因此，在另一个方面，本发明提供了治疗或预防多发性硬化的方法。该方法包括对罹患多发性硬化的对象施用治疗有效量的具有式 (I) 结构的化合物。在另一个示例性的实施方案中，该方法包括通过对有需要的哺乳动物施用本发明的化合物来治疗多发性硬化。

在另一个方面，本发明提供了治疗或预防肺性高血压症的方法。该方法包括对罹患肺性高血压症的对象施用治疗有效量的具有式 (I) 结构的化合物。在另一个示例性的实施方案中，该方法包括通过对有需要的哺乳动物施用本发明的化合物来治疗肺性高血压症。

在本发明的又一方面，本发明提供了治疗或预防中风的方法。该方法包括对罹患中风或处在罹患中风危险下的对象施用治疗有效量的具有式 (I) 结构的化合物。有关于使用离子通道调节剂 - 开放剂或阻断剂 - 治疗神经和心血管疾病的卓越记录。离子通道阻断剂作为全面类别，代表了用于治疗中风、癫痫症和心律不齐的主要治疗剂。在另一个示例性的实施方案中，该方法包括通过对有需要的哺乳动物施用本发明的化合物来治疗或预防中风。

本发明的这些和其它目的和优点将从以下的详细说明和实施例变得显而易见。

发明的详细说明

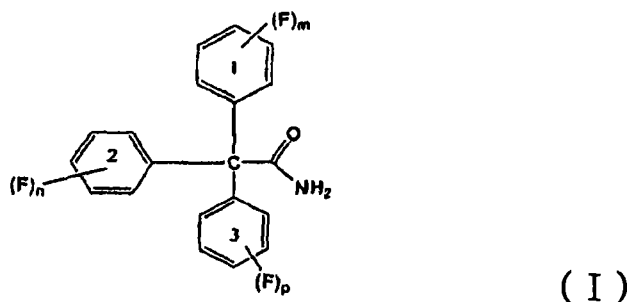
缩写和定义

本文使用的“生物培养基”是指体外和体内生物环境。示例性的体外“生物培养基”包括但不限于细胞培养物、组织培养物、匀浆、血浆和血液。体内应用通常在哺乳动物优选人中进行。

“氟代烷基”是指“被取代的烷基”的子类，包括被部分氟化或完全氟化的烷基或被取代的烷基。氟取代可以仅仅是烷基部分的取代，或者其可以是实质上与任何其它的取代基或取代基组的任何组合。

化合物

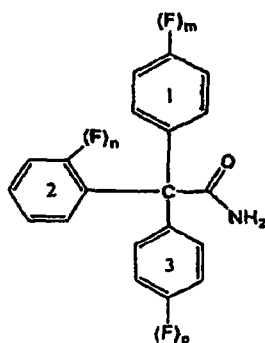
在第一方面，本发明使用了具有式(I)结构的化合物：



其中 m 、 n 和 p 独立地选自 0 和 1，并且 m 、 n 和 p 中至少之一是 1。

在示例性的实施方案中，当 m 、 n 和 p 都是 1 时，环 1 和环 2 的氟取代基所处的位置独立地选自乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位和乙酰胺取代基的对位，并且环 3 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。在另外的示例性的实施方案中。当 p 是 0 且 m 是 1 且 n 是 1 时，环 1 的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位，环 2 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。

在示例性的实施方案中，本发明使用的化合物具有式(II)的结构：

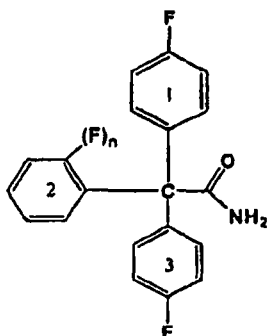


(II)

其中 m 、 n 和 p 独立地选自 0 和 1, 并且 m 、 n 和 p 中至少之一是 1。

符合这种结构的化合物如表 1 所示。

在另一个示例性的实施方案中, 本发明使用的化合物具有式 (III) 的结构:

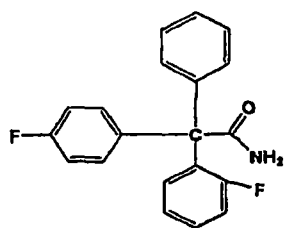


(III)

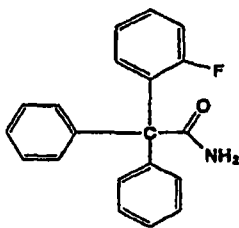
其中 n 为 0 或 1。

在结构上与本发明的化合物密切相关的化合物也如表 1 所示。在结构上与本发明的化合物相关的化合物用作“基线”, 用于评价本发明的氟代化合物的优点和意想不到的性质和益处。

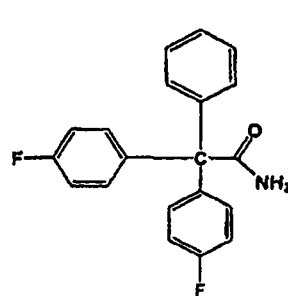
表 1



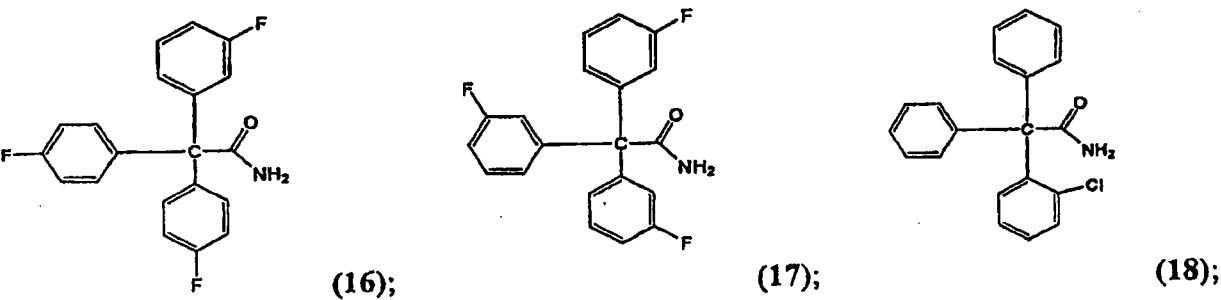
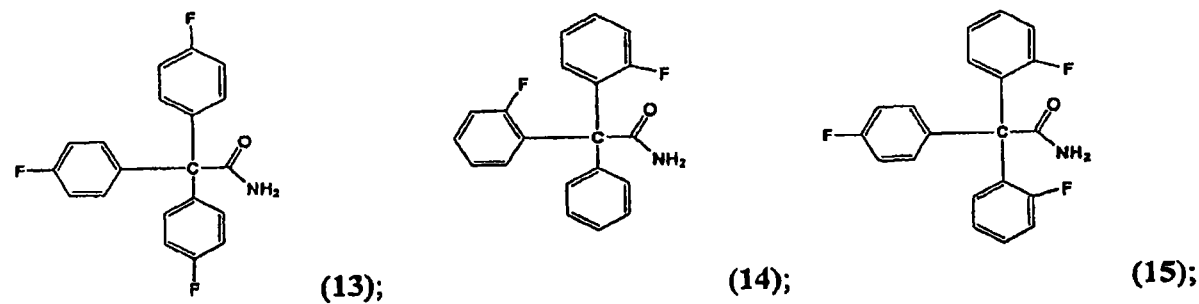
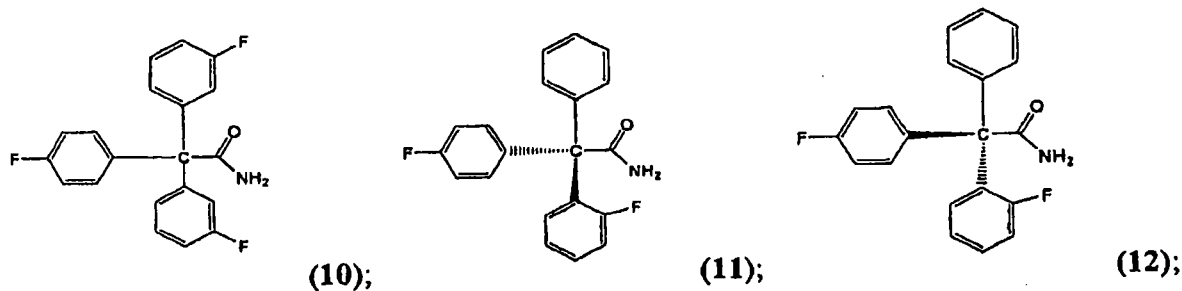
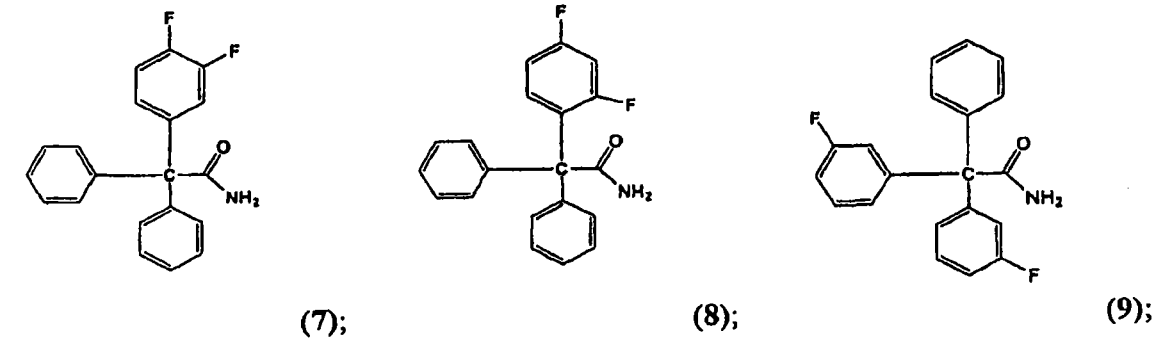
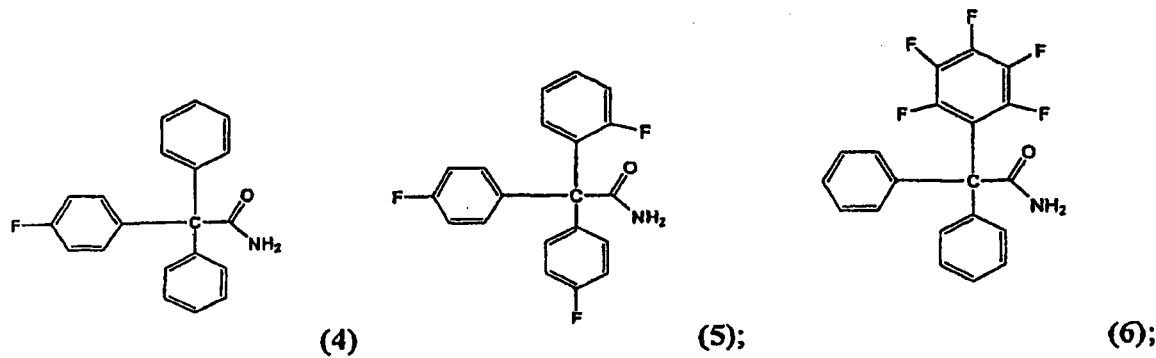
(1);

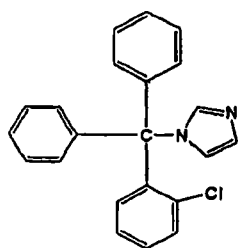


(2);

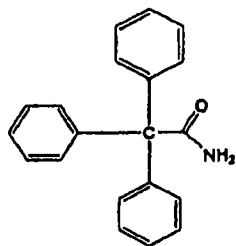


(3);

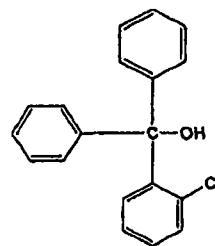




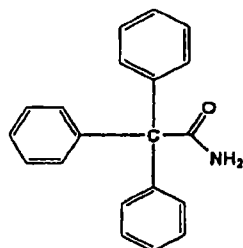
(19);



(20);



(21); 和

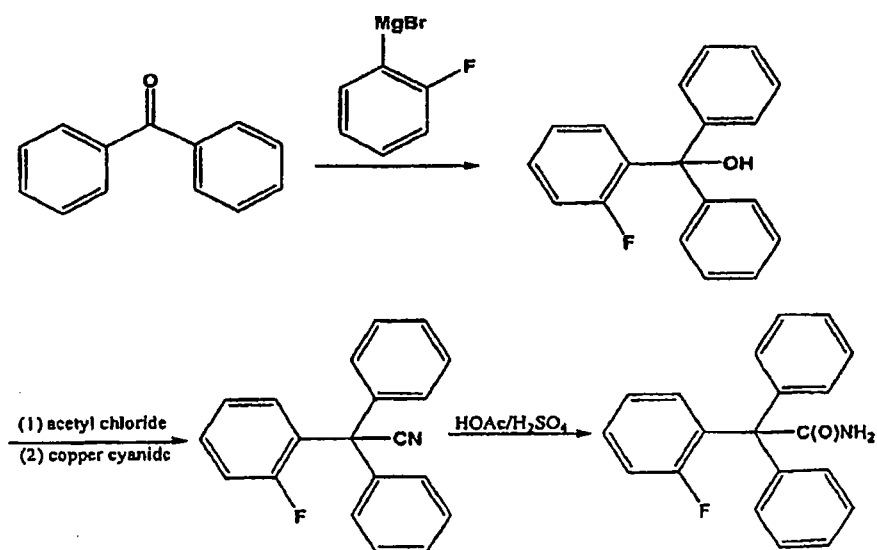


(22).

化合物的合成

本发明的化合物可以根据有机合成领域的标准技术制备。适当的起始原料和试剂可得自商业来源或者可通过标准的有机化学技术制备。示例性的过程通过具体实施例阐述。示例性的合成路线提供在反应路线 1 中。

反应路线 1



acetyl chloride: 乙酰氯

copper cyanide: 氰化铜

在反应路线 1 中，氟取代的三苯基乙酰胺的合成从相应的氟取代的三苯基甲醇开始，氟取代的三苯基甲醇从氟取代的二苯甲酮与向二苯甲酮附加苯基或氟取代的苯基部分的试剂制得。氟取代的三苯基甲醇随后通过将该醇暴露在乙酰氯下然后用氰化铜处理而被转化为相应的氟取代的三苯基乙腈。可通过中间体腈与硫酸和冰醋酸的混合物反应形成乙酰胺。其它获得氟取代的三苯甲烷物质，特别是乙酰胺的合成路线，处在本领域技术人员的能力范围内。

化合物的稳定性

对于用作药理学有用的 IK1 通道抑制剂的化合物，候选化合物必须显示出可接受的生物利用度和体内稳定性二者。经历治疗的对象必须有规律地被给药本发明的化合物。具有体内停留时间增加和生物利用度增加的化合物使得给药方案简单化(即剂量较/天和/或更少的投药)。另外，降低化合物的给药量有希望降低副作用和/或其代谢物引起的副作用。因此，非常希望提供显示出良好的生物利用度和增强的体内稳定性的 IK1 通道抑制剂。

化合物的活性

为了开发药理学有用的 IK1 通道抑制剂，候选化合物必须显示出针对目标通道的可接受的活性。如果化合物的针对 IK1 通道的 IC_{50} 不超过 100-500 nM，则判断该化合物具有足够效力。

本发明的化合物针对离子通道的活性可以采用本领域已知的方法试验。例如，参见 Brugnara 等，J. Biol. Chem., 268(12): 8760-8768(1993)。使用该文献中所述的方法，可以测定本发明化合物的 Gardos 通道的抑制%和 IC_{50} 。

用于检测离子通道的活性和 30 种影响离子通道的药物的活性的

其它方法是本领域已知的。适当的测定法的选择在本领域技术人员的能力范围内。例如，参见 Hille, B., *Ionic Channels Of Excitable Membranes*. Sinaner Associates, Inc., Sunderland, Mass. (1992)。

化合物的选择性

对于用作药理学有用的 IK1 通道抑制剂的化合物，候选化合物必须显示出可接受的针对目标通道的选择性。具有针对 Gardos 通道的选择性为至少 30 倍的化合物被判断为具有足够的选择性。

特定化合物的针对 IK1 通道相对于针对其它钾离子通道的选择性方便地测定为是两种化合物结合相关量（例如 IC50）的比。在示例性的实施方案种，使用如上所述测定的活性确定选择性，然而，用于检测离子通道的活性和影响离子通道的试剂的活性的其它方法是本领域已知的。适当的测定法的选择在本领域技术人员的能力范围内。例如，参见 Hille, B., *Ionic Channels Of Excitable Membranes*. Sinaner Associates, Inc., Sunderland, Mass. (1992)。

在一个实施方案中，本发明的化合物是钾流通（诸如由 IK1 通道介导的钾流通）的强力的、选择性的和稳定的抑制剂。

尽管不希望束缚于任何特定的工作原理，目前据信本发明化合物的某些结构特征（即用氟代替氢）与这些化合物的稳定性、选择性和功效有牵连。因此，在示例性的实施方案中，本发明的抑制剂包括芳基部分，其中芳基部分的至少一个氢原子被包含氟原子的基团代替。在该实施方案中，本发明包括抑制钾离子流通的化合物的氟化衍生物，特别是具有 IK1 通道抑制活性的那些化合物（例如抗霉菌剂，例如咪康唑、益康唑、布康唑、奥昔康唑和硫康唑）。其它具有钾离子通道抑制活性，特别是具有 IK1 通道抑制活性，并且具有至少一个带有至少一个氟原子的芳基部分的药剂处在本发明的范围内。

在示例性的实施方案中，芳基部分是苯基。在另一个示例性的实施方案中，芳基部分由三苯甲基构成。

本发明的化合物可以自身形式或药物组合物的形式给药，在药物组合物中，活性化合物与一种或多种可药用的载体、赋形剂或稀释剂混合。因此，除了影响细胞离子流通(例如 IK1 通道抑制活性)的化合物之外，本发明还提供了包含本发明化合物的药物制剂。

药物制剂

在第二方面，本发明提供了包括与可药用赋形剂混合的式(I)所示的本发明化合物的药物制剂。在示例性的实施方案中，化合物是式(II)的化合物，更优选地，是式(III)的化合物。

本文所述的化合物或其可药用加成盐或水合物，可以被配制为使得使用各种给药途径或方式被递送至患者。适当的给药途径包括但不限于吸入、透皮、经口、经眼、直肠、经粘膜、经肠、和非肠道给药，包括肌内、皮下和静脉内注射。

本文所述的化合物或其可药用盐和/或水合物可单独给药，与本发明的其它化合物组合给药，和/或在与其它治疗剂结合的组合中给药。可以与本发明的化合物共同给药的治疗剂的选择将部分地根据治疗病况的不同而异。

例如，当对罹患炎症过程诸如多发性硬化的患者给药时，本发明的化合物可以在包含用于治疗疼痛、感染和其它症状和通常与炎症过程有关的副作用的药剂的组合中被给药。这些药剂包括例如镇痛药，抗生素等。该化合物还可在包含其它的通常用于治疗炎症过程的药剂(包括丁酸酯和丁酸酯衍生物)的组合中被给药(Perrine 等, N.

Engl. J. Med. 328(2): 81-86(1993)); 羟基脲(Charache 等, N. Engl. J. Med. 323(20): 1317-1322(1995)); 红细胞生成素(Goldberg 等, N. Engl. J. Med. 323(6): 366-372(1990)); 和膳食盐如镁 (De Franceschi 等, Blood 88(648a): 2580(1996))。

根据本发明使用的药物组合物可以常规的方式配制, 使用包括赋形剂和助剂的一种或多种生理学可接受的载体, 其便于活性化合物进入可用作药物的制剂中的过程。适当的制剂根据选择的给药途径的不同而异。

对于注射剂, 本发明的药剂可配制在含水溶液中, 优选配制在生理学相容的缓冲液中, 诸如 Hanks' s 溶液, 林格氏液或生理盐水缓冲液。在示例性的实施方案中, 制剂包括水和醇和/或二醇。该制剂的其它有用的组分包括例如表面活性剂、乳化剂和诸如乙氧基化油的物质。示例性的制剂包括比率为 1:1:1 的本发明的化合物、聚乙二醇 400、乙醇和水。另一个示例性的制剂包括本发明的化合物、水、聚乙二醇 400 和 Cremophor-EL。

对于经粘膜给药(例如, 经颊、直肠、经鼻、经眼等), 在制剂中使用适合待渗透屏障的渗透剂。这些渗透剂通常是本领域已知的。

对于口服给药, 可通过将活性化合物与本领域公知的可药用载体混合而容易地配制化合物。这些载体能将本发明的化合物配制成片剂、丸剂、糖锭、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、淤浆剂、悬浮剂等, 被待治疗患者经口摄取。用于经口用途的药物制剂可与固体赋形剂组合, 任选地研磨得到的混合物, 并且, 如果需要, 在添加适当的助剂后加工颗粒的混合物, 得到片剂或糖锭核。适当的赋形剂特别是填料如糖, 包括乳糖, 蔗糖, 甘露醇或山梨醇; 纤维素制剂诸如例如玉米淀粉, 麦淀粉, 米淀粉, 马铃薯淀粉, 明胶, 黄蓍树胶, 甲基纤维素, 羟丙

基甲基纤维素，羧甲基纤维素钠，和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要，可添加崩解剂，诸如交联聚乙烯基吡咯烷酮，琼脂或海藻酸或其盐如海藻酸钠。

糖錠核可被提供适当的包衣。对于这一目的，可使用浓的糖溶液，其可任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯基吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液、和适当的有机溶剂或溶剂混合物。可向片剂或糖錠包衣中添加染料或颜料，用于识别或表征活性化合物剂量的不同组合。

可口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合胶囊，以及由明胶和增塑剂诸如甘油或山梨醇制成的密封软胶囊。推入配合胶囊可包含与填料诸如乳糖，粘合剂诸如淀粉，和/或润滑剂诸如滑石或硬脂酸镁和任选的稳定剂混合的活性成份。在软胶囊中，可将活性化合物溶解在或悬浮在适当的液体中，诸如脂肪油，液状石蜡，或液体聚乙二醇。另外，可添加稳定剂。所有的用于口服给药的制剂应当处在适合这些给药的剂量下。

对于经颊给药，组合物可采取以常规方式配制的片剂或錠剂的形式。

对于吸入给药，根据本发明使用的化合物可以方便地以由加压包装或喷雾器呈现的气溶胶喷射形式被递送，借助于适当的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、克立氟烷、二氧化碳或其它适当的气体。在加压气雾剂的情况下，剂量单位可通过提供阀门以递送计量的量而确定。供吸入器或吹药器用的如明胶的胶囊和药囊可配制为含有化合物和适当的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

化合物可配制用于通过注射例如快速浓注或连续输注的非肠道投

药。注射用制剂可以单位剂型存在，例如存在在安瓿或多剂量容器中，并添加防腐剂。组合物可采取诸如以下的形式：在油或含水介质中的悬浮剂，溶液剂或乳剂，并且可包含诸如助悬剂、稳定剂和/或分散剂的可配制试剂，诸如交联聚乙烯基吡咯烷酮，琼脂，或海藻酸或其盐诸如海藻酸钠。

用于非肠道给药的药物制剂包括水溶性化合物的水溶液，诸如上述的用于静脉内给药的形式。另外，可视情况而定将活性化合物的悬浮液配制成油状注射用悬浮剂。适当的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油诸如芝麻油，或合成脂肪酸酯诸如油酸乙酯或甘油三酯，或脂质体。含水注射用悬浮剂可包含增加悬浮剂粘度的物质，诸如羧甲基纤维素钠，山梨醇，或右旋糖酐。任选地，悬浮剂还可包含适当的稳定剂或增加化合物的溶解度以配制高浓度溶液的试剂。

或者，活性成分可以为粉末形式，用于在使用前与适当的媒介物例如无菌无热原水进行重构。

所述化合物还可配制在直肠给药组合物中，如栓剂或灌肠剂，如，含有常规的栓剂基质如可可脂或其它甘油酯的制剂。

除前述的制剂之外，所述化合物还可被配制成储库型制剂。这种长效作用制剂可通过植入或透皮递送（例如皮下或肌内），肌内注射或透皮贴片形式被给药。因此，例如，该化合物可与适当的聚合物型或疏水性材料进行配制（例如作为在可接受的油中的乳剂）或与离子交换树脂进行配制，或者配制为微溶的衍生物，例如配制为微溶性盐。

药物组合物还可包含适当的固体或凝胶相载体或赋形剂。这些载体或赋形剂的例子包括但是不限于碳酸钙，磷酸钙，多种糖，淀粉，纤维素衍生物，明胶，和聚合物诸如聚乙二醇。

有效剂量

适用于本发明的药物组合物包含这样的组合物，在该组合物中，活性成分以治疗有效量被包含，即，以有效实现其预定目的的量被包含。有效用于特定应用的实际量将特别地根据治疗病况的不同而异。例如，当在减少多发性硬化和/或损害自身反应性 T 细胞形成的事件的方法中被给药时，这种组合物包含有效实现这一结果的一定量的活性成分。有效量的确定充分地处在本领域技术人员的能力范围内，特别是在获悉本文的详细公开之后。

对于本文所述的任何化合物，治疗有效量最初可以根据细胞培养物试验来确定。目标血浆浓度将是能够诱导 IK1 通道抑制的活性化合物的浓度。在示例性的实施方案中，IK1 通道活性的至少 25% 被抑制。能够诱导 IK1 通道钾流通的至少约 50%、75%、或甚至 90% 或更高抑制的活性化合物的目标血浆浓度目前是优选的。可以监控患者 IK1 通道的抑制百分数以确定所实现的血浆药物浓度的适当性，并且可上调或下调剂量以实现所需的抑制百分数。

如本领域众所周知的，用于人的治疗有效量还可从动物模型来确定。例如，可配制人用剂量以达到被认为在动物中是有效的循环浓度。用于多发性硬化的特别有用的动物模型是 EME 小鼠模型 (Beeton 等, PNAS, 98: 13942-13947 (2001); Reich 等, Eur. J. Immunol, 35: 1 (2005); Lars Madsen 等, Eur. J. Immunol. 35: 10 (2005)。人用剂量可通过监控 IK1 通道的抑制和如上所述上调或下调剂量进行调整。

基于上述方法和其它本领域公知的方法调整剂量以在人中实现最大功效充分处在本领域技术人员的能力范围内。在局部给药的情况中，给药的化合物的系统循环浓度将不具有特别的重要性。在这种情况下，

化合物被给药从而在局部区域获得有效实现预期结果的浓度。

本文所述化合物的口服给药的患者剂量，其作为用于炎性过程事件的预防和治疗的给药的优选方式，通常为约 1 毫克/天到约 10,000 毫克/天，更优选约 10 毫克/天到约 1,000 毫克/天，和最优选约 50 毫克/天到约 500 毫克/天。根据患者体重，典型的剂量范围为约 0.01 到约 150 毫克/千克/天，更优选为约 0.1 到约 15 毫克/千克/天，和最优选为约 1 到约 10 毫克/千克/天。

对于其它的给药方式，可个别地调节剂量和间隔，以提供所给药的化合物有效用于治疗的特定的临床适应症的血浆水平。例如，如果急性炎性过程是最占优势的临床表现，在一个实施方案中，本发明的化合物可以比较高的浓度每天多次给药。或者，如果患者仅仅表现基于很少发生的、周期性的或无规律的周期炎性事件，则在一个实施方案中，可能更希望以最小有效浓度给药本发明的化合物并且使用频繁性较低的给药方案。这将提供与个体炎性疾病的严重性相当的治疗方案。

采用本文所述的教导，可以设计有效的预防性或治疗性治疗方案，其不引起实质的毒性，并且可完全有效地用于治疗由具体患者表现的临床症状。这些设计将包括通过考虑诸如以下的因素仔细选择活性化合物：化合物功效，相对的生物利用度，患者体重，不良副作用的存在和严重性，优选的给药方式和所选的药剂的毒性特性。

化合物的毒性

特定化合物的毒性和疗效之间的比是其治疗指数，并且可表示为 LD₅₀ (导致 50% 群体死亡的化合物的量) 和 ED₅₀ (在 50% 群体中有效的化合物的量) 之间的比。那些表现出高治疗指数的化合物是优选的。得自细胞培养物试验和/或动物研究的治疗指数数据可用于配制人用的剂

量范围。这些化合物的剂量优选位于包括 ED50 而有很少毒性或无毒性的血浆浓度范围内。剂量可以在该范围内改变，根据采用的剂型和采用的给药途径的不同而异。例如，参见 *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Ch.1 , p.1 , 1975。确切的制剂、给药途径和剂量可以通过单独医师鉴于患者情况和所用化合物的具体方法的考虑进行选择。

方法

除上面详细讨论的化合物和药物制剂之外，本发明提供了许多本发明的可应用于其中的方法。所述方法包括可用在实验室环境下的方法到例如药代动力学、药物活性、疾病起因和进展等基础机制的探针。

本发明可特别地用于治疗或预防炎性疾病。本文使用的“炎性过程”是指其中淋巴细胞增殖对组织或器官损伤有贡献导致疾病的疾病。例如，在组织或器官部位的过度 T 细胞增殖将损害该组织或器官。炎性过程是本领域公知的并且已经在医学教科书（参见，例如 *Harrison's Principles of Experimental Medicine*, 13th Edition, McGraw-Hill, Inc., N.Y.）中被广泛地描述。

在示例性的实施方案中，本发明提供了用于治疗或预防炎性过程的方法，包括对罹患炎性过程的对象施用治疗有效量的具有式 I 结构的化合物。

与炎性过程异常有关的疾病包括但不限于增殖性肾小球肾炎；红斑狼疮；硬皮病；巨细胞性动脉炎；闭塞性血栓性血管炎；皮肤粘膜淋巴结综合征；哮喘；宿主抗移植综合症；炎性肠病；癌；多发性硬化；类风湿性关节炎；甲状腺炎；格雷夫斯病；抗原诱导的气道活动过度；肺嗜曙红细胞增多；吉-巴综合征；变应性鼻炎；重症肌无力；人 T 亲淋巴病毒 1 型相关脊髓病；疱疹性脑炎；炎性肌病；动脉粥样

硬化；古德帕斯彻氏综合征；胰岛素依赖性(1型)糖尿病；周围神经炎；实验性自身免疫心肌炎和肺性高血压症。炎性过程的一些例子以及用于检测和开发化合物的动物模型在小表2中示出。

除上面列举的具体过程之外，本发明还可用于治疗或预防皮肤学疾病，包括瘢痕瘤，肥厚性瘢痕，皮脂溢性皮肤病，乳头状瘤病毒感染（例如导致寻常疣、跖疣、扁平疣、湿疣等等），湿疹，卡波济氏肉瘤，和上皮癌前病灶诸如光化性角化病。

表 2

疾病	增殖细胞	参考文献	动物模型	参考文献
哮喘	T-细胞	Hogg 1997 APMIS 100: 105 (10)	在 Ovalbuminsensitized 小鼠或豚鼠中的 气道炎症和超响应性	Henderson 等, 1997 J Clin Invest 100(12): 3083-3092
肾小球肾炎	肾小球膜 (肾小球) 细胞	Nitta 等, 1997 Eur J. Pharmacol 344: 107-110	发展成肾小球疾病 和狼疮样综合症的 NZB / NZW 交配小鼠	Clynes et al. 1998 Science 279 (5353): 1052-54.
宿主抗移植病	T-细胞 B-细胞	Schorlemmer 等, 1997 Int J Tissue React 19: 157-61. J. Immunol 160: 5320-30	小鼠中的肾同种异 体移植排斥	Lazarivuts 等, 1996 Nature 380 (6576) 717-720.
炎性肠病	上皮细胞	Bajaj-Elliott 等, 1997 Am J. Pathol. 151: 1469-76	大鼠中三硝基苯磺 酸诱导的肠炎症	Boughton-Smith 等, 1988 Br J Pharmacol 94: 65-72.
系统性红斑狼 疮	肾小球细胞 淋巴细胞	Kodera 等, 1997 Am J Nephrol 17: 466-70. Akashi et al. 1998 Immunology 93: 238-48	发展成肾小球疾病 和狼疮样综合症的 NZB / NZW 交配小鼠	Peng et al. 1996 Mol Biol Rep 23(3-4): 247-51.
多发性硬化	T-细胞	Constantinescu 等, 1998 Immunol Res 17(1-2): 217-27.	实验性变应性脑脊 髓炎	Drescher 等, 1998 J Clin Invest 101 (8): 1765-74.
类风湿性关节 炎	T-细胞 滑液细胞	Ceponis 等, 1998 Br J Rheumatol 37(2): 170-8	大鼠佐剂关节炎试 验	Anderson 等, 1996 J Clin Invest 97(11): 2672-9.

甲状腺炎	T-细胞和上皮细胞	Rose 等, 1997 Crit Rev Immunol 17: 511-7. Schumm-Draeger 等, 1996 Verh Dtsch Ges Pathol 80: 297-301.	用甲状腺球蛋白免 疫的 HLA 转基因小 鼠	J Clin Investig 101(5): 921-6.
格雷夫斯病	甲状腺细胞	DiPaola 等, 1997 J Clin Endocrinol Metab 82: 670-3.	用硫尿嘧啶喂养的 大鼠	Vilietto 等, 1997 Oncogene 15: 2687-98.
抗原诱导的气 道活动过度	T-细胞	Wolyniec 等, 1998 Am J Respir Cell Mol Biol 18: 777-85		
肺嗜曙红细胞 增多	T-细胞	Wolyniec 等, 1998 Am J Respir Cell Mol Biol 18: 777-85		
传染性神经元 炎(炎性脱髓 鞘病)	T-细胞	Hartung 等, 1991 Ann Neurol. 30: 48-53	实验性自身免疫神 经炎(用 PNS 髓磷脂 和福氏完全佐剂免 疫)	
巨 T 细胞动脉 炎(系统血管 炎的一种形式 的) 大动脉炎症	T-细胞	Brack 等, 1997 Mol Med 3: 530-43		
变应性鼻炎	T-细胞	Baraniuk 等, 1997 J Allergy Clin Immunol 99: S763-72		
重症肌无力	T-细胞	Hartung 等, 1991 Ann Neurol 30: 48-53		
人 T 亲淋巴病 毒 1 型相关脊 髓病	T-细胞	Nakamura 等, 1996 Intern Med 35: 195-99		
疱疹性脑炎	T-细胞	Hartung 等, 1991 Ann Neurol 30: 48-53		
炎性肌病(即 多肌炎, dermatomyosi tis)	T-细胞	Hartung 等, 1991 Ann Neurol 30: 48-53 Lindberg 等, 1995 Scan J Immunol 141: 421-26		

动脉粥样硬化	T-细胞	Rosenfeld 等, 1996 Diabetes Res Clin Pract 30 suppl: 1-11		
古德帕斯彻氏 综合征	巨噬细胞	Lan 等, 1995 Am J Pathol 147: 1214-20		

因此, 在第一方面, 本发明提供了治疗或预防炎性过程的方法, 所述方法包括对罹患所述炎性过程的对象施用治疗有效量的如上所述的具有式 I 结构的化合物。

因此, 在另一个方面, 本发明提供了治疗或预防多发性硬化的方法。该方法包括对罹患多发性硬化的对象施用治疗有效量的具有式 (I) 结构的化合物。在另一个示例性的实施方案中, 该方法包括通过对有需要的哺乳动物施用本发明的化合物来治疗多发性硬化。

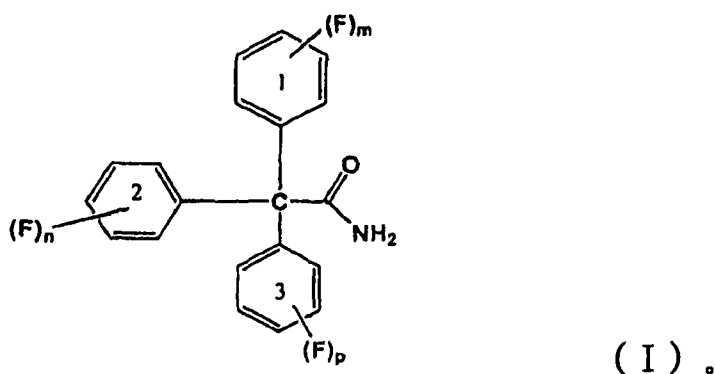
在另一个方面, 本发明提供了治疗或预防肺性高血压症的方法。该方法包括对罹患肺性高血压症的对象施用治疗有效量的具有式 (I) 结构的化合物。在另一个示例性的实施方案中, 该方法包括通过对有需要的哺乳动物施用本发明的化合物来治疗肺性高血压症。

有关于使用离子通道调节剂 - 开放剂或阻断剂 - 治疗神经和心血管疾病有卓越的跟踪记录。离子通道阻断剂作为一般的类别, 代表了用于治疗中风、癫痫症和心律不齐的主要治疗剂。在本发明的又一方面, 本发明了提供了治疗或预防中风的方法。该方法包括对罹患中风或处在罹患中风危险下的对象施用治疗有效量的具有式 (I) 结构的化合物。在示例性的实施方案中, 该方法包括通过对有需要的哺乳动物施用本发明的化合物来治疗或预防中风。

在本发明方法的示例性的实施方案中, 使用该方法进行治疗的对

象未罹患镰状细胞病。

总之，本发明提供了用于治疗或预防多种疾病状态的方法。因此，在一个方面，本发明提供了用于治疗或预防炎性过程的方法。该方法包括对罹患炎性过程或处在罹患炎性过程危险下的对象施用治疗有效量的式 I 的化合物：



在式 I 中，m、n 和 p 独立地选自 0 和 1，并且 m、n 和 p 中至少之一是 1。当 m、n 和 p 都是 1 时，环 1 和环 2 的氟取代基所处的位置独立地选自乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位和乙酰胺取代基的对位，并且环 3 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。当 p 是 0 且 m 是 1 且 n 是 1 时，环 1 的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位，环 2 的取代基所处的位置选自乙酰胺取代基的邻位和乙酰胺取代基的对位。

本发明还提供了根据上段所述的方法，其中所述疾病状态选自多发性硬化、胰岛素依赖性 (I 型) 糖尿病、类风湿性关节炎、周围神经炎和肺性高血压症。

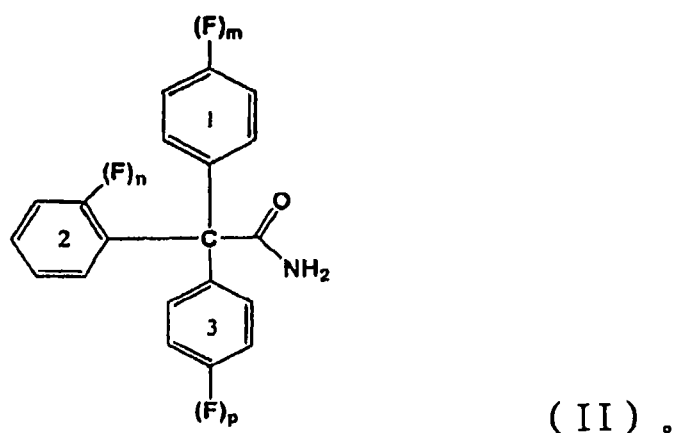
本发明还提供了用于治疗或预防肺性多发性硬化的方法。所述方法包括对罹患多发性硬化或处在罹患多发性硬化危险下的对象施用治疗有效量的式 I 的化合物。

本发明还提供了用于治疗或预防肺性高血压症的方法。所述方法

包括对罹患肺性高血压症的对象施用治疗有效量的式 I 的化合物。

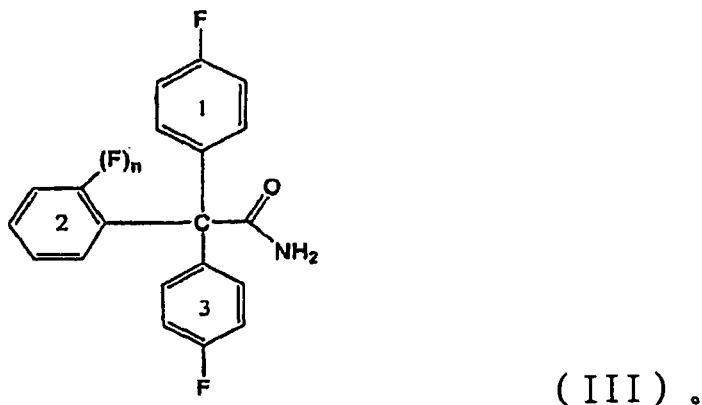
本发明另外提供了用于治疗或预防中风的方法。所述方法包括对罹患中风和处在罹患中风危险下的对象施用治疗有效量的式 I 的化合物。

本发明还提供了根据上段中任一段所述的方法，其中化合物具有式 II 的结构：



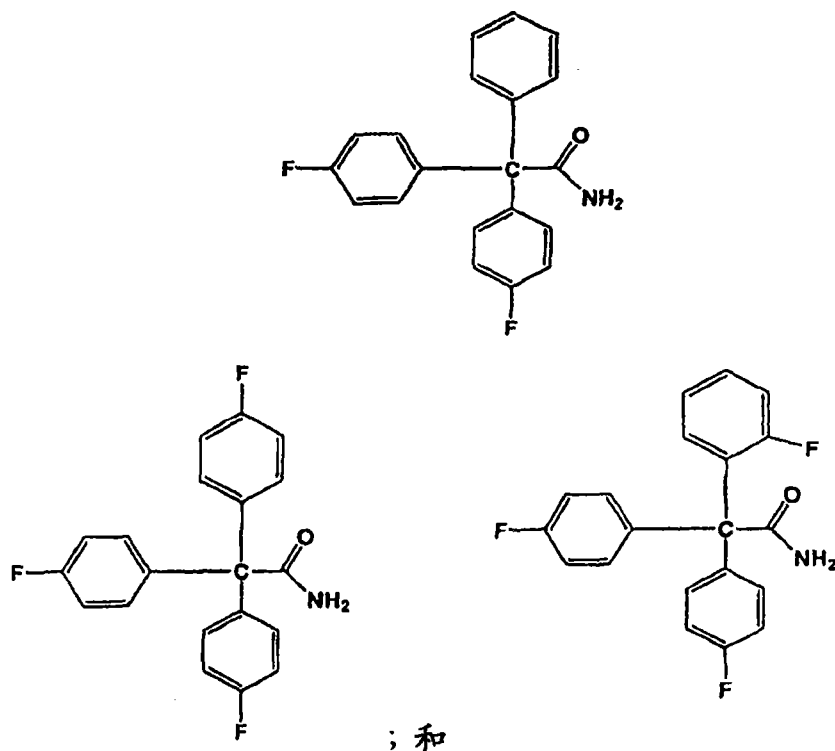
在式 II 中， m 、 n 和 p 独立地选自 0 和 1，并且 m 、 n 和 p 中至少之一是 1。

本发明另一个实施方案提供了根据上段中任一段所述的方法，其中化合物具有式 III 的结构：



在式 III 中， n 是选自 0 和 1 的整数。

本发明还提供了根据上段中任一段所述的方法，其中化合物具有选自以下的结构：



本发明还提供了根据上段中任一段所述的方法，其中所述疾病状态由钾通道介导。

在根据上段中任一段所述的示例性的方法中，钾通道是 IK1。

在根据上段中任一段所述的示例性的方法中，使用上段中任一段所述的方法治疗的对象未罹患镰状细胞病。

本发明的化合物、组合物和方法进一步通过下面的实施例进行说明。这些实施例的目的是说明性，而并非对要求保护的本发明构成限制。

实施例

实施例 1 说明了用于合成和表征本发明的化合物的方法。采用该实施例中详述的方法，本发明的化合物以实质上纯的形式和良好的收

率被分离。其它合成方法公开在美国专利 6,288,122 和美国专利 6,028,103 中。

实施例 2 描述了用于测量本发明化合物对钾通道的抑制的生物试验。

实施例 1

本实施例说明了用于合成和表征本发明的化合物的方法。采用以下详述的方法，本发明的化合物以实质上纯的形式和良好的收率被分离。本实施例提供了一般范围的方法，其可用于合成除了特别举例说明的化合物之外的本发明的化合物。

1.1 材料和方法

除非另有说明，否则使用获得试剂时的原样试剂。使用 Franco 等的 J. Chem. Soc. Perkins Trans. II, 443(1988)的方法用于制备非市售的氟代苯基锂试剂和氟代苯甲酮。所有的水分敏感性反应在使用烘干的玻璃器皿的氮保护气氛下进行。反应通过硅胶 60 F₂₅₄ 的 TLC 监控，通过使用 Hancssian's 染剂的炭化进行检测(Khadem 等, Anal. Chem., 30: 1958(1965))。使用 Selecto 硅胶(32-63 Γ M)进行柱色谱法。熔点在电热 IA9000 元件上测定，未校正。¹H(300 MHz)和 ¹⁹F(282 MHz)光谱在 Varian(Gemini 2000) NMR 机器上在室温下在 CDCl₃ 中记录。四甲基硅烷用作内标。化合物 1 的手性分离通过使用 CHLIRACEL1 tore^q OD-R 柱和乙腈/水作为洗脱液的手性技术进行。

1.2 化合物 1 的制备

从市售前体以四步骤和 28% 的收率制备化合物 1。

1.2a (2-氟苯基)-(4-氟苯基)苯基甲醇的合成

在室温 (“rt”, 约 25°C) 下将苯基溴化镁 (1.83 mL, 5.5 mmol) 滴加到搅拌的 2,4'-二氟苯甲酮 (1.09 g, 5.0 mmol) 的叔丁基甲基醚 (12 mL) 溶液中。滴加完成后, 将反应加热回流 3 小时, 将溶液冷却到室温, 并倾入到用冰冷却的 1.0 M HCl (aq) (20 mL) 中, 有机物用 EtOAc 提取 (3 X 10 mL) 并干燥 (Na₂SO₄), 减压浓缩, 得到所需产物 (2-氟苯基)-(4-氟苯基) 苯基甲醇, 为浅褐色油状物, 其用于随后的反应无需另外纯化。

1.2b (2-氟苯基)-(4-氟苯基) 苯基乙腈的合成

在室温下将 (2-氟苯基)-(4-氟苯基) 苯基甲醇 (1.47 g, 5.0 mmol) 加入到 20% 的乙酰氯在二氯甲烷 (10 mL) 中的溶液中, 得到的溶液搅拌 12 小时, 然后蒸发除去溶剂, 向残余物中加入甲苯 (2 X 20 mL) 并蒸发, 得到粗品 2-氟苯基-(4-氟苯基) 苯基氯甲烷, 其无需纯化而用于随后的步骤。

将氰化铜 (0.50 g, 5.5 mmol) 加入到残余物中, 得到的混合物在 130°C 加热 2.5 小时, 将反应冷却到约 110°C 时, 加入甲苯 (30 mL), 将混合物剧烈搅拌 10 分钟, 将混合物过滤, 并将溶剂减压除去, 向粗品加入热的己烷 (30 mL), 将混合物剧烈搅拌 30 分钟, 过滤并用更多的己烷洗涤, 得到所需的氰基产物, 为白色固体, 其直接用于无需另外纯化。

1.2c (2-氟苯基)-(4-氟苯基) 苯基乙酰胺 (1) 的合成

在室温下将浓硫酸 (10 mL) 和冰醋酸 (10 mL) 的溶液加入到粗品 (2-氟苯基)-(4-氟苯基) 苯基乙腈 (1.48 g, 5.0 mmol) 中, 将得到的橙色溶液搅拌并在 130°C 加热 3 小时, 将反应冷却到 0°C, 并通过滴加氢氧化铵进行中和。加入水 (30 mL), 有机物用氯仿提取 (3 X 30 mL), 有机级分合并并用水 (2 X 10 mL) 和盐水 (20 mL) 顺序地洗涤, 将有机相干燥 (Na₂SO₄) 并减压浓缩, 向得到的浅褐色油状物中加入己烷 (30 mL) 以引发沉淀, 将沉淀物研磨, 继而用热己烷 (30 mL) 洗涤, 从己烷/二

氯甲烷结晶，得到所需产物(2-氟苯基)-(4-氟苯基)苯基乙酰胺，为白色结晶固体(0.45 g, 1.4 mmol, 28%, 4 步骤)。

1.3 化合物 3 的制备

从市售前体以三步骤和 58% 的收率制备化合物 3。

1.3a 双(4-氟苯基)苯基甲醇的合成

在室温下将苯基溴化镁(100 mL, 0.1 mol)滴加到搅拌的 4,4'-二氟苯甲酮(20 g, 0.092 mol)的叔丁基甲基醚(150 mL)溶液中，滴加完成后，将反应加热回流 3 小时，将溶液冷却到室温，并倾入到用冰冷却的 1.0 M HCl(100 mL)水溶液中，有机物用 EtOAc(2 X 50 mL)提取并干燥(Na_2SO_4)，减压浓缩，得到双(4-氟苯基)苯基甲醇，为浅褐色油状物，真空干燥 2 小时后，将粗品用于随后的反应而无需另外纯化。

1.3b 双(4-氟苯基)苯基乙腈的合成

在室温下将双(4-氟苯基)苯基甲醇(0.092 mol)加入到 20%的乙酰氯在二氯甲烷(50 mL)中的溶液中，将得到的紫色溶液搅拌 12 小时，然后将溶剂通过蒸发除去，向残余物中加入甲苯(100 mL)，然后蒸发，得到粗品双(4-氟苯基)苯基氯甲烷，其无需纯化而用于随后的步骤。

将氰化铜(8.24 g, 0.11 mol)加入到粗品残余物中，将混合物在 140℃加热 3 小时，将反应冷却到 100℃，并加入甲苯(100 mL)，将得到的混合物剧烈搅拌 10 分钟，冷却到室温，通过硅胶短柱过滤，并减压除去溶剂，得到褐色固体，向粉末状粗品中加入热的己烷(100 mL)，将混合物剧烈搅拌 4 小时，过滤并用另外的己烷洗涤，得到所需的双(4-氟苯基)苯基乙腈，为白色固体(18.9 g, 67%)。

1.3c 双(4-氟苯基)苯基乙酰胺(3)的合成

在室温下将浓硫酸(50 mL)和冰醋酸(50 mL)的溶液加入到双(4-氟苯基)苯基乙腈(18.9 g, 0.06 mol)中, 将得到的橙色溶液搅拌并在130℃加热3小时, 将反应冷却到0℃, 倾入到水(150 mL)中, 并用氢氧化铵进行中和。有机物用氯仿(3 X 100 mL)提取, 合并, 并用盐水(2 X 50 mL)洗涤, 将有机物干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩, 得到黄橙色固体, 将该固体与热的己烷(100 mL)搅拌30分钟并过滤, 从二氯甲烷/己烷结晶, 达到双(4-氟苯基)苯基乙酰胺(3), 为白色结晶固体(16.9 g, 0.052 mol, 87%)。

1.4 化合物5的制备

从市售前体以四步骤和66%的收率制备化合物5。

1.4a 双(4-氟苯基)-2-氟苯基甲醇的合成

在室温下将对氟苯基溴化镁(124 mL, 0.12 mol)滴加到搅拌的2,4'-二氟苯甲酮(24.5 g, 0.11 mol)的叔丁基甲基醚(100 mL)溶液中, 滴加完成后, 将反应加热回流3小时, 然后将反应冷却到室温, 并倾入到用冰冷却的1.0 M HCl(aq) (100 mL)中, 有机物用EtOAc(3 X 70 mL)提取, 并干燥(Na_2SO_4), 减压浓缩, 得到所需产物双(4-氟苯基)-2-氟苯基甲醇, 为浅黄色油状物, 其用于随后的反应无需另外纯化。

1.4b 双(4-氟苯基)-2-氟苯基乙腈的合成

在室温下将20%的乙酰氯在二氯甲烷(60 mL)中的溶液加热到粗品双(4-氟苯基)-2-氟苯基甲醇中, 将得到的溶液搅拌12小时, 然后将溶剂蒸发除去, 向残余物加入甲苯(100 mL), 然后蒸发, 得到粗品双(4-氟苯基)-2-氟苯基氯甲烷, 其无需纯化而用于随后的步骤。

将氰化铜(12 g, 0.13 mol)加入到粗品中, 将得到的混合物在160

℃加热 3 小时，将反应冷却到约 110℃，加入甲苯(100 mL)，将混合物剧烈搅拌 10 分钟，将混合物冷却，通过硅胶短柱过滤，并减压浓缩，向粗品中加入热的己烷(100 mL)，将混合物剧烈搅拌 30 分钟，过滤并用很多的己烷洗涤，得到所需的双(4-氟苯基)-2-氟苯基乙腈，为白色固体(25.3 g, 70%)。

1.4c 双(4-氟苯基)-2-氟苯基乙酰胺(5)的合成

在室温下将浓硫酸(10 mL)和冰醋酸(10 mL)的溶液加入到双(4-氟苯基)-2-氟苯基乙腈(5.0 g, 0.015 mol)中，将得到的橙色溶液搅拌并在 130℃加热 2 小时，将反应冷却到 0℃，并倾入到冰(50 g)上，通过滴加氢氧化铵将得到的混合物中和，加入二氯甲烷(100 mL)，有机物用另外的二氯甲烷(3 X 30 mL)提取，合并的有机级分用水(2 X 10 mL)和盐水(20 mL)顺序地洗涤，将有机相干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩，得到黄/褐色固体，将该固体粉碎，并用热的己烷(50 mL)反复洗涤，直到滤液中明显变得无色，从己烷/二氯甲烷结晶，得到所需产物双(4-氟苯基)-2-氟苯基乙酰胺 5，为白色结晶固体(4.98 g, 0.0145 mol, 94%)。

1.5 化合物 16 的制备

从市售前体以四步骤和 11% 的收率制备化合物 16。

1.5a 双(4-氟苯基)-3-氟苯基甲醇的合成

将正丁基锂(4 mL, 10 mmol)滴加到搅拌的在-78℃下的溴-3-氟苯(1.75 g, 10 mmol)在 THF(25 mL)中的溶液中，20 分钟后，加入 4,4'-苯甲酮(1.96 g, 9 mmol)，在 30 分钟内将反应回温到 0℃，加入饱和氯化铵(aq)(30 mL)并继续搅拌 30 分钟，加入 EtOAc(20 mL)，分离有机物，用盐水(20 mL)洗涤，干燥(Na_2SO_4)和减压浓缩，残余物通过柱色谱法纯化(100% 己烷到 100% 二氯甲烷)，得到双(4-氟苯基)-3-氟

苯基甲醇 (2.81 g, 92%)。

1.5b 双(4-氟苯基)-3-氟苯基乙腈的合成

在室温下将双(4-氟苯基)-3-氟苯基甲醇 (999 mg, 3.18 mmol) 加入到 20% 的乙酰氯在氯甲烷 (10 mL) 中的溶液中, 将得到的紫色溶液搅拌 12 小时, 然后将溶剂蒸发除去, 向残余物中加入甲苯 (20 mL), 然后蒸发, 得到粗品双(4-氟苯基)-3-氟苯基氯甲烷, 其用于随后的步骤而无需纯化。

将氰化铜 (344 mg, 3.82 mmol) 加入到粗品中, 将得到的混合物在 140°C 加热 3 小时, 将反应冷却到约 110°C, 加入甲苯 (50 mL), 将混合物剧烈搅拌 10 分钟, 将混合物冷却到室温, 通过硅胶短柱过滤, 减压除去溶剂, 得到米色固体, 向粉末状的粗品中加入热的己烷 (100 mL), 将混合物剧烈搅拌 1 小时, 过滤并用另外的己烷洗涤, 得到双(4-氟苯基)-3-氟苯基乙腈, 为白色固体, 其直接使用无需另外的纯化。

1.5c 双(4-氟苯基)-3-氟苯基乙酰胺 (16) 的合成

在室温下将浓硫酸 (10 mL) 和冰醋酸 (10 mL) 的溶液加入到双(4-氟苯基)-3-氟苯基乙腈 (3.18 mmol) 中, 将得到的橙色溶液搅拌并在 130°C 加热 3 小时, 将反应冷却到 0°C, 倾入到冰水 (50 mL) 中, 并用氢氧化铵中和, 有机物用氯仿 (3 X 50 mL) 提取, 将有机级分合并, 用盐水 (2 X 20 mL) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4) 和减压浓缩, 得到黄-橙色固体, 将该固体与热的己烷 (50 mL) 搅拌 30 分钟, 并过滤, 从二氯甲烷/己烷结晶, 得到所需产物双(4-氟苯基)-3-氟苯基乙酰胺 16, 为白色结晶固体 (147 mg, 0.43 mmol, 11%, 4 步)。

1.6 通过 ^1H 和 ^{19}F NMR 光谱和熔点进行的化合物表征。

本发明的化合物通过 ^1H 和 ^{19}F NMR 光谱的组合进行表征, 并且测定了化合物的熔点。

1: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.39-7.26 (8H, m), 7.15-6.90 (5H, m), 5.83 (1H, brs), 5.72 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -103.4 (1F, s), -115.8 (1F, s); m.p 180-181 °C.

2: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.37-7.28 (6H, m), 7.15-7.05 (2H, m), 6.93 (1H, dt, $J=8$ 和 2 Hz), 5.90 (1H, brs), 5.68 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -103.4 (1F, m); m.p 210 °C.

3: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.37-7.20 (9H, m), 7.04-6.91 (4H, m), 5.81 (1H, brs), 5.71 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -115.7 (2F, s); m.p 180-181 °C.

4: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.37-7.24 (12H, m), 6.97 (2H, t, $J=8.5$ Hz), 5.83 (1H, brs), 5.75 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -116.2 (1F, s); m.p 193-194 °C.

5: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.41-7.34 (1H, m), 7.29-7.23 (4H, m), 7.16 (1H, ddd, $J=18.1, 8.1$ 和 1.2 Hz), 7.15 (1H, d, $J=7.7$ Hz), 7.05-6.97 (4H, m), 6.93-6.87 (1H, dt, $J=8.0$ 和 1.4 Hz), 5.90 (1H, brs), 5.74 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -103.3 (1F, s), -115.5 (2F, s); m.p 168-169 °C.

6: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.64-7.54 (4H, m), 7.40-7.34 (6H, m), 5.70 (2H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): 137.3 (2F, d, $J=19.2$ Hz), -155.8 (1F, t, $J=21.4$ Hz), -161.9 (2F, dd, $J=21.4$ 和 17.1 Hz).

7: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.37-7.31 (6H, m), 7.28-7.20 (5H, m), 7.12-7.04 (2H, m), 5.90 ((1H, brs), 5.74 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -137.8 to -137.9 (1F, m), -140.3 至 -140.4 (1F, m); m.p 174-175 °C.

8: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.37-7.28 (10H, m), 6.95-6.83 (2H, m), 6.81-6.75 (1H, m), 5.92 (1H, brs), 5.80 (H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -99.1 (1F, dd, $J=19.2$ 和 8.5 Hz), -111.6 (1F, m); m.p 187-188 °C.

9: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.38-7.22 (7H, m), 7.09-6.96 (6H, m), 5.83 (1H, brs), 5.77 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -112.6 (2F, dd, $J=17.1$ 和 6.4 Hz); m.p 195-196 °C.

13: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.26-7.19 (6H, dd, $J=9.0$ 和 5.4 Hz), 7.20-7.01 (6H, t, $J=8.7$ Hz), 5.83 (1H, brs), 5.69 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -115.3 (3F, s); m.p 180-181 $^\circ\text{C}$.

14: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.39-7.27 (9H, m), 7.17-7.03 (4H, m), 5.90 (1H, brs), 5.85 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -102.9 (2F, s); m.p 166-167 $^\circ\text{C}$.

15: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.41-7.34 (2H, m), 7.29-7.23 (4H, m), 7.17-7.05 (4H, m), 6.99 (2H, t, $J=8.7$ Hz), 5.78(2H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -103.0 (2F, s), -115.9 (1F, m); m.p 187-188 $^\circ\text{C}$.

16: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.34-7.20 (6H, m), 7.06-6.97 (6H, m), 5.90 (1H, brs), 5.71 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -112.2 (1F, dd, $J=17.1$ 和 7.4 Hz), -115.1 to -115.2 (2F, m); m.p 165-166 $^\circ\text{C}$.

17: ^1H NMR Γ (CHCl_3): 7.35 -7.21 (3H, m), 7.06-6.97 (9H, m), 7.17-7.05 (4H, m), 5.96 (1H, brs), 5.76 (1H, brs); ^{19}F NMR Γ (CHCl_3): -112.2 (3F, dd, $J=17.1$ 和 8.5 Hz); m.p 186-188 $^\circ\text{C}$.

实施例 2

MS 治疗的研究

在小鼠中检测了 IK1 阻断剂对多发性硬化的效果。使用的实验小鼠是雌性 C57BL/6 小鼠。首先在小鼠中诱导 EAE，然后用 IK1 阻断剂进行治疗。对于 EAE 诱导，可以在 CFA 中混合 150 μg 的 MOG₃₅₋₅₅ 肽和 300 μg 的灭活结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)，并在第 1 天以两次 50- μl 注射 s.c. 注射到小鼠的肋腹。另外，可在第 0 天和第 2 天注射 200 ng 的百日咳毒素。通过吸入异氟烷将动物麻醉。

可以将本发明的 IK1 阻断剂引入到制剂中，并且每天两次以 100- μl 的体积通过 i. p. 注射到小鼠体内进行给药。制剂的例子包括在盐水和 0.4% 的甲基纤维素中的 IK1 阻断剂。从第 0 天，在 MOG₃₅₋₅₅ 免疫(第 1 天)之前的 24 小时，剂量给药 IK1 阻断剂，然后每天监控小鼠，并以盲方式评价疾病的临床迹象。可以采用以下的标准来确定多发性硬化的症状：0，没有疾病迹象；1，尾部瘫痪；2，跛行，尾部和

后腿虚弱；3，后腿瘫痪；4，后腿加上前腿瘫痪；和5，濒死或死亡。可通过从免疫当天直到实验结束得到的每天的分值相加计算累积的临床得分。通过将每只小鼠的得分加合并除以每组中的小鼠数（包括不显示 EAE 迹象的小鼠）计算每天的平均临床得分和平均最大得分。

对于小鼠的免疫组织化学分析，可以使用以下的抗体：抗-CD4，抗-CD152，抗-ICOS，抗-小鼠-IFN- γ ，和抗-小鼠-TNF- α 。还可以使用生物素化兔抗-大鼠-IgG (H+L)，和生物素化抗仓鼠-IgG (H+L)。

在实验终止时，对小鼠通过左心室灌注盐水。可以解剖脑和脊髓，并且将脊髓片段嵌入 OCT 培养基中并冷冻。然后可进行 H&E 染色以检查脊髓的细胞浸润。还可进行过氧化物酶基免疫组织化学染色以测定脊髓病灶内的多种细胞类型。为了完成此项工作，将脊髓切片与抗小鼠 CD4 和 ICOS 的一抗之一或同种型-对照 mAb 培养，然后与生物素结合型二抗和抗生物素蛋白链菌素-HRP 培养。对于细胞因子的检测，可以使用对小鼠 IFN- γ 或小鼠 TNF- α 是特异性的一抗进行染色。最后，可是使用 DAB 在阳性染色细胞内显褐色，并且该组织可用苏木精进行对比染色。

然后可通过以下过程进行抗原特异性 T 细胞增殖试验。在实验终止时从小鼠分离的脾细胞可以用盐水洗涤，然后用补充有 MOG 肽的物质进行培养。对于非特异性的刺激对照，细胞用 Con A 进行培养。将细胞以每毫升 1×10^6 个细胞的密度在 96 孔微量滴定板中进行培养。培养之后，可将细胞用每孔 1 μ Ci 的 3 [H]胸苷进行脉冲处理 24 小时，然后收集并计数。

使用 TRI-试剂从单独小鼠的脊髓组织中分离出 RNA。RNA 的完整性(integrity)和浓度可以使用 RNA 6000 Nano LapChip 试剂盒进行测定。然后可使用 RT-PCR 试剂盒进行逆转录以生成 RNA 的 cDNA 拷贝。

可使用如下的用于 RT-PCR 试剂盒的 SuperScript™ 第一链合成系统进行逆转录。全部 RNA 可与 0.5 μg 的 Oligo(dT) 和 50 ng 的无规六聚体以 12 μl 的总体积在 70℃ 退火 10 分钟, 并在冰上冷却。然后可以加入 8 μl 的混合物, 其包含: 2.5 x RT 缓冲液, 6.25 mM MgCl₂, 1.25 mM dNTP, 25 mM DTT 和 200 U SuperScript II 逆转录酶。将混合物在 25℃ 培养 10 分钟, 在 42℃ 培养 50 分钟, 在 70℃ 培养 15 分钟, 并在冰上冷却。然后将样品用 2 U 的核糖核酸酶 (RNase H) 在 37℃ 处理 20 分钟。

可以在 cDNA 上进行实时 PCR, 以获得为计算小鼠中 mRNA 水平所必需的量的 cDNA。实时 PCR 可以在如下所述的采用 SYBR® Green PCR Master Mix 的 GeneAmp, 5700 序列检测系统上进行。低聚核苷酸可以购自 Invitrogen。PCR 反应由总体积为 30 μl 的 25 ng cDNA、400 nM 的各个目标引物、和 1x 最终浓度的 SYBR Green PCR Master Mix 组成。可以使用以下的扩增参数: 50℃ 持续 2 分钟, 然后在 95℃ 持续 10 分钟, 95℃ 的 40 个循环持续 15 秒, 和在 60℃ 持续 1 分钟。反应继续在 60℃ 进行另外 20 分钟以确定引物和潜在的引物二聚体的特异性。样品一式两份进行试验。然后使用相对循环阈 (C_T) 方法 (Applied Biosystems' User Bulletin No. 2) 的改进法, 使用 $2^{(-\Delta^{\circ} C_t)} \times 10000$ 算式计算 mRNA 水平。然后将该值归一化, 得到相应的泛素管家基因的水平。然后该结果代表了用和未用 IK1 阻断剂处理的显示 EAE 迹象的小鼠。

还可以使用第二组经治疗的动物用于血液收集, 以测定血浆中 IK1 阻断剂的浓度。在最后一次治疗后的 1、2、4、6、8、和 24 小时麻醉后通过眼窝后窦穿刺收集血液。然后将血液收集到肝素化管内并在冰上保存。可以通过离心作用获得血浆并保存在 -80℃ 等待分析。使用 LC-MS/MS 测定血浆中的 IK1 阻断剂的浓度。实验中使用的质谱仪的例子是 Waters/Micromass Micro 三重四极杆。可使用具有四向 Harney

阀和随机进样能力的 CTC HTS-PAL 自动进样器将样品引入到 LC-MS/MS 中。HPLC 系统还可以包括两个 Shimadzu LC-10ADvp 泵和 Luna C18 (2) 2.0×50.0 mm, 5 μ M 柱。

可以使用溶剂混合物 A (SMA) 和 B (SMB) 以 0.25 毫升/分钟的流速进行梯度洗脱。SMA 是 0.1% 甲酸的 95% 甲醇水溶液, SMB 是 0.1% 甲酸的 5% 甲醇水溶液。梯度条件是: 对于注射后的第一个 1.5 分钟, 使用 100% A; 从 1.5-2.5 分钟, 使用 70% A; 从 2.5-3.5 分钟, 使用 50% A; 从 3.5-4.5 分钟, 使用 0% A; 和在 4.5 分钟切换到初始条件 (100% SMA)。血浆样品用两体积的乙腈处理, 涡流, 并离心, 使蛋白质沉淀。可以将上清液引入到 LC-MS/MS 系统中。可以使用正离子方式的多反应监控法 (MRM) 进行分析。监控的转化是从 m/z 345 到 m/z 277。使用从未给药的小鼠血浆制备的五点校准曲线计算 IK1 阻断剂的血浆浓度。

还可以通过 E11oso 等在美国专利公开 2004/0167112 (公开日: 2004 年 8 月 26 日) ("E11oso") 的实施例 1 中所述的方法检验这些 IK1 阻断剂对小鼠中多发性硬化的进展的体内作用。可使用在 E11oso 的实施例 2 中所述的模型检验这些 IK1 阻断剂对细胞因子生成的体外抑制作用。

可以理解的是, 本文所述的实施例和实施方案仅仅用于说明性目的, 并且对其进行的各种修改或改变将由本领域的技术人员所提议, 并且被认为包含在本申请的精神和范围内, 并且被认为包含在所附权利要求要求的范围内。本文引用的所有的公开、专利和专利申请以全文并入本文作为参考用于所有目的。