



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101925603 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 04

(21) 申请号 200880125593. 7

A61K 31/517(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 12. 12

A61K 31/519(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 1/18(2006. 01)

61/013, 336 2007. 12. 13 US

A61P 3/06(2006. 01)

A61P 25/16(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61P 25/28(2006. 01)

2010. 07. 26

(56) 对比文件

(86) PCT申请的申请数据

WO 2006002421 A2, 2006. 01. 05, 权利要求
1-75.

PCT/US2008/086562 2008. 12. 12

(87) PCT申请的公布数据

WO 0129044 A1, 2001. 04. 26, 权利要求
1-33.

W02009/076593 EN 2009. 06. 18

(73) 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司

审查员 李钊博

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 H·宾奇 P·D·J·格鲁滕休斯

A·皮尔斯 L·T·D·范宁

(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 11038

代理人 吴宗颐

(51) Int. Cl.

C07D 487/04(2006. 01)

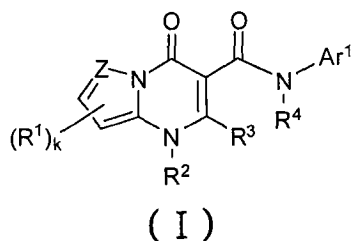
权利要求书3页 说明书44页

(54) 发明名称

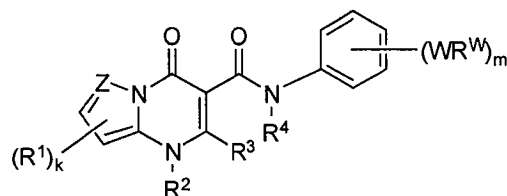
囊性纤维化跨膜通道调节因子的调节剂

(57) 摘要

本发明涉及式 (I) 的 ATP 结合盒 (“ABC”) 转运体或其片段, 包括囊性纤维化跨膜通道调节因子的调节剂, 其组合物及其方法。本发明也涉及使用这种 CFTR 调节剂治疗疾病的方法。



1. 式 IVA 的化合物



IVA

;

或其药学可接受的盐,其中:

W 是键;

R^W 独立地是卤素、氰基、CF₃、CHF₂、OCHF₂、Me、Et、CH(Me)₂、CHMeEt、正丙基、叔丁基、OH、OMe、OEt、OPh、O- 氟苯基、O- 二氟苯基、O- 甲氧基苯基、O- 甲基苯基、O- 苄基、SMe、SCF₃、SCHF₂、SEt、CH₂CN、NH₂、NHMe、N(Me)₂、NHEt、N(Et)₂、C(O)CH₃、C(O)Ph、C(O)NH₂、SPh、SO₂-(氨基-吡啶基)、SO₂NH₂、SO₂Ph、SO₂NHPh、SO₂-N- 吗啉代、SO₂-N- 吡咯烷基、N- 吡咯基、2- 甲基吡咯基、3- 氟吡咯基、2,5- 二甲基吡咯基、N- 吗啉代、1- 哌啶基、苯基、苄基、(环己基-甲氨基)甲基、4- 甲基-2,4- 二氢-吡唑-3- 酮-2- 基、苯并咪唑-2- 基、呋喃-2- 基、4- 甲基-4H-[1,2,4] 三唑-3- 基、3-(4'- 氯苯基)-[1,2,4] 噁二唑-5- 基、NHC(O)Me、NHC(O)Et、NHC(O)Ph、NHSO₂Me、2- 吡啶基、5- 吡啶基、-CH₂CH₂OH、-OCF₃、O-(2,3- 二甲基苯基)、5- 甲基呋喃基、-SO₂-N- 哌啶基、2- 甲基苯基、3- 甲基苯基、4- 甲基苯基、O- 丁基、NHCO₂C(Me)₃、CO₂C(Me)₃、异丙烯基、正丁基、O-(2,4- 二氯苯基)、NHSO₂PhMe、O-(3- 氯-5- 三氟甲基-2- 吡啶基)、苯基羧基甲基、NHCOCH₂C(Me)₃、O-(2- 叔丁基)苯基、2,3- 二甲基苯基、3,4- 二甲基苯基、4- 羟甲基苯基、4- 二甲氨基苯基、2- 三氟甲基苯基、3- 三氟甲基苯基、4- 三氟甲基苯基、4- 氰基甲基苯基、4- 异丁基苯基、3- 吡啶基、4- 吡啶基、4- 异丙基苯基、3- 异丙基苯基、2- 甲氧基苯基、3- 甲氧基苯基、4- 甲氧基苯基、3,4- 亚甲二氧基苯基、2- 乙氧基苯基、3- 乙氧基苯基、4- 乙氧基苯基、2- 甲硫基苯基、4- 甲硫基苯基、2,4- 二甲氧基苯基、2,5- 二甲氧基苯基、2,6- 二甲氧基苯基、3,4- 二甲氧基苯基、5- 氯-2- 甲氧基苯基、2-OCF₃- 苯基、3- 三氟甲氧基- 苯基、4- 三氟甲氧基苯基、2- 苯氧基苯基、4- 苯氧基苯基、2- 氟-3- 甲氧基- 苯基、2,4- 二甲氧基-5- 噻吩基、5- 异丙基-2- 甲氧基苯基、2- 氟苯基、3- 氟苯基、4- 氟苯基、3- 氰基苯基、3- 氯苯基、4- 氯苯基、2,3- 二氟苯基、2,4- 二氟苯基、2,5- 二氟苯基、3,4- 二氟苯基、3,5- 二氟苯基、3- 氯-4- 氟- 苯基、3,5- 二氯苯基、2,5- 二氯苯基、2,3- 二氯苯基、3,4- 二氯苯基、2,4- 二氯苯基、3- 甲氧羰基苯基、4- 甲氧羰基苯基、3- 异丙氧羰基苯基、3- 乙酰氨基苯基、4- 氟-3- 甲基苯基、4- 甲基亚磺酰基- 苯基、4- 甲磺酰基- 苯基、4-N-(2-N, N- 二甲氨基乙基) 氨甲酰基苯基、5- 乙酰基-2- 噻吩基、2- 苯并噻吩基、3- 苯并噻吩基、呋喃-3- 基、4- 甲基-2- 噻吩基、5- 氰基-2- 噻吩基、N'- 苯基羧基-N- 哌啶基、-NHCO₂Et、-NHCO₂Me、N- 吡咯烷基、-NHSO₂(CH₂)₂-N- 哌啶、-NHSO₂(CH₂)₂-N- 吗啉、-NHSO₂(CH₂)₂-N(Me)₂、COCH₂N(Me)COCH₂NHMe、-CO₂Et、O- 丙基、-CH₂CH₂NHCO₂C(Me)₃、氨基甲基、戊基、金刚烷基、环戊基、乙氧基乙基、C(Me)₂CH₂OH、C(Me)₂CO₂Et、-CHOHMe、CH₂CO₂Et、-C(Me)₂CH₂NHCO₂C(Me)₃、O(CH₂)₂OEt、O(CH₂)₂OH、CO₂Me、羟甲基、1- 甲基-1- 环己基、1- 甲基-1- 环辛基、1- 甲基-1- 环庚基、C(Et)₂C(Me)₃、C(Et)₃、CONHCH₂CH(Me)₂、2- 氨基甲基- 苯基、乙烯基、1- 哌啶基羧基、乙炔基、环己基、4- 甲基哌啶基、-OCO₂Me、-C(Me)₂CH₂NHCO₂CH₂CH(Me)₂、-C(Me)

$_2\text{CH}_2\text{NHCOC}_2\text{H}_4\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{Me})_2\text{CH}_2\text{NHCOC}_2\text{Et}$ 、 $-\text{C}(\text{Me})_2\text{CH}_2\text{NHCOC}_2\text{Me}$ 、 $-\text{C}(\text{Me})_2\text{CH}_2\text{NHCOC}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{Me})_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHCOCF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHCOC}_2\text{C}(\text{Me})_3$ 、 $-\text{C}(\text{Me})_2\text{CH}_2\text{NHCOC}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 、 $\text{C}(\text{Me})_2\text{CH}_2\text{NHCOC}_2(\text{CH}_2)_2\text{OMe}$ 、 $\text{C}(\text{OH})(\text{CF}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{Me})_2\text{CH}_2\text{NHCOC}_2\text{CH}_2-$ 四氢呋喃-3-基、 $\text{C}(\text{Me})_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OMe}$ 或 3-乙基-2,6-二氧代哌啶-3-基；

Z 是 $-\text{CH}-$ 、 $-\text{CR}^1-$ 或 N；

m 是 0-5；

k 是 0-1；

各 R^1 独立地是氢或 C1-C3 烷基；

R^2 是氢；

R^3 是氢；且

R^4 是氢或 C_{1-6} 脂族基。

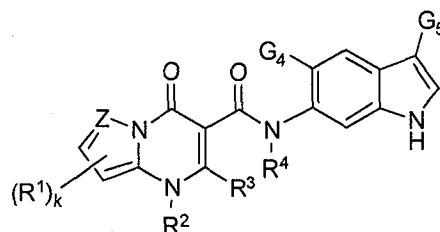
2. 权利要求 1 的化合物，其中 R^1 是氢。

3. 权利要求 1 的化合物，其中 R^1 是 C1-C3 烷基。

4. 权利要求 3 的化合物，其中 R^1 是甲基。

5. 权利要求 3 的化合物，其中 R^1 是乙基。

6. 式 VB-3 的化合物：



VB-3；

其中：

G_4 是氢、卤素、CN、 CF_3 、 CHF_2 、 CH_2F 、乙氧羰基、叔丁基、2-甲氧基苯基、2-乙氧基苯基、 $(4-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2)-$ 苯基、2-甲氧基-4-氯-苯基、吡啶-3-基、4-异丙基苯基、2,6-二甲氧基苯基、仲丁基氨基羰基、乙基、叔丁基或哌啶-1-基羰基；且

G_5 是氢、CN、 CF_3 、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、氰基甲基、甲氧基乙基、 $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OMe}$ 、 $(\text{CH}_2)_2\text{-NHC}(\text{O})\text{O}-$ 叔丁基或环戊基；

各 R^1 独立地是氢或 C1-C3 烷基；

R^2 是氢；

R^3 是氢；

R^4 是氢或 C_{1-6} 脂族基。

7. 权利要求 6 的化合物，其中 G_4 是氢，且 G_5 是氰基、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、氰基甲基、甲氧基乙基、 $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OMe}$ 、 $(\text{CH}_2)_2\text{-NHC}(\text{O})\text{O}-$ 叔丁基或环戊基。

8. 权利要求 6 的化合物，其中 G_5 是氢、CN 或 CF_3 ，且 G_4 是卤素、乙氧羰基、叔丁基、2-甲氧基苯基、2-乙氧基苯基、 $(4-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2)-$ 苯基、2-甲氧基-4-氯-苯基、吡啶-3-基、4-异丙基苯基、2,6-二甲氧基苯基、仲丁基氨基羰基、乙基、叔丁基或哌啶-1-基羰基。

9. 化合物，选自 N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-2-甲基-7-氧代-4,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-甲酰胺、N-(3-叔丁基-1H-吡啶-6-基)-7-氧代-4,7-二氢吡

唑并 [1,5-a] 嘧啶 -6- 甲酰胺、N-(4-(3,3- 二甲基吡咯烷 -1- 基) -2-(三氟甲基) 苯基) -7- 甲基 -4- 氧代 -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、N-(5- 叔丁基 -1H- 吡啶 -6- 基) -2- 甲基 -7- 氧代 -4,7- 二氢吡唑并 [1,5-a] 嘧啶 -6- 甲酰胺、N-(5- 叔丁基 -1H- 吡啶 -6- 基) -7- 氧代 -4,7- 二氢吡唑并 [1,5-a] 嘧啶 -6- 甲酰胺、N-(2,4- 二叔丁基 -5- 羟基苯基) -7- 氧代 -4,7- 二氢吡唑并 [1,5-a] 嘧啶 -6- 甲酰胺、7- 乙基 -4- 氧代 -N-(3-(三氟甲基) -1H- 吡啶 -6- 基) -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、7- 氧代 -N-(5-(三氟甲基) -1H- 吡啶 -6- 基) -4,7- 二氢吡唑并 [1,5-a] 嘧啶 -6- 甲酰胺、N-(1H- 吡啶 -6- 基) -2- 甲基 -7- 氧代 -4,7- 二氢吡唑并 [1,5-a] 嘧啶 -6- 甲酰胺、N-(3- 叔丁基 -1H- 吡啶 -6- 基) -7- 乙基 -4- 氧代 -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、7- 乙基 -4- 氧代 -N-(5-(三氟甲基) -1H- 吡啶 -6- 基) -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、7- 乙基 -N-(2- 氟 -5- 羟基 -4-(1- 甲基环己基) 苯基) -4- 氧代 -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、7- 氧代 -N-(4-(吡咯烷 -1- 基) -2-(三氟甲基) 苯基) -4,7- 二氢吡唑并 [1,5-a] 嘧啶 -6- 甲酰胺、N-(2- 氟 -5- 羟基 -4-(1- 甲基环己基) 苯基) -7- 甲基 -4- 氧代 -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、N-(4- 环戊基 -5- 羟基 -2-(三氟甲基) 苯基) -7- 甲基 -4- 氧代 -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、N-(2,4- 二叔丁基 -5- 羟基苯基) -7- 乙基 -4- 氧代 -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、7- 甲基 -4- 氧代 -N-(3-(三氟甲基) -1H- 吡啶 -6- 基) -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺、N-(4- 环戊基 -5- 羟基 -2- 甲基苯基) -7- 甲基 -4- 氧代 -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺或 N-(2- 氟基 -4- 环戊基 -5- 羟基苯基) -7- 甲基 -4- 氧代 -1,4- 二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶 -3- 甲酰胺。

10. 药物组合物, 包含权利要求 1 或 6 的化合物和药学可接受的载体或佐剂。

11. 权利要求 1 或 6 的化合物或其药学可接受的盐在制备用于调节 CFTR 活性的药物中的应用。

12. 权利要求 1 或 6 的化合物或其药学可接受的盐在制备用于治疗患者的疾病或减轻该疾病的严重性的药物中的应用, 其中所述疾病选自: 囊性纤维化、遗传性肺气肿、COPD 或干眼病。

13. 用于在体外或体内测定生物样品中 CFTR 或其片段的活性的试剂盒, 包括:

(i) 一种组合物, 包含权利要求 1 或 6 的化合物;

(ii) 说明书, 指示:

a) 将该组合物与生物样品接触;

b) 测定所述 CFTR 或其片段的活性。

14. 权利要求 13 的试剂盒, 还包括下列说明:

a) 将另外的化合物与该生物样品接触;

b) 在所述另外的化合物存在下测定所述 CFTR 或其片段的活性; 和

c) 将在所述另外的化合物存在下的所述 CFTR 或其片段的活性与在包含权利要求 1 或 6 的化合物的组合物存在下的 CFTR 或其片段的活性进行比较。

囊性纤维化跨膜通道调节因子的调节剂

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 根据 35U. S. C. § 119, 本申请要求 2007 年 12 月 13 日提交的题为“囊性纤维化跨膜通道调节因子的调节剂”的美国临时申请 US61/013, 336 的优先权, 将该文献的全部内容引入本文作参考。

背景技术

[0003] ATP 结合盒转运体是一族膜转运蛋白, 其调节广泛的药物、可能的毒性药物、外源物、以及阴离子的转运。它们是同源膜蛋白, 由于结合和使用细胞的三磷酸腺苷 (ATP) 来实现它们的特异性活性。人们发现, 这些转运体中的一些是多药耐药性蛋白质类 (例如 MDR1-P 糖蛋白, 或多药耐药性蛋白 MRP1), 保护恶性癌细胞不受化疗剂的影响。迄今为止, 已经鉴定出了 48 种 ATP 结合盒转运体, 根据它们的序列同一性和功能分为 7 族。

[0004] 通常与疾病有关的 ATP 结合盒转运体家族的一个成员是 cAMP/ATP- 介导的阴离子通道——CFTR。CFTR 在多种细胞类型中被表达, 所述细胞类型包括吸收性和分泌性上皮细胞, 其中它调节阴离子的跨膜流动, 并调节其他离子通道和蛋白质的活性。在上皮细胞中, CFTR 的正常功能对于维持包括呼吸和消化组织在内的整个身体的电解质转运是至关重要的。CFTR 是由大约 1480 个氨基酸组成, 这些氨基酸编码由串联重复的跨膜区所构成的蛋白质, 每个跨膜区含有 6 个跨膜螺旋和 1 个核苷酸结合区。2 个跨膜区通过一个具有多个磷酸化位点的大的、极性的、调节性 (R)- 区域相连, 所述磷酸化位点调节通道活性和细胞运输。

[0005] 编码 CFTR 的基因已经被鉴别和测序 (参见 Gregory, R. J. 等人 (1990) Nature 347 :382-386 ;Rich, D. P. 等人 (1990) Nature 347 :358-362), (Riordan, J. R. 等人 (1989) Science 245 :1066-1073)。这种基因的缺陷引起 CFTR 突变, 导致囊性纤维化 (“CF”), 这是人类最常见的致命性遗传疾病。在美国, 囊性纤维化影响大约 2, 500 分之一的婴儿。在全部美国人口中, 多达 1 千万人携带有缺陷基因的单个副本, 而没有明显的不良作用。相反, 带有两个 CF 相关基因副本的个体会发生 CF 的致虚弱和致命作用, 包括慢性肺病。

[0006] 在患有囊性纤维化病的患者中, 在呼吸道上皮中内源性表达的 CFTR 突变导致顶膜的阴离子分泌减少, 使离子和体液转运失衡。所导致的阴离子转运的减少使得 CF 患者的肺中粘液蓄积增加, 并伴随微生物感染, 最终导致死亡。除了呼吸道疾病以外, CF 患者典型地患有胃肠方面的问题和胰腺功能不全, 如果不治疗的话, 会导致死亡。此外, 大多数患有囊性纤维化病的男性都不能生育, 而患有囊性纤维化病的女性则生育力下降。与带有两个 CF 相关基因副本所导致的严重后果相反, 携带有单个 CF 相关基因副本的个体表现出对霍乱和腹泻所致脱水的抵抗力增加——这也许解释了 CF 基因在人群中相对高频率出现的原因。

[0007] CF 染色体的 CFTR 基因的序列分析已经揭示了多种致病性突变 (Cutting, G. R. 等人 (1990) Nature 346 :366-369 ;Dean, M. 等人 (1990) Cell 61 :863 :870 ;和 Kerem, B-S. 等人 (1989) Science 245 :1073-1080 ;Kerem, B-S 等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :8447-8451)。迄今为止, 已经鉴别出了 1000 种以上的致病性 CF 基因突变 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)。最常见的突变是在 CFTR 氨基酸序列的第 508 位上的苯丙

氨酸的缺失,通常被称为 $\Delta F508$ -CFTR。这种突变在大约 70% 的囊性纤维化病例中都会发生,与严重的疾病有关。另一种突变 G551D-CFTR 包括 Gly 被 551 位上的 Asp 替代。

[0008] CFTR 的突变妨碍了初生蛋白的正确折叠。这导致该突变蛋白不能退出 ER,和通过质膜。结果,膜中存在的通道数量远远小于表达野生型 CFTR 的细胞中所观察到的数量。除了运输受损以外,该突变还导致通道门控缺陷。这样加起来,膜中通道数量减少和门控缺陷导致通过上皮的阴离子转运减少,导致离子和体液转运出现缺陷 (Quinton, P. M. (1990), FASEB J. 4 :2709-2727)。然而,研究已经显示出,尽管比野生型 CFTR 少,膜中 CFTR 突变的数量减少是有用的。(Dalemans 等人 (1991), Nature Lond. 354 :526-528 ;Denning 等人,出处同前 ;Pasyk 和 Foskett (1995), J. Cell. Biochem. 270 :12347-50)。除了 $\Delta F508$ -CFTR 和 G551D-CFTR 以外,其他导致运输、合成和 / 或通道门控缺陷的致病性 CFTR 突变可以被向上或向下调节,以改变阴离子分泌,并改变疾病进程和 / 或严重性。

[0009] 尽管除了阴离子以外 CFTR 还转运许多种分子,但是显然,这种作用(转运阴离子、氯离子和碳酸氢根离子)代表了跨越上皮细胞而转运离子和水的重要机制中的一个要素。其他要素包括上皮 Na^+ 通道、ENaC、 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共转运体、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶泵和基底外侧膜 K^+ 通道,它们负责将氯离子摄取到细胞中。

[0010] 这些要素一起起作用,通过它们在细胞内的选择性表达和定位来实现跨上皮细胞的定向转运。通过存在于顶膜上的 ENaC 和 CFTR 与在细胞基底外侧表面表达的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶泵和 Cl^- 通道之间的协调活性,发生了氯离子的吸收。氯离子从腔侧的继发性主动转运导致细胞内的氯离子蓄积,接着被动地通过 Cl^- 通道离开细胞,导致向量转运。 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共转运体、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶泵和基底外侧膜 K^+ 通道在基底外侧表面上的排列和腔侧上的 CFTR 协调氯离子通过腔侧上 CFTR 的分泌。由于水可能从不自己主动转运,因此它依靠钠和氯离子的大量流动所产生的微小的跨上皮渗透梯度来流过上皮。

[0011] 推定因 CFTR 突变导致的碳酸氢盐转运缺陷导致一些分泌功能的缺陷。例如,参见“Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis,” Paul M. Quinton, Lancet 2008 ;372 :415-417。

[0012] 除了囊性纤维化,调节 CFTR 活性还有益于并非 CFTR 突变直接导致的其他疾病,例如 CFTR 介导的分泌性疾病和其他蛋白质折叠性疾病。CFTR 调节氯离子和碳酸氢盐流过许多细胞上皮,以控制流体运动、蛋白质增溶、粘液粘度和酶活性。CFTR 中的缺陷可以导致气道或许多器官包括肝和胰腺中的导管阻塞。任何涉及粘液浓稠、流体调节受损、粘液清除受损、或导致炎症和组织破坏的导管阻塞的疾病可以是增强剂的候选者。

[0013] 这些疾病包括但不限于慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、哮喘、吸烟诱发的 COPD、慢性支气管炎、鼻窦炎、便秘、干眼病和斯耶格伦 (Sjögren's) 综合征。COPD 的特征在于渐进性和非完全可逆性的气流受限。气流受限是由于粘液分泌过多、肺气肿和细支气管炎。突变体或野生型 CFTR 的活化剂为 COPD 中常见的粘液分泌过多和粘膜纤毛清除受损提供了潜在的治疗。具体地,跨 CFTR 的阴离子分泌的增加会促进流体转运到气道表面液体中,以水化粘液并优化纤周流体粘度。这会导致增强粘膜纤毛清除并减少与 COPD 有关的症状。干眼病的特征在于泪水产生减少以及泪液膜液体、蛋白质和粘蛋白性质异常。引起干眼病有多种原因,其中一些包括年龄、Lasik 眼科手术、关节炎、药物、化学 / 热灼伤、变态反应、和疾病,例如囊性纤维化和斯耶格伦综合征。通过 CFTR 的阴离子分泌增加会增加由眼周围的

角膜内皮细胞和分泌腺中的流体转运,以增强角膜水合。这有助于减少与干眼病有关的症状。斯耶格伦综合征是一种自身免疫性疾病,其中免疫系统攻击全身(包括眼、口、皮肤、呼吸组织、肝、阴道和消化道)的能产生液体的腺体。症状包括眼、口和阴道干燥,以及肺病。该疾病也与类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、全身性硬化症和多肌炎/皮炎有关。蛋白质运输缺陷据认为会导致该疾病,由此限制了治疗选择。CFTR 活性的调节剂可以使受该疾病影响的各种器官水合并有助于缓解相关的症状。

[0014] 据认为,CFTR 突变会妨碍初生蛋白正确折叠,导致该突变蛋白不能退出 ER,并通过质膜。结果,质膜中存在的成熟蛋白的数量不足,上皮组织内的氯离子转运显著减少。事实上,经由 ER 机制加工 CFTR 的 ER 缺陷的这种细胞现象已经显示出,其不仅是 CF 疾病的潜在基础,也是广泛的其他独立和遗传疾病的潜在基础。导致 ER 机制障碍的两种途径是,通过丧失与蛋白质的 ER 出口的偶合而导致降解,或者是通过这些有缺陷的/错误折叠的蛋白质的 ER 蓄积 [Aridor M 等人, *Nature Med.*, 5(7), pp 745-751 (1999); Shastry, B. S. 等人, *Neurochem. International*, 43, pp 1-7 (2003); Rutishauser, J. 等人, *Swiss Med Wkly*, 132, pp 211-222 (2002); Morello, JP 等人, *TIPS*, 21, pp. 466-469 (2000); Bross P. 等人, *Human Mut.*, 14, pp. 186-198 (1999)]。与第一类 ER 障碍有关的疾病是囊性纤维化(由如上所述的错误折叠的 $\Delta F508$ -CFTR 导致)、遗传性肺气肿(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶;非 Piz 变体导致)、遗传性血色素沉着症、凝血-纤溶缺陷,例如蛋白质 C 缺乏症、1 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷,例如家族性高胆固醇血症、1 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积症,例如 I-细胞疾病/假性胡尔勒病、粘多糖症(由溶酶体加工酶导致),桑霍夫病/泰-萨病(由 β -氨基己糖苷酶导致),克-纳综合征 (Crigler-Najjar) II 型(由 UDP-葡萄糖醛酸-唾液酸-转移酶导致)、多内分泌腺病/胰岛素分泌过多症、糖尿病(由胰岛素受体导致)、拉伦侏儒症(由生长激素受体导致)、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺功能减退(由前甲状旁腺激素原导致),黑素瘤(由酪氨酸酶导致)。与后一类 ER 障碍有关的疾病是聚糖病 CDG 1 型、遗传性肺气肿(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 (PiZ 变体) 导致)、先天性甲状旁腺功能亢进症、成骨不全(由 I、II、IV 型前胶原导致)、遗传性低纤维蛋白原血症(由纤维蛋白原导致)、ACT 不足(由 $\alpha 1$ -抗胰凝乳蛋白酶导致)、尿崩症 (DI)、神经生长性 DI (由加压素激素/V2-受体导致)、肾性 DI (由水通道蛋白-HI 导致)、夏-马-图三氏综合征(由周围髓磷脂蛋白 22 导致)、佩-梅二氏病、神经变性疾病,例如阿尔茨海默病(由 β APP 和衰老蛋白导致)、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上麻痹、匹克病、若干聚谷氨酰胺神经性障碍,例如亨廷顿病、I 型脊髓脑共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩,和强直性肌营养不良,以及海绵样脑病,例如遗传性克雅病(由朊病毒蛋白加工缺陷导致)、法布里病(由溶酶体 α -半乳糖苷酶 A 导致)、格-施-沙综合征(由 Prp 加工缺陷导致)、不育、胰腺炎和肝病。

[0015] CFTR 突变涉及的其他疾病包括因输精管先天性双侧缺失 (CBAVD) 导致的男性不育、轻度肺疾病、特发性胰腺炎和变应性支气管肺曲菌病 (ABPA)。参见“CFTR-opathies: disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations,” Peadar G. Noone 和 Michael R. Knowles, *Respir. Res.* 2001, 2:328-332 (引入本文参考)。

[0016] 除了向上调节 CFTR 活性以外,CFTR 调节剂导致的阴离子分泌减少对于治疗分泌

性腹泻可能是有益的,其中由于促分泌性活化的氯离子转运,上皮细胞的水转运显著增加。该机制包括提高 cAMP 和刺激 CFTR。尽管腹泻有很多原因,但由氯离子转运过度引起的腹泻性疾病的主要后果却是共同的,包括脱水、酸中毒、发育受损和死亡。急性和慢性腹泻代表了世界上很多地区的主要医学问题。腹泻是营养不良的重要因素,并且是导致 5 岁以下儿童死亡的主要原因(每年死亡 5,000,000 人)。

[0017] 分泌性腹泻也是获得性免疫缺陷综合征(AIDS)和慢性炎性肠病(IBD)患者的一种危险的症状。每年都有 1600 万从发达国家到发展中国家的旅行者会发生腹泻,腹泻病例的严重性和数量随着所旅行的国家和地区的不同而不同。

[0018] 因此,需要 CFTR 活性调节剂及其组合物,其可以用于调节哺乳动物的细胞膜中的 CFTR 活性。

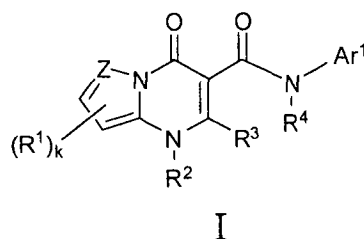
[0019] 需要使用这种 CFTR 活性调节剂治疗由 CFTR 突变导致的疾病的方法。

[0020] 需要在哺乳动物的离体细胞膜中调节 CFTR 活性的方法。

发明内容

[0021] 现在已经发现,本发明的化合物及其药学可接受的组合物可以用作 ABC 转运体的活性调节剂。这些化合物具有通式 I:

[0022]



[0023] 或其药学可接受的盐,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 Ar^1 如下文一般所述以及在分类项乃至亚分类项中所述。

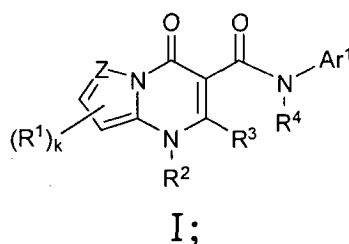
[0024] 这些化合物和药学可接受的组合物用于治疗以下各种疾病、病症或障碍或者减轻以下各种疾病、病症或障碍的严重性,所述疾病、病症或障碍包括但不限于囊性纤维化、哮喘、吸烟诱发的 COPD、慢性支气管炎、鼻窦炎、便秘、胰腺炎、胰腺功能不全、输精管先天性双侧缺失导致的男性不育(CBAVD)、轻度肺疾病、特发性胰腺炎、变应性支气管肺曲菌病(ABPA)、肝病、遗传性肺气肿、遗传性血色素沉着症、凝血-纤溶缺陷,例如蛋白质 C 缺乏症、1 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷,例如家族性高胆固醇血症、1 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积症,例如 I- 细胞疾病/假性胡尔勒病、粘多糖症、桑霍夫病/泰-萨病、克-纳综合征 II 型、多内分泌腺病/胰岛素分泌过多症、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺功能减退、黑素瘤、聚糖病 CDG 1 型、先天性甲状腺功能亢进症、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 不足、尿崩症(DI)、神经生长性 DI、肾性 DI、夏-马-图三氏综合征、佩-梅二氏病、神经变性疾病,例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上麻痹、匹克病、若干聚谷氨酰胺神经性障碍,例如亨廷顿病、I 型脊髓脑共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩、和强直性肌营养不良、以及海绵样脑病,例如遗传性克雅氏病(由朊病毒蛋白加工缺陷导致)、法布里病、格-施-沙综合征、COPD、干眼病和斯耶格伦病。

具体实施方式

[0025] I. 本发明化合物的一般描述：

[0026] 本发明涉及用作 ABC 转运蛋白活性调节剂的式 I 的化合物：

[0027]



[0028] 或其药学可接受的盐，其中：

[0029] Ar¹ 是具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元芳族单环，其中所述环任选与 5-12 元芳族的、部分不饱和的或饱和的单环或双环稠合，其中各环包含 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子，其中 Ar¹ 具有 m 个各自独立地选自 -WR'' 的取代基；

[0030] W 是键或是任选取代的 C₁-C₆ 亚烷基链，其中 W 中的至多 2 个亚甲基单元任选和独立地被 O、-CO-、-CS-、-COCO-、-CONR' -、-CONR' NR' -、-CO₂-、-OCO-、-NR' CO₂-、-O-、-NR' CONR' -、-C(O)NR' -、-OCONR' -、-NR' NR' -、-NR' NR' CO-、-NR' CO-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR' -、-SO₂NR' -、NR' SO₂- 或 -NR' SO₂NR' - 替代；

[0031] Z 是 -CH-、-CR¹- 或 N，

[0032] m 是 0-5；

[0033] k 是 0-1；

[0034] 各 R¹ 独立地是 -X-Rˣ；

[0035] X 是键或是任选取代的 C₁-C₆ 亚烷基链，其中 X 中的至多 2 个亚甲基单元任选和独立地被 -CO-、-CS-、-COCO-、-CONR' -、-CONR' NR' -、-CO₂-、-OCO-、-NR' CO₂-、-O-、-NR' CO NR' -、-OCONR' -、-NR' NR' -、-NR' NR' CO-、-NR' CO-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR' -、-SO₂NR' -、NR' SO₂- 或 -NR' SO₂NR' - 替代；

[0036] Rˣ 独立地是 R'、卤素、NO₂、CN、CF₃ 或 OCF₃；

[0037] R² 是氢；

[0038] R³ 是氢；

[0039] R⁴ 是氢或任选被 -X-Rˣ 取代的 C₁-₆ 脂族基；

[0040] R' 独立地选自氢或任选取代的选自 C₁-C₈ 脂族基、具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环、或具有 0-5 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 8-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的双环系的基团；或者 2 个 R' 与它们所连接的原子一起形成任选取代的具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或双环。

[0041] 2. 化合物和定义：

[0042] 本发明的化合物包括上文一般性描述的那些，通过本文所述的类、亚类和种类进一步说明。在本文中使用时，除非另有说明，适用下列定义。

[0043] 本文所用的术语“ABC-转运体”是指 ABC-转运蛋白或其包含至少一个结合区的片段，其中所述蛋白或其片段存在于体内或体外。本文所用的术语“结合区”是指可以与调节

剂结合的 ABC- 转运体上的一个区域。参见,例如 Hwang, T. C. 等人, J. Gen. Physiol. (1998) : 111 (3), 477-90。

[0044] 本文所用的术语“CFTR”是指囊性纤维化跨膜通道调节因子或其具有调节活性的突变体,包括但不限于 $\Delta F508$ CFTR 和 G551D CFTR(参见,例如, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, 关于 CFTR 突变体的)。

[0045] 本文所用的术语“调节”是指以可测定量增加或减少。

[0046] 为了本发明的目的,根据元素周期表, CAS 版, Handbook of Chemistry and Physics, 第 75 版,来鉴定化学元素。此外,在“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, UniVersity Science Books, Sausalito :1999, 以及“March ' s Advanced Organic Chemistry”, 第 5 版, Ed. :Smith, M. B. 和 March, J., John Wiley & Sons, New York :2001 中描述了有机化学的一般原理,将其全部内容通过参考引入本文。

[0047] 如本文所述,本发明的化合物任选可以被一个或多个取代基取代,例如如上所述所说明的或如本发明的具体类、亚类和种类所列举的。应当理解,短语“任选取代”与短语“取代或未取代”可互换使用。一般而言,术语“取代的”,无论是否前面有术语“任选”,都是指在指定结构中用一个具体的取代基取代氢基团。除非另有说明,任选取代的基团可以在该基团的各个可取代位置上带有取代基,当在任意指定结构中的一个以上位置可以被选自具体基团的一个以上取代基取代时,各个位置上的取代基可以相同或不同。本发明所包括的取代基的组合优选是导致形成稳定的或化学上可行的化合物的取代基组合。本文所用的术语“稳定的”是指当出于本文所述的一个或多个目的而受到允许它们的制备,检测,优选回收、精制和使用的条件的处理时,基本上不改变的化合物。在一些实施方案中,稳定的化合物或化学上可行的化合物是在没有水分或其他化学反应的条件下,当保持在 40℃ 或更低的温度下至少 1 周时基本上不改变的化合物。

[0048] 本文所用的术语“脂族基”或“脂族基团”是指直链(即无支链)或支链的、取代或未取代的、完全饱和的或包含一个或多个不饱和单元的烃链,或者是完全饱和的或者包含一个或多个不饱和单元、但非芳族的单环烃或双环烃(本文也称作“碳环”“脂环基”或“环烷基”),这些环烃具有与分子的其余部分相连的单独的点。除非另有说明,脂族基包含 1-20 个脂族碳原子。在一些实施方案中,脂族基包含 1-10 个脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基包含 1-8 个脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基包含 1-6 个脂族碳原子,而在其他实施方案中,脂族基包含 1-4 个脂族碳原子。在一些实施方案中,“脂环基”(或“碳环”或“环烷基”)是指单环 C_3-C_8 烃或者双环或三环 C_8-C_{14} 烃,其是完全饱和的,或者包含一个或多个不饱和单元、但非芳族的,其具有与分子的其余部分相连的单独的点,其中在所述双环系统中的任意各环具有 3-7 元。适当的脂族基包括但不限于,直链或支链的、取代或未取代的烷基、烯基、炔基及其混合物,例如(环烷基)烷基、(环烯基)烷基或(环烷基)烯基。适当的脂环基包括环烷基、二环烷基(例如,十氢化萘)、桥接二环烷基例如降莰烷基或 [2.2.2] 二环-辛基,或桥连的三环例如金刚烷基。

[0049] 本文所用的术语“杂脂族基”是指其中一个或两个碳原子独立地被一个或多个氧、硫、氮、磷或硅替代的脂族基。杂脂族基可以是取代或未取代的、支链的或非支链的、环或非环的,包括“杂环”、“杂环基”“杂脂环基”或“杂环的”基团。

[0050] 本文所用的术语“杂环”、“杂环基”“杂脂环基”或“杂环的”是指其中一个或多个

环成员是独立地选自杂原子的非芳族的单环、双环或三环系统。在一些实施方案中,该“杂环”、“杂环基”“杂脂环基”或“杂环的”基团具有 3-14 个环成员,其中一个或多个环成员是独立地选自氧、硫、氮或磷的杂原子,且该系统的各环包含 3-7 个环成员。

[0051] 术语“杂原子”是指一个或多个氧、硫、氮、磷或硅(包括任何氧化形式的氮、硫、磷或硅;任何碱性氮的四价形式;或者杂环的可取代的氮,例如 N(如在 3,4-二氢-2H-吡咯基中),NH(如在吡咯烷基中)或 NR^+ (如在 N-取代的吡咯烷基中))。

[0052] 本文所用的术语“不饱和”是指具有一个或多个不饱和单元的部分。

[0053] 本文所用的术语“烷氧基”或“硫烷基”是指通过氧(“烷氧基”)或硫(“硫烷基”)原子与主碳链相连的如上述定义的烷基。

[0054] 术语“卤代脂族基”和“卤代烷氧基”是指在一定情况下可以被一个或多个卤原子取代的脂族基或烷氧基。术语“卤素”或“卤代”是指 F、Cl、Br 或 I。卤代脂族基的例子包括 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2-$ 或全卤代烷基,例如 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 。

[0055] 单独使用或作为更大部分例如“芳烷基”、“芳烷氧基”或“芳氧烷基”中的一部分使用的术语“芳基”是指总计具有 5-14 个环成员的单环、双环和三环系统,其中该系统中的至少一个环是芳族的,并且该系统的各环包含 3-7 个环成员。术语“芳基”可以与术语“芳环”互换使用。术语“芳基”也指如下文定义的杂芳基环系统。

[0056] 单独使用或作为更大部分例如“杂芳烷基”或“杂芳烷氧基”中的一部分使用的术语“杂芳基”是指总计具有 5-14 个环成员的单环、双环和三环系统,其中该系统中的至少一个环是芳族的,并且该系统中的至少一个环包含一个或多个杂原子,并且其中该系统的各环包含 3-7 个环成员。术语“杂芳基”可以与术语“杂芳环”或术语“杂芳族基”互换使用。

[0057] 芳基(包括芳烷基、芳烷氧基、芳氧烷基等)或杂芳基(包括杂芳烷基和杂芳烷氧基等)可以包含一个或多个取代基。在芳基或杂芳基的不饱和碳原子上的适当的取代基选自卤素; $-\text{R}^\circ$; $-\text{OR}^\circ$; $-\text{SR}^\circ$;1,2-亚甲二氧基;1,2-亚乙二氧基;任选被 R° 取代的苯基(Ph);任选被 R° 取代的 $-\text{O}(\text{Ph})$;任选被 R° 取代的 $-(\text{CH}_2)_{1-2}(\text{Ph})$;任选被 R° 取代的 $-\text{CH}=\text{CH}(\text{Ph})$; $-\text{NO}_2$; $-\text{CN}$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{NR}^\circ\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{CO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{S}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{NR}^\circ\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{NR}^\circ\text{SO}_2\text{R}^\circ$; $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{C}(=\text{NH})-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$;或 $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NHC}(\text{O})\text{R}^\circ$,其中各 R° 独立地选自氢、任选取代的 C_{1-6} 脂族基、未取代的 5-6 元杂芳基或杂环、苯基、 $-\text{O}(\text{Ph})$ 或 $-\text{CH}_2(\text{Ph})$,或者尽管上述已定义,但在相同取代基或不同取代基上的 2 个独立的 R° 与各 R° 基团所连接的原子一起形成 3-8 元的环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环,其可具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子。 R° 的脂族基上的任选取代基选自 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基)、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基) $_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族基、 OH 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基)、 NO_2 、 CN 、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}$ 脂族基)、 $\text{O}(\text{卤代 } \text{C}_{1-4} \text{ 脂族基})$ 或卤代 C_{1-4} 脂族基,其中上述各 R° 的 C_{1-4} 脂族基是未被取代的。

[0058] 脂族基或杂脂族基或非芳香杂环可以包含一个或多个取代基。脂族基或杂脂族基或非芳香杂环的饱和碳上的适当取代基选自对于上述芳基或杂芳基的不饱和碳上所列举的那样的取代基,此外还包括如下的基团: $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 、 $=\text{NNHR}^*$ 、 $=\text{NN}(\text{R}^*)_2$ 、 $=\text{NNHC}(\text{O})\text{R}^*$ 、 $=\text{NNHCO}_2(\text{烷基})$ 、 $=\text{NNHSO}_2(\text{烷基})$ 或 $=\text{NR}^*$,其中各 R^* 独立地选自氢或任选取代的 C_{1-6} 脂族基。 R^* 的脂族基上的任选取代基选自 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基)、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}$ 脂族基) $_2$ 、卤素、 C_{1-4} 脂族基。

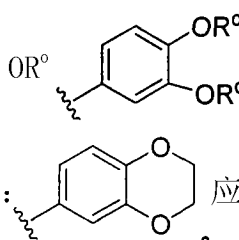
基、OH、O(C₁₋₄脂族基)、NO₂、CN、CO₂H、CO₂(C₁₋₄脂族基)、O(卤代C₁₋₄脂族基)或卤代(C₁₋₄脂族基),其中上述各R^{*}的C₁₋₄脂族基是未被取代的。

[0059] 非芳香杂环的氮上的任选取代基选自-R⁺、-N(R⁺)₂、-C(O)R⁺、-CO₂R⁺、-C(O)C(O)R⁺、-C(O)CH₂C(O)R⁺、-SO₂R⁺、-SO₂N(R⁺)₂、-C(=S)N(R⁺)₂、-C(=NH)-N(R⁺)₂或-NR⁺SO₂R⁺;其中R⁺是氢、任选取代的C₁₋₆脂族基、任选取代的苯基、任选取代的-O(Ph)、任选取代的-CH₂(Ph)、任选取代的-(CH₂)₁₋₂(Ph);任选取代的-CH=CH(Ph);或具有1-4个独立地选自氧、氮或硫的杂原子的未取代的5-6元杂芳基或杂环,或者尽管上述已定义,但在相同取代基或不同取代基上的2个独立的R⁺与各R⁺基团所连接的原子一起形成3-8元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环,其可具有0-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子。R⁺的脂族基或苯环上的任选取代基独立地选自NH₂、NH(C₁₋₄脂族基)、N(C₁₋₄脂族基)₂、卤素、C₁₋₄脂族基、OH、O(C₁₋₄脂族基)、NO₂、CN、CO₂H、CO₂(C₁₋₄脂族基)、O(卤代C₁₋₄脂族基)或卤代(C₁₋₄脂族基),其中上述各R⁺的C₁₋₄脂族基是未被取代的。

[0060] 术语“亚烷基链”是指完全饱和或者具有一个或多个不饱和单元、并且具有两个与分子的其余部分连接的点的直链或支链碳链。术语“亚螺环烷基”是指可以是完全饱和或者具有一个或多个不饱和单元,并且具有两个来自同一环碳原子的与分子其余部分连接的点的碳环。

[0061] 如上所述,在一些实施方案中,2个独立的R⁰(或R⁺或任何本文类似定义的其他变量)与各变量所连接的原子一起形成3-8元的环烷基、杂环基、芳基或杂芳环,其可具0-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子。2个独立的R⁰(或R⁺或任何本文类似定义的其他变量)与各变量所连接的原子一起形成的示例性的环包括但不限于下列的环:a)2个独立的R⁰(或R⁺或任何本文类似定义的其他变量)与相同的原子相连并与该原子一起形成环,例如N(R⁰)₂,其中2个R⁰与氮原子一起形成哌啶-1-基、哌嗪-1-基、或吗啉-4-基;以及b)2个独立的R⁰(或R⁺或任何本文类似定义的其他变量)与不同的原子相连,并与这些原子一起形成环,例如当苯基被2个OR⁰

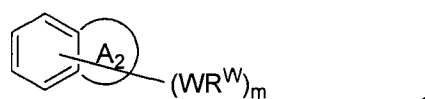
取代时,这2个R⁰与它们所连接的氧原子一起形成包含氧的稠合6元环:



应当理解,当2个独立的R⁰(或R⁺或任何本文类似定义的其他变量)与各变量所连接的一个或多个原子一起相连时,可以形成各种其他的环,上述例子并非起限定作用。

[0062] 如下所示,例如,双环系统中所连接的取代基是指该取代基可以连接到该双环系统的任意环上的任意可取代的环原子上:

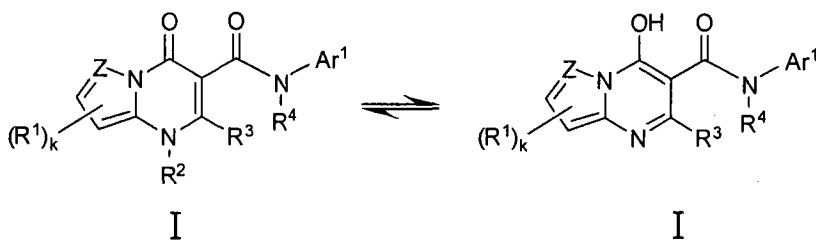
[0063]



[0064] 除非另有说明,本文所述的结构也包括该结构的所有异构(例如对映体、非对映体和几何异构(或构象异构))形式;例如,各不对称中心的R和S构型,(Z)和(E)双键异构体,以及(Z)和(E)构象异构体。因此,本发明化合物的单个立体化学异构体以及对映体、非对映体和几何异构体(或构象异构体)的混合物都在本发明的范围内。除非另有说明,

本发明化合物的所有互变异构形式都在本发明的范围内。例如,当式 I 的化合物上的 R^2 是氢时,式 I 的化合物可以以互变异构体的形式存在:

[0065]

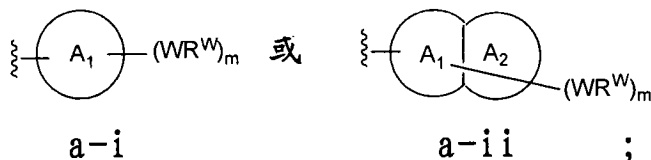


[0066] 此外,除非另有说明,本文所述的结构也指仅仅在存在一个或多个富含同位素的原子方面不同的化合物。例如,除了用氘或氚替代氢或者用富含 ^{13}C - 或 ^{14}C - 的碳替代碳以外,具有本发明结构的化合物也在本发明的范围内。这些化合物可以用于,例如在生物检验中作为分析工具或探针。

[0067] 3. 典型化合物的描述:

[0068] 在本发明的一些实施方案中, Ar^1 选自:

[0069]



[0070] 其中环 A_1 是具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元芳香单环;或

[0071] A_1 和 A_2 一起是 8-14 元芳族的双环或三环芳香环,其中各环包含 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子。

[0072] 在一些实施方案中, A_1 是任选取代的具有 0-4 个杂原子的 6 元芳环,其中所述杂原子是氮。在一些实施方案中, A_1 是任选取代的苯基。或者, A_1 是任选取代的吡啶基、嘧啶基、吡嗪基或三嗪基。或者, A_1 是任选取代的吡嗪基或三嗪基。或者, A_1 是任选取代的吡啶基。

[0073] 在一些实施方案中, A_1 是任选取代的具有 0-3 个杂原子的 5 元芳环,其中所述杂原子是氮、氧或硫。在一些实施方案中, A_1 是任选取代的具有 1-2 个氮原子的 5 元芳环。

[0074] 在一些实施方案中, A_2 是任选取代的具有 0-4 个杂原子的 6 元芳环,其中所述杂原子是氮。在一些实施方案中, A_2 是任选取代的苯基。或者, A_2 是任选取代的吡啶基、嘧啶基、吡嗪基或三嗪基。

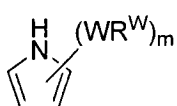
[0075] 在一些实施方案中, A_2 是任选取代的具有 0-3 个杂原子的 5 元芳环,其中所述杂原子是氮、氧或硫。在一些实施方案中, A_2 是任选取代的具有 1-2 个氮原子的 5 元芳环。在一些实施方案中, A_2 是任选取代的吡咯基。

[0076] 在一些实施方案中, A_2 是任选取代的、具有 1-3 个独立地选自氮、硫或氧的杂原子的、5-7 元饱和或不饱和的杂环。示例性的这种环包括哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、吡咯烷基、四氢呋喃基等。

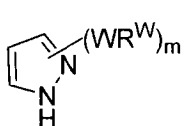
[0077] 在一些实施方案中, A_2 是任选取代的 5-10 元饱和或不饱和的碳环。在一个实施方案中, A_2 是任选取代的 5-10 元饱和碳环。示例性的这种环包括环己基、环戊基等。

[0078] 在一些实施方案中,环 A_2 选自:

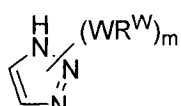
[0079]



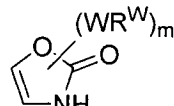
i



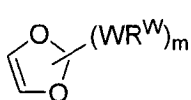
ii



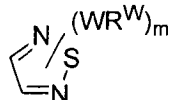
iii



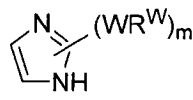
iv



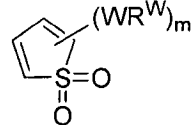
v



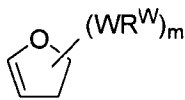
vi



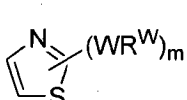
vii



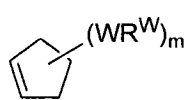
viii



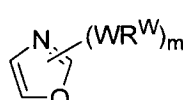
ix



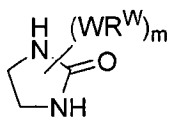
x



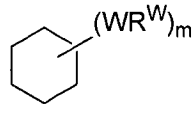
xi



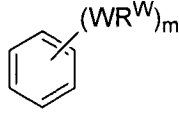
xii



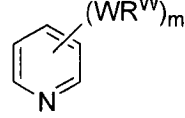
xiii



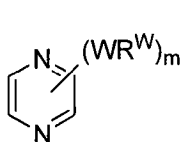
xiv



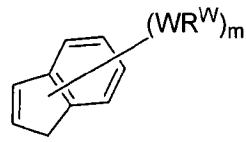
xv



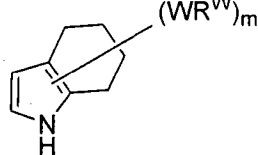
xvi



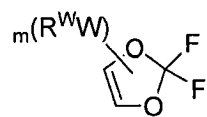
xvii



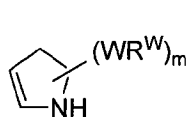
xviii



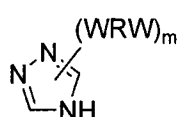
xix



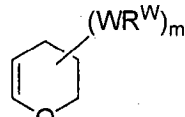
xx



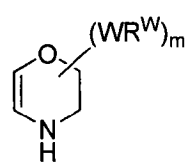
xxi



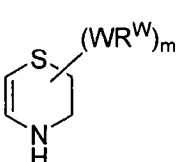
xxii



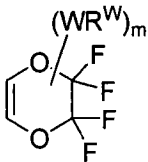
xxiii



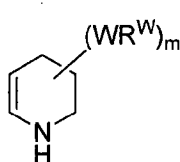
xxiv



xxv

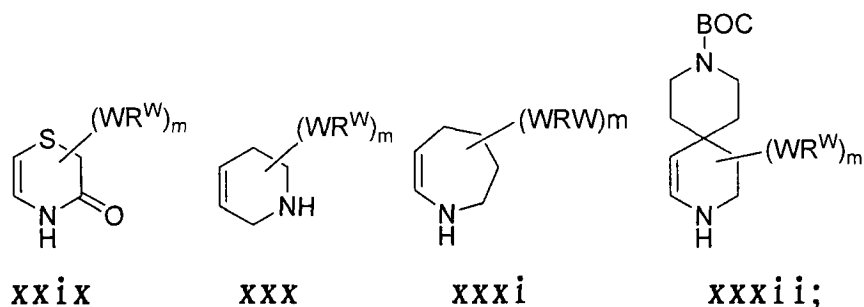


xxvi



xxviii

[0080]



[0081] 其中环 A_2 通过两个相邻的环原子与环 A_1 稠合。

[0082] 在其他实施方案中, W 是键或任选取代的 C_1-C_6 亚烷基链, 其中 W 中的至多 2 个亚甲基单元任选和独立地被 O 、 $-CO-$ 、 $-CS-$ 、 $-COCO-$ 、 $-CONR'$ 、 $-CONR'NR'$ 、 $-CO_2-$ 、 $-OCO-$ 、 $-NR'CO_2-$ 、 $-O-$ 、 $-NR'CONR'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-OCONR'$ 、 $-NR'NR'$ 、 $-NR'NR'CO-$ 、 $-NR'CO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR'$ 、 $-SO_2NR'$ 、 $-NR'SO_2-$ 或 $-NR'SO_2NR'$ 替代, 并且 R^W 是 R' 或卤素。

[0083] 在另外的实施方案中, 各 WR^W 独立地是 $-C_1-C_3$ 烷基、叔丁基、 C_1-C_3 全卤代烷基、 $-OH$ 、 $-O(C_1-C_3 \text{ 烷基})$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-SCF_3$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 或 $-COOR'$ 、 $-COR'$ 、 $-O(CH_2)_2N(R')(R')$ 、 $-O(CH_2)N(R')(R')$ 、 $-CON(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2OR'$ 、 $-(CH_2)OR'$ 、任选取代的 5-7 元杂环、任选取代的 5-7 元脂环基、任选取代的单环或双环芳环、任选取代的芳基砜、任选取代的 5 元杂芳环、 $-N(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2N(R')(R')$ 或 $-(CH_2)N(R')(R')$ 。

[0084] 在式 a-i 的 Ar^1 的一个实施方案中, 环 A_1 是苯环, m 是 2, 各 WR^W 独立地是 $-CF_3$ 或任选取代的 5-7 元杂环。

[0085] 在式 a-i 的 Ar^1 的一个实施方案中, 环 A_1 是苯环, m 是 3, 各 WR^W 独立地是 $-OH$ 或叔丁基。

[0086] 在式 a-i 的 Ar^1 的一个实施方案中, 环 A_1 是苯环, m 是 2 或 3, 各 WR^W 独立地是 $-OH$ 、 $-CF_3$ 或任选取代的 5-7 元脂环基。

[0087] 在式 a-i 的 Ar^1 的一个实施方案中, 环 A_1 是苯环, m 是 2 或 3, 各 WR^W 独立地是 $-OH$ 、 $-F$ 或任选取代的 5-7 元脂环基。

[0088] 在一些实施方案中, m 是 0。或 m 是 1。或 m 是 2。在一些实施方案中, m 是 3。在其他实施方案中, m 是 4。

[0089] 在本发明的一个实施方案中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 同时是氢。

[0090] 在本发明的另一个实施方案中, k 是 1 或 2, 各 R^1 独立地是 C_1-C_3 烷基。

[0091] 在一个实施方案中, k 是 1, R^1 是 C_1-C_3 烷基。

[0092] 在一个实施方案中, k 是 1, R^1 是甲基。

[0093] 在一个实施方案中, k 是 1, R^1 是乙基。

[0094] 在一个实施方案中, k 是 1, 和 R^1 是卤素。

[0095] 在一个实施方案中, k 是 1, R^1 是 CF_3 。

[0096] 在一些实施方案中, X 是键或任选取代的 C_{1-6} 亚烷基链, 其中一个或两个不相邻的亚甲基单元任选和独立地被 O 、 NR' 、 S 、 SO_2 、或 COO 、 CO 替代, 并且 R^X 是 R' 或卤素。在另外的实施方案中, 各 XR^X 独立地是 $-C_{1-3}$ 烷基、 $-O(C_{1-3} \text{ 烷基})$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-SCF_3$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-OH$ 、 $-COOR'$ 、 $-COR'$ 、 $-O(CH_2)_2N(R')(R')$ 、 $-O(CH_2)N(R')(R')$ 、 $-CON(R')(R')$

(R')、 $-(CH_2)_2OR'$ 、 $-(CH_2)OR'$ 、任选取代的苯基、 $-N(R')(R')$ 、 $-(CH_2)_2N(R')(R')$ 或 $-(CH_2)N(R')(R')$ 。

[0097] 在一个实施方案中, R^1 是 H、C1-C4 脂族基、卤素或 C3-C6 脂环基。

[0098] 在一些实施方案中, R^4 是氢。在一些另外的实施方案中, R^4 是 C_{1-4} 直链或支链脂族基。

[0099] 在一些实施方案中, R^W 选自卤素、氰基、 CF_3 、 CHF_2 、 $OCHF_2$ 、Me、Et、 $CH(Me)_2$ 、 $CHMeEt$ 、正丙基、叔丁基、 $-OH$ 、 OMe 、 OEt 、 OPh 、0- 氟苯基、0- 二氟苯基、0- 甲氧基苯基、0- 甲苯基、0- 苄基、 SMe 、 SCF_3 、 $SCHF_2$ 、 SEt 、 CH_2CN 、 NH_2 、 $NHMe$ 、 $N(Me)_2$ 、 $NHRt$ 、 $N(Et)_2$ 、 $C(O)CH_3$ 、 $C(O)Ph$ 、 $C(O)NH_2$ 、 SPh 、 SO_2 -(氨基-吡啶基)、 SO_2NH_2 、 SO_2Ph 、 SO_2NHPh 、 SO_2 -N- 吗啉代、 SO_2 -N- 吡咯烷基、N- 吡咯基、N- 吗啉代、1- 哌啶基、苯基、苄基、(环己基-甲氨基)甲基、4- 甲基-2,4- 二氢-吡唑-3- 酮-2- 基、苯并咪唑-2- 基、呋喃-2- 基、4- 甲基-4H-[1,2,4] 三唑-3- 基、3-(4'- 氯苯基)-[1,2,4] 噁二唑-5- 基、 $NHC(O)Me$ 、 $NHC(O)Et$ 、 $NHC(O)Ph$ 、 $NHSO_2Me$ 、2- 吡啶基、5- 吡啶基、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-OCF_3$ 、0-(2,3- 二甲基苯基)、5- 甲基呋喃基、 $-SO_2$ -N- 哌啶基、2- 甲苯基、3- 甲苯基、4- 甲苯基、0- 丁基、 $NHCO_2C(Me)_3$ 、 $CO_2C(Me)_3$ 、异丙烯基、正丁基、0-(2,4- 二氯苯基)、 $NHSO_2PhMe$ 、0-(3- 氯-5- 三氟甲基-2- 吡啶基)、苯基羟基甲基、2- 甲基吡咯基、3- 氟吡咯基、3,3- 二氟吡咯基、3,3- 二甲基吡咯基、2,5- 二甲基吡咯基、 $NHCOCH_2C(Me)_3$ 、0-(2- 叔丁基)苯基、2,3- 二甲基苯基、3,4- 二甲基苯基、4- 羟甲基苯基、4- 二甲氨基苯基、2- 三氟甲基苯基、3- 三氟甲基苯基、4- 三氟甲基苯基、4- 氰基甲基苯基、4- 异丁基苯基、3- 吡啶基、4- 吡啶基、4- 异丙基苯基、3- 异丙基苯基、2- 甲氧基苯基、3- 甲氧基苯基、4- 甲氧基苯基、3,4- 亚甲二氧基苯基、2- 乙氧基苯基、3- 乙氧基苯基、4- 乙氧基苯基、2- 甲硫基苯基、4- 甲硫基苯基、2,4- 二甲氧基苯基、2,5- 二甲氧基苯基、2,6- 二甲氧基苯基、3,4- 二甲氧基苯基、5- 氯-2- 甲氧基苯基、2- OCF_3 - 苯基、3- 三氟甲氧基- 苯基、4- 三氟甲氧基苯基、2- 苯氧基苯基、4- 苯氧基苯基、2- 氟-3- 甲氧基- 苯基、2,4- 二甲氧基-5- 噻吩基、5- 异丙基-2- 甲氧基苯基、2- 氟苯基、3- 氟苯基、4- 氟苯基、3- 氰基苯基、3- 氯苯基、4- 氯苯基、2,3- 二氟苯基、2,4- 二氟苯基、2,5- 二氟苯基、3,4- 二氟苯基、3,5- 二氟苯基、3- 氯-4- 氟- 苯基、3,5- 二氯苯基、2,5- 二氯苯基、2,3- 二氯苯基、3,4- 二氯苯基、2,4- 二氯苯基、3- 甲氧羰基苯基、4- 甲氧羰基苯基、3- 异丙氧羰基苯基、3- 乙酰氨基苯基、4- 氟-3- 甲基苯基、4- 甲基亚磺酰基- 苯基、4- 甲磺酰基- 苯基、4-N-(2-N, N- 二甲氨基乙基) 氨甲酰基苯基、5- 乙酰基-2- 噻吩基、2- 苯并噻吩基、3- 苯并噻吩基、呋喃-3- 基、4- 甲基-2- 噻吩基、5- 氰基-2- 噻吩基、N'- 苯基羰基-N- 哌嗪基、 $-NHC(O)Et$ 、 $-NHC(O)Me$ 、N- 吡咯烷基、 $-NHSO_2(CH_2)_2N$ - 哌啶、 $-NHSO_2(CH_2)_2N$ - 吗啉、 $-NHSO_2(CH_2)_2N(Me)_2$ 、 $COCH_2N(Me)COCH_2NHMe$ 、 $-CO_2Et$ 、0- 丙基、 $-CH_2CH_2NHC(O)C(Me)_3$ 、氨基甲基、戊基、金刚烷基、环戊基、乙氧基乙基、 $C(Me)_2CH_2OH$ 、 $C(Me)_2CO_2Et$ 、 $-CHOHMe$ 、 CH_2CO_2Et 、 $-C(Me)_2CH_2NHC(O)C(Me)_3$ 、 $O(CH_2)_2OEt$ 、 $O(CH_2)_2OH$ 、 CO_2Me 、羟甲基、1- 甲基-1- 环己基、1- 甲基-1- 环辛基、1- 甲基-1- 环庚基、 $C(Et)_2C(Me)_3$ 、 $C(Et)_3$ 、 $CONHCH_2CH(Me)_2$ 、2- 氨基甲基- 苯基、乙烯基、1- 哌啶基羰基、乙炔基、环己基、4- 甲基哌啶基、 $-OCO_2Me$ 、 $-C(Me)_2CH_2NHC(O)CH_2CH(Me)_2$ 、 $-C(Me)_2CH_2NHC(O)CH_2CH_2CH_3$ 、 $-C(Me)_2CH_2NHC(O)Et$ 、 $-C(Me)_2CH_2NHC(O)Me$ 、 $-C(Me)_2CH_2NHC(O)CH_2C(Me)_3$ 、 $-CH_2NHC(O)CF_3$ 、 $-CH_2NHC(O)C(Me)_3$ 、 $-C(Me)_2CH_2NHC(O)(CH_2)_3CH_3$ 、 $C(Me)_2CH_2NHC(O)(CH_2)_2OMe$ 、 $C(OH)(CF_3)_2$ 、 $-C(Me)_2CH_2NHC(O)CH_2$ - 四氢呋喃-3- 基、 $C(Me)_2CH_2O(CH_2)_2OMe$ 或 3- 乙基-2,6- 二氧代

哌啶-3-基。

[0100] 在一个实施方案中, R' 是氢。

[0101] 在一个实施方案中, R' 是 C1-C8 脂族基, 任选被至多 3 个选自卤素、CN、CF₃、CHF₂、OCF₃ 或 OCHF₂ 的取代基取代, 其中所述 C1-C8 脂族基的至多 2 个亚甲基单元任选被 -CO-、-CONH(C1-C4 烷基)-、-CO₂-、-OCO-、-N(C1-C4 烷基)CO₂-、-O-、-N(C1-C4 烷基)CON(C1-C4 烷基)-、-OCN(C1-C4 烷基)-、-N(C1-C4 烷基)CO-、-S-、-N(C1-C4 烷基)-、-SO₂N(C1-C4 烷基)-、N(C1-C4 烷基)SO₂- 或 -N(C1-C4 烷基)SO₂N(C1-C4 烷基)- 替代。

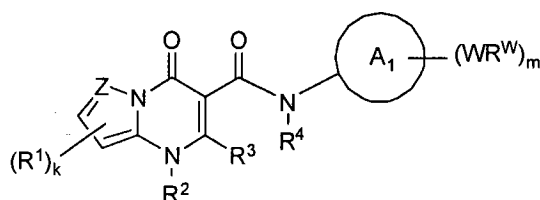
[0102] 在一个实施方案中, R' 是具有 0-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-8 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环, 其中 R' 任选被至多 3 个选自卤素、CN、CF₃、CHF₂、OCF₃、OCHF₂ 或 C1-C6 烷基的取代基取代, 其中所述 C1-C6 烷基中的至多 2 个亚甲基单元任选被 -CO-、-CONH(C1-C4 烷基)-、-CO₂-、-OCO-、-N(C1-C4 烷基)CO₂-、-O-、-N(C1-C4 烷基)CON(C1-C4 烷基)-、-OCN(C1-C4 烷基)-、-N(C1-C4 烷基)CO-、-S-、-N(C1-C4 烷基)-、-SO₂N(C1-C4 烷基)-、N(C1-C4 烷基)SO₂- 或 -N(C1-C4 烷基)SO₂N(C1-C4 烷基)- 替代。

[0103] 在一个实施方案中, R' 是具有 0-5 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 8-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的双环系统; 其中 R' 任选被至多 3 个选自卤素、CN、CF₃、CHF₂、OCF₃、OCHF₂ 或 C1-C6 烷基的取代基取代, 其中所述 C1-C6 烷基的至多 2 个亚甲基单元任选被 -CO-、-CONH(C1-C4 烷基)-、-CO₂-、-OCO-、-N(C1-C4 烷基)CO₂-、-O-、-N(C1-C4 烷基)CON(C1-C4 烷基)-、-OCN(C1-C4 烷基)-、-N(C1-C4 烷基)CO-、-S-、-N(C1-C4 烷基)-、-SO₂N(C1-C4 烷基)-、N(C1-C4 烷基)SO₂- 或 -N(C1-C4 烷基)SO₂N(C1-C4 烷基)- 替代。

[0104] 在一个实施方案中, 2 个 R' 与它们所连接的一个或多个原子一起形成任选取代的具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-12 元饱和、部分不饱和或完全不饱和的单环或双环, 其中 R' 任选被至多 3 个选自卤素、CN、CF₃、CHF₂、OCF₃、OCHF₂ 或 C1-C6 烷基的取代基取代, 其中所述 C1-C6 烷基的至多 2 个亚甲基单元任选被 -CO-、-CONH(C1-C4 烷基)-、-CO₂-、-OCO-、-N(C1-C4 烷基)CO₂-、-O-、-N(C1-C4 烷基)CON(C1-C4 烷基)-、-OCN(C1-C4 烷基)-、-N(C1-C4 烷基)CO-、-S-、-N(C1-C4 烷基)-、-SO₂N(C1-C4 烷基)-、N(C1-C4 烷基)SO₂- 或 -N(C1-C4 烷基)SO₂N(C1-C4 烷基)- 替代。

[0105] 根据一个实施方案, 本发明提供式 IIA 的化合物:

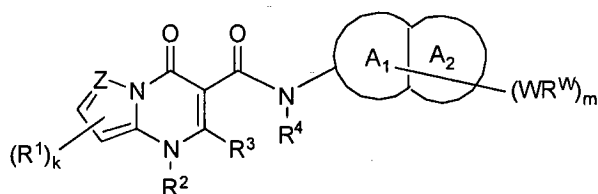
[0106]



IIA

[0107] 根据一个实施方案, 本发明提供式 IIB 的化合物:

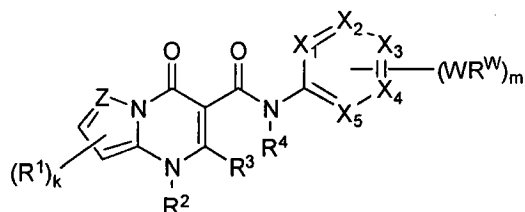
[0108]



IIB

[0109] 根据一个实施方案,本发明提供式 IIIA 的化合物:

[0110]

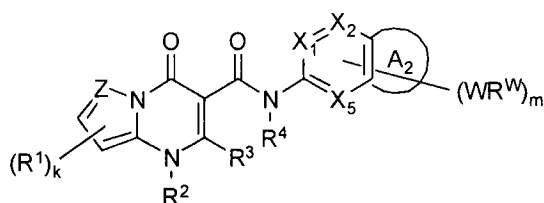


IIIA

[0111] 其中各 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , 和 X_5 独立地选自 CH 或 N。

[0112] 根据一个实施方案,本发明提供式 IIIB 的化合物:

[0113]

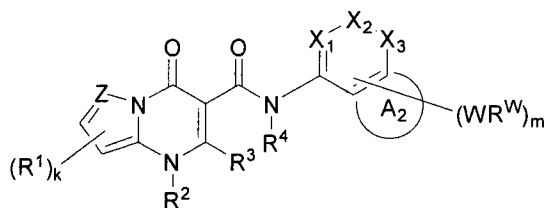


IIIB

[0114] 其中各 X_1 , X_2 和 X_5 独立地选自 CH 或 N。

[0115] 根据一个实施方案,本发明提供式 IIIC 的化合物:

[0116]

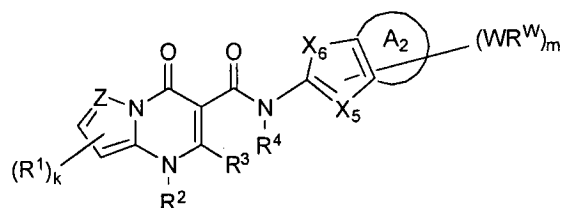


IIIC

[0117] 其中各 X_1 , X_2 和 X_3 独立地选自 CH 或 N。

[0118] 根据一个实施方案,本发明提供式 IIID 的化合物:

[0119]

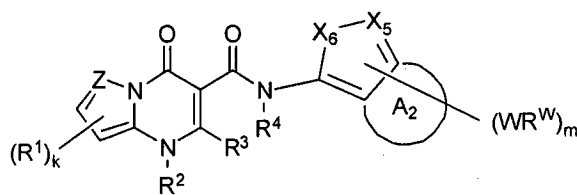


IIID

[0120] 其中 X_5 独立地选自 CH 或 N, X_6 是 O、S 或 NR' 。

[0121] 根据一个实施方案,本发明提供式 IIIIE 的化合物:

[0122]



IIIIE

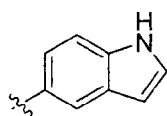
[0123] 其中 X_5 独立地选自 CH 或 N, X_6 是 O、S 或 NR' 。

[0124] 在式 IIIIA 的一些实施方案中,各 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 是 CH。

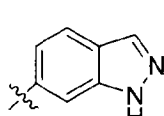
[0125] 在式 IIIA 的一些实施方案中, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 一起是任选取代的选自吡啶基、吡嗪基或嘧啶基的环。

[0126] 在式 IIIB 或式 IIIC 的一些实施方案中, X_1 、 X_2 、 X_3 或 X_5 与环 A_2 一起是任选取代的环,该环选自:

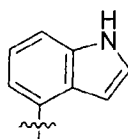
[0127]



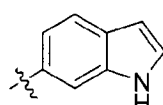
b-i



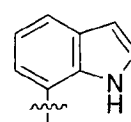
b-ii



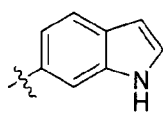
b-iii



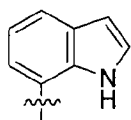
b-iv



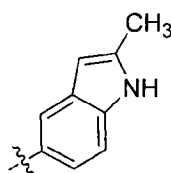
b-v



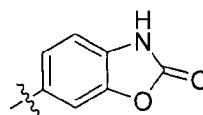
b-vi



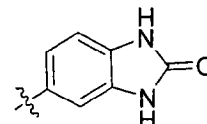
b-vii



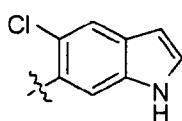
b-viii



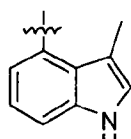
b-ix



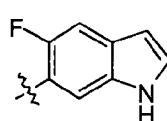
b-x



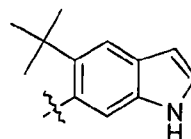
b-xi



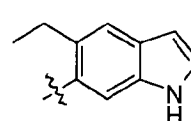
b-xii



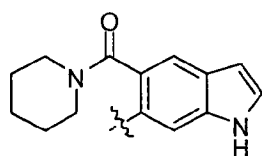
b-xiii



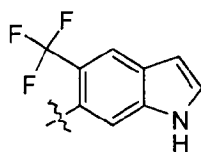
b-xiv



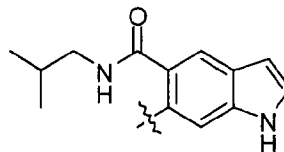
b-xv



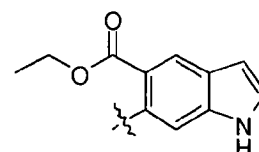
b-xvi



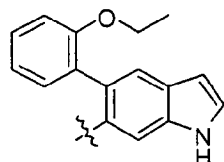
b-xvii



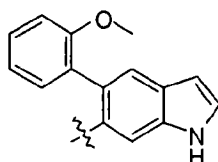
b-xviii



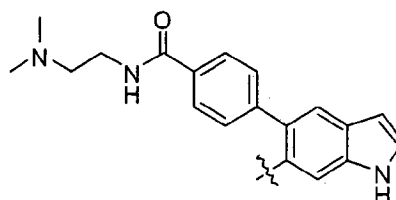
b-xix



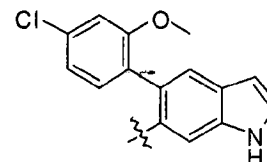
b-xx



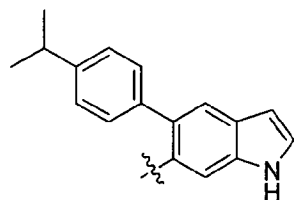
b-xxi



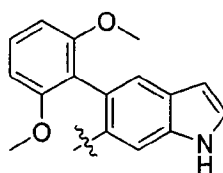
b-xxii



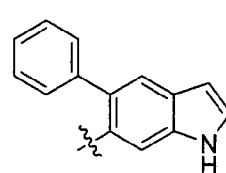
b-xxiii



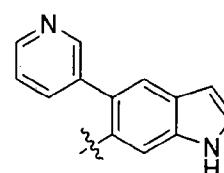
b-xxiv



b-xxv

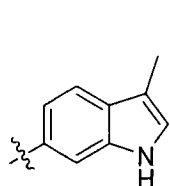


b-xxvi

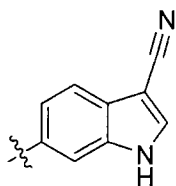


b-xxvii

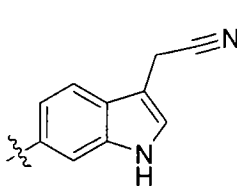
[0128]



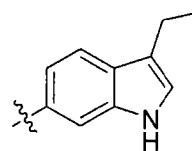
b-xxviii



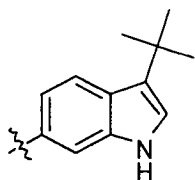
b-xxix



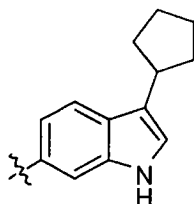
b-xxx



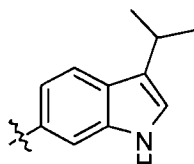
bxxxix



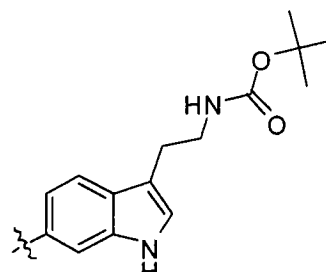
b-xxxii



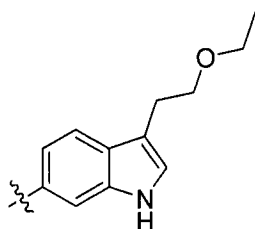
b-xxxiii



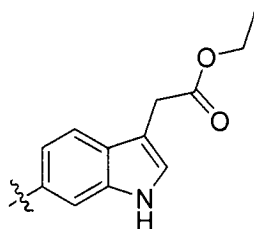
b-xxxiv



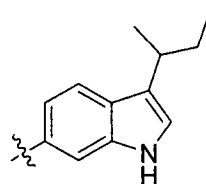
b-xxxv



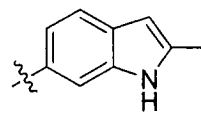
b-xxxvi



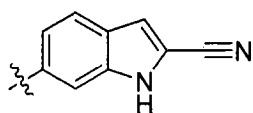
b-xxxvii



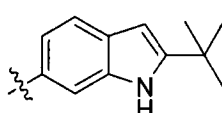
b-xxxviii



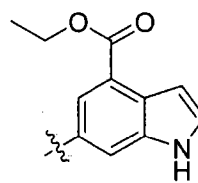
bxxxix



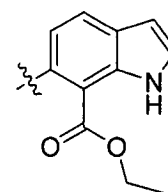
b-xL



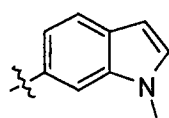
b-xLi



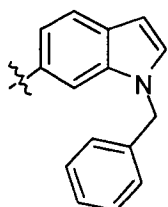
b-xLii



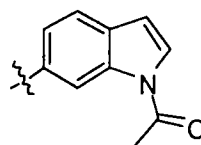
b-xLiii



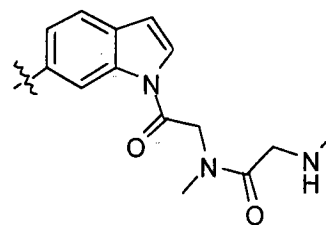
b-xLiv



b-xLv

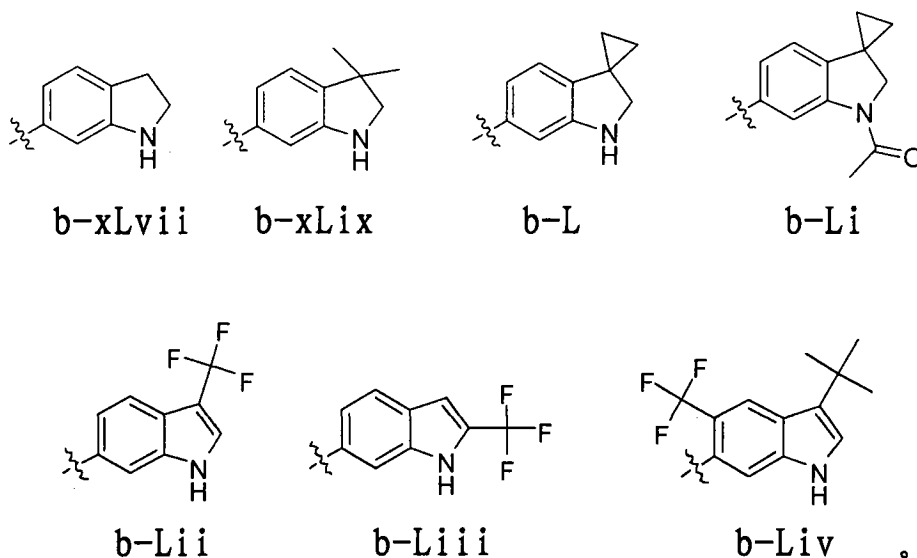


b-xLvi



b-xLviii

[0129]

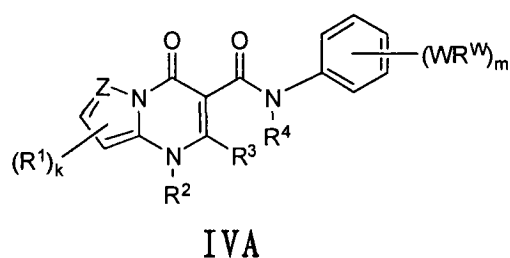


[0130] 在一些实施方案中, R^W 选自卤素、氰基、 CF_3 、 CHF_2 、 $OCHF_2$ 、Me、Et、 $CH(Me)_2$ 、 $CHMeEt$ 、正丙基、叔丁基、OH、OMe、OEt、OPh、O- 氟苯基、O- 二氟苯基、O- 甲氧基苯基、O- 甲苯基、O- 苄基、SMe、 SCF_3 、 $SCHF_2$ 、SEt、 CH_2CN 、 NH_2 、NHMe、 $N(Me)_2$ 、NHEt、 $N(Et)_2$ 、 $C(O)CH_3$ 、 $C(O)Ph$ 、 $C(O)NH_2$ 、SPh、 SO_2 -(氨基-吡啶基)、 SO_2NH_2 、 SO_2Ph 、 SO_2NPh 、 SO_2-N -吗啉代、 SO_2-N -吡咯烷基、N-吡咯基、N-吗啉代、1-哌啶基、苯基、苄基、(环己基-甲氨基)甲基、4-甲基-2,4-二氢-吡唑-3-酮-2-基、苯并咪唑-2-基、呋喃-2-基、4-甲基-4H-[1,2,4]三唑-3-基、3-(4'-氯苯基)-[1,2,4]噁二唑-5-基、 $NHC(O)Me$ 、 $NHC(O)Et$ 、 $NHC(O)Ph$ 或 $NHSO_2Me$ 。

[0131] 在一些实施方案中, X 和 R^X 一起是 Me、Et、卤素、CN、 CF_3 、OH、OMe、OEt、 $SO_2N(Me)$ (氟苯基)、 SO_2 -(4-甲基-哌啶-1-基) 或 SO_2-N -吡咯烷基。

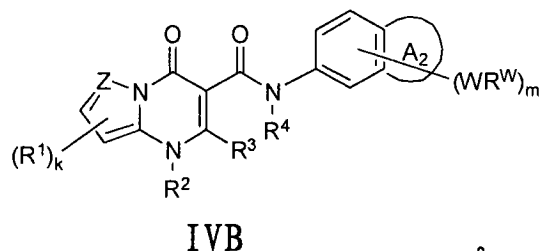
[0132] 根据另一个实施方案, 本发明提供式 IVA 的化合物:

[0133]



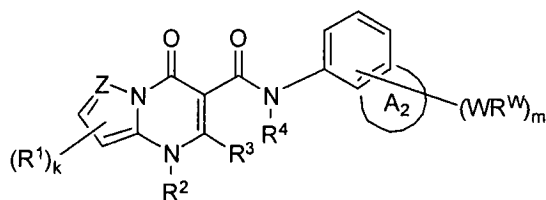
[0134] 根据另一个实施方案, 本发明提供式 IVB 的化合物:

[0135]



[0136] 根据另一个实施方案, 本发明提供式 IVC 的化合物:

[0137]



IVC

[0138] 在一个实施方案中,本发明提供了式 IVA、式 IVB 或式 IVC 的化合物,其中 k 是 1, R¹ 是 H、Me、Et 或卤素。在另一个实施方案中, k 是 1, R¹ 是 Me。在另一个实施方案中, k 是 1, R¹ 是 Et。

[0139] 在一个实施方案中,本发明提供了式 IVB 或式 IVC 的化合物,其中环 A₂ 是任选取代的、具有 0-3 个选自 O、S 或 N 的杂原子的、饱和的、不饱和的、或芳族的 7 元环。示例性的环包括氮杂环庚烷、5,5-二甲基氮杂环庚烷等。

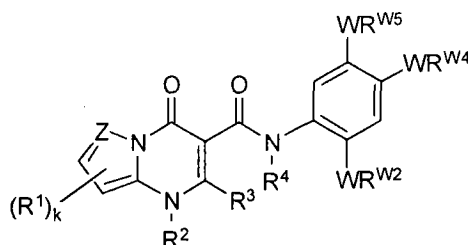
[0140] 在一个实施方案中,本发明提供了式 IVB 或式 IVC 的化合物,其中环 A₂ 是任选取代的、具有 0-3 个选自 O、S 或 N 的杂原子的、饱和的、不饱和的、或芳族的 6 元环。示例性的环包括哌啶基、4,4-二甲基哌啶基等。

[0141] 在一个实施方案中,本发明提供了式 IVB 或式 IVC 的化合物,其中环 A₂ 是任选取代的、饱和的、不饱和的或芳族的 5 元环,具有 0-3 个选自 O、S 或 N 的杂原子。

[0142] 在一个实施方案中,本发明提供了式 IVB 或式 IVC 的化合物,其中环 A₂ 是具有 1 个氮原子的任选取代的 5 元环,例如吡咯基或吡咯烷基。

[0143] 根据式 IVA 的一个实施方案,提供了下述式 VA-1 的化合物:

[0144]



VA-1

[0145] 其中各 WRᵂ² 和 WRᵂ⁴ 独立地选自氢、CN、CF₃、OCF₃、卤素、C1-C6 直链或支链烷基、3-12 元脂环基、苯基、C5-C10 杂芳基或 C3-C7 杂环基,其中所述杂芳基或杂环基具有至多 3 个选自 O、S 或 N 的杂原子,其中所述 WRᵂ² 和 WRᵂ⁴ 独立和任选地被至多 3 个选自 -OR'、-CF₃、-OCF₃、SR'、S(O)R'、SO₂R'、-SCF₃、卤素、CN、-COOR'、-COR'、-O(CH₂)₂N(R')(R')、-O(CH₂)N(R')(R')、-CON(R')(R')、-(CH₂)₂OR'、-(CH₂)OR'、CH₂CN、任选取代的苯基或苯氧基、-N(R')(R')、-NR' C(O)OR'、-NR' C(O)R'、-(CH₂)₂N(R')(R') 或 -(CH₂)N(R')(R') 的取代基取代;且

[0146] WRᵂ⁵ 选自氢、卤素、-OH、NH₂、CN、CHF₂、NHR'、N(R')₂、-NHC(O)R'、-NHC(O)OR'、NH₂SO₂R'、-OR'、CH₂OH、CH₂N(R')₂、C(O)OR'、C(O)N(R')₂、SO₂NHR'、SO₂N(R')₂、OSO₂N(R')₂、OSO₂CF₃ 或 CH₂NHC(O)OR'。或者, WRᵂ⁴ 和 WRᵂ⁵ 一起形成包含 0-3 个选自 N、O 或 S 的杂原子的 5-7 元环,其中所述环任选被至多 3 个 WRᵂ 取代基取代。

[0147] 在一个实施方案中,本发明提供了式 VA-1 的化合物,其中 k 是 0。

[0148] 在一个实施方案中,本发明提供了式 VA-1 的化合物,其中 k 是 1, R^1 是卤素。

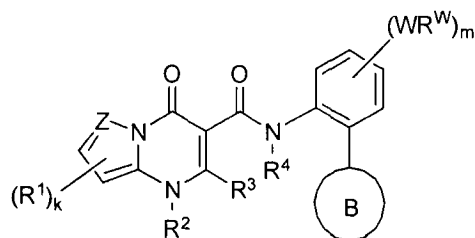
[0149] 在一个实施方案中,本发明提供了式 VA-1 的化合物,其中 k 是 1, R^1 是 C1-C3 烷基。

[0150] 在一个实施方案中,本发明提供了式 VA-1 的化合物,其中 k 是 1, R^1 是 Me。

[0151] 在一个实施方案中,本发明提供了式 VA-1 的化合物,其中 k 是 1, R^1 是乙基。

[0152] 在另一个实施方案中,本发明提供了式 VA-2 的化合物:

[0153]



VA-2

[0154] 其中:

[0155] 环 B 是 5-7 元单环或双环的、杂环或杂芳环,其任选被至多 n 个 $-Q-R^Q$ 取代;

[0156] Q 是 W;

[0157] R^Q 是 R^W ;

[0158] m 是 0-4;

[0159] n 是 0-4;且

[0160] R^1 、k、W、Z 和 R^W 如上述定义。

[0161] 在一个实施方案中, m 是 0-2。或者, m 是 0。或者, m 是 1。

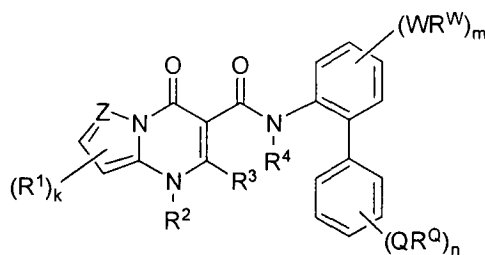
[0162] 在一个实施方案中, n 是 0-2。或者, n 是 0。或者, n 是 1。

[0163] 在另一个实施方案中,环 B 是具有至多 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的 5-7 元单环杂环,任选被至多 n 个 $-Q-R^Q$ 取代。示例性的杂环包括 N-吗啉基、N-哌啶基、4-苯甲酰基-哌嗪-1-基、吡咯烷-1-基或 4-甲基-哌啶-1-基。

[0164] 在另一个实施方案中,环 B 是具有至多 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的 5-6 元单环杂芳环,任选被至多 n 个 $-Q-R^Q$ 取代。示例性的环包括苯并咪唑-2-基、5-甲基-呋喃-2-基、2,5-二甲基-吡咯-1-基、吡啶-4-基、吡啶-5-基、吡啶-2-基、2,4-二甲氧基-嘧啶-5-基、呋喃-2-基、呋喃-3-基、2-酰基-噻吩-2-基、苯并噻吩-2-基、4-甲基-噻吩-2-基、5-氰基-噻吩-2-基、3-氯-5-三氟甲基-吡啶-2-基。

[0165] 在式 VA-3 的另一个实施方案中,本发明提供式 VA-3 的化合物:

[0166]



VA-3

[0167] 其中:

[0168] Q 是 W ;

[0169] R^Q 是 R^W ;

[0170] m 是 0-4 ;

[0171] n 是 0-4 ;且

[0172] R^1 、k、W、Z 和 R^W 如上述定义。

[0173] 在一个实施方案中, n 是 0-2。

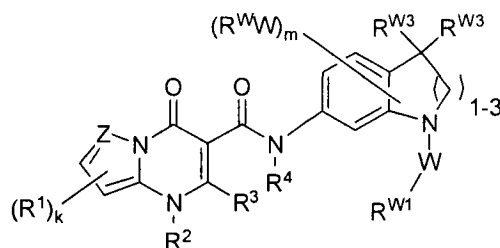
[0174] 在另一个实施方案中, m 是 0-2。在一个实施方案中, m 是 0。在一个实施方案中, m 是 1。或者, m 是 2。

[0175] 在一个实施方案中, QR^Q 一起是卤素、 CF_3 、 OCF_3 、CN、C1-C6 脂族基、0-C1-C6 脂族基、0- 苯基、NH(C1-C6 脂族基) 或 N(C1-C6 脂族基)₂, 其中所述脂族基和苯基任选被至多 3 个选自 C1-C6 烷基、0-C1-C6 烷基、卤素、氰基、OH 或 CF_3 的取代基取代, 其中所述 C1-C6 脂族基或 C1-C6 烷基中的至多 2 个亚甲基单元任选被 $-CO-$ 、 $-CONR'-$ 、 $-CO_2-$ 、 $-OCO-$ 、 $-NR'-CO_2-$ 、 $-O-$ 、 $-NR'-CONR'-$ 、 $-OCONR'-$ 、 $-NR'-CO-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'-S-$ 、 $-SOR'-$ 、 $-SO_2R'-$ 、 $-SO_2NR'-$ 、 $-NR'-SO_2-$ 或 $-NR'-SO_2NR'-$ 替代。在另一个实施方案中, 上述 R' 是 C1-C4 烷基。

[0176] 示例性的 QR^Q 包括甲基、异丙基、仲丁基、羟基甲基、 CF_3 、 NMe_2 、CN、 CH_2CN 、氟、氯、OEt、OMe、SMe、 OCF_3 、OPh、C(O)OMe、C(O)O-iPr、S(O)Me、NHC(O)Me 或 S(O)₂Me。

[0177] 在另一个实施方案中, 本发明提供式 VB-1 的化合物 :

[0178]



VB-1

[0179] 其中 :

[0180] R^{W1} 是氢或 C1-C6 脂族基 ;

[0181] 各 R^{W3} 是氢或 C1-C6 脂族基 ;或

[0182] 2 个 R^{W3} 一起形成 C3-C6 环烷基或杂环, 其可具有至多 2 个选自 O、S 或 NR' 的杂原子, 其中所述环任选被至多 2 个 WR^W 取代基取代 ;

[0183] m 是 0-4 ;且

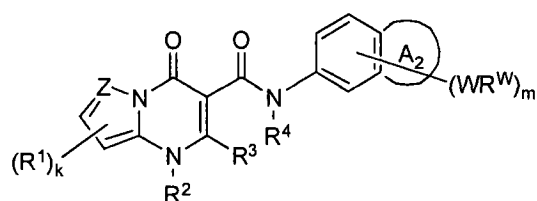
[0184] k、 R^1 、W、Z 和 R^W 如上述定义。

[0185] 在一个实施方案中, WR^{W1} 是氢、C1-C6 脂族基、C(O)C1-C6 脂族基或 C(O)OC1-C6 脂族基。

[0186] 在另一个实施方案中, 各 R^{W3} 是氢、C1-C4 烷基。或者, 2 个 R^{W3} 一起形成 C3-C6 脂环基环或具有至多 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的 5-7 元杂环, 其中所述脂环基或杂环任选被至多 3 个选自 WR^{W1} 的取代基取代。示例性的环包括环丙基、环戊基、任选取代的哌啶基等。

[0187] 在另一个实施方案中, 本发明提供式 VB-2 的化合物 :

[0188]



VB-2

[0189] 其中：

[0190] 环 A_2 是苯基或 5-6 元杂芳环，其中环 A_2 和与其耦合的苯环一起具有至多 4 个独立地选自 WR^W 的取代基；

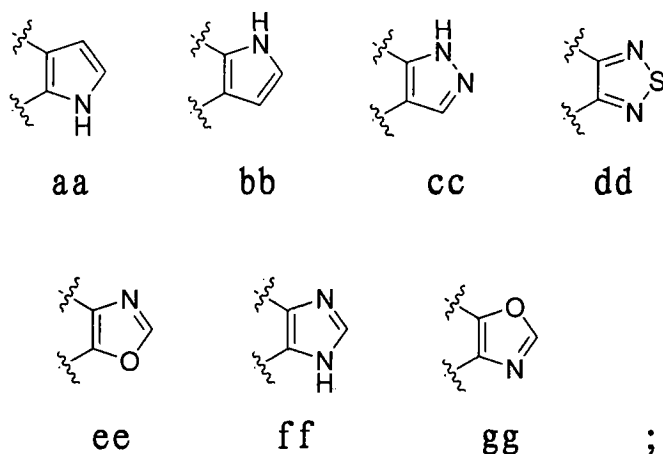
[0191] m 是 0-4；且

[0192] W 、 R^W 、 Z 、 k 和 R^1 如上述定义。

[0193] 在一个实施方案中，环 A_2 是任选取代的 5 元环，该环选自吡咯基、呋喃基、噻吩基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、**噁**唑基、噻二唑基、**噁**二唑基或三唑基。

[0194] 在一个实施方案中，环 A_2 是任选取代的 5 元环，该环选自吡咯基、吡唑基、噻二唑基、咪唑基、**噁**唑基、或三唑基。示例性的这种环包括：

[0195]



[0196] 其中所述环是如上所述任选被取代的。

[0197] 在另一个实施方案中，环 A_2 是任选取代的 6 元环。示例性的环包括吡啶基、吡嗪基、或三嗪基。在另一个实施方案中，所述环是任选的吡啶基。

[0198] 在一个实施方案中，环 A_2 是苯基。

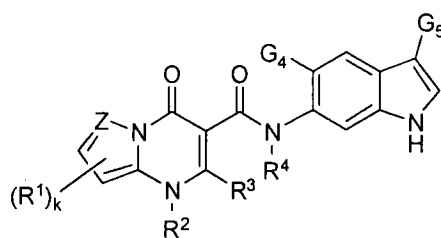
[0199] 在另一个实施方案中，环 A_2 是吡咯基、吡唑基、吡啶基或噻二唑基。

[0200] 在式 VB-2 中的示例性的 W 包括键、 $C(0)$ 、 $C(0)O$ 或 C1-C6 亚烷基。

[0201] 在式 VB-2 中的示例性的 R^W 包括氰基、卤素、C1-C6 脂族基、C3-C6 脂环基、芳基、具有至多 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的 5-7 元杂环，其中所述脂族基、苯基和杂环基独立和任选地被至多 3 个选自 C1-C6 烷基、O-C1-C6 烷基、卤素、氰基、OH 或 CF_3 的取代基取代，其中所述 C1-C6 脂族基或 C1-C6 烷基的至多 2 个亚甲基单元任选被 $-CO-$ 、 $-CONR'$ 、 $-CO_2-$ 、 $-OCO-$ 、 $-NR'$ 、 $-CO_2-$ 、 $-O-$ 、 $-NR'$ 、 $-CONR'$ 、 $-OCONR'$ 、 $-NR'$ 、 $-CO-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ 、 $-SO_2NR'$ 、 $-NR'$ 、 $-SO_2-$ 或 $-NR'$ 、 $-SO_2NR'$ 替代。在另一个实施方案中，上述 R' 是 C1-C4 烷基。

[0202] 在一个实施方案中，本发明提供式 VB-3 的化合物：

[0203]



VB-3

[0204] 其中：

[0205] G_4 是氢、卤素、CN, CF_3 , CHF_2 , CH_2F 、任选取代的 C1-C6 脂族基、芳基 -C1-C6 烷基、或苯基, 其中 G_4 任选被至多 4 个 WR^w 取代基取代; 其中所述 C1-C6 脂族基或 C1-C6 烷基的至多 2 个亚甲基单元任选被 -CO-, -CONR', -CO₂-, -OCO-, -NR' CO₂-, -O-, -NR' CONR', -OCONR', -NR' CO-, -S-, -NR', -SO₂NR', -NR' SO₂- 或 -NR' SO₂NR' 替代;

[0206] G_5 是氢、任选取代的 C1-C6 脂族基、 CF_3 或 CN;

[0207] 其中所述咪唑环系统还任选被至多 3 个独立地选自 WR^w 的取代基取代。

[0208] 在一个实施方案中, G_4 是氢。或者, G_5 是氢。

[0209] 在另一个实施方案中, G_4 是氢, 并且, G_5 是 C1-C6 脂族基、 CF_3 或 CN, 其中所述脂族基任选被 C1-C6 烷基、卤素、氰基或 CF_3 取代, 并且其中所述 C1-C6 脂族基或 C1-C6 烷基的至多 2 个亚甲基单元任选被 -CO-, -CONR', -CO₂-, -OCO-, -NR' CO₂-, -O-, -NR' CONR', -OCONR', -NR' CO-, -S-, -NR', -SO₂NR', -NR' SO₂- 或 -NR' SO₂NR' 替代。在另一个实施方案中, 上述 R' 是 C1-C4 烷基。

[0210] 在另一个实施方案中, G_4 是氢, 并且 G_5 是氰基、 CF_3 , 甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、氰基甲基、甲氧基乙基、 $CH_2C(O)OMe$ 、 $(CH_2)_2-NHC(O)O$ -叔丁基、或环戊基。

[0211] 在另一个实施方案中, G_5 是氢, 并且 G_4 是卤素、C1-C6 脂族基或苯基, 其中所述脂族基或苯基任选被 C1-C6 烷基、卤素、氰基或 CF_3 取代, 其中所述 C1-C6 脂族基或 C1-C6 烷基的至多 2 个亚甲基单元任选被 -CO-, -CONR', -CO₂-, -OCO-, -NR' CO₂-, -O-, -NR' CONR', -OCONR', -NR' CO-, -S-, -NR', -SO₂NR', -NR' SO₂- 或 -NR' SO₂NR' 替代。在另一个实施方案中, 上述 R' 是 C1-C4 烷基。

[0212] 在另一个实施方案中, G_5 是氢, 并且 G_4 是卤素、 CF_3 , 乙氧羰基、叔丁基、2-甲氧基苯基、2-乙氧基苯基、(4-C(O)NH(CH₂)₂-NMe₂)-苯基、2-甲氧基-4-氯-苯基、吡啶-3-基、4-异丙基苯基、2,6-二甲氧基苯基、仲丁基氨基羰基、乙基、叔丁基、或哌啶-1-基羰基。

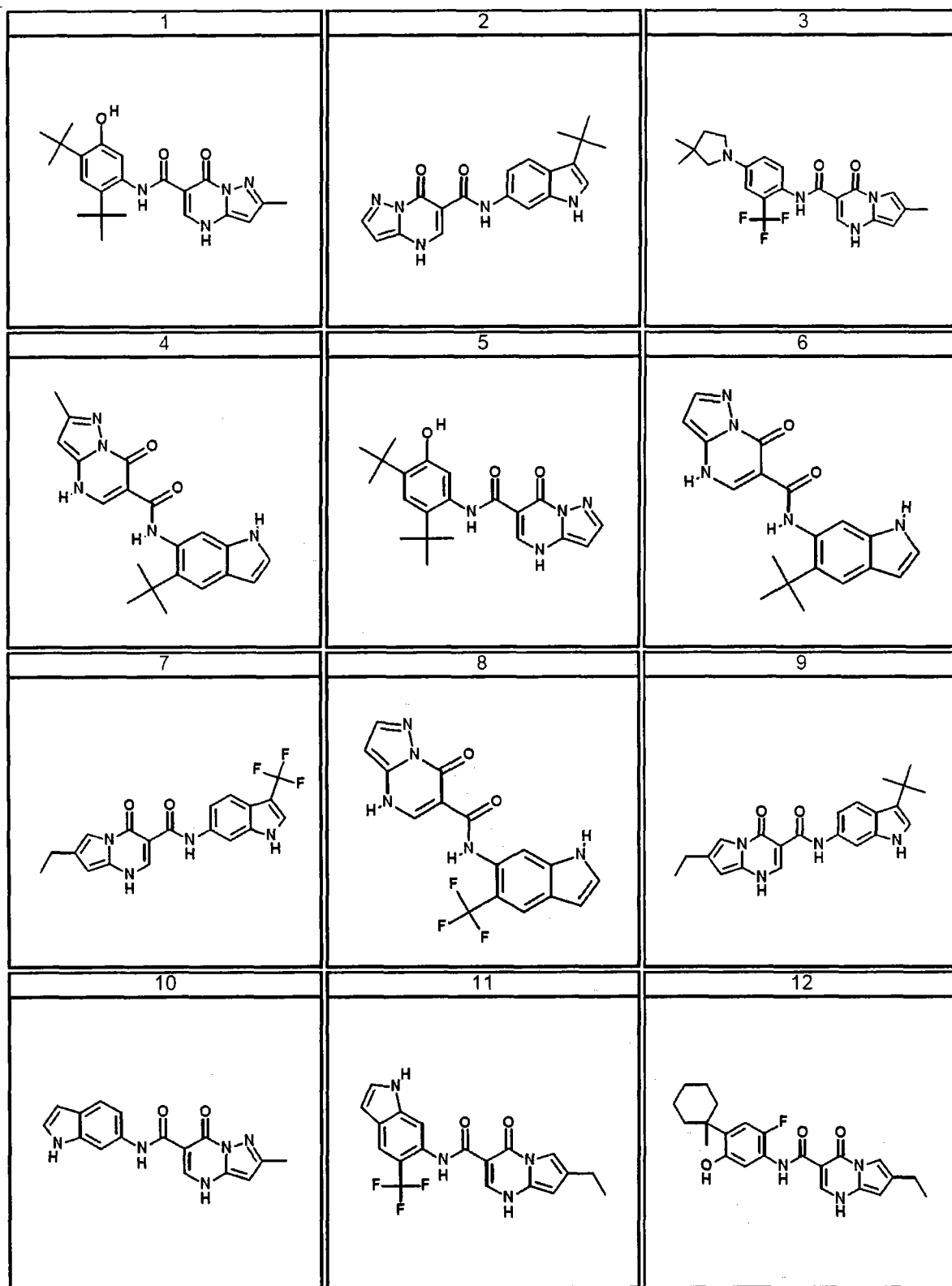
[0213] 在另一个实施方案中, G_4 和 G_5 都是氢, 并且所述咪唑环的氮环原子被 C1-C6 脂族基、C(O) (C1-C6 脂族基) 或苄基取代, 其中所述脂族基或苄基任选被 C1-C6 烷基、卤素、氰基或 CF_3 取代, 其中所述 C1-C6 脂族基或 C1-C6 烷基的至多 2 个亚甲基单元任选被 -CO-, -CONR', -CO₂-, -OCO-, -NR' CO₂-, -O-, -NR' CONR', -OCONR', -NR' CO-, -S-, -NR', -SO₂NR', -NR' SO₂- 或 -NR' SO₂NR' 替代。在另一个实施方案中, 上述 R' 是 C1-C4 烷基。

[0214] 在另一个实施方案中, G_4 和 G_5 都是氢, 并且所述咪唑环的氮环原子被酰基、苄基、C(O)CH₂N(Me)C(O)CH₂NHMe 或乙氧羰基取代。

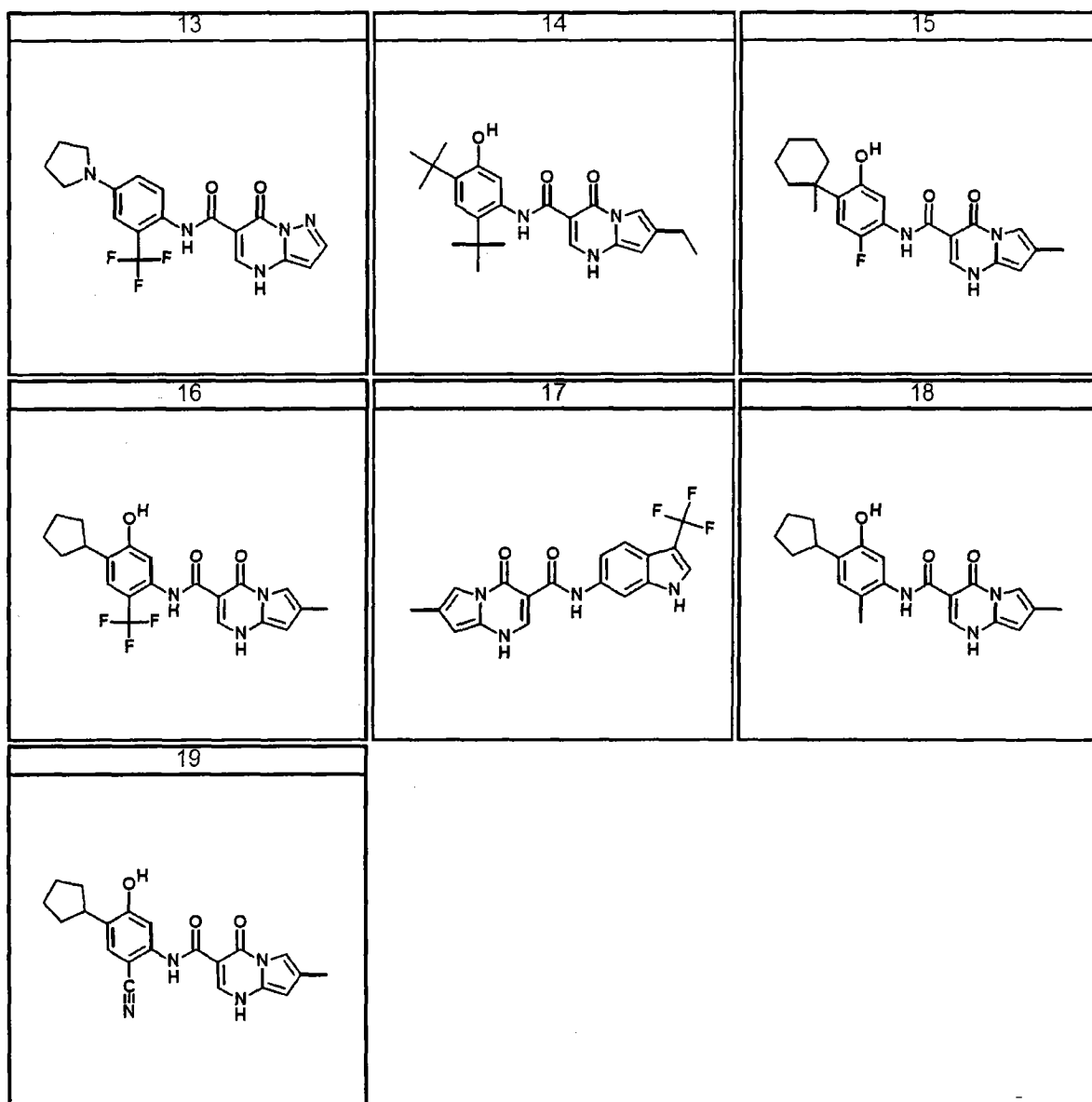
[0215] 本发明的示例性化合物如下表 1 所列。

[0216] 表 1

[0217]



[0218]



[0219] 4. 一般合成路线

[0220] 本发明的化合物可以通过本领域已知的方法容易地制备。下文在实施例中描述的是制备本发明化合物的示例性的方法。

[0221] 5. 应用、制剂和给药

[0222] 药学可接受的组合物

[0223] 在本发明的一个方面,提供药学可接受的组合物,其中这些组合物包含如本文所述的任意化合物、和任选地包含药学可接受的载体、佐剂或赋形剂。在一些实施方案中,这些组合物还任选包含一种或多种另外的治疗剂。

[0224] 也应当理解,本发明的某些化合物可以以游离形式存在而用于治疗,或者如果适当,可以以其药学可接受的衍生物或前药的形式存在。根据本发明,药学可接受的衍生物或前药包括但不限于,药学可接受的盐、酯、这些酯的盐或者在施用于有此需要的患者时能直接或间接提供本文所述的化合物或其代谢产物或残留物的任何另外的加合物或衍生物。

[0225] 本文所用的术语“药学可接受的盐”是指在合理的医学判断范围内,适用于与人和

低级动物的组织接触而没有异常毒性、刺激性、过敏反应等的那些盐,而且具有合理的收益/风险比。“药学可接受的盐”是指本发明化合物的任何无毒性的盐或酯盐,当施用于接受者时,能够直接或间接提供本发明的化合物或其具有抑制活性的代谢产物或残留物。

[0226] 药学可接受的盐是本领域公知的。例如 S. M. Berge 等人在 J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19 中详细描述了药学可接受的盐,将其引入本文作参考。本发明化合物的药学可接受的盐包括由适当的无机和有机的酸和碱产生的盐。药学可接受的无毒性的酸加成盐的例子是与无机酸例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸形成的氨基盐,或是与有机酸例如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸形成的氨基盐,或通过使用本领域使用的其他方法例如离子交换法而形成的氨基盐。其他药学可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙二磺酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。由适当的碱产生的盐包括碱金属、碱土金属、铵和 $N^+(C_{1-4} \text{烷基})_4$ 盐。本发明也包括本文所述的化合物的任何碱性含氮基团的四价化形式。通过这种四价化可以获得水溶性或油溶性产物或者可分散于水或油中的产物。代表性的碱或碱土金属盐类包括钠、锂、钾、钙、镁盐等。当适当时,药学上可接受的盐还包括无毒的铵盐、季铵盐,以及使用抗衡离子形成的胺阳离子盐,例如卤化物、氢氧化物、羧酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、低级烷基磺酸盐和芳基磺酸盐。

[0227] 如上所述,本发明的药学可接受的组合物还包含药学可接受的载体、佐剂或赋形物,其在本文中使用时,包括任何和所有的溶剂、稀释剂或其他液体载体、助分散剂或助悬剂、表面活性剂、等渗剂、增稠或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,其适合所需的特定剂型。Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 描述了在配制药学可接受的组合物中使用的各种载体和已知的制备技术。除了例如由于产生任何不希望的生物学效应或以有害的方式干扰该药学可接受的组合物的任何其他组分而与本发明化合物不相容的任何常规的载体介质以外,其使用也涵盖在本发明的范围内。可以用作药学可接受的载体的物质的一些例子包括但不限于,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白质例如人血清白蛋白、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸或山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质,例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段共聚物、羊毛脂、糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,例如可可脂和栓剂用蜡;油,例如花生油、棉籽油;红花油;芝麻油;橄榄油;玉米油和豆油;二醇类,例如丙二醇或聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格液;乙醇,和磷酸盐缓冲溶液,以及其他无毒性的相容性润滑

剂,例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及根据配制者的判断也可以存在于该组合物中的着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0228] 化合物和药学可接受的组合物的应用

[0229] 在另一个方面,本发明提供一种治疗与 CFTR 突变有关的疾病、病症或障碍或者减轻其严重程度的方法。在一些实施方案中,本发明提供一种治疗与 CFTR 活性缺陷有关的疾病、病症或障碍的方法,该方法包括给有此需要的受试者,优选哺乳动物施用包含式 (I) 化合物的组合物。

[0230] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗如下疾病的方法:囊性纤维化、哮喘、吸烟诱发的 COPD、慢性支气管炎、鼻窦炎、便秘、胰腺炎、胰腺功能不全、输精管先天性双侧缺失导致的男性不育 (CBAVD)、轻度肺疾病、特发性胰腺炎、变应性支气管肺曲菌病 (ABPA)、肝病、遗传性肺气肿、遗传性血色素沉着症、凝血-纤溶缺陷,例如蛋白质 C 缺乏症、I 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷,例如家族性高胆固醇血症、I 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积症,例如 I- 细胞疾病 / 假性胡尔勒病、粘多糖症、桑霍夫病 / 泰-萨病、克-纳综合征 II 型、多内分泌腺病 / 胰岛素分泌过多症、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺功能减退、黑素瘤、聚糖病 CDG1 型、先天性甲状腺功能亢进症、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 不足、尿崩症 (DI)、神经生长性 DI、肾性 DI、夏-马-图三氏综合征、佩-梅二氏病、神经变性疾病,例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上麻痹、匹克病、若干聚谷氨酰胺神经性障碍,例如亨廷顿病、I 型脊髓脑共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩、和强直性肌营养不良、以及海绵样脑病,例如遗传性克雅病 (因阮蛋白加工缺陷导致)、法布里病、格-施-沙综合征、COPD、干眼病和斯耶格伦病,该方法包括给所述哺乳动物施用有效量的包含本发明化合物的组合物。

[0231] 根据一个可替代的优选实施方案,本发明提供一种治疗囊性纤维化的方法,该方法包括给所述哺乳动物施用组合物的步骤,包括给所述哺乳动物施用有效量的包含本发明化合物的组合物的步骤。

[0232] 根据本发明,化合物或药学可接受的组合物的“有效量”是有效治疗如上所述的一种或多种疾病、障碍或病症或者减轻其严重程度的用量。

[0233] 根据本发明的方法,化合物和组合物可以使用能有效治疗如上所述的一种或多种疾病、障碍或病症或者减轻其严重程度的任何用量和任何给药途径来给予。

[0234] 在一些实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用于治疗患者的囊性纤维化或减轻患者的囊性纤维化的严重性,该患者的呼吸上皮或非呼吸上皮的顶膜中显示残留的 CFTR 活性。使用本领域已知的方法,例如标准的电生理学、生化或组织化学技术可以容易地检测上皮细胞表面残留的 CFTR 活性的存在。这些方法使用体外或离体的电生理技术、汗液或唾液的 Cl^- 浓度测定、或者离体生化或组织化学技术来监测细胞表面密度,以鉴定 CFTR 活性。使用这些方法,可以容易地在各种不同突变体杂合或纯合的患者,包括最常见的突变体 $\Delta F508$ 的杂合或纯合的患者中检测残留的 CFTR 活性。

[0235] 在另一个实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用于治疗患者的囊性纤维化或减轻患者的囊性纤维化的严重性,该患者具有用药理学方法或基因疗法诱导或增强的残留 CFTR 活性。这些方法增加细胞表面上存在的 CFTR 的量,因此在患者中诱导迄今不存在

的 CFTR 活性或在患者中提高残留 CFTR 活性的现存水平。

[0236] 在一个实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用于治疗患者的囊性纤维化或减轻患者的囊性纤维化的严重性,该患者具有某些显示残留 CFTR 活性的基因型,例如,III 类突变(调节或门控受损)、IV 类突变(传导改变)或 V 类突变(合成减少)(Lee R.Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521-529,2000)。显示残留 CFTR 活性的其他患者基因型包括这些类型之一的纯合或者与其他任意类型的突变体杂合的患者,所述其他类型的突变包括 I 类突变、II 类突变或未分类的突变。

[0237] 在一个实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用于治疗患者的囊性纤维化或减轻患者的囊性纤维化的严重性,该患者具有某些临床表型,例如,典型地与上皮顶膜上的残留 CFTR 活性的量相关的轻度至中度临床表型。这些表型包括显示胰功能不全的患者或者诊断为特发性胰腺炎和输精管先天性双侧缺失或者轻度肺病的患者。

[0238] 所需的确切的量对于不同的受试者而言是不同的,这取决于受治疗者的物种、年龄和一般状况、感染的严重度、具体的药物、其给药方式等。本发明的化合物优选配制成为易于给药和使剂量均匀的剂量单位形式。本文所用的表述“剂量单位形式”是指适合所要治疗的患者的药物的物理上分离的单位。但是,应当理解,本发明的化合物和组合物的每日总使用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何具体的患者或生物体的具体有效剂量水平将取决于多种因素,包括所要治疗的疾病和该疾病的严重性;所使用的具体化合物的活性;所使用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给药时间、给药途径和所使用的具体化合物的排泄率;治疗的持续时间;与所使用的具体化合物联合或同时使用的药物等,以及医学领域公知的其他类似因素。本文所用的术语“患者”是指动物,优选哺乳动物,最优选人。

[0239] 本发明的药学可接受的组合物可以通过口服、直肠、胃肠外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(例如通过粉剂、软膏、滴剂或贴剂)、经颊以及作为口腔或鼻喷雾剂等方式施用于人和其他动物,这取决于所要治疗的感染的严重性。在一些实施方案中,本发明的化合物可以以每日约 0.01mg/kg- 约 50mg/kg 患者体重,优选约 0.5mg/kg- 约 25mg/kg 患者体重的剂量水平经口服或胃肠外施用,每日一次或多次,以获得所需的治疗效果。

[0240] 用于口服给药的液体剂型包括但不限于,药学可接受的乳剂、微乳、溶液、混悬液、糖浆和酏剂。除了活性化合物以外,该液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3- 丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是,棉籽油、花生油、玉米油、胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨糖醇酯脂肪酸酯,以及它们的混合物。除了惰性稀释剂,该口服组合物也可以包含佐剂,例如湿润剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0241] 可以根据已知的技术,使用适当的分散或湿润剂和助悬剂配制可注射制剂,例如无菌注射用水性或油性混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒性的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液、混悬液或乳剂,例如在 1,3- 丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的载体或溶剂是水、林格液, U. S. P. 和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发性油一般也

用作溶剂或助悬介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸例如油酸可以用于注射制剂中。

[0242] 注射制剂可以通过例如细菌截留性过滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,其中所述无菌固体组合物可以在临用前溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0243] 为了延长本发明化合物的效果,经常需要缓慢地吸收由皮下或肌肉注射的化合物。这可以通过使用水溶性差的晶体或无定形物质的液体混悬液来实现。那么,化合物的吸收速率将取决于其溶出速度,溶出速度又可能取决于晶体大小和晶型。可替代地,延迟胃肠外给药的化合物形式的吸收可以通过将该化合物溶解或混悬于油性载体中来实现。制备可注射的储库型(长效型)剂型,包括在生物可降解的聚合物例如聚乳酸-聚乙醇酸交酯中形成化合物的微囊基质。根据化合物与聚合物的比例和所使用的具体聚合物的性质,可以控制化合物的释放速率。其他生物可降解的聚合物的例子包括聚(正酯)和聚(酸酐)。储库型注射剂也可以通过将化合物包埋在与机体组织相容的脂质体或微乳中来制备。

[0244] 直肠或阴道施用的组合物优选是栓剂,其可以通过将本发明的化合物与适当的非刺激性赋形剂或载体例如可可脂、聚乙二醇或栓剂用蜡混合来制备,其中所述赋形剂或载体在环境温度下是固体,但在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中融化并释放出活性化合物。

[0245] 口服给药的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,活性化合物与至少一种惰性的、药学可接受的赋形剂或载体混合,所述赋形剂或载体例如为柠檬酸钠或磷酸二钙、和/或 a) 填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸, b) 粘合剂,例如,羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶, c) 保湿剂,例如甘油, d) 崩解剂,例如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠, e) 溶解阻滞剂,例如石蜡, f) 吸收促进剂,例如季铵类化合物, g) 湿润剂,例如十六醇和单硬脂酸甘油酯, h) 吸收剂,例如高岭土和膨润土,和 i) 润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,及它们的混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,该剂型也可以包含缓冲剂。

[0246] 相似类型的固体组合物也可以填充在软和硬的填充性明胶胶囊中使用,胶囊使用例如乳糖或奶糖,以及高分子聚乙二醇等赋形剂。可以用包衣和壳例如肠溶衣和药物制剂领域公知的其他包衣材料来制备片剂、锭剂、胶囊、丸剂和颗粒剂等固体剂型。它们任选可以包含遮光剂,也可以具有这样一种组合物:它们只在或优选在肠道的某一部分(任选地以延迟方式)释放一种或多种活性成分。可以使用的包埋组合物的例子包括聚合物物质和蜡。相似类型的固体组合物也可以填充在软和硬的填充性明胶胶囊中使用,胶囊使用例如乳糖或奶糖,以及高分子聚乙二醇等赋形剂。

[0247] 活性化合物也可以存在于具有一种或多种上述赋形剂的微囊中。可以用包衣和壳例如肠溶衣、控释包衣、或者药物制剂领域公知的其他包衣材料来制备片剂、锭剂、胶囊、丸剂和颗粒剂等固体剂型。在这些固体剂型中,活性化合物可以与至少一种惰性稀释剂,例如蔗糖、乳糖或淀粉混合。这些剂型也可以例如如一般实践的,包含惰性稀释剂以外的其他添加剂,例如压片润滑剂和其他压片佐剂,例如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,该剂型也可以包含缓冲剂。它们任选可以包含遮光剂,也可以具有这样一种组合

物：它们只在或优选在肠道的某一部分（任选地以延迟方式）释放一种或多种活性成分。可以使用的包埋组合物的例子包括聚合物和蜡。

[0248] 本发明化合物的局部或经皮给药的剂型包括软膏、糊剂、乳剂、洗剂、凝胶剂、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。活性组分在无菌条件下与药学可接受的载体和任何需要的防腐剂或可能需要的缓冲剂混合。眼用制剂、滴耳剂和滴眼剂也涵盖在本发明的范围内。此外，本发明涵盖透皮贴剂的使用，它的附加优点是向机体提供化合物的可控递送。这类剂型可以通过将化合物溶解或分散于适当的介质中来制备。也可以使用吸收增强剂来增加化合物通过皮肤的流量。可以通过提供速率控制膜或通过将化合物分散于聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0249] 可以根据本领域一般描述和本文实施例中所述的方法测定用于本发明作为 CFTR 调节剂的化合物的活性。

[0250] 也应当理解，本发明的化合物和药学可接受的组合物可以用在联合治疗中，也就是说，本发明的化合物和药学可接受的组合物可以在一种或多种另外的所需治疗或医学操作的同时、之前或之后施用。在联合治疗方案中使用的治疗（治疗或操作）的具体组合将考虑所需的治疗和 / 或操作与所要实现的期望治疗效果之间的相容性。也应当理解，所使用的治疗可以对相同的疾病达到期望的效果（例如，本发明的化合物可以与另一种用于治疗相同疾病的药物同时施用），或者它们可以实现不同的效果（例如，控制任何不良反应）。本文所用的通过正常给药来治疗或预防特定疾病或病症的另外的治疗剂被称作“适合所要治疗的疾病或病症”。

[0251] 在一个实施方案中，另外的治疗剂选自溶粘蛋白剂、支气管扩张剂、抗生素、抗感染剂、抗炎剂、除本发明化合物以外的 CFTR 调节剂、或营养剂。在另一个实施方案中，另外的活性剂是除本发明化合物以外的 CFTR 调节剂。

[0252] 本发明的组合物中存在的另外的治疗剂的含量不超过在包含该治疗剂作为唯一活性剂的组合物中通常给予的量。目前所公开的组合物中另外的治疗剂的含量的优选范围是在仅包含该治疗剂作为唯一治疗活性剂的组合物中的通常含量的约 50% -100%。

[0253] 本发明的化合物或其药学可接受的组合物也可以掺入到组合物中，以涂覆到可植入的医疗装置例如假体、人工瓣膜、人造血管、支架或导管上。因此，在另一个方面，本发明包括用于涂覆到可植入装置上的组合物，该组合物包含如上文一般性描述、以及在类和亚类中所述的本发明的化合物，和适合涂覆到所述可植入装置上的载体。在另一个方面，本发明包括涂覆有组合物的可植入装置，该组合物包含如上文一般性描述、以及在类和亚类中所述的本发明的化合物，和适合涂覆到所述可植入装置上的载体。在美国专利 US6099562、US5886026 和 US5304121 中描述了适当的涂料（包衣）和经涂覆的可植入装置的一般制备方法。涂料（包衣）典型地是生物相容性聚合性物质，例如水凝胶聚合物、聚甲基二硅氧烷、聚己内酯、聚乙二醇、聚乳酸、乙烯 - 乙酸乙烯酯，及它们的混合物。该涂料（包衣）还可以任选覆盖有适当的氟硅氧烷、多糖、聚乙二醇、磷脂或其组合的薄膜衣，从而向组合物赋予控释特性。

[0254] 本发明的另一个方面涉及在生物样品或患者（例如，体外或体内）中调节 CFTR 活性的方法，该方法包括将式 (I) 的化合物或包含该化合物的组合物施用于患者，或者与所述生物样品接触。本文所用的术语“生物样品”包括但不限于，细胞培养物或其萃取物；得

自哺乳动物的活组织检查物质或其萃取物；和血液、唾液、尿液、粪便、精液、泪液或其他体液或其萃取物。

[0255] 在生物样品中 CFTR 的调节可以用于本领域技术人员已知的各种目的。这些目的的例子包括但不限于，在生物学和病理学现象中研究 CFTR；以及对新 CFTR 调节剂的对比评价。

[0256] 在另一个实施方案中，提供一种体外或体内调节阴离子通道活性的方法，包括将所述通道与式 (I) 的化合物接触的步骤。在优选的实施方案中，该阴离子通道是氯离子通道或碳酸氢根离子通道。在其他优选的实施方案中，该阴离子通道是氯离子通道。

[0257] 根据一个可替代的实施方案，本发明提供一种在细胞膜中增加功能性 CFTR 的数量方法，包括将所述细胞与式 (I) 的化合物接触的步骤。

[0258] 根据另一个优选的实施方案，通过测定跨膜电位来测定 CFTR 的活性。在生物样品中测定跨膜电位的方法可以使用本领域任何已知的方法，例如，光学膜电位测定法或其他电生理学方法。

[0259] 光学膜电位测定法使用如 Gonzalez 和 Tsien(See, Gonzalez, J.E. 和 R.Y.Tsien(1995) “Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells.” *Biophys J* 69(4):1272-80；以及 Gonzalez, J.E. 和 R.Y.Tsien(1997)；“Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer” *Chem Biol* 4(4):269-77) 所述的电压-敏感性 FRET 传感器，并联合使用测定荧光变化的仪器，例如电压/离子探针读数器 (VIPR) (参见 Gonzalez, J.E., K. Oades 等人 (1999) “Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets” *Drug Discov Today* 4(9):431-439)。

[0260] 这些电压敏感性测定法是基于膜-可溶性的电压-敏感性染料 DiSBAC₂(3) 与荧光磷脂 CC2-DMPE 之间的荧光共振能量转移 (FRET) 的变化进行的，所述荧光磷脂 CC2-DMPE 与质膜的外小叶相连并发挥 FRET 供体的作用。跨膜电位 (V_m) 的变化导致带负电荷的 DiSBAC₂(3) 跨质膜重新分布，使得从 CC2-DMPE 的能量转移量发生相应地改变。荧光发射的变化可以用 VIPRTM II 监测，VIPRTM II 是一种整合的液体处理器和荧光检测器，被设计用于在 96-孔或 384-孔微量滴定板上进行基于细胞的筛选。

[0261] 在另一个方面，本发明提供一种用于在体外或体内、在生物样品中测定 CFTR 或其片段的活性的试剂盒，其包含 (i) 包含式 (I) 的化合物的组合物或任意的上述实施方案；和 (ii) 说明书，指示 a) 将该组合物与生物样品接触和 b) 测定所述 CFTR 或其片段的活性。在一个实施方案中，该试剂盒还包括说明书，指示 a) 将另外的组合物与该生物样品接触；b) 在所述另外的化合物存在下测定所述 CFTR 或其片段的活性，和 c) 将在另外的化合物存在下的 CFTR 活性与在式 (I) 组合物存在下的 CFTR 的密度进行比较。在优选的实施方案中，该试剂盒用于测定 CFTR 的密度。

[0262] 为了更全面地理解本文所述的发明，列出了下列实施例。应当理解的是，这些实施例仅用于说明的目的，而不是以任何方式限制本发明。

[0263] 实施例

[0264] 一般合成路线

[0265] 本发明的化合物易于通过本领域公知的方法制备。下文示例了本发明化合物的典

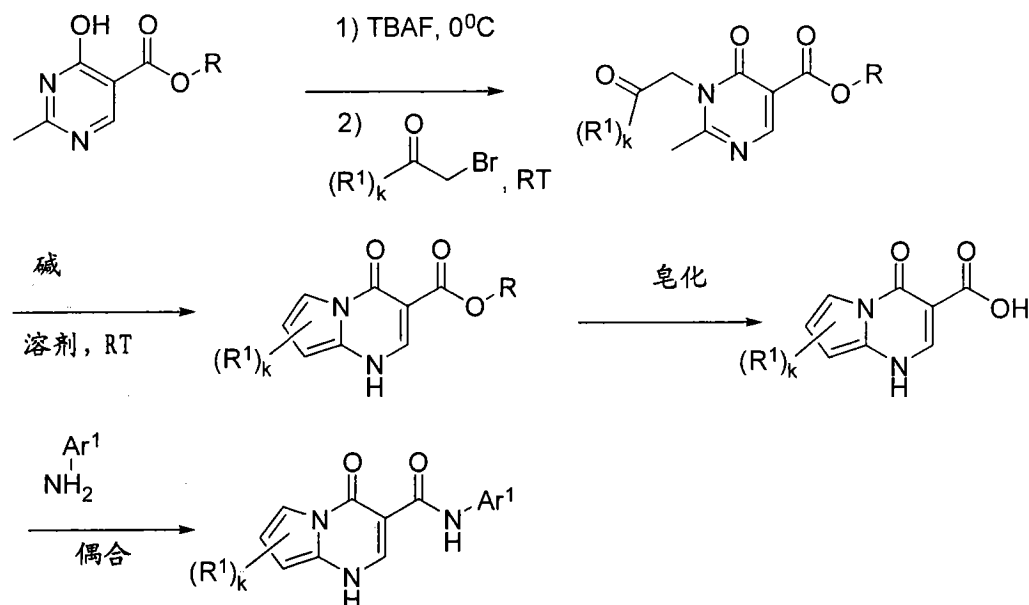
型制备方法。

[0266] 下文的合成路线示例了本发明式 (I) 化合物的合成。

[0267] 为了更完全地理解本文所述的本发明, 举出下列实施例。应当理解的是, 这些实施例仅用于说明目的, 而不以任何方式限制本发明。

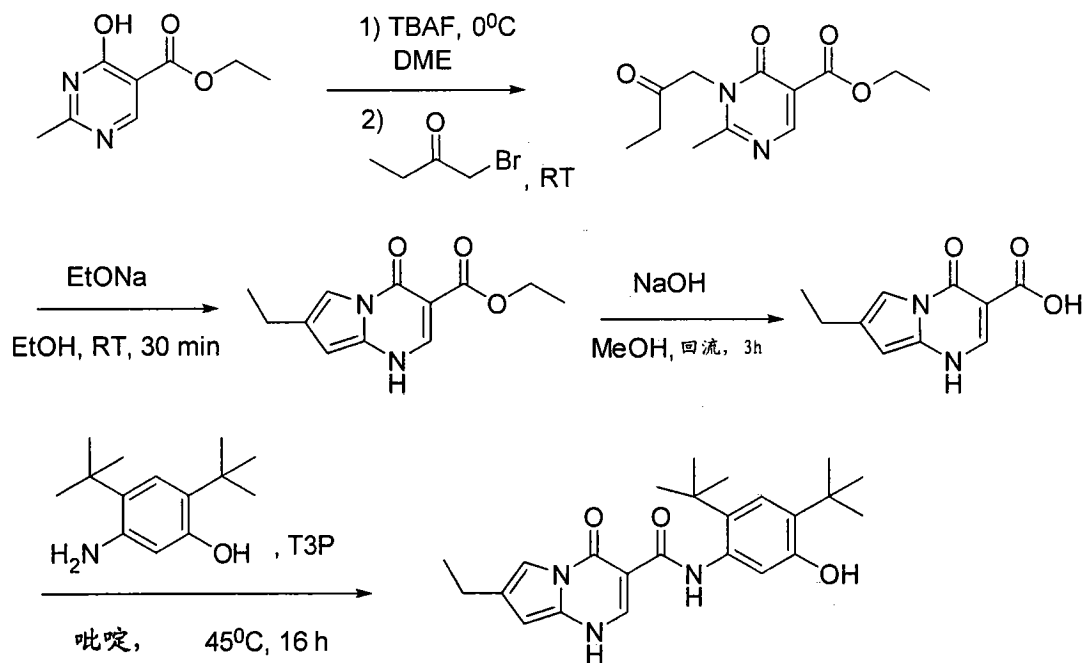
[0268] 合成路线 1

[0269]



[0270] 实施例 1: N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-7-乙基-4-氧代-1,4-二氢吡咯并[1,2-a]嘧啶-3-甲酰胺 (化合物 14, 表 1 的制备)

[0271]



[0272] 将 4-羟基-2-甲基嘧啶-5-甲酸乙酯 (1.5g, 8.234mmol) 混悬于 DME (48mL), 在 0°C 滴加 TBAF (13.17mL, 1M 的 THF 溶液, 13.17mmol)。将得到的溶液搅拌 10 分钟, 滴加

1-溴-2-丁酮 (1.318g, 8.728mmol) 的 DME (3mL) 溶液。将该反应体系在室温下搅拌过夜。然后真空浓缩该溶液, 使其分配在 EtOAc 与饱和 NH_4Cl 水溶液之间。分离 EtOAc 层, 用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩, 得到油状物。通过快速色谱法 (0-100% EtOAc/ 己烷) 纯化粗物质, 得到纯的期望产物 2-甲基-6-氧代-1-(2-氧代丁基)-1,6-二氢嘧啶-5-甲酸乙酯, 为灰白色固体; 1.73g (83%)。

[0273] LC/MS (10-99% CH_3CN /0.05% TFA 的水溶液 /0.05% TFA 梯度, 3min 内): M+H m/z 252.9, 保留时间 0.76 分钟。

[0274] ^1H NMR (400.0MHz, CDCl_3) δ 8.62 (s, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.38 (m, 2H), 2.68 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 1.39 (t, J = 7.1Hz, 3H) 和 1.18 (t, J = 7.3Hz, 3H)。

[0275] 在氮气气氛下, 向乙醇钠的乙醇溶液 (1.906g, 2.196mL, 5.882mmol) 加入乙醇 (9.2mL), 得到 5% w/w 乙醇钠溶液。向该乙醇钠溶液中滴加溶于乙醇 (7mL) 的 2-甲基-6-氧代-1-(2-氧代丁基)-1,6-二氢嘧啶-5-甲酸乙酯 (0.74g, 2.941mmol)。将该反应混合物搅拌 30 分钟, 减压除去溶剂, 将得到的固体用 6M HCl 处理至 pH 5。通过真空过滤收集得到的沉淀 7-乙基-4-氧代-1,4-二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶-3-甲酸乙酯, 为褐色固体; 0.63g (92%)。

[0276] LC/MS (10-99% CH_3CN /0.05% TFA 的水溶液 /0.05% TFA 梯度, 3min 内): M+H m/z 235.1, 保留时间 0.99 分钟。

[0277] ^1H NMR (400.0MHz, DMSO) δ 12.74 (bs, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.17 (t, J = 0.9Hz, 1H), 6.00 (d, J = 1.9Hz, 1H), 4.20 (q, J = 7.1Hz, 2H), 2.57-2.50 (m, 2H), 1.27 (t, J = 7.1Hz, 3H) 和 1.18 (t, J = 7.5Hz, 3H)。

[0278] 将 7-乙基-4-氧代-1,4-二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶-3-甲酸乙酯 (0.63g, 2.711mmol) 溶于甲醇 (8mL)/氢氧化钠 (13.56mL, 2.0M, 27.11mmol) 溶液, 加热回流 3 小时。将该混合物冷却至室温, 真空除去甲醇。将水溶液冷却至 0°C, 缓慢加入浓 HCl, 直到形成沉淀 (pH 4)。过滤沉淀, 用水洗涤, 干燥, 得到 7-乙基-4-氧代-1,4-二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶-3-甲酸; 0.43g (77%)。

[0279] LC/MS (10-99% CH_3CN /0.05% TFA 的水溶液 /0.05% TFA 梯度, 3min 内): M+H m/z 207.1, 保留时间 1.10 分钟。

[0280] ^1H NMR (400.0MHz, DMSO) δ 13.42 (bs, 1H), 12.89 (bs, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.29 (t, J = 0.8Hz, 1H), 6.17 (d, J = 1.8Hz, 1H), 2.61-2.50 (m, 2H) 和 1.20 (t, J = 7.5Hz, 3H)。

[0281] 向 7-乙基-4-氧代-1,4-二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶-3-甲酸 (32.3mg, 0.1566mmol) 的 2-甲基四氢呋喃 (400 μL) 溶液中加入 1-丙基膦酸环酐 (249.1mg, 233.0 μL , 0.3915mmol), 然后加入吡啶 (24.77mg, 25.33 μL , 0.3132mmol)。密封该反应体系, 在 45°C 加热 30 分钟, 此时加入 5-氨基-2,4-二叔丁基苯酚 (41.59mg, 0.1879mmol), 将该反应体系在 45°C 加热 16h。真空除去溶剂, 通过反相 HPLC (40-100% 乙腈 /0.035% TFA 的水溶液 /0.05% TFA) 纯化残余物, 得到 N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-7-乙基-4-氧代-1,4-二氢吡咯并 [1,2-a] 嘧啶-3-甲酰胺。

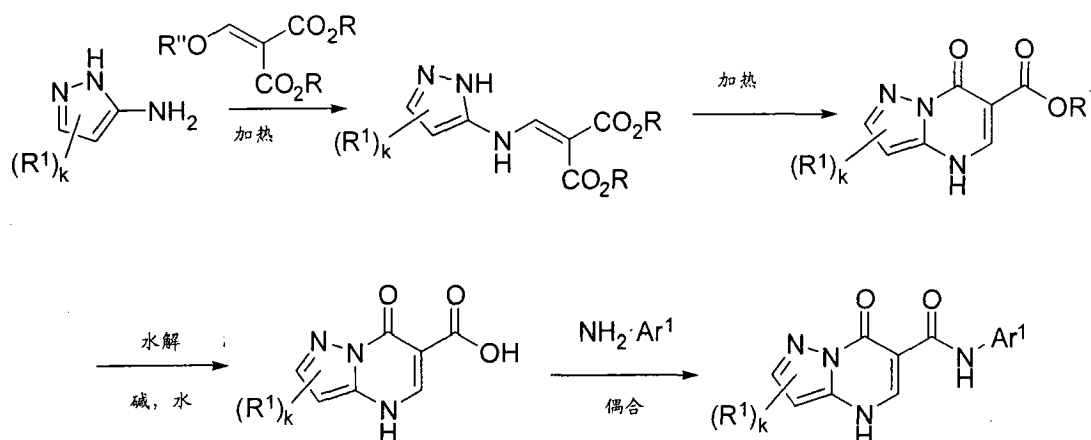
[0282] LC/MS (10-99% CH_3CN /0.05% TFA 的水溶液 /0.05% TFA 梯度, 3min 内): M+H m/z 410.5, 保留时间 2.24 分钟。

[0283] ^1H NMR (400.0MHz, DMSO) δ 13.07 (d, J = 6.6Hz, 1H), 10.72 (s, 1H), 9.20 (s, 1H),

8.55 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.11 (d, $J = 1.7\text{Hz}$, 1H), 2.59 (q, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 1.36 (s, 18H) 和 1.22 (t, $J = 7.5\text{Hz}$, 3H)。

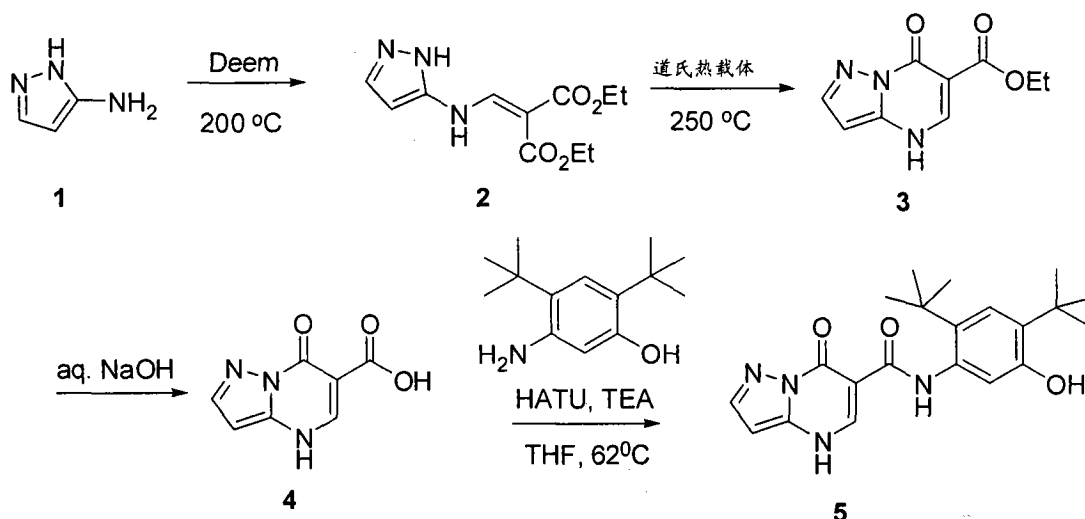
[0284] 合成路线 2

[0285]



[0286] 实施例 2: N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-7-氧代-4,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-甲酰胺 (化合物 5, 表 1) 的制备

[0287]



[0288] 将 1H-吡唑-5-胺 1 (2g, 24.1mmol) 和 2-(乙氧基亚甲基)丙二酸二乙酯 (10.4g, 48.2mmol) 的混合物在 200℃ 加热至原料完全耗尽。将该反应混合物冷却至室温, 加入 EtOH (10mL)。形成沉淀, 通过过滤除去沉淀, 用 EtOH 洗涤, 真空干燥, 得到 2-((1H-吡唑-5-基氨基)亚甲基)丙二酸二乙酯; 4.0g (66%)。

[0289] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 10.95 (d, $J = 13.5\text{Hz}$, 1H), 8.60 (d, $J = 13.8\text{Hz}$, 1H), 7.52 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.08 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 4.30 (q, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 4.22 (q, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.36 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.31 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0290] 将 2-((1H-吡唑-5-基氨基)亚甲基)丙二酸二乙酯 (4.0g, 15.8mmol) 在道氏热载体 (15mL) 中的溶液加热至 250℃ 2 小时。将该反应混合物冷却至室温, 向该混合物中加入 DMF/EtOH (10mL, 1/1, v/v), 过滤形成的沉淀, 用 EtOH 洗涤, 真空干燥, 得到 7-氧代-4,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-甲酸乙酯; 1.9g (58%)。

[0291] ^1H NMR (300MHz, DMSO) δ 13.01 (brs, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H),

6.30(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 4.22(q, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.27(t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0292] 将 7-氧代-4,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-甲酸乙酯(1.9g, 9.2mmol) 在 10% NaOH 水溶液(12mL, 30.0mmol) 中的混悬液回流 2 小时。将该反应混合物冷却至室温;将该溶液用 6M HCl 酸化至 pH 3-4。过滤形成的沉淀,用水洗涤,干燥,得到 7-氧代-4,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-甲酸;1.6g(97%)。

[0293] ^1H NMR(300MHz, DMSO) δ 8.53(s, 1H), 7.94(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 6.32(d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H)。

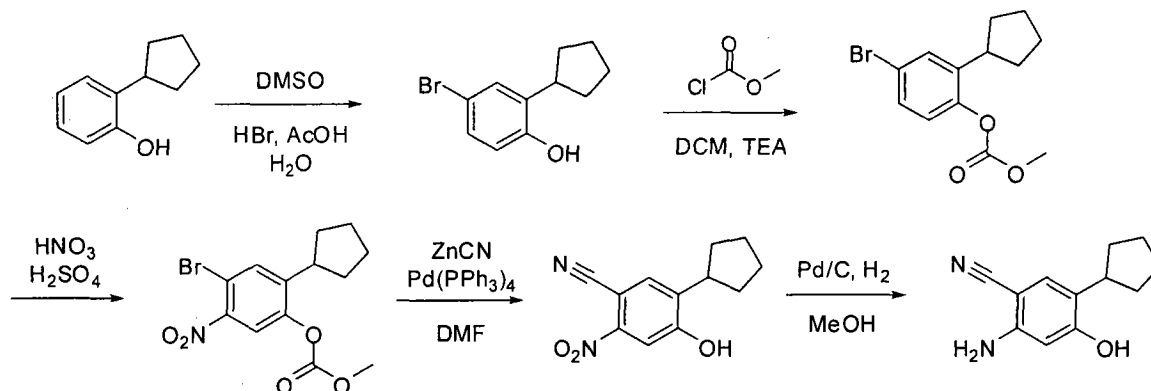
[0294] MS(ESI) m/z : 177.9[M-H] $^-$ 。

[0295] 向装有 7-氧代-4,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-甲酸(50mg, 0.28mmol) 和 HATU(117mg, 0.31mmol) 的小瓶中加入 2mL THF, 然后加入三乙胺(85mg, 0.84mmol)。将该反应混合物在室温搅拌 10 分钟, 此时加入 5-氨基-2,4-二叔丁基苯酚(62mg, 0.28mmol), 将该反应体系在 65°C 加热 16h。16h 后, 将该反应体系冷却至室温, 真空除去溶剂。通过反相 HPLC(10% -99% CH_3CN (0.035% TFA)/ H_2O (0.05% TFA)) 纯化残余物。LC/MS(10-99% CH_3CN /0.05% TFA 的水溶液/0.05% TFA 梯度, 3min 内), 得到 N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-7-氧代-4,7-二氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-甲酰胺; M+H m/z 383.3, 保留时间 1.71 分钟。

[0296] ^1H NMR(400.0MHz, DMSO) δ 13.48(s, 1H), 10.68(s, 1H), 9.24(s, 1H), 8.78(s, 1H), 8.06(d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 7.17(s, 1H), 7.13(s, 1H), 6.41(d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 1.36(d, $J = 4.5\text{Hz}$, 18H)。

[0297] **实施例 3: 2-氨基-5-环戊基-4-羟基苄腈的合成**

[0298]



[0299] 向搅拌的 2-环戊基苯酚(7.9g, 48.7mmol) 在乙酸(32mL) 和水(16mL) 中的溶液中加入 HBr(33% 的 AcOH 溶液, 50.45mL, 292.2mmol), 然后在 10min 内滴加 DMSO(34.8g, 31.6mL, 445.0mmol)。用饱和 NaHCO_3 水溶液使反应停止, 真空浓缩以除去气体。将残余物溶于乙醚(200mL), 用水(2x100mL) 和盐水(100mL) 洗涤, 然后用 Na_2SO_4 干燥。过滤该溶液, 真空浓缩, 得到油状物, 通过硅胶色谱法纯化(0-10% 乙酸乙酯/己烷), 得到 4-溴-2-环戊基苯酚(10.5g, 89% 收率), 为无色油状物。

[0300] ^1H NMR(400.0MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.59(s, 1H), 7.20(d, $J = 2.5\text{Hz}$, 1H), 7.13(dd, $J = 2.5, 8.5\text{Hz}$, 1H), 6.73(d, $J = 8.5\text{Hz}$, 1H), 3.21-3.13(m, 1H), 1.95-1.88(m, 2H), 1.77-1.69(m, 2H), 1.65-1.44(m, 4H)。

[0301] 将 4-溴-2-环戊基苯酚(10.0g, 41.47mmol) 和 DMAP(253mg, 2.07mmol) 溶于二氯

甲烷 (50mL) 和三乙胺 (11.6mL, 82.94mmol), 冷却至 0℃, 用氯甲酸甲酯 (4.8mL, 62.20mmol) 处理。将该反应体系在 2h 内温热至室温。用水使反应停止, 分离各层, 用二氯甲烷再萃取水层。用 Na₂SO₄ 干燥合并的有机萃取物, 过滤, 真空浓缩, 得到油状物, 通过硅胶色谱法纯化 (20% 乙酸乙酯 / 己烷), 得到 4- 溴 -2- 环戊基苯基甲基碳酸酯 (10.5g, 85% 收率)。

[0302] ¹H NMR (400.0MHz, DMSO-d₆) δ 7.52 (d, J = 2.4Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 2.4, 8.6Hz, 1H), 7.22-7.17 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.07-2.98 (m, 1H), 1.95-1.88 (m, 2H), 1.79-1.71 (m, 2H), 1.66-1.46 (m, 4H)。

[0303] 将浓 H₂SO₄ (115mL) 加入到 4- 溴 -2- 环戊基苯基甲基碳酸酯 (26.09g, 87.21mmol) 中, 搅拌该混合物, 冷却至 -10℃。然后在持续搅拌的同时逐份加入 KNO₃ (13.22g, 130.80mmol)。将该反应体系在 -10℃ 搅拌 1h, 然后用冰使反应停止, 得到沉淀, 为灰白色固体。过滤固体, 用水洗涤, 干燥至得到产物。用二氯甲烷 (3x10mL) 萃取水相, 用 Na₂SO₄ 干燥合并的有机萃取物。通过硅胶色谱法纯化 (5-20% 乙酸乙酯 / 己烷), 得到另外的 4- 溴 -2- 环戊基 -5- 硝基苯基甲基碳酸酯 (合并为 21.72g, 72% 收率)。

[0304] ¹H NMR (400.0MHz, DMSO-d₆) δ 8.12 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 3.88 (d, J = 5.7Hz, 3H), 3.13 (dd, J = 9.4, 17.2Hz, 1H), 1.96-1.92 (m, 2H), 1.80-1.75 (m, 2H), 1.68-1.54 (m, 4H)。

[0305] 在 N₂ 气氛下, 向装有 4- 溴 -2- 环戊基 -5- 硝基苯基甲基碳酸酯 (102mg, 0.29mmol)、氰化锌 (35mg, 0.30mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (21mg, 0.02mmol) 的微波小瓶中加入 DMF (500 μL)。将该反应体系在 130℃、在微波照射下加热 30min。用饱和 Na₂CO₃ 水溶液使反应停止, 用乙酸乙酯 (3x10mL) 萃取。用 Na₂SO₄ 干燥合并的有机萃取物, 过滤, 真空浓缩, 得到褐色油状物。通过硅胶色谱法纯化 (0-15% 乙酸乙酯 / 己烷), 得到 5- 环戊基 -4- 羟基 -2- 硝基苄腈, 为浅黄色固体 (40mg, 58% 收率)。

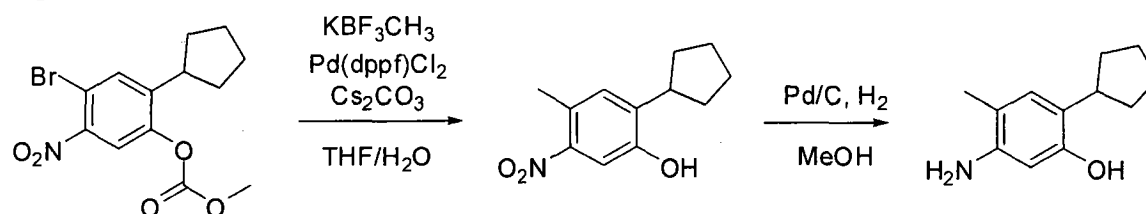
[0306] ¹H NMR (400.0MHz, DMSO-d₆) δ 11.62 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 3.29-3.24 (m, 1H), 1.99-1.93 (m, 2H), 1.78-1.76 (m, 2H), 1.66-1.57 (m, 4H)。

[0307] 将装有 10% Pd/C (4mg) 的烧瓶抽真空, 置于 N₂ 气氛中, 混悬于乙醇 (2mL)。向其中加入 5- 环戊基 -4- 羟基 -2- 硝基苄腈 (42mg, 0.18mmol) 的乙醇溶液 (1.5mL)。将该反应体系在 H₂ 气氛下搅拌 2h, 然后过滤, 真空浓缩, 得到 2- 氨基 -5- 环戊基 -4- 羟基苄腈, 为黄色油状物 (36mg, 定量收率)。

[0308] M+H m/z 203.1。

[0309] **实施例 4**: 5- 氨基 -2- 环戊基 -4- 甲基苯酚的合成

[0310]



[0311] 向装有 4- 溴 -2- 环戊基 -5- 硝基苯基甲基碳酸酯 (500mg, 1.45mmol)、Pd(dppf)Cl₂ (96mg, 0.13mmol)、钾三氟 - 甲基 - 硼 (177mg, 1.45mmol) 和碳酸铯 (1420mg, 4.36mmol) 的微波试管中加入四氢呋喃 (2.5mL) 和水 (1.25mL)。在微波照射下, 将该反应体系在 110℃ 加热 35min。使该反应体系分配在乙酸乙酯与水之间。分离有机层, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩, 得到褐色油状物。通过硅胶色谱法纯化 (0-6% 乙酸乙酯 / 己烷), 得到 2- 环戊基 -5- 氨基 -4- 甲基苯酚 (36mg, 定量收率)。

基-4-甲基-5-硝基-苯酚 (167mg, 52% 收率)。

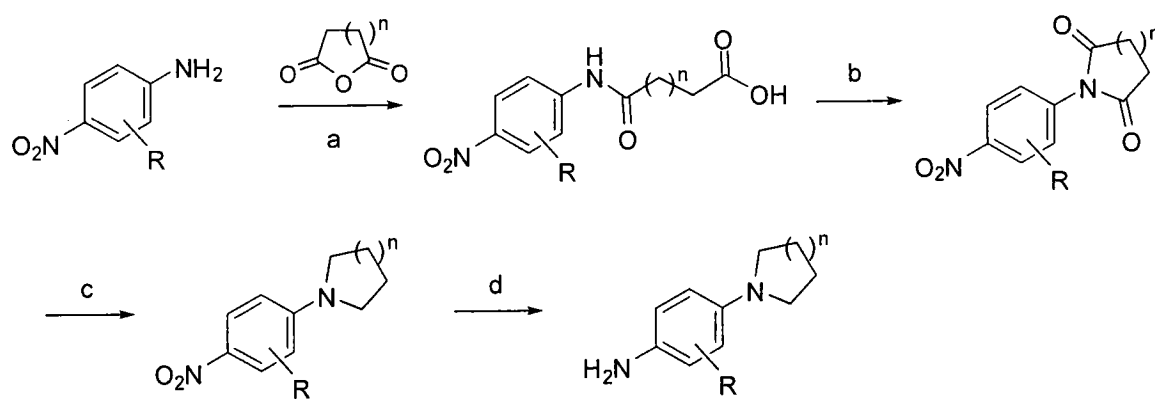
[0312] ^1H NMR (400.0MHz, DMSO- d_6) δ 10.08 (s, 1H), 7.43-7.38 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 3.28-3.21 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.80-1.51 (m, 6H)。

[0313] 将装有 10% Pd/C (16mg) 的烧瓶抽真空, 置于 N_2 气氛。向其中加入 2-环戊基-4-甲基-5-硝基-苯酚 (160mg, 0.72mmol) 的甲醇溶液 (3mL)。将该反应体系在 H_2 气氛下搅拌 4h, 然后过滤, 真空浓缩, 得到 5-氨基-2-环戊基-4-甲基苯酚, 为浅褐色固体 (130mg, 94% 收率)。

[0314] ^1H NMR (400.0MHz, DMSO- d_6) δ 8.47 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.02 (dd, $J = 2.4, 17.2\text{Hz}$, 1H), 1.91 (s, 3H), 1.84-1.77 (m, 2H), 1.71-1.66 (m, 2H), 1.58-1.54 (m, 2H), 1.44-1.39 (m, 2H)。

[0315] 合成路线 4

[0316]

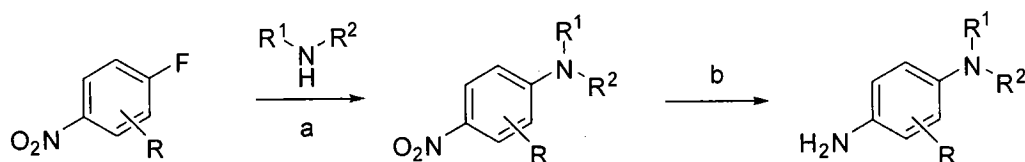


[0317] a) 甲苯, 回流; b) Ac_2O , NaOAc , 加热; c) BH_3 , THF, 加热; d) Pd/C, H_2 ,

[0318] MeOH. $n = 1, 2$ 或 3

[0319] 合成路线 5

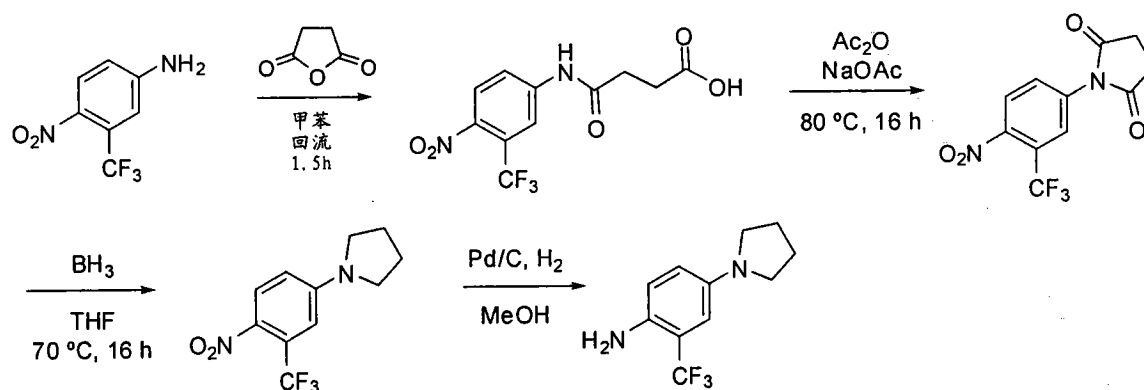
[0320]



[0321] a) CH_3CN , Et_3N , 加热或 DMSO, Na_2CO_3 , 加热; b) Pd/C, H_2 , EtOH; g) HATU, Et_3N , DMF 或丙基膦酸环酐 (T3P®), 吡啶, 2-甲基四氢呋喃。

[0322] 实施例 5: 4-(吡咯烷-1-基)-2-(三氟甲基)苯胺的合成

[0323]



[0324] 向 4-硝基-3-(三氟甲基)苯胺 (2.0g, 9.7mmol) 的甲苯 (30mL) 溶液中加入四氢呋喃-2,5-二酮 (1.2g, 11.6mmol), 将该混合物回流 1.5h。冷却该反应混合物, 过滤, 用乙醚洗涤固体, 得到 4-(4-硝基-3-(三氟甲基)苯基氨基)-4-氧代丁酸 (1.1g, 39% 收率)。

[0325] M+H m/z 307.3

[0326] 将 4-(4-硝基-3-(三氟甲基)苯基氨基)-4-氧代丁酸 (1.1g, 3.6mmol) 和 NaOAc (1.6g, 19.7mmol) 在乙酐 (15mL) 中的溶液在 80℃ 搅拌 16h。冷却该反应体系, 过滤。用水稀释滤液, 用二氯甲烷萃取。用 1N NaOH 洗涤合并的有机层, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩, 得到 1-(4-硝基-3-(三氟甲基)苯基)吡咯烷-2,5-二酮 (0.4g, 39% 收率)。

[0327] M+H m/z 289.1

[0328] 向 1-(4-硝基-3-(三氟甲基)苯基)吡咯烷-2,5-二酮 (400mg, 1.39mmol) 的 THF (10mL) 溶液中滴加 BH₃ (1.39mL 的 1M THF 溶液, 1.39mmol)。然后将该反应混合物在 N₂ 气氛下回流 16h。冷却该反应体系, 用甲醇使反应停止, 真空浓缩, 得到 1-(4-硝基-3-(三氟甲基)苯基)吡咯烷, 为黄色固体 (360mg, 定量收率)。

[0329] M+H m/z 261.1

[0330] 在惰性气体气氛下, 向装有 10% Pd/C (50mg) 的烧瓶中加入 1-(4-硝基-3-(三氟甲基)苯基)吡咯烷 (350mg, 1.34mmol) 的乙醇溶液。将该反应体系在 H₂ 气氛下搅拌 16h, 然后过滤, 干燥至得到 4-(吡咯烷-1-基)-2-(三氟甲基)苯胺 (300mg, 97% 收率)。

[0331] M+H m/z 231.3

[0332] ¹H NMR (400.0MHz, DMSO-d₆) δ 6.84 (d, J = 8.8Hz, 1H), 6.72 (dd, J = 2.5, 8.8Hz, 1H), 6.53 (d, J = 2.7Hz, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.18 (m, 4H), 1.99-1.95 (m, 4H)。

[0333] 下表 2 中举出的是根据上述实施例制备的本发明化合物的表征数据。

[0334] 表 2

[0335]

化合物 #	LC/MS M+1	LC/RT min	NMR
1	397.50	1.74	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.32 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.16 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.25 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.36 (s, 9H)
2	350.40	1.48	¹ H NMR (400.0 MHz, DMSO) δ 13.47 (s, 1H), 11.10 (s, 1H), 10.75 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.07 (d, J = 2 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 1.7, 1H), 7.66 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.02 (dd, J = 1.8, 8.6 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.41 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 1.39 (s, 9H)
3	433.20	2.10	
4	364.30	1.40	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.31 (s, 1H), 10.96 (s, 1H), 10.80 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.58 (d, J = 12.3 Hz, 2H), , 7.31 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.44 (s, 9H)
5	383.30	1.71	
6	350.50	1.35	
7	389.30	1.95	¹ H NMR (400.0 MHz, DMSO) δ 13.13 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 11.83 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 11.36 (s, 1H), 8.57 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.20-7.17 (m, 1H), 6.13 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 2.60 (d, J = 7.5 Hz, 2H) 和 1.22 (t, J = 7.5 Hz, 3H)
8	362.20	1.29	
9	377.50	2.09	¹ H NMR (400.0 MHz, DMSO) δ 13.07 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 11.22 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 8.55 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.99-6.96 (m, 2H), 6.11 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 2.63-2.57 (q, 2H), 1.39 (s, 9H) 和 1.22 (t, J = 7.5 Hz, 3H)

[0336]

化合物 #	LC/MS M+1	LC/RT min	NMR
10	308.30	2.17	
11	389.10	1.72	
12	412.20	2.54	
13	392.30	1.48	
14	410.50	2.24	¹ H NMR (400.0 MHz, DMSO) δ 13.07 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 10.72 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.55 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.11 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 2.59 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.36 (s, 18H) 和 1.22 (t, J = 7.5 Hz, 3H)
15	398.20	2.10	¹ H NMR (400.0 MHz, DMSO) δ 13.14 (s, 1H), 11.37 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 9.38 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.02 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.99 (d, J = 13.8 Hz, 1H), 6.09 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.12–2.07 (m, 2H), 1.60–1.51 (m, 2H), 1.42–1.36 (m, 6H) 和 1.25 (s, 3H)
16	420.30	2.06	¹ H NMR (400.0 MHz, DMSO) δ 13.14 (s, 1H), 11.40 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.08 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 3.20–3.16 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.94 (d, J = 5.0 Hz, 2H) 和 1.77–1.51 (m, 6H)
17	375.10	1.70	¹ H NMR (400.0 MHz, DMSO) δ 13.12 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 11.83 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 11.35 (s, 1H), 8.56 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.91 (t, J = 1.3 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.19 (dd, J = 1.8, 8.6 Hz, 1H), 6.09 (d, J = 1.8 Hz, 1H) 和 2.22 (s, 3H)
18	366	1.85	¹ H NMR (400.0 MHz, DMSO- d_6) δ 13.07 (s, 1H), 11.02 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.07 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.17–3.12 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.92–1.86 (m, 2H), 1.76–1.73 (m, 2H), 1.62–1.48 (m, 4H)
19	377	1.76	

[0337] 用于检测和测量化合物的 Δ F508-CFTR 增强作用的分析[0338] 用于测定化合物的 Δ F508-CFTR 调节性质的光学膜电位法

[0339] 该分析利用荧光电压传感染料,使用荧光板读数器(例如 FLIPR III, Molecular Devices, Inc.)测定跨膜电位的改变,以作为 NIH 3T3 细胞中功能性 $\Delta F508$ -CFTR 增加的读出值。对该响应的驱动力在于,在预先用化合物处理细胞、然后加载电压传感染料后,通过单独液体添加步骤产生的与通道活化相关的氯离子梯度。

[0340] 增强剂化合物的鉴定

[0341] 为了鉴定 $\Delta F508$ -CFTR 增强剂,研发了双重添加 HTS 分析形式。该 HTS 分析使用荧光电压传感染料以测定 FLIPR III 上跨膜电位的改变,以作为温度校准的 $\Delta F508$ CFTR NIH 3T3 细胞中 $\Delta F508$ CFTR 门控(传导)增加的测量值。对该响应的驱动力在于,在预先用增强剂化合物(或 DMSO 媒介物对照品)处理细胞、然后加载再分布染料后,在使用荧光板读数器例如 FLIPR III 的单独液体添加步骤中使用福司柯林产生的与通道活化相关的 Cl^- 离子梯度。

[0342] 溶液

[0343] 浴溶液 #1:(以 mM 计)NaCl 160, KCl 4.5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, pH 7.4, 含有 NaOH。

[0344] 不含氯离子的浴溶液:用葡糖酸盐置换浴溶液 #1 中的盐酸盐

[0345] 细胞培养

[0346] 将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于膜电位的光学测量。将细胞维持在 $37^\circ C$ 、5% CO_2 和 90%湿度下的 $175cm^2$ 培养烧瓶中的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基内,该培养基含有 2mM 谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X 青霉素/链霉素、和 25mM HEPES。为了进行全部光学分析,将细胞以 $\sim 20,000$ /孔接种在 384-孔的涂覆基质胶的培养板上,在 $37^\circ C$ 培养 2h,然后在 $27^\circ C$ 培养 24h,以进行增强剂分析。为了进行校准分析,在 $27^\circ C$ 或 $37^\circ C$,在化合物存在和不存在的条件下,培养细胞 16-24 小时。

[0347] 用于分析化合物的 $\Delta F508$ -CFTR 调节特性的电生理分析

[0348] 1. Ussing 室分析

[0349] 对表达 $\Delta F508$ -CFTR 的极化呼吸道上皮细胞进行 Ussing 室实验,以进一步表征在光学测定法中鉴定的 $\Delta F508$ -CFTR 调节剂。从支气管组织中分离非-CF 和 CF 呼吸道上皮,如上所述进行培养 (Galiotta, L. J. V., Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, G. A., & Zegarra-Moran, O. (1998) In Vitro Cell. Dev. Biol. 34, 478-481), 铺板在用 NIH3T3-条件培养基预涂覆的 Costar® Snapwell™ 过滤器上。4 天后,除去顶部培养基,使细胞在空气液体界面上生长 > 14 天,然后使用。这产生了单层的完全分化的柱状细胞,它们具有纤毛、并且具有呼吸道上皮的特征。从已知没有任何肺病的不吸烟者中分离非-CF HBE。从 $\Delta F508$ -CFT 纯合的患者中分离 CF-HBE。

[0350] 将生长在 Costar® Snapwell™ 细胞培养嵌入物上的 HBE 装配在 Ussing 室 (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA) 上,使用电压钳系统 (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA) 测定在从基底外侧到顶膜的 Cl^- 梯度 (I_{sc}) 的存在下的经上皮的电阻和短路电流。简言之,在电压钳记录条件下 ($V_{保持} = 0mV$)、在 $37^\circ C$ 检测 HBE。基底外侧的溶液包含(以 mM 计) 145NaCl、0.83 K_2HPO_4 、3.3 KH_2PO_4 、1.2 $MgCl_2$ 、1.2 $CaCl_2$ 、10 葡萄糖、10HEPES(用 NaOH 将 pH 调整至 7.35), 顶膜的溶液包含(以 mM 计) 145 葡糖酸钠、1.2 $MgCl_2$ 、1.2 $CaCl_2$ 、10 葡萄糖、10HEPES(用 NaOH 将 pH 调整至 7.35)。

[0351] 增强剂化合物的鉴定

[0352] 典型的方案是使用基底外侧膜至顶膜的 Cl^- 浓度梯度。为了产生该梯度,在基底外侧膜上使用标准的林格液,另外,通过用等摩尔的葡糖酸钠(用 NaOH 滴定至 pH 7.4)代替顶膜的 NaCl,以得到跨上皮的大幅的 Cl^- 浓度梯度。将福司柯林($10\text{ }\mu\text{M}$)和所有受试化合物加入到细胞培养嵌入物的两侧。对推定的 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 增强剂与已知增强剂染料木黄酮的效果进行比较。

[0353] 2. 膜片钳记录

[0354] 如上所述使用穿孔的膜片记录装置监测 $\Delta\text{F508-NIH3T3}$ 细胞中的总 Cl^- 电流(Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) J. Neurosci. Methods 37, 15-26)。使用 Axopatch 200B 膜片钳放大器(Axon Instruments Inc., Foster City, CA)在 22°C 进行电压钳记录。移液管溶液包含(以 mM 计)150N-甲基-D-葡糖胺(NMDG)-Cl、 2MgCl_2 、 2CaCl_2 、10EGTA、10HEPES 和 $240\text{ }\mu\text{g/ml}$ 两性霉素-B(用 HCl 将 pH 调整至 7.35)。细胞外培养基包含(以 mM 计)150NMDG-Cl、 2MgCl_2 、 2CaCl_2 、10HEPES(用 HCl 将 pH 调整至 7.35)。使用安装了 Digidata 1320 A/D 界面与 Clampex 8(Axon Instruments Inc.)的 PC 进行脉冲发生、数据采集和分析。为了活化 $\Delta\text{F508-CFTR}$,向溶液中加入 $10\text{ }\mu\text{M}$ 福司柯林和 $20\text{ }\mu\text{M}$ 染料木黄酮,每隔 30 秒监测一次电流-电压相关性。

[0355] 增强剂化合物的鉴定

[0356] 还使用穿孔膜片记录技术研究了 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 增强剂在稳定表达 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 的 NIH3T3 细胞中增加宏观 $\Delta\text{F508-CFTR}$ Cl^- 电流($I_{\Delta\text{F508}}$)的能力。从光学测定法中鉴定的增强剂以在光学测定法中观察到的类似效力和功效,使 $I_{\Delta\text{F508}}$ 剂量依赖性增加。在所有检验的细胞中,应用增强剂之前和应用过程中的逆转电位约为 -30mV ,其是计算的 E_{Cl} (-28mV)。

[0357] 细胞培养

[0358] 将稳定表达 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于全细胞记录。将细胞维持在 37°C 、 $5\%\text{ CO}_2$ 和 90% 湿度下的 175cm^2 培养烧瓶中的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基内,该培养基含有 2mM 谷氨酰胺、 10% 胎牛血清、 1X NEAA、 β -ME、 1X 青霉素/链霉素、和 25mM HEPES。为了进行全细胞记录,将 $2,500$ – $5,000$ 个细胞接种在涂覆聚-L-赖氨酸的玻璃盖玻片上,并且在 27°C 培养 24 – 48h 后用于测试增强剂的活性;且在存在或不存在校准化合物的情况下,在 37°C 下进行孵育,以测定校准物的活性。

[0359] 3. 单通道记录

[0360] 如上所述使用切下的膜内侧翻外膜片记录(Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R. G., Pavirani, A., Lecocq, J.-P., Lazdunski, M. (1991) Nature 354, 526-528)、采用 Axopatch 200B 膜片钳放大器(Axon Instruments Inc.)观察在 NIH3T3 细胞中表达的 wt-CFTR 的门控活性和温度校准的 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 。移液管包含(以 mM 计):150NMDG、150 天冬氨酸、 5CaCl_2 、 2MgCl_2 和 10HEPES(用 Tris 碱将 pH 调整至 7.35)。浴液包含(以 mM 计):150NMDG-Cl、 2MgCl_2 、5EGTA、10TES 和 14Tris 碱(用 HCl 将 pH 调整至 7.35)。切除后,通过添加 1mM Mg-ATP、 75nM 催化亚单位的 cAMP-依赖性蛋白激酶(PKA; Promega Corp. Madison, WI)和 10mM NaF,以抑制蛋白磷酸酶,活化 wt-CFTR 和 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 。这阻止了电流下降。将移液管电位维持在 80mV 。由包含 ≤ 2 个活性通道的膜片分析通道活性。同时开放的最大数量确定了实验过程中活性通

道的数量。为了测定单通道电流振幅,在 100Hz “离线”过滤从 120 秒的 $\Delta F508$ -CFTR 活性记录的数据,用于构建所有点的振幅直方图,使用 Bio-Patch 分析软件 (Bio-Logic Comp. France) 拟合多个高斯函数。从 120 秒的通道活性确定总微观电流和开放概率 (P_o)。使用 Bio-Patch 软件或根据 $P_o = I/i(N)$ 的关系式确定 P_o ,其中 I = 平均电流, i = 单通道电流振幅, N = 膜片中活性通道的数量。

[0361] 细胞培养

[0362] 将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于切下的膜片钳记录。将细胞维持在 37℃、5% CO_2 和 90% 湿度下的 175cm² 培养烧瓶中的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基内,该培养基含有 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X 青霉素 / 链霉素、和 25mM HEPES。为了进行单通道记录,将 2,500-5,000 个细胞接种在涂覆聚-L-赖氨酸的玻璃盖玻片上,并在 27℃ 培养 24-48h 后使用。

[0363] 本发明的化合物用作 ATP 结合盒转运体的调节剂。本发明化合物的活性和效力的实例如下表 3 所示。如果测定的活性小于 5.0 μM ,则化合物活性以“+++”表示;如果测定的活性为 5 μM -20.0 μM ,则化合物活性以“++”表示;如果测定的活性大于 20.0 μM ,则化合物活性以“+”表示;如果未测得数据,则化合物活性以“-”表示。如果所计算的效力大于 100%,则效力以“+++”表示;如果所计算的效力为 100% -25%,则效力以“++”表示;如果所计算的效力小于 25%,则效力以“+”表示;如果未测得数据,则效力以“-”表示。予以说明,100%效力是使用 4-甲基-2-(5-苯基-1H-吡唑-3-基)苯酚获得的最大响应。

[0364] 表 3

[0365]

化合物编号	活性 EC_{50} (μm)	%效力
1	+++	++
2	+++	+++
3	+++	++
4	+++	++
5	+++	++
6	+++	++
7	+++	++
8	+++	++
9	+++	++
10	+	++

11	+++	++
12	++	++
13	++	++
14	+++	++
15	+++	++
16	+++	++
17	+++	++
18	+++	++
19	+++	++