



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114096250 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 14

(21) 申请号 202080049199.0
(22) 申请日 2020.05.20
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 114096250 A
(43) 申请公布日 2022.02.25
(30) 优先权数据
 62/850,061 2019.05.20 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2022.01.04
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2020/033746 2020.05.20
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02020/236901 EN 2020.11.26
(73) 专利权人 匹兹堡大学 联邦高等教育系统
 地址 美国宾夕法尼亚州
(72) 发明人 马小超 朱俊杰 吕杰
(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
 专利代理师 张志楠 李栋修
(51) Int.Cl.
 A61K 31/505 (2006.01)
 A61K 31/517 (2006.01)
 A61P 1/16 (2006.01)
 C12N 9/14 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 106191061 A, 2016.12.07
 US 2017151339 A1, 2017.06.01
 WO 2019060742 A1, 2019.03.28
 Sheng Zhou et al. Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. 《BLOOD》. 2005, 第105卷第2571-2576页.
 审查员 曲聪

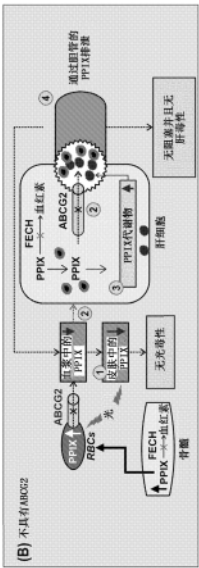
权利要求书9页 说明书62页
序列表5页 附图21页

(54) 发明名称

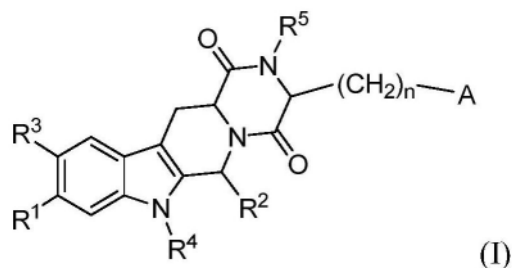
红细胞生成性原卟啉症 (EPP) 和X连锁原卟啉症 (XLP) 的疗法

(57) 摘要

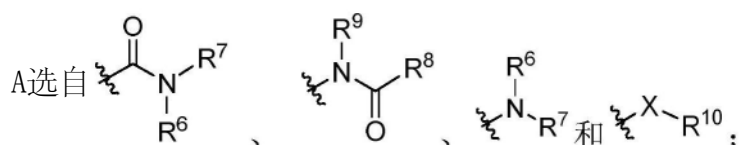
本文公开了用于治疗红细胞生成性原卟啉症 (EPP) 和X连锁原卟啉症 (XLP) 的新型组合物及其使用方法。公开了涉及治疗红细胞生成性原卟啉症和X连锁原卟啉症的方法和组合物。还描述了可以抑制ABCG2的治疗剂。例如, 本文提供了由式I定义的治疗剂。



1. 抑制ABCG2活性的治疗剂在制备用于治疗、预防、减少或抑制受试者的红细胞生成性原卟啉症 (EPP) 的药物中的应用, 其中所述治疗剂是由下式I表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中



n是1至4的整数;

X, 当存在时, 是O或S;

R¹是卤素或OR^a;

R²是C₁₋₆烷基;

R³是氢或甲基;

R⁴和R⁵各自是H;

R⁶和R⁷各自独立地选自由以下组成的组: H、C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团, 或者R⁶和R⁷与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基, 其是未经取代的或取代有1、2或3个R^A基团;

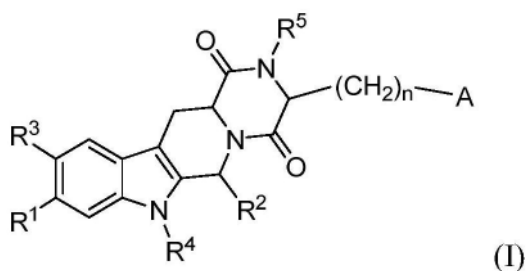
R⁸和R⁹独立地选自由以下组成的组: H、C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团, 或者R⁸和R⁹与它们所连接的原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基, 其是未经取代的或取代有1、2或3个R^A基团;

R¹⁰选自由以下组成的组: C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团;

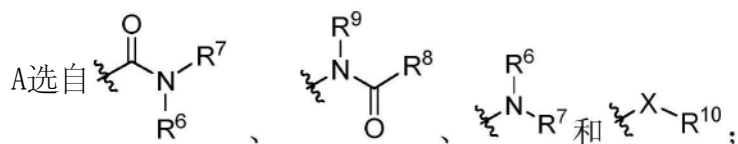
R^a选自H、C₁₋₆烷基、C₁₋₄卤代烷基和C₃₋₁₀环烷基; 并且

各R^A独立地选自OH、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₄卤代烷基和C₁₋₄烷氧基。

2. 抑制ABCG2活性的治疗剂在制备用于治疗、预防、减少或抑制受试者的X连锁原卟啉症 (XLP) 的药物中的应用, 其中所述治疗剂是由下式I表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中



n 是1至4的整数;

X , 当存在时, 是O或S;

R^1 是卤素或 OR^a ;

R^2 是 C_{1-6} 烷基;

R^3 是氢或甲基;

R^4 和 R^5 各自是H;

R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组: H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团, 或者 R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基, 其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

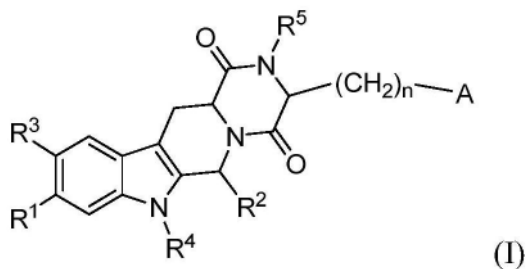
R^8 和 R^9 独立地选自由以下组成的组: H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团, 或者 R^8 和 R^9 与它们所连接的原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基, 其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

R^{10} 选自由以下组成的组: C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团;

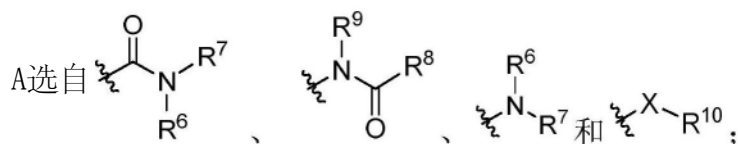
R^a 选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{3-10} 环烷基; 并且

各 R^A 独立地选自OH、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{1-4} 烷氧基。

3. 抑制ABCG2活性的治疗剂在制备用于减少受试者的红细胞或肝细胞的PPIX流出的药物中的应用, 其中所述治疗剂是由下式I表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中



n是1至4的整数;

X, 当存在时, 是O或S;

R¹是卤素或OR^a;

R²是C₁₋₆烷基;

R³是氢或甲基;

R⁴和R⁵各自是H;

R⁶和R⁷各自独立地选自由以下组成的组: H、C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团, 或者R⁶和R⁷与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基, 其是未经取代的或取代有1、2或3个R^A基团;

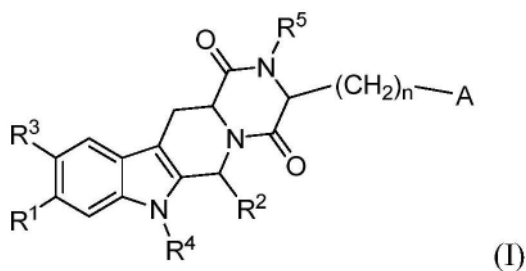
R⁸和R⁹独立地选自由以下组成的组: H、C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团, 或者R⁸和R⁹与它们所连接的原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基, 其是未经取代的或取代有1、2或3个R^A基团;

R¹⁰选自由以下组成的组: C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团;

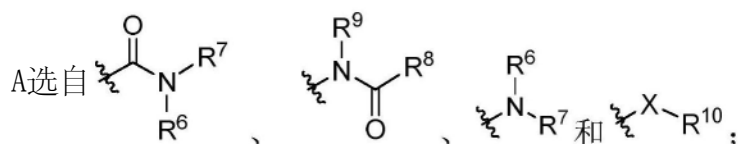
R^a选自H、C₁₋₆烷基、C₁₋₄卤代烷基和C₃₋₁₀环烷基; 并且

各R^A独立地选自OH、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₄卤代烷基和C₁₋₄烷氧基。

4. 抑制ABCG2活性的治疗剂在制备用于治疗、预防、减少或抑制患有红细胞生成性原卟啉症 (EPP) 和X连锁原卟啉症 (XLP) 的受试者的皮肤中的紫癜、红斑、水肿或烧灼感的药物中的应用, 其中所述治疗剂是由下式I表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中



n是1至4的整数;

X, 当存在时, 是O或S;

R¹是卤素或OR^a;

R²是C₁₋₆烷基;

R^3 是氢或甲基;

R^4 和 R^5 各自是H;

R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团,或者 R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

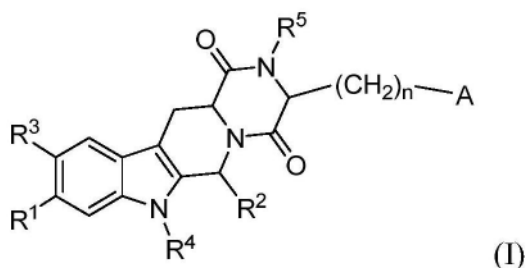
R^8 和 R^9 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团,或者 R^8 和 R^9 与它们所连接的原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

R^{10} 选自由以下组成的组: C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团;

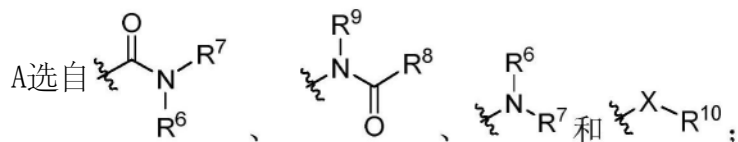
R^A 选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{3-10} 环烷基;并且

各 R^A 独立地选自OH、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{1-4} 烷氧基。

5. 抑制ABCG2活性的治疗剂在制备用于治疗、预防、减少或抑制受试者的肝毒性的药物中的应用,其中所述治疗剂是由下式I表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中



n 是1至4的整数;

X , 当存在时, 是O或S;

R^1 是卤素或 OR^a ;

R^2 是 C_{1-6} 烷基;

R^3 是氢或甲基;

R^4 和 R^5 各自是H;

R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团,或者 R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

R^8 和 R^9 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团,或者 R^8 和 R^9 与它们所连接的原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环

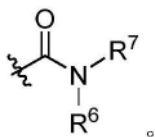
烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

R^{10} 选自自由以下组成的组: C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团;

R^a 选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{3-10} 环烷基;并且

各 R^A 独立地选自OH、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{1-4} 烷氧基。

6.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中,A是



7.如权利要求6所述的应用,其中,n是1或2。

8.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中, R^2 是异丁基。

9.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中, R^3 是氢。

10.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中, R^3 是甲基。

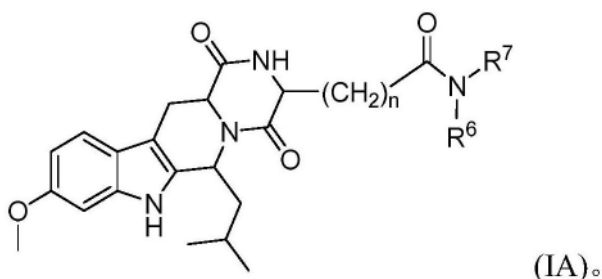
11.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中, R^1 是 OR^a ,其中, R^a 是H或 C_{1-6} 烷基。

12.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中, R^1 是卤素。

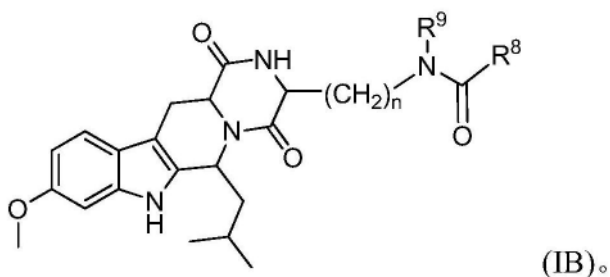
13.如权利要求11所述的应用,其中, R^1 选自自由羟基和 C_{1-4} 烷氧基组成的组。

14.如权利要求13所述的应用,其中, R^1 是甲氧基。

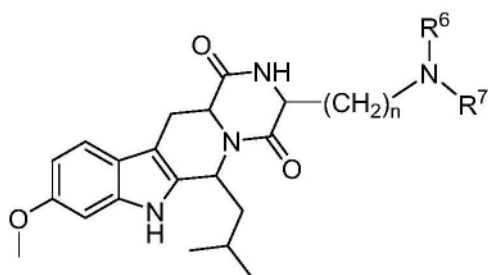
15.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中,所述化合物是由下式IA表示的化合物或其药学上可接受的盐



16.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中,所述化合物是由下式IB表示的化合物或其药学上可接受的盐

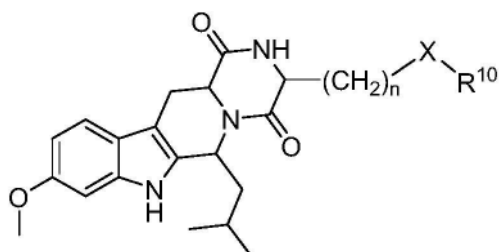


17.如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中,所述化合物是由下式IC表示的化合物或其药学上可接受的盐



(IC)。

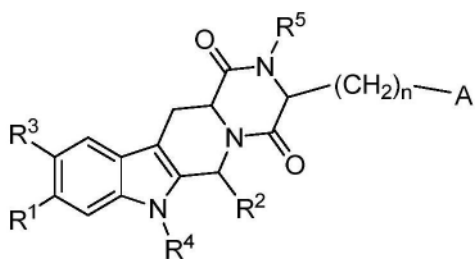
18. 如权利要求1至5中任一项所述的应用,其中,所述化合物是由下式ID表示的化合物或其药学上可接受的盐



(ID)。

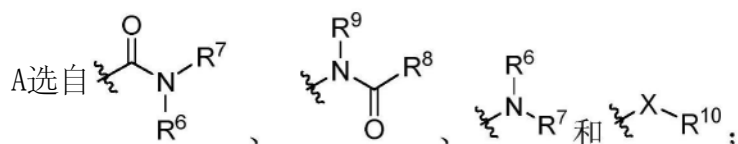
19. 如权利要求18所述的应用,其中,X是O。

20. 一种由下式I表示的化合物,或其药学上可接受的盐:



(I)

其中



n是1至4的整数;

X, 当存在时,是O或S;

R¹是卤素或OR^a;

R²是C₁₋₆烷基;

R³是氢或甲基;

R⁴和R⁵各自是H;

R⁶和R⁷各自独立地选自由以下组成的组:H、C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基,其中,所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团,或者R⁶和R⁷与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个R^A基团;

R⁸和R⁹独立地选自由以下组成的组:H、C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基,其中,所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团,或者R⁸和R⁹

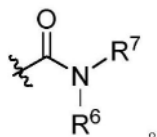
与它们所连接的原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

R^{10} 选自由以下组成的组: C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团;

R^a 选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{3-10} 环烷基;并且

各 R^A 独立地选自OH、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{1-4} 烷氧基。

21.如权利要求20所述的化合物,其中,A是



22.如权利要求20或21所述的化合物,其中,n是1或2。

23.如权利要求20或21所述的化合物,其中, R^2 是异丁基。

24.如权利要求20或21所述的化合物,其中, R^3 是氢。

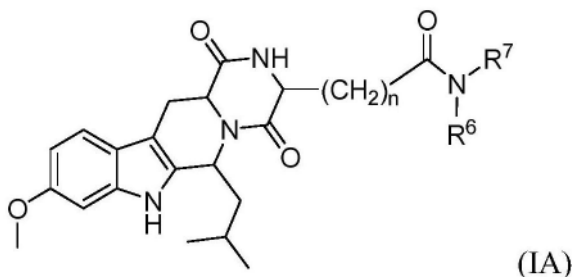
25.如权利要求20或21所述的化合物,其中, R^1 是 OR^a ,并且, R^a 是H或 C_{1-6} 烷基。

26.如权利要求20或21所述的化合物,其中, R^1 是卤素。

27.如权利要求25所述的化合物,其中, R^1 选自由羟基和 C_{1-4} 烷氧基组成的组。

28.如权利要求27所述的化合物,其中, R^1 是甲氧基。

29.一种由下式IA表示的化合物,或其药学上可接受的盐:



其中

n是1至4的整数;

R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团,或者 R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

各 R^A 独立地选自OH、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{1-4} 烷氧基。

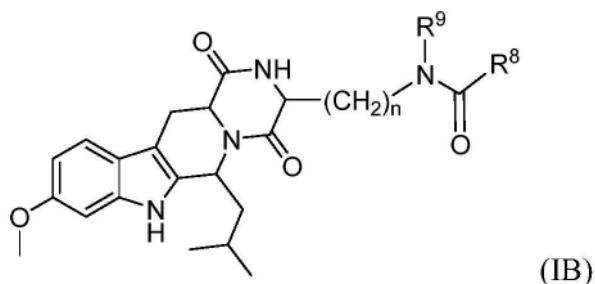
30.如权利要求29所述的化合物,其中,n是1或2。

31.如权利要求20或29所述的化合物,其中, R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基。

32.如权利要求31所述的化合物,其中, R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基和苯基。

33.如权利要求20或29所述的化合物,其中, R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个杂原子的5-6元杂芳基,所述杂原子独立地选自N、S和O。

34. 一种由下式IB表示的化合物,或其药学上可接受的盐:



其中

n是1至4的整数;

R^8 和 R^9 各自独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团,或者 R^8 和 R^9 与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

各 R^A 独立地选自OH、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基和 C_{1-4} 烷氧基。

35. 如权利要求34所述的化合物,其中,n是4。

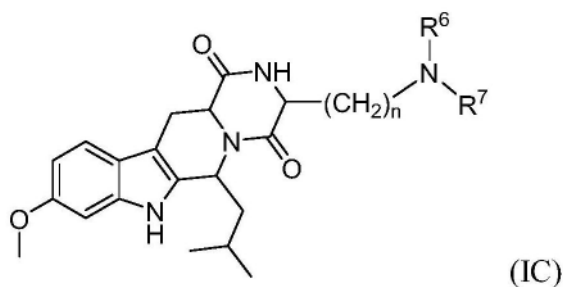
36. 如权利要求20或34所述的化合物,其中, R^9 是氢。

37. 如权利要求20或34所述的化合物,其中, R^8 选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基。

38. 如权利要求37所述的化合物,其中, R^8 和 R^9 各自独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基和苯基。

39. 如权利要求20或34所述的化合物,其中, R^8 和 R^9 与它们所连接的原子一起形成具有另外的0-1个杂原子的5-6元杂芳基,所述杂原子独立地选自N、S和O。

40. 一种由下式IC表示的化合物,或其药学上可接受的盐:



其中:

n是1至4的整数;

R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{3-10} 环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个 R^A 基团,或者 R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个独立地选自N、S和O的杂原子的4-7元杂环烷基,其是未经取代的或取代有1、2或3个 R^A 基团;

各 R^A 独立地选自OH、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基和 C_{1-4} 烷氧基。

41. 如权利要求40所述的化合物,其中,n是4。

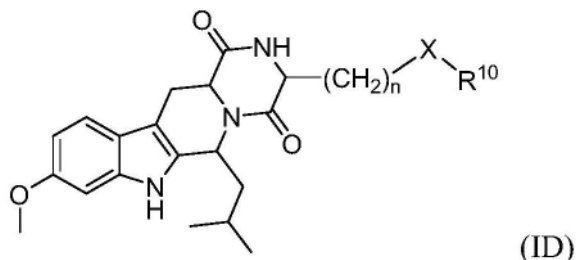
42. 如权利要求20或40所述的化合物,其中, R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组:H、

C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基。

43. 如权利要求42所述的化合物, 其中, R⁶和R⁷各自独立地选自由以下组成的组: H、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基和苯基。

44. 如权利要求20或40所述的化合物, 其中, R⁶和R⁷与它们所连接的N原子一起形成具有另外的0-1个杂原子的5-6元杂芳基, 所述杂原子独立地选自N、S和O。

45. 一种由下式ID表示的化合物, 或其药学上可接受的盐:



其中:

n是1至4的整数;

X是O或S;

R¹⁰选自由以下组成的组: C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基是未经取代的或取代有1、2、3或4个R^A基团;

各R^A独立地选自OH、CN、卤素、C₁₋₄烷基、C₁₋₆卤代烷基和C₁₋₄烷氧基。

46. 如权利要求20或45所述的化合物, 其中, X是O。

47. 如权利要求45所述的化合物, 其中, n是3。

48. 如权利要求20或45所述的化合物, 其中, R¹⁰选自由以下组成的组: C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基和6-10元芳基。

49. 如权利要求48所述的化合物, 其中, R¹⁰是C₁₋₆烷基。

红细胞生成性原卟啉症(EPP)和X连锁原卟啉症(XLP)的疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年5月20日提交美国临时申请62/850,061号的权益,在此将其通过引用整体上并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在政府资助下完成的。由国家糖尿病和消化和肾脏疾病研究所授予的R01 DK090305的资助下在政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

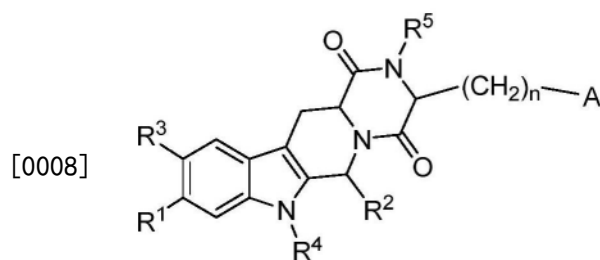
背景技术

[0005] 卟啉症是一组血红素生物合成途径的代谢紊乱。红细胞生成性原卟啉症(EPP)是第三最常见类型的卟啉症,也是儿童期最常见的卟啉症。EPP是由亚铁螯合酶(FECH)的功能丧失突变引起的,FECH是血红素生物合成途径中的最后一种酶,它将 Fe^{2+} 与原卟啉IX(PPIX)结合形成血红素。由于FECH缺陷,EPP患者中PPIX显著积累,主要在红细胞(R^{bC})、血浆和肝脏中。除EPP外,PPIX积累也发生在X连锁原卟啉症(XLP)中,这是另一种由 δ -氨基酮戊酸合酶2(ALAS2)的功能获得性突变引起的卟啉症,该酶是血红素生物合成途径中的限速酶。此外,包括利福平(RIF)、异烟肼(INH)、二乙氧基羰基-1,4-二氢可力定(DDC)和灰黄霉素(GSF)的许多临床使用的药物和环境毒素可通过诱导ALAS导致PPIX在肝脏中积累和/或FECH的抑制。需要的是EPP和XLP的疗法。

发明内容

[0006] 公开了涉及治疗红细胞生成性原卟啉症和X连锁原卟啉症的方法和组合物。

[0007] 还描述了可以抑制ABCG2的治疗剂。例如,本文提供了由以下式I定义的治疗剂



式 I

[0009] 其中

[0010] A选自由以下组成的组: $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^7 \\ | \\ \text{R}^6 \end{array}$, $\begin{array}{c} \text{R}^9 \\ | \\ \text{---} \text{N} \text{---} \text{C} \text{---} \text{R}^8 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$, $\begin{array}{c} \text{R}^6 \\ | \\ \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^7 \end{array}$, 并且

[0011] $\begin{array}{c} \text{X} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{10} \end{array}$;

[0012] n是0至6的整数;

[0013] X,当存在时,选自由 CH_2 、O和S组成的组;

[0014] R^1 选自自由以下组成的组:H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基、CN、 NO_2 、 OR^a 、 SR^a 、 $C(O)R^b$ 、 $C(O)NR^cR^d$ 、 $C(O)OR^a$ 、 $OC(O)R^b$ 、 $OC(O)NR^cR^d$ 、 NR^cR^d 、 NR^cOR^d 、 $NR^cC(O)R^b$ 、 $NR^cC(O)OR^a$ 、 $NR^cC(O)NR^cR^d$ 、 $C(=NR^e)R^b$ 、 $C(=NR^e)NR^cR^d$ 、 $NR^cC(=NR^e)NR^cR^d$ 、 $NR^cS(O)R^b$ 、 $NR^cS(O)_2R^b$ 、 $NR^cS(O)_2NR^cR^d$ 、 $S(O)R^b$ 、 $S(O)NR^cR^d$ 、 $S(O)_2R^b$ 和 $S(O)_2NR^cR^d$,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团;

[0015] R^2 和 R^3 独立地选自自由以下组成的组:H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基、CN、 NO_2 、 OR^a 和 SR^a ,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团;

[0016] R^4 和 R^5 独立地选自自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团取代;

[0017] R^6 和 R^7 各自独立地选自自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团,或者 R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基,各自可选地取代有1、2或3个独立选择的 R^A 基团;

[0018] R^8 和 R^9 独立地选自自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团,或者 R^8 和 R^9 与它们所连接的原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基,各自可选地取代有1、2或3个独立选择的 R^A 基团;

[0019] R^{10} 选自自由以下组成的组: C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团;

[0020] 各 R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 独立地选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基;其中, C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基各自可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团;

[0021] 各 R^e 独立地选自H、CN、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷基硫基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基、氨基酰基、 C_{1-6} 烷基氨基酰基、二(C_{1-6} 烷基)氨基酰基、氨基磺酰基、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基和二(C_{1-6} 烷基)氨基磺酰基;并且

[0022] 各 R^A 独立地选自OH、 NO_2 、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、氰基- C_{1-3} 烷基、HO- C_{1-3} 烷基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基、二(C_{1-6} 烷基)氨基、硫基、 C_{1-6} 烷基硫基、 C_{1-6} 烷基亚磺酰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基酰基、 C_{1-6} 烷基氨基酰基、二(C_{1-6}

烷基) 氨甲酰基、羧基、C₁₋₆烷基羰基、C₁₋₆烷氧基羰基、C₁₋₆烷基羰基氨基、C₁₋₆烷基磺酰基氨基、氨基磺酰基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基、二(C₁₋₆烷基) 氨基磺酰基、氨基磺酰基氨基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基氨基、二(C₁₋₆烷基) 氨基磺酰基氨基、氨基羰基氨基、C₁₋₆烷基氨基羰基氨基和二(C₁₋₆烷基) 氨基羰基氨基;

[0023] 或其药学上可接受的盐、酯或其N-氧化物。

[0024] 本文还公开了包含任一前述方面的治疗剂的药物组合物, 其进一步包含利福平(RIF)、异烟肼(INH)、二乙氧基羰基-1,4-二氢可力定(DDC) 或灰黄霉素(GSF)。

[0025] 一方面, 本文公开了治疗、预防、减少或抑制受试者的红细胞生成性原卟啉症(EPP) 或X连锁原卟啉症(XLP) 的方法, 其包括向受试者施用抑制ABCG2活性的治疗剂, 所述治疗剂包括但不限于任何前述方面的抑制ABCG2活性的治疗剂。

[0026] 本文还公开了减少受试者的红细胞或肝细胞的PPIX流出的方法, 其包括向受试者施用抑制ABCG2活性的治疗剂。

[0027] 一方面, 本文公开了治疗、预防、减少或抑制患有EPP的受试者皮肤中的紫癜、红斑、水肿或烧灼感的方法, 其包括向受试者施用抑制ABCG2活性的治疗剂。

[0028] 一方面, 本文公开了治疗、预防、减少或抑制受试者(例如, 患有EPP的受试者) 皮肤中的肝毒性的方法, 其包括向受试者施用抑制ABCG2活性的治疗剂。

[0029] 一方面, 本文公开了治疗、预防、减少或抑制EPP、XLP、红细胞或肝细胞的PPIX流出、任何前述方面的皮肤中的紫癜、红斑、水肿或烧灼感的方法, 其中, 所述治疗剂是抗体、肽、蛋白质、RNAi、小分子或靶向核酸整合系统, 如抗ABCG2抗体、包含靶向ABCG2基因的向导RNA的靶向核酸整合系统(例如, 成簇的规则间隔的短回文重复序列)(CRISPR)/CRISPR相关9(Cas9) 集成系统), 或靶向ABCG2基因的RNAi。

[0030] 一方面, 本文公开了治疗、预防、减少或抑制EPP、XLP、红细胞或肝细胞的PPIX流出、任何前述方面的皮肤中的紫癜、红斑、水肿或烧灼感的方法, 其中, 药剂包含组织特异性靶向部分或表达载体。

[0031] 一方面, 本文公开了包含ABCG2敲除的细胞。本文还公开了包含任一前述方面的细胞的转基因动物。

附图说明

[0032] 并入本说明书并构成本说明书的一部分的附图说明了数个实施方式, 并且与说明书一起说明了所公开的组合物和方法。

[0033] 图1A、1B、1C、1D、1E和1F显示了ABCG2在EPP相关光毒性中的作用。图1A显示了WT、Abcg2-null、Fech-mut和Fech-mut/Abcg2-null小鼠的基因分型结果。Fech-mut/Abcg2-null小鼠在Fech和Abcg2方面是缺陷型的。图1B显示了曝光后小鼠的肉眼观(gross appearance)。将小鼠的背部皮肤剃毛并暴露于紫外线(395-410nm) 下, 每天30分钟, 持续5天。图1C、1D、1E和1F显示了暴露于紫外线, H&E染色后小鼠皮肤的组织切片。条等于40 μ m。

[0034] 图2A、2B和2C显示暴露于紫外线后, WT、Abcg2-null、Fech-mut和Fech-mut/Abcg2-null小鼠皮肤中的氧化应激和炎症。将小鼠的背部皮肤剃毛并暴露于紫外线(395-410nm) 下, 每天30分钟, 持续5天。图2A显示了皮肤中的谷胱甘肽(GSH) 水平。图2B和2C显示了皮肤中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素1 β (IL-1 β) 的mRNA表达。所有数据均表示为平均值

±S.E.M. (n=4/组)。*P<0.05,***P<0.001,通过单因素方差分析(ANOVA)。

[0035] 图3A、3B、3C和3D显示了ABCG2调节红细胞(RBC)、血浆和EPP小鼠模型皮肤中的PPIX分布。图3A显示了RBC中的PPIX水平。图3B显示了血清中的PPIX水平。图3C显示了暴露于紫外线后小鼠皮肤中的PPIX水平。通过UPLC-QTOFMS分析PPIX。所有数据均表示为平均值±S.E.M. (n=4只/组)。*P<0.05,***P<0.001,通过单因素方差分析进行分析。图3D显示了ABCG2的缺陷降低了皮肤上的PPIX分布,并消除了EPP中PPIX介导的光毒性的示意图。

[0036] 图4A、4B、4C、4D、4E、4F、4G、4H和4I显示了EPP相关的肝毒性取决于ABCG2。WT、Abcg2-null、Fech-mut和Fech-mut/Abcg2-null小鼠保持在相同的环境下并在相似的年龄处死。图4A、4B和4C显示了丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和碱性磷酸酶(ALP)的血清活性。图4D显示了血清总胆红素。图4E显示了肝脏中的PPIX,通过UPLC-QTOFMS进行分析。数据表示为平均值±S.E.M. (n=4只/组)。***P<0.001,通过单因素方差分析进行分析。图4F、4G、4H和4I显示了具有H&E染色的代表性肝脏切片。箭头表示胆栓。条等于10μm。PV,门静脉;BD,胆管。

[0037] 图5A、5B、5C、5D、5E和5F显示了ABCG2的缺陷消除了DDC诱导的PPIX积累和肝毒性。WT和Abcg2-null小鼠用DDC(一种卟啉生成剂)治疗14天。图5A、5B和5C显示了ALT、AST和ALP的血清活性。图5D显示了肝脏中的PPIX,通过UPLC-QTOFMS进行分析。所有数据表示为平均值±S.E.M. (n=3-4只/组)。**P<0.01,***P<0.001,通过单因素方差分析进行分析(ANOVA)。图5E和5F显示了用H&E染色对肝脏进行的组织学分析。箭头表示胆栓。条等于10μm。PV,门静脉;BD,胆管。

[0038] 图6A、6B、6C、6D、6E和6F显示了ABCG2的缺陷消除了灰黄霉素(GSF)诱导的PPIX积累和肝毒性。WT和Abcg2-null小鼠用GSF(一种卟啉生成剂)治疗14天。图6A、6B和6C显示了ALT、AST和ALP的血清活性。图6D显示了肝脏中的PPIX。所有数据表示为平均值±S.E.M. (n=3-4只/组)。***P<0.001,通过单因素方差分析进行分析(ANOVA)。图6E和6F显示了用H&E染色对肝脏进行的组织学分析。箭头表示胆栓。条等于10μm。PV,门静脉;BD,胆管。

[0039] 图7A、7B、7C、7D、7E和7F显示了用利福平(RIF)和异烟肼(INH)治疗的hPXR和hPXR/Abcg2-null小鼠中的PPIX积累和肝毒性。图7A显示了hPXR和hPXR/Abcg2-null小鼠的基因分型结果。图7B和7C显示了ALT和ALP的血清活性。图7D显示了肝脏中的PPIX,通过UPLC-QTOFMS进行分析。所有数据表示为平均值±S.E.M. (n=3-4只/组)。*P<0.05,**P<0.01,通过单因素方差分析进行分析(ANOVA)。图7E和7F显示了用H&E染色对肝脏进行的组织学分析。箭头表示胆栓。PV,门静脉;BD,胆管。

[0040] 图8A、8B、8C、8D、8E、8F、8G、8H和8I显示了ABCG2的缺陷调节PPIX分布、代谢和排泄。图8A、8B、8C、8D、8E和8F显示了用氘标记的氨基酮戊酸(D₂-ALA)(PPIX的前体)处理的WT和Abcg2-null小鼠的代谢组学分析。在D₂-ALA处理后1小时收集肝脏和胆汁样品。图8A显示了通过主成分分析(PCA)生成的肝脏样品的评分图。每个点代表一个小鼠样品。图8B和8C显示了通过正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)生成的肝脏和胆汁代谢组的S图。每个点代表一个代谢物。所有代谢物均通过UPLC-QTOFMS进行分析。图8D显示了胆汁中的D₁₆-PPIX。图8E和8F显示了肝脏和胆汁中的D₁₆-原卟啉-1-0-酰基-葡萄糖苷酸(D₁₆-PPIX-glu)。所有数据均表示为平均值±S.E.M. WT中的数据设置为100%或1。*P<0.05,**P<0.01,通过双尾学生t检验。图8G显示了PPIX及其与葡萄糖醛酸、木糖和葡萄糖结合的代谢物的结构。图8H显示了

Fech-mut和Fech-mut/Abcg2-null小鼠胆汁中PPIX及其结合代谢物的百分比。图8I显示了通过调节PPIX分布、代谢和排泄,ABCG2的缺陷消除EPP相关的肝损伤的示意图。

[0041] 图9A、9B、9C和9D显示了原卟啉-1-0-酰基-葡萄糖苷酸(PPIX-glu)的鉴定。图9A显示了用D₂-ALA处理的Abcg2-null小鼠肝脏中D₁₆-PPIX-glu的提取色谱图。图9B显示了D₁₆-PPIX-glu的MS/MS。图9C显示了PPIX-glu合成路线的示意图。图9D显示了合成的PPIX-glu的MS/MS。

[0042] 图10A和10B显示了ABCG2在EPP病理生理学中的作用的总结。ABCG2在红细胞(RBC)和肝细胞中表达。图10A显示了显示ABCG2通过以下来驱动EPP中的光毒性和肝毒性的示意图:(1)增加PPIX分布到皮肤和增加光敏性;(2)增加PPIX向肝胆系统的输送,引起胆管阻塞和胆汁淤积性肝损伤;(3)ABCG2依赖性胆管阻塞进一步增加了体内PPIX的积累,从而增强了光毒性和肝毒性。图10B显示了显示ABCG2缺陷通过以下来消除EPP中的光毒性和肝毒性的示意图(1)减少PPIX分布到皮肤和降低光敏性;(2)减少PPIX向肝胆系统的输送,缓解PPIX介导的胆管阻塞;(3)肝细胞中滞留的PPIX可进一步代谢为结合产物,促进其排泄;(4)预防PPIX介导的胆管阻塞可减少PPIX在体内的积累并减弱光毒性和肝毒性。

[0043] 图11显示了K0143、K2、K31和K34在小鼠内的药代动力学分析。

[0044] 图12A和12B显示了K31对EPP相关光毒性的功效。Fech-mut小鼠模型用作EPP模型。图12A显示了EPP小鼠在光暴露前的皮肤外观。图12B显示了用或不用K31预处理后进行光暴露的EPP小鼠的皮肤外观。

[0045] 图13显示了K31戒断后Fech-mut小鼠的光毒性。小鼠用K31预处理,然后从第1天到第4天暴露于光照。从第5天开始,小鼠仅暴露于光照,而没有K31处理。

[0046] 图14显示了K31对Fech-mut小鼠RBC PPIX流出的影响。结果表示为平均值±S.E.M. (n=3)。**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001。

具体实施方式

[0047] 在公开和描述本发明的化合物、组合物、制品、装置和/或方法之前,应当理解的是,除非另有说明,否则它们不限于特定的合成方法或特定的重组生物技术方法,或者不限于特定试剂,除非另有说明,因此当然可以变化。还应当理解的是,本文使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的并且不旨在进行限制。

[0048] 定义

[0049] 在说明书和所附权利要求书中使用的单数形式“a”、“an”和“the”包括复数形式,除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及“药物载体”包括两种以上此类载体的混合物等。

[0050] 范围可以表示为从“约”一个特定值,和/或至“约”另一个特定值。当表达这样的范围时,另一实施方式包括从一个特定值和/或至另一个特定值。类似地,当数值表示为近似值时,通过使用先行词“约”,将理解为特定值形成了另一个实施方式。将进一步理解的是,每个范围的端点相对于另一个端点而言是重要的,并且独立于另一个端点。将进一步理解的是,本文中公开了多个值,并且除了值本身之外,每个值在本文中也公开为“约”所述特定值。例如,如果公开值“10”,那么也会公开“约10”。还应当理解的是,当一个值被公开时,“小于或等于”该值、“大于或等于该值”以及值之间的可能范围也被公开,如技术人员所适当理

解的。例如,如果公开值“10”,则还公开“小于或等于10”以及“大于或等于10”。还应当理解的是,在整个申请中,数据以多种不同的格式提供,并且该数据代表端点和起点,以及数据点的任意组合的范围。例如,如果公开了特定数据点“10”和特定数据点15,则应理解为考虑公开了大于、大于或等于、小于、小于或等于及等于10和15以及在10和15之间。还应当理解的是,还公开了两个特定单元之间的每个单元。例如,如果公开了10和15,那么11、12、13和14也被公开。

[0051] 在本说明书和随后的权利要求中,将引用许多术语,这些术语应定义为具有以下含义:

[0052] “可选的”或“可选地”是指随后描述的事件或情况可能发生也可能不发生,该描述包括所述事件或情况发生的情况和不发生的情况。

[0053] “引物”是能够支持某种类型的酶促操作并且可以与靶核酸杂交从而可以进行酶促操作的探针子集。引物可由不干扰酶促操作的本领域可获得的核苷酸或核苷酸衍生物或类似物的任何组合制成。

[0054] “探针”是能够与靶核酸相互作用的分子,通常以序列特异性方式,例如通过杂交。核酸的杂交在本领域中是众所周知的并且在本文中讨论。通常,探针可以由本领域可用的核苷酸或核苷酸衍生物或类似物的任何组合制成。

[0055] “编码”特定RNA的DNA序列是转录成RNA的DNA核酸序列。DNA多核苷酸可以编码被翻译成蛋白质的RNA (mRNA) (因此DNA和mRNA都编码蛋白质),或者DNA多核苷酸可以编码未翻译成蛋白质的RNA (例如tRNA、rRNA、microRNA (miRNA)、“非编码”RNA (ncRNA)、向导RNA等)。

[0056] “蛋白质编码序列”或编码特定蛋白质或多肽的序列,当置于适当调节序列的控制下时,是转录成mRNA (在DNA的情况下)并在体外或体内翻译 (在mRNA的情况下)成多肽的核酸序列。编码序列的边界由5'端 (N端)的起始密码子和3'端 (C端)的翻译终止无义密码子决定。编码序列可以包括但不限于来自原核或真核mRNA的cDNA、来自原核或真核DNA的基因组DNA序列和合成核酸。转录终止序列通常位于编码序列的3'端。

[0057] 用于核酸、多肽、细胞或生物体的术语“天然存在的”或“未修饰的”或“野生型”是指核酸、多肽、细胞或生物体,其是在自然界中发现。例如,存在于生物体 (包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列可以从自然界的来源中分离出来,并且在实验室中未经人类有意修饰的多肽或多核苷酸序列是野生型 (和天然存在的)。

[0058] 对受试者的“施用”包括向受试者引入或递送治疗剂的任何途径。施用可以通过任何合适的途径进行,包括口服、局部、静脉内、皮下、经皮、透皮、肌肉内、关节内、肠胃外、小动脉内、皮内、心室内、颅内、腹腔内、病灶内、鼻内、直肠、阴道、通过吸入、经由植入的储库、肠胃外 (例如,皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、腹腔内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术)等。如本文所用,“并行施用 (Concurrent administration)”、“组合施用”、“同时施用”是指化合物在同一时间点施用或基本上一个紧随另一个之后施用。在后一种情况下,两种化合物的施用时间足够接近,以至于观察到的结果与所述化合物在同一时间点施用时所获得的结果没有区别。“全身施用”是指通过将治疗剂引入或递送至受试者身体的广泛区域 (例如大于身体的50%)的途径向受试者引入或递送治疗剂,例如通过进入受试者循环系统或淋巴系统。相比之下,“局部施用”是指通过将具有治疗意义的量的治疗

剂引入或递送至与施用点紧邻的区域而不是全身性地将治疗剂引入或递送至受试者的途径。例如,局部施用的药剂在施用点的局部附近很容易检测到,但在受试者身体的远端部分检测不到或检测到的量可忽略不计。施用包括自我施用和他人施用。

[0059] 治疗剂的“有效量”是指足以提供所需效果的治疗剂的量。“有效”药剂的量将因受试者而异,这取决于许多因素,如受试者的年龄和一般状况、特定药剂等。因此,并不总是可以指定量化的“有效量”。然而,本领域普通技术人员可以使用常规实验确定任何受试者情况下的适当“有效量”。此外,如本文所用,除非另有特别说明,否则治疗剂的“有效量”也可以指涵盖治疗有效量和预防有效量的量。达到治疗效果所需的治疗剂的“有效量”可以根据诸如受试者的年龄、性别和体重等因素而变化。可以调整剂量方案以提供最佳治疗反应。例如,可以每天施用几个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急情况按比例减少剂量。

[0060] “药学上可接受的”组分可以指不是生物性的或其他不期望的组分,即,可以将所述组分掺入本发明的药物制剂中,并如上文所述向受试者施用,而不会引起显著的不希望的生物效应或以有害方式与包含它的制剂的任何其他组分相互作用。当用于人体施用时,该术语通常意味着所述组分已满足毒理学和制造测试的要求标准,或者其包含在美国食品和药物管理局制定的非活性成分指南中。

[0061] “药学上可接受的载体”(有时称为“载体”)是指可用于制备通常安全无毒的药物或治疗组合物的载体或赋形剂,并且包括兽医和/或人类药物或治疗用途可接受的载体。术语“载体”或“药学上可接受的载体”可包括但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(如油/水或水/油乳液)和/或各种类型的润湿剂。如本文所用,术语“载体”包括但不限于任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、脂质、稳定剂或本领域公知的用于药物制剂的其他材料,并且如本文进一步所述。

[0062] “药理活性”(或简称“活性”),如在“药理活性”衍生物或类似物中,可以指衍生物或类似物(例如,盐、酯、酰胺、缀合物、代谢物、异构体、片段等)具有与母体化合物相同类型并且程度大致相当的药理活性。

[0063] “治疗剂”是指具有有益的生物学作用的任何组合物。有益的生物学作用包括治疗作用,例如治疗障碍或其他不希望的生理状况,和预防作用,例如预防障碍或其他不希望的生理状况(例如,非免疫原性癌症)。该术语还包括特别提到的有益药剂的药学上可接受的药理学活性衍生物,其包括但不限于盐、酯、酰胺、前药、活性代谢物、异构体、片段、类似物等。当使用术语“治疗剂”时,或当具体确定特定药剂时,应理解该术语包括治疗剂本身以及药学上可接受的具有药理学活性的盐、酯、酰胺、前药、缀合物、活性代谢物、异构体、片段、类似物等。

[0064] 组合物(例如包含治疗剂的组合物)的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指有效实现所需治疗结果的量。在某些实施方式中,所需的治疗结果是控制I型糖尿病。在某些实施方式中,所需的治疗结果是控制肥胖。给定治疗剂的治疗有效量通常会随着诸如所治疗的病症或疾病的类型和严重程度以及受试者的年龄、性别和体重等因素而变化。该术语还可以指有效促进所需的治疗效果(例如缓解疼痛)的治疗剂的量,或治疗剂的递送速率(例如,随时间推移的量)。确切的期望治疗效果将根据待治疗的病症、受试者的耐受性、待施用的治疗剂和/或药剂制剂(例如,治疗剂的效力、制剂中的药剂浓度等),以及本领域普通技术人员理解的各种其他因素而变化。在某些情况下,在数天、数周或数年的时间段内向受试

者施用多剂量的组合物后实现所需的生物学或医学反应。

[0065] 术语“n-元”，其中n为整数，通常描述成环原子数为n的部分中的成环原子数。例如，哌啶基是6-元杂环烷基环的实例，吡唑基是5元杂芳环的实例，吡啶基是6元杂芳环的实例，1,2,3,4-四氢萘是10元环烷基的实例。

[0066] 如本文所用，短语“可选地取代”是指未经取代的或经取代的。如本文所用，术语“经取代的”是指氢原子被去除并被取代基取代。应当理解的是，给定原子上的取代受化合价的限制。

[0067] 在整个定义中，术语“C_{n-m}”表示包括端点的范围，其中n和m是整数并且表示碳数。实例包括C₁₋₄、C₁₋₆等。

[0068] 如本文所用，单独使用或与其他术语组合使用的术语“C_{n-m}烷基”是指可以是直链或支链的、具有n至m个碳的饱和烃基。烷基部分的实例包括但不限于化学基团，如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基；高级同系物，如2-甲基-1-丁基、正戊基、3-戊基、正己基、1,2,2-三甲基丙基等。在某些实施方式中，烷基中含有1至6个碳原子、1至4个碳原子、1至3个碳原子或1至2个碳原子。

[0069] 如本文所用，“C_{n-m}烯基”是指具有一个或多个碳-碳双键并具有n至m个碳的烷基。示例性烯基包括但不限于乙烯基、正丙烯基、异丙烯基、正丁烯基、仲丁烯基等。在某些实施方式中，烯基部分包含2至6、2至4或2至3个碳原子。

[0070] 如本文所用，“C_{n-m}炔基”是指具有一个或多个碳-碳三键并具有n至m个碳的烷基。示例性炔基包括但不限于乙炔基、丙炔-1-基、丙炔-2-基等。在某些实施方式中，炔基部分包含2至6、2至4或2至3个碳原子。

[0071] 如本文所用，单独使用或与其他术语组合使用的术语“C_{n-m}亚烷基”是指具有n至m个碳的二价烷基连接基团。亚烷基的实例包括但不限于乙烷-1,2-二基、丙烷-1,3-二基、丙烷-1,2-二基、丁烷-1,4-二基、丁烷-1,3-二基、丁烷-1,2-二基、2-甲基-丙烷-1,3-二基等。在某些实施方式中，亚烷基部分包含2至6、2至4、2至3、1至6、1至4或1至2个碳原子。

[0072] 如本文所用，单独使用或与其他术语组合使用的术语“C_{n-m}烷氧基”是指式-O-烷基的基团，其中，所述烷基具有n至m个碳。示例烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基（例如正丙氧基和异丙氧基）、叔丁氧基等。在某些实施方式中，烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0073] 如本文所用，术语“C_{n-m}烷基氨基”是指式NH(烷基)的基团，其中，所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中，烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0074] 如本文所用，术语“C_{n-m}烷氧基羰基”是指式C(O)O-烷基的基团，其中，所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中，烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0075] 如本文所用，术语“C_{n-m}烷基羰基”是指式-C(O)-烷基的基团，其中，所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中，烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0076] 如本文所用，术语“C_{n-m}烷基羰基氨基”是指式-NHC(O)-烷基的基团，其中，所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中，烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0077] 如本文所用，术语“C_{n-m}烷基磺酰基氨基”是式-NHS(O)₂-烷基的基团，其中，所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中，烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0078] 如本文所用，术语“氨基磺酰基”是指式-S(O)₂NH₂的基团。

[0079] 如本文所用，术语“C_{n-m}烷基氨基磺酰基”是指式-S(O)₂NH(烷基)的基团，其中，所

述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0080] 如本文所用,术语“二(C_{n-m}烷基)氨基磺酰基”是指式-S(O)₂N(烷基)₂的基团,其中,每个烷基独立地具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,每个烷基独立地具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0081] 如本文所用,术语“氨基磺酰基氨基”是指式-NHS(O)₂NH₂的基团。

[0082] 如本文所用,术语“C_{n-m}烷基氨基磺酰基氨基”是指式-NHS(O)₂NH(烷基)的基团,其中,所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0083] 如本文所用,术语“二(C_{n-m}烷基)氨基磺酰基氨基”是指式-NHS(O)₂N(烷基)₂的基团,其中,每个烷基独立地具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,每个烷基独立地具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0084] 如本文所用,单独使用或与其他术语组合使用的术语“氨基羰基氨基”是指式-NHC(O)NH₂的基团。

[0085] 如本文所用,术语“C_{n-m}烷基氨基羰基氨基”是指式-NHC(O)NH(烷基)的基团,其中,所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0086] 如本文所用,术语“二(C_{n-m}烷基)氨基羰基氨基”是指式-NHC(O)N(烷基)₂的基团,其中,每个烷基独立地具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,每个烷基独立地具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0087] 如本文所用,术语“C_{n-m}烷基氨甲酰基”是指式-C(O)-NH(烷基)的基团,其中,所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0088] 如本文所用,术语“巯基”是指式-SH的基团

[0089] 如本文所用,术语“C_{n-m}烷基亚磺酰基”是指式-S(O)-烷基的基团,其中,所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0090] 如本文所用,术语“C_{n-m}烷基磺酰基”是指式-S(O)₂-烷基的基团,其中,所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0091] 如本文所用,术语“氨基”是指式-NH₂的基团。

[0092] 如本文所用,单独使用或与其他术语组合使用的术语“芳基”是指芳香烃基团,其可以是单环或多环的(例如,具有2、3或4个稠合环)。术语“C_{n-m}芳基”是指具有n至m个环碳原子的芳基。芳基包括例如苯基、萘基、蒽基、菲基、茚满基、茚基等。在某些实施方式中,芳基具有6至约20个碳原子、6至约15个碳原子或6至约10个碳原子。在某些实施方式中,芳基是经取代或未经取代的苯基。

[0093] 如本文所用,术语“氨甲酰基”是指式-C(O)NH₂的基团。

[0094] 如本文所用,单独使用或与其他术语组合使用的术语“羰基”是指-C(=O)-基团,其也可写作C(O)。

[0095] 如本文所用,术语“二(C_{n-m}-烷基)氨基”是指式-N(烷基)₂的基团,其中,两个烷基各自独立地具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,每个烷基独立地具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0096] 如本文所用,术语“二(C_{n-m}-烷基)氨甲酰基”是指式-C(O)N(烷基)₂的基团,其中,两个烷基各自独立地具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,每个烷基独立地具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0097] 如本文所用,术语“卤素”是指F、Cl、Br或I。在某些实施方式中,卤素是F、Cl或Br。在某些实施方式中,卤素是F或C。

[0098] 如本文所用,“C_{n-m}卤代烷氧基”是指具有n至m个碳原子的式-O-卤代烷基的基团。示例性卤代烷氧基是OCF₃。在某些实施方式中,卤代烷氧基仅被氟化。在某些实施方式中,烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0099] 如本文所用,单独使用或与其他术语组合使用的术语“C_{n-m}卤代烷基”是指具有一个卤原子至2s+1个可以相同或不同的卤原子的烷基,其中“s”是烷基中的碳原子数,其中,所述烷基具有n至m个碳原子。在某些实施方式中,卤代烷基仅被氟化。在某些实施方式中,烷基具有1至6、1至4或1至3个碳原子。

[0100] 如本文所用,“环烷基”是指包括环化烷基和/或烯基的非芳族环状烃。环烷基可包括单环或多环(例如,具有2、3或4个稠合环)基团和螺环。环烷基可具有3、4、5、6、7、8、9或10个成环碳(C₃₋₁₀)。环烷基的成环碳原子可以可选地被氧代或硫代(例如,C(O)或C(S))取代。环烷基还包括亚环烷基。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环戊烯基、环己烯基、环己二烯基、环庚三烯基、降冰片基、降蒎基(norpinyl)、降莰基(norcarynyl)等。在某些实施方式中,环烷基是环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环戊基或金刚烷基。在某些实施方式中,环烷基具有6-10个成环碳原子。在某些实施方式中,环烷基是金刚烷基。环烷基的定义中还包括具有一个或多个与环烷基环稠合(即具有共同键)的芳环的部分,例如环戊烷、环己烷等的苯并或噻吩基衍生物。包含稠合芳环的环烷基可以通过任何成环原子连接,包括稠合芳环的成环原子。

[0101] 如本文所用,“杂芳基”是指具有至少一个选自硫、氧和氮的杂原子环成员的单环或多环芳族杂环。在某些实施方式中,杂芳环具有1、2、3或4个独立地选自氮、硫和氧的杂原子环成员。在某些实施方式中,杂芳基部分中的任何成环N可以是N-氧化物。在某些实施方式中,杂芳基具有5-10个环原子和1、2、3或4个独立地选自氮、硫和氧的杂原子环成员。在某些实施方式中,杂芳基具有5-6个环原子和1或2个独立地选自氮、硫和氧的杂原子环成员。在某些实施方式中,杂芳基是五元或六元杂芳环。五元杂芳环是具有五个环原子的环的杂芳基,其中一个或多个(例如,1、2或3个)环原子独立地选自N、O和S。示例性的五元环杂芳基是噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、异噻唑基、异恶唑基、1,2,3-三唑基、四唑基、1,2,3-噻二唑基、1,2,3-恶二唑基、1,2,4-三唑基、1,2,4-噻二唑基、1,2,4-恶二唑基、1,3,4-三唑基、1,3,4-噻二唑基和1,3,4-恶二唑基(oxadiazolyl)。六元杂芳基环是具有六个环原子的环的杂芳基,其中一个或多个(例如,1、2或3个)环原子独立地选自N、O和S。示例性的六元环杂芳基是吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基和哒嗪基。

[0102] 如本文所用,“杂环烷基”是指具有一个或多个选自O、N或S的成环杂原子的非芳族单环或多环杂环。包括在杂环烷基中的是单环4-、5-、6-和7-元杂环烷基。杂环烷基还可包括螺环。示例性杂环烷基包括吡咯烷-2-酮、1,3-异恶唑烷-2-酮、吡喃基、四氢吡喃、氧杂环丁烷基、氮杂环丁烷基、吗啉基、硫代吗啉基、哌嗪基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、哌啶基、吡咯烷基、异恶唑烷基、异噻唑烷基、吡唑烷基、恶唑烷基、噻唑烷基、咪唑烷基、氮杂环庚基、苯并氮杂环庚三烯(benzazapene)等。杂环烷基的成环碳原子和杂原子可以可选地被氧代或硫代(例如,C(O)、S(O)、C(S)或S(O)₂等)取代。杂环烷基可以通过成环碳原子或成环杂原子连接。在某些实施方式中,杂环烷基含有0至3个双键。在某些实施方式中,杂环烷基含有0

至2个双键。杂环烷基的定义中还包括具有一个或多个与环烷基环耦合(即具有共同键)的芳环的部分,例如吡啶、吗啉、氮杂环庚烷等的苯并或噻吩基衍生物。包含耦合芳环的杂环烷基可以通过任何成环原子连接,包括耦合芳环的成环原子。在某些实施方式中,杂环烷基具有4-10、4-7或4-6个环原子和1或2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子并且具有一个或多个氧化的环成员。

[0103] 在某些地方,定义或实施方式指的是特定的环(例如氮杂环丁烷环、吡啶环等)。除非另有说明,只要不超过原子价,这些环可以连接到任何环成员上。例如,氮杂环丁烷环可以连接在环的任何位置,而吡啶-3-基环连接在3-位。

[0104] 如本文所用的术语“化合物”意在包括所示结构的所有立体异构体、几何异构体、互变异构体和同位素。除非另有说明,通过名称或结构识别为一种特定互变异构形式的化合物旨在包括其他互变异构形式。

[0105] 本文提供的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式源于单键与相邻双键的交换以及质子的伴随迁移。互变异构形式包括质子互变异构体,它们是具有相同经验式和总电荷的异构质子化状态。示例性质子互变异构体包括酮-烯醇对、酰胺-亚氨酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺-亚胺对和其中质子可以占据杂环系统的两个以上位置的环状形式,例如,1H-和3H-咪唑,1H-、2H-和4H-1,2,4-三唑,1H-和2H-异吡唑,以及1H-和2H-吡唑。互变异构形式可以通过适当的取代处于平衡状态或空间锁定为一种形式。

[0106] 在某些实施方式中,本文所述的化合物可包含一个或多个不对称中心,因此以外消旋体和外消旋混合物、对映体富集的混合物、单一对映体、单个非对映体和非对映体混合物(例如,包括(R)-和(S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体、(+)(右旋)形式、(-)(左旋)形式、它们的外消旋混合物和它们的其他混合物)。额外的不对称碳原子可以存在于取代基中,如烷基。这些化合物的所有此类异构形式及其混合物均明确包括在本说明书中。本文所述的化合物还可以或进一步包含键,其中键旋转受限于该特定键,例如由于存在环或双键(例如碳-碳键、碳-氮键,如酰胺键)而导致的限制。因此,所有顺式/反式和E/Z异构体和旋转异构体都明确包括在本说明书中。除非另外提及或指明,化合物的化学名称包括该化合物所有可能的立体化学异构形式的混合物。

[0107] 光学异构体可以通过本领域技术人员已知的标准程序以纯形式获得,并且包括但不限于非对映成盐、动力学拆分和不对称合成。参见,例如,Jacques等,Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen, S.H.等, Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E.L. Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); Wilen, S.H. Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions 第268页 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972), 每篇文献均通过引用整体上并入本文。还应理解的是,本文所述化合物包括所有可能的区域异构体(regioisomer)及其混合物,其可以通过本领域技术人员已知的标准分离程序以纯形式获得,并且包括但不限于柱色谱、稀层色谱法和高效液相色谱法。

[0108] 除非具体定义,否则本文提供的化合物还可包括出现在中间体或最终化合物中的原子的所有同位素。同位素包括那些原子序数相同但质量数不同的原子。除非另有说明,当一个原子被指定为同位素或放射性同位素(例如,氘、 ^{11}C 、 ^{18}F)时,该原子被理解为至少大于该同位素或放射性同位素的天然丰度的量包含该同位素或放射性同位素。例如,当

一个原子被指定为“D”或“氘”时,该位置被理解为具有比氕的自然丰度(为0.015%)高至少3000倍的氕(即,至少45%的氕掺入)。

[0109] 所有化合物及其药学上可接受的盐可以与其他物质(如水和溶剂(例如水合物和溶剂化物))一起发现或可以被分离。

[0110] 在某些实施方式中,化合物的制备可涉及添加酸或碱以影响例如所需反应的催化或盐形式的形成(如酸加成盐)。

[0111] 示例性酸可以是无机或有机酸并且包括但不限于强酸和弱酸。某些示例性酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、对甲苯磺酸、4-硝基苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸、三氟乙酸和硝酸。某些弱酸包括但不限于乙酸、丙酸、丁酸、苯甲酸、酒石酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸和癸酸。

[0112] 示例性碱包括氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾和碳酸氢钠。某些示例性强碱包括但不限于氢氧化物、醇盐、金属酰胺、金属氢化物、金属二烷基酰胺和芳胺,其中;醇盐包括甲基、乙基和叔丁基氧化物的锂盐、钠盐和钾盐;金属酰胺包括氨化钠、氨化钾和氨化锂;金属氢化物包括氢化钠、氢化钾和氢化锂;金属二烷基酰胺包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、三甲基甲硅烷基和环己基取代的酰胺的锂盐、钠盐和钾盐。

[0113] 本申请还包括本文中描述的化合物的药学上可接受的盐。如本文所用,“药学上可接受的盐”是指本文描述的化合物的衍生物,其中母体化合物通过将现有的酸或碱部分转化为其盐形式而被修饰。药学上可接受的盐的实例包括但不限于矿物或碱性残基(如胺)的有机酸盐;酸性残基(如羧酸)的碱金属盐或有机盐;等。本申请的药学上可接受的盐包括母体化合物形成的常规无毒盐,例如由无毒无机或有机酸形成。本申请的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常,可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计算量的适当碱或酸在水中或有机溶剂中或两者的混合物中反应来制备此类盐;通常,非水介质如乙醚、乙酸乙酯、醇类(例如甲醇、乙醇、异丙醇或丁醇)或乙腈(MeCN)是优选的。在Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1985,第1418页和Journal of Pharmaceutical Science,66,2(1977)中可以找到合适的盐的列表。制备盐形式的常规方法描述于例如Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH, 2002。

[0114] 在某些实施方式中,本文提供的化合物或其盐基本上是分离的。“基本上分离”是指化合物至少部分或基本上与其形成或检测的环境分离。部分分离可包括例如富含本文提供的化合物的组合物。基本分离可包括含有至少约50%,至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%,至少约95%,至少约97%或至少约99%重量的本文提供的化合物或其盐的组合物。分离化合物及其盐的方法是本领域的常规方法。

[0115] 在本申请中,引用了各种出版物。这些出版物的公开内容在此通过引用整体上并入本申请,以便更全面地描述与其相关的现有技术。所公开的参考文献也单独地和具体地以引用方式并入其中所包含的材料,这些材料在依赖该参考文献的句子中进行了讨论。

[0116] 组合物

[0117] 公开了用于制备公开的组合物的组分以及在本文公开的方法中使用的组合物本身。这些和其他材料在本文公开,并且应当理解的是,当公开这些材料的组合、子集、相互作

用、组等被公开时,虽然可能未明确公开这些化合物的每个不同个体和集体组合和排列的具体参考,单每一个在本文中都被具体考虑和描述。例如,如果公开和讨论了特定化合物并且讨论了可以在化合物的多个位置进行的许多修饰,则特别考虑的是化合物的每一个组合和排列以及可能的修饰,除非特别指出相反。因此,如果公开了一类分子A、B和C以及一类分子D、E和F以及一个组合分子的实例A-D,那么即使每个没有单独叙述,每个都是单独和共同考虑的有意义的组合,A-E,A-F,B-D,B-E,B-F,C-D,C-E和C-F被认为是公开的。同样,还公开了这些的任何子集或组合。因此,例如,A-E、B-F和C-E子组将被视为已公开。该概念适用于本申请的所有方面,包括但不限于制造和使用所公开的组合物中的步骤。因此,如果存在可以执行的多种附加步骤,应当理解的是,这些附加步骤中的每一个都可以用所公开的方法的任何特定实施方式或实施方式的组合来执行。

[0118] 原卟啉IX (PPIX) 在皮肤中的积累导致红细胞生成性原卟啉症 (EPP) 患者的光毒性。PPIX是一种富含电子的四吡咯。当EPP患者暴露在光时,PPIX会激发并将其能量释放到氧气中,氧气会产生自由基并导致皮肤损伤。皮肤反应的症状包括紫癜、红斑、水肿和皮肤烧灼感。因此,EPP患者必须通过减少户外活动和/或使用防护服来避光,这会显著降低他们的社交和工作活动以及整体生活质量。目前针对EPP患者光毒性的疗法侧重于减少光对皮肤的渗透和/或管理由光激发的PPIX引起的皮肤损伤。 β -胡萝卜素因其抗氧化作用以及增加皮肤色素沉着和减少光线进入皮肤的能力而被用于EPP患者,但效果有限。阿法诺肽通过增加黑色素合成和减少光对皮肤的渗透来减轻EPP患者的皮肤症状。尽管有这些治疗选择,但目前还没有治疗能解决EPP光毒性的根本原因,即PPIX在皮肤中的积累。同样,PPIX的积累已被证明是X连锁原卟啉症 (XLP) 光毒性的根本原因。

[0119] 组合物可包含小分子ABCG2抑制剂。ABCG2抑制剂是本领域已知的,并且已经被描述(参见,例如,Ricci等.J Develop Drugs,2015,4:138,其作为附录附于本申请并通过引用并入本文)。示例性ABCG2抑制剂也描述于Chang等的美国专利申请公开号2017/0224837,将其通过引用整体上并入本文。

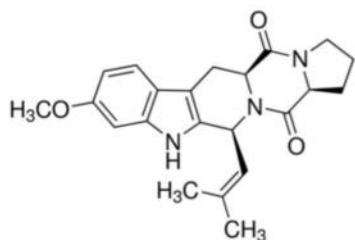
[0120] ABCG2抑制剂的实例包括,例如,1,4-二氢吡啶;青蒿琥酯;AST1306;联苯双酯-查耳酮混合物;Botryllamides;镉;钙通道阻滞剂(例如,尼卡地平、尼群地平、尼莫地平、双嘧达莫);喜树碱类似物(例如,ST1481、CH0793076);大麻类;CCT129202;查耳酮;姜黄素;环孢菌素(例如,环孢菌素A);二氢吡啶和吡啶;二甲氧基橙酮;多非喹达富马酸盐;EGFR抑制剂;黄酮类和苯并黄酮类;类黄酮类;香柑素;6',7'-二羟基佛手素;桔皮素;川陈皮素;橙皮苷;橙皮素;槲皮素;山奈酚;烟曲酶毒素C;烟曲酶毒素C类似物(例如,K0143);吉非替尼;GF120918;BNP1350;GW583340;GW2974;HM30181及其衍生物;抗菌肽(例如,人抗菌肽);甲磺酸伊马替尼;MBL-II-141;ML753286;拉帕替尼;LY294002;MBLI-87;甲氧基二苯乙烯;光神霉素A;槲皮素衍生物;萘并吡喃酮;尼洛替尼;新生霉素;NP-1250;奥罗莫星II和Purvalanol A;有机氯和拟除虫菊酯;OSI-930;植物雌激素类/类黄酮类;哌嗪基苯并吡喃酮;苯烷基氨基苯并吡喃酮;帕纳替尼;PZ-39;喹唑啉类;奎扎替尼;西地那非;索拉非尼;经取代的色酮;舒尼替尼;坦度替尼;Tariquidar;萜类;CI1033;托瑞米芬;XR9577;WK-X-34;WK-X-50;WK-X-84;YHO-13177;和YHO-13351。

[0121] 在某些实施方式中,ABCG2抑制剂可以包含烟曲酶毒素C、K0143、GF120918、YHO-13351、姜黄素、CID44640177、CID1434724、CID46245505、CCT129202、青蒿琥酯、ST1481、二

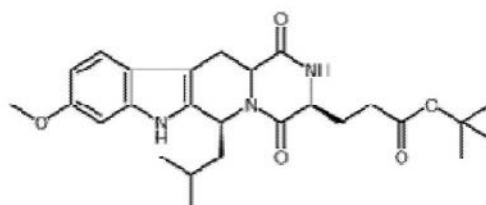
氢吡啶、多非喹达富马酸盐、吉非替尼、甲磺酸伊马替尼、拉帕替尼、WK-X-34、YHO-13177、MBL-II-141、ML753286或它们的任意组合。

[0122] 在某些实施方式中, ABCG2抑制剂可以包含烟曲酶毒素C、KO143、GF120918、YHO-13351、姜黄素、CID44640177、CID1434724、CID46245505、CCT129202、青蒿琥酯、ST1481、二氢吡啶、多非喹达富马酸盐、吉非替尼、甲磺酸伊马替尼、拉帕替尼、WK-X-34、YHO-13177或它们的任意组合。

[0123] 下面提供了这些ABCG2抑制剂中的某些的结构。

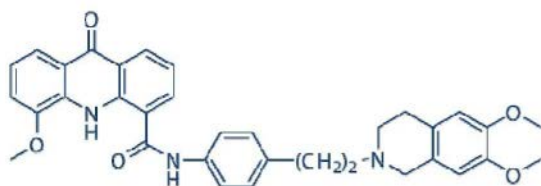


烟曲酶毒素 C

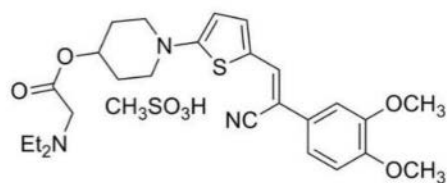


KO143

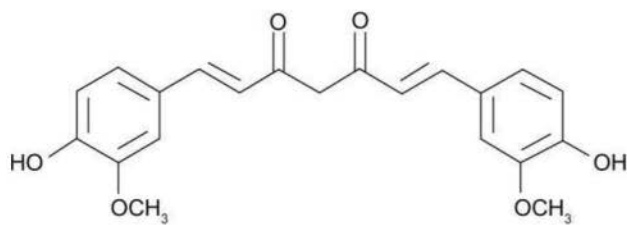
[0124]



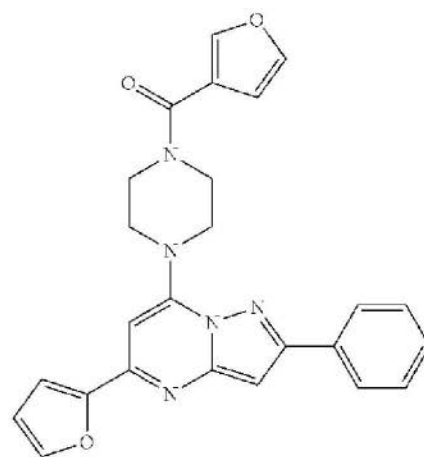
GF120918



YHO-13351

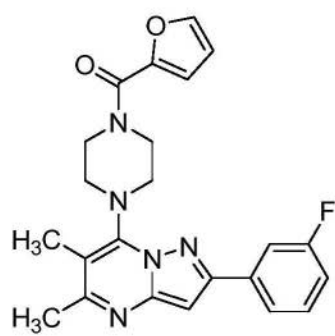


姜黄素

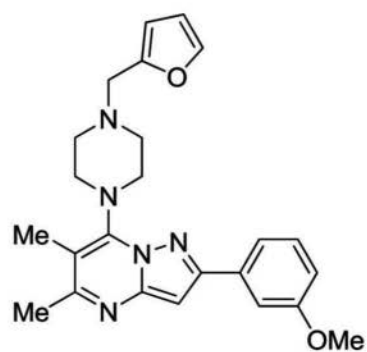


CID44640177

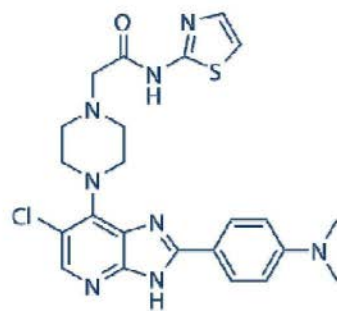
[0125]



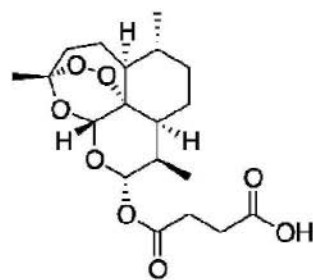
CID1434724

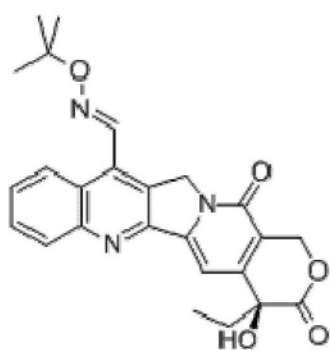


CID46245505

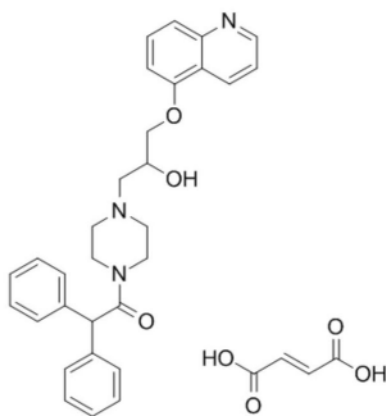


CCT129202

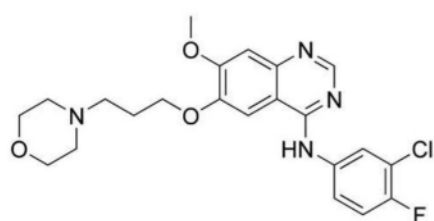




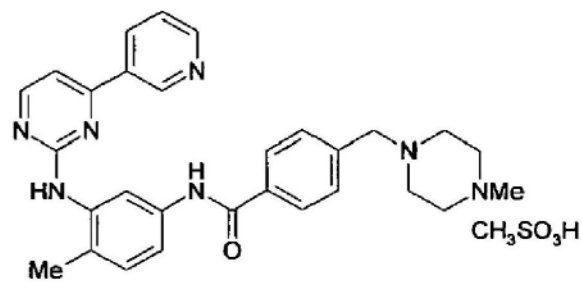
ST1481



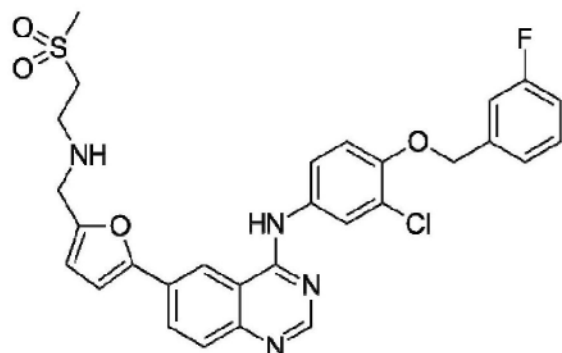
多非喹达富马酸盐



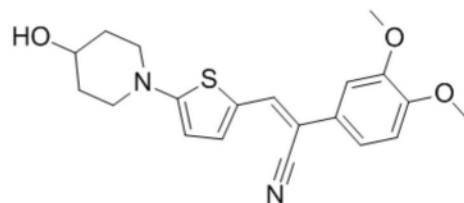
[0126] 吉非替尼



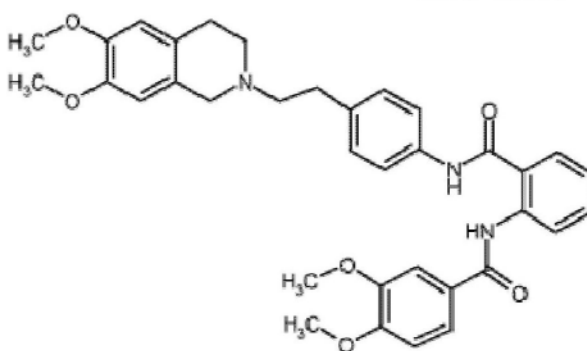
甲磺酸伊马替尼



拉帕替尼

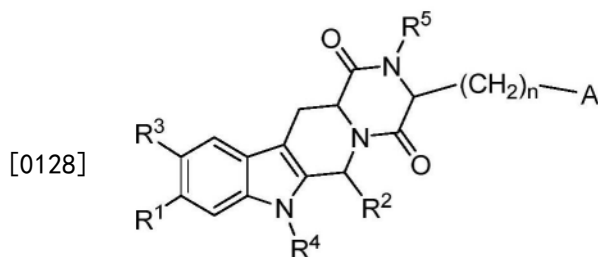


YHO-13177



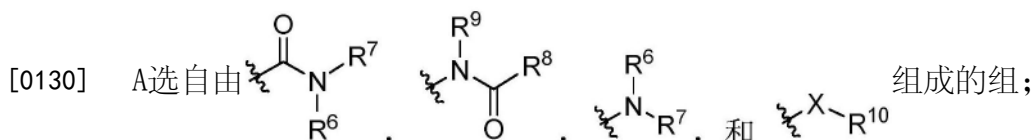
WK-X-34

[0127] 在某些实施方式中, ABCG2 抑制剂可以由下式 I 定义



式 I

[0129] 其中



[0131] n是0至6的整数；

[0132] X, 当存在时, 选自由CH₂、O和S组成的组；

[0133] R¹选自自由以下组成的组: H、卤素、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基、CN、NO₂、OR^a、SR^a、C(O)R^b、C(O)NR^cR^d、C(O)OR^a、OC(O)R^b、OC(O)NR^cR^d、NR^cR^d、NR^cOR^d、NR^cC(O)R^b、NR^cC(O)OR^a、NR^cC(O)NR^cR^d、C(=NR^e)R^b、C(=NR^e)NR^cR^d、NR^cC(=NR^e)NR^cR^d、NR^cS(O)R^b、NR^cS(O)₂R^b、NR^cS(O)₂NR^cR^d、S(O)R^b、S(O)NR^cR^d、S(O)₂R^b和S(O)₂NR^cR^d, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团；

[0134] R²和R³独立地选自自由以下组成的组: H、卤素、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基、CN、NO₂、OR^a和SR^a, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团；

[0135] R⁴和R⁵独立地选自自由以下组成的组: H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团；

[0136] R⁶和R⁷各自独立地选自自由以下组成的组: H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团, 或者R⁶和R⁷与它们所连接的N原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基, 各自可选地取代有1、2或3个独立选择的R^A基团；

[0137] R⁸和R⁹独立地选自自由以下组成的组: H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基, 其中, 所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团, 或者R⁸和R⁹与它们所连接的原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基, 各自可选地取代有1、2或3个独立选择的R^A基团；

[0138] R¹⁰选自自由以下组成的组: C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、

6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基,其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团;

[0139] 各 R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 独立地选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基;其中, C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基各自可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团;

[0140] 各 R^e 独立地选自H、CN、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷基硫基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基、氨基甲酰基、 C_{1-6} 烷基氨基甲酰基、二(C_{1-6} 烷基)氨基甲酰基、氨基磺酰基、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基和二(C_{1-6} 烷基)氨基磺酰基;并且

[0141] 各 R^A 独立地选自OH、 NO_2 、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、氰基- C_{1-3} 烷基、HO- C_{1-3} 烷基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基、二(C_{1-6} 烷基)氨基、硫基、 C_{1-6} 烷基硫基、 C_{1-6} 烷基亚磺酰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基甲酰基、 C_{1-6} 烷基氨基甲酰基、二(C_{1-6} 烷基)氨基甲酰基、羧基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、 C_{1-6} 烷基羰基氨基、 C_{1-6} 烷基磺酰基氨基、氨基磺酰基、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基、二(C_{1-6} 烷基)氨基磺酰基、氨基磺酰基氨基、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基氨基、二(C_{1-6} 烷基)氨基磺酰基氨基、氨基羰基氨基、 C_{1-6} 烷基氨基羰基氨基和二(C_{1-6} 烷基)氨基羰基氨基;

[0142] 或其药学上可接受的盐、酯或其N-氧化物。

[0143] 在某些实施方式中, R^4 和 R^5 都可以是氢。

[0144] 在某些实施方式中, R^2 和 R^3 独立地选自H和 C_{1-6} 烷基组成的组,其中,所述 C_{1-6} 烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团。

[0145] 在某些实施方式中, R^2 可以是异丁基。

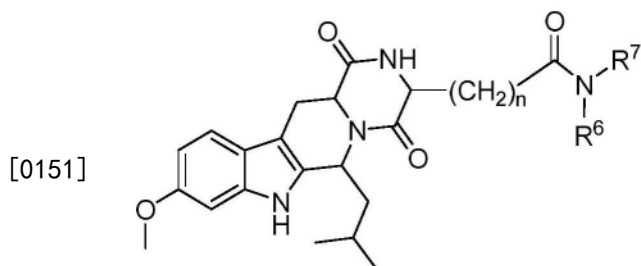
[0146] 在某些实施方式中, R^3 可以是氢。在其他实施方式中, R^3 可以是甲基。

[0147] 在某些实施方式中, R^1 可以选自由以下组成的组:H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基和 OR^a ;其中,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基和 C_{1-4} 卤代烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团;并且其中,当存在时, R^A 选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基;其中, C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基和 C_{1-4} 卤代烷基各自可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团。

[0148] 在某些实施方式中, R^1 可以是氢。在其他实施方式中, R^1 可以是选自由羟基、 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基组成的组,其中,所述 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基各自可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团。例如,在某些实施方式中, R^1 可以是甲氧基。

[0149] 在某些实施方式中,当存在时,X选自O和S。

[0150] 所述组合物可包含由以下式IA定义的小分子



式 IA

[0152] 其中

[0153] n是0至6的整数；

[0154] R^6 和 R^7 各自独立地选自由以下组成的组： H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基，其中，所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团，或者 R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基，各自可选地取代有1、2或3个独立选择的 R^A 基团；并且

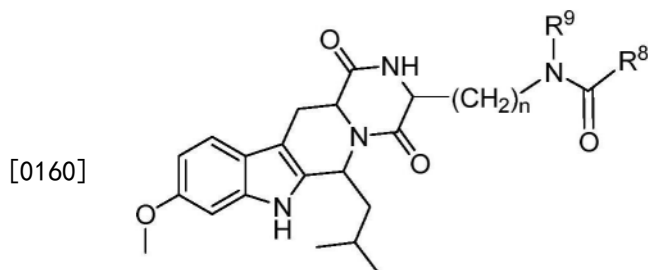
[0155] 各 R^A 独立地选自OH、 NO_2 、CN、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、氰基- C_{1-3} 烷基、HO- C_{1-3} 烷基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基、二(C_{1-6} 烷基)氨基、硫基、 C_{1-6} 烷基硫基、 C_{1-6} 烷基亚磺酰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基甲酰基、 C_{1-6} 烷基氨基甲酰基、二(C_{1-6} 烷基)氨基甲酰基、羧基、 C_{1-6} 烷基羧基、 C_{1-6} 烷氧基羧基、 C_{1-6} 烷基羧基氨基、 C_{1-6} 烷基磺酰基氨基、氨基磺酰基、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基、二(C_{1-6} 烷基)氨基磺酰基、氨基磺酰基氨基、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基氨基、二(C_{1-6} 烷基)氨基磺酰基氨基、氨基羧基氨基、 C_{1-6} 烷基氨基羧基氨基和二(C_{1-6} 烷基)氨基羧基氨基；

[0156] 或其药学上可接受的盐、酯或其N-氧化物。

[0157] 在某些实施方式中，n可以是1至4的整数。

[0158] 在某些实施方式中， R^6 和 R^7 各自独立地选自由H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基组成的组，其中，所述 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的 R^A 基团。在其他实施方式中， R^6 和 R^7 与它们所连接的N原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基，各自可选地取代有1、2或3个独立选择的 R^A 基团。

[0159] 所述组合物可包含由以下式IB定义的小分子



式 IB

[0161] 其中

[0162] n是0至6的整数；

[0163] R^8 和 R^9 独立地选自由以下组成的组： H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-4} 卤代烷基、

C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基,其中,所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团取代,或者R⁸和R⁹与它们所连接的原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基,每个可选地取代有1、2或3个独立选择的R^A基团;并且

[0164] 各R^A独立地选自OH、NO₂、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、氰基-C₁₋₃烷基、HO-C₁₋₃烷基、氨基、C₁₋₆烷基氨基、二(C₁₋₆烷基)氨基、硫基、C₁₋₆烷硫基、C₁₋₆烷基亚磺酰基、C₁₋₆烷基磺酰基、氨甲酰基、C₁₋₆烷基氨甲酰基、二(C₁₋₆烷基)氨甲酰基、羧基、C₁₋₆烷基羧基、C₁₋₆烷氧基羧基、C₁₋₆烷基羧基氨基、C₁₋₆烷基磺酰基氨基、氨基磺酰基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基、二(C₁₋₆烷基)氨基磺酰基、氨基磺酰基氨基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基氨基、二(C₁₋₆烷基)氨基磺酰基氨基、氨基羧基氨基、C₁₋₆烷基氨基羧基氨基和二(C₁₋₆烷基)氨基羧基氨基;

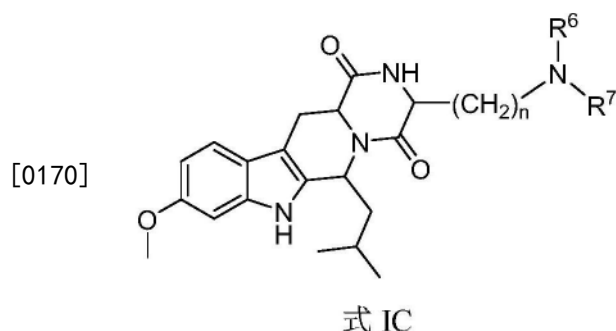
[0165] 或其药学上可接受的盐、酯或其N-氧化物。

[0166] 在某些实施方式中,n可以是1至4的整数。

[0167] 在某些实施方式中,R⁹是氢。

[0168] 在某些实施方式中,R⁸可以选自由以下组成的组:H、C₁₋₆烷基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基,其中,所述C₁₋₆烷基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团。在其他实施方式中,R⁸和R⁹与它们所连接的原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基,各自可选地取代有1、2或3个独立选择的R^A基团。

[0169] 所述组合物可包含由以下式IC定义的小分子



[0171] 其中

[0172] n是0至6的整数;

[0173] R⁶和R⁷各自独立地选自由以下组成的组:H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基,其中,所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团,或者R⁶和R⁷与它们所连接的N原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基,各自可选地取代有1、2或3个独立选择的R^A基团;并且

[0174] 各R^A独立地选自OH、NO₂、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、氰基-C₁₋₃烷基、HO-C₁₋₃烷基、氨基、C₁₋₆烷基氨基、二(C₁₋₆烷基)氨基、硫基、C₁₋₆烷硫基、C₁₋₆烷基亚磺酰基、C₁₋₆烷基磺酰基、氨甲酰基、C₁₋₆烷基氨甲酰基、二(C₁₋₆烷基)氨甲酰基、羧基、C₁₋₆烷基羧基、C₁₋₆烷氧基羧基、C₁₋₆烷基羧基氨基、C₁₋₆烷基磺酰基氨基、氨基磺酰基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基、二(C₁₋₆烷基)氨基磺酰基、氨基磺酰基氨基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基氨基、二(C₁₋₆烷基)氨基磺酰基氨基、氨基羧基氨基、C₁₋₆烷基氨基羧基氨基和二(C₁₋₆烷基)氨基羧基氨基;

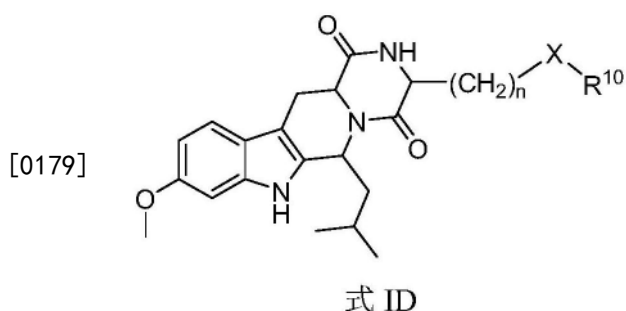
氨基磺酰基氨基、二(C₁₋₆烷基)氨基磺酰基氨基、氨基羰基氨基、C₁₋₆烷基氨基羰基氨基和二(C₁₋₆烷基)氨基羰基氨基；

[0175] 或其药学上可接受的盐、酯或其N-氧化物。

[0176] 在某些实施方式中，n可以是1至4的整数。

[0177] 在某些实施方式中，R⁶和R⁷各自独立地选自由以下组成的组：H、C₁₋₆烷基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基，其中，所述C₁₋₆烷基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团。在其他实施方式中，R⁶和R⁷与它们所连接的N原子一起形成4-9元杂环烷基或5-6元杂芳基，各自可选地取代有1、2或3个独立选择的R^A基团。

[0178] 在某些实施方式中，ABCG2抑制剂可以由下式ID定义



[0180] 其中

[0181] n是0至6的整数；

[0182] X选自由CH₂、O和S组成的组；

[0183] R¹⁰选自由以下组成的组：C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基，其中，所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₃₋₁₀环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环烷基可选地取代有1、2、3或4个独立选择的R^A基团；并且

[0184] 各R^A独立地选自OH、NO₂、CN、卤素、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₄卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、氰基-C₁₋₃烷基、HO-C₁₋₃烷基、氨基、C₁₋₆烷基氨基、二(C₁₋₆烷基)氨基、硫基、C₁₋₆烷硫基、C₁₋₆烷基亚磺酰基、C₁₋₆烷基磺酰基、氨甲酰基、C₁₋₆烷基氨甲酰基、二(C₁₋₆烷基)氨甲酰基、羧基、C₁₋₆烷基羰基、C₁₋₆烷氧基羰基、C₁₋₆烷基羰基氨基、C₁₋₆烷基磺酰基氨基、氨基磺酰基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基、二(C₁₋₆烷基)氨基磺酰基、氨基磺酰基氨基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基氨基、二(C₁₋₆烷基)氨基磺酰基氨基、氨基羰基氨基、C₁₋₆烷基氨基羰基氨基和二(C₁₋₆烷基)氨基羰基氨基；

[0185] 或其药学上可接受的盐、酯或其N-氧化物。

[0186] 在某些实施方式中，当存在时，X选自由O和S组成的组。在某些实施方式中，X是O。在某些实施方式中，X是S。

[0187] 在某些实施方式中，n是1至4的整数（例如，n是3）。

[0188] 上述ABCG2抑制剂（例如，式I、式IA、式IB、式IC和/或式ID所描述的ABCG2抑制剂）也可以与涉及抑制ABCG2的其他治疗方法联合使用。例如，这些ABCG2抑制剂可用于增强肿瘤细胞的化学治疗、降低癌细胞对化学治疗剂的抗性、降低癌细胞中的ABCG2转运蛋白活性，或其组合。例如，在美国专利号9,937,217；9,314,448；和9,056,111中描述了这样的方

法,每个都通过引用整体上并入本文。同样地,上述ABCG2抑制剂(例如,式I、式IA、式IB、式IC和/或式ID描述的ABCG2抑制剂)可用于例如美国专利号9,937,217;9,314,448;和9,056,111中描述的方法中。

[0189] 药学载体/药学产品的递送

[0190] 如上所述,所述组合物也可以在药学上可接受的载体中在体内施用。“药学上可接受的”是指不是生物性的或其他不期望的材料,即,所述材料可以与核酸或载体一起施用于受试者,而不会引起任何不期望的生物学效应或以有害方式与任何包含它的药物组合物的其他组分相互作用。如本领域技术人员所公知的,自然会选择载体以使活性成分的任何降解最小化并使受试者中的任何不利副作用最小化。

[0191] 所述组合物可以口服、肠胃外(例如静脉内)、肌肉注射、腹腔内注射、透皮、体外、局部等施用,包括局部鼻内施用或吸入剂施用。如本文所用,“局部鼻内施用”是指通过一个或两个鼻孔将组合物递送到鼻子和鼻道中,并且可以包括通过喷雾机构或液滴机构,或通过核酸或载体的雾化递送。所述组合物通过吸入剂的施用可以通过喷雾或液滴机制通过鼻或嘴进行递送。也可以通过插管直接输送到呼吸系统的任何区域(例如肺)。所需组合物的确切量因受试者而异,取决于受试者的物种、年龄、体重和一般状况、所治疗的过敏性疾病的严重程度、所用的特定核酸或载体、其施用方式等。因此,不可能为每个组合物指定准确的量。然而,适当的量可由本领域普通技术人员仅使用给出的教导的常规实验来确定。

[0192] 如果使用组合物的肠胃外施用,其通常以注射为特征。注射剂可以以常规形式制备,可以是液体溶液或悬浮液,适合在注射前将悬浮液溶解在液体中的固体形式,或作为乳剂。最近修订的肠胃外施用方法涉及使用缓释或持续释放系统,以保持恒定剂量。参见,例如,美国专利号3,610,795,将其通过引用并入本文。

[0193] 所述材料可以是溶液、悬浮液(例如,掺入微粒、脂质体或细胞中)。这些可以通过抗体、受体或受体配体靶向特定细胞类型。以下参考文献是使用该技术将特定蛋白质靶向肿瘤组织的实例(Senter,等,Bioconjugate Chem.,2:447-451,(1991);Bagshawe,K.D.,Br.J.Cancer,60:275-281,(1989);Bagshawe,等,Br.J.Cancer,58:700-703,(1988);Senter,等,Bioconjugate Chem.,4:3-9,(1993);Battelli,等,Cancer Immunol.Immunother.,35:421-425,(1992);Pietersz和McKenzie,Immunolog.Reviews,129:57-80,(1992);和Roffler,等,Biochem.Pharmacol,42:2062-2065,(1991))。载体诸如“stealth”和其他抗体偶联脂质体(包括脂质介导的靶向结肠癌的药物)、受体介导的通过细胞特异性配体靶向DNA、淋巴细胞介导的肿瘤靶标以及体内鼠神经胶质瘤细胞的高度特异性治疗性逆转录病毒靶标。以下参考文献是使用该技术将特定蛋白质靶向肿瘤组织的实例(Hughes等,Cancer Research,49:6214-6220,(1989);和Litzinger和Huang,Biochimica et Biophysica Acta,1104:179-187,(1992))。通常,受体参与组成型或配体诱导的内吞作用途径。这些受体聚集在网格蛋白包被的小坑中,通过网格蛋白包被的囊泡进入细胞,通过受体在其中进行分类的酸化的内体,然后再循环到细胞表面,储存在细胞内,或在溶酶体中降解。内化途径具有多种功能,如营养吸收、活化蛋白质的去除、大分子的清除、病毒和毒素的机会进入、配体的解离和降解以及受体水平调节。许多受体遵循不止一种细胞内途径,这取决于细胞类型、受体浓度、配体类型、配体价态和配体浓度。已经综述了受体介导的内吞作用的分子和细胞机制(Brown和Greene,DNA and Cell Biology 10:6,399-409(1991))。

[0194] 药学上可接受的载体

[0195] 包括抗体的组合物可以与药学上可接受的载体组合用于治疗。

[0196] 合适的载体及其制剂描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy (第19版) 编辑A.R.Gennaro,Mack Publishing Company,Easton,PA 1995。通常,在制剂中使用适量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的载体的实例包括但不限于盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。溶液的pH值优选为约5至约8,更优选为约7至约7.5。其他载体包括缓释制剂,如含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成型制品的形式,例如膜、脂质体或微粒。对于本领域技术人员来说显而易见的是,某些载体可以更优选,这取决于例如施用途和施用的组合物的浓度。

[0197] 药物载体是本领域技术人员已知的。这些最典型的是用于向人类施用药物的标准载体,包括诸如无菌水、盐水和具有生理pH的缓冲溶液等溶液。所述组合物可以肌肉内或皮下施用。其他化合物将根据本领域技术人员使用的标准程序施用。

[0198] 除了选择的分子之外,药物组合物还可以包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等。药物组合物还可包括一种或多种活性成分,诸如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。

[0199] 药物组合物可以多种方式施用,这取决于需要局部治疗还是全身治疗以及待治疗的区域。施用可以是局部(包括眼部、阴道、直肠、鼻内)、口服、吸入或肠胃外,例如通过静脉滴注、皮下、腹腔内或肌肉注射。所公开的抗体可以静脉内、腹腔内、肌肉内、皮下、腔内或经皮施用。

[0200] 肠胃外施用的制剂包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、诸如橄榄油等植物油和诸如油酸乙酯等可注射的有机酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,其包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发油。静脉内载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于林格氏右旋糖的那些)等。也可以存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0201] 用于局部施用的制剂可包括软膏、洗剂、霜剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、水性、粉末或油性基质、增稠剂等可能是必要的或期望的。

[0202] 用于口服施用的组合物包括粉剂或颗粒剂、水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、小袋或片剂。可能需要增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。

[0203] 某些组合物可能作为药学上可接受的酸或碱加成盐施用,所述酸或碱加成盐通过与诸如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸等无机酸,诸如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和富马酸等有机酸反应形成,或通过与诸如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾等无机碱,和诸如单-、二-、三烷基和芳基胺以及取代的乙醇胺等有机碱反应形成。

[0204] 治疗用途

[0205] 用于施用组合物的有效剂量和时间表可以凭经验确定,并且在本领域技术范围内做出这样的确定。组合物的施用剂量范围足够大以产生影响疾病症状的期望的作用。剂量不应大到引起不良副作用,如不希望的交叉反应、过敏反应等。通常,剂量将随着患者的年龄、状况、性别和疾病程度、施用途或方案中是否包括其他药物而变化,并且可由本领域

技术人员确定。在任何禁忌症的情况下,个体医生可以调整剂量。剂量可以变化,并且可以每天一次或多次给药,持续一天或几天。可以在文献中找到有关给定类别药品的适当剂量的指南。例如,可以在关于抗体治疗用途的文献中找到选择合适抗体剂量的指南,例如,Handbook of Monoclonal Antibodies,Ferrone等,编,Noges Publications,Park Ridge,N.J.,(1985)第22章和第303-357页;Smith等,Antibodies in Human Diagnosis and Therapy,Haber等,编,Raven Press,New York(1977)第365-389页。根据上述因素,单独使用的抗体的典型日剂量可能为每天约1 μ g/kg至高达100mg/kg体重以上。

[0206] 治疗红细胞生成性原卟啉症(EPP)或X连锁原卟啉症(XLP)的方法

[0207] 可以理解并在本文中考虑到PPIX的流出和作为结果的PPIX积累(即光毒性的原因)取决于ABCG2的活性。因此,所公开的ABCG2抑制剂可以防止PPIX流出并因此治疗EPP和XLP以及与其相关的任何症状。因此,一方面,本文公开的是治疗、预防、减少或抑制受试者的红细胞生成性原卟啉症(EPP)或X连锁原卟啉症(XLP)的方法,其包括向受试者施用本文公开的抑制ABCG2活性的任何治疗剂。

[0208] 如本文所用,本文所用的“治疗”及其语法变体包括以部分或完全预防、延迟、治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进、稳定、减轻和/或降低一种或多种疾病或病症的强度或频率、疾病或病症的症状或者疾病或病症的根本原因的意图或目的施用组合物。可以防止地、预防地、减轻地或治疗性地应用根据本发明的治疗。在发病之前(例如,在EPP或XLP的明显迹象之前)、在早期发病期间(例如,在EPP或XLP的初始迹象和症状之后)或在确定的癌症发展之后,向受试者施用预防性治疗。预防性施用可在感染症状出现前数天至数年进行。

[0209] “降低”可以指导致更少的基因表达、蛋白质产生、症状、疾病、组成、状况或活动的量的任何变化。当利用该物质的基因产物的遗传输出低于不利用该物质的基因产物的输出时,该物质也被理解为降低基因的遗传输出。此外,例如,降低可以是病症症状的变化,使得症状比之前观察到的要少。降低可以是病症、症状、活动、组合物以统计学显著量的任何个体、中值或平均降低。因此,减少可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100%减少,只要减少在统计上是显著的。

[0210] “抑制”是指降低活性、响应、病症、疾病或其他生物学参数。这可以包括但不限于完全消除活性、响应、病症或疾病。这还可以包括,例如,与天然或对照水平相比,活性、响应、病症或疾病减少10%。因此,与天然或对照水平相比,降低可以是10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%或其间的任何降低量。

[0211] 如本文所用,术语“预防”及其语法变体指部分或完全延迟或阻止疾病和/或其一种或多种伴随症状的发作或复发,或者阻止受试者获得或重新获得疾病或降低受试者获得或重新获得疾病或其一种或多种伴随症状的风险的方法。

[0212] 应当理解并在本文中预期的是,治疗、抑制、预防或减少EPP或XLP不一定与治愈结果相关,但可包括缓解EPP或XLP的症状,其包括但不限于光毒性、紫癜、红斑、水肿或皮肤灼热感。因此,一方面,本文公开的是治疗、预防、减少或抑制受试者皮肤的光毒性、紫癜、红斑、水肿或烧灼感的方法,其包括向受试者施用本文公开的抑制ABCG2活动的任何治疗剂。

[0213] 除皮肤外,肝脏是EPP中PPIX毒性的另一个靶器官,其严重程度受调节卟啉稳态的基因多态性的影响。肝脏负责通过肝胆系统从体内消除PPIX。由于PPIX具有高度疏水性,胆

汁中过多的PPIX会沉淀并导致胆管阻塞和胆汁淤积性肝损伤。这是一个恶性循环,因为PPIX介导的胆管阻塞会导致PPIX在体内进一步积累。临床上已尝试多种药理学方法来管理EPP相关的肝损伤,但没有一种产生令人满意的结果。肝移植是有效的,但EPP相关肝损伤的复发很常见,因为肝移植不能恢复骨髓中的FECH功能,也不能阻止PPIX在肝脏中的积累。应理解并在本文中预期的是,本文公开的所公开的ABCG2抑制剂治疗剂可用于管理EPP相关的肝损伤。因此,一方面,本文公开了减少受试者肝细胞的PPIX流出的方法,其包括向受试者施用抑制ABCG2活性的治疗剂。

[0214] 在EPP中,PPIX主要在骨髓中产生,并通过RBC和血浆通过循环系统输送到其他器官,包括皮肤和肝脏。PPIX从RBC流出到血浆中取决于转运蛋白ABCG2,暴露在光下会促进PPIX流出。这些数据导致这样的假设,即抑制ABCG2将减少PPIX对皮肤的分布并减轻EPP的光毒性。此外,PPIX在肝细胞和Kupffer细胞中但不在胆道系统中的保留减弱了EPP相关的肝毒性。ABCG2在肝细胞中表达并负责PPIX从肝细胞流入胆道系统。因此,还假设抑制ABCG2将减少胆道系统中PPIX的量,并减轻PPIX介导的胆管阻塞和胆汁淤积性肝损伤。因此,一方面,本文公开了减少受试者中红细胞的PPIX流出的方法,其包括向受试者施用抑制ABCG2活性的治疗剂。

[0215] 一方面,用于所公开方法的治疗剂可以包括但不限于本文公开的任何小分子以及GF120918、MBL-II-141、ML753286,以及抗体、寡核苷酸、小分子干扰RNA、RNAi、肽、蛋白质和/或靶向核酸整合系统。减少或抑制基因或其编码的蛋白质的表达可能会产生不可预见的后果,特别是如果诱导的基因表达或活性在脱靶侧受到抑制。一方面,ABCG2抑制性治疗剂可以被设计成在特定组织中表达(例如,在组织特异性启动子的控制下),在诱导条件下表达(cre-lox、flp或tet诱导启动系统,其是通过施用触发化合物(如四环素)激活,或其中ABCG2敲除基因座用表达Cre的构建体转染以去除floxed盒),或靶向特定组织(例如,组织特异性双抗体或二价构建体)。一方面,治疗剂可以是靶向核酸整合系统,例如CRISPR/Cas9系统,其中引导RNA(gRNA)靶向ABCG2基因。

[0216] 抗体

[0217] 如上所述,所公开的治疗方法可包括施用抗ABCG2抗体,包括免疫毒素、其变体或片段。

[0218] 一般抗体

[0219] 术语“抗体”在本文中以广义使用并且包括多克隆和单克隆抗体。除了完整的免疫球蛋白分子之外,术语“抗体”还包括那些免疫球蛋白分子的片段或聚合物,以及免疫球蛋白分子或其片段的人或人源化版本,包括二价单链抗体、双抗体、三抗体、四抗体,只要选择它们是因为它们能够与ABCG2相互作用,从而抑制ABCG2允许PPIX流出。可以使用本文所述的体外测定法或通过类似方法测试抗体的所需活性,然后根据已知的临床测试方法测试它们的体内治疗和/或预防活性。人类免疫球蛋白有五个主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中某些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG-1、IgG-2、IgG-3和IgG-4;IgA-1和IgA-2。本领域技术人员会认识到小鼠的可比较类别。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0220] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即群体中的个体抗体除了可能存在于抗体分子的小子集中的可能的天然发生的突变之外是

相同的。本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们表现出所需的拮抗活性即可。

[0221] 可以使用产生单克隆抗体的任何程序来制备所公开的单克隆抗体。例如,所公开的单克隆抗体可以使用杂交瘤方法制备,如由Kohler和Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) 描述的那些方法。在杂交瘤方法中,小鼠或其他合适的宿主动物通常用免疫剂免疫以引发生成或能够产生特异性结合免疫剂的抗体的淋巴细胞。作为另一种选择,淋巴细胞可以在体外免疫。

[0222] 单克隆抗体也可以通过重组DNA方法制备。使用常规程序(例如,通过使用能够与编码鼠抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)可以容易地分离和测序编码所公开的单克隆抗体的DNA。也可以使用噬菌体展示技术来生成和筛选抗体或活性抗体片段的文库,例如,如Burton等的美国专利号5,804,440和Barbas等的美国专利号6,096,441所述。

[0223] 体外方法也适用于制备单价抗体。消化抗体以产生其片段,特别是Fab片段,可以使用本领域已知的常规技术来完成。例如,可以使用木瓜蛋白酶进行消化。木瓜蛋白酶消化的实例描述于1994年12月22日公布的WO 94/29348和美国专利号4,342,566。抗体的木瓜蛋白酶消化通常会产生两个相同的抗原结合片段,称为Fab片段,每个片段都有一个抗原结合位点和一个残留的Fc片段。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原的片段。

[0224] 一方面,ABCG2结合抗体可以包含抗体片段。如本文所用,术语“抗体或其片段”包括具有双重或多重抗原或表位特异性的嵌合抗体和杂合抗体,以及片段,如F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等,其包括混合片段。因此,提供了保留结合其特定抗原的能力的抗体片段。例如,保持ABCG2结合活性的抗体片段包括在术语“抗体或其片段”的含义内。此类抗体和片段可以通过本领域已知的技术制备并且可以根据实施例中阐述的方法和一般用于产生抗体和筛选抗体的特异性和活性的方法筛选特异性和活性(参见Harlow和Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988))。

[0225] “抗体或其片段”的含义中还包括抗体片段和抗原结合蛋白(单链抗体)的缀合物。缀合的抗体或片段是指与效应子部分或标签可操作地连接或以其他方式在生理或功能上相关联的抗体或片段,所述效应子部分或标签例如尤其是毒性物质、放射性物质、荧光物质、脂质体或酶,如在美国专利号4,704,692中所述,其内容通过引用并入本文。

[0226] 片段,无论是否与其他序列连接,也可以包括特定区域或特定氨基酸残基的插入、缺失、取代或其他选定的修饰,条件是是与未修饰的抗体或抗体片段相比,所述抗体或抗体片段的活性没有显著改变或受损。这些修饰可以提供某些额外的特性,诸如去除/添加能够成二硫键的氨基酸,以增加其生物寿命,改变其分泌特征等。在任何情况下,抗体或抗体片段必须具有生物活性属性,诸如与其同源抗原的特异性结合。抗体或抗体片段的功能或活性区域可以通过蛋白质特定区域的诱变来鉴定,然后是表达和所表达的多肽的测试。此类方法对本领域技术人员来说是显而易见的,并且可以包括编码抗体或抗体片段的核酸的位点特异性诱变。(Zoller, M.J. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:348-354, 1992)。

[0227] 如本文所用,术语“抗体”或“抗体”还可指人抗体和/或人源化抗体。许多非人类抗体(例如,来自小鼠、大鼠或兔的抗体)在人类中具有天然抗原性,因此在施用于人类时会引起不期望的免疫响应。因此,在该方法中使用人抗体或人源化抗体有助于减少施用于人的抗体引起不希望的免疫响应的机会。

[0228] 人类抗体

[0229] 可以使用任何技术来制备所公开的人抗体。所公开的人抗体也可以从转基因动物中获得。例如,已经描述了能够响应免疫而产生完整的人抗体库的转基因突变小鼠(参见,例如,Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551-255 (1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258(1993);Bruggermann等,Year in Immunol.,7:33(1993))。具体而言,这些嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J(H))基因的纯合缺失导致内源抗体产生完全抑制,并成功转移人种系抗体基因阵列进入这种种系突变小鼠导致了在抗原攻击时产生人抗体。使用本文所述的Env-CD4-共受体复合物选择具有所需活性的抗体。

[0230] 人源化抗体

[0231] 抗体人源化技术通常涉及使用重组DNA技术来操纵编码抗体分子的一条或多条多肽链的DNA序列。因此,非人抗体(或其片段)的人源化形式是嵌合抗体或抗体链(或其片段,如sFv、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂,或抗体的其他抗原结合部分),其包含来自整合到人(接受者)抗体框架中的非人(供体)抗体的抗原结合位点的一部分。

[0232] 为了产生人源化抗体,来自接受者(人)抗体分子的一个或多个互补决定区(CDR)的残基被来自已知具有期望抗原结合特征(例如,对靶抗原的特定水平的特异性和亲和力)的供体(非人)抗体分子的一个或多个CDR的残基替换。在某些情况下,人抗体的Fv框架(FR)残基被相应的非人残基替换。人源化抗体也可能包含在接受者抗体和导入的CDR或框架序列中均未发现的残基。通常,人源化抗体具有从非人源引入的一个或多个氨基酸残基。在实践中,人源化抗体通常是人抗体,其中某些CDR残基和可能的某些FR残基被啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。人源化抗体通常包含抗体恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人抗体的恒定区(Jones等,Nature,321:522-525(1986),Reichmann等,Nature,332:323-327(1988),和Presta,Curr.Opin.Struct.Biol.,2:593-596(1992))。

[0233] 用于将非人抗体人源化的方法是本领域公知的。例如,人源化抗体可以根据Winter和同事的方法产生(Jones等,Nature,321:522-525(1986),Riechmann等,Nature,332:323-327(1988),Verhoeyen等,Science,239:1534-1536(1988)),对于人抗体的相应序列,通过取代啮齿动物CDR序列。可用于产生人源化抗体的方法也描述于美国专利号4,816,567(Cabilly等),美国专利号5,565,332(Hoogenboom等),美国专利号5,721,367(Kay等),美国专利号5,837,243(Deo等),美国专利号5,939,598(Kucherlapati等),美国专利号6,130,364(Jakobovits等),和美国专利号6,180,377(Morgan等)中。

[0234] 抗体施用

[0235] 抗体的施用可以如本文所公开的那样进行。也存在用于抗体递送的核酸方法。也可以将抗ABCG2抗体和抗体片段作为编码抗体或抗体片段的核酸制剂(例如,DNA或RNA)施用于患者或受试者,以便患者或受试者自身的细胞摄取该核酸并且产生和分泌所编码的抗体或抗体片段。核酸的递送可以通过任何方式进行,例如,如本文所公开的。

[0236] 转基因细胞和动物

[0237] EPP小鼠模型是通过FECH(Fech-mut)的功能丧失突变开发的。为了测试所述假设,生成了具有ABCG2缺陷(Fech-mut/Abcg2-null)的EPP小鼠模型。发现ABCG2缺陷消除了EPP小鼠的光毒性和肝毒性。还发现,当这些小鼠受到肝脏特异性卟啉化学物质的挑战时,Abcg2-null小鼠未能产生PPIX积累和肝毒性。代谢组学分析表明,ABCG2缺陷可通过调节PPIX分布、代谢和排泄来防止PPIX介导的光毒性和肝毒性。

[0238] 在各种实施方式中,本文提供了在其基因组中(例如,在其种系基因组中)包含编码ABCG2基因的无效突变的核酸序列的遗传修饰的细胞和非人类动物(例如啮齿类动物,例如小鼠或大鼠)。在某些方面,修饰的细胞还可包含FECH基因的突变。

[0239] 术语“细胞”包括适合于表达重组核酸序列的任何细胞。细胞包括原核生物和真核生物的细胞(单细胞或多细胞)、细菌细胞(例如大肠杆菌、芽孢杆菌属、链霉菌属等的菌株)、分枝杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞(例如,酿酒酵母、裂殖酵母、毕赤酵母、*P.methylica*等)、植物细胞、昆虫细胞(例如,SF-9、SF-21、杆状病毒感染的昆虫细胞、粉纹夜蛾等)、非人类动物细胞、人类细胞或细胞融合体,例如杂交瘤或四体瘤。在某些实施方式中,细胞是人、猴、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在某些实施方式中,细胞是真核细胞并且选自以下细胞:CHO(例如,CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO)、COS(例如,COS-7)、视网膜细胞、Vero、CV1、肾(例如,HEK293、293EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo₂05、HB 8065、HL-60、(例如,BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、足细胞、BRL 3A细胞、HT1080细胞、骨髓瘤细胞、肿瘤细胞和源自上述的细胞系细胞。在某些实施方式中,细胞包含一种或多种病毒基因,例如,表达病毒基因的视网膜细胞(例如,PER.C6.TM.细胞)。在某些实施方式中,细胞是ES细胞。

[0240] 一方面,转基因细胞可包含提供可诱导和/或组织特异性表达的选择盒。选择盒是插入到靶向构建体中的核苷酸序列,以促进已整合目标构建体的细胞(例如,细菌细胞、ES细胞)的选择。许多合适的选择盒是本领域已知的(Neo、Hyg、Pur、CM、SPEC等)。此外,选择盒的侧翼可以是重组位点,这允许在用重组酶处理时删除选择盒。常用的重组位点是loxP和Frt,分别被Cre和Flp酶识别,但其他位点是本领域已知的。选择盒可以位于编码区外的构建体中的任何位置。在一个实施方式中,选择盒插入人ABCG2无效插入序列的上游。

[0241] 在该方法中使用的选择盒可以通过本领域技术人员已知的方法去除。例如,可以用表达Cre的构建体转染带有ABCG2敲除基因座的ES细胞,以去除floxed盒。可以可选地通过与表达Cre重组酶的小鼠进行繁殖来去除选择盒。可选地,选择盒保留在小鼠体内。

[0242] 实施例

[0243] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制造和评价本文要求保护的化合物、组合物、制品、装置和/或方法的完整公开和描述,并且旨在纯粹示例性的并且不旨在限制本公开。已努力确保数字(例如数量、温度等)的准确性,但应考虑到某些错误和偏差。除非另有说明,份数是重量份数,温度单位为℃或环境温度,压力等于或接近大气压。

[0244] 实施例1:转运蛋白ABCG2的遗传缺陷可防止红细胞生成性原卟啉症(EPP)的光毒性和肝毒性

[0245] 结果

[0246] ABCG2缺陷可防止EPP相关的光毒性

[0247] *Fech-mut/Abcg2-null*小鼠具有FECH功能丧失突变并且是ABCG2缺陷的(图1A)。当*Fech-mut/Abcg2-null*和*Fech-mut*小鼠暴露在具有PPIX激发波长的光下时,*Fech-mut*小鼠出现严重的皮肤损伤,但这些表型在*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠中不存在(图1B、1C、1D、1E和1F)。此外,曝光后在*Fech-mut*小鼠的皮肤中观察到氧化应激和炎症,但在*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠中未观察到(图2A、2B和2C)。这些数据表明ABCG2是EPP相关光毒性的关键介质。接下来分析了EPP小鼠模型的RBC、血清和皮肤中的PPIX水平。发现ABCG2的缺陷显著增加了RBC中的PPIX水平,但降低了血清和皮肤中的PPIX水平(图3A、3B和3C),表明ABCG2的功能障碍阻止了PPIX从RBC流入血浆,因此降低了PPIX分布到皮肤并减弱PPIX介导的光毒性(图3D)。

[0248] ABCG2缺陷可防止EPP相关的肝毒性

[0249] 正如预期的那样,在*Fech-mut*小鼠中发生了肝损伤,但其在*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠中消失(图4)。与*Fech-mut*小鼠相比,在*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠中肝损伤血清生物标志物显著降低(图4A、4B、4C和4D)。*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠中血清碱性磷酸酶(ALP)活性的降低(图4C)表明胆汁淤积性肝损伤的减轻。事实上,*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠肝脏中的PPIX水平显著降低(图4E),并且在*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠的肝脏中未观察到PPIX介导的胆管阻塞和胆栓(图4F、4G、4H和4I)。肝纤维化是EPP相关肝损伤进展的关键步骤。在*Fech-mut*小鼠中观察到肝纤维化,但其在*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠中消失(通过总纤维化面积和mRNA表达来测量)。数据显示*Fech-mut*小鼠的胶原蛋白1a1和1a2的表达水平是*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠的15倍以上。此外,与纤维化区域增加8倍的*Fech-mut*小鼠相比,*Fech-mut/Abcg2-null*小鼠的纤维化区域处于背景水平。这些数据表明ABCG2在EPP相关肝损伤的发展中起着至关重要的作用。

[0250] ABCG2缺陷可防止化学诱导的PPIX积累和肝毒性

[0251] 为了进一步确定ABCG2在PPIX介导的肝损伤中的作用,野生型(WT)和*Abcg2-null*小鼠受到DDC或GSF的挑战,这两种模型化学物质会导致肝脏PPIX积累和肝毒性。虽然DDC和GSF在WT小鼠中引起肝损伤、PPIX积累和胆栓,但这些影响在*Abcg2-null*小鼠中不发生(图5和图6)。除DDC和GSF外,之前的研究发现,RIF和INH的联合治疗通过人孕烷X受体(hPXR)介导的途径导致肝脏PPIX积累和肝毒性。为了确定ABCG2在RIF和INH诱导的PPIX积累和肝毒性中的作用,产生了ABCG2缺陷的hPXR小鼠模型(hPXR/*Abcg2-null*) (图7A)。在用RIF和INH共同治疗的hPXR小鼠中观察到肝毒性以及PPIX积累和胆栓,但这些表型在hPXR/*Abcg2-null*小鼠中消失(图7B、7C、7D、7E和7F)。这些数据进一步证实了PPIX介导的肝损伤依赖于ABCG2。

[0252] ABCG2缺陷调节PPIX分布、代谢和排泄

[0253] 为了理解ABCG2缺陷消除PPIX积累和肝毒性的机制,在用氘标记的氨基酮戊酸(D_2 -ALA) (PPIX的前体)处理的WT和*Abcg2-null*小鼠中进行了肝脏和胆汁样品的代谢组学分析(图8A、8B和8C)。正如预期的那样, D_{16} -PPIX被鉴定为 D_2 -ALA的下游代谢物。与PPIX作为ABCG2底物的概念一致,与WT小鼠相比,*Abcg2-null*小鼠中 D_{16} -PPIX向胆汁的排泄显著减少(图8D),表明ABCG2的缺陷可以直接降低胆道系统中的PPIX水平,从而防止PPIX介导的胆管阻塞。有趣的是,在*Abcg2-null*小鼠的胆汁中检测到少量 D_{16} -PPIX(图8D),表明除ABCG2以外

的转运蛋白可能参与PPIX流出,尽管它们不太有效。我们观察到ABCG2缺陷小鼠肝脏中外排转运蛋白(例如,Mdr1、Mdr2、Bsep、Mrp2、Abcg5和Abcg8)的代偿性变化。

[0254] 代谢组学分析还发现了D16-原卟啉-1-0-酰基-葡萄糖苷酸(D₁₆-PPIX-glu),一种D₁₆-PPIX的缀合代谢物。D₁₆-PPIX-glu的结构通过将其与合成的PPIX-glu化学标准进行比较来验证(图9)。有趣的是,与WT小鼠相比,Abcg2-null小鼠肝脏和胆汁中的D₁₆-PPIX-glu水平显著增加(图8E和8F)。在Fech-mut/Abcg2-null小鼠的胆汁中也鉴定出PPIX-glu(图8G)。除PPIX-glu外,还在Fech-mut/Abcg2-null小鼠的胆汁中鉴定了PPIX的两种已知缀合代谢物,原卟啉-1-0-酰基-β-葡萄糖苷和原卟啉-1-0-酰基-β-木糖苷(图8G)。总体而言,与Fech-mut小鼠相比,Fech-mut/Abcg2-null小鼠胆汁中PPIX的缀合代谢物显著增加(图8H)。缀合代谢物被认为是解毒代谢物,因为它们比母体化合物更亲水且更容易排泄。因此,数据表明肝细胞中ABCG2的缺陷增加了PPIX的结合途径并促进了EPP条件下的PPIX排泄(图8I)。此外,RBC中ABCG2的缺陷降低了血浆中的PPIX水平(图3B),这反过来又减少了肝细胞对PPIX的摄取并降低了胆道系统中的PPIX水平,从而减轻了PPIX介导的胆管阻塞(图8I)。

[0255] 讨论

[0256] 光毒性是EPP患者最常见的症状。该工作表明EPP中的光毒性取决于ABCG2。与Fech-mut小鼠相比,RBC中的PPIX水平显著增加,但Fech-mut/Abcg2-null小鼠的血清和皮肤中PPIX水平降低。一致地,在Fech-mut小鼠中观察到的光毒性在Fech-mut/Abcg2-null小鼠中消失。这些数据表明,RBC中的ABCG2通过增加PPIX向皮肤的分布来驱动EPP中的光毒性(图10A)。此外,PPIX向胆道系统的ABCG2依赖性递送会导致胆管阻塞,这进一步增加了体内PPIX的积累,进而增强了光毒性(图10A)。数据表明抑制ABCG2可用作管理EPP相关光毒性的策略,因为ABCG2缺陷会减少PPIX在皮肤中的积累并防止光毒性(图10B)。

[0257] 在EPP中,肝脏中的PPIX主要通过循环系统来自骨髓,其次是肝细胞中较少程度的从头合成。PPIX在肝脏中的积累会导致肝损伤,这可能会因肝功能衰竭而危及生命。这里证明与EPP相关的肝毒性取决于ABCG2,ABCG2在胆道系统中建立高水平的PPIX,并导致胆管阻塞和胆汁淤积性肝损伤(图10A)。也就是说,EPP相关的肝毒性取决于ABCG2。在本文中显示,ABCG2的缺陷通过减少PPIX向肝胆系统的递送和缓解PPIX介导的胆管阻塞来消除EPP中的肝毒性(图10B)。此外,ABCG2的缺陷会在肝细胞中保留PPIX,在那里它可以被代谢为结合产物以促进它们的排泄。总体而言,ABCG2的缺陷打破了EPP患者PPIX积累的恶性循环,从而减少了体内PPIX的积累并减弱了肝毒性(图10B)。这些数据表明ABCG2是管理EPP相关肝毒性的靶标。

[0258] 本文公开的工作改变了当前关于ABCG2在卟啉稳态和毒性中的作用的研究范式。之前的报告表明,Abcg2-null小鼠对外源性光毒素脱镁叶绿素A(PPA)敏感,它是PPIX的类似物和ABCG2的底物。这种光毒性模型与EPP完全不同,因为口服PPA绕过RBC中的ABCG2,而PPA直接递送到皮肤;而EPP中PPIX到皮肤的分布取决于RBC中的ABCG2,并且ABCG2的缺陷会降低PPIX到皮肤的分布。此外,肠道中ABCG2的缺陷通过阻止PPA流出回到肠腔来增加PPA的生物利用度。此外,PPA不能通过缀合途径进一步代谢,因为甲基已经占据了PPA的缀合位置之一。此外,肝细胞中ABCG2的缺陷阻碍了PPA通过胆道系统的排泄,从而PPA回到循环系统并更多地沉积在皮肤中并增加光毒性。

[0259] EPP中ABCG2功能障碍的某些相关问题是:RBC中PPIX的积累是否安全以及RBC中高

水平的PPIX的命运如何?分析了EPP小鼠模型血液中的平均红细胞血红蛋白(MCH)和总血红蛋白(tHb)。在Fech-mut小鼠中观察到MCH和tHb降低,但在Fech-mut/Abcg2-null小鼠中未观察到。此外,与繁殖困难的Fech-mut小鼠相比,Fech-mut/Abcg2-null小鼠看起来健康,繁殖模式正常。在EPP患者中观察到脾肿大。有趣的是,尽管Fech-mut/Abcg2-null小鼠脾脏中的PPIX水平高于Fech-mut小鼠,但ABCG2的缺陷会减弱EPP相关的脾肿大。这些数据表明,在ABCG2缺陷的EPP中,RBC中PPIX的积累是安全的。红细胞的寿命约为120天;然后它们被脾脏和肝脏中的巨噬细胞回收。因此,Fech-mut/Abcg2-null小鼠的RBC中高水平的PPIX最终进入脾脏和肝脏的巨噬细胞,这是保护性的,因为PPIX保留在枯氏细胞(Kupffer cells)中,常驻肝脏巨噬细胞,减弱了与EPP相关的肝毒性。

[0260] 总之,目前的工作表明转运蛋白ABCG2是EPP病理生理学中的关键介质,表明ABCG2是EPP治疗的靶点。EPP中的发现也可用于管理卟啉药物/化学品和另一种卟啉症XLP的毒性,因为它们在PPIX积累方面都具有与EPP相似的生化基础。

[0261] 材料和方法

[0262] 动物发育、表征和维护

[0263] Fech-mut/Abcg2-null小鼠是通过将Fech-mut小鼠与Abcg2-null小鼠杂交产生的。Abcg2-null小鼠最初是在Dr.Schinkel的小组中产生的,并从Taconic Biosciences, Inc (Hudson, NY) 获得。Fech-mut小鼠购自Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), 其最初是基于FECH的功能丧失突变开发的。Fech-mut/Abcg2-null小鼠通过Fech突变和小鼠Abcg2的PCR基因分型进行验证。hPXR/Abcg2-null小鼠是通过将hPXR小鼠与Abcg2-null小鼠杂交产生的。hPXR小鼠最初是通过细菌人工染色体(BAC)转基因产生的。hPXR/Abcg2-null小鼠通过人PXR、小鼠Pxr和小鼠Abcg2的PCR基因分型进行验证。所有小鼠(2-4个月大,雄性)都保持在标准的12小时光照/黑暗循环下。小鼠的处理符合机构动物护理和使用委员会批准的研究方案。

[0264] 确定ABCG2在EPP相关光毒性中的作用的动物研究

[0265] WT、Abcg2-null、Fech-mut和Fech-mut/Abcg2-null小鼠用于确定ABCG2在EPP相关光毒性中的作用。简而言之,每天将小鼠的背部皮肤剃毛并暴露于紫外线(395-410nm)下30分钟,并持续5天。第6天处死所有小鼠。收获背部皮肤用于组织学分析。皮肤样品也用于测量PPIX。

[0266] 确定ABCG2在EPP相关肝毒性中的作用的动物研究

[0267] WT、Abcg2-null、Fech-mut和Fech-mut/Abcg2-null小鼠保持在相同的环境下并在相似的年龄处死。收集肝脏和血液样品用于评估肝损伤。肝脏、胆汁、脾脏和血液样品用于分析PPIX及其代谢物。

[0268] 确定ABCG2在化学诱导的PPIX积累和肝毒性中的作用的动物研究

[0269] WT和Abcg2-null小鼠用DDC(饮食中0.1%)或GSF(饮食中2.5%)处理两周。此外,hPXR和hPXR/Abcg2-null小鼠用RIF(100mg/Kg饮食)和INH(400mg/L饮用水)处理4周。处理后,采集血液和肝脏样品用于评估肝损伤和分析PPIX。

[0270] 确定ABCG2在调节PPIX分布、代谢和排泄中的作用的动物研究

[0271] WT和Abcg2-null小鼠用D₂-ALA(50mg/Kg, ip)处理,这是一种稳定的同位素标记的PPIX前体。D₂-ALA处理后一小时,收集肝脏和胆汁样品用于代谢组学分析。简而言之,肝脏

和胆汁样品通过超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱仪 (UPLC-QTOFMS, Waters Corp, Milford, MA) 进行分析。质心和积分质谱数据由MarkerLynx软件 (Waters Corp, Milford, MA) 处理以生成多变量数据矩阵。然后将这些数据导出到SIMCA-P+软件 (Umetrics, Kinnelon, NJ) 进行多变量数据分析。进行了主成分分析 (PCA) 和潜在结构判别分析的正交投影 (OPLS-DA), 以表示数据矩阵中的主要潜在变量。对组间区分有显著贡献的变量进行结构识别。

[0272] 统计

[0273] 数据显示为平均值±平均值的标准误差 (S.E.M.)。使用GraphPad Prism 7.0进行统计分析。使用Tukey事后检验的单因素方差分析 (ANOVA) 来比较多个组之间的差异。双尾学生t检验用于比较两组之间的差异。P值<0.05被认为具有统计学意义。

[0274] 化学品和试剂

[0275] 原卟啉IX (PPIX)、3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力定 (DDC)、灰黄霉素 (GSF)、利福平 (RIF)、异烟肼 (INH)、N-甲基吗啉和葡萄糖醛酸购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。氘标记的氨基酮戊酸 (D_2 -ALA) 购自CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canada)。1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶3-氧化六氟磷酸盐 (HATU) 购自Oakwood Products, Inc. (West Columbia, SC)。用于代谢物分析的所有溶剂均为市售的最高等级。

[0276] 代谢物分析的样品制备

[0277] 在RBC、血清、肝脏、皮肤、脾脏和胆汁中分析了PPIX和/或其代谢物。简而言之, 使用100 μ l 80%的甲醇从 3×10^7 个RBC中提取PPIX。将混合物超声10秒并以15,000g离心10分钟。将30 μ l血清样品加入70 μ l甲醇中, 然后涡旋并以15,000g离心10分钟。肝脏和脾脏样品在水中匀质化(100mg组织在500 μ l水中), 然后将200 μ l乙腈:甲醇(1:1, v/v)加入100 μ l每种匀浆液中, 然后涡旋并以15,000g离心10分钟。在液氮下将皮肤组织研磨成粉末, 然后在裂解缓冲液[0.1M Tris.HCl (pH=8)、5mM EDTA、0.2% SDS、0.2M NaCl和0.2mg/ml蛋白酶K]在54℃放置18小时(100mg组织粉末在500 μ l缓冲液中)。将200 μ l乙腈:甲醇(1:1, v/v)添加到100 μ l的每种皮肤混合物中, 然后以15,000g涡旋和离心10分钟。将2 μ l胆汁样品加入80 μ l 150%乙腈水溶液中, 然后涡旋30秒并以15,000g离心10分钟。将每个上清液转移到自动进样器小瓶中, 并将1.0 μ l注射到UPLC-QTOFMS中进行代谢物分析。

[0278] UPLC-QTOFMS分析

[0279] Acquity BEH C18柱(2.1 $\times$ 100mm, 1.7 μ m, Waters, Milford, MA)用于代谢物分离。流动相的流速为0.5ml/min, 使用梯度范围为5%至95%的乙腈/水, 其包含2mM NH_4HCO_3 和0.05%的氨水。柱温保持在50℃。QTOFMS在电喷雾电离的正模式下运行。源和去溶剂化温度分别设置为150℃和500℃。氩气用作碰撞气体。氮气用作锥孔和去溶剂化气体。毛细管和锥孔电压分别设置为0.8kV和40V。MS数据(50-1,000Da)以质心格式获得。碰撞能量从20eV上升到60eV的串联质谱片段化扫描(Tandem mass fragmentation scans)用于代谢物的结构解析。

[0280] 原卟啉-1-O-酰基-葡萄糖苷酸(PPIX-glu)的合成

[0281] 根据MS/MS数据, PPIX-glu被认为是PPIX的代谢物。为了确认其结构, 合成了PPIX-glu。简而言之, PPIX首先在N-甲基吗啉存在下在室温下使用HATU活化14小时, 然后与D-葡萄糖醛酸反应形成PPIX-glu。

[0282] 临床化学

[0283] 通过分析血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) (Pointe Scientific Canton, MI) 和总胆红素 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 评估肝损伤。根据制造商提供的标准程序分析这些肝损伤生物标志物。通过分析平均红细胞血红蛋白 (MCH) (HESKA HemaTrue; Loveland, CO) 和总血红蛋白 (tHb) (AVOXimeter 4000; Edison, NJ) 来评估血液毒性。

[0284] 组织学分析

[0285] 肝脏和皮肤组织首先在4%的磷酸甲醛溶液中固定过夜,然后脱水并用石蜡包埋。切割并染色4 μ m切片。苏木精和伊红 (H&E) 染色,组织切片在苏木精溶液中染色5min,自来水冲洗1min,然后在1%乙酸溶液中分化1min,然后在伊红溶液中染色1min。对于天狼猩红染色,组织切片在0.1%天狼猩红溶液中染色1h,然后用1%乙酸溶液洗涤两次。

[0286] PPIX的荧光分析

[0287] 将冷冻的肝组织安装在组织-Tek OCT化合物 (Sakura Finetek, Torrance, CA) 中并切成10 μ m的切片。然后通过荧光显微镜 (BZ-X710; Keyence Corporation, Osaka, Japan) 分析肝脏切片。PPIX以红色表示。细胞核被DAPI染色并以蓝色表示。

[0288] 定量PCR (qPCR) 分析

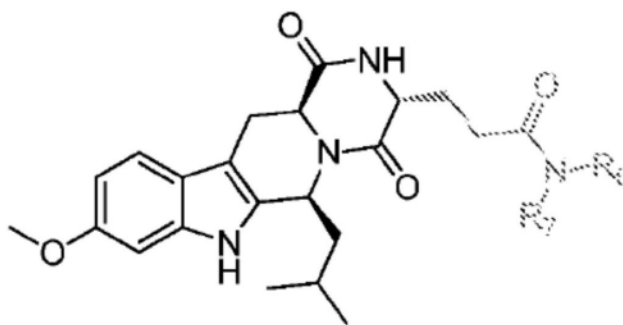
[0289] 使用TRIzol试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 从肝脏和皮肤组织中提取总mRNA,然后使用SuperScript II逆转录酶试剂盒和随机寡核苷酸 (Invitrogen) 从1 μ g总RNA中产生互补DNA (cDNA)。qPCR分析使用25ng cDNA、150nM的每个引物 (TNF- α 正向引物 (SEQ ID NO: 1), TNF- α 反向引物 (SEQ ID NO: 2), IL-1 β 正向引物 (SEQ ID NO: 3), IL-1 β 反向引物 (SEQ ID NO: 4), 胶原蛋白1a1正向引物 (SEQ ID NO: 5), 胶原蛋白1a1反向引物 (SEQ ID NO: 6), 胶原蛋白1a2正向引物 (SEQ ID NO: 7), 胶原蛋白1a2反向引物 (SEQ ID NO: 8), Mdr1正向引物 (SEQ ID NO: 9), Mdr1反向引物 (SEQ ID NO: 10), Mdr2正向引物 (SEQ ID NO: 11), Mdr2反向引物 (SEQ ID NO: 12), Bsep正向引物 (SEQ ID NO: 13), Bsep反向引物 (SEQ ID NO: 14), Mrp2正向引物 (SEQ ID NO: 15), Mrp2反向引物 (SEQ ID NO: 16), Abcg5正向引物 (SEQ ID NO: 17), Abcg5反向引物 (SEQ ID NO: 18), Abcg8正向引物 (SEQ ID NO: 19), 和Abcg8反向引物 (SEQ ID NO: 20)) 和5 μ L的SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 在10 μ L的总体积中进行。在ABI-Prism 7500序列检测系统 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 上读取qPCR板,并使用比较CT方法进行量化。

[0290] 实施例2: ABCG2抑制剂的开发及其在红细胞生成性原卟啉症 (EPP) 治疗中的应用

[0291] 尽管有几种具有不同支架的结构被公布为ABCG2抑制剂,但它们几乎不能在体内有效起作用。K0143是烟曲酶毒素C的结构类似物,是一种有效的选择性ABCG2抑制剂。然而, K0143具有较差的口服药代动力学特征。发现K0143非常不稳定,因为K0143结构中的叔丁酯基团被羧酸酯酶1快速水解 (方案1)。目前的工作开发了K0143类似物,重点是提高代谢稳定性。还测定了这些ABCG2抑制剂的抑制活性和细胞毒性。此外,在EPP小鼠模型中评估了这些ABCG2抑制剂的功效。

[0292] 结果

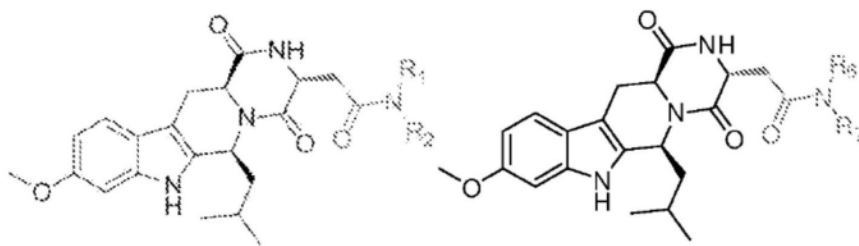
[0293] 表1显示了基于酰胺I开发的ABCG2抑制剂及其抑制活性、细胞毒性和代谢稳定性。IC₅₀, 半数最大抑菌浓度; CC₅₀, 50%细胞毒性浓度。



酰胺 I

化合物	R ₆	R ₇	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	HLM 稳定性 (% vs 0 min)	
					30 min	60 min
KO143	-	-	0.18	22.3	12%	3%
[0294] K2	H		0.13	52.2	83%	75%
					74%	51%
K12	H		3.23	> 100	74%	51%
K14	H		0.12	30.4	66%	57%
K18	Me	Me	0.54	> 100	60%	48%
K19	H	Ph	0.24	29.7	43%	24%
K20			0.74	85.6	22%	11%
K21	Et	Et	0.24	44.1	11%	6%
K22			4.40	> 100	-	-
K24			0.31	69.0	11%	7%
[0295] K26	Me		0.06	18.0	7%	7%
					73%	63%
K34	H		0.44	≈100	73%	63%

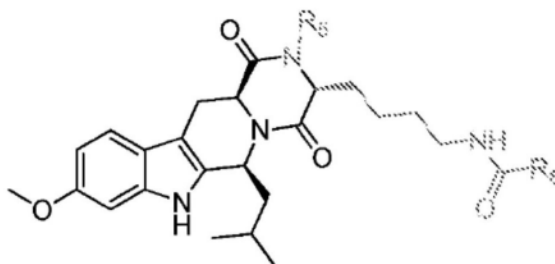
[0296] 表2显示了基于酰胺II开发的ABCG2抑制剂及其抑制活性、细胞毒性和代谢稳定性。IC₅₀, 半数最大抑菌浓度; CC₅₀, 50%细胞毒性浓度。



酰胺 II

[0297]	化合物	R ₆	R ₇	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	HLM 稳定性 (% vs 0 min)	
						30 min	60 min
	K3	H		0.18	58.9	74%	60%
	K23	H		0.13	46.6	45%	26%
	K25			3.14	26.5	-	-
	K31	H		0.27	> 100	65%	49%
	K33	H	Bn	0.25	31.1	37%	18%

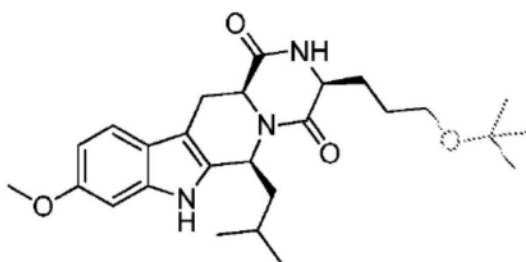
[0298] 表3显示了基于酰胺III开发的ABCG2抑制剂及其抑制活性、细胞毒性和代谢稳定性。IC₅₀, 半数最大抑菌浓度; CC₅₀, 50%细胞毒性浓度。



酰胺 III

化合物	R ₈	R ₅	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	HLM 稳定性 (% vs 0 min)	
					30 min	60 min
K8	苄氧基	H	> 1	71.7	42%	16%
[0299] K10		H	0.08	41.9	79%	72%
K11			0.16	39.6	7%	7%
K27			> 1	-	-	-
K28		H	0.14	42.6	32%	21%
K29	Ph	H	0.49	30.8	64%	51%
K30		H	0.12	43.7	35%	18%
K32		H	0.12	81.9	65%	49%

[0300] 表4显示了基于O-醚开发的ABCG2抑制剂及其抑制活性、细胞毒性和代谢稳定性。IC₅₀, 半数最大抑菌浓度; CC₅₀, 50%细胞毒性浓度。



O-醚

[0301]

化合物	HLM 稳定性			
	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	(% vs 0 min)	
			30 min	60 min
K7	0.09	> 100	16%	9%

[0302] 药代动力学。

[0303] 根据抑制活性、细胞毒性和代谢稳定性,选择K2、K31和K34用于小鼠的药代动力学研究。所有这三种K0143类似物都显示出比K0143更好的药代动力学特征,尤其是K31 (图11)。

[0304] K31在EPP小鼠模型中对抗光毒性的功效。

[0305] K31具有高ABCG2抑制活性、低细胞毒性、高代谢稳定性和理想的药代动力学特征(表2和图11)。因此,进一步研究了K31在EPP小鼠模型中对光毒性的影响。发现用K31处理完全保护EPP小鼠免受光毒性(图12)。Fech-mut小鼠中K31的戒断试验在K31戒断后不久也显示出光毒性(图13)。

[0306] ABCG2抑制剂对PPIX从RBC流出的影响。

[0307] 评估了K31对PPIX流出的影响。如图14所示,K31显著抑制了PPIX从RBC流出。

[0308] 总结与讨论

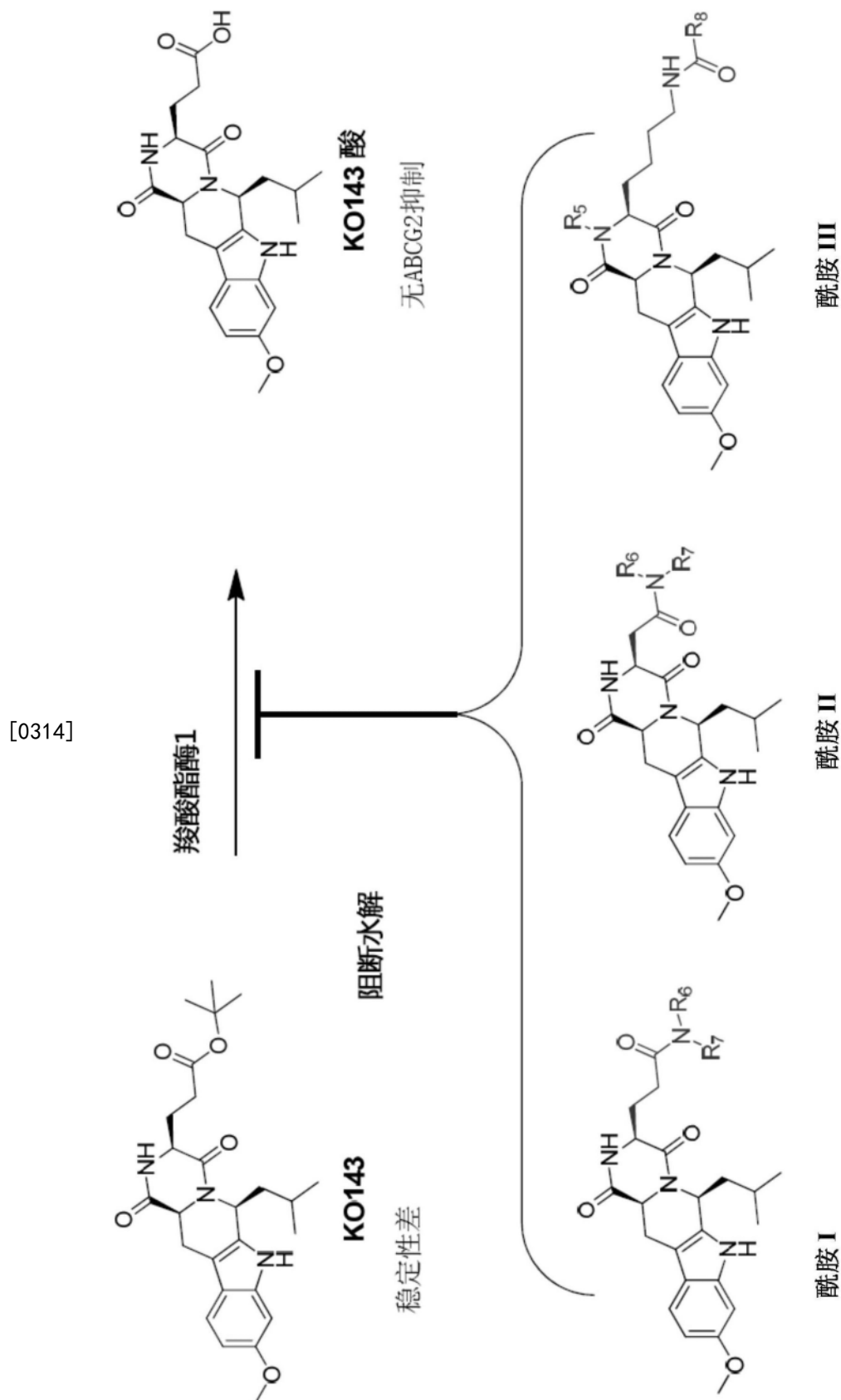
[0309] 总之,目前的工作开发了具有更好代谢稳定性的ABCG2抑制剂。本文还表明,ABCG2抑制剂可用于治疗EPP相关的光毒性,这是EPP患者最常见的症状。

[0310] 除了EPP治疗外,开发的ABCG2抑制剂还可用于预防癌症治疗中的多药抗性(MDR)。临床上使用的很多抗癌药物都是ABCG2的底物,而ABCG2在癌细胞中过表达,泵出抗癌药物,导致MDR和化疗失败。因此,ABCG2是在癌症治疗中克服MDR的靶标。开发的ABCG2抑制剂可用于预防癌症治疗中的MDR。

[0311] 方法

[0312] ABCG2抑制剂的设计

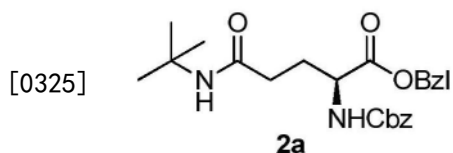
[0313] 为了开发稳定的ABCG2抑制剂,我们根据酯部分用不同的羧酸酯酶抗性基团(包括酰胺和醚)替换了叔丁酯基团。三个系列的酰胺(I、II、III)的结构在方案1中公开。



方案 1. 羧酸酯酶 1 将 KO143 酯水解为 KO143 酸，并设计了 ABCG2 抑制剂来阻断水解。

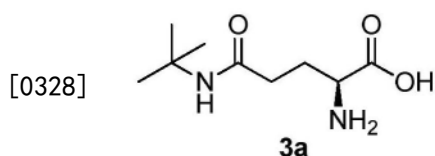
[0315] 化学合成。

[0316] 合成了 25 种目标化合物 (表 1、表 2、表 3 和表 4)。用于制备这些化合物的合成策略在



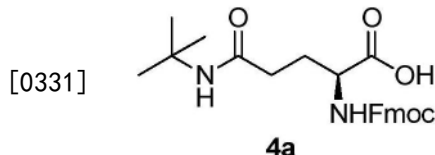
[0326] (S)-5-(苄氧基)-4-(((苄氧基)羰基)氨基)-5-氧代戊酸(1)购自Chem-Impex (Wood Dale, IL)。向化合物1 (8g, 21.5mmol) 的CH₂Cl₂溶液中加入EDCI (7g, 36mmol), HOBt (4.9g, 36.5mmol) 和叔丁胺 (3.37mL, 32.3mmol)。混合物在室温下搅拌过夜, 然后用饱和NaHCO₃水溶液淬灭, 用二氯甲烷萃取。合并的有机相用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥并浓缩。残余物通过硅胶色谱法 (PE/EtOAc=2:1) 纯化, 得到为无色油状物的化合物2a (8.9g, 97%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.34 (m, 10H), 5.66 (d, J=8.0Hz, 1H), 5.44 (brs, 1H), 5.23-5.12 (m, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.37 (m, 1H), 2.24-2.06 (m, 3H), 1.99 (m, 1H), 1.29 (s, 9H)。HRMS (ESI): C₂₄H₃₀N₂O₅Na的m/z (M+Na)⁺计算值: 449.2052, 实测值: 449.2062。

[0327] (S)-2-氨基-5-(叔丁基氨基)-5-氧代戊酸(3a)



[0329] 向化合物2a (8.9g, 20.9mmol) 的MeOH的溶液中加入10% Pd/C (900mg), 并将悬浮液在室温下氢化5小时直至原料耗尽。然后过滤混合物, 浓缩滤液, 得到为白色固体的化合物3a (2.09g, 49%)。HRMS (ESI): C₉H₁₉N₂O₃的m/z (M+H)⁺计算值: 203.1396, 实测值: 203.1392。

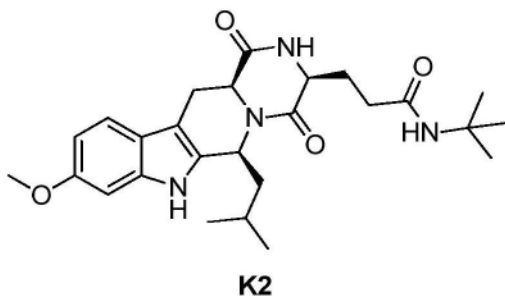
[0330] (S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(叔丁基氨基)-5-氧代戊酸(4a)



[0332] 将酸3a (7.16g, 35.4mmol) 溶于NaHCO₃水溶液 (8.92g, 106.2mmol, 100mL H₂O) 中, 并缓慢加入Fmoc N-羟基琥珀酰亚胺酯 (11.94g, 35.4mmol) 的1,4-二恶烷 (100mL) 溶液。反应混合物在室温下搅拌过夜。然后将所得混合物浓缩以除去大部分有机溶剂, 并用浓HCl将含水残余物调节至pH=1。混合物用EtOAc萃取, 合并的有机相用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥并浓缩。通过硅胶色谱法 (CH₂Cl₂/MeOH=10:1) 纯化残余物, 得到呈白色固体状的化合物4a (13g, 87%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.59 (m, 2H), 7.40 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.31 (t, J=7.2Hz, 2H), 6.06 (d, 1H), 5.76 (brs, 1H), 4.43-4.27 (m, 3H), 4.21 (t, J=6.9Hz, 1H), 2.49 (m, 1H), 2.37 (m, 1H), 2.23-2.11 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 1.35 (s, 9H)。HRMS (ESI): C₂₄H₂₇N₂O₅的m/z (M-H)⁻计算值: 423.1920, 实测值423.1922。

[0333] N-(叔丁基)-3-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)丙酰胺(K2)

[0334]

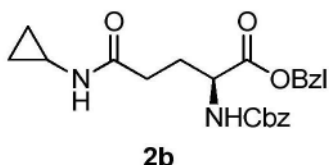


[0335] 在0℃氮气下,向化合物4a (8g, 19mmol) 的干燥CH₂Cl₂溶液中加入无水DMF (0.3mL, 3.8mmol), 然后加入SOCl₂ (13.8mL, 190mmol)。混合物在室温下搅拌2小时,直到所有的原料耗尽。浓缩混合物并用CH₂Cl₂洗涤残余物3次以蒸发大部分剩余的SOCl₂。将粗酰氯重新溶解在干燥CH₂Cl₂中,并在0℃将溶液滴加到化合物5 (1.8g, 5.7mmol, 参见Li Y, Hayman E, Plesescu M, 等Synthesis of potent BCRP inhibitor—Ko143. Tetrahedron Letters 2008; 49:1480-1483) 和Et₃N (2.35mL, 17mmol) 在CH₂Cl₂中的混合物中。然后将混合物升温至室温并搅拌过夜。用饱和NaHCO₃水溶液猝灭反应,并用CH₂Cl₂萃取。合并的有机相用盐水洗涤,经MgSO₄干燥并浓缩。残余物通过硅胶色谱法 (PE/EtOAc=2:1) 纯化,得到3.0g粗 (1S, 3S) - 甲基-2- ((S) - 2- (((9H- 茛-9-基) 甲氧基) 羰基) 氨基) -5- (叔丁基氨基) -5- 氧代戊酰基) -1- 异丁基-7- 甲氧基-2,3,4,9- 四氢-1H-吡啶并[3,4-b] 吡啶-3- 羧酸盐 (6a)。HRMS (ESI): C₄₂H₅₁N₄O₇的m/z (M+H)⁺计算值: 723.3758, 实测值: 723.3754。

[0336] 将上述粗化合物6a溶解于THF (60mL) 中,加入哌啶 (3mL), 室温搅拌过夜。将所得混合物浓缩,并将粗品溶解在EtOAc中。有机相用盐水洗涤,用硫酸镁干燥并浓缩。通过硅胶色谱法 (PE/EtOAc=1:1) 纯化残余物,然后在PE/EtOAc/CH₂Cl₂中重结晶,得到为浅黄色固体的K2 (820mg, 31%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.92 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.44 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.89 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.83 (dd, J=8.6, 2.2Hz, 1H), 5.45 (m, 2H), 4.05-3.95 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.52 (dd, J=15.8, 5.0Hz, 1H), 3.04 (dd, J=15.8, 11.7Hz, 1H), 2.42-2.34 (m, 3H), 2.30-2.20 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.59-1.48 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.06 (d, J=6.5Hz, 3H), 0.83 (d, J=6.4Hz, 3H)。HRMS (ESI): C₂₆H₃₇N₄O₄的m/z (M+H)⁺计算值: 469.2815, 实测值: 469.2818。

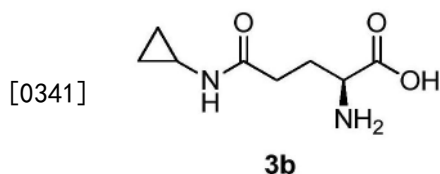
[0337] (S) -2- (((苄氧基) 羰基) 氨基) -5- (环丙氨基) -5- 氧代戊酸苄酯 (2b)

[0338]



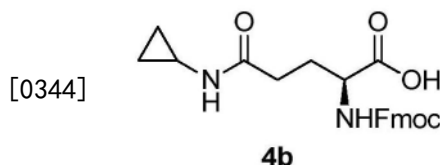
[0339] 按照与制备化合物2a所述的程序类似的程序,由环丙胺 (0.75mL, 10.76mmol) 制备为白色固体的化合物2b (2.0g, 92%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.33 (m, 10H), 5.86 (brs, 1H), 5.62 (m, 1H), 5.22-5.11 (m, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.37 (m, 1H), 2.66 (m, 1H), 2.27-2.08 (m, 3H), 1.97 (m, 1H), 0.77-0.66 (m, 2H), 0.46 (m, 2H)。HRMS (ESI): C₂₃H₂₆N₂O₅Na的m/z (M+Na)⁺计算值: 433.1739, 实测值: 433.1741。

[0340] (S) -2- 氨基-5- (环丙氨基) -5- 氧代戊酸 (3b)



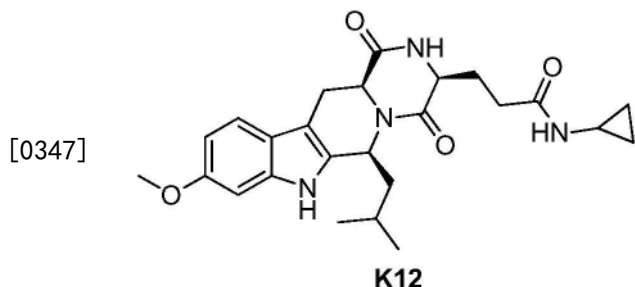
[0342] 向化合物2b (2g, 4.9mmol) 的THF/MeOH溶液中加入10% Pd/C (200mg), 并将悬浮液在室温下氢化3小时直至原料耗尽。然后将混合物用水溶解并过滤, 将滤液浓缩并进一步冻干得到粗化合物3b (1.2g)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 3.11 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.19 (t, J = 7.5Hz, 2H), 1.86 (m, 2H), 0.58 (m, 2H), 0.37 (m, 2H)。HRMS (ESI): C₈H₁₃N₂O₃的m/z (M-H)⁻计算值: 185.0926, 实测值: 185.0942。

[0343] (S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(环丙氨基)-5-氧代戊酸 (4b)



[0345] 按照与制备化合物4a所述的程序类似的程序, 由化合物3b (1.2g) 制备呈白色固体的化合物4b (1.2g, 2步60%产率)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 7.89 (m, 3H), 7.73 (d, J = 7.4Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.0Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.3Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.4Hz, 2H), 4.33-4.14 (m, 3H), 3.92 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.12 (t, J = 7.6Hz, 2H), 1.97 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 0.62-0.50 (m, 2H), 0.41-0.31 (m, 2H)。HRMS (ESI): C₂₃H₂₃N₂O₅的m/z (M-H)⁻计算值: 407.1607, 实测值: 407.1541。

[0346] N-环丙基-3-(((3S, 6S, 12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1, 4-二氧-1, 2, 3, 4, 6, 7, 12, 12a-八氢吡啶并[1', 2':1, 6]吡啶并[3, 4-b]吡啶-3-基)丙酰胺 (K12)

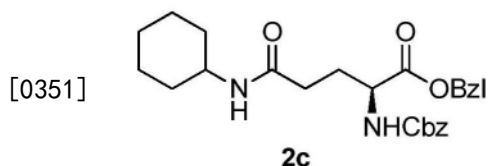


[0348] 向化合物5 (158mg, 0.5mmol) 的N-甲基吡咯烷酮溶液中加入化合物4b (306mg, 0.75mmol)、DIEA (131μL, 0.75mmol) 和CIP (140mg, 0.5mmol)。反应混合物在室温下搅拌24小时。24小时后分别加入第二份和第三份化合物4b、DIEA和CIP, 并将混合物再搅拌24小时。4天后, 通过TLC监测反应直至消耗大部分原料。然后用水稀释所得混合物并用EtOAc萃取。有机相用盐水洗涤, 用MgSO₄干燥并浓缩。残余物通过硅胶色谱法 (PE/EtOAc = 1:1) 纯化, 得到为淡黄色固体的(1S, 3S)-甲基-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(环丙氨基)-5-氧代戊酰基)-1-异丁基-7-甲氧基-2, 3, 4, 9-四氢-1H-吡啶并[3, 4-b]吡啶-3-羧酸盐 (6b), 130mg粗品。HRMS (ESI): C₂₅H₃₂N₄O₄的m/z (M+H)⁺计算值: 707.3445, 实测值: 707.3452。

[0349] 将120mg上述化合物6b (0.17mmol) 溶解在THF中, 加入哌啶 (0.3mL)。混合物在室温下搅拌过夜。将所得混合物浓缩, 并将粗品溶解在EtOAc中。有机相用盐水洗涤, 用MgSO₄干

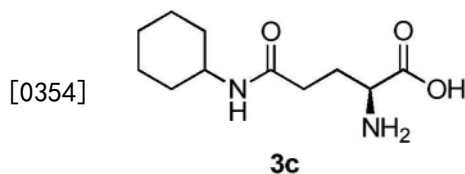
干燥并浓缩。残余物通过硅胶色谱法 (PE/EtOAc=2:1) 纯化, 得到为白色固体的K12 (40mg, 52%)。¹H NMR (400MHz, CDC13, 阻转异构体约4:1的混合物) δ 7.90 (s, 0.8H), 7.85 (s, 0.2H), 7.60 (s, 0.2H), 7.51 (s, 0.8H), 7.44 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.89 (d, J=1.8Hz, 1H), 6.83 (dd, J=8.7, 2.2Hz, 1H), 5.89 (brs, 0.2H), 5.80 (brs, 0.8H), 5.44 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.52 (dd, J=15.8, 4.9Hz, 1H), 3.04 (dd, J=15.7, 11.6Hz, 1H), 2.78-2.68 (m, 1H), 2.40 (m, 2H), 2.30 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.54 (m, 2H), 1.06 (m, 3H), 0.87-0.75 (m, 5H), 0.60 (m, 0.4H), 0.52 (m, 1.6H)。HRMS (ESI): C₂₅H₃₂N₄O₄的m/z (M+H)⁺计算值: 453.2502, 实测值: 453.2508。

[0350] (S)-2-(((苄氧基)羰基)氨基)-5-(环己基氨基)-5-氧代戊酸苄酯 (2c)



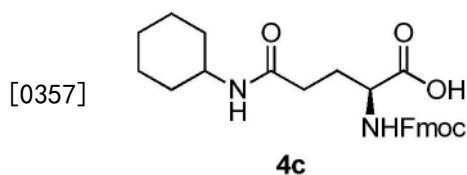
[0352] 按照与制备化合物2a所述的程序类似的程序, 由环己胺 (1.22mL, 10.76mmol) 制备为白色固体的化合物2c (2.14g, 87%)。¹H NMR (400MHz, CDC13) δ 7.44-7.32 (m, 10H), 5.71 (d, J=7.8Hz, 1H), 5.58 (d, J=7.0Hz, 1H), 5.25-5.14 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.41 (m, 1H), 3.81-3.68 (m, 1H), 2.28-2.13 (m, 3H), 2.07-1.97 (m, 1H), 1.89 (d, J=12.1Hz, 2H), 1.76-1.62 (m, 3H), 1.44-1.27 (m, 2H), 1.23-1.01 (m, 3H)。HRMS (ESI): C₂₆H₃₂N₂O₅Na的m/z (M+Na)⁺计算值: 475.2209, 实测值: 475.2202。

[0353] (S)-2-氨基-5-(环己基氨基)-5-氧代戊酸 (3c)



[0355] 按照与制备化合物3b所述的程序类似的程序, 由化合物2c (2.14g, 4.7mmol) 制备为白色固体的化合物3c (1.06g, 98%)。¹H NMR (400MHz, D₂O) δ 3.64 (t, J=6.1Hz, 1H), 3.49 (m, 1H), 2.35-2.21 (m, 2H), 2.02 (m, 2H), 1.72 (m, 2H), 1.68-1.57 (m, 2H), 1.51 (m, 1H), 1.31-1.01 (m, 5H)。HRMS (ESI): C₁₁H₁₉N₂O₃的m/z (M-H)⁻计算值: 227.1396, 实测值: 227.1402。

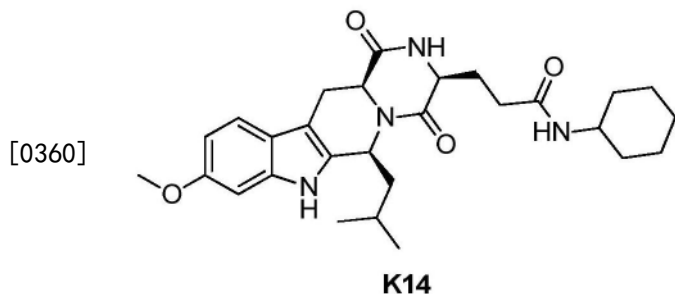
[0356] (S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(环己基氨基)-5-氧代戊酸 (4c)



[0358] 按照与制备化合物4a所述的程序类似的程序, 由化合物3c (1.05g, 4.6mmol) 制备为白色固体的化合物4c (2.09g, 93%)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 12.57 (brs, 1H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.73 (d, J=7.4Hz, 2H), 7.66 (t, J=8.1Hz, 2H), 7.42 (dt, J=7.5, 3.8Hz, 2H), 7.33 (t, J=7.5Hz, 2H), 4.31-4.15 (m, 3H), 3.94 (m, 1H), 3.50 (d, J=7.4Hz, 1H), 2.15 (t, J=7.6Hz, 2H), 2.02-1.92 (m, 1H), 1.73 (m, 5H), 1.53 (m, 1H), 1.24 (m, 2H), 1.10 (m, 3H)。HRMS (ESI): C₂₆H₂₉N₂O₅的m/z (M-H)⁻计算值: 449.2076, 实测值: 449.2077。

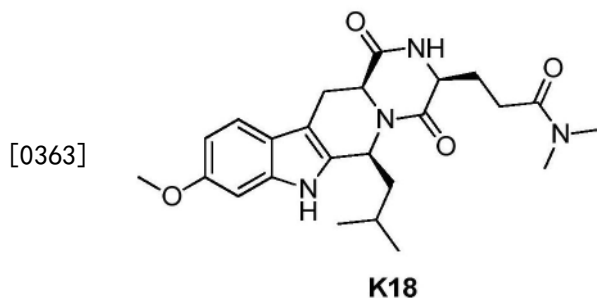
[0359] N-环己基-3-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,

12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)丙酰胺(K14)



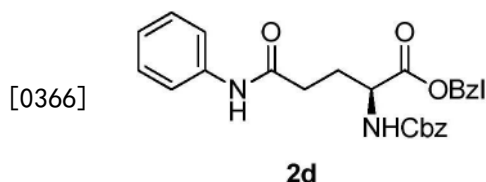
[0361] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,由化合物4c(1.01g,2.25mmol)制备为浅灰色固体的K14(73mg,30%)。¹H NMR(400MHz,CDC13)δ8.45(brs,1H),7.83(brs,1H),7.41(d,J=8.7Hz,1H),6.89(d,J=2.1Hz,1H),6.81(dd,J=8.6,2.0Hz,1H),5.88(brs,1H),5.52-5.43(m,1H),4.06-3.93(m,2H),3.84(s,3H),3.83-3.72(m,1H),3.51(dd,J=15.8,4.9Hz,1H),3.04(dd,J=15.7,11.7Hz,1H),2.51-2.24(m,4H),1.97-1.87(m,2H),1.77-1.66(m,3H),1.58(m,3H),1.36(m,2H),1.23-1.09(m,3H),1.03(d,J=6.2Hz,3H),0.81(d,J=6.3Hz,3H)。HRMS(ESI):C₂₈H₃₉N₄O₄的m/z(M+H)⁺计算值:495.2971,实测值:495.2969。

[0362] 3-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)-N,N-二甲基丙酰胺(K18)



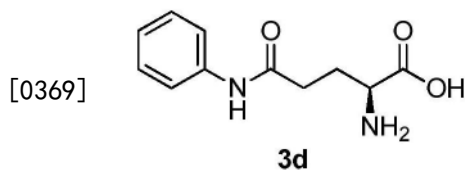
[0364] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,制备为白色固体的K18。¹H NMR(400MHz,CDC13)δ8.02(s,1H),7.82(s,1H),7.43(d,J=8.5Hz,1H),6.88(d,J=2.0Hz,1H),6.82(dd,J=8.6,2.0Hz,1H),5.45(m,1H),4.00(m,2H),3.84(s,3H),3.50(dd,J=15.9,5.0Hz,1H),3.08-3.00(m,1H),3.00(s,3H),2.98(s,3H),2.56(m,3H),2.34(m,1H),1.77-1.68(m,1H),1.60-1.49(m,2H),1.06(d,J=6.4Hz,3H),0.83(d,J=6.3Hz,3H)。HRMS(ESI):C₂₄H₃₃N₄O₄的m/z(M+H)⁺计算值:441.2502,实测值:441.2499。

[0365] (S)-2-(((苄氧基)羰基)氨基)-5-氧代-5-(苯基氨基)戊酸苄酯(2d)



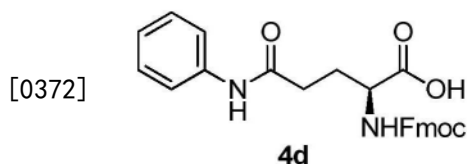
[0367] 按照与制备化合物2a所述的程序类似的程序,由苯胺(0.98mL,10.76mmol)制备为白色固体的化合物2d(2.2g,93%)。¹H NMR(400MHz,CDC13)δ7.94(brs,1H),7.53(d,J=7.9Hz,2H),7.39-7.28(m,12H),7.10(t,J=7.4Hz,1H),5.63(d,J=7.6Hz,1H),5.22-5.13(m,2H),5.09(m,2H),4.47(m,1H),2.37(m,3H),2.03(m,1H)。HRMS(ESI):C₂₆H₂₆N₂O₅Na的m/z(M+Na)⁺计算值:469.1739,实测值:469.1734。

[0368] (S)-2-氨基-5-氧代-5-(苯基氨基)戊酸(3d)



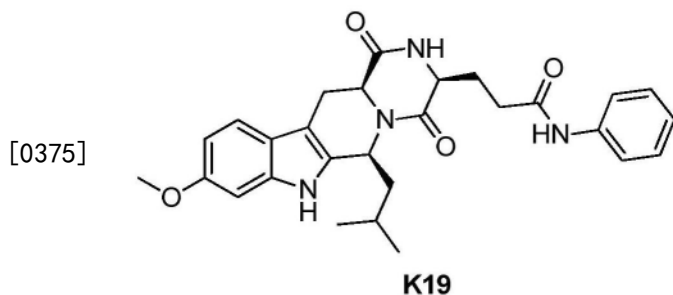
[0370] 按照与制备化合物3b所述的程序类似的程序,由化合物2d(2.2g,5.0mmol)制备为白色固体的化合物3d(1.08g,99%)。¹H NMR(400MHz,DMSO) δ 7.56(d,J=7.7Hz,2H),7.26(t,J=7.9Hz,2H),7.00(t,J=7.4Hz,1H),3.15(m,1H),2.35(s,2H),1.82(m,2H)。HRMS(ESI):C₁₁H₁₃N₂O₃的m/z(M-H)⁻计算值:221.0926,实测值:221.0936。

[0371] (S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-氧代-5-(苯基氨基)戊酸(4d)



[0373] 按照与制备化合物4a所述的程序类似的程序,由化合物3d(1.08g,4.9mmol)制备为浅黄色固体的化合物4d(1.88g,86%)。¹H NMR(400MHz,DMSO) δ 10.01(s,1H),7.90(d,J=7.4Hz,2H),7.73(d,J=7.5Hz,2H),7.59(d,J=7.9Hz,2H),7.42(t,J=7.3Hz,2H),7.31(m,4H),7.02(t,J=7.4Hz,1H),4.25(m,3H),3.96(m,1H),2.42(t,J=7.6Hz,2H),2.15-2.04(m,1H),1.89(m,1H)。HRMS(ESI):C₂₆H₂₃N₂O₅的m/z(M-H)⁻计算值:443.1607,实测值:443.1604。

[0374] 3-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)-N-苯基丙酰胺(K19)



[0376] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,由化合物4d(0.99g,2.25mmol)制备为浅黄色固体的K19(45mg,18%)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ 9.55(s,1H),7.52(d,J=8.1Hz,2H),7.38(d,J=8.6Hz,1H),7.29(d,J=8.2Hz,2H),7.12-7.03(m,1H),6.87(d,J=2.1Hz,1H),6.76(dd,J=8.5,2.0Hz,1H),5.46-5.36(m,1H),3.99(m,2H),3.82(s,3H),3.47(dd,J=15.6,4.7Hz,1H),3.39(m,1H),3.05-2.92(dd,J=15.6,11.7Hz,1H),2.52(m,2H),2.39-2.26(m,2H),1.65(m,1H),1.60-1.46(m,2H),1.01(d,J=6.1Hz,3H),0.77(d,J=6.1Hz,3H)。HRMS(ESI):C₂₈H₃₃N₄O₄的m/z(M+H)⁺计算值:489.2502,实测值:489.2481。

[0377] (S)-2-(((苄氧基)羰基)氨基)-5-氧代-5-(吡咯烷-1-基)戊酸苄酯(2e)

[0378]

2e

[0379] 按照与制备化合物2a所述的程序类似的程序,由吡咯烷(0.88mL,10.76mmol)制备为无色油状物的化合物2e(2.3g,100%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.40-7.28(m,10H),6.04(d,J=7.4Hz,1H),5.22-5.03(m,4H),4.39(m,1H),3.41(t,J=6.7Hz,2H),3.22(t,J=6.6Hz,2H),2.36-2.17(m,3H),2.15-2.02(m,1H),1.93-1.75(m,4H)。HRMS(ESI):C₂₄H₂₉N₂O₅的m/z(M+H)⁺计算值:425.2076,实测值:425.2076。

[0380] (S)-2-氨基-5-氧代-5-(吡咯烷-1-基)戊酸(3e)

[0381]

3e

[0382] 按照与制备化合物3a所述的程序类似的程序,由化合物2e(2.3g,5.4mmol)制备为白色固体的化合物3e(1.07g,98%)。¹H NMR(400MHz,MeOD) δ3.61(t,J=5.8Hz,1H),3.53-3.44(m,2H),3.42(t,J=6.9Hz,2H),2.61-2.54(m,2H),2.16-2.09(m,2H),2.02-1.93(m,2H),1.92-1.83(m,2H)。HRMS(ESI):C₉H₁₅N₂O₃的m/z(M-H)⁻计算值:199.1083,实测值:199.1049。

[0383] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-氧代-5-(吡咯烷-1-基)戊酸(4e)

[0384]

4e

[0385] 按照与制备化合物4a所述的程序类似的程序,由化合物3e(1.07g,5.34mmol)制备为白色固体的化合物4e(1.76g,78%)。¹H NMR(400MHz,DMSO) δ7.90(d,J=7.5Hz,2H),7.72(dd,J=7.1,4.8Hz,2H),7.66(d,J=7.8Hz,1H),7.42(t,J=7.4Hz,2H),7.32(t,J=7.4Hz,2H),4.32-4.16(m,3H),3.98(m,1H),3.42-3.29(m,4H),2.40-2.21(m,2H),2.00(m,1H),1.88-1.69(m,5H)。HRMS(ESI):C₂₉H₂₅N₉O₅的m/z(M-H)⁻计算值:421.1763,实测值:421.1749。

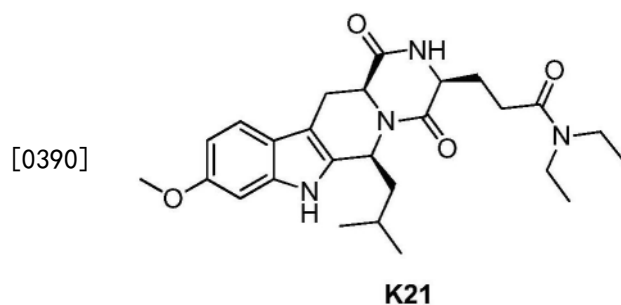
[0386] (3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-3-(3-氧代-3-(吡咯烷-1-基)丙基)-2,3,12,12a-四氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-1,4(6H,7H)-二酮(K20)

[illegible]

[0388] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,由化合物4e (0.95g, 2.25mmol) 制备为白色固体的K20 (92mg, 40%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.08 (s, 2H), 7.42 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H),

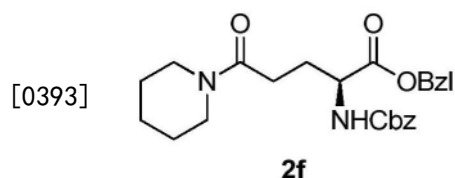
6.88 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 6.82 (dd, $J=8.6, 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.45 (m, 1H), 4.00 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.54-3.44 (m, 3H), 3.38 (m, 2H), 3.04 (dd, $J=15.8, 11.7\text{Hz}$, 1H), 2.61-2.43 (m, 3H), 2.40-2.27 (m, 1H), 2.02-1.92 (m, 2H), 1.91-1.81 (m, 2H), 1.77-1.68 (m, 1H), 1.60-1.47 (m, 2H), 1.06 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H), 0.82 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H)。HRMS (ESI): $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4$ 的 m/z ($M+H$)⁺ 计算值: 467.2658, 实测值: 467.2629。

[0389] N,N-二乙基-3-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)丙酰胺 (K21)



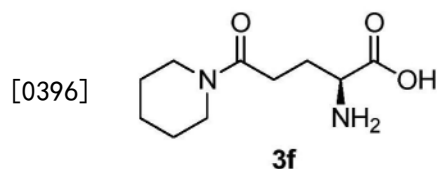
[0391] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,制备为浅黄色固体的K21。¹H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.00 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.43 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 6.88 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.82 (dd, $J=8.6, 2.0\text{Hz}$, 1H), 5.46 (m, 1H), 3.99 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.50 (dd, $J=15.8, 4.9\text{Hz}$, 1H), 3.40 (m, 2H), 3.31 (m, 2H), 3.04 (dd, $J=15.7, 11.7\text{Hz}$, 1H), 2.66-2.44 (m, 3H), 2.38-2.28 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.60-1.48 (m, 2H), 1.15 (m, 6H), 1.06 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.82 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H)。HRMS (ESI): $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4$ 的 m/z ($M+H$)⁺ 计算值: 469.2815, 实测值: 469.2802。

[0392] (S)-2-(((苄氧基)羰基)氨基)-5-氧代-5-(哌啶-1-基)戊酸苄酯 (2f)



[0394] 按照与制备化合物2a所述的程序类似的程序,由哌啶 (0.98mL, 10.76mmol) 制备为无色油状物的化合物2f (2.2g, 93%)。¹H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.28 (m, 10H), 5.85 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 5.22-5.13 (m, 2H), 5.13-5.04 (m, 2H), 4.40 (m, 1H), 3.53-3.45 (m, 2H), 3.27-3.18 (m, 2H), 2.40-2.16 (m, 3H), 2.11-2.04 (m, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.49 (m, 4H)。HRMS (ESI): $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5$ 的 m/z ($M+H$)⁺ 计算值: 439.2233, 实测值: 439.2239。

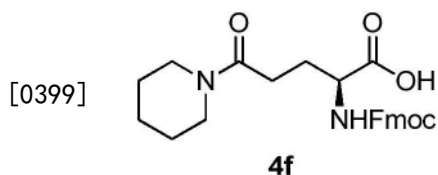
[0395] (S)-2-氨基-5-氧代-5-(哌啶-1-基)戊酸 (3f)



[0397] 按照与制备化合物3a所述的程序类似的程序,由化合物2f (2.2g, 5.0mmol) 制备为白色固体的化合物3f (1.02g, 95%)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 3.46-3.36 (m, 5H), 3.21-3.13 (m, 2H), 2.39 (m, 2H), 1.94-1.75 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.48 (m, 2H), 1.40 (m, 2H)。HRMS (ESI):

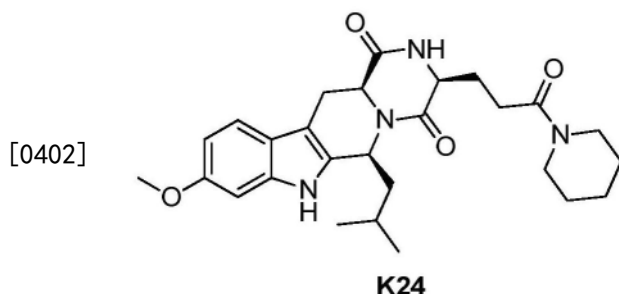
$C_{10}H_{17}N_2O_3$ 的 m/z (M-H)⁻计算值:213.1239,实测值:213.1227。

[0398] (S)-2-(((9H-苈-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-氧代-5-(哌啶-1-基)戊酸(4f)



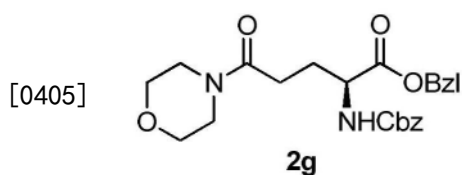
[0400] 按照与制备化合物4a所述的程序类似的程序,由化合物3f(1.02g,4.76mmol)制备为白色固体的化合物4f(1.82g,88%)。¹H NMR(400MHz,DMSO) δ7.90(d,J=7.4Hz,2H),7.72(m,2H),7.64(m,1H),7.47-7.36(t,J=7.2Hz,2H),7.33(t,J=7.2Hz,2H),4.33-4.14(m,3H),4.01(m,1H),3.41(m,4H),2.36(m,2H),1.97(m,1H),1.81(m,1H),1.55(m,2H),1.42(m,4H)。HRMS(ESI): $C_{25}H_{27}N_2O_5$ 的 m/z (M-H)⁻计算值:435.1920,实测值:435.1913。

[0401] (3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-3-(3-氧代-3-(哌啶-1-基)丙基)-2,3,12,12a-四氢吡啶并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-1,4(6H,7H)-二酮(K24)



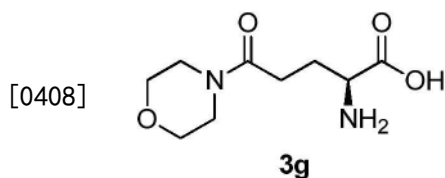
[0403] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,由化合物4f(0.97g,2.25mmol)制备为白色固体的K24(42mg,18%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.97(s,1H),7.79(s,1H),7.43(d,J=8.6Hz,1H),6.88(d,J=2.1Hz,1H),6.82(dd,J=8.6,2.2Hz,1H),5.45(dd,J=9.2,4.2Hz,1H),4.03-3.95(m,2H),3.84(s,3H),3.64-3.54(m,2H),3.51(dd,J=15.9,5.0Hz,1H),3.43-3.37(m,2H),3.04(dd,J=15.8,11.7Hz,1H),2.64-2.45(m,3H),2.31(m,1H),1.73(m,1H),1.67-1.60(m,2H),1.60-1.48(m,6H),1.06(d,J=6.5Hz,3H),0.83(d,J=6.4Hz,3H)。HRMS(ESI): $C_{27}H_{37}N_4O_4$ 的 m/z (M+H)⁺计算值:481.2815,实测值:481.2817。

[0404] (S)-2-(((苈氧基)羰基)氨基)-5-吗啉代-5-氧代戊酸苄酯(2g)



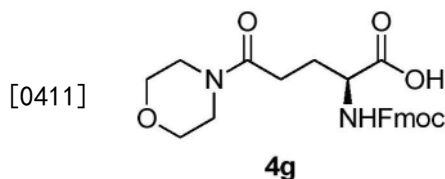
[0406] 按照与制备化合物2a所述的程序类似的程序,由吗啉(0.94mL,10.76mmol)制备为浅黄色固体的化合物2g(2g,84%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.39-7.29(m,10H),5.71(d,J=7.6Hz,1H),5.24-5.04(m,4H),4.46-4.37(m,1H),3.64-3.59(m,2H),3.56(m,4H),3.27(m,2H),2.39-2.18(m,3H),2.04(m,1H)。HRMS(ESI): $C_{24}H_{29}N_2O_6$ 的 m/z (M+H)⁺计算值:441.2026,实测值:441.2032。

[0407] (S)-2-氨基-5-吗啉代-5-氧代戊酸(3g)



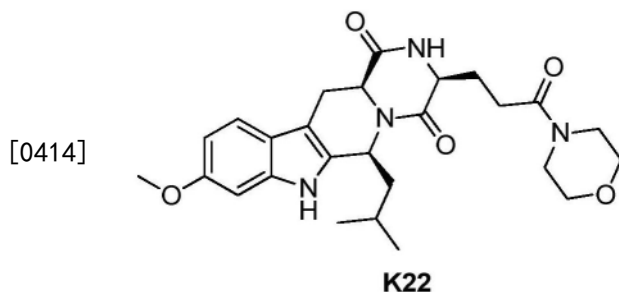
[0409] 按照与制备化合物3a所述的程序类似的程序,由化合物2g (2g, 4.54mmol) 制备为白色固体的化合物3g (0.98g, 99%)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ3.77-3.17 (m, 10H), 2.45 (m, 1H), 2.01-1.76 (m, 2H)。HRMS (ESI): C₉H₁₅N₂O₄的m/z (M-H)⁻计算值: 215.1032, 实测值: 215.1031。

[0410] (S)-2-(((9H-茱-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-吗啉代-5-氧代戊酸 (4g)



[0412] 按照与制备化合物4a所述的程序类似的程序,由化合物3g (0.98g, 4.53mmol) 制备为白色固体的化合物4g (1.57g, 79%)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ12.59 (brs, 1H), 7.97-7.87 (m, 2H), 7.73 (m, 2H), 7.66 (m, 1H), 7.49-7.39 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 5.77 (m, 1H), 4.27 (m, 3H), 4.01 (m, 1H), 3.48-3.30 (m, 7H), 2.55 (m, 1H), 2.39 (m, 2H), 2.00 (m, 1H), 1.89-1.73 (m, 1H)。HRMS (ESI): C₂₄H₂₅N₂O₆的m/z (M-H)⁻计算值: 437.1713, 实测值: 437.1725。

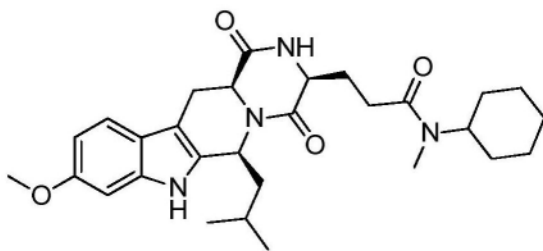
[0413] (3S, 6S, 12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-3-(3-吗啉代-3-氧代丙基)-2,3,12,12a-四氢吡啶并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋啉-1,4(6H,7H)-二酮 (K22)



[0415] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,由化合物4g (0.99g, 2.25mmol) 制备为白色固体的K22 (48mg, 20%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.00 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.43 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.88 (d, J=1.9Hz, 1H), 6.83 (dd, J=8.6, 2.1Hz, 1H), 5.44 (dd, J=9.3, 4.1Hz, 1H), 4.01 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.73-3.61 (m, 6H), 3.55-3.43 (m, 3H), 3.04 (dd, J=15.7, 11.8Hz, 1H), 2.67-2.43 (m, 3H), 2.34 (m, 1H), 1.78-1.72 (m, 1H), 1.60-1.48 (m, 2H), 1.06 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.82 (d, J=6.3Hz, 3H)。HRMS (ESI): C₂₆H₃₅N₄O₅的m/z (M+H)⁺计算值: 483.2607, 实测值: 483.2609。

[0416] N-环己基-3-((3S, 6S, 12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡啶并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋啉-3-基)-N-甲基丙酰胺 (K26)

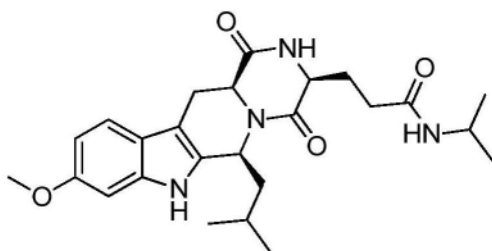
[0417]

**K26**

[0418] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,制备为白色固体的K26。¹H NMR (400MHz, CDCl₃,阻转异构体约的1:1的混合物) δ7.98 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.43 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.88 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.82 (dd, J=8.6, 2.2Hz, 1H), 5.46 (dd, J=9.4, 4.6Hz, 1H), 4.50-4.40 (m, 0.5H), 4.04-3.94 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.61-3.54 (m, 0.5H), 3.50 (dd, J=15.9, 5.0Hz, 1H), 3.04 (dd, J=15.8, 11.7Hz, 1H), 2.84 (s, 1.5H), 2.83 (s, 1.5H), 2.70-2.44 (m, 3H), 2.39-2.26 (m, 1H), 1.90-1.23 (m, 12H), 1.15 (m, 1H), 1.06 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.83 (d, J=6.2Hz, 3H)。HRMS (ESI): C₂₉H₄₁N₄O₄的m/z (M+H)⁺计算值:509.3128,实测值:509.3125。

[0419] 3-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)-N-异丙基丙酰胺 (K34)

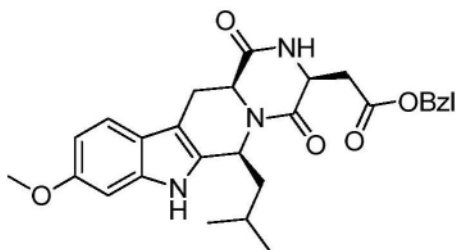
[0420]

**K34**

[0421] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,制备为浅黄色固体的K34。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.17 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.42 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.89 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.82 (dd, J=8.6, 2.2Hz, 1H), 5.66 (d, J=7.9Hz, 1H), 5.47 (dd, J=9.2, 4.1Hz, 1H), 4.13-4.07 (m, 1H), 4.06-3.96 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.51 (dd, J=15.8, 5.0Hz, 1H), 3.04 (dd, J=15.6, 11.7Hz, 1H), 2.48-2.23 (m, 4H), 1.74-1.65 (m, 1H), 1.61-1.47 (m, 2H), 1.17 (d, J=6.6Hz, 6H), 1.04 (d, J=6.5Hz, 3H), 0.82 (d, J=6.4Hz, 3H)。HRMS (ESI): C₂₅H₃₅N₄O₄的m/z (M+H)⁺计算值:455.2658,实测值:455.2663。

[0422] 2-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)乙酸苄酯 (K16)

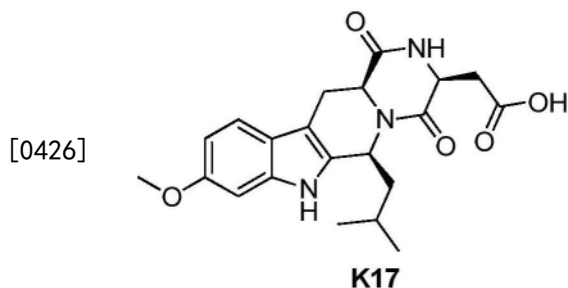
[0423]

**K16**

[0424] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,由Fmoc-Asp(OBzl)-OH(10.8g, 27mmol)制

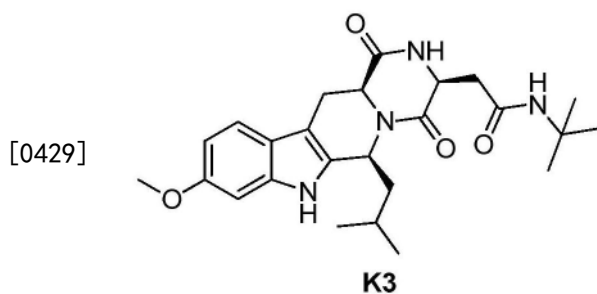
备为白色固体的K16(1.1g, 37%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.91(s, 1H), 7.47-7.30(m, 6H), 6.89(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.83(dd, $J=8.8, 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.78(s, 1H), 5.42(dd, $J=8.9, 3.3\text{Hz}$, 1H), 5.25-5.14(m, 2H), 4.41-4.32(dd, $J=8.7, 3.8\text{Hz}$, 1H), 4.06(dd, $J=11.6, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.85(s, 3H), 3.55(dd, $J=15.9, 4.6\text{Hz}$, 1H), 3.36(dd, $J=17.2, 3.9\text{Hz}$, 1H), 2.99(dd, $J=15.6, 11.7\text{Hz}$, 1H), 2.78(dd, $J=17.3, 9.3\text{Hz}$, 1H), 1.75(m, 1H), 1.54(m, 2H), 1.04(d, $J=6.2\text{Hz}$, 3H), 0.81(d, $J=6.1\text{Hz}$, 3H)。HRMS(ESI): $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_5$ 的 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 计算值: 490.2342, 实测值: 490.2345。

[0425] 2-((3S, 6S, 12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)乙酸(K17)



[0427] 按照与制备化合物3a所述的程序类似的程序,由K16(950mg, 4.33mmol)制备为浅灰色固体的K17(750mg, 96%)。 ^1H NMR(400MHz, MeOD) δ 10.46(brs, 1H), 7.40(d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 6.92(s, 1H), 6.74(dd, $J=8.9, 2.0\text{Hz}$, 1H), 5.44(m, 1H), 4.42(m, 1H), 4.23(m, 1H), 3.83(s, 3H), 3.66(brs, 1H), 3.48(dd, $J=15.2, 4.5\text{Hz}$, 1H), 3.09-2.80(m, 4H), 1.75(m, 1H), 1.61(m, 2H), 1.01(d, $J=6.1\text{Hz}$, 3H), 0.83(d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H)。HRMS(ESI): $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_5$ 的 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 计算值: 400.1872, 实测值: 400.1877。

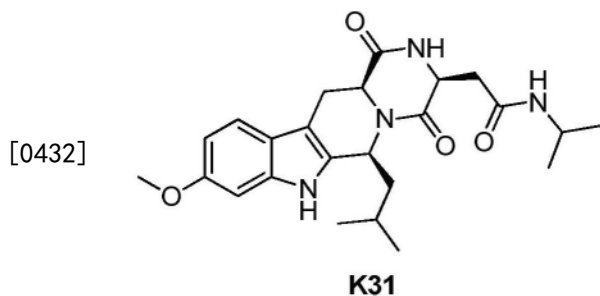
[0428] N-(叔丁基)-2-((3S, 6S, 12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)乙酰胺(K3)



[0430] 向K17(105mg, 0.26mmol)的 CH_2Cl_2 溶液中加入EDCI(100mg, 0.52mmol)、HOBt(70mg, 0.52mmol)和叔丁胺(55 μL , 0.52mmol)。混合物在室温下搅拌过夜。然后所得混合物用饱和 NaHCO_3 水溶液猝灭,并用 CH_2Cl_2 萃取。合并的有机相用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥并浓缩。残余物通过硅胶色谱法($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=40:1$)纯化,得到为白色固体的K3(48mg, 40%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.94(s, 1H), 7.43(d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 7.10(s, 1H), 6.88(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.83(dd, $J=8.8, 2.0\text{Hz}$, 1H), 5.82(s, 1H), 5.48-5.39(m, 1H), 4.27(dd, $J=9.4, 4.9\text{Hz}$, 1H), 4.04(dd, $J=11.2, 4.2\text{Hz}$, 1H), 3.85(s, 3H), 3.55(dd, $J=15.8, 4.7\text{Hz}$, 1H), 2.97(m, 2H), 2.63(dd, $J=15.0, 8.6\text{Hz}$, 1H), 1.72(m, 1H), 1.61-1.47(m, 2H), 1.35(s, 9H), 1.04(d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.82(d, $J=6.2\text{Hz}$, 3H)。HRMS(ESI): $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4$ 的 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 计算值: 455.2658, 实测值: 455.2658。

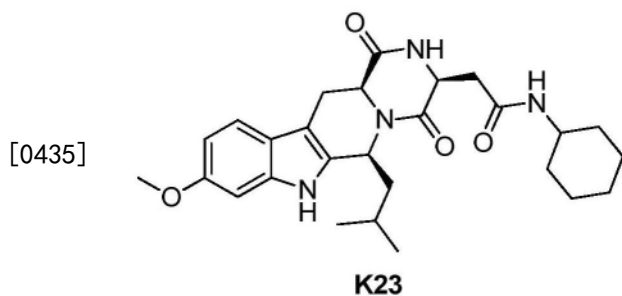
测值:455.2657。

[0431] 2-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)-N-异丙基乙酰胺 (K31)



[0433] 按照与制备K3所述的程序相似的程序,由异丙胺盐酸盐(50mg,0.52mmol)制备为白色固体的K31(50mg,44%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.92(s,1H),7.43(d,J=8.6Hz,1H),7.11(s,1H),6.89(d,J=2.0Hz,1H),6.83(dd,J=8.6,2.0Hz,1H),5.85(d,J=7.6Hz,1H),5.42(dd,J=9.2,4.0Hz,1H),4.28(dd,J=8.5,3.8Hz,1H),4.12-4.01(m,2H),3.85(s,3H),3.55(dd,J=15.8,4.9Hz,1H),2.99(m,2H),2.66(dd,J=15.1,8.5Hz,1H),1.72(m,1H),1.60-1.48(m,2H),1.17(m,6H),1.05(d,J=6.4Hz,3H),0.81(d,J=6.4Hz,3H)。HRMS(ESI):C₂₄H₃₃N₄O₄的m/z(M+H)⁺计算值:441.2502,实测值:441.2507。

[0434] N-环己基-2-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)乙酰胺 (K23)



[0436] 按照与制备K3所述的程序相似的程序,由环己胺(60μL,0.52mmol)制备为浅灰色固体的K23(55mg,44%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ8.04(s,1H),7.42(d,J=8.6Hz,1H),7.19(s,1H),6.88(d,J=2.1Hz,1H),6.82(dd,J=8.6,2.2Hz,1H),6.03(d,J=8.2Hz,1H),5.42(dd,J=9.2,4.0Hz,1H),4.28(dd,J=8.0,4.0Hz,1H),4.03(dd,J=11.7,4.7Hz,1H),3.84(s,3H),3.81-3.69(m,1H),3.54(dd,J=15.8,4.8Hz,1H),3.05-2.94(m,2H),2.68(dd,J=15.0,8.2Hz,1H),1.90(m,2H),1.78-1.65(m,3H),1.65-1.48(m,3H),1.36(m,2H),1.17(m,3H),1.04(d,J=6.4Hz,3H),0.80(d,J=6.3Hz,3H)。HRMS(ESI):C₂₇H₃₇N₄O₄的m/z(M+H)⁺计算值:481.2815,实测值:481.2814。

[0437] (3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-3-(2-氧代-2-(哌啶-1-基)乙基)-2,3,12,12a-四氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-1,4(6H,7H)-二酮 (K25)

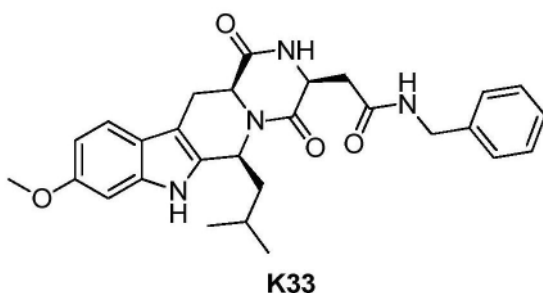
[0438]



[0439] 按照与制备K3所述的程序相似的程序,由哌啶(48 μ L,0.52mmol)制备为白色固体的K25(62mg,51%)。¹H NMR(400MHz,CDC1₃/d₄-MeOD) δ 8.87(s,1H),7.40(d,J=8.5Hz,1H),6.86(d,J=1.1Hz,1H),6.78(dd,J=8.3,1.5Hz,1H),5.38(dd,J=9.9,4.1Hz,1H),4.36(d,J=9.7Hz,1H),4.03(dd,J=12.3,4.8Hz,1H),3.82(s,3H),3.54(m,3H),3.41(m,3H),2.99-2.87(dd,J=11.7,15.52Hz,1H),2.56(dd,J=17.1,10.6Hz,1H),1.75-1.45(m,10H),1.01(d,J=6.1Hz,3H),0.78(d,J=6.3Hz,3H)。HRMS(ESI):C₂₆H₃₅N₄O₄的m/z (M+H)⁺计算值:467.2658,实测值:467.2670。

[0440] N-苄基-2-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡啶并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)乙酰胺(K33)

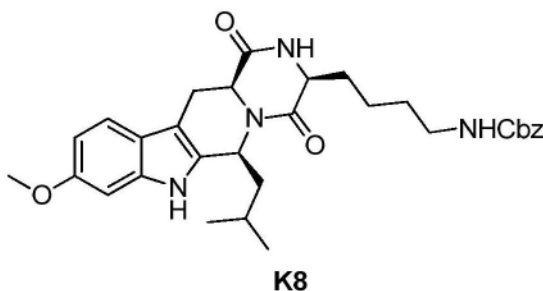
[0441]



[0442] 按照与制备K3所述的程序相似的程序,由苄胺(57 μ L,0.52mmol)制备为白色固体的K33(68mg,53%)。¹H NMR(400MHz,CDC1₃) δ 7.94(s,1H),7.45(d,J=8.6Hz,1H),7.39-7.33(m,2H),7.32-7.26(m,3H),7.17(s,1H),6.91(d,J=1.9Hz,1H),6.86(dd,J=8.7,2.2Hz,1H),6.45(m,1H),5.46-5.37(m,1H),4.47(qd,J=14.8,5.9Hz,2H),4.34(dd,J=8.0,3.5Hz,1H),4.05(dd,J=11.7,4.2Hz,1H),3.87(s,3H),3.56(dd,J=15.8,4.7Hz,1H),3.06(m,2H),2.75(dd,J=15.1,8.2Hz,1H),1.65(m,1H),1.52(m,2H),1.04(d,J=6.3Hz,3H),0.81(d,J=6.3Hz,3H)。HRMS(ESI):C₂₈H₃₃N₄O₄的m/z (M+H)⁺计算值:489.2502,实测值:489.2509。

[0443] (4-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡啶并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)丁基)氨基甲酸苄酯(K8)

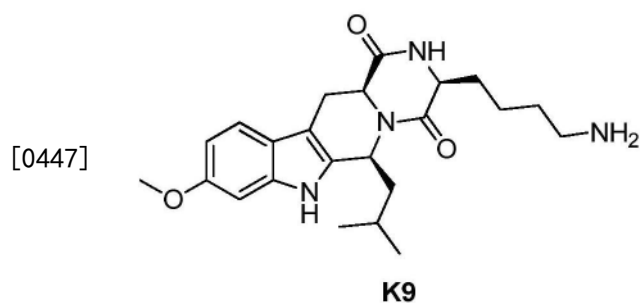
[0444]



[0445] 按照与制备K12所述的程序相似的程序,由Fmoc-Lys(Z)-OH制备为白色固体的K8。¹H

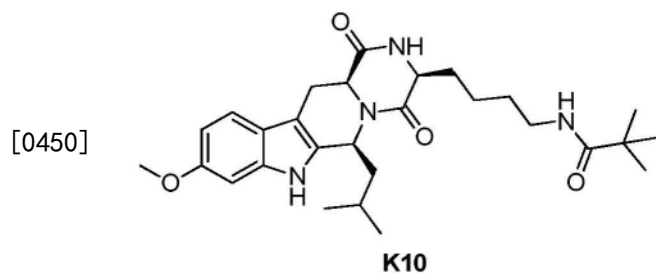
NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.92 (s, 1H), 7.44 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.32 (m, 5H), 6.89 (d, J=1.9Hz, 1H), 6.83 (dd, J=8.5, 2.0Hz, 1H), 6.68 (brs, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.17-5.07 (m, 2H), 5.02 (m, 1H), 3.98 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.53 (dd, J=15.7, 4.7Hz, 1H), 3.41-3.12 (m, 2H), 3.01 (dd, J=15.6, 11.7Hz, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.57 (m, 6H), 1.04 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.82 (d, J=6.2Hz, 3H)。HRMS (ESI): C₃₁H₃₉N₄O₅的m/z (M+H)⁺计算值: 547.2920, 实测值: 547.2919。

[0446] (3S, 6S, 12aS) - 3- (4-氨基丁基) -6-异丁基-9-甲氧基-2,3,12,12a-四氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-1,4 (6H,7H) -二酮 (K9)



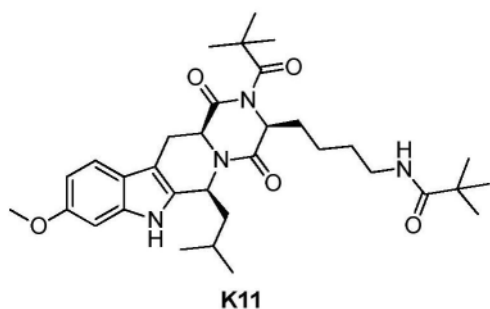
[0448] 向K8 (1.06g) 的MeOH的溶液中加入10% Pd/C (100mg) 和浓HCl (1mL)。混合物在室温下氢化4小时直至原料耗尽。然后过滤悬浮液并浓缩滤液。残余物为浅绿色固体的粗K9盐酸盐。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 10.95 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.00 (brs, 3H), 7.40 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.86 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.66 (dd, J=8.6, 2.2Hz, 1H), 5.33 (dd, J=7.9, 4.5Hz, 1H), 4.13 (dd, J=11.5, 4.8Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.30 (dd, J=15.6, 4.7Hz, 1H), 2.77 (m, 3H), 1.92-1.79 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.57 (m, 4H), 1.50-1.35 (m, 3H), 0.90 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.75 (d, J=6.5Hz, 3H)。HRMS (ESI): C₂₃H₃₃N₄O₃的m/z (M+H)⁺计算值: 413.2553, 实测值: 413.2543。

[0449] N- (4- ((3S, 6S, 12aS) -6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基) 丁基) 棕榈酰胺 (K10)



[0451] N- (4- ((3S, 6S, 12aS) -6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-2-新戊酰-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基) 丁基) 棕榈酰胺 (K11)

[0452]



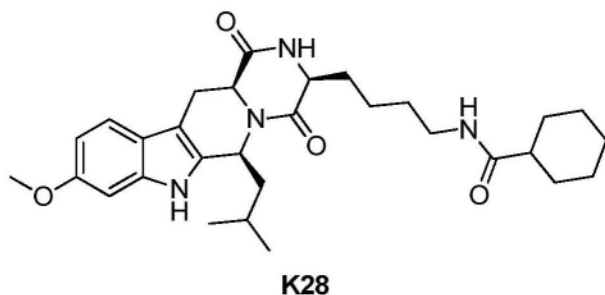
[0453] 在0℃向K9(90mg,0.22mmol)和Et₃N(89μL,0.64mmol)的二氯甲烷溶液中加入三甲基乙酰氯(40μL,0.32mmol)。所得混合物在室温下搅拌4小时,然后用水淬灭。有机相用盐水洗涤,用MgSO₄干燥并浓缩。通过硅胶色谱法(CH₂Cl₂/MeOH=30:1)纯化残余物以提供为白色固体的K10(28mg,26%) 和K11(26mg,18%)。

[0454] K10: ¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ8.14(brs,1H),7.43(d,J=8.6Hz,1H),6.89(d,J=2.0Hz,1H),6.82(dd,J=8.6,2.0Hz,1H),6.75(brs,1H),5.89(m,1H),5.45(dd,J=9.1,3.9Hz,1H),4.06-3.94(m,2H),3.84(s,3H),3.52(dd,J=15.8,4.8Hz,1H),3.40(m,1H),3.25(m,1H),3.01(dd,J=15.5,11.9Hz,1H),2.13(m,1H),2.01(m,1H),1.73(m,1H),1.64-1.49(m,4H),1.49-1.35(m,2H),1.23(s,9H),1.03(d,J=6.4Hz,3H),0.81(d,J=6.3Hz,3H)。HRMS(ESI):C₂₈H₄₁N₄O₄的m/z(M+H)⁺计算值:497.3128,实测值:497.3101。

[0455] K11: ¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.93(s,1H),7.41(d,J=8.7Hz,1H),6.88(d,J=2.0Hz,1H),6.83(dd,J=8.4,2.0Hz,1H),5.84(m,1H),5.34(m,1H),4.42(m,1H),4.06(dd,J=11.3,4.2Hz,1H),3.85(s,3H),3.62(dd,J=15.4,4.0Hz,1H),3.26(m,2H),2.95(dd,J=15.3,11.6Hz,1H),2.04(m,1H),1.95-1.68(m,3H),1.66-1.41(m,5H),1.34(s,9H),1.20(s,9H),0.98(d,J=6.5Hz,3H),0.86(d,J=6.5Hz,3H)。HRMS(ESI):C₃₃H₄₉N₄O₅的m/z(M+H)⁺计算值:581.3703,实测值:581.3714。

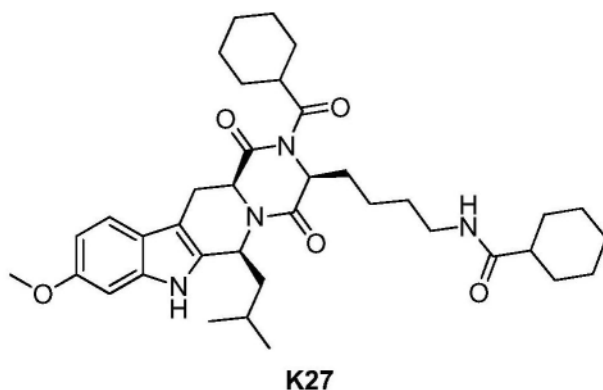
[0456] N-(4-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)丁基)环己烷甲酰胺(K28)

[0457]



[0458] N-(4-((3S,6S,12aS)-2-(环己烷羰基)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)丁基)环己烷甲酰胺(K27)

[0459]



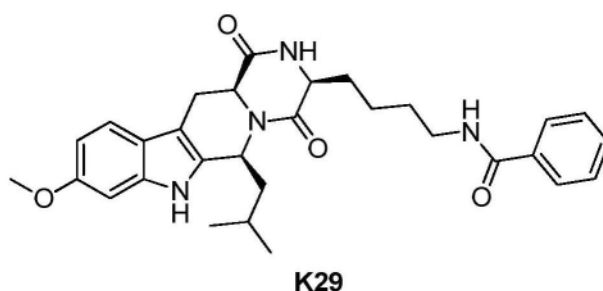
[0460] 按照与制备K10所述的程序类似的程序,由环己烷碳酰氯制备为白色固体的K27和K28。

[0461] K28: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.15 (s, 1H), 7.43 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 6.89 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.82 (dd, $J=8.6, 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.73 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 5.46 (dd, $J=9.1, 4.1\text{Hz}$, 1H), 4.03 (dd, $J=11.5, 4.7\text{Hz}$, 1H), 3.97 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.52 (dd, $J=15.8, 4.8\text{Hz}$, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.26 (m, 1H), 3.01 (dd, $J=15.7, 11.7\text{Hz}$, 1H), 2.18-2.05 (m, 2H), 1.98 (m, 1H), 1.87 (d, $J=13.4\text{Hz}$, 2H), 1.78 (t, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 1.72-1.63 (m, 2H), 1.62-1.52 (m, 4H), 1.46 (dd, $J=14.0, 9.0\text{Hz}$, 4H), 1.33-1.18 (m, 3H), 1.03 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.82 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H)。HRMS (ESI): $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_4$ 的 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 计算值: 523.3284, 实测值: 523.3279。

[0462] K27: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.94 (s, 1H), 7.38 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 6.88 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.82 (dd, $J=8.6, 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.55 (m, 1H), 5.04 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 4.83 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 4.29 (dd, $J=11.6, 3.9\text{Hz}$, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.56 (dd, $J=15.4, 3.6\text{Hz}$, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.20 (m, 2H), 2.97 (dd, $J=14.5, 12.6\text{Hz}$, 1H), 2.30-2.21 (m, 1H), 2.12-1.97 (m, 2H), 1.90-1.60 (m, 10H), 1.58-1.46 (m, 3H), 1.47-1.34 (m, 7H), 1.22 (m, 7H), 0.94 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 0.90 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H)。HRMS (ESI): $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_5$ 的 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 计算值: 633.4016, 实测值: 633.4008。

[0463] N-(4-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]呋喃-3-基)丁基)苯甲酰胺 (K29)

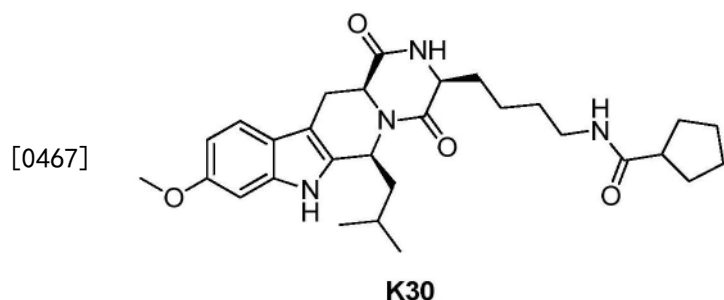
[0464]



[0465] 按照与制备K10所述的程序类似的程序,由苯甲酰氯制备为白色固体的K29。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.16 (s, 1H), 7.86-7.79 (m, 2H), 7.48 (m, 1H), 7.45-7.38 (m, 3H), 6.90 (s, 1H), 6.88 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 6.81 (dd, $J=8.6, 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.57 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 5.45 (dd, $J=9.1, 4.1\text{Hz}$, 1H), 4.01 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.60 (m, 1H), 3.55-3.45 (m, 2H), 2.99 (dd, $J=15.9, 12.0\text{Hz}$, 1H), 2.18 (m, 1H), 2.08-1.96 (m, 1H), 1.76-1.66 (m, 3H), 1.62-1.47

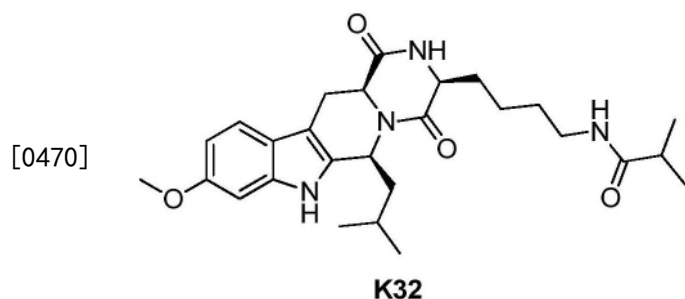
(m, 4H), 1.01 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.78 (d, J=6.3Hz, 3H)。HRMS (ESI): $C_{30}H_{37}N_4O_4$ 的 m/z (M+H)⁺ 计算值: 517.2815, 实测值: 517.2822。

[0466] N-(4-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)丁基)环戊烷甲酰胺 (K30)



[0468] 按照与制备K10所述的程序类似的程序,制备为白色固体的K30。¹H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8.09 (s, 1H), 7.43 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.89 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.82 (dd, J=8.6, 2.2Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 5.77 (t, J=6.0Hz, 1H), 5.45 (dd, J=9.1, 4.1Hz, 1H), 4.03 (dd, J=11.7, 4.8Hz, 1H), 3.97 (t, J=4.8Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.52 (dd, J=15.7, 4.8Hz, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.26 (m, 1H), 3.01 (dd, J=15.7, 11.7Hz, 1H), 2.53 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.05-1.94 (m, 1H), 1.92-1.70 (m, 7H), 1.64-1.51 (m, 6H), 1.50-1.40 (m, 2H), 1.04 (d, J=6.5Hz, 3H), 0.82 (d, J=6.4Hz, 3H)。HRMS (ESI): $C_{29}H_{41}N_4O_4$ 的 m/z (M+H)⁺ 计算值: 509.3128, 实测值: 509.3136。

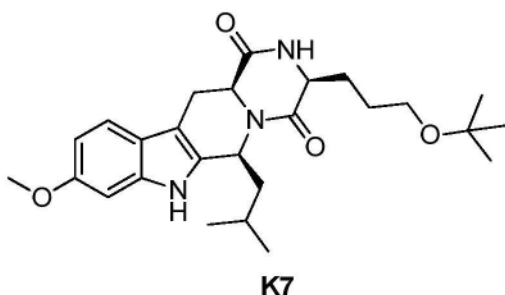
[0469] N-(4-((3S,6S,12aS)-6-异丁基-9-甲氧基-1,4-二氧-1,2,3,4,6,7,12,12a-八氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-3-基)丁基)异丁酰胺 (K32)



[0471] 按照与制备K10所述的程序类似的程序,制备为白色固体的K32。¹H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8.11 (s, 1H), 7.43 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.89 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.82 (dd, J=8.6, 2.0Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.78 (t, J=5.7Hz, 1H), 5.46 (dd, J=9.0, 4.0Hz, 1H), 4.07-3.94 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.52 (dd, J=15.8, 4.8Hz, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.01 (dd, J=15.6, 11.7Hz, 1H), 2.44-2.31 (m, 1H), 2.17-2.06 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.77-1.70 (m, 1H), 1.63-1.40 (m, 6H), 1.19 (m, 6H), 1.03 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.82 (d, J=6.4Hz, 3H)。HRMS (ESI): $C_{27}H_{39}N_4O_4$ 的 m/z (M+H)⁺ 计算值: 483.2971, 实测值: 483.2964。

[0472] (3S,6S,12aS)-3-(3-(叔丁氧基)丙基)-6-异丁基-9-甲氧基-2,3,12,12a-四氢吡嗪并[1',2':1,6]吡啶并[3,4-b]吡啶-1,4(6H,7H)-二酮 (K7)

[0473]



[0474] 按照与制备K12所述的程序类似的程序,制备为白色固体的K7。¹H NMR (400MHz, CDC13) δ 7.98 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.44 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.88 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.83 (dd, J=8.6, 2.1Hz, 1H), 5.45 (dd, J=9.3, 4.1Hz, 1H), 4.01 (dd, J=11.7, 4.9Hz, 1H), 3.89-3.81 (m, 4H), 3.54-3.36 (m, 3H), 3.04 (dd, J=15.8, 11.6Hz, 1H), 2.38 (m, 1H), 1.88 (m, 2H), 1.80-1.61 (m, 2H), 1.61-1.48 (m, 2H), 1.27 (s, 9H), 1.06 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.82 (d, J=6.3Hz, 3H)。HRMS (ESI): C₂₆H₃₈N₃O₄的m/z (M+H)⁺计算值:456.2862,实测值:456.2852

[0475] ABCG2抑制测定。

[0476] 使用A549癌细胞系开发了基于原卟啉IX (PPIX) 的ABCG2抑制测定。测量每个K0143类似物的半数最大抑制浓度 (IC₅₀) 值。K0143用作ABCG2抑制试验的阳性对照。

[0477] 细胞毒性测定。

[0478] MTT测定用于确定细胞毒性。计算每个K0143类似物的50%细胞毒性浓度 (CC₅₀) 值。

[0479] 代谢稳定性测定。

[0480] 代谢稳定性由合成的K0143类似物与人肝微粒体 (HLM) 的温育确定。温育 (0-60min) 后,剩余的母体化合物通过UPLC-QTOFMS进行分析。

[0481] 小鼠药代动力学研究。

[0482] 对具有高ABCG2抑制活性、低细胞毒性和高代谢稳定性的K0143类似物进行了药代动力学分析。简而言之,WT小鼠 (6-8周,雄性) 通过管饲法用选定的K0143类似物 (50mg/kg) 进行治疗。在治疗后0、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24小时收集血液。通过UPLC-QTOFMS分析血清中目标化合物的浓度。

[0483] ABCG2抑制剂在体内对抗EPP相关光毒性的功效。

[0484] 这项工作是针对具有高ABCG2抑制活性、低细胞毒性和高代谢稳定性的K0143类似物进行的。Fech-mut小鼠模型用作EPP模型,以确定ABCG2抑制剂对EPP相关光毒性的功效,这是EPP患者中最常见的症状 (6-8)。简而言之,去除背毛的Fech-mut小鼠用选定的K0143类似物预处理30分钟,然后暴露于紫外线 (395-410nm) 下30分钟。治疗5天后,处死所有小鼠以评估皮肤损伤。

[0485] 为了进一步验证ABCG2抑制剂对PPIX介导的光毒性的保护作用,使用K0143类似物进行了戒断试验。简而言之,Fech-mut小鼠用K0143类似物 (100mg/kg, po) 预处理。治疗后30分钟,将小鼠暴露在紫外线下30分钟。每天重复相同的治疗 (药物加光照) 一次,持续4天。从第5天开始停止药物治疗,但继续光照4天。每天记录小鼠皮肤的总体外观。第9天处死所有小鼠并收集背部皮肤用于评价光毒性。

[0486] ABCG2抑制剂对PPIX从RBC的流出的影响。

[0487] 从Fech-mut小鼠中收集RBC,并与每个选定的K0143类似物 (10 μ M) 一起温育。分别

提取RBC和培养基中的PPIX,并通过UPLC-QTOFMS进行分析。

[0488] 参考文献

[0489] A.G.Smith,F.De Matteis,Drugs and the hepatic porphyrias.Clin Haematol 9,399-425(1980) .

[0490] A.Schauder,A.Avital,Z.Malik,Regulation and gene expression of heme synthesis under heavy metal exposure--review.J Environ Pathol Toxicol Oncol 29,137-158(2010) .

[0491] A.V.Anstey,R.J.Hift,Liver disease in erythropoietic protoporphyria: insights and implications for management.Gut 56,1009-1018(2007) .

[0492] American Porphyria Foundation,<https://porphyriafoundation.org/about-porphyria/types/EPP-XLP>. (2018) .

[0493] B.M.McGuire等,Liver transplantation for erythropoietic protoporphyria liver disease.Liver Transpl 11,1590-1596(2005) .

[0494] C.LIM,M.RAZZAQUE,J.Luo,P.FARMER,Isolation and characterization of protoporphyrin glycoconjugates from rat Harderian gland by HPLC, capillary electrophoresis and HPLC/electrospray ionization MS.Biochem.J 347,757-761 (2000) .

[0495] C.Xu,C.Y.-T.Li,A.-N.T.Kong,Induction of phase I,II and III drug metabolism/transport by xenobiotics.Archives of pharmacal research 28,249 (2005) .

[0496] D.M.Becker,J.D.Viljoen,J.Katz,S.Kramer,Reduced ferrochelatase activity:a defect common to porphyria variegata and protoporphyria.Br J Haematol 36,171-179(1977) .

[0497] E.Henin等,Pharmacokinetic interactions in mice between irinotecan and MBL-II-141,an ABCG2 inhibitor.Biopharmaceutics&drug disposition38,351-362 (2017) .

[0498] E.I.Minder,X.Schneider-Yin,J.Steurer,L.M.Bachmann,A systematic review of treatment options for dermal photosensitivity in erythropoietic protoporphyria.Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand,France)55,84-97 (2009) .

[0499] F.Li等,Human PXR modulates hepatotoxicity associated with rifampicin and isoniazid co-therapy.Nat Med 19,418-420(2013) .

[0500] G.S.Marks,D.T.Zelt,S.P.Cole,Alterations in the heme biosynthetic pathway as an index of exposure to toxins.Can J Physiol Pharmacol 60,1017-1026(1982) .

[0501] G.Szakacs,J.K.Paterson,J.A.Ludwig,C.Booth-Genthe,M.M.Gottesman,Targeting multidrug resistance in cancer.Nature reviews.Drug discovery5,219-234(2006) .

[0502] H.Baart de la Faille等,Erythropoietic protoporphyria:clinical aspects

with emphasis on the skin.Curr Probl Dermatol 20,123-134(1991) .

[0503] H.L.Bonkovsky等,Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias.Compr Physiol 3,365-401(2013) .

[0504] H.Puy,L.Gouya,J.-C.Deybach,Porphyrrias.The Lancet 375,924-937(2010) .

[0505] J.D.Allen等,Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C.Mol Cancer Ther1,417-425(2002) .

[0506] J.G.Langendonk等,Afamelanotide for Erythropoietic Protoporphyria.The New England journal of medicine 373,48-59(2015) .

[0507] J.R.Bloomer,The liver in protoporphyria.Hepatology 8,402-407(1988) .

[0508] J.W.Jonker等,The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria.Proc Natl Acad Sci U S A 99,15649-15654(2002) .

[0509] K.Liu等,Metabolism of K0143,an ABCG2 inhibitor.Drug Metabolism and Pharmacokinetics32,193-200(2017) .

[0510] K.Natarajan,Y.Xie,M.R.Baer,D.D.Ross,Role of breast cancer resistance protein(BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance.Biochem.Pharmacol.83,1084-1103 (2012) .

[0511] M.B.Poh-Fitzpatrick,A.A.Lamola,Comparative study of protoporphyrins in erythropoietic protoporphyria and griseofulvin-induced murine protoporphyria.Binding affinities,distribution,and fluorescence spectra in various blood fractions.The Journal of clinical investigation 60,380-389 (1977) .

[0512] M.Balwani等,Clinical,Biochemical,and Genetic Characterization of North American Patients With Erythropoietic Protoporphyria and X-linked Protoporphyria.JAMA dermatology 153,789-796(2017) .

[0513] M.Balwani,R.J.Desnick,The porphyrias:advances in diagnosis and treatment.Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2012,19-27(2012) .

[0514] M.J.Casanova-Gonzalez,M.Trapero-Marugan,E.A.Jones,R.Moreno-Otero, Liver disease and erythropoietic protoporphyria:a concise review.World J Gastroenterol 16,4526-4531(2010) .

[0515] M.Lecha,H.Puy,J.C.Deybach,Erythropoietic protoporphyria.Orphanet J Rare Dis 4,19(2009) .

[0516] M.Wiese,BCRP/ABCG2 inhibitors:a patent review(2009-present).Expert Opin.Ther.Pat.25,1229-1237(2015) .

[0517] N.S.Key,J.M.Rank,D.Freese,J.R.Bloomer,D.E.Hammerschmidt,Hemolytic anemia in protoporphyria:possible precipitating role of liver failure and photic stress.American journal of hematology 39,202-207(1992) .

[0518] R.J.Hift,S.Thunell,A.Brun,Drugs in porphyria:From observation to a

modern algorithm-based system for the prediction of porphyrigenicity. *Pharmacol Ther* 132,158-169(2011).

[0519] S.Boulechfar等, Ferrochelatase structural mutant (Fechm1Pas) in the house mouse. *Genomics* 16,645-648(1993).

[0520] S.D.Whatley等, C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *American journal of human genetics* 83,408-414(2008).

[0521] S.Kramer, J.D.Viljoen, Erythropoietic protoporphyria: evidence that it is due to a variant ferrochelatase. *Int J Biochem* 12,925-930(1980).

[0522] S.Lyoumi等, Protoporphyrin retention in hepatocytes and Kupffer cells prevents sclerosing cholangitis in erythropoietic protoporphyria mouse model. *Gastroenterology* 141,1509-1519,1519e1501-1503(2011).

[0523] S.Sandberg, A.Brun, Light-induced protoporphyrin release from erythrocytes in erythropoietic protoporphyria. *The Journal of clinical investigation* 70,693-698(1982).

[0524] S.Tutois等, Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. A recessive inherited ferrochelatase deficiency with anemia, photosensitivity, and liver disease. *J Clin Invest* 88,1730-1736(1991).

[0525] S.Zhou等, Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood* 105,2571-2576(2005).

[0526] T.R.Tephly, A.H.Gibbs, F.De Matteis, Studies on the mechanism of experimental porphyria produced by 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine. Role of a porphyrin-like inhibitor of protohaem ferrolyase. *Biochem.J* 180,241-244(1979).

[0527] X.Ma等, The pregnane X receptor gene-humanized mouse: a model for investigating drug-drug interactions mediated by cytochromes P450 3A. *Drug Metab Dispos* 35,194-200(2007).

[0528] Y.Fukuda等, The severity of hereditary porphyria is modulated by the porphyrin exporter and Lan antigen ABCB6. *Nature communications* 7,12353(2016).

[0529] Y.Li等, Synthesis of a new inhibitor of breast cancer resistance protein with significantly improved pharmacokinetic profiles. *Bioorg Med Chem Lett* 26,551-555(2016).

[0530] 序列

[0531] SEQ ID NO:1 TNF- α 正向引物

[0532] CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA

[0533] SEQ ID NO:2 TNF- α 反向引物

[0534] TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC

[0535] SEQ ID NO:3 IL-1 β 正向引物

- [0536] TTGAGGGACCCCAAAAGATG
[0537] SEQ ID NO:4IL-1 β 反向引物
[0538] TGGACAGCCCAGGTCAAAG
[0539] SEQ ID NO:5胶原蛋白1a1正向引物
[0540] ACTGCAACATGGAGACAGGTCAGA
[0541] SEQ ID NO:6胶原蛋白1a1反向引物
[0542] ATCGGTCATGCTCTCTCCAAACCA
[0543] SEQ ID NO:7胶原蛋白1a2正向引物
[0544] GAGGACTTGTTGGTGAGCCT
[0545] SEQ ID NO:8胶原蛋白1a2反向引物
[0546] CTCACCCTTGTTACCGGATT
[0547] SEQ ID NO:9Mdr1正向引物
[0548] ATTCTGGGAACCTCTCGCTGC
[0549] SEQ ID NO:10Mdr1反向引物
[0550] CTCCAGACTGCTGTTGCTGA
[0551] SEQ ID NO:11Mdr2正向引物
[0552] CGGCGACTTTGAACTAGGCA
[0553] SEQ ID NO:12Mdr2反向引物
[0554] CAGAGTATCGGAACAGTGTCAAC
[0555] SEQ ID NO:13Bsep正向引物
[0556] GCAGAAGCAAAGGGTAGCCATC
[0557] SEQ ID NO:14Bsep反向引物
[0558] GGTAGCCATGTCCAGAAGCAG
[0559] SEQ ID NO:15Mrp2正向引物
[0560] AGCAGGTGTTTCGTTGTGTGT
[0561] SEQ ID NO:16Mrp2反向引物
[0562] CAGGAGGAATTGTGGCTTGTC
[0563] SEQ ID NO:17Abcg5正向引物
[0564] TGGATCCAACACCTCTATGCTAAA
[0565] SEQ ID NO:18Abcg5反向引物
[0566] GGCAGGTTTTCTCGATGAACTG
[0567] SEQ ID NO:19Abcg8正向引物
[0568] CCGTCGTCAGATTTCCAATGA
[0569] SEQ ID NO:20Abcg8反向引物
[0570] GGCTTCCGACCCATGAATG

[0001]	SEQUENCE LISTING	
[0002]	<110> 匹兹堡大学 联邦高等教育系统	
[0003]	<120> 红细胞生成性原卟啉症 (EPP) 和X连锁原卟啉症 (XLP) 的新疗法	
[0004]	<130> 10504-038W01	
[0005]	<160> 20	
[0006]	<170> PatentIn version 3.5	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 25	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0011]	<220>	
[0012]	<223> 合成构建体 (Synthetic construct)	
[0013]	<400> 1	
[0014]	catcttctca aaattcgagt gacaa	25
[0015]	<210> 2	
[0016]	<211> 23	
[0017]	<212> DNA	
[0018]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0019]	<220>	
[0020]	<223> 合成构建体 (Synthetic construct)	
[0021]	<400> 2	
[0022]	tgggagtaga caaggtacaa ccc	23
[0023]	<210> 3	
[0024]	<211> 20	
[0025]	<212> DNA	
[0026]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0027]	<220>	
[0028]	<223> 合成构建体 (Synthetic construct)	
[0029]	<400> 3	
[0030]	ttgagggacc ccaaaagatg	20
[0031]	<210> 4	
[0032]	<211> 19	
[0033]	<212> DNA	
[0034]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0035]	<220>	
[0036]	<223> 合成构建体 (Synthetic construct)	
[0037]	<400> 4	
[0038]	tggacagccc aggtcaaag	19

[0039]	<210>	5	
[0040]	<211>	24	
[0041]	<212>	DNA	
[0042]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0043]	<220>		
[0044]	<223>	合成构建体(Synthetic construct)	
[0045]	<400>	5	
[0046]		actgcaacat ggagacaggt caga	24
[0047]	<210>	6	
[0048]	<211>	24	
[0049]	<212>	DNA	
[0050]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0051]	<220>		
[0052]	<223>	合成构建体(Synthetic construct)	
[0053]	<400>	6	
[0054]		atcggtcatg ctctctccaa acca	24
[0055]	<210>	7	
[0056]	<211>	20	
[0057]	<212>	DNA	
[0058]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0059]	<220>		
[0060]	<223>	合成构建体(Synthetic construct)	
[0061]	<400>	7	
[0062]		gaggacttgt tggtgagcct	20
[0063]	<210>	8	
[0064]	<211>	20	
[0065]	<212>	DNA	
[0066]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0067]	<220>		
[0068]	<223>	合成构建体(Synthetic construct)	
[0069]	<400>	8	
[0070]		ctcacccttg ttaccggatt	20
[0071]	<210>	9	
[0072]	<211>	20	
[0073]	<212>	DNA	
[0074]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0075]	<220>		
[0076]	<223>	合成构建体(Synthetic construct)	
[0077]	<400>	9	

[0078]	attctgggaa ctctcgctgc	20
[0079]	<210> 10	
[0080]	<211> 20	
[0081]	<212> DNA	
[0082]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0083]	<220>	
[0084]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	
[0085]	<400> 10	
[0086]	ctccagactg ctgttgctga	20
[0087]	<210> 11	
[0088]	<211> 20	
[0089]	<212> DNA	
[0090]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0091]	<220>	
[0092]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	
[0093]	<400> 11	
[0094]	cggcgacttt gaactaggca	20
[0095]	<210> 12	
[0096]	<211> 23	
[0097]	<212> DNA	
[0098]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0099]	<220>	
[0100]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	
[0101]	<400> 12	
[0102]	cagagtatcg gaacagtgtc aac	23
[0103]	<210> 13	
[0104]	<211> 22	
[0105]	<212> DNA	
[0106]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0107]	<220>	
[0108]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	
[0109]	<400> 13	
[0110]	gcagaagcaa agggtagcca tc	22
[0111]	<210> 14	
[0112]	<211> 21	
[0113]	<212> DNA	
[0114]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0115]	<220>	
[0116]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	

[0117]	<400> 14	
[0118]	ggtagccatg tccagaagca g	21
[0119]	<210> 15	
[0120]	<211> 20	
[0121]	<212> DNA	
[0122]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0123]	<220>	
[0124]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	
[0125]	<400> 15	
[0126]	agcaggtggt cgttgtgtgt	20
[0127]	<210> 16	
[0128]	<211> 21	
[0129]	<212> DNA	
[0130]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0131]	<220>	
[0132]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	
[0133]	<400> 16	
[0134]	caggaggaat tgtggcttgt c	21
[0135]	<210> 17	
[0136]	<211> 24	
[0137]	<212> DNA	
[0138]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0139]	<220>	
[0140]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	
[0141]	<400> 17	
[0142]	tggtatccaac acctctatgc taaa	24
[0143]	<210> 18	
[0144]	<211> 22	
[0145]	<212> DNA	
[0146]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0147]	<220>	
[0148]	<223> 合成构建体(Synthetic construct)	
[0149]	<400> 18	
[0150]	ggcaggtttt ctgatgaac tg	22
[0151]	<210> 19	
[0152]	<211> 21	
[0153]	<212> DNA	
[0154]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0155]	<220>	

[0156]	<223>	合成构建体 (Synthetic construct)	
[0157]	<400>	19	
[0158]	ccgtcgtcag atttccaatg a		21
[0159]	<210>	20	
[0160]	<211>	19	
[0161]	<212>	DNA	
[0162]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[0163]	<220>		
[0164]	<223>	合成构建体 (Synthetic construct)	
[0165]	<400>	20	
[0166]	ggcttccgac ccatgaatg		19

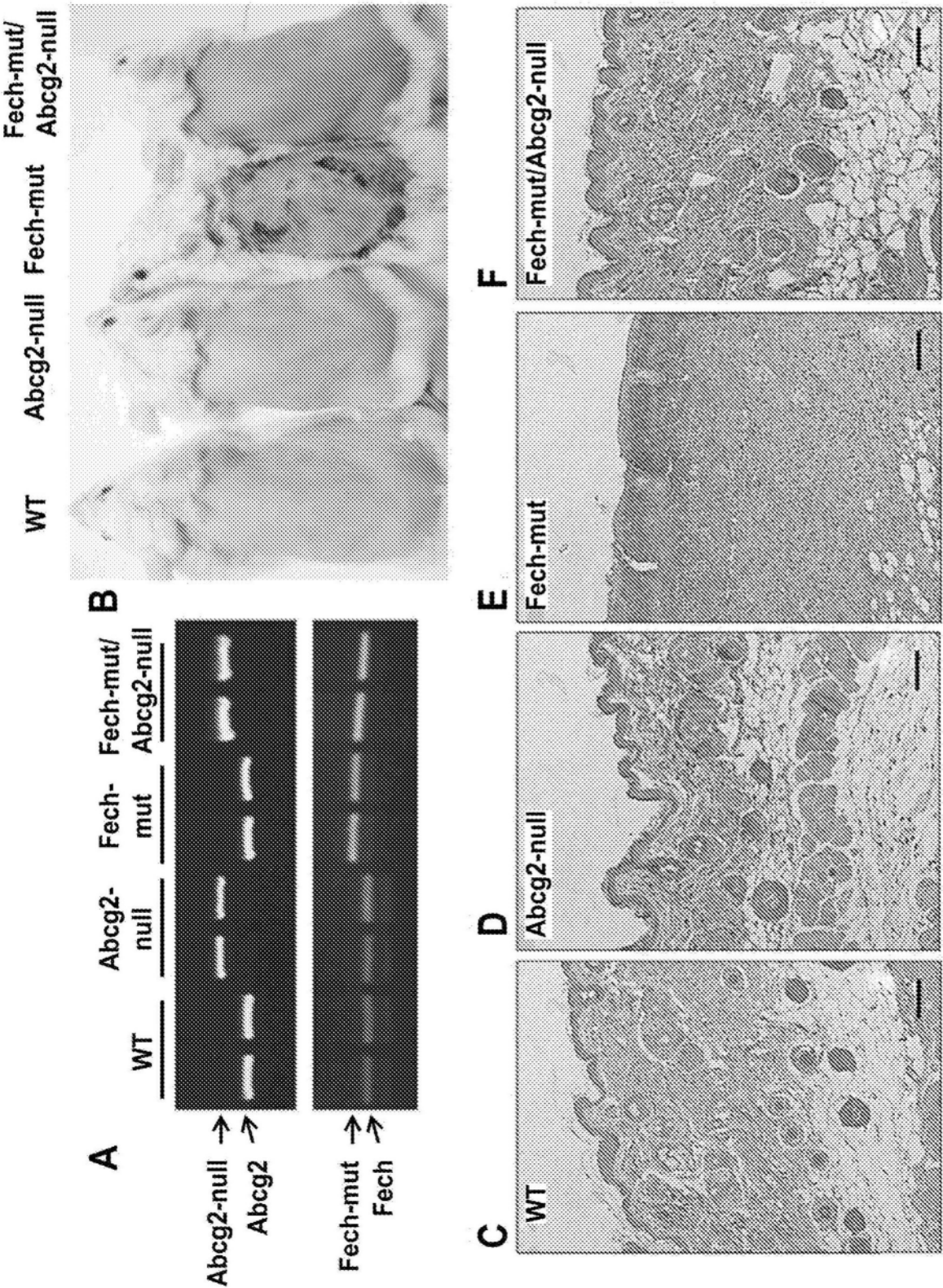


图1A-1F

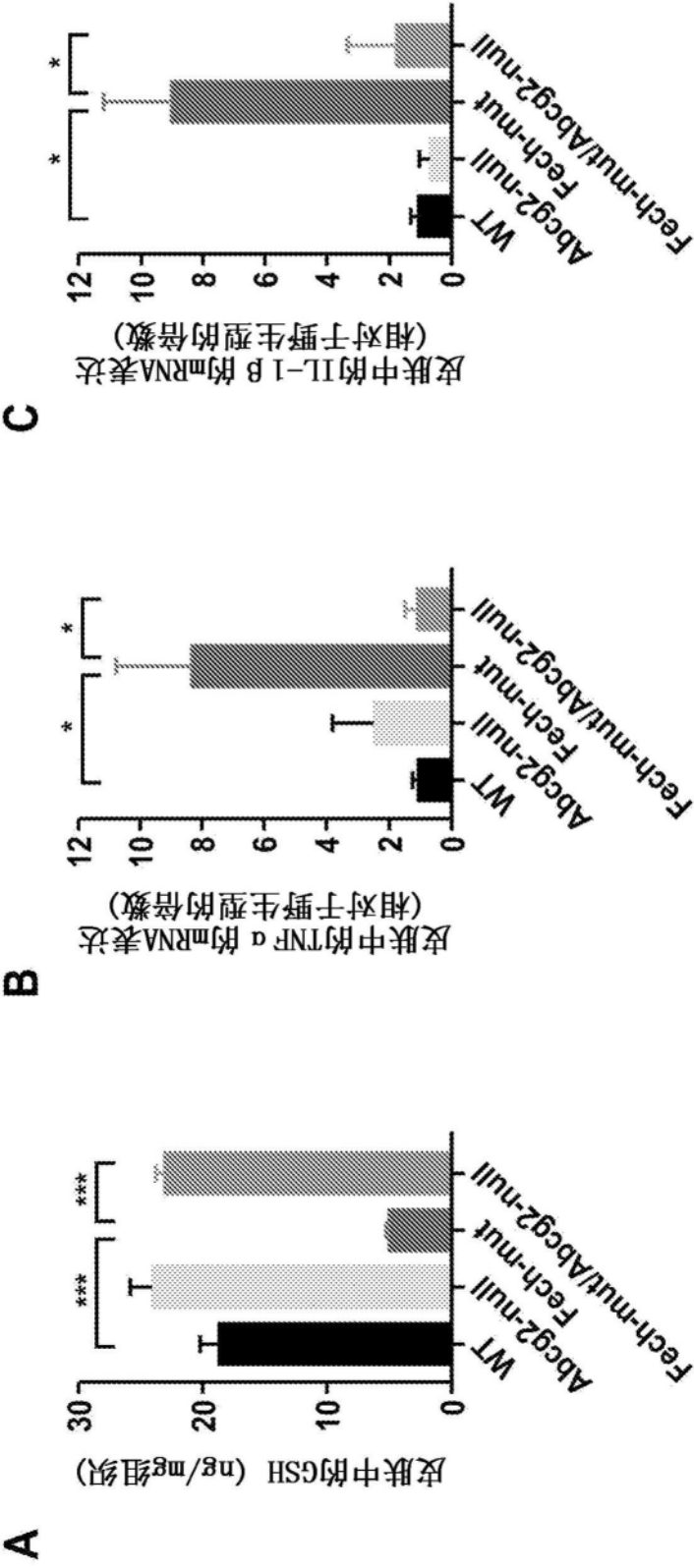


图2A-2C

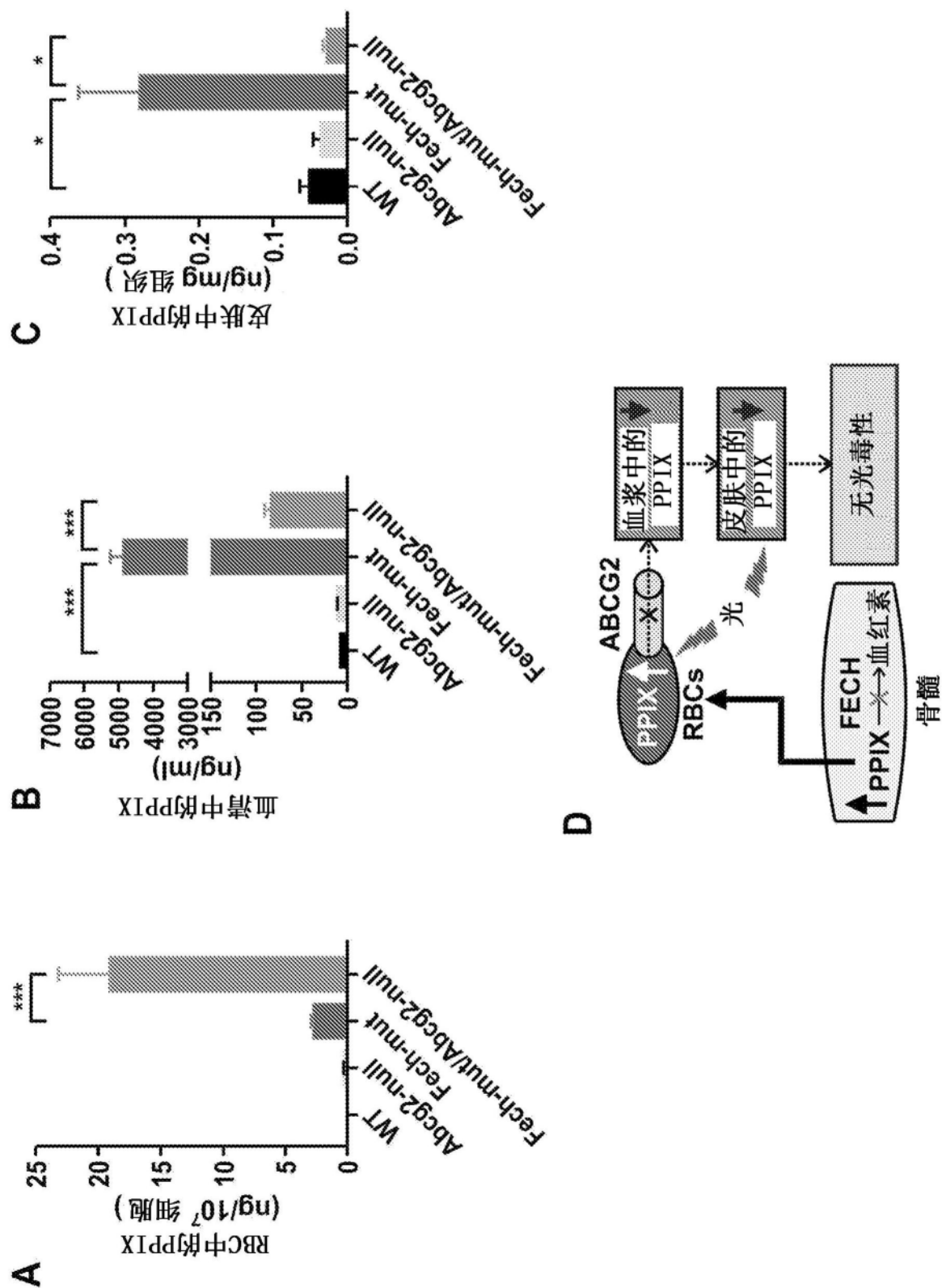


图3A-3D

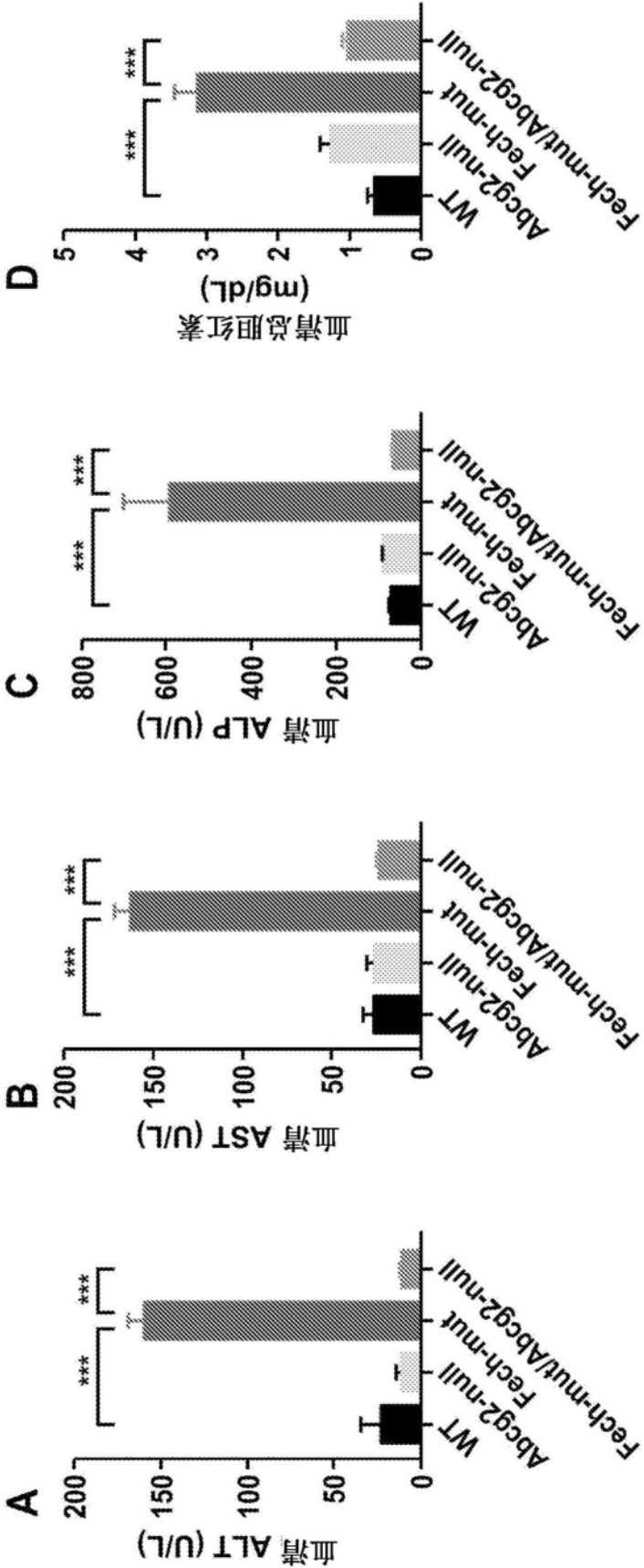


图4A-4D

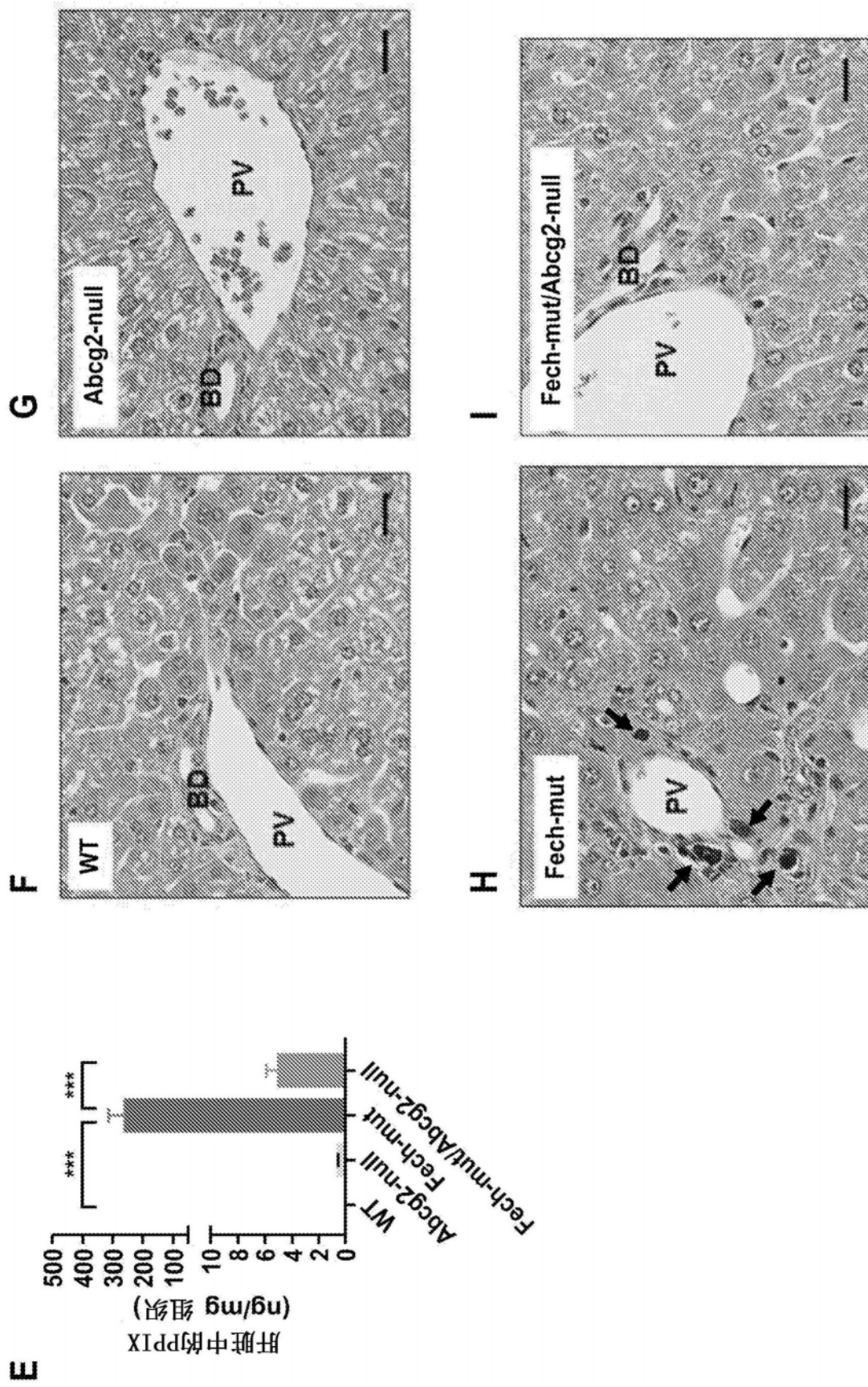


图4E-4I

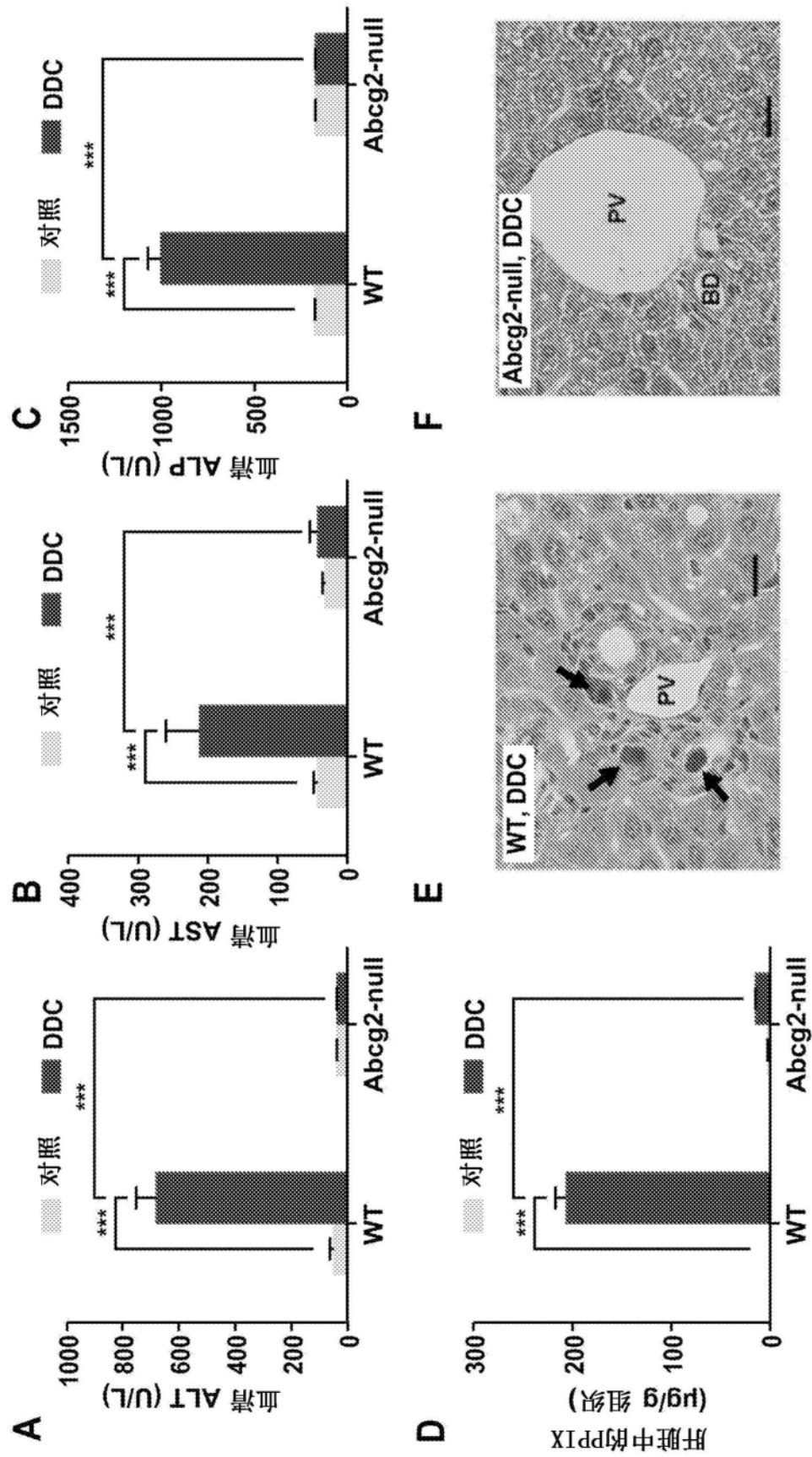


图5A-5F

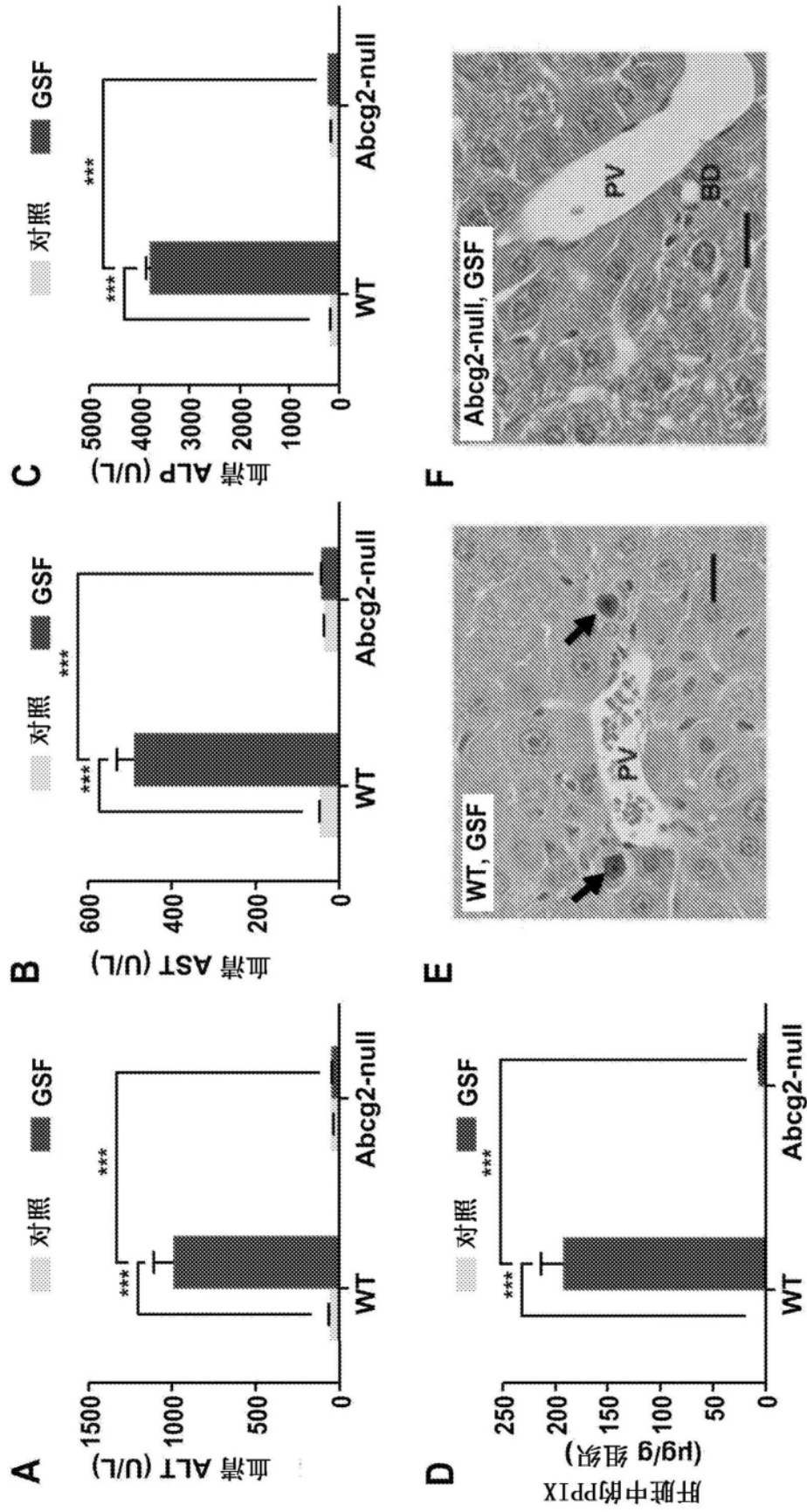


图6A-6F

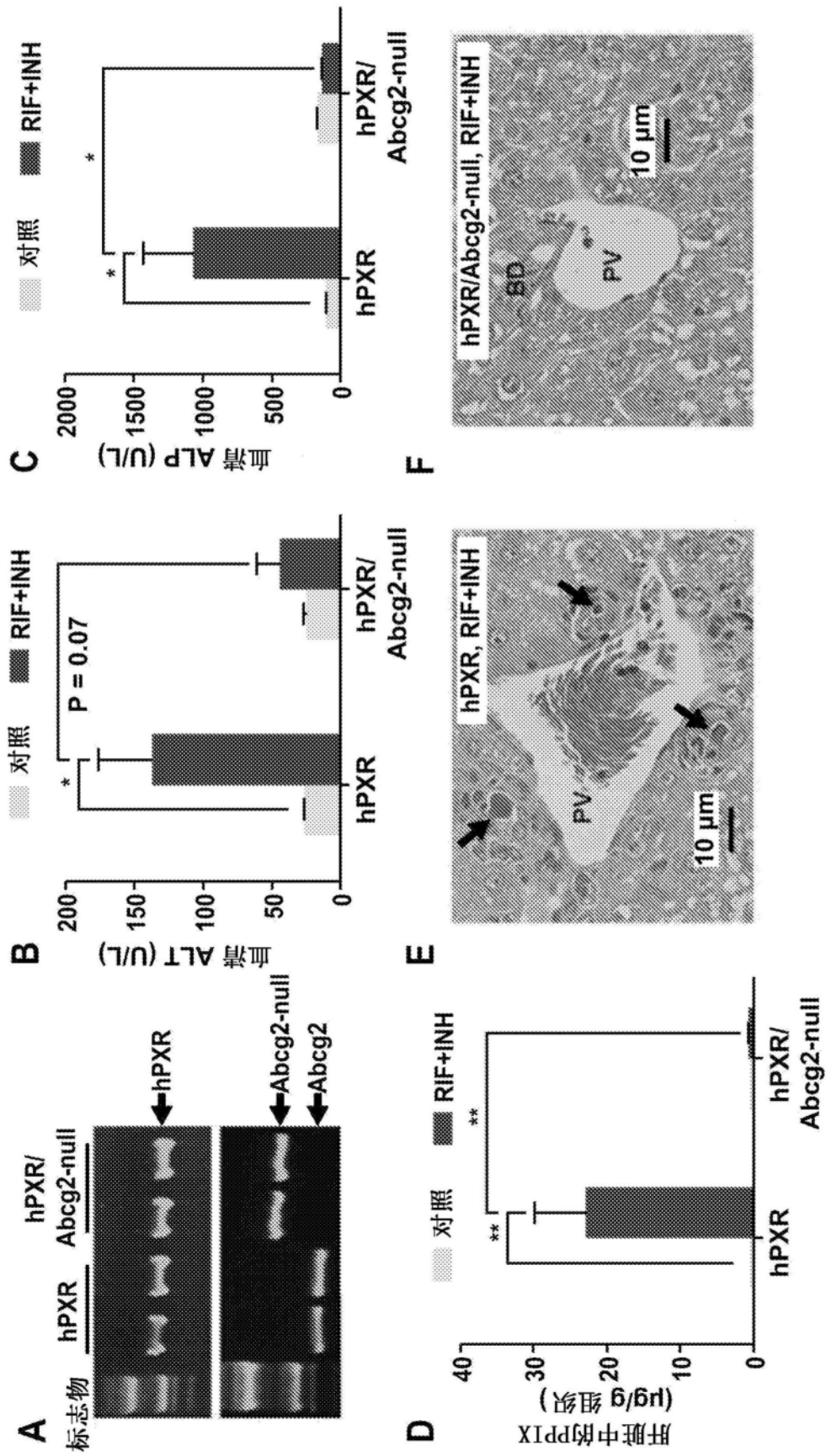


图7A-7F

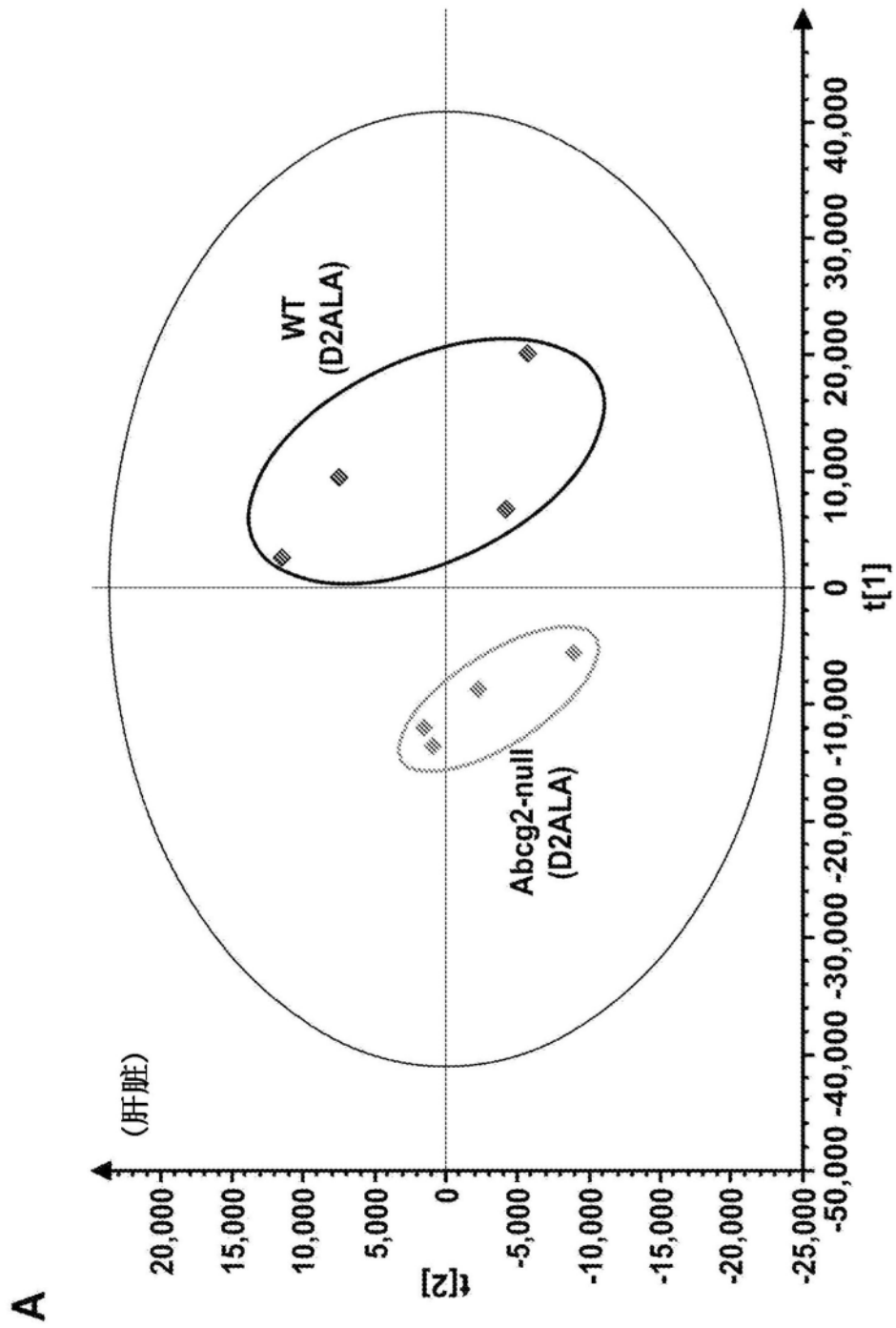


图8A

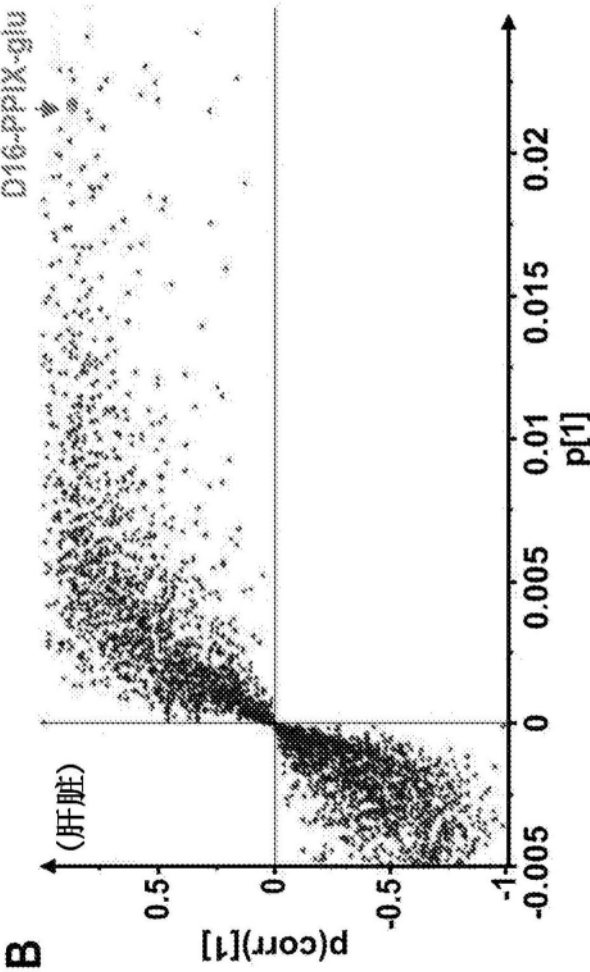


图8B

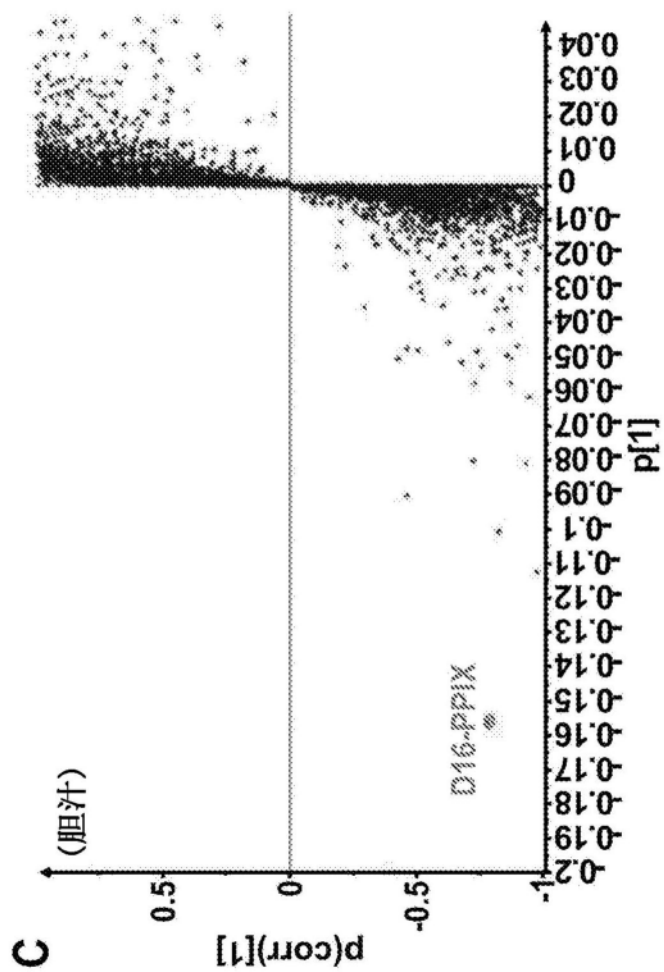


图8C

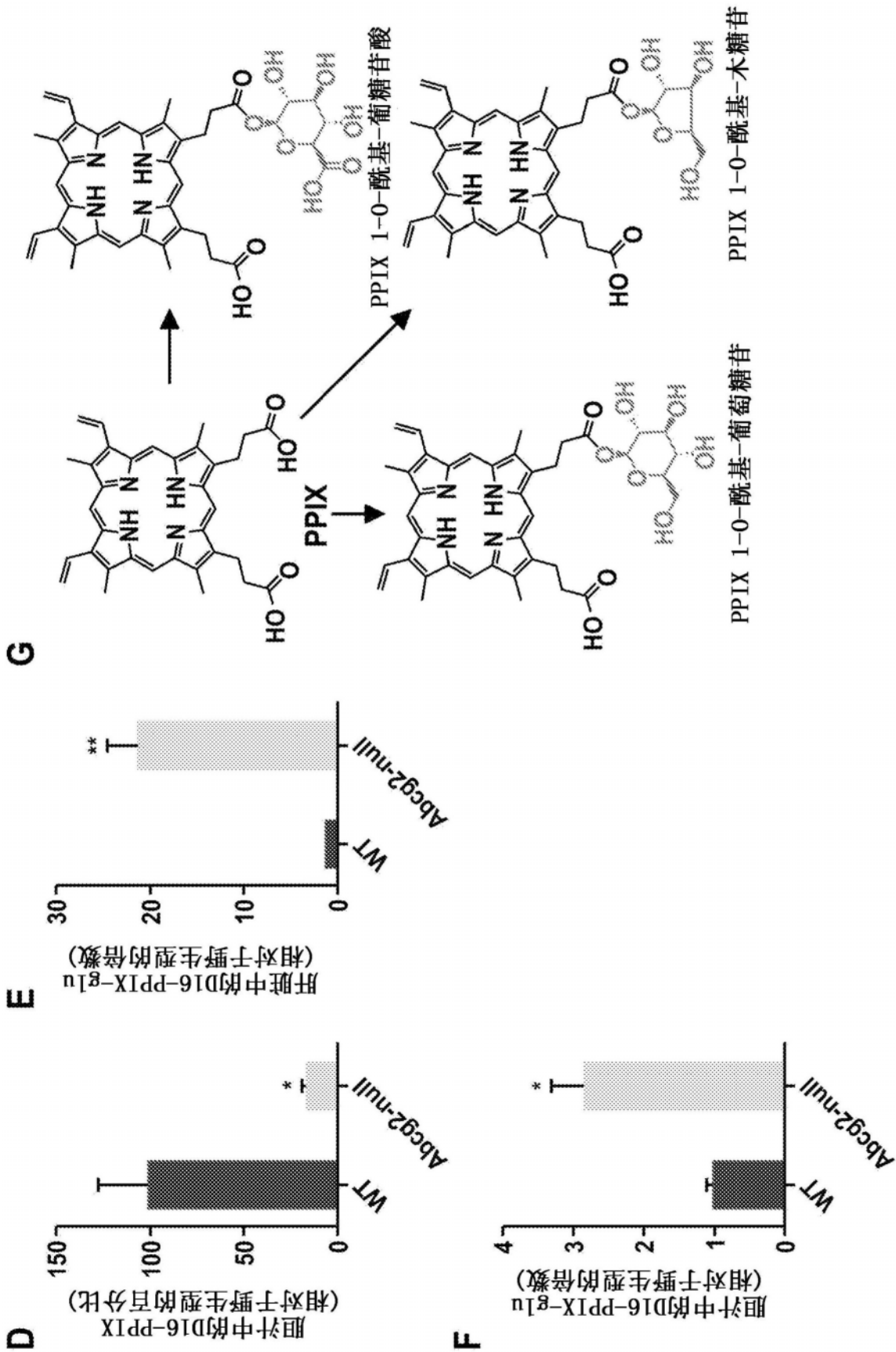


图8D-8G

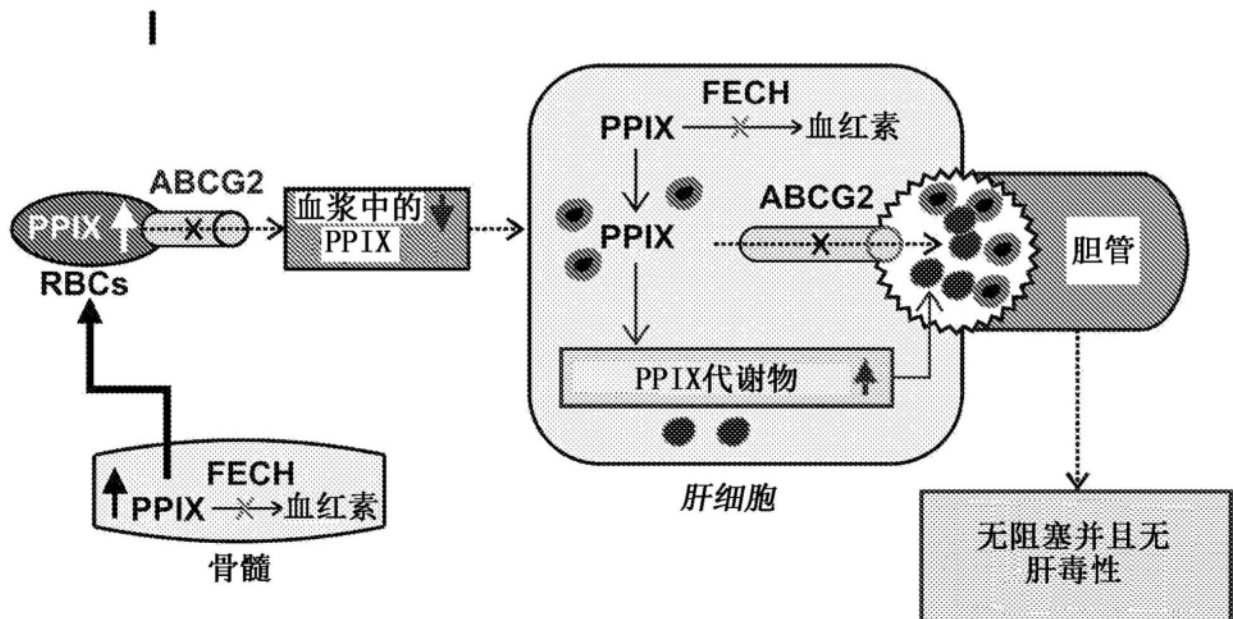
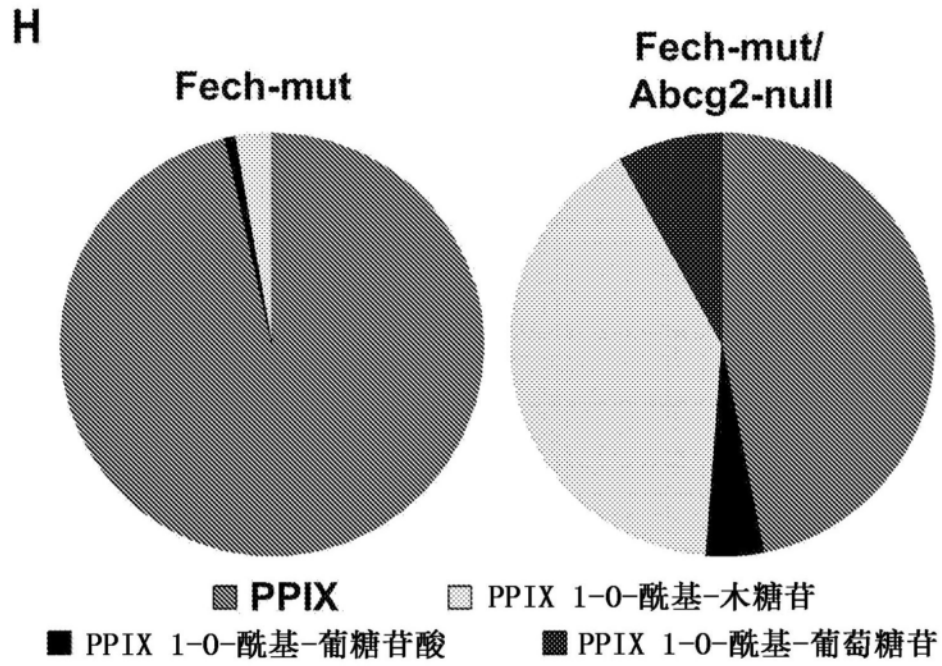


图8H-8I

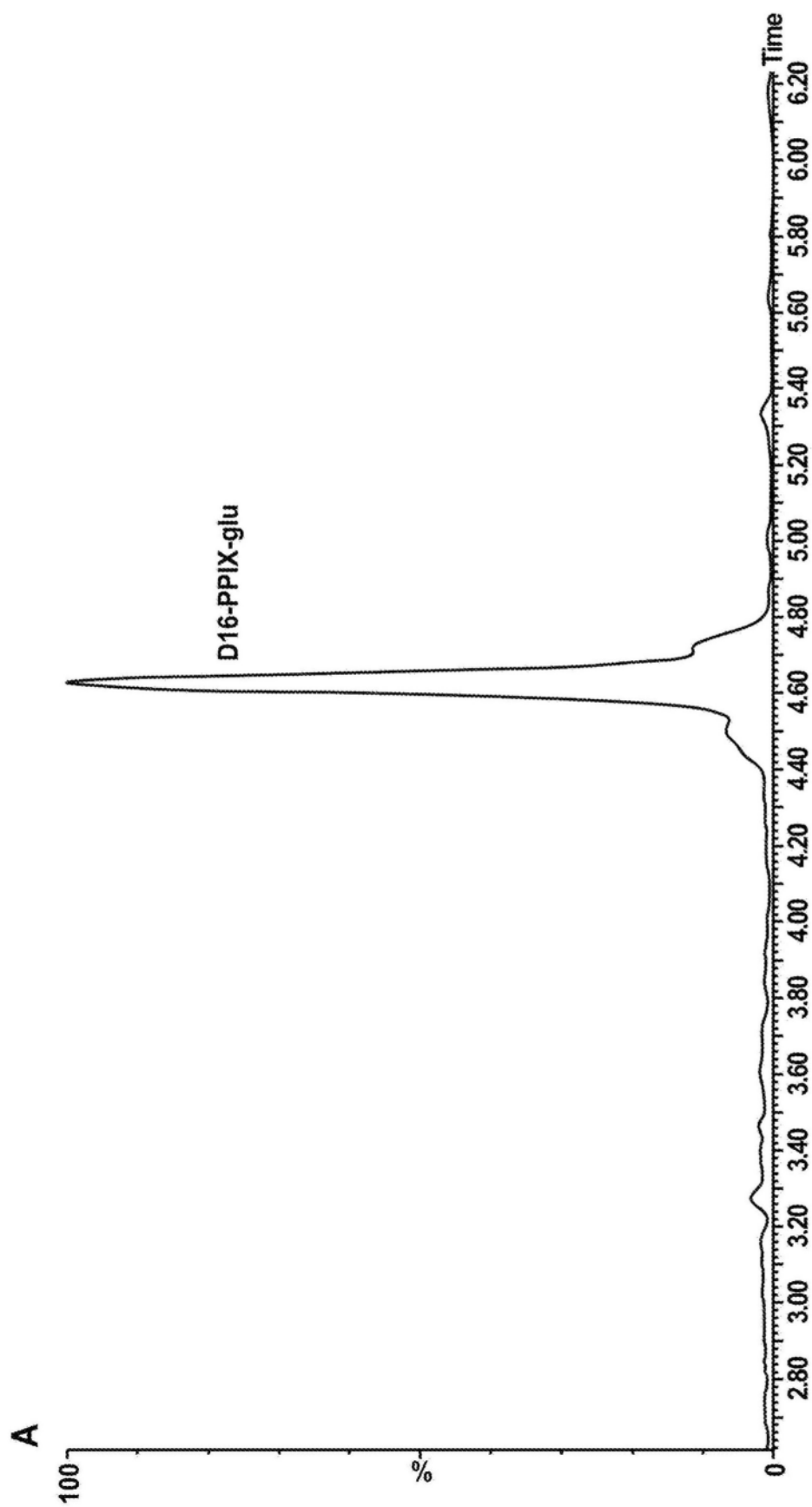


图9A

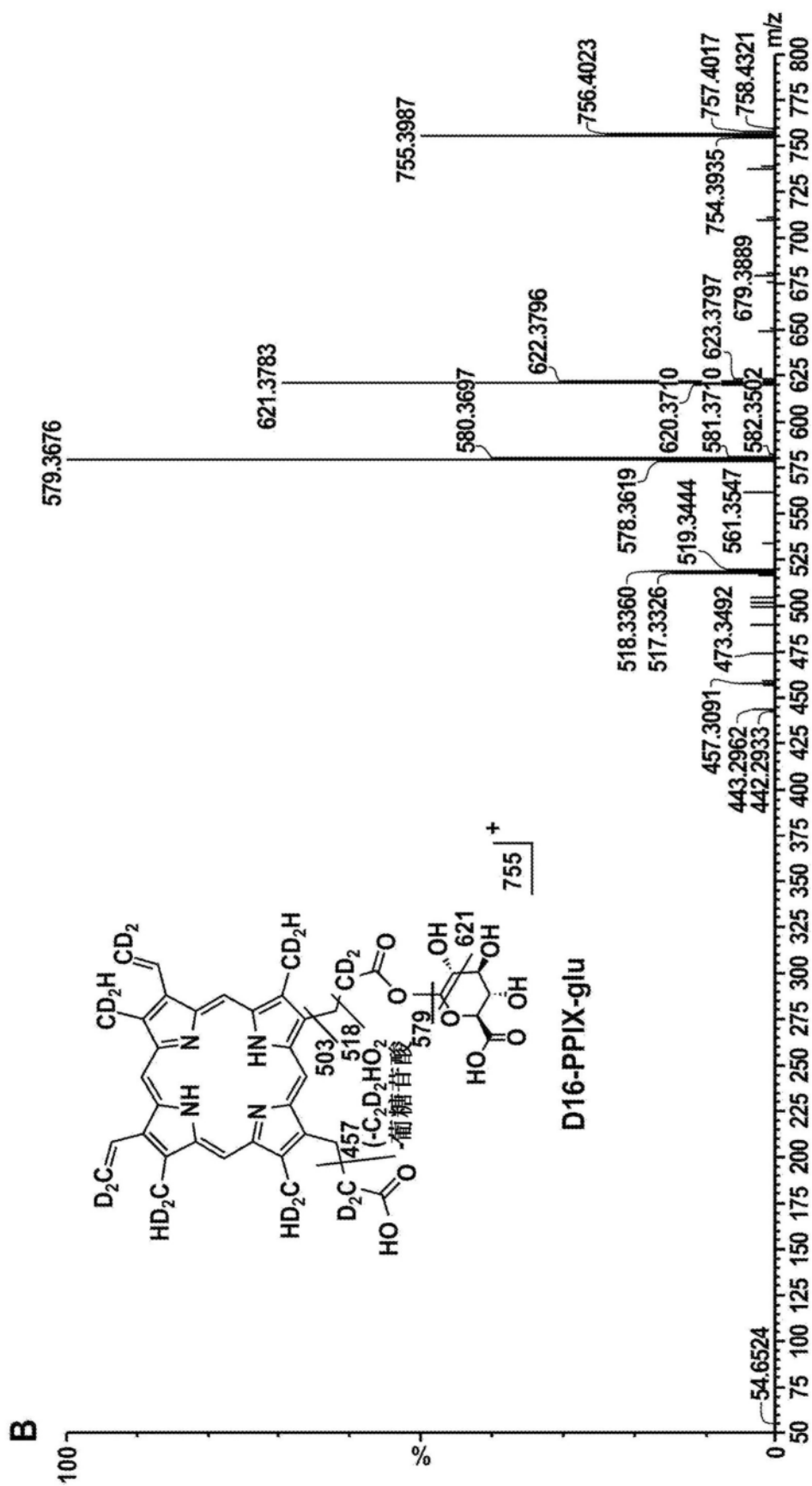


图9B

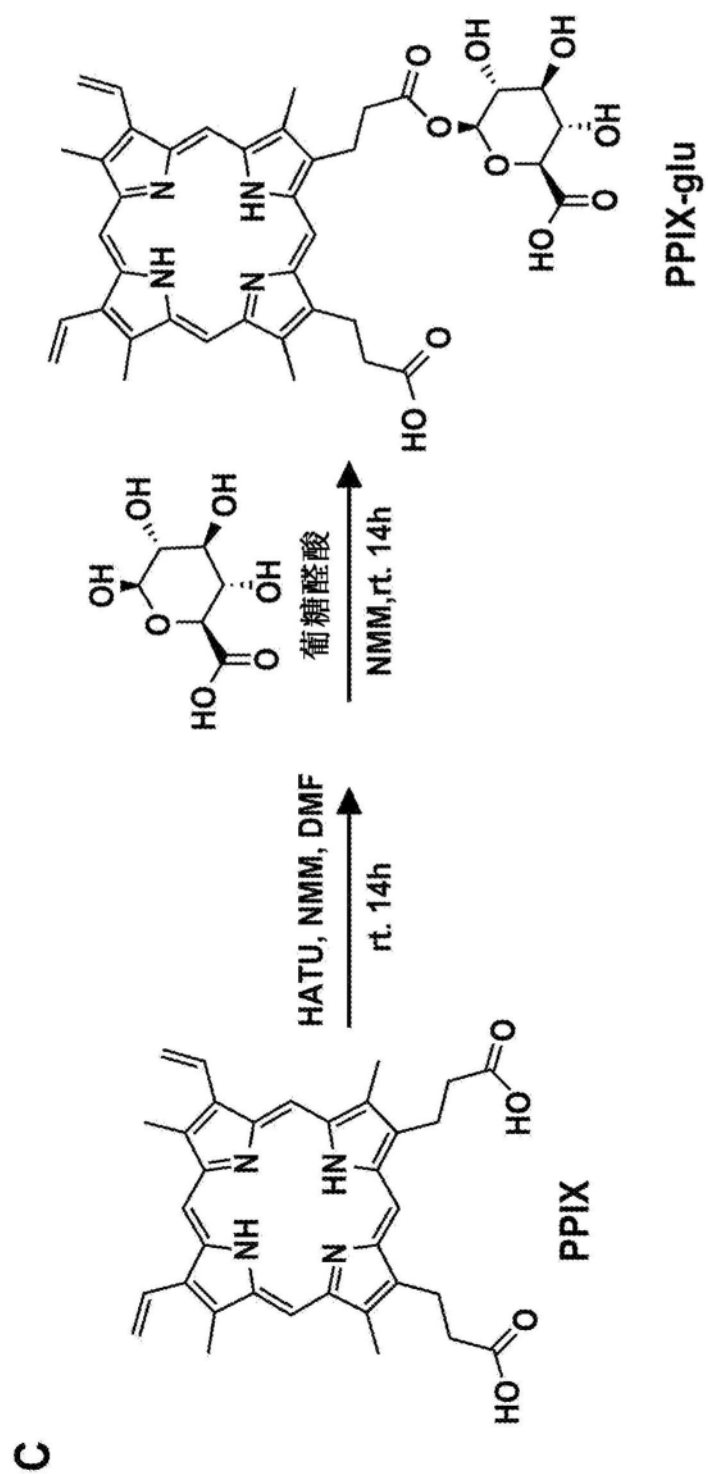


图9C

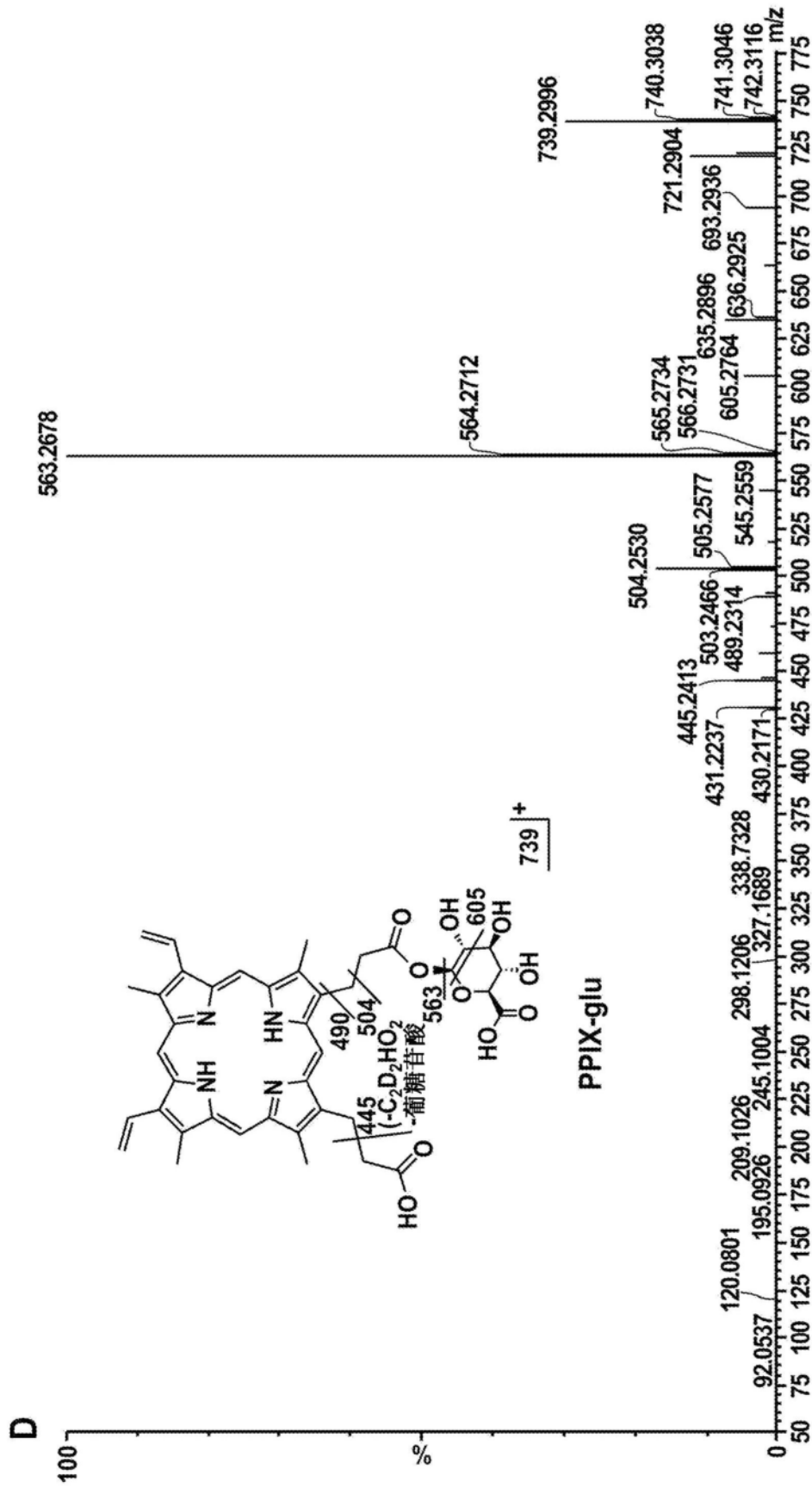


图9D

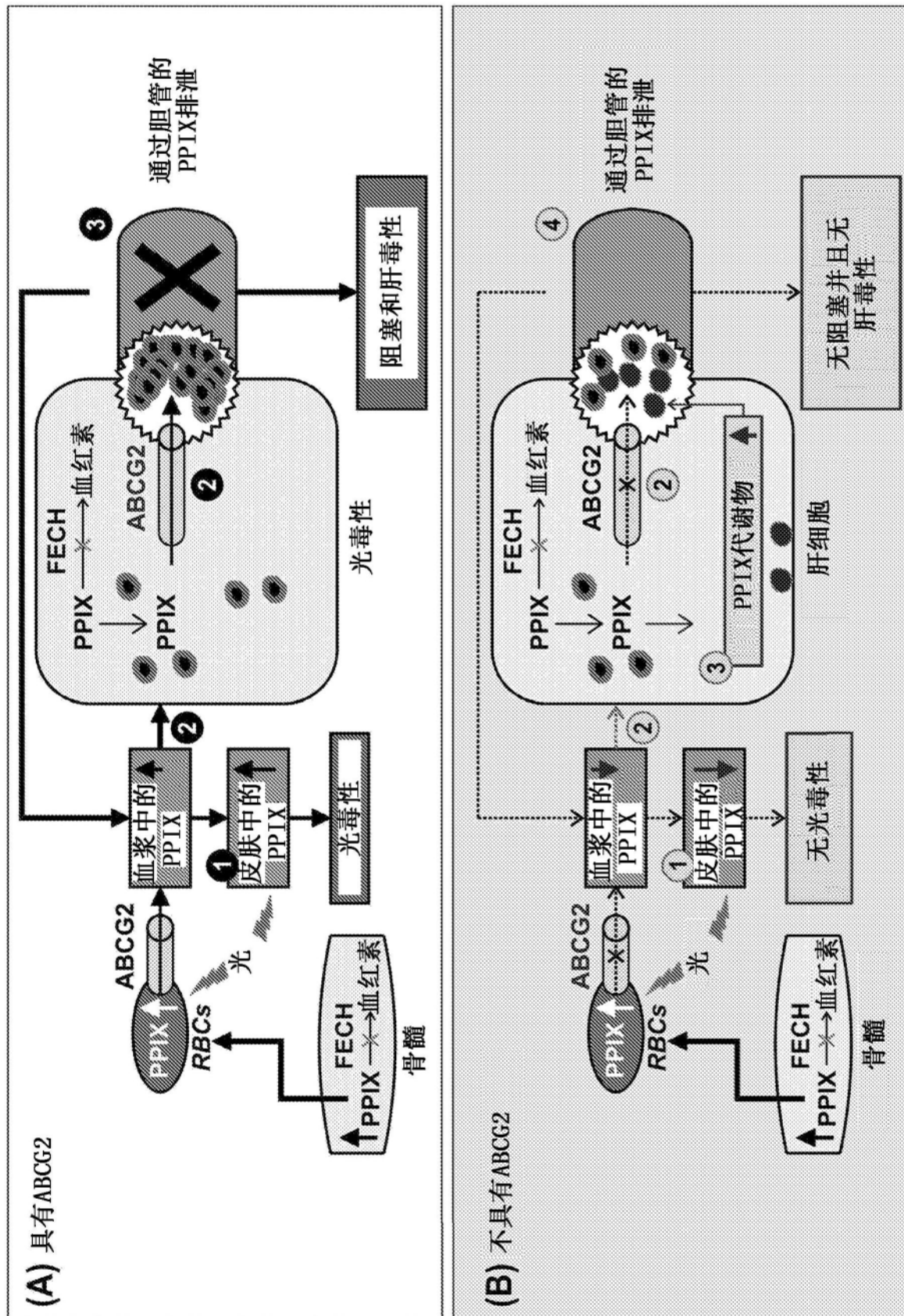


图10A-10B

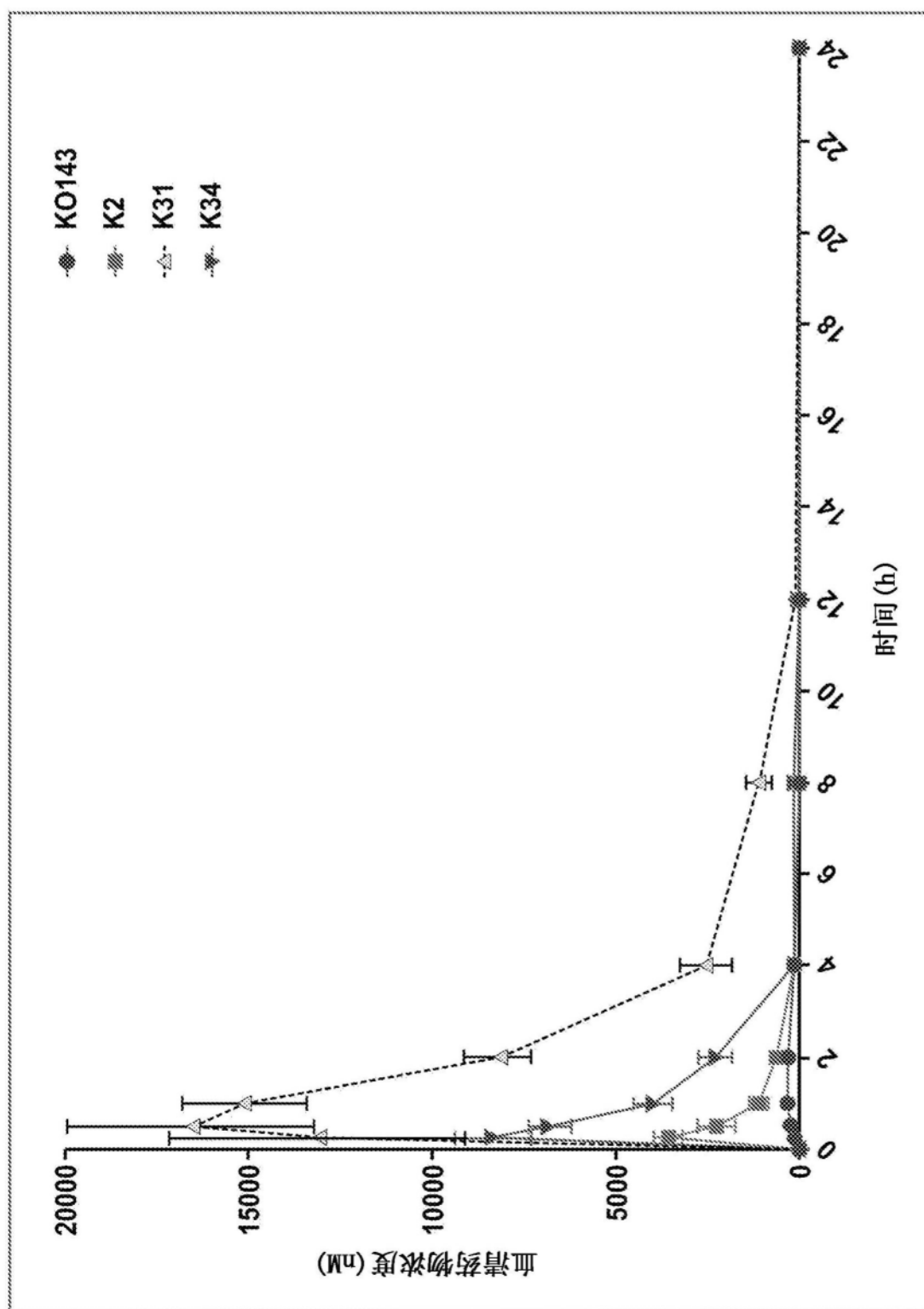
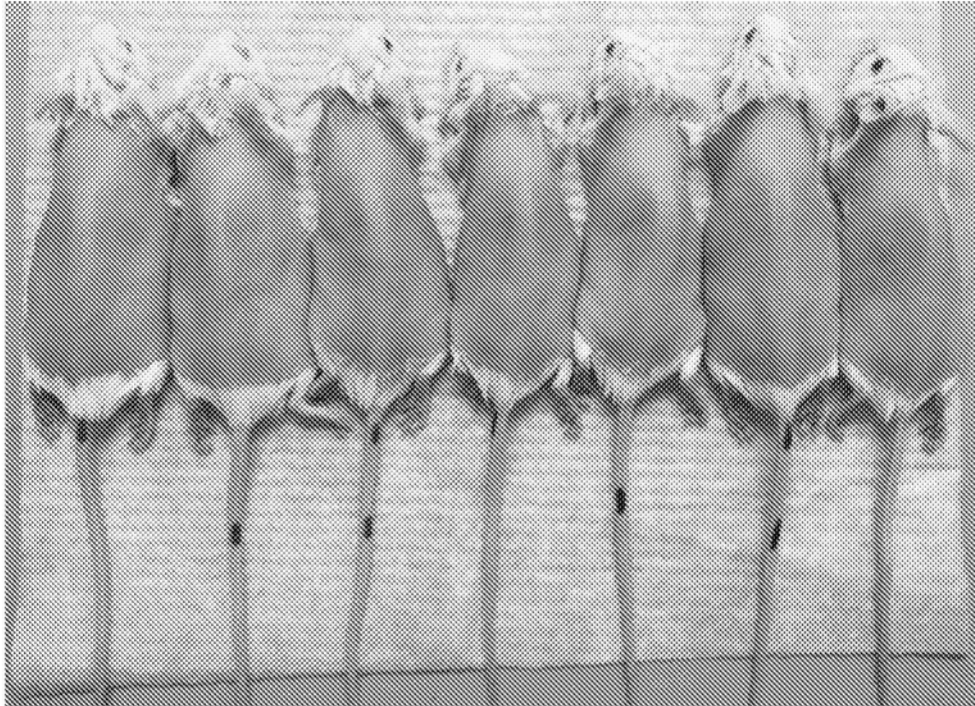


图11

(A) EPP小鼠：暴露于UV光之前



(B) EPP小鼠：暴露于UV光之后

对照

ABCG2抑制剂

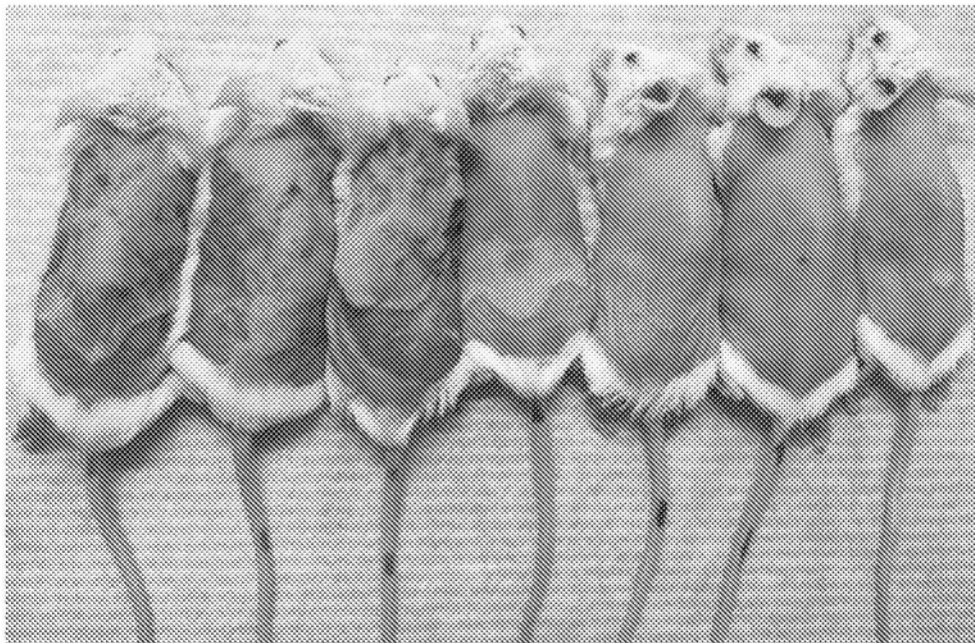


图12A-12B

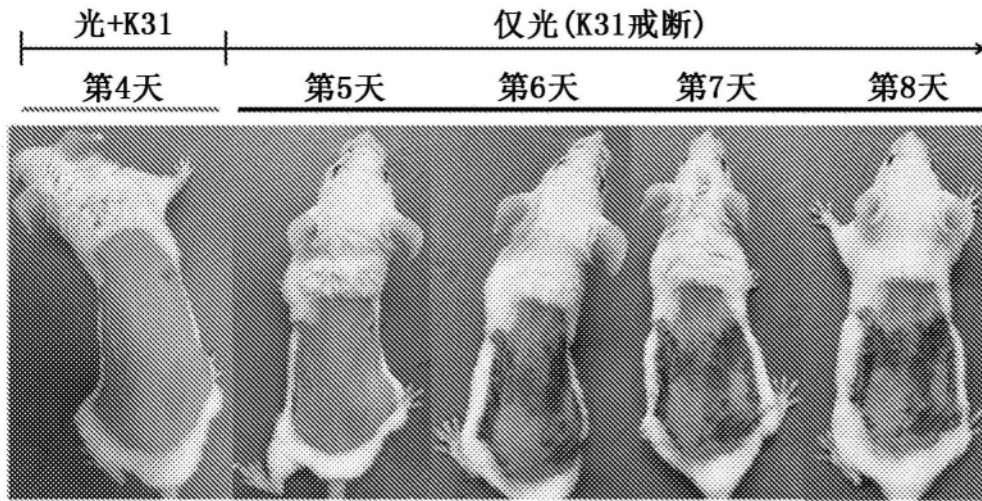


图13

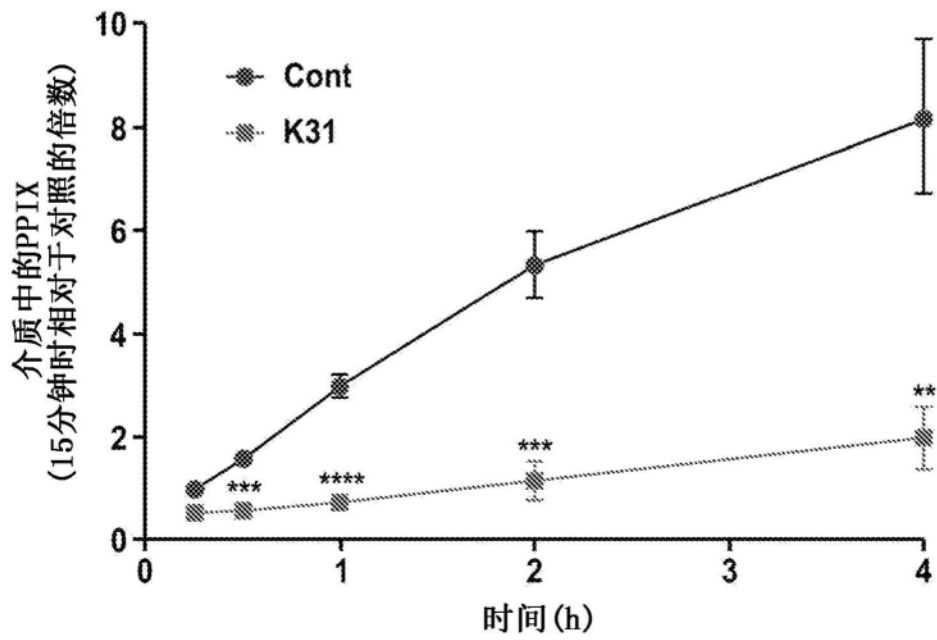


图14